

胆囊收缩素卵黄抗体在大鼠十二指肠的吸收*

张晓萍 黄浩龙 朱祖康 陈杰 赵茹茜**

南京农业大学农业部动物生理生化重点实验室, 南京 210095

摘要 为了探讨 CCK 卵黄抗体能否被动物消化道所吸收, 我们应用 SDS-PAGE 电泳、ELISA 和 Western blot 方法, 检测灌胃 CCK 卵黄抗体后 SD 大鼠十二指肠静脉血液中 CCK 卵黄抗体的免疫活性及存在形式。实验采用 14 只雄性成年 SD 大鼠, 随机分成试验组和对照组, 分别灌胃 150 mg/ml CCK 卵黄抗体粉混悬液和生理盐水 (2 ml/只)。安装亚急性十二指肠静脉插管, 在灌胃后第 2、3、4 h 采集十二指肠静脉血液, 分离血浆。SDS-PAGE 结果显示, CCK 卵黄抗体分子量为 200 kD。ELISA 研究表明, 试验组第 2、3 h 的血浆中, 均检测到 CCK 卵黄抗体效价, 效价达 1 128 以上。同时, Western blot 分析发现, 试验组第 2、3 h 血浆中存在完整分子形式的卵黄抗体。研究结果提示, CCK 卵黄抗体能被 SD 大鼠十二指肠段吸收或部分吸收进入血液, 发挥其免疫学活性 [动物学报 50 (3): 375-379, 2004]。

关键词 大鼠 CCK 卵黄抗体 吸收

Absorption of cholecystokinin (CCK) yolk antibody from the duodenum of the rat*

ZHANG Xiao-Ping, HUANG Hao-Long, ZHU Zu-Kang, CHEN Jie, ZHAO Ru-Qian**

Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract To clarify whether CCK yolk antibody can be absorbed from duodenum in rats, SDS-PAGE electrophoresis, ELISA and Western blot analysis were employed to detect the immunoreactivity and the chemical form of CCK yolk antibody in duodenal venous blood after gastric infusion of CCK yolk antibody. Fourteen adult male SD rats were divided at random into treatment and control groups. Two ml of CCK yolk antibody (150 mg/ml) or physiological solution (0.9% NaCl) was administered intragastrically to rats in treatment and control groups, respectively. Duodenal venous blood was collected from duodenal venous catheters at the 2nd, 3rd and 4th hour after infusion. SDS-PAGE electrophoresis showed that the molecular weight of CCK yolk antibody was 200 kD. CCK yolk antibody was detected in the duodenal venous plasma of animals in the treatment group with ELISA at the 2nd and 3rd hour after administration with the titer of 1 128. Western blot analysis confirmed the finding of ELISA that intact CCK yolk antibody existed in duodenal venous plasma of treatment group. These results suggest that CCK yolk antibody can be absorbed or partly absorbed from the duodenum and play its role in systematic circulation [Acta Zoologica Sinica 50 (3): 375-379, 2004].

Key words Rat, CCK, Yolk antibody, Absorption

禽类经特定抗原免疫后, 可产生相应的抗体, 并不断储存在卵黄中, 这种抗体称为卵黄抗体 (Yolk immunoglobulin, IgY)。IgY 是一种天然存在、无残留、无毒副作用的免疫球蛋白, 是抗生素的潜在替代品, 广泛应用于人类和动物的疾病防治、诊断及治疗。抗假单胞铜绿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) IgY 用于预防龋齿 (Carlande et al., 2002); 幽门螺旋菌 (*Helicobacter pylori*, Hp)

IgY 能预防和治疗由此引起的胃溃疡病 (Shin et al., 2002); 产肠毒素型大肠杆菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC) IgY 可防止新生及断奶仔猪和犊牛因 ETEC 引起的腹泻 (Yokoyama and Hashi, 1997); 抗奶牛乳腺炎 IgY 以 200 mg/kg 的剂量饲喂奶牛, 3 周后明显减轻奶牛的乳房炎症状, 已得到美国农业部的认可 (Stadelman, 1999)。胆囊收缩素 (Cholecystokinin, CCK) 是一种

2003-11-24 收稿, 2004-01-18 接受

* 香港华达生化实业有限公司资助 [This research was funded by Hongkong Walcom Bio-Chemicals Industrial Limited]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: lapb@njau.edu.cn

