

(gen *OVGP1*) và alen T (gen *LIF*) cần được duy trì và phát triển để nâng cao khả năng sinh sản trên 2 giống này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agarwal A., Yeung W.S. and Lee K.F. (2002). Cloning and characterization of the human oviduct-specific glycoprotein (*HuOGP*) gene promoter. *Mol. Hum. Rep.*, 8: 167-75.
2. Bhatt P., Kadam K., Saxena A. and Natraj U. (2004). Fertilization, embryonic development and oviductal environment: role of estrogen induced oviductal glycoprotein. *Indian. J. Exp Biol.*, 42: 1043-55.
3. Đặng Hoàng Biên (2016). Khả năng sản xuất và đa hình gen *PRKAG3* của lợn Lũng Pù và lợn Bản. Luận án Tiến sỹ Nông Nghiệp. Viện Chăn nuôi. Bộ NN&PTNT.
4. Ding Y., Ding C., Wu X., Wu C., Qian L., Li D., Zhang W., Wang Y., Yang M., Wang L., Ding J., Zhang X., Gao Y. and Yin Z. (2020). Porcine *LIF* gene polymorphisms and their association with litter size traits in four pig breeds. *Can. J. Anim. Sci.*, 100: 85-92.
5. Đỗ Võ Anh Khoa (2012). Ảnh hưởng của gen *MYOG* và *LIF* lên một số tính trạng kinh tế ở lợn. Tạp chí KHPT, 10(4): 620-26.
6. Đỗ Võ Anh Khoa và Nguyễn Thị Diệu Thúy (2012). Tương quan giữa đa hình di truyền gen Myogenin và gen mã hóa yếu tố ức chế ung thư máu (Leukemia inhibitory factor) với các đặc tính sinh lý-hóa máu lợn. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 28: 77-86.
7. Tạ Thị Loan, Nguyễn Thị Diệu Thúy, Nguyễn Giang Sơn và Đỗ Võ Anh Khoa (2011). Đa dạng di truyền nguồn gen giống lợn ngoại nuôi tại Việt Nam. Tuyển tập BC tại Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 4. Trang 697-03.
8. Lin H.C., G.F. Liu, A.G. Wang, L.J. Kong, X.F. Wang and J.L. Fu (2009). Effect of polymorphism in the leukemia inhibitory factor gene on litter size in Large White pigs. 36(7): 1833-38. doi: 10.1007/s11033-008-9387-0.
9. Merchan M., Rendon M. and Folch J.M. (2006). Assignment of the oviductal glycoprotein 1 gene (*OVGP1*) to porcine chromosome 4q22a23 by radiation hybrid panel mapping. *Cytogenet. Genome Res.*, 114(1): 93C.
10. Mucha A., Ropka-Molik K., Piórkowska K., Tyra M. and Oczkiewicz M. (2013). Effect of *EGF*, *AREG* and *LIF* genes polymorphisms on reproductive traits in pigs. *Anim. Rep. Sci.*, 137: 88-92.
11. Napierała D., Kawęcka M., Jacyno E., Matysiak B. and Wierzchowska A. (2014). *Short communication*: Effect of polymorphism in the *LIF* gene on reproductive performance of hybrid Polish LW and Polish Landrace sows. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 44(1): 49-53.
12. Niu B.Y., Y.Z. Xiong, F.E. Li, S.W. Jiang, C.Y. Deng, S.H. Ding, W.H. Guo, M.G. Lei; R. Zheng, B. Zuo, D.Q. Xu and J.L. Li (2006). Oviduct-specific Glycoprotein 1 locus is associated with litter size and weight of ovaries in pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 19(5): 632-37.
13. Nourseeda W., Liu G., Teltathum T., Srirangam K., Naraballoh W., Khamlor T. and Mekchay S. (2021). Effect of leukemia inhibitory factor polymorphism on litter size traits in Thai commercial pig breeds. *Vet. Integr. Sci.*, 19(2): 185-96.
14. Onteru S.K., Fan B., Nikkilä M.T., Garrick D.J., Stalder K.J. and Rothschild M.F. (2011). Whole-genome association analyses for lifetime reproductive traits in the pig. *J. Anim. Sci.*, 89(4): 988-95.
15. Ropka-Molik K., Oczkiewicz M., Mucha A., Piórkowska K. and Piestrzyńskakajtoch A. (2012). Variability of mRNA abundance of leukemia inhibitory factor gene (*LIF*) in porcine ovary, oviduct and uterus tissues. *Mol. Biol. Rep.*, 39(8): 7965-72.
16. Schneider J.F., Rempel L.A., Snelling W.M., Wiedmann R.T., Nonneman D.J. and Rohrer G.A. (2012). Genome-wide association study of swine farrowing traits. Part II: Bayesian analysis of marker data. *J. Anim. Sci.*, 90(10): 3360-67.
17. Spötter A., Drögemüller C., Hamann H. and Distl O. (2005). Evidence of a new leukemia inhibitory factor-associated genetic marker for litter size in a synthetic pig line. *J. Anim. Sci.*, 83: 2264-70.
18. Spötter A., Muller S., Hamann H. and Distl O. (2009). Effect of polymorphisms in the genes for *LIF* and *RBP4* on litter size in two German pig lines. *Rep. Dom. Anim.*, 44: 100-105.
19. Zhang Z.B., Lei M.G., Deng C.Y., Xiong Y.Z.H., Zuo B. and Li G.E. (2005). Lipoprotein lipase gene and productiv traits in pig resource family. *Asian-Austra. J. Anim. Sci.*, 18: 458-62.

