



牛瘤胃上皮细胞中挥发性脂肪酸吸收相关蛋白在白细胞介素 10 诱导下的差异表达研究

侯红雁, 王忠豪, 霍文婕, 刘 强, 张 静, 陈 雷, 裴彩霞, 郭 刚*

(山西农业大学动物科学学院, 太谷 030801)

摘 要: 本研究旨在探讨炎症因子(白细胞介素 10, IL-10)对牛瘤胃上皮细胞中挥发性脂肪酸(VFA)吸收相关蛋白基因表达的影响。试验采用随机区组设计,在瘤胃上皮细胞体外培养条件下,研究 50 ng · mL⁻¹浓度的 IL-10 对牛瘤胃上皮细胞中核因子(NF-κB)、假定阴离子转运蛋白 1(PAT1)、阴离子交换蛋白 2(AE2)、单羧酸转运蛋白 1(MCT1)、单羧酸转运蛋白 4(MCT4)、钠氢离子交换蛋白 1(NHE1)基因表达的影响。结果表明,在中性条件下,IL-10 添加显著下调了 NF-κB、PAT1、MCT1、NHE1 基因的表达($P < 0.05$),AE2 基因的表达显著性上调($P < 0.05$),而对 MCT4 基因的表达没有显著影响。在酸性条件下,IL-10 添加组的 NF-κB 基因表达被显著性抑制($P < 0.05$),而 PAT1、MCT1、MCT4 基因表达显著上调($P < 0.05$)。pH5.5 组与 pH7.2 组比较,pH5.5 组 NF-κB 基因表达显著性上调($P < 0.05$)。结果提示,在炎症条件下,白细胞介素 10 作为一种抗炎因子,可以缓解瘤胃上皮细胞炎症反应从而促进 VFA 吸收相关蛋白基因的表达。

关键词: IL-10; 瘤胃上皮细胞; 载体蛋白; 挥发性脂肪酸

中图分类号: S823.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2021)03-0714-09

Differential Expression of Volatile Fatty Acid Absorption Related Proteins in Bovine Rumen Epithelial Cells Induced by Interleukin 10

HOU Hongyan, WANG Zhonghao, HUO Wenjie, LIU Qiang, ZHANG Jing, CHEN Lei, PEI Caixia, GUO Gang*

(College of Animal Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: This study aimed to investigate the effect of inflammatory factor (interleukin-10, IL-10) on the expression of genes related to volatile fatty acid (VFA) absorption in bovine rumen epithelial cells. The experiment adopted a randomized block design. Under the conditions of *in vitro* culture of rumen epithelial cells, the effect of 50 ng · mL⁻¹ IL-10 on genes expression of nuclear factor (NF-κB), putative anion transporter 1 (PAT1), anion exchanger 2 (AE2), monocarboxylate transporter 1 (MCT1), monocarboxylate transporter 4 (MCT4), Na⁻/H⁺ exchanger 1 (NHE1) in bovine rumen epithelial cells was detected. The results showed that, under neutral conditions, IL-10 addition significantly down-regulated the expression of NF-κB, PAT1, MCT1, NHE1 genes ($P < 0.05$), and significantly up-regulated the expression of AE2 gene ($P < 0.05$), while had no significant effect on the gene expression of MCT4. Under acidic conditions, the ex-

收稿日期: 2020-08-21

基金项目: 山西省“1331 工程”畜牧学重点学科建设项目(J201711306); 山西农业大学引进人才科研启动项目(2014YJ11)

作者简介: 侯红雁(1995-), 女, 山西太原人, 硕士生, 主要从事反刍动物营养研究, E-mail: 804662423@qq.com; 王忠豪(1995-), 男, 山西晋中人, 硕士生, 主要从事反刍动物营养研究, E-mail: 805577875@qq.com。侯红雁和王忠豪为同等贡献作者

* 通信作者: 郭 刚, 主要从事反刍动物营养与饲料科学研究, E-mail: guosteel1984@163.com

pression of *NF- κ B* gene in the IL-10 addition group was significantly inhibited ($P < 0.05$), while the expression of *PAT1*, *MCT1*, and *MCT4* genes were significantly promoted ($P < 0.05$). Compared with the condition of pH7.2 group, the *NF- κ B* gene expression in the pH5.5 group was significantly increased ($P < 0.05$). The results suggest that, under inflammatory conditions, interleukin-10 as an anti-inflammatory factor can alleviate the inflammatory response of rumen epithelial cells and promote the genes expression of VFA absorption-related protein.

