

热应激时奶牛血液中游离氨基酸流向与乳蛋白下降的关系研究

艾 阳, 曹 洋, 谢正露, 张源淑*, 沈向真
(南京农业大学 农业部动物生理生化重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘 要: 目的: 探讨热应激时奶牛血液中氨基酸与乳蛋白的相互关系。方法: 选取6头相同泌乳期奶牛, 正常饲养和饮水, 实验期35 d (6月29日—8月5日)。每日10:00和18:00记录气温, 统计产奶量, 每周取全天奶样, Foss乳成分分析仪检测乳蛋白含量。于实验开始第1周和最后1周采集颈静脉血液, 反相高效液相色谱法检测血液中游离氨基酸含量。结果: 随着气温的升高 (由26℃升高至最高38℃), 实验奶牛日均产奶量由15.2 kg/d下降至10 kg/d, 乳蛋白产量由0.47 kg/d下降至0.31 kg/d。血液中Glu、Asp、Gly和Val等主要的生糖氨基酸 (参与糖异生作用) 以及Leu、Ile等生酮氨基酸均升高或显著升高 ($0.01 < P < 0.05$); 总支链氨基酸 (Val、Ile、Leu, 主要参加免疫反应) 含量显著增加 ($P < 0.05$), 在必需氨基酸中所占的比例由54.75%增至67.89%。结论: 在夏季高温高湿条件下, 奶牛可发生热应激, 产奶量和乳蛋白含量均降低, 但血液中游离氨基酸, 特别是支链氨基酸含量显著升高。提示热应激时奶牛血液中高水平的游离氨基酸并未完全用于乳蛋白的合成, 还发挥了除此之外的其他作用, 而后的作用优先于参与乳蛋白的合成, 即可能优先作为功能性氨基酸参与了机体的其他活动。

关键词: 热应激; 泌乳奶牛; 乳; 乳蛋白; 血浆; 游离氨基酸

Relationship between Free Amino Acids in Cow's Blood and Decreasing Milk Protein under Heat Stress

AI Yang, CAO Yang, XIE Zhenglu, ZHANG Yuanshu*, SHEN Xiangzhen

(Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Heat stress is an unspecific reaction of the body in hot and moist environments. Many studies have demonstrated that heat stress can be formed at temperature over 22 °C or temperature-humidity index higher than 72. In order to explore the relationship between free amino acids in plasma and milk protein synthesis under heat stress, we selected 6 dairy cows with similar parturition, regular diet and unlimited drink. The experiment lasted 35 days (from June 29 to August 5). The temperature (at 10:00 and 18:00) and milk yield were recorded. The protein content in whole-day milk sample was tested weekly by FOSS milk composition analyzer. Blood samples from jugular vein in both the first and last weeks were also collected. The free amino acid contents in blood samples were analyzed by RP-HPLC system. Our results showed that the milk yield decreased from 15.2 to 10 kg/d as the temperature rose from 26 to 38 °C, while milk protein declined from 0.47 to 0.31 kg/d. In blood, Glu, Asp, Gly and Val, known as the main amino acids for gluconeogenesis, increased ($0.01 < P < 0.05$), so did Leu and Ile, known as the main amino acids for ketogenesis. The branch chain amino acids (Val, Ile and Leu) responsible for immune response increased significantly. In conclusion, in hot and moist environment, dairy cows were vulnerable to heat stress, which could cause reduction of milk production and milk protein synthesis, suggesting that the high level of blood amino acids could preferentially exert other functions besides milk protein synthesis under heat stress.

Key words: heat stress; lactating dairy cows; milk; milk protein; plasma; free amino acids

中图分类号: S827.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 11-0038-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201511008

热应激是机体处于湿热环境下的一种非特异性反应。许多研究表明, 当气温高于22℃或温湿指数

(temperature-humidity index, THI) 高于72时就会发生热应激。热应激会引起奶牛产奶量下降和乳品质降低。

收稿日期: 2014-07-08

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973计划) 项目 (2011CB100802)

作者简介: 艾阳 (1987—), 男, 硕士, 主要从事动物机能生物化学研究。E-mail: Justin-ai@163.com

*通信作者: 张源淑 (1962—), 女, 教授, 博士, 主要从事乳蛋白生物活性肽和乳品质研究。E-mail: zhangyuanshu@njau.edu.cn

