

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.02.018

抗铜绿假单胞菌 IgY 的制备优化及抑菌效果

姚羽菲¹, 龙敏², 文荟淋², 姚刚^{3△}

(1. 四川大学华西临床医学院, 成都 610041; 2. 四川大学生命科学学院, 成都 610065;

3. 成都安蒂康生物科技有限公司 610041)

摘要:目的 探讨高效价、高纯度且生物活性好的抗铜绿假单胞菌(PA)的特异性鸡卵黄免疫球蛋白(IgY)的制备工艺。方法 采用超声破碎、共振裂解、研磨破碎等方法裂解 PA, 筛选出最佳裂解抗原, 然后将裂解抗原或经甲醛灭活的全菌抗原与佐剂充分乳化免疫产蛋母鸡; 采用酶联免疫吸附试验检测水稀释后的 IgY 抗体效价变化; 通过硫酸铵盐析, 超滤法纯化抗体, 并用十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)和二喹啉甲酸(BCA)法测定抗体纯度和浓度, 平板法评价 IgY 对 PA 的抑菌效果, 并以蒸馏水作为对照; 扫描电镜法检测细菌形态变化。结果 超声破碎法裂解的 PA 抗原浓度最高且蛋白条带最为完整; 0.5 mL 的 1×10^9 CFU/mL 灭活菌初次免疫 4 周后再次免疫的方案产生的抗体效价最高, 可高达 1 : 25 600; 硫酸铵沉淀, 超滤纯化后的抗体纯度可达 94%, 浓度为 27.02 mg/mL; IgY 体外抑菌试验表明, 2.7 mg 的抗体能明显抑制 PA 生长, 与蒸馏水对照组相比, IgY 试验组菌落数减少了 9/10, 并且明显抑制了细菌绿色色素的产生; 扫描电镜观察 IgY 试验组菌体较长、较大且皱缩。结论 采用灭活全菌免疫母鸡, 经水稀释、硫酸铵沉淀、超滤纯化的制备方法可得到高纯度和高效价的抗 PA IgY, 所制抗体具有特异性和显著抑菌活性。

关键词:铜绿假单胞菌; 鸡卵黄抗体; 抑菌效应

中图分类号: Q816

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)02-0202-05

The optimized preparation of IgY against p. aeruginosa and the detection of its antibiotic effectYAO Yufei¹, LONG Min², WEN Huilin², Yao Gang^{3△}

(1. West China Medicial School of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China;

2. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China; 3. Chengdu Andy Kang

Biotechnology Co. Ltd, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To prepare the pure and effective immunoglobulin yolk (IgY) against pseudomonas aeruginosa, and optimize the preparation process. **Methods** Using these methods, such as ultrasonication, resonance cracking, grinding, we lysed p. aeruginosa and gained the optimized lysis antigen. The laying hens were immunized with lysis antigen or inactivated bacteria. Indirect Enzyme-linked immunosorbent was used to evaluate the titer and stability of IgY. Then IgY was isolated and purified from egg yolks with high-titer using water dilution-salting out method or ultrafiltration. The purity and concentration of IgY were analysed by SDS-PAGE and BCA, respectively. The antibacterial effect was evaluated by plate method, and the cell morphology was detected by scanning electron microscopy. **Results** Ultrasonication was the most effective way to crack the antigen of p. aeruginosa. Immunization scheme that 0.5 mL inactivate bacteria (1×10^9 CFU/mL) were injected hens and secondly injected after 4 weeks was proved the best for the titer of 1 : 25 600. The purity of IgY was 94% after ammonium sulfate precipitation and ultrafiltration purification and the concentration 27.02 mg/mL, 2.7 mg IgY could restrain the growth of bacteria obviously and the colony number decreased 9/10 compared to the control group. Meanwhile, the green pigment produced by p. aeruginosa was inhibited obviously. Scanning electron microscope showed p. aeruginosa were bigger and shrinking after treated with IgY. **Conclusion** The preparation and purification IgY against P. aeruginosa has been successfully optimized. And the IgY antibody has specific and marked antibacterial activity.

