

维生素 A 对过氧化氢诱导的奶牛乳腺上皮细胞内乳脂合成的影响

郝颖 赵艳丽 闫素梅* 郭晓宇 郭咏梅 齐敬宇

(内蒙古农业大学动物科学学院, 内蒙古自治区高校动物营养与饲料科学重点实验室, 呼和浩特 010018)

摘要: 本试验旨在研究维生素 A 对过氧化氢(H_2O_2)诱导的奶牛乳腺上皮细胞(BMECs)内乳脂合成的影响。试验采用单因子完全随机试验设计, 将第 3 代 BMECs 随机分为 9 个组, 每组 6 个重复。其中, 对照组(CON 组)用生长培养基培养 30 h; H_2O_2 损伤组(H_2O_2 组)用 CON 组培养基培养 24 h 后, 再加入 H_2O_2 继续培养 6 h; 7 个维生素 A 预保护组则在 CON 组培养基中添加不同浓度维生素 A 培养 24 h 后, 再加入 H_2O_2 继续培养 6 h, 维生素 A 浓度分别为 0.05 (0.05 VAH 组)、0.10 (0.1VAH 组)、0.20 (0.2VAH 组)、0.50 (0.5VAH 组)、1.00 (1VAH 组)、2.00 (2VAH 组)和 4.00 $\mu\text{g/mL}$ (4VAH 组)。结果显示: 与 CON 组相比, H_2O_2 组诱导 BMECs 发生氧化损伤, BMECs 的相对增殖率(RGR)、甘油三酯(TG)含量、总抗氧化能力(T-AOC)以及总超氧化物歧化酶(T-SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、硫氧还蛋白还原酶 1(TrxR1)、脂肪酸合成酶(FASN)、脂酰辅酶 A 去饱和酶(SCD)、脂蛋白酯酶(LPL)和乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)活性显著降低($P \leq 0.05$), ACC、FASN、谷胱甘肽过氧化物酶 1(GPx1)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPx4)、TrxR1、过氧化酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、固醇调节元件结合蛋白 1(SREBP1)相对表达量显著降低($P \leq 0.05$), 但活性氧(ROS)活性显著提高($P \leq 0.05$)。与 H_2O_2 组相比, 0.2VAH~2VAH 组 BMECs 的 RGR 和 GPx1、GPx4、TrxR1、LPL、SCD、FASN、PPAR γ 和 SREBP1 相对表达量以及 GPx 活性和 T-AOC 显著提高($P \leq 0.05$), 并且 1VAH 组的 TG 含量、T-SOD 和 CAT 活性显著提高($P \leq 0.05$), 且 1VAH 组的 ROS 活性显著降低($P \leq 0.05$)。由此可见, 维生素 A 对由 H_2O_2 诱导引起的 BMECs 内抗氧化能力下降、乳脂从头合成和脂肪酸摄取相关酶活性及其基因表达的下调具有剂量依赖性的减缓效果, 以 0.20~2.00 $\mu\text{g/mL}$ 维生素 A 的效果较好, 尤以 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 维生素 A 的效果最好。

关键词: 维生素 A; 奶牛乳腺上皮细胞; 氧化损伤; 乳脂

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2021)11-6398-09

乳脂肪是构成牛奶的重要组成部分之一, 也是衡量乳品质的关键指标, 其含量与组成是奶业核心竞争力重要标志。在泌乳期间的奶牛, 尤其是高产奶牛, 由于合成和分泌大量的乳汁, 乳腺组织代谢增强, 对能量和氧的需求与利用增加, 奶牛乳腺上皮细胞(BMECs)内呼吸作用加强, 导致奶

牛体内产生过多的活性氧(ROS), 当奶牛体内产生的大量 ROS 与机体抗氧化防御系统的清除能力不平衡时, 会导致乳腺组织发生氧化应激^[1-2]。乳腺组织是泌乳动物体内代谢最强的组织之一, BMECs 是乳腺组织的主要实质细胞, 是合成和分泌乳汁中乳脂和乳蛋白的主要场所。氧化应激的

收稿日期: 2021-04-01

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目(2020BS03032); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY19055); 国家自然科学基金项目(31160466)

作者简介: 郝颖(1994—), 女, 内蒙古呼和浩特人, 硕士研究生, 从事动物营养与饲料研究。E-mail: 1229832932@qq.com

* 通信作者: 闫素梅, 教授, 博士生导师, E-mail: yansimau@163.com

发生会对乳腺组织造成损伤,使其易遭受病原微生物的感染,易患乳房炎,并且会降低乳脂和乳蛋白的合成,影响乳产量和乳品质^[3],使奶牛的淘汰率增加,对奶业的健康发展造成重大损失。因此,缓解 BMECs 氧化应激的发生,进而改善乳腺健康和保证乳品质对奶业的健康持续发展具有非常重要的意义。本课题组前期研究得出,饲料添加高于推荐剂量的维生素 A 可提高奶牛抗氧化功能和产乳性能^[4],体外研究也发现,维生素 A 的添加可促进 BMECs 内谷胱甘肽过氧化物酶 1 (GPx1)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPx4) 和硫氧还蛋白还原酶 1 (TrxR1) 的活性及其基因表达,促进乳脂合成相关基因的表达,对氧化损伤细胞具有缓解作用^[4-6],但其机制尚不清楚。过氧化氢 (H_2O_2) 是属于 ROS 的一种体内代谢产物,可消耗抗氧化物质使机体抗氧化能力降低,对细胞有一定的毒害作用,其极容易穿过细胞膜,在细胞内与 Fe^{2+} 反应生成高活性的自由基。Jin 等^[7] 研究发现,过量 H_2O_2 可引起 BMECs 氧化损伤,降低细胞抗氧化能力。由于 H_2O_2 性质较稳定并容易获得,所以目前很多研究都将其作为氧化损伤模型的诱导剂^[8]。鉴于此,本试验以 H_2O_2 为诱导剂,研究不同浓度的维生素 A 对 H_2O_2 诱导的 BMECs 内乳脂合成的影响,为合理调控乳腺内氧化还原平衡,进而改善乳腺健康、提升原料乳质量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

