

## 慢性冷热应激对三河牛血液生化指标及相关基因表达的影响

白丹丹<sup>1</sup> 敖日格乐<sup>1\*</sup> 王纯洁<sup>2</sup> 畅旺东<sup>1</sup> 徐东贺<sup>1</sup> 贾知锋<sup>2</sup>

(1. 内蒙古农业大学 动物科学学院, 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古农业大学 兽医学院, 呼和浩特 010018)

**摘要** 为研究冷热应激对三河牛血液生化指标及相关基因表达量的影响,利用实时荧光定量PCR和ELISA方法检测冷热应激期和非应激期血清中肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、葡萄糖(GLU)和尿素氮(BUN)含量及淋巴细胞中HSP70家族基因(HSPA1A、HSPA1B、HSPA8)mRNA表达量。结果显示:1)冷热应激期血清中CK和LDH活性相比非应激期均升高,热应激期升高尤为显著( $P<0.05$ );热应激期GLU含量相比非应激期显著降低( $P<0.05$ );热应激期BUN含量略低于非应激期,差异不显著;冷应激期GLU和BUN含量相比非应激期均显著升高( $P<0.05$ )。2)冷热应激期淋巴细胞中3个HSP70家族基因mRNA表达量相比非应激期显著升高( $P<0.05$ )。结果表明,慢性冷热应激改变了血液中酶的活性、糖和蛋白质的代谢,从而导致奶牛的一些组织细胞的损伤和营养代谢的紊乱,并冷热应激时血液淋巴细胞中HSP70家族基因mRNA表达量的上升,可在一定程度上反映其对动物机体的保护水平。

**关键词** 三河牛;冷热应激;酶活性;营养代谢相关生化指标;mRNA表达量

中图分类号 S823.9<sup>+</sup>4

文章编号 1007-4333(2017)08-0050-07

文献标志码 A

## Influences of chronic cold and heat stress on blood biochemical parameters and related gene expression in Sanhe cattle

BAI Dandan<sup>1</sup>, Aorigele<sup>1\*</sup>, WANG Chunjie<sup>2</sup>, CHANG Wangdong<sup>1</sup>, XU Donghe<sup>1</sup>, JIA Zhifeng<sup>2</sup>

(1. College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. College of Veterinary, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract** The purpose of this study was to detect biochemical indexes and genes related to cold and heat stress and non-stress in Sanhe cattle. Using real-time fluorescence quantitative PCR and ELISA, the expression quantity of HSP70 family genes (HSPA1A, HSPA1B, and HSPA8) mRNA in lymphocyte and concentrations of CK, LDH, GLU and BUN in serum were detected respectively after cold stress, heat stress and non-stress time. The results showed that CK and LDH activity in serum of cows were higher than non-stress time during cold and heat stress time, especially remarkably rose during heat stress ( $P<0.05$ ). The content of GLU was remarkably lower than non-stress time during heat stress time ( $P<0.05$ ). The content of BUN showed no remarkable changes during heat stress time. The content of GLU and BUN were remarkably higher than non-stress time during cold stress time ( $P<0.05$ ). Three HSP70 family genes mRNA expression quantities in lymphocyte of Sanhe cattle were increased during cold and heat stress. The results indicated that high and low temperature changed the activities of enzyme, glucose and protein metabolism in serum. Enhanced expressions of HSP70 family genes mRNA during cold and heat stress time improved the function of animal self-protection and enhanced resistance to adverse external stimulate.

