

不同 pH 和 SCFAs 对奶牛瘤胃上皮细胞 SCFAs 转运蛋白和 GPR41 表达的影响

姜茂成¹ 詹康¹ 贡笑笑¹ 赵国琦^{1,2,3*}

(1. 扬州大学 动物科学与技术学院,江苏 扬州 225009;

2. 扬州大学 农业科技发展研究院,江苏 扬州 225009;

3. 扬州大学 教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室,江苏 扬州 225009)

摘要 为研究不同 pH 和短链脂肪酸(SCFAs)对奶牛瘤胃上皮细胞 SCFAs 转运蛋白和 G-蛋白偶联受体 41(GPR41)表达影响,设计 6 组试验,每组 3 个重复,培养 24 h 之后,收集细胞提取细胞总 RNA。结果表明:在添加 SCFAs 条件下,pH 6.2、6.8 和 7.4 之间的 MCT1 表达量差异不显著($P > 0.05$);pH 6.8 且添加 SCFAs 条件下,MCT1 的表达量显著高于缺乏 SCFAs pH 6.8 和 7.4 试验组($P < 0.05$);pH 6.2 的 MCT4 的表达量显著高于 pH 6.8 和 7.4 ($P < 0.01$),MCT4 的表达量显著高于缺乏 SCFAs ($P < 0.01$),NHE1、NHE2 和 NHE3 表达量显著高于缺乏 SCFAs 时的表达量($P < 0.01$);随着 pH 的降低,NHE1、NHE2 和 NHE3 的表达量逐渐上调,而在缺乏 SCFAs 条件下,GPR41 不表达;在添加 SCFAs 之后,显著激活了 GPR41 的表达。研究发现 SCFAs 能够显著加强奶牛瘤胃上皮细胞 SCFAs 转运蛋白和 GPR41 的表达量,从而证明细胞对 SCFAs 的吸收主要依赖于 SCFAs 转运蛋白和 GPR41。

关键词 奶牛;短链脂肪酸;单羧酸转运蛋白;G 蛋白偶联受体

中图分类号 S513

文章编号 1007-4333(2018)10-0063-08

文献标志码 A

Effects of different pH and SCFAs on the expressions of SCFAs transport proteins and GPR41 in the rumen epithelial cells of dairy cow

JIANG Maocheng¹, ZHAN Kang¹, GONG Xiaoxiao¹, ZHAO Guoqi^{1,2,3*}

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou 225009, China;

2. Institutes of Agricultural Science and Technology Development, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

3. China Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-Product Safety of Ministry of Education,
Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract To investigate the effects of different pH and SCFAs on the expression of SCFAs transport proteins and GPR41 in rumen epithelial cells of dairy cows. Six groups of experiment were designed, after 24 h culturing, cells were collected and RNA was extracted. The results showed that with SCFAs supplementation: There was no significant difference in the expression levels of MCT1 among pH 6.2, 6.8 and 7.4 ($P > 0.05$). The expression of MCT1 in pH 6.8 was significantly higher than that in pH 6.8 and 7.4 ($P < 0.05$); The expression of MCT4 in pH 6.2 was significantly higher than those in pH 6.8 and pH 7.4 ($P < 0.01$); The expression of MCT4 was significantly higher than those of SCFAs ($P < 0.01$). The expressions of NHE1, NHE2 and NHE3 were significantly higher than those without SCFAs supplement ($P < 0.01$). With the decreasing of pH, the expressions of NHE1, NHE2 and NHE3 increased gradually;

收稿日期: 2017-12-27

基金项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-36);国家自然科学基金项目(31572430);江苏省研究生科研与实践创新计划(SJCX17_0630);农业三新工程(SXGC[2016]326)

第一作者: 姜茂成, 硕士研究生, E-mail: 593245397@qq.com

通讯作者: 赵国琦, 教授, 博士生导师, 主要从事动物营养与饲料研究, E-mail: gqzhao@yzu.edu.cn

Without additional SCFAs, GPR41 was not expressed. After the SCFAs supplementation, the expression of GPR41 was greatly activated. In conclusion, SCFAs could significantly enhance the expressions of SCFAs transport proteins and GPR41 in rumen epithelial cells of dairy cow. It was proved that the cell uptake of SCFAs was mainly depended on SCFAs transporter and GPR41.

