

饲料精粗比对犊牛组织中基因 *GLUT1* 和 *FATP4* 及 *PepT1* mRNA 表达的影响

占今舜, 杨宏波, 詹康, 刘红, 刘明美, 赵国琦*

(扬州大学动物科学技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要:为探明全价颗粒饲料精粗比与犊牛不同组织 *GLUT1*、*FATP4*、*PepT1* mRNA 表达的关系, 根据 NRC(2001) 营养需要, 采用 20 型颗粒饲料机组, 将质量比 3 : 1 的苜蓿和小黑麦草混合, 分别制成精粗比 75 : 25(I)、70 : 30(II)、65 : 35(III)、60 : 40(IV)的颗粒全价饲料, 分别饲喂 4 组日龄相近、体重相近的中国荷斯坦断奶公犊牛(共 12 头, 每组 3 头), 预试期 14 d, 正试期 56 d。结果表明: 1) 试验 III 组犊牛肝脏、瘤胃、十二指肠、盲肠的 *GLUT1* mRNA 相对表达量显著高于试验 IV 组($P < 0.05$), 而试验 I 组皱胃 *GLUT1* mRNA 的相对表达量显著高于其他各组($P < 0.05$); 2) 试验 III 组肝脏、盲肠和试验 I 组瘤胃、皱胃、十二指肠的 *FATP4* mRNA 相对表达量均高于其他各组($P < 0.05$); 3) 试验 I 组瘤胃、皱胃、十二指肠和试验 IV 组肝脏及试验 III 组盲肠的 *PepT1* mRNA 相对表达量均高于其他各组。总体而言, 不同精粗比全价颗粒饲料对不同组织 *GLUT1*、*FATP4*、*PepT1* 的表达具有一定的影响, 精粗比为 65 : 35 时更利于犊牛对葡萄糖、脂肪酸和蛋白质的吸收。

关键词: 犊牛; 基因表达; 饲料精粗比; 荧光定量 PCR

中图分类号: S816.8

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)05-0513-05

Effects of concentrate to forage ratio on gene expression of *GLUT1*, *FATP4* and *PepT1* mRNA in different tissues of calf

Zhan Jinshun, Yang Hongbo, Zhan Kang, Liu Hong, Liu Mingmei, Zhao Guoqi*

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: To know the relation on concentrate to forage ratio of pellet feed and gene expression of *GLUT1*, *FATP4*, *PepT1* mRNA in different tissues. 12 Holstein bull calves with the similar age and weight were chosen and divided into 4 groups with 3 calves. According to NRC(2001), calves in each group were fed the pellet feed with the concentrate to forage with ratio of 75 : 25(I), 70 : 30(II), 65 : 35(III) and 60 : 40(IV) which were made from the quality ratio of alfalfa to triticale for 3 : 1 by 20 type granulated feed unit. The experimental time included 14 days of preliminary trial period and 56 days of the experimental period. The results showed that 1) The expression of *GLUT1* mRNA in liver, rumen, duodenum and cecum in group III were significantly higher than that of group IV ($P < 0.05$). The expression of *GLUT1* mRNA in abomasum of group I were significantly higher than that of other groups ($P < 0.05$). 2) The expression of *FATP4* mRNA in liver, cecum of group III and rumen, duodenum, abomasum of group I were higher than that of other groups. 3) The expression of *PepT1* mRNA in rumen, duodenum, abomasum of group I, liver of group IV and cecum of group III were higher than that of other groups. In conclusion, the different concentrate to forage ratio in pellet feed could influence the expression of *GLUT1*, *FATP4* and *PepT1* in different tissues. The concentrate to forage ratio with 65 : 35 was beneficial for calves to absorb the glucose, fat acid and protein.

