

新疆野生一枝蒿粗多糖对流感疫苗小鼠免疫增强效果的分析

张爱莲*, 王丹阳, 赵淑述, 赵兵, 张富春

(新疆大学生命科学与技术学院 新疆生物资源与基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘要: 用新疆野生一枝蒿粗多糖(wild *Artemisia rupestris* L. crude polysaccharides, WARCP)通过肌肉注射免疫小鼠,研究其作为流感病毒疫苗(influenza virus vaccine, IVV)的佐剂效果和节约流感疫苗抗原用量的作用。WARCP与不同剂量(0.05、0.1、0.5 μg)的IVV配伍,肌肉注射免疫小鼠,观察小鼠的生长状态,通过ELISA法检测血清中抗体IgG及IgG₁、IgG_{2a}的水平;MTT法检测脾淋巴细胞的增殖;流式细胞术检测细胞因子CD4⁺IL-4和CD8⁺IFN- γ 以及CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞的表达水平。结果表明WARCP对小鼠的生长状态没有显著的影响($P>0.05$);WARCP能够显著提高不同剂量IVV特异性IgG及其IgG₁、IgG_{2a}的抗体水平($P<0.05$);增强淋巴细胞的增殖($P<0.05$);显著提高IL-4和IFN- γ 的分泌水平($P<0.05$);降低Treg细胞的表达水平($P<0.05$);尤其可以提高低剂量IVV的体液和细胞免疫反应,至少减少抗原用量91%。因此,WARCP作为IVV的佐剂通过降低Treg细胞的水平,显著增强了IVV的免疫效果,尤其是Th1型的免疫反应,能够很好地节约抗原用量,具有良好的安全性。

关键词: 流感疫苗;一枝蒿;多糖;节约抗原;肌肉免疫

中图分类号:S852.52

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2016)10-2089-09

The Analysis of Immune Enhancement Effect of Xinjiang Wild *Artemisia rupestris* L. Crude Polysaccharides on Influenza Viruses Vaccines in Mice

ZHANG Ai-lian*, WANG Dan-yang, ZHAO Shu-shu, ZHAO Bing, ZHANG Fu-chun

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: The immune effects of Xinjiang Wild *Artemisia rupestris* L. crude polysaccharides (WARCP) as an adjuvant and sparing antigen on different doses of influenza virus vaccine (IVV) were explored. ICR mice were intramuscularly immunized respectively with different doses (0.05, 0.1, 0.5 μg) of the IVV alone or co-administered with 300 μg WARCP at 0 d and 14 d. The growth state of mice were observed, antibody level of IgG and IgG₁, IgG_{2a} in serum were tested by ELISA; splenocyte proliferations were tested by MTT; The expression levels of CD4⁺IL-4, CD8⁺IFN- γ and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cells were tested by flow cytometry. The results showed that no significant differences in the body weight were observed between mice from different groups ($P>0.05$); WARCP can significantly improve the antibody level of influenza-specific IgG and IgG₁, IgG_{2a} ($P<0.05$); WARCP can significantly promote lymphocyte proliferation, the secretion level of IL-4 and IFN- γ ($P<0.05$), and significantly reduce the level of expression of Treg cells ($P<0.05$); In particular, it can enhance the humoral and cellular immunity responses of low-dose IVV, indicating an at least 91% reduction in vaccine dosage by adding WARCP as adju-

收稿日期:2016-05-16

基金项目:自治区自然科学基金(201404061219)

作者简介:张爱莲(1968-),女,山东东明人,副教授,博士,主要从事疫苗佐剂方面的研究, Tel:0991-5523400

* 通信作者:张爱莲,副教授, E-mail: xjzal@163.com

vant. These results indicated that adding WARCP to IVV enhanced the immune efficacy of IVV by reducing the level of Treg cells, significantly promote Th1-type immune response particularly, it can be an adjuvant with the advantages of high safety and dose-sparing.

Key words: influenza virus vaccine; *Artemisia rupestris* L.; polysaccharides; antigen sparing; intramuscle immunity

流感是一种最常见的危害人类健康的传染病,尤其是在高危人群中,如儿童和老人。研制流感疫苗是针对预防流感最有效的一种方法,但是由于流感病毒表面的抗原频繁突变,在大流感流行的时候,流感疫苗往往不能够满足接种人群的用量。而使用疫苗佐剂可以显著增强流感疫苗免疫效果,减少流感疫苗的抗原用量,使更多的易感人群接种流感疫苗,达到迅速应对流感大流行的目的^[1]。流感疫苗的佐剂虽然有铝佐剂和 MF59,但是 MF59 或 AS03 仅在欧洲流感大流行时准予使用^[2-3],目前人们使用的流感疫苗中并不含有佐剂,因此寻找安全有效的佐剂用于流感疫苗,降低抗原的用量,扩大流感流行时接种人群的数量仍然是流感疫苗研究的重要课题。

传统的中草药在人类疾病的治疗中有悠久的历史,大量的证据表明中草药具有很好的免疫调节作用,可以作为新型疫苗佐剂的候选资源^[4]。多糖是中草药的主要成分,具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等多种生物活性^[5-6]。国内外研究者从多种传统中草药中提取多糖成分研究其佐剂效果,如黄芪多糖、灵芝多糖、茯苓多糖、淫羊藿多糖等发现其具有很好的佐剂活性,达到增强免疫功能的作用而成为新型疫苗的候选佐剂^[7-11]。

