

苜蓿黄酮对脂多糖刺激下乳成分合成相关基因表达的影响

占今舜^{1,2} 陈小连² 詹康¹ 赵国琦^{1*}

(1. 扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009;

2. 江西省农业科学院 畜牧兽医研究所, 南昌 330200)

摘 要 为探索苜蓿黄酮对脂多糖(LPS)刺激下乳成分合成相关基因表达的影响,采用体外细胞培养技术,将奶牛乳腺上皮细胞分成4个组:1)基础培养基(Con);2)基础培养基中加入1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS(L);3)基础培养基中加入1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS和75 $\mu\text{g/mL}$ 苜蓿黄酮(L+F);4)基础培养基中加入75 $\mu\text{g/mL}$ 苜蓿黄酮(F)。细胞在37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中培养12 h后,对其乳成分合成相关基因的表达进行测定。结果表明:1)相对于对照组,L组和L+F组的酪氨酸激酶(*JAK2*)表达显著降低($P<0.01$),信号转导子和转录激活子(*STAT5*)和真核起始因子4E(*eIF4E*)表达显著升高($P<0.05$)。L+F组真核细胞起始因子4E结合蛋白1(*4EBP1*)的表达显著高于F组($P<0.01$),核糖体S6蛋白激酶1(*S6K1*)的表达显著高于L组和对照组($P<0.05$)。2)F组胆固醇调节元件结合蛋白1(*SREBP1*)的表达显著低于L组($P<0.05$),过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (*PPAR- γ*)的表达则相反;F组脂肪酸转运蛋白1(*FATP1*)和脂肪酸转运蛋白4(*FATP4*)的表达显著低于L和L+F组($P<0.01$),脂肪酸结合蛋白3(*FABP3*)和乙酰辅酶A羧化酶(*ACACA*)的表达则相反;对照组硬脂酰辅酶A去饱和酶1(*SCD1*)的表达显著高于其他各组($P<0.01$)。3) L+F组葡萄糖转运蛋白1(*Glut1*)($P<0.05$)、葡萄糖转运蛋白4(*Glut4*)($P<0.05$)和葡萄糖转运蛋白8(*Glut8*)($P<0.01$)的表达显著高于对照组,F组己糖激酶2(*HK2*)的表达显著低于L组和L+F组($P<0.05$),而 β -1,4-半乳糖基转移酶(β -1,4-*Gal T*)的表达最低。因此,在无LPS刺激下,添加苜蓿黄酮可能会抑制乳脂合成;在LPS刺激下,添加苜蓿黄酮可能会促进乳蛋白和乳糖的合成。

关键词 苜蓿黄酮; 脂多糖; 乳腺上皮细胞; 奶牛

中图分类号 S823; Q2-33

文章编号 1007-4333(2018)02-0050-07

文献标志码 A

Effects of alfalfa flavonoids on gene expression of milk component synthesis in bovine mammary epithelial cells induced by lipopolysaccharide

ZHAN Jinshun^{1,2}, CHEN Xiaolian¹, ZHAN Kang², ZHAO Guoqi^{2*}

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

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China)

Abstract The aim of this study was to examine the effect of alfalfa flavonoids (AF) on the gene expression of milk component synthesis in bovine mammary epithelial cells (BMECs) induced by lipopolysaccharide (LPS). BMECs were cultured on media without LPS + AF (Con), and with 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS (L), 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 75 $\mu\text{g/mL}$ AF (L + F), 75 $\mu\text{g/mL}$ AF (F) at 37 $^{\circ}\text{C}$ with 5% CO_2 for 12 h. The expression of gene related to milk component synthesis was evaluated. The results showed: 1) Compared with the control group, the L and L + F treatment groups showed significant decrease in *JAK2* expression ($P<0.01$), but significant increase in the expressions of *STAT5* and *eIF4E* ($P<0.01$). The relative expressions of *4EBP1* and *S6K1* were significantly higher in the L + F treatment group than in the F treatment group

收稿日期: 2017-02-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31572430); 江苏省高校优势学科建设工程项目(PAPD); 江苏省农业三新工程项目(SXGC[2016]326)

