

抗猪大肠杆菌功能性卵黄粉的制备及对小鼠的攻毒保护作用

杨金先¹, 郭 庆², 俞伏松¹, 叶鼎承², 曾丽莉², 宋铁英¹

(1. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003;

2. 福建省华龙集团饲料有限公司, 福建 福州 350003)

摘要: 通过制备抗致病性大肠杆菌特异性 IgY 及富含特异性 IgY 的功能性卵黄粉, 进行小鼠的攻毒保护试验, 探讨功能性卵黄粉对由致病性大肠杆菌引起的疾病的防治作用。结果显示: (1) 致病性大肠杆菌与特异性 IgY 混合后, 菌体出现凝集, 且病原菌的运动力明显受抑制; (2) 浓度为 $1.3 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的致病性大肠杆菌 K88、K99 和 987P 攻毒小鼠后死亡率为 60%, 而将病原菌液与特异性 IgY 混合后攻毒小鼠, 死亡率仅为 10%; (3) 饲喂功能性卵黄粉 30 d 后用浓度为 $2.6 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的致病性大肠杆菌 K88、K99 和 987P 攻毒小鼠的死亡率为 40%, 而同等剂量的对照攻毒小鼠死亡率为 84%; 并且饲喂功能性卵黄粉试验组小鼠的血清 ALT、AST 和 ALP 检测值显著低于对照组; 肝、脾、胸腺的脏器指数、肠绒毛高度和 V/C 比值显著增高。试验结果说明: 功能性卵黄粉中的特异性 IgY 可粘附并阻断致病性大肠杆菌对小鼠的致病力, 减轻病原菌攻毒对小鼠内脏和肠道组织的功能损伤, 并提高动物机体耐受由致病性大肠杆菌引起疾病的作用, 从而促进动物肠道对营养物质的吸收, 提高动物生长性能。

关键词: 功能性卵黄粉; 特异性 IgY; 致病性大肠杆菌

中图分类号: Q 93-337

文献标识码: A

Preparation of Egg Yolk Antibody Against Pig Pathogenic *Escherichia coli* and Its Passive Immunoprotection of Mouse from Challenge

YANG Jinxian¹, GUO Qing², YU Fusheng¹, YE Dingceng², ZENG Lili², SONG Tieying¹

(1. Bio-technology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 35000;

2. Hualong Feedstuffs Technology and Development Group Company in Fujian Province,
Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: The experiments were conducted to investigate whether or not egg yolk antibodies can be used as a functional egg yolk powder preparation in the prevention and treatment for enteric infection caused by pathogenic *Escherichia coli*. The major results were as follows: 1) agglutination reaction appeared after the egg yolk antibodies mixed with the pathogenic *Escherichia coli*, and the bacteria activity decreased which's not agglutination; 2) the mortality rate of mouse was 60% after challenge with $1.3 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ *Escherichia coli* pathogen K88, K99 and 987P, while the mortality rate of mouse decreased to 10% after the pathogen mixed with egg yolk antibodies; 3) after feeding functional egg yolk powder for 30 days and challenge with $2.6 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, the mortality rate of mouse was 40% compared with the control group in 84%. Comparing with control group, the serum ALT, AST and ALP were significantly lower in treated mouse and the organ index of liver, spleen, thymus, the intestinal villus height and V/C ratio were significantly higher. The results indicated that the functional egg yolk powder can be prepared to prevent and treat the infection disease caused by pathogenic *E. coli* and effectively to improve the growth performance of mouse.

Key words: functional egg yolk powder; egg yolk antibodies; pathogenic *Escherichia coli*

卵黄抗体 (IgY) 分子结构独特, 性质稳定, 生化检测以及人类食品、化妆品等领域^[1-3]。国内功能多样, 已被广泛应用于疾病防治、免疫检测、外学者就 IgY 用于防治畜禽疾病的研究和开发做

收稿日期: 2010-11-15 初稿; 2011-02-11 修改稿

作者简介: 杨金先 (1971-), 男, 副研究员, 主要从事动物病害防治 (E-mail: nks139@139.com)

通讯作者: 宋铁英 (1963-), 女, 研究员, 主要从事动物病害防治 (E-mail: tieyingsong@163.com)

基金项目: 科技部科技人员服务企业行动项目 (2009GJC40042); 科技部农业科技成果转化资金项目 (2010GB2C400209); 福建省科技计划重大专项 (2010NZ0002-3)

了大量的工作, 证明免疫家禽是提供特异性 IgY 最方便、最廉价的来源, 具有取材方便、产量高、便于工业化生产、使用便捷、效果显著等优点, 可作为注射剂、口服剂或饲料添加剂用于预防和治疗动物的疾病^[4~6]。

