

# 胰岛素对体外培养奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白、乳脂肪合成相关基因 mRNA 表达的影响

王皓宇, 秦 彤, 郝海生, 杜卫华, 赵学明, 朱化彬\*

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

**摘 要:** 旨在研究胰岛素对体外培养奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白、乳脂肪合成相关基因 mRNA 表达的影响。采用无激素处理组(NH, 对照组)、氢化可的松( $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) + 催乳素( $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )处理组(FP)和胰岛素( $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) + 氢化可的松( $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) + 催乳素( $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )处理组(IFP)处理体外培养奶牛乳腺上皮细胞 24 h, 利用 real-time PCR 方法检测乳腺上皮细胞中乳蛋白、乳脂肪合成相关基因 mRNA 的相对表达丰度。结果表明, IFP 激素处理组显著上调  $\beta$ -酪蛋白基因(CSN2)、 $\kappa$ -酪蛋白基因(CSN3)、乙酰辅酶 A 羧化酶基因(ACACA)、脂肪酸合成酶基因(FASN)和固醇调节元件结合蛋白-1 基因(SREBP1) mRNA 的相对表达丰度( $P < 0.05$ ); 显著上调 JAK2-STAT5 信号通路中信号转导和转录激活因子 5B 基因(STAT5B)和 E74 样因子 5 基因(ELF5) mRNA 的相对表达丰度( $P < 0.05$ ); 显著上调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路中磷脂酰肌醇-3 激酶基因(PI3K)、蛋白激酶 B 基因(AKT1)及真核细胞翻译起始因子 4E 基因(EIF4E) mRNA 的相对表达丰度( $P < 0.05$ ), 但对 AMPK 信号通路中结节性硬化复合物基因(TSC1、TSC2)和 RHEB(Ras homolog enriched in brain) mRNA 的相对表达丰度无显著影响( $P > 0.05$ )。结果提示, 胰岛素通过 JAK2-STAT5 和 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导体外培养奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白合成相关基因 mRNA 的表达, 通过 PI3K/Akt/mTOR 和 SREBP 信号通路诱导体外培养奶牛乳腺上皮细胞脂合成相关基因 mRNA 的表达, 表明胰岛素作为一种重要的催乳激素, 与氢化可的松和催乳素共同调节乳蛋白和乳脂肪合成相关基因 mRNA 的表达。

**关键词:** 胰岛素; 乳腺上皮细胞; real-time PCR; 乳蛋白; 乳脂肪; mRNA

中图分类号: S823.9<sup>+</sup>1.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)05-0710-09

## Effects of Insulin on mRNA Expression of Genes Related to Milk Protein and Fat Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells Cultured *in vitro*

WANG Hao-yu, QIN Tong, HAO Hai-sheng, DU Wei-hua, ZHAO Xue-ming, ZHU Hua-bin\*

(Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to study the effects of insulin on mRNA expression of genes related to milk protein and fat synthesis in bovine mammary cells cultured *in vitro*. Mammary epithelial cells were cultured for 24 h with the following hormone treatments: no hormones (NH, control),  $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  hydrocortisone +  $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  prolactin (FP) or  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  insulin +  $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  hydrocortisone +  $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  prolactin (IFP). The relative expression of the related genes of milk protein and fat synthesis were measured by real-time PCR. The results showed that the mRNA relative abundance of  $\beta$ -casein (CSN2),  $\kappa$ -casein (CSN3), Acetyl-CoA carboxylase (ACACA), fatty acid synthase (FASN) and sterol regulatory element binding protein1 (SREBP1) in IFP group were significantly up-regulated ( $P < 0.05$ ). In addition, sig-

收稿日期: 2012-12-19

基金项目: 国家“973”项目(2011CB100805); 中央级科研院所基本科研业务费(2011cj-10-1)

作者简介: 王皓宇(1988-), 河北峰峰人, 硕士生, 主要从事奶牛营养与繁殖研究, E-mail: wanghaoyu2000@163.com

\* 通信作者: 朱化彬, 研究员, E-mail: zhuhuabin@iascaas.net.cn

nal transducers and activators of transduction 5 (STAT5B) and ETS-related transcription factor Elf-5 (ELF5) in JAK2-STAT5 signal pathway, as well as Phosphoinositide-3-kinase (PI3K), protein kinase B (AKT1) and eukaryotic translation initiation factor 4E (EIF4E) in PI3K/Akt/mTOR signal pathway in IFP group were significantly up-regulated ( $P < 0.05$ ), while the IFP hormone combinations had no effect on TSC1, TSC2 or RHEB transcription in AMPK signal pathway. The data demonstrated that insulin induced the mRNA expression of genes related to milk protein synthesis through JAK2-STAT5 and PI3K/Akt/mTOR signal pathway and the mRNA expression of genes related to milk fat synthesis through PI3K/Akt/mTOR and SREBP signal pathway in bovine mammary epithelial cells cultured *in vitro*, which indicated insulin, hydrocortisone and prolactin regulate the mRNA expression of genes related to milk protein and fat synthesis together.