**Keywords** Sanhe cattle; cold and heat stress; enzymatic activity; biochemical parameters of nutrition metabolism; mRNA expression quantity

收稿日期: 2016-06-08

基金项目: 国家科技支撑项目(2015BAD03B04-5); 国家自然科学基金资助项目(31160473)

第一作者: 白丹丹, 硕士研究生, E-mail: 905224851@qq.com

通讯作者: 敖日格乐, 教授, 博士生导师, 主要从事牛生产学与产品品质研究, E-mail: aori6009@163.com

现代畜牧生产中,对家畜影响最普遍且不可避免的应激有热应激和冷应激。持续的高温和低温导致的冷热应激引起畜禽机体生理平衡的破坏,导致免疫力下降,表现为生长放缓、生产性能下降、繁殖力降低、发病率和死亡率高<sup>[1]</sup>。因此,给我国畜牧业造成了巨大经济损失。研究冷热应激过程中血液生化指标变化规律和相关基因表达量,对于明确家畜冷热应激相关指标以及探索冷热应激的发生机理和研究出克服冷热应激的方法具有重要意义。多项研究表明,长时间的冷刺激会严重影响生物体内酶及各种激素水平的稳定<sup>[2]</sup>。热应激影响动物机体细胞代谢,包括促进葡萄糖和氨基酸的氧化,抑制脂肪酸代谢和蛋白质合成<sup>[3]</sup>。近年来研究发现,应激诱导热休克蛋白(Heat shock protein, HSP)的产生。当机体受到刺激后产生非特异性细胞保护作用,可启动体内 HSPs mRNA 调节机理,对维持细胞生存和体内环境稳定起重要作用<sup>[4]</sup>。在 HSP 家族中 HSP70 基因对温度变化最敏感,且具有极高的保守性。Behla 等<sup>[5]</sup>也通过研究印度瘤牛发现, HSPA1A 和 HSPA1B 具有较高的保守性。因此,本试验从 HSP70 家族中选择有代表性的 HSPA1A、HSPA1B 和 HSPA8 基因,研究冷热应激对其 mRNA 表达量的影响。目前,冷热应激的机理十分复杂,相关的作用机理只有部分被揭露,并有关三河牛品种冷热应激条件下血液生化指标及相关基因表达量方面的变化规律报道较少。因此,通过研究冷热应激对三河牛血液生化指标及相关基因表达量的影响,旨在为三河牛抗逆性选育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

随机选取内蒙古谢尔塔拉牧场三河牛群体中体质健康、体重相近、同胎(2胎)次泌乳中期三河牛(Sanhe cattle, SC)。试验分3个阶段进行,即夏季(热应激期)(2015年7月23日—7月29日),春季(无应激期)(2016年4月24日—4月30日)和冬季(冷应激期)(2015年12月28日—2016年1月3日),每个试验阶段选取无亲缘关系的15头牛,共45头。试验牛群采用散栏式饲养,每日早和晚饲喂2次,日粮公司统一配制。于试验期最后1d清晨,对三河牛进行空腹采血,采用真空采血管奶牛尾静脉采集血液,抗凝血5 mL分离淋巴细胞,分离的淋

巴细胞加1 mL Trizol 保存于液氮中带回实验室放入-80 °C超低温冰箱,非抗凝血10 mL分离血清,保存于-20 °C冰箱。

### 1.2 主要试剂

牛淋巴细胞分离液购自天津灏洋华科生物技术有限公司; Trizol、DNA Marker、Rnase-free ddH<sub>2</sub>O、10× Loading Buffer、TE 缓冲液、琼脂糖、氯仿、异丙醇、酒精均购自北京百泰克生物技术有限公司; 2× Taq PCR MasterMix 试剂盒、反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix (perfect real time)、荧光定量试剂盒 SYBR Premix Ex Taq II (Tli RnaseH Plus)均购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司; CK、LDH、BUN 和 GLU 检测试剂盒均从南京建成生物工程研究所购买。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 牛舍温湿度及 THI 的测定

试验期间,在舍内距地面1.5 m处悬挂温湿度计,记录试验期间早,中和晚舍内温湿度并算出 THI。温湿度指数(THI)公式为:  $THI = (1.8 \times Td + 32) - (0.55 - 0.55 \times RH) \times (1.8 \times Td - 26)$ <sup>[6]</sup>,其中:Td为舍内温度;RH为舍内相对湿度。以 THI 作为热应激程度的判定标准。

