

不同蛋白水平日粮对荷斯坦公犊牛糖异生的影响

杨天宇¹ 马晓宇¹ 贡笑笑¹ 彭程¹ 黄杰¹ 赵国琦^{1,2,3} 詹康^{1*}

(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 为探究不同蛋白水平日粮对荷斯坦公犊牛糖异生的影响,选取年龄和生理状态相似的10头荷斯坦公犊牛(平均为5月龄,体重(172.80±7.16)kg),随机分为2组,每组5头,分别饲喂粗蛋白水平为15.05%和21.02%的颗粒料日粮,预试期7d,正试期56d。通过葡萄糖试剂盒测定血清和肝脏葡萄糖含量,液相色谱测定氨基酸含量,qRT-PCR分析肝脏糖异生途径关键基因的mRNA表达量。结果表明,与低蛋白水平组(15.05%)相比,日粮中高蛋白水平组(21.02%)显著提高血清和肝脏中葡萄糖含量($P<0.05$),且显著提高Gly、Asp、Ala、Ser、Leu、Lys、Phe、Ile、Val、Tyr、Pro、Arg、Glu和His的含量($P<0.05$),且显著提高了($P<0.05$)PCK1、PCK2、PC和PGC1A的mRNA表达量。综上所述,日粮中高蛋白水平(21.02%)可增加肝脏中氨基酸的含量以及糖异生途径关键基因的mRNA表达,进而加快葡萄糖的生成,进一步为犊牛提供能量。

关键词 犊牛; 蛋白水平; 糖异生

中图分类号 S815.4

文章编号 1007-4333(2022)04-0187-08

文献标志码 A

Effects of different protein levels on gluconeogenesis of Holstein bull calves

YANG Tianyu¹, MA Xiaoyu¹, GONG Xiaoxiao¹, PENG Cheng¹, HUANG Jie¹,
ZHAO Guoqi^{1,2,3}, ZHAN Kang^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, 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 protein levels on gluconeogenesis of Holstein bull calves, ten Holstein bull calves at similar age and physiological state (average age of 5 months old, weight of (172.80±7.16) kg) were randomly divided into two groups with five calves in each group. Pellet diets with crude protein levels of 15.05% and 21.02% were fed for seven days in the pre-trial periods and 56 days in the pilot period. The glucose content in serum and liver was measured by glucose kit, the content of amino acids was determined by liquid chromatography, and qRT-PCR was employed for analysis of mRNA expression of key genes in the gluconeogenesis pathway. The results showed that compared with the low protein level group (15.05%), the high-protein level group (21.02%) significantly increased the glucose content in serum and liver ($P<0.05$) and significantly increased the content of Gly, Asp, Ala, Ser, Leu, Lys, Phe, Ile, Val, Tyr, Pro, Arg and Glu in liver ($P<0.05$); The mRNA expression of PCK1, PCK2, PC and PGC1A were also significantly increased ($P<0.05$). In conclusion, the high protein level (21.02%) in the diet

收稿日期: 2021-06-08

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20190898);国家自然科学基金项目(32002200);财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系资助(CARS-36)

第一作者: 杨天宇, 博士研究生, E-mail: 18762304846@163.com

通讯作者: 詹康, 讲师, 主要从事动物营养与饲料研究, E-mail: kzhan@yzu.edu.cn

can increase the content of amino acids in the liver and mRNA expression of key genes of gluconeogenesis pathway, thus accelerating the production of glucose to further provide energy for calves.

Keywords calf; protein level; gluconeogenesis

犊牛时期是奶牛饲养过程中重要环节,犊牛生长性能受饲料成分和饲喂方式等多种因素的影响^[1]。提供合理的日粮不仅可以提高饲料的利用率,还可提高其成年后的总体发育水平。因此,犊牛培育是提高牛群品质和创建高产奶牛群的关键。以前奶牛营养研究关注点主要在泌乳奶牛,而近些年来,更多的研究集中在幼龄反刍动物营养方面^[2]。

