

# 抗脂肪酶 IgY 之生產與小鼠減重研究<sup>(1)</sup>

劉振發<sup>(2)</sup> 曲鳳翔<sup>(2)</sup> 陳立人<sup>(2)(3)</sup>

收件日期：111 年 9 月 22 日；接受日期：112 年 5 月 31 日

## 摘 要

本研究旨在探討抗脂肪分解酶特異性免疫蛋黃抗體 (anti-lipase IgY) 對小鼠體重控制功效的評估。抗體的生產是利用豬脂肪分解酶為抗原，對 6 隻來亨蛋雞進行免疫注射，並以酵素結合免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 方式進行免疫蛋抗體含量的分析。結果顯示，雞蛋中 anti-lipase IgY 的特異性抗體含量於雞隻免疫接種後第 3 週開始上升；自第 3 週到第 20 週，平均每個蛋黃中之總 Ig Y 含量與 anti-lipase IgY 特異性抗體含量分別為  $143.8 \pm 18.0$  mg/yolk 與  $7.6 \text{ mg} \pm 0.4$  mg/yolk。以小鼠為動物模式進行 anti-lipase IgY 對體重控制的試驗評估，結果顯示每日餵飼 4 mg 之 anti-lipase IgY 對於以高脂飼料誘發肥胖的小鼠具有控制體重增加的效果。因此 anti-lipase IgY 未來或許可具有應用作為食品添加物之潛力，透過抑制胰臟分泌的 lipase 在腸道的作用，減少脂肪的吸收達到控制體重的功效。

關鍵詞：蛋黃免疫球蛋白、脂肪分解酶、體重控制。

## 緒 言

雞蛋是具有高蛋白質含量及重要營養成分的民生必需食品。此外，雞蛋也是目前應用廣泛的多功能性生物製劑原料之一。雞蛋組成包括三個部分：蛋黃、蛋白及蛋殼，其中蛋黃是應用最廣的部分。蛋黃占整顆雞蛋重量約 31%，其主要成分為 51% 水分、16% 蛋白質、30.5% 脂質和其他次要組成物，而蛋白質主要分布在卵黃粒 (yolk granule) 和卵黃漿 (yolk plasma)(Miranda *et al.*, 2015)。在 yolk granule 包含卵黃高磷蛋白 (phosvitin)、 $\alpha$ -卵黃低脂磷蛋白 ( $\alpha$ -lipovitellins) 與  $\beta$ -卵黃低脂磷蛋白 ( $\beta$ -lipovitellins) 和脂溶性低密度脂蛋白 (low-density lipoproteins)；而在 yolk plasma 之蛋白質包含  $\alpha$ -、 $\beta$ - 及  $\gamma$ -卵黃蛋白 (livetins) 等三種水溶性脂蛋白 (lipoproteins)，其中  $\gamma$ -livetins 經分析後發現是一種 IgG-like 的免疫球蛋白 (Polson and Von Wechmar, 1980)，因為是從蛋黃中發現，因而目前多被稱為蛋黃抗體 (immunoglobulin in the yolk, IgY)。

雞蛋中的免疫球蛋白包含有 IgA、IgM 及 IgY 三種，它的來源是在產卵過程中由母雞的血液中轉移而來，IgA、IgM 會存在蛋白中，而 IgY 則會移行到蛋黃部分。蛋黃中的 IgY 和哺乳動物血液中 IgG 的來源和免疫功能相似。IgY 是從鳥類 (包括家禽) 血液中的 IgG 運輸到蛋中並累積在蛋黃部分，這個過程作用就如同哺乳動物之 IgG，主要由母親透過胎盤轉移至胎兒提供其被動免疫，使胎兒具有基本的病菌防衛系統 (Klemperer, 1993)。

家禽之蛋黃中含有來自母禽免疫產生之抗體是在多年前就為人所發現 (Klemperer, 1993)。雞隻如果以傳統免疫法免疫，每隻雞每個月約可生產 1,500 mg 的 IgY，其中 2 – 10% 是具特異性之抗體 (Schade *et al.*, 1994)。另外，利用雞蛋生產抗體除了具有不必犧牲動物的好處外，更由於人類與禽類之遺傳距離遠，人類蛋白質在家禽較易引起免疫反應 (Gassmann *et al.*, 1990)；而且雞蛋 IgY 的純化步驟也已被建立 (Akita and Nakai, 1993)。由於上述多項優點，利用禽蛋生產抗體漸受重視，曾有人利用 IgY 方式生產抗體，對抗大腸桿菌 (Amaral *et al.*, 2002; Owusu-Asiedu *et al.*, 2003)、沙門氏桿菌 (Lee *et al.*, 2002)、牛冠狀病毒 (Ikemori *et al.*, 1997)、狂犬病毒 (Sun *et al.*, 2001) 或輪狀病毒 (Sarker *et al.*, 2001) 皆可獲得 IgY 抗體，減輕病原之影響。

現今大眾因飲食習慣的改變，導致肥胖現象日益增加。肥胖症經常伴隨高血壓、高血脂症、糖尿病、冠心病、腦中風、骨性關節炎、膽結石等慢性疾病 (Borgstrom, 1988; Leonhardt *et al.*, 1999)，所以降低肥胖是防治上述疾病的基礎。然而，肥胖是因為飲食中攝入過多的能量，長期堆積在脂肪組織而改變身體成分的組成，造成體重過重的情

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2750 號。

(2) 農業部畜產試驗所遺傳生理組。

(3) 通訊作者，E-mail: rchen131@gmail.com。

形。因此，改變日常飲食習慣，均衡膳食降低能量的攝取，是對抗肥胖重要原則 (Hill *et al.*, 2000)。在日常飲食中脂肪的攝取對於形成肥胖的影響遠大於碳水化合物化合物的攝取；因此，如何少飲食中脂肪組成的消化和吸收是防治肥胖症的關鍵。

