

叶酸与维生素 B₁₂ 在奶牛中的应用

叶酸在生物体内参与 DNA 和 RNA 的生物合成、血色素的形成、甘氨酸与丝氨酸的转化、苏氨酸和组氨酸的分解、半胱氨酸甲基化成为甲硫氨酸以及一些 B 族维生素的生物合成,对于动物机体的生命活动具有重要作用。在组织代谢中,叶酸可以为奶牛体组织提供一碳基团,但这一过程需要 VB₁₂ 参与,因此,叶酸与 VB₁₂ 在代谢过程中是相互联系相互制约的。目前这些维生素在改善奶牛生产性能方面的研究已取得一定进展,但它们的具体代谢途径、作用机制,有待进一步研究。

1 叶酸

1.1 叶酸的转运

动物摄食叶酸后,多谷氨酸形式的叶酸必须先降解为蝶酰单谷氨酸(PGA)才能被小肠吸收。Reisenauer 等(1971)对猪的研究表明,叶酸穿过肠粘膜的转运是与 Na⁺ 偶联的载体转运过程^[1]。另一种转运机制是简单扩散,这种转运机制在肠腔 pH 值较高或叶酸浓度达到药理水平时占主导地位^[2]。

关于叶酸在鱼体内的转运机制,得出了有趣的结论:在冷水性鱼类,如斑点叉尾鲷,其转运方式属于自由扩散,而在暖水性鱼类,如虹鳟鱼属于载体转运。

叶酸进入细胞内的过程则依赖叶酸结合蛋白所介导的内吞作用方式。5-甲基-四氢叶酸进入细胞后,必须在维生素 B₁₂ 依赖性甲基转移酶催化下脱去甲基转变成四氢叶酸,才能在叶酸多聚谷氨酸合酶的作用下形成叶酸多聚谷氨酸。这是因为四氢叶酸是多谷氨酰化的最适底物,而 5-甲基-四氢叶酸作为底物的活性较差。

目前发现的结合蛋白包括 3 类:一类是高亲和力的膜叶酸结合蛋白;另一类是低亲和力的膜叶酸结合蛋白,其中低亲和力的膜叶酸结合蛋白对氧化状态的叶酸不起作用;第三类是位于细胞内的叶酸结合蛋白,主要存在于线粒体和细胞浆中,细胞浆中的叶酸结合蛋白有两种被证实为 10-甲酰-四氢叶酸脱氢酶和甘氨酸 N-甲基转移酶;线粒体中的叶酸结合蛋白则分别为二甲酰甘氨酸脱氢酶和肌氨酸脱氢酶。

1.2 叶酸的代谢

叶酸在生物体内的代谢主要可以分为 3 个部分,这 3 个部分可以看作是叶酸作为“一碳单位转移载体”的辅酶功能的发挥过程。

第一部分是参与丝氨酸和甘氨酸的相互转化的过程。由于丝氨酸是由葡萄糖合成的，所以这种叶酸依赖性合成反应属于重新合成作用，促进了葡萄糖的分解。自此，5，10-亚甲基-四氢叶酸分别进入叶酸代谢的第二和第三部分。

第二部分参与胸苷酸的从头合成途径。5，10-亚甲基-四氢叶酸递给脱氢尿苷一磷酸一个甲基重新形成二氢叶酸谷氨酸，完成了尿嘧啶到胸腺嘧啶的转化。

第三部分参与蛋氨酸的合成反应。5，10-亚甲基-四氢叶酸经亚甲基四氢叶酸还原酶作用转变成甲基四氢叶酸，而生物体内由甲基受体（磷脂、DNA、蛋白质、神经递质等）代谢产生的同型半胱氨酸在钴胺素依赖性蛋氨酸合酶的作用下，形成蛋氨酸。蛋氨酸进一步与甲基受体反应重新生成同型半胱氨酸，形成“蛋氨酸-同型半胱氨酸”循环。甲基四氢叶酸也脱甲基形成四氢叶酸后重新进入代谢循环。

