

不同黏蛋白 4 基因型離乳仔豬經灌注腸毒型大腸桿菌對生長性能和發炎反應之影響

周家豪⁽¹⁾ 許惠貞⁽¹⁾ 楊天樹⁽²⁾ 李德南⁽¹⁾⁽³⁾

摘要：仔豬於離乳初期因消化系統未發育完成、加上離乳造成的生理緊迫及因衛生條件不良而感染大腸桿菌，但影響此菌發病的原因相當複雜，除前述因素外，亦可能受仔豬腸道分泌黏蛋白 (mucin) 之黏蛋白 4 (*MUC4*) 基因的控制。因此，本研究目的在於分析帶有不同 *MUC4* 基因型離乳仔豬經腸毒型大腸桿菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) 灌注後餵飼有無添加抗生素 (antibiotic, AB) 對生長性能和發炎反應之影響。試驗選取 32 頭 4 週齡二品種雜交離乳仔豬，依逢機完全區集設計分配至空白料組和 AB 組，以聚合酶連鎖反應 - 限制酶片段長度多型性 (the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 區分離乳仔豬 *MUC4* 基因型成抵抗型 (resistant, F4R⁻) 和敏感型 (susceptible, F4R⁺)，在試驗第 12 天每頭仔豬灌食 5×10^{10} cfu ETEC-F4ac，收集灌注後 (day post-infection, dpi) 5 天之糞便樣品以及 dpi 7 和 dpi 14 之豬隻血液樣品。試驗結果發現，F4R⁻ 基因型豬隻在空白料組和 AB 組同為 2 頭，而 F4R⁺ 基因型豬隻在二飼料處理組同為 14 頭。仔豬的存活率無論是空白料組或是 AB 組屬於 F4R⁻ 型豬隻同為 100%，而 F4R⁺ 型豬隻在空白料組和 AB 組存活率分別為 71 和 93% ($P = 0.14$)。F4R⁺ 基因型離乳仔豬餵食空白料組飼料較 AB 組飼料降低 dpi 0 - 14 之日增重 14.15% (528 vs. 615 g/day) ($P = 0.09$)；而 F4R⁻ 基因型離乳仔豬餵食空白料組較 AB 組飼料則減低 43.18% (325 vs. 572 g/day) ($P = 0.39$)。包括 F4R⁺ 和 F4R⁻ 基因型離乳仔豬糞便 ETEC 排毒量，餵飼空白料組於 dpi 2 - 3 與 AB 組飼料於 dpi 1 - 5 顯著提高 ($P < 0.05$)，而餵飼空白料組比 AB 組僅在 F4R⁺ 基因型離乳仔豬提高糞便水分含量 ($P < 0.05$)。餵飼空白料組比 AB 組可提高 F4R⁺ 基因型離乳仔豬 dpi 7 之血漿溶菌酶活性以及 dpi 14 血漿 IgA 特異型 F4 抗體力價 ($P < 0.05$)，但對 F4R⁻ 基因型離乳仔豬卻提高 dpi 14 血漿 IgG 特異型 F4 抗體力價 ($P < 0.01$)。綜合以上結果顯示，飼料添加 AB 降低 F4R⁺ 基因型離乳仔豬於灌注 ETEC 後之發炎反應程度，而 F4R⁻ 基因型離乳仔豬發炎較輕微而未能顯出添加 AB 之效果。

(關鍵語：抗生素、腸毒型大腸桿菌、基因型、離乳仔豬)

⁽¹⁾ 國立宜蘭大學生物技術與動物科學系，26047 宜蘭縣宜蘭市神農路 1 段 1 號。

⁽²⁾ 臺灣動物科技研究所，35053 苗栗縣竹南鎮科東二路 52 號。

⁽³⁾ 通訊作者，E-mail: dnlee@niu.edu.tw

緒 言

仔豬於 21 - 28 日齡離乳時，易受本身生理、環境改變及建立社會位序過程而產生緊迫，進而降低免疫系統及腸道消化吸收功能，導致此階段仔豬易受病原菌感染，而至引發消化道疾病，其中腸病原型大腸桿菌（enterotoxigenic *E. coli*, ETEC）即是常導致發病之病原菌種類（鍾等, 1981）。腸道大腸桿菌屬於兼性厭氧型革蘭氏陰性之短桿菌，可依據細胞壁之 O 抗原、夾膜之 K 抗原、纖毛之 F 抗原及鞭毛之 H 抗原進行分類，其中生長在細菌表面形狀類似髮狀細絲的纖毛，可以讓細菌附著在宿主細胞表面上的特殊受體而感染細胞。Cahill and Glantz (1978) 使用免疫電泳法，將 ETEC-F4 種類區分成 F4ab、F4ac 及 F4ad 三種亞型，發現不同亞型之流行率和致病機制並不相同，如美國及韓國之流行病因主要是以 F4ac 型為主，而歐洲之流行病因則是 F18 型；而仔豬年齡亦會影響不同亞型之流行率，如離乳階段之下痢致病性主要以 F4ac 型為主，而 F18 型同時會影響新生及離乳兩個階段（Nagy and Fekete, 1999; Fairbrother et al., 2007）。帶有 F4 纖毛之 ETEC 感染豬隻，一般病徵包括抑制胃腸蠕動、附著於小腸絨毛上皮細胞及分泌腸細胞毒素，以及擾亂腸管黏膜細胞之代謝，使血漿與鹽類大量流入腸腔，造成豬之發生下痢現象與引發發炎反應（Dubreuil, 2012）。

仔豬小腸上皮細胞刷狀緣及黏膜中之 F4 受體（F4R）可與 ETEC-F4 結合，而此過程為引發腸道感染之重要關鍵，目前已知 F4R 具有許多不同功能特性之基因亞型，其中某些亞型可與 ETEC-F4 之三種、其中二種或其中一種之纖毛結合（Willemsen and de Graff, 1992; Erickson et al., 1994）。在 Jørgensen et al. (2004) 文獻首先證明，豬隻第 13 號染色體黏蛋白（mucin 4, *MUC4*）基因型與 ETEC 之 F4ab/ac 種類具有關聯性，其位於隱子（intron）7 內之第 8227 核苷酸種類可區分成 G 和 C 二種，利用限制內切酶可將 *MUC4* 切割區分抵抗型（F4R⁻）和敏感型（F4R⁺）豬隻，此基因型和實際利用離乳仔豬小腸腸道進行 ETEC 吸附反應具有很高之相關性（Jensen et al., 2006; Rasschaert et al., 2007）。離乳仔豬 F4R 基因型種類受 ETEC 感染之反應差異極大，如口服 ETEC-F4 可提高 F4R⁺ 基因型豬隻血清 IgA 和 IgG 特異型 F4 抗體力價以及糞便 IgA 特異型 F4 抗體力價，而 F4R⁻ 基因型豬隻則不會誘發血清抗體及腸黏膜抗體反應，但此反應亦受其他基因型的影響（Rasschaert et al., 2007; 游等, 2013）。

