

# 饲料中添加苏氨酸和色氨酸对接种猪繁殖与呼吸综合征弱毒苗生长猪免疫反应的影响

王 军 赵迎飞 方正锋 林 燕 车炼强 杨 敏 吴 德\*

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

**摘 要:** 本试验旨在研究饲料中添加苏氨酸和色氨酸对接种猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)弱毒苗生长猪免疫反应的影响。试验选取 16 头平均体重为  $(29.11 \pm 4.41)$  kg 健康去势生长猪, 按体重相近原则随机分为 4 个处理, 每个处理 4 个重复, 每个重复 1 头猪。采用  $2 \times 2$  两因子试验设计, 设 2 个苏氨酸和色氨酸添加水平, 按比例分别为赖氨酸:苏氨酸:色氨酸 = 100:64:18 (NRC 对照水平) 和赖氨酸:苏氨酸:色氨酸 = 100:80:26 (试验水平); 2 个氨基酸添加水平下按免疫处理情况分为注射磷酸盐缓冲液 (PBS) 和接种 PRRS 弱毒苗 (试验开始当天和第 35 天肌肉注射 2 mL PBS 或 PRRS 弱毒苗)。试验第 14、28、35 和 49 天收集血样, 检测血浆中干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-10 (IL-10)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 含量和血清中免疫球蛋白 G (IgG) 含量; 试验第 49 天屠宰取样, 利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法检测肺组织中 Toll 样受体 1 ~ 10 (*TLR1* ~ *TLR10*) mRNA 相对表达量。结果表明: 与饲料添加 NRC 对照水平苏氨酸和色氨酸相比, 注射 PBS 条件下, 饲料添加试验水平苏氨酸和色氨酸显著提高了生长猪试验第 14 和 28 天血清 IgG 含量 ( $P < 0.05$ ); 接种 PRRS 弱毒苗条件下, 饲料添加试验水平苏氨酸和色氨酸显著提高了生长猪试验第 35 天血清 IgG 含量 ( $P < 0.05$ )。试验第 14、28 和 35 天, 接种 PRRS 弱毒苗生长猪血浆 IFN- $\gamma$ 、IL-10、IL-1 $\beta$  含量均显著高于注射 PBS 生长猪 ( $P < 0.05$ ); 试验第 14、28、35 和 49 天, 接种 PRRS 弱毒苗条件下, 与饲料添加 NRC 对照水平苏氨酸和色氨酸相比, 饲料添加试验水平苏氨酸和色氨酸提高了生长猪血浆 IL-1 $\beta$  (试验第 14 天除外)、IFN- $\gamma$  (试验第 49 天除外) 含量, 降低了血浆 IL-10 含量, 但差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。接种 PRRS 弱毒苗生长猪肺组织中 *TLR1* ~ *TLR7*、*TLR9*、*TLR10* mRNA 相对表达量显著高于注射 PBS 生长猪 ( $P < 0.05$ ); 接种 PRRS 弱毒苗条件下, 与饲料添加 NRC 对照水平苏氨酸和色氨酸相比, 饲料添加试验水平苏氨酸和色氨酸显著提高了生长猪肺组织中 *TLR1* ~ *TLR3*、*TLR7*、*TLR8*、*TLR10* mRNA 相对表达量 ( $P < 0.05$ ), 显著降低了 *TLR4*、*TLR6*、*TLR9* mRNA 相对表达量 ( $P < 0.05$ )。由结果分析可知, 饲料中添加苏氨酸和色氨酸可上调 *TLR3*、*TLR7*、*TLR8* mRNA 相对表达量, 表明 PRRS 弱毒苗可能激活了 TLR3、TLR7、TLR8 信号通路, 进而提高血清免疫球蛋白含量, 促进炎症细胞因子产生, 最终强化获得性免疫。

**关键词:** 苏氨酸; 色氨酸; PRRS 弱毒苗; 免疫反应; 生长猪

中图分类号: S828

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2013)06-1189-10

抗病营养理论认为畜禽在疾病和应激状况下 对特殊营养物质的需求增加。猪繁殖与呼吸综合

收稿日期: 2012-12-03

基金项目: 大学生创新性实验计划项目 (01509210)

作者简介: 王 军 (1987-), 男, 四川雅安人, 博士研究生, 从事动物营养与饲料科学的研究。E-mail: wjssw1987@163.com

\* 通讯作者: 吴 德, 教授, 博士生导师, E-mail: pig2pig@sina.com

征 (PRRS) 是危害养猪业的严重传染病之一。大规模接种 PRRS 弱毒苗是控制 PRRS 急性爆发的有效办法<sup>[1]</sup>。营养是提高猪免疫力的物质基础, 通过营养手段增强猪的抗病力是提高猪群健康水平的重要途径。研究发现, 苏氨酸是免疫球蛋白的主要组成成分<sup>[2]</sup>, 生长猪对苏氨酸需要量较高<sup>[3]</sup>, 缺乏苏氨酸会抑制免疫球蛋白产生, 进而影响免疫功能, 添加苏氨酸可增加动物免疫球蛋白含量<sup>[4]</sup>; 而色氨酸作为动物体内唯一与血清白蛋白结合的氨基酸, 在机体免疫过程中也显示出重要作用。然而, 苏氨酸、色氨酸能否在接种 PRRS 弱毒苗条件下影响机体免疫状况, 有待深入研究。因此, 本试验考察在饲料中添加不同水平苏氨酸、色氨酸对接种 PRRS 弱毒苗的生长猪体液免疫和肺组织中免疫相关基因 Toll 样受体 1 ~ 10 (*TLR1* ~ *TLR10*) mRNA 相对表达量的影响, 探讨苏氨酸、色氨酸影响 PRRS 疫苗阳性猪群免疫功能的可能机制, 为苏氨酸、色氨酸在 PRRS 疫苗阳性猪群中的合理利用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验动物与设计

