

日粮中添加苜蓿黄酮对奶牛血液生化指标、抗氧化性能和免疫的影响

占今舜^{1,2} 苏效双¹ 刘明美^{1,3} 詹康¹ 张春刚^{1,4} 赵国琦^{1*}

(1.扬州大学 动物科学技术学院,江苏 扬州 225009;

2.江西省农业科学院 畜牧兽医研究所,南昌 330200;

3.江苏联合职业技术学院 淮安生物工程分院,江苏 淮安 223200;

4.上海光明荷斯坦牧业有限公司,上海 200443)

摘要 为研究苜蓿黄酮对奶牛血液生化指标、抗氧化性能和免疫的影响,选取4头装有瘘管的头胎荷斯坦奶牛,试验采用4×4拉丁方设计,每组奶牛饲喂混合日粮中分别添加0 g(I组)、20 g(II组)、60 g(III组)和100 g(IV组)的苜蓿黄酮。试验期为4期,每期24 d。结果显示:1)血清的总蛋白含量随苜蓿黄酮添加剂量的升高呈二次曲线变化,出现先下降后升高($P<0.05$)趋势,但其他指标没有影响;2)苜蓿黄酮组血液中的血小板数量($P<0.05$)和血小板压积($0.05<P\leq 0.10$)均高于对照组,但随着苜蓿黄酮添加剂量的升高而下降;中性粒细胞比例随苜蓿黄酮添加剂量的升高呈线性升高($P<0.05$),而淋巴细胞比例则呈降低的趋势($0.05<P\leq 0.10$);3)谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性随苜蓿黄酮添加剂量的升高呈线性升高($P\leq 0.05$),而丙二醛(MDA)含量则呈现降低的趋势($0.05<P\leq 0.10$),过氧化氢酶(CAT)活性随苜蓿黄酮添加剂量的升高呈先升高后降低($P<0.05$);4)血清中IgG含量($0.05<P\leq 0.10$)和淋巴细胞 *Fas* 基因相对表达($P<0.05$)随着苜蓿黄酮添加剂量的升高呈先升高后下降的趋势。以上结果表明,苜蓿黄酮能够提高机体的抗氧化性能和调节机体免疫。

关键词 奶牛;苜蓿黄酮;血液生化指标;抗氧化性能;免疫力

中图分类号 S823;S816.7

文章编号 1007-4333(2017)05-0066-09

文献标志码 A

Effects of diet added alfalfa flavonoids on blood biochemical indexes, oxidation resistance and immunity of dairy cow

ZHAN Jinshun^{1,2}, SU Xiaoshuang¹, LIU Mingmei^{1,3}, ZHAN Kang¹, ZHANG Chungang^{1,4}, ZHAO Guoqi^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China;

3. Jiangsu Joint Institute of Technology of Profession of Huai'an Bio-Engineering Branch, Huai'an 223200, China;

4. Shanghai Bright Holstein Co., Ltd, Shanghai 200443, China)

Abstract The objective of this study was to examine the effects of flavonoids from alfalfa on blood biochemical indexes, oxidation resistance and immunity of dairy cows. Four primiparous Holstein cows fitted with ruminal cannulas were selected. 4×4 Latin square design was used in the experiment and the cows were fed total mixed ration added 0, 20, 60 or 100 g alfalfa flavonoids at different periods, respectively. The experiment had four experiment periods and each period contained 24 days. The results showed: 1) The total protein content of serum appeared change of quadratic curve, and was decreased at first and then increased with increasing doses of alfalfa flavonoids extract (AFE) ($P<0.05$). The other indexes were not affected by AFE; 2) Platelet counts ($P<0.05$) and thrombocytocrit ($0.05<P\leq 0.10$) were higher than that of control group, and showed a tendency of decrease with increasing the dose of AFE. The proportion of neutrophil was increased linearly ($P<0.05$), whereas the proportion of lymphocyte displayed a decline

收稿日期: 2016-05-04

基金项目: 江苏省高校优势学科建设工程项目(PAPD); 上海市科委国内科技合作项目(14395810100); 江苏省高校研究生科研创新计划项目(KYZZ_0367)

第一作者: 占今舜, 博士研究生, E-mail: zhanjinshun1985@163.com

通讯作者: 赵国琦, 教授, 博士生导师, 主要从事牧草和草食动物营养研究, E-mail: gqzhao@yzu.edu.cn

trend ($0.05 < P \leq 0.10$) with the increasing level of AFE; 3) The glutathione peroxidase activity was increased linearly ($P \leq 0.05$), whereas the methane dicarboxylic aldehyde concentration had a tendency of decrease ($0.05 < P \leq 0.10$) with increasing the level of AFE. The catalase activity was increased at first and then decreased with increasing the dose of AFE ($P < 0.05$); 4) The Ig G concentration of serum ($0.05 < P \leq 0.10$) and the relative expression of *Fas* gene in lymphocyte ($P < 0.05$) was increased first and then decreased with the increasing dose of AFE. In conclusion, AFE could improve oxidation resistance and regulate the immunity of dairy cow.

