

## 研究报告

## 猪圆环病毒 2 型感染对仔猪盲肠免疫功能与菌群的影响

刘雪威<sup>#</sup>, 李新新<sup>#</sup>, 武子函, 王建航, 周双海, 李焕荣<sup>\*</sup>

北京农学院动物科学技术学院 动物类国家级实验教学示范中心, 北京 102206

刘雪威, 李新新, 武子函, 王建航, 周双海, 李焕荣. 猪圆环病毒 2 型感染对仔猪盲肠免疫功能与菌群的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5266-5276

Liu Xuewei, Li Xinxin, Wu Zihuan, Wang Jianfang, Zhou Shuanghai, Li Huanrong. Effect of porcine circovirus type 2 on cecal immune function and flora in piglets[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5266-5276

**摘要:**【背景】肠炎是猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type 2, PCV2)感染猪的临床症状之一, 其发生影响猪的生产性能。盲肠是单胃动物重要的消化器官, PCV2 感染的影响值得探究。【目的】探究猪盲肠在 PCV2 感染后的免疫功能及菌群变化。【方法】将 12 头健康断奶仔猪随机分为对照组和感染组, 每组 6 头, 感染途径为口服和肌注, 分别接种 5 mL, 总接种量为 10 mL/头, 对照组以同种方式接种 PK15 细胞培养物。分别检测在感染后 56 d (days post-infection, dpi)内血清中病毒载量、抗体动态及 21 dpi 和 56 dpi 盲肠的组织病理变化、病毒抗原含量、免疫功能及其内容物微生物菌群的变化。【结果】在 21 dpi, 血清病毒核酸载量和抗体均达较高水平, PCV2 抗原信号强, 主要分布在盲肠黏膜上皮细胞和固有层中, 盲肠分泌物 SIgA 含量显著降低, 而 T 淋巴细胞增殖能力显著增高, 感染猪盲肠上皮细胞严重脱落, 肠腺萎缩, 盲肠菌群多样性与丰度显著降低, 有益菌属如弧菌属(*Butyrivibrio*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae*-NK4A214)显著降低, 条件致病菌普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)显著增高; 56 dpi, 病毒核酸载量降至 7 dpi 水平, 抗体持续较高水平, 其他各项指标基本恢复到对照组水平。【结论】PCV2 感染导致仔猪盲肠免疫功能紊乱, 引起盲肠黏膜损伤, 有益菌丰度降低、条件致病菌丰度增高, 这些变化与病毒含量存在一定关系。

**关键词:** 猪圆环病毒 2 型; 仔猪; 盲肠免疫功能; 菌群

基金项目: 北京市自然科学基金项目-北京市教育委员会科技计划重点项目(KZ201910020021)

#对本文贡献相同

Supported by: Beijing Natural Science Foundation & Key Project of Science and Technology of Beijing Education Commission (KZ201910020021)

#These authors equally contributed to this work

\*Corresponding author: E-mail: lihuanrongl@126.com

Received: 2022-09-29; Accepted: 2022-10-27; Published online: 2022-11-16

## Effect of porcine circovirus type 2 on cecal immune function and flora in piglets

LIU Xuewei<sup>#</sup>, LI Xinxin<sup>#</sup>, WU Zihan, WANG Jianfang, ZHOU Shuanghai, LI Huanrong<sup>\*</sup>

Animal Science and Technology College, National Demonstration Center for Experimental Animal Education, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

**Abstract:** [Background] Enteritis is one of the clinical signs of pigs infected with porcine circovirus type 2 (PCV2), and it has an impact on pig performance. It can lead to reproductive failure. The cecum is an essential digestive organ in monogastric animals, and the impact of PCV2 infection on it should be investigated. [Objective] The purpose of this study was to look into the immunological activity and flora of the cecum after PCV2 infection. [Methods] Twelve healthy weaned piglets were randomly assigned to the control ( $n=6$ ) or infection ( $n=6$ ) groups. Piglets in the infection group received the virus via oral delivery (5 mL) and intramuscular injection (5 mL), for a total of 10 mL/piglet. The control group was similarly injected with PK15 cell culture. The viral nucleic acid load and antibody dynamics were identified 56 days post-infection (dpi), and micromorphology, viral antigen distribution, immune function, and microbial ecology in pig cecum contents were also examined at 21 and 56 dpi. [Results] PCV2 antigen signal was greater at 21 dpi than at 56 dpi, and viral nucleic acid load and antibody in serum were both at high levels. PCV2 antigen was mostly dispersed in the epithelial cells and lamina propria of the cecum mucosa. While the ability of T cells to proliferate was greatly increased, the amount of SIgA in cecal secretions was significantly reduced. Pigs with the infection experienced significant cecal epithelial cell loss and intestinal gland atrophy. Diversity and quantity of the cisternal vegetation were greatly diminished. Beneficial bacteria like *Butyrivibrio* and *Ruminococcaceae*-NK4A214-group were noticeably reduced, whereas conditional harmful bacteria like *Alloprevotella* were noticeably elevated. The viral nucleic acid load decreased to 7 dpi at 56 dpi, whereas the antibody level remained high. Other indicators essentially reverted to control group levels. [Conclusion] PCV2 infection causes immune dysfunction in the piglets' cecum, which damages the cecum mucosa and results in an increase in conditionally pathogenic bacteria and a decrease in beneficial bacteria. These changes are connected to the viral content.

