天冬提取物作为流感灭活疫苗佐剂的初步研究

陈芹芹[1]，程永现[2]，吕青[2]，李慧[1]，宋绍辉[1]，赵兰华[1]，王俊[1]，余巍[1]，李映波[1]

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所，云南 昆明 650118；
2. 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室，云南 昆明 650204)

摘要：目的 探讨天冬提取物作为流感疫苗佐剂的免疫增强作用，并应用二次回归正交旋转组合方法优化天冬佐剂与疫苗剂量。**方法** 将不同剂量的天冬提取物与 H3N2 流感灭活疫苗共同肌肉免疫小鼠，以相应剂量灭活疫苗的单独免疫组、灭活疫苗与氢氧化铝共同免疫组、生理盐水免疫组作为对照组，间隔 3 周，免疫 2 次，取尾血收集血清，测定血凝抑制(HI)抗体效价。并且应用二次回归正交旋转组合方法，以天冬提取物及流感疫苗血凝素(HA)含量作为 2 个关键因素设计分组，将HI效价作为响应值，使用 SAS9.1 软件进行数据分析，对天冬提取物及疫苗剂量组合进行研究，并得出最佳响应值对应的二者剂量。**结果** 天冬提取物能显著增强血清 HI 抗体效价，并且高于氢氧化铝佐剂。当流感疫苗 HA 含量为 4.345 μg、天冬提取物含量为 0.1 mg 时能够获得最高响应值（HI 效价为 5 092）。**结论** 天冬提取物对流感灭活疫苗具有佐剂效果，并有望成为流感灭活疫苗的新型免疫佐剂。

关键词： 天冬提取物；流感疫苗；佐剂；二次回归正交旋转组合设计

DOI： 10.3969/j.issn.1005-5304.2011.07.024

中图分类号： R285.5　　**文献标识码：** A　　**文章编号：** 1005-5304(2011)07-0063-03

Preliminary Study of Radix Asparagi Extracts as Inactived Influenza Vaccine Adjuvant

CHEN Qin-qin[1], CHNEG Yong-xian[2], LV Qing[2], LI Hui[1], SONG Shao-hui[1], ZHAO Lan-hua[1], WANG Jun[1], YU Wei[1], LI Ying-bo[1] *(1.Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Kunming 650118, China; 2.State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)*

Abstract: Objective To explore the adjuvant effect of Radix Asparagi extracts on inactivated influenza virus vaccine and to optimize the dose of them by quadratic orthogonal rotation combination design. **Methods** Different dosages of Radix Asparagi extracts mixed with different dosages of inactivated influenza virus H3N2 vaccine were injected intramuscularly into mice. And mice immunized respectively with inactivated vaccine alone, aluminium-adjuvanted inactivated vaccine and physiological saline which were control groups. Each group of mice was immunized twice at 3 week intervals. Two weeks after the boost, blood samples were collected for measurement of serum hemagglutination inhibition (HI) titers. And further study on the dose of Radix Asparagi extracts and inactivated vaccine HA was evaluated by quadratic orthogonal rotation combination design with HI titers as response value. The data was analyzed by SAS9.1 software. In addition, the dose of Radix Asparagi extracts and inactivated vaccine HA with the optimal response value were defined. **Result** Radix Asparagi extracts significantly enhanced the HI titers, which was higher than those of aluminium. And when the dosage of Radix Asparagi extracts and inactivated vaccine HA respectively were 0.1mg and 4.345 μg, the optimal response value (HI titer) obtained was 5092. **Conclusion** Radix Asparagi extracts can be used as a potential adjuvant of inactivated influenza virus vaccine.

Key words: Radix Asparagi extracts; influenza virus vaccine; adjuvant; quadratic orthogonal rotation combination design

2010 年 8 月，WHO 表示甲型 H1N1 流感流行势态趋缓，预测在未来几年甲型 H1N1 型流感病毒可能会以季节性流感流行方式继续存在，但鉴于历史上几次大流行流感的流行趋势，也不排除发生新的变异再次致使大流行流感爆发的可能性[1]。在流感爆发期间，适当及时的疫苗接种可明显降低流感发病率和病死率。但由于当前流感疫苗生产工艺的限制，一旦大流行流感爆发，不可能在短时间内向接种人群提供足量的疫苗。在流感疫苗中使用佐剂不仅可以增强疫苗抗原免疫原性，还可以降低抗原用量。特别在应对大流行流感时，使用佐剂节约抗原用量进而使更多的人群在爆发期间能够及时接种疫苗显得尤为重要[2]。