食物中的脂肪組成並不是直接在小腸就能被吸收，它必須先經過胰臟所分泌的脂肪分解酶 (pancreatic lipase) 的作用後，才能由小腸絨毛吸收利用。因此要克服因攝入過多的脂肪而發生肥胖的問題，首要之務就是阻止食物中的脂肪組成被小腸絨毛吸收利用 (Ballinger and Peikin, 2002)，而要阻止食物中脂肪組成不被小腸吸收的關鍵，就是要能抑制脂肪分解酶的作用，如此就可以達到體重控制的目的 (Gargouri *et al.*, 1997)。故本研究之目的乃嚐試利用豬脂肪分解酶 (lipase) 為抗原，對產蛋母雞進行免疫接種，藉以生產具有抗胰臟所分泌的脂肪分解酶功用之 IgY 抗體，並以小鼠為動物模式進行評估是否具抑制 (或) 減緩脂肪吸收而達到體重控制之功效。

## 材料與方法

### I. 試驗動物

本試驗使用 23 週齡的白色單冠來亨蛋雞 6 隻，作為抗原免疫刺激及生產特異性抗體收集之來源。另外，使用 10 – 12 週齡之雄性 ICR 品系小鼠 (購自 BioLASCO; I-Lan, Taiwan) 20 隻，以進行特異性抗體功效測試用。本實驗之實驗動物使用、飼養管理及試驗內容經畜產試驗所實驗動物管理小組以畜試動字 97003 號申請核准在案。

### II. 抗原免疫濃度調整

選用豬脂肪分解酶 (Lipase from porcine pancreas; Type II; sigma Cat. No.L3126) 做為本次試驗的免疫抗原，抗原免疫濃度調整先以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA; Sigma Cat. No. A7906) 做標準曲線稀釋濃度成 5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.625 mg/mL、0.3125 mg/mL 及 0.156 mg/mL。將抗原濃度調整為 200 mg/mL 做為免疫注射用。

### III. 雞隻抗原免疫

免疫注射時，將抗原與弗氏完全佐劑 (Freund,s complete adjuvant) 以 1：1 比例調配成乳化狀液，對母雞行注射。每隻母雞於左右胸部肌肉各注射 0.5 mL 進行免疫，第 4 週起每隔 2 週進行補強免疫注射時，改用弗氏不完全佐劑 (Freund,s incomplete adjuvant)，整個免疫流程約歷時 12 週。

### IV. 免疫蛋收集、蛋黃分離及冷凍乾燥

自免疫注射前一週開始收蛋 (控制組)，以每隻雞為單位，將其每週所生之免疫蛋收集，進行蛋黃與蛋白分離，收取蛋黃部分。並將每週第 3 天所生產的免疫蛋分離的蛋黃，個別進行冷凍乾燥，分析專一性抗體力價，以了解在整個免疫的過程中雞隻的免疫反應情形。其餘天數所收取之蛋黃予以混合，存放於 -20℃ 備用，每週皆以相同的方式進行，持續收蛋到最後一次免疫完成後的第 6 週。

### V. 蛋黃中 IgY 抗體的分離與純化

以水溶液分離法 (Akita and Nakai, 1992) 進行蛋黃中 IgY 抗體分離與純化。取經過冷凍乾燥後的蛋黃粉 15 g，以 20 倍 (300 mL) 去離子水溶解；及未經冷凍乾燥的蛋黃 30 g，以 10 倍 (300 mL) 去離子水溶解，變成蛋黃液後調整 pH 至 5.0，隔夜再 pH 由 5.0 調至 7.0，離心 (700 × g，40 分鐘，4℃)，取上清液以濾紙過濾，最後的過濾液為 water soluble fraction (WSF)，即 IgY 抗體。

### VI. IgY 抗體力價分析

以商業套組進行 ELISA (Abcam ELISA Kits; UK) 進行 IgY 抗體力價的分析，分析步驟如下：

#### (i) 第 1 天：

- A. 在 96 孔反應盤中之樣品 (IgY 抗體) 分析反應小孔中加入 100 µL 之抗原 (lipase, 10 µg/mL)，進行抗原的塗抹 (coating)。
- B. 在標準曲線的反應小孔加入 100 µL 的 rabbit anti-chicken IgY (10 µg/mL) (Sigma Cat # C2288)，置於冰箱中 (4℃) 作用至次日。

#### (ii) 第 2 天：

- A. 將蛋黃粉做 20 倍稀釋成蛋黃液 (0.5 g 蛋黃粉加入 10 mL 去離子水置於 15 mL 離心管中震盪混勻)，冷凍備用。

B. 將第 1 天製備的 96 孔反應盤從冰箱中取出，用磷酸緩衝溶液 (phosphate buffer saline, PBS; HyClone, Cat # SH30256.01) 沖洗 3 次，再於每小孔中加入 200  $\mu$ L 的 2% BSA 後，置於冰箱中 (4°C) 作用至次日。

(iii) 第 3 天：

A. 在標準曲線反應小孔部分，每小孔分別加入 100  $\mu$ L 不同濃度 (0.5、0.25、0.125、0.06、0.03、0.015  $\mu$ g/mL) 的 1 級抗體 [rabbit anti-Chicken IgY (H+L); Invitrogen, Cat # LS-C204071]。

B. 在樣品分析小孔部分，將第 2 天已製備完成的 20 倍稀釋之蛋黃液，再稀釋 100 倍後於每個檢測小孔加入 100  $\mu$ L 後，置於冰箱 (4°C) 作用至次日。

(iv) 第 4 天：

A. 取出 96 孔反應盤，使用含有 0.05% tween 20 的 PBS 溶液沖洗 3 次，再以 PBS 溶液沖洗 1 次以去除泡沫。

B. 隨後於每個檢測小孔加 2 級抗體 (alkaline phosphate-conjugated rabbit anti-chicken IgY; Sigma, Cat # SA1-9514) 100  $\mu$ L，置於 37°C 作用 2 小時。

