

# 饲料添加 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 对轮状病毒攻毒和未攻毒断奶仔猪血清和肠内容物抗体和细胞因子水平的影响

廖波<sup>1</sup> 张克英<sup>1\*</sup> 丁雪梅<sup>1</sup> 徐志文<sup>2</sup> 白世平<sup>1</sup>

(1. 四川农业大学动物营养研究所, 抗病营养教育部重点实验室, 雅安 625014;

2. 四川农业大学动物生物技术中心, 雅安 625014)

**摘要:** 本试验旨在研究饲料中添加 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> (25-OH-D<sub>3</sub>) 对轮状病毒攻毒和未攻毒断奶仔猪血清和肠内容物抗体和细胞因子水平的影响。选取 48 头 28 日龄断奶的平均体重为 (7.35 ± 0.75) kg 的杜长大三元杂交仔猪, 按体重随机分配到 4 个组, 每组 12 个重复, 每个重复 1 头猪, 试验期 21 d。C<sup>-</sup>、C<sup>+</sup> 分别为未攻毒和攻毒对照组, 饲料添加 25-OH-D<sub>3</sub> 220 IU/kg; T<sup>-</sup>、T<sup>+</sup> 分别为未攻毒和攻毒试验组, 饲料添加 25-OH-D<sub>3</sub> 2 200 IU/kg。C<sup>+</sup>、T<sup>+</sup> 组仔猪试验开始时灌服人轮状病毒 1 mL (轮状病毒浓度为 1 × 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL)。结果表明, 饲料添加 2 200 IU/kg 25-OH-D<sub>3</sub> 提高了攻毒仔猪试验第 5、21 天血清和肠内容物轮状病毒抗体 (RV-Ab) 水平 ( $P < 0.05$ ); 降低了未攻毒仔猪第 5 天血清免疫球蛋白 G (IgG)、免疫球蛋白 M (IgM)、免疫球蛋白 A (IgA) 含量 ( $P < 0.05$ ) 以及攻毒仔猪第 5、15 天血清 IgA 含量和第 15 天血清 IgM 含量 ( $P < 0.01$ ); 对未攻毒和攻毒仔猪血清和肠内容物白介素-2 (IL-2)、白介素-6 (IL-6) 水平以及肠内容物干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 水平有降低趋势 ( $P > 0.05$ ); 提高了未攻毒仔猪血清和肠内容物白介素-4 (IL-4) 水平 ( $P > 0.05$ ) 以及攻毒仔猪第 5 天血清 IL-4 水平和第 15 天肠内容物 IL-4 水平 ( $P < 0.01$ )。由结果可知, 饲料添加 2 200 IU/kg 的 25-OH-D<sub>3</sub> 可以提高轮状病毒攻毒和未攻毒断奶仔猪血清及肠内容物 RV-Ab 水平, 降低促炎症细胞因子的分泌及其参与的炎症反应, 促进抗炎细胞因子的生成及其参与的免疫应答, 进而表现出提高断奶仔猪抗病力的作用。

**关键词:** 断奶仔猪; 25-OH-D<sub>3</sub>; 轮状病毒; 抗体; 细胞因子

中图分类号: S816

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2011)01-0034-09

腹泻是断奶仔猪生产中危害较大的疾病, 严重危害仔猪生产。断奶时期免疫功能低下、消化道发育不完善是仔猪对病原体抵抗差, 易发生肠道疾病的重要原因<sup>[1-5]</sup>。因此, 如何通过营养措施调节免疫反应来对抗疾病, 从而实现提高仔猪生产的目的成为动物营养学研究的热点。近 30 年的研究证实, 维生素 D<sub>3</sub>, 主要是其激素活性形式 1, 25-二羟基维生素 D<sub>3</sub> [1, 25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>], 不仅

在传统钙磷稳态中发挥着重要作用, 在调节动物机体的免疫反应中也起着重要作用<sup>[6]</sup>。1, 25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> 能调节 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞的分化、成熟、分泌细胞因子和免疫球蛋白<sup>[7-10]</sup>。在畜禽上的研究显示, 1, 25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> 对猪<sup>[11-12]</sup> 和牛<sup>[13]</sup> 的免疫功能有重要影响。25-OH-D<sub>3</sub> 是维生素 D<sub>3</sub> 在饲料生产中的最新应用形式, 与普通的维生素 D<sub>3</sub> 相比在吸收转运方面有突出的优势<sup>[14]</sup>。

收稿日期: 2010-06-18

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目 (IRT0555-5)

作者简介: 廖波 (1976—), 男, 四川成都人, 博士研究生, 主要从事猪的营养的研究。E-mail: liaobo1976@126.com

\* 通讯作者: 张克英, 教授, 博士生导师, E-mail: zkeying@yahoo.com

因此, 在断奶仔猪饲料中添加 25-OH-D<sub>3</sub> 是否能更好地发挥维生素 D<sub>3</sub> 的免疫调节功能值得研究。本试验拟在轮状病毒感染断奶仔猪的条件下, 研究饲料添加高水平的 25-OH-D<sub>3</sub> 对断奶仔猪血清和肠内容物抗体和细胞因子水平的影响, 旨在为 25-OH-D<sub>3</sub> 在仔猪饲料中的应用提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

1.25% 25-OH-D<sub>3</sub> (1 μg = 40 IU, DSM)、其他单体维生素 (Bayer)、MEM 液 (Gibco)、胰蛋白酶抑制剂 (Sigma)、亮抑蛋白酶肽 (Sigma)。

