

饲料结构对山羊消化系统尿素转运蛋白 - B 表达的影响

杜建文¹ 孙海洲^{1*} 赵存发² 李胜利¹ 宋丽霞³

(1. 内蒙古农牧业科学院动物营养研究所, 呼和浩特 010031; 2. 内蒙古农牧业科学院, 呼和浩特 010031;
3. 内蒙古农业大学动物科学学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 本试验旨在研究饲料结构对山羊消化系统尿素转运蛋白 - B (UT-B) 表达的影响。选用 18 只装有永久性瘤胃瘘管的内蒙古白绒山羊半同胞羯羊, 随机分为 6 组 (每组 3 个重复, 每个重复 1 只羊), 45 d 后每组随机屠宰 1 只山羊, 采用蛋白质印迹分析所采集的样品中 UT-B 的表达情况, 并对 34 ku UT-B 进行相对定量分析。结果表明: 所有样品表达的 UT-B 处于 30 ~ 55 ku 且均含有 34 ku 的 UT-B; 饲料高蛋白质水平可提高前胃 (瘤胃、网胃和瓣胃)、回肠、盲肠盲囊和肾脏中 34 ku UT-B 的表达; 玉米膨化加工减少了 34 ku UT-B 在回肠和肝脏的表达; 各组织中 34 ku UT-B 分布由高到低依次为肝脏、皱胃、网胃、瘤胃背囊、瘤胃腹囊、腮腺、瓣胃、十二直肠、盲肠、盲肠盲囊、回肠和肾脏。由此可知, 通过改变饲料结构可以调控山羊消化系统各组织中 UT-B 的表达, 为进一步研究尿素循环和机体氮代谢提供依据。

关键词: 饲料结构; 山羊; 消化系统; UT-B

中图分类号: S827

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2011)05-0875-06

尿素是动物机体蛋白质代谢的主要终产物, 它一直被认为是以脂质扩散的形式进行跨膜运动的。然而, 随着研究的深入, 人们发现在红细胞和肾集合管末端对尿素的通透率远高于简单脂质扩散, 于是广大研究者推断存在一种控制尿素转运的载体——尿素转运蛋白 (urea transporter, UT)^[1-3], 随后证明尿素跨膜转运是由载体蛋白调控的^[4]。1993 年, You 等^[5]首次从兔肾脏内髓质层分离得到尿素转运蛋白 - A2 (UT-A2) 的 cDNA, 为研究 UT 奠定了基础, 从而也对传统的尿素转运机制提出了挑战。随后, Olives 等^[6]从人骨髓中分离出了另一个 UT 家族成员——尿素转运蛋白 - B (UT-B) 的 cDNA。随着研究的深入, 人们已从大量的动物中发现了 UT 的存在, 尤其是山羊消化系统、肝脏和唾液腺^[7], 牛瘤胃^[8-9]以及绵羊消化系统^[10]。众所周知, 反刍动物饲料氮的利用率很低,

一般认为其通过大量的内源氮循环 (其中大部分以尿素的形式进行循环) 来提高氮的利用。研究发现, 饲料可以调控内源氮循环^[7-10], 而已有研究表明 UT 对尿素循环起着极其重要的作用^[1-5]。本研究拟通过蛋白质印迹 (Western Blot) 来测定饲料中玉米的加工方式和蛋白质水平对内蒙古白绒山羊消化系统 UT-B 的相对表达量, 旨在研究饲料结构对山羊消化系统 UT-B 表达的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 试验动物

选用 18 只体况良好、平均体重为 (34.95 ± 2.37) kg 的装有永久性瘤胃瘘管的内蒙古白绒山羊半同胞羯羊, 随机分为 6 组, 每组 3 个重复, 每个重复 1 只, 单栏饲养。

