

中草药提取物作为疫苗佐剂的研究进展

朱 喆 蔡泓志 李映波

摘 要 佐剂作为疫苗研发的 1 个重要组成部分,随着新型疫苗研究的深入和市场应用需求的提高,新型佐剂的研发已得到广泛重视。中草药作为中国传统医药,含有许多有效活性成分,其中部分提取物具有显著免疫增强作用,可有效促进体液免疫及细胞免疫,发挥着免疫佐剂活性。同时,中草药有效提取成分作为疫苗佐剂,更具毒性低、免疫原性弱等优点,因而成为现代新型佐剂研究的一大热点。本文综述了近年来具有佐剂活性的多种中草药提取成分及其免疫佐剂调节功能,为开发研制高效低毒的免疫佐剂提供参考。

关键词 疫苗佐剂 中草药提取物 免疫调节

中图分类号 R392

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.05.002

自 1920 年发现铝佐剂能够促进抗体反应,佐剂就被特意加入疫苗中来增加疫苗的保护效果。第 1 种疫苗是偶然发现的,用于更安全但免疫效果较差的亚单位疫苗^[1]。随着许多新型疫苗的问世,增强疫苗的免疫原性成为了疫苗研发中的关键问题之一。佐剂具有减少抗原使用量,迅速激活免疫系统,诱导快速、广泛和强烈的免疫反应,增强免疫应答等作用,特别对老年及儿童等免疫力低下的人群意义重大^[2]。

佐剂是现代疫苗发展的一个重要组成部分。经过几十年的发展,只有铝盐佐剂、水包油乳液(MF59、AS03 和 AF03)、病毒体和 AS04 几种佐剂被批准用于人类^[3]。但是一些局部反应、IgE 抗体反应和安全性等问题仍不容忽视。人用疫苗佐剂应具有无毒、可降解、无致敏性、使抗原具有持久且高效的免疫活性等特点。然后目前常见的几种高效佐剂常伴有较高的毒性,不能应用于人类疫苗。因此,人用疫苗佐剂仍处于不断探索、研究和开发的阶段。当前,在研发的新型人用疫苗佐剂主要有脂质体、免疫复合物、寡核苷酸、多糖、细胞因子、油水乳剂及天然产物等^[1]。其中天然来源的产物中草药提取物受到了佐剂研究领域的广泛关注。中草药具有抑菌抗病毒的功效,其提取物也具有免疫佐剂的作用,如皂苷、蜂胶、植物多

糖及复合中草药佐剂等。因其具有天然可降解、免疫原性低、使用安全等优点,成为近几年疫苗佐剂研究的一大热点。本文就近年来中草药提取物作为疫苗佐剂的研究概况做一简要的综述。

一、中草药中具有佐剂效果的成分

1. 多糖:植物多糖作为佐剂具有较好的安全性,可降解,相比铝佐剂无组织沉积^[4]。从酸浆杆茎中提取并纯化的一种水溶性酸性杂多糖(water-soluble polysaccharide, WSPA),其与 DNA 疫苗 pD-HSP90C 共同免疫小鼠时能够增强体液和细胞反应,显著增强特异性 IgG 抗体反应和 IgG1 和 IgG2b 的抗体效价及细胞因子 IL-2、IL-4 的产生^[5]。该多糖可作为一种潜在的 DNA 疫苗候选佐剂。植物来源的多糖菊粉,其自然溶解状态下不具有免疫活性,但当其在适宜的温度和溶解度下结晶形成稳定的结晶颗粒制成 Advax™佐剂,该佐剂与疫苗联合使用是安全有效的,可增强机体对抗原的体液免疫和细胞免疫^[6]。Advax 已发展成为多种疫苗佐剂,但其免疫学特性及潜在的作用机制尚未阐明。更有研究发现泰山马尾松花粉多糖和禽波杆菌重组外膜蛋白 A 疫苗共同免疫小鼠,能够增强小鼠的特异性体液免疫及细胞免疫,且无不良反应的发生^[3]。黄芪多糖(astragalus polysaccharides, APS)是从黄芪属植物中提取的具有较强免疫调节功能的生物高分子。APS 作为 HBV DNA 疫苗的佐剂免疫小鼠,能够增强乙肝表面抗原特异性的抗体水平并促进 T 细胞的增殖,诱导 CD4⁺ T 细胞产生 IL-4、IL-2 和 IFN- γ ,促进 CD8⁺ T 细胞表达 IFN- γ ,并诱导杀伤性 T 细胞活化,通过上调 MHC I/II、CD40、CD80 和 CD86 刺激 DC 细胞成熟^[7]。

