

王天蔚,郎巧利,杨希,等. 动物用口服抗体的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 119-125.

Wang TW, Lang QL, Yang X, et al. Research progress of oral antibodies in animals [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 119-125.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.018

动物用口服抗体的研究进展

王天蔚^{1,2,3}, 郎巧利¹, 杨希¹, 李周权^{2*}, 葛良鹏^{1*}

(1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2. 西南大学动物科学技术学院 生物饲料与分子营养实验室, 重庆 400715; 3. 四川省畜牧科学研究院, 成都 610066)

【摘要】 抗体是机体分泌的用来鉴别与中和外来病原微生物如细菌、病毒等的 Y 形蛋白质, 具有保护机体健康的功能。口服抗体进入肠道内能够给予肠道被动免疫, 使肠道免受病原微生物的感染。近些年来, 越来越多的研究发现一些特异性抗体可免受胃环境的影响, 立即在动物肠道内发挥保护作用。本文介绍了口服抗体的发展过程、作用机制、制备途径、稳定特性, 并根据实际应用情况综述了天然抗体、基因工程抗体通过口服摄入的方式对动物肠道感染的保护作用。

【关键词】 口服抗体; 动物健康; 病原微生物; 肠道感染

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0119-07

Research progress of oral antibodies in animals

WANG Tianwei^{1,2,3}, LANG Qiaoli¹, YANG Xi¹, LI Zhouquan^{2*}, GE Liangpeng^{1*}

(1. Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China. 2. Key Laboratory for Bio-Feed and Molecular Nutrition, College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715. 3. Sichun Academy of Animal Sciences, Chengdu 610066)

【Abstract】 Antibodies are Y-shaped proteins secreted to identify and neutralize pathogenic microorganisms, such as bacteria and viruses, which maintain our health. Oral antibodies that enter the intestinal tract provide intestinal passive immunity to protect the intestinal tract from infection by pathogenic microorganisms. In recent years, a growing number of studies have shown that the gastric environment does not affect some specific antibodies, which provide immediate protection in an animal's gut. The development process, action mechanism, preparation route, and stability characteristics of oral antibodies are introduced and the protective effect of natural antibodies and genetically engineered antibodies on intestinal infections in animals by oral intake are summarized in accordance with the practical application.

【Keywords】 Oral antibodies; Animal health; Pathogen microbiology; Intestinal infection

肠道是动物重要的消化和免疫器官, 肠道健康是保障动物健康的重要因素。病原微生物可以通过感染肠道黏膜, 影响正常的肠道功能进而影响动物健康^[1-2], 特别在动物的初生阶段, 由于肠道的发

育及免疫系统不完善, 易感染病原微生物, 这将严重影响动物的健康, 甚至导致其死亡^[3-4]。

口服抗体作为一种被动免疫药物, 以口服的途径将预先形成的抗体输送至动物肠道粘膜, 能够立

【基金项目】 国家自然科学基金(5167070727); 畜禽养殖技术研发应用基础研究(19503-20)。

【作者简介】 王天蔚(1996—), 男, 硕士, 研究方向: 单胃动物营养。E-mail: 940893978@qq.com

【通信作者】 葛良鹏(1982—), 男, 研究员。E-mail: geliangpeng1982@163.com

李周权(1964—), 男, 副教授, 硕士生导师。E-mail: marcli@126.com * 共同通信作者

刻作用于肠道发挥抗体功能,起到治疗或预防肠道病原感染的作用^[5],是一种新型肠道保护策略。相对于常规的注射免疫,口服抗体可更快的发挥抗体功能^[6]。同时,口服方式对抗体的纯度要求较低,可通过廉价的蛋白表达系统表达抗体并将抗体伴随载体一同饲喂动物^[7],较为便捷。因此,口服抗体具有广阔的应用前景,本文就口服抗体的发展过程、作用机制、制备途径、稳定特性、对动物肠道健康保护作用的应用展开综述,为口服抗体的研究提供参考。

1 口服抗体的发展过程

抗体的发现可追溯至 19 世纪末,Behring 和 Kitasato 发现血浆中含有抗白喉和破伤风毒素的物质^[8],后称之为抗体。随着对抗体研究的深入,人们发现一些抗体以口服的方式饲喂给动物,也可以达到保障动物健康的效果。目前,常见的口服抗体有卵黄抗体 (immunoglobulin of yolk, IgY)、血液抗体以及基因工程抗体。