Key words: IL-10; rumen epithelial cells; carrier protein; volatile fatty acids

* **Corresponding author:** GUO Gang, E-mail: guosteel1984@163.com

挥发性脂肪酸(VFA)是反刍动物日粮中碳水化合物在瘤胃微生物发酵下产生的可利用终产物。VFA 是反刍动物重要的能源物质,它不仅参与动物体脂和乳成分的合成,还对维持瘤胃内环境稳态具有重要作用^[1-2]。因此,瘤胃内 VFA 的产生及其吸收对于反刍动物来说尤为重要。早期的研究认为,VFA 主要通过瘤胃壁扩散吸收,并证明了 VFA 的吸收速率与瘤胃 pH 有关。随着研究的深入,研究者对 VFA 在瘤胃上皮吸收的认识不断提高,发现 VFA 只有在非解离状态下才可以通过细胞脂质分子层进行扩散,随着 pH 降低,非解离态 VFA 比例增加,才能提高 VFA 通过瘤胃上皮自由扩散的速度。因此,通过扩散吸收的 VFA 是很有限的^[3]。目前,研究者认为,瘤胃上皮对 VFA 吸收不仅依靠扩散作用,还存在一系列依赖载体促进吸收的转运途径。瘤胃作为 VFA 吸收的主要场所,通过复层鳞状瘤胃上皮对 VFA 的吸收转运及适应性调节发挥重要作用^[4]。复层瘤胃上皮由可以代谢 VFA 生成酮体的基底层和棘状层、具有渗透屏障作用的颗粒层以及在瘤胃内环境与上皮细胞层间起物理保护作用的角质层 4 层细胞组成。细胞层间的蛋白载体是瘤胃上皮细胞对 VFA 吸收的主要介质,包括位于瘤胃上皮颗粒层顶膜的阴离子交换蛋白(AE)以及位于瘤胃上皮基底层的单羧酸转运蛋白(MCT)、钠氢离子交换蛋白亚型 1(NHE1)、假定阴离子转运蛋白 1(PAT1)^[5]。

亚急性瘤胃酸中毒(SARA)是奶牛饲养过程中常见的营养代谢疾病^[6]。高精料饲喂反刍动物导致瘤胃长时间 pH 降低,引发 SARA^[7]。低 pH 破坏瘤胃内环境,释放大量游离脂多糖。在瘤胃低 pH 环境下,脂多糖(LPS)易位引起机体免疫反应^[8]。在 LPS 诱导的牛炎症模型中,瘤胃 pH 下降,VFA 积累^[9]。静脉注射 LPS 引起牛血液中细胞因子、急性期蛋白和激素等增加,这些物质共同组成机体炎症免疫应答^[10]。本课题组前期体内研究发现,机体

发生炎症反应时瘤胃中 VFA 吸收受到抑制,为研究相关机制,采用瘤胃上皮细胞作为研究对象,设计各种单一炎症因子处理组,以期找到导致 VFA 吸收受阻的物质基础。而白细胞介素 10(IL-10)由 LPS 刺激巨噬细胞和自然杀伤细胞产生,释放进入血液循环^[11]。在生理状态下,IL-10 由多种细胞分泌产生,例如单核细胞、巨噬细胞、T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞等。在正常情况下,机体内 IL-10 含量极低。当机体处于应激状态下,IL-10 含量明显增加。IL-10 作为抗炎因子,在先天性免疫中发挥着重要作用。在奶牛静脉注射 LPS 引起的免疫应答中,奶牛血液 IL-10 含量增加^[12]。细胞因子 IL-10 是否影响瘤胃上皮细胞 VFA 吸收尚不清楚。

为探索牛发生 SARA 时,IL-10 对瘤胃上皮细胞 VFA 吸收相关基因的影响。本研究以牛瘤胃上皮细胞作为研究对象,体外培养瘤胃原代细胞,建立瘤胃上皮模型,模拟 SARA 酸性条件,研究 IL-10 刺激瘤胃上皮细胞对其 VFA 吸收相关蛋白基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12 培养基(BI,01-172-1ACS); $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶-EDTA(BI,03-050-1B);新生胎牛血清(GIBCO,16000044);青链霉素(BI,030311B);D-Hanks 溶液(Solarbio,H1045);IL-10(Peprotech,210-10-2);CCK-8 试剂盒(日本同仁,CK04);牛 β -羟丁酸(β -HB)酶联免疫分析试剂盒(江莱生物,JL12238);细胞总 RNA 提取试剂盒(TaKaRa,9109);反转录试剂盒(TaKaRa,RR047A);SYBR[®] Green 定量试剂盒(TaKaRa,RR820A)。

1.2 细胞的原代分离与培养

成年安格斯牛屠宰后,取瘤胃腹囊侧的上皮组织,用含 5 倍青链霉素的 D-Hanks 溶液冲洗多次,

去除瘤胃内容物,将冲洗完的瘤胃上皮组织放入用4℃预冷的含5倍青链霉素的D-Hanks溶液中,立即带回实验室超净台工作。在培养皿中将瘤胃组织剪成1 mm×1 mm×1 mm左右的均匀小块,用5倍青链霉素的D-Hanks溶液清洗5次直至无血球为止。在离心管中加入消化液(2.5 g·L⁻¹胰蛋白酶+0.2 g·L⁻¹ EDTA),混合均匀后放入37℃水浴锅中消化20 min,每隔5 min摇匀一次,用细胞筛过滤,收集的消化液加入等体积含100 g·L⁻¹胎牛血清的DMEM/F12培养基以终止酶的消化。重复4~6次,用D-Hanks缓冲液洗涤两次细胞悬液,最后收集的细胞悬液用70 μm的滤膜进行过滤,合并各管细胞滤液,400 g离心8 min,弃上清液,收集细胞。细胞再悬浮,密度调节为1×10⁶个·mL⁻¹。分装在10个左右的培养瓶中。置于50 mL·L⁻¹ CO₂, 37℃, 90%~95%湿度的培养箱中培养。每隔24 h更换新的完全培养液继续培养,倒置显微镜下观察瘤胃上皮细胞形态及生长情况。

1.3 CCK-8 试剂盒法选择 VFA 浓度

收集对数生长期的牛瘤胃上皮细胞,用DMEM/F12培养基将细胞密度调节为1×10⁶个·mL⁻¹,按照每孔3 000个接种于96孔板中(Corning, TCP011096),至细胞生长达到90%时,加入不同浓度(0、13.2、66、132 mol·L⁻¹)的VFA处理12 h,用CCK-8法测定OD_{450 nm}值,每组取3个平行样本的平均值。

