

# 太子参参须皂苷的免疫佐剂作用研究

曾 丽<sup>1†</sup>,甘思言<sup>2†</sup>,杜莹莹<sup>1</sup>,乔 石<sup>1</sup>,张炎达<sup>3</sup>,王金溪<sup>2</sup>,黄一帆<sup>2\*</sup>,马玉芳<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中西兽医结合与动物保健福建省高等学校重点实验室,福州 350002;

<sup>2</sup>福建农林大学兽医中药与动物保健重点实验室,福州 350002;<sup>3</sup>福建贝迪药业有限公司,宁德 355399

**摘要:**本实验旨在研究太子参参须皂苷(Radix Pseudostellariae fibrous roots saponins, RPFRS)对免疫模式抗原Ovalbumin(OVA)小鼠的免疫佐剂作用。将60只雌性ICR小鼠随机分成对照空白组(CK),单独免疫OVA组(OVA),OVA+RPFRS低、中、高(50,100,200 mg/kg)剂量组(D、Z、G)。在实验的第1~5天和第16~20天,除CK组和OVA组小鼠灌胃双蒸水之外,其他组分别灌胃对应剂量的RPFRS。第6天和第21天,除CK组0.2 mL/只皮下注射PBS外,其余各组小鼠注射配OVA溶液0.2 mL/只,共免疫2次。第36天采样检测相关指标。结果表明:与OVA组相比,RPFRS组对T细胞和OVA的刺激指数均差异显著( $P < 0.05$ ),D组B细胞刺激指数显著提高( $P < 0.05$ ),D组和G组IL-2、IL-4含量显著升高( $P < 0.05$ ),G组IFN- $\gamma$ 含量显著升高( $P < 0.05$ ),各剂量RPFRS组OVA-IgG和OVA-IgG1含量显著提高( $P < 0.05$ ),D组和G组OVA-IgG2a含量显著提高( $P < 0.05$ ),D组和Z组的OVA-IgG2b含量显著提高( $P < 0.05$ ),RPFRS组IL-2 mRNA、IL-4 mRNA和IFN- $\gamma$  mRNA相对表达量提高( $P < 0.05$ ),G组IL-10 mRNA相对表达量提高( $P < 0.05$ ),RPFRS组CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞数和CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值显著提高( $P < 0.05$ ),对CD4<sup>+</sup>T细胞的提升作用以D、Z组最为明显( $P < 0.05$ )。上述结果表明RPFRS能够增强小鼠免疫功能,提高OVA免疫原性,加强小鼠对OVA免疫应答能力,从而起到一定佐剂作用。

**关键词:**太子参参须皂苷;卵清白蛋白;佐剂;免疫功能

中图分类号:S852.4

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)6-0934-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.6.004

## Study on the immune adjuvant effect of Radix Pseudostellariae fibrous roots saponin

ZENG Li<sup>1†</sup>, GAN Si-yan<sup>2†</sup>, DU Yin-yin<sup>1</sup>, QIAO Shi<sup>1</sup>,  
ZHANG Yan-da<sup>3</sup>, WANG Quan-xi<sup>2</sup>, HUANG Yi-fan<sup>2\*</sup>, MA Yu-fang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>University Key Laboratory for Integrated Chinese Traditional and Western Veterinary Medicine and Animal Healthcare in Fujian Province, Fuzhou 350002, China; <sup>2</sup>Fujian Key Laboratory of Traditional

Chinese Veterinary Medicine and Animal Health, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

<sup>3</sup>Fujian Beidi Co., Ltd., Ningde 355399, China

**Abstract:** To study the adjuvant effect of Radix Pseudostellariae fibrous roots Saponin (RPFRS) on mice immunized with Ovalbumin (OVA). 60 ICR female mice were randomized into control group (CK group), individual immunization OVA group (OVA group), RPFRS low, medium and high dose groups (50, 100, 200 mg/kg) (D, Z, G groups). On day 1st-5th, 16th-20th of the experiment, the other groups were given the corresponding dose of RPFRS except CK and OVA group. On the 6th and 21st day, except for the CK group, 0.2 mL of PBS was injected subcutaneously, and 0.2 mL of OVA solution dissolved in PBS was injected into the other groups, that is, the injection weight of OVA in the other groups was 100  $\mu$ g, twice in total. During the period, each group was free to eat and drink. On the 36th day, related indicators were tested. The results showed that compared with OVA group, the RPFRS groups significantly raised the stimulation index of T cells and OVA ( $P < 0.05$ ). The stimulation index of B cells in D group was significantly increased ( $P < 0.05$ ), the contents of IL-2 and IL-4 in

收稿日期:2021-11-17 接受日期:2022-03-08

基金项目:福建省重大专项专题(2021NZ02908)

