

吴柯, 韩印如, 李斌, 等. 采食高淀粉高油日粮奶牛的泌乳性能、乳成分变化及乳腺差异表达基因筛选 [J]. 华南农业大学学报, 2024, 45(1): 31-41.
WU Ke, HAN Yinru, LI Bin, et al. Changes in milk production and milk composition of dairy cows fed with high starch and oil diet, and screening of differentially expressed genes in mammary glands[J]. Journal of South China Agricultural University, 2024, 45(1): 31-41.

采食高淀粉高油日粮奶牛的泌乳性能、乳成分变化及乳腺差异表达基因筛选

吴柯^{1†}, 韩印如^{1†}, 李斌¹, 刘肃然¹, 贾坤², 毕研亮³, 刘德武¹, 郭勇庆¹

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642;

3 中国农业科学院 饲料研究所, 北京 100081)

摘要:【目的】研究高淀粉高油日粮对奶牛泌乳性能和乳腺组织转录组的影响, 探索乳脂下降综合征 (Milk fat depression, MFD) 的分子机制。【方法】选用 8 头荷斯坦泌乳奶牛, 随机分为对照组和处理组 (4 头/组), 采用 2×2 反转试验设计, 分为 2 期, 每期 23 d, 期间 2 组对调。每期的前 16 d, 对照组奶牛饲喂低淀粉低油的基础饲料, 对照组日粮的泌乳净能为 6.78 MJ/kg; 处理组奶牛在基础饲料基础上添加 266 g/kg(DM 基础) 细粉碎玉米和 46 g/kg(DM 基础) 大豆油; 后 7 d 2 组奶牛均喂基础饲料, 处理组日粮的泌乳净能为 7.66 MJ/kg。分别于每期的第 1、4、7、10、13、16、19 和 22 天测定产奶量和乳成分, 第 16 天采集乳腺组织用于检测转录本的变化。【结果】与对照组相比, 处理组第 13、16 天奶牛的干物质采食量和产奶量显著降低 ($P<0.05$); 饲喂高淀粉高油饲料 7 d 后乳脂率开始降低, 其中, 第 10、13、16 和 19 天的乳脂率和乳脂产量显著降低 ($P<0.05$); 第 13、16 和 19 天的乳蛋白、乳糖和非脂固形物含量显著提高 ($P<0.05$)。在奶牛乳腺对照组和处理组中共检测到 235 个显著差异表达的基因, 其中, 64 个上调、171 个下调。GO 分析表明, 差异表达基因主要与炎症反应、 α -氨基酸代谢、有机氮化合物代谢、细胞发育、脂质生物合成和脂肪细胞分化等相关; KEGG 分析表明, 差异表达基因主要与轴突导向、NF- κ B 信号通路、钙信号通路等相关。结合差异表达基因与泌乳性能的相关性分析, 本研究筛选出了部分与脂质调控相关的基因作为研究奶牛 MFD 状态下脂质代谢的候选基因, 包括在乳腺中下调表达的 *FGFR4*、*VDR*、*HTR2B*、*CCL21* 和 *TYRP1*。【结论】高淀粉高油饲料饲喂奶牛降低了干物质采食量、产奶量和乳脂率, 提高了乳蛋白、乳糖和非脂固形物含量, 下调了奶牛乳腺中脂肪酸合成相关基因的表达。本研究为科学配制日粮和研究 MFD 的分子机制研究提供了数据参考。

关键词: 高淀粉; 高油; 奶牛; 乳腺; 转录组; 泌乳性能; 差异表达基因

中图分类号: S823.91; S815.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2024)01-0031-11

Changes in milk production and milk composition of dairy cows fed with high starch and oil diet, and screening of differentially expressed genes in mammary glands

WU Ke^{1†}, HAN Yinru^{1†}, LI Bin¹, LIU Suran¹, JIA Kun², BI Yanliang³, LIU Dewu¹, GUO Yongqing¹

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 College of Veterinary Medicine,

收稿日期: 2022-10-17 网络首发时间: 2023-08-25 17:44:25

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.s.20230824.1920.002>

作者简介: 吴柯, 硕士研究生, 主要从事反刍动物营养与饲料科学研究, E-mail: wuke991117@163.com; 韩印如, 硕士研究生, 主要从事反刍动物营养与饲料科学研究, E-mail: 1203555945@qq.com; †表示同等贡献; 通信作者: 刘德武, 教授, 博士, 主要从事畜禽健康养殖与安全生产研究, E-mail: dwliu@scau.edu.cn; 郭勇庆, 讲师, 博士, 主要从事反刍动物营养与饲料科学研究, E-mail: yongqing@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31501982, 31872382); 广东省自然科学基金 (2019B1515210020)

South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3 Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: 【Objective】 The aim of this experiment was to study the effects of high starch and oil diet on milk performance and mammary gland transcriptome of dairy cows, and explore the molecular mechanism of milk fat depression (MFD). 【Method】 Eight lactation Holstein cows were randomly divided into two groups of the control group and treatment group, four cows in each group with a 2×2 crossover experiment. The test was divided into two periods, each period was 23 days, and two groups were switched in the second period. In the first 16 days of each period, the cows in the control group were fed low starch and oil diet, the net lactation energy of the control diet was 6.78 MJ/kg. For the cows in the treatment group, 266 g/kg fine ground corn and 46 g/kg soybean oil (dry matter basis) were added to the control diet. In the last seven days of each trial period, the cows of two groups were both fed with low starch and oil diet, the net lactation energy of the diet in the treatment group was 7.66 MJ/kg. Milk yield and milk composition were measured on the 1st, 4th, 7th, 10th, 13th, 16th, 19th and 22nd days of each period respectively, and mammary tissues were collected on the 16th day to detect changes in transcripts. 【Result】 Compared with the cows fed with low starch and oil diet, the dry matter intake and milk yield of cows fed high starch and oil diet decreased on the 13th and 16th days ($P<0.05$). After feeding high starch and oil diet for seven days, the milk fat percentage began to decrease, and the milk fat rate and milk fat yield decreased significantly on the 10th, 13th, 16th and 19th days ($P<0.05$). The contents of milk protein, lactose and non-fat solids increased significantly on the 13th, 16th and 19th days ($P<0.05$). A total of 235 differentially expressed genes (DEGs) were detected in the control and treatment groups, 64 of which were up-regulated and 171 were down regulated. GO analysis showed that the DEGs were mainly related to inflammatory reaction, α -amino acid metabolism, organic nitrogen compound metabolism, cell development, lipid biosynthesis and adipocyte differentiation. KEGG analysis showed that the DEGs were mainly related to axon guidance, NF- κ B signaling pathway, calcium signaling pathway and so on. Combined with the correlation analysis between the DEGs and milk performance, this study screened some genes related to lipid regulation as candidate genes for studying lipid metabolism in dairy cows under MFD, including *FGFR4*, *VDR*, *HTR2B*, *CCL21* and *TYRPI* which were down regulated in mammary glands. 【Conclusion】 Feeding cows with high starch and oil diet can reduce dry matter intake, milk yield and milk fat rate, increase the contents of protein, lactose and non-fat solids, and down-regulate the expression of fatty acid synthesis related genes in mammary glands of dairy cows. The study can provide data references for scientific formulation of diets and investigation of the molecular mechanism of MFD in dairy cows.

