

蛋氨酸对奶牛乳腺上皮细胞内乳蛋白和乳糖合成的调节作用

赵艳丽 闫素梅* 郭晓宇 史彬林 陈璐

(内蒙古农业大学动物科学学院,内蒙古自治区高校动物营养与饲料科学重点实验室,呼和浩特 010018)

摘要: 本试验旨在研究蛋氨酸(Met)对泌乳奶牛乳腺上皮细胞(BMECs)内乳糖含量及乳蛋白和乳糖合成相关基因和蛋白表达的影响,探讨Met对乳蛋白和乳糖合成的影响机理。将第3代BMECs随机分为6个组,每个组6个重复。Met终浓度分别为0.13、0.26、0.39、0.52、0.65和0.78 mmol/L,37℃、5% CO₂培养48 h后测定BMECs活力、ATP含量、乳蛋白和乳糖合成相关基因和蛋白表达及细胞液中乳糖含量。结果表明:与0.13和0.78 mmol/L组相比,0.39~0.65 mmol/L组细胞活力显著增加($P<0.05$),0.26~0.52 mmol/L组的葡萄糖转运蛋白1和 α -乳清白蛋白的基因相对表达量显著下降($P<0.05$),0.39 mmol/L组乳糖含量显著增加($P<0.05$)。与0.13~0.26 mmol/L组相比,0.39~0.52 mmol/L组信号转导和转录因子5、真核起始因子4E基因相对表达量及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白、核糖体蛋白S6激酶1磷酸化水平显著增加($P<0.05$)。0.52 mmol/L组ATP含量、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白和酪氨酸激酶2基因相对表达量显著高于其他组($P<0.05$),但腺苷酸活化蛋白激酶磷酸化水平显著低于其他组($P<0.05$)。0.26~0.52 mmol/L组的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白基因相对表达量显著高于0.65~0.78 mmol/L组($P<0.05$)。综合乳蛋白和乳糖合成的多项指标,0.39~0.52 mmol/L的Met对BMECs乳蛋白基因和蛋白表达及乳糖的合成促进效果较好。

关键词: 奶牛;乳腺上皮细胞;蛋氨酸;乳蛋白;乳糖

中图分类号:S823

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)04-2073-10

乳腺组织的基本功能是产乳,为后代的生长和发育提供营养,牛奶的主要成分是乳蛋白、乳脂和乳糖^[1]。乳蛋白是衡量牛奶质量的重要指标之一,也是牛奶作为高营养食品的基本条件。乳糖是牛奶中的主要碳水化合物,是影响牛奶产量高低的决定因素。乳糖产量与乳产量呈高度的正相关^[2-3]。必需氨基酸作为乳蛋白合成的重要前体物,可同时促进奶牛乳腺上皮细胞(BMECs)内乳蛋白和乳糖的合成^[4]。蛋氨酸(Met)是乳蛋白合成的必需氨基酸,也是奶牛的第一限制性氨基酸。因此,深入探讨Met对乳蛋白和乳糖合成的影响

及其机理对提高产奶量和改善乳品质有重要意义。奶牛饲料添加过瘤胃蛋氨酸可显著提高产奶量、乳蛋白率^[5]和乳糖含量^[6]。体外研究发现,0.4 mmol/L的Met可以促进BMECs内乳蛋白合成和乳糖分泌^[7]。可见Met调节乳蛋白合成的同时,对乳糖合成也有一定的影响。然而,前人的研究多偏重于Met对奶牛乳成分尤其是乳蛋白合成的影响效果,研究其对乳蛋白合成的影响机理较少,尤其对乳糖合成的影响机理探索则更少,有必要对此进行深入研究。鉴于此,本研究以BMECs为模型,从基因和蛋白质水平研究Met对乳蛋白

收稿日期:2020-09-18

基金项目:内蒙古自治区高校科研项目(NJZY19055);内蒙古农业大学高水平人才引进科研启动基金项目(NDYB-2017);国家奶业“973计划”项目(2011CB1008003)

作者简介:赵艳丽(1986—),女,陕西榆林人,讲师,博士,从事反刍动物营养研究。E-mail: ylzha2010@163.com

*通信作者:闫素梅,教授,博士生导师,E-mail: yansimau@163.com

和乳糖合成的影响,为深入研究 Met 对乳蛋白和乳糖合成的调节机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验设计

采用胶原酶消化法培养 BMECs,具体参照 Sheng 等^[8]的方法进行,原代细胞贴壁率达约 90% 后进行纯化和传代。试验采用单因子随机试验设计,将第 3 代 BMECs 培养 24 h 后随机分为 6 个组,每组 6 个重复。根据课题组前期的试验结果^[9]选取不同浓度的 Met,分别为 0.13(对照)、0.26、0.39、0.52、0.65 和 0.78 mmol/L,DMEM/F12 培养基(Gibco)中 Met 浓度为 0.13 mmol/L,是王新朋^[10]报道中奶牛动脉血中 Met 浓度的 5 倍。BMECs 贴壁率为 80%~90%时,无血清 DMEM/F12 培养基饥饿 12 h 后每孔加入含不同浓度 Met 的培养基。37℃、5% CO₂ 培养 48 h,研究 Met 对 BMECs 内乳蛋白和乳糖合成的影响机理。