BIỂU HIỆN GEN *VEGF-R1* TRÊN MẪU MÔ BUỒNG TRỨNG VÀ PHỨC HỢP CUMULUS-TẾ BÀO TRỨNG HEO Ở CÁC GIAI ĐOẠN PHÁT TRIỂN KHÁC NHAU

Nguyễn Ngọc Tấn^{1*}, Phan Hữu Hương Trinh¹, Lê Thị Thanh¹, Trâm Minh Thành¹ và Lê Tấn Lợi¹

Ngày nhận bài báo: 10/07/2021 - Ngày nhận bài phản biện: 10/08/2021

Ngày bài báo được chấp nhận đăng: 20/08/2021

¹ Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

* Tác giả liên hệ: TS. Nguyễn Ngọc Tấn, Giảng viên chính Khoa Khoa học Sinh học-Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh; Điện thoại: 0948 993 338; Email: nntan@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm đánh giá sự biểu hiện gen *VEGF-R1* (gen thụ thể VEGF-Vascular Endothelial Growth factor receptor 1) trên mẫu mô buồng trứng, phức hợp cumulus-tế bào trứng (cumulus oocyte complexes-COC) theo giai đoạn phát triển của nang noãn và quá trình nuôi thành thực thể bào trứng heo *in vitro*. Mẫu mô thu nhận chứa nang noãn nhỏ (<3mm), trung bình (3-7mm) và lớn (>7mm), hoặc phức hợp COC theo thời điểm: 0, 22 và 44 giờ sau nuôi cấy. Ly trích RNA và áp dụng kỹ thuật one-step RT-PCR để khuếch đại đoạn gen mục tiêu của *VEGF-R1* với kích thước 180bp, sử dụng GAPDH với kích thước 187bp như là đối chứng nội. Sử dụng kỹ thuật bán định lượng mức độ biểu hiện bằng phần mềm ImageJ để xác định điểm ảnh cho băng biểu hiện mRNA của gen *VEGF-R1* và GAPDH trên ảnh điện di. Kết quả cho thấy sự biểu hiện *VEGF-R1* ở mức mRNA thấp trong mẫu mô thu từ nang noãn nhỏ và vừa ($0,81\pm 0,06$ và $0,82\pm 0,05$), cao dần ở mẫu mô thu từ nang noãn lớn ($0,95\pm 0,04$) và cao nhất ở mẫu mô thu từ hoàng thể ($1,14\pm 0,12$), khác biệt có ý nghĩa ($P<0,05$). Đối với phức hợp COC theo giai đoạn nuôi cấy, kết quả cho thấy sự biểu hiện mRNA của *VEGF-R1* thấp ở 0h ($0,65\pm 0,06$), kể đến là 22h nuôi cấy ($0,82\pm 0,05$) và cao nhất ở 44h nuôi cấy ($1,05\pm 0,06$). Sự biểu hiện có khác biệt ý nghĩa ở 0h so với hai thời điểm còn lại. Biểu hiện gen *VEGF-R1* có liên quan đến quá trình thành thực thể bào trứng và có thể được xem là cơ sở để sử dụng protein VEGF nhằm cải thiện hiệu quả nuôi cấy tế bào trứng *in vitro*.

Từ khóa: Heo, tế bào trứng, phức hợp tế bào trứng-cumulus, thụ thể VEGF.

