

L 型氨基酸转运载体 1 及其配体 在奶牛乳腺中的协同表达研究

林 叶, 侯晓明*

(东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘 要: 为探讨氨基酸转运与乳腺泌乳功能之间的关系, 本研究采用激光扫描共聚焦显微技术对泌乳期和干奶期奶牛乳腺中 LAT1 和 4F2hc 的表达含量和表达方式进行研究。结果显示, LAT1 和 4F2hc 的蛋白表达含量在泌乳期高乳蛋白率荷斯坦奶牛中显著高于泌乳期低乳蛋白率的荷斯坦奶牛和干奶期的荷斯坦奶牛。泌乳期 LAT1 和 4F2hc 协同表达于腺泡上皮细胞基底侧的细胞膜上和围绕导管的肌上皮细胞; 干奶期 LAT1 和 4F2hc 协同表达于乳导管上皮细胞质膜。相关性分析显示泌乳期和干奶期 LAT1 和 4F2hc 在乳腺中的表达高度正相关, 相关系数 0.810。结果表明, LAT1 是奶牛乳腺中负责转运氨基酸的载体, LAT1/4F2hc 协同表达与泌乳期乳蛋白生物合成以及干奶期乳腺组织重建紧密正相关。

关键词: 奶牛; 乳腺; LAT1; 4F2hc; 协同表达; 相关性

中图分类号: S823.9⁺1.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)02-0212-06

Research on L-type Amino Acid Transporter 1 and Its Ligand Coordinated Expression in Dairy Cow Mammary Gland

LIN Ye, HOU Xiao-ming*

(The Key Laboratory of Dairy Science of Ministry of Education,
Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To investigate the underlying relationship between amino acid transportation and lactation in dairy cow mammary gland, LAT1 and 4F2hc expression were detected by laser confocal microscope. The results showed that LAT1 and 4F2hc expression were higher in mammary gland with high quality milk than mammary gland with low quality milk and mammary gland in dry period. In lactation, LAT1 and 4F2hc were detected on the basolateral of acinar epithelial cells and myoepithelial cells. In dry period, LAT1 and 4F2hc were detected on the plasma membrane of ductal epithelial cells. Correlation analysis showed LAT1 expression was highly correlated with 4F2hc. All these results revealed that LAT1 was the major amino acid transporter in mammary gland of dairy cow. LAT1/4F2hc coordinated expression was closely related to milk protein synthesis and mammary gland reconstruction.

Key words: dairy cow; mammary gland; LAT1; 4F2hc; coordinated expression; correlation

L 型氨基酸转运载体 1 (L-type amino acid transporter 1, LAT1) 是活体组织中主要的营养素

收稿日期: 2013-08-20

基金项目: 2010 年高等学校博士学科点专项科研基金联合资助课题(新教师类联合)(20102325120018); 2012 年黑龙江省博士后科研启动金(LBH-Q12157)

作者简介: 林 叶(1980-), 女, 黑龙江江西人, 博士, 副教授, 主要从事泌乳生物学与乳腺功能调控研究, E-mail: linlu516@163.com

* 通信作者: 侯晓明, 副教授, E-mail: xiaominghou@126.com

转运载体^[1],负责从细胞外液摄入支链氨基酸和芳香族氨基酸进入细胞内^[2]。LAT1 是一个非糖基化膜蛋白质,需要与 4F2 抗原的重链(4F2hc, solute carrier[slc]3A2, slc3a2)通过二硫键结合,形成异二聚体(LAT1/4F2hc)才具有转运氨基酸的活性^[3-4]。

研究表明,乳腺泌乳过程中,LAT1/4F2hc 可能是氨基酸透过血乳屏障进入乳腺上皮细胞的必需介质,但是 LAT1/4F2hc 的表达与奶牛乳腺泌乳功能之间的关系尚不清楚。本研究采用间接免疫荧光技术,通过激光扫描共聚焦显微镜对泌乳期高乳蛋白率、泌乳期低乳蛋白率以及干奶期荷斯坦奶牛乳腺组织中 LAT1 和 4F2hc 的表达部位和表达含量进行研究,并分析了奶牛乳腺中 LAT1 和 4F2hc 表达的相关性,为深入探讨 LAT1/4F2hc 与乳腺泌乳功能之间的关系提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