#### 1.3.2 血清指标的测定

试验期间,对45头奶牛进行空腹采血10 mL,常温静止30 min后,2 000~3 000 r/min离心10 min,收集血清检测 LDH、CK、BUN 和 GLU 浓度。

#### 1.3.3 淋巴细胞总 RNA 提取

淋巴细胞中总 RNA 用 Trizol 提取,采用分光光度计法检测总 RNA 浓度,选出 D<sub>260</sub>/D<sub>280</sub> 比值在 1.8~2.0 的总 RNA 样品,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。

#### 1.3.4 反转录

反转录体系 10 μL: 计算出 RNA 加入量  $x(x = 500/\text{总 RNA 浓度})$ , 5× PrimeScript RT Master Mix 2 μL, RNase Free ddH<sub>2</sub>O 补至 10 μL; 反转录 PCR 反应程序: 37 °C 反转录反应 15 min, 85 °C 反转录酶的失活反应 5 s。反应结束后温度降到 4 °C 终止反应, cDNA 产物于 -20 °C 保存。

#### 1.3.5 PCR 扩增

参照 Kumar<sup>[7]</sup>关于牛 HSP70 家族基因 mRNA 表达研究中的引物序列。引物序列见表 1, 委托宝生物工程(大连)有限公司合成引物。

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物大小/bp Product length
<i>HSPA1A</i>	F:TCATCAACGACGGAGACAAGCCTA R:TTCATCTTGGTCAGCACCATCGAG	103
<i>HSPA1B</i>	F:AAGCACAAGAAGGACATTGCACCC R:AAGTGTTAGAAATCCACGCCCTCCT	130
<i>HSPA8</i>	F:CACCACCATGAAGGGCCAATGTTT R:CGGTGATGCAGCAAAGAACCAAGT	133
<i>GAPDH</i>	F:GGGTCATCATCTCTGCACCT R:GGTCATAAGTCCCTCCACGA	218

PCR反应体系 20  $\mu\text{L}$ : cDNA 2  $\mu\text{L}$ , *ExTaq* 酶 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , RNase Free ddH<sub>2</sub>O 5  $\mu\text{L}$ 。PCR扩增条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 59、61、62  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.3.6 实时荧光定量 PCR

进行普通 PCR 扩增检测引物特异性, 后续做实时荧光定量 PCR。实时荧光定量反应体系 20  $\mu\text{L}$ : SYBR<sup>®</sup> Rmix *ExTaq*TM II 10  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , RNase Free ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 59、61、62  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s, 共 40 个循环。

### 1.4 统计分析

所测定数据采用 Excel 整理, 采用 SAS 9.0 统计软件进行方差分析, 并采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  方法计算目的

基因相对表达量。结果以平均值±标准差表示, 以  $P < 0.05$  为差异显著性判断标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同试验期环境温度及 THI 的测定结果

THI 的测定结果见表 2, 在夏季(热应激)试验期, 舍内日平均温度为 25.50  $^{\circ}\text{C}$ , THI 平均为 73.20, 已超过奶牛产生热应激的临界值 72, 因此奶牛处于热应激状态。春季(非应激)试验期, 无论是舍内温度 8  $^{\circ}\text{C}$  和 THI 50.23 都没有达到奶牛产生热应激的临界值, 是奶牛生存与生产适合的时期。冬季(冷应激)试验期间, 舍内日平均温度下降到 -16.65  $^{\circ}\text{C}$ , 远远低于奶牛的适宜泌乳温度 4  $^{\circ}\text{C}$  ~ 21  $^{\circ}\text{C}$ 。由此可知, 不论是炎夏还是寒冬都使奶牛产生应激反应。

表2 不同试验期牛舍温湿度及 THI

Table 2 Environmental temperatures and temperature-humidity index of cowshed during different times

