

# 脂多糖诱导奶牛细胞因子及其他相关物质变化研究进展

胡 涛<sup>1,2</sup>, 周凌云<sup>1</sup>, 卜登攀<sup>1</sup>, 张养东<sup>1</sup>

(1 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193;

2 扬州大学 动物科学技术学院, 江苏 扬州 225009)

**摘要:** 目前, 奶牛的亚急性瘤胃酸中毒 (SARA) 的发生率较高, 这是因为瘤胃中革兰氏阴性菌 (GNB) 崩解释放大量脂多糖 (LPS) 引起的。脂多糖刺激后, 会导致一系列的细胞因子级联反应, 相应的乳蛋白及其他物质也会发生变化, 对奶牛生产产生了很不利的影响。笔者就脂多糖刺激对奶牛细胞因子、乳蛋白及其他物质的变化做一具体综述。

**关键词:** 奶牛; SARA; 脂多糖; 细胞因子

中图分类号: S852.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)增刊-0144-05

## Progress on the Changes of the Cytokines and Other Relative Substances after the LPS Stimulation

HU Tao<sup>1,2</sup>, ZHOU Ling-yun<sup>1</sup>, BU Deng-pan<sup>1</sup>, ZHANG Yang-dong<sup>1</sup>

(1 State Key Lab of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100193, China; 2 College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract** The incidence rate of the Subacute ruminal acidosis (SARA) in cow is relatively high, it was because of the Gram negative bacteria (GNB) in the rumen have released a lot of lipopolysaccharide (LPS). After the stimulation of the LPS, it will cause a series of cytokines cascade reaction, and the related milk protein and other substances will have some changes, it has a very bad effect on the milk production. This paper will summarize the changes of the cytokines, milk proteins and other substances that after the LPS stimulation.

**Key words** Dairy cows; Subacute ruminal acidosis; Lipopolysaccharide; Cytokine

随着泌乳奶牛单产水平的逐渐提高, 人们用提高饲料中精粗比的方式来增加饲料中蛋白质等营养物质。而精粗比增加后, 奶牛瘤胃内发酵模式受到影响, pH 下降, SARA 发生率显著提高。研究发现, 泌乳早期和泌乳中期奶牛 SARA 发生率 (pH < 5.6, 180 min/d) 分别为 19% 和 26%<sup>[1]</sup>。pH 下降时, 瘤胃中的革兰氏阴性菌崩解, 释放大量的 LPS<sup>[2-5]</sup>。同时, 瘤胃上皮的屏障功能由于高瘤胃酸度<sup>[6]</sup>及高渗透压导致的瘤胃乳头破裂或隆起<sup>[4]</sup>而受到伤害, 瘤胃中的 LPS 向外周血液渗透, 引起相关的细胞因子和其他物质的变化, 并导致代谢性内毒素血症<sup>[4-7]</sup>, 代谢性内毒素血症引起肝脏中胰岛素抵抗, 高胰岛素血症、血糖水平升高、能量代谢紊乱和厌食

症<sup>[8]</sup>。最终会影响到奶牛的健康及牛奶的品质。

### 1 脂多糖

#### 1.1 脂多糖的性质

1892年, Pfeiffer 从 GNB 中发现了具有生物学活性且对热稳定的 LPS。以来, 人们在 LPS 对机体免疫系统影响的双重性, 以及其在 GNB 引起的败血症休克中的特殊作用的研究不断深入。LPS 是 GNB 细胞壁外膜的主要成份, 约占细菌干重的 3-4%, 每个细菌表面约有一百多万个脂多糖分子, 革兰氏阴性菌在细胞壁外膜中的结构如图 1 所示。典型的 LPS 分子由 O-特异性多糖、核心多糖和类脂 A 三部分以共价键结合而成, 在组成上糖分的量多于脂, 类

收稿日期: 2010-10-11

作者简介: 胡 涛 (1986-), 男, 安徽人, 硕士, 主要从事反刍动物营养研究。

通讯作者: 周凌云 (1977-), 女, 北京人, 硕士, 助理研究员, 主要从事反刍动物营养与牛奶质量改良研究。

脂 A 是内毒素多种生物学活性和毒性的决定部位, 其生物学活性包括在体和离体激活 B 细胞、单核-巨噬细胞, 刺激机体产生多种免疫活性物质, 如  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{NO}$ 、 $\text{PGE}_2$ 、 $\text{IFN-}\gamma$ , 另外还有佐剂样作用、有丝分裂原样作用等; 毒性作用包括发热、肠道出血性坏死、致死、流产、体重减少、厌食、血压下降、弥漫血管内凝血、以及局部或全身性 *shw artzan an* 反应等<sup>[9]</sup>。

