

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.24.014

玉屏风散和芪寄方对流感病毒裂解疫苗注射小鼠免疫反应的影响

尹怡铭, 杨颖, 刘苗苗, 郑冰清, 赵方舒, 倪雯婷, 李保宏, 万新焕[✉], 田景振

山东中医药大学药学院, 山东省济南市大学路4655号, 250355

[摘要] **目的** 探讨玉屏风散和芪寄方对流感病毒裂解疫苗保护效力的影响。**方法** 40只Balb/c小鼠随机分为空白组、免疫对照组、铝佐剂组、玉屏风散组、芪寄方组, 每组8只。玉屏风散组小鼠给予玉屏风散0.25 g/10 g灌胃, 芪寄方组小鼠给予芪寄方0.25 g/10 g灌胃, 其余各组小鼠给予纯净水0.25 ml灌胃。各组均每日灌胃1次, 连续10天。给药4天, 空白组小鼠经腿部肌肉注射0.1 ml PBS, 其余各组小鼠经腿部肌肉注射季节性流感病毒裂解疫苗(IVV) 0.75 μ g进行初次免疫, 其中铝佐剂组IVV含100 μ g氢氧化铝。在初次免疫2周后各组以同样方法加强免疫1次。每隔7天称取小鼠体质量1次, 观察小鼠一般情况, 至给药28天。采用ELISA法检测初次免疫后7、14、21、28天血清特异性抗体IgG水平, 初次免疫后28天检测血清特异性抗体IgG亚型IgG₁、IgG_{2a}的水平; 留取脾脏称重, 计算脾脏指数, 并采用流式细胞术检测脾脏记忆性B细胞比例。**结果** 各组间小鼠同时间体质量差异无统计学意义($P>0.05$)。与本组给药前及给药7天时比较, 芪寄方组小鼠给药14天时体质量明显下降($P<0.05$)。与本组给药14天时比较, 玉屏风散组和芪寄方组给药28天时体质量明显上升($P<0.05$)。各组小鼠毛发柔顺光滑, 一般活动正常, 排泄物质地无明显异常。与空白组和免疫对照组相比, 芪寄方组小鼠脾脏指数、记忆性B细胞比例明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与空白组比较, 各组小鼠血清IgG₁和IgG_{2a}水平, 各时间点IgG水平均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与免疫对照组相比, 玉屏风散组初次免疫后21、28天, 芪寄方组初次免疫后28天IgG水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与铝佐剂组相比, 玉屏风散组初次免疫后21天IgG水平显著升高($P<0.05$)。与免疫对照组相比, 玉屏风散组和芪寄方组IgG₁水平, 铝佐剂组IgG_{2a}水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与铝佐剂组相比, 玉屏风散组和芪寄方组IgG₁水平显著升高($P<0.05$)。玉屏风散组与芪寄方组IgG₁、IgG_{2a}水平, 各时间点IgG水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 玉屏风散和芪寄方可以有效提高流感裂解疫苗免疫水平, 促进Th2型免疫应答, 并主要提高体液免疫应答水平。

[关键词] 流感病毒裂解疫苗; 玉屏风散; 芪寄方; 免疫佐剂; 免疫反应

流感病毒感染是人类的一种主要传染病, 尤其对免疫力较弱的老年人和儿童会引起肺炎等严重的疾病。流感病毒具有高传染性和变异性, 流行时会导致较高的发病率和致死率^[1-3]。目前, 接种疫苗是预防流感大暴发最直接有效的办法^[4]。佐剂是指与抗原一同注入机体或先于抗原使用, 能特异性地增强机体免疫应答的物质。临床上应用的流感疫苗

佐剂有铝佐剂、油乳佐剂MF59、油乳佐剂AS03等^[5]。尽管疫苗佐剂的相关研究发展很快, 但大多存在免疫效果不理想或毒副作用大等缺陷^[6-7]。目前疫苗佐剂的给药方式基本上为注射给药, 存在给药部位炎症、肉芽肿、局部红斑等不良反应^[8]。

