

邝良德, 王云端, 李钰莹, 等. 四川麻兔不同泌乳时期乳脂球膜蛋白的差异分析[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(5): 990-1003.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.05.013

四川麻兔不同泌乳时期乳脂球膜蛋白的差异分析

邝良德¹, 王云端², 李钰莹¹, 刘艳¹, 穆雪儿², 雷岷¹, 郑洁¹, 郭志强¹,
杨锐¹, 向雨晗², 付伟², 李丛艳¹

(1. 四川省畜牧科学研究院/畜禽种业四川省重点实验室, 四川 成都 610066; 2. 西南民族大学畜牧兽医学院/西南民族大学
青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

摘要: 乳脂球膜(MFGM)蛋白在脂质代谢、免疫防御及泌乳调控中发挥关键作用。本研究采用非对称轨道无损质量分析器-数据非依赖性采集(Astral-DIA)质谱技术对四川麻兔泌乳前期(MM1)、泌乳中期(MM21)、泌乳后期(MM35)的乳脂球膜蛋白质谱进行分析。共鉴定出2 937种乳脂球膜蛋白,其中1 907种在所有泌乳阶段均存在。泌乳前期与泌乳后期之间存在1 331种差异表达蛋白(DEMP),泌乳中期与泌乳后期之间有458种差异表达蛋白,泌乳前期与泌乳中期间有1 351种差异表达蛋白。通过KEGG通路映射、eggNOG分类注释、Pfam结构域分析及亚细胞定位预测进行多维功能注释,揭示了乳脂球膜蛋白功能在3个泌乳阶段呈现差异性:泌乳前期更关联生物体免疫系统;泌乳中期与泌乳后期功能趋于稳定,主要参与营养代谢。通过优化Mfuzz时序聚类及关联功能注释,解析了特征乳脂球膜蛋白的时间表达模式,同时筛选出8种代表性乳脂球膜蛋白。本研究结果表明,四川麻兔乳脂球膜蛋白具备脂质代谢、囊泡运输、信号调控和免疫保护的复杂功能特征,既为能量代谢提供支持,又可通过免疫通路提高新生幼兔对病原体的防御能力。本研究结果阐明了兔不同泌乳阶段乳汁中特异性蛋白质组学特征及其生物学意义,为后续研究乳脂球膜蛋白在乳汁分泌和新生幼兔发育中的作用提供了重要理论基础。

关键词: 四川麻兔; 泌乳期; 乳脂球膜蛋白

中图分类号: S829.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2026)05-0990-14

Differential analysis of milk fat globule membrane proteins across lactation stages in Sichuan rabbits

KUANG Liangde¹, WANG Yunduan², LI Yuying¹, LIU Yan¹, MU Xue'er², LEI Min¹, ZHENG Jie¹,
GUO Zhiqiang¹, YANG Rui¹, XIANG Yuhang², FU Wei², LI Congyan¹

(1. Sichuan Animal Science Academy/Animal Genetic Breeding and Reproduction Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610066, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Southwest Minzu University/Key Laboratory of the Qinghai-Tibet Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Utilization of Ministry of Education, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

收稿日期: 2025-09-05

基金项目: 四川省科院所基本科研项目(SASA202405); 国家现代农业产业技术体系四川兔创新团队项目(SCCXTD-2024-26); 国家兔产业技术体系项目(CARS-43-D-1); 四川省畜禽育种攻关项目(2021YFYZ0033); 四川省财政运行专项(SASA2025CZYX004)

作者简介: 邝良德(1983-), 男, 湖南郴州人, 硕士, 副研究员, 研究方向为家兔遗传育种与饲养。(E-mail) 215640832@qq.com

通讯作者: 李丛艳, (E-mail) licongyan0311@sina.com

Abstract: Milk fat globule membrane (MFGM) proteins play essential roles in lipid metabolism, immune defense, and the regulation of lactation. In this study, the asymmetric track lossless mass analyzer-data-independent acquisition (Astral-DIA) mass spectrometry platform was employed to profile the MFGM proteome of Sichuan rabbits across three lactation stages: early lactation (MM1), mid-lactation (MM21), and late lactation (MM35). A total of 2 937 MFGM proteins were identified, of which 1 907

were consistently present throughout all lactation stages. Comparative analyses revealed 1 331 differentially expressed MFGM proteins (DEMPs) between early lactation and late lactation, 458 DEMPs between mid-lactation and late lactation, and 1 351 DEMPs between early lactation and mid-lactation. Functional annotations based on KEGG pathway analysis, eggNOG classification, Pfam domain identification, and subcellular localization prediction uncovered distinct stage-specific roles of MFGM proteins; those in early lactation were predominantly linked to immune function, while proteins in mid-lactation and late lactation were functionally stable and mainly involved in nutrient metabolism. Time-course expression patterns of characteristic MFGM proteins were further dissected using optimized Mfuzz clustering, and eight representative proteins were identified and functionally characterized. The MFGM proteins of Sichuan rabbits exhibited complex functional characteristics related to lipid metabolism, vesicle trafficking, signal transduction, and immune protection, supporting both energy supply and innate immunity in neonates. This study elucidates the specific proteomic characteristics and biological significance of MFGM proteins during lactation, providing an important foundation for subsequent research on the functional roles of MFGM proteins in milk secretion and development of newborn rabbit pups.

Key words: Sichuan rabbits; lactation; milk fat globule membrane protein

乳汁对哺乳动物后代的生长发育具有不可替代的重要作用,其富含蛋白质、脂肪、乳糖、维生素及矿物质等营养成分,在调控后代免疫系统发育、大脑发育、认知功能形成及肠道菌群定殖等方面发挥关键作用^[1-3]。相关研究结果表明,泌乳前期乳汁中生物活性物质与营养物质含量较高,不仅可以为新生个体提供必需营养,还可介导新生个体早期被动免疫的传递^[4-5]。随着泌乳阶段的推进,泌乳中期乳汁中生物活性物质及免疫相关物质含量呈逐渐下降趋势,最终趋于与泌乳后期相近的水平^[4,6-7]。此外,乳汁组分并非恒定不变,受物种遗传、泌乳阶段、母体营养状况等多种因素共同调控^[8]。兔的乳汁具有独特的营养价值与保健功能,其短链脂肪酸含量丰富,对增强肠道免疫功能、保障仔兔健康生长具有重要意义^[9]。兔乳汁中脂肪含量约为牛奶的2倍,蛋白质含量约为牛奶的3倍,而乳糖含量仅为牛奶的1/3。

蛋白质是乳汁的关键成分,主要包括乳清蛋白、酪蛋白和乳脂球膜(MFGM)蛋白。乳脂球膜蛋白作为牛奶中营养价值突出的优质蛋白,近年来受到广泛关注。乳脂球膜是包裹于乳脂球(MFG)外层,由3层磷脂双分子层构成的膜性结构,嵌入或附着于该膜结构上的蛋白质统称为乳脂球膜蛋白,这类蛋白质已被证实参与多种生物过程,包括细胞生长分化、免疫防御及脂质代谢^[10-15]。目前,关于兔乳汁的研究非常有限,只有少数文献报道了兔泌乳前期和泌乳后期乳汁的化学成分和形态特征^[10,16]。针对兔乳汁中MFGM蛋白在不同泌乳阶段的系统性研究十分匮乏。为填补这一空白,本研究利用

Astral-DIA质谱组学技术,结合时序聚类与功能注释方法,对四川麻兔泌乳前期、泌乳中期和泌乳后期的MFGM蛋白谱进行全面表征,为阐明兔乳汁成分与功能提供理论依据,同时为创新性将兔乳汁添加至婴幼儿乳制品提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物及样品采集

本试验位于四川省畜牧科学研究院肉兔科研基地。选取6月龄、初产且健康无遗传病史的四川麻兔18只,体重每只约4 kg,均饲养于环境控制型兔舍的双层欧式兔笼中,每笼1只母兔、5只仔兔,哺乳期35 d。饲喂颗粒料,每日定时投喂2次(8:00-8:30和18:00-18:30),自由饮水,自然光照,定期清理笼舍,保持环境清洁。饲料营养水平为粗蛋白含量16.0%~18.0%、粗纤维含量13.0%~18.0%、粗脂肪含量≥3.0%、粗灰分含量<10.0%、赖氨酸含量≥0.8%。

乳汁样品于母兔分娩后3个泌乳阶段采集:泌乳前期(MM1)为产后12 h左右(第1 d),泌乳中期(MM21)为产后第2 d至第21 d,泌乳后期(MM35)为产后第22 d至第35 d,每个阶段采集18份乳汁样品,共采集54份。各阶段乳汁样品随机分为3组,从每组6份样品中各取100 μL等量混合,作为1个生物学重复,每个阶段3个重复,最终获得9份混合乳样,立即置于-80℃超低温冰箱冷冻保存。委托美吉生物科技有限公司进行蛋白质组学检测与分析。

1.2 主要仪器与试剂

本试验所用仪器主要有美国Scientific Industries公司生产的Vortex-Genie 2涡旋混匀仪,德国Ep-

pendorf 公司生产的 Centrifuge 5424R 型高速冷冻离心机,中国艾本森科学仪器有限公司生产的 ABS-MS-078 型恒温混匀仪,美国 Molecular Devices 公司生产的 SpectraMax plus 384 型酶标仪,中国华美生化仪器厂生产的 LNG-T98 型冷冻离心浓缩干燥器和 LNG-T88 型台式快速离心浓缩干燥器,美国 Thermo Fisher Scientific 公司生产的 Vanquish Neo 高效液相色谱仪、NanoDrop One 分光光度计和 Orbitrap Astral 质谱仪。