项目 Item	平均值 Average value		
	夏季 Summer	春季 Spring	冬季 Winter
温度/ $^{\circ}\text{C}$	25.50	8.00	-16.65
相对湿度/%	57	40	72
温湿指数	73.20	50.23	—

### 2.2 血液生化指标的测定结果

血清指标的测定结果见表 3。结果显示: 冷热应激期 CK 活性均显著高于非应激期 ( $P < 0.05$ )。

热应激期 LDH 活性显著高于非应激期 ( $P < 0.05$ ), 与非应激期相比冷应激期有所升高的趋势, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 热应激期 GLU 含量显著低于非

应激期( $P < 0.05$ ), BUN 含量略低于非应激期, 差异不显著( $P > 0.05$ ); 冷应激期 GLU 和 BUN 含量均显著高于非应激期( $P < 0.05$ )。

表 3 血清指标的测定结果

Table 3 Determination results of serum indexes

项目 Item	热应激 Heat stress	非应激 Non-stress	冷应激 Cold stress
肌酸激酶/(U/mL) CK	0.46 ± 0.08 a	0.36 ± 0.06 b	0.42 ± 0.05 a
乳酸脱氢酶/(U/L) LDH	1 293.11 ± 83.22 a	1 107.60 ± 80.54 b	1 201.20 ± 68.82 b
葡萄糖/(mmol/L) GLU	4.17 ± 0.21 c	4.73 ± 0.24 b	5.43 ± 0.38 a
尿素氮/(mmol/L) BUN	4.42 ± 0.54 b	4.47 ± 0.49 b	5.18 ± 0.82 a

注:同行数据相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: In the same row, values with same letter superscript mean insignificant difference, those with different letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

### 2.3 牛淋巴细胞中 *HSPA1A*, *HSPA1B* 及 *HSPAB* 基因 mRNA 表达量的测定

#### 2.3.1 总 RNA 质量及 PCR 产物检测结果

提取的三河牛淋巴细胞总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 由图 1 可见较清晰的 28S 和 18S 条带, 较浅的 5S 条带, 无明显降解, 表明 RNA 样品质量可靠。

将 *HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPA8*, *GAPDH* 基因扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 2。可知, 均与预期目的带大小相符的 DNA 条带, 没有非特异条带, 说明扩增成功。

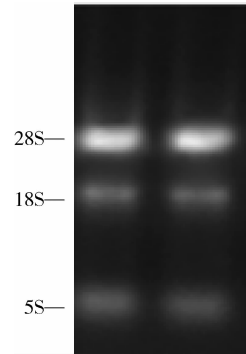
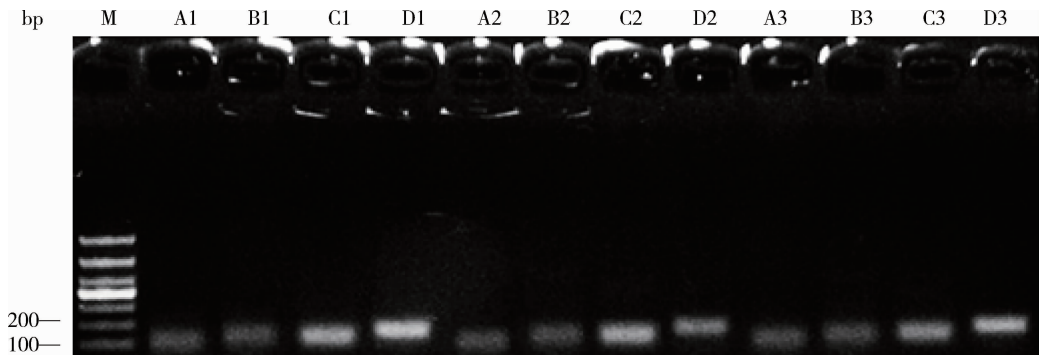


图 1 总 RNA 质量检测

Fig. 1 Total RNA quality testing



M, DNA Marker; A、B、C、D 分别代表 *HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPA8* 和 *GAPDH* 基因; 数字 1、2、3 分别代表热应激、冷应激和无应激期的样品。