Keywords: calf; genetic expression; concentrate to forage ratio; RT-PCR

豆科牧草紫花苜蓿在世界上广泛分布,且享有盛誉,被称为“牧草之王”。紫花苜蓿含有蛋白质等营养物质,是较好的饲料原料之一^[1-2]。在西方,小黑麦草是主要的饲草之一;在中国,随着农业结构的调整,小黑麦草也被作为饲料作物进行开发。饲用小黑麦草具有相对较强的抗逆性,能够于干旱瘠薄地、闲散废弃地生长,对畜牧业的发展具有一定的促进作用^[3]。

葡萄糖转运蛋白(GLUTs)是细胞转运葡萄糖的载体,介导葡萄糖在细胞膜两侧的转运,广泛分布于体内各种组织。GLUT1是一种易化扩散的葡萄糖转运蛋白,分布广泛,具有维持基础状态下组织细胞葡萄糖摄入的功能。GLUT1是反刍动物乳腺中主要的葡萄糖转运蛋白^[4-6]。细胞膜脂质和细胞内部多种信号分子等均由脂肪酸构成,而脂肪酸转运蛋白(FATP)是促进脂肪酸转运的蛋白之一。*FATP4*是动物肠道中唯一存在的FATPs家族成员,存在于肠绒毛细胞,被认为是调控肠道细胞吸收脂肪酸的重要因子^[7-8]。小肽转运载体(PepT)在肠道内参与二肽和三肽的跨膜转运。组织和细胞中的PepT1通过跨膜转运肽类物质,对营养物质的吸收具有重要作用^[9-10]。

饲料营养水平对葡萄糖、脂肪和小肽转运蛋白

具有调控作用。笔者将质量比3:1的苜蓿和小黑麦草制成不同精粗比的颗粒全价饲料,研究其对犊牛不同组织*GLUT1*、*FATP4*、*PepT1*基因的影响,以从分子水平探明不同营养水平对动物营养物质吸收的影响。

1 材料与方法

1.1 试验日粮和犊牛

根据NRC(2001)营养需要,采用20型颗粒饲料机组,将质量比3:1的苜蓿和小黑麦草分别制成精粗比75:25、70:30、65:35和60:40的颗粒全价饲料。

将日龄(104.00±1.50)d、平均体重(121.25±4.12)kg的中国荷斯坦断奶公犊牛12头分为4组,分别饲喂精粗比75:25、70:30、65:35、60:40的颗粒全价饲料(分别称其为试验I组、II组、III组、IV组),预试期14d,正试期56d。每天饲喂3次,饲喂时间为8:30、14:30和20:30,每周调整1次饲喂量,但保证每组犊牛的干物质采食量基本一致。犊牛自由饮水,每天有6~7h户外活动。每日清晨打扫圈舍,每周至少对牛舍消毒2次。各试验组饲料的组成和营养水平见表1。

表1 饲料组成和营养水平(干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of basal diets (DM basis)

原料	饲料组成/%				营养成分	营养水平/%			
	I组	II组	III组	IV组		I组	II组	III组	IV组
玉米	35.42	34.50	32.39	30.95	干物质	84.50	84.89	85.05	85.20
豆粕	12.00	11.50	11.28	11.00	粗灰分	4.22	4.22	4.31	4.35
酒糟	3.40	5.02	4.80	5.00	粗蛋白质	17.61	17.54	17.36	17.42
麸皮	21.00	16.00	13.50	9.96	能量	1.55	1.52	1.52	1.51
苜蓿	18.75	22.50	26.25	30.00	粗脂肪	3.67	3.71	3.58	3.50
小黑麦	6.25	7.50	8.75	10.00	中性洗涤纤维	28.94	31.54	34.72	37.68
食盐	-	0.07	0.09	0.24	酸性洗涤纤维	13.38	14.31	15.41	16.62
磷酸氢钙	-	0.17	0.17	0.28	钙	0.58	0.58	0.58	0.58
碳酸钙	0.40	0.025	0.025	-	磷	0.40	0.40	0.40	0.40
小苏打	0.25	0.19	0.22	0.05	赖氨酸	0.73	0.73	0.73	0.73
蛋氨酸	0.03	0.02	0.02	0.02	蛋氨酸	0.26	0.26	0.26	0.26
预混料	2.50	2.50	2.50	2.50					
合计	100	100	100	100					

