

# 共轭亚油酸对环孢霉素 A 注射仔猪细胞免疫反应的影响

刘永祥<sup>1,2</sup> 程伟<sup>1,2</sup> 邱荣超<sup>2</sup> 姜东风<sup>2</sup>

(1. 河南省高校动物营养与饲料工程技术研究中心, 郑州 450011;

2. 郑州牧业工程高等专科学校, 郑州 450011)

**摘要** 为研究日粮添加共轭亚油酸(Conjugated linoleic acid, CLA)对细胞免疫抑制剂环孢霉素 A(Ciclosporin A, CsA)注射仔猪细胞免疫反应的影响,采用 $2 \times 2$  试验设计即日粮类型(2%CLA 或 2%大豆油)和细胞免疫抑制处理(注射 CsA 或生理盐水),48 头 21 d 断奶仔猪随机分为 4 个处理组,试验期为 42 d。注射 CsA 显著提高仔猪的料重比( $P < 0.05$ ),而日粮添加 CLA 显著降低仔猪的料重比( $P < 0.05$ ),且日粮 CLA 阻止因 CsA 注射引起的仔猪料重比提高( $P < 0.05$ )。CsA 注射极显著降低胸腺  $CD4^+$  和  $CD8^+$  T 淋巴细胞百分数( $P < 0.01$ )。日粮 CLA 显著提高胸腺  $CD4^+$   $CD8^+$  双阳性和  $CD8^+$  单阳性 T 淋巴细胞百分数( $P < 0.05$ ),且阻止注射 CsA 引起的仔猪胸腺  $CD4^+$  单阳性、 $CD8^+$  单阳性 T 淋巴细胞百分数的降低( $P < 0.01$ )。CsA 注射严重耗竭仔猪外周血  $CD3^+$ 、 $CD4^+$  和  $CD8^+$  T 淋巴细胞( $P < 0.01$ )。无论注射 CsA 与否,日粮添加 CLA 均提高仔猪外周血  $CD8^+$  T 淋巴细胞数和 IL-2 诱生活性( $P < 0.05$ ),显著缓解注射 CsA 引起仔猪外周血  $CD3^+$ 、 $CD4^+$  和  $CD8^+$  T 淋巴细胞数的减少和 IL-2 诱生活性的降低( $P < 0.01$ )。在无 CsA 注射的情况下,日粮 CLA 对仔猪外周血淋巴细胞转化率没有显著影响( $P > 0.05$ ),但日粮 CLA 显著抑制因 CsA 注射引起的仔猪外周血淋巴细胞转化率降低( $P < 0.05$ )。日粮添加 CLA 能显著缓解因 CsA 注射引起的仔猪细胞免疫抑制。

**关键词** 仔猪; 共轭亚油酸; 环孢霉素 A; 细胞免疫反应

中图分类号 S 828; S 852.4

文章编号 1007-4333(2013)02-0130-07

文献标志码 A

## Effects of dietary conjugated linoleic acid on cell immunity response of piglets after CsA injection

LIU Yong-xiang<sup>1,2</sup>, CHENG Wei<sup>1,2</sup>, QIU Rong-chao<sup>2</sup>, JIANG Dong-feng<sup>2</sup>

(1. Henan Engineering Technology Research Center of Animal Nutrition and Feed, Zhengzhou 450011, China;

2. Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450011, China)

**Abstract** The present experiment was conducted to investigate effects of conjugated linoleic acid (CLA) on cell immunity response of piglets after Cyclosporin A (CsA) injection. The experiment design was a  $2 \times 2$  factorial design, and the main factors consisted of diets (2% CLA or 2% soybean oil) and immunosuppression treatment (CsA or saline injection). Forty-eight weaned piglets at 21 days were randomly allocated into four experimental groups. The experimental period was 42 days. CsA injection significantly increased Feed/Gain (F:G) of piglets ( $P < 0.05$ ), however dietary CLA significantly decreased F:G of piglets ( $P < 0.05$ ), moreover CLA diets ameliorated the increase of F:G resulted from CsA injection ( $P < 0.01$ ). CsA-treatment significantly decreased the percentage of  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T lymphocytes in thymus ( $P < 0.01$ ). 2% CLA diets resulted in higher percentage of  $CD4^+$   $CD8^+$  doublepositive and  $CD8^+$  siglepositive T lymphocytes in thymus ( $P < 0.05$ ), and decrement of  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T lymphocytes of thymus resulted from CsA injection was lesser in piglets fed the CLA diet compared with those fed basal diets ( $P < 0.01$ ). CsA-treatment significantly depleted the number of  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T lymphocytes of peripheral blood. Whether with CsA injection or not, dietary CLA significantly increased  $CD8^+$  T lymphocyte subpopulations of peripheral blood and IL-2 production ( $P < 0.05$ ). The decrement of  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T lymphocyte of peripheral blood and IL-2 production

