

亮氨酸水平对奶牛乳腺上皮细胞增殖及 κ -酪蛋白合成相关基因表达的影响

代文婷^{1,2,3} 李爱军⁴ 郑楠^{2,3} 王加启^{1,2,3*}

(1. 吉林大学动物科技学院, 长春 130062; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业部奶产品质量安全风险实验室(北京), 北京 100193; 3. 农业部奶及奶制品质量监督检验测试中心(北京), 北京 100193; 4. 唐山市畜牧水产品质量监测中心, 唐山 063000)

摘要: 本试验旨在研究添加不同水平亮氨酸对乳腺上皮细胞体外增殖及 κ -酪蛋白(CSN3)合成相关基因表达的影响。选用中国荷斯坦奶牛乳腺上皮细胞进行体外培养,以不含有亮氨酸的培养基为对照组(0×组),试验组培养基分别添加 0.112 5(0.25×组)、0.225 0(0.5×组)、0.450 0(1×组)、0.900 0(2×组)、1.800 0(4×组)、3.600 0(8×组)、7.200 0(16×组)、14.400 0 mmol/L(32×组)的亮氨酸。试验采用噻唑蓝(MTT)比色法检测奶牛乳腺上皮细胞增殖;运用实时定量PCR检测CSN3合成相关基因相对表达量。结果表明:亮氨酸能够提高乳腺上皮细胞的相对增殖率。24和48 h时,除0.25×组外,其余各组与对照组相比细胞均差异均显著($P<0.05$);72 h时,各组与对照组相比差异均显著($P<0.05$);其中2×组的促增殖作用都达到最强。亮氨酸能够促进哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(*mTOR*)、核糖体蛋白S6激酶1(*S6K1*)、蛋白质酪氨酸激酶2(*JAK2*)、转录激活因子5(*STAT5*)和CSN3基因的表达,抑制真核细胞翻译启动因子4E结合蛋白1(*4EBP1*)基因的表达,其中2×组对*mTOR*、*S6K1*、*JAK2*、*STAT5*和CSN3基因的上调表达最强,而对*4EBP1*基因的下调表达最强。总之,添加亮氨酸能够促进奶牛乳腺上皮细胞增殖和CSN3合成相关基因(除*4EBP1*)表达,亮氨酸水平为0.900 0 mmol/L时,其促进作用均达到最大。

关键词: 亮氨酸;细胞增殖; κ -酪蛋白;基因表达

中图分类号:S823

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2015)05-1559-08

乳蛋白是最富有营养价值的蛋白质之一,也是衡量牛奶品质的重要指标,可分为酪蛋白和清蛋白,其中酪蛋白含量较多,约占80%。常见的酪蛋白一般有4种,分别是 α_s 1-酪蛋白(α_s 1-casein, CSN1S1)、 α_s 2-酪蛋白(α_s 2-casein, CSN1S2)、 β -酪蛋白(β -casein, CSN2)和 κ -酪蛋白(κ -casein, CSN3)^[1],分别约占酪蛋白总量的38%、10%、36%和12%^[2],其中CSN3是唯一含有乳糖成分且对钙不敏感的酪蛋白。研究表明,CSN3基因的表

达对维持大鼠细胞中COP9信号小体(CSN)的完整性、保证细胞存活、维持乳腺细胞形态都至关重要,而且CSN3基因敲除的雌鼠不能哺乳,甚至丧失泌乳性能,因此CSN3基因是哺乳动物泌乳和繁殖所必需的^[3-4]。一直以来,奶牛养殖者一直致力于牛奶中蛋白质含量的提高,进而提升牛奶的营养价值。

根据动物体的生长和氮代谢平衡特点,氨基酸通常被分为必需氨基酸(essential amino acids)

收稿日期:2014-12-10

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2011CB100805);现代农业产业技术体系专项资金(nycytx-04-01);中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS12)

作者简介:代文婷(1988—),女,山西临汾人,硕士研究生,从事奶牛乳蛋白合成调控研究。E-mail: daiwenting_2012@sina.com

* 通信作者:王加启,研究员,博士生导师, E-mail: wangjiaqinmqc@126.com

和非必需氨基酸(non-essential amino acids),亮氨酸就属于必需氨基酸。Wu^[5]于2010年提出功能性氨基酸(functional amino acids)的概念,即那些能调控生物体内关键的代谢通路,以改善动物体的生理健康,促进其生长发育,调控其泌乳以及生殖的氨基酸。而亮氨酸在机体中发挥着重要的营养生理作用,也是一类功能性氨基酸。概括起来主要功能包括3个方面,即氧化供能、调节机体免疫和调节机体(尤其是骨骼肌)蛋白质代谢^[6]。