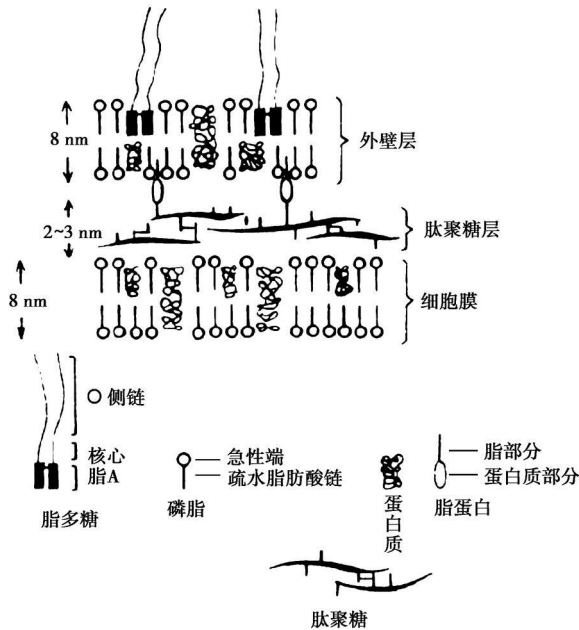


图 1 革兰氏阴性菌在细胞壁外膜中的结构

Fig 1 The structural drawing of the cell wall's outer man brane in the GNB

## 1.2 脂多糖诱导免疫反应过程

奶牛乳腺组织通过防御机制来保护其免受病原菌的侵袭。除了乳头导管的解剖组织学的屏障外, 病原体的主要进入途径、杀菌酶和溶菌酶及其蛋白、非特异性的免疫反应是构成乳腺免疫的主要部分。

当奶牛患上 SARA, 产生的脂多糖迁移入外周血后, 引起一系列的免疫反应, 最主要是白细胞很快从血液进入到乳腺组织并转入到乳汁中。乳汁中主要的白细胞是巨噬细胞、淋巴细胞和多型核中性粒细胞 (PMNs)<sup>[10]</sup>。健康奶牛乳汁中的体细胞数 (SCC) 较少, 且体细胞中巨噬细胞比例很大。而 LPS 刺激后, 由于免疫应答反应和炎症反应, 体细胞数大量增加, 体细胞组成也有很大变化, 其中 PMN 变化最大, 数量也最多。定量 mRNA 分析结果显示, 免疫系统的一些细胞因子和另一些炎症调节剂在乳腺组织和免疫细胞中有表达<sup>[11]</sup>, 乳腺组织和免疫细胞来源的细胞因子和另一些炎症调节剂的表达水平变化较大。细胞因子和脂质调节剂主要是免疫细胞表达的, 而抗菌性的防御蛋白如乳铁转运蛋

白主要是乳腺组织表达<sup>[11]</sup>。在乳汁体细胞中, 巨噬细胞中的细胞因子和调节剂的表达水平在 PMN 中得多<sup>[12]</sup>。因此, 巨噬细胞在最初的免疫反应中占主要地位。相反的, 在炎症期, 相关的免疫蛋白, 主要的乳汁蛋白合成减少<sup>[13]</sup>。LPS 诱导乳房炎后, 在短期内各种炎症因子和乳蛋白都发生了变化<sup>[13-14]</sup>。

## 2 相关细胞因子的变化

LPS 经过特定的 LBP-CD 14 途径激活单核-巨噬细胞系统, 触发一系列的细胞因子产生。这些细胞因子, 如  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$  等的分泌有先后顺序, 具有相互诱导的链式反应特点, 引起机体免疫机能的改变。经典的 LPS 细胞因子级联系统包括  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{IL-6}$ 、 $\text{IL-8}$ <sup>[15]</sup>、 $\text{IL-10}$ <sup>[16]</sup> 等, 其中一些细胞因子可以诱导某些组织产生急性期反应蛋白、 $\text{NO}$ 、 $\text{PGF}_2$ 、 $\text{PGF}_2\alpha$ 、活性氧自由基等, 使机体形成多种病理状态。