Keywords dairy cow; alfalfa flavonoids; blood biochemical indexes; oxidation resistance; immunity

紫花苜蓿 (*Medicago Sativa*) 是豆科多年生草本植物, 由于具有营养价值高、产量高和草质优良等优点, 被誉为“牧草之王”, 广泛应用于奶牛生产^[1]。黄酮类化合物是含有 2-苯基色原酮结构的化合物, 包括黄酮醇、花色素、异黄酮等物质^[2], 是紫花苜蓿中的主要代谢产物之一。大量研究结果表明黄酮类化合物具有抗氧化、改善血液循环、抑制炎症等作用, 广泛应用于医药和保健品等方面^[3]。Aguiar 等^[4-5] 研究发现, 蜂胶黄酮能够提高瘤胃中蛋白质代谢, 提高牛奶抗氧化能力, 降低奶牛乳中饱和脂肪酸的含量。Andrés 等^[6] 研究发现, 槲皮素能够降低羊肉中饱和脂肪酸的含量, 降低肉脂质过氧化。另外, 大豆黄酮能够提高奶牛的产奶性能和抗氧化能力, 增强奶牛的免疫功能和抗热应激能力^[7-9]。以上结果表明, 黄酮类化合物具有提高奶牛的生产性能, 增强免疫力等作用。研究发现, 苜蓿中的黄酮类化合物能够提高小鼠生长性能, 改善小鼠特异性和非特异性免疫功能, 并通过影响下丘脑-垂体-卵巢性腺轴, 改善小鼠的繁殖性能。另外, 日粮中添加苜蓿黄酮能够减少崇仁麻鸡母雏皮下脂肪的沉积, 但不会影响生产性能^[10-13]。目前, 苜蓿黄酮类化合物对奶牛的影响鲜见报道。因此, 本试验通过研究苜蓿黄酮对奶牛血液生化指标、抗氧化性能和免疫的影响, 旨在为苜蓿黄酮在奶牛业上的应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验设计及饲养管理

试验开始于 2015 年 4 月, 在上海光明荷斯坦牧业有限公司的星火奶牛二场进行。选取 4 头装有瘤胃瘘管的头胎荷斯坦奶牛 (平均体重为 (500 ± 25) kg, 泌乳时间为 (79 ± 6) d), 采用 4×4 拉丁方设计进行试验, 奶牛饲喂全混合型日粮中分别添加 0 g (I 组)、20 g (II 组)、60 g (III 组) 和 100 g (IV 组) 的苜蓿黄酮 (含量为 50%, 由陕西绿清生物工程有限公司提供)。进行 4 期动物饲养试验, 每个试验期

为 24 d, 其中预饲期为 10 d。奶牛采用拴式饲养方式, 自由饮水, 每天饲喂 3 次, 分别为 06:30、13:30 和 19:30, 每日挤奶 3 次, 时间分别为 10:00、16:00 和 22:00。日粮配方及营养水平见表 1。

1.2 血液生化指标测定

每期试验的第 18 天, 在采食前和采食后 2 h 分别进行尾静脉采血。用含 EDTA 的抗凝真空采血管收集的血液送往上海动物实验中心进行血液指标的检测。将含有惰性分离胶的促凝真空采血管收集的血液进行静置 1 h, 然后进行离心分离血清。离心条件为 3 500 r/min, 10 min。血清于 -20 °C 保存, 用于免疫球蛋白含量、抗氧化酶活性以及生化指标的检测。

1.3 淋巴细胞相关基因的测定

1.3.1 淋巴细胞的提取

每期试验第 21 天, 奶牛采食 2 h 后, 用含有肝素的抗凝真空采血管进行尾静脉采血, 用来淋巴细胞的提取。提取方法如下: 将收集的 5 mL 血液用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 进行 1:1 稀释成总体积为 10 mL 的稀释血液; 吸取 7 mL 稀释血液缓慢加入含有 5 mL 淋巴分离液 (Lympholyte[®]-H, 加拿大) 的离心管, 2 300 r/min 离心 30 min; 离心后细胞将分层, 依次为血清和稀释液层、淋巴细胞层、淋巴细胞分离液层和血细胞、粒细胞层, 将血清和稀释液层去除, 吸取淋巴细胞层 (约 3 mL), 然后加入等体积的 PBS 溶液, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 然后加入细胞冻存液转移到冻存管, 缓慢放入液氮进行保存。

1.3.2 淋巴细胞 RNA 的提取

将冻存的淋巴细胞进行解冻, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 根据购买于天根生化科技有限公司 RNA 提取试剂盒中的说明书进行细胞总 RNA 的提取。采用 One Drop 仪器进行总 RNA 的浓度和纯度的测定。cDNA 合成是根据 Roche 反转录试剂盒中说明书的步骤进行操作, 操作在冰上进行。反应体系为 20 μ L, 反应液配制如下: Total

表1 日粮组成和营养水平

Table 1 Ingredient and composition of basal diet

原料 Ingredient	含量 Content	化学组成 ^③ Chemical composition	含量 Content
精料补充料/(g/kg) ^① Concentrate supplement	333.50	产奶净能/(MJ/kg) NEL	7.11
毛棉籽/(g/kg) Gross cottonseed	37.90	粗蛋白/(g/kg) CP	175.00
甜菜粕/(g/kg) Beet pulp, pellet	32.80	粗脂肪/(g/kg) CF	25.00
预混料/(g/kg) ^② Premix	1.80	中性洗涤纤维/(g/kg) NDF	311.00
青贮玉米/(g/kg) Corn silage	432.90	酸性洗涤纤维/(g/kg) ADF	151.00
燕麦草/(g/kg) Oat grass	116.20	钙/(g/kg) Ca	6.60
苜蓿/(g/kg) Alfalfa	44.90	磷/(g/kg) P	2.80

注:①精料补充料包含 158.30 g/kg 玉米,35.30 g/kg 豆粕,52.90 g/kg 大豆皮,54.90 g/kg 酒糟,16.70 g/kg 啤酒糟,2.20 g/kg 食盐,3.50 g/kg 碳酸钙,4.40 g/kg 碳酸氢钙,3.30 g/kg 碳酸氢钠。②预混料为每千克日粮提供 3 000 IU 维生素 A,31 400 IU 维生素 D,30 IU 维生素 E,100 mg 铁,10 mg 铜,35 mg 锌,20 mg 锰,0.30 mg 碘,0.10 mg 硒,0.08 mg 钴。③产奶净能为计算值,其他为实测值。

Note:Concentrate supplement contained 159.30 g/kg corn,36.30 g/kg soybean meal,52.90 g/kg soybean hull,54.90 g/kg dried distillers grains with solubles,16.70 g/kg brewer's grain,2.20 g/kg sodium chloride,3.50 g/kg calcium carbonate,4.40 g/kg calcium hydrophosphate,3.30 g/kg sodium bicarbonate. The premix per kilogram of the diet contained 3 000 IU vitamin A,31 400 IU vitamin D,30 IU vitamin E,100 mg iron,10 mg copper,35 mg zinc,20 mg manganese,0.30 mg iodine,0.10 mg selenium,0.08 mg cobalt. Net energy for lactation (NEL) was calculated and the others were measured.