ABSTRACT

Expression of *VEGF-R1* in porcine ovary tissue and cumulus oocyte complexes at different stages of development

The objectives of this study were to evaluate the expression of *VEGF-R1* gene in ovarian tissue, cumulus oocyte complexes-COC according to the developmental stages of follicles and during the maturation process of porcine oocyte *in vitro*. Samples were collected from ovarian tissue contained small follicles (SF, <3mm in diameter), medium follicles (MF, 3-7mm) and large follicles (LF, >7mm) or COCs at 0, 22 and 44h post maturation culture. Extracted RNA was used to amplify the fragment product of *VEGF-R1* with 180bp by one-step RT-PCR, GAPDH gene with 187bp that using as internal control, was also amplified as parallel with *VEGF-R1*. Semi-quantitative of mRNA expression level was applied to measure the relative density of target gene bands in agarose (1.5%) by ImageJ software. The result showed that the expression of *VEGF-R1* at mRNA was low at the tissue sampled derived from small and medium follicles (0.81 ± 0.06 and 0.82 ± 0.05), then higher in large follicles (0.95 ± 0.04) and highest in CL (corpus luteum) stage (1.14 ± 0.12 , $P<0.05$). In term of maturation process, the expression of *VEGF-R1* at mRNA was lowest at 0h (0.65 ± 0.06 , $P<0.05$), higher at 22h (0.82 ± 0.05) and then reached to highest level at 44h (1.05 ± 0.06) post culture. In conclusion, expression of *VEGF-R1* gene is in relation to oocyte maturation manner and VEGF protein can be considered as candidate growth factor for improvement of porcine oocyte maturation, at least in part of *in vitro*.

Keywords: Pig, oocyte, cumulus oocyte complexes, VEGF receptor.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nuôi thành thực thể bào trứng là bước đầu tiên và cũng là mắt xích quyết định cho sự thành công của kỹ thuật sản xuất phôi *in vitro*, nhiều nghiên cứu đã nỗ lực cải thiện điều kiện IVM bằng cách tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng, kể cả sử dụng yếu tố tăng trưởng hoặc cytokine hay vitamin đến thành thực thể bào trứng và sự

phát triển phôi sau đó (Gilchrist và Thampson, 2007; Nguyen và ctv, 2010; Kere và ctv, 2012; Kwak và ctv, 2012). Protein VEGF (Vascular Epithelial Growth Factor) là yếu tố tăng trưởng nội mao mạch được quan tâm nghiên cứu nhiều trong thời gian qua. VEGF là yếu tố điều hòa phát triển mạch máu trong giai đoạn phôi thai và hình thành mạch máu ở người trưởng

thành (Olsson và ctv, 2006). Theo Ferrara (2001), nhóm protein VEGF bám vào ba loại thụ thể Flt-1 (*VEGFR-1*), KDR/Flk-1 (*VEGFR-2*) và Flt-4 (*VEGFR-3*). Thụ thể *VEGFR-1* tiếp nhận protein VEGFA, VEGFB, PLGF1 và PLGF2 để tuyển dụng, di chuyển tế bào tiền thân nội mô và bạch cầu đơn nhân. *VEGFR-2* là thụ thể cho VEGFA, VEGFC, VEGFD và VEGFE, các protein này tham gia vào điều hòa tăng sinh tế bào, tính thấm, khả năng sống và di chuyển của tế bào nội mô. Trong khi đó, *VEGF-R3* có liên quan đến hình thành mạch máu ở các khối u (Nilsson và Heymach, 2006). Đối với sinh sản, mất một allele của gen VEGF hoặc thụ thể sẽ gây nên chết phôi ở loài gặm nhấm (Ferrara và ctv, 1996). VEGFA và thụ thể của nó cũng điều hòa sự sống và biệt hóa tế bào tinh trùng (Nalbandian và ctv, 2003). VEGF và thụ thể của nó phát hiện ở nhau thai, ở tử cung của heo không mang thai (Winther và ctv, 1999), trong quá trình phát triển nang noãn ở chuột (Abramovich và ctv, 2009). Sử dụng yếu tố đối kháng VEGF gây nên sự chết lập trình tế bào, thoái hóa nang noãn ở chuột (Abramovich và ctv, 2006). VEGF được cho thấy có tham gia vào sự phát triển nang noãn ở linh trưởng (Zimmermann và ctv, 2001; Shimizu, 2006; Trousdale và ctv, 2007), kích thích sự tăng sinh và kìm chế việc gây chết tế bào nang noãn ở bò (Einspanier và ctv., 2002; Greenaway và ctv, 2004; Doyle và ctv, 2010), cừu (Gao và ctv, 2010; Yan và ctv., 2012) và chuột (Irusta và ctv, 2010). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm hiểu rõ hơn sự biểu hiện gen thụ thể *VEGF-R1* ở mức độ mRNA trong mẫu mô buồng trứng và phức hợp cumulus-oocyte (COC) ở heo theo giai đoạn phát triển của nang noãn, theo giai đoạn nuôi cấy thành thực phức hợp tế bào trứng heo để làm cơ sở cho các nghiên cứu liên quan đến sử dụng yếu tố tăng trưởng VEGF nhằm nâng cao hiệu quả hệ thống nuôi cấy tế bào trứng và phôi.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, địa điểm và thời gian

