

复方益母生化散对奶牛子宫内膜细胞 CYP450 表达和免疫功能的影响

杜金梁, 秦建华, 褚景生, 徐丽娜, 马玉忠

(河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071001)

摘要: 【目的】探讨复方益母生化散对奶牛子宫内膜炎的作用机理。【方法】体外实验: 分离奶牛子宫内膜细胞, 细菌脂多糖 (LPS) 诱导子宫内膜细胞炎症模型, 复方益母生化散处理子宫内膜炎症细胞 48 h、72 h, Western blotting 法检测 CYP450 的表达; 体内实验: 复方益母生化散栓剂治疗患有子宫内膜炎的奶牛, 检测血清中 IgG、IgA 含量的变化。【结果】复方益母生化散处理后, 子宫内膜炎症细胞 CYP450 的表达随复方益母生化散剂量的增加而呈升高的趋势, 血清中 IgG、IgA 的含量与对照组相比明显升高。【结论】2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的复方益母生化散作用奶牛子宫内膜炎症细胞 48 h, CYP450 的表达最明显。

关键词: 奶牛; 子宫内膜细胞; CYP450; 复方益母生化散; 免疫功能

Effects of Yimu Shenghuasan on Cytochrome P450 of Endometrial Cells and Immune Function in Dairy Cows

DU Jin-liang, QIN Jian-hua, CHU Jing-sheng, XU Li-na, MA Yu-zhong

(College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei)

Abstract: 【Objective】The aim of the study is to investigate the acting mechanism of Yimu Shenghuasan on dairy cow endometrial cells. 【Method】*In vitro* experiment, the primary cultured endometrial cells in cows were isolated and the inflammatory models were made by lipopolysaccharide (LPS) induction. The inflammatory cells were treated with gradient concentrations of herbal medicine prescription Yimu Shenghuasan for 48h and 72h, then the Western blot was used to detect the expression of CYP450. *In vivo* experiment, the suppository Yimu Shenghuasan was put into the endometritis dairy cows to detect the content of IgG and IgA in sera. 【Results】The expression of cytochrome P450 in dairy cow endometrial cells increased gradually by Western blot; compared with the control group, the content of IgG, IgA increased significantly; 【Conclusion】CYP450 in the inflammatory cells expressed significantly by treatment of 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Yimu Shenghuasan for 48h.

Key words: dairy cow; endometrial cell; CYP450; Yimu Shenghuasan; immune function

0 引言

【研究意义】子宫内膜炎^[1-4]是奶牛常发病, 可造成巨大损失。在兽医临床上, 对奶牛子宫内膜炎的治疗普遍采用抗生素和激素, 这样可造成细菌的耐药性增加, 动物机体免疫力下降, 并导致肉、奶的药物残留, 严重危害着人们的健康。因此, 研制开发高效、稳定、安全, 使用方便的中成药, 是当前广大兽医科

技工作者所面临的问题。【前人研究进展】治疗该病的方法很多, 如抗生素法、激素疗法、生物学疗法等^[5-6], 但这些方法存在着很多问题。运用中药治疗奶牛子宫内膜炎在中国有着悠久的历史, 并积累了丰富的经验, 形成了许多经典的方剂^[7], 取得了不错的治疗效果。【本研究切入点】本研究通过体内和体外试验两方面来探讨复方益母生化散的作用机理, 体外试验主要从细胞及分子生物学方面, 而体内试验主要从

收稿日期: 2009-08-24; 接受日期: 2009-12-23

基金项目: 国家科技支撑计划“华北农区奶牛疾病综合技术的应用与示范”(2006BAD04A10-4)

作者简介: 杜金梁, 硕士研究生。Tel: 0312-7528443; E-mail: xiaoduhaoabcd@163.com. 通信作者马玉忠, 教授, 博士。Tel: 0312-7528446; E-mail: dkma@hebau.edu.cn

免疫功能方面。【拟解决的关键问题】成功地分离和培养奶牛的原代子宫内膜细胞, 运用 Western blotting 等分子生物学的手段, 来探索复方益母生化散对奶牛子宫内膜炎的作用机理, 为临床合理用药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

LPS (Sigma), DMEM/F-12 (Invitrogen), FBS (杭州四季青), 预染蛋白 Marker III (北京天根生物技术公司), CYP450 抗体 (ADL), 碱磷酶标记 IgG (北京中杉金桥公司), NBT、BCIP (Amresco), IgG、IgA (上海蓝基生物科技有限公司)。

