

基于胰岛素样生长因子-I 信号通路体外研究 丁酸钠促进羔羊瘤胃上皮细胞增殖的机理

张雅丽 刘理想 孙大明 刘军花*

(国家动物消化道营养国际联合研究中心,江苏省消化道营养与动物健康重点实验室,
南京农业大学动物科技学院消化道微生物研究室,南京 210095)

摘要: 本试验基于胰岛素样生长因子-I (IGF-I) 信号通路通过体外试验研究丁酸钠促进羔羊瘤胃上皮细胞增殖的机理。试验选取 4 头健康、胎次一致、体重相近的 49 日龄公羔羊,屠宰采集瘤胃上皮组织,利用胰酶消化获取原代瘤胃上皮细胞。待原代瘤胃上皮细胞贴壁后,将细胞分为 4 组,分别添加 0、2、4、8 mmol/L 丁酸钠。为了进一步研究 IGF-I 信号通路在添加丁酸钠促进瘤胃上皮细胞增殖中的作用,将细胞分为 3 组,丁酸钠组添加 4 mmol/L 丁酸钠,抑制剂组添加 4 mmol/L 丁酸钠+2.5 μ mol/L 胰岛素样生长因子-I 受体(IGF-IR)抑制剂,对照组加入相同体积的 DMEM。所有细胞试验重复 4 次。细胞处理 24 h 后收集细胞液用于测定 IGF-I 浓度,收集细胞检测细胞周期以及增殖和凋亡相关基因的表达。结果表明:1) 0 和 8 mmol/L 丁酸钠组 G0/G1 期细胞比例显著高于 2 和 4 mmol/L 丁酸钠组($P<0.05$),且 8 mmol/L 丁酸钠组显著高于 0 mmol/L 丁酸钠组($P<0.05$)。4 mmol/L 丁酸钠组 S 期细胞比例显著高于 0、2 和 8 mmol/L 丁酸钠组($P<0.05$)。8 mmol/L 丁酸钠组 G2/M 期细胞比例显著低于 0、2 和 4 mmol/L 丁酸钠组($P<0.05$)。2) 8 mmol/L 丁酸钠组的细胞周期蛋白 A2(Cyclin A2) mRNA 相对表达量显著低于 0、2 和 4 mmol/L 丁酸钠组($P<0.05$),8 mmol/L 丁酸钠组的细胞周期蛋白依赖性激酶 I (CDK I) mRNA 相对表达量显著低于 0 和 2 mmol/L 丁酸钠组($P<0.05$),2 和 4 mmol/L 丁酸钠组的细胞周期蛋白 D I (Cyclin D I) mRNA 相对表达量显著高于 0 和 8 mmol/L 丁酸钠组($P<0.05$),4 mmol/L 丁酸钠组的细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4) mRNA 相对表达量显著高于 0、2 和 8 mmol/L 丁酸钠组($P<0.05$),2 和 4 mmol/L 丁酸钠组的细胞周期蛋白依赖性激酶 6(CDK6) mRNA 相对表达量显著高于 8 mmol/L 丁酸钠组($P<0.05$)。3) 8 mmol/L 丁酸钠组的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)和 B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)的 mRNA 相对表达量显著高于 0、2 和 4 mmol/L 丁酸钠组($P<0.05$)。4) 丁酸钠组的 IGF-IR mRNA 相对表达量和细胞培养液中 IGF-I 浓度显著高于对照组和抑制剂组($P<0.05$)。丁酸钠组 Cyclin D I 和 CDK4 mRNA 相对表达量显著高于对照组和抑制剂组($P<0.05$)。由此可见,添加 4 mmol/L 丁酸钠可以促进羔羊瘤胃上皮细胞增殖,并且主要是通过 IGF-I 信号通路来发挥作用,说明丁酸钠促进瘤胃上皮生长的作用机制与 IGF-I 信号通路密切相关。

关键词: 丁酸钠;瘤胃上皮细胞;增殖;凋亡;IGF-I;羔羊

中图分类号:S826

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)03-1687-12

收稿日期:2020-08-19

基金项目:南京农业大学动物科技学院青年人才拔尖项目(DKQB201904)

作者简介:张雅丽(1997—),女,山西孝义人,硕士研究生,从事反刍动物营养研究。E-mail: zhangyali8014@163.com

* 通信作者:刘军花,副教授,硕士生导师,E-mail: liujunhua0011@163.com

瘤胃作为反刍动物特有的消化吸收器官,其发育状态直接影响反刍动物生产性能和健康。而新生反刍动物瘤胃功能发育尚不完善,不能够充分地消化和吸收固体饲料^[1],所以在生产中通过营养手段促进幼龄反刍动物瘤胃的发育和成熟对提高动物生产性能和维持动物健康具有重要意义。瘤胃的发育成熟包括瘤胃微生物区系的建立健全及瘤胃上皮形态和功能的完善;瘤胃微生物区系的建立健全主要是保证高效消化植物性固体饲料产生挥发性脂肪酸(VFA)及菌体蛋白;瘤胃上皮功能的完善主要是保证高效吸收和代谢VFA,维持瘤胃稳态并为机体供能^[2]。瘤胃上皮发育与细胞周期的变化密切相关。细胞周期包括静止期(G_0 期)、分裂间期(G_1 期、S期和 G_2 期)和分裂期(M期)。其中, G_1 期调节细胞周期蛋白(Cyclin)D I和细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4的mRNA的大量表达,推动细胞周期快速进入S期^[3-4],在S期急速合成与DNA复制相关的酶类^[5-6]。

近期研究表明,口腔灌服0.36 g/kg BW的丁酸钠可促进哺乳期羔羊瘤胃乳头的生长,并且该过程与瘤胃上皮细胞增殖的加速和细胞凋亡的抑制相关^[7-8],表明灌服适宜剂量丁酸钠对瘤胃上皮的发育有促进作用^[9],但是灌服不同剂量丁酸钠对瘤胃上皮细胞的促进作用及机制需进一步探明。研究证实,瘤胃发酵产物丁酸在体内条件下能够促进瘤胃上皮发育,但单独在体外试验中却没有发挥作用^[8],上述研究提示,丁酸促进瘤胃上皮发育并非直接作用,可能与某些激素调节作用密切相关^[9]。同时,相关研究发现,在培养基中添加适量的胎牛血清有利于细胞的生长,这可能是胎牛血清中的胰岛素样生长因子-I(IGF-I)诱导细胞周期停滞的成纤维细胞Cyclin D I表达和Cyclin-CDK4复合物合成,进而加快细胞增殖,于是采用无血清的培养基培养细胞,单独添加适量的IGF-I后,2 d内细胞增殖明显加快,合成的DNA量也明显增多^[10]。

在单胃哺乳动物中,IGF-I可以通过分泌或旁分泌方式调节多种组织的细胞增殖和凋亡,IGF-I和胰岛素样生长因子-I受体(IGF-IR)结合后可以激活下游多条信号转导通路,将相关细胞信号从细胞外转导至细胞内,激活转录因子,发挥其促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的生物学效

