

竹叶黄酮与青蒿提取物对患隐性乳房炎奶牛产奶性能、乳中体细胞数及血清免疫和抗氧化相关指标的影响

侯 昆¹ 童津津¹ 楚康康² 熊本海^{3*} 蒋林树^{1*}

(1.北京农学院动物科学技术学院,奶牛营养学北京市重点实验室,北京 102206;2.北京奶牛中心,首农集团,北京 100192;3.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所,北京 100193)

摘要: 本试验旨在研究竹叶黄酮与青蒿提取物对患隐性乳房炎奶牛产奶性能、乳中体细胞数(SCC)及血清免疫和抗氧化相关指标的影响。将2~4胎次、体重(590±15)kg、产奶量和泌乳天数相近的18头患隐性乳房炎荷斯坦奶牛[SCC为(41.31±0.49)×10⁴个/mL]随机分为3组,每组6头,进行饲养试验。其中,对照组奶牛饲喂全混合日粮(TMR),竹叶黄酮组与青蒿提取物组奶牛除饲喂TMR外,再分别投喂30g/d的竹叶黄酮和60g/d的青蒿提取物。饲养试验进行35d,其中预试期7d,饲喂期14d,停止饲喂期14d。分别在试验第1、14、28天晨饲前采集血样、奶样,并记录产奶量,分别进行乳中SCC、乳成分以及血清免疫相关因子含量和抗氧化指标的检测。结果显示:1)与对照组相比,竹叶黄酮组和青蒿提取物组奶牛的产奶量分别增加了8.95%和13.24%($P>0.05$),4%乳脂校正乳产量和第14天乳蛋白率显著提高($P<0.05$),第14天乳中SCC显著降低($P<0.05$)。2)竹叶黄酮组与青蒿素提取物组奶牛第14天血清中白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量均显著低于对照组($P<0.05$);此外,青蒿提取物组奶牛第14天血清中白细胞介素-2(IL-2)含量显著高于对照组($P<0.05$)。3)与对照组相比,竹叶黄酮组与青蒿提取物组奶牛第14天血清中丙二醛(MDA)含量显著下降($P<0.05$),第14天血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性有上升趋势($P=0.06$)。综上可知,竹叶黄酮与青蒿提取物可在一定程度上提高奶牛的产奶性能,增强机体抗氧化能力与免疫功能,并可降低患隐性乳房炎奶牛乳中SCC。

关键词: 竹叶黄酮;青蒿提取物;奶牛;隐性乳房炎;抗氧化能力;免疫功能

中图分类号:S816

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2019)09-4286-10

乳房炎在奶牛围产期与泌乳早期发病率较高,严重影响奶牛的生产性能、泌乳量及乳品质,给世界乳制品行业带来了严重的安全隐患,也给奶牛养殖行业带来了巨大的经济损失。采用抗生素治疗奶牛乳房炎会造成乳制品中抗生素残留,危及人类的健康。因此,采用绿色植物添加剂替

代抗生素对奶牛乳房炎进行治疗与预防,具有巨大的应用潜力。

竹叶黄酮是天然的植物提取物,其主要活性成分黄酮广泛存在于各类植物中,由于其特殊的2-苯基色原酮结构,使之具有抗氧化、抗炎、抗诱变和抗致癌性质以及调节关键细胞酶和增强免疫

收稿日期:2019-04-16

基金项目:国家自然科学基金项目(31772629,31702302,31802091);2019年北京农学院学位与研究生教育改革与发展项目(2019YJS031)

作者简介:侯 昆(1996—),男,北京人,硕士研究生,研究方向为反刍动物营养与免疫。E-mail: 1031520946@qq.com

* 通信作者:蒋林树,教授,博士生导师,E-mail: kjsxnb@vip.sina.com;熊本海,研究员,博士生导师,E-mail: xiongbenhai@caas.cn

力等作用^[1-2]。栗明月等^[3]研究发现,竹叶黄酮可以提高奶牛血液中免疫细胞的数量和含量,提高血浆中免疫球蛋白含量及抗氧化酶活性,降低血浆中丙二醛(MDA)含量,显著降低奶牛乳中体细胞数(SCC),进而降低奶牛乳房炎的发生率。据报道,在奶牛饲料中添加竹叶黄酮可以在一定程度上提高奶牛的产奶性能,延缓产奶量下降的趋势,改善乳品质及奶牛泌乳后期的生理机能^[4]。其机制可能是黄酮类化合物通过催乳素受体(PRLR)/信号转导与转录因子5(STAT5)信号通路,影响奶牛乳腺上皮细胞的产奶性能,促进泌乳及乳糖的合成^[5]。不仅如此,黄酮类化合物还以剂量依赖性的方式影响炎症因子和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的产生及相关基因的表达,从而起到免疫调节作用^[6]。

