

· 实验研究 ·

特异性抗镰刀菌感染鸡卵黄抗体的制备及其抗镰刀菌作用

林静¹ 刘星¹ 彭旭东¹ 李翠¹ 隋建新² 赵桂秋¹¹青岛大学附属医院眼科, 青岛 266003; ²中国海洋大学食品科学学院, 青岛 266003

通信作者: 赵桂秋, Email: zhaoguiqiu_good@126.com

【摘要】 目的 制备特异性抗镰刀菌鸡卵黄抗体(IgY)并检测其对温度和 pH 的耐受性及抗真菌作用。**方法** 取 22 周龄莱杭母鸡 18 只, 采用随机数表法将其随机分为阴性对照组和实验组, 每组 9 只。制备灭活镰刀菌丝悬液, 将菌丝浓度 2×10^7 菌落形成单位(CFU)/ml 的菌悬液与弗氏完全佐剂等体积混合充分乳化后, 对实验组莱杭母鸡进行免疫, 每只鸡注射 1 ml, 2 周后换为弗氏不完全佐剂加强免疫。在免疫后的第 5~16 周每周收集卵黄, 用硫酸铵盐析法制备 IgY, 将得到的蛋白溶液放入冻干机中制作成冻干粉, 4 °C 保存。以质量分数 0.9% 氯化钠溶液代替菌悬液按照同样方式进行阴性对照组莱杭母鸡的注射, 以制备非特异性抗体作为实验中的阴性对照。采用考马斯亮蓝法测定特异性 IgY 蛋白浓度, 采用间接酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定其效价。将 1×10^5 CFU/ml 和 1×10^3 CFU/ml 镰刀菌悬液与不同浓度 IgY 及磷酸盐缓冲液(PBS)混合培养 4 d 后测定吸光度(A)值, 用 PBS 及非特异性 IgY 与镰刀菌悬液共孵育作为空白对照组及阴性 IgY 组, 绘制抗镰刀菌 IgY 的抑菌曲线。用 pH 7.4 的 PBS 将特异性 IgY 溶液稀释至 0.02 mg/ml, 分别在 30、40、50、60、70、80 和 90 °C 水浴中孵育 30 min 后冷却至室温; 此外, 用 pH 值为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 的 PBS 将特异性 IgY 溶液稀释至 0.02 mg/ml, 4 °C 下放置 1 h, 均采用间接 ELISA 法测定抗体活性, 评估 IgY 对不同温度和 pH 的耐受性。取 SPF 级 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 12 只, 采用随机数表法将其分为 PBS 对照组和特异性 IgY 治疗组, 每组 6 只。用镰刀菌感染小鼠右眼角膜, 建立小鼠真菌性角膜炎动物模型, 建模后 1 d, 特异性 IgY 治疗组用 200 mg/ml 特异性抗镰刀菌 IgY 点眼, PBS 对照组用 PBS 点眼, 于感染后 1、3 和 5 d 在裂隙灯显微镜下观察小鼠角膜, 根据炎症评分表对真菌性角膜炎的严重程度进行评分。**结果** 免疫后第 5~16 周的 IgY 蛋白质量浓度分别为 1.57、2.89、24.98、25.09、23.89、25.78、21.57、21.37、18.98、15.78、14.67 和 12.67 mg/ml。特异性抗镰刀菌 IgY 的效价从第 5 周开始升高, 第 7 周时达到最高效价, 为 1:10 000, 可维持至免疫后 12 周, 12 周后抗体效价逐渐下降。抑菌曲线显示, 与空白对照组和阴性 IgY 组相比, 特异性 IgY 治疗组镰刀菌生长缓慢。抗体效价高于 1:10 000 的特异性 IgY 在 60 °C 以下具有较好的热稳定性; 在 pH 4~6 具有最高活性, 在 pH 3~9 的免疫活性能够保持在 70% 以上, 随着 pH 值的进一步降低或升高, 其活性迅速降低。镰刀菌感染后 1、3 和 5 d, PBS 对照组角膜炎评分分别为 3.50 ± 0.55 、 7.33 ± 0.82 和 4.00 ± 0.63 , 特异性 IgY 治疗组角膜炎评分分别为 3.33 ± 0.82 、 4.17 ± 0.75 和 2.50 ± 0.55 。2 个组不同时间点炎症评分总体比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 247.35, P < 0.05$; $F_{\text{时间}} = 23.19, P < 0.05$), 其中镰刀菌感染后 3 d 和 5 d, 与 PBS 对照组相比, 特异性 IgY 治疗组小鼠真菌性角膜炎炎症评分降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 用硫酸铵盐析法可成功制备高效价特异性抗镰刀菌 IgY, 其稳定性高, 对温度和酸碱度均有一定的耐受性, 可以在小鼠的真菌性角膜炎模型中减轻角膜溃疡的严重程度, 降低炎症评分。

【关键词】 真菌性角膜炎/治疗; 镰刀菌; 抗体; 效价; 鸡卵黄抗体**基金项目:** 山东省重点研发计划项目(2019GSF107022)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20201126-00796

Preparation of specific yolk immunoglobulin against *Fusarium* and evaluation of its anti-*Fusarium* effect

Lin Jing¹, Liu Xing¹, Peng Xudong¹, Li Cui¹, Sui Jianxin², Zhao Guiqiu¹¹Department of Ophthalmology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China; ²College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Corresponding author: Zhao Guiqiu, Email: zhaoguiqiu_good@126.com

