

奶牛产后血浆¹H-NMR 代谢组学分析

陶金忠*, 郭延生

(宁夏大学农学院动物科学系, 银川 750021)

摘要: 为了从代谢组角度系统揭示奶牛分娩后能量缺乏的生理机制, 采用¹H-NMR 代谢组学技术, 结合多元统计学方法探讨了奶牛分娩后不同阶段血浆小分子代谢物的变化趋势及其对能量代谢通路的影响。结果表明: 奶牛分娩后第 7 天与分娩第 1 天之间血浆代谢轮廓无明显差异; 分娩后第 14 天与第 1 天之间血浆代谢轮廓出现明显差异, 其差异标志物为不饱和脂肪酸、胆碱和氧化三甲胺; 分娩后第 28 天与第 1 天之间血浆代谢轮廓也存在明显差异, 其差异标志物为不饱和脂肪酸、胆碱、氧化三甲胺、三羧酸和葡萄糖; 随着分娩后时间的延长, 不饱和脂肪酸、胆碱和三羧酸表达逐渐上调, 而氧化三甲胺和葡萄糖表达逐渐下调。可见, 随着奶牛分娩后泌乳量的不断增加, 逐渐呈现出能量负平衡状态, 而机体应答性的上调了脂肪分解、脂肪酸氧化、胆碱氧化、蛋氨酸再甲基化和甲基代谢途径以缓解奶牛分娩后的能量负平衡状态。研究结果可为进一步阐明奶牛分娩后能量负平衡的生理机制提供科学依据。

关键词: 奶牛; 围产期; 能量负平衡; 代谢组学; ¹H 核磁共振

中图分类号: S857.21

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)01-0198-09

Study on the Plasma Metabolism Using ¹H-NMR in Postpartum Cows

TAO Jin-zhong*, GUO Yan-sheng

(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: In postpartum, cows often suffer from negative energy balance, resulting in physical dysfunction. The aim of this study was to define the physiological mechanism of cows exercising metabolic energy shortage after calving. ¹H-NMR technology was used for measurement of metabolites. Results were analyzed in multivariate statistical methods to find out the trend of plasma metabolites changing after calving and the influence on energy metabolism pathway. Results showed that: the biomarkers profile of plasma was not significantly different in Day 7 from Day 1 after calving; but a significant difference were found between Day 14 and Day 1 after calving. The biomarkers are unsaturated fatty acid, choline and trimethylamine oxide; There were significant differences in biomarkers profile between Day 28 and Day 1 after calving with different markers of unsaturated fatty acid, choline, trimethylamine oxide, citric acid and glucose. After calving, unsaturated fatty acid, choline and tricarboxylic acid expression gradually increased, whereas trimethylamine oxide and glucose expression gradually decreased. With the increasing lactating yield after calving, cows showed a negative energy balance. In response, the lipolysis and fatty acid oxidation, the oxidation of choline, re-methylation methionine and methyl metabolic pathways were increased, relieving the negative energy balance. This study could provide a scientific basis for the physiological mechanism of the negative energy balance after calving for dairy cows.

Key words: cow; periparturition; negative energy balance; metabolomics; ¹H nuclear magnetic res-

收稿日期: 2015-06-20

基金项目: 国家自然科学基金(31160523)

作者简介: 陶金忠(1977-), 男, 甘肃天水人, 博士后, 副教授, 主要从事家畜繁殖及繁殖障碍的研究, E-mail: tao_jz@nxu.edu.cn

* 通信作者: 陶金忠

onance

围产期是奶牛整个泌乳周期中最至关重要的一个时期,在这个阶段,奶牛经历了巨大的代谢变化,主要表现在干物质摄入减少而能量需求增加所致的能量负平衡(NEB)^[1]。大多数研究表明,围产期奶牛能量代谢特点是干物质摄入减少及能量负平衡,在正常生理情况下,母牛分娩后的4~6周出现泌乳高峰,但其食欲恢复和采食量的高峰约在产犊后8~10周。因此,在产犊后10周内奶牛摄入的能量不能满足泌乳消耗的需要,如果奶牛泌乳量过高,将势必加剧这种不平衡,继而引发酮病、脂肪肝等围产期能量代谢障碍性疾病^[2],给奶牛业带来严重的经济损失。目前,对于奶牛产后NEB的发生规律的研究,已经从最初的生理和生化水平,发展到现在的分子水平,但其精确的发生机制仍未完全清楚。

代谢组学技术已经逐渐成为探索代谢物质新陈代谢过程的重要技术平台,该技术可全面地展示机体所有代谢物在生理或病理状态下的代谢变化,以及研究细胞代谢过程中最接近末端的代谢物,因此应用代谢组学的理论和技术将有助于全面揭示奶牛产后NEB的发生机制、细胞代谢过程、系统功能联系网络,对进一步丰富和发展奶牛产后NEB理论具有非常重要的科学意义。近年来已建立的代谢组学技术平台有高分辨核磁共振(NMR)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)、液相色谱-质谱联用(LC-MS)

等^[3]。NMR技术是最早用于代谢组学的分析方法,具有分辨率高、不破坏样品结构和性质且能对样品实现非选择性分析等优点^[4]。本试验采用¹H-NMR代谢组学技术分析奶牛分娩后血浆代谢物的变化,寻找奶牛分娩后不同阶段的差异代谢物,以期从代谢组角度阐明奶牛分娩后能量缺乏的机制,为进一步缓解能量负平衡和预防奶牛酮病与脂肪肝等围产期能量代谢障碍性疾病的发生提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