Key words: High starch; High oil; Dairy cow; Mammary gland; Transcriptome; Lactation performance; Differentially expressed gene

近年来，我国奶业发展迅速，奶牛养殖业和乳品加工业逐渐成为国民经济中重要支柱产业之一^[1]。乳脂作为牛奶营养的重要物质之一，是衡量牛奶品质优劣的重要指标，其含量直接影响原奶品质和售价。然而，现行生鲜乳国家标准中要求的乳脂率仅为 3.1%，我国原奶乳脂率的整体水平为 3.69%，远低于欧盟 (4.04%)、澳大利亚 (4.11%) 和新西兰 (4.78%) 等乳业发达国家生鲜乳中的乳脂

率^[2]。乳脂率受遗传、饲料、泌乳阶段等多种因素影响，其中受饲料组成影响最大。乳脂降低综合征 (Milk fat depression, MFD) 是指日粮因素造成奶牛乳脂率或乳脂产量明显降低，而对产奶量和乳蛋白产量影响较小的一种现象^[3]。我国优质粗饲料资源短缺，为了使奶牛充分发挥产奶性能，生产中不得不饲喂高淀粉高油饲料来满足奶牛能量需要，造成乳脂合成抑制多发^[4]。过去的研究通常采用单独的

高精料或高油饲料来诱导奶牛产生 MFD，而给奶牛同时饲喂高精料高油饲料的研究相对较少。

日粮组成会影响反刍动物乳腺中乳脂肪和乳蛋白的合成。研究表明，在日粮诱导奶牛发生 MFD 过程中参与脂质合成的关键酶下调，启动子中有一个受固醇反应元件 *SREBP1* 调节^[5]，表明 *SREBP1* 在调节牛乳腺上皮细胞脂肪酸合成的信号通路中具有重要作用。RNA 测序技术 (RNA-seq) 已成为基因表达和转录组分析的重要手段，Cui 等^[6] 以荷斯坦奶牛乳蛋白和乳脂肪含量作为差异性状，对奶牛的乳腺上皮细胞进行转录组测序，推测出了调控乳中蛋白和脂肪含量的关键基因。因此，利用 RNA-seq 技术阐明牛乳腺转录组对于确定影响奶牛乳成分性状的候选基因至关重要^[7]。

本研究旨在探究同时饲喂高淀粉高油日粮对奶牛生产性能和乳成分的影响，并结合乳腺组织的转录组表达情况，筛选出参与脂质调控的候选基因，为进一步阐述 MFD 的分子机制和科学配制日粮提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验动物和饲养管理

选取来自广东某奶牛场的 8 头头胎荷斯坦奶牛为试验动物，其泌乳日龄 (215±34) d，体质量 (575±23) kg。全混合日粮 (Total mixed ration, TMR) 饲喂，每天饲喂时间为 07:00 和 17:00，挤奶时间为 06:30 和 16:30，自由采食和饮水，保证剩料量 (w)5%~10%。试验期间，每头奶牛单独拴系饲养于栏舍内，地面铺有橡胶垫和细沙，每日清粪 2 次。

1.2 试验设计

试验开始前预饲 10 d，奶牛均饲喂低淀粉低油饲料。试验期将 8 头奶牛随机分为对照组和处理组 (每组 4 头)，采用 2×2 反转试验设计，进行两期试验，每期 23 d (诱导期 16 d，恢复期 7 d)，两期间对照组和处理组对调。诱导期时，对照组奶牛饲喂低淀粉低油日粮，精粗比 (*m:m*) 50:50，处理组奶牛在对照组日粮基础上添加了 266 g/kg (干物质基础) 细粉碎玉米 (过 1.2~1.5 mm 筛) 和 46 g/kg (干物质基础) 的大豆油，精粗比 (*m:m*) 62:38；恢复期，两组奶牛均饲喂低淀粉低油饲料。诱导组奶牛在每期试验的前 4 d 进行饲料过渡。饲料组成和营养成分见表 1。

1.3 样品采集

1.3.1 饲料样品采集和测定 饲养过程中每天记录每头牛的 TMR 饲喂量和剩料量，测定第 1、4、7、10、13、16、19 和 22 天的干物质采食量 (Dry matter

表 1 试验饲料组成和营养水平 (干物质基础)¹⁾
Table 1 Composition and nutrient levels of experimental diets (DM basis)

项目 Item	组成 Component	w/%	
		对照组 Control group	处理组 Treatment group
原料 Ingredient	全株玉米青贮 Whole corn silage	10.65	8.12
	燕麦干草 Oats hay	7.02	5.35
	苜蓿干草 Alfalfa hay	16.71	12.72
	高湿玉米 High moisture corn	4.65	3.55
	蒸汽压片玉米 Steam flaked corn	9.31	7.11
	粉碎玉米 Ground corn	9.86	27.79
	大豆油 Soybean oil		3.51
	干酒糟及其可溶物 Distillers dried grains with solubles	2.76	2.11
	大豆粕 Soybean meal	5.02	3.83
	双低菜籽粕 Double low rapeseed meal	5.38	4.10
	甜菜颗粒粕 Dried beet pellet	6.54	4.98
	湿啤酒糟 Wet brewer's grains	6.85	5.22
	发酵菠萝渣 Fermented pineapple residue	2.37	1.80
	全棉籽 Whole cottonseed	6.90	5.26
	甘蔗糖蜜 Cane molasses	2.45	1.87
	过瘤胃脂肪 Rumen bypass fat	0.78	0.59
	预混料 ²⁾ Premix	0.46	0.35
	磷酸氢钙 CaHPO ₄	0.36	0.27
	石粉 CaCO ₃	0.72	0.55
	小苏打 NaHCO ₃	0.72	0.55
	氧化镁 MgO	0.13	0.10
	盐 NaCl	0.36	0.27
营养成分 Nutrient	有机物 Organic matter	92.94	94.31
	粗蛋白质 Crude protein	16.10	14.12
	中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber	31.43	26.42
	酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber	19.45	15.78
	淀粉 Starch	23.77	31.43
粗脂肪 Crude protein		4.55	7.80
泌乳净能/(MJ·kg ⁻¹) Net energy of lactation		6.78	7.66

1) 泌乳净能为计算值，其余为实测值；2) 每千克预混料(DM基础)含：铜 2 525 mg，铁 4 150 mg，锌 10 025 mg，锰 4 200 mg，钴 60 mg，硒 100 mg，碘 200 mg，维生素A 1100 000 IU，维生素D₃ 360 000 IU，维生素E 10 000 mg，生物素 200 mg，β-胡萝卜素 300 mg，瘤胃素 3 000 mg
1) Net energy of lactation is a calculated value, while the others are measured values; 2) Each kilogram of premix (DM base) contains: Copper 2 525 mg, iron 4 150 mg, zinc 10 025 mg, manganese 4 200 mg, cobalt 60 mg, selenium 100 mg, iodine 200 mg, vitamin A 1100 000 IU, vitamin D₃ 360 000 IU, vitamin E 10 000 mg, biotin 200 mg, β-carotene 300 mg, rumenin 3 000 mg

intake, DMI)。于每期的第 13~15 天采集饲料原料和 TMR, 65 °C 烘干后粉碎, 过 18 目筛后, 参照《饲料分析及饲料质量检测技术》^[8] 中的方法测定干物质 (Dry matter, DM)、有机物 (Organic matter, OM)、粗蛋白质 (Crude protein, CP)、粗脂肪 (Ether extract, EE)、中性洗涤纤维 (Neutral detergent fiber, NDF) 和酸性洗涤纤维 (Acid detergent fiber, ADF) 含量, 采用比色法测定淀粉含量^[9]。

