

组合添加雌激素和催乳素对奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白合成的影响

金亚亚 李大彪* 孙梅 母晓佳 曹越 郝怡泓

(内蒙古农业大学动物科学学院, 动物营养与饲料科学自治区高等学校重点实验室, 呼和浩特 010018)

摘要 为了探讨组合添加雌激素和催乳素对奶牛乳腺上皮细胞(BMECs)酪蛋白合成的影响及作用机制, 以课题组前期筛选出的最佳雌激素和催乳素浓度为基础, 开展组合添加试验。雌激素和催乳素的添加总量为300 ng/mL, 根据二者的添加比例分为试验I组(对照组, 不添加雌激素和催乳素)、试验II组(雌激素:催乳素=5:1)、试验III组(雌激素:催乳素=2:1)和试验IV组(雌激素:催乳素=1:2)。采用MTT法检测细胞增殖情况; qRT-PCR法检测酪蛋白合成、mTOR信号通路和JAK2-STAT5信号通路相关基因表达情况; 蛋白印迹法检测细胞中 α 酪蛋白和 β 酪蛋白水平。结果显示, 与对照组相比, 试验II、III、IV组均显著增加了BMECs的增殖率, 提高了BMECs中CSN1S1、CSN3、AMPK、PI3K、AKT、mTOR、eIF4E、JAK2、STAT5、ER β 和PRLR的基因表达水平($P<0.05$); 试验III组和试验IV组显著提高了BMECs中CSN2的基因表达水平($P<0.05$)。与对照组相比, 试验II组和IV组显著增加了BMECs的 α 酪蛋白和 β 酪蛋白表达量($P<0.05$), 其中 α 酪蛋白的表达量分别提高了22.7%和38.6%, β 酪蛋白的表达量分别提高了62.9%和102.9%。试验III组 β 酪蛋白的表达量显著高于对照组($P<0.05$), 而 α 酪蛋白表达量与对照组无显著差异。综合细胞增殖和酪蛋白表达的结果, 组合添加100 ng/mL雌激素和200 ng/mL催乳素的试验IV组对BMECs酪蛋白合成的促进效果最佳。

关键词 奶牛乳腺上皮细胞; 雌激素; 催乳素; 酪蛋白

Effects of Estrogen and Prolactin on Casein Synthesis of Bovine Mammary Epithelial Cells

JIN Yaya, LI Dabiao*, SUN Mei, MU Xiaojia, CAO Yue, HAO Yihong

(College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science at Universities of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010018, China)

Abstract In order to explore the effect of combined addition of estrogen and prolactin on the synthesis of casein in dairy BMECs (bovine mammary epithelial cells) and the mechanism of action, the research team conducted a combined addition experiment based on the optimal estrogen and prolactin concentration screened in the early stage. The total amount of estrogen and prolactin added is 300 ng/mL. According to the ratio of the two additions, they are divided into test group I (control group, no estrogen and prolactin), test group II (estrogen:prolactin=5:1), test group III (estrogen:prolactin=2:1) and test group IV (estrogen:prolactin=1:2). MTT method was used to detect cell proliferation; qRT-PCR method was used to detect casein synthesis, mTOR signaling pathway and JAK2-

收稿日期: 2021-07-19 接收日期: 2021-10-26

国家自然科学基金(批准号: 31860652)资助的课题

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

Received: July 19, 2021

Accepted: October 26, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31860652)

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

STAT5 signaling pathway related gene expression; Western blot method was used to detect the levels of α -casein and β -casein in cells. The results showed that compared with the control group, the test groups II, III, and IV significantly increased the proliferation rate of BMECs, and increased *CSN1S1*, *CSN3*, *AMPK*, *PI3K*, *AKT*, *mTOR*, *eIF4E*, *JAK2*, *STAT5*, *ER β* and *PRLR* in BMECs. The test group III and test group IV significantly increased the gene expression level of *CSN2* in BMECs ($P<0.05$). Compared with the control group, test groups II and IV significantly increased the expression of BMECs α -casein and β -casein ($P<0.05$), and the expression of α casein increased by 22.7% and 38.6%, respectively. The protein expression increased by 62.9% and 102.9%, respectively. The expression of β -casein in group III was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$), while the expression of α -casein was not significantly different from that of the control group. Based on the results of cell proliferation and casein expression, the combination of 100 ng/mL estrogen and 200 ng/mL prolactin in test group IV had the best effect on promoting the synthesis of BMECs casein.

Keywords bovine mammary epithelial cells; estrogen; prolactin; casein

乳蛋白作为乳中最重要的营养物质之一, 包含所有人体需要的氨基酸, 且比例适宜, 酪蛋白是牛乳中的主要蛋白质, 在乳蛋白中占比达到80%以上^[1]。酪蛋白分为4类, 即 α s1酪蛋白、 α s2酪蛋白、 β 酪蛋白和 κ 酪蛋白, 它们分别由不同的多肽链和不同数量磷酸化的丝氨酸残基组成。由于酪蛋白全部是在乳腺中利用从血液摄取的氨基酸从头合成的, 因此, 酪蛋白的含量直接反映了乳腺合成乳蛋白的能力。

