

刘雅丽,荣玉静,胡深强,等. miR-199a-5p对鹅颗粒细胞凋亡的影响及其机制[J]. 江苏农业科学,2020,48(23):60-65.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.23.011

# miR-199a-5p对鹅颗粒细胞凋亡的影响及其机制

刘雅丽,荣玉静,胡深强,李亮,刘贺贺,何桦,夏露,胡继伟,胡博,王继文

(四川农业大学动物科技学院/畜禽遗传资源发掘与创新利用四川省重点实验室,四川成都611130)

**摘要:**为了揭示 miR-199a-5p 在鹅卵泡颗粒细胞凋亡中的作用及调控机制,本研究分离培养鹅等级卵泡颗粒细胞并转染 miR-199a-5p 相似物(mimic)和抑制物(inhibitor),采用 qPCR 法检测细胞凋亡相关基因的 mRNA 表达量;为进一步探究其作用机制,结合 RNAhybrid 和 Targetscan 7.0 预测 miR-199a-5p 靶基因,然后在中国仓鼠卵巢细胞系(CHO)中采用双荧光素酶报告系统检测 miR-199a-5p 对血管生成因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)3'UTR 荧光素酶活性的影响,最后采用 qPCR 检测 miR-199a-5p 对鹅颗粒细胞 VEGFA 表达量的影响。结果显示,过表达 miR-199a-5p 能显著升高 BCL2/BAX 比值( $P < 0.05$ ),显著下调 Caspase3 mRNA 表达量( $P < 0.05$ );抑制 miR-199a-5p 则显著下调 BCL2/BAX 值( $P < 0.05$ ),对 Caspase3 mRNA 表达量无影响( $P > 0.05$ )。双荧光素酶报告载体系统发现,miR-199a-5p 能极显著抑制 VEGFA-WT 报告载体荧光素酶活性( $P < 0.01$ ),但对 VEGFA mRNA 表达量无显著性影响( $P > 0.05$ )。上述试验结果表明,miR-199a-5p 可能通过抑制 BAX 和 Caspase3 表达量来抑制鹅颗粒细胞凋亡,但在鹅颗粒细胞中 miR-199a-5p 是否通过 VEGFA 调控细胞凋亡需要进一步研究。

**关键词:**miR-199a-5p;VEGFA;颗粒细胞凋亡;鹅;mimic;inhibitor

**中图分类号:**S858.33 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)23-0060-06

卵巢卵泡发育状况影响家禽繁殖性能和产蛋率,而影响卵泡正常发育的因素众多,其中颗粒细胞增殖分化或凋亡对卵泡发育具有重要作用<sup>[1]</sup>。颗粒细胞能合成多种活性肽,不仅可以调节垂体释放促卵泡素(FSH)影响卵泡发育,还能作为局部调节因子调控类固醇激素生成和细胞增殖,为卵泡生长发育所必需。禽类卵泡发育过程中大量发生闭锁,这个过程主要受颗粒细胞凋亡率调控。Johnson 等发现,鸡卵泡闭锁起始于颗粒层并受颗粒细胞凋亡过程的调节<sup>[2-3]</sup>。

miRNA 是一类长约 18~25 nt 具有调控功能的内源性非编码蛋白 RNA<sup>[4]</sup>。目前在颗粒细胞中已经发现许多 miRNA 参与调控细胞增殖凋亡。对猪健康卵泡和闭锁卵泡测序后发现,miR-26b 在闭锁卵泡中表达量显著升高,进一步研究发现其通过靶