1.3.2 奶样采集和测定 测定每期第 1、4、7、10、13、16、19 和 22 天的产奶量, 并采集奶样。将每天采集的早晚奶样按照 1:1 体积比均匀混合后 4 °C 保存, 利用多功能乳成分分析仪 (LactoStar 3560; FUNKE GERBER, Germany) 测定乳脂、乳蛋白、乳糖和非脂固形物含量。

1.3.3 乳腺组织采集与测定 于饲养期第 17 天由经过培训的专业兽医人员对奶牛进行乳腺组织的活体采样, 其中每期每个处理组随机采集乳腺样本 2 个 (共 8 个)。采集乳腺组织时, 选择奶牛乳房后区上四分之一中点处为采样部位。皮下注射体积分数为 1% 的盐酸普鲁卡因 (每头注射 20~30 mL) 进行麻醉。麻醉起效后, 使用 12 号活检针移除适量乳腺组织, 用生理盐水洗去血液, 放入冻存管, 存于液氮中待测。观察伤口不再出血时 (活检后约 5 min) 将其缝合。转录组测序由北京诺禾致源科技股份有限公司完成, 测序文库使用 NEBNext®Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB, USA) 生成, 高通量测序平台为 Illumina HiSeq 4000 (Illumina, USA)。

1.4 数据统计分析

采用 Excel(2016) 进行所有数据的基本处理。奶牛的 DMI、产奶量和乳成分结果折线图采用 GraphPad Prism 7 绘制; 各指标采用 SAS version 9.4 的 MIXED 程序进行统计分析, 使用 *t* 检验比较差异显著性, 根据以下模型进行分析: $Y_{ijkl} = \mu + S_i + T_j + N_k(Si) + P_l + \varepsilon_{ijkl}$, 其中 Y_{ijkl} 为试验牛在不同处理下的因变量值, μ 为总体均值, S_i 为次序 *i* 的随机效应 (*i*=1、2), T_j 为日粮 *j* 处理效应 (*j*=1、2), N_k 为嵌套次序的试验牛 *k* 的随机效应 (*k*=1~8), P_l 为采样时期效应 (*l*=1、2), ε_{ijkl} 为随机误差。使用 Kenward-Rogers 语句校正自由度。剔除学生化残差 (Studentized residuals) 超过±3 的数据点。采用的软件方法为 Goseq 的 GO 分析, 使用 KOBAS(2.0) 和 KEGG 数据库对差异表达基因进行通路显著性富集分析, 确定差异基因的主要生化代谢途径和信号转导途径。基于皮尔逊相关系数对奶牛的平均泌乳性能与部

分乳腺差异表达基因进行相关分析。

2 结果与分析

2.1 高淀粉高油日粮对奶牛 DMI、产奶量及乳成分变化的影响

由于饲料对奶牛的影响是渐进的过程, 因此本试验进行了分阶段采样, 以观察饲养期间奶牛相应指标的变化情况 (图 1)。由图 1a 可以看出, 处理组 DMI 在诱导期呈波动性变化, 整体低于对照组, 其中第 13、16 天显著低于对照组 ($P<0.05$), 恢复期逐渐回升。图 1b 表明, 试验初期处理组产奶量略高于对照组, 第 4 天后处理组逐渐下降, 其中第 13、16 天显著低于对照组 ($P<0.05$), 恢复期有所回升。乳成分方面, 与对照组相比, 饲喂处理组饲料 7 d 后乳脂率和乳脂产量整体呈降低趋势, 且第 10、13、16 和 19 天显著降低 ($P<0.05$) (图 1c、1d); 乳蛋白、乳糖和非脂固形物的含量先升高后降低 (图 1e、1g、1i), 而产量先降低后回升 (图 1f、1h、1j), 其中第 13、16、19 天差异显著 ($P<0.05$)。

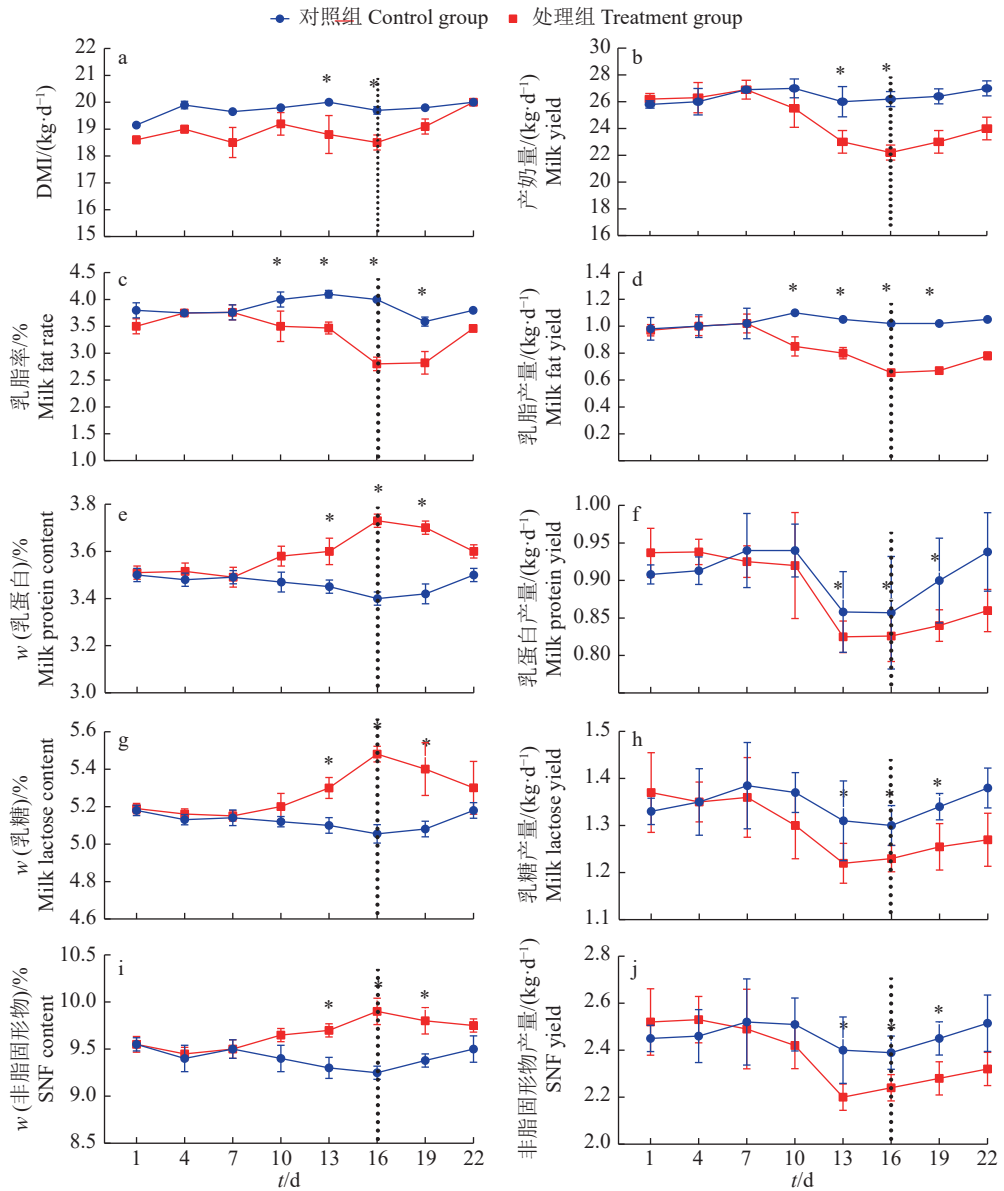
2.2 高淀粉高油日粮对奶牛乳腺组织转录组的影响

2.2.1 RNA 抽提结果与质量检测 共提取了泌乳奶牛 8 个乳腺组织 RNA 以供建库使用。乳腺处理组和对照组每组各取 4 个样本, 通过 Nanodrop 和 Agilent 2100 检测总 RNA 的质量浓度、纯度和完整性, 结果表明, 乳腺样本 RNA 完整值 (RNA integrity number, RIN) ≥ 6.8, 质量浓度、纯度和完整性较好, 检测结果为 A 级, 达到测序样品质量要求, 可用于后续转录组测序。

