

苜蓿黄酮对奶牛泌乳性能、血清激素和免疫指标的影响

占今舜 胡利珍 钟小军 霍俊宏* 谷德平

(江西省农业科学院 畜牧兽医研究所,南昌 330200)

摘要 为研究苜蓿黄酮对奶牛产奶性能、血清激素和免疫指标的影响,选择4头装有瘻管的头胎荷斯坦奶牛,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。试验分4期,每期24 d。结果表明:1)奶牛的干物质采食量随苜蓿黄酮含量的升高呈二次曲线变化,其中试验III组显著高于试验I和IV组($P<0.05$);2)催乳素浓度随苜蓿黄酮含量呈先升高后降低的趋势,以试验III组最高。三碘甲状腺原氨酸和四碘甲状腺原氨酸浓度随苜蓿黄酮含量的升高呈线性升高,其中试验IV组显著高于试验I组($P<0.05$);3)试验II组的CD4⁺数量和CD4⁺/CD8⁺均显著高于其他各组($P<0.05$),而CD8⁺数量则相反;4)试验II组淋巴细胞的白介素4基因、干扰素 γ 基因和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子基因的相对表达量均显著高于其他各组($P<0.05$)。因此,适量添加苜蓿黄酮能够提高奶牛的采食量,调节机体激素分泌和免疫性能,添加60 g的效果较好。

关键词 奶牛; 黄酮; 苜蓿; 激素; 免疫性能; 泌乳性能

中图分类号 S823;S816.7

文章编号 1007-4333(2018)12-0084-07

文献标志码 A

Effects of flavonoids from alfalfa on the milk production, serum hormone and immune indexes of dairy cows

ZHAN Jinshun, HU Lizhen, ZHONG Xiaojun, HUO Junhong*, GU Deping

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China)

Abstract The aim of this study was to examine the effects of flavonoids from alfalfa on the milk production, serum hormone and immune indexes of dairy cows. Four primiparous Holstein cows fitted with ruminal cannulas were taken as study object, and 4×4 Latin square design was conducted. The cows were fed with total mixed ration supplemented with 0, 20, 60 or 100 g alfalfa flavonoids (AF) at different periods, respectively. The experiment lasted four periods and each period contained 24 days. The results showed that: 1) The dry matter intake (DMI) of dairy cows showed quadratic curve change with the increasing dose of AF. DMI was significantly higher in group II than that in groups I and IV ($P<0.05$); 2) Prolactin (PRL) concentration was increased at first and then decreased with the increasing dose of dietary AF supplementation. The concentration of PRL in group III was the highest. The concentrations of triiodothyronine and tetraiodothyronine were increased linearly with increasing dose of dietary AF supplementation and were significantly higher in group IV than that in groups I ($P<0.05$). 3) The count of CD4⁺ and the ratio of CD4⁺ to CD8⁺ in group II were significantly higher than that in other groups ($P<0.05$), whereas the count of CD8⁺ showed the opposite result; 4) The relative expression of genes of *IL-4*, *IFN- γ* and *GM-CSF* colony stimulating factor in lymphocyte of group II were significantly higher than that of other groups ($P<0.05$). In conclusion, the moderate supplement of alfalfa flavonoids in diet could improve cow's feed intake and regulate hormone secretion and immune performance of dairy cows. The addition of 60 g AF in the diet of dairy cows was shown to be most beneficial.

Keywords dairy cow; flavonoids; alfalfa; hormone; immune performance; milk production

收稿日期: 2018-02-12

基金项目: 江西省现代农业科研协同创新专项(JXXTCX201702-04)