向 ATM(共济失调突变基因)促进颗粒细胞凋亡<sup>[5]</sup>。对水牛健康卵泡、早期闭锁卵泡和晚期闭锁卵泡测序后发现,包括 miR-21-5p 在内多个 miRNA 表达量随着卵泡闭锁程度增加先升高后下降,表明 miR-21-5p 可能参与了调控颗粒细胞凋亡<sup>[6]</sup>。FSH 处理鸡颗粒细胞后能抑制细胞凋亡,对处理样品测序后发现包括 let-7 家族和 miR-130/301 家族在内的 miRNA 差异表达,表明它们可能在细胞凋亡中发挥了作用<sup>[7]</sup>。表皮生长因子(EGF)处理鹅等级前颗粒细胞后,能促进细胞增殖,miRNA 测序后发现包括 miR-26b、miR-27a、miR-27b 等多个 miRNA 表达量显著上调<sup>[8]</sup>。笔者所在课题组通过对不同发育阶段卵泡颗粒层测序得到许多差异表达的 miRNA,包括 miR-199a-5p<sup>[9]</sup>。Donadeu 等测序发现,miR-199a-5p 在牛闭锁卵泡颗粒细胞中的表达量显著高于在健康卵泡颗粒细胞中<sup>[10]</sup>。对牛发情期第 3 天次级卵泡和优势卵泡的颗粒层测序后发现,miR-199a-5p 在次级卵泡颗粒层中表达量显著高于在优势卵泡中,但在发情期第 7 天 miR-199a-5p 表达量趋势与之相反,说明 miR-199a-5p 在颗粒细胞中的作用可能与卵泡发育阶段有关<sup>[11]</sup>。目前 miR-199a-5p 在颗粒细胞中的研究只停留在测序水平,关于其在颗粒细胞中的功

收稿日期:2020-03-18

基金项目:国家现代水禽产业技术体系(编号:CARS-42-4);国家科技支撑计划(编号:2015BAD03B06);国家级大学生创新性实验计划(编号:201710626002)。

作者简介:刘雅丽(1998—),女,山西晋城人,主要从事水禽繁殖与遗传研究。E-mail:2366802552@qq.com。

通信作者:王继文,博士,教授,主要从事水禽繁殖与遗传研究。E-mail:wjw2886166@163.com。

能及作用机制尚未报道。

目前,miR-199a-5p在禽类颗粒细胞中的作用尚未有报道,而颗粒细胞的凋亡率影响卵泡正常发育,因此本试验通过在鹅颗粒细胞中转染miR-199a-5p相似物(mimic)或抑制物(inhibitor)来过表达或抑制内源性miR-199a-5p表达。qPCR法检测细胞凋亡关键基因表达量,使用生物信息学预测miR-199a-5p靶基因并通过双荧光素酶报告系统验证,最后qPCR法检测miR-199a-5p对靶基因表达量的影响。本研究结论旨在为进一步阐明miR-199a-5p在禽类颗粒细胞中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料和细胞系

本试验动物材料选用在相同条件下饲养的健康、开产时间和体质量基本一致并处于产蛋高峰期的天府肉鹅母系母鹅。试验动物来自四川农业大学禽育种场,使用程序按照四川农业大学动物护理与使用指南进行;中国仓鼠卵巢细胞系(CHO)购自中国科学院昆明动物研究所。试验于2018—2019年在四川农业大学畜禽遗传资源发掘与创新利用四川省重点实验室完成。

### 1.2 鹅颗粒细胞分离培养

将鹅颈部放血处死后取出卵泡,按照Gilbert等的方法分离F2~F4等级阶段卵泡颗粒层:在超净台中剪碎后加入0.05% II型胶原酶(美国MPbio公司),在37℃水浴锅中消化,无明显块状物后终止消化<sup>[12]</sup>。离心后弃去上清,加入含10% FBS(胎牛血清,美国Gibco公司)和1%青链霉素混合液的DMEM/F12(杜尔贝科改良伊格尔培养基,美国

HyClone公司)培养基重悬细胞,接种于12孔板,放入37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

### 1.3 颗粒细胞转染

颗粒细胞培养48 h后,按照Lipofectamine® 3000(美国英杰生命技术有限公司)说明书操作转染不同浓度的miR-199a-5p的相似物(mimic)和抑制物(inhibitor)。笔者所在课题组前期对鹅颗粒细胞miRNA进行测序,得到miR-199a-5p序列(5'-CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC-3'),根据其序列由上海吉玛制药技术有限公司设计合成miR-199a-5p的mimic和inhibitor,详见表1。每个试验组共设3个重复孔,24 h后使用RNAiso Plus[宝生物工程(大连)有限公司]收集RNA样品。

