ผลของระดับโปรตีนในอาหารที่ไม่เพียงพอต่อการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนระบบต่าง ๆ ที่ระยะการให้น้ำนมสูงในเนื้อเยื่อเต้านมสุกร

นางสาวภัทราพรรณ รุ่งเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF DIETARY PROTEIN DEFICIENCY ON GENE EXPRESSIONS OF AMINO ACID TRANSPORT SYSTEMS AT PEAK LACTATION IN PORCINE MAMMARY TISSUE

Miss Patrapan Rungcharoen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Animal Nutrition
Department of Animal Husbandry
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006
Copyright of Chulalongkorn University

492255

Thesis title	EFFECT OF DIETARY PROTEIN DEFICIENCY ON GENE EXPRESSIONS OF AMINO ACID TRANSPORT SYSTEMS AT PEAK LACTATION IN PORCINE MAMMARY TISSUE
By	Miss Patrapan Rungcharoen
Field of Study	Animal Nutrition
Thesis Advisor	Associate Professor Boonrit Thongsong, D.V.M., Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Sarinee Kalandakanond-Thongsong, D.V.M., Ph.D.

Accepted by the Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Veterinary Science

(Professor Annop Kunavongkrit, D.V.M., Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associate Professor Somchai Chanpongsang, D.V.M., M.S.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Boonrit Thongsong, D.V.M., Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Sarinee Kalandakanond-Thongsong, D.V.M., Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Uttra Jamikorn, D.V.M., Ph.D.)

.....Member

(Instructor Sirakarnt Dhitavat, D.V.M., Ph.D.)

ภัทราพรรณ รุ่งเจริญ : ผลของระดับโปรตีนในอาหารที่ไม่เพียงพอต่อการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนระบบต่างๆ ที่ระยะการให้น้ำนมสูงในเนื้อเยื่อเต้านมสุกร (EFFECT OF DIETARY PROTEIN DEFICIENCY ON GENE EXPRESSIONS OF AMINO ACID TRANSPORT SYSTEMS AT PEAK LACTATION IN PORCINE MAMMARY TISSUE) อ. ที่ปรึกษา : รศ.น.สพ.ดร.บุญฤทธิ์ ทองทรง, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.สพ.ญ.ดร.สฤณี กลันทกานนท์ ทองทรง, 65 หน้า.

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนระบบต่างๆ ได้แก่ ระบบ A; ATA2 ระบบ $B^{0,+}$; $ATB^{0,+}$ ระบบ L; LAT2 และ 4F2hc (heterodimer) และ ระบบ y^+; CAT2B ที่ระยะการให้น้ำนมสูงในเนื้อเยื่อเต้านมสุกร และผลของโปรตีนในอาหารที่ไม่เพียงพอต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ระดับกรดอะมิโนในพลาสมาของแม่สุกรและลูกสุกร การเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านกายภาพและเนื้อเยื่อของเต้านมแม่สุกร และปริมาณการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านมสุกรที่ระยะการให้น้ำนมสูง (วันที่ 18 ของการให้น้ำนม) ในการทดลองใช้แม่สุกรลูกผสมที่ผ่านการตั้งท้องแล้วอย่างน้อย 1 ครั้ง (multiparous sow) จำนวน 11 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่ม สุกรกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนไม่เพียงพอจำนวน 5 ตัว และสุกรกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนเพียงพอจำนวน 6 ตัว ใช้ระยะเวลาในการทดลอง 28 วัน ตั้งแต่วันคลอด (d 0) จนถึงวันที่หย่านม (d 28) อาหารทดลองที่ใช้ประกอบด้วย 2 สูตร กำหนดให้มีค่าองค์ประกอบทางโภชนะทุกตัวใกล้เคียงกันยกเว้นระดับโปรตีนรวมแตกต่างกัน โดยอาหารที่มีระดับโปรตีนไม่เพียงพอมีระดับโปรตีนรวมเท่ากับ 8.2% และอาหารที่มีระดับโปรตีนเพียงพอมีระดับโปรตีนรวมเท่ากับ 18.2% ทั้งนี้จำกัดการให้อาหารสุกรวันละ 4 กิโลกรัม/ตัว

