

亚油酸对奶牛乳腺上皮细胞乳脂肪和乳蛋白合成相关基因表达的影响

李大彪* 李红磊 邢媛媛 于永强 王卫云 陈玲 李平

(内蒙古农业大学动物科学学院, 呼和浩特 010018)

摘要 该文主要研究了添加不同浓度的亚油酸(顺-9,顺-12-十八碳二烯酸)(0、20、40、80、120 $\mu\text{mol/L}$)对奶牛乳腺上皮细胞(bovine mammary epithelial cells, BMECs)乳脂和乳蛋白合成相关基因表达的影响。通过MTT法检测细胞活力,利用甘油三酯试剂盒检测BMECs内甘油三酯(triglyceride, TAG)的合成量,实时荧光定量PCR检测乳脂和乳蛋白合成相关基因的表达。结果表明:(1)添加20 $\mu\text{mol/L}$ 的亚油酸能促进BMECs的增殖,120 $\mu\text{mol/L}$ 的亚油酸组BMECs的相对增殖率显著低于对照组($P<0.05$);(2)40 $\mu\text{mol/L}$ 和80 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸添加组BMECs中TAG的合成量显著高于对照组($P<0.05$);(3)添加20 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸显著上调 αs1 -酪蛋白(casein αs1 identifiers symbols, *CSN1S1*)和 κ -酪蛋白(κ -casein, *CSN3*)基因的表达,而80 $\mu\text{mol/L}$ 和120 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸显著下调*CSN1S1*和*CSN3*基因的表达($P<0.05$);(4)120 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸上调了真核启动子4E结合蛋白-1(eukaryotic initiation factor 4E-binding-protein-1, *4EBP1*)基因的表达,下调了核糖体蛋白S6激酶-1(ribosomal protein S6 kinase-1, *RPS6K1*)基因的表达($P<0.05$);(5)添加20~120 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸显著下调脂肪酸合酶(fatty acid synthase, *FASN*)、硬脂酰辅酶A去饱和酶(stearoyl-CoA desaturase, *SCD*)、脂肪酸结合蛋白-3(fatty acid-binding protein-3, *FABP3*)的基因表达($P<0.05$);(6)20 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸添加组过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor γ , *PPARG*)基因表达量显著高于对照组,而120 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸组*PPARG*、固醇调节元件结合因子-1(sterol regulatory element binding factor-1, *SREBF1*)的表达量显著低于对照组($P<0.05$)。综上所述,20~40 $\mu\text{mol/L}$ 的亚油酸对BMECs乳脂肪和乳蛋白合成有较好的促进效果。

关键词 奶牛乳腺上皮细胞; 细胞活力; αs1 -酪蛋白; κ -酪蛋白; 甘油三酯; 乳脂合成相关基因

Effect of Linoleic Acid on the Expression of Genes Associated with Milk Fat and Milk Protein Synthesis of Bovine Mammary Epithelial Cells

Li Dabiao*, Li Honglei, Xing Yuanyuan, Yu Yongqiang, Wang Weiyun, Chen Ling, Li Ping

(College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010031, China)

Abstract The aim of this study was to determine the effect of linoleic acid supplementation (0, 20, 40, 80, 120 $\mu\text{mol/L}$) on expression of genes involved in milk fat and protein synthesis in bovine mammary epithelial cells (BMECs). Cell viability was detected by MTT. Triglyceride (TAG) content was measured by using triglyceride de-

收稿日期: 2015-10-22 接受日期: 2016-01-22

内蒙古自治区高等学校“青年科技英才支持计划”(批准号: NJYT-14-B05)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-4307726, E-mail: dkyldb@imau.edu.cn

Received: October 22, 2015 Accepted: January 22, 2016

This work was supported by the Inner Mongolia Autonomous Region “Young Talents of Science and Technology Support Project” of Institutions of Higher Learning (Grant No. NJYT-14-B05)

*Corresponding author. Tel: +86-471-4307726, E-mail: dkyldb@imau.edu.cn

网络出版时间: 2016-03-17 17:56:09 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160317.1756.004.html>

termination kit. Expression of genes involved in milk fat and milk protein synthesis were measured by RT-qPCR. The results showed as follows. (1) 20 $\mu\text{mol/L}$ linoleic acid promoted the proliferation of BMECs. However, 120 $\mu\text{mol/L}$ linoleic acid significantly decreased the relative proliferation rate of BMECs ($P<0.05$). (2) The content of TAG in BMECs were significantly higher in groups with addition of 40 $\mu\text{mol/L}$ and 80 $\mu\text{mol/L}$ linoleic acid than that of control group ($P<0.05$). (3) 20 $\mu\text{mol/L}$ linoleic acid significantly upregulated the transcription of *CSN1S1* and *CSN3*, whereas 80 $\mu\text{mol/L}$ and 120 $\mu\text{mol/L}$ linoleic acid significantly downregulated the transcription of *CSN1S1* and *CSN3* ($P<0.05$). (4) 120 $\mu\text{mol/L}$ linoleic acid significantly upregulated the transcription of *4EBP1*, and downregulated the transcription of *RPS6K1* ($P<0.05$). (5) The mRNA levels of *FASN*, *SCD* and *FABP3* in linoleic acid supplementation groups were significantly lower than those of control group ($P<0.05$). (6) 20 $\mu\text{mol/L}$ linoleic acid significantly upregulated the transcription of *PPARG*, whereas 120 $\mu\text{mol/L}$ linoleic acid significantly downregulated the transcription of *PPARG* and *SREBF1* ($P<0.05$). In conclusion, 20~40 $\mu\text{mol/L}$ linoleic acid are optimal, considering its simulative effects on milk fat and protein synthesis.

