doi:10.11659/jjssx.04E020086

·基础研究·

小鼠卵巢体外培养过程中 FSH 干预对 VEGF 及其受体表达的影响

张旭红[1],陈 杰[2] (1.乌兰察布市中心医院产科,内蒙古 乌兰察布 012000;2.内蒙古医科大学人体解剖学教研室,内蒙古 呼和浩特 010000)

[摘 要] **目的** 通过小鼠卵巢体外培养过程添加促卵泡刺激素(FSH)保护性干预,观察体外培养过程中 FSH 对血管内皮生长因子(VEGF)及血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)表达的影响。**方法** 将 9 只 4 周龄 C57BL/6J 雌性小鼠卵巢组织随机分为新鲜对照组(CG 组)、体外培养对照组(VCG 组)、0.3 IU/mL FSH 干预体外培养组(IG-FSH 组),通过免疫组织化学技术及实时荧光定量 PCR 技术观察并分析各组卵巢组织 VEGF 及 VEGFR-2 表达情况。**结果** IG-FSH 组 VEGF、VEGFR-2 蛋白及 mRNA 表达量高于 VCG 组及 CG 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。IG-FSH 组及 CG 组 VEGF mRNA 表达量高于 VCG 组($P<0.05$),但 IG-FSH组及 CG 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。IG-FSH 组 VEGFR-2 mRNA 表达量高于 CG 组和 VCG 组($P<0.05$)。**结论** FSH 体外干预可有效促进 VEGF 及 VEGFR-2 的表达,在小鼠卵巢组织体外培养过程中发挥积极作用。

[关键词] 卵巢;体外培养;FSH;VEGF;VEGFR-2
[中图分类号] R711.75 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-04-16

Effect of FSH intervention on the expression of VEGF and its receptor in the process of mouse ovary culture in vitro

ZHANG Xu-hong[1], CHEN Jie[2] (1. Department of Obstetrics, Ulanqab Central Hospital, Ulanqab Inner Mongolia 012000, China; 2. Department of Human Anatomy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of follicle-stimulating hormone (FSH) on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor-2(VEGFR-2) in the process of mouse ovary culture in vitro by adding FSH protective intervention. **Methods** The ovarian tissues of 9 4-week-old C57BL/6J female mice were randomly divided into fresh control group (CG group), culture in vitro control group (VCG group), 0.3 IU/mL FSH intervention culture in vitro group (IG-FSH group). The expression levels of VEGF and VEGFR-2 of ovarian tissues in each group were observed and analyzed by immunohistochemistry and real-time fluorescence quantitative PCR technology. **Results** The expression levels of VEGF, VEGFR-2 protein in the IG-FSH group were significantly higher than those in the VCG group and the CG group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). VEGF mRNA expression levels in IG-FSH group and CG group were higher than those in VCG group ($P<0.05$), but there were no significant difference between IG-FSH group and CG group($P>0.05$); VEGFR-2 expression level in IG-FSH group was higher than those in CG group and VCG group ($P<0.05$). **Conclusion** FSH intervention in vitro can effectively promote the expression of VEGF and VEGFR-2, and plays an active role in the process of mouse ovary tissue culture in vitro.

Keywords: ovary; culture in vitro; FSH; VEGF; VEGFR-2

近年来,不孕不育患者比例呈逐年增高趋势[1]。随着国家生育政策的开放,较多家庭选择生育二胎,有生育需求的高龄产妇比例大幅增加。为此,辅助生殖技术飞速发展,也推动了卵巢组织体外保存技术的发展,但是卵巢组织在体外保存过程中,大量卵泡丢失、死亡,或者出现空卵泡等卵巢早衰现象,为卵巢组织体外保存技术带来了新的挑战。促卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)能够促进卵泡的发育成熟[2],抑制颗粒细胞的凋亡,同时促进卵泡周围颗粒细胞 VEGF 及缝隙连接蛋白的表达,从而促进血管生成、卵泡发育成熟[3]。研究显示,适当剂量的 FSH 体外短暂干预新鲜卵巢组织可有效提高冻融卵巢卵泡的存活率,并缩短冻融卵巢组织移植后血流重建时间,其机制是上调了能加速血管新生以及血管重建的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达[4]。血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2)是 VEGF 调控血管新生的主要酪氨酸激酶功能受体[5],主要功能是在各种病理、生理情况下介导新生血管的形成[6],同时其也是血管新生和有丝分裂过程主要的 VEGF 信号转导受体。因此,本研究拟通过小鼠卵巢组织体外培养过程中添加 FSH 的干预方式探究其在卵巢组织体