由於目前國內豬隻育成率偏低，其年週轉率為 1.46（臺灣養豬統計手冊, 2012）與理想目標 2.0 仍有一段差距，而臺灣與全球許多地區一樣，豬隻之生產易受大腸桿菌威脅（林等, 2003），在開發防治 ETEC 之飼料添加物前，需先建立不同基因型離乳仔豬感染 ETEC 之反應資料。因此，本研究目的在於探討不同 *MUC4* 基因型離乳仔豬經灌注 ETEC 後，分別餵飼有無添加抗生素（antibiotic, AB）飼料對生長性能和發炎反應之影響。

材料與方法

一、試驗設計

試驗分成 2 次重複進行，共選取 32 頭 4 週齡雜交離乳閩公仔豬，依逢機完全區集設計（randomized complete block design, RCBD）分配至二處理組，飼料處理為空白料組和抗生素組，抗生素組添加治療用量之克利斯汀（colistin）250 mg/kg 和安莫西林（amoxyciline）500 mg/kg（宏

昌製藥, 臺南市)。飼料分為 0 - 14 天和 15 - 26 天二期, 基礎飼料以玉米—大豆粕為主, 飼料配方和營養組成列於表 1, 營養分超過 NRC (1998) 之需要量標準。

表 1 飼料配方和營養成分

Table 1 Formula and nutrient composition of diets

Item	Days 0 - 14	Days 15 - 26
Ingredient (%)		
Yellow corn	57.46	63.38
Full-fat soybean meal	9.37	4.23
Soybean meal	21.18	25.02
Fish meal	10.00	5.00
Limestone	0.70	0.85
Mono-calcium phosphate	0.29	0.52
Salt	0.30	0.30
Vitamin premix ^a	0.10	0.10
Trace mineral premix ^b	0.10	0.10
Corn starch or AB ^c	0.50	0.50
Total	100.00	100.00
Calculated nutrient composition		
ME (kcal/kg)	3,265	3,265
CP (%)	23.77	20.97
Lys (%)	1.47	1.22
Met (%)	0.47	0.38
Met + Cys (%)	0.84	0.73
Thr (%)	0.93	0.81
Ca (%)	0.80	0.70
Available P (%)	0.40	0.33

^aSupplied per kg diet: vitamin A, 6,000 IU; vitamin D, 900 IU; vitamin E, 30 IU; vitamin K₃, 3 mg; vitamin B₂, 6 mg; pantothenic acid, 18 mg; niacin, 60 mg; vitamin B₁₂, 30 μ g, and choline-Cl, 525 mg.

^bSupplied per kg diet: Cu, 20 mg; Zn, 100 mg; Fe, 140 mg; Mn, 4 mg; Se, 0.1 mg, and I, 0.2 mg.

^cAB: Supplied per kg diet containing colistin 250 mg and amoxycline 500 mg.

二、動物管理與飼養

離乳仔豬飼養於維持通風與溫度控制之貨櫃屋豬舍中, 每欄 3.6 m² 下鋪塑鋼網狀地面, 每欄以密實鋼板隔間, 重複 1 每欄飼養 1 頭 (共 16 欄), 而重複 2 每欄飼養 2 頭 (共 8 欄), 飼料與飲水採任食, 畜舍設有保溫燈與冷氣機使溫度維持在 26 - 29°C 之間, 畜舍內並實施全日照明。豬隻飼養 12 天後, 先進行抽血和灌注 ETEC。本試驗涉及之動物試驗, 動物之使用、飼養與試驗內容係依據宜蘭大學實驗動物管理委員會批准之試驗準則進行。

三、分析方法

(一) ETEC-F4ac 之製備與灌注

源自民間豬場下痢仔豬腸道所分離的野生型 ETEC-F4ac，以胰化酪蛋白大豆培養液 (trypticase soy broth, Becton Dickinson, NY) 在 37°C 下培養過夜後，第 2 天以 1% 接種至新培養液，經培養 3 - 4 h 然後離心 15 min，去除上清液並以磷酸緩衝溶液將沉澱物重新懸浮，再次離心棄上清液後，將沉澱物以 TSB 重新懸浮溶解，調整菌數量為 1×10^9 cfu/mL。ETEC-F4ac 之亞型鑑定，以商業套組 (QIA prep® spin Mini prep kit, QIAGEN, Hilden, Germany) 流程抽取大腸桿菌質體 (plasmid) 作為模板，然後參考 Franklin et al. (1996) 方法，使用引子 AM005 (sense) : 5'-GGT GAT TTC AAT GGT TCG GTC-3' 為三種亞型共用之正向引子 (forward primer)，而分別選用反向引子 (reverse primer) MF007 : 5'-TGC AGC ACC CGA AAC AGT CGT CGT-3' ; MF008 : 5'-CCC AGC CGA CGA TTC AGA ACC CCT-3' ; MF009 : 5'-TGC AGA ATT CTG AAC ATT CGT CGG-3' 作為 ETEC-F4ab、-F4ac 及 -F4ad 之專一性引子。再以 PCR 商業套組進行 PCR 反應 (Astec, Fukuoka, Japan)，反應溫度條件設為 94°C 反應 5 min ; 94°C 反應 1 min ; 60°C 反應 1 min ; 72°C 反應 1 min ; 進行 35 個循環，最後以 72°C 反應 7 min 結束。PCR 產物以洋菜膠與 0.5 倍 TBE 緩衝液配置成 1.2% 電泳膠，結果列於圖 1，僅以 ETEC-F4ac 亞型之專一性引子可在 450 bps 處具有條紋 (band)，而 ETEC-F4ab 和 -F4ad 之專一性引子則未出現產物，接續將 ETEC-F4ac 之專一性引子之 PCR 產物進行定序 (基龍米克斯，臺北)，使用 NCBI 資料庫比較 F4 亞型核苷酸序列，證實為 ETEC-F4ac 亞型。