Keywords BMECs; cell viability; α s1-casein; κ -casein; TAG; genes associated with milk fat synthesis

在日益追求健康饮食的今天, 牛奶成为越来越多人的选择, 对牛奶质量的要求也越来越高。脂肪和蛋白质作为牛奶中重要的营养物质, 是衡量牛奶品质的重要指标, 是牛奶作为高营养食品的物质基础。我国生鲜乳的品质比较低, 乳蛋白和乳脂肪的含量普遍低于发达国家^[1]。所以, 加快奶业发展进度、提高牛奶中各种营养成分的含量、促进奶类消费, 是增强全民族体质的迫切需要^[2]。血液中乳成分前体物(milk components precursor, MCP)的含量和组成直接影响着牛奶中乳脂肪和乳蛋白的含量。为了改善牛乳品质, 前人开展了大量研究工作。在体内试验中, 往往通过饲料添加或灌注的方法来研究MCP对牛乳合成的影响。有研究表明, 饲喂泌乳奶牛含有脂和油的饲料, 会降低乳腺中脂肪酸的从头合成^[3]。Purdie等^[4]研究发现, 灌注乙酸盐会引起奶牛动脉血中葡萄糖和胰岛素的浓度显著增加。而体外实验主要以培养的奶牛乳腺上皮细胞(bovine mammary epithelial cells, BMECs)和组织块为模型, 研究乳腺的发育机制和乳汁的合成分泌机制。雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路在调节乳蛋白和乳脂肪合成方面起重要作用, 除了内分泌信号外, 乳腺氨基酸的利用和细胞能量水平都受到mTOR信号途径的调控^[5]。亚油酸是人体必需脂肪酸, 具有抗肿瘤、抗氧化、抗动脉粥样硬化、提高免疫力、提高骨骼密度、防治糖尿病等多种生理功能。关于亚油酸在动物机体中的重要作用, 前人做了大量研究。刘仕军等^[6]的研究表明, 在饲料中添加亚油酸一定程度上可以降低乳蛋

白质、酪蛋白以及乳清蛋白的含量。崔瑞莲等^[7]的研究表明, 在细胞增殖不受抑制的脂肪酸添加浓度范围内, BMECs甘油三酯的合成对硬脂酸、油酸、亚油酸及亚麻酸均有剂量依赖效应。Yonezawa等^[8]的研究表明, 在培养液中添加棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸均能促进BMECs中*CSN1S1*(casein alpha s1 identifiers symbols)的表达。齐利枝等^[9]的研究表明, *mTOR*的mRNA相对表达量随着油酸、亚油酸或亚麻酸添加浓度的增加呈一次线性或二次线性曲线增加, 并呈剂量依赖关系。本实验以体外培养的BMECs为模型, 研究添加不同浓度的亚油酸对BMECs活力和胞内甘油三酯(triglyceride, TAG)含量的变化规律以及对乳脂肪和乳蛋白合成相关基因表达的影响, 旨在为调控乳脂肪和乳蛋白合成提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM/F12、胎牛血清、无脂肪酸的牛血清白蛋白、氢化可的松、胰岛素-转铁蛋白-硒溶液均购自Gibco公司, 表皮生长因子、催乳素、胶原酶II粉剂、双抗、胰蛋白酶/EDTA混合液、MTT粉剂和亚油酸、二甲基亚砷均购自Sigma公司; 磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)溶液购自HyClone公司; 总RNA提取试剂盒RNA Isoplus、RT-PCR试剂盒Prime Script™ RT Reagent Kit、Real-time PCR试剂盒均购自TaKaRa公司; TAG试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 BMECs的培养与鉴定

用胶原酶消化法获得原代BMECs。选取泌乳期的荷斯坦奶牛3头, 经伦理委员会同意, 通过宰杀的方式采集结缔组织和脂肪组织较少的乳腺组织, 将乳腺组织在配液瓶中清洗, 用3×双抗PBS缓冲液清洗3次, 经75%酒精浸泡漂洗, 再将组织放入1×双抗PBS缓冲液瓶, 清洗3次, 此时已基本清洗干净。用眼科剪分离去除脂肪和结缔组织, 得到腺泡组织后将其剪碎至1 mm³左右的大小^[10], 用弯头吸管转移至离心管, 加入0.5% II型胶原酶溶液, 置于37 °C、5% CO₂浓度的恒温培养箱中消化1~1.5 h, 期间每隔20 min晃动离心管。消化液用孔径100目的细胞滤器过滤, 收集细胞滤液转入10 mL离心管, 800 r/min, 离心8 min, 弃去上清液。用生长培养基悬浮细胞后接种于一次性培养瓶内, 于37 °C、5% CO₂浓度的恒温培养箱培养, 待原代细胞生长至70%~80%汇合时, 根据不同的贴壁时间和对胰蛋白酶的敏感度不同来纯化BMECs并传代。实验时用0.25%胰蛋白酶3 mL在37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中消化3 min, 待成纤维细胞变圆后小心倒掉胰酶消化液, 加入PBS清洗1遍, 再加入0.25%胰蛋白酶2.5 mL、0.02% EDTA 2.5 mL, 放入37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中消化5 min, 等80%的细胞悬浮在培养瓶中, 即用终止培养基终止消化。BMECs传至第2代(P2)备用。原代培养所得到的BMECs见图1。