[基金项目] 内蒙古自治区自然科学基金(2019MS08139);内蒙古医科大学 2020 年度大学生科技创新英才培养项目(YCPY20200047)

[通信作者] 陈 杰,E-mail:13614719343@yeah.net

外培养过程中是否可有效保护卵巢组织,以期为提高辅助生殖技术成功率、促进卵巢组织体外培养技术发展提供基础研究依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 以9只4周龄(处于青春期)C57BL/6J(合格证号:000664)雌性小鼠为研究对象,每日光照12 h,环境温度保持在22~24 ℃,自由饮水取食。

1.1.2 主要试剂 FSH:注射用重组人卵泡刺激素(果纳芬)购自瑞士默克雪兰诺制药厂;白蛋白:人血清白蛋白购自Sigma;一抗VEGF及VEGFR-2(兔抗小鼠多克隆抗体)购自Abcam;荧光定量PCR试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 液体的配制 基液按DMEM:F12(1:1)配制。培养液含12%人血清白蛋白,添加FSH浓度为0.3 IU/mL。

1.2.2 卵巢组织的获取 颈椎脱臼处死小鼠,75%酒精消毒,在背部肾区切开皮肤及筋膜取出卵巢组织。

1.2.3 实验分组 将9只小鼠卵巢组织剥去外膜,随机分为3组,每组6枚。新鲜对照组(CG组):提取卵巢组织后直接固定或提取总RNA。体外培养对照组(VCG组):提取卵巢组织后将其放入培养液于37 ℃ CO_2 培养箱中培养60 min,之后投入液氮冻存24 h,解冻过程为冻存组织依次浸入梯度递减的解冻液,组织解冻完成再进行固定或提取总RNA,冻存全程不添加FSH干预。FSH干预体外培养组(IG-FSH组):体外培养过程添加0.3 IU/mL FSH,进行保护性干预。

1.2.4 免疫组织化学实验观察VEGF、VEGFR-2表达 将卵巢组织以4%多聚甲醛固定24 h,用多聚赖氨酸处理后的载玻片制作石蜡切片(切片厚度5 μm)。将切片脱水,PBS液冲洗3次,每次5 min,柠檬酸盐缓冲液微波加热法进行抗原修复。后续3% H_2O_2 37 ℃避光孵育10 min,山羊血清(与二抗同源)37 ℃封闭30 min。加一抗(VEGF稀释为1:200,VEGFR-2稀释为1:100)4 ℃过夜。第2天,切片复温30 min,PBS液冲洗3次,每次5 min,反应增强液37 ℃孵育30 min,二抗37 ℃孵育60 min,DAB(1:50)显色,镜下观察,PBS终止反应,封片。显微镜下观察VEGF及VEGFR-2阳性表达情况。采用DP Ctroller 3.1.1.267及Image Pro Plus 6.0软件拍照并按阳性表达的热区检测累积光密度值(IOD值)。

1.2.5 实时荧光定量PCR检测VEGF、VEGFR-2 mRNA表达 引物由上海生物工程有限公司合成,VEGF上游引物:5′-GTAACGATGAAGCCCTGGAGT-3′,下游引物:5′-TGTTCTGTCTTTCTTTGGTCTGC-3′;VEGFR-2上游引物:5′-ACTGTCATCCTTACCAATCCCA-3′,下游引物:5′-ATCTGGGGTGGGACATACAC-3′。采用TRIZOL法提取小鼠总RNA:将玻璃化冻融后的小鼠卵巢组织迅速放入预冷的匀浆器中研磨,再转入无RNA酶的1.5 mL EP管中静置5 min;加入200 μL氯仿震荡15 s后于室温静置2 min,于4 ℃以12 000 r/min转速离心15 min;取上层水相,移至另1根1.5 mL EP管中;加入500 mL异丙醇,颠倒混匀,再于4 ℃以12 000 r/min转速离心10 min;晾干,加入1 mL冰预冷的75%乙醇充分混匀洗涤,再于4 ℃以7 500 r/min转速离心5 min;晾干,溶于高压后的DEPC水,-80 ℃保存。检测A260:A280的比值,确定RNA的纯度。逆转录cDNA单链合成:加入2 μL TotalRNA、1 μL Anchored Oligo(dT) 18 Primer、10 μL 2×TS Reaction Mix、1 μL TransScript RT/RI Enzyme Mix、1 μL gDNA Remover、5 μL RNase-free Water、20 μL Total轻轻混匀,于4 ℃以12 000 r/min转速离心1 min;将样品置于PCR扩增仪内进行反转录,反应条件为:42 ℃ 30 min,85 ℃ 5 min,4 ℃再循环。经PCR设定温度梯度,确定退火温度。反应条件:95 ℃预变性4 min;95 ℃变性30 s,59 ℃退火30 s,72 ℃延伸50 s,循环30次;72 ℃延伸10 min,4 ℃降温10 min。上机进行实时荧光定量PCR检测。