© 2004 动物学报 Acta Zoologica Sinica

重要的胃肠道多肽激素，它在胃肠道的主要作用是促进胆囊收缩及胰酶分泌，调节胰腺内、外分泌，促进胰腺细胞生长（唐承薇、韩军，2001）。同时，CCK被认为是一种重要的内源性生理饱感因子，参与摄食和体重调节（Danny，1998）。通过CCK免疫中和技术，能部分消除内源性CCK的饱感作用，促进摄食，从而促进动物生长。美国佐治亚州肉鸡研究中心进行了一系列关于CCK卵黄抗体对肉鸡生长性能影响的应用试验，CCK卵黄抗体对肉鸡的体重和饲料效率具有显著作用，与抗生素结合使用有协同效应，能部分替代抗生素（Cook et al. *）。另有资料报道，在饲料中添加70 mg/kg的CCK卵黄抗体能促进肉鸡的生长速度，增加2%的胸肌重量（Adalsteinsson**）。

上述研究均显示，IgY能通过经口被动免疫途径，有效地发挥其免疫学活性或生物学活性。大部分IgY都是通过在口腔或胃肠道内直接黏附细菌，阻止细菌对肠道的黏附而发挥作用。但是，抗奶牛乳腺炎IgY和CCK卵黄抗体结合的抗原并不在消化道内，它们通过何种途径发挥作用？IgY是否能被胃肠道吸收进入血液，从而发挥其免疫学效应和生物学效应呢？

以往的研究表明，蛋白质进入胃肠道首先被胃内的胃蛋白酶部分水解为胨、多肽、寡肽或氨基酸，然后被小肠中的胰蛋白酶和小肠粘膜细胞刷状缘中的氨基肽酶、寡肽酶共同作用，产生最终的消化产物——氨基酸及短肽（Pacha，2002）。氨基酸在小肠的吸收是与Na⁺偶联的需耗能的主动吸收，部分二肽、三肽也可以直接被转运入血液。氨基酸与小肽的吸收互不竞争，且肽比相应的氨基酸的吸收更快速有效。肽转运载体（Peptide transporters, PEPT）在小肠吸收小肽过程中发挥重要作用，其对小肽的吸收没有特异性（Shen et al.，2001）。幼年动物在小肠未封闭以前能吸收大分子的蛋白质。出生6h的仔猪肠道能吸收初乳中的抗体而获得被动免疫（Pacha，2002）。12日龄的大鼠小肠能吸收母乳中的IGF-1（Philipps et al.，2002）。然而，成年动物胃肠道能否吸收像IgY这类大分子蛋白质？

目前，尚未见国内外关于IgY能否被成年动物胃肠道吸收进入血液的研究报道。因此，我们以成年SD大鼠为研究对象，采用SDS-PAGE、

ELISA和Western blot方法，验证SD大鼠灌胃CCK卵黄抗体后，CCK卵黄抗体是否可在十二指肠段被吸收及其吸收后的存在形式，以期能为IgY吸收机理的研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 CCK卵黄抗体

由南京农业大学农业部动物生理生化重点实验室提供，经ELISA检测，纯CCK卵黄抗体粉效价达1 12 800。

1.2 主要仪器与试剂

96孔酶标板（美国Costar），550型自动酶标仪（美国BIO-RAD），分光光度计（德国Eppendorf），DYY-8B型电泳仪、DYCZ-23A型电泳槽和DYCP-40C型电转印槽（北京市六一仪器厂）。羊抗鸡IgG-HRP（Southern Biotechnology Associates Inc.），硝酸纤维素膜（美国Hybond），High Protein Mark（上海华舜生物公司）。

1.3 SD大鼠亚急性动物模型的建立

成年SD大鼠（购自南京中医药大学实验动物中心），雄性，4月龄，体重350 ± 5 g，14只，随机分成试验组和对照组。试验组灌胃150 mg/ml CCK卵黄抗体粉混悬液（2 ml/只），对照组灌胃等体积的生理盐水，灌胃前禁食12 h。灌胃1 h后，用20 mg/ml的戊巴比妥钠，2 ml/kg腹腔注射麻醉。仰卧位固定，打开腹腔，暴露肝门静脉主干，分离十二指肠静脉段，结扎其向心端，用充满肝素钠生理盐水（100 mg/ml）的PE-100插管，朝离心端方向插入，并沿其下行，固定插管，缝合皮肤切口。在灌胃后第2、3、4 h采集SD大鼠十二指肠静脉血液0.8 ml，抗凝，分离血浆，-20℃保存备用。

