

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

朱志宁 郝振荣 王 明 蒋林树* 郭玉琴

(北京农学院动物科技学院, 北京 102206)

摘要: 本试验旨在研究大豆异黄酮对高产奶牛泌乳后期乳腺免疫功能的影响。选用 12 头胎次、体重和产奶量相近的泌乳后期中国荷斯坦奶牛, 随机分为 4 组, 每组 3 头。4 个组中, D 为对照组, 饲喂全混合日粮, A、B 和 C 组在全混合日粮的基础上分别添加 10、20 和 30 mg/kg 大豆异黄酮。为进一步探索大豆异黄酮对奶牛乳腺免疫细胞的作用, 分离采自试验组和对照组奶牛的乳腺肥大细胞, 并分别与 0(D1)、0.25(A1)、0.50(B1)、0.75 mg/mL(C1) 的大豆异黄酮共育。结果表明: 1) 日粮添加大豆异黄酮后, 试验中后期试验组奶牛血清及乳样中的雌激素(E_2)、三碘甲状腺原氨酸(T_3)、甲状腺素(T_4) 含量比对照组有不同程度地提高; 2) 试验组乳样中表面型免疫球蛋白 A (sIgA) 含量呈显著上升趋势 ($P < 0.05$), 并于试验后期下降至与对照组相当水平, 乳腺中 sIgA 含量试验组显著高于对照组 ($P < 0.05$); 3) 试验组血清和乳样中的肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 明显下降, 并于试验后期显著低于对照组 ($P < 0.05$), 乳腺中 TNF- α 的含量显著低于对照组 ($P < 0.05$); 4) 细胞共育试验表明, 添加一定浓度的大豆异黄酮 (0.50 mg/mL) 能够显著降低奶牛乳腺肥大细胞的 TNF- α mRNA 表达量 ($P < 0.05$)。由此得出, 本试验条件下, 奶牛全混合日粮中添加不同浓度大豆异黄酮能够提高奶牛的乳腺免疫功能, 且大豆异黄酮添加量为 30 mg/kg 时, 能够得到较好的免疫效果。

关键词: 大豆异黄酮; 荷斯坦奶牛; 乳腺; 肥大细胞; TNF- α

中图分类号: S852.2; S823

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2011)01-0112-10

奶牛乳腺肥大细胞不仅具有重要的黏膜免疫学属性, 促进嗜中性白细胞、嗜酸性白细胞浸润^[1], 而且本身能够分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、表面型免疫球蛋白 A (sIgA) 等多种细胞因子, 进而影响和调节机体免疫功能。据报道, 大豆异黄酮能够通过调节动物机体的免疫功能而减少因疾病所导致的生产损失, 显著提高动物的生产性能^[2-3]。虽然 TNF- α 等免疫因子不仅仅由肥大细胞分泌, 但在炎症发生早期, 肥大细胞释放的 TNF- α 在防御性免疫反应的启动过程中发挥重要作用,

此外, TNF- α 还具有抗感染、杀瘤抑菌、免疫调节等作用^[4]。sIgA 则具有与细菌和病毒或其抗原相结合的功能, 在抗感染过程中起着十分重要的作用^[5]。由此可见, 肥大细胞作为调节奶牛乳腺免疫功能的重要组成部分, 研究其在大豆异黄酮作用下的免疫调节机理具有十分重要的意义。本试验拟通过研究日粮中添加大豆异黄酮对奶牛乳腺肥大细胞 TNF- α 、sIgA 分泌量的影响, 揭示大豆异黄酮调节奶牛乳腺免疫功能的机理。

收稿日期: 2010-06-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30871796)

作者简介: 朱志宁 (1983—), 女, 北京人, 硕士研究生, 主要从事反刍动物营养与免疫研究。E-mail: amethystness@hotmail.com.cn

* **通讯作者:** 蒋林树, 副教授, 硕士生导师, E-mail: kjsxnb@vip.sina.com

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验用大豆异黄酮呈棕黄色细小粉末状,纯度 $\geq 98\%$,购自陕西森弗生物技术有限公司;M-MLV逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司,SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 购自 Takara 公司,TRIzol 购自 Invitrogen 公司,反转录过程中以 Oligo (dT) 为引物。

1.2 试验动物与分组

选择 12 头胎次、体重 $[(472.35 \pm 37.00) \text{ kg}]$ 、产奶量 $[(30.00 \pm 3.25) \text{ kg/d}]$ 相近的泌乳后期 $[(203 \pm 5) \text{ 日龄}]$ 中国荷斯坦奶牛,采用单因子试验设计,按大豆异黄酮添加水平随机分为 1 个对照组(D)和 3 个试验组,每个组 3 个重复。其中对照组饲喂全混合日粮(TMR),各试验组在 TMR 基础上分别添加 10(A)、20(B)、30 mg/kg(C)大豆异黄酮。试验预试期 7 d,正试期 28 d。正试期第 0、3、7、14、21、28 天,分别采集乳样和血样。试验结束时屠宰全部 12 头试验奶牛,采集乳腺组织。

1.3 饲养管理

试验奶牛饲喂 TMR,单槽饲喂,大豆异黄酮与少量 TMR 混合均匀后于早、中、晚添加到供试牛日粮中,试验期间奶牛自由饮水,每天挤奶 3 次。TMR 组成及营养水平见表 1。

1.4 样品的测定及方法

1.4.1 乳样与血样的处理与测定

乳样采集:采集早、中、晚 3 次乳样,按比例混匀并立即于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻贮藏,用于乳样中生化指标三碘甲腺原氨酸(T_3)、甲状腺素(T_4)、雌二醇(E_2)以及 sIgA、TNF- α 含量的测定。

