

丙酸对山羊小肠上皮细胞糖异生途径关键基因表达的影响

宁丽丽¹ 詹康¹ 霍俊宏⁴ 占今舜⁴ 彭程¹ 杨天宇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;

4. 江西省农业科学院 畜牧兽医研究所, 南昌 330200)

摘要 为探究丙酸对山羊小肠上皮细胞(GIEC)糖异生途径关键基因表达是否有影响,试验分为2个部分:第1部分分为4个处理组,分别添加0、0.75、1.50和3.00 mmol/L丙酸培养GIEC,6 h后收集细胞提取总RNA;第2部分分为2个处理组,分别添加0和3.00 mmol/L丙酸培养GIEC,培养3、6、12和24 h时,收集细胞提取总RNA。通过qRT-PCR对糖异生途径关键基因的mRNA表达量进行测定。结果表明,0.75和1.50 mmol/L丙酸对PC、FBP1和PGC1A的mRNA表达量无显著影响($P>0.05$);1.50 mmol/L丙酸可显著增加PCK2的mRNA表达量($P<0.05$);3.00 mmol/L丙酸可显著增加PCK2和PGC1A的mRNA表达量($P<0.05$),还可上调PC和FBP1 mRNA表达量但无差异($P>0.05$)。与未处理组相比,3.00 mmol/L丙酸在6 h时可极显著上调PCK2和PGC1A的mRNA表达量($P<0.01$),还可增加PC和FBP1的mRNA表达量($P>0.05$);在12~24 h对糖异生途径关键基因没有影响($P>0.05$)。综上,丙酸可以在山羊小肠细胞中诱导糖异生途径关键基因PCK2、PC、FBP1和PGC1A的mRNA表达,并且PCK2在山羊小肠上皮细胞糖异生途径中发挥关键作用。

关键词 丙酸; 小肠上皮细胞; 糖异生; 葡萄糖

中图分类号 S513

文章编号 1007-4333(2021)03-0080-06

文献标志码 A

Effects of propionate on the mRNA expressions of key genes in the gluconeogenesis pathway in goat intestinal epithelial cells

NING Lili¹, ZHAN Kang¹, HUO Junhong⁴, ZHAN Jinshun⁴, PENG Cheng¹,
YANG Tianyu¹, ZHAO Guoqi^{1,2,3*}

(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;

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

Abstract To explore whether propionate has effect on the expressions of key genes in the gluconeogenesis pathway in goat intestinal epithelial cells, the experiment was divided into two parts: The first part was divided into four groups. Firstly, 0, 0.75, 1.50 and 3.00 mmol/L propionate were respectively added to culture GIEC for 6 hours. Then the total RNA was extracted from the collected cells. The second part was divided into two groups. GIEC was cultured with 0 and 3.00 mmol/L propionate, respectively. The total RNA was extracted from the collected cells at 3, 6, 12 and 24 h after culturing. qRT-PCR was employed for analysis of mRNA expression of key genes in the gluconeogenesis pathway.

收稿日期: 2020-07-02

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(SBK2019043455);国家自然科学基金项目(31972589);江西现代农业科研协同创新专项(JXXTCX201702-04)

第一作者: 宁丽丽, 硕士研究生, E-mail: ninglili6688@163.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

The results showed that there was no significant difference in the mRNA expression levels of *PC*, *FBP1* and *PGC1A* with the addition of 0.75 and 1.50 mmol/L propionate groups ($P>0.05$). The 1.50 mmol/L propionate significantly increased *PCK2* mRNA expression ($P<0.05$), while 3.00 mmol/L propionate significantly increased the mRNA expression of *PCK2* and *PGC1A* ($P<0.05$) and upregulated the mRNA expression of *PC* and *FBP1*, but there was no difference ($P>0.05$). Compared with untreated group, 3.00 mmol/L propionate significantly increased the mRNA expression of *PCK2* and *PGC1A* at 6 h ($P<0.01$), and the mRNA expression of *PC* and *FBP1* was also increased ($P>0.05$). There was no effect on the key genes of gluconeogenesis pathway between 12 and 24 h ($P>0.05$). In conclusion, propionate can induce mRNA expression of key genes in the gluconeogenesis pathway in goat intestinal epithelial cells, and *PCK2* plays a key role in the gluconeogenesis pathway.

