

VEGF对小鼠卵巢类固醇合成相关基因表达的影响及其机制

张智慧^{1,2}, 高鸿霞², 王国庆², 侯巍², 邹畅², 芦小单^{1,2*}

¹吉林省人民医院精准分子医学中心, 吉林长春 130000; ²北华大学医学技术学院, 吉林省吉林市 132000

[中图分类号] R339.2¹

[文献标志码] A

[DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2633.2024.0229

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 张智慧, 高鸿霞, 王国庆, 等. VEGF对小鼠卵巢类固醇合成相关基因表达的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(6): 679-685.

[收稿日期] 2022-12-26

[录用日期] 2023-03-14

[上线日期] 2024-02-29

[摘要] **目的** 探讨血管内皮生长因子(VEGF)对小鼠卵巢类固醇合成相关基因表达的影响及其机制。**方法** 利用四环素可逆调节VEGF表达的转基因小鼠模型, 采用聚合酶链反应(PCR)法鉴定小鼠基因型, 通过喂食强力霉素将20只小鼠分为VEGF表达正常组(Dox⁺)与VEGF表达抑制组(Dox⁻)(n=10)。采用Western blotting检测卵巢组织中VEGF蛋白的表达情况; 荧光定量PCR检测VEGF、VEGF受体2(KDR)及已知在卵泡发育中发挥作用的基因卵泡刺激素(FSH)、抑制素B(INHBB)mRNA的表达情况。HE染色观察卵巢组织的变化。取小鼠卵巢组织提取总RNA进行转录组测序, 并通过FPKM、log₂FC值分析相关差异基因。**结果** 与Dox⁺组比较, Dox⁻组VEGF mRNA和蛋白水平明显降低, KDR mRNA水平明显降低(P<0.05)。HE染色结果显示, 与Dox⁺组比较, Dox⁻组卵泡发育障碍, 并出现闭锁卵泡。根据测序结果分析筛选出两组小鼠的卵泡发育相关基因、类固醇合成相关基因具有明显差异(P<0.05); 富集分析发现小鼠卵巢中VEGF主要参与调控卵巢类固醇生成等通路。荧光定量PCR结果显示, 与Dox⁺组相比, Dox⁻组小鼠卵巢组织中卵泡发育相关基因(INHBB、FSHR)明显上调(P<0.05), 类固醇合成的关键基因(StAR、CYP11A1、3β-HSD)明显下调(P<0.05), 定量结果与测序结果基本一致。**结论** VEGF抑制可使小鼠卵泡发育障碍, 其可能的机制是通过下调卵巢类固醇合成相关基因FSH、INHBB的表达从而阻碍胆固醇代谢来实现的。

[关键词] 血管内皮生长因子; 卵泡发育; 性类固醇激素; 转录组测序

Effect of VEGF on the expression of genes related to ovarian steroid synthesis in mice and its mechanism

Zhang Zhi-Hui^{1,2}, Gao Hong-Xia², Wang Guo-Qing², Hou Wei², Zou Chang², Lu Xiao-Dan^{1,2*}

¹Precision Medicine Center, Jilin Province People's Hospital, Changchun, Jilin 130000, China

²School of Medical Technology, Beihua University, Jilin, Jilin 132000, China

*Corresponding author, E-mail: luxiaodan@ccsfu.edu.cn

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jilin Province (20240101007JC); the Natural Science Foundation of Jilin Province (YDZJ202201ZYTS148), and the Jilin Provincial Science and Technology Department Innovation Team Project (20220508080RC)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on the expression of genes related to ovarian steroid synthesis in mice and its underlying mechanism. **Methods** A transgenic mouse model with tetracycline-reversible regulation of VEGF expression was used, and the genotype of mice was identified by polymerase chain reaction (PCR). Twenty mice were divided into normal VEGF expression group (Dox⁺, n=10) and VEGF expression inhibition group (Dox⁻, n=10) by feeding them doxycycline. Western blotting was used to detect the expression of VEGF protein in ovarian tissues. Fluorescence quantitative PCR was used to detect the mRNA expression of VEGF, KDR and genes known to play roles in follicle development, such

[基金项目] 吉林省自然科学基金(20240101007JC); 吉林省自然科学基金项目(YDZJ202201ZYTS148); 吉林省科技厅创新团队项目(20220508080RC)