血样采集:使用真空采血管进行尾静脉无菌采血,血样于 3 000 r/min 离心 15 min 后吸取上清液,制备血清并于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻贮藏,用于血清生化指标 T_3 、 T_4 、 E_2 、TNF- α 含量的测定。血样和乳样的所有指标均采用放免法进行测定。

1.4.2 屠宰、取样与测定项目

试验结束时屠宰试验奶牛,屠宰按照试验动物保护条例进行,采集其乳房的不同部位乳腺组织于液氮中保存,用于测定乳腺组织中 sIgA、TNF- α 的含量,以及乳腺组织中免疫球蛋白 A (IgA)、TNF- α 的 mRNA 表达量。乳腺组织中的 sIgA、TNF- α 的含量采用放免法进行测定。另取部分乳

腺组织 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,用于乳腺肥大细胞的分离以及其与大豆异黄酮共育后的 TNF- α 分泌量和 mRNA 表达量的研究。

表 1 TMR 组成及营养水平(干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the total mixed ration (TMR) (DM basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
大麦 Barley	6.25
玉米 Corn	12.72
豆粕 Soybean meal	3.75
棉籽粕 Cottonseed meal	3.60
小麦麸 Wheat bran	2.50
预混料 Premix ¹⁾	0.25
干酒糟及其可溶物 DDGS	1.25
菜籽粕 Rapeseed meal	1.25
青贮玉米 Corn silage	42.50
膨化大豆 Extruded soybean	2.00
小苏打 NaHCO ₃	0.45
过瘤胃保护脂肪 Rumen protected fat ²⁾	1.00
玉米干粕 Dried corn meal	5.00
苹果粕 Apple meal	3.35
胚芽粕 Plumule meal	3.75
石粉 Limestone	0.66
羊草 Chinese wildrye	4.50
苜蓿干草 Alfalfa hay	5.00
食盐 NaCl	0.22
合计 Total	100.00
干物质采食量 DM intake/kg	23.60
净能 NE/(MJ/kg)	7.45
粗脂肪 EE	4.70
粗蛋白质 CP	17.50
酸性洗涤纤维 ADF	20.20
中性洗涤纤维 NDF	36.20
钙 Ca	0.86
磷 P	0.44

¹⁾ 每千克预混料含有 One kilogram of premix contains: Cu 4 560 mg, Mn 4 590 mg, Zn 12 100 mg, Se 200 mg, Co 60 mg, VA 2 000 000 IU, VD 450 000 IU, VE 10 000 IU, 烟酸 niacin 3 000 mg。

²⁾ 过瘤胃保护脂肪含有 Rumen protected fat contains: 干物质 DM 93%, 粗蛋白质 CP 25%, 油脂 oil 32%, 中性洗涤纤维 NDF 17%, 淀粉 starch 3%, 蔗糖 sucrose 5%, 消化能 ME 19 MJ/kg。

1.4.3 乳腺肥大细胞的分离与筛选

取材:切取和选择脂肪较少且富含乳腺小叶的乳腺组织,用磷酸盐缓冲液(PBS,含有 1.0 g/L 青霉素、0.5 g/L 链霉素)后在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ PBS 中暂存。

采用分次酶消化法对乳腺细胞进行分散。剪碎的组织块,采用消化液 A(含 3.00 mg/mL 链霉蛋白酶、0.75 mg/mL 木瓜凝乳蛋白酶,室温,20 min)消化 2 次,每次消化后使用孔径为 300 μm 的细胞筛进行过滤,去除已游离的细胞;然后使用消化液 B(含 1.50 mg/mL 胶原酶、0.15 mg/mL 弹性蛋白酶,30 $^{\circ}\text{C}$,20 min)消化 2 次,每次消化后使用孔径为 300 μm 的细胞筛进行过滤,收集滤液。离心(400 $\times g$,10 min,4 $^{\circ}\text{C}$),弃上清液,PBS [含牛血清白蛋白(BSA)0.25 mg/mL]重悬。

肥大细胞的分离与纯化:细胞悬液采用孔径为 100 μm 的细胞筛过滤,并收集滤液,进行细胞计数。取所收集滤液进行离心(400 $\times g$,10 min,4 $^{\circ}\text{C}$),弃上清液,以 1.062 g/mL Percoll 细胞分离液进行重悬,并使细胞数量达到 1×10^7 个。利用不连续 Percoll 密度梯度离心进行肥大细胞的纯化。Percoll 分离液自下至上密度为:1.090、1.080、1.070 和 1.062 g/mL。其中 1.062 g/mL 为待分离细胞悬液。20 $^{\circ}\text{C}$ 下离心(500 $\times g$,40 min)后,收集 1.070/1.080 和 1.080/1.090 2 个界面的细胞,PBS 洗涤,离心并重悬。

1.4.4 乳腺肥大细胞的培养

肥大细胞完全培养液:RPMI1640(GIBCO,含 25 mmol/L HEPES)、L-谷氨酰胺 2 mmol/L、10%

胎牛血清(FBS),青霉素 100 IU/mL,链霉素 100 IU/L 和干细胞因子 50 ng/mL。试验过程中应用的细胞维持培养液中 FBS 浓度为 1%,其他与完全培养液相同。试验过程中,除对照组(D1)单纯使用细胞维持培养液外,试验组使用的细胞维持培养液中分别含 0.25(A1)、0.50(B1)0.75 mg/mL(C1)大豆异黄酮。

75 cm^2 培养瓶内接种 5.0×10^8 细胞以完全培养液培养 24 h 后进行试验,每组 6 个重复,置 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 细胞培养箱中孵育,并于 24、48 h 时分别收集培养上清液和肥大细胞,冷冻保存用于测定 TNF- α mRNA 的表达量,其中培养上清液中的 TNF- α mRNA 的表达量使用 ELISA 放免试剂盒进行翻译水平检测。