主要试剂有美国 Sigma 公司生产的氨水、碘乙酰胺、三乙胺碳酸氢铵 (TEAB) 缓冲液,美国 Thermo Fisher Scientific 公司生产的色谱纯水、LC-MS 级水、LC-MS 级乙腈、LC-MS 级甲醇、LC-MS 级甲酸、LC-MS 级异丙醇、Bond-Breaker™ TCEP Solution (TCEP) 和二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白质定量试剂盒,美国 Promega 公司生产的质谱级 Modified Trypsin 蛋白酶,美国 Bimake 公司生产的蛋白酶抑制剂,中国沃凯生物科技有限公司生产的色谱纯氯仿,上海阿拉丁生化科技股份有限公司生产的色谱纯吡啶,中国国药集团化学试剂有限公司生产的丙酮和十二烷基硫酸钠 (SDS)。

1.3 乳脂球膜蛋白的制备

将混合后的四川麻兔乳汁样品首先在 4 °C 条件下 10 000 g 离心 15 min,随后取上层样品与 10 mL 磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 混合,80 W 超声波处理 3 次,每次 15 s,将混合液再次在 4 °C 条件下 10 000 g 离心 60 min,收集上清液并转移至肌纤维蛋白 (MP) 振荡管中,加入适量硼砂/聚乙烯吡咯烷酮/苯酚 (BPP) 混合液,使用高通量组织研磨器振荡处理 3 次,每次 40 s,随后,样本在 4 °C 条件下 12 000 g 离心 20 min,收集上清液,加入等体积的 Tris 饱和苯酚溶液,于 4 °C 条件下涡旋混合 10 min,4 °C 条件下 12 000 g 离心 20 min 后,分离苯酚相并加入等体积的 BPP 溶液混合。混合液在 4 °C 条件下涡旋混合 10 min,再次在 4 °C 条件下 13 000 g 离心 20 min,苯酚层用预冷的乙酸铵甲醇溶液 (体积为苯酚层的 5 倍) 处理,-20 °C 过夜进行蛋白质沉淀,次日将混合液在 4 °C 条件下 12 000 g 离心 20 min,弃去上清液,蛋白质样品用 90% 预冷丙酮洗涤 2 次,每次洗涤后弃去上清液,最后蛋白质样品用蛋白裂解缓冲液 (8 mol/L 尿素 + 1% SDS,含蛋白酶抑制剂混合物) 重悬,冰浴超声 2 min,然后 4 °C 条件下 12 000 g 离心 20 min,收集含

乳脂球膜蛋白的上清液,并使用 BCA 定量试剂盒测定蛋白质浓度。

1.4 乳脂球膜蛋白酶解

将 100 μg 蛋白质样品溶于 100 mmol/L TEAB 缓冲液,加入 TCEP 溶液至终浓度 10 mmol/L,37 °C 孵育 60 min,加入碘乙酰胺至终浓度 40 mmol/L,室温避光孵育 40 min,4 °C 条件下 12 000 g 离心 20 min 后取沉淀并用 100 μL 100 mmol/L TEAB 充分溶解,最后加入胰蛋白酶,37 °C 过夜酶解。

1.5 Astral-DIA 质谱检测

胰蛋白酶酶解后的肽段经真空泵抽干,使用 0.1% 三氟乙酸溶液复溶,经亲水亲脂平衡 (HLB) 固相萃取小柱脱盐后再次真空干燥。采用 NanoDrop One 超微量分光光度计对肽段进行紫外定量。肽段分离采用 Thermo Vanquish Neo 高效液相色谱系统,上样至 uPAC 高通量分析柱 (75.0 μm × 5.5 cm,美国赛默飞世尔科技有限公司产品)。流动相 A 由 0.1% 甲酸、2% 乙腈和 97.9% LC-MS 级水组成,流动相 B 由 0.1% 甲酸、80% 乙腈和 19.9% LC-MS 级水组成,色谱运行时间为 8 min。数据通过 Thermo Xcalibur 4.7 软件进行采集。线性梯度设置如下: 0~0.10 min,流动相 B 由 4.0% 线性升至 8.0%; 0.11~1.00 min,流动相 B 由 8.0% 线性升至 12.5%; 1.01~1.10 min,流动相 B 由 12.5% 线性升至 12.6%; 1.11~3.60 min,流动相 B 由 12.6% 线性升至 22.5%; 3.61~5.80 min,流动相 B 由 22.5% 线性升至 45.0%; 5.81~6.40 min,流动相 B 由 45.0% 线性升至 99.0%; 6.41~8.00 min,保持流动相 B 为 99.0%。HPLC 分离的样品采用 Orbitrap Astral 质谱仪进行质谱分析,运行于数据非依赖采集 (DIA) 模式,正离子检测,离子源电压为 1.5 kV,一级质谱数据在 m/z 为 100~1 700 范围内采集。

1.6 DIA 数据分析

使用 Spectronaut 软件对 DIA 原始数据进行搜索。每个蛋白质选择 6 个肽段,每个肽段选择 3 个子离子进行定量分析。参数设置如下:蛋白质错误发现率 (FDR) ≤ 0.01,肽段错误发现率 (FDR) ≤ 0.01,肽段置信度 ≥ 99%,提取离子色谱图宽度 (XIC) ≤ 7.5×10^{-5} [17]。为保证数据完整性并优化下游统计分析,仅对至少在一个试验组中表达的蛋白质进行表达量估算。若某蛋白质在组内 3 次生物学重复中至少 1 次被检测到,则判定该蛋白质在该试

验组中表达。对于此类蛋白质,使用顺序 K 近邻插补法估算同一组内未检测到的重复试验。排除共享肽段和修饰肽段,计算峰面积并相加得到定量结果。只有具备至少 1 个独特肽段的蛋白质才用于蛋白质鉴定。所有显著差异表达的 MFGM 蛋白(DEMP)均使用 t 检验进行组间成对比较鉴定,显著性定义为 $P < 0.05$ 和表达倍数(FC)变化 ≥ 2.0 或 ≤ 0.5 。仅在单一组别中检测到的独特表达蛋白质也被定义为 DEMP。对于此类蛋白质,当 FC 计算的分母为 0 时, FC 值被估算为相应成对比较中所有蛋白质最大 FC 的 2 倍。

1.7 生物信息学分析

利用 Majorbio Cloud 平台对蛋白质组数据进行生物信息学分析^[18]。使用 KEGG 通路^[19]、eggNOG 数据库^[20]、Pfam 数据库^[21]及亚细胞定位预测^[22]对所有识别出的蛋白质进行功能注释。利用 Mfuzz 2.6.0 软件进行 Mfuzz 时间聚类分析^[23]。确定最佳模糊化参数(m) = 3.694 4,聚类数为 10。

2 结果与分析

2.1 四川麻兔各泌乳期乳脂球膜(MFGM)蛋白的鉴定与特征分析

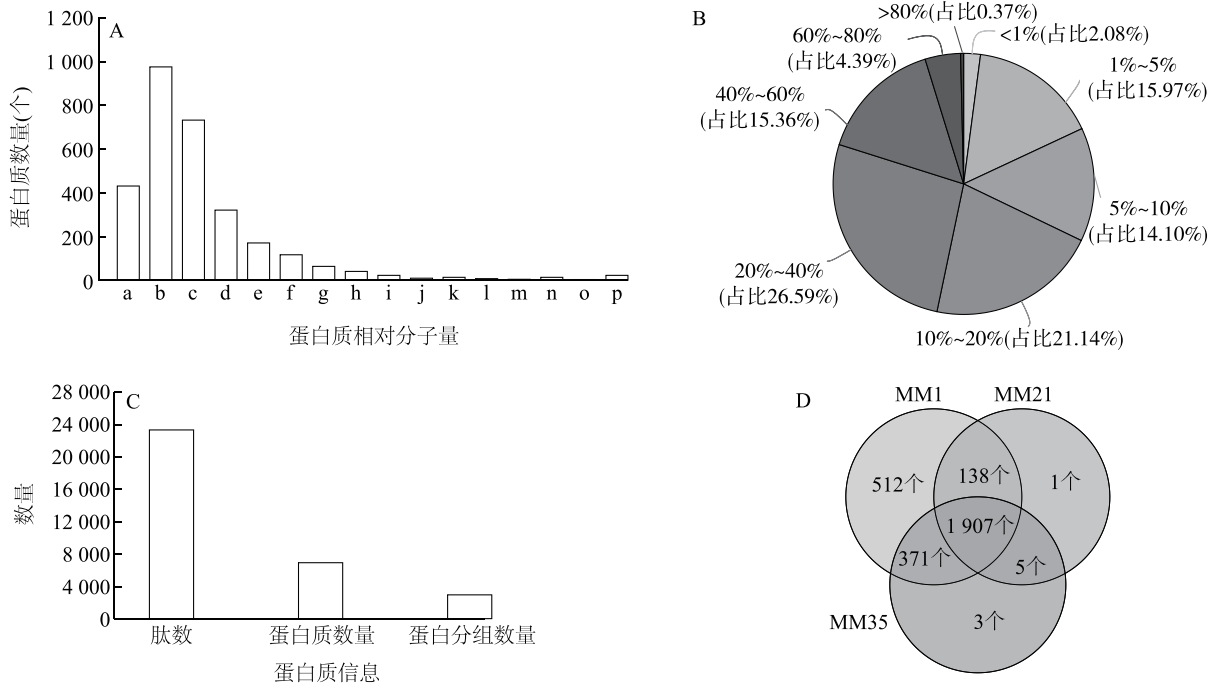
本研究鉴定了四川麻兔泌乳前期、泌乳中期和泌乳后期分离出的 3 组蛋白质,结果表明,大多数乳脂球膜蛋白相对分子量集中在 21 001~40 000 区间,其次为 41 001~60 000 区间(图 1A)。蛋白质氨基酸序列覆盖度在 20%~40% 的占比最高(26.59%),其次为 10%~20%(21.14%)(图 1B)。本研究共鉴定出 23 298 条肽段、6 905 个蛋白质及 2 937 个蛋白质分组数量(图 1C)。其中,蛋白质分组由共享肽段而无法进一步区分的同源蛋白构成的集合,因此其数目少于直接鉴定出的蛋白质数量。最终被定义的 2 937 个乳脂球膜蛋白中 1 907 个蛋白质在四川麻兔 3 个泌乳时期共同表达,泌乳前期 512 个乳脂球膜蛋白独特表达,泌乳中期与泌乳后期分别有 1 个和 3 个乳脂球膜蛋白独特表达(图 1D)。

