

Expression of H-ras, RLIP76 mRNA and Protein, and Angiogenic Receptors in Corpus Luteum Tissues during Estrous Cycles

Minseong Kim¹, Sang-Hee Lee², Seunghyung Lee¹

¹Department of Animal Industry Convergence, College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

²Institute of Animal Resources, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

난소 내 황체조직에서 발정주기별 H-Ras, RLIP76, Angiogenic Receptors mRNA와 Protein의 발현

김민성¹, 이상희², 이승형¹

¹강원대학교 동물생명과학대학 동물산업융합학과, ²강원대학교 동물자원공동연구소

Corpus luteum (CL) is a transient endocrinal tissue that undergoes repeated formation and regression during the estrous cycle. In this study, we hypothesized that the functional and structural mechanism of angiogenesis is similar between CL and tumor formation. First, we measured mRNA and protein expression of angiogenic receptors (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR2; Tie 2) in the early, middle, and late phase CL tissues during the estrous cycle. Ral-interacting protein of 76 kDa (RLIP76) and H-ras mRNA and protein were also expressed in the CL tissues. VEGFR2 and Tie 2 mRNA and protein were expressed in the early and middle phase CLs and decreased in the late phase. H-ras mRNA and protein were expressed in the early and middle phase CLs, but not in the late phase. RLIP76 mRNA was expressed in all phase CLs, and the protein expression was highest in early phase CLs. We suggest that RLIP76 and H-ras, an oncogenic gene, regulate the function of the CL during the estrous cycle, and the proteins will play an important role in the angiogenic mechanism of the CL.

Key words: Angiogenesis, Corpus luteum, H-ras, RLIP76

Corresponding author: Seunghyung Lee
Department of Animal Industry Convergence,
College of Animal Life Sciences, Kangwon
National University, 1 Gangwondaehak-gil,
Chuncheon 24341, Korea
Tel: 82-33-250-8637
Fax: 82-33-259-5572
E-mail: s.lee@kangwon.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2018 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: September 20, 2018
Revised 1st: October 3, 2018
Revised 2nd: October 24, 2018
Accepted: October 25, 2018

서론

황체는 배란 후 난소 내 발생하는 내분비 기관으로 발정주기에 따라 형성과 퇴행을 반복한다. 주된 역할은 임신의 유지와 확립에 필요한 프로게스테론 (P₄)을 합성하는 것이다[1, 2]. P₄를 합성하는 황체 스테로이드제닉 세포(LSCs)과 혈관을 구성하는 황체혈관세포(LECs)를 중심으로 섬유아세포와 평활근세포, 면역세포 등으로 구성되어 있다[3, 4]. 뇌하수체에서 분비되는 여

포자극호르몬(FSH)와 황체형성호르몬(LH)에 의해 배란된 난포 내의 과립막 세포와 난포막 세포가 각각 자극을 받아 LSCs의 종류인 큰 황체세포(LLCs)과 작은 황체세포(SLCs)로 분화 되는 것으로 알려져 있다[5]. 황체는 혈관내피성장인자 A (VEGFA), 종양괴사인자- α (TNF- α) 등 여러 인자와 LH, P₄ 등 호르몬에 의해 형성과 퇴행이 조절된다[6, 7]. 성장인자와 호르몬의 영향으로 세포의 증식이 일어나고, 혈관이 확장되면서 조직이 성장한다. 여러 인자와 호르몬의 상호작용으로 조절되기 때문에, 세포

의 증식부터 황체조직의 아포토시스에 이르기까지 일련의 과정에 대한 연구가 필요하다.