泌乳激素与乳蛋白合成密切相关。有研究观察到, 乳产量和乳成分含量不同的奶牛, 血清中泌乳相关激素的水平存在差异^[2]。前人研究发现通过给泌乳奶牛注射生长激素和催乳素(prolactin, PRL)均能提高乳产量和乳蛋白的产量^[3-5]。在体外培养的BMECs中, 也证实PRL、胰岛素、氢化可的松、雌激素等均能够促进BMECs中蛋白质的合成^[6-7]。泌乳激素能够促进编码乳蛋白的基因转录^[8]。JAK2-STAT5通路是一条激素刺激细胞因子信号转导的通路, 泌乳激素与它们各自的表面受体结合后激活JAK2, 活化的JAK2分子使受体自身的酪氨酸发生磷酸化。在JAK激酶的作用下, STAT5的酪氨酸被磷酸化。活化的STAT5从细胞质进入到细胞核中与它们的靶基因(例如*CSN2*)结合从而调控基因的转录^[9]。泌乳激素还通过调节蛋白质翻译机制以增强乳蛋白mRNA翻译来调节牛奶蛋白合成^[10]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)能够被激素、细胞因子、营养物质(氨基酸)和细胞能量状态(高ATP/ADP比值)所激活; 活化的mTOR能引起蛋白质翻译相关元件4EBP1和S6K1的磷酸化水平增加, 促进mRNA翻译增加, 进而导致蛋白质合成增多^[11]。

雌二醇(estrogen, E2)能调控乳汁的生成, 降低乳糖及乳脂的分泌, 提高乳蛋白的含量^[12]。PRL具有刺激乳腺生长发育、启动乳汁合成以及维持泌乳等功能^[13]。本课题组前期研究发现, 在体外培养的BMECs中, 单独添加适宜水平的PRL和E2能促进酪蛋白合成^[14]。有研究指出, 在荷斯坦奶牛日粮中添加微生物制剂(PM发酵粉)能够调节血清中E2、孕酮和PRL水平, 促进奶牛泌乳^[15]。处于泌乳中期的荷斯坦奶牛注射17 β -雌二醇, 可以提高血清中PRL的含量, 并显著增加乳蛋白的含量^[13]。这表明PRL和雌二醇不仅能单独发挥促进BMECs酪蛋白合成的作用, 且二者之间还存在相互作用关系。那么, PRL和E2之间是否存在促进酪蛋白合成的最佳组成比例目前尚不明。为此, 本研究旨在向体外培养的BMECs中添加不同比例的E2和PRL的组合剂, 探究其对BMECs增殖和酪蛋白合成的影响, 并通过检测mTOR和JAK2-STAT5通路关键信号分子转录水平, 初步探索其作用机制, 为调控奶牛乳成分合成提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

本研究中所涉及的实验动物的饲养和使用经内蒙古农业大学动物饲养和使用委员会和中国农业部批准(批准号: GB/T35892-2018)。奶牛乳腺上皮细胞采自北亚清真屠宰场; DMEM/F12(12491-015)、葡萄糖(A2494001)、氢化可的松、E2、胶原酶II、青-链霉素、胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(EDTA)均购自Gibco公司; PRL购自以色列ProsPec公司; 四甲基偶

氮唑盐(MTT)(298-93-1)购自美国 AMRESCO 公司; 胰岛素转铁蛋白溶液(ITS)(41400045)、胎牛血清(FBS)和 PBS 购自美国 Hyclone 公司; PCR 引物和基因序列购自内蒙古洪阳生物有限公司; 总 RNA 提取试剂盒和实时定量 PCR 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司; 75 cm² 细胞培养瓶(430720)和 6 孔培养板和 96 孔板购自 Corning 公司; 酪蛋白多克隆抗体(ab166596)购自 Abcam 公司。 β -Actin(4970T)购自 Cell Signaling 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 采集北亚清真屠宰场中国荷斯坦奶牛乳腺组织, 用含有 3 $\times$ 双抗(300 IU)的 PBS 清洗乳腺组织外层, 迅速带回实验室。将乳腺组织用含有 3 $\times$ 双抗的 PBS 清洗 3 次, 将乳腺组织反复剪碎成 1 mm³ 的小块, 采用胶原酶消化法对组织进行消化。消化结束后组织过 80 目筛, 将过滤液收集至离心管中 150 $\times$ g 离心 8 min, 弃上清, 将细胞沉淀悬浮于生长培养基中, 接种至 75 cm²(瓶底面积)的培养瓶中, 待细胞生长至 80% 汇合后, 用 0.25% 的胰蛋白酶采用差速消化法对奶牛乳腺上皮细胞进行纯化。纯化后的细胞生长至 80% 汇合时, 饥饿培养 16 h, 更换含 E2 和 PRL 的诱导培养基(在 DMEM/F12 的基础加入不同水平 E2 和 PRL)。E2 和 PRL 的添加剂量参照本课题组前期试验结果设置^[14], 确定添加激素的总浓度为 300 ng/mL, 不同的处理组为 PRL 和 E2 的不同添加比例, 分别为试验 I 组(对照组, 不添加 E2 和 PRL)、试验 II 组(E2:PRL=5:1, E2 和 PRL 浓度分别为 250 ng/mL 和 50 ng/mL)、试验 III 组(E2:PRL=2:1, E2 和 PRL 浓度分别为 200 ng/mL 和 100 ng/mL)和试验 IV 组(E2:PRL=1:2, E2 和 PRL 浓度分别为 100 ng/mL 和 200 ng/mL), 继续培养细胞 24 h 后收集细胞进行后续试验。

1.2.2 细胞鉴定 将 BMECs 细胞接种于 6 孔板中, 当细胞生长至 70%~80% 汇合时取出 6 孔板, 用 PBS 小心清洗细胞表面 2~3 次。用 4% 多聚甲醛在室温下固定细胞约 30 min, 再用 0.2% 的 TritonX-100 处理细胞 10 min, 使细胞更通透, 之后将 6 孔板置于摇床上用 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。在 6 孔板中加入含有 1% 明胶的 PBS, 室温下封闭 30 min 后加入鼠抗人角蛋白 18 单克隆一抗抗体(1:50 稀释)室温振荡孵育 1 h。孵育结束后回收抗体, 6 孔板中加入 PBS 置于摇床上清洗 3 次, 每次 5 min。之后加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗抗体(1:50 稀释), 摇床振荡 30 min。振荡结