第一作者: 占今舜, 博士, 助理研究员, 主要从事动物营养与饲料科学研究, E-mail: zhanjinshun1985@163.com

通讯作者: 赵国琦, 教授, 博士生导师, 主要从事牧草和草食动物营养研究, E-mail: gqzhao@yzu.edu.cn

($P < 0.01$), L treatment and control groups ($P < 0.05$), respectively. 2) The relative expression of *SREBP1* was significantly lower in the F treatment group than that of the L treatment group ($P < 0.05$), whereas the *PPAR- γ* showed the opposite result. The relative expressions of *FATP1* and *FATP4* were significantly lower in the F treatment group than in the L and L + F treatment groups ($P < 0.01$), whereas the *FABP3* and *ACACA* had the opposite result. The relative expression of *SCD1* was significantly higher in the control group than in other groups ($P < 0.01$). 3) Compared with the control group, the L + F treatment group showed significantly higher expression levels of *Glut1* ($P < 0.05$), *Glut8* ($P < 0.01$) and *Glut4* ($P < 0.05$). The relative expression of *HK2* was significantly lower in the F treatment group than in the L + F and L treatment groups ($P < 0.05$), and the relative expression of β -1,4-Gal T was the lowest in the F treatment group. This study showed that alfalfa flavonoids might inhibit milk fat synthesis of BMECs cultured without LPS. Alfalfa flavonoids might promote lactose and protein synthesis of BMECs induced by LPS.

Keywords alfalfa flavonoids; lipopolysaccharide; mammary epithelial cells; dairy cow

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 被称为“牧草之王”, 属豆科多年生草本植物。因其营养丰富、产量高和草质优良等特点, 被广泛应用于奶牛生产中^[1]。紫花苜蓿的主要代谢产物为黄酮类化合物, 具 2-苯基色原酮结构, 以 C6-C3-C6 为碳架^[2]。通过饲养试验研究发现, 奶牛日粮中添加适量的槲皮素, 能够升高牛奶中乳蛋白含量, 但不影响乳脂和乳糖含量; 添加富含黄酮的葡萄渣粉提取物, 能够提高每天乳蛋白产量; 添加芦丁能够显著降低乳脂率, 但不影响乳蛋白和乳糖含量^[3-5]。结果说明, 黄酮类物质能够影响奶牛乳成分的合成, 且不同种类的黄酮效果不同。

奶牛乳腺组织在金黄葡萄球菌、大肠杆菌和链球菌等病原菌感染下, 会产生乳房炎, 而奶牛乳房炎的产生会导致产奶量和乳品质下降。脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 又称内毒素, 是革兰氏阴性菌如大肠杆菌等细胞壁中的一种成分, 当细菌死亡溶解时, 其释放出来会使乳腺组织产生损伤^[6]。研究发现, LPS 降低乳脂率和乳脂肪产量主要和乳腺内脂肪酸摄取、活化与转运等相关基因表达有关; LPS 还通过调节哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路和酪氨酸蛋白激酶-信号转导子和转录激活子 (JAK2-STAT5) 通路影响乳蛋白及氨基酸组成^[7-8]。上述研究结果说明 LPS 能够影响乳成分的合成。因此, 本研究拟研究在 LPS 刺激下, 苜蓿黄酮对奶牛乳腺上皮细胞乳成分合成的影响, 从而了解苜蓿黄酮影响乳成分合成机理, 为苜蓿黄酮的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

苜蓿黄酮购于陕西绿清生物工程有限公司,

LPS(血清型 O55 : B5) 购于美国 Sigma 公司, 奶牛乳腺上皮细胞由本试验室通过组织块培养法获得^[9]。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

试验于 2016 年 7 月开始进行, 取密度为 5×10^5 个/mL 细胞接种到 6 孔板, 将细胞置于 DMEM/F12 (Gibco, 美国) 培养基在 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中培养, 培养基中含有 10% 的胎牛血清 (Gibco, 美国)、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素 (Sigma, 美国)。试验分为 4 组, 即基础培养基 (Con)、基础培养基中加入 1 μ g/mL 的 LPS (L)、基础培养基中加入 1 μ g/mL 的 LPS 和 75 μ g/mL 苜蓿黄酮 (L+F) 和基础培养基中加入 75 μ g/mL 苜蓿黄酮 (F), 每组 3 个重复, 其中苜蓿黄酮用 DMSO (索莱宝, 北京) 完全溶解, 4 个处理组中的二甲亚砜 (DMSO) 含量低于 2%。细胞培养 12 h 后, 进行 RNA 提取。