应^[11-13]。而在新生反刍动物上尚未有相关报道。现有研究表明,灌服丁酸钠促进反刍动物瘤胃上皮细胞增殖与IGF-I、IGF-IR和瘤胃上皮增殖因子密切相关^[14-17]。因此,本文通过体外细胞试验,研究不同浓度丁酸钠对瘤胃上皮细胞周期进程和细胞凋亡的影响,再进一步探究丁酸钠通过IGF-I信号通路调控瘤胃上皮细胞增殖的作用机制,为生产中通过营养手段促进幼龄反刍动物瘤胃的发育和成熟、提高动物生产性能和维持动物健康提供依据。

1 材料与方法

1.1 瘤胃上皮细胞的分离与培养

试验选择4只49日龄,性别一致,体重分别为11.3、12.9、11.2和11.0 kg的湖羊公羔羊用于细胞试验。羔羊瘤胃上皮细胞的分离及培养参照Stumpff等^[18]和卢劲晔^[19]的方法进行了改进。具体操作步骤如下:

1)羔羊屠宰后立即分离瘤胃,用6倍的青链霉素的D-Hanks溶液多次冲洗,去除瘤胃内容物,然后再漂洗2~3次,能有效地去除残留的细菌和真菌。

2)在D-Hanks溶液中小心地用分离工具如剪刀、镊子、手术刀等钝性分离黏附的浆膜和肌肉,收集瘤胃腹囊部上皮组织块,然后再用D-Hanks溶液冲洗3次。

3)将瘤胃组织剪成小块平铺在锥形瓶底部,加入含0.25%的胰蛋白酶液(Gibco公司,美国)在37℃水浴中消化30 min,消化液没过组织即可,每隔5 min轻轻摇晃,使其消化均匀。

4)重复上述胰蛋白酶消化步骤3次;若中途胰蛋白酶溶液出现浑浊,可进行更换;等到瘤胃上皮组织出现黏稠且乳头发白,一般羊的瘤胃上皮组织的消化时间为2~3 h。

5)进入超净台操作,将上述处理后的上皮组织置于无菌烧杯中,用D-Hanks液清洗3次,更换烧杯再洗3次。

6)清洗后用含0.25%胰蛋白酶继续消化,直到看到有细碎细胞脱落(大部分是椭圆形细胞时开始收集),间隔5 min收集1次细胞消化液。

7)收集的细胞消化液用70 μ m的滤膜进行过滤(事先在收集的离心管中加入2 mL的血清)后,在1 500 r/min下离心8 min收集细胞。

8)用磷酸盐缓冲溶液(PBS)将收集到的细胞沉淀清洗2次,用完全培养基重悬细胞后离心,然后调节细胞密度至 1×10^6 个/mL,接种到培养瓶中(除培养基外还要加入10%的胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素),置于5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养。

9)培养1 h后,轻轻吸取上层悬液于另一培养瓶中继续培养,换瓶培养重复2次可有效去除成纤维细胞;换瓶培养48 h后,更换新的完全培养液继续培养(瓶底铺满明胶的培养瓶),5 d后细胞大量贴壁,形态均一,呈鳞片状,即绵羊羔羊瘤胃上皮细胞(图1)。细胞贴壁后可进行试验处理。

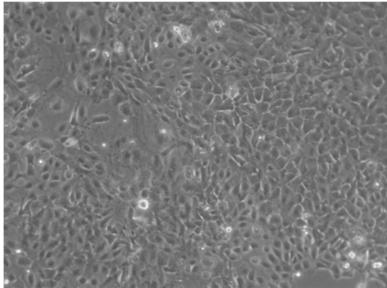


图1 羔羊瘤胃上皮细胞消化分离后120 h生长情况

Fig.1 Growth condition of lamb's rumen epithelial cell at 120 h after isolation

10)将细胞冻存,在铺层至80%~90%时,PBS清洗2次,用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的质量分数为0.25%的胰蛋白酶消化4 min,终止消化后离心处理,重悬于冻存液[胎牛血清:杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)=9:1],按照冻存步骤储存于液氮中。

1.2 丁酸钠和IGF-I R抑制剂溶液配制

丁酸钠溶液的配制:取1 g丁酸钠(Sigma公司,美国)溶解于11.35 mL的DMEM中,配制成浓度为800 mmol/L的母液,试验时再稀释成所需要的浓度。

IGF-I R抑制剂[鬼臼苦素(picropodophyllin, PPP)]溶液配制:将100 mg的IGF-I R抑制剂(Merck Millipore公司,美国)溶解在100 μL 的二甲基亚砜(Sigma公司,美国)中,然后加入9.5 mL的DMEM配制成浓度为 2.5×10^{-4} mol/L的母液。参照Duan等^[20]研究,试验时IGF-I R抑制剂需要配制成浓度为2.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的溶液。

1.3 体外细胞试验设计

待细胞贴壁大约80%后,更换培养基,将胎牛血清的浓度降至0.5%,饥饿12 h,使细胞同步化。然后将细胞分为4组,分别添加0、2、4、8 mmol/L丁酸钠。为了进一步研究IGF-I信号通路在添加丁酸钠促进瘤胃上皮细胞增殖中的作用,将细胞分为3组,丁酸钠组添加4 mmol/L丁酸钠,抑制剂组添加4 mmol/L丁酸钠+2.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ IGF-I R抑制剂(在添加丁酸钠前1 h加入IGF-I R抑制剂),对照组加入相同体积的DMEM。所有细胞试验重复4次。细胞处理24 h后收集细胞液用于测定IGF-I浓度,收集细胞检测细胞周期以及增殖和凋亡相关基因的表达。

1.4 细胞样品采集

瘤胃上皮细胞培养24 h后,吸取1 mL的细胞培养液置于-80 $^\circ\text{C}$ 保存,用于IGF-I浓度测定。剩余细胞培养液在1 500 r/min下离心10 min,获得细胞沉淀,同时在细胞培养瓶中加入胰蛋白酶将贴壁细胞消化下来,2种细胞沉淀混合后,用PBS(pH 7.4)洗涤2次。一部分细胞用75%的乙醇固定,4 $^\circ\text{C}$ 避光过夜用于细胞周期的检测;一部分细胞用TRIzol试剂重悬,置于-80 $^\circ\text{C}$ 保存用于RNA的提取。

1.5 细胞培养液中IGF-I浓度测定和细胞周期检测

使用细胞培养液IGF-I测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)检测细胞培养液中IGF-I浓度。使用细胞周期检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)检测细胞周期,采用FlowJo 7.6软件进行分析处理。

1.6 总RNA提取和cDNA合成

使用RNAiso Plus(TaKaRa公司,日本)从匀浆的瘤胃上皮组织中提取总RNA。使用Nano-Drop ND-1000分光光度计(Thermo Fisher Scientific公司,美国)测定提取的总RNA的浓度和纯度。所有样品的260/280 nm吸光度(OD)值介于1.80~2.10,表明RNA纯度高。用1.4%琼脂糖-甲醛凝胶评估RNA完整性。使用含RNA酶的TaKaRa反转录试剂盒将总RNA(1 μg)反转录成cDNA。

