

严康, 马晓宇, 杨天宇, 等. 饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对瘤胃上皮细胞炎症因子表达量的影响[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(4): 1003-1012.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.04.017

## 饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对瘤胃上皮细胞炎症因子表达量的影响

严康<sup>1,2</sup>, 马晓宇<sup>1</sup>, 杨天宇<sup>1</sup>, 姜茂成<sup>1</sup>, 詹康<sup>1</sup>, 赵国琦<sup>1</sup>

(1.扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009; 2.江苏省畜牧总站, 江苏南京 210017)

**摘要:** 本研究旨在探索饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对奶牛瘤胃上皮细胞(BRECs)炎症因子基因表达量的影响。利用qRT-PCR等方法,研究饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对BRECs炎症因子、趋化因子以及抗氧化指标的影响。试验分为2个组:对照组(精粗料比为50:50)和高精料组(精粗料比为65:35),各自培养BRECs 6 h,每组设6个重复。结果表明,与对照组相比,高精料组BRECs炎症因子基因*IL-1 $\beta$* 、*IL-6*、*TNF- $\alpha$* 的mRNA表达量显著提高。饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液能显著提高BRECs中*CCL2*、*CCL20*、*CXCL2*、*CXCL8*、*CXCL9*基因的mRNA表达量。饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液显著降低*TLR2*、*TLR4*基因的mRNA表达量,但并未显著改变*CD14*、*MD2*、*MyD88*基因以及下游信号通路白细胞介素-1受体相关激酶基因*IRAK1*、*TRAF6*的mRNA表达量。值得注意的是,饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液显著上调BRECs中*PEPT1*基因的mRNA表达量( $P < 0.05$ ),推测PEPT1可能转运饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液中的细菌小肽进入细胞,引起炎症反应。饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液显著提高BRECs中丙二醛(MDA)含量和过氧化氢( $H_2O_2$ )含量,然而,超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总抗氧化物质(T-AOC)含量显著降低。说明,饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液能够促进瘤胃上皮细胞的炎症反应并加强免疫应答。此外,饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对奶牛瘤胃上皮具有损伤作用。

**关键词:** 高精料; 奶牛瘤胃液; 瘤胃上皮细胞; 炎症因子

中图分类号: S823.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2022)04-1003-10

## Effects of rumen fluid from dairy cows fed high concentrate diet on expression of inflammatory factors in bovine rumen epithelial cells

YAN Kang<sup>1,2</sup>, MA Xiao-yu<sup>1</sup>, YANG Tian-yu<sup>1</sup>, JIANG Mao-cheng<sup>1</sup>, ZHAN Kang<sup>1</sup>, ZHAO Guo-qi<sup>1</sup>

(1.School of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2.Jiangsu Province General Station of Animal Husbandry, Nanjing 210017, China)

**Abstract:** The purpose of this study is to explore the effects of rumen fluid from dairy cows fed high concentrate diet (HCRL) on expression of inflammatory factors in bovine rumen epithelial cells (BRECs). The effect of HCRL on the inflammatory factors, chemokines and antioxidant indices in BRECs was investigated using qRT-PCR. The experiment was divided into two groups: BRECs were cultured for six hours in control group (ratio of concentrate to coarse material was 50 :

50) and high concentrate group (ratio of concentrate to coarse material was 65 : 35) with six replicates in each group. These results showed that compared with control group, the mRNA expression levels of *IL-1 $\beta$* , *IL-6* and *TNF- $\alpha$*  in high concentrate group were significantly increased. In addition, HCRL could significantly enhance the mRNA expression levels of *CCL2*, *CCL20*, *CXCL2*,

收稿日期: 2022-06-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972589); 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS36)

作者简介: 严康(1985-), 男, 江苏南京人, 博士研究生, 高级畜牧师, 主要从事动物营养与饲料研究。(E-mail) yan-kang97822@163.com

通讯作者: 赵国琦, (E-mail) gqzhao@yzu.edu.cn

*CXCL8* and *CXCL9* in BRECs, and significantly reduce the mRNA expression levels of *TLR2* and *TLR4*, but did not significantly change the mRNA expression levels of *CD14*, *MD2*, *MyD88*, *IRAK1* and *TRAF6*. Notably, the HCRL could significantly enhance the mRNA expression level of *PEPT1* in BRECs. It was suggested that PEPT1 may transport the small bacterial peptides into the cells, resulting in inflammatory response. Rumen fluid from dairy cows fed high concentrate diet significantly increased malondialdehyde (MDA) content and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) content in BRECs. However, the activities of superoxide dismutase (*SOD*) and glutathione peroxidase (*GSH-PX*) and total antioxidant capacity (T-AOC) were significantly reduced. The results indicate that the HCRL can promote the inflammation response of rumen epithelial cells and strengthen the immune response. In addition, the HCRL has a damaging effect on the rumen epithelium of dairy cows.

**Key words:** high concentrate; rumen fluid of dairy cows; rumen epithelial cells; inflammatory cytokines

瘤胃上皮是重要的免疫屏障器官,对抵御瘤胃内微生物崩解产生的抗原具有重要的生理意义<sup>[1]</sup>。高精料日粮饲喂下瘤胃液中抗原肽以及有害物质会损害瘤胃上皮屏障功能<sup>[2-3]</sup>,引发系统性炎症反应,影响奶牛的健康和生产性能<sup>[4]</sup>。然而,关于饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液是如何引发牛瘤胃上皮细胞(BRECs)炎症反应的研究较少。因此,在高精料日粮饲喂条件下,阐明饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液诱导瘤胃上皮细胞炎症反应的分子机制,可为缓解奶牛瘤胃上皮炎症等代谢性障碍提供理论依据。

在奶牛生产中,为提高产奶量,一般会在日粮中添加高精料日粮,但长时间饲喂高精料日粮会诱发瘤胃内革兰氏阴性菌大量死亡和崩解<sup>[5]</sup>,导致瘤胃内产生大量脂多糖(LPS)<sup>[6]</sup>,引发系统性促炎症反应,导致产奶量下降<sup>[7-8]</sup>,给奶牛养殖业造成巨大的经济损失<sup>[9]</sup>。当LPS与BRECs共培养时,LPS能上调炎症因子基因*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$* 以及趋化因子基因*CXCL2*、*CXCL8*的mRNA表达量<sup>[10]</sup>。LPS与Toll样受体4(TLR4)结合,可识别和启动LPS触发的炎症反应<sup>[11-12]</sup>。LPS激活TLR4后,TLR4与细胞质内TIR结构域的接头蛋白相互作用<sup>[13]</sup>,接头蛋白包括髓样分化因子(MyD88)和Toll受体相关的分子<sup>[14-15]</sup>。TLR4与接头蛋白相互作用后,诱导IRAK1、IRAK4的招募和激活<sup>[16]</sup>,并与TRAF6形成复合体,激活下游蛋白激酶TAK1、IKK<sup>[17-18]</sup>,最终使NF- $\kappa$ B转录因子从细胞质移位至细胞核,进而引起炎症反应<sup>[15]</sup>。