天冬为百合科植物天门冬 *Asparagus cochinchinensis*

基金项目： 国家高技术研究发展计划(2006AA02Z409)；云南省联合支持国家资助项目(2008GA007)

通讯作者： 李映波，E-mail: lyb@imbcams.com.cn

(Lour.)Merr 的干燥块根，为传统中药，早在《神农本草经》中就有记载，被列为上品。具有滋阴润燥、清肺生津功能，主治肺燥干咳、阴虚劳嗽、热病伤阴、肠燥便秘等[3]。现代药理研究表明，天冬具有增强网状内皮系统吞噬能力及体液免疫功能的作用，其煎剂或醇提取液可促进抗体生成，延长抗体生存时间，还有抑制肿瘤细胞增殖及抗菌、抗氧化等作用[4]。

本研究对天冬提取物用于流感灭活疫苗(H3N2)的佐剂效果进行了研究。并且首次将二次回归正交旋转组合设计用到佐剂与疫苗剂量的研究当中，以天冬提取物及流感疫苗血凝素(HA)含量作为 2 个关键因素设计分组，同时，将血凝抑制(HI)抗体效价作为响应值，对天冬提取物及疫苗剂量组合进行研究。

1 材料

1.1 动物

清洁级雌性昆明小鼠，体质量 18～22 g，购自昆明医学院实验动物中心，合格证号：SCXK(滇)2005-0008。

1.2 病毒与疫苗

由本实验室保藏并提供，疫苗 HA 含量为 43.67 μg/mL。

1.3 药物和试剂

天冬购自云南省药材公司；氢氧化铝佐剂由中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所制备，浓度为 16.31 mg/mL；受体破坏酶(RDE)，购自日本 SEIKEN 公司。

1.4 仪器

电子分析天平，德国 Sartorius 公司；台式微型离心机，美国 Beckman 公司；电热恒温水浴锅，上海医疗器械七厂；96 孔血凝板，美国 Sigma 公司。

2 方法与结果

2.1 天冬提取物的制备

将干燥的天冬粉碎成粉，加入 2 倍体积的 75%乙醇温浸(60 ℃)提取 2 次，每次温浸 2 h，过滤并合并滤液，减压回收溶剂，浓缩得浸膏，易溶于水。临用时用生理盐水配制成相应浓度。

2.2 血凝抑制实验

参考文献[5]按常规操作方法进行。

2.3 二次回归正交旋转设计优化天冬佐剂及流感疫苗剂量

以天冬提取物及流感灭活疫苗 HA 含量作为 2 个关键设计因素，以二次免疫后 2 周血清 HI 效价平均值为响应值，采用二次回归正交旋转组合设计天冬提取物及流感疫苗剂量组合并进行分组。根据公式 $Z_0j=(Z_1j+Z_2j)/2$，$\triangle j=(Z_2j-Z_1j)/2\gamma$ 计算出零水平 Z_0j 和半区间$\triangle j$，得到二因素水平编码表[6]，见表 1。

表 1 二因素水平编码表

水平	编码	X_1 流感疫苗 HA(μg)	X_2 天冬提取物(mg)
+γ	1.414 214	4.345	1.5
+1	1	3.84	1.3
0	0	2.62	0.8
-1	-1	1.4	0.3
-γ	-1.414 214	0.894 6	0.1

采用 SAS9.1 软件响应面设计中的 Central Composite: Orthogonal Design 生成二因素中心回归正交旋转组合设计，试验方案见表 2。

表 2 二因素中心回归正交旋转组合设计分组

试验号	X_1 流感疫苗 HA(μg)	X_2 天冬提取物(mg)
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1.414 214	0
6	1.414 214	0
7	0	-1.414 214
8	0	1.414 214
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	0	0
16	0	0