1.2 试验动物及分组

10 头健康奶牛作为正常对照; 患子宫内膜炎奶牛 20 头, 其中 10 头用复方益母生化散栓剂进行治疗, 另外 10 头不做任何处理。分别于用药后 1、3、5、7 d 采集奶牛颈静脉血, 分离血清, 4℃ 保存备用。

1.3 奶牛子宫内膜细胞的分离和培养

无菌采取奶牛子宫, D-Hank's 液漂洗。刮取子宫内膜, 加入 I 型胶原酶, 37℃ 水浴消化。过滤液 1 200 r/min 离心 10 min, Hank's 液洗 3 次。弃上清, 加入含 15% FBS 的 DMEM/F-12 制成细胞悬液, 台盼蓝法检测细胞活率, 接种于培养瓶中, 37℃、5% CO₂ 条件下培养。

1.4 奶牛子宫内膜细胞炎症模型实验

不同浓度 LPS 处理奶牛子宫内膜细胞, 37℃、5% CO₂ 培养 48 h, 然后加入 5 mg·mL⁻¹ MTT 20 μL 孵育 6 h。吸去培养液, 加入 DMSO 100 μL, 震荡 5 min, 酶标仪测定吸光度, 确定 LPS 的最佳浓度。根据确定的 LPS 浓度, 作用子宫内膜细胞 24—72 h, 双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测细胞培养液中 IL-1β、TNF-α 的浓度。

1.5 复方益母生化散处理奶牛子宫内膜炎症细胞

将复方益母生化散 (金银花、连翘、蒲公英、紫花地丁各 5 g, 益母草 6 g, 当归、川芎、熟地、草红花、甘草各 3 g) 浸泡 1 h, 粗提取, 浓缩成含生药 4 g·mL⁻¹ 的溶液, 真空冷冻干燥成粉状。相同方法处理金银花、甘草、当归、益母草。将复方益母生化散粉及金银花、甘草、当归、益母草粉分别溶解于 DMEM/F-12 培养基中, 0.22 μm 微型过滤器过滤除菌后, 处理奶牛子宫内膜炎症细胞 48、72 h, 收集细胞蛋白并定量。

1.6 Western blotting 法检测 CYP450 的表达

蛋白变性, 12% SDS-PAGE 电泳, 转膜, 5% 脱脂奶封闭, 加 CYP450 一抗, TBST 洗膜, 碱磷酶标记 IgG 二抗, TBST 洗膜, NBT/BCIP 显色。

2 结果

2.1 奶牛子宫内膜细胞的形态特征

所获得的奶牛子宫内膜细胞生长良好, 存活率在 95% 左右。镜下观察, 72 h 内多数细胞成圆球状, 120 h 时细胞铺满, 腺体细胞呈铺路石状 (图 1), 基质细胞呈梭形。

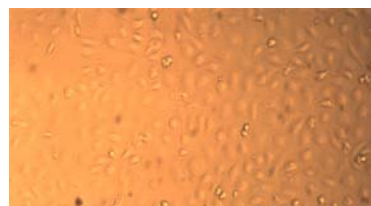


图 1 奶牛子宫内膜细胞 (120 h, ×250)

Fig. 1 Endometrial cells in dairy cow (120 h, ×250)

2.2 LPS 剂量的筛选

由表 1 可知, 100 ng·mL⁻¹ LPS 开始对细胞有抑制作用, 最接近 IR ≤ 10 的浓度。

表 1 LPS 对正常子宫内膜细胞生长的抑制作用 (n=6)

Table 1 The inhibitory effect of LPS on growth of normal endometrial cells

浓度 Concentration (ng·mL ⁻¹)	吸光度值 Absorbance value	抑制率 Inhibition (%)
空白对照组 Control group	0.1704±0.0067	0
1	0.1706±0.0035	0
10	0.1658±0.0051	2.6
50	0.1622±0.0024	4.8
100	0.1526±0.0059 [#]	10.4
200	0.1356±0.0062 [▲]	20.4
500	0.1282±0.0056 [▲]	24.8