Key words: pseudomonas aeruginosa; immunoglobulin of yolk; antibiotic effect

铜绿假单胞菌(PA)广泛存在于自然界, 是伤口 感染较常见的一种条件致病菌, 亦为医院内感染的重

要病原菌之一。PA 可感染人体的血液、呼吸、中枢神经、泌尿等各个组织系统,引发一系列病变。当机体遭受严重烧伤或患代谢性疾病、血液病、恶性肿瘤,免疫功能受损,容易受该菌感染^[1]。囊性纤维化(CF)是一种常染色体隐性遗传病,也常常由于该菌的机会感染导致患者死亡^[2]。近年来,由于抗菌药物的广泛使用,PA 的耐药菌株不断增加,寻找一种具有特异性抑菌作用,又不产生耐药性的产品对 PA 感染的预防和治疗具有重要意义。国内外研究发现,采用抗原免疫产蛋的母鸡可产生相应的卵黄免疫球蛋白(IgY)抗体,该抗体通过产蛋的方式遗传给后代而储存于蛋黄中^[2-3]。IgY 具有化学性质稳定、产量高、成本低、特异性强且无不良反应等优势,且动物种系发生距离远,不会发生交叉血清学反应。同时,IgY 可通过被动免疫有效防治幽门螺杆菌、大肠埃希菌、沙门菌等引起的消化道感染性疾病,变异链球菌、牙龈卟啉单胞菌等引起的口腔感染性疾病,以及肿瘤防治、抗病毒感染^[4-5]。本文通过多种制备方法对比,探讨高效价、高纯度且生物活性好的抗 PA 的特异性鸡卵黄 IgY 的制备工艺,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 PA(CMCC10211)、大肠埃希菌(CMCC44103)购于中国食品药品检定研究院;PA 临床分离株(编号 COCC072)由口腔疾病研究国家重点实验室提供;4 月龄的产蛋鸡由四川大学华西五教动物实验中心提供,正常饲养;胰蛋白胨大豆琼脂培养基购自英国 Oxoid 公司;弗氏完全佐剂(F5881)、弗氏不完全佐剂(F5506)以及 50~200 μm 玻珠购自美国 Sigma 公司;HRP 酶标兔抗鸡 IgY(二抗)购自美国 Promega 公司;BCA 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;四甲基联苯胺显色剂购自潮州英创生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 裂解细菌抗原的方法 将 PA 复苏并扩大培养,收集细菌,使其浓度为 5×10^9 CFU/mL,然后采用以下方法各裂解 3 mL 菌液:(1)超声破碎。将菌悬液置于 1.5 mL EP 管中进行超声破碎,设置功率为 220 W,超声 5 s,暂停 10 s,如此反复,共超声 30 min。(2)TissueLyser II 组织裂解仪共振裂解。2 mL EP 管中加入菌悬液和 50~200 μm 玻珠 50 μg ,25 Hz 5 min,共振 2~3 次;(3)研磨破碎。离心取菌苔,-70 $^{\circ}\text{C}$ 与 37 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次,取出置于研钵,将 150 mL 液氮边加入边研磨,用 3 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)复溶。细菌裂解完成后,10 000 r/min 离心 10 min,取 30 μL 上清液做常规十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测蛋白裂解的完全性,采用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度。选取最完

整裂解抗原用于后续免疫方案。

1.2.2 免疫方案的优化 将所得抗原与弗氏佐剂充分乳化。佐剂是一类可增强或改变机体对抗原免疫应答的非特异免疫增强剂。弗氏完全佐剂是常用的强效佐剂,但也常常造成对实验动物组织的损伤;弗氏不完全佐剂的效力较低,但较少发生动物损伤。因此,一般在免疫应答最敏感的首免使用完全佐剂以增强免疫效果,而在跟踪免疫时使用不完全佐剂以维持动物健康。采用上述方法筛选的细菌裂解液或经过 0.5% 甲醛灭活的细菌作为抗原免疫母鸡,将 12 只母鸡随机分为 4 组,每组 3 只。1 组免疫抗原为 1×10^9 CFU/mL 灭活菌;2 组为 1×10^9 CFU/mL 灭活菌,4 周后免疫第 2 针;3 组为 2×10^9 CFU/mL 灭活菌;4 组为 1 mg/mL 的裂解抗原。用等体积的弗氏完全佐剂(初次免疫)或弗氏不完全佐剂(再次免疫)充分乳化制成疫苗,初次免疫采用皮下多点注射,每只鸡注射弗氏完全佐剂疫苗 1 mL;再次免疫采用肌肉多点注射^[6],每只鸡注射弗氏不完全佐剂疫苗 1 mL。其中 1、3、4 组在初次免疫后第 2、4、6、10 周分别再次免疫,第 2 组在初次免疫后第 4、6、10 周分别再次免疫。