目前,大多有关氨基酸影响乳腺上皮细胞蛋白质合成的研究集中于对酪蛋白合成相关基因的影响,例如当培养基中蛋氨酸浓度为57 mg/L时,CSN1S1的mRNA的表达水平最高^[7];当培养基中精氨酸浓度为556.00 mg/L时,CSN3的表达量达到最高^[1]。而亮氨酸对蛋白质合成的调控研究最早致力于骨骼肌细胞,主要采用灌注或者静脉注射的方法。Dardevet等^[8]研究发现,注射亮氨酸的大鼠或新生仔猪的骨骼肌蛋白质合成显著增加,补充亮氨酸比其他必需氨基酸要更有利于氨基酸的利用与骨骼肌的合成。研究发现亮氨酸能通过哺乳动物类帕霉素(mTOR)-真核起始因子4E(eIF4E)-核糖体蛋白S6(RPS6)信号通路来调控骨骼肌蛋白质的合成^[9-11]和乳腺组织中蛋白质的合成^[12-14]。此外,酪氨酸激酶(JAK)-转录激活因子(STAT)路径是多种细胞因子共用的信号通路途径,其广泛参与细胞生长、增殖、应激、凋亡等,可将细胞膜的信号直接传递到细胞核内,启动基因的转录。目前,Hu等^[15]研究发现,0.900 0 mmol/L的精氨酸能显著上调乳腺细胞中蛋白质酪氨酸激酶2(JAK2)和转录激活因子5(STAT5)的基因表达,从而调控蛋白质的转录过程。最新研究还发现,与其他组合相比,当赖氨酸与蛋氨酸的比例为3:1(赖氨酸为1.2 mmol/L,蛋氨酸为0.4 mmol/L)时,JAK2和STAT5基因表达显著上调^[5,14]。亮氨酸对骨骼肌蛋白质调控机制已经很清楚,而不同水平的亮氨酸对乳腺上皮细胞的增殖以及乳蛋白的合成调控作用还不是很透彻。本研究旨在以奶牛乳腺上皮细胞为模型,研究不同水平的亮氨酸对其增殖以及泌乳相关基因表达的影响,进而能为亮氨酸对乳中酪蛋白合成的调控机理提供一定的理论支持。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

1.1.1 主要试剂

DMEM/F12培养基(Gibco,货号:11995-065/11765-054)、缺亮氨酸的DMEM/F12培养基(Gibco定制,货号:CM028817)、L-亮氨酸(Sigma,货号:L8912-100G)、胎牛血清(FBS,Gibco,货号:10099-141)、胰蛋白酶(碧云天生物技术研究,货号:C0203)、噻唑蓝(MTT,Sigma,货号:0793-5G)、二甲基亚砜(DMSO,Sigma,货号:D4540)、青链霉素(碧云天生物技术研究,货号:C0222)、RNA提取试剂盒(TIANGEN,货号:74106)、反转录试剂盒(TaKaRa,货号:RRR037A)、实时定量PCR试剂盒(TaKaRa,货号:RRR820A)。

1.1.2 主要仪器

恒温CO₂培养箱(美国Thermo)、超净工作台(江苏苏净集团有限公司)、冷冻离心机(德国Leg-end)、酶标仪(美国Gene)、实时定量PCR仪(美国ABI7500)、倒置显微镜(日本Olympus)、细胞计数仪(美国Bio-Rad)、RNA浓度测定仪(美国Thermo)等。

1.2 奶牛乳腺上皮细胞的培养方法

荷斯坦奶牛乳腺上皮细胞培养方法参照本实验室前期建立的奶牛乳腺上皮细胞培养方法^[15]。采取1头3周岁泌乳中期奶牛的乳腺组织,通过组织块接种法对奶牛乳腺上皮细胞进行体外分离培养,经纯化可得到细胞形态均一的奶牛乳腺上皮细胞并处于正常的生理状态,且具有正常的分泌功能。将奶牛乳腺上皮细胞置于含有10%胎牛血清的DMEM/F12生长培养基中(pH 7.4),在38℃、5% CO₂培养箱中培养。当细胞长满培养皿,达到80%~90%汇合时,用0.25%胰蛋白酶和0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)溶液于38℃、5% CO₂的恒温培养箱中消化待细胞质回缩,细胞间隙增大缩成圆形时(8~15 min),用培养基终止消化反应;用移液器反复吹打后,收集细胞悬液于15 mL离心管,500×g室温离心5 min;弃上清液,加入新鲜的DMEM/F12生长培养基,制成细胞悬浮液。

