

氢化可的松对奶牛乳腺上皮细胞乳脂肪合成的影响

孙 梅 李大彪* 邢媛媛 张 花 王卫云 李子健

(内蒙古农业大学动物科学学院, 呼和浩特 010018)

摘要 该研究旨在探讨不同浓度的氢化可的松处理对奶牛乳腺上皮细胞(bovine mammary gland epithelial cells, BMECs)增殖、甘油三酯(triglyceride, TAG)合成、脂滴的形成以及乳脂肪合成相关基因表达的影响。采用单因子随机实验设计,以不添加氢化可的松组为对照组,处理组的氢化可的松浓度分别为1、10、100、1 000 ng/mL。各组细胞处理24 h后,通过四甲基偶氮唑盐(thiazoly blue tetrazolium, MTT)比色法检测细胞活力;利用试剂盒检测胞内TAG的含量;使用油红O染色法检测细胞内乳脂球的合成;采用实时定量PCR法检测乳脂合成相关基因的表达。结果表明,氢化可的松处理对BMECs增殖无显著影响($P>0.05$);与对照组相比,100 ng/mL氢化可的松组能够显著提高TAG的合成量、增加胞内脂滴的形成以及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , *PPAR γ*)的基因表达($P<0.05$);10 ng/mL和100 ng/mL氢化可的松组能够显著上调乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, *ACC*)、二酰甘油酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, *DGAT*)的基因表达($P<0.05$);1、10、100 ng/mL氢化可的松组能够显著上调脂肪酸合酶(fatty acid synthase, *FASN*)基因表达($P<0.05$),且1 ng/mL的促进效果最明显,而1 000 ng/mL则显著抑制了*FASN*的表达($P<0.05$)。该研究结果说明,氢化可的松能够促进BMECs乳脂肪合成,且100 ng/mL的剂量对乳脂合成的促进效果最佳。

关键词 氢化可的松; 奶牛乳腺上皮细胞; 乳脂合成

The Effect of Hydrocortisone on Milk Fat Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells

Sun Mei, Li Dabiao*, Xing Yuanyuan, Zhang Hua, Wang Weiyun, Li Zijian

(College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract The aim of this study was to explore the effects of hydrocortisone (HYD) on proliferation, synthesis of triglyceride, formation of lipid droplets and expression of genes involved in milk fat synthesis of bovine mammary gland epithelial cells (BMECs). A single factor randomized trial design was applied. Different concentrations (0, 1, 10, 100, 1 000 ng/mL) of HYD were added in culture medium of BMECs for 24 h. Cell viability was detected by thiazoly blue tetrazolium (MTT). Triglyceride (TAG) content was measured by TAG determination kit. Expression of genes involved in milk fat synthesis were measured by real time quantitative PCR (RT-qPCR). The results showed that the activity of cell proliferation was not influenced by supplementation of HYD ($P>0.05$). Compared with the control group, 100 ng/mL HYD significantly increased the concentration of TAG and the formation of intracellular fat droplets, the expression of peroxisome proliferator activated receptor γ

收稿日期: 2017-04-14 接受日期: 2017-07-07

国家自然科学基金(批准号: 31360559)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18947196215, E-mail: dkyldb@imau.edu.cn

Received: April 14, 2017 Accepted: July 7, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31360559)

*Corresponding author. Tel: +86-18947196215, E-mail: dkyldb@imau.edu.cn

网络出版时间: 2017-08-16 16:47:22

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170816.1647.004.html>

(*PPAR γ*) was also upregulated ($P<0.05$). 10 ng/mL and 100 ng/mL HYD significantly increase the gene expressions of acetyl-CoA carboxylase (*ACC*) and diacylglycerol acyltransferase (*DGAT*) ($P<0.05$); 1, 10, 100 ng/mL HYD significantly upregulated the mRNA level of fatty acid synthase (*FASN*), whereas 1 000 ng/mL HYD was significantly downregulated the mRNA level of *FASN* ($P<0.05$). In conclusion, HYD treatment can promote milk fat synthesis in BMECs and the 100 ng/mL HYD is an optimal level considering its improvement effects on milk fat synthesis of BMECs.

