

# 被动免疫接种鸡蛋抗体防治人类和动物疾病研究现状和前景

邹新玉 译

利用口服特异性抗体,在人类和动物中建立其对各种病原体的被动免疫,已引起生物医药学界的极大关注。已知每一个鸡蛋的蛋黄含有 100 mg 以上的免疫球蛋白 Y(IgY),同时,与来自哺乳动物血清的抗体比较,来自鸡蛋的抗体是一种更卫生和更经济的抗体来源。最近,IgY 作为哺乳动物抗体的替代物,特别是在防治各种细菌和病毒时的口服被动免疫接种。已证实,应用 IgY 可成功地治疗各种胃肠道(GI)病原体,诸如牛和人轮状病毒、牛冠状病毒、红色耶尔森菌、肠毒原性大肠杆菌、沙门菌、爱德华菌、葡萄球菌和假单胞菌的感染。最近利用杂交瘤技术生产单克隆 IgY 的进展,也为 IgY 的普遍应用增加了诸多的优越性。IgY 技术可以对今后人类和动物传染性胃肠道疾病的预防和治疗方法的设计提供巨大的机遇。

免疫球蛋白或抗体,乃是免疫系统产生的大分子,高等生物可利用免疫球蛋白来防御外来物质的侵犯。在动物和人类两者中,特异性抗体的利用是建立防御病毒和细菌病原体的保护性免疫的很有吸引力的途径。由于对抗生素具有抗药性,或对传统的抗生素治疗肆无忌惮的微生物越来越多,迫使生物医药界亟需寻求一种可替代抗生素的疾病防治途径,从而推动有关特异性抗体的研究。此外,还有一些个体,包括罹患先天性或后天获得性免疫缺陷综合症的婴儿和儿童,不能对病原体产生主动免疫反应,以及一些个体由于化疗、营养不良或衰老而存在免疫缺陷,这些个体也都将因有效的被动免疫接种技术而深受裨益。

被动免疫接种可能是最有价值的抗体利用技术之一。这种接种是指将事先制备的病原体特异抗体,经口给予个体,从而达到预防,以及在某些例子中的治疗传染病的目的。认为抗体可通过对病原体的结合和制动,从而减缓和抑制病原体的生长、增殖或集落形成能力。

在传统医学中,迄今一直利用哺乳动物诸如小鼠、大鼠、兔和山羊生产多克隆抗体,并且从动物的血清中采收这些抗体。然而,由于从动物体中一次性采收的血液的数量是有限的,所以不能利用这种方法,以工业规模制备被动免疫接种技术所需要的抗体。近年来,利用鸡作为制备用于传染病的预防和治疗所需要的抗体的另一种来源,已获得生物医学界的密切关注。曾发现,将鸡的血清免疫球蛋白即 IgY,大量转移于蛋黄,可赋予发育中的鸡胚以获得性免疫,这样就可以很容易地从蛋黄提取出免疫球蛋白。

利用鸡蛋不仅可以大规模生产 IgY,而且鸡蛋也是人类的正常食物之一,这就使 IgY 可理想地用于被动免疫。利用蛋黄抗体作为食品强化剂,或以其生产保健食品,有可能缓解人类和动物病原体感染引起的患病率和病死率。

对 IgY 的结构和物理特征,IgY 的众多优点和免疫治疗应用,以及 IgY 的研究前景进行论述。

## 1 鸡蛋抗体

### 1.1 鸡的免疫系统

鸡的免疫球蛋白的产生,明显不同于哺乳动物。在哺乳动物体内,免疫球蛋白基因的重排是一个不断发展的过程,但在鸡体内,这种基因重排则是胚胎发生中的单一的阵发性事件,其抗体的可能数量局限于 B 细胞前体的数量,估计为  $2 \sim 3 \times 10^4$  个细胞。与哺乳动物系统相反,基因重排对鸡的抗体多样性也几乎不产生什么影响。然而,与哺乳动物比较,事实上鸡仅拥有极端有限数量的免疫球蛋白基因,但它们仍然可以通过其他方法,产生广谱的免疫反应和多种多样的抗体分子,从而使其可用于特异抗体的生产。

迄今,已证明在鸡体内存在 3 大类免疫球蛋白,即 IgA, IgM 和 IgY。IgA 和 IgM 雷同于哺乳动物的 IgA 和 IgM。鸡 IgY 是 IgG 的功能等当物,后者是哺