† 共同第一作者

\* 通信作者 Tel:86-013705057609; E-mail:myfau850@sohu.com

group D and G were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the contents of IFN- $\gamma$  in group G was significantly increased ( $P < 0.05$ ). The contents of OVA-IgG and OVA-IgG1 in RPFRS groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the contents of OVA-IgG2a in group D and G were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the contents of OVA-IgG2b in group D and Z were significantly increased ( $P < 0.05$ ). The relative expression of IL-2 mRNA, IL-4 mRNA and IFN- $\gamma$  mRNA in RPFRS groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the relative expression of IL-10 mRNA in G group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). The number of CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells and the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> in RPFRS groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the promoting effect on CD4<sup>+</sup> T cells was the most obvious in group D and Z ( $P < 0.05$ ). In summary, RPFRS can enhance the immune function of mice, improve the immunogenicity of OVA and enhance the immune response ability of mice to OVA, thus playing a certain role as an adjuvant.

**Key words:** Radix Pseudostellariae fibrous roots saponins; ovalbumin; adjuvant; immune function

皂苷是一种甾体或三萜配糖类物质,广泛存在于一些植物体内,且随着研究深入,它也被作为一种植物来源佐剂应用于疫苗中<sup>[1]</sup>。研究表明,皂苷口服有一定佐剂作用,如口服藜芦皂苷能增强卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)的免疫效果<sup>[2]</sup>,灌服人参茎叶皂苷能够显著提升被注射口蹄疫疫苗小鼠血清中特异 IgG 及亚类滴度,且促进脾淋巴细胞增殖,上调相关基因的 mRNA 表达,强化应答效果<sup>[3]</sup>。太子参参须皂苷(Radix Pseudostellariae fibrous roots saponins, RPFRS)是从太子参(*Pseudostellaria heterophylla*)参须中提取的活性成分,具有增强机体免疫<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>和抗应激<sup>[6]</sup>等作用。现在太子参以主根入药,根须则弃之不用,造成极大浪费,研究发现太子参参须中总皂苷平均含量是块根中的 1.14 倍<sup>[7]</sup>。课题组前期实验表明,以皂苷为成分之一的太子参参须提取物可增强免疫损伤小鼠的机体免疫,具有显著的调节免疫的作用<sup>[4]</sup>,推测其可能具有增强机体对于抗原的免疫应答潜力。但目前关于太子参参须皂苷协助抗原免疫机体的效果鲜见报道,而常有研究利用 OVA 作为一种模式抗原来验证佐剂效果<sup>[8]</sup>,被 OVA 诱导的模型抗原会产生更高的 IgG 反应,且小鼠脾脏细胞增殖能力、细胞因子 IL-4、IL-10、IL-12 和 IFN- $\gamma$  以及转录因子 GATA-3 和 T-bet 的 mRNA 表达等同样有所提高<sup>[9]</sup>。故本实验通过口服 RPFRS 对 OVA 模式抗原免疫小鼠的免疫佐剂效果,检测其相关免疫学指标,探讨 RPFRS 对模式抗原 OVA 的免疫佐剂作用及可能的机理,为进一步寻找高效、无毒、安全的中药免疫佐剂提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 太子参参须皂苷

福建贝迪药业有限公司惠柘荣县所产太子参参

须,太子参参须皂苷(RPFRS)采取醇提法自行完成提取,经香草醛-冰醋酸法检测可得皂苷浓度为 48.9%。

#### 1.1.2 实验动物

清洁级雌性 ICR 小鼠,  $20 \pm 2$  g, 60 只,福建医科大学实验动物中心购入。

#### 1.1.3 主要试剂

金标级卵清白蛋白(上海酶联生物科技有限公司,批号:RD20C904); RPMI 1640 培养基(Gibco 公司,批号:AC10238685); 胎牛血清(CellMax 公司,批号:HQ202003); 磷酸盐缓冲液(PBS,美国 Hyclone 公司,批号:PB20041309); 红细胞裂解液、刀豆蛋白 A(ConA)、脂多糖(LPS)(美国 Sigma 公司,批号分别为:20191108、512C0310、127M4030V); 四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号分别为:1223G054、20190125); 细胞因子 ELISA 试剂盒,特异性抗体及其亚类 ELISA 试剂盒(上海邦奕生物有限公司,批号为:20201108、20201104、20201101); APC Anti-Mouse CD3e、FITC Anti-Mouse CD4、PE Anti-Mouse CD8a(Tonbo Biosciences 公司,批号分别为:85-17-0031-81、FMF004-1000U、CB4286178)。

#### 1.1.4 主要仪器

V-1200 可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); Infinite M200 Pro 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); 恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司); PCR 仪(美国 BIO-RAD Thermal Cycler); Real-time PCR 仪(QuanStudioTM 1 Real-Time PCR System); ACEA NovoCyteTM 流式细胞仪(美国艾森公司)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 实验动物分组

