

# 生长激素和胰岛素样生长因子 I 对奶牛乳蛋白合成关键激酶及调节因子 mRNA 表达量的影响

季 昀<sup>1</sup> 庞学燕<sup>1</sup> 田 青<sup>1</sup> 王梦芝<sup>1</sup> 王洪荣<sup>1\*</sup> 敖长金<sup>2</sup>

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 内蒙古农业大学动物科学学院, 呼和浩特 010018)

**摘 要:** 本试验旨在探讨生长激素(GH)和胰岛素样生长因子 I (IGF- I) 对体外培养的奶牛乳腺上皮细胞内调控乳蛋白合成的关键激酶及调节因子 mRNA 表达量的影响。试验对纯化后的荷斯坦奶牛乳腺上皮细胞进行 4 种处理, 对照组采用无血清生长培养基, 试验组在对照组的基础上分别添加 GH (100 ng/mL)、IGF- I (100 ng/mL) 和 GH (100 ng/mL) + IGF- I (100 ng/mL)。培养 24 h 后, 采用实时定量 PCR(RT-qPCR)法测定  $\kappa$ -酪蛋白基因以及调控乳蛋白合成的关键激酶及调节因子的 mRNA 表达量, 并测定生长激素受体(GHR)和胰岛素样生长因子 I 受体(IGF- I R) mRNA 表达量。结果表明: 体外培养的奶牛乳腺上皮细胞可以表达 GHR 和 IGF- I R mRNA, 各试验组均能显著提高  $\kappa$ -酪蛋白(CSN3) mRNA 表达量( $P < 0.05$ ), 但未发现 GH 和 IGF- I 复合存在累积效应; 与对照组相比, GH 组有提高 E74-样转录因子 5 (ELF5) mRNA 表达量的趋势( $P < 0.10$ ), 而 IGF- I 组显著提高了哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和核糖体蛋白 S6 激酶 1(rpS6K1) mRNA 表达量( $P < 0.05$ ), GH + IGF- I 组未呈现加强作用。结果提示, GH 和 IGF- I 可能单独通过影响调控乳蛋白合成的关键激酶及调节因子 mRNA 表达来调节  $\kappa$ -酪蛋白的合成。

**关键词:** 生长激素; 胰岛素样生长因子 I; 乳腺上皮细胞; 乳蛋白; mRNA 表达量

**中图分类号:** S852.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1006-267X(2013)01-0198-10

生长激素(growth hormone, GH)是一种由动物垂体前叶分泌的肽类激素。在动物体内, GH 通过与其受体结合发挥作用, 包括调节机体生长发育, 促进脂肪分解、蛋白质合成以及肝脏糖异生作用, 还具有维持内环境稳态和免疫等多种生理学功能。早期的大量研究证实了 GH 具有明显的促乳作用, 能够提高奶牛泌乳量、乳成分产量和饲料转化效率<sup>[1-6]</sup>。这一方面得益于 GH 在体内的营养分配功能<sup>[7-8]</sup>, 促使更多的营养物质分配到乳腺; 另一方面归因于其促进乳腺腺泡发育, 提高腺泡活性, 维持泌乳持久性的作用<sup>[9]</sup>。GH 能够刺激肝脏分泌大量的胰岛素样生长因子 I (in-

sulin-like growth factor-I, IGF- I)<sup>[10-11]</sup>, 而研究发现奶牛血液 IGF- I 含量通常与泌乳量呈正相关<sup>[12]</sup>, 另外, 前人证实了奶牛乳腺组织上存在生长激素受体(GHR)<sup>[13]</sup>和胰岛素样生长因子 I 受体(IGF- I R)<sup>[14]</sup>, 因此 GH 可能是直接作用于乳腺上的 GHR 或通过刺激 IGF- I 的合成间接作用于乳腺来发挥作用的<sup>[15]</sup>, 深入研究 GH 和 IGF- I 对奶牛乳腺的作用机理对奶业生产具有重要的意义。GH 能够提高奶牛乳蛋白和酪蛋白产量<sup>[7,16]</sup>, 而这种产量的提高可能也与血液中 IGF- I 浓度的升高有关, 研究发现阴外动脉灌注 IGF- I 能明显促进乳汁分泌, 提高乳腺血流量<sup>[17-18]</sup>。在组织细

收稿日期: 2012-07-16

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2011CB100803); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 季 昀(1987-), 男, 蒙古族, 内蒙古集宁人, 硕士研究生, 从事乳蛋白合成调控与分子营养学的研究。E-mail: jean500@163.com

\* 通讯作者: 王洪荣, 教授, 博士生导师, E-mail: hongrongwang@sina.com

胞水平上,利用奶牛乳腺组织或乳腺上皮细胞为模型的相关研究已报道了 GH 能够促进  $\alpha_s$ -酪蛋白的合成<sup>[19]</sup>和  $\beta$ -酪蛋白基因的表达<sup>[20]</sup>,IGF- I 能促进奶牛乳腺上皮细胞蛋白质的合成<sup>[21]</sup>,但它们调控乳蛋白合成的机理还未完全阐明,前人的研究表明乳蛋白合成在转录水平受到 Janus 激酶 2-转录激活子 5 (JAK2-STAT5) 信号通路调节<sup>[22]</sup>,在翻译水平主要受到 mTOR 信号通路调控<sup>[23]</sup>,而 GH 和 IGF- I 对这些信号通路上与调控乳蛋白合成有关的关键激酶和调节因子的 mRNA 表达量是否有调节作用的相关报道较少见,因此本试验以奶牛乳腺上皮细胞为研究材料,首先用实时定量 PCR (RT-qPCR) 法在体外培养的奶牛乳腺上皮细胞中检测是否有 *GHR* 和 *IGF- I R* mRNA 的表达,确定胞外 GH 和 IGF- I 是否直接作用于受体来发挥作用;然后测定 GH 和 IGF- I 对  $\kappa$ -酪蛋白 (*CSN3*) mRNA 表达量的影响;最后在前人的研究基础上,选择在胞内与乳蛋白合成调控相关的一些重要的激酶和调节因子,探究 GH 和 IGF- I 对这些基因 mRNA 表达量的影响,旨在为 GH 和 IGF- I 调控乳蛋白合成的机理奠定一定的科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 主要仪器