第一作者: 占今舜,助理研究员,博士,主要从事草食动物营养研究,E-mail: zhanjinshun1985@163.com

通讯作者: 霍俊宏,副研究员,主要从事反刍动物育种研究,E-mail: hjh_0222@126.com

黄酮类化合物是一类多酚化合物,其结构中含有 2-苯基色原酮,是植物中主要的次级代谢产物。黄酮类化合物具有抗病原微生物、免疫刺激和抗氧化等性能,因此可以作为一种饲料添加剂广泛应用于动物生产中^[1-2]。紫花苜蓿(*Medicago sativa*)为豆科多年生草本植物,由于其具有营养价值高、产量高和草质优良等优点,被广泛栽培,为“牧草之王”。饲喂苜蓿能够提高反刍动物的生长性能、泌乳性能和饲料转化率^[3-5]。紫花苜蓿中含有多糖、皂苷和黄酮等多种活性成分,其中黄酮类化合物的含量最高。通过检测 45 个紫花苜蓿品种中的黄酮类化合物,73.3% 的品种的总黄酮含量达 0.6%~0.9%^[6]。在肉鸡日粮中添加苜蓿黄酮,能够提高平均日增重,可上调脂肪和肝脏组织的脂蛋白脂肪酶(LPL)、脂肪甘油三酯脂肪酶(ATGL)、过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)基因的表达和下调脂肪酰合成酶(FAS)基因的表达,降低肉中脂肪沉积,从而改善肉品质^[7]。在绵羊日粮中添加苜蓿黄酮能够调节脂类代谢和提高氮的利用率,维持体内能量代谢及平衡钙、磷含量,对肝脏功能无不良影响^[8]。在扬州鹅日粮中添加适量的苜蓿黄酮能够提高生产性能,促进营养物质代谢吸收,提高血清抗氧化和免疫指标水平,但添加过量对扬州鹅存在副作用^[9]。以上结果说明,苜蓿黄酮具有提高畜禽生产性能的作用。综上,紫花苜蓿提高奶牛生产性能可能与其含有高含量的黄酮有关。因此,为了解苜蓿黄酮是否影响奶牛生产性能,本试验拟采用拉丁方设计进行饲养试验,探究苜蓿黄酮对奶牛泌乳性能、血清激素和免疫指标的影响,以期苜蓿黄酮在奶牛业中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验设计及饲养管理

试验于 2015 年 4 月在上海星火奶牛二场(上海光明荷兰斯坦牧业有限公司)进行。苜蓿黄酮的纯度为 50%,购于陕西绿清生物工程有限公司。试验过程采用 4×4 拉丁方设计,将 4 头装有瘰管、平均体重为 500±25 kg,泌乳天数为 79±6 d 的头胎奶牛分为 4 组(试验 I~IV 组),奶牛饲喂全混合型日粮,每组日粮中分别添加 0、20、60 和 100 g 苜蓿黄酮,试验分 4 期,每期 24 d。奶牛采用拴式饲养,自由饮水,饲喂时间分别为早上 6:30、中午 1:30 和晚上 7:30,挤奶时间分别为早上 10:00、下午 4:00 和晚

上 10:00,每天记录各组奶牛的采食量和产奶量。计算 4% 标准乳(FCM)每天产量的公式为^[10]:

$$W_{4\% \text{ FCM}} = 0.40 \times W_{\text{产奶量}} + 15.00 \times W_{\text{乳脂量}}$$

日粮配方及营养水平见参考文献[11]。

1.2 血清激素测定

每个试验期的第 21 d,奶牛采食 2 h 后进行尾静脉采血,将含惰性分离胶的促凝真空采血管采集的血液静置 1 h 后,进行 3 500 r/min 离心 10 min,分离出血清。试验结束后,将血清寄到北京华英生物技术研究所进行检测,激素检测采用放射免疫分析法。

1.3 CD4、CD8 和淋巴细胞相关基因表达的检测

每个试验期的第 21 d,奶牛采食 2 h 后利用含有肝素的抗凝真空采血管进行尾静脉采血,血液采集结束后马上开始提取淋巴细胞。淋巴细胞提取方法参照文献[11]。CD 4 和 CD 8 采用流式细胞仪进行检测,在扬州大学检测中心完成。检测方法如下:先将淋巴细胞用 PBS 清洗,去除上清液,加入 100 μ L PBS 和 50 μ L 一抗(Kingfisher,英国)进行重悬细胞,后放置冰上进行孵育 30 min。孵育结束后离心去除上清液,用含有马血清的 PBS 进行清洗细胞 3 次,然后加入 50 μ L PBS 和 100 μ L 二抗(Kingfisher,英国)进行重悬细胞后放置冰上进行孵育 30 min,孵育结束后去除上清液,用 100 μ L PBS 重悬细胞后用流式细胞仪进行检测。

淋巴细胞总 RNA 的提取根据提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)中的说明书进行,cDNA 合成和 RT-PCR 条件参照文献[12]。引物由 Invitrogen 公司合成,白介素 2(IL-2)、白介素 4(IL-4)、转化生长因 β 1(TGF- β 1)、干扰素 γ (IFN- γ)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)基因引物序列参照文献[13]。