乳动物体内存在的主要血清抗体,在总抗体群中占有 75% 的份额。据报道,IgY、IgA 和 IgM 的血清浓度,分别为 5.0、1.25 和 0.61 mg/ml。在哺乳动物中,母体的抗体可在胎儿出生后发生转移。但在鸡中,其母体的抗体则必须转移至发育中的胚胎,才能赋予雏鸡以获得性免疫。在鸡体,抗体(明确地说是 IgA 和 IgM)是在鸡蛋形成时参入蛋白的。血清 IgY 可通过 IgY 转移特异的蛋黄膜表面的受体,选择性地转移至蛋黄。最近 Morrison 等(2002)在 IgY 分子内鉴定出一些区域,这些区域对于 IgY 分子进入蛋黄,从而完成特异的转位,具有重要的意义。蛋白含有浓度分别为 0.15 和 0.7 mg/ml 的 IgA 和 IgM,而蛋黄则可能含有浓度高达 25% mg/ml 的 IgY。但迄今尚未在鸡中鉴定出哺乳动物的 IgE 和 IgD 等当物。

## 2 IgY 的分子特征

### 2.1 IgY 的结构

IgY 的结构显著不同于哺乳动物的 IgG,虽然两者具有类似的功能。IgY 含有两条重(H)链和两条轻(L)链,其分子量为 180 kD,超过哺乳动物的 IgG (159 kD)。IgY 的 H 链的分子量(68 kD)也超过哺乳动物的 H 链(50 kD)。IgG 的 H 链包含 4 个域,即一个可变域(Vh)和三个恒定域(C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2 和 C $\gamma$ 3)。C $\gamma$ 1 域通过一铰链区而与 C $\gamma$ 2 域分隔。这使得抗原结合(Fab)片段(具有抗原结合活性的部分)具有相当大的灵活度或屈曲度。反之,IgY 的 H 链不具有铰链区,但除具有可变域外,还具有 4 个恒定域(C $\nu$ 1 ~ C $\nu$ 4)(图 1 略)。IgG 和 IgY 间的序列比较证明,C $\gamma$ 2 和 C $\gamma$ 3 域是分别与 IgY 的 C $\nu$ 3 和 C $\nu$ 4 域密切相关的。但另一方面,IgG 链中缺少 C $\nu$ 2 域的等当物,取而代之的是铰链区。据报道,IgY 的恒定域中的  $\beta$  折叠结构含量逊于 IgG,同时,相应于 IgG 的铰链区的 C $\nu$ 1 与 C $\nu$ 2 域之间的灵活度或屈曲度则逊与 IgG。与 IgG 不同,IgY 的 C $\nu$ 2-C $\nu$ 3 连接处具有两个附加的 Cys 残基即 Cys331 和 Cys338,这些残基有可能参与  $\nu$  链间的二硫键连。

已知 IgG 和 IgY 两者都含有 Asn 连接的寡糖,但 IgY 中的寡糖的结构不同于任何哺乳动物 IgG,后者含有具有 GiC1Man7-9G1cNAc2 结构的不常见的单葡萄糖基寡甘露糖型寡糖。

此外,IgY 的等电点低于 IgG。同时,有人提出,IgY 是一种疏水性超过 IgG 的分子。还证明,它不具有沉淀多价抗原的能力,除非存在高盐浓度,这可能是紧密排列的 Fab 臂所引起的空间位阻所致。高盐浓度有可能松弛 Fab 臂,从而产生了沉淀作用。

### 2.2 IgY 的物理化学特性

IgY 和 IgG 对于 pH、热和蛋白水解具有不同的稳定性。虽然这两种免疫球蛋白在碱性条件下的稳定性是相似的,但 IgY 对于加酸变性的稳定性却要比兔的 IgG 低得多。志水等发现,将 IgY 在  $\leq$  pH3.5 的条件下温育,可减低其活性,pH3 时其活性甚至可完全丧失。另一方面,当 pH 一直下降至 2 时,兔的 IgG 抗体仍未见活性丧失,甚至在这样的条件下,仍可继续保持其活性。八田等曾经报道了口服抗人轮状病毒 IgY 的被动免疫效应及其抗蛋白水解酶行为,在此项研究中也观察到类似的结果。认为 IgY 对于热的敏感性也显著高与兔的 IgG。志水等发现, $\geq$ 70 $^{\circ}$ C 下加热 15 min,可降低 IgY 的活性,但 IgG 则要在达到 75 ~ 80 $^{\circ}$ C 后,才能降低其活性。不过,志水等也发现,将糖加入 IgY 溶液,可增加其稳定性,即可使 IgY 在高温(75 ~ 80 $^{\circ}$ C)、低 pH 或高压(5 000 kg/ $\text{CM}^2$ )下仍可保持其活性。此外,男谷等发现,IgY 对于蛋白水解酶包括胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶消化的易感性超过 IgG,这将在下文中详细讨论。