电热恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo)、倒置显微镜 (CKX41, Olympus)、超低温冰箱(美国 Thermo)、冷冻离心机(5415R 型,德国 Eppendorf)、常温低速离心机(上海卢湘仪)、PCR 仪 (ABI 2720 型)、NanoDrop ND-1000 浓度测定仪(美国 Thermo)、RT-qPCR 仪 (ABI 7500 型)、普通 PCR 仪 (ABI 2720 型)、凝胶成像系统 (Infinity 3026 型,法国 Vilber) 等。

#### 1.1.2 主要试剂

DMEM/F<sub>12</sub> 培养基(美国 Gibco)、胎牛血清(美国 Gibco)、碳酸氢钠(美国 Sigma)、青链霉素(美国 Gibco)、两性霉素 B(美国 Amresco)、表皮生长因子(美国 Gibco)、催乳素(美国 Sigma)、胰岛素-转铁蛋白-硒(美国 Gibco)、皮质醇(美国 Sigma)、磷酸盐缓冲液 (PBS, 美国 Thermo)、重组牛 GH(美国 RayBiotech)、重组 IGF- I (美国 Peprotech)、RNAsimple Total RNA Kit(北京天根生化

科技有限公司)、PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix (日本 TaKaRa)、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (日本 TaKaRa)、Takara Taq<sup>™</sup> 试剂盒(日本 TaKaRa) 等。

#### 1.1.3 细胞来源

乳腺组织来自扬州大学实验农牧场提供的泌乳中后期健康中国荷斯坦奶牛,运用手术法活体采集 5 g 左右乳腺组织进行乳腺上皮细胞的原代培养。原代培养采用胶原酶消化法进行,传代及纯化过程中用 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (EDTA) 除去成纤维细胞。得到的纯乳腺上皮细胞用冻存液于 -70 °C 冻存待用。

### 1.2 试验设计

取冻存的奶牛乳腺上皮细胞进行复苏,加入生长培养基 (DMEM/F<sub>12</sub> + 10% 胎牛血清,并补充 100 U/mL 青链霉素、2.5 μg/mL 两性霉素 B、1 μg/mL 催乳素、1 μg/mL 胰岛素-转铁蛋白-硒、500 ng/mL 氢化可的松以及 10 ng/mL 表皮生长因子),按照 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL 的密度接种到 6 孔板中,每孔 2 mL。24 h 细胞贴壁后,用 PBS 洗涤各孔 2 次,用无血清 DMEM/F12 培养基处理细胞 16 h,再用 PBS 洗涤各孔 2 次,然后按照如下方案对细胞处理 24 h:对照组采用无血清生长培养基;GH 组采用无血清生长培养基 + GH (100 ng/mL);IGF- I 组采用无血清生长培养基 + IGF- I (100 ng/mL);GH + IGF- I 组采用无血清生长培养基 + GH (100 ng/mL) + IGF- I (100 ng/mL),每孔加 2 mL 培养基,每个处理设 3 个重复,每孔为 1 个重复。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 细胞总 RNA 的提取

细胞处理完成后,总 RNA 提取按照试剂盒说明书进行。用 NanoDrop ND-1000 核酸蛋白测定仪测定提取的总 RNA 浓度,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳测定其完整性。总 RNA 于 -70 °C 保存,待反转录。

#### 1.3.2 反转录合成 cDNA

反转录操作按照 PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix 试剂盒说明书进行。10 μL 体系如下:无 RNA 酶水 7 μL、5 × PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix 2 μL、总 RNA (250 ng/μL) 1 μL。反应条件为 37 °C 15 min;85 °C 5 s;4 °C 保存。

1.3.3 PCR 检测 *GHR* 和 *IGF- I R* mRNA 的表达  
PCR 反应使用 Takara Taq<sup>™</sup> 试剂盒于普通

PCR 仪上进行。按照试剂盒说明配制反应液: TaKaRa Taq(5 U/ $\mu\text{L}$ )0.25  $\mu\text{L}$ 、10  $\times$  PCR 缓冲液(含  $\text{Mg}^{2+}$ )5  $\mu\text{L}$ 、dNTP 4  $\mu\text{L}$ 、模板 cDNA 250 ng、上游和下游引物(20  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ ;加双蒸水至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  5 min;94  $^{\circ}\text{C}$

50 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,40 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 反应中引物序列见表 1。*GHR* 引物参照文献[24],*IGF- I R* 引物采用 Primer 3 引物设计程序。反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,凝胶成像系统拍照观察结果。

表 1 *GHR* 和 *IGF- I R* 基因引物序列

Table 1 Sequences of primers for *GHR* and *IGF- I R* genes

基因 Genes	序列 Sequences (5'—3')	GenBank 登录号 GenBank accession No.	产物大小 Product size/bp
生长激素受体 <i>GHR</i>	上游:CGTCTCTGCTGGTGAAAACA 下游:AACGGGTGGATCTGGTTGTA	AY748827.1	148
胰岛素样生长因子 I 受体 <i>IGF- I R</i>	上游:GCTCTGGCCCACGAGTGGAGA 下游:GCCCTCGATCACCGTGCAGTT	NM_001244612.1	100

### 1.3.4 RT-qPCR 法测定 mRNA 表达量

用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 试剂盒进行 RT-qPCR 试验。20  $\mu\text{L}$  反应体系为:SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (2  $\times$ ) 10  $\mu\text{L}$ 、上游和下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.8  $\mu\text{L}$ 、ROX Reference Dye II (50  $\times$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ 、cDNA 样品 2  $\mu\text{L}$ 、双蒸水 6  $\mu\text{L}$ 。每个样品设 3 个重复(每个处理共计 9 个重复)。2 步法进行 RT-qPCR 扩增。反应程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  34 s,40 个循环。溶解曲线程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  15 s;60  $^{\circ}\text{C}$  1 min;95  $^{\circ}\text{C}$  15 s;60  $^{\circ}\text{C}$  15 s。PCR 反应中引物序列见表 2。 $\kappa$ -酪蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)基因引物序列参考文献[24],Janus 激酶 2(*JAK2*)、信号转导子与转录激活子 5(*STAT5*)、E74-样转录因子 5(*ELF5*)基因引物序列参考文献[25],真核生物起始因子 4E 结合蛋白 1(*4EBP1*)基因引物序列参考文献[16],其他基因均采用 Primer 3 引物设计程序。