### 2.1 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ( $\text{TNF-}\alpha$ )

$\text{TNF-}\alpha$  是 LPS 诱导单核-巨噬细胞分泌的细胞因子反应中首要的和关键的细胞因子<sup>[17]</sup>。小鼠在体研究表明, 肝巨噬细胞 (Kupffer cell) KC 是 LPS 诱导下产生  $\text{TNF-}\alpha$  的重要来源, Kupffer 细胞特异性阻断剂可使 LPS 诱导  $\text{TNF-}\alpha$  的产生下降 90% 左右<sup>[15]</sup>。

有学者报道  $\text{TNF-}\alpha$  的基因表达在 LPS 刺激的乳区瞬间增加, 在刺激后 3 h 达到峰值, 峰值大约是平时水平的 47 倍, 紧接着,  $\text{TNF-}\alpha$  的 mRNA 出现一个平稳的下降<sup>[15]</sup>。而有的学者在实验性内毒素血症实验中, 给予 LPS 后的 60~90 min 内, 血浆  $\text{TNF-}\alpha$  即达到峰值, 之后在 3 h 内迅速下降到接近基础水平<sup>[13]</sup>。 $\text{TNF-}\alpha$  对 LPS 的反应特点是短暂、迅速, 仅有单个峰值<sup>[15-18]</sup>。 $\text{TNF-}\alpha$  的一过性浓度升高对于诱导其他的细胞因子是至关重要的, 特别是  $\text{IL-1}\beta$  和  $\text{IL-6}$  采用  $\text{TNF-}\alpha$  可以诱导  $\text{IL-1}\beta$  和  $\text{IL-6}$  的产生<sup>[19-20]</sup>, 而用抗  $\text{TNF-}\alpha$  抗体可以抑制菌血症中  $\text{IL-1}\beta$  和  $\text{IL-6}$  的产生<sup>[21]</sup>。

### 2.2 白介素-1 $\beta$ ( $\text{IL-1}\beta$ )

$\text{IL-1}\beta$  是继  $\text{TNF-}\alpha$  之后分泌的另一种细胞因子, 在注射 LPS 静脉后的 30 min 时有  $\text{IL-1}\beta$  的浓度升高<sup>[15]</sup>, 一般认为其升高是与  $\text{TNF-}\alpha$  相平行的。 $\text{IL-1}\beta$  和  $\text{TNF-}\alpha$  在乳腺病原菌入侵的急性期扮演很重要的角色, 包括白细胞向感染区的聚集<sup>[22]</sup>。重组的  $\text{IL-1}\beta$  增加了乳腺的回缩率, 同时也增加了乳铁蛋白在乳汁中的浓度<sup>[23]</sup>。在炎症期, 在凋亡酶激活的同时, 可能乳蛋白下调、乳铁蛋白上调<sup>[13]</sup>。给狒狒动脉内注入活的大肠杆菌可引起循环中  $\text{IL-1}\beta$  浓

度的迅速升高,在 3~4 h 达到高峰,之后开始下降<sup>[18]</sup>,但在用 LPS 作为刺激的试验中 IL-1 $\beta$  常常不易被测到,其原因尚不清楚。应用抗 TNF- $\alpha$  证明, TNF- $\alpha$  诱导了 IL-1 $\beta$  的分泌。在 LPS 所致的器官组织损伤中, TNF- $\alpha$  较 IL-1 $\beta$  的效应更为强烈,二者在诱导发热、激素水平的变化方面各有不同。IL-1 $\beta$  在诱导 IL-6 的分泌方面也发挥较强作用。

### 2.3 白介素-6(IL-6)

IL-6 是继前两种细胞因子分泌之后第三种细胞因子,在 LPS 诱导的 IL-6 分泌中, KC 是一个重要的来源。IL-6 通常在 LPS 刺激后的 3~4 h 内出现一个分泌高峰<sup>[19]</sup>,但不同的作者对此峰持续时间的报道不一致,有人证明在 3~7 h 内保持在较高水平<sup>[15]</sup>。在 LPS 诱导的急性期反应中, IL-6 的分泌高峰是继 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  之后出现的,因此可能是 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  协同诱导了 IL-6 的分泌。与 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  不同的是 IL-6 对机体一般无毒性作用,也不会引起休克。有研究表明 IL-6 可起到保护肝细胞免受免疫性损伤的作用<sup>[21]</sup>。

