

游离亚麻酸对奶牛乳腺上皮细胞脂肪酸代谢 相关基因 mRNA 转录的影响

胡 茵^{1,2} 王加启^{1,2*} 李发弟¹ 卜登攀² 李喜艳² 周凌云²

(1. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193)

摘 要: 本研究以体外培养的奶牛乳腺上皮细胞为模型, 研究外源添加不同浓度游离 α -亚麻酸(LNA)对细胞脂肪酸代谢相关靶基因 mRNA 转录水平的影响。体外培养的奶牛乳腺上皮细胞, 以牛血清白蛋白(BSA)代替胎牛血清为对照组, BSA 与不同浓度 LNA 为试验组, 试验培养 36 h, 采用 RT-qPCT 对目的基因进行定量, 检测其表达丰度。结果显示: 1) 0.625~5.000 $\mu\text{mol/L}$ LNA 极显著上调了脂肪酸转运基因中 CD36 的表达 ($P < 0.01$), 而较高浓度 ($\geq 5 \mu\text{mol/L}$) 的 LNA 下调了另 2 种转运蛋白, 即长链酰基辅酶 A 合成酶-1 基因 (ACSL1) 和脂肪酸结合蛋白-3 (FABP3) 基因的表达 ($P < 0.01$); 2) LNA 对奶牛乳腺上皮细胞脂肪酸合成相关基因表达丰度的影响具有剂量效应, 较高浓度 ($\geq 5 \mu\text{mol/L}$) 的 LNA 极显著降低脂肪酸合成酶 (FASN) 基因和硬脂酰去饱和酶 (SCD) 基因 mRNA 转录水平 ($P < 0.01$); 3) LNA 的浓度对过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPARG) 基因的 mRNA 转录水平没有显著影响 ($P > 0.05$), 但所有浓度的 LNA 均极显著降低了固醇调节元件结合蛋白-1 (SREBF1) 基因的 mRNA 转录水平 ($P < 0.01$)。本试验结果证实, 长链脂肪酸 LNA 对乳腺上皮细胞脂肪酸关键合成酶的基因转录具有抑制作用, 而 CD36 在长链脂肪酸转运进入奶牛乳腺上皮细胞的过程中具有重要作用。

关键词: 牛乳腺上皮细胞; 亚麻酸; 脂肪酸; 摄取与转运; 内源合成; 硬脂酰去饱和酶

中图分类号: S852.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2010)05-1342-08

随着生活水平的逐步提高, 生产具有优质乳脂组成的牛奶是未来健康食品的发展趋势。而牛奶乳脂中不同分子量、饱和度的甘油三酯是由数量和种类繁多的脂肪酸 (fatty acids, FA) 构成。短链和中链 FA (C4~C16) 占乳中 FA 含量的 40%~50%, 它们几乎全部来源于乳腺的内源合成; 而少量中链 FA 和几乎所有长链 FA ($\geq C16$) 则主要是从血液摄取进入乳腺^[1]。在过去的近 10 年中, 大量与反刍动物乳脂合成与分泌相关的基因备受关注, 并不断被研究人员所发现和鉴定。同时, 牛基因序列和功能注解结合定量 PCR (qPCR) 技术已经成为一种高精度分析基因表达的有效工具^[2], 从而能够从分子水平上研究改变乳腺的脂肪代谢对乳脂产生的作用。这些受到关注的候选基因主要包括 FA 摄取、内源合成、去饱和以及酯化等方面的相关酶基因^[3]。以往的功能型基因组学研究已证明, 作为细胞代谢

长期调节机制的主要途径之一, 基因表达的转录调控研究是至关重要的^[4]。长链脂肪酸 (LCFA) 会改变奶牛乳腺上皮细胞短链和中链脂肪酸的内源合成, 以及相关酶基因的表达^[5-6]。目前, 国内外在此方面的研究还非常有限, 许多推断和假设还需要更进一步的试验证明。

α -亚麻酸 (c9c12c15C18 : 3, 简称 C18 : 3; LNA) 属 ω -3 系多不饱和 LCFA, 是维系人体进化、保持人体健康的必需脂肪酸。LNA 具有很强的增长智力, 保护视力, 降低血脂、胆固醇, 延缓衰老, 抗过敏, 抑制癌症的发生和转移等功效。泌乳奶牛瘤胃后灌注 LNA 至 120 g/d 不会影响 4% 校正乳产量, 但改变了乳中 FA 组成, 增加了乳脂中 LNA 含量, 而减少了 C4 : 0、C14 : 0 和 C16 : 0 的含量^[7]。在以往的研究中, 还未见有关于 LNA 对乳腺上皮细胞 FA 功能基因影响的报道。本研究以体外培养