选择品种相同、日龄相近的 16 头平均体重为 (29.11 ± 4.41) kg 的健康去势生长猪 [经 PRRS 病毒抗体酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒检测后血清均为阴性], 按体重相近原则随机分为 4 个处理, 每个处理 4 个重复, 每个重复 1 头猪。采用 2 × 2 两因子试验设计, 设 2 个苏氨酸和色氨酸添加水平, 按比例分别为赖氨酸: 苏氨酸: 色氨酸 = 100:64:18 (NRC 对照水平) 和赖氨酸: 苏氨酸: 色氨酸 = 100:80:26 (试验水平); 2 个氨基酸添加水平下按免疫处理情况分为注射磷酸盐缓冲液 (PBS) 和接种 PRRS 弱毒苗。预试期 3 周。正试期处理 1 和 2 饲喂赖氨酸: 苏氨酸: 色氨酸 = 100:64:18 的饲料, 处理 3 和 4 饲喂赖氨酸: 苏氨酸: 色氨酸 = 100:80:26 的饲料, 在正式试验开始当天 (试验第 0 天) 处理 1 和 3 肌肉注射 2 mL PBS, 处理 2 和 4 肌肉注射 2 mL PRRS 弱毒苗 (一免)。试验第 35 天各处理分别再次肌肉注射 2 mL PBS 或 PRRS 弱毒苗 (二免)。试验期 49 d。

### 1.2 试验饲料

试验采用玉米 - 豆粕型饲料, 除苏氨酸、色氨酸外, 其他营养成分每天摄入量相同, 参照 NRC

(1998) 生长猪营养需要推荐量配制。饲料组成及营养水平见表 1。

### 1.3 样品采集与测定

#### 1.3.1 血样采集与测定

采集试验第 14、28、35、49 天的血液, 一部分收集于普通离心管中, 4 °C 离心 (3 000 r/min, 15 min), 收集血清; 一部分收集于含肝素钠的离心管中, 4 °C 离心 (3 000 r/min, 15 min), 收集血浆, -20 °C 保存待测。血清中免疫球蛋白 G (IgG) 含量采用免疫散射比浊法测定; 血浆中白细胞介素 -1β (IL-1β)、白细胞介素 -10 (IL-10)、干扰素 -γ (IFN-γ) 含量采用 ELISA 测定。

#### 1.3.2 肺组织样采集与测定

##### 1.3.2.1 肺组织样采集

试验第 49 天上午采血后, 电击放血屠宰所有生长猪, 迅速打开腹腔, 取出肺组织, 称重并记录, 样品液氮速冻, -70 °C 保存待测。

##### 1.3.2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

肺组织总 RNA 按 Trizol 法提取。利用琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白检测仪检测 RNA 的质量和浓度。用无 RNase 的 DNase I 处理总 RNA, 以消除总 RNA 中痕量 DNA 的污染。采用 10 μL 反转录反应体系: 总 RNA, 4 μL; 5 × Prime Script™ Buffer, 2 μL; Prime Script™ RT Enzyme Mix I, 0.5 μL; Oligo dT Primer (50 μmol/L), 0.5 μL; Random 6mers (100 μmol/L), 0.5 μL; RNase Free dH<sub>2</sub>O, 2.5 μL。反转录反应参数: 37 °C, 15 min; 85 °C, 5 s。反应结束后立即进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 反应或 -20 °C 保存备用。

##### 1.3.2.3 RT-qPCR 反应

采用 12.5 μL 反应体系: SYBR Premix Ex Taq™ (2 ×), 6.25 μL; 上游引物 (10 μmol/L), 0.25 μL; 下游引物 (10 μmol/L), 0.25 μL; 第一链 cDNA, 1 μL; ddH<sub>2</sub>O, 4.75 μL。利用 NCBI 在线资源、Primer 5.0 与 Oligo 6.0 进行引物设计, 由 Invitrogen 公司合成, 引物序列见表 2。反应程序如下: 95 °C 预变性 1 min, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。以 β-肌动蛋白 (β-actin) 为内参基因, 采用双标准曲线法测定目的基因 *TLR1* ~ *TLR10* mRNA 相对表达量 (*F*), 按如下公式计算:

$$F = \left( \frac{\text{待测样品目的基因浓度}}{\text{待测样品内参基因浓度}} \right) / \left( \frac{\text{对照样品目的基因浓度}}{\text{对照样品内参基因浓度}} \right)$$

表 1 饲料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of diets (air-dry basis)

%

项目 Items	苏氨酸和色氨酸添加水平(赖氨酸:苏氨酸:色氨酸) Thr and Trp supplemental levels (Lys:Thr:Trp)	
	100:64:18	100:80:26
原料 Ingredients		
玉米 Corn	69.825 3	69.579 9
豆粕 Soybean meal	23.400 0	23.400 0
鱼粉 Fish meal	2.000 0	2.000 0
豆油 Soybean oil	2.500 0	2.500 0
胆碱 Choline	0.100 0	0.100 0
维生素预混料 Vitamin premix <sup>1)</sup>	0.050 0	0.050 0
矿物质预混料 Mineral premix <sup>2)</sup>	0.300 0	0.300 0
磷酸氢钙 CaHPO <sub>4</sub>	0.550 0	0.550 0
碳酸钙 CaCO <sub>3</sub>	0.750 0	0.750 0
食盐 NaCl	0.350 0	0.350 0
赖氨酸 Lys	0.170 0	0.170 0
苏氨酸 Thr	0.004 7	0.168 5
色氨酸 Trp		0.081 6
合计 Total	100.000 0	100.000 0
营养水平 Nutrient levels <sup>3)</sup>		
消化能 DE/(MJ/kg)	14.23	14.23
粗蛋白质 CP	17.00	17.00
赖氨酸 Lys	1.00	1.00
苏氨酸 Thr	0.64	0.80
色氨酸 Trp	0.18	0.26
钙 Ca	0.60	0.60
磷 P	0.50	0.50