应用荧光免疫染色法鉴定奶牛乳腺上皮细胞骨架蛋白CK-18的表达情况。经检测所培养的BMECs呈阳性, 说明本试验分离培养的细胞是BMECs(图2)。

1.3 实验设计

采用单因子完全随机实验设计。采集3头健康

的泌乳期荷斯坦奶牛的BMECs进行实验。实验设计5个处理组, 亚油酸的终浓度分别是0(对照)、20、40、80、120 μmol/L, 每组3个重复, 培养液中的胎牛血清用1 g/L的牛血清白蛋白代替。

亚油酸(顺-9,顺-12-十八碳二烯酸)的配置: 将亚油酸溶于无水乙醇中, 终浓度为35.66 mmol/L, 保存于-80 °C备用。在配置培养基时, 将亚油酸添加到不含有脂肪酸的牛血清白蛋白中, 使亚油酸与牛血清白蛋白结合, 再加入到液体培养基中, 防止亚油酸析出。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 MTT法测定BMECs活力 利用MTT法检测BMECs的活力。将细胞悬浮液以1×10⁴的密度接种在96孔培养板上, 于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中培养。待细胞长到70%~80%汇合后分别添加含有不同浓度亚油酸的诱导培养液, 继续培养24 h, 每实验组设7个重复。在培养结束前4 h, 各培养孔加入MTT(5 mg/mL) 20 μL, 4 h后弃去上清液, 每孔加入二甲基亚砜(DMSO) 100 μL/孔, 振荡10 min, 用全自动酶标仪检测各孔490 nm波长下的吸光光度(D_{490})值。细胞相对增殖率(relative growth rate, RGR)=试验组 D_{490} /对照组 D_{490} 。

1.4.2 BMECs中TAG含量的测定 将P2代的BMECs用胰酶/EDTA消化后, 以8×10⁵/瓶的密度接种于75 cm²的培养瓶中, 待细胞生长至70%~80%汇合时, 添加含有亚油酸的诱导培养液继续培养24 h, 利用胰蛋白酶/EDTA消化细胞, 用TAG试剂盒测定BMECs中TAG的含量。

1.4.3 BMECs乳脂、乳蛋白合成相关基因表达量的测定 利用实时定量PCR法测定BMECs乳脂、乳

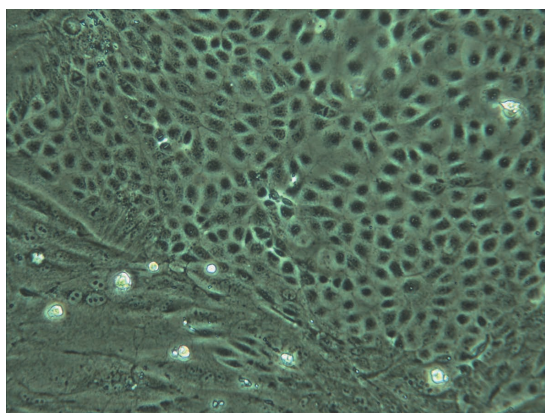


图1 原代培养的奶牛乳腺上皮细胞(100×)

Fig.1 Primary cultured bovine mammary cells (100×)

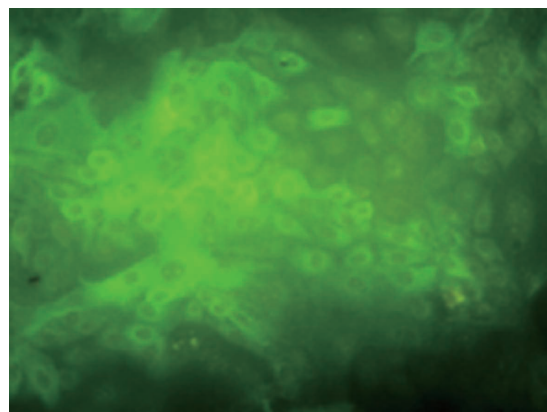


图2 奶牛乳腺上皮细胞的免疫细胞化学分析(100×)

Fig.2 Immunocytochemistry of bovine mammary epithelial cells (100×)