收稿日期: 2012-06-05

基金项目: 河南省科技厅重点科技公关资助项目(082102110123); 郑州牧专博士基金项目(2007DSR003)

第一作者: 刘永祥, 副教授, 博士, 主要从事单胃动物营养研究, E-mail: yxliu225@163.com

was notably suppressed in piglets fed the CLA diet ( $P < 0.01$ ). Without CsA injection treatment, dietary CLA didn't influence lymphocyte proliferation of peripheral blood ( $P > 0.05$ ), but notably suppressed the decrease of lymphocyte proliferation resulted from CsA injection ( $P < 0.05$ ). Dietary CLA effectively ameliorated cell immunosuppression resulted from CsA injection.

**Key words** piglets; CLA; CsA; cell immune response

现代养猪生产中, 传染性疾病、霉菌毒素、药物滥用、重金属和应激等多种因素导致猪的免疫抑制发生越来越普遍, 猪对疾病变得越来越易感, 如何增强猪的免疫反应以提高猪对疫病的抵抗力是行业关注的焦点。随着对营养抗病原理认识的深入和营养抗病技术的建立, 通过营养改善猪的免疫反应是研究方向之一。

共轭亚油酸(Conjugated linoleic acid, CLA)是指含有共轭双键的亚油酸的空间和几何异构体的一类化合物, 属多不饱和脂肪酸家族的成员, 因具有抗癌、预防心血管疾病和糖尿病及控制体重等多种生理活性而日益引起人们的重视。在动物生产方面, 人们致力于生产富含 CLA 的动物产品以满足人类的健康需求, 同时利用 CLA 的免疫调节作用, 缓解畜禽免疫应激, 保证畜禽正常生长<sup>[1-2]</sup>。在伪狂犬病毒和 2 型圆环病毒感染猪的试验中, 日粮 CLA 显著减轻伪狂犬病毒和 2 型圆环病毒对猪的损伤程度, 并提高特异效应 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的比例<sup>[3-4]</sup>, 鉴于

伪狂犬病毒和 2 型圆环病毒的细胞免疫抑制特性, 上述研究提示日粮 CLA 对免疫抑制状态猪的细胞免疫反应的调节作用。

本试验利用细胞免疫抑制剂—环孢霉素 A (Cyclosporin A, CsA) 来模拟仔猪的细胞免疫抑制状态, 研究 CLA 对免疫抑制状态仔猪的细胞免疫调控作用, 旨在为通过营养调控措施缓解猪的免疫抑制状态, 保证仔猪正常生长提供理论和实践依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

选择 48 头 21 日龄杜长大断奶仔猪, 按体重相近, 性别比例一致原则两两配对, 随机分配到 4 个处理组, 每个处理组 6 个重复, 每个重复 2 头猪, 其中 2 个处理组饲喂基础日粮, 另外 2 个处理组饲喂 2% CLA 日粮, 日粮按照猪的营养标准(NRC, 1998)配制, 基础日粮的组成和营养水平如表 1 所示, CLA 日粮以 2% CLA 替代等量大豆油。CLA 由青岛澳

表 1 基础日粮组成和营养水平

Table 1 Control diet composition and nutrition levels

原料/(g/kg) Ingredient	日龄/d Day-old		营养水平 Nutrition levels	日龄/d Day-old	
	21~35	36~63		22~35	36~63
玉米 Maize	595.0	603.4	代谢能/(MJ/kg) DE	14.09	13.87
小麦麸 Wheat bran	50.0	100.0	粗蛋白/(g/kg) CP	191.2	175.4
豆粕 Soyabean meal	250.0	225.0	钙/(g/kg) Ca	8.1	7.1
豆油 Soya oil	20.0	20.0	总磷/(g/kg) P	6.6	6.0
鱼粉 Fish meal	30.0	20.0	赖氨酸/(g/kg) Lys	10.8	9.5
膨化大豆 Swelling soybean	20.0	0.0	(蛋+胱)/(g/kg) Met + Cys	7.1	6.5
石粉 Limestone	9.2	10.0			
磷酸氢钙 CaHPO <sub>3</sub>	12.1	8.1			
蛋氨酸 DL-Methionine	1.2	1.0			
食盐 NaCl	2.5	2.5			
1% 预混料* Premixa	10.0	10.0			
合计 Total	1 000.0	1 000.0			