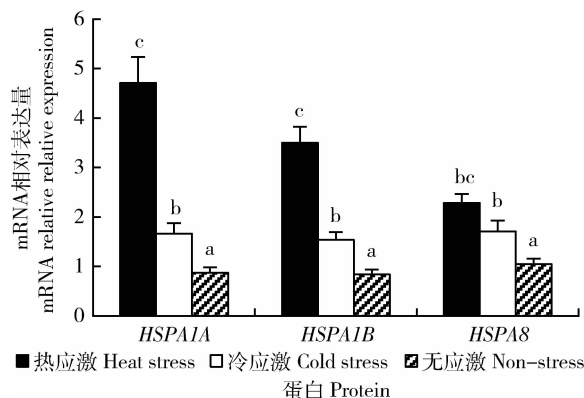
M, 1 000 bp DNA Marker; A, B, C and D are *HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPA8* and *GAPDH*, respectively; 1, 2 and 3 represent summer, winter and spring of samples, respectively.

图 2 PCR 产物琼脂糖电泳

Fig. 2 PCR results

### 2.3.2 HSPA1A、HSPA1B 和 HSAPA8 基因 mRNA 相对表达量测定结果

由图 3 可知,三河牛淋巴细胞中 HSPA1A、HSPA1B 和 HSAPA8 基因 mRNA 相对表达量在冷热应激期均显著高于非应激期( $P < 0.05$ )。



相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Values with same letter mean insignificant difference, while with different letter mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 3 淋巴细胞中目的基因 mRNA 的相对表达水平

Fig. 3 Expression of target gene mRNA in lymphocytes

## 3 讨论

1) 根据低温和高温持续的时间长短可以把冷热应激分为慢性冷热应激和急性冷热应激。慢性冷热应激是指机体在寒冷和高温环境中暴露的时间至少为几小时或长达几周。此时,动物机体血液生化指标发生特异性变化维持自身体温的恒定。因此,本研究中冷热应激属于慢性冷热应激。

血液生化指标可反映动物冷热应激时机体内物质代谢,并改变一些组织器官机能的状态。动物处于应激状态下,机体启动一系列非特异性的自身免疫反应中和应激的影响,导致某些血液生化指标的变化。当动物引起组织损伤时,组织内酶会透过细胞膜进入血液,CK 和 LDH 可作为诊断应激的指标<sup>[8]</sup>。CK 主要存在于骨骼肌和心肌的类细胞内酶,是一种器官特异性酶,其含量的增加反映出应激对某些组织细胞的损伤和受损伤的程度。蔡明成<sup>[9]</sup>研究发现,热应激肉牛血清中 CK 活性相比非热应激升高;包晶莹等<sup>[10]</sup>研究大鼠血清中 CK 活性的变化发现,随着冷应激时间的增加 CK 活性显著升高。本研究结果与上述研究结果一致。表明,冷热应激均对 CK 活性影响较大,使牛骨骼肌和心肌细胞受

到一定程度的损伤。机体一些组织器官病变可改变其组织器官本身的 LDH 活性,使血液中 LDH 活性改变,机体的能量代谢受影响,使糖代谢途径从产生大量能量的有氧氧化向无氧酵解方向转变。Hocking 等<sup>[11]</sup>研究发现,高温热环境处理会使动物 LDH 活性显著升高。吕晓伟<sup>[12]</sup>研究发现,泌乳中期奶牛血清 LDH 活性冷应激期相比非应激期有所升高趋势,但差异不显著。本研究结果与上述研究结果一致。表明,热应激使细胞膜通透性和能量代谢的无氧酵解过程明显增强,引起血液中 LDH 活性的升高。

