

无菌猪生长、血液以及脏器相关指标的测定

孙静^{1,2,3}, 杜蕾⁴, 丁玉春^{1,2,3}, 曹浩然^{1,2,3}, 吴梦^{1,2,3},
林保忠^{1,2,3}, 张世华¹, 刘作华^{1,2,3*}, 葛良鹏^{1,2,3*}

(1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2. 农业部养猪科学重点实验室, 重庆 402460;
3. 养猪科学重庆市市级重点实验室, 重庆 402460; 4. 西南大学荣昌校区, 重庆 荣昌 402460)

【摘要】 目的 建立无菌太湖猪多项生理数据背景资料。方法 对4头25 d无菌猪和4头同窝普通级群体, 雌雄比3:1, 测定并比较血液常规、生化、免疫球蛋白和主要脏器发育指标。运用异速生长建模, 对主要脏器重量相对体重的异速生长进行了分析。结果 (1) 无菌猪与普通级猪的12项血常规和8项血生化指标差异有显著性($P < 0.05$); (2) 无菌猪与普通级猪的平均体重、血清中IgM表达量差异达到显著性水平($P < 0.05$), 且无菌猪缺少肠系膜淋巴结; (3) 无菌猪的心脏、脾和胃与体重呈负异速生长(异速生长指数 $b < 1$), 肠道与体重的异速生长指数为1.78, 为正异速生长; 而普通级猪的心脏、胃和肠道与体重呈负异速生长($b < 1$), 肾与体重的异速生长指数最大, 为1.20, 呈正异速生长。结论 微生物学等级差异影响了猪体重、血液及脏器、免疫系统的发育。

【关键词】 无菌猪; 血液参数; 脏器发育; 异速生长分析

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)04-0388-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.010

Measurement of body weight, blood parameters and main organ coefficients of germ-free piglets

SUN Jing^{1,2,3}, DU Lei⁴, DING Yu-chun^{1,2,3}, CAO Hao-ran^{1,2,3}, WU Meng^{1,2,3},
LIN Bao-zhong^{1,2,3}, ZHANG Shi-hua¹, LIU Zuo-hua^{1,2,3*}, GE Liang-peng^{1,2,3*}

(1. Chongqing Academy of Animal Science, 2. Key Laboratory of Pig Industry Science of Agriculture Ministry,
3. Chongqing Key Laboratory of Pig Industry Science, Rongchang Chongqing 402460, China;
4. Department of Animal Nutrition and Feed Science, Southwest University Rongchang Campus, Rongchang Chongqing 402460)

【Abstract】 Objective To establish the background information of physiological parameters for germ-free (GF) Taihu piglets. **Methods** In this study we selected 25 days old GF Taihu piglets and 4 conventional (CV) littermates, the male and female ratio was 1:3, to measure the normal clinical values of hematology and serum biochemistry, immunoglobulin concentration and main organ coefficients. The analysis of relative growths of main organ weight to body weight was conducted in the Taihu GF and CV pigs by allometric scaling model. **Results** (1) Twelve hematological parameters and 8 blood biochemical parameters in the GF piglets were significantly lower than those in CV pigs ($P < 0.05$). (2) The average body weight, IgM concentration of GF pigs and CV pigs had significant difference ($P < 0.05$), and no mesenteric lymph nodes were found in the GF pigs. (3) The gut weight had the largest allometric association with body weight in the GF pigs, while spleen weight has the largest allometric association with body weight in the CV pigs. Both the weight of heart and stomach in CV and GF pigs had a negative allometric association with body weight (allometric coefficient $b < 1$), respectively. **Conclusions** Different microbe control grades affect the body weight, hematology and serum biochemistry, expression of immunoglobulin and development of main organs in laboratory pigs.

【基金项目】 国家“863”计划(2014AA021602); 重庆市国际合作项目(CSTC2013ghz80002); 重庆市基础与前沿研究(cstc2013jcyjC80001); 重庆市农发资金(12402)资助项目; 无菌动物应用示范平台(cstc2015pt-kjyfs0024)。

【作者简介】 孙静(1985-), 女, 博士, 肠道微生物, 研究方向: 无菌动物的培育与应用。E-mail: sunjing85026@163.com

【通讯作者】 葛良鹏(1982-), 男, 研究员, 研究方向: 动物资源创新开发利用。E-mail: geliangpeng1982@163.com; 刘作华, 男, 研究员, 研究方向: 地方猪资源保护与开发利用。

【Key words】 Germ-free pig; Hematological parameters; Organ coefficient; Allometric analysis

Corresponding author: GE Liang-peng, E-mail: geliangpeng1982@163.com; LIU Zuo-hua, Email: liuzuohua66@163.com