C. 2 小時之後以含有 0.05% tween 20 的 PBS 溶液沖洗 3 次，再以 PBS 溶液沖洗 1 次以去除泡沫後移除 PBS 溶液。

D. 最後加入 100  $\mu$ L 的呈色劑 (disodium p-nitrophenyl phosphate; Sigma-Aldrich, Cat. No. N9389) 反應 8 – 10 分鐘，利用 microplate reader (Multiskan MS; Thermo Labsystems) 以波長 405 nm 進行吸光值測量。

## VII 蛋黃 IgY 抗體含量換算

一般雞蛋重約 60 g，蛋黃占整顆雞蛋重量約 31% (18.6 g)，故本實驗每顆雞蛋的蛋黃是以 18.6 g 為其重量。每顆蛋黃 IgY 抗體含量換算方式為：IgY 抗體含量 (g)/mL  $\times$  18.6 = 每顆蛋黃 IgY 抗體含量 (g)。

## VIII 專一性抗體體重控制評估測試 IgY 抗體

### (i) 小鼠飼養管理

10 – 12 週齡之雄性 ICR 品系小鼠 20 隻飼養在溫度維持 22 – 24°C、溼度維持 50 – 60%、光照週期為 12 小時光照與 12 小時黑暗 (光照持續時間 07:00 – 19:00) 的鼠房中，飼養期間飼料與飲水採任食。

### (ii) 試驗流程與分組

試驗期間約 7 週，分為適應期 (1 週)、誘發期 (3 週) 和測試期 (3 週) 等三階段。適應期：試驗前所小有鼠先於鼠房中飼養 1 週，使其適應環境。誘發期時，將小鼠進行隨機分組，各組間平均體重無顯著差異為原則，分為 1 組餵食正常飼料 (Laboratory rodent diet/MF18, fat: 18%, Oriental Yeast, Tokyo, Japan) 之對照組 (control group, C)，與 3 組餵食高熱量飼料 (TestDiet®, DIO rodent diet purified w/60% Energy From Fat-Blue/58Y1, fat: 34.9%, Tokyo, Japan) 之高熱量組 (high energy group, HE)，共分為 4 組 (5 隻/組/cage)；期間每週測量體重 2 次，確定 HE 組之體重顯著高於 C 組後 ( $P < 0.05$ ) 即可進入測試期。測試期時 C 組持續以正常飼料飼養，HE 組持續餵食高熱量飼料再依照 IgY 有無投予及投予劑量之高低分為 HE (-) 組 (不投與 IgY，灌食 PBS)、HE (1X) 組 (IgY 灌食 2 mg) 及 HE (2X) 組 (IgY 灌食 4 mg) 等三組，每組 5 隻。每天以胃管灌食 IgY 1 次，每天記錄消耗的飼料總量，每隻小鼠每週進行 2 次的體重測量，持續 3 週。各試驗結束後，以過量的乙醚麻醉方式進行小鼠犧牲後解剖，採集副睪週圍脂肪組織並稱重。相關流程如下：

1 週	3 週	3 週	犧牲動物
適應期 正常飼料	誘發期 C 組：正常飼料 HE (-) 組：高熱量飼料 HE (1X) 組：高熱量飼料 HE (2X) 組：高熱量飼料	試驗期 C 組：正常飼料 HE (-) 組：高熱量飼料，不投與 anti-lipase IgY，灌食 PBS HE (1X) 組：高熱量飼料，灌食 2 mg 之 anti-lipase IgY HE (2X) 組：高熱量飼料，灌食 4 mg 之 anti-lipase IgY	

## IX. 統計分析

試驗所得數據以分析系統套裝程式 (SAS, Version 9.1, 2004) 分析，使用一般線性模式 (General Linear Model, GLM) 及鄧肯式多變異法 (Duncan's multiple range test) 分析比較各處理組間的差異顯著性 ( $P < 0.05$ )。

# 結果與討論

## I. 專一性 IgY 抗體生產

蛋黃中所累積之 IgY 是源自母鳥 (包括家禽) 血液中的 IgG 使雛鳥具有基本的防衛系統 (Klemperer, 1993)。因此, 如同目前生產抗體的雞隻一樣, 當給予家禽特定抗原進行免疫刺激, 即可產生對應抗原之特異性抗體儲存於蛋黃中 (Leslie and Clem, 1969)。本研究以 lipase 做為抗原, 對白色來亨蛋雞進行免疫注射以生產 anti-lipase IgY。抗原劑量是根據大部分 IgY 文獻所使用的劑量進行免疫 (Hatta *et al.*, 1993; Yoshinori and Jennifer, 2002), 由於目前絕大部分應用於 IgY 的免疫抗原都是哺乳類腸胃道的細菌性病源 (Hatta *et al.*, 1993; Bizhanov and Vyshniauskis, 2000), 其抗原劑量使用也多為 100  $\mu\text{g/mL}$  以下。因此 lipase 濃度亦採用 100  $\mu\text{g/mL}$  進行免疫, 實驗結果顯示, 免疫期間蛋黃中的總 IgY 含量與 anti-lipase IgY 含量變化如圖 1 及圖 2 所示, 平均總 IgY 含量與 anti-lipase IgY 含量分別為  $7.7 \pm 1.2 \text{ mg/mL WSF}$  及  $409.3 \pm 16.7 \mu\text{g/mL WSF}$ , 換算成每顆蛋黃平均總 IgY 含量與 anti-lipase IgY 含量分別為  $143.8 \pm 18.0 \text{ mg/yolk}$  與  $7.6 \pm 0.4 \text{ mg/yolk}$ 。Schade *et al.* (1994) 指出隻雞以傳統的免疫方法, 每隻雞每個月約可生產 1,500 mg 的 IgY, 其中 2 – 10% 為具特異性的抗體。本研究免疫後特異性的 anti-lipase IgY 含量約占總 IgY 的 5.08%。Sunwoo *et al.* (2002) 利用大腸桿菌 O157:H7 菌株為抗原, 對產蛋雞進行免疫研究中分析總 IgY 含量為 12.58  $\text{mg/mL WSF}$ , 其結果與本研究測得之總 IgY 含量高許多。有文獻指出蛋黃中總 IgY 的含量, 會因分離方法及分析方法的不同而有所差異 (1 – 25  $\text{mg/mL WSF}$ ) (Rose *et al.*, 1974; Shimizu *et al.*, 1988; Li-chan *et al.*, 1998)。