对叶酸参与大量反应的认识促进了人们对叶酸代谢调节机制的探讨。Krumdieck(1985)认为，叶酸代谢是两个主要基团在细胞内竞争利用叶酸的反应：蛋氨酸的合成和胸苷酸的合成调节着叶酸在体内的代谢，其中以蛋氨酸的合成更为重要，因为蛋氨酸不仅是蛋白质的结构单元和多胺的来源，而且是一百多种反应通用的甲基供体——S-腺苷蛋氨酸的前体物质，所以根据这种“拔河”理论推测，当体内叶酸不足时，叶酸辅酶将首先放弃核酸的合成而趋向于合成蛋氨酸^[3]。

1.3 叶酸的主要功能

叶酸的主要功能是作为一碳基团的载体，参与一碳化合物的代谢。它参与一碳基团的主要代谢有：1. 嘌呤和嘧啶的合成；2. 甘氨酸与丝氨酸的相互转化；3. 组氨酸的降解；4. 蛋氨酸、胸腺嘧啶和胆碱的合成。

1.4 对高产奶牛生产性能的影响

Dumoulin 等（1991）通过对小母牛的自由采食与限制饲养以及肌肉注射 0 和 40 mg 叶酸的 2×2 因子处理，发现在 5~10 周龄阶段自由采食组比限制采食组日增重高（ $P<0.01$ ）同时添加叶酸亦可提高日增重 7.6%（ $P<0.05$ ）^[4]。Petitclerc 等（1999）也发现叶酸对于小母牛的生长性能与乳腺发育均有促进作用^[5]。Girard 等（1995）报道，奶牛从妊娠 45 天至产犊后 6 周，每周肌肉注射 160 mg 叶酸（蝶酰谷氨酸），结果发现与不注射相比，胎盘和初乳中的叶酸浓度分别提高了 24%和 54%；在妊娠 45 天到干奶期奶牛产奶量提高了 1.5 kg/d，产犊后对奶产量没有影响；对初产奶牛试验组与对照组乳蛋白浓度没有变化，经产奶牛乳蛋白的浓度提高了 8.7%；奶牛干物质采食量不受叶酸影响^[6]。Girard 等其余多项研究也表明添

加叶酸增加了产奶量，且叶酸对于经产泌乳奶牛生产性能的促进作用更大^[7-11]。

Ragaller 等（2010）不仅研究了叶酸对泌乳奶牛生产性能的影响，还研究了叶酸对奶牛瘤胃发酵的影响，发现用高精料日粮（精粗比 66:34）饲喂奶牛，添加 1 g/d 叶酸减少了瘤胃可发酵有机物，从而能被微生物利用的能量减少，流入小肠的微生物粗蛋白减少，同时降低血清中葡萄糖和核黄素水平，增加血清 5-甲基四氢叶酸浓度；饲喂高粗料日粮，叶酸增加瘤胃 ADF 表观消化率和血清 5-甲基四氢叶酸浓度^[12]。

1.5 过瘤胃叶酸在奶牛生产中的应用

20 世纪末国外关于叶酸对奶牛生产性能影响的试验中叶酸多以肌肉注射的方式添加，但肌肉注射叶酸无法判定叶酸对奶牛瘤胃发酵是否有促进作用，且在实际生产中较为不便。由于日粮补充的叶酸在反刍动物瘤胃内极易降解，因此利用过瘤胃技术将其保护起来，能够降低其在瘤胃中的降解率，提高奶牛对日粮叶酸的利用率。近年来，国内外学者对于奶牛日粮补充过瘤胃叶酸做了许多研究。

Sacadura 等（2008）用包含叶酸的过瘤胃复合 B 族维生素饲喂初产奶牛与经产奶牛，发现对早期泌乳奶牛的生产性能更加有效^[13]。Evans 等（2013）给泌乳奶牛日粮添加 3 g/d 过瘤胃 B 族维生素混合物后，产奶量和乳成分含量显著增加^[14]（如表 1）。国内研究发现，过瘤胃叶酸促进了泌乳奶牛瘤胃发酵，提高了日粮养分的表观消化率和能量平衡，进而提高了产奶量以及牛奶中营养物质的含量，因此改善了奶牛的泌乳性能和繁殖性能^[15-18]。