1.3 细胞增殖检测

1.3.1 种板

收集第4或5代乳腺上皮细胞,使用加入胎牛血清的DMEM/F12培养基悬浮细胞,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL接种到96孔板中,每孔200 μL,四周边缘孔加入无菌D-Hanks缓冲液,置于38℃、5% CO₂培养箱贴壁培养24 h。

1.3.2 换液

24 h后吸去各孔内的培养基,用无菌D-Hanks缓冲液洗各孔2遍,向各孔中加入200 μL不同水平亮氨酸的培养基(表1),培养基中不添加胎牛

血清。以不添加亮氨酸的为对照组(0×组),每组设置3个重复孔,每板均设对照组。

1.3.3 MTT 法检测细胞增殖

分别于接种后24、48、72 h小心吸去培养基,然后各孔加入MTT工作液(5 mg/mL)20 μL,4 h后弃去上清,每孔中加入二甲基亚砷200 μL,振荡5 min后采用全自动酶联免疫分析仪检测各孔590 nm波长下的吸光度值(OD_{590 nm})。细胞相对增殖率(relative proliferation rate,RGR)计算公式:

$$RGR = \frac{\text{试验组 OD}_{590\text{ nm}}}{\text{对照组 OD}_{590\text{ nm}}}^{[5]}。$$

表 1 试验培养基中所添加的亮氨酸水平
Table 1 Supplemental levels of leucine in experimental mediums mmol/L

项目 Items	组别 Groups								
	0×	0.25×	0.5×	1×	2×	4×	8×	16×	32×
亮氨酸 Leucine	0	0.112 5	0.225 0	0.450 0	0.900 0	1.800 0	3.600 0	7.200 0	14.400 0

1.4 实时定量PCR 法检测CSN3合成相关基因的表达

1.4.1 铺板

收集第3或4代乳腺上皮细胞,使用加入胎牛血清的DMEM/F12培养基悬浮细胞,调整细胞密度为 5×10^5 个/mL接种到6孔板中,每孔1.5 mL,共接种27个孔,置于37℃、5% CO₂培养箱贴壁培养24 h。

1.4.2 换液

24 h后,吸去各孔内的培养基,用无菌D-hanks润洗各孔2遍,然后加入不同水平亮氨酸的培养基,每组设置3个重复,继续培养24 h。

1.4.3 总RNA提取

继续培养24 h之后,使用总RNA提取试剂盒(QIAGEN RNeasy Mini Kit)提取细胞总RNA,每个孔单独提取,共提取27个孔,提取的总RNA经浓度测定和纯度检测合格后立即进行反转录。利用TaKaRa反转录试剂盒(PrimeScript RT Master Mix)将总RNA反转录为cDNA,以用于下一步的实时定量PCR。

1.4.4 CSN3合成相关基因的表达检测

试验所用引物设计见下表2。选用核糖体蛋白S9(RPS9)作为内参基因。选用TaKaRa实时定量PCR试剂盒(SYBR Premix Ex TaqTM II),反应体系为20 μL:10 μL SYBR Premix Ex TaqTM II

(2×)、ROX Reference Dye II(50×)0.4 μL,0.6 μL上游引物,0.6 μL下游引物,2 μL cDNA模板,6.4 μL双蒸水。反应程序:95℃,30 s;95℃,5 s,60℃退火延伸34 s,40个循环,熔解曲线程序为:95℃,15 s;55℃,1 min,95℃,15 s。

1.5 统计学方法

采用SAS 9.2软件PROC ANOVA对数据进行方差分析,均值多重比较采用Duncan氏法,以 $P<0.05$ 为显著性检验水平。统计所得数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 培养基中亮氨酸水平对奶牛乳腺上皮细胞增殖的影响

由表3可知,孵育24和48 h,培养基中添加亮氨酸能够提高乳腺上皮细胞相对增殖率,0.25×组与对照组相比差异不显著($P>0.05$),而其余各组均显著高于对照组($P<0.05$);孵育72 h,各亮氨酸添加组与对照组相比,细胞相对增殖率差异均显著提高($P<0.05$)。低水平组(0.25×组~2×组),细胞的相对增殖率随着亮氨酸水平的升高而增大;3个时间点均以2×组细胞的相对增殖率最大;高水平组(2×组~32×组),细胞的相对增殖率随着亮氨酸水平的升高而有所下降。结果表明,培养基中添加0.900 0 mmol/L亮氨酸对乳腺上皮细胞的促