样本间相关性分析结果(表 1)显示,各组内重复样本之间的相关系数均大于 0.960,而不同泌乳阶段之间相关性存在显著差异,说明试验重复性良好,数据质量可靠。主成分分析(PCA)结果(图 2A)同样表明,不同泌乳阶段 MFGM 蛋白存在显著差异,这可能与四川麻兔泌乳前期、泌乳中期和泌乳

后期 MFGM 蛋白组成和功能不同有关。为进一步探索 MFGM 蛋白在四川麻兔乳汁中的功能,本研究将所有鉴定出的 MFGM 蛋白与 eggNOG 数据库功能注释的蛋白质进行比对获取功能信息,结果(图 2B)发现其中有 476 种 MFGM 蛋白参与了细胞内运输、分泌与囊泡运输;此外,401 种 MFGM 蛋白参与翻译后修饰、蛋白质更替、伴侣蛋白相关通路。为明确四川麻兔 MFGM 蛋白潜在的代谢通路,本研究通过 KEGG 通路注释分析,结果(图 2C)发现,其主要参与 10 条通路,其中以全局代谢概览蛋白质数量最多,说明 MFGM 蛋白功能广泛覆盖代谢过程。病毒感染、细菌感染及免疫系统相关通路也有较多 MFGM 蛋白注释,表明大量的 MFGM 蛋白在新生哺乳动物建立免疫防御保护中发挥重要作用。同时,内分泌系统、信号转导与分解代谢相关通路中 MFGM 蛋白也显著富集,表明 MFGM 蛋白不仅参与物质合成与能量代谢,在囊泡运输与细胞信号调节中也发挥作用。通过与蛋白质亚细胞定位数据库比对,本研究进一步解析了 MFGM 蛋白在细胞内的具体作用位置(图 2D):1 384 种 MFGM 蛋白在细胞质中发挥作用,337 种和 305 种 MFGM 蛋白在线粒体和细胞外作用,值得关注的是,定位于质膜的蛋白质有 215 个,这是 MFGM 的关键成分,直接参与乳脂球的形成与分泌。

2.2 四川麻兔泌乳前期与泌乳中期乳脂球膜蛋白的特征差异

本研究对四川麻兔泌乳前期与泌乳中期 MFGM 蛋白组分进行了比较蛋白质组学分析。结果(图 3A)显示,两组间共鉴定出 1 351 个显著差异表达 MFGM 蛋白(DEMP),其中 1 025 个上调表达,326 个下调表达。聚类分析结果表明(图 3B),与泌乳中期相比,泌乳前期乳汁中的 DEMP 主要聚为两类:215 个 DEMP 参与细胞内运输、分泌与囊泡运输过程,185 个 DEMP 与蛋白质翻译后修饰、蛋白质周转及分子伴侣功能相关。基于 Pfam 数据库的蛋白质家族与结构域分类结果(图 3C)显示,具有 ADP 核糖基化因子结构域(Arf)和 RNA 识别基序 1(RRM_1)结构域的蛋白质均有 25 个;具有酪氨酸/丝氨酸/苏氨酸双特异性蛋白激酶结构域(PK_Tyr_Ser_Thr)、蛋白激酶结构域(Pkinase)及 Src 同源 3 结构域亚型 2(SH3_2)的蛋白质均有 23 个。KEGG 通路富集分析结果(图 3D)表明,差异表达蛋白显著富集于



A:蛋白质相对分子量分布;B:蛋白质氨基酸序列覆盖率分布;C:鉴定到的蛋白质信息;D:已鉴定乳脂球膜蛋白的维恩图。a:1 000~20 000; b:20 001~40 000;c:40 001~60 000;d:60 001~80 000;e:80 001~100 000;f:100 001~120 000;g:120 001~140 000;h:140 001~160 000; i:160 001~180 000;j:180 001~200 000;k:200 001~220 000;l:220 001~240 000;m:240 001~260 000;n:260 001~280 000;o:280 001~300 000; p:300 000以上。MM1:泌乳前期(产后第 1 d);MM21:泌乳中期(产后第 2 d 至第 21 d);MM35:泌乳后期(产后第 22 d 至第 35 d)。

图 1 四川麻兔乳脂球膜蛋白的质量控制分析结果

Fig.1 Quality control analysis results of milk fat globule membrane proteins in Sichuan rabbits

表 1 四川麻兔乳汁样本间相关系数

Table 1 Correlation coefficients between milk samples of Sichuan rabbits

样本	MM1_1	MM1_2	MM1_3	MM21_1	MM21_2	MM21_3	MM35_1	MM35_2	MM35_3
MM1_1	1.000	0.969	0.971	0.527	0.508	0.529	0.484	0.461	0.486
MM1_2	0.969	1.000	0.962	0.532	0.513	0.533	0.480	0.456	0.482
MM1_3	0.971	0.962	1.000	0.523	0.504	0.524	0.473	0.450	0.474
MM21_1	0.527	0.532	0.523	1.000	0.994	0.996	0.636	0.622	0.637
MM21_2	0.508	0.513	0.504	0.994	1.000	0.995	0.629	0.616	0.630
MM21_3	0.529	0.533	0.524	0.996	0.995	1.000	0.635	0.621	0.637
MM35_1	0.484	0.480	0.473	0.636	0.629	0.635	1.000	0.993	0.995
MM35_2	0.461	0.456	0.450	0.622	0.616	0.621	0.993	1.000	0.993
MM35_3	0.486	0.482	0.474	0.637	0.630	0.637	0.995	0.993	1.000

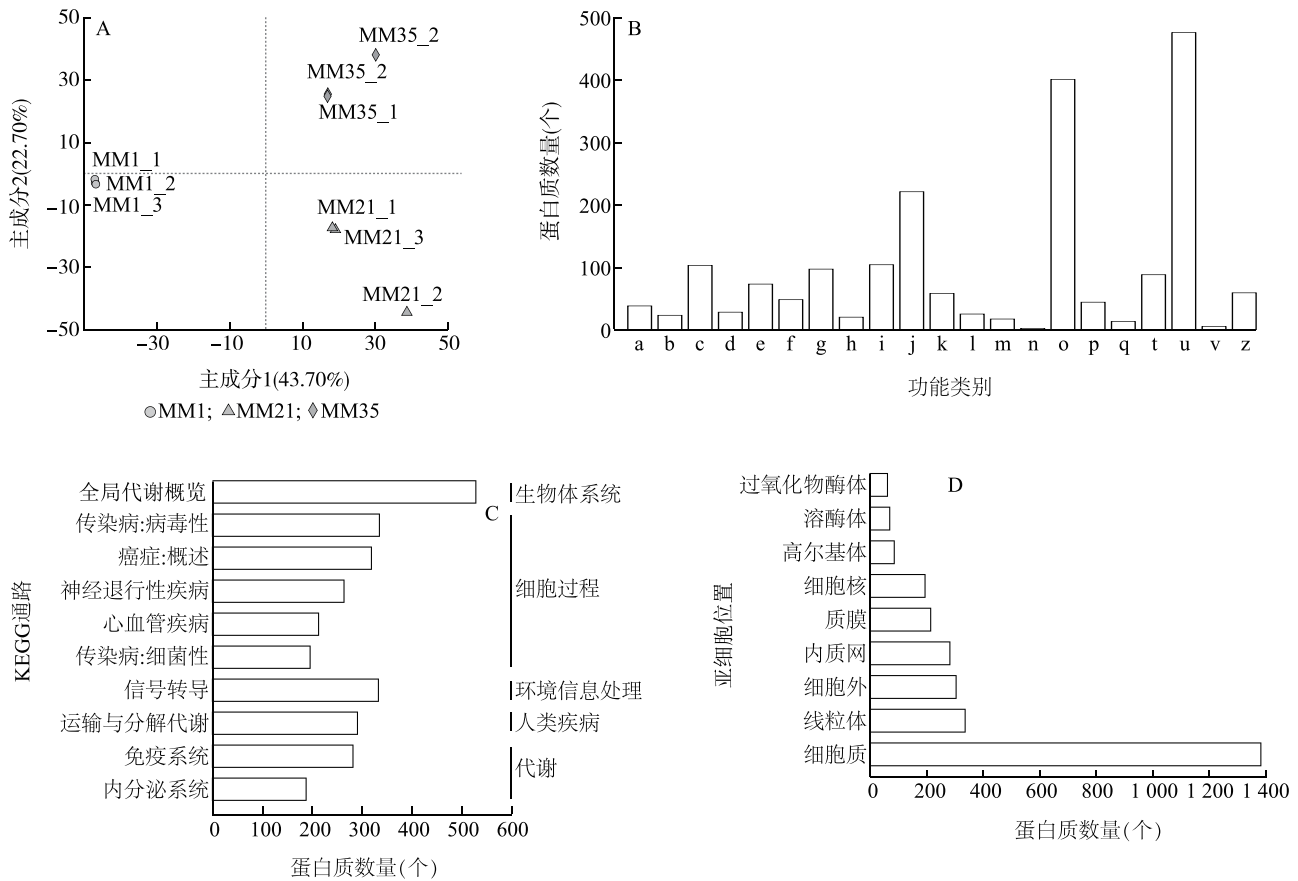
MM1、MM21、MM35 见图 1 注。MM1_1、MM1_2、MM1_3 分别代表泌乳前期 3 个乳汁样品,MM21_1、MM21_2、MM21_3 分别代表泌乳中期 3 个乳汁样品,MM35_1、MM35_2、MM35_3 分别代表泌乳后期 3 个乳汁样品。

cGMP-PKG 信号通路、蛋白质消化与吸收通路及细胞周期等通路。

2.3 四川麻兔泌乳中期与泌乳后期乳脂球膜蛋白的特征差异

对四川麻兔泌乳中期与泌乳后期 MFGM 蛋白

组分进行比较蛋白质组学分析,结果(图 4A)发现,泌乳中期与泌乳后期相比,泌乳中期中存在 458 种 DEMP,其中 156 种上调表达,302 种下调表达。聚类分析结果(图 4B)表明,与泌乳后期相比,泌乳中期乳汁中的 DEMP 主要聚为两类,其中