灌注 ETEC 過程參考 Jensen et al. (2006) 之方法，每頭仔豬先禁食飼料與水 3 h，經由胃管灌注 30 mL 10% 之碳酸氫鈉溶液與 5×10^{10} cfu ETEC-F4ac。其後每週秤取豬隻體重、連續收集灌服日 5 天內所有豬隻之直腸糞便，分析糞便 ETEC 數目和水分含量，並於灌服後第 7 (dpi 7) 及 14 天 (dpi 14) 由頸靜脈以含 EDTA 之真空抽血管進行血液收集，經 $1,500 \times g$ 離心 10 min 後，收集血漿，測定血漿急性蛋白濃度和 F4 免疫球蛋白專一性抗體力價。

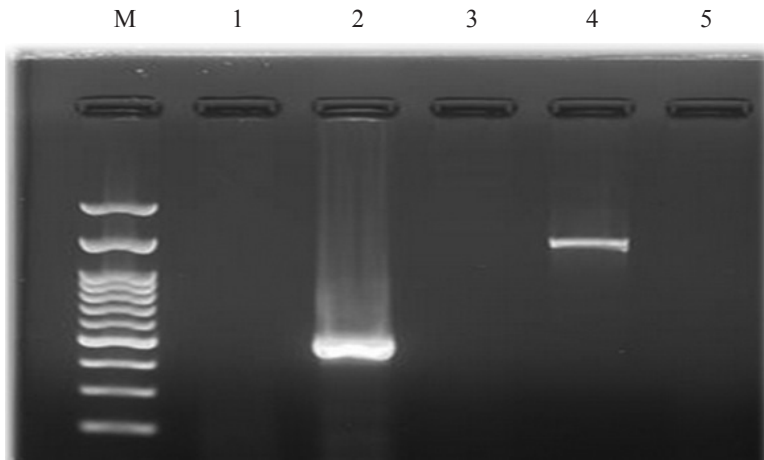


圖 1 腸毒型大腸桿菌 F4 基因之 PCR 產物電泳圖。

Figure 1 Electrophoresis gel indicating ETEC-F4ac gene PCR amplified products.

From left to right: M, 100 bp DNA ladder; lane 1, amplified product using primers AM005 and MF007 (*ab* variant); lane 2, amplified product using primers AM005 and MF008 (*ac* variant); lane 3, amplified product using primers AM005 and MF009 (*ad* variant); lane 4, amplification of *E. coli* 16S rRNA DNA template; lane 5, no primer.

(二) 豬隻 MUC4 基因多態性分析

參考 Jensen et al. (2006) 之聚合酶連鎖反應-限制酶片段長度多型性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 方法測定豬隻 *MUC4* 基因型，首先抽取 EDTA 抗凝之血液，經 $2,000 \times g$ 離心 10 min 分離出白血球，再以商業套組純化出 DNA (Qiagen, Manchester, UK)，使用引子：5'-GTGCCTGGGTGAGAGGTTA-3'/5'-CACTCTGCCGTTCTCTTTCC-3' 與商業套組 (Qiagen)，以 PCR 方式增幅 *MUC4* 基因片段，產物為 367 bps，再利用 *Xba*I 內切限制酶 (Qiagen) 作用後，若分切產物核苷酸長度為 367 核苷酸長度 (bps)，基因型符號為 RR 而為抵抗型 (F4R⁻) 豬隻；而切成 367、216 及 151 bps 三個核苷酸片斷，基因型屬 SR；而切成 216 及 151 bps 二個核苷酸片斷，基因型屬 SS，而 SR 和 SS 基因型均屬於敏感型 (F4R⁺) 豬隻，有關 *MUC4* 之 PCR-RFLP 參考圖譜，列於圖 2。

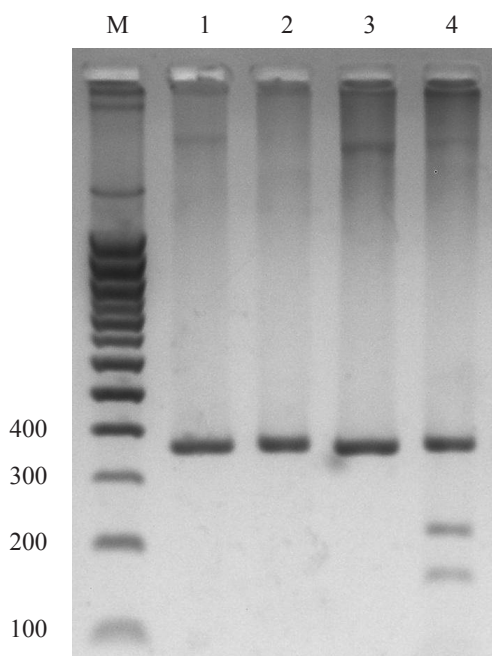


圖 2 PCR-RFLP 鑑定 *MUC4* 基因型之膠體電泳圖。

Figure 2 Electrophoresis gel indicating PCR-RFLP for *MUC4* gene.

From left to right: M, 100 bp DNA ladder; lane 1, PCR product of F4R⁻ genotype; lane 2, PCR product by *Xba*I digested of F4R⁻ genotype; lane 3, PCR product of F4R⁺ genotype; lane 4, PCR product by *Xba*I digested of F4R⁺ genotype.

(三) 糞便 ETEC 數目和水分分析

糞便樣品經 10 倍序列稀釋，利用直徑 4 mm 玻璃珠均勻塗於培養基上，以含有 5% 去纖維綿羊紅血球的大豆分解蛋白質瓊脂 (TSA, Becton Dickinson, Spark, NJ) 於 37°C 培養環境下 24 h 後計算 ETEC 菌落數目，水分含量以 AOAC (1984) 之方法分析。

(四) 血漿急性蛋白濃度分析

1. 血漿溶菌酶活性分析：參考 Masuda et al. (2001) 之方法，使用無菌 96 孔盤，每孔加入 200 μL 內含 0.3 mg/mL 之 *Micrococcus lysodeikiticus* 菌液，分別加入 20 μL 之豬血漿及 0-12.5 $\mu\text{g/mL}$ 之雞蛋白溶菌酶 (Worthington biochemical, Lakewood, NJ) 作為標準品，置於多功能全波長微量盤讀儀中，設定 41°C 培養條件下，每 10 min 讀取 450 nm 之吸光值一次，讀取至 60 min，並以雞蛋白溶菌酶標準品計算反應時間序列之迴歸係數作為標準曲線。
2. 血漿血紅素結合蛋白分析：參照 Dritz et al. (1995) 之方法進行分析。首先將樣品或標準血清與豬變性血紅素混合，再從中取 10 μL 標準品或樣品稀釋液與 2.5 mL 鄰 - 二甲氧基聯苯胺溶液於 37°C 反應 45 min，加入 25 μL 之 200 mM 過氧化氫，反應 1 h 後測定 450 nm 之吸光值。