1.2.2 细胞 RNA 提取、cDNA 的合成和荧光定量 PCR 条件

将细胞培养液吸弃, 然后 6 孔板中加入 1 mL/孔的 Trizol, 静置 10 min。根据 RNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司, 北京) 中的说明书进行总 RNA 的提取, 提取的 RNA 采用 One Drop 仪器进行测定浓度和纯度。cDNA 的合成在冰上进行, 操作方法参照 Roche 反转录试剂盒中说明书进行。反应体系为 20 μ L, 反应条件为 25 °C, 10 min、55 °C, 30 min。所得 cDNA 保存于 -20 °C 待测。荧光定量 PCR 方法参照占今舜等^[10]。

1.2.3 引物设计

根据 GenBank 中的基因序列, 采用 Primer 5.0 软件设计引物, 引物由 Invitrogen 公司合成 (表 1)。

表 1 乳成分合成相关基因的引物序列

Table 1 The primer sequence of genes of milk component synthesis

基因 Gene	登录号 Accession number	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物长度/bp Product length
<i>GAPDH</i>	NM_001034034	F:GGGTCATCATCTCTGCACCT R:GGTCATAAGTCCCTCCACGA	176
葡萄糖转运蛋白 8 <i>GLUT8</i>	NM_201528.1	F:TGGTGTCTACAAGCCCTTCA R:TGACCACACCTGACAAGGTC	233
葡萄糖转运蛋白 1 <i>GLUT1</i>	NM_174602.2	F:CCTGGATGTCCTACCTGAGC R:CGCACAGTTGCTCCACATAC	204
葡萄糖转运蛋白 4 <i>GLUT4</i>	NM_174604.1	F:TTCTCTGTGGGTGGCATGAT R:GCTCCAATGAAGAACCGTCC	179
己糖激酶 2 <i>HK2</i>	XM_015465313.1	F:AAGATGCTGCCCACCTACG R:TCGCTTCCCATTCCTCACA	123
β -1,4-半乳糖基转移酶 <i>β1,4-Gal T</i>	NM_177512.2	F:GGCGTCACCCTCGTCTATTA R:GAGTACGCGTATAGGTTGGA	215
雷帕霉素靶蛋白 <i>mTOR</i>	XM_002694043.3	F:TGTGGAGTTTGAGGTGAAGC F:ATTATCAAAGAAGGGCTGCAC F:ATGAAAGCATGGACCATGGG	148
核糖体 S6 蛋白激酶 1 <i>S6K1</i>	NM_205816.1	R:CCGGTATTTGCTCCTGTTAC F:GAACTCACCTGTGACCAAGA	199
真核细胞始动因子 4E 结合蛋白 1 <i>4EBP1</i>	NM_1077893.2	R:CTCAAAGTGTGACTCTTCACC F:GAAGACTTTTGGGCTCTGTAC	157
真核起始因子 4E <i>eIF4E</i>	NM_174310.3	R:CAGCTCCACATACATCATCA F:TGAAGACCGAGACCCTACAC	250
酪氨酸激酶 <i>JAK2</i>	XM_005209981	R:CTGCAAGGATTTAAGGATTTT F:TTCAGCGACTCAGAAATTGG	211
信号转导子和转录激活子 5 <i>STAT5</i>	NM_001012673.1	R:GGTCGGGAAACACGTAGATG F:CGCTCTTCCATCAATGACAA	163
胆固醇调节元件结合蛋白 1 <i>SREBP1</i>	NM_001113302.1	R:GTCCTTCAGCGATTTGCTTT F:TGGTGTCTGTGTTGTGCT	192
硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 <i>SCD1</i>	NM_173959.4	R:GGTAGTTGTGGAAGCCCTCA F:ACTCCCTAATGGCCATTGAA	242
过氧化物酶体增殖物激活受体 γ <i>PPAR-γ</i>	NM_181024.2	R:ATGAGACATCCCCACAGCAA F:TCCATCTGGGAGGAGTTAC	221
脂肪酸转运蛋白 1 <i>FATP1</i>	NM_001033625.2	R:GTCCTCGTTGACCTCACCA F:GCGCTTCATCCGAATCTTTA	177
脂肪酸转运蛋白 4 <i>FATP4</i>	NM_001075667.1	R:GGCCACGCTGTTTGAGTAGT F:GAACTCGACTCCCAGCTTGAA	229
脂肪酸结合蛋白 3 <i>FABP3</i>	NM_174313.2	R:AAGCCTACCACAATCATCGAAG F:TCCTGCTGCTATTGCTACTCCA	102
乙酰辅酶 A 羧化酶 <i>ACACA</i>	NM_174224.2	R:CAGTCCCCGCACTCACATAA	95