基金项目:国家高技术研究发展计划“863 计划”项目(2006AA02Z409);云南省联合支持国家基金资助项目(2008GA007)

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所生物制品五室(朱喆、李映波);571199 海口,海南医学院基础医学院和生命科学院免疫学教研室(蔡泓志)

通讯作者:李映波,研究员,电子信箱:lyb@imbeams.com

APS 作为禽传染性支气管炎病毒 (Avian infectious bronchitis virus, IBV) 疫苗佐剂, 增强 IBV 特异性抗体的效价, 淋巴细胞增殖和 IL-2、IL-8、IL-1 β , 和 TNF- α mRNA 的表达水平明显增高^[8]。黄芪多糖作为疫苗佐剂提供了更好的保护效力。多糖作为中草药中常见的能够提取的有效成分, 其与疫苗联合使用能有效的诱导细胞免疫和体液免疫, 具有一定佐剂效果, 其将在新型人用疫苗佐剂的研发过程中扮演重要的角色。

2. 皂苷: 皂苷是一大类具有许多不同的生物活性和药理活性的两性植物苷类化合物, 分为甾体皂苷和三萜皂苷。皂苷佐剂 (saponin-based adjuvants, SBAs) 已被用于动物疫苗及人类疫苗的临床试验中, 其佐剂作用是诱导炎症小体产生并通过树突状细胞增强抗原的交叉递呈, 诱导强烈的 Th1 型细胞免疫及 Th2 型体液免疫^[9]。长刺天门冬皂苷与卵清蛋白共同免疫小鼠, 小鼠体内特异性 IgG 显著增加, 产生一种持续的适应性反应, 并对细胞免疫产生影响, 且无不良反应发生^[10]。由磷脂、皂苷、胆固醇组成的笼状结构的佐剂 ISCOMATRIX™, 与一些预防性和治疗性疫苗共同免疫的效果及安全性正在进行着临床前及临床试验的评估。如 ISCOMATRIX™ 佐剂与禽流感病毒 H7N9-VLP 疫苗联合使用能够在人体中产生高质量的抗体免疫反应, 实验结果同时发现无佐剂的 H7N9-VLP 疫苗只诱导产生针对 C 端 HA1 结构域的抗体, 而 ISCOMATRIX™ 佐剂与 H7N9-VLP 疫苗共同免疫能够诱导产生针对更大表位即 HA1 生成的受体结合结构域的抗体^[2]。相比无佐剂的 H7N9-VLP 疫苗, 佐剂与疫苗共同免疫能够诱导更高的 HA1 抗体效价并促进抗体亲和力成熟^[2]。Patil 等^[11]研究发现皂苷佐剂 GPI-0100 是一个耐受性良好的流感病毒亚单位疫苗的黏膜佐剂, 在小鼠模型中, GPI-0100 能够在鼻内及肺内加强疫苗的黏膜抗体反应, 并诱导全身的抗体保护, 该佐剂还能大大降低流感病毒亚单位疫苗鼻腔免疫途径的抗原使用量。大量实验数据已充分说明皂苷其作为许多中草药中的主要成分, 和多糖相似, 可作为佐剂和疫苗共同使用, 能一定程度上增强免疫应答效果, 且已有的临床实验也表明其成为新型疫苗佐剂的巨大潜力。