A:主成分分析(PCA);B:MFGM蛋白的 eggNOG 功能分类;C:MFGM蛋白的 KEGG 通路注释;D:MFGM蛋白的亚细胞定位分布。a:RNA 加工与修饰;b:染色质结构与动力学;c:能量产生与转换;d:细胞周期控制、细胞分裂、染色体分配;e:氨基酸运输与代谢;f:核苷酸运输与代谢;g:碳水化合物运输与代谢;h:辅酶运输与代谢;i:脂质运输与代谢;j:翻译、核糖体结构与生物合成;k:转录;l:复制、重组与修复;m:细胞壁、细胞膜、细胞包膜生物合成;n:细胞运动性;o:翻译后修饰、蛋白质周转、分子伴侣;p:无机离子运输与代谢;q:次生代谢产物的生物合成、运输与分解;t:信号传导机制;u:细胞内运输、分泌与囊泡运输;v:防御机制;z:细胞骨架。MM1、MM21、MM35 见图 1 注。MM1_1、MM1_2、MM1_3、MM21_1、MM21_2、MM21_3、MM35_1、MM35_2、MM35_3 见表 1 注。

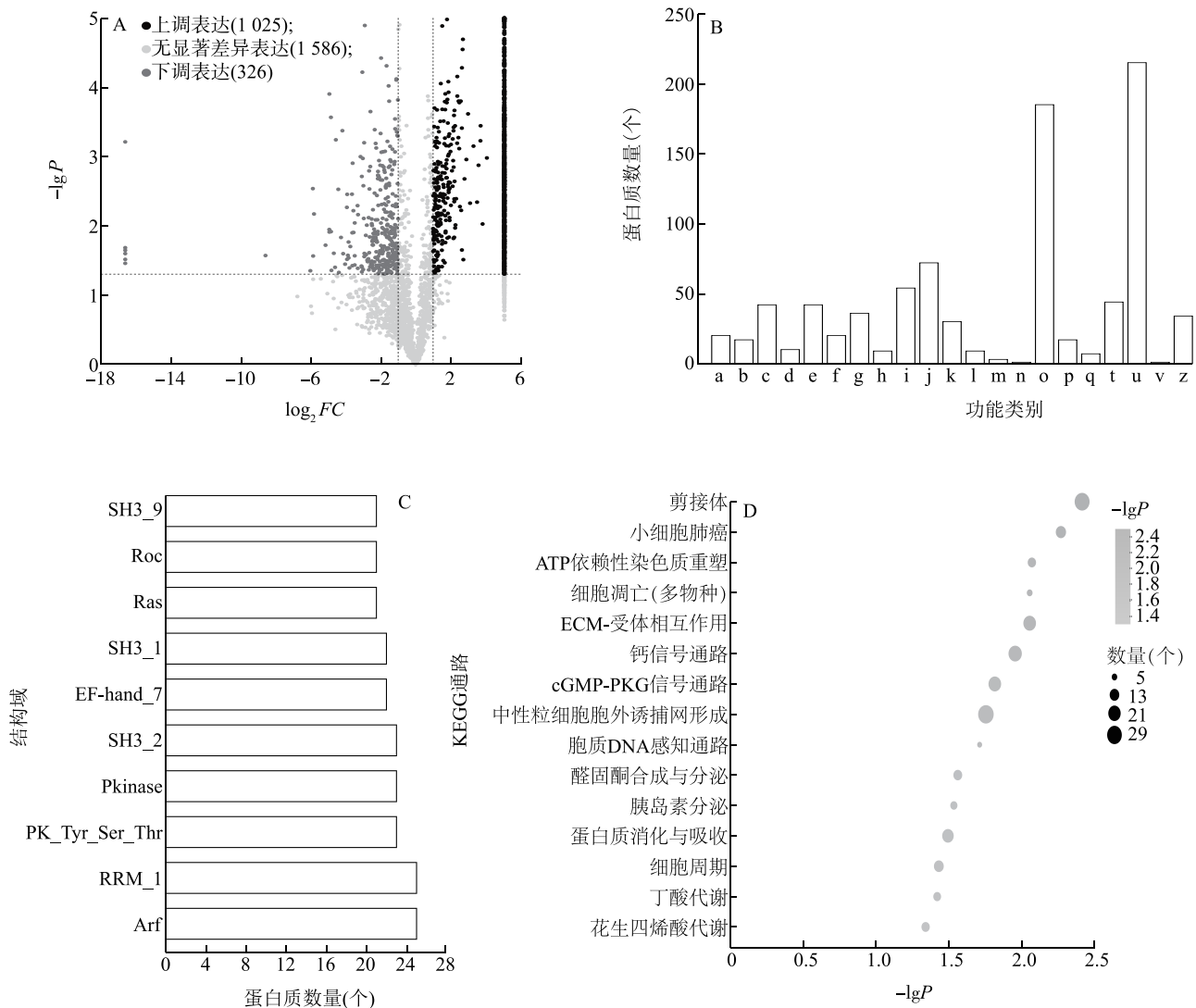
图 2 四川麻兔乳脂球膜蛋白的功能注释与分类结果

Fig.2 Functional annotation and classification results of milk fat globule membrane proteins in Sichuan rabbits

65 种 DEMP 参与细胞内运输、分泌及囊泡运输;60 种 DEMP 与蛋白质翻译后修饰、蛋白质周转、分子伴侣相关。基于 Pfam 数据库的蛋白质家族与结构域分类结果(图 4C)显示,具有酪氨酸/丝氨酸/苏氨酸双特异性蛋白激酶结构域(PK_Tyr_Ser_Thr)、蛋白激酶结构域(Pkinase)及 Src 同源 3 结构域亚型 2(SH3_2)的蛋白质均有 11 个。在泌乳中期与泌乳后期的比较组中,免疫球蛋白样结构域没有出现在 Pfam 域前 10,说明两组间的免疫相关蛋白质差异小。KEGG 富集分析结果(图 4D)显示,MAPK 信号通路、TGF-β 信号通路和癌症通路等通路富集显著。

2.4 四川麻兔泌乳前期与泌乳后期乳脂球膜蛋白的特征差异

对四川麻兔泌乳前期与泌乳后期 MFGM 蛋白组分进行比较蛋白质组学分析,结果(图 5A)发现,泌乳前期与泌乳后期相比,存在 1 331 种 DEMP,包括 901 种上调表达,430 种下调表达。这些发育阶段特异性蛋白质被推测参与关键代谢通路并发挥重要生物学功能,故需进一步进行功能鉴定。eggNOG 功能分类结果(图 5B)显示 DEMP 主要聚为两类,其中 217 种 DEMP 参与细胞内运输、分泌及囊泡运输;187 种 DEMP 与蛋白质翻译后修饰、蛋白质周转、分子伴侣相关。值得注意的