增殖作用最强,低水平和高水平的促增殖作用均有所减弱。

表 2 实时定量 PCR 引物序列
Table 2 Sequences of primers for real-time PCR

基因 Genes	序列号 Accession number	引物序列 Primer sequences (5'—3')	长度 Length/bp	文献 Reference
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 <i>mTOR</i>	XM_001788228.1	F: TGCTGTCCCTGGTCCTTATG R: GGGTCAGAGAGTGGCCTTAA	178	李喜燕 ^[7]
核糖体蛋白 S6 激酶 1 <i>S6K1</i>	NM_205816.1	F: CCAGCACGGCAAATCCGCAG R: AAGCCTCCCCGCTCATCGTCA	90	李喜燕 ^[7]
真核细胞翻译启动因子 4E 结合蛋白 1 <i>4EBP1</i>	BC120290.1	F: GAACTCACCTGTGACCAAGA R: CTCAAAGTGTGACTCTTCACC	157	Hayashi 等 ^[16]
酪氨酸激酶 2 <i>JAK2</i>	XM_002689603.1	F: ACAGGGGCTGGCGTTCA R: TATTGGTAACCAACAGCTCAAGG	460	Nan 等 ^[17]
转录激活因子 5 <i>STAT5</i>	NM_001012673.1	F: AAGACCCAGACCAAGTTCGC R: AGCACCGTGGCAGTGCAT	422	Nan 等 ^[17]
核糖体蛋白 S9 <i>RPS9</i>	DT860044	F: GGAGACCCTTCGAGAAGTCC R: GGGCATTACCTTCGAACAGA	172	胡菡等 ^[18]
κ-酪蛋白 <i>CSN3</i>	NM_174294	F: CCAGGAGCAAAACCAAGAAC R: TGCAACTGGTTTCTGTTGGT	148	Sigl 等 ^[19]

表 3 亮氨酸水平对奶牛乳腺上皮细胞相对增殖率的影响
Table 3 Effect of leucine level on of bovine mammary epithelial cell proliferation rate (n=3)

组别 Groups	时间 Time/h			P 值 P-value
	24	48	72	
0×	1 ^d	1 ^d	1 ^d	
0.25×	1.107 4±0.032 7 ^{cdA}	1.287 4±0.077 1 ^{adA}	1.151 9±0.027 9 ^{bB}	0.012 0
0.5×	1.292 7±0.020 2 ^{ba}	1.990 7±0.224 1 ^{bB}	1.911 7± 0.120 3 ^{cB}	0.005 7
1×	1.624 0±0.025 1 ^{aA}	1.776 9±0.168 4 ^{bcAB}	1.575 9±0.065 5 ^{aA}	0.115 9
2×	1.762 2±0.055 7 ^{aA}	2.161 6±0.303 8 ^{bB}	2.047 7±0.089 6 ^{aAB}	0.080 3
4×	1.239 0±0.080 9 ^{bcA}	1.968 0±0.092 6 ^{bcB}	1.728 6±0.071 3 ^{cC}	0.000 1
8×	1.709 5±0.067 2 ^{aA}	1.698 6±0.227 2 ^{bcA}	1.557 7±0.005 3 ^{aA}	0.243 0
16×	1.400 5±0.050 0 ^{ba}	1.702 0±0.212 4 ^{bcB}	1.544 0±0.013 9 ^{aAB}	0.070 1
32×	1.390 6±0.054 4 ^{ba}	1.373 6±0.023 6 ^{aA}	1.314 3±0.035 9 ^{ba}	0.847 8
P 值 P-value	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$),同行数据肩标不同大写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Values in the same column with different small letters mean significant difference ($P<0.05$), and those in the same row with different capital letters mean significant difference ($P<0.05$).