束后加入 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。在倒置相差荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 MTT 检测细胞增殖 细胞活力的检测采用 MTT 法。96 孔板中每孔接种 1×10^4 的 BMECs, 将 96 孔板放入 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中, 培养至细胞汇合 80% 时, 弃去上清, 添加饥饿培养基, 饥饿 16 h, 再更换含有不同浓度 E2 的 DMEM/F12 培养基继续培养 24 h, 本实验每个处理组设 5 个重复。加入诱导培养基培养至 20 h 时, 96 孔板每孔加入 5 μ L 浓度为 5 mg/mL 的 MTT, 继续培养 4 h。培养结束, 取出 96 孔板, 弃上清液, 每孔加入二甲基亚砷(DMSO) 200 μ L, 振荡 10 min, 在 490 nm 处测定吸光度(*D*)值。细胞相对增殖率(relative growth rate, RGR)=试验组 *D*₄₉₀/对照组 *D*₄₉₀。

1.2.4 qRT-PCR 检测基因表达 不同浓度的诱导培养基处理 BMECs 24 h 后用胰酶-EDTA 消化细胞, 将消化下来的细胞移入离心管中, 1 280 r/min 离心 8 min, 弃去上清, 用 PBS 吹打清洗, 在 1 280 r/min 离心 3 min, 收集细胞沉淀, 提取细胞中总 RNA, 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达水平。以 GAPDH、*UXT* 和 β -actin 为内参。引物序列见表 1。

1.2.5 蛋白印迹法检测酪蛋白水平 按照 1.2.4 方法收集细胞沉淀于 1.5 mL EP 管中, 用 RIPA 试剂提取细胞中总蛋白, 经 BCA 法测定蛋白含量后, 进行 SDS-PAGE 电泳。将分离蛋白转至 PVDF 膜, 封闭液 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h。加入兔多克隆一抗(1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。加入羊抗兔二抗 IgG(1:2 000), 室温孵育 1 h。滴加化学发光试剂, 避光显影后, 曝光拍照。

1.3 统计学分析

利用 SPSS 26.0 软件分析试验数据。多组间比较用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异显著, 有统计学意义。

2 结果

2.1 BMECs 的鉴定

采用荧光免疫染色法对 BMECs 进行鉴定。由图 1 可知, 原代培养的乳腺上皮细胞大多数呈卵圆形, 细胞之间连接成片, 呈鹅卵石样单层生长。由图 2 可知培养的 BMECs 骨架蛋白 CK-18 表达呈阳性, 说明本实验分离培养的细胞是 BMECs。

2.2 组合添加 E2 和 PRL 对 BMECs 增殖率的影响

由图 3 可知, 与对照组相比, 组合添加处理组均

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Genes	序列 Sequences	GenBank登录号 GenBank accession No.	长度/bp Length /bp
<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	177
<i>β-actin</i>	F: 5'-GCC ATG AAG CTG AAG ATG AC-3' R: 5'-CCT TCT GCA GCT CAG ATA TG-3'	NM-173979	124
<i>UXT</i>	F: 5'-CAG CTG GCC AAA TAC CTT CAA-3' R: 5'-GTG TCT GGG ACC ACT GTG TCA A-3'	NM-005163	224
<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	192
<i>CSN2</i>	F: 5'-AGC TCT CCA CCA GTG AGG AA-3' R: 5'-GCA AGG CGA ATT TCT GGT AA-3'	NM_174528.2	116
<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.	148
<i>AMPK</i>	F: 5'-TTA CTT GGC AAC GAG CCC AC-3' R: 5'-CCC TGG GAG TTT CAG CAA C-3'	NM-001167633	98
<i>PI3K</i>	F: 5'-GGT GCG AGA GGA GTG GAC AA-3' R: 5'-CGG GAC AGG TGG AAG AAC AGC-3'	NC_041784.1	117
<i>AKT</i>	F: 5'-CCT GCT CTC TGG GCT ACT CAA-3' R: 5'-CAC GAT GCT GGC GAA GAA-3'	NM_005163	210
<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	199
<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	203
<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	302
<i>S6K1</i>	F: 5'-ATG AAA GCA TGG ACC ATG GG-3' R: 5'-CCG GTA TTT GCT CCT GTT AC-3'	NM_205816.1	101
<i>eIF4E</i>	F: 5'-GAA GAC TTT TGG GCT CTG TAC-3' R: 5'-CAG CTC CAC ATA CAT CAT CAC-3'	NM-174310.3	82
<i>JAK2</i>	F: 5'-CAA GAC CAG ATG GAT GCC CAG-3' R: 5'-ACT CGA ACT GCT AGG TCTCTGA-3'	XM_005209981.4 103	101
<i>ER-α</i>	F: 5'-CGG TGG ATG TGG TCC TTC TCT-3' R: 5'-AGG GAA GCT CCT ATT TGC TCC-3'	Z49257	187
<i>ER-β</i>	F: 5'-GCT AAC CTG CTG ATG CTC CTG TCT C-3' R: 5'-GCC CTC TTT GCT CTC ACT GTC CTC-3'	EU847291	220
<i>PRLR</i>	F: 5'-GAT GAC TGT GAG GAC CCA GCA-3' R: 5'-AAG GCC ATG TGG AAG ATT TG-3'	NM_174155	165