**Key words:** insulin; mammary epithelial cells; real-time PCR; milk protein; milk fat; mRNA

牛奶被誉为“最接近完善的食物”为人类提供能量、高蛋白和人体所需的主要矿物质和维生素。乳汁中的酪蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、 $\alpha$ -乳清蛋白、几乎所有的短链和中链脂肪酸都由乳腺上皮细胞合成<sup>[1]</sup>,而乳腺上皮细胞的增殖、分化与泌乳功能受多种激素的调节<sup>[2]</sup>,泌乳功能主要受催乳素、糖皮质激素和胰岛素等激素的影响<sup>[3]</sup>。催乳素是一种多肽类激素,主要功能是驱动乳腺发育,发动并维持泌乳及乳蛋白合成与分泌<sup>[4]</sup>。在乳腺上皮细胞中,催乳素主要通过 JAK2/STAT5 信号通路诱导乳蛋白基因的表达<sup>[5]</sup>。糖皮质激素是由肾上腺皮质中束状带分泌的一类甾体激素,主要为氢化可的松,具有调节糖、脂肪和蛋白质的生物合成和代谢的作用。糖皮质激素与其胞内(核)受体结合后,启动并调控相关基因的表达及蛋白质的合成,通过基因组机制实现其生理药理功能<sup>[6]</sup>。胰岛素在乳腺发育和泌乳中的作用主要与泌乳乳腺营养分配有关<sup>[7]</sup>,近年来激素对乳腺外植体功能影响的研究表明,酪蛋白基因的表达需要催乳素和氢化可的松诱导<sup>[8]</sup>,而胰岛素能诱导更高层次的酪蛋白和脂合成相关基因的表达<sup>[9]</sup>。哺乳动物乳腺组织中蛋白的合成过程均受 PI3K/Akt/mTOR 通路调控<sup>[10]</sup>,脂肪酸的合成过程均受固醇调控元件结合蛋白家族(SREBPs)调控<sup>[11]</sup>。研究表明胰岛素作为信号分子激活 mTOR<sup>[12]</sup>,mTORC1 通过 SREBP 通路调节脂类合成<sup>[13]</sup>。此外,单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)抑制 mTOR 活性<sup>[14]</sup>,影响 FASN 和 ACACA 等脂合成相关基因 mRNA 的表达和脂肪酸的从头合成<sup>[15]</sup>。

目前有关胰岛素在催乳素和氢化可的松作用基础上,通过 JAK2/STAT5、AMPK、PI3K/Akt/mTOR 和 SREBP 信号通路调节体外培养奶牛乳腺

上皮细胞乳蛋白、乳脂肪合成相关基因 mRNA 表达的研究尚未见报道。本试验意在以奶牛乳腺上皮细胞为模型,以 JAK2/STAT5、AMPK、PI3K/Akt/mTOR 和 SREBP 信号通路中的几个关键调节因子为节点,探索胰岛素调控乳腺上皮细胞中乳蛋白、乳脂肪合成的分子机制,为研究奶牛泌乳机制和改善乳品质提供试验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

DMEM/F12 培养基(Gbico, 11330-032); FBS (Gbico, 16000); 0.25% 胰蛋白酶-EDTA (Gbico, 25200); PBS (Gbico, 21600010); 抗角蛋白 18 抗体 (Abcam, ab668); 胰岛素 (Sigma, I1882); 氢化可的松 (Sigma, H0888); 羊催乳素 (Selleck, D1550)。细胞总 RNA 提取试剂盒 (RNeasy Plus Mini Kit, QIAGEN 74134); 反转录试剂盒 (TaKaRa, DRR036A); SYBR<sup>®</sup> Green 定量试剂 (TaKaRa, DRR420A)。

### 1.2 细胞培养与激素处理

采用组织块贴壁法建立奶牛乳腺上皮细胞系<sup>[16]</sup>。3代纯化后经抗角蛋白 18 抗体鉴定得到纯的乳腺上皮细胞。细胞在 DMEM/F12 培养基 (10% FBS、100 U · mL<sup>-1</sup>青霉素、100  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup>链霉素)、37.5 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养。

收集对数生长期的奶牛乳腺上皮细胞,用 DMEM/F12 培养基将细胞密度调整为  $1.0 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  并等体积浓度接种到 6 孔培养板中 (Coming, 3516),至细胞生长达 80% 汇合时,血清饥饿 (0.5% FBS) 12 h。按以下模式进行激素处理<sup>[9]</sup>: 1) 无激素处理组 (NH); 2) 50 ng · mL<sup>-1</sup> 氢化可的松 (F) + 200

ng · mL<sup>-1</sup> 羊催乳素(P);3)100 ng · mL<sup>-1</sup> 胰岛素(I) + 50 ng · mL<sup>-1</sup> 氢化可的松(F) + 200 ng · mL<sup>-1</sup> 羊催乳素(P)。试验处理 24 h<sup>[17]</sup> 后收集细胞提取 RNA。每个试验处理设 3 个重复,整个试验重复 2 次。

### 1.3 real-time PCR

细胞总 RNA 提取参照 QIAGEN 试剂盒使用说明提取,采用 AstraGene 快速核酸蛋白分析仪测定提取的细胞总 RNA 浓度及 A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> 值。样品 RNA 浓度保持在 350~400 ng · μL<sup>-1</sup>, A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> 均为 1.90~2.0。反转录参照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书,以 400 ng RNA · 10 μL<sup>-1</sup> 反应体系,37 °C 反转录反应 15 min、85 °C 反转录酶失活反应 5 s,制备足量的 cDNA 于 -20 °C 保存备用。

real-time PCR 以 UXT (Ubiquitously Expressed Transcript) 基因作为内参基因,采用相对定量法测定不同目的基因 mRNA 的表达丰度。用 ABI 7900 荧光定量 PCR 仪,SYBR<sup>®</sup> Green 染料法进行定量扩增。总反应体系为 10 μL:5 μL SYBR<sup>®</sup> PremixEx Taq TM II (TaKaRa Ex Taq HS,dNTP Mixture,Mg<sup>2+</sup>,SYBR<sup>®</sup> Green I),上下游引物各 0.4 μL,ROX Reference Dye 0.2 μL,cDNA 0.5 μL,灭菌蒸馏水 3.5 μL。PCR 反应程序为 95 °C 30 s;95 °C 5 s;60 °C 30 s;40 个循环。引物序列见表 1。内参基因和目的基因的扩增效率均为 90%~110%,熔解曲线均为单一峰值,基线平稳。