蛋白合成相关基因的表达量。将P2代细胞悬浮液接种于75 cm²培养瓶中, 每瓶10 mL含有 8×10^5 细胞, 置于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中培养。待细胞生长至70%~80%汇合后分别添加含有不同浓度亚油酸的DMEM/F12诱导培养液, 于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中继续培养24 h, 用0.25%胰蛋白酶/EDTA于37 °C消化细胞, 将细胞悬浮液以800 r/min离心10 min, 弃去上清液, 用PBS清洗2次。细胞总RNA的提取采用试剂盒按说明进行, 用分光光度计测定提取的总RNA的浓度及 D_{260}/D_{280} , 反转录PCR按照试剂盒说明进行操作。引物序列及参数见表1。

1.5 数据统计分析

实验数据采用Excel 2007进行计算和整理, 实时定量PCR实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量数据分析^[11]。利用SAS 9.0软件的ANOVA程序对数据进行方差分析, 多重比较采用Duncan氏法。 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 不同浓度亚油酸对BMECs增殖的影响

由表2可以看出, 添加20 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸, BMECs的相对增殖率有高于对照组的趋势, 但统计分析差异不显著($P > 0.05$); 40~120 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸添加组BMECs相对增殖率均低于对照组, 其中, 120 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

2.2 不同浓度的亚油酸对BMECs中TAG含量的影响

由表3可知, 40 $\mu\text{mol/L}$ 和80 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸组BMECs中TAG的合成量显著高于对照组($P < 0.05$), 而120 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸组TAG合成量显著低于对照组($P < 0.05$); 20 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸添加组TAG合成量高于对照组, 但统计分析差异不显著($P > 0.05$)。

2.3 不同浓度的亚油酸对BMECs乳脂肪合成相关基因表达的影响

从表4可以看出, 添加20~120 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸会

表1 引物序列及参数

Table 1 Primer sequences and paramter

基因名称 Genes	引物序列 Primer sequences	Gene bank序列号 Gene bank accessions No.
<i>GAPDH</i>	F: 5'-GTT TGT GAT GGG CGT GAA C-3' R: 5'-CAG TCT TCT GGG TGG CAG TGA T-3'	XM-001034034.1
<i>CSN1S1</i>	F: 5'-TTC CCT CTT TCA TAC TGT GAA GTC GT-3' R: 5'-GGC TAT GGC TCC TAA GCA CA-3'	NM_181029.2
<i>CSN3</i>	F: 5'-CCA GCT GCA GTT AGG TCA C-3' R: 5'-GGT GGA ATG GCC ATA AAT GAT-3'	NM_174294.1
<i>mTOR</i>	F: 5'-TGT GGA GTT TGA GGT GAA GC-3' R: 5'-ATT ATC AAA GAA GGG CTG CAC-3'	XM_002694043.1
<i>STAT5</i>	F: 5'-TGT GGA GTT TGA GGT GAA GC-3' R: 5'-ATT ATC AAA GAA GGG CTG CAC-3'	NM_001012673
<i>AKT</i>	F: 5'-CCT GCT CTC TGG GCT ACT CAA-3' R: 5'-CAC GAT GCT GGC GAA GAA-3'	NM_005163
<i>4EBP1</i>	F: 5'-GAA CTC ACC TGT GAC CAA GA-3' R: 5'-CTC AAA CTG TGA CTC TTC ACC-3'	BC120290.1
<i>PR56K1</i>	F: 5'-ATG AAA GCA TGG ACC ATG GG-3' R: 5'-CCG GTA TTT GCT CCT GTT AC-3'	NM205816.1
<i>ACACA</i>	F: 5'-GTT TGT GAT GGG CGT GAA CC-3' R: 5'-CAG TCT TCT GGG TGG CAG TGA T-3'	NM_174224
<i>FASN</i>	F: 5'-GTT TGT GAT GGG CGT GAA CC-3' R: 5'-CAG TCT TCT GGG TGG CAG TGA T-3'	NM_001012699
<i>DGAT2</i>	F: 5'-CAT GAA GAC CCT CAT AGC CG-3' R: 5'-ACC AGC CAG GTG AAG TAG AGC-3'	NM_205793
<i>SCD</i>	F: 5'-TCC TGT TGT TGT GCT TCA TCC-3' R: 5'-GGC ATA ACG GAA TAA GGT GGC-3'	AY241993
<i>FABP3</i>	F: 5'-GAA CTC GAC TCC CAG CTT GAA-3' R: 5'-AAG CCT ACC ACA ATC ATC GAA G-3'	DN518905
<i>PPARG</i>	F: 5'-ATG TCT CAT AAT GCC ATC AGG TT-3' R: 5'-GAT AAC AAA CGG TGA TTT GTC TGT C-3'	NM_181024
<i>SREBF1</i>	F: 5'-CGC TCT TCC ATC AAT GAC AA-3' R: 5'-TTC AGC GAT TTG CTT TTG TG-3'	NM_001113302

表2 亚油酸对奶牛乳腺上皮细胞活力的影响
Table 2 Effect of linoleic acid on activity of bovine mammary epithelial cells

项目 Items	亚油酸浓度(μmol/L) Linoleic acid concentration (μmol/L)				
	0	20	40	80	120
RGR	1±0.06 ^{ab}	1.07±0.08 ^a	0.99±0.04 ^{ab}	0.89±0.02 ^{bc}	0.85±0.02 ^c

同行数据肩注不包含相同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下表同。
Values in the same row with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same as below.