中药具有较好的调节免疫作用, 且安全性高, 毒副作用小, 具有作为新型流感疫苗佐剂的应用前景^[9]。目前, 中药作为疫苗佐剂的研究主要集中在单体成分如黄芪多糖^[10]、淫羊藿多糖^[11]等, 和中药复方^[9]两方面, 且其均表现出较好的免疫佐剂活性。玉屏风散是由黄芪、白术、防风组成的中药

基金项目: 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(2020CXGC010505, 2020CXGC010511); 山东省自然科学基金(ZR2021QH232)

[✉] 通讯作者: wanxinhuan20073212@163.com

复方, 具有益气、固表、止汗的功效。研究表明, 玉屏风散参与体液免疫、固有免疫及细胞免疫等多个免疫系统环节并且可对机体免疫系统功能进行调节^[12]。芪寄方为自拟方, 由补益效果较好的药物黄芪、桑寄生、女贞子、淫羊藿组成。本试验观察玉屏风散和芪寄方对四价流感裂解疫苗免疫反应的影响, 为提高四价流感裂解疫苗的免疫效果提供实验依据。本研究经山东中医药大学实验动物福利伦理审查委员会批准(伦理号: SDUTCM20210310010)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雌性 Balb/c 小鼠 40 只, 6~8 周龄, 体重(20±2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK(京) 2021-0006。饲养于山东中医药大学 SPF 级实验室, 12 h 光照和黑暗循环, 温度 22~25 °C, 相对湿度 45%~55%。

1.2 药物

玉屏风散组成参照《医方类聚》^[13]: 黄芪 60 g, 白术 20 g, 防风 20 g。称取生药, 加处方 10 倍重量的水, 浸泡 30 min, 用加热微沸冷凝回流提取 1 h 滤过; 残渣再用 8 倍处方重量水同样提取 1 h, 滤过。合并两次煎煮液, 浓缩为相当于含生药 2 g/ml 的药液, -4 °C 保存备用。芪寄方组成: 黄芪 20 g, 桑寄生 12 g, 女贞子 9 g, 淫羊藿 20 g。制备方法同玉屏风散, 最终浓缩为相当于含生药 2 g/ml 的药液, -4 °C 保存备用。

季节性流感病毒裂解疫苗 (IVV, 血凝素含量 30 µg/ml, 批号: 202009B058, 华兰生物疫苗股份有限公司)。含铝佐剂流感疫苗制备^[14]: 取 0.5 ml IVV, 用无菌 PBS 稀释, 稀释后 IVV 浓度为原来的 1/3; 取 0.1 ml 商品铝佐剂 (批号: WB317588, Thermo Fisher 公司, 氢氧化铝含量 40 mg/ml), 用无菌 PBS 稀释 (氢氧化铝含量 2 mg/ml); 将上述疫苗和铝佐剂 1:1 混合, 4 °C 垂直混悬吸附过夜即得。

1.3 主要试剂及仪器

辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠的 IgG (批号: GR3335361-12)、IgG₁ (批号: GR3365481-4)、IgG_{2a} (批号: GR3362355-4), Abcam 公司; N-四甲基联苯胺 (TMB) 显色液 (批号: 20210416)、Tris-NH₄Cl 缓冲液 (红细胞裂解液) (批号: 20210301), Solarbio 公司; 流式抗体 FITC 抗小鼠

CD3 (批号: B321979)、PerCP/Cyanine5.5 抗小鼠 CD19 (批号: B313801)、APC/Fire™ 750 抗小鼠/大鼠/人 CD27 (批号: B302856), Biolegend 公司; 7-AAD (批号: 2286874), Invitrogen 公司; PBS 缓冲液 (批号: 22059494), Biosharp 公司; 牛血清白蛋白 (BSA, 批号: EZ7890C310)、吐温 20 (批号: EZ6789D143), BioFroxx 公司; 新生牛血清 (批号: 20120402), 四季青血清公司。