1.3 数据处理

基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算,试验数据用 Excle 2007 进行处理,采用 IBM SPSS Statistics 21.0 单因素方差分析(ANOVA),LSD 法多重比较, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 苜蓿黄酮对脂多糖刺激下乳蛋白合成基因表达的影响

相对于对照组,L 组和 L+F 组 *JAK2* 的表达

显著降低($P<0.01$),而 *STAT5* 和 *eIF4E* 的表达显著升高($P<0.01$);L+F 组 *S6K1* 的表达显著高于对照组和 L 组($P<0.05$),而 *LAT1* 和 *4EBP1* 的表达显著高于 F 组($P<0.05$)(表 2)。结果表明,在 LPS 刺激下,可能会影响乳蛋白的合成,而添加苜蓿黄酮对乳蛋白合成具有一定的促进作用。

表 2 苜蓿黄酮对 LPS 刺激下细胞内乳蛋白合成基因表达的影响

Table 2 Effect of alfalfa flavonoids on gene expression of milk protein synthesis in cells stimulated by LPS

基因 Gene	组别 Group				SEM	P 值 P-value
	对照组 CK	LPS 组 L	LPS+苜蓿黄酮组 L+F	苜蓿黄酮组 F		
<i>JAK2</i>	1.00 A	0.39 B	0.37 B	0.94 A	0.05	<0.01
<i>STAT5</i>	1.00 B	1.81 A	2.21 A	1.00 B	0.21	<0.01
<i>mTOR</i>	1.00 a	0.82 a	0.88 a	0.84 a	0.09	0.21
<i>S6K1</i>	1.00 b	0.99 b	1.11 a	1.06 ab	0.04	0.04
<i>4EBP1</i>	1.00 AB	0.97 AB	1.06 A	0.60 B	0.13	0.02
<i>eIF4E</i>	1.00 Bb	2.23 Aa	1.71 ABa	1.18 Bab	0.27	<0.01

注:同行不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),相同大小写字母表示差异不显著($P>0.01$ 或 $P>0.05$)。下表同。

Note:Different capital letters within the same row represent extremely significant differences at $P<0.01$,different lowercases letters within the same row represent significant differences at $P<0.05$,and the same capital or lowercases letters represent no significant difference at $P>0.01$ or $P>0.05$. The same below.

2.2 苜蓿黄酮对脂多糖刺激下乳脂合成基因表达的影响

从表 3 中可知,L 组 *SREBP1* 的表达显著高于 F 组($P<0.05$),而 *PPAR-γ* 表达的结果则相反。L 组和 L+F 组 *FATP1* 和 *FATP4* 的表达显著高于 F 组($P<$

0.01),而 *FABP3* 和 *ACACA* 表达的结果则相反。相对于对照组,其他各组 *SCD1* 的表达均显著下降($P<0.01$),其中 F 组最低。结果表明,在 LPS 刺激下,能够抑制乳脂合成,而添加苜蓿黄酮并不能改善乳脂的合成,而且苜蓿黄酮本身亦有抑制乳脂合成的作用。

表 3 苜蓿黄酮对 LPS 刺激下细胞内乳脂合成基因表达的影响

Table 3 Effect of alfalfa flavonoids on gene expression of milk fat synthesis in cells stimulated by LPS

