

# 绵羊血管内皮生长因子基因 siRNA 载体在卵巢颗粒细胞中的表达

靳晓霞 罗海玲\* 许旭 闫乐艳 葛素云 刘昆 袁飞

(中国农业大学 动物科学技术学院/动物营养国家重点实验室,北京 100193)

**摘要** 为构建绵羊血管内皮生长因子(*VEGF*)基因 siRNA 载体并对其在绵羊颗粒细胞中的表达,采用 DMEM/F12 培养液对绵羊卵巢颗粒细胞进行体外培养,采用脂质体转染法将干扰载体转染到颗粒细胞中,用 ELISA 试剂盒测定转染后各组颗粒细胞中 *VEGF* 的表达量。转染阳性对照载体 PGC 的颗粒细胞组为对照组,转染 PGC-1、PGC-2 和 PGC-3 的颗粒细胞组分别为试验组 I、试验组 II 和试验组 III。与对照组相比,各试验组中 *VEGF* 的表达量分别降低了 55.37%、81.45% 和 73.29%,其中载体 PGC-2 所转染的细胞中 *VEGF* 的表达量最少,说明在 3 个载体中,PGC-2 对 *VEGF* 的基因沉默效果最好。

**关键词** 绵羊; 血管内皮生长因子; 颗粒细胞; 转染

中图分类号 S 826

文章编号 1007-4333(2011)02-0104-05

文献标志码 A

## Expression of sheep *VEGF* siRNA vector in granular cell

JIN Xiao-xia, LUO Hai-ling\*, XU Xu, YAN Le-yan, GE Su-yun, LIU Kun, YUAN Fei

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

**Abstract** The aim of this research is to explore siRNA expression plasmid vector on gene *VEGF*, and the expression of this plasmid in granular cells of ovine ovary. The granular cells of ovine ovary were cultured in vitro using DMEM/F12 (containing 10% FBS), and the four kinds of vectors constructed before were transfected into granular cells using lipofectamine 2000. The control group is granular cells transfected vector PGC, and the other three groups are granular cells transfected vectors PGC-1, PGC-2, PGC-3 respectively, named Group I, Group II and Group III. The expression of *VEGF* in fibroblast was calculated by standard curve which was drawn according to ELISA. Compared with the control, the expression of *VEGF* in treatment groups were partly lower 55.37%, 81.45% and 73.29%. The interference efficiency of PGC-2 is the best of all.

**Key words** sheep; *VEGF*; granular cell; transfection

血管内皮生长因子在某些疾病如癌症发生过程中可以增加血管通透性和促进病理性血管生成。siRNA 是长度为 20~23 个核苷酸片段,可以干扰特定基因的表达,与基因敲除和诱导变异相比,它具有高效快速稳定等优点。目前对于血管内皮生长因子(*VEGF*)基因的研究多集中于疾病学,尤其是肿瘤方面。但是越来越多的科学家发现 *VEGF* 在胚胎血管发育,卵母细胞成熟和颗粒细胞毛细血管生成方面都有不可忽视的作用。*VEGF* 在卵泡发育的过程中发挥重要作用,有研究证明<sup>[1]</sup>,小鼠卵泡中表

达 *VEGF*,从而诱导卵泡周围生成血管,促进颗粒细胞生长并刺激颗粒细胞周围膜的生成。另有研究表明<sup>[2]</sup>,在原始卵泡和初级卵泡的颗粒细胞中 *VEGF* 的表达量很少,而在次级卵泡颗粒细胞中 *VEGF* 的表达明显增强。目前国内外对反刍动物 *VEGF* 基因 siRNA 的研究报道较少。

本试验根据 NCBI 所公布的绵羊 *VEGF* 基因序列设计 3 个干扰片段,构建相应载体并将其转染入卵巢颗粒细胞,旨在为探索 *VEGF* 通过颗粒细胞对卵母细胞和胚胎作用的机制奠定基础,同时也为

收稿日期: 2010-06-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30771551)