注: \* 预混料为每 kg 日粮提供: 维生素 A, 9 000 IU; 维生素 D<sub>3</sub>, 2 500 IU; 维生素 E, 20.0 IU; 维生素 K<sub>3</sub>, 3.0 mg; 维生素 B<sub>1</sub>, 1.5 mg; 维生素 B<sub>2</sub>, 4.0 mg; 维生素 B<sub>6</sub>, 3.0 mg; 维生素 B<sub>12</sub>, 0.012 mg; 烟酸, 30.0 mg; 泛酸, 15.0 mg; 叶酸, 0.75 mg; 生物素, 0.05 mg; 氯化胆碱, 350 mg; 铁, 75.0 mg; 铜, 225.0 mg; 锌, 75.0 mg; 锰, 20.0 mg; 碘, 0.048 mg; 硒, 0.04 mg。

Note: \* Premix provided per kilogram of complete feed: VA, 9000 IU; VD<sub>3</sub>, 2500 IU; vitamin E, 20.0 IU; VK<sub>3</sub>, 3.0 mg; VB<sub>1</sub>, 1.5 mg; VB<sub>2</sub>, 4.0 mg; VB<sub>6</sub>, 3.0 mg; VB<sub>12</sub>, 0.012 mg; niacin, 30.0 mg; pantothenic acid, 15.0 mg; folic acid, 0.75 mg; biotin, 0.05 mg; Fe, 75 mg; Cu, 225 mg; Zn, 75 mg; Mn, 20 mg; I, 0.048 mg; Se, 0.04 mg.

海生物科技有限公司提供,纯度为 80.8%。在仔猪 35、42、49 和 56 日龄,饲喂基础日粮和 CLA 日粮的 1 个处理组仔猪颈部肌肉注射 CsA(橄榄油稀释,10 mg/kg BW),另 1 个处理组注射等量的生理盐水,试验自动变为 2×2 试验设计即日粮类型(2%CLA 或 2%大豆油)和细胞免疫抑制处理(注射 CsA 或生理盐水),试验期为 42 d。

饲养管理。试验在河南省益发猪场进行,网床饲养,舍温保持在 25~27℃。猪栏面积为 2 m×2 m,不锈钢可调式料槽,乳头式饮水器。粉料饲喂,自由采食和饮水。按常规管理程序进行免疫和驱虫。

## 1.2 检测指标与方法

### 1.2.1 生长性能

于试验开始(21 d)和结束(63 d)时,仔猪个体空腹 18 h 称重,计算平均日增重(ADG),记录给料量和剩料量,计算料肉比。

### 1.2.2 胸腺指数

在 63 d 时屠宰猪,无菌摘除胸腺,称重,计算胸腺指数/(g/kg)=(胸腺质量/g)/(活体质量/kg)。

### 1.2.3 外周血和胸腺淋巴细胞的分离

外周血淋巴细胞分离采用赖长华等<sup>[5]</sup>的方法。在 63 d 时,用肝素抗凝真空管前腔静脉采血,移取 4 mL 淋巴细胞分离液于 10 mL 离心管中,然后沿管壁加入 3 mL 血,2 500 r/min 离心 30 min,取中间白细胞层约 1 mL,加入 3~5 倍 RPMI-1640 营养液,洗涤 3 次,每次 2 500 r/min 离心 10 min,弃上清。然后将细胞悬浮于 RPMI-1640 完全培养液,用台盼蓝染色,计数活细胞数(>95%),调整细胞含量为  $1 \times 10^7$  个/mL。