1893 年,德国医生 Klemperer 等^[9]在免疫蛋鸡的试验中发现,经免疫的蛋鸡所产鸡蛋蛋黄中含有能够中和免疫原的特异性蛋白质,即 IgY。自此,各国学者相继对其分子结构、理化性质、制备工艺、检测方法及应用等领域进行了广泛而深入的研究。直到上个世纪末,有研究发现在饲料中添加 IgY 可降低仔猪的腹泻率、死亡率,且有效预防细菌和病毒引起的消化道疾病^[10],这是人们首次将外源抗体以口服的方式饲喂动物并取得了预防疾病的效果。目前,卵黄抗体的研究较为广泛,以其获取方式的

高效便捷、产量高等优点在动物生产中得到了广泛应用,但卵黄抗体存在通过蛋传递病原的风险。

20 世纪 80 年代,有研究表明在断奶动物的饲料中加入喷雾干燥血浆能够提高动物的采食量、加快生长速度等^[11]。后续更多的研究表明,喷雾干燥血浆发挥作用的成分是其中的特异性抗体^[12]。自此,人们展开对口服血液抗体的研究。血液抗体能否预防动物疾病取决于血液中是否含有特异性抗体,这点对血液抗体的来源提出了更高的要求。

进入 21 世纪,随着基因工程的发展,人们能够获得表达特异性抗体的基因序列,随后根据用途对抗体加以修饰改造,利用蛋白表达技术实现了特异性重组抗体的大量表达,并在活体实验中取得了良好的效果。自此,越来越多的基因工程抗体作为口服抗体被开发出来。

2 口服抗体的作用机制

自然状态下,动物肠道内含有自身抗体来保护肠道系统,人们根据此类抗体的作用机制设计外源口服抗体,以期待外源抗体通过口服的方式能够达到保护肠道健康的效果。口服抗体主要通过以下方式发挥生物学功能:直接中和病原微生物,防止病原侵入;与病原微生物结合,抑制病原微生物繁殖;诱导抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用,杀死病原微生物(图 1)。