1.7 引物的合成和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

使用Primer Premier 6.0软件设计目的基因和

内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)的引物,并进行BLAST比对。本研究中使用的所有引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成,引物序列参见Liu等^[7]。使用Q5 Real-time PCR仪(Applied Biosystems公司,美国)对目的基因和*GAPDH*进行定量。qRT-PCR在20 μL反应体系中进行,含有2 μL cDNA,0.8 μL引物(反应中最终引物浓度为0.4 μmol/L)和SYBR Green PCR Master Mix(TaKaRa公司,日本)作为荧光染料。反应条件如下:95℃ 30 s 预变性;95℃ 5 s,60℃ 30 s,40个循环,95℃ 15 s;60℃ 1 min;95℃ 15 s。所有样品设3个重复。目的基因的mRNA相对表达量计算参照Niwińska等^[21]的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法。

1.8 数据分析

使用SPSS 25.0软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),并采用Duncan氏法进行多重比较。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P > 0.05$ 为差异不显著。使用GraphPad Prism 6进行绘图。

2 结果

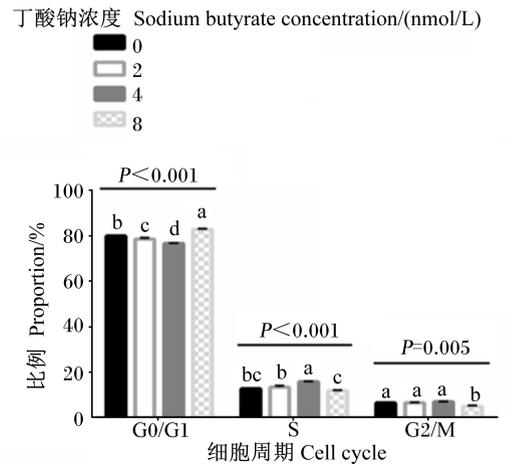
2.1 不同浓度的丁酸钠对瘤胃上皮细胞周期的影响

如图2所示,随着丁酸钠浓度的升高,G0/G1期和S期细胞比例呈二次变化($P < 0.05$)。0和8 mmol/L丁酸钠组G0/G1期细胞比例显著高于2和4 mmol/L丁酸钠组($P < 0.05$),且8 mmol/L丁酸钠组显著高于0 mmol/L丁酸钠组($P < 0.05$),而2 mmol/L丁酸钠组显著高于4 mmol/L丁酸钠组($P < 0.05$)。4 mmol/L丁酸钠组S期细胞比例显著高于0、2和8 mmol/L丁酸钠组($P < 0.05$),且8 mmol/L丁酸钠组显著低于2 mmol/L丁酸钠组($P < 0.05$)。随着丁酸钠浓度的升高,G2/M期细胞比例呈线性降低($P < 0.05$),8 mmol/L丁酸钠组显著降低于0、2和4 mmol/L丁酸钠组($P < 0.05$)。

2.2 不同浓度的丁酸钠对瘤胃上皮细胞*Cyclin*和*CDK* mRNA相对表达量的影响

如图3所示,随着丁酸钠浓度的升高,羔羊瘤胃上皮细胞*Cyclin A2*和*CDK I*的mRNA相对表达量呈线性降低($P < 0.05$)。8 mmol/L丁酸钠组的*Cyclin A2* mRNA相对表达量显著低于0、2和4 mmol/L丁酸钠组($P < 0.05$),8 mmol/L丁酸钠组的*CDK I* mRNA相对表达量显著低于0和

2 mmol/L丁酸钠组($P < 0.05$)。随着丁酸钠浓度的升高,羔羊瘤胃上皮细胞*Cyclin D I*、*CDK4*和*CDK6* mRNA相对表达量呈二次变化($P < 0.05$)。2和4 mmol/L丁酸钠组的*Cyclin D I* mRNA相对表达量显著高于0和8 mmol/L丁酸钠组($P < 0.05$),且8 mmol/L丁酸钠组显著低于0 mmol/L丁酸钠组($P < 0.05$);4 mmol/L丁酸钠组的*CDK4* mRNA相对表达量显著高于0、2和8 mmol/L丁酸钠组($P < 0.05$);2和4 mmol/L丁酸钠组的*CDK6* mRNA相对表达量显著高于8 mmol/L丁酸钠组($P < 0.05$)。不同浓度的丁酸钠对羔羊瘤胃上皮细胞*Cyclin B I*、*Cyclin E I*和*CDK2* mRNA相对表达量无显著影响($P > 0.05$)。



数据柱标相同小写字母表示差异不显著($P > 0.05$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下图同。

Value columns with the same small letter mean no significant difference ($P > 0.05$), while with different small letters mean significant difference ($P < 0.05$). The same as below.

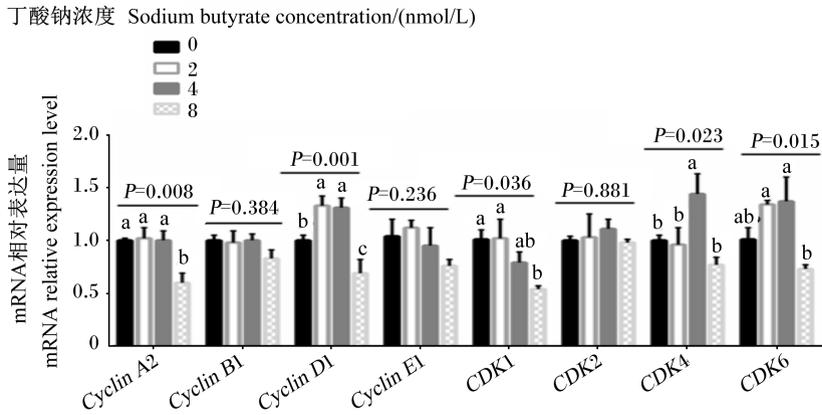
图2 不同浓度的丁酸钠对瘤胃上皮细胞周期的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of sodium butyrate on rumen epithelial cell cycle

2.3 不同浓度的丁酸钠对瘤胃上皮细胞凋亡相关基因mRNA相对表达量的影响

如图4所示,随着丁酸钠浓度的升高,羔羊瘤胃上皮细胞含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(*Caspase-3*)和B淋巴细胞瘤-2相关的X蛋白(*Bax*)mRNA相对表达量呈线性升高($P < 0.05$)。8 mmol/L丁酸钠组的*Caspase-3*和*Bax* mRNA相对表达量显著高于0、2和4 mmol/L丁酸钠组($P < 0.05$)。不同浓度的丁酸钠对羔羊瘤胃上皮细胞

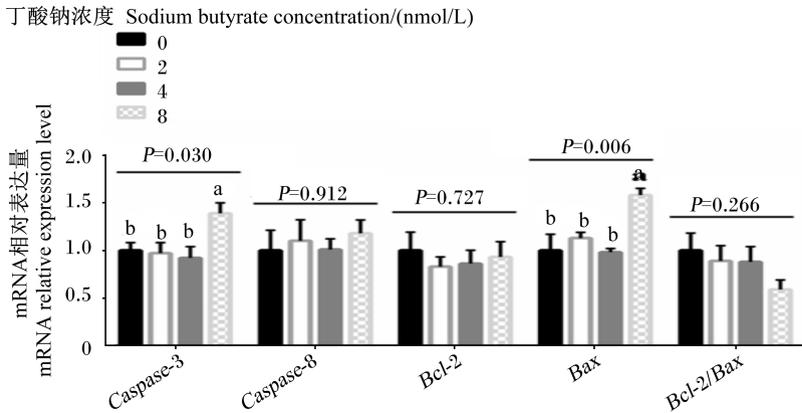
含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-8 (*Caspase-8*)、B 淋巴细胞瘤-2 (*Bcl-2*) 和 *Bcl-2/Bax* mRNA 相对表达量无显著影响 ($P>0.05$)。



Cyclin A2: 细胞周期蛋白 cyclin protein A2; *Cyclin B1*: 细胞周期蛋白 cyclin protein B1; *Cyclin D1*: 细胞周期蛋白 cyclin protein D1; *Cyclin E1*: 细胞周期蛋白 cyclin protein E1; *CDK1*: 细胞周期蛋白依赖性激酶 1 cyclin dependent protein kinases 1; *CDK2*: 细胞周期蛋白依赖性激酶 2 cyclin dependent protein kinases 2; *CDK4*: 细胞周期蛋白依赖性激酶 4 cyclin dependent protein kinases 4; *CDK6*: 细胞周期蛋白依赖性激酶 6 cyclin dependent protein kinases 6。图 6 同 The same as Fig.6.

