

# 黄芪多糖对猪瘟活疫苗免疫应答的佐剂作用

杜立中<sup>1</sup>,马 霞<sup>2\*</sup>,刘永录<sup>2</sup>,张国祖<sup>2</sup>

(1. 河南省九安牧业有限公司,河南 郑州 451450; 2. 河南牧业经济学院 药物工程系,  
河南 郑州 450011)

**摘要:** 为研究黄芪多糖对猪瘟活疫苗的佐剂作用,分别用 0.5% 黄芪多糖、疫苗专用稀释液、生理盐水(对照)稀释猪瘟耐热保护剂活疫苗免疫猪,测定免疫后不同时间段内血清中 IgG 及其亚型 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 和细胞因子 IL-2、IL-6 的含量。结果显示,与对照组相比,黄芪多糖作为疫苗稀释液可以显著提高血清中 IgG 及其亚型和细胞因子 IL-2、IL-6 的含量。与疫苗专用稀释液组相比,在免疫后第 7、14、28 天,黄芪多糖组 IgG 含量均提高,分别提高 1.6% ( $P>0.05$ )、6.4% ( $P<0.05$ )、7.1% ( $P<0.05$ ), IL-2 含量分别提高 12.1% ( $P<0.05$ )、2.9% ( $P>0.05$ )、15.3% ( $P<0.05$ ), IL-6 含量差异均不显著。表明,黄芪多糖作为疫苗稀释液对猪瘟活疫苗具有良好的佐剂作用。

**关键词:** 黄芪多糖; 猪瘟; 佐剂; 体液免疫; 细胞免疫

**中图分类号:** S853.74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)09-0156-04

## Adjuvant Effects of *Astragalus* Polysaccharide on Immune Response of Activated Vaccine of Swine Fever

DU Li-zhong<sup>1</sup>, MA Xia<sup>2\*</sup>, LIU Yong-lu<sup>2</sup>, ZHANG Guo-zu<sup>2</sup>

(1. Henan Province Jiuan Husbandry Co., Ltd., Zhengzhou 451450, China; 2. Medicinal Engineering Department, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450011, China)

**Abstract:** The present study aimed to investigate the effects of *Astragalus* polysaccharide (APS) on immune response of activated vaccine of swine fever, separately using 0.5% of the APS and swine fever vaccine special diluent dilution for activated vaccine of swine fever. After vaccination, content of specific IgG, subclasses IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 and IL-2, IL-6 in serum were measured in different time period. The results showed that compared with special diluent vaccine group, APS as a vaccine diluent could significantly improve IgG and its subtype, IL-2 and IL-6 content in serum. On days of 7, 14, 28 after immunization, IgG levels of APS group were improved, respectively increased by 1.6% ( $P>0.05$ ), 6.4% ( $P<0.05$ ), 7.1% ( $P<0.05$ ), IL-2 content increased by 12.1% ( $P<0.05$ ), 2.9% ( $P>0.05$ ), 15.3% ( $P<0.05$ ), but no significant difference was observed in the content of IL-6. It could be inferred that APS had good adjuvant effect on vaccine inoculation of swine fever used as immune diluent.

**Key words:** *Astragalus* polysaccharide; swine fever; adjuvant; humoral immunity; cellular immunity

疫苗稀释剂指用于对疫苗进行稀释并用于免疫的试剂,其在对疫苗进行稀释的同时,还应对疫苗有

保护作用并能提高疫苗免疫效果<sup>[1]</sup>。中草药是我国的宝贵遗产,具有不良反应和毒副作用小、多效性、

收稿日期:2014-04-06

基金项目:河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A230012)

作者简介:杜立中(1964-),男,河南固始人,高级兽医师,硕士,主要从事兽医临床工作。E-mail:295382590@qq.com

\*通讯作者:马 霞(1978-),女,山东泰安人,讲师,博士,主要从事中兽药药理学研究。E-mail:maxia801010@126.com

双向调节性特点,已成为免疫佐剂研究的一个热点<sup>[2-4]</sup>。黄芪多糖(Astragalus polysaccharide, APS)是黄芪的主要活性成分之一,为葡萄糖和阿拉伯糖的多聚糖,毒性很低,具有提高白细胞和淋巴细胞数量、淋巴细胞转化率、巨噬细胞活性和诱导干扰素产生等作用<sup>[5-6]</sup>。