收稿日期: 2010-04-16

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助 (nycytx-04-01); 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所基本科研专项资金项目 (2010jc-3-2)

作者简介: 胡 茵 (1979—), 女, 湖北武汉人, 博士, 主要从事反刍动物营养方面研究。E-mail: wuhan_hh@126.com

* 通讯作者: 王加启, 研究员, 博士生导师, E-mail: Wang-jia-qi@263.net

的奶牛乳腺上皮细胞为模型,以 LNA 为代表,研究外源添加 LCFA 对奶牛乳腺上皮细胞 FA 摄取与转运基因 [CD36、长链酰基辅酶 A 合成酶 - 1 (ACSL1)和脂肪酸结合蛋白 - 3 (FABP3)]、内源合成基因 [脂肪酸合成乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACACA)、脂肪酸合成酶 (FASN)]、FA 去饱和酶基因 [硬脂酰去饱和酶 (SCD)] 和网络调控基因 [过氧化物酶体增殖物激活受体 - α (PPARA)、过氧化物酶体增殖物激活受体 - γ (PPARG) 和固醇调节元件结合蛋白 - 1 (SREBF1)] 等相关基因表达的影响。为进一步研究 LCFA 对奶牛乳腺中 FA 转运、合成以及对乳腺上皮细胞调控功能的影响提供参考。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

基础培养基是 DMEM/F12 (Gibco, 体积比为 1 : 1) 添加 10% FBS (Gibco, 10099 - 141); 诱导培养基是基础培养基添加孕酮 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、氢化可的松 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、转铁蛋白 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、表皮生长因子 (10 ng/mL)、胰岛素溶液 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、雌激素 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、去除 FA 牛血清白蛋白 (BSA) 等, 试剂均购自 Sigma 公司; 0.25% 的胰蛋白酶和 0.02% EDTA 溶液。

添加游离脂肪酸 C18 : 3 标准溶液购自众意泰 (Larodan, 瑞典) 公司, 使用无水乙醇 (Sigma) 配制 成 1 mol/L 的储备液于 - 80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存, 使用时用培养基配置成最终浓度进行添加。

采用 QIAGEN 试剂盒 (RNeasy[®] Mini Kit, No. 74106) 提取细胞 RNA, 天根试剂盒 (Cat KR 103 - 04) 进行反转录, ABI 定量试剂 (SYBR[®] Green, No. 0910187) 进行表达丰度定量。

1.2 试验材料

将冻存的奶牛乳腺上皮细胞^[8], 使用基础培养基悬浮, 并以大于 1×10^5 个/孔的数量接种于培养皿 (Corning, 430165) 中, 置于 38 $^{\circ}\text{C}$ 的 5% CO_2 培养箱中培养至细胞生长达 80% ~ 90% 时, 用 0.25% 胰酶 - 0.02% EDTA 消化制成细胞悬液; 细胞悬液以 1×10^4 个/孔的数量种于 12 孔板中, 采用诱导培养基培养至细胞生长达 80% ~ 90% 时, 使用 BSA (1 g/L) 替代诱导培养基中的 FBS, 不添加 C18 : 3 作为空白对照组, 0.625、2.500、5.000、10.000 和 20.000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 添加 C18 : 3 分别作为试验组, 继续培养 36 h 后提取细胞 RNA, 每个处理 3 个重复,

整体试验重复 2 次。

1.3 定量方法

细胞 RNA 的提取完全参照德国 QIAGEN 试剂盒说明书; 采用分光光度计 (NanoDrop 1000) 测定提取 RNA 浓度及 $\text{OD}_{260/280}$, 样品浓度均保持在 150 ~ 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$, $\text{OD}_{260/280}$ 测定值在 1.8 ~ 2.0。反转录时采用 800 ng RNA/20 μL 体系, 参照天根试剂盒说明书, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min。反转录结束后采用分光光度计 (NanoDrop 1000) 测定 cDNA 浓度和 $\text{OD}_{260/280}$ 。

采用相对定量方法, 以核糖体蛋白基因 (RPS9) 为参照基因, 对目的基因 mRNA 表达丰度进行测定, 这些基因包括: 脂肪酸合成关键基因 ACACA 和 FASN 基因; SCD 基因; 脂肪酸转运蛋白的 ACSL1、CD36 和 FABP3 基因; 以及代谢调控网络基因 PPARA、PPARG 和 SREBF1 基因。定量仪器为 ABI 7500, 染料 SYBR[®] Green 方法; 程序采用: 50 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s; Tm, 35 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 40 s; 40 循环。溶解曲线均为单一峰值。