第一作者: 靳晓霞,硕士研究生, E-mail: saiwaidereana@163.com

通讯作者: 罗海玲,教授,主要从事反刍动物营养与饲料研究, E-mail: luohailing@cau.edu.cn

探讨颗粒细胞的培养方法提供依据。

## 1 材料与方方法

### 1.1 试验试剂与材料

脂质体 lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司), G418(Geneticin Sulphate, Invitrogen 公司), 绵羊颗粒细胞, FBS、DMEM/F12、PBS(美国 hyclone 公司), ELISA 试剂盒 (R&D Systems, Human VEGF Immunoassay, 美国), 胰蛋白酶 (Amresco, 美国), DMSO(WAKO, 日本), 其余试剂为国产分析纯及 6 孔板、24 孔板、培养皿(100 mm、60 mm 和 35 mm 为 Corning(美国)产品)、凹皿、口吸管、克隆杯和凡士林。

试验用卵巢取自内蒙古呼和浩特市屠宰场屠宰的母羊体内。

DMEM/F12 培养基: DMEM 粉末 10 g, 溶于 900 mL 二蒸水中, 加入  $\text{NaHCO}_3$  3.500 g, HEPES 3.570 g, pen 0.075 g, str 0.050 g, 调节 pH 7.2~7.4, 用 0.22  $\mu\text{m}$  的一次性滤器过滤, 分装, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。取 450 mL DMEM 加入 50 mL FBS 配制成细胞培养液。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 绵羊颗粒细胞体外培养

试验用卵巢用生理盐水清洗 3 遍, 用手术剪将卵巢周围附带的脂肪和输卵管剪掉再用盐水冲洗卵巢直至盐水不再污浊。

将准备好的卵巢采用剖切法采集卵母细胞。将培养皿放置在显微镜下选取周围颗粒细胞丰富的卵母细胞, 用自制口吸管吸取, 并将其在采卵液中洗涤 3~4 次, 放入盛有适量 DMEM 培养液(含 10%(体积分数) FBS)的凹皿中, 用移液枪吹打卵母细胞使

其周围颗粒细胞脱离。用口吸管将卵母细胞吸出, 剩余液体(含有颗粒细胞)1 500 r/min, 5min 离心 3 遍转移到培养皿中在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%(体积分数, 下同。)  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度的条件下培养, 每 2 d 换液 1 次。

#### 1.2.2 绵羊颗粒细胞生长曲线的绘制

将传至第 1 代和第 5 代的绵羊颗粒细胞分别消化接种到 2 个 24 孔板中, 每孔接种  $1 \times 10^4$  个/mL, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度的条件下培养, 每 2 d 换 1 次液。每天同一时间用 0.25 mg/mL 胰蛋白酶-EDTA 消化收集 3 孔细胞, 用血细胞计数板分别对 3 个孔中的细胞计数, 每孔计数 3 次, 取平均值。以接种时间为第 1 天, 连续培养计数 8 d, 绘制绵羊卵巢颗粒细胞生长曲线。

#### 1.2.3 绵羊颗粒细胞对 G418 最佳质量浓度的筛选

将培养至第 2 代的颗粒细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔的密度接种到六孔板中, 培养 1~2 d 当细胞生长至 80% 汇合度时更换培养液, 同时在六孔板中加入 G418, 使 6 个孔中 G418 的最终质量浓度分别为 200、300、500、600、800 和 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 隔天换 1 次培养液, 每天观察细胞生长状况, 记录在不同 G418 质量浓度下培养的细胞被完全杀死所需时间, 以 7~10 d 内杀死全部细胞的最小 G418 质量浓度作为筛选时的最佳浓度。

#### 1.2.4 干扰载体的转染

干扰片段由上海吉凯基因有限公司设计合成, 分别命名为 si-1、si-2 和 si-3(表 1)。将干扰片段通过酶切连接等操作连入质粒载体中合成干扰载体, 并分别命名为 PGC-1、PGC-2 和 PGC-3, 所转染的细胞分别为试验组 I、试验组 II 和试验组 III。对照组载体为空载体, 其干扰片段命名为 PGC。