조직의 성장을 위해 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 형성되는데 이를 혈관신생이라 한다[8]. 혈관신생은 혈관의 기저막을 불안정하게 만들고, 혈관세포(ECs)의 이동과 증식을 유도한다[7, 9]. 혈관신생인자들은 EC를 포함하여 종양세포 등에서도 분비되며, VEGF, 섬유아세포성장인자(FGF), 피브리노겐 등이 있다[4]. 대표적인 혈관신생인자로는 VEGFA와 angiopoietin-1, -2 (Ang 1, 2) 등이 알려져 있다. VEGFA는 vascular endothelial growth factor receptor-1, -2 (VEGFR1, 2)에 binding 하며, 특히 VEGFR2와 결합하여 불안정한 기저막의 EC의 migration에 관여한다[7]. Ang 1, 2는 수용체인 Tie 2에 경쟁적으로 결합하는데, Ang 1-Tie 2 결합체는 혈관의 안정화와 유지의 역할을 한다[9]. Ang 2-Tie 2 결합체는 Ang 1에 antagonist로, 혈관의 불안정화와 재구조화에 영향을 미친다. Ang 2/Ang 1의 값은 혈관의 안정도를 확인하는 지표로 알려져 있다[9].

세포의 증식은 혈관신생의 중요한 과정이다. 종양세포의 경우 작은 oncoprotein인 ras 단백질이 그 수용체인 ral-interacting protein 76 kDa (RLIP76)에 binding하여 일어나는 G-protein 신호기전에 의해 증식과 조직의 성장이 일어나는 것으로 알려져 있다[10]. RLIP76는 대부분의 인간 조직에서 발현되며, 특히 다수의 암에서 과발현이 일어나는 것으로 알려져 있다[11-13]. 따라서 앞선 연구에서 RLIP76 발현을 차단하여 종양 조직의 퇴행을 유도하는 다수의 실험이 실시되었다[13, 14]. 또한 RLIP76 발현의 조절은 대표적인 혈관신생인자인 VEGF의 발현과 연관성이 있는 것으로 알려져 있다[10]. 따라서, 대표적인 혈관신생 관련 인자와 ras 계열의 oncoprotein을 연관 지어, 황체 내 밝혀지지 않고 있는 생리기전을 명확히 하기 위한 연구의 수행이 필요하다.

본 연구는 황체와 종양의 형성과정에 중요한 역할을 하는 혈관신생의 유사성을 확인하고자, 인간과 유사한 생리구조 현상을 지닌 소 황체조직에서 혈관신생관련 receptor인 VEGFR2, Tie 2와 oncoprotein인 H-ras와 RLIP76의 mRNA와 단백질의 발현을 알아보려고 실시하였다.

재료 및 방법

1. 소 황체 시료의 채취 및 구분

본 실험은 강원대학교 동물실험윤리위원회의 승인(No. KIACUC-17-109)을 받아 수행하였다. 소 황체 시료는 미경산우 한우로부터 난소를 분리하여 4°C, 0.85% 생리식염수에 보관

하여 2시간 이내에 실험실로 운반하여 실험에 사용하였다. 운반된 난소는 형태학적 방법으로 초기(황체의 크기 0.3~0.5 mm, 붉은색), 중기(1.0~1.5 mm, 황색), 후기(0.5~0.7 mm, 옅은 살색) 등 주기로 구분하여 각각 3개씩의 난소조직을 샘플로 하여, mRNA와 단백질을 측정하기 위해서 각각의 난소조직을 사용하였다. 실험에 사용한 난소는 4°C, 0.90% 생리식염수로 2회 세척하고, 실험에 사용하기 전까지 4°C가 유지되도록 ice에 담아 보관하였다.

2. RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)

혈액을 제거하고 황체조직은 RNAiso Plus (Takara, Japan)를 처리 후 RNA를 추출하였다. RNA의 농도를 측정된 뒤, cDNA synthesis KIT (Takara, Japan)를 처리하여 cDNA를 합성하였다. RT-PCR에 필요한 primer는 National center for biotechnology information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 디자인하여 제작하였다. 합성된 cDNA와 primer, PCR kit (PCR premix, Accupower, Bioneer, Cat No. K-2012, 2016)를 혼합하여 기존 연구[15]를 바탕으로 각각의 primer에 맞는 annealing temperature와 cycle 수를 설정하여 실시하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에 분주하여 100 V, 20 min간 전기영동을 실시하였다(Mupid-2plus, OPTIMA, Japan). 발현된 mRNA는 UV에 노출하여 Image J software 프로그램(NCBI, USA)을 사용하여 발현의 차이를 분석하였다.