新疆野生一枝蒿(WARCP)主要含有多糖、黄酮等多种化合物^[12],多糖为其主要活性成分之一。在前期的研究中发现 WARCP 与 IVV 配伍进行皮下免疫小鼠后,WARCP 具有很好的佐剂效果^[13]。结合实际应用中 IVV 多采用肌肉途径接种,为此本研究将 WARCP 作为 IVV 的新型疫苗佐剂,通过肌肉途径免疫小鼠,检测其免疫增强的效果和节约抗原用量的作用,评价 WARCP 作为 IVV 佐剂的可行性,为 WARCP 作为 IVV 佐剂的研制提供实验依据,并为后期研制禽流感以及其他病毒疫苗的佐剂奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新疆野生一枝蒿全草(市售)。季节性流感病毒裂解疫苗(2014/2015 株流感病毒裂解疫苗,主要成分:A/加利福尼亚/7/2009(H1N1) pdm09-衍生株

(NYMC X-179A)、A/德克萨斯/50/2012(H3N2)-衍生株(NYMC X-223A)、B/马萨诸塞/2/2012-衍生株(NYMC BX-51B)(血凝素含量均为 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (市售)。辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠的 IgG、IgG₁、IgG_{2a} 购自美国 Southbiotech 公司。刀豆蛋白 A (ConA) 和脂多糖(LPS)为美国 Sigma-Aldrich 公司产品。噻唑蓝(MTT)为 Amresco 公司产品。N-四甲基联苯胺(TMB)购自上海蓝季科技发展有限公司。流式抗体 PE-CD3e、FITC-CD8a、APC-CD4、FITC-CD4、PE-IL-4、PE-IFN- γ 、APC-CD25 和 PE-Foxp3、Fixation/Permeabilization Solution、Perm/Wash buffer、Golgi stop 均购自美国 BD 公司。Regulatory T Cell Staining Kit 购自 eBioscience 公司。RPMI-1640 培养基为 Hyclone 公司产品。其他试剂为国产分析纯。

1.2 新疆野生一枝蒿粗多糖的制备

采用水提醇沉法提取新疆野生一枝蒿粗多糖^[14]。用 Sevag 法对新疆野生一枝蒿粗多糖除蛋白质,得到除蛋白质的新疆野生一枝蒿粗多糖粉末^[15]。蒽酮-硫酸法^[16]测定新疆野生一枝蒿粗多糖中多糖的含量为 30.94%^[13]。

1.3 实验动物与免疫

ICR 小鼠,雌性,6~8 周龄,18~22 g,购自新疆医科大学实验动物中心。40 只小鼠随机分为 8 组(表 1)。WARCP 300 μg 分别与 0.05、0.1、0.5 μg IVV 配伍后免疫小鼠为试验组,以不同剂量的 IVV 单独免疫组为试验对照组,生理盐水免疫组为空白对照组,IVV 与铝佐剂组为阳性对照组,于 0 d 和 14 d 分别进行肌肉免疫,体积为 100 μL 。免疫后不同时间点称取小鼠体重并观察小鼠的生长状态。

另取 20 只小鼠,设 IVV 0.05 μg 、IVV 0.05 μg + WARCP 300 μg 、IVV 0.1 μg 、IVV 0.1 μg + WARCP 300 μg 4 组($n=5$),分别于 0 d 和 14 d 进行皮下注射免疫,用于分析不同免疫途径对抗体滴度的影响。

1.4 WARCP 免疫后小鼠血清 IgG 及亚类抗体检测

初免后 7、14、21 d 进行小鼠眼眶采血,收集血清,用间接 ELISA 法测定血清中的抗体水平。简述

如下:将 $0.125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 2014/2015 株流感病毒裂解疫苗加入 96 孔板中, 4°C 过夜; 37°C 封闭 1 h; 每孔加入 1:200 稀释后的血清, 37°C 1 h; 每孔分

别加入 1:5 000 稀释的 HRP 标记 IgG、IgG₁、IgG_{2a}, 37°C 1 h; 加入 TMB 底物避光显色 10 min, 终止反应后 $\text{OD}_{450/655 \text{ nm}}$ 的条件下测定吸光度。

表 1 免疫小鼠分组表

Table 1 The group of immunization

分组 Groups	动物 Animals	数量 Number	疫苗(或对照) Vaccine (or control)
1	ICR 小鼠	5	0.9% NaCl
2	ICR 小鼠	5	IVV(influenza virus vaccine) 0.05 μg
3	ICR 小鼠	5	IVV 0.05 μg + WARCP 300 μg
4	ICR 小鼠	5	IVV 0.1 μg
5	ICR 小鼠	5	IVV 0.1 μg + WARCP 300 μg
6	ICR 小鼠	5	IVV 0.5 μg
7	ICR 小鼠	5	IVV 0.5 μg + WARCP 300 μg
8	ICR 小鼠	5	IVV 0.1 μg + Alum 100 μg

1.5 WARCP 免疫后小鼠淋巴细胞增殖的检测

小鼠二免后 7 d, 在无菌条件下制成脾细胞悬液, 将 5×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 脾细胞悬液加入 96 孔板, 分别加入 $3.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ConA 和 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS, 设置 3 个复孔, 于 37°C 培养箱中孵育 48 h。每孔加入 20 μL 质量浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液, 继续孵育 4 h, 加入 100 μL DMSO 后用酶标仪检测 $\text{OD}_{570/630 \text{ nm}}$ 条件下的吸光度, 计算各组刺激指数(SI), $\text{SI} = (\text{各刺激孔的 OD 值} - \text{培养基 OD 值}) / (\text{未刺激孔的 OD 值} - \text{培养基 OD 值})$ 。