Keywords dairy; short chain fatty acids; monocarboxylate transporter; G protein-coupled receptors

短链脂肪酸(Short chain fatty acid, SCFAs)是通过瘤胃内的微生物发酵日粮产生的碳原子数为1~6的有机脂肪酸,主要包括乙酸、丙酸和丁酸,约占总挥发性脂肪酸95%^[1]。瘤胃中的SCFAs能够为反刍动物提供60%~70%的能量需要^[2]。反刍动物先天缺乏葡萄糖,因此,SCFA对维持反刍动物能量平衡至关重要^[3]。SCFAs除了能够为反刍动物提供能量之外,它还能够刺激瘤胃上皮的发育和增殖^[4-5]。此外,反刍动物瘤胃上皮组织吸收SCFAs之后,能够增加血液中胰岛素和胰高血糖素的浓度^[6-7]。单羧酸转运蛋白1(Monocarboxylate transporter 1, MCT1)和MCT4对瘤胃上皮转运和吸收SCFAs至关重要^[8]。大部分细胞吸收SCFAs主要依赖于细胞膜上的单羧酸转运蛋白家族^[8]。目前,14个单羧酸转运蛋白家族已经被鉴定,他们分布在不同的组织和部位且具有不同的功能^[9]。然而,对SCFAs具有转运功能的只有MCT1、MCT2和MCT4^[10]。MCT1和MCT4在转运单羧酸时需要一个辅助蛋白CD147。CD147是仅仅含有一个跨膜区的糖蛋白,它有利于靶向定位MCT1和MCT4至细胞膜上,彼此之间仅仅地保持在一起^[11-12]。MCT1和MCT4在反刍动物消化道存在表达差异,MCT1的蛋白表达顺序盲肠>近端结肠>远端结肠^[13]。MCT4其蛋白表达差异顺序为前胃>大肠>皱胃>小肠^[7]。MCT1和MCT4的表达量受到日粮和pH的调控。日粮中各自添加10%和35%的精料饲喂山羊,结果显示添加35%的精料能够显著增加瘤胃上皮的MCT1和MCT4的表达量^[14]。饲料补充精料之后,能够显著增加绵羊瘤胃上皮的MCT1的表达量^[15]。添加苜蓿饲喂犊牛显著加强了瘤胃上皮MCT1的表达水平^[16]。山羊自由采食干草与干草/精料混合饲喂组相比,干草/精料混合饲喂能够加强MCT1的表达^[14]。以上的研究表明,饲喂高精料能够加强MCT1和MCT4的表达量且能够增加瘤胃发酵和挥发性脂肪酸的吸收^[17-19]。

饲喂高精料之后瘤胃内微生物快速发酵碳水化

合物并产生大量有机酸和乳酸。瘤胃内大量质子的释放对反刍动物瘤胃微环境和动物的健康产生不利的影响。因此,质子的减少对于反刍动物瘤胃发酵和产奶量有着深远意义^[14]。目前,已经被证明唾液能够很好地消除瘤胃内的质子,如唾液中碳酸氢盐和磷酸氢盐^[20]。瘤胃上皮对于瘤胃内质子的减少起决定性因素,这对于缓解亚急性酸中毒至关重要。同时,瘤胃上皮的钠、氢离子交换蛋白(Na^+/H^+ exchange, NHE)对于瘤胃内质子的转出扮演重要作用^[21]。山羊饲喂精料能够增加瘤胃上皮的NHE1、NHE2和NHE3的表达量^[22-23]。这是由于瘤胃上皮吸收SCFAs同时也增加了质子量,高表达的NHE1、NHE2和NHE3能够排出质子从而维持瘤胃内pH平衡^[20,24]。通过添加能量饲料能够加强山羊瘤胃上皮NHE1和NHE3的表达水平,但是,并未改变NHE2的表达量^[25]。

已有研究表明,G-蛋白偶联受体41(G protein-coupled receptor 41, GPR41)作为SCFAs的受体^[26]。但是目前pH和SCFAs对奶牛瘤胃上皮细胞的MCT1、MCT4、NHE1、NHE2、NHE3以及GPR41表达的相关性研究还存在空白。因此,本试验拟研究不同pH和添加SCFAs对SCFAs转运蛋白以及GPR41表达的影响,旨在为影响瘤胃上皮吸收SCFA机理的研究提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

DMEM高糖培养基、澳洲胎牛血清、非必须氨基酸、PBS和胰蛋白酶(Gibco,美国);乙酸、丙酸、丁酸、青霉素、链霉素、L-谷氨酰胺溶液、EDTA(Sigma,美国);PrimeScriptTM RT Master Mix和SYBR[®] Premix Ex TaqTM II(Takara,中国);总RNA提取试剂盒(Tiangen,中国)。奶牛瘤胃上皮细胞^[27]由扬州大学动物培养物保藏与应用研究所(IACCA)提供。

1.2 方法

1.2.1 不同pH和SCFAs对涉及SCFAs转运蛋白和GPR41表达影响

试验分为 6 组: 培养基 pH 6.2、6.8 和 7.4 分别培养奶牛瘤胃上皮细胞 24 h; 培养基含 20 mmol/L SCFAs (pH 6.2)、20 mmol/L SCFAs (pH 6.8) 和 20 mmol/L SCFAs (pH 7.4) 各自培养奶牛瘤胃上皮细胞 24 h。每组试验组的样品 3 个重复。培养 24 h 之后, 细胞被收集提取细胞总 RNA。