葡萄糖作为体内重要的营养单糖,是动物体内唯一可以通过血浆和细胞循环于全身的碳水化合物,参与多种细胞功能^[3]。在反刍动物中,循环葡萄糖的90%~100%均来自糖异生。此外,调节反刍动物糖异生是改善动物健康、生长与生产性能的有效手段^[3]。糖异生在犊牛生长发育发挥着至关重要的作用^[4]。犊牛出生后经历的一个关键适应过程是:从子宫中葡萄糖、乳酸、氨基酸和脂肪酸获取能量,转变为依赖于乳糖、蛋白质和脂肪通过消化转变为葡萄糖、氨基酸和脂肪酸获取能量^[5-6]。Elwyn等^[7]研究表明,在消化蛋白的过程中,肝脏通过门静脉吸收多余氨基酸为糖异生储备糖原。与单胃动物不同,反刍动物从肠道中吸收的葡萄糖很少,都不同程度地依赖氨基酸作为糖异生底物产生葡萄糖。处于生长阶段的反刍动物需要大量的氨基酸通过糖异生途径合成葡萄糖^[8]。此外,参与糖异生途径的关键限速酶包括磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PCK)、丙酮酸羧化酶(PC)、果糖-1,6-二磷酸酶1(FBP1)和葡萄糖-6-磷酸酶(G6PC)。提高肝糖异生与PCK和PC的表达增加有关^[9-10]。此外,PC负责将线粒体中的丙酮酸转化为草酰乙酸,其启动子是通过过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子1 α (PGC1A)的活化而被转录激活^[11];PGC1A可以调节关键的线粒体基因,这些基因有助于促进糖异生途径^[12]。而FBP1酶催化果糖-1,6-二磷酸转化为果糖-6-磷酸。Wang等^[13]研究表明,FBP1酶活性的降低会导致葡萄糖产量的下降。葡萄糖异生的最后一步,即G6PC酶催化葡萄糖-6-磷酸,是葡萄糖从肝细胞释放的必要步骤^[14]。

日粮中蛋白质是犊牛获取氨基酸最重要的途径。蛋白质是影响犊牛生长性能的重要因素。饲料中蛋白质水平对反刍动物的生长性能、氮代谢、瘤胃

发育有着促进作用^[15]。前人研究表明日粮中蛋白水平在18%~21%可提高反刍动物的生长性能、采食量和蛋白利用率^[16-17]。液体和固体是犊牛饲料两种形态。颗粒料既提供了均衡的营养成分,又可以直接进入瘤胃,促进瘤胃的发育^[18],同时也为成年时期提供了良好营养物质代谢的前提^[19]。本课题组前期研究发现21.02%的蛋白水平更有利于5月龄公犊牛的生长发育^[20]。

之前的研究均集中在不同蛋白水平对荷斯坦公犊牛生长性能的影响,而不同蛋白水平全价颗粒料能否对荷斯坦公犊牛糖异生途径产生影响?因此,本研究旨在探究不同蛋白水平全价颗粒料对5~6月龄荷斯坦公犊牛糖异生影响,为进一步探究高蛋白水平全价颗粒料对犊牛糖异生途径的影响提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于2017年4月—2017年6月在扬州大学农牧场进行,选择月平均月龄为5月龄,体重(172.80 \pm 7.16) kg 10头荷斯坦公犊牛(随机分为2组,每组5头。试验每组分别添加蛋白含量为15.05%和21.02%的犊牛全价颗粒料,15.05%的犊牛全价颗粒料记为LP及21.02%的犊牛全价颗粒料记为HP组,自由饮水。按试验牛体重的3%进行饲喂。通过每周更改一次颗粒料的饲喂量,确保LP与HP组犊牛的干物质饲喂量基本一致。试验分为预试期和正试期,预试期7 d,正试期56 d。饲养试验结束后,将所有供试牛,在禁食(自由饮水)24 h后进行屠宰,收集3 g肝脏到2 mL离心管,迅速放入液氮中,回到实验室于-80℃冰箱冻存。

试验期间,日粮采用全价颗粒料,自由采食,营养需要参照NRC(2001)。全价颗粒营养成分见表1。

1.2 样本采集

在正试期第56天,于晨饲5 h后,在犊牛颈部颈静脉使用真空采血管进行采血,采血量约为20 mL,在真空采血管中(无抗凝剂)转入5 mL血样,静置30 min,3 500 r/min 15 min离心,制备的血清样品于-80℃冰箱中保存。