研究表明,热应激时期乳中蛋白质、糖类、脂质含量均降低,且乳脂水平为一年中最低^[1]。高民等^[2]研究发现,热应激可导致奶牛饲料营养物质消化率下降。Shehab-El-Deen^[3]、O'Brien^[4]等研究认为热应激可降低基础循环中的葡萄糖含量,使血糖浓度显著降低。热应激也会抑制细胞和体液免疫,并会诱发诸如乳房炎、子宫内膜炎、胎衣不下等疾病,是夏季奶业生产中面临的主要问题^[5-6]。近年来,随着全球气候变暖,热应激情况愈发严重。尤其是在高温高湿的中国南方,热应激成为关键环境因素,严重制约着奶业发展。

乳蛋白是乳中总蛋白的总称,约占乳中干物质的90%,是构成乳重要营养品质的主要物质基础。氨基酸是蛋白质合成的基本原料,也是构成机体免疫系统的基本物质。血液中氨基酸是乳蛋白的前体物和原料,其在血液中的含量决定着乳中蛋白质的含量。已有文献报道氨基酸适宜均衡的饲料有利于乳蛋白的合成^[6]。另有研究表明氨基酸在血液中的变化反映了乳蛋白的变化,血液中氨基酸增加,乳蛋白的含量也增加^[7]。因此,血液中氨基酸含量与乳蛋白合成之间的相互关系一直是备受关注的研究热点。但目前仍未见热应激条件下二者关系的详细报道。本研究通过分析研究南京地区夏季6—8月高温高湿气候条件下,奶牛乳产量和乳品质的变化,从血液中乳蛋白前体物——氨基酸代谢变化的角度探讨夏季热应激情况下,乳蛋白下降与血液游离氨基酸重分配间的相互关系,揭示其可能机制,以期夏季奶牛合理饲养提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂与仪器

邻苯二甲醛(*o*-phthalaldehyde, OPA) 国药集团化学试剂有限公司; β -巯基乙醇(2-mercaptoethanoic acid, β -ME) 美国Sigma公司; 甲醇(色谱级) 德国默克公司; 乙腈(色谱级) 美国天地有限公司; 四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF, 色谱纯) 上海凌峰化学试剂有限公司; 其余试剂均为分析纯。20种氨基酸标准品纯度均大于98%,美国Holey教授馈赠。

Foss乳成分分析仪 丹麦Hillerod公司; 1100型安捷伦高效液相色谱仪(配有G1311A型液相流动泵, G1321A型紫外-可见检测器) 法国Agilent公司; WAT045905型C₁₈色谱柱 美国Waters公司; 室温检测仪唐山现代工控技术有限公司; 自动挤奶机 淄博博山先锋机械厂; 集乳器 余姚市宇海塑料制品有限公司。

1.2 动物与饲养

6头健康, 体质量(490±7) kg、分娩日期相近的泌乳期荷斯坦奶牛, 饲养于南京农业大学江浦畜牧兽医

实验站(北纬32° 93', 东经119° 82')。采用Cornell-Penn-Miner System(NRC 2001)设计基础日粮, 饲料中青贮玉米为60%, 苜蓿干草17%, 精饲料23%, 具体营养成分见表1。

饲养期从6—8月为南京暑热期间, 维持35 d(2013年6月29日—8月5日)。6头奶牛均饲养于开放式牛舍中, 实验期间自由饮水, 每天分别于4:00、12:00和18:00喂给饲料并于奶牛采食完成后挤奶。

表1 日粮营养成分

Table 1 Ingredients of diets

日粮	配比/%	日粮	配比
青贮玉米	30.00	营养指标	
苜蓿	30.00	经能量/(MJ/kg)	6.36
玉米	24.30	粗蛋白含量/%	16.99
豆粕	13.50	粗脂肪含量/%	3.93
磷酸氢钙	0.85	中性洗涤纤维含量/%	36.54
石粉	0	酸性洗涤纤维含量/%	22.51
食盐	0.35	非纤维性碳水化合物含量/%	33.76
预混料	1.00	钙含量/%	0.88
合计	100	磷含量/%	0.43

1.3 气温测定

实验期间每日气温纪录采用室温检测仪, 于上午10:00和下午18:00 2次测定, 2次气温平均值记为每天日间气温。实验期间日间气温介于26~38℃之间。

1.4 产奶量和乳成分测定

产奶量: 每天于奶牛进食后进行挤奶, 挤奶采用自动挤奶机, 集乳器收集后称质量, 早中晚3次总和为每日产奶量。

乳蛋白含量测定: 实验期间每周周五采集全天乳样, 按体积比4:3:3将早、中、晚奶样混合加入200 μ L饱和重铬酸钾作为全天乳样, 送至南京卫岗乳业乳品检测中心检测。采用Foss乳成分分析仪检测乳蛋白含量。