Keywords propionate; intestinal epithelial cells; gluconeogenesis; glucose

反刍动物体内的碳水化合物主要经过瘤胃微生物发酵后生成短链脂肪酸(Short chain fatty acid, SCFA, 包含乙酸、丙酸和丁酸等),再经过糖异生途径转变为葡萄糖被机体吸收利用^[1]。糖异生的主要场所是肝脏,肝脏糖异生可产生血液中80%以上的葡萄糖,因此肝脏糖异生对反刍动物十分重要^[2]。反刍动物肝脏主要以丙酸、氨基酸(AA)、乳酸和甘油作为糖异生底物合成葡萄糖。丙酸对反刍动物来说更为重要,因为丙酸是反刍动物肝脏糖异生的主要底物,可为糖异生提供60%以上的碳源^[3]。有研究发现,向每千克体重的山羊瘤胃灌注1.2 g 丙酸后,其血液葡萄糖含量显著升高^[4]。奶牛被灌注160.4 g 丙酸,可促进犊牛和泌乳中期奶牛肝脏糖异生^[5];体外培养的犊牛肝细胞添加2.50 $\mu\text{mol/L}$ 丙酸可促进肝细胞糖异生^[6]。在反刍动物围产期,肝脏糖异生必须持续快速地运转,一旦不能满足其增加的能量需要,就会出现低血糖和能量负平衡现象,导致代谢紊乱^[2,7]。在人和大鼠中小肠被认为是糖异生的另一重要器官,在其饥饿和胰岛素依赖型糖尿病的情况下会出现小肠糖异生现象^[8]。小肠糖异生可能在影响血糖调节的门脉系统中起信号转导作用^[9]。之前的研究已经发现15%~50%的SCFA可以进入反刍动物消化吸收系统末端^[10],这表明部分SCFA可以到达小肠。所以丙酸可能被小肠细胞吸收合成葡萄糖满足对能量的需求。

丙酸可以直接促进牛肝细胞糖异生途径相关基因的表达,包括丙酮酸羧化酶(*PC*)、细胞质磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(*PCK1*)和线粒体磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(*PCK2*)^[6]。丙酮酸羧化酶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 (*PGC-1 α*)的活化而被转录激活^[11]; *PGC-1 α* 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]。

细胞质磷酸烯醇丙酮酸羧激酶负责将草酰乙酸转化为磷酸烯醇丙酮酸,这是细胞质糖异生的关键部分。但是草酰乙酸不能直接穿过线粒体进入细胞质,因此*PCK2*在将草酰乙酸转化为线粒体中的磷酸烯醇丙酮酸中发挥关键作用。丙酸对山羊小肠上皮细胞*PCK2* mRNA的调控作用尚未被研究。丙酸通过肠脑轴诱导糖异生关键基因的表达,对糖代谢和小肠能量稳态有积极的促进作用^[13-14]。由瘤胃微生物产生的SCFA 50%~85%直接通过网胃壁吸收,15%~50%的SCFA不通过网胃吸收,而直接进入牛的小肠吸收系统^[10]。由此,推测丙酸可激活山羊小肠糖异生基因的表达,因为已经有研究发现山羊小肠上皮细胞可以运输和吸收丙酸^[15],并且丙酸对维持小肠细胞葡萄糖稳态有促进作用^[14]。而Zhan等^[16]研究表明小肠上皮细胞可以吸收和运输丙酸,并且丙酸可以诱导奶牛小肠上皮细胞糖异生途径关键基因的表达。

之前的研究均集中在反刍动物肝细胞的糖异生途径,而丙酸对山羊小肠上皮细胞(GIEC)糖异生相关限速酶基因表达的影响目前尚不清楚。因此本研究旨在探究丙酸对GIEC中关键糖异生基因mRNA表达的影响,包括线粒体的*PCK2*、*PC*、果糖1,6二磷酸酶1(*FBP1*)和*PGC1A*,为进一步探究丙酸对小肠上皮细胞糖异生途径的影响提供理论依据。

1 材料方法

1.1 试验材料

DMEM/F12培养基、澳洲胎牛血清、非必需氨基酸(NEAA)、磷酸盐缓冲液(PBS)和胰蛋白酶(Gibco,美国);丙酸、青霉素、链霉素、两性霉素、L-谷氨酰胺溶液和乙二胺四乙酸(EDTA)(Sigma,美国);PrimeScript™ RT Master Mix 和 SYBR®