表1 miR-199a-5p相关序列

种类	序列 (5'→3')
mimic	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC ACAGGUAGUCUGAACACUGGGUU
mimic NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT ACGUGACACGUUCGGAGAATT
inhibitor	GAACAGGUAGUCUGAACACUGGG
inhibitor NC	CAGUACUUUGUGUAGUACAA

### 1.4 荧光定量PCR检测基因表达量

用RNAiso Plus提取细胞总RNA后,使用上海吉玛制药技术有限公司设计合成的miRNA&U6反转录与定量试剂盒检测miR-199a-5p的表达量。使用PrimeScript™ RT reagent Kit和SYBR® Premix Ex Taq™ II[宝生物工程(大连)有限公司]检测mRNA表达量。每个样本重复3次,miRNA和mRNA表达量计算分别以U6和β-actin为内参,本试验所用定量引物序列见表2。

表2 定量引物序列

基因	上游引物序列 (5'→3')	下游引物序列 (5'→3')
VEGFA	AGACCTGGAGCTTGCATGAC	GGTAGGACACACACGACAGG
Caspase3	CTGGTATTGAGGCAGACAGTGG	CAGCACCTACACAGAGACTGAA
BAX	GAAGCATTACAGTTGCCATTACAG	CCACAAGCAAGCAAAGAGCC
BCL2	GATGCCTTCGTGGAGTTGTATG	GCTCCCACCAAGCAACAAAC
β-actin	CAACGAGCGGTTTCAGGTGT	TGGAGTTGAAGGTGCTCTCC
miR-199a-5p	CTTGCCTATCCCAGTTCAGA	TATGGTTGTTCCAGGCTCCTTCTC
U6	ATTGGAACGATACAGAGAAGATT	GGAACGCTTCACGAATTTG

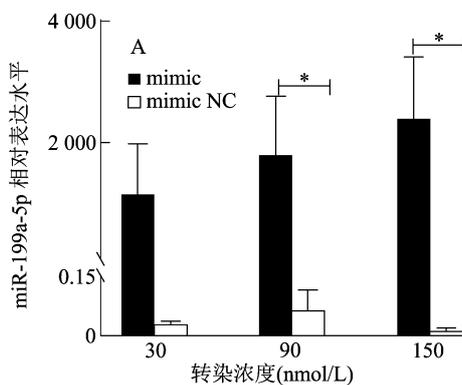
注:β-actin表示mRNA定量内参;U6表示miRNA定量内参。

### 1.5 靶基因预测与载体构建

根据靶基因预测网站 Targetscan 7.0 ([http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/)) 和 RNAHybrid (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) 预测到鹅 *VEGFA* (XM\_013200060.1) 可能是 miR-199a-5p 的靶基因,在 3'UTR 处存在潜在结合位点。根据鹅 *VEGFA* 3'UTR 设计如下引物扩增包括潜在结合位点在内的片段:F:5'-cgagctcTCAGTACGGACGA-3';R:5'-ctctagaGGCGAAGGTTGG-3',引物 5'端小写字母分别代表 *Sac* I、*Xba* I 酶切位点和保护碱基。将扩增产物胶回收后和 pmirGLO 质粒[普洛麦格(北京)生物技术有限公司]使用 *Sac* I、*Xba* I 内切酶(英国 New England Biolabs 公司)进行双酶切,再次胶回收后将扩增片段连接到 pmirGLO 质粒上得到野生型重组载体即 *VEGFA*-WT。将野生型载体的潜在结合位点突变为互补序列,得到突变型重组载体即 *VEGFA*-MUT,点突变由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