表1 real-time PCR 引物信息

Table 1 Primer sequence of real-time PCR

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物大小/bp Product size	参考文献 Reference
<i>MCT1</i>	F: AACACTGTGCAGGAACCTTTACTTTTC R: TGCCAGCGGTCTCTCTTAT	120	[13]
<i>MCT4</i>	F: TGTGTGTGAATCGCTTTGGC R: CCAAACCCAAGCCAGTAAGGA	141	[13]
<i>AE2</i>	F: CGACACTTGGTGCGGAAGAA R: TTCAGCTCCACAAACACCTCA	128	[13]
<i>PAT1</i>	F: TACCACAGGGCCTTGCTAT R: CTGCCACCATCACAGACAT	154	[13]
<i>NHE1</i>	F: GACTACCAACACGTGCGCATA R: CAGCAGCCCCACCACAAT	141	[13]
<i>NF-κB</i>	F: ATCTTTGACAACCGCGCC R: CGAGGCAGCTCCCAGAGTT	76	[14]
<i>GAPDH</i>	F: TGCCGCTGGAGAAACC R: CGCCTGCTTACCACCTT	59	[15]

1.4 CCK-8 试剂盒法选择 IL-10 浓度

在处于对数生长期的细胞中加入适量的2.5 g·L⁻¹胰蛋白酶+0.2 g·L⁻¹ EDTA从而起到消化的作用,然后按照每孔3 000个将细胞接种于96孔板中,放置于CO₂培养箱中,至细胞生长达到90%时去除上清液,然后设置每组IL-10的浓度分别为0、0.1、1、10、50、100 ng·mL⁻¹,每一浓度3个孔。放置于培养箱中12 h后,将96孔板中200 μL培养基吸弃,每孔加入100 μL完全培养基;然后每孔加入10 μL CCK-8试剂(避光操作且不能在孔中形成气泡),培养箱中孵育1 h;用酶标仪测定OD_{450 nm}值,每组取3个平行样本的平均值。

1.5 细胞处理

本试验设5组,分别为pH7.2(空白组)、pH7.2+VFA、pH7.2+VFA+IL-10、pH5.5+VFA、pH5.5+VFA+IL-10。取对数生长期细胞接种到6孔板,至细胞生长达到90%时,用含VFA的培养基诱导3 h,然后分别换液继续培养12 h,收集培养基和提取细胞RNA。每个试验处理设3个重复。

1.6 RNA 的提取和实时荧光定量 PCR

总RNA是根据制造商的指示使用Trizol(TaKaRa, 9109)提取的。用微量分光光度计检测RNA浓度。用反转录试剂盒(TaKaRa, RR047A)将RNA反向转录成cDNA。试验条件为:95℃ 3 min; 95℃ 15 s; 60℃ 1 min, 40个循环。基因引物如表1所示。

1.7 β -羟丁酸(β -HB)分泌量的测定

用 PBS 稀释细胞悬液,使细胞密度达到 1×10^6 个 \cdot mL⁻¹ 左右。通过反复冻融使细胞破坏并放出细胞内成份。离心 20 min 左右,收集上清。设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μ L;分别设空白孔、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ L,然后再加待测样品 10 μ L(样品最终稀释度为 5 倍)。将样品加于酶标板孔底部,每孔加入酶标试剂 100 μ L,空白孔除外。用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 60 min。将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水稀释 20 倍后备用。小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,拍干。每孔先加入显色剂 A 50 μ L,再加入显色剂 B 50 μ L,轻轻震荡混匀,

37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min。每孔加终止液 50 μ L,终止反应。以空白孔调零,测定 OD_{450 nm} 值。

1.8 统计分析

使用 SPSS Statistics V23.0 统计学软件对试验结果数据进行单因素 ANOVA 检验,本试验中所有数值均采用“平均值 \pm 标准误(mean \pm S. E.)”表示,以 $P < 0.05$ 为差异显著性判断标准。

2 结果

2.1 牛瘤胃上皮细胞分离培养的细胞形态

如图 1 所示,细胞贴壁后 24~72 h 形态变化与前人分离培养的牛瘤胃上皮细胞形态一致,且经角蛋白 18(CK18)免疫荧光染色和 β -羟丁酸分泌物检测证明其为瘤胃上皮细胞,可开展后续试验。

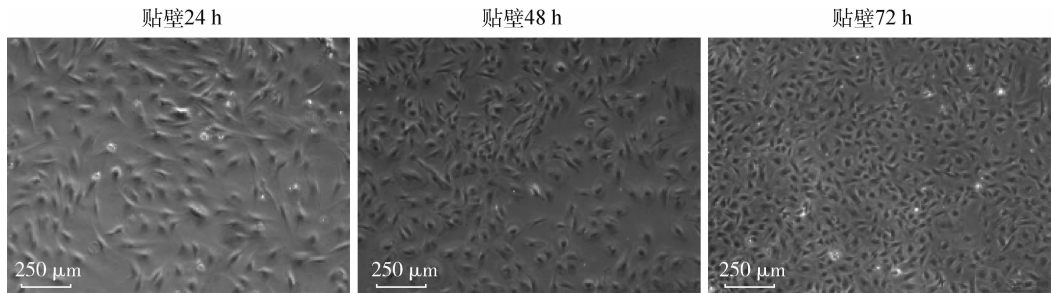


图 1 牛瘤胃上皮细胞 (BRECs) 接种 24~72 h 形态变化(100 \times)

Fig. 1 Morphological changes of bovine rumen epithelial cells (BRECs) after 24-72 h inoculation(100 \times)