[作者简介] 张智慧, 硕士研究生, 主要从事临床检验诊断方面的研究

[通信作者] 芦小单, E-mail: luxiaodan@ccsfu.edu.cn

as follicle-stimulating hormone (FSH) and inhibin B (INHBB). HE staining was used to observe changes in ovarian tissue. Total RNA was extracted from mouse ovarian tissues for transcriptome sequencing, and the relevant differential genes were analyzed by FPKM and \log_2FC values. **Results** Compared with the Dox^+ group, the mRNA and protein levels of VEGF in the Dox^- group significantly reduced, and the mRNA levels of *KDR* also significantly decreased ($P < 0.05$). HE staining results showed that compared with the Dox^+ group, follicular development was impaired and atresia follicles appeared in the Dox^- group. Sequencing analysis identified that significant differences in follicular development-related genes and steroid synthesis-related genes between the two groups ($P < 0.05$). Enrichment analysis showed that VEGF in mouse ovaries mainly regulates ovarian steroidogenesis and other pathways. Fluorescence quantitative PCR results demonstrated that compared with the Dox^+ group, the follicular development-related genes (*INHBB* and *FSHR*) in the ovarian tissues of the Dox^- group were significantly up-regulated ($P < 0.05$), whereas the key genes of steroid synthesis (*StAR*, *CYP11A1*, *3 β -HSD*) were significantly down-regulated ($P < 0.05$). The quantitative results were basically consistent with the sequencing results. **Conclusion** Mice with inhibited VEGF exhibited ovarian follicular dysplasia, potentially due to the mechanism whereby VEGF inhibition downregulated the expression of genes associated with steroid synthesis, such as *FSH* and *INHBB*, thereby obstructing cholesterol metabolism.

[Key words] vascular endothelial growth factor; follicular development; sexual steroid hormones; transcriptome sequencing

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 作为血管生成过程的主要成员之一^[1], 可通过与其受体 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2, 又名 *KDR*) 结合参与卵泡的血管化及氧合作用, 进而参与卵母细胞的成熟和胚胎发育过程^[2-3]; 这些新生的血管保证并增加了促性腺激素、生长因子、氧、类固醇激素和其他促卵泡生长物质的供应^[4-6]。随着研究的逐渐深入, 越来越多的证据表明, 血管生成可通过促卵泡生长物质的供应成为卵泡发育和闭锁的关键调节因素, 并在多个物种 (如鸡^[7]、猪^[8]和牛^[9]) 中得到证实。本研究利用四环素可逆调节系统抑制 VEGF 表达的转基因小鼠模型 ($VEGF^{tetO/tetO}; \beta AK^{tg/tg}$)^[10], 分析类固醇激素合成相关基因在卵巢中的表达情况, 并探讨相关机制, 旨在揭示 VEGF 与类固醇激素合成调节的关系, 为其发挥卵泡发育调节作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 TransZol 购自北京全式金生物技术有限公司; 琼脂糖购自北京达科为生物技术有限公司; MinuteTM 动物组织总蛋白提取试剂盒购自北京 Invent 生物技术有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、10 \times 蛋白上样缓冲液、DL2000 DNA Marker、PCR 试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量 PCR 反应试剂盒、ECL 化学发光试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; VEGF 抗体 (货号: ab183100) 购自英国 Abcam 公司; GAPDH 抗体 (货号: sc-166574) 购自美国 Santa Cruz 公司; HE 染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 实验动物及分组 四环素调节 VEGF 可逆抑制小鼠模型^[10] 由东北师范大学郑耀武教授惠赠, 饲养于东北师范大学转基因动物实验中心 SPF 级动物房独立通气 (individual ventilated cages, IVC) 笼中, 恒温

22 $^{\circ}C$, 维持 12 h 的光暗循环, 自由饮食。本研究获吉林省人民医院医学伦理委员会审批 (2022001), 实验过程符合国家及单位有关实验动物的管理及使用规定。将 20 只 12 周龄雌性小鼠分为 VEGF 正常表达组 (Dox^+) 和 VEGF 抑制表达组 (Dox^-), 每组 10 只。所有小鼠选用的基因型为 $VEGF^{tetO/tetO}; \beta AK^{tg/tg}$, 喂食四环素条件下度过哺乳期后即可分为 Dox^+ 组和 Dox^- 组用于实验。

1.3 小鼠基因型鉴定 剪取出生两周龄小鼠鼠尾约 0.5 cm 置于 1.5 ml EP 管中, 每管中加入 100 μ l 鼠尾消化液 (GNTK, 每 1 ml GNTK 加入 8 μ l 蛋白酶 K), 于 56 $^{\circ}C$ 水浴锅中消化过夜。第 2 天将消化好的鼠尾充分混匀后沸水浴 10 min 使蛋白酶失去活性从而终止消化, 12 000 r/min 离心 1 min 后进行 PCR 鉴定, 取上清用作 PCR 反应的模板进行 PCR 反应。PCR 扩增反应体系根据试剂盒使用说明书, 按照 25 μ l 反应体系进行扩增反应, 分别加入 *Taq* mix 12.5 μ l、F 引物 (10 μ mol/L) 1 μ l、R 引物 (10 μ mol/L) 1 μ l、DNA 模板 2 μ l, 再加入双蒸水补足至 25 μ l。扩增条件: 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}C$ 30 s、54 $^{\circ}C$ 30 s、72 $^{\circ}C$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}C$ 10 min 后回温至 4 $^{\circ}C$ 。利用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 引物序列见表 1。

1.4 实时荧光定量 PCR 测定卵巢组织中相关基因的

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 PCR primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')	目的片段 (bp)
<i>VEGF</i>	F: CGGCAGCGGATCTCTGTCGC	野生型 400
	R: GGAGCTCTGATACTCTTTCTGA	重组型 500
<i>tetR-Krab</i>	F: CAGCGCATTAGTGCTGCTTA	464
	R: TAGCGACTTGATGCTCTTGATC	