### 2.4 白介素-8(IL-8)

IL-8 是一种小分子量的肽,其在诱导 PMNs 的趋化和活化方面发挥重要作用。LPS 也能诱导 IL-8 的变化,在人体,给予 4 ng/kg 体重的 LPS 后, IL-8 在刺激后的 1 h 后血浆浓度开始上升, 2~3 h 达到峰值,之后很快下降, 5 h 时降到刺激前的水平<sup>[15]</sup>。

### 2.5 白介素-12(IL-12)

IL-12 是一种 70 kDa 的异二聚体,由 2 条共价链连接的多肽链组成,一条为 35 kDa (p35),另一条为 40 kDa (p40)。P35 由多种细胞产生,包括 T、B 淋巴细胞、NK 细胞和大单核细胞等; p40 则是由激活的单核-巨噬细胞和 B 细胞产生。动物接受 LPS 刺激之后,血浆 IL-12 (p40) 在 2~7 h 期间升高,峰值在 5 h<sup>[13]</sup>。一般认为, IL-12 在介导细胞免疫应答方面发挥重要的调节作用,能够强有力地激活自然杀伤细胞 (Natural Killer Cell) 细胞并通过自然杀伤细胞诱导干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 的产生,刺激 0 型 T 辅助细胞 (TH0) 向 1 型 (TH1) 分化。

### 2.6 干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )

LPS 诱导 IFN- $\gamma$  产生时间略晚于 IL-12 及 IL-8, 注射 LPS 后, 4 h 之前几乎测不出来, 5 h 时有轻微升高, 7 h 时达到峰值,并在 7~11 h 间维持较高的水平<sup>[17]</sup>。IFN- $\gamma$  在诱导 NO 产生方面与 TNF- $\alpha$  有密切关系,可协同增强刺激效应。

### 2.7 白介素-10(IL-10)

IL-10 能强烈抑制活化的单核-巨噬细胞分泌各

种细胞因子。在 LPS 刺激下,小鼠脾细胞在 3 h 时即有 IL-10 mRNA 的转录,且在 3~11 h 期间逐渐增多,但 IL-10 蛋白的分泌可能很晚<sup>[15]</sup>。在人体,受 LPS 活化的单核细胞在刺激后 7 h 才有低水平的 IL-10 分泌, IL-10 的分泌高峰在 24~48 h<sup>[17]</sup>。IL-10 可强烈抑制单核-巨噬细胞分泌 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-8、GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)。抑制 LPS 诱导的吞噬细胞 MHC-II (Major histocompatibility complex class II molecules, 组织相容性复合物) 的表达,抑制吞噬细胞作为 APC (antigen presenting cell, 抗原递呈细胞) 所致的抗原特异性 T 细胞增殖。由此看来, IL-10 是炎症和免疫反应的强有力控制者,也是活化的巨噬细胞及 KC 的自我控制者。

## 3 相关蛋白、酶及其他物质的变化

在 LPS 注射后 3 h 内,乳铁蛋白、溶菌酶和诱导型一氧化氮合酶 (NOS) 的基因表达显著增加, 6 h 时到达峰值。溶菌酶的变化较显著,且在对照的乳区表达量也有增加<sup>[13]</sup>。在乳房炎或乳房回缩期间,乳腺中分泌的乳铁蛋白浓度增加说明在乳腺中乳铁蛋白的调节和别的乳蛋白的调节方向是相反的<sup>[24]</sup>,除了通过上皮细胞分泌外,在炎症期乳铁蛋白还可以被 PMNs 释放<sup>[12, 13]</sup>。

### 3.1 脂多糖结合蛋白 (LBP) 变化

脂多糖结合蛋白 (Lipopolysaccharide binding protein, LBP) 是 Tobias 等<sup>[25]</sup>于 1986 年发现的存在于血浆中的一种糖蛋白,可特异地与 LPS 结合。一般情况下,巨噬细胞表面的 CD14 不能与 LPS 直接结合,需通过 LBP 的作用分散成单个分子,再与 LBP 结合为高亲和力的 LPS-LBP 复合物,然后再被 CD14 识别和结合,从而激活单核-巨噬细胞系统。