与空白对照组相比较, [#]P<0.05, [▲]P<0.01

Compare with control group, [#]P<0.05, [▲]P<0.01

2.3 炎症模型试验

由表 2 可知, 空白对照组在培养期间 IL-1β、TNF-α 的分泌很低; 但是在 LPS 组, 随着 LPS 诱导时间的延长, 这两种细胞因子的分泌呈上升趋势。经统计学分析显示, 48 h 和 72 h 模型组 IL-1β、TNF-α 的含量明显高于同时段空白对照组 (P<0.01); 同时 LPS 组

表 2 LPS 对奶牛子宫内膜细胞 TNF- α 和 IL-1 β 含量的影响 (n=6)

Table 2 Effect of LPS on the contents of TNF- α and IL-1 β in endometrial cells of dairy cow

时间 Time (h)	TNF- α		IL-1 β	
	空白对照组 Control group	LPS 组 LPS group	空白对照组 Control group	LPS 组 LPS group
24	21.96 \pm 4.70	22.63 \pm 2.29	21.08 \pm 6.52	35.78 \pm 7.18
48	22.16 \pm 4.43	41.44 \pm 8.74 [#]	21.54 \pm 5.21	90.17 \pm 8.38 [▲]
72	20.20 \pm 3.89	63.18 \pm 6.08 [#]	23.16 \pm 8.56	136.77 \pm 9.13 [▲]

与空白对照组相比较, [#] $P < 0.05$, [▲] $P < 0.01$ Compare with control group, [#] $P < 0.05$, [▲] $P < 0.01$

72 h 时间段 IL-1 β 、TNF- α 的含量明显高于 48 h 时间段 ($P < 0.01$)。

2.4 复方益母生化散对奶牛子宫内膜细胞 CYP450 表达的影响

不同浓度的复方益母生化散处理奶牛子宫内膜炎症细胞后, 48 h 时 CYP450 的表达随复方益母生化散剂量的增加而呈升高的趋势, 但当药物浓度达到 5 000

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的时候 CYP450 的表达呈降低趋势, 10 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 CYP450 的表达消失; 72 h 时, CYP450 的表达开始升高, 不久后呈下降的趋势。2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的复方益母生化散作用 48 h 效果最佳。

2.5 甘草对奶牛子宫内膜细胞 CYP450 表达的影响

甘草处理奶牛子宫内膜炎症细胞 48 h、72 h, CYP450 的表达无变化。但 72 h 时, 10 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

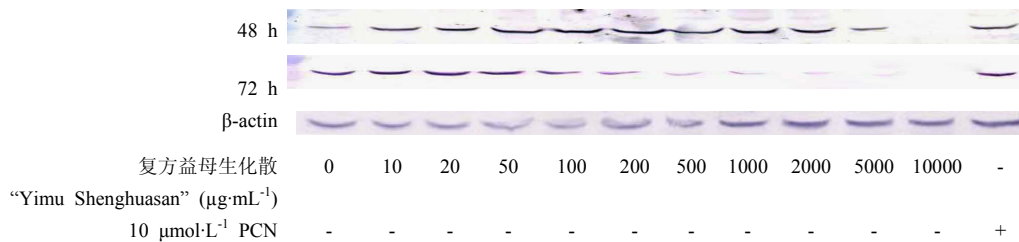


图 2 复方益母生化散对奶牛子宫内膜细胞 CYP450 的诱导作用

Fig. 2 CYP 450 expression in endometrial cells of dairy cow induced by Yimu Shenghuasan

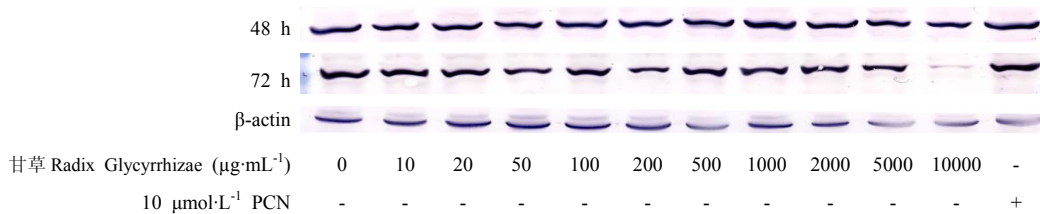


图 3 甘草对奶牛子宫内膜细胞 CYP450 的诱导作用

Fig. 3 CYP 450 expression in endometrial cells of dairy cow induced by Radix Glycyrrhizae