表 1 real-time PCR 引物信息

Table 1 Primer sequence of real-time PCR

基因 Gene	GenBank 号 GenBank number	正/反向引物 (5'-3') Forward/Reverse primer	长度/bp Length
UXT <sup>[19]</sup>	BQ676558	TGTGGCCCTTGGATATGGTT GGTTGTCGCTGAGCTCTGTG	101
CSN2 <sup>[20]</sup>	NM_181008	CCCTAACAGCCTCCCACA AGCCATAGCCTCCCTTCAC	112
CSN3 <sup>[10]</sup>	BC102120	GGCGAGCCTACAAGTACACCTA GGACTGTGTTGATCTCAGGTGG	106
ACACA <sup>[21]</sup>	NM_174224	CATGTATGGACACCAGTTCTGCAT GTTTGGTAGGACATCAAAAATCGA	82
FASN <sup>[21]</sup>	AY343889	GCTTTGTGTTGGCAGAGAAGG TCGAGGCCAAGGTCTGAAAG	142
SREBP1	NM_001113302	GACACCACCAGCATCAACC CCATTCATCAGCCAGACCAG	113
STAT5B <sup>[10]</sup>	Z72482	GCAGCTCCAGAACACGTACG CATTTGTTGGCTTCGGACC	101
JAK2 <sup>[10]</sup>	DT897449	TGAAGAAAACAGGTAATCAGACTGGA AACATTTTCTCGCTCAACAGCA	101
ELF5	BT021517	TGCCAACACGTCCTTCTG GGAGTCGCAAGCTGTCTGATG	101
TSC1 <sup>[10]</sup>	BT021605	TACTGGGCCACGTCGTGAG CGTCGGTGTCCATCTTGAGAC	102
TSC2 <sup>[10]</sup>	EE334794	GCAGCAGGATCCAGACCTCT GTCTCTGTGAGCTCCAGGTGG	112
RHEB <sup>[10]</sup>	NM_001031764	GCTAAGATGCCGAGTCCA CGTCAACGAGGATTTCCCC	75
PI3K <sup>[10]</sup>	NM_002645.1	CAAGCCCTTTGCTGGGTACAT TTCCTCTTGACCACAACTTTTAGAA	81
AKT1 <sup>[10]</sup>	NM_173986	CACGTGCTCTGGACGCTTC ATGGCGAGGTTCCACTCAAAC	102
RPS6KB1 <sup>[10]</sup>	DN544771	CAAGCTTGCATGCTAATTTGTCC TTGAGTCCTGATCATGTGCAAGA	101
EIF4E <sup>[10]</sup>	BC111272	AGGGAGGGTATACAAGGAAAGGTT TTTTAGTGGTGGAGCCGCTC	101
EIF4EBP1 <sup>[10]</sup>	BC120290	TTTGAGATGGACATTTAAAGGGC CTTGATAAGGCCTGGCTG	101
EIF4EBP2 <sup>[10]</sup>	CB446708	CAAACCTGAGCATCATCCCCA CCCCGGCACCTTAATTGAA	101

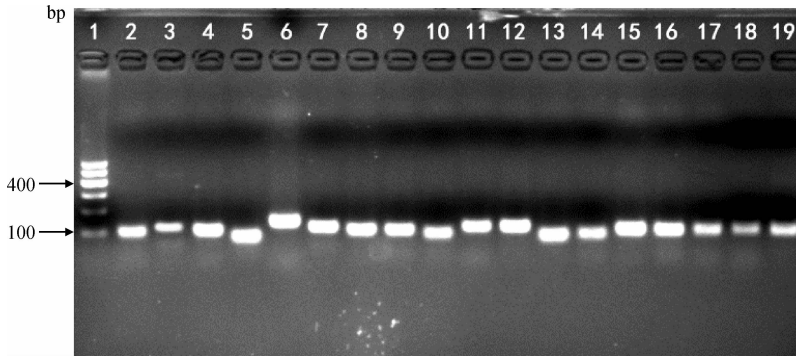
## 1.4 数据处理

real-time PCR 生成的数据采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[18]</sup> 在 EXCEL 中计算整理。整理后的数据采用 SAS 9.2 软件 ANOVA 程序进行显著性比较 ( $P < 0.05$ ), 结果以“平均数 ± 标准误”形式表示。

