

营养丰盛期和营养匮乏期牦牛组织中 BCMO1 蛋白表达

王蕊 苟锐锋 王树林*

青海大学农牧学院 西宁 810016

摘要: 通过研究营养匮乏期和丰盛期牦牛 (*Bos mutus*) 体内 β 胡萝卜素-15, 5'-单加氧酶 (BCMO1) 蛋白表达水平, 探讨不同营养时期 BCMO1 参与牦牛机体维持维生素 A 营养平衡的功能。于 2013 年 7 月 (营养丰盛期) 和 2014 年 3 月 (营养匮乏期) 赴青海省海西州乌兰县铜普镇采集样品, 每次选取健康成年 (36 月龄) 雄性牦牛 3 头, 采集组织样品。采用蛋白质免疫印迹技术检测不同营养时期牦牛肝、肺、肾、肌肉、十二指肠、回肠、空肠、瘤胃 8 种组织中 BCMO1 蛋白的表达量。利用多重比较和 *T* 检验对同一时期不同组织及不同时期同一组织 BCMO1 蛋白表达量进行比较分析。在营养匮乏期, BCMO1 蛋白表达量最高的组织为十二指肠 ($P < 0.05$); 空肠和回肠组织中 BCMO1 蛋白表达量高于肾和瘤胃 ($P < 0.05$); 肝组织中 BCMO1 蛋白表达量最低。在营养丰盛期牦牛肝组织中 BCMO1 蛋白表达量最高, 明显高于其他组织 ($P < 0.05$)。营养丰盛期肝中的 BCMO1 蛋白表达量为 0.919 ± 0.228 , 显著高于营养匮乏期 ($P < 0.05$); 而营养丰盛期牦牛十二指肠、空肠、肾、肌肉和瘤胃组织中的 BCMO1 蛋白表达量分别为 0.811 ± 0.134 、 0.336 ± 0.255 、 0.739 ± 0.404 、 0.619 ± 0.092 , 均低于营养匮乏期表达量 ($P < 0.05$); 在营养丰盛期和营养匮乏期的肺中 BCMO1 蛋白表达量分别为 1.128 ± 0.407 、 1.083 ± 0.232 , 回肠在营养丰盛期和营养匮乏期的 BCMO1 蛋白表达量分别为 0.466 ± 0.337 、 0.517 ± 0.280 , 两组织在不同时期 BCMO1 蛋白表达量差异不明显 ($P > 0.05$)。研究表明, 在牦牛体内的 β -胡萝卜素和维生素 A 含量较高的营养丰盛期, 大部分牦牛组织中 BCMO1 蛋白表达量较匮乏期要低, 体内维生素 A 的含量提高可能对 BCMO1 的表达有反馈抑制作用, 这对维持和调节牦牛在不同营养时期机体内维生素 A 营养平衡具有重要意义。

关键词: β 胡萝卜素-15, 5'-单加氧酶; 蛋白质免疫印迹技术; 营养平衡

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2016) 06-1003-07

Expression of BCMO1 Protein in Yak (*Bos mutus*) Tissues during Different Nutrition Periods

WANG Rui GOU Rui-Feng WANG Shu-Lin*

College of Agriculture and Animal Husbandry of Qinghai University, Xining 810016, China

基金项目 青海省高原放牧家畜营养与生态省部共建国家重点实验室培育基地开放课题, 科技部 973 专项 (No. 2012CB722906);

* 通讯作者, E-mail: wangsl1970@163.com;