【Abstract】 Objective To prepare specific anti-*Fusarium* yolk immunoglobulin (IgY) and investigate its tolerance to temperature and pH and verify its antifungal effect against *Fusarium*. **Methods** Eighteen 22-week-old Leghorn laying hens were selected and randomized into negative control group and experimental group according to the

random number table method, with 9 hens in each group. The 2×10^7 colony forming units (CFU)/ml suspension of inactivated hyphae of *Fusarium* and Freund complete adjuvant was mixed in a 1 : 1 ratio and emulsified. The hens in the experimental group were injected with 1 ml of the mixture to immunize and received 1 ml of Freund incomplete adjuvant as booster injection at two weeks after the initial injection. The egg yolk was collected from the 5th to 16th week after immunization. Specific anti-*Fusarium* IgY protein was prepared by salting out method using ammonium sulfate. The obtained protein solution was put into a freeze dryer and made into freeze-dried powder stored at 4 °C. The hens in the negative control group were injected with 0.9% sodium chloride to prepare the non-specific antibody as the negative control. Bradford method was used to determine the concentration of specific egg IgY protein and the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to measure its titer. The 1×10^5 CFU/ml and 1×10^3 CFU/ml *Fusarium* suspension were cultured with different concentrations of IgY and phosphate buffered saline (PBS) for 4 days, and the absorbance value at 600 nm was measured. The co-incubated PBS/negative IgY with *Fusarium* solution was set as blank control/negative control accordingly. The concentration-killing curve of anti-*Fusarium* IgY against *Fusarium* was obtained. The specific IgY solution was diluted to 0.02 mg/ml with PBS pH 7.4, and the diluted specific IgY solution was placed into the water bath for 30 minutes at 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C, respectively, and was cooled down to room temperature. The specific IgY solution was diluted to 0.02 mg/ml with PBS pH 1, pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, pH 10, pH 11, pH 12, respectively, and the diluted specific IgY solution was placed at 4 °C for one hour. The activity of diluted specific IgY solution by different methods was measured by indirect ELISA, and the tolerance of IgY to various temperatures and pH was evaluated. Twelve 8-week-old SPF female C57BL/6 mice were selected and randomized into the PBS control group and specific IgY treatment group according to the random table method, with 6 mice in each group. The right eyes of the 12 mice were infected with *Fusarium* to establish mice model of fungal keratitis. One day after modeling, 200 mg/ml of anti-*Fusarium* IgY was dropped to the right eyes of mice in the specific IgY treatment group, and PBS was dropped to the right eyes of mice in the PBS control group. The corneas of mice in the two groups were observed under the slit lamp microscope at 1, 3 and 5 days following modeling, and the corneal ulcer was scored according to the grading scale for inflammation score. The use and care of experimental animals followed the Association for Research in Vision and Ophthalmology statement. This study protocol was approved by an Ethics Committee of The Affiliated Hospital of Qingdao University (No. QYFYWZLL26168).

Results The IgY protein concentration from the 5th to 16th week after immunization was 1.57, 2.89, 24.98, 25.09, 23.89, 25.78, 21.57, 21.37, 18.98, 15.78, 14.67, 12.67 mg/ml, respectively. The titer of IgY was increased from the 5th week, and it reached the highest titer 1 : 10 000 at the 7th week, which could be maintained until the 12th week after immunization before it dropped gradually. The concentration-killing curve showed that compared with the blank control group and negative control group, *Fusarium* grew slowly in the specific IgY treatment group. The specific IgY with a titer greater than 1 : 10 000 had thermal stability below 60 °C. The activity of specific IgY was highest at pH 4 to 6, which could be maintained above 70% at pH 3 to 9 and was further reduced with the decrease or increase of pH. At 1, 3 and 5 days after *Fusarium* infection, the inflammation scores were 3.50 ± 0.55 , 7.33 ± 0.82 , 4.00 ± 0.63 in the PBS control group, and 3.33 ± 0.82 , 4.17 ± 0.75 , 2.50 ± 0.55 in the specific IgY treatment group. There was a statistically significant overall difference in inflammation scores at various time points between the two groups ($F_{\text{group}} = 247.35, P < 0.05$; $F_{\text{time}} = 23.19, P < 0.05$). At 3 and 5 days after *Fusarium* infection, there was a smaller ulcer area and decreased inflammation scores in the specific IgY treatment group compared with the PBS control group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$).

Conclusions The high titer specific IgY can be successfully prepared by salting out method using ammonium sulfate, which is with high stability, tolerance to temperature and pH. Moreover, it can alleviate the severity of corneal ulcers and reduce inflammation scores in the mouse model of fungal keratitis.

[Key words] Keratitis, fungal/therapy; *Fusarium*; Antibodies; Titer; Yolk immunoglobulin

Fund Program: Key Research and Development Plan of Shandong Province (2019GSF107022)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20201126-00796

真菌性角膜炎是一种由致病真菌感染引起的严重致盲眼病。植物性外伤是其主要发病诱因,因此其在以农业生产为主的发展中国家发病率较高^[1-2]。真

菌性角膜炎的致病菌属主要包括镰孢菌属、曲霉菌属、念珠菌属和弯孢菌属,以镰刀菌和烟曲霉菌常见^[3]。在我国,镰刀菌导致真菌性角膜炎的发病率逐年升高。



真菌性角膜炎起病缓慢、病程长,与病毒性或细菌性角膜溃疡相比,真菌性角膜溃疡预后更差。目前在临床中常用的抗真菌药物主要有多烯类(两性霉素 B)、唑类(伏立康唑、氟康唑)、棘白菌素类(卡泊芬净、米卡芬净)和环孢素类等^[4]。由于抗真菌药物的毒性和不良反应较大,局部渗透性差且刺激性强,限制了其在真菌性角膜炎中的应用^[5],因此亟需寻找毒性低、抗真菌效果好、渗透性强的药物来增加局部作用效果并减轻全身毒性作用。鸡卵黄抗体(yolk immunoglobulin, IgY)是将抗原通过注射的方式免疫禽类后,通过其免疫系统产生并蓄积在卵细胞中的特异性抗体。母鸡产生 IgY 是为了给后代提供对常见禽病原体有效的体液免疫,直至后代自身免疫系统完全成熟。IgY 具有产量高、易获得、价格低廉、毒性低、对温度和 pH 具有良好的耐受性等特点,已经在疾病诊断和治疗等方面有广泛的研究和应用^[6-8]。研究表明,用细菌、真菌、病毒等病原体作为抗原免疫蛋鸡后,均能使蛋鸡产生针对特定抗原的 IgY^[9],产生的特异性 IgY 能够有效抑制痢疾志贺菌、轮状病毒、白念珠菌、毛癣霉菌等的生长,并在口腔念珠菌感染、皮肤毛癣霉病等多种疾病中具有较好的治疗效果^[10-13]。但是到目前为止,特异性 IgY 在真菌性角膜炎中的作用尚不清楚。本实验拟制备特异性抗镰刀菌的 IgY,并检测其抗真菌作用及对温度和 pH 的耐受性,以期对真菌性角膜炎的药物治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象及来源 标准镰刀菌菌株(NO.3.01829)(中国普通微生物保藏中心提供)。22 周龄莱杭母鸡 18 只,体质量约 1 kg(青岛森森公司提供)。健康 8 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠 12 只(济南朋悦公司),均经过检验及检疫,眼前节无明显异常。小鼠饲养环境温度控制在 18~22 ℃,湿度为 50%~60%,室内明暗循环各 12 h。实验动物的使用遵循美国眼科和视觉研究协会关于实验动物使用的原则和标准,本研究方案经青岛大学附属医院实验动物伦理委员会审核批准(批文号:QYFYWZLL26168)。

