

# 妊娠母羊饲料添加叶酸对不同出生类型新生羔羊脐带血管生成相关基因表达的影响

彭思嘉 李鹤琼 罗海玲\* 王波 李贞 王月君

(中国农业大学动物科技学院,动物营养学国家重点实验室,北京 100193)

**摘要:** 试验旨在研究妊娠母羊饲料添加叶酸对不同出生类型新生羔羊脐带血管生成相关基因表达的影响。选用体重相近、年龄一致的经产湖羊母羊 120 只,人工授精后随机分为 3 组,分别单栏饲喂补充 0、16 和 32 mg/kg DM 叶酸的全混合日粮。母羊分娩时,每组随机采集出生类型为双羔和三羔的胎盘与脐带样品各 3 个,共 18 个样品用于测定胎盘相关指标,胎儿脐带样品利用实时荧光定量 PCR 法检测血管生成相关基因——血管内皮生长因子 A (VEGFA)、转换生长因子- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3)、血管生成素-1 (ANGPT-1)、血管内皮生长因子受体-1 (FLT-1) 和血管内皮生长因子受体-2 (KDR) 基因的相对表达水平。结果表明:妊娠母羊饲料添加叶酸对胎盘重、子叶数、胎盘效率无显著影响 ( $P>0.05$ ),对新生羔羊脐带 TGF- $\beta$ 3、ANGPT-1、FLT-1、KDR 基因的相对表达水平无显著影响 ( $P>0.05$ ),但能显著提高 VEGFA 基因的相对表达水平 ( $P<0.05$ )。而出身类型对胎盘重、子叶数、胎盘效率和新生羔羊脐带 VEGFA、TGF- $\beta$ 3、FLT-1、KDR 基因的相对表达水平无显著影响 ( $P>0.05$ ),但是三羔脐带 ANGPT-1 基因的相对表达水平显著高于双羔 ( $P<0.05$ )。由此可见,妊娠母羊饲料添加叶酸对胎盘发育没有显著影响,但是显著提高了新生羔羊脐带 VEGFA 基因的相对表达水平,有利于新生羔羊脐带血管生成。同时,新生羔羊三羔脐带 ANGPT-1 基因的相对表达水平显著高于双羔,有利于多羔脐带血管生成。

**关键词:** 母羊;叶酸;脐带;血管生成;基因表达

中图分类号:S826

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)02-0944-10

胎儿生长发育的营养完全来自于母体,妊娠期母体营养不足会严重影响胎儿生长,多胎品种因胎儿数量的增加更易出现这一情况。湖羊作为我国特有的绵羊品种,具有早熟、多胎、早期生长快等特点。有研究表明,在湖羊妊娠后期持续供应全价营养有利于胎儿的指数级生长<sup>[1]</sup>;绵羊在妊娠后期限饲,营养水平越低,胎儿受限越严重<sup>[2]</sup>。因此,保证妊娠期母体营养充足可以减少母体和胎儿出现不利情况,合理利用母畜生产优质后代,提高生产效率。

叶酸参与核酸和蛋白质的合成,在细胞分裂

过程中起重要作用,也是胎盘发育、血管生成的必需条件<sup>[3]</sup>。叶酸可以通过减少胚胎死亡而提高动物的繁殖能力,对猪和绵羊等多胎动物的胚胎存活和胎儿发育至关重要<sup>[4-6]</sup>,不足时可能引发心血管疾病<sup>[4,7]</sup>。绵羊血清叶酸含量在妊娠期间呈先下降后上升的趋势,并且这一现象在高产品种中更为明显<sup>[6]</sup>。随着饲养集约化程度的提高,饲料的变化会影响动物的生长,因此推测高产母羊在妊娠期间对叶酸的需求量可能会增加,无法完全通过饲料和瘤胃微生物合成来满足。

胎盘作为妊娠期母体和胎儿之间运输营养物

收稿日期:2020-07-06

基金项目:国家重点研发项目(2018YFD0500402);国家肉羊产业技术体系(CARS-38)

作者简介:彭思嘉(1997—),女,四川绵阳人,硕士研究生,研究方向为动物营养与肉品调控。E-mail:scarlett\_sjj@163.com

\*通信作者:罗海玲,教授,博士生导师,E-mail:luohailing@cau.edu.cn

质、气体和代谢产物的器官,其血管发育与胎盘本身的生长以及胎盘功能正常发挥都密切相关,这对胎儿正常生长和初生重至关重要<sup>[3,8-11]</sup>。胎盘血管功能不全是胎儿生长受限最常见的病因之一<sup>[12]</sup>,甚至引发胎儿或母体出现如宫内生长受限、妊娠高血压、子痫前期、流产、早产或死胎等现象<sup>[8]</sup>。