APS可从多个层面发挥免疫增强作用,既可直接影响细胞内物质的代谢,又可诱导机体细胞产生有关的体液因子,从而进一步影响其他细胞的活性;既可增强机体的特异性免疫,又可增强机体的非特异性免疫;既可增强正常机体的免疫功能,又可调节机体异常的免疫功能。笔者所在课题组前期研究发现,APS具有较好的疫苗佐剂作用<sup>[7]</sup>,但其作用机制尚不明确。为此,本研究采用ELISA试剂盒监测免疫后各阶段IgG及其亚型和细胞因子IL-2、IL-6的含量变化,进一步探讨APS作为疫苗稀释剂对猪瘟活疫苗免疫应答作用的影响,旨在为阐明APS作为疫苗佐剂的作用机制提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和仪器

猪瘟耐热保护剂活疫苗(兔源)、猪瘟疫苗稀释液均为山东绿都生物科技有限公司产品。APS纯度为92.5%,由河南牧业经济学院药物工程系中兽医教研室制备;猪瘟抗体检测试剂盒购自上海朗顿生物科技有限公司;IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IL-2、IL-6试剂盒购自美国R&D Systems公司。

### 1.2 试验动物分组与处理

26日龄断奶仔猪,体质量(8±0.5)kg,由郑州某猪场提供,临床检查健康,试验前未接种过猪瘟疫苗,所有猪只饲养于温度24~28℃的动物房内,定时用乳猪料喂养,自由饮水。免疫前选择经ELISA法检测猪瘟抗体为阴性的猪只30只,随机均分为3组,1组为0.5%的APS稀释液组,2组为猪瘟疫苗专用稀释液组,3组为生理盐水对照组。免疫后的第7(D<sub>7</sub>)、14(D<sub>14</sub>)、28(D<sub>28</sub>)天随机取6只前腔静脉采血,分离血清,-20℃保存备用。

### 1.3 测定项目及方法

ELISA试剂盒测定血清中IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IL-2、IL-6的含量,试剂盒操作步骤如下。标准品的稀释:将标准品按倍比稀释法依次稀释5个浓度;加样:分别设空白孔、标准孔、待测样品孔,除空白孔外,余孔分别加标准溶液或待测样品100 μL,37℃反应120 min,弃去液体,甩干;每孔加A工作液100 μL,37℃反应60 min,洗板3次,每

孔350 μL;每孔加B工作液100 μL,37℃反应60 min,洗板5次,每孔350 μL;依序每孔加底物溶液90 μL,37℃避光显色30 min(此时肉眼可见标准品的前1—3孔有明显的梯度蓝色,后4—5孔梯度不明显);依序每孔加终止溶液50 μL,终止反应。以空白孔调零,用酶联仪在450 nm波长依序测量各孔的光密度(OD<sub>450</sub>值);以所测不同浓度标准品OD<sub>450</sub>值为横坐标、标准品浓度为纵坐标绘制标准曲线及回归方程,将样品所测OD<sub>450</sub>值代入回归方程计算含量。

### 1.4 数据分析

数据以平均值±标准值表示,用SPSS软件进行Duncan's多重分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 血清IgG的含量变化

IgG的标准曲线回归方程为 $y = 508.41x + 1.7176$ ( $R^2 = 0.9991$ )。

由表1可以看出,在免疫后第7天,APS组的血清IgG含量比疫苗专用稀释液组高1.6%,但二者差异不显著,在第14、28天,APS组的血清IgG含量分别比疫苗专用稀释液组显著提高6.4%、7.1%。免疫后,APS组的血清IgG含量显著高于疫苗专用稀释液组和对照组。

表1 血清IgG含量变化 μg/mL

时间	APS组	专用稀释液组	对照组
D <sub>7</sub>	769.6±30.3a	757.6±42.5a	714.5±43.1b
D <sub>14</sub>	834.8±36.5a	784.6±44.5b	719.5±31.6c
D <sub>28</sub>	722.6±37.5a	674.6±37.4c	685.4±42.6b

