

小肽转运载体 2 在奶牛乳腺小肽摄取中的作用研究

周苗苗 吴跃明* 刘红云 赵珂 刘建新*

(浙江大学奶业科学研究所, 动物分子营养学教育部重点实验室, 杭州 310029)

摘要: 本试验旨在研究 2 型小肽转运载体 (oligopeptide transporter 2, PepT 2) 在奶牛乳腺组织吸收利用小肽合成乳蛋白过程中的作用。在体外培养的奶牛乳腺组织培养液中分别添加不同浓度的苯丙氨酸二肽 (Phe-Phe) (0 和 11.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和/或焦碳酸二乙酯 (DEPC) (0、0.01、0.1、0.5 和 1.0 mmol/L) 进行培养, 试验结束后收集乳腺组织和培养液分别用于基因表达和乳蛋白合成的检测。结果表明, Phe-Phe 促进了 PepT 2 和 α_{sl} -酪蛋白基因表达及乳蛋白合成 ($P < 0.05$); 随 DEPC 添加浓度的升高, α_{sl} -酪蛋白基因表达 ($P < 0.01$) 和乳蛋白合成 ($P < 0.05$) 显著降低; 0.5 mmol/L DEPC 显著降低了 Phe-Phe 组 α_{sl} -酪蛋白的基因表达 ($P < 0.05$) 和乳蛋白合成 ($P < 0.01$) 以及不添加小肽组乳蛋白合成 ($P < 0.05$), 但不影响不添加小肽组 α_{sl} -酪蛋白基因表达 ($P > 0.05$)。结果提示, 奶牛乳腺能摄取 Phe-Phe 用于乳蛋白的合成, PepT 2 可能在乳腺小肽摄取过程中发挥重要作用。

关键词: 二肽; PepT 2; 酪蛋白; DEPC; 奶牛乳腺组织

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2011)08-1303-06

随着反刍动物蛋白质和氨基酸营养研究的深入, 小肽在反刍动物乳腺蛋白质合成中的作用已引起重视。有研究表明, 25% 以上的乳蛋白合成原料来自于过瘤胃小肽^[1]。除氨基酸之外, 乳腺组织很可能直接摄取和利用血液中的小肽和多肽作为合成酪蛋白等的前体物质。研究证实, 给体外培养的奶牛乳腺上皮细胞培养液中添加适当浓度的蛋氨酸或赖氨酸小肽能促进酪蛋白的基因表达和乳蛋白合成^[2-4]。然而, 泌乳反刍动物乳腺对小肽的摄取和利用是一个较复杂的过程, 其具体机制还不清楚。乳腺上皮细胞如何摄取并利用小肽方面, 目前仍没有定论。有研究用反转录 PCR 和免疫化学的方法检测到大鼠、人和奶牛的乳腺中均有 2 型小肽转运载体 (oligopeptide transporter 2, PepT 2) 表达^[5-6], 这为进一步研究乳腺对小肽的摄取机制提供了基础。哺乳动物 PepT 2 是一种高亲和力低容量的小肽转运载体, 它利用电子梯

度逆浓度转运短链肽和肽结构类似物到各种细胞内, 主要在肾脏上皮细胞内表达^[7]。PepT 2 蛋白由 12 个跨膜域组成, 包含几个保守的组氨酸 (His) 残基, 这些 His 残基与其结合转运 H^+ /小肽相关, 对维持蛋白质正常功能必不可少^[8-9]。另有研究报道, His 变性剂焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 能完全阻断大鼠肾近曲小管细胞 (SKPT) 对二肽的吸收^[10]。因此, 本试验旨在通过研究小肽和 DEPC 对 PepT 2 基因表达以及乳蛋白合成的影响, 试图揭示 PepT 2 在奶牛乳腺小肽摄取过程中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 奶牛乳腺组织体外培养

取泌乳中期的中国荷斯坦奶牛乳腺组织, 清洗并剪碎至 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小。将组织块种植于 6 孔板上 (Corning, USA), 置于二氧化碳

收稿日期: 2011-02-25

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (2011CB100801); 浙江省自然科学基金 (Z305036)

作者简介: 周苗苗 (1984—), 女, 山东聊城人, 博士研究生, 从事奶牛乳腺氨基酸和小肽营养研究。E-mail: zhoumm0329@163.com

* 通讯作者: 吴跃明, 教授, 博士生导师, E-mail: ymwu@zju.edu.cn; 刘建新, 教授, 博士生导师, E-mail: liujx@zju.edu.cn