1.4 IgY提取及浓度测定

参照Akita and Nakai（1993）介绍的IgY水稀释提取法，并进行适当改进。CCK卵黄抗体用pH 5.2的双蒸水10倍稀释，充分摇匀，4℃静置6 h。4 000 r/min离心20 min，吸取上清，加入50%的饱和硫酸铵，摇匀，4℃盐析2 h。4 000 r/min离心20 min，弃上清，沉淀以1 ml的PBS（pH 7.4，0.2 mol/L）完全溶解。用30%的饱和硫酸铵重复

* Cook, Mark E, Miller, Cheryl C, Pimentel, Julio L, 1998. CCK antibodies used to improve feed efficiency. United States Patent 5 827 517.

** Adalsteinsson O, Fitzpatrick ME, Sandra G, Hunchar JG, Jeffery G, 2000. Method of increasing muscle protein and reducing fat in animals. United States Patent 6 086 878.

盐析 3 次, 沉淀用 PBS 透析 24 h。分装, -20 保存。按照 Bradford 法测定提取 IgY 总蛋白浓度。

1.5 SDS-PAGE

采用非还原性 SDS-PAGE 电泳, 检测 IgY 提取过程中分步得到的蛋白。3% 浓缩胶, 8% 分离胶。恒压 100 V, 电泳 3 h。电泳结果采用灰度扫描分析系统分析提取 IgY 的纯度。

1.6 ELISA

CCK-卵清蛋白耦联抗原以碳酸盐缓冲液 (pH 9.6, 0.01 mol/L) 1:100 稀释, 加入 96 孔酶标板, 100 μ l/孔, 4 包被过夜。用洗涤液 (pH 7.4, 0.01 mol/L PBS-Tween20) 洗板 3 次, 1% 明胶封闭, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 1 h, 洗板 3 次。加入试验组血浆倍比稀释液, 以提取的 IgY 作阳性对照, 以对照组血浆倍比稀释液作阴性对照, 0.01 mol/L PBS 为空白对照, 每个样品均做 3 个重复, 每孔均为 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 1 h, 洗板 3 次。羊抗鸡 IgG-HRP 用 0.01 mol/L PBS 稀释 (1:4000), 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 1 h, 洗板 3 次。加入底物液 (2 mg/ml 邻苯二胺, 0.1% H_2O_2), 100 μ l/孔, 避光室温反应 15 min。用 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 在酶标仪上测定 OD₄₉₀ 值。

1.7 Western blot

试验组血浆 10 倍稀释, 分别取 20 μ l 总蛋白进行 5% 非还原性 SDS-PAGE 电泳, 以提取的 IgY 作为阳性对照, 对照组血浆作为阴性对照组。恒压 100 V, 电泳 150 min。恒流 28 mA, 半干式电转印 3 h。转印后的硝酸纤维素膜, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。羊抗鸡 IgG-HRP 以 TBS (pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris) 1:6000 稀释, 与硝酸纤维素膜室温孵育 1 h。然后用 TBS 洗涤 3 次, 加入 10 ml 底物液 (0.6 mg/ml 3,3'-二氨基联苯胺, 0.1% H_2O_2)。当出现棕黄色区带后, 即将硝酸纤维素膜移入双蒸水中, 终止反应。

1.8 统计分析

数据采用 SPSS 11.0 for windows 统计软件, 文中数据均为平均数 \pm 标准误 (Mean \pm SE)。电泳图像采用 Kodak 1D 图像分析系统分析条带灰度。

2 结果

2.1 IgY 的浓度

按照 Bradford 法测定提取 IgY 总蛋白浓度为 22.624 mg/ml。

2.2 SDS-PAGE

CCK 卵黄抗体中存在多种蛋白, 经过多步提取后, IgY 的纯度逐渐提高。SDS-PAGE 电泳显示, IgY 分子量为 200 kD (图 1)。电泳结果经灰度扫描系统分析, 经提取后的 IgY 纯度达 83.8%。