## 2 结果

### 2.1 real-time PCR 产物电泳结果

real-time PCR 扩增产物电泳图谱清晰、完整、无非特异性杂带出现(图 1)。

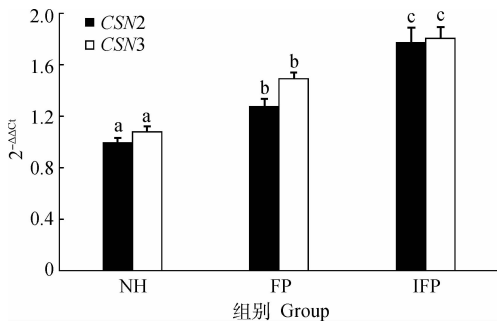


1. DNA 相对分子质量标准 I; 2. 泛表达转录子; 3.  $\beta$ -酪蛋白; 4.  $\kappa$ -酪蛋白; 5. 乙酰辅酶 A 羧化酶; 6. 脂肪酸合成酶; 7. 固醇调节元件结合蛋白-1; 8. 信号转导和转录激活因子 5B; 9. 酪氨酸蛋白激酶 2; 10. E74 样因子 5; 11. 结节性硬化复合物 1; 12. 结节性硬化复合物 2; 13. 小 G 蛋白 Rheb; 14. 磷脂酰肌醇-3 激酶; 15. 蛋白激酶 B; 16. 核糖体蛋白 S6 激酶; 17. 真核细胞翻译起始因子 4E; 18. 真核细胞翻译起始因子 4E 结合蛋白 1; 19. 真核细胞翻译起始因子 4E 结合蛋白 2

1. Marker I; 2. *UXT*; 3. *CSN2*; 4. *CSN3*; 5. *ACACA*; 6. *FASN*; 7. *SREBP1*; 8. *STAT5B*; 9. *JAK2*; 10. *ELF5*; 11. *TSC1*; 12. *TSC2*; 13. *RHEB*; 14. *PI3K*; 15. *AKT1*; 16. *RPS6KB1*; 17. *EIF4E*; 18. *EIF4EBP1*; 19. *EIF4EBP2*

图 1 内参基因与不同目的基因 real-time PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of the real-time PCR product



不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。下同

Different letters show significantly different ( $P < 0.05$ ), the same letters show no significantly different ( $P > 0.05$ ). The same as below

图 2 催乳激素对奶牛乳腺上皮细胞 *CSN2* 和 *CSN3* mRNA 表达的影响

Fig. 2 The effect of lactogen hormones on the mRNA expression of *CSN2* and *CSN3* in bovine mammary epithelial cells

### 2.2 胰岛素调节体外培养奶牛乳腺上皮细胞 *CSN2* 和 *CSN3* mRNA 的表达

氢化可的松和催乳素作用下, 胰岛素对外培养奶牛乳腺上皮细胞  $\beta$ -酪蛋白基因 (*CSN2*) 和  $\kappa$ -酪蛋白基因 (*CSN3*) mRNA 表达的影响, 结果见图 2。由图 2 可知, *CSN2* 和 *CSN3* mRNA 的相对表达丰度在 IFP (胰岛素 + 氢化可的松 + 羊催乳素) 组最高, 显著高于 NH (无激素添加) 和 FP (氢化可的松 + 羊催乳素) 组 ( $P < 0.05$ ); 其次是 FP 组, 显著高于 NH 组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 胰岛素调节体外培养奶牛乳腺上皮细胞 *ACACA*、*FASN* 和 *SREBP1* mRNA 的表达

氢化可的松和催乳素作用下, 胰岛素对外培养奶牛乳腺上皮细胞乙酰辅酶 A 羧化酶基因 (*ACACA*)、脂肪酸合成酶基因 (*FASN*) 和固醇调节元件结合蛋白-1 基因 (*SREBP1*) mRNA 表达的影响, 结果见图 3。由图 3 可知, *ACACA* 和 *FASN* mRNA 的相对表达丰度在 IFP 组最高, 显著高于 NH 和 FP 组 ( $P < 0.05$ ); 其次是 FP 组, 显著高于 NH 组 ( $P < 0.05$ )。 *SREBP1* mRNA 的相对表达丰度在 IFP 组最高, 显著高于 NH 和 FP 组 ( $P < 0.05$ ), 但在 NH 和 FP 组间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 胰岛素对 *JAK2*-*STAT5* 信号通路中 *STAT5B*、*JAK2*、*ELF5* mRNA 表达的影响

氢化可的松和催乳素作用下, 胰岛素对 *JAK2*-

STAT5 信号通路中信号转导和转录激活因子 5B 基因(*STAT5B*)、酪氨酸蛋白激酶 2 基因(*JAK2*)和 E74 样因子 5 基因(*ELF5*)mRNA 表达的影响,结果见图 4。由图 4 可知,*STAT5B* mRNA 的相对表达丰度在 IFP 组中最高,显著高于 NH 和 FP 组的表达水平( $P < 0.05$ );其次是 FP 组,显著高于 NH 组( $P < 0.05$ )。*JAK2* mRNA 的相对表达丰度在 NH、FP 和 IFP 组间均无显著差异( $P > 0.05$ )。*ELF5* mRNA 的相对表达丰度在 IFP 组最高,显著高于 NH 和 FP 组( $P < 0.05$ ),但在 NH 和 FP 组间无显著差异( $P > 0.05$ )。

mRNA 表达的影响,结果见表 2。由表 2 可知,AMPK 信号通路中结节性硬化复合物基因(*TSC1*、*TSC2*)和 *RHEB*(Ras homolog enriched in brain) mRNA 的相对表达丰度在 NH、FP 和 IFP 组间均无显著差异( $P > 0.05$ )。PI3K/Akt/mTOR 信号通路中磷脂酰肌醇-3 激酶基因(*PI3K*)、蛋白激酶 B 基因(*AKT1*)和真核细胞翻译起始因子 4E 基因(*EIF4E*)mRNA 的相对表达丰度在 IFP 组最高,显著高于 NH 和 FP 组( $P < 0.05$ );其次是 FP 组,FP 组 *PI3K* 和 *EIF4E* mRNA 的相对表达丰度显著高于 NH 组( $P < 0.05$ )。PI3K/Akt/mTOR 信号通路中核糖体蛋白 S6 激酶基因(*RPS6KB1*)、真核细胞翻译起始因子 4E 结合蛋白基因(*EIF4EBP1*、*EIF4EBP2*)mRNA 的相对表达丰度在 FP 和 IFP 组均显著上调( $P < 0.05$ ),但在 FP 和 IFP 组间差异不显著( $P > 0.05$ )。