1.4 数据处理

定量结束后自动生成报告, 采用文献中相对定量 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法^[10] 对试验数据进行数据计算和整理。使用 SAS 9.0 软件 ANOVA 程序对数据进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著水平, $P < 0.01$ 为极显著水平。

2 结 果

图 1 显示了 LNA 对奶牛乳腺上皮细胞脂肪酸转运酶基因表达的影响。相比不添加 LNA 的对照组, 外源添加 0.625、2.500 和 5.000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 LNA 极显著上调了 CD36 mRNA 转录水平 ($P < 0.01$), 而 > 5.000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 浓度的 LNA 对 CD36 mRNA 转录水平则没有显著影响 ($P > 0.05$)。较高添加浓度 (≥ 5.000 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 的 LNA 极显著抑制转运基因 ACSL1 和 FABP3 的转录 ($P < 0.01$)。

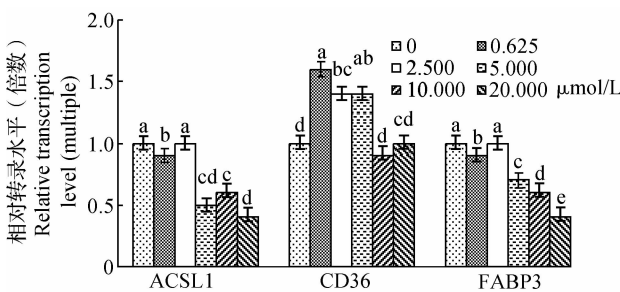
外源添加 LNA 对 FA 合成基因 ACACA 和 FASN, 以及 SCD 基因 mRNA 转录水平的影响具有剂量效应 (图 2)。较低浓度 (0.625 $\mu\text{mol}/\text{L}$) LNA 对 ACACA 基因的表达没有显著影响 ($P > 0.05$), 随浓度增加, 2.500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ LNA 极显著上调了 ACACA 基因的表达丰度 ($P < 0.01$); 而 5.000 和 20.000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ LNA 则极显著抑制 ACACA 基因表达 ($P < 0.01$)。随着 LNA 添加浓

度的变化, FASN 和 SCD 基因的表达变化一致。较高浓度的 LNA ($\geq 5.000 \mu\text{mol/L}$) 极显著降低

FASN 和 SCD 的 mRNA 转录水平 ($P < 0.01$), 其中对 SCD 的影响表现最为明显。

表 1 qPCR 定量引物及反应条件
Table 1 Primer sequence and reactive condition of qPCR

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank No.	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	Tm/°C	长度 Length/bp	参考文献 References
ACACA	NM_174224	5'-TCAGGGACTGCCGAAACATT 3'-TCAGGGACTGCCGAAACATT	53	144	[8]
ACSL1	TC264053	5'-GTGGGCTCCTTTGAAGAACTGT 3'-ATAGATGCCTTTGACCTGT- TCAAAT	56	120	[2]
CD36	BC103112	5'-CCTCTTGGCAACCACCTTTCA 3'-GCAATGAGCCACAGTTTCG	55	113	本文 This text
FABP3	DN518905	5'-GAACTCGACTCCCAGCTTGAA 3'-AAGCCTACCACAATCATCGAAG	53	102	[2]
FASN	AY343889	5'-GTTTGACGCTTCCTTCTTCG 3'-GAAGCCTCAGAGCCACTCAC	56	174	本文 This text
PPARA	AF229356	5'-CGGTGTCCACGCATGTGA 3'-TCAGCCGAATCGTTCTCTCTAAA	53	56	[9]
PPARG	NM_181024	5'-GATAAAGCGTCAGGGTTCCA 3'-CCTGATGGCATTATGAGACA	53	198	本文 This text
SCD	NM_173959	5'-TCCTGTTGTTGTGCTTCATCC 3'-GGCATAACGGAATAAGGTGGC	60	101	本文 This text
SREBF1	AB355703	5'-CGCTCTCCATCAATGACAA 3'-TTCAGCGATTTGCTTTTGTG	53	188	本文 This text
R9	DT860044	5'-ATGAGGGCAAGATGAAGCTG 3'-ATGAAGGACGGGATGTTTAC	53	181	本文 This text



标注不同字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), 标注相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$). 下图同。

Values with different letter superscripts mean significant difference ($P < 0.01$), while with the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