2.2.2 测序数据总体分析 在本研究中, 8 个乳腺测序文库共计得到 477.47 M Raw reads, 每个样品的 Raw reads 总数均达 47 M 以上, 每个样品保留下来的 Clean reads 最少约占总数的 97.33%。每个乳腺组织样的 Clean bases 总数均大于 7.76 G, 检测碱基含量分布发现, GC 含量为 49.3%~52.23%, Q20 ≥ 97.14%, Q30 ≥ 92.24%, 说明测序质量较高, 可进行后续分析。

2.2.3 差异表达分析 通过 Cuffdiff 同种组织各组间差异表达基因进行筛选, 发现乳腺组织共筛选出 235 个显著差异表达的 mRNA, 其中上调表达的有 64 个, 下调表达的有 171 个。筛选条件为 $P<0.05$, $|\log_2(\text{Fold change})|>1$ (Fold change 表示差异倍数), 乳腺组织差异基因火山图如图 2 所示。

对乳腺 235 个差异表达基因的表达量做 FPKM (Fragments per kb per million reads) 层次聚类

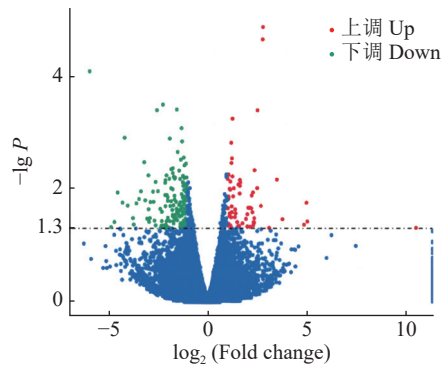


虚线前后分别为诱导期和恢复期; “*” 表示组间差异显著 ($P<0.05$, t 检验, $n=8$)

The induction period and recovery period are before and after the dashed line; “*” indicates significant difference between groups ($P<0.05$, t test, $n=8$)

图 1 高淀粉高油日粮对奶牛干物质采食量 (DMI)、产奶量及乳成分的影响

Fig. 1 Effects of high starch and oil diet on dry mater intake (DMI), milk yield and milk composition of dairy cows



蓝色的点代表没有差异表达的基因

The blue dots represent genes that are not differentially expressed

图 2 乳腺组织差异表达基因火山图

Fig. 2 Volcanic map of differentially expressed genes in mammary gland tissue

(Hierarchical clustering) 分析后得到差异基因聚类图, FPKM 指每百万 fragments 中来自某一基因每千碱基长度的 fragments 数目, 同时考虑了测序深度和基因长度对 fragments 计数的影响。如图 3 所示, 可以看出饲料处理后乳腺组间差异基因的聚类明显分开, 8 个样本聚成 2 个类别, 对照组样本和处理组样本分别聚为一类, 说明这些聚集基因可能具有相似的功能注释或处于相同的代谢通路, 各组组内样本之间也有明显的差异。

2.2.4 测序结果的 qPCR 验证 对差异表达 mRNA 进行荧光定量 PCR, 以验证测序结果的准确性。选取乳腺中参与脂质调控的关键基因包括 *FASN*(脂肪酸合成酶)、*SREBF1*(固醇调节元件结合

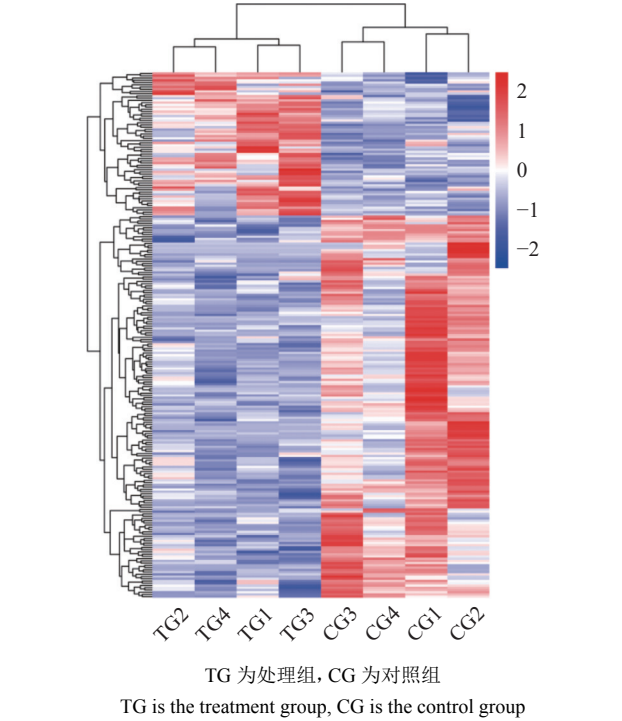


图 3 乳腺组织差异表达基因热图

Fig. 3 Heat map of differentially expressed genes in mammary gland tissue

转录因子), 另外又随机选取 4 个基因在乳腺中进行验证, 包括 *SCGB1D*、*PLA2G16*、*RNASE1* 和 *BICDL1*。如图 4 所示, 实时荧光定量 PCR 结果与

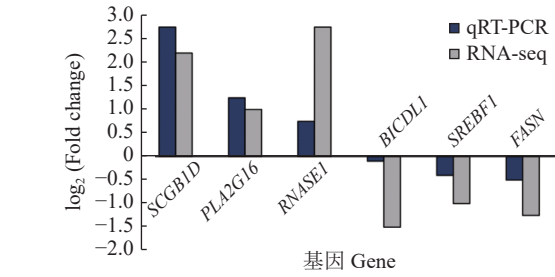


图 4 乳腺组织部分差异表达 mRNA 荧光定量 PCR 验证

Fig. 4 Fluorescence quantitative PCR validation of partial differentially expressed mRNA in mammary gland tissue

测序结果基本一致, 说明测序结果可靠性较高。

2.2.5 mRNA 功能富集分析 GO 分析结果表明, 筛选出的乳腺差异表达基因显著富集到 609 个 GO 条目 ($P<0.05$), 其中包含 454 个生物学过程条目、111 个分子功能条目和 44 个细胞成分条目。图 5 为乳腺差异 mRNA 显著富集的前 30 个 GO 条目。对差异表达基因进一步富集分析发现, 上调基因主要与炎症反应、氨基酸代谢和有机氮化合物代谢等过程有关。下调基因主要与脂质代谢、脂质生物合成、脂肪细胞分化、信号调节以及细胞的增殖、分化、发育等过程有关。