Muhammad 等（2019）从分子水平探讨了过瘤胃叶酸对奶牛免疫基因与通路的影响，结果表明，高剂量（240 mg/500 kg 奶牛/d）与低剂量（120 mg/500 kg 奶牛/d）包被叶酸和对照组相比能够调节更多与免疫相关的基因与通路，如 TNF 信号通路、抗原的处理与呈递、金黄色葡萄球菌感染以及 NF-kappa B 信号通路，及 CXCL10, TNFRSF1A, CD4, BOLA-DQB, NFKB1A, 和 TNFSF13 等基因，表明 120 mg/500 kg 奶牛/d 包被叶酸提高了奶牛免疫力^[19]。

2 VB₁₂

VB₁₂ 是维生素中唯一含有金属原子（钴原子）的维生素，一般认为，在有足够的钴原子的条件下，奶牛瘤胃维生素能够合成 VB₁₂。研究发现奶牛日粮组成能够改变瘤胃微生物合成 VB₁₂ 的能力，高精料日粮能提高 VB₁₂ 类似物的合成能力；提高日粮中钴的含量则瘤胃内 VB₁₂ 类似物的浓度提高。

Rusoff 等（1954）按照日粮 1% 的水平给奶牛补充 VB₁₂，发现 VB₁₂ 对其生产性能无促进作用^[20]。Akins 等（2013）给奶牛每周肌注 10 mg VB₁₂ 同样发现奶牛的干物质采食量、体

重、体况评分、血浆和肝脏代谢能不受 VB₁₂ 影响，仅组织中 VB₁₂ 浓度提高^[21]。这些研究表明单独补充 VB₁₂ 对于奶牛生产性能的促进作用可能不明显。Ouattara 等（2016）研究了 VB₁₂ 对早期泌乳奶牛肝脏和乳腺基因表达的影响，发现每周肌注 10 mg 维生素 B₁₂ 促进奶牛泌乳早期肝脏再生并减少泌乳早期脂肪分解代谢^[22]。

3 叶酸和 VB₁₂ 之间的相互关系

奶牛代谢过程对叶酸的需要量经常受到叶酸、VB₁₂ 和 VB₆ 摄入量的影响。叶酸在吸收和运输过程中被甲基化为 N⁵-甲基四氢叶酸，致使达到组织叶酸的蝶酰谷氨酸将减少。并且只有 5-甲基-四氢叶酸才具有生物活性，它在 VB₁₂ 的作用下，它为高半胱氨酸提供一个甲基基团，生成蛋氨酸和四氢叶酸。

由于许多研究表明了单独补充 VB₁₂ 对于奶牛生产性能促进作用的局限性，因此基于叶酸与 VB₁₂ 间的相互关系，国内外学者研究了同时添加叶酸和 VB₁₂ 以及添加同时含有叶酸和 VB₁₂ 的复合维生素对奶牛的影响，主要集中于以下两方面：一是对奶牛生产性能的影响；二是从分子水平探讨对奶牛免疫功能的影响。

关于叶酸与 VB₁₂ 对奶牛生产性能的影响，研究发现日粮添加^[23,24]或肌肉注射^[25-31]均能增加奶牛产奶量与乳中营养成分产量，提高能量代谢效率，提高繁殖性能（如表 2），降低淘汰率。Gagnon 等（2012）与 Gagnon 等（2015）分别研究了叶酸与 VB₁₂ 对经产泌乳奶牛优势卵泡颗粒细胞基因表达，发现促进了奶牛排卵，有利于提高其繁殖性能^[32,33]。Duplessis 等（2017）发现同时添加叶酸与 VB₁₂ 促进了肝脏甲基丙二酰辅酶 A 变位酶和 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶的基因表达^[34]。关于叶酸与 VB₁₂ 对泌乳奶牛免疫功能的影响，近期 Vanacker 等（2020）研究发现，肌内注射 320 mg 叶酸与 10 mg 维生素 B₁₂ 除影响乳脂和乳糖含量外，对免疫细胞功能及血细胞数量等均无影响^[35]。