1.2.2 总 RNA 提取

加 1 mL 的 Trizol 裂解液来裂解奶牛瘤胃上皮细胞, 室温放置 5 min, 将细胞裂解液转移到 1.5 mL 的无酶离心管中; 加入 200 μ L 氯仿, 盖好管盖, 在漩涡振荡器上剧烈振荡 15 s, 室温放置 3 min; 4 $^{\circ}$ C 2 000 r/min 离心 10 min, 样品将会分层: 最上层为无色的水相, 细胞总 RNA 主要存在于水相中, 把水相转移到新的 1.5 mL 的无酶离心管中; 缓慢加入水相 0.5 倍体积无水乙醇, 轻轻吹打混匀, 将溶液转移至吸附柱中, 4 $^{\circ}$ C 2 000 r/min 离心 30 s; 向吸附柱中加入 500 μ L 去蛋白液 RD, 4 $^{\circ}$ C 2 000 r/min 离心 30 s, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中; 再向吸附柱中加入 700 μ L 的漂洗液 RW, 室温静置 2 min, 4 $^{\circ}$ C 2 000 r/min 离心 30 s, 弃废液; 重复上述操作步骤; 将含有总 RNA 的吸附柱放入收集管中, 4 $^{\circ}$ C 2 000 r/min 离心 2 min; 打开吸附柱盖子于超净工作台上 12 min 后, 去除残余有机液体; 将吸附柱转入新的 1.5 mL 离心管中, 加 30 μ L 无 RNA 酶水, 室温放

置 3 min, 4 $^{\circ}$ C 2 000 r/min 离心 2 min。接下来, One Drop 测定总 RNA 的浓度和纯度。

1.2.3 反转录成 cDNA

按照 Takara 反转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA, 试验于冰上操作, 反转录体系 10 μ L: total RNA 500 ng, 5 \times PrimeScript RT Master Mix 2 μ L 和无 RNA 酶水, 总体积 10 μ L。反应条件: 37 $^{\circ}$ C 15 min 和 85 $^{\circ}$ C 5 s。PCR 反应体系 20 μ L: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II Kit 10 μ L、上游和下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L、cDNA 模板 100 ng 和灭菌蒸馏水, 总体积 20 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环, 每个样品 3 个重复。RT-PCR 反应液配置, 采用总体系为 20 μ L, 其中 2 \times Taq PCR MasterMix 4 μ L; Total RNA 4 μ L; Free-RNase ddH₂O 12 μ L, 混合后使用。

1.2.4 Real-time PCR

反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环, 每个样品 3 个重复。目的基因的相对表达量通过 GAPDH 作为内参进行标准化。计算方法按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。荧光定量 PCR 反应液配置为总体系 20.0 μ L, 其中 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II Kit 10.0 μ L; 10 μ mol/L 的 PCR Forward primer 和 PCR Reverse Primer 各 0.8 μ L; Water PCR grade 6.4 μ L; cDNA 2.0 μ L。引物详情见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物

Table 1 Reverse-transcription PCR primers

基因 Gene	引物序列(5'-3') Sequence of primer (5'-3')	产物大小/bp Length of product
MCT1	F : CAATGCCACCAGCAGTTG	376
	R : GCAAGCCCAAGACCTCCAAT	
MCT4	F : AGCGTCTGAGCCCAGGGAGG	223
	R : ACCTCGCGGCTTGGCTTCAC	
NHE1	F : GAAAGACAAGCTCAACCGGTTT	67
	R : GGAGCGCTCACCGGCTAT	
NHE2	F : TTGGAGAGTCCCTGCTGAAC	257
	R : GGCCGTGATGTAGGACAAAT	
NHE3	F : AGCCTTCGTGCTCCTGACA	56
	R : TGACCCCTATGGCCCTGTAC	
GPR41	F : AACCTCACCTCTCGGATCT	214
	R : GCCGAGTCTTGTACCAAAGC	
GAPDH	F : GGGTCATCATCTCTGCACCT	176
	R : GGTCATAAGTCCCTCCACGA	

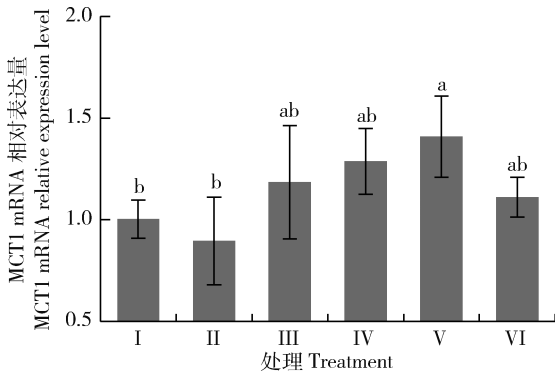
1.3 数据统计分析

试验数据结果用“平均数±标准差”表示。运用 SPSS16.0 统计软件中的 One-Way ANOVA 模块进行单因素方差分析,显著性检验应用 LSD 法表示。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示极显著差异。