1) 每1kg预混料中含V-A 7.5 IU/g, V-D 20 IU/g, V-E 25 IU/kg, Fe 15 mg/kg, Cu 15 mg/kg, Mn 70 mg/kg, Zn 70 mg/kg, I 1 mg/kg, Se 0.22 mg/kg, Co 1 mg/kg; 2) 除能量、钙、磷、赖氨酸和蛋氨酸外,其余均为实测值。

1.2 方法

试验于 2014 年 3 月至 2014 年 5 月在扬州大学实验农牧场进行。

1.2.1 样品采集

于试验第 70 天, 每组犊牛禁食 12 h 后进行屠宰, 沿纵向剖开腹腔, 分离出肝脏、瘤胃、十二指肠和肌肉。用高温灭菌后的镊子和手术剪刀剪取各组织, 在灭菌生理盐水中清洗, 装入 1.5 mL 的离心管中, 液氮速冻后转移到 -80 °C 的冰箱冷冻保存。

1.2.2 组织总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

根据 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)

说明书进行组织总 RNA 的提取, 采用 One Drop 仪测定总 RNA 的浓度和纯度。根据 1% 琼脂糖凝胶电泳结果判断 RNA 是否有降解。采用 Takara 反转录试剂盒进行 cDNA 合成。试验在冰上进行。反应体系 10 μL。反应条件: 37 °C 反转入反应 15 min, 85 °C 反转入酶失活反应 5 s; 4 °C 保存。所得 cDNA 保存于 -20 °C。

1.2.3 引物设计

根据 Genbank 中的 *GAPDH*、*GLUT1*、*FATP4*、*PepT1* 基因的序列, 采用 Primer 5.0 软件设计。引物(表 2)由 Invitrogen 公司合成。

表 2 设计引物
Table 2 Primer design

目的基因	登录号	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
<i>GAPDH</i>	XM_001252479	F : GGGTCATCATCTCTGCACCT R : GGCATAAGTCCCTCCACGA	177
<i>GLUT1(SLC2A1)</i>	NM_174602.2	F : CCTGGATGTCCTACCTGAGC R : CGCACAGTTGCTCCACATAC	204
<i>FATP4(SLC27A4)</i>	NM_001075667.1	F : GCGCTTCATCCGAATCTTTA R : GGCCACGCTGTTTGAGTAGT	229
<i>PepT1 (SLC15A1)</i>	NM_001099378.1	F : TGTTCCTGGGCCTTGTGTTGAT R : GGATATACCACGGCATCCAC	163

1.2.4 Real Time-PCR 反应条件

根据 TaKaRa 试剂盒说明书配制反应液(表 3)。在罗氏 Light Cycler® 96 PCR 仪上进行检测。条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 20 s, 40 个循环; 65 °C 延伸 15 s。RT-PCR 反应液总体积 20 μL, 其中, SYBR 预混合试剂 Ex Taq II (2×) 10 μL(终浓度 1×); 10 μmol/L PCR 正向引物 0.8 μL(终浓度 0.4 μmol/L), 10 μmol/L PCR 反向引物 0.8 μL(终浓度 0.4 μmol/L), cDNA 模板 2 μL, 灭菌蒸馏水 6.4 μL。

公式 $2^{-\Delta Ct}$ 计算出目的基因的相对表达量, 其中 $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因}$ 。采用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析, 用 LSD 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 各试验组犊牛不同组织中 *GLUT1* mRNA 的相对表达量

从表 3 中可以看出, 试验 III 组犊牛肝脏、瘤胃、十二指肠和盲肠的 *GLUT1* mRNA 相对表达量显著高于试验 IV, 试验 I 组皱胃的 *GLUT1* mRNA 相对表达量极显著高于试验 III 和 IV 组。