4 研究切入点

1. 关于叶酸与维生素 B₁₂ 对奶牛生产性能的影响，国外研究较多，今年来国内也有部分相关研究，仍应进行更深入的探讨。

2. 过瘤胃技术的应用虽然能减少维生素在瘤胃中的降解，提高小肠吸收率，但由于维生素在瘤胃中释放的量较小，所以瘤胃微生物对维生素的利用率有限，这一点已在关于犊牛的研究中得到验证。未来研究应当进一步探讨过瘤胃维生素的最适添加量，使其在瘤胃和小肠中均能被最大限度地利用。

参考文献

- [1] Reisenauer A M, Buffington C A, Villanueva J A, et al. Folate absorption in alcoholic pigs: in vivo intestinal perfusion studies[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1989, 50(6):1429-35.
- [2] Bhandari S D, Rd G J. Folic acid, 5-methyl-tetrahydrofolate and 5-formyl-tetrahydrofolate exhibit equivalent intestinal absorption, metabolism and in vivo kinetics in rats.[J]. Journal of Nutrition, 1992, 122(9):1847-54.
- [3] Khaled M A, Krumdieck C L. Association of folate molecules as determined by proton NMR: implications on enzyme binding[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1985, 130(3):1273-1280.
- [4] Dumoulin P G, Girard C L, Matte J J, et al. Effects of a parenteral supplement of folic acid and its interaction with level of feed intake on hepatic tissues and growth performance of young dairy heifers[J]. Journal of Animal Science, 1991, 69(4):1657.
- [5] Petitclerc D, Dumoulin P, Ringuet H, et al. Plane of nutrition and folic acid supplementation between birth and four months of age mammary development of dairy heifers.[J]. Canadian Journal of Animal Science, 1999, 79(2):227-234.
- [6] Girard C L , Matte J J , Tremblay G F . Gestation and Lactation of Dairy Cows: A Role for Folic Acid?[J]. Journal of dairy science, 1995, 78(2):0-411.
- [7] Girard, C.L., Matte, J.J., 1998. Dietary supplements of folic acid during lactation: effects on the performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 81, 1412 - 1419.
- [8] Girard C L , Matte J J. Changes in serum concentrations of folates, pyridoxal, pyridoxal-5-phosphate and vitamin B-12 during lactation of dairy cows fed dietary supplements of folic acid[J]. Canadian journal of animal science, 1999, 79(1):107-113.
- [9] Girard C L , Lapierre H, Matte JJ, et al. Effects of dietary supplements of folic acid and rumen—protected methionine on lactational performance and folate metabolism of dairy cows[J]Journal of dairy science, 2005, 88(2): 660~670.
- [10] Girard C L, Matte J J. Impact of B-vitamin supply on major metabolic pathways of lactating dairy cows.[J]. Canadian Journal of Animal Science, 2006, 86(2):213-220.
- [11] Girard C L, Benchaar C, Chiquette J, et al. Net flux of nutrients across the rumen wall of lactating dairy cows as influenced by dietary supplements of folic acid[J]. Journal of dairy science, 2009, 92(12): 6116-6122.
- [12] Ragaller V , Lebzien P , Bigalke W , et al. Effects of folic acid supplementation to rations differing in the concentrate to roughage ratio on ruminal fermentation, nutrient flow at the duodenum, and on serum and

milk variables of dairy cows[J]. Archives of Animal Nutrition, 2010, 64(6):p.484-503.