本团队前期研究发现,妊娠母羊饲料添加过瘤胃叶酸可以显著增加新生羔羊的初生重,提高促进肌肉发育相关基因的表达,降低抑制肌肉发育相关基因的表达,并提高免疫力<sup>[13-14]</sup>;还能优化新生羔羊小肠发育相关基因的表达,使新生羔羊小肠发育获得先天优势<sup>[15]</sup>,并且三羔较双羔对母体叶酸添加更敏感。因为胎儿获得的营养全部由胎盘通过血管运输,推测叶酸可能通过影响胎盘发育和脐带血管生成相关基因[血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, *VEGFA*)<sup>[12,16-17]</sup>、转化生长因子- $\beta$ 3 (transforming growth factor-beta 3, *TGF- $\beta$ 3*)<sup>[18-22]</sup>、血管生成素-1 (angiopoietin-1, *ANGPT-1*)<sup>[8,23-24]</sup>]以及脐带血管内皮生长因子受体基因[血管内皮生长因子受体-1 (fms related tyrosine kinase-1, *FLT-1*)、血管内

皮生长因子受体-2 (kinase-inserted domain containing receptor, *KDR*)<sup>[25-27]</sup>]等参与调控血管生成的关键基因的表达,从而导致营养物质的运输和供给差异,最终影响不同出生类型新生羔羊的初生重。因此,本试验旨在研究妊娠母羊饲料添加叶酸对不同出生类型新生羔羊脐带血管生成相关基因 *VEGFA*、*TGF- $\beta$ 3*、*ANGPT-1*、*FLT-1* 和 *KDR* 表达的影响,为妊娠母羊饲料添加叶酸影响不同出生类型新生羔羊脐带血管生成提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计及饲料

试验于 2017 年 5—12 月在江苏省乾宝牧业有限公司进行,提前对羊舍消毒。选用体重相近、年龄一致的经产湖羊母羊 120 只,人工授精后随机分为 3 组,分别饲喂添加 0 (C)、16 (F16) 和 32 mg/kg DM (F32) 叶酸的全混合日粮 (TMR)。母羊分娩时记录窝产仔数,从试验中淘汰单胎和四胎出生的羔羊,选择体重相近的新生羔羊根据出生类型和妊娠母羊叶酸添加水平分为 6 个组。试验设计见表 1。

表 1 试验设计

Table 1 Experimental design

组别 Groups	出生类型 Litter size	叶酸添加水平 Folic acid supplemental level/(mg/kg DM)
TW-C		0
TW-F16	双羔 Twin lambs	16
TW-F32		32
TR-C		0
TR-F16	三羔 Triplet lambs	16
TR-F32		32

试验使用的叶酸为包被叶酸,经前期绵羊瘤胃瘘管半体内试验测得瘤胃通过率约为 92.60%,小肠释放率约为 85.59%。试验羊单栏饲养,每天 07:00 和 17:00 饲喂饲料,自由饮水。试验饲料参照 NRC (2007) 配制,母羊妊娠前期和后期的 TMR 组成及营养水平如表 2、表 3 所示。

### 1.2 样品采集

母羊分娩后,收集胎盘,测量并记录胎盘重量、子叶数;用生理盐水去除胎盘血渍,剥离胎盘子叶,经生理盐水清洗后,保存胎盘样品于液氮

中,收集新生羔羊胎儿端脐带样品保存于液氮中,从 6 个组中每组随机选取 3 个样品,共 18 个脐带样品进行后续测定。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成

选用北京艾德莱生物科技有限公司的 EASYspin 纤维类组织 RNA 快速提取试剂盒 (RN44) 提取脐带总 RNA,使用微量核酸蛋白检测仪 NanoDrop2000 分光光度计 (Thermo Fisher, 美国) 测定 RNA 的浓度和纯度并用琼脂糖凝胶电泳

检验其质量。对提取的总 RNA 选用诺唯赞生物的 HiScript III 1st Strand Cdna Synthesis Kit 试剂盒 (R312-01), 建立 20  $\mu\text{L}$ 、500 ng 体系反转录合成第 1 链 cDNA, 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

表 2 母羊妊娠前期 TMR 组成及营养水平 (干物质基础)

Table 2 Composition and nutrient levels of the TMR of ewes during early gestation (DM basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
花生秧 Peanut vines	50.00
全株青贮玉米 Whole corn silage	45.00
精料 Concentrate	5.00
合计 Total	100.00
精料组成 Concentrate composition	
玉米 Corn	53.00
豆粕 Soybean meal	9.70
菜粕 Rapeseed meal	12.00
麸皮 Wheat bran	15.70
石粉 Limestone	1.00
磷酸氢钙 $\text{CaHPO}_4$	0.60
小苏打 $\text{NaHCO}_3$	1.30
食盐 NaCl	0.80
维生素 E Vitamin E	0.40
植物油 Soybean oil	0.30
预混料 Premix <sup>1)</sup>	5.00
脱霉剂 De-mold agent	0.20
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels <sup>2)</sup>	
干物质 DM	92.35
粗蛋白质 CP	9.60
粗脂肪 CF	3.51
粗灰分 Ash	11.19
中性洗涤纤维 NDF	49.19
酸性洗涤纤维 ADF	29.98
代谢能 ME/(MJ/kg)	8.08
钙 Ca	0.54
磷 P	0.37
叶酸 Folate/(mg/kg)	0.26