注:同行数据中不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),下同。

### 2.2 血清IgG1含量变化

IgG1的标准曲线回归方程为 $y = 200.84x - 23.462$ ( $R^2 = 0.9977$ )。

由表2可以看出,与对照组相比,免疫后APS组、疫苗专用稀释液组的血清IgG1含量均显著升高,免疫后第7天分别升高43.8%、29.2%,免疫后第14天分别升高55.6%、44.4%;与疫苗专用稀释液组相比,APS组在免疫后第7、14天的IgG1含量分别显著升高11.3%、7.8%。第28天,APS组低于疫苗稀释液组,但比对照组高34.3%。

表2 血清IgG1含量变化 μg/mL

时间	APS组	专用稀释液组	对照组
D <sub>7</sub>	446.8±47.3a	401.5±50.1b	310.8±46.5c
D <sub>14</sub>	523.6±52.5a	485.9±53.7b	336.5±45.3c
D <sub>28</sub>	495.2±60.1b	543.9±63.4a	368.6±53.6c

### 2.3 血清 IgG2 的含量变化

IgG2 的标准曲线回归方程为  $y = 272.73x - 28.806$ , ( $R^2 = 0.9990$ )。

由表 3 可以看出,与对照组相比,免疫后 APS 组、疫苗专用稀释液组的血清 IgG1 含量均显著升高;且与疫苗专用稀释液组相比,APS 组在免疫后第 7、14、28 天血清 IgG2 的含量分别显著升高 14.6%、10.8%、13.7%。

表 3 血清 IgG2 含量变化  $\mu\text{g/mL}$

时间	APS 组	专用稀释液组	对照组
D <sub>7</sub>	253.7±50.5a	221.4±41.6b	175.0±38.5c
D <sub>14</sub>	315.8±56.4a	285.0±50.6b	231.1±40.3c
D <sub>28</sub>	336.9±60.7a	296.3±57.4b	257.5±43.5c

### 2.4 血清 IgG3 的含量变化

IgG3 的标准曲线回归方程为  $y = 19.112x - 0.7069$  ( $R^2 = 0.9991$ )。

由表 4 可以看出,与对照组相比,免疫后 APS 组、疫苗专用稀释液组的血清 IgG1 含量均显著升高;且与疫苗专用稀释液组相比,APS 组在免疫后第 7、14、28 天血清 IgG3 的含量分别比专用稀释液组显著升高 44.2%、20.4%、17.4%。

表 4 血清 IgG3 含量变化  $\mu\text{g/mL}$

时间	APS 组	专用稀释液组	对照组
D <sub>7</sub>	13.7±3.5a	9.5±2.7b	8.0±1.5c
D <sub>14</sub>	16.5±2.7a	13.7±1.5b	9.1±1.4c
D <sub>28</sub>	19.6±3.6a	16.7±1.8b	10.6±2.7c

### 2.5 血清 IgG4 的含量变化

IgG4 的标准曲线回归方程为  $y = 39.051x - 2.602$  ( $R^2 = 0.9992$ )。

由表 5 可以看出,与对照组相比,免疫后 APS 组、疫苗专用稀释液组的血清 IgG4 含量均显著升高;且与疫苗专用稀释液组相比,APS 组在免疫后第 7、14、28 天血清 IgG4 的含量分别比专用稀释液组显著升高 23.4%、15.9%、19.0%。

表 5 血清 IgG4 含量变化  $\mu\text{g/mL}$

时间	APS 组	专用稀释液组	对照组
D <sub>7</sub>	21.6±3.6a	17.5±2.9b	13.0±1.7c
D <sub>14</sub>	27.7±3.4a	23.9±4.3b	18.1±2.2c
D <sub>28</sub>	34.4±5.7a	28.9±3.8b	20.8±2.4c

### 2.6 血清 IL-2 和 IL-6 的含量变化

IL-2 的标准曲线回归方程为  $y = 174.64x - 3.5099$  ( $R^2 = 0.9936$ );IL-6 的标准曲线回归方程为  $y = 81.019x - 2.6631$  ( $R^2 = 0.9981$ )。