**Keywords:** porcine circovirus type 2; piglets; cecal immune function; bacterial flora

猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type 2, PCV2)引起的猪圆环病毒病是猪的一种免疫抑制性疾病<sup>[1-2]</sup>, 易导致猪体继发感染, 危害养猪业。PCV2 主要引起断奶仔猪多系统衰竭综合征, 还可引起感染猪小肠发生肠炎<sup>[3]</sup>, 导致小肠免疫功能紊乱, 有益菌减少、有害菌增多, 加剧了肠炎的发生<sup>[4-5]</sup>。

盲肠是草食或杂食单胃动物的重要消化器官, 其微生物菌群平衡对动物健康至关重要。不同因素可引起盲肠微生物菌群变化不一, 对动物机体的表现作用也不一<sup>[6]</sup>, 如粗纤维、可饲用药用植物、许多饲料添加剂等均可引起盲肠有益菌数量增加<sup>[7-8]</sup>, 促进动物生长, 而非肠道和肠道病毒则可影响猪粪便中的微生物组发生变化, 导

致有害菌增加<sup>[8-9]</sup>,降低动物生产性能。此外,盲肠也是机体免疫系统的一部分,大量的淋巴结相互融合渗透到黏膜下层,起到抵御外来细菌和病毒的作用,保护身体不受损伤,具有稳定和监测功能<sup>[10]</sup>。

已有研究表明,PCV2感染可引起空肠炎症,导致空肠菌群失调<sup>[4-5]</sup>,同时考虑到小肠与盲肠的结构与功能差异,本研究从PCV2感染仔猪盲肠的形态学、抗原分布、免疫功能与菌群变化角度分析其相互关系,以期完善PCV2致病机理、探寻病毒感染引起的肠黏膜损伤的预防及治疗措施的制定提供实验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病毒

PCV2 SD/2008 株(GenBank 登录号为GQ174519)第3代细胞毒,来自河北农业大学动物传染病实验室。

#### 1.1.2 试验动物

12头35日龄断奶健康长白×大白杂交二元仔猪,购自北京某种猪场;PCV2、猪圆环病毒I型(porcine circovirus type 1, PCV1)、猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)、猪伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)、猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)和猪呼吸与繁殖综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)核酸检测均为阴性,PCV2抗体检测为阴性。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

DNA提取试剂盒,天根生物科技有限公司;SYB Green Realtime PCR Master Mix, TOYOBO公司;PCV2抗体检测ELISA试剂盒,深圳绿诗源生物科技有限公司;H-E染色试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;小鼠抗PCV2单抗,由江苏省农业科学院畜牧兽医研究所温立斌研究员惠

赠;猪分泌型免疫球蛋白A(secretory immunoglobulin A, SIgA)ELISA,武汉伊莱瑞特生物科技有限公司。QuantiFluor™-ST蓝色荧光定量系统, Promega公司;Illumina MiSeq platform, Illumina公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物试验及样品的制备

12头断奶仔猪随机分为对照组和感染组,每组6头,隔离饲养,自由采食和饮水。感染组接种途径为口服和肌注,每种途径分别为5 mL,接种量为10 mL/头。对照组接种细胞培养物上清,接种途径和接种量与感染组一致。在病毒感染后3、7、14、21、28、35、42、49、56 d采血,检测血清中病毒核酸载量及抗体水平动态变化。21 d和56 d分别宰杀6头仔猪(对照组3头,感染组3头),采集相应样品。实验动物的处置严格遵守实验动物管理要求。

采集3-4 cm盲肠肠段固定于4%多聚甲醛中,用于苏木精-伊红染色(hematoxylin eosin staining, H-E)和IHC观察;刮去肠黏膜液以1:5置于PBS中,8 000 r/min离心10 min取上清供SIgA检测;采集盲肠内容物3-5 g用于菌群检测。

#### 1.2.2 PCV2感染后不同时间血清中病毒载量及特异性抗体水平检测

用DNA提取试剂盒提取血清中病毒DNA,以其为模板,采用与文献[4]中测定PCV2的核酸方法进行实时荧光PCR扩增。每个样品设3个重复。

参照PCV2抗体检测试剂盒使用说明书操作,对不同时段血清样品进行特异性抗体检测。

#### 1.2.3 H-E染色和免疫组织化学法

取经4%多聚甲醛固定24 h的盲肠组织,经脱水、包埋、切片步骤制成5 μm厚石蜡切片, H-E染色,光学显微镜观察盲肠组织病理变化。根据表1的盲肠组织病理损伤评分参考标准对盲肠组织进行评分。

表 1 盲肠组织病理损伤评分参考标准

Table 1 Reference standard for cecal tissue pathological damage score

| 等级       | 特征病理描述   | 评分    |
|----------|--|-------|
| Grade    | Description of characteristic pathology  | Score |
| 正常       | 盲肠各层组织结构正常, 黏膜光滑、完整, 盲肠腺体整齐排布  | 0     |
| Normal   | The structure of the cecum is normal in all layers, the mucosa is smooth and intact, and the cecum glands are neatly arranged  |       |
| 轻度       | 黏膜层上皮细胞轻微脱落坏死, 盲肠腺体轻微萎缩, 分布较均匀, 固有层淋巴组织分布较均匀   | 1     |
| Mild     | Slightly detached necrotic epithelial cells in the mucosal layer, slight atrophy of the cecum glands, more evenly distributed, more evenly distributed lymphoid tissue in the lamina propria |       |
| 中度       | 黏膜层上皮脱落或黏膜层局部缺失, 盲肠腺体萎缩且大小不一, 固有层淋巴组织增多  | 2     |
| Moderate | Loss of epithelium or partial absence of mucosal layer, atrophy of cecum glands of variable size, increased lymphoid tissue in lamina propria  |       |
| 重度       | 黏膜层较大面积缺失脱落, 盲肠组织结构破坏, 盲肠腺体间弥散, 淋巴组织明显增多   | 3     |
| Severe   | Large area of mucosal layer missing and detached, destruction of cecum tissue structure, diffusion between cecum glands, marked increase in lymphoid tissue                                  |       |