Thu nhận buồng trứng của heo cái khoảng 5-6 tháng tuổi, khối lượng 80-100kg, từ lò mổ

địa phương (Dĩ An – Bình Dương). Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này được nhập từ công ty Sigma – Alrich (Hoa Kỳ), ngoại trừ những hóa chất đặc biệt sẽ được chỉ ra trong bài viết.

Nghiên cứu được tiến hành tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Phôi Động vật, Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học-Môi trường và Khoa Khoa học sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, từ tháng 04/2020 đến tháng 6/2021.

2.2. Phương pháp và nội dung

2.2.1. Phương pháp thu nhận buồng trứng và tế bào trứng

Việc thu nhận buồng trứng và tách tế bào trứng được thực hiện theo quy trình của Nguyễn Ngọc Tấn và ctv (2019).

2.2.2. Nuôi cấy thành thực tế bào trứng (IVM)

Sau khi tách tế bào trứng từ các nang noãn có kích thước trung bình (3-7mm), các phức hợp COC có ≥ 2 lớp tế bào cumulus, đồng đều tế bào chất được lựa chọn đưa vào nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy thành thực tế bào trứng là TCM 199 (chứa Earl's salts, L-glutamine và Sodium bicarbonate) bổ sung 10% dịch nang noãn, 0,8% BSA (Bovine Serum Albumin), 100 UI/ml Penicillin G sodium salt và 100 UI/ml Streptomycin sulfate salt trong 44h ở điều kiện 39°C, 5% CO₂. Bổ sung 10 UI/ml hCG (human Chorionic Gonadotropin) cho môi trường nuôi cấy trong 22h đầu và không bổ sung hormone cho môi trường nuôi cấy trong 22h sau (Nguyễn Ngọc Tấn và ctv, 2019).

2.2.3. Phương pháp thu nhận mẫu để ly trích RNA, khuếch đại đoạn gen VEGF-R1

Mẫu mô chứa nang noãn có kích thước khác nhau (A) được thu nhận (B), nghiền (C) trước khi đưa vào ly trích (Hình 1) và COC thu nhận theo giai đoạn nuôi cấy khác nhau: 0, 22 và 44h (Hình 2) được đưa vào ly trích RNA. Sử dụng kỹ thuật one-step RT-PCR để khuếch đại đoạn gen mục tiêu của *VEGF-R1* với kích thước 180bp, sử dụng GAPDH với kích thước 187bp như là đối chứng nội. Thực hiện phản ứng RT-PCR bằng bộ kit MyTaq One-

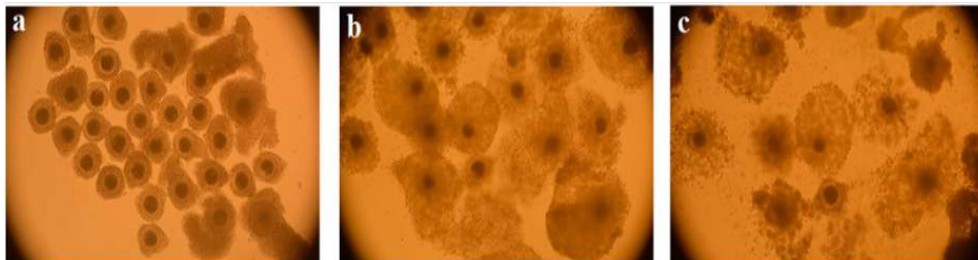
Step RT-PCR (Bioline) trong một phản ứng gồm 2 giai đoạn: phản ứng phiên mã ngược tổng hợp đoạn cDNA; phản ứng PCR, tổng hợp ADN từ đoạn cDNA trên. Trình tự mỗi được sử dụng: *VEGF-R1* (AJ245445) với mỗi xuôi 5'-CACCCCGGAAATCTATCAGATC-3' và mỗi ngược

5'-GAGTACGTGAAGCCGCTGTTG-3' (Chrusciel và ctv, 2011), GAPDH (AF017079) với mỗi xuôi 5'-AGCAATGCCTCCTGTACCAC-3' mỗi ngược 5'-AAGCAGGGATGATGTTCTGG-3'. Điện di sản phẩm PCR bằng gel agarose 1,5% (Bioline).



