

Pten 对奶牛乳腺上皮细胞活力及乳蛋白合成的影响

王卓然, 侯晓明, 曲波, 王杰, 高学军, 李庆章*

(东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 *Pten* 作为抑癌基因, 参与调控细胞生长、粘附、凋亡以及其它细胞活动。目前, 国内外关于 *Pten* 在奶牛乳腺发育过程中表达及调节的研究鲜有报道。为了揭示 *Pten* 的表达与奶牛乳腺发育与泌乳之间的关系, 本研究应用 qRT-PCR 技术检测 *Pten* 在不同泌乳时期和不同乳品质的奶牛乳腺组织中的表达差异, 进而应用脂质体转染方法, 通过 siRNA 介导的 RNA 干扰技术改变 *Pten* 基因在奶牛乳腺上皮细胞中的表达量, CASY 法检测细胞活力, 用 ELISA 试剂盒检测细胞分泌 β -酪蛋白的含量, 采用 qRT-PCR、Western 印迹等技术检测 *Pten* 对奶牛乳腺上皮细胞中乳蛋白相关信号通路基因表达的影响。结果显示, 泌乳期高乳品质奶牛乳腺组织中 *Pten* 表达水平显著低于泌乳期低乳品质及干乳期奶牛; *Pten* 基因沉默后, 细胞活力提高, β -酪蛋白质量浓度增加, CSN2、AKT、MTOR、STAT5 表达量增加。研究表明, *Pten* 可通过抑制细胞活力和乳蛋白分泌而影响泌乳。

关键词 *Pten*; RNA 干扰; 奶牛乳腺; 细胞活力; 乳蛋白

中图分类号 Q527

Impact of *Pten* on Cell Viability and Milk Protein Synthesis in Dairy Cow Mammary Epithelial Cells

WANG Zhuo-Ran, HOU Xiao-Ming, QU Bo, WANG Jie, GAO Xue-Jun, LI Qing-Zhang*

(Key Laboratory of Dairy Science of Education Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract *Pten*, as a tumor suppressor gene, participates in the regulation of cell growth, adhesion, apoptosis and other cell progresses. However, the knowledge about expression and regulation mechanism of *Pten* in the development of dairy cow mammary gland is limited. To reveal the relationship among *Pten* and dairy cow mammary gland development and lactation, qRT-PCR was used to analyze the expression level of *Pten* of dairy cow mammary gland in different lactation period and milk quality. Liposome transfection technique was used to change the expression of *Pten* in dairy cow mammary epithelial cells by RNA interference. The viability of dairy cow mammary epithelial cells was analyzed by CASY-YY method. The content of β -casein was detected by ELISA. The effect of *Pten* on milk protein related signaling pathway genes in dairy cow mammary epithelial cells was analyzed by qRT-PCR and Western blotting, respectively. The results showed that *Pten* mRNA expression was decreased significantly in lactation mammary gland with high milk quality, compared with lactation mammary gland with low milk quality and pregnancy period tissue. After *Pten* silence cell viability was enhanced, β -casein content was increased, and CSN2, AKT, MTOR, STAT5 expression was increased also. The results suggest that *Pten* may inhibit mammary epithelial cells lactation by suppressing cell viability and milk protein synthesis.

Key words *Pten*; RNA interference; dairy cow mammary; cell viability; milk protein

收稿日期: 2013-10-25; 接受日期: 2014-01-08

国家重点基础研究发展规划(973 计划, No. 2011CB100804)

* 联系人 Tel: 0451-55191416; E-mail: qzli@neau.edu.cn.

Received: October 25, 2013; Accepted: January 8, 2014

Supported by Major State Basic Research Development Program of China (973 Program, No. 2011CB100804)

* Corresponding author Tel: 0451-55191416; E-mail: qzli@neau.edu.cn.

