

中国图书分类号 R392 R979.5 文献标识码 A 文章编号 1004-5503(2008)03-0197-04

【基础研究】

## 三七皂苷 R1 对铝佐剂甲型肝炎疫苗的免疫增强作用

陶里 段金梅 舒晓明 胡凝珠 兰芸 陈阳 白巍

**【摘要】** 目的 探索三七皂苷 R1 对 Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂甲型肝炎疫苗的免疫增强作用及降低铝佐剂用量的可行性。方法在甲型肝炎病毒(HAV)抗原中,加入不同剂量的铝佐剂与三七皂苷 R1 构成复合佐剂,经肌肉注射免疫小鼠,每隔 4 周检测小鼠血清 HAV-IgG 水平,并与无佐剂组和单独铝佐剂组进行比较。结果 各免疫组抗体水平在 12 周时达到最高,之后逐渐下降。在抗原中加入复合佐剂后,与无佐剂组相比,IgG 水平显著升高;与单独铝佐剂组相比,加入一定剂量的三七皂苷 R1 能够显著增强铝佐剂的作用,且抗体水平维持时间较长。结论 适当剂量的铝佐剂与三七皂苷 R1 混合作为佐剂,具有增强铝佐剂的作用,并能降低铝佐剂的用量。

**【关键词】** 三七皂苷 R1; 氢氧化铝; 佐剂; 甲型肝炎疫苗

## Sanchinoside R1 as An Immunopotentiator of Hepatitis A Vaccine Containing Aluminium Adjuvant

TAO Li, DUAN Jin-mei, SHU Xiao-ming, et al ( *Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China* )

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of sanchinoside R1 as an immunopotentiator of hepatitis A (HA) vaccine containing aluminium adjuvant as well as the feasibility of decreasing the aluminium content in vaccine. **Methods** Add the compound adjuvant consisting of aluminium hydroxide and sanchinoside R1, at various dosages, to hepatitis A virus (HAV) antigen respectively. Inject i. m. mice with the prepared HA vaccines, determine the serum HAV-IgG every 4 weeks and compare with those of mice immunized by adjuvant-free vaccine and by the vaccine containing aluminium adjuvant. **Results** The HAV-IgG titers of mice in various test groups reached the peak values 12 weeks after immunization then decreased gradually. The IgG titer induced by vaccine containing compound adjuvant was significantly higher than that by adjuvant-free vaccine. The addition of sanchinoside R1 at a certain dosage enhanced the effect of adjuvant and prolonged the maintain time of antibody level. **Conclusion** The compound adjuvant consisting of aluminium hydroxide and sanchinoside R1 enhanced the immune effect of HA vaccine and decreased the dosage of aluminium adjuvant used.

**【Key words】** Sanchinoside R1; Aluminium hydroxide; Adjuvant; hepatitis A vaccine

三七为五加科(Araliaceae)人参属植物的干燥根,是我国特产的传统珍贵药材,主要产于云南、广西等省区。三七主要含有皂苷、多糖、氨基酸等化学成分,《本草纲目》将三七的功效概括为“降血压、散血、止痛”<sup>[1]</sup>。

三七总皂苷是三七活血化淤功效的物质基础,含有多人参皂苷及三七皂苷,其中三七皂苷 R1 (Sanchinoside R1, SR1) 是最具代表性的特征化合物。通过对其结构式的分析,发现它与人参皂苷(Ginsenoside)的结构相似,都属达马烷型四环三萜皂苷。

研究表明,人参皂苷与铝佐剂合用,能够显著增强机体对抗原的免疫应答,并能使机体 Th1 和 Th2 免疫应答达到平衡<sup>[2]</sup>。多种传统补益类中药的有效

成分能够增加腹腔巨噬细胞(Macrophage, M $\phi$ )、自然杀伤(Natural killer, NK)细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)和淋巴因子激活的杀伤(Lymphokines activated killer, LAK)细胞的数量,促进白介素-12(Interleukin-12, IL-12)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、干扰素(Interferon, IFN)等细胞因子的分泌,加强细胞因子的作用,并能激活 T 细胞、B 细胞,活化补体,促进提高机体的免疫功能,产生免疫调节作用<sup>[3]</sup>。