60 只雌性 ICR 小鼠,适应性饲养 7 天后开始正式实验。随机分成对照空白组(CK)、OVA 免疫对

对照组(OVA)、OVA + RPFRS 低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg, 即 D、Z、G)。在第 1~5 天和第 16~20 天, 除 CK 组和 OVA 组小鼠灌胃双蒸水之外, 其他组分别灌胃对应剂量 RPFRS。第 6 天和第 21 天, 除 CK 组各只小鼠腹股沟皮下注射无菌 PBS 0.2 mL 外, 其余各组各只小鼠腹股沟皮下注射 OVA 溶液 0.2 mL, 即其余各组每只小鼠 OVA 注射质量为 100  $\mu\text{g}$ 。饲养期间各组采食、饮水自由。第 36 天检测各项指标, 小鼠摘眼球采血, 颈椎脱臼法处死, 其中每组各取 4 只进行脾淋巴细胞增殖测定及脾脏 T 淋巴细胞亚群分析, 剩余的细胞悬液进行脾细胞因子及转录因子 mRNA 相对表达量检测; 4 只进行脾脏自然杀伤细胞(NK)活性测定。

### 1.2.2 实验小鼠脾 T、B 淋巴细胞体外转化率测定

#### 1.2.2.1 脾淋巴细胞悬液制备

脾淋巴细胞的制备流程参考文献<sup>[10]</sup>, 无菌取脾, 将脾脏置于研钵中研磨, 加入 3.75 mL PBS 缓冲液后混匀, 过滤, 各组清楚标记。1 500 r/min 离心 5 min 后弃上清, 加入 2 mL 红细胞裂解液, 轻轻吹打混匀, PBS 液洗涤, 相同速度时间离心后, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液 2 mL, 涡旋均匀, 台盼兰法计数活细胞  $\geq 95\%$ , 用 RPMI 1640 完全培养液调到所需浓度。

#### 1.2.2.2 实验小鼠脾淋巴细胞增殖测定

用 96 孔板, 除试剂空白孔(只加培养液, 无细胞)外, 在每个孔里添加  $5 \times 10^6$  个/mL 脾细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ , 空白组孔只加 100  $\mu\text{L}$  RPMI 1640 完全培养液, 实验孔分别加入 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ConA 稀释液、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 稀释液、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 OVA 稀释液各 100  $\mu\text{L}$ , 各重复 3 孔。于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温, 5%  $\text{CO}_2$  培育箱中 44 h, 各孔再分别添加 5 mg/mL 的 MTT 20  $\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  酸性 DMSO, 低速遮光震荡 10 min, 酶标仪上波长选 492 nm, 试剂空白孔调零后测定其余各孔的吸光度。参照文献<sup>[11]</sup>公式计算:

刺激指数 SI = 实验孔 OD 值/空白孔 OD 值

#### 1.2.3 实验小鼠脾脏中 NK 细胞杀伤活性测定

于 96 孔板中加入 100  $\mu\text{L}$  浓度为  $1 \times 10^7$  个/mL 的脾细胞悬液作为效应细胞, 另再取浓度为  $2 \times 10^5$  个/mL YAC-1 肿瘤细胞悬液(效靶比 50:1) 100  $\mu\text{L}$  加入上述含脾细胞的孔中, 作为实验孔; 另做效应细胞对照孔、靶细胞对照孔和空白对照孔。加液完毕后, 于微量震荡仪上震荡片刻, 置于 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$

培育箱中 4 h, 各孔加入 20  $\mu\text{L}$  5 mg/mL 的 MTT, 继续培养 4 h; 2 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 各孔再加入 150  $\mu\text{L}$  酸性 DMSO 溶液(内含 4% 1N HCl), 避光, 于细胞板振荡器上振荡, 待甲瓚结晶完全溶解后, 在酶标仪 492 nm 处测 OD 值, 根据公式算出 NK 细胞杀伤活性:

$$\text{NK 细胞活性} = \frac{[\text{靶细胞对照 OD 值} - (\text{实验组 OD 值} - \text{效应细胞对照组 OD 值})]}{\text{靶细胞对照 OD 值}} \times 100\%$$

#### 1.2.4 实验小鼠血清细胞因子及特异性抗体及其亚类含量检测

小鼠摘眼球取血后, 室温静置 2 h, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集血清, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。用 ELISA 法检测血清细胞因子(IL-2、IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$ )以及特异性抗体 OVA-sIgG 及其亚类(IgG1、IgG2a、IgG2b)含量, 具体操作方法见试剂盒说明书。

#### 1.2.5 实验小鼠脾细胞因子及转录因子的表达检测

采用 qRT-PCR 检测小鼠脾脏细胞因子(IL-2、IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$ )及转录因子(T-bet、GATA-3) mRNA 相对表达量, 具体操作及引物序列按照参考文献进行<sup>[10,11]</sup>。计算公式参照文献<sup>[12]</sup>: 相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ,  $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{实验组目的基因}} - \text{Ct}_{\text{实验组管家基因}}) - (\text{Ct}_{\text{对照组目的基因}} - \text{Ct}_{\text{对照组管家基因}})$ 。引物序列表 1。