2.4 统计学方法

数据先进行单因素方差分析，当差异有统计学意义时再用 t 检验法检测 2 组之间的差异，显著性水平设 $P<0.05$。根据表 2 试验设计，检测各组血清 HI 抗体效价，取平均值后使用 SAS9.1 软件进行二次回归方程建立及方差分析，拟合显著性回归方程，使用 SAS 9.1 软件中的响应面优化(Response Optimization)程序做出响应面图并进行分析，再利用数据优化(Numerical Optimization)程序求出当响应值最大时各因素的水平。

2.5 天冬提取物对流感疫苗 H3N2 的佐剂效果

2.5.1 不同组别血凝抑制抗体效价比较 昆明小鼠 20 只，随机分为 4 组：0.2 mg 天冬提取物与流感灭活疫苗(HA 1.8 μg)共同免疫组、0.2 mg 氢氧化铝与灭活疫苗(HA 1.8 μg)共同免疫组、灭活疫苗单独免疫组(HA 1.8 μg)以及生理盐水空白对照免疫组，每组 5 只。小鼠腿部肌肉免疫，间隔 3 周，免疫 2 次，于第 2 次免疫后 2 周采集小鼠尾动脉血，分离血清，测定 HI 抗体效价，结果见图 1。

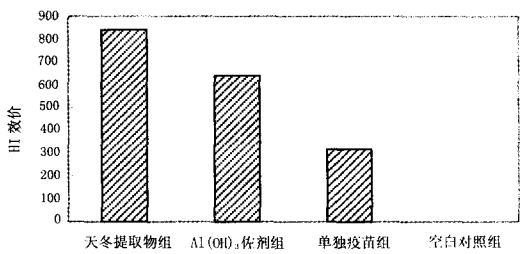

图 1 不同免疫组第 2 次免疫后 2 周血清 HI 效价

2.5.2 不同组别血凝抑制抗体效价趋势及比较 按照二次回归正交旋转组合设计方法所得表 2 中试验号 9～16 组又统称为中心点试验组剂量设计，配制天冬提取物(0.8 mg)与流感灭活疫苗(HA 2.62 μg)共同免疫组，并设相应 HA 含量的氢氧化铝(0.2 mg)与灭活疫苗共同免疫组、灭活疫苗单独免疫组及生理盐水免疫组。每组 5 只，间隔 3 周，免疫 2 次，自首次免疫后，

每隔 7 d 尾动脉取血，于第 70 日结束，分离血清，测定各组 HI 平均效价，进一步验证了天冬提取物对流感疫苗的佐剂效果，并且描述了各组抗体生成的趋势，见图 2。

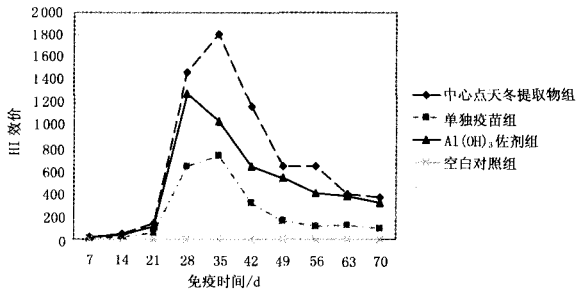

图 2　不同免疫组在不同免疫天数的 HI 效价

2.6　天冬佐剂及流感疫苗剂量优化结果

参照表 1 中的编码剂量，按照表 2 所设剂量编码，分别配制试验号 1～16 组天冬提取物和流感疫苗的混合注射样品，每组接种 5 只小鼠，间隔 3 周，免疫 2 次，采集小鼠尾动脉血，分离血清，对第 2 次免疫后 2 周的血清进行 HI 抗体效价检测，并以各组所测 HI 效价平均值作为响应值进行分析。各组 HI 平均效价见表 3。

表 3　二次回归正交旋转组合设计各组 HI 平均效价

组别	HI 效价	组别	HI 效价
1	1 470	9	1 810
2	1 076	10	1 688
3	2 940	11	1 810
4	4 305	12	1 676
5	1 470	13	1 940
6	2 228	14	1 684
7	3 880	15	1 780
8	2 228	16	1 790

将表 3 中各组血清 HI 效价平均值输入 SAS9.1 软件进行分析，建立二次回归模型并进行方差分析，计算出各因素的方差与 F 值，在 $P=0.05$ 水平上将不显著项省略。获得回归方程为 $Y=7.494\ 378+0.273\ 337X_1-1.663\ 532X_2+0.927\ 965X_{22}$。对拟合的回归方程进行 F 检验，$F_{回归}=10.593\ 34>F_{0.01}(3,12)=5.95$，$P<0.01$，说明该方程具有统计学意义。