1.3 数据分析

先用 Excle 2007 对试验数据进行预处理, 根据

表 3 不同组织中 *GLUT1* mRNA 的相对表达量

Table 3 Relative expression levels of *GLUT1* mRNA in different tissues

试验组别	相对表达量				
	肝脏	瘤胃	皱胃	十二指肠	盲肠
I	(0.021 0±0.002 2)ab	(0.019 1±0.001 5)b	(0.060 3±0.008 0)aA	(0.009 9±0.000 6)b	(0.021 9±0.005 6)ab
II	(0.027 8±0.004 6)a	(0.019 8±0.000 9)b	(0.040 6±0.009 6)bAB	(0.028 5±0.007 9)a	(0.022 9±0.002 8)ab
III	(0.027 2±0.004 5)a	(0.030 9±0.004 2)a	(0.022 1±0.009 7)bB	(0.028 4±0.005 1)a	(0.025 2±0.008 2)a
IV	(0.017 4±0.001 3)b	(0.014 1±0.002 3)b	(0.008 3±0.000 8)bB	(0.010 1±0.003 6)b	(0.012 8±0.003 9)b

数字后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下表同。

2.2 各试验组犊牛不同组织中 *FATP4* mRNA 的相对表达量

由表 4 可见, 试验 III 组犊牛肝脏中 *FATP4* mRNA 的相对表达量极显著高于试验 IV 组, 显著高于试验 I 和 II 组, 试验 I 组瘤胃和十二指肠中 *FATP4*

mRNA 的相对表达量显著高于试验 III 组; 试验 I 组皱胃中 *FATP4* mRNA 的相对表达量极显著高于试验 IV 组; 试验 III 组盲肠中 *FATP4* mRNA 的相对表达量显著高于其他各组。

表 4 不同组织中 *FATP4* mRNA 的相对表达量

Table 4 Relative expression levels of *FATP4* mRNA in different tissues

试验组别	相对表达量				
	肝脏	瘤胃	皱胃	十二指肠	盲肠
I	(0.034 7±0.000 8)bAB	(0.005 9±0.001 6)a	(0.011 6±0.002 7)aA	(0.082 1±0.018 8)a	(0.002 9±0.000 6)b
II	(0.025 8±0.001 8)cAB	(0.004 1±0.000 2)ab	(0.007 3±0.001 9)bAB	(0.018 8±0.000 2)c	(0.005 2±0.000 9)b
III	(0.042 3±0.003 1)aA	(0.003 5±0.000 3)b	(0.005 4±0.001 6)bAB	(0.041 3±0.011 2)bc	(0.008 8±0.002 9)a
IV	(0.017 6±0.001 6)cB	(0.001 8±0.000 4)b	(0.000 6±0.000 1)aB	(0.062 6±0.004 3)ab	(0.004 6±0.000 8)b

2.3 各试验组犊牛不同组织中 *PepT1* mRNA 的相对表达量

从表 5 中可以看出, 试验 II 和 IV 组犊牛肝脏中 *PepT1* mRNA 的相对表达量显著高于试验 I 和 III 组, 试验 I 和 IV 组瘤胃中 *PepT1* mRNA 的相对表达

量显著高于试验 II 和 III 组, 试验 I 组皱胃和十二指肠中 *PepT1* mRNA 的相对表达量显著高于试验 IV 组, 试验 III 组盲肠中 *PepT1* mRNA 的相对表达量显著高于试验 I 和 IV 组。

表 5 不同犊牛组织中 *PepT1* mRNA 的相对表达量

Table 5 Relative expression levels of *PepT1* mRNA in different tissues

试验组别	相对表达量				
	肝脏	瘤胃	皱胃	十二指肠	盲肠
I	(0.003 4±0.000 4)b	(0.020 1±0.002 7)a	(0.011 5±0.002 8)a	(0.106 0±0.019 6)a	(0.003 8±0.002 0)b
II	(0.007 7±0.000 9)a	(0.004 9±0.001 4)c	(0.003 4±0.000 6)bc	(0.074 0±0.006 9)ab	(0.006 4±0.002 2)ab
III	(0.004 5±0.000 8)b	(0.009 7±0.000 3)b	(0.005 9±0.001 0)b	(0.081 5±0.008 4)a	(0.009 7±0.002 1)a
IV	(0.009 3±0.000 1)a	(0.016 4±0.001 0)a	(0.001 1±0.000 4)c	(0.044 2±0.008 8)b	(0.004 0±0.002 0)b