收稿日期: 2010-12-20

基金项目: 国家绒毛用羊产业技术体系建设 (nycytx-40); 内蒙古农牧业科技创新基金项目

作者简介: 杜建文 (1981—), 男, 河北赞皇人, 硕士研究生, 研究方向为反刍动物营养。E-mail: heihualin98@163.com

* 通讯作者: 孙海洲, 研究员, 硕士生导师, E-mail: sunhaizhou@china.com

1.2 试验饲粮和试验设计

试验饲粮参照 NRC(2007) 山羊营养需求配制。试验用玉米分为破碎(C)和膨化(E)2种,试验饲粮蛋白质含量分为低(L)、中(M)、高(H)3个水平。6组试验饲粮分别为破碎玉米低蛋白质(CL)组、破碎玉米中蛋白质(CM)组、破碎玉米高蛋白质(CH)组、膨化玉米低蛋白质(EL)组、膨化

玉米中蛋白质(EM)组和膨化玉米高蛋白质(EH)组。CM组为对照组,代谢能为维持代谢能的1.4倍。试验饲粮组成及营养水平见表1。

试验羊每天分别在06:30和18:30先粗后精等量饲喂,自由饮水,饲喂45d后每组选取1只屠宰采样。

表1 试验饲粮组成及营养水平(干物质基础)
Table 1 Composition and nutrient levels of experimental diets (DM basis)

项目 Items	组别 Groups						%
	CL	CM	CH	EL	EM	EH	
原料 Ingredients							
青干草 Green hay	87.75	58.00	50.50	87.75	58.00	50.50	
苜蓿 Alfalfa	2.25	12.00	9.50	2.25	12.00	9.50	
玉米 Corn	7.40	20.00	20.00	7.40	20.00	20.00	
小麦麸 Wheat bran	1.00	2.25	3.80	1.00	2.25	3.80	
豆粕 Soybean meal	1.10	6.25	14.20	1.10	6.25	14.20	
预混料 Premix ¹⁾	0.50	1.50	2.00	0.50	1.50	2.00	
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	
营养水平 Nutrient levels ²⁾							
代谢能 ME/(MJ/kg)	8.11	8.57	8.91	8.52	9.70	10.04	
干物质 DM	90.94	88.72	88.03	91.34	89.88	89.19	
粗蛋白质 CP	7.50	10.50	13.50	7.50	10.50	13.50	
钙 Ca	0.32	0.40	0.47	0.32	0.40	0.47	
磷 P	0.17	0.21	0.25	0.17	0.21	0.25	
钙/磷 Ca/P	1.88	1.90	1.88	1.88	1.90	1.88	
中性洗涤纤维 NDF	61.54	49.39	44.60	61.54	48.20	44.59	
酸性洗涤纤维 ADF	30.65	24.93	22.44	30.71	24.30	22.77	
中性洗涤纤维/酸性洗涤纤维 NDF/ADF	1.00:0.50	1.00:0.51	1.00:0.50	1.00:0.50	1.00:0.50	1.00:0.51	
非纤维性碳水化合物 NFC	23.56	32.54	34.32	23.56	32.54	34.32	
中性洗涤纤维/非纤维性碳水化合物 NDF/NFC	1.00:0.38	1.00:0.66	1.00:0.77	1.00:0.38	1.00:0.68	1.00:0.77	
瘤胃可降解蛋白质 RDP	4.34	5.94	8.90	4.34	5.94	8.90	
瘤胃非降解蛋白质 UDP	3.15	4.51	4.57	3.15	4.51	4.57	
瘤胃可降解蛋白质/瘤胃非降解蛋白质 RDP/UDP	1.00:0.73	1.00:0.76	1.00:0.77	1.00:0.73	1.00:0.76	1.00:0.77	

¹⁾ 每千克预混料含有 One kilogram of premix contains: VA 55 000 IU, VD₃ 13 695 IU, VE 220 mg, Co 3 mg, Fe 1 173 mg, Cu 135 ~ 226 mg, Zn 847 ~ 1 297 mg, 水分 moisture ≤ 10%。

²⁾ RDP、UDP 为计算值,其他营养水平均为实测值。RDP and UDP are calculated values, and the other nutrient levels are measured values.