1.2 测试指标与方法

1.2.1 细胞活力的测定

细胞活力采用噻唑兰(MTT)法测定^[8],用细胞相对增殖率(RGR)表示。在培养结束前 4 h,每孔加入 20 μL 的 5 mg/mL MTT(Amresco),培养结束后弃上清液,每孔加入 100 μL 二甲基亚枫(DMSO),振荡 10 min,使用全自动酶标仪(Synergy H4, Bio-Tek)于 490 nm 波长下检测培养孔的吸光值(OD)。

$$RGR(\%) = (\text{试验组 } OD_{490} / \text{对照组 } OD_{490}) \times 100。$$

1.2.2 乳糖含量的测定

BMECs 培养液中乳糖含量采用酶联免疫法,按照试剂盒(厦门慧嘉生物科技有限公司)说明书进行测定。将细胞悬液以 2×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔培养板,按试验设计培养 48 h 后收集培养液,3 000×g 离心 20 min,收集上清。将标准品分别稀释至 1 200、800、400、200 和 100 μg/L,分别取 50 μL 加入标准样品孔内。待测样品孔内加入 40 μL 稀释液和 10 μL 待测样品,37℃温育 30 min 后清洗 5 次。加入酶标试剂 50 μL,37℃温育 30 min,洗涤 5 次;然后加入显色剂 A 和 B 各 50 μL,混匀,37℃避光显色 15 min,加入 50 μL 终

止液。使用全自动酶标仪(Synergy H4, Bio-Tek),450 nm 波长下空白调零后,测定 OD,根据标准曲线计算样品中乳糖的含量。

1.2.3 BMECs 内 ATP 含量

采用化学发光法测定 BMECs 内的 ATP 含量^[11]。BMECs 于工作液培养基中培养 48 h 后弃培养基,每孔加入 200 μL 裂解液,4℃、15 455×g 离心 5 min,取上清备用。用检测裂解液将标准溶液稀释至 0.01、0.03、0.10、0.30、1.00、3.00 和 10.00 μmmol/L。将稀释液和检测试剂按照 1:9 混合后作为工作液。最后孔内加入 100 μL 工作液,室温放置 3 min 后加入 20 μL 样品或标准品,迅速混匀,使用酶标仪(Synergy H4, Bio-Tek)测定闪光值。根据标准曲线计算样品中 ATP 的含量,以 nmol/mg prot 形式表示。

1.2.4 基因的表达和磷酸化水平的测定

总 RNA 提取采用 Trizol 法^[11],RNA 反转录使用 PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa)试剂盒并按说明书进行。依据 SYBY Premix Ex TaqTM II(TaKaRa)试剂盒说明书,采用实时荧光定量 PCR 检测乳蛋白和乳糖合成相关基因的表达,基因引物序列详见表 1。管家基因为磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)和 β-肌动蛋白(ACTB)。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

采用 Western Blotting 法^[11]测定哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、核糖体蛋白 S6 激酶 1(S6K1)、真核起始因子 4E 结合蛋白 1(4EBP1)、真核起始因子 4E(eIF4E)和腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)的磷酸化水平。使用 Quantity one 软件进行灰度值分析。

$$\text{磷酸化水平值} = \frac{\text{各组磷酸化灰度值}}{\text{对应蛋白的灰度值。}}$$

mTOR、p-mTOR、eIF4E、p-eIF4E、S6K1、p-S6K1、4EBP1、p-4EBP1 抗体购自 Abcam 公司。

1.3 数据处理

所有数据通过 Excel 2010 进行计算和整理,采用 SAS 9.0 分析软件的方差分析(ANOVA)程序进行显著性检验。使用回归统计程序进行一次线性与二次曲线回归分析。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $0.05 < P < 0.10$ 表示差异趋于显著。

表 1 乳蛋白和乳糖合成相关基因的引物序列

Table 1 Primer sequence of genes related with milk protein and lactose synthesis

基因 Genes	GenBank 登录号 GenBank accession No.	引物序列 Primer sequences (5'—3')	长度 Length/bp
磷酸甘油醛脱氢酶 <i>GAPDH</i>	XM_001252479	F:GGTCATCATCTCTGCACCT R:GGTCATAAGTCCCTCCACGA	177
β -肌动蛋白 <i>ACTB</i>	NM_173979	F:AACTCCATCATGAAGTGTGACG R:GATCCACATCTGCTGGAAGG	234
α S-1 酪蛋白 <i>CSN1S1</i>	NM_181029	F:ACATCCTATCAAGCACCAAGGACTC R:GACGAAATGCTTTCAGCTTCCA	192
β -酪蛋白 <i>CSN2</i>	M-64755.1	F:TCTGCCTCTGCTCCAGTCTT R:AGGAGGGGGCATTCACTTT	116
κ -酪蛋白 <i>CSN3</i>	NM_174294	F:CCAGGAGCAAACCAAGAAC R:TGCAACTGGTTTCTGTTGGT	148
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 <i>mTOR</i>	XM_001788228	F:TGAAGTGGAGGCTGATGGACAC R:TGACTGGCCAGCAGAGTAGGAA	83
真核起始因子 4E 结合蛋白 1 <i>4EBP1</i>	BC120290	F:GGCAGGCGGTGAAGAGTC R:CCTGGGCTGCGGGAT	302
核糖体蛋白 S6 激酶 1 <i>S6K1</i>	DN544771	F:CAAGCTTGCATGCTAATTTGTCC R:TTGAGTCCTGATCATGTCAAGA	101
信号转导和转录因子 5 <i>STAT5</i>	NM_001012673	F:AAGACCCAGACCAAGTTCGC R:AGCACCGTGGCAGTAGCAT	422
酪氨酸激酶 2 <i>JACK2</i>	DT897449	F:TGAAGAAAACAGGTAATCAGACTGGA R:AACATTTTCTCGCTCAACAGCA	101
真核起始因子 4E <i>eIF4E</i>	NM_174310.3	F:GAAGACTTTTGGGCTCTGTAC R:CAGCTCCACATACATCATCAC	82
腺苷酸活化蛋白激酶 α 1 <i>AMPKα1</i>	NM_001109802	F:ACCATTCTTGTTGCTGAAACTC R:CACCTGGTGTGGATTCTG	80
α -乳清白蛋白 <i>LALBA</i>	NM_174378.2	F:AGTTTGCCTGAATGGGTCTG R:TGAGTGAGGGTTCTGGTCGT	144
β -1,4-半乳糖基转移酶 <i>β-4GALT1</i>	NM_177512.2	F:GAAGTTGGGTGGTCGCTACA R:CTGACGCTGTACCATTGGGT	133
葡萄糖转运蛋白 1 <i>GLUT1</i>	NM_174602.2	F:GTGCTCCTGGTTCTGTTTCTTCA R:GCCAGAAGCAATCTCATCGAA	84
己糖激酶 I <i>HK I</i>	NM_001012668.1	F:TGATGGGACTGAGAACGG R:TCAATGGGAATGGCGTAG	135
己糖激酶 II <i>HK II</i>	XM_00125583	F:AAGATGCTGCCCACCTACG R:TCGCTTCCCATTCCTCACA	123