1.5 血液样品的采集与处理

血液样品分别于实验开始(0周)和第5周采集。采集采用真空抗凝管于奶牛进食后2 h收集每头奶牛颈静脉血液。采集的血液以3 000 r/min离心15 min后, -20℃保存待测。

1.6 血液游离氨基酸的定量分析

采用OPA氨基酸柱前衍生法。反相高效液相色谱(reversed high performance liquid chromatography, RP-HPLC)仪: Kromasil C₈柱; 流动相: A为甲醇, B为乙腈; C为水, D为磷酸盐缓冲液(pH 7.2, 含3%四氢呋喃)。梯度洗脱, 程序为10 min 9% A、6% B与85% D, 10~25 min 12% A、8% B与80% D, 25~40 min 15% A、15% B与70% D, 40 min 30% A、25% B与45% D, 直至最终洗脱完成。

样品处理和操作方法按照张树坤等^[8]方法进行。

流速为1 mL/min, 激发波长为340 nm, 紫外检测波长450 nm, 进样量20 μ L。取样品手工进行进行色谱分析。

2 结果与分析

2.1 乳产量和气温变化

2.1.1 气温变化

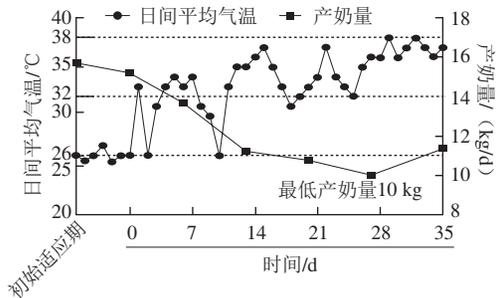


图1 实验期间每日气温和乳产量

Fig.1 Average daily temperature and milk production during the experiment

由图1可知, 实验前1周为适应期, 饲喂实验饲料, 期间记录每日气温。实验第1周, 环境气温保持在26 $^{\circ}$ C左右。从第2周开始, 日间平均气温剧烈上升, 总体保持在32 $^{\circ}$ C以上, 在总共35 d的实验期中, 日间平均气温32 $^{\circ}$ C以上持续时间达25 d, 占实验总天数的68.5%。整个实验期间最高温度为38 $^{\circ}$ C, 共计2 d。

一般认为THI高于72时奶牛就会发生热应激^[5]。根据THI公式和相关文献^[9], 当温度达到32 $^{\circ}$ C时奶牛会发生热应激, 由此可以认为本实验设计中参试奶牛处于热应激状态。

2.1.2 热应激对乳产量的影响

由图1可知, 在实验开始的前2周, 产奶量迅速降低(由15.2 kg/d降至11.2 kg/d), 而这一时间内温度由26 $^{\circ}$ C上升至36 $^{\circ}$ C。实验中随着热应激的发生发展, 产奶量不断下降, 最低为10 kg/d, 仅为开始时的67%, 下降了33%。乳产量随着实验期间温度上升总体呈下降趋势。

2.2 热应激对乳蛋白的影响

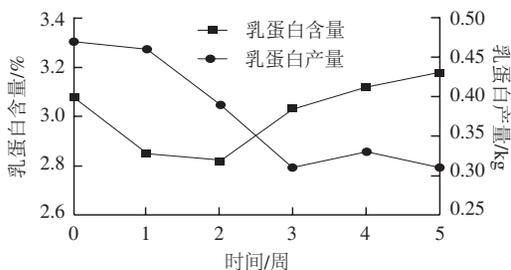


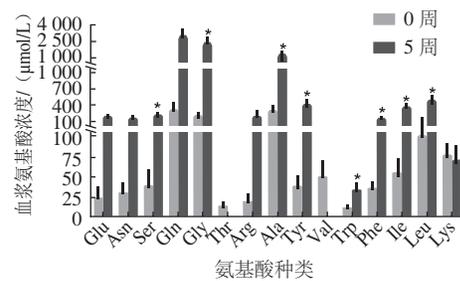
图2 实验期间乳蛋白变化

Fig.2 Milk protein changes during the experiment

如图2所示, 乳蛋白含量在实验前2周迅速下降, 由3.08%下降至2.82%, 其后3周含量又逐渐恢复至3.18%。

由于在实验过程中产奶量随时间变化和温度的升高不断降低, 随后又统计了乳中蛋白质的实际质量, 蛋白质的实际质量在前3周由0.47 kg下降至0.31 kg, 后2周保持在较低水平。这种含量百分比与实际质量之间相异的变化很可能是由于在7月份的高温天气下, 奶牛排汗增多, 产奶量下降, 乳蛋白由于浓缩而升高了其含量百分比, 而乳蛋白实际质量是降低的。