表 1 针对 VEGF 基因不同区域的干扰片段

Table 1 siRNA corresponding to different regions of VEGF

干扰片段	正义链	Loop 环	反义链
si-1	TGCAGACCAAAGAAAGATA	TTCAAGAGA	TATCTTTCTTTGGTCTGCA
si-2	GATAAAGCAAGGCAAGAAA	TTCAAGAGA	TTTCTTGCCTTGCTTTATC
si-3	ACATCACCATGCAGATTAT	TTCAAGAGA	ATAATCTGCATGGTGATGT

转染前 1 d 用胰蛋白酶-EDTA 消化第 2 代绵羊颗粒细胞并进行计数, 离心弃掉上清液, 以无抗生素的 DMEM(含 10%(体积分数) FBS)悬浮细

胞, 并以每孔  $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$  个/mL 的密度接种到 24 孔板中进行培养, 培养 1~2 d 后待细胞汇合度达到 90% 以上进行转染。根据脂质体 lipofectamine

2000的说明书进行转染,所构建载体的质量浓度和用量(表2)。

表2 载体质量浓度和用量

Table 2 Concentration and dosage of each vector

指标	载体			
	PGC	PGC-1	PGC-2	PGC-3
质量浓度/( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	400	160	333	358
用量/ $\mu\text{L}$	2.0	5.0	2.5	2.3

### 1.2.5 单克隆的挑选

转染48 h后,弃掉原有培养液,并用PBS清洗2遍,加入200  $\mu\text{L}$ 胰蛋白酶-EDTA进行消化,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育2~3 min,加入等量DMEM培养液(含10% (体积分数)FBS)终止消化,用移液枪轻轻吹打使细胞脱离培养品底部,转入100 mm培养皿继续培养,加入G418使其最终质量浓度为500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,每2 d换液1次。在倒置荧光显微镜下观察发荧光的细胞群,并在培养皿底部进行标记。待细胞汇合度达到80%,挑选单克隆进行培养,为下一步测定VEGF含量做准备。

### 1.2.6 绵羊颗粒细胞VEGF基因的表达

试验前,取绵羊颗粒细胞保存在DMEM中放于-20  $^{\circ}\text{C}$ 备用。用ELISA试剂盒测定转染后绵羊颗粒细胞中VEGF基因的表达量,根据试剂盒说明书进行试验操作,用酶标仪在450 nm的条件下,测定标准品和样品的吸光度,从而绘制VEGF标准品曲线,确定各个样品中VEGF的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 绵羊卵巢颗粒细胞生长曲线

绵羊卵巢颗粒细胞的生长趋势呈“S”形(图1)。不同代次的细胞其生长趋势基本一致,第5代细胞

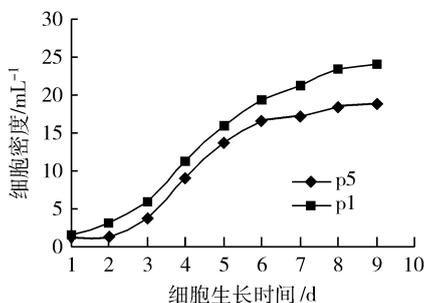


图1 绵羊卵巢颗粒细胞生长曲线

Fig. 1 Auxodrome of ovine granular cell

可能由于代次增加细胞活力下降而导致生长缓慢。第1~2天为细胞生长的恢复期,这个时期细胞基本不生长,致使细胞密度增长缓慢,在颗粒细胞生长过程中没有出现密度下降的情况。第2~5天为对数生长期,而第7天后进入平台期,细胞数量增长缓慢或是基本不生长。

### 2.2 颗粒细胞对G418敏感度监测

从图2中可以看出,随着G418质量浓度的增加,颗粒细胞死亡速度加快。在筛选过程中,G418质量浓度为800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的时候,第1天就有大量颗粒细胞死亡,只有少数存活了6 d而到第7天的时候则全部死亡。在第7~10天之间,培养在G418为500和600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 孔中细胞分别在第10天和第9天全部死亡,因此G418对于筛选具有抗性的绵羊卵巢颗粒细胞的最佳浓度是500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