主要试剂:山羊的 4F2hc 多克隆抗体(Santa Cruz, sc-31250)、兔的 LAT1 多克隆抗体(Abcam, ab85226)、驴抗兔 IgG-R(Santa Cruz, sc-2905)、驴抗羊 IgG-FITC(Santa Cruz, sc-2024)、封闭用驴血清以及 DAPI。

主要仪器:激光扫描共聚焦显微镜(Leica TCS SP2)、冷冻切片仪(Leica CM1850)。

1.2 试验材料

本研究选择相同饲养条件下泌乳中期的高乳蛋白率(乳蛋白率 3.27%,乳脂率 4.17%)、泌乳中期低乳蛋白率(乳蛋白率 2.89%,乳脂率 3.2%)以及干奶 30 日的荷斯坦奶牛各 3 头进行试验。选取的奶牛无亲缘关系,奶牛生理状态正常,无疾病记录。奶牛屠宰后,取乳腺实体组织,迅速液氮冷冻带回实验室,-80℃冻存备用。

1.3 间接免疫荧光技术

取奶牛乳腺实体组织,制作冰冻切片,厚度 7 μm。冰冻切片经 PBS(pH7.4)处理后,冷丙酮固定 10 min,室温风干。PBS 清洗 3 次,每次 5 min,然后用 10% 驴血清室温封闭 2 h。封闭结束后,采用 LAT1(1:25)和 4F2hc(1:50)多克隆抗体孵育组织切片,4℃过夜。第 2 天弃去一抗,用 PBS 清洗 3 次后分别用驴抗兔 IgG-R 和驴抗羊 IgG-FITC 孵育组织切片,37℃作用 30 min。最后采用 DAPI 标记细胞核,室温孵育 10 min。PBS 清洗后,抗荧光淬

灭封片剂封片。

1.4 图像采集

采用激光扫描共聚焦显微镜对组织切片进行观察。每张组织切片选择 5 个视野进行拍照,并对每张光切片进行 2 次面平均。所有光切片均采用相同的光电倍增管强度进行拍摄。

1.5 数据处理与统计分析

LAT1 和 4F2hc 表达的荧光强度用 Image Pro Plus 6.0 软件进行分析,以每个视野的平均光密度表示 LAT1 和 4F2hc 的表达强度。所得数据采用 SPSS16.0 进行统计分析。

2 结果

2.1 奶牛乳腺中 LAT1 表达的定位研究

泌乳中期高乳蛋白率的荷斯坦奶牛乳腺中,LAT1 表达的荧光强度较高。在乳腺小叶腺泡区域,LAT1 围绕在乳腺腺泡结构的基底外侧特异表达(图 1A1);在乳腺导管区域,LAT1 在围绕乳导管的肌上皮细胞中表达,表达部位为肌上皮细胞的细胞膜(图 1A2、A3)。

泌乳中期低乳蛋白率的荷斯坦奶牛乳腺中,LAT1 表达的荧光强度低于高乳蛋白率的荷斯坦奶牛。在乳腺小叶腺泡区域,LAT1 围绕在乳腺腺泡结构的基底外侧表达(图 1B1);在乳腺导管区域,LAT1 围绕导管上皮细胞表达,基底侧和导管腔侧均检测到(图 1B2、B3)。