Premix Ex Taq™ II (TaKaRa, 中国); 荧光定量 96 孔板和 8 连管(Bio-rad, 美国); 总 RNA 提取试剂盒(Tiagen, 中国)。试验所用的山羊小肠上皮细胞 GIEC^[15] 由扬州大学动物培养物保藏与应用研究所(IACCA)提供。

1.2 试验方法

1.2.1 不同浓度丙酸对 GIEC 糖异生途径相关基因表达的影响

将 GIEC(每孔 2×10^5 个细胞)接种到 6 孔板中, 培养 24 h 后进行不同浓度丙酸对 GIEC 糖异生途径相关基因表达影响的试验。试验分为 4 个处理组, 每个处理 3 个重复。每个处理组分别添加 0、0.75、1.50、和 3.00 mmol/L 丙酸。放置在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中。孵育 6 h 后, 消化并收集细胞进行 RNA 提取。

1.2.2 丙酸在不同时间点对 GIEC 糖异生途径相关基因表达的影响

将 GIEC(每孔 2×10^5 个细胞)接种到 6 孔板中, 培养 24 h 后进行丙酸在不同时间点对 GIEC 糖异生途径相关基因表达影响的试验。试验分为 2 个

处理组, 每个处理 12 个重复。每个处理组分别添加 0 和 3.00 mmol/L 丙酸。放置在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中。在培养 3、6、12 和 24 h 时, 每个处理消化并收集 3 个重复的细胞进行 RNA 提取。

1.2.3 总 RNA 提取

按照总 RNA 提取试剂盒(Tiagen, 中国)提取总 RNA。1% 凝胶电泳检测 RNA 完整性。最后, 取 1 μL 提取的样品进行总 RNA 浓度和纯度的测定。

1.2.4 反转录成 cDNA

按照 Takara 反转录试剂盒进行, 整个过程在冰上操作。反转录体系为 10 μL, 反应条件: 37 ℃ 15 min 和 85 ℃ 5 s。

1.2.5 Real-time PCR

荧光定量 PCR 反应配置总体系为 20 μL, 其中 SYBR® Premix Ex Taq™ II Kit 10 μL; 10 μmol/L 的 PCR Forward primer 和 PCR Reverse Primer 各 0.8 μL; Water PCR grade 6.4 μL; cDNA 2 μL。引物详情见表 1。反应条件: 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 40 个循环, 每个样品都有 3 个重复。计算方法按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Table 1 Real-time PCR primers

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	GenBank 序列号 GenBank accession No.	产物大小/bp Size
<i>PCK2</i>	F: AGAATGTGATCTGAGCCTTC R: CAGAGGATGAGAGTGTGT	XM_018054616.1	132
<i>PC</i>	F: ACCGAGGAGATTACCGATGTG R: CCGTTGATGCGGATGTTCT	HQ853232.1	107
<i>FBP1</i>	F: TGACGGGAGATCAAGTGAAGAA R: CACAAGAACACAGGTGGCAA	HQ853230.1	92
<i>PGC1A</i>	F: AGCCTCTTTGCCCAGATCTT R: GGCAATCCGTCTTCATCCAC	NM_001285631.1	241
<i>GAPDH</i>	F: CAAAGTGGACATCGTTGCCA R: TGGAAGATGGTGATGGCCTT	XM_005680968.2	156

1.3 数据分析

结果采用“平均数±标准差”表示。运用 SPSS 16.0 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。P<0.05 表示差异显著, P<0.01 表示极显著差异。

2 结果分析

2.1 不同浓度丙酸对 GIEC 中糖异生途径关键基因 mRNA 表达的影响

采用 qRT-PCR 分别检测 GIEC 在不同处理中

PCK2、*PC*、*FBP1* 和 *PGC1A* mRNA 的表达变化(表 2)。与未添加丙酸相比,添加 3.00 mmol/L 丙酸可显著提高 *PCK2* 和 *PGC1A* 的 mRNA 表达量($P<$

0.05);不同浓度的丙酸对 *PC* 和 *FBP1* 的 mRNA 表达量没有显著影响($P>0.05$),但是添加 3.00 mmol/L 丙酸对其表达量有上调的趋势,并且表达量最高。

表 2 不同浓度丙酸对 GIEC 中糖异生途径关键基因 mRNA 表达的影响
Table 2 Effect of propionate at different concentrations on mRNA expression of key genes of gluconeogenesis pathway in GIEC