RNA 1 μL , Anchored-oligo (dT) 18 primer 1 μL , Random hexamer primer 2 μL , Water(PCR-grade) 9 μL , Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer 4 μL , Protector RNase Inhibitor 0.5 μL , Deoxynucleotide Mix 2 μL , Transcriptor Reverse Transcriptase 0.5 μL 。反应条件为 25 $^{\circ}\text{C}$,

10 min、55 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min。所得 cDNA 保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 待测。

1.3.3 引物设计

根据 Gene Bank 中的基因序列,采用 Primer 5.0 软件设计引物,引物由 Invitrogen 公司合成(表 2)。其引物序列为:

表2 引物设计

Table 2 Primer design

基因 Gene	登录号 Accession number	引物序列 Primer sequence	产物长度/bp Product length
<i>βactin</i>	NM_173979.3	F:GACATCCGCAAGGACCTCTA	205
		R:ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	
<i>Fas</i>	NM_174662.2	F:GAGAAATGCACACCAACGAG	189
		R:CAGTTGCCTCCCTTCATCAT	
<i>Caspase3</i>	NM_001077840.1	F:GACAGTGGTGCTGAGGATGA	167
		R:AGCCTGTGAGCGTGCTTT	
<i>Bcl-2</i>	NM_001166486.1	F:ATGACTTCTCTCGGCGCTAC	181
		R:ACGCTCTCCACACACATGAC	
<i>P53</i>	NM_174201.2	F:CGTCTAGGGTTCCTGCAATC	194
		R:CTCACAACCTCCGTTCATGTG	

1.3.4 荧光定量 PCR 条件

根据 Roche 试剂盒说明书进行冰上配制反应液,罗氏 Light Cycler® 96 PCR 仪上进行检测。反应液配制如下: Master Mix 10 μL , 上下游引物各 1 μL , PCR 级水 3 μL , cDNA 5 μL 。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 600 s; PCR 反应为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸各 10 s, 循环 45 次; 融解曲线分析 65 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s。

1.4 数据处理

基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行计算, 试验数据先用 Excle 2007 进行预处理, 数据采用 SAS 9.2 软件的 PROC MIXED 程序进行分析。分析模

型为 $Y_{ijk} = \mu + P_i + C_j + T_k + E_{ijk}$, 其中: Y_{ijk} 为因变量值; μ 为总体均值; P_i 为试验期效应; C_j 为奶牛的随机效应; T_k 为日粮处理效应; E_{ijk} 为随机误差。采用 Duncan 进行多重比较, $P \leq 0.05$ 表示差异显著, 而 $0.05 < P \leq 0.10$ 表示为趋势性。

2 结果与分析

2.1 苜蓿黄酮对奶牛血清生化指标的影响

从表 3 可知, 随着苜蓿黄酮添加含量的升高, 血清总蛋白含量呈现降低再升高 ($P < 0.05$), 但苜蓿黄酮对血清其他指标无影响。说明苜蓿黄酮可能会影响机体蛋白质的吸收和代谢。

表 3 苜蓿黄酮对奶牛血清生化指标的影响

Table 3 Effects of alfalfa flavonoids on blood biochemical indexes of dairy cow

指标 Index	组别 Group				标准误 SEM	P 值 P-Value	
	I	II	III	IV		线性 Linear	二次 Quadratic
谷丙转氨酶/(U/L) ALT	29.05	27.40	31.00	29.23	1.62	0.59	0.97
谷草转氨酶/(U/L) AST	89.20	80.38	104.55	81.00	11.33	0.99	0.54
总蛋白/(g/L) TP	80.34	78.11	77.91	80.99	0.90	0.68	0.03
白蛋白/(g/L) ALB	33.56	33.57	33.52	32.67	0.39	0.17	0.31
碱性磷酸酶/(U/L) ALP	63.28	59.88	61.73	55.50	5.38	0.41	0.80
血糖/(mmol/L) GLU	3.95	3.74	4.05	3.94	0.14	0.66	0.76
尿素氮/(mmol/L) BUN	6.01	4.77	5.75	5.88	0.49	0.79	0.21
肌酐/(mmol/L) CREA	51.30	53.30	52.15	51.40	1.35	0.89	0.35
总胆固醇/(mmol/L) TC	6.51	5.56	7.31	6.60	0.41	0.32	0.78
甘油三酯/(mmol/L) TG	0.18	0.19	0.17	0.17	0.01	0.29	0.49
高密度脂蛋白/(mmol/L) HDL	2.29	2.32	2.49	2.21	0.09	0.90	0.15
低密度脂蛋白/(mmol/L) LDL	1.23	1.23	1.42	1.27	0.06	0.26	0.22
乳酸脱氢酶/(U/L) LDH	1 198.13	1 159.15	1 141.25	1 139.05	67.09	0.54	0.79

