

陆露, 蔡江雪, 孙一然, 等. 血管生成素在猪囊肿卵巢中的表达 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (5): 49-55.

LU L, CAI J X, SUN Y R, et al. Expression of angiogenin in porcine cystic ovaries [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (5): 49-55.

血管生成素在猪囊肿卵巢中的表达

陆露¹, 蔡江雪¹, 孙一然¹, 李平华², 黄瑞华², 贺斌^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

2. 南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 旨在观察猪正常和囊肿卵巢中血管生成素 (ANG) 的定位和表达情况, 探讨 ANG 的表达与猪卵巢囊肿发生之间的关系。从屠宰场收集 250~300 日龄的大白猪母猪卵巢, 根据形态将其分为正常组和卵巢囊肿组 ($n=8$), 通过 HE 染色对正常卵巢和囊肿卵巢进行形态学观察, 利用 Western blot 检测卵巢中 ANG 蛋白的表达, 采用免疫组织化学法检测卵巢中 ANG 的定位和表达情况。结果: 外观上囊肿卵泡和囊肿黄体体积明显增大, 卵泡膜细胞和黄体细胞均出现肿大、间隙不均和脂滴空泡增多的异常现象; Western blot 结果表明囊肿卵巢中 ANG 的表达量极显著升高 ($P<0.01$); 免疫组化检测显示 ANG 在囊肿卵泡膜细胞和囊肿黄体细胞中的表达量明显上升, 而在囊肿卵巢正常部位处有腔卵泡膜细胞中的表达量明显减少。结论: ANG 与猪卵巢囊肿的发生之间存在关联, 提示 ANG 可以作为一种诊断标志物, 为临床上卵巢囊肿的确诊提供帮助。

关键词: 血管生成素; 卵巢囊肿; 母猪

中图分类号: S852 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)05-0049-07

Expression of angiogenin in porcine cystic ovaries

LU Lu¹, CAI Jiangxue¹, SUN Yiran¹, LI Pinghua², HUANG Ruihua², HE Bin^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This study aimed to investigate the localization and expression of angiogenin (ANG) in normal and cystic ovaries of pigs, and to explore the relationship between ANG expression and the occurrence of ovarian cysts. Samples of ovaries from Large White sows aged 250-300 days were collected in a slaughterhouse, and they were divided into the normal and cystic groups ($n=8$) based on the morphological criteria. Then, histological observations of normal and cystic ovaries were conducted using HE staining. Finally, Western blot was used to detect ANG protein expression in the ovaries, and immunohistochemistry was employed to detect the localization and expression of ANG in the ovaries. The results showed that, morphologically, the cystic follicles and cystic corpora lutea were significantly enlarged, with abnormal phenomena such as hypertrophy of follicular theca cells and luteal cells, uneven gaps, and increased lipid droplets. The Western blot results showed that ANG expression in the cystic ovaries was significantly increased ($P<0.01$). The immunohistochemistry results indicated that ANG expression was markedly elevated in theca cells of the cystic follicles and the luteal cells of the cystic corpora lutea, while the expression of ANG in theca cells of the antral follicles in the normal parts of the cystic ovaries was also affected and significantly decreased. The present results indicated that there was association between ANG and the occurrence of ovarian cysts in pigs, suggesting that ANG could serve as a diagnostic marker to assist in the clinical diagnosis of ovarian cysts.

Keywords: angiogenin; ovarian cysts; sows

卵巢囊肿是集约化养殖中常见的雌性家畜生殖系统疾病, 主要可分为卵泡囊肿和黄体囊肿^[1]。因生育问题被淘汰的母猪中约 10% 都患有卵巢囊肿^[2]。

患病母猪表现出乏情、发情不规律、受孕率降低、产仔减少、攻击性变强、行为异常等病症, 严重影响养猪业的经济效益^[3]。目前普遍认为卵泡囊肿是由于促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 峰异常所导致, 成熟卵泡缺乏 LH 刺激, 无法排卵并持续增长, 最终形成囊肿^[2,4]。黄体囊肿则可能源自排卵后排卵破裂过早闭合的卵泡^[5], 但卵巢囊肿的具体形成机制仍未被阐明。

有观点认为排卵是一个与炎症反应相类似的过程, 成熟卵泡排卵前的血管变化与炎症组织的血管扩

收稿日期: 2024-07-10; 修回日期: 2025-03-24

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1300405); 国家自然科学基金项目 (32372965, 32072807); 江苏高校优势学科建设工程四期项目