无菌动物 (germ-free, GF) 是以剖腹术获得、饲养在隔离器内, 利用现代检查技术未能检出微生物的动物。由于多数啮齿类模型在复制大型动物的疾病的临床表现可靠性低^[1], 大型无菌动物 (猪) 被认为是研究人类的胃肠道、免疫以及大脑发育等影响因素的首选非灵长类动物模型^[2-4]。目前, 无菌猪已用于肠出血性大肠杆菌感染^[5]、艰难梭菌感染^[6]等研究; 或与菌群移植技术结合, 用于研究肠道菌群与环境间关系的研究^[7]。此外, 无菌猪模型也被用于评估轮状病毒疫苗免疫原性和保护效果^[8]。

临床前安全性评价研究结果的准确和可靠性, 是保证新型药物、疫苗、益生类产品安全、有效、可控性开发的基本条件之一。但实验动物品系、个体差异、遗传背景以及实验室评估方法等存在差异, 为此, 建立实验室内实验动物生理指标数据背景资料必不可少。如詹纯列等^[9]针对 SPF 小型猪开展了血液学和尿常规等指标的测定。类似地, 开展无菌猪血常规、血液生化、主要脏器生长发育等指标数据资料的收集与分析, 能为以无菌猪为基础的研究与临床应用提供客观的科学依据。本研究对同日龄的无菌级猪 (GF) 和普通级猪 (CV) 的生长、血液学及血液生化指标、血液免疫球蛋白、脏器发育等多项指标进行测定, 为 GF 猪的使用提供基础参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

实验母猪 (子宫剖腹术): 选用健康后备太湖母猪 (编号 346), 配种太湖公猪编号 375 (体重 > 200 kg), 购自荣昌县树德养猪场 (种畜禽生产经营许可证 (渝荣) 23150004), 地址为重庆市荣昌县昌州街道石河村二组。配种时间 2015 年 8 月 6 日, 预产期为 2015 年 11 月 28 日。剖腹产手术时间: 2015 年 11 月 23 日上午 11 时起。无菌条件下, 选出 4 头体重相似的无菌仔猪进入隔离器内饲喂, 直至 25 日龄。其余 15 头仔猪剪耳号后, 由普通级母猪 (编号 379) 代哺至 25 日龄。

无菌级仔猪 (GF 组): 共 4 头, 3 母 1 公, 由重庆市畜牧科学院无菌猪培育平台提供。普通级仔猪 (CV 组): 25 日龄时, 选择 4 头体重相似个体 (3 母 1 公), 由重庆市畜牧科学院石河实验动物基地提供。

由本实验室和重庆市荣永总医院按照 GB - 14926.4 - 2001 标准, 对动物粪便和生活环境标本进行检测, 结果符合无菌要求。

1.1.2 饲养

动物饲养在隔离系统中【SYXK (渝) 2011 - 0001】, 洁净度为 100 级^[10], 室温 22℃ ~ 28℃, 湿度 40% ~ 70%, 光照 12 h/d, 动物自由采食和饮水。配方奶粉由⁶⁰Co- γ 线源辐照灭菌、饮用酸化水经高温高压灭菌处理 (pH = 2 ~ 3)。同窝 4 头普通级仔猪饲养在普通级动物房, 日常饲养管理遵循猪场内制度施行。

1.2 方法

1.2.1 样品采集

采样前 12 h, 动物禁食不禁水, 前腔静脉采血。抗凝剂使用情况为: 血常规测定 (EDTA-K2 抗凝管)、血生化指标测定 (肝素钠抗凝管)、血中免疫球蛋白 IgA、IgG 和 IgM (无抗凝剂)。其中, 血常规和血生化测定由重庆市永荣总医院当天完成测定 (BC-6900 全自动五分类血细胞分析仪, 深圳迈瑞; AU-680 全自动生化分析仪, 贝克曼公司), 按照该医院血液检测实验室相关标准操作规程进行检测。

免疫球蛋白测定: Elx50 微孔板全自动洗板机 (BioTek)、Epoch 微孔板分光光度计 (BioTek); 测定使用试剂盒为 IgA (Pig) ELISA kit (KA2038)、IgM (Pig) ELISA Kit (KA2039)、IgG (Pig) ELISA kit (KA2016), Abnova 公司。

1.2.2 测定指标

血常规指标: 白细胞总数 (WBC)、中性粒细胞百分比 (Neu%)、淋巴细胞百分比 (LYM%)、单核细胞百分比 (MON%)、嗜酸性粒细胞百分比 (Eos%)、嗜碱性粒细胞 (BAS%)、中性粒细胞数目 (NEU)、淋巴细胞数目 (LYM)、单核细胞数目 (MON)、嗜酸性粒细胞 (EOS)、嗜碱性粒细胞 (BAS)、红细胞数目 (RBC)、血红蛋白浓度 (HGB)、红细胞压积 (HCT)、平均红细胞体积 (MCV)、平均红细胞血红蛋白含量 (MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度 (MCHC)、红细胞分布宽度变异系数 (RDW-C)、红细胞分布宽度标准差 (RDW-S)、血小板 (PLT)、平均血小板体积 (MPV)、血小板分布宽度 (PDW)、血小板容积 (PCT)。