将固定的盲肠组织制成 2  $\mu\text{m}$  厚的石蜡切片, 按常规步骤进行免疫组化染色, 光学显微镜观察盲肠组织 PCV2 抗原分布情况, 并利用 Image J 软件进行阳性着色细胞计数, 计算 PCV2 阳性细胞的比例。

#### 1.2.4 盲肠肠道黏膜层细胞、固有层细胞的分离

参照文献[4]介绍的方法, 对猪盲肠肠道黏膜层、固有层细胞进行分离。用 10% 无酚红 RPMI1640 营养液悬浮, 经台盼蓝染色计数, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$  个/mL, 用于后续实验。

#### 1.2.5 T 淋巴细胞增殖试验

取已调整好浓度( $1 \times 10^6$  个/mL)的盲肠黏膜层和固有层细胞悬液, 以每孔 200  $\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^5$  个细胞)/铺于平底 96 孔板中, 每个样重复 3 孔, 以刀豆蛋白 A (conduin protein, ConA) 作为刺激物, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 72 h。按照 MTS 试剂盒说明书操作, 各反应孔每孔吸弃上清 100  $\mu\text{L}$ , 加入 20  $\mu\text{L}$  MTS 和 PMS 混合溶液, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵 4 h, 酶标仪检测  $OD_{490}$  值, 参考文献[4]计算淋巴细胞增殖的刺激指数 (stimulus index, SI)。

#### 1.2.6 盲肠肠道分泌性免疫球蛋白 A (SIgA) 的含量检测

选用 Elabscience 的猪分泌型免疫球蛋白 A

(secretory immunoglobulin A, SIgA) ELISA Kit, 按照使用说明书检测盲肠肠道分泌物中 SIgA 的蛋白表达情况, 根据标准曲线计算蛋白浓度。

#### 1.2.7 盲肠菌群 MiSeq 测序

盲肠菌群 MiSeq 测序主要由上海美吉生物公司完成。与参考文献[5]中所用方法一致, 大致步骤如下: 提取盲肠样本中微生物 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测是否符合测序要求; 利用细菌 16S rRNA 基因的 V4-V5 区域进行 PCR 扩增, 回收扩增产物, 使用 QuantiFluor<sup>TM</sup>-ST 蓝色定量系统进行检测。根据标准方案, 在 Illumina MiSeq 平台上以等摩尔和配对末端测序( $2 \times 250$ )合并纯化的扩增子。根据重叠关系进行拼接, 经序列质量质控和过滤以区分样品, 再利用 Mothur 软件对序列进行分类操作单元 (operational taxonomic unit, OTU) 聚类, 进行样品间的相似性分析, 绘制样品的稀释曲线, 计算样品的  $\alpha$  多样性, 分析菌群变化。

#### 1.3 数据分析

使用 SPSS 18.0 进行统计分析; 利用 GraphPad Prism 5.0 软件绘图; 采用独立样本  $t$  检验确定显著性差异, 其中数据表示为平均值  $\pm$  标准差 (SEM),  $P < 0.05$  为差异显著, 以 \* 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒核酸载量与血清抗体动态变化

感染 PCV2 后 7 d 病毒核酸检测呈阳性, 达  $2.8 \text{ Log}_{10}(\text{copies/mL})$ , 而且在 14–28 d 呈上升趋势, 28 d 时病毒核酸载量达最高, 为  $4.58 \text{ Log}_{10}(\text{copies/mL})$ ; 28 d 后呈现下降趋势, 在 56 d 时病毒载量接近 7 d 时水平, 为  $2.78 \text{ Log}_{10}(\text{copies/mL})$  (图 1)。

对照组仔猪血清 PCV2 特异性抗体始终为阴性, 感染组在 7 d 时疑似阳性, 在感染后 14 d 血清转阳, 21–56 d 期间血清抗体水平呈逐渐上升趋势且趋于平稳(图 2)。

### 2.2 盲肠组织病理变化及 PCV2 抗原分布

对照组仔猪的盲肠在接种后 21 d 显示黏膜光滑、完整, 盲肠腺体整齐地分布在黏膜层中,

未见明显的组织病理损伤改变(图 3A)。感染组, 21 dpi 时盲肠组织显示大面积黏膜上皮脱落, 盲肠腺体萎缩变形, 排列紊乱, 盲肠腺体间弥散, 淋巴组织增多(图 3B); 对照组仔猪的盲肠在接种后 56 d 也未见明显的组织病理损伤改变(图 3C)。56 dpi 时黏膜上皮较为整齐, 固有层淋巴组织分布均匀, 盲肠腺体大小形态接近, 分布均匀(图 3D)。依据表 1 盲肠组织病理损伤评分参考标准, 将 21 dpi 和 56 dpi 接毒组与对照组所有仔猪盲肠进行评分, 平均分显示 21 dpi 仔猪盲肠的病理组织评分明显高于对照组( $P < 0.0001$ ), 而 56 dpi 仔猪盲肠的病理组织评分虽然也高于对照组, 但是显著性较低( $P < 0.0035$ ) (图 4)。可见, 盲肠病理变化与 PCV2 的载量有一定关系。

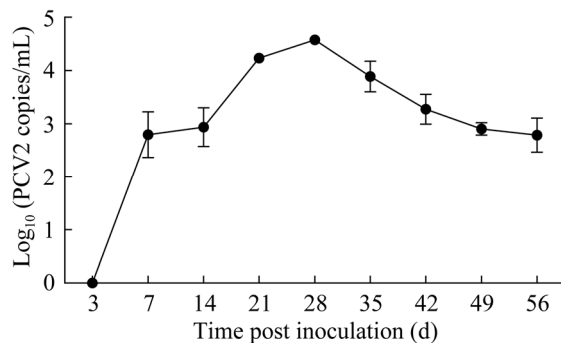


图 1 仔猪感染后血清中病毒核酸载量

Figure 1 Kinetics of PCV2 viral load in sera of piglets.