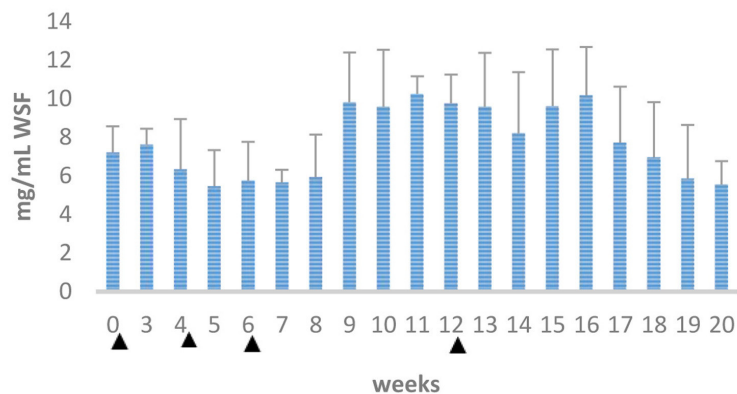


圖 1. 試驗期間蛋黃中總 IgY 的含量 ( $\text{mg/mL WSF}$ )。

Fig. 1. The content ( $\text{mg/mL WSF}$ ) of total IgY per egg yolk during the immunization period.

Values are shown as average data from eggs in the same week for all experimental chickens. Vertical bars indicate the standard deviation.

▲ Time of antigen immunization.

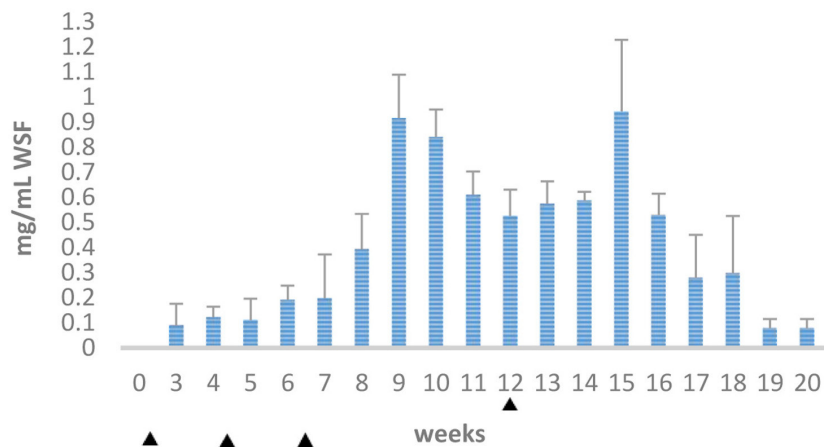


圖 2. 試驗期間每個蛋黃中 anti-lipase IgY 的含量。

Fig. 2. The content of anti-lipase IgY per egg yolk during the immunization period.

Values are shown as average data from eggs in the same week for all experimental chickens. Vertical bars indicate the standard deviation.

▲ Time of antigen immunization.

由圖 2 可知, 蛋黃中 anti-lipase IgY 的特異性抗體含量, 在免疫後第 3 週起開始上升, 且分別於第 9 週



(915  $\mu\text{g/mL}$ ) 週和第 15 週 (941  $\mu\text{g/mL}$ ) 出現二個高峰，整個免疫期間以第 9 週至 16 週為 anti-lipase IgY 含量較高的時期，平均每顆蛋黃可生產約 10 mg 的 anti-lipase IgY。雞隻免疫後特异性 IgY 抗體的產量在不同品種間因其遺傳背景差異，對相同的抗原免疫後，會呈現出不同的免疫反應 (Amaral *et al.*, 2002)。在家禽的免疫反應除了品種間的差異外，抗原的種類和型式亦有很大影響，不同的抗原有其不同的抗原決定位 (epitope)，因此引起的免疫反應也不同 (Yokoyama *et al.*, 1992)。

## II. Anti-lipase IgY 對小鼠體重控制之功效

為了確認 anti-lipase IgY 的功效，本研究使用商用的高熱量飼料 (TestDiet®, DIO rodent diet purified w/60% Energy From Fat-Blue/58Y1, fat: 34.9%, Tokyo, Japan) 餵飼進行小鼠肥胖的誘導，再進行 anti-lipase IgY 對體重控制的功效測試。此種高熱量飼料是許多進行肥胖或體重控制研究時，常被選用作為誘發小鼠或大鼠等齧齒類實驗動物肥胖的飼料 (Gelineau *et al.*, 2017; Jingang *et al.*, 2022)。

在實驗期間體重增加情形，如圖 3 所示，在 3 個以高熱量飼料餵食的實驗組，體重均呈現穩定上升，經過 2 週後體重顯著高於餵食正常飼料的對照組 ( $P < 0.05$ )。於第 18 天開始進行 anti-lipase IgY 灌食，可發現在 HE (2X) 組 (灌食 4 mg) 的體重增加明顯趨於緩和，HE (1X) 組 (灌食 2 mg) 體重增加的速度是在灌食後 1 週才有減緩的趨勢，HE (-) 組 (灌食 PBS) 仍呈現穩定上升的趨勢。從開始高熱量飼料 (第 0 天) 期間，於第 18 天開始灌食 anti-lipase IgY，到試驗結束 (第 44 天)，體重增加比例、飼料的攝取量及飼料效率如表 1 所示，在體重增加比例分別為 HE (2X) 組  $25.0 \pm 0.79\%$ 、HE (1X) 組  $31.6 \pm 0.26\%$ 、HE (-) 組  $32.5 \pm 0.92\%$  和對照組  $19.9 \pm 0.58\%$ 。另外，在每日飼料攝取量與飼料效率又分別為 HE (2X) 組  $3.3 \pm 0.14$  g 與  $2.9 \pm 0.28$ 、HE (1X) 組  $3.3 \pm 0.15$  g 與  $7.0 \pm 0.37$ 、HE (-) 組  $3.5 \pm 0.12$  g 與  $7.1 \pm 0.41$  和對照組  $5.5 \pm 0.18$  g 與  $2.2 \pm 0.12$  g。結果顯示每日額外補充 anti-lipase IgY 4 mg，對於餵食高熱量飼料小鼠具有顯著的體重控制效果 ( $P < 0.05$ )。