高速冷冻离心机 (型号: Sorvall ST 8R), Thermo Fisher 公司; 酶标仪 (型号: Spectra Max M5), Molecular Device 公司; 流式细胞仪 (型号: BD Aria III), 美国 BD 公司。

1.4 分组及给药

将 40 只 Balb/c 小鼠采用随机数字表法分为空白组、免疫对照组、铝佐剂组、玉屏风散组、芪寄方组, 每组 8 只。玉屏风散组小鼠给予玉屏风散 0.25 g/10 g (相当于 60 kg 成人每日用量的 3 倍) 灌胃, 芪寄方组给予芪寄方 0.25 g/10 g (相当于 60 kg 成人每日用量的 3 倍) 灌胃, 其余各组给予纯净水 0.25 ml 灌胃。各组均每日灌胃 1 次, 连续 10 天。给药第 4 天, 空白组小鼠经腿部肌肉注射 0.1 ml PBS, 其余各组经腿部肌肉注射 IVV 0.75 µg 进行初次免疫, 其中铝佐剂组 IVV 含 100 µg 氢氧化铝。在初次免疫 2 周后各组以初次免疫的相同方法加强免疫 1 次。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 小鼠一般情况 给药前一天称取小鼠体重 1 次。此后每周第一天在相同时间点称取小鼠体重 1 次, 并观察小鼠的生长状态, 包括小鼠的毛发、活动度及排泄物质地情况, 至给药 28 天。

1.5.2 血清抗流感病毒抗体及亚类 各组小鼠于初次免疫后 7、14、21 天尾尖采血, 第 28 天摘眼球取血, 室温下静置 2 h, 在 4 °C、9000 r/min 离心 (离心半径 14 cm) 20 min, 收集血清。各时间点血清用于检测抗流感病毒特异性抗体 IgG 水平, 第 28 天的血清进行 IgG 亚型 IgG₁、IgG_{2a} 检测。

血清中抗流感病毒 IgG 及其亚型 IgG₁、IgG_{2a} 特异性抗体采用间接 ELISA 技术检测: 用 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH=9.6) 稀释流感裂解疫苗 100 倍 (稀释后为 0.3 µg/ml), 将稀释后的溶液包被 96 孔酶标板, 4 °C 过夜。PBST 洗涤后用封闭液 (含 0.5% BSA 的 PBST 溶液) 37 °C 封闭 1 h。PBST 洗涤 3 次, 将稀释后的血清 [根据酶标仪的吸光度测定范围 (OD 值 0~2.5)] 将不同时间点的血清相应调

整为最适稀释倍数, 初次免疫后第 7、14、21、28 天抗体稀释倍数分别为 100、800、1500、2000 倍] 加至 96 孔酶标板, 37 °C 孵育 1 h。PBST 洗涤 6 次, 加入 HRP 标记的 IgG/IgG₁/IgG_{2a}, 37 °C 孵育 1 h。PBST 洗涤 6 次, 加入显色液室温避光显色 20 min。终止反应后用酶标仪在 OD_{450/655 nm} 的条件下测定吸光度。

1.5.3 小鼠脾脏指数及脾脏记忆性 B 细胞比例 饲养至初次免疫后第 28 天时对各组小鼠进行活体称重, 随后脱颈处死, 采集脾脏, 进行称重, 计算脾脏指数。脾脏指数 = [脾脏质量/体质量] × 100%。再将小鼠脾脏研磨制成脾细胞悬液, 加入红细胞裂解液 (Tris-NH₄Cl); 细胞计数后用 FACS 缓冲液调节脾细胞密度为 2×10⁶/ml; 加入 FITC 抗小鼠 CD3、PerCP/Cyanine5.5 抗小鼠 CD19 和 APC/Fire™ 750 抗小鼠/大鼠/人 CD27 对细胞进行染色, 4 °C 条件下放置 40 min。用 FACS 缓冲液洗涤 1 次, 重悬细胞, 流式细胞仪上机检测, 用 FlowJo V10 软件进行分析脾脏记忆性 B 细胞比例。