近年来, 养殖业片面追求快速生长而大剂量和超范围使用抗生素的现象越来越普遍, 造成畜禽产品品质下降和药物残留超标。病原细菌特异性 IgY 的化学本质为蛋白质, 具有营养和防治疾病双重功效, 可替代饲料中的抗生素添加剂, 而且不存在药物残留和耐药性问题, 具有安全、高效、环保等优点, 目前常作为预防胃肠道疾病的功能性饲料添加剂^[7]。本研究拟通过检测抗致病性大肠杆菌特异性 IgY 对病原菌的粘附能力, 及特异性 IgY 和富含特异性 IgY 的功能性卵黄粉对小鼠的攻毒保护试验, 探讨功能性卵黄粉对由致病性大肠杆菌引起疾病的防治作用及提高动物生长性能、调节机体免疫力的功能。

1 材料与方法

1.1 试验材料

致病性大肠杆菌 K88、K99 和 987P, 由福建省农业科学院生物技术研究所鱼病室提供; 致病性大肠杆菌 K88、K99 和 987P 菌毛抗原及 K88、K99 和 987P 菌毛抗原 ISCOMs 制备, 由福建省农科院生物技术研究所鱼病室提供。NIH 系清洁级小白鼠, 雌雄各半共 96 只, 体重 18~22 g, 购于福建省中医药大学。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋鸡免疫 选择生物安全隔离条件好、饲养管理科学规范、鸡群健康的福州永泰某鸡场, 600 羽健康、大小均匀刚开产的商品蛋鸡(海兰褐壳蛋鸡)作为试验鸡群, 饲养管理按海兰蛋鸡产蛋期饲养管理要求进行。蛋鸡首次免疫方法为鸡腿部肌肉注射制备的致病性大肠杆菌 K88、K99 和 987P 菌毛抗原 ISCOMs $0.5 \text{ mL} \cdot \text{羽}^{-1}$, 之后每隔 15 d 加强免疫 1 次, 剂量为 $1 \text{ mL} \cdot \text{羽}^{-1}$, 共强化免疫 2 次。3 免后 10 d 抽检蛋样特异性 IgY 滴度, 经 ELISA 检测效价达到 1: 12 800 以上即可作为高免鸡蛋。

1.2.2 特异性 IgY 的制备 将高免鸡蛋用酒精棉球消毒鸡蛋壳, 用一次性针筒吸取 2 mL 卵黄液, 加 2 mL 0.9% 的生理盐水充分混匀, 再加入 4 mL 氯仿, 充分混匀, 室温下静置 1 h, 4℃ 条件下 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清 4℃ 保存,

ELISA 检测效价。未经免疫的同鸡场蛋鸡产下的鸡蛋作为阴性对照, 提取程序相同。

1.2.3 功能性卵黄粉制备 收集经 ELISA 检测效价达到 1: 12 800 以上的高免鸡蛋, 4℃ 贮存, 7 d 内送交福建省华龙饲料有限公司经喷雾干燥制备成功能性卵黄粉, 喷雾干燥, 所含的抗致病性大肠杆菌 K88、K99 和 987P 特异性卵黄抗体效价不低于 1: 12 800。

1.2.4 特异性 IgY 效价检测方法 采用间接 ELISA 法: 特异性 IgY 或功能性卵黄粉用生理盐水从 1: 50 开始作 2 倍比稀释。将 3 株致病性大肠杆菌 K88、K99 和 987P 菌毛抗原(浓度为 $15 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按 $50 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 包被 ELISA 板, 4℃ 过夜; 次日弃去包被液, 用 2% BSA-PBST 室温封闭 1 h, 洗涤后加入特异性 IgY 或功能性卵黄粉 2 倍比稀释液, 反应体积每孔 50 μL , 室温反应 1 h 后, PBS-T 洗涤 3 次, 加入兔抗鸡 HRP 标记抗体(Sigma) 室温反应 1 h, 同上洗涤 3 次; 用蒸馏水冲洗 1 次加入 OPD 室温显色 15 min, 用 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 终止反应。用酶联仪 Microplate Reader (BioRad Model 550) 在 495 nm 处读取 OD 值。

1.2.5 特异性 IgY 的菌体凝集试验 将效价为 1: 12 800 的特异性 IgY 用灭菌生理盐水倍比稀释成效价为 1: 6 400、1: 3 200 的使用液, 按 1: 1 的体积比, 分别与致病性大肠杆菌 K88、K99 和 987P 菌液(浓度为 $2.6 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 3 种病原菌混合比例为 1: 1: 1) 等量混合, 置 25℃ 恒温水浴锅中孵育 60 min 后, 滴加少许混合液于载玻片上, 盖上盖玻片进行显微镜观察。