### 1.6 双荧光素酶报告载体试验

CHO 细胞系复苏后接种于培养皿中,待细胞长满后用胰酶消化,然后用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基重悬细胞,以  $1 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$  个/mL 的密度接种于 96 孔板。待细胞密度达到约 70%~80% 时,按照 Lipofectamine<sup>®</sup> 3000(美国英杰生命技术有限公司)说明书将 miR-199a-5p mimic/NC 分别与 *VEGFA*-WT/MUT 两两共转染,试验共设 4 个试验组,每组 3 孔重复值。



\*、\*\*、\*\*\* 分别表示在 0.05、0.01、0.001 水平上差异显著。下图同

图1 不同浓度 mimic 和 inhibitor 对 miR-199a-5p 表达量的影响

### 1.7 双荧光素酶活性检测

使用 Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter 试剂盒 (Promega) 检测荧光活性,检测前先将 luciferase 底物按要求溶解分装,-80℃ 备用。按试验需要量稀释  $1 \times$  裂解液,并按 stop & Glo buffer : stop & Glo 底物 = 50 : 1 的比例现配 stop & Glo 底物备用。CHO 细胞转染 24 h 后弃去培养基,PBS 清洗 1 次,加入裂解液充分裂解细胞后将其转移到小 EP 管中。检测时先加入 20  $\mu$ L 细胞裂解液和 100  $\mu$ L luciferase 底物反应并读取 A 值,继续加入 100  $\mu$ L stop & Glo 底物反应读取 B 值,A/B 比值即为最终检测结果。

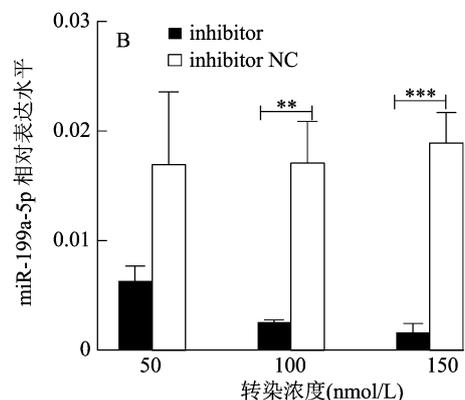
### 1.8 数据分析

使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因相对表达量<sup>[13]</sup>,使用 GraphPad Prism 7.0 软件的 *t*-test 检验分析数据并作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 miR-199a-5p 过表达和抑制效果检测

本试验中 miR-199a-5p mimic 设置 30、90、150 nmol/L 3 个转染浓度,检测 miR-199a-5p 过表达效果,结果见图 1-A。miR-199a-5p mimic 转染颗粒细胞 24 h 后,与各自对照组相比,90、150 nmol/L 浓度时 miR-199a-5p 表达量显著增加 ( $P < 0.05$ )。miR-199a-5p inhibitor 设置 50、100、150 nmol/L 3 个转染浓度,结果见图 1-B,100、150 nmol/L 时,miR-199a-5p 表达量均极显著减少 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ),因此后续试验过表达组和抑制组定量样品转染浓度均选择 150 nmol/L。



### 2.2 miR-199a-5p 对颗粒细胞凋亡关键基因表达量的影响

由图 2 可知,过表达 miR-199a-5p 后,抗凋亡

基因 *B-Cell CLL/Lymphoma 2 (BCL2)* 与促凋亡因子 *BCL2 Associated X Protein (BAX)* 的比值 (*BCL2/BAX*) 上升,促凋亡基因 *Caspase3* mRNA 表达量均下