1.6 统计学方法

利用 Graph Pad Prism 8.0 进行数据分析, 计量资料均满足正态分布且方差齐, 以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用单因素方差分析对组间的数据进行比较, 两两比较采用 LSD 检验, 差异显著标准为 $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况

各组小鼠毛发柔顺光滑, 一般活动正常, 排泄物质地无明显异常。表 1 示, 各组小鼠同时间体质量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。空白组和免疫对照组小鼠体重呈现平稳生长趋势, 各时间点体质量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与本组给药前及给药 7 天比较, 芪寄方组小鼠给药 14 天体质量明显下降 ($P < 0.05$)。与本组给药 14 天比较, 玉屏风组和芪寄方组给药 28 天体质量明显上

升 ($P < 0.05$)。

2.2 各组小鼠脾脏指数及脾脏记忆性 B 淋巴细胞比例比较

表 2 示, 与空白组和免疫对照组比较, 芪寄方组小鼠的脾脏指数及脾脏记忆性 B 淋巴细胞比例明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其余各组两两比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组小鼠脾脏指数及脾脏记忆性 B 淋巴细胞比例比较
(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	脾指数	脾脏记忆性 B 淋巴细胞比例
空白组	8	0.43±0.04	1.30±0.43
免疫对照组	8	0.43±0.05	1.40±0.21
铝佐剂组	8	0.47±0.04	1.54±0.40
玉屏风散组	8	0.46±0.06	1.60±0.09
芪寄方组	8	0.49±0.04 ^{a) c)}	1.79±0.18 ^{b) c)}

注: a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与空白组比较, $P < 0.01$; c) 与免疫对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 各组小鼠血清 IgG 亚型 IgG₁ 和 IgG_{2a} 表达比较

表 3 示, 与空白组相比, 其余各组小鼠血清 IgG₁ 和 IgG_{2a} 水平均升高 ($P < 0.01$)。与免疫对照组相比, 玉屏风散组和芪寄方组 IgG₁ 水平均显著提高 ($P < 0.05$), 铝佐剂组 IgG_{2a} 水平亦提高 ($P < 0.05$)。与铝佐剂组相比, 玉屏风散组和芪寄方组 IgG₁ 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与玉屏风散组相比, 芪寄方组 IgG₁ 和 IgG_{2a} 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组小鼠血清 IgG 亚型 IgG₁ 和 IgG_{2a} 水平比较
(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IgG ₁	IgG _{2a}
空白组	8	0.04±0.01	0.09±0.02
免疫对照组	8	1.39±0.35 ^{a)}	0.63±0.23 ^{a)}
铝佐剂组	8	1.32±0.36 ^{a)}	1.08±0.17 ^{a) b)}
玉屏风散组	8	1.93±0.76 ^{a) b) c)}	0.53±0.16 ^{a)}
芪寄方组	8	2.00±0.45 ^{a) b) c)}	0.53±0.07 ^{a)}

注: a) 与空白组比较, $P < 0.01$; b) 与免疫对照组比较, $P < 0.05$; c) 与铝佐剂组比较, $P < 0.05$ 。

表 1 各组小鼠不同时间体质量重比较
(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	给药前	给药 7 天	给药 14 天	给药 21 天	给药 28 天
空白组	8	17.91±0.45	17.94±0.76	18.09±0.96	18.3±0.97	18.78±0.94
免疫对照组	8	17.65±0.31	17.75±0.66	17.89±0.69	18.31±0.87	18.76±0.87
铝佐剂组	8	17.64±0.53	17.58±1.16	17.46±1.07	18.10±0.84	18.48±0.64
玉屏风散组	8	17.66±0.34	17.58±1.46	16.76±1.64	17.90±0.86	18.72±0.61 ^{c)}
芪寄方组	8	17.88±0.38	17.73±0.61	16.90±0.51 ^{a) b)}	17.62±0.44	18.62±0.39 ^{c)}