1.4 数据处理

数据先用 Excle 2007 进行预处理,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达量。数据采用 SAS 9.2 软件的 PROC MIXED 程序进行分析,Duncan 进行多重比较。分析模型同文献[11]。

2 结果与分析

2.1 苜蓿黄酮对奶牛采食量及产奶量的影响

日粮添加苜蓿黄酮对奶牛采食量和产奶量的影响测定结果见表 1。奶牛干物质采食量随日粮中苜蓿黄酮添加剂量的升高呈先升高后下降趋势,其中

试验Ⅲ组干物质采食量显著高于试验Ⅰ和Ⅳ组 ($P < 0.05$)。随着苜蓿黄酮添加剂量的升高,产奶量、4%标准乳和奶料比均呈升高后降低趋势,其中

试验Ⅲ最高,但各组之间差异不显著。说明添加适量苜蓿黄酮可以提高奶牛采食量,对提高产奶量也具有一定的作用。

表1 苜蓿黄酮对奶牛采食量和产奶量的影响

Table 1 Effects of alfalfa flavonoids on dry matter intake and milk production of lactating cows

指标 Index	组别 Group				标准 误差 SE	P 值 P-value	
	I	II	III	IV		线性 Linear	二次 Quadratic
干物质采食量/(kg/d) DMI	16.80 b	16.97 ab	17.58 a	16.30 b	0.21	0.37	0.01
产奶量/(kg/d) MY	28.65	30.93	34.39	30.51	3.61	0.60	0.43
4%标准乳/(kg/d) FCM	26.14	27.45	31.06	26.97	1.77	0.47	0.18
奶料比(M/F)	0.97	1.02	1.10	1.08	0.05	0.11	0.50

注:同行数值后的不同字母,代表差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: Different letters within same column represent significant differences at $P < 0.05$. The same bellow.

2.2 苜蓿黄酮对奶牛血清中激素浓度的影响

通过对奶牛血清激素浓度的测定(表2),发现催乳素浓度随日粮中苜蓿黄酮添加剂量的升高呈二次升高($P = 0.05$),其中试验Ⅲ组最高。血清中 T_3

和 T_4 浓度随着苜蓿黄酮添加剂量的升高呈线性升高($P = 0.02$),其中试验Ⅳ组显著高于试验Ⅰ组 ($P < 0.05$)。苜蓿黄酮对其他激素浓度无显著影响。说明苜蓿黄酮具有调节奶牛激素分泌的作用。

表2 苜蓿黄酮对奶牛血清激素浓度的影响

Table 2 Effects of alfalfa flavonoids on hormones concentration in serum of lactating cows

指标 Index	组别 Group				标准 误差 SE	P 值 P-value	
	I	II	III	IV		线性 Linear	二次 Quadratic
催乳素/(μ IU/mL) PLR	187.69	187.96	219.64	193.96	9.24	0.22	0.05
孕酮/(ng/mL) P	0.65	0.73	0.78	0.74	0.09	0.44	0.50
雌二醇/(pg/mL) E_2	22.26	23.00	26.73	22.80	1.29	0.39	0.12
生长激素/(ng/mL) GH	4.18	3.83	3.77	3.66	0.19	0.11	0.56
胰岛素/(μ IU/mL) INS	16.91	16.18	19.97	16.11	1.96	0.88	0.45
三碘甲状腺原氨酸/(ng/mL) T_3	1.01 b	1.05 ab	1.06 ab	1.08 a	0.01	0.02	0.42
四碘甲状腺原氨酸/(ng/mL) T_4	73.62 b	74.02 b	75.36 b	84.63 a	2.44	0.02	0.12

2.3 苜蓿黄酮对奶牛免疫指标的影响

采用流式细胞仪检测奶牛血液 T 淋巴细胞数量,结果见表3。随着日粮中苜蓿黄酮添加剂量的升高,CD 4⁺ T 淋巴细胞和 CD 4⁺/CD 8⁺ 均呈先升高后降低趋势,其中试验Ⅱ组显著高于其他各组 ($P < 0.05$),而 CD 8⁺ T 淋巴细胞的结果则相反。