1.2.6 特异性 IgY 对小鼠的攻毒保护试验 取 18~22 g 小鼠 35 只, 随机分成 4 组, I~II 组各 10 只, IV 组 5 只, 观察 3 d 后进行试验。攻毒中和试验的分组处理为: I 组: 将 $2.6 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的致病性大肠杆菌 K88、K99 和 987P(混合比例为 1: 1: 1) 和灭菌生理盐水等量混合, 置 25℃ 恒温水浴箱中孵育 60 min 后, 腹腔注射小鼠 0.2 $\text{mL} \cdot \text{只}^{-1}$; II 组: 将 $2.6 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的致病性大肠杆菌 K88、K99 和 987P(混合比例为 1: 1: 1) 和特异性 IgY 等量混合, 置 25℃ 恒温水浴箱中孵育 60 min 后, 腹腔注射小鼠 0.2 $\text{mL} \cdot \text{只}^{-1}$; III 组: 将特异性 IgY 和灭菌生理盐水等量混合后, 腹腔注射小鼠 0.2 $\text{mL} \cdot \text{只}^{-1}$; IV 组为灭菌生理盐水做空白对照, 腹腔注射小鼠 0.2 $\text{mL} \cdot \text{只}^{-1}$ 。注射后观察 3 d, 记录小鼠发病及死亡情况。

1.2.7 小鼠饲喂功能性卵黄粉后的攻毒保护试验

取18~22 g小鼠60只, 雌雄各半, 随机分为2组, 对照组和试验组各30只, 每隔4~6 d更换垫料。试验组每天饮用10%功能性卵黄粉的水溶液, 对照组每天饮用清水, 饲喂30 d后, 将试验组和对照组的小鼠又各自分为攻毒组和未攻毒组2组(试验组的攻毒组和未攻毒组命名为试1组和试2组, 对照组的攻毒组和未攻毒组命名为对1组和对2组), 攻毒组25只, 腹腔注射致病性大肠杆菌混合菌液($2.6 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 混合比例为1:1:1)0.2 mL·只⁻¹, 未攻毒组5只, 腹腔注射生理盐水0.2 mL·只⁻¹, 观察3 d, 并记录小鼠发病及死亡情况。

(1) 攻毒后小鼠的血清生化指标的检测。功能性卵黄粉的攻毒保护试验观察期结束后, 各组存活小鼠称其重量后颈椎处死, 采血1 mL, 离心分离出血清。冷藏保存样本, 送往福建省省直机关医院检测血清生化指标。每个样本检测如下9个血清指标: 总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、血糖(GLU)、总胆固醇(CHO)、尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)。

(2) 攻毒后小鼠脏器指数的变化情况。功能性卵黄粉的攻毒保护试验观察期结束后, 各组存活小鼠称其重量后颈椎处死, 剥取其肝脏、脾脏和胸腺称重, 并计算脏器指数。

$$\text{脏器指数} (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{\text{脏器重量}}{\text{体重}}$$

(3) 攻毒后小鼠肠组织结构的变化情况。功能性卵黄粉的攻毒保护试验观察期结束后, 各组存活小鼠称其重量后颈椎处死, 取刚处死试验小白鼠的十二指肠、空肠和回肠, 各肠段1 cm, 浸入pH 7.2的磷酸盐缓冲液迅速洗掉内容物, Carnoy's固定液固定12 h, 石蜡切片制作, 常规HE染色, 观察小鼠肠组织结构的变化情况。

1.2.8 试验数据的处理方法 应用SPSS13.0统计软件对测量数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 特异性IgY和功能性卵黄粉的效价测定

经3次免疫后的鸡蛋提取的特异性IgY和制备的功能性卵黄粉对3株致病性大肠杆菌K88、K99和987P的ELISA检测效价均达到1:12 800以上。

2.2 特异性IgY的凝集

效价为1:12 800的特异性IgY用灭菌生理盐

水倍比稀释成效价为1:12 800、1:6 400、1:3 200的3种浓度后, 分别与浓度为 $2.6 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的致病性大肠杆菌K88、K99和987P(混合比例为1:1:1)等体积混合, 显微镜观察结果显示, 不加特异性IgY的致病性大肠杆菌菌液的细菌分布均匀, 活力很强。加入效价为1:12 800的IgY的菌液出现细菌凝集, 聚合体较大、数量较多且集中, 未被凝集的病原菌活力明显降低; 加入效价为1:6 400的IgY的菌液也出现较大的聚合体, 但数量明显减少, 未被凝集的病原菌活力比加入效价为1:12 800 IgY的菌液有所提高; 加入效价为1:3 200的IgY的菌液出现的聚合体数量少且小。

