DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.003
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
1390 2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)12-1390-03

抗白色念珠菌IgY的稳定性与应用研究

常 山,张雅萍,肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察抗白色念珠菌鸡蛋黄抗体IgY的稳定性与体外生物学效应。方法 用水溶法从免疫鸡蛋黄中提取抗白色念珠菌抗体IgY,ELISA法检测抗体耐热、耐酸、耐碱的稳定性,观察IgY抑制白色念珠菌生长和抑制白色念珠菌粘附肠上皮细胞(IEC-6)。结果 IgY在巴氏消毒后活性为对照的61%,在pH 7.0至3.0酸性环境中活性改变不显著,在pH 7.9,37 ℃作用150 min活性仍为对照的60%。IgY在10 mg/ml时能明显抑制白色念珠菌生长和对肠上皮细胞的粘附,明显降低细胞上清二胺氧化酶(DAO)释放。结论 鸡蛋黄抗体IgY具有高度稳定性和良好的体外生物学效应。

关键词:鸡卵黄抗体;IgY;白色念珠菌
中图法分类号:R392.1 文献标识码:A

Stability and activities of immunoglobulin Y against *Candida albicans* IgY *in vitro*

CHANG Shan, ZHANG Ya-ping, XIAO Guang-xia (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe bio-activities and stability of egg immunoglobulin Y (IgY) against *Candida albicans*. Methods IgY was purified with simple water dilution method (WD) from the eggs yolk of hens immunized with *Candida albicans*. The stabilities of IgY against acid, alkali, and heat were measured with ELISA. The effects of IgY on the growth of the bacterium and on its adhesion to cultured intestinal cells (IEC-6) were studied. Results The minimal ELISA positive titer of IgY was 1∶12 800 and 61% activity remained after pasteurization. The decrease of IgY activity was not apparent at pH value from 7.0 to 3.0, and 60% activity remained after 150 min incubation at pH 7.9 and 37 ℃. IgY at 10 mg/ml inhibited the growth of *Candida albicans* apparently and prevented the adhesion of the bacterium (10^5 cfu/ml) to cultured intestinal cells and the DAO production. Conclusion Egg yolk IgY against *Candida albicans* possesses its activities against *Candida albicans in vitro*, and shows stable properties to heat and acid or alkali environments.

Key words: egg yolk antibody; IgY; *Candida albicans*

免疫鸡蛋黄中含有大量来源于血清的IgG抗体(又名IgY),浓度远高于血清,且抗体提取简单,来源十分丰富,近年来已引起了广大研究人员的兴趣。同时由于IgY的分子结构与哺乳类IgG的差异使IgY的稳定性远高于哺乳类IgG,作检测试剂时因不激活补体而比哺乳类IgG更精确。本研究用白色念珠菌作为抗原免疫产蛋鸡,从蛋黄中提取出抗白色念珠菌IgY,通过ELISA系统检测其耐热、耐酸、耐碱的稳定性,同时观察了其抑制白色念珠菌生长和抑制白色念珠菌粘附培养肠上皮细胞的生物学效应,为口服应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 抗白色念珠菌IgY抗体的制备

白色念珠菌(CMCC 44104)于0.4%福尔马林液中灭活后与等体积完全福氏佐剂混合乳化,作抗原皮下注射免疫25周龄Leghorn鸡,水溶法(蛋黄溶于9倍蒸馏水,离心取上清并用硫酸钠沉淀IgY)分离纯化IgY并透析过滤除菌。紫外光双波长测定IgY含量,SDS-PAGE电泳检测提取IgY的纯度,细菌酶标染色观察IgY结合白色念珠菌的特异性。