1.2.3 IgY 效价测定 从免疫后鸡蛋中分离蛋黄,采用灭菌蒸馏水按 1:9(g/v)比例稀释^[6-7],并用 1 mol/L 盐酸调节 pH 值为 5.0~5.2,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜。10 000 r/min 离心 15 min,取上清液,得水溶性组分(WSF)。抗体效价测定采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA),PA 的裂解抗原以浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被 ELISA 板,将疫苗免疫后不同时间收集的 WSF 先用蒸馏水 1:100(v/v)稀释,再等比稀释加入 ELISA 板中。同时加入空白对照(生理盐水),阴性对照(未免疫蛋黄的 WSF,蒸馏水 1:100 稀释),然后加入酶标 IgY 二抗(1:3 000),以 TMB 底物溶液显色,2 mmol/L 硫酸终止,酶标仪 450 nm 处测吸光度(A 值)。实验孔 A 值大于阴性对照孔 A 值 2.1 倍的最大稀释度即为效价。收集高效价组的鸡蛋用于后续 IgY 的提取。

1.2.4 IgY 提取及纯化 选取第 2 组 11~14 周的所有鸡蛋进行 WSF 上清液的收集,然后缓缓加入饱和硫酸铵溶液使终浓度为 50%,同时用搅拌子轻轻搅拌,静置 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,离心留沉淀并溶于等体积的 0.1 mol/L、pH 为 7.4 的 PBS 中。缓缓加入饱和硫酸铵溶液,使终浓度为 33%,轻轻搅拌混匀,静置 6 h,离心留沉淀并溶于原卵黄液等体积的蒸馏水中。采用 Amicon Ultra-100K 离心过滤器纯化。SDS-PAGE 检测 IgY 蛋白裂解的完全性,BCA 法测定蛋白浓度。

1.2.5 IgY 的体外抑菌实验 IgY 经超滤浓缩、过滤除菌处理后浓度为 27.02 mg/mL。取制备好的基础

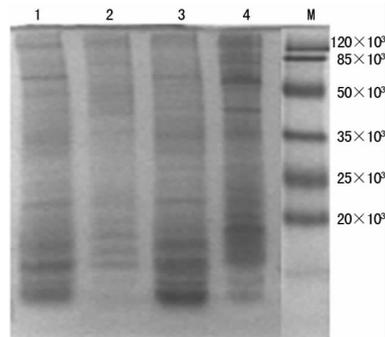
固体培养基数,用 100 μ L IgY(2.7 mg)与 100 μ L 1×10^4 CFU/mL 的 PA 标准株和临床株菌液混合,作用 1 min 后均匀涂布于平板上,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养,24 h 后计算长出的菌落数。对照组用 100 μ L 蒸馏水与 100 μ L 1×10^4 CFU/mL 菌混合。

1.2.6 扫描电镜观察细菌形态变化 截取 1/4 的 1 cm \times 1 cm 盖玻片,盖在 IgY 处理组和对照组的菌落上 10 s,取出印有细菌的盖玻片置于 6 孔板中,加入 2.5% 戊二醛 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h。之后取出用 PBS 清洗 2 次,再依次用 30%、50%、70%、80%、90%、100% 乙醇分别梯度脱水 10 min。然后放入 100% 乙酸正戊酯溶液中置换处理 20 min。再在 CO₂ 临界点干燥机中进行干燥,干燥后用离子溅射仪喷射金粉,处理好后上机检测。

2 结 果

2.1 抗原裂解方法优化 PA 经超声破碎、共振裂解、研磨破碎处理所得抗原浓度分别为 13.40、9.26、0.28 mg/mL,由图 1 可知,超声破碎法所得蛋白条带浓度最高、条带数最多,与菌液经蛋白电泳上样缓冲液破碎后产生的蛋白条带谱最为接近,裂解效果最好。因此,后续实验采用超声破碎的裂解抗原用于免疫。