由于免疫球蛋白乃是大型的复杂的分子,所以目前还不了解可导致上述两种免疫球蛋白的稳定性差异的结构特征。志水等曾经预测,IgY 的  $\beta$  结构含量较低,有可能证明,与哺乳动物的 IgG 比较,IgY 的构型更为无序,因而更不稳定。IgY 中缺少铰链区可能是影响其分子稳定性的另一个因素。鉴于铰链区的灵活度或屈曲度可影响免疫球蛋白分子的总的特性,所以,与 IgG 的铰链区比较,IgY 的 C $\nu$ 1 和 C $\nu$ 2 域的低灵活度或屈曲度,有可能由于各种处理而使抗体快速失活。

### 2.3 IgY 的优点

与利用哺乳动物生产抗体的传统方法比较,利用鸡生产多克隆抗体具有诸多的优点。例如,与哺乳动物血清比较,蛋黄仅含有单一种类的抗体即 IgY,同时利用简单的沉淀技术,就可以简易地从蛋

黄中提纯出这种抗体。由于鸡与哺乳动物之间存在种族发生的鸿沟,这就使得鸡有可能产生针对高度保守的哺乳动物蛋白质的抗体。Knecht 等(1996)曾比较了利用兔和鸡两者生产抗人二氢乳清酸脱氢酶的抗体,指出哺乳动物是不可能产生针对保守的哺乳动物蛋白质的抗体的。与哺乳动物系统比较,在鸡中产生有效的免疫反应所需要的抗原要少得多。与哺乳动物的抗体比较,鸡的抗体还可以识别不同的表位(抗原决定簇),从而提供了不同于哺乳动物抗体的抗体谱。利用母鸡生产抗体,只需要采集鸡蛋,而不需要采血,因而不会伤害动物。此外,还可以由于能在鸡中保持高度的效价,从而不需要经常注射。与哺乳动物诸如兔比较,利用鸡还可以降低饲养成本。所以,与从哺乳动物血清获取抗体的传统方法比较,母鸡可提供卫生状况更好、成本效益更高、更为方便和更为丰富的抗体来源。

在安全方面,鉴于鸡蛋是一种正常的食物,因而 IgY 的服用是不存在产生副作用的风险的。与 IgG 不同,IgY 不会激活哺乳动物的补体,或可与胃肠道中介导炎症反应的哺乳动物结晶片段(Fc)受体相互作用。此外,虽然犊牛和仔猪口服上述抗体后,可在其血清中检出低浓度水平的 IgY,但在人体中却未出现完整抗体的吸收,因此可以预期,对纯化的 IgY 制剂产生变态反应的风险是很小的。

中伊等曾经预测,根据每一只动物产生的抗体质量,母鸡的抗体产量可相当于兔的抗体产量的约 18 倍。由此可见,利用母鸡来生产抗体,可减少用于生产抗体的动物的数量。由于蛋黄中的 IgY 浓度甚高,因此从一个鸡蛋中可获得 100 mg 以上的 IgY。鉴于一只产蛋母鸡每个月可产约 20 个鸡蛋,所以每月从一只母鸡可获得 2 g 以上的 IgY。IgY 在鸡蛋中可保持若干个月的稳定性,经过提纯后还可在冷藏下保存若干年。由于鸡群在经过防止传染病的免疫接种后,可以大规模饲养,以及可以自动化采蛋和分离,所以利用鸡蛋来大规模生产和采收用于疾病治疗的抗体是完全切实可行的。

### 3 IgY 被动免疫接种

#### 3.1 IgY 的免疫治疗应用

迄今,抗生素一直被广泛用于治疗感染。然而由于免疫抑制个体日益增多,新的病原体包括对抗

生素无应答反应的病原体诸如病毒的出现,以及微生物对抗微生物药物的抗药性的不断增强,从而使这种治疗方法目前正在遭受威胁。这一情况促使生物医学界,在利用特异抗体来替代抗生素和抗微生物化疗,作为另一种治疗感染的途径方面,进行了大量的研究。已知道被动免疫的应用具有常规疫苗所欠缺的诸多优点,包括可提供及时的防护作用,可调控的活性保持时间,以及靶标微生物的选择性。已经详尽地研究了 IgY 在预防和治疗病原细菌和病毒引起的传染病上的可能的应用(表 2 略)。