Hình 1. Thu nhận và xử lý mẫu mô chuẩn bị cho ly trích RNA

Buồng trứng ở các giai đoạn khác nhau (A), cắt nhỏ mẫu mô buồng trứng (B), nghiền mẫu mô buồng trứng (C)



Hình 2. Phức hợp COCs thu được tại các thời điểm nuôi cấy

a) 0h, b) 22h và c) 44h sau nuôi cấy. Độ phóng đại 150 lần

2.2.4. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1. Đánh giá sự biểu hiện gen *VEGF-R1* ở mẫu mô buồng trứng chứa nang noãn có kích thước khác nhau của buồng trứng heo. Mẫu mô được thu nhận từ nang noãn có kích thước khác nhau: nhỏ (<3mm), trung bình (3-7mm) và lớn (>7mm). Đánh giá mức độ biểu hiện của gen *VEGF-R1* ở mức độ mRNA.

Nội dung 2. Đánh giá sự biểu hiện gen *VEGF-R1* ở COC theo thời điểm nuôi cấy *in vitro*. Phức hợp COC thu từ nang noãn có kích thước trung bình (3-7mm) có từ 2 lớp CC trở lên được lựa chọn và nuôi cấy thành thực *in vitro*, sử dụng để đánh giá mức độ biểu hiện của gen thụ thể *VEGF-R1* ở mức độ mRNA theo thời điểm: 0, 22 và 44h sau nuôi cấy.

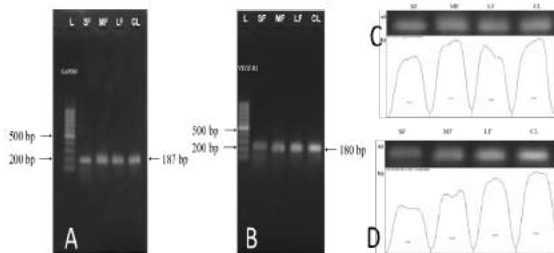
2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê mô tả và ANOVA một yếu tố bằng phần mềm MINITAB, số liệu được trình bày dưới dạng Mean±SEM với ít nhất 3 lần lặp lại. Giá trị điểm ảnh thu được từ gen mục tiêu sau khi phân tích bằng phần mềm imageJ được chuẩn hóa tương ứng qua giá trị của gen GAPDH ở từng lần lặp lại trước khi đưa vào ANOVA.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá sự biểu hiện của gen *VEGF-R1* ở mẫu mô buồng trứng chứa các nang noãn khác nhau của buồng trứng heo

Thực hiện phản ứng RT-PCR khuếch đại đoạn gen mục tiêu GAPDH và *VEGF-R1*, phân tích điểm ảnh sau điện di được với trình bày ở Hình 3 cho thấy biểu hiện rõ đoạn gen GAPDH với kích thước khoảng 187bp, gen *VEGF-R1* với kích thước 180bp trên tất cả các mẫu mô thu nhận từ các kích thước nang noãn khác nhau. Từ dữ liệu phân tích điểm ảnh (Hình 3C và 3D), các số liệu về phân bố điểm ảnh của gen thụ thể *VEGF-R1* được chia cho số liệu điểm ảnh của gen GAPDH theo từng giai đoạn tương ứng.

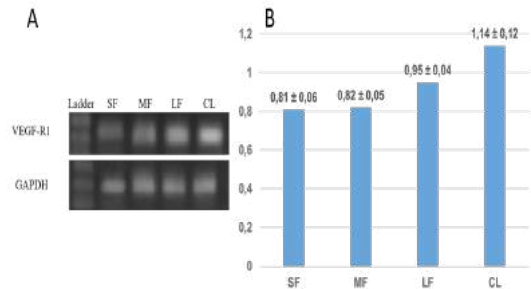


Hình 3. Hình ảnh đại diện sản phẩm PCR: GAPDH (A), *VEGF-R1* (B), phân tích điểm ảnh cho band điện di gen GAPDH (C) và *VEGF-R1* (D) bằng phần mềm ImageJ

(a: hình ảnh chuyển đổi khi sử dụng phần mềm của bảng điện di, b: đồ thị biểu diễn mức độ phân bố điểm ảnh). L: thang đo 100bp. SF: mẫu mô buồng trứng chứa nang noãn nhỏ (<3mm). MF: mẫu mô buồng trứng chứa nang noãn trung bình (3-7mm). LF: mẫu mô buồng trứng chứa nang noãn lớn (>7mm). CL: mẫu mô chứa hoàng thể