VEGF. 血管内皮生长因子; tetR-Krab. 四环素阻遏蛋白融合蛋白

表达 以 Trizol 法从小鼠卵巢中提取总 RNA。按照说明书使用 HiScript RT-PCR 试剂盒对纯化的 1 μ g RNA 进行反转录。根据 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒说明书, 以 20 μ l 反应体系进行扩增反应, 分别加入: 2 \times ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10 μ l、F 引物(10 μ mol/L)0.4 μ l、R 引物(10 μ mol/L) 0.4 μ l、cDNA 2 μ l, 加入双蒸水补足至 20 μ l。qRT-PCR 分析在 7500 fast real-time PCR 系统上进行, PCR 条件为: 98 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 40 个循环。以 18s 为内参照, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。引物序列见表 2。

表 2 qRT-PCR 引物序列
Tab.2 qRT-PCR primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	目的片段(bp)
VEGF	F: GATCATGCGGATCAAACCTC	105
	R: AATGCTTTCTCCGCTCTGAA	
KDR	F: CTGGAGCCTACAAGTGCTCG	179
	R: GAGGTTTGAAATCGACCCTCG	
StAR	F: ATGTTCTCGCTACGTTCAAG	122
	R: CCCAGTGCTCTCCAGTTGAG	
CYP11A1	F: ACACTGAGACTCCACCCCAT	137
	R: CTCGACCCATGGCAAAGCTA	
3 β -HSD	F: AGCTCTGGACAAAGTATCCGA	234
	R: GCCTCCAATAGGTTCTGGGT	
INHBB	F: AACTGCTCCCCTATGTCCTGG	127
	R: CCGCTACGTTTCAGGTCCAC	
FSHR	F: ATGTGTTCTCCAACCTACCCA	145
	R: GCTGGCAAGTGTTTAATGCCTG	
18s	F: CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	101
	R: CGAACCTCCGACTTTCGTTCT	

VEGF. 血管内皮生长因子; KDR. 血管内皮生长因子受体 2; StAR. 类固醇生成急性调节蛋白; CYP11A1. 细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶; 3 β -HSD. 3 β -羟基类固醇脱氢酶; INHBB. 抑制素 B; FSHR. 促卵泡激素受体

1.5 Western blotting 检测小鼠卵巢组织中 VEGF 蛋白的表达 取适量小鼠卵巢组织, 按照 MinuteTM 动物组织总蛋白提取试剂盒说明书提取组织总蛋白。BCA 法测定总蛋白浓度, 取 20 μ g/孔总蛋白进行 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, PVDF 膜湿转 2 h, 随后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。VEGF、GAPDH 一抗在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜(TBS 缓冲液=1:1000), 次日用 TBST 洗涤 3 次, 5 min/次, 在室温下与 HRP 标记的二抗(TBS 缓冲液=1:2000)孵育 2 h。以 GAPDH 为内参照, 通过 ECL 化学发光检测试剂曝光显影, 重复 3 次。使用 ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白/GAPDH 的灰度值, 所得结

果即为目的蛋白相对表达量。

1.6 HE 染色观察卵巢组织形态学变化 卵巢组织固定 24 h 后, 经 70%~100% 乙醇梯度脱水, 石蜡包埋、切片(厚度 5 μ m)。切片经二甲苯脱蜡及由高到低梯度浓度(100%~70%)乙醇水洗后, 苏木精染色 7 min、水洗 3 min, 重复 4 次; 分化液分化 30 s、自来水浸泡 10 min、伊红染液染色 2 min、水洗 3 min, 重复 4 次; 经常规脱水晾干后用中性树胶封片, 镜检, 观察卵巢形态学变化。

1.7 RNA 文库构建及测序 提取的 RNA 经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 降解程度以及是否存在污染。文库构建及测序均由中科基因生物科技有限公司完成。具体步骤如下: 将所提 RNA 以带有 Oligo(dT) 的磁珠富集成含 polyA 尾的 mRNA; 随后加入片段化酶将 mRNA 片段化后进行反转录, 再合成 cDNA 双链形成双链 DNA; 将合成的双链 DNA 末端修复并 5' 端磷酸化, 3' 端形成突出 1 个 "A" 的黏末端, 再连接 1 个 3' 端有凸出 "T" 的测序接头; 连接产物通过特异引物进行 PCR 扩增; 并使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物, 即得到最终文库。对构建好的文库进行质检, 合格后测序。

1.8 生物信息学分析 通过 HISAT2 软件将测序获得的核苷酸长度(reads)比对至小鼠全基因组, 使用 edgeR 软件包计算基因差异表达情况, 根据差异表达倍数(fold change, FC)、P 值和表达量(FPKM)筛选差异表达的 mRNA ($|\log_2 FC| > 1$, $P < 0.05$ 且 FPKM > 0.5)。