通过溶解曲线和 1% 琼脂糖凝胶电泳判定 PCR 反应的特异性。

以 *GAPDH* 为内参基因计算各基因的 mRNA 表达量,计算公式<sup>[26]</sup>为:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{对照}} - Ct_{\text{样品}};$$

$$\text{mRNA 表达量} = \frac{(E_{\text{目标基因}})^{\Delta Ct_{\text{目标基因}}}}{(E_{\text{内参基因}})^{\Delta Ct_{\text{内参基因}}}}$$

式中: $E_{\text{目标基因}}$ 和 $E_{\text{内参基因}}$ 分别为该基因的 PCR 扩增效率; $Ct$ 为阈值循环。PCR 扩增效率通过 LinReg PCR 11.0 软件计算<sup>[27]</sup>。

### 1.4 数据统计分析

数据用 SAS 9.1 软件 ANOVA 程序进行统计分析,并采用 Duncan 氏法进行多重比较, $P < 0.05$  为差异显著。数据统计的最终结果以平均值  $\pm$  标准误的形式表示。

## 2 结果

### 2.1 复苏后奶牛乳腺上皮细胞贴壁与增殖情况

复苏后的奶牛乳腺上皮细胞在生长培养基中经过 24 h 大部分已贴壁(图 1),细胞成活率达 90% 以上,并保持了较高的增殖活性,冻存的奶牛乳腺上皮细胞经过复苏可以用于后续的试验。

### 2.2 总 RNA 提取

从奶牛乳腺上皮细胞中提取的总 RNA 经测定,各样本  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$  均介于 1.9 ~ 2.1 之间,表明总 RNA 纯度较高。另外,1% 琼脂糖凝胶电泳结果表明总 RNA 完整性较好。总之,总 RNA 样本质量较高,可以用于后续的反转录试验。

### 2.3 *GHR* 和 *IGF- I R* mRNA 的表达

PCR 扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳观察到与目的片段大小相吻合的条带(图 2),且无杂带产生,表明该试验中体外培养的奶牛乳腺上皮细胞能够表达 *GHR* 和 *IGF- I R* mRNA, GH 和 IGF- I 通过作用于乳腺上皮细胞上的相应的受体来发挥各自的作用。

### 2.4 GH 和 IGF-I 对 $\kappa$ -酪蛋白 mRNA 表达量的影响

由图 3 可见,在无血清生长培养基的基础上单独添加 100 ng/mL 的 GH 或 IGF- I 均能显著提

高  $\kappa$ -酪蛋白 mRNA 表达量 ( $P < 0.05$ ), 二者联合添加也能显著促进  $\kappa$ -酪蛋白 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ), 但与 2 个单独添加组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

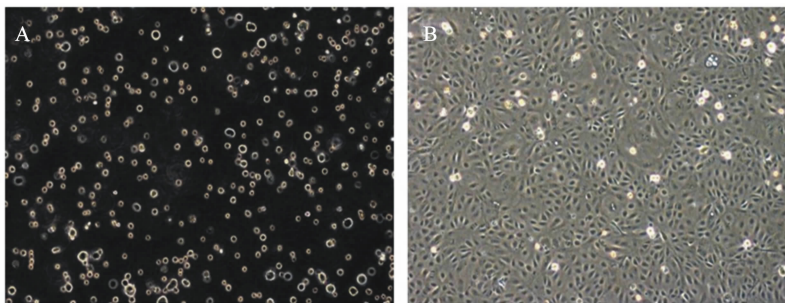
RT-qPCR 熔解曲线和产物电泳结果表明无非

特异性产物产生, 且扩增产物大小与目的基因的片段大小相符合, 表明较准确地对  $\kappa$ -酪蛋白 mRNA 的表达进行了相对定量。

表 2 RT-qPCR 各基因引物序列

Table 2 Sequences of primers for the RT-qPCR

基因 Genes	序列 Sequences (5'—3')	GenBank 登录号 GenBank accession No.	产物大小 Product size/ bp
$\kappa$ -酪蛋白 <i>CSN3</i>	上游: CCAGGAGCAAAACCAAGAAC 下游: TGCAACTGGTTTCTGTTGGT	NM_174294	148
Janus 激酶 2 <i>JAK2</i>	上游: TGAAGAAAACAGGTAATCAGACTGGA 下游: AACATTTTCTCGCTCAACAGCA	DT897449	101
信号转导子与转录激活子 5 <i>STAT5</i>	上游: GCAGCTCCAGAACACGTACG 下游: CATTGTTGGCTTCTCGGACC	NM_001012673.1	101
E74-样转录因子 5 <i>ELF5</i>	上游: TGCCCAACACGTCCTTCTG 下游: GGAGTCGCAAGCTGTCTGATG	NM_001024569.1	101
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 <i>mTOR</i>	上游: ATGCTGTCCCTGGTCCTTATG 下游: GGGTCAGAGAGTGGCCTTCAA	XM_001788228.1	178
核糖体蛋白 S6 激酶 1 <i>rpS6K1</i>	上游: CCAGCACGGCAAATCCGCAG 下游: AAGCCTCCCCGCTCATCGTCA	NM_205816.1	90
真核生物起始因子 4E 结合蛋白 1 <i>4EBP1</i>	上游: GAACTCACCTGTGACCAAGA 下游: CTCAAAGTGTGACTTTCACC	NM_001077893.1	157
真核生物起始因子 4E <i>eIF4E</i>	上游: ACTAAGAGCGGCTCCACCACT 下游: AGAGGCTTTGGTTCAGCTCCCA	NM_174310.3	116
真核生物延伸因子 2 <i>eEF2</i>	上游: AGCTGCCACGGACGTTCTGC 下游: AGCGGCGCATCACAGCCTTC	NM_001075121.1	177
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 <i>GAPDH</i>	上游: GGGTCATCATCTCTGCACCT 下游: GGTCCATAAGTCCCTCCACGA	XM_001252479	176



A 和 B 分别为贴壁前后的细胞。A and B showed cells before and after adhering, respectively.