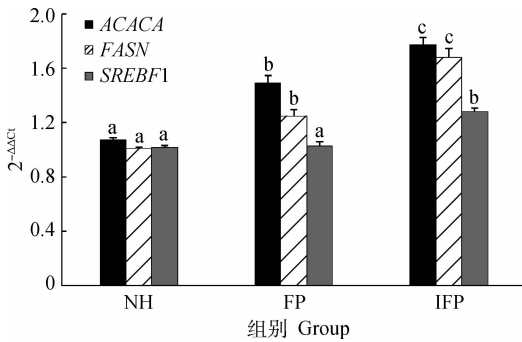


图 3 催乳激素对奶牛乳腺上皮细胞 *ACACA*、*FASN*、*SREBF1* mRNA 表达的影响

Fig. 3 The effect of lactogen hormones on the mRNA expression of *ACACA*, *FASN* and *SREBF1* in bovine mammary epithelial cells

## 2.5 胰岛素对 AMPK、PI3K/Akt/mTOR 信号通路关键调节因子 mRNA 表达的影响

氢化可的松和催乳素作用下,胰岛素对 AMPK、PI3K/Akt/mTOR 信号通路关键调节因子

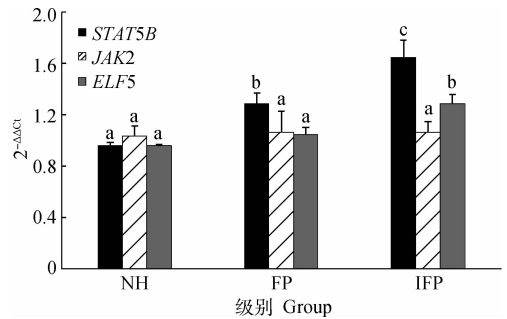


图 4 催乳激素对奶牛乳腺上皮细胞 *STAT5B*、*JAK2* 和 *ELF5* mRNA 表达的影响

Fig. 4 The effect of lactogen hormones on the mRNA expression of *STAT5B*, *JAK2* and *ELF5* in bovine mammary epithelial cells

表 2 胰岛素对 AMPK-mTOR 信号通路关键调节因子 mRNA 表达的影响

Table 2 The effect of insulin on the mRNA expression of key regulators of AMPK-mTOR signaling pathway in bovine mammary epithelial cells

基因 Gene	组别 Group		
	NH	FP	IFP
<i>TSC1</i>	1.01 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.06 <sup>a</sup>
<i>TSC2</i>	0.98 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.03 <sup>a</sup>
<i>RHEB</i>	0.95 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.01 <sup>a</sup>
<i>PI3K</i>	1.01 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.25 ± 0.02 <sup>c</sup>
<i>AKT1</i>	0.98 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.05 <sup>b</sup>
<i>RPS6KB1</i>	1.04 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.26 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.22 ± 0.04 <sup>b</sup>
<i>EIF4E</i>	1.00 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.21 ± 0.02 <sup>c</sup>
<i>EIF4EBP1</i>	1.01 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.17 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.14 ± 0.02 <sup>b</sup>
<i>EIF4EBP2</i>	1.00 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.21 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.16 ± 0.06 <sup>b</sup>

同行数据后所标字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ ),所标字母相同表示差异不显著( $P > 0.05$ )

Different letters in the same row means significant difference between treatments( $P < 0.05$ ), same letter in the same row means not significant difference between treatments( $P > 0.05$ )

### 3 讨论

乳蛋白和乳脂肪的含量与组成是构成牛奶重要营养品质的主要物质基础。牛乳蛋白以酪蛋白为主,约占乳中蛋白总量的 80%。乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACACA) 和脂肪酸合成酶 (FASN) 是脂合成的关键调节酶,分别催化脂肪酸合成的第一步反应和长链脂肪酸的合成。检测  $\beta$ -酪蛋白、 $\kappa$ -酪蛋白、乙酰辅酶 A 羧化酶和脂肪酸合成酶基因 mRNA 水平上的表达能很好的反映奶牛乳腺上皮细胞的泌乳功能。泌乳是乳腺发育和激素共同作用的结果,胰岛素、催乳素和氢化可的松是主要的催乳激素,影响乳蛋白和乳脂的合成<sup>[22]</sup>。本试验研究了催乳素和氢化可的松作用基础上,外源添加胰岛素后对外培养奶牛乳腺上皮细胞 CSN2、CSN3、ACACA 和 FASN mRNA 表达的影响,结果表明,胰岛素通过 JAK2-STAT5、PI3K/Akt/mTOR 和 SREBP 信号通路影响 CSN2、CSN3、ACACA 和 FASN mRNA 的表达。