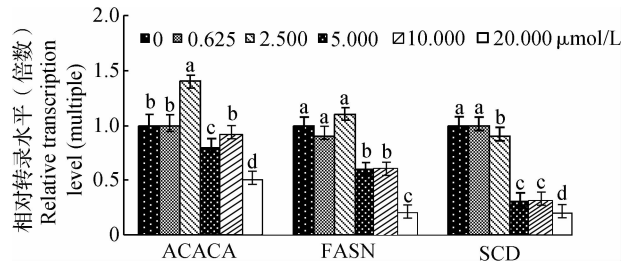


图 2 LNA 对奶牛乳腺上皮细胞脂肪酸合成关键基因和去饱和酶基因转录的影响

Fig.2 Effects of LNA on the transcription of fatty acid biosynthesis and stearoyl-CoA desaturase genes in mammary epithelial cells of daily cows

图 3 显示了 LAN 对网络调控基因转录水平的影响。尽管显著性差异分析结果显示 5.000 和 20.000 $\mu\text{mol/L}$ LNA 极显著抑制了 PPARG 的表达 ($P < 0.01$), 但考虑试验误差和整体添加浓度结果, 认为 PPARG 基因在 20.000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内对 LAN 处理不敏感。与之相反, SREBF1 则表现出对 LNA 处理的极度敏感, 其表达水平随 LNA

图 1 LNA 对奶牛乳腺上皮细胞脂肪酸转运酶基因转录的影响

Fig.1 Effects of LNA on the transcription of fatty acid intracellular channel genes in mammary epithelial cells of daily cows

添加浓度的增加而极显著下调($P < 0.01$)。而同为过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)家族的PPARA的转录水平随LNA浓度的增加呈现出先上升后下降的变化,5.000和20.000 $\mu\text{mol/L}$ LNA极显著抑制PPARA基因的转录水平($P < 0.01$)。

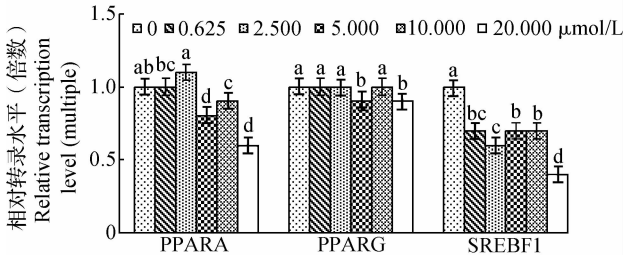


图3 LNA对奶牛乳腺上皮细胞脂肪代谢调控基因转录的影响

Fig.3 Effects of LNA on the transcription of fatty acid metabolism genes in mammary epithelial cells of daily cows

3 讨论

3.1 FA摄取与转运基因

奶牛乳腺细胞摄取FA是一个复杂而协同的机制,需要多种基因或蛋白的参与^[4]。研究已证明质膜蛋白脂肪酸结合蛋白(FABP)和脂肪酸转移酶(FAT/CD36)为FA的转运载体^[11],同时,CD36与长链酰基辅酶A合成酶(ACSL)和FABP具有协同作用^[4]。由于LCFA进入奶牛乳腺主要依赖转运体系,因此,对于LCFA的研究,应更加关注转运基因的变化。

脂膜蛋白CD36是一个多功能的清道夫受体,是一种在质膜上存在的LCFA转运载体;CD36是反刍动物乳腺FA结合蛋白和LCFA的转运蛋白,结合LCFA并帮助LCFA转运进入细胞;CD36的缺乏和过度表达都会影响FA的摄取^[12-16]。在正常状态下,随奶牛泌乳过程CD36 mRNA表达增加^[4]。尽管许多研究认为CD36在乳脂分泌过程中扮演重要角色,但Bionaz等^[4]则认为CD36转运FA进入奶牛乳腺上皮细胞的作用更为重要。在以往的研究中发现,与对照组相比,一定浓度的辛酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、t10c12CLA和C20:5均能显著或极显著增加CD36 mRNA的转录水平^[6,17-18]。本研究结果与前人的研究一致,0.625、2.500和5.000 $\mu\text{mol/L}$ 的LNA能极显著增加CD36 mRNA的转录水平($P < 0.01$),而 $> 5.000 \mu\text{mol/L}$ 浓度的LNA对CD36 mRNA转录