对差异表达基因进行 KEGG 通路分析 (图 6) 发现, 共有 20 个基因之间有互作关系, 而乳腺上调

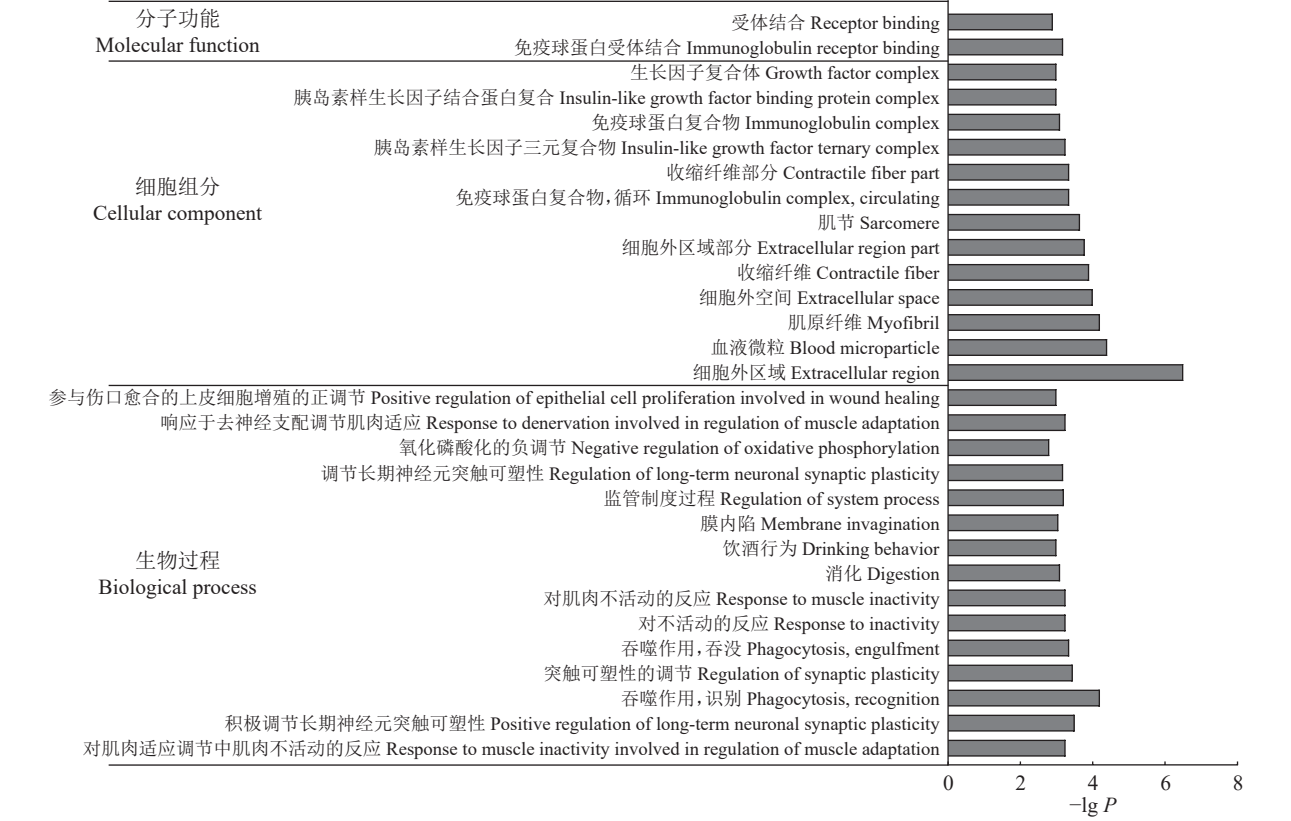


图 5 乳腺差异 mRNA 显著富集的前 30 个 GO 条目

Fig. 5 The first 30 GO terms with significant enrichment of differential mRNAs in mammary glands

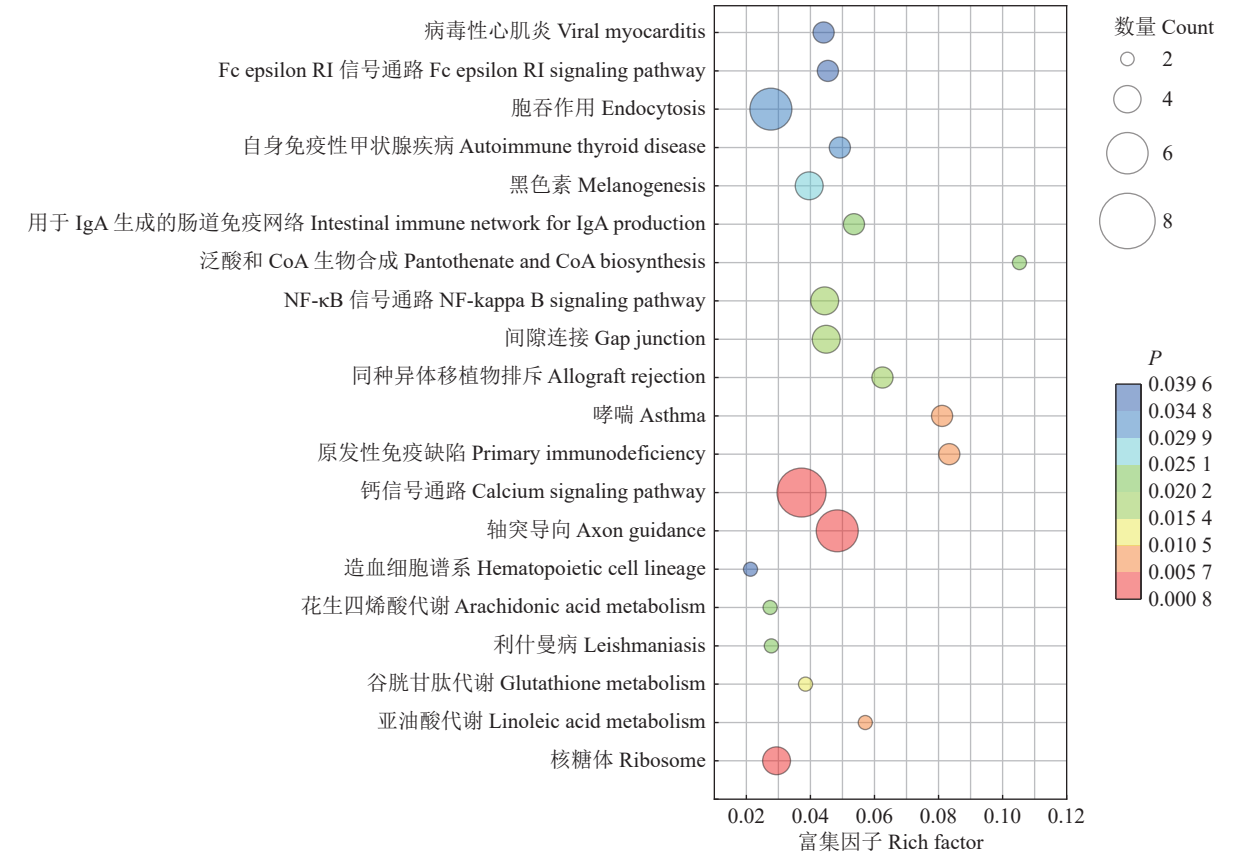


图 6 乳腺差异表达基因 KEGG 富集图

Fig. 6 KEGG enrichment map of differentially expressed genes in mammary glands

差异基因显著富集到 6 条通路上 ($P<0.05$), 包括核糖体、亚油酸代谢和花生四烯酸代谢等; 下调差异基因显著富集到 14 条通路上 ($P<0.05$), 包括轴突导向、钙信号通路、原发性免疫缺陷、NF-κB 信号通路、泛酸和 CoA 生物合成以及用于 IgA 生成的肠道免疫网络等。