干奶期,LAT1 在乳腺导管上皮细胞的基底侧和导管腔侧特异性表达(图 1C1~C3)。

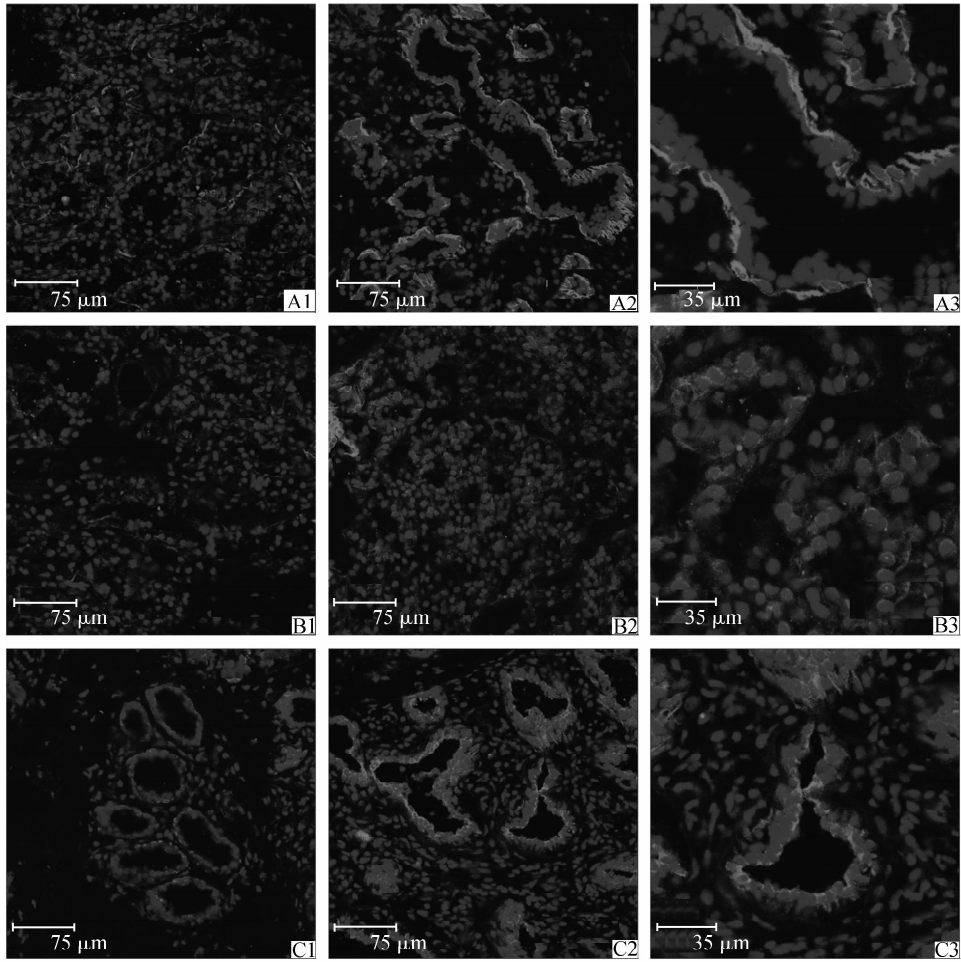
2.2 奶牛乳腺中 4F2hc 表达的定位研究

泌乳期高乳蛋白率的荷斯坦奶牛乳腺小叶腺泡区域,4F2hc 在乳腺腺泡结构的基底外侧表达(图 2A1);在乳腺导管区域,4F2hc 在导管上皮细胞细胞膜上以及乳腺导管之间的基质中检测到(图 2A2、A3)。泌乳期低乳蛋白率的荷斯坦奶牛乳腺中 4F2hc 的表达部位与高乳蛋白率的荷斯坦奶牛相同(图 2B1~B3)。

干奶期,4F2hc 在乳腺导管上皮细胞的细胞膜以及导管外的基质中表达(图 2C1),特别是在导管上皮细胞外的基膜上表达显著(图 2C2、C3)。

2.3 奶牛乳腺中 LAT1 和 4F2hc 的表达含量变化

根据乳腺组织间接免疫荧光检测的激光共聚焦图片,采用 Image Pro Plus 6.0 软件进行荧光强度分析,以光切片的平均光密度表示 LAT1 和 4F2hc



A1~A3. 泌乳期高乳蛋白率的奶牛乳腺组织, A1. 乳腺腺泡区域, A2、A3. 乳腺导管区域; B1~B3. 泌乳期低乳蛋白率的奶牛乳腺组织; C1~C3. 干奶期的奶牛乳腺组织, 下同。蓝色荧光为 DAPI 标记的细胞核, 红色荧光为 TRITC 标记的 LAT1

A1-A3. Dairy cow mammary gland in lactation with high quality milk. A1 represented mammary acini area, A2 and A3 represented mammary duct area; B1-B3. Dairy cow mammary gland in lactation with low quality milk; C1-C3. Dairy cow mammary gland in dry period. The same as bleow. Nucleus was stained by DAPI (blue) and LAT1 was stained by TRITC (red)

图 1 激光共聚焦检测奶牛乳腺中 LAT1 的表达

Fig. 1 Expression of LAT1 in dairy cow mammary gland by laser confocal microscopy