Pten (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) 为一新发现的抑癌基因, 其中文名为人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因, 在体内所有组织中都有表达^[1]. 它通过负调控多种信号转导途径包括磷脂酸肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, 又称 AKT) 途径、局部粘着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 途径和丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 途径调节细胞生长、增殖、生存及转移^[2]. *Pten* 可能在乳腺组织中发挥作用. 近期一项研究表明, PTEN-AKT 通路通过诱导催乳素自分泌参与泌乳启动, 并且证明了 AKT 和信号传导子及转录激活子 5 (signal transducer and activator of transcription 5, STAT5) 通路直接相关联^[3]. 研究发现, *Pten* 过表达可抑制小鼠乳腺上皮细胞的生长、分化并促进细胞凋亡^[4]. 但是, *Pten* 在奶牛乳腺中的影响尚无相关报道. 乳腺是合成乳蛋白的重要器官, 乳蛋白的质量分数与组成是衡量牛奶营养品质的重要指标, 其质量分数高低不仅决定牛奶的风味水平, 而且体现了乳制品企业的产品核心竞争力^[5]. 酪蛋白是乳腺上皮细胞产生的磷酸化蛋白, 它的合成及分泌是研究激素、细胞外基质对乳腺细胞分泌作用的标志^[6].

为进一步阐释 *Pten* 作用机制, 本文拟从不同发育时期乳腺组织中鉴定 *Pten* 差异性, 对 *Pten* 沉寂, 在细胞水平检测 *Pten* 表达量变化对奶牛乳腺细胞增殖及泌乳功能的影响, 为人工调控乳产量和乳质量奠定实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物组织 本研究选取的荷斯坦奶牛均在相同饲喂条件下饲养. 选择泌乳期高乳品质 (H, 乳蛋白率 > 3.0%)、泌乳期低乳品质 (L, 乳蛋白率 < 3.0%) 及干乳期荷斯坦奶牛 (P) 各 3 头进行试验. 乳腺组织取材后迅速放入液氮中带回实验室, -80℃ 储存备用.

1.1.2 RNA 干扰片段 *Pten* RNA 干扰片段由上海吉玛生物有限公司设计并合成. 干扰序列: *Pten* inhibitor 上游 5'-GCACAAGAGGCCCUAGAUUTT-3', 下游 5'-AAUCUAGGGCCUCUUGUGCTT-3'. Negative control 上游 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'; 下游 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'.

1.1.3 抗体 兔抗羊 casein beta (CSN2)、AKT、phospho-AKT (Ser473)、mechanistic target of rapamycin (MTOR)、phospho-MTOR、STAT5、phospho-STAT5 多克隆抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA); 兔抗羊 PTEN 多克隆抗体, 鼠抗羊 β -Actin 多克隆抗体, 辣根酶标记羊抗兔、羊抗鼠 IgG, FITC 二抗 (Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA).

1.1.4 试剂和仪器 *Pten* inhibitor, Negative Control (N. C), Trizol, ECL 超敏发光液, CASY-ton 缓冲液, Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA), 激光共聚焦显微镜 (Leica TCS SP2).

1.2 奶牛乳腺不同发育时期 *Pten* 表达量

针对奶牛不同发育时期乳腺组织, 采用荧光定量的方法对泌乳期高乳品质、泌乳期低乳品质及干乳期 *Pten* 进行相对定量分析, 以 β -Actin 为内参, 荧光定量引物均由上海吉玛公司合成: 引物序列 *Pten* 上游 5'-CACCTATTCCTCAGCCCTTAT-3'; 下游 5'-AACCCCTCATTCAGACCTTCAC-3'; β -Actin 上游 5'-AAGGACCTCTACGCCAACACG-3'; 下游 5'-TTTGGGGTGGACGATGGAG-3'. 取不同发育时期奶牛乳腺组织, 提取总 RNA, 反转录反应条件: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s. 应用 Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System 和 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒进行荧光定量 RT-PCR 反应^[7].

1.3 奶牛乳腺上皮细胞培养与鉴定

奶牛乳腺上皮细胞进行原代培养和传代培养^[8], 所得乳腺上皮细胞接种于培养瓶中, 37℃ 在 5% CO₂ 培养箱中培养. 细胞角蛋白 18 免疫荧光染色, 在激光共聚焦显微镜下观察细胞角蛋白 18 的特异性表达^[9].