3.1.1 轮状病毒 人轮状病毒(HRV)已被鉴定为急性婴儿胃肠炎的主要病原体,其对 3 岁以下幼儿的感染率高达 90%,每年因感染 HRV 而引起死亡的幼儿人数超过 100 万。HRV 可特征性栖居于胃肠道的上皮细胞,使小肠的绒毛变短和萎缩,从而导致患者肠道的吸水量减少,引起严重腹泻和呕吐,最后死于脱水。Yolken 等发现,口服从 3 种不同的轮状病毒亚型(小鼠,人和猴)免疫鸡所产的蛋分离出来的抗体,可以预防感染鼠轮状病毒的小鼠因轮状病毒而引起的腹泻,但口服从未免疫鸡所产的蛋分离出来的 IgY 则不能防御轮状病毒感染。据八田等的报道,利用哺乳小鼠的 HRV 感染模型证明,在 HRV 攻击前后,给予小鼠以可抗 HRV 的 IgY,可降低轮状病毒在小鼠诱发的腹泻的发病率。这提示,抗 HRV 的 IgY 可用于疾病的治疗和预防。与此相似,海老名(1996)也观察到,利用可抗 HRV 的 IgY,可以预防小鼠因 HRV 而诱发的症状。最近,已有人生产了可对抗轮状病毒蛋白 VP4 的裂解物重组 HRV 外壳蛋白 VP8\*。据悉,VP4 可参与数种重要功能包括细胞附着和穿透,血凝反应和毒力。已发现 VP8 可在病毒感染和病毒中和中发挥重要作用。单独利用 VP8 即可导致可中和病毒的高度特异的抗体的产生。Kovacs-Noan 等在利用重组 VP8\* 免疫鸡的试验中发现,由此产生的抗 VP8\* IgY,可在离体条件下显示出对 HRV 的 Wa 株系的强烈的中和活性。这说明,抗 VP8\* IgY 可用于 HRV 感染的预防和治疗。

牛轮状病毒(BRV)引起的新生犊牛腹泻是一种常见的疾病,也是导致牛死亡的重要原因。也已经证明,利用抗 BRV IgY,可以在犊牛进行防止 BRV

感染的被动性防护。

鉴此,利用抗 HRV IgY,有可能显著降低 HRV 感染引起的发病率和病死率。

3.1.2 冠状病毒 与 BRV 相似,牛冠状病毒(BCR)也是新生犊牛腹泻和成年牛急性腹泻的主要原因。但由于 BCV 可在小肠和大肠两者中增殖,故其严重性超过 BRV。池森等检测了蛋黄和初乳中的抗 BCV 抗体,对于犊牛遭受 BCV 攻击时的保护效应。他们发现,没有接受抗体的对照犊牛,在遭受感染后,可发生严重腹泻,并在 6 d 内全部病死,然而喂以含有蛋黄的乳汁或初乳的犊牛,则可全部存活并增重。这些结果证实,口服蛋黄或初乳抗体,可以被动地保护犊牛免于遭受 BCV 感染,给予蛋黄抗体尤其可以提供高度的保护。由此认为,口服抗 BCV 抗体乃是可以替代现行的被动抗 BCV 感染方法的更为有效的抗 BCV 感染的途径。

3.1.3 大肠杆菌 肠毒原性大肠杆菌(*Escherichia coli*)(ETEC)引起的腹泻,可严重影响人类和家畜的健康。已知 ETEC 是发展中国家新生犊牛和仔猪,以及儿童和旅游者中发生的大肠杆菌病的最常见的病原体。据调查,每年有 10 亿人因 ETEC 感染而发生腹泻,其中的 100 万人因此病死。ETEC 由于可在猪中引起死亡和影响生长,以及使 1.5%~2.0% 的离乳猪病死,从而可使养猪业遭受巨大的经济损失。可在肠道栖居并引起严重腹泻的 ETEC 菌株是 K88、K99 和 987P,其菌毛黏附素可引起腹泻。鉴于已发现 IgY 可离体抑制大肠杆菌结合于肠黏膜,故认为 IgY 可用于预防 ETEC 感染。已证实,仔猪口服可抗 ETEC 抗原的 IgY,有可能预防和治疗 ETEC 诱发的腹泻。Marquardt 等发现,在利用大肠杆菌菌毛抗原,而不是其完整细胞时,IgY 的效价要高得多。Imberechts 等曾经培育了针对大肠杆菌 F18ac 菌毛的 IgY,同时在离体粘附试验中证明,IgY 可抑制 F18ac 阳性大肠杆菌附着与肠黏膜。还发现,抗 F18 抗体可减低感染 F18ac 阳性大肠杆菌的动物的腹泻发病率和死亡率。横山等研究了在新生仔猪中,IgY 的抗御 ETEC 感染的被动保护效应。已发现,在被动免疫试验中,口服 IgY 可以决定于剂量的方式,保护动物免于遭受三种大肠杆菌株系中的每一个株系的感染。他们还证实,虽然大肠杆菌