1) 预混料为每千克精料提供 The premix provided the following per kg of the concentrate: VA 30 000 IU, VD 10 000 IU, VE 100 mg, Fe (as ferrous sulfate) 90 mg, Cu (as copper sulfate) 12.5 mg, Mn (as manganese sulfate) 50 mg, Zn (as zinc sulfate) 80 mg, Se (as sodium selenite) 0.3 mg, I (as potassium iodide) 0.8 mg, Co (as cobalt chloride) 0.5 mg。表 2 同 The same as Table 2。

2) 代谢能为计算值,其余为实测值。表 2 同。ME was a calculated value, while the others were measured values. The same as Table 2.

表 3 母羊妊娠后期 TMR 组成及营养水平 (干物质基础)

Table 3 Composition and nutrient levels of the TMR of ewes during late gestation (DM basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
花生秧 Peanut vines	27.00
全株青贮玉米 Whole corn silage	28.00
精料 Concentrate	45.00
合计 Total	100.00
精料组成 Concentrate composition	
玉米 Corn	50.00
豆粕 Soybean meal	22.50
菜粕 Rapeseed meal	7.00
麸皮 Wheat bran	11.50
石粉 Limestone	1.00
磷酸氢钙 $\text{CaHPO}_4$	0.60
小苏打 $\text{NaHCO}_3$	1.30
食盐 NaCl	0.40
维生素 E Vitamin E	0.10
植物油 Soybean oil	0.40
预混料 Premix <sup>1)</sup>	5.00
脱霉剂 De-mold agent	0.20
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels <sup>2)</sup>	
干物质 DM	90.96
粗蛋白质 CP	10.00
粗脂肪 EE	4.52
粗灰分 Ash	8.85
中性洗涤纤维 NDF	34.15
酸性洗涤纤维 ADF	24.86
代谢能 ME/(MJ/kg)	9.00
钙 Ca	0.56
磷 P	0.26
叶酸 Folate/(mg/kg)	0.29

### 1.3.2 血管生成相关基因的引物设计及实时荧光定量 PCR 检测

参考文献[18,28-29]及 NCBI 设计目标基因引物序列,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,委托北京擎科生物科技有限公司进行引物合成,目标基因引物序列信息如表 4 所示。

使用 LineGene 964 BIOER 荧光定量 PCR 检测系统(杭州博日科技有限公司)进行实时荧光定量 PCR,选用天根生化科技(北京)有限公司的 SuperReal 荧光定量预混试剂(SYBR Green,FP205),建立 20  $\mu\text{L}$  反应体系,包括:10  $\mu\text{L}$  2 $\times$ SuperReal PreMix Plus,正向、反向引物各 0.6  $\mu\text{L}$ ,1  $\mu\text{L}$  cDNA 模板,RNase free ddH<sub>2</sub>O 补齐至 20  $\mu\text{L}$ 。采用两步法进行扩增,PCR 反应程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 15 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,共 40 个循环,收集荧光信号。

表 4 引物序列信息  
Table 4 Primer sequences

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'—3')
血管内皮生长因子 A <i>VEGFA</i>	F: ATGACGAAAGTCTGGAGTGTGTG R: TCTCTCCTATGTGCTGGCTTTG
转换生长因子-β3 <i>TGF-β3</i>	F: CCACCTTGGACTTCAACC R: CGGGTGCTGTTGTAAAGA
血管生成素-1 <i>ANGPT-1</i>	F: AGGAGGCTGGTGCCTATCTC R: TCTGGAGCATGTGATGGAAA
血管内皮生长因子受体-1 <i>FLT-1</i>	F: TCTTACGGAGTGTGCTGTGTG R: GCGTTGAGCGGAATGTAGT
血管内皮生长因子受体-2 <i>KDR</i>	F: CGTGTGGTCTTTTGGTGTCC R: CAGAGAGAGTCCCGAATCCT
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 <i>GAPDH</i>	F: GGCGTGAACCACGAGAAGTA R: GGCGTGGACAGTGGTCATAA

试验中每个模板每个基因做 3 个技术重复,结果取平均值,采用相对定量法分析数据,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[30-31]</sup> 计算目的基因在样本中的相对表达水平,其中:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}};$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}) - (Ct_{\text{目的基因平均值}} - Ct_{\text{内参基因平均值}})。$$

#### 1.4 统计分析

应用 Excel 2016 整理相关数据,导入 SPSS 21.0 软件,用 GLM 进行主效应(出生类型和叶酸添加水平)分析,并用 Duncan 氏法进行多重比较检验,结果以平均值表示。使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件作图。 $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 妊娠母羊饲料添加叶酸对不同出生类型新生羔羊胎盘发育的影响