- [13] Sacadura F C , Robinson P H , Evans E , et al. Effects of a ruminally protected B-vitamin supplement on milk yield and composition of lactating dairy cows[J]. Animal Feed Science and Technology, 2008, 144(1-2):0-124.
- [14] Evans E, Mair D T. Effects of a rumen protected B vitamin blend upon milk production and component yield in lactating dairy cows[J]. Open Journal of Animal Sciences, 2013, 3(1): 76-82.
- [15] H.Q. Li, Q. Liu, C. Wang, Z.M. Yang, G. Guo, W.J. Huo, C.X. Pei, Y.L. Zhang, S.L. Zhang, H. Wang, J.X. Liu, Y.X. Huang. Effects of dietary supplements of rumen-protected folic acid on lactation performance, energy balance, blood parameters and reproductive performance in dairy cows[J]. Animal feed science and technology, 2016, 213: 55-63.
- [16] C. Wang, Q. Liu, G. Guo, W.J. Huo, Y.L. Zhang, C.X. Pei, S.L. Zhang. Effects of rumen-protected folic acid and branched-chain volatile fatty acids supplementation on lactation performance, ruminal fermentation, nutrient digestion and blood metabolites in dairy cows[J]. Animal feed science and technology, 2019, 247: 157-165.
- [17] 王翀, 汪海峰, 茅慧玲,等. 一种过瘤胃保护叶酸、含有该过瘤胃保护叶酸的牛用饲料及其应用:, 2015.
- [18] 张志超, 陈思倩, 刘刚, et al. 围产期奶牛饲喂包被叶酸对早期产奶性能的影响[J]. 中国奶牛, 2019, 349(05):16-19.
- [19] Muhammad Zahoor Khan, Zhichao Zhang, Lei Liu, Di Wang, Siyuan Mi, Xueqin Liu, Gang Liu, Gang Guo, Xizhi Li, Yachun Wang, Ying Yu. Folic acid supplementation regulates key immunity-associated genes and pathways during the periparturient period in dairy cows[J]. Asian-australasian journal of animal sciences, 2019 (published online).
- [20] Rusoff L L , Haq M O . Studies on Aureomycin and Vitamin B12 Supplementations for Dairy Cows. II. Effect on Production, Composition, and Vitamin B12 Content of the Milk[J]. Journal of Dairy Science, 1954, 37(6):677-683.
- [21] Akins M S , Bertics S J , Socha M T , et al. Effects of cobalt supplementation and vitamin B₁₂ injections on lactation performance and metabolism of Holstein dairy cows[J]. Journal of dairy science, 2013, 96(3):1755-1768.
- [22] Ouattara B , Bissonnette N , Duplessis M , et al. Supplements of vitamins B9 and B12 affect hepatic and mammary gland gene expression profiles in lactating dairy cows[J]. BMC Genomics, 2016, 17(1):640.
- [23] D. N. Majee, E. C. Schwab, S. J. Bertics, W. M. Seymour, and R. D. Shaver. Lactation performance by dairy

- cows fed supplemental biotin and a B-vitamin blend[J]. *Journal of dairy science*, 2003, 86: 2106-2112.
- [24] Graulet B, Matte J J, Desrochers A, et al. Effects of dietary supplements of folic acid and vitamin B12 on metabolism of dairy cows in early lactation[J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(7): 3442-3455.
- [25] Preynat A, Lapierre H, Thivierge M C, et al. Influence of methionine supply on the response of lactational performance of dairy cows to supplementary folic acid and vitamin B12[J]. *Journal of dairy science*, 2009, 92(4): 1685~1695.
- [26] Duplessis, M., Girard, C.L., Santschi, D.E., Lefebvre, D.M., Pellerin, D., 2012. Folic acid and vitamin B12 supplement enhances energy metabolism of dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 95 (Suppl. 2), 118 (Abstr.).
- [27] Duplessis M, Girard C L, Santschi D E, et al. Effects of folic acid and vitamin B₁₂ supplementation on culling rate, diseases, and reproduction in commercial dairy herds[J]. *Journal of dairy science*, 2014, 97(4):2346-2354.
- [28] M.Duplessis, H.Lapierre, D.Pellerin, J.-P.Laforest, C.L.Girard. Effects of intramuscular injections of folic acid, vitamin B12, or both, on lactational performance and energy status of multiparous dairy cows[J]. *Journal of dairy science*, 2017, 100(5): 4051-4064.
- [29] Preynat A, 张养东. 叶酸和维生素 B₁₂在补充蛋氨酸的情况下对奶牛泌乳性能的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2009(07):148.
- [30] 刘冰, A.Preynat, H.Lapierre,等. 补充叶酸和维生素 B₁₂对奶牛泌乳性能中蛋氨酸供给的影响[J]. *饲料与畜牧*, 2009(4).
- [31] 刘汉根, 刘文忠, 吴疆, et al. 奶牛围产期日粮补充复合 B 族维生素对改善酮病发生与提高产奶量的研究[J]. *中国乳业*, 2018, 000(001):34-40.
- [32] Gagnon A, Sirard M A, Richard F, et al. Effects of Folic Acid and Vitamin B12 Supplementation on Granulosa Cells of the Dominant Follicle of Dairy Cows[J]. *Biology of Reproduction*, 2012, 87(Suppl_1): 504-504.
- [33] Gagnon A, Khan D R, Sirard M A, et al. Effects of intramuscular administration of folic acid and vitamin B₁₂ on granulosa cells gene expression in postpartum dairy cows[J]. *Journal of dairy science*, 2015, 98(11):7797-7809.
- [34] M.Duplessis, H.Lapierre, B.Ouattara, N.Bissonnette, D.Pellerin, J.-P.Laforest, C.L.Girard. Whole-body propionate and glucose metabolism of multiparous dairy cows receiving folic acid and vitamin B12 supplements[J]. *Journal of dairy science*, 2017, 100: 8578-8589.