2.1 中和病原微生物

病原与宿主肠道的粘附是其感染肠道的重要途径^[13-14],口服抗体进入肠道内,能够与病原特异性结合、中和病原产物如酶和毒素,同时能够在肠

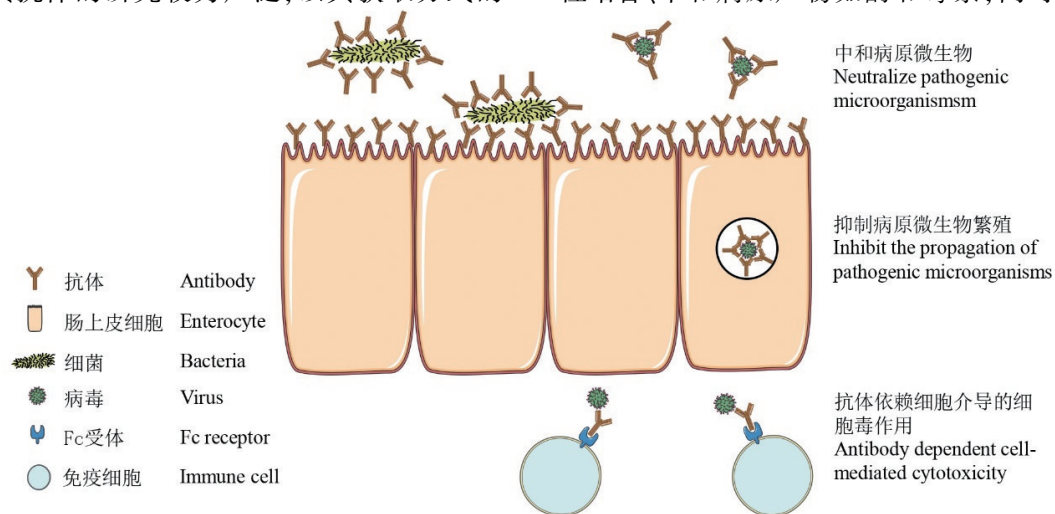


图 1 口服抗体作用机制示意图

Figure 1 Schematic diagram of the mechanism of action of oral antibody

道粘膜形成一层覆盖层,抑制病原的粘附。外膜蛋白和鞭毛是细菌类病原体粘附肠道的重要毒力因子,参与肠细胞的粘附^[15],是细菌运动和定植肠道的关键^[16]。口服抗体一般具有多个抗原结合位点,能够与细菌外膜蛋白、鞭毛结合并具有类似包裹、凝集的功能,实现对细菌的快速清除,阻止细菌对肠上皮细胞的黏附。Saberianfar 等^[17]将抗体的重链可变区(variable domain of heavy-chain antibody, VHH)片段融合到猪分泌型免疫球蛋白 A(secretory immunoglobulin A, SIgA)的可结晶片段(crystallizable fragment, Fc)区域,在体外试验中验证了针对大肠杆菌黏附素的 VHH-SIgA 抗体能与 O145:Hnm、O111:Hnm、O26:H11 和 O157:H7 血清型大肠杆菌结合,并在显微镜下观察到经抗体中和后的大肠杆菌粘附肠上皮细胞的能力明显减弱。Vanmarsenille 等^[15]利用拟南芥种子表达针对弯曲杆菌外膜蛋白和鞭毛的鸡用口服抗体,将含有抗体的种子提取物加入培养弯曲杆菌的琼脂中,发现其明显减弱了弯曲杆菌的活性,将抗体稀释加入后该抑制活性作用减弱。

2.2 抑制病原微生物繁殖

病毒类病原体进入动物肠道后,口服抗体可以与之结合,形成病毒抗体复合物。病毒抗体复合物的形成可以干扰病毒在上皮细胞传染中的复制过程,当复合物进入上皮细胞后被排泄至管腔中清除^[18]。例如,在极化上皮细胞的基底外侧表面添加特异性抗病毒抗体可降低仙台病毒、轮状病毒的病毒滴度^[19-20]。

2.3 抗体依赖细胞介导的细胞毒作用

抗体依赖细胞介导的细胞毒作用是抗体发挥功能的重要途径,是指有杀伤性的免疫细胞通过其细胞表面的 Fc 受体识别包被于靶抗原上的抗体 Fc 段,直接杀死病原微生物^[21]。其中,嗜中性粒细胞被证实参与抗体介导的免疫反应,研究表明嗜中性粒细胞的 Fc 受体与抗体结合后会释放一种化学诱导剂,诱导剂会诱导嗜中性粒细胞迁移发挥免疫功能直到病原微生物被消除^[22]。到目前为止,已经证实病原微生物特异性抗体存在下,中性粒细胞对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的摄取增加^[23]。参考这一抗体作用途径,基因工程抗体融合了抗体的 Fc 区域^[24],期待口服抗体进入肠腔后能够依赖免疫细胞发挥清除病原体的作用。

3 口服抗体的制备途径

口服抗体主要有两种制备途径,一种是通过简单纯化从动物产品中获取天然抗体,另一种是根据人们的意图,通过基因工程外源表达特异性功能抗体。在天然抗体中,卵黄抗体是母鸡经特异性抗原刺激在孵育过程中由血清中的免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)转移到卵黄中形成的^[25],将蛋黄直接冷冻或喷雾干燥制成卵黄粉即可饲喂动物。从动物血液获取天然抗体主要有血浆喷雾和抗体纯化两种方式。喷雾血浆(spray-dried plasma, SDP)是利用屠宰后动物的血液,经过抗凝、离心、喷雾干燥等过程得到的粗糙口服抗体产品^[26]。如需获取更高纯度的血液天然抗体,也可通过蛋白纯化的方法从血清中提取抗体用于动物饲喂^[27]。

基因工程抗体的制备结合了基因工程以及蛋白质工程技术,人们在基因水平对抗体分子进行切割、拼接或修饰,再通过真核细胞表达获得抗体蛋白。植物表达系统已被证明可生产高价值的聚合物蛋白,大量的研究表明植物可表达用于被动免疫的口服抗体^[28]。烟草^[29]和拟南芥^[30]可稳定表达完整结构的 SIgA,并且具有免疫活性,将表达目的抗体的转基因植物与饲料一同饲喂动物,可达到口服抗体的预期效果^[31]。人们普遍认为细菌和酵母系统不能有效分泌组装好的抗体,并且正确转录后修饰的抗体水平较低^[32-33]。但最近 Viridi 等^[34]的研究表明,毕赤酵母可大量表达针对产毒性大肠杆菌的重组抗体,将含有表达抗体的酵母上清液经冷冻喷雾干燥后饲喂动物,能有效帮助动物抵御产毒性大肠杆菌的感染。

4 口服抗体的稳定性

口服抗体是一种蛋白质,经口服途径到达肠粘膜发挥作用前可能会被胃肠道消化系统水解,因此口服抗体在胃肠道中的稳定性被认为是其发挥作用的关键因素。在胃肠道中,口服抗体主要受到温度、pH、蛋白酶的影响。抗体的热稳定性相对其它蛋白质较好,大多数抗体在 37℃ 的条件下仍能保持良好的生物学活性。胃肠道内的 pH 较低,会对口服抗体与抗原的结合有一定的影响^[35],但不会造成抗体失活,酸性环境主要通过保障蛋白酶活性进而对口服抗体产生影响^[36]。在胃肠道中,口服抗体的

