

# 干奶期奶牛不同能量摄入对其肝脏胰岛素受体 mRNA 表达的影响

李红梅<sup>1</sup>, 王 哲<sup>2</sup>, 夏 成<sup>2</sup>, 徐 闯<sup>2</sup>, 牛淑玲<sup>2</sup>, 张乃生<sup>2</sup>, 李艳飞<sup>1\*</sup>

(1. 东北农业大学动物医学院, 哈尔滨 150030; 2. 吉林大学农学部畜牧兽医学院, 长春 130062)

**摘 要:** 将健康围产期奶牛 30 头随机分为 3 组, 产前 28 d 分别饲喂奶牛标准日粮(能量摄入 100% 组)、标准日粮增加 20% 日粮(能量摄入 120% 组)和标准日粮减少 20% 日粮(能量摄入 80% 组), 产后各组奶牛均饲喂标准的产奶日粮, 至产后 56d 结束, 采用半定量 RT-PCR 方法, 观测干奶期不同能量摄入水平对围产期健康奶牛肝脏胰岛素受体(IR)基因表达的影响。试验结果表明, 干奶期低能饲喂奶牛, 产后肝脏 IR mRNA 表达增加, 提示低能饲喂有利于调节奶牛产后血糖平衡。

**关键词:** 能量摄入; 奶牛; 胰岛素受体

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)06-0617-04

## Effect of Energy Intake Level on the Expression of IR mRNA in the Liver of Periparturient Cows

LI Hong-mei<sup>1</sup>, WANG Zhe<sup>2</sup>, XIA Cheng<sup>2</sup>, XU Chuang<sup>2</sup>, NIU Shu-ling<sup>2</sup>,  
ZHANG Nai-sheng<sup>2</sup>, LI Yan-fei<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;  
2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

**Abstract:** The objective of present study was to investigate the effect of energy intake during the dry period on the expression of IR mRNA in the liver of periparturient dairy cows. Thirty healthy multiparous Holstein cows were randomly allocated into three groups and fed 100% energy diet (standard diets), 120% energy diet and 80% energy diet, respectively, beginning at the 28th day before parturition. After calving, all the cows were offered the lactation ration *ad libitum* until the 56th day postpartum. The results indicated that the cows fed with low energy diet during the dry period had the significant highest level of IR mRNA in the liver than that in the cows fed with 120% energy diet and 100% energy diet. It is concluded that the low energy diet during the dry period could be helpful to regulation of blood glucose balance in the periparturient dairy cows by enhancing insulin receptor quantity.

**Key words:** energy level; dairy cows; IR mRNA

胰岛素是动物的重要激素, 主要作用于肝脏, 调控机体能量代谢。与肝脏 IR 结合, 通过介导葡萄糖进入肝细胞内合成糖原而维持血糖平衡。IR 对胰岛素存在负反馈调节<sup>[1]</sup>, 研究表明 IR 障碍会引起

高血糖症及糖代谢障碍<sup>[2]</sup>, 因此, 肝脏 IR 对调节血液胰岛素浓度及血糖稳定具有重要意义。近年来对 IR 的分子生物学特性及其功能和胰岛素对 IR 的作用机制有了深入的研究<sup>[3]</sup>, 但有关摄食对围产期奶

收稿日期: 2005-05-17

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30230260); 中国博士后科学基金资助项目(2004036400)

作者简介: 李红梅(1977-), 女, 硕士生, 主要从事动物营养代谢病的研究, E-mail: lhmeijl@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 李艳飞, Tel: 0451-55190407; E-mail: yanfeili200@126.com

牛肝脏 IR mRNA 表达的影响在国内外均尚未见报道。本试验通过半定量 RT-PCR 方法,探讨干奶期奶牛不同能量摄入对其肝脏 IR mRNA 表达的影响,为从分子水平上揭示围产期奶牛肝糖调节的机制提供理论和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