### 1.2 试验动物及饲料

试验动物选用 48 头 28 日龄断奶的平均体重为 (7.35 ± 0.75) kg 的杜长大三元杂交仔猪。试验饲料参照美国 NRC (1998) 5 ~ 10 kg 阶段生长猪的营养需要配合成粉状全价料, 基础饲料组成及营养水平见表 1。对照组饲料添加 220 IU/kg (5.5 μg/kg) 的 25-OH-D<sub>3</sub>, 试验组饲料添加 2 200 IU/kg (55.0 μg/kg) 的 25-OH-D<sub>3</sub> (为 NRC 推荐量的 10 倍)。

### 1.3 试验设计与饲养管理

试验采用 2 × 2 双因子设计, C<sup>-</sup>、C<sup>+</sup> 组分别为未攻毒和攻毒对照组, T<sup>-</sup>、T<sup>+</sup> 组分别为未攻毒和攻毒试验组。所选仔猪按体重相近原则随机分配到 4 个组中 (每组 12 个重复, 每个重复 1 头猪), 单笼饲养, 未攻毒处理和攻毒处理各饲养在 1 间隔离环境控室内。试验期 21 d。舍内温度保持在 25 ~ 28 °C。饲养管理按常规饲养管理进行, 仔猪自由采食饮水。

### 1.4 病毒接种

攻毒试验采用的病毒为人轮状病毒 (HRV) Wa 株, 由四川农业大学动物生物技术中心提供。在试验第 0 天 08:00, 攻毒处理的每头仔猪用注射器灌服轮状病毒 1 mL (轮状病毒浓度为 1 × 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL), 未攻毒处理的每头仔猪用同样方式灌服同体积 MEM 液。

### 1.5 样品采集与制备

在试验第 0、5、15、21 天的 08:00, 每组分别随机选取 6、12、8、4 头仔猪, 从前腔静脉采血 10 mL, 3 000 r/min 离心 10 min 取血清, -20 °C 保存。采

血前 1 天 20:00 停喂饲料, 使仔猪空腹 12 h。

表 1 基础饲料组成及营养水平 (风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	51.19
豆粕 Soybean meal	17.50
膨化大豆 Expanded soybean	28.50
磷酸氢钙 CaHPO <sub>4</sub>	1.60
石粉 Limestone <sup>1)</sup>	0.18
食盐 NaCl	0.30
赖氨酸 Lysine	0.18
蛋氨酸 Methionine	0.02
微量元素预混料 Trace mineral premix <sup>2)</sup>	0.50
维生素预混料 Vitamin premix <sup>3)</sup>	0.03
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels	
消化能 DE/(MJ/kg)	14.08
粗蛋白质 CP	20.98
赖氨酸 Lysine	1.19
钙 Ca	0.88
有效磷 AP	0.57

<sup>1)</sup> 基础饲料中单独添加石粉 0.18%, 作为微量元素预混料载体添加石粉 0.37%, 因此基础饲料中石粉总添加量为 0.55%。The basal diet was added 0.18% limestone individually, and trace mineral premix was added 0.37% limestone as a carrier, therefore the total limestone supplemental level in the basal diet was 0.55%.

<sup>2)</sup> 微量元素预混料为每千克饲料提供 Trace mineral premix provided following per kg of diet: Zn (as zinc sulfate) 100 mg, Fe (as ferrous sulfate) 100 mg, Mn 4 mg, Cu (as copper sulfate) 6 mg, I 0.14 mg, Se 0.3 mg.

<sup>3)</sup> 维生素预混料为每千克饲料提供 Vitamin premix provided following per kg of diet: VA 2 200 IU, VE 6 IU, VK 0.15 mg, 叶酸 folic acid 0.3 mg, 生物素 biotin 2.5 mg, 核黄素 riboflavin 1 mg, 泛酸 pantothenic acid 10 mg, 烟酸 nicotinic acid 15 mg, VB<sub>6</sub> 1.5 mg, VB<sub>12</sub> 0.017 5 mg.

在试验第 5、15、21 天分 3 次进行屠宰, 每次屠宰每组取 4 头仔猪。在屠宰前, 将各组的仔猪按体重相近原则分为 3 个小组, 随机选取 1 个小组的仔猪进行屠宰。屠宰前 1 天 20:00 停喂饲料, 使仔猪空腹 12 h。屠宰试验在 08:00 点开始, 通

过前腔静脉注射过量戊巴比妥钠(1 mL/kg BW, 戊巴比妥钠浓度为 1 g/mL)致死仔猪。分别在十二指肠和回盲结节处末端结扎,收集回肠内容物(IC),用 MEM 液按 IC:MEM 液为 1:2 的比例稀释 IC,加入胰蛋白酶抑制剂 250  $\mu\text{g/mL}$ 、亮抑蛋白酶肽 50  $\mu\text{g/mL}$ ,以防细胞因子等成分的降解<sup>[15]</sup>,将 IC -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.6 测定指标与方法

血清和 IC 中的免疫球蛋白 G (IgG)、免疫球蛋白 M (IgM)、免疫球蛋白 A (IgA) 含量采用 IgG&A&M 试剂盒 (Maker) 测定,轮状病毒抗体 (RV-Ab) 水平采用猪轮状病毒抗体酶联免疫吸附试剂盒 (ADL) 测定,细胞因子白介素-2 (IL-2)、白介素-4 (IL-4)、白介素-6 (IL-6)、干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 水平采用猪细胞因子酶联免疫吸附试剂盒 (ADL) 测定。