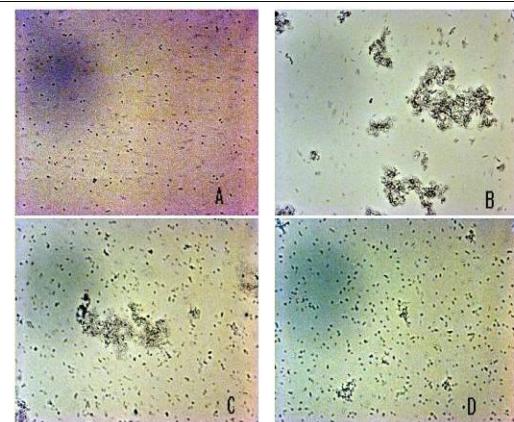


图1 IgY体外粘附试验的显微镜观察($\times 400$)

Fig 1 Microscopic observation of IgY in-vitro adhesive test ($\times 400$)

注: A: 致病性大肠杆菌菌液; B: 菌液加IgY(效价1:12 800); C: 菌液加IgY(效价1:6 400); D: 菌液加IgY(效价1:3 200)

2.3 特异性IgY对病原菌的攻毒保护

特异性IgY的攻毒保护试验结果显示, 注射浓度为 $1.3 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的致病性大肠杆菌K88、K99和987P的I组死亡率为60%, 与其他三组差异显著($P < 0.05$); 将菌液与特异性IgY混合后注射的II组死亡率为10%, 注射特异性IgY的II组和注射生理盐水的阴性对照的IV组均无死亡, 这三组之间的差异不显著($P > 0.05$)。在试验后2 d内, I组和II组未死亡小白鼠出现程度不一的症状, 主要为精神萎靡, 倦怠, 腹泻, 寒战, 眼角包裹着眼屎, 皮毛耸乱等; 但II组发病情况比I组轻, 3 d后都渐渐康复; II组和IV组的小白鼠精神状态良好, 外观正常。

2.4 饲喂功能性卵黄粉后的攻毒保护

小鼠在饲喂功能性卵黄粉30 d后, 用浓度为 $2.6 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的致病性大肠杆菌K88、K

99 和 987P 进行攻毒, 结果显示, 饲喂和未饲喂功能性卵黄粉的试验组和对照组中的攻毒组(试-1 组、对-1 组), 小鼠在攻毒后死亡率分别为 40% 和 84%, 相对死亡率降低 52.3%, 差异显著 ($P < 0.05$), 其他未死亡的发病小白鼠出现短期主要症状为精神萎靡, 倦怠, 腹泻, 寒战, 眼角包裹着眼屎, 皮毛耸乱等, 但试-1 组发病情况要比对-1 组轻。而未攻毒的试-2 组和对-2 组的小白鼠健康状态良好。

表 1 特异性 IgY 对病原菌的攻毒保护试验结果

Table 1 Results of animal protection test by IgY

| 组别 | 处理 | 只数 (只) | 死亡只数 (只) | 死亡率 (%) |
|-------|------------|-----------|-------------|------------|
| I 组 | 菌液+灭菌生理盐水 | 10 | 6 | 60 a |
| II 组 | IgY | 10 | 1 | 10 b |
| III 组 | IgY+灭菌生理盐水 | 10 | 0 | 0 b |
| IV 组 | 灭菌生理盐水 | 5 | 0 | 0 b |

注: 同一列或同一行数据后不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

表 2 饲喂功能性卵黄粉后小白鼠的攻毒保护试验结果

Table 2 Results of mouse by attacking ETEC test

| 项目 | 试验组 | | 对照组 | |
|---------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | 攻毒 (试-1 组) | 未攻毒 (试-2 组) | 攻毒 (对-1 组) | 未攻毒 (对-2 组) |
| 只数(只) | 25 | 5 | 25 | 5 |
| 死亡只数(只) | 10 | 0 | 21 | 0 |
| 死亡率(%) | 40a | 0 | 84b | 0 |