2.2 苜蓿黄酮对奶牛血细胞的影响

由表 4 中可知, 随着苜蓿黄酮添加量的升高, 血小板的数量和血小板压积呈下降, 但均显著高于试验 I 组; 随着苜蓿黄酮添加量的升高, 中性粒细胞的百分比升高, 但淋巴细胞的百分比呈下降趋势。说明苜蓿黄酮能够影响机体的细胞免疫。

2.3 苜蓿黄酮对抗氧化性能的影响

GSH-PX 活性随苜蓿黄酮添加剂量的升高呈线性升高 ($P \leq 0.05$), 而 MDA 含量则呈现降低的趋势 ($0.05 < P \leq 0.10$)。CAT 活性呈现二次曲线变

化, 随苜蓿黄酮添加剂量的升高呈先升高后降低 ($P < 0.05$), 而 SOD 活性没有出现显著的影响。说明苜蓿黄酮能够通过调节抗氧化酶活性来提高机体的抗氧化能力 (表 5)。

2.4 苜蓿黄酮对血清免疫球蛋白的影响

随着苜蓿黄酮添加量的升高, 血清中 Ig G 含量呈先升高后下降的趋势 ($0.05 < P \leq 0.10$), 但对其他免疫蛋白含量无显著影响。说明苜蓿黄酮可能会通过调节免疫蛋白的分泌来影响机体免疫 (表 6)。

表4 苜蓿黄酮对奶牛血细胞的影响

Table 4 Effects of alfalfa flavonoids on blood cells of dairy cow

指标 Index	组别 Groups				标准误 SEM	P 值 P-Value	
	I	II	III	IV		线性 Linear	二次 Quadratic
白细胞/(10^9 /L) WBC	13.52	13.26	14.14	13.28	0.41	0.93	0.49
红细胞/(10^{12} /L) RBC	6.96	8.85	6.99	6.60	0.18	0.30	0.48
中性粒细胞/(10^9 /L) NEUT	4.57	4.15	5.10	4.83	0.27	0.21	0.80
淋巴细胞/(10^9 /L) LYM	8.18	8.53	8.50	7.63	0.32	0.29	0.11
单核细胞/(10^9 /L) MONO	0.33	0.23	0.27	0.20	0.05	0.16	0.81
嗜酸性粒细胞/(10^9 /L) EO	0.39	0.29	0.22	0.57	0.13	0.45	0.13
嗜碱性粒细胞/(10^8 /L) BASO	0.55	0.63	0.45	0.60	0.07	0.94	0.63
血小板/(10^9 /L) PLT	363.75	511.50	501.75	397.75	48.35	0.68	0.04
中性粒细胞/% NEUT	33.56	35.05	37.23	39.10	1.12	0.02	0.18
淋巴细胞/% LYM	61.33	58.23	58.20	55.10	1.59	0.13	0.09
单核细胞/% MONO	3.40	2.13	2.58	1.50	0.73	0.16	0.89
嗜酸性粒细胞/% EO	2.90	2.48	1.63	3.80	0.91	0.67	0.20
嗜碱性粒细胞/% BASO	0.43	0.50	0.38	0.50	0.06	0.73	0.69
血小板压积/% PCT	0.28	0.38	0.37	0.29	0.04	0.94	0.06

表5 苜蓿黄酮对抗氧化性能的影响

Table 5 Effects of alfalfa flavonoids on oxidation resistance of dairy cow

指标 Index	组别 Groups				标准误 SEM	P 值 P-Value	
	I	II	III	IV		线性 Linear	二次 Quadratic
超氧化物歧化酶/(U/mL) SOD	43.02	43.59	45.44	45.38	1.14	0.13	0.80
谷胱甘肽过氧化物酶/(U/mL) GSH-PX	420.61	509.74	479.12	521.33	24.96	0.05	0.38
过氧化氢酶/(U/mL) CAT	57.57	59.75	57.39	56.98	0.47	0.10	0.03
丙二醛/(nmol/mL) MDA	2.42	1.39	1.13	1.52	0.34	0.10	0.08

表6 苜蓿黄酮对免疫球蛋白含量的影响

Table 6 Effects of alfalfa flavonoids on immunoglobulin concentration g/L

指标 Index	组别 Groups				标准误 SEM	P 值 P-Value	
	I	II	III	IV		线性 Linear	二次 Quadratic
Ig G	10.39	11.84	10.19	10.06	0.34	0.13	0.06
Ig M	2.65	2.69	2.46	2.41	0.17	0.26	0.81
Ig A	0.76	0.81	0.71	0.71	0.05	0.35	0.63

2.5 苜蓿黄酮对淋巴细胞相关基因表达的影响

从表7中可知,淋巴细胞中 *Fas* 基因的相对表达呈二次曲线变化($P < 0.05$),其随着苜蓿黄酮添

加量的升高呈现先升高后降低;而苜蓿黄酮对其他基因的相对表达没有显著的影响。说明苜蓿黄酮能够调节淋巴细胞的基因表达来影响机体的免疫力。

表7 苜蓿黄酮对淋巴细胞相关基因表达的影响

Table 7 Effect of alfalfa flavonoids on relative gene expression of lymphocyte

基因 Gene	组别 Groups				标准误 SEM	P 值 P-Value	
	I	II	III	IV		线性 Linear	二次 Quadratic
<i>Fas</i>	1.00	1.99	0.84	0.90	0.17	0.11	0.04
<i>Caspase3</i>	1.00	1.54	0.95	1.05	0.24	0.67	0.39
<i>Bcl-2</i>	1.01	1.15	0.91	1.27	0.13	0.39	0.41
<i>P53</i>	1.02	2.17	1.12	1.42	0.30	0.93	0.20

