

辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞脂肪酸合成 相关酶表达的影响

刘莉莉¹, 曹 玲¹, 李慧玲¹, 高 宁¹, 李庆章^{2*}

(1. 黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040;

2. 东北农业大学/乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 为研究辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞脂肪酸合成关键酶乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)、脂肪酸合成酶(FAS)和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(SCD)表达的影响, 采用 0.5、1.0、2.0 mmol/L 的辛酸钠处理体外培养的奶牛乳腺上皮细胞, 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 ACC、FAS、SCD 基因相对表达丰度, Western blot 检测 ACC、FAS、SCD 蛋白相对表达水平。结果显示: 与不添加辛酸钠组相比, 辛酸钠以浓度依赖的方式显著抑制 ACC、FAS、SCD 的表达。辛酸钠能抑制奶牛乳腺上皮细胞脂肪酸合成关键酶和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶的表达。

关键词: 辛酸钠; 奶牛乳腺上皮细胞; 乙酰辅酶 A 羧化酶; 脂肪酸合成酶; 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶
中图分类号: S823.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)05-0160-04

Effects of Sodium Octanoate on Key Fatty Acid Synthesis Enzyme in Mammary Epithelial Cells of Dairy Cows

LIU Li-li¹, CAO Ling¹, LI Hui-ling¹, GAO Ning¹, LI Qing-zhang^{2*}

(1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Key Lab of Dairy Sciences, Ministry of Education/Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To investigate the effects of sodium octanoate on the expression level of key fatty acid synthesis enzymes ACC, FAS and SCD in desaturation of dairy mammary epithelial cells (DCMECs) cultured *in vitro*. In the experiment, the mRNA expression levels of ACC, FAS and SCD were determined by qRT-PCR and the protein expression levels of ACC, FAS and SCD were determined by Western blot. The results showed as follows: compared with the group without sodium octanoate, the gene expression and protein expression of ACC, FAS and SCD were inhibited significantly by in sodium octanoate in concentration-dependent manner from 0.5 mmol/L to 2 mmol/L. This study indicated that sodium octanoate could inhibit the gene and protein expression of key fatty acid synthesis enzymes and stearyl coenzyme A desaturation enzyme in dairy mammary epithelial cells.

Key words: sodium octanoate; dairy cows mammary epithelial cells; ACC; FAS; SCD

乳脂肪主要由含有 3 个酯化脂肪酸的甘油三酯(triacylglycerol, TAG)组成^[1]。奶牛乳腺乳脂肪的合成过程有多种酶参与调节。Bionaz 等^[2]研究奶牛从临产期至泌乳末期, 乳腺组织从血液摄取脂肪酸、胞内脂肪酸运输、脂肪酸活化、脂肪酸从头合成、去饱和

作用、甘油三酯合成、脂滴形成、酮体利用等与脂类合成和分泌有关的 45 个基因的表达变化, 提出了参与协调乳脂肪合成和分泌的基因网络。奶牛乳腺可以利用乙酸和 β -羟基丁酸从头合成脂肪酸^[3]。乳腺上皮细胞乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)和脂肪酸合成酶

收稿日期: 2013-12-16

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究(面上)项目(12531638); 黑龙江中医药大学校科研基金项目(201316)

作者简介: 刘莉莉(1980-), 女, 黑龙江铁力人, 讲师, 博士, 主要从事生物技术制药研究。E-mail: liulili-liulili@163.com

* 通讯作者: 李庆章(1953-), 男, 河北清苑人, 教授, 博士生导师, 主要从事泌乳生物学与乳腺功能调控研究。

E-mail: qzli@neau.edu.cn

(FAS)是乳腺从头合成脂肪酸的 2 个关键酶^[4]。奶牛乳腺组织合成单不饱和脂肪酸的主要酶是硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(SCD),它可在十六烷酰辅酶 A 和十八烷酰辅酶 A 的 Δ^9 位置引入双键^[5]。

近年来研究发现,脂肪酸在生命活动中具有非常重要的作用,它们不仅是供能物质、生物膜的组成部分,而且可通过细胞膜受体信号途径和转录因子活化途径等间接、直接或独立地调控基因的表达^[6]。脂肪酸作为乳腺组织摄取的一种重要营养素,其对奶牛乳腺上皮细胞乳脂合成相关基因的表达也具有一定的调节作用^[7-10]。孔庆洋等^[11]发现,短链脂肪酸乙酸和丁酸能提高乳腺脂肪酸合成关键基因 ACC、FAS 的表达。崔瑞莲^[10]研究表明,奶牛乳腺上皮细胞添加不同的十八碳脂肪酸能抑制 ACC、FAS 和 SCD 的表达。胡菡等^[12]发现,较高浓度的 α -亚麻酸对奶牛乳腺上皮细胞脂肪酸关键合成酶和去饱和酶的基因转录具有抑制作用。Bauman 等^[13]报道,长链脂肪酸能改变奶牛乳腺上皮细胞从头合成短链和中链脂肪酸相关基因的 mRNA 表达。