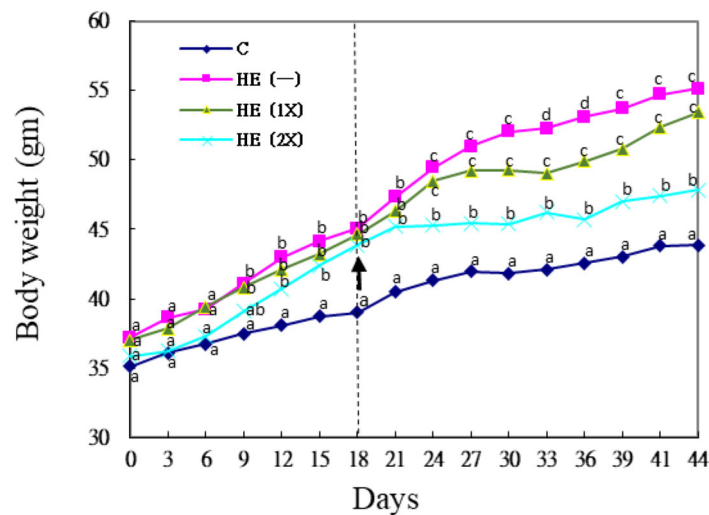


圖 3. 添加 anti-lipase IgY 對高能量飲食小鼠體重控制的功效。

Fig. 3. Effects of anti-lipase IgY supplement on body weight control in mice fed a high energy diet.

C: laboratory rodent diet, HE (-): high energy diet + anti-lipase IgY (2 mg), HE (1X): high energy diet + anti-lipase IgY (2 mg), HE (2X): high energy diet + anti-lipase IgY (4 mg). Among different groups, different lowercase superscripts indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

↑: anti-Lipase IgY supplement started on day 18.

在本研究中，使用高熱量飼料 (含 34.9% 油脂) 餵飼小鼠。試驗組在高脂飲食下飼養 6 週小鼠體重與飼料效率均顯著高於對照組。另外，於試驗組中額外給予 anti-lipase IgY 4 mg 有抑制體重增加功效，其體重與飼料效率顯著 ( $P < 0.05$ ) 低於其他 2 個試驗組 (HE (1X) 組與 HE (-) 組)。且此結果並不是因為減少飼料量的攝取，在 3 個不同試驗組飼料攝取量沒有顯著 ( $P < 0.05$ ) 差異 (表 1)。

膳食中所攝取的脂肪並不會直接被身體吸收利用，脂肪必須經過脂肪酶作用後才能被吸收利用。胰脂肪酶為體內最主要的脂肪水解酶，是脂肪在消化道能被吸收的關鍵酵素 (Hanl *et al.*, 2005)。與膳食碳水化合物相比，膳食脂肪對於誘發肥胖體重增加更為顯著 (Portillo *et al.*, 1999; Hanl *et al.*, 2021)。因此，要克服因攝入過多的脂肪而發生肥胖的問題，首要之務就是阻止食物中的脂肪組成不被小腸絨毛吸收利用 (Ballinger and Peikin, 2002)，而要阻止脂肪組成不被小腸吸收，關鍵就是要能有效且具專一性抑制脂肪分解酶的作用，如此就可以達到體重

控制的目的 (Gargouri *et al.*, 1997)。本研究於 3 組餵食高能量飼料的試驗組其飼料量的攝取量並沒有差異，但額外給予 4 mg anti-lipase IgY，其體重與飼料效率顯著低於其他 2 個試驗組 (HE (1X) 組與 HE (-) 組)。推測此結果應是額外補充 4 mg anti-lipase IgY 組對小鼠消化道內的脂肪分解酶產生了抑制作用，減少飼料中脂肪組成在消化過程中被分解吸收，而達到體重控制的效果。另外，在補充 2 mg anti-lipase IgY 組的體重控制效果並不明顯僅在後期 (第 30 天) 觀察到體重與沒有餵食 anti-lipase IgY 組有減緩的趨勢但不顯著。從細胞生物學觀點，肥胖的表徵是指脂肪組織中脂肪細胞，從無脂質的成纖維—前脂肪細胞 (fibroblastic pre-adipocytes) 分化變成堆積大量脂質且體積變大變圓的脂肪細胞 (Woo *et al.*, 2009)。另亦有研究指出小鼠以高脂飼料誘發肥胖，脂肪組織內的脂肪細胞會變大為其主要特徵 (Sakai *et al.*, 2007)。本研究於試驗結束後將小鼠犧牲取出副睪周圍的脂肪組織進行秤重及顯微鏡觀察亦發現脂肪細胞直徑變大 (表 2，圖 4)。結果如同上述體重觀察的情形，在 3 組餵食高能量飼料之試驗組的副睪周圍脂肪組織重量與脂肪細胞大小均顯著高於餵食正常飼料的對照組 ( $P < 0.05$ )。在試驗組部分亦是以 HE (2X) 組顯著低於其他 2 個試驗組 HE (1X) 組與 HE (-) 組。