注: a) 与本组给药前比较, $P < 0.05$; b) 与本组给药 7 天比较, $P < 0.05$; c) 与本组给药 14 天比较, $P < 0.05$ 。

2.4 各组小鼠不同时间血清 IgG 水平比较

表 4 示, 与空白组比较, 各组各时间点 IgG 水平均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与免疫对照组相比, 玉屏风散组初次免疫后 21、28 天, 芪寄方组初次免疫后 28 天 IgG 水平显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与铝佐剂组相比, 玉屏风散组初次免疫后 21 天 IgG 水平显著升高 ($P<0.05$)。玉屏风散组与芪寄方组在各时间点 IgG 水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

中医学认为, 流行性感属“时行感冒”, 发病原因为“非时之气”。流感病毒的性质和致病特点与“六淫”之邪不同, 与吴又可所论“戾气”“疫气”“杂气”“疠气”相符^[15-16]。预防流感, 中医强调扶正固本, 正气强盛方能防外邪侵入。同时, 正气充盛, 也易驱邪。玉屏风散中黄芪补益脾肺之气兼能升阳固护卫表, 为君药; 白术补气健脾以加强黄芪补气之力, 兼以培土生金, 增强肺气的卫外御邪功能, 为臣药; 防风疏风解表, 防君臣补益壅滞, 为佐药。芪寄方, 以黄芪为君, 扶正固本防外邪入侵; 桑寄生、淫羊藿共为臣药, 补肝肾, 扶固人身根本之正气, 同时祛风胜湿以祛邪; 女贞子为佐药, 佐助君臣滋补肝肾强正气, 甘润滋阴佐制君臣诸药辛燥伤阴; 诸药相合, 扶正固本强正气, 增强人体防御力和防疫功能, 避免被外邪侵袭。

目前, 接种流感疫苗是预防流感病毒感染最直接的策略, 但存在保护期较短和保护强度不够等问题。疫苗佐剂可以增强机体的免疫系统对抗原的异性免疫应答能力, 可大幅度减少提供保护性免疫所需的抗原用量或接种次数, 还可提高疫苗在新生儿、老年人等免疫应答减弱者中的接种效力^[17]。研究显示, 补益类中药具有较好的增强免疫的效果, 并且对细胞没有毒性反应, 能促进免疫活化因子的分泌, 激活 B 细胞和 T 细胞, 从而增强机体的体液免疫和细胞免疫^[18]。脾脏是机体重要的免疫

器官, 其功能状态在一定程度上可以反映机体的免疫功能。本研究结果表明, 与空白组和免疫对照组相比, 芪寄方组小鼠脾脏指数明显升高, 这说明芪寄方能提高机体免疫功能。另外, 芪寄方组小鼠在给药 14 天体质量较给药前及给药 7 天下降明显; 但给药 28 天体质量与给药 14 天相比, 芪寄方组和玉屏风散组小鼠体质量均明显上升, 考虑可能是由于药液质地较黏稠, 对小鼠食欲产生一定影响, 但玉屏风散和芪寄方作为流感疫苗佐剂对小鼠整体体质量增长无显著影响, 小鼠毛发、活动度及排泄物质地情况亦无明显变化, 说明中药复方玉屏风散和芪寄方作为佐剂对小鼠生长无明显影响。

IgG 是血清免疫球蛋白的主要成分^[19], 是病毒激活适应性免疫应答后产生的保护性抗体, 在机体抗流感病毒感染过程中发挥着重要作用^[20]。空白组小鼠未接种流感疫苗, 起到空白对照的作用; 免疫对照组只接种流感疫苗, 未配合疫苗佐剂, 起到阴性对照的作用; 铝佐剂为目前已上市的疫苗佐剂, 铝佐剂组起到阳性对照的作用。本研究结果表明, 初次免疫后 21 天玉屏风散组的 IgG 水平与免疫对照组和铝佐剂组相比明显升高, 初次免疫后 28 天玉屏风散组和芪寄方组的 IgG 水平与免疫对照组相比明显升高, 说明玉屏风散和芪寄方作为疫苗佐剂对流感疫苗的保护性抗体 IgG 的水平有明显提高作用, 并且玉屏风散的流感疫苗佐剂效果出现得更早。