药理实验发现,三七总皂苷具有增强免疫力的作用,能明显刺激小鼠的脾淋巴细胞增殖、转化、促进小鼠迟发型变态反应,提高小鼠的抗体生成细胞数及血清溶血素水平,促进小鼠的单核-巨噬细胞碳廓清作用,增强小鼠的单核-腹腔巨噬细胞吞噬作用,提高小鼠的 NK 细胞活性<sup>[4]</sup>。三七水煎剂或三

七多糖对小鼠体内抗原结合细胞的生成具有明显的促进作用<sup>[5]</sup>。此外, Sun 等<sup>[6]</sup>发现, 三七根中提取的人参皂苷 Rh4 及三七皂苷 K3 能够作为佐剂, 增强小鼠对卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)所产生的体液免疫效应。

根据以上分析, 本实验采用灭活甲型肝炎病毒(Hepatitis A virus, HAV)作为抗原, 以三七特有的皂苷 R1 及 Al(OH)<sub>3</sub> 的混合物作为佐剂, 对 SR1 的免疫增强效果进行研究。现将结果报道如下。

## 1. 材料与方法

### 1.1 实验动物

ICR 健康小鼠, SPF 级, 雌性, 6~8 周龄, 18~20 g, 由本所灵长类实验动物中心提供, 并按实验动物中心的方法饲养。

### 1.2 主要试剂

HAV 抗原(滴度 1 280 EIU/ml)和 Al(OH)<sub>3</sub> 均由本室制备并保存; 三七皂苷 R1 购自昆明同持医药研究有限公司; ELISA 检测试剂盒购自 KPL 公司。

### 1.3 不同剂量三七皂苷 R1 对铝佐剂甲肝疫苗的免疫增强作用

1.3.1 动物分组及免疫: 将 ICR 雌性小鼠随机分成 6 组, 其中 2 组分别为无佐剂的单独抗原组(HAV)和铝佐剂疫苗对照组(含 HAV 抗原 200 μg 和 1 mg 铝佐剂), 其余 4 组在铝佐剂对照组基础上, 分别加入三七皂苷 R1 200 μg(SR1-1)、600 μg(SR1-2)、1 mg(SR1-3)和 2 mg(SR1-4)。每组 6 只, 每只肌肉注射 1 次。

1.3.2 血清抗体检测: 分别于免疫后 4、8、12、16、20、24、28、32 和 36 周, 尾静脉采血 0.1 ml, 分离血清, 用 ELISA 试剂盒检测抗-HAV 的特异性 IgG 水平。

### 1.4 三七皂苷 R1 对不同剂量铝佐剂甲肝疫苗的免疫增强作用

1.4.1 动物分组及免疫: 将 ICR 雌性小鼠随机分成 4 组, HAV 抗原 200 μg + 1 mg 铝佐剂为对照组(HAV+0), 其余 3 组为 HAV 抗原 200 μg 和三七皂苷 R1 1 mg, 再分别加入铝佐剂 0.25 mg(A1-1)、0.5 mg(A1-2)和 1 mg(A1-3)。每组 6 只, 每只肌肉注射 1 次。

1.4.2 血清抗体检测: 按 1.3.2 项方法进行。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件对数据结果进行析因设计的方差分析。