表1 全价颗粒料组成及营养水平(干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient level of whole grain (DM basis)

项目 Item	低蛋白组 LP	高蛋白组 HP
日粮组成 Composition		
玉米/% Corn	24.3	9
豆粕/% Soybean meal	9.7	27
大豆皮/% Soybean hull	6.4	4.6
干酒糟及其可溶物/% DDGS	9	9
麸皮/% Bran	5	5
苜蓿/% Alfalfa	23	23
燕麦草/% Oats	17	17
食盐/% Salt	0.3	0.3
磷酸氢钙/% CaHPO ₄	1.2	0.9
石粉/% Limestone	1	1.1
小苏打/% Sodium bicarbonate	0.2	0.2
蛋氨酸/% Methionine	0.1	0.1
葡萄糖/% Glucose	0.3	0.3
预混料/% Premix ^①	2.5	2.5
总计 Total	100	100
营养水平 Nutrition level		
粗蛋白/% CP	15.05	21.02
增重净能 NE _G ^② /(mg/kg)	4.44	4.31
中性洗涤纤维/% NDF	29.95	29.78
酸性洗涤纤维/% ADF	18.25	18.57
粗脂肪/% EE	3.58	3.24
钙/% Ca	1.12	1.12
磷/% P	0.60	0.61

注：①预混料为每千克日粮提供：维生素 A 15 000 IU，维生素 D 500 0 IU，维生素 E 50 mg，Fe 90 mg，Cu 12.5 mg，Mn 60 mg，Zn 100 mg，I 1.5 mg，Se 0.3 mg，Co 1.0 mg。②增重净能为计算值，其他均为实测值。

Note: ① Premix provided per kg of starter: VA 15 000 IU, VD 5 000 IU, VE 50 mg, Fe 90 mg, Cu 12.5 mg, Mn 60 mg, Zn 100 mg, I 1.5 mg, Se 0.3 mg, Co 1.0 mg. ② NE_G was a calculated value, while the others were measured values.

试验结束后，共 10 头试验公犊牛，在禁食(自由饮水)24 h 后进行屠宰，收集 3 g 肝脏，迅速放入液氮中，回到实验室放入 -80 °C 冰箱冻存。

1.3 肝脏和血清中葡萄糖的测定

精确称取 50 mg 肝脏组织放入离心管后，加入 250 μL 裂解液，用电动匀浆器匀浆破碎组织，匀浆后室温静置 10 min。取 230 μL 上清液转移至

1.5 mL 离心管中，取剩下的裂解液用 BCA 法进行蛋白质质量浓度测定。

制备好的血清样品和肝脏裂解液，采用葡萄糖试剂盒(购于北京普利莱基因技术有限公司)测定葡萄糖(GLU)。

1.4 肝脏中氨基酸测定

称取肉样 70 mg，加 500 μL 6 mol/L HCL，匀

浆 60 s。将其转移至 20 mL 安瓿瓶, 2 mL 6 mol/L HCL 清洗匀浆器, 然后使用 6 mol/L HCL 定容至 10 mL。放 -20 °C 冰箱 5 min, 氮吹仪去掉空气, 酒精喷灯封口。在 110 °C 下水解 24 h, 1 h 后摇动一次; 24 h 后拿出冷却至室温, 全部转移至 50 mL 容量瓶, 使用超纯水定容后摇匀。用 0.22 mm 水相滤膜过滤 1 mL 取 500 μ L 至 1.5 ml 离心管中, 氮吹仪吹干。200 μ L 0.1 mol/L HCL 溶解, 漩涡震荡。加 20 μ L 正亮 AA, 加 100 μ L 三乙氨已漂溶液, 加 100 μ L 衍生试剂 c 异硫晴酸苯苄, 混匀, 室温静置 1 h。加正己烷 400 μ L, 漩涡震荡, 室温 15 min。取下层液体, 0.22 mm 滤膜过滤后, 取 200 μ L 滤液 + 800 μ L 超纯水。最后取 10 μ L 上样。谱柱: SunFire™ C18 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 装有 SunFire™ C18 保护柱 (4.6 mm \times 20 mm, 5 μ m); 流动相 A: 0.1 mol/L 醋酸钠乙腈溶液 (93 : 7), pH 6.5; 流动相 B: 乙腈-甲醇-超纯水溶液, 比例为 80 : 10 : 10; 梯度洗脱, 程序见表 1, 流速 0.7 mL/min, 柱温 40 °C, 检测波长 254 nm。测定肝脏中 17 种氨基酸。