第一作者: 陆露, 女, 博士研究生

* 通信作者: 贺斌, 教授, 研究方向为动物生殖生理与健康调控,

E-mail: heb@njau.edu.cn。

张和毛细血管通透性增加基本一致^[6], 血管生成异常则会影响排卵的正常进行。血管的生成需要多种血管因子的参与, 例如血管内皮生长因子 (VEGF)、血管生成素 (ANG)、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血小板衍生生长因子 (PDGF) 等^[7]。ANG 的发现源于对“肿瘤血管生成因子”的探索, 首次发现于人结肠癌细胞 (HT-29), 是一种 14 kDa 的非糖基化单链多肽^[8-10]。ANG 因具有核糖核酸酶活性最为独特, 并且它对 VEGF、bFGF 等其他因子起着一定的调控作用, 推测可能处于血管生成的核心位置^[11]。已有研究发现, ANG 参与卵巢的形态变化与血管生成^[12], 在牛囊肿卵巢中 ANG mRNA 的丰度显著上调^[13], 并且 ANG 还参与机体炎症反应的调节过程^[14]。以上研究表明 ANG 可能与卵巢囊肿的发生存在一定联系。ANG 可能通过调控卵巢血管生成和炎症反应参与排卵过程, 进而影响卵巢囊肿的形成。本试验通过对比猪正常卵巢和囊肿卵巢中 ANG 的变化情况, 探究其与猪卵巢囊肿形成之间的联系, 为揭示母猪卵巢囊肿的表型特征和形成机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采集经同期发情处理的大白猪母猪的新鲜卵巢, 根据卵巢分类标准, 将卵巢分为正常组和卵巢囊肿组 ($n=8$), 正常卵巢约为 2 cm \times 1.5 cm 的卵圆形, 表面可见不同大小的卵泡和黄体; 囊肿卵巢可分为卵泡囊肿和黄体囊肿, 卵泡囊肿可见卵泡异常增大, 发于一侧或两侧, 囊肿大小不等, 壁薄且致密, 充满囊液, 而黄体囊肿由黄体囊状化形成, 多发于单侧, 大小不等, 囊腔形状不规则且充满透明液体^[1]。部分卵巢组织置于冻存管内放入液氮速冻, 之后于-80 °C 冰箱中保存; 部分卵巢组织采集后立即放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h。

1.2 主要试剂及仪器

通用型组织固定液 (武汉塞维尔生物科技有限公司), HE 染色液 (上海源叶生物科技有限公司), 兔抗 ANG (武汉三鹰生物技术有限公司), 牛血清白蛋白 (BSA) (北京兰杰柯科技有限公司), 即用型二抗 (武汉三鹰生物技术有限公司), 二氨基联苯胺 (DAB) 显色剂 (上海碧云天生物技术股份有限公司), 磷酸酶及蛋白酶抑制剂 (美国 APEX BIO 生物科技有限公司), 放射免疫沉淀法缓冲液 (RIPA) (上海碧云天生物技术股份有限公司), BCA 蛋白定量试剂盒 (南京翼飞雪生物科技有限公司), ECL 化学发光底物试剂盒 (北京兰杰柯科技有限公司),

终校

Ocus 40 数字扫描显微镜成像系统, Tanon-5200 化学发光成像仪。

1.3 石蜡切片制备及 HE 染色

选取卵巢的最大横切面进行连续切片, 制备厚度为 5 μ m 的石蜡切片。将切片脱蜡至水后, 苏木素 2 min 30 s, 流水冲洗 4 min, 75% 乙醇 2 min, 85% 乙醇 2 min, 伊红 1 min, 95% 乙醇 I 2 min, 95% 乙醇 II 2 min, 无水乙醇 I 2 min, 无水乙醇 II 2 min, 二甲苯 I 10 min, 二甲苯 II 10 min, 中性树胶封片, 待树胶自然风干后扫描拍照, 观察卵巢的基本形态结构。

1.4 免疫组织化学

将石蜡切片脱蜡至水后进行热抗原修复, 自然冷却至室温, 放入 3% H_2O_2 20 min 去除内源性过氧化物酶活性, 滴加 5% BSA 后放入湿盒, 置于 37 °C 封闭 40 min, 一抗 (1 : 200) 4 °C 孵育过夜, 使用 TBST 洗去残留一抗, 滴加二抗, 37 °C 孵育 1 h, 使用 TBST 洗去残留二抗, 滴加 DAB 显色液, 显色 7 min, 蒸馏水终止显色后放入苏木素 2 min 染核, 流水冲洗 4 min, 乙醇梯度脱水, 二甲苯浸润, 中性树胶封片, 封片后扫描拍照。

1.5 蛋白提取及 Western blot

称取 40 mg 卵巢样品置于离心管中, 加入配好的 RIPA 裂解液, 匀浆 6 次, 20 s/次, 冰上静置 30 min, 让组织充分裂解, 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液至新的离心管内, 使用蛋白定量试剂盒测量各样品浓度, 使用 RIPA 裂解液将蛋白浓度统一, 加入适量 5 \times 上样缓冲液后 100 °C 金属浴 10 min。依次进行 SDS-PAGE 和湿法转印检测, 5% 奶粉封闭 2 h, 一抗 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 二抗 (1 : 10 000) 常温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 发光液浸泡后使用化学发光仪成像。