## 2. 结果

### 2.1 不同剂量三七皂苷 R1 对铝佐剂甲肝疫苗的免疫增强作用

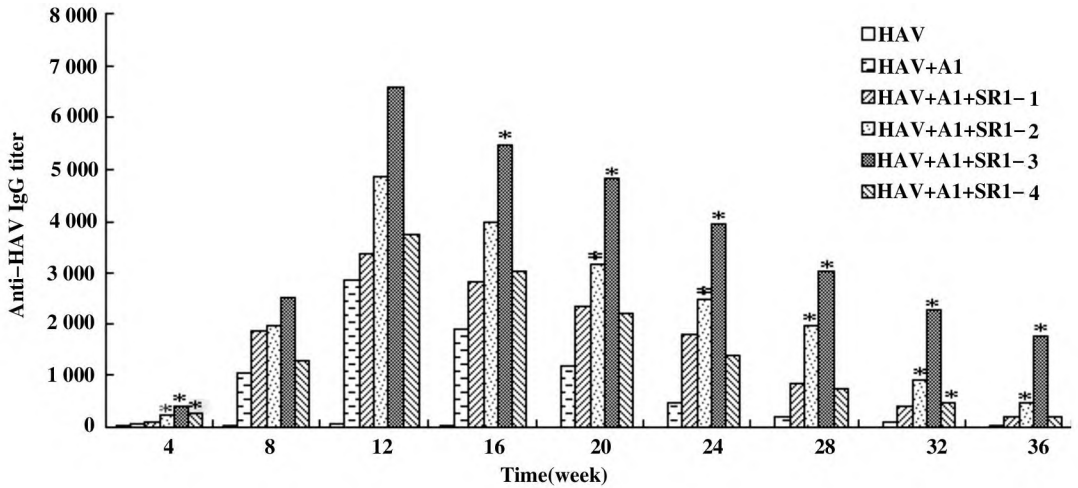
实验结果显示, 各实验组小鼠在 4 周内均产生抗-HAV IgG, 于第 12 周普遍达到抗体滴度的峰值, 此后逐渐下降。所有混合佐剂甲肝疫苗免疫组的抗体水平均高于无佐剂疫苗对照组和单纯铝佐剂疫苗对照组, 不同剂量的三七皂苷 R1 免疫组在同一时间产生的抗体水平不同, SR1-3 组的抗体水平(1: x)始终高于其他组, 在 4 到 36 周内分别达到 407 ± 1.77、2537 ± 2.39、6592 ± 2.55、5475 ± 2.22、4825 ± 2.76、3938 ± 2.33、3041 ± 2.31、2276 ± 1.97、1744 ± 2.56, 提示三七皂苷 R1 对铝佐剂疫苗的免疫增强作用在一定范围内可能与免疫剂量呈正相关。

各混合佐剂疫苗免疫组与 HAV 抗原单独免疫组的免疫效果相比较, 36 周内, 所有三七皂苷 R1 免疫组的抗体水平均高于 HAV 抗原单独免疫组( $t = 2.703 \sim 28.410, P < 0.05$ ), 同时抗体滴度维持时间较长。而所有混合佐剂疫苗免疫组与单纯铝佐剂疫苗免疫组的免疫效果相比较, 各混合佐剂组不同时期的抗体滴度水平均在单纯铝佐剂之上。

SR1-3 组除第 8 周和第 12 周外, 其他各时期的抗体水平与单纯铝佐剂对照组相比, 差异均具有显著意义( $t = 2.501 \sim 6.287, P < 0.05$ ), SR1-2 组在第 20 周后与单纯铝佐剂对照组相比, 差异具有显著意义( $t = 2.240 \sim 4.592, P < 0.05$ )。其他两个混合佐剂疫苗组在 28 周前的抗体水平虽高于单纯铝佐剂疫苗对照组, 但差异无显著意义( $t = 0.217 \sim 1.828, P > 0.05$ ), 然而至第 32 周, 这 2 组的抗体水平与单纯铝佐剂疫苗对照组相比, 差异均具有显著意义( $t = 2.303 \sim 2.524, P < 0.05$ )。见图 1。这表明三七皂苷 R1 可有效增强 Al(OH)<sub>3</sub> 的免疫佐剂效应, 混合佐剂可以显著提高抗 HAV-IgG 的水平, 并有助于抗体维持时间的延长。基于以上实验结果, 我们筛选出 1 mg 三七皂苷 R1 作为 HAV 免疫增强剂的最佳剂量。