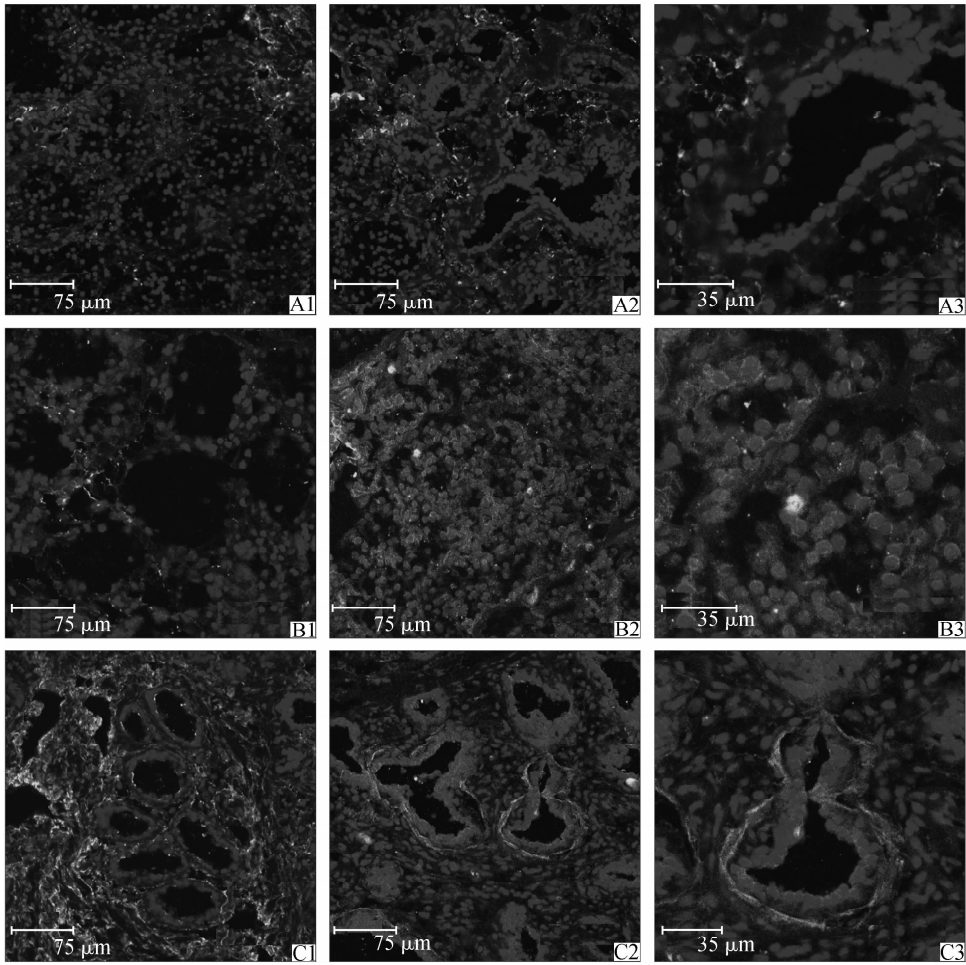
蛋白水平的表达量, 结果如图 3 所示。泌乳期高乳蛋白率的荷斯坦奶牛乳腺组织中 LAT1 的表达水平极显著高于泌乳期低乳蛋白率的荷斯坦奶牛和干奶期的荷斯坦奶牛 ($P < 0.01$), 4F2hc 的表达水平显著高于泌乳期低乳蛋白率的荷斯坦奶牛和干奶期的荷斯坦奶牛 ($P < 0.05$)。但是在干奶期奶牛乳腺中, LAT1 的表达显著高于泌乳期低乳蛋白率的荷斯坦奶牛 ($P < 0.05$), 而 4F2hc 的表达在泌乳期低乳蛋白率的荷斯坦奶牛和干奶期的荷斯坦奶牛乳腺中差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 奶牛乳腺中 LAT1 和 4F2hc 的协同表达

采用激光扫描共聚焦显微技术对奶牛乳腺中

LAT1 和 4F2hc 的协同表达进行研究显示, 泌乳期高乳蛋白率荷斯坦奶牛乳腺小叶腺泡区域, LAT1 和 4F2hc 在乳腺腺泡的基底侧协同表达, 在腺泡之间的基质中可以观察到 4F2hc 单独免疫荧光染色 (图 4A1)。在乳腺导管区域, LAT1 和 4F2hc 在围绕导管外的肌上皮细胞的细胞膜上协同表达 (图 4A2、A3)。