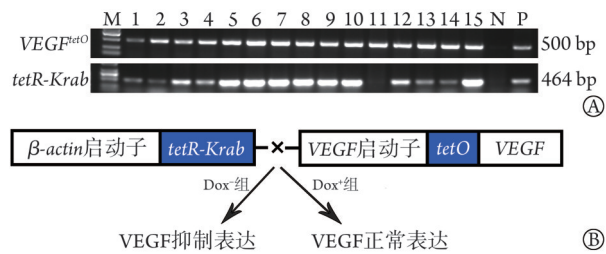
1.9 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用两独立样本 t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 转基因小鼠模型筛选 实验筛选出同时含有 VEGF^{tetO} 及 tetR-Krab 目的片段的 1-10、12-15 号双转基因小鼠(图 1A), 在喂食常规鼠粮时, 四环素阻遏蛋白融合蛋白(tetracycline repressor, tetR-Krab)与四环素操纵子(tetracycline operator, tetO)结合, 抑制了 VEGF 的表达; 当鼠粮中含有强力霉素(doxycycline, Dox)时, 由于 Dox 与 tetR 的结合能力更强, 构型因此发生改变, 导致 tetR-Krab 从 tetO 上脱落, 最终实现 VEGF 的正常表达(图 1B)。

2.2 VEGF 在小鼠卵巢组织中的表达情况 qRT-PCR 结果显示, 与 Dox⁺ 组小鼠比较, Dox⁻ 组小鼠 VEGF mRNA 水平也明显降低 ($P < 0.05$, 图 2A)。Western blotting 检测结果显示, 与 Dox⁺ 组小鼠比较, Dox⁻ 组小鼠卵巢组织中的 VEGF 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$, 图 2B)。

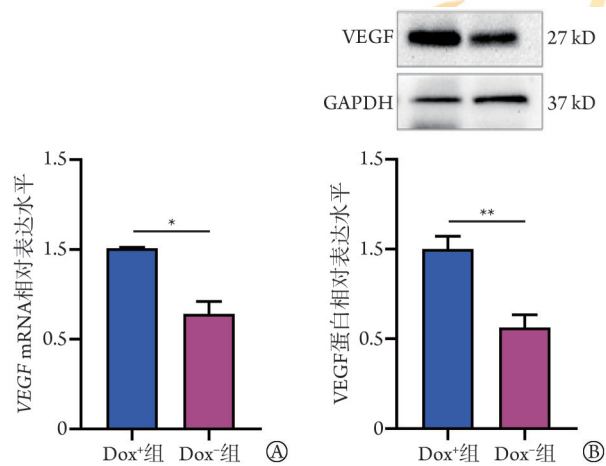
2.3 HE 染色观察小鼠卵巢组织的形态学变化 HE



VEGF. 血管内皮生长因子; M. DNA Marker; P. 阳性对照; N. 阴性对照; A. PCR电泳结果; B. 四环素调节VEGF可逆抑制小鼠模型

图1 四环素调节VEGF可逆抑制模型小鼠基因型鉴定结果

Fig.1 Genotypic identification of mice with reversible inhibition of VEGF mediated by tetracycline



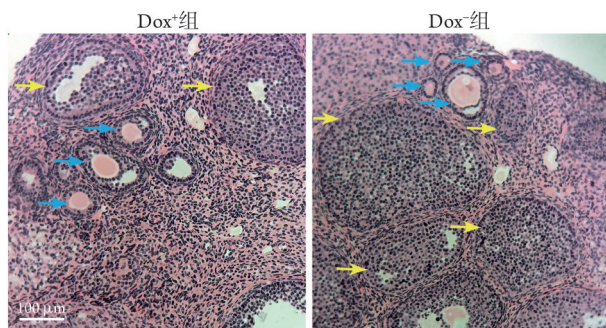
VEGF. 血管内皮生长因子; A. qRT-PCR检测VEGF mRNA表达水平($n=6$); B. Western blotting检测VEGF蛋白表达水平($n=3$); * $P<0.05$; ** $P<0.01$

图2 小鼠卵巢组织中VEGF mRNA及蛋白的表达情况

Fig.2 VEGF mRNA and protein expression in ovarian tissue in mice

染色结果显示,与Dox⁺组比较,Dox⁻组卵泡膜增殖减少,卵泡核浓缩,卵泡塌陷,轮廓曲折,卵泡发育障碍开始发生闭锁,黄体膨大,卵巢基质和间质腺出现增生现象(图3)。

2.4 生物信息学分析 对Dox⁺组和Dox⁻组小鼠卵巢



蓝色箭头示卵泡,黄色箭头示黄体

图3 两组小鼠卵巢组织HE染色结果

Fig.3 HE staining of ovarian tissue in two groups of mice

组织进行转录组学分析,得到VEGF及其受体KDR、与类固醇合成(*StAR*、*CYP11A1*、*3 β -HSD*)和调节卵泡刺激素(FSH)相关基因(*INHBB*、*FSHR*)的相对表达趋势,具体结果见表3。将筛选出的所有差异基因进行KEGG通路富集分析,结果显示,差异基因主要富集于过氧化物酶体增殖激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors, PPAR)、卵巢类固醇生成、凝血与补体级联反应、类固醇激素生物合成等信号通路(图4)。qRT-PCR检测结果显示,*KDR*、*StAR*、*CYP11A1*、*3 β -HSD* mRNA水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),*INHBB*、*FSHR* mRNA水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.001$)(图5),与测序结果基本一致。