饲喂高精料日粮后,奶牛瘤胃液中不仅含有LPS,还含有细菌二肽和细菌三肽<sup>[19]</sup>。营养代谢异常会破坏消化道天然免疫屏障,如小肠上皮屏障,使细菌小肽通过细胞旁路方式进入小肠固有层或直接进入小肠上皮细胞内,引发小肠上皮炎症反应<sup>[20]</sup>。细菌小肽诱发胃肠道炎症反应,严重影响奶牛健康、

鲜奶质量和饲料利用率。有学者指出,大肠杆菌崩解产生的细菌三肽,如甲酰三肽(fMLP)进入小肠内腔,引发小肠上皮的免疫应答反应<sup>[21]</sup>。通过fMLP处理小肠上皮细胞,能够上调肠上皮细胞转录因子基因*NF- $\kappa$ B* mRNA表达,并诱发促炎症反应<sup>[22]</sup>。此外,细菌胞壁酰二肽(MDP)和Tri-DAP三肽也能激活转录因子基因*NF- $\kappa$ B*。小肽转运蛋白1(PEPT1)转运细菌胞壁酰二肽MDP进入细胞内,刺激人结肠腺癌细胞Caco-2上皮细胞中*IL-8* mRNA上调<sup>[23]</sup>。MDP能够识别NOD2受体,引发一系列炎症反应,但不是通过Toll样受体信号通路<sup>[24-25]</sup>。Tri-DAP识别NOD1受体,激活RIPK2激酶,与IKK激酶相互作用,激活*NF- $\kappa$ B*信号通路,上调*TNF- $\alpha$* 、*IL-6*的表达<sup>[26]</sup>。Tri-DAP激活Caco-2丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),引发*IL-8*的mRNA表达<sup>[20]</sup>。

本研究拟探究饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对BRECs炎症因子、趋化因子和抗氧化指标的影响,以期解析高精料日粮饲喂条件下奶牛瘤胃上皮细胞的炎症反应机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

DMEM/F12培养基、胎牛血清和胰蛋白酶由Gibco公司提供;青霉素、链霉素、L-谷氨酰胺溶液、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸由Sigma公司提供;PrimeScript™ RT Master Mix和SYBR® Premix Ex Taq™ II由TaKaRa公司提供;超氧化物歧化酶(*SOD*)、谷胱甘肽过氧化物酶(*GSH-Px*)、丙二醛(MDA)、过氧化氢( $H_2O_2$ )、总抗氧化物质(T-AOC)的检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 奶牛瘤胃上皮细胞培养 奶牛瘤胃上皮细胞来自扬州大学<sup>[27]</sup>。用 DMEM/F12 完全培养基培养奶牛瘤胃上皮细胞,待细胞密度达到培养瓶 70% 生长面积时,用 0.05% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化奶牛瘤胃上皮细胞,放置于 37 °C 细胞培养箱中温育 3 min,培养瓶中的细胞开始发亮并从瓶底脱落,拍打细胞培养瓶数次,直至奶牛瘤胃上皮细胞全部从培养瓶底部脱落,用 5 ml 含 10.00% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM/F12 完全培养基终止消化,转移至 3 个瓶底面积为 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中继续培养。

1.2.2 瘤胃液样品采集 试验分为 2 组,分别为对照组(正常饲喂)和高精料组(饲喂高精料日粮),每组 6 头荷斯坦奶牛。试验奶牛处于泌乳中期且无临床疾病,100%全混合日粮 TMR 饲喂且满足美国国家科学研究委员会修订的奶牛营养需要(NRC)要求,每天于 8:00、14:00 和 21:00 分别挤奶。饲粮组成、营养成分见表 1 和表 2。每组奶牛饲喂相应日粮 28 d,诱导高精料组奶牛发生亚急性酸中毒(SARA)。当高精料组奶牛瘤胃液 pH 值为 5.5~5.8 时,对奶牛瘤胃液进行采集。采集时间为晨饲 3 h 后,用瘤胃液口腔采集器从瘤胃中采集约 50 ml 瘤胃食糜,并用 4 层纱布过滤后,转移至 50 ml 无菌离心管中,立即用便携式 pH 计测定瘤胃液 pH 值,并立即放置于液氮中暂存,然后带回实验室保存在 -80 °C 超低温冰箱中。

表 1 饲粮组成

Table 1 Diet formulations

原料	含量(%)	
	对照组	高精料组
玉米	19.4	27.0
豆粕 43	13.5	14.6
大麦	-	13.0
玉米酒糟	13.8	6.4
石粉	0.8	1.6
磷酸氢钙	1.1	1.0
食盐	0.4	0.4
青贮玉米	10.0	11.0
苜蓿干草	20.0	12.0
燕麦干草	20.0	12.0
泌乳牛预混料	1.0	1.0

1.00 kg 泌乳牛预混料含有 10 000 IU 维生素 A, 5 500 IU 维生素 D3, 2 000 IU 维生素 E, 2 200 IU 维生素 K3。1.00 kg 日粮含有 61.50 mg 锌、56.50 mg 锰、70.50 mg 铁、10.75 mg 铜、0.75 mg 碘、0.45 mg 钴和 0.50 mg 硒。

表 2 饲粮营养成分含量

Table 2 Nutritional contents of diet

营养成分	对照组	高精料组
泌乳净能(Mcal/kg)	1.57	1.66
干物质含量(%)	48.32	48.51
粗蛋白含量(%)	16.24	16.21
粗脂肪含量(%)	3.02	3.07
中性洗涤纤维含量(%)	30.26	23.75
酸性洗涤纤维含量(%)	24.08	18.02
粗灰分含量(%)	5.99	4.56
钙含量(%)	1.16	1.15
磷含量(%)	0.52	0.53
淀粉含量(%)	17.65	30.65

泌乳净能为计算值,其他指标是以干物质为基础实测的物质含量。

1.2.3 瘤胃液中挥发性脂肪酸浓度测定 瘤胃液中挥发性脂肪酸(VFA)浓度使用气相色谱法进行测定。取 2.0~3.0 ml 瘤胃液经 12 000 g 离心 10 min 后取 1.0 ml 上清液于 1.5 ml 离心管中,加 0.2 ml 20% 含 60 mmol/L 巴豆酸的偏磷酸,混匀后在 -20 °C 冰箱中过夜。第 2 d 将样品进行 12 000 g 离心 10 min 后,取上清液于 0.22 μm 水相滤膜过滤后,取 1.0 μl 进样进行 VFA 浓度测定。