血生化指标: 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶

(AST)、谷氨酰氨基转移酶 (GGT)、碱性磷酸酶 (ALP)、谷草转氨酶/谷丙转氨酶 (AST/ALT)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、球蛋白 (GLO)、白球比 (A/G)、总胆红素 (TBIL)、直接胆红素 (DBIL)、间接胆红素 (IDBIL)、胆碱酯酶 (CHE)、尿素 (BUN)、肌酐 (CREA)、尿酸 (UA)、总胆固醇 (CHOL)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL)、低密度脂蛋白 (LDL)、全程 C 反应蛋白 (CRP)、葡萄糖 (GLU)、肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)。

1.2.3 猪脏器测定

放血处死后立即解剖,分离心、肝、脾、肺、肾、胃、肠道、淋巴结等脏器称湿重,并计算其脏器指数。脏器指数 (g/kg) = 各脏器湿重/仔猪体重 × 100%。

异速生长方程: $Y = aX^b$, 其中 X 为体重, Y 为各器官重量, a 表示异速生长常数, b 表示异速生长指数; X 与 Y 之间的关系主要取决于 b 值的大小^[11, 12]。

1.3 数据整理与分析

Excel 统计分析各指标的测定值, 计算每个表型性状的平均值 ± 标准差。T 检验进行 GF 猪与 CV 猪各性状的差异显著性分析。

异速生长模型以幂函数方程 ($Y = aX^b$) 计算, 并以相关指数 R^2 最大及残差平方和最小最小作为曲线拟合标准, 并求出器官重与体重的拐点。

Excel 对猪 IgA、IgM 和 IgG 标准品拟合标准曲线, 计算 IgA、IgM 和 IgG 的浓度; T 检验比较在 GF 猪与 CV 猪血清中浓度差异。

2 结果

2.1 GF 猪与 CV 猪的血液学检查结果

2.1.1 血常规测定结果

比较发现, GF 猪多项血液学指标与 CV 猪差异有显著性 (见表 1)。其中, 在 WBC、MON 与 MON%、EOS 与 EOS%、BAS 与 BAS%、HGB、HCT、RBC、PCT、PLT 这 12 项血常规指标上, GF 猪低于 CV 猪 ($P < 0.05$)。血液中仅 LYM、MCV、MCH、MCHC、RDW-S、RDW-C 指标上, GF 猪与 CV 猪差异无显著性 ($P > 0.05$)。和猪血常规参考值相比, GF 猪血液的 HGB、HCT、MCV、MCH、MCHC 都低于猪的参考值范围; PLT 指标上, GF 猪与 CV 猪差异达到显著水平 ($P = 0.04$), 且高于猪参考值。无论肠道内是否存在微生物, 25 日龄太湖猪在 MON、MON%、PDW 指标上都明显高于 2~6 月龄太湖猪。

表 1 25 日龄 GF 猪与 CV 猪的血常规指标比较

Tab. 1 Comparison of the results of routine blood test in the GF and CV piglets aged 25 days old

项目 Index/Unit	GF 猪 GF pigs	CV 猪 CV pigs	P 值 P value	太湖猪参考值* Blood parameters of Taihu pigs	猪参考值 Pig blood parameters
白细胞数目 WBC / $10^9/L$	6.64 ± 1.38	10.48 ± 1.91	0.02	10.76 - 14.02	3.48 - 14.79
中性粒细胞百分比 Neu /%	58.33 ± 10.12	47.53 ± 5.40	0.11	33.61 - 49.73	64.00 - 96.00
淋巴细胞百分比 LYM /%	27.30 ± 19.54	13.45 ± 0.62	0.25	47.03 - 61.93	10.00 - 28.00
单核细胞百分比 MON /%	13.73 ± 10.61	36.78 ± 6.02	0.01	1.41 - 3.94	3.00 - 9.00
嗜酸性粒细胞百分比 EOS /%	0.40 ± 0.25	1.43 ± 0.26	0.00	0.39 - 0.85	/
嗜碱性粒细胞百分比 BAS /%	0.25 ± 0.17	0.83 ± 0.32	0.02	0.12 - 4.88	/
中性粒细胞数目 NEU / $10^9/L$	3.87 ± 1.02	4.91 ± 0.34	0.10	4.03 - 7.02	6.20 - 14.8
淋巴细胞数目 LYM / $10^9/L$	1.75 ± 1.25	1.40 ± 0.21	0.62	5.47 - 6.67	0.90 - 4.50
单核细胞数目 MON / $10^9/L$	0.98 ± 0.72	3.93 ± 1.35	0.01	0.15 - 0.51	0.30 - 1.50
嗜酸性粒细胞数目 Eos / $10^9/L$	0.03 ± 0.02	0.16 ± 0.06	0.01	0.06 - 0.09	/
嗜碱性粒细胞数目 BAS / $10^9/L$	0.02 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.02	0.01 - 0.62	/
红细胞数目 RBC / $10^{12}/L$	5.91 ± 0.66	6.94 ± 0.45	0.04	5.50 - 5.98	4.50 - 8.00
血红蛋白浓度 HGB /g/L	95.00 ± 4.90	121.25 ± 6.80	0.00	97.00 - 110.00	110.00 - 180.00
红细胞压积 HCT /%	32.53 ± 1.96	41.88 ± 1.97	0.00	28.00 - 33.00	38.00 - 53.00
平均红细胞体积 MCV /fL	55.35 ± 4.11	60.45 ± 2.10	0.07	52.22 - 55.45	59.00 - 68.00
平均红细胞血红蛋白含量 MCH /pg	16.20 ± 1.29	17.48 ± 0.69	0.13	17.68 - 18.41	27.00 - 35.00
平均红细胞血红蛋白浓度 MCHC /g/L	292.50 ± 7.14	289.25 ± 2.98	0.43	325.00 - 340.00	310.00 - 370.00
红细胞分布宽度变异系数 RDW-C /%	19.65 ± 1.24	18.35 ± 0.85	0.13	11.00 - 16.00	6.00 - 20.00
红细胞分布宽度标准差 RDW-S /fL	39.90 ± 5.32	39.43 ± 2.93	0.88	35.00 - 56.00	30.00 - 80.00
血小板 PLT / $10^9/L$	522.75 ± 65.95	722.50 ± 148.44	0.05	/	92.20 - 218.60
平均血小板体积 MPV /fL	7.57 ± 0.53	8.30 ± 0.41	0.07	8.59 - 9.83	7.50 - 12.00
血小板分布宽度 PDW /fL	15.00 ± 0.41	15.52 ± 0.10	0.08	0.19 - 0.21	10.00 - 30.00
血小板容积 PCT /%	0.40 ± 0.07	0.60 ± 0.14	0.04	0.40 - 0.49	0.08 - 0.30