2.4.1 功能性卵黄粉对小鼠血液生化指标的影响 小鼠经正常喂养或饲喂功能性卵黄粉 30 d 后分

别分组进行攻毒试验, 结果显示, 未饲喂功能性卵黄粉攻毒的对-1 组小鼠, 其反应肝功能的主要血液生化指标如 ALT、AST 和 ALP 较其他组显著升高, 说明致病性大肠杆菌攻毒后对小鼠的肝脏损伤严重; 饲喂功能性卵黄粉攻毒的试-1 组的 ALT、AST 和 ALP 极显著低于对照攻毒组, 但比未攻毒的两组略高, 说明其肝脏受损程度较轻; 两个攻毒组小鼠的 CRE 都显著高于试验未攻毒组, 说明致病性大肠杆菌对小鼠的肾脏也有一定的损伤(表 3)。

2.4.2 功能性卵黄粉对脏器指数影响 脏器指数的试验结果显示, 经 30 d 饲喂功能性卵黄粉后, 小鼠的肝脏指数极显著高于未饲喂功能性卵黄粉的对照组 ($P < 0.01$); 且试-2 组比试-1 组极显著提高 6.5% ($P < 0.01$)。脾脏指数和胸腺指数的结果相似, 饲喂功能性卵黄粉攻毒的试-1 组比未饲喂功能性卵黄粉攻毒的对-1 组分别显著提高了 9% 和 6% ($P < 0.05$); 而饲喂功能性卵黄粉未攻毒的试-2 组比未饲喂功能性卵黄粉未攻毒的对-2 组分别极显著提高了 21% 和 12% ($P < 0.01$); 且试-2 组比对-2 组分别极显著提高 14% 和 8% ($P < 0.01$); 试-2 组比试-1 组分别极显著提高了 11% 和 6% ($P < 0.01$) (表 4)。

2.4.3 功能性卵黄粉对肠绒毛结构的影响 将各组的不同部位肠段进行切片观察并测量其肠绒毛高度、隐窝深度及 V/C 比值, 结果显示(图 2~4), 饲喂功能性卵黄粉后, 小鼠的十二指肠、空肠和回肠的肠绒毛高度和 V/C 比值均显著高于对照组, 但隐窝深度的差异不显著(表 5)。切片图像观察的结果显示, 未饲喂功能性卵黄粉攻毒的小白鼠各肠段的肠绒毛都有不同程度的损伤, 而饲喂功能性卵黄粉后攻毒的小白鼠的损伤程度要比对照组轻微。

表 3 攻毒后小鼠血清生化指标检测结果

Table 3 Results of blood biochemical test

| 项目 | 试验组 | | 对照组 | |
|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 攻毒(试-1 组) | 未攻毒(试-2 组) | 攻毒(对-1 组) | 未攻毒(对-2 组) |
| 总蛋白(TP, g·L ⁻¹) | 66.4±3.4ab | 65.2±2.3a | 65.3±3.7a | 70.4±4.2b |
| 白蛋白(ALB, g·L ⁻¹) | 42.2±1.3ac | 38.4±3.9b | 38.7±3.9ab | 45.8±2.9d |
| 谷丙转氨酶(AST, IU·L ⁻¹) | 43.0±3.9ab | 39.2±6.5b | 66.5±5.8d | 47.8±4.3a |
| 谷草转氨酶(ALT, IU·L ⁻¹) | 124.1±21.9a | 128.8±18.0a | 201.5±27.7c | 133.6±14.0a |
| 碱性磷酸酶(ALP, IU·L ⁻¹) | 126.1±10.1a | 59.4±23.6e | 144.0±5.7a | 93.4±26.9c |
| 血糖(GLU, mmol·L ⁻¹) | 5.4±1.1 | 5.5±1.4 | 4.6±0.9 | 5.8±1.4 |
| 总胆固醇(CHO, mmol·L ⁻¹) | 2.4±0.5c | 3.1±0.3a | 2.7±0.4ac | 3.2±0.3a |
| 尿素氮(BUN, mmol·L ⁻¹) | 8.3±0.4b | 9.2±2.1ab | 9.1±0.7ab | 10.1±0.5a |
| 肌酐(CRE, mmol·L ⁻¹) | 8.3±0.4b | 17.6±2.6c | 23.5±3.9ab | 22.0±1.9abc |

表4 功能性卵黄抗体对小白鼠脏器指数的影响
Table 4 Effects of functional egg yolk powder on mouse's organ index (单位: mg · g⁻¹)

| 项目 | 试验组 | | 对照组 | |
|------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 攻毒(试-1组) | 未攻毒(试-2组) | 攻毒(对-1组) | 未攻毒(对-2组) |
| 肝脏指数 | 57.0±1.6c | 60.7±2.1e | 50.9±1.1a | 53.1±2.0a |
| 脾脏指数 | 3.6±0.1b | 4.0±0.3d | 3.3±0.3a | 3.5±0.1ab |
| 胸腺指数 | 5.3±0.1b | 5.6±0.2d | 5.0±0.2a | 5.2±0.1ab |