青蒿是一年生草本植物,而其提取物为含有倍半萜内酯的化合物,具有抗氧化、抗炎与抗菌、抗肿瘤、提高免疫力等功能^[7]。Hunt等^[8]研究发现,通过脂多糖(LPS)诱导嗜中性粒细胞至炎症状态时,添加青蒿提取物可显著抑制活化的嗜中性粒细胞所产生的TNF- α ,从而改善机体炎症反应状态。并且这种抑制具有剂量和时间依赖性,主要是因为青蒿提取物通过阻断核因子- κ B(NF- κ B)信号转导途径,在一定程度上减少炎症介质的合成和释放,从而降低体液和细胞免疫反应^[9]。由于青蒿提取物中含有的大量酚类和黄酮类化合物,可以预防或中和自由基的破坏作用,而黄酮类化合物可以通过诱导 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的转录来增加细胞内谷胱甘肽含量,使得细胞抗氧化防御系统更加稳定^[10-11]。因此,青蒿提取物的合理开发与利用具有广阔的应用前景。

本试验拟在奶牛饲料中添加竹叶黄酮或青蒿提取物,研究竹叶黄酮与青蒿提取物对患隐性乳房炎奶牛产奶性能、乳中SCC及血清免疫和抗氧化相关指标的影响,探究其在奶牛生产中对乳房炎的治疗效果,为植物提取物在奶牛生产实践中的应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验所用竹叶黄酮和青蒿提取物均购于陕西森弗有限公司。竹叶黄酮为棕黄色粉末,采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法对其成分进行测定得出黄

酮含量为40%^[12]。青蒿提取物为棕色粉末,经紫外光谱鉴别法对其有效成分进行测定,其青蒿素含量为39%。

1.2 试验设计与饲养管理

试验采用2~4胎次、体重(590 \pm 15)kg、泌乳量和泌乳天数相近的18头患隐性乳房炎荷斯坦奶牛[SCC为(41.31 \pm 0.49) \times 10⁴个/mL,处于未治疗的状态,加州乳房炎试验(CMT)法与奶牛生产成绩(DHI)报告确定为患隐性乳房炎]作为试验动物,由北京延庆区某奶牛养殖场提供。将18头试验奶牛随机分为3组,每组6头,进行饲养试验。其中,对照组(A组)奶牛饲喂全混合日粮(TMR),竹叶黄酮组(B组)与青蒿提取物组(C组)奶牛除饲喂TMR之外,再分别投喂30g/d的竹叶黄酮和60g/d的青蒿提取物。竹叶黄酮与青蒿提取物的投喂量是依据本实验室前期研究结果^[13]确定的最佳投喂量。将称量好的添加剂使用可食用性滤纸包裹,放入投药枪(HL-Q11A,张家港创普机械有限公司)内,徒手让奶牛开口,将投药枪塞入,确认成功投入后,将投药枪抽出。添加剂在晨饲前进行投喂,每日投喂1次。饲养试验进行35d,其中预试期7d,饲喂期14d,停止饲喂期14d。TMR组成及营养水平见表1。

1.3 样品的采集与保存

分别在试验的第1、14、28天晨饲前,使用美国BD公司的采血管进行奶牛尾部静脉采血,每头牛采集10mL血样,在室温下静置1h后于3000 \times g离心15min获取血清,血清于-80 $^{\circ}$ C保存备用;对每头牛进行奶样的采集,采样时间为08:20、15:20、20:20,早、中、晚奶样按4:3:3混合后,置于4 $^{\circ}$ C下保存,用于乳中SCC测定及乳成分分析,并记录每天奶牛产奶量,试验期的平均产奶量代表该阶段的产奶量。

1.4 指标测定与方法

1.4.1 饲料常规营养成分含量

参照GB/T 6432—1994测定粗蛋白质含量,参照GB/T 6433—2006测定粗脂肪含量,参照GB/T 6434—2006测定酸性洗涤纤维和中性洗涤纤维含量,参照GB/T 6435—2002测定钙含量,参照GB/T 6436—2002测定磷含量。