本试验采用单因子完全随机试验设计,将第 3 代 BMECs 随机分成对照组 (CON 组)、 H_2O_2 损伤组 (H_2O_2 组) 和 7 个维生素 A 预保护组,每个组 6 个重复。其中,CON 组 BMECs 不进行维生素 A 与 H_2O_2 处理,用生长培养基于 5% CO_2 、37 °C 条件下培养 30 h; H_2O_2 组 BMECs 进行 H_2O_2 损伤处理,即用 CON 组培养基于 5% CO_2 、37 °C 条件下培养 24 h,再加入 H_2O_2 继续培养 6 h;7 个维生素 A 预保护组 BMECs 预添加维生素 A 后进行 H_2O_2 损伤处理,即在 CON 组培养基中添加不同浓度维生素 A 后于 5% CO_2 、37 °C 条件下培养 24 h,再加入 H_2O_2 继续培养 6 h,维生素 A 浓度分别为 0.05 (0.05VAH 组)、0.10 (0.1VAH 组)、0.20 (0.2VAH 组)、0.50 (0.5VAH 组)、1.00 (1VAH 组)、2.00 (2VAH 组) 和 4.00 $\mu\text{g/mL}$ (4VAH 组)。培养结

束后收集培养液和细胞用于分析测定。维生素 A 浓度以及 H_2O_2 浓度与处理时间依据本课题组前期研究结果^[4,7] 设定, H_2O_2 浓度与处理时间分别为 800 $\mu\text{mol/L}$ 和 6 h。

1.2 试剂配制

生长培养基:在 DMEM/F12 基础培养基中添加 10% 胎牛血清 (FBS, Gibco 公司,美国)、0.5% 胰岛素转铁蛋白硒钠 (ITS, Gibco 公司,美国)、10 ng/mL 表皮生长因子 (EGF, Sigma 公司,美国)、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 两性霉素 (Sigma 公司,美国)、2% 双抗 (Gibco 公司,美国)、1 $\mu\text{g/mL}$ 氢化可的松 (Sigma 公司,美国)。

维生素 A 贮备液:称取 100 mg 的视黄酸 (RA, Sigma 公司,美国) 溶解于 5 mL 的二甲基亚砜 (DMSO, Amresco 公司,美国) 溶液中,配制成 20 mg/mL 的维生素 A 原液,然后再用 DMSO 溶液将维生素 A 原液稀释成 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 和 4.00 mg/mL 的维生素 A 贮备液,用 0.22 μm 过滤器过滤,避光保存。

H_2O_2 工作液:3% 的 H_2O_2 (Sigma 公司,美国) 浓度约为 0.88 mol/L,用超纯水将 0.88 mol/L 的 H_2O_2 原液稀释成 800 mmol/L 的 H_2O_2 贮备液,最后用不加 FBS 的生长培养基将 H_2O_2 贮备液配制成 880 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。

1.3 BMECs 的培养

BMECs 原代培养采用胶原酶消化法,操作方法参考 Sheng 等^[9] 的方法进行。将从屠宰场采回的健康奶牛乳腺去除组织表层,再剪成约 1 cm^3 大小的组织块,用 3×双抗磷酸盐缓冲溶液 (PBS, HyClone 公司,美国) 清洗。在超净台里用 PBS、75% 酒精分别清洗后从乳腺内部剪取腺泡丰富的部位剪碎至糊状,再加入等体积的 0.5% 胶原酶 II (Gibco 公司,美国),37 °C 消化 1 h。最后用 80 目滤网过滤,滤液 262×g 离心 5 min 后弃上清,用 PBS 清洗细胞,在相同条件下离心 3 min,弃上清,加入生长培养基悬浮细胞并接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中,于 37 °C、5% CO_2 条件下培养。当细胞贴壁度达到 80%~90% 时,使用 0.05% 胰蛋白酶/乙二胺四乙酸 (Gibco 公司,美国) 进行细胞纯化并传代。原代细胞含有少量的成纤维细胞,但在纯化与传代培养过程中,成纤维细胞很少被传入第 3 代细胞中,详见图 1。

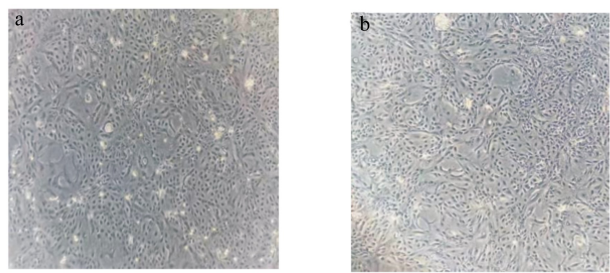


图1 原代(a)和第3代(b)奶牛乳腺上皮细胞的显微镜图像

Fig.1 Microscopic images of primary (a) and F3 (b) bovine mammary epithelial cells (100×)