图 1 复苏后的奶牛乳腺上皮细胞贴壁和生长状况

Fig. 1 Status of adherence and growth of bovine mammary epithelial cells after resuscitated

2.5 GH 和 IGF- I 对乳蛋白合成的关键激酶和调节因子 mRNA 表达量的影响

由表 3 可见, 在无血清生长培养基的基础上

给奶牛乳腺上皮细胞补充 GH、IGF- I 或 GH + IGF- I, 处理 24 h 后对 *JAK2*、*STAT5*、*4EBP1*、真核生物起始因子 4E (*eIF4E*)、真核生物延伸因子 2

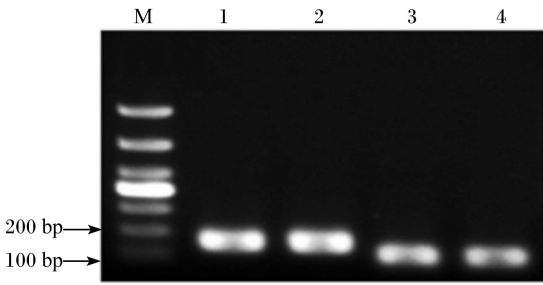
(*eEF2*) mRNA 的表达量没有显著影响 ( $P > 0.05$ )。与对照组相比, GH 组 *ELF5* mRNA 表达量有提高的趋势 ( $P < 0.10$ )。IGF- I 组哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (*mTOR*) 和核糖体蛋白 S6 激酶 1 (*rpS6K1*) mRNA 的表达量显著提高 ( $P < 0.05$ )。尽管 GH + IGF- I 组 *rpS6K1* mRNA 表达量显著提高 ( $P < 0.05$ ), 但其表达量与 IGF- I 组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

各基因 RT-qPCR 反应溶解曲线均为单一峰, 无任何杂峰出现, 此外, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示各基因扩增产物均为单一条带, 且符合扩增产物大小, 表明 RT-qPCR 过程中无非特异性产物产生, 较准确地定量了各基因 mRNA 的表达量。

### 3 讨论

#### 3.1 GH 和 IGF-I 对 $\kappa$ -酪蛋白 mRNA 表达量的影响

乳蛋白主要由酪蛋白 ( $\alpha_{s1}$ -、 $\alpha_{s2}$ -、 $\beta$ -、 $\kappa$ -酪蛋白) 和清蛋白 ( $\alpha$ -乳白蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白) 组成, 为了解释 GH 和 IGF- I 促进乳蛋白合成的机理, 许多国外学者做了相关的研究, Yang 等<sup>[20]</sup> 和 Sakamoto 等<sup>[19]</sup> 于同年分别发现了 GH 对奶牛乳腺组织  $\beta$ -酪蛋白基因表达的促进作用和 GH 提高奶牛乳腺上皮细胞  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白基因表达、蛋白合成的作用, 同时用免疫组化法检测到了 *GHR* 基因的表达, 近年来, Johnson 等<sup>[28]</sup> 在奶牛乳腺上皮细胞系 MAC-T 细胞上也发现 GH 可提高  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白基因表达量, 此外还发现 GH 可促进  $\alpha$ -乳白蛋白基因的表达, 同时在 MAC-T 细胞上检测到了 *GHR* 基因的表达。原代培养的奶牛乳腺上皮细胞多次经过传代后,  $\alpha_{s1}$ -、 $\alpha_{s2}$ -、 $\beta$ -、 $\kappa$ -酪蛋白基因表达量均有所下降, 但  $\kappa$ -酪蛋白基因表达量比其他酪蛋白更稳定, 此外,  $\kappa$ -酪蛋白是 4 种酪蛋白中的一种极其重要的种类, 它不但能促进酪蛋白胶束的形成, 还影响乳的许多物理特性<sup>[29]</sup>,  $\kappa$ -酪蛋白的糖基化程度可影响泌乳量、蛋白和酪蛋白含量<sup>[30]</sup>,  $\kappa$ -酪蛋白基因敲除的小鼠乳酪蛋白胶束不稳定且不能泌乳<sup>[31]</sup>。鉴于  $\kappa$ -酪蛋白的重要性及其基因表达的稳定性, 本试验选择了  $\kappa$ -酪蛋白为研究对象, 发现 GH 能显著促进  $\kappa$ -酪蛋白基因的表达, 这与 Zhou 等<sup>[24]</sup> 的研究结果不一致, 他们发现 GH 能显著促进  $\alpha_{s1}$ -、 $\alpha_{s2}$ -、 $\beta$ -酪蛋白以及  $\alpha$ -乳白蛋白基因的表达,  $\kappa$ -酪蛋白基因的表达有所提高但差异不显著, 原因可能与细胞来源和处理方式的不同有关, Zhou 等<sup>[24]</sup> 利用的是感染了 *GHR* 和 *STAT5* 基因的 MAC-T 细胞且处理方式为单一添加 GH, 而本试验则是用从奶牛乳腺组织中分离培养并传代纯化后的奶牛乳腺上皮细胞, 处理方式是在无血清生长培养基的基础上添加 GH。关于 IGF- I 对酪蛋白基因表达量的研究尚未见报道, Burgos 等<sup>[21]</sup> 近年来报道了 IGF- I 能显著促进 MAC-T 细胞总蛋白的合成, 而本试验首次发现 IGF- I 能显著提高  $\kappa$ -酪蛋白 mRNA 表达量。与对照组相比, GH 和 IGF- I 同时添加到无血清生长培养基中显著促进了  $\kappa$ -酪蛋白 mRNA 表达, 但未发现协同或累积效应, 联合添加 GH 与

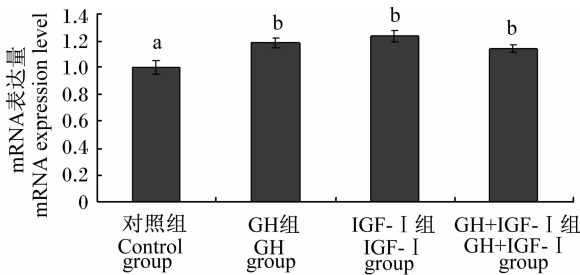


M: DNA 分子质量标准, 1~2: *GHR* 基因 PCR 产物电泳结果, 3~4: *IGF- I R* 基因 PCR 产物电泳结果。

M: DNA molecular marker, lanes 1 to 2: the PCR product of *GHR* gene, lanes 3 to 4: the PCR product of *IGF- I R* gene.