### 2.2 三七皂苷 R1 对不同剂量铝佐剂甲肝疫苗的免疫增强作用

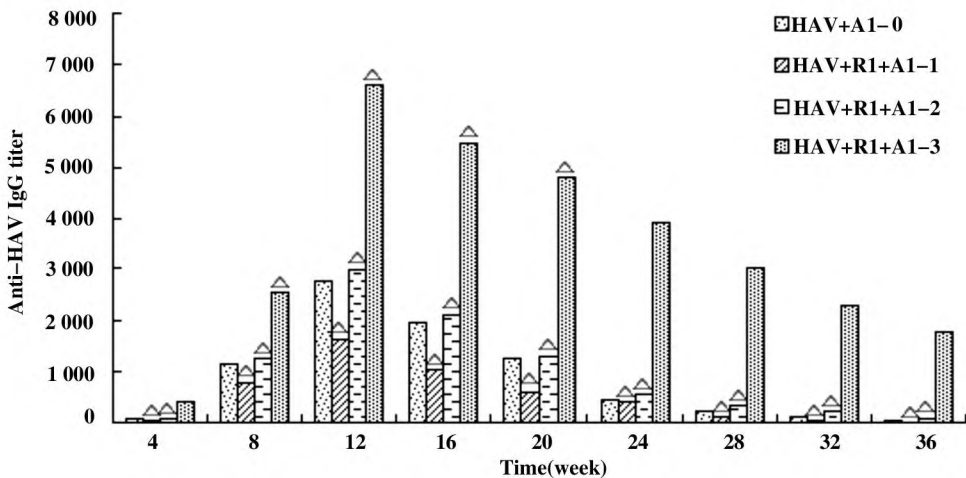
实验结果显示, A1-1 和 A1-2 组抗体水平与对照组比较, 差异无显著意义( $t = 0.006 \sim 1.801, P > 0.05$ ), 而 A1-3 组与对照组相比, 差异有显著意义( $t = 3.013 \sim 8.722, P < 0.05$ ), 见图 2。说明三七皂苷 R1 对铝佐剂疫苗具有免疫增强作用, 与铝佐剂合用可降低铝佐剂用量。



\*  $P < 0.05$ .

图 1 不同剂量三七皂苷 R1 对小鼠血清 HAV-IgG 水平的影响

Fig 1. Effects of different dosages of SR1 on serum IgG level of mice



$\Delta P > 0.05$ .

图 2 三七皂苷 R1 与不同剂量铝佐剂合用对小鼠血清 HAV-IgG 水平的影响

Fig 2. Effects of different dosages of compound adjuvant consisting of aluminium hydroxide and sanchinoside R1 on serum IgG level of mice

### 3. 讨论

目前绝大多数疫苗仍以铝盐为佐剂, 但铝佐剂存在着以下缺点: ① 注射部位偶有局部反应而出现红斑、皮炎、皮下结节、接触性过敏和肉芽肿性炎症; ④ 吸引嗜酸性细胞到注射部位, 增加特异性抗原的水平 and 总 IgE 抗体, 诱导 IgE 介导的变态反应, 从而有可能增加易感个体的敏感性; ④ 诱导细胞免疫的能力较弱, 常常增加同源细胞互向性抗体水平, 不适用于针对病毒、胞内菌和胞内寄生虫的疫苗抗原; ④ 有可能诱导产生神经系统疾病<sup>[7]</sup>。通过开发新型

佐剂或减少铝佐剂剂量, 可以达到解决以上问题的目的。皂苷类成分可用作免疫佐剂已在国内外得到证实。从南美皂树素中提取出来的皂角素曾被用作疫苗佐剂, 其有效部位 QuiA 在较低剂量时对机体免疫系统有较强的刺激作用, 能诱发 CTL 活性, 较大剂量时可形成网状结构, 作为抗原载体, 可延长抗原作用时间, 但其表现出的高溶血性限制了其在佐剂中的应用<sup>[8]</sup>。Rivera 等<sup>[9]</sup> 对于人参皂苷的佐剂作用进行的研究显示, 人参皂苷对动物模型表现出良好的安全性。