如表 5 所示,妊娠母羊饲料添加叶酸对胎盘重、子叶数、胎盘效率均无显著影响( $P > 0.05$ )。

### 2.2 妊娠母羊饲料添加叶酸对不同出生类型新生羔羊脐带血管生成相关基因表达的影响

如表 6 所示,妊娠母羊饲料添加叶酸对不同出生类型新生羔羊脐带 *VEGFA* 基因的相对表达水平有显著影响( $P < 0.05$ ),但对 *TGF-β3*、*ANGPT-1* 基因的相对表达水平无显著影响( $P > 0.05$ )。0 mg/kg DM 叶酸添加水平组的新生羔羊脐带 *VEGFA* 基因的相对表达水平显著低于 16、32 mg/kg DM 叶酸添加水平组( $P < 0.05$ )。三羔组的新生羔羊脐带 *ANGPT-1* 基因的相对表达水平

显著高于双羔组( $P < 0.05$ )。各基因的相对表达水平分析中,妊娠母羊饲料添加水平和出生类型交互作用不显著( $P > 0.05$ )。

### 2.3 妊娠母羊饲料添加叶酸对不同出生类型新生羔羊脐带血管内皮生长因子受体基因表达的影响

如表 7 所示,妊娠母羊饲料添加叶酸对不同出生类型新生羔羊脐带 *FLT-1*、*KDR* 基因的相对表达水平无显著影响( $P > 0.05$ )。各基因的相对表达水平分析中,妊娠母羊饲料添加水平和出生类型交互作用不显著( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 妊娠母羊饲料添加叶酸对胎盘发育的影响

胎盘重指在分娩结束后排出的胎盘重量,子叶数指胎盘上的子叶个数<sup>[32]</sup>,胎盘效率这一概念由 Wilson 等<sup>[33]</sup>首次在猪上提出,即初生窝重与胎盘重的比值,被认为是子宫容量的指标。对猪<sup>[34]</sup>、萨福克羊<sup>[35]</sup>的相关研究发现,窝产仔数与胎盘效率密切相关,且产仔数越多胎盘效率越高。但也有研究表明,随着产仔数的增加,绵羊的胎盘效率显著降低<sup>[36]</sup>。前期研究发现,妊娠母羊饲料添加叶酸可以显著增加新生羔羊初生重<sup>[13-14]</sup>,但在本试验中,妊娠母羊饲料添加水平和出生类型对胎盘重、子叶数、胎盘效率均无显著影响,这可能是由于物种或品种差异造成的研究结果不统一,还需要进一步研究。虽然各组胎盘重均值不同,但胎盘的发育程度是有限的,而湖羊相比萨福克羊体型较小,体重较轻,胎盘的发育可能不会随着胎儿数增多而持续增长。

表 5 妊娠母羊饲料添加叶酸对不同类型新生羔羊胎盘发育的影响  
Table 5 Effects of dietary folic acid supplementation in pregnant ewes on placental development of newborn lambs of different litter size

项目 Items	组别 Groups				SEM	出生类型 Litter size		叶酸添加水平 Folic acid supplemental level/(mg/kg DM)		P 值 P-value			
	TW-C	TW-F16	TR-C	TR-F32		双羔 Twin lambs	三羔 Triplet lambs	0	16	32	出生类型 Litter size	叶酸添加水平 Folic acid supplemental level	交互作用 Interaction
胎盘重 Placental weight/g	760.22	689.75	812.91	639.47	827.01	668.12	759.79	786.56	664.61	690.70	0.435	0.662	0.514
子叶数 Cotyledon number/个	78.00	76.00	62.33	71.67	86.33	72.11	75.89	74.83	72.83	74.33	0.659	0.980	0.270
胎盘效率 Placental efficiency	13.93	11.55	16.44	18.57	11.84	13.97	15.71	15.78	14.14	14.14	0.540	0.790	0.289

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ),相同或无字母表示差异不显著( $P>0.05$ )。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ( $P>0.05$ ). The same as below.

表 6 妊娠母羊饲料添加叶酸对不同类型新生羔羊脐带血管生成相关基因表达的影响

Table 6 Effects of dietary folic acid supplementation in pregnant ewes on expression of gene related to umbilical cord angiogenesis of newborn lambs of different litter size

项目 Items	组别 Groups				SEM	出生类型 Litter size		叶酸添加水平 Folic acid supplemental level/(mg/kg DM)		P 值 P-value			
	TW-C	TW-F16	TR-C	TR-F16		双羔 Twin lambs	三羔 Triplet lambs	0	16	32	出生类型 Litter size	叶酸添加水平 Folic acid supplemental level	交互作用 Interaction
血管内皮生长因子 A VEGFA	1.02	2.82	4.10	1.97	0.74	2.65	3.15	1.50b	3.60a	3.60a	0.425	0.022	0.236
转换生长因子-β3 TGF-β3	1.24	1.55	1.22	0.91	0.17	1.34	1.05	1.08	1.36	1.15	0.066	0.267	0.803
血管生成素-1 ANGPT-1	0.40	0.28	0.99	1.78	0.43	0.56b	1.45a	1.09	1.09	0.83	0.025	0.785	0.083