第一作者介绍 王蕊, 女, 硕士研究生; 研究方向: 反刍动物营养; E-mail: wr1147562784@163.com。

收稿日期: 2015-12-17, 修回日期: 2016-04-18 DOI: 10.13859/j.cjz.201606008

Abstract: In order to explore the function of β -carotene-15, 15'-monooxygenase 1 (BCMO1) in vitamin A (VA) metabolic balance in Yak (*Bos mutus*), the expression levels of BCMO1 protein were studied in Yak tissues at different nutrition periods. Three healthy adult males of 3 years old were selected for samples collection at July 2013 (nutrition-rich period) and March 2014 (nutrition-deficiency period) at Tongpu town of Wulan County in Qinghai Province. Western blotting were used to detect the expression of BCMO1 protein in eight tissues including liver, lung, kidney, muscle, duodenum, ileum, jejunum and rumen. The different expression levels of BCMO1 protein in different tissues at the same nutrition stage was compared using multiple comparisons and the difference of the expression level at different nutrition periods for the same tissue was compared using *T* test. As shown in Fig. 1 and Fig. 2, there was the highest expression level of BCMO1 protein in duodenum among all tissues ($P < 0.05$), and the expression level in ileum and jejunum tissue was higher than that of kidney and rumen ($P < 0.05$). BCMO1 protein expression level was the lowest in liver among all tissues during the nutrition-deficiency period. During the nutrient-rich period, liver tissue showed the highest level of BCMO1 protein among all tissues ($P < 0.05$). As shown in Fig. 2 and Table 1, the expression of BCMO1 protein in the liver was 0.919 ± 0.228 at nutrition-rich period, which was significantly higher than that at nutrient-deficiency period ($P < 0.05$). However, the expression levels of BCMO1 protein in duodenum, jejunum, kidney, muscle and rumen were 0.811 ± 0.134 , 0.336 ± 0.255 , 0.739 ± 0.404 , 0.619 ± 0.092 respectively at nutrition-rich period, which were lower than those at nutrition-deficiency period ($P < 0.05$). The BCMO1 expression levels in lung were 1.128 ± 0.407 and 1.083 ± 0.232 , and its expression levels in ileum were 0.466 ± 0.337 and 0.517 ± 0.280 at nutrition-rich and nutrition-deficiency periods, respectively. There was no significant difference between two different nutritional periods for BCMO1 expression in two tissues ($P > 0.05$). The expression of BCMO1 protein was lower at nutrition-rich period than that at the nutrition-deficiency period for most tissues, which indicated that sufficient content of vitamin A in tissues might inhibit expression of BCMO1, as the contents of β -carotene and vitamin A were adequate in Yak tissues at nutrition-rich time. It is very important to maintain and regulate vitamin A metabolic balance in Yak at different nutrition periods.

Key words: β -carotene-15, 15'-monooxygenase 1; Western blotting; Nutrition balance

生活在海拔 3 000 ~ 6 000 m 高寒地区的牦牛 (*Bos mutus*) 由于特殊的生活环境已具有耐高寒、抗缺氧的优良特性。它们对高原严寒、季节性的营养匮乏亦具有良好的适应机制。虽然牦牛每年有 6 个月的时间在冬季牧场, 但是它能顺利度过营养缺乏的枯草季节, 并保持一定的产乳、产肉及繁殖能力, 并且体内不缺乏维生素 A。

包括 β -胡萝卜素 (β -carotene) 在内的类胡萝卜素是动物体内维生素 A 的主要来源, 维生素 A 及其衍生物 (视黄酸和视黄醛) 不仅可维持动物和人的正常视力, 而且能够提高免疫力,

调节细胞分化、发育和增殖等 (von Lintig et al. 2005)。而动物和人的机体不能合成维生素 A, 只能直接通过维生素 A 制剂或降解食物中的类胡萝卜素而获得 (Nickell et al. 1998, Biesalski et al. 2007)。

β -胡萝卜素-15, 15'-加单氧酶 (β -carotene-15, 15'-monooxygenase 1, BCMO1) 是维生素 A 代谢过程中的一种关键酶。它能够通过对称性裂解将 β -胡萝卜素裂解成 2 分子的全反式视黄醛, 最后生成视黄酸或维生素 A (肖寒等 2014)。BCMO1 的活性中心存在 4 个保守的组氨酸残基 (His172、His237、His308、His514),

此酶必须通过亚铁离子与 4 个残基、水、氧分子连接, 组成一个特殊的八面体结构才具有活性 (Poliakov et al. 2009)。

BCMO1 是一种可溶于细胞溶质中的酶, 在人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*)、大鼠 (*Rattus norvegicus*)、家兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 等的小肠黏膜中均检测到了该酶的活性 (Duszka et al. 1996, Barua et al. 2000, Lindqvist et al. 2005)。由于反刍动物一般需要进食包括 β -胡萝卜素在内的类胡萝卜素来产生维生素 A, 因此在草食家畜体内 BCMO1 的活性比其他动物的高。故 BCMO1 蛋白的表达对于调控和稳定牦牛体内维生素 A 平衡具有重要作用。