培养箱中(37 °C, 5% CO₂)。待组织贴壁后每孔添加 2 mL 培养液。培养液成分为:基础培养液 DMEM (dubecco's modified Eagle's medium)-F12 (Gibco, USA) 添加 1% 谷氨酰胺、100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、5 μg/mL 胰岛素 (Sigma, USA)、500 ng/mL 催乳素 (Sigma, USA)、

1 μg/mL 氢化可的松 (Sigma, USA) 以及 10% 的胎牛血清 (FCS) (杭州四季青)。

1.2 试验设计

试验处理培养液中去除胎牛血清、补充几种必需氨基酸(表 1),并按以下试验设计调整相应氨基酸和小肽的浓度。

表 1 培养液中几种必需氨基酸的最终浓度

Table 1 Final concentrations of several essential amino acids in medium

μg/mL

项目 Items	培养液中的必需氨基酸 EAA in medium							
	苯丙氨酸 Phe	苏氨酸 Thr	蛋氨酸 Met	赖氨酸 Lys	亮氨酸 Leu	异亮氨酸 Ile	缬氨酸 Val	组氨酸 His
最终浓度 Final concentrations	117	123	60	210	214	120	154	45

1.2.1 苯丙氨酸二肽等量替代 10% 总游离苯丙氨酸

以培养液中 Phe 总量(117 μg/mL)10% 的二肽结合 Phe (Phe-Phe, 纯度 > 98%, 杭州中肽) 替代等量的 Phe 作为试验培养液孵育乳腺组织 48 h。

1.2.2 不同浓度 DEPC 的添加

在含有 10% Phe-Phe (11.7 μg/mL) 的培养液中分别添加 0、0.01、0.1、0.5 和 1.0 mmol/L 的 DEPC 用于奶牛乳腺组织的培养,培养时间为 24 h。

在不含小肽和含 10% Phe-Phe (11.7 μg/mL) 的培养液中分别添加 0 和 0.5 mmol/L DEPC (由上述试验得出) 用于奶牛乳腺组织的培养,培养时间为 24 h。

试验结束后,收集乳腺组织和培养液分别用于总 RNA 的提取和总乳蛋白含量的测定。每个试验重复 3 次。

1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

用 Trizol (Invitrogen, USA) 提取乳腺组织中的总 RNA。RNA 纯度以紫外吸光法检测 ($OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}} > 1.80$)。抽提的 RNA 溶解后立即用于第 1 链 cDNA 的合成 (PrimeScript™ 反转录试剂盒, Takara)。合成的 cDNA 贮存于 -20 °C 冰箱中,备用。

1.4 实时荧光定量 PCR (real-time PCR)

用实时荧光定量 PCR 的方法检测 mRNA 的表达。α_{s1}-酪蛋白、PepT 2 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 的实时荧光定量专用引物见表 2。

PCR 反应在 96 孔板中进行,反应体系为 2 μL cDNA 模板加 18 μL PCR 反应液 (SYBR® Premix Ex Taq™ Real Time PCR 试剂盒, Takara)。用三蒸水替代 cDNA 模版作为阴性对照。反应条件如下: 95 °C, 10 s; 95 °C, 5 s, 40 个循环; 60 °C, 34 s。ABI-7500 实时定量序列检测软件 (Applied Biosystems, USA) 自动读取 CT 值。PepT 2、α_{s1}-酪蛋白和 GAPDH 的扩增效率分别为 101%、100% 和 102%。mRNA 相对变化值用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算。

1.5 DNA 总量和培养液中总乳蛋白含量测定

用 Trizol 提取组织中的总 DNA。紫外吸光法测定 DNA 的纯度 ($OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}} > 1.80$) 和含量。DNA 量的多少作为组织/细胞数量的代表用于校正培养液中的蛋白质含量。

用冷的丙酮沉淀培养液中的蛋白质,并将蛋白质溶于含 1 mmol EDTA 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中。随后,根据 Bradford^[11] 的方法,用蛋白质检测试剂盒 (博士德,武汉) 检测培养液中总蛋白质含量,并以此代表培养液中的乳蛋白含量。