1.4 测定指标与方法

1.4.1 细胞活力

BMECs 的细胞活力采用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8)法测定,使用相对增殖率(RGR)表示。将细胞悬液接种到 96 孔细胞板内,按试验设计处理后加入 20 μL 的 CCK-8 溶液(北京碧云天生物研究所),继续培养 1 h,使用全自动酶标仪检测各孔 450 nm 波长处的吸光度值(OD_{450 nm})。

$$RGR(\%) = \frac{\text{试验组 OD}_{450\text{ nm}}}{\text{CON 组 OD}_{450\text{ nm}}} \times 100.$$

1.4.2 甘油三酯(TG)含量、抗氧化指标以及乳脂合成相关酶活性

按照试验设计培养结束后弃上清,用 PBS 清洗 2 次,每孔加入 200 μL 裂解液混匀后室温静置 10 min,收集裂解液于 1.5 mL 无酶无菌离心管中,70 ℃加热 10 min,室温下 622×g 离心 5 min 后取上层清液进行 TG 含量测定。TG 含量使用酶法,按照试剂盒说明书(北京普利莱基因技术有限公司)进行测定。

细胞培养液总抗氧化能力(T-AOC)采用钼酸铵显色法测定,总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性采用黄嘌呤氧化酶法测定,过氧化氢酶(CAT)活性采用比色法测定,谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性采用二硫代二硝基苯甲酸法测定,试剂盒购于南京建成生物工程研究所,具体测定方法按照试剂盒说明书进行。细胞裂解液中 ROS 和 TrxR1 以及乳脂合成相关酶——脂肪酸合成酶(FASN)、乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)、脂酰辅酶 A 去饱和酶(SCD)和脂蛋白酯酶(LPL)活性采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定,试剂盒购自美国 R&D 公司,具体测定方法按照试剂盒说明书进行。细胞

裂解液中 GPx 和 TrxR1 活性换算为蛋白质基础,蛋白质含量采用二喹啉甲酸法测定。

1.4.3 细胞内抗氧化和乳脂合成相关基因的相对表达量

采用实时荧光定量 PCR 仪(ABI-7500,ABI 公司)测定细胞内抗氧化和乳脂合成相关基因的相对表达量。测定的抗氧化相关基因包括 GPx1、GPx4 和 TrxR1,乳脂合成相关基因包括脂肪酸结合蛋白 3(FABP3)、FASN、ACC、SCD、LPL、固醇调节元件结合蛋白 1(SREBP1)和过氧化酶体增殖物激活受体 γ(PPARγ)。以内参基因磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、酪氨酸 3-单氧合酶(YWHAZ)、锌 12 同源基因抑制剂(SUZ12)的几何平均值为计算依据(几何平均值= $\sqrt[3]{X1 \times X2 \times X3}$),目的基因相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。引物序列及参数见表 1。反应程序:95 ℃预变性 30 s,1 个循环;95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 30 s,95 ℃延伸 15 s,40 个循环;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,95 ℃ 15 s,51 个循环;绘制熔解曲线。

1.5 数据统计与分析

试验数据利用 SAS 9.0 软件的 ANOVA 程序进行单因素方差分析,采用 Duncan 氏法进行多重比较。统计结果以 $P \leq 0.05$ 表示组间差异显著, $P > 0.05$ 表示组间差异不显著。

2 结果与分析

2.1 维生素 A 对 H₂O₂ 诱导的 BMECs 内 RGR、抗氧化指标和 ROS 活性的影响

由表 2 可知,H₂O₂ 组的 RGR 显著低于 CON 组($P \leq 0.05$);与 H₂O₂ 组相比,0.1VAH~4VAH 组的 RGR 显著增加($P \leq 0.05$),以 1VAH 组最高。与 CON 组相比,H₂O₂ 组的 GPx、T-AOC、T-SOD、CAT、TrxR 活性显著降低($P \leq 0.05$),但 ROS 活性显著增加($P \leq 0.05$)。与 H₂O₂ 组相比,0.2VAH~4VAH 组的 GPx 活性显著升高($P \leq 0.05$),以 1VAH 组最高;0.2VAH~2VAH 组的 T-AOC 显著增加($P \leq 0.05$),其他维生素 A 预保护组变化不显著($P > 0.05$);1VAH~4VAH 组的 TrxR 活性显著增加($P \leq 0.05$),其他维生素 A 预保护组变化不显著($P > 0.05$);1VAH 组的 T-SOD 和 CAT 活性显著增加($P \leq 0.05$),但 ROS 活性显著下降($P \leq 0.05$)。