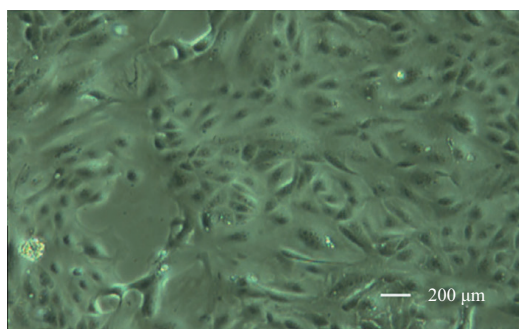


图1 纯化后的BMECs

Fig.1 Purified bovine mammary epithelial cells

显著提高了BMECs的增殖率($P<0.05$)。试验IV组BMECs的增殖率显著高于试验II组和III组, 试验II组又显著高于试验III组($P<0.05$)(图3)。

2.3 组合添加E2和PRL对BMECs酪蛋白合成及相关基因表达的影响

2.3.1 组合添加E2和PRL对BMECs酪蛋白合成的影响 由图4可知, 与对照组相比, 组合添加PRL和E2均上调BMECs酪蛋白的基因表达, 其中试验II、III和IV组显著上调了 $CSN1S1$ 和 $CSN3$ 的基因表达($P<0.05$); 试验III组和IV组显著上调了 $CSN2$ 的基因表达($P<0.05$)。试验IV组 $CSN1S1$ 、 $CSN2$ 和 $CSN3$ 基因表达显著高于试验II组和III组($P<0.05$)。试验II组 $CSN3$ 基因表达量显著高于试验III组, 而 $CSN2$ 表达量显著低于试验III组($P<0.05$), 试验II组和III的 $CSN1S1$ 表达量无显著差异($P>0.05$)。

2.3.2 组合添加E2和PRL对BMECs mTOR信号通路相关基因表达的影响 由图5可知, 试验II、III和IV组BMECs的 $AMPK$ 、 $PI3K$ 、 AKT 、 $mTOR$ 和

$eIF4E$ 的基因表达均显著高于对照组($P<0.05$)。试验IV组 AKT 、 $PI3K$ 和 $eIF4E$ 基因表达显著高于试验II组和III组($P<0.05$)。试验III组和IV组 $AMPK$ 基因表达显著高于试验II组($P<0.05$)。试验II组和IV组 $S6K1$ 基因表达显著高于试验III组($P<0.05$)。试验II组和III组 $4EBP1$ 基因表达显著低于对照组($P<0.05$), 试验IV组 $4EBP1$ 表达量与对照组无显著差异($P>0.05$)(图5)。

2.3.3 组合添加E2和PRL对BMECs JAK2-STAT5信号通路相关基因表达的影响 由图6可知, 试验II组、III组和IV组BMECs的 $JAK2$ 和 $STAT5$ 基因表达均显著高于对照组($P<0.05$)。试验IV组的 $JAK2$ 和 $STAT5$ 基因表达显著高于试验II组和III组; 试验II组的 $STAT5$ 基因表达显著高于试验III组($P<0.05$)。试验II组和III组 $JAK2$ 表达量无显著差异($P>0.05$)(图6)。

2.3.4 组合添加E2和PRL对BMECs E2和PRL受体基因表达的影响 由图7可知, 试验IV组BMECs

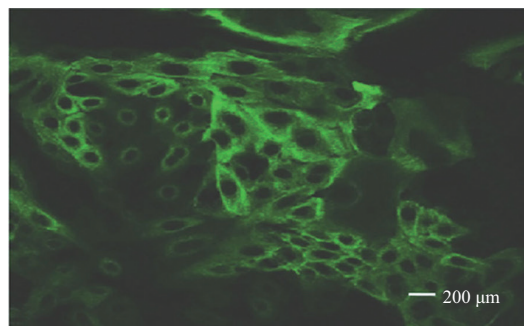
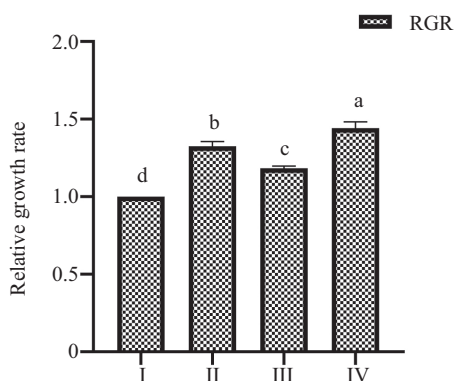


图2 BMECs免疫荧光鉴定

Fig.2 BMECs identification by immunofluorescence

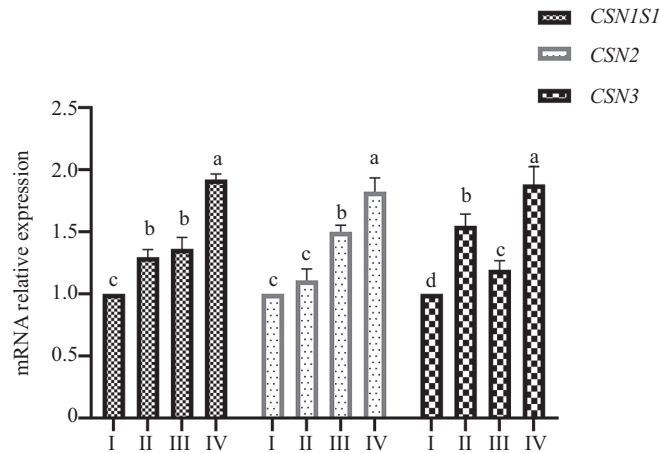


同一组数据肩标中不含相同字母表示差异显著($P<0.05$); 含相同字母者表示差异不显著($P>0.05$)。

The same group of data without the same letter in the shoulder indicates significant difference ($P<0.05$), while with same superscript means no significant difference ($P>0.05$).