筛选出的差异显著基因中, *FCGR1A*、*SAA3*、*NLRC4* 和 *CATHL5* 参与炎症反应和免疫反应; *CD40LG* 和 *CCL21* 参与 NF-κB 信号非经典通路; *FASN*、*SREBF1*、*MLXIPL*、*HTR2B*、*ETNK2*、*FGFR4* 和 *VDR* 参与脂质生物合成过程; *CCL21*、

CYP1A2、*LRAT* 和 *TYRP1* 参与脂质代谢过程调节; *SREBF1*、*VDR* 和 *FGFR4* 参与调节类固醇代谢过程; *AGAP2*、*NEURL1*、*IGFBP5*、*FASN* 和 *VDR* 参与乳腺发育过程; *HTR2B*、*ETNK2* 和 *SREBF1* 参与甘油酯合成过程。

2.2.6 奶牛泌乳性能与差异基因表达的相关分析

本研究选取了差异显著性 TOP 10 的基因, 并根据功能富集分析筛选了与氨基酸代谢、脂质代谢、炎症反应等过程相关的差异表达基因, 将乳腺中筛选出的差异基因分别与奶牛的平均泌乳性能数据做了相关性分析, 由表 2 可知, 乳腺中, *RNASE1*、

表 2 奶牛泌乳性能与部分乳腺差异基因表达的相关分析¹⁾

Table 2 Correlation analysis of lactation performance and expression of selected differential genes in mammary glands of dairy cows

基因 Gene	干物质采食量 Dry mattter intake	产奶量 Milk yield	乳脂率 Milk fat rate	乳脂产量 Milk fat yield	乳蛋白含量 Milk protein content	乳蛋白产量 Milk protein yield
<i>GSTA2</i>	-0.925**	-0.259	-0.562	-0.508	0.717*	0.007
<i>FCGR1A</i>	-0.945**	-0.198	-0.463	-0.360	0.687	0.064
<i>SAA3</i>	-0.929**	-0.210	-0.522	-0.433	0.717*	0.064
<i>RNASE1</i>	-0.933**	-0.584	-0.757*	-0.774*	0.829*	-0.343
<i>Novel02780</i>	-0.533**	-0.658	-0.976**	-0.862**	0.655	-0.512
<i>TECTB</i>	-0.636	-0.567	-0.771*	-0.869**	0.851**	-0.304

续表 2 Continued table 2

基因 Gene	干物质采食量 Dry mattter intake	产奶量 Milk yield	乳脂率 Milk fat rate	乳脂产量 Milk fat yield	乳蛋白含量 Milk protein content	乳蛋白产量 Milk protein yield
<i>NLRC4</i>	-0.889**	-0.624	-0.584	-0.754*	0.893**	-0.356
<i>VTN</i>	0.507	0.389	0.807*	0.508	-0.627	0.203
<i>GPA33</i>	0.691	0.767*	0.597	0.904**	-0.798*	0.567
<i>LRRC75A</i>	0.612	0.732*	0.856**	0.790*	-0.770*	0.550
<i>EPOP</i>	0.595	0.683	0.872**	0.788*	-0.694	0.522
<i>GPR37L1</i>	0.711*	0.786*	0.749*	0.813*	-0.871**	0.566
<i>COL26A1</i>	0.462	0.876**	0.533	0.788*	-0.562	0.806*
<i>APLN</i>	0.606	0.848**	0.775*	0.851**	-0.737*	0.700
<i>FBXO10</i>	0.595	0.669	0.825*	0.861**	-0.687	0.506
<i>FASN</i>	0.556	0.353	0.622	0.660	-0.826*	0.061
<i>SREBF1</i>	0.648	0.820 *	0.782*	0.817*	-0.772*	0.653
<i>MLXIPL</i>	0.369	0.476	0.608	0.614	-0.748*	0.248
<i>HTR2B</i>	0.406	0.537	0.472	0.777*	-0.739*	0.314
<i>VDR</i>	0.532	0.948**	0.598	0.845**	-0.750*	0.813*
<i>FGFR4</i>	0.516	0.847**	0.655	0.874**	-0.836**	0.651
<i>CCL21</i>	0.426	0.821*	0.350	0.830*	-0.712*	0.667
<i>TYRP1</i>	0.449	0.534	0.406	0.749**	-0.789*	0.285
<i>CD40LG</i>	0.549	0.653	0.600	0.857**	-0.739*	0.455
<i>AGAP2</i>	0.598	0.561	0.593	0.759*	-0.804*	0.321
<i>NEURL1</i>	0.242	0.905**	0.599	0.808*	-0.647	0.807*
<i>IGFBP5</i>	0.395	0.693	0.438	0.833*	-0.660	0.538

1) 表中数值为皮尔逊相关系数; “*” 表示 $P<0.05$, “**” 表示 $P<0.01$
1) Values in the form are Pearson’s correlation coefficients; “*” indicates $P<0.05$, “**” indicates $P<0.01$

Novel02780 和 *TECTB* 表达与乳脂率和乳脂产量呈显著负相关 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); *GSTA2*、*FCGR1A*、*SAA3*、*RNASE1*、*Novel02780* 和 *NLRC4* 表达与 DMI 呈极显著负相关 ($P<0.01$), 其中 *FCGR1A*、*SAA3* 和 *NLRC4* 参与炎症与免疫反应; *GPA33*、*LRRC75A*、*GPR37L1*、*COL26A1*、*APLN*、*SREBF1*、*VDR*、*FGFR4*、*CCL21* 和 *NEURL1* 表达与产奶量和乳脂产量呈显著正相关 ($P<0.05$); *FBXO10*、*HTR2B*、*TYRP1*、*CD40LG*、*AGAP2* 和 *IGFBP5* 表达与乳脂产量呈显著正相关 ($P<0.05$)。

3 讨论与结论

3.1 高淀粉高油日粮对奶牛 DMI 和泌乳性能的影响

DMI 受日粮适口性、能量水平等多种因素影响。本研究得出, 处理组奶牛的 DMI 和产奶量在 13 和 16 d 显著降低。早期研究显示, 每天采食高浓度油时, DMI 较低, 产奶量也有所下降^[10]。但 Boerman 等^[11] 饲喂添加大豆油或大豆脂肪酸馏出

物饲料时发现, 奶牛的 DMI 下降, 产奶量却提高。此外, Oba 等^[12] 研究发现, 在奶牛瘤胃中灌注丙酸来替代乙酸可导致奶牛 DMI 下降。本试验处理组日粮中添加了粉碎玉米, 较高的淀粉含量可在瘤胃中产生较多的丙酸, 参与到肝脏的氧化代谢, 抑制动物机体采食, 进而导致奶牛 DMI 下降。

产奶量受生理、环境、营养、疾病等多种因素影响。在瘤胃健康时, 高精料饲料通常可提高奶牛的产奶量, 但是当瘤胃健康受损时, 高精料饲喂则会降低奶牛的产奶量^[13]。另一方面, 泌乳后期奶牛在妊娠过程中食欲较差, 采食量下降, 产奶量也会降低^[14]。本试验得出, 诱导初期处理组奶牛的产奶量略高于对照组, 之后呈下降趋势, 可能与 DMI 的显著降低及瘤胃健康有关。

本试验处理组奶牛饲料添加粉碎玉米和大豆油饲喂 7 d 后, 乳脂率和乳脂产量开始下降且差异显著。研究表明, 用高精料诱导奶牛 MFD 时乳脂率显著降低了 25%, 乳脂产量显著降低了 27%^[15]; 饲料中添加 4%(w) 豆油或 4%(w) 胡麻油后, 奶牛均