3. 中药复方制剂: 单味中草药或中草药中提取的活性混合物具有增强免疫功能的作用, 一些中药复方制剂由多味中草药按照一定的比例配制而成, 具有增强机体免疫力的功效。由黄芪、淫羊藿、白芍、麦冬

以适当比例配制而成的中草药复方制剂, 配方含有多糖、皂苷、黄酮等活性成分, 将该配方给腹腔注射了皮质醇诱导免疫抑制的小鼠灌胃之后, 其能够有效对抗皮质醇引起的小鼠脾脏缩小及抗体减少的现象, 同时能促进 T 淋巴细胞的增殖, 增强细胞免疫和体液免疫, 预防免疫损伤和促进免疫损伤的恢复^[12]。中药复方制剂将具有活性成分的中药提取物复合使用, 虽然一定程度上改善了单一制剂功效用途单一的特点, 能更有效的发挥复合佐剂的功效, 但仍需要进一步证实其使用的安全性, 因此在其推广使用之前仍需要进行更多更深入的研究。

4. 其他: 除多糖、皂苷以及一些复方制剂以外, 一些中草药中提取的挥发油、生物碱等有效成分也具有佐剂活性。Wei 等^[13]将大黄素作为黑色素瘤 DNA 疫苗佐剂应用于小鼠, 能够有效减小肿瘤并提高小鼠的存活率。冰香散与流感疫苗液联合滴鼻免疫小鼠, 能够有效诱导黏膜免疫反应, 引起体液免疫和细胞免疫, 发挥抗病毒作用^[14]。中草药中含有的许多有效活性成分还有待开发应用于疫苗佐剂中。

二、中草药提取物佐剂对免疫系统的作用

1. 促进脾脏细胞增殖: 白芨块茎中提取的多半乳糖甘露聚糖 (novel polysaccharide fraction, BSPF2), 其包含甘露糖、葡萄糖和半乳糖, 其能够显著诱导脾脏细胞增殖^[4]。在免疫抑制的小鼠中, 苦瓜中提取的水溶性多糖 (momordica charantia polysaccharides, MCP) 能够增强脾脏及胸腺重量指数, 并且能够促进淋巴细胞转化^[15]。提示中药提取物能直接影响免疫器官的生理状态和功能。

2. 增强巨噬细胞的吞噬能力: 巨噬细胞具有很强的吞噬能力, 是机体固有免疫的重要组成部分, 同时又是一类主要的抗原递呈细胞, 在特异性免疫应答的诱导和调节中起着关键作用。从广西莪术提取纯化的相对分子质量为 5.3kDa 的果聚糖 (curcuma kwangsiensis polysaccharides, CKNP), 其中 96.8% 为果糖, 3.2% 为葡萄糖, 其能明显的刺激巨噬细胞增殖并提高其吞噬能力^[16]。用人参根茎进行水提取并纯化的低聚糖能够增强腹膜巨噬细胞的吞噬作用, 并促进 NO、TNF- α 、活性氧的产生^[17]。中草药提取物能直接作用于巨噬细胞, 进而影响机体的天然免疫和特异性免疫。

