

汪 伟,何孔旺,温立斌,等. 人参皂苷 Rb1 对猪圆环病毒 2 型疫苗免疫的增强效果[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):180-182.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.046

人参皂苷 Rb1 对猪圆环病毒 2 型疫苗免疫的增强效果

汪 伟,何孔旺,温立斌,肖 琦,倪艳秀

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:人参皂苷 Rb1 是人参的主要有效成分之一。通过将人参皂苷 Rb1 与氢氧化铝胶作为佐剂和猪圆环病毒 2 型抗原混合免疫 Babc/c 小鼠,检测免疫后 PCV2 抗体转阳时间、抗体滴度及攻毒后血清病毒载量变化。结果表明,Rb1 和抗原混合物免疫动物后,高剂量 Rb1 (100 μg) 能够明显缩短抗体转阳时间,显著提高抗体滴度,降低血清病毒载量及血清病毒阳性率。因此,人参皂苷 Rb1 具有较好的免疫增强效果,是一种较好的免疫佐剂。

关键词:人参皂苷 Rb1;佐剂;猪圆环病毒 2 型;疫苗免疫;滴度

中图分类号:S858.285.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)21-0180-03

人参(ginseng)是传统补益中药,具有补气生血、扶正祛邪等功效。人参还具有多方面的药理和生物活性,含有多种类型的化学成分,人参皂苷(ginseng saponins,简称 GS)是人参主要的有效成分之一^[1]。迄今已从人参中分离到 40 余种皂苷^[2],其中以人参皂苷 Rb1 含量最高^[3]。目前大量研究表明,GS 在免疫应答中具有较好的佐剂作用^[4],能够显著提高体液免疫应答和细胞免疫应答^[5]。猪圆环病毒(porcine circovirus,简称 PCV)属于圆环病毒科圆环病毒属成员,为无囊膜、单链负股 DNA 病毒,于 1982 年由 Tischer 等首次发现^[6],是目前发现最小的病毒之一,有 2 个血清型;其中,猪圆环病毒 2 型(PCV2)对猪群具有致病性,是猪圆环病(porcine circovirus diseases,简称 PCVD)的主要病原^[7]。PCV2 影响猪机体的免疫系统功能的发挥,从而产生免疫抑制^[8],给全世界养猪业造成了重大的经济损失^[9]。该病目前仍无有效治疗措施,疫苗接种是预防 PCV2 感染的主要途径^[10-12]。本研究旨在探索将人参皂苷 Rb1 单体作为免疫增强剂与 PCV2 疫苗混合后使用,研究人参皂苷 Rb1 对 PCV2 疫苗的免疫增强

效果,为 PCV2 疫苗更好地发挥作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

20 只清洁级 Babc/c 雌性小鼠购自扬州大学比较医学中心。本试验于 2016 年 4—6 月在江苏省农业科学院动物试验中心进行。

1.2 试剂与仪器

2% 氢氧化铝佐剂,由北京希凯创新科技有限公司提供;人参皂苷 Rb1 单体标准品、纯度 98.0% 以上,由南京泽朗医药科技有限公司提供;用生理盐水配制成浓度为 10 mg/mL,0.22 μm 滤器过滤除菌;病毒 DNA 提取试剂盒,由北京天恩泽科技有限公司;ABI 7500 荧光定量 PCR 仪,由美国 ABI 公司提供。

1.3 PCV2 疫苗抗原及攻毒用 PCV2 强毒

PCV2 疫苗抗原由笔者所在实验室用昆虫细胞-杆状病毒表达系统表达获得,抗原浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。攻毒用 PCV2 强毒,为笔者所在实验室自行分离鉴定并由 PK-15 细胞传代获得,IFA 测得其 TCID₅₀ 为 10⁻⁶/mL。