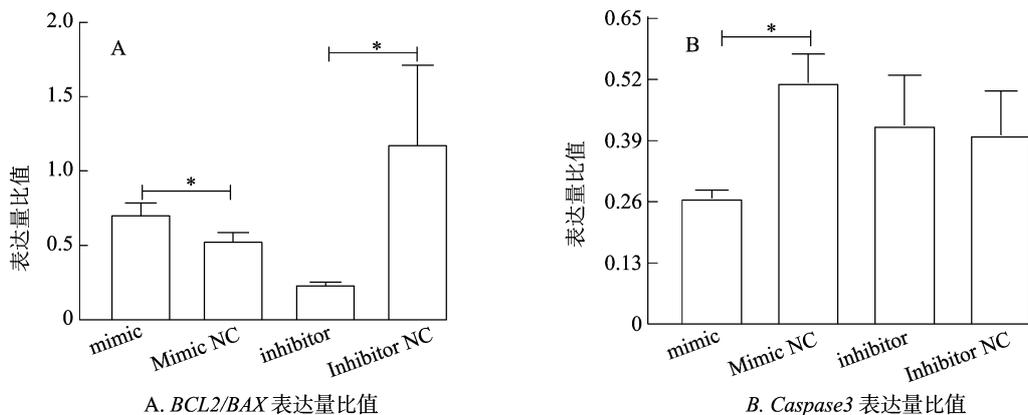


图2 过表达和抑制 miR-199a-5p 对鹅颗粒细胞凋亡相关基因的影响

降,与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。抑制 miR-199a-5p 后, *BCL2/BAX* 比值显著下降,但 *Caspase3* 表达量没有显著差异( $P > 0.05$ )。

### 2.3 miR-199a-5p 靶基因预测与载体构建

通过 Targetscan 网站预测 miR-199a-5p 靶基因,从中挑选与颗粒细胞增殖凋亡相关的基因,最

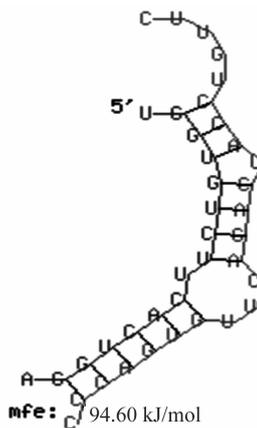
终选择 *VEGFA* 作为候选靶基因。将鹅 *VEGFA* 3' UTR 序列和鹅 miR-199a-5p 序列导入 RNAhybrid 网站中寻找二者的结合位点,结果见图 3。设计引物扩增得到 677 bp 的 *VEGFA* 3' UTR 片段,包含潜在的结合位点。最终构建得到的野生型和突变型载体序列见图 4。

**Target:** *goose-VEGFA*  
length: 663  
**MiRNA:** *miR-199a-5p*  
length: 23

mfe: -22.6 kcal/mol  
p-value: undefined

**Position:** 334

target 5'	U	U	A 3'
	GGU	GUCU	CACUGG
	CCA	CAGA	GUGACC
miRNA 3'	CUUGU	U	CUU C 5'



miR-199a-5p(长度 23 bp)的靶基因为鹅 *VEGFA*(长度 663 bp), 自由能为 94.60 kJ/mol, 假定值不确定。结合位点位于靶基因上 334 bp 的位置

图3 miR-199a-5p 与鹅 *VEGFA* 潜在结合位点预测

<i>VEGFA</i> -3'UTR 5'	UUAUUGGU - GUCUU - - CACUGGA-3'
miR-199a-5p 3'	CUUGUCCAUCAGACUUGUGACC C-5'
	种子序列

***VEGFA*-WT:** 5'-ATGTTATTGGTGTCTTCACTGGATAATACTCGACTGCTGTGGACA-3'  
***VEGFA*-MUT:** 5'-ATGTTATTGGTGTCTTGTGACCATAATACTCGACTGCTGTGGACA-3'

*VEGFA*-WT 表示 *VEGFA* 野生型, *VEGFA*-MUT 表示 *VEGFA* 突变型

图4 *VEGFA* 野生型和突变型载体序列

### 2.4 miR-199a-5p 靶基因鉴定

CHO 细胞转染 24 h 后检测荧光活性,结果见图 5。当过表达 miR-199a-5p 时,和对照组相比 *VEGFA*-WT 荧光活性被极显著抑制( $P < 0.01$ ),说明二者之间存在结合位点;过表达 miR-199a-5p 对 *VEGFA*-MUT 荧光活性没有显著变化( $P >$