1.2 ELISA检测IgY的效价、耐热、耐酸和耐碱稳定性

效价:将IgY从1∶200倍比稀释至1∶25 600检测其效价。耐热:将提取IgY分别置于25、37、50、64、70、75、80 ℃孵育15 min后稀释5 000倍进行ELISA检测。耐酸:将IgY分别置于pH值为1,2,3,4,5,6,7酸性环境中37 ℃孵育1 h后稀释5 000倍进行ELISA检测。耐碱:将IgY置于pH 7.9的液体环境中37 ℃分别孵育30、60、90、120、150 min后稀释5 000倍进行ELISA检测。ELISA操作步骤:白色念珠菌包被96孔酶联板后依次加入:处理后IgY稀释液(每组6孔);兔抗鸡IgY二抗;最后加入邻苯二胺底物显色30 min,并用一滴2 mol/L硫酸终止反应,于490 nm比色(洗涤液为0.05% Tween-20, PH 7.4 0.01 mol/L PBS,阳性对照分别为未加热、酸和碱处理的IgY稀释液,阴性对照的一抗为未免疫鸡蛋黄提取物)。

1.3 IgY的体外生物学效应

IgY抑制白色念珠菌生长:实验分2组:①对照组:3.9×10^5 cfu/ml白色念珠菌液于37 ℃恒温箱中孵育,于6、12、24、32 h,取样后活菌计数。②IgY拮抗组:将白色念珠菌(3.9×10^5 cfu/ml)分别加入IgY 10、5、2.5 mg/ml,于6、12、24、32 h,取样后活菌计数。

IgY抑制白色念珠菌粘附培养肠上皮细胞(IEC-6):将含白色念珠菌(5×10^5 cfu/ml)的DMEM培养液和含同浓度白色念珠菌的DMEM培养液(分别加入IgY 10、5、2.5 mg/ml于37 ℃孵育预处理30 min)加入长满肠上皮细胞的96孔板,每时相点设

基金项目:重庆市科委98年院士基金资助项目(980010)
作者简介:常 山(1969-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事烧伤肠源性感染的防治,现在解放军47医院外一科工作。电话:(028)3016822
收稿日期:2001-07-04;修回日期:2001-10-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

6 平行孔。观察时相点为: 加入白色念珠菌后 30、60、90、120、150 min。检测指标与方法: ①粘附细菌数: 将各个时相点的培养孔去除上清, 10 mmol/L pH 7.4 PBS 冲洗培养孔 6 次(每次 200 μl/ 孔), 然后加入 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化液 100 μl/ 孔消化约 2 min 后接种于沙氏平板培养 72 h 后活菌计数。②上清液二胺氧化酶(DAO): 0.2 mol/L pH 7.2 的 PB 液 1.5 ml + 二甲基联苯胺 50 μl + 尸胺底物溶液 50 μl + 样本 250 μl + 辣根过氧化物酶 50 μl 共计 1.9 ml 置于 37 ℃水浴 30 min 于 436 nm 比色。检测时相点为粘附后 60 min。

1.4　统计学处理

采用 t 检验。

2　结　果

2.1　IgY 特异性、含量和纯度

抗白色念珠菌 IgY 对该菌染色阳性而对绿脓杆菌, 葡萄球菌染色阴性。提取物 IgY 含量平均为 13.7 mg/ml 蛋黄液。将 SDS-PAGE 电泳凝胶扫描, 检测 180× 10^3带(IgY)所占百分比, 得出 IgY 纯度高达 95%。