1.4 奶牛乳腺上皮细胞的瞬时转染

取对数生长期的奶牛乳腺上皮细胞, 用培养基将其浓度调整为 1.0×10^4 个细胞/mL, 接种于培养板中, 当细胞生长密度达到 80% 左右时, 用 *Pten* inhibitor 和 Negative Control 分别转染奶牛乳腺上皮细胞, 37℃ 培养 48 h, 具体操作见 *Pten* siRNA Transfection Reagent 说明书. 实验分组如下: *Pten* 抑制组 (*Pten* inhibitor); 阴性对照组 (Negative control); 空白对照组 (Cell control).

1.5 奶牛乳腺上皮细胞活力测定

用 *Pten* siRNA Transfection Reagent 进行转染, 方法及分组同 1.4, 每组设 3 个平行, 转染 48 h 后消

化各组细胞, CASY-ton 缓冲液 1: 100 稀释后用 CASY 细胞分析仪检测细胞活力^[10].

1.6 细胞酪蛋白分泌能力的检测

转染方法同 1.4, *Pten* 抑制 48 h 后收获细胞培养液, 运用双抗体夹心 ELISA 法测定细胞培养液中 CSN2 含量, 检测方法按 β -酪蛋白 (CSN2) 检测试剂盒 (Usen Life Science Inc.) 说明书进行. 在同等条件下进行酪蛋白标准品的测定.

1.7 检测转染后细胞内乳蛋白相关信号通路基因 mRNA 表达量

转染方法同 1.4, 分 *Pten* 抑制组、阴性对照组和空白对照组, 每组 3 个平行, 48 h 后收获细胞, 提取细胞总 RNA, 应用 qRT-PCR 技术检测 *Pten* 和乳蛋白相关信号通路基因 *Csn2*、*Akt*、*Mtor*、*Stat5* 的 mRNA 表达变化.

1.8 Western 印记检测乳蛋白相关信号通路蛋白表达量

转染方法同 1.4, 分 3 组, 转染 48 h 后, 分别收集各组奶牛乳腺上皮细胞, 用 2 \times SDS 上样缓冲液提取细胞总蛋白, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳并转膜, 一抗为兔抗羊 PTEN、CSN2、AKT、phospho-AKT (Ser473)、MTOR、phospho-MTOR、STAT5、phospho-STAT5 多克隆抗体; 鼠抗羊 β -Actin 多克隆抗体, 二抗为辣根酶标记羊抗兔、羊抗鼠 IgG, ECL 化学发光系统显示蛋白质表达, 以 β -Actin 为内参, 进行光密度分析.

1.9 数据处理

qRT-PCR 的结果以 Ct 值显示, 采用 $\Delta\Delta C_t$ 法分析, 计算相对定量结果 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)^[11]. Band Scan 5.0 对蛋白区带进行灰度扫描分析. 应用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析, 所有试验重复 3 次. 定量数据以平均数 (M) \pm 标准差 (SD) 表示. 多组数据组间均值比较采用单因素方差分析, 两两组间多重比较采用 Duncan 检验, 同一样本不同处理的进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为统计学差异有显著性.

2 结果

2.1 不同发育时期奶牛乳腺组织 *Pten* 差异表达

qRT-PCR 表达结果显示, 与泌乳期相比, 干乳期荷斯坦奶牛 (P) 乳腺中 *Pten* mRNA 的表达最高 ($P < 0.05$), 泌乳期高乳品质的荷斯坦奶牛 (H) 中 *Pten* mRNA 的表达量显著低于泌乳期低乳品质荷斯坦奶牛 (L) ($P < 0.05$) (Fig. 1).

2.2 *Pten* 抑制后细胞活力增强

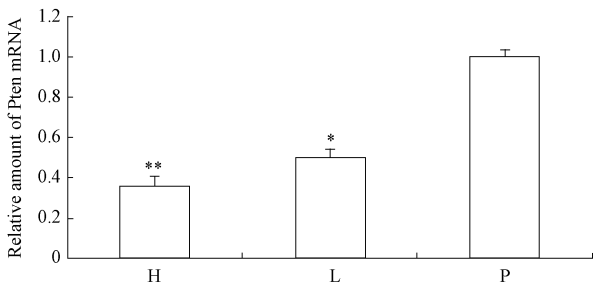


Fig. 1 *Pten* mRNA expression in different lactation period of dairy cow mammary tissues (H) lactation period tissue with high milk quality; (L) lactation period tissue with low milk quality; (P) pregnancy period tissue; Relative expression level of *Pten* was determined for the three groups using qRT-PCR. *Pten* was downregulated in lactation compared with pregnancy. The expression is lower in lactation period with high milk quality than low milk quality. Data represent mean \pm S. D. derived from three independent experiments. * $P < 0.05$ versus pregnancy period tissue, ** $P < 0.01$ versus pregnancy period tissue