1.6 流式细胞术检测细胞因子 CD4⁺IL-4、CD8⁺IFN- γ 的表达

从小鼠分离得到的脾细胞, 取 2×10^6 个细胞加入到 24 孔板里, 加入 IVV 抗原 0.6 μg , 37°C 培养箱孵育 4 h。加入 Golgi stop 过夜培养后, 收集细胞, 用 FITC-CD4 进行细胞表面染, 室温避光 30 mins。每管加入 150 μL Cytotfix/Cytoperm(BD) 重悬细胞, 4°C , 30 min; 加入 1 mL Perm/Wash buffer (BD), 离心, 弃上清。加入 1 μL 的 PE-IL-4 和 PE-IFN- γ ; 室温避光 20 min。每个样用 3 mL $1 \times$ Perm/Wash buffer (BD) 洗, PBS 重悬细胞, 流式细胞术检测。

1.7 流式细胞术检测 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞的表达

制备小鼠二免后 7 d 的脾细胞悬液, 细胞计数后将浓度调整为 2×10^6 个, 用 eBioscience 的 Regulatory T Cell Staining Kit 进行细胞染色, 按照说明书进行, 简述如下: 细胞洗涤后, $1\ 200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 7 min, 各加入 APC-CD4、FITC-CD25 进行表面

染色, 避光室温 20 min。加固定破膜液 120 μL , 用 1 mL $1 \times$ Wash buffer 洗一次, 各加 1 μL PE-Foxp3, 室温孵育 20 min。每个样加入 1 mL wash buffer, 离心, 弃上清。加入 300 μL PBS 重悬细胞, 过铜网, 流式上机检测, 用 FlowJo 软件进行分析。

1.8 统计学分析

利用 Graph Pad Prism 5.0 进行数据分析, 数据均采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 用 Student's test 对试验组间的数据进行比较, 差异显著标准为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 WARCP 对小鼠生长状况的影响

WARCP 与 IVV 共免疫后, 各组小鼠体重增长无显著差异 ($P > 0.05$), 见表 2。表明以 WARCP 为 IVV 的佐剂对小鼠机体刺激性较小, 对小鼠的生长并无显著影响。

2.2 WARCP 对 IVV 诱导小鼠 IgG 抗体滴度的影响

用间接 ELISA 法检测小鼠初免后不同时期血清中 IgG 的抗体滴度, 结果如图 1。随着免疫后时间的增加, 各组抗体滴度水平也逐渐增加; 随着流感单独免疫组 IVV 剂量的增加, 低、中、高剂量组的 IgG 抗体滴度也逐渐增加; 在加入了 WARCP300 μg 后, 流感低剂量、中剂量组的抗体滴度均显著提高。其中, 初免后 14 d, 低剂量 IVV 0.05 μg + WARCP 300 μg 与 IVV 0.05 μg 相比增加了 2.5 倍, 其滴度比高剂量 IVV 单独免疫组还高。中剂量 IVV 0.1 μg + WARCP 300 μg 与 IVV 0.1 μg 相比增加了近 1.7 倍, 其滴度与铝佐剂组相当。但高剂量 IVV 组加入 WARCP300 μg 后没有显著提高。

表 2 WARCP 处理后对各组小鼠免疫后体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 2 Effects of administration of WARCP on the body weight of mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

g

组别 Group	0 d	14 d	28 d
0.9%NaCl	20.50±3.49	27.03±2.48	27.72±2.48
IVV 0.05 μg	23.68±2.71	31.88±2.87	32.48±1.61
IVV 0.05 μg + WARCP 300 μg	25.16±3.82	30.46±4.50	31.92±3.58
IVV 0.1 μg	26.12±1.79	30.06±1.07	31.62±2.13
IVV 0.1 μg + WARCP 300 μg	24.35±1.77	28.57±0.96	30.21±1.01
IVV 0.5 μg	25.16±3.06	29.74±2.22	30.44±1.83
IVV 0.5 μg + WARCP 300 μg	26.30±4.49	29.24±1.00	27.88±1.81
IVV 0.1 μg + Alum	25.07±3.55	31.75±4.19	32.96±2.95

各组小鼠免疫后相同时间的体重无统计学差异 ($P>0.05$)

No statistical difference between groups at the same time ($P>0.05$)

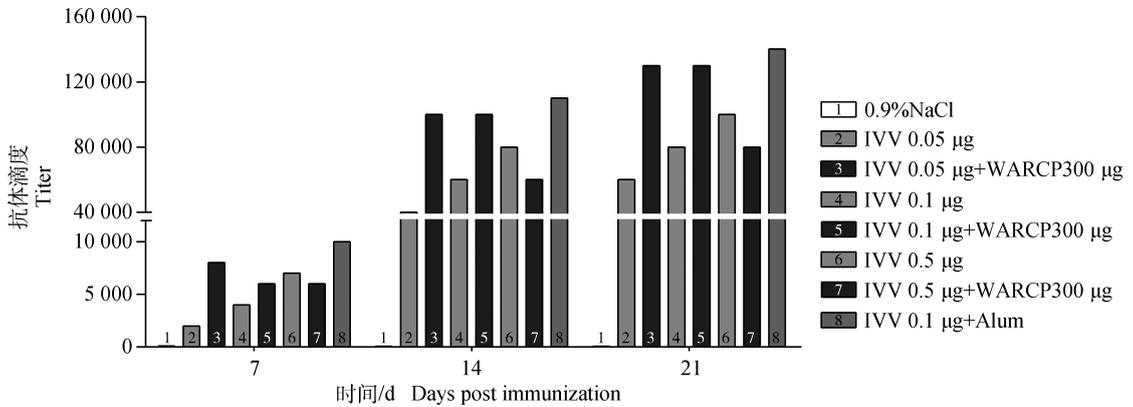


图 1 间接 ELISA 检测初免后不同时期小鼠血清中 IgG 的抗体滴度

Fig. 1 Detection of IgG titer in serum of different times after immunization by indirect ELISA