<sup>1)</sup> 维生素预混料为每千克饲料提供 The vitamin premix provided the following per kg of diets: VA 13 500 IU, VD 3 000 IU, VE 36 IU, VK 33 mg, VB<sub>1</sub> 3 mg, VB<sub>2</sub> 7.5 mg, VB<sub>6</sub> 6 mg, VB<sub>12</sub> 0.03 mg, 生物素 biotin 0.15 mg, 叶酸 folic acid 1.5 mg, 烟酸 nicotinic acid 34.5 mg, D-泛酸 D-pantothenic acid 15 mg。

<sup>2)</sup> 矿物质预混料为每千克饲料提供 The mineral premix provided the following per kg of diets: Fe (as ferrous sulfate) 100 mg, Cu (as copper sulfate) 10 mg, Zn (as zinc sulfate) 100 mg, Mn (as manganese sulfate) 20 mg, I (as potassium iodide) 0.3 mg, Se (as sodium selenite) 0.3 mg。

<sup>3)</sup> 营养水平均为计算值。Nutrient levels were calculated values.

## 1.4 数据处理与分析

采用 Excel 2007 进行数据处理, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析, 并用 Duncan 氏法进行多重比较检验。结果用平均值 ± 标准差表示,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 饲料添加苏氨酸和色氨酸对生长猪血清 IgG 含量的影响

由表 3 可知, 注射 PBS 条件下, 与饲料添加 NRC 对照水平苏氨酸和色氨酸相比, 在试验第 14、28 天, 饲料添加试验水平苏氨酸和色氨酸显著提高了生长猪血清 IgG 含量 ( $P < 0.05$ ); 在试验第 35、49 天, 血清 IgG 含量有所提高, 但差异不显著

( $P > 0.05$ )。接种 PRRS 弱毒苗条件下,与饲料添加 NRC 对照水平苏氨酸和色氨酸相比,在试验第 14、28、49 天,饲料添加试验水平苏氨酸和色氨酸

有提高生长猪血清 IgG 含量的趋势,但差异不显著( $P > 0.05$ );在试验第 35 天,血清 IgG 含量显著提高( $P < 0.05$ )。

表 2 RT-qPCR 引物序列  
Table 2 Primer sequence for RT-qPCR

基因 Genes	引物序列 Primer sequence (5'—3')	扩增片段大小 Size of amplified fragment/bp	登录号 Accession No.
Toll 样受体 1 <i>TLR1</i>	上游: CAAGAGTTTGGCAGTATGTT 下游: CCCGTAAGAGTCTCCTAAGA	132	AB086376
Toll 样受体 2 <i>TLR2</i>	上游: ACTTCTCCCATTTCCGCTCTC 下游: GCCACTCCAGGTAGGTCTT	141	GU138028
Toll 样受体 3 <i>TLR3</i>	上游: TCCAACATAACAAACCAGGC 下游: ACATCCTTCCACCATCT	233	AB111939
Toll 样受体 4 <i>TLR4</i>	上游: AAGGTTATTGTCGTGGTGT 下游: CTGCTGAGAAGGCGATAC	179	AB188301
Toll 样受体 5 <i>TLR5</i>	上游: GCCAACTTCATCCACTTATC 下游: CGTGCCTCTGTTACAAT	130	FJ754217
Toll 样受体 6 <i>TLR6</i>	上游: ATGGCACAGCGAACTTATT 下游: ATCATCCTCTTCAGCGACTA	117	AB085746
Toll 样受体 7 <i>TLR7</i>	上游: TGCTTCCAGTTGCGACATC 下游: CAGACAAGCCACACAGCGTC	153	EF583901
Toll 样受体 8 <i>TLR8</i>	上游: CGCTACCTGACCGCACTTC 下游: CAGAGGCGATTTTCGTCCATC	139	AB258452
Toll 样受体 9 <i>TLR9</i>	上游: CCTGGCCAAGCAGTTAGAAG 下游: AGGAAGCCCACGAAGGTC	156	AY859728
Toll 样受体 10 <i>TLR10</i>	上游: TGCCACTATGAACTCTACTT 下游: CAACATTTACGCCTATCC	108	AB219565
$\beta$ -肌动蛋白 <i><math>\beta</math>-actin</i>	上游: ACCACTGGCATTGTCA 下游: CTCCTGCTCGAAGTCC	237	U07786

表 3 饲料添加苏氨酸和色氨酸对生长猪血清 IgG 含量的影响

Table 3 Effects of dietary Thr and Trp on serum IgG content of growing pigs g/L

时间 Time	苏氨酸和色氨酸添加水平(赖氨酸:苏氨酸:色氨酸) Thr and Trp supplemental levels (Lys:Thr:Trp)			
	100:64:18		100:80:26	
	磷酸盐缓冲液 PBS	PRRS 弱毒苗 PRRS modified live virus vaccine	磷酸盐缓冲液 PBS	PRRS 弱毒苗 PRRS modified live virus vaccine
第 14 天 Day 14	0.373 ± 0.005 <sup>b</sup>	0.392 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.398 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.413 ± 0.014 <sup>a</sup>
第 28 天 Day 28	0.381 ± 0.024 <sup>b</sup>	0.404 ± 0.008 <sup>ab</sup>	0.421 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.427 ± 0.007 <sup>a</sup>
第 35 天 Day 35	0.401 ± 0.018 <sup>b</sup>	0.416 ± 0.006 <sup>b</sup>	0.423 ± 0.012 <sup>ab</sup>	0.450 ± 0.030 <sup>a</sup>
第 49 天 Day 49	0.427 ± 0.015 <sup>a</sup>	0.406 ± 0.008 <sup>b</sup>	0.439 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.416 ± 0.002 <sup>b</sup>