#### 3.1 胰岛素对奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白合成相关基因表达的影响

近期研究发现 JAK2-STAT5 信号通路中 *ELF5* 的表达水平和 PI3K/Akt/mTOR 信号通路中 RPS6K 与 EIF4EBP 的磷酸化水平调节乳蛋白基因的转录和蛋白翻译的起始<sup>[9-10, 14]</sup>。JAK2-STAT5 信号通路通过催乳素与催乳素受体结合激活 JAK2 激酶并诱导 STAT5 磷酸化,磷酸化的 STAT5 以二聚体形式转移至细胞核内与 GAS 元件结合,诱导 *ELF5* 和细胞信号抑制因子 (SOCS1、SOCS2) 的转录和乳蛋白的合成<sup>[23-25]</sup>。*ELF5* 也是 STAT5 的上游信号分子,与 STAT5 的启动子结合调节其活性<sup>[24]</sup>。M. N. Le 等<sup>[26]</sup>发现胰岛素与胰岛素受体结合也能激活 STAT5,胞内高浓度的 STAT5 有助于胰岛素受体 (IR) 激酶和 JAK 激酶对 STAT5 直接磷酸化。K. K. Menzies 等<sup>[27]</sup>研究发现在催乳素和氢化可的松共同作用基础上,外源添加胰岛素显著上调小鼠乳腺外植体中 *STAT5A* mRNA 的表达。本研究中,IFP 激素处理组 *STAT5B* mRNA 表达量最高,显著高于 NH 和 FP 组,这与前人的研究结果一致,表明胰岛素作为信号分子诱导 *STAT5B* 的转录。JAK2-STAT5 通路中,JAK2 通过相互磷酸化作用激活催乳素受体并磷酸化 STAT5,使磷酸化的 STAT5 发挥转录因子

的作用<sup>[4]</sup>。本研究中,胰岛素、催乳素和氢化可的松对 *JAK2* 的转录水平无显著影响,3 种催乳激素对 JAK2-STAT5 通路的激活作用可能与 *JAK2* 的转录水平无关,而与 *JAK2* 的自身磷酸化能力相关。K. K. Menzies 等<sup>[27]</sup>和 J. Harris 等<sup>[28]</sup>发现 *ELF5* 调节小鼠乳腺组织中乳蛋白基因的转录,K. K. Menzies 等<sup>[9]</sup>研究发现胰岛素显著上调奶牛乳腺外植体中 *ELF5* 的表达水平。本研究中,催乳素和氢化可的松作用基础上,外源添加胰岛素显著促进了 *ELF5*、*CSN2* 和 *CSN3* mRNA 的表达,表明 *ELF5* 可能是调节奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白基因表达的重要转录因子。

PI3K/Akt 信号通路对泌乳起重要调节作用<sup>[29]</sup>,PI3K/Akt 作为 mTOR 的上游分子,磷酸化 mTOR 下游的 2 个底物 (EIF4EBP 和 RPS6K),使前者失活、后者被激活<sup>[30]</sup>。活化的 mTOR 使真核细胞翻译起始因子 eIF4E 从 4E-BP1 上释放。eIF4E 是真核细胞翻译起始的核心成分,通过与 mRNA 5' 端帽子结合,同 eIF4G、eIF4A、eIF4B 和 40S 核糖体亚单位形成 43S 翻译起始复合体<sup>[31]</sup>,起始蛋白的翻译。C. A. Toerien 等<sup>[32]</sup>发现泌乳牛乳腺组织中 *RPS6K1* 和 *EIF4E* 的转录水平分别比干奶牛高 1.8 和 2.0 倍。A. R. Saltiel 等<sup>[33]</sup>报道了胰岛素作为信号分子激活 PI3K/Akt 通路,K. K. Menzies<sup>[9]</sup>和 B. Raught 等<sup>[34]</sup>报道了胰岛素刺激 *EIF4E* 的表达。本研究在催乳素和氢化可的松作用基础上,外源添加胰岛素显著上调乳腺上皮细胞 *PI3K*、*AKT1* 和 *EIF4E* 的转录水平,提示胰岛素作为信号分子,通过激活 PI3K/Akt/mTOR 通路影响乳腺上皮细胞乳蛋白基因的表达;催乳素和氢化可的松作用基础上,外源添加胰岛素对 *RPS6K1*、*EIF4EBP1* 和 *EIF4EBP2* 的转录水平无显著影响,提示胰岛素通过 PI3K/Akt/mTOR 通路影响乳蛋白基因转录和翻译起始的作用可能与 *RPS6K1*、*EIF4EBP1* 和 *EIF4EBP2* 的转录水平无关,与 *RPS6K1* 的自身磷酸化能力和 EIF4EBP 的主要磷酸化酶效率相关<sup>[10]</sup>。

AMPK 是哺乳动物细胞中高度保守的蛋白,活化的 AMPK 磷酸化结节性硬化复合物 (TSC1/TSC2),TSC 复合物抑制小 GTP 酶 Rheb (*Ras homolog enriched in brain*),而后者是 mTOR 活化所必需的刺激蛋白<sup>[14]</sup>。M. H. Rider<sup>[35]</sup>报道了胰岛素通过 Akt 刺激 AMPK Ser485/491 位点的磷酸

化,抑制 AMPK 的活性。黄德强等<sup>[36]</sup>研究发现胰岛素能增加 AMPK Thr172 的磷酸化,但并不伴有 AMPK 活性的增加。刘微等<sup>[37]</sup>报道了提高 RHEB 的表达水平可以过度激活 mTORC1 的活性。本研究中,催乳素、氢化可的松和胰岛素对 AMPK 信号通路中 TSC1、TSC2 和 RHEB 的转录水平均无显著影响,提示催乳素诱导乳蛋白合成的功能可能与 TSC1、TSC2 和 RHEB 的转录水平无关或关系较小。