水平则没有显著影响($P > 0.05$)。因此,更进一步证明CD36在LCFA(包括饱和FA和多不饱和FA)转运进入奶牛乳腺上皮细胞的过程中发挥了重要作用。

FABP指脂质结合蛋白转运家族,是一组结合LCFA的胞质蛋白质,在很多组织的FA摄取和转运过程中起作用。CD36会与细胞内FABP发生协同作用,在乳腺上皮细胞膜上完成对FA的转运^[19]。越来越多的研究证明FABP的多个成员可以选择性的直接与相对应的核受体结合,形成LCFA代谢的信号通路^[20]。其中,FABP3在乳脂合成中起主要作用,FABP3能够大量结合棕榈酸、油酸、硬脂酸,并与ACSL1和脂肪酸转运蛋白家族SLC27A6协作引导LCFA酯化形成乳中甘油三酯(TAG)^[2]。奶牛乳腺中FABP3 mRNA表达丰度相比其他异构体高,且随泌乳的上调可达到80倍^[4]。在体外试验中,棕榈酸和硬脂酸显著增加了FABP3的mRNA丰度;相比之下,t10c12CLA和c9C18:1降低了FABP3的表达^[6]。同时,奶牛瘤胃后灌注t10c12CLA减少了乳腺组织脂蛋白脂肪酶(LPL)和FABP基因mRNA的表达量^[21]。总结以往的研究结果,饱和LCFA会增加FABP3在奶牛乳腺或乳腺上皮细胞中FABP3的mRNA丰度,但单不饱和或多不饱和LCFA则降低FABP3的mRNA丰度。由于LNA是多不饱和脂肪酸(PUFA),因此,本试验结果FABP3的转录水平与LNA的浓度具有依赖性,高浓度($\geq 5 \mu\text{mol/L}$)的LNA会抑制FABP3基因表达这一结果是与以往研究相吻合的。

ACSL在从脂肪酸到复杂的脂质合成和贮存通路以及脂肪酸氧化通路中都起到一定作用,能够促进哺乳动物长链脂肪酸转运^[22-23]。作为5个家族成员其中的ACSL1的存在与TAG的合成紧密相关,大量试验证明ACSL1能活化外源FA和内源合成的FA,为TAG的合成和磷脂(PL)的内源合成提供酰基辅酶A^[22,24]。哺乳动物细胞中,脂肪酸转运蛋白1(SCL27A1)和ACSL1都会刺激或调控脂肪酸通过质膜的转运^[23]。对奶牛不同时期的基因定量分析发现,ACSL1 mRNA占奶牛乳腺ACSL家族基因表达的主体,随泌乳其表达上调大于4倍,在乳脂合成过程中具有重要作用^[4]。在脂肪生成和氧化时,ACSL1 mRNA转录增加^[24]。Kadegowda等^[6]发现ACSL1的基因表达不受FA(C16:0、C18:0、c9C18:1、t10C18:1、t10c12CLA和C20:5)处理的影响。但在本试验中,ACSL1的

mRNA 转录与 FABP3 有着一致的现象,低浓度($< 2.500 \mu\text{mol/L}$)的 LNA 对 ACSL1 的 mRNA 转录水平没有趋势性的影响,但高浓度($\geq 5.000 \mu\text{mol/L}$)的 LNA 会极显著抑制 ACSL1 的基因表达($P < 0.01$)。这一结果与 Kadegowda 等^[6]的试验不一致,可能与 FA 的种类、浓度、处理时间以及细胞的种类均有关系。

3.2 FA 内源合成基因

ACACA 和 FASN 是奶牛乳腺 FA 合成的 2 个关键酶^[25]。奶牛乳腺中 ACACA 的基因表达量相对 FASN 较高,但除了表达丰度外,2 种基因的表达随泌乳过程是同步的^[4]。奶牛瘤胃后灌注 t10c12CLA 降低乳腺组织 ACACA 和 FASN 基因 mRNA 的转录水平^[20]。同时,t10C18 : 1 减少 FASN 基因的表达,而硬脂酸和 t10c12CLA 均降低奶牛乳腺上皮细胞 ACACA 和 FASN 的基因表达^[6]。不完全相同的结果是 Peterson 等^[26]发现 $75 \mu\text{mol/L}$ t10c12CLA 处理 48 h 后会减少奶牛乳腺上皮细胞 ACACA、FASN 和 SCD 基因的表达;但硬脂酸和 c9t11CLA 的处理对这些基因的表达没有显著影响。在试验中,低浓度($\leq 2.500 \mu\text{mol/L}$)的 LNA 处理 36 h 后对 ACACA 和 FASN 基因表达丰度没有抑制作用,高剂量($\geq 5.000 \mu\text{mol/L}$)的 LNA 会显著降低这 2 个基因的 mRNA 丰度($P < 0.01$)。以往的动物试验也证明,奶牛瘤胃后灌注 LCFA(LNA)会改变乳脂组成,并显著降低乳中主要短链和中链 FA 的含量^[7,27-28]。因此,可以得到结论,一定剂量的 LCFA 会抑制短链和中链 FA 的内源合成,并且降低 FA 合成基因 ACACA 和 FASN 的表达丰度。尽管体外细胞试验与动物试验的结果是一致的,但 LCFA 是否通过抑制 FA 合成酶基因的转录和翻译来减少奶牛乳腺上皮细胞合成短链和中链 FA 的机理还需进一步的试验证明。