甘草时 CYP450 的表达减弱。

2.6 当归对奶牛子宫内膜细胞 CYP450 表达的影响

当归处理奶牛子宫内膜炎症细胞后, 随着药物浓度的增加和作用时间的延长, CYP450 的表达呈降低趋势。

2.7 益母草对奶牛子宫内膜细胞 CYP450 表达的影响

不同浓度的益母草处理奶牛子宫内膜炎症细胞后, 随药物浓度的增加, CYP450 的表达增强。在相

同的浓度梯度下, 作用时间越长, CYP450 的诱导效果越明显。

2.8 金银花对奶牛子宫内膜细胞 CYP450 表达的影响

不同浓度的金银花处理奶牛子宫内膜炎症细胞后, 随浓度的增加, CYP450 的表达增强。在相同的浓度梯度下, 作用时间越长, CYP450 的诱导效果越明显。但 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 金银花作用细胞 72 h, CYP450 的表达减弱。

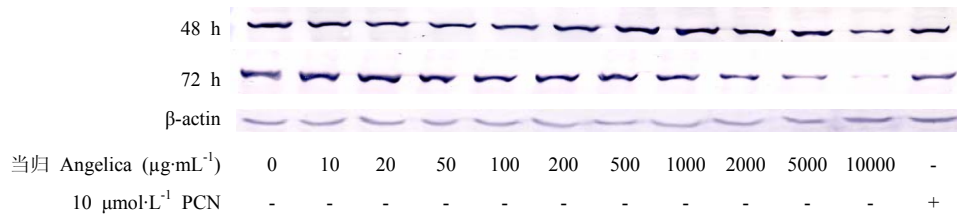


图 4 当归对奶牛子宫内膜细胞 CYP450 的诱导作用

Fig. 4 CYP 450 expression in endometrial cells of dairy cow induced by Angelica

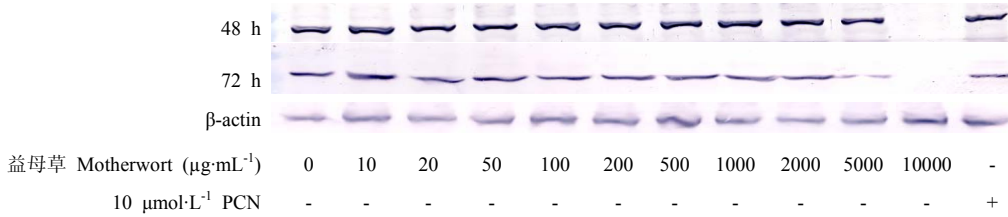


图 5 益母草对奶牛子宫内膜细胞 CYP450 的诱导作用

Fig. 5 CYP 450 expression in endometrial cells of dairy cow induced by Motherwort

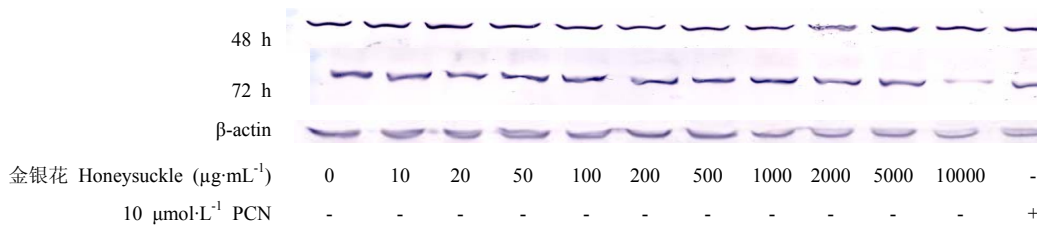


图 6 金银花对奶牛子宫内膜细胞 CYP450 的诱导作用

Fig. 6 CYP 450 expression in endometrial cells of dairy cow induced by Honeysuckle

2.9 免疫球蛋白 IgG 含量的测定

由表 3 可以看出，用药前，患子宫内膜炎奶牛血清中 IgG 含量略高于正常对照组。用药后，用药组奶牛血清中 IgG 含量明显升高 ($P < 0.01$)，差异极显著；而未用药组无明显变化。表明复方益母生化散能明显提高子宫内膜炎奶牛血清中 IgG 含量，增强机体免疫

力。

2.10 免疫球蛋白 IgA 含量的测定

由表 4 可以看出，用药前，子宫内膜炎奶牛血清中 IgA 含量略高于正常对照组。用药后，用药组奶牛血清中 IgA 含量明显升高 ($P < 0.01$)，差异极显著；而未用药组无明显变化。