ผลการทดลองพบว่า แม่สุกรที่ได้รับอาหารที่ระดับโปรตีนไม่เพียงพอมีการสูญเสียน้ำหนักตัวสูงขึ้นตลอดระยะเวลาการให้น้ำนม ค่าการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวและอัตราการเจริญเติบโตต่อวันของลูกสุกรลดลง ระดับความเข้มข้นของกรดอะมิโนส่วนใหญ่โดยเฉพาะกรดอะมิโนที่เป็นกลางและกรดอะมิโนที่มีประจุบวกในพลาสมาแม่สุกรลดลง ระดับความเข้มข้นของกรดอะมิโนส่วนใหญ่ในพลาสมาของลูกสุกรไม่เปลี่ยนแปลงยกเว้นโพรลีน สำหรับการเปลี่ยนแปลงของเต้านมเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพภายนอก และเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางจุลพยาธิวิทยาภายในเนื้อเยื่อเต้านม ซึ่งแสดงถึงการทำหน้าที่ที่ลดลงในการผลิตน้ำนม ทั้งนี้ที่ระยะการให้น้ำนมสูงพบมีการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนระบบ A; ATA2 ระบบ $B^{0,+}$; $ATB^{0,+}$ ระบบ L; LAT2 และ 4F2hc และระบบ y^+; CAT2B ในเนื้อเยื่อเต้านมแม่สุกร และปริมาณการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน $ATB^{0,+}$ และ LAT2 ในเนื้อเยื่อเต้านมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ในแม่สุกรที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนไม่เพียงพอเมื่อเปรียบเทียบกับแม่สุกรที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนเพียงพอ

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ในเนื้อเยื่อเต้านมแม่สุกรมีการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนระบบต่างๆ ที่สนใจศึกษา ทั้งนี้เมื่อแม่สุกรที่ได้รับอาหารที่ระดับโปรตีนไม่เพียงพอมีผลทำให้เกิดการสูญเสียน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการให้น้ำนม เต้านมมีความสมบูรณ์น้อยลง ซึ่งล้วนแต่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกรลดลง นอกจากนั้นมีผลให้ระดับความเข้มข้นของกรดอะมิโนส่วนใหญ่ในพลาสมาลดลง ดังนั้นจึงมีผลให้การแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนซึ่งทำหน้าที่ขนส่งกรดอะมิโนเหล่านั้นได้แก่ $ATB^{0,+}$ และ LAT2 มีปริมาณการแสดงออกที่ลดลง

ภาควิชา สัตวบาล ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา อาหารสัตว์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4775570531: MAJOR ANIMAL NUTRITION

KEY WORD: AMINO ACID TRANSPORTER/ GENE EXPRESSION/ PEAK LACTATION/ PORCINE MAMMARY TISSUE/ DIETARY PROTEIN DEFICIENCY

PATRAPAN RUNGCHAROEN: EFFECT OF DIETARY PROTEIN DEFICIENCY ON GENE EXPRESSIONS OF AMINO ACID TRANSPORT SYSTEMS AT PEAK LACTATION IN PORCINE MAMMARY TISSUE. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. BOONRIT THONGSONG, D.V.M. Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. SARINEE KALANDAKANOND-THONGSONG, D.V.M., Ph.D. 65 p.

The objectives of this study were to determine the mRNA expressions of amino acid transport system A; ATA2, system $B^{0,+}$; $ATB^{0,+}$, system L; LAT2 and 4F2hc (heterodimer), and system y^+; CAT2B in porcine mammary tissues and to determine the effects of dietary protein deficiency on growth performance, individual plasma amino acid concentrations in sows and their piglets, physical and histological changes of mammary glands, and the expression level of amino acid transporter genes in mammary tissues at peak lactation (d 18 of lactation). Eleven multiparous crossbred sows were allocated into 2 groups; 5 sows for deficient protein diet group and 6 sows for normal protein diet group. The experimental period started from farrowing (d 0) until weaned day (d 28). Sows were fed 4 kg per day. Two experimental diets differed only in the crude protein (CP) levels; normal protein diet contained 18.2% CP and deficient protein diet contained 8.2% CP.

The sows fed with deficient protein diet had significant increase in the body weight losses throughout lactation period ($P \leq 0.05$), significant decrease in the body weight and average daily gain (ADG) of their piglets ($P \leq 0.05$), significant decrease in plasma amino acid concentrations notably for neutral and cationic amino acids in sows and proline in their piglets ($P \leq 0.05$), appearance of visible physical change of mammary glands, and histological change of mammary tissues. Moreover, sow mammary gland expressed mRNA of system A; ATA2, system $B^{0,+}$; $ATB^{0,+}$, system L; LAT2 and 4F2hc (heterodimer), and system y^+; CAT2B. In addition, the quantitative mRNA expressions of $ATB^{0,+}$ and LAT2 were down regulated significantly ($P \leq 0.05$) when compared to the sows fed with normal protein diet.