表 1. 餵飼不同飼料對小鼠的飼料效率與體重增加之影響

Table 1. Feed efficiency and body weight gain in mice fed different diets

Items	Laboratory pellet chow <sup>1</sup> (Control)	High-energy diet <sup>2</sup>		
		PBS	anti-lipase IgY 2 mg	anti-lipase IgY 4 mg
Initial body weight (g)	35.1 ± 0.31 <sup>a</sup>	37.2 ± 0.26 <sup>a</sup>	37.0 ± 0.14 <sup>a</sup>	35.9 ± 0.38 <sup>a</sup>
Final body weight (g)	43.9 ± 0.87 <sup>a</sup>	55.1 ± 1.04 <sup>c</sup>	54.1 ± 0.26 <sup>c</sup>	47.9 ± 0.68 <sup>b</sup>
Body Weight Gain (g)	8.8 ± 0.25 <sup>a</sup>	17.9 ± 0.61 <sup>c</sup>	17.1 ± 0.26 <sup>c</sup>	12.0 ± 0.54 <sup>b</sup>
Body Weight Gain (%)	19.9 ± 0.58 <sup>a</sup>	32.5 ± 0.92 <sup>c</sup>	31.6 ± 0.26 <sup>c</sup>	25.0 ± 0.79 <sup>b</sup>
Food intake (g/day)	5.5 ± 0.18 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.12 <sup>b</sup>	3.3 ± 0.15 <sup>b</sup>	3.3 ± 0.14 <sup>b</sup>
Food efficiency ratio	2.2 ± 0.12 <sup>a</sup>	7.1 ± 0.41 <sup>b</sup>	7.0 ± 0.37 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.28 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Laboratory rodent diet/MF18 (fat: 18%) (Oriental Yeast, Tokyo, Japan).

<sup>2</sup> High-energy diet: DIO rodent diet purified w/60% Energy From Fat-Blue/58Y1 (fat: 34.9%) (TestDiet®, Tokyo, Japan).

<sup>a, b, c</sup> Values in the same row with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

表 2. 不同飼料餵養小鼠的脂肪細胞直徑和脂肪組織 (副睪) 重量

Table 2. The diameter of adipocyte and the weight of adipose tissue (epididymal) in mice fed with different diets

Diet	Weight of adipose tissue (g)	Adipocyte diameter (μm)
Laboratory pellet chow <sup>1</sup> (Control)	1.3 ± 0.33 <sup>a</sup>	71.6 ± 3.52 <sup>a</sup>
High-energy diet <sup>2</sup> + anti-lipase IgY 4 mg	2.8 ± 0.56 <sup>b</sup>	81.7 ± 5.55 <sup>b</sup>
High-energy diet + anti-lipase IgY 2 mg	3.8 ± 0.51 <sup>c</sup>	103.5 ± 4.4 <sup>c</sup>
High-fat diet + PBS	4.1 ± 0.83 <sup>c</sup>	112.2 ± 4.91 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Laboratory rodent diet/MF18 (fat: 18%) (Oriental Yeast, Tokyo, Japan).

<sup>2</sup> High-energy diet: DIO rodent diet purified w/60% Energy From Fat-Blue/58Y1 (fat: 34.9%) (TestDiet®, Tokyo, Japan).

<sup>a, b, c</sup> Values in the same column with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

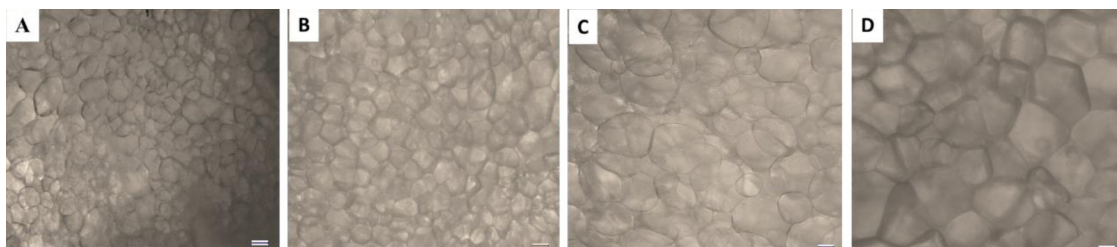


圖 4. 不同飼料餵養小鼠的副睪脂肪組織細胞形態。(A) 正常飼料 (對照組)，(B) 高熱量飼料 + 4 mg anti-lipase IgY，(C) 高熱量飼料 + 2 mg anti-lipase IgY，(D) 高熱量飼料 + PBS。

Fig. 4. The morphology of epididymal adipocytes in mice fed with different diets. (A) Laboratory pellet chow (Control), (B) High-fat diet + 4 mg anti-lipase IgY, (C) High-fat diet + 2 mg anti-lipase IgY, and (D) High-fat diet + PBS. Scale bar = 50 μm.

有研究指出利用高脂肪飼料餵飼進行誘發肥胖會增加大鼠 (Lee *et al.*, 2006) 和小鼠 (Jung *et al.*, 2008) 附睾周圍脂肪組織細胞的直徑和重量。Woo *et al.* (2009) 在利用添加岩藻黃素 (fucoxanthin) 對肥胖小鼠的研究中, 指出體重與內臟脂肪重量之間是呈現正相關 (副睪脂肪:  $r = 0.684$ ,  $P < 0.01$ , 腎週脂肪:  $r = 0.840$ ,  $P < 0.01$ )。飲食中攝入的脂質會先經過脂肪分解酶水解, 以三酸甘油酯的形式儲存白色脂肪組織 (white adipose tissue, WAT) (Gesta *et al.*, 2007)。副睪周圍的脂肪組織亦屬 WAT 的一部分, 在本研究額外補充 4 mg anti-lipase IgY 對餵食高熱量飼料之小鼠副睪周圍的脂肪組織重量與脂肪細胞直徑有顯著 ( $P < 0.05$ ) 的減少。此結果再次說明飼糧中添加 4 mg anti-lipase IgY 對小鼠體重的控制效果, 是透過抑制消化過程中脂肪分解酶的作用所致。