它主要在肝脏内合成,是一种急性期反应蛋白。许多动物包括人在内,正常情况下血清中含量少于 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ,但在急性期反应的最初 24 h 内可上升到 50  $\mu\text{g/mL}$ <sup>[22]</sup>。Jack 等<sup>[26]</sup>采用基因突变种纯合子小鼠 LBP<sup>-/-</sup> 和杂合子 LBP<sup>+/-</sup> 小鼠注射 LPS 显示,在注射后 5 min 内 95% 的 LPS 集中于肝脏,杂合子小鼠和纯合子小鼠之间无显著性差异,表明 LBP 和 CD14 对清除 LPS 不是必需的。由此可以看出 LPS-LBP-mCD14 单核巨噬细胞体系对于清除 LPS 不是关键因素,而可能是机体的预警系统。

### 3.2 溶菌酶变化

溶菌酶是乳腺中相关的自然防御系统,它对乳房致病菌有抑菌和杀菌的作用。溶菌酶在正常奶牛

的乳汁中浓度比较低,而在患乳房炎的奶牛的乳汁中浓度较高。在溶菌酶浓度和 SCC 之间有显著的相关性,所以在炎症期间白细胞最有可能是溶菌酶的来源。有报道称在溶菌酶合成时乳腺上皮细胞很有可能起重要作用<sup>[13]</sup>。

### 3.3 诱导型一氧化氮合酶 (NOs) 变化

LPS 的刺激能导致 NOs 大量表达<sup>[13]</sup>,继而乳腺内的 NO 产量增加<sup>[27]</sup>,TNF- $\alpha$  对 NOS 的上调起作用<sup>[13,27]</sup>。在 LPS 刺激后 3 h 内,核因子- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) 的表达增加了大约 8 倍,此后逐渐下降,其可能和另一些转录因子如 STAT-1 $\alpha$  一起在 NOS 的合成中扮演一个关键的角色,因为它是 NOS 表达的抑制剂和激活剂<sup>[28]</sup>。另外,IFN- $\gamma$  诱导巨噬细胞可诱导 NOS 产生,促进 NO 的合成,IFN- $\gamma$  还可诱导小胶质细胞星形细胞的 NOS 产生,可能与中枢神经系统的某些疾病的发生或保护作用有关。

NO 是内毒素血症中出现的另一种显著变化的介质,其半衰期甚短,在内皮细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、肝细胞、KC 等都有合成,与前炎性细胞因子有密切的关系,LPS、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  都是 NO 产生的促进因素。有活性的巨噬细胞合成 NO 作为一个重要的免疫应答成份。在内毒素血症中产生适量的 NO 对机体抵抗病原的侵袭是有益的,NO 在调节杀菌活动中<sup>[29]</sup>,或者在增加乳房血流量以及转运更多的白细胞到感染部位有很重要作用。

### 3.4 诱导初期血液蛋白变化

急性期的蛋白变化是一个重要的免疫系统的调整阶段,也是在免疫应答的早期的刺激效应。在金黄色葡萄球菌引起的乳房炎的急性期,血清淀粉样蛋白 A (SAA) 和结合珠蛋白 (Hp) 在乳汁和血液中的表达都增加;在慢性乳房炎期间只有 SAA 的表达量增加<sup>[30]</sup>。在大肠埃希菌的 LPS 处理或金黄色葡萄球菌感染的免疫应答中,SAA 在乳腺上皮细胞的表达显著增加<sup>[31]</sup>。在乳腺中,由于在白细胞的趋化作用下,SAA 可能在白细胞补充中扮演一个重要的角色。在 LPS 处理的乳区,Hp 表达量明显的增加。

### 3.5 乳汁蛋白的变化

$\alpha$ S1-CN、 $\alpha$ S2-CN、 $\beta$ -CN 和  $\beta$ -乳球蛋白在 LPS 处理后 9 h 与 0 h 相比在表达量上降低,但没有显著性。 $\alpha$ -乳白蛋白的表达量在 LPS 处理组和对照组都下降, $\kappa$ -CN 只在 LPS 处理组下降<sup>[13]</sup>。这些影响可能导致早期乳腺上皮细胞凋亡的反应<sup>[14]</sup>。