注: /表示在医院检查报告单上未显示该参考值。* 表示为 2~6 月龄太湖猪 (性别不限) 的血常规测定值, 引用至《太湖猪实验动物化的初步研究——太湖猪血液生理指标测定与分析》^[13]。

Note. / represents no reference value shown in the Medical Examination Report by the Hospital. * The hematological parameters of 2- to 6-month-old pigs, which were cited from the journal article *Preliminary research on experimental animalization of Taihu pig - Detection and analysis of blood physiological parameters in Taihu pig*^[13].

2.1.2 猪血液生化指标测定

在测定的 25 项血生化指标中, CV 猪血清中 ALT、GGT、ALP 含量高于 CV 猪血清内含量 ($P < 0.05$); 而 TP、ALB、GLO、BUN、UA、CHOL、TG、HDL 这 8 项指标在 GF 猪血清内含量低于 CV 猪, 差异有显著性 ($P < 0.05$, 见表 2)。

2.1.3 猪血清免疫球蛋白测定

血清中 IgA、IgG、IgM 测定结果 (见表 3) 显示, GF 猪血清中 IgA 和 IgG 表达量分别为 (399.48 ± 71.59) ng 和 (1406.60 ± 146.78) ng, 高于 CV 猪的表达量 ($P < 0.05$); CV 猪血清中 IgM 表达量则高于 GF 猪, 为 (142.52 ± 13.55) ng ($P < 0.05$)。

表 2 25 日龄 GF 猪与 CV 猪各血液生化指标的比较

Tab. 2 Blood biochemical parameters in the GF and CV piglets aged 25 days old

项目/单位 Index/Units	GF 猪 GF pigs	CV 猪 CV pigs	P 值 P values	人参考值 Human blood parameters
谷丙转氨酶 ALT /U/L	66.75 ± 14.01	38.75 ± 9.00	0.02	0.00 - 40.00
谷草转氨酶 AST /U/L	58.50 ± 4.43	50.50 ± 21.61	0.52	0.00 - 45.00
谷氨酰氨基转移酶 GGT /U/L	59.25 ± 8.26	43.25 ± 8.46	0.04	7.00 - 50.00
碱性磷酸酶 ALP /U/L	746.75 ± 150.66	300.75 ± 95.27	0.00	40.00 - 150.00
谷草/谷丙 AST /ALT	0.90 ± 0.18	1.27 ± 0.24	0.05	
总蛋白 TP /g/L	40.25 ± 3.97	56.23 ± 4.19	0.00	66.00 - 87.00
白蛋白 ALB /g/L	29.05 ± 1.64	38.23 ± 2.79	0.00	35.00 - 52.00
球蛋白 GLO /g/L	11.20 ± 2.35	18.00 ± 2.03	0.00	28.00 - 43.00
白球比 A/G	2.65 ± 0.39	2.13 ± 0.22	0.06	1.20 - 2.50
总胆红素 TBIL /μmol/L	12.07 ± 6.68	6.58 ± 2.32	0.17	0.00 - 20.00
直接胆红素 DBTL /μmol/L	4.80 ± 2.53	3.00 ± 1.62	0.28	1.70 - 6.80
间接胆红素 IDBIL /μmol/L	7.28 ± 4.17	3.58 ± 0.88	0.17	0.00 - 12.00
胆碱酯酶 CHE /U/L	625.50 ± 23.76	705.50 ± 63.10	0.06	5320.00 - 12920.00
尿素 BUN /mmol/L	0.98 ± 0.28	4.85 ± 0.58	0.00	2.10 - 7.80
肌酐 CREA /μmol/L	35.27 ± 12.16	47.23 ± 1.93	0.14	44.00 - 124.00
尿酸 UA /μmol/L	5.50 ± 1.91	2.50 ± 1.00	0.03	40.00 - 416.00
总胆固醇 CHOL /μmol/L	1.77 ± 0.21	2.95 ± 0.47	0.00	3.90 - 6.00
甘油三酯 TG /mmol/L	0.40 ± 0.12	0.99 ± 0.16	0.00	0.57 - 1.70
高密度脂蛋白 HDL /mmol/L	0.85 ± 0.18	1.45 ± 0.26	0.01	0.69
低密度脂蛋白 LDL /mmol/L	0.74 ± 0.23	1.05 ± 0.32	0.17	0.68
全程 C 反应蛋白 CRP /mg/L	3.02 ± 1.21	1.69 ± 0.67	0.10	2.63
葡萄糖 GLU /mmol/L	5.91 ± 1.87	6.09 ± 1.88	0.90	8.41
肌酸激酶 CK /U/L	440.50 ± 115.11	547.50 ± 280.36	0.51	556.00
乳酸脱氢酶 LDH /U/L	984.50 ± 133.10	840.50 ± 138.60	0.18	894.00