2.2 免疫方案优化及 IgY 效价变化 ELISA 测定 IgY 抗体滴度随时间的变化如表 1 所示。4 组 IgY 抗体均在 9 周后有较高的滴度,第 2 组和第 4 组滴度相对其他组更高,可达 1 : 25 600;第 1 组在 4~8 周、第 2 组和第 3 组在 4~9 周、第 4 组在 5~7 周均未产蛋,3~4 周仅第 4 组有产蛋。免疫后所产生的抗体滴度有波动,第 1 组、第 3 组抗体滴度均呈低水平趋势,第 2 组 11 周后滴度在 (1 : 12 800)~(1 : 25 600),第 4 组第 10 周上升至最高点 1 : 25 600 后下降并达到较低水平后稳定。因此,第 2 组抗体的滴度和稳定性最佳。



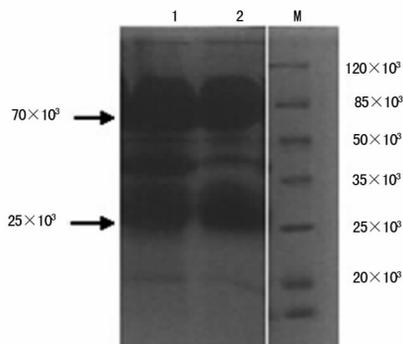
注:1 为共振裂解;2 为研磨破碎;3 为超声裂解;4 为菌液(阳性对照);M 为蛋白质相对分子质量标准

图 1 不同方法裂解菌体抗原的 SDS-PAGE 分析

表 1 不同免疫方案产生的抗 PA IgY 抗体效价消长比较

组别	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周	13 周	14 周
第 1 组	—	1 : 3 200	1 : 3 200	1 : 3 200	1 : 1 600	1 : 6 400	1 : 3 200
第 2 组	—	—	1 : 6 400	1 : 12 800	1 : 25 600	1 : 12 800	1 : 25 600
第 3 组	—	—	1 : 6 400	1 : 3 200	1 : 3 200	1 : 3 200	1 : 3 200
第 4 组	1 : 6 400	1 : 12 800	1 : 25 600	1 : 12 800	1 : 6 400	1 : 6 400	1 : 6 400

注:—表示无数据

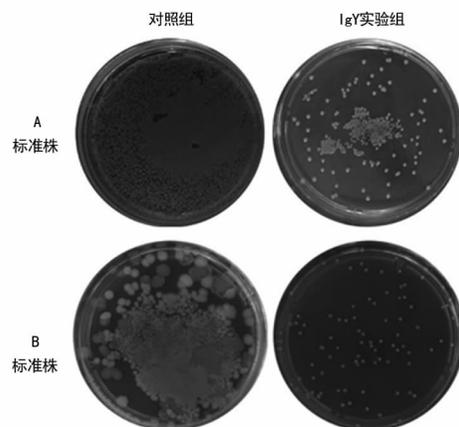


注:1 为 50%~33% 硫酸铵沉淀的 IgY;2 为 1 产生的 IgY 再经超滤管纯化;M 为蛋白质相对分子质量标准

图 2 IgY 的纯度分析

2.3 IgY 纯化方案优化及纯度检测 由图 2 可知,SDS-PAGE 电泳目的蛋白 IgY 的相对分子质量约为 70×10^3 和 25×10^3 。用 50%~33% 硫酸铵两步法提取的 IgY 浓度较高,且杂带少;经超滤后可以进一步纯化,使杂带含量继续减少。凝胶成像软件分析两种方法纯化的 IgY 抗体纯度分别为 85%、94%。BCA

法检测后者 IgY 水平为 27.02 mg/mL。



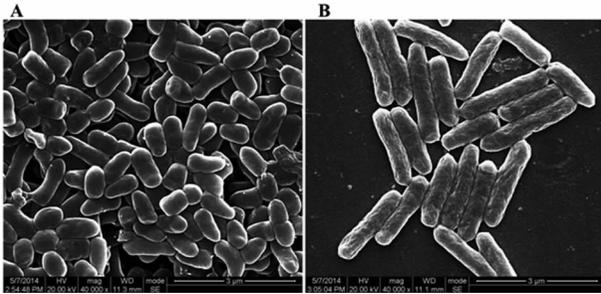
注:A 为 PA 标准株 CMCC10211;B 为 PA 临床分离株 COCC072