1.4.2 乳中SCC及乳成分的检测

乳中SCC检测采用体细胞计数仪(Fossomatic 5000,丹麦FOSS公司)测定。将储存的乳样混匀

后使用 MilkoScan FT120 乳成分分析仪测定乳脂率、乳蛋白率、乳糖率和乳尿素氮含量。4%乳脂校正乳(4%FCM)产量依据如下公式^[15]进行计算。

$$4\%FCM \text{ 产量} = M \times (0.4 + 15F)。$$

式中： M 为产奶量； F 为乳脂率（乳脂率为整个试验阶段的平均值）。

表 1 TMR 组成及营养水平（干物质基础）

Table 1 Composition and nutrient levels of the

TMR (DM basis)		%
项目 Items	含量 Content	
原料 Ingredients		
玉米青贮 Corn silage	24.53	
玉米 Corn	15.73	
棉籽粕 Cottonseed meal	3.31	
苜蓿干草 Alfalfa hay	14.31	
羊草 <i>Leymus chinensis</i>	10.20	
干酒糟及其可溶物 DDGS	3.11	
压片玉米 Pressure corn piece	8.17	
豆粕 Soybean meal	12.32	
甜菜粕 Beet pulp	4.81	
预混料 Premix ¹⁾	2.95	
食盐 NaCl	0.56	
合计 Total	100.00	
营养水平 Nutrient levels ²⁾		
产奶净能 NE_L /(MJ/kg)	7.13	
粗脂肪 EE	4.56	
粗蛋白质 CP	17.36	
酸性洗涤纤维 ADF	18.50	
中性洗涤纤维 NDF	31.34	
钙 Ca	0.68	
磷 P	0.41	

¹⁾ 每千克预混料含有 One kilogram of the premix contained the following: Fe 1 400 mg, Cu 1 200 mg, Mn 2 400 mg, Zn 5 500 mg, Se 40 mg, Co 30 mg, I 90 mg, VA 900 000 IU, VD 700 000 IU, VE 9 000 IU。

²⁾ 产奶净能为计算值^[14], 其他营养水平为实测值。 NE_L was a calculated value^[14], while the other nutrient levels were measured values.

1.4.3 血清免疫和抗氧化指标检测

血清中免疫相关因子[白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-8 (IL-8)、TNF- α 、干扰素- γ (IFN- γ)、淀粉样蛋白 A (SAA) 含量]及抗氧化指标[谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性及总抗氧化

能力 (T-AOC)、MDA 含量]均采用购于南京建成生物工程研究所的试剂盒, 参照说明书在酶标仪 (Multiskan FC, 赛默飞世尔仪器有限公司) 上进行检测。

1.5 数据处理与分析

所有试验数据先采用 Excel 2007 进行初步整理, 再采用 SPSS 17.0 统计软件中的 one-way ANOVA 程序进行单因素方差分析, 然后用 Duncan 氏法进行组间多重比较。 $P < 0.01$ 代表差异极显著, $P < 0.05$ 代表差异显著, $0.05 \leq P < 0.10$ 代表具有变化趋势。

2 结果与分析

2.1 竹叶黄酮与青蒿提取物对奶牛产奶性能和乳中 SCC 的影响

从表 2 中可以看出, 与 A 组相比, 投喂 30 g/d 竹叶黄酮使奶牛的产奶量增加了 8.95% ($P > 0.05$), 4%FCM 产量和第 14 天乳蛋白率显著提高 ($P < 0.05$), 第 14 天乳中 SCC 降低了 14.57% ($P < 0.05$); 投喂 60 g/d 青蒿提取物使奶牛的产奶量增加了 13.24% ($P > 0.05$), 显著提高了 4%FCM 产量和第 14 天乳蛋白率 ($P < 0.05$), 第 14 天乳中 SCC 降低了 27.15% ($P < 0.05$)。由此可见, 竹叶黄酮与青蒿提取物对奶牛机体无不良影响, 在一定程度上提升了奶牛的产奶性能, 并降低了乳中 SCC。

2.2 竹叶黄酮与青蒿提取物对奶牛血清免疫相关因子含量的影响

从表 3 中可以看出, 与 A 组相比, 投喂 30 g/d 的竹叶黄酮使奶牛第 14 天血清中 IL-1 β 、TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.05$), 且竹叶黄酮对奶牛 IL-1 β 含量的影响最为明显, 较 A 组降低了 4.61%; 而投喂 30 g/d 的竹叶黄酮对奶牛第 1、14、28 天血清中 IL-2、IL-6、IL-8、IFN- γ 含量均没有产生显著影响 ($P > 0.05$)。上述结果说明, 竹叶黄酮可在一定程度上提高奶牛机体的免疫功能。

从表 3 中还可以看出, 与 A 组相比, 投喂 60 g/d 青蒿提取物使奶牛第 14 天血清中 IL-1 β 、TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.05$), 第 14 天血清中 IL-2 含量显著升高 ($P < 0.05$); 而投喂 60 g/d 青蒿提取物对奶牛第 1、14、28 天血清中 IL-6、IL-8、IFN- γ 含量没有产生显著影响 ($P > 0.05$)。上述结果说明, 青蒿提取物可在一定程度上提高奶牛机体的免疫功能。

表 2 竹叶黄酮与青蒿提取物对奶牛产奶性能和乳中 SCC 的影响

Table 2 Effects of bamboo leaf flavonoids and *Artemisia annua* extract on milk performance and SCC in milk of dairy cows