3. 诱导树突状细胞的成熟和分化: 树突状细胞是目前已知抗原递呈功能最强的抗原递呈细胞, 其成熟和活化在免疫调节中发挥重要作用, 最大的特点是能

够刺激初始 T 细胞活化和增殖,是特异性免疫应答的使动者。成熟的树突状细胞抗原的摄取和处理能力降低,细胞表面高表达 MHC - I 分子及 MHC - II 分子。CD40、CD80 和 CD86 分子的表达促进 T 淋巴细胞的活化及分化。从川明参中提取的水溶性多糖(chuanminshen violaceum polysaccharides, CVPS)作为口蹄疫疫苗佐剂免疫小鼠,均能诱导树突状细胞 CD40、CD80、和 CD86 分子的表达,上调 MHC - I 分子及 MHC - II 分子以及 TLR - 2/4 mRNA 水平,促进树突状细胞成熟及分化;并且其作为口蹄疫疫苗佐剂还能够活化 NK 细胞及 CTL 细胞,增加口蹄疫病毒特异性的 IgG 抗体及 IgG 亚类的抗体效价,下调 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞的数量^[18]。台湾紫芝中提取的多糖能够在体外刺激树突状细胞产生促炎性细胞因子 TNF - α 、IL - 6、IL - 12、IL - 23 以及表达成熟的 CD40、CD80、CD86 细胞;其作为佐剂进行体内实验能够诱导 Th1 极化的适应性免疫反应,用于疫苗中能够有效的抵抗病毒^[19]。中草药提取物佐剂诱导树突状细胞的成熟和分化,增强机体对抗原的摄取能力,提高了疫苗对机体的保护力。

4. 增强 T 淋巴细胞的免疫反应:T 细胞参与了机体所有免疫应答的不同类型和过程,是机体免疫系统中非常重要的细胞亚群。T 淋巴细胞及其亚群在消灭病毒和预防病毒持续感染中起着至关重要的作用,而 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞数是体内免疫反应的一个指标。CD4⁺T 细胞通过细胞因子的产生和分泌,发挥 Th 细胞的功能,调节细胞免疫应答和体液免疫应答;CD8⁺T 细胞主要发挥杀伤性 T 细胞的功能,产生细胞毒效应。来自白术根茎的一种多糖能够特异性增强 T 淋巴细胞增殖,促进淋巴细胞进入 S 期和 G₂/M 期,CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的比例增加^[20]。麦冬脂多糖作为灭活猪细小病毒疫苗的佐剂应用于小鼠,能够显著增强淋巴细胞增殖,增强 CD4⁺和 CD8⁺细胞的比例,增强特异性的 IgG 抗体效价,促进细胞因子的产生^[21]。狂犬病毒灭活疫苗目前是一种相对较贵的疫苗,并且在某些情况下不能诱导持久的保护性免疫应答。研究发现人参皂苷 Re 作为狂犬病毒灭活疫苗的佐剂免疫小鼠可减少疫苗剂量,降低成本,并增强血清抗体效价,促进 T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞的增殖并增加 CD4⁺:CD8⁺T 细胞的比例,促进 Th1 型反应相关细胞因子 IL - 12 和 IFN - γ 及 Th2 型反应相关细胞因子 IL - 4、IL - 10 的分泌,Th1 型及 Th2 型免疫反应均被激活^[22]。

理想的佐剂应能够同时诱导 Th1 型及 Th2 型的免疫反应。在人类身上已用了几十年的铝佐剂,其主要的缺点是不能诱导 Th2 型的免疫反应进而不能诱导产生对大多数的细胞内感染的病原体例如结核、疟疾、利什曼病、麻风、艾滋病等的免疫保护。多糖和皂苷作为中草药中的主要有效成分,作为疫苗佐剂均能够增强 T 淋巴细胞的免疫反应,其中一些中草药提取物佐剂还能够同时激发 Th1 型和 Th2 型免疫反应,在安全性得到完全保障的情况下,是铝佐剂所不能媲美的。

5. 促进体液免疫:大多数中草药提取物佐剂均能够激活 B 淋巴细胞,增强体液免疫,是一种特异性的抗原抗体反应。灵芝多糖能增加鸡新城疫病毒疫苗抗体效价,表明灵芝多糖能显著提高鸡新城疫病毒疫苗的体液免疫应答^[23]。白色念珠菌的表面抗原能够诱导保护性的抗体产生,但是,将其分离是很困难的。人参皂苷具有免疫佐剂活性能够诱导表面甘露糖抗原产生保护性抗体 IgG 和 IgG2a。给怀孕的小鼠接种 Advax 佐剂流感灭活疫苗(A/H1N1/PR8),Advax 佐剂疫苗显著增加血清和乳汁中抗流感病毒抗体效价,Advax 佐剂与流感病毒亚单位疫苗共同免疫可在妊娠期通过增强母乳传递的抗流感抗体为幼崽提供保护^[24]。许多研究均证明中草药提取物佐剂疫苗与无佐剂疫苗相比能够增强机体的体液免疫,提高疫苗对机体的保护效果。