3 讨论与结论

血液生化指标的变化能够反映机体营养物质代谢,因此检测动物血液生化指标能够间接了解动物的机体健康状况,在一定程度上能够可以反映动物的生产性能^[14]。血清 TP 和 ALB 含量的变化能够反映机体蛋白质的吸收、代谢以及肝脏功能和免疫功能的情况^[15]。GLU 含量的变化可以反映机体对糖吸收、运转和代谢的动态平衡。TG 和 TC 是血液脂肪的组成部分,其含量的高低可以反映脂类的吸收和代谢状况^[16]。血清 BUN 和 CREA 含量的高低能够反映蛋白质分解代谢的程度^[15]。ALT、AST、HDL 和 LDL 是反映肝脏功能的重要指标,而 ALP 活性高低能够反映肠道吸收和动物骨骼生长^[15]。研究发现,染料木黄酮不会影响奶牛血清 TG、TP 和 BUN 的含量;芦丁和大豆黄酮对奶牛和蛋鸡血清 ALB 和 GLU 含量以及 ALT、AST 和 ALP 活性无影响^[17-19]。本试验研究与其相似。刘艳丰等^[20]研究发现,沙棘黄酮能够提高阿勒泰羊血清 TP、LDL、ALP 和 LDH 含量,降低 BUN 含量。本试验结果与其不同,可能是黄酮类化合物来源不同,其结构和种类不同造成。从本试验结果来看,苜蓿黄酮不会影响葡萄糖、脂肪的吸收和代谢以及肝脏功能,但可能会影响蛋白质的吸收和代谢。

机体代谢过程中能够产生大量的自由基,而自由基的大量积累会导致细胞的不饱和脂肪酸产生 MDA,而 MDA 会促使细胞解体,导致细胞死亡^[21]。刘德义等^[22]研究发现,大豆黄酮能够提高奶牛血清 SOD、CAT 和 GSH-PX 活性,降低 MDA 的含量。刘春龙等^[23]研究发现,大豆黄酮和染料木素能够提

高奶牛乳腺上皮细胞的 SOD 和 GSH-PX 活性,降低 MDA 的含量。另外,红三叶异黄酮能够提高鸡血清 SOD 和 GSH-PX 活性,降低 MDA 含量^[24]。说明黄酮能够改善机体的抗氧化性能。苏效双等^[3]研究发现,苜蓿黄酮能够提高奶牛乳腺上皮细胞的 CAT 和 GSH-PX 活性,降低 MDA 的含量,但对 SOD 活性无影响。本试验结果与其相似。然而在本试验中,奶牛血清 CAT 活性随苜蓿黄酮添加含量升高呈下降趋势,可能是动物之间的差异和后期试验气温高造成奶牛产生热应激所致。

方洛云等^[25]研究发现,大豆异黄酮能够提高血液中红细胞数的数量,但不会影响白细胞数。从本试验结果来看,苜蓿黄酮不会影响奶牛血液白细胞数,随着其添加量的升高,红细胞数先上升后下降,但各组之间无显著差异,结果与其相似。血小板是由骨髓成熟的巨核细胞细胞质裂解脱落的有生物活性的胞质,其主要是凝血和止血,修补破损的血管。血小板压积升高,表明巨核细胞高度成熟,骨髓造血小板良好。本试验中,苜蓿黄酮能够促进血小板的生成,但随着添加量的升高,具有抑制作用。中性粒细胞含有大量抗微生物颗粒,能够通过吞噬和脱颗粒来杀死病原菌^[26]。本试验的苜蓿黄酮有助于提高机体清除病原微生物的作用。研究发现,低剂量大豆黄酮能够促进淋巴细胞的增殖,而超剂量则抑制淋巴细胞增殖^[22]。另外,黄酮能够通过抑制淋巴细胞的活性来发挥抗炎作用^[27]。本试验结果表明,高剂量的苜蓿黄酮在一定程度上能够发挥抗炎作用。黄酮类物质能够通过调节免疫球蛋白的含量来调节机体的体液免疫应答^[28-29]。有研究表明,大豆黄酮能够提高奶牛血清和乳中 IgA 含量,红车轴草

异黄酮提高肉鸡血清 IgG 和 IgM 含量^[30-31]。另外研究发现,蜂胶黄酮能够降低犊牛血清 IgG 和 IgM 含量^[32],芹菜素对小鼠血清 IgA、IgG 和 IgM 含量无影响^[33]。本试验结果表明,苜蓿黄酮对奶牛血清免疫球蛋白的含量没有影响。这些结果表明不同来源的黄酮类化合物,可能其组成和不同种类黄酮结果不同对动物的影响效果不同。

细胞凋亡受体 Fas 是一种细胞表面蛋白,Fas 与其配体(FasL)结合会对淋巴细胞产生破坏,导致淋巴细胞凋亡^[34]。Caspase-3 活化能够通过酶解灭活凋亡抑制物,酶解细胞外基质及骨架蛋白和裂解 DNA 修复相关分子等方式来促进细胞凋亡^[35]。Bcl-2 能够抑制线粒体通透性转换孔开放,阻止细胞凋亡,而 P53 能通过激活位于血浆膜的死亡受体促进细胞凋亡^[36]。Zhou 等^[37]和 Perumal 等^[38]研究发现,黄酮类化合物能够通过激活 Caspase-3、下调 Bcl-2 和升高 Bax 蛋白表达来促进癌细胞的凋亡。另外,黄酮类化合物还能够诱导 Fas 蛋白的合成,促进肿瘤细胞的凋亡^[39-40]。Zhang 等^[41]研究发现,在脑缺血再灌注情况下,给小鼠口服黄酮类化合物能够提高脑组织的抗氧化能力,显著降低 DNA 断裂,提高的 Bcl-2 表达,降低 P53、Fas、FasL 和 Caspase-3 基因等的表达,进而抑制细胞凋亡。另外,黄酮类化合物能够通过降低 P53 和 Caspase-3 基因的表达和 Bax/Bcl-2 来抑制小鼠大脑皮质和海马神经细胞的凋亡^[42-43]。以上结果说明,黄酮类化合物能够通过调节 Fas、Caspase-3、P53 和 Bcl-2 蛋白的合成来抑制和促进细胞凋亡。本试验苜蓿黄酮对淋巴细胞 Caspase-3、Bcl-2 和 P53 基因表达无影响,但能够降低 Fas 基因的表达。结果表明,苜蓿黄酮可能通过调节 Fas 蛋白的合成来抑制淋巴细胞的凋亡。