1.6 数据统计与分析

试验数据均使用 SPSS 27.0.1 软件进行独立样本 t 检验分析, 以“平均值 \pm 标准误”表示, 并用 GraphPad 8.0.2 作图。

2 结果与分析

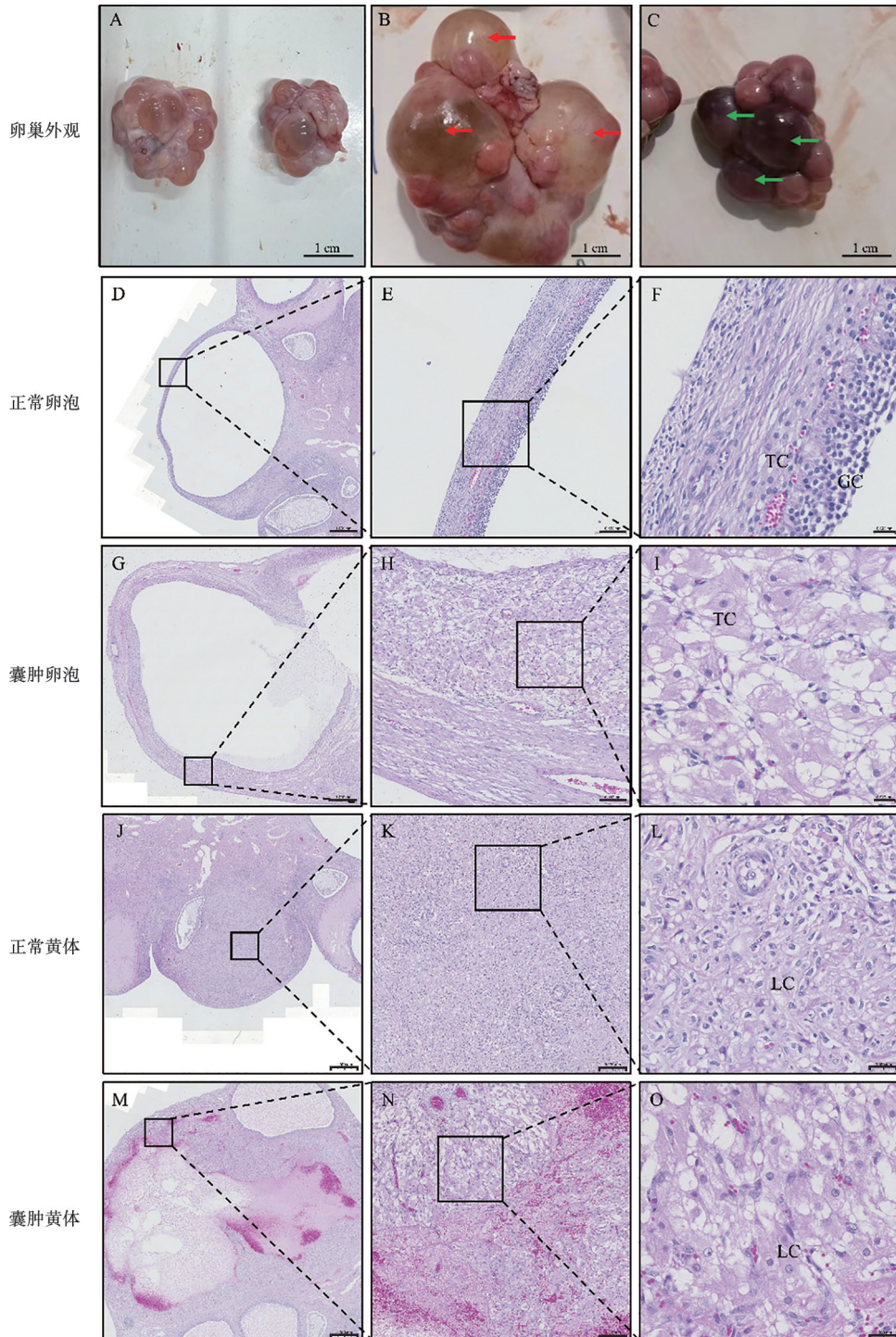
2.1 正常及囊肿卵巢形态学观察

正常及囊肿卵巢外观如图 1A~C 所示。正常成熟卵泡颗粒细胞层及卵泡膜结构清晰, 厚度适中, 颗粒细胞因卵泡腔扩大而变薄, 卵泡膜尤其是内膜中血管丰富 (图 1D~F)。囊肿卵泡明显大于正常卵泡 (图 1G), 颗粒细胞变性减少, 卵泡膜异常增厚, 结缔组织增生明显 (图 1H)。放大可见膜细胞肿大,

细胞间隙不均匀, 并且有较多脂肪空泡 (图 1I)。

正常黄体形状规则, 边界清楚, 富含血管, 黄体细胞形态正常、分布均匀 (图 1J~L)。外观上囊肿黄体明显大于正常黄体, 囊腔形状不规则 (图 1M),

腔内液体含有大量红细胞, 实质部分也富含血管且血管内红细胞充盈 (图 1N、O)。放大可见黄体细胞肿大且间隙不均, 脂滴空泡增多, 与囊肿卵泡膜细胞的异常状态高度相似 (图 1I、O)。