3 结论与讨论

不同精粗比饲料显著或极显著地影响着绵羊瘤胃纤维素酶的活性^[11]。采食精粗比 20:80、30:70、和 40:60 的日粮, 小尾寒羊纤维素和半纤维素消化量呈先上升后下降的趋势^[12], 说明适当的精粗比日粮可以促进纤维素的分解, 进而提高葡萄糖的生成。潘巧等^[13]发现, 饲喂高精料日粮, 奶山羊门静脉吸收丙酸的量增加, 导致肝脏增强吸收和利用丙酸, 使肝脏糖异生相关酶基因的表达上调。当细胞外葡萄糖浓度增加时, 细胞膜上 *GLUT1* 的表达增加^[14-15]。本试验结果表明, 除皱胃外, 试验 III 组各组织中 *GLUT1* mRNA 的相对表达量最高, 说明精粗比为 65:35 的日粮更利于犊牛吸收葡萄糖。试验 IV 组皱胃的 *GLUT1* mRNA 相对表达量低于其他各组, 可能是因为高精料日粮中淀粉的含量高,

瘤胃淀粉分解菌占优势, 淀粉被大量降解, 未被瘤胃降解的部分淀粉则在皱胃中被消化酶分解成葡萄糖, 导致 *GLUT1* 基因表达升高, 促进葡萄糖的吸收。

给 COS1 细胞转染 *FATP4* cDNA 导致棕榈酰-CoA 合成酶和二十四烷基-CoA 合成酶升高^[16], 表明 *FATP4* 基因能够编码酰-CoA 合成酶, 说明 *FATP4* 在长链脂肪酸的摄取和代谢调节中发挥着重要作用。长链脂肪酸的合成原料是乙酰辅酶 A, 而反刍动物脂肪酸的合成是由瘤胃中形成的乙酸和丁酸转化为乙酰辅酶 A 和丁酰辅酶 A 的。随精料水平的提高, 瘤胃乙酸、丁酸含量降低, 丙酸含量增加^[17]; 随采食时间的延长, 挥发性脂肪酸含量呈先增加后降低趋势。随精粗比的升高, 奶牛瘤胃的乙酸、丁酸含量降低^[18]。本试验中, 试验 III 组肝脏 *FATP4* 基因的表达高于其他各组, 可能是因为该组日粮使

瘤胃产生的乙酸、丁酸含量高,导致肝脏合成脂肪酸多,促进肝脏对脂肪酸的转运和代谢。饲料中的脂肪在瘤胃微生物作用下水解产生甘油和各种脂肪酸。在本试验中,试验 I 组瘤胃、皱胃和十二指肠 *FATP4* 基因的表达量最高,这可能是因为该组日粮中含量较高的蛋白和脂肪在瘤胃微生物的作用下大量合成脂肪酸。

在本试验中,试验 I 组的日粮蛋白质水平最高,因此,在瘤胃降解成的小肽较多,进而导致瘤胃、皱胃和十二指肠的 *PepT1* mRNA 相对表达量最高。盲肠是反刍动物微生物消化的另一主要场所。王东升^[19]等发现,高精粗比能显著提高山羊盲肠内容物和盲肠静脉的生物胺含量。本试验中,试验 I 组 *PepT1* 基因的表达量最低,可能是由盲肠中产生的大量生物胺导致小肽生成较少引起。张树坤等^[20]发现,高精料饲喂泌乳期山羊,其肝脏中氨基酸消耗增多,同时小肽合成减少。本试验中试验 I 组肝脏的 *PepT1* mRNA 的相对表达量最低,可能是因为高精料引起肝脏合成小肽减少导致的。

综合分析结果表明,精粗比为 65:35 的全价颗粒饲料能促进消化道 *GLUT1* 基因的表达,精粗比为 75:25 的全价颗粒饲料能促进消化道 *FATP4*、*PepT1* 基因的表达。从整体上看,精粗比为 65:35 的全价颗粒饲料更有利于犊牛对葡萄糖、脂肪酸和蛋白质的吸收。