前期已有的研究中, 采用蛋白质印迹杂交、荧光定量、原位杂交和免疫组化等方法对不同物种中 BCMO1 基因和 BCMO1 蛋白的表达与分布进行了研究。发现 BCMO1 基因在人体整个小肠肠道、肝和肾中具有高水平表达, 而前列腺、睾丸、卵巢和骨骼肌中表达水平较低 (Lindqvist et al. 2002); 通过免疫组织化学对人类组织中 BCMO1 基因表达研究发现, BCMO1 基因在肾、肺、皮肤、睾丸、视网膜上皮色素细胞、小肠和肝均有表达 (Helden et al. 2010); 研究者联合使用 RNA 杂交和原位杂交分析了 BCMO1 在仔鸡 (*Gallus gallus*) 和大鼠体内组织特异性表达, 发现 BCMO1 主要分布在十二指肠绒毛上, 同时在肝及肺和肾的管状结构上均有表达 (Wyss et al. 2001)。Gong 等 (2006) 证明人类肠道细胞 BCMO1 表达依赖于过氧化氢酶增殖体激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR γ) 和肌细胞增强因子 2 (myocyte enhancer factor 2, MEF2) 亚型的协作功能, 二者相互作用的发现为种间 BCMO1 基因转录调控差异提供了分子基础 (Lietz et al. 2010)。

本研究应用蛋白免疫印迹法 (western blot) 从蛋白水平分析 BCMO1 蛋白在牦牛各组织中的表达差异, 从而为探讨 BCMO1 蛋白在不同

营养时期参与牦牛维持体内维生素 A 平衡的作用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

由于青藏高原气候环境的特殊性, 牧草生长时间较短, 每年的 5~9 月份为牧草生长期, 此阶段牧草中维生素类营养物质含量丰富, 在本研究中将此阶段确定为营养丰盛期, 从 10 月到次年的 4 月为牧草枯黄期, 此阶段确定为营养匮乏期。2013 年 7 月 20 日 (营养丰盛期) 和 2014 年 3 月 16 日 (营养匮乏期) 两次于青海省海西州乌兰县铜普镇采集样品。两次分别选取健康成年 (36 月龄) 雄性牦牛 3 头, 于清晨 6:00~7:00 时将牦牛颈动脉放血致死, 迅速取各组织样本, 包括十二指肠、空肠、回肠、肝、肾、肺、大腿部肌肉、瘤胃, 将其置于液氮中低温保存, 并运回实验室。

1.2 实验方法

1.2.1 总蛋白质的提取及浓度测定 从 -80℃ 冰箱取出组织, 用干净的剪刀剪下 200 mg 组织将其尽量剪碎, 置于 2 ml 的离心管中, 加 800 μ l 单去污剂裂解液 (含 PMSF) 于匀浆器中, 进行匀浆。然后置于冰上, 重复碾几次使组织尽量碾碎。裂解 10 min 后, 在 4℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清分装于 0.2 ml 离心管中并置于 -80℃ 保存。按照说明书操作步骤使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司] 测定样品蛋白质含量。

1.2.2 Western Blot 操作步骤 使用 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 按照说明书分别配制 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶。向电泳槽加注 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 室温静置凝固。向加样孔中加入 3 μ l 处理好的牦牛各组织样品, 并使用 14~20 ku 分子量的双色预染蛋白质 Maker [上海生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 作为对照。电泳时初始电压为 60 V, 当溴酚蓝染料的前缘进入分离胶后将电压升高到 120 V, 继续电泳直至溴酚蓝 (北

京索莱宝科技有限公司)跑到分离胶的下缘。电泳结束后,取出凝胶,参照蛋白质 Maker 分子量大小分别切取含有目的蛋白(BCMO1 蛋白)和管家蛋白(β -actin)的凝胶置于 BIO-RAD 转印仪中进行转膜。转膜条件:目的蛋白稳流 100 mA 转印 105 min,管家蛋白稳流 100 mA 转印 55 min;转膜后将 PVDF 膜(北京索莱宝科技有限公司)浸入 5%脱脂奶粉,室温摇动 3 h。用 TBST 溶液 1:200 稀释 BCMO1 一抗(北京华大蛋白质研发中心有限公司制备),加入装有 PVDF 膜的孵育袋中,移除所有气泡,4℃孵育过夜;将 4℃孵育过夜的 PVDF 膜用 TBST 洗 5 次,每次 5 min;将辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠 IgG 抗体(1:3 000)(武汉博士德生物工程有限公司)加入装有 PVDF 膜的孵育袋中,移除所有气泡,室温下振荡孵育 2 h;再用 TBST 洗 10 次,每次 6 min。内参 β -actin 抗体[艾美捷(Abcam)科技有限公司]用 TBST 溶液按照 1:2 000 稀释,操作过程按照上述步骤进行。使用 ECL 发光试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)进行化学发光,并在暗室中使用胶片曝光,最后,将胶片进行拍照。