反转录酶(购自 NEB 公司),Olig dT、DNA 聚合酶、DNA T4 连接酶和 PMDI8-T 载体(购自 TaKaRa 公司),焦磷酸二乙酯(DEPC)(购自 Sigma 公司),Trizol mRNA 提取液(购自 Roche 公司),质粒、DNA 回收试剂盒(购自杭州维特洁生物技术公司)。上、下游引物由上海 Sangon 生物工程公司合成。

### 1.2 供试奶牛的选择、分组、饲养管理

2003 年 5 月—12 月,在吉林省长春市新希望奶牛场选用围产期健康荷斯坦奶牛 30 头,年龄(3.3±1.1)岁,305 d 的产奶量为(7 436±1 089)kg,体重为(637±71)kg,将奶牛随机分为 3 组(每组 10 头):C 组为对照组,饲喂按中国奶牛饲养标准(2000)设计的日粮(能量摄入为营养需要量的 100%),H 组饲喂标准日粮增加 20%日粮(能量摄入为营养需要量的 120%组),L 组饲喂标准日粮减少 20%日粮(能量摄入为营养需要量的 80%组)。预饲 1 周后进入试验期,试验从产前第 28 天开始到产后第 56 天结束。分娩后各组均按中国奶牛饲养标准(2000)配制相同日粮,日粮配制及营养组成参见文献[4]。精料补充料饲喂量依产奶量供给(既每产 3 kg 奶增加 1 kg 精料),自由摄食干草。

### 1.3 样品的采集与分析

1.3.1 肝脏活体样品采集 分别于产前第 28、14 天及产后第 1、14、28、56 天,采用细针吸引技术采取肝组织 50~100 mg,用生理盐水漂洗后装入塑料瓶存于液氮中待测。

1.3.2 血液样品采集 分别于产前第 28、14 天及产后第 1、14、28、56 天,采集肝脏活体样品前,颈静脉采取血液,血样分两份,一份血用肝素抗凝(20 U 肝素/mL 血液),迅速分离血浆,-70℃保存;另一份血制备血清,-20℃保存。

### 1.4 血浆葡萄糖和血清胰岛素浓度的测定

血浆葡萄糖(GLU)采用葡萄糖氧化酶法(GOD 法)检测,检测试剂盒购自上海复兴长征医学科学有限公司;血清胰岛素(Ins)浓度采用放射免疫分析法

检测,试剂盒分别购自北京北免东雅生物技术研究所和天津协和医药科技有限公司。

### 1.5 半定量 RT-PCR 检测 IR mRNA 表达水平

根据 GenBank 发表的牛 IR 序列和牛  $\beta$ -actin 的序列,设计 2 对引物。将采集的肝脏活体样品提取总 RNA,作 200 倍稀释后测定浓度,调整总 RNA 的体积并进行逆转录,使每组、每天的样品体系 RNA 量相同,2 个 PCR 反应管中分别加入 1  $\mu$ L 的逆转录 cDNA、IR 上、下游引物和 1  $\mu$ L 的逆转录 cDNA、 $\beta$ -actin 上、下游引物。PCR 体系为 25  $\mu$ L,相同反应条件下同时扩增。分别取 5  $\mu$ L IR 和 5  $\mu$ L  $\beta$ -actin PCR 产物在 2.0% EB 染色的琼脂糖凝胶上点于同一孔中,电泳。图像处理及灰度分析用 TANNONG 凝胶分析软件进行,根据 IR 和  $\beta$ -actin PCR 产物的面积比,确定样品中 IR 基因表达水平。