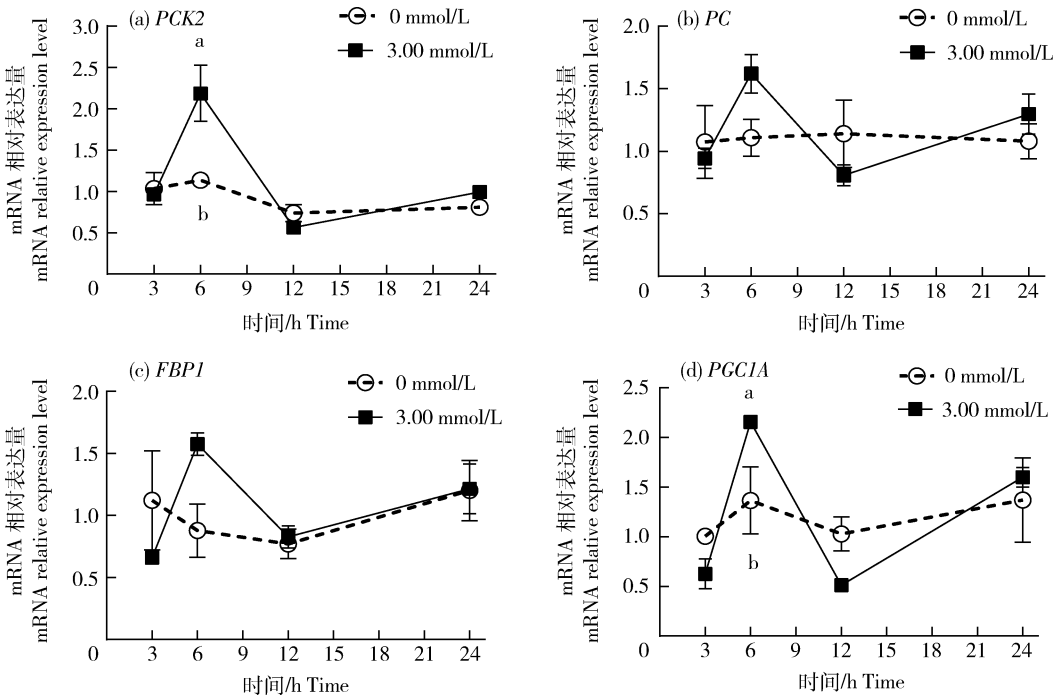
基因 Gene	丙酸浓度/(mmol/L) Concentration of propionate			
	0	0.75	1.50	3.00
<i>PCK2</i>	1.01±0.17 b	1.34±0.36 ab	1.55±0.04 a	1.64±0.23 a
<i>PC</i>	1.01±0.13	1.05±0.24	0.81±0.45	1.16±0.81
<i>FBP1</i>	1.02±0.28	1.05±0.53	0.78±0.39	1.26±0.64
<i>PGC1A</i>	1.00±0.01 b	0.90±0.24 b	0.94±0.29 b	1.69±0.22 a

注:同行标注不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Different lowercase letters in the same row indicate significant differences ($P<0.05$).

2.2 丙酸在不同时间点对 GIEC 中糖异生途径关键基因 mRNA 表达的影响

GIEC 在不同处理时间的 *PCK2*、*PC*、*FBP1* 和 *PGC1A* mRNA 的表达变化见图 1。在孵育 3、12 和 24 h 时,与未处理组相比,3.00 mmol/L 丙酸对

PCK2 和 *PGC1A* 的 mRNA 表达量没有显著影响($P>0.05$);在孵育 6 h 时,丙酸极显著增加了 *PCK2* 和 *PGC1A* 的 mRNA 表达量($P<0.01$),并且表达量最高,且 3.00 mmol/L 丙酸对 *PC* 和 *FBP1* 的 mRNA 表达量无显著影响($P>0.05$)。



数据标注不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Data annotations with different lowercase letters mean significant difference ($P<0.05$).

图 1 丙酸在不同时间点对 GIEC 中糖异生途径关键基因 mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effects of propionate at different time points on the mRNA expression of key genes of gluconeogenesis pathway in GIEC BRECs