3.3 FA 去饱和基因

乳脂中单不饱和脂肪酸(MUFA)的合成依赖于 SCD,因为 SCD 会依次诱导 14 烷酰-、16 烷酰-和 18 烷酰-CoA 的 Δ^9 位上的双键形成^[4,29]。SCD 是一种主要的 Δ^9 去饱和酶,是 MUFA 主要合成酶,为细胞内 MUFA 合成的限速酶,也参与了胆固醇酯及脂肪酸的合成^[4]。Bionaz 等^[4]对奶牛乳腺的 45 个基因进行了定量,SCD mRNA 的丰度是所有检测基因中表达最高的,因此,认为其表达是乳脂合成的关键;SCD mRNA 的高丰度也与其他脂肪合成基因(如 ACACA、FASN)有关。也有研究证明,SCD 的多态性影响乳脂饱和度,且对中链和长

链 FA(10C~16C)的作用更加明显,这种现象很大程度上与去饱和指数的基因遗传差异有关^[2,30]。瘤胃后灌注 t10c12CLA^[21]和直接使用 t10c12CLA 处理奶牛乳腺上皮细胞^[26],都会减少 SCD 基因的表达,但硬脂酸和 c9t11CLA 处理奶牛乳腺上皮细胞对 SCD 的表达没有影响^[26]。另一体外试验发现,拥有一个或多个双键的 LCFA(c9C18 : 1、t10C18 : 1、t10c12CLA 和 C20 : 5)降低了奶牛乳腺上皮细胞 SCD mRNA 的转录,同样硬脂酸对 SCD mRNA 的丰度没有影响,而棕榈酸上调了 SCD mRNA 的转录水平^[6]。在本试验中 LNA 对 SCD mRNA 转录的影响非常显著, $\geq 5.000 \mu\text{mol/L}$ 浓度处理时,细胞中 SCD 基因表达仅为对照组的 0.3 倍甚至更低。表明 MUFA 和 PUFA 均会降低 SCD mRNA 的转录,并且这种作用与浓度有剂量效应。

3.4 网络调控基因

固醇调节元件结合蛋白(SREBP)和 PPAR 在乳脂合成基因中具有主导调控作用;网络分析的结果明确表明了 SREBP 基因 SREBF1、SREBF2 和 PPARG 基因 PPARG 在调控多数已知的乳脂合成相关基因时具有重要作用。一个包括 SREBF1、SREBF2、PPARG、胰岛素诱导基因 1(INSIG1)和 PPARGC1A 在内的转录调控和核受体网络,共同管理驱使乳脂合成基因的激活,而 SREBF1 是调节奶牛乳腺乳脂合成的中心执行者^[4]。由于研究中定量条件的限定,仅选择了 PPARA、PPARG 和 SREBF1 作为网络调控的目的基因进行了检测。

Peterson 等^[26]发现 t10c12CLA 处理 48 h 后,奶牛乳腺上皮细胞 SREBF1 的 mRNA 表达没有变化,但蛋白的活性核片段却显著减少,认为 t10c12CLA 通过抑制 SREBP1 蛋白水解活性和程序性减少脂肪合成基因的转录活性来减少乳腺乳脂合成。而 Kadegowda 等^[6]证明 c9C18 : 1、t10C18 : 1、t10c12CLA 和 C20 : 5 均降低了 SREBF1 在奶牛乳腺上皮细胞中的表达。本研究所有浓度的 LNA 均极显著降低了 SREBF1 mRNA 的转录水平($P < 0.01$),说明 SREBF1 对 PUFA 的非常敏感。Madsen 等^[5]认为 PUFA 能够通过下调 SREBPs 基因的表达来抑制作为 PPAR 的配基的脂肪合成基因的转录。

过氧化物酶激活受体是配体激活核受体亚家族,在 FA 代谢方面起到关键转录调控作用。PPARA 调控与 FA 摄取和氧化、甘油三酯合成和葡萄糖代谢等相关的重要酶基因的转录表达;而 PPARG 转录调控 FA 代谢^[31]。PPARA 表现出对