Keywords hydrocortisone; bovine mammary epithelial cells; milk fat synthesis

乳脂肪是高质量的天然脂肪, 乳脂肪的脂肪酸组成中水溶性挥发性脂肪酸的含量特别高, 在各种膳食脂肪和油类中, 乳脂肪最容易被消化吸收。而我国生鲜乳中乳脂肪的含量相对较低, 因此, 提高乳脂肪的含量同时改善乳品质是非常必要的。奶牛乳腺上皮细胞(bovine mammary gland epithelial cells, BMECs)是一种具有合成和分泌乳汁功能的分泌型细胞。乳汁中几乎所有的短链脂肪酸和中链脂肪酸均由乳腺上皮细胞合成。在奶牛的泌乳周期中, 乳腺泌乳功能受多种因素影响, 其中内分泌系统发挥着重要的调控作用。众多研究表明, 在体外培养的乳腺细胞中添加多种激素和因子均能发挥调节乳脂肪合成的作用^[1-2]。糖皮质激素(glucocorticoid, GC)是下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)上的重要激素, 主要为皮质醇(cortisol), 又名氢化可的松(hydrocortisone, HYD), 具有调节糖、脂肪和蛋白质生物合成和代谢的作用。作为奶牛的主要内源性糖皮质激素, 氢化可的松在体内对乳腺的基本作用是促进乳腺腺泡系统分化发育。Talwalker等^[3]研究发现, 给孕期大鼠每日注射2 mg醋酸氢化可的松能提前发动并维持泌乳。糖皮质激素对于泌乳期乳腺中脂质正常合成是必需的。在体外培养的乳腺细胞中, 氢化可的松能够促进细胞的贴壁生长和诱导细胞分化, 同时它能够抑制成纤维细胞的增殖。Forsyth等^[4]在体外培养妊娠60 d山羊的乳腺细胞培养基中组合添加皮质醇和胰岛素, 使从头合成的脂肪酸增加了四倍。Collier等^[5]研究发现, 在体外培养的奶牛乳腺细胞中联合添加氢化可的松、催乳素和胰岛素, 48 h后由乙酸生成的脂肪酸增加了三倍。前人研究表明, 在体外培养的奶牛肝细胞中, 糖皮质激素主要通过上调糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的表达水平来激活核转录因子、碳水化合物反应元件结合蛋白以及过氧化物酶体增殖物激活受体 α , 促进它们的

表达和入核, 进而使下游脂合成相关基因的表达水平升高^[6]。

纵观前人的研究可以发现, 氢化可的松在体内外均能够促进乳脂的合成, 但大多数体外研究是氢化可的松联合多种激素共同作用促进乳脂生成, 单一氢化可的松处理对奶牛乳腺上皮细胞乳脂合成影响的相关报道较少, 为此本研究通过使用不同浓度的氢化可的松处理体外培养的奶牛乳腺上皮细胞来研究其对乳脂合成相关基因表达、TAG含量和脂滴的形成的影响, 旨在为激素调控乳脂合成提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM/F12和胰岛素转铁蛋白溶液均购自Gibco公司; 氢化可的松、表皮生长因子、催乳素、胶原酶II、青-链霉素、胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(EDTA)、四甲基偶氮唑盐(thiazoly blue tetrazolium bromide, MTT)、二甲基亚砷均购自Sigma公司; 胎牛血清(HyClone)、PBS(HyClone)、总RNA提取试剂盒RNA isoplus、反转录PCR试剂盒Prime scriptTM RT reagent kit、实时定量PCR(RT-qPCR)试剂盒均购自TaKaRa公司; 75 cm²(瓶底面积)细胞培养瓶购自Corning公司。

1.2 实验设计

本实验采用单因子完全随机实验设计。采集健康的处于泌乳高峰期的中国荷斯坦奶牛的乳腺上皮细胞进行体外培养。经纯化后, 收集第2代的乳腺上皮细胞, 接种于75 cm²培养瓶中, 置于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中培养。细胞生长至80%汇合时, 先用无血清无激素DMEM/F12培养基过渡16 h(饥饿处理), 然后更换含有不同氢化可的松浓度[0(control)、1、10、100、1 000 ng/mL]的诱导培养基。诱导培养基含有2 mmol/L谷氨酰胺、3 μ g/mL催乳素

及5 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素转铁蛋白溶液的DMEM/F12培养基。培养24 h后收集细胞,通过四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞活力;利用试剂盒检测胞内TAG的含量;使用油红O染色法检测细胞内乳脂球的合成;采用实时定量PCR法检测乳脂合成相关基因的表达。

1.3 方法

1.3.1 BMECs获取与纯化 选取处于泌乳高峰期体况良好的荷斯坦奶牛进行实验,从奶牛乳腺组织取样,剪取腺泡丰富的乳腺组织约50 g,利用胶原酶II消化法获得原代乳腺上皮细胞。待原代细胞生长至80%汇合时,利用乳腺上皮细胞和成纤维上皮细胞对胰蛋白酶的敏感度不同来纯化乳腺上皮细胞并传代。传至第1代冻存备用。

1.3.2 BMECs细胞活力的检测 利用MTT法检测乳腺上皮细胞的活力。收集第2代细胞,按照 1×10^4 /孔的密度将细胞悬浮液接种于96孔培养板中,置于培养箱中培养,待细胞生长至80%汇合时,进行饥饿处理。16 h后分别添加含不同浓度氢化可的松的DMEM/F12诱导培养基,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养24 h。实验共5个处理组,每组设5个重复。在培养结束前4 h,每孔分别加入20 μL MTT (5 mg/mL),4 h后弃去培养液,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)100 μL ,振荡10 min,用全自动酶标仪检测各孔490 nm波长下的吸光度(D)值。细胞相对增殖率(relative growth rate, RGR)=实验组 D_{490} /对照组 D_{490} 。