3 讨 论

糖异生主要有 2 种途径:一种是使用 AA、乳酸、丙酮酸和甘油等经典途径,另一种是使用丙酸作为糖异生底物的途径^[2]。在反刍动物中,后者更为重要,因为后者负责将 60%~74%的丙酸在肝脏中转化为葡萄糖,而丙酸是迄今为止含量最丰富的生成葡萄糖的酸(占瘤胃释放有机酸总量的 15%~40%)和糖异生的主要底物^[17]。有研究已经证明,SCFA 可以被人体回肠吸收,SCFA 是肠腔中的主要阴离子,是一种易于吸收和代谢的胃肠道特殊能量来源^[18]。此外,15%~50%的 SCFA 可以进入反刍动物消化吸收系统末端^[10],这表明部分 SCFA 可以到达小肠。反刍动物小肠上皮细胞可以运输和吸收丙酸^[15],并且丙酸可以促进牛小肠上皮细胞中糖异生基因的表达^[16],这表明丙酸可能诱导山羊小肠细胞中关键糖异生基因的表达。以往的研究主要集中在经典的糖异生途径,但丙酸对山羊小肠上皮细胞糖异生基因表达的影响尚不清楚。因此本试验主要研究丙酸对山羊小肠上皮细胞中糖异生途径关键基因表达的影响。

糖异生途径包含 4 种关键的限速酶,包括 PC、PCK、FBP1 和葡萄糖-6-磷酸酶(G6PC)。PC 是生理上重要的一种调节酶,其使用 HCO_3^- 作为 CO_2 源来催化丙酮酸的 ATP 依赖性羧化,提供糖异生中间体补充所需的草酰乙酸^[19],草酰乙酸的缺乏会抑制三羧酸循环^[20]。本研究结果显示,添加 3.00 mmol/L 丙酸可提高 PC 的 mRNA 表达量,并且在 6 h 时其表达量最高。草酰乙酸通过线粒体苹果酸脱氢酶还原成苹果酸,输出到细胞质中,并通过细胞质苹果酸脱氢酶氧化以再生草酰乙酸。细胞质 PCK1 催化草酰乙酸生成磷酸烯醇丙酮酸,这是糖异生途径的关键反应。在牛肝细胞中,添加丙酸盐和环腺苷酸可以提高细胞内 PCK1 的表达量,添加胰岛素可以降低 PCK1 的表达量^[6]。但目前研究表明,在 GIEC 中添加丙酸后 PCK1 的表达量并未发生变化。有趣的是,在本研究中,添加 3.00 mmol/L 丙酸可显著增强 PCK2 的 mRNA 表达量,并且 6 h 时表达效果最显著。Zhan 等^[16]研究表明 3.00 mmol/L 丙酸也可以显著增加牛小肠上皮细胞中 PCK2 的 mRNA 表达量。PCK2 的过表达在人肝脏糖异生和脂质代谢中起重要作用^[21]。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 1%~5%^[22],但在反刍动物中 PCK1 和 PCK2 的活性大致相同^[23]。PCK2 催化草酰乙酸在线粒体中转化为磷酸烯醇丙酮酸,在糖异生中起关键的限速酶作用。PCK2 产生的磷酸烯醇丙酮酸作为糖异生前体物质,可以直接穿过线粒体膜进入细胞质进行糖异生,表明 PCK2 在反刍动物糖异生途径中发挥了关键作用,效率高于 PCK1。PCK1 和 PCK2 两者表达量的差异有待进一步深入研究。综上所述,PCK2 在山羊小肠细胞中将草酰乙酸转化为磷酸烯醇丙酮酸和糖异生途径中起关键作用。

FBP1 的功能是催化果糖 1,6-二磷酸水解为果糖 6-磷酸。ATP 的缺乏会降低 FBP1 的活性和果糖 6-磷酸的产量,最终降低葡萄糖产量^[24]。本研究结果显示,与未处理组相比,3.00 mmol/L 丙酸处理后 FBP1 的 mRNA 表达量提高了 23%,并且在 6 h 时表达量最高,这表明丙酸可以诱导山羊小肠上皮细胞产生更多的果糖 6-磷酸来合成葡萄糖。本研究还发现,GIEC 中添加丙酸后并没有检测到 G6PC 的 mRNA 表达,与 Zhan 等^[16]在牛小肠上皮细胞中的研究结果一致。在牛肝细胞中添加丙酸、cAMP 或胰岛素也不会改变 G6PC 的 mRNA 表达量^[6]。PGC1A 是一种调节与能量代谢相关基因的转录辅激活因子^[25]。此外,PGC1A 还是一种重要的蛋白质,可以上调糖异生相关基因的表达,还可以改变 PCK 启动子的转录活性以调控肝脏中的 PCK 水平^[12]。在本研究中,3.00 mmol/L 丙酸处理 GIEC 显著增加了 PGC1A 的 mRNA 表达量,并且依然在 6 h 时作用效果最好。