活性主要受蛋白酶的影响。

不同种类口服抗体在胃肠道中的稳定性差异非常大。IgY 摆动性和柔韧性较低,结构稳定,这可能是由于 IgY 分子重链和轻链间存在一个富含脯氨酸残基和甘氨酸残基的转换区。Yokoyama 等^[37]的研究发现,IgY 能够抵抗幼年动物胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的降解。

基因工程抗体是根据人们的意愿改造而成。Hu 等^[38]模拟 SIgA 的分子结构,利用中国仓鼠卵巢细胞表达出抗毒素的重组 SIgA 和 IgG,并通过蛋白纯化获得了高纯度 SIgA 和 IgG 抗体。在体外模拟胃肠道环境测试其稳定性的过程中发现,两种抗体在 37℃、pH=3.5、胃蛋白酶浓度 2000 U/mL 的条件下孵育一夜后均被完全消化,但 SIgA 的分解速度慢得多,表现出对 pH、胃蛋白酶更强的抵抗力,并且 SIgA 在整个过程均具有一定的抗原结合能力保留。基因工程表达 IgA 抗体的 VHH 较天然抗体具有更高的稳定性,可能其特殊的氨基酸序列缺少蛋白酶的作用位点^[39]。

在抵抗酶解作用的过程中,植物表达系统表现出了较大的优势。植物细胞壁为抗体提供了一个屏障,抗体在植物组织基质中得到了较好的保护,能大幅减少蛋白酶的降解作用^[40],同时植物表达的抗体铰链区糖基化也一定程度上抵御胃蛋白酶的酶解^[41]。在豆科植物的种子中,含有蛋白酶抑制剂,也可以保护种子中的抗体不被酶解^[42]。同时,Schade 等^[43]提出饲料中大量的其他蛋白质对抗体具有消化竞争作用,也有可能保障抗体的完整性。

5 口服抗体的应用

在口服抗体的应用研究中,口服抗体多以饲料添加或灌服的方式传递至动物肠道内,通过对实验动物进行攻毒处理,并观测实验动物的生理状况、生化指标和肠道病原微生物载量来评价口服抗体的功效。口服抗体的基础研究多以小鼠为实验模型,其应用研究主要在猪、禽生产中,本文将口服抗体分为天然抗体和基因工程抗体来阐述其应用研究现状。

5.1 天然抗体的应用

动物的血液中含有大量的抗体,主要以 IgG 抗体为主。研究表明,血液抗体经血浆喷雾干燥或者抗体纯化后饲喂动物能够保护肠道抵抗病原感染。Balan 等^[44]从羊血清中提纯抗体,并将其饲喂给大

鼠,经肠炎沙门氏菌攻毒后发现,与无抗体摄入的对照组相比,摄入抗体的大鼠在攻毒前后的日增重和日采食量无显著变化,基本没有沙门氏菌的感染症状。Hedegaard 等^[27]从猪血清中纯化获得天然 IgG 抗体,以 5 mg/d 的剂量饲喂断奶仔猪,并用 F4 型大肠杆菌给予攻毒。试验发现,饲料中添加 IgG 抗体的仔猪表现出对大肠杆菌更强的抵抗力,回肠大肠杆菌的细菌比例极显著低于对照组仔猪,表明口服摄入的 IgG 有效抑制了大肠杆菌对仔猪肠道的感染。Bosi 等^[45]在已感染产毒性大肠杆菌的仔猪饲料中添加 6% 的 SDP,发现 SDP 可显著降低肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor- α , TNF- α) 和白介素 8 (Interleukin-8, IL-8) 的表达,改善了仔猪的感染症状,表明 SDP 对大肠杆菌诱导的肠道炎症具有保护效果。