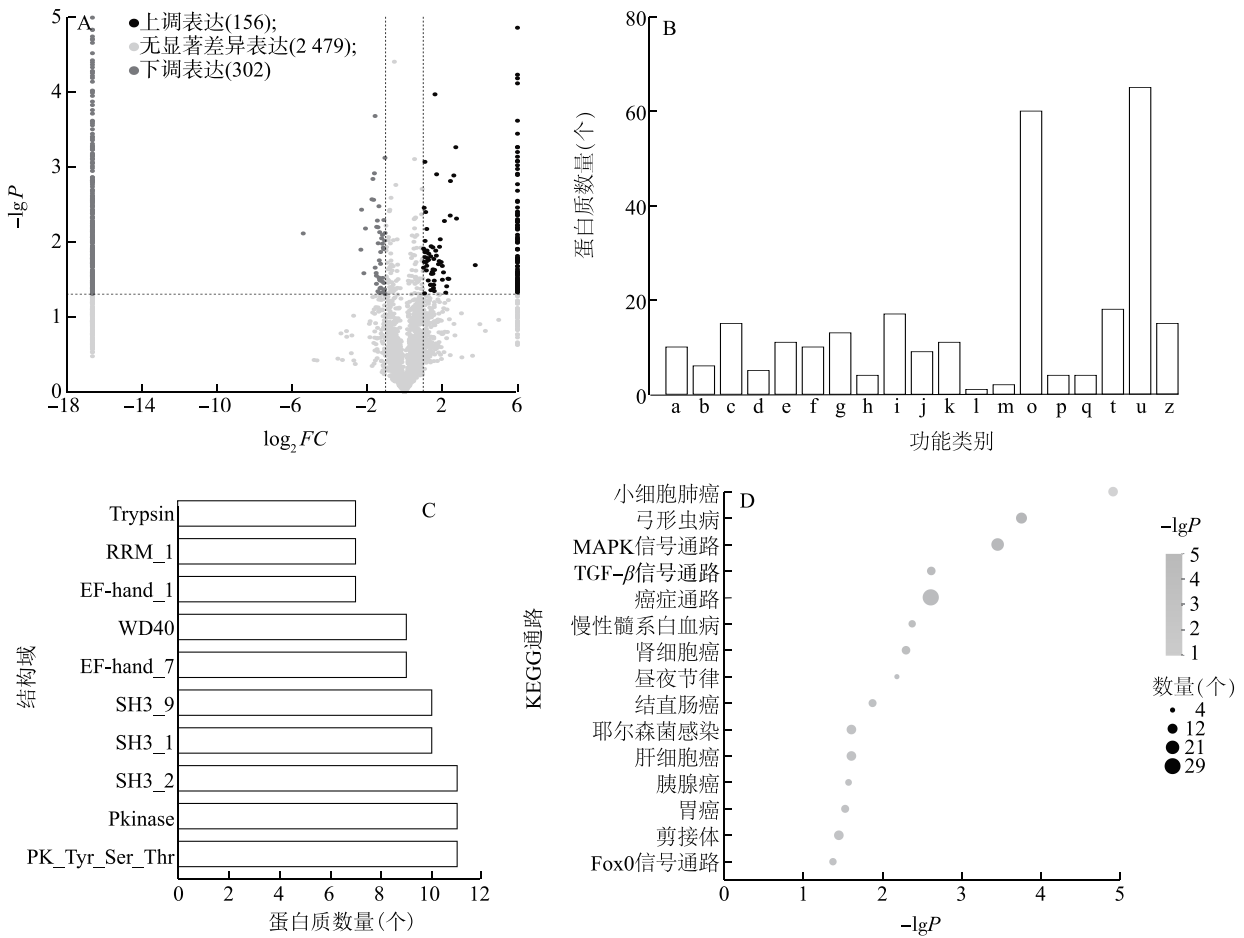
A: 泌乳前期与泌乳中期差异表达 MFGM 蛋白 (DEMP) 的火山图, 黑色圆点表示相对于泌乳中期, 在泌乳前期上调表达的蛋白质, 深灰色圆点表示下调表达的蛋白质, 浅灰色圆点表示无显著差异表达的蛋白质; B: 差异表达蛋白质的 eggNOG 功能分类; C: 差异表达蛋白质的 Pfam 结构域注释; D: 差异表达蛋白质的 KEGG 通路富集分析。a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、l、m、n、o、p、q、t、u、v、z 见图 2 注。SH3_9/SH3_1/SH3_2: Src 同源 3 结构域, 第 9、第 1、第 2 个重复; Roc: 复合物蛋白 Ras 结构域; Ras: 小 GTP 酶结构域; EF-hand_7: EF 手型结构域, 第 7 重复; Pkinase: 蛋白激酶结构域; PK_Tyr_Ser_Thr: 酪氨酸/丝氨酸/苏氨酸双特异性蛋白激酶结构域; RRM_1: RNA 识别基序 1; Arf: ADP 核糖基化因子结构域。FC 表示表达量倍数, 反映基因或蛋白质表达水平的变化幅度; P 表示差异显著性水平, 筛选标准: $FC \geq 2.0$ 或 ≤ 0.5 , 且 $P \leq 0.05$ 。

图 3 四川麻兔泌乳前期与泌乳中期乳脂球膜 (MFGM) 蛋白的差异特征分析结果

Fig.3 Differential analysis of milk fat globule membrane (MFGM) proteins between early lactation and mid-lactation in Sichuan rabbits

是, 免疫与防御功能类别在泌乳前期和泌乳后期的比较组中被注释, 但在泌乳中期和泌乳后期的比较组中没有被注释, 表明母源免疫功能主要集中在泌乳前期乳汁中。在泌乳前期与泌乳后期的比较中, DEMP 更多被注释于翻译与核糖体组装; 而在泌乳中期与泌乳后期的比较组中, DEMP 主要富集于脂质转运与代谢。基于 Pfam 数据库的蛋

白质家族与结构域分类结果 (图 5C) 显示, 具有 ADP 核糖基化因子结构域 (Arf) 的蛋白质有 28 个, 具有小 GTP 酶结构域 (Ras) 的蛋白质有 23 个, 具有免疫球蛋白样结构域 (Ig_3) 的蛋白质有 19 个。KEGG 富集分析结果 (图 5D) 表明, 泌乳前期 MFGM 蛋白突显 cGMP-PKG 信号通路、细胞因子-受体相互作用、氨基糖与核苷酸糖代谢等通路。



A: 泌乳中期与泌乳后期差异表达 MFGM 蛋白 (DEMP) 的火山图, 黑色圆点表示相对于泌乳后期, 在泌乳中期上调表达的蛋白质, 深灰色圆点表示下调表达的蛋白质, 浅灰色圆点表示无显著差异表达的蛋白质; B: 差异表达蛋白质的 eggNOG 功能分类; C: 差异表达蛋白质的 Pfam 结构域注释; D: 差异表达蛋白质的 KEGG 通路富集分析。a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、l、m、o、p、q、t、u、z 见图 2 注。Trypsin: 胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶结构域; RRM_1: RNA 识别基序; EF-hand_1、EF-hand_7: EF 手型钙结合基序第 1 重复、第 7 重复; WD40: WD40 重复结构域; SH3_9、SH3_1、SH3_2: Src 同源 3 结构域第 9 重复、第 1 重复、第 2 重复; Pkinase: 蛋白激酶结构域; PK_Tyr_Ser_Thr: 酪氨酸/丝氨酸/苏氨酸双特异性蛋白激酶结构域。FC 和 P 见图 3 注。

图 4 四川麻兔泌乳中期与泌乳后期乳脂球膜 (MFGM) 蛋白的差异特征分析结果

Fig.4 Differential analysis of milk fat globule membrane (MFGM) proteins between mid-lactation and late lactation in Sichuan rabbits

2.5 四川麻兔不同泌乳时期乳脂球膜蛋白差异表达的时间序列特征分析

为系统表征四川麻兔泌乳前期、泌乳中期及泌乳后期 MFGM 蛋白表达时空动态, 对 MFGM 蛋白进行 Mfuzz 时序聚类分析。选取其中 3 个显著共表达蛋白簇簇 1 (cluster 1)、簇 2 (cluster 2) 和簇 3 (cluster 3) 进行描绘。结果显示, 簇 1 ($n=93$) 呈现从泌乳前期高表达, 泌乳中期明显下降, 泌乳后期进一步降低但斜率趋缓; 簇 2 ($n=16$) 则呈现从泌乳前期至泌乳中期再至泌乳后期逐渐上调表达; 簇 3 ($n=149$) 呈现从泌乳前期升高至泌乳中期趋于平稳, 并在泌

乳后期维持稳定。从图 6A 可见, 簇 1 中 MFGM 蛋白的 KEGG 富集通路分析结果显示, 其显著富集于蛋白酶体、细胞黏附分子、脊髓小脑共济失调、Hippo 信号通路、糖尿病中的 AGE-RAGE 信号通路、p53 信号通路等通路。这些在泌乳前期高表达的 MFGM 蛋白, 功能主要集中于蛋白质稳态调控 (蛋白酶体)、细胞黏附与信号转导 (细胞黏附分子、Hippo 信号通路、p53 信号通路、AGE-RAGE 信号通路)、免疫与应激响应等方面。其共性特征表现为: 在泌乳前期被高度激活, 以协同支持乳腺上皮细胞快速建立分泌功能、维持细胞内稳态及母源免疫物质的传递;