2 结果与分析

2.1 不同 pH 和 SCFAs 对单羧酸转运蛋白 MCT1 和 MCT4 表达的影响

通过对奶牛瘤胃上皮细胞进行不同处理方法提取的 RNA 进行转录水平下的相对定量检测,结果见图 1 和图 2。在缺乏 SCFAs 条件下, pH 6.2、6.8 和 7.4 之间的 MCT1 表达量没有显著差异。与 pH 6.8 和 7.4 相比,在 pH 6.2 条件下, MCT1 表达量最高 ($P > 0.05$; 图 1)。在添加 SCFAs 条件下, pH 6.2、6.8 和 7.4 之间的 MCT1 表达量差异不显著。与 pH 6.2 和 7.4 相比,在 pH 6.8 条件下, MCT1 表达量最高 ($P > 0.05$)。在 pH 6.8 且添加 SCFAs 条件下, MCT1 的表达量显著高于 pH 6.8 且缺乏 SCFAs 的条件 ($P < 0.05$; 图 1), 表明 SCFAs 能够促进 MCT1 的表达量。缺乏 SCFAs 条件下, pH 6.2、6.8 和 7.4 之间的 MCT4 表达量差异不显著 ($P > 0.05$; 图 2)。添加 SCFAs 条件下, pH 6.2 的 MCT4 的表达量显著高于 pH 6.8 和 7.4 ($P < 0.01$; 图 2), 结果表明同时添加 SCFAs 情况下, pH 6.2 能够显著加强 MCT4 的表达量。添加 SCFAs



I, pH 7.4; II, pH 6.8; III, pH 6.2; IV, pH 7.4+20 mmol/L SCFAs; V, pH 6.8+20 mmol/L SCFAs; VI, pH 6.2+20 mmol/L SCFAs; 下同。The same below.

图 1 不同 pH 和 SCFAs 对单羧酸转运蛋白 MCT1 的 mRNA 表达影响

Fig. 1 Effects of different pH and SCFAs on the abundance of MCT1 mRNA involved in monocarboxylate transporters

条件下, MCT4 的表达量显著高于缺乏 SCFAs ($P < 0.01$; 图 2), 表明 SCFAs 能够促进 MCT4 的表达量。

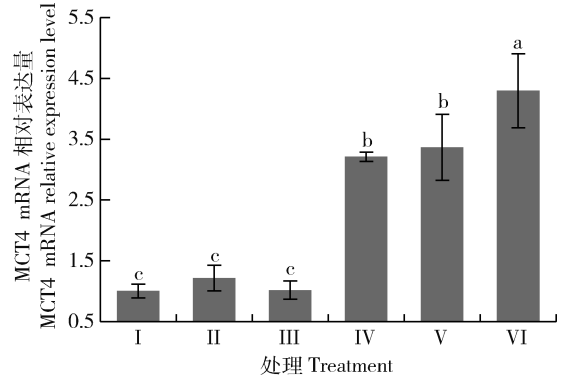


图 2 不同 pH 和 SCFAs 对单羧酸转运蛋白 MCT4 的 mRNA 表达影响

Fig. 2 Effects of different pH and SCFAs on the abundance of MCT4 mRNA involved in monocarboxylate transporters

2.2 不同 pH 和 SCFAs 对 NHE1、NHE2 和 NHE3 表达影响

通过对奶牛瘤胃上皮细胞进行不同处理方法提取的 RNA 进行转录水平下的相对定量检测,结果见图 3、4、5。缺乏 SCFAs 条件下, pH 6.2、6.8 和 7.4 之间的 NHE1、NHE2 和 NHE3 表达量差异不显著 ($P > 0.05$; 图 3、4 和 5)。添加 SCFAs 条件下, pH 6.2 和 6.8 的 NHE1 和 NHE3 表达量显著高于 pH 7.4 且 6.2 时表达量最高 ($P < 0.01$; 图 3 和图 5)。添加 SCFAs 条件下, NHE1、NHE2 和 NHE3 表达量显著高于缺乏 SCFAs 时的表达量 ($P < 0.01$; 图 3、4 和 5), 结果表明 SCFAs 能够促进 NHE1、NHE2 和 NHE3 的表达量。此外,随着 pH 的降低, NHE1、NHE2 和 NHE3 的表达量逐渐上调,说明同时添加 SCFAs, 低 pH 能够显著加强 NHE1、NHE2 和 NHE3 的表达量。

2.3 不同 pH 和 SCFAs 对 GPR41 表达的影响

通过对奶牛瘤胃上皮细胞进行不同处理方法提取的 RNA 进行转录水平下的相对定量检测,结果见图 6。缺乏 SCFAs 条件下, GPR41 不能够表达。然而,添加 SCFAs 之后,能够显著激活 GPR41 的表达。与 pH 7.4 相比, pH 6.8 能够显著上调 GPR41 的表达量 ($P < 0.05$), 但与 pH 6.2 无显著性差异 ($P > 0.05$)。