图 3 IgY 抑菌效果检测

2.4 IgY 抑菌效果检测 由图 3 可以看出,将纯化 IgY 抗体以体积 1 : 1 的比例与 1×10^4 CFU/mL 的 PA 混合涂布培养后,不论是标准株还是临床株的细

菌生长均受到明显抑制, IgY 实验组菌落数为对照组的 1/10 左右, 细菌的绿色色素产生不明显, 革兰染色显示 IgY 实验组细菌菌体变长变粗。

2.5 IgY 对 PA 形态影响 如图 4 所示, IgY 实验组(图 B)的 PA 菌体较粗长, 且有皱缩干瘪。对照组细菌(图 A)成球杆或短杆状, 较饱满。



注:A 为对照组($\times 40\ 000$); B 为 IgY 实验组($\times 40\ 000$)

图 4 IgY 抑制 PA 扫描电镜图

3 讨论

免疫抗原的常用裂解方法有超声破碎、共振裂解、研磨破碎等。本研究的优化裂解结果显示 PA 是革兰阴性细菌, 菌体小且细胞壁薄, 主要抗原为内毒素, 故经超声破碎裂解所得抗原效果最好, 浓度最高, 为 13.40 mg/mL。而共振裂解和研磨破碎获得的抗原浓度分别为 9.26、0.28 mg/mL, 均低于超声破碎法, 尤其是研磨破碎效果很差。

与张小莺等^[8]研究抗原剂量对免疫效果和抗体浓度的影响不同, 本文研究了不同抗原剂量(1×10^9 、 2×10^9 CFU/mL)、不同抗原状态(完全抗原、裂解抗原)和不同免疫间隔时间(首次免疫和再次免疫间隔 2 周或 4 周)对免疫效果和抗体滴度的影响, 结果显示抗原剂量对其影响不大, 而首次免疫和二次免疫间隔 4 周抗体滴度高达 1:25 600, 约为间隔 2 周抗体滴度的 8 倍, 裂解抗原组的抗体滴度也高达 1:25 600, 但稳定性不高, 在 10 周达到最高后, 11 周滴度开始下降。综合分析后推测, 首次免疫形成较强的免疫记忆需要 20 d 以上, 裂解抗原能使鸡更快地形成较强免疫记忆, 但无法稳定地保持下去, 可能是 IgY 半衰期较 IgG 短所致。第 2 组方案中, 抗体产生形成了较长的节律符合张小莺等^[8]分析的抗体量周期性变化结果, 即 60 d 左右为大周期, 7 d 为 1 小周期, 产量由相对低谷到顶点再回落到低谷。虽然动物生物节律背后的生物学意义还缺乏统一认识, 但这种节律的认知有助于解释抗体表达波动现象^[9]。免疫后 4~9 周母鸡的产蛋量为 0, 可能免疫对母鸡的产蛋有严重的抑制作用; 3~4 周仅第 4 组有产蛋, 可能因为第 4 组是裂解抗原, 其抗原特性和化学毒性物质不同于完整菌体。其次, 细菌裂解碎片的抗原特异性可能不完全同于完整菌体, 而抗原特性是影响鸡产蛋能力的最重要因素。

本研究将 100 μ L IgY(27.02 mg/mL)与 100 μ L (1×10^4 CFU/mL)细菌相互作用后, 观察到了显著的抑菌(菌落数约为对照的 1/10)现象。在王吉潭等^[6]的抗猪大肠卵黄抗体对大肠埃希菌的体外抑菌实验中, 体积比为 1:1 的抗体与菌液(1×10^8 CFU/mL)相互作用, 得出抗体的杀菌浓度为 0.5 mg/mL, 抑菌浓度为 0.05 mg/mL。由此可知, 所得浓度为 27.02 mg/mL 的抗 PA 抗体对浓度为 1×10^4 CFU/mL 的菌液有很好的抑菌作用, 相较于王吉潭等^[6]的抗大肠埃希菌卵黄抗体, 该抗体抑菌作用略差。