Pten 抑制 48 h 后, CASY 细胞分析仪分析奶牛乳腺上皮细胞活性, *Pten* 抑制组细胞活力高于阴性对照组和空白对照组 (Table 1), 且差异显著 ($P < 0.05$), 两个对照组差异不显著 ($P > 0.05$). 说明 *Pten* 可抑制奶牛乳腺上皮细胞活力.

Table 1 Mammary epithelial cells viability

Groups	Cell viability (%)
Cell control group	80.4933 \pm 1.709 ^b
Negative control group	80.1267 \pm 1.412 ^b
<i>Pten</i> inhibition group	85.4211 \pm 1.373 ^a

Column data between different letters is significant, $P < 0.05$

2.3 *Pten* 抑制后酪蛋白质量浓度升高

根据 β -酪蛋白标准曲线分析, 比较 3 组. 结果显示, *Pten* 抑制后 β -酪蛋白质量浓度增加, 显著高于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$, Fig. 2), 两对照组间 β -酪蛋白分泌量差异不显著 ($P > 0.05$). 说明 *Pten* 可抑制奶牛乳腺上皮细胞 β -酪蛋白的分泌.

2.4 *Pten* 基因沉寂对乳蛋白相关信号通路 mRNA 表达的影响

Pten 抑制 48 h 后, 提取细胞总 RNA 并反转录成 cDNA, 经 qRT-PCR 检测, 比较 *Pten* 抑制组, 阴性对照组和空白对照组中乳蛋白合成相关信号通路 mRNA 表达变化. 结果显示, 与两个对照组相比, 转染 48 h 后, 奶牛乳腺上皮细胞中 *Pten* 的 mRNA 表

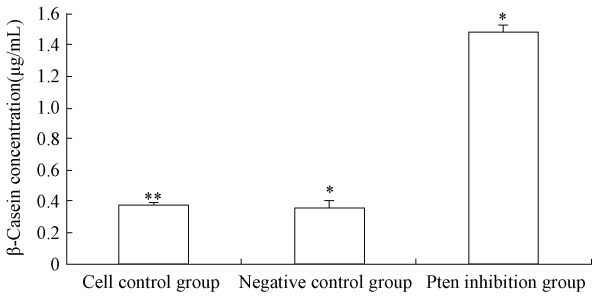


Fig. 2 *Pten* influences on secretion of β -casein in mammary epithelial cells β -casein concentration of DCMECs 48 hours after transfected with *Pten* interference segment, negative control, and cell control group was nontransfected. Secretion of β -casein was markedly increased in cells transfected with *Pten* interference segment, compared to that of negative control group and cell control group ($P < 0.05$). Data represent mean \pm S. D. derived from three independent experiments. * $P < 0.05$