采用 RT-PCR 检测细胞因子基因表达发现,GM-CSF、IFN- γ 和 IL-4 的表达均呈二次曲线变化,其中试验Ⅱ组显著高于其他各组 ($P < 0.05$),而其他基因各组无显著差异(表4),说明苜蓿黄酮能够调节奶牛的免疫性能。

表 3 苜蓿黄酮对奶牛血液中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞比例的影响Table 3 Effects of alfalfa flavonoids on ratio of CD 4⁺ and CD 8⁺ in blood of lactating cows

指标 Index	组别 Group				标准 误差 SE	P 值 P-value	
	I	II	III	IV		线性 Linear	二次 Quadratic
CD3 ⁺	40.55%	36.78%	46.96%	37.05%	7.27	0.84	0.72
CD4 ⁺	37.33% b	46.87% a	35.00% b	35.70% b	2.00	0.66	0.08
CD8 ⁺	33.03% a	26.40% b	34.07% a	37.07% a	1.40	0.05	0.11
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.20% b	1.81% a	1.06% b	1.06% b	0.09	0.10	0.04

表 4 苜蓿黄酮对细胞因子基因相对表达的影响

Table 4 Effects of alfalfa flavonoids on relative expression of cytokines

基因 Gene	组别 Group				标准 误差 SE	P 值 P-Value	
	I	II	III	IV		线性 Linear	二次 Quadratic
<i>IL-2</i>	1.02	1.59	0.83	1.91	0.41	0.34	0.56
<i>TGF-β1</i>	1.01	1.02	1.08	1.29	0.18	0.32	0.61
<i>GM-CSF</i>	1.00 b	2.25 a	0.89 b	0.83 b	0.23	0.12	0.03
<i>IL-4</i>	1.00 b	2.30 a	0.89 b	0.84 b	0.22	0.11	0.02
<i>IFN-γ</i>	1.00 b	2.28 a	0.89 b	0.88 b	0.22	0.13	0.03

3 讨论

Gessner 等^[14]研究发现,富含黄酮类物质的葡萄酒渣可能通过调节瘤胃代谢来提高奶牛的产奶量。Winkler 等^[15]发现奶牛摄食富含黄酮的绿茶(95%)和姜黄(5%)提取物,能够提高产奶量。Nielsen 和 Hansen^[16]研究发现,奶牛每天摄入富含黄酮的葡萄渣有提高产奶量的趋势。高靖等^[17]研究发现,富含黄酮的葛根提取物能够提高奶牛的产奶量。然而,添加含黄酮的蜂胶对奶牛干物质采食量和产奶量均无显著影响^[18]。在本试验中,添加 60 g 苜蓿黄酮能够显著提高干物质采食量;产奶量虽升高,但无显著影响。本研究结果有所不同,可能是来自不同材料的黄酮类物质的结构不同。

催乳素能够促进乳腺生长和发育,其在启动泌乳和维持泌乳方面具有重要作用^[19]。芦丁、大豆黄酮、染料木黄酮和木犀草素等是一类植物雌激素物质,而植物雌激素的结构与内源性雌激素相似,具有雌激素样和抗雌激素的作用。机体内雌激素浓度较低时,植物雌激素发挥雌激素样作用,而浓度较高

时,植物雌激素会阻止内源性雌激素与受体相结合,发挥拮抗雌激素的作用^[20]。苜蓿属中黄酮类成分的母核主要有芦丁、大豆黄酮、染料木黄酮和木犀草素等^[21]。染料木黄酮和大豆黄酮能够提高奶牛雌二醇含量和促进催乳素的释放^[22-24]。在本试验中,雌二醇和催乳素的浓度随苜蓿黄酮添加剂量的升高呈升高后下降,这变化与产奶量相似。结果说明:低剂量苜蓿黄酮发挥雌激素的作用,促进催乳素的释放,进而促进泌乳;而高剂量则发挥拮抗作用,通过降低雌激素浓度来抑制催乳素的释放,进而降低泌乳。甲状腺激素存在 T₃ 和 T₄ 2 种形式,其在促进物质和能量代谢、生长和发育过程中发挥重要作用^[25]。王凯等^[26]研究发现,添加苜蓿和红车轴草黄酮提取物提高了绵羊血清中生长激素、胰岛素生长因子 1 和 T₃ 含量。本试验也发现苜蓿黄酮提高 T₃ 和 T₄ 含量,与其结果相一致。添加苜蓿黄酮具有提高粗蛋白和中性洗涤纤维的表观消化率^[27]。说明苜蓿黄酮可能通过调节甲状腺激素的分泌,促进营养物质的消化,进而提高生产性能。苜蓿黄酮对奶牛血清生长激素和胰岛素等无显著影响,结果与