2.2 培养基中亮氨酸水平对乳腺上皮细胞 CSN3 合成相关基因表达量的影响

由表 4 可知,各亮氨酸试验组与对照组比较, *mTOR*、核糖体蛋白 S6 激酶 1 (*S6K1*)、真核细胞翻译启动因子 4E 结合蛋白 1 (*4EBP1*)、*JAK2* 和 *STAT5* 基因的相对表达量均差异显著 ($P<0.05$);

亮氨酸低水平组 (0.25×组~2×组) *mTOR*、*S6K1*、*JAK2* 和 *STAT5* 基因的相对表达量随着水平的升高先降低后升高;这 4 种基因的表达量都以 2×组达到最大,继续升高亮氨酸水平,这些基因的表达量均有所下降。然而,亮氨酸处于低浓度水平 (0.25×组~2×组)时, *4EBP1* 基因的相对表达量随

着水平的升高而降低;4EBP1 基因相对表达量以 2×组达到最小;随着亮氨酸水平的继续升高,该基因的表达式有所升高。结果说明,亮氨酸能促进奶牛乳腺上皮细胞中 mTOR、S6K1、JAK2 和 STAT5 的表 达, 但 是 抑 制 4EBP1 的 表 达。0.900 0 mmol/L(2×组)的亮氨酸水平对 mTOR、S6K1、JAK2 和 STAT5 这 4 种基因的上调表达作用最强,而对 4EBP1 的下调表达最强。

0.25×组、0.5×组、8×组和 16×组 CSN3 基因的

相对表达量与对照组比较差异均不显著 ($P>0.05$),其他各亮氨酸试验组中 CSN3 基因的相对表达量与对照组比较差异显著 ($P<0.05$),该基因的相对表达量以 2×组最大。这说明亮氨酸对 CSN3 基因表达的促进作用与剂量有关,当亮氨酸水平为 0.900 0 mmol/L(2×组)时,该基因的相对表达量最高,上调作用最强,继续升高水平,其表达量有所下降。

表 4 亮氨酸水平对奶牛乳腺上皮细胞 CSN3 合成相关基因表达相对表达量的影响

Table 4 Effects of leucine level on the relative expression levels of genes related to CSN3 synthesis ($n=3$)

组别 Groups	哺乳动物雷帕 霉素靶蛋白 <i>mTOR</i>	核糖体蛋白 S6 激酶 1 <i>S6K1</i>	真核细胞翻译 启动因子 4E 结合蛋白 1 <i>4EBP1</i>	蛋白质酪 氨酸激酶 2 <i>JAK2</i>	转录激活因子 5 <i>STAT5</i>	κ-酪蛋白 <i>CSN3</i>
0×	1 ^g	1 ^d	1 ^c	1 ^c	1 ^c	1 ^d
0.25×	1.901 3 ±0.050 2 ^{def}	1.747 4 ±0.108 1 ^{bc}	2.035 4 ±0.129 4 ^a	1.578 4 ±0.058 3 ^a	1.593 4 ±0.107 3 ^a	1.169 7 ±0.074 5 ^{cd}
0.5×	1.760 0 ±0.386 5 ^{ef}	1.516 6 ±0.251 4 ^c	1.636 2 ±0.045 4 ^b	1.720 9 ±0.008 6 ^b	1.654 0 ±0.121 1 ^{ab}	1.377 7 ±0.195 2 ^{cd}
1×	1.504 2 ±0.160 1 ^f	1.664 7 ±0.172 2 ^{bc}	1.497 9 ±0.205 9 ^{bc}	1.790 1 ±0.042 2 ^{bc}	1.929 7 ±0.116 2 ^c	3.679 7 ±0.413 9 ^{ab}
2×	2.811 3 ±0.047 1 ^a	2.436 3 ±0.037 5 ^a	0.366 9 ±0.007 7 ^d	2.474 7 ±0.043 5 ^d	2.777 6 ±0.090 3 ^d	4.095 2 ±0.052 2 ^b
4×	2.593 4 ±0.143 6 ^{ab}	2.390 3 ±0.078 9 ^a	1.744 8 ±0.285 7 ^f	2.083 9 ±0.158 9 ^f	2.496 0 ±0.051 0 ^f	3.375 6 ±0.016 0 ^b
8×	2.299 3 ±0.113 8 ^{bcd}	1.896 9 ±0.046 3 ^b	2.315 0 ±0.292 3 ^{ab}	1.979 3 ±0.125 1 ^f	2.587 3 ±0.144 2 ^f	1.252 6 ±0.357 3 ^{cd}
16×	2.123 4 ±0.166 6 ^{cde}	2.178 6 ±0.023 1 ^a	3.183 4 ±0.222 8 ^a	1.883 5 ±0.047 1 ^{cfg}	2.204 1 ±0.040 2 ^{fg}	1.614 7 ±0.094 9 ^{cd}
32×	2.462 8 ±0.058 7 ^{abc}	2.362 3 ±0.043 1 ^a	4.284 1 ±0.298 3 ^g	1.801 1 ±0.032 3 ^{bcfg}	1.883 8 ±0.046 0 ^c	1.803 8 ±0.094 3 ^c
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
In the same column, values with different small letters mean significant difference ($P<0.05$).