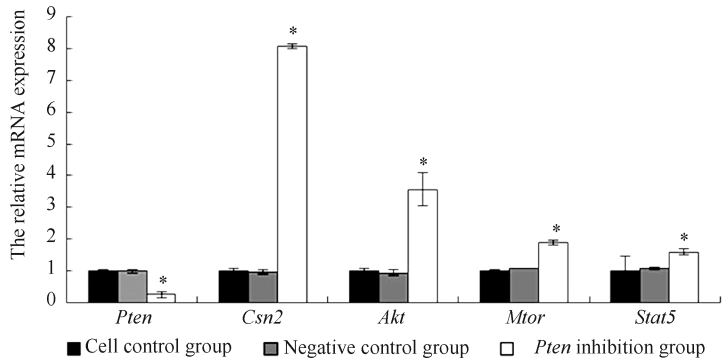


Fig. 3 mRNA expression in the mammary glands of *Pten* inhibition measured by qRT-PCR mRNA levels of *Pten*, *Csn2*, *Akt*, *Mtor* and *Stat5* after DCMECs were transfected with *Pten* interference segment, negative control and cell control group was nontransfected. Expression is shown relative to the average expression of β -actin. The results indicated that with *Pten* inhibition, the mRNA expression of *Csn2*, *Akt*, *Mtor* and *Stat5* were increased in different levels compared with both the negative control group and the cell control group ($P < 0.05$), while there was no significant change between the two control groups ($P > 0.05$). Data represent mean \pm S. D. derived from three independent experiments. * $P < 0.05$

3 讨论

乳腺是哺乳动物具有的有泌乳功能的特殊腺体,是少数几个可以重复经历生长、功能分化和退化过程的器官之一.乳腺内基因表达水平受遗传和环境因素的双重调控.泌乳重要功能基因的表达水平变化能够调控乳腺的生长发育、分化和组织重建,以及乳汁合成、分泌、运输等重要生理过程.奶牛乳腺在泌乳期是乳汁合成和分泌旺盛时期,受多种基因协同调节.本实验采用 qRT-PCR 技术,通过对泌乳期高乳品质、低乳品质和干乳期奶牛乳腺组织中

达水平降低了 4 倍,*Csn2*、*Akt*、*Mtor*、*Stat5* 表达量都有不同程度的增加,与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$),两个对照组之间差异不显著 ($P > 0.05$) (Fig. 3).

2.5 *Pten* 基因沉寂对乳蛋白相关信号通路蛋白表达的影响

Pten 基因沉寂后,乳蛋白相关信号通路蛋白表达量变化趋势与 mRNA 表达量变化趋势相同 (Fig. 4).灰度扫描分析乳蛋白相关信号通路蛋白的表达,通过 3 个平行试验获得试验数据.结果显示,与对照组相比,*Pten* inhibitor 转染 48 h 后,奶牛乳腺上皮细胞中 PTEN 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$),*CSN2*, *AKT*, *MTOR*, *STAT5* 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.05$),两个对照组之间差异不显著 ($P > 0.05$).结果表明,*Pten* 的表达可负调控 *Csn2*、*Akt*、*Mtor*、*Stat5* 的表达.

Pten 表达情况的对比,发现 *Pten* 在泌乳期低表达,而且在泌乳期高乳品质奶牛乳腺组织中表达量低于低乳品质奶牛.反映 *Pten* 基因可能参与调节奶牛乳腺的发育和泌乳,为后续试验提供了参考.

乳腺上皮细胞的活力与泌乳活动密切相关^[12].大多数乳腺上皮细胞是分泌性细胞,在妊娠期进行功能性分化以产生乳汁.因此,增强乳腺上皮细胞活力可促进泌乳^[13,14].实验结果表明,*Pten* 表达可负调控奶牛乳腺上皮细胞活力,推测其可因此导致乳腺生物合成能力降低,间接影响乳腺泌乳功能.

牛奶中的蛋白质是食用蛋白的主要来源之一,

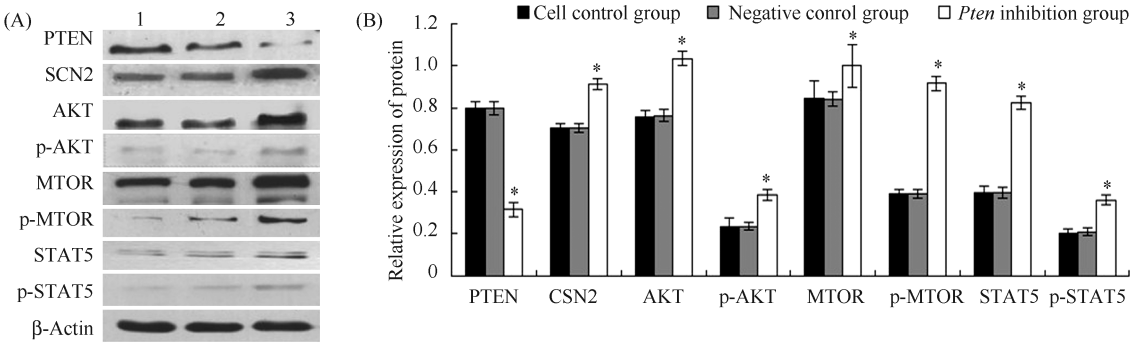


Fig. 4 Expression and activation of lactation related key pathway proteins following *Pten* inhibition