1.2.4 瘤胃上皮细胞炎症因子基因 mRNA 相对表达量测定 选取试验组奶牛瘤胃液置于 50 ml 离心管中,4 °C 12 000 g 离心 90 min,小心吸取上清液并转移至 50 ml 离心管中,再进行 4 °C 12 000 g 离心 90 min,吸取上清,并用无菌 0.22 μm 滤膜进行过滤、除菌。试验分为 2 个组,分别为对照组(CK)和高精料组(HCRF)。6 孔板每孔接 2×10<sup>5</sup> 个 BRECs,CK 组在培养基中添加 10% 正常饲喂奶牛的瘤胃液,HCRF 组在培养基中添加 10% 饲喂高精料日粮奶牛的瘤胃液,分别孵育 BRECs 6 h。然后,使用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA。根据 TaKaRa 反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA,其中反转录反应混合物含有 1 μg 总 RNA 和 1×PrimeScript RT Master Mix,最终体积为 20 μl,反应在 37 °C 条件下进行 15 min。使用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex TaqTM II 试剂盒进行 qRT-PCR 试验。qRT-PCR 反应混合物包含 1×SYBR<sup>®</sup> Premix Ex TaqTM II, 0.4 μmol/L 的上游、下游引物,以及 100 ng cDNA 模板,最终体积为 20 μl,反应过程:95 °C 初始变性 30 s;然后在 95 °C 5 s,60 °C 30 s,进行 40 个循环。本研究所用引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成(表 3)。试验设 3 个重复,GAPDH 为内参基因,基因相对表达量用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算。

表3 荧光定量PCR引物信息表

Table 3 Primers information for real-time quantitative PCR

基因名称	引物序列(5'→3')	基因登录号	产物长度(bp)
<i>GAPDH</i>	F:GGGTCATCATCTCTGACACCT R:GGTCATAAGTCCCTCCACGA	NM_001034034.2	176
<i>IL-1β</i>	F:CAGTGCCTACGCACATGTCT R:AGAGGAGGTGGAGAGCCTTC	NM_174093.1	209
<i>IL-6</i>	F:CACCCAGGCGAGACTACTTC R:TCCTTGCTGCTTTCACACTC	NM_173923.2	129
<i>IL-32</i>	F:TCAAGAGAACAGTCCCGAAACC R:AGCGTACTTCTTGCTGTGCTTC	XM_005224639	71
<i>TNF-α</i>	F:GCCCTCTGGTTCAGACACTC R:AGATGAGGTAAGCCCGTCA	NM_173966.3	192
<i>IL-12</i>	F:TCTTTTCGGGACTGTTGACC R:AAAATCCCCATCCAAGGTAG	NM_174355.2	224
<i>p38</i>	F:GAGATCATGCTGAACTGGAT R:CTGGTCGATGTAAGTCACTTC	NM_001102174.1	120
<i>TGF-β</i>	F:CTGCTGTGTTCTGCTCAGCTCT R:TCCAGGCTCCAGATGTAAGG	NM_001166068.1	123
<i>CCL2</i>	F:GCTCGCTCAGCCAGATGCAA R:GGACACTTGCTGCTGGTACTC	NM_174006	171
<i>CCL20</i>	F:FTCGACTGCTGCTCCGATA R:GCACAACCTGTTTCAACCACT	NM_174263	172
<i>CCL28</i>	F:GCTTCTGAAAGAGTGACAAAGCT R:AGGATGACAGCAGCCAAAGTC	NM_001101163.1	72
<i>CXCL2</i>	F:CCCCTGGTCAACGAACTGCGCTGC R:CTAGTTTAGCATCTTATCGATGATT	NM_174299.3	204
<i>CXCL3</i>	F:CCCCTGGTCAACGAACTGCGCTGC R:AGTTGGTGTGCTGCCCTGTGTTAG	NM_001046513	217
<i>CXCL8</i>	F:TGGGCCACACTGTGAAAAT R:TCATGGATCTTGCTTCTCAGC	NM_173925.2	136
<i>CXCL9</i>	F:ACTGGAGTTCAAGGAGTTCAGCA R:TCTCACAAGAAGGGCTTGAGCAA	NM_001113172	129
<i>CXCL14</i>	F:AAGCTGGAATGAAGCCAAA R:GTTCCAGCGTGTGTAACATT	NM_001034410.2	153
<i>TLR-2</i>	F:CAGGCTTCTTCTCTGTCTTGT R:CTGTTGCCGACATAGGTGATA	NM_174197.2	140
<i>TLR-4</i>	F:GACCCTTGCCGTACAGGTTGT R:GGTCCAGCATCTTGTTGAT	NM_174198.6	103
<i>CD14</i>	F:CAGTATGCTGACACAATCAA R:AGTTCCTTGAGACGAGAGTA	NM_174008.1	122
<i>MD2</i>	F:GGAGAATCGTGGGTCTGC R:GCTCAGAACCTATTGAAACAGGA	NM_001046517.1	92
<i>MyD88</i>	F:TCATTGAGAAGAGGTGCCGT R:TGGCTTGACTTGATGGGAT	NM_001014382.2	146
<i>IRAK1</i>	F:CCTCAGCCACTGGACATCCT R:GGACGTTGGAACCTTGGACATCT	NM_001040555.1	103
<i>TRAF6</i>	F:AGAACAGATGCCAATCACTATGAT R:CTGATTCTCTGCATCTTTTCATG	NM_001034661.2	100
<i>PEPT1</i>	F:CAACATCATCTGCTTATTTG R:GGTAATCTTCTTGTCTATCC	NM_001099378	185
<i>NHE1</i>	F:GAAAGACAAGCTCAACCCGGTTT R:GGAGCGCTCACCGGCTAT	NM_174833.2	67
<i>NOD1</i>	F:TCAACACTGACCCAGTGAAGC R:TGAAGTTGACCACTGCCACC	NM_001256563.1	147
<i>NOD2</i>	F:CTCCTTGATCTGCCACAGT R:AGCATCTTCAAAAAGGCAGGG	NM_001002889.1	102
<i>RIPK2</i>	F:AGAATGCATCAAGAAGTGTTC R:AGGATCCACATGACTCTCTCC	NM_001034610	102