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

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

## 2.2 饲料添加苏氨酸和色氨酸对生长猪肺组织中TLR1 ~ TLR10 mRNA相对表达量的影响

由表4可知,饲料添加NRC对照水平苏氨酸和色氨酸条件下,接种PRRS弱毒苗的生长猪肺组织中TLR1 ~ TLR7、TLR9、TLR10 mRNA相对表达量显著高于注射PBS的生长猪( $P < 0.05$ );饲料添加试验水平苏氨酸和色氨酸条件下,接种PRRS弱毒苗的生长猪肺组织中TLR1 ~ TLR8、TLR10

mRNA相对表达量显著高于注射PBS的生长猪( $P < 0.05$ )。接种PRRS弱毒苗条件下,与饲料添加NRC对照水平苏氨酸和色氨酸相比,饲料添加试验水平苏氨酸和色氨酸显著提高了生长猪肺组织中TLR1 ~ TLR3、TLR7、TLR8、TLR10 mRNA相对表达量( $P < 0.05$ ),显著降低了TLR4、TLR6、TLR9 mRNA相对表达量( $P < 0.05$ )。

表4 饲料添加苏氨酸和色氨酸对生长猪肺组织中TLR1 ~ TLR10 mRNA相对表达量的影响

Table 4 Effects of dietary Thr and Trp on the relative mRNA expression levels of TLR1 to TLR10 in lungs of growing pigs

项目 Items	苏氨酸和色氨酸添加水平(赖氨酸:苏氨酸:色氨酸) Thr and Trp supplemental levels (Lys:Thr:Trp)			
	100:64:18		100:80:26	
	磷酸盐缓冲液 PBS	PRRS 弱毒苗 PRRS modified live virus vaccine	磷酸盐缓冲液 PBS	PRRS 弱毒苗 PRRS modified live virus vaccine
Toll 样受体 1 TLR1	1.00 ± 0.14 <sup>c</sup>	2.67 ± 0.90 <sup>b</sup>	1.28 ± 0.12 <sup>c</sup>	4.50 ± 0.77 <sup>a</sup>
Toll 样受体 2 TLR2	1.00 ± 0.73 <sup>c</sup>	4.07 ± 0.34 <sup>b</sup>	2.55 ± 0.81 <sup>bc</sup>	6.45 ± 1.21 <sup>a</sup>
Toll 样受体 3 TLR3	1.00 ± 0.46 <sup>c</sup>	2.54 ± 0.62 <sup>b</sup>	1.71 ± 0.02 <sup>c</sup>	4.53 ± 0.42 <sup>a</sup>
Toll 样受体 4 TLR4	1.00 ± 0.37 <sup>d</sup>	6.17 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.49 ± 0.34 <sup>c</sup>	3.43 ± 0.72 <sup>b</sup>
Toll 样受体 5 TLR5	1.00 ± 0.20 <sup>c</sup>	1.54 ± 0.14 <sup>ab</sup>	1.28 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.80 ± 0.10 <sup>a</sup>
Toll 样受体 6 TLR6	1.00 ± 0.09 <sup>d</sup>	2.60 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.24 ± 0.08 <sup>c</sup>	2.40 ± 0.04 <sup>b</sup>
Toll 样受体 7 TLR7	1.00 ± 0.24 <sup>d</sup>	2.06 ± 0.28 <sup>b</sup>	1.58 ± 0.18 <sup>c</sup>	2.72 ± 0.22 <sup>a</sup>
Toll 样受体 8 TLR8	1.00 ± 0.19 <sup>b</sup>	2.63 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.48 ± 0.25 <sup>b</sup>	4.92 ± 1.80 <sup>a</sup>
Toll 样受体 9 TLR9	1.00 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.66 ± 0.40 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.64 ± 0.14 <sup>bc</sup>
Toll 样受体 10 TLR10	1.00 ± 0.22 <sup>c</sup>	5.07 ± 0.38 <sup>b</sup>	3.95 ± 0.44 <sup>b</sup>	6.53 ± 1.09 <sup>a</sup>

## 2.3 饲料添加苏氨酸和色氨酸对生长猪血浆免疫相关细胞因子含量的影响

由表5可知,饲料添加NRC对照水平和试验水平苏氨酸和色氨酸条件下,试验第14、28和35天,接种PRRS弱毒苗的生长猪血浆IFN- $\gamma$ 、IL-10、IL-1 $\beta$ 含量均显著高于注射PBS的生长猪( $P < 0.05$ );试验第49天,接种PRRS弱毒苗的生长猪血浆IFN- $\gamma$ 、IL-10、IL-1 $\beta$ 含量均与注射PBS的生长猪无显著性差异( $P > 0.05$ )。接种PRRS弱毒苗条件下,与饲料添加NRC对照水平苏氨酸和色氨酸相比,在试验第14、28、35和49天,饲料添加试验水平苏氨酸和色氨酸提高了生长猪血浆IL-1 $\beta$ (试验第14天除外)、IFN- $\gamma$ (试验第49天除外)的含量,降低了血浆IL-10的含量,但差异均不显著( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 饲料添加苏氨酸和色氨酸对生长猪血清IgG含量的影响