表 1 引物序列及参数

Table 1 Primer sequences and parameters

基因 Genes	GenBank 登录号 GenBank accession No.	引物序列 Primer sequences (5'—3')	长度 Length/bp	退火温度 Tm/℃
磷酸甘油醛脱氢酶 <i>GAPDH</i>	XM_001252479	F:GGGTCATCATCTCTGCACCT R:GGTCATAAGTCCCTCCACGA	177	60
酪氨酸 3-单氧化酶 <i>YWHAZ</i>	NM_174814	F:GTAGGAGCCCGTAGGTCATC R:CCTCAGCCAAGTAGCGGTAG	241	60
锌 12 同源基因抑制剂 <i>SUZ12</i>	XM_582605	F:AGCCATGCAGGAAATGGAAG R:GCAAGAGGTTTGGCTATAGG	183	60
谷胱甘肽过氧化酶 1 <i>GPx1</i>	NM_174076.3	F:AGTGCAGGTTGARATGGCGAGARA R:TGGGCARARARATCCCTGGAGAGCA	328	60
谷胱甘肽过氧化酶 4 <i>GPx4</i>	NM_174770.3	F:ATCARARAGAGTTCGCCGCTGGCT R:TCGGARACACAGGCARACAGGCTT	295	60
硫氧还蛋白还原酶 1 <i>TrxR1</i>	NM_174625.3	F:AGGAGARARAGCTGTGGAGARARA R:TTATCCCTTGATGGARATCGT	94	60
脂肪酸结合蛋白 3 <i>FABP3</i>	DN518905	F:GAACTCGACTCCCAGCTTGAA R:AAGCCTACCACAATCATCGAAG	102	62
脂肪酸合成酶 <i>FASN</i>	NM_001012669	F:AGGACCTCGTGAAGGCTGTGA R:CCAAGGTCTGAAAGCGAGCTG	85	60
乙酰辅酶 A 羧化酶 <i>ACC</i>	AJ132890	F:CATCTTGTCCGAAACGTCGAT R:CCCTTCGAACATACACCTCCA	101	60
硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 <i>SCD</i>	AY241933	F:TCCTGTTGTTGTGCTTCATCC R:GGCATAACGGAATAAGGTGGC	101	58
脂蛋白酯酶 <i>LPL</i>	BC118091	F:ACACAGCTGAGGACACTTGCC R:GCCATGGATCACCACAAAGG	101	60
固醇调节元件结合蛋白 1 <i>SREBP1</i>	NM_001113302	F:CTGACGACCGTGAAAACAGA R:AGACGGCAGATTTATTCAACTT	334	62
过氧化酶体增殖物激活受体 γ <i>PPARγ</i>	NM_181024	F:CCAAATATCGGTGGGAGTCG R:ACAGCGAAGGGCTCACTCTC	101	60

表 2 维生素 A 对 H₂O₂ 诱导的 BMECs 内 RGR、抗氧化指标和 ROS 活性的影响

Table 2 Effects of VA on RGR, antioxidant indexes and ROS activity of BMECs induced by H₂O₂

项目 Items	组别 Groups									均值 标准误 SEM	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
	CON	H ₂ O ₂	0.05VAH	0.1VAH	0.2VAH	0.5VAH	1VAH	2VAH	4VAH		
相对增殖率 RGR/%	100.00 ^a	70.34 ^d	73.24 ^{cd}	78.29 ^{bc}	81.84 ^b	82.44 ^b	93.61 ^a	85.96 ^b	82.33 ^b	2.500	<0.001
谷胱甘肽过氧化物酶 GPx/(U/mg prot)	35.19 ^a	9.57 ^e	9.88 ^e	11.11 ^e	15.76 ^d	20.38 ^c	29.33 ^b	24.67 ^c	23.74 ^c	1.418	<0.001
总抗氧化能力 T-AOC/(U/mL)	1.55 ^a	0.63 ^f	0.69 ^{ef}	0.87 ^{def}	0.93 ^{cde}	1.18 ^{bc}	1.31 ^{ab}	1.00 ^{cd}	0.81 ^{def}	0.063	<0.001
总超氧化物歧化酶 T-SOD/(U/mL)	54.69 ^{ab}	31.75 ^c	36.99 ^{bc}	44.24 ^{abc}	46.42 ^{abc}	41.15 ^{bc}	59.64 ^a	45.13 ^{abc}	39.26 ^{bc}	5.453	0.036
过氧化氢酶 CAT/(U/mL)	1.86 ^a	0.44 ^c	0.58 ^c	0.72 ^{bc}	1.09 ^{abc}	1.06 ^{abc}	1.51 ^{ab}	1.21 ^{abc}	0.93 ^{bc}	0.265	0.019

续表 2

项目 Items	组别 Groups									均值 标准误 SEM	P 值 P-value
	CON	H ₂ O ₂	0.05VAH	0.1VAH	0.2VAH	0.5VAH	1VAH	2VAH	4VAH		
硫氧还蛋白酶 TrxR1/(U/mg prot)	4.65 ^a	3.29 ^c	3.37 ^c	3.40 ^c	3.90 ^{bc}	3.78 ^{bc}	4.11 ^{ab}	4.11 ^{ab}	4.08 ^{ab}	0.159	0.002
活性氧 ROS/(U/mL)	67.20 ^c	78.40 ^a	70.20 ^{bc}	77.70 ^a	77.40 ^a	75.33 ^{ab}	66.73 ^c	76.13 ^{ab}	69.73 ^{bc}	1.842	0.003

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P\leq 0.05$)。下表同。
In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P\leq 0.05$). The same as below.

2.2 维生素 A 对 H₂O₂ 诱导的 BMECs 内 TG 含量和乳脂合成相关酶活性的影响

由表 3 可知, H₂O₂ 组的 TG 含量显著低于 CON 组 ($P\leq 0.05$)。与 H₂O₂ 组相比, 1VAH 组的 TG 含量显著升高 ($P\leq 0.05$)。与 CON 组相比, H₂O₂ 组的 ACC、LPL 和 SCD 活性显著降低 ($P\leq 0.05$), FASN 活性无显著变化 ($P>0.05$)。与

H₂O₂ 组相比, 0.5VAH 和 1VAH 组的 FASN 活性显著升高 ($P\leq 0.05$); 0.1VAH~4VAH 组的 ACC 活性显著升高 ($P\leq 0.05$); 0.1VAH、1VAH、2VAH 和 4VAH 组的 LPL 活性显著升高 ($P\leq 0.05$); 0.2VAH、1VAH、2VAH 和 4VAH 组的 SCD 活性显著升高 ($P\leq 0.05$)。

表 3 维生素 A 对 H₂O₂ 诱导的 BMECs 内 TG 含量和乳脂合成相关酶活性的影响

Table 3 Effects of VA on TG content and enzyme activities related to milk fat synthesis of BMECs induced by H₂O₂