目前,关于脂肪酸对奶牛乳腺乳脂合成调控的研究主要集中在短链和长链脂肪酸上,而中链脂肪酸对乳脂合成的调控及其相关机制报道较少。辛酸是饱和八碳脂肪酸,属于典型的中链脂肪酸。为此,以奶牛乳腺上皮细胞为模型,研究不同浓度的辛酸钠对 ACC、FAS 和 SCD 表达的影响,以期为进一步研究中链脂肪酸对奶牛乳脂合成调控机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

奶牛乳腺上皮细胞由东北农业大学动物生物化学实验室馈赠。

辛酸钠、胰蛋白酶、去除脂肪酸的牛血清白蛋白购自 Sigma 公司,DMEM/F12 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司,Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,DEPC 试剂购自 Amresco 公司,实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq、Prime Script RT reagent Kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司,ACC 抗体(sc-26817)、FAS 抗体(sc-16147)、SCD 抗体(sc-23016)、辣根酶标记兔抗山羊 IgG 购自北京中杉金桥公司。

1.2 奶牛乳腺上皮细胞培养和处理

采用生长培养基(DMEM/F12+10% FBS)于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养奶牛乳腺上皮细胞。收集对数生长期乳腺上皮细胞接种于 6 孔板中,待细胞融合度达到 80%~90%时,将细胞转入

无脂无血清培养基(DMEM/F12+1 g/L BSA)培养 24 h,更换新鲜无脂无血清培养基,分别添加终浓度为 0、0.5、1.0、2.0 mmol/L 的辛酸钠,每组 3 个平行,培养 48 h。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中 ACC、FAS、SCD、 β -actin 基因的 mRNA 序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计各基因 qRT-PCR 引物(表 1)。

表 1 基因的 qRT-PCR 引物序列

基因名称	GenBank 登录号	引物序列(5'-3')
ACC	NM_174224.2	F:AGACAAACAGGGACCATT R:AGGGACTGCCGAAACAT
FAS	NM_001012669.1	F:CCACGGCTGTCGGTAAT R:CGCTCCCACTCATCCTG
SCD	NM_173959.4	F:CTGTGGAGTCAACGAACC R:TAGCGTGGAAACCTTTT
β -actin	NM_173979	F:AAGGACCTCTACGCCAACACG R:TTTGCGGTGGACGATGGAG

1.4 奶牛乳腺上皮细胞总 RNA 提取、cDNA 合成及各基因的 qRT-PCR 检测

用 Trizol 试剂提取奶牛乳腺上皮细胞总 RNA,甲醛变性凝胶电泳及紫外分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。反转录按照 Prime Script RT 试剂盒说明书进行,冰上配制反应液,反应条件为:37℃ 15 min,85℃ 5 s。应用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒进行荧光定量 RT-PCR 反应,冰上配制反应液,反应条件为:95℃,30 s;95℃ 5 s,60℃ 34 s,40 个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。每个基因进行 3 次平行试验,各基因的 qRT-PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 相对定量的方法(β -actin 基因为参照基因)计算目的基因的 mRNA 表达丰度^[14]。

1.5 乳腺上皮细胞总蛋白提取

以 4℃ 预冷的 D-Hanks 洗涤细胞 2 次,每孔中加 100 μ L 1×SDS Sample Buffer,用 1 mL 枪头轻轻刮下细胞,转移到 0.5 mL 的 EP 管中,100℃ 煮沸 10 min,使蛋白质变性,超声波破碎 15 s/次,重复 3 次,分装,-20℃ 冻存储用。

1.6 Western blot 检测

配制浓缩胶和分离胶进行 SDS-PAGE 分析。电泳结束后将凝胶上的蛋白转印到硝酸纤维素膜上。室温用脱脂牛奶封闭 2 h,一抗 4℃ 孵育过夜,取出后洗 3 次,每次 5 min,二抗 37℃ 摇床孵育 1 h,洗 3 次,发光液显色,在暗室中曝光、显影。

1.7 数据处理

采用 Band Scan 4.3 软件对 Western blot 图谱进

行灰度扫描。应用 SAS 9.1 统计学软件进行单因素方差分析,数据以平均数 \pm 标准差表示, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 辛酸钠对 ACC、FAS、SCD 基因表达的影响