2.2 不同浓度 VFA 对瘤胃上皮细胞活性的影响

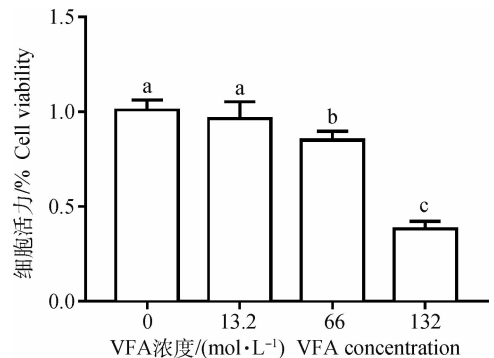
由图 2 可知,用不同浓度 VFA(0、13.2、66、132 mol \cdot L⁻¹) 处理瘤胃上皮细胞 12 h 后,66 和 132 mol \cdot L⁻¹ VFA 对瘤胃上皮细胞的增殖有明显的抑制作用($P < 0.05$),而用 13.2 mol \cdot L⁻¹ VFA 作用 12 h 后对瘤胃上皮细胞的增殖无明显抑制作用($P > 0.05$)。因此选择 13.2 mol \cdot L⁻¹ VFA 作为后续细胞处理的浓度。

2.3 不同浓度 IL-10 对瘤胃上皮细胞活性的影响

由图 3 可知,用不同浓度 IL-10(0、0.1、1、10、50、100 ng \cdot mL⁻¹) 处理瘤胃上皮细胞 12 h 后,50 和 100 ng \cdot mL⁻¹ IL-10 对瘤胃上皮细胞的活力有明显的抑制作用($P < 0.05$),但是出于细胞耐受性及致炎效果考虑,选择 50 ng \cdot mL⁻¹ IL-10 作为后续细胞处理的浓度。

2.4 不同处理物对瘤胃上皮细胞 VFA 吸收相关基因表达的影响

如图 4 所示,VFA 添加组与空白组比较,VFA



图中小写字母完全不同者为差异显著 $P < 0.05$,下同
The different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$), the same as below

图 2 不同浓度 VFA 对瘤胃上皮细胞活性的影响

Fig. 2 Effects of VFA at different concentrations on the activity of rumen epithelial cells

的添加能够显著促进 *PAT1*、*AE2* 和 *NHE1* 基因的表达($P < 0.05$),而对 *NF- κ B* 基因的表达没有显著影响,表明添加 VFA 没有造成瘤胃上皮细胞产生炎症反应。在中性条件下,IL-10 添加组显著下调

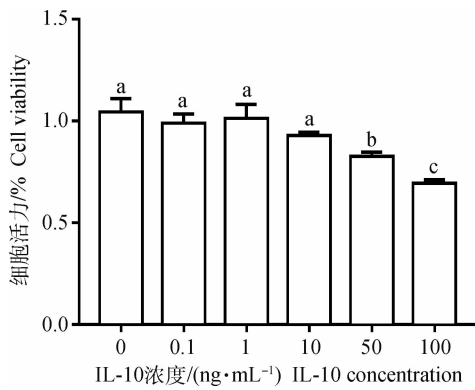


图3 不同浓度 IL-10 对瘤胃上皮细胞活性的影响

Fig. 3 Effects of IL-10 at different concentrations on the activity of rumen epithelial cells

了 $NF-\kappa B$ 、 $PAT1$ 、 $MCT1$ 、 $NHE1$ 基因的相对表达 ($P < 0.05$), $AE2$ 基因被显著性上调 ($P < 0.05$), 而对 $MCT4$ 基因的表达没有显著影响。pH5.5 组与 pH7.2 组比较, pH5.5 组 $NF-\kappa B$ 基因表达显著上调 ($P < 0.05$)。表明低 pH 对瘤胃上皮细胞有致炎作用。在酸性条件下, IL-10 添加组的 $NF-\kappa B$ 基因表达被显著性抑制 ($P < 0.05$), 而促进 $PAT1$ 、 $MCT1$ 、 $MCT4$ 基因表达 ($P < 0.05$)。表明在酸性条件下, IL-10 有一定的抗炎作用, 并且有利于 VFA 的吸收。

2.5 不同处理物对于瘤胃上皮细胞 β -羟丁酸 (β -HB) 分泌量的影响

如图 5 所示, VFA 添加组与空白组比较, β -羟丁酸分泌量没有显著性变化 ($P > 0.05$)。与 pH7.2 + VFA 组比较, pH7.2 + VFA + IL-10 组 β -羟丁酸分泌量显著性增加 ($P < 0.05$)。pH5.5 + VFA 组与 pH7.2 + VFA 组比较, β -羟丁酸分泌量没有显著变化 ($P > 0.05$)。与 pH5.5 + VFA 组比较, pH5.5 + VFA + IL-10 组 β -羟丁酸分泌量显著增加 ($P < 0.05$)。

3 讨论

亚急性瘤胃酸中毒是奶牛常见的营养代谢病, 主要是由高精料饲喂导致奶牛瘤胃内 VFA 的积累, 从而降低瘤胃 pH, 破坏瘤胃内环境引起机体炎症反应。NF- κB 作为细胞炎症反应的重要标志物, Zhao 等^[16] 研究表明, 高精料饲喂能激活牛瘤胃上皮组织 NF- κB 炎症信号通路。而牛在高精料饲喂情况下产生的炎症反应由瘤胃内多种因素造成, 例如: 低 pH^[17]、LPS^[18]、组胺^[19] 等。而 LPS 引起机体的炎症反应会导致多种细胞因子的释放, 例如: IL-