### 1.7 数据处理与分析

结果以平均值  $\pm$  标准误表示,数据采用 SPSS 13.0 软件的 GLM 的 Univariate 法进行互作分析,

然后进行 Duncan 氏多重比较,以  $P < 0.01$  (极显著), $P < 0.05$  (显著)作为差异显著性判断标准。

## 2 结果

### 2.1 抗体

#### 2.1.1 血清 IgG、IgM、IgA 含量

由表 2 可知,饲料添加 10 倍 NRC 推荐量的 25-OH- $\text{D}_3$  显著降低了试验第 5 天仔猪血清 IgG 含量 ( $P = 0.005$ ) 和第 5、15 天血清 IgM ( $P = 0.035$ ,  $P = 0.003$ ) 和 IgA 含量 ( $P = 0.008$ ,  $P = 0.010$ )。轮状病毒攻毒显著增加了试验第 15 天仔猪血清 IgG 含量 ( $P = 0.040$ ) 以及第 5、15 天血清 IgM ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ) 和 IgA 含量 ( $P = 0.002$ ,  $P = 0.043$ )。25-OH- $\text{D}_3$  与轮状病毒的交互作用对试验期内各阶段仔猪血清 IgG 含量均无显著影响 ( $P > 0.05$ ),但对试验第 15 天血清 IgM ( $P = 0.000$ ) 和 IgA 含量 ( $P = 0.038$ ) 有显著影响。

表 2 血清 IgG、IgM 和 IgA 含量

Table 2 IgG, IgM and IgA contents in serum

mg/mL

项目 Items	攻毒后天数 Days after challenged/d	组别 Groups				P 值 P-value		
		C <sup>-</sup>	T <sup>-</sup>	C <sup>+</sup>	T <sup>+</sup>	D <sub>3</sub>	RV	D <sub>3</sub> × RV
免疫球 蛋白 G IgG	0	3.946 $\pm$ 0.448	3.164 $\pm$ 0.785	3.617 $\pm$ 0.254	3.417 $\pm$ 0.337	0.161	0.051	0.088
	5	3.362 $\pm$ 0.309 <sup>ABa</sup>	2.361 $\pm$ 0.309 <sup>Bb</sup>	3.685 $\pm$ 0.205 <sup>Aa</sup>	3.104 $\pm$ 0.187 <sup>ABab</sup>	0.005	0.050	0.432
	15	3.191 $\pm$ 0.256 <sup>ab</sup>	2.820 $\pm$ 0.237 <sup>b</sup>	3.960 $\pm$ 0.409 <sup>a</sup>	3.259 $\pm$ 0.212 <sup>ab</sup>	0.066	0.040	0.561
	21	3.031 $\pm$ 0.296	2.495 $\pm$ 0.270	3.087 $\pm$ 0.109	3.141 $\pm$ 0.250	0.339	0.174	0.247
免疫球 蛋白 M IgM	0	0.635 $\pm$ 0.061	0.543 $\pm$ 0.035	0.689 $\pm$ 0.076	0.571 $\pm$ 0.033	0.077	0.473	0.821
	5	0.687 $\pm$ 0.052 <sup>Bb</sup>	0.571 $\pm$ 0.035 <sup>Bc</sup>	0.934 $\pm$ 0.037 <sup>Aa</sup>	0.873 $\pm$ 0.034 <sup>Aa</sup>	0.035	0.000	0.492
	15	0.546 $\pm$ 0.035 <sup>Bb</sup>	0.578 $\pm$ 0.024 <sup>Bb</sup>	0.893 $\pm$ 0.073 <sup>Aa</sup>	0.595 $\pm$ 0.025 <sup>Bb</sup>	0.003	0.000	0.000
	21	0.751 $\pm$ 0.042	0.601 $\pm$ 0.038	0.703 $\pm$ 0.058	0.680 $\pm$ 0.049	0.093	0.747	0.204
免疫球 蛋白 A IgA	0	0.283 $\pm$ 0.029	0.321 $\pm$ 0.077	0.308 $\pm$ 0.021	0.282 $\pm$ 0.021	0.903	0.884	0.496
	5	0.292 $\pm$ 0.026 <sup>ABab</sup>	0.145 $\pm$ 0.010 <sup>Cc</sup>	0.347 $\pm$ 0.037 <sup>Aa</sup>	0.244 $\pm$ 0.014 <sup>Bb</sup>	0.008	0.002	0.351
	15	0.255 $\pm$ 0.023 <sup>Bb</sup>	0.237 $\pm$ 0.024 <sup>Bb</sup>	0.383 $\pm$ 0.050 <sup>Aa</sup>	0.235 $\pm$ 0.017 <sup>Bb</sup>	0.010	0.043	0.038
	21	0.270 $\pm$ 0.030	0.229 $\pm$ 0.017	0.297 $\pm$ 0.028	0.278 $\pm$ 0.047	0.376	0.256	0.741

D<sub>3</sub> 表示 25-OH- $\text{D}_3$ , RV 表示轮状病毒。D<sub>3</sub> and RV mean 25-OH- $\text{D}_3$  and rotavirus, respectively.

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), and with different capital letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.01$ ). The same as below.

#### 2.1.2 肠内容物 IgG、IgM、IgA 含量

由表 3 可知,饲料添加 10 倍 NRC 推荐量的 25-OH- $\text{D}_3$  有提高仔猪肠内容物 IgG、IgM、IgA 含量的作用,但作用不显著 ( $P > 0.05$ )。轮状病毒攻

毒显著增加了试验第 15 天仔猪肠内容物 IgG ( $P = 0.046$ )、IgA 含量 ( $P = 0.042$ )。25-OH- $\text{D}_3$  与轮状病毒的交互作用对试验期内各阶段仔猪肠内容物 IgG、IgM、IgA 含量都没有显著影响 ( $P > 0.05$ )。