以试验组 DNA 校正乳蛋白含量 [蛋白质含量 (mg) 同 DNA 含量 (μg) 的比值] 同对照组 DNA 校正乳蛋白含量的比值作为最终结果进行比较。

1.6 统计分析

所有数据用 Excel 软件进行处理,用 SAS 8.0 软件的 PROC-GLM 程序进行统计分析^[12], $P < 0.05$ 时差异显著, $P < 0.01$ 时差异极显著。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物

Table 2 Oligonucleotide primer sets for real-time PCR

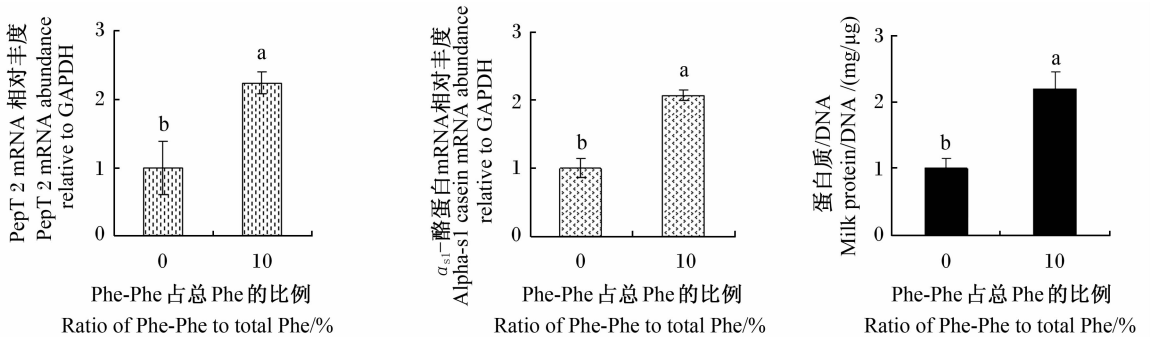
目的基因 Target gene	上游引物 Upstream primer (5'-3')	下游引物 Downstream primer (5'-3')	产物大小 Product size/bp	登录号 Accession No.
α_{s1} -酪蛋白 α_{s1} -casein	CCTAAACATCCTAT- CAAGCACCAA	ATTGACCTTCTCCTT TCCAAACAC	111	NM181029
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH	GCCAAGAGGGTCAT- CATCTC	GGTCATAAGTCCCTC- CACGA	197	AJ000039
2 型小肽转运载体 PepT 2	ATGGCAATGCCCAAT- GAAG	CACCAACACAGCAA- CAAACAAA	105	NM001079582

2 结果

2.1 Phe-Phe 等量替代 10% 游离 Phe 对乳蛋白合成的影响

结果显示,以 Phe-Phe 替代培养液中 10% 的

游离 Phe (11.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 显著提高了乳腺组织中 PepT 2 和 α_{s1} -酪蛋白的 mRNA 水平以及培养液中乳蛋白的含量 ($P < 0.05$) (图 1)。



同一柱形图中,数据柱上标有相邻小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),标有相间小写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$),标相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下表同。

In the same figure, data columns with adjacent small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and with alternate small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.01$), while with the same small letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

图 1 Phe-Phe 对 PepT 2 和 α_{s1} -酪蛋白基因表达及乳蛋白合成的影响

Fig. 1 Influence of Phe dipeptide on PepT 2 and α_{s1} -casein gene expressions and milk protein synthesis

2.2 PepT 2 功能抑制对乳腺小肽摄取和乳蛋白合成的影响

PepT 2 功能抑制剂——DEPC 的添加降低了乳腺组织中 α_{s1} -酪蛋白的 mRNA 丰度。其中,0.5 和 1.0 mmol/L DEPC 添加组 α_{s1} -酪蛋白的基因表达水平均显著低于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 2);随着 DEPC 浓度的不断升高,乳蛋白的合成逐渐降低。同对照组相比,0.1、0.5 和 1.0 mmol/L DEPC 添加组培养液中乳蛋白的含量均显著降低 ($P < 0.05$) (图 3)。