表5 功能性卵黄粉对小白鼠肠黏膜形态的影响
Table 5 Effects of functional egg yolk powder on mouse's intestinal mucosa

| 项目 | 试验组 | | 对照组 | |
|------|-----------|-------------|------------|------------|
| | 攻毒(试-1组) | 未攻毒(试-2组) | 攻毒(对-1组) | 未攻毒(对-2组) |
| 十二指肠 | 绒毛高度(mm) | 542.8±8.7cd | 567.6±7.3d | 469.7±6.5a |
| | 隐窝深度(mm) | 137.3±9.0 | 136.8±5.0 | 140.6±3.5 |
| | V/C比值(mm) | 3.9±0.2ab | 4.1±0.2b | 3.3±0.2a |
| 空肠 | 绒毛高度(mm) | 438.8±3.5c | 443.6±3.7c | 372.4±6.7a |
| | 隐窝深度(mm) | 93.8±2.9 | 94.1±3.0 | 94.1±2.6 |
| | V/C比值(mm) | 4.6±0.2c | 4.7±0.1c | 3.9±0.1a |
| 回肠 | 绒毛高度(mm) | 401.2±6.3c | 434.8±7.3d | 343.3±6.4a |
| | 隐窝深度(mm) | 99.1±3.7a | 92.8±2.8b | 92.2±3.7b |
| | V/C比值(mm) | 3.4±0.2a | 3.9±0.12ac | 4.3±0.12ce |

注: V/C比值为绒毛高度/窝深度。

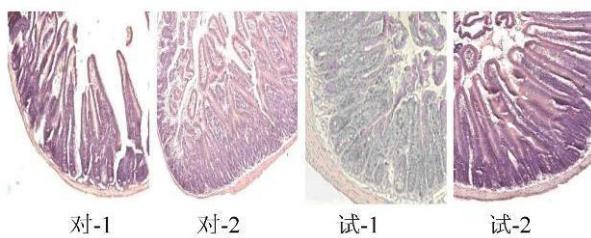


图2 小白鼠十二指肠绒毛结构 (HE染色, @40)

Fig 2 The structure of villus in the duodenum of broiler (HE staining)

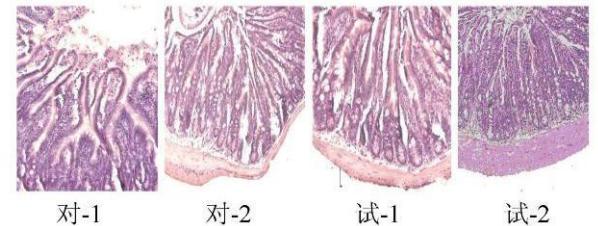


图4 小白鼠回肠肠绒毛结构 (HE染色, @40)

Fig 4 The structure of villus in the ileum of broiler (HE staining)

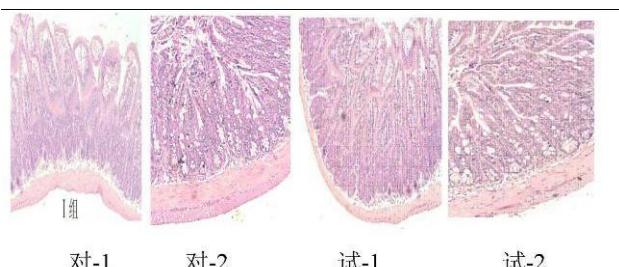


图3 小白鼠空肠肠绒毛结构 (HE染色, @40)

Fig 3 The structure of villus in the jejunum of broiler (HE staining)

3 讨 论

3.1 特异性 IgY 对小鼠的攻毒保护作用

许多研究者在研究 IgY 的动物保护试验中证明 IgY 具有良好的抑菌和攻毒保护效应。郭洁等^[8]研究结果表明 IgY 能有效地抑制葡萄球菌的生长, 抑制强度与 IgY 浓度呈正相关。其中 IgY 溶液以 $10 \text{ mg } \# \text{ mL}^{-1}$ 浓度即能有效抑制 $1 @ 10^9 \text{ CFU } \# \text{ mL}^{-1}$ 金黄色葡萄球菌生长达 24 h, 表明 IgY 具有良好的体外抑菌效果。耿艺介等^[9]对 IgY 的抗菌性能进行研究, 用菌液直接涂板的方法结果