图 3 不同浓度的丁酸钠对瘤胃上皮细胞 *Cyclin* 和 *CDK* mRNA 相对表达量的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of sodium butyrate on mRNA relative expression levels of *Cyclin* and *CDK* in rumen epithelial cells



Caspase-3: 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 cysteinyl aspartate specific proteinase-3; *Caspase-8*: 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-8 cysteinyl aspartate specific proteinase-8; *Bcl-2*: B 淋巴细胞瘤-2 B-cell lymphoma-2; *Bax*: B 淋巴细胞瘤-2 相关的 X 蛋白 B-cell lymphoma-2-associated X protein; *Bcl-2/Bax*: B 淋巴细胞瘤-2/B 淋巴细胞瘤-2 相关的 X 蛋白 B-cell lymphoma-2/B-cell lymphoma-2-associated X protein。图 7 同 The same as Fig.7.

图 4 不同浓度的丁酸钠对瘤胃上皮细胞凋亡相关基因 mRNA 相对表达量的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of sodium butyrate on mRNA relative expression levels of cell apoptosis related genes in rumen epithelial cells

2.4 丁酸钠对 IGF- I R 抑制剂处理的瘤胃上皮细胞 IGF- I、IGF- I R mRNA 相对表达量和细胞培养液中 IGF- I 浓度的影响

如图 5 所示,丁酸钠组的瘤胃上皮细胞 IGF- I R mRNA 相对表达量和细胞培养液中 IGF- I 浓

度显著高于对照组和抑制剂组 ($P<0.05$),但是对照组和抑制剂组之间 IGF- I R mRNA 相对表达量和细胞培养液中 IGF- I 浓度无显著差异 ($P>0.05$)。各组瘤胃上皮细胞 IGF- I mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$)。

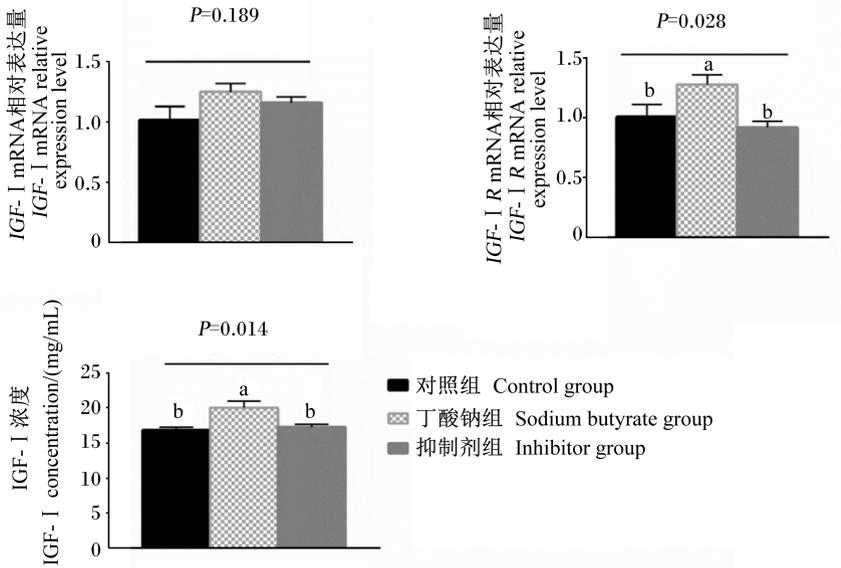


图5 丁酸钠对 IGF-1R 抑制剂处理的瘤胃上皮细胞 IGF-1、IGF-1R mRNA 相对表达量和细胞培养液中 IGF-1 浓度的影响

Fig.5 Effects of sodium butyrate on mRNA relative expression levels of IGF-1, IGF-1R in rumen epithelial cells treated by IGF-1R inhibitor and IGF-1 concentration in cell culture fluid

2.5 丁酸钠对 IGF-1R 抑制剂处理的瘤胃上皮细胞 Cyclin 和 CDK mRNA 相对表达量的影响

如图6所示,丁酸钠组瘤胃上皮细胞 Cyclin D I 和 CDK4 mRNA 相对表达量显著高于对照组和

抑制剂组 ($P < 0.05$)。各组瘤胃上皮细胞 Cyclin A2、Cyclin B I、Cyclin E I、CDK I、CDK2 和 CDK6 mRNA 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$)。

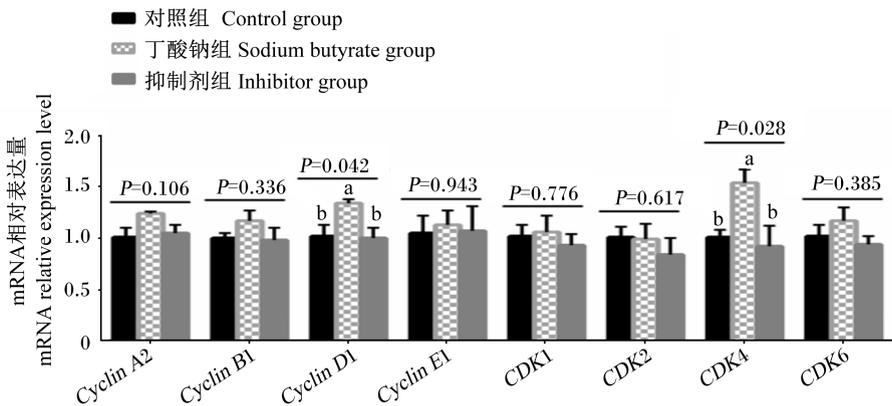


图6 丁酸钠对 IGF-1R 抑制剂处理的瘤胃上皮细胞凋亡相关基因 mRNA 相对表达量的影响

Fig.6 Effects of sodium butyrate on mRNA relative expression levels of apoptosis related genes in rumen epithelial cells treated by IGF-1R inhibitor

2.6 丁酸钠对 IGF-1R 抑制剂处理的瘤胃上皮细胞细胞凋亡相关基因 mRNA 相对表达量的影响

如图7所示,各组瘤胃上皮细胞 Caspase-3、Caspase-8、Bcl-2、Bax 和 Bcl-2/Bax mRNA 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