表3 小鼠卵巢组织中筛选出的相关差异基因

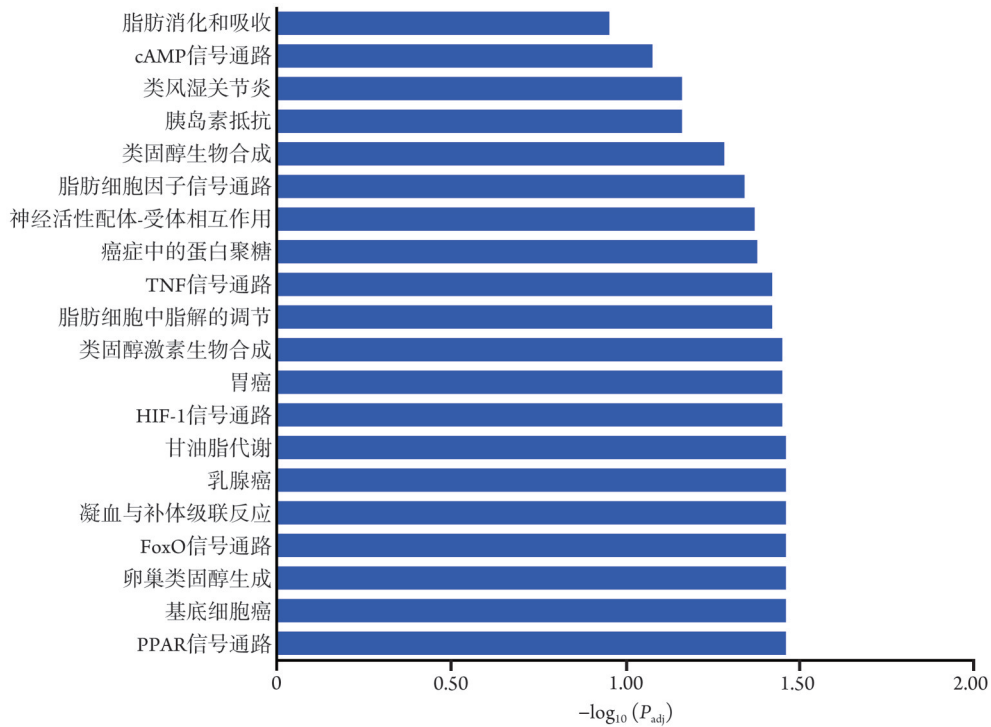
Tab.3 Selected related differential genes in ovarian tissue in mice

基因编号	差异倍数(Dox ⁺ /Dox ⁻)	P	基因名称
ENSMUSG00000031574	0.015342889	<0.0001	<i>StAR</i>
ENSMUSG00000023951	0.079371166	<0.0001	<i>VEGF</i>
ENSMUSG00000032323	0.180817292	<0.0001	<i>CYP11A1</i>
ENSMUSG00000027871	0.701481773	0.02156	<i>3β-HSD</i>
ENSMUSG00000062960	0.384831849	0.00110	<i>KDR</i>
ENSMUSG00000037035	10.53237967	<0.0001	<i>INHBB</i>
ENSMUSG00000032937	2.765252522	0.00082	<i>FSHR</i>

StAR. 类固醇生成急性调节蛋白; VEGF. 血管内皮生长因子; *CYP11A1*. 细胞色素P450胆固醇侧链裂解酶; *3 β -HSD*. 3 β -羟基类固醇脱氢酶; *KDR*. 血管内皮生长因子受体2; *INHBB*. 抑制素B; *FSHR*. 促卵泡激素受体