0.05),说明二者不存在结合位点,即预测的结合位点正确,鹅 *VEGFA* 是 miR-199a-5p 的靶基因。进一步在鹅颗粒细胞中检测 *VEGFA* mRNA 表达量(图 6)发现,无论是过表达还是抑制 miR-199a-5p 表达, *VEGFA* mRNA 表达量均没有显著差异( $P > 0.05$ )。

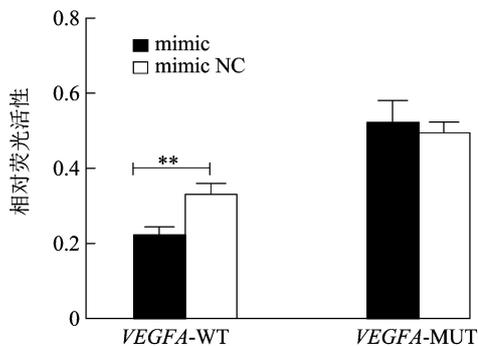


图5 双荧光素酶报告系统检测相对荧光活性

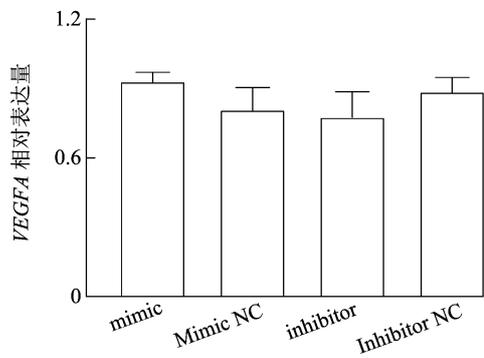


图6 过表达和抑制 miR-199a-5p 对鹅颗粒细胞 VEGFA 表达量的影响

### 3 讨论与结论

已知 *BCL2* 和 *BAX* 是通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡的,二者比值降低促进凋亡,反之则抗凋亡<sup>[14]</sup>。本研究中过表达 miR-199a-5p 后 *BCL2/BAX* 比值显著升高,而抑制后比值显著下降,促凋亡基因 *Caspase3* 表达量也在过表达 miR-199a-5p 后显著下降,说明 miR-199a-5p 在鹅颗粒细胞中可能起到抑制细胞凋亡的作用。miR-199a-5p 在颗粒细胞中的功能研究尚未有报道。Zhu 等发现 miR-199a-5p 可以诱导心肌细胞和结直肠癌细胞凋亡<sup>[15-16]</sup>。在小鼠肝细胞中刺激内质网应激发生后,抑制 miR-199a-5p 表达可以促进细胞凋亡,表明 miR-199a-5p 在肝细胞中起到抗凋亡的作用,抑制内质网应激引起的细胞凋亡<sup>[17]</sup>。此外 miR-199a-5p 还可以调控细胞增殖。在肝癌细胞中,miR-199a-5p 调节缺氧诱导因子 *I $\alpha$*  (*HIF1A*) 和 *VEGFA* 抑制细胞增殖<sup>[18]</sup>。Ye 等发现在结直肠癌细胞中,miR-199a-5p 通过 *HIF1A/VEGFA* 途径抑制细胞增殖,但不影响细胞凋亡和细胞周期<sup>[19]</sup>。

miRNAs 的经典作用方式是通过与靶基因 mRNA 3'UTR 结合抑制靶基因表达,继而发挥不同

功能。本研究使用 Targetscan 网站共预测到 621 个 miR-199a-5p 靶基因,从中筛选与颗粒细胞凋亡相关的基因,最终选择 *VEGFA* 基因作为候选基因。*VEGFA* 基因编码肝素结合蛋白,诱导血管内皮细胞的增殖和迁移,对于血管生成必不可少<sup>[20]</sup>。在小鼠颗粒细胞中慢病毒介导过表达 *VEGFA* 后,*BAX* 和 *Caspase3* 表达量显著下降,抑制颗粒细胞凋亡<sup>[21]</sup>。在绵羊颗粒细胞中直接添加 *VEGFA* 可促进细胞增殖<sup>[22-23]</sup>。卵泡发育需要血管提供氧气,因此 *VEGFA* 还影响卵泡正常发育,直接向小鼠卵巢中注射 *VEGFA* 后,可促进卵泡数量增加和血管生成<sup>[24]</sup>。Hsu 等发现上调 miR-199a-5p 可以通过靶向 *VEGFA* 的 3'UTR 抑制子宫内膜间充质干细胞增殖,验证了二者之间的靶向关系<sup>[25]</sup>。