(五) F4 抗原製作與血漿 F4 特異型抗體力價測定

1. F4 抗原製作：參考 Bosi et al. (2004) 之方法，ETEC-F4ac 以 TSB 在 37°C 下培養 18 h。收集菌液後以 3,000 $\times g$ 離心 30 min，以 PBS 清洗 1 次，菌塊以 PBS 回溶後，降溫後以 24,000 rpm 均質 20 min (DREMEL[®], Racine, WI)，再以 10,000 $\times g$ 離心 20 min，移除大的片段，收集上清液繼續以 20,000 $\times g$ 離心 40 min，沉澱物以少量水溶解。添加 40% 硫酸銨進行沉澱，4°C 放置隔夜，以 5,000 $\times g$ 離心 30 min，取出沉澱的蛋白以二次水進行透析，再以二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid) 商業套組測定蛋白質濃度 (Thermo, Rockford, IL)。
2. 血漿 F4 特異型抗體力價測定：主要依據 van der Stede et al. (2002) 之方法，以 ELISA 方法進行測定。首先以 100 μL 之 1 $\mu\text{g/mL}$ 小鼠抗 F4 鞭毛蛋白單株抗體 (AbD, Kidlington, UK) 被覆 96 孔免疫分析微孔盤，經 37°C 作用 2 h，再以 300 μL 含 0.2% Tween 80 之 PBS 溶液封閉固相上的空餘間隙。加入 100 μL 之 50 $\mu\text{g/mL}$ ETEC-F4 鞭毛蛋白於 37°C 作用 1 h，再加入經 2 倍序列稀釋之血漿，於 37°C 作用 1 h，再分別加入 100 μL 經 50,000 倍稀釋之山羊抗豬 IgA、IgG 及 IgM 標記辣根過氧化物酶 (HRP) 的抗體 (Bethyl Lab, Montgomery, TX)，於 37°C 作用 1 h，最後以 100 μL 過氧化氫酵素反應基質 (TMB) 作為呈色劑，反應 15 min 後以 100 μL 之 2 M 硫酸溶液中止反應，以盤式酵素免疫分析儀 (Sunrise[™], TECAN, Grödig, Austria) 讀取 450 nm 之吸光值。血漿抗 F4 特異型抗體力價的評定，以超過該項目 dpi 0 之血漿吸光值加上 3 倍量標準偏差值之最高稀釋倍數的倒數值表示。

四、統計分析

試驗之各項資料統計分析採用 SAS (2002) 統計軟體進行，豬隻基因型於不同重複間分布差異，以試驗重複當作共變方修正，仔豬糞便 ETEC 數目和血漿特異型抗體力價分別以 \log_{10} 和 \log_2 進行資料轉換，所有資料利用 Mixed 程序進行不同時間資料之變方分析，當變方分析後其處理效應 F 值達 $P < 0.05$ 時，復以最低顯著差異法比較處理組平均值間之差異顯著性。

結 果

不同黏蛋白 4 基因型離乳仔豬經灌注腸毒型大腸桿菌對日增重和存活率之影響，結果列於表 2。F4R⁻ 離乳仔豬於空白料組和 AB 組之隻數同為 2 隻，而 F4R⁺ 基因型之隻數同為 14 隻，但在感染 ETEC 後，F4R⁺ 離乳仔豬於空白料組和 AB 組飼料，分別導致 4 隻和 1 隻仔豬死亡，但不影響

其存活率 ($P > 0.05$)。F4R⁻ 與 F4R⁺ 離乳仔豬感染前 12 天之日增重不受飼料處理影響，餵飼空白料組和 AB 組飼料之離乳仔豬 ADG 相近。F4R⁺ 離乳仔豬餵飼空白料組較 AB 組飼料具有降低感染 ETEC 後 dpi 0 - 14 天日增重之趨勢 ($P = 0.09$)，其值約差異 14.15% (528 vs. 615 g/day)；對於 F4R⁻ 離乳仔豬則降低 43.18% (325 vs. 572 g/day)，但統計上不顯著 ($P = 0.39$)。

表 2 不同黏蛋白 4 基因型離乳仔豬經灌注腸毒型大腸桿菌對日增重和存活率之影響

Table 2 Effects of various mucin 4 genotype on the survival rate and ADG of weaned pigs after challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*

Genotype	Treatment		P-value
	Control	AB [†]	
F4R ⁻			
Survival rate (%)	100 (2/2) [#]	100 (2/2)	1.00
ADG for dpi 0 - 12 (g/day)	219 ± 203 [‡]	233 ± 329	0.96
ADG for dpi 0 - 14 (g/day)	325 ± 142	572 ± 162	0.39
F4R ⁺			
Survival rate (%)	71.43 (10/14)	92.86 (13/14)	0.14
ADG for dpi 0 - 12 (g/day)	185 ± 162	212 ± 228	0.22
ADG for dpi 0 - 14 (g/day)	528 ± 142	615 ± 79	0.09

[†]AB = colistin 250 mg/kg and amoxyciline 500 mg/kg.

[‡]The value is present as mean ± SD.

[#]The parenthesis meaning the ratio of alive/total pigs.