比较小鼠肌肉免疫和皮下免疫后 14 d 的血清中 IgG 的抗体滴度, 结果如图 2, 肌肉免疫的 IVV 单独免疫组 IVV0.05 μg 、IVV 0.1 μg 的抗体滴度均比皮下免疫后的高至少 2 倍; WARCP300 μg 与 IVV0.05 μg 、IVV 0.1 μg 配伍后, 两种免疫方式各组 IgG 抗体滴度均比 IVV 单独免疫组有显著增高, 肌肉免疫后的滴度比皮下免疫后的高至少 2 倍。

2.3 WARCP 对 IVV 诱导小鼠抗体亚类的影响

用间接 ELISA 法检测小鼠初免后 14 d 血清中抗体亚类 IgG₁ 和 IgG_{2a} 的水平, 结果如图 3, WARCP 300 μg 和低、中剂量 IVV0.05 μg 、IVV0.1 μg 配伍后的血清 IgG₁ 和 IgG_{2a} 抗体水平均显著高于低、中剂量的 IVV 单独免疫组 ($P<0.05$), 其中, 中剂量 IVV 0.1 μg + WARCP 300 μg 与对照组 IVV 0.1 μg + Alum 相比无显著差异 ($P>0.05$); 各

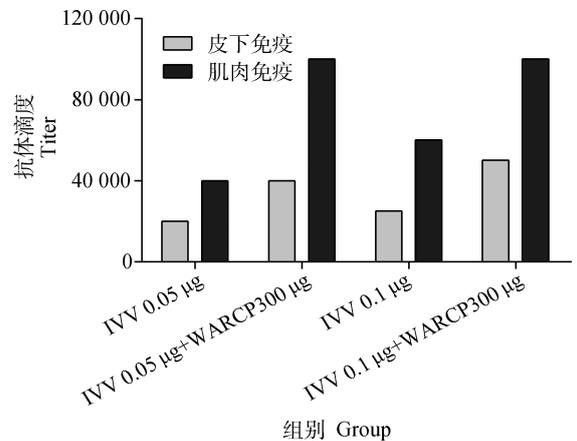


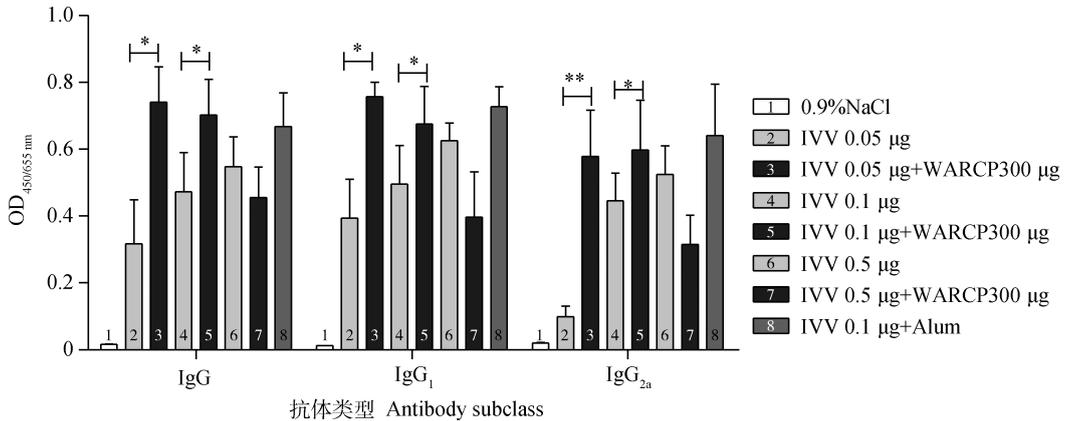
图 2 间接 ELISA 检测不同免疫途径初免后 14 d 小鼠血清中 IgG 的抗体滴度

Fig. 2 Detection of IgG titer in serum of 14 d after immunization from different immune pathway by indirect ELISA

免疫组 IgG₁ 的抗体水平均高于 IgG_{2a} 的抗体水平。但高剂量 IVV 组加入 WARCP300 μg 后的血清 IgG₁ 和 IgG_{2a} 抗体水平均没有显著提高。

2.4 WARCP 对 IVV 诱导小鼠淋巴细胞增殖的影响

MTT 法检测初免后 21 d 各组小鼠淋巴细胞的增殖情况,加入浓度为 $3.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ConA 和 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 刺激物后各组的刺激指数如图 4:

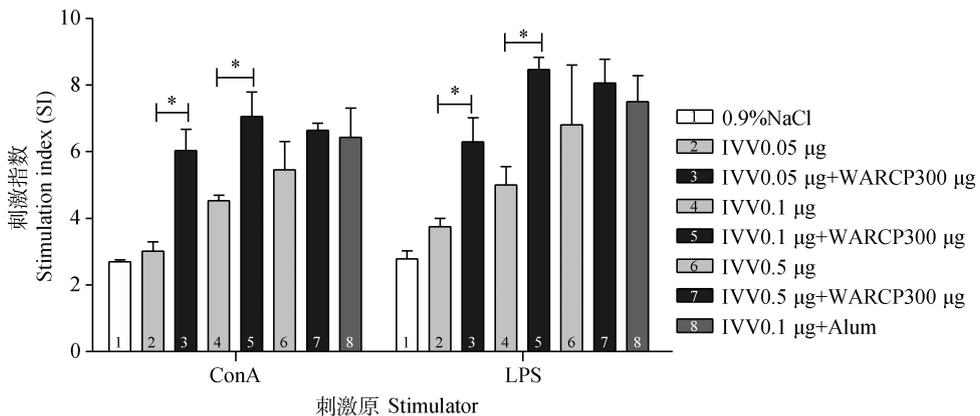


与 IVV 单独免疫组相比较, * . $P < 0.05$, * * . $P < 0.01$

Compared with IVV immunization group, * . $P < 0.05$; * * . $P < 0.01$

图 3 间接 ELISA 检测初免后 14 d 小鼠血清中抗体分型的水平

Fig. 3 Detection of antibody subclasses in serum by indirect ELISA in 14 d after first immunization