德国 Bruker AVIII 600 MHz NMR 谱仪(配备超低温探头),美国 BECKMAN 公司 OPTIME L-80 低温高速离心机, DW-86L628 海尔超低温冰箱。100 mL 45 mmol · L⁻¹ Na⁺/K⁺ 缓冲液(K₂HPO₄ · 3H₂O 0.830 g, NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.139 g, D₂O:100 mL, NaCl 0.9 g)。

1.2 动物和样品采集

试验奶牛来自宁夏某规模化养殖厂,选择9头2~3胎的荷斯坦分娩奶牛,分别在产后第1、7、14和28天尾静脉采血,3 000 r · min⁻¹,4 °C离心10 min制备血浆,于-80 °C冰箱保存。血浆样品和核磁编号见表1。

表1 产后奶牛血浆样品和核磁编号

Table 1 Codes of plasma samples and ¹H-NMR form postpartum cows

采样时间 Sampling time	编号 Codes								
产后1天	1 011	1 012	1 013	1 014	1 015	1 016	1 017	1 018	1 019
产后7天	1 021	1 022	1 023	1 024	1 025	1 026	1 027	1 028	1 029
产后14天	1 031	1 032	1 033	1 034	1 035	1 036	1 037	1 038	1 039
产后28天	1 051	1 052	1 053	1 054	1 055	1 046	1 047	1 048	1 049

1.3 血浆样品的¹H-NMR分析

所有血浆样品的一维¹H-NMR谱的采集在配备有超低温探头的 Bruker AVIII 600 MHz NMR 谱仪(Bruker Biospin, 德国)上完成,质子共振频率为600.13 MHz,实验温度为298 K。每个血样精确吸取180 μL样品和360 μL Na⁺/K⁺缓冲液(45 mmol · L⁻¹),4 °C条件下离心10 min(12 000 r · min⁻¹),抽取上清液500 μL至5 mm核磁管^[5],

混匀后进行核磁检测,记录所有检测样品的¹H-NMR谱。

1.4 ¹H-NMR数据采集和数据预处理

使用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)序列 [RD-90°-(τ-180°-τ)n-ACQ]采集小分子信息。参数设置如下:谱宽(SW)为20 ppm,等待时间(RD)为2 s,90°脉宽为11.5 μs,采样点数为32 K,自由感应衰减(FID)累计信号采集次数为128次。回波演化时

间(d20)为 350 μ s,回波循环(L4)为 100,总回波时间(2n τ)为 70 ms^[6]。

¹H-NMR 谱和基线校正均使用 TopSpin 软件人工处理,用葡萄糖(δ 5.23)的信号进行化学位移定标,然后对核磁谱图(δ 8.5 ~ 0.6)进行积分(积分区间大小为 0.004 ppm)和化学位移校正。为了消除因样品的浓度差异造成的分析误差,对所得数据进行归一化。目前常用的归一化方法有总面积归一化^[7]、概率熵归一化^[8]、重量归一化^[9]、向量归一化和不归一化^[7]等。不同归一化方法各有其优缺点,适用的对象和条件不尽相同。其中概率熵归一化(PQN)是在总面积归一化的基础上,通过计算谱图中熵幅度的分布来寻找样品的最佳熵值(即最佳稀释因子)来还原样品的真实浓度。当样品中出现变化剧烈的信号时,概率熵归一化的方法比较适用,有利于分析其他容易被忽略的代谢物的变化规律。对于本项目的血浆样品,葡萄糖的浓度可能发生急剧变化,因此概率熵归一化(PQN)是合适的选择。

1.5 ¹H-NMR 谱数据的统计学分析

将归一化处理后的数据导入 SIMCA-P+ 软件包(V. 11.0, Umetrics, Sweden)进行主成分分析(PCA),偏最小二乘判别分析(PLS-DA)和正交化偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)^[10]。采用 PCA 的方法来评价组间样本的总体分布状况,观察自然凝集状态和确定是否存在奇异样本;用 PLS-DA 和 OPLS-DA 鉴别区分各组间代谢物贡献值,找到最相关的差异代谢物。对 PLS-DA 和 OPLS-DA 模型使用 7 层交叉验证(7-fold cross validation),其中 PLS-DA 使用了排列实验进行验证(重复次数 $n = 200$),OPLS-DA 使用交叉验证残差的方差分析(CV-ANOVA)进行验证。

OPLS-DA 结果用得得分图和相关系数负载图来表示,相关系数负载图是将每一个变量的 loading 值与其标准偏差进行数据的回溯转换,最后导入基于 MATLAB 的多变量分析负载作图软件系统中作图。该图用颜色对代谢物相关系数的绝对值进行编码,红色表示该代谢物对组间的区分具有显著贡献,而蓝色表示该代谢物对组间的区分无显著性的贡献。此外,通过皮尔森相关系数显著性差异检测(Pearson's Product-moment correlation coefficient),并综合考虑组内样本数 N ,确定评估代谢物含量是否具有显著性变化的阈值($P \leq 0.05$)。由于样本数 $N=9$,相关系数的阈值为 0.632,因此本试