1.3.3 BMECs内乳脂球的形态观察 利用油红O染色观察BMECs内乳脂球的形态。将细胞悬浮液接种于24孔培养板中,每孔500 μL 培养基中含 5×10^4 细胞,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,待细胞生长至80%汇合时,分别添加含不同氢化可的松浓度的诱导培养基,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养24 h。培养结束后,弃去培养基,用PBS清洗2次,加入4%多聚甲醛溶液固定细胞30 min(避光)。用PBS漂洗2次后,每孔加入300 μL 油红染液浸染2 h,弃去油红O染液,用PBS漂洗3次,在倒置显微镜下观察。将已染色的培养板蒸发掉水分,加入300 μL 异丙醇,萃取20 min后,用分光光度计在波长510 nm处测吸光度值。

1.3.4 BMECs内TAG含量的测定 将第2代的BMECs用胰蛋白酶/EDTA消化后,以 8×10^5 /瓶的密度接种于75 cm^2 的培养瓶中,待细胞生长至80%汇合

时进行饥饿处理,16 h后添加含有氢化可的松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。实验共5个处理组,每组3个重复(每个处理组3瓶细胞,1瓶为1个重复)。

1.3.5 BMECs中乳脂合成相关基因的表达量的测定 将第2代细胞悬浮液接种于75 cm^2 培养瓶中,每瓶10 mL,含有 8×10^5 细胞,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养。待细胞生长至80%汇合时,先用无血清无激素培养基过渡16 h后,分别添加含不同浓度的氢化可的松DMEM/F12诱导培养基,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养24 h后,用胰蛋白酶/EDTA消化细胞。将细胞悬液以128 r/min离心10 min,弃去上清液,用PBS清洗,采用试剂盒提取总RNA,测定RNA的浓度和 D_{260}/D_{280} ,同时对RNA进行电泳鉴定。 D_{260}/D_{280} 值均在1.8~2.0之间,表示RNA纯度较好。电泳鉴定结果如图1所示,RNA分子保持完整,能清晰地分辨出28S、18S和5.8S条带。

将提取的RNA稀释至500 ng/ μL 后进行反转录,按照试剂盒说明进行操作。本实验应用RT-qPCR方法,制备RT-qPCR反应液,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参基因,检测乳脂合成相关基因[乙酰辅酶A羧化酶(ACC)、脂肪酰合酶(FASN)、二酰甘油酰基转移酶(DGAT)、硬脂酰辅酶去饱和酶(SCD)]、乳脂合成相关转运调控因子[脂肪酸结合蛋白(FABP3)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、固醇调节元件结合蛋白1(SREBP1)]和糖皮质激素受体(GR)。各基因表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值表示^[7]。引物序列及参数见表1。实验每组设3个重复。

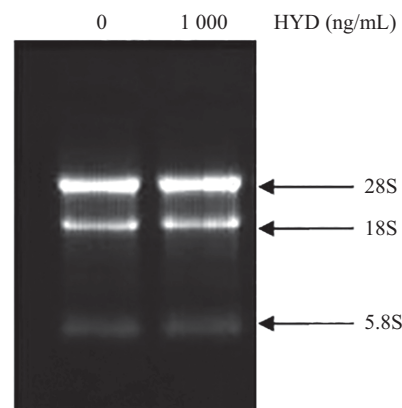


图1 总RNA电泳鉴定

Fig.1 Identification of total RNA by electrophoresis

表1 引物序列及参数
Table 1 Primer sequences and parameters

基因 Gene	序列 Sequence	登录号 GeneBank accession 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>ACC</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>DGAT</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>PPARγ</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>SREBP1</i>	F: 5'-CGC TCT TCC ATC AAT GAC AA-3' R: 5'-TTC AGC GAT TTG CTT TTG TG-3'	NM_001113302
<i>GR</i>	F: 5'-TGG CCC TGT GCA CCA TGA AGG T-3' R: 5'-GGG AGG CTG AAT GTG ATG GTG CCT-3'	NM-001206634

表2 氢化可的松对BMECs增殖的影响
Table 2 Effects of HYD on proliferation of BMECs

项目 Item	氢化可的松(ng/mL) Hydrocortisone (ng/mL)				
	0	100	300	500	1 000
RGR	1.00±0.04	1.00±0.03	0.96±0.05	0.97±0.07	0.97±0.06

1.4 数据统计

实验数据采用Excel 2007进行计算和整理, RT-qPCR实验结果采用2^{-ΔΔC_t}法进行相对定量分析。利用SAS 9.0软件的One-Way ANOVA程序对数据进行单因素方差分析, *P*<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 氢化可的松对BMECs增殖的影响

由表2可知, 不同浓度的氢化可的松对BMECs增殖均没有影响(*P*>0.05)。

2.2 氢化可的松对BMECs脂滴形成的影响

氢化可的松对BMECs内脂滴形成的影响见图2。与对照组相比, 100 ng/mL氢化可的松组显著促进了BMECs内脂滴的合成(*P*<0.05); 10 ng/mL和100 ng/mL氢化可的松组的脂滴合成量显著高于1 000 ng/mL氢化可的松组(*P*<0.05); 1 000 ng/mL