IgG₁ 和 IgG_{2a} 是 IgG 主要的两种亚型。IgG₁ 是由 Th2 型细胞因子诱导产生的, IgG_{2a} 是由 Th1 型细胞因子诱导产生的。其中, Th2 型调节体液免疫, Th1 型调节细胞免疫^[21]。本实验结果表明, 与免疫对照组相比, 铝佐剂组 IgG_{2a} 水平显著提高, 玉屏风散和芪寄方可以显著提高 IgG₁ 抗体水平, 说明铝佐剂作为流感疫苗佐剂可以促进机体 Th1 型免疫应答, 提高机体细胞免疫水平; 玉屏风散和芪寄方作为流感疫苗佐剂可以促进机体 Th2 型免疫应答, 提

表 4 各组小鼠不同时间血清 IgG 水平比较 (OD 值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	初次免疫后 7 天	初次免疫后 14 天	初次免疫后 21 天	初次免疫后 28 天
空白组	8	1.17±0.15	0.33±0.06	0.28±0.12	0.19±0.04
免疫对照组	8	1.90±0.33 ^{a)}	0.77±0.24 ^{a)}	1.22±0.24 ^{a)}	1.06±0.26 ^{a)}
铝佐剂组	8	2.16±0.43 ^{a)}	0.85±0.22 ^{a)}	1.40±0.46 ^{a)}	1.22±0.50 ^{a)}
玉屏风散组	8	1.90±0.47 ^{a)}	1.05±0.30 ^{a)}	1.89±0.52 ^{a) c) e)}	1.66±0.33 ^{a) c)}
芪寄方组	8	1.76±0.35 ^{b)}	0.80±0.08 ^{a)}	1.82±0.73 ^{a)}	1.58±0.17 ^{a) d)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与空白组比较, $P<0.05$; c) 与免疫对照组比较, $P<0.01$; d) 与免疫对照组比较, $P<0.05$; e) 与铝佐剂组比较, $P<0.05$ 。

高机体体液免疫水平。记忆性 B 细胞是机体重要的免疫细胞,在体液免疫中发挥着重要的作用^[22]。当机体再次暴露于相同抗原时,记忆性 B 细胞会被诱导并快速反应,分化成为产生相应抗体的细胞^[23]。本研究结果表明,玉屏风散不能提高记忆性 B 细胞比例,芪寄方对提高记忆性 B 细胞比例有一定作用,提示芪寄方能促进机体产生持久的免疫保护。

综上所述,中药复方玉屏风散和芪寄方作为流感裂解疫苗的佐剂,通过口服给药可以增强机体的免疫应答水平,并主要提高体液免疫应答水平;芪寄方可以提高记忆性 B 细胞的比例,对机体产生持久的免疫保护起到一定促进作用。但本研究仅在小鼠体内通过生长状态、特异性抗体水平及记忆性 B 细胞等指标对两种复方佐剂效果进行了评价,实验设计相对简单,样本量偏少,后续研究应扩大样本量,增加检测指标比如免疫相关细胞因子、淋巴细胞增值率及其他免疫器官免疫细胞变化等,更系统地对其佐剂活性进行评价并探讨其作用机理。