不饱和 LCFA 以及几乎所有的 LCFA-CoA 和 VL-CFA-CoA 有较高的亲和力,而不结合饱和 LCFA 或 VLCFA^[20]。一些 PUFA 特别是 ω -3FA 是 PPAR 的天然配基; ω -3FA(EPA 和 DHA)比 ω -6FA 能更有效在体内活化 PPARA^[5,32]。LNA 是 ω -3LCFA,因此,LNA 表现出能够在一定范围内上调 PPARA mRNA 转录水平。乙酸盐和辛酸盐均能够增加 PPARG 表达^[18];C16:0、C18:0、c9C18:1、t10C18:1、t10c12CLA 和 C20:5 的处理对奶牛乳腺上皮细胞 PPARG 的表达都没有显著影响^[6],这与本试验的结果完全一致。试验中 PPARG 的表达水平与 LNA 的浓度没有显著的剂量关系,PPARG 的表达水平相比其他检测基因最为平稳。

4 结 论

① 0.625、2.500 和 5.000 $\mu\text{mol/L}$ 的 LNA 能极显著上调奶牛乳腺上皮细胞 CD36 mRNA 的转录水平($P < 0.01$),因此,更进一步证明 CD36 在 LCFA(包括 SUFA 和 PUFA)转运进入奶牛乳腺上皮细胞的过程中发挥了重要作用。

② $\geq 5.000 \mu\text{mol/L}$ LNA 极显著抑制了 FA 合成关键基因 ACACA 和 FASN 的 mRNA 转录($P < 0.01$),这一结果与 LCFA 影响乳脂中短链和中链 FA 合成相吻合;同时,网络调控基因 PPARG 的表达最为稳定,SREBF1 则对 LNA 表现出非常敏感。LCFA 是否能够通过基因调控影响 FA 代谢,以及如何通过网络调控基因来抑制合成基因最终影响乳脂中 FA 组成还有待进一步探明。

参考文献:

- [1] 胡菡,王加启,李发弟,等.奶牛乳腺脂肪酸合成相关基因研究进展[J].生物技术通报,2009(10):34-38.
- [2] BIONAZ M, LOOR J J. ACSL1, AGPAT6, FABP3, LPIN1, and SLC27A6 are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation[J]. The Journal of Nutrition, 2008, 138(6):1019-1024.
- [3] SEJRSEN K, HVELPLUND T, NIELSEN M O. Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress[M]. [S. l.]: Wageningen Academic Publishers, 2006.
- [4] BIONAZ M, LOOR J J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle[J]. BMC Genomics, 2008, 9:366.
- [5] MADSEN L, PETERSEN R K, KRISTIANSEN K.

- Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids[J]. Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease, 2005, 1740(2):266-286.
- [6] KADEGOWDA A K, BIONAZ M, PIPEROVA L S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92(9):4276-4289.
- [7] KHAS-ERDENE Q, WANG J Q, BU D P, et al. Short communication: responses to increasing amounts of free alpha-linolenic acid infused into the duodenum of lactating dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(4):1677-1684.
- [8] 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.
- [9] LOOR J J, DANN H M, EVERTS R E, et al. Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function[J]. Physiological Genomics, 2005, 23(2):217-226.
- [10] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C (T)} Method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [11] HUI T Y, BERNLOHR D A. Fatty acid transporters in animal cells[J]. Frontiers in Bioscience, 1997(2):d222-d231.
- [12] ABUMRAD N A, EL-MAGHRABI M R, AMRI E Z, et al. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(24):17665-17668.
- [13] MATHER I H. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane[J]. Journal of Dairy Science, 2000, 83(2):203-247.
- [14] CAMPBELL S E, TANDON N N, WOLDEGIORGIS G, et al. A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(35):36235-36241.
- [15] SU X, ABUMRAD N A. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction[J]. Trends in Endo-