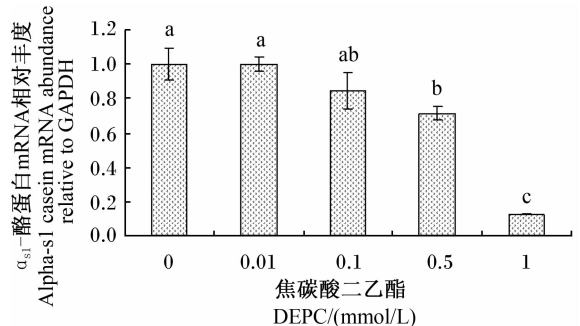


图 2 DEPC 浓度对 α_{s1} -酪蛋白基因表达的影响

Fig. 2 Influence of DEPC concentration on α_{s1} -casein gene expression

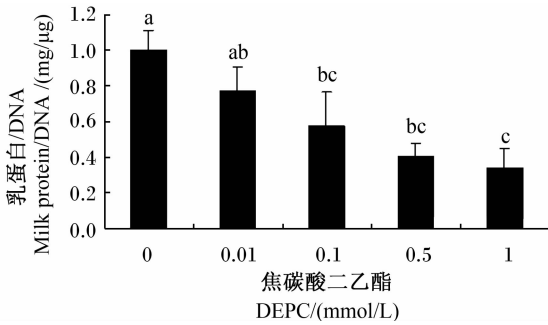


图3 DEPC浓度对乳蛋白合成的影响

Fig. 3 Influence of DEPC concentration on milk protein synthesis

不含小肽组添加 0.5 mmol/L DEPC 有降低乳腺组织中 α_{s1} -酪蛋白基因表达的趋势 (mRNA 丰度降低 23%), 但差异不显著 ($P > 0.05$); 而 10% Phe-Phe 组添加 0.5 mmol/L DEPC 则显著降低了乳腺组织中 α_{s1} -酪蛋白的基因表达, 其降低幅度为 29% ($P < 0.05$) (图 4)。

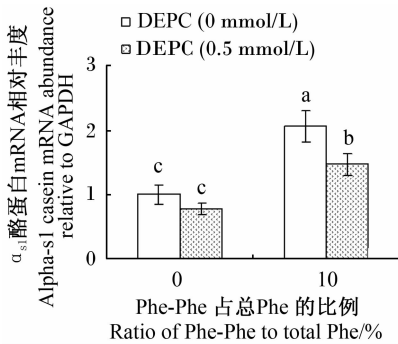


图4 PepT 2 功能抑制对 α_{s1} -酪蛋白基因的影响

Fig. 4 Influence of inhibition of PepT 2 function on α_{s1} -casein gene expression

DEPC 对乳蛋白合成的影响结果见图 5。添加 0.5 mmol/L DEPC 显著降低了不含小肽组培养液中乳蛋白的含量 ($P < 0.05$), 极显著降低了 10% Phe-Phe 组培养液中乳蛋白的含量 ($P < 0.01$)。其中, 不含小肽组乳蛋白含量降低 59%, 而添加 Phe-Phe 组乳蛋白含量降低 74%。

3 讨论

研究证实泌乳小鼠乳腺外植体可以摄取完整形式的蛋氨酸 (Met) 二肽用于乳蛋白的合成^[13]。众多研究也表明奶牛乳腺可以摄取血液中的肽结合必需氨基酸作为乳蛋白合成的前体

物^[14-15]。Pan 等^[16]比较了不同 Met 二肽对奶牛乳腺上皮细胞 (MAC-T) 中乳蛋白合成的影响, 结果发现 Met-Met、Met-Val 和 Leu-Met 的乳蛋白合成效率高于游离的 Met。Wu 等^[4]研究结果也表明, 同游离 Met 和 Lys 相比, 添加 Met 和 Lys 二肽能促进体外培养的奶牛乳腺上皮细胞中 α_{s1} -酪蛋白的基因表达。本试验以 Phe-Phe 等量替代培养液中 10% 的游离 Phe 显著促进了体外培养的乳腺组织中 α_{s1} -酪蛋白基因表达和乳蛋白合成, 表明乳腺组织可以利用 Phe-Phe 合成乳蛋白, 且利用效率高于等量的游离 Phe。该结果同上述用其他小肽所得结论一致。同时, Phe-Phe 的添加也提高了 PepT 2 的 mRNA 表达水平, 提示该小肽转运载体在乳腺小肽摄取方面可能发挥作用。