胸腺淋巴细胞的制备。无菌摘取胸腺,去除结缔组织和脂肪,用冷的 PBS 冲洗后,放入含 Hank's (pH7.4)液的平皿中剪碎,用玻璃注射器内芯在孔径 70 μm 的不锈钢细胞筛网上挤压研磨,将收集的细胞悬液加入装有等量淋巴细胞分离液的无菌玻璃试管中,2 500 r/min 离心 20 min,吸取中间云雾状的白细胞层,低渗溶血去除红细胞,Hank's 液反复洗涤离心。台盼蓝染色计数,镜检细胞活力。用含胎牛血清和双抗的 RPMI1640 液稀释细胞含量至  $1 \times 10^7$  个/mL 备用。

### 1.2.4 外周血淋巴细胞转化率检测

采用 MTT(四甲基偶氮唑盐)法测定淋巴细胞转化率。96 孔细胞培养板,每孔加入  $190 \mu\text{L}$   $1 \times 10^7$  个/mL 的细胞悬液,再加入含伴刀豆球蛋白

(Concanavalin A, ConA)(终质量浓度为  $45 \mu\text{g}/\text{mL}$ )的 RPMI-1640 完全营养液,对照组则加等体积的不含丝裂原的培养液,培养体系每孔共  $200 \mu\text{L}$ ,3 个重复。于 5%CO<sub>2</sub>、37℃下培养 72 h。在培养结束前 4 h,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT  $10 \mu\text{L}$ ,继续培养 4 h。培养结束时,每孔再加入  $100 \mu\text{L}$  10% SDS-0.04 mol/L HCl 溶液,30 min 后用酶标仪于 570 nm 波长下测定 OD 值。

### 1.2.5 外周血和胸腺淋巴细胞亚群检测

外周血淋巴细胞 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞单色分析。将分离到的外周血淋巴细胞悬液,荧光标记 CD 单抗染色后,用流式细胞仪测定其分化抗原 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> (FITC 标记的鼠抗猪 CD3<sup>+</sup> 抗体,PE 标记的鼠抗猪 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 抗体试剂均来自于 Southern Biotechnology Associates, Inc)。流式细胞仪(Beckman-Counter)由河南省人民医院血液实验室提供。

胸腺淋巴细胞 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞单色分析和 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞双色分析。CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞单色分析与外周血方法相同。CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞双色分析时,胸腺淋巴细胞悬液中同时加入合适体积的抗猪淋巴细胞 CD4<sup>+</sup> PE 标记单克隆抗体和抗猪淋巴细胞 CD8<sup>+</sup> PE 标记单克隆抗体。

### 1.2.6 IL-2 诱生活性的检测

采用体外细胞培养,伴刀豆蛋白(Concanavalin A, ConA)诱生及 MTT 比色法<sup>[6]</sup>。

## 1.3 统计分析

采用 SPSS 11.5 统计分析软件 GLM 模型进行两因子方差分析,模型主效应包括日粮类型、免疫抑制处理及两者的交互,显著标准为  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ,用 LSD 进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 日粮 CLA 对 CsA 注射仔猪生长性能的影响

从表 2 可知,日粮添加 CLA 与 CsA 注射对仔猪体增重均没有显著的影响( $P > 0.05$ )。日粮添加 CLA 有降低仔猪日采食量的趋势,但并未达到显著水准( $P = 0.174$ );CsA 注射对仔猪日采食量没有显著的影响( $P > 0.05$ )。注射 CsA 使仔猪的料重比提高( $P < 0.05$ ),而 CLA 日粮显著降低仔猪的料重比( $P < 0.05$ ),且添加 CLA 与注射 CsA 对仔猪料重比的影响交互明显( $P < 0.05$ ),CLA 日粮阻止了因注射 CsA 造成的仔猪料重比提高( $P < 0.05$ )。

表 2 CLA 日粮对 CsA 注射仔猪生长性能的影响

Table 2 Effects of dietary CLA supplementation on growth performance of piglets after CsA injection

项目 Items	无环孢霉素注射 No CsA injection		环孢霉素注射 CsA injection		P P value		
	基础日粮 Control diet	CLA 日粮 CLA diet	基础日粮 Control diet	CLA 日粮 CLA diet	环孢霉素 CsA	日粮 Diet	交互 Interaction
日增重/g Average daily gain	376.63±18.76	379.06±20.82	352.29±19.67	369.54±21.24	0.307	0.720	0.486
日采食量/g Average daily feed intake	685.47±35.46	648.20±37.74	683.44±37.61	646.70±36.34	0.963	0.174	0.871
料重比 (F/G) Feed conversion efficiency	1.82±0.07 a	1.71±0.06 b	1.94±0.07 c	1.75±0.07 ab	0.035	0.023	0.037

注：同行数据中不同字母者表示差异显著 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )，下表同。

Note: Different superscripts within a line means significant difference ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The same as follows.