与 IVV 单独免疫组相比较, * . $P < 0.05$, * * . $P < 0.01$

Compared with IVV immunization group, * . $P < 0.05$; * * . $P < 0.01$

图 4 MTT 法检测初免后 21 d 小鼠脾中淋巴细胞的增殖

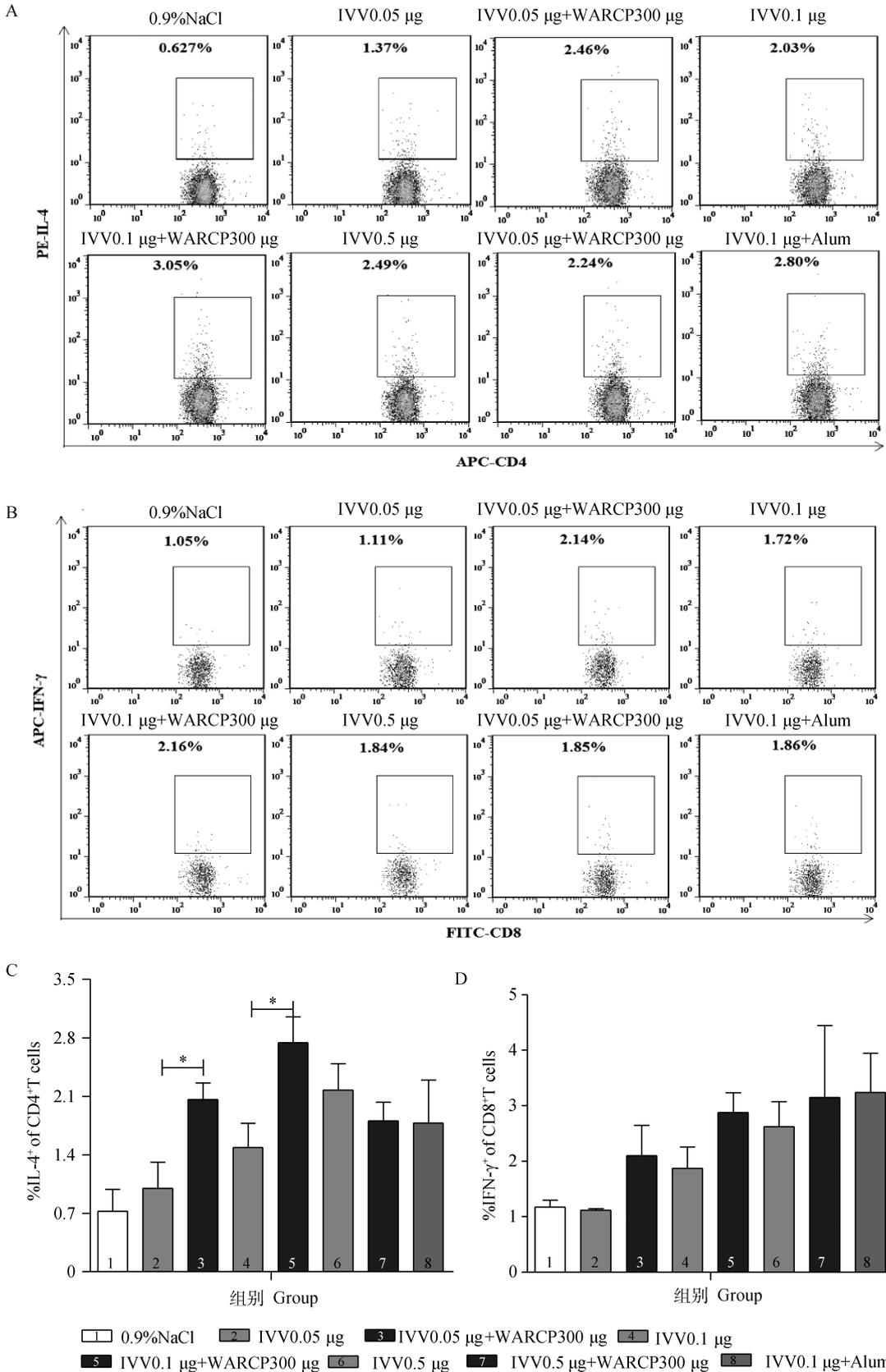
Fig. 4 Detection of splenocyte proliferation by MTT in 21 d after first immunization

2.5 流式细胞术检测 CD4⁺IL-4、CD8⁺IFN- γ 的水平

流式细胞术检测初免后 21 d 各组小鼠的 CD4⁺IL-4、CD8⁺IFN- γ 的表达水平,结果如图 5:随着单独免疫 IVV 0.05 μg 、IVV 0.1 μg 、IVV 0.5 μg 剂量的不断增加,CD4⁺IL-4、CD8⁺IFN- γ 分泌水平也不断升高。WARCP 300 μg 配伍的低剂量、中剂量

随着 IVV 0.05 μg 、IVV 0.1 μg 、IVV 0.5 μg 剂量的不断增加,其刺激指数也不断升高。ConA 和 LPS 诱导 WARCP 300 μg 配伍的 IVV 低剂量、中剂量组淋巴细胞的增殖活性显著升高 ($P < 0.05$),高剂量组无显著差异 ($P > 0.05$)。此外,中剂量 IVV 0.1 μg + WARCP 300 μg 与铝佐剂组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。