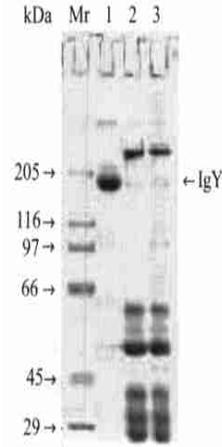


图 1 分步提取 IgY 的 SDS-PAGE 电泳图谱

Mr: 蛋白质分子量标准。1: 提取卵黄抗体。2: 水溶性片段。3: 卵黄。

Fig. 1 SDS-PAGE patterns for IgY purified from egg yolk antibody

Mr: Protein molecular weight marker. 1: IgY obtained after salting out. 2: Water-soluble fraction. 3: Egg yolk.

2.3 ELISA

ELISA 结果显示, 试验组 SD 大鼠灌胃后第 2、3 h 的十二指肠静脉血浆中, 均检测到 CCK 卵黄抗体, 其效价为 1:128 以上, 极显著地高于对照组, 且第 3 h 效价极显著地高于第 2 h, 第 4 h 和对照组血浆中未检测到 CCK 卵黄抗体 (图 2)。说明试验组 SD 大鼠灌胃后第 2、3 h 的十二指肠静脉血浆中存在 CCK 卵黄抗体。

2.4 Western blot

由图 3 (左) 可以看出, SD 大鼠灌胃后采集的十二指肠静脉血浆, 经 SDS-PAGE 电泳, 存在一条与 IgY 分子量相同的蛋白区带。Western blot 结果显示, 试验组 SD 大鼠灌胃后第 2、3 h 的十二指肠静脉血浆中, 有一条与 IgY 分子量相同的棕色区带, 灰度扫描显示第 3 h 灰度极显著地高于第 2 h, 第 4 h 及对照组血浆中未出现反应区带 (图 3 右)。表明试验组 SD 大鼠灌胃后第 2、3 h, 其十二指肠段有完整分子形式的 IgY 被吸收或部分吸收进入血液。

3 讨论

IgY 是存在于卵黄中的免疫球蛋白。蛋禽能选

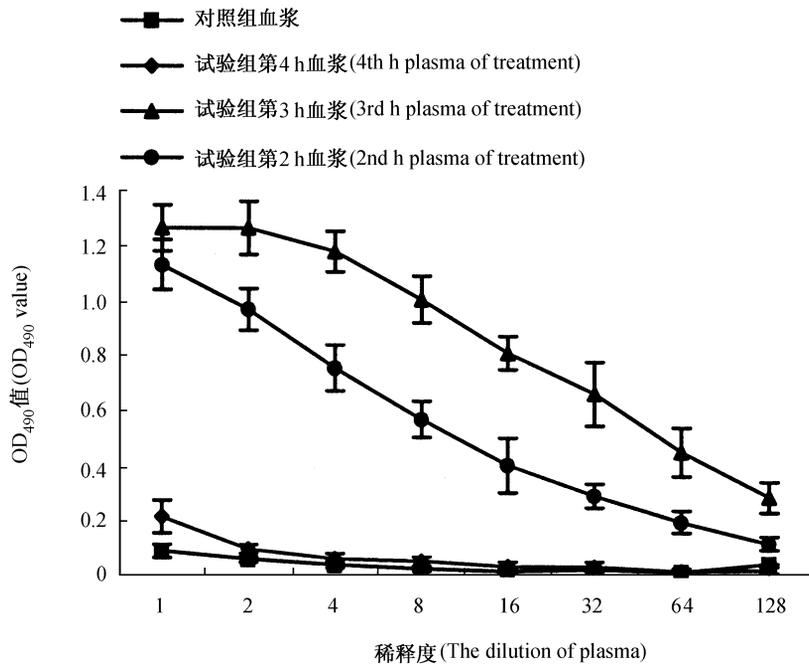


图2 ELISA 检测 SD 大鼠灌胃后十二指肠静脉血浆 CCK卵黄抗体效价

Fig. 2 Titer of CCK yolk antibody in duodenal venous plasma of SD rat detected with ELISA after gastric administration