不同黏蛋白 4 基因型離乳仔豬經灌注腸毒型大腸桿菌對糞便 ETEC 和水分含量之影響，結果列於表 3。空白料組豬隻經灌注 ETEC 後，其糞便 ETEC 的排毒量於 dpi 1 最高，然後呈現逐次下降之現象 ($P < 0.01$)，其中 F4R⁻ 和 F4R⁺ 離乳仔豬約分別在 dpi 2 和 dpi 5 減少至 dpi 1 ETEC 排毒量的一半；飼料添加 AB 可有效抑制 ETEC 的排毒量，其較空白料組降低 F4R⁻ 離乳仔豬 dpi 2 - 3 以及 F4R⁺ 離乳仔豬 dpi 1 - 5 之糞便 ETEC 排毒量 ($P < 0.05$)。綜合 5 天糞便 ETEC 排毒量之結果顯示，F4R⁻ 離乳仔豬在空白料組和 AB 組約分別為 $10^{2.86}$ 和 10^0 ，但在 F4R⁺ 離乳仔豬約分別為 $10^{5.40}$ 和 $10^{0.09}$ 。因此，添加 AB 對 F4R⁺ 離乳仔豬減低糞便 ETEC 排毒量之效果較 F4R⁻ 離乳仔豬效果大。經灌注 ETEC 並不影響仔豬糞便的水分含量 ($P > 0.05$)，但 F4R⁺ 離乳仔豬餵食空白料組較 AB 組飼料增加經灌注 ETEC 後整個 5 天之糞便水分含量 ($P < 0.05$)，但 F4R⁻ 離乳仔豬之糞便水分含量則不受飼料處理影響 ($P > 0.05$)。綜合 5 天糞便水分含量之結果顯示，F4R⁻ 離乳仔豬在空白料組和 AB 組分別為 69.38% 和 71.53%，二組數值相近，但在 F4R⁺ 離乳仔豬，則以空白料組較 AB 組增加 8.5% (分別為 81.58 和 73.08%)。

表 3 不同黏蛋白 4 基因型離乳仔豬經灌注腸毒型大腸桿菌對糞便 ETEC 和水分含量之影響

Table 3 Effects of various mucin 4 genotype on the fecal moisture and ETEC shedding of weaned pigs after challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*

Genotype	Treatment (T)		P-value		
	Control	AB [†]	T	Day	T*Day
Feces ETEC shedding (log ₁₀ CFU/g)					
F4R ⁻					
Dpi 1	7.08 ± 0.51	0 ± 0	0.06	-	-
Dpi 2	3.88 ± 0.02	0 ± 0	0.01	-	-
Dpi 3	2.04 ± 0.05	0 ± 0	0.02	-	-
Dpi 4	1.29 ± 1.83	0 ± 0	0.67	-	-
Dpi 5	0 ± 0	0 ± 0	-	-	-
Means	2.86 ± 0.40	0 ± 0	0.01	0.01	0.01
F4R ⁺					
Dpi 1	6.68 ± 1.61	0 ± 0	0.04	-	-
Dpi 2	6.04 ± 1.72	0 ± 0	0.01	-	-
Dpi 3	5.58 ± 2.06	0.07 ± 0.27	0.01	-	-
Dpi 4	5.68 ± 2.19	0.28 ± 0.53	0.01	-	-
Dpi 5	3.11 ± 2.63	0.10 ± 0.36	0.01	-	-
Means	5.40 ± 1.47	0.09 ± 1.22	0.01	0.01	0.01
Feces moisture (%)					
F4R ⁻					
Dpi 1	72.43 ± 0.28 [‡]	72.03 ± 4.48	0.08	-	-
Dpi 2	70.69 ± 1.85	68.54 ± 6.99	0.44	-	-
Dpi 3	74.44 ± 5.44	75.11 ± 4.67	0.66	-	-
Dpi 4	72.06 ± 0.41	70.15 ± 1.62	0.37	-	-
Dpi 5	71.12 ± 1.81	71.83 ± 1.84	0.53	-	-
Means	69.38 ± 3.36	71.53 ± 2.37	0.15	0.14	0.87
F4R ⁺					
Dpi 1	79.83 ± 8.38	71.71 ± 2.30	0.01	-	-
Dpi 2	82.91 ± 8.26	72.91 ± 4.13	0.01	-	-
Dpi 3	81.43 ± 7.31	73.08 ± 3.45	0.01	-	-
Dpi 4	82.98 ± 8.42	73.71 ± 4.89	0.01	-	-
Dpi 5	79.81 ± 6.01	74.12 ± 4.97	0.02	-	-
Means	81.58 ± 2.67	73.08 ± 2.16	0.01	0.64	0.77

[†]AB = colistin 250 mg/kg and amoxyciline 500 mg/kg.

[‡]The value is present as mean ± SD.

不同黏蛋白 4 基因型離乳仔豬對灌注腸毒型大腸桿菌後 7 天血漿急性蛋白質濃度之影響，結果列於表 4。餵食空白料組較 AB 組飼料增加 F4R⁺ 離乳仔豬之血漿溶菌酶活性 ($P < 0.01$)，但對 F4R⁻ 離乳仔豬則沒有影響。F4R⁻ 和 F4R⁺ 離乳仔豬之血漿血紅素結合蛋白濃度不受飼料處理影響 ($P > 0.05$)，其中空白料組與 AB 組在 F4R⁻ 離乳仔豬其值分別為 2.31 和 4.66 mg/mL，而在 F4R⁺ 離乳仔豬其值則分別為 2.07 和 1.84 mg/mL。

表 4 不同黏蛋白 4 基因型離乳仔豬對灌注腸毒型大腸桿菌後 7 天血漿急性蛋白質濃度之影響

Table 4 Effects of various mucin 4 genotype on the plasma acute phase proteins of weaned pigs after challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* on dpi 7

Genotype	Treatment		P-value
	Control	AB [†]	
F4R ⁻			
Lysozyme (U/mL)	1.70 ± 0.41 [‡]	1.28 ± 1.08	0.62
Haptoglobin (mg/mL)	2.31 ± 0.20	4.66 ± 3.26	0.88
F4R ⁺			
Lysozyme (U/mL)	8.13 ± 5.61	3.42 ± 2.10	0.01
Haptoglobin (mg/mL)	2.07 ± 0.89	1.84 ± 0.71	0.31

[†]AB = colistin 250 mg/kg and amoxyciline 500 mg/kg.

[‡]The value is present as mean ± SD.