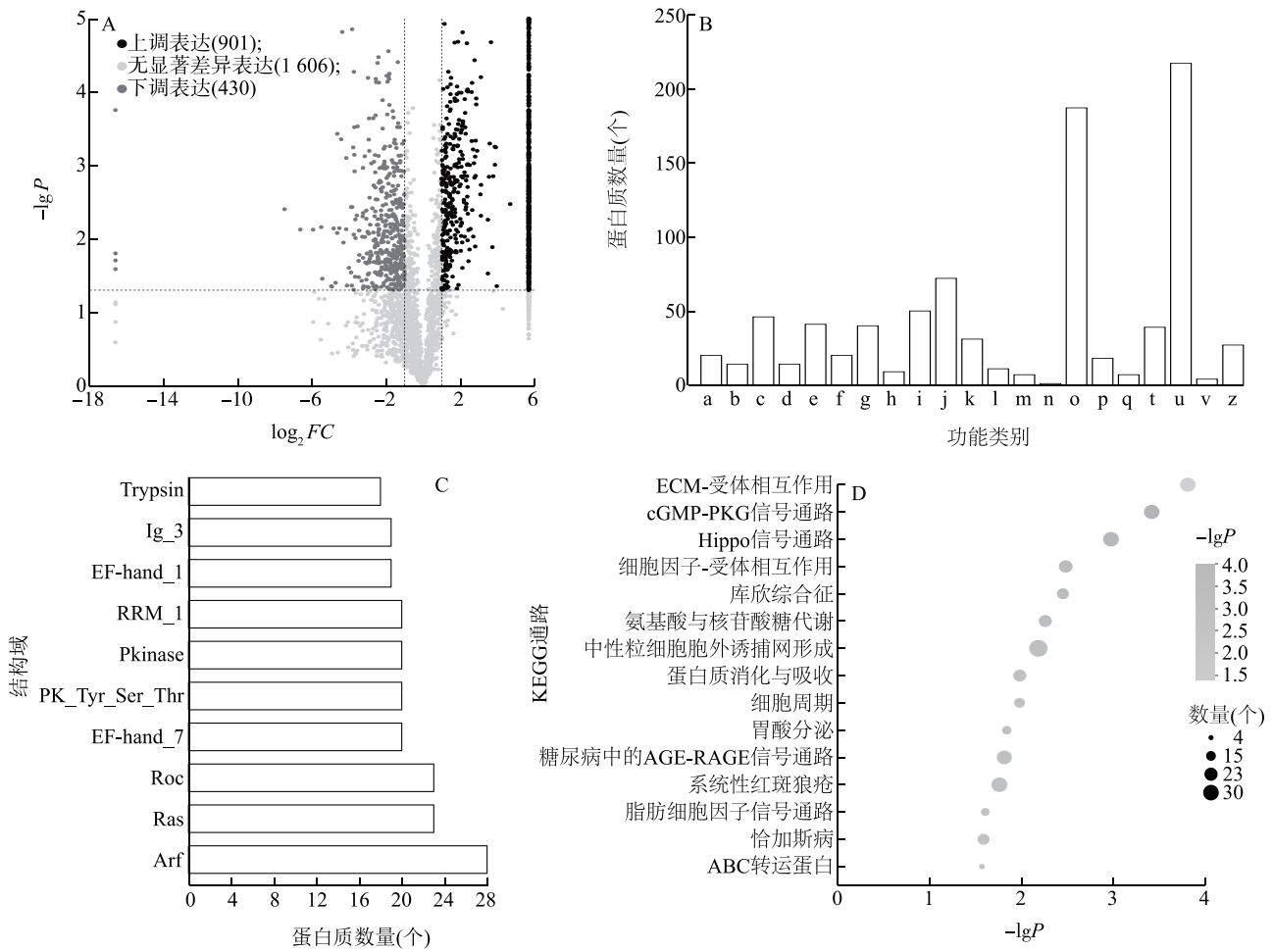


图 5 四川麻兔泌乳前期与泌乳后期乳脂球膜 (MFGM) 蛋白的差异特征分析结果

Fig.5 Differential analysis of milk fat globule membrane (MFGM) proteins between early lactation and late lactation in Sichuan rabbits

A: 泌乳前期与泌乳后期差异表达 MFGM 蛋白 (DEMP) 的火山图。黑色圆点表示相对于泌乳后期,在泌乳前期上调表达的蛋白质,深灰色圆点表示下调表达的蛋白质,浅灰色圆点表示无显著差异表达的蛋白质;B: 差异表达蛋白质的 eggNOG 功能分类;C: 差异表达蛋白质的 Pfam 结构域注释;D: 差异表达蛋白质的 KEGG 通路富集分析 ($P < 0.05$)。a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、l、m、n、o、p、q、t、u、v、z 见图 2 注。Trypsin: 胰蛋白酶样氨基酸蛋白酶结构域;Ig_3: 免疫球蛋白样结构域,3 型;EF-hand_1、EF-hand_7: EF 手型钙结合基序,第 1 重复、第 7 重复;RRM_1: RNA 识别基序,1 型;Pkinase: 蛋白激酶结构域;PK_Tyr_Ser_Thr: 酪氨酸/丝氨酸/苏氨酸双特异性蛋白激酶结构域;Roc: 复合蛋白 Roc 结构域;Ras: 小 GTP 酶结构域;Arf: ADP 核糖基化因子结构域。FC 和 P 见图 3 注。

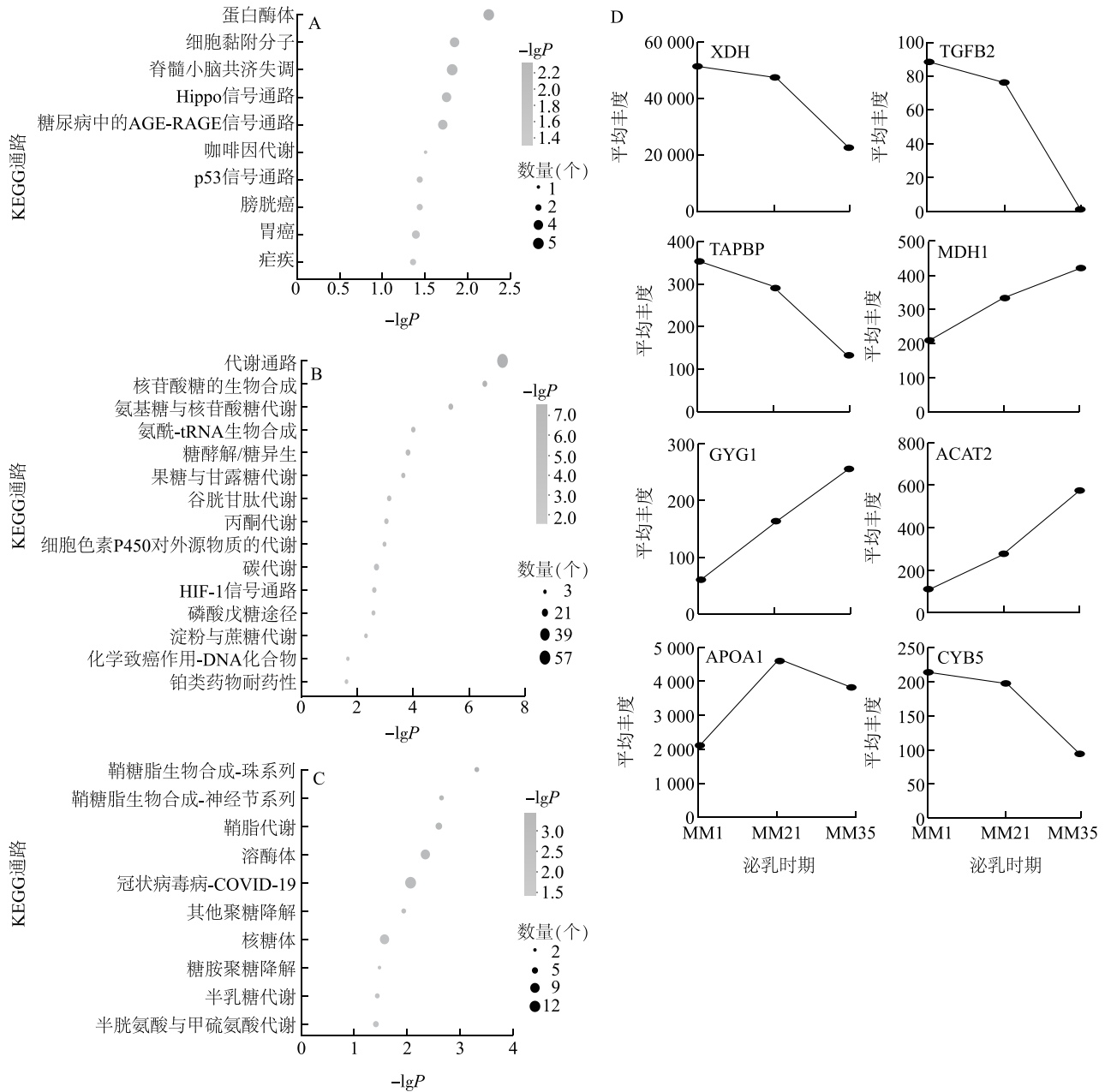
随着泌乳进程的推进,相关功能活性逐步下调,乳腺组织转向以稳定泌乳供给为核心的生理状态。从图 6B 可见,簇 2 中 MFGM 蛋白的 KEGG 富集通路分析结果显示,其显著富集于代谢通路、核苷酸糖的生物合成、丙酮酸代谢、氨基糖与核苷酸糖代谢以及果糖与甘露糖代谢等通路。簇 2 的 MFGM 蛋白功能主要集中于代谢相关通路,呈现代谢稳态和长期供给模式。从图 6C 可见,簇 3 中 MFGM 蛋白的 KEGG 富集通路分析结果显示,其显著富集于鞘糖脂生物合成(球系列、神经节系列)、鞘脂代谢、溶酶体、半

乳糖代谢等通路。这一结果提示,在泌乳进程推进过程中,MFGM 蛋白的功能重心逐步由早期的细胞稳态与免疫防御,向脂质代谢重塑、碳水化合物高效利用及细胞代谢调控转变,从而保障泌乳后期持续、稳定的营养供给与代谢稳态,以满足新生哺乳动物生长发育的需求。

进一步从簇 1、簇 2、簇 3 中筛选出 8 种核心乳脂肪球膜蛋白,其中 XDH、TGFB2、TAPBP 归属于簇 1,MDH1、GYG1、ACAT2 归属于簇 2,APOA1、CYB5 归属于簇 3。XDH 是介导乳脂球释放与 MFGM 组

装的关键蛋白;TGFB2 被推测参与免疫调节、组织修复及环境应激适应过程;TAPBP 为抗原加工与呈递通路中的核心枢纽蛋白;MDH1 负责细胞质与线粒体间还原当量的穿梭转运,且推测其与脂质合成密切相关;GYG1 为糖原合成的起始酶,可能参与能量代谢调控;ACAT2 为乙酰辅酶 A 乙酰转移酶,可

催化脂肪酸合成相关反应;APOA1 是机体内关键的脂质转运蛋白;CYB5 为脂质代谢通路中不可或缺的功能蛋白。这 8 种核心 MFGM 蛋白在泌乳时期的动态表达调控模式见图 6D。综上,本研究筛选得到 8 种与免疫调控、能量代谢及脂质合成密切相关的核心 MFGM 蛋白。