反刍动物瘤胃上皮细胞的生长发育与细胞周期的变化密切相关。细胞周期的1个或多个阶段的变化最终影响细胞的产生速率和最终的转化时

间^[22]。细胞周期的每个阶段(G0期、G1期、S期、G2期和M期)由 *Cyclin* 和 *CDK* 的活性控制^[23]。*Cyclin A2* 参与 S 期 DNA 复制的起始和完成^[24]。从 G1 期进入 S 期, *Cyclin E I* 替代 *Cyclin A2* 和 *CDK2* 起作用^[25]。*Cyclin A2-CDK2* 复合物通过磷酸化驱动染色质浓缩对 DNA 复制具有重要作用^[26]。*Cyclin* 结合并激活其伴侣 *CDK*, 然后活性激酶使细胞内的大量蛋白质底物磷酸化以改变蛋白质的活性, 调节 mRNA 的转录和翻译^[8], 使细胞周期能够顺利进行; 如果有细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CKI) 降低活性激酶的活性, 那么 *Cyclin-CDK* 复合物的形成受到阻碍, 阻止细胞周期的正常变化。*Cyclin D I*、*Cyclin D2*、*Cyclin D3* 及 *Cyclin E* 在 G1 期达到其合成和活性的高峰, 调节细胞从 G1 期过渡到 S 期, 保证细胞的增殖过

程, 而抑制 *Cyclin* 的表达会延长细胞停留在 G1 期的时间, 从而减少细胞的增殖^[27]。同时, 瘤胃上皮的发育也与细胞凋亡的变化密切相关, 也是瘤胃上皮发育的重要组成部分, 细胞凋亡进程主要受 *Bcl-2* 和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspases) 家族调控^[28-30]。据报道, 通过灌服丁酸钠可以调控 IGF- I 浓度来调控上皮细胞增殖的基因表达^[7]。有研究表明, IGF- I 通过改变 *Cyclin D I* 蛋白的表达来调节 *Cyclin D I-CDK4* 复合物的合成, 推动细胞周期运转^[31]; 在缺乏血清的情况下, 添加 IGF- I 可诱导细胞周期停滞的成纤维细胞 *Cyclin D I* 蛋白表达, 细胞周期恢复正常运转^[19]。所以羔羊灌服一定量的丁酸钠可能通过 IGF- I 信号通路间接地调控瘤胃上皮细胞增殖。

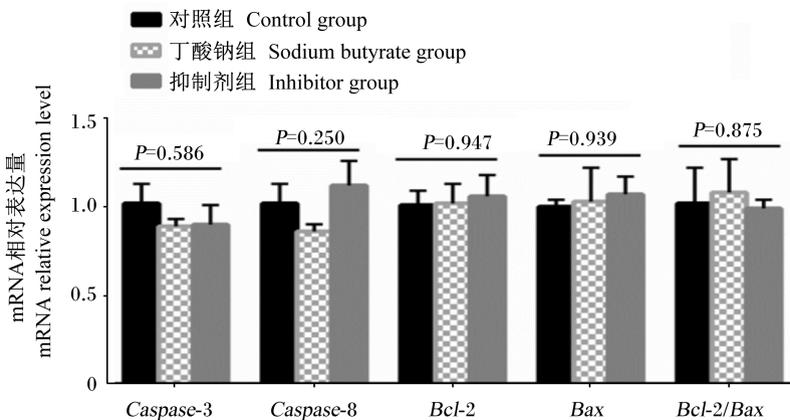


图7 丁酸钠对 IGF- I R 抑制剂处理的瘤胃上皮细胞凋亡相关基因 mRNA 相对表达量的影响

Fig.7 Effects of sodium butyrate on mRNA relative expression levels of cell apoptosis related genes in rumen epithelial cells treated by IGF- I R inhibitor

本文体外细胞试验结果发现, 8 mmol/L 的丁酸钠处理羔羊瘤胃上皮细胞 24 h, 增加了细胞周期 G0/G1 期的细胞比例, 降低了细胞周期 S 期和 G2/M 期的细胞比例, 同时下调了瘤胃上皮细胞 *Cyclin A2*、*Cyclin D I* 和 *CDK6* 的表达, 上调了凋亡基因 *Caspase-3* 和 *Bax* 的表达。以上结果说明高浓度的丁酸钠有抑制细胞增殖的作用。同时, Gabel 等^[32]研究表明, 当灌服丁酸钠浓度较高时, 瘤胃上皮细胞的增殖在某一时刻停止, 而细胞的分化程度增加。Baldwin 等^[33]研究表明, 在持续灌服丁酸钠 168 h 后, 上调了与细胞分化相关的基因表达, 同时下调了与瘤胃上皮细胞增殖相关的基因表达。与使用 8 mmol/L 丁酸钠相比, 使用 2 和

4 mmol/L 丁酸钠处理羔羊瘤胃上皮细胞 24 h, 上调了瘤胃上皮细胞 *Cyclin D I*、*CDK4* 和 *CDK6* 的表达, 且 4 mmol/L 丁酸钠的作用优于 2 mmol/L 丁酸钠。*Cyclin D I*、*CDK4* 和 *CDK6* 是 G1 期重要的 *Cyclin* 和相关依赖性激酶, 推动细胞周期 G1 期到 S 期的过渡^[8]。同时, 本研究发现使用 2 和 4 mmol/L 丁酸钠处理羔羊瘤胃上皮细胞 24 h, 降低了细胞周期 G0/G1 期的细胞比例, 增加了 S 期的细胞比例, 此结果与上调瘤胃上皮细胞 *Cyclin D I*、*CDK4* 和 *CDK6* 表达的结果相一致。上述结果说明较低浓度的丁酸钠具有加速细胞周期 G1 期到 S 期的过渡、推动细胞周期进程、促进瘤胃上皮细胞增殖的作用。彭志鹏等^[34]研究也表

明,低浓度丁酸可以促进体外培养瘤胃上皮细胞的生长,而高浓度的丁酸作用则相反。Gabel等^[32]研究表明,高浓度丁酸可能会造成细胞分化和抑制上皮细胞增殖。Liu等^[35]研究表明,5 mmol/L丁酸钠处理瘤胃上皮细胞对细胞周期阶段没有显著影响,而8、10和20 mmol/L丁酸钠处理增加了细胞周期G0/G1期的细胞比例,降低了S期和G2/M期的细胞比例,随着丁酸钠浓度的增加,这种作用越来越明显。上述体外细胞试验研究表明,不同浓度的丁酸钠对瘤胃上皮细胞增殖和凋亡的作用不同,为了更具体研究丁酸钠的促生长作用机制,试验中筛选4 mmol/L丁酸钠继续培养瘤胃上皮细胞。但是加入丁酸钠和IGF- I R抑制剂明显下调了*Cyclin D I*和*CDK4* mRNA相对表达量,说明IGF- I R抑制剂可能阻断了IGF- I信号通路,IGF- I不能与受体结合激活相应酶类,进一步说明IGF- I信号通路对羔羊瘤胃上皮细胞增殖和凋亡的影响。