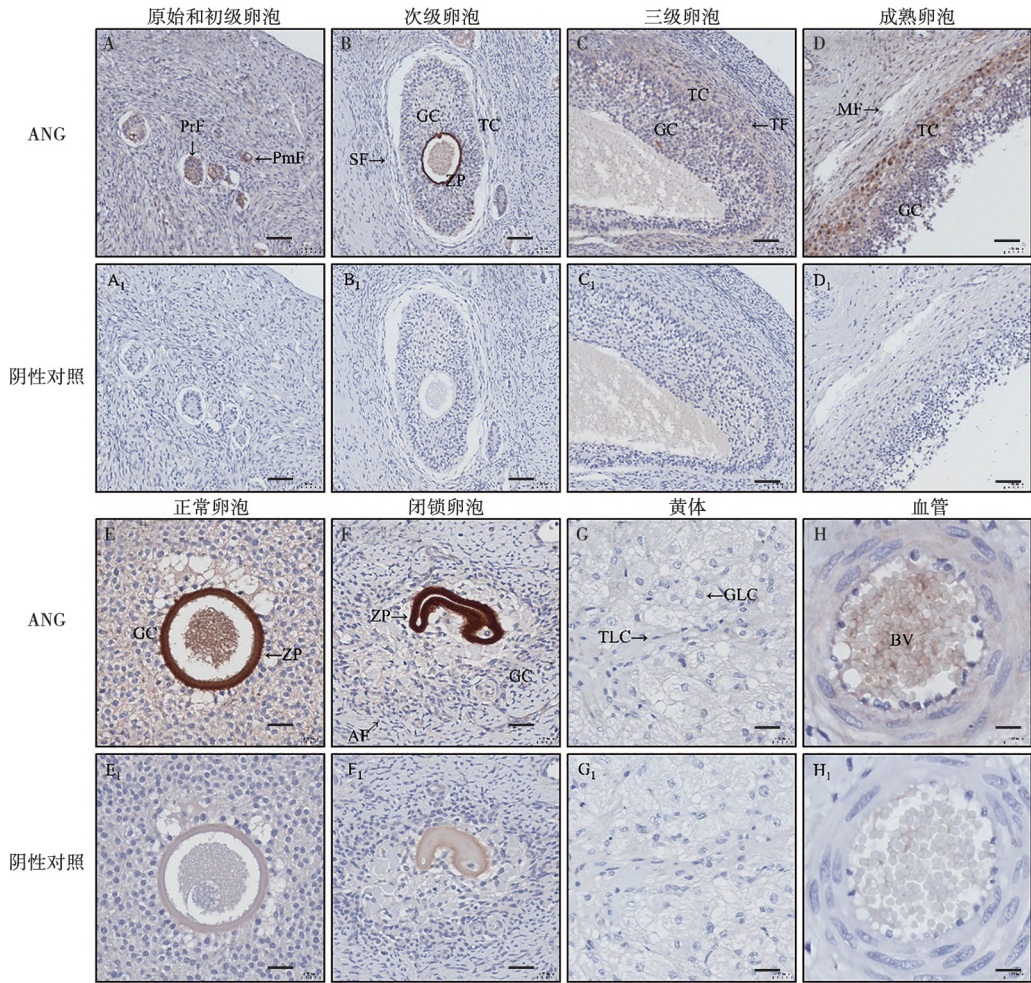
A. 正常卵巢外观; B. 卵泡囊肿卵巢外观; C. 黄体囊肿卵巢外观; D~F. 正常卵泡的 HE 染色; G~I. 囊肿卵泡的 HE 染色; J~L. 正常黄体的 HE 染色; M~O. 囊肿黄体的 HE 染色; GC. 颗粒细胞; TC. 膜细胞; LC. 黄体细胞。图中红色箭头处为囊肿卵泡, 绿色箭头处为囊肿黄体。标尺=1 cm (A、B、C), 标尺=1 000 μm (D、G、J、M), 标尺=100 μm (E、H、K、N), 标尺=20 μm (F、I、L、O)。

图 1 囊肿卵巢外观及 HE 染色结果

2.2 正常卵巢 ANG 的表达和分布

免疫组化分析结果显示, ANG 在各级卵泡中均有表达, 原始卵泡、初级卵泡和次级卵泡中 ANG 主要表达于颗粒细胞和卵母细胞的细胞质 (图 2A、A₁、B、B₁)。有腔卵泡中 ANG 主要表达于颗粒细胞和膜细胞, 并且随着卵泡的发育, 膜细胞中的表达量

明显升高 (图 2C、C₁、D、D₁)。进一步观察发现, 不论是正常卵泡还是闭锁卵泡, ANG 在透明带中都呈现出强阳性 (图 2E、E₁、F、F₁)。在正常黄体中, ANG 几乎未见表达, 仅有个别膜黄体细胞表达 (图 2G、G₁)。此外, ANG 在血液及血管中也有分布 (图 2H、H₁)。