卵黄抗体已广泛用于防治动物肠道类疾病,主要应用于猪、禽生产中。Vandeputte 等^[46]在肉鸡饲料中添加 5% 的抗空肠弯曲杆菌的 IgY 抗体,同时用弯曲杆菌对肉鸡进行攻毒处理。结果显示,饲料添加特异性 IgY 能显著减少空肠弯曲杆菌定植的肉鸡数量,使感染鸡的总定植率从 78% 降低至 15%。Mahdavi 等^[47]的研究表明,饲料中添加 0.2% 和 0.4% 的特异性 IgY 抗体对雏鸡回肠中大肠杆菌 O78:K80 的增殖具有明显的抑制作用。IgY 抗体同样可应用于猪生产中,猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的急性、高度接触传染性消化道疾病,仔猪感染 PEDV 的死亡率高达 80% ~ 100%,严重危害仔猪健康^[48]。在 Lee 等^[49]的研究中,新生仔猪以 500 mg/d 的剂量灌服特异性 IgY 抗体,经 PEDV 攻毒后的结果显示,口服抗 PEDV 的 IgY 抗体显著降低了仔猪的腹泻率以及死亡率,且试验组仔猪肠道仅观察到轻微的肠道损伤,表明抗 PEDV 的 IgY 抗体有效地保护仔猪肠道免受 PEDV 的感染。由此可见,口服天然抗体可有效保护病原菌对动物肠道的感染,起到肠道疾病的预防和治疗的作用。

5.2 基因工程抗体的应用

基因工程抗体主要经历多克隆抗体、单克隆抗体和重组抗体三个阶段。上个世纪末,de 等^[50]首次将单克隆抗体以口服的方式供给动物,通过 BABL/c 小鼠制备针对 F4 型大肠杆菌受体表位的单克隆抗体,将纯化腹水后得到的抗体以 15 mg/d

的剂量饲喂刚出生的无菌仔猪,同时对仔猪进行 F4 型大肠杆菌的攻毒处理。结果显示饲喂抗体有效降低了仔猪的死亡率,并且当抗体饲喂停止后,仔猪出现了感染症状,表明仔猪对 F4 大肠杆菌的抵抗依赖于经口服摄入的单克隆抗体。

基因工程抗体的口服应用研究主要集中在重组抗体方面。单链抗体(single chain antibody fragment, scFv)由抗体重链可变区和轻链可变区通过 15~20 个氨基酸的短肽连接而成,具有抗原识别功能。Zimmermann 等^[31]利用噬菌体展示抗体库,获得了抗艾美耳球虫(*Eimeria*)单链抗体片段,并在转基因豌豆种子中成功表达该抗体。将表达抗体的豌豆种子制成碎片饲喂家禽,发现豌豆种子可以保护抗体不被胃肠道蛋白酶降解,同时表达抗体的豌豆种子显著降低了家禽 *Eimeria* 的感染率。Zhang 等^[51]将抗 PEDV 病毒单链抗体基因克隆至 pet-28 表达质粒中重组表达抗 PEDV 病毒单链抗体,仔猪以 25 mg/d 的剂量摄入该抗体后表现出轻微或无 PEDV 临床症状,病毒载量明显减少,无肠道病变,表明口服单链抗体具有预防和治疗 PEDV 的作用。骆驼体内存在天然缺失轻链的重链抗体(heavy chain of antibody, HCAs),此类抗体的抗原结合位点仅由重链的可变区 VHH 单结构域构成^[52]。VHH 抗体具有高度的亲和力、特异性和稳定性,并且它们可以在恶劣的化学和热条件下保持功能^[39]。由于它们的互补性决定区 3 (complementarity determining region 3, CDR3)的扩展,该区域呈凸环型,具有更多与抗原识别的表位^[53]。Tokuhara 等^[54]利用转基因水稻表达抗轮状病毒的特异性的抗体片段 VHH,在小鼠攻毒实验中发现,口服 VHH 可显著降低免疫功能低下和免疫缺陷小鼠的轮状病毒载量。该抗体在长期保存和煮沸后仍保持体外中和活性,即使在 94℃ 下热处理 30 min,也能对小鼠产生保护作用。Pant 等^[55]利用重组乳酸菌表达了针对轮状病毒的 VHH 抗体,小鼠口服摄入后,可显著降低其由轮状病毒引起的腹泻程度和病毒载量。由此可见,VHH 对病毒的侵染具有一定的效果,然而单个 VHH 抗体是一价的,在机体内容易被迅速清除,通过将 VHH 融合到抗体的 Fc 结构域可以在发挥功能的同时避免这些缺点。VHH 与 Fc 结构域的融合将通过增加 Fc 受体的大小和相互作用而延长体内半衰期^[56],同时融合抗体确保抗体的多价性,这对细菌凝集交联和防止细菌附着于肠绒毛

肠细胞受体极为重要^[57]。Virdi 等^[24]成功地将针对 F4 型产毒大肠杆菌的 VHH 片段融合至猪 IgA、IgG 的 Fc 区域,在拟南芥种子中表达,并通过饲喂种子的方式使仔猪获得抗体。在仔猪的攻毒实验中,每天接受 80 mg VHH-IgA 的仔猪肠道中产毒大肠杆菌载量呈下降趋势,免疫反应明显降低,体增重高于其它实验组,表明 VHH-IgA 保护了大肠杆菌对仔猪肠道的感染,而 VHH-IgG 不能抵抗大肠杆菌感染。VHH-IgG 不能保护仔猪肠道感染的原因可能是 VHH-IgA 在胃肠道中具有更好的稳定性和更高的保留效率^[58]。同样,VHH-IgA 也在毕赤酵母中成功表达,并在仔猪攻毒实验中取得了相同的效果^[34]。