1.4.5 乳腺组织和乳腺肥大细胞中 TNF- α mRNA 表达量的测定

试验过程中以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参照物,以 TRIzol 法提取乳腺组织的总 RNA。对所提取 RNA 质量进行检测后,以 Oligo(dT)作为下游引物按照 M-MLV 反转录试剂盒推荐方法进行反转录。反转录扩增条件:60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行 mRNA 相对表达量的计算。TNF- α 以 GeneBank 中 Gene ID 280943 为目的基因设计引物序列。

表 3 实时 PCR 引物序列

Table 3 Primer sequences of real-time PCR

扩增目的基因 Gene amplification	引物序列 Primer sequence (5'-3')
肿瘤坏死因子- α TNF- α	TCTCAAGCCTCAAGTAACAAGCCATTGGCATAACGAGTCCCACC
3-磷酸甘油醛脱氢酶 GAPDH	TCAACGACCACTTTGTCAAGCTCAGCTGGGGGTCCAGGGACCTTACT

1.5 数据处理与统计分析

试验数据使用 Excel 进行整理,应用 SAS 9.0 软件进行统计处理。采取 ANOVA 进行方差分析,差异显著时用 Duncan 氏法进行各组间的多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。试验数据用平均值 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 日粮中添加不同水平的大豆异黄酮对奶牛血清、乳样中激素含量的影响

由表 4 可知,21 d 时,A 组的血清 E_2 含量显著高于 B、C 组($P < 0.05$),极显著高于 D 组($P <$

0.01)。其他时间,各组差异均不显著($P > 0.05$)。添加不同浓度的大豆异黄酮后,各组奶牛乳样中的 E_2 含量均无显著差异($P > 0.05$)。

由表 5 可知,A 组血清 T_3 含量在添加大豆异黄酮后,显著高于添加前($P < 0.05$)。其他各组各个时间点差异不显著($P > 0.05$)。21 d 时,A 组的 T_3 含量显著高于其他组($P < 0.05$)。C 组乳样 T_3 含量在添加大豆异黄酮后,显著高于添加前($P < 0.05$)。其他各组不同时间点差异不显著($P > 0.05$)。14 d 时,C 组乳样 T_3 含量极显著高于添加前($P < 0.01$),显著高于其他时间点($P < 0.05$)。

表 4 日粮中添加不同水平大豆异黄酮对奶牛血清及乳样中 E₂ 含量的影响

Table 4 Effects of different dietary soy isoflavone (SI) supplemental levels on E₂ content in serum and milk of dairy cows

项目 Items	时间 Time/d	组别 Groups			
		A	B	C	D
血清 E ₂ 含量 E ₂ content in serum	0	67.14 ± 2.01 ^{aA}	71.10 ± 2.22 ^{aA}	71.26 ± 1.43 ^{aA}	57.06 ± 2.44 ^{bA}
	3	70.69 ± 0.15 ^{aA}	67.66 ± 3.28 ^{aA}	62.99 ± 3.28 ^{aA}	57.85 ± 1.83 ^{aA}
	7	62.64 ± 2.30 ^{aA}	76.59 ± 5.54 ^{aA}	72.61 ± 5.54 ^{aA}	57.14 ± 6.38 ^{aA}
	14	62.58 ± 1.83 ^{aA}	61.88 ± 3.05 ^{aA}	68.47 ± 3.05 ^{aA}	66.37 ± 0.00 ^{aA}
	21	75.40 ± 2.33 ^{aA}	58.99 ± 2.48 ^{aB}	63.43 ± 2.48 ^{aB}	55.51 ± 3.18 ^{aC}
	28	61.68 ± 2.58 ^{aA}	59.44 ± 2.62 ^{aA}	62.30 ± 2.62 ^{aA}	55.29 ± 2.48 ^{aA}
乳样 E ₂ 含量 E ₂ content in milk	0	9.21 ± 0.70 ^{aA}	8.81 ± 0.38 ^{aA}	8.32 ± 1.49 ^{aA}	7.40 ± 0.03 ^{aA}
	3	9.90 ± 1.57 ^{aA}	7.04 ± 1.59 ^{aA}	8.28 ± 1.02 ^{aA}	7.02 ± 1.62 ^{aA}
	7	8.40 ± 0.09 ^{aA}	6.78 ± 0.72 ^{aA}	6.89 ± 1.24 ^{aA}	8.27 ± 1.07 ^{aA}
	14	8.95 ± 0.22 ^{aA}	7.08 ± 1.92 ^{aA}	8.48 ± 1.50 ^{aA}	7.81 ± 0.82 ^{aA}
	21	7.85 ± 0.41 ^{aA}	8.87 ± 1.03 ^{aA}	7.76 ± 0.54 ^{aA}	7.91 ± 2.10 ^{aA}
	28	9.19 ± 1.86 ^{aA}	9.12 ± 1.95 ^{aA}	7.54 ± 2.14 ^{aA}	7.24 ± 0.17 ^{aA}

同一指标同列数据肩标相邻小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相间小写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$); 同行数据肩标相邻大写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相间大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$); 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。表 5、表 6、表 7、表 9 和表 11 同。

Values of the same indexes in the same column with adjacent small letter superscripts mean significantly different ($P < 0.05$), and with alternate small letter superscripts mean significantly different ($P < 0.01$); in the same row, values with adjacent capital letter superscripts mean significantly different ($P < 0.05$), and with alternate capital letter superscripts mean significantly different ($P < 0.01$); values with the same letter superscripts mean not significantly different ($P > 0.05$). The same as Table 5, Table 6, Table 7, Table 9, and Table 11.