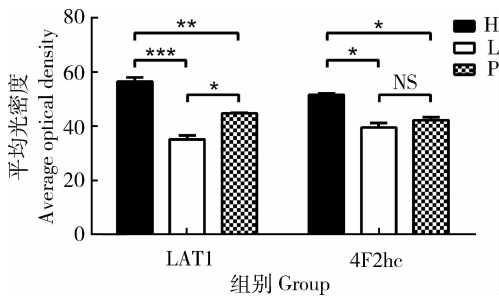
泌乳期低乳蛋白率的荷斯坦奶牛乳腺小叶腺泡区域, LAT1 和 4F2hc 同样在乳腺腺泡基底侧协同表达 (图 4B1); 但是在乳腺导管区域, LAT1 和 4F2hc 围绕乳腺导管上皮细胞表达, 在基底侧和导管腔侧均检测到 (图 4B2、B3)。



蓝色荧光为 DAPI 标记的细胞核,绿色荧光为 FITC 标记的 4F2hc
Nucleus was stained by DAPI (blue) and 4F2hc was stained by FITC (green)

图 2 激光共聚焦检测奶牛乳腺中 4F2hc 的表达

Fig. 2 Expression of 4F2hc in dairy cow mammary gland by laser confocal microscopy



H. 泌乳期高乳蛋白率的奶牛乳腺;L. 泌乳期低乳蛋白率的奶牛乳腺;P. 干奶期的奶牛乳腺

H. Dairy cow mammary gland in lactation with high quality milk;L. Dairy cow mammary gland in lactation with low quality milk;P. Dairy cow mammary gland in dry period

图 3 奶牛乳腺中 LAT1 和 4F2hc 的表达含量变化

Fig. 3 Expression of LAT1 and 4F2hc in dairy cow mammary gland

干奶期的荷斯坦奶牛乳腺中,LAT1 和 4F2hc 在导管上皮细胞膜上协同表达,基底侧和导管腔侧均检

测到。在导管外的基质成分中可以观察到 4F2hc 单独免疫荧光染色(图 4C1~C3)。

2.5 奶牛乳腺中 LAT1 和 4F2hc 表达的相关性分析

采用 SPSS16.0 软件对荷斯坦奶牛乳腺中 LAT1 和 4F2hc 的表达进行相关性分析,结果如表 1 所示,表明在泌乳及干奶期的荷斯坦奶牛乳腺中,LAT1 和 4F2hc 的表达高度相关,相关系数为 0.810($P < 0.05$)。