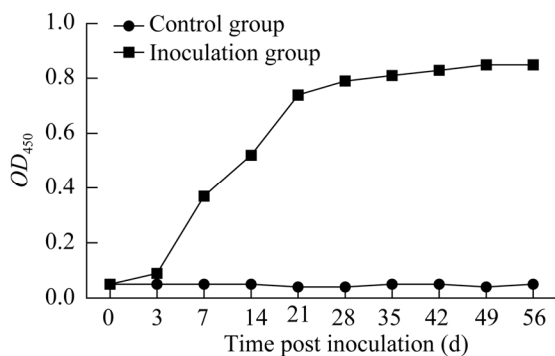


图 2 仔猪感染后血清中抗体动态变化

Figure 2 Kinetics of PCV2-specific antibody in serum of piglets.

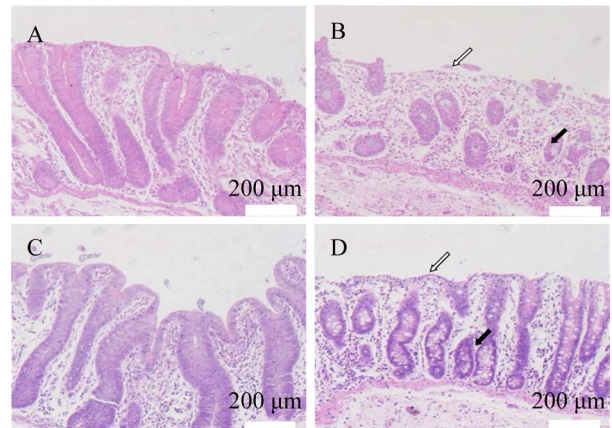


图 3 PCV2 感染仔猪 21 与 56 d 盲肠组织病理学变化 A 和 B 分别为 21 d 对照组和感染组的盲肠组织; C 和 D 分别为 56 d 的对照组和感染组盲肠组织. 白色箭头标记黏膜上皮; 黑色箭头标记盲肠腺体

Figure 3 Pathological changes of cecal tissues in piglets infected with PCV2 for 21 and 56 days. A and B represent the cecum tissue of control group and infection group at 21 day, respectively; C and D represent the cecum tissue of control group and infection group at 56 day, respectively. White arrows mark the mucosal epithelium; black arrows mark the cecum glands.

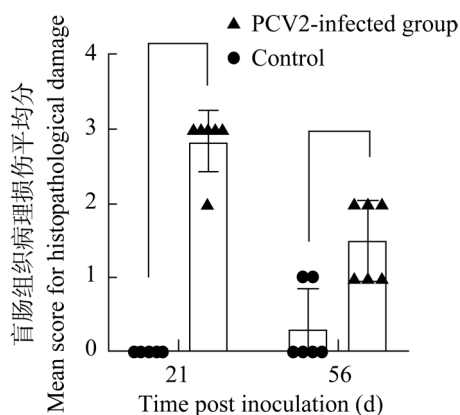


图 4 PCV2 感染仔猪 21 d 与 56 d 后盲肠组织病理损伤平均分

Figure 4 Average score of cecal tissue pathological damage in piglets infected with PCV2 for 21 and 56 days.

通过免疫组化检测 PCV2 抗原, 结果如图 5 所示。对照组 21 dpi 盲肠组织中未检测到 PCV2 抗原(图 5A); 21 dpi 时经免疫组化染色均可见阳性信号, 而且 PCV2 抗原主要分布在盲肠黏膜上皮细胞和固有层中(图 5B)。对照组 56 dpi 盲肠组织中也未检测到 PCV2 抗原(图 5C), 而感染组 56 d 时阳性信号变弱(图 5D)。利用 Image J 软件进行阳性着色细胞计数, 结果如图 5E 所示, 21 dpi 感染组盲肠内 PCV2 阳性细胞的比例显著高于对照组( $P < 0.0001$ ); 56 dpi 感染组盲肠内 PCV2 阳性细胞的比例也显著高于对照组( $P < 0.0001$ ), 但 PCV2 阳性细胞比例低于 21 dpi 的 PCV2 组(图 5F)。

### 2.3 T 淋巴细胞增殖能力的变化

MTS 方法检测盲肠黏膜上皮、固有层中 T 淋巴细胞的增殖活性。结果显示, 21 dpi 时, 感染组盲肠黏膜上皮层细胞中 T 淋巴细胞的 SI 显著高于对照组, 固有层中的 SI 虽有上调但差异不显著; 56 dpi 时盲肠黏膜上皮层 T 淋巴细胞增殖的 SI 上调, 固有层中的 SI 下调, 但均无统计学意义(表 2)。

### 2.4 盲肠内容物分泌性 SIgA 蛋白的检测

根据试剂盒说明书操作, 标准曲线判定系数

( $R^2$ )为 0.996, 线性关系良好。在 21 dpi 时感染仔猪盲肠黏膜 SIgA 含量显著低于对照组( $P < 0.054$ ), 分别为( $5.72 \pm 0.104$ ) ng/mL 和( $7.67 \pm 0.161$ ) ng/mL; 在 56 dpi 时, 感染组 SIgA 含量虽然仍低于对照组, 分别为( $7.27 \pm 0.577$ ) ng/mL 和( $7.60 \pm 0.087$ ) ng/mL, 但差异不显著( $P > 0.05$ )。