表 3 复方益母生化散对子宫内膜炎奶牛血清中 IgG 的影响 (n=10)

Table 3 Effects of herbal medicine prescription Yimu Shenghuasan on the content of IgG in endometritis dairy cows ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

组别 Group	治疗天数 Treatment days (d)			
	0	3	5	7
用药组 Medication group	6.4563±0.3241	9.2362±0.4119A	9.6987±0.3471A	10.1861±0.5601A
未用药组 Untreated group	6.4687±0.4582	6.3468±0.3389	6.2865±0.3962	6.4964±0.4015
正常对照组 Control group	5.7912±0.5231	5.8243±0.3438B	5.8454±0.2961B	5.9243±0.3565B

同列内不同大写字母表示各组间差异极显著 ($P < 0.01$)

Values in the same column with different letters mean significant difference ($P < 0.01$)

表 4 复方益母生化散对子宫内膜炎奶牛血清中 IgA 的影响 (n=10)

Table 4 Effects of herbal medicine prescription Yimu Shenghuasan on the content of IgA in dairy cows with endometritis ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

组别 Group	治疗天数 Treatment days (d)			
	0	3	5	7
用药组 Medication group	0.7247±0.0423	1.2346±0.2789A	1.5789±0.3721A	2.0034±0.3461A
未用药组 Untreated group	0.7512±0.0631	0.7986±0.0829	0.7435±0.0286	0.8203±0.0231
正常对照组 Control group	0.6652±0.0216	0.6200±0.0332B	0.6531±0.0255B	0.6251±0.0200B

同列内不同大写字母表示各组间差异极显著 ($P<0.01$)

Values in the same column with different letters mean significant difference ($P<0.01$)

3 讨论

3.1 LPS 诱导奶牛子宫内膜细胞炎症模型

LPS 能诱导子宫内膜的上皮细胞、间质细胞等的炎症^[8-9]。笔者用 LPS 诱导奶牛子宫内膜细胞的炎症,以便研究奶牛子宫内膜炎的发病机理。选取 IL-1 β 、TNF- α 这两个经典的急性炎症早期细胞因子作为衡量模型成功与否的标准。结果表明,在 100 ng·mL⁻¹ 浓度时,细胞正常生长,48、72 h 两时段的 TNF- α 、IL-1 β 含量明显高于正常对照组 ($P<0.01$),且 TNF- α 、IL-1 β 的分泌在 72 h 内与时间成正比。通过以上结果,该子宫内膜细胞炎症模型成功制备。本模型的建立为奶牛子宫内膜炎的治疗^[10-11]和相关药物疗效的评价奠定了基础。

3.2 复方益母生化散对奶牛子宫内膜细胞 CYP450 的影响

目前,治疗奶牛子宫内膜炎的药物很多^[12-15],但效果不够理想,且用分子生物学的方法来研究药物作用的机制还较少。运用细胞色素 CYP450 酶筛选和开发研究新药已在国内外广泛应用^[16-20]。采用这一方法,一方面可在新药开发研究的早期预测候选药物在体内的药理学特性及其可能产生的代谢物和潜在毒性;另一方面亦可预知在体外有效的药物在体内是否同样有效^[21]。并根据体外的疗效和毒性的筛选结果,对候选药物进行初步的综合评价,以缩小筛选范围,设计和开发出更为安全有效的药物,达到减少开支,缩短开发周期的目的。

本试验用不同浓度的复方益母生化散处理奶牛子宫内膜炎症细胞后,来研究与药物代谢相关的细胞色素酶 CYP450 的表达水平。结果发现,子宫内膜细胞 CYP450 的表达随复方益母生化散剂量的增加而呈升高的趋势。药物作用 48 h 时,以 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为最佳剂量。以上结果表明,复方益母生化散对于治疗奶牛

子宫内膜炎有较好的治疗效果,但随药物的剂量进一步加大,作用时间进一步延长,CYP450 的表达呈减弱的趋势。这说明药物的浓度过大时,可引起子宫内膜细胞的严重损伤乃至死亡,因而造成 CYP450 的表达减弱或消失。

在研究中发现一个有趣的问题,将这一组方中的各单体药物甘草、当归、益母草、金银花分别作用于奶牛子宫内膜炎症细胞,发现它们对 CYP450 的诱导作用各异,有的诱导作用甚至相反。