1 β 、IL-6、IL-8、IL-10 等。据报道, 低 pH、LPS、组胺、IL-1 β 、IL-6 及 IL-8 都能引起细胞炎症反应, 并引起细胞 NF- κB 基因表达上调^[17-19]。与本试验中, 低 pH 引起 NF- κB 基因表达上调一致。然而, IL-10 作为一种抗炎细胞因子参与了促炎细胞因子的调节活性^[20]。IL-10 的释放有助于调控促炎细胞因子水平, 防止组织过度损伤和过度免疫反应^[21]。因此, IL-10 具有缓解细胞炎症的功能。在本试验低 pH 条件下, IL-10 也具有缓解瘤胃上皮细胞炎症并且降低 NF- κB 基因表达的作用。

瘤胃 VFA 可通过扩散或蛋白介导途径被瘤胃上皮有效吸收^[22-23]。在瘤胃上皮细胞中, 主要存在 3 种类型蛋白介导 VFA 吸收^[24]。一是 VFA⁻/H⁺ 交换载体, 主要包括阴离子交换蛋白 2 (AE2)、假定阴离子转运蛋白 1 (PAT1)^[25-26], AE2 和 PAT1 主要是 VFA⁻ 和 HCO₃⁻ 交换载体; 二是 VFA⁻ 和 H⁺ 共同转运体, 主要包括单羧酸转运蛋白 1 (MCT1) 和单羧酸转运蛋白 4 (MCT4)^[27], 现已证明, MCT1 和 MCT4 与 VFA 吸收有关^[28-30]; 三是细胞稳态调节蛋白, 包括钠氢离子交换蛋白 1 (NHE1)。AE2 和 PAT1 蛋白决定瘤胃上皮细胞 VFA 吸收能力, 特别是乙酸主要通过 HCO₃⁻ 吸收^[31]。Cl⁻/HCO₃⁻ 交换时, Cl⁻ 转运吸收有利于丁酸的吸收^[32-33]。MCT1 可以调控乙酸和丙酸在胃肠道吸收, 有研究^[34-35] 发现, MCT1 在基层可转运乙酸和丙酸进入血液, 同时, MCT1 和 MCT4 也可以转运酮体进入血液。随着瘤胃 VFA 积累, NHE1 调节瘤胃上皮细胞 pH, NHE1 在维持瘤胃上皮细胞稳态中发挥着重要作用^[36]。

VFA 作为反刍动物的主要能量来源。虽然体外研究表明, 高浓度 VFA 对瘤胃上皮细胞活性有抑制作用, 但是在本试验中, VFA 浓度并不影响细胞活性, 并且不引起细胞炎症反应, 可以进行下一步研究。本试验中, VFA 促进瘤胃上皮细胞 NHE1 和 AE2 基因的表达, 有利于 VFA 吸收和调节瘤胃上皮细胞 pH。NHE1 表达有利于调节 VFA 吸收后细胞酸碱度平衡, 维持瘤胃上皮细胞稳态。

3.1 IL-10 在中性条件下对瘤胃上皮细胞 VFA 吸收的影响

在 pH7.2 添加 VFA 和 IL-10 组发现, IL-10 抑制了 MCT1、PAT1、NHE1 的基因表达。在 Zhao 等^[37] 的研究中, 通过低 pH 降低了瘤胃上皮细胞 MCT1 基因表达, 同时抑制了 VFA 的吸收。Kirat 等^[13]