2) 血清代谢产物可反映机体代谢变化,评定组织生理功能较为敏感的指标。热应激时,肾上腺交感神经兴奋,使肾上腺素分泌增强,导致 GLU 含量升高,随着热应激时间的延长,糖异生作用加强,保持血液 GLU 恒定<sup>[13]</sup>。王金涛等<sup>[14]</sup>研究显示,慢性冷应激时雏鸡 GLU 含量明显升高。Scharf 等<sup>[15]</sup>研究表明,与非应激期相比急性热应激时肉牛血清中 GLU 升高,慢性热应激时降低。目前,冷热应激对 GLU 含量的改变有多种报道。然而本研究发现,血清中 GLU 含量热应激期相比非应激期显著降低,冷应激期相比非应激期显著升高。这与上述研究结果不一致,可能与动物品种、应激作用强度和持续时间有关,但应激能引起包含血糖在内的 3 大营养物质含量的改变是肯定的。血清中 BUN 含量直接反映了动物机体蛋白质的代谢变化,蛋白质代谢良好时,其含量较低。BUN 主要经肾小球滤过而随尿排出,肾功能受损时导致血液中 BUN 含量升高。宋小珍等<sup>[16]</sup>研究发现,随热应激时间的延长,肉牛血清中 BUN 含量降低,这与本研究结果一致。梁鸿雁等<sup>[17]</sup>研究发现,冷应激时奶牛乳清中 BUN 含量升高。本研究发现,冷应激期血清中 BUN 含量显著高于非应激期。表明,冷应激使糖和脂肪代谢降低,蛋白质和氨基酸分解代谢增强产生大量尿素,使血清中 BUN 含量增加。

3) 应激中 HSP70 基因的高表达,不仅反映机体适应性和保护机制的发挥作用,并且说明应激可能造成了细胞功能的受损。因此,检测 HSP70 mRNA 表达量能作为判定组织细胞处于危急状态的一个重要生物学指标。有研究发现,结构型热休克蛋白 70(HSPA8)在所有应激源刺激下均表现为相同的表达,而诱导型热休克蛋白 70(HSPA1A)则极易被应激源诱导而增多<sup>[3]</sup>。HSP70-2(HSPA1B)

基因仅在诱导时表达<sup>[18]</sup>。有研究报道称,正常细胞应激蛋白表达量很低,但在细胞发生应激反应时,应激蛋白(特别是 *HSP70*)在细胞内的浓度增加<sup>[19]</sup>。刘延鑫等<sup>[20]</sup>研究发现,随着温湿度指数升高,*HSP70* mRNA 表达量增加,高温期奶牛血液淋巴细胞中 *HSP70* mRNA 表达相比适温期极显著升高,并与奶牛的耐热相关指标有一定的遗传相关。Kumar 等<sup>[7]</sup>研究发现,瘤牛淋巴细胞中 *HSPA1A*, *HSPA1B* 和 *HSPA8* mRNA 表达量冬夏季相比春季显著升高。Shim 等<sup>[21]</sup>研究发现,小鼠在寒冷刺激下多种组织检测到 *HSP70* 表达量增加。杨莉等<sup>[22]</sup>在湖羊上研究发现,冷应激时各组织中 *HSP70* mRNA 表达均呈上升趋势。本研究发现,冷热应激使三河牛淋巴细胞中 *HSPA1A*, *HSPA1B* 和 *HSPA8* mRNA 表达均呈上升趋势。这与上述研究结果一致,说明 *HSP70* 表达量的增加,一方面使动物机体的自我保护机能提高,另一方面提高对外界不良刺激的抵抗力。应激的强度和持续时间均影响其血液生化指标及相关基因表达量,因此可选取更有代表性的指标进行进一步的探究,探讨冷热应激损伤机体反应机制,为三河牛抗冷热应激提供更全面、更科学的理论依据。

## 4 结 论

1)慢性冷热应激均一定程度上影响三河牛血清中酶活性和营养代谢相关的生化指标,从而使奶牛免疫功能下降,代谢机能紊乱以及产生多种疾病,这已严重影响到畜牧业养殖。

2)慢性冷热应激期相比非应激期,三河牛淋巴细胞中 *HSP70* 家族基因(*HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPA8*)mRNA 表达量均呈上升趋势,表现为一定程度上对机体的保护作用。