出现了乳脂降低现象^[16]; 高淀粉饲料添加 600 g 葵花籽油饲喂 2 周以上, 可引起奶牛的乳脂合成抑制^[17], 说明高淀粉高油饲料可降低乳脂合成, 与本试验结果一致。本试验处理组奶牛第 13、16 和 19 天的乳蛋白、乳糖和非脂固形物含量显著提高。然而部分研究显示, 饲喂高精料植物油饲料时并未观察到乳糖、乳蛋白和非脂固形物有显著影响^[18], 与本试验结果不一致, 这可能与引起乳脂降低的饲料组成及其对产奶量的影响不同有关。有研究表明, 乳蛋白含量与饲料的能量水平有关, 适当增加饲料精粗比可以提高乳蛋白含量^[19]。乳糖含量增加, 可能是由于奶牛采食高淀粉日粮后, 饲料中的过瘤胃淀粉进入肠道生成葡萄糖量相应增加^[20]。

3.2 高淀粉高油日粮对奶牛乳腺组织脂代谢相关基因表达的影响

对乳腺差异 mRNA 进行富集分析后发现, 上调 mRNA 显著富集到的 GO 条目主要与炎症反应和免疫反应、氨基酸代谢和有机氮化合物代谢有关; 下调 mRNA 显著富集到的 GO 条目主要与脂质生物合成与脂质代谢、细胞增殖分化与细胞发育以及乳腺发育有关。

3.2.1 高淀粉高油日粮影响奶牛乳腺脂质代谢的作用机制 通过筛选得到与炎症反应和免疫反应相关的基因有 *FCGR1A*、*SAA3*、*NLRC4* 和 *CATHL5*。*FCGR1A* 是免疫球蛋白 FcγR 受体家族的主要成员之一, 可参与调节免疫反应, 它可通过激活 NF-κB 信号传导增加 NLRP3 炎症小体的形成以及炎性细胞因子 (IL-1β 和 IL-18) 的释放, 从而加剧免疫炎症^[21]。*SAA3* (血清淀粉样蛋白 A3) 是奶牛乳腺上皮细胞 (Mammary epithelial cell, MEC) 分泌的主要血清淀粉样蛋白 A (Serum amyloid A, SAA) 亚型, 在炎症期间于大多数 MEC 中高水平表达, 能在宿主防御中发挥作用。此外, 研究表明, *SAA3* 也能由脂肪细胞产生, 且 *SAA3* 参与奶牛分娩前后的炎症反应调节^[22]。*NLRC4* 在幽门螺杆菌感染中, 可通过控制 IL-18 的产生来降低宿主的免疫反应, 从而导致炎症^[23]。*CATHL5* 是抗菌肽家族的成员, 具有抗菌活性和炎症反应调节功能, 还可触发宿主的特定防御反应, 对哺乳动物的免疫反应有重要作用^[24]。除此之外, *CD40LG* 和 *CCL21* 基因表达下调并显著富集到 NF-κB 信号非经典通路, *CD40LG* 在免疫应答中起主要作用, 能诱导激活 NF-κB^[25]; *CCL21* 是一种趋化因子, 对淋巴组织内原始淋巴细胞的返回和运输具有重要作用^[26]。本研究中, *CCL21* 表达与乳脂产量之间具有高度正相关

性, 因此 *CCL21* 表达量的减少可能是乳脂产量降低的影响因素之一。

3.2.2 高淀粉高油日粮影响奶牛乳腺的脂质调控

本试验结果显示, 多个基因参与脂质合成、代谢等生物学过程。

奶牛饲喂高淀粉高油饲料后, 乳脂合成降低与关键脂质合成基因 (*FASN*) 和转录因子 (*SREBF1*、*MLXIPL*) 的表达下调有关。*FASN* 是参与脂肪酸合成的关键酶, 其转录本显著降低直接影响乳腺脂肪酸的从头合成。*SREBF1* 可通过调控涉及胆固醇和脂肪代谢的众多基因的转录来调节脂质的生物合成和脂肪形成^[27]。*MLXIPL* 又被称为碳水化合物反应元件结合蛋白 (*ChREBP*), 是乳腺中调节脂肪生成的另一个转录因子; 研究表明 *MLXIPL* 对脂肪生成有积极作用, 对于脂肪酸和体内甘油三酯合成的协调控制至关重要^[28]。本研究发现 *HTR2B*、*ETNK2* 均富集到磷脂合成、甘油磷脂合成的 GO 条目中。*HTR2B* (5-羟色胺受体 2B) 被发现于研究人类脂肪形成和脂肪储存的新基因中, 当 *HTR2B* 表达显著下调 12.25 倍时, 脂肪细胞表现出脂质积累增加; 用 *HTR2B* 拮抗剂处理过的细胞进行验证发现, 细胞中性脂质水平显著增加^[29]。*ETNK2* (乙醇胺激酶 2) 是乙醇胺激酶 (*EKI*) 家族成员, *EKI* 通过二磷酸胞苷 (*CDP*) 乙醇胺途径催化磷脂酰乙醇胺 (*PE*) 生物合成的第 1 步, 该酶参与甘油磷脂代谢。*FGFR4* 是跨膜酪氨酸激酶受体, 在调节肝胆汁酸、全身脂质代谢、葡萄糖稳态以及细胞信号传导中起重要作用^[30]。*VDR* (维生素 D3 受体) 是配体诱导型转录因子的核激素受体超家族的成员, *VDR* 直接与 *NLRP3* 相互作用, 抑制 *NLRP3* 炎症细胞的组装, 减少 *NLRP3* 介导的 IL-1β 和 IL-18 的分泌^[31], 提示 *VDR* 可能是一种潜在的抗炎因子。

LRAT (卵磷脂视黄醇酰基转移酶) 催化视黄醇转化为视黄酯, 在人乳腺组织中的研究表明 *LRAT* 在人的乳房生理中起重要作用^[32]。*CYP1A2* 是细胞色素 P450 酶超家族的成员之一, *CYP1A2* 可存在于内质网囊泡产生的脂质微区中但似乎并不影响其形成。*TYRP1* (酪氨酸酶相关蛋白 1) 参与黑色素生物合成途径, *Randhawa* 等^[33] 研究发现黑色素生成相关基因在内脏脂肪组织中的表达, 首次证明了黑色素的生物合成途径在脂肪组织中起作用。此外, 本试验相关性分析结果显示 *TYRP1* 表达与乳脂产量之间有极显著的正相关性。

本研究中 *AGAP2*、*NEURL1* 和 *IGFBP5* 参与了乳腺发育过程, 说明高淀粉高油饲料对奶牛乳腺发

育有一定的影响。AGAP2 参与细胞凋亡、细胞存活和受体运输相关的信号通路^[34]。NEURL1(神经化 E3 泛素蛋白连接酶 1) 能通过泛素的赖氨酸残基 K27 导致其蛋白酶体介导的降解来调节 PDE9A 蛋白水平,从而可能对细胞 cGMP 水平产生积极影响。IGFBP5(胰岛素样生长因子结合蛋白 5) 对调节乳腺发育和泌乳后复性过程中的细胞凋亡和细胞增殖有重要作用^[35]。

以上基因中, *CCL21* 既参与脂质代谢调节也参与了炎症调节,而由于之前在 *SREBP1* 的启动子区域中发现了 NF-κB 的结合位点^[36],因此推测炎症信号通路可能影响了脂质代谢的调节,有待进一步验证。结合差异表达基因与泌乳性能的相关性分析,基因 *FGFR4*、*VDR*、*HTR2B*、*CCL21* 和 *TYRPI* 虽不在常规的脂肪代谢过程中,但其表达量与乳脂产量具有较高的正相关,对乳腺发育和乳腺脂质代谢具有重要调控作用,上述基因表达量的下调可能是引起乳脂含量降低的重要因素,因此可作为研究奶牛 MFD 脂质代谢调控的候选基因。