2.2　IgY 效价和稳定性

效价: ELISA 检测出蛋黄 IgY 效价为 1∶12 800, 而血清 IgG 效价为 1∶6 400。耐热: 以温度为横轴, 以吸光值为纵轴, 各温度处理后的吸光值形成一曲线(阳性对照 D_{490} 值为 1.841), 见图 1。曲线表明在 25~64 ℃作用后 IgY 的活性下降缓慢, 64 ℃作用 15 min 后活性为对照的 61%。64 ℃以上作用 15 min 后 IgY 活性迅速下降。耐酸: 以 pH 值为横轴, 以吸光值为纵轴作一光滑曲线(阳性对照 D_{490} 值为 0.827), 取阴性对照 D_{490} 值 0.24 为纵轴原点, 见图 2。曲线表明 IgY 在 pH 值为 3 以上时其活性改变不大, 在 pH 值等于 3 时其活性为阳性对照的 70% 以上, 但在 pH 值为 3 以下时其活性迅速下降。耐碱: 以时间为横轴, 以吸光值为纵轴作一光滑曲线, 取阴性对照 D_{490} 值 0.201 为纵轴原点, 作用时间为 0 的 D_{490} 值为阳性对照 D_{490} 值, 见图 3。曲线表明 IgY 在 37 ℃pH 值 7.9 碱性环境中, 其活性随时间延长下降缓慢, 在作用时间为 150 min 后其活性接近阳性对照的 60%。

2.3　IgY 的体外生物学效应

抑制白色念珠菌生长: 白色念珠菌正常生长量和不同浓度 IgY 作用下生长量见表 1, 结果表明白色念珠菌在 24 h 内为对数生长期, 24 h 后进入生长平稳期, 加入不同浓度 IgY 后白色念珠菌的生长受到一定程度的抑制, 在 IgY 浓度为 10 mg/ml 时抑制作用最明显且抑制时间最长。