首先进行同一营养期不同组织蛋白量表达差异检测,然后比较不同营养期同一组织蛋白量表达差异。

1.3 数据分析

使用 Image J 软件测定其灰度值,灰度值的大小代表所测蛋白表达量的高低。以管家蛋白 β -actin 作为内参进行半定量分析,最终以目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值表示 BCMO1 蛋白相对表达量。采用 SPSS 22.0 软件进行统计,统计数据采用平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 的形式表示,采用多重比较统计方法,检验同一时期不同组织之间蛋白相对表达量的差异性;采用 t 检验统计不同时期同一组织之间的差异性;差异性显著定义为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 营养匮乏期和营养丰盛期牦牛各组织目的蛋白和内参蛋白免疫印迹结果

营养匮乏期和营养丰盛期牦牛各组织 BCMO1 蛋白和 β -actin 蛋白免疫印迹结果见图 1。同一营养期,不同组织中 BCMO1 蛋白表达水平存在差异。

2.2 营养匮乏期和营养丰盛期牦牛各组织间 BCMO1 蛋白相对表达量结果

营养匮乏期和营养丰盛期牦牛各组织间 BCMO1 蛋白相对表达量测定结果见图 2。

在营养匮乏期,十二指肠中 BCMO1 蛋白的表达量最高 ($P < 0.05$);空肠和回肠组织中 BCMO1 蛋白表达差异不显著 ($P > 0.05$),但高于肾和瘤胃 ($P < 0.05$);肝组织中 BCMO1 蛋白表达量最低。在营养丰盛期牦牛肝组织中 BCMO1 蛋白表达量最高,显著高于其他组织 ($P < 0.05$);十二指肠、空肠和回肠组织中 BCMO1 蛋白表达差异不显著 ($P > 0.05$),而十二指肠高于肺 ($P < 0.05$);肺组织 BCMO1 蛋白表达又明显高于肾、肌肉和瘤胃 ($P < 0.05$),而肌肉和瘤胃之间差异不显著 ($P > 0.05$)。由于试验中受加样孔数量限制,每次只能做一个时期的样品,所以图 2 相对表达量结果不能反映不同营养时期同一组织中 BCMO1 蛋白表达差异。

将不同营养时期同一组织样品作为一组进行 BCMO1 蛋白相对表达量的检测,结果见表 1,此结果可反映出不同营养期,同一组织 BCMO1 蛋白相对表达量的差异。牦牛十二指肠、空肠、肾、肌肉和瘤胃组织中的 BCMO1 蛋白表达量,在营养丰盛期均低于营养匮乏期 ($P < 0.05$),这可能由于在营养丰盛期维生素 A 的补充较为充足,导致维生素 A 反馈调节抑制了 BCMO1 蛋白的表达;而肝中的 BCMO1 蛋白表达量在营养丰盛期要显著高于营养匮乏期 ($P < 0.05$),由于肝是维生素 A 源的代谢和储存运输的枢纽,在营养丰盛期补充的维生素 A 源较为充分,需要降解大量的类胡萝卜素化合物,从而促进肝中此蛋白表达升高;肺和回



图 1 Western Blot 检测牦牛组织中 BCMO1 和 β-actin 蛋白免疫印迹结果

Fig. 1 Western blotting for BCMO1 and β-actin in Yak tissues

a. 营养匮乏期牦牛组织中 BCMO1 蛋白免疫印迹结果；b. 营养丰盛期牦牛组织中 BCMO1 蛋白免疫印迹结果。

a. Western blotting for BCMO1 in yak tissues collected from nutrition-deficiency periods; b. Western blotting for BCMO1 in yak tissues collected from nutrition-rich period.

肝. Liver; 肺. Lung; 肾. Kidney; 肌肉. Muscle; 十二指肠. Duodenum; 回肠. Ileum; 空肠. Jejunum; 瘤胃. Rumen.