表 7 妊娠母羊饲料添加叶酸对不同出生类型新生羔羊脐带血管内皮生长因子受体基因表达的影响

Table 7 Effects of dietary folic acid supplementation in pregnant ewes on expression of vascular endothelial growth factor receptor gene of newborn lambs of different litter size

项目 Items	组别 Groups						SEM	出生类型 Litter size			叶酸添加水平 Folic acid supplemental level/(mg/kg DM)			P 值 P-value					
	TW-F16		TW-F32		TR-F16			TR-F32		双羔 Twin lambs		三羔 Triplet lambs		0		16		32	
血管内皮生长 因子受体-1 <i>FLT-1</i>	0.56	0.27	0.35	2.92	0.83	0.38	0.71	0.39	1.38	1.74	0.55	0.37	0.116	0.155	0.267				
血管内皮生长 因子受体-2 <i>KDR</i>	1.14	0.68	1.06	1.30	1.96	0.59	0.45	0.96	1.28	1.23	1.32	0.83	0.395	0.524	0.184				

### 3.2 妊娠母羊饲料添加叶酸对不同出生类型新生羔羊脐带血管生成相关基因表达的影响

血管内皮生长因子促进血管内皮细胞的分裂和迁移,主要调控血管生成,妊娠期间由胎盘组织产生并参与血管生成<sup>[16]</sup>。其中 VEGFA 作为血管形成和功能的主要调节因子,在血管生成和内皮细胞生长中起作用,能诱导血管通透性等,在胚胎发育过程不可或缺<sup>[12]</sup>。比如在兔后肢缺血模型中,添加 VEGFA 能通过促进血管生成刺激血流灌注<sup>[37]</sup>;向糖尿病大鼠胚胎添加叶酸,检测到 VEGFA 基因的相对表达水平增加,促进血管生成以及血管形态正常化<sup>[17]</sup>;而在宫内生长迟缓猪胎盘中, VEGF 基因的相对表达水平显著降低<sup>[38]</sup>。这说明组织中 VEGFA 基因的相对表达水平增加可以促进血管生成,发生在胎盘中时可能影响营养运输。本试验中,妊娠母羊饲料添加叶酸显著提高了 VEGFA 基因的相对表达水平,说明妊娠母羊补充叶酸可以可能促进了脐带血管生成,影响母体和胎儿间的营养物质运输。

TGF- $\beta$ 3 同样具有调节血管系统的作用,可调节细胞生长过程和血管生成,是重要的内源性微血管生成调节因子<sup>[19]</sup>。在人和小鼠上的研究表明, TGF- $\beta$  缺失时可能因为血管缺陷而具有胚胎致死性<sup>[20]</sup>。向体外培养牛和大鼠血管内皮细胞中添加 TGF- $\beta$ 3 时,可以促进血管内皮细胞的增殖、迁移和血管生成<sup>[21]</sup>;在大鼠的脂肪干细胞和卵巢的自体移植中,检测到 TGF- $\beta$ 3 基因的相对表达水平上升,血管密度增加<sup>[18,22]</sup>。但本试验中,妊娠母羊饲料添加叶酸和出生类型对 TGF- $\beta$ 3 基因的相对表达水平均无显著影响,可能由于体内试验与细胞试验的内环境存在较大差异造成的。

ANGPT-1 可以与血管内皮生长因子协同作用并增强其作用,诱导系统发育健全和稳定进行血管生成<sup>[23]</sup>。ANGPT-1 对脉管系统成熟和重塑非常重要,缺乏时会引发功能不全<sup>[24]</sup>,胚胎缺乏 ANGPT-1 表现出心血管缺陷并在妊娠中期死亡<sup>[8]</sup>。ANGPT-1 和血管生成素-2 (angiopoietin-2, ANGPT-2) 都是在胎盘中表达的血管生成生长因子,它们竞争相同受体——内膜内皮细胞特异性酪氨酸激酶受体-2 (Tie-2);前者是 Tie-2 受体的主要激动剂,后者则有可能是 Tie-2 的拮抗剂或部分激动剂<sup>[24]</sup>。本试验中,妊娠母羊饲料添加叶酸对 ANGPT-1 基因的相对表达水平无显著影响,推测

ANGPT-1 会与 ANGPT-2 竞争 Tie-2 受体<sup>[23]</sup>,引起三者表达的变化,还需结合 ANGPT-2 和 Tie-2 基因的相对表达水平作进一步研究分析;但三羔组脐带 ANGPT-1 基因的相对表达水平显著高于双羔组,可能有利于多羔脐带血管生成,说明不同出生类型可能影响胎盘脐带向胎儿运输更多营养物质。