2.3 热应激对血液中乳蛋白合成前体物氨基酸代谢流向的影响



*. 0.01 < P < 0.05, 表示差异显著。

图3 实验期间氨基酸变化

Fig.3 AA changes during the experiment

由图3可知, 随着实验期的延长, 血液中游离氨基酸中的必需氨基酸和非必需氨基酸含量均显著增高。随着温度的升高, 热应激程度的加深, 除Thr以外, 血液中各游离氨基酸浓度均升高, Ser、Gly、Ala、Tyr、Val、Trp、Ile和Leu显著升高 ($P < 0.05$), 其中支链氨基酸 (Val、Ile、Leu, 主要参与免疫反应) 明显升高 ($(198.37 \pm 52.58) \sim (1474.85 \pm 355.83) \mu\text{mol/L}$), 从54.75%增至67.89% ($P = 0.024 < 0.05$), 生酮氨基酸从 $(169.27 \pm 32.27) \mu\text{mol/L}$ 升至 $(502.76 \pm 105.50) \mu\text{mol/L}$ ($P = 0.037 < 0.05$)。

3 讨论

THI是衡量热应激的一个重要指标。根据已有研究结果^[9], 当温度达到32 $^{\circ}$ C时, THI最低值为72, 这一数值即为奶牛发生热应激的最低THI。本实验首先对南京地区夏季6月底至8月气温条件进行了监测, 得出整个实验35 d期间牛舍的温度数据, 结果发现, 在总共35 d的实验期中, 日间平均气温32 $^{\circ}$ C以上持续时间达25 d, 最高温度为38 $^{\circ}$ C。高温持续期间THI远远超过72, 即此实验条件奶牛处于热应激状态。

20世纪30年代, 人们就发现高温可以引起产奶量下降。有研究发现随着温度上升, 奶产量会下降35%~40%^[5]; 另有研究证实, 高温与奶牛生产性能之间存在着负相关性^[6]。Soriani等^[10]研究发现当气温从21 $^{\circ}$ C上升至38 $^{\circ}$ C时, 产奶量降低程度逐渐加强, 38 $^{\circ}$ C时产奶量仅为21 $^{\circ}$ C的38.9%。本实验结果表明, 热应激时实验

组中奶产量呈直线下降,奶产量的下降与温度的升高呈明显的负相关。这一结果与以前的研究结果一致。

多年的研究证实,随着温度的上升,热应激的程度加深,奶牛不仅产奶量减少,而且生鲜乳的品质也降低。Regan等^[11]研究发现,气温达21.1℃时,生鲜乳的乳脂率有下降趋势。Suchanek等^[12]对10个品种的奶牛研究证实,在高温环境条件下,各品种奶牛产奶的乳脂、乳蛋白、乳糖、乳干物质、非脂干物质和灰分水平均有所下降。何钦^[9]研究发现,当气温从18℃上升到30℃时,乳蛋白含量下降16.9%。本研究显示,乳蛋白含量在实验的前2周迅速下降,由3.08%下降至2.82%,以后又逐渐回升,但其实际质量在前3周由0.47 kg下降至0.31 kg,后2周保持在较低水平,总体热应激时可引起乳蛋白降低。