图2 *GHR* 和 *IGF- I R* 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram for PCR products of *GHR* and *IGF- I R* genes



数据柱形标注不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Data columns with different small letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

图3  $\kappa$ -酪蛋白 mRNA 表达量

Fig. 3 The mRNA expression level of *CSN3*

IGF- I 与单独添加 GH 或 IGF- I 促进  $\kappa$  - 酪蛋白 mRNA 表达的效果差异不显著。另外,本试验检测到了 *GHR* 和 *IGF- I R* mRNA 在奶牛乳腺上皮

细胞中的表达,表明 GH 和 IGF- I 通过与细胞受体结合激活胞内信号通路,进而促进酪蛋白的表达。

表 3 GH 和 IGF- I 对乳蛋白合成的关键激酶和调节因子 mRNA 表达量的影响

Table 3 Effects of GH and IGF- I on mRNA expression levels of key kinases and factors regulating milk protein synthesis

基因 Genes	对照组 Control group	GH 组 GH group	IGF- I 组 IGF- I group	GH + IGF- I 组 GH + IGF- I group	P 值 P-value
Janus 激酶 2 <i>JAK2</i>	1.006 ± 0.080	1.084 ± 0.070	1.039 ± 0.036	1.053 ± 0.022	0.915 0
信号转导子与转录激活子 5 <i>STAT5</i>	1.037 ± 0.207	0.906 ± 0.130	0.726 ± 0.087	0.742 ± 0.159	0.585 5
E74 - 样转录因子 5 <i>ELF5</i>	1.003 ± 0.053	1.141 ± 0.064	1.038 ± 0.013	1.021 ± 0.034	0.554 1
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 <i>mTOR</i>	1.000 ± 0.021 <sup>a</sup>	1.156 ± 0.117 <sup>ab</sup>	1.239 ± 0.022 <sup>b</sup>	1.022 ± 0.043 <sup>ab</sup>	0.008 8
核糖体蛋白 S6 激酶 1 <i>rpS6K1</i>	1.001 ± 0.024 <sup>a</sup>	1.087 ± 0.058 <sup>ab</sup>	1.151 ± 0.057 <sup>b</sup>	1.181 ± 0.023 <sup>b</sup>	0.033 7
真核生物起始因子 4E 结合蛋白 1 <i>4EBP1</i>	1.010 ± 0.099	0.979 ± 0.076	1.091 ± 0.117	0.873 ± 0.125	0.743 4
真核生物起始因子 4E <i>eIF4E</i>	1.000 ± 0.022	0.984 ± 0.026	1.076 ± 0.073	1.093 ± 0.086	0.619 0
真核生物延伸因子 2 <i>eEF2</i>	1.006 ± 0.078	0.872 ± 0.068	0.807 ± 0.034	0.828 ± 0.169	0.360 7

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同或无字母肩标表示不差异显著 ( $P > 0.05$ )。

Datas in the same row with different small letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ( $P > 0.05$ ).

### 3.2 GH 和 IGF- I 对乳蛋白基因转录的关键激酶和调节因子的影响

乳蛋白基因转录可受到 JAK2-STAT5 信号通路的调节,而 JAK2-STAT5 信号通路可能是多种激素的共同作用路径。当胞内激素受体与激素结合后发生二聚,引起交叉磷酸化,使得 JAK2 被激活并发生酪氨酸磷酸化,为 STAT5 提供停留位点,进而使 STAT5 在 JAK2 的作用下发生磷酸化,磷酸化的 STAT5 发生二聚移向细胞核内,与核内 DNA 结合,激活乳蛋白等基因的转录<sup>[32-33]</sup>。另外,该信号通路对于乳腺发育、乳腺上皮细胞的增殖与分化也发挥重要作用,无 JAK2 的小鼠在分娩时不但不能形成分泌腺泡而且激素诱导的细胞增殖严重减少<sup>[34]</sup>。反刍动物与啮齿类动物不同,乳蛋白基因的高表达并非主要通过催乳素调控 STAT5 活性来实现,GH 和 IGF- I 可能也发挥了很大的作用<sup>[35]</sup>。一方面,GH 和 IGF- I 也可以调控 STAT5-DNA 结合活性。高浓度或生理范围的催乳素、GH 或 IGF- I 均能提高体外培养的奶牛乳腺组织的 STAT5-DNA 结合活性,同时添加 GH 和催乳素的奶牛乳腺组织的 STAT5 活性显著高于单一添加其中一种激素<sup>[36]</sup>。另一方面,GH 和 IGF- I 可能对 STAT5 的基因表达和蛋白质合成产

生影响。Boutinaud 等<sup>[37]</sup>给奶山羊每日外源补充 GH,23 d 后发现 GH 显著提高了乳腺 STAT5 蛋白合成量和基因表达量,而本试验结果发现添加 GH 和 IGF- I 在 24 h 内不影响奶牛乳腺上皮细胞 JAK2 和 STAT5 mRNA 的表达。Yang 等<sup>[36]</sup>也发现 GH 和 IGF- I 在短时间内对体外培养的奶牛乳腺组织 STAT5 蛋白丰度没有影响,因此 GH 和 IGF- I 对 STAT5 基因表达和 STAT5 蛋白合成产生明显作用可能需要较长的作用时间,而短时间内它们可促进 STAT5-DNA 结合活性。ELF5 属于 ETS 结构域转录因子家族,它不但能够调控乳腺细胞 JAK2-STAT5 信号通路,明显促进 STAT5 活性,而且它自身的基因表达也受到 STAT5 的调控<sup>[38-39]</sup>。缺少 *ELF5* 基因的小鼠乳腺 STAT5 的基因表达量和蛋白活性降低<sup>[40]</sup>,进而引起小鼠乳蛋白合成的下降<sup>[41]</sup>,这可能是因为 *ELF5* 可通过抑制细胞因子信号抑制物 (*SOCS*) 基因表达来提高 STAT5 的活性<sup>[40]</sup>。虽然在奶牛乳腺组织上也发现了 *ELF5* 对乳蛋白合成起重要作用<sup>[24]</sup>,但关于 GH 和 IGF- I 对 *ELF5* 基因表达量的影响到目前尚未见报道,本试验发现尽管 GH 在 24 h 内没有显著促进 *ELF5* mRNA 的表达,但有提高其表达量的趋势,没有进一步影响到 *STAT5* mRNA 的表达。