表 5 日粮中添加不同水平大豆异黄酮对奶牛血清及乳样中 T₃ 含量的影响

Table 5 Effects of different dietary SI supplemental levels on T₃ content in serum and milk of dairy cows

项目 Items	时间 Time/d	组别 Groups			
		A	B	C	D
血清 T ₃ 含量 T ₃ content in serum	0	1.14 ± 0.01 ^{bA}	1.02 ± 0.12 ^{aA}	1.28 ± 0.30 ^{aA}	1.28 ± 0.09 ^{aA}
	3	1.27 ± 0.22 ^{aA}	1.19 ± 0.13 ^{aA}	1.06 ± 0.03 ^{aA}	1.02 ± 0.11 ^{aA}
	7	1.23 ± 0.03 ^{aA}	1.27 ± 0.06 ^{aA}	1.25 ± 0.11 ^{aA}	1.25 ± 0.22 ^{aA}
	14	1.15 ± 0.03 ^{aA}	1.27 ± 0.25 ^{aA}	1.27 ± 0.23 ^{aA}	1.24 ± 0.12 ^{aA}
	21	1.43 ± 0.11 ^{aA}	1.28 ± 0.06 ^{aB}	1.28 ± 0.01 ^{aB}	1.07 ± 0.19 ^{aB}
	28	1.32 ± 0.01 ^{aA}	1.04 ± 0.01 ^{aA}	1.34 ± 0.14 ^{aA}	1.31 ± 0.01 ^{aA}
乳样 T ₃ 含量 T ₃ content in milk	0	0.33 ± 0.04 ^{aA}	0.31 ± 0.03 ^{aA}	0.27 ± 0.02 ^{cA}	0.28 ± 0.08 ^{aA}
	3	0.32 ± 0.02 ^{aA}	0.28 ± 0.03 ^{aA}	0.33 ± 0.04 ^{bA}	0.30 ± 0.06 ^{aA}
	7	0.21 ± 0.05 ^{aA}	0.29 ± 0.03 ^{aA}	0.30 ± 0.02 ^{bA}	0.32 ± 0.04 ^{aA}
	14	0.30 ± 0.05 ^{aA}	0.29 ± 0.07 ^{aA}	0.32 ± 0.01 ^{aA}	0.30 ± 0.02 ^{aA}
	21	0.33 ± 0.12 ^{aA}	0.26 ± 0.03 ^{aA}	0.31 ± 0.01 ^{bA}	0.32 ± 0.05 ^{aA}
	28	0.30 ± 0.05 ^{aA}	0.26 ± 0.01 ^{aA}	0.31 ± 0.02 ^{bA}	0.31 ± 0.01 ^{aA}

由表 6 可知, D 组 0、7、14 d 血清 T₄ 含量显著低于其他时间点 ($P < 0.05$), 其他各组各个时间点差异不显著 ($P > 0.05$)。A 组 21 d 乳样 T₄ 含量

显著或极显著高于其他时间点 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。14 d 时, A、B 组乳样 T₄ 含量显著低于 C、D 组 ($P < 0.05$)。

表6 日粮中添加不同水平大豆异黄酮对奶牛血清及乳样中 T₄ 含量的影响Table 6 Effects of different dietary SI supplemental levels on T₄ content in serum and milk of dairy cows ng/mL

项目 Items	时间 Time/d	组别 Groups			
		A	B	C	D
血清 T ₄ 含量 T ₄ content in serum	0	83.80 ± 2.52 ^{aa}	91.89 ± 1.62 ^{aa}	90.91 ± 2.78 ^{aa}	83.80 ± 1.93 ^{ba}
	3	92.96 ± 2.46 ^{aa}	88.41 ± 1.76 ^{aa}	92.19 ± 1.15 ^{aa}	85.94 ± 0.66 ^{aa}
	7	86.01 ± 1.30 ^{aa}	86.49 ± 0.56 ^{aa}	88.89 ± 2.07 ^{aa}	81.07 ± 2.57 ^{ba}
	14	95.35 ± 2.87 ^{aa}	86.18 ± 2.66 ^{aa}	91.08 ± 2.98 ^{aa}	81.55 ± 0.21 ^{ba}
	21	91.77 ± 1.01 ^{aa}	92.89 ± 1.49 ^{aa}	95.17 ± 1.01 ^{aa}	94.42 ± 1.50 ^{aa}
	28	97.11 ± 2.42 ^{aa}	88.09 ± 1.45 ^{aa}	96.63 ± 0.08 ^{aa}	90.39 ± 1.30 ^{aa}
乳样 T ₄ 含量 T ₄ content in milk	0	15.46 ± 0.61 ^{ba}	14.64 ± 0.73 ^{aa}	13.86 ± 0.68 ^{aa}	15.73 ± 1.64 ^{aa}
	3	14.50 ± 0.75 ^{ba}	15.77 ± 1.91 ^{aa}	14.91 ± 1.38 ^{aa}	13.81 ± 2.03 ^{aa}
	7	14.51 ± 0.48 ^{ba}	14.61 ± 0.96 ^{aa}	17.02 ± 3.81 ^{aa}	13.79 ± 0.47 ^{aa}
	14	13.91 ± 0.48 ^{cb}	14.04 ± 0.96 ^{ab}	17.61 ± 2.04 ^{aa}	16.15 ± 0.75 ^{aa}
	21	16.64 ± 0.04 ^{aa}	15.61 ± 2.31 ^{aa}	16.61 ± 0.55 ^{aa}	14.35 ± 2.17 ^{aa}
	28	14.48 ± 0.27 ^{ba}	14.29 ± 2.58 ^{aa}	13.91 ± 0.31 ^{aa}	15.18 ± 0.97 ^{aa}