(A) Western blotting of protein expression of PTEN, CSN2, AKT, phospho-AKT, MTOR, phospho-MTOR, STAT5, phospho-STAT5 after *Pten* inhibition. 1) Cell control group, DCMECs were non-transfected and cultured for 48 hours; 2) Negative control group, DCMECs were transfected with negative control interference segment for 48 hours; 3) *Pten* inhibition group, DCMECs were transfected with *Pten* siRNA interference segment for 48 hours; (B) The gray scale scanning analysis of Western blotting results of protein expression of PTEN, CSN2, AKT, MTOR, STAT5 after *Pten* inhibition for 48 hours. Expression is shown relative to the average expression of β -Actin.

Data represent mean \pm S. D. derived from three independent experiments. * $P < 0.05$

其中大约 82% 是酪蛋白,包括 α s1-、 α s2-、 β - 和 κ -酪蛋白. 酪蛋白是乳腺上皮细胞产生的磷酸化蛋白,它的合成及分泌是研究激素、细胞外基质对乳腺细胞分泌作用的标志^[6]. β -酪蛋白(CSN2)是牛乳中含量最高的酪蛋白,在泌乳激素的刺激下, β -酪蛋白具有很强的表达活性,其调控成分能够指导靶基因在乳腺组织中高效表达^[15]. 本研究发现,*Pten* 基因的抑制使细胞分泌 β -酪蛋白的质量浓度明显升高,表明 *Pten* 能够负调控 β -酪蛋白的合成,进而对奶牛乳腺上皮细胞泌乳能力造成综合性影响. 这种影响不会由单个靶基因的调节而实现,而是通过在基因组水平参与多个相关联信号通路的广泛调节作用而实现.

PI3K-AKT 信号通路在细胞的生长、增殖以及代谢中具有重要作用,它受到多种分子的调节. 研究发现 PTEN 可以介导 PIP3 去磷酸化转化为 PIP2,从而失去对 PI3K/AKT 通路的活化作用,因而 *Pten* 成为该信号通路的上游抑制基因. *Pten* 活化后主要通过 PI3K-AKT 途径在细胞生长、迁移等活动中发挥作用. AKT1 表达或者 PTEN 的缺失都会迅速诱导小鼠乳腺上皮细胞分裂,*Pten* 基因敲除的小鼠在其发育过程中由于多种组织异常增殖而死亡,同时 *Akt* 被持续性激活^[16]. 而且 *Akt* 下游基因参与一系列调控蛋白合成的过程,表明 AKT 介导的信号通路在 PTEN 调节的细胞分裂、存活和合成代谢中占有重要地位^[17]. 本实验结果表明在奶牛乳腺上皮细胞中,*Pten* 对 *Akt* 的表达起负调控作用,*Pten* 的抑制显

著降低了细胞活力,与先前小鼠中的研究一致.

在 AKT 的大量靶基因中,*Mtor* 与泌乳尤为相关,参与调节细胞生长与增殖、蛋白合成等一系列代谢过程^[18-20]. 近期研究发现,*Mtor* 在啮齿类和反刍动物乳蛋白合成的调控活动中起重要作用^[21-25]. MTOR 主要通过调控它的两个下游靶基因核糖体蛋白 S6 激酶多肽 1 (ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1, p70S6K1) 和真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1, 4EBP1) 来发挥作用. 研究发现,AKT1 可通过作用于靶蛋白如 MTOR/s6k1MTOR/4EBP1 而增强乳蛋白相关基因的转录^[26]. 推测 PTEN 可通过负调 PI3K/AKT 信号通路下游这些效应蛋白来参与乳蛋白合成调控.