3. Western blotting

황체조직 시료는 25 µg/20 µL의 농도로 정량하여, 단백질의 크기에 맞는 8~12%의 acrylamide gel에 100 V, 0.5 A, 90분간 전기영동을 실시하였다. 단백질을 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF membrane)으로 transfer 후, 항체의 비특이적 결합을 방지하기 위해 membrane을 5% blocking solution에 담가 1시간 동안 blocking을 실시하였다(5% skim milk in Tris-buffered saline/0.5% Tween-20; TBS-T). 각 인자에 맞는 일차 항체는 0.5% bovine serum albumin (BSA, Bovogen, Cat. No. BSAS 0.1, Australia)/TBS-T에 1:1,000으로 희석하여, 4°C에서 overnight 반응하고, 실온에서 1시간 추가로 반응시켰다. Secondary antibody는 1:10,000으로 희석하여 암실에서 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. Membrane을 ECL kit (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo, Cat. No. 32106)와 반응 후 EZ-capture II chemidoc (ATTO, Tokyo, Japan)을 사용하여 밴드를 확인하였다. Image J

software 프로그램을 사용하여 발현 밴드의 차이를 통계 처리하여 분석하였다.

4. 통계분석

실험에서 얻어진 결과는 통계 프로그램(SPSS version 24, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 최소 유의차 검정 (Least Significant Different test, LSD test)을 적용한 Duncan의 multiple range test에 의해 유의차($P < 0.05$) 검정을 실시하였다.

결 과

난소의 발정 주기별 황체조직에서 VEGFR2, Tie 2, H-ras, RLIP76 mRNA와 단백질 발현 양상

황체조직에서의 발정 주기별 VEGFR2, Tie 2, H-ras, RLIP76의 mRNA 발현을 분석한 결과, VEGFR2와 Tie 2는 황체초기와 중기에서는 강하게 발현하였으나, 후기에서는 발현이 감소하는 것으로 나타났다(Figure 1, $P < 0.05$). 또한, H-ras mRNA도 황체초기와 중기보다는 후기에서 발현이 감소하였다. RLIP76은 발정주기에 따른 mRNA 발현에 큰 차이가 확인되지 않았으나, 모든 황체주기에서 발현되는 것으로 나타났다(Figure 1, $P < 0.05$). VEGFR2와 Tie 2의 발현은 황체가 성장하기 위해서 혈관의 신생에 관여하기 때문에 황체의 후기보다는 초기와 중기에 과발현 되는 것으로 나타났다. 또한, H-ras가 황체의 초기와 중기에 강하게 발현되는 것으로 보아 황체의 퇴행기보다는 황체의 형성에 관여하는 것으로 보여진다.

황체조직에서 단백질 발현의 경우, VEGFR2와 Tie 2의 단백질 발현은 초기와 중기 황체에서 높은 수준으로 발현하였으나 후기 황체에서는 발현이 되지 않거나 감소하였다(Figure 2, $P < 0.05$). H-ras 단백질은 초기와 중기 황체에서 발현되었으나, 후기에서는 발현되지 않는 것으로 나타났다. 그리고, RLIP76 단백질은 모든 발정주기에서 발현되는 것으로 나타났다(Figure 2, $P < 0.05$). mRNA의 발현 결과와 유사하게 VEGFR2와 Tie 2