### 3.3 妊娠母羊饲料添加叶酸对不同出生类型新生羔羊脐带血管内皮生长因子受体基因表达的影响

血管发育过程中,血管内皮生长因子主要通过 FLT-1 和 KDR 结合发挥生理作用<sup>[37]</sup>。FLT-1 主要在胚胎发育过程中作为 VEGFA 功能的负调控因子,降低 VEGFA 对 KDR 的可用性,防止信号过度转导<sup>[12]</sup>,可溶性 FLT-1 可以与血管内皮生长因子结合并抑制其活性<sup>[9]</sup>。而 KDR 作为血管内皮生长因子的主要受体,主要介导内皮细胞增殖,从而提高血管通透性<sup>[25-26]</sup>,仅激活 KDR 就足以激活参与有丝分裂和细胞迁移的信号转导因子,也可以通过封闭 KDR 抑制血管内皮生长因子活性,影响内皮细胞增殖<sup>[27]</sup>。本试验中,妊娠母羊饲料添加叶酸和出生类型对 FLT-1、KDR 基因的相对表达水平均无显著影响,与前人关于小鼠病理性血管模型中 FLT-1、KDR 基因的相对表达水平上调的研究结果<sup>[25]</sup>不一致,可能是因为叶酸添加水平或者物种差异引起的。但无论是双羔还是三羔,16、32 mg/kg DM 叶酸添加水平组 FLT-1 基因的相对表达水平与 0 mg/kg DM 叶酸添加水平组相比有下降的趋势,与 VEGFA 基因表达的变化趋势相反,因为 FLT-1 负调控血管内皮生长因子功能,推测随着 FLT-1 基因的相对表达水平下降,VEGFA 能更大程度上发挥其促进血管生成的生理功能。

## 4 结 论

妊娠母羊饲料添加叶酸对胎盘发育没有显著影响,但是显著提高了新生羔羊脐带 VEGFA 基因的相对表达水平,有利于新生羔羊脐带血管生成。同时,新生羔羊三羔脐带 ANGPT-1 基因的相对表达水平显著高于双羔,有利于多羔脐带血管生成。

### 参考文献:

- [1] 张帆,崔凯,王杰,等.妊娠后期饲料营养水平对母羊和胚胎发育的影响[J].畜牧兽医学报,2016,48

- (3):474-482.  
ZHANG F, CUI K, WANG J, et al. Effects of dietary nutrient levels on the development of late pregnant ewes and fetal[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2017, 48(3):474-482. (in Chinese)
- [2] XUE Y F, GUO C Z, HU F, et al. Maternal undernutrition induces fetal hepatic lipid metabolism disorder and affects the development of fetal liver in a sheep model[J]. The FASEB Journal, 2019, 33(9):9990-10004.
- [3] MEHER A, SUNDRANI D, JOSHI S. Maternal nutrition influences angiogenesis in the placenta through peroxisome proliferator activated receptors; a novel hypothesis[J]. Molecular Reproduction & Development, 2015, 82(10):726-734.
- [4] MÉTHOT H, GIRARD C L, MATTE J J, et al. Effects of dietary supplements of folic acid on reproductive performance in ewes[J]. Canadian Journal of Animal Science, 2008, 88(3):489-497.
- [5] 盘瑶晖. 叶酸在动物生产中的应用[J]. 饲料与畜牧, 2015(11):45-47.  
PAN Y H. Application of folates in animal production[J]. Feed and Animal Husbandry, 2015(11):45-47. (in Chinese)
- [6] GIRARD C L, CASTONGUAY F, FAHMY M H, et al. Serum and milk folates during the first two gestations and lactations in Romanov, Finnsheep, and Suffolk ewes[J]. Journal of Animal Science, 1996, 74(7):1711-1715.
- [7] 李丹, 吴坤. 叶酸和同型半胱氨酸对血管病的影响及其机制[J]. 疾病控制杂志, 2006, 10(3):299-302.  
LI D, WU K. Effect and mechanism of folic acid and Hcy on vascular diseases[J]. Chinese Journal of Disease Control, 2006, 10(3):299-302. (in Chinese)
- [8] PEREIRA R D, DE LONG N E, WANG R C, et al. Angiogenesis in the placenta: the role of reactive oxygen species signaling[J]. Biomed Research International, 2015, 2015:814543.
- [9] REYNOLDS L P, CATON J S, REDMER D A, et al. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies[J]. The Journal of Physiology, 2006, 572(1):51-58.
- [10] REYNOLDS L P, BOROWICZ P P, VONNAHME K A, et al. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy[J]. The Journal of Physiology, 2005, 565(1):43-58.
- [11] PARRAGUEZ V H, ATLAGICH M A, URQUIETA B, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase is increased in the placenta of sheep at high altitude in the Andes[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2010, 74(3):193-199.
- [12] MEHTA V. The effects of VEGF overexpression on the utero-placental circulation[D]. Ph.D. Thesis. London: University College London, 2011.
- [13] WANG B, LI H Q, LI Z, et al. Maternal folic acid supplementation modulates the growth performance, muscle development and immunity of Hu sheep offspring of different litter size[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2019, 70:194-201.
- [14] LI H Q, WANG B, LI Z, et al. Effects of rumen-protected folic acid addition in maternal and post-weaning diets on growth performance, total tract digestibility, ruminal fermentation and blood metabolites in lambs[J]. Animal Feed Science and Technology, 2020, 260:114364.
- [15] 李贞. 母羊妊娠期日粮添加叶酸对新生羔羊小肠发育的影响[D]. 硕士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2019.  
LI Z. Effects of dietary folic acid supplementation in pregnant ewes on small intestinal development of newborn lambs[D]. Master's Thesis. Beijing: China Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [16] REYNOLDS L P, REDMER D A. Angiogenesis in the placenta[J]. Biology of Reproduction, 2001, 64(4):1033-1040.
- [17] ZABIHI S, ERIKSSON U J, WENTZEL P. Folic acid supplementation affects ROS scavenging enzymes, enhances Vegf-A, and diminishes apoptotic state in yolk sacs of embryos of diabetic rats[J]. Reproductive Toxicology, 2007, 23(4):486-498.
- [18] 徐业芬. Smad 信号转导通路相关基因表达与湖羊高繁殖力关系的研究[D]. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2010:88-89.  
XU Y F. Gene expressions related to Smad signaling molecule and its relationship with fecundity in Hu sheep[D]. Ph.D. Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010:88-89. (in Chinese)
- [19] HOLIFIELD J S, ARLEN A M, RUNYAN R B, et al. TGF- $\beta_1$ , - $\beta_2$  and - $\beta_3$  cooperate to facilitate tubulogenesis in the explanted quail heart[J]. Journal of Vascular Research, 2004, 41(6):491-498.
- [20] LEBRIN F, DECKERS M, BERTOLINO P, et al.