表3 添加亚油酸对奶牛乳腺上皮细胞内TAG合成的影响
Table 3 Effect of linoleic acid on the triglyceride content of bovine mammary epithelial cells

项目 Items	亚油酸浓度(μmol/L) Linoleic acid concentration (μmol/L)				
	0	20	40	80	120
TAG	0.0142±0.003 ^b	0.0154±0.002 ^b	0.019±0.004 ^a	0.022±0.004 ^a	0.012±0.003 ^c

表4 不同浓度亚油酸对奶牛乳腺上皮细胞乳脂肪合成相关基因表达的影响
Table 4 Effects of supplementation of linoleic acid on the expression of genes associated with milk fat synthesis in bovine mammary epithelial cells

项目 Items	亚油酸浓度(μmol/L) Linoleic acid concentration (μmol/L)				
	0	20	40	80	120
<i>ACACA</i>	1.00±0.31 ^a	0.95±0.18 ^a	0.67±0.11 ^b	0.80±0.15 ^{ab}	0.73±0.07 ^{ab}
<i>FASN</i>	1.00±0.09 ^a	0.62±0.12 ^b	0.22±0.03 ^c	0.18±0.01 ^c	0.22±0.03 ^c
<i>DGAT2</i>	1.00±0.65 ^{bc}	1.52±0.24 ^a	1.10±0.11 ^b	1.08±0.18 ^b	0.69±0.16 ^c
<i>SCD</i>	1.00±0.49 ^a	0.54±0.13 ^b	0.27±0.13 ^c	0.25±0.05 ^c	0.22±0.03 ^c
<i>FABP3</i>	1.0±0.001 ^a	0.70±0.10 ^b	0.31±0.06 ^c	0.30±0.05 ^c	0.20±0.02 ^d
<i>SREBF1</i>	1.00±0.23 ^a	0.76±0.03 ^a	0.44±0.04 ^b	0.19±0.1 ^b	0.20±0.1 ^b
<i>PPARG</i>	1.00±0.32 ^b	1.35±0.19 ^a	0.47±0.14 ^c	0.91±0.13 ^b	0.64±0.02 ^c

表5 不同浓度亚油酸对奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白合成相关基因表达的影响
Table 5 Effects of supplementation of linoleic acid on the expression of genes associated with milk protein synthesis in bovine mammary epithelial cells

项目 Items	亚油酸浓度(μmol/L) Linoleic acid concentration (μmol/L)				
	0	20	40	80	120
<i>CSN1S1</i>	1.00±0.11 ^b	1.67±0.38 ^a	0.70±0.12 ^{bc}	0.39±0.01 ^{cd}	0.25±0.02 ^d
<i>CSN3</i>	1.00±0.32 ^b	1.21±0.02 ^a	1.07±0.11 ^{bc}	0.47±0.06 ^{cd}	0.61±0.12 ^d
<i>STAT5</i>	1.00±0.15 ^b	1.22±0.08 ^a	0.83±0.13 ^{bc}	0.33±0.50 ^c	0.63±0.13 ^c
<i>mTOR</i>	1.00±0.24 ^{ab}	1.22±0.10 ^a	1.00±0.17 ^{ab}	0.76±0.12 ^b	0.87±0.14 ^b
<i>AKT</i>	1.00±0.30 ^a	0.74±0.09 ^b	0.96±0.17 ^a	0.57±0.16 ^b	0.64±0.14 ^b
<i>4EBP1</i>	1.00±0.11 ^{bc}	1.32±0.38 ^{ab}	1.24±0.12 ^{ab}	0.66±0.01 ^c	1.45±0.02 ^a
<i>RPS6K1</i>	1.00±0.03 ^{ab}	1.58±0.12 ^a	1.30±0.20 ^b	1.36±0.05 ^{ab}	0.67±0.09 ^d

抑制BMECs中*ACACA*(acetyl-coenzyme a carboxylase a)基因的表达, 其中, 40 μmol/L亚油酸组*ACACA*基因的表达量显著低于对照组($P<0.05$)。添加不同浓度亚油酸会显著抑制*FASN*(fatty acid synthase)、*SCD*(stearoyl-CoA desaturase)和*FABP3*(fatty acid-binding protein-3)基因表达($P<0.05$); 20 μmol/L亚油酸添加组*DGAT2*(diacylglycerol acyltransferase 2)基因表达量显著高于对照组($P<0.05$); 40 μmol/L、

80 μmol/L亚油酸添加组*DGAT2*的表达量有上调趋势, 而120 μmol/L的亚油酸组*DGAT2*的表达量显著低于对照组($P<0.05$)。添加40~120 μmol/L亚油酸组*SREBF1*(sterol regulatory element binding factor 1)基因表达量显著低于对照组和20 μmol/L亚油酸组($P<0.05$), 而20 μmol/L亚油酸组与对照组无显著差异。20 μmol/L亚油酸添加组*PPARG*(peroxisome proliferator-activated receptor γ)基因表达量显著高于