由表 6 可以看出,与对照组相比,免疫后 APS

组、疫苗专用稀释液组的血清 IL-2、IL-6 含量均显著升高。与疫苗专用稀释液组相比,APS 组在免疫后第 7、28 天,血清 IL-2 含量分别显著高于猪瘟疫苗专用稀释液组 12.1%、15.3%,在免疫后第 14 天升高 2.9%,差异不显著。APS 组、疫苗专用稀释液组血清 IL-6 的含量差异不显著。

表 6 血清 IL-2 和 IL-6 含量变化  $\mu\text{g/mL}$

项目	时间	APS 组	专用稀释液组	对照组
IL-2	D <sub>7</sub>	151.4±16.6a	135.1±15.2b	112.4±14.3c
	D <sub>14</sub>	158.0±16.8a	153.5±15.4a	115.6±15.4b
	D <sub>28</sub>	144.3±14.5a	125.1±13.4b	104.2±13.6c
IL-6	D <sub>7</sub>	125.5±16.5a	130.4±14.3a	98.6±12.4b
	D <sub>14</sub>	132.5±15.1a	127.4±13.5a	93.2±13.5b
	D <sub>28</sub>	117.3±12.3a	121.4±13.5a	101.0±14.5b

## 3 讨论

### 3.1 APS 用作猪瘟疫活疫苗稀释剂对疫苗佐剂活性的影响

目前市场上的疫苗稀释液产品较多,但大多数产品的主要成分仅为缓冲剂和染色指示剂,不能很好地保护疫苗中的抗原活性,使畜禽在免疫接种过程中抗原活性损失过快,甚至导致免疫失败。中药多糖作为疫苗佐剂使用一般有 2 种方法,一是与疫苗分开使用,在疫苗免疫前后或同时给动物口服或注射,另一种是与疫苗混合在一起使用,多与灭活苗混合使用<sup>[8]</sup>。

本试验结果显示,APS 疫苗稀释液可以提高猪瘟疫活疫苗免疫后的体液免疫和细胞免疫指标水平,为猪瘟疫活疫苗乃至其他活疫苗的免疫效果改进提供了理论依据和方法。本试验中,APS 在疫苗稀释液中的浓度为 0.5%,具有较好的佐剂作用,但不同活疫苗适宜使用浓度以及具体的 APS 浓度与疫苗佐剂活性间关系还需进一步的研究。

### 3.2 APS 用作猪瘟疫活疫苗稀释剂对体液免疫应答的影响

抗感染免疫是动物机体抵抗病原体感染的能力,特异性免疫(疫苗接种)在消除病原体作用中占重要地位。特异性免疫包括体液免疫和细胞免疫,其中体液免疫的抗感染作用是通过抗体来实现的,抗体在体内可发挥中和作用、对病原微生物生长的抑制作用、抑制病原体粘附细胞的作用、免疫溶解作用、免疫调理作用、抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用<sup>[9]</sup>。抗体效价的高低直接反映机体的体液免疫状态,血清中高水平 IgG 分型的产生更有益于机体抵御病原体的入侵。

本试验结果显示,APS可以使猪瘟疫苗取得很好的体液免疫,特别是在免疫早期,APS组免疫猪产生IgG及其亚型IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等抗体的效果优于疫苗专用稀释液,在免疫后第7天可使IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4的含量分别比疫苗专用稀释液组高1.6%、43.8%、14.6%、44.2%、23.4%,这与施志玉等<sup>[10]</sup>、Sun等<sup>[11]</sup>、Song等<sup>[12]</sup>的研究结果相似,表明APS在抗体产生早期的效果优于疫苗稀释液。

### 3.3 APS用作猪瘟活疫苗稀释剂对细胞免疫应答的影响

细胞因子水平是反映细胞免疫状态的主要指标之一,主要分为Th1型和Th2型,其中Th1型参与细胞免疫和迟发型超敏性炎症反应,产生IL-2、IL-12等,促进小鼠B细胞产生IgG2a、IgG2b和IgG3抗体;Th2可辅助B细胞分化为抗体分泌细胞,参与体液免疫应答,产生IgG1、分泌性IgA及细胞因子IL-4、IL-6等,Th1和Th2反应相互拮抗<sup>[13]</sup>。T细胞的免疫功能与机体的抗病毒功能有很大关系,当T细胞功能下降时,不但使白介素、干扰素和肿瘤坏死因子等各种细胞因子生成减少,而且影响T辅助性淋巴细胞对B细胞抗体生成的辅助作用<sup>[13]</sup>。许多中药多糖如当归多糖和淫羊藿多糖,可以促进T淋巴细胞分泌IL-2和IFN- $\gamma$ ,从而增强机体的细胞免疫<sup>[14-15]</sup>。