表 3 肠内容物 IgG、IgM 和 IgA 含量

Table 3 IgG, IgM and IgA contents in intestinal contents

mg/mL

项目 Items	攻毒后天数 Days after challenged/d	组别 Groups				P 值 P-value		
		C <sup>-</sup>	T <sup>-</sup>	C <sup>+</sup>	T <sup>+</sup>	D <sub>3</sub>	RV	D <sub>3</sub> × RV
免疫球蛋白 G	5	4.722 ± 0.667	5.408 ± 1.848	3.994 ± 0.652	4.050 ± 1.114	0.758	0.392	0.793
IgG	15	3.144 ± 0.470 <sup>b</sup>	3.544 ± 0.727 <sup>ab</sup>	8.109 ± 2.751 <sup>a</sup>	3.717 ± 0.550 <sup>ab</sup>	0.199	0.046	0.126
免疫球蛋白 M	21	6.570 ± 1.441	5.416 ± 0.940	3.307 ± 0.512	5.687 ± 1.528	0.612	0.228	0.160
IgM	5	0.417 ± 0.068	0.571 ± 0.163	0.347 ± 0.074	0.383 ± 0.125	0.420	0.282	0.618
免疫球蛋白 A	15	0.310 ± 0.033	0.324 ± 0.119	0.636 ± 0.166	0.414 ± 0.061	0.354	0.078	0.296
IgA	21	0.589 ± 0.201	0.560 ± 0.067	0.320 ± 0.067	0.585 ± 0.145	0.391	0.378	0.289
免疫球蛋白 A	5	0.246 ± 0.047	0.324 ± 0.108	0.221 ± 0.047	0.213 ± 0.063	0.629	0.355	0.554
IgA	15	0.126 ± 0.022 <sup>b</sup>	0.186 ± 0.053 <sup>ab</sup>	0.362 ± 0.096 <sup>a</sup>	0.214 ± 0.031 <sup>ab</sup>	0.463	0.042	0.097
IgA	21	0.287 ± 0.074	0.322 ± 0.049	0.170 ± 0.034	0.394 ± 0.127	0.128	0.785	0.255

### 2.1.3 血清和肠内容物 RV-Ab 水平

由表 4 可知, 饲料添加 10 倍 NRC 推荐量的 25-OH-D<sub>3</sub> 显著提高了试验第 5、21 天仔猪血清 ( $P = 0.018, P = 0.002$ ) 和肠内容物 ( $P = 0.005, P = 0.045$ ) RV-Ab 水平。轮状病毒攻毒显著增加了试验第 5、15、21 天仔猪血清 ( $P = 0.000, P = 0.001$ ,

$P = 0.000$ ) 和肠内容物 ( $P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$ ) RV-Ab 水平。25-OH-D<sub>3</sub> 与轮状病毒的交互作用对试验第 5、21 天仔猪血清 ( $P = 0.016, P = 0.001$ ) 和肠内容物 ( $P = 0.010, P = 0.009$ ) RV-Ab 水平有显著影响。

表 4 血清和肠内容物轮状病毒抗体水平

Table 4 Rotavirus antibody level in serum and intestinal contents

IU/mL

项目 Items	攻毒后天数 Days after challenged/d	组别 Groups				P 值 P-value		
		C <sup>-</sup>	T <sup>-</sup>	C <sup>+</sup>	T <sup>+</sup>	D <sub>3</sub>	RV	D <sub>3</sub> × RV
血清轮状病毒抗体	0	0.100 ± 0.013 <sup>a</sup>	0.061 ± 0.009 <sup>b</sup>	0.074 ± 0.009 <sup>ab</sup>	0.095 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.361	0.682	0.006
RV-Ab in serum	5	0.094 ± 0.009 <sup>Bb</sup>	0.084 ± 0.006 <sup>Bb</sup>	0.456 ± 0.042 <sup>Ba</sup>	1.406 ± 0.342 <sup>Ac</sup>	0.018	0.000	0.016
	15	0.049 ± 0.011 <sup>Bb</sup>	0.067 ± 0.009 <sup>Bb</sup>	0.381 ± 0.106 <sup>ABb</sup>	0.884 ± 0.178 <sup>Aa</sup>	0.100	0.001	0.125
	21	0.106 ± 0.010 <sup>Cc</sup>	0.085 ± 0.009 <sup>Cc</sup>	0.293 ± 0.019 <sup>Bb</sup>	0.629 ± 0.070 <sup>Aa</sup>	0.002	0.000	0.001
肠内容物轮状病毒抗体	5	0.093 ± 0.007 <sup>Cc</sup>	0.109 ± 0.006 <sup>Cc</sup>	0.305 ± 0.068 <sup>Bb</sup>	0.535 ± 0.023 <sup>Aa</sup>	0.005	0.000	0.011
RV-Ab in intestinal contents	15	0.101 ± 0.008 <sup>Bc</sup>	0.107 ± 0.015 <sup>Bc</sup>	0.360 ± 0.055 <sup>ab</sup>	0.503 ± 0.051 <sup>Aa</sup>	0.077	0.000	0.102
	21	0.130 ± 0.013 <sup>Cc</sup>	0.108 ± 0.012 <sup>Cc</sup>	0.298 ± 0.030 <sup>Bb</sup>	0.427 ± 0.033 <sup>Aa</sup>	0.045	0.000	0.009

## 2.2 细胞因子

### 2.2.1 血清细胞因子水平

由表 5 可知, 饲料添加 10 倍 NRC 推荐量的 25-OH-D<sub>3</sub> 显著提高了试验第 5 天仔猪血清 IL-4 水平 ( $P = 0.001$ ), 对血清 IL-2、IL-6、IFN- $\gamma$  水平无显著影响 ( $P > 0.05$ )。轮状病毒攻毒显著增加了试验第 5 天仔猪血清 IL-2 水平 ( $P = 0.009$ ) 和第 15 天血清 IL-6 水平 ( $P = 0.006$ ), 对血清 IL-4、IFN- $\gamma$  水平无显著影响 ( $P > 0.05$ )。25-OH-D<sub>3</sub> 与轮状病毒的交互作用对各阶段仔猪血清 IL-2、IL-4、IL-6、IFN- $\gamma$