基因 Gene	组别 Group				SEM	P 值 P-value
	对照组 CK	LPS 组 L	LPS+苜蓿黄酮组 L+F	苜蓿黄酮组 F		
<i>SREBP1</i>	1.00 ab	1.23 a	1.06 ab	0.77 b	0.14	0.04
<i>PPAR-γ</i>	1.00 a	0.69 b	0.93 ab	1.00 a	0.14	0.05
<i>FATP1</i>	1.00 A	0.92 A	0.80A	0.39 B	0.11	<0.01
<i>FATP4</i>	1.00 A	1.18 A	1.01 A	0.53 B	0.15	<0.01
<i>SCD1</i>	1.00 Aa	0.62 Bab	0.66 Ba	0.47 Bb	0.08	<0.01
<i>FABP3</i>	1.00 A	0.57 B	0.50 B	0.91 A	0.07	<0.01
<i>ACACA</i>	1.00 ab	0.87 b	0.85 b	1.15 a	0.11	0.07

2.3 苜蓿黄酮对脂多糖刺激下乳糖合成基因表达的影响

从表4中可知,L+F组 *Glut1*、*Glut4* 和 *Glut8* 的表达显著高于对照组和 F 组 ($P<0.01$ 或 $P<$

0.05),L 组和 L+F 组 $\beta 1,4\text{-Gal T}$ 和 *HK2* 的表达显著高于 F 组 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结果表明,在 LPS 刺激下,可能促进乳糖的合成,而添加苜蓿黄酮可能对乳糖合成的影响不大。

表4 苜蓿黄酮对 LPS 刺激下细胞内乳糖合成基因表达的影响
Table 4 Effect of alfalfa flavonoids on gene expression of lactose synthesis in cells stimulated by LPS

项目 Item	组别 Group				SEM	P 值 P-value
	对照组 CK	LPS 组 L	LPS+苜蓿黄酮组 L+F	苜蓿黄酮组 F		
<i>Glut1</i>	1.00 b	1.30 ab	1.69 a	0.96 b	0.22	0.02
<i>Glut4</i>	1.00 b	1.21 ab	1.47 a	0.85 b	0.19	0.04
<i>Glut8</i>	1.00 Bb	1.44 ABa	1.66 Aa	1.12 Bab	0.16	<0.01
$\beta 1,4\text{-Gal T}$	1.00 B	1.48 A	1.22 AB	0.22 C	0.15	<0.01
<i>HK2</i>	1.00 ab	1.34 a	1.38 a	0.75 b	0.22	0.08

3 讨论

1)敲除小鼠的 *JAK2* 和 *STAT5* 基因,会导致小鼠乳腺腺泡发育不良,乳蛋白浓度降低,酪氨酸磷酸化作用减弱^[11-12]。说明乳蛋白的合成受到 *JAK2*-*STAT5* 信号通路的调控。*JAK* 激酶由于能够与胞内受体结构域相结合导致激活,进而激活 *STAT5*,激活的 *STAT5* 形成二聚体或者四聚体异位进入细胞核与特异的 DNA 序列相结合,促使激活或抑制基因的转录^[13]。*4EBP1* 和 *S6K1* 是蛋白质的翻译调节因子,而 *mTOR* 能够调节 *4EBP1* 和 *S6K1* 激活下游信号的转导。激活的 *mTOR* 能够通过抑制 *4EBP1* 发生磷酸化,导致 *eIF4E* 释放 *4EBP1*,使 *eIF4E* 的表达增高,从而促进蛋白质的翻译;另外, *mTOR* 能够促进 *S6K1* 磷酸化,增强含嘧啶基因 mRNA 的翻译功能来调节蛋白质的合成^[14]。张养东^[7]通过细胞培养技术研究发现,LPS (0.1~1 ng/mL)提高 *S6K1* 和 *4EBP1* mRNA 的表达 ($P>0.05$),显著提高了 *STAT5* mRNA 表达水平 ($P<0.05$),而对 *mTOR* 和 *JAK2* mRNA 的表达水平影响不显著。刘立新等^[15]研究发现,奶牛乳腺上皮细胞在 LPS ($>1\mu\text{g/mL}$) 的作用下, *mTOR*、*S6K1*、*4EBP1* 和 *STAT5* mRNA 转录和相关蛋白的表达降低。而本试验发现,LPS 下调 *JAK2* 的表达,升高 *STAT5* 和 *eIF4E* 的表达,结果有点不同,可能是 LPS 添加剂量不同所致。然而,在本试验