### 1.6 数据处理

数据均以平均值±标准差表示,用 SPSS10.0 软件进行分析,组间差异显著性用 ONE-WAY ANOVA(方差分析)进行统计分析。

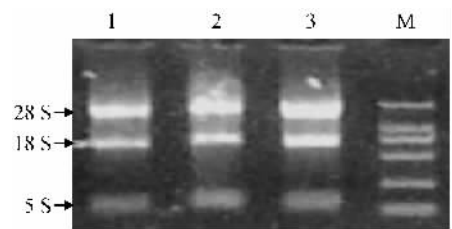
## 2 结果

### 2.1 肝脏总 RNA 提取的电泳结果

提取的总 RNA 有清晰、完整的 3 条带,见图 1。A260/A280 值为 1.8,符合实验纯度和逆转录要求。

### 2.2 干奶期奶牛不同能量水平对其肝脏 IR mRNA 表达水平的半定量 RT-PCR 测定结果

见表 1 和图 2。



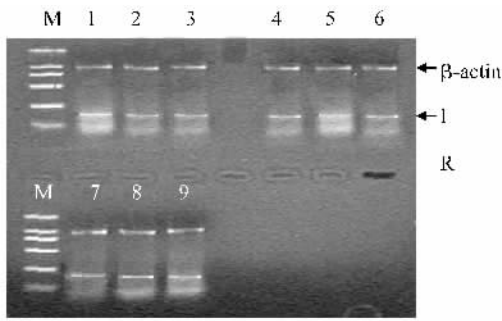
M. DNA Marker DL-2000

1~3. 提取的总 RNA

图 1 肝脏总 RNA 提取结果

Fig. 1 The total RNA from the liver

IR mRNA: -28 d~1 d,高能组奶牛肝脏 IR mRNA 表达水平始终最高,低能组的最低;14~56 d,低能组奶牛 IR mRNA 表达水平最高,高能组奶牛的最低。-14 d~28 d,组间差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ )。



M, DNA Marker DL-2000

1、2、3. 标准日粮组;4、5、6. 高能组;7、8、9. 低能组

图2 奶牛肝脏 IR mRNA 半定量 PCR 电泳

Fig. 2 Half Q-PCR products of IR mRNA in liver tissue

GLU: -28 d~56 d, 低能组奶牛血液 GLU 浓度始终高于其它两组, -14 d 组间差异显著 ( $P < 0.05$ ); 除产后 14 d, 其他时期, 高能组奶牛血浆 GLU 浓度均低于标准日粮组。

Ins: -28 d~-14 d 和 28 d~56 d, 低能组奶牛血清 Ins 浓度最低; 1 d~14 d, 低能组奶牛血清 Ins 浓度最高。-14 d 和 14 d 组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。各组奶牛血清 Ins 浓度分娩时明显增加。

### 3 讨论

胰岛素受体为细胞膜上特异识别胰岛素并与其结合起生物学效应的一种糖蛋白, 具有高度的特异性和亲和力。胞膜上的受体数量一方面处于不断合成与降解的动态平衡中, 另一方面又受各种生理或病理因素的影响而发生变化。每种细胞 IR 与胰岛素结合的程度取决于受体的数量和亲和力, 此二者又受血浆胰岛素浓度调节, 当胰岛素浓度增高时 IR 数量下降, 这种自身调节现象称为降调节<sup>[5]</sup>。肝脏是循环胰岛素清除的主要途径, 胰岛素与其受体结合实施其降血糖的作用。围产期奶牛能量代谢的特点是能量负平衡, 此时奶牛糖代谢紊乱, 血糖降低,

表 1 干奶期奶牛不同能量摄入对其肝脏 IR mRNA 表达及血液葡萄糖和胰岛素浓度的影响 ( $\bar{x} \pm SD, n=8$ )

Table 1 Effect of different energy intake on IR mRNA expression in the liver tissue, plasma concentrations of glucose and serum concentrations of insulin in periparturient cows