2.2 日粮中添加不同水平的大豆异黄酮对奶牛乳样中 sIgA 含量以及乳腺中 sIgA 含量和 IgA mRNA 表达量的影响

由表7可知,21 d时,A、C组乳样 sIgA 含量显著高于B、D组($P < 0.05$),其他时间点各组差异不显著($P > 0.05$)。A组21 d乳样 sIgA 含量极

显著高于28 d($P < 0.01$),显著高于其他时间点($P < 0.05$);C组21 d乳样 sIgA 含量显著高于其他时间点($P < 0.05$)。由表8可知,乳腺中 sIgA 含量A、C组显著高于B、D组($P < 0.05$);IgA mRNA 表达量D组显著低于其他各组($P < 0.05$)。

表7 日粮中添加不同水平大豆异黄酮对奶牛乳样中 sIgA 含量的影响

Table 7 Effects of different dietary SI supplemental levels on sIgA content in milk of dairy cows $\mu\text{g/mL}$

时间 Time/d	组别 Groups			
	A	B	C	D
0	0.021 ± 0.010 ^{ba}	0.036 ± 0.014 ^{aa}	0.043 ± 0.006 ^{ba}	0.033 ± 0.013 ^{aa}
3	0.034 ± 0.006 ^{ba}	0.026 ± 0.005 ^{aa}	0.038 ± 0.020 ^{ba}	0.008 ± 0.005 ^{aa}
7	0.033 ± 0.018 ^{ba}	0.029 ± 0.014 ^{aa}	0.021 ± 0.008 ^{ba}	0.018 ± 0.011 ^{aa}
14	0.043 ± 0.006 ^{ba}	0.049 ± 0.027 ^{aa}	0.026 ± 0.012 ^{ba}	0.016 ± 0.005 ^{aa}
21	0.085 ± 0.012 ^{aa}	0.047 ± 0.001 ^{ab}	0.062 ± 0.012 ^{aa}	0.005 ± 0.001 ^{ab}
28	0.014 ± 0.000 ^{ca}	0.008 ± 0.002 ^{aa}	0.011 ± 0.005 ^{ba}	0.007 ± 0.002 ^{aa}

表8 日粮中添加不同水平大豆异黄酮对奶牛乳腺中 sIgA 含量和 IgA mRNA 表达量的影响

Table 8 Effects of different dietary SI supplemental levels on sIgA content and IgA mRNA expression in the mammary gland of dairy cows

组别 Groups	sIgA 含量 sIgA content/($\mu\text{g/mL}$)	IgA mRNA 表达量 IgA mRNA expression
A	0.17 ± 0.038 ^b	2.26 ± 0.56 ^a
B	0.13 ± 0.001 ^a	1.79 ± 0.11 ^a
C	0.17 ± 0.011 ^b	2.36 ± 0.52 ^a
D	0.09 ± 0.016 ^a	0.52 ± 0.49 ^b

2.3 日粮中添加不同水平的大豆异黄酮对奶牛血清、乳样中 TNF- α 含量以及乳腺中 TNF- α 含量和 mRNA 表达量的影响

由表 9 可知,28 d 时,D 组血清 TNF- α 含量显著高于其他各组 ($P < 0.05$)。A 组 0、3 d 乳样

TNF- α 含量显著高于其他各时间点 ($P < 0.05$)。7、21 和 28 d 时,D 组乳样 TNF- α 含量显著高于其他各组 ($P < 0.05$)。由表 10 可知,D 组的乳腺 TNF- α 含量和其 mRNA 表达量极显著高于其他各组 ($P < 0.01$),其他各组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 9 日粮中添加不同水平大豆异黄酮对奶牛血清及乳样中 TNF- α 含量的影响

Table 9 Effects of different dietary SI supplemental levels on TNF- α content in serum and milk of dairy cows ng/mL

项目 Items	时间 Time/d	组别 Groups			
		A	B	C	D
血清 TNF- α 含量 TNF- α content in serum	0	0.81 ± 0.12 ^{aA}	1.49 ± 0.36 ^{aA}	1.36 ± 0.45 ^{aA}	1.81 ± 0.59 ^{aA}
	3	0.96 ± 0.24 ^{aA}	1.16 ± 0.32 ^{aA}	1.27 ± 0.36 ^{aA}	1.70 ± 0.14 ^{aA}
	7	0.90 ± 0.41 ^{aA}	1.25 ± 0.41 ^{aA}	0.65 ± 0.11 ^{aA}	1.49 ± 0.49 ^{aA}
	14	1.10 ± 0.35 ^{aA}	1.40 ± 0.40 ^{aA}	0.97 ± 0.01 ^{aA}	1.60 ± 0.16 ^{aA}
	21	0.94 ± 0.31 ^{aA}	1.17 ± 0.44 ^{aA}	1.09 ± 0.21 ^{aA}	1.41 ± 0.55 ^{aA}
	28	0.84 ± 0.03 ^{aB}	0.98 ± 0.24 ^{aB}	0.72 ± 0.08 ^{aB}	1.96 ± 0.46 ^{aA}
乳样 TNF- α 含量 TNF- α content in milk	0	0.23 ± 0.01 ^{aA}	0.22 ± 0.09 ^{aA}	0.20 ± 0.01 ^{aA}	0.25 ± 0.07 ^{aA}
	3	0.25 ± 0.01 ^{aA}	0.21 ± 0.06 ^{aA}	0.16 ± 0.07 ^{aA}	0.30 ± 0.05 ^{aA}
	7	0.16 ± 0.03 ^{bB}	0.18 ± 0.02 ^{aB}	0.17 ± 0.01 ^{aB}	0.27 ± 0.02 ^{aA}
	14	0.15 ± 0.00 ^{bB}	0.20 ± 0.06 ^{aA}	0.15 ± 0.02 ^{aB}	0.30 ± 0.08 ^{aA}
	21	0.19 ± 0.04 ^{bB}	0.17 ± 0.03 ^{aB}	0.13 ± 0.02 ^{aB}	0.25 ± 0.02 ^{aA}
	28	0.15 ± 0.06 ^{bB}	0.17 ± 0.04 ^{aB}	0.16 ± 0.04 ^{aB}	0.28 ± 0.04 ^{aA}