对照组($P<0.05$), 而40 $\mu\text{mol/L}$ 和120 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸添加组则显著低于对照组($P<0.05$)。

2.4 不同浓度的亚油酸对BMECs乳蛋白合成相关基因表达的影响

从表5可以看出, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的亚油酸添加组, *CSN1S1*、*CSN3*(κ -casein)、信号转导和转录激活因子5(signal transducer and activator of transcription 5, *STAT5*)基因相对表达水平显著高于对照组($P<0.05$), 80 $\mu\text{mol/L}$ 和120 $\mu\text{mol/L}$ 的亚油酸组, *CSN1S1*、*CSN3*、*STAT5*基因表达量显著低于对照组($P<0.05$)。20 $\mu\text{mol/L}$ 的亚油酸组, *mTOR*的表达量与对照组相比有增加的趋势, 80 $\mu\text{mol/L}$ 和120 $\mu\text{mol/L}$ 的亚油酸组, *mTOR*表达量有下降的趋势, 但统计分析差异不显著($P>0.05$)。20、80、120 $\mu\text{mol/L}$ 的亚油酸添加组, *AKT*(serine-threonine protein kinase)的表达量显著低于对照组($P<0.05$)。120 $\mu\text{mol/L}$ 的亚油酸添加组, *4EBP1*(eukaryotic initiation factor 4E-binding-protein-1)的表达量显著高于对照组($P<0.05$), *RPS6K1*(ribosomal protein S6 kinase-1)的表达量显著低于对照组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 亚油酸对BMECs的活力的影响

体外培养BMECs的增殖、分化、生理功能等受多种因素的影响。脂肪酸作为乳脂肪合成的前体物, 其对乳腺上皮细胞的增殖具有一定的作用。王治国等^[12]研究发现, 饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸都会抑制BMECs的增殖, 其抑制情况呈现浓度依赖效应。孙晓菊等^[13]研究表明, 低浓度的亚油酸会促进BMECs的增殖, 高浓度则抑制细胞的增殖。本研究发现, 添加较高浓度的亚油酸(120 $\mu\text{mol/L}$)会显著抑制BMECs相对增殖率, 这与前人研究结果是一致的。

3.2 亚油酸对BMECs乳脂肪合成相关基因表达及TAG合成的影响

针对如何提高牛奶中乳脂肪的含量和改善乳脂肪组成, 研究者们开展了大量的研究工作。乳脂肪在BMECs的合成和分泌是一个复杂而协同的过程, 需要多种基因或蛋白的参与。*ACACA*、*FASN*是乳腺脂肪酸从头合成的关键酶。前人研究发现, 长链脂肪酸的供给会抑制短链脂肪酸的从头合成^[14]。添加十八碳脂肪酸会抑制胞质内TAG的合

成^[15]。崔瑞莲等^[7]研究发现, 添加不饱和脂肪酸, 会抑制*ACACA*、*FASN*和*SCD*基因的表达。本研究得出, 亚油酸添加组*FASN*和40 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸组*ACACA*基因表达量均显著低于对照组, 这与前人的研究结果是一致的。

DGAT2是TAG合成过程中的限速酶, 其主要作用是催化二酰甘油生物合成TAG。有研究表明, 在体外培养BMECs中添加长链脂肪酸能促进TAG的合成, 并对*DGAT2*的基因表达有一定的上调作用^[16-17]。本研究结果表明, 20 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸促进*DGAT2*的表达, 而120 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸则显著抑制*DGAT2*的表达, 这与120 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸组TAG含量显著低于对照组的结果相吻合。*SCD*是一种主要的 $\Delta 9$ 去饱和酶, 为细胞内单不饱和脂肪酸合成的限速酶, 也参与胆固醇的合成。卜登攀等^[17]研究表明, 日粮中添加豆油、鱼油均会导致奶牛乳腺组织*SCD* mRNA表达量的下降。胡菡等^[18]研究指出, 亚麻酸浓度大于5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 乳腺上皮细胞*SCD* mRNA表达量显著下降。本研究得出, 添加20~120 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸显著下调了*SCD*基因表达, 表明添加多不饱和脂肪酸可能会影响乳脂肪酸的组成。*FABP*(fatty acid-binding-protein)是一组结合长链脂肪酸的胞质蛋白质, 在很多组织的脂肪酸摄取和转运过程中起重要作用。*FABP3*对长链脂肪酸有高亲和力, 能协同其他酶一起将长链脂肪酸酯化成甘油三酯。前人研究表明, 饱和长链脂肪酸会增加BMECs中*FABP3*的基因表达量, 而不饱和长链脂肪酸则降低*FABP3*的基因表达量^[18]。本研究得出, 亚油酸添加组*FABP3*的基因表达量显著低于对照组, 这与前人研究结果相一致。