综上,特异性口服抗体具有保护动物肠道健康的作用。在动物养殖领域中,人们需结合实际情况,可将口服抗体用于治疗或预防高发疾病。在这一过程中,口服抗体的特异性和使用剂量是其发挥功能的关键因素。通常情况下,口服抗体不具备广谱性,仅针对某一病原或某一类病原具有抗体功能,因此,需根据疾病病原选用特异性口服抗体。口服抗体的使用剂量受多方面因素影响,在实际应用过程中需根据具体情况添加合适的抗体剂量。其中,动物物种是影响口服抗体剂量的重要因素,以上研究表明猪类口服抗体的使用剂量高于禽类、鼠类,可推断高体重的物种所需抗体剂量更高。同时,口服抗体通常不以高纯度形式作为饲料添加剂,往往伴随其表达载体一同摄入动物体内,需要结合抗体的表达载量计算饲料中的添加量。其次,口服抗体与病原的亲和力以及病原载量也将影响抗体的使用剂量,以上研究中,大多以细菌攻毒为试验模型,而在实际生产中的疾病预防与治疗情况将与此不同,口服抗体的使用剂量也将不同。因此,口服抗体使用剂量应依据实际情况、应用目的而界定。

6 总结及展望

口服抗体作为一种被动免疫制剂可以针对肠道感染病原体给予动物肠道保护作用,尤其在初生动物肠道免疫系统不完善的情况下效果尤为明显。近些年来,口服抗体对动物保护作用的研究不断增加,取得了不错的进展,但仍存在以下不足:(1)口服抗体对整个肠道免疫系统的影响缺乏系统性研究;(2)口服抗体与肠道的相互作用机制仍需进一步研究。未来,人们将更着眼于基因工程类抗体,对抗

体的稳定性、功能性、高效性做更深入的研究,同时口服抗体是否能通过口服途径为非肠道型疾病给药也是值得探究的方向。总之,继续深入全面、系统的研究口服抗体对肠道的保护作用及防护机制,对保障动物健康、实现抗生素的替代具有重大意义。

参考文献:

- [1] Paulin SM, Jagannathan A, Campbell J, et al. Net replication of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Choleraesuis in porcine intestinal mucosa and nodes is associated with their differential virulence [J]. *Infect Immun*, 2007, 75(8): 3950-3960.
- [2] Charania MA, Laroui H, Liu H, et al. Intestinal epithelial CD98 directly modulates the innate host response to enteric bacterial pathogens [J]. *Infect Immun*, 2013, 81(3): 923-934.
- [3] Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age [J]. *Proc Biol Sci*, 2015, 282(1821): 20143085.
- [4] Croxen MA, Law RJ, Scholz R, et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli* [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2013, 26(4): 822-880.
- [5] Corthesy B. Recombinant secretory immunoglobulin A in passive immunotherapy: linking immunology and biotechnology [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2003, 4(1): 51-67.
- [6] Melkebeek V, Goddeeris BM, Cox E. ETEC vaccination in pigs [J]. *Vet Immunol Immunop*, 2013, 152(1-2): 37-42.
- [7] Juarez P, Virdi V, Depicker A, et al. Biomanufacturing of protective antibodies and other therapeutics in edible plant tissues for oral applications [J]. *Plant biotechnol J*, 2016, 14(9): 1791-1799.
- [8] Von Behring E, Kitasato S. Ueber das Zustandekommen der diphtherie-immunität und der tetanus-immunität bei thieren [J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 1890, 16: 1113-1114.
- [9] Klemperer G, Klemperer F. Versuche über immunisierung und heilung bei der pneumokokkeninfektion [J]. *Berlin Klin*, 1893, 28: 833-835.
- [10] Yokoyama H, Peralta RC, Diaz RI, et al. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets [J]. *Infect Immun*, 1992, 60(3): 998-1007.
- [11] Gao YY, Jiang ZY, Lin YC, et al. Effects of spray-dried animal plasma on serous and intestinal redox status and cytokines of neonatal piglets [J]. *J Anim Sci*, 2011, 89(1): 150-157.
- [12] Pierce JL, Cromwell GL, Lindemann MD, et al. Effects of spray-dried animal plasma and immunoglobulins on performance of early weaned pigs [J]. *J Anim Sci*, 2005, 83(12): 2876-2885.
- [13] Buttner D. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria [J]. *Microbiol Mol Biol R*, 2012, 76(2): 262-310.
- [14] Dziva F, Diemen PM, Stevens MP, et al. Identification of *Escherichia coli* O157: H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis [J]. *Microbiology*, 2004, 150(11): 3631-3645.
- [15] Vanmarsenille C, Diaz Del Olmo I, Elseviers J, et al. Nanobodies targeting conserved epitopes on the major outer membrane protein of *Campylobacter* as potential tools for control of *Campylobacter* colonization [J]. *Vet Res*, 2017, 48(1): 86.
- [16] Guerry P. *Campylobacter* flagella: not just for motility [J]. *Trends Microbiol*, 2007, 15(10): 456-461.
- [17] Saberianfar R, Chin-Fatt A, Scott A, et al. *E. coli* Plant-produced chimeric VH-sIgA against enterohemorrhagic intimin shows cross-serotype inhibition of bacterial adhesion to epithelial cells [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10(1): 270.
- [18] Bakema JE, Van EM. Immunoglobulin A: A next generation of therapeutic antibodies? [J]. *MABs*, 2011, 3(4): 352-361.
- [19] Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME, et al. Intracellular neutralization of Sendai and influenza viruses by IgA monoclonal antibodies [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1995, 371(4): 651-654.
- [20] Corthésy B, Benureau Y, Perrier C, et al. Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion [J]. *J Virol*, 2006, 80(21): 10692-10699.
- [21] Vandervén HA, Jegaskanda S, Wheatley AK, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity and influenza virus [J]. *Curr Opin Virol*, 2017, 22: 89-96.
- [22] van der Steen L, Tuk CW, Bakema JE, et al. Immunoglobulin A: Fc(alpha)RI interactions induce neutrophil migration through release of leukotriene B4 [J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(6): 2018-2029.
- [23] Spriel AB, Herik-OI, Sorge N, et al. Effective phagocytosis and killing of *Candida albicans* via targeting Fc gamma RI (CD64) or Fc alpha RI (CD89) on neutrophils [J]. *J Pediatr Inf Dis Soc*, 1999, 179(3): 661-669.
- [24] Virdi V, Coddens A, De BS, et al. Orally fed seeds producing designer IgAs protect weaned piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(29): 11809-11814.
- [25] 李玉莲, 曹满湖, 肖勇, 等. 卵黄抗体制备影响因素及其在动物生产中的应用 [J]. *中国饲料*, 2013, 4: 8-11.
- [26] 李伟锋, 王鹏, 徐幸莲, 等. 喷雾干燥鸡血浆蛋白粉工艺优化 [J]. *农业工程学报*, 2012, 28(21): 248-255.
- [27] Hedegaard CJ, Strube ML, Hansen MB, et al. Natural pig plasma immunoglobulins have anti-bacterial effects: potential for use as feed supplement for treatment of intestinal infections in pigs [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147373.
- [28] Palaci J, Virdi V, Depicker A. Transformation strategies for stable expression of complex hetero-multimeric proteins like secretory immunoglobulin A in plants [J]. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17(9): 1760-1769.
- [29] Juarez P, Huet TE, Sarrion PA, et al. Combinatorial analysis of secretory immunoglobulin a (sIgA) expression in plants [J]. *Int*