1.4 疫苗制备与动物免疫

以总体积 1 400 μL 无菌配制疫苗,混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 72 h。将小鼠随机分为 4 组(表 1),疫苗免疫前再次混匀,每只小鼠腹腔免疫疫苗 200 μL 。

1.5 PCV2 血清抗体检测

1.5.1 PCV2 血清抗体持续期变化 分别与免疫后 14、21 d 采血,分离小鼠血清,血清 1:100 稀释,用实验室已经建立的 PCV2 IgG 抗体间接酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay,简称 ELISA)检测方法检测血清抗体效

收稿日期:2017-08-30

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201303046);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(14)2045];江苏省农业科学院基本科研业务专项重大成果培育类项目[编号:ZX(15)1003]。

作者简介:汪 伟(1988—),男,安徽庐江人,硕士,助理研究员,主要从事兽用生物制品研究。Tel:(025)84391226;E-mail:weiwang054@126.com。

通信作者:何孔旺,研究员。Tel:(025)84390748;E-mail:kwh2003@263.net。

[11] 黄干荣,李晓华,黄衍强,等. 大黄素等提取物对耐药性大肠杆菌生物膜形成的影响[J]. 中成药,2013,35(12):2602-2605.

[12] 索朗扎西,范云鹏,麻武仁,等. 锦珠草颗粒对人工感染鸡大肠杆菌病的防治试验[J]. 中国兽医学报,2015,35(2):319-324.

[13] 戴 荣,程茂基,韩 信,等. 中草药混菌发酵生产新型生物中药的研究[J]. 饲料工业,2013,34(11):20-24.

[14] 崔泽林,郭晓奎. 食物链中抗生素耐药性基因的转移[J]. 中国

微生态学杂志,2011,23(1):89-92.

[15] 祖先鹏,林 璋,谢海胜,等. 中药有效成分与肠道菌群相互作用的研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(10):1766-1772.

[16] 刘晓霓,谢 立,刘 芳,等. 益生菌生物转化中药研究现状[J]. 时珍国医国药,2014,25(4):928-930.

[17] 谢莉敏,李 丹,程秀芳,等. 益生菌及其在药学研究中的应用[J]. 药学研究,2013,32(4):238-240.

表 1 试验分组与疫苗配制

组别	各配制剂的体积(μL)				
	生理盐水	抗原	2% 氢氧化铝佐剂	10 mg/mL 人参皂苷 Rb1	
A:阴性对照组	1 400.0	—	—	—	—
B:氢氧化铝佐剂组	520.0	700	140	—	—
C:Rb1 - 25 μg 组(低剂量)	542.5	700	140	17.5	每只小鼠注射 25 μg 人参皂苷 Rb1
D:Rb1 - 100 μg 组(高剂量)	490.0	700	140	70.0	每只小鼠注射 100 μg 人参皂苷 Rb1

价。具体如下:(1)用碳酸盐缓冲液(pH 值=9.6)将大肠杆菌表达的重组 Cap 蛋白稀释至 3 μg/mL,100 μL/孔加入 ELISA 板中,4 ℃包被过夜;(2)ELISA 板用 PBST 洗 5 次,每次 3 min;加入 5%脱脂奶,200 μL/孔,37 ℃封闭 2 h;(3)一抗孵育(待检血清),ELISA 板用 PBST 洗 5 次,每次 3 min;加入稀释的待检血清,同时加入 1:50 稀释的标准 PCV2 阳性和阴性血清,100 μL/孔,37 ℃孵育 1 h;(4)二抗孵育,ELISA 板用 PBST 洗 5 次,每次 3 min;加入 1:8 000 稀释的 HRP-羊抗鼠酶标二抗,100 μL/孔,37 ℃孵育 1 h;(5)显色,ELISA 板用 PBST 洗 5 次,每次 3 min;加入 TMB 显色液,100 μL/孔,避光显色 8 min;(6)终止显色,加 2 mol/L H₂SO₄ 终止液,50 μL/孔,终止显色;(7)读数,在酶标仪上读取 450 nm 波长的 $D_{450\text{ nm}}$ 。最后进行结果判定,当阳性对照孔 $\bar{D}_{450\text{ nm}} \geq 0.7$,阴性对照孔 $\bar{D}_{450\text{ nm}} < 0.2$,判定试验成立; $\bar{D}_{450\text{ nm}} \geq 0.42$,判定为阳; $\bar{D}_{450\text{ nm}} < 0.42$,判定为阴性。