中,*STAT5* 的表达升高,可能发挥抑制基因的转录,具体情况需要进一步研究。从本试验结果来看,LPS 可能通过抑制 *JAK2* 活性,降低 *STAT5* 的激活,进而抑制乳蛋白合成,而添加苜蓿黄酮可能会通过提高 *mTOR* 的表达,促使 *S6K1* 蛋白磷酸化,进而促进乳蛋白的合成。

2)乙酰辅酶 A 羧化酶(*ACACA*)是乳脂肪酸从头合成的关键基因。本试验发现 LPS 能够下调 *ACACA* 的表达,说明 LPS 影响乳脂肪酸的从头合成。如果敲除硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(*SCD*)基因,小鼠的体脂沉积大大减少,说明其具有促进脂肪的合成作用^[16]。从本试验来看,LPS 和苜蓿黄酮均能通过下调 *SCD1* 的表达来抑制乳脂的合成。*FATP1* 和 *FATP4* 具有转运长链和极长链脂肪酸进入细胞内的能力^[10]。本试验发现,LPS 不会影响细胞的脂肪酸转运,而苜蓿黄酮会降低细胞脂肪酸的转运。脂肪酸结合蛋白(*FABP*)与脂肪酸结合,促使细胞内游离脂肪酸含量降低,进而降低不饱和脂肪酸对细胞造成损伤。另外,它还能调节脂肪酸的氧化、供能和磷脂、甘油三酯的代谢^[17]。从本试验来看,在 LPS 刺激下,*FABP3* 的表达降低,可能会导致游离脂肪酸含量升高,进而对细胞造成损伤,而添加苜蓿黄酮对其无改善作用。在体内,固醇调控元件结合蛋白(*SREBP*)能够调控 *ACACA*、*FASN*、*SCD1* 及 *FABP3* 等的表达,进而影响脂肪酸的从头合成、转运以及去饱和。当 *SREBP1* 过表

达时, *FASN*、*SCD* 和 *mTOR* 基因表达显著升高, 而 *SREBP1* 基因沉寂时, 这些基因则表达下降。说明 *SREBP1* 是乳脂合成中的关键调节子, 对乳脂合成具有正调节作用^[18]。在本试验中, 苜蓿黄酮能够下调 *SREBP1* 的表达, 进而抑制 *SCD1* 和脂肪酸转运蛋白的表达, 影响乳脂的合成。过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (*PPAR- γ*) 能够调节乳腺组织中 *SREBP* 的活性、脂质蛋白酶、脂肪酸转运酶和脂肪酸转运蛋白的表达来调节脂肪酸和胆固醇的摄入^[19]。当使用 *PPAR- γ* 激动剂后, 能够上调 *SCD*、*FASN* 等表达^[20]。张养东^[7] 研究发现, LPS 能够抑制脂肪酸合成酶 *FASN*、*ACACA* 和 *ACSS2* 以及脂肪酸调控网络中 *PPAR- γ* 基因表达水平。本试验与其结果相似, 说明 LPS 能够下调 *PPAR- γ* 的表达和 *SCD1* 的表达, 进而抑制乳脂的合成。而苜蓿黄酮对 LPS 刺激下抑制乳脂合成的改善作用较小。