Mức độ biểu hiện của gen thụ thể *VEGF-R1* qua từng loại mẫu mô buồng trứng được trình bày ở Hình 4 cho thấy mẫu mô thu từ nang noãn có kích thước nhỏ (<3mm) có mức biểu hiện gen thụ thể *VEGF-R1* thấp ($0,81 \pm 0,06$), kể đến mẫu mô thu từ nang noãn có kích thước trung bình ($0,82 \pm 0,05$) và có xu hướng tăng dần ở mẫu mô chứa nang noãn lớn ($0,95 \pm 0,04$) và cao nhất ở mẫu mô chứa hoàng thể ($1,14 \pm 0,12$; $P < 0,05$). Winther và ctv (1999) cho thấy có sự biểu hiện protein VEGF và thụ thể của nó ở nhau thai hay tử cung của heo không mang thai. Kaczmarek và ctv (2009) chứng minh sự biểu hiện của protein VEGF và thụ thể *VEGF-R1* ở mức mRNA ở nội mạc

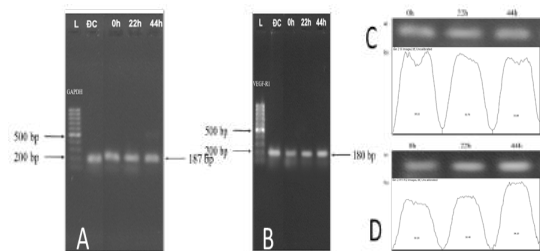
tử cung và hoàng thể trên buồng trứng heo có liên quan đến sự phát triển của phôi tiền làm tổ và duy trì chức năng hoàng thể.



Hình 4. Hình ảnh đại diện sự biểu hiện gen *VEGF-R1* và GAPDH (A) và đồ thị biểu diễn mức độ biểu hiện của gen *VEGF-R1* từ mẫu mô buồng trứng heo với kích thước nang noãn khác nhau (B)

3.2. Đánh giá sự biểu hiện của gen *VEGF-R1* ở COC theo thời điểm nuôi cấy *in vitro*

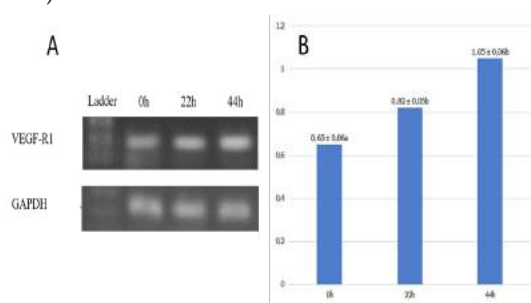
Thực hiện phản ứng RT-PCR khuếch đại đoạn gen mục tiêu GAPDH và *VEGF-R1*, hình ảnh đại diện sau điện di và phân tích điểm ảnh được với trình bày ở Hình 5 cho thấy biểu hiện rõ đoạn gen GAPDH với kích thước khoảng 187bp, gen *VEGF-R1* với kích thước 180bp trên tất cả các mẫu thu nhận từ COC ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau (0, 22 và 44h).



Hình 5. Hình ảnh đại diện, điện di sản phẩm PCR: GAPDH (A), *VEGF-R1* (B), phân tích điểm ảnh cho band điện di gen GAPDH (C) và *VEGF-R1* (D) bằng phần mềm ImageJ.

a: hình ảnh chuyển đổi khi sử dụng phần mềm của bảng điện di, b: đồ thị biểu diễn mức độ phân bố điểm ảnh; 0, 22 và 44h: COC thu nhận tại thời điểm 0, 22 và 44h sau nuôi cấy. DC: mẫu mô hoàng thể-đôi chứng dương

Từ dữ liệu phân tích điểm ảnh (Hình 5C và 5D), các số liệu về phân bố điểm ảnh của gen thụ thể *VEGF-R1* ở COC theo từng thời điểm nuôi cấy được trình bày ở Hình 6 cho thấy, ở thời điểm 0h (ngay sau khi thu nhận COC từ nang noãn) mức biểu hiện mRNA gen *VEGF-R1* thấp nhất ($0,65 \pm 0,06$), kể đến là thời điểm 22h ($0,82 \pm 0,05$), cao ở 44h ($1,05 \pm 0,06$) và sự khác biệt có ý nghĩa tìm thấy ở thời điểm 0h so với hai thời điểm còn lại (22 và 44h). Một số nghiên cứu trước đó cũng minh chứng sự biểu hiện của protein và thụ thể VEGF ở nang noãn có kích thước khác nhau và hơn thế nữa việc bổ sung VEGF trong môi trường nuôi cấy cải thiện thành thực tế bào trứng và phát triển phôi sau đó (Kere và ctv, 2014; Bui và ctv, 2017).