1.5.2 比较 3 种配方疫苗免疫后 21 d 抗体效价 将各组

表 2 PCV2 荧光定量 PCR 检测方法的引物与探针

引物	序列 (5'→3')	扩增区间 (nt)	产物大小 (bp)
ORF2 - F	TAAATCTCATCATGTCCACATTCCA	1 512 ~ 1 632 nt	121 bp
ORF2 - R	CGTTACCGCTGGAGAAGGAA		
ORF - P	FAM - AATGGCATCTTCAACACCCGCTCT - TAMRA		

1.8 统计分析

所有试验数据在 SPSS 22.0 软件下采用独立样本 *t* 检验进行统计分析,以 *P* < 0.05 为差异显著,*P* < 0.01 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 免疫后的抗体滴度和抗体效价

2.1.1 抗体滴度随免疫时间的变化 3 种配方的疫苗免疫小鼠后,均可刺激小鼠产生 PCV2 特异性抗体。其中 C、D 组在免疫后 14 d,血清即转阳;在 14 d 时,C、D 组血清 $D_{450\text{ nm}}$ 明显高于 A、B 组。而 B 组血清仍为阴性,其在 21 d 血清才转阳(图 1)。另在免疫后 14、21 d,D 组血清 $D_{450\text{ nm}}$ 均要略高于 C 组,但差异不显著。添加人参皂苷 Rb1 的 2 组疫苗,其产生特异性抗体时间要早于不添加组疫苗。

2.1.2 3 种配方疫苗免疫后 21 d 抗体效价差异 D 组疫苗产生的抗体滴度明显高于 B、C 组;同时,C 组整体抗体效价也高于 B 组,但无显著差异。添加人参皂苷 Rb1 的疫苗抗体效价要高于不添加的疫苗,且高剂量组抗体滴度高于低剂量组(图 2)。

2.2 攻毒后血清病毒载量

攻毒后 28 d,检测小鼠血清病毒载量,未免疫组(A 组)血清病毒载量明显高于疫苗免疫组(*P* < 0.01)(图 3)。高剂

21 d 小鼠血清作 50、100、200、400、800、1 600 倍稀释,用实验室已经建立的 PCV2 抗体间接 ELISA 检测方法检测血清抗体效价。具体检测方法同“1.5.1”节。

1.6 PCV2 强毒攻毒

免疫后 21 d,对小鼠进行腹腔攻毒,每只小鼠注射 300 μL 病毒液;攻毒后 28 d,眼球采血并处死所有小鼠。

1.7 血清病毒载量检测

用病毒 DNA 提取试剂盒提取小鼠血清病毒 DNA,用笔者所在实验室已经建立的 PCV2 荧光定量 PCR 方法检测血清中的病毒载量。荧光定量 PCR 经优化,25 μL 反应体系如下:2 × Premix Ex Taq (Probe qPCR) 12.5 μL,上、下游引物(10 μmmol/L)各 0.5 μL,探针(10 μmol/L)0.5 μL,ROX Reference Dye II (50 ×) 0.5 μL,质粒模板 1.0 μL,ddH₂O 9.5 μL。反应程序如下:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,共 40 个循环。引物与探针序列如表 2 所示。