鉴于以上研究, 本文选择传统补益类中药三七, 证明了其中三七皂苷 R1 的佐剂作用。三七皂苷 R1 与铝佐剂联用作为 HAV 抗原的佐剂, 能够产生较高的抗体水平。不同剂量的 SR1 均能对铝佐剂产生协同作用, 而且在一定剂量范围内, 随着用量增加, 针对 HAV 抗原的特异性抗体水平相对单纯铝佐剂组的增幅也逐渐加大, 且抗体能在一个较高的水平上维持较长时间, 但超出这一剂量范围后, 抗体水平有所下降。这说明三七皂苷 R1 的剂量也是影响免疫增强效应的一个主要因素。另外, 铝佐剂的使用剂量也能够对免疫效果产生显著的影响。综合两组实验数据, HAV 抗原 200 µg、1 mg 铝佐剂与 1 mg 三七皂苷 R1 合用, 能够产生最佳免疫效果。另外, 降低铝佐剂剂量到 0.5 mg, 与 1 mg 三七皂苷 R1 合用, 依然能够达到 1 mg 单纯铝佐剂组的免疫效果, 提示使用一定剂量的三七皂苷 R1 与较低铝佐剂剂量联用, 可以达到与高剂量铝佐剂组相当的免疫效果。这就为降低铝佐剂剂量, 从而避免铝佐剂造成的不良反应提供了可行性依据。目前尚未研究清楚三七皂苷 R1 的这一免疫增强效果的作用机制, 我们认为, 有可能是因为相对于 HAV 抗原-铝佐剂混合物来说, HAV 抗原-铝佐剂-SR1 聚合物的体积更大, 在注射部位更容易募集抗原提呈细胞, 从而提高机体免疫应答, 延长抗原作用时间。此外, 基于混合佐剂免疫组表现出的较长时间高抗体滴度水平, 三七皂苷 R1 有可能像与之结构相似的人参皂苷一样, 能够刺激细胞免疫, 诱发 CTL 活性, 达到更好的免疫

效果。

综上所述, 三七皂苷 R1 具有较大的作为疫苗佐剂的潜力, 与铝佐剂合用, 能够明显降低铝佐剂用量, 在一定程度上克服了铝佐剂的弊端, 并显著地增强了 HAV 抗原的免疫原性。

#### 参考文献

- [1] 徐冬英. 三七名称及其有文字记载时间的考证. 广西中医学院学报, 2000, 17(3): 91~92.
- [2] Rivera E, Ekholm-Petersson F, Inganas M, et al. The Rb1 fraction of ginseng elicits a balanced Th1 and Th2 immune response. Vaccine, 2005, 23(46-47): 5411-5419.
- [3] 祝峥, 胡云章, 钱子刚. 补益类中药有效成分作为新型人用疫苗佐剂的应用前景. 生物技术通讯, 2004, 15(1): 92~94.
- [4] 赵鹏, 李彬, 何为涛, 等. 三七皂苷对小鼠免疫功能影响的实验研究. 中国热带医学, 2004, 4(4): 522~524.
- [5] 邓小红. 中药免疫增强剂研究进展. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2006, 23(6): 556~559.
- [6] Sun HX, Ye YP, Pan YJ. Immunological adjuvant saponins from the roots of *Panax notoginseng*. Chem Biodivers, 2005, 2(4): 510-515.
- [7] Duclos P. Safety of immunisation and adverse events following vaccination against hepatitis B. Expert Opin Drug Saf, 2003, 2(3): 225-231.
- [8] Dalsgaard K. A study on the isolation and characterization of the saponin Quil A. Evaluation of its adjuvant activity with special reference to the application in foot-and-mouth disease. Acta Vet Scand, 1978, 69(Suppl): 1-40.
- [9] Rivera E, Hu S, Concha C. Ginseng and aluminium hydroxide act synergistically as vaccine adjuvants. Vaccine, 2003, 21(11-12): 1149-1157.

(收稿日期: 2007-08-31)

#### 【消息】

### 欢迎订阅《中国生物制品学杂志》

《中国生物制品学杂志》为报道我国生物制品研究开发重大成果和国内外最新进展的国内唯一的生物制品专业学术期刊。

本刊已被美国化学文摘(CA)、荷兰医学文摘(EM)、波兰《哥白尼索引》(IC)、美国剑桥科学文摘(CSA)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、《中国科学引文数据库》(CSCD)、《中国学术期刊文摘》等国内外重要检索系统收录。本刊主要介绍国内外生物制品和生物技术最新科研成果、学术动态、实践经验及实验技术等。欢迎订阅。

本杂志为月刊, 每月 20 日出版, 每期单价 10 元, 全年 120 元。

邮发代号为: 国内 12-128, 国外 BM5490。由邮局及自办结合发行。

银行汇款: 中国生物制品学杂志社

开户行: 长春市工商行和平大路分理处

帐号: 4200220909000025622

邮局汇款: 《中国生物制品学杂志》编辑部

通信地址: 长春市西安大路 137 号

邮政编码: 130062

电话(传真): 0431-87923344, 0431-87910140

网址: www.zgswj.com.cn

E-mail: zgsv1988@163.com