表 1 基因及引物序列

Table 1 Gene and primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5'→3')
$\beta$ -actin	F: GAGACCTTCAACACCCAGCC R: AATGTCACGCAGGATTTCCC
IL-2	F: TACAGCGGAAGCACAGCAG R: CGCAGAGGTCCAAGTTCATC
IL-4	F: AACGAGGTCACAGGAGAAGG R: TGGAAGCCCTACAGACAAGC
IL-10	F: AATAACTGCACCCACTTCCCA R: GGTAATAACTGGATCATTTCCG
IFN- $\gamma$	F: CGCTACACACTGCATCTTGG R: TTCCACATCTATGCCACTTGAG
T-bet	F: CTGTTCCAGCCGTTTCTAC R: CCGCTTCATAACTGTGTTCC
GATA-3	F: TTATCAAGCCCAAGCGAAG R: CATTAGCGTTCCTCTCCAG

### 1.2.6 实验小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群分析

采用流式细胞术检测第 2 次免疫后两周的小鼠脾脏中的 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的数量及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的比例。将 CD3、CD4、CD8 三个抗体用灭菌中性 PBS 稀释至 0.05 μg/μL 备用。而后各实验组细胞中分别加入稀释后的 CD3、CD4 和 CD8 抗体各 10 μL, 混匀; 分别设单克隆抗体单标管各 1 支(共 3 支)、1 支空白管(不加染料)。4 ℃ 下孵育 15 min(避光); 各管分别加入 1 mL 红细胞裂解液(1 ×), 混匀静置 15 min(避光), 1 500 r/min 离心 5 min 弃上清; 分别各用 1 mL pH 值呈中性的 PBS 洗

涤沉淀两遍; 最后用 300 μL 的 PBS 将沉淀重悬后置于冰上, 立刻上流式细胞仪机器检测。

### 1.3 数据统计

所有数据均在 SPSS 24.0 软件上应用单因素方差分析(one-way ANOVA), LSD 法多重比较, 显著差异用  $P < 0.05$  表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 RPFERS 对实验小鼠淋巴细胞增殖的影响

由表 2 可知, 与 OVA 组相比, RPFERS 各剂量组对 T 细胞和 OVA 的 SI 均差异显著( $P < 0.05$ ), D 组显著提高 B 细胞 SI( $P < 0.05$ )。

表 2 RPFERS 对实验小鼠脾淋巴细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 2 Effect of RPFERS on spleen lymphocytes proliferation in experimental mice( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别 Group	T 细胞刺激指数 T cell stimulation index	B 细胞刺激指数 B cell stimulation index	OVA 刺激指数 OVA stimulation index
CK	2.830 2 ± 0.103 9 <sup>b</sup>	1.079 3 ± 0.043 9 <sup>c</sup>	1.158 6 ± 0.057 1 <sup>d</sup>
OVA	2.789 0 ± 0.046 8 <sup>b</sup>	1.099 1 ± 0.011 8 <sup>bc</sup>	1.239 8 ± 0.028 9 <sup>c</sup>
D	3.164 2 ± 0.040 9 <sup>a</sup>	1.162 8 ± 0.031 8 <sup>a</sup>	1.454 9 ± 0.013 1 <sup>ab</sup>
Z	3.114 3 ± 0.109 2 <sup>a</sup>	1.159 6 ± 0.046 2 <sup>ab</sup>	1.487 8 ± 0.028 5 <sup>a</sup>
G	3.112 7 ± 0.038 5 <sup>a</sup>	1.152 6 ± 0.020 0 <sup>ab</sup>	1.397 2 ± 0.081 2 <sup>b</sup>

注: 与 OVA 组相比, 同一列中小写字母肩标不同者表示差异显著( $P < 0.05$ )。下同。

Note: Compared with OVA group, different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). The same below.

### 2.2 RPFERS 对实验小鼠 NK 细胞杀伤活性的影响

由表 3 可知, RPFERS 各剂量组与 OVA 组的 NK 细胞杀伤活性差异不显著( $P > 0.05$ ), 但 RPFERS 各剂量组均对于 NK 细胞的杀伤力有一定程度的提升, 且以 D 组效果最好。

表 3 RPFERS 对实验小鼠 NK 细胞杀伤活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 3 Effect of RPFERS on killing activity of NK cell in experimental mice( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别 Group	NK 细胞杀伤活性 NK cell killing activity (%)
CK	47.64 ± 1.29
OVA	47.01 ± 6.78
D	54.89 ± 3.08
Z	50.28 ± 3.43
G	48.05 ± 5.26