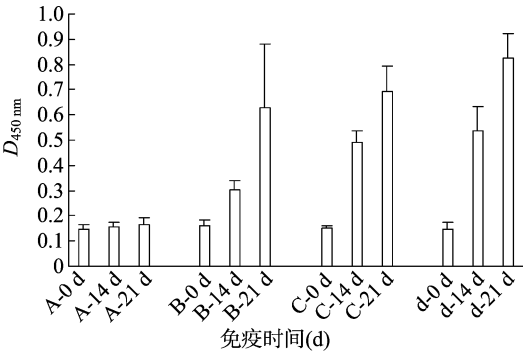


图 1 疫苗免疫后的 PCV2 IgG 抗体应答

量组血清病毒阳性率也明显低于其他组,结果表明,高剂量人参皂苷 Rb1 具有较高的抑制病毒增殖的功效(表 3)。

3 结论与讨论

将人参皂苷 Rb1 单体与 PCV2 疫苗混合免疫小鼠后,能够明显缩短抗体产生时间,显著提高抗体效价,降低血清病毒载量及血清病毒阳性率,具有较好的免疫增强效果,是一种较好的免疫增强剂。

人参皂苷能够显著提高机体的体液免疫应答和细胞免疫应答,其机制可能是激活机体的先天性免疫^[13]。目前有研究将人参皂苷 Rb1 作为佐剂或免疫增强剂与不同病原疫苗混

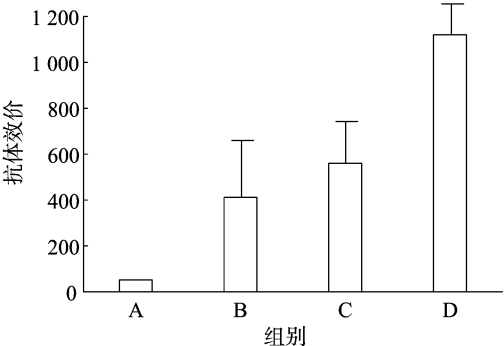


图2 疫苗免疫应答后 21 d 抗体效价差异

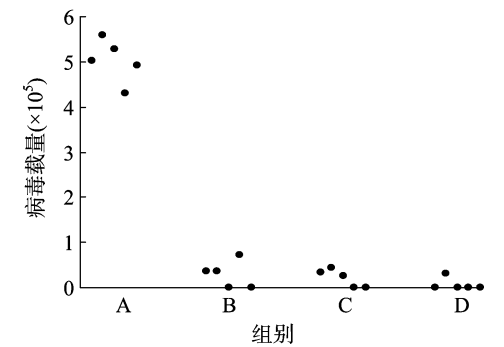


图3 攻毒后 28 d 血清 PCV2 病毒载量

表 3 小鼠血清 PCV2 病毒阳性率

分组	阳性数(只)/总数(只)	血清病毒阳性率(%)
A	5/5	100
B	3/5	60
C	3/5	60
D	1/5	20

合后免疫动物,均可以产生免疫增强作用。Rivera 等将人参皂苷 Rb1 与猪细小病毒(porcine parvovirus,简称 PPV)疫苗混合后免疫,能够显著提高疫苗抗体应答,并诱导多种细胞因子,结果表明激活了 Th1、Th2 应答^[14-15]。史秀山将人参皂苷 Rb1 作为人用纯化非洲绿猴肾细胞(vero 细胞)狂犬病疫苗的佐剂免疫小鼠,结果表明,单针免疫加入人参皂苷 Rb1 后抗体效价高且抗体产生时间早,且加入人参皂苷 Rb1 后抗体水平达到 5 针常规免疫抗体水平^[16]。Zhang 等将人参皂苷制备成纳米粒子佐剂与鸡艾美儿球虫重组抗原形成重组亚单位疫苗,能够促使疫苗产生强烈的免疫应答和免疫保护^[17]。胡松华等将人参皂苷 Rb1 以及氢氧化铝胶作为佐剂和金黄色葡萄球菌菌体抗原混合免疫豚鼠,并用 Rb1 和奶牛乳腺炎金黄色葡萄球菌菌苗混合免疫奶牛^[18];结果表明,Rb1 组豚鼠血清抗体滴度比对照组和氢氧化铝胶佐剂组增加快,幅度显著增高,Rb1 组奶牛血清抗体滴度比对照组奶牛显著增加。以上研究均表明,人参皂苷及其单体具有良好的免疫增强作用,可作为新的佐剂成分用于疫苗生产。