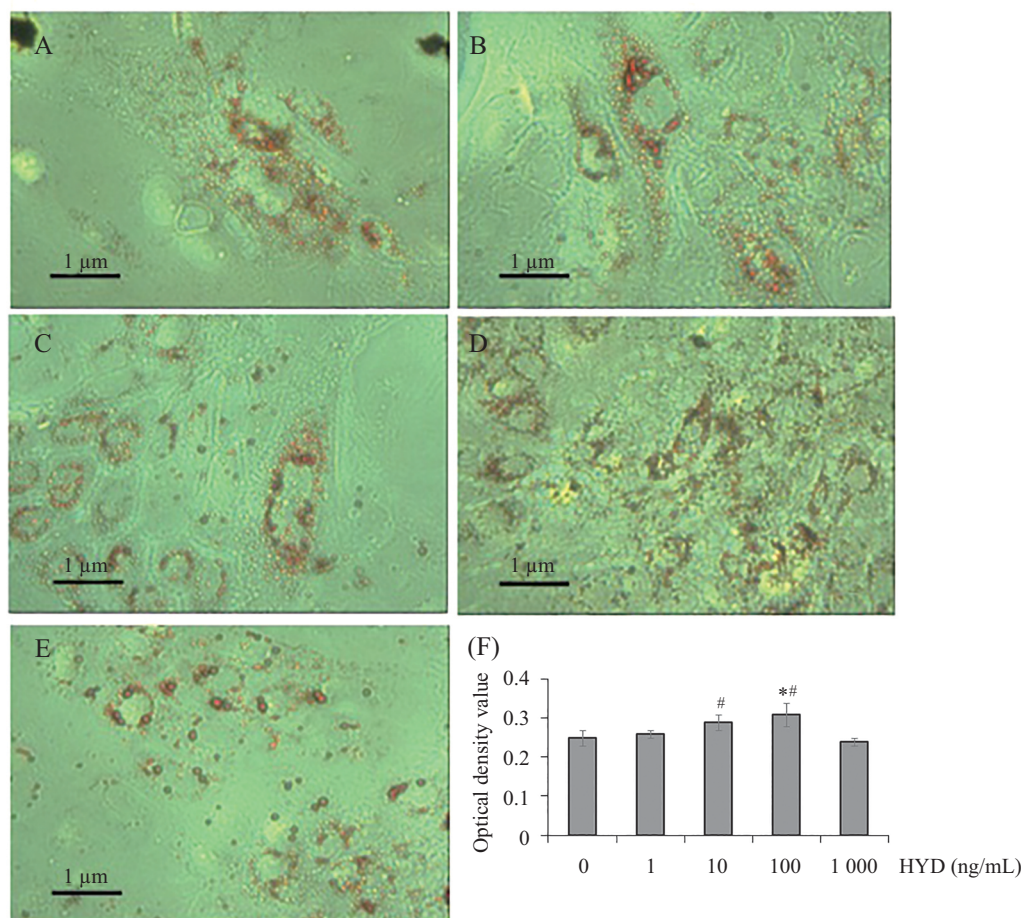
氢化可的松组呈现出抑制脂滴形成的趋势, 但统计分析结果与对照组差异不显著(*P*>0.05)。结果表明, 氢化可的松对BMECs内脂滴形成有剂量依赖效应。

2.3 氢化可的松对BMECs内TAG含量的影响

氢化可的松对BMECs内TAG的影响见图3。与对照组相比, 氢化可的松组均能显著促进TAG的合成(*P*<0.05), 促进作用呈现出先上升后下降的趋势, 100 ng/mL氢化可的松组显著高于其他各组(*P*<0.05), 10 ng/mL和1 000 ng/mL氢化可的松组TAG合成量显著高于1 ng/mL氢化可的松组(*P*<0.05)。

2.4 氢化可的松对BMECs乳脂肪合成相关基因表达的影响

氢化可的松对BMECs中糖皮质激素受体(*GR*)基因表达的影响见图4。与对照组相比, 10~1 000 ng/mL氢化可的松组显著上调了*GR*的mRNA水平(*P*<0.05)。

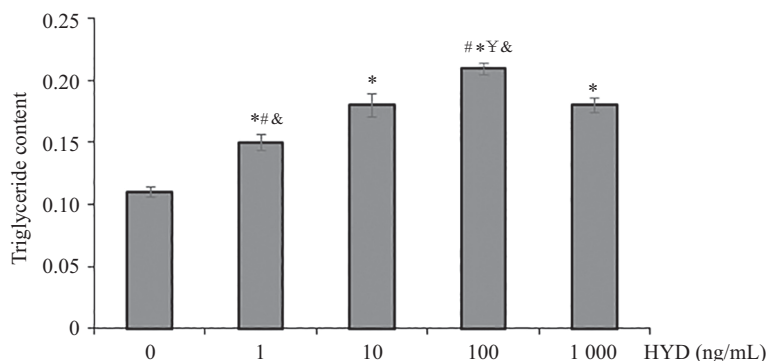


A~E: 0(对照组)、1、10、100、1 000 ng/mL氢化可的松处理细胞24 h后油红O染色; F: 细胞着色后510 nm波长下检测吸光度值, $*P<0.05$, 与对照组比较, $^{#}P<0.05$, 与1 000 ng/mL氢化可的松组比较。

A-E: 0 (control), 1, 10, 100, 1 000 ng/mL HYD were added for 24 h and staining by oil red O; F: the BMECs were measured at 510 nm by a microplate reader after stained, $*P<0.05$ vs control group, $^{#}P<0.05$ vs 1 000 ng/mL HYD group.