验选择相关系数绝对值 $|r| \geq 0.632$ 的代谢物作为显著性差异代谢物。

1.6 产后奶牛差异代谢物的代谢通路及变化趋势

将鉴定后的生物标志物输入 KEGG 数据库(<http://www.kegg.com>),选择 Bos taurus (cow 通路)为通路路径库,进行代谢通路的查询,并将各差异代谢物的峰面积平均值作为相对含量,绘制奶牛产后各差异代谢物与产后天数曲线图,分析各差异代谢物的变化趋势。

2 结果

2.1 产后奶牛血液代谢物的¹H-NMR 建立与指认

通过对原始谱图的分析,发现第 2 组 24 号样品(核磁编号 1 024)的水峰抑制效果(图 1 中桔黄色谱图)与其他样品差别较大,其原因可能是由于自动进样时匀场差异导致水峰压制效果较差,因此作为异常点在后续分析中去除,建立奶牛血样的代表性的¹H 核磁谱图(图 2)。根据每个代谢物的化学位移,裂峰情况及偶合常数,结合文献^[11-12]数据,并参照 Chenomx NMR Suite(加拿大 Chenomx Inc. 公司)数据库,对所得的图谱(图 2)进行指认。

2.2 代谢物的统计学分析

为了从代谢层面判断奶牛产后机能的恢复情况,本试验以产后第 1 天作为对照组,分别与产后第 7 天、第 14 天和第 28 天的核磁数据导入 SIMCA-P+ 软件包进行 PCA、PLS-DA 和 OPLS-DA 分析,并采用排列试验(permutation test)和 CV-ANOVA (variance analysis of the cross-validated residuals)^[12],分别对 PLS-DA 和 OPLS-DA 模型的有效性进行检验,各组 PCA、PLS-DA 和 OPLS-DA 得分图见图 3。

奶牛产后第 1 天与产后第 7 天 PLS-DA 模型 $R^2 X=0.352$, $Q^2=0.222$, $Q^2 < 0.4$,表明模型预测能力较差,并且未通过排列实验验证,PLS-DA 模型无效;OPLS-DA 模型中 $R^2 X=0.352$, $Q^2=0.452$,虽然 $Q^2 > 0.4$,且 CV-ANOVA 检验中 $P=0.100$ ($P < 0.05$ 模型才有效),因此 OPLS-DA 模型也无效,后续分析中止,这表明奶牛产后 1 天与 7 天血液代谢物之间无显著差异。

奶牛产后第 1 天与产后第 14 天 PLS-DA 模型 $R^2 X=0.251$, $Q^2=0.431$, $Q^2 > 0.4$,表明具有较好的预测能力,但未通过排列实验,OPLS-DA 模型 $R^2 X=0.251$, $Q^2=0.663$, $Q^2 > 0.4$,且 CV-ANOVA

验证模型有效($P=0.05$),表明奶牛产后第 1 天与第 14 天之间血液代谢物存在明显差异。

奶牛产后第 1 天与产后第 28 天 PLS-DA 模型 $R^2 X=0.579, Q^2=0.844, Q^2>0.4$,但未通过排列

实验, OPLS-DA 模型 $R^2 X=0.358, Q^2=0.681, Q^2>0.4, CV\text{-ANOVA}$ 验证模型有效($P=0.03$),表明奶牛产后第 1 天与第 28 天之间血液代谢物存在明显差异。