水平均无显著影响 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2.2 肠内容物细胞因子水平

由表 6 可知, 饲料添加 10 倍 NRC 推荐量的 25-OH-D<sub>3</sub> 显著提高了试验第 15 天仔猪肠内容物 IL-4 水平 ( $P = 0.001$ ), 显著降低了第 5、15 天肠内容物 IL-6 水平 ( $P = 0.013, P = 0.022$ ) 和第 15 天肠内容物 IFN- $\gamma$  水平 ( $P = 0.030$ )。轮状病毒攻毒显著降低了试验第 15 天仔猪肠内容物 IL-4 水平 ( $P = 0.017$ ), 对肠内容物 IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-6 水平无显著影响 ( $P > 0.05$ )。25-OH-D<sub>3</sub> 与轮状病毒的交互作

用对试验期内各阶段仔猪肠内容物 IL-2、IL-6、IFN- $\gamma$  肠内容物 IL-4 水平有显著影响 ( $P=0.047$ )。水平均无显著影响 ( $P>0.05$ ), 但对试验第 15 天

表 5 血清细胞因子水平  
Table 5 Cytokine levels in serum

项目 Items	攻毒后天数 Days after challenged/d	组别 Groups				P 值 P-value		
		C <sup>-</sup>	T <sup>-</sup>	C <sup>+</sup>	T <sup>+</sup>	D <sub>3</sub>	RV	D <sub>3</sub> × RV
白细胞 介素-2 IL-2	0	49.84 ± 3.38	52.54 ± 5.07	45.93 ± 2.74	54.25 ± 2.19	0.151	0.768	0.453
	5	55.99 ± 1.82 <sup>Bb</sup>	86.07 ± 18.92 <sup>ABab</sup>	107.46 ± 20.89 <sup>ABa</sup>	121.74 ± 15.74 <sup>Aa</sup>	0.172	0.009	0.623
	15	93.53 ± 20.74	62.11 ± 17.34	76.18 ± 3.74	93.61 ± 7.78	0.637	0.634	0.107
	21	104.53 ± 28.79 <sup>a</sup>	56.44 ± 11.45 <sup>ab</sup>	43.59 ± 3.14 <sup>b</sup>	39.03 ± 4.63 <sup>b</sup>	0.120	0.028	0.192
白细胞 介素-4 IL-4	0	59.85 ± 7.01	55.15 ± 5.24	60.14 ± 6.08	52.86 ± 7.35	0.360	0.876	0.842
	5	59.80 ± 1.91 <sup>Bb</sup>	90.73 ± 19.28 <sup>ABab</sup>	64.33 ± 4.62 <sup>Bb</sup>	127.13 ± 16.04 <sup>Aa</sup>	0.001	0.120	0.224
	15	96.79 ± 6.70	111.52 ± 17.70	80.67 ± 3.82	98.48 ± 7.95	0.143	0.187	0.888
	21	73.00 ± 9.49	92.03 ± 3.95	74.60 ± 11.84	86.49 ± 6.68	0.950	0.821	0.683
白细胞 介素-6 IL-6	0	61.18 ± 3.82	58.81 ± 6.58	59.96 ± 17.15	53.87 ± 5.63	0.695	0.775	0.863
	5	176.75 ± 34.60 <sup>a</sup>	72.14 ± 3.45 <sup>b</sup>	156.09 ± 37.94 <sup>ab</sup>	161.91 ± 31.04 <sup>a</sup>	0.070	0.250	0.103
	15	74.89 ± 5.38 <sup>ABab</sup>	47.28 ± 2.09 <sup>Bb</sup>	103.15 ± 20.36 <sup>Aa</sup>	95.45 ± 16.37 <sup>ABa</sup>	0.444	0.006	0.180
	21	81.05 ± 7.50 <sup>Aa</sup>	56.12 ± 15.89 <sup>ABb</sup>	37.39 ± 2.12 <sup>Bb</sup>	49.92 ± 2.51 <sup>ABab</sup>	0.501	0.016	0.058
干扰素- $\gamma$ IFN- $\gamma$	0	71.54 ± 6.91	67.85 ± 2.61	69.00 ± 3.19	65.89 ± 1.75	0.400	0.576	0.942
	5	66.12 ± 1.31	114.14 ± 28.88	123.91 ± 21.48	124.87 ± 19.66	0.240	0.103	0.259
	15	102.36 ± 23.09	103.48 ± 25.80	87.42 ± 11.45	85.31 ± 8.50	0.980	0.396	0.934
	21	119.83 ± 33.09	120.00 ± 46.98	40.28 ± 1.20	41.79 ± 4.01	0.977	0.018	0.982