采用 qRT-PCR 检测奶牛乳腺上皮细胞 ACC、FAS、SCD 基因的相对表达量,结果如图 1—3 所示。与未添加辛酸钠的乳腺上皮细胞相比,辛酸钠以浓度依赖的方式显著降低细胞 ACC、FAS、SCD 基因的表达。

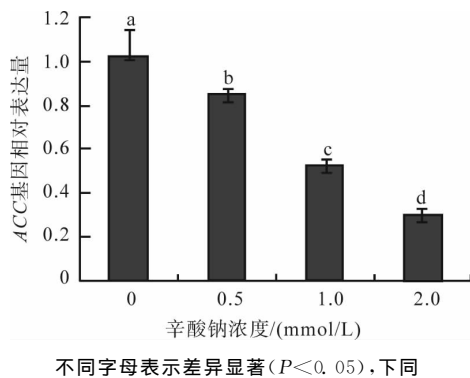


图 1 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞 ACC 基因表达的影响

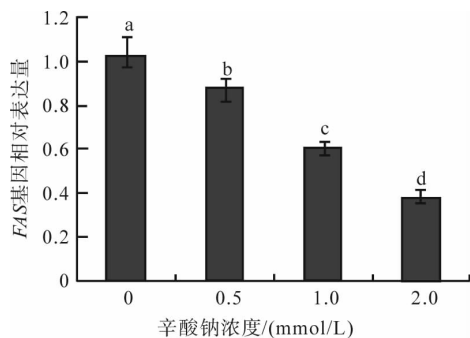


图 2 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞 FAS 基因表达的影响

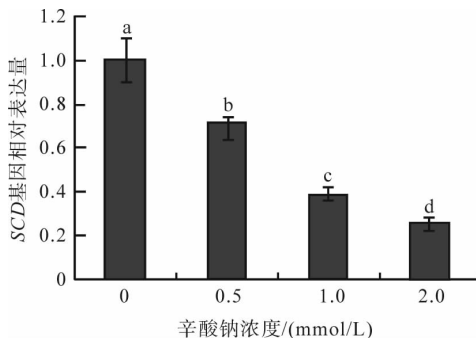
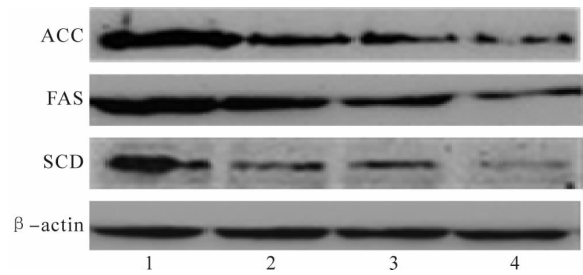