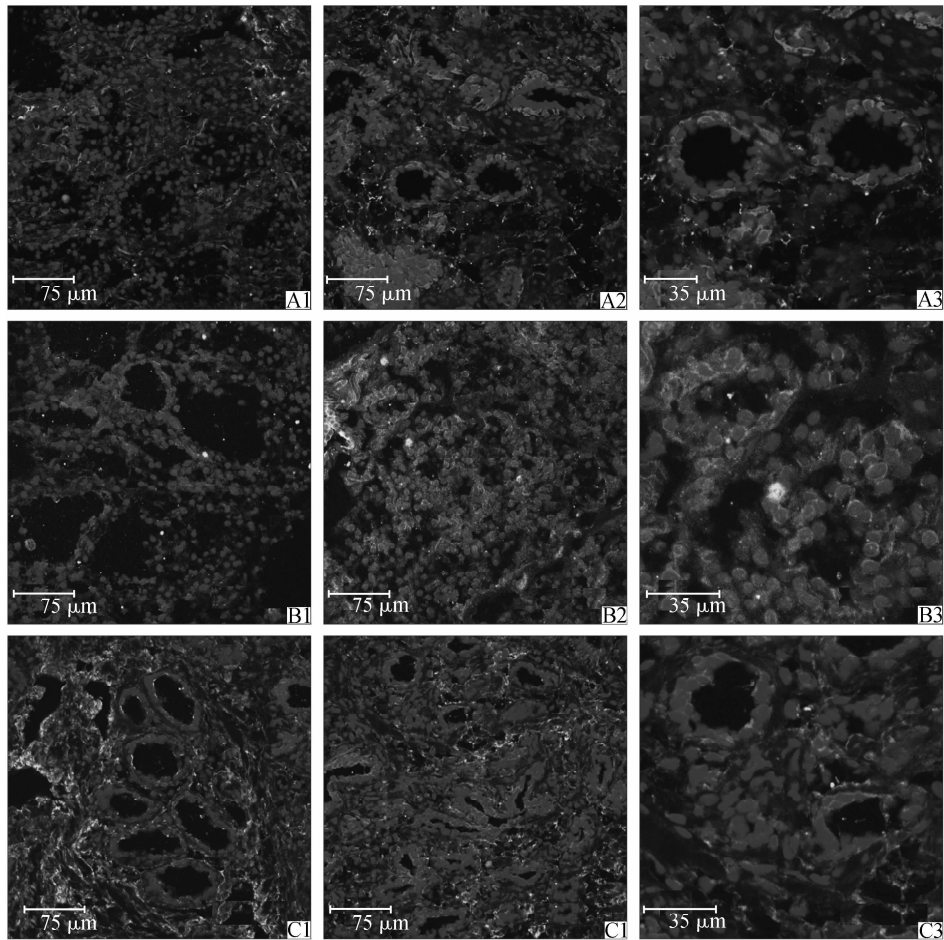
表 1 奶牛乳腺中 LAT1 和 4F2hc 表达的相关性分析

Table 1 Correlation analysis of LAT1 and 4F2hc expression in dairy cow mammary gland

		LAT1
4F2hc	相关系数 Correlation coefficient	0.810*
	显著性概率值 Sig. (2-tailed)	0.015

*. 相关系数显著性水平在 0.05 水平(双尾检验)

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)



蓝色荧光为 DAPI 标记的细胞核,红色荧光为 TRITC 标记的 LAT1,绿色荧光为 FITC 标记的 4F2hc
Nucleus was stained by DAPI (blue),LAT1 was stained by TRITC (red) and 4F2hc was stained by FITC (green)

图 4 激光共聚焦检测奶牛乳腺中 LAT1 和 4F2hc 的协同表达

Fig. 4 Coordinated expression of LAT1 and 4F2hc in dairy cow mammary gland by laser confocal microscopy

3 讨论

在生长发育的细胞中,氨基酸的摄取是维持细胞生存和增殖所必需的。LAT1 是第一个被克隆出来的氨基酸转运载体,是溶质载体家族 7 的成员,由 *SLC7A5* 基因编码^[5]。LAT1 需要与 4F2hc 形成异二聚体,执行转运氨基酸的功能^[6-7]。奶牛乳腺间接免疫荧光结果显示,在泌乳中期高乳蛋白率和低乳蛋白率的荷斯坦奶牛乳腺腺泡区域,LAT1 的表达位于腺泡上皮细胞基底侧的细胞膜上,在 LAT1 的表达部位均可以同时检测到 4F2hc 的表达,预示 LAT1/4F2hc 协同作用,负责将氨基酸从腺泡上皮细胞的基底外侧转运至细胞内,用于乳蛋白的生物合成。激光扫描共聚焦图片的平均光密度分析结果显示,LAT1 和 4F2hc 的表达在泌乳中期高乳蛋白率的荷斯坦奶牛乳腺中显著高于低乳蛋白率的荷斯

坦奶牛($P < 0.01$, $P < 0.05$)。泌乳中期高乳蛋白率的荷斯坦奶牛乳腺中 LAT1/4F2hc 表达上调支持了高水平的蛋白质合成^[8-9]。对泌乳中期高乳蛋白率和低乳蛋白率的荷斯坦奶牛乳腺组织进行数字基因表达谱分析也显示,乳中标志性蛋白 β -酪蛋白 mRNA 的表达水平在高乳蛋白率的奶牛乳腺组织中显著高于低乳蛋白率的奶牛^[10]。这个结果与泌乳奶牛乳汁中的乳蛋白丰度是一致的^[11]。在泌乳期的乳腺导管区域,LAT1 和 4F2hc 在围绕导管上皮细胞外侧的肌上皮细胞质膜上协同表达。肌上皮细胞收缩是引起排乳的主要机制,表明在泌乳阶段大量氨基酸需要转运至肌上皮细胞内,肌上皮细胞中组织蛋白的大量更新与其收缩引起排乳的生理功能是一致的。