综上所述,苜蓿黄酮可能能够调节机体对蛋白质的吸收和代谢,提高机体的抗氧化能力,抑制淋巴细胞的凋亡以及调节血液中的中性粒细胞、淋巴细胞数量来改善奶牛的非特异性免疫。

参考文献 References

[1] 占今舜,詹康,刘明美,霍永久,林森,赵国琦,杨富裕.苜蓿草颗粒饲料对鹅屠宰性能、器官和血液生化指标的影响[J].草业学报,2015,24(8):181-187
Zhan J S, Zhan K, Liu M M, Huo Y J, Lin M, Zhao G Q, Yang F Y. Effect of alfalfa pellet feed on slaughter performance,

organ weights and blood biochemical indices of geese[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(8):181-187 (in Chinese)

[2] 占今舜,刘明美,赵国琦.黄酮的作用及其在反刍动物上的应用[J].中国饲料,2014,23:13-15
Zhan J S, Liu M M, Zhao G Q. Effects of flavonoids and its application in ruminant[J]. *China Feed*, 2014, 23: 13-15 (in Chinese)

[3] 苏效双,占今舜,詹康,刘明美,赵国琦.苜蓿黄酮对体外培养的奶牛乳腺上皮细胞增殖与抗氧化的影响[J].草业学报,2015,24(12):139-145
Su X S, Zhan J S, Zhan K, Liu M M, Zhao G Q. Proliferation stimulus and antioxidant effect of alfalfa flavonoids on dairy cow mammary epithelial cells cultured *in vitro* [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(12):139-145 (in Chinese)

[4] Aguiar S C, Cottica S M, Boeing J S, Samensari R B, Santos G T, Visentainer J V, Zeoula L M. Effect of feeding phenolic compounds from propolis extracts to dairy cows on milk production, milk fatty acid composition, and the antioxidant capacity of milk[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2014, 193:148-154

[5] Aguiar S C, Paula E M, Yoshimura E H, Santos W B R, Machado E, Valero M V, Santos G T, Zeoula L M. Effects of phenolic compounds in propolis on digestive and ruminal parameters in dairy cows[J]. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2014, 43(4):197-206

[6] Andrés S, Morán L, Aldai N, Tejido M L, Prieto N, Bodas R, Giraldez F J. Effects of linseed and quercetin added to the diet of fattening lambs on the fatty acid profile and lipid antioxidant status of meat samples[J]. *Meat Science*, 2014, 97:156-163

[7] Liu D Y, He S J, Jin E H, Liu S Q, Tang Y G, Li S H, Zhong L T. Effect of daidzein on production performance and serum antioxidative function in late lactation cows under heat stress[J]. *Livestock Science*, 2013, 152:16-20

[8] 郝振荣,朱志宁,王明,蒋林树,郭玉琴.大豆异黄酮对奶牛泌乳后期泌乳性能、免疫功能和乳腺肥大细胞白介素-4 水平的影响[J].动物营养学报,2010,22(6):1679-1686
Hao Z R, Zhu Z N, Wang M, Jiang L S, Guo Y Q. Effects of soybean isoflavone on lactating performance, immune function, and interleukin-4 expression level in mammary mast cell of late lactating dairy cows[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(6):1679-1686 (in Chinese)

[9] 朱志宁,郝振荣,王明,蒋林树,郭玉琴.大豆异黄酮对高产奶牛泌乳后期乳腺肥大细胞分泌肿瘤坏死因子- α 和表面型免疫球蛋白 A 水平的影响[J].动物营养学报,2011,23(1):112-121
Zhu Z N, Hao Z R, Wang M, Jiang L S, Guo Y Q. Effects of dietary soy isoflavone supplementation on the levels of tumor necrosis factor α and surface-type IgA secreted by mammary mast cells in higher lactating dairy cows during late lactation[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(1):112-121 (in Chinese)