图3 组合添加E2和PRL对BMECs增殖率的影响

Fig.3 Effect of mixed supplementation of E2 and PRL on proliferation in BMECs

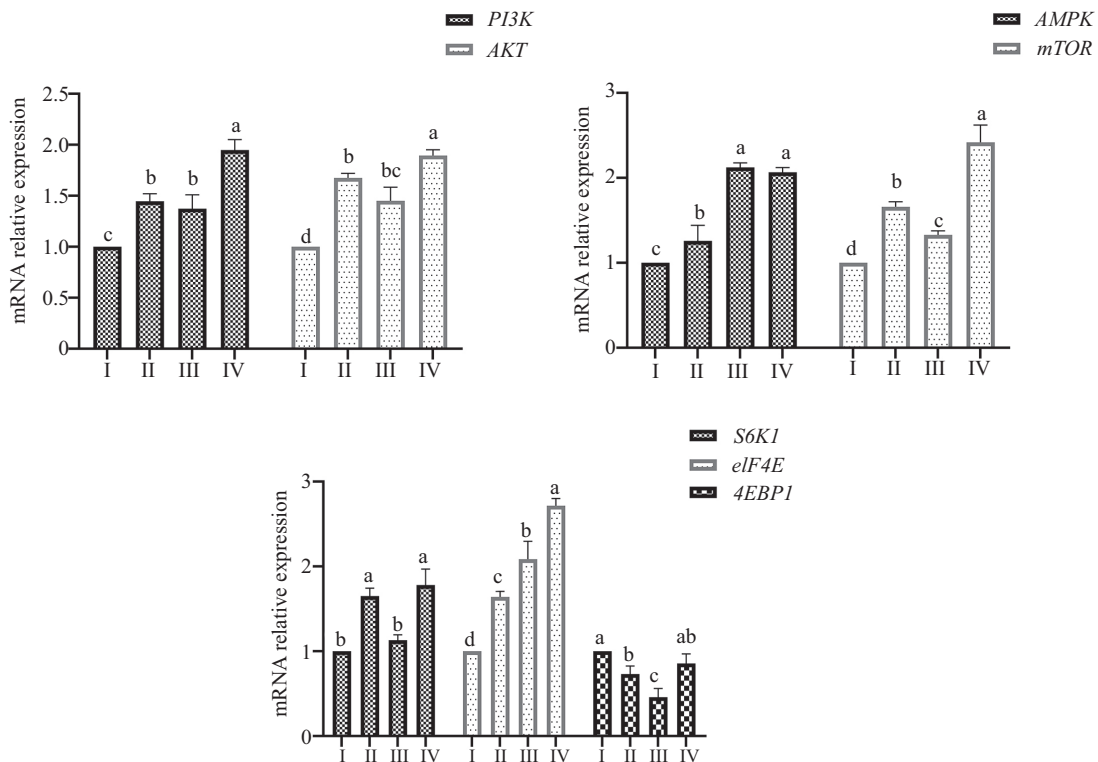


同一组数据肩标中不含相同字母表示差异显著($P<0.05$); 含相同字母者表示差异不显著($P>0.05$)。

The same group of data without the same letter in the shoulder indicates significant difference ($P<0.05$), while with same superscript means no significant difference ($P>0.05$).

图4 组合添加E2和PRL对BMECs酪蛋白合成基因表达的影响

Fig.4 Effect of mixed supplementation of E2 and PRL on mRNA expression of casein in BMECs



同一组数据肩标中不含相同字母表示差异显著($P<0.05$); 含相同字母者表示差异不显著($P>0.05$)。

The same group of data without the same letter in the shoulder indicates significant difference ($P<0.05$), while with same superscript means no significant difference ($P>0.05$).

图5 组合添加E2和PRL对BMECs mTOR信号通路相关基因mRNA表达的影响

Fig.5 Effect of mixed supplementation of E2 and PRL on mRNA expression of genes involved in mTOR signaling pathway in BMECs

的 $ER-\alpha$ 基因表达显著高于对照组、试验II组和III组($P<0.05$), 试验II组和III组 $ER-\alpha$ 基因表达高于对照组, 但统计分析差异不显著($P>0.05$)。试验II组、III

组和IV组BMECs的 $ER-\beta$ 和 $PRLR$ 基因表达均显著高于对照组($P<0.05$)。试验IV组 $PRLR$ 基因表达显著高于试验II组和III组($P<0.05$), $ER-\beta$ 的表达试验

II组、III组和IV组无显著差异($P>0.05$)。

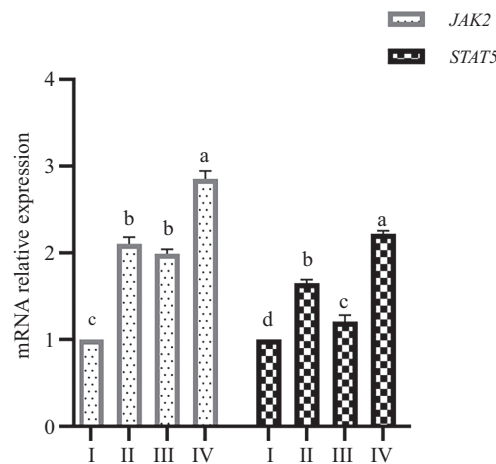
2.4 组合添加E2和PRL对BMECs酪蛋白表达量的影响

由图8可知,与对照组相比,试验II组和IV组BMECs的 α 酪蛋白表达量显著增加($P<0.05$),分别提高了1.23倍和1.39倍,试验III组 α 酪蛋白表达量与对照组无显著差异($P>0.05$)。试验II组、III组和IV组BMECs的 β 酪蛋白表达量均显著增加($P<0.05$),与对照组相比分别提高了1.63倍、1.66倍和2.03倍。试验IV组BMECs的 α 酪蛋白和 β 酪蛋白表达量显著高于试验II组和III组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 组合添加E2和PRL对BMECs增殖的影响