1.5 肝脏总 RNA 提取和反转录成 cDNA

称 50 mg 肝脏组织于 1.5 mL 离心管, 按照总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen, 中国) 提取总 RNA。最后, 取 1 μ L 提取的样品进行总 RNA 浓度和纯度的测定。按照 Takara 反转录试剂盒进行。反转录体系为 10 μ L, 反应条件: 37 °C 15 min 和 85 °C 5 s; PCR 反应体系为 20 μ L, 反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环, 每个样品都有 3 个重复。

1.6 Real-time PCR

荧光定量 PCR 反应配置总体积为 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 2。反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环, 每个样品都有 3 个重复。计算方法按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。因为在奶牛中甘油醛 3 磷酸脱氢酶 (GAPDH) 基因稳定性高。因此, 以 GAPDH 作为内参基因对糖异生关键的 mRNA 表达进行归一化处理。

表 2 荧光定量 PCR 引物信息

Table 2 Information of reverse-transcription PCR primers

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	GenBank 序列号 GenBank accession No.	来源 Source
<i>PCK1</i>	F: 5 AGGGAAATAGCAGGCTCCAGGAAA 3 R: 5 CACACGCATGTGCACACACACATA 3	NM_174737.2	[21]
<i>PCK2</i>	F: 5 TGA CTGGGCAAGGGGAGCCG 3 R: 5 GGGGCCACCCCAAAGAAGCC 3	NM_001205594.1	[21]
<i>PC</i>	F: 5 CCACGAGTTCTCCAACACCT 3 R: 5 TTCTCCTCCAGCTCCTCGTA 3	NM_177946.4	[21]
<i>G6PC</i>	F: 5 TGATGGACCAAGAAAGATCCAGGC 3 R: 5 TATGGATTGACCTCACTGGCCCTCTT 3	NM_001076124.2	[21]
<i>FBP1</i>	F: 5 ATAGAGAAGGCAGGAGGAAT 3 R: 5 CAGGA ACTCAGTCACATCTT 3	NM_001034447	[21]
<i>PGC1A</i>	F: 5 AGCCTCTTTGCCAGATCTT 3 R: 5 GGCAATCCGTCTTCATCCAC 3	NM_001285631.1	Designed by Prime6
<i>GAPDH</i>	F: 5 GGGTCATCATCTCTGCACCT 3 R: 5 GGTCATAAGTCCCTCCACGA 3	NM_001034034	[21]

1.7 数据统计分析

结果采用“平均数 ± 标准误”表示。运用 SPSS 16.0 统计软件中的独立样本 *t* 检验进行显著性检验。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示极显著差异。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白水平的日粮对犊牛血清和肝脏葡萄糖含量的影响

不同蛋白水平的日粮对犊牛血清和肝脏葡萄糖

的含量,结果见表 3。与低蛋白组相比,高蛋白组极显著提高($P < 0.01$)肝脏中的葡萄糖含量,同时也显著提高($P < 0.05$)血清中葡萄糖含量。

2.2 不同蛋白水平的日粮对犊牛肝脏氨基酸含量的影响

采用液相色谱的方法检测犊牛肝脏中氨基酸的含量见表 4。与低蛋白组相比,高蛋白组显著提高($P < 0.05$) Asp、Ala、Ser、Leu、Lys、Phe、Ile、Val、Tyr、Arg、Glu 和 His 的含量,极显著提高($P < 0.01$) Gly 和 Pro 的含量,但未改变 Thr 和 Met 的含量。

表 3 不同蛋白水平饲料对犊牛血清和肝脏葡萄糖含量的影响

Table 3 Effects of protein at different concentrations on glucose content in serum and liver of Holstein bull calves

项目 Item	低蛋白组 LP	高蛋白组 HP	标准误 SEM
肝中葡萄糖/(mg/g)	0.921 0 b	1.806 1 a	0.06
血清中葡萄糖/(mg/dL)	63.950 4 b	81.033 6 a	3.83

注:同行标注不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: Different lowercase letters in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$). The same as below.