### 2.5 PCV2 感染对猪盲肠内容物菌群丰度与多样性的影响

#### 2.5.1 稀释性曲线

PCV2 感染 21 d 和 56 d 时稀释性曲线趋势均趋于平缓(图 6A、6B), 说明测序数据量足够大, 可以反映样本中的微生物信息。

#### 2.5.2 盲肠菌群丰度与多样性分析

由表 3 可见, 与对照组相比, 在 21 dpi 和 56 dpi 时感染组 Chao1 指数、Shannon 多样性指数均降低, 而 Simpson 多样性指数均上调, 而且 21 dpi 时感染组 Chao1 指数和 Simpson 多样性指数差异显著( $P < 0.05$ ), 提示感染组菌群丰度和多样性显著降低。

#### 2.5.3 门水平上盲肠菌群结构的分析

盲肠内容物菌群测序和比对分析见表 4。与对照组相比, 盲肠菌群主要包括厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和螺旋菌门(*Spirochaetae*) 4 个门, 其中隶属于厚壁菌门和拟杆菌门的约占总序列的 95%, 是盲肠菌群中绝对优势菌; 门水平上, 21 dpi 时增多的有拟杆菌门、变形菌门和螺旋菌门, 降低的是厚壁菌门, 但差异不显著; 而 56 dpi 时 4 种菌门均增多, 仅厚壁菌门差异显著( $P < 0.05$ )。

#### 2.5.4 属水平上盲肠菌群结构的分析

由表 5 可见, 21 dpi 时感染组普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)和克里斯滕森菌属(*Christensenellaceae-R-7-group*)显著增高( $P < 0.05$ ), 丁酸弧菌属(*Butyrivibrio*)和瘤胃菌属(*Ruminococcaceae-NK4A214-group*)显著降低( $P < 0.05$ ); 56 dpi 时除丁酸弧菌属未检出外, 其余 3 种均接近对照组。

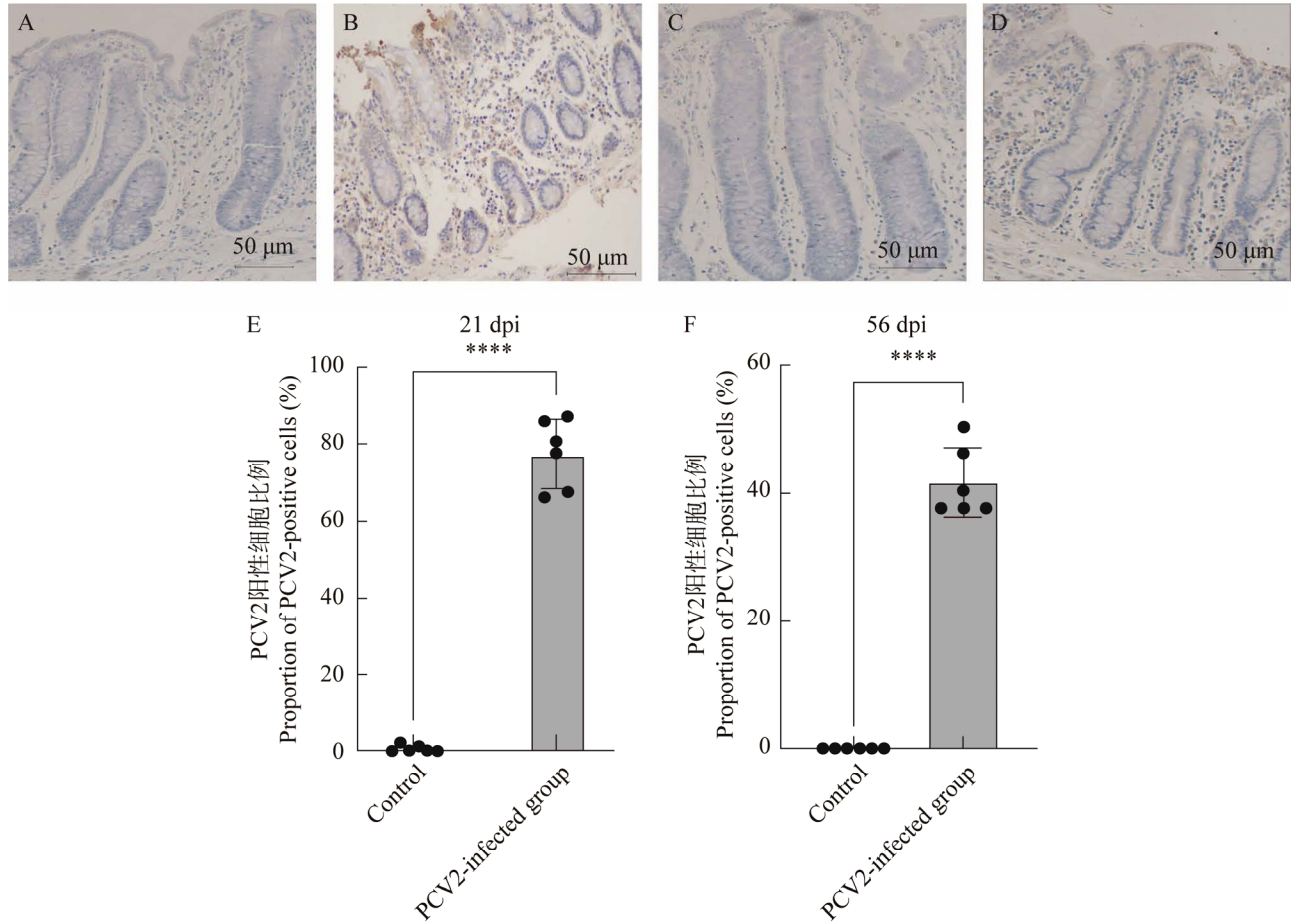


图 5 仔猪盲肠组织中 PCV2 抗原的免疫组化检测 A 和 B 分别为 21 d 时对照组和感染组盲肠组织；C 和 D 分别为 56 d 时的对照组和感染组的盲肠组织；E 和 F 分别为 21、56 d 对照组与感染组的 PCV2 阳性细胞比例的对比如。\*\*\*\*：P<0.000 1

Figure 5 Immunohistochemical staining of PCV2 antigen in the cecal tissues of piglets. A and B represent the cecum tissue of control group and infection group at 21 day, respectively; C and D represent the cecum tissue of control group and infection group at 56 day, respectively. Comparison diagram of the proportion of PCV2 positive cells in the control group and the infection group at 21 d and 56 d, respectively. \*\*\*\*: P<0.000 1.