项目 Items	组别 Groups									均值 标准误 SEM	P 值 P-value
	CON	H ₂ O ₂	0.05VAH	0.1VAH	0.2VAH	0.5VAH	1VAH	2VAH	4VAH		
甘油三酯 TG/(μg/mg prot)	39.27 ^a	26.60 ^c	27.93 ^c	29.27 ^{bc}	25.93 ^c	26.60 ^c	35.27 ^{ab}	32.60 ^{bc}	31.60 ^{bc}	1.732	0.003
脂肪酸合成酶 FASN/(U/L)	2.55 ^{ab}	2.19 ^b	2.24 ^b	2.38 ^{ab}	2.48 ^{ab}	2.65 ^a	2.68 ^a	2.60 ^{ab}	2.53 ^{ab}	0.104	0.045
乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC/(U/L)	7.95 ^a	5.75 ^c	6.02 ^{dc}	7.00 ^{bc}	7.56 ^{ab}	6.80 ^c	6.63 ^{cd}	6.43 ^{cde}	6.40 ^{cde}	0.205	<0.001
脂蛋白酯酶 LPL/(U/mL)	2.97 ^{ab}	2.51 ^d	2.64 ^{cd}	2.83 ^{cb}	2.53 ^d	2.58 ^d	2.96 ^{ab}	3.20 ^a	2.99 ^{ab}	0.095	<0.001
脂酰辅酶 A 去饱和酶 SCD/(U/L)	133.29 ^{ab}	120.31 ^d	124.36 ^{cd}	120.19 ^d	141.62 ^{ab}	129.24 ^{cd}	133.82 ^{bc}	150.55 ^a	148.00 ^a	4.227	<0.001

2.3 维生素 A 对 H₂O₂ 诱导的 BMECs 内抗氧化和乳脂合成相关基因表达的影响

由表 4 可知, 与 CON 组相比, H₂O₂ 组的 GPx1、GPx4、TrxR1、FASN、ACC 和 PPARγ 相对表达量显著降低 ($P\leq 0.05$)。与 H₂O₂ 组相比, 0.05VAH~4VAH 组的 GPx1、SCD 和 PPARγ 相对表达量显著升高 ($P\leq 0.05$), GPx1 相对表达量以 1VAH 组最高; 1VAH~4VAH 组的 GPx4 相对表

达量显著升高 ($P\leq 0.05$), 以 4VAH 组最高; 0.1VAH~4VAH 组的 TrxR1 相对表达量显著升高 ($P\leq 0.05$); 0.2VAH~4VAH 组的 FASN 和 LPL 相对表达量显著升高 ($P\leq 0.05$), FASN 相对表达量以 1VAH 组最高; 0.1VAH 和 0.2VAH 组的 ACC 相对表达量显著升高 ($P\leq 0.05$); 0.05VAH~2VAH 组的 SREBP1 相对表达量显著升高 ($P\leq 0.05$); 0.05VAH~0.5VAH 组的 FABP3 相对表达量显著升高 ($P\leq 0.05$)。

表 4 维生素 A 对 H₂O₂ 诱导的 BMECs 内抗氧化和乳脂合成相关基因表达的影响

项目 Items	组别 Groups									均值 标准误 SEM	P 值 P-value
	CON	H ₂ O ₂	0.05VAH	0.1VAH	0.2VAH	0.5VAH	1VAH	2VAH	4VAH		
谷胱甘肽过氧化物酶 1 <i>GPx1</i>	1.00 ^c	0.60 ^d	0.87 ^c	1.00 ^c	1.47 ^b	1.31 ^b	1.88 ^a	1.45 ^b	1.45 ^b	0.058	<0.001
谷胱甘肽过氧化物酶 4 <i>GPx4</i>	1.00 ^b	0.75 ^c	0.79 ^c	0.76 ^c	0.75 ^c	0.75 ^c	1.02 ^b	0.95 ^b	1.22 ^a	0.038	<0.001
硫氧还蛋白酶 1 <i>TrxR1</i>	1.00 ^{cd}	0.70 ^{ef}	0.83 ^{ed}	0.89 ^c	1.11 ^c	1.05 ^{cd}	2.06 ^a	2.05 ^a	1.87 ^b	0.051	<0.001
脂肪酸合成酶 <i>FASN</i>	1.00 ^{bc}	0.48 ^d	0.56 ^d	0.61 ^d	0.92 ^c	1.22 ^b	1.54 ^a	1.20 ^b	1.14 ^{bc}	0.076	<0.001
乙酰辅酶 A 羧化酶 <i>ACC</i>	1.00 ^a	0.73 ^c	0.83 ^{bc}	0.96 ^{ab}	0.97 ^a	0.80 ^c	0.80 ^c	0.78 ^c	0.77 ^c	0.086	0.001
硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 <i>SCD</i>	1.00 ^{cd}	0.88 ^d	1.35 ^b	1.60 ^a	1.62 ^a	1.43 ^{ab}	1.63 ^a	1.61 ^a	1.12 ^c	0.137	<0.001
脂蛋白酯酶 <i>LPL</i>	1.00 ^b	0.78 ^b	0.80 ^b	0.82 ^b	1.43 ^a	1.25 ^a	1.40 ^a	1.34 ^a	1.23 ^a	0.063	<0.001
过氧化酶体增殖物 激活受体 γ <i>PPARγ</i>	1.00 ^{bc}	0.56 ^d	0.86 ^c	0.99 ^{bc}	1.16 ^b	1.07 ^b	1.15 ^b	1.54 ^a	1.53 ^a	0.143	<0.001
脂肪酸结合蛋白 3 <i>FABP3</i>	1.00 ^{bc}	0.86 ^{cd}	1.16 ^{ab}	1.21 ^a	1.14 ^{ab}	1.15 ^{ab}	1.03 ^{abc}	1.04 ^{abc}	0.70 ^d	0.063	<0.001
固醇调节元件 结合蛋白 1 <i>SREBP1</i>	1.00 ^{bc}	0.81 ^c	1.28 ^{ab}	1.33 ^{ab}	1.57 ^a	1.34 ^{ab}	1.17 ^b	1.21 ^b	1.05 ^{bc}	0.109	0.003