1.1.2 主要试剂及仪器 沙氏培养基、沙氏 Agar 培养基、Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(北京索莱宝公司);DMEM(美国 HyClone 公司);弗氏佐剂、弗氏不完全佐剂、辣根酶标记兔抗鸡 IgG(美国 Sigma 公司);优级纯

硫酸铵(天津科密欧化学试剂开发中心)。透气封口膜(上海富雪生物科技有限公司);普兰德封口膜(上海生物公司);角膜板层刀(美国 Alcon 公司);5-0 带线缝合针(宁波医用缝针公司);体式显微镜(德国 Carl Zeiss 公司);-80 ℃和 4 ℃冰箱、超净工作台、冻干机(美国 Thermo Scientific 公司);全套移液器、低温高速离心机(5810R)(德国 Eppendorf 公司);高压立式蒸汽灭菌器(日本 Tomy 公司);酶标仪(美国 Thermo Forma 公司);恒温培养箱(上海力康公司);裂隙灯显微镜(日本拓普康公司)。

1.2 方法

1.2.1 特异性 IgY 的制备 取出冻存的标准镰刀菌菌株于超净工作台中溶解吹打后接种在沙氏 Agar 培养基,置于 28 ℃恒温箱中 5~7 d,刮取镰刀菌的孢子及菌丝接种于含沙氏培养基的无菌细胞培养瓶内,透气封口膜封口,在 37 ℃摇床培养箱内 120 r/min 条件下培养约 5 d。收集细胞培养瓶内的镰刀菌菌丝于离心管内研磨充分后在离心半径 13.5 cm, 12 000 r/min、4 ℃条件下离心 15 min,弃上清,无菌 PBS 充分洗涤菌液 3 遍。加入体积分数 75%乙醇充分混匀后于 4 ℃冰箱过夜灭活菌丝。次日再次 12 000 r/min 离心 15 min,弃去 75%乙醇,用无菌 PBS 洗涤 3 遍,加入 DMEM 培养液混匀,配制成终浓度为 2×10^7 菌落形成单位(colony forming units, CFU)/ml 的菌丝刺激液。采用随机数表法将 18 只莱杭母鸡随机分为阴性对照组和实验组,每组 9 只。取菌悬液与弗氏完全佐剂等体积混合并充分乳化,取 1 ml 混合液于实验组鸡的颈部、双翅及胸肌处皮下散点注射,2 周后换为弗氏不完全佐剂加强免疫 1 次。收集免疫后的鸡蛋,4 ℃储存备用。同时以氯化钠溶液代替菌悬液按照同样方式对阴性对照组莱杭母鸡进行注射,以制备非特异性抗体作为实验中的阴性对照。取免疫后蛋黄 20 g,用灭菌双蒸水稀释至质量浓度为 90 mg/ml,混匀后调节 pH 至 5.0,4 ℃静置过夜。4 ℃条件下 10 000 r/min 离心 30 min,取上清液过滤,收集滤液。向滤液中加入 50%饱和度的优级纯硫酸铵,4 ℃条件下搅拌 30 min 并静置 2 h 以使蛋白沉淀。4 ℃条件下 10 000 r/min 离心 15 min,弃上清。将离心所得沉淀溶解于适量的 PBS 中,再加入 33%饱和度的优级纯硫酸铵进行二次盐析,4 ℃条件下搅拌 20 min 后静置 40 min 以使蛋白沉淀。4 ℃条件下 10 000 r/min 离心 15 min,弃上清,沉淀溶解于适量的 PBS 中,充分透析后获得 IgY 溶液。将得到的 IgY 蛋白液体放入冻干机中制作成冻干粉,4 ℃保存。

1.2.2 考马斯亮蓝法测定特异性 IgY 蛋白浓度 将考马斯亮蓝工作液分别加到一系列不同浓度标准蛋白质 BSA 溶液中,振荡摇匀,15 min 后,测定波长 595 nm 处吸光度(absorbance, A) 值,以蛋白质浓度为横坐标, A 值为纵坐标,绘成标准曲线。取第 5~16 周适宜体积待测样品,使其测定值在标准曲线的线性范围内,根据所测定的 A_{595} 值,计算出待测样品的蛋白质浓度。

1.2.3 间接酶联免疫吸附法测定特异性 IgY 效价 取第 5~16 周 IgY,将质量浓度调整至 100 mg/ml,用 2×10^7 CFU/ml 镰刀菌丝包被 96 孔免疫板。分别以 PBS 和阴性 IgY 提取液作为空白对照和阴性对照,浓度与特异性抗镰刀菌 IgY 的稀释梯度一致。辣根酶标记兔抗鸡 IgG 按 1:2 500 稀释,每孔 100 μ l, TMB 显色剂显色后,1 mol/L H_2SO_4 终止反应,酶标仪测定 A_{450} 值。抗体的效价定义为样品 A_{450} 与阴性对照 A_{450} 的比值 ≥ 2.1 时所需要的样品最大稀释倍数。

1.2.4 特异性 IgY 体外抑菌活性的测定 将 1×10^5 CFU/ml 和 1×10^3 CFU/ml 镰刀菌悬液与效价为 1:10 000 的不同浓度特异性 IgY 混合培养 4 d 后用酶标仪测定 A_{600} 值。用 PBS 及阴性卵黄抗体与镰刀菌液共孵育分别作为空白对照组和阴性 IgY 组,绘制抑菌曲线。