由于 Targetscan 网站中预测靶基因与 miRNA 结合位点时不包含鹅,为了确定 miR-199a-5p 与鹅 *VEGFA* 基因潜在的结合位点,使用 RNAHybrid 网站导入鹅 *VEGFA* 3'UTR 与 miR-199a-5p 序列,预测二者可能的结合位点并构建野生型和突变型载体。本研究发现过表达 miR-199a-5p 后,*VEGFA*-WT 报告载体荧光素酶活性显著下降,说明 *VEGFA* 是 miR-199a-5p 的靶基因。当突变二者的潜在结合位点后过表达 miR-199a-5p 对 *VEGFA*-MUT 报告载体荧光素酶活性无影响,证明预测的结合位点正确。本研究进一步检测 miR-199a-5p 对 *VEGFA* 表达量的影响时发现,无论是过表达还是抑制 miR-199a-5p 表达,都不影响颗粒细胞中 *VEGFA* mRNA 的表达量,表明 miR-199a-5p 是在翻译水平调控 *VEGFA* 蛋白表达。在人子宫内质膜基细胞中,miR-199a-5p 通过与 *VEGFA* 3'UTR 结合抑制其蛋白表达量,但不影响 mRNA 表达量<sup>[26]</sup>。

miRNA 靶基因众多,在不同发育阶段或组织细胞中起主要作用的靶基因可能存在差异,而单个靶基因又会同时受到多个 miRNA 调控,共同构成复杂的调控网络<sup>[27-28]</sup>。目前众多研究表明,*VEGFA* 在颗粒细胞中行使促进细胞增殖和抗凋亡的作用,而本研究发现 miR-199a-5p 在鹅颗粒细胞中可能发挥抑制细胞凋亡的作用,因此推测 miR-199a-5p 在鹅颗粒细胞中抗凋亡功能可能不是通过靶基因 *VEGFA* 实现的,或者说 *VEGFA* 在此过程中作用很小,不是主要靶基因,仍需要进一步试验探究。