项目 Items	时间 Time	A 组 A group	B 组 B group	C 组 C group	SEM	P 值 P-value
产奶量 Milk yield/(kg/d)		22.35	24.35	25.31	1.82	0.31
4%乳脂校正乳产量 4% FCM yield/(kg/d)		25.19 ^b	28.66 ^a	28.95 ^a	0.66	0.03
乳脂率 Milk fat percentage/%	第 1 天 Day 1	4.65	4.84	4.75	0.37	0.49
	第 14 天 Day 14	4.98	5.57	5.34	0.67	0.16
	第 28 天 Day 28	4.93	5.14	4.79	0.49	0.47
乳蛋白率 Milk protein percentage/%	第 1 天 Day 1	3.26	3.25	3.36	0.23	0.11
	第 14 天 Day 14	3.21 ^b	3.50 ^a	3.49 ^a	0.19	0.04
	第 28 天 Day 28	3.31	3.23	3.34	0.15	0.36
乳糖率 Lactose percentage/%	第 1 天 Day 1	3.96	4.07	3.83	0.40	0.88
	第 14 天 Day 14	3.92	4.24	4.19	0.35	0.18
	第 28 天 Day 28	3.98	3.87	3.79	0.14	0.45
乳尿素氮含量 Milk UN content/(mg/dL)	第 1 天 Day 1	12.56	12.43	12.66	0.15	0.34
	第 14 天 Day 14	12.77	12.41	12.82	0.56	0.27
	第 28 天 Day 28	13.24	12.9	12.43	0.48	0.29
乳体细胞数 Milk SCC/($\times 10^4$ 个/mL)	第 1 天 Day 1	45.0	41.8	39.6	0.76	0.15
	第 14 天 Day 14	45.3 ^a	38.7 ^b	33.0 ^b	0.30	0.01
	第 28 天 Day 28	46.3	40.9	41.2	0.43	0.34

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同或无字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P > 0.05$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

2.3 竹叶黄酮与青蒿提取物对奶牛血清抗氧化指标的影响

从表 4 中可以看出,与 A 组相比,投喂 30 g/d 竹叶黄酮或 60 g/d 青蒿提取物后,奶牛第 14 天血清中 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$),第 14 天血清中 SOD 活性有上升的趋势 ($P = 0.06$),而第 1、14、28 天血清中 CAT 活性、T-AOC 和 NO 含量均没有显著变化 ($P > 0.05$)。上述结果说明,竹叶黄酮与青蒿提取物对奶牛机体的抗氧化能力有一定的提高作用。

3 讨论

3.1 竹叶黄酮与青蒿提取物对奶牛产奶性能和乳中 SCC 的影响

本试验结果表明,给奶牛投喂竹叶黄酮与青蒿提取物可以在一定程度上提高奶牛的产奶量,显著提高乳蛋白率,并且降低乳中 SCC。前人的

研究发现,饲喂富含黄酮类化合物的植物有提高奶牛产奶量的趋势^[16-17],这可能是由于黄酮类化合物可影响甲状腺激素的分泌,促进营养物质的消化,进而提高生产性能。杨建英等^[18]研究发现,在奶牛饲料中加入 20 mg/kg 大豆黄酮可以增加奶牛的产奶量,并提高血清中催乳素含量。本研究结果与上述研究结果一致,给奶牛额外投喂 30 g/d 竹叶黄酮后,同样提高了奶牛的产奶量,这可能与黄酮类化合物能够促进奶牛催乳素的释放^[19-20]相关。催乳素是控制泌乳最重要的激素,其在单胃和反刍哺乳动物中具有促进乳腺生长和发育的作用^[21]。目前,关于青蒿提取物对奶牛产奶量影响的相关报道较少。本研究结果显示,青蒿提取物对奶牛的产奶量具有明显的促进作用,可能是由于青蒿提取物富含酚类及黄酮类化合物,可促进催乳素的释放,增强机体抗氧化能力并减少代谢紊乱,从而使得奶牛产奶量增加^[11,22-23]。

表 3 竹叶黄酮与青蒿提取物对奶牛血清免疫相关因子含量的影响
Table 3 Effects of bamboo leaf flavonoids and *Artemisia annua* extract on serum immune-related factor contents of dairy cows