2 结果

2.1 Met 对 BMECs 的 RGR、ATP 和乳糖含量及相关基因相对表达量的影响

如表 2 可知,随着 Met 浓度的增加,RGR 呈一元二次增加的趋势 ($P = 0.062$, $R^2 = 0.8434$),其中,0.39 ~ 0.65 mmol/L 组显著高于 0.13 和 0.78 mmol/L 组 ($P < 0.05$)。ATP 含量随着 Met 浓

度增加呈显著的一元二次增加 ($P = 0.027$, $R^2 = 0.5507$),以 0.52 mmol/L 组最高,0.78 mmol/L 组最低。0.39 mmol/L 组 BMECs 乳糖含量与 0.65 mmol/L 组差异不显著 ($P > 0.05$),但显著高于其他组 ($P < 0.05$)。

如图 1 可知,葡萄糖转运蛋白 1 (*GLUT1*) 和 α -乳清白蛋白 (*LALBA*) 基因相对表达量随 Met 浓度的增加呈显著的一元二次下降 ($P = 0.019$, $P =$

0.020; $R^2=0.930$, $R^2=0.925$ 4)。GLUT1 基因相对表达量以 0.13 和 0.78 mmol/L 组较高,显著高于其他组 ($P<0.05$); LALBA 基因相对表达量以 0.39 和 0.52 mmol/L 组较低,显著低于其他组 ($P<0.05$)。己糖激酶 I (HK I)、己糖激酶 II (HK II) 和 β -1,4-半乳糖基转移酶-1 (β -4GALT1) 基因相

对表达量与 Met 浓度无显著的剂量依赖关系 ($P>0.05$); 但 0.13 和 0.52 mmol/L 组 HK I 基因相对表达量有高于 0.39 mmol/L 组的趋势 ($0.05<P<0.10$); 0.39~0.52 mmol/L 组的 β -4GALT1 基因相对表达量有高于 0.13 mmol/L 组的趋势 ($0.05<P<0.10$)。

表 2 Met 对 BMECs RGR、ATP 和乳糖合成的影响

Table 2 Effects of Met on RGR, ATP and lactose synthesis of BMECs

项目 Items	Met 浓度 Met concentration/(mmol/L)						SEM	P 值 P-value		
	0.13	0.26	0.39	0.52	0.65	0.78		方差分析 ANOVA	一次 Linear	二次 Quadratic
相对增殖率 RGR/%	100.0 ^c	102.3 ^{bc}	110.3 ^a	113.6 ^a	108.3 ^{ab}	99.9 ^c	1.808	0.001	0.715	0.062
ATP/(nmol/mg prot)	8.76 ^c	15.25 ^b	11.18 ^d	21.45 ^a	12.39 ^c	7.45 ^f	2.301	<0.001	0.875	0.027
乳糖 Lactose/(ng/mL)	255.7 ^b	265.2 ^b	291.8 ^a	266.0 ^b	273.1 ^{ab}	268.6 ^b	2.560	0.036	0.381	0.104

同行数据肩标相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Values in the same line with the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$).