组的 CD4⁺IL-4、CD8⁺IFN- γ 分泌水平显著高于低剂量、中剂量 IVV 单独免疫组 ($P < 0.05$),WARCP 300 μg 配伍高剂量 IVV 组无显著差异 ($P > 0.05$)。中剂量 IVV 0.1 μg + WARCP 300 μg 与对照组 IVV 0.1 μg + Alum 相比 CD4⁺IL-4、CD8⁺IFN- γ 的分泌水平无显著差异 ($P > 0.05$)。



与 IVV 单独免疫组相比较, * . $P < 0.05$, * * . $P < 0.01$

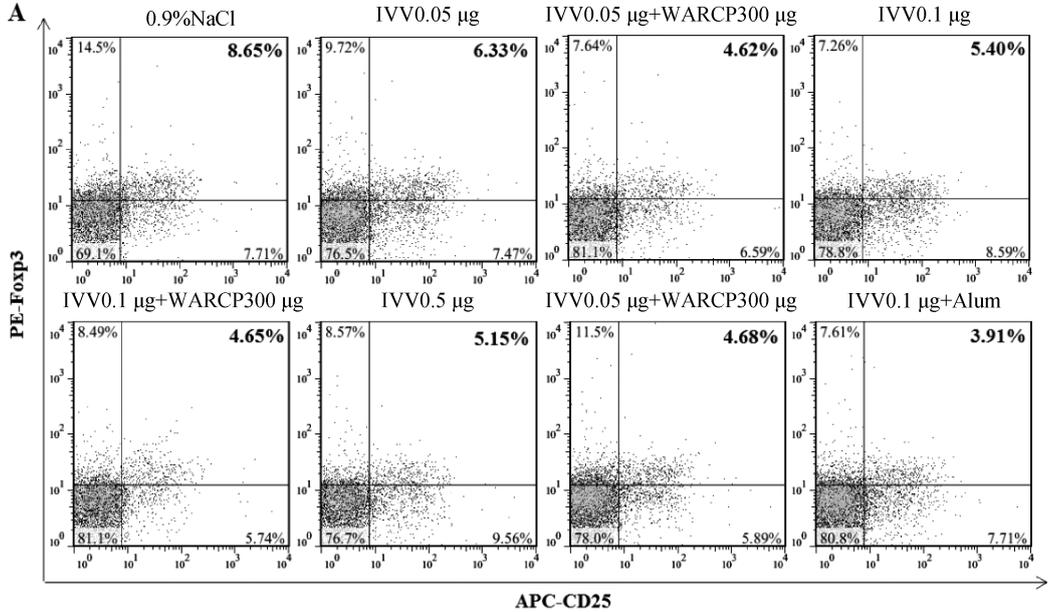
Compared with IVV immunization group, * . $P < 0.05$; * * . $P < 0.01$

图 5 WARCP 对流感疫苗免疫后小鼠脾分泌 $CD4^+ IL-4$ 、 $CD8^+ IFN-\gamma$ 水平的影响

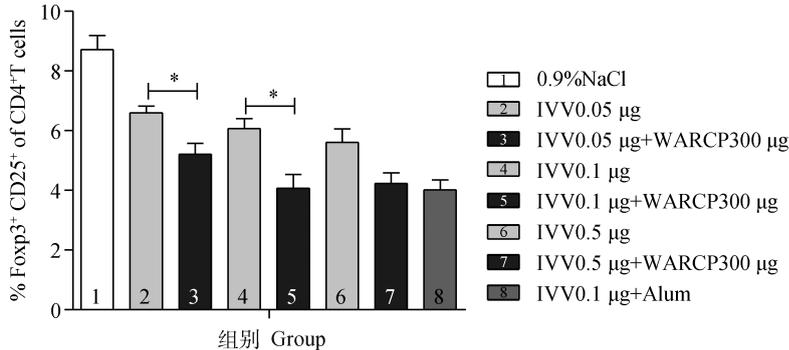
Fig. 5 The secretion level of $CD4^+ IL-4$, $CD8^+ IFN-\gamma$ in the spleen of mice immunized with IVV mixed WARCP

2.6 流式细胞术检测 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞的表达

为了检测免疫后各组小鼠调节性 T 细胞的表达水平,用流式细胞术检测 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞的表达,结果如图 6:随着单独免疫组 IVV0.05 μg 、IVV 0.1 μg 、IVV 0.5 μg 剂量的不断增加,CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 表达水平也不断降低。



B



与 IVV 单独免疫组相比较, * . $P < 0.05$, * * . $P < 0.01$

Compared with IVV immunization group, * . $P < 0.05$; * * . $P < 0.01$

图 6 WARCP 对流感疫苗免疫后小鼠 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞百分比的影响

Fig. 6 The percentage of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg cell in the spleen of mice immunized with IVV mixed WARCP

3 讨论

随着现代分离技术的发展,越来越多的中草药组分被鉴定和分离出来,其中包括多糖、皂素、酚类化合物及类黄酮等,这些组分作为佐剂能促进激活抗原递呈细胞,促进细胞因子的合成,增强抗肿瘤和抗感染的免疫反应^[17]。尤其是补益类中药的有效

成分,能影响机体的免疫功能,很有希望开发成为新型疫苗佐剂。现代药理学研究表明,多糖类作为佐剂不仅可以通过激活 T、B 淋巴细胞等免疫细胞对机体的免疫系统进行调节,还可以通过激活补体,促进干扰素生成,诱生细胞因子等方式得以实现^[18]。本研究旨在探讨 WARCP 作为 IVV 的佐剂,加强 IVV 的免疫效果和节约 IVV 抗原用量的作用。将 WARCP 300 μg 配伍 IVV 低剂量、中剂量组的 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 表达水平显著低于 IVV 低剂量、中剂量单独免疫组 ($P < 0.05$), WARCP 300 μg 配伍 IVV 高剂量组无显著差异 ($P > 0.05$)。中剂量 IVV 0.1 μg + WARCP 300 μg 与对照组 Alum 相比 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 表达水平无显著差异 ($P > 0.05$)。