- TGF- $\beta$  receptor function in the endothelium[J]. Cardiovascular Research, 2005, 65(3): 599-608.
- [21] MERWIN J R, ROBERTS A, KONDAIAH P, et al. Vascular cell responses to TGF- $\beta$ 3 mimic those of TGF- $\beta$ 1 *in vitro* [J]. Growth Factors, 1991, 5(2): 149-158.
- [22] ZOGRAFOU A, TSIGRIS C, PAPAPOPOULOS O, et al. Improvement of skin-graft survival after autologous transplantation of adipose-derived stem cells in rats[J]. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2011, 64(12): 1647-1656.
- [23] HAGEN A S E, ORBUS R J, WILKENING R B, et al. Placental expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and tie-2 during placental development in an ovine model of placental insufficiency-fetal growth restriction[J]. Pediatric Research, 2005, 58(6): 1228-1232.
- [24] 杨柳, 徐农. 抗血管生成靶向治疗的作用机制[J]. 实用肿瘤杂志, 2013, 28(2): 109-113.  
YANG L, XU N. The mechanism of anti-angiogenesis targeted therapy [J]. Journal of Practical Oncology, 2013, 28(2): 109-113. (in Chinese)
- [25] 史萌萌, 奚胜艳, 王彦晖, 等. 桃红四物汤对肝纤维化小鼠病理性血管生成相关因子 *VEGF*、*KDR* 与 *Flt-1* 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(2): 487-491.  
SHI M M, XI S Y, WANG Y H, et al. Effects of *Tao-hong Siwu* decoction on the expression of pathological angiogenesis correlation factors including *VEGF*, *KDR* and *Flt-1* in hepatic fibrosis mice [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2016, 31(2): 487-491. (in Chinese)
- [26] GILLE H, KOWALSKI J, LI B, et al. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2): a reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(5): 3222-3230.
- [27] LI Y Q, XIA Y, JIN B. Effect of Anti-KDR antibody on the proliferation of hemangioma vascular endothelial cells *in vitro* [J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology, 2007, 27(5): 551-553.
- [28] QUINN K E, ASHLEY A K, REYNOLDS L P, et al. Activation of the CXCL12/CXCR4 signaling axis may drive vascularization of the ovine placenta [J]. Domestic Animal Endocrinology, 2014, 47: 11-21.
- [29] 曹忻. 血管内皮生长因子促进绵羊卵母细胞体外成熟机理研究 [D]. 博士学位论文. 兰州: 甘肃农业大学, 2008: 64-65.
- CAO X. The mechanism of vascular endothelial growth factor on promoting ovine oocyte maturation *in vitro* [D]. Ph. D. Thesis. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2008: 64-65. (in Chinese)
- [30] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [31] 曲扬华. 维生素 E 对绵羊精子发生的影响及其作用机制 [D]. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2018: 34.  
QU Y H. Effects of vitamin E supplementation on ovine spermatogenesis and its regulating mechanisms [D]. Ph. D. Thesis. Beijing: China Agricultural University, 2018: 34. (in Chinese)
- [32] 范景胜, 熊朝瑞, 俄木曲者, 等. 山羊的胎盘性状与繁殖性能的相关分析 [J]. 西南民族大学学报 (自然科学版), 2015, 41(3): 295-298.  
FAN J S, XIONG C R, EMU Q Z. Correlation analysis of placental traits and reproductive performance in goats [J]. Journal of Southwest Minzu University (Natural Science Edition), 2015, 41(3): 295-298. (in Chinese)
- [33] WILSON M E, BIENSEN N J, FORD S P. Novel insight into the control of litter size in pigs, using placental efficiency as a selection tool [J]. Journal of Animal Science, 1999, 77(7): 1654-1658.
- [34] 王立贤, 李光全, 刘剑锋. 猪胎盘效率用于选择产仔数的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(5): 487-490.  
WANG L X, LI G Q, LIU J F. Study on using placental efficiency select litter size in pig [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2004, 35(5): 487-490. (in Chinese)
- [35] DWYER C M, CALVERT S K, FARISH M, et al. Breed, litter and parity effects on placental weight and placentome number, and consequences for the neonatal behaviour of the lamb [J]. Theriogenology, 2005, 63(4): 1092-1110.
- [36] OCAK S, EMSEN E, KÖYCEGİZ F, et al. Comparison of placental traits and their relation to litter size and parity weight in sheep [J]. Journal of Animal Science, 2009, 87(10): 3196-3201.
- [37] BABIAK A, SCHUMM A M, WANGLER C, et al. Coordinated activation of VEGFR-1 and VEGFR-2 is a potent arteriogenic stimulus leading to enhancement