1.2.5 特异性 IgY 热稳定性的测定 将特异性 IgY 用 pH 7.4 的 PBS 稀释至 0.02 mg/ml,分别在 30、40、50、60、70、80 和 90 $^{\circ}C$ 水浴中孵育 30 min,室温冷却后,以 2×10^7 CFU/ml 镰刀菌丝包被 96 孔板,以间接酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法测定不同温度处理后 IgY 的活性。

1.2.6 特异性 IgY 酸碱稳定性的测定 将特异性 IgY 分别用 pH 值为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 的 PBS 稀释至 0.02 mg/ml,并在 4 $^{\circ}C$ 条件下放置 1 h,以 2×10^7 CFU/ml 的镰刀菌丝包被 96 孔板,以间接 ELISA 法测定不同 pH 条件处理后 IgY 的活性。

1.2.7 小鼠镰刀菌性角膜炎模型的建立及处理 采用随机数表法将 12 只小鼠随机分为 PBS 对照组和特异性 IgY 治疗组,每组 6 只。腹腔内注射质量分数 8% 水合氯醛(0.4 ml/kg)麻醉 C57BL/6 小鼠,在体式显微镜下,用板层刀刮除约 2 mm 直径范围的眼

中央角膜上皮组织以形成角膜缺损,将 10 μ l 镰刀菌悬液点于角膜上并用封口膜自制的软性角膜接触镜覆盖,用 5-0 带线缝合针缝合上下眼睑。建模后 1 d,特异性 IgY 治疗组用 200 mg/ml 特异性抗镰刀菌 IgY 点眼, PBS 对照组用 PBS 点眼,每 2 h 点 1 次。于镰刀菌感染后 1、3 和 5 d 在裂隙灯显微镜下观察并拍照,参照文献[14]的标准对小鼠镰刀菌性角膜炎的严重程度进行分级(表 1)。

1.3 统计学方法

采用 Graphpad Prism 7.0 和 SPSS 23.0 统计学软件进行统计分析。计量资料的数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间不同时间点小鼠角膜炎评分总体差异比较采用重复测量两因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 特异性抗镰刀菌 IgY 的浓度及效价测定

考马斯亮蓝法测定 IgY 浓度标准曲线见图 1,根据标准曲线测得第 5~16 周的特异性 IgY 的蛋白质量浓度分别为 1.57、2.89、24.98、25.09、23.89、25.78、21.57、21.37、18.98、15.78、14.67 和 12.67 mg/ml。特异性抗镰刀菌 IgY 的效价从第 5 周开始升高,第 7 周时达到最高效价,为 1:10 000,可维持至免疫后第 12 周,从第 12 周开始效价缓慢下降(图 2)。

2.2 特异性抗镰刀菌 IgY 抑制镰刀菌生长的抑菌曲线

抑菌曲线显示,特异性 IgY 治疗组的抑菌效果明显好于空白对照组及阴性 IgY 组,250 mg/ml 的特异性 IgY 可完全抑制 1×10^5 CFU/ml 的镰刀菌生长(图 3),100 mg/ml 的特异性 IgY 可完全抑制 1×10^3 CFU/ml 镰刀菌的生长(图 4)。

表 1 小鼠真菌性角膜炎模型炎症分级^[14]
Table 1 Inflammation grading in mouse model of fungal keratitis^[14]

项目	I 级(1 分)	II 级(2 分)	III 级(3 分)	IV 级(4 分)
溃疡面积(%)	1-25	26-50	51-75	76-100
混浊程度	虹膜纹理尚清,瞳孔可见,角膜轻度混浊	虹膜可见,角膜较混浊	虹膜不可见,角膜不均匀混浊	角膜均匀,重度混浊
溃疡形态	轻度不规则	轻度水肿、不规则	重度水肿,兔样溃疡,或后弹力层膨出	穿孔或后弹力层膨出

注:3 项分数相加为最终炎症得分

Note: The final inflammation score was the sum of the three items

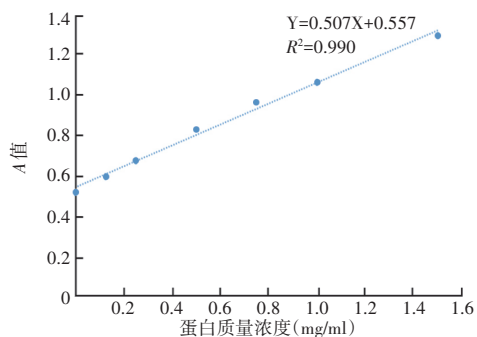


图 1 考马斯亮蓝法测定 IgY 浓度标准曲线 根据标准曲线公式 $Y=0.507X+0.557$ ($R^2=0.990$) 测得蛋白质量浓度 A:吸光度
Figure 1 Bradford assay standard curve of IgY concentration versus absorbance The IgY concentration was calculated according to the equation $Y=0.507X+0.557$ ($R^2=0.990$) A:absorbance

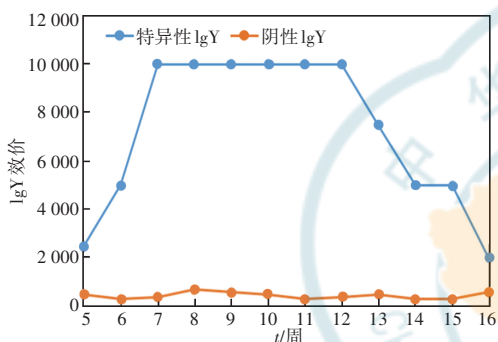


图 2 间接 ELISA 法测定第 5~16 周 IgY 效价 特异性抗镰刀菌 IgY 的效价从第 5 周开始升高,第 7 周时达到最高效价,为 1:10 000,可维持至免疫后第 12 周,从第 12 周开始效价开始缓慢下降 IgY:鸡卵黄抗体
Figure 2 Indirect ELISA method to determine the titer of IgY in 5-16 weeks following immunization The titer of IgY was increased from the 5th week and reached the highest titer 1:10 000 at the 7th week, which could be maintained until the 12th week after immunization. The titer began to decline slowly from the 12th week IgY: yolk immunoglobulin