3 讨论

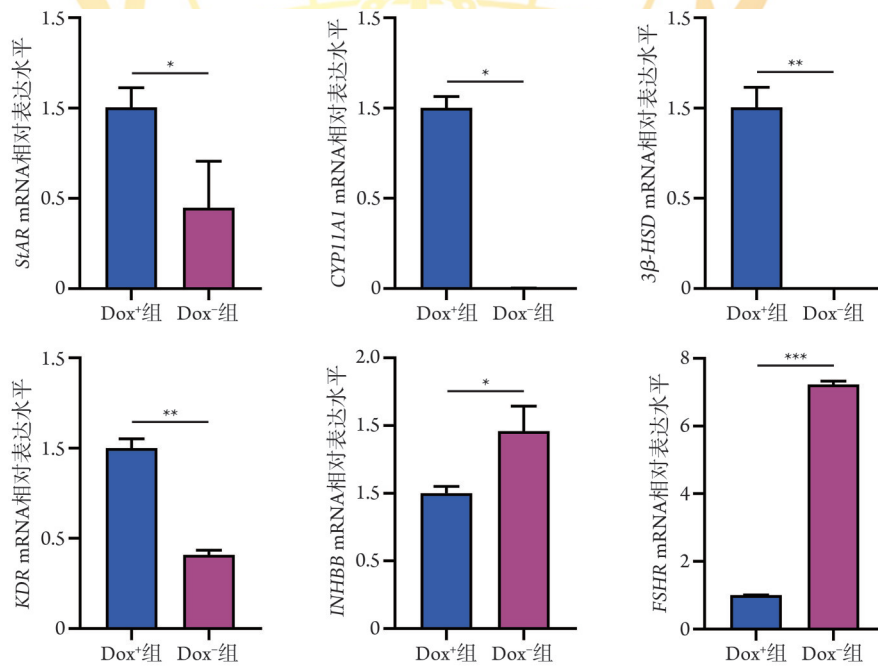
卵巢血管生成受促血管生成因子和抗血管生成因子之间的平衡调节,是一个复杂的过程^[11]。在正常生理条件下,血管生成是一个严格调控的过程,卵巢作为成年动物中少数经历重复血管形成、成熟和退化的组织之一,为血管生成过程研究提供了独特的机会^[12]。卵巢内的卵泡发生、排卵和黄体形成等生理过程中,营养物质及类固醇激素均需经血管从卵巢运输至卵泡,若营养物质和激素供给不足,卵泡更倾向于发育为闭锁状态,因此,任何影响正常血管生成过程的因素均可能导致卵巢功能障碍,甚至不孕^[13]。VEGF作为调节卵巢血管生成的关键因子之一,可将原始卵泡募集到生长的卵泡池,且通过血管依赖性和血管非依赖性机制成为初级和晚期卵泡的存活因子^[14]。体内研究表明,抑制血管内皮生长因子A和KDR可抑制卵泡发育或阻止排卵^[15]。充足的血管供应是优势卵泡选择和成熟的限速步骤,



cAMP, 环腺苷酸; TNF, 肿瘤坏死因子; PPAR, 过氧化物酶体增殖物激活受体; P_{adj} , 校正后的 P 值

图4 Dox⁻组与Dox⁺组小鼠卵巢组织差异基因KEGG通路富集分析

Fig.4 KEGG pathway enrichment analysis of differential genes between Dox⁻ group and Dox⁺ group



StAR, 类固醇生成急性调节蛋白; CYP11A1, 细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶; 3β-HSD, 3β-羟基类固醇脱氢酶; KDR, 血管内皮生长因子受体2; INHBB, 抑制素B; FSHR, 促卵泡激素受体; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

图5 qRT-PCR分析小鼠卵巢组织类固醇相关基因变化情况

Fig.5 Changes of steroid-related gene changes in ovarian tissue of mice were analyzed by qRT-PCR

而血液供应不足时, 卵泡生长则受限、闭锁, 且性类固醇生成减少^[16]。本研究通过形态学观察发现, VEGF 受到抑制会使卵泡发育障碍, 卵泡膜的增殖明显减少, 最终导致卵巢颗粒细胞的增殖和性类固醇

产生减少, 提示 VEGF 在卵泡发育中发挥重要作用, 但其具体机制尚不明确。本研究还通过高通量转录组测序技术对可逆抑制 VEGF 表达的转基因小鼠模型进行了生物信息学分析, 明确了 VEGF 在卵巢发

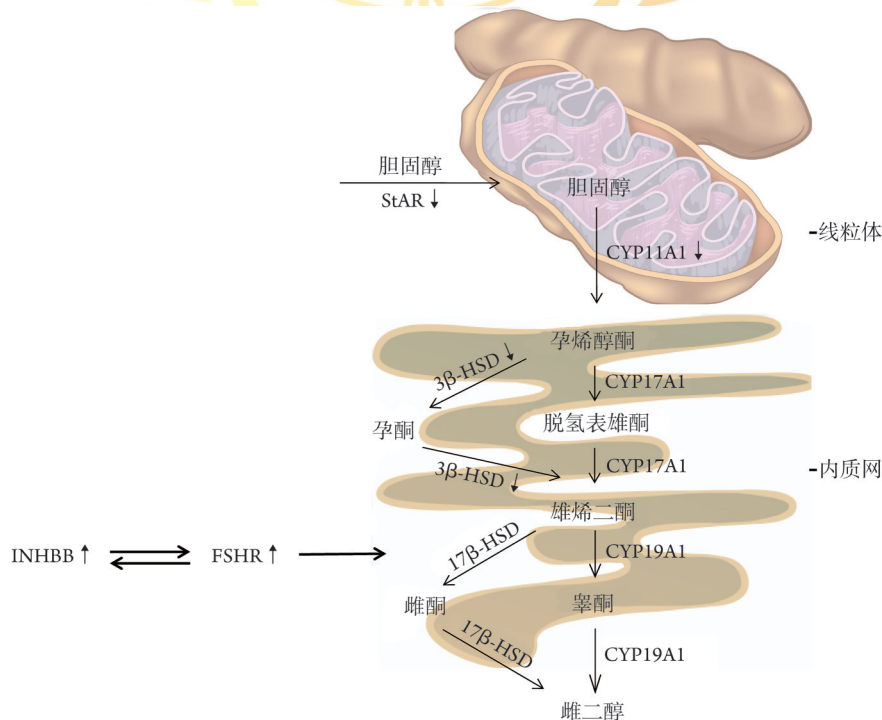
育中的调控作用, 差异基因主要富集到PPAR、卵巢类固醇生成、凝血与补体级联反应、类固醇激素生物合成等信号通路。