表 2 盲肠组织中淋巴细胞刺激指数变化

Table 2 Kinetics of stimulation index (SI) of lymphocytes in the tissues of caecum.

| 盲肠组织结构<br>Histological structure<br>of cecum | SI (21 dpi)          |                        | SI (56 dpi)          |                        |
|--|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
|  | 对照组<br>Control group | 感染组<br>Infection group | 对照组<br>Control group | 感染组<br>Infection group |
| 黏膜上皮<br>Mucosal epithelium                   | 0.94±0.003           | 0.98±0.003*            | 0.96±0.036           | 1.02±0.034             |
| 固有层<br>Lamina propria                        | 0.86±0.050           | 0.90±0.055             | 0.95±0.090           | 0.93±0.009             |

Note: \*: P<0.05.

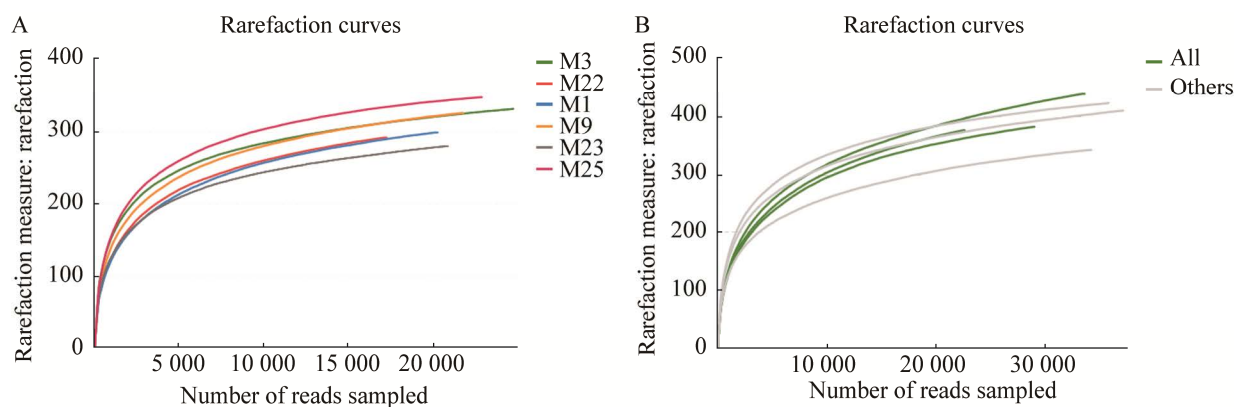


图 6 样品的稀释性曲线 A: 21 d 的稀释曲线, M9、M23、M25 为对照组; M1、M3、M22 为感染组; B: 56 d 的稀释曲线, 灰色为对照组, 绿色为感染组

Figure 6 Rarefaction curves for each sample. A: Rarefaction curves of 21 day, M9, M23, M25 were the control group; M1, M3, M22 were the infected group. B: Rarefaction curves of 56 day, gray is the control group, green is the infected group.

表 3 盲肠菌群的丰度和多样性

Table 3 The richness and diversity of caecal bacteria

| 指数<br>Index                                  | 21 dpi               |                        | 56 dpi               |                        |
|--|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
|  | 对照组<br>Control group | 感染组<br>Infection group | 对照组<br>Control group | 感染组<br>Infection group |
| Chao 1 丰度指数<br>Chao 1 richness estimation    | 282±5.03             | 267±5.51*              | 476.86±6.66          | 463.14±9.56            |
| Shannon 多样性指数<br>Shannon index for diversity | 4.08±0.80            | 3.90±0.42              | 3.98±0.28            | 3.59±0.11              |
| Simpson 多样性指数<br>Simpson diversity index     | 0.04±0.00            | 0.07±0.02*             | 0.05±0.02            | 0.08±0.01              |

Note: \*:  $P < 0.05$ .

表 4 门水平上 PCV2 感染仔猪盲肠菌群组成

Table 4 Composition of cecal flora in piglets infected with PCV2 at phyla level

| 菌门<br>Phyla                | 21 dpi               |                        | 56 dpi               |                        |
|----------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
|                            | 对照组<br>Control group | 感染组<br>Infection group | 对照组<br>Control group | 感染组<br>Infection group |
| 拟杆菌门 <i>Bacteroidetes</i>  | 0.549±0.032          | 0.589±0.099            | 0.233±0.072          | 0.288±0.144            |
| 厚壁菌门 <i>Firmicutes</i>     | 0.421±0.027          | 0.373±0.075            | 0.618±0.187*         | 0.723±0.027            |
| 变形菌门 <i>Proteobacteria</i> | 0.018±0.009          | 0.022±0.003            | 0.022±0.002          | 0.051±0.021            |
| 螺旋菌门 <i>Spirochaetae</i>   | 0.005±0.004          | 0.009±0.001            | 0.011±0.003          | 0.026±0.022            |

Note: \*:  $P < 0.05$ .