图2 氢化可的松对BMECs内脂滴形成的影响

Fig.2 Effect of HYD on the lipid droplet formation in BMECs



$*P<0.05$, 与对照组比较; $^{\wedge}P<0.05$, 与1 ng/mL HYD组比较; $^{*}P<0.05$, 与10 ng/mL HYD组比较; $^{*}P<0.05$, 与1 000 ng/mL HYD组比较。

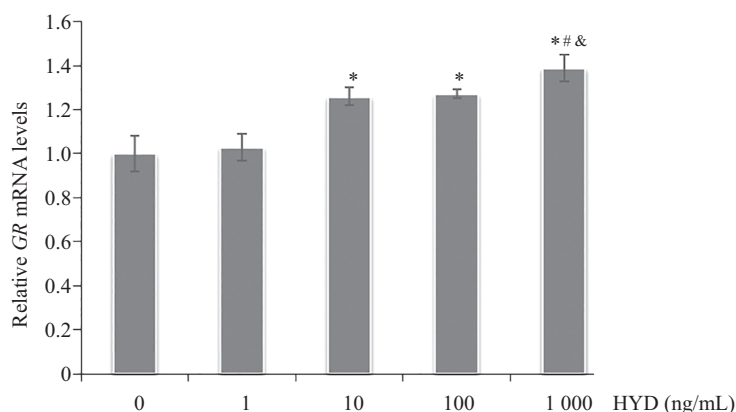
$*P<0.05$ vs control group; $^{\wedge}P<0.05$ vs 1 ng/mL HYD group; $^{*}P<0.05$ vs 10 ng/mL HYD group; $^{*}P<0.05$ compared with 1 000 ng/mL HYD group.

图3 氢化可的松对BMECs内TAG合成的影响

Fig.3 Effect of HYD on triglyceride content of BMECs

随着HYD浓度的增加, *GR*的mRNA水平呈上升趋势, 1 000 ng/ml氢化可的松组显著高于其他各组 ($P<0.05$)。

氢化可的松对BMECs乳脂肪从头合成基因 *ACC*、*FASN*表达的影响见图5。其中10 ng/mL和100 ng/mL氢化可的松组显著高于对照组 ($P<0.05$);

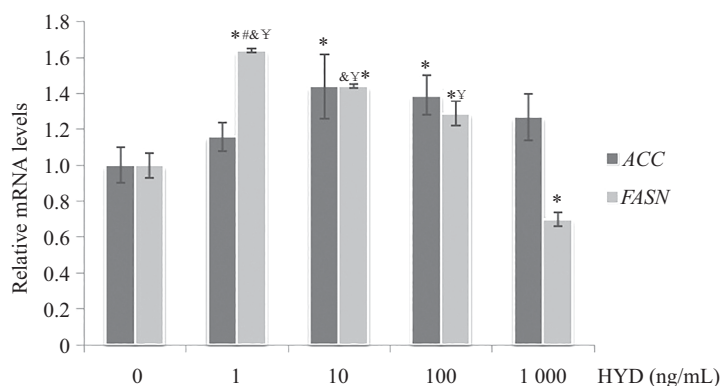


* $P < 0.05$, 与对照组和1 ng/mL HYD组比较; [#] $P < 0.05$, 与10 ng/mL HYD组比较; [&] $P < 0.05$, 与100 ng/mL HYD组比较。

* $P < 0.05$ vs control and 1 ng/mL HYD groups; [#] $P < 0.05$ vs 10 ng/mL HYD group; [&] $P < 0.05$ compared with 100 ng/mL HYD group.

图4 氢化可的松对糖皮质激素受体mRNA水平的影响

Fig.4 Effect of HYD on mRNA level of GR



* $P < 0.05$, 与对照组比较; [#] $P < 0.05$, 与10 ng/mL HYD组比较; [&] $P < 0.05$, 与100 ng/mL HYD组比较; ^Y $P < 0.05$, 与1 000 ng/mL组比较。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs 10 ng/mL HYD group; [&] $P < 0.05$ vs 100 ng/mL HYD group; ^Y $P < 0.05$ vs 1 000 ng/mL HYD group.

图5 氢化可的松对ACC和FASN mRNA水平的影响

Fig.5 Effect of HYD on mRNA levels of ACC and FASN

1 ng/mL氢化可的松组FASN的mRNA水平显著高于对照组及其他各组($P < 0.05$), 而高剂量的氢化可的松(1 000 ng/mL)却显著抑制了FASN的mRNA水平($P < 0.05$)。

氢化可的松对BMECs中PPAR γ 和SREBP1基因表达的影响见图6。随着氢化可的松剂量的增加, PPAR γ 和SREBP1的mRNA水平呈现逐步上升的趋势, 100 ng/mL氢化可的松组PPAR γ 和SREBP1的mRNA水平显著高于对照组($P < 0.05$); 1 000 ng/mL氢化可的松组SREBP1的mRNA水平显著高于其他各组($P < 0.05$), 1 ng/mL和10 ng/mL氢化可的松组二者的mRNA水平与对照组差异不显著($P > 0.05$)。