3 讨 论

3.1 培养基中亮氨酸水平对乳腺上皮细胞增殖的影响

乳腺组织在动物体内的增殖和分化受许多因素如激素、维生素、氨基酸、微量元素、生长因子等的影响,这些因素也能影响体外培养的乳腺上皮细胞的增殖、分化、泌乳等功能^[20]。庞学燕等^[21]

研究表明,24 h 时,与不添加亮氨酸的对照组相比,外源添加 177.15 mg/L 亮氨酸显著促进奶牛乳腺上皮细胞的细胞增殖。徐柏林^[1]研究发现 24、48 和 72 h 时,添加 556.00 mg/L 的精氨酸对奶牛乳腺细胞的促增殖作用最强。适宜水平的特定氨基酸在调控细胞增殖的过程中,存在一种时间和水平的最优化效应,一旦超过或者低于这个水平时,其促增殖效应会相应地降低^[22]。有研究

表明,与添加 177.15 mg/L 亮氨酸试验组相比,添加 LY294002 抑制剂(一种能抑制 mTOR 信号通路的抑制剂)亮氨酸试验组的奶牛乳腺上皮细胞增殖显著降低^[23]。王志钢等^[22]和 Mercier 等^[24]均指出 mTOR 信号通路可以介导调控奶牛乳腺上皮细胞的增殖,继而通过细胞数量来调控乳蛋白的合成。在动物体内,亮氨酸可以在支链氨基酸转氨酶的作用下生成 α -酮戊二酸, α -酮戊二酸一方面能调节 mTOR 的活性,从而有效提高蛋白质的合成效率,有利于细胞的增殖^[5-6];另一方面还能降低蛋白质的分解率,并改善机体的免疫水平,从而促进机体的生长。另外,有一些学者认为 α -酮戊二酸还能刺激胰岛素的分泌,进而调控生物体的生长代谢^[8]。

3.2 培养基中亮氨酸水平对乳腺上皮细胞 CSN3 合成相关基因表达量的影响

CSN3 是一种表达相对稳定的酪蛋白基因,因而本试验以 CSN3 为中心来探索乳蛋白合成相关基因的表达。氨基酸对酪蛋白合成影响主要表现在 2 个方面:转录水平调控和翻译水平调控。酪蛋白基因的转录过程主要由信号转换和 STAT5 调控^[25],JAK2 能磷酸化 STAT5,继而使 STAT5 形成二聚体,转位进入细胞核并能与核内的特异序列结合^[26-27]。氨基酸对酪蛋白表达调控主要是通过 mTOR 信号通路介导,氨基酸主要通过激活哺乳动物雷帕霉素靶标复合物 1(mTORC1),一方面促使核糖体蛋白 S6 激酶的磷酸化并激活,继而促进 mRNA 的翻译;另一方面促使 4EBP1 发生磷酸化,释放 eIF4E,启动 mRNA 的翻译起始,而未发生磷酸化的 4EBP1 与 eIF4E 相结合,抑制 eIF4E 与 eIF4G 的结合^[28]。

庞学燕^[23]研究了不同水平亮氨酸对 CSN3 表达的影响,发现水平为 118.1~236.2 mg/L 时 CSN3 基因的表达显著高于其他组。Arriola 等^[13]和 Appuhamy 等^[14]研究发现,培养基中单独添加亮氨酸和必需氨基酸,奶牛乳腺上皮细胞中 mTOR、S6K1 以及 4 种酪蛋白 CSN1S1、CSN1S2、CSN2 和 CSN3 的基因表达量显著上调,而与酪蛋白合成相关的 4EBP1 基因表达量也都显著下调。此外,Rius 等^[29]给饥饿处理 36 h 后的泌乳中期奶牛静脉灌注氨基酸,发现乳腺组织中 mTOR 和 S6K1 的磷酸化程度显著提高,而 4EBP1 的磷酸化显著降低,同时乳蛋白的合成量也有所提高,这表

明 mTOR 通路能够调控乳蛋白产量^[6]。这些为进一步研究氨基酸对体外培养的奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白合成的机制提供了理论依据。