表 6 肠内容物细胞因子水平  
Table 6 Cytokine levels in intestinal contents

项目 Items	攻毒后天数 Days after challenged/d	组别 Groups				P 值 P-value		
		C <sup>-</sup>	T <sup>-</sup>	C <sup>+</sup>	T <sup>+</sup>	D <sub>3</sub>	RV	D <sub>3</sub> × RV
白细胞 介素-2 IL-2	5	124.16 ± 48.69	47.31 ± 4.15	88.61 ± 31.74	48.75 ± 5.28	0.069	0.571	0.539
	15	113.35 ± 53.54	54.89 ± 2.81	101.37 ± 54.27	58.46 ± 6.34	0.210	0.914	0.842
	21	104.53 ± 41.65	56.88 ± 4.32	51.86 ± 3.12	39.03 ± 4.63	0.154	0.104	0.379
白细胞 介素-4 IL-4	5	48.93 ± 15.01	93.43 ± 14.28	64.62 ± 31.41	75.82 ± 8.33	0.174	0.961	0.404
	15	76.15 ± 18.33 <sup>Aa</sup>	94.62 ± 3.69 <sup>Aa</sup>	27.56 ± 1.06 <sup>Bb</sup>	89.29 ± 5.63 <sup>Aa</sup>	0.001	0.017	0.047
	21	38.82 ± 5.50	83.20 ± 6.34	58.62 ± 28.21	86.49 ± 6.68	0.057	0.459	0.594
白细胞 介素-6 IL-6	5	118.44 ± 33.13 <sup>ab</sup>	47.18 ± 4.83 <sup>b</sup>	141.66 ± 20.06 <sup>a</sup>	80.98 ± 24.49 <sup>ab</sup>	0.013	0.217	0.773
	15	106.72 ± 33.20 <sup>a</sup>	46.71 ± 4.28 <sup>b</sup>	87.67 ± 13.18 <sup>ab</sup>	52.37 ± 3.65 <sup>ab</sup>	0.022	0.718	0.508
	21	55.70 ± 5.29	58.83 ± 4.60	46.12 ± 3.87	49.92 ± 2.51	0.425	0.068	0.938
干扰素- $\gamma$ IFN- $\gamma$	5	94.27 ± 46.72	50.05 ± 7.24	83.93 ± 32.79	50.65 ± 0.75	0.203	0.868	0.852
	15	85.24 ± 6.41	45.79 ± 3.36	80.40 ± 24.48	55.71 ± 5.14	0.060	0.848	0.581
	21	117.05 ± 51.24	60.71 ± 1.48	66.36 ± 10.81	41.79 ± 4.01	0.150	0.210	0.557



### 3 讨 论

#### 3.1 饲料添加 25-OH-D<sub>3</sub> 对轮状病毒攻毒和未攻毒断奶仔猪血清和肠内容物抗体水平的影响

维生素 D<sub>3</sub> 主要调节细胞免疫,但对体液免疫和抗体的分泌也有很强的调节作用。Reinhardt 等<sup>[13]</sup>将 1 $\alpha$ ,25-二羟基维生素 D<sub>3</sub>[1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>]作为免疫佐剂显著提高了乳中埃希氏大肠杆菌 IgG、IgM、IgA 抗体水平。Van der Stede 等<sup>[16]</sup>给仔猪肌肉注射 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> 和人血清白蛋白,同样使特异抗体水平升高。这些研究表明,维生素 D<sub>3</sub> 能提高动物抗原特异抗体水平。本试验结果显示,饲料中添加 2 200 IU/kg 的 25-OH-D<sub>3</sub> 显著提高了断奶仔猪血清和肠内容物 RV-Ab 水平,对肠内容物 IgG、IgM、IgA 的产生也有促进作用,但抑制仔猪血清 IgG、IgM、IgA 的产生。本试验中,未攻毒试验组仔猪血清 IgG、IgM、IgA 含量在试验第 5 天后有低于未攻毒对照组的趋势;攻毒试验组仔猪血清 IgG、IgM、IgA 含量也较攻毒对照组低,只相当于未攻毒对照组水平。上述结果表明,饲料添加高水平 25-OH-D<sub>3</sub> 有降低未攻毒仔猪血清抗体的作用,这与前人的报道一致<sup>[17-19]</sup>。

轮状病毒感染会提高无菌仔猪体内抗体分泌细胞数量<sup>[20-22]</sup>,从而使仔猪产生大量抗体来对抗病毒感染。本试验中,攻毒同样使断奶仔猪血清 RV-Ab 水平增加。25-OH-D<sub>3</sub> 与轮状病毒的交互作用对血清 IgM、IgA 含量和 RV-Ab 水平有显著影响,提示 25-OH-D<sub>3</sub> 在仔猪遭受轮状病毒攻毒的强应激条件下作用更明显。

本试验中,25-OH-D<sub>3</sub> 降低了断奶仔猪血清总抗体水平,促进肠内容物总抗体分泌,对仔猪体内血清和肠内容物总抗体表现出不同的作用方式,可能与本试验采用的从胃肠道系统攻毒的方式有关。黏膜免疫系统对病原体的防御应答主要取决于抗原刺激后功能性淋巴细胞源源不断由感应部位转移至效应部位<sup>[23]</sup>,使消除效应更为集中。本试验中,仔猪接触病原体和发生免疫反应的部位主要是胃肠道黏膜组织,因此,为了对抗胃肠道受到的病原攻击,仔猪体内包括外周血的大量淋巴细胞迁移到肠道免疫效应部位,在肠道内产生强烈的免疫应答。

#### 3.2 饲料添加 25-OH-D<sub>3</sub> 对轮状病毒攻毒和未攻毒断奶仔猪血清和肠内容物细胞因子水平的影响

IL-2、IFN- $\gamma$  是 Th1 型细胞因子,在 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞参与 Th1 免疫反应中发挥重要调节作用。IL-4、IL-6 是 Th2 型细胞因子,在 CD4<sup>+</sup> 细胞介导的 Th2 免疫反应中发挥重要调节作用,如促进 B 细胞产生抗体。辅助 T 淋巴细胞及其分泌的细胞因子之间有自我加强效应,而分别对其相对立的细胞亚型具有抑制作用<sup>[23]</sup>。众多研究都一致发现维生素 D<sub>3</sub> 可抑制 IL-2<sup>[24-26]</sup>、IFN- $\gamma$  的产生<sup>[27-28]</sup>。维生素 D<sub>3</sub> 对 IL-4 的作用在各种报道中不尽一致,大多数研究发现维生素 D<sub>3</sub> 促进 IL-4 的产生<sup>[29-31]</sup>,但也有研究发现 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> 抑制极化的初级鼠 CD4<sup>+</sup> 细胞产生 IL-4<sup>[28]</sup>。少量研究报告维生素 D<sub>3</sub> 抑制 IL-6 的产生<sup>[32]</sup>。