of regional perfusion [ J ]. Cardiovascular Research, 2004, 61(4) : 789-795.

[ 38 ] CHEN F, WANG T J, FENG C P, et al. Proteome

differences in placenta and endometrium between normal and intrauterine growth restricted pig fetuses [ J ].

PLoS One, 2015, 10(11) : e0142396.

## Effects of Dietary Folic Acid Supplementation in Pregnant Ewes on Expression of Genes Related to Umbilical Cord Angiogenesis of Newborn Lambs of Different Litter Size

PENG Sijia LI Heqiong LUO Hailing\* WANG Bo LI Zhen WANG Yuejun

(State Key Laboratory of Animal Nutrition, College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate the effects of dietary folic acid supplementation in pregnant ewes on expression of genes related to umbilical cord angiogenesis of newborn lambs of different litter size. A total of 120 mutated *Hu* sheep ewes with similar body weight and consistent age were artificial inseminated and randomly divided into 3 groups, they were housed in individual pens and fed total mixed ration supplemented with 0, 16 and 32 mg/kg DM folic acid, respectively. At the time of delivery, each 3 samples of placenta and fetal umbilical cord of twin lambs and triplet lambs were collected randomly from each group, a total of 18 samples were used to measure placental related traits. The real-time quantitative PCR was used to detect the relative expression levels of the angiogenesis-related genes, including vascular endothelial growth factor A (*VEGFA*), transforming growth factor- $\beta$ 3 (*TGF- $\beta$ 3*), angiopoietin-1 (*ANGPT-1*), fms related tyrosine kinase 1 (*FLT-1*) and kinase insert domain receptor (*KDR*). The results showed that the dietary folic acid supplementation in pregnant ewes had no significant effects on placental weight, cotyledon number, placental efficiency ( $P>0.05$ ), and had no significant effects on the relative expression levels of *TGF- $\beta$ 3*, *ANGPT-1*, *FLT-1* and *KDR* genes in the umbilical cord of newborn lambs ( $P>0.05$ ), but significantly increased the relative expression level of *VEGFA* gene ( $P<0.05$ ). Besides, litter size had no significant effects on placental weight, cotyledon number, placental efficiency and the relative expression levels of *VEGFA*, *TGF- $\beta$ 3*, *FLT-1* and *KDR* genes in the umbilical cord of newborn lambs ( $P>0.05$ ), while the relative expression level of *ANGPT-1* gene of triplet lambs was significantly higher than that of twin lambs ( $P<0.05$ ). In conclusion, the dietary folic acid supplementation in pregnant ewes have no significant effects on the development of placenta, but it can significantly increase the relative expression level of *VEGFA* gene in the umbilical cord of newborn lambs, which is beneficial to umbilical cord angiogenesis of newborn lambs. Meanwhile, among newborn lambs, the relative expression level of *ANGPT-1* gene of triplet lambs is significantly higher than that of twin lambs, which is beneficial to umbilical cord angiogenesis of multiple lambs. [ *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(2) : 944-953 ]

**Key words:** ewes; folic acid; umbilical cord; angiogenesis; gene expression

\* Corresponding author, professor, E-mail: luohailing@cau.edu.cn