显示, IgY 药物在一定的稀释度下对 3 种细菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌)的抑菌率均可达到 90% 以上。甄宇红等^[10]研究证实特异性 IgY 对小鼠大肠杆菌败血症具有保护作用, 能有效改善败血症小鼠的各种临床症状, 明显降低小鼠的死亡率。

本试验将稀释成 3 个浓度梯度的特异性 IgY 分别与病原菌液等量混合后进行显微镜观察。结果表明 IgY 特异性凝集病原细菌, 且 IgY 效价越高, 与病原菌产生的凝集物就越大越多, 相应游离的病原菌数量显著减少, 且运动性下降。将特异性 IgY 与病原菌混合后注射小白鼠()组的死亡率仅为 10%, 与等剂量菌液对照()组的 60% 死亡率相比, 表现了极为显著的被动免疫保护作用。这一结果与高云英等^[11]研究结果基本一致。由此推测, 由于 IgY 与致病性大肠杆菌表面的菌毛抗原进行了特异结合形成凝集块, 从而抑制了病原菌的活力和粘附定植, 并中和了细菌的大部分毒力因子, 显著降低了细菌对小鼠的致病作用。

3.1.2 口服功能性卵黄粉对小白鼠的攻毒保护作用

由于功能性卵黄粉的优良特性, 通过口服途径来研究其对动物机体各方面的影响, 是一种十分便捷、安全的方式, 可以避免注射^[12]带来的不良反应。口服特异性 IgY 能够提高机体被动免疫保护力^[13~14]。邵华等^[15~16]研究结果显示攻菌前口服特异性 IgY 的乳鼠, 其直肠内分离菌的百分率明显低于攻击后口服 IgY 的乳鼠。抑菌作用随着口服 IgY 剂量的减少和攻菌量的增加而降低。口服大于 3 mg # 只⁻¹ 的特异性 IgY, 可使肠内特异菌减少 50% 以上。口服 4 mg # 只⁻¹ 可御 10 亿菌的攻击。

本次试验通过口服功能性卵黄粉后攻毒的方式观察功能性卵黄粉对动物的保护效果, 结果显示: 试验攻毒组的小白鼠死亡率极显著降低(521.3%), 说明口服富含特异性 IgY 的功能性卵黄粉同样具有良好的攻毒保护效应, 对致病性大肠杆菌引起的疾病具有预防和治疗作用。

总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、血糖(GLU)、总胆固醇(CHO)是反映肝功能的主要指标。尿素氮(BUN)和肌酐(CRE)主要是反映肾功能的指标。本试验结果显示: 未服用功能性卵黄粉进行攻毒的对 1 组小鼠, 血清中 ALT、AST 和 ALP 较其他组显著升高, 说明致病性大肠杆菌对小鼠的肝脏损伤严重; 服用功能性卵黄粉后进行攻毒组的试 1 组小鼠, 血清

中 ALT、AST 和 ALP 极显著低于对 1 组, 但比未攻毒的对 2 组和试 2 组略高, 说明其肝脏受损程度较轻; 两个攻毒组小鼠的 CRE 都显著高于试验未攻毒组, 说明致病性大肠杆菌对小鼠的肾脏也有一定的损伤。上述结果显示, 功能性卵黄粉可显著降低致病性大肠杆菌对肝、肾等脏器的损伤。

动物的脏器指数是其主要的生物学特性指标之一。脏器指数的大小, 从一定程度上也可说明其功能的强弱^[17]。肝脏的重要作用是参与完成新陈代谢, 内有强大吞噬功能的免疫细胞, 具免疫能力, 在维持机体营养与健康上占据极其重要的地位。从免疫学角度看, 脾脏、胸腺是动物机体的免疫器官, 免疫功能的强弱与这些免疫器官的重量变化有着密切关系, 伴随着重量的增加, 其免疫功能必然明显加强。胸腺为一级免疫器官, 主要介导细胞免疫反应, 对 T 淋巴细胞的成熟至关重要; 脾脏为二级免疫器官, 主要参与体液免疫, 是抗体生成的器官, 其数量对调节血清抗体水平起很大作用。动物胸腺、脾脏的萎缩是受病菌或病毒感染, 自身免疫疾病及恶性病变导致免疫功能下降的表现^[18]。本试验结果显示饲喂功能性卵黄粉的试验组, 脏器指数显著高于对照组。由此可推论, 功能性卵黄粉具有提高动物机体免疫力的功能。