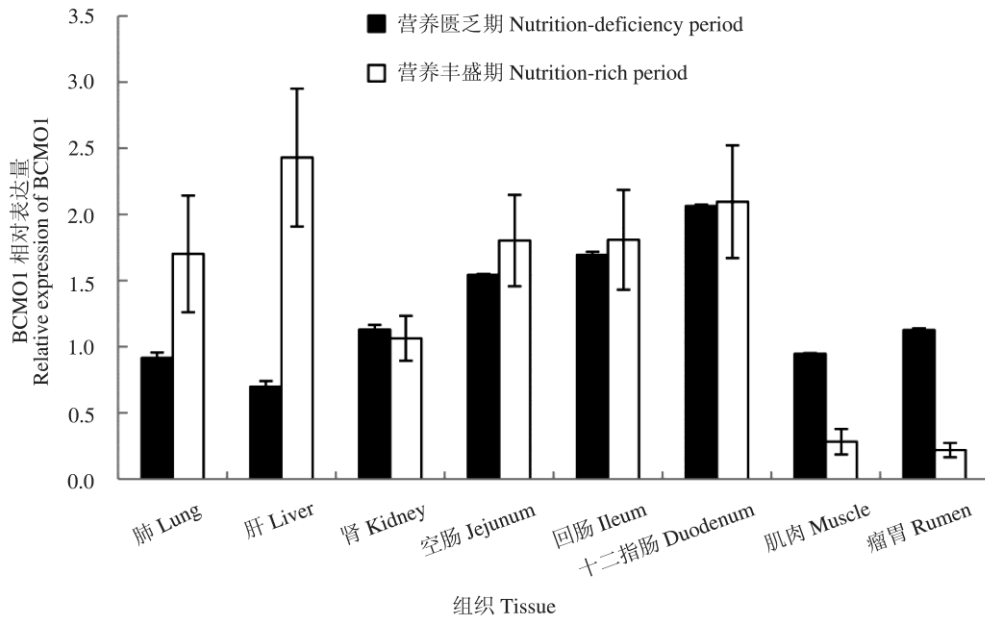


图 2 营养匮乏期和营养丰盛期牦牛各组织间 BCMO1 蛋白相对表达量

Fig. 2 Quantification of BCMO1 protein levels in Yak tissues at nutrition-deficiency and nutrition-rich periods

肠在两个营养时期差异不显著 ($P > 0.05$)。

(小鼠、大鼠、家兔等)上已得到验证 (Duszka et al. 1996, Lindqvist et al. 2004, Zaripheh et al. 2006)。通过 RNA 印记和蛋白质免疫印迹法证明了人类各组织中 BCMO1 的表达。本文采用

3 讨论

BCMO1 的表达和活性在人类及其他物种

表 1 不同营养时期牦牛组织 BCMO1 蛋白相对表达量

Table 1 Relative expression of BCMO1 protein in yak tissues at different nutrition periods

组织 Tissue	营养丰盛期 Nnutrition-rich period	营养匮乏期 Nutrition-deficiency period
肝 Liver	0.919 ± 0.228 ^a	0.611 ± 0.337 ^b
回肠 Ileum	0.466 ± 0.337 ^a	0.517 ± 0.280 ^a
空肠 Jejunum	0.336 ± 0.255 ^a	0.627 ± 0.198 ^b
十二指肠 Duodenum	0.811 ± 0.134 ^a	1.288 ± 0.077 ^b
肺 Lung	1.128 ± 0.407 ^a	1.083 ± 0.232 ^a
瘤胃 Rumen	1.014 ± 0.089 ^a	1.543 ± 0.054 ^b
肌肉 Muscle	0.619 ± 0.092 ^a	1.175 ± 0.203 ^b
肾 Kidney	0.739 ± 0.404 ^a	1.201 ± 0.055 ^b

不同时期同一组织间比较, 相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著。

For different stages in same organ, the same letter indicates no significant difference, while different letters indicate significant difference.