STAT5 是在研究催乳素刺激乳房上皮细胞时发现的调节因子. 研究发现,*Stat5a* 敲除的小鼠在妊娠结束后乳房小泡发育不足,导致在分娩后由于乳腺分化不足而不能泌乳. 这个结果表明,STAT5a 是乳腺产生和催乳信号途径中的关键因子. *Stat5* 基因是乳蛋白合成过程中的另一个重要的调节基因^[27]. 在哺乳动物中,STAT5 是重要的泌乳信号转导转录因子,介导 JAK2-STAT5 信号转导途径参与乳蛋白的合成,在妊娠期参与乳腺上皮细胞的分化、维持乳腺上皮细胞的生存. 在 β -酪蛋白基因的启动子上至少有一个 STAT5 的结合位点^[28]. 本实验结果显示 *Pten* 表达负调控 STAT5 和 β -酪蛋白的表达,表明 *Pten* 参与奶牛乳腺中 JAK2-STAT5 信号通路的调

节。本实验表明,在奶牛乳腺上皮细胞中,*Pten* 可抑制细胞活力和 β -酪蛋白分泌,并参与调控 AKT、MTOR、STAT5 相关信号通路,为进一步研究 *Pten* 在乳腺发育及泌乳功能方面的作用提供了一定的实验依据。

参考文献 (References)