成分,能影响机体的免疫功能,很有希望开发成为新型疫苗佐剂。现代药理学研究表明,多糖类作为佐剂不仅可以通过激活 T、B 淋巴细胞等免疫细胞对机体的免疫系统进行调节,还可以通过激活补体,促进干扰素生成,诱生细胞因子等方式得以实现^[18]。本研究旨在探讨 WARCP 作为 IVV 的佐剂,加强 IVV 的免疫效果和节约 IVV 抗原用量的作用。将

一定剂量的 WARCP 与不同剂量的 IVV 配伍后免疫小鼠作为试验组,以不同剂量 IVV 单独免疫小鼠为无佐剂对照组,铝佐剂组作为阳性对照组,肌肉途径进行免疫,检测 WARCP 与 IVV 配伍后对小鼠免疫应答的增强效果。

研究发现,WARCP 配伍 IVV 肌肉途径免疫小鼠后,各组小鼠体重均没有显著差异,也没有明显的过敏反应,表明 WARCP 并未对小鼠的生长状况产生影响,WARCP 具有一定的安全性。合适的抗原剂量与合适多糖剂量配伍才会起到理想的免疫效果。IgG 是血清免疫球蛋白的主要成分,其含量高低可以反映机体的防御能力^[19]。抗体 IgG 滴度结果表明,WARCP 可以显著提高 IVV 诱导产生的 IgG 抗体滴度,IVV 低剂量组加入 WARCP 后与 IVV 高剂量单独组相比可减少抗原用量 91%,WARCP 显著增强了 IVV 激起的体液免疫应答水平,并节约抗原的用量,这表明通过本试验确定了合适的抗原剂量与多糖的剂量配伍,因此起到了很好的免疫增强效果^[20-21]。为了比较不同的免疫途径对小鼠抗体水平的影响,对初免后 14 d 的 IgG 滴度进行了比较,结果发现肌肉途径免疫后各组的抗体滴度水平均比皮下免疫高至少 2 倍,说明肌肉免疫途径效果优于皮下免疫。

在小鼠体内,IgG₁ 是依赖 Th2 途径免疫应答的特征性标志,而 IgG_{2a} 是依赖 Th1 途径免疫应答的特征性标志^[22]。初免后 14 d 小鼠血清抗体亚类 IgG₁ 和 IgG_{2a} 的结果表明:WARCP 配伍低、中、高剂量的 IVV 后均能同时提高流感低、中剂量 IVV 的 IgG₁ 和 IgG_{2a} 的水平,说明 WARCP 作为 IVV 的佐剂能够同时促进 Th1 和 Th2 免疫反应,尤其可以提高 Th1 型的免疫反应。

淋巴细胞转化能力的高低可反映机体的免疫功能状态,常用淋巴细胞增殖指数反应机体细胞免疫能力^[19]。本研究结果表明 WARCP 能显著性地提高 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖和 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖,WARCP 与低剂量 IVV 配伍组的刺激指数和高剂量 IVV 单独免疫组无统计学差异,说明 WARCP 能够显著提高流感疫苗的细胞免疫水平。

在免疫应答识别和激活阶段,有多种细胞因子可刺激免疫活性细胞的增殖,IFN- γ 主要由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生,还可以激活 CTL^[18]。IL-4 主要产生于活化 T 细胞和肥大细胞中,它可以刺激 B 淋巴细胞的增殖。本试验通过流式细胞术检测

CD4⁺ IL-4、CD8⁺ IFN- γ 的表达水平,结果发现,WARCP 均能显著提高低、中剂量 IVV 的 IL-4 和 IFN- γ 表达水平,表明 WARCP 与 IVV 配伍后可以产生强烈的体液免疫和细胞免疫应答。

Foxp3 对 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的发展和功能是至关重要的,起到免疫抑制的调节作用^[23]。有研究发现川牛膝多糖作为佐剂通过抑制 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 的表达来增强体液和细胞免疫反应^[24]。本研究发现 WARCP 作为低、中剂量 IVV 的佐剂能显著降低 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞的表达。这些结果表明,WARCP 能够通过抑制 Treg 细胞的表达来增强免疫应答。

综上所述,新疆野生一枝蒿粗多糖通过肌肉途径免疫后可以增强特异性的体液免疫和细胞免疫反应,效果优于皮下免疫途径,尤其是激发了 Th1 型免疫反应并抑制了 Treg 细胞的表达,可以节约抗原用量 91%。因此,新疆野生一枝蒿粗多糖可以为流感病毒疫苗新型免疫佐剂的研制及用于解决流感大暴发时流感疫苗供应短缺问题提供重要的研究参考。

参考文献(References):

- [1] TETSUTANI K, ISHII K J. Adjuvants in influenza vaccines[J]. *Vaccine*, 2012, 30(52):7658-7661.
- [2] KHURANA S, VERMA N, YEWDELL J W, et al. MF59 adjuvant enhances diversity and affinity of antibody-mediated immune response to pandemic influenza vaccines[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(85):85-88.
- [3] WALKER W T, FAUST S N. Monovalent inactivated split-virion AS03-adjuvanted pandemic influenza A (H1N1) vaccine[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2010, 9(12):1385-1398.
- [4] LV X H, LIU W, LI Z L, et al. Research progress on Chinese traditional medicine as vaccine adjuvants[J]. *J Tradit Chin Med*, 2008, 6(2):64-67.
- [5] LI J Y, LI J Y, ZHANG F C. The immunoregulatory effects of Chinese herbal medicine on the maturation and function of dendritic cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 171(2):184-195.
- [6] 张宝柱. 补益类中药所含多糖成分的免疫调节作用研究进展[J]. 中国中医药资讯, 2011, 3(9):41-42.
ZHANG B Z. Research progress on immunomodulatory effects of Chinese Herbal Polysaccharides composition[J]. *Journal of China Traditional Chinese Medicine Information*, 2011, 3(9):41-42. (in Chinese)
- [7] CHEN H, JIAO H, CHENG Y, et al. *In vitro* and *in*