表 3 ELISA 检测无菌猪血清中 IgA、IgG 和 IgM 的含量 (ng; $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The expression of antibodies in the serum of GF and CV piglets determined by ELISA

组别 Groups	头数 Numbers	IgA	IgM	IgG
无菌猪 GF pigs	4	399.48 ± 71.59	64.81 ± 3.02	1406.60 ± 146.78
普通级猪 CV pigs	4	204.06 ± 10.06	142.52 ± 13.55	834.96 ± 93.88
P 值 P value *	/	0.01	0.00	0.00

注: * ELISA 抗体检测结果显示 IgA 和 IgG 表达量在无菌猪和普通级猪两组间差异分别达到显著性水平 ($P < 0.05$), 而无菌猪血清中 IgM 表达量低于普通级猪, 且差异达到显著性水平 ($P < 0.05$)。

Note. * The result of ELISA antigen detection showed that the expression of IgA and IgG in the serum between GF group and CV group had a significant difference ($P < 0.05$), while the expression of IgM in the serum between GF piglets was significantly lower than that in CV piglets' serum ($P < 0.05$).

2.2 猪脏器指标测定

主要脏器称重结果显示, GF 猪平均活体重为 (2.61 ± 0.42) kg, CV 猪平均活体重为 (4.82 ± 0.69) kg, 两组间活体重差异达到极显著 ($P < 0.01$)。GF 猪平均体长为 (34.50 ± 3.53) cm、胸围为 (32.25 ± 3.01) cm, 低于 CV 猪平均体长 (45.50 ± 3.00 cm, $P < 0.01$) 和胸围 (38.25 ± 1.50) cm, 且

差异达显著水平 ($P < 0.05$)。

各项脏器湿重中, GF 猪与 CV 猪差异存在显著性 ($P < 0.05$), 尤其体现在心肺、胃、肠道湿重上。比较脏器指数发现, GF 猪心肺指数、肝指数、脾指数以及胃指数与 CV 猪差异无显著性 ($P > 0.05$)。GF 猪与 CV 猪的肾指数差异达到显著性水平 ($P < 0.05$), 而肠指数差异达到极显著水平 ($P = 0.02$)。