本试验采用实时定量 PCR 方法检测添加不同水平的亮氨酸对奶牛乳腺上皮细胞中 CSN3 合成相关基因的表达。结果表明,在缺少亮氨酸的培养基中添加水平范围为 0.112 5~14.400 0 mmol/L (0.2×组~32×组)的亮氨酸,与对照组相比,mTOR、S6K1、4EBP1、JAK2 和 STAT5 基因均显著上调表达;除了 0.25×组、0.5×组、8×组和 16×组 CSN3 基因的相对表达量与 0×组比较差异均不显著外,其他各亮氨酸试验组中 CSN3 基因表达量与对照组比较差异显著。但是不同水平亮氨酸对 CSN3 合成相关基因的促进效果不同,当亮氨酸水平为 0.900 0 mmol/L (2×组)时,mTOR、S6K1、JAK2、STAT5 和 CSN3 基因表达量均达到最高,而 4EBP1 基因表达量最低。这与前人庞雪燕等报道的一致^[18,24]。另外,本试验结果还表明,对于低水平亮氨酸组(0.25×组~1×组),随着亮氨酸水平的提高,各酪蛋白相关合成基因的相对表达量随之升高(4EBP1 呈现下降的趋势);对于高水平亮氨酸组(4×组~32×组),随着亮氨酸水平的提高,各酪蛋白合成相关基因的相对表达量随之降低(4EBP1 呈现升高的趋势)。这说明亮氨酸在调控 CSN3 合成相关基因表达时存在剂量效应和最优化效应;这种效应可能是由于亮氨酸需借助相应的转运载体进入乳腺细胞内继而发挥对 mTOR 通路的调控作用,而细胞膜表面的亮氨酸转运载体数量是有限的,这就从一定程度上限制了亮氨酸调控作用的不断提高。

4 结 论

亮氨酸能促进奶牛乳腺上皮细胞的增殖和 CSN3 合成相关基因的表达。奶牛乳腺上皮细胞的相对增殖率和 CSN3 合成相关基因 mTOR、S6K1、JAK2 和 STAT5 的上调表达作用都以 0.900 0 mmol/L 亮氨酸达到最强,而此水平下 4EBP1 的基因表达量达到最低。

参考文献:

- [1] 徐柏林.精氨酸对乳腺上皮细胞中酪蛋白合成的影响及其调控机制[D].硕士学位论文.扬州:扬州大学,2012:2-55.

- [2] 夏文水, SINDAYIKENGERA S. 食品中乳蛋白的重要作用[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(6): 100-105.
- [3] SHEKAR P C, GOEL S, RANI S D, et al. Kappa-casein-deficient mice fail to lactate[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(21): 8000-8005.
- [4] YAN J, WALZ K, NAKAMURA H, et al. COP9 signalosome subunit 3 is essential for maintenance of cell proliferation in the mouse embryonic epiblast[J]. Molecular and Cellular Biology, 2003, 23(19): 6798-6808.
- [5] WU G Y. Functional amino acids in growth, reproduction, and health[J]. Advance in Nutrition, 2010, 1(1): 31-37.
- [6] 刘红云, 刘建新, 王迪铭. 功能性氨基酸在反刍动物营养中的研究进展[C]//饲料营养研究进展. 北京: 中国畜牧兽医学会, 2010: 181-189.
- [7] 李喜艳. 奶牛乳腺上皮细胞中赖氨酸蛋氨酸配比模式对酪蛋白合成的影响及机理研究[D]. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2011: 1-32.
- [8] DARDEVET D, SORNET C, BAYLE G, et al. Postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats can be restored by a leucine-supplemented meal[J]. The Journal of Nutrition, 2002, 132(1): 95-100.
- [9] NORTON L E, LAYMAN D K. Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise[J]. The Journal of Nutrition, 2006, 136(2): 533S-537S.
- [10] TORRAZZA R M, SURYAWAN A, GAZZANEO M C, et al. Leucine supplementation of a low-protein meal increases skeletal muscle and visceral tissue protein synthesis in neonatal pigs by stimulating *mTOR*-dependent translation initiation[J]. The Journal of Nutrition, 2010, 140(12): 2145-2152.
- [11] KIMBALL S R, JEFFERSON L S. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis[J]. The Journal of Nutrition, 2006, 136(1): 227S-231S.
- [12] ARRIOLA A S I, SINGER L M, RAY W K, et al. Casein synthesis is independently and additively related to individual essential amino acid supply[J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(5): 2998-3005.
- [13] ARRIOLA A S I, SINGER L M, LIN X Y, et al. Iso-leucine, leucine, methionine, and threonine effects on mammalian target of rapamycin signaling in mammary tissue[J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(2): 1047-1056.
- [14] 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.
- [15] HU H, WANG J Q, BU D P, et al. *In vitro* culture and characterization of a mammary epithelial cell line from Chinese Holstein dairy cow[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7636.
- [16] HAYASHI A A, NONES K, ROY N C, et al. Initiation and elongation steps of mRNA translation are involved in the increase in milk protein yield caused by growth hormone administration during lactation[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92(5): 1889-1899.
- [17] 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.
- [18] 胡茵, 王加启, 李发弟, 等. 高温诱导体外培养奶牛乳腺上皮细胞的应激响应[J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(2): 287-293.
- [19] SIGL T, MEYER H H D, WIEDEMANN S. Gene expression analysis of protein synthesis pathways in bovine mammary epithelial cells purified from milk during lactation and short-term restricted feeding[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2013, 98(1): 84-95.
- [20] 周振峰, 崔瑞莲, 王加启, 等. 热应激对体外培养奶牛乳腺上皮细胞生长、凋亡及其热休克蛋白 mRNA 转录的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(5): 600-607.
- [21] 庞学燕, 季昀, 田青, 等. 亮氨酸对 κ -酪蛋白合成的影响及相关信号通路的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2013(9): 38-41.
- [22] 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.
- [23] 庞学燕. 亮氨酸在奶牛乳腺中的摄取效率及其对乳蛋白合成的影响[D]. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学, 2013: 1-62.
- [24] MERCIER J C, GAYE P. Early events in secretion of main milk proteins: occurrence of precursors[J]. Journal of Dairy Science, 1982, 65(2): 299-316.