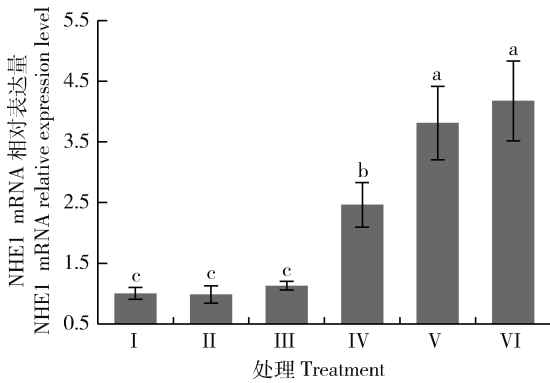


图 3 不同 pH 和 SCFAs 对 Na^+/H^+ 交换蛋白 NHE1 的 mRNA 表达影响

Fig. 3 Effects of different pH and SCFAs on the abundance of NHE1 mRNA involved in Na^+/H^+ exchanges

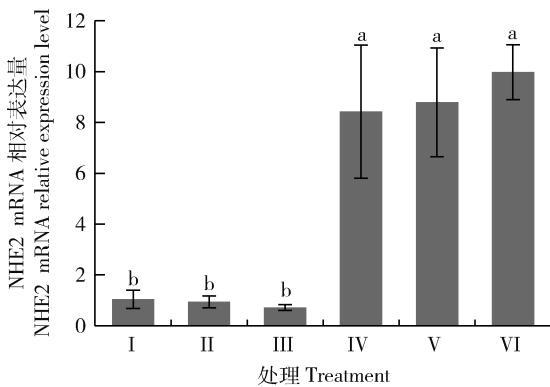


图 4 不同 pH 和 SCFAs 对 Na^+/H^+ 交换蛋白 NHE2 的 mRNA 表达影响

Fig. 4 Effects of different pH and SCFAs on the abundance of NHE2 mRNA involved in Na^+/H^+ exchanges

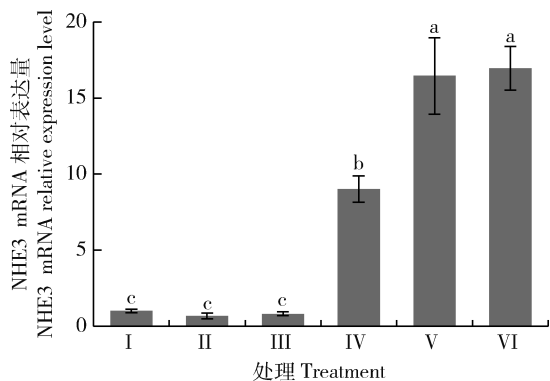


图 5 不同 pH 和 SCFAs 对 Na^+/H^+ 交换蛋白 NHE3 的 mRNA 表达影响

Fig. 5 Effects of different pH and SCFAs on the abundance of NHE3 mRNA involved in Na^+/H^+ exchanges