$\beta$ -酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白是牛乳中主要的 2 种酪蛋白,本研究中,氢化可的松和催乳素作用下,外源添加胰岛素可诱导更高水平的酪蛋白基因表达,这与 K. K. Menzies 等<sup>[9, 27]</sup>研究结果一致,提示胰岛素作为一种重要的催乳激素,通过 JAK2-STAT5 和 PI3K/Akt/mTOR 通路直接参与诱导奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白基因的表达。

### 3.2 胰岛素对奶牛乳腺上皮细胞乳脂合成相关基因表达的影响

脂类物质在动物体内的合成过程均受到固醇调控元件结合蛋白家族(SREBPs)的调控,SREBPs 通过与脂合成相关酶基因启动子中的固醇调节元件(SRE)结合激活目的基因转录,调控脂类合成<sup>[38]</sup>。近年来研究表明胰岛素通过诱导固醇调控元件结合蛋白-1c(SREBP-1c)的转录,调控脂类合成<sup>[11]</sup>。I. Shimomura 等<sup>[39]</sup>研究发现用链脲霉素处理大鼠时,胰岛素分泌受抑制,导致 SREBP-1c mRNA 水平下降;注射胰岛素后 SREBP-1c mRNA 水平恢复。Y. A. Yang 等<sup>[40]</sup>研究结果发现,在人乳腺上皮细胞(MCF-10a)中,MAPK 和 PI3K 的激活上调 SREBP1 和 FASN 的 mRNA 表达水平,促进脂肪酸合成;反之,添加 MAPK 和 PI3K 抑制剂则下调 SREBP1 和 FASN 的转录水平。D. G. Peterson 等<sup>[41]</sup>用 trans-10 和 cis-12 共轭亚油酸处理奶牛乳腺上皮细胞,发现 SREBP1 的解脲激活作用受到抑制,并抑制了脂合成相关基因的转录。此外,林先滋等<sup>[42]</sup>研究报道了 miR-200a 在细胞中过表达通过增强胰岛素信号通路来促进乳脂合成相关基因 mRNA 表达水平。

本研究在氢化可的松和催乳素作用基础上,外源添加胰岛素显著促进奶牛乳腺上皮细胞 ACA-CA、FASN 和 SREBP1 mRNA 的表达,这与 Y. Shao 等<sup>[22]</sup>的研究结果一致。另外,本研究中,外源添加胰岛素显著促进 *ELF5*、*AKT1*、*PI3K* 和

*EIF4E* mRNA 的表达,提示胰岛素作为一种重要的脂代谢相关激素,通过 PI3K/Akt/mTOR 和 SREBP1 通路调节乳腺上皮细胞中乳脂的合成。

## 4 结 论

氢化可的松和催乳素作用基础上,外源添加胰岛素显著上调体外培养奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白基因 *CSN2* 和 *CSN3* mRNA 的相对表达丰度;显著上调脂合成相关基因 *ACACA*、*FASN* 和 *SREBP1* mRNA 的相对表达丰度;显著上调 JAK2-STAT5 和 PI3K/Akt/mTOR 信号通路中 *ELF5*、*PI3K*、*AKT1* 和 *EIF4E* mRNA 的相对表达丰度。结果提示胰岛素作为一种重要的催乳激素,通过 JAK2-STAT5、PI3K/Akt/mTOR 和 SREBP 信号通路,与氢化可的松和催乳素共同调节体外培养奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白和乳脂肪合成相关基因 mRNA 的表达。

## 参考文献:

- [1] ERDMANN B, BRETER H. Irregular distribution of mammary-derived growth inhibitor in the bovine mammary epithelium[J]. *Cell Tissue Res*, 1993, 272(2): 383-389.
- [2] ACCORNERO P, MARTIGNANI E, MIRETTI S, et al. Epidermal growth factor and hepatocyte growth factor receptors collaborate to induce multiple biological responses in bovine mammary epithelial cells[J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92(8): 3667-3675.
- [3] 佟慧丽,高学军,李庆章,等.胰岛素、催乳素对奶山羊乳腺上皮细胞泌乳功能的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2008,39(6):721-725.
- [4] FREEMAN M E, KANYICKSKA B, LERANT A, et al. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion[J]. *Physiol Rev*, 2000, 80(4): 1523-1631.
- [5] LEE H J, ORMANDY C J. Interplay between progesterone and prolactin in mammary development and implications for breast cancer[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 357(1-2): 101-107.
- [6] 李 敏. 新型糖皮质激素对肥大细胞脱颗粒的快速作用及其机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2010.
- [7] 李 真,李庆章. 奶山羊乳腺发育过程中生长激素、胰岛素及其受体的变化规律研究[J]. *中国农业科学*, 2010,43(8):1730-1737.
- [8] SHEEHY P A, NICHOLAS K R, WYNN P C. An investigation of the role of insulin in bovine milk pro-