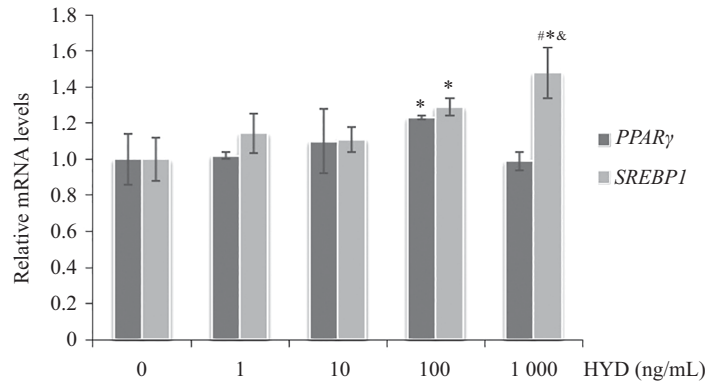
氢化可的松对SCD、DGAT和FABP3基因表达的影响见图7。由图7可知, 1 000 ng/mL氢化可的松组SCD的mRNA水平显著高于10 ng/mL氢化可的

松组; 10 ng/mL和100 ng/mL氢化可的松组DGAT的mRNA水平显著高于对照组及1 ng/mL氢化可的松组($P < 0.05$), 1 ng/mL和1 000 ng/mL氢化可的松组与对照组差异不显著($P > 0.05$)。不同浓度的氢化可的松处理对FABP3的mRNA水平无显著影响($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 氢化可的松对BMECs增殖的影响

由于乳腺上皮细胞的增殖和分化始终贯穿于乳腺发育及泌乳过程, 因此在细胞水平上研究乳腺上皮细胞的增殖及分化对进一步研究调控乳成分合成至关重要。前人研究发现, 多种激素和生长因子对乳腺生长发育、泌乳的启动和维持具有十分重要的调控作用^[8-9]。田青等^[10-11]的研究发现, 在乳腺上皮细胞中单独添加氢化可的松对细胞增殖没有促进

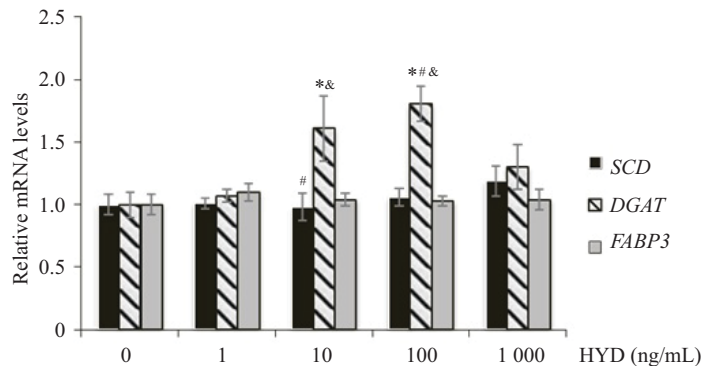


* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与1 ng/mL HYD组比较; & $P < 0.05$, 与10 ng/mL HYD组比较。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 1 ng/mL group; & $P < 0.05$ compared with 10 ng/mL HYD group.

图6 氢化可的松对*PPARγ*和*SREBP1* mRNA水平的影响

Fig.6 Effect of HYD on mRNA levels of *PPARγ* and *SREBP1*



* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与1 ng/mL HYD组比较; & $P < 0.05$, 与1000 ng/mL HYD组比较。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ compared with 1 ng/mL HYD group; & $P < 0.05$ vs 1000 ng/mL HYD group.

图7 氢化可的松对*SCD*、*DGAT*和*FABP3* mRNA水平的影响

Fig.7 Effect of HYD on mRNA levels of *SCD*, *DGAT* and *FABP3*

作用, 而氢化可的松与胰岛素和催乳素协同作用能够促进乳腺上皮细胞的增殖。本研究结果显示, 不同浓度的氢化可的松处理对BMECs的增殖均没有促进或抑制的作用, 与前人研究结果一致。说明在体外研究中, 氢化可的松促进细胞增殖的作用是与其他激素协同实现的。

3.2 氢化可的松对BMECs乳脂合成的影响

奶牛乳脂脂肪酸有两个来源, 第一, 从血浆脂蛋白中吸收, 约占乳脂脂肪酸的60%; 第二, 由乳腺利用乙酸和 β -羟丁酸为原料从头合成。ACC和FASN是参与乳腺组织脂肪酸从头合成过程的两个限速酶。乳脂的合成以瘤胃发酵生成的乙酸作为主要原料, 以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸生成酶催化产生的NADPH作为还原当量, 在ACC和FASN等关键酶的催化作用下合成脂肪酸, 进一步酯化形成脂肪。研究表明, ACC和FASN基因表达受激素和营养条件调节^[12-14]。Plucinski等^[15]报道, 小鼠肾上腺切除后, 乳