Hình 6. Hình ảnh đại diện sự biểu hiện gen *VEGF-R1* và *GAPDH* (A) và biểu đồ biểu diễn mức độ biểu hiện của gen *VEGF-R1* qua các thời điểm nuôi cấy tế bào trứng heo

4. KẾT LUẬN

Mức độ biểu hiện mRNA của gen *VEGF-R1* thấp ở mẫu mô chứa nang noãn nhỏ và vừa, cao ở mẫu mô chứa nang noãn có kích thước lớn và cao nhất ở mô hoàng thể. Đối với phức hợp tế bào trứng-cumulus thu tại các thời điểm nuôi cấy khác nhau, mức biểu hiện mRNA gen *VEGF-R1* thấp ở thời điểm 0h, tăng cao lúc 22h và cao nhất ở thời điểm 44h sau nuôi cấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abramovich D., Parborell F. and Tesone M. (2006). Effect of a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitory treatment on the folliculogenesis and ovarian apoptosis in gonadotropin-treated prepubertal rats. *Biol. Rep.*, 75: 434-41.
2. Abramovich D., Rodriguez C.A., Hernandez F., Tesone M. and Parborell F. (2009). Spatiotemporal analysis of the protein expression of angiogenic factors and their related receptors during folliculogenesis in rats with and without hormonal treatment. *Rep.*, 137: 309-20.
3. Bui T.M.T., Nguyen K.X., Karata A., Ferré P., Trần M.T., Wakai T. and Funahashi H. (2017). Presence of vascular endothelial growth factor during the first half of IVM improves the meiotic and developmental competence of porcine oocytes from small follicles. *Rep. Fer. Dev.*, 29(10): 1902.
4. Chrusciel M., Ziecik A. J. and Andronowska A. (2011). Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A) and its Receptors in the Umbilical Cord in the Course of Pregnancy in the Pig. *Rep. Dom. Anim.*, 46: 434-43.
5. Doyle L.K., Walker C.A. and Donadeu F.X. (2010). VEGF modulates the effects of gonadotropins in granulosa cells. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 38: 127-37.
6. Einspanier R., Schönfelder M., Müller K., Stojkovic M., Kosmann M., Wolf E. and Schams D. (2002). Expression of the vascular endothelial growth factor and its receptors and effects of VEGF during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes (COC). *Mol. Rep. Dev.*, 62: 29-36.
7. Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O'Shea K.S., Powell-Braxton L., Hillan K.J. and Moore M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380: 439-42.
8. Ferrara N. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Phy. Cell Physiol.*, 280: 1358-66.
9. Gao Y., Lu N., Ling Y., Chen Y., Wang L., Zhao Q., Qi Q., Liu W., Zhang H., You Q. and Guo Q. (2010). Oroxylin A inhibits angiogenesis through blocking vascular endothelial growth factor-induced KDR/Flk-1 phosphorylation. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 136: 667-75.
10. Gilchrist R.B. and Thampson J.G. (2007). Oocyte maturation: Emerging concept and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenol.*, 67: 6-15.
11. Greenaway J., Connor K., Pedersen H.G., Coomber B.L., LaMarre J. and Petrik J. (2004). Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinol.*, 145: 2896-05.
12. Irusta G., Abramovich D., Parborell F. and Tesone M. (2010). Direct survival role of vascular endothelial growth factor (VEGF) on rat ovarian follicular cells. *Mol. Cell Endocrinol.*, 325: 93-00.
13. Kaczmarek M.M., Kiewisz J., Schams D. and Ziecik A.J. (2009). Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and lutealexpression of soluble VEGFR-1 in the pig. *Theriogenol.*, 71: 1298-06.
14. Kere M., Siriboon C., Lo N.W., Nguyen N.T. and Ju J.C. (2013). Ascorbic acid improves the developmental competence of porcine oocytes after parthenogenetic