表 10 日粮中添加不同水平的大豆异黄酮对奶牛乳腺中 TNF- α 含量和 TNF- α mRNA 表达量的影响

Table 10 Effects of different dietary SI supplemental levels on TNF- α content and TNF- α mRNA expression in the mammary gland of dairy cows

组别 Groups	TNF- α 含量 TNF- α content/(ng/mL)	TNF- α mRNA 表达量 TNF- α mRNA expression
A	0.57 ± 0.14 ^{bB}	0.93 ± 0.11 ^{bB}
B	0.58 ± 0.03 ^{bB}	0.98 ± 0.12 ^{bB}
C	0.36 ± 0.11 ^{bB}	0.32 ± 0.06 ^{bB}
D	1.08 ± 0.17 ^{aA}	4.28 ± 1.36 ^{aA}

同列数据肩标不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$),不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Values in the same column with different capital letter superscripts mean significantly different ($P < 0.01$), with different small letter superscripts mean significantly different ($P < 0.05$), and with the same letter superscripts mean not significantly different ($P > 0.05$).

2.4 不同浓度大豆异黄酮的添加对奶牛乳腺肥大细胞 TNF- α 分泌和其 mRNA 表达量的影响

由表 11 可知,D1 组 24 h TNF- α 分泌量极显著低于 C1 组 ($P < 0.01$),显著低于 A1 组 ($P < 0.05$),TNF- α mRNA 表达量与 TNF- α 分泌量变化趋势一致;48 h 时,C1 组 TNF- α 分泌量显著高

于其他各组 ($P < 0.05$),D1 组 TNF- α mRNA 表达量极显著低于 C1 组 ($P < 0.01$),显著低于 A1 组 ($P < 0.05$)。B1 组 48 h TNF- α mRNA 表达量显著低于 24 h ($P < 0.05$),A1 组 48 h TNF- α mRNA 表达量比 24 h 有降低的趋势 ($P > 0.05$)。

表 11 不同浓度大豆异黄酮的添加对细胞培养物 TNF- α 分泌量及其 mRNA 表达量的影响Table 11 Effects of different SI supplemental levels on TNF- α secretion and TNF- α mRNA expression in cultured mast cells

项目 Items	组别 Groups			
	A1	B1	C1	D1
24 h				
TNF- α 分泌量 TNF- α secretion/(ng/mL)	1.40 \pm 0.016 ^{cB}	1.31 \pm 0.050 ^{dC}	1.75 \pm 0.128 ^{aA}	1.16 \pm 0.044 ^{dC}
TNF- α mRNA 表达量 TNF- α mRNA expression	6.74 \pm 0.34 ^{bB}	1.58 \pm 0.31 ^{cC}	3.26 \pm 0.20 ^{aA}	1.00 \pm 0.31 ^{cC}
48 h				
TNF- α 分泌量 TNF- α secretion/(ng/mL)	1.47 \pm 0.044 ^{bB}	1.45 \pm 0.037 ^{bB}	1.93 \pm 0.052 ^{aA}	1.37 \pm 0.057 ^{bB}
TNF- α mRNA 表达量 TNF- α mRNA expression	0.91 \pm 0.26 ^{bB}	0.47 \pm 0.12 ^{dC}	4.02 \pm 0.16 ^{aA}	0.60 \pm 0.30 ^{cC}

3 讨论

3.1 日粮中添加不同水平的大豆异黄酮对奶牛机体激素水平的影响

奶牛产奶后期,多种激素的共同作用使产奶量降低并逐渐过渡至干奶期,最终结束泌乳过程^[6]。同一种激素在不同的泌乳阶段其作用并不是相同的。研究表明,E₂能够促进奶牛乳腺实质的增生^[7],启动并促进泌乳;然而在去卵巢情况下或干奶期,E₂则能促进泌乳的结束^[8]。大豆异黄酮是一类结构复杂具有雌激素样活性的化合物,这种活性能够调节受雌激素调控的生理活动^[9]。本研究发现,21 d时,不同浓度的大豆异黄酮添加组血清中的E₂含量均显著高于对照组,但乳中则无显著差异。奶牛血清以及乳样中T₃、T₄的含量,仅仅在部分取样时间点有统计差异出现,这说明了泌乳期间除乳腺外,动物机体的其他部分均处于甲状腺功能较差的状态,从而保证了乳中的碘含量较为恒定^[6]。

3.2 日粮中添加不同水平的大豆异黄酮对奶牛乳腺中 sIgA 含量以及乳腺 IgA mRNA 表达量的影响

黏膜免疫是机体抵抗感染的重要手段。当病原体侵袭黏膜组织时,位于上皮内的黏膜型肥大细胞首先将其吞噬并递呈给T细胞和B细胞^[10]。在T细胞和B细胞开始再循环后,活化的黏膜肥大细胞通过表达一系列细胞因子,使局部黏膜组织成为既有利于Th₀细胞向Th₂细胞分化,又有利于B细胞向IgA⁺浆细胞分化的场所,于是黏膜免疫得以建立^[11]。Goldblum等^[12]发现给围产期妇女口服E. coli 083能够在初乳中检测到大量的sIgA。McDermott等^[13]在小鼠上证实,乳腺中的