3 讨 论

动物机体在正常的生理代谢情况下会产生具有氧化性的自由基,例如 ROS 和 H₂O₂ 等,但 ROS 过量产生并积累可对动物组织和细胞产生实质性损害,导致细胞氧化应激^[10-11]。抗氧化酶 GPx、TrxR、T-SOD 和 CAT 在催化还原 H₂O₂ 和一些脂溶性过氧化物方面发挥了重要的作用,可以清除组织细胞由氧化损伤而产生的自由基^[1,12]。在人体肝细胞及 BMECs 上的研究表明,H₂O₂ 损伤细胞后,细胞内 GPx1、CAT 和超氧化物歧化酶(SOD)的活性显著降低,而 ROS 活性显著升高^[5,11]。本课题组前期研究得出,奶牛饲粮添加高于推荐剂量的维生素 A(220 IU/kg 饲粮)可以提高血清抗氧化酶 GPx、TrxR、T-SOD、CAT 等的活性,降低 ROS 活性,减缓机体及细胞氧化损伤^[5],

体外研究也得出了相似的结果^[7]。本试验从体外进一步验证了 H₂O₂ 会导致细胞活力和抗氧化功能的降低,抗氧化酶活性及抗氧化相关基因 GPx1、GPx4 和 TrxR 表达的下调,ROS 活性显著增加;采用 0.20~2.00 μ g/mL 维生素 A 进行预保护会减缓细胞氧化损伤,抑制 ROS 活性的增加,尤以 1.00 μ g/mL 的维生素 A 效果最好。

TG 含量约占乳脂总量的 98%,其含量高低可以反映乳脂的合成情况。TG 主要在哺乳动物的乳腺组织中积累形成脂质滴,其主要成分是脂肪酸^[13]。乳中脂肪酸有 2 个来源途径:一是中短链脂肪酸的从头合成;二是从血液中吸收的长链脂肪酸。FASN 和 ACC 是乳腺内短链(C4~C8)和中链(C10~C14)以及一部分 C16 脂肪酸从头合成的 2 个关键酶^[13],并且 ACC 也是牛乳脂合成的限速酶。LPL 和 FABP3 参与 BMECs 内多种组织脂肪酸的摄取和转运,LPL 将血液中摄取的乳糜

微粒和 TG 水解成甘油和分子质量较小的脂肪酸,然后 FABP3 将脂肪酸从细胞膜运送到 TG 和磷脂合成与氧化的位点上^[14]。SCD 在乳脂合成过程中具有脱氢去饱和作用,FABP3 主要作用是为 SCD 提供脱氢底物^[14]。有研究表明,用氧化诱导剂作用 BMECs 后,细胞内抗氧化酶活性降低,导致细胞氧化损伤,进而引起乳脂合成相关酶活性降低^[3,13],抑制乳脂的合成^[15]。本研究发现,添加维生素 A 预保护后可减缓 H_2O_2 引起的细胞内 TG 含量、与脂肪酸从头合成相关基因 *FASN* 和 *ACACA* 的表达和其对酶活性及其与脂肪酸摄取相关酶 *LPL* 和 *SCD* 活性的下降。

PPAR γ 和 *SREBP1* 是脂肪合成中重要的转录因子和核受体,可以调节乳腺内 *FASN*、*ACACA*、*SCD*、*LPL* 和 *FABP3* 等靶基因的表达。奶山羊乳腺细胞中敲除 *PPAR γ* 会导致上述基因的表达量显著下降^[16],表明 *PPAR γ* 调节乳腺细胞中脂肪酸的从头合成和去饱和过程。Wang 等^[13]研究指出,脂多糖 (LPS) 诱导的 BMECs 会使 *SREBP1* 活性及其基因相对表达量下降,导致 TG 合成和分泌减少。 H_2O_2 诱导损伤神经元细胞后,使 *PPAR γ* 磷酸化并使其失活^[17],而 *PPAR γ* 激活可以抑制 ROS 和脂质过氧化物产生,提高 SOD 活性和谷胱甘肽 (GSH) 含量,减少细胞氧化损伤^[18]。本课题组前期研究指出,在 BMECs 中添加 *PPAR γ* 抑制剂 GW9662 后,细胞内 *PPAR γ* 和 *TrxR* 的相对表达量显著降低^[19]。过氧化酶体增殖物激活受体 (PPAR) 与配体结合激活后能和类维生素 A 的 X 受体 (RXR) 形成异源二聚体,然后和靶基因上的 PPAR 反应元件相互作用调控靶基因的转录和表达,而维生素 A 的代谢产物 9-顺式维甲酸 (9-*cis* RA) 是 RXR 的有效配体^[20]。本研究结果得出,添加维生素 A 预保护逆转了 H_2O_2 诱导引起的 BMECs 中 *PPAR γ* 、*FASN*、*ACC* 和 *LPL* 相对表达量的降低,并上调了 *SREBP1*、*SCD* 和 *FABP3* 的表达,提示维生素 A 可能通过抑制转录因子 *PPAR γ* 和 *SREBP1* 表达的下降,促进脂肪酸从头合成和脂肪酸摄取来缓解氧化损伤引起的细胞内 TG 合成的下降;但维生素 A 在减缓氧化损伤的细胞内 TG 合成降低的同时,是否对乳脂肪中各种脂肪酸的组成产生影响尚需在后续的研究中进一步探讨。