### 2.3 RPFERS 对实验小鼠血清中细胞因子含量的影响

由表 4 可知, 与 OVA 组相比, D 组和 G 组 IL-2、IL-4 含量升高( $P < 0.05$ ), G 组 IFN-γ 含量升高( $P$

$< 0.05$ )。

### 2.4 RPFERS 对实验小鼠血清中特异性抗体及其亚类含量的影响

由表 5 可知, 与 OVA 组相比, 各剂量 RPFERS 组的 OVA-IgG 和 OVA-IgG1 含量有显著提高( $P < 0.05$ ), D 组和 G 组 OVA-IgG2a 含量显著提高( $P < 0.05$ ), D 组和 Z 组的 OVA-IgG2b 含量显著提高( $P < 0.05$ )。

### 2.5 RPFERS 对实验小鼠脾脏细胞因子与转录因子表达情况的影响

RPFERS 对实验小鼠脾淋巴细胞因子 mRNA 表达的影响如图 1 所示: 与 OVA 组相比, RPFERS 各剂量组 IL-2 mRNA、IL-4 mRNA 和 IFN-γ mRNA 相对表达量增高( $P < 0.05$ ), G 组 IL-10 mRNA 相对表达量升高( $P < 0.05$ ) (见图 1A), RPFERS 各剂量组对 T-bet、GATA 相对表达量和 T-bet/GATA-3 比值的提升也均不显著( $P > 0.05$ ) (见图 1B、1C)。

### 2.6 RPFERS 对实验小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群影响

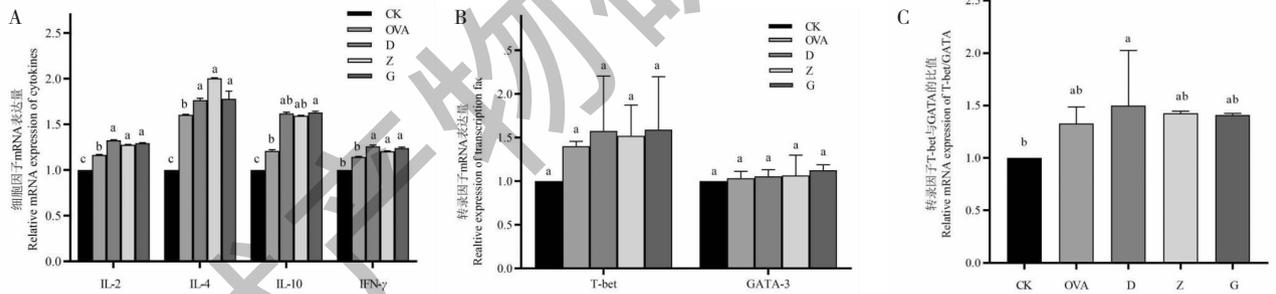
RPFERS 对各实验组小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的影响见图 2。与 CK 组相比, RPFERS 组的 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞数均显著提升( $P < 0.05$ ), OVA

表4 RPFERS对实验小鼠血清中IL-2、IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$ 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )Table 4 Effect of RPFERS on contents of cytokines IL-2、IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$  in serum of experimental mice( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别 Group	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IFN- $\gamma$ (pg/mL)
CK	156.11 $\pm$ 3.12 <sup>c</sup>	219.88 $\pm$ 12.19 <sup>b</sup>	260.17 $\pm$ 2.53 <sup>b</sup>	521.67 $\pm$ 36.34 <sup>c</sup>
OVA	156.98 $\pm$ 21.12 <sup>c</sup>	223.81 $\pm$ 8.49 <sup>b</sup>	265.00 $\pm$ 18.66 <sup>ab</sup>	537.57 $\pm$ 11.54 <sup>b</sup>
D	188.64 $\pm$ 8.05 <sup>a</sup>	249.82 $\pm$ 3.28 <sup>a</sup>	297.50 $\pm$ 34.52 <sup>a</sup>	591.82 $\pm$ 19.33 <sup>ab</sup>
Z	161.85 $\pm$ 12.87 <sup>bc</sup>	228.33 $\pm$ 9.57 <sup>b</sup>	279.75 $\pm$ 11.39 <sup>ab</sup>	578.33 $\pm$ 34.79 <sup>abc</sup>
G	183.46 $\pm$ 12.88 <sup>ab</sup>	253.81 $\pm$ 17.79 <sup>a</sup>	281.83 $\pm$ 9.61 <sup>ab</sup>	600.45 $\pm$ 48.68 <sup>a</sup>