1.2.5 奶牛瘤胃上皮细胞抗氧化指标测定 试验分为2个组,分别为对照组(CK)和高精料组(HCRF)。6孔板每孔接 $2 \times 10^5$ 个BREC<sub>s</sub>,CK组在F12基础培养基中添加10%饲喂正常日粮奶牛的瘤胃液,HCRF组在F12基础培养基中添加10%饲喂高精料日粮奶牛的瘤胃液,分别孵育BREC<sub>s</sub> 6 h。然后,用含有蛋白酶抑制剂裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白质。通过试剂盒检测细胞内SOD、GSH-Px、MDA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、T-AOC的含量。

1.2.6 统计分析 利用SPSS16.0统计软件中的One-Way ANOVA模块进行单因素方差分析,显著性检验应用多重比较法。

## 2 结果与分析

### 2.1 饲喂高精料日粮对奶牛瘤胃发酵反应的影响

表4显示,与对照组相比,高精料组的奶牛瘤胃液中总挥发性脂肪酸浓度以及乙酸、丙酸、丁酸含量极显著提高( $P < 0.010$ ),戊酸含量提高( $P = 0.070$ )。与对照组相比,高精料组的奶牛瘤胃液的pH值极显著下降( $P = 0.005$ ),说明饲喂高精料日粮可以诱导奶牛发生亚急性酸中毒(SARA)。

表4 饲喂高精料日粮对奶牛瘤胃发酵参数的影响

Table 4 Effects of high concentrate diet on ruminal fermentation parameters of dairy cows

项目	对照组	高精料组	标准差	P值
总挥发性脂肪酸浓度(mmol/L)	72.87	102.88	6.25	0.001
乙酸含量(mmol/L)	48.08	57.73	3.02	<0.010
丙酸含量(mmol/L)	14.37	30.56	0.08	0.001
丁酸含量(mmol/L)	7.99	11.70	0.18	<0.010
异丁酸含量(mmol/L)	0.41	0.52	0.12	0.390
戊酸含量(mmol/L)	0.79	1.18	0.04	0.070
异戊酸含量(mmol/L)	0.88	1.14	0.02	0.310
乙酸/丙酸	3.47	1.90	0.29	<0.010
pH值	6.15	5.64	0.14	0.005

### 2.2 饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对奶牛瘤胃上皮细胞炎症因子基因表达的影响

通过qRT-PCR检测*IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α*、*IL-12*、*IL-32*、*p38β*、*TGF-β*的mRNA表达量,*GAPDH*作为内参基因。表5显示,与对照组相比,高精料组BREC<sub>s</sub>炎症因子基因*IL-1β*、*TNF-α*的mRNA表达量极显著

上调, *IL-6* 的 mRNA 表达量也极显著上调, 然而, 炎症因子 *IL-12*、*IL-32* 的 mRNA 表达量并没有显著改变。与对照组相比, 高精料组 *p38β* 和 *TGF-β* 的 mRNA 表达量也没有显著变化。说明, 饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液可以促进 BRECs 的炎症反应。

表 5 饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对 BRECs 炎症因子基因 mRNA 相对表达量的影响

Table 5 Effects of rumen fluid from dairy cows fed high concentrate diet on mRNA level of inflammatory cytokines in bovine rumen epithelial cells (BRECs)

基因	mRNA 相对表达量		标准差	P 值
	对照组	高精料组		
<i>IL-1β</i>	1.07	3.28	0.56	0.007
<i>IL-6</i>	1.05	3.46	0.59	0.007
<i>TNF-α</i>	1.01	1.98	0.25	0.009
<i>IL-12</i>	1.09	1.11	0.29	0.930
<i>IL-32</i>	1.06	0.85	0.14	0.170
<i>p38β</i>	1.02	0.81	0.11	0.090
<i>TGF-β</i>	1.02	0.92	0.10	0.350

### 2.3 饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对奶牛瘤胃上皮细胞趋化因子基因表达的影响

当受到外来抗原刺激时, 机体会启动先天免疫反应来积极响应感染。由于饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液中含有细菌死亡崩解产生的细菌小肽, 本研究假设饲喂高精料日粮后, 奶牛瘤胃上皮能够积极响应瘤胃液中细菌小肽对 BRECs 的感染, 因此, 通过 qRT-PCR 来检测 BRECs 初始炎症反应相关趋化因子基因的 mRNA 表达量。表 6 显示, 饲喂高精料日粮奶牛的瘤胃液能够显著上调 BRECs 中 CCL 型的 *CCL2*、*CCL20* 的 mRNA 表达量, 但 *CCL28* 的 mRNA 表达量并未显著上调 ( $P>0.05$ )。此外, 与对照组相比, 高精料组的 BRECs 中 CXCL 型的 *CXCL8*、*CXCL9* 的 mRNA 表达量极显著上调 ( $P<0.01$ ), *CXCL2* 的 mRNA 表达量显著上调 ( $P<0.05$ ), *CXCL14* 的 mRNA 表达量未显著上调 ( $P=0.09$ )。说明, 饲喂高精料日粮奶牛的瘤胃液能够增加大部分 CCL 型和 CXCL 型趋化因子基因的 mRNA 表达量, 进而积极响应饲喂高精料日粮奶牛的瘤胃液中细菌抗原的感染。

### 2.4 饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对奶牛瘤胃上皮细胞 Toll 信号通路的影响

模式识别受体主要包括 2 种, 即细胞膜表面的

Toll 样受体 (TLR) 和胞浆内 NOD 受体。Toll 样受体信号通路的激活在炎症反应中发挥重要作用。TLR 能够识别各种病原体中的保守基序, 迅速激活细胞内信号传导的级联反应, 促使机体生成炎症因子和趋化因子。与对照组相比, 高精料组 *TLR2*、*TLR4* 基因的 mRNA 表达量显著降低。TLR4 与许多细胞质内的接头蛋白 (包括 *CD14*、*MD2*、*MyD88*) 相互作用。TLR4 与接头蛋白的相互作用, 会引起、导致白介素-1 受体相关激酶的募集和激活, 并与 *TRAF6* 形成复合体。结果 (表 7) 表明, 饲喂高精料日粮奶牛的瘤胃液并未显著改变 *CD14*、*MD2*、*MyD88* 以及下游信号通路 *IRAK1* 激酶、*TRAF6* 连接酶基因的 mRNA 表达量, 说明饲喂高精料日粮奶牛的瘤胃液促进 BRECs 炎症反应可能不是通过 Toll 样受体信号通路, 而是通过其他信号通路实现的。

表 6 饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对 BRECs 趋化因子基因 mRNA 表达量的影响

Table 6 Effects of rumen fluid from dairy cows fed high concentrate diet on mRNA level of chemokines in BRECs