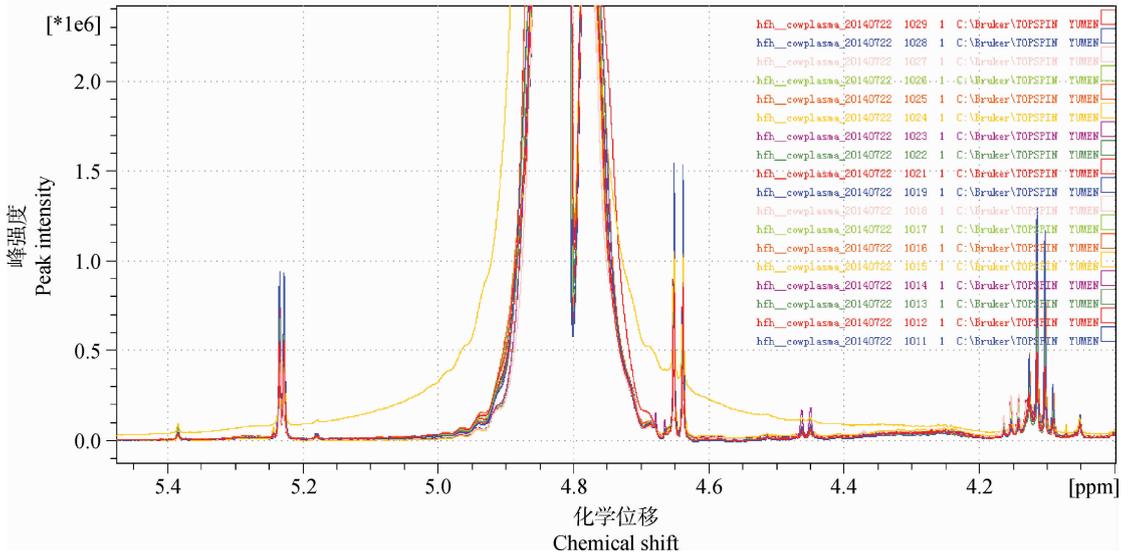
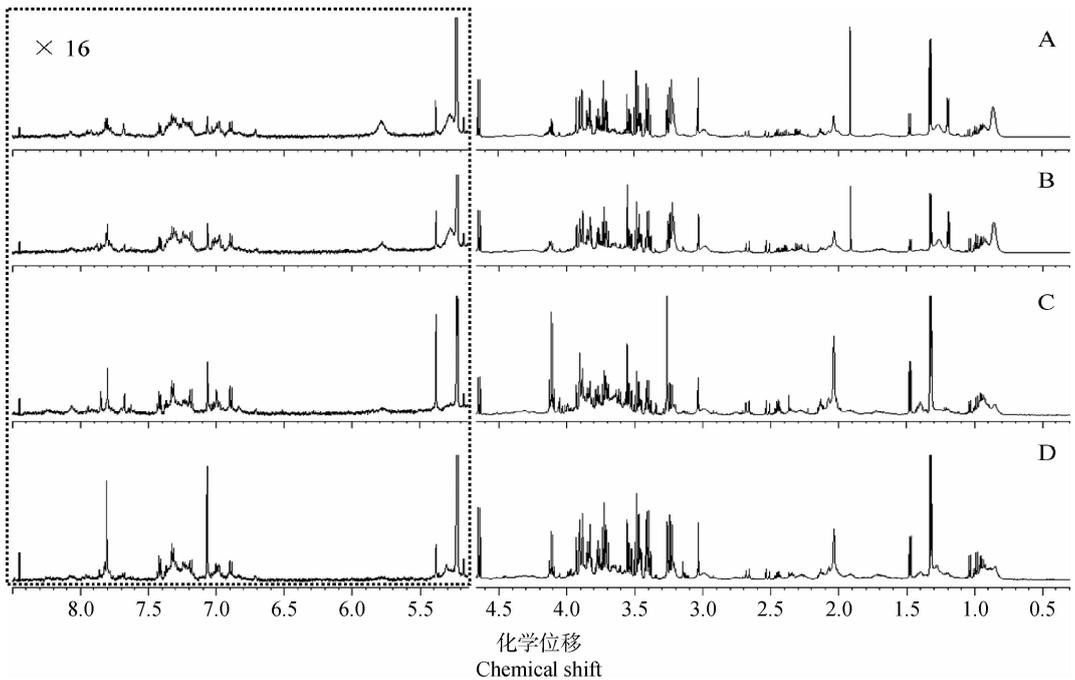