不同黏蛋白 4 基因型離乳仔豬對灌注腸毒型大腸桿菌後 14 天血漿免疫球蛋白特異型 F4 抗體力價之影響，結果列於表 5。離乳仔豬經灌注 ETEC 後 14 天不論對 F4R⁻ 和 F4R⁺ 離乳仔豬均可誘發產生血漿免疫球蛋白特異型 F4 抗體力價反應，其中 F4R⁺ 離乳仔豬餵食空白料組較 AB 組飼料增加血漿 IgA 特異型 ($P < 0.05$)，而 F4R⁻ 離乳仔豬則提高 IgG 特異型 ($P < 0.01$)。離乳仔豬血漿 IgM 特異型 F4 抗體力價，不論其為 F4R⁺ 或 F4R⁻ 離乳仔豬均不受飼料處理影響 ($P > 0.05$)。

表 5 不同黏蛋白 4 基因型離乳仔豬對灌注腸毒型大腸桿菌後 14 天血漿免疫球蛋白特異型 F4 抗體力價之影響

Table 5 Effects of various mucin 4 genotype on the plasma F4-specific antibody titer of weaned pigs after challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* on dpi 14

Genotype	Treatment		P-value
	Control	AB [†]	
F4R ⁻			
F4-specific IgA (log ₂ titer)	5.32 ± 2.83 [‡]	4.16 ± 1.19	0.67
F4-specific IgG (log ₂ titer)	7.32 ± 0	6.82 ± 0.95	0.01
F4-specific IgM (log ₂ titer)	6.66 ± 2.12	4.16 ± 1.19	0.51
F4R ⁺			
F4-specific IgA (log ₂ titer)	5.60 ± 2.58	3.74 ± 1.60	0.04
F4-specific IgG (log ₂ titer)	5.82 ± 2.22	5.63 ± 1.84	0.55
F4-specific IgM (log ₂ titer)	5.22 ± 1.27	4.44 ± 1.09	0.12

[†]AB= colistin 250 mg/kg and amoxyciline 500 mg/kg.

[‡]The value is present as mean ± SD.

討 論

一、日增重及存活率

試驗所選用作為灌注用之 ETEC，分別造成 F4R⁺ 基因型仔豬餵飼空白料組與 AB 組 29% 與 7% 之死亡率，同時 AB 組在 dpi 0 - 14 之日增重高於空白料組（615 g vs. 528 g），顯示帶有 F4R⁺ 基因型離乳仔豬日增重與存活率均受到 ETEC 灌注的影響。先前報告瞭解帶有莢膜 F4 抗原株之 ETEC 菌種較 K99、F41 或 P897 抗原株之毒性強，當灌注仔豬消化道容易導致生長速度變慢（Cox and Houvenaghel, 1993）。本研究發現 F4R⁻ 豬隻在空白料組未有豬隻死亡，但其 dpi 0 - 14 之日增重仍較 AB 組降低 43%。而國內利用檢定站之公豬資料證實，在未刻意進行任何攻毒情況下，*MUC4* 基因型種類並不影響藍瑞斯、約克夏或杜洛克於檢定期間之生長性能（游等, 2011）。

二、糞便生理

灌注 ETEC 對離乳仔豬糞便水分與 ETEC 數目產生劇烈變化，其中飼料處理之差異在 F4R⁺ 豬隻較 F4R⁻ 豬隻差異加大，可能因絨毛上受體對 ETEC-F4ac 吸附性不一樣所致（Jensen et al., 2006）。先前已有報告證實豬隻小腸對 ETEC-F4ac 之反應，可區分成不吸附和吸附二類型（van den Broeck et al., 1999），在 Jørgensen et al.（2004）文獻發現 *MUC4* 基因型與小腸絨毛對 ETEC-F4ab/ac 之吸附性有關，其中 F4R⁺ 和 F4R⁻ 基因型均會與 ETEC 之纖毛結合，在灌注 ETEC 後有 74% 仔豬下痢，但在 F4R⁻ 豬隻則僅有 20% 出現半水樣性下痢。

本研究使用糞便含水量以取代一般以眼睛評級下痢等級之作法，因以眼睛評估於實際應用上甚為耗時，且亦受主觀意相影響，但二者間之密切關聯，即糞便水分量提高即代表趨向下痢發展。一般仔豬糞便正常含水量約為 70 - 75%，但灌注 ETEC-F4ac 後會增加，而 AB 組可減低糞便含水量及 ETEC 排毒量，主要因為 AB 組之抗生素種類為克利斯汀 250 mg/kg 和安莫西林 500 mg/kg，二者對於大腸桿菌均有殺菌功能，達到降低 ETEC 攻毒後對仔豬之影響（Stuyven et al., 2009）。可由以上結果發現 F4R⁺ 型與 F4R⁻ 離乳仔豬餵飼含 AB 飼料對 ETEC 灌注後，具有減低仔豬糞便水分含量與 ETEC 數目的效果，另外帶有 F4R⁻ 基因型離乳仔豬經灌注 ETEC 後之糞便水分含量，大部分在 70-75% 正常範圍值內，對飼料添加 AB 之差異較小，而此等 F4R⁻ 基因型對灌注 ETEC 之反應類型可供作開發豬隻飼料添加物參考。

三、發炎反應

ETEC 誘發豬隻產生抗體反應過程相當複雜，豬隻腸道細胞首先與 ETEC 之纖毛結合後，藉由腸道固有細胞層內之免疫細胞和腸道黏膜系統之濾泡相關腸細胞（follicle-associated enterocyte）進行胞飲和穿膜作用，方能引發抗原呈現細胞活化與其後續之局部性與全身性免疫反應（Snoeck et al., 2008）。血漿溶菌酶係由全身或腸道組織之嗜中性球和巨噬細胞所分泌，對革藍氏陽性菌具有強烈殺菌作用。當灌注 ETEC 後，首先會活化小腸組織之免疫細胞，因提高血漿溶菌酶活性代表腸道組織之局部性組織免疫活化，而血漿血紅素結合蛋白主要由肝臟細胞產生，然後再循環至血液中，故血漿溶菌酶和血紅素結合蛋白二者所代表之意義不同，主要作為局部性組織和肝臟之活化差異（Tizard, 2009）。F4R⁺ 豬隻之血漿溶菌酶濃度於 AB 組飼料較空白料組降低，但是 F4R⁺ 離乳豬隻之血漿血紅素結合蛋白濃度，在空白料組和 AB 組豬隻之濃度差異不顯著，顯示添加 AB 讓灌注 ETEC 後帶有 F4R⁺ 基因型離乳豬降低腸道組織之發炎程度。