表5 RPFERS对实验小鼠血清中特异性抗体IgG及亚类IgG1、IgG2a和IgG2b含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )Table 5 Effect of RPFERS on the contents of specific antibody IgG and its subclasses IgG1, IgG2a and IgG2b in the serum of experimental mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别 Group	OVA-IgG	OVA-IgG1	OVA-IgG2a	OVA-IgG2b
CK	0.106 1 $\pm$ 0.006 8 <sup>c</sup>	0.107 0 $\pm$ 0.008 0 <sup>b</sup>	0.123 3 $\pm$ 0.008 5 <sup>c</sup>	0.111 7 $\pm$ 0.002 9 <sup>c</sup>
OVA	0.702 5 $\pm$ 0.010 0 <sup>b</sup>	0.826 0 $\pm$ 0.024 7 <sup>b</sup>	0.461 1 $\pm$ 0.017 2 <sup>b</sup>	0.615 7 $\pm$ 0.023 0 <sup>b</sup>
D	0.903 9 $\pm$ 0.042 3 <sup>a</sup>	0.934 1 $\pm$ 0.015 8 <sup>a</sup>	0.512 4 $\pm$ 0.026 0 <sup>a</sup>	0.665 7 $\pm$ 0.004 4 <sup>a</sup>
Z	0.800 2 $\pm$ 0.062 7 <sup>a</sup>	0.898 2 $\pm$ 0.054 9 <sup>a</sup>	0.498 8 $\pm$ 0.020 4 <sup>ab</sup>	0.665 5 $\pm$ 0.010 3 <sup>a</sup>
G	0.866 5 $\pm$ 0.019 4 <sup>a</sup>	0.897 0 $\pm$ 0.036 1 <sup>a</sup>	0.504 4 $\pm$ 0.026 7 <sup>a</sup>	0.640 9 $\pm$ 0.041 5 <sup>ab</sup>

图1 RPFERS对实验小鼠细胞因子和转录因子mRNA表达量的影响( $\bar{x} \pm s, n=4$ )Fig. 1 Effect of RPFERS on mRNA expression of cytokines and transcription factors in splenic lymphocyte of experimental mice( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

注:与OVA组相比,不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ );相同字母或无字母标注表示差异不显著( $P > 0.05$ )。下同。Note: Compared with OVA group, different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ); the same letter or no letter mark indicates no significant difference ( $P > 0.05$ ). The same below.

组的CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞数量显著降低( $P < 0.05$ ),D、G组及OVA组CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值显著提高( $P < 0.05$ );与OVA组相比,RPFERS组的CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞数和CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值显著提高( $P < 0.05$ ),对CD4<sup>+</sup>T细胞的提升作用以D、Z组最为明显( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

T、B细胞能识别抗原,启动机体免疫,激活细胞增殖<sup>[13]</sup>,而是否能诱导有效T、B淋巴细胞免疫反应的能力则可以通过刺激淋巴细胞增殖反应来显示<sup>[14]</sup>。人参茎叶皂苷能增强口蹄疫疫苗的效价,在ConA和LPS分别刺激作用下淋巴细胞的增殖<sup>[15]</sup>;

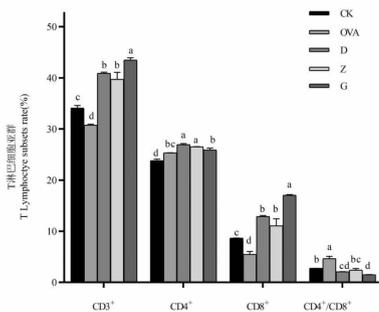


图2 RPFRS对实验小鼠脾脏T淋巴细胞亚群的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 2 Effect of RPFRS on spleen T-cell subpopulation in experimental mice ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

三七根人参皂苷可显著提升 ConA、LPS 和 OVA 各自诱导的被 OVA 免疫过的小鼠脾细胞增殖效果<sup>[16]</sup>。本实验结果显示,Z 组能够协同 ConA 促进小鼠脾淋巴细胞增殖,而 Z、G 组能更明显地协同 LPS 以及 OVA 显著促进小鼠脾细胞的增殖,说明 RPFRS 能够通过提升脾细胞增殖来升高体液、细胞免疫,对免疫 OVA 小鼠 T、B 细胞活力都有提高作用。

NK 细胞具有天然的杀伤功能,机体固有免疫的激活能促使 NK 细胞的分泌,在自身免疫疾病当中起到至关重要的作用。Li 等<sup>[17]</sup>发现人参皂苷 Rb1 能降低由于达沙替尼抑制的 NK 细胞杀伤作用。本实验结果表明,RPFRS 组都能一定程度提高 NK 细胞活性,而其中低剂量 RPFRS 更为有效,使得 YAC-1 的被杀伤率更高,证明 RPFRS 能够提升免疫 OVA 小鼠机体的细胞免疫过程,增强小鼠非特异性免疫的功能。

Th 细胞包括 Th1 细胞(产生 IFN- $\gamma$ 、IL-2 等)和 Th2 细胞(产生 IL-4、IL-6、IL-10 等),Th1 可激活促炎反应,促进巨噬细胞活化、CTL 细胞增殖;Th2 促进 B 细胞的活化、增殖以及抗体的产生,Th1 和 Th2 的平衡调节着机体的免疫反应<sup>[17]</sup>。本实验结果表明,RPFRS 组 IL-2、IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$  细胞因子含量升高,显示 RPFRS 能促进 Th2 型且也能促进 Th1 型免疫,提高细胞因子分泌程度,进而促进机体免疫。由此可知,口服 RPFRS 对于上述两种类型免疫都有促进作用,这可使其在临床应用方面有更广的发展空间。