本研究表明,人参皂苷 Rb1 能够增加 PCV2 疫苗的免疫效果,是一种较好的免疫增强剂,具有潜在的应用价值。

参考文献:

[1] Su F, Yuan L, Zhang L, et al. Ginsenosides Rg1 and Re act as adjuvant via TLR4 signaling pathway[J]. Vaccine,2012,30(27):4106-4112.

[2] Cheng Y, Shen L H, Zhang J T. Anti-amnestic and anti-aging effects of ginsenoside Rg1 and Rb1 and its mechanism of action[J]. Acta Pharmacologica Sinica,2005,26(2):143-149.

[3] Radad K, Gille G, Moldzio R, et al. Ginsenosides Rb-1 and Rg(1) effects on mesencephalic dopaminergic cells stressed with glutamate[J]. Brain Research,2004,1021(1):41-53.

[4] Rivera E, Hu S, Concha C. Ginseng and aluminium hydroxide act synergistically as vaccine adjuvants[J]. Vaccine,2003,21(11):1149-1157.

[5] Qu D F, Yu H J, Liu Z, et al. Ginsenoside Rg1 enhances immune response induced by recombinant *Toxoplasma gondii* SAG1 antigen[J]. Veterinary Parasitology,2011,179(1):28-34.

[6] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA[J]. Nature,1982,295(5844):64-66.

[7] Chang S L, Chang C L, Chiang Y M, et al. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases[J]. Veterinary Journal,2005,169(3):326-336.

[8] Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology[J]. Veterinary Journal,2004,168(1):41-49.

[9] 郭龙军,唐青海. 猪圆环病毒 2 型疫苗的研究进展[J]. 畜牧兽医学报,2012,43(9):1337-1345.

[10] 乔绪稳,张元鹏,陈瑾,等. 猪圆环病毒 2 型荧光抗体的原核表达及初步应用[J]. 江苏农业学报,2017,33(3):610-617.

[11] 曹东阳,王小敏,钱爱东,等. 江苏省及周边地区猪圆环病毒Ⅱ型(PCV2)分子流行病学调查[J]. 江苏农业学报,2016,32(2):390-398.

[12] 徐悦,常晨,侯继波,等. PCV2 病毒生物矿化条件的优化[J]. 江苏农业学报,2017,33(1):159-165.

[13] Rivera E, Daggfeldt A, Hu S. Ginseng extract in aluminium hydroxide adjuvanted vaccines improves the antibody response of pigs to porcine parvovirus and *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology,2003,91(1):19-27.

[14] Rivera E, Hu S, Concha C. Ginseng and aluminium hydroxide act synergistically as vaccine adjuvants[J]. Vaccine,2003,21(11):1149-1157.

[15] Rivera E, Pettersson F E, Inganas M, et al. The Rb1 fraction of ginseng elicits a balanced Th1 and Th2 immune response[J]. Vaccine,2005,23(46/47):5411-5419.

[16] 史秀山. 人参皂甙 Rb1 提高狂犬病疫苗免疫效果的研究[J]. 中国热带医学,2005,5(1):22-24.

[17] Zhang D F, Xu H, Sun B B, et al. Adjuvant effect of ginsenoside-based nanoparticles (ginsomes) on the recombinant vaccine against *Eimeria tenella* in chickens[J]. Parasitology Research,2012,110(6):2445-2453.

[18] 林锋强. 人参皂甙 Rb1 的免疫佐剂作用[J]. 中国兽医学报,2003,23(5):480-482.