羅氏鮮 (Orlistat) 是一種合成的脂肪酶抑制劑, 主要是透過抑制小腸對脂肪的吸收達到減肥的效果 (Ballinger and Peikin; 2002)。在臨床上服用羅氏鮮常會有引起胃腸道不良反應的副作用, 如油便、腹瀉、膽結石和膽汁淤積性肝炎 (Filippatos *et al.*, 2008)。本研究小鼠飼糧中添加 anti-lipase IgY 雖未進行相關副作用的探討, 但是在進行墊料更換時於餵飼高能量飼料的試驗組不論有無額外補充 anti-lipase IgY 均有觀察到油便的現象, 但無下痢的情形; 於餵食正常飼料的對照組則無油便與下痢情形。Moreno *et al.* (2006), 指出飼糧中添加源自花生殼 (peanuts shell) 萃取之抑制胰脂肪分解酶的萃取物 (shell extracts; PSE) 有顯著增加餵食高脂飼糧大鼠糞便脂質含量。另外, Desmarchelier *et al.* (2012) 亦指出, 給予小鼠餵食含有高脂肪的西方飲食, 除了體重會上升外, 亦會顯著增加糞便中油脂的含量。以上說明攝取含高量脂質的飼料會增加糞便中脂質的含量, 若同時再額外補充具抑制脂肪分解酶的物質, 可抑制消化過程中脂肪分解酶的作用, 降低消化道對脂質吸收, 致使糞便中脂質含量更明提升。但是提高具抑制脂肪分解酶的物質補充, 是否會導致誘發下痢有待進一步探討。

## 結 論

以本研究之雞隻免疫計畫利用 IgY 免疫技術進行 anti-lipase IgY 特異性抗體生產, 於第 9 – 16 週的期間收集免疫蛋可得到較高含量的 anti-Lipase IgY 專一性抗體。經以小鼠的動物模式測試, 證實本研究所生產 anti-lipase IgY 抗體具有抑制消化道中脂肪分解酶功效達到體重控制的效果, 是具有開發為減重之健康產品的潛力。

## 參考文獻

- Akita, E. M. and S. Nakai. 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* 60: 207-214.
- Amaral, J. A., T. D. E. Franco, M., M. M. Carneiro-Sampaio, and S. B. Carbonare. 2002. Anti-enteropathogenic *Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunized leghorn chickens. *Res. Vet. Sci.* 72: 229-234.
- Ballinger, A. and S. R. Peikin. 2002. Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. *Eur. J. Pharmacol.* 440: 109-117.
- Bizhanov, G. and G. Vyshniauskis. 2000. A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. *Vet. Res. Commun.* 24: 103-113.
- Borgstrom, B. 1988. Mode of action of tetrahydrolipstatin: a derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin. *Biochim. Biophys. Acta.* 962: 308-316.
- Desmarchelier, C., C. Dahlhoff, S. Keller, M. Sailer, G. Jahreis, and H. Daniel. 2012. C57Bl/6 N mice on a western diet display reduced intestinal and hepatic cholesterol levels despite a plasma hypercholesterolemia. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-84>.
- Filippatos, T. D., C. S. Derdemezis, I. F. Gazi, E. S. Nakou, and D. P. Mikhailidis. 2008. Elisaf MS: Orlistat-associated adverse effects and drug interactions a critical review. *Drug Saf.* 31: 53-65.
- Gargouri, Y., S. Ransac, and R. Verger. 1997. Covalent inhibition of digestive lipases: an in vitro study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1344: 6-37.
- Gassmann, M., P. Thommes, T. Weiser, and U. Hubscher. 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* 4: 2528-2532.
- Gelineau, R. R., N. L. Arruda, J. A. Hicks, I. M. de Pina, A. Hatzidis, and J. A. Seggio. 2017. The behavioral and physiological effects of high-fat diet and alcohol consumption: Sex differences in C57BL/6J mice. *Brain Behav.* 7: e00708.