1.3 统计学分析

采用SPSS 15.0统计软件,免疫组织化学技术及实时荧光定量PCR检测结果均采用单因素方差分析检验,按 $\alpha=0.05$ 为检验水准,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

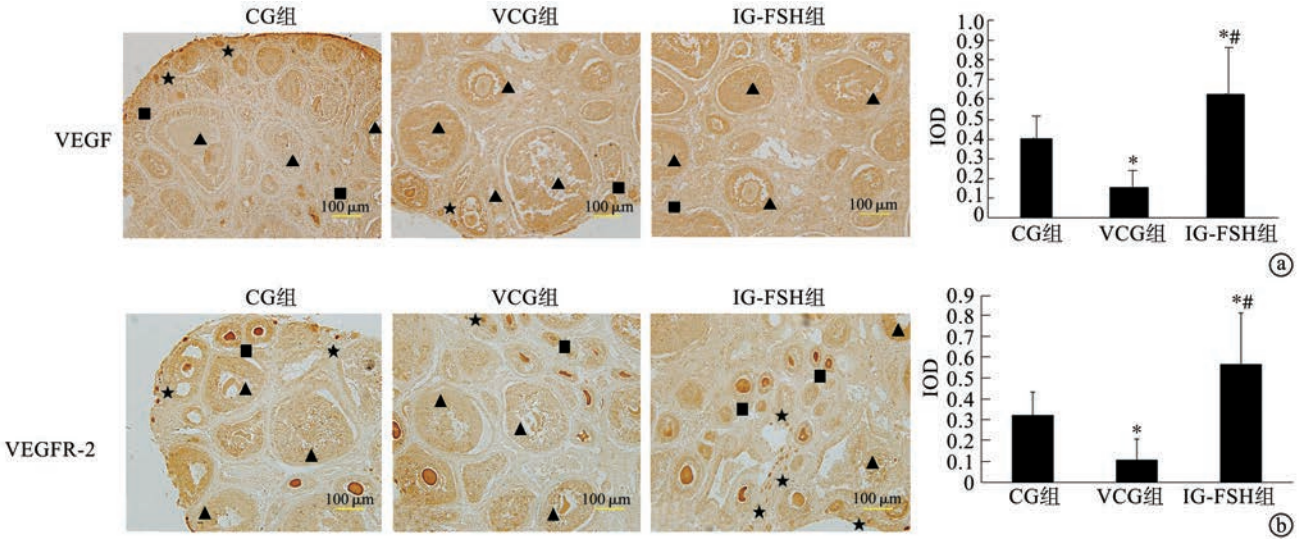
2 结果

2.1 FSH干预对VEGF及VEGFR-2蛋白表达的影响

免疫组织化学结果显示,IG-FSH组中VEGF及VEGFR-2蛋白表达量均高于CG组和VCG组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图1。

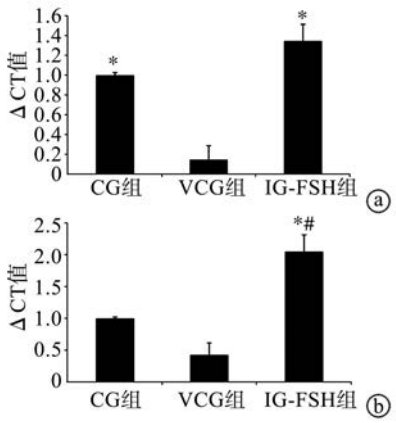
2.2 实时荧光定量PCR检测FSH干预后VEGF及VEGFR-2 mRNA表达

实时荧光定量PCR结果显示:IG-FSH组和CG组VEGF mRNA表达量显著高于VCG组($P<0.05$),但IG-FSH组和CG组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图2a。IG-FSH组VEGFR-2 mRNA表达量显著高于CG组及VCG组($P<0.05$),CG组与VCG组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图2b。



a:VEGF 免疫组织化学结果及定量分析;b:VEGFR-2 免疫组织化学结果及定量分析 ★:原始卵泡;■:初级卵泡;▲:次级卵泡;*:与CG 组比较,$P<0.05$;#:与 VCG 组比较,$P<0.05$