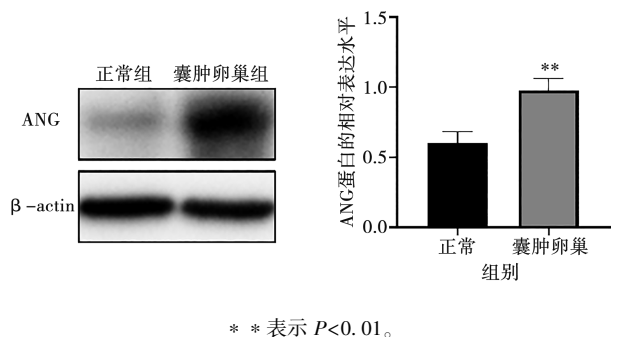
PmF. 原始卵泡; PrF. 初级卵泡; SF. 次级卵泡, TF. 三级卵泡, MF. 成熟卵泡, GC. 颗粒细胞; TC. 膜细胞; ZP. 透明带; AF. 闭锁卵泡; O. 卵母细胞; GLC. 颗粒黄体细胞; TLC. 膜黄体细胞; BV. 血管。标尺 = 50 μm (A~D、A₁~D₁), 标尺 = 20 μm (E~G、E₁~G₁), 标尺 = 10 μm (H、H₁)。

图 2 免疫组化法检测 ANG 在正常卵巢中的表达和分布

2.3 囊肿卵巢 ANG 的表达和分布

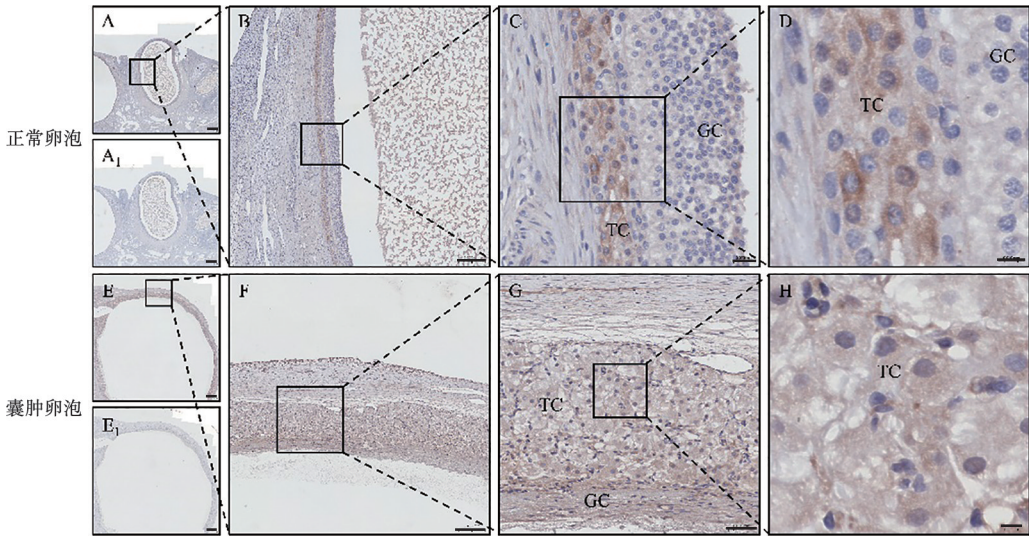
利用 Western blot 技术检测卵巢组织内 ANG 的表达情况, 结果如图 3 所示, 与正常卵巢相比, 囊肿卵巢中 ANG 的表达量极显著增高 ($P < 0.01$)。

免疫组化结果显示, 正常卵泡颗粒细胞胞质少量表达 ANG, 部分膜细胞的胞质和胞核均表达 ANG, 且表达量较高 (图 4A~D、A₁)。囊肿卵泡颗粒细胞减少, 膜细胞肿大至正常状态下的数倍, 细胞间脂滴空泡明显增多, 并且全部高表达 ANG (图 4E~H、E₁)。



** 表示 $P < 0.01$ 。

图 3 Western blot 检测 ANG 在正常及囊肿卵巢内的表达 ($n = 8$)