K88、K99 和 987P 菌株都可同样地黏附于猪十二指肠和回肠上皮细胞,但在同源抗菌毛 IgY 参与下,却都无法如此。在另一项动物喂饲试验中,用一种剂量的 ETEC( $10^{12}$  菌落形成单位)攻击 21 日龄猪。将 IgY 在乳中给予仔猪,每天 3 次,共 2 d。结果发现,对照猪在 12 h 内发生严重腹泻,并有 30% 的猪病死。反之,喂以 IgY 的猪,在治疗后 24 或 48 h 内,未出现腹泻病症。还有人研究了在新生犊牛中,抗 ETEC IgY 对于防御致命性大肠杆菌病的被动保护效应。表明喂饲含有 IgY 的乳液的犊牛,在研究过程中仅出现一过性腹泻,同时受试犊牛不仅 100% 存活,而且增重良好。O'Farrelly 等还报道了通过径口给予抗 ETEC IgY,以此将 IgY 用于预防兔的腹泻。鉴于已证实口服抗 ETEC IgY,可以成功地治疗动物的胃肠病,因此目前正在观察利用 IgY 的被动免疫接种,来预防和治疗婴儿的 ETEC 感染的临床效果。

3.1.4 沙门菌 沙门菌(*Salmonella* spp.)是引起食物中毒的元凶。据统计,美国每年有 200~400 万人罹患沙门菌病。沙门菌病的症状有发热,腹痛,头痛,不适,昏睡,皮疹,便秘和精神状态改变。老年人、婴儿和免疫功能衰退个体的症状尤为严重。在这些病例中,沙门菌感染有可能从肠道扩展至血流,并进而扩展至人体的其他部位,从而引起死亡。特别是肠炎沙门菌(*Salmonella enteritidis*, SE)和鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*, ST),这两种沙门菌业已成为人类食物中毒的罪魁祸首。沙门菌具有多种与其毒性有关的表面组分,包括外膜蛋白(OMP)。脂多糖(LPS),鞭毛(FLa)以及某些株系中的菌毛抗原。OMP 在病原检测中可发挥一定的作用,现已成功地应用于主动和被动免疫接种研究。也已证明,LPS 可引起强烈的免疫原反应,产生大量的 LPS 特异性 IgY,因而有可能用于抑制沙门菌黏附和疾病的预防。已检测了 GMP、LPS 或 F1a 特异的鸡 IgY,在控制小鼠实验性沙门菌病中的被动保护效果。在 SE( $2 \times 10^9$  集落形成单位)攻击的小鼠中,给予特异性 IgY,或在给予 OMP、LPS 或 F1a 特异的 IgY 时,可分别导致 80%、47% 和 60% 的存活率,但在对照小鼠中其存活率仅为 20%。在用 ST( $2 \times 10^9$ )攻击时给予 OMP、LPS 或 Fac 特异的 IgY,

存活率分别为 40%、30% 和 20%, 但对照组小鼠则无 1 例存活。Peralta 等描述了一种主要由 SE 和都柏林沙门菌(*S. dublin*) 株系产生的新的菌毛抗原 SEF14。表明用 SE 攻击小鼠后, 再用抗 SEF14 IgY 治疗, 可使小鼠的存活率达到 77.8%, 而喂以正常蛋黄 IgY 的对照组小鼠的存活率却只有 32%。最近, Lee 等描述了可抗 SE 和 ST 的 IgY 的生产, 并发现这些 IgY 可在离体条件下, 抑制 SE 和 ST 的生长。他们还发现, 这种 IgY 可结合表达于沙门菌表面的抗原, 从而导致细菌表面结构的改变。