大鼠发生脂肪肝炎后,脂肪组织内 *TrxR*、GPx 的活性与 *TrxR* 的基因表达量显著降低,氧化应激

加剧,引起肝组织中游离脂肪酸含量增加,*PPAR γ* 的基因表达量显著减少^[21]。在小鼠上的研究发现,增加血清 GPx 活性可以促进 *PPAR γ* 活化,减轻动脉炎症并降低体内氧化应激水平^[22]。本课题组前期研究指出,沉默 BMECs 中 *GPx* 基因可降低 *PPAR γ* 基因的表达^[20]。上述结果提示维生素 A 缓解 H_2O_2 引起的 BMECs 内乳脂合成的降低可能是通过增强 *TrxR*、GPx 活性引起 *PPAR γ* 的活性升高,因此有必要利用基因沉默或过表达技术从该领域继续进行深入研究。本试验从体外研究了维生素 A 对氧化损伤后 BMECs 内乳脂合成减少的缓解效果,并得出 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 维生素 A 的效果较好。在实际生产中,饲料中维生素 A 的添加量具体为多少可以对乳腺组织氧化损伤具有较好的减缓效果,还需要在体内进一步验证。

4 结 论

维生素 A 对 H_2O_2 诱导的氧化损伤引起的 BMECs 抗氧化能力的降低,乳脂合成、转录因子 *PPAR γ* 和 *SREBP1* 以及从头合成基因 *FASN*、*ACC* 与脂肪酸摄取基因 *LPL*、*SCD* 和 *FABP3* 表达的下降具有减缓作用,并呈剂量依赖性,以 0.20 ~ 2.00 $\mu\text{g/mL}$ 维生素 A 的效果较好,尤以 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 维生素 A 的效果最好。

参考文献:

- [1] SORDILLO L M, AITKEN S L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009, 128 (1/2/3): 104-109.
- [2] PUTMAN A K, BROWN J L, GANDY J C, et al. Changes in biomarkers of nutrient metabolism, inflammation, and oxidative stress in dairy cows during the transition into the early dry period [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101 (10): 9350-9359.
- [3] ZHANG B Q, GUO Y M, YAN S M, et al. The protective effect of selenium on the lipopolysaccharide-induced oxidative stress and depressed gene expression related to milk protein synthesis in bovine mammary epithelial cells [J]. *Biological Trace Element Research*, 2020, 197: 141-148.
- [4] SHIH Y, YAN S M, GUO Y M, et al. The pre-protective effect of vitamin A on LPS-induced oxidative stress of bovine mammary epithelial cells [J]. *Italian*

- Journal of Animal Science, 2018, 17(4): 959–966.
- [5] JIN L, YAN S M, SHI B L, et al. Effects of vitamin A on the milk performance, antioxidant functions and immune functions of dairy cows [J]. Animal Feed Science & Technology, 2014, 192: 15–23.
 - [6] 苏芮, 刘阳, 闫素梅, 等. 维生素 A 对奶牛乳腺上皮细胞乳脂和乳蛋白合成相关基因表达的影响 [J]. 动物营养学报, 2018, 30(8): 3151–3158.
SU R, LIU Y, YAN S M, et al. Effects of vitamin A on gene expressions related to milk fat and protein synthesis in bovine mammary epithelial cells [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(8): 3151–3158. (in Chinese)
 - [7] JIN L, YAN S M, SHI B L, et al. Retinoic acid attenuates oxidative injury in bovine mammary epithelial cells induced by hydrogen peroxide [J]. Czech Journal of Animal Science, 2017, 63(12): 539–548.
 - [8] 张斌, 夏作理, 赵晓民, 等. 氧化应激模型的建立及其评价 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(44): 112–114.
ZHANG B, XIA Z L, ZHAO X M, et al. Establishment and evaluation of oxidative stress models [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006, 10(44): 112–114. (in Chinese)
 - [9] SHENG R, YAN S M, QI L Z, et al. Effect of the ratios of unsaturated fatty acids on the expressions of genes related to fat and protein in the bovine mammary epithelial cells [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 2015, 51(4): 381–389.
 - [10] FANG Y Z, YANG S, WU G Y. Free radicals, antioxidants, and nutrition [J]. Nutrition, 2002, 18(10): 872–879.
 - [11] SHI C, CHEN X, LIU Z, et al. Oleuropein protects L-02 cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing SOD1, GPx1 and CAT expression [J]. Bio-medicine & Pharmacotherapy, 2017, 85(1): 740–748.
 - [12] GOYAL M M, BASAK A. Human catalase: looking for complete identity [J]. Protein & Cell, 2010, 1: 888–897.
 - [13] WANG J, ZHANG X, HE X, et al. LPS-induced reduction of triglyceride synthesis and secretion in dairy cow mammary epithelial cells via decreased SREBP1 expression and activity [J]. Journal of Dairy Research, 2018, 85(4): 439–444.
 - [14] BIONAZ M, LOOR J J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle [J]. BMC Genomics, 2008, 9: 366.
 - [15] 刘立新. 14-3-3 γ 调控脂多糖诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症反应和泌乳 [D]. 博士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
LIU L X. 14-3-3 γ regulates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and lactation in dairy cow mammary epithelial cells [D]. Ph.D. Thesis. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016. (in Chinese)
 - [16] SHI H B, LUO J, ZHU J J, et al. PPAR γ regulates genes involved in triacylglycerol synthesis and secretion in mammary gland epithelial cells of dairy goats [J]. PPAR Research, 2013(2013): 310948.
 - [17] 王宁. PPAR γ 保护原代皮层神经元过氧化氢损伤的研究 [D]. 硕士学位论文. 天津: 天津医科大学, 2015.
WANG N. Study on the protective effects of PPAR γ against hydrogen peroxide-induced injury in primary cultured cortical neurons [D]. Master's Thesis. Tianjin: Tianjin Medical University, 2015. (in Chinese)
 - [18] YU X, SHAO X G, SUN H, et al. Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma exerts neuroprotection by inhibiting oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus [J]. Brain Research, 2008, 1200: 146–158.
 - [19] 苏芮. 硒通过 Nrf2/GPX1-PPAR γ -NF- κ B 信号通路对一氧化氮诱导的奶牛乳腺上皮细胞氧化应激的减缓作用 [D]. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
SU R. The mechanism on se alleviating oxidative stress in the bovine mammary epithelial cells induced by NO through Nrf2/GPX1-PPAR γ -NF- κ B signaling pathway [D]. Master's Thesis. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019. (in Chinese)
 - [20] 赵向利, 张英杰. 维生素 A 对动物基因表达的调控 [J]. 饲料工业, 2014, 35(17): 83–86.
ZHAO X L, ZHANG Y J. Regulation of vitamin A for gene expression in animals [J]. Feed Industry, 2014, 35(17): 83–86. (in Chinese)
 - [21] 张成琰. 硫氧还蛋白还原酶表达上调治疗非酒精性脂肪性肝病的实验研究 [D]. 硕士学位论文. 太原: 山西医科大学, 2009.
ZHANG C Y. Experimental study on the up-regulation of thioredoxin reductase expression in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease [D]. Master's Thesis. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2009. (in Chinese)
 - [22] 徐梦, 马艳玲, 赵奇红, 等. PPAR γ 激动剂对妊娠期糖尿病小鼠氧化应激和炎症水平的影响 [J]. 中华疾病控制杂志, 2018, 22(2): 195–198.