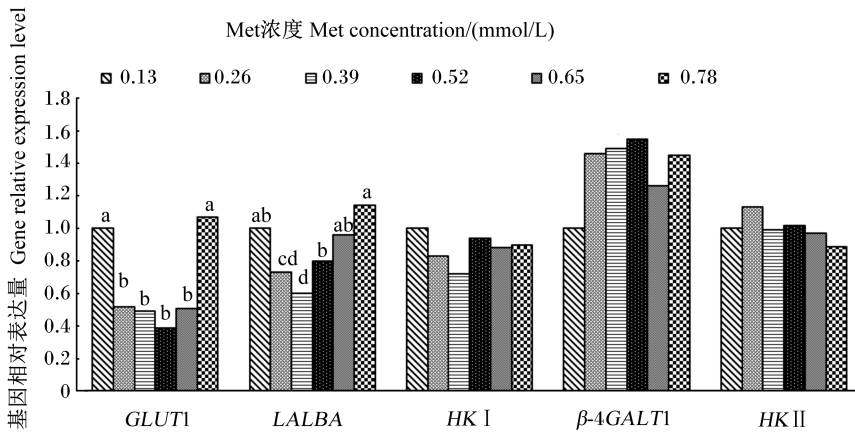


图 1 Met 对 BMECs 内乳糖合成相关基因相对表达量的影响

Fig.1 Effects of Met on relative expression levels of genes involved lactose synthesis in BMECs

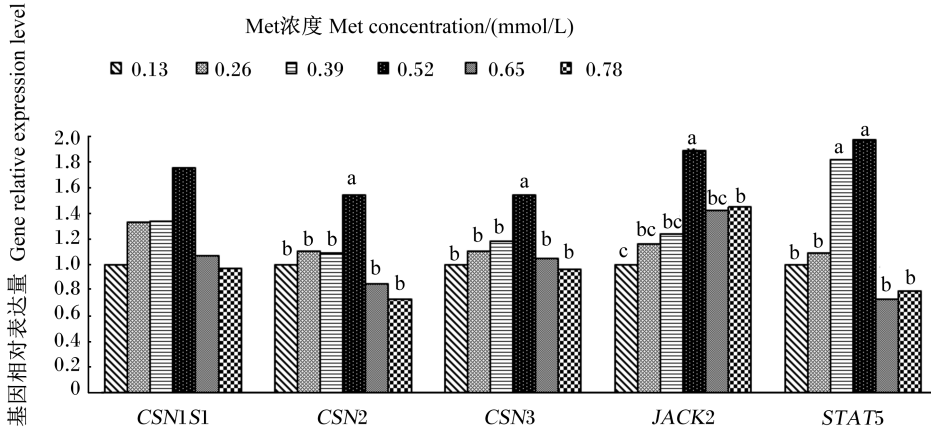
2.2 Met 对 BMECs 内乳蛋白合成相关基因表达和磷酸化水平的影响

如图 2 所示, α S-1 酪蛋白 (CSN1S1) 和 κ -酪蛋白 (CSN3) 基因相对表达量随 Met 浓度的增加呈显著的一元二次增加 ($P<0.001$, $P=0.004$, $R^2=0.978$ 8; $R^2=0.890$ 4), CSN3 基因相对表达量以

0.52 mmol/L 组最高, 0.78 mmol/L 组最低; β -酪蛋白 (CSN2) 基因相对表达量与 Met 浓度无显著的回归关系 ($P>0.05$), 但 0.52 mmol/L 组显著高于其他组 ($P<0.05$)。酪氨酸激酶 2 (JACK2) 和信号转导和转录因子 5 (STAT5) 基因相对表达量随 Met 浓度的增加呈显著的一元二次增加 ($P=$

0.001, $P < 0.001$; $R^2 = 0.9479$, $R^2 = 0.9772$), 0.52 mmol/L 组 *JACK2* 基因表达量显著高于其他组 ($P < 0.05$); 0.39~0.52 mmol/L 组 *STAT5* 基因相

对表达量显著高于其他组 ($P < 0.05$), 其他组间差异不显著 ($P > 0.05$)。



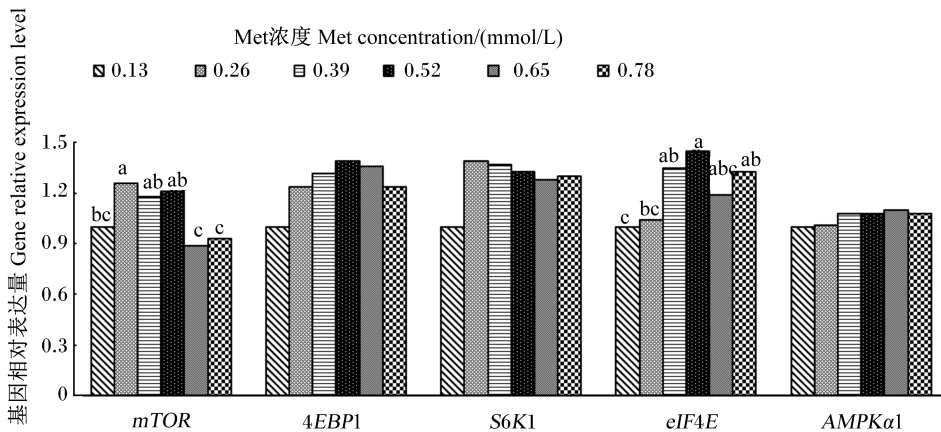
CSN1S1: α S-1 酪蛋白 α S1-casein; *CSN3*: κ -酪蛋白 κ -casein; *CSN2*: β -酪蛋白 β -casein; *JACK2*: 酪氨酸激酶 2 Janus kinase 2; *STAT5*: 信号转导和转录因子 5 signal transducer and activator of transcription 5。

图 2 Met 对 BMECs 内乳蛋白合成相关基因相对表达量的影响

Fig.2 Effects of Met on relative expression levels of genes involved milk protein synthesis in BMECs