[10] 王伟,田苗苗,梁新平,张红瑞,王成章,严学兵.苜蓿总黄酮对妊娠雌鼠繁殖性能及相关基因表达量的影响[J].草业学报,2013,22(6):249-256

- Wang W, Tian M M, Liang X P, Zhan H R, Wang C Z, Yan X B. Effect of alfalfa flavonoids on reproductive performance of female rats in pregnancy and on gene expression in the hypothalamus-pituitary-ovarian gonadal axis [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, 22(6): 249-256 (in Chinese)
- [11] 朱宇旌, 张勇, 宁自利, 王蕊, 李新华, 赵加柱. 苜蓿异黄酮提取物对小鼠生长和免疫功能的影响[J]. *营养学报*, 2008, 30(6): 615-618
- Zhu Y J, Zhang Y, Ning Z L, Wang R, Li X H, Zhao J Z. Effects of isoflavone extracted from alfalfa on growth performance and immune function in mice[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2008, 30(6): 615-618 (in Chinese)
- [12] 任慧玲. 紫花苜蓿及红三叶异黄酮对小鼠生长性能、免疫功能及抗氧化能力的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2007
- Ren H L. Effects of alfalfa and red clover isoflavones on growth performance and immune function in mice [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2007 (in Chinese)
- [13] 欧阳克惠, 熊小文, 王文君, 胡耀, 周萍芳, 刘党生. 苜蓿黄酮对崇仁麻鸡生长性能及肌肉化学成分的影响[J]. *草业学报*, 2013, 22(4): 340-345
- Ouyang K H, Xiong X W, Wang W J, Hu Y, Zhou P F, Liu D S. Effects of alfalfa flavones on growth performance and carcass quality of female Chongren chickens [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, 22(4): 340-345 (in Chinese)
- [14] 王高富, 黄勇富, 任航行, 周鹏, 韩燕国, 何春波, 刘良佳, 黎年富, 卢国华. 西州乌羊血液生化指标测定及其相关性分析[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(35): 47-52
- Wang G F, Huang Y F, Ren H X, Zhou P, Han Y G, He C B, Liu L J, Li N F, Lu G H. The analysis of the blood biochemical indices and correlation of Youzhou black goat [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29 (35): 47-52 (in Chinese)
- [15] 周玉香, 吕玉玲, 王洁, 吉帅, 侯鹏霞. 血液生化指标在动物生产与营养调控研究中的应用概况[J]. *畜牧与饲料科学*, 2012, 33(5/6): 72-73
- Zhou Y X, Lv Y L, Wang J, Ji S, Hou P X. Application survey of blood biochemical indices in the studies of animal production and nutritional regulation[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2012, 33(5/6): 72-73 (in Chinese)
- [16] 古今舜, 夏晨, 赵国琦, 霍永久, 徐红蕊, 杨富裕. 黑麦草颗粒饲料对扬州鹅器官发育和血清生化指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(6): 1668-1673
- Zhan J S, Xia C, Zhao G Q, Huo Y J, Xu H R, Yang F Y. Effects of ryegrass pellet diet on organ development and serum biochemical indexes of Yangzhou geese[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(6): 1668-1673 (in Chinese)
- [17] 李晶晶. 日粮中添加染料木黄酮对荷斯坦奶牛生产性能和血液生化指标的影响[D]. 保定: 河北农业大学, 2008
- Li J J. Effects of genistein supplement on performance and blood biochemical parameters in lactating cow [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2008 (in Chinese)
- [18] 郭旭东. 芦丁对奶牛泌乳性能、瘤胃消化代谢和对大鼠乳腺发育的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011
- Guo X D. Studies of rutin's role on lactation performance, the rumen digestion and metabolism in dairy cows, and the development of mammary glands in rat [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011 (in Chinese)
- [19] 顾欢, 施寿荣, 童海兵, 邹剑敏, 王志跃. 大豆黄酮对产蛋后期蛋鸡生产性能、血液指标和经济效益的影响[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(2): 390-396
- Gu H, Shi S R, Tong H B, Zou J M, Wang Z Y. Effects of daidzein on performance, blood parameters and economic benefits in laying hens during the late laying period[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25 (2): 390-396 (in Chinese)
- [20] 刘艳丰, 唐淑珍, 张文举, 侯广田, 聂存喜, 张志军. 沙棘叶黄酮对阿勒泰羊生长性能、屠宰性能和血清生化指标的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(12): 1981-1987
- Liu Y F, Tang S Z, Zhang W J, Hou G T, Nie C X, Zhang Z J. Effects of flavonoids of sea buckthorn leaves on growth performance, slaughter performance and serum biochemical indexes of Altay sheep [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(12): 1981-1987 (in Chinese)
- [21] 古今舜, 吴力专, 李丽立, 张彬. 金属硫蛋白对热应激下体外培养奶牛淋巴细胞的影响[J]. *草业学报*, 2014, 23(3): 215-223
- Zhan J S, Wu L Z, Li L L, Zhang B. Effect of metallothionein on lymphocyte apoptosis of the dairy cow cultured *in vitro* under heat stress[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2014, 23(3): 215-223 (in Chinese)
- [22] 刘德义, 顾有方, 王永鑫, 丁春华, 陈会良. 大豆黄酮对奶牛血清抗氧化能力和免疫功能的影响[J]. *中国兽医学报*, 2008, 28(11): 1306-1309
- Liu D Y, Gu Y F, Wang Y X, Ding C H, Chen H L. Effects of daidzein on anti-oxidative activities and immune functions in dairy cows[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2008, 28(11): 1306-1309 (in Chinese)
- [23] 刘春龙, 李忠秋, 张帆, 姜文博, 徐岩, 单安山. 大豆黄酮和染料木素对体外培养奶牛乳腺上皮细胞增殖及抗氧化水平的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(11): 1517-1522
- Liu C L, Li Z Q, Zhang F, Jiang W B, Xu Y, Shan A S. Effect of daidzein and genistein on proliferation and antioxidation of mammary epithelial cell of dairy cow *in vitro* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2008, 39(11): 1517-1522 (in Chinese)
- [24] 朱宇旌, 田书音, 张勇, 任慧玲, 李冰. 红三叶异黄酮对肉鸡免疫功能 and 抗氧化性能的影响[J]. *沈阳农业大学学报*, 2008, 39(6): 699-703
- Zhu Y J, Tian S Y, Zhang Y, Ren H L, Li B. Effect of red clover isoflavones on immune function and antioxidant activity in broilers[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2008, 39(6): 699-703 (in Chinese)
- [25] 方洛云, 赵燕飞, 金凯, 王俊杰, 周敏, 蒋树林. 大豆异黄酮对奶牛泌乳性能、血液免疫及抗氧化指标的影响[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(11): 9-15
- Fang L Y, Zhao Y F, Jin K, Wang J J, Zhou M, Jiang L S.