抗 PA 的 IgY 抗菌机制目前认为有以下方式: (1) IgY 直接黏附于病原菌的细胞壁、菌毛上, 抑制病原菌黏附宿主细胞的能力, 破坏病原菌的完整性并抑制其增殖; 如 CF 患者用特异性抗 PA 的 IgY 溶液漱口可以防止细菌初始黏附在口咽黏膜表面^[10]。抗 PA 的 IgY 也可促进细菌聚集体形成, 从而增加细菌疏水性, 降低感染黏附^[11]。(2) 口服 IgY 可以发动固有免疫, 促进中性粒细胞快速和及时地清除 PA^[12]。(3) 部分病原菌 IgY 也可能在肠道消化酶的作用下降解为可结合片段, 其中含有抗体的片段可变成容易被肠黏膜吸收的小肽, 进入血液后与病原菌黏附因子结合, 稳定部分则仍留在肠内但会失去对易感细胞的致病性^[3]。革兰染色观察发现经抗体处理的 PA 标准株的菌体变长变粗后, 为进一步确定该变化, 做了扫描电镜观察, 证实了菌体变长变粗的现象的存在。结合抗体处理使菌株产色素时间延迟的现象, 可推测抗体对 PA 的形态影响可能涉及到其生理的变化。

综上所述, 本研究采用灭活全菌免疫母鸡, 经水稀释、硫酸铵沉淀、超滤纯化的制备方法可得到高纯度和高效价的抗 PA 的 IgY, 所制抗体具有特异性和显著抑菌活性。

参考文献

- [1] VALENTINI M, GONZALEZ D, MAVRIDOU D A, et al. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 41:15-20.
- [2] MÜLLER S, SCHUBERT A, ZAJAC J, et al. IgY antibodies in human nutrition for disease prevention[J]. *Nutr J*, 2015, 14:109-115.
- [3] 元秀哗, 宋翔, 王业华, 等. 卵黄抗体在疾病防制中的应用研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(9):2767-2772.
- [4] WANG B, YANG J, CAO S, et al. Preparation of specific anti-*Helicobacter pylori* yolk antibodies and their antibacterial effects[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10):6430-6437.
- [5] NGUYEN S V, ICATLO FC J R, NAKANO T, et al. Anti-cell-associated glucosyltransferase immunoglobulin Y suppression of salivary mutans streptococci(下转第 208 页)

肉的力量和弹性,调节与伸展和放松有关的神经和相关肌肉群,提高分娩时的协调能力及体力^[8]。规范而规律的孕妇体操不仅对孕妇的身心健康十分有益,而且在提高自然分娩率、减少剖宫产概率方面有着积极的作用^[9]。

拉玛泽减痛分娩法与传统临产呼吸方法的最大区别就是方便、简单、安全、易学^[10]。传统的方法可能造成初产妇不能很好地掌握而出现杂乱无章的呼吸,且对体力的要求较高,产程的时间也相对较长,容易增加初产妇的恐惧心理,对胎儿的健康也有较大的影响^[11]。拉玛泽减痛分娩法弥补了传统方法的不足,增强经过训练的初产妇的信心,正确运用不同的呼吸技巧通过不同产程的宫缩变化降低分娩时的产痛,减少宫缩乏力的发生^[12]。

本研究结果显示,研究组初产妇自然分娩率明显高于对照组,剖宫产率明显低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明体操和拉玛泽减痛分娩法训练可以提高孕妇的身体耐力。研究组总产程、第一产程、第二产程时间均比对照组短,且差异均有统计学意义($P < 0.05$),这主要得益于拉玛泽减痛分娩法帮助产妇掌握并改进有效的呼吸方法及用力技巧,避免了更多额外体力的消耗及发生宫缩乏力,增强了孕妇对分娩的信心,从而明显缩短了产程。研究组孕妇的产后不良反应少于对照组,且差异有统计学意义($P < 0.05$),孕妇体操训练起到了主要作用,因为孕妇体操可以增强孕妇肌肉的力量和耐力,缓解腰背疼痛和肌肉紧张,纠正不良姿势,使关节、韧带松弛柔软。通过体操和拉玛泽减痛分娩法训练,增加产妇的自然分娩信心,提高了自然分娩率,降低了剖宫产的概率,所以使研究组孕妇发生相关产后并发症的可能性降低。