血漿 F4 特異型免疫球蛋白濃度代表離乳仔豬針對 ETEC 所產生特異型之體液免疫反應，其反應值在不同 F4R 基因型豬隻差異應會甚大，如 Verdonck et al. (2002) 文獻指出，F4R⁺ 豬隻經灌注 ETEC-F4 後 dpi 7 可提高血清 IgG 和 IgA 特異型 F4 抗體力價，而至 dpi 21 - 25 達到最高峰；而血清 IgM 特異型 F4 抗體力價在 dpi 7 即達最高，然後下降；而腸道 IgA 特異型 F4 抗體力價，最早於 dpi 4 即可於空腸出現，而於 dpi 7 起即可布滿全部腸道。但本試驗結果顯示 F4R⁻ 豬隻仍像 F4R⁺ 豬隻具有相似之 F4 抗體力價，其結果不似理論上 F4R⁻ 豬隻應減低對 ETEC 之反應程度，確實原因並不清楚，而本研究之觀測動物頭數僅有 2 頭，數目嚴重不足而容易影響此測定項目結果之判讀。F4R⁺ 豬隻餵食空白料組飼料增加血漿 IgA 特異型 F4 抗體力價與文獻灌注 ETEC 反應結果相似，而血漿 IgM 特異型 F4 抗體力價偏低，推測可能 dpi 14 已過了反應最高峰天數，而致飼料處理間未達顯著差異。雖然 F4R⁻ 豬隻較 F4R⁺ 豬隻對 ETEC 感受力低，但仍可發現 F4R⁻ 豬隻餵食空白料組較 AB 組飼料增加豬隻血漿 IgG 特異型 F4 抗體力價。考量 F4R⁺ 基因型仍包含 SR 和 SS 二種基因型，雖然此類豬隻與 ETEC-F4ab/ac 之免疫反應變化相似，而被歸納為同一類型，但在特定之反應項目上仍有差異 (Sugiharto et al., 2012)，其情況就如同在 F4R⁺ 豬隻中仍可發現部分具有吸附 ETEC-F4ac 之特性，且可再細分成會產生或不產生抗體反應之不同表現型 (Nguyen et al., 2013)。或許除了本研究所要探討之 *MUC4* 基因外，尚有其他受體亦可能與 ETEC-F4 纖毛產生免疫活化作用，報告所提出之候選基因包括腸黏蛋白 - 唾液糖蛋白 (intestinal mucin-type sialoglycoproteins, IMTGPS) (Francis et al., 1998)、胺肽酶 N (aminopeptidase N) 基因型均能控制腸細胞胞飲作用和穿膜作用而能誘發黏膜免疫反應 (Melkebeek et al., 2012)。由前述結果與推論，離乳仔豬感染 ETEC 對發炎反應之機制相當複雜，除了受 *MUC4* 基因型影響外，應尚有許多遺傳基因型具有與 ETEC 之亞型產生交互影響之可能，值得進一步探討。

結 論

離乳仔豬 *MUC4* 基因型會影響 ETEC 感染後之發炎反應，若屬於 F4R⁺ 基因型離乳仔豬，可在離乳後之飼料中添加抗生素以減低此病原菌之危害，而屬於 F4R⁻ 基因型離乳仔豬發炎程度較輕微，但仍需藉由更多的動物試驗加以驗證。

誌 謝

本研究承蒙國科會 99-2324-B-197-005-MY2 和農委會 102 農科 -2.1.1- 牧 -U1 補助經費，經中興大學黃三元博士修改文稿，特此致謝。

參考文獻

- 林信宏、邱慧英、張文發、葉光勝、蔡清恩、翁仲男、廖朝暉。2003。豬 F18 (+) -VT 腸毒性大腸桿菌本省分離株之特性。臺灣獸醫誌 29：136-145。
- 游永佳、彭麟量、黃三元。2013。豬隻腸毒性大腸桿菌、沙門氏桿菌及病毒性疾病抗病力候選基因之探討。中畜會誌 42：87-96。
- 游永佳、李德南、黎漢龍、鄒會良、黃三元。2011。豬大腸桿菌 F4ab/ac 抗性基因多態性和生長性

- 能之關係。中畜會誌 40 : S80。
- 鍾文彬、徐興鎔、沈詠梅。1981。哺乳仔豬死亡原因之調查研究。臺糖畜研所研究試驗報告 69/70 年期：157-166。
- 臺灣養豬統計手冊。2012。畜產統計年報，中央畜產會，臺北市。
- AOAC. 1984. Official Method of Analysis, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Bosi, P., L. Casini, A. Finamore, C. Cremokolini, G. Merialdi, P. Trevisi, F. Nobili, and E. Mengheri. 2004. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J. Anim. Sci.* 82:1764-1772.
- Cahill, E. E., and P. J. Glantz. 1978. Demonstration of K88ac and K88ab antigens of *Escherichia coli* by means of immunoelectrophoresis and immunodiffusion. *Infect. Immun.* 20:811-815.
- Cox, E., and A. Houvenaghel. 1993. Comparison of the in vitro adhesion of F4, K99, F41 and P987 positive *Escherichia coli* to intestinal villi of 4- to 5-week-old pigs. *Vet. Microbiol.* 34:7-18.
- Dritz, S. S., J. Shi, T. L. Kielian, R. D. Goodband, J. L. Nelssen, M. D. Tokach, M. M. Chengappa, J. E. Smith, and F. Blecha. 1995. Influence of dietary β -glucan on growth performance, nonspecific immunity, and resistance to *streptococcus suis* infection in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 73:3341-3350.
- Dubreuil, J. D. 2012. The wholeShebang: the gastrointestinal tract, *Escherichia coli* enterotoxins and secretion. *Curr. Issues Mol. Biol.* 14:71-82.
- Erickson, A. K., D. R. Baker, B. T. Bosworth, T. A. Casey, D. A. Benfield, and D. H. Francis. 1994. Characterization of porcine intestinal receptors for the K88ac fimbrial adhesin of *Escherichia coli* as mucin-type sialoglycoproteins. *Infect. Immun.* 62:5404-5410.
- Fairbrother, J. M., É. Nadeau, and C. L. Gyles. 2007. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 6:17-39.
- Francis, D. H., P. A. Grange, D. H. Zeman, D. R. Baker, R. Sun, and A. K. Erickson. 1998. Expression of mucin-type glycoprotein F4 receptors strongly correlates with piglet susceptibility to F4⁺ enterotoxigenic *Escherichia coli*, but adhesion of this bacterium to brush borders does not. *Infect. Immun.* 66:4050-4055.
- Franklin, M. A., D. H. Francis, D. Baker, and A. G. Mathew. 1996. A PCR-based method of detection and differentiation of K88⁺ adhesive *Escherichia coli*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8:460-463.
- Jensen, G. M., K. Frydendahl, O. Svendsen, C. B. Jorgensen, S. Cirera, M. Fredholm, J. P. Nielsen, and K. Moller. 2006. Experimental infection with *Escherichia coli* O149: F4ac in weaned piglets. *Vet. Microbiol.* 115:143-249.
- Jørgensen, C. B., S. Cirera, A. L. Archibald, L. Anderson, M. Fredholm, and I. Edfors-Lilja. 2004. Porcine polymorphisms and methods for detecting them. International application published under the patent cooperation treaty (PCT). PCT/DK2003/000807 or WO2004/048606-A2.
- Masuda, T., Y. Ueno, and N. Kitabatake. 2001. Sweetness and enzymatic activity of lysozyme. *J. Agri. Food Chem.* 49:4937-4941.
- Melkebeek, V., K. Rasschaert, P. Bellot, K. Tilleman, H. Favoreel, D. Deforce, B. G. De Geest, B. M.