表 5 属水平上 PCV2 感染仔猪盲肠菌群组成

Table 5 Composition of cecal flora in piglets infected with PCV2 at genus level

| 菌属<br>Genus                                     | 21 dpi               |                        | 56 dpi               |                        |
|---|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
|   | 对照组<br>Control group | 感染组<br>Infection group | 对照组<br>Control group | 感染组<br>Infection group |
| 普雷沃氏菌属 <i>Alloprevotella</i>                    | 0.005±0.003          | 0.033±0.010*           | 0.051±0.003          | 0.052±0.004            |
| 丁酸弧菌属 <i>Butyrivibrio</i>                       | 0.015±0.003          | 0.001±0.000*           | 0.000±0.000          | 0.000±0.000            |
| 克里斯滕森菌属<br><i>Christensenellaceae-R-7-group</i> | 0.010±0.004          | 0.044±0.006*           | 0.006±0.004          | 0.008±0.002            |
| 瘤胃菌属<br><i>Ruminococcaceae-NK4A214-group</i>    | 0.021±0.001          | 0.007±0.002*           | 0.003±0.001          | 0.004±0.002            |

Note: \*:  $P < 0.05$ .



### 3 讨论与结论

PCV2 可引起肠炎<sup>[3]</sup>, 其发生与回肠黏膜中 CD8<sup>+</sup> T 细胞上调、SIgA 减少等有关<sup>[4]</sup>。感染猪空肠菌群表现多样性增高, 有益菌乳酸菌属含量显著降低, 有害菌假单胞菌属含量显著增高<sup>[5]</sup>。然而盲肠的功能与空肠和回肠并不完全一致, 本研究显示, PCV2 感染同样可引起仔猪盲肠黏膜损伤, 盲肠黏膜分泌物中 SIgA 含量下调, 黏膜层 T 淋巴细胞增殖能力增强, 在病毒载量较高的 21 dpi 时差异显著, 这与 PCV2 感染仔猪空肠的变化<sup>[4]</sup>基本一致; 但菌群多样性和丰度显著降低, 条件致病菌普雷沃氏菌属显著增高, 有益菌梭菌属、丁酸弧菌属、瘤胃菌属显著降低, 与空肠菌群变化<sup>[5]</sup>不同, 这可能与盲肠正常菌群组成和功能有关; 另外, 病毒载量处于较低水平, 盲肠结构基本恢复, 菌群多样性与丰度无显著差异, 菌群组成接近对照组。提示 PCV2 载量与盲肠黏膜损伤、免疫功能及盲肠菌群紊乱有一定关系。该研究结果可为临床预防与治疗 PCV2 感染导致的肠道炎症, 以及改善 PCV2 感染导致的仔猪生产性能降低提供参考。

SIgA 在肠黏膜免疫中发挥着主要作用, 在病原体引起的特异性免疫中起着不可替代的作用, 如抗流感病毒黏膜疫苗可诱导 SIgA 产生<sup>[11]</sup>, 也可防止细菌和病毒吸附在黏膜表面形成集落, 还可凝集细菌形成较大颗粒, 有利于黏膜清除细菌颗粒, 保护肠道正常功能<sup>[12]</sup>。此外, SIgA 有利于正常菌群形成菌影, 维持共生微生物之间的黏膜免疫平衡, 防御黏膜表面的病原体<sup>[13-14]</sup>。本研究显示, PCV2 感染导致盲肠 SIgA 水平降低, 提示感染猪盲肠黏膜免疫功能下降, 条件致病菌可能异常增殖而损伤肠黏膜。

饲料组成、抗生素、饲料添加剂、感染因素等凡能导致肠道内环境发生改变的均可影响肠

道菌群结构组成, 体现在菌群丰度与多样性, 更主要的是有害微生物增加、有益微生物减少, 动物生产性能降低, 或者是感染性疾病临床症状加重甚至死亡<sup>[5,13,15]</sup>。因此, 实际生产中常通过微生态制剂、菌群移植、药用植物及其提取物等干预肠道菌群来预防和治疗疾病<sup>[7-8]</sup>。病毒感染同样可引起肠道菌群多样性降低, 而且有益菌减少、有害菌增多<sup>[5,9]</sup>。本研究结果显示, PCV2 感染猪盲肠的菌群多样性降低, 尤其是病毒感染核酸载量较高时普雷沃氏菌属和克里斯滕森菌科显著增高, 丁酸弧菌属和瘤胃菌属显著降低, 但对照组猪盲肠优势菌群与文献<sup>[16]</sup>的报道基本一致, 盲肠中菌群主要有厚壁菌门和拟杆菌门, 而一定数量拟杆菌门中的普雷沃氏菌属虽可分解蛋白质和碳水化合物, 但它同时也是条件致病菌, 可引起肠道炎症等<sup>[17-18]</sup>。还有研究证明, 克里斯滕森菌科 R-7 群能够调节脂质代谢, 减少机体肥胖症的发生<sup>[19]</sup>, 其上调是否对 PCV2 感染仔猪代谢、吸收甚至消瘦症状等出现有关, 还有待探索。丁酸弧菌属和瘤胃菌属, 主要参与纤维素代谢, 可产生大量短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA)<sup>[9,20]</sup>, 促进黏蛋白生成, 对肠上皮细胞有营养、促增殖、促分化的作用, 维持肠黏膜屏障完整性<sup>[21]</sup>。此外, SCFA 不仅可通过降低肠道 pH 而促进益生菌生长、抑制特定病原菌定殖<sup>[22-23]</sup>, 而且也可作用于 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞和 Treg 细胞, 参与肠道内免疫调节, 发挥抗炎作用<sup>[24]</sup>。本研究中 T 细胞增殖能力增强, 而 Tc 细胞数量增加(未显示), 推测 PCV2 感染猪盲肠中细胞毒性作用增强, 加之感染猪盲肠菌群的改变, 可能影响仔猪对纤维素的代谢, 从而导致 SCFA 产物降低, 加重炎症发生。

总而言之, PCV2 感染可引起仔猪盲肠黏膜损伤, 黏膜分泌物 SIgA 下调, T 淋巴细胞增殖能力增强, 提示感染猪盲肠免疫功能发生紊乱;