### 2.2 CLA 日粮对 CsA 注射仔猪外周血淋巴细胞亚群和淋巴细胞转化率的影响

如表 3 所示，注射 CsA 使仔猪外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数分别降低 48.06%、41.62% 和 43.63% ( $P < 0.01$ )。日粮添加 CLA 对仔猪外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 没有显著的影响 ( $P >$

0.05)，但显著提高 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞总数 ( $P < 0.05$ )。日粮添加 CLA 与注射 CsA 对 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数的影响交互明显 ( $P < 0.01$ )，日粮添加 CLA 显著缓解注射 CsA 造成的仔猪外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数的降低。

表 3 CLA 日粮与 CsA 注射对仔猪外周血淋巴细胞转化率和淋巴细胞数的影响

Table 3 Effects of dietary CLA supplementation on lymphocyte proliferation and T lymphocyte number of peripheral blood in piglets after CsA injection

项目 Items	无环孢霉素 No CsA injection		环孢霉素注射 CsA injection		P P value		
	基础日粮 Control diet	CLA 日粮 CLA diet	基础日粮 Control diet	CLA 日粮 CLA diet	环孢霉素 CsA	日粮 Diet	交互 Interaction
CD3 <sup>+</sup> /(个/ $\mu$ L)	2 723±522 a	2 895±532 a	1 419±307 b	1 806±413 c	<0.001	0.256	<0.001
CD4 <sup>+</sup> /(个/ $\mu$ L)	675±83 a	724±97 a	394±91 b	586±104 c	<0.001	0.178	<0.001
CD8 <sup>+</sup> /(个/ $\mu$ L)	1 096±116 a	1 306±121 b	618±112 c	1 073±136 a	<0.001	0.026	<0.001
刺激指数 SI Thymus index	1.11±0.10 a	1.23±0.11 a	0.65±0.06 b	0.82±0.09 c	<0.001	0.227	0.015

CsA 注射极显著降低断奶仔猪外周血淋巴细胞转化率 ( $P < 0.01$ )。日粮添加 CLA 与 CsA 注射对仔猪外周血淋巴细胞转化率的影响交互明显 ( $P < 0.05$ )，在无 CsA 注射的情况下，CLA 日粮对仔猪外周血淋巴细胞转化率没有显著影响 ( $P > 0.05$ )，但在 CsA 注射的情况下，CLA 日粮组仔猪比对照组仔猪的外周血淋巴细胞转化率高 10.15%

( $P < 0.05$ )。

### 2.3 CLA 日粮对 CsA 注射仔猪胸腺淋巴细胞亚群和胸腺指数的影响

日粮添加 CLA 对 CsA 注射仔猪胸腺淋巴细胞亚群的影响见表 4。大多数胸腺淋巴细胞为 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 双表达细胞，而单表达的 T 细胞则相对较少。CsA 对胸腺淋巴细胞亚群的影响不同，CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>

表4 CLA日粮对CsA注射仔猪胸腺淋巴细胞亚群的影响

Table 4 Effects of dietary CLA supplementation on T lymphocyte subsets and index of thymus in piglets after CsA injection

项目 Items	无环孢霉素注射 No CsA injection		环孢霉素注射 CsA injection		P P value		
	基础日粮 Control diet	CLA日粮 CLA diet	基础日粮 Control diet	CLA日粮 CLA diet	环孢霉素 CsA	日粮 Diet	交互 Interaction
	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> /%	48.62±5.73 a	55.36±6.26 b	42.74±5.19 a	53.36±6.38 b	0.11	0.02
CD4 <sup>+</sup> /%	10.27±1.93 a	10.95±1.87 a	4.21±0.82 b	7.34±1.39 c	<0.001	0.34	0.07
CD8 <sup>+</sup> /%	9.76±1.83 a	13.54±2.19 b	4.37±1.17 c	8.84±2.25 a	<0.001	0.03	0.18
胸腺指数 Thymus index	0.576±0.10 a	0.581±0.09 a	0.553±0.07 a	0.560±0.10 a	0.65	0.78	0.91