### 3.3 GH 和 IGF- I 对乳蛋白翻译的关键激酶和调节因子的影响

mTOR 信号通路在调节蛋白质合成上的作用已被广泛证实,其下游靶标 rpS6K1、4EBP1、eEF2 等在蛋白质翻译起始或延伸过程中发挥了关键作用。mTOR 通过提高 rpS6K1 的活性促使核糖体蛋白 S6 发生磷酸化进而促进蛋白质翻译起始和延伸的进行<sup>[42-43]</sup>;通过促进 4EBP1 磷酸化使 eIF4E 得以解离并与真核生物起始因子 4G (eIF4G)、真核生物起始因子 4A (eIF4A) 等起始因子等形成 eIF4F 起始复合物,启动含帽子结构的 mRNA 的翻译起始<sup>[44]</sup>;eEF2 受到 eEF2 激酶调节, rpS6K1 可使其下游的 eEF2 激酶发生磷酸化以抑制 eEF2 激酶活性,这有利于 eEF2 发生去磷酸化,进而使翻译延伸能够顺利进行<sup>[42]</sup>。前人在奶牛乳腺上的研究已发现了 rpS6K1、4EBP1、eIF4E、eEF2 等对乳蛋白合成有重要作用<sup>[23,45-47]</sup>。基于这些研究的基础之上,本试验选择了在翻译水平调控乳蛋白合成的关键激酶和调节因子 mTOR、rpS6K1、4EBP1、eIF4E 和 eEF2,观察它们的 mRNA 表达量是否受到 GH 和 IGF- I 的影响。研究表明在无血清生长培养基的基础上给奶牛乳腺上皮细胞补充 GH 没有显著影响 *mTOR*、*rpS6K1*、*4EBP1*、*eIF4E*、*eEF2* mRNA 的表达量,这与 Hayashi 等<sup>[16]</sup>的奶牛体内研究结果相一致,他们发现给奶牛皮下注射 GH 显著提高了乳蛋白产量及奶牛乳腺 eIF4E 和 eEF2 的蛋白丰度,但 *eIF4E*、*mTOR* 和 *eEF2* mRNA 表达量未受影响。GH 可能在调控 mTOR 下游靶标磷酸化水平上有重要作用,因为在肝癌细胞上的研究证明了 mTOR 信号通路在 GH 对蛋白质合成的快速激活中发挥重要作用,且能促进 mTOR 下游靶标的磷酸化<sup>[48]</sup>,但在乳腺上皮细胞上是否存在同样的作用需要进一步的研究。Burgos 等<sup>[21]</sup>以奶牛乳腺上皮细胞系 MAC-T 细胞为研究模型,发现 IGF- I 在显著提高蛋白质合成同时显著提高了 S6K1、4EBP1 磷酸化水平以及 eIF4G 与 eIF4E 的结合量,并显著降低 4EBP1 与 eIF4E 的结合量,而 IGF- I 是否影响奶牛乳腺上皮细胞 *mTOR*、*rpS6K1*、*4EBP1*、*eIF4E*、*eEF2* 基因的表达量尚未见报道,在本试验条件下 IGF- I 显著促进了 *mTOR* 和 *rpS6K1* mRNA 的表达量,其他基因未受到影响。研究发现 GH 可通过抑制胰岛素样生长因子结合蛋白 5

(*IGFBP-5*) 基因的表达,降低 *IGFBP-5* 对 IGF- I 的高亲和力来促进 IGF- I 对奶牛乳腺上皮细胞的作用<sup>[49]</sup>,表明 GH 和 IGF- I 存在一定的协同作用,而本试验发现联合添加 GH 和 IGF- I 虽能显著提高 *rpS6K1* mRNA 的表达量,但与单独添加 IGF- I 产生的作用差异不显著,另外 GH + IGF- I 对  $\kappa$ -酪蛋白 mRNA 的表达量也未发现累积效应,因此 GH 和 IGF- I 对乳腺上皮细胞的协同作用可能表现在调节细胞增殖和凋亡方面,这尚需进一步的研究。综合前人和本试验的研究结果, GH 和 IGF- I 可能在基因表达、蛋白丰度以及磷酸化水平多个层次下调控参与调节乳蛋白合成的关键激酶和调节因子,进而促进乳蛋白的合成,但具体的调节机理仍需进一步通过大量的体内外试验研究来确认。

## 4 结 论

① 在无血清生长培养基的基础上给体外培养的奶牛乳腺上皮细胞补充 GH 和 IGF- I 能够显著提高  $\kappa$ -酪蛋白 mRNA 表达量,这是 GH 和 IGF- I 通过分别作用于其受体来激活胞内信号通路实现的,但未发现 GH 和 IGF- I 在促进  $\kappa$ -酪蛋白 mRNA 表达量方面存在联合效应。

② 在本试验条件下,单独补充 GH 有促进 *ELF5* mRNA 表达量的趋势;单独添加 IGF- I 可显著提高 *mTOR* 和 *rpS6K1* mRNA 表达量,但 GH 没有进一步加强 IGF- I 的这种作用,表明 GH 和 IGF- I 可单独通过影响调控乳蛋白合成的关键激酶及调节因子基因的转录来调节  $\kappa$ -酪蛋白的合成。