3.1.3 功能性卵黄粉对小鼠肠道的保健作用

小肠是营养物质消化吸收的重要部位, 肠绒毛作为小肠的重要组成部分, 不但在吸收营养物质上至关重要, 而且其强有力的、有规律的摆动也有助于排斥有害菌群的定植^[19]。Caspary^[20]报道指出绒毛高度增加后会使小肠接触营养物质的面积增大, 从而增强小肠对营养物质的吸收, 所以肠绒毛的形态直接和机体的生长发育有关。绒毛高度与隐窝深度的比值(V/C 比值)综合反映了小肠的功能状态, 比值下降, 表明黏膜受损, 消化吸收功能下降, 常伴有腹泻发生; 反之, 肠黏膜消化吸收功能增强。

本试验结果显示: 饲喂功能功能性卵黄粉后, 小鼠的肠绒毛高度、V/C 比值与对照组相比均有增高的趋势, 而饲喂功能功能性卵黄粉后进行攻毒, 各肠段的绒毛在致病性大肠杆菌的攻击下的损伤程度与未饲喂功能性卵黄粉的对照组相比大大减轻, 表明功能性卵黄粉能提高肠绒毛高度和 V/C 比值, 改善小白鼠消化道的组织结构, 并降低病原菌攻击所造成的肠道损伤, 促进动物肠道对营养物质的吸收, 从而有利于动物的生长。

参考文献：

- [1] 王忠泽, 侯晓军, 荫俊, 等. 抗大肠杆菌 O157:H7 鸡卵黄抗体的制备及其被动保护作用的研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, (2): 331- 332.
- [2] 王婷, 宋怀燕. IgY 技术及其在医学领域的应用 [J]. 中华医学研究杂志, 2005, 5 (8): 770- 772.
- [3] MORRIS JA, WELLS G A, SCOTT A C, et al. A comparison of methods for demonstrating colonization in the small intestine of piglets by enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. Br Vet J, 1985, 141 (5): 484- 489.
- [4] 黄莉, 赵德明1 卵黄抗体的研究进展 [J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20 (3): 39- 41.
- [5] HATTA H, TSUDA K, AKACHI S, et al. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1993, 57 (3): 450- 454.
- [6] 王一武, 孟昭强1 卵黄抗体的机理及应用研究 [J]. 山东畜牧兽医, 2008, 29 (9): 41- 43.
- [7] 史同瑞, 李丹, 姚瑞1 卵黄免疫球蛋白的应用进展 [J]. 中国动物保健, 2010, (4): 20- 24.
- [8] 郭洁, 甄宇红, 李小宇, 等1 抗金黄色葡萄球菌卵黄抗体的制备及活性研究 [J]. 现代生物医学进展, 2007, 7 (12): 1797- 1799.
- [9] 耿艺介, 张仁利, 高世同, 等1 IgY 抗菌性能评价方法的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16 (2): 1307- 1308.
- [10] 甄宇红, 韩旭, 郭洁, 等1 特异性卵黄抗体 (IgY) 对小鼠大肠杆菌败血症的保护作用 [J]. 现代生物医学进展, 2008 (1): 457- 460.
- [11] 高云英, 赵发苗, 张金良, 等1 鸡抗猪大肠杆菌高免卵黄抗体的研制与应用 [J]. 畜牧兽医杂志, 2003, 22 (1): 6- 8.
- [12] 程学慧1 预防仔猪腹泻外源抗体)) 卵黄抗体研究 [M]. 武汉: 华中农业大学, 2003.
- [13] LEE E N, SUNWOO H H, MENNINEN K, et al. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* [J]. Poult Sci, 2002, 81 (5): 632- 641.
- [14] LU Y, LIU J, JIN L, et al. Passive Immunization of Crayfish (*Procambarus clarkii*) with Chicken Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) Against White Spot Syndrome Virus (WSSV) [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 159 (3): 750- 758.
- [15] 邵华, 陈子杨, 张勇, 等1 福氏志贺菌 IgY 的抑菌作用 [J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20 (10): 754- 756.
- [16] 邵华, 张勇, 杨宇飞, 等1 细菌性痢疾 IgY 生物学活性探讨 [J]. 微生物学杂志, 2006, (5): 32.
- [17] 高丽松, 周海英, 曾凡潘, 等1 磁处理白术药液对小白鼠免疫器官指数影响的药效研究 [J]. 生物磁学, 2004, 4 (3): 9- 11.
- [18] 李苑, 陈亦, 胡兴昌1 板蓝根枸杞提取液对小鼠免疫机能影响的比较 [J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2006, 35 (5): 83- 86.
- [19] 马仲华1 家畜解剖及组织胚胎学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [20] CASPARY W F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption [J]. Am J Clin Nutr, 1992, 55 (1): 299- 308.

(责任编辑: 柯文辉)