1.3 样品采集

试验羊宰前禁食 24 h, 禁水 12 h, 取腮腺、瘤胃背囊和腹囊、网胃、瓣胃、皱胃、十二指肠(近端)、回肠、盲肠盲囊和盲肠(回盲结合部后 30 cm

处)、肝脏、肾脏, 用冷生理盐水冲洗。瘤胃黏液层要从肌层剥离, 肠道要把浆膜和肌膜从黏膜上剥离, 样品进行编号(表 2)后 -80 °C 保存待测。

表 2 各组试验羊样品编号

Table 2 The number of the samples in various organs of the goats in each group

样品 Samples	组别 Groups					
	CL	CM	CH	EL	EM	EH
腮腺 Parotid salivary gland	1	13	25	37	49	61
瘤胃背囊 Ventral rumen	2	14	26	38	50	62
瘤胃腹囊 Dorsal Rumen	3	15	27	39	51	63
网胃 Reticulum	4	16	28	40	52	64
瓣胃 Omasum	5	17	29	41	53	65
皱胃 Abomasum	6	18	30	42	54	66
十二指肠 Duodenum	7	19	31	43	55	67
回肠 Ileum	8	20	32	44	56	68
盲肠盲囊 Blind sac of cecum	9	21	33	45	57	69
盲肠 Cecum	10	22	34	46	58	70
肝脏 Liver	11	23	35	47	59	71
肾脏 Kidney	12	24	36	48	60	72

1.4 兔抗羊多克隆抗体的制备和样品中 UT-B 的测定

多克隆抗体制备参照 Ludden 等^[10]的方法, 免疫用多肽序列为: CEENRIFYLQSTKRTV, 根据 Smith 等^[11]描述的山羊 UT-B 的 ACP18881 序列合成的。

蛋白质印迹检测各样品中 UT-B 的表达情况, 然后将 CL 组试验羊的腮腺目的蛋白(34 ku)条带的灰度值定义为基准值(1.000), 计算各组织的目的蛋白(34 ku)的相对表达量(目的蛋白条带的灰度值/基准值)。

1.5 数据处理

所有数据用 Excel 软件进行整理。

2 结果

图 1 是所有被测样品中 UT-B 的免疫印迹图, 各试验羊组织均表达了 34 ku 的 UT-B, 然而所有检测的腮腺样品中均表达了 30、50 和 54 ku 的 UT-B, 前胃(瘤胃、网胃和瓣胃)样品中表达了 30 ku 的 UT-B, 肝脏样品中表达了 54 ku 的 UT-B。此外, 一些样品中还表达了其他分子质量的 UT-B, 比如 5 和 6 号(CL 组的瓣胃和皱胃)样品中表达了 40 ku 的 UT-B、30 号(CH 组的瓣胃)样品中表达了 50 ku 的 UT-B。研究认为, 32 ~ 36 ku 的 UT-B

为未糖基化的 UT-B, 可调控尿素双向跨消化道(瘤胃壁)转运^[8], 因此本研究仅对 34 ku UT-B 的相对表达量进行分析。各组试验羊消化系统的 34 ku UT-B 的相对表达量差异性如表 3 所示。相对定量分析结果: 组间比较发现, CL 组 34 ku UT-B 的相对表达量最高, EM 组次之, CM 组最低; 组织间比较发现, 34 ku UT-B 的相对表达量以肝脏最高, 次之为皱胃、网胃、瘤胃背囊、腹囊、腮腺、瓣胃, 随后是十二直肠、盲肠、盲肠盲囊、回肠, 肾脏最低。

3 讨论

UT-B 是哺乳动物体内存在的尿素易化转运的载体, 研究认为 UT-B 是 Na- 依赖性的尿素易化转运系统。据报道, 羔羊的十二指肠、回肠和结肠^[11]以及牛的瘤胃腹部^[12]均存在 47 ku 的 UT-B。Marini 等^[13]研究发现, 羔羊肝脏含有 45 ku 的 UT-B。Ludden 等^[10]研究发现, 羊腮腺、瘤胃背腹囊、网胃、小肠、盲肠、结肠、肝脏和肾脏中都含有 32 和 47 ku 的 UT-B, 瘤胃、网胃和肝脏中 32 ku 的 UT-B 较多, 而在肠道中 47 ku 的 UT-B 较多, 肾脏中 2 种分子质量的 UT-B 接近, 并认为 32 ku 为未糖基化的 UT-B, 47 ku 为 UT-B 的 N 端糖基化形式, 这类似于 Stewartg 等^[8]应用 RT-PCR 技术推断