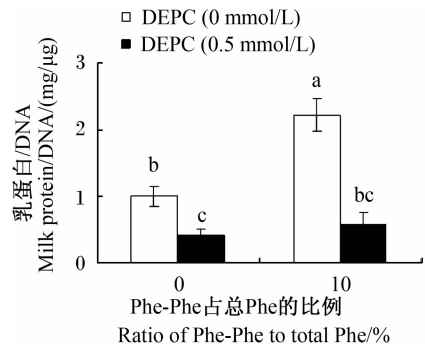


图5 PepT 2 功能抑制对乳蛋白合成的影响

Fig. 5 Influence of inhibition of PepT 2 function on milk protein synthesis

Brandsch 等^[10]利用大鼠 SKPT 表达高亲和力载体 PepT 2, 研究了组氨酸抑制剂 DEPC 对 PepT 2 动力学参数 V_{max} 、 K_m 的影响。结果表明, 在 pH 7.5 的环境下用 DEPC 处理后, SKPT 细胞膜上的 PepT 2 失去结合 H^+ 的能力, 进而显著抑制了 SKPT 对甘氨酸-肌氨酸 (glycylsarcosine, Gly-Sar) 的吸收, 但并不影响 PepT 2 和底物结合的 K_m 值。本试验为研究 PepT 2 在乳腺小肽摄取过程中的可能作用, 以 DEPC 抑制 PepT 2 蛋白转运功能来检测其对 α_{s1} -酪蛋白基因表达和乳蛋白合成的影响。结果发现, 0.5 和 1.0 mmol/L DEPC 的添加显著降低了 α_{s1} -酪蛋白基因表达和乳蛋白的合成。其机制可能是: 小肽转运载体蛋白的活性基团组氨酸的咪唑环结合了 DEPC 使其蛋白质变性, 从而破坏了载体蛋白的转运功能, 最终阻断了乳腺通过小肽转运载体对小肽的摄取, 抑制了

小肽对乳蛋白基因转录和翻译的促进作用。另外, DEPC 还可以抑制植物细胞上的非选择性阳离子通道 (nonselective cation channel, NSCC), 是常用的 NSCC 抑制剂。为避免 PepT 2 功能抑制剂 (DEPC) 通过影响乳腺组织中其他离子通道和转运载体来抑制乳蛋白合成, 本试验比较了不添加和添加 Phe-Phe 的情况下, 以 0.5 mmol/L DEPC 抑制 PepT 2 功能对乳腺组织中乳蛋白合成的影响。结果发现, 抑制 PepT 2 功能显著降低了添加 Phe-Phe 组的 α_{s1} -酪蛋白基因表达, 但不影响无小肽组的 α_{s1} -酪蛋白基因表达。就乳蛋白合成而言, 抑制 PepT 2 功能显著降低了 2 组的合成量。然而, 添加 Phe-Phe 组乳蛋白合成量降低了 74%, 同不添加小肽组 (乳蛋白降低 59%) 相比, 添加二肽组乳蛋白合成受 PepT 2 功能抑制的影响更大。由此可见, 无论乳腺组织中其他离子通道和转运载体是否受 DEPC 的影响, DEPC 都通过破坏 PepT 2 蛋白功能抑制了乳腺中二肽的转运, 进而降低了 α_{s1} -酪蛋白基因的表达和乳蛋白的合成。因此, 乳腺对小肽的摄取是通过或者至少部分通过 PepT 2 来实现的。

4 结 论

① 奶牛乳腺组织能够利用 Phe-Phe 合成乳蛋白, 且 Phe-Phe 用于乳蛋白合成的效率高于等量游离 Phe。

② 2 型小肽转运载体 (PepT 2) 在乳腺组织小肽摄取过程中发挥积极作用。

参考文献:

- [1] CHEN G, SNIFFEN C J, RUSSELL J B. Concentration and estimated flow of peptides from the rumen of dairy cattle: effects of protein quantity, protein solubility, and feeding frequency [J]. *Journal of Dairy Science*, 1987, 70:983.
- [2] 杨金勇. 蛋氨酸、赖氨酸及其二肽对奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白 α_{s1} 基因表达的影响 [D]. 硕士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [3] 吴慧慧. 必需氨基酸及蛋氨酸二肽供给模式对奶牛乳腺组织 α_{s1} 酪蛋白合成的影响 [D]. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [4] WU H H, YANG J Y, ZHAO K, et al. Effects of methionine-containing dipeptides on casein α_{s1} expression in bovine mammary epithelial cells [J]. *Journal of Animal Feed Science*, 2007, 16 (Suppl. 2): 7 - 12.
- [5] GRONEBERG D A, DORING F, THEIS S, et al. Peptide transport in the mammary gland: expression and distribution of PEPT2 mRNA and protein [J]. *The American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 2002, 282: E1172 - E1179.
- [6] ZHOU M M, WU Y M, LIU H Y, et al. Effects of tripeptides and lactogenic hormones on oligopeptide transporter 2 in bovine mammary gland [J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, DOI: 10.1111/j.1439-0396.2010.01110.x
- [7] 周苗苗, 吴跃明. 小肽转运载体 2 及其在乳腺泌乳中的作用 [J]. *动物营养学报*, 2009, 21 (5): 603 - 608.
- [8] KLAPPER M, DANIEL H, DORING F. Cytosolic COOH terminus of the peptide transporter PEPT2 is involved in apical membrane localization of the protein [J]. *The American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 2006, 290: C472 - C483.
- [9] FEI Y J, LIU W, PRASAD P D. Identification of the histidyl residue obligatory for the catalytic activity of the human H^+ /peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2 [J]. *Biochemistry*, 1997, 36: 452 - 460.
- [10] BRANDSCHA M, BRANDSCHA C, GANAPATHY M E. Influence of proton and essential histidyl residues on the transport kinetics of the H^+ /peptide cotransport systems in intestine (PEPT1) and kidney (PEPT2) [J]. *Biophysica Acta*, 1997, 1324: 251 - 262.
- [11] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248 - 254.
- [12] SAS Institute. SAS User's Guide; Statistics. Version 8.01. Cary, NC. SAS Institute. Inc., 2000.
- [13] WANG S, WEBB K E, AKERS M R. Peptide-bound methionine can be a source of methionine for the synthesis of secreted proteins by mammary tissue explants from lactating mice [J]. *Journal of Nutrition*, 1996, 126: 1662 - 1672.
- [14] REMOND D, BERNARD L, PONCET C. Free and peptide amino acid net flux across the rumen and the mesenteric- and portal-drained viscera of sheep [J]. *Journal of Animal Science*, 2000, 78: 1960 - 1972.
- [15] TAGARI H, WEBB K, Jr, THEURER B, et al. Mammary uptake, portal-drained visceral flux, and

hepatic metabolism of free and peptide-bound amino acids in cows fed steam-flaked or dry-rolled sorghum grain diets[J]. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91: 679–697.

onine-containing peptides can be used as methionine sources for protein accretion in cultured C2C12 and MAC-T cells[J]. *Journal of Nutrition*, 1996, 126: 232–241.

[16] PAN Y, BENDER P K, AKERS R M, et al. Methi-

Role of Oligopeptide Transporter 2 in Bovine Mammary Gland Phenylalanine Dipeptide Uptake

ZHOU Miaomiao WU Yueming* LIU Hongyun ZHAO Ke LIU Jianxin*

(*Institute of Dairy Science, Ministry of Education Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Abstract: This experiment was conducted to study the role of oligopeptide transporter 2 in small peptides uptake and milk protein synthesis in bovine mammary gland. Different doses of Phe dipeptide (0 and 11.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and DEPC (0, 0.01, 0.1, 0.5 and 1 mmol/L) were added to the culture medium of bovine mammary gland tissues. After incubated in the experimental medium, mammary tissues and medium were collected and used for gene expression and milk protein determination, respectively. The results showed that 1) Phe dipeptide increased oligopeptide transporter 2 and α_{S1} -casein gene expression and milk protein quantity in the medium ($P < 0.05$); 2) with increasing of DEPC dose, α_{S1} -casein gene mRNA level ($P < 0.01$) and synthesis of milk protein ($P < 0.05$) were decreased; 3) treatment with 0.5 mmol/L DEPC significantly decreased α_{S1} -casein gene expression ($P < 0.05$) and synthesis of milk protein ($P < 0.01$) in Phe dipeptide group, and synthesis of milk protein ($P < 0.05$) in free Phe group, but had no effect on α_{S1} -casein gene mRNA level ($P > 0.05$) in free Phe group. These results indicate that Phe dipeptide can be used for synthesis of milk protein by bovine mammary gland while PepT2 may play an important role in small peptides uptake by bovine mammary gland. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(8):1303-1308]

Key words: dipeptides; PepT2; casein; DEPC; bovine mammary gland tissues

* Corresponding author, WU Yueming, professor, E-mail: ymwu@zju.edu.cn; LIU Jianxin, professor, E-mail: liujx@zju.edu.cn