图 1 产后奶牛血样原始¹H 核磁图谱

Fig. 1 Original ¹H-NMR spectras of plasma samples from postpartum cows

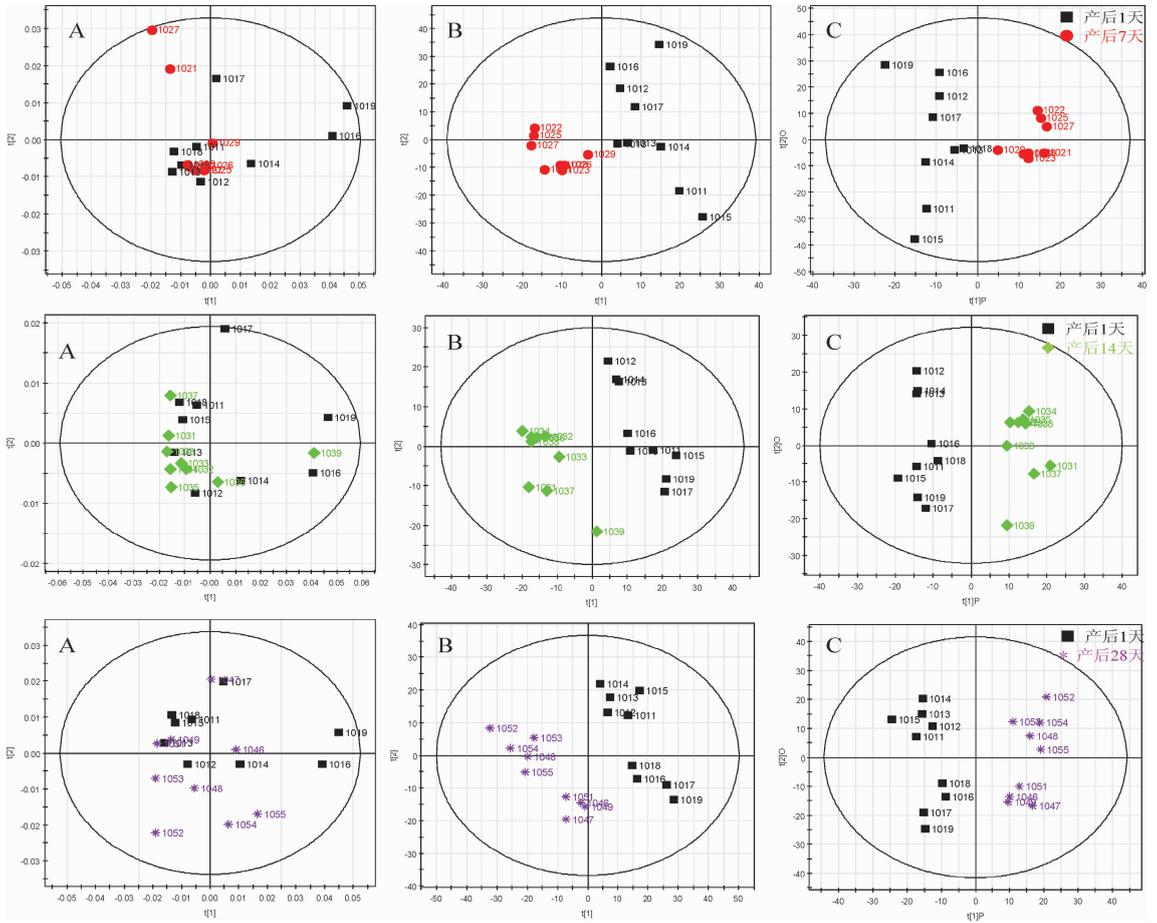


A. 母牛生产后第 1 天; B. 母牛生产后第 7 天; C. 母牛生产后第 14 天; D. 母牛生产后第 28 天。虚线框内谱图为 16 倍纵向放大

A. The 1st day after delivery; B. The 7th day after delivery; C. The 14th day after delivery; D. The 28th day after delivery. The region (dashed box) was longitudinally magnified 16 times

图 2 产后牛血样的代表性的¹H 核磁谱图(600 MHz)

Fig. 2 Representative 600 MHz ¹H-NMR spectras of plasma samples from postpartum cow



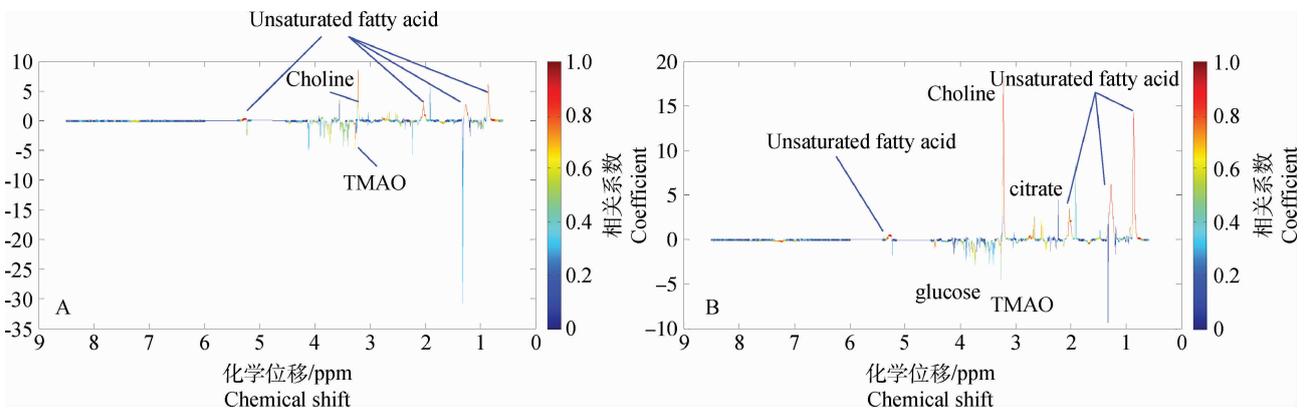
A. PCA 得分图; B. PLS-DA 得分图; C. OPLS-DA 得分图
 A. PCA scores plot; B. PLS-DA scores plot; C. OPLS-DA scores plot
 图 3 奶牛分娩后 1 天与第 7、14 和 28 天血浆 ¹H-NMR 得分图

Fig. 3 Scores plot based on ¹H-NMR spectra of plasma obtained from 1st day after delivery compared with that of 7th, 14th and 28th day, respectively

2.3 显著性差异代谢物的归属

相关系数负载图和显著性差异代谢物归属分别

见图 4、表 2 和表 3, 结果显示, 奶牛分娩后第 1 天与第 14 天显著性差异代谢物为 4 种不饱和脂肪酸、胆



A. 产后第 1 天与第 14 天; B. 产后第 1 天与第 28 天
 A. The 1st day vs the 14th day after delivery, B. The 1st day vs the 28th day after delivery

图 4 相关系数负载图
 Fig. 4 Correlation coefficient load

表 2 奶牛产后第 1 天与第 14 天显著性差异代谢物归属表

Table 2 ¹H-NMR signal assignments of significant differential metabolites between 1st day and 14th day after delivery

编号 Key	化学位移 δ ¹ H	基团 Moieties	代谢物 Metabolites
1	0.88 (b)	-CH ₃	Unsaturated fatty acids ↑ 不饱和脂肪酸
	1.26 (b)	-(CH ₂) _n	
	2.03 (b)	-CH ₂ -C=C-	
	2.75 (b)	=C-CH ₂ -C=	
	5.27 (b)	-CH=CH ₂ -	
2	3.23 (s)	-N(CH ₃) ₃	Choline ↑ 胆碱
	3.53 (m)	β-CH ₂	
	4.06 (m)	α-CH ₂	
3	3.26(s)	-N(CH ₃) ₃	TMAO ↓ 氧化三甲胺

峰的多重性:s.单峰;m.多重峰,b.广泛共鸣峰;“↓”表示分娩后第 14 天相对于分娩后第 1 天含量下降;“↑”表示分娩后第 14 天相对于分娩后第 1 天含量增加

Multiplicity;s. Singlet;m. Multiplet;b. Broad peak;TMAO. Trimethylamine-N-oxide;Compared to 1st day after delivery,“↓” denote down regulated expression,and“↑”denote up-regulated expression at 14th day after delivery

表 3 奶牛产后第 1 天与第 28 天显著性差异代谢物归属表

Table 3 ¹H-NMR signal assignments of significant differential metabolites between 1st day and 28th day after delivery