项目 Items	第 1 天 Day 1				第 14 天 Day 14				第 28 天 Day 28						
	A 组		B 组		A 组		B 组		A 组		B 组		C 组		
	A group	B group	C group	C group	A group	B group	C group	C group	A group	B group	C group	C group	A group	C group	
	SEM	SEM	P-value	P-value	SEM	SEM	P-value	P-value	SEM	SEM	P-value	P-value	SEM	P-value	
白细胞介素-1 β IL-1 β /(pg/mL)	24.34	23.16	23.36	0.72	0.26	23.42 ^a	22.34 ^b	22.25 ^b	0.39	0.03	23.67	24.03	23.34	0.67	0.61
白细胞介素-2 IL-2/(pg/mL)	280.34	275.44	275.75	8.83	0.83	264.08 ^b	276.92 ^{ab}	291.54 ^a	9.43	0.04	261.28	266.59	270.92	7.08	0.42
白细胞介素-6 IL-6/(pg/mL)	103.46	102.96	104.77	1.85	0.62	104.51	100.7	101.74	1.66	0.11	104.81	104.39	103.83	2.06	0.89
白细胞介素-8 IL-8/(pg/mL)	259.06	261.98	266.81	5.01	0.34	264.08	260.52	262.38	5.26	0.80	254.17	258.51	260.47	5.29	0.50
肿瘤坏死因子- α TNF- α /(pg/mL)	52.44	52.41	52.56	0.45	0.94	52.67 ^a	51.05 ^b	50.74 ^b	0.66	0.04	52.39	51.79	52.01	0.39	0.35
干扰素- γ IFN- γ /(pg/mL)	537.54	545.67	549.09	8.79	0.44	549.90	549.73	567.92	14.10	0.37	544.2	533.33	544.81	5.76	0.14
淀粉样蛋白 A SAA/(mg/L)	76.45	78.81	76.36	3.79	0.77	77.71	75.7	73.43	2.99	0.10	76.81	74.69	74.43	0.98	0.11

表 4 竹叶黄酮与青蒿提取物对奶牛血清抗氧化指标的影响

Table 4 Effects of bamboo leaf flavonoids and *Artemisia annua* extract on serum antioxidant indexes of dairy cows

项目 Items	第 1 天 Day 1			第 14 天 Day 14			第 28 天 Day 28			P 值 P-value							
	A 组 A group	B 组 B group	C 组 C group	A 组 A group	B 组 B group	C 组 C group	A 组 A group	B 组 B group	C 组 C group								
	SEM	SEM	SEM	SEM	SEM	SEM	SEM	SEM	SEM								
过氧化氢酶 CAT/(U/mL)	35.49	35.22	35.15	35.36	36.49	36.75	35.49	37.05	36.28	0.18	0.78	0.18	35.49	37.05	36.28	0.74	0.17
一氧化氮 NO/($\mu\text{mol/L}$)	16.54	17.15	17.39	17.98	17.02	16.90	17.15	17.28	16.85	0.86	0.89	0.86	17.15	17.28	16.85	0.40	0.60
超氧化物歧化酶 SOD/(U/mL)	60.10	60.85	57.03	60.45	64.98	62.88	58.62	62.16	58.53	0.06	3.32	0.06	58.62	62.16	58.53	1.65	0.90
总抗氧化能力 T-AOC/(U/mL)	13.10	13.26	12.96	13.03	13.31	13.06	12.88	12.85	12.87	0.90	0.25	0.90	12.88	12.85	12.87	0.34	0.90
丙二醛 MDA/(nmol/mL)	3.13	2.99	3.03	3.30 ^a	2.77 ^b	2.65 ^b	3.30	2.75	2.80	0.04	0.22	0.04	3.30	2.75	2.80	0.31	0.19
谷胱甘肽过 氧化物酶 GSH-Px/(U/mL)	795.78	788.46	793.48	794.32	792.40	799.61	791.26	796.59	793.12	0.66	8.03	0.66	791.26	796.59	793.12	8.65	0.83

研究表明,奶牛机体的中性粒细胞和巨噬细胞迅速流入乳腺中可有效清除病原体并控制早期的炎症反应,但由于病原菌的入侵,加剧机体炎症反应使得乳腺中上皮细胞与参与机体免疫反应的细胞大量聚集,导致了乳中 SCC 急剧增加,依据奶牛乳中 SCC 可以判断奶牛乳腺的健康状态^[24]。本试验所用奶牛乳中 SCC 为 $(41.31 \pm 0.49) \times 10^4$ 个/mL,表明奶牛患隐性乳房炎^[25]。在给奶牛投喂竹叶黄酮或青蒿提取物后,乳中 SCC 显著下降。这与 Zhan 等^[16]依据奶牛体重饲喂 60 mg/kg 苜蓿黄酮,从而降低了乳中 SCC 的结果相似。其主要原因可能是竹叶黄酮与青蒿提取物具有抑菌抗炎的作用,可抑制细胞壁和细胞膜合成,对特定细胞内或表面的酶产生干扰,从而对引起奶牛乳房炎的细菌起到抑制作用^[26];此外,竹叶黄酮与青蒿提取物可在一定程度上影响血液中 TNF- α 的含量,诱导白细胞蛋白酶抑制剂的表达,从而减少 TNF- α 的分泌,提高免疫性能,进一步提高产奶量及乳品质,在一定程度上降低了奶牛乳房炎的发生^[27-28]。