表 4 不同蛋白水平饲料对犊牛肝脏氨基酸含量的影响

Table 4 Effects of protein at different concentrations on amino acids content in liver of Holstein bull calves mg/g

氨基酸 Amino acid	低蛋白组 LP	高蛋白组 HP	标准误 SEM
甘氨酸 Gly	0.006 8 b	0.008 8 a	0.000 4
天冬氨酸 Asp	0.020 0 b	0.024 6 a	0.001 3
丙氨酸 Ala	0.009 4 b	0.011 6 a	0.000 6
丝氨酸 Ser	0.009 6 b	0.011 4 a	0.000 6
苏氨酸 Thr	0.006 8	0.007 9	0.000 4
亮氨酸 Leu	0.013 1 b	0.016 3 a	0.000 9
赖氨酸 Lys	0.012 2 b	0.015 0 a	0.000 9
苯丙氨酸 Phe	0.007 4 b	0.009 1 a	0.000 6
异亮氨酸 Ile	0.007 0 b	0.008 2 a	0.000 5
缬氨酸 Val	0.008 8 b	0.010 9 a	0.000 7
酪氨酸 Tyr	0.005 6 b	0.006 7 a	0.000 4
脯氨酸 Pro	0.005 8 b	0.007 3 a	0.000 3
精氨酸 Arg	0.011 0 b	0.013 4 a	0.000 7
谷氨酸 Glu	0.027 6 b	0.033 7 a	0.002 0
蛋氨酸 Met	0.004 1	0.004 7	0.000 3
组氨酸 His	0.003 4 b	0.004 9 a	0.000 5

2.3 不同蛋白水平的日粮对犊牛肝脏糖异生关键基因表达水平的影响

采用 qRT-PCR 分别检测 *PCK1*、*PCK2*、*PC*、*FBP1*、*G6PC* 和 *PGC1A* 在不同蛋白水平日料饲喂犊牛的肝脏中的表达变化(表 5)。与高蛋白组相比,高蛋白组显著提高了($P < 0.05$)*PCK2*、*PC* 和 *PGC1A* 基因表达量,极显著提高了($P < 0.01$)*PCK1* 基因表达量,其他基因无显著差异。

表 5 不同蛋白水平饲料对犊牛肝脏糖异生途径关键基因 mRNA 表达的影响

Table 5 Effects of protein at different concentrations on mRNA expression of key genes of gluconeogenesis pathway in liver of male calves

基因 Gene	低蛋白组 LP	高蛋白组 HP	标准误 SEM
<i>PCK1</i>	1.01 b	1.88 a	0.20
<i>PCK2</i>	1.18 b	2.39 a	0.45
<i>PC</i>	1.11 b	2.20 a	0.36
<i>FBP1</i>	1.11	1.26	0.40
<i>G6PC</i>	1.01	1.25	0.28
<i>PGC1A</i>	1.02 b	1.83 a	0.28

3 讨论与结论

糖异生对犊牛生长发育起着重要的作用^[4]。尤其在进食后,当代谢产物大量流入血液时,糖异生起着至关重要的角色^[22]。通过氨基酸转成为葡萄糖是糖异生经典途径之一^[23]。除了赖氨酸和亮氨酸外,其他的氨基酸都可以通过糖异生途径生成糖。在维持饲养水平的反刍动物中,内源性葡萄糖最少有 15% 是由氨基酸转化而来的,来自肝脏摄取的氨基酸占 32%。在生长阶段的反刍动物,需要大量的氨基酸去合成葡萄糖维持生长发育^[24]。而日粮中蛋白质是氨基酸的最重要来源。以往的研究主要集中在不同水平蛋白日粮对犊牛生长性能、血清生化和瘤胃发酵的影响,但不同水平蛋白日粮对犊牛糖异生的影响尚不清楚。因此本研究旨在不同蛋白水平全价颗粒日粮对犊牛糖异生的影响。