IgA⁺浆细胞使用胃肠道相关淋巴组织迁移来的B细胞分化而成的。

乳腺免疫中sIgA是一种十分重要的细胞因子,不仅能够作为保护母体的黏膜免疫效应因子,同时能够作为刺激幼畜肠黏膜淋巴组织的抗原,即所谓的肠-乳腺免疫链^[14]。sIgA是黏膜免疫的主要效应因子,其不仅可中和、排斥病原体,防止细菌、病毒与黏膜结合,还可促进外分泌液中天然抗菌因子的作用,并可调节黏膜免疫。Lamm等^[15]指出,IgA可通过中和黏膜上皮内病原体而捕获进入到黏膜内层的病原体,在黏膜结缔组织中形成免疫复合物,然后由上皮细胞排入腔内。

本研究结果表明:乳样中,除21 d时A、C组sIgA含量显著高于B、D组外,其他时间点各组样品间差异均不显著。奶牛乳腺中的sIgA含量同样为A、C组显著高于B、D组。乳样和乳腺中,尽管统计上B组与D组差异不显著,然而在具体数值上仍然为B组高于D组。乳腺中,IgA的mRNA表达量则显示出各个大豆异黄酮添加组的IgA相关基因的表达显著高于对照组。这与怀孕对乳腺免疫的影响具有相同的结果,并最终引起一系列免疫细胞向乳腺富集,免疫因子的分泌等免疫反应^[14]。

3.3 不同水平的大豆异黄酮对奶牛乳腺中 TNF- α 含量以及 mRNA 表达量的影响及其对奶牛乳腺肥大细胞 TNF- α 分泌量及其 mRNA 表达量的影响

TNF- α 是一类与急性期乳腺炎相关的炎性细胞因子,其在乳腺炎发展过程中具有及其重要的作用,特别是其具有能够造成吞噬性球蛋白累积的作用^[16-17]。肥大细胞是TNF- α 的主要来源之一^[18],且TNF- α 对上皮细胞作用显著。高浓度的TNF- α 具有细胞毒作用,而低浓度TNF- α 则具有

抗增殖作用, TNF- α 的过量释放可以导致上皮细胞损伤及上皮萎缩^[19]。TNF- α 还能诱导细胞毒性 T 细胞的分化, 增强单核细胞的细胞毒作用, 激活淋巴因子活性杀伤细胞和自然杀伤细胞。

动物试验证明了雌激素疗法能够有效的降低 TNF- α 的表达量^[20], 且另有研究表明大豆异黄酮这类雌激素样物质能够在在体和离体试验中影响 TNF- α 这一类炎症因子的表达量^[21-25]。本试验的研究中, 血清中的 TNF- α 含量在大豆异黄酮添加的前期尽管统计学上差异不显著, 然而从数值上看, 各个试验组均低于对照组, 28 d 时对照组显著高于各试验组。这可能是由于大豆异黄酮并非直接对 TNF- α 的分泌量进行调控, 随着添加时间的延长, 大豆异黄酮才能够有效的降低 TNF- α 的分泌量。乳样中的情况基本与血样相同, 然而自 7 d 开始对照组 TNF- α 的含量显著高于试验组。奶牛乳腺中的 TNF- α 含量以及 TNF- α 相关基因的表达量均为对照组显著高于试验组。这与 24 ~ 48 h 的大豆异黄酮能够显著降低 TNF- α mRNA 表达量的试验结果相同。

乳腺肥大细胞的离体试验发现: B1 组 48 h TNF- α mRNA 表达量显著低于 24 h, A1 组 48 h TNF- α mRNA 表达量比 24 h 有降低的趋势。以上说明: 细胞试验中, 添加适宜浓度的大豆异黄酮后, 随着作用时间的延长, 能够使 TNF- α mRNA 的表达有所下降。这与 Satsu 等^[26]的试验结果相同。

4 结 论

① 大豆异黄酮能够调控奶牛乳腺免疫, 增加防御性免疫因子分泌量, 同时降低致炎因子的表达量, 日粮大豆异黄酮添加量为 30 mg/kg 时, 对乳腺 TNF- α 和 sIgA 等的分泌具有较理想的调控效果。

② 大豆异黄酮通过对乳腺免疫因子表达量的调控, 增强奶牛的乳腺免疫功能。

参考文献:

[1] RAMOS B F, QURESHI R, OLSEN K M, et al. The importance of mast cells for the neutrophil influx in immune complex-induced peritonitis in mice [J]. The Journal of Immunology, 1990, 145 (6) : 1868 - 1873.

[2] CHEN P Y, KUO Y C, CHEN C H, et al. Isolation

and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. [J]. Molecules, 2009, 14 (5) : 1789 - 1795.

[3] GRIMALDI C M. Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells [J]. Current Opinion in Rheumatology, 2006, 8 (5) : 456 - 461.

[4] MALAVIYA R, IKEDA T, ROSS E, et al. Mast-cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α [J]. Nature, 1996, 381 (6577) : 77 - 80.

[5] MAYER L. Review article: local and systemic regulation of mucosal immunity [J]. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 1997, 11 : 81 - 85.

[6] TUCKER H A. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective [J]. Journal of Dairy Science, 2000, 83 (4) : 874 - 884.

[7] HOVEY R C, MCFADDEN T B, MICHAEL A R. Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison [J]. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 1999, 4 (1) : 53 - 68.

[8] BRUCE J O, RAMIREZ V D. Site of action of the inhibitory effect of estrogen upon lactation [J]. Neuroendocrinology, 1970, 6 (1) : 19 - 29.