### 致谢:

感谢扬州大学兽医学院李建基教授、王亨副教授在奶牛乳腺手术活体采样上给予的大力帮助;感谢徐柏林硕士在奶牛乳腺上皮细胞体外培养技术上给予的耐心指导。

### 参考文献:

- [ 1 ] CHILLIARD Y, CISSE M, LEFAIVRE R, et al. Body composition of dairy cows according to lactation stage, somatotropin treatment, and concentrate supplementation [ J ]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74 ( 9 ): 3103 - 3116.
- [ 2 ] EPPARD P J, BAUMAN D E, MCCUTCHEON S N. Effect of dose of bovine growth hormone on lactation

- of dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 1985, 68(5):1109-1115.
- [ 3 ] LOUGH D S, MULLER L D, KENSINGER R S, et al. Effect of exogenous bovine somatotropin on mammary lipid metabolism and milk yield in lactating dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 1989, 72(6):1469-1476.
- [ 4 ] PEEL C J, FRONK T J, BAUMAN D E, et al. Effect of exogenous growth hormone in early and late lactation on lactational performance of dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 1983, 66(4):776-782.
- [ 5 ] PEEL C J, BAUMAN D E, GOREWIT R C, et al. Effect of exogenous growth hormone on lactational performance in high yielding dairy cows[J]. *The Journal of Nutrition*, 1981, 111(9):1662-1671.
- [ 6 ] MACHLIN L J. Effect of growth hormone on milk production and feed utilization in dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 1973, 56(5):575-580.
- [ 7 ] MOLENTO C F, BLOCK E, CUE R I, et al. Effects of insulin, recombinant bovine somatotropin, and their interaction on insulin-like growth factor- I secretion and milk protein production in dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2002, 85(4):738-747.
- [ 8 ] SARTIN J L, CUMMINS K A, KEMPPAINEN R J, et al. Glucagon, insulin, and growth hormone responses to glucose infusion in lactating dairy cows[J]. *American Journal of Physiology*, 1985, 248:E108-E114.
- [ 9 ] BALDI A, MODINA S, CHELI F, et al. Bovine somatotropin administration to dairy goats in late lactation: effects on mammary gland function, composition and morphology[J]. *Journal of Dairy Science*, 2002, 85(5):1093-1102.
- [10] BAUMAN D E. Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 1999, 17(2/3):101-116.
- [11] VELEZ J C, DONKIN S S. Bovine somatotropin increases hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in lactating dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87(5):1325-1335.
- [12] ROSE M T, WEEKES T E, ROWLINSON P. Correlation of blood and milk components with the milk yield response to bovine somatotropin in dairy cows[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2005, 28(3):296-307.
- [13] GLIMM D R, BARACOS V E, KENNELLY J J. Molecular evidence for the presence of growth hormone receptors in the bovine mammary gland[J]. *Journal of Endocrinology*, 1990, 126(3):R5-R8.
- [14] BAUMRUCKER C R, ERONDU N E. Insulin-like growth factor(IGF) system in the bovine mammary gland and milk[J]. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2000, 5(1):53-64.
- [15] FLINT D J, GARDNER M. Evidence that growth hormone stimulates milk synthesis by direct action on the mammary gland and that prolactin exerts effects on milk secretion by maintenance of mammary deoxyribonucleic acid content and tight junction status[J]. *Endocrinology*, 1994, 135(3):1119-1124.
- [16] HAYASHI A A, NONES K, ROY N C, et al. Initiation and elongation steps of mRNA translation are involved in the increase in milk protein yield caused by growth hormone administration during lactation[J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(5):1889-1899.
- [17] PROSSER C G, DAVIS S R, FARR V C, et al. Effects of close-arterial(external pudic) infusion of insulin-like growth factor- II on milk yield and mammary blood flow in lactating goats[J]. *Journal of Endocrinology*, 1994, 142(1):93-99.
- [18] PROSSER C G, FLEET I R, CORPS A N, et al. Increase in milk secretion and mammary blood flow by intra-arterial infusion of insulin-like growth factor- I into the mammary gland of the goat[J]. *Journal of Endocrinology*, 1990, 126(3):437-443.
- [19] SAKAMOTO K, KOMATSU T, KOBAYASHI T, et al. Growth hormone acts on the synthesis and secretion of alpha-casein in bovine mammary epithelial cells[J]. *Journal of Dairy Research*, 2005, 72(3):264-270.
- [20] YANG J, ZHAO B, BARACOS V E, et al. Effects of bovine somatotropin on beta-casein mRNA levels in mammary tissue of lactating cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(8):2806-2812.
- [21] BURGOS S A, CANT J P. IGF-1 stimulates protein synthesis by enhanced signaling through mTORC1 in bovine mammary epithelial cells[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2010, 38(4):211-221.
- [22] YANG J, KENNELLY J J, BARACOS V E. Physiological levels of Stat5 DNA binding activity and protein in bovine mammary gland[J]. *Journal of Animal Science*, 2000, 78(12):3126-3134.
- [23] 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]. *Journal of Dairy Science*,