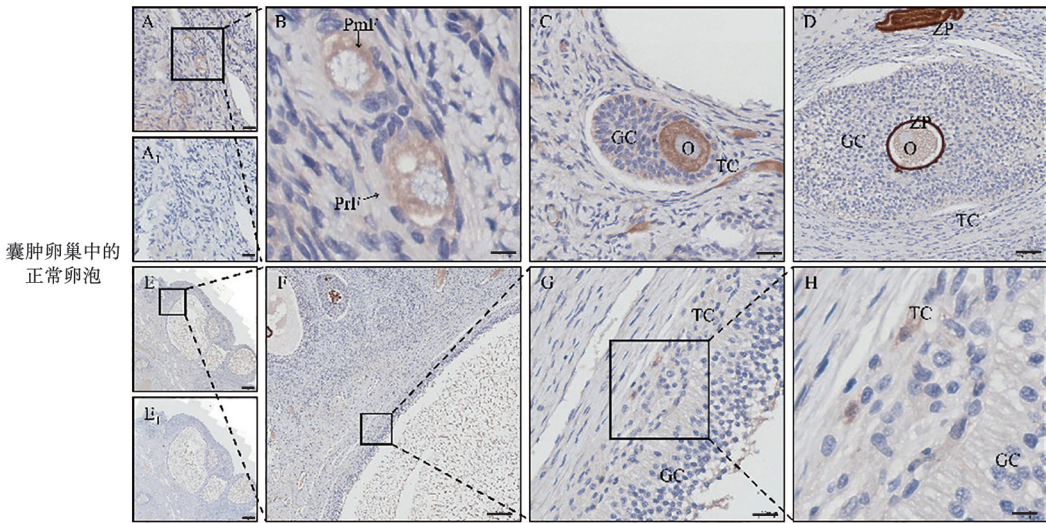


A₁. 正常卵泡阴性对照; E₁. 囊肿卵泡阴性对照; GC. 颗粒细胞; TC. 膜细胞。标尺=1 000 μm (A、A₁、E、E₁), 标尺=200 μm (B、F), 标尺=50 μm (G), 标尺=20 μm (C), 标尺=10 μm (D、H)。

图4 免疫组化法检测 ANG 在正常及囊肿卵泡中的表达和分布

进一步观察囊肿卵巢中的正常卵泡发现, 囊肿卵巢中原始卵泡、初级卵泡以及次级卵泡中 ANG 的表达情况与正常卵巢基本一致, 主要表达于颗粒细胞及

卵母细胞的胞质 (图 5A~D、A₁)。而有腔卵泡膜细胞中 ANG 的表达量明显减少 (图 5E~H、E₁), 低于正常卵巢 (图 4D)。

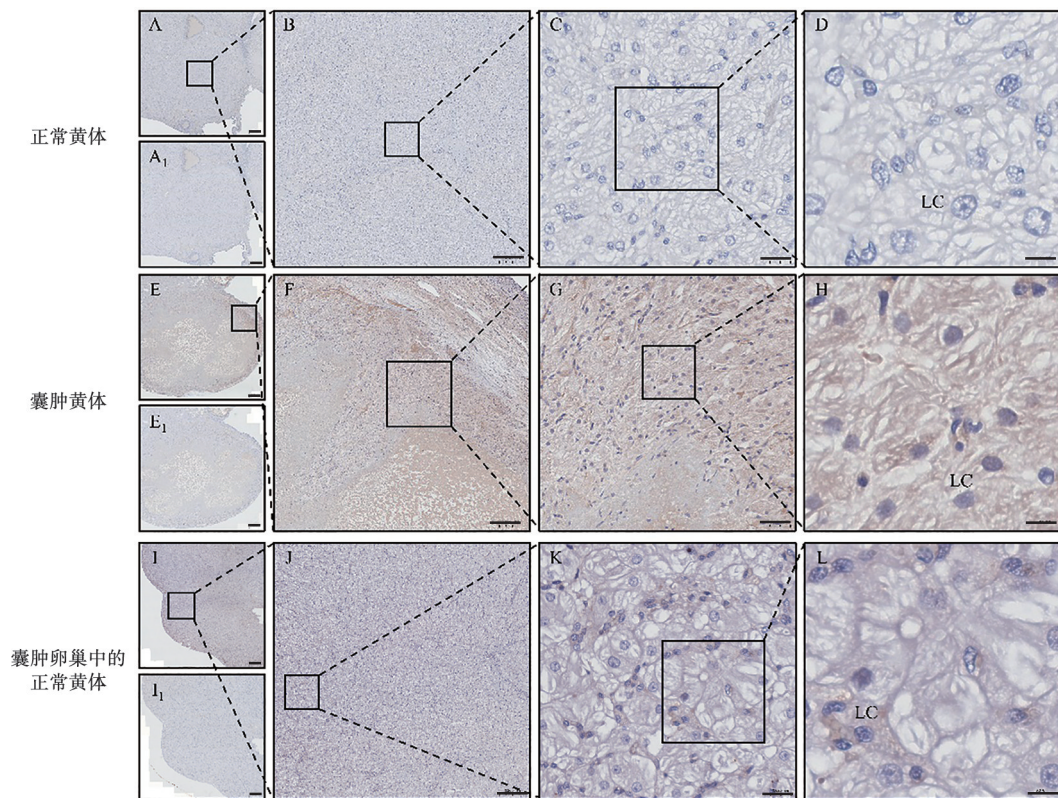


A、B. 原始卵泡和初级卵泡; C、D. 次级卵泡; E~H. 有腔卵泡; A₁. 原始卵泡和初级卵泡阴性对照; E₁. 有腔卵泡阴性对照; PmF. 原始卵泡; PrF. 初级卵泡; GC. 颗粒细胞; TC. 膜细胞; O. 卵母细胞; ZP. 透明带。标尺=1 000 μm (E、E₁), 标尺=200 μm (F), 标尺=50 μm (D), 标尺=20 μm (A、A₁、C、G), 标尺=10 μm (B、H)。

图5 免疫组化法检测 ANG 在囊肿卵巢正常卵泡中的表达和分布

正常黄体中 ANG 表达较少, 几乎不表达 (图 6A~D、A₁), 囊肿黄体中 ANG 丰度显著增高 (图 6E~H、E₁), 尤其在黄体细胞中 (图 6H)。对囊肿卵巢中的正常黄体进行观察, 发现这些黄体的 ANG 表