基因	mRNA 相对表达量		标准差	P 值
	对照组	高精料组		
<i>CCL2</i>	1.05	1.81	0.32	0.047
<i>CCL20</i>	1.10	6.02	1.31	0.010
<i>CCL28</i>	1.07	1.65	0.36	0.150
<i>CXCL2</i>	1.09	3.86	0.99	0.040
<i>CXCL3</i>	1.06	0.85	0.14	0.170
<i>CXCL8</i>	1.02	3.52	0.55	0.001
<i>CXCL9</i>	1.03	1.53	0.13	0.004
<i>CXCL14</i>	1.13	1.65	0.28	0.090

表 7 饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对 BRECs Toll 样受体信号通路的影响

Table 7 Effects of rumen fluid from dairy cows fed high concentrate diet on Toll-like receptor signaling pathway in BRECs

基因	mRNA 相对表达量		标准差	P 值
	对照组	高精料组		
<i>CD14</i>	1.09	1.55	0.33	0.190
<i>MD2</i>	1.11	1.01	0.26	0.690
<i>TLR2</i>	1.02	0.67	0.14	0.040
<i>TLR4</i>	1.01	0.53	0.11	0.002
<i>MyD88</i>	1.01	0.89	0.12	0.340
<i>IRAK1</i>	1.05	1.20	0.29	0.630
<i>TRAF6</i>	1.02	1.15	0.20	0.530

## 2.5 饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对奶牛瘤胃上皮细胞 NOD/RIPK2 信号通路的影响

PEPT1 可以将细菌小肽转运至细胞内,细菌小肽引起核苷酸寡聚化结构域 NOD 受体与 RIPK2 相互作用,进而引起奶牛瘤胃上皮细胞炎症反应。NOD 受体可以识别细菌小肽,激活 NF- $\kappa$ B 转录因子并诱导炎症反应。NOD1 和 NOD2 是先天免疫受体,能够识别革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌崩解的细菌小肽。NOD1 主要识别革兰氏阴性菌崩解产生的细菌小肽,而 NOD2 既能识别革兰氏阴性菌崩解产生的细菌小肽也能识别革兰氏阳性菌崩解产生的细菌小肽。表 8 显示,与对照组相比,高精料组 BRECs 中 *PEPT1* 的 mRNA 表达量显著提高 ( $P < 0.05$ ),但 *NHE1*、*NOD1*、*NOD2*、*RIPK2* 的 mRNA 表达量并无显著变化。说明,PEPT1 可能转运饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液中的细菌小肽进入细胞,引起炎症反应,但还需要进一步证明。

表 8 饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对 BRECs NOD 样受体和 RIPK2 信号通路的影响

Table 8 Effects of rumen fluid from dairy cows fed high concentrate diet on NOD-like receptor and RIPK2 signaling pathway in BRECs

基因	mRNA 相对表达量		标准差	P 值
	对照组	高精料组		
<i>PEPT1</i>	1.09	1.99	0.40	0.04
<i>NHE1</i>	1.00	0.88	0.12	0.31
<i>NOD1</i>	1.06	1.10	0.43	0.93
<i>NOD2</i>	1.05	0.75	0.22	0.21
<i>RIPK2</i>	1.04	0.84	0.41	0.21

## 2.6 饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对奶牛瘤胃上皮细胞抗氧化性的影响

表 9 显示,饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液可以极显著增加 BRECs 中 MDA、 $H_2O_2$  含量,然而,*SOD*、*GSH-Px*、*T-AOC* 含量极显著降低。表明饲喂高精料日粮会对奶牛瘤胃上皮产生损伤作用。

## 3 讨论

为了提高产奶量,经常以高精料日粮饲喂奶牛。然而,长期饲喂高精料日粮会改变奶牛瘤胃微生物的组成和代谢,导致挥发性脂肪酸大量积累,降低瘤

表 9 饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液对奶牛瘤胃上皮细胞抗氧化指标的影响

Table 9 Effects of rumen fluid from dairy cows fed high concentrate diet on the antioxidant index in BRECs

抗氧化指标	对照组	高精料	标准差	P 值
谷胱甘肽过氧化物酶含量( $\mu$ mol/L)	201.10	102.20	23.00	0.002
丙二醛含量(nmol/ml)	0.14	0.35	0.05	0.001
过氧化氢含量(mmol/L)	6.40	10.91	1.20	0.004
超氧化物歧化酶含量(nmol/ml)	65.70	56.70	1.46	<0.001
总抗氧化物质含量( $\mu$ mol/ml)	17.29	7.34	0.04	<0.001

胃液 pH 值<sup>[28-29]</sup>。瘤胃液 pH 值的急剧下降是目前奶牛养殖业主要关注的健康问题之一,会导致奶牛出现消化不良,引发生产损失。有报道指出,SARA 与低纤维、高能量的日粮和 pH 值有关<sup>[9]</sup>。SARA 会导致瘤胃内 LPS 产生,甚至从瘤胃转移到血液内循环<sup>[30]</sup>。有研究发现,饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液 pH 值低于 5.8,且持续时间为 1 d 约 5.1 h,成功诱导奶牛出现 SARA<sup>[31]</sup>。在本研究中,与对照组相比,高精料组的瘤胃液 pH 值显著降低,说明 SARA 被成功诱导。通常情况下,高精料会促进乳酸产生菌的增加,减少瘤胃内纤维降解菌的数量,导致瘤胃液 pH 值急剧下降<sup>[32]</sup>。因此,瘤胃液 pH 值的改变可能是由于饲料从干草到高精料过渡过程中,非结构性碳水化合物的快速发酵和瘤胃内挥发性脂肪酸的积累引起的<sup>[33]</sup>。pH 值的降低也可能是由于瘤胃内乳酸积累导致的。此外,在本研究中,饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液中乙酸、丙酸、丁酸含量和总挥发性脂肪酸浓度显著升高。有研究发现,饲喂高精料日粮会引起瘤胃内丙酸、丁酸含量的升高<sup>[34-35]</sup>,这与本研究结果一致。有学者指出,高精料日粮会激活瘤胃上皮钙信号通路,可能是由于挥发性脂肪酸在瘤胃内大量积累引起的<sup>[36-37]</sup>。低 pH 值会降低瘤胃内细菌的丰富度和多样性,在饲喂高精料日粮引起奶牛 SARA 时,低 pH 瘤胃环境会导致细菌死亡和崩解,使其相对丰度降低<sup>[38]</sup>。因此,饲喂高精料日粮会影响奶牛瘤胃发酵,导致瘤胃内环境紊乱。

饲喂高谷物日粮引起的 SARA 会损害奶牛健康,如产生瘤胃炎、代谢性酸中毒、跛行和肝脓肿等<sup>[38-40]</sup>。此外,谷物诱导的 SARA 会增加急性时相反应蛋白和血清淀粉样蛋白 A 的水平,引起全身炎症反应<sup>[41-42]</sup>。这种全身性炎症反应与日粮引起的