腺中ACC和甘油三酯合成酶活性下降, 而对其进行糖皮质激素处理后则又使其酶活性上升。孙晓静等^[16]研究发现, 在体外培养的奶牛乳腺上皮细胞中, 氢化可的松与生长激素联合作用能够显著上调ACC和FASN的表达。本研究结果表明, 在BMECs中添加氢化可的松10 ng/mL和100 ng/mL能够显著提高ACC和FASN的基因表达量, 与前人在体内的研究结果相一致。Ma等^[17]通过转染技术使细胞低表达*SREBP1*, 研究了*SREBP1*基因对脂肪酸合成过程中关键酶的影响。结果表明, *SREBP1*基因低表达会降低脂肪酸的摄取和从头合成过程, 抑制*SREBP1*基因的表达会导致脂肪酸代谢相关基因ACC、FASN、FABP3和SCD的表达量下降。Kadegowda等^[18]研究*PPARγ*基因对奶牛乳脂合成的调节作用, 使用*PPARγ*激动剂Rosiglitazone后, 脂肪酸摄取基因[CD36(cluster of differentiation 36)]、脂肪酸内源合成基因(ACC、FASN、*SREBP1*)和TAG合成基因

(SCD)表达均上调, 这表明, PPAR γ 与SREBP1在脂肪合成细胞调控因子通路中处于枢纽位置, 可以通过结合其靶基因, 影响脂肪酸的合成。本实验结果显示, 氢化可的松能显著上调SREBP1和PPAR γ 基因表达, 并具有剂量依赖效应。100 ng/mL氢化可的松组的SREBP1、ACC、FASN、PPAR γ 基因表达量均显著高于对照组, 这说明100 ng/mL氢化可的松处理促进了处于枢纽位置的SREBP1和PPAR γ 的表达, 进而激活相关通路, 上调了ACC和FASN等乳脂相关基因的表达。TAG是由内质网中脂肪酸和磷酸甘油在3-磷酸甘油转移酶、一酰甘油磷酸酰基转移酶和二酰甘油磷酸酰基转移酶的共同作用下合成的。DGAT的主要作用是使二酰甘油与脂肪酸酰基结合形成甘油三酯, 是TAG合成过程中唯一的限速酶^[19]。本研究发现, 氢化可的松组能显著促进BMECs中甘油三酯的合成和脂滴的形成($P<0.05$), 并且促进作用随着氢化可的松浓度的增大呈现出先上升后下降的趋势, 100 ng/mL的氢化可的松添加剂量促进甘油三酯合成和脂滴生成的效果最明显。1 000 ng/mL的处理剂量仍然促进TAG的合成却抑制脂滴的形成, 这可能是由于合成的TAG进入内质网膜的小叶形成脂肪滴后在向质膜转运的过程中协助其分泌到腺泡中的蛋白[XDH(xanthine dehydrogenase)、ADFP(adipose differentiation-related protein)和BTN(butyrophilin)等]的基因表达受到了高浓度(1 000 ng/mL)氢化可的松的抑制。同时, 氢化可的松对DGAT基因表达的调节趋势与甘油三酯合成量基本一致。由此结果推断, 由于DGAT基因表达升高促使细胞内甘油三酯的合成增多, 进而通过相应转运蛋白的作用使细胞内脂滴增多。前人研究发现, FABP和酰基辅酶A结合蛋白(acyl-CoA-binding protein, ACP)是反刍动物细胞内主要的脂肪酸转运蛋白, 前者对长链脂肪酸(long chain fatty acid, LCFA)具有高亲和力且可以绑定酰基辅酶A^[20]。在泌乳期奶牛的乳腺组织中, FABP3的mRNA水平会上升80倍。SCD是脂肪代谢过程中一种重要的酶, 它催化饱和脂肪酸去饱和化, 是单不饱和脂肪酸合成的限速酶。FABP3在乳腺的主要功能是为SCD提供脂肪酸, 作用于对油酸高亲和力的FABP4, 使其mRNA水平在泌乳期乳腺组织中上调, 为乳脂的合成提供更多的酶类。前人研究发现, 在鸡中FABP和SCD的表达呈

现正相关^[21]。本研究结果表明, 氢化可的松组SCD和FABP3的mRNA水平与对照组差异不显著, 但在BMECs中, SCD的mRNA表达量为所有被检测基因中最高的, 其次为FABP3的mRNA表达量。这一结果说明, 可能正是由于SCD和FABP3在BMECs中高表达, 使大量饱和脂肪酸去饱和化导致乳汁中不饱和脂肪酸含量较高。本实验研究结果显示, 10 ng/mL和100 ng/mL氢化可的松处理组均能显著提高GR的mRNA水平, 且具有剂量依赖效应。1 000 ng/mL氢化可的松组GR的mRNA水平显著高于其他各组, 这与SREBP1和PPAR γ 的趋势一致。这一结果说明, 氢化可的松可能是通过上调GR的mRNA水平激活相应核转录调控因子(SREBP1和PPAR γ), 促使它们入核, 提高了下游的脂肪合成相关基因(ACC和FASN)的表达, 进而使从头合成的脂肪酸增多, 在相应酶(SCD、FABP3、DGAT)的作用下合成甘油三酯, 最终聚集成脂滴。

在体外培养的BMECs中, 氢化可的松能通过上调细胞GR的表达水平激活核转录因子SREBP1和PPAR γ , 从而促进其下游ACC、FASN、DGAT等乳脂合成相关基因的表达, 使从头合成的脂肪酸增加进而促进甘油三酯的合成和脂滴的形成, 且100 ng/mL氢化可的松为最佳作用剂量。以上研究说明, 单独的氢化可的松作用能够刺激体外培养的乳腺上皮细胞合成并分泌脂滴。