王凯等^[26]研究不同。可能是因为试验动物品种、生理状况、日粮、环境因素等不同造成的。

2)作为T淋巴细胞的表面标记,CD 4⁺和CD 8⁺T淋巴细胞可以反映T淋巴细胞的激活和细胞的免疫状态。CD 4⁺和CD 8⁺T淋巴细胞比例以及CD 4⁺/CD 8⁺反映免疫应答的水平,当CD 4⁺/CD 8⁺比值升高时,说明机体免疫性能增强^[28]。木其尔^[29]研究发现,肉羊日粮中添加适量的沙葱黄酮能上调CD 4⁺细胞比例、CD 4⁺/CD 8⁺比值,下调CD 8⁺细胞比例。从本试验结果来看,低剂量苜蓿黄酮能够通过增加奶牛CD 4⁺细胞数量和CD 4⁺/CD 8⁺比值来提高机体细胞免疫性能。然而,也有研究发现黄芩苷和杨梅酮等黄酮化合物有抑制淋巴细胞活化和增殖的作用^[30],而已有研究发现随着苜蓿黄酮添加剂量的升高,奶牛外周血淋巴细胞数量呈线性降低^[27]。因此,高剂量苜蓿黄酮具有抑制淋巴细胞增殖的作用,可以作为一种免疫抑制剂。

IL-4能够增强B淋巴细胞的抗原递呈能力,促进细胞毒性T细胞活性和巨噬细胞的功能等;IFN- γ 能够增强T、B细胞的分化,促进抗体的分泌、细胞毒性T细胞成熟和激活单核巨噬细胞等;然而它们之间互为拮抗,在调节机体免疫应答方面具有重要作用^[31]。研究发现,槲皮素、木樨草素、芹黄素等黄酮类化合物具有抑制IL-4分泌,促进IFN- γ 分泌^[32-33]。然而,奶牛摄食含大豆异黄酮的日粮,其血清、乳和乳腺组织中IL-4的水平升高,增强了奶牛的免疫功能^[34]。本试验结果说明低剂量苜蓿黄酮能够通过提高IFN- γ 和IL-4基因的表达来提高机体免疫。而高剂量降低了IFN- γ 和IL-4基因的表达,可能与减少T淋巴细胞数量有关。粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)是一种免疫细胞因子,它通过提高嗜中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞的生长、增殖、分化,进而通过提高它们的吞噬和杀菌作用来发挥有效的免疫刺激作用^[35]。嗜中性粒细胞和单核细胞数量均随苜蓿黄酮剂量的升高呈先升高后降低趋势^[27]。因此,本试验结果表明,苜蓿黄酮可能通过影响嗜中性粒细胞和单核细胞数量来调节GM-CSF基因的表达,进而提高机体的抗菌能力。

综上所述,日粮中添加苜蓿黄酮能够提高奶牛采食量,通过调节激素的分泌来影响泌乳性能,通过影响血液中CD 4⁺和CD 8⁺T淋巴细胞比例以及细胞因子基因的表达来调节机体的免疫性能。奶牛生