3) 乳腺上皮细胞吸收乳腺组织的血糖, 然后在细胞内合成乳糖。血糖进入乳腺细胞需要葡萄糖转运蛋白(*Glut*)的协助才能完成。*Glut1* 是奶牛最主要的葡萄糖转运蛋白, 然而 *Glut 4* 和 *Glut 8* 在泌乳期奶牛的乳腺中也有表达^[21]。己糖激酶(*HK*)和乳糖合成酶参与乳糖的合成需要, *HK* 将葡萄糖转变成葡萄糖-6-磷酸, 然后在变位酶和 *UTP* 的作用下生成 UDP-半乳糖, 乳糖合成酶由 β -1, 4-半乳糖基转移酶(β -1, 4-*GT*)和辅助因子 α -乳白蛋白组成, 是乳糖合成与分泌过程中的限速酶。乳糖合成酶能够催化葡萄糖和 UDP-半乳糖合成乳糖^[22]。从本试验的结果来看, 在 LPS 刺激下, 是否添加苜蓿黄酮均能够通过提高葡萄糖转运蛋白和催化乳糖的合成酶的表达, 说明 LPS 可能有促进乳糖合成的作用。然而, 无 LPS 刺激下, 添加苜蓿黄酮可能会抑制乳腺上皮细胞乳糖的合成。

4 结 论

1) LPS 可能通过调控 *JAK2-STAT5* 通路来抑制乳蛋白的合成, 而在 LPS 刺激下, 添加苜蓿黄酮可能会通过调控 *mTOR* 通路来促进乳蛋白的合成。

2) 苜蓿黄酮能够通过抑制 *SREBP* 和脂肪酸转运蛋白的表达来抑制乳脂的合成, LPS 能够通过调控 *PPAR- γ* 的表达来抑制乳脂的合成。在 LPS 刺激下, 添加苜蓿黄酮对乳脂的合成无影响。

3) 在 LPS 刺激下, 是否添加苜蓿黄酮均能够通过调节催化乳糖合成酶和葡萄糖转运蛋白来促进乳

糖的合成; 而仅添加苜蓿黄酮可能会通过抑制催化乳糖合成酶来降低乳糖合成。

参考文献 References

- [1] 占今舜, 詹康, 刘明美, 霍永久, 林森, 赵国琦, 杨富裕. 苜蓿草颗粒饲料对鹅屠宰性能、器官和血液生化指标的影响[J]. 草业学报, 2015, 24(8): 181-187
Zhan J S, Zhan K, Liu M M, Huo Y J, Lin M, Zhao G Q, Yang F Y. Effect of alfalfa pellet feed on slaughter performance, organ weights and blood biochemical indices of geese[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(8): 181-187 (in Chinese)
- [2] 占今舜, 刘明美, 赵国琦. 黄酮的作用及其在反刍动物上的应用[J]. 中国饲料, 2014, 23: 13-15
Zhan J S, Liu M M, Zhao G Q. Effects of flavonoids and its application in ruminant[J]. *China Feed*, 2014, 23: 13-15 (in Chinese)
- [3] Gohlke A, Ingelmann C J, Nürnberg G, Weitzel J M, Hammon H M, Görs S, Starke A, Wolfram S, Metges C C. Influence of 4-week intraduodenal supplementation of quercetin on performance, glucose metabolism, and mRNA abundance of genes related to glucose metabolism and antioxidative status in dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(11): 6986-7000
- [4] Gessner D K, Koch C, Romberg F J, Winkler A, Dusel G, Herzog E, Most E, Eder K. The effect of grape seed and grape marc meal extract on milk performance and the expression of genes of endoplasmic reticulum stress and inflammation in the liver of dairy cows in early lactation[J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(12): 8856-8868
- [5] Cui K, Guo X D, Tu Y, Zhang N F, Ma T, Diao Q Y. Effect of dietary supplementation of rutin on lactation performance, ruminal fermentation and metabolism in dairy cows [J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2015, 99: 1065-1073
- [6] Piotrowska-Tomala K K, Siemieniuch M J, Szóstek A Z, Korzekwa A J, Wocławek-Potocka I, Galvão A M, Okuda K, Skarzynski D J. Lipopolysaccharides, cytokines, and nitric oxide affect secretion of prostaglandins and leukotrienes by bovine mammary gland epithelial cells [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2012, 43(4): 278-288
- [7] 张养东. 脂多糖对泌乳奶牛乳脂肪和乳蛋白影响及其机理研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011
Zhang Y D. Effects of lipopolysacchride on the milk fat and protein synthesis in dairy cow [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2011 (in Chinese)
- [8] 臧长江, 张养东, 王加启, 胡涛, 卜登攀, 金迪, 周凌云, 李发弟. 脂多糖对泌乳奶牛乳中氨基酸组成及蛋白质代谢相关基因表达的影响[J]. 动物营养学报, 2012, 24(9): 1770-1777
Zang C J, Zhang Y D, Wang J Q, Hu T, Bu D P, Jin D, Zhou L