参考文献 (References)

- 1 Ma L. Regulatory factors of milk fat synthesis in dairy cows. Virginia Polytechnic Institute and State University Doctoral dissertation, 2012.
- 2 Zidi A, Serradilla JM, Jordana J, Carrizosa J, Urrutia B, Polvillo O, et al. Pleiotropic effects of the goat prolactin receptor genotype on milk fatty acid composition. *Domest Anim Endocrin* 2010; 39(2): 85-9.
- 3 Talwalker PK, Nicoll CS, Meites J. Induction of mammary secretion in pregnant rats and rabbits by hydrocortisone acetate. *Endocrinology* 1961; 69(4): 802.
- 4 Forsyth IA, Turvey A. Fatty acid synthesis by explant cultures from the mammary glands of goats on days 60 and 120 of pregnancy. *J Endocrinol* 1984; 100(1): 87-92.
- 5 Collier RJ, Bauman DE, Hays RL. Lactogenesis in explant cultures of mammary tissue from pregnant cows. *Endocrinology* 1977; 100(4): 1192-200.
- 6 殷利恒. PRL、GC对奶牛脂肪细胞和肝细胞脂代谢的影响. 吉林大学(硕士论文)(Yin Liheng. Effects of PRL and GC on lipid metabolism in adipocytes and hepatocytes of dairy cows. Jilin University), 2015.

- 7 邢媛媛, 李大彪, 李红磊, 于永强, 王卫云. 催乳素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 (Xing Yuanyuan, Li Dabiao, Li Honglei, Yu Yongqiang, Wang Weiyun. Effects of prolactin on gene expressions involved in milk fat and milk protein synthesis in bovine mammary epithelial cells. Chinese Journal of Animal Nutrition) 2016; 28(8): 2439-47.
- 8 Huderson BP, Velayudhan BT, Pearson RE, Ellis SE, Akers RM. Effect of exogenous somatotropin in Holstein calves on mammary gland composition and proliferation. J Dairy Sci 2011; 94(10): 5005.
- 9 Zhou Y. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on milk protein gene expression and nutrient uptake and cell proliferation in clonal bovine mammary epithelial cells. (doctoral dissertation) Virginia Polytechnic Institute and State University 2007; 74(219): 1-4.
- 10 田青, 王洪荣. 胰岛素、催乳素和氢化可的松对奶牛乳腺上皮细胞增殖和凋亡的影响. 中国饲料 (Tian Qing, Wang Hongrong. China Feed) 2013; 2: 8-12.
- 11 田青, 王洪荣, 王梦芝. 氢化可的松对奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白合成的影响. 畜牧兽医学报 (Tian Qing, Wang Hongrong, Wang Mengzhi. Effect of HYD on the synthesis of casein in mammary epithelial cells of holstein cows *in vitro*. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences) 2014; 45(10): 1663-70.
- 12 Smith VG, Edgerton LA, Hafs HD, Convey EM. Bovine serum estrogens, progestins and glucocorticoids during late pregnancy, parturition and early lactation. J Anim Sci 1973; 36(2): 391-6.
- 13 Hillgartner FB, Salati LM, Goodridge AG. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. Physiol Rev 1995; 75(1): 47-76.
- 14 Kim TS, Freake HC. High carbohydrate diet and starvation regulate lipogenic mRNA in rats in a tissue-specific manner. J Nutr 1996; 126(3): 611-7.
- 15 Plucinski T, Baldwin RL. Effects of adrenalectomy and glucocorticoid therapy on enzyme activities in mammary and adipose tissues from lactating rats. J Dairy Sci 1976; 59(1): 157-60.
- 16 孙晓静. 奶牛泌乳相关激素周期性变化规律及激素对乳腺外植体中基因表达的影响. 山东农业大学(硕士论文) (Sun Xiaojing. Periodic change of bovine lactation-related hormones and the effect of hormones on gene expression in bovine mammary gland explants. Shandong Agriculture University), 2012.
- 17 Ma L, Corl BA. Transcriptional regulation of lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells by sterol regulatory element binding protein-1. J Dairy Sci 2012; 95(7): 3743-55.
- 18 Kadegowda AK, Bionaz M, Piperova LS, Erdman RA, Loor JJ. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ 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.
- 19 杨凤. 动物营养学. 北京: 中国农业出版社 (Yang Feng. Animal Nutrition. Beijing: China Agriculture Press), 2004, 36-9.
- 20 McArthur MJ, Atshaves BP, Frolov A, Foxworth WD, Kier AB, Schroeder F. Effects of adrenalectomy and glucocorticoid therapy on enzyme activities in mammary and adipose tissues from lactating rats. J Lipid Res 2001; 40(8): 1371.
- 21 Awad AC, Shin HS, Romsos DR, Gray JI. Direct desaturation of free myristic acid by hen liver microsomal Delta 9-desaturase without prior activation to Myristoyl-CoA derivative. J Agr Food Chem 2004; 52(10): 3194-201.