机体抗体亚类的产生受不同细胞因子的影响,Th1 型细胞因子促进 B 细胞产生 IgG2a,而 Th2 促进机体产生 IgG1<sup>[18]</sup>。Sun 等<sup>[19]</sup>通过对原人参二醇和三醇皂苷联合 OVA 免疫小鼠后发现,二者都能提高免疫小鼠的 OVA 特异性抗体 IgG。合欢皮总皂苷

AJS75 组分也被探究发现,它显著提高 OVA 的免疫效价,激活小鼠 Th1/Th2 应答<sup>[20]</sup>。本实验结果表明,各剂量 RPFRS 组比 OVA 组更能提升 OVA 特异性 IgG 抗体及其亚类含量,说明 RPFRS 能够促进 Th1 及 Th2 型免疫,刺激机体分泌特异性抗体,这与上述文献中的结果保持一致。

T-bet 和 GATA-3 与 Th1/Th2 的分化密切相关,二者可通过调节细胞因子的分泌及 mRNA 的表达等进而影响 Th1/Th2 之间的动态平衡<sup>[21]</sup>。Su<sup>[22]</sup>的研究表明,人参皂苷 Rg1 和 Re 能通过提升 IFN- $\gamma$  等相关细胞因子的 mRNA 表达,来提高由 OVA 引起的小鼠免疫力。Wang 等<sup>[23]</sup>在小鼠身上进行的实验表明,人参茎叶总皂苷与硒联合可通过上调 T-bet/GATA-3 mRNA 的表达,从而对伪狂犬病减毒疫苗的免疫应答呈佐剂作用。本实验结果表明,中剂量 RPFRS 能显著提高 IL-4 mRNA 的表达,高剂量 RPFRS 显著促进 IL-10 mRNA 的表达,且 RPFRS 各组均能一定程度提升 T-bet、GATA-3 表达及 T-bet/GATA-3 之比,说明 RPFRS 既能够通过促进有关细胞因子及转录因子 mRNA 的表达来促进 Th1/Th2 反应的产生,从而提升机体的细胞免疫作用,加强机体对 OVA 的应答。

T 淋巴细胞亚群情况展示了机体整体的细胞免疫状态,CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞的数量以及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的比例平衡可显示机体免疫状态<sup>[24,25]</sup>,其中 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞主要由细胞免疫介导<sup>[26]</sup>。Qi 等<sup>[27]</sup>发现人参皂苷 Rh2 及其主要代谢产物 R-PHQ 和 S-PHQ 可提高环磷酰胺诱导的免疫功能低下小鼠的免疫应答:通过阻止免疫器官萎缩,促进脾细胞增殖,恢复 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比例。本实验结果表明,相对 OVA 组,RPFRS 各组均能显著提升 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞数及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值,D、Z 组能明显提高 CD4<sup>+</sup> T 细胞数,说明 RPFRS 具有平衡机体,提升 T 细胞免疫,加大免疫应答的作用。

通过以上指标测定的结果显示,RPFRS 能提升 OVA 免疫后的小鼠的体液、细胞免疫应答,比 OVA 免疫对照的小鼠更能够持久地让机体产生应答和提升小鼠免疫功能,证明 RPFRS 具有作为免疫佐剂的良好潜力,实验中不同剂量太子参参须皂苷作用时,三种剂量在某些指标上各有优势,因此需对最优浓度做进一步筛选,同时,太子参参须皂苷具体有效成分及作用机制尚未完全阐明,有待进一步研究。

## 参考文献

- Highton AJ, Kojarunchitt T, Girardin A, et al. Chitosan hydrogel vaccine generates protective CD8<sup>+</sup> T cell memory a-