- Gesta, S., Y. H. Tseng, and C. R. Kahn. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131: 242-256.
- Han, L. K., Y. N. Zheng, M. Yoshikawa, H. Okuda, and Y. Kimura. 2005. Anti-obesity effects of chikusetsusaponins isolated from *Panax japonicus* rhizomes. *BMC Complement Altern. Med.* 5: 9.
- Han, L. K., Y. Kimura, M. Kawashima, T. Takaku, T. Taniyama, T. Hayashi, Y. N. Zheng, and H. Okuda. 2021. Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor. *Int. J. Obes.* 26: 1459-1464.
- Hatta, H., K. Tsuda, S. Akachi, M. Kim, and T. Yamamoto. 1993. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 450-454.
- Hill, J. O., E. L. Melanson, and H. T. Wyatt. 2000. Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. *J. Nutr.* 130 (2S, Suppl): 284-288.
- Ikemori, Y., M. Ohta, K. Umeda, F. C. J. Icatlo, M. Kuroki, H. Yokoyama, and Y. Kodama. 1997. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrums antibody powder. *Vet. Microbiol.* 58: 105-111.
- Jingang, H., J. Byeongmin, B. Jongin, Y. Yeejin, K. Daeun, C. Boyoon, K. Sungyeon, and K. Sunchang. 2022. High fat diet-induced brain damaging effects through autophagy-mediated senescence, inflammation and apoptosis mitigated by ginsenoside F1-enhanced mixture. *J Ginseng Res.* 46: 79-90.
- Jung, U. J., N. I. Baek, H. G. Chung, M. H. Bang, T. S. Jeong, K. T. Lee, Y. J. Kang, M. K. Lee, H. J. Kim, J. Yeo, and M. S. Choi. 2008. Effects of the ethanol extract of the roots of *Brassica rapa* on glucose and lipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice. *Clin. Nutr.* 27: 158-167.
- Klemperer, F. 1893. XV. Über natürliche Immunität und ihre Verwertung für die Immunisierungstherapie. In: Naunyn, B., Schmiedeberg, O. (Eds.).
- Lee, J. S., M. K. Lee, T. Y. Ha, S. H. Bok, H. M. Park, K. S. Jeong, M. N. Woo, G. M. Do, J. Y. Yeo, and M. S. Choi. 2006. Supplementation of whole persimmon leaf improves lipid profiles and suppresses body weight gain in rats fed high-fat diet. *Food Chem. Toxicol.* 44: 1875-1883.
- Lee, E. N., H. H. Sunwoo, K. Menninen, and J. S. Sim. 2002. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poult Sci.* 81: 632-641.
- Leslie, G. A. and L. W. Clem. 1969. Phylogen of immunoglobulin structure and function. *Immunoglobulins of the chicken.* *J. Exp. Med.* 130: 1337-1352.
- Leonhardt, M., B. Hrupka, and W. Langhans. 1999. New approaches in the pharmacological treatment of obesity. *Eur. J. Nutr.* 38: 1-13.
- Li-Chan, E. C. Y., S. S. Ler, A. Kummer, and E. M. Akita. 1998. Isolation of lactoferrin by immunoaffinity chromatography using yolk antibodies. *J. Food Biochem.* 22: 179-195.
- Miranda, J. M., X. Anton, C. R. Valbuena, P. R. Saavedra, J. A. Rodriguez, A. Lamas, C. M. Franco, and A. Cepeda. 2015. Egg and Egg-Derived Foods: Effects on Human Health and Use as Functional Foods. *Nutrients* 706-729.
- Moreno, D. A., N. Ilic, and A. Poulev. 2006. Raskin I: Effects of *Arachis hypogaea* nutshell extract on lipid metabolic enzymes and obesity parameters. *Life Sci.* 78: 2797-2803.
- Owusu-Asiedu, A., C. M. Nyachoti, and R. R. Marquardt. 2003. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic. *J. Anim. Sci.* 81: 1790-1798.
- Polson, A. and M. B. Von Wechmar. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.* 9: 476-493.
- Portillo, M. P., E. Simon, M. A. Garcia-Calonge, and A. S. Del-Barrio. 1999. Effects of high-fat diet on lipolysis in isolated adipocytes from visceral and subcutaneous WAT. *Eur. J. Nutr.* 38: 177-182.
- Rose, M. E., E. Orlans, and N. Buttress. 1974. Immunoglobulin classes in the hen's egg their segregation in yolk & white. *Eur. J. Immunol.* 4: 521-523.
- Sakai, T., H. Sakaue, T. Nakamura, M. Okada, Y. Matsuki, E. Watanabe, R. Hiramatsu, K. Nakayama, K. I. Nakayama, and M. Kasuga. 2007. Skp2 controls adipocyte proliferation during the development of obesity. *J. Biol. Chem.* 3: 2038-2046.
- Sarker, S. A., T. H. Casswall, L. R. Juneja, E. Hoq, I. Hossain, G. J. Fuchs, and L. Hammarstrom. 2001. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32: 19-25.



- SAS Institute. 2004. SAS for Windows, version 9.1. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Schade, R., W. Bürger, T. Schöneberg, A. Schniering, C. Schwarzkopf, A. Hlinak, and H. Kobilke. 1994. Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunization with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. *Altex* 11: 75-84.
- Shimizu, M., R. C. Fitzsimmons, and S. Nakai. 1988. Anti-E. coli immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Sci.* 53: 1360-1366.
- Sun, S., Mo, W., Y. Ji, and S. Liu, 2001. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15: 708-712.
- Sunwoo, H. H., E. N. Lee, K. Menninen, M. R. Suresh, and J. S. Sim. 2002. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on O157:H7. *J. Food Sci.* 67: 1486-1494.
- Woo, M. N., S. M. Jeon<sup>1</sup>, Y. C. Shin, M. K. Lee, M. A. Kang, and M. S. Choi. 2009. Anti-obese property of fucoxanthin is partly mediated by altering lipid-regulating enzymes and uncoupling proteins of visceral adipose tissue in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 53: 1603-1611.
- Yokoyama, H., R. C. Peralta, S. Sendo, Y. Ikemori, and Y. Kodama. 1993. 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. *Am. J. Vet. Res.* 54: 867-872.
- Yokoyama, H., R. C. Peralta, R. Diaz, S. Sendo, and Y. Ikemori. 1992. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect. Immunol.* 60: 998-1007.
- Yoshinori, M. and K. Jennifer. 2002. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J. Med. Food.* 5: 159-169.

# Production of anti-lipase IgY and study on weight loss of mice <sup>(1)</sup>

Jenn- Fa Liou <sup>(2)</sup> Fung-Hsiang Chu <sup>(2)</sup> and Lih-Ren Chen <sup>(2)(3)</sup>

Received: Sep. 22, 2022; Accepted: May. 31, 2023

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the body weight control efficiency of the immunoglobulin in chicken yolk (IgY) specifically against lipase. This antibody was raised by intramuscular immunization to 10 White Leghorn hens with lipase as antigen and the ELISA method was used to analyze the antibody content of the immunized egg. The titer of specific IgY against lipase increased from the third week after the first immunization. The content of total IgY was  $143.8 \pm 18$  mg/yolk, with the average concentration of specific IgY of  $7.6 \text{ mg} \pm 0.4 \text{ mg/yolk}$  in the eggs from 3 to 20 wks after immunization. The investigation on body weight control efficiency of specific IgY indicated that this anti-lipase IgY was able to prevent obesity induced by a high-fat diet in mice. Our results suggested that anti-lipase IgY may be a good candidate as a natural dietary supplement which reduces intestinal absorption of extra dietary fat by inhibiting pancreatic lipase activity.

Key words: IgY, Lipase, Body weight control.

---

(1) Contribution No. 2750 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Genetics and Physiology Division, MOA-TLRI, HsinHua, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Corresponding author, E-mail: rchen131@gmail.com.