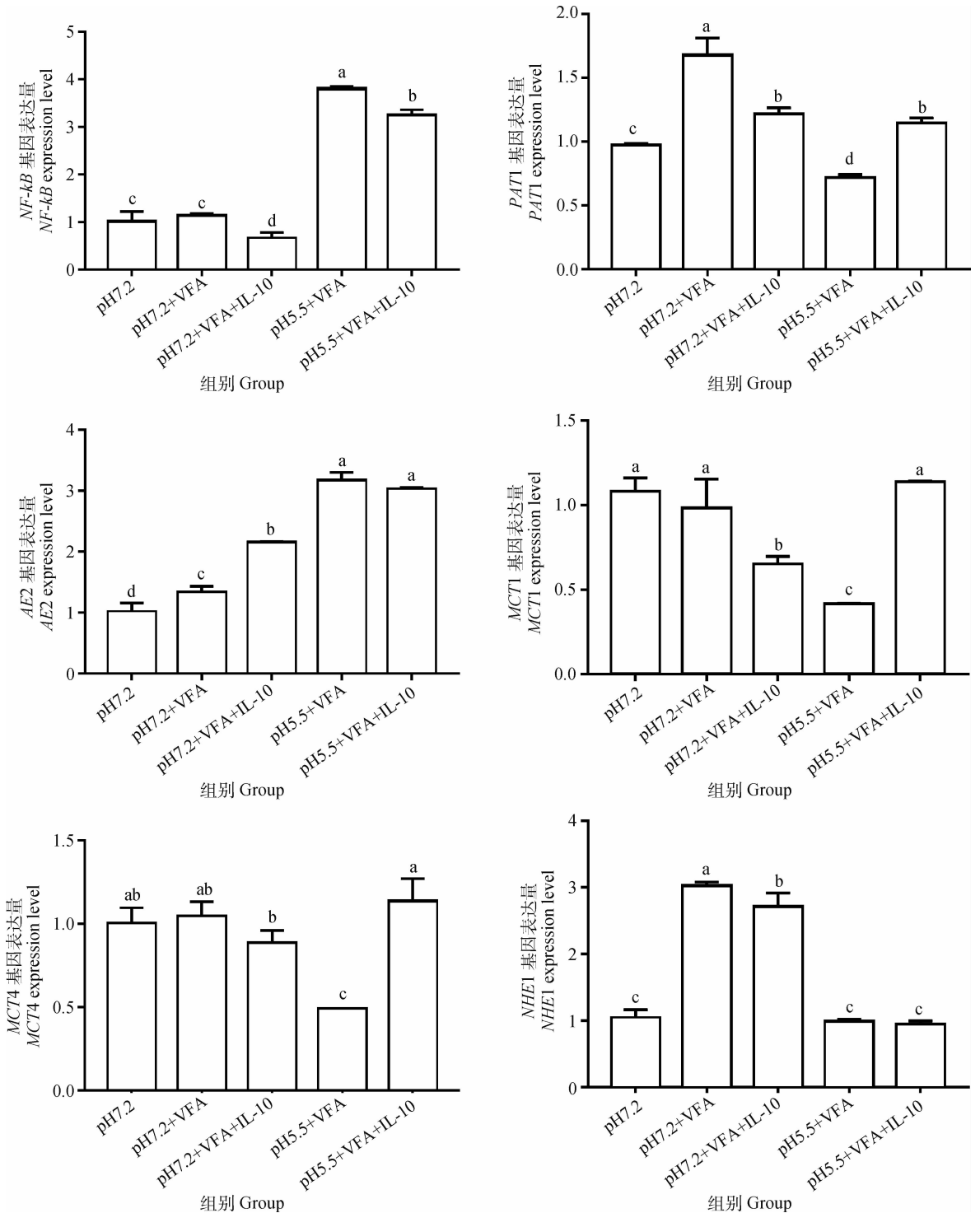


图 4 细胞在不同处理下相关基因表达的柱状图

Fig. 4 Histogram of related genes expression in cells under different treatments

通过 MCT1 抑制剂处理瘤胃上皮细胞发现,乙酸和丙酸吸收被显著抑制。因此, MCT1 基因表达下降会抑制乙酸和丙酸的吸收。MCT1 基因表达下调导致进入瘤胃上皮细胞的乙酸和丙酸减少,减少细胞内 H^+ 和 OH^- 产生,影响细胞内 HCO_3^- 产生。

然而,来自上皮细胞内的 HCO_3^- 是通过 PAT1 为瘤胃提供 HCO_3^- ,从而中和瘤胃内 H^+ 生成 CO_2 和 H_2O ^[25],由于 VFA 吸收受阻,细胞内 HCO_3^- 含量减少,所以 PAT1 基因表达显著下降。细胞内 H^+ 依赖 NHE1 与血液中 Na^+ 进行交换,稳定细胞内

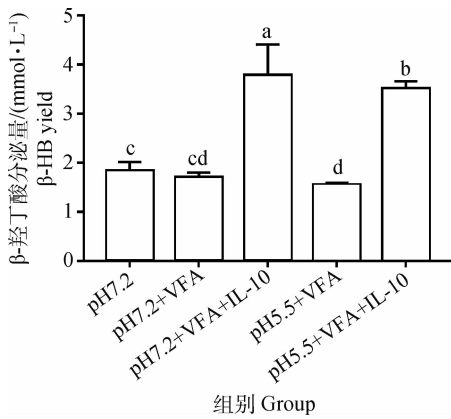


图5 细胞在不同处理下β-羟丁酸分泌量的柱状图

Fig. 5 Histogram of bHBA yield in cells under different treatments

pH,由于VFA吸收受阻,细胞内 H^+ 含量减少,所以 $NHE1$ 基因表达显著下降。然而,我们发现,IL-10上调 $AE2$ 的基因表达,而 $AE2$ 是 Cl^- 转运体, Cl^- 转运丁酸进入细胞进行酮体合成并产生能量。前人研究表明,机体免疫应答会增加基础代谢导致能量需要增加^[38],提高细胞对丁酸的利用会产生大量β-羟丁酸。因此,培养基中β-羟丁酸含量明显增高可能是IL-10上调 $AE2$ 基因表达的作用。

3.2 IL-10在酸性条件下对瘤胃上皮细胞VFA吸收的影响

Zhao等^[37]在体外通过低pH处理瘤胃上皮细胞发现瘤胃上皮VFA吸收减少,并且降低了 $MCT1$ 基因表达。在本试验中,低pH处理细胞除了降低 $MCT1$ 基因表达,还降低了 $PAT1$ 、 $MCT4$ 、 $NHE1$ 基因表达。这就更进一步说明,高精料饲喂降低瘤胃pH导致瘤胃上皮细胞VFA吸收减少,进一步加剧VFA在瘤胃中的积累。在酸性条件下, $NF-\kappa B$ 基因表达上调,炎症状态机体能量需要增加^[38], $AE2$ 基因表达上调增加丁酸摄取。 $MCT1$ 和 $MCT4$ 除了能调控VFA吸收之外,还负责瘤胃细胞内β-羟丁酸转运^[13,29]。 $MCT1$ 和 $MCT4$ 基因表达下调抑制丁酸代谢产物β-羟丁酸转运出瘤胃上皮细胞外,从而破坏细胞内环境平衡,影响细胞活性。

牛发生SARA主要是因为牛采食高精料后瘤胃长时间处于低pH环境,瘤胃低pH破坏瘤胃上皮组织黏膜使瘤胃内革兰阴性菌大肠杆菌进入血液循环^[39]。在大肠杆菌感染期间,IL-10的释放有助于机体缓解炎症反应^[40]。在本试验中,瘤胃上皮细胞在酸性条件下引起的炎症反应经过IL-10处理,