- crinology & Metabolism, 2009, 20(2):72-77.
- [16] SILVERSTEIN R L, FEBBRAIO M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior [J]. Science Signaling, 2009, 2(72):re3.
- [17] YONEZAWA T, YONEKURA S, KOBAYASHI Y, et al. Effects of long-chain fatty acids on cytosolic triacylglycerol accumulation and lipid droplet formation in primary cultured bovine mammary epithelial cells[J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(8):2527-2534.
- [18] YONEZAWA T, YONEKURA S, SANOSAKA M, et al. Octanoate stimulates cytosolic triacylglycerol accumulation and CD36 mRNA expression but inhibits acetyl coenzyme A carboxylase activity in primary cultured bovine mammary epithelial cells[J]. Journal of Dairy Research, 2004, 71(4):398-404.
- [19] BARBER M C, CLEGG R A, TRAVERS M T, et al. Lipid metabolism in the lactating mammary gland [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1997, 1347(2/3):101-126.
- [20] SCHROEDER F, PETRESCU A D, HUANG H, et al. Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription[J]. Lipids, 2008, 43(1):1-17.
- [21] BAUMGARD L H, MATITASHVILI E, CORL B A, et al. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85(9):2155-2163.
- [22] COLEMAN R A, LEWIN T M, VAN HORN, et al. Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways?[J]. The Journal of Nutrition, 2002, 132(8):2123-2126.
- [23] RICHARDS M R, HARP J D, ORY D S, et al. Fatty acid transport protein 1 and long-chain acyl coenzyme A synthetase 1 interact in adipocytes[J]. Journal of Lipid Research, 2006, 47(3):665-672.
- [24] LI L O, MASHEK D G, AN J, et al. Overexpression of rat long chain acyl-coa synthetase 1 alters fatty acid metabolism in rat primary hepatocytes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(48):37246-37255.
- [25] FOX P F, MCSWEENEY P L H. Advanced dairy chemistry, volume 2: lipids[M]. [S. l.]: Aspen Publishers, 2006.
- [26] PETERSON D G, MATITASHVILI E A, BAUMAN D E. The inhibitory effect of *trans*-10, *cis*-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1[J]. The Journal of Nutrition, 2004, 134(10):2523-2527.
- [27] LITHERLAND N B, THIRE S, BEAULIEU A D, et al. Dry matter intake is decreased more by abomasal infusion of unsaturated free fatty acids than by unsaturated triglycerides[J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(2):632-643.
- [28] DRACKLEY J K, OVERTON T R, ORTIZ-GONZALEZ G, et al. Responses to increasing amounts of high-oleic sunflower fatty acids infused into the abomasum of lactating dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(11):5165-5175.
- [29] NTAMBI J M, MIYAZAKI M. Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1 [J]. Current Opinion in Lipidology, 2003, 14(3):255-261.
- [30] BICKERSTAFFE R, JOHNSON A R. The effect of intravenous infusions of sterculic acid on milk fat synthesis [J]. The British Journal of Nutrition, 1972, 27(3):561-570.
- [31] YANG Q, LI Y. Roles of PPARs on regulating myocardial energy and lipid homeostasis[J]. Journal of molecular medicine, 2007, 85(7):697-706.
- [32] SCHMITZ G, ECKER J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids[J]. Progress in lipid research, 2008, 47(2):147-155.

Effects of Free Linolenic Acid on Transcription of mRNAs of Genes Related to Fatty Acid Metabolism in Mammary Epithelial Cells of Dairy Cows

HU Han^{1,2} WANG Jiaqi^{1,2*} LI Fadi¹ BU Dengpan² LI Xiyan² ZHOU Linyun²

(1. Faculty of Animal Science & Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the effects of free linolenic acid (LNA) on the targeted genes of mammary epithelial cells of dairy cows cultured *in vitro*, which were related to fatty acid metabolism. In the cultured epithelial cells, the control group was supplemented with BSA replacing FBS, and treatments were supplemented with both BSA and LNA at different concentrations. The experiment lasted for 36 h, and the technique RT-qPCR was used to analyse the transcription level of targeted genes. The results showed as follows: 1) 0.625~5.000 $\mu\text{mol/L}$ LNA significantly upregulated the transcription of CD36 gene ($P<0.01$), and higher ($\geq 5 \mu\text{mol/L}$) LNA downregulated the transcription of acyl-CoA synthetase-isoform-1 and fatty acid-binding protein-3 genes ($P<0.01$). 2) The transcription level of fatty acid biosynthesis genes had a dose response with LNA. Higher concentration of LNA ($\geq 5 \mu\text{mol/L}$) decreased the transcription of fatty acid synthase and stearoyl CoA desaturase-1 genes ($P<0.01$). 3) The extent of LNA concentration did not affect the transcription of prox1, but sterol response element binding protein gene was very sensitive to LNA ($P<0.01$). This study suggests that long-chain fatty acid LNA inhibits the expression of fatty acid endogenous synthesis genes; however, CD36 plays an important role in the transportation process of fatty acids into the mammary epithelial cells of dairy cows. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(5):1342-1349]

Key words: mammary epithelial cells of dairy cows; linolenic acid; fatty acids; uptake and transportation; endogenous synthesis; stearoyl-CoA desaturase