三、展 望

中草药在我国食用及药用方面历史悠久,资源丰富。由于现研制出的许多佐剂毒性不良反应大,用途受到限制,因此从具有佐剂活性的中草药中寻找合适的佐剂将是人工免疫中很有意义的课题。开发一种安全并能够针对多种疫苗发挥免疫增强作用的新型佐剂势在必行。大量的研究表明中草药提取物具有激活免疫系统发挥免疫调节作用,其作为疫苗佐剂具有很好的免疫增强作用,可改变免疫应答类型,降低抗原的用量,因其毒性不良反应较小而有望成为未来临床应用的一大潜力开发佐剂药物。近年来对于中草药提取物特别是多糖及皂苷的佐剂活性功能方面研究已取得较大的进展,对其化学组成及结构的研究已经相对深入,但对其免疫机制的阐述还不是十分清晰,对中草药提取物佐剂的免疫机制进行系统深入的研究仍然很必要。同时,中草药提取物的生产工艺的稳定性和质量控制也需要进一步加强。

参考文献

- 1 McKee AS, Marrack P. Old and new adjuvants[J]. *Curr Opin Immunol*, 2017, 47: 44–51
- 2 Chung KY, Coyle EM, Jani D, *et al.* ISCOMATRIX adjuvant promotes epitope spreading and antibody affinity maturation of influenza A H7N9 virus like particle vaccine that correlate with virus neutralization in humans[J]. *Vaccine*, 2015, 33(32): 3953–3962
- 3 Liu L, Yu C, Wang C, *et al.* Immuno-enhancement of Taishan Pinus massoniana pollen polysaccharides on recombinant Bordetella avium ompA expressed in Pichia pastoris[J]. *Microb Pathog*, 2016, 95: 54–61
- 4 Peng Q, Li M, Xue F, *et al.* Structure and immunobiological activity of a new polysaccharide from Bletilla striata[J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 107: 119–123
- 5 Yang J, Yang F, Yang H, *et al.* Water-soluble polysaccharide isolated with alkali from the stem of Physalis alkekengi L.: structural characterization and immunologic enhancement in DNA vaccine[J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 121: 248–253
- 6 Menon V, Ayala VI, Rangaswamy SP, *et al.* DNA prime/protein boost vaccination elicits robust humoral response in rhesus macaques using oligomeric simian immunodeficiency virus envelope and Advax delta inulin adjuvant[J]. *J Gen Virol*, 2017, 98(8): 2143–2155
- 7 Du X, Zhao B, Li J, *et al.* Astragalus polysaccharides enhance immune responses of HBV DNA vaccination via promoting the dendritic cell maturation and suppressing Treg frequency in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(4): 463–470
- 8 Zhang P, Wang J, Wang W, *et al.* Astragalus polysaccharides enhance the immune response to avian infectious bronchitis virus vaccination in chickens[J]. *Microb Pathog*, 2017, 111: 81–85
- 9 den Brok MH, Bull C, Wassink M, *et al.* Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13324
- 10 Tiwari N, Gupta VK, Pandey P, *et al.* Adjuvant effect of Asparagus racemosus Willd. derived saponins in antibody production, allergic response and pro-inflammatory cytokine modulation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 86: 555–561
- 11 Patil HP, Herrera Rodriguez J, de Vries-Idema J, *et al.* Adjuvantation of Pulmonary-Administered Influenza Vaccine with GPI-0100 Primarily Stimulates Antibody Production and Memory B Cell Proliferation[J]. *Vaccines (Basel)*, 2017, 5(3): 19
- 12 Bao Y, Jing C, Shi W. Effects of Chinese herbal recipes on immunity in immunosuppressive mice[J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2012, 9(4): 548–552
- 13 Wei WC, Wang JH, Aravindaram K, *et al.* Polysaccharides from Dioscorea (shan yao) and other phytochemicals enhance antitumor effects induced by DNA vaccine against melanoma[J]. *J Tradit Complement Med*, 2014, 4(1): 42–48