参考文献

- [1] DRONINA J, SAMUKAITE-BUBNIENE U, RAMANAVICIUS A. Advances and insights in the diagnosis of viral infections[J]. J Nanobiotechnology, 2021, 19(1):348.
- [2] PRACHANRONARONG KL, CANALE AS, LIU P, et al. Mutations in influenza A virus neuraminidase and hemagglutinin confer resistance against a broadly neutralizing hemagglutinin stem antibody[J]. J Virol, 2019, 93(2): e01639-18. doi: 10.1128/JVI.01639-18.
- [3] FTOUH M, KALBOUSSI N, ABID N, et al. Contribution of nanotechnologies to vaccine development and drug delivery against respiratory viruses[J]. PPAR Res, 2021: 6741290. doi: 10.1155/2021/6741290.
- [4] SASAKI E, HAMAGUCHI I, MIZUKAMI T. Pharmacodynamic and safety considerations for influenza vaccine and adjuvant design[J]. Expert Opin Drug Met, 2020, 16(11):1051-1061.
- [5] TREGONING JS, RUSSELL RF, KINNEAR E. Adjuvanted influenza vaccines[J]. Hum Vaccin Immunother, 2018, 14(3):550-564.
- [6] TOMLJENOVIC L, SHAW CA. Aluminum vaccine adjuvants: are they safe?[J]. Curr Med Chem, 2011, 18(17): 2630-2637.
- [7] NOHYNEK H, JOKINEN J, PARTINEN M, et al. AS03 adjuvanted AH1N1 vaccine associated with an abrupt increase in the incidence of childhood narcolepsy in Finland[J]. PLoS One, 2012, 7(3):e33536.
- [8] 李宗霖, 廖国阳. 流感疫苗新型佐剂的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33(4):465-469.
- [9] 林巧, 郑军, 张国良, 等. 补益类复方中药增强流感 VLPs 疫苗免疫原性的佐剂效应研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(1):43-47.
- [10] ZHOU Y, ZONG Y, LIU Z, et al. Astragalus polysaccharides enhance the immune response to OVA antigen in BALB/c mice[J]. Biomed Res Int, 2021: 9976079. doi: 10.1155/2021/9976079.
- [11] 董娜, 李倩, 张贵强, 等. 淫羊藿多糖对甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗的免疫佐剂作用[J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(1):63-68.
- [12] 汪青楠, 吕文良, 李娟梅, 等. 玉屏风散实验研究及临床应用进展[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(9):165-168.
- [13] 金利蒙. 医方类聚·第 7 册[M]. 北京:人民卫生出版社, 1982:379.
- [14] 王月琦. 新型壳聚糖季铵盐凝胶微球作为流感疫苗佐剂的研究[D]. 北京:中国科学院过程工程研究所, 2016.
- [15] 王玉光, 焦扬, 周平安. 流行性感冒辨治体会[J]. 中医杂志, 2010, 51(3):213-214.
- [16] 胡思源, 李新民, 耿福能, 等. 抗感颗粒治疗小儿流行性感冒 120 例多中心随机对照双盲临床研究[J]. 中医杂志, 2018, 59(6):486-489.
- [17] O'HAGAN DT, MACKICHAN ML, SINGH M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases[J]. Biomol Eng, 2001, 18(3):69-85.
- [18] 祝峥. 补益类中药有效成分作为新型人用疫苗佐剂的应用前景[J]. 生物技术通讯, 2004(1):92-94.
- [19] BARTON JC, BARTON JC, BERTOLI LF. Hydroxychloroquine therapy and serum immunoglobulin levels in women with IgG subclass deficiency and systemic lupus erythematosus, sjögren syndrome, and rheumatoid arthritis: a retrospective study[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2022, 70(1):14.
- [20] 蔡琨, 王平, 杨翠萍, 等. 仙茅多糖辅助流感裂解疫苗对小鼠免疫原性和保护性研究[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(5):84-87.
- [21] FAN Y, PIAO CH, HYEON E, et al. Gallic acid alleviates nasal inflammation via activation of Th1 and inhibition of Th2 and Th17 in a mouse model of allergic rhinitis[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 70(13): 512-519.
- [22] 张莉芳, 廖焕金, 蔡珺, 等. 记忆性 B 细胞体外扩增影响因素的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(1):144-147.
- [23] SHINNAKASU R, INOUE T, KOMETANI K, et al. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment[J]. Nat Immunol, 2016, 17(7):861-869.