- Y, Li F D. Effects of lipopolysacchride on amino acid composition and gene expression related to protein metabolism in milk of dairy cows[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(9): 1770-1777 (in Chinese)
- [9] 詹康, 贡笑笑, 左晓昕, 陈银银, 占今舜, 赵国琦. 奶牛乳腺上皮细胞系的培养与鉴定[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(8): 2544-2550
- Zhan K, Gong X X, Zuo X X, Chen Y Y, Zhan J S, Zhao G Q. Culture and identification of the bovine mammary epithelial cell line[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(8): 2544-2550 (in Chinese)
- [10] 占今舜, 刘明美, 詹康, 赵国琦. 苜蓿黄酮对奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白、乳脂和乳糖合成的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2017, 53(1): 91-95
- Zhan J S, Liu M M, Zhan K, Zhao G Q. Effects of alfalfa flavonoids on lactoprotein, milk fat and lactose synthesis in bovine mammary epithelial cells [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2017, 53(1): 91-95 (in Chinese)
- [11] Liu X, Robinson G W, Wagner K U, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis[J]. *Genes & Development*, 1997, 11(2): 179-186
- [12] Shillingford J M, Miyoshi K, Robinson G W, Grimm S L, Rosen J M, Neubauer H, Pfeffer K, Hennghausen L. Jak2 is an essential tyrosine kinase involved in pregnancy-mediated development of mammary secretory epithelium [J]. *Molecular Endocrinology*, 2002, 16(3): 563-570
- [13] 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]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014
- Wang L N. Effect of interaction between amino acids and STAT5A on lactation of dairy cow mammary epithelial cells and its mechanism [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [14] Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan K L. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control[J]. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(1): 79-100
- [15] 刘立新, 林叶, 张莉, 李庆章. 脂多糖对奶牛乳腺上皮细胞毒性作用及乳蛋白合成的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46(6): 61-66
- Liu L X, Lin Y, Zhang L, Li Q Z. Cytotoxicity of LPS and effects on milk protein synthesis in dairy cow mammary epithelial cells [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2015, 46(6): 61-66 (in Chinese)
- [16] 张蕊, 张宜辉, 邵丹, 王来娣, 龚道清. 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶基因的功能与调控[J]. *生命科学*, 2013, 25(4): 378-382
- Zhang R, Zhang Y H, Shao D, Wang L D, Gong D Q. The function and regulation of stearoyl-CoA desaturase gene[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2013, 25(4): 378-382 (in Chinese)
- [17] Matsumata M, Inada H, Osumi N. Fatty acid binding proteins and the nervous system: Their impact on mental conditions[J]. *Neuroscience Research*, 2014, 102: 47-55
- [18] 李楠. SREBP1 在奶牛乳腺上皮细胞乳脂合成中的功能研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014
- Li N. Function of SREBP1 in the milk fat synthesis of dairy cow mammary gland epithelial cells [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [19] Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional regulation of metabolism[J]. *Physiological Reviews*, 2006, 86(2): 465-514
- [20] Kadegowda A K G, Bionaz M, Piperova L S, Erdman R A, Loores J J. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents[J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(9): 4276-4289
- [21] 李文清, 王加启, 南雪梅, 孙鹏. 奶牛乳糖合成及泌乳相关基因和细胞信号通路的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(11): 104-110
- Li W Q, Wang J Q, Nan X M, Sun P. Research progress on genes and signal pathways associated with lactose synthesis and lactation in dairy cows[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 39(11): 104-110 (in Chinese)
- [22] 孙晓旭. 葡萄糖对奶牛乳腺上皮细胞乳糖合成的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013
- Sun XX. Effect of glucose on lactose synthesis in bovine mammary epithelial cells [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013 (in Chinese)

责任编辑: 杨爱东