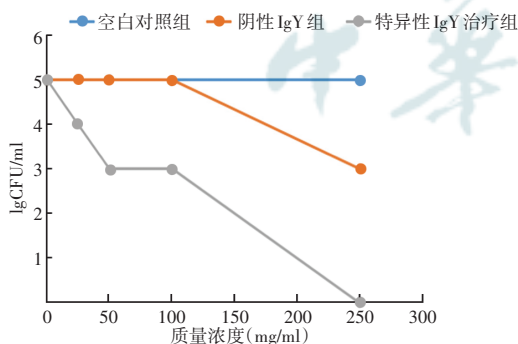


图 3 各组对 1×10⁵ CFU/ml 镰刀菌悬液的抑菌曲线 特异性 IgY 治疗组的抑菌效果明显好于空白对照组及阴性 IgY 组,250 mg/ml 的特异性 IgY 可完全抑制 1×10⁵ CFU/ml 的镰刀菌生长 CFU:菌落形成单位;IgY:鸡卵黄抗体
Figure 3 Concentration-bactericidal curve of different groups against 1×10⁵ CFU/ml *Fusarium* suspension The antifungal effect of the specific IgY group against *Fusarium* was significantly better than the blank group and the negative IgY group. The specific IgY with a concentration of 250 mg/ml could completely inhibit the growth of *Fusarium* of 1×10⁵ CFU/ml CFU: colony forming units; IgY: yolk immunoglobulin

2.3 特异性 IgY 对不同温度和 pH 的耐受性

效价高于 1:10 000 的特异性 IgY 在 60 °C 以下具有较好的热稳定性,效价无明显变化,60 °C 以上抗体效价明显下降(图 5);特异性 IgY 在 pH 4~6 具有最高的活性,在 pH 3~9 的条件下能够维持活性;随着 pH 值的进一步降低或者升高,其活性迅速降低(图 6)。

2.4 特异性 IgY 治疗组与 PBS 对照组角膜炎评分比较

镰刀菌感染后 3 d 和 5 d,与 PBS 对照组相比,特异性 IgY 治疗组小鼠角膜混浊面积减小、溃疡程度减

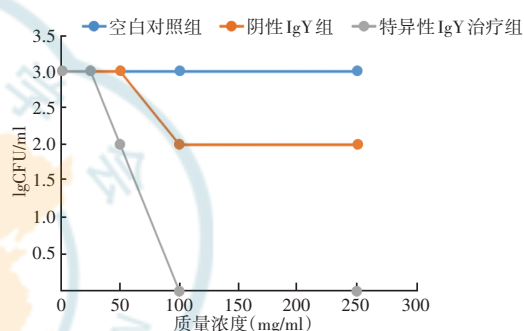


图 4 各组对 1×10³ CFU/ml 镰刀菌悬液的抑菌曲线 特异性 IgY 治疗组的抑菌效果明显好于空白对照组及阴性 IgY 组,质量浓度为 100 mg/ml 的特异性 IgY 可完全抑制 1×10³ CFU/ml 镰刀菌的生长 CFU:菌落形成单位;IgY:鸡卵黄抗体
Figure 4 Concentration-bactericidal curve of different groups against 1×10³ CFU/ml *Fusarium* suspension The antifungal effect of the specific IgY group against *Fusarium* was significantly better than the blank group and the negative IgY group. The specific IgY with a concentration of 100 mg/ml could completely inhibit the growth of *Fusarium* of 1×10³ CFU/ml CFU: colony forming units; IgY: yolk immunoglobulin

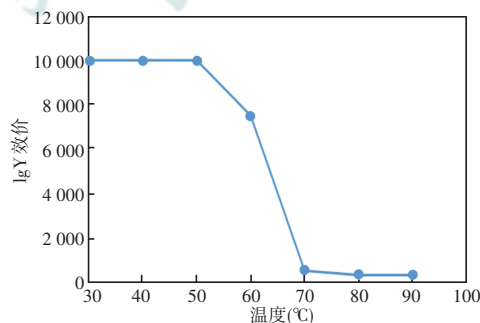


图 5 不同温度对特异性 IgY 效价的影响 效价高于 1:10 000 的特异性 IgY 在 30~60 °C 间效价无明显变化,60 °C 以上抗体效价明显下降 IgY:鸡卵黄抗体
Figure 5 Effect of temperature on the titer of specific IgY There was no significant change in the titer of the specific IgY with a titer higher than 1:10 000 in the range of 30~60 °C, and the titer was decreased significantly when the temperature reached above 60 °C IgY: yolk immunoglobulin

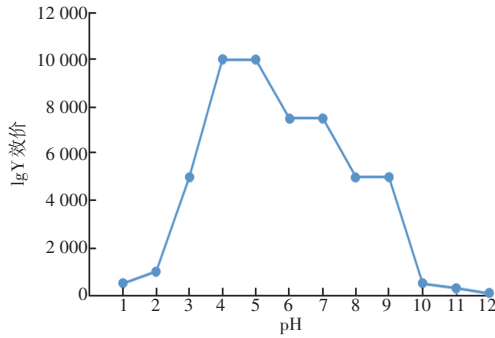


图 6 不同 pH 对特异性 IgY 效价的影响 效价高于 1:10 000 的特异性 IgY 在 pH 4~6 具有最高的活性,在 pH 3~9 的条件下能够维持活性;随着 pH 值的进一步降低或者升高,其活性迅速降低 IgY:鸡卵黄抗体

Figure 6 Effect of pH on the titer of specific IgY There was the highest activity of the specific IgY with a titer higher than 1:10 000 at pH 4-6, which could be maintained at pH 3-9. With the decrease or increase of pH, the activity was reduced rapidly IgY:yolk immunoglobulin

表 2 2 个组镰刀菌感染后不同时间点小鼠角膜炎症评分比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of corneal inflammation scores of mice at various time points after *Fusarium* infection between the two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	感染后不同时间点小鼠角膜炎症评分		
		1 d	3 d	5 d
PBS 对照组	6	3.50±0.55	7.33±0.82	4.00±0.63
特异性 IgY 治疗组	6	3.33±0.82	4.17±0.75 ^a	2.50±0.55 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 247.35, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 23.19, P < 0.05; F_{\text{交互作用}} = 32.10, P < 0.05$. 与 PBS 对照组比较,^a $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验) PBS:磷酸盐缓冲液;IgY:鸡卵黄抗体
Note: $F_{\text{group}} = 247.35, P < 0.05; F_{\text{time}} = 23.19, P < 0.05; F_{\text{interaction}} = 32.10, P < 0.05$. Compared with the PBS control group,^a $P < 0.05$ (Two-way repeated measures ANOVA, LSD-*t* test) PBS:phosphate buffered saline; IgY:yolk immunoglobulin