### 3.6 凋亡因子的变化

细菌毒素可能在乳汁白细胞和乳腺组织中诱导凋亡。凋亡是一连串的形态学和生化过程,导致在

没有任何炎症症状的情况下,细胞发生程序性死亡。TNF- $\alpha$  在 LPS 刺激发生应答时释放,可能是诱导凋亡的因子之一<sup>[32]</sup>。在中性粒细胞和乳腺的分泌组织细胞中 LPS 诱导凋亡<sup>[14,33]</sup>,在凋亡过程中,主要的变化是核蛋白裂解,DNA 断裂<sup>[34]</sup>。caspase-3 和 caspase-7 属于效应器半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶 (Caspase) 一族,caspase-3 参与由骨髓来源的中性粒细胞的凋亡。LPS 刺激后,乳房内的免疫应答中,caspase-3 和 caspase-7 的表达在注射完 LPS 后 6 h 内显著的增加,其后再次下降<sup>[14]</sup>。另外,FS-7 细胞联合表面抗体 (Fas) 的表达量在 LPS 刺激后开始增加,到 3 h 达到峰值<sup>[14]</sup>。

通过 LPS 的刺激,乳腺上皮细胞的激活可能通过 CD14 被调节,一个特殊的 LPS 受体要么呈现在巨噬细胞上,要么为可溶性的形式<sup>[35]</sup>。由此引出了一个推测,在细菌毒素的应答中,经历程序性死亡的乳腺上皮细胞在凋亡早期正在改变它们的蛋白表达模式。这可能导致了已经观察到的乳汁蛋白如  $\alpha$ -乳白蛋白和  $\kappa$ -CN 的合成下降,同时伴随着抗菌蛋白及酶如乳铁蛋白和溶菌酶合成的显著增加<sup>[13]</sup>。另一方面,在 LPS 刺激后,在炎症期,大量的 PMN 进入对样品中的凋亡因子起作用。一般情况下,PMN 的生命很短,在迁徙到乳汁后,将很快的凋亡,而 LPS 能增加了 PMN 在体外的存活能力<sup>[36]</sup>。

## 4 结语

LPS 引起相关物质变化后会直接影响到奶牛健康及牛奶的品质,影响奶牛养殖效益。因此,充分认识 LPS 在奶牛体内的作用机理等有着重要的意义。目前,国内外学者在这方面已做了大量的研究,对 LPS 引起机体内各种物质的变化情况已有所了解,但是对 LPS 在奶牛机体内的作用机理、肠道内 LPS 向血液的迁移位点等所做研究还不够深入。

## 参考文献:

- [1] Plaizier J C, Krause D O, Gozho G N, *et al*. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences [J]. *The Veterinary Journal* 2008 176(1): 21-31.
- [2] Andersen P H, Bergelin B, Christensen K A. Effect of feeding regimen on concentration of free endotoxin in ruminal fluid of cattle [J]. *J Anim Sci* 1994 72(2): 487-491.
- [3] 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]. *J Dairy Sci* 2007, 90(2): 856-866.
- [4] Khafipour E, Krause D O, Plaizier J C. A grain-based sub-