如图 3 所示, *mTOR*、*eIF4E* 和 *4EBP1* 基因相对表达量随 Met 浓度的增加呈显著的一元二次增加 ($P = 0.006$, $P < 0.001$, $P = 0.020$; $R^2 = 0.8684$, $R^2 = 0.9610$, $R^2 = 0.7928$), *mTOR* 基因相对表达量以 0.26~0.52 mmol/L 组较高, 0.65~0.78 mmol/L 组较低; *eIF4E* 基因相对表达量 0.39~

0.52 mmol/L 组显著高于 0.13 mmol/L 组 ($P < 0.05$)。 *S6K1* 基因相对表达量随 Met 浓度增加呈显著的一次线性增加 ($P = 0.038$, $R^2 = 0.6756$), 0.26~0.78 mmol/L 组有高于 0.13 mmol/L 组的趋势 ($0.05 < P < 0.10$)。



mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 mammalian target of rapamycin; *S6K1*: 核糖体蛋白 S6 激酶 1 ribosomal protein S6 kinase beta 1; *4EBP1*: 真核起始因子 4E 结合蛋白 1 eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; *eIF4E*: 真核起始因子 4E eukaryotic translation initiation factor 4E; *AMPKα1*: 腺苷酸活化蛋白激酶 α 1 AMP-activated protein kinase α 1。下图同 the same as below。

图 3 Met 对 BMECs 内 mTOR 信号通路相关基因相对表达量的影响

Fig.3 Effects of Met on relative expression levels of genes involved mTOR signaling pathway in BMECs

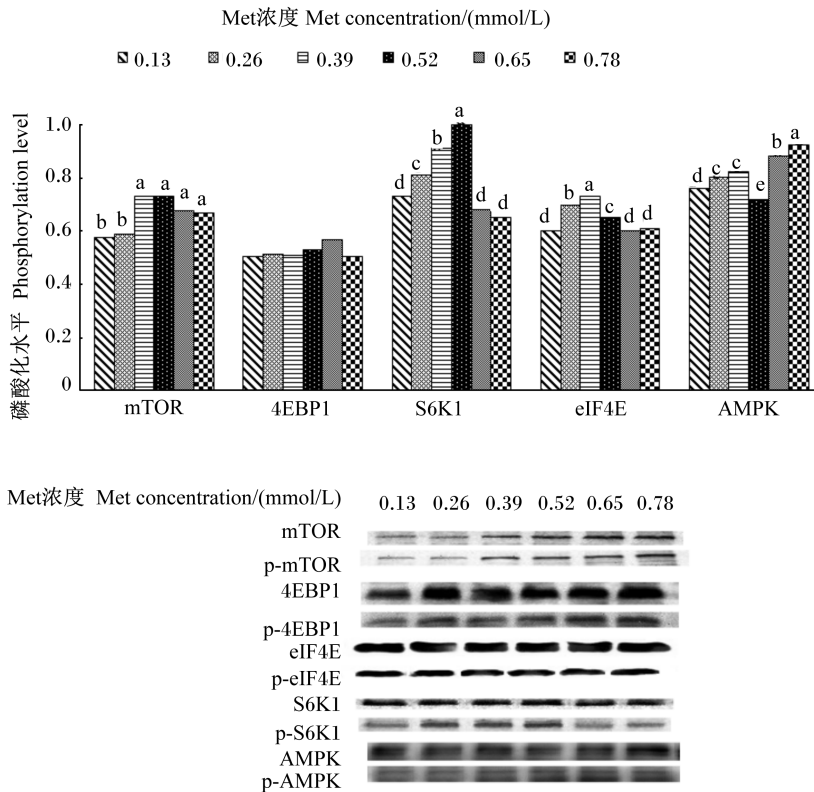


图4 Met对BMECs内mTOR信号通路磷酸化水平的影响

Fig.4 Effects of Met on phosphorylation level of mTOR signaling pathway in BMECs

如图4所示,mTOR、S6K1、eIF4E和AMPK磷酸化水平随Met浓度的增加呈显著的一元二次增加($P=0.001$, $P=0.001$, $P=0.003$, $P=0.002$; $R^2=0.6073$, $R^2=0.6496$, $R^2=0.5441$, $R^2=0.5711$),mTOR磷酸化水平0.39~0.78 mmol/L组显著高于0.13和0.26 mmol/L组($P<0.05$);S6K1磷酸化水平以0.52 mmol/L组最高,0.26~0.52 mmol/L组eIF4E磷酸化水平显著高于其他组($P<0.05$),尤以0.39 mmol/L组最高;AMPK磷酸化水平以0.52 mmol/L组最低,0.78 mmol/L组最高,显著高于其他组($P<0.05$)。Met浓度对4EBP1磷酸化水平影响不显著($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 Met对BMECs内乳蛋白合成相关基因表达及磷酸化水平的影响

氨基酸作为细胞生长的营养素,可以调节细胞的生长。适宜浓度的氨基酸与细胞的增殖存在时间和浓度的最优化效应,若低于或高于该值,增殖率就相应下降^[12],常晨城^[9]研究指出,

0.52 mmol/L的Met提高细胞增殖率。乳蛋白的合成很大程度上受细胞增殖的影响,祁昊等^[13]发现Met可通过激活mTOR信号通路促进BMECs的增殖。本研究得出相似的结果,0.39~0.52 mmol/L组细胞增殖率和mTOR磷酸化水平较高,0.78 mmol/L组均较低,说明适宜浓度Met促进细胞增殖,高浓度反而有抑制作用。