图 1 FSH 干预对体外保存卵巢组织 VEGF 及 VEGFR-2 蛋白表达的影响



a:VEGF;b:VEGFR-2 *:与 VCG 组比较,$P<0.05$;#:与 CG 组比较,$P<0.05$

图 2 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达结果

3 讨论

VEGF 作为高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,具有增加血管通透性,促进血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等重要作用[7]。而小鼠卵巢组织体外培养过程中血管的通透性以及内皮细胞的迁移直接关系到体外保存过程中卵泡的存活数量及质量[8]。VEGF 在发挥促进内皮细胞增殖作用时,主要由内皮细胞表面的 VEGFR-2(即 VEGF 受体)介导,VEGF 与 VEGFR-2 结合后引起自身及相关蛋白的磷酸化[9-10],从而启动细胞间信号转导以及信息传递,进而促进内皮细胞的分裂增殖,对维持卵巢组织体外培养过程中卵泡的正常生长发育有积极作用[11]。FSH 作为辅助生殖技术中应用广泛的药物之一,可对生殖细胞的发育成熟以及卵巢组织的内分泌功能发挥积极作用[12]。

本研究免疫组化实验表明,在卵巢组织体外培养过程中添加 FSH 进行保护性干预可有效促进 VEGF 及 VEGFR-2 蛋白的表达,效果显著优于 CG 组和 VCG 组。FSH 在卵泡存活过程中发挥着重要作用,而 VEGF 及其受体 VEGFR-2 在 FSH 的促进作用下有效结合,直接影响了卵巢间质细胞的血管重建与再生,为体外培养过程中卵泡的存活提供了先决条件[13]。本研究实时荧光定量 PCR 检测结果也证实,卵巢组织在体外培养过程中经添加 FSH 干预性保护作用后,增加了 VEGF 及 VEGFR-2 mRNA 的表达,证明 VEGF 及 VEGFR-2 具有激素依赖性[14],且在 FSH 的刺激作用下更有利于 VEGF 与其受体 VEGFR-2 结合充分发挥作用。据报道,FSH 的干预是促进 VEGF 及 VEGFR-2 表达的重要因素,且 VEGF 及其受体 VEGFR-2 能够使卵泡数量成倍增加,本实验证实了 FSH 在卵巢组织体外培养过程中起到了增加 VEGF、VEGFR-2 表达及促进两者结合的双重作用,在卵巢组织玻璃化冻存过程中有效保护了卵巢卵泡的功能,为后期体外受精打下坚实基础[15-16]。

综上所述,小鼠卵巢组织体外培养过程中添加 FSH 进行干预性保护,可有效促进 VEGF 及 VEGFR-2 的表达,保证体外培养过程中的卵泡数量,减少卵泡损失,为辅助生殖技术的发展提供了实验室研究证据。

[参考文献]

[1] 付景丽,丁秋霞,黄 燕. 人类辅助生殖技术的研究进展[J]. 局解手术学杂志, 2019, 28(5): 418 - 421. doi: 10. 11659/jjssx. 02E019005.

doi:10.11659/jjssx.06E019073

·基础研究·

miR-146a 调控 TGF-β/SMAD2 信号通路对膝关节韧带损伤的影响

王 振,杜异凡,袁赞安,邝欢欢,位付涛 (联勤保障部队第九八八医院骨科,河南 郑州 450042)

[摘 要] **目的** 探究 miR-146a 调控 TGF-β/SMAD2 信号通路对膝关节韧带损伤的影响。**方法** 将 32 只兔平均分为假手术组(只切开皮肤并缝合,但不损伤前交叉韧带)、模型组(膝关节韧带损伤后仅缝合)、安慰剂组(膝关节韧带损伤后给予生理盐水安慰剂)、miR-146 mimic 组(膝关节韧带损伤后给予 miR-146a mimic 处理)。对模型动物进行行为能力观察和副韧带拉伸试验,通过 HE 染色观察兔膝关节内侧副韧带的组织变化,采用 Western blot 和 qRT-PCR 检测膝关节转化生长因子-β(TGF-β)和 SMAD2 的表达。**结果** 假手术组兔膝关节可正常活动,关节软骨清晰无损坏;模型组和安慰剂组兔四肢出现疼痛现象,有明显抽搐,软骨裂痕明显严重,关节腔内液体明显增多,骨髓组织出血严重、结构紊乱;miR-146 mimic 组兔关节腔内液体、骨髓组织出血及结构紊乱明显减少/轻,膝关节活动明显好转。miR-146 mimic 组最大应变明显较强,且其最大位移明显较长,均优于模型组和安慰剂组($P<0.05$)。Western blot 分析显示,模型组和安慰剂组 TGF-β 和 SMAD2 蛋白表达明显低于假手术组($P<0.05$);miR-146 mimic 组 TGF-β 和 SMAD2 蛋白表达显著高于模型组和安慰剂组($P<0.05$)。qRT-PCR 检测结果显示,模型组及安慰剂组 TGF-β 和 SMAD2 mRNA 表达显著低于假手术组和 miR-146 mimic 组($P<0.05$);与假手术组比较,miR-146 mimic 组 TGF-β 和 SMAD2 mRNA 表达较低($P<0.05$)。**结论** miR-146a 可促进 TGF-β/SMAD2 蛋白表达,增强韧带拉伸效果,改善膝关节韧带的损伤。