## 参考文献 References

[1] 李玮,刘蕤,马尧,李金龙,吴宏军,刘爱荣,俞英,徐青,王雅春. 重度冷应激对三河牛血液生化指标及相关基因表达的影响[J]. 畜牧兽医学报,2015,46(8):1463-1470  
Li W, Liu R, Ma Y, Li J L, Wu H J, Liu A R, Shu Y, Xu Q, Wang Y C. Effects of severe cold stress on blood biochemical parameters and related gene expression in Sanhe cattle[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(8):1463-1470 (in Chinese)

[2] 刘晓丹. 肉鸡冷应激相关基因的表达谱分析及差异表达基因的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2012

Liu X D. Analysis of mRNA expression profile of cold stress gene in broilers and study of differential expression genes[D]. Haerbin: Northeast Agricultural University, 2012 (in Chinese)

[3] Collier R J, Collier J, Rhoads R P, Baumgard L H. Invited review: Genes involved in the bovine heat stress response[J]. *Journal of Dairy Sciences*, 2008, 91(2):445-454

[4] Bruemmer-Smith S, Stüber F, Schroeder S. Protective function of intracellular heat-shock protein (*HSP*) 70-expression in patients with severe sepsis[J]. *Intensive Care Medicine*, 2001, 27(12):1835-1841

[5] Behla R, Behla J, Sadana D K, Vijn R K, Tantia M S, Joshi B K. Characterization of *HSP70* gene promoter for cis-acting elements in Indian Zebu cattle of Harijana breed[J]. *Animal Biotechnology*, 2014, 25(3):160-164

[6] Ravagnolo O, Misztal I, Hoogenboom G. Genetic component of heat stress in dairy cattle, development of heat index function [J]. *Journal of Dairy Science*, 2000, 83(9):2120-2125

[7] Kumar A, Ashraf S, Goud, T S, Grewal A, Singh S V, Yadav B R, Upadhyay R C. Expression profiling of major heat shock protein genes during different seasons in cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) under tropical climatic condition [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2015(51):55-64

[8] 杨小娇,许静,宗凯,张黎莉,刘国庆. 不同温度热应激对肉鸡血液生化指标及肉品质的影响[J]. 家禽科学, 2011(3):10-14  
Yang X J, Xu J, Zong K, Zhang L L, Liu G Q. Effect of acute heat stress on blood biochemical parameters and meat quality of broiler[J]. *Poultry Science*, 2011(3):10-14 (in Chinese)

[9] 蔡明成. 热应激对肉牛生理生化指标及外周血 microRNA 表达水平的影响[D]. 重庆:西南大学,2014  
Cai M C. Effects of heat stress on physiological and biochemical indexes and expression levels of microRNA in peripheral blood [D]. Chongqing: Xinan University, 2014 (in Chinese)

[10] 包晶莹,林飞燕,王一龙,黄卡特,朱加银,林婷婷,吴军,方周溪,吴步猛. 冷拘束应激对大鼠心脏和肝脏 *HSP70* 表达及血清中 CK、ALT 含量的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(7):36-39  
Bao J Y, Lin F Y, Wang Y L, Huang K T, Zhu J Y, Lin T T, Wu J, Fang Z X, Wu B M. The effect of cold restraint stress on the expression of heat shock protein in heart and liver and the levels of CK, ALT from serum in rats[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2010, 20(7):36-39 (in Chinese)

[11] Hocking P M, Marwell M H, Mitchell M A. Hematology and blood composition at two ambient temperatures in genetically fat and lean adult broiler breeder females fed ad libitum or throughout life[J]. *British Poultry Science*, 1994, 35:799-807

[12] 吕晓伟. 慢性冷热应激对荷斯坦奶牛血清酶活力、内分泌激素水平及维持行为的影响[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2006  
Lv X W. The influences of chronic cold and heat stress on activity of enzyme, endocrine hormones and behavior in Holstein cow [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agriculture