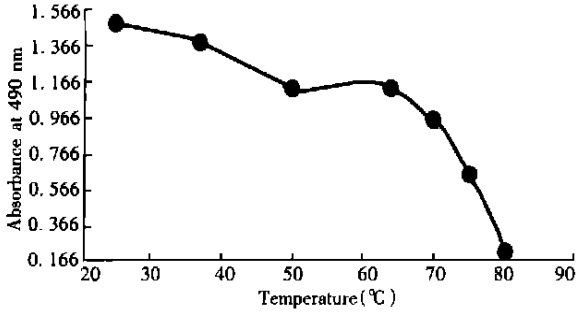


图 1　不同温度下 IgY 抗体活性变化

Fig 1　IgY activities at different temperatures

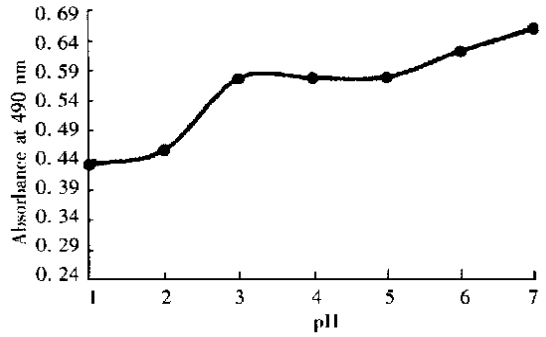


图 2　不同 pH 下 IgY 抗体活性变化

Fig 2　IgY activities at different pH values

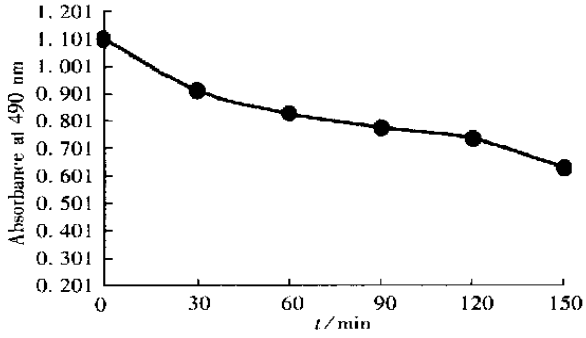


图 3　pH 7.9 37 ℃下 IgY 抗体活性变化

Fig 3　IgY activities at pH 7.9 and 37 ℃

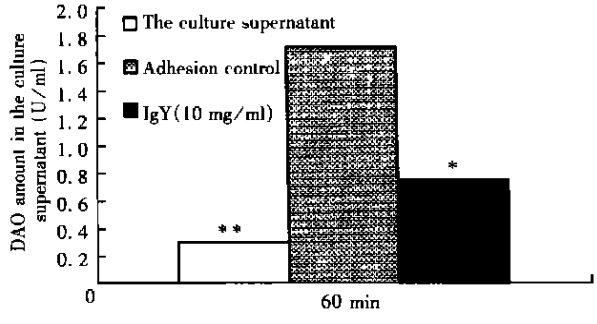
抑制白色念珠菌粘附肠上皮细胞: 白色念珠菌和加入不同浓度 IgY 处理后, 于各时相点粘附培养肠上皮细胞菌量见表 2。60 min 上清二胺氧化酶 DAO 见图 4。结果表明: 白色念珠菌粘附肠上皮细胞高峰在 60 min, 不同浓度 IgY 均能抑制白色念珠菌的粘附, 在 IgY 浓度为 10 mg/ml 时抑制作用最明显且抑制时间最长。

表 1　IgY 对白色念珠菌生长的影响(× 10^5cfu/ ml)

Tab 1　Effects of IgY on the growth of *Candida albicans*(× 10^5cfu/ ml)

	6 h	12 h	24 h	32 h
Control	5.4±1.7	136±26	332±44	339±36
IgY 2.5 mg/ml	3.4±1.2	90±9.5 *	288±52 *	321±18
IgY 5 mg/ml	1.8±1.1 *	65±15 **	278±30	341±28
IgY 10 mg/ml	2.0±2 *	57±13 **	219±36 *	249±67

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control



*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* adhesion control

图 4　IgY 处理后细胞培养上清 DAO 的含量

Fig 4　Amount of DAO in the culture supernatant of ICE-6 with IgY treatment

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 IgY 对白色念珠菌粘附肠上皮细胞(IEC-6)的影响($\times 10^5$ cfu/ml)

Tab 2 Effects of IgY on the adhesion of *Candida albicans* to intestinal epithelial cells (IEC-6) ($\times 10^5$ cfu/ml)

	30 min	60 min	90 min	120 min
Control	910±188	3 400±750	2 410±491	2 190±735
IgY 10 mg/ml	390±136	560±219 **	420±116 **	790±145 **
IgY 5 mg/ml	600±105	1 760±642 **	2 190±416	1 720±797
IgY 2.5 mg/ml	480±117	1 630±913 *	2 450±478	1 660±681

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

3 讨论

目前 IgY 已经引起广大研究人员的兴趣,它主要有三个特性:①产量大提取简便 ②具有高度的稳定性和生物效应 ③作为诊断试剂干扰小。

本研究应用简便水溶法提取 IgY 的产量高达 13.7 mg/ml 蛋黄液,纯度高达 95%,ELISA 滴度在 1∶12 800,且 IgY 只对白色念珠菌染色阳性,对绿脓杆菌和葡萄球菌染色均阴性,表明 IgY 来源丰富、纯化简便、具有较好的特异性,是一种具有很高研究和应用价值的抗体。

既往有学者采用抗体中和滴度法检测 IgY 的稳定性,发现其具有良好的耐酸,耐热的理化性质。本研究首次采用敏感的 ELISA 法对 IgY 的稳定性进行系统研究发现 IgY 具有高度的稳定性。IgY 能耐受巴氏消毒(63 ℃ 15 min),能耐受 37 ℃、pH 值 3 以上的酸性环境 1 h,能耐受 37 ℃、pH 7.9 碱性环境 150 min。37 ℃、pH 值 3 为通常状况下胃环境,37 ℃、pH 7.9 为通常状况下肠道环境.因此上述结果表明 IgY 能够通过食品工业中常用的巴氏消毒法,口服后有望能在消化道保持高活性。这种稳定的理化性质对 IgY 作为口服药物和诊断试剂都是十分有利和必要的。IgY 优良的稳定性可能与其分子结构有关:IgY 氨基酸及含糖量与哺乳类 IgG 有明显差异,其分子结构虽仍然为 2H+2L,但它与哺乳类 IgG 最大区别是 IgG 的 Fc 段缺少 IgY 的第 2 恒定区(C_2)而代之以 IgG 出现了一个铰链区(Hinge region),而二者的抗原结合部位 F(ab)尚未发现明显不同。在某些鸡蛋黄中天然含有 IgY 的 △Fc 片段,而这种 △Fc 片段比完整的 IgY 具有更高的稳定性。上述事实说明 IgY Fc 段结构变化对其活性有明显影响。