3 讨论

轻(图 7)。镰刀菌感染后 1、3 和 5 d, PBS 对照组和特异性 IgY 治疗组不同时间点炎症评分总体比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 247.35, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 23.19, P < 0.05; F_{\text{交互作用}} = 32.10, P < 0.05$)。镰刀菌感染后 1 d, 2 个组炎症评分比较差异无统计学意义 ($P = 0.610$); 镰刀菌感染后 3 d 和 5 d, 与 PBS 对照组相比, 特异性 IgY 治疗组炎症评分降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

IgY 来自于被抗原免疫后的蛋鸡卵黄。国内外大量研究发现, 特异性针对病原体的 IgY 可被应用于病原体感染性疾病的诊断及治疗^[15]。IgY 不仅具有抗原结合力, 而且对其抗原菌的生长具有明显抑制作用。尽管其作用机制尚不明确, IgY 应用于动物病原菌的被动免疫在病原体相关疾病的预防和治疗中有重要作用^[16-18]。特异性 IgY 能够有效抑制鲍曼不动杆菌、轮状病毒、白念珠菌、毛癣霉菌等的生长。在小鼠模型中应用特异性 IgY 能够减轻口腔念珠菌感染、皮肤毛癣霉病等多种疾病的严重程度^[8,10]。但特异性针对镰刀菌的 IgY 未见相关报道。

本研究制备了特异性针对镰刀菌的 IgY, 并验证了其抗真菌作用。我们用镰刀菌菌丝作为抗原, 与弗氏佐剂混合, 采用颈部、双翅及胸肌等多处皮下散点注射的方式免疫莱杭母鸡, 2 周后更换为弗氏不完全佐剂加强免疫 1 次。用硫酸铵盐析法从免疫后的莱杭母鸡卵黄中提取出特异性 IgY, 并检测了效价。结果显示, 特异性 IgY 的最高效价可达到 1:10 000, 在免疫后 5 周效价开始升高, 7~12 周时效价最高, 12 周后效价开始下降。研究显示, 鸡卵黄抗体在免疫制备过程中, 免疫的途径、注射部位、抗原用

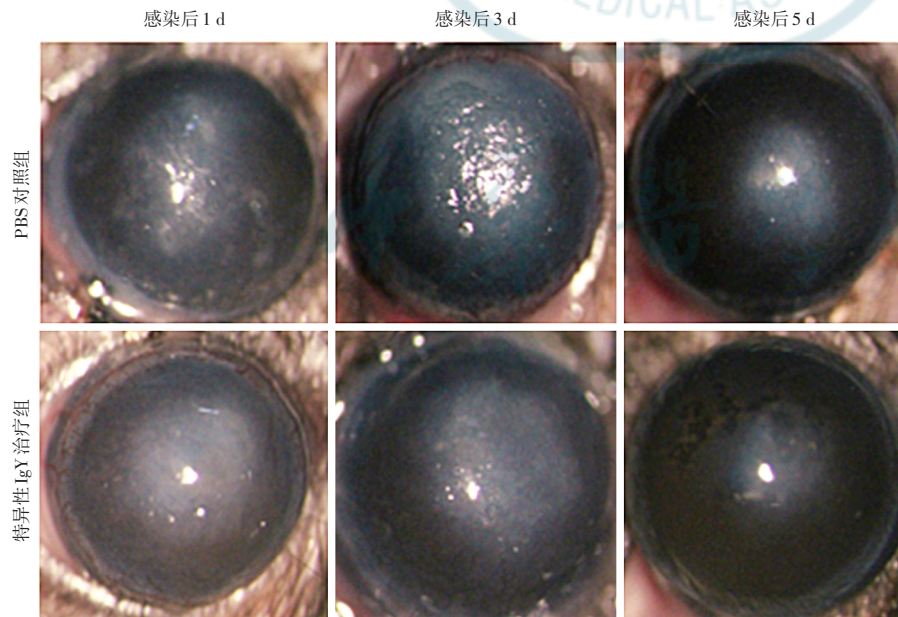


图 7 特异性 IgY 治疗组与 PBS 对照组小鼠角膜形态及炎症程度比较 裂隙灯显微镜下观察可见, 感染后 3 d 和 5 d, 与 PBS 对照组相比, 特异性 IgY 治疗组小鼠角膜混浊面积缩小, 溃疡程度和炎症程度均明显减轻 PBS:磷酸盐缓冲液; IgY:鸡卵黄抗体

Figure 7 Comparison of morphology of mice cornea and degree of inflammation between the two groups At 3 and 5 days after infection, there was a smaller area of corneal opacity, relieved ulceration and inflammation in the specific IgY treatment group compared with the PBS group PBS:phosphate buffered saline; IgY:yolk immunoglobulin

量、间隔时间、免疫次数等都是影响免疫效果的因素^[19]。本实验结果表明,镰刀菌的菌丝在颈部、双翅及胸肌等多处皮下散点注射的方式能够充分引起蛋鸡的免疫,而且硫酸铵盐析法可高效提取 IgY,与文献^[20]研究结果一致。既往实验中,提取 IgY 的方法可分为 4 种,即硫酸铵盐析法、硫酸钠盐析法、冰乙醇法和聚乙二醇沉淀法^[21]。硫酸铵盐析法提取产物的抗体效价最高,且产量大,是较为理想的提取纯化方法。另外有研究表明,针对白念珠菌的 IgY 可以封闭白念珠菌的表面抗原,防止白念珠菌菌丝体转变,引起凝集,从而抑制白念珠菌的生长^[18]。本研究发现,与空白对照组及阴性 IgY 组相比,特异性 IgY 可显著抑制镰刀菌生长,这为特异性 IgY 成为新型抗真菌药提供了研究基础。另外,在小鼠镰刀菌性角膜炎中,特异性 IgY 治疗组小鼠角膜混浊面积、溃疡程度、炎症程度均明显减轻,炎症评分显著降低,这表明特异性 IgY 对小鼠的镰刀菌性角膜炎具有治疗作用,有望作为天然生物抑菌剂应用于镰刀菌性角膜炎的治疗中。IgY 作为一种蛋白类物质,在应用中对温度及酸碱度的耐受性非常重要。本实验测定了特异性 IgY 对酸碱度和温度的耐受力,结果显示抗体效价高于 1:10 000 的特异性 IgY 在 60 °C 以下具有较好的热稳定性;抗体在 pH 4~6 具有最高的活性,在 pH 3~9 的条件下能够维持活性,随着 pH 值的进一步降低或者升高,其活性迅速降低,与既往研究结果一致^[21-23]。IgY 良好的温度及酸碱耐受性为其大量制备和广泛应用提供了基础。