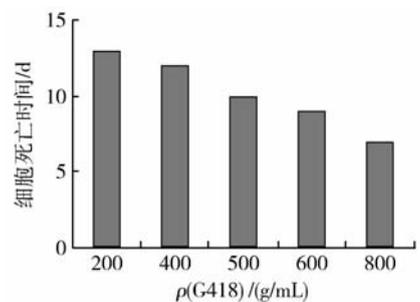


图2 绵羊卵巢颗粒细胞在G418各质量浓度下全部死亡时间

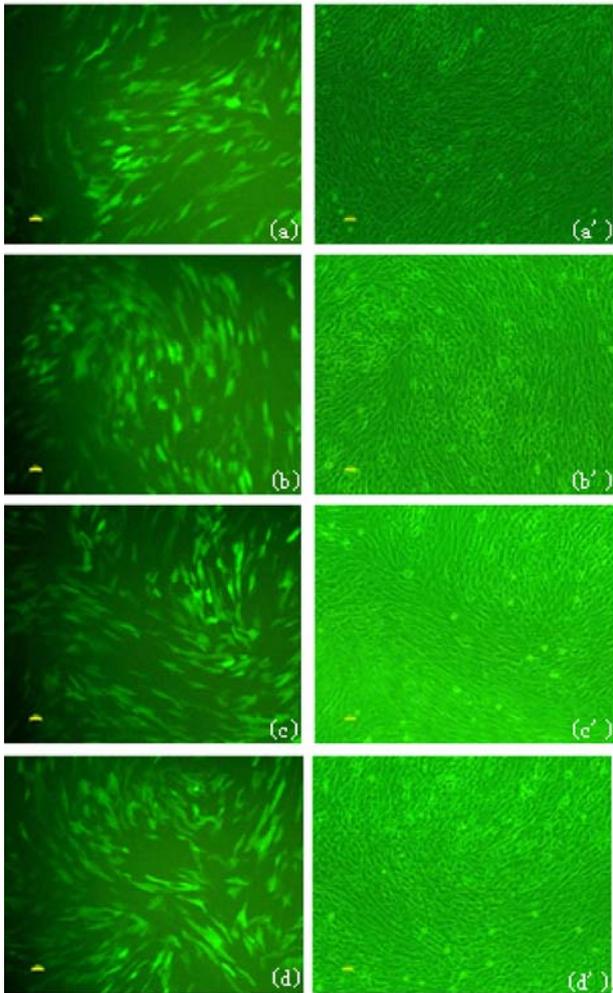
Fig. 2 Dead time of ovine granular cell with G418

### 2.3 绵羊卵巢颗粒细胞转染荧光图

颗粒细胞最初呈圆形或椭圆形,贴壁后的形态则呈多角形或是梭形。由图3可以看出细胞贴壁生长情况良好,在倒置荧光显微镜下可见发绿色荧光的颗粒细胞(图3(a)~(d)),图3(a')~(d')是在普通视野下对应的颗粒细胞。

### 2.4 绵羊卵巢颗粒细胞中VEGF含量的测定

用ELISA试剂盒测定转染后各组颗粒细胞中VEGF的表达情况,根据试剂盒所给定的标准VEGF质量浓度绘制标准曲线(图4),曲线基本呈直线趋势,说明绘制准确。各组中VEGF的表达量如表3所示,VEGF的表达量分别降低了55.37%、81.45%和73.29%,其中载体PGC-2所转染的细胞中VEGF的表达量最少,说明在3个载体中,PGC-2对VEGF的基因沉默效果最好。



(a)、(a')；(b)、(b')；(c)、(c')以及(d)、(d')分别为对照组、试验组 I、试验组 II 和试验组 III 转染后的荧光图。

图 3 干扰载体转染绵羊卵巢颗粒细胞结果(×200)

Fig. 3 RNAi vector transfection results of ovine granulosa cells(×200)