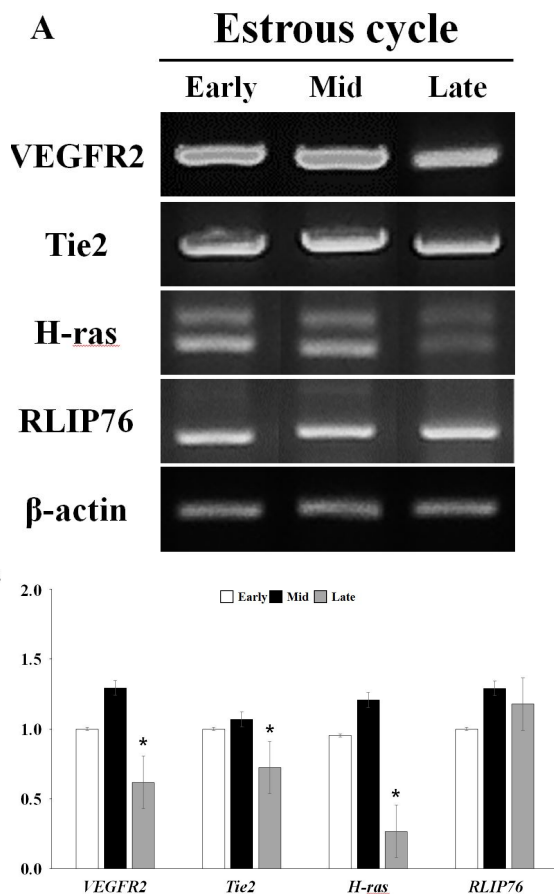


Figure 1. Angiogenic gene receptors and oncogenic factors mRNA were detected in corpus luteum tissues. (A) VEGFR2, Tie 2, H-ras, RLIP76 mRNA in luteal tissues during early-, middle-, late-luteal phase were expressed by quantitative PCR. (B) showed relative mRNA levels at different corpus luteum phases. Bars represent the means±SEM. Letters indicate that there was a statistical difference at $P < 0.05$.

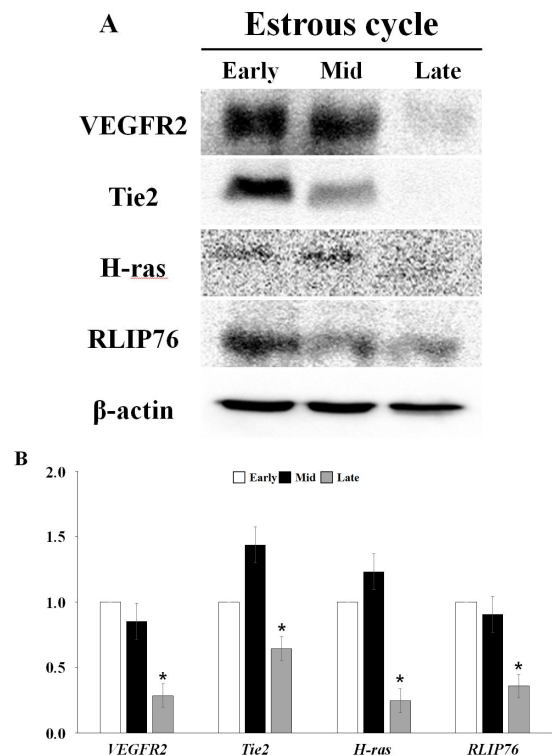


Figure 2. The protein expression of VEGFR2, Tie 2, H-ras, RLIP76 in corpus luteum tissues during the estrous cycle. (A) Protein levels of angiogenic receptors and oncogenic factors were expressed by Western blot. Each protein levels during corpus luteum phases are shown on (B) Bars represent the means±SEM. $P < 0.05$.

의 단백질 발현은 황체의 초기와 중기에서 강하게 발현되는 것으로 보아 혈관신생에 주요한 역할을 하는 것을 나타냈고, H-ras 단백질 발현은 약하게 발현되었으나 황체의 초기와 중기에서 발현되는 것으로 나타났다. RLIP76 단백질은 모든 주기에서 발현이 되었으나 황체 초기에서 강하게 발현되었다. H-ras와 RLIP76 단백질은 세포의 증식과 혈관신생 작용에 중요한 역할을 할 것으로 보여진다.