In conclusion, the present study showed that dietary protein deficiency had the effects on increase in body weight losses of sows, impairment of mammary gland conformation during lactation, decrease in plasma amino acid concentrations, and down regulation of mRNA expression levels of $ATB^{0,+}$ and LAT2. These important factors lead to the decrease in growth performance of piglets.

Department	Animal Husbandry	Student's signature.....
Field of study	Animal nutrition	Advisor's signature.....
Academic year	2006	Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

Firstly, I would like to express my deep gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Boonrit Thongsong for his molecular lab training, patience and understanding my problems during study, encouraging words, valuable guidances, and unrestricted time and unlimited time for the discussions. Secondly, I would like to thank my co-advisor Assistant Professor Dr. Sarinee Kalandakanond-Thongsong for sharing her valuable time, useful consultation and clear guidance.

My thanks also expressed to the thesis committee, Associate Professor Somchai Chanpongsang, Assistant Professor Dr. Uttra Jamikorn, and Instructor Dr. Sirakarnt Dhitavat for their valuable suggestions.

My sincere and warm appreciation is expressed to Associate Professor Dr. Duangsmorn Suwattana, Associate Professor Dr. Roongroje Thanawongnuwech and Mrs. Jutarat Jirasupphachok for their helps in molecular lab instrument suggestion and miscellaneous assistance, Associate Professor Suwanna Kijpakorn, Miss Punyapat Ittitanawong and Miss Siripen Komolvanich for their technical suggestion, Mr. Somporn Wangsoongnoen and Mr. Chuan Sangaroon for great taking care of my experimental animals.

My sincere is also expressed to Associate Professor Dr. Anudep Rungsipipat for his histological photographs and discussions, and Miss Sookruthai Wongsubin for amino acid analysis.

I am also deeply grateful to my mom and dad as well as my friends for their kind encouragement throughout my study period.

Finally, my thanks go to the financial support from Graduate thesis grant, Graduate School, and Graduate student fund, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv
ENGLISH ABSTRACT.....v
ACKNOWLEDGEMENTS.....vi
CONTENTS.....vii
LIST OF TABLES.....x
LIST OF FIGURES.....xi
ABBREVIATIONS.....xii
CHAPTER
I. INTRODUCTION AND AIMS.....1
II. BACKGROUND INFORMATION.....5
1. Anatomy and physiology of sow mammary gland.....5
2. Blood circulatory system of sow mammary gland.....7
3. Development of the mammary gland.....7
4. Amino acid utilization in sow mammary tissues during lactation period.....8
5. Effect of dietary protein concentration on amino acid uptake across the porcine mammary tissue at peak lactation.....11
6. Effect of dietary protein concentration on amino acid transporters and amino acid transporter gene expressions in porcine mammary tissues at peak lactation.....12
7. Amino acid transport across mammary epithelial cells.....13
8. Transporter theory.....13
9. Identification of amino acid transport systems in mammary tissue...14
10. Functional characteristic of amino acid transport systems.....16
III MATERIALS AND METHODS.....22
1. Experimental design and animals.....22

CHAPTER page

2. Diets.... 23
3. Sample sampling.....25
3.1 Blood sampling 25
3.2 Collection of mammary tissues 26
4. Chemical analysis and composition.....28
4.1 Diets.....28
4.2 Plasma.....28
5. Histological procedure and determination.....29
6. RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis for determination of amino acid transporter gene expressions.....29
6.1 Isolations of total RNA.....29
6.2 Reverse transcription and the first strand cDNA synthesis 30
6.3 Polymerase chain reaction (PCR).....30
7. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction for quantitative determination of amino acid transporter genes.....32
8. Calculation of the growth performance.....33
9. Statistical analysis.....33
IV RESULTS.....35
1. Growth performance of sows and piglets.....35
2. Health monitoring of sows used in the experiment.....37
3. Nutrient composition in experimental diets.....38
4. Amino acid concentrations of two experimental diets.....39
5. Plasma amino acid concentrations of sows and piglets.....40
6. Effect of dietary protein deficiency on physical changes of sow mammary glands.....43
7. Effect of dietary protein deficiency on histological changes of sow mammary tissues.....44

CHAPTER page

8. Expressions of mRNA amino acid transporters in porcine mammary tissues at peak lactation.....46
9. Optimum cycle for semiquantitative RT-PCR.....47
10. The effect of dietary protein deficiency on relative mRNA abundance of some amino acid transporters in porcine mammary tissues at peak lactation.....48
V DISCUSSION.....51
REFERENCES.....57
BIOGRAPHY.....65