Met是蛋白质合成的第一限制性氨基酸,Nan等^[14]发现,与无氨基酸组相比,0.5 mmol/L Met显著促进BMECs内CSN1S1和CSN3的基因表达,但对CSN3基因表达影响不显著。常晨城^[9]指出,与0.13 mmol/L Met组相比,0.52 mmol/L Met显著上调BMECs内CSN1S1和CSN3的基因表达量,但不影响CSN2的基因表达量。本研究结果表明,Met对于酪蛋白的合成调控有显著的作用,0.52 mmol/L的Met显著上调CSN1S1和CSN3的基因相对表达量,但0.78 mmol/L的Met抑制其表达。JACK2/STAT5和mTOR信号通路是参与乳蛋白调控的2条重要通路。BMECs内生长激素可以通过激活STAT5调控CSN1S1、CSN1S2和

CSN2 mRNA 表达^[15]。与无 Met 组相比, 0.5 mmol/L 的 Met 显著上调 BMECs 内 *JACK2* 和 *STAT5* 基因表达^[14], *JACK2/STAT5* 信号通路是 Met 促进酪蛋白合成的重要途径^[16]。本研究, 0.39~0.52 mmol/L Met 对 *JACK2* 和 *STAT5* 基因相对表达量有较好的促进效果, 因此, Met 通过 *JACK2/STAT5* 通路在转录水平上调乳蛋白合成。

mTOR 通路及下游元件共同参与氨基酸调控乳蛋白的合成。有研究发现, 与氨基酸组相比, 0.5 mmol/L 的 Met 对 BMECs 内 *mTOR* 和 *S6K1* 基因表达均无显著的促进作用, 但 mTOR 磷酸化水平显著增加, Met 对蛋白合成的影响主要在转录后的翻译阶段^[14]。本研究, 发现 *mTOR*、*eIF4E*、*4EBP1* 和 *S6K1* 基因相对表达量及 mTOR 和 *S6K1* 磷酸化水平与 Met 浓度呈剂量依赖关系, 以 0.39~0.52 mmol/L 组较高, 0.78 mmol/L 抑制 *mTOR* 的表达和磷酸化水平, 说明适宜浓度的 Met 通过激活 mTOR 信号通路促进酪蛋白合成。mTOR 信号通路上游的元件 AMPK 是细胞内能量的主要调节器, 调节能量的供应与需求的平衡^[17], 其活性与 mTOR 介导的合成代谢信号通路呈负相关^[18]。当细胞内 ATP 含量下降和 AMP 含量增加时 AMPK 被激活, 抑制 ATP 的消耗^[19]。本研究, 发现 0.26~0.65 mmol/L 组 ATP 含量较高, AMPK 磷酸化水平较低, *mTOR* 基因相对表达量和磷酸化水平和酪蛋白基因表达较高; 相反高浓度 Met 组 ATP 含量较低, AMPK 磷酸化水平较高, mTOR 磷酸化水平和酪蛋白基因表达下降, 说明适宜浓度的 Met 可以通过促进细胞内 ATP 含量抑制 AMPK 磷酸化水平, 进而激活 mTOR 信号通路促进乳蛋白的合成。

3.2 Met 对 BMECs 内乳糖合成及相关基因表达的影响

葡萄糖是乳糖合成的主要前体物, 由于乳腺内缺少葡萄糖-6-磷酸酶, 不能通过糖异生合成葡萄糖^[20]。所以, 在体外研究中, 乳腺内氨基酸对乳糖合成的影响只能通过调控作用来完成。血液中总葡萄糖的 60%~85% 被乳腺吸收^[21]。所以, 乳腺对葡萄糖的吸收是控制乳产量的限速步骤。GLUT 是牛乳腺中主要的葡萄糖转运蛋白, 牛乳腺中主要表达的转运蛋白是 GLUT1, 泌乳期其表达上调几百倍^[22]。*GLUT1* 表达的下调导致葡萄糖

用于合成乳糖的利用率降低^[23]。鸡和大鼠的胸腺中, 随着葡萄糖利用率增加, *GLUT1* mRNA 的表达也增加^[24]。本研究, 发现 0.26~0.65 mmol/L 组 *GLUT1* 基因相对表达量较低, 提示 0.26~0.65 mmol/L 的 Met 抑制细胞对葡萄糖的摄取。乳糖合成酶是由 β -4GALT1 与 LALBA 构成的二聚体, 是乳糖合成和分泌的限速酶。有研究指出, 奶牛饲料添加瘤胃蛋氨酸对血浆葡萄糖含量影响不显著^[25], 乳糖含量的变化也较小^[26]。但体外研究发现, 0.4 mmol/L 的 Met 组 BMECs 乳糖含量显著高于 0.2 mmol/L 组^[8]。本研究, 发现 0.39 mmol/L 组乳糖含量高于其他组。但 0.26~0.52 mmol/L 的 Met 抑制葡萄糖的摄取和乳糖合成酶 *LALBA* 基因相对表达量, 这可能与 β -4GALT1 基因相对表达量增加有关。但目前, 关于 Met 对乳糖合成的影响研究较少, 确切的机理尚不清楚, 有待于进一步研究探讨。