3.3 复方益母生化散对血清中 IgG、IgA 含量影响的研究

子宫分泌物中存在免疫球蛋白 (Ig) 的所有主要亚型^[22-23]。IgA 结合病原体,以预防病原体粘附到子宫黏膜表面; IgG 可调理和激活补体,补体又可借助于肥大细胞脱颗粒和嗜酸性粒细胞激活所诱导的血清渗出到达子宫腔,以参与子宫腔内的免疫反应。

有关研究表明,中草药可提高机体的抗体水平和免疫力。如淫羊藿可提高羊红细胞免疫小鼠血清溶血素水平,增加抗体生产细胞数量及对抗环磷酸胺抑制抗体的生成^[24]。段纲等^[25]报道,中草药添加剂能够显著增加土杂鸡 IgG 水平。

从本试验来看,通过复方益母生化散的处理,从第 3 天开始,治疗组奶牛血清中 IgG、IgA 含量显著升高,表明复方益母生化散能够增加血清中免疫球蛋白含量,增强机体的体液免疫功能,从而提高机体的抗病能力。

4 结论

本试验成功地分离了奶牛子宫内膜细胞,并建立了奶牛子宫内膜细胞炎症模型。通过将复方益母生化散作用于炎症细胞和奶牛机体,发现复方益母生化散对于增强奶牛的免疫功能有很好的效果。这一结果为治疗奶牛子宫内膜炎奠定了基础。

References

- [1] Wathes D C, Cheng Z, Chowdhury W, Fenwick M A, Fitzpatrick R, Morris D G, Patton J, Murphy J J. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiological Genomics*, 2009, 39(1): 1-13.
- [2] Herath S, Lilly S T, Santos N R, Gilbert R O, Goetze L, Bryant C E, White J O, Cronin J, Sheldon I M. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2009, 7: 55.
- [3] Donofrio G, Ravanetti L, Cavarani S, Herath S, Capocéfalo A, Sheldon I M. Bacterial infection of endometrial stromal cells influences bovine herpesvirus 4 immediate early gene activation: a new insight into bacterial and viral interaction for uterine disease. *Reproduction*, 2008, 136(3): 361-366.
- [4] Lee J I, Kim I H. Pregnancy loss in dairy cows: the contributing factors, the effects on reproductive performance and the economic impact. *Journal of Veterinary Science*, 2007, 8(3): 283-288.
- [5] 王东升, 梁纪兰, 严作廷, 李世宏, 谢家声. 防治奶牛子宫内膜炎中药制剂的研究进展. *安徽农业科学*, 2008, 36(25): 10881-10883.
Wang D S, Liang J L, Yan Z T, Li S H, Xie J S. Advance of Chinese medicine preparation for prevention and cure of dairy cow endometritis. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(25): 10881-10883. (in Chinese)
- [6] 贾杏林, 齐长明. 奶牛子宫内膜炎研究进展. *中国兽医杂志*, 2005, 41(2): 34-36.
Jia X L, Qi C M. Advance of dairy cow endometritis. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2005, 41(2): 34-36. (in Chinese)
- [7] 李星艳, 谷新利. 中草药治疗奶牛子宫内膜炎的研究进展. *畜牧兽医学杂志*, 2008, 27(4): 38-40.
Li X Y, Gu X L. Progress of treatment of traditional Chinese herb on dairy cows with endometritis. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2008, 27(4): 38-40. (in Chinese)
- [8] Leung S T, Cheng Z, Sheldrick E L, Derecka K, Derecka K, Flint A P, Wathes D C. The effects of lipopolysaccharide and interleukins-1 alpha, -2 and -6 on oxytocin receptor expression and prostaglandin production in bovine endometrium. *Journal of Endocrinology*, 2001, 168(3): 497-508.
- [9] Rozeboom K J, Rocha-Chavez G, Troedsson M H. Inhibition of neutrophil chemotaxis by pig seminal plasma in vitro: a potential method for modulating post-breeding inflammation in sows. *Reproduction*, 2001, 121(4): 567-572.
- [10] Walsh R B, Kelton D F, Duffield T F, Leslie K E, Walton J S, LeBlanc S J. Prevalence and risk factors for postpartum anovulatory condition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(1): 315-324.
- [11] Walsh R B, LeBlanc S J, Vernoooy E, Leslie K E. Safety of a progesterone-releasing intravaginal device as assessed from vaginal mucosal integrity and indicators of systemic inflammation in postpartum dairy cows. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2008, 72(1): 43-49.
- [12] Rutigliano H M, Lima F S, Cerri R L, Greco L F, Vilela J M, Magalhães V, Silvestre F T, Thatcher W W, Santos J E. Effects of method of presynchronization and source of selenium on uterine health and reproduction in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91(9): 3323-3336.
- [13] Drillich M, Voigt D, Forderung D, Heuwieser W. Treatment of acute puerperal metritis with flunixin meglumine in addition to antibiotic treatment. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(8): 3758-3763.
- [14] Pol M, Ruegg P L. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(1): 249-261.
- [15] LeBlanc S J, Lissemore K D, Kelton D F, Duffield T F, Leslie K E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(4): 1267-1279.
- [16] Ma Y, Sachdeva K, Liu J, Song X, Li Y, Yang D, Deng R, Chichester C O, Yan B. Clofibrate and perfluorodecanoate both upregulate the expression of the pregnane X receptor but oppositely affect its ligand-dependent induction on cytochrome P450A23. *Biochemical Pharmacology*, 2005, 69(9): 1363-1371.
- [17] Ma Y, Sachdeva K, Liu J, Ford M, Yang D, Khan I A, Chichester C O, Yan B. Desmethoxyyangonin and dihydromethysticin are two major pharmacological kavalactones with marked activity on the induction of cytochrome P450A23. *Drug Metabolism and Disposition*, 2004, 32(11): 1317-1324.
- [18] Cabrera M A, Dip R M, Furlan M O, Rodrigues S L. Use of drugs that act on the cytochrome P450 system in the elderly. *Clinics*, 2009, 64(4): 273-278.
- [19] Sinz M, Wallace G, Sahi J. Current industrial practices in assessing CYP450 enzyme induction: preclinical and clinical. *The AAPS Journal*, 2008, 10(2): 391-400.
- [20] 于倩, 左楠, 贾海燕, 李金敏, 王俊杰, 李术. 硒对氟中毒雏鸡肝脏细胞色素 P450 酶系主要亚型的影响. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(6): 922-927.
Yu Q, Zuo N, Jia H Y, Li J M, Wang J J, Li S. The effect of Selenium on main subtypes of hepatic microsomal cytochrome P450s in chickens with exposure of Fluoride. *Acta Veterinaria et Zootechnica*