本研究发现,与饲料添加NRC对照水平苏氨酸和色氨酸相比,饲料添加试验水平苏氨酸和色氨酸均可提高血清IgG含量,这与Li等<sup>[5]</sup>研究结果一致。IgG含量是反映动物特异性免疫功能的主要指标,也是动物重要的体液免疫因子,故添加苏氨酸和色氨酸可能会因提高体液免疫功能而增强疫苗对机体免疫保护。研究显示,苏氨酸和色氨酸在免疫过程中有着重要作用。Wang等<sup>[4]</sup>报道,提高饲料中苏氨酸添加水平有助于迅速提高生长猪IgG含量,且抗体水平随饲料苏氨酸添加水平升高而升高;进一步研究,色氨酸代谢对机体的免疫功能也有重要影响<sup>[6]</sup>。苏氨酸和色氨酸能

提高机体的 IgG 含量,其原因可能是苏氨酸作为维持血清 IgG 含量的第一限制性氨基酸<sup>[2]</sup>,在维持需要的基础上添加一定量的苏氨酸能促进 IgG 的

合成;色氨酸分解代谢能影响 T 细胞功能<sup>[7]</sup>,T 细胞的分化和代谢产物对于 B 细胞的成熟有重要作用,进而影响 B 细胞分泌 IgG 的能力。

表 5 饲料添加苏氨酸和色氨酸对生长猪血浆免疫相关细胞因子含量的影响

Table 5 Effects of dietary Thr and Trp on plasma immune-related cytokine content of growing pigs pg/mL

项目 Items	苏氨酸和色氨酸添加水平(赖氨酸:苏氨酸:色氨酸) Thr and Trp supplemental levels (Lys:Thr:Trp)			
	100:64:18		100:80:26	
	磷酸盐缓冲液 PBS	PRRS 弱毒苗 PRRS modified live virus vaccine	磷酸盐缓冲液 PBS	PRRS 弱毒苗 PRRS modified live virus vaccine
干扰素- $\gamma$ IFN- $\gamma$				
第 14 天 Day 14	77.01 $\pm$ 11.62 <sup>b</sup>	182.77 $\pm$ 10.86 <sup>a</sup>	76.71 $\pm$ 10.06 <sup>b</sup>	256.91 $\pm$ 31.37 <sup>a</sup>
第 28 天 Day 28	83.88 $\pm$ 5.32 <sup>b</sup>	166.61 $\pm$ 37.12 <sup>a</sup>	73.68 $\pm$ 3.90 <sup>b</sup>	210.43 $\pm$ 29.19 <sup>a</sup>
第 35 天 Day 35	72.77 $\pm$ 1.51 <sup>b</sup>	307.72 $\pm$ 64.67 <sup>a</sup>	72.97 $\pm$ 5.77 <sup>b</sup>	326.71 $\pm$ 60.36 <sup>a</sup>
第 49 天 Day 49	74.38 $\pm$ 4.67	79.03 $\pm$ 1.78	81.96 $\pm$ 7.48	76.40 $\pm$ 2.26
白细胞介素-10 IL-10				
第 14 天 Day 14	69.34 $\pm$ 1.51 <sup>b</sup>	211.87 $\pm$ 51.933 <sup>a</sup>	63.79 $\pm$ 5.33 <sup>b</sup>	161.46 $\pm$ 4.07 <sup>a</sup>
第 28 天 Day 28	67.53 $\pm$ 2.56 <sup>b</sup>	201.67 $\pm$ 38.07 <sup>a</sup>	67.02 $\pm$ 2.03 <sup>b</sup>	185.50 $\pm$ 22.63 <sup>a</sup>
第 35 天 Day 35	69.34 $\pm$ 0.90 <sup>b</sup>	383.38 $\pm$ 77.52 <sup>a</sup>	69.44 $\pm$ 7.94 <sup>b</sup>	207.02 $\pm$ 37.65 <sup>a</sup>
第 49 天 Day 49	83.48 $\pm$ 8.32	68.84 $\pm$ 4.47	65.81 $\pm$ 2.98	63.08 $\pm$ 3.75
白细胞介素-1 $\beta$ IL-1 $\beta$				
第 14 天 Day 14	83.31 $\pm$ 4.91 <sup>b</sup>	194.93 $\pm$ 30.58 <sup>a</sup>	79.79 $\pm$ 4.19 <sup>b</sup>	171.50 $\pm$ 4.09 <sup>a</sup>
第 28 天 Day 28	91.98 $\pm$ 8.40 <sup>b</sup>	215.60 $\pm$ 48.71 <sup>a</sup>	106.93 $\pm$ 14.77 <sup>b</sup>	220.27 $\pm$ 42.89 <sup>a</sup>
第 35 天 Day 35	87.98 $\pm$ 4.20 <sup>b</sup>	300.17 $\pm$ 61.73 <sup>a</sup>	83.31 $\pm$ 5.29 <sup>b</sup>	333.98 $\pm$ 78.85 <sup>a</sup>
第 49 天 Day 49	80.17 $\pm$ 4.77	81.22 $\pm$ 5.84	97.41 $\pm$ 4.38	88.46 $\pm$ 12.30

### 3.2 饲料添加苏氨酸和色氨酸对生长猪肺组织中 *TLR1* ~ *TLR10* mRNA 相对表达量的影响

本研究发现,与注射 PBS 相比,接种 PRRS 弱毒苗能上调生长猪肺组织中 *TLR1* ~ *TLR10* mRNA 相对表达量。据报道,繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 作为阳性单链 RNA 病毒,首先感染肺巨噬细胞,进而造成机体的免疫力下降和病毒的持续感染<sup>[8-9]</sup>。进一步研究发现,PRRSV 感染与 TLRs 有关<sup>[10]</sup>,PRRSV 能激活肺巨噬细胞 TLRs 信号途径<sup>[11-12]</sup>。Sang 等<sup>[12]</sup> 研究报道,PRRSV 感染导致肺巨噬细胞的 *TLR3* 表达量上升;Liu 等<sup>[13]</sup> 研究显示,PRRSV 感染导致肺支气管淋巴结的 *TLR2* ~ *TLR4*、*TLR7*、*TLR8* 表达量上升;Miguel 等<sup>[14]</sup> 研究也表明,感染 PRRSV 的生长猪其脑组织中 *TLR3*、*TLR4*、*TLR7* 表达量也显著升高。TLRs 是连接先天性免疫与适应性免疫的桥梁,不同的 TLRs 可识别不同种类的病原体相关分子模式