综合以上结果, Met 浓度为 0.39~0.52 mmol/L 时对 BMECs 内乳蛋白和乳糖合成的促进效果较好。目前已有研究证实了体外细胞培养液的氨基酸浓度与血液氨基酸浓度有一定关系, Appuhamy 等^[18] 研究中 BMECs 细胞培养液的氨基酸浓度大于奶牛血液氨基酸浓度。本研究中细胞培养液 Met 的最低浓度约为 Rius 等^[27] 和王新朋^[10] 报道的奶牛动脉血中 Met 浓度的 5 倍。在实际生产中, NRC (2001) 推荐泌乳奶牛 Met 的供给量应占饲料代谢蛋白质的 2.4%, 且有关奶牛饲料添加 Met 的研究多侧重于研究乳成分含量的变化, 而针对影响机理的研究较少, 因此, 本研究利用体外法得出的结果还需要在体内进一步验证。

4 结 论

Met 对 *CSN1S1* 和 *CSN3* 基因表达的促进作用呈剂量依赖关系, 以 0.52 mmol/L 组表达较好, 0.78 mmol/L 组抑制其表达; 0.39~0.52 mmol/L 组对 *JACK2/STAT5*、mTOR 通路相关基因的表达, mTOR 和 *S6K1* 的磷酸化水平及 ATP 含量促进效果较好, 但抑制 AMPK 的磷酸化水平。Met 对 *GLUT1* 和 *LALBA* 基因表达的抑制作用呈显著的剂量依赖关系, 0.52~0.65 mmol/L 组的抑制作用较弱, 但乳糖含量以 0.39 mmol/L 组最高。综合以上指标, Met 浓度为 0.39~0.52 mmol/L 时对乳蛋白和乳糖合成的促进效果较好。

参考文献:

- [1] ANDERSON S M, RUDOLPH M C, MCMANAMAN J L, et al. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland; it's not just about milk protein synthesis! [J]. Breast Cancer Research, 2007, 9(1): 204.
- [2] JOHNSON D L, PETCH S F, WINKELMAN A M, et al. Genetics of milk characteristics in New Zealand dairy cattle [C] // Proceedings of the New Zealand society of animal production. Hamilton; New Zealand Society of Animal Production, 2000, 60: 318-319.
- [3] SNEDDON N W, LOPEZ-VILLALOBOS N, HICKSON R E, et al. Genetic parameters for lactose and its relationship with concentrations and ratios of other milk components [C] // Proceedings of the New Zealand society of animal production. Christchurch; New Zealand Society of Animal Production, 2012, 72: 76-80.
- [4] 王立娜. 氨基酸与 *STAT5A* 基因互作对奶牛乳腺上皮细胞泌乳的调节作用及机理 [D]. 博士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- WANG L N. Effect of interaction between amino acid and *STAT5A* on lactation of dairy cow mammary epithelial cells and its mechanism [D]. Ph.D. Thesis. Harbin; Northeast Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [5] NOFTSGER S, ST-PIERRE N R. Supplementation of methionine and selection of highly digestible rumen undegradable protein to improve nitrogen efficiency for milk production [J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(3): 958-969.
- [6] PATE R T, LUCHINI D, MURPHY M R, et al. Effects of rumen-protected methionine on lactation performance and physiological variables during a heat stress challenge in lactating Holstein cows [J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(3): 2800-2813.
- [7] 王佳丽, 高学军, 李庆章, 等. 蛋氨酸对体外培养奶牛乳腺上皮细胞泌乳能力的影响 [J]. 乳业科学与技术, 2012, 35(1): 8-10.
- WANG J L, GAO X J, LI Q Z, et al. Effect of methionine on lactation ability of dairy cow mammary epithelial cells cultured *in vitro* [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2012, 35(1): 8-10. (in Chinese)
- [8] SHENG R, YAN S M, QI L Z, et al. Effect of the ratios of unsaturated fatty acids on the expressions of genes related to fat and protein in the bovine mammary epithelial cells [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal, 2015, 51(4): 381-389.
- [9] 常晨城. 蛋氨酸及含蛋氨酸二肽对奶牛乳腺上皮细胞内乳蛋白合成相关基因表达的影响 [D]. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015.
- CHANG C C. Effect of methionine and dipeptides containing methionine on genes expression involved in milk protein synthesis in bovine mammary epithelial cells [D]. Master's Thesis. Hohhot; Inner Mongolia Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [10] 王新朋. 阴外动脉灌注氨基酸和脂肪酸对奶牛乳腺蛋白质合成和氨基酸摄取规律的影响 [D]. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015.
- WANG X P. The effects of external pudendal artery infusion of amino acid and fatty acid on protein synthesis and amino acid uptake in mammary glands of dairy cows [D]. Master's Thesis. Hohhot; Inner Mongolia Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [11] ZHAO Y L, YAN S M, CHEN L, et al. Effect of interaction between leucine and acetate on the milk protein synthesis in bovine mammary epithelial cells [J]. Animal Science Journal, 2018, 90(1): 81-89.
- [12] 王志钢, 吴应积, 旭日干. mTOR 信号通路与细胞生长调控 [J]. 生物物理学报, 2007, 23(5): 333-342.
- WANG Z G, WU Y J, XU R G. The mTOR signaling pathway and the regulation of cell growth [J]. ACTA Biophysica Sinica, 2007, 23(5): 333-342. (in Chinese)
- [13] 祁昊, 孟春雨, 高学军, 等. SNAT2 介导蛋氨酸对牛乳腺上皮细胞增殖与自噬的调节作用 [J]. 中国畜牧兽医, 2019(9): 2516-2525.
- QI H, MENG C Y, GAO X J, et al. SNAT2: a key mediator for methionine to regulate proliferation and autophagy in bovine mammary epithelial cells [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2019(9): 2516-2525. (in Chinese)
- [14] NAN X M, BU D P, LI X Y, et al. Ratio of lysine to methionine alters expression of genes involved in milk protein transcription and translation and mTOR phosphorylation in bovine mammary cells [J]. Physiological Genomics, 2014, 46(7): 268-275.
- [15] ZHOU Y, AKERS R M, JIANG H. Growth hormone can induce expression of four major milk protein genes in transfected MAC-T cells [J]. Journal of Dairy Science, 2008, 91(1): 100-108.
- [16] 代文婷. SARS 介导蛋氨酸调节奶牛乳腺上皮细胞