Azevedo 等<sup>[15]</sup>的研究发现,感染轮状病毒提高了仔猪血清和肠内容物细胞因子 IL-4、IL-6、IFN- $\gamma$  的水平。本试验中,轮状病毒攻毒提高了试验第 5 天仔猪血清 IL-2、IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平,第 15 天血清 IL-6 水平以及第 5 天仔猪肠内容物 IL-6 水平。此结果与 Azevedo 等<sup>[15]</sup>的研究基本一致。本试验结果显示,饲料中添加 2 200 IU/kg 的 25-OH-D<sub>3</sub> 对断奶仔猪体内细胞因子的影响呈经典的作用模式:提高抗炎症细胞因子 IL-4 的水平,降低促炎症细胞因子 IL-2、IL-6、IFN- $\gamma$  的水平。上述结果说明 25-OH-D<sub>3</sub> 抑制仔猪 Th1 型免疫反应,增强 Th2 型免疫应答。试验还发现,饲料添加高水平 25-OH-D<sub>3</sub> 降低仔猪肠内容物促炎症细胞因子的分泌比其对外周血中的促炎症细胞因子的作用更强烈;同时,25-OH-D<sub>3</sub> 还可提高抗炎症细胞因子的分泌。

### 4 结 论

① 饲料添加 2 200 IU/kg 的 25-OH-D<sub>3</sub> 显著提高了轮状病毒攻毒断奶仔猪血清和肠内容物 RV-Ab 水平,对肠内容物 IgG、IgM、IgA 的产生也有促进作用,但抑制仔猪血清 IgG、IgM、IgA 的产生。

② 饲料添加 2 200 IU/kg 的 25-OH-D<sub>3</sub> 可以降低轮状病毒攻毒和未攻毒断奶仔猪血清和肠内容物促炎症细胞因子 IL-2、IL-6、IFN- $\gamma$  的分泌并抑制其参与的炎症反应,促进抗炎症细胞因子 IL-4 的生成并增强其参与的免疫应答,进而表现出提

高断奶仔猪抗病力的作用。

### 参考文献:

- [1] BECKER B A, MISFELDT M L. Evaluation of the mitogen-induced proliferation and cell surface differentiation antigens of lymphocytes from pigs 1 to 30 days of age[J]. *Journal of Animal Science*, 1993, 71(8):2073-2078.
- [2] BLECHA F, POLLMANN D S, NICHOLS D A. Weaning pigs at an early age decreases cellular immunity[J]. *Journal of Animal Science*, 1983, 56(2):396-400.
- [3] HAMMERBERG C, SCHURIG G G, OCHS D L. Immunodeficiency in young pigs[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1989, 50(6):868-874.
- [4] WILSON A D, STOKES C R, BOURNE F J. Responses of intraepithelial lymphocytes to T-cell mitogens: a comparison between murine and porcine responses[J]. *Immunology*, 1986, 58(4):621-625.
- [5] STOKES C R, BAILEY M, HAVERSON K, et al. Postnatal development of intestinal immune system in piglets; implications for the process of weaning[J]. *Animal Research*, 2004, 53:325-334.
- [6] CANTORNA M T, ZHU Y, FROICU M, et al. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, and the immune system [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 80(6):1717S-1720S.
- [7] BINDERUP L. Immunological properties of vitamin D analogues and metabolites[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1992, 43(9):1885-1892.
- [8] BOUILLON R, GARMYN M, VERSTUYF A, et al. Paracrine role for calcitriol in the immune system and skin creates new therapeutic possibilities for vitamin D analogs[J]. *European Journal of Endocrinology*, 1995, 133(1):7-16.
- [9] HEWISON M. Vitamin D and the immune system [J]. *Journal of Endocrinology*, 1992, 132(2):173-175.
- [10] REINHARDT T A, HORST R L, GOFF J P. Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants[J]. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 1988, 4(2):331-350.
- [11] 李德发,刘焕龙,席鹏彬,等. 维生素 D<sub>3</sub> 对断奶仔猪生长性能和免疫机能的影响[J]. *中国农业大学学报*, 2001, 6:87-94.
- [12] VAN DER STEDE Y, VERFAILLIE T, COX E, et al. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> increases IgA serum antibody responses and IgA antibody-secreting cell numbers in the Peyer's patches of pigs after intramuscular immunization[J]. *Clinical & Experimental Immunology*, 2004, 135(3):380-390.
- [13] REINHARDT T A, STABEL J R, GOFF J P. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> enhances milk antibody titers to *Escherichia coli* J5 vaccine[J]. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82(9):1904-1909.
- [14] WARD N E. Consideration of vitamin D<sub>3</sub> absorption may be need[J]. *Feedstuffs*, 2004, 14:36-37.
- [15] AZEVEDO M S P, YUAN L, POULY S, et al. Cytokine responses in gnotobiotic pigs after infection with virulent or attenuated human rotavirus[J]. *Journal of Virology*, 2006(1):372-382.
- [16] VAN DER STEDE Y, COX E, VERDONCK F, et al. Reduced faecal excretion of F4<sup>+</sup>-*E. coli* by the intramuscular immunisation of suckling piglets by the addition of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> or CpG-oligodeoxynucleotides[J]. *Vaccine*, 2003, 21:1023-1032.
- [17] LEMIRE J M, ADAMS J S, SAKAI R, et al. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1984, 74(2):657-661.
- [18] IHO S, TAKAHASHI T, KURA F, et al. The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on *in vitro* immunoglobulin production in human B cells [J]. *Journal of Immunology*, 1986, 136(12):4427-4431.
- [19] LINKER-ISRAELI M, ELSTNER E, KLINENBERG J R, et al. Vitamin D(3) and its synthetic analogs inhibit the spontaneous *in vitro* immunoglobulin production by SLE-derived PBMC[J]. *Clinical Immunology*, 2001, 99(1):82-93.
- [20] YUAN L, WARD L A, ROSEN B I, et al. Systematic and intestinal antibody-secreting cell responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70(5):3075-3083.
- [21] YUAN L, KANG S Y, WARD L A, et al. Antibody-secreting cell responses and protective immunity assessed in gnotobiotic pigs inoculated orally or intramuscularly with inactivated human rotavirus [J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(1):330-338.
- [22] CHANG K O, VANDAL O H, YUAN L, et al. Antibody-secreting cell responses to rotavirus proteins in