- [1] Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, **13**(5): 283-296
- [2] 韩杨,程克棣. 抑癌基因 PTEN 的研究进展[J]. 国外医学药学分册 (Han Y, Cheng K D. Research progress of tumor suppressor gene PTEN[J]. *Foreign Med Sci (Pharm)*, 2006, **33**(4):241-245
- [3] Chen CC, Stairs DB, Boxer RB, *et al.* Autocrine prolactin induced by the Pten-Akt pathway is required for lactation initiation and provides a direct link between the Akt and Stat5 pathways [J]. *Genes Dev*,2012, **26**(19): 2154-2168
- [4] Dupont J, Renou JP, Shani M, *et al.* PTEN overexpression suppresses proliferation and differentiation and enhances apoptosis of the mouse mammary epithelium [J]. *J Clin Invest*, 2002, **110**(6): 815-825
- [5] 王晓艳,张娜,高学军,等. 奶牛乳腺对血液游离氨基酸吸收的差异性研究[J]. 中国乳品工业(Wang X Y, Zhang N, Gao X J, *et al.* Study on differential intake of mammary gland to free amino acids in dairy cows [J]. *Chin Dairy Ind*), 2013, **41**(1): 8-10
- [6] 王治国,卜登攀,王加启. 牛乳腺上皮细胞 β -酪蛋白的检测及核型分析[J]. 中国畜牧兽医(Wang Z G, Bu D P, Wang J Q. Bovine mammary epithelial cells beta-casein protein detection and karyotype analysis [J]. *China Anim Husb Vet Med*), 2007, **34**(2):8-11
- [7] Macheda ML, Williams ED, Best JD, *et al.* Expression and localisation of GLUT1 and GLUT12 glucose transporters in the pregnant and lactating rat mammary gland [J]. *Cell Tissue Res*, 2003, **311**(1): 91-97
- [8] Zhao K, Liu HY, Zhou MM, *et al.* Establishment and characterization of a lactating bovine mammary epithelial cell model for the study of milk synthesis [J]. *Cell Biol Int*,2010, **34**(7):717-721
- [9] 王春梅,李庆章,李晔. miR-138 对小鼠乳腺上皮细胞的作用及其调控的靶序列[J]. 生物化学与生物物理进展(Wang C M, Li Q Z, Li Y. miR-138 function and its targets on mouse mammary epithelial cells[J]. *Progr Biochem Biophys*), 2008, **35**(7):834-838
- [10] 崔巍,王春梅,李庆章,等. miR-126 对小鼠乳腺上皮细胞增殖及泌乳功能的影响[J]. 中国乳品工业(Cui W, Wang C M, Li Q Z, *et al.* Impact of miR-126 on proliferation and lactation of mouse mammary epithelial cells [J]. *Chin Dairy Ind*), 2011, **39**(3):17-19,45
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. 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
- [12] Boutinaud M, Guinard-Flament J, Helene J, *et al.* The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production[J]. *Reprod Nutr Dev*,2004, **44**(5): 499-508
- [13] Santos SJ, Aupperlee MD, Xie J, *et al.* Progesterone receptor A-regulated gene expression in mammary organoid cultures [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*,2009, **115**(3-5): 161-172
- [14] Cui W, Li Q, Feng L, *et al.* MiR-126-3p regulates progesterone receptors and involves development and lactation of mouse mammary gland [J]. *Mol Cell Biochem*,2011, **355**(1-2): 17-25
- [15] 田甜,蔡鸿瑞,陈玉珍,等. 奶牛 β -酪蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 贵州农业科学(Tian T, Zhai H R, Chen Y Z, *et al.* Cloning of bovine β -casein gene and its sequential analysis [J]. *Guizhou Agric Sci*), 2009, **37**(8):129-131.
- [16] Machama T, Taylur GS, Dixon JE. PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases[J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, **70**: 247-279
- [17] 陈忠民,胡迎春,莫琳,等. PTEN 通过抑制 PI3K-AKT 信号通路上调 *Rad51* 基因的表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报(Chen Z M, Hu Y C, Mo L, *et al.* PTEN upregulates Rad51 gene expression through the inhibition of PI3K-AKT signal pathway[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2011, **27**(3): 254-259
- [18] Ortega-Molina A, Serrano M. PTEN in cancer, metabolism, and aging [J]. *Trends Endocrinol Metab*,2013, **24**(4): 184-189
- [19] Saqcena M, Menon D, Patel D, *et al.* Amino acids and mTOR mediate distinct metabolic checkpoints in mammalian G₁ cell cycle. [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(8): e74157
- [20] Blagosklonny MV. M(o)TOR of aging: MTOR as a universal molecular hypothalamus [J]. *Aging (Albany NY)*, 2013, **5**(7): 490-494
- [21] Prizant RL, Barash I. Negative effects of the amino acids Lys, His, and Thr on S6K1 phosphorylation in mammary epithelial cells [J]. *Cell Biochem*, 2008, **105**(4):1038-1047
- [22] Toerien CA, Trout DR, Cant JP. Nutritional stimulation of milk protein yield of cows is associated with changes in phosphorylation of mammary eukaryotic initiation factor 2 and ribosomal s6 kinase 1[J]. *J Nutr*, 2010, **140**(2):285-292
- [23] Galbaugh T, Cerrito MG, Jose CC, *et al.* EGF-induced activation of Akt results in mTOR-dependent p70S6 kinase phosphorylation and inhibition of HC11 cell lactogenic differentiation [J]. *BMC Cell Biol*, 2006, **7**:34
- [24] Jankiewicz M, Groner B, Desrivieres S. Mammalian target of rapamycin regulates the growth of mammary epithelial cells through the inhibitor of deoxyribonucleic acid binding Id1 and their functional differentiation through Id2 [J]. *Mol Endocrinol*, 2006, **20**(10):2369-2381
- [25] Moshel Y, Rhoads RE, Barash I. Role of amino acids in translational mechanisms governing milk protein synthesis in murine and ruminant mammary epithelial cells [J]. *Cell*

Biochem, 2006, **98**(3):685-700

[26] Maehama T, Taylor GS, Dixon JE. PTEN and myotubularin; novel phosphoinositide phosphatases [J]. Annu Rev Biochem, 2001, **70**: 247-279

[27] Mao J, Molenaar AJ, Wheeler TT, *et al.* STAT5 binding contributes to lactational stimulation of promoter III expressing the bovine acetyl-CoA carboxylase alpha-encoding gene in the mammary gland [J]. J Mol Endocrmol,2002, **29**(1): 73-88

[28] 刘晓飞,高学军,李庆章,等. stat5 高效表达对奶牛乳腺上皮细胞泌乳能力的影响[J]. 畜牧兽医学报(Liu X F, Gao X J, Li Q Z, *et al.* Effects on lactation ability of dairy cow mammary gland epithelial cells by stat5 high expression[J]. Chin J Anim Vet Sci),2011,**42**(4):508-512