本实验中 IgY 体外能明显抑制白色念珠菌生长,抑制强度和时间与浓度呈量效关系。筛选出的 IgY 浓度(10 mg/ml)能明显抑制细菌生长达 24 h,而前 24 h 正是该菌的对数生长期,表明 IgY 具有良好的抑菌效果。同时在该浓度下 IgY 在各时相点能明显抑制白色念珠菌对培养肠上皮细胞的粘附,其抑制效果同样具有量效关系。IgY 抗体抑制白色念珠菌生长主要机制可能为抗体封闭白色念珠菌表面抗原,防止白色念珠菌向菌丝体转变;引起凝集等。同时白色念珠菌是典型的粘附致病菌,特别在肠道,白色念珠菌感染的首要条件是通过菌体表面抗原粘附在肠上皮细胞上,因而抗体封闭菌体表面抗原对防止白色念珠菌感染将起到重要作用。二胺氧化酶(DAO)是一种控制肠粘膜增殖的细胞质酶,主要存在于哺乳动物肠上皮细胞内。肠上皮细胞受损时,其细胞内 DAO 下降,而上清 DAO 明显升高。因此 DAO 已成为反映肠上皮细胞因缺血和感染而受损的重要敏感指标。本实验应用 IgY 处理白色念珠菌后,在粘附高峰明显降低了肠上皮细胞 DAO 的释放,保护了细胞免受白色念珠菌的破坏。IgY 抑制白色念珠菌生长、抑制其粘附肠上皮细胞的结果表明该抗体不仅具有良好的稳定性和特异性,还具有高度的生物学活性和高度结合抗原的能力。

目前已成功提取出抗蛋白质、病毒、细菌的 IgY,并发现其具有良好的抗病毒抗细菌的生物学效应,用于口服防治肠道病原体已取得良好效果。本研究制备出抗白色念珠菌 IgY,发现该抗体产量高,稳定性极好,具有很好的生物学效应,作为口服药物或食品添加剂预防和治疗病原性腹泻和肠源性感染将具有广阔的前景。

参考文献:

[1] Akita E M, Nakai S. Comparision of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain [J]. J Immunol Methods, 1993, 160(2): 207-214.

[2] Terzolo H R. Agglutination of hen egg-yolk immunoglobulins (IgY) against Salmonella enterica, serovar enteritidis[J]. Rev Argent Microbiol, 1998, 30(2): 84-92.

[3] Hansen P, Scoble J A. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. [J] J Immunol Methods, 1998, 1; 215(1-2): 1-7.

[4] Sugita Konishi Y, Shibata K, Yun S S. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60(5): 886-888.

[5] Akita E M, Nakai S. Neutralization of enterotoxigenic escherichia coli heat-labile toxin by chicken egg yolk immunoglobulinY and its antigen-bind fragments[J]. Food Agric Immunol, 1998, 10(2): 161-172.

[6] Li X. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens[J]. Poult Sci, 1998, 77(2): 266-270.

[7] Casadevall A. Antibody immunity and invasive fungal infection[J]. Infect Immun, 1995, 63(11): 4 211-4 218.

[8] 常 山,张雅萍.鸡卵黄免疫球蛋白抗体(IgY)研究进展[J].第三军医大学学报,2000,22(6):19-22.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net