3.3 结论

通过饲喂高淀粉高油日粮,降低了奶牛的 DMI、产奶量、乳脂率,提高了乳蛋白、乳糖和非脂固形物含量。测序结果显示,乳腺中参与脂肪合成的 mRNA 的表达下调是造成乳脂率和乳脂产量降低的主要因素。结合差异表达基因与泌乳性能的相关性分析,筛选出了乳腺中可能与脂质代谢调控存在紧密联系的基因 *FGFR4*、*VDR*、*HTR2B*、*CCL21* 和 *TYRPI* 作为研究 MFD 的候选基因,可为研究荷斯坦奶牛 MFD 的分子机制奠定基础。

参考文献:

[1] 黄建新,刘喜雨,李艳平,等. 浅析我国奶业发展现状[J]. 中国畜禽种业, 2020, 16(1): 41-42.

[2] 郎宇,王桂霞,吴佩蓉. 我国奶业发展的困境及对策[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(4): 12-16.

[3] 赵勐,卜登攀,张养东,等. 奶牛乳脂降低综合征理论及其分子调节机制[J]. 动物营养学报, 2014, 26(2): 287-294.

[4] XU T L, SEYFERT H M, SHEN X Z. Epigenetic mechanisms contribute to decrease stearoyl-CoA desaturase 1 expression in the liver of dairy cows after prolonged feeding of high-concentrate diet[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(3): 2506-2518.

[5] HARVATINE K J, BAUMAN D E. SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA[J]. *Journal of Nutrition*, 2006, 136(10): 2468-2474.

[6] CUI X, HOU Y, YANG S, et al. Transcriptional profiling of mammary gland in Holstein cows with extremely different milk protein and fat percentage using RNA sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 226.

[7] 樊永亮. 奶牛泌乳早期乳脂肪酸变化及乳腺组织转录调控分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2017.

[8] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2016: 48-86.

[9] BAL M A, SHAVER R D, JIROVEC A G, et al. Crop processing and chop length of corn silage: Effects on intake, digestion, and milk production by dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2000, 83(6): 1264-1273.

[10] MARTIN C, ROUEL J, JOUANY J P, et al. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil[J]. *Journal of Animal Science*, 2008, 86(10): 2642-2650.

[11] BOERMAN J P, LOCK A L. Effect of unsaturated fatty acids and triglycerides from soybeans on milk fat synthesis and biohydrogenation intermediates in dairy cattle[J]. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(11): 7031-7042.

[12] OBA M, ALLEN M S. Dose-response effects of intra-uterine infusion of propionate on feeding behavior of lactating cows in early or midlactation[J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(9): 2922-2931.

[13] 王建平,王加启,卜登攀. 精料和饱和脂肪酸对奶牛生产性能和乳中脂肪酸组成的影响[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(1): 92-96.

[14] 王雪松. 奶牛泌乳期易出现的问题及对策[J]. 现代畜牧科技, 2017(5): 25.

[15] PETERSON D G, MATITASHVILI E A, BAUMAN D E. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased trans-10, cis-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis[J]. *Journal of Nutrition*, 2003, 133(10): 3098-3102.

[16] 胡志勇. 日粮添加豆油和胡麻油对脂肪酸消化代谢和牛奶中脂肪酸组成的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.

[17] ZENED A, TROEGELER-MEYNADIER A, NAJAR T, et al. Effects of oil and natural or synthetic vitamin E on ruminal and milk fatty acid profiles in cows receiving a high-starch diet[J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(10): 5916-5926.

[18] VARGAS-BELLO-PEREZ E, FEHRMANN-CARTES K, INIGUEZ-GONZALEZ G, et al. Short communication: Chemical composition, fatty acid composition, and sensory characteristics of Chanco cheese from dairy cows supplemented with soybean and hydrogenated vegetable oils[J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(1): 111-117.

[19] 刘峰. 不同品质粗饲料 (GI) 与精料给量对奶牛生产性能及营养物质消化代谢影响的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.

[20] 王雪. 不同饲粮能源结构对泌乳后期荷斯坦奶牛泌乳

性能、体况和血液生化指标影响的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.

[21] ZHANG H, LI L, LIU L. FcγRI (CD64) contributes to the severity of immune inflammation through regulating NF-κB/NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Life Sciences*, 2018, 207: 296-303.

[22] SAREMI B, MIELENZ M, RAHMAN M M, et al. Hepatic and extrahepatic expression of serum amyloid A3 during lactation in dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(11): 6944-6954.

[23] SEMPER R P, VIETH M, GERHARD M, et al. *Helicobacter pylori* exploits the NLR4 inflammasome to dampen host defenses[J]. *Journal of Immunology*, 2019, 203(8): 2183-2193.

[24] TOMASINSIG L, DE CONTI G, SKERLAVAJ B, et al. Broad-spectrum activity against bacterial mastitis pathogens and activation of mammary epithelial cells support a protective role of neutrophil cathelicidins in bovine mastitis[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(4): 1781-1788.

[25] MIKOLAJCZAK S A, MA B Y, YOSHIDA T, et al. The modulation of CD40 ligand signaling by transmembrane CD28 splice variant in human T cells[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2004, 199(7): 1025-1031.

[26] EBERT L M, SCHAEERLI P, MOSER B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues[J]. *Molecular Immunology*, 2005, 42(7): 799-809.

[27] BERTOLIO R, NAPOLETANO F, MANO M, et al. Sterol regulatory element binding protein 1 couples mechanical cues and lipid metabolism[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1326.

[28] SONG Z, XIAOLI A M, YANG F. Regulation and metabolic significance of *De novo* lipogenesis in adipose tissues[J]. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1383.

[29] SOHLE J, MACHUY N, SMAILBEGOVIC E, et al. Identification of new genes involved in human adipogenesis and fat storage[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31193.

[30] CHIANG J Y. Bile acids: Regulation of synthesis[J]. *Journal of Lipid Research*, 2009, 50(10): 1955-1966.

[31] RAO Z, CHEN X, WU J, et al. Vitamin D receptor inhibits NLRP3 activation by impeding its BRCC3-mediated deubiquitination[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2783.

[32] SHEREN-MANOFF M, SHIN S J, SU D, et al. Reduced lecithin: Retinol acyltransferase expression in human breast cancer[J]. *International Journal of Oncology*, 2006, 29(5): 1193-1199.

[33] RANDHAWA M, HUFF T, VALENCIA J C, et al. Evidence for the ectopic synthesis of melanin in human adipose tissue[J]. *FASEB Journal*, 2009, 23(3): 835-843.

[34] NAVARRO-CORCUERA A, ANSORENA E, MONTIEL-DUARTE C, et al. AGAP2: Modulating TGFβ1-signaling in the regulation of liver fibrosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(4): 1400.

[35] ALLAN G J, BEATTIE J, FLINT D J. The role of IGF-BP-5 in mammary gland development and involution[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2004, 27(3): 257-266.

[36] ZHANG C, SHIN D J, OSBORNE T F. A simple promoter containing two Sp1 sites controls the expression of sterol-regulatory-element-binding protein 1a (SREBP-1a)[J]. *Biochemical Journal*, 2005, 386(Pt 1): 161-168.

【责任编辑 庄 延】