- Effect of soy isoflavones on lactating performance, blood immunity and antioxidative activity of dairy cows[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(11): 9-15 (in Chinese)
- [26] 吴腾飞, 陈福广, 黄清华, 陈伟, 邓旭明, 张巧灵, 刘波. 中性粒细胞杀灭病原体的新途径: 胞外诱捕网[J]. *免疫学杂志*, 2013, 29(2): 173-176
- Wu T F, Chen F G, Huang Q H, Chen W, Deng X M, Zhang Q L, Liu B. A new strategy for eliminating invading microbes by neutrophil: Extracellular traps[J]. *Immunological Journal*, 2013, 29(2): 173-176 (in Chinese)
- [27] Hedi H, Fadwa C, Kamel G, Leila C G. Inhibition of proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation *in vitro* by ethyl acetate leaf extract from *Daphne gnidium*[J]. *Cellular Immunology*, 2011, 267: 94-101
- [28] Chen X L, Chen X Y, Qiu S L, Hu Y L, Jiang C M, Wang D Y, Fan Q, Zhang C S, Huang Y, Yu Y, Yang H F, Liu C, Gao Z Z, Hou R R, Li X P. Effects of epimedium polysaccharide-propolis flavone oral liquid on mucosal immunity in chickens [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 64: 6-10
- [29] Fan Y P, Ma L, Zhang W M, Xu Y Y, Suo L, Zhi X Y. Microemulsion can improve the immune-enhancing activity of propolis flavonoid on immunosuppression and immune response [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 63: 126-132
- [30] 杨建英, 王艳玲, 郭永国, 张勇法, 兰尊海. 大豆黄酮对奶牛免疫功能 and 血清及乳中激素水平的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2006, 42(7): 15-17
- Yang J Y, Wang Y L, Guo Y G, Zhang Y F, Lan Z h. Effects of daidzein on immune function and hormone levels in serum and milk of cows[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2006, 42(7): 15-17 (in Chinese)
- [31] 姜义宝, 王成章, 崔国文. 红车轴草异黄酮对肉鸡免疫器官、免疫球蛋白及抗氧化性能的影响[J]. *草地学报*, 2011, 19(3): 520-524
- Jiang Y B, Wang C Z, Cui G W. Effect of red clover isoflavone on immune organs, Igs and anti-oxidation activity of broiler chicks[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2011, 19(3): 520-524 (in Chinese)
- [32] Yaghoubi S M J, Ghorbani G R, Rahmani H R, Nikkhal A. Growth, weaning performance and blood indicators of humoral immunity in Holstein calves fed supplemental flavonoids[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2008, 92: 456-462
- [33] Satomi Y, Daisuke U, Norihide M, Yoshinori F, Koji Y, Hirofumi T. Dietary apigenin suppresses IgE and inflammatory cytokines production in C57BL/6N mice [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54: 5203-5207
- [34] 张雷明, 董群. 凋亡的 Fas/FasL 与自身免疫病[J]. *皖南医学院学报*, 2003, 22(1): 65-67
- Zhang L M, Dong Q. The apoptosis of Fas/FasL and autoimmunity disease[J]. *Acta Academiae Medicinae Wannan*, 2003, 22(1): 65-67 (in Chinese)
- [35] 赵瑞杰, 李引乾, 王会, 王广彬, 娜日苏, 金大鹏, 关伟军, 马月辉. Caspase 家族与细胞凋亡的关系[J]. *中国畜牧杂志*, 2010, 46(17): 73-78
- Zhao R J, Li H Q, Wang H, Wang G B, Na R S, Jin D P, Guan W J, Ma Y H. Relationship of Caspase family and apoptosis [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2010, 46(17): 73-78 (in Chinese)
- [36] 周桔, 罗荣保, 汤长发, 瞿树林. Bcl-2 蛋白家族和 p53 基因在细胞凋亡中的调控效应[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(10): 1950-1952
- Zhou J, Luo R B, Tang C F, Qu S L. Effect of Bcl-2 protein family and p53 gene on regulating and controlling cell apoptosis [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2007, 11(10): 1950-1952 (in Chinese)
- [37] Zhou D N, Wei A H, Cao C, Ruan J L. DICO, a novel nonaromatic B-ring flavonoid, induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatoma cells[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 57: 322-329
- [38] Perumal M, Perumal N, Halagowder D, Sivasithamparam N. Morin, a dietary flavonoid, exhibits anti-fibrotic effect and induces apoptosis of activated hepatic stellate cells by suppressing canonical NF- κ B signaling[J]. *Biochimie*, 2015, 110: 107-118
- [39] Kumar S, Pathania A S, Saxena A K, Vishwakarma R A, Ali A, Bhushan S. The anticancer potential of flavonoids isolated from the stem bark of *Erythrina suberosa* through induction of apoptosis and inhibition of STAT signaling pathway in human leukemia HL-60 cells [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2013, 205: 128-137
- [40] Liu Y L, Tang L H, Liang Z Q, You B G, Yang S L. Growth inhibitory and apoptosis inducing by effects of total flavonoids from *Lysimachia clethroides* Duby in human chronic myeloid leukemia K562 cells [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 131: 1-9
- [41] Zhang S, Qi Y, Xu Y W, Han X, Peng J Y, Liu K X, Sun C K. Protective effect of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation[J]. *Neurochemistry International*, 2013, 63: 522-532
- [42] Prakash D, Sudhandiran G. Dietary flavonoid fisetin regulates aluminium chloride-induced neuronal apoptosis in cortex and hippocampus of mice brain [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2015, 26: 1527-1539
- [43] Guo M J, Suo Y R, Gao Q, Du H, Zeng W Y, Wang Y J, Hu X T, Jiang X J. The protective mechanism of Ginkgolides and Ginkgo flavonoids on the TNF- α induced apoptosis of rat hippocampal neurons and its mechanisms *in vitro*[J]. *Heliyon*, 2015, 1(1): e00020