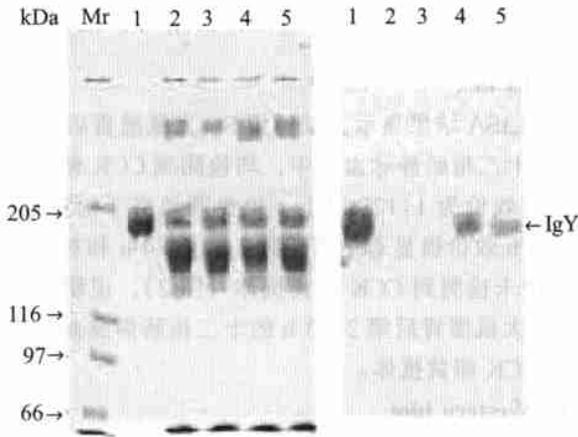


图3 SDS-PAGE和 Western blot 分析 SD 大鼠灌胃后十二指肠静脉血浆图谱

Mr: 蛋白质分子量标准。1: 卵黄抗体。2: 对照组血浆。3: 试验组第4 h 血浆。4: 试验组第3 h 血浆。5: 试验组第2 h 血浆。左图: SDS-PAGE。右图: Western blot。

Fig. 3 SDS-PAGE patterns and Western blot analysis for duodenal venous plasma of SD rat after gastric administration

Mr: Protein molecular weight marker. 1: IgY. 2: Control plasma. 3: 4th h plasma of treatment. 4: 3rd h plasma of treatment. 5: 2nd h plasma of treatment. Left: SDS-PAGE. Right: Western blot.

择性地将血液循环中的 IgG 转移到成熟的卵黄中, 而且卵黄对 IgY 具有富集作用。IgY 与哺乳动物 IgG 相比, 不结合哺乳动物的 Fc 受体, 不与金黄色葡萄球菌 A 蛋白结合, 不能活化血浆中的补体系统, 也不会与类风湿因子 (RF) 反应, 具有特殊的生物学活性 (Tini et al., 2002)。同时, IgY 具有良好的稳定性。IgY 能耐受巴氏消毒 (63 °C, 15 min); 能耐受 37 °C, pH 3.0 的胃环境 1 h; 37 °C, pH 7.9 的肠道环境 2.5 h (常山等, 2001)。IgY 与胃蛋白酶 (pH 4.0) 温育 10 h 后, 仍有 63 % 的活性; 与胰蛋白酶温育 8 h 后, 其活性保存 39 %。由此表明, IgY 在一定时间内对胃蛋白酶和胰蛋白酶具有抵抗作用 (Hatta et al., 1993)。因此, IgY 能使用食品工业中常用的巴氏消毒法消毒, 口服后能抵抗一定强度的酸碱环境和消化酶的消化, 保留其活性。进一步的组织切片技术证明, 沙鼠在口服抗幽门螺旋菌 IgY 后, 能减少胃黏膜损伤, 抑制了细菌对黏膜的黏附能力 (Shin et al., 2002)。以上研究显示, IgY 确实能在胃肠道保持活性, 发挥其免疫学效应和生物学效应。

目前, 随着对小肽的吸收机理和 PEPT 研究的深入, 认为 PEPT 存在二种亚型 PEPT₁ (低亲和力和型) 和 PEPT₂ (高亲和力和型)。PEPT₁ 广泛分布于动物小肠和肾脏, 且呈相应的发育性变化。研究

发现, 大鼠十二指肠 PEPT₁ 的 mRNA 和蛋白表达水平都在出生后第 4 d 达到高峰, 随后下降, 到 28 d 后呈现稳定表达。日粮中蛋白质小肽成分增加, 能激活 PEPT₁ 的活性, 上调其 mRNA 表达 (Shen et al., 2001)。

但是, 关于蛋白质的吸收研究相对较少, 一般认为大部分蛋白质都在胃肠道中被降解, 因而限制了对其吸收机理的研究。Ig Y 具有良好的稳定性, 能以完整、有活性的形式到达小肠 (Shin et al., 2002), 可作为研究蛋白质吸收的代表。CCK 卵黄抗体能促进动物生长, 部分消除内源性 CCK 的饱感作用。国内外大量的应用研究 (Danny, 1998; Cook et al., 1998) 表明, CCK 卵黄抗体能部分中和血液循环系统中的 CCK, 从而发挥其生物学效应。