(PAMPs)<sup>[15]</sup>。一般认为 TLR3、TLR7、TLR8 主要特异地针对病毒成分<sup>[16]</sup>。TLR7、TLR8 参与单链 RNA (ssRNA) 病毒的识别<sup>[17]</sup>,PRRSV 作为一种有囊膜的单股正链小 RNA 病毒,可直接激活 TLR7、TLR8 相关信号途径<sup>[15]</sup>;TLR3 可特异性地识别双链 RNA (dsRNA)<sup>[18]</sup>,接种 PRRS 弱毒苗导致 *TLR3* 表达量显著升高,表明进入机体的 PRRSV 可能启动了 dsRNA 的合成。而以识别细菌成分为主的 *TLR1*、*TLR2*、*TLR4* ~ *TLR6* 和 *TLR9*<sup>[16]</sup>,在接种 PRRS 弱毒苗后,其表达量均显著上调,表明接种 PRRS 弱毒苗可能增加了机体对细菌的易感性,进而导致与识别细菌成分相关的 TLRs 基因显著表达。

本研究显示,与饲料添加 NRC 对照水平苏氨酸和色氨酸相比,饲料添加试验水平苏氨酸和色氨酸可显著提高接种 PRRS 弱毒苗生长猪肺组织中 *TLR3*、*TLR7*、*TLR8* mRNA 相对表达量,表明饲

粮添加苏氨酸和色氨酸可进一步强化 PRRS 弱毒苗引起的获得性免疫。TLR3、TLR7、TLR8 可识别 PRRSV,进而启动先天性免疫,诱导 T、B 淋巴细胞分化,最终强化获得性免疫<sup>[19]</sup>。研究发现,TLR2 能够识别多种细菌的脂肽<sup>[20]</sup>,与 TLR1、TLR6 以异二聚体形式发挥作用;TLR4 是参与细菌脂多糖信号转导的主要受体<sup>[21]</sup>;TLR9 在识别细菌非甲基化 DNA 的过程中起着关键作用<sup>[22]</sup>。而接种 PRRS 弱毒苗条件下,与饲料中添加 NRC 对照水平苏氨酸和色氨酸相比,饲料添加试验水平的苏氨酸和色氨酸显著降低了生长猪肺组织中 TLR4、TLR6、TLR9 mRNA 相对表达量,显著升高了 TLR1、TLR2 mRNA 相对表达量,表明饲料添加苏氨酸和色氨酸是否有利于降低机体对细菌的易感性还不能确定,需要做进一步的研究。

### 3.3 饲料添加苏氨酸和色氨酸对生长猪血浆免疫相关细胞因子含量的影响

本研究结果表明,接种 PRRS 弱毒苗有提高血浆中 IFN- $\gamma$ 、IL-10 和 IL-1 $\beta$  含量的趋势,这与 Diaz 等<sup>[23]</sup> 研究结果一致。IFN- $\gamma$  是抗病毒应答的关键细胞因子,研究报告,PRRSV 感染的猪肺组织中 IFN- $\gamma$  的表达上升<sup>[24]</sup>。IL-1 $\beta$  是促进炎症反应的重要因子,在获得性免疫应答中有重要作用。研究发现,PRRSV 感染早期,支气管肺泡灌洗液中的白细胞介素-1(IL-1)含量显著提高<sup>[25]</sup>。IL-10 被认为是体内最重要的 Th<sub>2</sub> 型抗炎细胞因子,猪感染 PRRSV 后,其外周血单核细胞和支气管肺泡灌洗液中 IL-10 mRNA 相对表达量显著上升<sup>[26-27]</sup>。Chang 等<sup>[28]</sup> 研究也表明,PRRSV 感染可显著增强肺巨噬细胞 IL-10 的释放。

本研究发现,与饲料添加 NRC 对照水平苏氨酸和色氨酸相比,饲料添加试验水平苏氨酸和色氨酸有提高接种 PRRS 弱毒苗生长猪血浆 IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  含量,降低 IL-10 含量的趋势。IFN- $\gamma$  通过阻滞或干扰病毒复制以抵抗病毒感染,在 T、B 淋巴细胞的活化过程起重要作用,IFN- $\gamma$  表达上升利于机体清除病毒<sup>[24]</sup>;Meier 等<sup>[29]</sup> 研究显示,IFN- $\gamma$  可抑制病毒 RNA 的合成来阻止 PRRSV 的复制。IL-1 $\beta$  可激活核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B),促进多种细胞因子、黏附分子及急性期蛋白的产生,进而影响机体免疫功能。IL-10 则与 IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  有相反的免疫效应,IL-10 可下调主要组织相容性复合体(MHC)的表达,抑制 Th<sub>1</sub> 型细胞因子的分泌,削弱