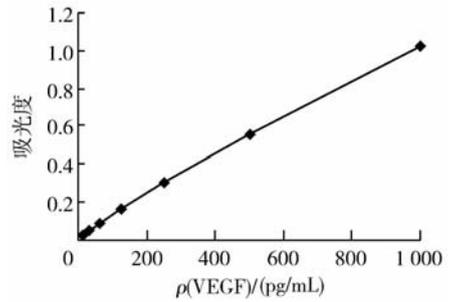


图 4 ELISA 标准曲线

Fig. 4 Standard curve of ELISA

### 3 讨论

1)卵巢颗粒细胞位于卵母细胞透明带外侧,是雌性动物生殖系统中非常重要的一种细胞,颗粒细胞的分泌和卵母细胞成熟受精等过程密切相关,又影响卵泡的生长发育以及黄体生成。卵母细胞影响颗粒细胞的功能和分化,而颗粒细胞反过来可以为卵母细胞提供特异性因子、能量和物质<sup>[3]</sup>。有研究报道<sup>[2]</sup>未成熟卵母细胞体外培养的成熟度不同,其周围颗粒细胞的凋亡率也有所差别,成熟程度越好的卵母细胞其颗粒细胞凋亡率越低。

Hunter 等<sup>[4]</sup>研究发现卵泡液中存在 VEGF 累积现象,并通过颗粒细胞直接作用于卵母细胞。Einspanier 等<sup>[5-6]</sup>发现 VEGF 在牛的颗粒细胞中有表达,并且在颗粒细胞表面检测到 VEGF 受体。尽管对 VEGF 通过颗粒细胞对卵母细胞起作用的研究已有初步了解,但是卵母细胞成熟是个极其复杂的过程,还需要对其进行进一步研究。

本试验前期研究证明 VEGF 通过颗粒细胞促进

表 3 试验各组对应载体表达量

Table 3 Expression of each vector

指 标	试验组对应载体			
	对照组(PGC)	试验组 I (PGC-1)	试验组 II (PGC-2)	试验组 III (PGC-3)
表达量/(pg/mL)	49.39	22.04	9.16	13.19

牛卵母细胞成熟<sup>[7]</sup>和胚胎体外发育<sup>[8-9]</sup>,以及羊卵母细胞体外成熟<sup>[10]</sup>和胚胎体外发育<sup>[11]</sup>,但其信号转导机制仍不清楚。曹忻等<sup>[12]</sup>研究发现 VEGF 通过促进皮质颗粒的时空迁移和重新分配来促进卵母细胞成熟过程中胞质的成熟;并且在绵羊卵母细胞和颗粒细胞中都检测到 VEGF 及其受体 mRNA 的表

达。因此需要分别抑制绵羊颗粒细胞、卵母细胞和胚胎中 VEGF 基因的表达,使 VEGF 的作用通路受到影响,从而对 VEGF 的作用途径进行更深入的研究。因为 RNA 干扰技术具有高特异性、高稳定性、高效性、精确性和可遗传性等优点,因此本试验选用此种技术来抑制 VEGF 的表达。卵母细胞体外成

熟和体外受精的过程中颗粒细胞是必不可少的,本试验选用颗粒细胞来进行有效干涉载体的筛选。

2)对于哺乳动物卵巢颗粒细胞的体外培养条件国内外都有不同报道<sup>[13-15]</sup>。Broussard等<sup>[16]</sup>采用含胰酶不含血清的 M199 做培养液;Gregoraszczy等<sup>[17]</sup>采用含有血清的 DMEM 培养液;而王琪等<sup>[18]</sup>采用无血清加胰酶的 1640 培养液;刘英华等<sup>[19]</sup>比较了 DMEM、F12 和 RPM1640 3 种培养液(加 0.1 mg/mL 胰酶和 10 % (体积分数)血清)体外培养颗粒细胞的优劣,结果得出无胰酶条件下用 DMEM 培养液颗粒细胞成活率最高。本试验培养的颗粒细胞采用含 10 mg/mL FBS 的 DMEM/F12 培养液,经观察细胞贴壁后形态呈多角形或梭形(图 3);细胞成活率高,生长状况良好(图 1),生长曲线呈“S”形。

总之,哺乳动物卵巢卵泡的颗粒细胞和卵母细胞的发育和成熟分裂,是紧密相关和相互依赖的,进一步了解颗粒细胞分裂、分化过程及其影响因素,对于研究卵泡生长发育机理与卵母细胞体外成熟具有重要意义。