综上所述,孕妇体操运动配合拉玛泽减痛分娩法的训练可提高初产妇的自然分娩率,降低剖宫产率,

缩短产程,降低产后不良反应的发生率,具有较大的临床意义。

参考文献

- [1] 曾庆奇,常春,袁雁飞,等.湖南省产妇产娩方式及其影响因素分析[J].中国公共卫生,2014,30(3):350-353.
- [2] 李爱红,陈世荣,黄碧红.拉玛泽减痛分娩法在基层医院初产妇的临床应用观察[J].中国妇幼保健,2013,28(21):3510-3512.
- [3] 胡华青.导乐陪伴分娩联合拉玛泽分娩法在缓解产妇不良情绪中应用的效果评价[J].中国实用护理杂志,2012,28(9):37-38.
- [4] 张玉华.孕妇营养过剩与妊娠结局关系探究[J].医药与保健,2015,6(4):213-214.
- [5] 谭芸,孔林,黄飞燧,等.妊娠期间营养状况对母婴结局影响的研究现状及进展[J].医学综述,2017,23(2):290-293.
- [6] 谭淑卓,郑军廷,王莹.孕妇体操对分娩的影响[J].中国妇幼保健,2012,27(7):1114-1115.
- [7] 张文.半卧位屈大腿法在第二产程中的应用分析[J].实用临床医药杂志,2011,15(23):162.
- [8] 张小英,陈淑娟,蔡彩萍,等.孕妇体操配合呼吸训练对分娩进展的影响[J].护理研究,2007,21(28):2587-2588.
- [9] 朱爱萍,陈亚丽,单玉娇.城镇孕妇妊娠晚期加腹压训练对分娩结局的影响[J].中华妇产科杂志,2013,48(8):622-623.
- [10] 廖群英,韦珍,庞义坚,等.孕期有氧运动训练对妊及分娩的影响[J].中国妇幼保健,2011,26(27):4190.
- [11] 胡慧梅.爱力呼吸减痛分娩法训练对高龄孕妇分娩时心理因素的影响[J].实用医学杂志,2013,29(14):2388-2389.
- [12] 韦秋华,曾玉娟,雷利志.孕妇体操在分娩中的临床效果[J].中国妇幼保健,2010,25(34):5024.

(收稿日期:2017-08-20 修回日期:2017-10-12)

(上接第205页)

- in healthy young adults[J].J Am Dent Assoc,2011,142(8):943-949.
- [6] 王吉潭,李德发,龚利敏,等.抗猪大肠杆菌卵黄抗体变化规律及在体外对大肠杆菌生长的影响[J].饲料研究,2004(1):1-5.
 - [7] DIAS DA SILVA W,TAMBOURGI DV. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 135(3/4):173-180.
 - [8] 张小莺,郑礼,SCHADE R,等.免疫鸡产生 IgY 抗体的技术[J].中国药理学通报,2004,20(10):1102-1106.
 - [9] 张小莺,陈琛.卵黄抗体技术[M].北京:科学出版社,2011.
 - [10] THOMSEN K,CHRISTOPHERSEN L,BJARNSHOLT T, et al. Anti-Pseudomonas aeruginosa IgY antibodies augment bacterial clearance in a murine pneumonia model [J]. J Cyst Fibros,2016,15(2):171-178.
 - [11] THOMSEN K,CHRISTOPHERSEN L,BJARNSHOLT T, et al. Anti-Pseudomonas aeruginosa IgY antibodies induce specific bacterial aggregation and internalization in human polymorphonuclear neutrophils[J]. Infect Immun, 2015,83(7):2686-2693.
 - [12] THOMSEN K,CHRISTOPHERSEN L,JENSEN PØ, et al. Anti-Pseudomonas aeruginosa IgY antibodies promote bacterial opsonization and augment the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophils [J]. Hum Vaccin Immunother,2016,12(7):1690-1699.

(收稿日期:2017-07-13 修回日期:2017-09-27)