- activation and somatic cell nuclear transplantation. J. Rep. Dev., 59:78-84.
15. Kwak S.S., Cheong S.A., Jeon Y., Lee S., Choi K.C., Jeung E.B. and Huynh S.H. (2012). The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization. Theriogenol. Anim. Rep., 78(1): 86-01.
 16. Lin H.J., Chen W.L., Chen T.H., Kung Y.J. and Wan L. (2014). Vascular endothelial growth factor-460 C/T BstUI Gene polymorphism is associated with primary open angle glaucoma. Biomedicine, 4: 20-23.
 17. Nalbandian A., Dettin L., Dym M. and Ravindranath N. (2003). Expression of vascular endothelial growth factor receptors during male germ cell differentiation in the mouse. Biol. Rep., 69: 985-94.
 18. Nguyen N.T., Lin P.C., Siriboon C., Lo N.W. and Ju J.C. (2010). Sonic Hedgehog improves *in vitro* development of porcine parthenotes and handmade cloned embryos. Theriogenol., 74: 1149-60.
 19. Nilsson M. and Heymach J.V. (2006). Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway. J. Thorac Oncol., 1: 768-70.
 20. Olsson A.K., Dimberg A., Kreuger J. and Claesson-Welsh L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. Nat Rev. Mol. Cell Biol., 7: 359-71.
 21. Shimizu T. (2006). Promotion of ovarian follicular development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) and growth differentiation factor 9 (GDF-9) genes. J. Rep. Dev., 52: 23-32.
 22. Nguyễn Ngọc Tấn, Trần Hồ Ái Ngân và Phạm Thị Ngọc Trúc (2019). Ảnh hưởng của đồng nuôi cấy phức hợp tế bào trứng heo có chất lượng khác nhau đến khả năng thành thực nhân trong điều kiện *in vitro*. Tạp chí KHKT Chăn nuôi, 251: 65-70.
 23. Trousdale R.K., Pollak S.V., Klein J., Lobel L., Funahashi Y., Feirt N. and Lustbader J.W. (2007). Single-chain bifunctional vascular endothelial growth factor (VEGF)-follicle-stimulating hormone (FSH)-C-terminal peptide (CTP) is superior to the combination therapy of recombinant VEGF plus FSH-CTP in stimulating angiogenesis during ovarian folliculogenesis. Endocrinol., 148: 1296-05.
 24. Winther H., Leiser R., Pfarrer C. and Dantzer V. (1999). Localization of micro- and intermediate filaments in non-pregnant uterus and placenta of the mink suggests involvement of maternal endothelial cells and periendothelial cells in blood flow regulation. Ana. Embryol., 200: 253-63.
 25. Yan L., Luo H., Gao X., Liu K. and Zhang Y. (2012). Vascular endothelial growth factor-induced expression of its receptors and activation of the MAPK signaling pathway during ovine oocyte maturation *in vitro*. Theriogenol., 78: 1350-60.
 26. Zimmermann R.C., Xiao E., Husami N., Sauer M.V., Lobo R., Kitajewski J. and Ferin M. (2001). Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. J. Clin. Endocrinol. Metab., 86: 768-72.

ẢNH HƯỞNG CỦA TẾ BÀO CUMULUS ĐẾN HIỆU QUẢ THỤ TINH VÀ TẠO PHÔI BÒ *IN VITRO*

Nguyễn Khánh Vân¹, Phạm Thị Kim Yến¹ và Phạm Doãn Lâm^{2*}

Ngày nhận bài báo: 10/07/2021 - Ngày nhận bài phản biện: 10/08/2021

Ngày bài báo được chấp nhận đăng: 20/08/2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của tế bào cumulus trong quá trình thụ tinh và tạo phôi bò *in vitro*. Tế bào trứng bò có hoặc không có cumulus được sử dụng cho quá trình thụ tinh và tạo phôi bò *in vitro*. Tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ đa tinh trùng của nhóm không có cumulus là cao hơn nhóm có cumulus (tương ứng 91,12 và 10,92% so với 80,91 và 2,24%, $P < 0,05$). Không có sự khác biệt về tỷ lệ phân chia giữa nhóm có cumulus và không có cumulus (tương ứng 80,04% so với 79,98%, $P > 0,05$). Tuy nhiên tỷ lệ tạo phôi nang của nhóm có cumulus là cao hơn nhóm không có cumulus (tương ứng 35,68% so với 26,75%, $P < 0,05$). Không có sự khác biệt về chất lượng phôi nang bò *in vitro* được tạo ra từ hai nhóm có và không có cumulus. Việc sử dụng tế bào trứng bò thành thực *in vitro* có tế bào cumulus trong quá trình thụ tinh sẽ nâng cao hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*.

Từ khóa: Tế bào trứng bò, IVE, phôi nang, tế bào cumulus.

¹ Phòng TNTĐ Công nghệ tế bào động vật, Viện Chăn nuôi

² Viện Chăn nuôi

* Tác giả liên hệ: TS. Phạm Doãn Lâm, Phó Viện trưởng Viện Chăn nuôi. Điện thoại: 0914366975; Email: pdlanvn@yahoo.com