感染猪盲肠菌群多样性和丰度降低, 条件致病菌普雷沃氏菌属增高, 有益菌梭菌属、丁酸弧菌属、瘤胃菌属降低, 而且这些变化与感染猪体内病毒含量存在一定关系。

## REFERENCES

- [1] Ramamoorthy S, Meng XJ. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox[J]. *Animal Health Research Reviews*, 2009, 10(1): 1-20
- [2] Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV<sub>2</sub>) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis[J]. *Virus Research*, 2012, 164(1/2): 10-19
- [3] Resendes AR, Segalés J. Characterization of vascular lesions in pigs affected by porcine circovirus type 2-systemic disease[J]. *Veterinary Pathology*, 2015, 52(3): 497-504
- [4] Shi FY, Li QM, Zou ZM, Wang Y, Hou XL, Zhang YH, Song QY, Zhou SH, Li HR. The changes of immune-related molecules within the ileal mucosa of piglets infected with porcine circovirus type 2[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2020, 21(5): e78
- [5] 朱琳琳, 武子函, 邹成明, 杨宁, 王建舫, 李焕荣. 猪圆环病毒 2 型感染的仔猪空肠菌群变化[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(12): 2951-2957  
Zhu LL, Wu ZH, Zou ZM, Yang N, Wang JF, Li HR. Change of the jejunum flora from PCV<sub>2</sub>-infected piglets[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(12): 2951-2957 (in Chinese)
- [6] Smith BN, Fleming SA, Wang M, Dilger RN. Alterations of fecal microbiome characteristics by dietary soy isoflavone ingestion in growing pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Journal of Animal Science*, 2020, 98(6): skaa156
- [7] Niederwerder MC, Constance LA, Rowland RRR, Abbas W, Fernando SC, Potter ML, Sheahan MA, Burkey TE, Hesse RA, Cino-Ozuna AG. Fecal microbiota transplantation is associated with reduced morbidity and mortality in porcine circovirus associated disease[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1631
- [8] Wu MJ, Yi D, Zhang Q, Wu T, Yu K, Peng M, Wang L, Zhao D, Hou YQ, Wu GY. Puerarin enhances intestinal function in piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 6552
- [9] Jiang N, Liu H, Wang P, Huang J, Han H, Wang QF. Illumina MiSeq sequencing investigation of microbiota in bronchoalveolar lavage fluid and cecum of the swine infected with PRRSV[J]. *Current Microbiology*, 2019, 76(2): 222-230
- [10] Laurin M, Everett ML, Parker W. The cecal appendix: one more immune component with a function disturbed by post-industrial culture[J]. *Anatomical Record: Hoboken, N J*: 2007, 2011, 294(4): 567-579
- [11] Suzuki T, Aina A, Hasegawa H. Functional and structural characteristics of secretory IgA antibodies elicited by mucosal vaccines against influenza virus[J]. *Vaccine*, 2017, 35(39): 5297-5302
- [12] Tagliabue A, Nencioni L, Villa L, Keren DF, Lowell GH, Boraschi D. Antibody-dependent cell-mediated antibacterial activity of intestinal lymphocytes with secretory IgA[J]. *Nature*, 1983, 306(5939): 184-186
- [13] Corthésy B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces[J]. *Frontiers in Immunology*, 2013, 4: 185
- [14] Bollinger RR, Everett ML, Palestrant D, Love SD, Lin SS, Parker W. Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut[J]. *Immunology*, 2003, 109(4): 580-587
- [15] Liu BH, Piao XH, Niu W, Zhang QY, Ma C, Wu T, Gu QC, Cui TF, Li SD. Kuijieyuan decoction improved intestinal barrier injury of ulcerative colitis by affecting TLR4-dependent PI3K/AKT/NF-κB oxidative and inflammatory signaling and gut microbiota[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 1036
- [16] Panasevich MR, Wankhade UD, Chintapalli SV, Shankar K, RS. Cecal versus fecal microbiota in ossabaw swine and implications for obesity[J]. *Physiological Genomics*, 2018, 50(5): 355-368
- [17] Wang CS, Li WB, Wang HY, Ma YM, Zhao XH, Yang H, Qian JM, Li JN. VSL#3 can prevent ulcerative colitis-associated carcinogenesis in mice[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2018, 24(37): 4254-4262
- [18] Shang P, Wei MB, Duan MQ, Yan FF, Chamba Y. Healthy gut microbiome composition enhances disease resistance and fat deposition in Tibetan pigs[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 965292
- [19] Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, Beaumont M, Van Treuren W, Knight R, Bell JT, et al. Human genetics shape the gut microbiome[J]. *Cell*, 2014, 159(4): 789-799

- [20] Bindelle J, Pieper R, Montoya CA, Van Kessel AG, Leterme P. Nonstarch polysaccharide-degrading enzymes alter the microbial community and the fermentation patterns of barley cultivars and wheat products in an *in vitro* model of the porcine gastrointestinal tract[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 76(3): 553-563
- [21] Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, Wilson KE, Glover LE, Kominsky DJ, Magnuson A, et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function[J]. Cell Host & Microbe, 2015, 17(5): 662-671
- [22] Wang ZY, Bai Y, Pi Y, Gerrits WJJ, De Vries S, Shang LJ, Tao SY, Zhang SY, Han DD, Zhu ZP, et al. Xylan alleviates dietary fiber deprivation-induced dysbiosis by selectively promoting *Bifidobacterium pseudocatenulatum* in pigs[J]. Microbiome, 2021, 9(1): 227
- [23] Dengler F, Kraetzig A, Gäbel G. Butyrate protects porcine colon epithelium from hypoxia-induced damage on a functional level[J]. Nutrients, 2021, 13(2): 305
- [24] Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, MacKay F, Artis D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43[J]. Nature, 2009, 461(7268): 1282-1286