- [25] ROSEN J M, WYSZOMIERSKI S L, HADSELL D. Regulation of milk protein gene expression[J]. Annual Review of Nutrition, 1999, 19: 407–436.
- [26] LEVY D E, DARNELL J E Jr. STATs: transcriptional control and biological impact[J]. Nature, 2002, 3(9): 651–662.
- [27] WATSON C J, BURDON T G. Prolactin signal transduction mechanisms in the mammary gland: the role of the Jak/Stat pathway[J]. Reproduction, 1996, 1: 1–5.
- [28] LYNCH C J. Role of leucine in the regulation of mTOR by amino acids: revelations from structure–activity studies[J]. The Journal of Nutrition, 2001, 131(3): 861S–865S.
- [29] 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.

Effects of Leucine Level on Proliferation and κ -Casein Synthesis Related Gene Expressions of Bovine Mammary Epithelial Cells

DAI Wenting^{1,2,3} LI Aijun⁴ ZHENG Nan^{2,3} WANG Jiaqi^{1,2,3*}

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. Ministry of Agriculture Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Dairy Products (Beijing), Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Ministry of Agriculture-Milk and Dairy Product Inspection Center (Beijing), Beijing 100193, China; 4. The Livestock and Aquatic Products Quality Inspection and ITest Center (Tangshan), Tangshan 063000, China)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the effects of the supplementation of leucine (Leu) in culture medium at different levels on proliferation and κ -casein (CSN3) synthesis related gene expressions of bovine mammary epithelial cells (BMECs). BMECs of Chinese Holstein dairy cows were used in this study. Supplementation levels of Leu were 0 (0×group, control group), 0.112 5 (0.25×group), 0.225 0 (0.5×group), 0.450 0 (1×group), 0.900 0 (2×group), 1.800 0 (4×group), 3.600 0 (8×group), 7.200 0 (16×group), 14.400 0 mmol/L (32×group), respectively. The proliferation of BMECs was determined using thiazolyl blue (MTT) method, and the relative expression levels of CSN3 synthesis related gene were determined using real-time PCR. The results showed as follows: the relative proliferation rate of BMECs was promoted by different levels of Leu. Compared with control group, the promotion efficiency of all the experimental groups was significantly higher except 0.25× group after incubation for 24 and 48 h ($P<0.05$), and the promotion efficiency of all the experimental groups was significantly higher after incubation for 72 h ($P<0.05$). After incubation for 24, 48 and 72 h, the promotion efficiency of 2×group was the highest. The relative expression levels of *mTOR*, *S6K1*, *JAK2*, *STAT5* and *CSN3* genes were increased by Leu, and that of *4EBP1* gene was decreased. The upper-/down-regulated expression levels reached the highest/lowest in 2×group. In summary, Leu can promote cell proliferation and CSN3 synthesis related gene expressions of BMECs, and the promotion efficiency is the highest when Leu level is 0.900 0 mmol/L. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(5): 1559–1566]

Key words: leucine; cell proliferation; κ -casein; gene expression