瘤胃上皮屏障功能的破坏有关<sup>[5]</sup>。因此,本研究采集饲喂高精料日粮奶牛的瘤胃液进行体外试验,进一步探索其是否会引起 BRECs 的炎症反应,结果表明,与对照组相比,高精料组促炎因子基因 *IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$* 、*IL-6* 的 mRNA 表达量显著上升。有研究发现,LPS 的释放以及 pH 值的降低可能通过协同作用破坏瘤胃上皮屏障<sup>[43]</sup>。上皮屏障被破坏后,促使炎症因子大量释放,引起瘤胃上皮局部炎症反应<sup>[44-45]</sup>。*IL-6* 作为一种多功能细胞因子,参与调节免疫反应、急性时相反应和炎症<sup>[46-47]</sup>。前人的研究结果表明,*IL-6* 可以参与肠道组织修复,阻止 *IL-6* 的产生有利于创伤面的愈合<sup>[48-49]</sup>。因此,BRECs 炎症因子基因的高表达,说明长时间饲喂高精料日粮能引起奶牛瘤胃上皮发生炎症反应。有研究发现,SARA 引发的炎症因子基因 mRNA 表达量增加主要与淀粉类细菌有关,高精料日粮有利于这类细菌增长,进而增加瘤胃内毒素和其他细菌崩解产物在胃肠道的易位,这可能是诱发反刍动物炎症的原因<sup>[42]</sup>。

趋化因子是能诱导免疫细胞发生定向趋化的细胞因子的总称,是一类结构、功能相似的小分子蛋白质,在细胞迁移、免疫、炎症等反应中发挥重要作用。趋化因子可参与调节白细胞、淋巴细胞等免疫细胞的募集<sup>[50]</sup>。根据半胱氨酸的序列位置将趋化因子分为 CXCL、CCL、C 和 CX3C(C 为半胱氨酸,X 为任意氨基酸)4 大类。CCL 型趋化因子主要趋化单核细胞,CXCL 型趋化因子主要趋化中性粒细胞。本研究选取趋化因子家族中种类较多的 2 种亚家族(CCL 型趋化因子和 CXCL 型趋化因子)进行测定。趋化因子在免疫细胞迁移中的作用主要是通过与其受体结合完成的。一种趋化因子可结合多种趋化因子受体,一种趋化因子受体也能与多种趋化因子相结合<sup>[51]</sup>。CCL2 是在人体内最早被发现及研究最多的 CCL 类趋化因子,可通过受体 CCR2 介导,将免疫细胞迁移至损伤部位引发免疫应答反应<sup>[52]</sup>。有研究发现,CXCL14 可以通过调节其他趋化因子受体,在介导免疫及炎症反应等过程中发挥作用<sup>[53]</sup>。CXCL14 可由 B 淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、单核细胞衍生的未成熟的树突状细胞等多种细胞分泌产生,并能聚集、激活免疫细胞至炎症部位杀死靶细胞,发挥免疫监视及免疫防御作用<sup>[54]</sup>。在本研究中,饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液可显著

提高 BRECs 中 CCL 型 *CCL2*、*CCL20* 基因以及 CXCL 型 *CXCL2*、*CXCL8*、*CXCL9* 基因的表达。另有研究发现,饲喂高精料日粮奶牛的瘤胃上皮趋化因子基因表达上调<sup>[34]</sup>,这与本研究结果一致,表明饲喂高精料日粮触发了奶牛瘤胃上皮免疫应答反应,这可能是在饲喂高精料日粮条件下机体对自身的免疫保护。

反刍动物 PEPT1 主要分布于胃上皮组织和小肠黏膜<sup>[55]</sup>。有研究报道,PEPT1 介导细菌小肽转运,进入结肠上皮细胞,通过调节 *IFN- $\gamma$*  活性,激活 *NF- $\kappa$ B* 通路,诱导肠道炎症反应<sup>[22]</sup>。有研究发现,饲喂高精料日粮能促进马肠道中 *PEPT1* mRNA 的表达<sup>[22]</sup>。由此可知,PEPT1 可以介导细菌小肽的转运和吸收,激活肠道免疫细胞,促进肠上皮细胞与免疫细胞相互作用,最终导致小肠上皮细胞的炎症反应。此外,有研究发现,饲喂高精料日粮会导致奶牛瘤胃内有机酸大量累积和瘤胃液 pH 值急剧下降,改变瘤胃内环境的酸碱平衡,影响瘤胃微生物区系多样性,并诱发微生物崩解释放大量细菌小肽和促炎因子<sup>[31]</sup>。在本研究中,饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液显著上调 BRECs 中 *PEPT1* 的 mRNA 表达量,这可能是由于瘤胃液中携带大量细菌分解产生的细菌小肽,通过 PEPT1 可以将这些细菌小肽运输到细胞中,细菌小肽的运输也可能导致瘤胃上皮细胞内的细菌产物抗原增加,诱导 *PEPT1* 在瘤胃上皮细胞中的表达,进而导致细胞对细菌小肽转运的增加,使细胞内的细菌小肽大量积累,激活炎症信号通路,从而引发下游的促炎症反应。

细菌小肽可激活细胞内的 NOD1、NOD2 样受体,并使其结构发生改变,进而激活丝氨酸/苏氨酸激酶 2(*RIPK2*)并引起泛素化<sup>[56]</sup>。*RIPK2* 是 NOD1 和 NOD2 的下游信号分子。*RIPK2* 在树突状细胞和巨噬细胞等细胞中表达,NOD1 和 NOD2 对微生物相关分子模式的识别导致 *RIPK2* 与这些天然免疫受体相互作用,进而通过激活 MAPK 信号通路中关键激酶和 *NF- $\kappa$ B* 转录因子表达,释放 *TNF- $\alpha$* 、*IL-6*、*IL-12* 等促炎细胞因子<sup>[57]</sup>。有研究证实,*RIPK2* 依赖 NOD 受体诱导促炎细胞因子的产生<sup>[25]</sup>。此外,有研究发现,与受刺激的 *RIPK2* 完整小鼠的巨噬细胞相比,缺乏 *RIPK2* 的小鼠中,*IL-6*、*TNF- $\alpha$*  炎症因子基因的 mRNA 表达量明显降低<sup>[58]</sup>。因此,这些研究结果表明 *RIPK2* 是通过 NOD1/NOD2 介导产生促