- vivo* immunomodulatory activity of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) polysaccharides[J]. *J Med Food*, 2016,19(3):253-265.
- [8] ZHU F J, LIU X SUN Z H, et al. Immune-enhancing effects of taishan pinus massoniana pollen polysaccharides on DNA vaccine expressing *Bordetella avium* ompA[J]. *Front Microbiol*, 2016, 66(7):1-8.
- [9] 董娜, 李倩, 张贵强, 等. 淫羊藿多糖对甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗的免疫佐剂作用[J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(1):63-68.
DONG N, LI Q, ZHANG G Q, et al. Adjuvant effect of Epimedium polysaccharide for H1N1 influenza viruses split vaccine [J]. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2013, 40(1):63-68. (in Chinese)
- [10] 谢国秀, 王芙艳, 杨忠东, 等. 茯苓多糖对流感灭活疫苗的免疫增强作用[J]. 生命科学研究, 2009, 13(3):246-250.
XIE G X, WANG F Y, YANG Z D, et al. Enhanced immune effects of pachyman on inactivated influenza virus vaccine[J]. *Life Science Research*, 2009, 13(3):246-250. (in Chinese)
- [11] YI Y, ZHANG M W, LIAO S T, et al. Structural features and immunomodulatory activities of polysaccharides of longan pulp[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(1):636-643.
- [12] GU D Y, ABDULLA R, AISA H A, et al. Characterization and identification of chemical compositions in the extract of *Artemisia rupestris* L. by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2012, 26(2):83-100.
- [13] 王丹阳, 杨雨, 张爱莲, 等. 新疆野生一枝蒿粗多糖作为流感病毒疫苗佐剂的免疫效果[J]. 中华微生物学与免疫学杂志, 2016, 36(6):230-234.
WANG D Y, YANG Y, ZHANG A L, et al. Efficacy of using Xinjiang wild *Artemisia rupestris* L. crude polysaccharides as a immunologic adjuvant for influenza virus vaccine[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2016, 36(6):230-234. (in Chinese)
- [14] 王如涛, 吴绵斌, 林建平, 等. 植物多糖分离提取技术的研究进展[J]. 中国生物工程志, 2013, 33(7):118-123.
WANG R T, WU M B, LIN J P, et al. Research progress on the extraction technology of plant polysaccharide[J]. *China Biotechnology*, 2013, 33(7):118-123. (in Chinese)
- [15] 刘玉佳, 孔繁东, 刘兆芳, 等. 桔梗多糖 Sevag 法除蛋白工艺的研究[J]. 中国调味品, 2014, 39(4):5-7.
LIU Y J, KONG F D, LIU Z F, et al. Research on technology of deproteinization from polysaccharide of platycodon grandiflorum by Sevag method[J]. *China Condiment*, 2014, 39(4):5-7. (in Chinese)
- [16] DUBOIS M, GILLES K, HAMILTON J K, et al. A colorimetric method for the determination of sugars [J]. *Nature*, 1951, 168(4265):167.
- [17] LAI C Y, HUNG J T, LIN H H, et al. Immunomodulatory and adjuvant activities of a polysaccharide extract of *Ganoderma lucidum* *in vivo* and *in vitro* [J]. *Vaccine*, 2010, 28(31):4945-4954.
- [18] JIANG M H, ZHU L, JIANG J G. Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine[J]. *Expert Opin Ther Tar*, 2010, 14(12):1367-1402.
- [19] 董耀泽, 李晓云, 张晋强, 等. 复方中药对猪嗜血支原体感染预防作用的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(2):404-410.
DONG Y Z, LI X Y, ZHANG J Q, et al. Prophylactic effect of compound Chinese herbal medicine on *Mycoplasma suis* infection[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(2):404-410. (in Chinese)
- [20] RUPP R, LUCKASEN G J, KIRSTEIN J L, et al. Safety and immunogenicity of different doses and schedules of a live attenuated tetravalent dengue vaccine (TDV) in healthy adults: A Phase 1b randomized study[J]. *Vaccine*, 2015, 33(46):6351-6359.
- [21] HONDA Y, SAADE F, PETROVSKY N. Advax™, a polysaccharide adjuvant derived from delta inulin, provides improved influenza vaccine protection through broad-based enhancement of adaptive immune responses[J]. *Vaccine*, 2012, 30(36):5373-5381.
- [22] HUBER V C, MCKEON R M, BRACKIN M N, et al. Distinct contributions of vaccine induced immunoglobulin G1(IgG₁) and IgG_{2a} antibodies to protective immunity against influenza[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13(9):981-990.
- [23] ZARAGOZA B, CHEN X, OPPENHEIM J J, et al. Suppressive activity of human regulatory T cells is maintained in the presence of TNF [J]. *Nat Med*, 2016, 22(1):16-17.
- [24] FENG H, FAN J, DU X, et al. Sulfated Radix Cyathulae officinalis polysaccharides act as adjuvant via promoting the dendritic cell maturation and suppressing Treg frequency[J]. *Immunol Invest*, 2015, 44(3):288-308.