SREBP(sterol-regulatory element binding protein)和PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor)在乳脂合成基因中具有主导调控作用, 是脂肪酸和胆固醇合成过程中一些关键酶基因的主要激活剂。Kadegowda等^[16]研究报道, c9 18:1, t10 18:1, t10c12CLA和C20:5都降低了BMECs中*SREBF1*的基因表达, 而对*PPARG*的基因表达没有显著影响。胡菡等^[18]研究指出, 添加亚麻酸显著降低了*SREBF1* mRNA的转录水平, 高浓度的亚麻酸会下调*PPARG* mRNA转录水平。本研究发现, 120 $\mu\text{mol/L}$ 亚油酸添加组*SREBF1*和*PPARG*的基因表达量显著低于对照组, 这可能是导致该处理组TAG含量显著降低的主要原因。

3.3 油酸对BMECs乳蛋白合成相关基因表达的影响

乳蛋白合成过程存在两条重要的信号通路: 一条是JAK-STAT(Janus kinase 2-signal transducer and activator)信号通路, 调控乳腺组织内的乳蛋白合成相关基因的转录激活; 另一条是mTOR信号通路, 在蛋白质翻译水平上影响蛋白质合成^[19]。前人研究发现, 乳脂合成前体物影响乳蛋白合成, 但结果不尽一致。Yonezawa等^[20]利用体外研究发现, 外源补加棕榈酸、油酸和亚油酸等长链脂肪酸促进了*CSN1S1*基因的表达。然而, 也有研究报道, 添加乳脂合成前体物会抑制乳蛋白的合成。Jenkins等^[21]指出, 奶牛日粮中添加脂肪能提高乳脂率和泌乳量, 但通常会降低乳蛋白率, 而且以酪蛋白下降最多。塔娜等^[11]研究发现, BMECs中同时添加乙酸钠和β-羟丁酸钠显著下调*CSN1S1*、*CSN3*基因表达, 而*mTOR*基因表达则显著上调。

本研究发现, 20 μmol/L的亚油酸组*CSN1S1*和*CSN3*基因的表达量显著高于对照组, 而80 μmol/L和120 μmol/L的亚油酸组显著低于对照组。结合JAK-STAT和mTOR信号通路上下游基因表达的变化规律, 本文得出低浓度的亚油酸可能会通过上调*STAT5*、*mTOR*和*RPS6KI*基因表达, 促进酪蛋白的合成; 而高浓度的亚油酸则会下调*STAT5*、*mTOR*和*RPS6KI*基因表达, 上调*4EBP1*基因表达, 抑制酪蛋白的转录和翻译过程, 这还有待进一步研究的证实。

本研究得出, 40 μmol/L和80 μmol/L亚油酸显著增加了奶牛乳腺上皮细胞TAG的合成。20 μmol/L亚油酸显著上调奶牛乳腺上皮细胞*CSN1S1*、*CSN3*、*STAT5*的基因表达。120 μmol/L亚油酸显著减少了奶牛乳腺上皮细胞TAG的合成, 上调*4EBP1*基因的表达, 下调了*FASN*、*SCD*、*FABP3*、*SREBF1*、*PPARG*、*CSN1S1*、*CSN3*、*STAT5*、*mTOR*、*RPS6KI*的基因表达。综合各项指标, 20~40 μmol/L的亚油酸对乳脂肪和乳蛋白的合成有较好的促进效果。

参考文献 (References)