고 찰

황체는 호르몬과 성장인자에 의해서 형성되고 퇴행하는 과정을 반복하며 다양한 생리현상에 관여하는 것으로 보고하고 있다[16-18]. 또한, 황체에서 혈관신생작용에 관한 연구가 수행되고 있으나 그 기전은 아직까지 명확하게 밝혀지지 않고 있다[19-21]. 본 연구에서는 혈관신생과정에 영향을 미치는 새로운 인자를 밝혀내고, 유사한 혈관신생과정에서의 새로운 모델을 구축하고자 실시하였다. 그 결과를 토대로 혈관신생기전의 새로운 방향을 제시하고, 이를 검증하여 새로운 세포신호기전의 기반을 마련하는데 있다.

본 연구의 결과, 초기와 중기의 황체 조직에서 혈관신생관련 수용체인 VEGFR2와 Tie 2의 mRNA 및 단백질의 발현이 후기보다 높은 것으로 확인되었다. 이를 통해 황체의 혈관신생작용이 초기와 중기에서 활발하게 일어나고, 후기로 진행되며 황체의 퇴행이 이뤄지며 혈관신생작용이 저해되는 것을 확인할 수 있다. 황체 조직이 성장하기 위해서는 VEGFA, angiopoietin과 같은 다양한 인자가 작용한다. 이에 따라 EC의 이동, 증식 등 혈관신생 작용이 일어난다[1, 22, 23]. 이전 연구에서 VEGF와 VEGFR2의 mRNA는 초기 황체에서 가장 높은 수준으로 발현하였다[24]. Embryo의 혈관연구에서는 angiopoietin family의 경우 Ang1, Ang2로 구성되어 EC 특이 수용체인 Tie 2에 경쟁적으로 결합하여, 혈관의 안정과 재구성에 관여하는 보고가 있다[25]. Tie 2 mRNA와 단백질은 buffalo의 중기 황체에서 가장 높은 수준으로 발현되는 것을 알 수 있다[26]. 본 연구에서도 황체가 형성되기 위해서 새로운 혈관이 생성되기 때문에, 초기의 황체와 중기에서 혈관 수용체들이 강하게 발현되는 것으로 보인다.

또한, 우리는 종양 생성에 관여하는 인자가 황체조직에서 발현되는지를 알아보고자, 발정주기별 황체조직에서 H-ras와 RLIP76의 mRNA 및 단백질 발현을 측정하였다. GTPase 단백질인 H-ras의 mRNA와 단백질은 초기와 중기에서 발현되었으나, 후기에서는 발현되지 않았다. Buratta 등의 연구에 의하면, H-ras는 G-protein 수용체에 결합하여 종양 조직의 형성에 작

용한다는 보고가 있다[27]. 또한 H-ras는 VEGF의 발현을 향상시키고, 세포의 증식, 이동과 혈관신생에 관여하는 matrix metalloproteinase-2, 9 (MMP-2, 9)의 활성도 증가시킨다는 보고가 있다[28]. 따라서, H-ras가 황체에서 새로운 기능적 역할을 수행 할 것으로 보여지기 때문에 추가적인 세포실험을 통하여 그 기전을 명확하게 밝혀야 할 것이다.