炎因子的重要信号分子, *RIPK2* 的激活在宿主防御微生物感染中起着至关重要的作用。

有学者指出, 日粮的改变会影响动物机体瘤胃组织的抗氧化能力<sup>[59]</sup>。饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液可以极显著增加 BREC 中 MDA、 $H_2O_2$  含量, 然而, *SOD*、*GSH-Px*、*T-AOC* 含量极显著降低, 说明饲喂高精料日粮奶牛的瘤胃液可能影响瘤胃上皮细胞的抗氧化能力, 与前人的研究结果一致。组织中的 *SOD*、*GSH-Px*、MDA 和 *T-AOC* 等指标的变化是反应机体氧化/抗氧化状态的重要指标, 其中超氧化物歧化酶是消除动物体内自由基损伤的主要防御酶<sup>[60-62]</sup>, 具有清除自由基、提高细胞活力、保持生物膜稳态等功能; MDA 是脂质过氧化反应的终产物, 其含量可直接反映细胞膜脂质过氧化的程度<sup>[63]</sup>。通过本研究结果证明, 饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液会对细胞活力和生物膜稳态造成损伤, 并且会加剧细胞膜脂质过氧化程度。饲喂高精料日粮的奶牛瘤胃液会影响瘤胃上皮细胞的稳态, 致使瘤胃上皮细胞对营养物质的代谢受阻, 从而造成代谢紊乱, 引起机体的氧化应激反应, 导致炎症反应。

#### 参考文献:

- [1] STEELE M A, ALZAHAL O, HOOK S E, et al. Ruminal acidosis and the rapid onset of ruminal parakeratosis in a mature dairy cow: a case report [J]. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2009, 51(1): 39.
- [2] STEELE M A, CROOM J, KAHLER M, et al. Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis [J]. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative & Comparative Physiology*, 2011, 300(6): R1515-R1523.
- [3] STEELE M A, GREENWOOD S L, CROOM J, et al. An increase in dietary non-structural carbohydrates alters the structure and metabolism of the rumen epithelium in lambs [J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2012, 92(2): 123-130.
- [4] PLAIZIER J C, KHAFIPOUR E, LI S, et al. Subacute ruminal acidosis (SARA), endotoxins and health consequences [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2012, 172(1): 9-21.
- [5] LIU J H, XU T T, LIU Y J, et al. A high-grain diet causes massive disruption of ruminal epithelial tight junctions in goats [J]. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative & Comparative Physiology*, 2013, 305(3): 232-241.
- [6] KLEEN J L, HOOIJER G A, REHAGE J, et al. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review [J]. *Journal of Veterinary Medicine a Physiology Pathology Clinical Medicine*, 2003, 50(8): 406.
- [7] NORDLUND K V, GARRETT E F. Rumencentesis: A technique for collecting rumen fluid for the diagnosis of subacute rumen acidosis in dairy herds [J]. *The Bovine Practitioner*, 1994, 15(2): 14-16.
- [8] DUFFIELD T, PLAIZIER J C, FAIRFIELD A, et al. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87(1): 59-66.
- [9] KRAUSE K M, OETZEL G R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review [J]. *Animal Feed Science & Technology*, 2006, 126(3/4): 215-236.
- [10] DENNIS C K, PENNER G B. Effects of a proinflammatory response on metabolic function of cultured, primary ruminal epithelial cells [J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(1): 1002-1017.
- [11] MEDZHITOV R, PRESTON H, JANEWAY C. A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. *Nature*, 1997, 388(6640): 394-397.
- [12] TAKEUCHI O, HOSHINO K, KAWAI T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components [J]. *Immunity*, 1999, 11(4): 443-451.
- [13] ALEXOPOULOU L, HOLT A C, MEDZHITOV R, et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3 [J]. *Nature*, 2001, 413(6857): 732-738.
- [14] ZHANG F X, KIRSCHNING C J, MANCINELLI R, et al. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor- $\kappa$ B through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(12): 7611-7614.
- [15] HORNG T, BARTON G M, MEDZHITOV R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway [J]. *Nature Immunology*, 2001, 2(9): 835-841.
- [16] OSHIUMI H, MATSUMOTO M, FUNAMI K, et al. An adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- $\beta$  induction [J]. *Nature Immunology*, 2003, 4(2): 161-167.
- [17] SUZUKI N, SUZUKI S, DUNCAN G S, et al. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking *I-RAK-4* [J]. *Nature*, 2002, 416(6882): 750-756.
- [18] IRIE T, MUTA T, TAKESHIGE K. TAK1 mediates an activation signal from Toll-like receptor(s) to nuclear factor- $\kappa$ B in lipopolysaccharide-stimulated macrophages [J]. *FEBS Letters*, 2000, 467(2/3): 160-164.
- [19] CHARRIER L, DRISS A, YAN Y, et al. hPepT1 mediates bacterial tripeptide fMLP uptake in human monocytes [J]. *Laboratory Investigation*, 2006, 86: 490-503.
- [20] DALMASSO G, NGUYEN H, CHARRIER-HISAMUDDIN L, et al. PEPT1 mediates transport of the proinflammatory bacterial tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*meso*-DAP in intestinal epithelial cells [J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal & Liver Physiology*, 2010, 299(3): 687-696.
- [21] MERLIN D, STEEL A, GEWIRTZ A T, et al. PEPT1-mediated