Western blot 对不同营养期牦牛 8 种组织中 BCMO1 蛋白表达差异进行研究, 发现在不同营养时期, 牦牛 8 种组织中 BCMO1 蛋白均有表达, 且营养匮乏期十二指肠中 BCMO1 蛋白表达最高, 肝最低, 而营养丰盛期肝的表达量反而增强, 我们推测可能在营养丰盛期机体补充的类胡萝卜素化合物较为充足, 消化系统内有大量类胡萝卜素化合物需要降解, 而肝是 β -胡萝卜素代谢的主要器官, 导致 BCMO1 蛋白在肝中的表达增强, 但由于体内维生素 A 的整体水平较高, 其他组织器官中降解类胡萝卜素化合物的压力减轻, 导致其他组织器官内 BCMO1 的表达水平较低, 此种状况也有利于类胡萝卜素化合物在营养丰盛期储存于包括脂肪在内的各种组织中。在营养匮乏期, 牦牛需要将体内储存的类胡萝卜素化合物转化为维生素 A, 而小肠是营养物质吸收转运以及各种消化酶分泌的主要场所, 所以 BCMO1 蛋白在小肠中的表达增加, 同时, 其他组织器官中 BCMO1 的表达水平也相应提高, 也许与 β -胡萝卜素降解压力的提高有关。在 β -胡萝卜素和维生素 A 营养较为充分的营养丰盛期, 牦牛大部分组织中 BCMO1 蛋白表达量较匮乏期要低, 说明维生素 A 的补充可能对牦牛大多数组织中 BCMO1 的表达有一定的反馈抑制调节作

用; 当维生素 A 缺乏时, BCMO1 表达增强, 以利于体内类胡萝卜素化合物的降解, 满足牦牛对维生素 A 的需求。如果牦牛以这种方式调节和维持维生素 A 的平衡, 使机体在任何情况下都不会出现维生素 A 缺乏或维生素 A 过剩, 这为解释牦牛适应特殊的高原营养环境提供了重要证据。

参 考 文 献

- Barua A B, Olson J A. 2000. β -carotene is converted primarily to retinoids in rats *in vivo*. *Journal of Nutrition*, 130(8): 1996–2001.
- Biesalski H K, Chichili G R, Frank J, et al. 2007. Conversion of β -carotene to retinal pigment. *Vitamins & Hormones*, 75(6): 117–130.
- Duszka C, Grolier P, Azim E M, et al. 1996. Rat intestinal beta-carotene dioxygenase activity is located primarily in the cytosol of mature Jejunal Enterocytes. *Journal of Nutrition*, 126(10): 2550–2556.
- Gong X M, Yan T B. 2006. Cooperation between MEF2 and PPAR gamma in human intestinal, beta, beta-carotene 15, 15'-monooxygenase gene expression. *Bmc Molecular Biology*, 7(707): 1–12.
- Helden Y G J V, Heil S G, Schooten F J V, et al. 2010. Knockout of the BCMO1 gene results in an inflammatory response in female lung, which is suppressed by dietary beta-carotene. *Cellular &*

- Molecular Life Sciences, 67(12): 2039–2056.
- Lietz G, Lange J, Rimbach G. 2010. Molecular and dietary regulation of β , β -carotene 15, 15'-monooxygenase 1 (BCMO1). Archives of Biochemistry and Biophysics, 502(1): 8–16.
- Lindqvist A, Andersson S. 2002. Biochemical properties of purified recombinant human β -carotene 15, 15'-monooxygenase. Journal of Biological Chemistry, 277(26): 23942–23948.
- Lindqvist A, Andersson S. 2004. Cell type-specific expression of beta-carotene 15, 15'-mono-oxygenase in human tissues. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 52(4): 491–499.
- Lindqvist A, He Y G, Andersson S. 2005. Cell type-specific expression of β -carotene 9', 10'-monooxygenase in human tissues. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 53(11): 1403–1412.
- Nickell D C, Bromage N R. 1998. The effect of dietary lipid level on variation of flesh pigmentation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 161(14): 237–251.
- Poliakov E, Gentleman S, Chander P, et al. 2009. Biochemical evidence for the tyrosine involvement in cationic intermediate stabilization in mouse β -carotene 15, 15'-monooxygenase. Bmc Biochemistry, 10(1): 31.
- von Lintig J, Hessel S, Isken A, et al. 2005. Towards a better understanding of carotenoid metabolism in animals. Biochimica Et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease, 1740(2): 122–131.
- Wyss A, Wirtz G, Woggon W, et al. 2001. Expression pattern and localization of β , β -carotene 15, 15'-dioxygenase in different tissues. Biochemical Journal, 354(3): 521–529.
- Zaripheh S, Nara T Y, Nakamura M T, et al. 2006. Dietary lycopene downregulates carotenoid 15, 15'-monooxygenase and PPAR- γ in selected rat tissues. The Journal of Nutrition, 136(4): 932–938.
- 肖寒, 靳青, 刘桂芬, 等. 2014. 2 种胡萝卜素加氧酶相关特性及调控机制的研究进展. 动物营养学报, 26(12): 3587–3592.