- against mouse melanoma [J]. *Immunol Cell Biol*, 2015, 93: 634-640.
- 2 Katayama S, Mine Y. *Quillaja* saponin can modulate ovalbumin-induced IgE allergic responses through regulation of Th1/Th2 balance in a murine model [J]. *J Agr Food Chem*, 2006, 54: 3271-3276.
  - 3 Li RJ. Enhancement of the immune response to FMD vaccine and gut mucosal immunity by oral administration of satragalus polysaccharides and ginseng stem-leaf saponins [D]. Hangzhou: Zhejiang Univesity (浙江大学), 2017.
  - 4 Yi WM, Chen SH, Min SM, et al. Study on the immunoprotective effects of *Radix Pseudostellariae* fibrous root extraction in immunosuppressed mice [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32: 837-844.
  - 5 Xiong HJ, Pang J, Xie ZX. Antioxidant activities of extracts from *Radix Pseudostellariae* [J]. *Acta Sci Nat Univ Nankai* (南开大学学报: 自科版), 2009, 42(6): 37-41.
  - 6 Rui G, Wei W, Yuliang W, et al. Protective effects of *Radix Pseudostellariae* extract against retinal laser injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33: 1643-1653.
  - 7 Ding CH, Lin PL, Zeng JW, et al. Determination of polysaccharides and total saponins in root tuber and fibrous root of *Pseudostllaria heterophylla* [J]. *J Fujian Tradit Chin Med* (福建中医药大学学报), 2012, 22(3): 40-43.
  - 8 Liu C, Luo J, Xue RY, et al. The mucosal adjuvant effect of plant polysaccharides for induction of protective immunity against *Helicobacter pylori* infection [J]. *Vaccine*, 2019, 37: 1053-1061.
  - 9 Su F, Yuan L, Zhang L, et al. Ginsenosides Rg1 and Re act as adjuvant via TLR4 signaling pathway [J]. *Vaccine*, 2012, 30: 4106-4112.
  - 10 Zheng NZ, Zheng XX, Li P, et al. Effects of polysaccharides from *Hericium erinaceus* on murine splenic lymphocyte proliferation and the cell cycle *in vitro* [J]. *Chin Vet Sci* (中国兽医科学), 2015, 45: 837-842.
  - 11 Tan XZ, Chen SH, Chen JY, et al. Effects of *Radix pseudostellariae* stem and leaf polysaccharide on contents of cytokines and mRNA expression of cytokines and transcription factors in spleen lymphocytes of mice [J]. *Chin Vet Sci* (中国兽医科学), 2018, 48(1): 124-129.
  - 12 Zhang JL, Qiu FA, Dong X, et al. Effects of *Hericium erinaceus* polysaccharide on ileal morphology and permeability of pidlets under oxidative stress [J]. *Acta Vet Zootech Sin* (畜牧兽医学报), 2018, 49(1): 203-210.
  - 13 Michael JD, Ronald DS. *Veterinary Immunology: Principles and Practice* (Second Edition) [M]. CRC Press, 2014.
  - 14 Xu HS, Wu YW, Xu SF, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the roots of *Actinidia eriantha* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 125: 310-317.
  - 15 Ni J, Bi S, Xu W, et al. Improved immune response to an attenuated pseudorabies virus vaccine by ginseng stem-leaf saponins (GSLs) in combination with thimerosal (TS) [J]. *Antiviral Res*, 2016, 132: 92-98.
  - 16 Yang Z, Chen A, Sun H, et al. Ginsenoside Rd elicits Th1 and Th2 immune responses to ovalbumin in mice [J]. *Vaccine*, 2007, 25(1): 161-169.
  - 17 Li HY, Chen HX, Wang L. Ginsenoside Rb<sub>1</sub> antagonist dasatinib-induced inhibition on NK cells cytotoxicity to ovarian cancer cells [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2014, 31(3): 293-297.
  - 18 Ming F, Yang J, Chu P, et al. Immunization of aged pigs with attenuated pseudorabies virus vaccine combined with CpG oligodeoxynucleotide restores defective Th1 immune responses [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65536.
  - 19 Sun J, Hu S, Song X. Adjuvant effects of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins from ginseng roots on the immune responses to ovalbumin in mice [J]. *Vaccine*, 2007, 25: 1114-1120.
  - 20 Sun H, He S, Shi M. Adjuvant-active fraction from *Albizia julibrissin* saponins improves immune responses by inducing cytokine and chemokine at the site of injection [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 22: 346-355.
  - 21 Ellison MA, Gearheart CM, Porter CC, et al. IFN- $\gamma$  alters the expression of diverse immunity related genes in a cell culture model designed to represent maturing neutrophils [J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0185956.
  - 22 Su F. Ginsenosides Rg1 and Re modulate immune responses and protect against endotoxin via TLR4 signaling pathway [D]. Hangzhou: Zhejiang Univesity (浙江大学), 2015.
  - 23 Wang Y, Cui X, Yuan L, et al. A solution with ginseng saponins and selenium as vaccine diluent to increase Th1/Th2 immune responses in mice [J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 2714257.
  - 24 Klingensmith NJ, Fay KT, Lyons JD, et al. Chronic alcohol ingestion worsens survival and alters gut epithelial apoptosis and CD8<sup>+</sup> T cell function after pseudomonas aeruginosa pneumonia-induced sepsis [J]. *Shock*, 2019, 51: 453-463.
  - 25 Sjaastad FV, Kucaba TA, Dileepan T, et al. Polymicrobial sepsis impairs antigen-specific memory CD4 T cell-mediated immunity [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1786.
  - 26 Zhang WJ, Wang JP, Su BW, et al. Cimetidine augments Th1/Th2 dual polarized immune responses to recombinant HBV antigens [J]. *Vaccine*, 2011, 29: 4862-4868.
  - 27 Qi Z, Chen L, Li Z, et al. Immunomodulatory effects of (24R)-pseudo-ginsenoside HQ and (24S)-pseudo-ginsenoside HQ on cyclophosphamide-induced immunosuppression and their anti-tumor effects study [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): 836.