奶牛乳腺细胞的生长发育,以及乳腺细胞内一系列的代谢活动依靠激素间协同调控。妊娠期间奶牛乳腺快速发育,生长激素、E2、黄体酮、PRL等激素刺激乳腺上皮细胞增殖^[16]。在反刍动物乳腺上皮细胞培养中,PRL具有维持乳腺细胞数量及分化状态的作用。本实验研究结果表明,PRL浓度高于E2处理组的BMECs增殖率显著高于PRL浓度低于E2的处理组。有研究指出,E2对乳腺发育的影响可能是通过PRL调控的E2信号通路和E2受体基因表

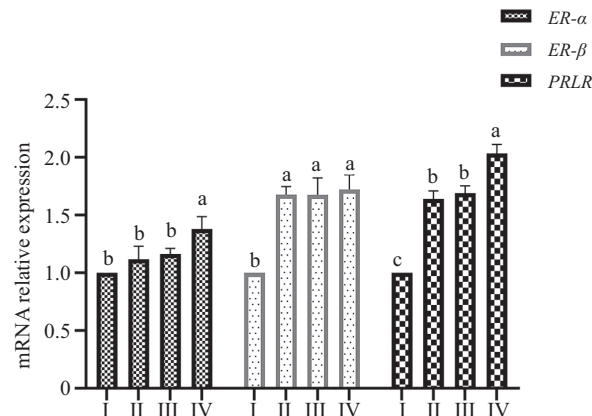


同一组数据肩标中不含相同字母表示差异显著($P<0.05$); 含相同字母者表示差异不显著($P>0.05$)。

The same group of data without the same letter in the shoulder indicates significant difference ($P<0.05$), while with same superscript means no significant difference ($P>0.05$).

图6 组合添加E2和PRL对BMECs JAK-STAT信号通路相关基因mRNA表达的影响

Fig.6 Effect of mixed supplementation of E2 and PRL on mRNA expression of genes involved in JAK-STAT signaling pathway in BMECs

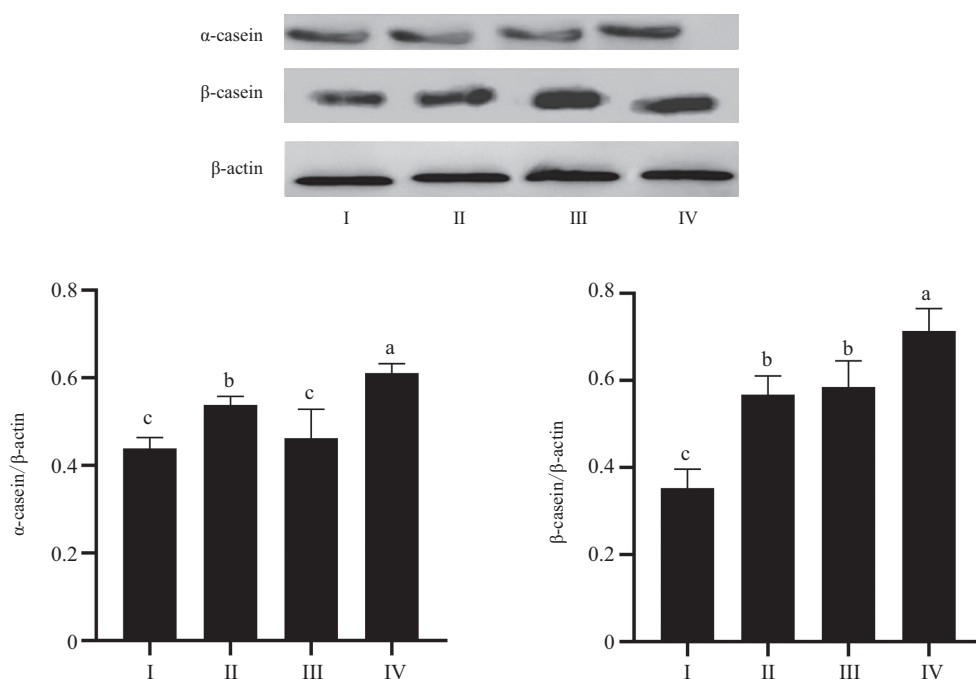


同一组数据肩标中不含相同字母表示差异显著($P<0.05$); 含相同字母者表示差异不显著($P>0.05$)。

The same group of data without the same letter in the shoulder indicates significant difference ($P<0.05$), while with same superscript means no significant difference ($P>0.05$).

图7 组合添加E2和PRL对BMECs和催乳素受体相关基因mRNA表达的影响

Fig.7 Effect of mixed supplementation of E2 and PRL on mRNA expression of hormone receptor in BMECs



同一组数据肩标中不含相同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 含相同字母者表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

The same group of data without the same letter in the shoulder indicates significant difference ($P < 0.05$), while with same superscript means no significant difference ($P > 0.05$).