综上所述,本研究结果显示采用硫酸铵盐析法可成功制备高产量、高效价的特异性 IgY,该抗体可显著抑制镰刀菌生长,在小鼠镰刀菌性角膜炎模型中降低角膜炎评分,减轻角膜溃疡的严重程度,并且其稳定性高,对温度和酸碱度均有一定的耐受性。高效价特异性 IgY 作为一种新的天然抑菌剂,有望应用于真菌性角膜炎的治疗中。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

作者贡献声明 林静:分析/解释数据,酝酿和设计实验,对文章的知识性内容作批评性审阅,获取研究经费;刘星:实施研究,分析/解释数据,起草文章;彭旭东:对文章的知识性内容作批评性审阅,统计分析;李翠:分析/解释数据,对文章的知识性内容作批评性审阅;隋建新:对文章的知识性内容作批评性审阅;赵桂秋:对文章的知识性内容作批评性审阅,提供研究经费,行政、技术或材料支持

参考文献

- [1] van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Romani L, et al. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15 (11) : 661-674. DOI: 10. 1038/nrmicro. 2017. 90.
- [2] Niu Y, Zhao G, Li C, et al. *Aspergillus fumigatus* increased PAR-2

expression and elevated proinflammatory cytokines expression through the pathway of PAR-2/ERK1/2 in cornea [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59 (1) : 166-175. DOI: 10. 1167/iovs. 17-21887.

- [3] Tabatabaei SA, Soleimani M, Tabatabaei SM, et al. The use of *in vivo* confocal microscopy to track treatment success in fungal keratitis and to differentiate between *Fusarium* and *Aspergillus* keratitis [J]. *Int Ophthalmol*, 2020, 40 (2) : 483-491. DOI: 10. 1007/s10792-019-01209-2.
- [4] Wiederhold NP. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2018, 51 (3) : 333-339. DOI: 10. 1016/j. ijantimicag. 2017. 09. 002.
- [5] Fu T, Yi J, Lv S, et al. Ocular amphotericin B delivery by chitosan-modified nanostructured lipid carriers for fungal keratitis-targeted therapy [J]. *J Liposome Res*, 2017, 27 (3) : 228-233. DOI: 10. 1080/08982104. 2016. 1224899.
- [6] Xu Y, Jin L, Li X, et al. Application of chicken egg yolk immunoglobulin in land and aquatic animal diseases control [J]. *J Biotechnology*, 2008, 136 (Suppl) : S9-S10. DOI: 10. 1016/j. jbiotec. 2008. 07. 1800.
- [7] Kim DK, Jang IK, Seo HC, et al. Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a truncated fusion protein derived from WSSV [J]. *Aquaculture*, 2004, 237 (1-4) : 21-30. DOI: 10. 1016/j. aquaculture. 2004. 03. 015.
- [8] Ibrahim ESM, Rahman AKMS, Isoda R, et al. *In vitro* and *in vivo* effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY) [J]. *Vaccine*, 2008, 26 (17) : 2073-2080. DOI: 10. 1016/j. vaccine. 2008. 02. 046.
- [9] Jiang JP, Zhou J, Chen J, et al. Effect of chicken egg yolk antibody against adipose tissue plasma membranes on carcass composition and lipogenic hormones and enzymes in pigs [J]. *Livestock Sci*, 2007, 107 (2-3) : 235-243. DOI: 10. 1016/j. livsci. 2006. 09. 020.
- [10] Xiao Y, Hu Q, Jiao L, et al. Production of anti-*Trichophyton rubrum* egg yolk immunoglobulin and its therapeutic potential for treating dermatophytosis [J/OL]. *Microb Pathog*, 2019, 137 : 103741 [2021-05-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31513894/>. DOI: 10. 1016/j. micpath. 2019. 103741.
- [11] Kamikawa Y, Fujisaki J, Nagayama T, et al. Use of *Candida*-specific chicken egg yolk antibodies to inhibit the adhering of *Candida* to denture base materials: prevention of denture stomatitis [J]. *Gerodontology*, 2016, 33 (3) : 342-347. DOI: 10. 1111/ger. 12163.
- [12] 何艳萍, 钟青萍, 钟士清. 抗痢疾志贺氏菌卵黄抗体的制备及其稳定性 [J]. *免疫学杂志*, 2006, 22 (1) : 164-166. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-8861. 2006. z1. 044.
- [13] 曾小平, 傅颖媛, 况南珍. 抗白色念珠菌 IgY 的稳定性及体内抗感染活性研究 [J]. *免疫学杂志*, 2005, 21 (4) : 303-305. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-8861. 2005. 04. 010.
- [14] Zeng XP, Fu YY, Kuang NZ. Stability and activity of anti-*C. albicans* IgY *in vivo* [J]. *Immunol J*, 2005, 21 (4) : 303-305. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-8861. 2005. 04. 010.
- [15] Wu TG, Wilhelmus KR, Mitchell BM. Experimental keratomycosis in a mouse model [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (1) : 210-216. DOI: 10. 1167/iovs. 02-0446.
- [16] Pereira E, van Tilburg MF, Florean E, et al. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: a review [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 73 : 293-303. DOI: 10. 1016/j. intimp. 2019. 05. 015.
- [17] 贺攀, 赵肃清, 杨慧怡, 等. 抗伴放线聚集杆菌卵黄抗体的制备及其体外活性研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35 (22) : 2755-2758, 2764. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-484X. 2019. 22. 013.
- [18] He P, Zhao SQ, Yang HY, et al. Preparation and *in vitro* activity of egg yolk antibody (IgY) against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [J]. *Chin J Immunol*, 2019, 35 (22) : 2755-2758, 2764. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-484X. 2019. 22. 013.