- Sinica*, 2009, 40(6): 922-927. (in Chinese)
- [21] McKerrow J H, Doyle P S, Engel J C, Podust L M, Robertson S A, Ferreira R, Saxton T, Arkin M, Kerr I D, Brinen L S, Craik C S. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009, 104(S1): 263-269.
- [22] 李 勇, 吴 德, 郭海燕, 郑爱荣, 张 果. 营养水平对妊娠早期母猪免疫状况及胚胎存活的影响. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(6): 846-854.
- Li Y, Wu D, Guo H Y, Zheng A R, Zhang G. Effects of feed intake level on the immunity states and embryonic survival during early pregnancy in gilts. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2009, 40(6): 846-854. (in Chinese)
- [23] Sharkey A M, Gardner L, Hiby S, Farrell L, Apps R, Masters L, Goodridge J, Lathbury L, Stewart C A, Verma S, Moffett A. Killer Ig-like receptor expression in uterine NK cells is biased toward recognition of HLA-C and alters with gestational age. *Journal of Immunology*, 2008, 181(1): 39-46.
- [24] 胡元亮, 吕殿红, 刘家国, 宋大鲁. 淫羊藿-蜂胶佐剂对雏鸡和小白鼠腹腔巨噬细胞活性的影响. *中国兽医科技*, 1999, 29(5): 8-10.
- Hu Y L, Lü D H, Liu J G, Song D L. Effect of Epimediumpropolis Adjuvant (EPA) on activity of celiac macrophages in chicks and mice. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1999, 29(5): 8-10. (in Chinese)
- [25] 段 纲, 杨林富, 代飞燕, 项 勋, 朱春贤. 中草药复方添加剂对土杂鸡 IgG 的影响. *家畜生态学报*, 2005, 26(6): 79-80.
- Duan G, Yang L F, Dai F Y, Xiang X, Zhu C X. Effect of herbal medicine additives IgG of local-breeding chicks. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2005, 26(6): 79-80. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)