图8 组合添加E2和PRL对BMECs酪蛋白表达量的影响

Fig.8 Effect of mixed supplementation of E2 and PRL on expression of casein in BMECs

达来实现的^[17]。MULDOON等^[18]研究发现, PRL能增强小鼠乳腺中ER的活性。本研究得出, PRL与E2比例为2:1时, ER- α 基因表达和BMECs的RGR显著高于对照组和其他处理组, 这与前人研究结果相一致。STAT5和AKT介导的信号通路有维持细胞生长、保护细胞免疫不同细胞凋亡因子影响的作用。从STAT5与AKT的基因表达量可以看出, 当PRL与E2比例为2:1时, 二者基因表达均显著高于对照组和其他处理组, 这与细胞活力检测结果相一致。

3.2 组合添加E2和PRL对BMECs酪蛋白合成的影响

酪蛋白是牛奶中的一种分泌蛋白, 是哺乳期犊牛必需氨基酸和钙的主要来源。酪蛋白在分娩后大量表达, 并在哺乳期的乳腺腺泡中持续供给^[19]。激素在乳腺发育以及合成蛋白的过程中不仅能单独发挥作用, 而且还能协同调控乳腺的发育以及乳成分的合成。PRL和糖皮质激素在分娩前后分泌增加, 调节乳蛋白中 β 酪蛋白的表达^[20]。ZHOU等^[21]研究表明, PRL能在翻译水平上促进BMECs β 酪蛋白的表达。KOBAYASHI等^[22]在体外培养的乳腺上皮细胞中添加PRL, 结果表明PRL促进了入BMECs β 酪蛋

白的表达及分泌。LIU等^[23]研究发现, 葡萄糖调节蛋白能刺激PRL和E2的表达, 通过mTOR信号通路在翻译水平上促进酪蛋白的生成。BUSER等^[24]研究发现, 糖皮质激素在乳腺细胞内促进PRL的分泌, 通过上调STAT5的表达促进了BMECs酪蛋白的表达。研究发现, JAK-STAT通路相关蛋白受到PRLR的调控^[25], 通过激活JAK-STAT途径, PRL与膜上受体结合调节BMECs乳蛋白合成^[26]。JAK2是负责PRLR和STAT5磷酸化的酪氨酸激酶, 在沉默JAK2基因表达的情况下, 分娩前后乳腺上皮细胞的增殖和分化减少了95%^[27]。而高STAT5磷酸化水平促进细胞炎症反应的发生^[28]。JAK2-STAT5信号通路高表达可增加奶牛乳腺炎的发生^[29]。

本研究结果表明, 组合添加E2和PRL时, 当PRL浓度高于E2时, BMECs酪蛋白以及mTOR和JAK2-STAT5信号通路相关基因的表达均高于对照组和PRL浓度低于E2的处理组。LI等^[30]研究发现, 在BMECs中添加PRL和适宜剂量的氨基酸能够上调eIF4E和S6K1, 下调4EBP1的基因表达量, 并促进BMECs酪蛋白的合成。ZHANG等^[31]研究发现, 在BMECs的培养基中添加PRL和葡萄糖, 能够上调

AMPK、JAK和STAT5的基因表达量,并促进CSN2和CSN3的蛋白表达量。这表明本研究与前人的研究结果一致,其原因可能是当PRL的浓度高于E2时,PRL与其受体结合,激活mTOR和JAK2-STAT5信号通路,进而有效促进酪蛋白的表达;而当E2浓度大于PRL时,高浓度的E2抑制了PRL的作用,减少了BMECs酪蛋白的合成。

综上所述,组合添加100 ng/mL E2和200 ng/mL PLR(即E2:PLR=2:1)对BMECs酪蛋白合成的促进效果最佳。E2和PRL协同调控酪蛋白合成的分子机制还有待深入研究。

参考文献 (References)