双阳性淋巴细胞百分数仅减少12.09% ( $P=0.11$ ), 但CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>单阳性淋巴细胞百分数分别降低59.88%和55.22% ( $P<0.01$ )。CLA日粮显著提高胸腺CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>双阳性和CD8<sup>+</sup>单阳性T淋巴细胞比例 ( $P<0.05$ )。在注射CsA情况下,CLA日粮组仔猪胸腺CD4<sup>+</sup>单阳性、CD8<sup>+</sup>单阳性T淋巴细胞百分数显著高于对照组 ( $P<0.01$ )。

#### 2.4 CLA日粮与CsA注射对仔猪外周血淋巴细胞IL-2诱生活性

基础日粮组、CLA日粮组、基础日粮CSA注射组和CLA日粮CsA注射组仔猪外周血淋巴细胞诱生活性分别是24.37.6±4.19、47.59±5.72、5.36±0.95和23.75±3.61 ng/mL。CsA注射极显著抑制仔猪外周血淋巴细胞IL-2诱生活性 ( $P<0.01$ )，日粮添加CLA显著提高仔猪外周血淋巴细胞IL-2诱生活性 ( $P<0.05$ )，显著缓解因注射CsA引发仔猪外周血淋巴细胞IL-2诱生活性的降低 ( $P<0.01$ )。

### 3 讨论

免疫抑制是指免疫系统因受到损害,导致暂时性的或持久性的免疫应答功能紊乱,从而使机体对疾病易感性增加。维护免疫系统的有效性和完整性在猪疾病防控中的地位是十分重要的。CsA是一种细胞免疫抑制药物,可以特异性抑制T细胞活动,并抑制细胞因子产生<sup>[7]</sup>。本试验以CsA注射建立猪细胞免疫抑制模型,探讨了日粮添加CLA对

免疫抑制猪细胞免疫功能的调节作用,研究发现,日粮添加CLA有显著缓解CsA免疫抑制的作用。

#### 3.1 日粮添加CLA对CsA注射对仔猪生产性能的影响

在本试验中,CsA注射使仔猪的饲料转化率变差 ( $P<0.05$ ),但对仔猪体增重没有显著的影响 ( $P>0.05$ ),说明CsA对猪生产性能影响较小,是一种理想的免疫抑制诱导剂。Fitzgerald等<sup>[8]</sup>认为,CsA只是特异性地改变了T细胞活动,不是破坏性的改变机体的免疫器官,所以CsA的毒副作用较小。

在本试验的条件下,日粮添加2%CLA对仔猪的日增重没有显著的影响,但显著改善仔猪的饲料转化效率 ( $P<0.05$ ),而且CLA缓解因注射CsA而造成的仔猪饲料转化率变差 ( $P<0.05$ )。Michael等<sup>[9]</sup>曾综述14项研究的结果,其中12项研究表明日粮添加CLA改善猪的饲料转化效率。国内研究显示,断奶仔猪的饲料转化效率随着日粮CLA添加量的增加呈线性改善<sup>[10]</sup>。由此可见,无论有无免疫抑制,CLA对仔猪的饲料转化率均有改善作用。

#### 3.2 日粮添加CLA对CsA注射断奶仔猪胸腺和胸腺淋巴细胞亚群的影响

胸腺是淋巴细胞成熟、分化和增殖的重要场所,其相对重量可在某种程度上反映机体整体的免疫功能。本试验中,CsA注射没有改变仔猪胸腺的相对质量,表明CsA没有破坏性的改变机体的免疫器官

发育。但有研究显示, CsA 显著降低鼠胸腺的质量<sup>[11]</sup>, 在药理剂量下 ( $\geq 20$  mg/kg), CsA 诱导鼠胸腺形态的改变, 显著较少髓质, 在毒力剂量 ( $\geq 50$  mg/kg) 下, 诱发髓质空泡化和坏死<sup>[12]</sup>。试验结果的差异可能在于本研究 CsA 注射剂量较低, 也可能是由于猪对 CsA 的反应与鼠存在差异。