本研究发现 miR-199a-5p 可能抑制鹅颗粒细胞凋亡,并通过双荧光素酶报告系统验证了

*VEGFA* 是 miR - 199a - 5p 的靶基因,但是 miR - 199a - 5p 抑制鹅颗粒细胞凋亡的功能是否通过 *VEGFA* 通路实现需要进一步研究。本研究初步探讨 miR - 199a - 5p 在禽类颗粒细胞中的功能及可能机制,为深入探究 miRNA 在禽类卵巢颗粒细胞中的功能提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Matsuda F, Inoue N, Manabe N, et al. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries; regulation by survival and death of granulosa cells [J]. *The Journal of Reproduction and Development*, 2012, 58(1): 44 - 50.
- [2] Johnson A L, Bridgham J T, Witty J P, et al. Expression of *bel - 2* and *nr - 13* in hen ovarian follicles during development [J]. *Biology of Reproduction*, 1997, 57(5): 1096 - 1103.
- [3] Manabe N, Matsuda - Minehata F, Goto Y, et al. Role of cell death ligand and receptor system on regulation of follicular atresia in pig ovaries [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008, 43 (S2): 268 - 272.
- [4] Vrijens K B V, Nawrot T S. MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: a systematic review [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2015, 123(5): 399 - 411.
- [5] Lin F, Li R, Pan Z X, et al. miR - 26b promotes granulosa cell apoptosis by targeting ATM during follicular atresia in porcine ovary [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38640.
- [6] 李 润. 水牛颗粒细胞凋亡相关基因和 miRNA 表达及雌二醇对其表达调控的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2014.
- [7] 侯英萍. FSH 处理对鸡卵泡颗粒细胞凋亡的影响及差异表达 miRNAs 的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [8] 黄正洋. 表皮生长因子参与鹅卵泡颗粒细胞增殖调控机理的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2016.
- [9] Li Q, Hu S Q, Wang Y S, et al. mRNA and miRNA transcriptome profiling of granulosa and theca layers from geese ovarian follicles reveals the crucial pathways and interaction networks for regulation of follicle selection [J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 988.
- [10] Donadeu F X, Mohammed B T, Ioannidis J. A miRNA target network putatively involved in follicular atresia [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2017, 58: 76 - 83.
- [11] Salilew - Wondim D, Ahmad I, Gebremedhn S, et al. The expression pattern of microRNAs in granulosa cells of subordinate and dominant follicles during the early luteal phase of the bovine estrous cycle [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106795.
- [12] Gilbert A B, Evans A J, Perry M M, et al. A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) [J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1977, 50(1): 179 - 181.
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 - 408.
- [14] Renault T T, Dejean L M, Manon S. A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl - xL and Bcl - 2 [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2017, 161: 201 - 210.
- [15] Zhu Q D, Zhou Q Q, Dong L, et al. MiR - 199a - 5p inhibits the growth and metastasis of colorectal cancer cells by targeting ROCK1 [J]. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2018, 17: 1 - 10.
- [16] Yan M J, Yang S B, Meng F B, et al. MicroRNA 199a - 5p induces apoptosis by targeting JunB [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1 - 10.
- [17] Dai B H, Geng L, Wang Y, et al. microRNA - 199a - 5p protects hepatocytes from bile acid - induced sustained endoplasmic reticulum stress [J]. *Cell Death & Disease*, 2013, 4(4): e604.
- [18] Morita K, Shirabe K, Taketomi A, et al. Relevance of microRNA - 18a and microRNA - 199a - 5p to hepatocellular carcinoma recurrence after living donor liver transplantation [J]. *Liver Transplantation*, 2016, 22(5): 665 - 676.
- [19] Ye H, Pang L P, Wu Q, et al. A critical role of mir - 199a in the cell biological behaviors of colorectal cancer [J]. *Diagnostic Pathology*, 2015, 10: 65.
- [20] Nichols J A, Perego M C, Schütz L F, et al. Hormonal regulation of vascular endothelial growth factor A (*VEGFA*) gene expression in granulosa and theca cells of cattle [J]. *Journal of Animal Science*, 2019, 97(7): 3034 - 3045.
- [21] 秦 岭. 慢病毒载体介导小鼠卵巢颗粒细胞内特异性超表达 *VEGF* 基因的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 65 - 71.
- [22] 杨永梅. *VEGF* 对绵羊卵泡颗粒细胞增殖作用机制的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2011: 31 - 33.
- [23] 曹颖楠, 刘松财, 郝林琳, 等. ERK1/2 通路在 *VEGF* 促进绵羊卵泡颗粒细胞增殖中的作用 [J]. *中国兽医学报*, 2012, 32(10): 1532 - 1535, 1559.
- [24] Quintana R, Kopcow L, Sueldo C, et al. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development [J]. *Fertility and Sterility*, 2004, 82 (S3): 1101 - 1105.
- [25] Hsu C Y, Hsieh T H, Tsai C F, et al. miRNA - 199a - 5p regulates *VEGFA* in endometrial mesenchymal stem cells and contributes to the pathogenesis of endometriosis [J]. *The Journal of Pathology*, 2014, 232(3): 330 - 343.
- [26] Dai L, Lou W H, Zhu J, et al. MiR - 199a inhibits the angiogenic potential of endometrial stromal cells under hypoxia by targeting *HIF - 1 $\alpha$ /VEGF* pathway [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 8(5): 4735 - 4744.
- [27] Huang J C, Babak T, Corson T W, et al. Using expression profiling data to identify human microRNA targets [J]. *Nature Methods*, 2007, 4(12): 1045 - 1049.
- [28] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215 - 233.