达量也有所上升 (图 6I~L、I₁), 虽不及囊肿黄体表达量增加明显 (图 6E~H), 但表达 ANG 的黄体细胞数明显多于正常组黄体 (图 6D、L)。



A₁. 正常黄体阴性对照; E₁. 囊肿黄体阴性对照; I₁. 囊肿卵巢中的正常黄体阴性对照; LC. 黄体细胞; 标尺 = 1 000 μm (A、A₁、E、E₁、I、I₁), 标尺 = 200 μm (B、F、J), 标尺 = 50 μm (G), 标尺 = 20 μm (C、K), 标尺 = 10 μm (D、H、L)。

图 6 免疫组化法检测 ANG 在正常及囊肿黄体中的表达和分布

3 讨论

卵巢囊肿是母猪集约化养殖中常见的生殖系统疾病, 损害母猪繁殖性能, 严重影响经济效益^[2-3]。卵巢囊肿的常见致病因素有下丘脑-垂体轴功能缺陷、卵巢结构异常、内分泌紊乱、细胞凋亡异常等^[6,15-17]。当前, 规模化养殖场大力推行批次化生产技术, 利用多种激素诱导同期发情和超数排卵^[18], 增加了母猪卵巢囊肿的出现频率^[19]。因此, 深入揭示母猪卵巢囊肿的表型特征和形成机制对于提高母猪繁殖效率具有重要意义。

卵巢是动物机体中少数生理状态下会进行血管新生的组织, 血管发生随着发情的进行呈现周期性变化, 血管的生成和退化是保证卵巢功能正常的必要条件。随着卵泡的发育, 血管生成愈发活跃, 最终在成熟卵泡外周形成复杂且独立的血管网络, 保证血液供应和营养支持^[20]。若卵巢的血管生成存在异常, 会影响卵泡的发育和排出, 甚至可能诱导健康卵泡闭锁^[21]。已有报道, ANG 与卵泡生长^[22-23]、类固醇激素分泌^[24]以及血管生成^[12, 25]之间都存在关联, 表明 ANG 能够从多个方面影响卵巢发育和功能。本研究

发现, ANG 在腔前卵泡中主要表达于颗粒细胞和卵母细胞胞质, 当卵泡膜分化后, 膜细胞中 ANG 的表达量增多, 并逐渐多于颗粒细胞, 即 ANG 在各级卵泡中均有表达, 不同阶段的定位和表达量略有不同。以上结果表明, ANG 直接参与卵泡的发育过程, 并且可能在不同阶段有着不同的作用。

本研究发现, 猪囊肿卵巢中 ANG 的表达量极显著高于正常卵巢, 这与牛卵巢囊肿中 ANG 的变化相一致^[13]。免疫组化结果显示, 囊肿卵泡的膜细胞和囊肿黄体的黄体细胞是 ANG 表达量增加的主要来源, 而 ANG 能够影响颗粒细胞和膜细胞的增殖^[22], 提示 ANG 可能通过调节卵泡细胞的增殖来影响卵巢发育。并且外源性促性腺激素能够使卵巢 ANG 表达上调^[24], 这可能是批次化养殖猪场中卵巢囊肿呈现高发状态的诱因之一。

本研究还发现, 患卵泡囊肿的卵巢中, 即使是形态正常的黄体细胞, ANG 的表达量也略高于正常黄体。黄体细胞是孕酮的主要来源, 而卵巢囊肿的形成与孕酮的异常增多存在关联^[15], 并且卵泡液中 ANG 与孕酮的浓度之间存在正相关^[24], 因此卵巢中 ANG 的增加可能会影响孕酮的分泌进而引起囊肿。患黄体

囊肿的卵巢中, 腔前卵泡的形态以及 ANG 的表达情况与正常卵巢中差异不大, 但到了有腔卵泡阶段则表现出明显的异常, 膜细胞 ANG 的表达量显著减少, 这可能正是由囊肿黄体中 ANG 的过度增高所导致。该阶段血管生成极为活跃, ANG 的缺乏会直接影响卵泡外周血管网络的形成以及后续的发育。此外, 结果显示 ANG 在透明带中的表达呈强阳性, 若机体透明带合成异常, 卵泡的发育也会受到限制^[26], 同时 ANG 和卵母细胞成熟程度也呈现正相关^[23], 表明它可能通过参与透明带的形成以及卵母细胞的发育影响卵泡的生长。ANG 在正常黄体中的表达量较少, 仅在少数黄体细胞的胞质中观察到, 这可能因为黄体结构和功能趋于稳定后, 血管发生趋于平缓, 仅少量 ANG 就能满足生理需求。

综上所述, 囊肿卵巢中 ANG 的表达模式显著异于正常卵巢, 不论是卵泡囊肿还是黄体囊肿中 ANG 的表达量都明显升高, 且囊肿卵巢正常部位 ANG 的表达也会受到一定影响。结果提示, ANG 可以作为一种诊断指标, 为临床上卵巢囊肿的确诊提供帮助, 但具体的作用机制还需要进一步的探索。