机体抗病毒的细胞免疫功能,抑制抗原呈递和免疫反应<sup>[30]</sup>。由此可见,饲料添加苏氨酸和色氨酸可促进 PRRS 弱毒苗引起的适应性免疫反应。

### 3.4 TLRs 基因表达与免疫相关细胞因子的关系

细菌或病毒激活 TLRs 信号通路进而释放相关细胞因子,最终引起适应性免疫反应;而细胞因子作为体内调节的关键性因子,在 TLRs 基因表达中起重要的调控作用。本研究中 TLRs 基因表达与 Th<sub>1</sub> 型细胞因子(IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ )的规律一致,这提示 TLRs 基因表达与 Th<sub>1</sub> 型细胞因子的浓度可能存在一定的关系。定量 PCR 测定显示,IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  可促进相关 TLRs 基因表达<sup>[31]</sup>;Nagase 等<sup>[32]</sup> 发现 IFN- $\gamma$  可以显著上调嗜酸性粒细胞相关 TLRs 基因表达。TLRs 激活可导致自然杀伤(NK)细胞快速释放高水平的 IFN- $\gamma$  等 Th<sub>1</sub> 型细胞因子。相对地,本研究中 TLRs 基因表达与 Th<sub>2</sub> 型细胞因子(IL-10)则表现出相反的规律,这提示在调控 Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> 型细胞因子的过程中,接种 PRRS 弱毒苗后的 TLRs 更倾向于激活 Th<sub>1</sub> 型细胞因子的表达,抑制 Th<sub>2</sub> 型细胞因子的表达。Th<sub>1</sub> 型细胞因子参与炎症反应的发生,Th<sub>2</sub> 型细胞因子能促进 IgG 的分泌,两者互相抑制;Schnare 等<sup>[33]</sup> 研究发现,TLRs 介导的免疫反应更倾向于引起 Th<sub>1</sub> 型反应,而不是 Th<sub>2</sub> 型。因此,饲料添加苏氨酸和色氨酸引起的血清 IgG 含量上升的机制需进一步研究。

## 4 结论

生长猪在接种 PRRS 弱毒苗的条件下,饲料中添加苏氨酸和色氨酸可上调 TLR3、TLR7、TLR8 mRNA 相对表达量,表明接种 PRRS 弱毒苗可能激活了 TLR3、TLR7、TLR8 信号通路,进而提高血清免疫球蛋白含量,促进炎症细胞因子产生,最终强化获得性免疫。

### 参考文献:

- [1] CANO J P, DEE S A, MURTAUGH M P, et al. Effect of vaccination with a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on dynamics of homologous viral infection in pigs[J]. American Journal of Veterinary Research, 2007, 68: 565 - 571.
- [2] 胡家澄, 邹晓庭, 董金格. 苏氨酸对畜禽免疫性能的

- 影响研究进展[J]. 中国饲料, 2008(21): 4-6.
- [ 3 ] 郑春田, 李德发, 谯仕彦, 等. 生长猪苏氨酸需要量研究[J]. 畜牧与兽医, 2000, 32(1): 9-11.
- [ 4 ] WANG X, QIAO S Y, LIU M, et al. Effects of graded levels of true ileal digestible threonine on performance, serum parameters and immune function of 10-25 kg pigs [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2006, 129: 264-278.
- [ 5 ] LI D, XIAO C, QIAO S, et al. Effects of dietary threonine on performance, plasma parameters and immune function of growing pigs [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1999, 78: 179-188.
- [ 6 ] SCHRÖCKSNADDEL K, WIRLEITNER B, WINKLER C, et al. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 364(1): 82-90.
- [ 7 ] FALARINO F, GROHMANN U, YOU S, et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down regulate T cell receptor chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells [J]. *The Journal of Immunology*, 2006, 76: 6752-6761.
- [ 8 ] MURTAUGH M P, XIAO Z, ZUCKERMANN F. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection [J]. *Viral Immunology*, 2002, 15: 533-547.
- [ 9 ] OSORIO F A, GALEOTA J A, NELSON E, et al. Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity [J]. *Virology*, 2002, 302: 9-20.
- [ 10 ] MILLER L C, LAGER K M, KEHRLI M E. Role of toll-like receptors in activation of porcine alveolar macrophages by porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2009, 16: 360-365.
- [ 11 ] LUO R, XIAO S, JIANG Y, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) suppresses interferon-beta production by interfering with the RIG-I signaling pathway [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45: 2839-2846.
- [ 12 ] SANG Y, ROSS C R, ROWLAND R R, et al. Toll-like receptor 3 activation decreases porcine arterivirus infection [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 21: 303-314.
- [ 13 ] LIU C H, CHAUNG H C, CHANG H L, et al. Expression of Toll-like receptor mRNA and cytokines in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 136: 266-276.
- [ 14 ] MIGUEL J C, CHEN J, VAN ALSTINE W G, et al. Expression of inflammatory cytokines and Toll-like receptors in the brain and respiratory tract of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 135(3): 314-319.
- [ 15 ] KRISHNAN J, SELVARAJOO K, TSUCHIYA M, et al. Toll-like receptor signal transduction [J]. *Experimental and Molecular Medicine*, 2007, 39(4): 421-438.
- [ 16 ] ARANCIBIA S A, BELTRÁN C J, AGUIRRE I M, et al. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses [J]. *Biological Research*, 2007, 40(2): 97-112.
- [ 17 ] DIEBOLD S S, KAISHO T, HEMMI H, et al. Innate antiviral responses by means of TLR7 mediated recognition of single-stranded RNA [J]. *Science*, 2004, 303(5): 1529-1531.
- [ 18 ] ALEXOPOULOU L, HOLT 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: 732-738.
- [ 19 ] MEDZHITOV R. Toll-like receptors and innate immunity [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2001, 1(2): 135-145.
- [ 20 ] BAUER S, KIRSCHNING C J, HACKER H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species specific CpG motif recognition [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(16): 9237-9242.
- [ 21 ] POLTORAK A, SMIRNOVA I, HE X, et al. Genetic and physical mapping of the LPS locus; identification of toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region [J]. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 1998, 24: 340-355.
- [ 22 ] YANG R B, MARK M R, GRAY A, et al. Toll like receptor-2 mediates lipopolysaccharide induced cellular signaling [J]. *Nature*, 1998, 395(9): 284-288.
- [ 23 ] DIAZ I, DARWICH L, PAPPATERRA G, et al. Different european-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs [J]. *Virology*, 2006, 351: 249-259.