犊牛中的沙门菌感染也是一个世界性的问题。据悉, 出生后 2 周的犊牛罹患的沙门菌病, 大多数是有 ST 和都柏林沙门菌引起的。已研究了感染 ST 或都柏林沙门菌的犊牛, 口服免疫接种可抗 ST 或都柏林沙门菌的 IgY(3 次/d, 连续 7~10 d) 后, 对 ST 和都柏林沙门菌的攻击性暴露的被动防御效果。表明, 全部对照犊牛均在 7~10 d 内死亡, 但经过使用低效剂量 IgY 治疗的犊牛病死率仅为 60%~70%, 用高效价剂量 IgY 治疗的犊牛仅出现发热和腹泻, 而无一例死亡。还发现 IgY 可在离体条件下抑制 SE 黏附于人肠细胞。这些研究结果证实, 沙门菌特异的 IgY 可以防治致命的沙门菌病, 因而有可能在沙门菌病爆发时应用于临床治疗。

**3.1.5 红色耶尔森菌** 已经研究了利用 IgY 对大麻哈鱼(红鲱, 鲑鱼)(*Oncorhynchus mykiss*), 因红色耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*) 感染的被动免疫。红色耶尔森菌是鲑鱼的一种肠道性红嘴病——系统性细菌败血症。长时期持续存在于带菌鱼体的红色耶尔森菌, 以及脱落于其粪便中的细菌, 成为其持续感染的来源。认为, 如果利用口服抗红色耶尔森菌抗体疗法, 就能大量消除带菌鱼类种群。这种方法有望成为可以替代单纯依靠杀灭威胁鱼群健康的带菌鱼类种群的一种有成本效益的有效方法。试验表明, 在利用红色耶尔森菌进行浸渍攻击前的 2 h, 喂以抗红色耶尔森菌 IgY 的红鲱鱼群, 与攻击前喂以正常饲料的鱼群比较, 其 8 d 后的死亡率较低。根据器官和肠道培养, 喂以 IgY 的鱼群, 其 8 d 后的染菌鱼数量较少。在此后的喂饲试验中, 也证明喂以 IgY 的鱼群, 其死亡率低于接受正常饲料的鱼群。表明, 无论是在攻击前还是在攻击后, 将 IgY 喂给鱼群, 喂

以 IgY 的鱼群中的肠道样品中含有红色耶尔森菌的鱼类数量, 看来总是低于喂以正常饲料的对照鱼群。鉴此认为, 在渔场中, 通过饲料经口给予可抗鱼类病原体的特异性 IgY, 将有望替代抗生素和化疗来预防鱼病。此外, 由于目前还没有一种药物可有效地防止鱼类的病毒感染, 因此经口喂给活性 IgY, 也将成为一种预防鱼类病毒的新方法。

**3.1.6 迟钝爱德华菌** 迟钝爱德华菌(*Edwardsiella tarda*) 是另一种通过肠黏膜传播的重要的鱼类病原体。日本鳎罹患的爱德华菌病业已对日本鳎类养殖业构成了严重的威胁。鉴已发现抗生素治疗可促进细菌抗药株系的生长, 所以利用蛋黄抗体来预防这种鳎类传染病, 已提上议事日程。试验时首先用迟钝爱德华菌( $10^5 \sim 10^6$  集落形成单位) 攻击鳎类, 然后经口给予可抗迟钝爱德华菌的抗体。结果发现, 染菌的鳎可在 15 d 内死亡, 而接受 IgY 的鳎类则可无任何迟钝爱德华菌感染症状, 而安全存活。这提示口服可抗迟钝爱德华菌的 IgY, 有可能成为防止鳎类遭受爱德华菌感染的有效方法。

**3.1.7 变异链球菌** 认为变异链球菌(*Streptococcus mutans*) 血清型 C, 乃是人类龋齿的主要病原细菌。变异链球菌引起的龋齿的分子发病机理, 包括了一系列的结合事件。这些事件最终导致大量的生龋细菌的积累, 从而引起龋齿。已制备了可抗变异链球菌 MT8148 血清型 C 的鸡抗体或细胞相关糖基转移酶, 并检测了其抗龋齿效果。已发现, 食用含有超过 2% IgY-蛋黄粉的生龋食物, 可导致很低的龋齿得分。也就是说, 这种含有抗体的食物可对变异链球菌在口腔中定居, 作出有效的被动防御。还有人报道说, 含有变异链球菌特异性 IgY 的口腔清洗剂, 可在离体和在体条件下, 有效地预防人齿出现齿斑。最近, Szmith 等制备了可抗变异链球菌的葡聚糖结合蛋白 B(GBS-B) 的 IgY。认为鉴于 GBS 可参与变异链球菌生物膜的形成, 因此, 可抗 GBS-B 的抗体, 看来有可能控制变异链球菌感染及其引发的疾病。Smith 等利用大鼠龋齿模型进行的研究表明, 与对照大鼠比较, 经过可抗 GBS-B 的 IgY 治疗的那些大鼠, 不仅变异链球菌积累量减少, 而且龋齿的总发生数也有所下降。这些研究证明, 可抗变异链球菌或起组分的 IgY, 有可能干扰变异链球菌的积累, 从而