- 1 王加启. 牛奶乳脂肪和乳蛋白的合成与调控机理. 饲料营养研究进展(Wang Jiaqi. Milk fat and milk protein synthesis and regulation mechanisms. Research Progress of Feed Nutrition) 2010; 12: 67-78.
- 2 韩高举. 中国奶业发展问题研究. 华中农业大学博士学位论文(Han Gaoju. Studies on the development of dairy industry in China. Hua zhong Agricultural University doctoral thesis), 2005.
- 3 Lacount DW, Drackley JK, Laesch SO. Secretion of oleic acid in milk fat in response to abomasal infusion of canola or high oleic sunflower fatty acids. J Dairy Sci 1994; 77(2): 1372-85.
- 4 Purdie NG, Trout DR, Poppi DP, Cant JP. Milk synthetic response of the bovine mammary gland to an increase in the local concentration of amino acids and acetate. J Dairy Sci 2008; 91(1): 218-28.
- 5 Burgos SA, Dai M, Cant JP. Nutrient availability and lactogenic hormones regulate mammary protein synthesis through the mammalian target of rapamycin signaling pathway. J Dairy Sci 2010; 93(1): 153-61.
- 6 刘仕军, 卜登攀, 王加启, 梁松, 刘亮, 魏宏阳, 等. 日粮添加LA和DHA对乳脂脂肪酸含量及比值的影响. 动物营养学报(Liu Shijun, Pu Dengpan, Wang Jiaqi, Liang Song, Liu Liang, Wei Hongyang, et al. Chinese Journal of Animal Nutrition) 2008; 20(5): 515-21.
- 7 崔瑞莲, 王加启, 卜登攀, 魏宏阳, 南雪梅, 胡菡, 等. 不同十八碳脂肪酸对奶牛乳腺上皮细胞增殖及甘油三酯合成的影响. 畜牧兽医学报(Cui Ruilian, Wang Jiaqi, Pu Dengpan, Wei Hongyang, Nan Xuemei, Hu Han, et al. Effects of 18-carbon fatty acids on cell proliferation and triacylglycerol accumulation in bovine mammary epithelial cell in vitro. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica) 2012; 43(7): 1064-70.
- 8 Yonezawa T, Yonekura S, Kobayashi Y. Effects of long-chain fatty acids on cytosolic triacylglycerol accumulation and lipid droplet formation in primary cultured bovine mammary epithelial cells. J Dairy Sci 2004; 87(8): 2527-34.
- 9 齐利枝. 乳脂前体物及其配比对奶牛乳腺上皮细胞内乳脂及乳蛋白合成的影响机理研究. 内蒙古农业大学博士论文(Qi Lizhi. Effects of milk fat precursors and the ratios among them on the synthesis of milk fat and protein in bovine mammary epithelial cell and underlying mechanisms. Inner Mongolia Agricultural University doctoral thesis), 2013.
- 10 王亨, 韩超, 邱昌伟, 吴培福, 齐长明. 体外培养奶牛乳腺上皮细胞的形态学观察. 中国兽医杂志(Wang Heng, Han Chao, Qiu Chang, Wu Peifu, Qi Changming. Morphology observation of bovine mammary epithelial cell in vitro culture. Chinese Journal of Veterinary Medicine) 2001; 43(6): 15-7.
- 11 塔娜, 李红磊, 侯先志, 考桂兰, 高民, 李大彪. 乙酸钠和β-羟丁酸钠对奶牛乳腺上皮细胞乳脂和乳蛋白合成相关基因表达的影响. 动物营养学报(Ta Na, Li Honglei, Hou Xianzhi, Kao Guilan, Gao Min, Li Dabiao. Effects of sodium acetate and sodium β-hydroxybutyrate on expressions of genes involved in milk fat and protein synthesis in bovine mammary epithelial cells. Chinese Journal of Animal Nutrition) 2014; 26(6): 1527-34.
- 12 王治国. 奶牛乳腺上皮细胞的体外培养及应用. 中国农业科学院(Wang Zhiguo. In vitro culture and application of bovine mammary epithelial cell. Chinese Academy of Agricultural Sciences), 2007.
- 13 孙晓菊. 十八碳不饱和脂肪酸对乳腺上皮细胞脂肪代谢的影响及其研究机制(硕士论文). 内蒙古农业大学(Sun Xiaojun. Effects of C₁₈ unsaturated fatty acids on lipid metabolism and its mechanisms in mammary epithelial cell. Inner Mongolia Agricultural University), 2012.
- 14 Warntjes JL, Robinson PH, Galo E. Effects of feeding supplemental palmitic acid (C16:0) on performance and milk fatty acid profile of lactating dairy cows under summer heat. Anim

- Feed Sci Technol 2008; 140(3): 241-57.
- 15 王红芳, 刘红云, 杨维仁, 李建新, 杨在宾. 外源反-10,顺-12共轭亚油酸对体外培养的奶牛乳腺上皮细胞SREBP-1基因表达和蛋白质合成的影响. 中国农业科学(Wang Hongfang, Liu Hongyun, Yang Weiren, Li Jianxin, Yang Zaibin. Effects of exogenous Trans-10, Cis-12 CLA on genes expression and protein synthesis of SREBP-1 gene in bovine mammary epithelial cells. Scientia Agricultura Sinica) 2011; 44(23): 4892-901.
- 16 Kadegowda AK, Bionaz M, Piperova LS, Erdman RA, Loores JJ. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. J Dairy Sci 2009; 92(9): 4276-89.
- 17 卜登攀, 王加启. 日粮不饱和脂肪酸对乳脂CLA合成的影响研究进展. 中国农学通报(Pu Dengpan, Wang Jiaqi. Effects and mechanisms of dietary unsaturated fatty acids on milk CLA synthesis. Chinese Agricultural Science Bulletin) 2006; 22(4): 15-9.
- 18 胡 蕊, 王加启, 李发弟, 卜登攀. 奶牛乳腺脂肪酸合成相关基因研究进展. 生物技术通讯(Hu Han, Wang Jiaqi, Li Fadi, Pu Dengpan. Advance of fatty acid synthesis regulated genes dairy cow. Biotechnology Bulletin) 2009; 10: 34-9.
- 19 史琳琳, 赵 锋, 高学军, 李庆章. 乳蛋白合成信号通路的研究进展. 中国畜牧兽医(Shi Linlin, Zhao Feng, Gao Xuejun, Li Qingzhang. The structure and regulation of growth hormone on dairy lactation. Chinese Journal of Veterinary Medicine) 2013; 40(1): 130-5.
- 20 Yonezawa T, Sanosaka M, Haga S, Kobayashi Y, Katoh K, Obara Y. Regulation of uncoupling protein 2 expression by long-chain fatty acids and hormones in bovine mammary epithelial cells. Biochemical Biophysical Research Communications 2008; 375(2): 280-5.
- 21 Jenkins, McGuire MA. Major advances in nutrition: Impact on milk composition. J Dairy Sci 2006; 89(4): 1302-10.