- [1] 丁慧. 酪蛋白质量分数作为乳品掺假鉴定指标的研究[D]. 陕西: 陕西科技大学, 2010.
- [2] 武雪会, 孙会增, 王迪铭, 等. 不同产奶量和乳蛋白率奶牛的血液生化及激素水平分析[J]. 中国畜牧杂志(WU X H, SUN H Z, WANG D M, et al. Research on serum biochemical parameters and hormone profiles in cows with extremely different milk yield or milk protein content [J]. Chinese Journal of Animal Science), 2019, 55(11): 99-104.
- [3] WALL E H, CRAWFORD H M, MCFADDEN T B, et al. Mammary response to exogenous prolactin or frequent milking during early lactation in dairy cows [J]. J Dairy Sci, 2006, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72514-0.
- [4] PLAUT K, BAUMAN DE, AKERS RM, et al. Effect of exogenous prolactin administration on lactational performance of dairy cows [J]. Domest Anim Endocrin, 1987, 4(4): 279-90.
- [5] HAYASHI A A, 张养东, 卜登攀. 泌乳牛皮下注射生长激素能通过调控mRNA翻译的启动及延伸阶段增加乳蛋白的产量[J]. 中国畜牧兽医(HAYASHI A A, ZHANG Y D, BU D P. Hormone injection under lactating cow skin can increase the yield of milk protein by regulating the initiation and extension stages of mRNA translation [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine), 2009(9): 151-2.
- [6] BURGOS S A, DAI M, CANT J P. Nutrient availability and lactogenic hormones regulate mammary protein synthesis through the mammalian target of rapamycin signaling pathway [J]. J Dairy Sci, 2010, 93(1): 153-61.
- [7] 李楠, 高学军. 雌激素及其受体对动物乳腺上皮细胞泌乳性能的影响[J]. 中国畜牧兽医(LI N, GAO X J. Effects of estrogen and its receptor on lactation function of mammary gland epithelial cell in mammal [J]. Journal of Dairy Science), 2011, 38(4): 151-3.
- [8] MALEWSKI T, GAJEWSKA M, EBROWSKA T, et al. Differential induction of transcription factors and expression of milk protein genes by prolactin and growth hormone in the mammary gland of rabbits [J]. Growth Hormone & Igf Research, 2002, 12(1): 41-53.
- [9] KELLY P A, BACHELOT A, KEDZIA C, et al. The role of prolactin and growth hormone in mammary gland development [J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 197(1): 127-31.
- [10] ROBERT E R, EWA G N. Translational regulation of milk protein synthesis at secretory activation [J]. J Mammary Gland Biol and Neoplasia, 2007, 12(4): 283-92.
- [11] 张猛. mTORC1和mTORC2在人肝细胞氨基酸代谢关键酶表达中的调控作用[D]. 内蒙古: 内蒙古大学, 2019.
- [12] DELBECCHI L, MILLER N, PRUD'HOMME C, et al. 17 β -estradiol reduces milk synthesis and increases stanniocalcin gene expression in the mammary gland of lactating cows [J]. Livestock Production Science, 2005, 98(1/2): 57-66.
- [13] 童津津. 泌乳相关激素对奶牛泌乳性能的影响及调控机制研究[D]. 黑龙江: 东北农业大学, 2017.
- [14] 金亚亚. 雌激素和催乳素对奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白合成的影响[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2021.
- [15] 邵伟, 赵艳坤, 余雄, 等. 微生态制剂对新疆荷斯坦奶牛生产性能和血清生化水平的影响[J]. 饲料工业(SHAO W, ZHAO Y K, YU X, et al. Effects of probiotics on production performance and serum biochemical level of Xinjiang Holstein dairy cows [J]. Feed Industry), 2015, 36(17): 47-50.
- [16] TOPPER Y J, FREEMAN C S. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland [J]. Physiol Meas, 1980, 60(4): 1049-106.
- [17] FRASOR J, GIBORI G. Prolactin regulation of estrogen receptor expression [J]. Trends Endocrinol Metab, 2003, 14(3): 118-23.
- [18] MULDOON T G, EVANS A C J. Hormones and their receptors [J]. Arch Intern med, 1988, 148(4): 961-7.
- [19] ANDERSON S M, RUDOLPH M C, MCMANAMA J L, et al. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis [J]. Breast Cancer Res, 2007, 9(1): 204.
- [20] NGUYEN D A, PARLOW A F, NEVILLE M C. Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation [J]. J Endocrinol, 2001, 170(2): 347-56.
- [21] ZHOU J Y, JIANG M H, SHI Y, et al. Prolactin regulates LAT1 expression via STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) signaling in mammary epithelial cells of dairy cows [J]. J Dairy Sci, 2020, 103(7): 6627-34.
- [22] KEN K, OYAMA S, KUKI C, et al. Distinct roles of prolactin, epidermal growth factor, and glucocorticoids in β -casein secretion pathway in lactating mammary epithelial cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 2017, 440: 16-24.
- [23] YING L, WANG X M, ZHEN Z, et al. GRP78 regulates milk biosynthesis and the proliferation of bovinemammaryepithelial cells through the mTOR signaling pathway [J]. Cell Mol Biol Lett, 2019, 24(1): 1-12.
- [24] BUSER A C, GASS H E K, WYSZOMIERSKI S L, et al. Progesterone receptor repression of prolactin/signal transducer and activator of transcription 5-mediated transcription of the β -casein gene in mammary epithelial cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 2007, 21(1): 106-25.
- [25] SIGL T, MEYER H H D, WIEDEMANN S. Gene expression analysis of protein synthesis pathways in bovine mammary epithelial cells purified from milk during lactation and short-term restricted feeding [J]. J Anim Physiol An N, 2014, 98(1): 84-95.
- [26] TIAN Q, WANG H R, WANG M Z, et al. Lactogenic hormones regulate mammary protein synthesis in bovine mammary epithelial cells via the mTOR and JAK-STAT signal pathways [J].

- Anim Prod Sci, 2016, 56(11): 1803-9.
- [27] SHILLINGFORD J M, MIYOSHI K, ROBINSON G W, et al. Jak2 is an essential tyrosine kinase involved in pregnancy-mediated development of mammary secretory epithelium [J]. Mol Endocrinol, 2002, 16(3): 563-70.
- [28] HEE S H, SHIN J S, LEE S B, et al. Cirsimarín, a flavone glucoside from the aerial part of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* (Regel) Kitam. ex Ohwi, suppresses the JAK/STAT and IRF-3 signaling pathway in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. Chem Biol Interact, 2018, doi: 10.1016/j.cbi.2018.07.024.
- [29] MUHAMMAD Z K, KHAN A, XIAO J X, et al. Role of the JAK-STAT pathway in bovine mastitis and milk production [J]. Animals, 2020, doi: 10.3390/ani10112107.
- [30] LI S, LOOR J J, LIU H, et al. Optimal ratios of essential amino acids stimulate β -casein synthesis via activation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway in MAC-T cells and bovine mammary tissue explants [J]. J Dairy Sci, 2017, doi: 10.3168/jds.2017-12681.
- [31] ZHANG M C, ZHAO S G, WANG J Q, et al. d-Glucose and amino acid deficiency inhibits casein synthesis through JAK2/STAT5 and AMPK/mTOR signaling pathways in mammary epithelial cells of dairy cows [J]. J Dairy Sci, 2018, 101(2): 1737-46.