作为雌性哺乳动物的性腺, 卵巢的主要功能是排卵及分泌类固醇激素, 即发挥卵巢的生殖功能和内分泌功能^[17]。卵泡合成性类固醇激素的过程复杂, 需要多种酶的参与。首先, 胆固醇作为合成类固醇激素的前体物质, 可通过脂蛋白受体转运到卵泡的膜细胞中, 也可以从头合成。类固醇生成StAR将胆固醇从细胞质内化到线粒体中, 这是类固醇激素合成的初始步骤。随后, 胆固醇在CYP11A1的作用下被转化为孕烯醇酮, 后者从线粒体转运至内质网后, 分别通过3 β -HSD或17 α -羟化酶-17, 20desmolase (cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1, CYP17A1)转化为孕酮或脱氢表雄酮。最后, 孕酮和脱氢表雄酮分别通过CYP17A1或3 β -HSD转化为雄激素雄烯二酮^[18]。雄烯二酮可通过17 β -羟基类固醇脱氢酶(17 β -hydroxysteroid dehydrogenases, 17 β -HSD)或芳香酶 (cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1, CYP19A1)转化为睾酮或雌酮^[19]。睾酮和雌酮在卵巢分别通过CYP19A1或17 β -HSD转化为最有效的雌激素雌二醇(E₂)^[20], 具体过程见图6。E₂产生后即可被运输到其他靶组织发挥各种作用。有研究发现, 卵泡液中VEGF水平对卵母细胞成熟有促

进作用, 提示卵泡液中VEGF与E₂水平升高存在相关性^[21]。因此, 本研究通过高通量转录组测序技术分析初步认为, VEGF对卵巢卵泡发育的影响可能是通过下调重要的卵巢类固醇合成相关基因的表达从而阻碍胆固醇代谢来实现的。

卵巢类固醇的生成受垂体促性腺激素、FSH和促黄体生成素的调节。正常情况下, 女性生理周期中一定水平的INHBB可适时抑制FSH的分泌, 这是卵泡优势化过程的重要环节^[22]。有研究发现, 多囊卵巢综合征患者卵泡内环境发生改变, INHBB水平升高并过度抑制垂体FSH的合成与分泌, 使患者卵泡内的FSH水平降低, 从而影响性类固醇激素的生成, 使卵泡发育发生障碍, 且卵泡募集和优势卵泡形成受阻, 窦卵泡群集, 无卵泡成熟, 最终导致排卵障碍^[23]。本研究利用可逆抑制VEGF小鼠模型发现, 抑制VEGF会导致INHBB、FSHR高表达, 从而抑制小鼠卵巢中卵泡的生长发育, 且与类固醇激素的合成密切相关。以上结果提示INHBB、FSHR、StAR、CYP11A1、3 β -HSD基因可能是VEGF参与调控小鼠卵巢卵泡发育的重要基因。

卵巢产生正常水平的性类固醇激素的能力对于生殖和身体健康极其重要。低水平的性类固醇激素与多种疾病有关, 包括自身免疫性疾病、不孕症、抑郁症、骨质疏松症和心血管疾病等^[24]; 高水平的



VEGF. 血管内皮生长因子; StAR. 类固醇生成急性性调节蛋白; CYP11A1. 细胞色素P450胆固醇侧链裂解酶; 3 β -HSD. 3 β -羟基类固醇脱氢酶; KDR. 血管内皮生长因子受体2; INHBB. 抑制素B; FSHR. 卵泡刺激素受体

图6 VEGF抑制小鼠卵巢类固醇激素合成的相关机制

Fig.6 Inhibition mechanism of VEGF on ovarian steroid hormone synthesis in mice

性类固醇激素则会增加乳腺癌和结肠癌的风险^[25-26]。

综上所述,本研究初步证实 VEGF 对卵巢卵泡发育的影响可能是通过调节重要的卵巢类固醇合成相关通路,从而阻碍胆固醇代谢实现的,因此,研究 VEGF 与类固醇激素合成调节的关系对由 VEGF 引起的类固醇激素合成异常的相关疾病,尤其是生殖方面的疾病有重要意义。但本研究尚存在不足之处:转录组测序未设置生物学重复,在一定程度上削弱了数据结果的可靠性;未进一步在蛋白水平阐明 VEGF 对卵巢类固醇生成等通路的调控作用。因此,后续应针对上述不足进一步探索 VEGF 调控卵泡发育的机制,为防治此类疾病的相关药物研发提供合理的科学依据。