## 4 结 论

本研究成功构建绵羊 *VEGF* 基因的干扰载体,并将其转染到颗粒细胞中抑制其 *VEGF* 的表达。结果显示,载体 PGC-2 为 3 个载体中干扰效率最高的载体。

## 参 考 文 献

- [1] 李庆雷,王红梅,祝诚,等. 血管内皮生长因子在妊娠及产后大鼠卵巢中的表达[J]. 中国科学 C 辑,2002,32(2):131-137
- [2] Eppig J J. Growth and development of the mammalian oocyte granulosa cell complex in culture[C]// Trounson A O, Gosden R G, eds. Biology and Pathology of the Oocyte. Cambridge: Cambridge University Press,2003:273-282
- [3] 李媛,曹义娟,姜晶晶,等. 卵母细胞发育潜能与颗粒细胞凋亡关系的初步研究[J]. 生殖医学杂志,2005,15(1):6-9
- [4] McKeeman G C, Ardill J E, Caldwell C M, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have preeclampsia develop [J]. American Journal Obstetrics Gynecology,2004,191(4):1240-1246
- [5] Einspanier R, Schonfelder M, Muller K, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor and its receptors and effects of VEGF during *in vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes(COC)[J]. Mol Reprod Dev,2002,62(1):29-36
- [6] Einspanier R, Gabler C, Bieser B, et al. Growth factors and extracellular matrix proteins in interactions of cumulus-oocyte complex, spermatozoa and oviduct [J]. Journal Reproduction and Fertility Supplement,1999,54:359-365
- [7] Luo Hailing, Kimura K, Aoki M, et al. Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on maturation, fertilization and developmental competence of bovine oocytes [J]. Veterinary Medical Science(SCI),2002(9):803-806
- [8] Luo Hailing, Kimura K, Aoki M, et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) promotes the early development of bovine embryo in the presence of cumulus cells [J]. Veterinary Medical Science,2002,11:967-971
- [9] Luo Hailing, Kimura K, Aoki M, et al. Vascular Endothelial Growth Factor has beneficial effect Independent of serum components throughout oocyte maturation and early embryonic development in cattle Asia-Australia [J]. Animal Science,2006,19(4):495-499
- [10] Cao Xin, Zhou Ping, Luo Hailing, et al. The effect of VEGF on the temporal - spatial change of (-Tubulin and cortical granule of ovine oocytes matured in vitro [J]. Ani Rep Sci, 2009,113:236-250
- [11] Luo Hailing, Cao Xin, Zhao Youzhang, et al. Effects of VEGF on the early development and the polyspermy rate of ovine embryo in different culture systems in vitro (abs) [J]. Reproduction, Fertility and Development, 2009, 21(1):204
- [12] 曹忻,罗海玲,石国庆,等. 血管内皮生长因子对绵羊卵母细胞体外受精及胚胎发育的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2008,43(4):27-31
- [13] Lovekamp T N, Davis B J. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2001,172(3):217-224
- [14] Davis B J, Maronpot R R, Heindel J J. Di (2-ethylhexyl) phthalatesup presses estradiol and ovulation in cycling rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol,1994,128(2):216-223
- [15] 张天宝. 大鼠卵巢颗粒细胞体外培养及生殖毒理研究中的应用[J]. 卫生毒理学杂志,1997,11(2):128-130
- [16] Broussard J R, Thibodeaux J K, Myers M W, et al. Effect of media substitutes on bovine granulosa cell function and proliferation during in vitro culture [J]. Journal of animal Science,1995,73(11):3287-3293
- [17] Gregoraszczy E L, Sowa M, Kajta M, et al. Effect of PCB and PCB 153 on incidence of apoptosis in cultured theca and granulosa cells collected from small, medium and lar preovulatory follicles [J]. Reproduc Toxicol,2003,17(4):465-471
- [18] 王琪,陈绍仁,何英. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )对卵巢功能的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2003(1):8
- [19] 刘英华,王静,王晓军,等. 大鼠卵巢颗粒细胞培养及分泌产物测定条件的研究[J]. 毒理学杂志,2008,5(22):384-386