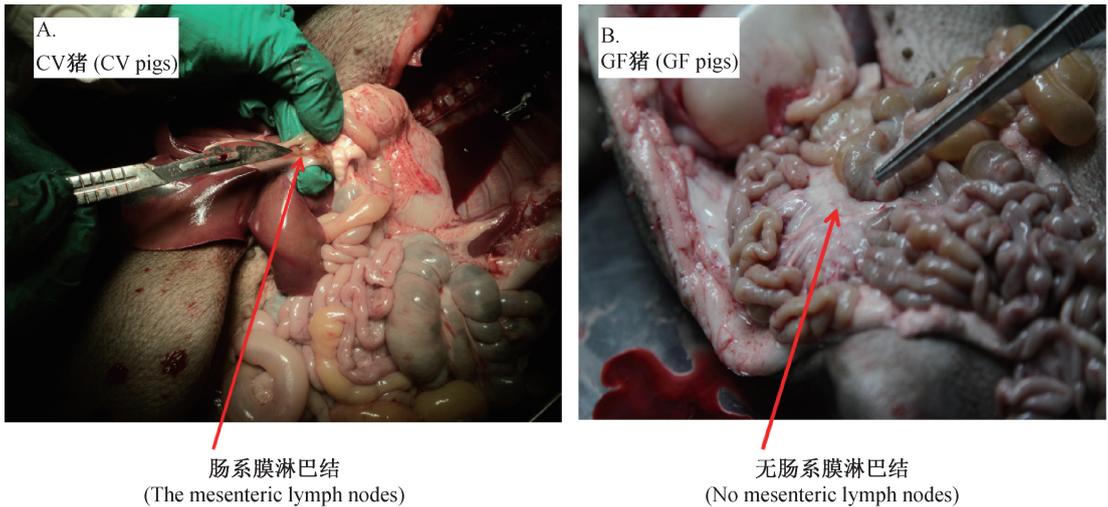
表 4 GF 猪与 CV 猪各个脏器指标的测定

Tab. 4 Comparison of body weight and organ coefficients of the GF and CV pigs

项目/单位 Index/Unit	GF 猪 GF pigs	CV 猪 CV pigs	P 值 P value	GF 猪脏器的拟合公式 Allometric equation for GF pigs	CV 猪脏器的拟合公式 Allometric equation for CV pigs
活体重 Live weight/kg	2.61 ± 0.42	4.82 ± 0.69	0.00	/	/
体长 Body length/cm	34.50 ± 3.53	45.50 ± 3.00	0.00	/	/
胸围 Chest/cm	32.25 ± 3.01	38.25 ± 1.50	0.01	/	/
心肺 Heart/g	52.27 ± 4.28	106.76 ± 6.54	0.00	$Y = 1.63X^{0.44}$	$Y = 96.41X^{0.01}$
肝 Liver/g	74.11 ± 11.02	123.39 ± 24.25	0.01	$Y = 0.05X^{0.92}$	$Y = 0.03X^{0.99}$
脾 Spleen/g	5.36 ± 0.26	8.67 ± 1.54	0.01	$Y = 9.00X^{-0.07}$	$Y = 3.00E - 03X^{0.95}$
肾 Kidney/g	19.83 ± 3.42	26.95 ± 4.66	0.05	$Y = 0.01X^{1.01}$	$Y = 1.00E - 03X^{1.20}$
胃 Stomach/g	23.60 ± 2.68	46.57 ± 6.63	0.00	$Y = 41.16X^{0.07}$	$Y = 0.20X^{0.64}$
肠道 Gut/g	130.28 ± 11.91	343.52 ± 31.99	0.00	$Y = 1.00E - 4X^{1.78}$	$Y = 2.08X^{0.61}$
心肺指数 Heart and lung coefficients	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.50	/	/
肝指数 Liver coefficient	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.21	/	/
脾指数 Spleen coefficient	2.00E - 03 ± 0.00	2.00E - 03 ± 0.00	0.22	/	/
肾指数 Kidney coefficient	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00	/	/
胃指数 stomach coefficient	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.65	/	/
肠指数 Gut coefficient	0.05 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.02	/	/

注:肠道包括十二指肠、空肠、回肠、结肠和直肠的总重量。/ 表示对应的项目不存在拟合公式。

Note. Gut represents the total wet weight of duodenum, jejunum, ileum and colon. / No allometric equation for the corresponding index.



注:A:普通级(CV)猪肠内肠系膜淋巴结明显存在;B:无菌级(GF)猪缺乏肠系膜淋巴结。

图 1 不同微生物学等级影响猪肠内肠系膜淋巴结的存在

Note. A: Mesenteric lymph nodes are present in a gut of CV pig; B: No mesenteric lymph node is observed in a GF pig.

Fig. 1 Different microbiological background affected the presence of mesenteric lymph nodes in the gut of Taihu piglets

从表 4 中分析可知 GF 猪的内脏器官的早熟性顺序是:脾 > 胃 > 心肺 > 肝 > 肾 > 肠道。若以异速生长系数 b 值为准,则无菌猪的心肺、脾和胃属早熟的器官,肝属中熟器官,而肾和肠道则属晚熟的器官。而 CV 猪内脏器官的早熟性顺序为:心肺 > 肠道 > 胃 > 脾 > 肝 > 肾。同样地, CV 猪的心肺、胃和肠道为早熟的器官,肝和脾则为中熟的器官,肾为晚熟的器官。另外,微生物学质量等级影响了猪肠系膜淋巴结的存在。25 日龄无菌猪肠道内缺少肠系膜淋巴结,而 CV 猪肠道内肠系膜淋巴结

明显存在(见图 1)。

3 讨论

3.1 无菌状态对仔猪血液指标的影响

大型无菌动物模型与粪移植技术共同推动菌群与人和动物疾病的研究。因此,获得无菌猪、建立其血液学参考指标是本单位无菌猪培育平台现阶段研究重点。实验动物血液学参数能反映机体各组织、器官的功能状态。一旦机体既能出现问题,亦会在血液上反映出来。血常规作为疾病诊断的必要检