- J Mol Sci, 2013, 14(3): 6205–6222.
- [30] Nakanishi K, Morikane S, Ichikawa S, et al. Protection of human colon cells from shiga toxin by plant-based recombinant secretory IgA [J]. Sci Rep, 2017, 7: 45843.
- [31] Zimmermann J, Saalbach I, Jahn D, et al. Antibody expressing pea seeds as fodder for prevention of gastrointestinal parasitic infections in chickens [J]. BMC biotechnol, 2009, 9: 79.
- [32] Fischer R, Stoger E, Schillberg S, et al. Plant-based production of biopharmaceuticals [J]. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7(2): 152–158.
- [33] Vasilev N, Smales CM, Schillberg S, et al. Developments in the production of mucosal antibodies in plants [J]. Biotechnol Adv, 2016, 34(2): 77–87.
- [34] Viridi V, Palaci J, Laukens B, et al. Yeast-secreted, dried and food-admixed monomeric IgA prevents gastrointestinal infection in a piglet model [J]. Nat Biotechnol, 2019, 37(5): 527–530.
- [35] Boswell CA, Tesar DB, Mukhyala K, et al. Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics [J]. Bioconjugate chem, 2010, 21(12): 2153–2163.
- [36] Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, et al. Physicochemical stability of monoclonal antibodies: a review [J]. J Pharm Sci, 2020, 109(1): 169–190.
- [37] Yokoyama H, Peralta RC, Sendo S, et al. Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing [J]. Am J Vet Res, 1993, 54(6): 867–872.
- [38] Hu Y, Kumru OS, Xiong J, et al. Preformulation characterization and stability assessments of secretory IgA monoclonal antibodies as potential candidates for passive immunization by oral administration [J]. J Pharm Sci, 2020, 109(1): 407–421.
- [39] Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology [J]. Vet Immunol Immunop, 2009, 128(1–3): 178–183.
- [40] Saeki M, Nishimura T, Kaminuma O, et al. Oral immunotherapy for allergic diseases using transgenic rice seeds: current state and future prospects [J]. Int Arch Allergy Imm, 2013, 161: 164–169.
- [41] Plomp R, Dekkers G, Rombouts Y, et al. Hinge-region O-glycosylation of human immunoglobulin G3 (IgG3) [J]. Mol Cell Proteomics, 2015, 14(5): 1373–1384.
- [42] Avilés-Gaxiola S, Chuck-Hernández C, Serna Saldívar SO. Inactivation methods of trypsin inhibitor in legumes: a review [J]. J Food Sci, 2018, 83(1): 17–29.
- [43] Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine [J]. Altern Lab Anim, 2005, 33(2): 129–154.
- [44] Balan P, Han KS, Rutherford SM, et al. Dietary supplementation with ovine serum immunoglobulin attenuates acute effects on growth, organ weights, gut morphology and intestinal mucin production in the growing rat challenged with *Salmonella enteritidis* [J]. Animal, 2011, 5(10): 1570–1578.
- [45] Bosi P, Casini L, Finamore A, et al. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 [J]. J Anim Sci, 2004, 82(6): 1764–1772.
- [46] Vandeputte J, Martel A, Canessa S, et al. Reducing *Campylobacter jejuni* colonization in broiler chickens by in-feed supplementation with hyperimmune egg yolk antibodies [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 8931.
- [47] Mahdavi AH, Rahmani HR, Nili N, et al. Effects of dietary egg yolk antibody powder on growth performance, intestinal *Escherichia coli* colonization, and immunocompetence of challenged broiler chicks [J]. Poultry Sci, 2010, 89(3): 484–494.
- [48] 王丽珍, 罗桂芳, 张艳萍, 等. 猪流行性腹泻病毒间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(2): 377–383.
- [49] Lee DH, Jeon YS, Park CK, et al. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk antibody (IgY) against a recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein in piglets [J]. Arch Virol, 2015, 160(9): 2197–2207.
- [50] de Geus B, Harmsen M, van Zijderveld F. Prevention of diarrhoea using pathogen specific monoclonal antibodies in an experimental enterotoxigenic *E. coli* infection in germfree piglets [J]. Vet Q, 1998, 20: S87–S89.
- [51] Zhang F, Chen Y, Ke Y, et al. Single chain fragment variable (scFv) antibodies targeting the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus provide protection against viral infection in piglets [J]. Viruses, 2019, 11(1): 58.
- [52] Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status [J]. J Biotechnol, 2001, 74(4): 277–302.
- [53] Harmsen MM, Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments [J]. Appl Microbiol Biot, 2007, 77(1): 13–22.
- [54] Tokuhara D, Alvarez B, Mejima M, et al. Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection [J]. Digestion, 2013, 123(9): 3829–3838.
- [55] Pant N, Hultberg A, Zhao Y, et al. Lactobacilli expressing variable domain of llama heavy-chain antibody fragments (lactobodies) confer protection against rotavirus-induced diarrhea [J]. J Infect Dis, 2006, 194(11): 1580–1588.
- [56] Hutt M, Farber-Schwarz A, Unverdorben F, et al. Plasma half-life extension of small recombinant antibodies by fusion to immunoglobulin-binding domains [J]. J Biol Chem, 2012, 287(7): 4462–4469.
- [57] Roche AM, Richard AL, Rahkola JT, et al. Antibody blocks acquisition of bacterial colonization through agglutination [J]. Mucosal Immunol, 2015, 8(1): 176–185.
- [58] De Greve H, Viridi V, Bakshi S, et al. Simplified monomeric VHH-Fc antibodies provide new opportunities for passive immunization [J]. Curr Opin Biotech, 2020, 61: 96–101.

[收稿日期] 2021-01-27