编号 Key	化学位移 δ ¹ H	基团 Moieties	代谢物 Metabolites
1	0.88 (b)	-CH ₃	Unsaturated fatty acids ↑ 不饱和脂肪酸
	1.26 (b)	-(CH ₂) _n	
	2.03 (b)	-CH ₂ -C=C-	
	2.75 (b)	=C-CH ₂ -C=	
	5.27 (b)	-CH=CH ₂ -	
2	2.52(d)	(a,b)half-CH ₂	Citrate ↑ 三羧酸
	2.67 (d)	(a,b)half-CH ₂	
3	3.23 (s)	-N(CH ₃) ₃	Choline ↑ 胆碱
	3.53 (m)	β-CH ₂	
	4.06 (m)	α-CH ₂	
4	3.26(s)	-N(CH ₃) ₃	TMAO ↓ 氧化三甲胺
	3.26 (dd)	3-CH	
5	3.40 (dd)	5-CH	β-Glucose ↓ β-葡萄糖
	3.46 (dd)	6-CH	
	3.47 (dd)	4-CH	
	3.72 (dd)	half-CH ₂	
	3.89 (dd)	half-CH ₂	
	4.45(d)	2-CH	

峰的多重性:s.单峰;d.双峰;dd.二联的双重峰;m.多重峰,b.广泛共鸣峰;“↓”表示分娩后 28 天相对于分娩后第 1 天含量下降;“↑”表示分娩后 28 天相对于分娩后第 1 天含量增加

Multiplicity;s. Singlet;d. Doublet;dd. Doublet of doublets;m. Multiplet;b. Broad peak;TMAO. Trimethylamine-N-oxide;Compared to 1st day after delivery,“↓” denote down regulated expression,and“↑”denote up-regulated expression at 28th day after delivery

碱和氧化三甲胺,其中 4 种不饱和脂肪酸和胆碱表达上调,氧化三甲胺表达下调;与分娩后第 28 天差异代谢物为 4 种不饱和脂肪酸、胆碱、氧化三甲胺、三羧酸和葡萄糖,其中 4 种不饱和脂肪酸、胆碱和三羧酸表达上调,氧化三甲胺和葡萄糖表达下调。

2.4 产后奶牛差异代谢物变化趋势

从表 4 和图 5 可以看出,奶牛产后 4 种不饱和脂肪酸(UFAs1、UFAs2、UFAs3 和 UFAs4)、三羧酸

酸、胆碱、氧化三甲胺和葡萄糖含量随产后时间的延长发生了不同程度变化,其中 4 种不饱和脂肪酸(UFAs1、UFAs2、UFAs3 和 UFAs4)、三羧酸和胆碱呈逐渐升高趋势,而氧化三甲胺和葡萄糖呈逐渐降低趋势。从相关系数负载图可知,4 种不饱和脂肪酸、氧化三甲胺和葡萄糖在产后第 14 天已经出现了显著性变化,至第 28 天,三羧酸和葡萄糖含量也相继出现显著性变化。

表 4 奶牛产后第 1、7、14 和 28 天差异代谢物相对含量

Table 4 Relative content of differential metabolites at 1st, 7th, 14th and 28th day after delivery

	第 1 天 The 1 st day	第 7 天 The 7 th day	第 14 天 The 14 th day	第 28 天 The 28 th day
UFAs1	0.043 9±0.008 6	0.041 1±0.015 0	0.059 9±0.008 7	0.080 6±0.024 5
UFAs2	0.030 3±0.005 2	0.033 3±0.003 3	0.040 1±0.004 5	0.052 5±0.015 6
UFAs3	0.018 9±0.001 8	0.021 0±0.002 1	0.023 2±0.002 6	0.024 9±0.002 1
UFAs4	0.003 0±0.000 5	0.003 6±0.000 4	0.004 2±0.000 5	0.005 1±0.001 5
Citrate	0.003 1±0.001 1	0.003 9±0.001 4	0.004 4±0.000 9	0.005 0±0.001 7
Choline	0.013 9±0.004 0	0.014 8±0.003 0	0.018 6±0.002 4	0.025 2±0.008 8
TMAO	0.007 7±0.001 2	0.006 4±0.002 0	0.005 8±0.000 9	0.005 9±0.001 0
Glucose	0.003 7±0.000 8	0.003 1±0.001 0	0.002 8±0.000 5	0.002 7±0.000 4

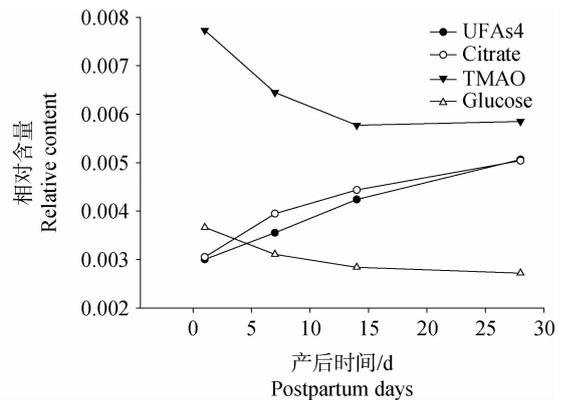
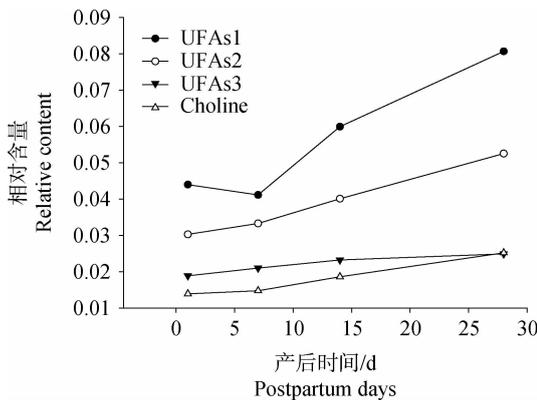