参考文献:

- [1] 占今舜,陈佩佩,张彬. 苜蓿在养猪生产上的应用研究进展[J]. 养猪, 2012(6): 27-30.
- [2] 卢欣石. 中国苜蓿产业发展问题[J]. 中国草地学报, 2013, 35(5): 1-5.
- [3] 谢楠,李源,赵海明,等. 饲用黑麦、小黑麦品种的抗旱性评价[J]. 中国草地学报, 2011, 33(6): 82-88.
- [4] 刘越素,任跃忠. 葡萄糖转运蛋白-1 与糖尿病肾病[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2004, 24(3): 388-391.
- [5] Christina P, Alexandra C, Jordan S, et al. Effects of cinnamaldehyde on the glucose transport activity of GLUT1[J]. Biochimie, 2011, 93: 339-344.
- [6] 齐利枝,闫素梅,生冉,等. 奶牛乳腺中乳成分前体物对乳成分合成影响的研究进展[J]. 动物营养学报, 2011, 23(12): 2077-2083.
- [7] 齐仁立,黄金秀,杨飞云,等. 脂肪酸转运蛋白家族及其介导的脂肪酸跨膜转运[J]. 动物营养学报, 2013, 25(5): 905-911.
- [8] Blackburn C, Guan B, Brown J, et al. Identification and characterization of 4-aryl-3, 4-dihydropyrimidin-2 (1H)-ones as inhibitors of the fatty acid transporter FATP4[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2006, 16: 3504-3509.
- [9] Fei Y J, Sugawara M, Liu J C, et al. cDNA structure, genomic organization, and promoter analysis of the mouse intestinal peptide transporter PEPT1[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1492: 145-154.
- [10] 朱宇旌,王秉玉,张勇,等. 小肽转运载体 1 的生物学特性及其功能[J]. 动物营养学报, 2012, 24(10): 1847-1853.
- [11] 霍鲜鲜,侯先志,赵志恭,等. 不同精粗比日粮对绵羊瘤胃内纤维素酶活的影响[J]. 甘肃畜牧兽医, 2003(5): 16-20.
- [12] 门小明,雒秋江,唐志高,等. 3 种不同精粗比日粮条件下空怀小尾寒羊母羊的消化与代谢[J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(10): 13-16.
- [13] 潘巧. 日粮精粗比对奶山羊肝脏糖异生的影响及其机理研究[D]. 南京:南京农业大学, 2012.
- [14] 丁红,马健飞,樊怡,等. 高糖对大鼠腹膜间皮细胞葡萄糖转运蛋白 1 调节作用的研究[J]. 中国医科大学学报, 2006, 35(2): 151-152.
- [15] 任蕾. 高血糖对大鼠肾皮质葡萄糖转运蛋白 1 mRNA 表达的影响[D]. 沈阳:中国医科大学, 2008.
- [16] Thomas H, Florian B, Isabella G, et al. Mouse fatty acid transport protein 4 (*FATP4*): Characterization of the gene and functional assessment as a very long chain acyl-CoA synthetase[J]. Gene, 2001, 270:31-40.
- [17] 华金玲,郭亮,王立克,等. 不同精粗比日粮对黄淮白山羊瘤胃挥发性脂肪酸影响[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(6): 58-61.
- [18] 贾玉东,王振勇,柴同杰,等. 日粮精粗比对奶牛瘤胃液和血清乙酸、丙酸、丁酸的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2008, 36(7): 27-32.
- [19] 王东升. 日粮模式对瘤胃与后肠中生物胺生成的影响[D]. 南京:南京农业大学, 2012.
- [20] 张树坤,姜雪元,倪迎冬,等. 不同精粗比日粮对泌乳山羊肝脏蛋白质代谢及乳蛋白含量的影响[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(4): 413-420.

责任编辑: 王赛群
英文编辑: 王 库