- [17] 周莉莉, 徐燕, 蒋鹏, 等. 抗变异链球菌卵黄抗体对变异链球菌致龋毒力因子及菌斑生物膜的影响[J]. 口腔医学研究, 2019, 35(5): 448-452. DOI: 10. 13701/j. cnki. kqxyj. 2019. 05. 009.
Zhou LL, Xu Y, Jiang P, et al. Effect of anti-*Streptococcus Mutans* yolk antibody on virulence factors and plaque biofilm induced by *Streptococcus Mutans*[J]. J Oral Sci Res, 2019, 35(5): 448-452. DOI: 10. 13701/j. cnki. kqxyj. 2019. 05. 009.
- [18] Jahangiri A, Owlia P, Rasooli I, et al. Specific egg yolk immunoglobulin as a promising non-antibiotic biotherapeutic product against *Acinetobacter baumannii* pneumonia infection [J/OL]. Sci Rep, 2021, 11(1): 1914 [2021-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33479293/>. DOI: 10. 1038/s41598-021-81356-8.
- [19] 邵敏, 王新颖, 卢毓璁, 等. 抗人蔗糖酶卵黄抗体的制备及其稳定性和体外活性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(12): 1785-1789. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-484X. 2016. 12. 013.
Shao M, Wang XY, Lu YC, et al. Preparation, stability and *in vitro* activity of egg yolk immunoglobulin Y against human Sucrase[J]. Chin J Immunol, 2016, 32(12): 1785-1789. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-484X. 2016. 12. 013.
- [20] 隋建新, 林洪, 曹立民, 等. 单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 鸡卵黄抗体的制备及其抑菌活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 1-6.
Sui JX, Lin H, Cao LM, et al. Preparation and characterization of chicken egg yolk antibodies against *Listeria monocytogenes* [J]. Food Fermentat Ind, 2009, 35(2): 1-6.
- [21] 范彬, 刘立国, 邓旭亮, 等. 抗白念珠菌鸡卵黄抗体的制备及温度对其效价的影响[J]. 北京大学学报: 医学版, 2006, 38(4): 428-431. DOI: 10. 3321/j. issn. 1671-167X. 2006. 04. 020.
Fan B, Liu LG, Deng XL, et al. Preparation of chicken egg yolk antibody against *Candida albicans* and effect of temperature on its titer [J]. J Peking Univ Health Sci, 2006, 38(4): 428-431. DOI: 10. 3321/j. issn. 1671-167X. 2006. 04. 020.
- [22] Zhang S, Xing P, Guo G, et al. Development of microbeads of chicken yolk antibodies against *Clostridium difficile* toxin A for colonic-specific delivery [J]. Drug Deliv, 2016, 23(6): 1940-1947. DOI: 10. 3109/10717544. 2015. 1022836.
- [23] Lee KA, Chang SK, Lee YJ, et al. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution [J]. J Biochem Mol Biol, 2002, 35(5): 488-493. DOI: 10. 5483/bmbrep. 2002. 35. 5. 488.

(收稿日期: 2021-07-15 修回日期: 2021-12-24)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

读者·作者·编者

本刊对中英文摘要的要求

论著或综述文稿正文请撰写中英文摘要。原创性论著文稿要求为结构式摘要, 包括目的 (Objective)、方法 (Methods)、结果 (Results) 和结论 (Conclusions) 4 个要素, 摘要应能够回答以下问题: (1) 为什么进行这项研究; (2) 主要用什么方法进行研究; (3) 获得什么主要结果; (4) 通过研究得出什么结论等。其中, 目的部分为本课题对上述提出问题设立的目标; 方法部分应提供研究对象、样本量、分组情况、各组的干预情况、与研究相适应的观察或检测指标, 获得结局指标的手段和设备等, 临床研究请说明是前瞻性研究、回顾性研究还是观察性研究; 结果部分请客观描述研究的主要发现, 包括主要的形态学检查表现、相关的关键性或主要的量化资料以及相应的统计学比较结果, 须写明统计学量值及其概率值; 结论部分请提出与本研究论据直接相关的、必然的推论, 避免得出过度推测性、评价性和扩大化的结论。摘要请用第三人称客观表述, 不列图表, 不引用文献, 不加评论和解释。英文摘要应与中文摘要内容相对应, 但为了对外交流的需要, 可以略详细。英文摘要应包括论文文题 (正体) 及全部作者姓名 (汉语拼音, 姓在前, 首字母大写, 名在后, 首字母大写, 双字连写。如: Yin Xiaohui)、标准化的单位名称、城市名称 (汉语拼音)、邮政编码及国家名称 (全部为斜体)。并请在另起一行处提供通信作者姓名的汉语拼音和 Email 地址, 如 *Corresponding author: Yin Xiaohui, Email: xiaohuih@126.com*。专家述评或综述类文稿请撰写指示性中英文摘要, 摘要内容应包含研究涉及的概念、研究的目的、综述资料的来源、复习的文献量、研究的新发现或应用领域、综合的结果和结论及其意义等必要的信息。

研究论文为前瞻性研究者应在中英文摘要结束处提供临床试验注册号, 以“临床试验注册 (Trial registration)”为标题, 提供注册机构名称和注册号。前瞻性临床研究的论著摘要应注明遵循 CONSORT 声明 (Consolidated Standards of Reporting Trials) (<http://www.consort-standart.org/home>)。

本刊对论文中关键词的著录要求

本刊投稿的论文请分别在中英文摘要下方标引 3~8 个关键词以便于编制文献索引。关键词应选取能反映文章主题概念的词或词组, 中英文关键词应一致。投稿作者可登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> 或 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh> 网站从美国国立医学图书馆的 MeSH 数据库中选取关键词, 其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语 (自由词) 可直接作为关键词使用, 但应排序在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释字顺表》还原为全称, 每个关键词之间用“;”分隔。

(本刊编辑部)