RLIP76의 mRNA와 단백질 발현을 검토한 결과, mRNA는 발정주기에 따른 차이는 확인되지 않았으나 단백질 발현에서는 초기에서 가장 높은 수준으로 발현되는 것을 확인하였다. 이전의 연구 결과에서 RLIP76 knock out mouse와 wild-type mouse에 B16F10 mouse melanoma 세포와 Lewis lung carcinoma 세포를 이식한 결과로 형성된 RLIP76 knock out mouse의 종양 조직의 크기, 무게, VEGF 발현 등이 wild-type mouse보다 현저히 낮은 것을 보고하였다[12]. 본 실험에서도 초기와 중기황체에서 높은 수준으로 발현이 되었고, VEGFR2는 초기황체에서 가장 높은 수준으로 발현하였다. 이러한 결과를 보면, 황체의 혈관신생과정에서 RLIP76는 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

결론적으로 종양의 성장에 관여하는 RLIP76와 H-ras가 황체의 혈관신생 과정에 관여 할 수 있는 가능성을 암시하고 있다. 또한 혈관신생에 관여하는 주요 수용체들이 이들의 단백질에 의해서 조절된다면 황체의 새로운 기능뿐만 아니라 종양과의 상관관계를 알아보기 위한 중요한 자료가 될 것이다. 따라서, 추가적인 실험을 토대로 황체에서의 분자생물학적 세포실험을 통하여 RLIP76와 H-ras가 황체세포에 미치는 영향을 명확하게 밝힐 필요성이 있다.

요 약

황체는 발정주기에 따라 형성과 퇴행이 반복되는 일시적인 내분비기관이다. 본 연구에서는 황체와 종양의 혈관신생과정이 기능적과 구조적 기전이 유사하다는 가정하에 실시하였다. 먼저, 우리는 혈관신생관련 수용체인 VEGFR2와 Tie 2 mRNA와 단백질 발현을 검토하였다. 또한, RLIP76와 H-ras의 발현도 측정하였다. 그 결과, 초기와 중기황체에서 VEGFR2와 Tie 2 mRNA와 단백질의 발현되었으나, 후기황체에서는 발현이 감소하였다. H-ras의 경우, mRNA와 단백질 모두 초기와 중기황체에서 발현되었으나, 후기황체에서는 발현되지 않았다. RLIP76 mRNA은 모든 황체주기에서 발현되었고, 단백질은 초기황체에서 강하게 발현되었다. 이상의 결과를 토대로, RLIP76와 H-ras는 황체의 기능에 관여하고, 황체의 혈관신생과정 메

커니즘에 중요한 역할을 할 것이다.

Acknowledgements: This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (2018R1D1A3B07048167). This study was supported by 2017 Research Grant from Kangwon National University (No. 520170021).

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Kim M¹, Graduate student; Lee SH², Graduate student; Lee, SJ¹, Professor.