图 3 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞 SCD 基因表达的影响

2.2 辛酸钠对 ACC、FAS、SCD 蛋白表达的影响

采用 Western blot 检测奶牛乳腺上皮细胞 ACC、FAS、SCD 蛋白的相对表达量,结果如图 4—7

所示,与未添加辛酸钠的乳腺上皮细胞相比,辛酸钠以浓度依赖的方式显著降低细胞 ACC、FAS、SCD 蛋白的表达。



1:对照组; 2:0.5 mmol/L 辛酸钠组; 3:1.0 mmol/L 辛酸钠组; 4:2.0 mmol/L 辛酸钠组

图 4 辛酸钠处理奶牛乳腺上皮细胞后 ACC、FAS 和 SCD 蛋白的表达情况

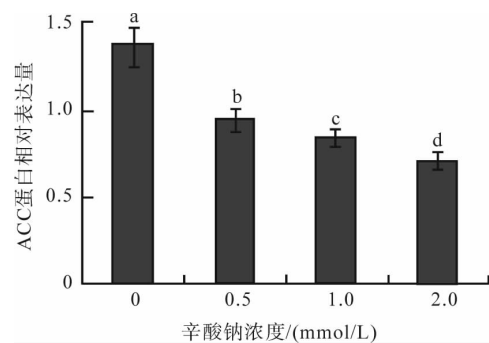


图 5 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞 ACC 蛋白表达的影响

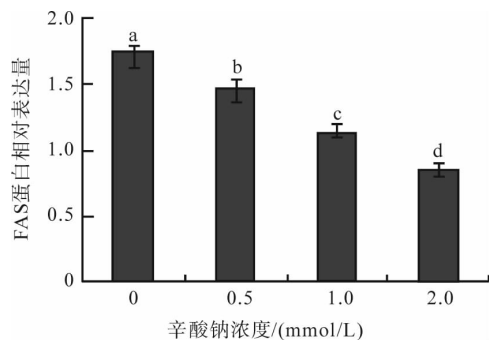


图 6 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞 FAS 蛋白表达的影响

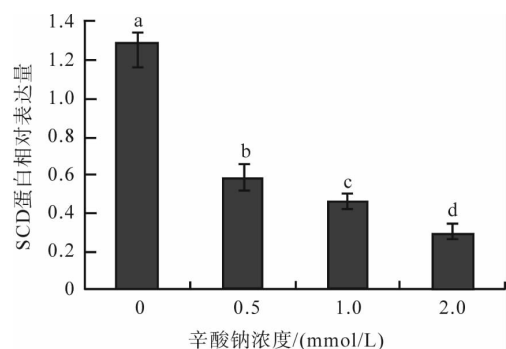


图 7 辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞 SCD 蛋白表达的影响

3 结论与讨论

前人研究表明,辛酸盐能参与调节脂肪细胞中脂肪合成相关基因的表达。Guo 等^[15]研究发现,辛酸盐能降低小鼠脂肪细胞(3T3-L1 细胞)中 FAS、分化抗原簇(CD36)、二酰甘油酰基转移酶(DGAT)、ACC、SCD-1、过氧化物酶体增殖物激活受体 δ (PPAR δ)和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)基因的表达。Han 等^[16]研究发现,辛酸盐能明显降低 3T3-L1 中关键的生脂基因转录调节因子 PPAR γ 、固醇调节元件结合蛋白(SREBP-1c)和 CCAAT 元件结合蛋白(C/EBP α)的表达。本研究结果发现,辛酸钠能以浓度依赖的方式显著降低 ACC、FAS 和 SCD 的表达,这也与前人^[17]用辛酸盐在其他细胞上的研究结果一致。表明辛酸钠对奶牛乳腺上皮细胞脂肪酸的合成及去饱和相关酶的基因表达和蛋白表达也具有一定的调节作用。

本研究提示,中链脂肪酸辛酸抑制奶牛乳腺上皮细胞短链脂肪酸和中链脂肪酸的内源合成,并对长链饱和脂肪酸的去饱和有一定的抑制作用,说明辛酸能参与调节乳腺脂肪酸的合成与去饱和。然而,辛酸对乳腺脂肪酸合成及去饱和作用调控的具体机制仍需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 胡茵,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):34-39.
- [2] Bionaz M, Loores J J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 366.
- [3] Mansbridge R J, Blake J S. Nutritional factors affecting the fatty acid composition of bovine milk[J]. Br J Nutr, 1997, 78(1): S37-S47.
- [4] Fox P F, McSweeney P L H. Advanced dairy chemistry: Lipid[M]. Third edition. New York: Springer, 2006: 1-42.
- [5] Ntambi J M, Miyazaki M. Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1[J]. Curr Opin Lipidol, 2003, 14(3): 255-261.
- [6] 徐盛玉, 吴德. 脂肪酸对基因表达的影响及调控[J]. 饲料工业, 2007, 28(5): 16-19.
- [7] 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]. J Dairy Sci, 2009, 92(9): 4276-4289.
- [8] 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]. J Nutr, 2004, 134(10): 2523-2527.
- [9] 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]. J Dairy Sci, 2004, 87(8): 2527-2534.
- [10] 崔瑞莲. 十八碳脂肪酸对泌乳奶牛乳腺上皮细胞甘油三酯合成的影响及机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [11] 孔庆洋, 林叶, 李庆章. 乙酸钠和丁酸钠对奶牛乳腺脂肪酸合成相关基因的影响[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(3): 15-17.
- [12] 胡茵, 王加启, 李发弟, 等. 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[J]. 动物营养学报, 2010, 22(5): 1342-1349.
- [13] Bauman D E, Perfield J W, Harvatine K J, et al. Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: Lactation and the ruminant model[J]. J Nutr, 2008, 138(2): 403-409.
- [14] 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.
- [15] Guo W, Xie W, Han J. Modulation of adipocyte lipogenesis by octanoate: Involvement of reactive oxygen species[J]. Nutr Metab(Lond), 2006, 3: 30.
- [16] Han J, Farmer S R, Kirkland J L, et al. Octanoate attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes[J]. J Nutr, 2002, 132(5): 904-910.
- [17] Guo W, Lei T, Wang T, et al. Octanoate inhibits triglyceride synthesis in 3T3-L1 and human adipocytes[J]. J Nutr, 2003, 133(8): 2512-2518.