- 2010, 93(1):153-161.
- [24] ZHOU Y, AKERS R M, JIANG H. Growth hormone can induce expression of four major milk protein genes in transfected MAC-T cells[J]. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91(1):100-108.
- [25] BIONAZ M, LOOR J J. Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle [J]. *Bioinformatics and Biology Insights*, 2011, 5: 83-98.
- [26] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9):e45.
- [27] RAMAKERS C, RUIJTER J M, DEPREZ R H, et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data [J]. *Neuroscience Letters*, 2003, 339(1):62-66.
- [28] JOHNSON T L, FUJIMOTO B A, JIMENEZ-FLORES R, et al. Growth hormone alters lipid composition and increases the abundance of casein and lactalbumin mRNA in the MAC-T cell line [J]. *Journal of Dairy Research*, 2010, 77(2):199-204.
- [29] GUTIERREZ-ADAN A, MAGA E A, MEADE H, et al. Alterations of the physical characteristics of milk from transgenic mice producing bovine kappa-casein [J]. *Journal of Dairy Science*, 1996, 79(5):791-799.
- [30] ROBITAILLE G, NG-KWAI-HANG K F, MONARDES H G. Association of kappa-casein glycosylation with milk production and composition in Holsteins [J]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10):3314-3317.
- [31] SHEKAR P C, GOEL S, RANI S D, et al. Kappa-casein-deficient mice fail to lactate [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(21):8000-8005.
- [32] WHEELER T T, KUYS Y M, BROADHURST M M, et al. Mammary STAT5 abundance and activity are not altered with lactation state in cows [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1997, 133(2):141-149.
- [33] BUITENHUIS M, COFFER P J, KOENDERMAN L. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, 36(11):2120-2124.
- [34] 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]. *Molecular Endocrinology*, 2002, 16(3):563-570.
- [35] WHEELER T T, BROADHURST M K, SADOWSKI H B, et al. Stat5 phosphorylation status and DNA-binding activity in the bovine and murine mammary glands [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2001, 176(1/2):39-48.
- [36] YANG J, KENNELLY J J, BARACOS V E. The activity of transcription factor STAT5 responds to prolactin, growth hormone, and IGF- I in rat and bovine mammary explant culture [J]. *Journal of Animal Science*, 2000, 78(12):3114-3125.
- [37] BOUTINAUD M, JAMMES H. Growth hormone increases Stat5 and Stat1 expression in lactating goat mammary gland; a specific effect compared to milking frequency [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2004, 27(4):363-378.
- [38] ROGERS R L, VAN SEUNINGEN I, GOULD J, et al. Transcript profiling of *Elf5*<sup>+/-</sup> mammary glands during pregnancy identifies novel targets of *Elf5* [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10):e13150.
- [39] DONG J, TONG T, REYNADO A M, et al. Genetic manipulation of individual somatic mammary cells *in vivo* reveals a master role of STAT5a in inducing alveolar fate commitment and lactogenesis even in the absence of ovarian hormones [J]. *Developmental Biology*, 2010, 346(2):196-203.
- [40] CHOI Y S, CHAKRABARTI R, ESCAMILLA-HERNANDEZ R, et al. *Elf5* conditional knockout mice reveal its role as a master regulator in mammary alveolar development; failure of STAT5 activation and functional differentiation in the absence of *Elf5* [J]. *Developmental Biology*, 2009, 329(2):227-241.
- [41] ZHOU J, CHEHAB R, TKALCEVIC J, et al. *Elf5* is essential for early embryogenesis and mammary gland development during pregnancy and lactation [J]. *The EMBO Journal*, 2005, 24(3):635-644.
- [42] WANG X, PROUD C G. The mTOR pathway in the control of protein synthesis [J]. *Physiology*, 2006, 21:362-369.
- [43] MAGNUSON B, EKIM B, FINGAR D C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks [J]. *Biochemical Journal*, 2012, 441(1):1-21.
- [44] FINGAR D C, SALAMA S, TSOU C, et al. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E [J]. *Genes & Development*, 2002, 16(12):1472-1487.
- [45] TOERIEN C A, TROUT D R, CANT J P. Nutritional stimulation of milk protein yield of cows is associated

- with changes in phosphorylation of mammary eukaryotic initiation factor 2 and ribosomal S6 kinase 1 [J]. *The Journal of Nutrition*, 2010, 140(2):285-292.
- [46] TOERIEN C A, CANT J P. Abundance and phosphorylation state of translation initiation factors in mammary glands of lactating and nonlactating dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(6):2726-2734.
- [47] CHRISTOPHERSEN C T, KARLSEN J, NIELSEN M O, et al. Eukaryotic elongation factor-2 (eEF-2) activity in bovine mammary tissue in relation to milk protein synthesis [J]. *Journal of Dairy Research*, 2002, 69(2):205-212.
- [48] HAYASHI A A, PROUD C G. The rapid activation of protein synthesis by growth hormone requires signaling through mTOR [J]. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 2007, 292(6):E1647-E1655.
- [49] SAKAMOTO K, YANO T, KOBAYASHI T, et al. Growth hormone suppresses the expression of IGFBP-5, and promotes the IGF-I-induced phosphorylation of Akt in bovine mammary epithelial cells [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2007, 32(4):260-272.

## Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor I : Effects on mRNA Expression Levels of Key Kinases and Regulatory Factors Regulating Milk Protein Synthesis

JI Yun<sup>1</sup> PANG Xueyan<sup>1</sup> TIAN Qing<sup>1</sup> WANG Mengzhi<sup>1</sup> WANG Hongrong<sup>1\*</sup> AO Changjin<sup>2</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to investigate the effects of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I (IGF-I) on mRNA expression levels of key kinases and regulatory factors regulating milk protein synthesis in cultured bovine mammary epithelial cells *in vitro*. Four treatments were employed to culture the purified mammary epithelial cells of a Holstein dairy cow and growth medium without serum was used in a control group, and based on the control group, mediums supplemented with GH (100 ng/mL), IGF-I (100 ng/mL) and GH (100 ng/mL) + IGF-I (100 ng/mL) were used in experimental groups. After cultured for 24 h, the mRNA expression levels of *CSN3*, key kinases and regulatory factors regulating milk protein synthesis, *GHR* and *IGF-I R* were determined by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The results showed as follows: there were mRNA expressions of *GHR* and *IGF-I R* in mammary epithelial cells cultured *in vitro*, and *CSN3* mRNA expression level was significantly enhanced in all experimental groups ( $P < 0.05$ ), however, no cumulative effect was found; compared with the control group, the mRNA expression level of E74-like transcription factor 5 (*ELF5*) tended to be increased in GH group ( $P < 0.10$ ), mRNA expression levels of mammalian target of rapamycin (*mTOR*) and ribosomal protein S6 kinase 1 (*rpS6K1*) were significantly increased in IGF-I group ( $P < 0.05$ ), but no augmented effect was found in GH + IGF-I group. All results indicate that GH and IGF-I may modulate  $\kappa$ -casein synthesis independently through affecting mRNA expressions of key kinases and regulatory factors that regulating milk protein synthesis. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(1):198-207]

**Key words:** growth hormone; insulin-like growth factor I; mammary epithelial cell; milk protein; mRNA expression level