然而, 尚未见有关 CCK 卵黄抗体吸收机理研究的报道。我们以 SD 大鼠为模型, 应用 ELISA 和 Western blot 两种方法均验证, 试验组 SD 大鼠灌胃后第 2、3 h 的十二指肠静脉血液中均有 Ig Y 存在, 并且第 3 h Ig Y 效价和灰度均极显著地高于第 2 h, 而第 4 h 未检测到 Ig Y, 表明 SD 大鼠灌胃后第 2 h 已有 Ig Y 吸收, 在第 3 h 达到一吸收峰值, 随着大鼠机体的消化代谢和血液循环作用, 以及 CCK 免疫中和反应, Ig Y 逐步在十二指肠静脉血液中丧失。研究结果提示, CCK 卵黄抗体能在 SD 大鼠十二指肠段以完整分子形式吸收或部分吸收进入血液, 发挥其免疫学效应和生物学效应。因此, 我们推测 CCK 卵黄抗体几种可能的吸收机制: (1) 卵黄中胆固醇、卵磷脂等含量较高, 对其中的 Ig Y 有包埋保护作用, 形成脂质体小颗粒后被胞吞, 或者由细胞间隙进入毛细血管; (2) 动物胃肠道存在相应的转运蛋白质载体, 其活性与胃肠道中蛋白质含量有关, 从而帮助其转运进入血液 (Shen et al., 2001)。本研究首次应用体内试验, 运用 ELISA 和

Western blot 两种不同的方法, 验证了 CCK 卵黄抗体能被 SD 大鼠十二指肠段吸收或部分吸收进入血液。但其具体的吸收过程还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Akita EM, Nakai S, 1993. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. Immunol. Methods* 160: 207 - 214.
- Carlander D, Kollberg H, Larsson A, 2002. Retention of specific yolk Ig Y in the human oral cavity. *Bio. Drugs* 16 (6): 433 - 437.
- Chang S, Zhang YP, Xia XG, 2001. Stability and activities of immunoglobulin Y against *Candida albicans* Ig Y *in vitro*. *Acta Acad. Med. Militaris Tertiae* 23 (12): 1 390 - 1 392 (In Chinese).
- Danny MH, 1998. Studies show benefits of cholecystokinin antibodies. *Feedstuffs* 2: 12 - 15.
- Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T, Ebina T, 1993. Oral passive immunization effect of *anti-human rotavirus* Ig Y and its behavior against proteolytic enzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 1 077 - 1 081.
- Pacha J, 2002. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol. Rev.* 80: 1 633 - 1 667.
- Philipps AF, Kling PJ, Grilli JG, Dvorak B, 2002. Intestinal transport of insulin-like growth factor-1 in the suckling rat. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 35 (4): 539 - 544.
- Shen H, Smith DE, Brosius FC, 2001. Developmental expression of PEPT₁ and PEPT₂ in rat small intestine, colon, and kidney. *Pediatr. Res.* 49 (6): 789 - 795.
- Shin J H, Yang M, Nam SW, Kim JT, Myung NH, Bang WG, Roe IH, 2002. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9 (5): 1 061 - 1 066.
- Stadelman WJ, 1999. The incredibly functional egg. *Poult. Sci.* 78 (6): 807 - 811.
- Tang CW, Han J, 2001. The physiological and pathologic physiological effect of CCK regulated human pancreas. *Chin. J. Dig.* 21 (1): 43 - 45 (In Chinese).
- Tini M, Jewell UR, Camenisch G, Chilov D, Gassmann M, 2002. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 131 (3): 569 - 574.
- Yokoyama H, Hashi T, 1997. Effect of oral egg antibody in experimental F18⁺ *E. coli* infection in weaned pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 59 (10): 917 - 921.
- 常山, 张雅萍, 肖光夏, 2001. 抗白色念珠菌 Ig Y 的稳定性与应用研究. *第三军医大学学报* 23 (12): 1 390 - 1 392.
- 唐承薇, 韩军, 2001. 胆囊收缩素对胰腺生理及病理生理的调节作用. *中华消化杂志* 21: 43 - 45.