关于热应激时乳蛋白降低的机制的研究尚不多见,侯引绪等^[13]认为,乳蛋白的降低可能是由于高温导致了奶牛的蛋白进食量降低和皮肤的氮排泄增加造成的,但详细的机制并没有阐明。氨基酸是蛋白质合成的原料。奶牛血液中氨基酸是乳蛋白合成的前体物和原料,其在血液中的含量决定着乳中蛋白的含量。已有文献报道氨基酸适宜均衡的饲料有利于围产期奶牛乳蛋白的合成^[6]。张树坤等^[8]对泌乳山羊的研究证实,血液中氨基酸增加,乳蛋白的前体物也增加,乳蛋白含量增加。其在热应激情况下,与乳蛋白的合成关系如何,是否如围产期奶牛或奶山羊一样有利于乳蛋白的合成?尚没有研究报道。为了证实这一推测,本实验进一步检测了实验组各奶牛血液中游离氨基酸的含量,结果发现,当奶牛处于热应激时,其血液中游离氨基酸浓度均明显升高,与以上的研究结果相反。另外,本结果也发现,热应激时奶牛血液中支链氨基酸(主要参与免疫反应,调节蛋白质代谢^[14-16]),Glu、Asp、Gly和Val等主要的生糖氨基酸(参与糖异生作用,调节蛋白质贮存,调节基因表达)^[15-21]以及Leu、Ile等生酮氨基酸均显著升高。提示热应激时奶牛血液中高水平的游离氨基酸并未完全用于乳蛋白的合成,也就是说,奶牛机体处于热应激情况下,血液中氨基酸除了发挥其作为前体物合成蛋白质的作用外,还发挥了除此之外的其他作用,而後者的作用优先于参与乳蛋白的合成。详细机理有待进一步研究。

总之,我国夏季多呈高温高湿天气,奶牛热应激程度严重,造成产奶量减少,生鲜乳质量降低,深入揭示其影响机制和防控措施是十分重要的。

参考文献:

- [1] 陈福音,高艳霞,李建国. 奶牛热应激的危害及营养调控措施[J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(8): 37-41.
- [2] 高民,杜瑞平,温雅丽. 热应激对奶牛生产的影响及应对策略[J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(9/10): 59-61.
- [3] SHEHAB-EL-DEEN M A, LEROY J L, FADEL M S, et al. Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early post-partum[J]. *Animal Reprod Science*, 2010, 117(3/4): 189-200.
- [4] O'BRIEN M D, RHOADS R P, SANDERS S R, et al. Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle[J]. *Domest Animal Endocrinol*, 2010, 38(2): 86-94.
- [5] WEST J W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle[J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(6): 2131-2144.
- [6] LIANG D, WOOD C L, McQUERRY K J, et al. Influence of breed, milk production, season, and ambient temperature on dairy cow reticulorumen temperature[J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(8): 5072-5081.
- [7] 程玉兰,徐鹏. 热应激对奶牛行为和性能的影响及综合缓解措施[J]. 中国奶牛, 2011(7): 47-50.
- [8] 张树坤,姜雪元,倪迎冬,等. 不同精粗饲料对泌乳中期山羊氨基酸的代谢流向及乳蛋白含量的影响[J]. 草业学报, 2012, 21(3): 258-265.
- [9] 何钦. 热应激对不同泌乳阶段奶牛生产性能及其营养代谢的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [10] SORIANI N, PANELLA G, CALAMARI L. Rumination time during the summer season and its relationships with metabolic conditions and milk production[J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96: 5082-5094.
- [11] REGAN W M. Reactions of the dairy cow to changes in environmental temperature[J]. *Journal of Dairy Science*, 1938, 21(2): 73-79.
- [12] SUCHANEK B, GAJDUSEK S. Composition of the milk of cattle breed in the CSFR[J]. *Zivocisna Vyroba*, 1991, 36: 289-296.
- [13] 侯引绪,张凡建,魏朝利. 中度热应激对荷斯坦牛部分血液生化指标的影响[J]. 中国奶牛, 2013(1): 11-13.
- [14] RHOADS J M, WU G. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine[J]. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 111-122.
- [15] ESCOBAR J, FRANK J W, SURYAWAN A, et al. Physiological rise in plasma leucine stimulates muscle protein synthesis in neonatal pigs by enhancing translation initiation factor activation[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2005, 288(5): E914-E921.
- [16] ESCOBAR J, FRANK J W, SURYAWAN A, et al. Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched chain amino acids in neonatal pigs[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2006, 290(4): E612-E621.
- [17] MEIJER A J, DUBBELHUIS P F. Amino acid signaling and the integration of metabolism[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 313(2): 397-403.
- [18] YAO Kang, YIN Yulong, CHU Wuyin, et al. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs[J]. *Journal of Nutrition*, 2008, 138(5): 867-872.
- [19] OU Deyuan, LI Defa, CAO Yunhe, et al. Dietary supplementation with zinc oxide decreases expression of the stem cell factor in the small intestine of weanling pigs[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007, 18(12): 820-826.
- [20] GALLI F. Amino acid and protein modification by oxygen and nitrogen species[J]. *Amino Acids*, 2007, 32(4): 497-499.
- [21] WU Guoyao. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition[J]. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 1-17.