【参考文献】

- [1] 王淞,李海胜,钱卫,等. P311 对人微血管内皮细胞 1 体外血管形成能力的影响及其分子机制[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2022, 38(2): 119-129.
- [2] 徐欢,姚浩,雷武龙,等. 血管生成素 1 对大鼠脉络膜新生血管的治疗作用及其初步机制[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(10): 1122-1128.
- [3] Bhattacharya R, Ray Chaudhuri S, Roy SS. FGF9-induced ovarian cancer cell invasion involves VEGF-A/VEGFR2 augmentation by virtue of ETS1 upregulation and metabolic reprogramming[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(10): 8174-8189.
- [4] Damdimopoulou P, Chiang C, Flaws JA. Retinoic acid signaling in ovarian folliculogenesis and steroidogenesis[J]. Reprod Toxicol, 2019, 87: 32-41.
- [5] 张清荣,陈长友,徐娜,等. 载 P311 微球的温敏壳聚糖水凝胶对大鼠全层皮肤缺损创面愈合的影响[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2022, 38(10): 914-922.
- [6] 田悦,陈慧珊,张佩佩,等. 血管内皮生长因子在牙周组织再生中作用的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2022, 48(2): 546-552.
- [7] Ma Y, Zhou S, Lin X, et al. Effect of dietary N-carbamylglutamate on development of ovarian follicles via enhanced angiogenesis in the chicken[J]. Poult Sci, 2020, 99(1): 578-589.
- [8] Kaczmarek MM, Schams D, Ziecik AJ. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview[J]. Reprod Biol, 2005, 5(2): 111-136.
- [9] Abedal-Majed MA, Kurz SG, Springman SA, et al. Vascular endothelial growth factor A isoforms modulate follicle development in peripubertal heifers independent of diet through diverse signal transduction pathways[J]. Biol Reprod, 2020, 102(3): 680-692.
- [10] Lu X, Ji Y, Zhang L, et al. Resistance to obesity by repression of VEGF gene expression through induction of brown-like adipocyte differentiation[J]. Endocrinology, 2012, 153(7): 3123-3132.
- [11] 张婷,王超,张玉红,等. 凝血酶敏感蛋白-1 与多囊卵巢综合征血管生成的研究进展[J]. 医学综述, 2021, 27(23): 4702-4707.
- [12] Dehghan M, Shahbazi S, Salehnia M. Effect of lysophosphatidic acid on the vascular endothelial growth factor expression in autotransplanted mouse ovaries encapsulated in sodium alginate[J]. J Family Reprod Health, 2021, 15(2): 91-98.
- [13] Kuwabara Y, Ono S, Katayama A, et al. Plasma and follicular fluid osteopontin levels during ovarian cycle and their correlation with follicular fluid vascular endothelial growth factor levels[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 286.
- [14] Henríquez S, Kohen P, Xu X, et al. Significance of pro-angiogenic estrogen metabolites in normal follicular development and follicular growth arrest in polycystic ovary syndrome[J]. Hum Reprod, 2020, 35(7): 1655-1665.
- [15] Wischral A, Pastorello M, Gastal MO, et al. Hemodynamic, endocrine, and gene expression mechanisms regulating equine ovarian follicular and cellular development[J]. Mol Reprod Dev, 2022, 89(1): 23-38.
- [16] Ginther OJ, Dangudubiyam SV, Domingues RR. Follicle blood flow and FSH concentration associated with variations in characteristics of follicle selection in heifers[J]. Theriogenology, 2019, 125: 93-101.
- [17] 王喜艳,孙艳美,何海,等. 双酚 A 对腔前卵泡体外发育的干扰作用[J]. 解放军医学杂志, 2018, 43(10): 866-871.
- [18] Fürbass R, Michaelis M, Schuler G. Unhatched bovine blastocysts express all transcripts of the estrogen biosynthetic pathway, but steroid hormone synthesis could not yet be demonstrated[J]. Domest Anim Endocrinol, 2023, 82: 106770.
- [19] De Jesus AN, Henry BA. The role of oestrogen in determining sexual dimorphism in energy balance[J]. J Physiol, 2023, 601(3): 435-449.
- [20] 毛宁,王嘉福,张福平,等. 香猪卵巢 StAR 和 CYP11A1 基因的差异表达研究[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(5): 1137-1144.
- [21] Devesa J, Caicedo D. The role of growth hormone on ovarian functioning and ovarian angiogenesis[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 450.
- [22] 张博琦,李纯锦,陈璐,等. 抑制素-活化素-卵泡抑素系统在哺乳动物生殖系统中的作用机制研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(8): 131-136.
- [23] 孙怡,胡智海,马桂芝,等. 针灸治疗抗苗勒管激素相关卵泡发育障碍性疾病的研究现状分析[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(1): 324-329.
- [24] Shepherd R, Cheung AS, Pang K, et al. Sexual dimorphism in innate immunity: the role of sex hormones and epigenetics[J]. Front Immunol, 2020, 11: 604000.
- [25] Chuffa LG, Lupi-Júnior LA, Costa AB, et al. The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers[J]. Steroids, 2017, 118: 93-108.
- [26] Mahhub AA. Therapeutic strategies and potential actions of female sex steroid hormones and their receptors in colon cancer based on preclinical studies[J]. Life (Basel), 2022, 12(4): 605.

(责任编辑: 张小利)