在正常饲养水平下,反刍动物血糖浓度总是维持在一定的恒定范围之内,这对维持机体各组织细胞的能耗和功能发挥着重要作用。外源葡萄糖的吸

收和内源性糖异生作用都对血糖浓度有影响,而内源性糖异生作用主要来自肝糖异生^[25]。本课题组前期研究表明^[20],高蛋白组会提高 3 h 血清中葡萄糖含量,但显著不差异。李辉等^[26]研究表明,22% 蛋白水平也可提高犊牛血糖含量。低蛋白组由于采食的日粮水平较低,犊牛对营养物质的消化吸收能力较差,难以提供足够的葡萄糖。本研究表明,日粮中高水平蛋白(21.02%)可以显著提高犊牛 5 h 血清葡萄糖和屠宰后肝脏葡萄糖含量。这可能是蛋白质消化为氨基酸在肝脏通过糖异生作用促进血糖提高的原因。但是关于犊牛的氨基酸肝脏糖异生研究很少有报道。肝脏是氨基酸主要代谢的场所。除了赖氨酸和亮氨酸外的 18 种常见氨基酸均可以通过糖异生途径生成葡萄糖。本研究中发现,除了苏氨酸和蛋氨酸以外,21.02% 蛋白水平组增加了肝脏中其他氨基酸的含量。

糖异生途径包含 4 种关键的限速酶,即 *PC*、*PCK*、*FBP1* 和 *G6PC*。草酰乙酸是由 *PC* 编码的酶催化线粒体中丙酮酸得来的,提供糖异生中间体补充所需的草酰乙酸。在糖异生作用的增加时候,*PC* 的 mRNA 表达被促进以响应来自糖原性 AA 和乳酸的草酰乙酸^[9]。本研究表明,与低蛋白组相比,高蛋白组可以显著提高 *PC* 的 mRNA 表达量。苹果酸是草酰乙酸在线粒体苹果酸脱氢酶的还原作用下生成的,并输出到细胞质中,并在细胞质中苹果酸脱氢酶氧化作用后再次生成草酰乙酸。*PCK1* 和 *PCK2* 酶分别催化草酰乙酸在细胞质和线粒体中形成磷酸烯醇式丙酮酸。在细胞中,磷酸烯醇式丙酮酸是由 *PCK1* 催化草酰乙酸产生,这是糖异生的关键反应。本研究发现,高蛋白组可显著促进 *PCK1* 的 mRNA 表达量。先前的研究报道表明,氨基酸进入糖异生是由 *PC* 和 *PCK1* 编码的酶调节的,而不是 *PCK2*,因为氨基酸形成磷酸烯醇式丙酮酸需要在胞浆中独立合成 NADH^[27]。*PC* 和 *PCK1* 的 mRNA 表达量的增加,进一步暗示了饲喂高蛋白可促进肝脏中磷酸烯醇式丙酮酸浓度增加,进而满足下一步糖异生反应。尽管以氨基酸作为前体物质的糖异生并不依赖 *PCK2*,但是 *PCK2* 也在糖异生发挥着重要的作用。在单胃动物的肝脏中,*PCK2* 只占总磷酸烯醇丙酮酸羧化酶活性的大约 1%~5%^[28],但在反刍动物中 *PCK1* 和 *PCK2* 的活性大致相等^[10]。本研究发现,高蛋白组可显著促进 *PCK2* 的 mRNA 表达量。*FBP1* 和 *G6PC* 的功能是