控制齿斑的出现,以及此后因齿斑的积累而出现的口腔卫生问题。

**3.1.8 金黄色葡萄球菌** 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)可产生一个细菌抗原族。这些抗原可引起几种严重的疾病,包括食物中毒、细菌性关节炎和中毒性休克综合征。杉田-小西等发现,特异性 IgY 可以抑制金黄色葡萄球菌肠毒素-A 的离体产生。LeClaire 等最近报道了可抗金黄色葡萄球菌肠毒素-B(SEB)的特异性 IgY 的生产。他们发现,在利用 SEB 诱发的致死性休克的猕猴模型进行的研究中,若在 SEB 攻击前后,系统地给予这些抗体,就可以保护猕猴免于发生中毒性综合征。这提示,利用可抗 SEB 的 IgY,可以预防治疗金黄色葡萄球菌肠毒素的毒害。

**3.1.9 其他** 已经证明,特异性 IgY 除可用于上述疾病的防治外,还可以有效地预防和治疗几种其他的病原体。例如,杉田小西等发现,特异性 IgY 可以预防铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的发病。还有人提示,特异性 IgY 可被动防御鸡传染性囊病病毒(IBDV)仔猪中的猪流行性腹泻病毒(PEDV)以及预防原生动物隐抱球虫(*Cryptosporidium*)感染引起的隐抱球虫病。

## 4 抗体的稳定性

### 4.1 胃肠道的生理学

人体的胃肠道是由胃、小肠和大肠所组成。其中,小肠又可划分为十二指肠、空肠和回肠。人体摄入的蛋白质在受到胃中酸性 pH 的变性作用后,又为胃和小肠中的蛋白水解酶所降解。

胃内的 pH,由于膜壁细胞所分泌的盐酸,而处于 1~3.5 的范围。然而,在新生儿,其胃液的 pH 虽接近中性,但在出生后的最初几天,胃液的 pH 可迅速减低至 3 以下。在婴儿和成人进食期间,胃液的 pH 可在食物到达胃时,迅速上升至 4 或 5 左右,但此后又回复到低度的 pH,同时婴儿的回复速度远较成人慢。蛋白质就是在胃内,被主细胞分泌的胃蛋白酶所消化的。胃蛋白酶在 pH1.8~3.5 时具有最佳活性,但在 pH4 左右时,可开始丧失这种活性,并在碱性条件下完全失活。当胃的内含物与小肠内的碱性胰液混合时,胃蛋白酶的消化活性便终止其作用。胃内蛋白质的消化程度,决定于摄入的蛋白质

的物理状态和胃液内蛋白酶的活性,以及其在胃中停留的时间长短。蛋白质在胃中停留的时间长短。蛋白质在胃中的通过时间有很大差异,据报道为 0.5~4.5 h,中等停留时间为 1~1.5 h。

在小肠内,胰蛋白酶和胰液乳蛋白酶可在 pH6~7.4 的条件下继续进行消化。据报道,蛋白质通过小肠的时间为 1~4 h,但也可长达 7.5 h。大肠中的 pH 可上升至 7.5~8,蛋白质的通过时间可长达 17 h。

除了蛋白质在胃肠道各个阶段的暴露持续时间的久暂之外,酶与蛋白质的比例也可决定蛋白质的降解程度。

### 4.2 IgY 的降解和稳定

已经进行了几项有关胃肠酶类和 pH 对 IgY 的结构和活性的影响的离体研究,籍以预测 IgY 口服后的去向。科学家们检测了在模拟抗体通过胃和小肠的条件下,胃蛋白酶在 pH2~4 下,以及胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶在中性 pH 下,对抗体的影响。

已发现,IgY 可相对地抵抗胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶消化,但对胃蛋白酶消化却是敏感的。然而,已发现它对胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶消化的敏感性超过 IgG。八田等利用可抗 HRV 的 IgY 证实,IgY 在经过胃蛋白酶消化后,其全部活性可丧失殆尽,但在经过胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶温育长达 8 h 之后,却仍然可保持其活性。他们发现,用胃蛋白酶在 pH2 条件下消化 IgY,可使这种抗体分子完全水解,只有小肽残存。然而,用胃蛋白酶在 pH4 条件下消化 IgY,则仍可保持其某些活性,除小肽外,重(H)链和轻(L)链也仍然存在。志水等在用胃肠酶类消化可抗大肠杆菌的 IgY 后,也获得了类似的结果。