T 细胞的成熟和选择发生在胸腺。在本试验中, CsA 对胸腺淋巴细胞亚群的影响不同, 对 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 双阳性淋巴细胞比例影响较小 ( $P=0.11$ ), 但极显著耗竭 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 单阳性淋巴细胞 ( $P<0.01$ )。环孢霉素 A 通过与胞浆内的环孢霉素 A 受体及钙调磷酸酶形成三元复合物, 进而阻断 T 细胞活化, 使静止淋巴细胞停留在 G0 或 G1 期, 并抑制抗原激活的 T 细胞释放细胞因子, 从而达到细胞免疫抑制效果, 也就是说, 环孢霉素 A 的作用机制是阻断 T 细胞活化, 而不是增加 T 淋巴细胞的消耗。因此 CsA 对胸腺细胞分化抑制作用主要发生在 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 双阳性阶段, 即影响 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 双阳性细胞向 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 单阳性阶段细胞的转化。日粮 CLA 显著提高胸腺 CD8<sup>+</sup> 单阳性 T 淋巴细胞比例 ( $P<0.05$ ), 且极显著缓解因注射 CsA 引发仔猪胸腺 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 单阳性 T 淋巴细胞比例的降低 ( $P<0.01$ )。以前的研究表明, 在无外源刺激的情况下, 日粮添加 CLA 提高猪胸腺 CD8 $\alpha\alpha$  T 淋巴细胞比例<sup>[13]</sup>。由此可见, 无论有无免疫抑制, CLA 对仔猪的胸腺 T 淋巴细胞均有调节作用。

### 3.3 日粮添加 CLA 对 CsA 注射仔猪外周血淋巴细胞亚群和 IL-2 诱生活性的影响

注射 CsA 极显著降低仔猪外周血 T 淋巴细胞数 ( $P<0.01$ ), 由于仔猪外周血 T 细胞来源于胸腺淋巴细胞, 降低的外周血 T 淋巴细胞数与降低的胸腺 T 淋巴细胞百分数相一致。在本试验中, 日粮添加 CLA 有效阻止因注射 CsA 引起仔猪外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞总数降低, 说明 CLA 能有效缓解免疫抑制状态对仔猪外周血淋巴细胞的耗竭, 有效维持仔猪外周血的 T 淋巴细胞状态。在伪狂犬病毒和 2 型圆环病毒感染猪的试验中, 日粮 CLA 可有效维持特异效应 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的比例<sup>[3-4]</sup>。在无外源刺激的情况下, 日粮 CLA 通过影响猪外周血细胞类型和 CD8<sup>+</sup> 细胞效应功

能, 诱导猪 CD8<sup>+</sup> 细胞包括 (TCR)  $\gamma$ QCD8 $\alpha\alpha$ 、CD32CD16CD8 $\alpha\alpha$  和 TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\beta$  T 淋巴细胞增殖, 增强特定 CD8<sup>+</sup> 介导的免疫功能<sup>[14]</sup>。日粮添加 CLA 提高禽外周血 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数<sup>[15]</sup>。上述研究共同表明 CLA 对仔猪的外周血 T 淋巴细胞的增殖作用。

IL-2 是一种重要的细胞因子, 是由辅助性 T1 细胞、外周单核细胞和脾淋巴细胞在有丝分裂原或特异抗原刺激下分泌的可作用于 T 细胞本身的一种糖蛋白, 在促进 T 细胞增殖分化方面起着非常重要的作用<sup>[16]</sup>。本试验的条件下, 日粮添加 CLA 提高仔猪外周血淋巴细胞 IL-2 诱生活性 ( $P<0.05$ ), 缓解 CsA 对外周血淋巴细胞 IL-2 诱生活性的抑制作用 ( $P<0.01$ )。人、家禽和鼠等方面的试验均表明, CLA 提高 Con A 诱导的 IL-2 诱生活性<sup>[17-19]</sup>。在 2 型圆环病毒感染猪的试验中, CLA 组仔猪 IL-2 的表达水平显著高于对照组<sup>[3]</sup>, 因此, 日粮添加 CLA 可能通过调控 IL-2 的基因表达提高 IL-2 的诱生活性, 从而促进 T 细胞增殖分化。