- epithelial transport of bacteria-derived chemotactic peptides enhances neutrophil-epithelial interactions [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, 102(11): 2011-2018.
- [22] BUYSE M, TSOCA S A, WALKER F, et al. PEPT1-mediated fMLP transport induces intestinal inflammation *in vivo* [J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2002, 283(6): C1795-C1800.
- [23] VAVRICKA S R, MUSCH M W, CHANG J E, et al. PEPT1 transports muramyl dipeptide, activating NF- $\kappa$ B and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells [J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(5): 1401-1409.
- [24] GIRARDIN S E, BONECA I G, VIALA J, et al. NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(11): 8869-8872.
- [25] KOBAYASHI K, INOHARA N, HERNANDEZ L D, et al. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems [J]. *Nature*, 2002, 416(6877): 194-199.
- [26] PARK J H, KIM Y G, MCDONALD C, et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through NOD1 and NOD2 but not TLRs [J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 178(4): 2380-2386.
- [27] 詹康. SCFAs 通过 GPR41 调控奶牛瘤胃上皮细胞炎症反应的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2017.
- [28] AMETAJ B N, ZEBELI Q, SALEEM F, et al. Metabolomics reveals unhealthy alterations in rumen metabolism with increased proportion of cereal grain in the diet of dairy cows [J]. *Metabolomics*, 2010, 6(4): 583-594.
- [29] HOOK S E, STEELE M A, NORTHWOOD K S, et al. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation and recovery on the density and diversity of bacteria in the rumen of dairy cows [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2011, 78(2): 275-284.
- [30] GUO J, CHANG G, ZHANG K, et al. Rumen-derived lipopolysaccharide provoked inflammatory injury in the liver of dairy cows fed a high-concentrate diet [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(29): 46769-46780.
- [31] MAO S Y, ZHANG R Y, WANG D S, et al. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing [J]. *Anaerobe*, 2013, 24: 12-19.
- [32] MACKIE R I, GILCHRIST F. Changes in lactate-producing and lactate-utilizing bacteria in relation to pH in the rumen of sheep during stepwise adaptation to a high-concentrate diet [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 38(3): 422-430.
- [33] GOAD D W, GOAD C L, NAGARAJA T G. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers [J]. *Journal of Animal Science*, 1998, 76(1): 234-241.
- [34] ZHANG R, ZHU W, MAO S, et al. High-concentrate feeding up-regulates the expression of inflammation-related genes in the ruminal epithelium of dairy cattle [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2016, 7: 599-611.
- [35] AGLE M, HRISTOV A N, ZAMAN S, et al. Effect of dietary concentrate on rumen fermentation, digestibility, and nitrogen losses in dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2010, 93(9): 4211-4222.
- [36] UPPAL S K, WOLF K, MARTENS H. The effect of short chain fatty acids on calcium flux rates across isolated rumen epithelium of hay-fed and concentrate-fed sheep [J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2003, 87(1/2): 12-20.
- [37] LEONHARD S, BECKER G, BREVES G, et al. Chloride, gluconate, sulfate, and short-chain fatty acids affect calcium flux rates across the sheep forestomach epithelium [J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(3): 1516-1526.
- [38] OGATA T, KIM Y H, MASAKI T, et al. Effects of an increased concentrate diet on rumen pH and the bacterial community in Japanese black beef cattle at different fattening stages [J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2019, 81(7): 968-974.
- [39] PLAIZIER J C, KRAUSE D O, GOZHO G N, et al. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences [J]. *Veterinary Journal*, 2008, 176(1): 21-31.
- [40] JAMES C M, JAN C P, MICHAEL A S, et al. Butyrate-mediated genomic changes involved in non-specific host defenses, matrix remodeling and the immune response in the rumen epithelium of cows afflicted with subacute ruminal acidosis [J]. *American Journal of Animal & Veterinary Sciences*, 2013, 128(23): 89-115.
- [41] GOZHO G N, KRAUSE D O, PLAIZIER J C. Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(2): 856-866.
- [42] KHAFIPOUR E, KRAUSE D O, PLAIZIER J C. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation [J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(3): 1060-1070.
- [43] EMMANUEL D, MADSEN K L, CHURCHILL T A, et al. Acidosis and lipopolysaccharide from *Escherichia coli* B:055 cause hyperpermeability of rumen and colon tissues [J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(12): 5552-5557.
- [44] YOSUKE K, YOSHIYUKI G, HIROSHI K. Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation [J]. *European Journal of Immunology*, 2013, 43(12): 3108-3115.
- [45] MANI V, WEBER T, BAUMGARD L, et al. Growth and development symposium: endotoxin, inflammation, and intestinal function in livestock [J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(5): 1452-1465.
- [46] CHANG P, HAO L, OFFERMANN S, et al. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition [J]. *Proceedings of the National Acad-*

- emy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(6): 2247-2252.
- [47] TEBBUTT N C, GIRAUD A S, INGLESE M, et al. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice [J]. *Nature Medicine*, 2002, 8(10): 1089-1097.
- [48] AKDIS M, BURGLER S, CRAMERI R, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : receptors, functions, and roles in diseases [J]. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 2011, 127(3): 701-721.
- [49] EMING S A, KRIEG T, DAVIDSON J M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007, 127(3): 514-525.
- [50] NOMIYAMA H, OSADA N, YOSHIE O. The evolution of mammalian chemokine genes [J]. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 2010, 21(4): 253-262.
- [51] HUGHES C E, NIBBS R. A guide to chemokines and their receptors [J]. *FEBS Journal*, 2018, 285(16): 2944-2971.
- [52] ROBERTS T K, EUGENIN E A, LOPEZ L, et al. CCL2 disrupts the adherens junction: implications for neuroinflammation [J]. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 2012, 92(8): 1213-1233.
- [53] PAUL C, MICHELLE L M, MARTÍNEZ M L, et al. Epithelial chemokine CXCL14 synergizes with CXCL12 via allosteric modulation of CXCR4 [J]. *The FASEB Journal*, 2017, 31(7): 3084-3097.
- [54] LU J, CHATTERJEE M, SCHMID H, et al. CXCL14 as an emerging immune and inflammatory modulator [J]. *Journal of Inflammation*, 2016, 13: 1.
- [55] PAN Y, WONG E A, BLOOMQUIST J R, et al. Expression of a cloned ovine gastrointestinal peptide transporter (PEPT1) in xenopus oocytes induces uptake of oligopeptides *in vitro* [J]. *Journal of Nutrition*, 2001, 131(4): 1264-1270.
- [56] STROBER W, FUSS I J. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(6): 1756-1767.
- [57] HONJO H, WATANABE T, KAMATA K, et al. *RIPK2* as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 650403.
- [58] USLUOGLU N, PAVLOVIC J, MOELLING K, et al. *RIP2* mediates LPS-induced p38 and ikappaBalpha signaling including IL-12 p40 expression in human monocyte-derived dendritic cells [J]. *European Journal of Immunology*, 2007, 37(8): 2317.
- [59] 耿雅丽,田平,罗燕文,等. 高精料对泌乳奶山羊瘤胃上皮氧化应激和胆固醇代谢的影响 [J]. *草业学报*, 2017, 26(11): 94-103.
- [60] 高爱保. 草甘膦对黑斑蛙主要器官中抗氧化酶的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(1): 278-281.
- [61] 吴晓云,陈叶雨,赖见生,等. 饥饿复投喂对长江鲟肝脏、肠道和肌肉抗氧化功能的影响 [J]. *南方农业学报*, 2021, 52(11): 3157-3165.
- [62] 李浩,陈亚平,鲁智慧,等. 草地贪夜蛾和斜纹夜蛾幼虫体内保护酶及解毒酶对2种杀虫剂的响应比较 [J]. *南方农业学报*, 2021, 52(3): 559-569.
- [63] CUI J J, YUAN J F, ZHANG Z Q. Anti-oxidation activity of the crude polysaccharides isolated from *Polygonum cillinerve* (Nakai) ohwi in immunosuppressed mice [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 132(2): 512-517.

(责任编辑:王妮)