[关键词] miR-146a;TGF-β/SMAD2 信号通路;膝关节;韧带损伤

[中图分类号] R684 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-06-14

[基金项目] 国家自然科学基金(81744125)

[通信作者] 位付涛,E-mail:47651717@qq.com

[2] 赵振钏,亓 蓉,吴小华,等.卵巢刺激慢反应患者补充生长激素的疗效评价[J].中国计划生育和妇产科,2019,11(7):41-44.doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2019.07.11.

[3] 杨润雨,张 杨,冯晓玲.卵巢储备功能下降所致不孕症中西医机制及治疗进展探析[J].辽宁中医药大学学报,2019,21(9):189-192.doi:10.13194/j.issn.1673-842x.2019.09.049.

[4] Wang YR,Chang Q,Sun J,et al.Effects of HMG on revascularization and follicular survival in autotransplant mouse ovarian tissue[J].Reprod Biomed Online,2012,24(6):646-653.doi:10.1016/j.rbmo.2012.02.025.

[5] 刘 杰.转化生长因子 β 通过调节 VEGF-A 的表达影响子宫内膜异位症的发展[J].中国妇幼保健,2020,35(5):938-940.doi:10.19829/j.zgfybj.issn.1001-4411.2020.05.050.

[6] 王玉霞,孔红霞,韩贝贝,等.VASH1 和 VEGFR-2 在宫颈鳞癌组织的表达及意义[J].山东医药,2015,55(21):40-42.doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2015.21.015.

[7] Tavana S,Valojerdi MR,Azarnia M,et al.Restoration of ovarian tissue function and estrous cycle in rat after autotransplantation using hyaluronic acid hydrogel scaffold containing VEGF and bFGF[J].Growth Factors,2016,34(3-4):97-106.doi:10.1080/08977194.2016.1194835.

[8] 龙惠东,周灿权,邓伟芬,等.人冻融卵巢组织异种异位移植血管生成的研究[J].中国妇幼健康研究,2020,31(2):213-218.doi:10.3969/ji.ssn.1673-5293.2020.02.016.

[9] Turwankar A,Ghaskadbi S.VEGF and FGF signaling during head regeneration in hydra[J].Gene,2019:144047.doi:10.1016/j.gene.2019.144047.

[10] 林哲洙,张 磊,张 睿,等.乳腺浸润性导管癌 Ephrin-A1、VEGF、VEGFR2 表达对血管生成的影响[J].中国老年学杂志,2017,37(10):2466-2468.doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2017.10.053.

[11] 高江曼,严 杰,于 洋,等.VEGF 和 bFGF 联用对小鼠卵巢组织移植后的影响[J].天津医药,2013,41(5):459-461.doi:10.3969/j.issn.0253-9896.2013.05.017.

[12] 李 超,殷金凤,罗 莉,等.米索前列醇联合 COOK 球囊用于足月孕引产的临床观察[J].中国妇幼健康研究,2017,28(8):1010-1013.doi:10.3969/j.issn.1673-5293.2017.08.042.

[13] 熊 露,刘 莉,胡雅君.TNF-α、IFN-γ、IL-2 及生殖激素在卵巢早衰中的水平变化及临床意义[J].国际检验医学杂志,2020,41(6):745-748.doi:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.06.028.

[14] 沈 澍,周晓燕,胡恒贵,等.血清 INHB、IGF-1、VEGF、E2 在多囊卵巢综合征患者中的表达及临床意义[J].国际检验医学杂志,2019,40(2):181-183.doi:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.02.014.

[15] 颜 贝,单园园,蒲 静,等.小鼠卵巢玻璃化冻存中 FSH 干预对移植卵巢 VEGF 和 VEGFR-2 表达的影响[J].宁夏医科大学学报,2014,36(6):600-603.doi:10.16050/j.cnki.issn1674-6309.2014.06.024.

[16] 叶耀群.雌-孕激素序贯疗法对药物流产后出血患者卵巢功能和血管生成调节因子的影响[J].中国实用医药,2019,14(18):4-6.doi:10.14163/j.cnki.11-5547/r.2019.18.002.

(编辑:杨 颖)