催化果糖 1,6-二磷酸转变为葡萄糖。尽管本研究显示,高蛋白组并未有显著的提高 *FBP1* 和 *G6PC* 的 mRNA 的表达量。先前的研究表明,高蛋白饮食增加了肝脏中 *PCK* 的活性,但对 *G6PC* 的活性影响不大^[29-30]。*PGC1A* 作为一种调节与能量代谢相关基因的转录辅激活物^[31]。此外,*PGC1A* 还参与糖异生关键基因的表达,通过提高 *PCK* 启动子的转录活性去提高肝脏中的 *PCK* 的表达水平。与低蛋白组相比,高蛋白组显著提高了 *PGC1A* 的 mRNA 表达量。此外,Dai 等^[32] 研究发现高水平的氨基酸可以提高肝脏糖异生基因的表达和氨基酸的利用效率。本研究表明,日粮中高蛋白水平可以提高肝脏中氨基酸丰度同时增加肝脏糖异生关键基因的表达量,进而促进糖异生生成葡萄糖提供机体所需的能量。

参考文献 References

- [1] Berends H, van Reenen C G, Stockhofe-Zurwieden N, Gerrits W J J. Effects of early rumen development and solid feed composition on growth performance and abomasal health in veal calves[J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(6):3190-3199
- [2] 刁其玉. 后备牛蛋白质营养需要研究进展[J]. 饲料工业, 2010, 31(S2):15-19
Diao Q Y. A Review: Development for the requirement of young cattle to crude protein level in diets[J]. *Feed Industry*, 2010, 31(S2): 15-19 (in Chinese)
- [3] 朱雯, 任春环, 张彦, 张子军. 反刍动物肝脏糖异生及营养调控[J]. 动物营养学报, 2019, 31(10): 4434-4441
Zhu W, Ren C H, Zhang Y, Zhang Z J. Mechanisms of hepatic gluconeogenesis and nutritional regulation in ruminants [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(10): 4434-4441 (in Chinese)
- [4] Hammon H M, Steinhoff-Wagner J, Flor J, Schönhusen U, Metges C C. Lactation biology symposium: Role of colostrum and colostrum components on glucose metabolism in neonatal calves[J]. *Journal of Animal Science*, 2013, 91(2): 685-695
- [5] Girard J, Ferré P, Pégiorier J P, Duée P H. Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition[J]. *Physiological Reviews*, 1992, 72(2): 507-562
- [6] Hannan K M, Thomas G, Pearson R B. Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex[J]. *The Biochemical Journal*, 2003, 370(Pt2): 469-477
- [7] Elwyn D H, Parikh H C, Shoemaker W C. Amino acid movements between gut, liver and periphery in unanesthetized dogs[J]. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 1968, 215(5):1260-1275
- [8] Lane M A, Baldwin R L, Jesse B W. Sheep rumen metabolic development in response to age and dietary treatments[J]. *Journal of Animal Science*, 2000, 78(7): 1990-1996
- [9] Greenfield R B, Cecava M J, Donkin S S. Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation [J]. *Journal of Dairy Science*, 2000, 83(6): 1228-1236
- [10] Agca C, Greenfield R B, Hartwell J R, Donkin S S. Cloning and characterization of bovine cytosolic and mitochondrial PEPCK during transition to lactation [J]. *Physiological Genomics*, 2002, 11(2): 53-63
- [11] Yoon J C, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn C R, Granner D K, Newgard C B, Spiegelman B M. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1 [J]. *Nature*, 2001, 413(6852): 131-138
- [12] Tiraby C, Langin D. PGC-1alpha, a transcriptional coactivator involved in metabolism[J]. *Medicine science*, 2005, 21(1): 49-54
- [13] Wang L F, Yang G Q, Yang S, Yang G Y, Li M, Zhu H S, Wang Y Y, Han L Q, Liu R Y, Jia S D, Song F. Alteration of factors associated with hepatic gluconeogenesis in response to acute lipopolysaccharide in dairy goat [J]. *Journal of Animal Science*, 2015, 93(6): 2767-2777
- [14] Nordlie R C, Foster J D. A retrospective review of the roles of multifunctional glucose-6-phosphatase in blood glucose homeostasis: Genesis of the tuning/retuning hypothesis[J]. *Life Sciences*, 2010, 87(11/12): 339-349
- [15] Cole N A, Greene L W, McCollum F T, Montgomery T, McBride K. Influence of oscillating dietary crude protein concentration on performance, acid-base balance, and nitrogen excretion of steers[J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81(11): 2660-2668
- [16] 黄利强, 龚月生, 崔伟, 王晶, 刘锦妮. 犊牛开食料中适宜蛋白质水平的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009(3): 54-56
Huang L Q, Gong Y S, Cui W, Wang J, Liu J N. The research of protein level in calf starter [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary*, 2009(3): 54-56 (in Chinese)
- [17] 蔺军. 不同蛋白水平的颗粒料对特陶寒羔羊干物质采食量及饲料利用率的影响[J]. 中国草食动物科学, 2017, 37(3): 70-71
Lin J. Effects of different protein levels on dry matter intake and feed efficiency of tetraoan lambs [J]. *China Herbivore Science*, 2017, 37(3): 70-71 (in Chinese)
- [18] Baldwin VI R L, McLeod K R, Klotz J L, Heitmann R N. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre-and postweaning ruminant[J]. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87: E55-E65