3.2 竹叶黄酮与青蒿提取物对奶牛血清免疫相关因子含量的影响

细胞因子是机体面对炎症时自身调节的重要组成部分,TNF- α 和 IL-1 β 是巨噬细胞产生的主要促炎因子,与各种慢性炎症疾病均有关^[29]。当机体受到外界病原微生物的入侵后,某些组织会发生病理性的损伤,使得炎症部位的白细胞介素-1(IL-1)含量上升,并加速其他促炎因子的释放,促进和维持炎症反应,引发炎症部位的疼痛感。然而,研究发现,奶牛血清中 IL-1 含量的上升,可作用于神经递质引发厌食,并且抑制胃动力、胃排空和胃酸分泌,并在中枢和外周神经系统作用下在疾病的急性期间将采食量减少超过 50%,最终导致奶牛生产性能降低^[30]。本研究结果发现,竹叶黄酮与青蒿提取物显著降低了奶牛血清中 IL-1 β 的含量,可以有效地防治疾病对机体免疫损害过程中的应激反应,有利于动物机体的健康。TNF- α 的生物学作用主要有抵抗疾病感染、参与炎症的发热过程、调节机体免疫力。前人研究发现,在饲料中添加大豆异黄酮可以在一定程度上降低奶牛血清中 TNF- α 的含量,并促进机体免疫因子的分泌,使促炎因子的表达下降^[31]。这主要是因为黄酮类化合物可以影响丝裂原活化

蛋白激酶(MAPK)和 NF- κ B 信号转导通路,通过稳定 NF- κ B/NF- κ B 抑制蛋白(I κ B)复合物和阻止 I κ B 的降解,选择性抑制 p38-MAPK 信号转导通路中 TNF- α 的产生,最终产生抗炎作用^[32]。综上所述,竹叶黄酮与青蒿提取物可降低奶牛血清中 IL-1 与 TNF- α 的含量,这有利于动物在面对乳房炎时抑制促炎因子的过量表达,进而降低乳房炎的发生率。

促炎因子被认为是代谢和免疫功能的中枢整合者^[33]。本研究结果表明,青蒿提取物可显著增加奶牛血清中 IL-2 的含量。细胞因子 IL-2 主要由 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞产生,具有多种免疫学功能^[34]。研究发现,IL-2 也具有抗炎特性,通过抑制调节性 T 细胞 17(Th17)分化来控制炎症,并通过刺激调节性 T 细胞的产生和稳态发挥其免疫抑制作用^[35]。因此,提高血清中 IL-2 的含量可提高乳腺免疫功能,有效降低奶牛乳房炎的发生率。血清 SAA 是高密度脂蛋白的载脂蛋白,对机体的影响是多方面的,并可以调节免疫反应^[36],其含量的高低可以作为判断奶牛是否患有乳房炎的重要指标^[37]。本试验中,竹叶黄酮与青蒿提取物在一定程度上降低了奶牛血清中 SAA 的含量,进而降低乳房炎的发生率。

3.3 竹叶黄酮与青蒿提取物对奶牛血清抗氧化指标的影响

氧自由基具有较强的氧化特性,可对生物体的组织和细胞造成损伤,机体内源的 SOD 在氧自由基转化为过氧化物过程中起到了重要的作用,而 MDA 的含量高低反映了机体的氧化代谢状态^[38]。占今舜等^[39]研究发现,苜蓿黄酮的添加可以通过增加乳腺上皮细胞 CAT 和 GSH-Px 的活性,降低 MDA 的含量,提高乳腺上皮细胞的抗氧化能力。研究发现,青蒿提取物在一定程度上抑制大鼠的脂质过氧化,增强机体抗氧化酶活性,保护细胞免受氧自由基的侵害^[7,40]。植物提取物中的黄酮类化合物与青蒿提取物在生物系统中起到的保护作用均与其抗氧化能力有关^[41]。在本研究中,竹叶黄酮与青蒿提取物提高了奶牛血清中 SOD 活性,降低 MDA 含量,而 CAT 和 GSH-Px 活性未受到显著影响,与栗明月等^[13]以竹提取物饲喂奶牛的试验结果相似。上述结果说明这竹叶黄酮与青蒿提取物可在一定程度上增强奶牛机体的抗氧化能力。

4 结 论

竹叶黄酮与青蒿提取物均能够在一定程度上提高奶牛的产奶性能,增强机体的抗氧化能力与免疫功能,并可降低患隐性乳房炎奶牛乳中 SCC。

参考文献:

- [1] WANG T Y, LI Q, BI K S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate [J]. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 13(1): 12-23.
- [2] 栗明月, 焦梦荷, 蒋林树, 等. 竹叶黄酮的生理功能及其应用前景[J]. *中国农学通报*, 2018, 34(32): 144-149.
- [3] 栗明月, 方洛云, 苏汉书, 等. 竹叶提取物对奶牛泌乳性能、血液常规指标、免疫和抗氧化性能的影响[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(7): 3302-3309.
- [4] 贾若愚. 竹提取物对泌乳后期奶牛生产性能和血液生化指标的影响[D]. 硕士学位论文. 合肥: 安徽农业大学, 2011.
- [5] TSUGAMI Y, MATSUNAGA K, SUZUKI T, et al. Isoflavones and their metabolites influence the milk component synthesis ability of mammary epithelial cells through prolactin/STAT5 signaling [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017, 61(10): 1700156.
- [6] NAIR M P, MAHAJAN S, REYNOLDS J L, et al. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system [J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2006, 13(3): 319-328.
- [7] KIM W S, CHOI W J, LEE S, et al. Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial effects of artemisinin extracts from *Artemisia annua* L. [J]. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2015, 19(1): 21-27.
- [8] HUNT S, YOSHIDA M, DAVIS C E, et al. An extract of the medicinal plant *Artemisia annua* modulates production of inflammatory markers in activated neutrophils [J]. *Journal of Inflammation Research*, 2015, 8: 9-14.
- [9] SHAKIR L, HUSSAIN M, JAVEED A, et al. Artemisinins and immune system [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2011, 668(1/2): 6-14.
- [10] MYHRSTAD M C W, CARLSEN H, NORDSTRÖM O, et al. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 32(5): 386-393.
- [11] FERREIRA J F S, LUTHRIA D L, SASAKI T, et al. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer [J]. *Molecules*, 2010, 15(5): 3135-3170.
- [12] 贾可敬. 竹叶黄酮提取、纯化及抗氧化活性研究[D]. 硕士学位论文. 长沙: 中南林业科技大学, 2014.
- [13] 栗明月, 方洛云, 苏汉书, 等. 竹叶提取物对奶牛瘤胃体外发酵参数及产气量的影响[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(4): 1816-1822.
- [14] 冯仰廉, 周建民, 张晓明, 等. 我国奶牛饲料产奶净能值测算方法的研究[J]. *中国畜牧杂志*, 1987(1): 8-11.
- [15] 方必春, 高士宝, 戴克宏, 等. 关于校正不同乳脂率奶量公式的探讨[J]. *中国奶牛*, 2003(1): 39.
- [16] ZHAN J S, LIU M M, SU X S, et al. 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.
- [17] INKLER A, GESSNER D K, KOCH C, et al. 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.
- [18] 杨建英, 王艳玲, 郭永国, 等. 大豆黄酮对奶牛免疫功能及血清及乳中激素水平的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2006, 42(7): 15-17.
- [19] 李琮, 陈俊宏, 刘亚伟, 等. 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.
- [20] 占今舜, 胡利珍, 钟小军, 等. 苜蓿黄酮对奶牛泌乳性能、血清激素和免疫指标的影响[J]. *中国农业大学学报*, 2018, 23(12): 84-90.
- [21] LACASSE P, LOLLIVIER V, BRUCKMAIER R M, et al. Effect of the prolactin-release inhibitor quinagolide on lactating dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94(3): 1302-1309.
- [22] SARACILA M, CRISTE R D, PANAITTE T D, et al. *Artemisia annua* as phyto-genic feed additive in the diet of broilers (14-35 days) reared under heat stress (32 $^{\circ}$ C) [J]. *Brazilian Journal of Poultry Science*,

- 2018, 20(4): 825–832.
- [23] SAFARI M, GHASEMI E, ALIKHANI M, et al. Supplementation effects of pomegranate by-products on oxidative status, metabolic profile, and performance in transition dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(12): 11297–11309.
- [24] BOUVIER-MULLER J, ALLAIN C, ENJALBERT F, et al. Somatic cell count-based selection reduces susceptibility to energy shortage during early lactation in a sheep model [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(3): 2248–2259.
- [25] 李睿文, 李铁拴, 关鸣, 等. 康贝防治奶牛隐性乳房炎疗效观察及对乳汁体细胞数的影响 [J]. *中国兽医杂志*, 2002(6): 11–13.
- [26] CUSHNIE T P T, LAMB A J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011, 38(2): 99–107.
- [27] DE SANTIS S, KUNDE D, SERINO G, et al. Secretory leukoprotease inhibitor is required for efficient quercetin-mediated suppression of TNF α secretion [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(46): 75800–75809.
- [28] BURMA NCZUK A, HOLA P, MILCZAK A, et al. Quercetin decrease somatic cells count in mastitis of dairy cows [J]. *Research in Veterinary Science*, 2018, 117: 255–259.
- [29] FAN H K, COOK J A. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance [J]. *Journal of Endotoxin Research*, 2004, 10(2): 71–84.
- [30] KASIMANICKAM R K, KASIMANICKAM V R, OLSEN J R, et al. Associations among serum pro- and anti-inflammatory cytokines, metabolic mediators, body condition, and uterine disease in postpartum dairy cows [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2013, 11: 103.
- [31] 朱志宁, 郝振荣, 王明, 等. 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.
- [32] CHO S Y, PARK S J, KWON M J, et al. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2003, 243(1/2): 153–160.
- [33] SORDILLO L M, PIGHETTI G M, DAVIS M R. Enhanced production of bovine tumor necrosis factor- α during the periparturient period [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995, 49(3): 263–270.
- [34] FERREIRA V L, BORBA H H L, DE F. BONETTI A, et al. Cytokines and interferons: types and functions [M]//KHAN W A. Autoantibodies and cytokines. Wahid Ali Khan: IntechOpen, 2018.
- [35] ZECCONI A, PICCININI R, FIORINA S, et al. Evaluation of interleukin-2 treatment for prevention of intramammary infections in cows after calving [J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2009, 32(5): 439–451.
- [36] SACK G H, Jr. Serum amyloid A—a review [J]. *Molecular Medicine*, 2018, 24(1): 46.
- [37] KARREMAN H J, WENTINK G H, WENSING T. Using serum amyloid a to screen dairy cows for subclinical inflammation [J]. *Veterinary Quarterly*, 2000, 22(3): 175–178.
- [38] WANG B, TU Y, ZHAO S P, et al. Effect of tea saponins on milk performance, milk fatty acids, and immune function in dairy cow [J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(10): 8043–8052.
- [39] 占今舜, 詹康, 陈小连, 等. 苜蓿素对脂多糖诱导下奶牛乳腺上皮细胞炎症和乳蛋白合成相关基因表达的影响 [D]. *草业科学*, 2015, 24(12): 139–145.
- [40] REZAEI A, SHEKARFOROUSH S, CHANGIZI ASHTIYANI S, et al. The effects of *Artemisia aucheri* extract on hepatotoxicity induced by thioacetamide in male rats [J]. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 2013, 3(4): 293–301.
- [41] RAVISHANKAR D, RAJORA A K, GRECO F, et al. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2013, 45(12): 2821–2831.