- [35] N. Vanacker, C. L. Girard, R. Blouin, P. Lacasse. Effects of feed restriction and supplementary folic acid and vitamin B12 on immune cell functions and blood cell populations in dairy cows[J]. *Animal*, 2020, 14(2): 339-345.

表 1 B 族维生素对泌乳性能的影响

Table 1 Effects of B vitamin supplementation upon lactation performance

Parameter	BVB	Biotin	P-Level
All cows (N = 608)			
Milk, l	32.1	31.42	<0.05
Fat, %	3.69	3.53	<0.05
Protein, %	3.14	3.12	<0.05
Fat yield, kg	1.17	1.10	<0.05
Protein yield, kg	1.00	0.98	<0.05
First lactation cows (N = 191)			
Milk, l	28.1	27.9	0.57
Fat, %	3.80	3.67	<0.05
Protein, %	3.19	3.15	<0.05
Fat yield, kg	1.06	1.02	<0.05
Protein yield, kg	0.89	0.87	0.16
Cows lactation ≥ 2 (N = 417)			
Milk, l	34.0	33.1	<0.05
Fat, %	3.64	3.47	<0.05
Protein, %	3.12	3.11	<0.05
Fat yield, kg	1.22	1.14	<0.05
Protein yield, kg	1.05	1.02	<0.05

表 2 叶酸与 VB₁₂ 对奶牛繁殖性能的影响

Table 2 Effects of folic acid and VB₁₂ supplementation upon reproductive performance

Item	Treatment ¹ (Trt)				P-value		
	Primiparous		Multiparous		Trt	Parity	Trt × parity
	Control	Vitamins	Control	Vitamins			
DIM at first breeding ²	79.9 ± 1.8	81.8 ± 1.8	80.4 ± 1.4	76.6 ± 1.3	0.54	0.13	0.07
Days open	127.9 ± 6.5	133.5 ± 6.7	136.9 ± 5.2	134.1 ± 5.0	0.80	0.41	0.46
First-breeding CR ³ (%)	46.1 ± 5.2	36.1 ± 5.0	39.2 ± 4.1	36.7 ± 3.8	0.15	0.49	0.40
Second-breeding CR ⁴ (%)	46.7 ± 7.2	58.5 ± 6.9	43.3 ± 5.7	43.8 ± 5.3	0.31	0.14	0.35
First + second breeding CR (%)	72.0 ± 4.7	74.5 ± 4.6	68.3 ± 4.0	66.9 ± 3.8	0.88	0.17	0.62
Breedings per conception	2.2 ± 0.2	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0.67	0.45	0.47
Pregnant at 150 DIM (%)	78.0 ± 4.3	75.8 ± 4.5	66.0 ± 4.0	69.3 ± 3.7	0.95	0.03	0.51

¹Control = 5 mL of saline 0.9% NaCl; Vitamins = 3 mL of 320 mg of folic acid and 2 mL of 10 mg of vitamin B₁₂.

²No treatment effect for primiparous cows ($P = 0.44$) but the vitamin supplement decreased DIM at first breeding for multiparous cows compared with controls ($P = 0.05$).

³CR = conception rate.

⁴Percentage of cows confirmed pregnant after the second service excluding cows confirmed pregnant after the first service.