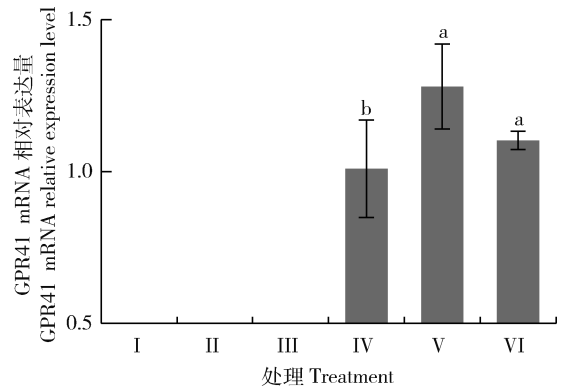


图 6 不同 pH 和 SCFAs 对 GPR41 的 mRNA 表达影响

Fig. 6 Effects of different pH and SCFAs on the abundance of GPR41 mRNA

3 讨论

SCFAs 能够被瘤胃上皮通过亲脂性扩散或相关的挥发性脂肪酸转运蛋白被吸收进入血液提供能量和合成乳脂的前体物质^[20-28]。通过 MCT1^[23-24,29-30]、亲脂性扩散^[31]和 $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$ ^[32] 通路都能转运和输出 SCFAs, 因此, 这 3 种不同通路输出的 SCFAs 都是为了将细胞内质子转运至血液。在此过程中, 单羧酸转运蛋白 MCT1 和 MCT4 对于 SCFAs 转运和吸收扮演关键作用^[8]。同时, 丙酸和丁酸的转运模式部分地依赖于碳酸氢盐模式^[33]。高精料日粮能够加强瘤胃上皮对 SCFAs 的吸收^[17-19]。高精料能够在瘤胃微生物的作用下能够产生更多的 SCFAs, 可能会加强 MCT1 和 MCT4 的表达^[17]。通过在日粮中添加不同比例的谷物饲喂山羊, 添加 60% 的谷物日粮能够加强 MCT1 的表达量, 然而 MCT4 的表达量下调; 通过回归分析 MCT1 的表达量与山羊瘤胃液中 pH 高度相关^[34]。丁酸代谢为酮和丙酸代谢乳酸以及它们相应的质子主要通过 MCT1 从瘤胃上皮细胞运送至血液^[35-36]。瘤胃上皮顶部也存在 MCT 的同型 MCT4^[8,37]。本试验的研究结果表明, 添加 SCFAs 能够加强奶牛瘤胃上皮细胞的 MCT1 的表达量, 但 pH 不能够改变 MCT1 的表达量。低 pH 和 SCFAs 能够显著加强奶牛瘤胃上皮细胞的 MCT4 的表达量, 表明 MCT4 对 SCFAs 的转运和吸收至关重要。

瘤胃微生物能够快速发酵日粮中碳水化合物转化为有机酸, 瘤胃内有机酸不断增加对瘤胃引起酸中毒构成潜在的风险^{[31-32][38-39]}。反刍动物瘤胃处

于酸性条件下饮食,会破坏瘤胃的健康平衡和引起酸中毒^[40]。利用蛋白或者非蛋白氮发酵会产生氨,氨进一步与质子结合从而上调 pH 值^[41],可减轻瘤胃酸中毒。非游离的 HSCFA 进入瘤胃上皮细胞和通过 SCFA⁻/HCO³⁻交换蛋白排出 HCO³⁻都会下降瘤胃上皮细胞的 pH;同时,瘤胃对 SCFAs 的吸收以及唾液提供的 Na⁺能够加强 NHE 对 H⁺的循环,从而控制瘤胃内 pH 的稳定;瘤胃内游离的 SCFAs 能够在 SCFA⁻/HCO³⁻交换蛋白作用下进入瘤胃上皮细胞,随之 HCO³⁻从瘤胃上皮细胞排出进入瘤胃以及通过亲脂性扩散通路将 HSCFA 转运至瘤胃上皮细胞,从而上调瘤胃内 pH;然而 NHE 能够将瘤胃上皮细胞内的 H⁺重新循环至瘤胃从而下调 pH^[20]。因此,重复循环的生理过程能够保持瘤胃内环境 pH 稳定。

与添加花生秸秆相比,添加精料之后饲喂山羊能够加强 NHE1 和 NHE3 的表达量,但是没有改变 NHE2 的表达量;此外,乙酸、丙酸、丁酸和总 SCFAs 显著增加;与添加低精料组相比,高精料组能够增加 NHE1、NHE2 和 NHE3 的表达量^[41]。同时,乙酸的浓度增加,但是,差异不显著。丙酸、丁酸和总 SCFAs 浓度被显著增加^[22]。这些结果说明,SCFAs 能够加强 NHE 的表达水平。本试验结果表明,在缺乏 SCFAs 条件下,不同 pH 刺激奶牛瘤胃上皮细胞条件下,NHE1、NHE2 和 NHE3 表达量差异不显著。值得注意的是,添加 SCFAs 之后能够显著增加奶牛瘤胃上皮细胞的 NHE1、NHE2 和 NHE3 的表达量。尤其在低 pH 条件下,NHE1、NHE2 和 NHE3 表达量最高。结果证明,NHE1、NHE2 和 NHE3 的表达量与 pH 和 SCFAs 相关联。

高精料能够加强瘤胃上皮组织中涉及 SCFAs 转运蛋白的表达,添加高精料饲喂奶牛之后能够快速产生大量的 SCFAs 以及低 pH 的瘤胃液^[40]。此外,SCFAs 已经被证明是 GPR41 的受体^[42-43]。因此,本研究通过不同 pH 条件下刺激奶牛瘤胃上皮细胞,试验结果表明在 pH 6.2、6.8 和 7.4 的条件下,GPR41 的 qRT-PCR 的 CT 值都>36,由此判断 CT 值都>36 情况下,GPR41 不表达。添加 SCFAs 能够显著增加奶牛瘤胃上皮细胞 GPR41 的表达量,说明 SCFAs 对 GPR41 的表达有一定关联性。

4 结 论

SCFAs 能够加强 MCT1 的表达量,pH 并不能

够改变 MCT1 的表达量。低 pH 和 SCFAs 能够显著加强 MCT4 的表达量。低 pH 和 SCFAs 能够显著加强 NHE1、NHE2 和 NHE3 的表达量。缺乏 SCFAs 条件下,GPR41 并不能被表达。添加 SCFAs 能够显著加强奶牛瘤胃上皮细胞 GPR41 的表达量。