在体研究也获得了类似的结果。例如,池森等曾用可抗大肠杆菌的 IgY 喂给犊牛,并发现这种抗体在通过胃后,其活性锐减。横山等获得的结果也是类似的。他们曾经将也是可抗大肠杆菌的特异性 IgY 喂给猪。已发现,猪的胃肠道的形态学和生理学变化类似于人类,因而认为猪乃是研究人类消化的理想的动物模型。Miller 等利用从出生后 10 h 的新生仔猪至 28 日龄的不同年龄的猪进行的研究表明,IgY 在通过胃肠道时可被降解。认为可在新生

仔猪的肠道中检出一些完整的 IgY,但在年龄较大的猪的肠道中仅检出较少完整的 IgY,这可能反映了猪的胃肠道成熟度的增加。

为了使 IgY 可以抵抗胃中的蛋白水解和变性条件,已经研究了 IgY 的包裹方法。志水等曾经用卵磷脂/胆固醇脂质体包裹 IgY,并且发现,经过包裹的抗体可增加其对离体胃条件的稳定性。志水和仲根曾经在水/油/水(W/O/W)乳胶中包裹 IgY。结果发现这种包裹可显著减小抗体的活性。这提示,IgY 可在油/水界面发生变性。池森等曾经用一种用于药物的肠道包裹物质羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯处理可抗大肠杆菌的 IgY,并观察了其在通过犊牛胃肠道后的活性。他们发现,虽然包裹 IgY 的活性有所减小,但其减小程度仍低于未包裹的抗体。这项研究证明,对 IgY 进行成功的包裹,乃是保护 IgY 抵抗胃内条件的有效措施。

## 5 鸡蛋抗体的生物技术

鸡是一种可用于生产特异性抗体的有益动物。由于应用前述的 IgY 具有诸多的优点,并且传统上曾经应用单克隆小鼠抗体,因此任务将单克隆 IgY 用于诊断是理想的。已经克隆出各种杂交瘤,并对其进行了无限期的大量繁育,从而利用其分泌高浓度的单克隆抗体。还已经研究了单克隆 IgY 的生产,即通过免疫鸡脾细胞与鸡 B 细胞的融合,来生产可分泌 IgY 的单克隆杂交瘤,从而持续供应具有单一和已知的特异性,以及同质结构的抗体。几位科学家已描述了利用重组 DNA 技术,来生产单链片

段可度区(SCFV)单克隆 IgY,籍以改进利用鸡杂交瘤系统来生产低浓度水平的方法。Kim 等曾利用从鸡杂交瘤细胞中萃取出来的 RNA,将重组单克隆 IgY 表达于大肠杆菌,从而生产出 5~6 mg 的 IgY/L 培养物,这提示大规模生产单克隆 IgY 是有可能的。Lillhoj 等和 Kim 等曾生产了可抗一种可引起鸡或禽球虫病的细胞内寄生物—艾美球虫(*Eimeria* spp.)的单克隆 IgY,籍以研究禽类对这种寄生物的免疫反应,以及帮助研发疫苗。这是因为曾经设想,由于小鼠和禽或鸡的抗体谱的差别,所以来自小鼠的单克隆抗体不能充分反映禽或鸡的免疫反应。鉴于利用鸡可生产出可抗众多抗原和表位(抗原决定簇)的抗体,因此认为利用鸡就有可能生产出可抗任何数量的细菌、病毒或生物性抗原的抗体。这提示,禽或鸡的抗体很有可能进一步应用于免疫诊断和疾病标记物的鉴定、免疫诊断和疾病的预防和治疗,以及亲和纯化方法。目前正在研究和开发蛋黄抗体的可能的生产和应用方法。Romito 等建议,利用裸 DNA 免疫鸡,从而激发其产生抗原特异性 IgY。利用 DNA 而不是利用蛋白质抗原,可以不通过蛋白质表达和纯化步骤,就能生产可抗致病抗原或毒性抗原的抗体。Mohammed 等还证实,人们不仅可以利用鸡来生产特异性 IgY,还可以将人类的抗体导入转基因鸡的蛋黄。说明人类利用鸡蛋生产特异性 IgY 的方法又向前迈出了一大步。(译自 Food Biotechnology 2004,18(1):39~62;译者单位:中国农业科学院农业信息研究所)