- acute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation [J]. *J Dairy Sci* 2009 92(3): 1060–1070.
- [5] Nagaraña T G, Lechtenberg K F. Acidosis in feedlot cattle [J]. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 2007, 23(2): 333–350.
- [6] Kleen J L, Hooijer G A, Rehage J *et al* Subacute Ruminant Acidosis (SARA): a Review [J]. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 2003, 50(8): 406–414.
- [7] Chin A, Flynn A, Fedwick J, Buret A. The role of caspase-3 in lipopolysaccharide-mediated disruption of intestinal epithelial tight junctions [J]. *Can J Physiol Pharmacol* 2006, 84(10): 1043–1050.
- [8] Cani P, Amar J, Iglesias M, *et al* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. *Diabetes* 2007, 56(7): 1761–1772.
- [9] 程 违, 李春德. 免疫生理学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993 77–79.
- [10] Sarkaya H, Pigom C, Pfaffl M W. Differentiation of leukocytes in bovine milk [J]. *Milchwiss* 2004, 59: 586–589.
- [11] Pfaffl M W, Witmann S L, Meyer H H D, *et al* Gene expression of immunologically important factors in blood cells, milk cells and mammary tissue of cows [J]. *J Dairy Sci* 2003, 86: 538–545.
- [12] Witmann S L, Pfaffl M W, Meyer H H D, *et al* 5-lipoxygenase, cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor  $\alpha$  gene expression in somatic milk cells [J]. *Milchwiss* 2002, 57: 63–66.
- [13] Schmitz S, Pfaffl M W, Meyer H H D, *et al* Short-term changes of mRNA expression of various inflammatory factors and milk proteins in mammary tissue during LPS-induced mastitis [J]. *Domest Anim Endocrinol* 2004, 26: 111–126.
- [14] Dillier A, Bruckmaier R M. mRNA expression of apoptosis-related genes in mammary tissue and milk cells in response to lipopolysaccharide challenge and during subclinical mastitis [J]. *Milchwiss* 2004, 59: 119–123.
- [15] Van Deuren M, Dofferhoff A M S, Van Meer J W M. Cytokines and the response to infection [J]. *J Pathology* 1992, 168: 349–356.
- [16] Knolle P, Schaak J, Uhrig A, *et al* Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge [J]. *J Hepatol* 1995, 22(2): 226–229.
- [17] Watanabe A, Yagi Y, Shiono H, *et al* Effect of intramammary infusion of tumor necrosis factor- $\alpha$  on milk protein composition and induction of acute-phase protein in the lactating cow [J]. *Vet Med B* 2000, 47: 653–662.
- [18] Ikejima K, Enomoto N, Imuro Y, *et al* Estrogen increases sensitivity of hepatic Kupffer cells to endotoxin [J]. *Am J Physiol* 1998, 274(4 pt 1): G669–G676.
- [19] McIntosh J K, Jablons D M, Mule J J *et al* In vivo induction of IL-6 by administration of exogenous cytokines and detection of de novo serum levels of IL-6 in tumor-bearing mice [J]. *J Immunol* 1989, 143: 162–1678.
- [20] Dinarello C A, Cannon J G, Wolff S M, *et al* Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1 [J]. *J Exp Med* 1986 163: 1433–1450.
- [21] Fong Y M, Tracey K J, Moldawer L L, *et al* Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 appearance during lethal bacteremia [J]. *J Exp Med* 1989, 170: 1627–1633.
- [22] Riöllet C, Rainard P, Poutrel B. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary glands [J]. *Adv Exp Med Biol* 2000, 480: 247–258.
- [23] Wedlock D N, McCarthy A R, Doolin E E, *et al* Effect of recombinant cytokines on leukocytes and physiological changes in bovine mammary glands during early involution [J]. *Dairy Res* 2004, 71: 154–161.
- [24] Neville M C, Zhang P. Lactoferrin secretion into milk: comparison between ruminant, murine, and human milk [J]. *Anim Sci* 2000, 78: 26–35.
- [25] Tobias P S, Soltau K, Ulevitch R J. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum [J]. *J Exp Med* 1986, 164: 777–793.
- [26] Jack R S, Fan X, Bernheiden M, *et al* Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine Gram-negative bacterial infection [J]. *Nature* 1997, 389: 742–745.
- [27] Blum J W, Dosogne H, Hoeben D, *et al* Tumor necrosis factor  $\alpha$  and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows [J]. *Domest Anim Endocrinol* 2000, 19: 223–235.
- [28] Kleiñert H, Schwarz P M, Fistermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase [J]. *Biol Chem*, 2003, 384: 1343–1364.
- [29] Jungi T W. Research from the division of immunology: production of nitric oxide (NO) by macrophages in ruminants [J]. *Schweizerische Tierärztliche Zeitschrift* 2000, 142(5): 215–7.
- [30] Gmünd U, Hultén C, Eckersall P D, *et al* Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis [J]. *Dairy Res* 2003, 70: 379–386.
- [31] Welhitz O, Kerr D E. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection [J]. *Vet Immunol Immunopathol* 2004, 101: 191–202.
- [32] Maiani N A, Roos D, Kuijpers T W. Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils [J]. *Blood* 2003, 101: 1987–1995.
- [33] Van Oostveldt K, Paape M J, Burvenich C. Apoptosis of bovine neutrophils following diapedesis through a monolayer of endothelial and mammary epithelial cells [J]. *J Dairy Sci* 2002, 85: 139–147.
- [34] Robertson J D, Orrenius S, Zhivotovsky B. Review: nuclear events in apoptosis [J]. *Struct Biol* 2000, 129: 246–258.
- [35] Wang Y, Zarlega D S, Paape M J *et al* Recombinant bovine soluble CD14 sensitizes the mammary gland to lipopolysaccharide [J]. *Vet Immunol Immunopathol* 2002, 86: 115–124.
- [36] Boulanger V, Zhao X, Lacasse P. Protective effect of melatonin and catalase in bovine neutrophil-induced model of mammary cell damage [J]. *J Dairy Sci* 2002, 85(3): 562–569.