参考文献 References

- [1] Thorp C L, Arg W, Rwj S, Shaw C, Mcevoy J D. Effect of dietary forage: concentrate ratio on the behaviour, rumen fermentation and circulating concentrations of IGF-1, insulin, glucagon and metabolites of beef steers and their potential effects on carcass composition[J]. *Animal Science*, 2016, 68 (3): 533-546
- [2] Popova M, McGovern E, McCabe M S, Martin C, Doreau M, Arbre M, Meale S J, Morgavi D P, Waters S M. The structural and functional capacity of ruminal and cecal microbiota in growing cattle was unaffected by dietary supplementation of linseed oil and nitrate[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8(8): 937
- [3] 王亚洲,孙国权,赵晨旭,魏园,崔媛旭,苑学,王哲,李心慰,刘国文. MCT1 在犊牛消化道的分布以及 SCFA 对 MCT1 表达的影响[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(03): 509-513
Wang Y Z, Sun G Q, Zhao C X, Wei Y, Cui Y X, Yuan X, Wang Z, Li X W, Liu G W. Distribution of MCT1 in calf gastrointestinal tract and the effect of SCFA on the expression of MCT1[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(03): 509-513 (in Chinese)
- [4] Cavini S, Iraira S, Sturana A, Foskolos A, Ferret A, Calsamiglia S. 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
- [5] Gorka P, Kowalski Z M, Pietrzak P, Kotunia A, Kiljanczyk R, Flaga J, Holst J J, Guilloteau P, Zabielski R. Effect of sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter diet on rumen development in calves [J]. *Journal of Physiology & Pharmacology*, 2009, 60(S3): 47-53
- [6] Crookenden M A, Mandok K S, Grala T M, Phyn C V, Kay J K, Greenwood S L, Roche J R. Source of metabolizable energy affects gene transcription in metabolic pathways in adipose and liver tissue of nonlactating, pregnant dairy cows [J]. *Journal of Animal Science*, 2015, 93(2): 685-69
- [7] Kristensen N B and Harmon D L. Effect of increasing ruminal butyrate absorption on splanchnic metabolism of volatile fatty acids absorbed from the washed reticulorumen of steers[J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82(7): 3549-3559

- [8] Kirat D, Matsuda Y, Yamashiki N, Hayashi H, Kato S. 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
- [9] Halestrap A P, Meredith D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond [J]. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 2004, 447(5): 619-628
- [10] Müller F, Huber K, Pfannkuche H, Aschenbach J R, Breves G, Gäbel G. Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1 [J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal & Liver Physiology*, 2002, 283(5): G1139
- [11] Kirk P, Wilson M C, Heddle C, Brown M H, Barclay A N, Halestrap A P. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression[J]. *Embo Journal*, 2000, 19(15): 3896-3904
- [12] Deora A A, Philp N, Hu J, Bok D, Rodriguezboulant E. Mechanisms regulating tissue-specific polarity of monocarboxylate transporters and their chaperone CD147 in kidney and retinal epithelial[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(45):16245-16250
- [13] Kirat D, Kato S. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) mediates transport of short-chain fatty acids in bovine caecum [J]. *Experimental Physiology*, 2006, 91(5): 835-844
- [14] 闫磊. 日粮精料水平对瘤胃上皮 SCFA 吸收相关载体表达的影响及其机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014
Yan L. Effects of dietary concentrate level on expression of several transporters involved in SCFA absorption in rumen epithelium and its underlying mechanism (Short Communication) [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [15] Kuzinski J, M Röntgen. The mRNA and protein expression of ruminal MCT1 is increased by feeding a mixed hay/concentrate diet compared with hay ad libitum diet [J]. *Archiv Tierzucht*, 2011, 54(3): 280-286
- [16] Castells L, Bach A, Aris A, Terré M. Effects of forage provision to young calves on rumen fermentation and development of the gastrointestinal tract [J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(8): 5226-5236
- [17] Chibisa G E, Gorka P, Penner G, Berthiaume R, Mutsvangwa T. Effects of partial replacement of dietary starch from barley or corn with lactose on ruminal function, short-chain fatty acid absorption, nitrogen utilization, and production performance of dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(4): 2627
- [18] Moslemipur F, Torbatinejad N M, Khazali H, Hassani S, Ghoorchi T. Effect of permanent hypoinsulinemia on appetite, performance, carcass composition, blood metabolites and leptin concentrations in lambs [J]. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2009, 22(6): 827-835
- [19] Sehested J, Andersen J B, Aaes O, Kristensen N B, Diernæs L. Feed-induced changes in the transport of butyrate, sodium and chloride ions across the isolated bovine rumen epithelium [J]. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 2000, 50(1): 47-55
- [20] Aschenbach J R, Penner G B, Stumpff F, Gäbel G. Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH [J]. *Journal of Animal Science*, 2011, 89(4): 1092-1107
- [21] Dibrov P, Fliegel L. Comparative molecular analysis of Na⁺/H⁺ exchanger: A unified model for Na⁺/H⁺ antiporter [J]. *Febs letters*, 1998, 424(1-2): 1-5
- [22] Yan L, Zhang B, Shen Z. 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]. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(9): 5668-5675
- [23] Yang W, Shen Z, Martens H. An energy-rich diet enhances expression of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 and 3 messenger RNA in rumen epithelium of goat [J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(1): 307-317
- [24] Müller F, Aschenbach J R, Gäbel G. Role of Na⁺/H⁺ exchange and HCO₃⁻ transport in pH recovery from intracellular acid load in cultured epithelial cells of sheep rumen [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2000, 170(4): 337-343
- [25] Etschmann B, Suplie A, Martens H. Change of ruminal sodium transport in sheep during dietary adaptation [J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2009, 63(1): 26-38
- [26] Nilsson N E, Kotarsky K, Owman C, Olde B. Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 303(4): 1047-1052
- [27] 姜茂成, 詹康, 严康, 赵倩明, 赵国琦. 奶牛瘤胃上皮细胞分离培养与鉴定 [J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(1): 80-86
Jiang M C, Zhan K, Yan K, Zhao Q M, Zhao G Q. Culture and identification of the bovine rumen epithelial cell line [J]. *Journal of China Agricultural University*. 2018, 23(1): 80-86 (in Chinese).
- [28] Leonhard-Marek, Stumpff S F, Martens H. Transport of cations and anions across forestomach epithelia: Conclusions from *in vitro* studies [J]. *Animal An International Journal of Animal Bioscience*, 2010, 4(7): 1037-1056
- [29] Graham C, Gatherer I, Haslam I, Glanville M, Simmons N L. Expression and localization of monocarboxylate transporters and sodium/proton exchangers in bovine rumen epithelium [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2007,