干奶期乳腺腺泡腔皱缩,腺泡间的结缔组织和成纤维细胞增加^[12]。此时 LAT1 和 4F2hc 的表达

水平显著低于泌乳中期高乳蛋白率的荷斯坦奶牛 ($P < 0.05$), 表达部位也由腺泡上皮细胞转移至导管上皮细胞, 在基底侧和导管腔侧的细胞膜上均检测到。但是本研究检测到在干奶期乳腺组织中 LAT1 的表达要高于泌乳中期低乳蛋白率的荷斯坦奶牛, 这可能是由于干奶期是乳腺更替衰老和损坏的上皮细胞, 为再次泌乳做准备的时期。此时乳腺组织中虽然不需要合成乳蛋白, 但是导管上皮细胞膜上仍需要大量表达 LAT1, 用于摄取氨基酸来维持导管上皮细胞的生存和增殖, 完成干奶期乳腺组织重建过程。

间接免疫荧光结果显示, 除了在乳腺实体组织中 4F2hc/LAT1 协同表达, 4F2hc 在干奶期乳腺基质中也单独被检测到。这是由于 4F2hc 并非 LAT1 专一性配体。4F2hc 作为重链结构可以与许多轻链结构共价结合。4F2hc 可以结合葡萄糖转运载体 GLUT1, 维持细胞膜上 GLUT1 蛋白的稳定性^[13]。4F2hc 也可以与基底外侧表达的整联蛋白 β 亚基细胞质结构域相互作用, 调节改变细胞黏附、迁移以及分支形态发生^[14], 而这些都是维持干奶期乳腺组织重建所必需的^[15]。

参考文献:

- [1] SMITH Q R. Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier [J]. *J Nutr*, 2000, 130(4):1016S-1022S.
- [2] KANAI Y, SEGAWA H, MIYAMOTO K, et al. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98) [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(37):23629-23632.
- [3] WAGNER C A, LANG F, BROER S. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281(4): C1077-1093.
- [4] BROER S, WAGNER C A. Structure-function relationships of heterodimeric amino acid transporters

- [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2002, 36(2-3):155-168.
- [5] FOTIADIS D, KANAI Y, PALACIN M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters [J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(2-3):139-158.
- [6] LAHOUTTE T, CAVELIERS V, CAMARGO S M, et al. SPECT and PET amino acid tracer influx via system L (h4F2hc-hLAT1) and its transstimulation [J]. *J Nucl Med*, 2004, 45(9):1591-1596.
- [7] SHI L, LUO W, HUANG W, et al. Downregulation of L-type amino acid transporter 1 expression inhibits the growth, migration and invasion of gastric cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(1):106-112.
- [8] CHRISTENSEN H N. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism [J]. *Physiol Rev*, 1990, 70(1):43-77.
- [9] LI P, KNABE D A, KIM S W, et al. Lactating porcine mammary tissue catabolizes branched-chain amino acids for glutamine and aspartate synthesis [J]. *J Nutr*, 2009, 139(8):1502-1509.
- [10] 胡红柳. GRK2 基因在奶牛乳腺上皮细胞中的功能研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2013.
- [11] MATSUMOTO T, NAKAMURA E, NAKAMURA H, et al. The production of free glutamate in milk requires the leucine transporter LAT1 [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 305(6):C623-631.
- [12] HURLEY W L. Mammary gland function during involution [J]. *J Dairy Sci*, 1989, 72(6):1637-1646.
- [13] OHNO H, NAKATSU Y, SAKODA H, et al. 4F2hc stabilizes GLUT1 protein and increases glucose transport activity [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300(5):C1047-1054.
- [14] PRAGER G W, FERALL C C, KIM C, et al. CD98hc (SLC3A2) interaction with the integrin beta subunit cytoplasmic domain mediates adhesive signaling [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(33):24477-24484.
- [15] 赵 锋, 刘 畅, 高学军, 等. 奶牛乳腺中整连蛋白 alpha6/beta4 表达对细胞增殖的影响 [J]. *中国乳品工业*, 2012, 40(8):12-15.

(编辑 程金华)