降低 $NF-\kappa B$ 基因表达,缓解瘤胃上皮炎症反应,同时,提高 $PAT1$ 、 $MCT1$ 、 $MCT4$ 基因表达,促进VFA吸收,释放出β-羟丁酸。因此,SARA引起机体炎症反应,IL-10作用于瘤胃上皮细胞缓解细胞炎症,促进VFA吸收,减少瘤胃内VFA积累,使瘤胃pH以及VFA恢复到正常水平。

4 结论

综上所述,在酸性条件下,IL-10可以增加瘤胃上皮对VFA的吸收与利用,并且改善低pH条件下VFA吸收相关蛋白基因的表达。因此,IL-10通过平衡瘤胃上皮细胞炎症反应的方式促进VFA吸收。所以,发生SARA时,血液中的IL-10可以增加瘤胃内VFA吸收,并且促进β-羟丁酸分泌,满足机体其他部位能量供应,缓解SARA。

参考文献(References):

- [1] VISENTIN G, NIERO G, BERRY D P, et al. Genetic (co)variances between milk mineral concentration and chemical composition in lactating Holstein-Friesian dairy cows[J]. *Animal*, 2019, 13(3): 477-486.
- [2] KLIEM K E, HUMPHRIES D J, KIRTON P, et al. Differential effects of oilseed supplements on methane production and milk fatty acid concentrations in dairy cows[J]. *Animal*, 2019, 13(2): 309-317.
- [3] BALDWIN R L, CONNOR E E. Rumen function and development[J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2017, 33(3): 427-439.
- [4] 杨春涛, 刁其玉, 司丙文, 等. 挥发性脂肪酸在反刍动物瘤胃上皮吸收转运及调节作用[J]. *中国畜牧杂志*, 2015, 51(7): 78-83.
YANG C T, DIAO Q Y, SI B W, et al. Absorption and regulation of volatile fatty acids in the ruminal epithelium[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2015, 51(7): 78-83. (in Chinese)
- [5] DIJKSTRA J, BOER H, VAN BRUCHEM J, et al. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume[J]. *Br J Nutr*, 1993, 69(2): 385-396.
- [6] JACOBSEN S, ANDERSEN P H, AASTED B. The cytokine response of circulating peripheral blood mononuclear cells is changed after intravenous injection of lipopolysaccharide in cattle[J]. *Vet J*, 2007, 174(1): 170-175.
- [7] 胡永林, 张祥胤, 毋程飞, 等. 高精料日粮对奶山羊肝、

- 脾炎症因子表达的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(7):1646-1655.
- HU Y L, ZHANG X Y, WU C F, et al. Effects of high concentrate diet on expression of inflammatory factors of liver and spleen in dairy goats[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(7): 1646-1655. (in Chinese)
- [8] CHALMEH A, BADIEI K, POURJAFAR M, et al. Modulation of inflammatory responses following insulin therapy in experimentally bolus intravenous *Escherichia coli* lipopolysaccharide serotype O55: B5 induced endotoxemia in Iranian fat-tailed sheep[J]. *Small Ruminant Res*, 2013, 113(1): 283-289.
- [9] JING L H, ZHANG R Y, LIU Y J, et al. Intravenous lipopolysaccharide challenge alters ruminal bacterial microbiota and disrupts ruminal metabolism in dairy cattle[J]. *Br J Nutr*, 2014, 112(2): 170-182.
- [10] WALDRON M R, NISHIDA T, NONNECKE B J, et al. Effect of lipopolysaccharide on indices of peripheral and hepatic metabolism in lactating cows[J]. *J Dairy Sci*, 2003, 86(11): 3447-3459.
- [11] ADEREM A, ULEVITCH R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response [J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 782-787.
- [12] YAN L, ZHANG B, SHEN Z M. Dietary modulation of the expression of genes involved in short-chain fatty acid absorption in the rumen epithelium is related to short-chain fatty acid concentration and pH in the rumen of goats[J]. *J Dairy Sci*, 2014, 97(9): 5668-5675.
- [13] KIRAT D, MASUOKA J, HAYASHI H, et al. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen[J]. *J Physiol*, 2006, 576(2): 635-647.
- [14] DE CAMPOS F T, RINCON J A A, ACOSTA D A V, et al. The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on serum and intrafollicular HDL components and gene expression in granulosa cells of the bovine dominant follicle[J]. *Theriogenology*, 2017, 89: 244-249.
- [15] SCHLAU N, GUAN L L, OBA M. The relationship between rumen acidosis resistance and expression of genes involved in regulation of intracellular pH and butyrate metabolism of ruminal epithelial cells in steers[J]. *J Dairy Sci*, 2012, 95(10): 5866-5875.
- [16] ZHAO K, CHEN Y H, PENNER G B, et al. Transcriptome analysis of ruminal epithelia revealed potential regulatory mechanisms involved in host adaptation to gradual high fermentable dietary transition in beef cattle[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 976.
- [17] GUO J F, CHANG G J, ZHANG K, et al. Rumen-derived lipopolysaccharide provoked inflammatory injury in the liver of dairy cows fed a high-concentrate diet[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(29): 46769-46780.
- [18] MALIK M I, RASHID M A. Genomics of subacute ruminal acidosis[J]. *Large Anim Rev*, 2020, 26(2): 93-98.
- [19] SUN X D, YUAN X, CHEN L, et al. Histamine induces bovine rumen epithelial cell inflammatory response via NF- κ B pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(3): 1109-1119.
- [20] MÜHL H, PFEILSCHIFTER J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon- γ [J]. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3(9): 1247-1255.
- [21] MOCELLIN S, MARINCOLA F M, ROSSI C R, et al. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15(1): 61-76.
- [22] LEONHARD-MAREK S, STUMPF F, MARTENS H. Transport of cations and anions across forestomach epithelia: conclusions from *in vitro* studies[J]. *Animal*, 2010, 4(7): 1037-1056.
- [23] YAN L, ZHANG B, SHEN Z M. Dietary modulation of the expression of genes involved in short-chain fatty acid absorption in the rumen epithelium is related to short-chain fatty acid concentration and pH in the rumen of goats[J]. *J Dairy Sci*, 2014, 97(9): 5668-5675.
- [24] 李洋, 高民, 胡红莲, 等. 反刍动物瘤胃挥发性脂肪酸的吸收机制[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(6): 2070-2078.
- LI Y, GAO M, HU H L, et al. Ruminal absorption mechanism of volatile fatty acids in ruminants[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(6): 2070-2078. (in Chinese)
- [25] BILK S, HUH N K, HONSCHA K U, et al. Bicarbonate exporting transporters in the ovine ruminal epithelium[J]. *J Comp Physiol B*, 2005, 175(5): 365-374.
- [26] 艳城, 金鹿, 孙海洲, 等. 饲料不同非纤维性碳水化合物/中性洗涤纤维对细毛羊氮代谢、瘤胃内环境及挥发性脂肪酸吸收的影响[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(4): 1685-1694.
- YAN C, JIN L, SUN H Z, et al. Effects of dietary