REFERENCES

1. Chouhan V, Dangi S, Gupta M, Babitha V, Khan F, Panda R, et al. Stimulatory effect of vascular endothelial growth factor on progesterone production and survivability of cultured bubaline luteal cells. *Anim Reprod Sci.* 2014;148:251-259.
2. Tomac J, Cekinović Đ, Arapović J. Biology of the corpus luteum. *Periodicum biologorum.* 2011;113:43-49.
3. Schams D, Berisha B. Regulation of corpus luteum function in cattle—an overview. *Reprod Domest Anim.* 2004;39:241-251.
4. Berisha B, Schams D, Rodler D, Pfaffl MW. Angiogenesis in the ovary—the most important regulatory event for follicle and corpus luteum development and function in cow—An overview. *Anat Histol Embryol.* 2016;45:124-130.
5. Abulafia O, Sherer DM. Angiogenesis of the ovary. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182:240-246.
6. Benyo DF, Pate JL. Tumor necrosis factor- α alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology.* 1992;130:854-860.
7. Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim.* 2004;39:206-216.
8. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386:671.
9. Berisha B, Schams D. Ovarian function in ruminants. *Domest Anim Endocrinol.* 2005;29:305-317.
10. Lee S, Goldfinger LE. RLIP76 regulates HIF-1 activity, VEGF expression and secretion in tumor cells, and secretome trans-activation of endothelial cells. *FASEB J.* 2014;28:4158-4168.
11. Awasthi YC, Singhal SS, Gupta S, Ahmad H, Zimniak P, Radomska A, et al. Purification and characterization of an ATPase from human liver which catalyzes ATP hydrolysis in the presence of the conjugates of bilirubin, bile acids and glutathione. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;175:1090-1096.
12. Lee S, Wurtzel JG, Singhal SS, Awasthi S, Goldfinger LE. RALBP1/RLIP76 depletion in mice suppresses tumor growth by inhibiting tumor neovascularization. *Cancer Res.* 2012;72:5165-5173. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0468>.
13. Singhal SS, Singhal J, Yadav S, Dwivedi S, Boor PJ, Awasthi YC, et al. Regression of lung and colon cancer xenografts by depleting or inhibiting RLIP76 (Ral-binding protein 1). *Cancer Res.* 2007;67:4382-4389.
14. Singhal SS, Awasthi YC, Awasthi S. Regression of melanoma in a murine model by RLIP76 depletion. *Cancer Res.* 2006;66:2354-2360.
15. Lee S, Lee SH, Yang BK, Park CK. The expression of VEGF, myoglobin and CRP2 proteins regulating endometrial remodeling in the porcine endometrial tissues during follicular and luteal phase. *Animal Sci J.* 2017;88:1291-1297.
16. Smith MW, Stevenson JS. Fate of the dominant follicle, embryonal survival, and pregnancy rates in dairy cattle treated with prostaglandin F 2α and progestins in the absence or presence of a functional corpus luteum. *J Anim Sci.* 1995;73:3743-3751.
17. Farin C, Moeller C, Mayan H, Gamboni F, Sawyer H, Niswender G. Effect of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on cell populations in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod.* 1988;38:413-421.
18. Garcia MR. Leptin contributes to the development of the corpus luteum. *Cell Dev Biol.* 2017;6:190. <https://doi.org/10.4172/2168-9296.1000190>.
19. de Carvalho Sousa LMM, Mendes GP, Campos DB, Baruselli PS, de Carvalho Papa P. Equine chorionic gonadotropin modulates the expression of genes related to the structure and function of the bovine corpus luteum. *PLoS One.* 2016;11:e0164089.
20. Wiles JR, Katchko RA, Benavides EA, O'Gorman CW, Escudero JM, Keisler DH, et al. The effect of leptin on luteal angiogenic factors during the luteal phase of the estrous cycle in goats. *Anim Reprod Sci.* 2014;148:121-129.
21. Stirling D, Magness R, Stone R, Waterman M, Simpson E. Angiotensin II inhibits luteinizing hormone-stimulated cholesterol side chain cleavage expression and stimulates basic fibroblast growth factor expression in bovine luteal cells in primary culture. *J Biol Chem.* 1990;265:5-8.
22. Robinson RS, Woad KJ, Hammond AJ, Laird M, Hunter MG, Mann GE. Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction.* 2009;138:869-881.
23. Chouhan V, Panda R, Yadav V, Babitha V, Khan F, Das G, et al. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in the corpus luteum during oestrous cycle in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Reprod Domest Anim.* 2013;48:810-818.
24. Schams D, Berisha B. Angiogenic factors in the bovine corpus luteum. *J Reprod Dev.* 2002;48:233-242.
25. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997;277:55-60.
26. Mishra S, Parmar M, Yadav V, Reshma R, Bharati J, Bharti M, et al. Expression and localization of angiopoietin family in corpus luteum during different stages of oestrous cycle and modulatory role of angiopoietins on steroidogenesis, angiogenesis and survivability of cultured buffalo luteal cells. *Reprod Domest Anim.* 2016;51:855-869.
27. Buratta S, Urbanelli L, Sagini K, Giovagnoli S, Caponi S, Fioretto D, et al. Extracellular vesicles released by fibroblasts undergoing H-Ras induced senescence show changes in lipid profile. *PLoS One.* 2017;12:e0188840.
28. Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA, Ghiso N, Cao Y, Klauber N, et al. Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:861-866.