4 结 论

丙酸可以在山羊小肠细胞中诱导糖异生途径关键基因 PCK2、PC、FBP1 和 PGC1A 的 mRNA 表达,并且 PCK2 在 GIEC 糖异生途径中发挥关键作用,为研究丙酸在诱导糖异生关键基因表达方面提供了新思路。

参考文献 References

- [1] 桑丹,娜美日嘎,孙海洲,金鹿,张崇志,张春华,茹婷,贾春雷,敖长金. 5-羟色胺前体物对围产期母羊肝脏糖异生关键基因 mRNA 和蛋白质表达量的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(11):5214-5220
- Sang D, Namirga, Sun H Z, Jin L, Zhang C Z, Zhang C H, Ru T, Jia C L, Ao C J. Effects of serotonin precursor on

- mRNA and protein expressions of liver gluconeogenesis key genes of perinatal ewes[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(11): 5214-5220 (in Chinese)
- [2] 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
- [3] Larsen M, Kristensen N B. Precursors for liver gluconeogenesis in periparturient dairy cows[J]. *Animal*, 2013, 7(10): 1640-1650
- [4] 刘威. 丙酸对山羊血液理化指标、真胃组织结构及相关基因表达的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2016
- Liu W. Effect of propionic acid on blood parameters, histomorphology and expression of relative genes in goat abomasum tissue[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2016 (in Chinese)
- [5] Zhang Q, Koser S L, Bequette B J, Donkin S S. Effect of propionate on mRNA expression of key genes for gluconeogenesis in liver of dairy cattle[J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(12): 8698-8709
- [6] 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
- [7] Young J W. Gluconeogenesis in cattle: Significance and methodology[J]. *Journal of Dairy Science*, 1977, 60(1): 1-15
- [8] Mithieux G, Bady I, Gautier A, Croset M, Rajas F, Zitoun C. Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes[J]. *American Journal of physiology. Endocrinology and Metabolism*, 2004, 286(3): E370-375
- [9] De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Zitoun C, Duchampt A, Bäckhed F, Mithieux G. Microbiota-produced succinate improves glucose homeostasis via intestinal gluconeogenesis[J]. *Cell Metabolism*, 2016, 24(1): 151-157
- [10] 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
- [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-1 α , a transcriptional coactivator involved in metabolism[J]. *Medical Science*, 2005, 21(1): 49-54
- [13] Delaere F, Duchampt A, Mounien L, Seyer P, Duraffourd C, Zitoun C, Thorens B, Mithieux G. The role of sodium-coupled glucose co-transporter 3 in the satiety effect of portal glucose sensing[J]. *Molecular Metabolism*, 2012, 2(1): 47-53
- [14] De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchampt A, Bäckhed F, Mithieux G. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits[J]. *Cell*, 2014, 156(1/2): 84-96
- [15] Zhan K, Jiang M C, Gong X X, Zhao G Q. Effect of short-chain fatty acids on the expression of genes involved in short-chain fatty acid transporters and inflammatory response in goat jejunum epithelial cells[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 2018, 54(4): 311-320
- [16] Zhan K, Yang T Y, Chen Y Y, Jiang M C, Zhao G Q. Propionate enhances the expression of key genes involved in the gluconeogenic pathway in bovine intestinal epithelial cells[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(6): 5514-5524
- [17] Larsen M, Kristensen N B. Effect of abomasal glucose infusion on splanchnic amino acid metabolism in periparturient dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(7): 3306-3318
- [18] Schmitt M G Jr, Soergel K H, Wood C M, Steff J J. Absorption of short-chain fatty acids from the human ileum[J]. *The American Journal of Digestive Diseases*, 1977, 22(4): 340-347
- [19] Lao-On U, Attwood P V, Jitrapakdee S. Roles of pyruvate carboxylase in human diseases: From diabetes to cancers and infection[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2018, 96(3/4): 237-247
- [20] Herdt T H. Ruminant adaptation to negative energy balance[J]. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2000, 16(2): 215-230
- [21] Méndez-Lucas A, Duarte J A G, Sunny N E, Satapati S, He T T, Fu X R, Bermúdez J, Burgess S C, Perales J C. PEPCK-M expression in mouse liver potentiates, not replaces, PEPCK-C mediated gluconeogenesis[J]. *Journal of Hepatology*, 2013, 59(1): 105-113
- [22] 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
- [23] 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
- [24] 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
- [25] 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