- [24] THANAWONGNUWECH A, UNGSIPIPAT S, DI-SATIAN R, et al. Immunohistochemical staining of IFN- $\gamma$  positive cells in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected lungs [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2003, 91: 73 – 77.
- [25] VAN REETH K, LABARQUE G, NAUWYNCK H. Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections; correlations with pathogenicity [J]. *Research in Veterinary Science*, 1999, 67: 47 – 52.
- [26] SURADHAT S, THANAWONGNUWECH R. Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Journal of General Virology*, 2003, 84: 2755 – 2760.
- [27] THANAWONGNUWECH R, THACKER B, HALBUR P. Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and mycoplasma hyopneumoniae [J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory*, 2004, 11: 901 – 908.
- [28] CHAUNG H C, PENG Y T, CHANG H L, et al. Phenotypic and functional modulation of bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 129: 281 – 293.
- [29] MEIER W A, GALEOTA J, OSORIO F A, et al. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination [J]. *Virology*, 2003, 309: 18 – 31.
- [30] ASTE-AMEZAGA M, MA X, SARTORI A. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10 [J]. *The Journal of Immunology*, 1998, 160: 5936 – 5944.
- [31] FAN Z, YU P, WANG Y, et al. NK-cell activation by LIGHT triggers tumor-specific CD8<sup>+</sup> T-cell immunity to reject established tumors [J]. *Blood*, 2006, 107 (4): 1342 – 1351.
- [32] NAGASE H, OKUGAWA S, OTA Y, et al. Expression and function of toll-like receptors in eosinophils; activation by Toll-like receptor 7 ligand [J]. *The Journal of Immunology*, 2003, 171 (8): 3977 – 3982.
- [33] SCHNARE M, BARTON G, HOLT A C, et al. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses [J]. *Nature Immunology*, 2001, 2: 947 – 950.

## Effects of Dietary Threonine and Tryptophan on Immune Response of Growing Pigs Inoculated Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Modified Live Virus Vaccine

WANG Jun ZHAO Yingfei FANG Zhengfeng LIN Yan CHE Lianqiang  
YANG Min WU De\*

(Key Laboratory for Animal Disease-Resistance Nutrition of the Ministry of Education of China, Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Ya' an 625014, China)

**Abstract:** Sixteen healthy castrated growing pigs with an initial body weight of  $(29.11 \pm 4.41)$  kg were used to investigate the effects of dietary threonine (Thr) and tryptophan (Trp) on immune response of growing pigs inoculated with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) modified live virus vaccine. The pigs were randomly allocated to 4 treatments with 4 replicates in each treatment and 1 pig per replicate. According to a  $2 \times 2$  factorial design, growing pigs received diets containing two amino acid levels [Lys:Thr:Trp = 100:64:18 (NRC level) or Lys:Thr:Trp = 100:80:26 (test level)] and were injected with 2 mL of phosphate buffered saline (PBS) or PRRS modified live virus vaccine on day 0 and 35 of experiment. Blood samples were collected to determine the contents of plasma interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-10 (IL-10), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and serum immunoglobulin G (IgG) on days 14, 28, 35 and 49 of experiment, and pigs were slaughtered to collect lung tissue on day 49 of experiment. And real-time quantitative PCR was applied to deter-

mine the relative mRNA expression levels of Toll-like receptor1 to 10 (*TLR1* to *TLR10*) in lungs. The results showed as follows: compared with the supplementation of NRC levels of Thr and Trp, when pigs were injected with PBS, serum IgG content in pigs fed diets containing the test levels of Thr and Trp was significantly increased on days 14 and 28 of experiment ( $P < 0.05$ ); when pigs were injected with PRRS modified live virus vaccine, pigs fed diets containing the test levels of Thr and Trp had a higher serum IgG content on day 35 of experiment ( $P < 0.05$ ). Compared with PBS injection, the higher plasma IFN- $\gamma$ , IL-10 and IL-1 $\beta$  contents were observed under immune stress condition challenged by PRRS modified live virus vaccine on days 14, 28 and 35 of experiment ( $P < 0.05$ ). Moreover, compared with the supplementation of NRC levels of Thr and Trp, the supplementation of test levels of Thr and Trp increased plasma IL-1 $\beta$  (except for day 14 of experiment) and IFN- $\gamma$  (except for day 49 of experiment) contents, and decreased plasma IL-10 content on days 14, 28, 35 and 49 of experiment when pigs were injected with PRRS modified live virus vaccine ( $P > 0.05$ ). Compared with PBS injection, the relative mRNA expression levels of *TLR1* to *TLR10* of lungs were significantly increased under immune stress condition challenged by PRRS modified live virus vaccine ( $P < 0.05$ ); under immune stress condition challenged by PRRS modified live virus vaccine, compared with the supplementation of NRC levels of Thr and Trp, there were higher relative mRNA expression levels of *TLR1* to *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* and *TLR10* of lungs and lower relative mRNA expression levels of *TLR4*, *TLR6* and *TLR9* of lungs in pigs fed diets containing the test levels of Thr and Trp ( $P < 0.05$ ). In conclusion, the supplementation of Thr and Trp can increase the relative mRNA expression levels of *TLR3*, *TLR7* and *TLR8*, indicating the PRRS modified live virus vaccine can further activate the signal pathway of *TLR3*, *TLR7* and *TLR8*, which results in higher serum IgG content and inflammatory cytokines. Therefore, Thr and Trp can enhance adaptive immune response of growing pigs. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(6):1189-1198]

**Key words:** threonine; tryptophan; PRRS modified live virus vaccine; immune response; growing pigs