- 酪蛋白合成的机制研究[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2018.
- DAI W T.Mechanism of seryl-tRNA synthetase-mediated methionine regulating casein synthesis in bovine mammary epithelial cells [D]. Ph. D. Thesis. Hangzhou:Zhejiang University,2018. (in Chinese)
- [17] HARDIE D G.AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy[J].Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(10): 774-785.
- [18] APPUHAMY J A D R N, NAYANANJALIE W A, ENGLAND E M, et al.Effects of AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling and essential amino acids on mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and protein synthesis rates in mammary cells [J].Journal of Dairy Science,2014,97(1):419-429.
- [19] KAHN B B, ALQUIER T, CARLING D, et al.AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism[J].Cell Metabolism, 2005, 1(1): 15-25.
- [20] THREADGOLD L C, KUHN N J. Glucose-6-phosphate hydrolysis by lactating rat mammary gland[J]. International Journal of Biochemistry, 1979, 10(8): 683-685.
- [21] SUNEHAG A, TIGAS ST, HAYMOND M W. Contribution of plasma galactose and glucose to milk lactose synthesis during galactose ingestion[J].The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2003, 88(1): 225-229.
- [22] ZHAO F Q, KEATING A F.Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland [J].Journal of Dairy Science, 2007, 90 (Suppl. 1): E76-E86.
- [23] BEN CHEDLY H, LACASSE P, MARNET P G, et al.Use of milk epithelial cells to study regulation of cell activity and apoptosis during once-daily milking in goats[J].Animal, 2011, 5(4): 572-579.
- [24] HUMPHREY B D, RUDRAPPA S G.Increased glucose availability activates chicken thymocyte metabolism and survival[J].The Journal of Nutrition, 2008, 138(6): 1153-1157.
- [25] CIVELEK T, BİRDANE F M, KABU M, et al.Effects of methionine and lysine on metabolic profile in dairy cattle during periparturient period[J].Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 2013, 19(3): 423-432.
- [26] 孙华, 张晓明, 王欣, 等.过瘤胃保护蛋氨酸对奶牛生产性能的影响及经济效益分析[J].中国奶牛, 2010(11): 7-11.
- SUN H, ZHANG X M, WANG X, et al.Effect of supplementing rumen protected methionine on milk performance of dairy cow and economic benefits analysis [J].China Dairy Cattle, 2010(11): 7-11. (in Chinese)
- [27] RIUS A G, APPUHAMY J A D R N, CYRIAC J, et al.Regulation of protein synthesis in mammary glands of lactating dairy cows by starch and amino acids[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(7): 3114-3127.

Regulating Effects of Methionine on Milk Protein and Lactose Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells

ZHAO Yanli YAN Sumei* GUO Xiaoyu SHI Binlin CHEN Lu

(Inner Mongolia Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science, College of Animal Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: This study was to detect the effects of methionine (Met) on lactose content, gene expression and protein expression of milk protein and lactose synthesis in bovine mammary epithelial cells (BMECs) to investigate the mechanism of Met regulating milk protein and lactose synthesis. The third generation of BMECs were divided into six groups with six replicates and cultured in medium with 0.13, 0.26, 0.39, 0.52, 0.65 and 0.78 mmol/L Met, respectively. After culture at 37 °C, 5% CO₂ for 48 h, cell viability, ATP content, the relative expression levels of genes involved in milk protein and lactose synthesis, and lactose content were detected. The results showed that compared with 0.13 and 0.78 mmol/L groups, the cell viability in 0.39 to 0.65 mmol/L groups was significantly increased ($P<0.05$), the relative expression levels of glucose transporter 1 (*GLUT1*) and α -whey albumin (*LALBA*) genes were significantly decreased in 0.26 to 0.52 mmol/L groups ($P<0.05$), and lactose content was significantly increased in 0.39 mmol/L group ($P<0.05$). Compared with 0.13 to 0.26 mmol/L groups, the relative expression levels of signal transduction and transcription factor 5 (*STAT5*) and eukaryotic initiation factor 4E (*eIF4E*) genes and the phosphorylation levels of mammalian target of rapamycin (mTOR) and ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1) in 0.39 to 0.52 mmol/L groups were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the other groups, the ATP content, relative expression levels of β -casein (*CSN2*), κ -casein (*CSN3*) and tyrosine kinase 2 (*JACK2*) genes in 0.52 mmol/L group were significantly increased ($P<0.05$), but AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation level was significantly decreased ($P<0.05$). The relative expression level of *mTOR* was significantly greater in 0.26 to 0.52 mmol/L groups than that in 0.65 to 0.78 mmol/L groups ($P<0.05$). These results demonstrate that the optimal Met concentrations are 0.39 to 0.52 mmol/L for protein and gene expression of milk protein and lactose synthesis in BMECs. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(4):2073-2082]

Key words: dairy cow; bovine mammary epithelial cells; methionine; milk protein; lactose