组别	采样时间 Day from parturition						
	-28 d	-14 d	1 d	14 d	28 d	56 d	
IR mRNA	C	1.41±0.04	1.31±0.01 <sup>a</sup>	0.76±0.10	1.02±0.01 <sup>a</sup>	0.99±0.08	1.09±0.13
	H	1.56±0.11	1.52±0.02 <sup>Ab</sup>	0.89±0.05 <sup>a</sup>	0.91±0.02 <sup>b</sup>	0.9±0.03 <sup>a</sup>	0.91±0.18
	L	1.37±0.07	1.14±0.02 <sup>Bb</sup>	0.69±0.01 <sup>b</sup>	1.17±0.03 <sup>c</sup>	1.08±0.01 <sup>b</sup>	1.25±0.16
GLU (mmol/L)	C	2.10±0.03	2.03±0.07 <sup>a</sup>	2.25±0.18	2.52±0.10	3.03±0.29	3.80±0.22
	H	2.04±0.15	1.69±0.10 <sup>b</sup>	2.10±0.28	2.57±0.09	2.71±0.14	3.64±0.20
	L	2.06±0.18	2.24±0.24 <sup>a</sup>	2.47±0.31	2.94±0.11	3.21±0.23	4.04±0.39
Ins ( $\mu$ Iu/mL)	C	10.30±0.22	7.58±0.03 <sup>a</sup>	9.09±0.38	9.32±0.16 <sup>a</sup>	8.43±0.47	8.28±0.65
	H	10.36±0.35	8.51±0.20 <sup>b</sup>	8.68±0.77	9.59±0.19 <sup>a</sup>	8.84±0.74	8.65±0.62
	L	9.38±0.50	7.25±0.08 <sup>c</sup>	10.24±1.01	10.37±0.29 <sup>b</sup>	7.93±0.55	8.09±0.83

肩标同列大写字母不同者表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 肩标同列小写字母不同者表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。C. 标准日粮组; H. 高能日粮组; L. 低能日粮组

Within a column, followed by different capital letters were significantly different ( $P < 0.01$ ); values followed by different small letters were different ( $P < 0.05$ ). C. Standard diet; H. 120% energy diet; L. 80% energy diet

导致脂肪大量动员, 易引起奶牛产后酮病, 脂肪肝等营养代谢性疾病。

产前, 高能组奶牛 IR mRNA 表达水平最高, 血清胰岛素浓度增加, 使肝脏对葡萄糖的摄取能力增强, 降低血糖。而低能组奶牛产前摄食不足, 血液游离脂肪酸显著增加, 降低肝细胞 IR 数量, 抑制胰岛素与其受体结合<sup>[6]</sup>, 血糖升高, 降低奶牛产后酮病和脂肪肝的发病率。

产后 1d, 低能组奶牛 IR mRNA 表达水平显著低于高能组, 而胰岛素水平则高于高能组, 研究证实, 长时间的胰岛素刺激会导致 IR 降解, 从而减弱胰岛素的刺激作用, 即 IR 的降调节。IR mRNA 减少, 降低 IR 合成及细胞膜的表达量, 使胰岛素敏感性降低, 降糖作用减弱。同时胰岛素浓度代偿性增加, 可抑制奶牛分娩时体脂动员, 从而缓解奶牛能量负平衡, 防止泌乳早期奶牛酮病和脂肪肝的发生<sup>[9]</sup>。

分娩时各组奶牛 IR 均呈现明显的降调节作用,减弱肝脏降糖作用,满足奶牛分娩时对葡萄糖的大量需要。

产后 14~56 d,低能组奶牛 IR mRNA 表达水平最高,这是由于低能组奶牛产后摄食显著增加,血糖升高,因而促进了 IR 基因表达增加。与 Briata 报道的人血液葡萄糖浓度升高,促进细胞水平 IR 基因表达的增加<sup>[7]</sup>相一致。产后 28~56 d,低能组奶牛胰岛素降低,上调 IR mRNA 表达。但血液胰岛素浓度降低,IR 对胰岛素敏感性降低,降糖作用减弱,循环血糖增加,供给奶牛产后泌乳的需要。而高能组奶牛在产后 14~56 d,IR mRNA 表达减少,本课题对血液酮体和 NEFA 的研究表明,产后高能组奶牛脂肪大量动员,酮体和 NEFA 浓度显著升高,与邵建华和 Hiroki Yokoo 的研究结果一致,游离脂肪酸<sup>[6]</sup>和酮体<sup>[8]</sup>下降调节细胞表面胰岛素受体功能,降低 IR mRNA 水平及 IR 的合成。高能组奶牛 IR mRNA 表达减少,会使机体代偿性增加血液胰岛素浓度,持续高浓度的胰岛素可降低肝糖异生能力<sup>[10]</sup>,减少肝糖输出,加重能量负平衡状态。

#### 4 小结

干奶期低能饲喂奶牛,产后肝脏 IR mRNA 表达增加,有效调节血糖平衡,减少脂肪动员,缓解机体能量负平衡。

#### 参考文献:

[1] 曾民德,萧树东. 肝脏及内分泌[M]. 北京:人民卫生出版社,1995.