出牛瘤胃 UT-B 为 43 ~ 54 ku, 利用尤斯灌流室技术发现 UT-B 调控尿素双向跨瘤胃壁转运, 并发现 36 ku 为未糖基化的 UT-B。Simmons 等^[9] 研究饲喂青贮基础饲料和精料基础饲料的利木赞杂交肉牛发现, 饲喂精料基础饲料的肉牛瘤胃 UT-B

mRNA 含量显著增加, 表明 UT-B 可以调节氮代谢平衡。本研究所测样品中 UT-B 基本在 30 ~ 54 ku 且各组织均含有 34 ku 的 UT-B, 其他分子质量的 UT-B 的表达与否因饲料和组织不同呈现差异。

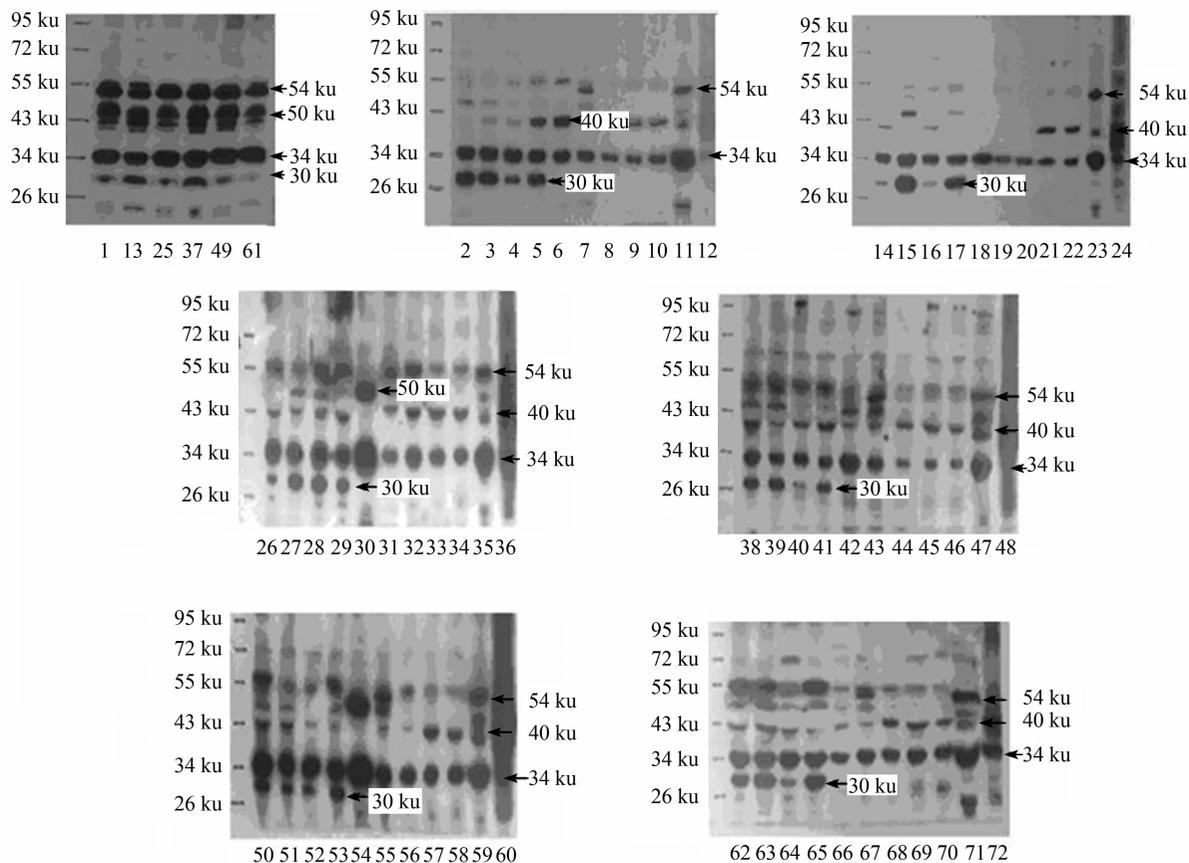


图 1 各组试验羊不同组织的蛋白质印迹分析结果

Fig. 1 The results of Western Blot analysis in various organs of the goats in each group