- 292(2): R997-R1007
- [30] Kirat D, Masuoka J, Hayashi H, Iwano H, Yokota H, Taniyama H, Kato S. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen [J]. *The Journal of Physiology*, 2006, 576(2): 635-47
- [31] Gäbel 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
- [32] Bilk S, Huhn K, Honscha K U, Pfannkuche H, Gäbel G. Bicarbonate exporting transporters in the ovine ruminal epithelium[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2005, 175(5): 365-374
- [33] 刘锐钢, 肖英平, 陈安国. 丁酸盐的生物学功能和机制及其在动物生产中的应用[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(06): 1180-1188
- Liu R G, Xiao Y P, Chen A G. Biological functions and mechanism of butyrate and its application in animal production[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(6): 1180-1188 (in Chinese)
- [34] Metzlerzebeli B U, Hollmann M, Sabitzer S, Podstatzky-Lichtenstein L, Klein D, Zebeli Q. Epithelial response to high grain diets involves alteration in nutrient transporter and $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ mRNA expression in rumen and colon of goats[J]. *Journal of Animal Science*, 2013, 91(9): 4256-4266
- [35] Gäbel G, Müller F, Pfannkuche H, Aschenbach J R. Influence of isoform and DNP on butyrate transport across the sheep ruminal epithelium[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2001, 171(3): 215-221
- [36] Penner G B, Aschenbach J R, Gäbel G, Rackwitz R, Oba M. Epithelial capacity for the apical uptake of short-chain fatty acids is a key determinant for intra-ruminal pH and the susceptibility to sub-acute ruminal acidosis in sheep [J]. *Journal of Nutrition*, 2009, 139(9): 1714-1720
- [37] Aschenbach J R, Bilk S, Tadesse G, Stumpff F, Gäbel G. Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive apical uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep[J]. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2009, 296(5): G1098-G1107
- [38] Allen M S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber[J]. *Journal of Dairy Science*, 1997, 80(7): 1447-1462
- [39] Russell J B and Rychlik K L. Factors that alter rumen microbial ecology[J]. *Science*, 2001, 292(5519): 1119-1122
- [40] 梁玉生, 李发弟, 李飞. 高精料饲粮条件下反刍动物瘤胃适应机制的解析[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(1): 20-26
- Liang Y S, Li F D, Li F. Analysis of rumen adaptive mechanism under the condition of higher concentrated diets[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(1): 20-26 (in Chinese)
- [41] Wang J, Fung D Y. Alkaline-fermented foods; A review with emphasis on pidan fermentation [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 1996, 22(2): 101-138
- [42] Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael J Y, Lannoy V. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation [J]. *Journal of Chemical Biology*, 2003, 278(28): 25481-25489
- [43] Brown A J, Goldsworthy S M, Barnes A A, Eilert M M, Tcheang L. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids[J]. *Journal of Chemical Biology*, 2003, 278(13): 11312-11319

责任编辑:杨爱东