- gnotobiotic pigs inoculated with attenuated or virulent human rotavirus [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(8):2807-2813.
- [23] 吴玉章, 白云, 程晓刚. 基础免疫学 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2003.
- [24] TAKEUCHI A, REDDY G S, KOBAYASHI T, et al. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-mediated effects [J]. *Journal of Immunology*, 1998, 160(1):209-218.
- [25] SMITH E A, FRANKENBURG E P, GOLDSTEIN S A, et al. Effects of long-term administration of vitamin D<sub>3</sub> analogs to mice [J]. *Journal of Endocrinology*, 2000, 165(1):163-172.
- [26] ALROY I, TOWERS T L, FREEDMAN L P. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D<sub>3</sub>: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(10):5789-5799.
- [27] CIPPITELLI M, SANTONI A. Vitamin D<sub>3</sub>: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene [J]. *European Journal of Immunology*, 1998, 28(10):3017-3030.
- [28] STAEVA-VIEIRA T P, FREEDMAN L P. 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during *in vitro* polarization of primary murine CD4<sup>+</sup> T cells [J]. *Journal of Immunology*, 2002, 168(3):1181-1189.
- [29] BOONSTRA A, BARRAT F J, CRAIN C, et al. 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> has a direct effect on naive CD4<sup>(+)</sup> T cells to enhance the development of Th2 cells [J]. *Journal of Immunology*, 2001, 167(9):4974-4980.
- [30] CANTORNA M T, WOODWARD W D, HAYES C E, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF-beta 1 and IL-4 [J]. *Journal of Immunology*, 1998, 160(11):5314-5319.
- [31] HAGESTUEN E D, ARRUDA A F, CAMPIGLIA A D. On the improvement of solid-phase extraction room-temperature phosphorimetry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples [J]. *Talanta*, 2000, 52(4):727-737.
- [32] Evans K N, Nguyen L, Chan J, et al. Effects of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on cytokine production by human decidual cells [J]. *Biology of Reproduction*, 2006, 75(6):816-822.



## Effects of Dietary Supplementation with 25-OH-D<sub>3</sub> on Antibody and Cytokine Levels in Serum and Intestinal Contents of Weanling Pigs with or without Rotavirus Challenge

LIAO Bo<sup>1</sup> ZHANG Keying<sup>1\*</sup> DING Xuemei<sup>1</sup> XU Zhiwen<sup>2</sup> BAI Shiping<sup>1</sup>

(1. Institute of Animal Nutrition, Key Laboratory for Animal Disease-resistance Nutrition of China Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Animal Biotechnology Centre, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to study the effects of dietary supplementation with 25-OH-D<sub>3</sub> on the antibody and cytokines in serum and intestinal contents of weanling pigs with or without rotavirus challenge. Forty-eight 28-day-old three-way cross (Duroc × Landrace × Yorkshire) weanling pigs with an average body weight of 7.35 kg were randomly assigned into 4 treatments with 12 replicates and 1 pig in each replicate. The experimental period lasted for 21 d. The pigs of control groups with or without rotavirus challenge (C<sup>+</sup> or C<sup>-</sup>) and experimental groups with or without rotavirus challenge (T<sup>+</sup> or T<sup>-</sup>) were fed diets with 220 and 2 200 IU/kg 25-OH-D<sub>3</sub>, respectively. The C<sup>+</sup> and T<sup>+</sup> groups were challenged orally with 1 mL human rotavirus (1 × 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL). The results showed that dietary supplementation with 2 200 IU/kg 25-OH-D<sub>3</sub> had elevated the level of rotavirus antibody in serum and intestinal contents of pigs with rotavirus challenge at d 5 and 21 ( $P < 0.05$ ), had decreased the serum immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin A (IgA) contents of pigs without rotavirus challenge at d 5 ( $P < 0.05$ ), and had reduced the serum IgA content at d 5 and 15 ( $P < 0.05$ ) and serum IgM content at d 15 ( $P < 0.01$ ) of pigs with rotavirus challenge. Dietary supplementation with 2 200 IU/kg 25-OH-D<sub>3</sub> had a decreasing trend of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-6 (IL-6) levels in serum and intestinal contents and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) level in intestinal contents of pigs with or without rotavirus challenge ( $P > 0.05$ ), had enhanced the interleukin-4 (IL-4) level in serum and intestinal contents of pigs without rotavirus challenge ( $P > 0.05$ ), and had increased the serum IL-4 level at d 5 ( $P < 0.01$ ) and IL-4 level in intestinal contents at d 15 ( $P < 0.01$ ) of pigs with rotavirus challenge. These results indicate that dietary supplementation with 2 200 IU/kg 25-OH-D<sub>3</sub> can increase the rotavirus antibody level in serum and intestinal contents with or without rotavirus challenge, reduce the secretion of proinflammatory cytokines and the inflammatory responses concerned with them, promote the production of anti-inflammatory cytokines and the anti-inflammatory responses concerned with them, and enhance the ability of disease resistance of weanling pigs. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(1):34-42]

**Key words:** weanling pigs; 25-OH-D<sub>3</sub>; rotavirus; antibody; cytokines