本试验中,APS组血清IL-2含量水平显著高于专业疫苗稀释液组,最高时比疫苗稀释液组高15.3%,血清IL-6含量水平与专业疫苗稀释液组间大多差异不显著,但显著高于对照组,表明,APS对疫苗产生Th1反应的效果优于专用疫苗稀释液,APS能够有效地提高免疫猪瘟活疫苗后的细胞免疫水平,但其具体的作用机制还有待于进一步研究。

综合APS作为猪瘟活疫苗的疫苗稀释液使用试验结果可知,APS可以有效地提高猪瘟活疫苗的体液免疫和细胞免疫应答,起到良好的疫苗佐剂作用。因此,APS可用于疫苗稀释液,在畜禽活疫苗中作为疫苗佐剂来开发使用。

#### 参考文献:

[1] 薛俊龙,张李俊,王采先,等.鸡大肠杆菌多价复合佐剂灭活疫苗的研制[J].山西农业科学,2009,37(11):50-53,57.

[2] 邹曜宇,王月.黄芪多糖在家禽养殖业中的应用[J].现代农业科技,2010(12):280,283.

[3] 张红英,王学兵,崔保安,等.山药多糖对PRRSV灭活疫苗免疫猪抗体和T细胞亚群的影响[J].华北农学报,2010,25(2):236-238.

[4] 龚晓明,吴耀妹.免疫佐剂研究的现状与趋势[J].中国兽医杂志,1996,30(1):41-43.

[5] Qiu Y, Hu Y L, Cui B A, *et al.* Immunopotentiating effects of four Chinese herbal polysaccharides administered vaccination in chickens[J]. Poultry Sci, 2007, 86(12):2530-2535.

[6] 王德云,胡元亮,孔祥峰,等.中药成分对培养的鸡脾脏淋巴细胞增殖的影响[J].畜牧兽医学报,2005,6(11):1210-1214.

[7] 马霞,李利红,刘永录,等.黄芪多糖对猪瘟活疫苗免疫效果的影响[J].郑州牧业工程高等专科学校学报,2013,12(3):12-13,16.

[8] 王凯,卢曦,刘艳芬,等.杜仲多糖对三黄鸡免疫应答的佐剂作用[J].河南农业科学,2014,43(1):23-126.

[9] 陆承平.兽医微生物学[M].3版.北京:中国农业出版社,2001:130-139.

[10] 施志玉,黄小燕,李大鹏,等.硫酸化黄芪多糖对IBD疫苗接种雏鸡免疫水平的影响[J].畜牧与兽医,2009,41(2):6-8.

[11] Sun J H, Hu S H, Song X M. Adjuvant effects of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins from ginseng roots on the immune responses to ovalbumin in mice[J]. Vaccine, 2007, 25:1114-1120.

[12] Song X M, Bao S J, Wu L H, *et al.* Ginseng stem-leaf saponins(GSLs) and mineral oil act synergistically to enhance the immune responses to vaccination against foot-and-mouth disease in mice[J]. Vaccine, 2009, 27:51-55.

[13] Yuan L, Wu L, Chen J, *et al.* Paclitaxel acts as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice[J]. Vaccine, 2010, 28:4402-4410.

[14] 王德云,胡元亮,张宝康,等.几种中药成分与IL-2免疫协同作用的比较[J].南京农业大学学报,2005,28(3):140-142.

[15] Wang D Y, Li X R, Xu L X, *et al.* Immunologic synergism with IL-2 and effects of cCHMIs on mRNA expression of IL-2 and IFN- $\gamma$  in chicken peripheral T lymphocyte[J]. Vaccine, 2006, 24:7109-7114.