测手段之一。表 1 数据显示,GF 猪血液中多项检测指标都显著低于同窝、同日龄 CV 猪;仅在 LYM、MCV、MCH、MCHC、RDW-SY 指标上未出现明显差异。

值得注意,GF 猪和 CV 猪血液中多项指标都未在猪和人的参考值范围内。这除了与医院的检测仪器、试剂和检测方法有关外,也与猪品种等因素有关,也提示我们仅靠现有的猪血液参考值并不能有效地反映 GF 猪组织、器官的功能状态。因此,在 GF 猪的培育过程中,及时完整地收集每批次动物血常规和血生化指标,建立 GF 猪血液学参数是基础而重要工作之一。

血生化指标是动物机体代谢过程的内在反映,可作为检测机体健康、生产性能以及适应性的重要参考依据。表 2 数据可知,25 日龄 GF 猪血清中 ALT、GGT 和 ALP 含量高于 CV 猪血清,差异达到显著性水平 ($P < 0.05$),而在 TP、ALB、GLO、BUN、UA、CHOL、TG、HDL 这 8 项指标上与 CV 猪存在显著性差异。研究指出,尿素是氨基酸代谢的最终产物,血清中尿素含量主要受蛋白质摄入量和肝分解代谢能力的影响^[14]。GF 猪血清尿素含量显著低于同日龄 CV 猪以及断奶阶段 CV 猪^[15, 16],这说明 GF 猪对蛋白质的代谢能力低于 CV 猪,且可能受年龄的影响小。血清中 GLO 指标反映了机体抗病力,降低则易受肠道病原微生物的侵袭。GF 猪血清中 GLO 显著低于 CV 猪,这表明无菌状态下仔猪的自身防御能力低。这与本次实验结果显示 GF 猪肠系膜淋巴结缺失的结果(见图 1)相吻合。

研究已知,无菌动物的肠道相关免疫组织(GALT)如派氏淋巴结或孤立的淋巴滤泡是欠发育的^[17, 18];且小肠内淋巴细胞群也相应改变,效应细胞群如分泌型 IgA 浆细胞、上皮内淋巴细胞等都明显减少。最新研究比较了 GF 猪和 CV 猪小肠内淋巴细胞的分布情况,发现效应细胞仅出现在微生物定植肠道之后,且主要为类型切换型 $IgM^+ IgA^+ B$ 细胞,活化 $CD_2^- CD21^+$ B 细胞,抗体生成/记忆 $CD_2^+ CD21^- B$ 细胞,以及效应/记忆 $CD_4^+ CD_8^+ \alpha\beta$ Th 细胞^[19]。可见,深入肠道菌群对无菌猪免疫系统发育的影响研究,或许能帮助加强猪替代啮齿类动物,成为免疫学模型的可行性。

3.2 无菌状态对猪血液中免疫球蛋白表达量影响

新生仔猪血清与初乳中都含有低数量的免疫球蛋白,代表了它们建立在抵抗自身抗原的多特异性

和反应性基础上的未免疫抗体组库^[20]。Markowska-Daniel 等^[21]检测发现,10 日龄仔猪血清中 IgA、IgM 和 IgG 浓度已达到毫克级别,且可能与提高仔猪自身免疫有关。本次试验中,25 日龄 GF 猪和 CV 猪血清中,三种免疫球蛋白的含量均在纳克级别,仅 IgG 浓度达到了微克级别。这说明血清内免疫球蛋白浓度与猪品种有关。而 GF 猪血清内 IgA 和 IgG 浓度高于 CV 猪 ($P < 0.05$),IgM 量低于 CV 猪血清,差异达到显著性水平 ($P < 0.05$)。杜凌等^[22]测定出 1 段婴儿配方奶粉中 IgG 含量为 45.90 mg/100 g 奶粉。而本试验整个无菌猪培育过程都采用婴儿奶粉(0-6 月龄)作为保证动物生长的营养基础,这很可能是 GF 猪血清中相对高含量免疫球蛋白的原因之一。

而肠道菌群会刺激保护性免疫应答反应,以确保宿主-微生物互利共生。因此肠道共生菌群的存在使得黏膜免疫动态研究成为难题。IgA 是哺乳类动物黏膜表面分泌的主要抗体,尤其在肠道内。Hapfelmeier 等^[23]利用无菌小鼠发现了高特异性抗共生 IgA 反应,而菌群定植小鼠则快速消除了这一反应。这可能也是解释本实验中 GF 猪血清中较高表达量免疫球蛋白存在的原因之一。

3.3 无菌状态对猪器官发育的影响

动物的脏器重量和脏器指数可一定程度体现其功能的强弱。同日龄的 GF 猪无论在体长、胸围还是体重等生长指标上,都显著低于 CV 猪。而这一情况同样反映在了各脏器的发育上,尤其表现在心肺、胃和肠道的发育。研究认为内脏器官的发育早晚直接影响其他部位的生长发育快慢。一般,体重相近动物,心脏大小和重量与运动量有关。变速生长系数 b 显示,GF 猪的内脏器官中肠道是晚熟的器官,而在 CV 猪上则为早熟的器官;脾在 GF 猪上表现为早熟的器官而在 CV 猪上为中熟的器官。研究指出细菌对动物的免疫器官发育具有刺激调节作用^[24]。由此可见,微生物学等级差异影响了猪内脏器官发育的早熟性顺序,尤其是与免疫有关的脏器。