- [19] Kristensen N B, Sehested J, Jensen S K, Vestergaard M. Effect of milk allowance on concentrate intake, ruminal environment, and ruminal development in milk-fed Holstein calves[J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(9): 4346-4355
- [20] 黄杰. 不同蛋白水平全价颗粒料对公犊牛生长性能、血清生化指标及瘤胃发酵的影响[D]. 扬州, 扬州大学, 2020
Huang J. Effects of full-price granule with different protein levels on growth performance, serum biochemical indexes and rumen fermentation of male calves [D]. Yangzhou, China: Yangzhou University, 2020 (in Chinese)
- [21] Zhang Q, Koser S L, Donkin S S. Propionate induces mRNA expression of gluconeogenic genes in bovine calf hepatocytes [J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(5): 3908-3915.
- [22] Young J W. Gluconeogenesis in cattle: Significance and methodology[J]. *Journal of Dairy Science*, 1977, 60(1): 1-15
- [23] 朱雯,任春环,张彦,张子军. 反刍动物肝脏糖异生及营养调控[J]. 动物营养学报, 2019, 31(10): 4434-4441
Zhu W, Ren C H, Zhang Y, Zhang Z J. Mechanisms of hepatic gluconeogenesis and nutritional regulation in ruminants [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(10): 4434-4441 (in Chinese)
- [24] Lane M A, Baldwin R L, Jesse B W. Sheep rumen metabolic development in response to age and dietary treatments[J]. *Journal of Animal Science*, 2000, 78(7): 1990-1996
- [25] Nocek J E, Tamminga S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition[J]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10): 3598-3629
- [26] 李辉,刁其玉,张乃锋,屠焰,王吉峰. 不同蛋白水平对犊牛消化代谢及血清生化指标的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(4): 1219-1226
Li H, Diao Q Y, Zhang N F, Tu Y, Wang J F. Effect of different protein levels on nutrient digestion metabolism and serum biochemical indexes in calves[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2008, 41(4): 1219-1226 (in Chinese)
- [27] Aschenbach J R, Kristensen N B, Donkin S S, Hammon H M, Penner G B. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough[J]. *IUBMB Life*, 2010, 62(12): 869-877
- [28] Wiese T J, Lambeth D O, Ray P D. The intracellular distribution and activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase isozymes in various tissues of several mammals and birds[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1991, 100(2): 297-302
- [29] Azzout-Marniche D, Gaudichon C, Blouet C, Bos C, Mathé V, Huneau J F, Tomé D. Liver glyconeogenesis: A pathway to cope with postprandial amino acid excess in high-protein fed rats [J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2007, 292(4): R1400-R1407
- [30] Azzout-Marniche D, Gaudichon C, Tomé D. Dietary protein and blood glucose control [J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2014, 17(4): 349-354
- [31] Miller R A, Birnbaum M J. An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010, 120(7): 2267-2270
- [32] Dai W W, Panserat S, Plagnes-Juan E, Seiliez I, Skiba-Cassy S. Amino acids attenuate insulin action on gluconeogenesis and promote fatty acid biosynthesis via mTORC1 signaling pathway in trout hepatocytes [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2015, 36(3): 1084-1100

责任编辑: 秦梅