图 5 奶牛产后不同时间血液差异代谢物变化趋势

Fig. 5 Change trend of differential metabolites at different time after delivery

3 讨论

血糖含量变化是机体对糖的吸收、运转和代谢的动态平衡状态的反映,循环血液中葡萄糖的浓度体现奶牛的能量代谢水平。奶牛产后葡萄糖主要用于合成乳糖,随着产后泌乳量的持续增高,机体对葡萄糖的需要量也不断增加,奶牛在这个阶段容易发生能量负平衡^[13]。奶牛分娩后 4~6 周出现泌乳高

峰,但其食欲恢复和采食量的高峰在 8~10 周,食欲恢复远远落后于能量的需要,如果此阶段泌乳量过高,将势必加剧这种能量负平衡,血糖急剧下降。本试验结果也显示奶牛产后血糖呈下降趋势,产后第 28 天血糖含量显著低于产后第 1 天,这表明奶牛在产后 4 周左右出现泌乳高峰,从而加剧了能量的负平衡状态。

血液中血糖浓度急剧下降,为了满足泌乳头几

周的能量需要,奶牛从脂肪组织中动员大量的脂肪酸,结果导致循环中游离脂肪酸浓度(NEFA)急剧升高,被动员的体脂通过血液进入其他组织,20%被乳腺利用,其余大部分被肝吸收^[14],本试验结果也显示奶牛产后第 28 天内不饱和游离脂肪酸浓度持续升高,且产后第 14 天后显著升高,这说明奶牛产后随着泌乳量的逐渐升高而体脂大量动员。

NEFA 进入肝后首先在脂酰辅酶 A 合成酶作用下活化为脂酰脂酰辅酶 A,进一步代谢包括 3 种途径:一是 NEFA 被彻底氧化成二氧化碳,所产生的能量被肝利用;二是部分氧化生成酮体,被肝外组织利用;三是再酯化形成甘油三酯、磷脂或胆固醇酯,用于极低密度脂蛋白的组装,转运到肝外组织利用或在肝中蓄积。反刍动物肝脂肪酸氧化或以 VLDL 的形式输出甘油三酯的能力是有限的^[15],因此,如果肝摄入过多的脂肪酸,超过了肝输出或氧化脂肪酸的能力,那么脂肪酸就会以甘油三酯的形式在肝中蓄积形成脂肪肝,而且脂肪酸的不完全氧化产物形成酮体,可能导致酮病发生^[16]。而本试验中奶牛产后血液中三羧酸含量逐渐升高,而酮体和甘油三脂未见明显变化,这表明奶牛产后在 28 d 内体脂动员生成的 NEFA 除一小部分合成乳脂外,大部分 NEFA 经过 β -氧化途径被彻底氧化,释放出大量能量以缓解产后能量的负平衡。

胆碱是动物生长发育所必需的水溶性维生素,其在动物脂肪沉积的调控中起非常重要的作用。胆碱在胆碱脱氢酶和甜菜醛脱氢酶作用下氧化生成甜菜碱,高半胱氨酸在甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶作用下,可由甜菜碱提供活性甲基转变为蛋氨酸,继而在甲硫氨酸腺苷转移酶作用下转变为 S-腺苷甲硫氨酸,S-腺苷甲硫氨酸是体内重要的活性甲基供体,其参与了机体内众多的甲基代谢过程,在脂肪酸分解代谢过程中,肉碱是长链脂肪酸进入细胞线粒体内进行脂肪酸氧化的重要跨膜转运载体,在脂肪酸氧化中起关键作用。1 分子肉碱的合成需要 3 分子 S-腺苷甲硫氨酸提供活性甲基供体。由此可见胆碱可通过胆碱氧化途径生成甜菜碱,继而通过蛋氨酸再甲基化途径间接参与 S-腺苷甲硫氨酸的合成,进而通过以 S-腺苷甲硫氨酸为活性甲基供体的甲基代谢促进肉碱合成,增强组织中脂肪酸的氧化,提高组织对脂肪酸的降解^[17-19]。增加饲料胆碱水平可明显增强动物体内脂肪酸的氧化分解^[20]。据此可以推测,奶牛产后血液中胆碱含量持续升高提示

脂肪酸氧化分解持续增强。

已有研究表明,胆碱在肠道内细菌的作用下,代谢生成三甲胺(TMA)^[21],后者在黄素单加氧酶(flavine monooxygenase)的作用下在肝被氧化生成氧化三甲胺(TMAO),因此胆碱水平升高并伴随氧化三甲胺水平降低提示肠道菌群失调^[22]。本试验结果显示,奶牛在产后血液中胆碱持续升高,TMAO 含量持续下降,且在 14 d 后出现明显改变,可能与瘤胃微生物菌群失调有关,而瘤胃微生物对葡萄糖的异生具有重要的生物学意义,产后瘤胃微生物菌群的失调可进一步加剧能量的负平衡。