参考文献:

- [1] 陈怀涛, 许乐仁. 兽医病理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 568-569.
- [2] CASTAGNA C D, PEIXOTO C H, BORTOLOZZO F P, et al. Ovarian cysts and their consequences on the reproductive performance of swine herds [J]. *Anim Reprod Sci*, 2004, 81 (1/2): 115-123.
- [3] ORTEGA H H, DÍAZ P U, SALVETTI N R, et al. Follicular cysts: a single sign and different diseases. A view from comparative medicine [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22 (36): 5634-5645.
- [4] KNOX R V, VATZIAS G, NABER C H, et al. Plasma gonadotropins and ovarian hormones during the estrous cycle in high compared to low ovulation rate gilts [J]. *J Anim Sci*, 2003, 81 (1): 249-260.
- [5] GRZESIAK M, SOCHA M, HRABIA A. Altered vitamin D metabolic system in follicular cysts of sows [J]. *Reprod Domest Anim*, 2021, 56 (1): 193-196.
- [6] STASSI A F, DÍAZ P U, GASSER F B, et al. A review on inflammation and angiogenesis as key mechanisms involved in the pathogenesis of bovine cystic ovarian disease [J]. *Theriogenology*, 2022, 186: 70-85.
- [7] POLVERINI P J. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *J Dent Educ*, 2002, 66 (8): 962-975.
- [8] FETT J W, STRYDOM D J, LOBB R R, et al. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells [J]. *Biochemistry*, 1985, 24 (20): 5480-5486.
- [9] MAO M, CHEN W, YE D. Research progress on the structure, function, and use of angiogenin in malignant tumours [J]. *Heliyon*, 2024, 10 (9): e30654.
- [10] SULTANA M F, ABO H, KAWASHIMA H. Human and mouse angiogenins: emerging insights and potential opportunities [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1022945.
- [11] KISHIMOTO K, LIU S, TSUJI T, et al. Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis [J]. *Oncogene*, 2005, 24 (3): 445-456.
- [12] LEE H S, LEE I S, KANG T C, et al. Angiogenin is involved in morphological changes and angiogenesis in the ovary [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 257 (1): 182-186.
- [13] GRADO-AHUIR J A, AAD P Y, SPICER L J. New insights into the pathogenesis of cystic follicles in cattle: microarray analysis of gene expression in granulosa cells [J]. *J Anim Sci*, 2011, 89 (6): 1769-1786.
- [14] CAI J, LI C, LIU S, et al. Angiogenin-mediated tsRNAs control inflammation and metabolic disorder by regulating NLRP3 inflammasome [J]. *Cell Death Differ*, 2024, 31 (8): 1057-1069.
- [15] SILVIA W J, HATLER T B, NUGENT A M, et al. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2002, 23 (1/2): 167-177.
- [16] WANG F, CHEN L, CHEN S, et al. Association of RBP-4 gene polymorphisms with follicular cysts in large white sows [J]. *Reprod Domest Anim*, 2019, 54 (7): 972-978.
- [17] ISOBE N, YOSHIMURA Y. Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle [J]. *J Reprod Dev*, 2007, 53 (5): 1119-1124.
- [18] 周振民, 于洋, 李晗星, 等. 母猪发情控制技术研究进展 [J]. *中国畜牧杂志*, 2023, 59 (10): 7-13.
- [19] ZIECIK A J, KLOS J, PRZYGRÓDZKA E, et al. Aberrant effects of altrenogest and exposure to exogenous gonadotropins on follicular cysts appearance in gilts [J]. *Theriogenology*, 2017, 89: 250-254.
- [20] XU X, MU L, LI L, et al. Imaging and tracing the pattern of adult ovarian angiogenesis implies a strategy against female reproductive aging [J]. *Sci Adv*, 2022, 8 (2): eabi8683.
- [21] 程颖, 魏全伟, 王喆, 等. 母猪健康和闭锁卵巢有腔卵泡的转录组测序比较分析 [J]. *南京农业大学学报*, 2023, 46 (3): 555-563.
- [22] DENTIS J L, SCHREIBER N B, BURESS A M, et al. Effects of angiogenin on granulosa and theca cell function in cattle [J]. *Animal*, 2017, 11 (5): 811-819.
- [23] MALAMITSI-PUCHNER A, SARANDAKOU A, BAKA S G, et al. Concentrations of angiogenic factors in follicular fluid and oocyte-cumulus complex culture medium from women undergoing *in vitro* fertilization: association with oocyte maturity and fertilization [J]. *Fertil Steril*, 2001, 76 (1): 98-101.
- [24] KOGA K, OSUGA Y, TSUTSUMI O, et al. Evidence for the presence of angiogenin in human follicular fluid and the up-regulation of its production by human chorionic gonadotropin and hypoxia [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85 (9): 3352-3355.
- [25] RIORDAN J F. Angiogenin [J]. *Methods Enzymol*, 2001, 341: 263-273.
- [26] WASSARMAN P M, CHEN J, COHEN N, et al. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida [J]. *J Exp Zool*, 1999, 285 (3): 251-258.