表 3 各组试验羊消化系统 34 ku UT-B 的相对表达量

Table 3 The relative expression quantity of 34 ku UT-B in digestive system of the goats in each group

样品 Samples	组别 Groups					
	CL	CM	CH	EL	EM	EH
腮腺 Parotid salivary gland	1.000	0.883	0.923	0.986	1.001	1.017
瘤胃背囊 Ventral rumen	1.137	0.851	0.925	0.989	1.152	1.012
瘤胃腹囊 Dorsal rumen	1.149	0.932	0.931	0.999	1.110	0.924
网胃 Reticulum	1.280	0.825	0.982	1.026	1.126	0.945
瓣胃 Omasum	1.096	0.755	0.857	0.930	1.187	0.907
皱胃 Abomasum	2.042	0.847	0.863	0.399	1.841	1.565
十二指肠 Duodenum	0.486	0.399	0.789	0.589	0.800	0.915
回肠 Ileum	0.807	0.441	0.566	0.574	0.769	0.206
盲肠盲囊 Blind sac of cecum	0.584	0.472	0.644	0.780	0.777	0.342
盲肠 Cecum	0.579	0.488	0.715	0.732	0.844	0.380
肝脏 Liver	1.682	1.411	1.724	1.196	0.958	1.376
肾脏 Kidney	0.666	0.468	0.142	0.763	0.625	0.556

研究表明,饲喂低蛋白质饲料会增加反刍动物消化道对尿素的通透性^[9,13-14]。一般认为,低蛋白质饲料可以促进动物消化道及其他组织中 UT 的表达。Inoue 等^[12]研究发现,低蛋白质饲料促进大鼠肾脏 UT-B 的表达,低蛋白质饲料使大鼠结肠 UT-B 表达稍有降低,高蛋白质饲料则变化不显著。饲喂高蛋白质饲料的奶牛瘤胃背囊乳头中 UT-B 表达增强^[14],这与本研究结果相同。本研究还发现,瘤胃腹囊、网胃、瓣胃、回肠、盲肠盲囊以及肾脏中的 34 ku UT-B 的相对表达量随着饲料蛋白质水平增加而增加。本研究中,饲料结构对腮腺 UT-B 表达的影响最小,皱胃最大;饲料高蛋白质水平可促进前胃、回肠、盲肠及盲囊和肾脏中 34 ku UT-B 的表达,对十二直肠起抑制作用,对腮腺、皱胃和肝脏的影响较小,玉米膨化加工只降低了 34 ku UT-B 在回肠和肝脏的表达;从组织层次看,34 ku UT-B 相对表达量最高为肝脏,次之为皱胃、网胃、瘤胃、腮腺、瓣胃,随后为肠道组织,肾脏最低。因此,可以认为饲料结构可调控 34 ku UT-B 在羊消化系统中的表达。

4 结 论

在综合考虑饲料蛋白质水平和碳水化合物的形式对内蒙自绒山羊瘤胃内环境的影响的情况下,通过改变饲料结构可以调控羊消化系统各组织中的 UT-B 的表达,为进一步研究尿素循环和机体氮代谢提供依据。

参考文献:

- [1] CHOU C L, KNEPPER M A. Inhibition of urea transport in inner medullary collecting duct by phloretin and urea analogues [J]. *American Journal of Physiology*, 1989, 257:F359 - F365.
- [2] CHOU C L, SANDS J M, NONOGUCHI H, et al. Concentration dependence of urea and thiourea transport in rat inner medullary collecting duct [J]. *American Journal of Physiology*, 1990, 258:F486 - F494.
- [3] STAR R A. Apical membrane limits urea permeation across the rat inner medullary collecting duct [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1990, 86:1172 - 1178.
- [4] SMITH C P, ROUSSELET G. Facilitative urea transporters [J]. *Journal of Membrane Biology*, 2001, 183(1):1 - 14.
- [5] YOU G, SMITH C P, KANAI Y, et al. Cloning and characterization for the vasopressin-regulated urea transporter [J]. *Nature*, 1993, 365:844 - 847.
- [6] OLIVES B, NEAU P, BAILLY P, et al. Cloning and functional expression of a urea transporter from human bone marrow cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269:31694 - 31652.
- [7] STOHRER R M, AUSTIN K J, ATKINSON R L, et al. Expression and distribution of urea transporter-B in lambs fed increasing dietary protein [J]. *Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science*, 2007, 58:47 - 50.
- [8] STEWART G S, GRAHAM C, CATTELL S, et al. UT-B is expressed in bovine rumen: potential role in ruminal urea transport [J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2005, 289:R605 - R612.
- [9] SIMMONS N L, CHAUDHRY A S, GRAHAM C, et al. Dietary regulation of ruminal bovine UT-B urea transporter expression and localization [J]. *Journal of Animal Science*, 2009, 87(10):3288 - 3299.
- [10] LUDDEN P A, STOHRER R M, AUSTIN K J, et al. Effect of protein supplementation on expression and distribution of urea transporter-B in lambs fed low-quality forage [J]. *Journal of Animal Science*, 2009, 87:1354 - 1365.
- [11] SMITH C P, SHAYAKUL C, YOU G, et al. Molecular characterization and regulation of expression of the vasopressin-regulated urea transporter [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1995, 6:3291. (Abstr)
- [12] INOUE H, KOZLOWSKI S D, KLEIN J D, et al. Regulated expression of renal and intestinal UT-B urea transporter in response to varying urea load [J]. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 2005, 289:F451 - F458.
- [13] MARINI J C, KLEIN J D, SANDS J M, et al. Effect of nitrogen intake on nitrogen recycling and urea transporter abundance in lambs [J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82:1157 - 1164.
- [14] MARINI J C, VAN AMBURGH M E. Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers [J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81:545 - 552.

Effects of Dietary Structure on Urea Transporter-B Expression in Digestive System of Goats

DU Jianwen¹ SUN Haizhou^{1*} ZHAO Cunfa² LI Shengli¹ SONG Lixia³

(1. *Institute of Animal Nutrition, Inner Mongolian Academy of Agriculture and Animal Husbandry, Huhhot 010031, China;*

2. *Inner Mongolian Academy of Agriculture and Animal Husbandry, Huhhot 010031, China;*

3. *College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)*

Abstract: This study was designed to investigate the effects of dietary structure on urea transporter-B (UT-B) expression in digestive system of goats. A total of 18 Inner Mongolia white cashmere goats with the same father were divided into 6 groups with 3 replicates per group and 1 goat per replicate. After 45 days, one goat was selected and euthanized in each group in a completely randomized design, and samples were taken for Western Blot for UT-B and for evaluation of the relative quantity of the 34 ku UT-B. The results showed as follows: the 30 to 55 ku UT-B were shown in all samples and all of them contained 34 ku UT-B; the expression of 34 ku UT-B in forestomach (rumen, reticulum and omasum), ileum, blind sac of cecum and kidney were improved by high dietary protein level, but extrusion corn lowered the UT-B expression in the ileum and liver. Among organizations, the order of the intension for 34 ku UT-B is liver, abomasum, reticulum, ventral rumen, dorsal rumen, parotid salivary gland, omasum, duodenum, cecum, blind sac of cecum, ileum and kidney. Therefore, the expression of UT-B in the digestive system of goats can be adjusted by the variation of dietary structure, and it can provide a far-reaching foundation of research in urea cycle and nitrogen metabolism. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(5):875-880]

Key words: dietary structure; goats; digestive system; UT-B