- [2] Haring H U. The insulin receptor: signaling mechanism and contribution to the pathogenesis of insulin resistance[J]. *Diabetologia*, 1991, 34: 848~852.
- [3] 朱文玉. 胰岛素研究的进展[J]. *生物学通报*, 1997, 32(12): 2~4.
- [4] 孙玉成,王雪莹,李红梅,等. 不同能量摄入水平对围产期奶牛肝载脂蛋白 E mRNA 丰度的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(4): 342~347.
- [5] 贺石林,李俊成,秦晓群. 临床生理学[M]. 北京:科学出版社, 2003. 553~558.
- [6] 邵建华,高妍,袁振芳,等. 游离脂肪酸抑制大鼠肝细胞胰岛素受体和胰岛素受体底物 1 酪氨酸磷酸化[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 1999, 15(6): 342~345.
- [7] Briata P, Laurino C, Gherzi R. C-myc gene expression in human cells is controlled by glucose[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 165(3): 1 123~1 129.
- [8] Yokoo H, Saitoh T, Shiraiishi S, *et al.* Distinct effects of ketone bodies on down-regulation of cell surface insulin receptor and insulin receptor substrate-1 phosphorylation in adrenal chromaffin cells[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003, 304(3): 994~1 002.
- [9] Hayirli A, Bertics S J, Grummer R R. Effects of slow-release insulin on production, liver triglyceride and metabolic profiles of holsteins in early lactation [J]. *J Dairy Sci*, 2002, 85(9): 2 180~2 191.
- [10] O'Brien R M, Granner D K. PEPCK gene as a model of inhibitory effects of insulin on gene transcription [J]. *Diabetes Care*, 1990, 13: 327~334.

## 动物疫情速递

### 博茨瓦纳口蹄疫实验室确证(后续报告)

2006年5月4日OIE收到博茨瓦纳农业部动物卫生和生产局局长Musa Fanikiso博士从哈博罗内发来口蹄疫疫情后续报告(2006年4月26日报告发生口蹄疫)。病原是SAT2血清型口蹄疫病毒。此次疫情始于2006年4月11日,于2006年4月25日确认。博茨瓦纳疫苗研究所2006年5月3日的实验室诊断(ELISA、病毒中和、病毒分离)结果确认口蹄疫系SAT2血清型口蹄疫病毒引起。从2006年4月26日到5月4日Selibe Phikwe地区(7区)发生了8起口蹄疫。感染动物(214例病例)位于公共耕作区。疫区中心位于Sekgopye,而且国际边界组成了北和东北周界。据估计感染区有25 000头牛,监测区有75 000头牛。没有证据显示该村其他地方有疫情。在6区10公里范围的监测区,5 700头牛经临床检查未发现FMD病例。8区和9区的10公里范围监测区1 400头牛的检测结果也呈阴性。目前整个7区已实施封锁,转移禁令和消毒措施也已施行。感染来源正在调查中。

### 危地马拉发生古典猪瘟

2006年5月5日危地马拉向OIE报告Mixto市Lo de Coy村的一个49头猪的猪群发生古典猪瘟。病原是古典猪瘟病毒。此次暴发始于2006年4月20日,并于2006年4月27日确认。猪群中有33头哺乳仔猪、4头育成猪、10头种猪和2头公猪。实验室诊断(PCR)于设在尼加拉瓜马那瓜的MAGA参考中心实验室进行。危地马拉采取的措施:扑杀、免疫、检疫和消毒。52头动物进行了减毒PAV-250疫苗免疫。