- 14 栗昀, 赖艳妮, 李向阳, 等. 冰香散挥发油黏膜免疫抗流感病毒效果评价[J]. *广州中医药大学学报*, 2016, 33(4): 535–539
- 15 Deng YY, Yi Y, Zhang LF, *et al.* Immunomodulatory activity and partial characterisation of polysaccharides from Momordica charantia[J]. *Molecules*, 2014, 19(9): 13432–13447
- 16 Dong CX, Zhang LJ, Xu R, *et al.* Structural characterization and immunostimulating activity of a levan-type fructan from Curcuma kwangsiensis[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 77: 99–104
- 17 Jiao L, Wan D, Zhang X, *et al.* Characterization and immunostimulating effects on murine peritoneal macrophages of oligosaccharide isolated from Panax ginseng C. A. Meyer[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(3): 490–496
- 18 Feng H, Fan J, Qiu H, *et al.* Chuanminshen violaceum polysaccharides improve the immune responses of foot-and-mouth disease vaccine in mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 78: 405–416
- 19 Pi CC, Chu CL, Lu CY, *et al.* Polysaccharides from Ganoderma formosanum function as a Th1 adjuvant and stimulate cytotoxic T cell response in vivo[J]. *Vaccine*, 2014, 32(3): 401–408
- 20 Zhao X, Sun W, Zhang S, *et al.* The immune adjuvant response of polysaccharides from Atractylodes macrocephalae Koidz in chickens vaccinated against Newcastle disease (ND)[J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 141: 190–196
- 21 Fan Y, Ma X, Hou W, *et al.* The adjuvant activity of ophiopogon polysaccharide liposome against an inactivated porcine parvovirus vaccine in mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 82: 264–272
- 22 Su X, Pei Z, Hu S. Ginsenoside Re as an adjuvant to enhance the immune response to the inactivated rabies virus vaccine in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20(2): 283–289
- 23 Zhang P, Ding R, Jiang S, *et al.* The adjuvant activity of Ganoderma lucidum polysaccharide for Newcastle disease vaccine[J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 65: 431–435
- 24 Honda-Okubo Y, Kolpe A, Li L, *et al.* A single immunization with inactivated H1N1 influenza vaccine formulated with delta inulin adjuvant (Advax) overcomes pregnancy-associated immune suppression and enhances passive neonatal protection[J]. *Vaccine*, 2014, 32(36): 4651–4659

(收稿日期:2017-08-31)

(修回日期:2017-09-14)

(上接第6页)

- 7 Mievile FA, Gudinchier F, Brunelle F, *et al.* Iterative reconstruction methods in two different MDCT scanners: Physical metrics and 4-alternative forced-choice detectability experiments—A phantom approach[J]. *Phys Med*, 2013, 29(1): 99–110
- 8 郑钧正. 坚持不懈追求 CT 低剂量成像目标[J]. *世界医疗器械 (IMD)*, 2015, 21(2): 51–54

- 9 EC, FAO, IAEA, *et al.* Radiation Protection and Safety of Radiation Sources: International Basic Safety Standards (IBSS)[M]. IAEA Safety Standards Series GSR Part 3, Vienna: IAEA, 2014
- 10 郑钧正. 从基因组学到放射组学的启示(专家论坛)[J]. *医学研究杂志*, 2016, 45(2): 1–4

(收稿日期:2018-01-02)

(修回日期:2018-01-10)