目前体内研究发现,羔羊瘤胃乳头大小和表面积的增加证实了IGF- I对瘤胃生长发育的促进作用^[36-38]。在丁酸钠灌服促进羔羊瘤胃发育的同时,羔羊血浆IGF- I浓度显著提高,也上调了瘤胃上皮IGF- I R和胰岛素样生长因子结合蛋白-5(IGFBP-5)的表达^[7]。再次证实丁酸钠可能是通过调控内源IGF- I的分泌,进而通过IGF- I信号通路来调控羔羊瘤胃上皮细胞增殖和凋亡。在正常情况下,当IGF- I和IGF- I R结合后,其酪氨酸和丝氨酸残基发生自身磷酸化反应,IGF- I R的活化可以激活胰岛素受体底物-1(IRS-1)、胰岛素受体底物-2(IRS-2)、同源性和胶原蛋白(SHC)和磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)等多种底物,这些底物的活化启动了不同的细胞信号转导通路,分别介导有丝分裂、细胞的增殖分化和抑制细胞凋亡等生物学功能^[39-42]。本试验中通过PPP来抑制IGF- I R的活性,PPP是一种常用的IGF- I R抑制剂,可以与IGF- I竞争性结合IGF- I R达到抑制其活性的作用^[38]。为了具体验证IGF- I信号通路在丁酸钠调控瘤胃上皮细胞增殖和凋亡过程中的作用,在加入4 mmol/L丁酸钠前1 h,通过加入IGF- I R抑制剂来抑制IGF- I信号通路,进而观察丁酸钠对瘤胃上皮细胞增殖的作用。本研究发现,虽然4 mmol/L丁酸钠处理对IGF- I的mRNA相对表达量无显著影响,但4 mmol/L丁酸钠处理

升高了细胞液中IGF- I浓度,上调了瘤胃上皮细胞IGF- I R的mRNA相对表达量,而添加PPP抑制了瘤胃上皮细胞IGF- I R、*Cyclin D I*和*CDK4*的mRNA相对表达量,并且降低了细胞培养液中IGF- I浓度。这说明添加一定浓度的丁酸钠增加了IGF- I的合成,并且推动瘤胃上皮细胞周期进程,促进瘤胃上皮细胞增殖^[43];而4 mmol/L丁酸钠处理的瘤胃上皮细胞IGF- I的mRNA相对表达量无显著差异,说明本试验的样品收集时间点可能存在缺陷,在今后的试验中需要增加样品收集的时间点。一定浓度的IGF- I可诱导细胞周期停滞的成纤维细胞*Cyclin D I*蛋白表达和*Cyclin-CDK4*复合物合成,促进其与*CDK4*异二聚体化,加快细胞周期从G1期到S期的转变,并增加瘤胃上皮细胞的DNA合成量^[44]。所以细胞液中较高浓度的IGF- I是促进瘤胃上皮细胞发育的重要因素^[18]。本试验研究表明,抑制IGF- I R能够有效阻断丁酸钠对瘤胃上皮细胞*Cyclin D I*和*CDK4*的mRNA表达及对细胞增殖的促进作用。所以IGF- I必须与IGF- I R结合以后才能上调瘤胃上皮细胞*Cyclin D I*的表达,促进其与相应的*CDK4*形成复合物,从而加速细胞周期进程,促进细胞增殖^[37]。Sell等^[45]研究发现,当小鼠IGF- I R基因敲除后,体外培养的成纤维细胞即使在培养基中添加再多的胎牛血清,其增殖速度仍远低于正常细胞水平,延长了细胞周期的运转时间;血清饥饿法能使成纤维细胞的细胞周期停滞在G0/G1期,而添加IGF- I后,细胞能够重新进入S期,恢复细胞周期正常运转,但对缺失IGF- I R基因的小鼠则没有这种影响。总之,IGF- I R是IGF- I发挥促进细胞增殖作用的关键,只有两者结合才能发挥促进作用。

在本试验条件下,添加IGF- I R抑制剂抑制了丁酸钠对羔羊瘤胃上皮细胞的增殖作用。而IGF- I信号通路只有把细胞外的信号传导至细胞内才能对其靶细胞发挥一系列调控功能^[39-42,46]。目前公认的IGF- I信号转导途径有3条:Ras/Raf/丝裂原激活蛋白激酶(MEK)/胞外信号调节激酶(ERK)信号转导途径、PI3K/蛋白激酶B(AKT)信号转导途径和14-3-3蛋白/Raf信号转导途径。其中,Ras/Raf/MEK/ERK和PI3K/AKT信号转导途径与细胞增殖有关,然而14-3-3蛋白/Raf信号转导途径主要通过钝化凋亡蛋白(BAD)

来抑制细胞凋亡,而 IGF- I 激活细胞膜上的 IGF- I R就是通过经典的 Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导途径来调节细胞增殖^[14]。据 Arunee 等^[47]报道,体外添加 IGF- I 促进小鼠视网膜色素上皮细胞受体辅助因子(c-Raf)和 ERK 磷酸化,激活 Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导途径,加快细胞周期 G1 期进程;相反,不论是否添加 IGF- I ,只要 Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导途径被阻断则导致细胞周期停滞。卢劲晔^[19]研究表明,体外添加 IGF- I 提高 ERK 磷酸化水平,而当 ERK 抑制剂抑制 ERK 磷酸化,则添加 IGF- I 对瘤胃上皮细胞 *Cyclin D I* 表达的促进作用也被抑制。但是 IGF- I 通过结合 IGF- I R 激活 Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导途径来提高羔羊瘤胃上皮细胞周期 G1 期 *Cyclin D I* 和 *CDK4* 的 mRNA 相对表达量,同时降低 *Caspase-3* 的 mRNA 相对表达量的具体机理还有待进一步研究。

4 结 论

① 体外培养细胞中添加 2 和 4 mmol/L 的丁酸钠可促进羔羊瘤胃上皮细胞增殖,而添加 8 mmol/L 的丁酸钠具有抑制细胞增殖、加快细胞凋亡的作用,说明较低浓度的丁酸钠可促进体外培养瘤胃上皮细胞的生长,而高浓度的丁酸钠作用则相反。

② IGF- I 信号通路在丁酸钠促进瘤胃上皮细胞发育的过程中具有重要作用,一定浓度的丁酸钠可以促进 IGF- I 的分泌,IGF- I 与 IGF- I R 结合后,推动细胞从 G1 期过渡到 S 期,进而促进瘤胃上皮细胞增殖。

参考文献:

- [1] GÓRKA P, KOWALSKI Z M, ZABIELSKI R, et al. Invited review: use of butyrate to promote gastrointestinal tract development in calves[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(6): 4785-4800.
- [2] PENNER G B. Mechanisms of volatile fatty acid absorption and metabolism and maintenance of a stable rumen environment[C]//Proceedings of the 25th annual florida ruminant nutrition symposium. [S. l.]: [s. n.], 2014: 92.
- [3] SHERR C J. Mammalian G1 cyclins[J]. *Cell*, 1993, 73(6): 1059-1065.
- [4] SHERR C J. D-type cyclins[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1995, 20(5): 187-190.
- [5] DINGWALL C. The accumulation of proteins in the nucleus[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1985, 10(2): 64-66.
- [6] KORNBERG A, BAKER T A. DNA replication[M]. 2nd ed. New York: W. H. Freeman & Co., 1992.
- [7] LIU L X, SUN D M, MAO S Y, et al. Infusion of sodium butyrate promotes rumen papillae growth and enhances expression of genes related to rumen epithelial VFA uptake and metabolism in neonatal twin lambs[J]. *Journal of Animal Science*, 2019, 97(2): 909-921.
- [8] 庄一民,刁其玉,张乃锋. 幼龄反刍动物瘤胃上皮细胞 β -羟基丁酸代谢与调控机制[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(4): 660-669.
ZHUANG Y M, DIAO Q Y, ZHANG N F. β -hydroxybutyrate metabolism and regulation mechanism in rumen epithelial cells of young ruminant[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2020, 51(4): 660-669. (in Chinese)
- [9] 王璐,刘理想,孙大明,等. 丁酸调控幼龄反刍动物瘤胃上皮发育研究进展[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(2): 49-57.
WANG L, LIU L X, SUN D M, et al. Research progress of butyric acid regulating rumen epithelial development in young ruminant[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(2): 49-57. (in Chinese)
- [10] WANG A, JIANG H. Rumen fluid inhibits proliferation and stimulates expression of cyclin-dependent kinase inhibitors 1A and 2A in bovine rumen epithelial cells[J]. *Journal of Animal Science*, 2010, 88(10): 3226-3232.
- [11] BALDWIN R L. The proliferative actions of insulin, insulin-like growth factor- I , epidermal growth factor, butyrate and propionate on ruminal epithelial cells *in vitro* [J]. *Small Ruminant Research*, 1999, 32(3): 261-268.
- [12] 卢劲晔,卢炜,刘静,等. IGF-1 促进山羊瘤胃上皮细胞增殖的机制[J]. *南京农业大学学报*, 2014, 37(5): 106-110.
LU J Y, LU W, LIU J, et al. The mechanism of IGF- I promoting the proliferation of goat rumen epithelial cells[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2014, 37(5): 106-110. (in Chinese)
- [13] BIBOLLET-BAHENA O, ALMAZAN G. IGF-1-stimulated protein synthesis in oligodendrocyte progenitors requires PI3K/mTOR/Akt and MEK/ERK pathways [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2009, 109(5): 1440-1451.

- [14] YU Y, MU J Q, FAN Z P, et al. Insulin-like growth factor 1 enhances the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via ERK and JNK MAPK pathways [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2012, 137(4): 513–525.
- [15] PENNER G B, STEELE M A, ASCHENBACH J R, et al. Ruminant nutrition symposium; molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets [J]. *Journal of Animal Science*, 2011, 89(4): 1108–1119.
- [16] CAVINI S, IRAIRA S, SIURANA A, et al. Effect of sodium butyrate administered in the concentrate on rumen development and productive performance of lambs in intensive production system during the suckling and the fattening periods [J]. *Small Ruminant Research*, 2015, 123(2/3): 212–217.
- [17] ODONGO N E, ALZAHAL O, LINDINGER M I, et al. Effects of mild heat stress and grain challenge on acid-base balance and rumen tissue histology in lambs [J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(2): 447–455.
- [18] STUMPF F, GEORGI M L, MUNDHENK L, et al. Sheep rumen and omasum primary cultures and source epithelia; barrier function aligns with expression of tight junction proteins [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2011, 214(17): 2871–2882.
- [19] 卢劲晔. 日粮能量水平对山羊瘤胃上皮生长的影响及机理研究 [D]. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2012.
LU J Y. Effect and mechanism of dietary energy level on the growth of goat rumen epithelium [D]. Ph. D. Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [20] DUAN Z F, CHOY E, HARMON D, et al. IGF-1 receptor (IGF-1R) tyrosine kinase inhibitor cyclooligan PPP inhibits proliferation and induces apoptosis in multidrug resistant osteosarcoma cell lines [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2009, 8(8): 2122–2130.
- [21] NIWIŃSKA B, HANCZAKOWSKA E, ARCISZEWSKI M B, et al. Review: exogenous butyrate; implications for the functional development of ruminal epithelium and calf performance [J]. *Animal*, 2017, 11(9): 1522–1530.
- [22] SHEN Z M, SEYFERT H M, LÖHRKE B, et al. An energy-rich diet causes rumen papillae proliferation associated with more IGF type 1 receptors and increased plasma IGF-1 concentrations in young goats [J]. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134(1): 11–17.
- [23] CASEM M L. Chapter 13—cell cycle [M]//CASEM M L. *Case studies in cell biology*. Amsterdam: Academic Press, 2016: 299–326.
- [24] BENDRIS N, LEMMERS B, BLANCHARD J M, et al. Cyclin A2 mutagenesis analysis: a new insight into CDK activation and cellular localization requirements [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22879.
- [25] LEE H J, JEDRYCHOWSKI M P, VINAYAGAM A, et al. Proteomic and metabolomic characterization of a mammalian cellular transition from quiescence to proliferation [J]. *Cell Reports*, 2017, 20(3): 721–736.
- [26] KANAKKANTHARA A, JEGANATHAN K B, LIMZERWALA J F, et al. Cyclin A2 is an RNA binding protein that controls *Mre11* mRNA translation [J]. *Science*, 2016, 353(6307): 1549–1552.
- [27] MUISE-HELMERICKS R C, GRIMES H L, BELLA-COSA A, et al. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(45): 29864–29872.
- [28] NEW D C, WONG Y H. Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression [J]. *Journal of Molecular Signaling*, 2007, 2(1): 2.
- [29] VERMEULEN K, VAN BOCKSTAELE D R, BERNEMAN Z N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer [J]. *Cell Proliferation*, 2003, 36(3): 131–149.
- [30] WNEK A, ANDRZEJEWSKA E, KOBOS J, et al. Molecular and immunohistochemical expression of apoptotic proteins Bax, bcl-2 and caspase 3 in infantile hemangioma tissues as an effect of propranolol treatment [J]. *Immunology Letters*, 2017, 185: 27–31.
- [31] SEWING A, BURGER C, BRUSSELBACH S, et al. Human cyclin D1 encodes a labile nuclear protein whose synthesis is directly induced by growth factors and suppressed by cyclic AMP [J]. *Journal of Cell Science*, 1993, 104(2): 545–554.
- [32] GABEL G, ASCHENBACH J R, MÜLLER F. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium; implications and limitations [J]. *Animal Health Research Reviews*, 2002, 3(1): 15–30.
- [33] BALDWIN VI R L, WU S T, LI W Z, et al. Quantification of transcriptome responses of the rumen epithelium to butyrate infusion using RNA-seq technology [J]. *Gene Regulation and Systems Biology*, 2012, 6: 67–80.
- [34] 彭志鹏, 罗丹, 许超, 等. 丁酸对瘤胃上皮细胞生长和凋亡的影响 [J]. *江西农业大学学报*, 2018, 40(3): 606–611.
PENG Z P, LUO D, XU C, et al. Effect of butyric acid on the growth and apoptosis of rumen epithelial cells [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2018, 40(3): 606–611. (in Chinese)
- [35] LIU D C, ZHOU X L, LIU G J, et al. Promotion and inhibition of ruminal epithelium growth by butyric acid