LIST OF TABLES

Table page

2.1 The summary of Na^+–dependent transport systems recognized in mammary tissues.....15

2.2 The summary of Na^+–independent transport systems recognized in mammary tissues.....16

3.1 Ingredient composition of the experimental diets, as fed basis.....24

3.2 Calculated values of nutrient composition in the experimental diets, as dry matter basis.....25

3.3 The primer sequence used in region PCR amplification.....31

4.1 Effect of dietary protein deficiency on performance of lactating sow and litter...36

4.2 Hematological values of sows in two experimental groups.....37

4.3 Proximate analysis of nutrient composition in the experimental diets, as dry matter basis.....38

4.4 Result of amino acid composition in the experimental diets (dry matter basis) using RP-HPLC (mg/100 mg).....39

4.5 Effect of dietary protein deficiency on individual plasma amino acid concentration in lactating sows (pmol/μl).....41

4.6 Effect of dietary protein deficiency on individual plasma amino acid concentration in piglets (pmol/μl).....42

LIST OF FIGURES

Figure page

1.1 Rationale of the study....4

2.1 Physical and histological appearance of sow's mammary gland....6

2.2 Blood supply of sow's mammary gland....7

2.3 Illustrative picture of transporter protein locates on cellular membrane....14

2.4 Northern blot analysis of ATA2-specific mRNA in human tissues....17

2.5 Model of 4F2hc....18

2.6 Northern blots of human CAT1, CAT-2A, CAT-2B, and porcine $B^{0,+}$ in porcine mammary or liver tissues....20

3.1 Experimental management chart....23

3.2 Procedure of the porcine mammary tissue sampling....28

4.1 Comparison of physical changes of sow mammary gland between sows fed with deficient protein diet (8.2% CP) and normal protein diet (18.2% CP) at d 14, 18, and 28 of lactation....43

4.2 Comparison of histological changes of mammary tissues between sows fed with deficient protein diet (8.2% CP) and normal protein diet (18.2% CP)....45

4.3 PCR amplification of sequences comprising cDNA from porcine mammary tissues by RT-PCR....46

4.4 Determination of optimum cycles for PCR amplification of ATA2, $ATB^{0,+}$, LAT2, 4F2hc, and CAT2B gene in each experimental group. 47

4.5 Analysis of relative quantification of mRNA amino acid transporter by semiquantitative RT-PCR....49

ABBREVIATIONS

β-Ala	bata-alanine
β-Tau	beta-taurine
µl	microliter
µm	micron
18S rRNA	18S ribosomal ribonucleic acid
4F2hc	4F2 heavy chain
Ala	alanine
Arg	arginine
Asp	Aspartate
ATA2	Amino acid transporter A2
$ATB^{0,+}$	Amino acid transporter $B^{0,+}$
AV-dif	arteriovenous difference
BCAA	branched-chain amino acids
BHC	2-aminobicyclo(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid
bp	base pair
BW	body weight
CAT2A	Cationic amino acid transporter-2A
CAT2B	Cationic amino acid transporter-2B
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
Cl^-	chloride
CP	crude protein
Cys	cysteine
d	day
DM	dry matter
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
g	gram
g/d	gram per day

Gly	glycine
H^+	hydrogen
His	histidine
IU	international unit
K^+	potassium
kg/d	kilogram per day
K_m	Michaelis constant
L	litter
L-Asp	L-aspartate
L-Glu	L-glutamate
LAT2	L type -amino acid transporter-2
Lys	lysine
Mcal/kg	megacalory per kilogram
ME	metabolizable energy
MeAIB	methyl aminoisobutyric acid
Met	methionine
mg	milligram
ml	milliliter
mRNA	messenger ribonucleic acid
Na^+	sodium
Na^+- dependent	sodium dependent
Na^+- independent	sodium independent
Ort	ornithine
PCR	polymerase chain reaction
Phe	phenylalanine
pmol/ µl	picomol per microliter
Pro	proline
R.B.C	red blood cells
RP-HPLC	reverse phase-high performance liquid chromatography

RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SD.	standard deviation
SE.	standard error
Ser	serine
TAE	Tris Acetic acid EDTA
Thr	threonine
total RNA	total ribonucleic acid
Trp	tryptophan
Tyr	tyrosine
units/ml	units per milliliter
V_{max}	maximum velocity
W.B.C.	white blood cells