采用 SAS9.1 软件绘制响应面图和等高线图见图 3、图 4。

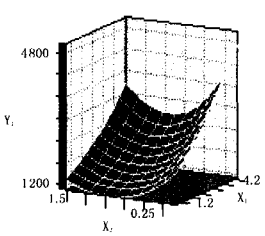

图 3　二次回归设计响应面图

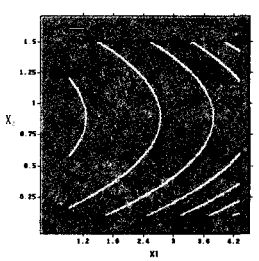

图 4　二次回归设计等高线图

由图 3 和图 4 可见流感疫苗 HA 含量和天冬提取物含量的变化对响应值的影响，当流感疫苗 HA 含量增加时，响应值即 HI 效价升高；当天冬提取物含量增加时，响应值先升高后降低。

通过 SAS9.1 软件中的数据优化 Optimization 程序，得出当获得最高响应值 HI 为 5 092 时，流感疫苗 HA 含量为 4.345 μg、天冬提取物含量为 0.1 mg。

3　讨论

HI 是评价流感疫苗免疫效果的经典方法[7]。本研究通过将天冬提取物与流感灭活疫苗混合共同免疫小鼠，并以相应剂量灭活疫苗的单独免疫组、灭活疫苗与氢氧化铝共同免疫组、生理盐水免疫组作为对照组，通过检测及比较各组诱导产生的 HI 抗体水平来评价天冬提取物的免疫佐剂作用。结果显示，天冬提取物疫苗组可产生较高的 HI 抗体水平，且优于氢氧化铝佐剂组。本研究结果初步表明天冬提取物具有免疫佐剂作用。

二次回归正交旋转组合设计是旋转设计的一种，在处理多因素多水平试验设计方面具有很多优势，在基本保留了正交设计优点的同时，还克服了正交设计中预测值依赖实验点取值的缺点[8]，在中草药研究领域中常被用于中草药提取条件方面的研究[9]。笔者首次将此设计应用于中草药佐剂的研究中，以天冬提取物与流感疫苗 HA 二者剂量为两个关键因素，设立 HI 效价为响应值，通过绘制响应面图与等高线图，疫苗与天冬佐剂对于 HI 效价的影响明显可见，在一定程度了弥补了疫苗佐剂研究中常用的低中高剂量组合设计的盲目性，并且通过数据优化程序可以得出最佳响应值时对应的二因素剂量，为将来天冬提取物作为流感疫苗佐剂实际应用的使用剂量提供依据。结果表明，天冬提取物与流感灭活疫苗共同免疫小鼠，可显著提高 HI 抗体水平，且效果优于氢氧化铝佐剂，有望发展成为流感灭活疫苗的新型免疫佐剂。

参考文献：

[1] WHO/SAGE. Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2010－2011 northern hemisphere influenza season[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2010, 85(10)：81－92.

[2] Lorena E Brown. The role of adjuvant in vaccines for seasonal and pandemic influenza[J]. Vaccine, 2010, 28(50)：8043－8045.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 北京：化学工业出版社，2005：37.

[4] 李敏，费曜，王家葵. 天冬药材药理实验研究[J]. 时珍国医国药，2005，16(7)：580－582.

[5] 郭元吉，程晓雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京：中国三峡出版社，1997：100－104.

[6] 余家林，肖枝洪. 多元统计及 SAS 应用[M]. 武昌：武汉大学出版社，2008：98－104.

[7] The European agency for the evaluation of medical product[S]. CPMP/BWP/214/96. Harmonization of requirements for influenza vaccines, 1997.

[8] 王惠，吴兆亮，童应凯，等. 应用二次回归正交旋转组合设计优化黄霉素发酵培养基[J]. 食品研究与开发，2006，27(6)：19－22.

[9] 彭晓霞，张振巍. 二次正交旋转组合设计法优化赤芍醇提工艺[J]. 中药材，2010，33(6)：991－994.

(收稿日期：2010-12-22，编辑：华强)