- different non-fiber carbohydrate/neutral detergent fiber on nitrogen metabolism, rumen environment and volatile fatty acid absorption of fine wool sheep[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(4): 1685-1694. (in Chinese)
- [27] DIEHO K, VAN BAAL J, KRUIJT L, et al. Effect of supplemental concentrate during the dry period or early lactation on rumen epithelium gene and protein expression in dairy cattle during the transition period [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(9): 7227-7245.
- [28] GRAHAM C, GATHERAR I, HASLAM I, et al. Expression and localization of monocarboxylate transporters and sodium/proton exchangers in bovine rumen epithelium [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007, 292(2): R997-R1007.
- [29] KIRAT D, MATSUDA Y, YAMASHIKI N, et al. Expression, cellular localization, and functional role of monocarboxylate transporter 4 (MCT4) in the gastrointestinal tract of ruminants [J]. *Gene*, 2007, 391(1-2): 140-149.
- [30] 李晓彤, 杨凯, 张瑞阳, 等. 反刍动物瘤胃发育规律及其调控机制研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(7): 2055-2062.
- LI X T, YANG K, ZHANG R Y, et al. Research progress of rumen development and its regulation mechanism of ruminants [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(7): 2055-2062. (in Chinese)
- [31] PENNER G B, ASCHENBACH J R, GÄBEL G, et al. Technical note: Evaluation of a continuous ruminal pH measurement system for use in noncannulated small ruminants [J]. *J Anim Sci*, 2009, 87(7): 2363-2366.
- [32] SEHESTED J, BASSE A, ANDERSEN J B, et al. Feed-induced changes in transport across the rumen epithelium [J]. *Comp Biochem Phys A*, 1997, 118(2): 385-386.
- [33] MARTENS H, RABBANI I, SHEN Z M, et al. Changes in rumen absorption processes during transition [J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2012, 172(1-2): 95-102.
- [34] CONNOR E E, LI R W, BALDWIN R L, et al. Gene expression in the digestive tissues of ruminants and their relationships with feeding and digestive processes [J]. *Animal*, 2010, 4(7): 993-1007.
- [35] MÜLLER F, HUBER K, PFANNKUCHE H, et al. Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1 [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 283(5): G1139-G1146.
- [36] 马嘉琪, 陈章炜, 钱菊英. 钠氢交换蛋白 1 及其抑制剂的研究进展 [J]. *中国心血管杂志*, 2019, 24(1): 89-93.
- MA J Q, CHEN Z W, QIAN J Y. Research progress of sodium hydrogen exchange protein-1 and its inhibitors [J]. *Chinese Journal of Cardiovascular Medicine*, 2019, 24(1): 89-93. (in Chinese)
- [37] ZHAO C X, WANG Y Z, PENG Z C, et al. Subacute ruminal acidosis suppressed the expression of MCT1 in rumen of cows [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 11734-11745.
- [38] 魏凤仙. 湿度和氨暴露诱导的慢性应激对肉仔鸡生长性能、肉品质、生理机能的影响及其调控机制 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- WEI F X. Effects of exposure to humidity and ammonia-induced chronic stress on growth performance, meat quality, physiological function in broilers and its regulating mechanism [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2012. (in Chinese)
- [39] SULABH S, PANIGRAHI M, VARSHNEY R, et al. *In-vitro* analysis of Interleukin-10 expression in cell cultures of Crossbred cattle, Tharparkar cattle and Murrah buffalo in response to mastitis causing antigens derived from *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J/OL]. *Biol Rhythm Res*, 2019, doi: 10.1080/09291016.2019.1628407.
- [40] JIN D, CHANG G J, ZHANG K, et al. Rumen-derived lipopolysaccharide enhances the expression of lingual antimicrobial peptide in mammary glands of dairy cows fed a high-concentrate diet [J]. *BMC Vet Res*, 2016, 12(1): 128.

(编辑 范子娟 郭云雁)