- and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in dairy goats[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2014, 13(9):2005–2009.
- [36] HAMMON H M, BLUM J W. Feeding different amounts of colostrum or only milk replacer modify receptors of intestinal insulin-like growth factors and insulin in neonatal calves[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2002, 22(3):155–168.
- [37] GRILL C J, COHICK W S. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates IGF- I action in a bovine mammary epithelial cell line independent of an IGF interaction[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2000, 183(2):273–283.
- [38] LEE W H, GAYLORD T D, BOWSHER R R, et al. Nutritional regulation of circulating insulin-like growth factors (IGFs) and their binding proteins in the ovine fetus[J]. *Endocrine Journal*, 1997, 44(1):163–173.
- [39] TARTARE-DECKERT S, SAWKA-VERHELLE D, MURDACA J, et al. Evidence for a differential interaction of SHC and the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) with the insulin-like growth factor- I (IGF- I) receptor in the yeast two-hybrid system[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(40):23456–23460.
- [40] DEY B R, FRICK K, LOPACZYNSKI W, et al. Evidence for the direct interaction of the insulin-like growth factor I receptor with IRS-1, Shc, and Grb10 [J]. *Molecular Endocrinology*, 1996, 10(6):631–641.
- [41] VASILCANU D, GIRNITA A, GIRNITA L G, et al. The cyclolignan PPP induces activation loop-specific inhibition of tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor-1 receptor. Link to the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt apoptotic pathway [J]. *Oncogene*, 2004, 23(47):7854–7862.
- [42] LU J, ZHAO H, XU J, et al. Elevated cyclin D1 expression is governed by plasma IGF-1 through Ras/Raf/MEK/ERK pathway in rumen epithelium of goats supplying a high metabolizable energy diet[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2013, 97(6):1170–1178.
- [43] 金志忠.对“基因的选择性表达”调控机理的解读[J]. *生物学教学*, 2020, 45(9):69–71.
- JIN Z Z. Interpretation of the regulatory mechanism of “selective expression of genes” [J]. *Biology Teaching*, 2020, 45(9):69–71. (in Chinese)
- [44] XU L, WANG Y, LIU J H, et al. Morphological adaptation of sheep’s rumen epithelium to high-grain diet entails alteration in the expression of genes involved in cell cycle regulation, cell proliferation and apoptosis [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2018, 9(1):32.
- [45] SELL C, DUMENIL G, DEVEAUD C, et al. Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(6):3604–3612.
- [46] RECHLER M M, NISSLEY S P. Insulin-like growth factor (IGF)/somatomedin receptor subtypes: structure, function, and relationships to insulin receptors and IGF carrier proteins [J]. *Hormone Research*, 1986, 24(2/3):152–159.
- [47] ARUNEE H, DANIEL S, FRIEDERIKE E S, et al. NBS1 is required for IGF-1 induced cellular proliferation through the Ras/Raf/MEK/ERK cascade [J]. *Cellular Signalling*, 2008, 20:2276–2285.

Mechanism of Sodium Butyrate Promoting Rumen Epithelial Cell Proliferation *in Vitro* Based on Insulin-Like Growth Factor I Signaling Pathway

ZHANG Yali LIU Lixiang SUN Daming LIU Junhua*

(Laboratory of Digestive Tract Microbiology, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Jiangsu Key Laboratory of Digestive Tract Nutrition and Animal Health, National Animal Digestive Tract Nutrition International Joint Research Center, Nanjing 210095, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the mechanism of sodium butyrate promoting rumen epithelial cell proliferation *in vitro* based on insulin-like growth factor I (IGF- I) signaling pathway. Four healthy 49-day-old male lambs with similar parity and body weight were slaughtered to collect rumen epithelial tissue,

which was digested with trypsin to obtain primary rumen epithelial cells. After the cells adhered to the wall, they were divided into four groups, and supplemented 0, 2, 4 and 8 mmol/L sodium butyrate, respectively. In order to further study the role of IGF- I signaling pathway in the promotion of rumen epithelial cell proliferation by sodium butyrate addition, the cells were divided into three groups, the sodium butyrate group supplemented 4 mmol/L sodium butyrate, the inhibitor group supplemented 4 mmol/L sodium butyrate+2.5 μ mol/L insulin-like growth factor I receptor (IGF- I R) inhibitor, and the control group supplemented the same volume of DMEM. All cell experiments were repeated 4 times. When the cells were treated for 24 h, the cell fluid was collected for determinate IGF- I concentration, and the cells were collected to analyses the cell cycle and expression of genes related to proliferation and apoptosis. The results showed as follows: 1) the proportion of cells in G0/G1 phase in 0 and 8 mmol/L sodium butyrate groups was significantly higher than that in 2 and 4 mmol/L sodium butyrate groups ($P<0.05$), and the proportion of cells in G0/G1 phase in the 8 mmol/L sodium butyrate group was significantly higher than that in the 0 mmol/L sodium butyrate group ($P<0.05$). The proportion of cells in S phase in the 4 mmol/L sodium butyrate group was significantly higher than that in 0, 2 and 8 mmol/L sodium butyrate groups ($P<0.05$). The proportion of cells in G2/M phase in the 8 mmol/L sodium butyrate group was significantly lower than that in 0, 2 and 4 mmol/L sodium butyrate groups ($P<0.05$). 2) The mRNA relative expression level of cyclin protein A2 (*Cyclin A2*) in the 8 mmol/L sodium butyrate group was significantly lower than that in 0, 2 and 4 mmol/L sodium butyrate groups ($P<0.05$), the mRNA relative expression level of cyclin dependent protein kinases I (*CDK I*) in the 8 mmol/L sodium butyrate group was significantly lower than that in the 0 and 2 mmol/L sodium butyrate group ($P<0.05$), the mRNA relative expression level of cyclin protein D I (*Cyclin D I*) in 2 and 4 mmol/L sodium butyrate groups was significantly higher than that in 0 and 8 mmol/L sodium butyrate groups ($P<0.05$), the mRNA relative expression level of cyclin dependent protein kinases 4 (*CDK4*) in the 4 mmol/L sodium butyrate group was significantly higher than that in the 0, 2 and 8 mmol/L sodium butyrate groups ($P<0.05$), and the mRNA relative expression level of cyclin dependent protein kinases 6 (*CDK6*) in 2 and 4 mmol/L sodium butyrate groups was significantly higher than that in 8 mmol/L sodium butyrate group ($P<0.05$). 3) The mRNA relative expression levels of cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (*Caspase-3*) and B-lymphoma-2-associated X protein (*Bax*) in the 8 mmol/L sodium butyrate group were significantly higher than those in 0, 2 and 4 mmol/L sodium butyrate groups ($P<0.05$). 4) The *IGF- I R* mRNA relative expression level and cell culture fluid IGF- I concentration in sodium butyrate group were significantly higher than those in control group and inhibitor group ($P<0.05$). The mRNA relative expression levels of *Cyclin D I* and *CDK4* in sodium butyrate group were significantly higher than those in control group and inhibitor group ($P<0.05$). These results suggest that adding 4 mmol/L sodium butyrate promotes the rumen epithelial cell proliferation, mainly through the IGF- I signaling pathway, it shows that the mechanism of sodium butyrate promoting rumen epithelial growth is closely related to IGF- I signaling pathway. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33 (3):1687-1698]

Key words: sodium butyrate; rumen epithelial cells; proliferation; apoptosis; IGF- I ; lambs