A~C 分别表示簇 1、簇 2、簇 3 中 MFGM 蛋白位列前 10 的显著富集通路 ($P < 0.05$); D: 簇 1、簇 2、簇 3 中代表性高丰度 MFGM 蛋白表达模式。MM1、MM21、MM35 见图 1 注。P 见图 3 注。

图 6 四川麻兔乳脂球膜 (MFGM) 蛋白在不同泌乳阶段的动态表达模式与功能特性

Fig.6 Dynamic expression patterns and functional characteristics of milk fat globule membrane (MFGM) proteins in Sichuan rabbits at different lactation stages

3 讨论

本研究采用 Astral-DIA 蛋白质组学技术,对四川麻兔泌乳前期、泌乳中期和泌乳后期 3 个泌乳阶段的乳脂球膜(MFGM)蛋白进行分析,分别在泌乳前期、泌乳中期和泌乳后期鉴定出 2 928 种、2 051 种和 2 286 种 MFGM 蛋白。主成分分析(PCA)与层次聚类结果共同证实,泌乳时期存在显著的阶段依赖性蛋白质组重塑,3 个泌乳阶段各自呈现出独特的蛋白质表达特征。值得注意的是,eggNOG 功能注释结果显示,四川麻兔乳汁中 MFGM 蛋白主要富集于细胞内运输、分泌与囊泡运输及翻译与核糖体组装、蛋白质周转、分子伴侣等相关通路。其中,翻译与核糖体组装主要参与蛋白质合成的起始过程;蛋白质翻译后修饰、降解及分子伴侣相关通路则负责蛋白质合成后的质量控制与功能多样化,介导蛋白质的正确折叠并清除错误折叠或受损蛋白质以维持蛋白质稳态。上述功能模块协同作用保障了泌乳过程中蛋白质的高效合成与持续稳态,相关功能在已有研究^[24-25]中已得到验证。

泌乳前期虽仅为母兔产仔后 1 d,此阶段分泌的乳汁却对仔兔健康至关重要,前人针对骆驼、牛、猪、绵羊及驴等的相关研究结果均已证实该阶段分泌的乳汁的重要性^[26-29]。本研究采用蛋白质组学技术,解析了四川麻兔泌乳前期与泌乳后期乳脂球膜蛋白的差异表达特征,共鉴定出 1 331 种差异表达蛋白(DEMP)。泌乳前期差异表达蛋白在蛋白质翻译与免疫防御功能上更具优势。此外,这些差异表达蛋白质显著富集于代谢途径及免疫系统相关通路,与 Zhao 等^[29]的研究结果一致。Pfam 结构域分析发现,差异表达蛋白质中主要具有免疫球蛋白样结构域(Ig_3),该结构域与免疫功能密切相关。综上,泌乳前期乳汁中的差异表达蛋白主要参与代谢及免疫相关通路,提示其在提升仔兔免疫力方面具有重要潜力。

泌乳中期是 MFGM 蛋白由泌乳前期形态向泌乳后期形态转变的阶段,其蛋白质组成与功能特性与泌乳前期相比均发生显著变化。本研究通过蛋白质组学分析发现,四川麻兔泌乳中期与泌乳后期相比乳汁中存在 458 种 DEMP。这些差异表达蛋白质主要参与脂质转运与代谢过程,提示乳腺功能由前期的免疫防御为主逐渐转向营养供给为主,乳汁成

分逐步接近泌乳后期,整体仍处于功能过渡状态。Wang 等^[30]针对牦牛乳汁的研究结果表明,随着泌乳进程推进,脂质代谢相关蛋白质丰度上升,尤其在泌乳中期,与甘油三酯合成及脂肪酸去饱和相关的代谢通路被显著激活。泌乳中期 MFGM 中仍保留部分免疫相关蛋白,不过此类蛋白质在泌乳后期会逐步降低。总体而言,MFGM 蛋白的功能优势从泌乳前期以免疫防御为主,逐步过渡至泌乳中期以信号调控与内环境稳态维持为主。

本研究通过定量蛋白质组分析,在四川麻兔泌乳前期与泌乳中期的乳汁中共鉴定出 1 351 种 DEMP。泌乳前期与泌乳中期、泌乳前期与泌乳后期的差异表达蛋白质在 eggNOG 功能分类上分布高度一致。据此推测,与泌乳维持阶段相比,泌乳起始阶段发生了系统性重编程,主要表现为能量代谢、蛋白质合成及质量控制相关通路的增强,随后在泌乳中期至后期逐步趋于稳态。KEGG 富集到免疫与防御相关通路,说明泌乳前期承担更强的免疫保护与母源抗体传递功能。已有研究结果证实,奶牛泌乳前期乳汁中多种免疫相关蛋白的含量同样高于其他泌乳阶段^[7]。此外,泌乳前期乳汁中 KEGG 富集到多条与人类疾病相关的通路。这类疾病相关通路在人、猪、山羊、骆驼等多种哺乳动物的 MFGM 蛋白中同样显著富集,其次为代谢及其他过程^[29,31-33]。因此,泌乳前期乳汁中大量 MFGM 蛋白与疾病的关联性很可能通过被动免疫发挥作用,从而保护幼崽免受感染^[3]。

随着泌乳时期的推进,乳汁中 MFGM 蛋白的特性也逐渐发生变化。本研究通过 Mfuzz 时序聚类分析挖掘在不同泌乳时期表达丰度一致的 MFGM 蛋白。簇 1 中 MFGM 蛋白主要集中在蛋白质稳态控制和免疫与应激响应方面。此外,蛋白酶体通路在簇 1 中被显著富集。蛋白质水解是指蛋白质被各类蛋白酶水解,导致底物分解为肽或氨基酸,而蛋白酶体可确保底物的正确降解^[34]。已有研究结果证实,蛋白质水解与乳蛋白消化密切相关,而乳蛋白消化又直接影响新生儿发育^[35]。簇 2 中的 MFGM 蛋白主要富集于代谢相关通路,包括糖酵解/糖异生、丙酮酸代谢、戊糖磷酸途径和核苷酸糖代谢等。这表明,随着泌乳进程推进,MFGM 蛋白功能由早期的免疫与质量控制逐步转向高效营养代谢与稳定的抗氧化防御,以满足泌乳后期持续供给仔兔生长所需的

营养与能量。其中,新生哺乳动物在度过产后早期阶段后,营养需求成为首要任务。因此泌乳中期和泌乳后期乳汁中的 MFGM 蛋白更侧重营养代谢^[3]。

通过挖掘具有时间表达特征的 MFGM 蛋白,本研究筛选到 8 种重要的 MFGM 蛋白。研究结果表明,不同泌乳阶段的时序表达变化可揭示乳汁功能的演进^[36]。本研究发现,四川麻兔从泌乳前期向泌乳后期转变过程中,乳汁中若干蛋白质含量呈下降趋势,包括 XDH、TGFB2、TAPBP 和 CYB5 蛋白。XDH(黄嘌呤脱氢酶)是乳脂球形成与分泌的关键蛋白,可促进脂滴在细胞质中的封装及其向细胞外的运输,最终形成乳脂球(MFG)并分泌至乳汁中^[37]。TGFB2 可促进肠道屏障修复与免疫耐受^[38-39],并在乳腺发育及免疫保护中发挥重要作用,其浓度在泌乳前期最高,并随泌乳进程逐渐下降^[40-41]。母乳中的 TGFB2 是转化生长因子的重要外源性来源。TAPBP 参与将抗原肽高效加载至 MHC-I 分子并维持其稳定表达,是适应性免疫的重要组成部分^[42]。CYB5 蛋白可为多种膜结合氧化还原酶提供电子,包括脂肪酸去饱和酶(*SCD1*),而 *SCD1* 是乳脂合成中催化脂肪酸引入双键的关键限速酶^[43]。部分 MFGM 蛋白在乳汁中的丰度随泌乳期的推进持续升高,并在泌乳后期达到峰值,包括 ACAT2、MDH1 和 GYG1 蛋白。ACAT2 蛋白负责催化乙酰-CoA 生成乙酰乙酰-CoA,是胆固醇合成、脂肪酸合成及酮体生成的关键步骤^[44]。MDH1 蛋白可参与苹果酸与草酰乙酸的相互转化,是三羧酸循环(TCA 循环)、糖异生及 NADPH 生成的关键蛋白^[45]。GYG1 为糖原合成的起始酶,可维持葡萄糖储备稳定^[46]。此外,少数 MFGM 蛋白在泌乳中期达到峰值后于泌乳后期趋于稳定,如 APOA1, APOA1 参与胆固醇从外周组织向肝脏的逆向转运,并作为卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)的辅因子促进胆固醇酯化^[47-48]。

本研究虽然分析了四川麻兔泌乳前期、泌乳中期、泌乳后期 MFGM 蛋白特性的变化,但未验证单个蛋白质特性的变化,后续可进一步研究。此外,本研究仅聚焦 3 个阶段的 MFGM 蛋白谱,乳汁中其他重要功能物质也值得深入探索。

4 结论

本研究揭示了四川麻兔 3 个泌乳阶段(泌乳前

期、泌乳中期、泌乳后期)乳汁中乳脂球膜(MFGM)蛋白的特征,深入探索了各阶段差异表达蛋白(DEMP)的功能。此外,还分析了 3 个泌乳阶段 MFGM 蛋白的时序表达,筛选出 8 种与免疫调控、能量代谢及脂质合成密切相关的核心 MFGM 蛋白。

参考文献:

- [1] MAITY S, AMBATIPUDI K. Quantitative proteomics of milk whey reveals breed and season specific variation in protein abundance in Holstein Friesian cow and Murrah buffalo[J]. *Research in Veterinary Science*, 2019, 125: 244-252.
- [2] DEMMELMAIR H, PRELL C, TIMBY N, et al. Benefits of lactoferrin, osteopontin and milk fat globule membranes for infants[J]. *Nutrients*, 2017, 9(8): 817.
- [3] BRINK L R, LÖNNERDAL B. Milk fat globule membrane: the role of its various components in infant health and development[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2020, 85: 108465.
- [4] GODDEN S. Colostrum management for dairy calves[J]. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2008, 24(1): 19-39.
- [5] BLÄTTLER U, HAMMON H M, MOREL C, et al. Feeding colostrum, its composition and feeding duration variably modify proliferation and morphology of the intestine and digestive enzyme activities of neonatal calves[J]. *The Journal of Nutrition*, 2001, 131(4): 1256-1263.
- [6] INABU Y, PYO J, PLETTS S, et al. Effect of extended colostrum feeding on plasma glucagon-like peptide-1 concentration in newborn calves[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(5): 4619-4627.
- [7] FAHEY M J, FISCHER A J, STEELE M A, et al. Characterization of the colostrum and transition milk proteomes from primiparous and multiparous Holstein dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(2): 1993-2005.
- [8] RAHMAN M M, TAKASHIMA S, KAMATARI Y O, et al. Comprehensive proteomic analysis revealed a large number of newly identified proteins in the small extracellular vesicles of milk from late-stage lactating cows[J]. *Animals*, 2021, 11(9): 2506.
- [9] SANTILLO A, FIGLIOLA L, CILIBERTI M G, et al. Focusing on fatty acid profile in milk from different species after *in vitro* digestion[J]. *The Journal of Dairy Research*, 2018, 85(2): 257-262.
- [10] MAERTENS L L, LEBAS F, ZS S. Rabbit milk: a review of quantity, quality and non-dietary affecting factors[J]. *World Rabbit Science*, 2010, 14(4): 205-230.
- [11] LU J, WANG X Y, ZHANG W Q, et al. Comparative proteomics of milk fat globule membrane in different species reveals variations in lactation and nutrition[J]. *Food Chemistry*, 2016, 196: 665-672.
- [12] GUAN B Y, ZHANG Z H, CAO X Y, et al. Characterization and

- comparison site-specific N-glycosylation profiling of milk fat globule membrane proteome in donkey and human colostrum and mature milk[J]. *Food Chemistry*, 2023, 419:136081.
- [13] JI X X, LI X S, MA Y, et al. Differences in proteomic profiles of milk fat globule membrane in yak and cow milk[J]. *Food Chemistry*, 2017, 221:1822-1827.
- [14] ZHAO L L, DU M, GAO J, et al. Label-free quantitative proteomic analysis of milk fat globule membrane proteins of yak and cow and identification of proteins associated with glucose and lipid metabolism[J]. *Food Chemistry*, 2019, 275:59-68.
- [15] LI S S, BU T T, ZHENG J X, et al. Preparation, bioavailability, and mechanism of emerging activities of ile-pro-pro and val-pro-pro [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(4):1097-1110.
- [16] HUANG D, WANG Y, DING H, et al. Comparative analysis of Angora Rabbit colostrum and mature milk using quantitative proteomics[J]. *Biology*, 2024, 13(8):634.
- [17] LOU R H, SHUI W Q. Acquisition and analysis of DIA-based proteomic data: a comprehensive survey in 2023 [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2024, 23(2):100712.
- [18] HAN C, SHI C P, LIU L M, et al. Majorbio cloud 2024: update single-cell and multiomics workflows[J]. *iMeta*, 2024, 3(4):217.
- [19] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1):27-30.
- [20] CANTALAPIEDRA C P, HERNÁNDEZ-PLAZA A, LETUNIC I, et al. EggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(12):5825-5829.
- [21] FINN R D, TATE J, MISTRY J, et al. The Pfam protein families database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36:281-288.
- [22] BLUM T, BRIESEMEISTER S, KOHLBACHER O. MultiLoc2: integrating phylogeny and Gene Ontology terms improves subcellular protein localization prediction[J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10(1):274.
- [23] FUTSCHIK M E, CARLISLE B. Noise-robust soft clustering of gene expression time-course data[J]. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2005, 3(4):965-988.
- [24] ZHAO H W, LIU X Y, AMANTAI X, et al. Characterization and comparison analysis of milk fat globule membrane proteins between human and porcine milk [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(6):3210-3217.
- [25] HE J, SI R, WANG Y L, et al. Lipidomic and proteomic profiling identifies the milk fat globule membrane composition of milk from cows and camels [J]. *Food Research International*, 2024, 179:113816.
- [26] HAN B S, ZHANG L N, LUO B L, et al. Comparison of milk fat globule membrane and whey proteome between Dromedary and Bactrian camel[J]. *Food Chemistry*, 2022, 367:130658.
- [27] LU J, LIU L, PANG X Y, et al. Comparative proteomics of milk fat globule membrane in goat colostrum and mature milk[J]. *Food Chemistry*, 2016, 209:10-16.
- [28] LI W X, LI M H, CAO X Y, et al. Quantitative proteomic analysis of milk fat globule membrane (MFGM) proteins from donkey colostrum and mature milk [J]. *Food & Function*, 2019, 10(7):4256-4268.
- [29] ZHAO H W, LI M H, ZHU Q, et al. Label-free quantitative proteomic analysis of milk fat globule membrane proteins in porcine colostrum and mature milk [J]. *Food Chemistry*, 2023, 426:136447.
- [30] WANG Y D, LAN D L, LIU S Y, et al. Astral-data-independent acquisition depicts the dynamic landscape of milk fat globule membrane proteins in yak colostrum, transitional milk, and mature milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2025, 108(9):9095-9112.
- [31] CAO X Y, KANG S M, YANG M, et al. Quantitative N-glycoproteomics of milk fat globule membrane in human colostrum and mature milk reveals changes in protein glycosylation during lactation [J]. *Food & Function*, 2018, 9(2):1163-1172.
- [32] HAN B S, ZHANG L N, ZHOU P. Comparison of milk fat globule membrane protein profile among bovine, goat and camel milk based on label free proteomic techniques[J]. *Food Research International*, 2022, 162:112097.
- [33] SUN Y X, WANG C N, SUN X M, et al. Characterization of the milk fat globule membrane proteome in colostrum and mature milk of Xinong Saanen goats [J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(4):3017-3024.
- [34] KIM J, BYUN I, KIM D Y, et al. Targeted protein degradation directly engaging lysosomes or proteasomes [J]. *Chemical Society Reviews*, 2024, 53(7):3253-3272.
- [35] PIERONI M, MOON J C, ARBUSTINI E, et al. Cardiac involvement in fabry disease JACC review topic of the week [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2021, 77(7):922-936.
- [36] GAO X L, MCMAHON R J, WOO J G, et al. Temporal changes in milk proteomes reveal developing milk functions [J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(7):3897-3907.
- [37] JEONG J, KADEGOWDA A K G, MEYER T J, et al. The butyrophilin 1a1 knockout mouse revisited: ablation of *Btn1a1* leads to concurrent cell death and renewal in the mammary epithelium during lactation [J]. *FASEB BioAdvances*, 2021, 3(12):971-997.
- [38] LI M O, WAN Y Y, SANJABI S, et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses [J]. *Annual Review of Immunology*, 2006, 24:99-146.
- [39] PLANCHON S M, MARTINS C A, GUERRANT R L, et al. Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1. Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine [J]. *Journal of Immunology*, 1994, 153(12):5730-5739.
- [40] PENTTILA I A, VAN SPRIEL A B, ZHANG M F, et al. Transforming growth factor-beta levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum [J]. *Pediatric Research*, 1998, 44(4):524-531.
- [41] ZHANG M F, ZOLA H, READ L C, et al. Localization of trans-

- forming growth factor-beta receptor types I, II, and III in the postnatal rat small intestine[J]. *Pediatric Research*,1999,46(6): 657-665.
- [42] ZHANG Y N, WILLIAMS D B. Assembly of MHC class I molecules within the endoplasmic reticulum [J]. *Immunologic Research*,2006,35(1):151-162.
- [43] SHEN J M, WU G, TSAI A L, et al. Transmembrane helices mediate the formation of a stable ternary complex of b5R, cyt b5, and SCD1[J]. *Communications Biology*,2022,5:956.
- [44] CHEN Z X, CHAU C H J, ERICKSON A, et al. Phytosterols inhibit *ACAT2*-catalyzed cholesteryl esterification in caco-2 cells without affecting cholesterol transporter genes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2025,73(31):19823-19833.
- [45] KIM E Y, KIM W K, KANG H J, et al. Acetylation of malate dehydrogenase 1 promotes adipogenic differentiation *via* activating its enzymatic activity[J]. *Journal of Lipid Research*,2012,53(9): 1864-1876.
- [46] MOSLEMI A R, LINDBERG C, NILSSON J, et al. Glycogenin-1 deficiency and inactivated priming of glycogen synthesis[J]. *The New England Journal of Medicine*,2010,362(13):1203-1210.
- [47] VAN DER VORST E P C. High-density lipoproteins and apolipoprotein A1[J]. *Sub-Cellular Biochemistry*,2020,94:399-420.
- [48] YUI Y, AOYAMA T, MORISHITA H, et al. Serum prostacyclin stabilizing factor is identical to apolipoprotein A-I (Apo A-I). A novel function of Apo A-I[J]. *The Journal of Clinical Investigation*,1988,82(3):803-807.

(责任编辑:黄克玲)