XU M, MA Y L, ZHAO Q H, et al. The effect of PPAR γ agonist on the level of oxidative stress and inflammation in gestational diabetes mellitus mice [J].

Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2018, 22(2): 195–198. (in Chinese)

Effects of Vitamin A on Milk Fat Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells Induced by Hydrogen Peroxide

HAO Ying ZHAO Yanli YAN Sumei* GUO Xiaoyu GUO Yongmei QI Jingyu

(Inner Mongolia Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science, College of Animal Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: The purpose of this experiment was to study the effects of vitamin A on milk fat synthesis in bovine mammary cells (BMECs) induced by hydrogen peroxide (H_2O_2). This experiment was designed with a single-factor completely randomized trial. The third-generation BMECs were randomly divided into 9 groups with 6 replicates in each group. Among them, the control group (CON group) was cultured with growth medium for 30 h, the H_2O_2 injury group (H_2O_2 group) was cultured with CON group medium for 24 h, and then H_2O_2 was added to continue the culture for 6 h. The seven vitamin A pre-protection groups were cultured for 24 h with different concentrations of vitamin A in the CON group medium, and then added H_2O_2 for 6 h, the vitamin A concentration was 0.05 (0.05VAH group), 0.10 (0.1VAH group), 0.20 (0.2VAH group), 0.50 (0.5VAH group), 1.00 (1VAH group), 2.00 (2VAH group) and 4.00 $\mu\text{g/mL}$ (4VAH group), respectively. The results showed that compared with the CON group, the H_2O_2 induced oxidative damage to BMECs, the relative growth rate (RGR), triglyceride (TG) content, total antioxidant capacity (T-AOC) and the activities of total superoxide dismutase (T-SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), thioredoxin reductase 1 (TrxR1), fatty acid synthase (FASN), acyl-CoA desaturase (SCD), lipoprotein esterase (LPL) and acetyl-CoA carboxylase (ACC) activities of BMECs in the H_2O_2 group were significantly reduced ($P \leq 0.05$), and the relative expression levels of ACC, FASN, glutathione peroxidase 1 (GPx1), glutathione peroxidase 4 (GPx4), thioredoxin reductase 1 (TrxR1), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1) were significantly reduced ($P \leq 0.05$), but the activity of reactive oxygen species (ROS) was significantly increased ($P \leq 0.05$). Compared with the H_2O_2 group, the RGR and the relative expression levels of GPx1, GPx4, TrxR1, LPL, SCD, FASN, PPAR γ and SREBP1 and the GPx activity, T-AOC of the BMECs in the 0.2VAH to 2VAH groups were significantly increased ($P \leq 0.05$), and the TG content, T-SOD and CAT activities of the BMECs in the 1VAH group were significantly increased ($P \leq 0.05$), while the ROS activity of the BMECs in the 1VAH group was significantly reduced ($P \leq 0.05$). It can be seen that vitamin A has a dose-dependent mitigating effect on the decrease in antioxidant capacity, enzyme activities and gene expressions associated with the *de novo* synthesis of milk fat and fatty acid uptake in BMECs by H_2O_2 -induced damage. The vitamin A of 0.20 to 2.00 $\mu\text{g/mL}$ has better effect, especially the vitamin A of 1.00 $\mu\text{g/mL}$ has the best effect. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33 (11): 6398-6406]

Key words: vitamin A; bovine mammary epithelial cells; oxidative damage; milk fat

* Corresponding author, professor, E-mail: yansmimau@163.com