- Goddeeris, and E. Cox. 2012. Targeting aminopeptidase N, a newly identified receptor for F4ac fimbriae, enhances the intestinal mucosal immune response. *Mucosal Immunol.* 5:635-645.
- Nagy, B., and P. Z. Fekete. 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 30:259-284.
- Nguyen, V. U., T. Goetstouwers, A. Coddens, M. Van Poucke, L. Peelman, D. Deforce, V. Melkebeek, and E. Cox. 2013. Differentiation of F4 receptor profiles in pigs based on their mucin 4 polymorphism, responsiveness to oral F4 immunization and in vitro binding of F4 to villi. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152:93-100.
- NRC. 1998. *Nutrient Requirements of Pig*. 10th Ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Rasschaert, K., F. Verdonck, B. M. Goddeeris, L. Duchateau, and E. Cox. 2007. Screening of pigs resistant to F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection. *Vet. Microbiol.* 123:249-253.
- SAS Institute. 2002. *Sas/stat user's guide, version 9*. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Snoeck, V., W. Van den Broeck, V. De Colvenaer, F. Verdonck, B. Goddeeris, and E. Cox. 2008. Transcytosis of F4 fimbriae by villous and dome epithelia in F4-receptor positive pigs supports importance of receptor-dependent endocytosis in oral immunization strategies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124:29-40.
- Stuyven, E., E. Cox, S. Vancaeneghem, S. Arnouts, P. Deprez, and B. M. Goddeeris. 2009. Effect of β -glucans on an ETEC infection in piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128:60-66.
- Sugiharto, S., M. S. Hedemann, B. B. Jensen, and C. Lauridsen. 2012. Diarrhea-like condition and intestinal mucosal responses in susceptible homozygous and heterozygous F4R⁺ pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Anim. Sci.* 90:281-283.
- Tizard, I. R. 2009. *Veterinary Immunology: An Instruction*, 8th ed. Saunders Elsevier, st. Louis, MO, USA.
- van den Broeck, W., E. Cox, and B. M. Goddeeris. 1999. Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 fimbriae. *Infect. Immun.* 67:520-526.
- van der Stede, Y., E. Cox, and B. M. Goddeeris. 2002. Antigen dose modulates the immunoglobulin isotype responses of pigs against intramuscularly administrated F4-fimbriae. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88:209-215.
- Verdonck, F., E. Cox, K. van Gog, Y. van der Stede, L. Duchateau, P. Deprez, and B. M. Goddeeris. 2002. Different kinetic of antibody responses following infection of newly weaned pigs with an F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* strain or an F18 verotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Vaccine* 20:2995-3004.
- Willemsen, P. T., and F. K. de Graaf. 1992. Age and serotype dependent binding of K88 fimbriae to porcine intestinal receptors. *Microb. Pathog.* 12:367-375.

Effects of various mucin 4 genotype on growth and inflammatory responses in weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*

Jia-Hao Zhou⁽¹⁾ Hui-Chen Hsu⁽¹⁾ Tien-Shuh Yang⁽²⁾ and Der-Nan Lee⁽¹⁾⁽³⁾

ABSTRACT

Piglets are vulnerable to *Escherichia coli* infection due to a combined effect of malabsorption, weaning stresses, in addition to a poorer sanitary condition compared to that of nursing. The vulnerability is complex and varies particularly noticeable during the early post-weaning period, and *MUC4* genotype difference, known to be responsible for intestinal secretion of mucin may play a certain role. This study was designed to understand the relationship between different *MUC4* genotype on growth and inflammatory responses in weaned pigs after enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) challenge under feeding a diet with or without antibiotics (AB) supplementation. A total of 32 crossbred post-weaning pigs were randomly allotted into dietary treatments of control and AB supplemented diet formulated on a corn-soybean meal base. All pigs were challenged with 5×10^{10} cfu ETEC-F4ac on day 12 post weaning, and afterwards weighed every 7 days, while feces were collected on day post infection (dpi) 1 - 5, and blood sampled on dpi 7 and 14 for analysis of the inflammatory responses. The pigs were distinguished to be resistant (F4R⁻) and susceptible (F4R⁺) genotype by PCR-RFLP. The results showed that there were 2 F4R⁻ pigs and 14 F4R⁺ pigs in both of control and AB group. The survival rate of F4R⁻ pigs was 100% in control and AB group, for F4R⁺ pigs, it was 71% and 93%, respectively ($P = 0.14$). The ADG was 14.15% less (528 vs. 615 g/day, $P = 0.09$) in control when compared to that of AB group in F4R⁺ pigs from dpi 0 - 14; it was 43.18% lower (325 vs. 572 g/day, $P > 0.05$) in the case of F4R⁻ pigs. Furthermore, the fecal ETEC shedding count during dpi 2 - 3 and dpi 1 - 5 was significantly ($P < 0.05$) higher in control than that of AB in F4R⁻ and F4R⁺ pigs, respectively. Higher fecal moisture content ($P < 0.05$) was observed in F4R⁺ pigs. Plasma lysozyme activity on dpi 7 of F4R⁺ pigs was higher in control than that of AB group in F4R⁺ pigs but not in F4R⁻ pigs. Plasma F4- specific IgA titer on dpi 14 after ETEC challenged was also elevated in F4R⁺ of control while F4R⁻ pigs only increased their plasma F4-specific IgG titer. In evidence, the diet supplemented with AB could alleviate inflammatory responses of ETEC challenged in F4R⁺ pigs than that of F4R⁻ pigs.

(Key Words: Antibiotics, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Genotype, Weaned pigs)

⁽¹⁾Department of Biotechnology and Animal Science, National Ilan University, No. 1, Sec. 1, Shenlung Rd., Ilan 26047, Taiwan.

⁽²⁾Animal Technology Institute Taiwan, No. 52, Kedong 2nd Road, Zhunan Township, Miaoli 35053, Taiwan.

⁽³⁾Corresponding author, E-mail: dnlee@niu.edu.tw