[9] HELFERICH W G, ANDRADE J E, HOAGLAND M S. Phytoestrogens and breast cancer: a complex story [J]. Inflammopharmacology, 2008, 16 (5) : 219 - 226.

[10] BERIN M C, KILIAAN A J, YANG P C, et al. The influence of mast cell on pathways of transepithelial antigen transport in rat intestine [J]. The Journal of Immunology, 1998, 161 (5) : 2561 - 2566.

[11] HIROI T, YANAGITA M, IJIMA H, et al. Deficiency of IL-5 receptor alpha-chain selectively influences the development of the common mucosal immune system independent IgA-producing B-1 cell in mucosa-associated tissues [J]. The Journal of Immunology, 1999, 162 (2) : 821 - 828.

[12] GOLDBLUM R M, AHLSTEDT S, CARLSSON B, et al. Antibody-forming cells in human colostrums after oral immunisation [J]. Nature, 1975, 257 (5529) : 797 - 798.

[13] MCDERMOTT M R, BIOENENSTOCK J. Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory

- and genital tissues[J]. *The Journal of Immunology*, 1979, 122(5):1892-1898.
- [14] SALMON H, BERRI M, GERDTS V, et al. Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33(3):384-393.
- [15] LAMM M E. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1997, 51:311-340.
- [16] SHUSTER D E, LEE E K, KEHRLI M E Jr. Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1996, 57(11):1569-1575.
- [17] PERSSON-WALLKER K, COLDITZ I G, SEOW H F. Accumulation of leucocytes and cytokines in the lactating ovine udder during mastitis due to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*[J]. *Research in Veterinary Science*, 1997, 62(1):63-66.
- [18] WALSH L J. Mast cells and oral inflammation[J]. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: an Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 2003, 14(3):188-198.
- [19] SUGERMAN P B, SAVAGE N W, WALSH L J, et al. The pathogenesis of oral lichen planus[J]. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: an Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 2002, 13(4):350-365.
- [20] ITO A, BEBO B F Jr, MATEJUK A, et al. Estrogen treatment down-regulates TNF-alpha production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice[J]. *The Journal of Immunology*, 2001, 167(1):542-552.
- [21] CHACKO B K, CHANDLER R T, MUNDHEKAR A, et al. Revealing anti-inflammatory mechanisms of soy isoflavones by flow: modulation of leukocyte-endothelial cell interactions[J]. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 2005, 289(2):H908-H915.
- [22] MAY M J, WHEELER-JONES C P, PEARSON J D. Effects of protein tyrosine kinase inhibitors on cytokine-induced adhesion molecule expression by human umbilical vein endothelial cells[J]. *British Journal of Pharmacology*, 1996, 118(7):1761-1771.
- [23] MCGREGOR P E, AGRAWAL D K, EDWARDS J D. Attenuation of human leukocyte adherence to endothelial cell monolayers by tyrosine kinase inhibitors[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, 198(1):359-365.
- [24] WEBER C, NEGRESCU E, ERL W, et al. Inhibitors of protein tyrosine kinase suppress TNF-stimulated induction of endothelial cell adhesion molecules[J]. *The Journal of Immunology*, 1995, 155(1):445-451.
- [25] AZADBAKHT L, KIMIAGAR M, MEHRABI Y, et al. Soy consumption, markers of inflammation, and endothelial function: a cross-over study in postmenopausal women with the metabolic syndrome[J]. *Diabetes Care*, 2007, 30(4):967-973.
- [26] SATSU H, HYUN J S, SHIN H S, et al. Suppressive effect of an isoflavone fraction on tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production in human intestinal epithelial Caco-2 cells[J]. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, 2009, 55(5):442-446.

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

ZHU Zhining HAO Zhenrong WANG Ming JIANG Linshu* GUO Yuqin

(College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the effects of dietary soy isoflavone supplementation on the immunological function in the mammary of Chinese Holstein cows during late lactation. Twelve cows with similar parity, body weight and milk production were randomly assigned to four groups with three cows in each group. Cows in the control group (group D) were fed the total mixed ration (TMR) and the cows in the other groups were fed the TMR supplemented with 10 (group A), 20 (group B) and 30 mg/kg (group C) soy isoflavone, respectively. To further evaluate the influence of soy isoflavone on the dairy cows during late lactation, mammary mast cells were isolated from the cows and cultured in the media containing different concentrations of soy isoflavone, which were 0 (group D1), 0.25 (group A1), 0.50 (group B1) and 0.75 mg/mL (group C1). The results showed as follows: 1) the contents of estrogen (E_2), 3, 5, 3'-triiodothyronine (T_3) and thyroxine (T_4) in the serum and milk in the experimental groups were higher in varying degrees than those in the control group in the mid-anaphase after feeding the soy isoflavone. 2) The content of surface-type IgA (sIgA) in the milk from the experimental groups were significantly increased in prophase ($P < 0.05$), and then decreased to the same level as the control group. The sIgA content in the mammary gland of the experimental groups was higher than that in the control group ($P < 0.05$). 3) Tumor necrosis factor α (TNF- α) content in serum and milk in the experimental groups was decreased and significantly lower than that in the control group in the anaphase ($P < 0.05$). TNF- α content in the mammary gland of the experimental groups was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). 4) In the cell co-culture experiment, 0.50 mg/mL soy isoflavone could inhibit the mRNA expression of TNF- α in mammary mast cell ($P < 0.05$). The results indicate that dietary soy isoflavone supplementation can improve the immunological function of mammary gland of dairy cows, and the optimal supplemental level is 30 mg/kg. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(1):112-121]

Key words: soy isoflavone; Holstein cows; mammary gland; mast cells; TNF- α