- tein gene expression in mammary explant culture[J]. *Asian-Aus J Anim Sci*, 2000, Supplement (13): 272-275.
- [9] MENZIES K K, LEFEVRE C, MACMILLAN K L, et al. Insulin regulates milk protein synthesis at multiple levels in the bovine mammary gland[J]. *Funct Integrat Genom*, 2009, 9(2): 197-217.
- [10] BIONAZ M, LOOR J J. Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle[J]. *Bioinform Biol Insights*, 2011, 5: 83-98.
- [11] HORTON J D, GOLDSTEIN J L, BROWN M S. SREBPs; activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1125-1131.
- [12] WANG X, PROUD C G. The mTOR pathway in the control of protein synthesis[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2006, 21: 362-369.
- [13] PETERSON T R, SENGUPTA S S, HARRIS T E, et al. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway[J]. *Cell*, 2011, 146(3): 408-420.
- [14] 张 霞,孙琳琳,钟殿胜. LKB1-AMPK-mTOR 信号传导通路在肿瘤中的研究进展[J]. *中国肺癌杂志*, 2011,14(8):685-688.
- [15] MCFADDEN J W, CORL B A. Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibits fatty acid synthesis in bovine mammary epithelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390(3): 388-393.
- [16] HU H, WANG J, BU D, et al. *In vitro* culture and characterization of a mammary epithelial cell line from Chinese Holstein dairy cow[J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(11): e7636.
- [17] 胡小丽,张春林,王加启,等. 不同剂量胰岛素、胰高血糖素和甲状腺素处理对奶牛乳腺上皮细胞 FcRn mRNA 表达的影响[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(20): 4279-4283.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] BIONAZ M, LOOR J J. Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in the bovine mammary gland during the lactation cycle[J]. *Physiol Genom*, 2007, 29(3): 312-319.
- [20] 胡 菡,王加启,李发弟,等. 高温诱导体外培养奶牛乳腺上皮细胞的应激响应[J]. *农业生物技术学报*, 2011,19(2):287-293.
- [21] BERNIER-DODIER P, GIRARD C L, TALBOT B G, et al. Effect of dry period management on mammary gland function and its endocrine regulation in dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 2011, 94(10): 4922-4936.
- [22] SHAO Y, WALL E H, MCFADDEN T B, et al. Lactogenic hormones stimulate expression of lipogenic genes but not glucose transporters in bovine mammary gland[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2013, 44(2): 57-69.
- [23] LIU X, ROBINSON G W, HENNIGHAUSEN L. Activation of Stat5a and Stat5b by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation[J]. *Mol Endocrinol*, 1996, 10(12): 1496-1506.
- [24] HENNIGHAUSEN L, ROBINSON G W. Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(6): 711-721.
- [25] SHEKAR P C, GOEL S, RANI S D, et al. kappa-casein-deficient mice fail to lactate[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(21): 8000-8005.
- [26] LE M N, KOHANSKI R A, WANG L H, et al. Dual mechanism of signal transducer and activator of transcription 5 activation by the insulin receptor[J]. *Mol Endocrinol*, 2002, 16(12): 2764-2779.
- [27] MENZIES K K, LEE H J, LEFEVRE C, et al. Insulin, a key regulator of hormone responsive milk protein synthesis during lactogenesis in murine mammary explants[J]. *Funct Integr Genom*, 2010, 10(1): 87-95.
- [28] HARRIS J, STANFORD P M, SUTHERLAND K, et al. Socs2 and elf5 mediate prolactin-induced mammary gland development[J]. *Mol Endocrinol*, 2006, 20(5): 1177-1187.
- [29] LEMAY D G, NEVILLE M C, RUDOLPH M C, et al. Gene regulatory networks in lactation: identification of global principles using bioinformatics[J]. *BMC Syst Biol*, 2007, 1: 56.
- [30] ZHOU X, TAN M, STONE HAWTHORNE V, et al. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(20): 6779-6788.
- [31] KIMBALL S R, JEFFERSON L S. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation[J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83(2): 500S-507S.



- [32] TOERIEN C A, CANT J P. Abundance and phosphorylation state of translation initiation factors in mammary glands of lactating and nonlactating dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 2007, 90(6): 2726-2734.
- [33] SALTIEL A R, PESSIN J E. Insulin signaling pathways in time and space[J]. *Trends Cell Biol*, 2002, 12(2): 65-71.
- [34] RAUGHT B, GINGRAS A C, SONENBERG N. The target of rapamycin (TOR) proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(13): 7037-7044.
- [35] RIDER M H. The ubiquitin-associated domain of AMPK-related protein kinases allows LKB1-induced phosphorylation and activation[J]. *Biochem J*, 2006, 394(Pt 3): e7-9.
- [36] 黄德强, 罗凌玉, 王丽丽, 等. AMPK 在胰岛素信号转导通路中的作用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(11): 1220-1229.
- [37] 刘 微, 邹俊杰, 李晓曦, 等. mTOR 信号通路中上游调控蛋白 Rheb 在脂肪细胞分化中的作用[J]. *第二军医大学学报*, 2012, 33(7): 697-702.
- [38] 王红芳, 杨维仁, 刘建新, 等. 固醇调控元件结合蛋白及其对乳脂合成的调节作用[J]. *动物营养学报*, 2010, 22(5): 1165-1170.
- [39] SHIMOMURA I, BASHMAKOV Y, IKEMOTO S, et al. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(24): 13656-13661.
- [40] YANG Y A, HAN W F, MORIN P J, et al. Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation; role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase [J]. *Exp Cell Res*, 2002, 279(1): 80-90.
- [41] PETERSON D G, MATITASHVILI E A, BAUMAN D E. The inhibitory effect of trans-10, cis-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1[J]. *J Nutr*, 2004, 134(10): 2523-2527.
- [42] 林先滋, 罗 军, 张犁苹, 等. miR-200a 对奶山羊乳腺上皮细胞乳脂合成相关基因 mRNA 表达的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(7): 1028-1036.

(编辑 程金华)