无菌猪在菌群与疾病、营养、代谢等关系研究均有广泛的应用前景。因此,在国内建立以 GF 猪资源开发及技术服务为导向的无菌猪工程中心是整个课题组共同的目标。本次研究测定表明了生长在血液以及内脏器官等多个发育指标上,GF 猪与 CV 猪都存在显著差异。

参 考 文 献

[1] Lunney JK. Advances in swine biomedical model genomics [J].

- Int J Biol Sci, 2007, 3(3): 179–84.
- [2] Guilloteau P, Zabielski R, Hammon HM, et al. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? [J]. Nutrition Rev, 2010, 23(1): 4–22.
- [3] Odle J, Lin X, Jacobi SK, et al. The suckling piglet as an agricultural model for the study of pediatric nutrition and metabolism [J]. Ann Rev Animal Biosci, 2014, 2: 419–444.
- [4] Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, et al. The pig: a model for human infectious diseases [J]. Trends Microbiol, 2012, 20(1): 50–57.
- [5] Brady MJ, Radhakrishnan P, Liu H, et al. Enhanced actin pedestal formation by enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 adapted to the mammalian host [J]. Front Microbiol, 2011, 2: 226.
- [6] Steele J, Feng H, Parry N, et al. Piglet models of acute or chronic Clostridium difficile illness [J]. J Infect Dis, 2010, 201(3): 428–434.
- [7] Wang M, Donovan SM. Human microbiota-associated swine: current progress and future opportunities [J]. ILAR J, 2015, 56(1): 63–73.
- [8] Wen K, Tin C, Wang H, et al. Probiotic Lactobacillus rhamnosus GG enhanced Th1 cellular immunity but did not affect antibody responses in a human gut microbiota transplanted neonatal gnotobiotic pig model [J]. PloS One, 2014, 9(4): e94504.
- [9] 詹纯列, 李权超, 徐本法, 等. SPF 小型猪血液学、血液生化正常参考值、尿常规值测定 [J]. 中国比较医学杂志, 2001, 11(3): 134–137.
- [10] ISO 会员团体. ISO_14644 – 2004 洁净室及相关受控环境 [S]. 中国标准, 2004.
- [11] 杨联, 刘孟洲, 汪晓娟, 等. 合作猪内脏器官生长发育研究 [J]. 中国畜牧杂志, 2008, 44(13): 5–8.
- [12] 张瑞昌, 岳明. 异速生长模型及其应用概述 [J]. 生物学通报, 2011, 46(8): 6–9.
- [13] 王婧, 王禹斌, 周正宇, 等. 太湖猪实验动物化的初步研究——太湖猪血液生理指标测定与分析 [J]. 南通大学学报 (医学版), 2012, 32(6): 449–451.
- [14] 赵拴平, 王睿琪, 唐中林, 等. 3 个地方品种猪血液生化指标分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(2): 96–100.
- [15] 朱孟玲, 徐孝宙, 张建生, 等. 小梅山猪及其二元杂交猪断奶前后血液指标的检测 [J]. 畜牧与兽医, 2011, 43(7): 66–69.
- [16] 杨利娜, 朱志刚, 边高瑞, 等. 梅山仔猪和大白仔猪生长性能和消化道发育的比较研究 [J]. 动物营养学报, 2014(6): 1644–1651.
- [17] Bouskra D, Brézillon C, Bérard M, et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis [J]. Nature, 2008, 456(7221): 507–510.
- [18] Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(8): 600–600.
- [19] Potockova H, Sinkorova J, Karova K, et al. The distribution of lymphoid cells in the small intestine of germ-free and conventional piglets [J]. Dev Comp Immunol, 2015, 51(1): 99–107.
- [20] Tlaskalova-Hogenova H, Mandel L, Trebichavsky I, et al. Development of immune responses in early pig ontogeny [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1994, 43(1–3): 135–142.
- [21] Markowska-Daniel I, Pomorska-Mol M, Pejsak Z. Dynamic changes of immunoglobulin concentrations in pig colostrum and serum around parturition [J]. Pol J Vet Sci, 2010, 13(1): 21–27.
- [22] 杜凌, 孟令洁, 苏米亚. 婴儿配方奶粉中 IgG 的测定方法 [J]. 乳业科学与技术, 2004, 26(3): 102–105.
- [23] Hapfelmeier S, Lawson MA, Slack E, et al. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses [J]. Science, 2010, 328(5986): 1705–1709.
- [24] Slawinska A, Siwek M, Zylinska J, et al. Influence of synbiotics delivered in ovo on immune organs development and structure [J]. Folia Biol, 2014, 62(3): 277–285.

[收稿日期] 2016-01-28