- University, 2006 (in Chinese)
- [13] 唐丽. 热应激对肉种母鸡繁殖性能、相关生理生化及分子指标的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013  
Tang L. Effects of heat stress on reproductive performance, related physiological-biochemical and molecular indicators in broiler breeder hens [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013 (in Chinese)
- [14] 王金涛, 张校军, 徐世文. 冷应激对雏鸡能量代谢的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2009, 25(2): 172-176  
Wang J T, Zhang X J, Xu S W. Effects of cold stress on energy metabolism in the chicken [J]. *The Chinese Journal of Applied Physiology*, 2009, 25(2): 172-176 (in Chinese)
- [15] Scharf B A, Carroll J A, Riley D G, Chase C C, Coleman S, Keisler D. Evaluation of physiological and blood serum differences in heat tolerant (Romosinuano) and heat-susceptible (Angus) *Bos Taurus* cattle during controlled heat challenge [J]. *Journal of Animal Science*, 2010, 88(7): 2321-2336
- [16] 宋小珍, 付戴波, 瞿明仁, 杨食堂, 刘道杨, 徐振松. 热应激对肉牛血清内分泌激素含量、抗氧化酶活性及生理生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2012, 24(12): 2485-2490  
Song X Z, Fu D B, Qu M R, Yang S T, Liu D Y, Xu Z S. Effects of heat stress on endocrine hormone content, antioxidant enzyme activity and physiological and serum biochemical indices of beef cattle [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(12): 2485-2490 (in Chinese)
- [17] 梁鸿雁, 贾永全, 苗树君, 黄大鹏, 韩华. 慢性冷应激对奶牛乳清生化指标及酶活性的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(5): 45-47  
Liang H Y, Jia Y Q, Miao S J, Huang D P, Han H. Effect of chronic cold stress on biochemical indicators and enzyme in whey in Holstein lactating cows [J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2011, 38(5): 45-47 (in Chinese)
- [18] Milner C M, Campbell R D. Polymorphic analysis of the three MHC-linked *HSP70* genes [J]. *Immunogenetics*, 1992, 36(6): 357-362
- [19] 王玮. 冷应激对家猪、野猪 *HSP70*、*GR* mRNA 表达量的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2007  
Wang W. Effect of cold stress on expression level of *Heat Shock Protein 70* glucocorticoid receptor mRNA in swine and *Sus scrofa* [D]. Changchun: Jilin University, 2007 (in Chinese)
- [20] 刘延鑫, 李大齐, 崔群维, 史红霞, 王根林. 奶牛 *HSP70* 基因表达及其连锁微卫星标记与耐热性状的相关性[J]. 遗传, 2010, 32(9): 935-941  
Liu Y X, Li D Q, Cui Q W, Shi H X, Wang G L. Analysis of *HSP70* mRNA level and association between linked microsatellite loci and heat tolerance traits in dairy cows [J]. *Hereditas*, 2010, 32(9): 935-941 (in Chinese)
- [21] Shim S B, Lee S H, Kim C K, Kim B G, Kim Y K, Jee S W, Sin J S, Bae C J, Lee B C, Jang M K, Cho J S, Chae K R, Hwang D Y. The effects of long-duration, low-temperature ground transportation on physiological and biochemical indicators of stress in mice [J]. *Laboratory Animals*, 2008, 37(3): 121-126
- [22] 杨莉, 张莉, 齐亚银, 沈文, 李岩, 张鲁安. 冷应激对湖羊血清因子及热休克蛋白 70 mRNA 表达的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(4): 890-895  
Yang L, Zhang L, Qi Y Y, Shen W, Li Y, Zhang L A. Effect of cold stress on serum factor and *HSP70* mRNA in Hu sheep [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2015, 42(4): 890-895 (in Chinese)

责任编辑: 苏燕