综上所述,奶牛分娩后 28 d,随着乳量的不断增加,血糖含量降低趋势,呈现出能量负平衡状态,与此同时血液中不饱和脂肪酸、三羧酸、胆碱的含量逐渐升高,TMAO 逐渐降低,说明机体应答性的上调了脂肪分解、脂肪酸氧化、胆碱氧化、蛋氨酸再甲基化和甲基代谢途径以缓解奶牛分娩后的能量负平衡状态。

4 结 论

采用¹H-NMR 代谢组学技术分析奶牛分娩后不同阶段血浆小分子代谢物的变化趋势及其对能量代谢通路的影响,筛选出 8 种差异标志物,代谢通路分析显示奶牛分娩后逐渐呈现出能量负平衡状态,机体通过上调脂肪分解、脂肪酸氧化、胆碱氧化、蛋氨酸再甲基化和甲基代谢途径来进行调节。研究结果有望为奶牛的产后保健和预防奶牛酮病与脂肪肝等围产期能量代谢障碍性疾病的发生提供理论依据。

参考文献(References):

- [1] FATIMA A, WATERS S, O'BOYLE P, et al. Alterations in hepatic miRNA expression during negative energy balance in postpartum dairy cattle[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 28.
- [2] McCARTHY S D, WATERS S M, KENNY D A, et al. Negative energy balance and hepatic gene expression patterns in high-yielding dairy cows during the early postpartum period: a global approach[J]. *Physiol Genomics*, 2010, 42(3): 188-199.
- [3] WU H, XUE R Y, DONG L, et al. Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 648(1): 98-104.

- [4] 张艳花,王东琴,李晓伟,等. 基于¹H-NMR 代谢组学技术寻找 CCl₄ 致大鼠急性肝损伤的代谢标志物[J]. 药物评价研究, 2014, 37(1): 11-16.
ZHANG Y H, WANG D Q, LI X W, et al. Searching for biomarkers of CCl₄-induced acute liver injury in rats based on ¹H-NMR metabonomic approach[J]. *Drug Evaluation Research*, 2014, 37(1): 11-16. (in Chinese)
- [5] HUANG C Y, LEI H H, ZHAO X J, et al. Metabolic influence of acute cyadox exposure on Kunming mice [J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(1): 537-545.
- [6] ZHAO X J, HAO F H, HUANG C Y, et al. Systems responses of rats to mequindox revealed by metabolic and transcriptomic profiling [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(9): 4712-4721.
- [7] DAI H, XIAO C N, LIU H B, et al. Combined NMR and LC-MS analysis reveals the metabonomic changes in salvia miltiorrhiza bunge induced by water depletion[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(3): 1460-1475.
- [8] ZHANG J, ZHANG Y, DU Y, et al. Dynamic metabonomic responses of tobacco (nicotiana tabacum) plants to salt stress[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(4): 1904-1914.
- [9] CHEN F, ZHANG J, SONG X, et al. Combined metabonomic and quantitative real-time PCR analyses reveal systems metabolic changes of Fusarium graminearum induced by Tri5 gene deletion[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(5): 2273-2285.
- [10] BYLESJO M, RANTALAINEN M, CLOAREC O, et al. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification[J]. *J Chemometr*, 2006, 20(8-10): 341-351.
- [11] TRYGG J, HOLMES E, LUNDSTEDT T. Chemometrics in metabonomics[J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(2): 469-479.
- [12] FONVILLE J M, RICHARDS S E, BARTON R H, et al. The evolution of partial least squares models and related chemometric approaches in metabonomics and metabolic phenotyping [J]. *J Chemometr*, 2010, 24(11-12): 636-649.
- [13] MULLIGAN F J, DOHERTY M L. Production disease of the transition cow[J]. *Vet J*, 2008, 176(1): 3-9.
- [14] EMERY R S, LIESMAN J S, HERDT T H. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver[J]. *J Nutr*, 1992, 122(3 Suppl): 832-837.
- [15] GERLOFF B J, HERDT T H, EMERY R S. Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1986, 188(8): 845-850.
- [16] GRUMMER R R. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 1993, 76(12): 3882-3896.
- [17] CARTER A L, FRENKEL R. The relationship of choline and carnitine in the choline deficient rat[J]. *J Nutr*, 1978, 108(11): 1748-1754.
- [18] DAILY III J W, HONGU N, MYNATT R L, et al. Choline supplementation increases tissue concentrations of carnitine and lowers body fat in guinea pigs [J]. *J Nutr Biochem*, 1998, 9(8): 464-470.
- [19] SHEARD N F, KRASIN B. Restricting food intake does not exacerbate the effects of a choline-deficient diet on tissue carnitine concentrations in rats[J]. *J Nutr*, 1994, 124(5): 738-747.
- [20] 马维英,王爽,沈军达,等. 饲料胆碱水平对绍兴鸭脂质代谢的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(2): 233-242.
MA W Y, WANG S, SHEN J D, et al. Effect of choline level in diet on lipid metabolism in Shaoxing ducks during the initial egg-laying period [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(2): 233-242. (in Chinese)
- [21] AL-WAIZ M, MIKOV M, MITCHELL S C, et al. The exogenous origin of trimethylamine in the mouse [J]. *Metabolism*, 1992, 41(2): 135-136.
- [22] WANG Z, KLIPFELL E, BENNETT B J, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 57-63.

(编辑 白永平)