## 4 结 论

综上所述, CLA 日粮阻止了因注射 CsA 造成的仔猪料重比提高 ( $P<0.05$ ), 且显著缓解因注射 CsA 引发的仔猪胸腺 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分率和外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数的降低, 说明日粮添加 2% CLA 能显著缓解因 CsA 注射引起的仔猪细胞免疫抑制。

## 参 考 文 献

- [1] Valentino B, Davide S, Grazia P, et al. Dietary conjugated linoleic acid positively affects immunologic variables in lactating sows and piglets[J]. J Nutr, 2004, 134(4): 817-824
- [2] Corino C, Pastorelli G, Rosi F, et al. Effect of dietary conjugated linoleic acid supplementation in sows on performance and immunoglobulin concentration in piglets[J]. J Anim Sci, 2009, 87(7): 2299-2305
- [3] Bassaganya-Riera J, Hontecillas R, Zimmerman D R, et al. Long-term influence of lipid nutrition on the induction of CD8 (+) responses to viral or bacterial antigens[J]. Vaccine, 2002, 20(8): 1435-1444
- [4] Bassaganya-Riera J, Pogradichniy R M, Jobgen S C, et al. Conjugated linoleic acid ameliorates viral infectivity in a pig

- model of virally induced immunosuppression[J]. *J Nutr*, 2003, 133(10):3204-3214
- [5] 赖长华. 共轭亚油酸对断奶仔猪免疫应激的调控[D]. 北京: 中国农业大学, 2004
- [6] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1/2):55-63
- [7] Lillehoj H S. Effects of immunosuppression on avian coccidiosis: Cyclosporine A but not hormonal bursectomy abrogates host protective immunity[J]. *Infect Immun*, 1987, 55(7):1616-1621
- [8] Fitzgerald S D, Williams S M, Reed W M. Development of a chicken model for studying avian polyomavirus infection[J]. *Avian Dis*, 1996, 40(2):377-381
- [9] Michael E R D, Jennifer L A, John K G K. Conjugated linoleic acid pork research[J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79(6):1212S-1216S
- [10] 赖长华, 尹靖东, 李德发. 共轭亚油酸对断奶仔猪生产性能和免疫功能的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2004, 40(12):9-12
- [11] Tanaka M, Shinohara K, Fukumoto T, et al. Effect of Cyclosporin A on rat thymus: time course analysis by immunoperoxidase technique and flow cytofluorometry[J]. *Clin Exp Immunol*, 1988, 72(2):216-221
- [12] Blair J T, Thomson A W, Whiting P H, et al. Toxicity of the immune suppressant Cyclosporine A in the rat[J]. *Pathology*, 1982, 138(1):163-178
- [13] Bassaganya-Riera J, Hontecillas R, Bregendahl K, et al. Dietary conjugated linoleic acid modulates phenotype and effector functions of porcine CD8<sup>+</sup> lymphocytes[J]. *J Anim Sci*, 2001, 131(9):2370-2377
- [14] Bassaganya-Riera J, Hontecillas R, Bregendahl K, et al. Effects of dietary conjugated linoleic acid in nursery pigs of dirty and clean environments on growth, empty body composition and immune competence[J]. *J Anim Sci*, 2001, 79(6):714-721
- [15] 张海军, 昝于明, 袁建敏. 日粮共轭亚油酸对肉仔鸡生长性能、淋巴细胞转化率、抗体水平及血清溶菌酶活性的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2005, 41:12-15
- [16] Furue M, Ishibashi Y. Differential regulation by dexamethasone and cyclosporine of human T cells activated by various stimuli[J]. *Transplantation*, 1991, 52(3):522
- [17] Wong M W, Chew B P, Wong T S, et al. Effects of dietary conjugated linoleic acid on lymphocyte function and growth of mammary tumors in mice[J]. *Anticancer Res*, 1997, 17(2A):987-993
- [18] Nugent A P, Roche H M, Noone E J, et al. The effects of conjugated linoleic acid supplementation on immune function in healthy volunteers[J]. *Euro J Clin Nutr*, 2005, 59:742-750
- [19] Takahashi K, Kawamata K, Akiba Y. Effect of a mixture of Conjugated linoleic acid (CLA) isomers on T cell subpopulation and responsiveness to mitogen in splenocytes of male broiler chicks[J]. *Asian-Australasian J Anim Sci*, 2007, 20(6):954-961

责任编辑: 苏燕