Influence of *Yupingfeng Powder* (玉屏风散) and *Qiji Formula* (芪寄方) on the Immune Response in Mice Injected with Split Virus Influenza Vaccine

YIN Yiming, YANG Ying, LIU Miaomiao, ZHENG Bingqing, ZHAO Fangshu, NI Wenting, LI Baohong, WAN Xinhuan, TIAN Jingzhen

School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, 250355

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of oral administration of *Yupingfeng Powder* (玉屏风散) and *Qiji Formula* (芪寄方) on the protective efficacy of the split virus influenza vaccine. **Methods** Forty Balb/c mice were randomly divided into blank group, immune control group, aluminum adjuvant group, *Yupingfeng Powder* group and *Qiji Formula* group, with eight mice in each group. *Yupingfeng Powder* group and *Qiji Formula* group were given 0.25 g/10 g of corresponding formulas by gavage, while the other groups were given 0.25 ml purified water by gavage, once every day for 10 days. After 4-day medication, mice in the blank group were injected intramuscularly with 0.1 ml of PBS on the legs, while those in other groups were injected with 0.75 μ g of seasonal influenza virus split vaccine (IVV) for initial immunization, and additionally 100 μ g of aluminum hydroxide was contained in IVV in the aluminum adjuvant group. Two weeks after the initial immunization, the mice in all groups were continued for a booster injection. The mice were weighed every 7 days to observe the general condition. ELISA method was used to detect the level of serum specific antibody IgG 7, 14, 21 and 28 days after the initial immunization, and 28 days after the initial immunization, the level of serum specific antibody subtype IgG₁ and IgG_{2a} was tested, the spleen was weighed to calculate the spleen index. The proportion of memory B cells in the spleen was detected by flow cytometry. **Results** There was no significant differences in the body weight of the mice among the groups regarding the same measurement time ($P>0.05$). The body weight significantly decreased after 14-day medication in the *Qiji Formula* group compared to that measured before and after 7-day medication ($P<0.05$). Compared to those measured after 14-day medication, the body weight after 28-day medication significantly increased in the *Yupingfeng Powder* group and *Qiji Formula* group ($P<0.05$). The hair of the mice in all groups was soft and smooth, with normal general activities and no obvious abnormality in the excrement. Compared to that in the blank group and the immune control group, the spleen index and the proportion of memory B cells in the *Qiji Formula* group significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared to those in the blank group, the levels of serum IgG₁ and IgG_{2a} in all other groups as well as IgG levels at all measured times significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared to those in the immune control group, the IgG level significantly increased in the *Yupingfeng Powder* group 21 and 28 days after initial immunization, and in the *Qiji Formula* group 28 days after initial immunization ($P<0.05$ or $P<0.01$). The IgG level in the *Yupingfeng Powder* group 21 days after the initial immunization was significantly higher than that in the aluminum adjuvant group ($P<0.05$). Compared to those in the immune control group, the IgG₁ level in the *Yupingfeng Powder* group and *Qiji Formula* group, and the IgG_{2a} level in the aluminum adjuvant group significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The IgG₁ level in compared with aluminum adjuvant group, *Yupingfeng powder* The level of IgG₁ in the *Yupingfeng Powder* group and *Qiji Formula* group were significantly higher than that in the aluminum adjuvant group ($P<0.05$). There was no significant difference in IgG₁ and IgG_{2a} levels between *Yupingfeng Powder* group and *Qiji Formula* group and IgG levels measured at different timepoints ($P>0.05$). **Conclusion** *Yupingfeng Powder* and *Qiji Formula* can effectively improve the immune response of split virus influenza vaccine, promote Th2 immune response, and mainly improve the body's humoral immune response.

Keywords split virus influenza vaccine; *Yupingfeng Powder* (玉屏风散); *Qiji Formula* (芪寄方); immunoadjuvant; immune response

(收稿日期: 2022-04-25; 修回日期: 2022-09-08)

[编辑: 王利芬]