产中,日粮中添加60g苜蓿黄酮的效果较好。

参考文献 References

- [1] Yang Y Y, Bai L, Li X R, Xiong J, Xu P X, Guo C Y, Xue M. Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: An evaluation using the blood-brain barrier cell and Caco-2 cell models[J]. *Toxicology in Vitro*, 2014,28(3): 388-396
- [2] Kumar S, Pandey A K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview[J]. *Scientific World Journal*, 2013, doi:10.1155/2013/162750
- [3] Jahani-Moghadam M, Mahjoubi E, Hossein Y M, Cardoso F C, Drackley J K. Effects of alfalfa hay and its physical form (chopped versus pelleted) on performance of Holstein calves [J]. *Journal of Dairy Science*, 2015,98(6):4055-4061
- [4] Neal K, Eun J S, Young A J, Mjoun K, Hall J O. Feeding protein supplements in alfalfa hay-based lactation diets improves nutrient utilization, lactational performance, and feed efficiency of dairy cows[J]. *Journal of Dairy Science*, 2014,97(12):7716-7728
- [5] Wang B, Mao S Y, Yang H J, Wu Y M, Wang J K, Li S L, Shen Z M, Liu J X. Effects of alfalfa and cereal straw as a forage source on nutrient digestibility and lactation performance in lactating dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2014,97(12): 7706-7715
- [6] 高薇薇. 苜蓿生物活性及影响其黄酮和皂苷成分因素的研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2004
Gao W W. Study on the bioactivity of alfalfa and the influence factors to its flavonoids and saponins [D]. Beijing: Chinese Peking Union Medical College, 2004 (in Chinese)
- [7] Ouyang K H, Xu M S, Jiang Y, Wang W J. Effects of alfalfa flavonoids on broiler performance, meat quality, and gene expression[J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2016, 96(3):332-341
- [8] 王梦竹. 苜蓿黄酮对绵羊瘤胃发酵、生长性能和血液生化指标的影响研究[D]. 石河子:石河子大学,2016
Wang M Z. Effects of alfalfa flavonoids on rumen fermentation, growth performance and serum indexes of sheep [D]. Shihezi: Shihezi University, 2016 (in Chinese)
- [9] 陈银银. 苜蓿黄酮对扬州鹅生产性能、血液生化指标和免疫性能的影响[D]. 扬州:扬州大学,2016.
Chen Y Y. Effects of alfalfa flavonoids extraction on production performance, blood biochemical indexes and immune performance of Yangzhou geese [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2016 (in Chinese)
- [10] Tyrrell H F, Reid J T. Prediction of the energy value of cow's milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 1965,48(9):1215-1223
- [11] 占今舜,苏效双,刘明美,詹康,张春刚,赵国琦. 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[J].