Effects of Bamboo Leaf Flavonoids and *Artemisia annua* Extract on Milk Performance, Milk Somatic Cell Count and Serum Immune and Antioxidant Related Indexes of Dairy Cows with Subclinical Mastitis

HOU Kun¹ TONG Jinjin¹ CHU Kangkang² XIONG Benhai^{3*} JIANG Linshu^{1*}

(1. *Beijing Institute of Animal Science and Technology, Beijing Key Laboratory of Cow Nutrition, Beijing 102206, China;*

2. *Beijing Dairy Cattle Center, Beijing Capital Agribusiness Group, Beijing 100192, China;* 3. *Beijing*

Institute of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Chinese Academy of

Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the effects of bamboo leaf extract and *Artemisia annua* extract on milk performance, milk somatic cell count (SCC) and serum immune and antioxidant related indexes of dairy cows with subclinical mastitis. Eighteen Chinese Holstein cows with subclinical mastitis [SCC was $(41.31 \pm 0.49) \times 10^4$ cell/mL] with similar days in milk, similar milk yield, body weight of (590 ± 15) kg, 2 to 4 parities were selected and randomly divided into 3 groups with 6 cows per group for feeding experiment. Cows in control group were a total mixed ration (TMR), while cows in bamboo leaf flavones group and *Artemisia annua* extract group were also fed TMR, and supplementary fed with bamboo leaf flavones (30 g/d) and *Artemisia annua* extract (60 g/d), respectively. The feeding experiment was conducted for 35 days, including pre-test period of 7 days, feeding period of 14 days and post feeding period of 14 days. Blood and milk samples were collected on day 1, 14, 28 to measure milk SCC, milk composition and serum immune-related factor contents and antioxidant indexes, and the milk yield was recorded. The results showed as follows: 1) compared with the control group, the milk yield in bamboo leaf flavones group and *Artemisia annua* extract group was increased by 8.95% and 13.24% ($P > 0.05$), respectively, the 4% fat corrected milk (FCM) yield and milk protein percentage on day 14 were significantly increased ($P < 0.05$), and the milk SCC on day 14 was significantly decreased ($P < 0.05$). 2) The contents of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum on day 14 in bamboo leaf flavones group and *Artemisia annua* extract group were significantly lower than those in control group ($P < 0.05$); otherwise, the serum interleukin-2 (IL-2) content in serum in *Artemisia annua* extract group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). 3) Compared with the control group, the serum malondialdehyde (MDA) content on day 14 was decreased significantly ($P < 0.05$), and serum superoxide dismutase (SOD) activity on day 14 tended to be increased both in bamboo leaf flavones group and *Artemisia annua* extract group ($P = 0.06$). In conclusion, both bamboo leaf flavonoids and *Artemisia annua* extract can improve the milk performance, enhance the immune function and antioxidant capacity of dairy cows, and decrease the milk SCC of dairy cows with subclinical mastitis. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(9):4286-4295]

Key words: bamboo leaf flavonoids; *Artemisia annua* extract; antioxidant capacity; immune function; dairy cows; subclinical mastitis

* Corresponding authors: JIANG Linshu, professor, E-mail: kxjnb@vip.sina.com; XIONG Benhai, professor, E-mail: xiongbenhai@caas.cn