- 中国农业大学学报, 2017, 22(5): 66-74
- Zhan J S, Su X S, Liu M M, Zhan K, Zhang C G, Zhao G Q. Effects of diet alfalfa flavonoids on blood biochemical indexes, oxidation resistance and immunity of dairy cow[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2017, 22(5): 66-74 (in Chinese)
- [12] 古今舜, 刘明美, 詹康, 赵国琦. 苜蓿黄酮对奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白、乳脂和乳糖合成的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(1): 91-95
- Zhan J S, Liu M M, Zhan K, Zhao G Q. Effects of alfalfa flavonoids on lactoprotein, milk fat and lactose synthesis in bovine mammary epithelial cell [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2017, 53(1): 91-95 (in Chinese)
- [13] Tanaka S, Aso H, Miyazawa K, Nagai Y, Watanabe K, Ohwada S, Kobayashi J, Yamaguchi T. Differential cytokine gene expression in CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets of calves [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2007, 118(1-2): 84-91.
- [14] Gessner D K, Koch C, Romberg F J, Winkler A, Dusel G, Herzog E, Most E, Eder K. The effect of grape seed and grape marc meal extract on milk performance and the expression of genes of endoplasmic reticulum stress and inflammation in the liver of dairy cows in early lactation[J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(12): 8856-8868
- [15] Winkler A, Gessner D K, Koch C, Romberg F J, Dusel G, Herzog E, Most E, Eder K. Effects of a plant product consisting of green tea and curcuma extract on milk production and the expression of hepatic genes involved in endoplasmic stress response and inflammation in dairy cows [J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2015, 69(6): 425-441
- [16] Nielsen B, Hansen H. Effect of grape pomace rich in flavonoids and antioxidants on production parameters in dairy production[J]. *Journal of Animal and Feed Science*, 2004, 13(4): 535-538
- [17] 高靖, 高腾云, 王荷香. 葛根提取物对奶牛生产性能和血液生化指标的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(7): 126-128
- Gao J, Gao T Y, Wang H X. Effects of extracts of *Puerariae radix* on productive performance and blood biochemical parameters of dairy cow [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 39(7): 126-128 (in Chinese)
- [18] 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(7): 148-154
- [19] Groner B. Transcription factor regulation in mammary epithelial cells[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2002, 23(1/2): 25-32
- [20] 赵元, 郑红霞, 徐颖, 林娜. 中药植物雌激素的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18): 3474-3487
- Zhao Y, Zheng H X, Xu Y, Lin N. Research progress in phytoestrogens of traditional Chinese medicine [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2017, 42(18): 3474-3487 (in Chinese)
- [21] 朱见明, 李娜, 张亚军, 李晓东, 王成章. 苜蓿黄酮的研究进展[J]. 草业科学, 2009, 26(9): 156-162
- Zhu J M, Li N, Zhang Y J, Li X D, Wang C Z. The research progress of alfalfa flavonoids [J]. *Pratacultural Science*, 2009, 26(9): 156-162 (in Chinese)
- [22] 刘春龙, 任延铭, 姜文博, 付强, 刘娣, 富相奎, 李忠秋. 大豆异黄酮类植物雌激素对奶牛内分泌水平的影响[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(9): 1261-1264, 1268
- Liu C L, Ren Y M, Jiang W B, Fu Q, Liu D, Fu X K, Li Z Q. Effects of soybean isoflavone on incretion parameters of dairy cow [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2010, 30(9): 1261-1264, 1268 (in Chinese)
- [23] 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)
- [24] 李琼, 陈俊宏, 刘亚伟, 谭世新, 杨开伦. 大豆黄酮、芒柄花素及其组合对奶牛产奶性能、血浆和乳中激素含量的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(1): 309-316
- Li C, Chen J H, Liu Y W, Tan S X, Yang K L. Effects of daidzein, formononetin and their combination on milk performance, plasma and milk hormone contents of dairy cows [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(1): 309-316 (in Chinese)
- [25] 张颖, 姚旋, 宋宜云, 应浩. 甲状腺激素与代谢调控[J]. 生命科学, 2013, 25(2): 176-183
- Zhang Y, Yao X, Song Y Y, Ying H. Thyroid hormone and metabolic regulation [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2013, 25(2): 176-183 (in Chinese)
- [26] 王凯, 王洋, 孙娟娟, 刘振阳, 姜义宝, 王美静, 李敏. 苜蓿和红车轴草黄酮提取物对绵羊生长性能和血液相关指标的影响[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(4): 704-709
- Wang K, Wang Y, Sun J J, Liu Z Y, Jiang Y B, Wang M J, Li M. Effects of flavonoids of *Medicago sativa L* and *Trifolium pratense L* extraction on growth performance, blood biochemical indexes of sheep [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(4): 704-709 (in Chinese)
- [27] Zhan J S, Liu M M, Su X S, Zhan K, Zhang C G, Zhao G Q. Effects of alfalfa flavonoids on the production performance, immune system, and ruminal fermentation of dairy cows [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2017, 30(10): 1416-1424
- [28] Uehara S, Gothoh K, Handa H, Tomita H, Tomita Y. Immune function in patients with acute pancreatitis [J].

- Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2003, 18(4): 363-370
- [29] 木其尔. 沙葱黄酮对肉羊机体抗氧化和免疫功能的影响及其机理研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016
Mu Q E. The effects of flavonoids from *Allium Mongolicum Regel* on antioxidant capacity immune function and its mechanism in meat sheep [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- [30] Hedi H, Fadwa C, Kamel G, Chekir-Ghedira L. Inhibition of proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation *in vitro* by ethyl acetate leaf extract from *Daphne gnidium* [J]. *Cellular Immunology*, 2011, 267(2): 94-101
- [31] 占今舜. 苜蓿黄酮对奶牛生产性能、瘤胃代谢和免疫性能影响的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2017
Zhan J S. Effect of alfalfa flavonoids on production performance, ruminal metabolism and immunity [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2017 (in Chinese)
- [32] Hirano T, Higa S, Arimitsu J, Naka T, Shima Y, Ohshima S, Fujimoto M, Yamadori T, Kawase I, Tanaka T. Flavonoids such as luteolin, fisetin and apigenin are inhibitors of interleukin-4 and interleukin-13 production by activated human basophils [J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2004, 134(2): 135-140
- [33] Naira M P N, Kandaswami C, Mahajan S, Chadha K C, Chawda R, Nair H, Kumar N, Nair R E, Schwart S A. The flavonoid, quercetin, differentially regulates *Th*-1 (IFN γ) and *Th*-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1593(1): 29-36
- [34] 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)
- [35] Hamilton J A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(7): 533-544

责任编辑: 杨爱东