

· 乙肝疫苗免疫策略研究 ·

成人接种乙型肝炎疫苗后细胞免疫应答的动态变化

胡忠玉 朱凤才 何鹏 刘社兰 张瑞 方鑫 翟祥军 邱少辉
梁争论 汪华 李河民 庄辉

【摘要】 目的 探讨人体接种乙型肝炎(乙肝)疫苗后细胞免疫的动态变化,了解疫苗介导的细胞免疫应答与体液免疫应答的关联。**方法** 8例成人按0、1、2月程序接种乙肝疫苗,于首针免疫后3、8、21、34和65 d采静脉血,分离外周血单个核细胞(PBMC),对PBMC进行细胞分选,获得纯度95%以上的CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞,应用酶联免疫斑点法(ELISPOT)测定PBMC、CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞体外刺激后所产生的细胞因子IFN- γ 、IL-2和IL-4的斑点数(SFC),并收集乙肝疫苗免疫前(0 d)和免疫后3、8、21、30、34、60、65和150 d血样,测定乙肝表面抗体(抗-HBs)。同时设立阴、阳性对照各2例。**结果** 人接种乙肝疫苗后,CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞产生不同细胞因子趋势和强度不同:IFN- γ (由CD8⁺、CD4⁺T淋巴细胞产生)出现较早,且较为稳定,而CD4⁺T淋巴细胞产生的IL-2和IL-4出现较晚,但其升高与第2、3针乙肝疫苗免疫有关;免疫后IL-4阳转率与抗-HBs阳转率呈显著正相关,IL-2、IL-4的SFC与抗-HBs滴度也呈显著正相关。**结论** 成人接种乙肝疫苗后可早期检测出以IFN- γ 为主的细胞免疫,IL-4和IL-2阳转与抗-HBs升高有关。

【关键词】 酶联免疫斑点法;外周血单个核细胞;斑点形成细胞计数

Study on the kinesis of cellular immunity in adults vaccinated with recombinant hepatitis B vaccine HU Zhong-yu*, ZHU Feng-cai, HE Peng, LIU She-lan, ZHANG Rui, FANG Xing, ZHAI Xiang-jun, QIU Shao-hui, LIANG Zheng-lun, WANG Hua, LI He-min, ZHUANG Hui.*National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China
Corresponding author: LIANG Zheng-lun, Email: lzlun@yahoo.com

【Abstract】 Objective To evaluate the kinesis of cellular immunity in adults who were vaccinated with yeast recombinant hepatitis B(rHB) vaccine and the correlation between cellular and humoral immune responses induced by the vaccine. **Methods** Eight adults were vaccinated with rHB vaccine according to 0, 1, 2 month schedule. The peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) were collected at the 3, 8, 21, 34 and 65 days after the first dose. The high purity of CD4⁺ and CD8⁺T cells obtained by sorting from PBMCs were restimulated with recombinant hepatitis B surface antigens(rHBsAg) or peptides. The spot forming cell(SFC) of IFN- γ , IL-2 and IL-4 of CD4⁺ and CD8⁺T cells were detected by enzyme-linked immunospot(ELISPOT). **Results** The characteristics of IFN- γ , IL-2 and IL-4 of CD4⁺ and CD8⁺T cells appeared different after immunization with rHB vaccine. IFN- γ of CD8⁺ and CD4⁺T cells could be detected early with stable SFC, while the IL-2 and IL-4 of CD4⁺T cells appeared late but increased after the second and third dose of vaccination. The positive rate of IL-4 of CD4⁺T cells were significantly correlated with the positive rate of anti-HBs, while the SFCs of IL-4 and IL-2 of CD4⁺T cells were also significantly related to the titers of anti-HBs. **Conclusion** IFN- γ could be detected early after rHB vaccination in adults, and the positive rates of IL-4 and IL-2 were correlated with that of anti-HBs.

【Key words】 Enzyme-linked immunospot; Peripheral blood mononuclear cells; Spot forming cell

关于乙型肝炎(乙肝)疫苗初次免疫和加强免

疫后的体液免疫应答规律已积累了大量资料^[1]。婴幼儿接种乙肝疫苗后的免疫持久性以及再免疫、加强免疫策略,对控制乙肝流行具有重要意义,而阐明相关的免疫机制和制订相应策略,不仅需了解体液免疫应答的动态变化,更需了解乙肝疫苗接种后细胞免疫应答的规律。目前,国内外尚无系统的有关

基金项目:国家“十五”科技攻关课题资助项目(2004BA718B02)
作者单位:100050 北京,中国药品生物制品检定所(胡忠玉、何鹏、张瑞、方鑫、邱少辉、梁争论、李河民);江苏省疾病预防控制中心(朱凤才、刘社兰、翟祥军、汪华);北京大学医学部微生物学系(庄辉)
通讯作者:梁争论 Email: lzlun@yahoo.com

乙肝疫苗接种后细胞免疫应答的动态变化资料。研究乙肝疫苗细胞免疫应答,对我国改进乙肝疫苗免疫策略,控制乙肝流行具有重要意义。近年来,随着免疫学理论和技术的发展,有可能定量测定乙肝疫苗免疫后细胞免疫应答。酶联免疫斑点法(ELISPOT)灵敏度高,且可定量,可用于评价乙肝疫苗的细胞免疫效果。本研究选择健康成人作为研究对象,对乙肝疫苗接种后细胞免疫应答的动态变化进行了测定,并与体液免疫应答比较。

对象与方法

1. 研究对象:12 例研究对象来自江苏省大学生入学体检人群,男、女各 6 人,年龄范围在 17~20 岁。经测定,抗-HCV、抗-HIV 和丙氨酸氨基转移酶(ALT)等指标均为阴性,2 人单项抗-HBs 阳性。10 例乙肝病毒(HBV)感染标志全阴性,其中 8 例随机分为 2 组,每组 4 例,按 0、1、2 月程序分别接种乙肝酵母和 CHO 基因重组疫苗,另 2 例作为阴性对照,于试验开始后 1 和 2 个月时,接种第 1 和第 2 针乙肝疫苗。2 例单项抗-HBs 阳性者分别接种 1 针乙肝酵母或 CHO 重组疫苗,作为阳性对照。本研究经当地医学伦理委员会批准。每个研究对象均签署知情同意书。

研究用乙肝重组酵母和 CHO 重组疫苗,分别由大连汉信生物制药有限公司和华北制药金坦生物技术股份有限公司生产,每针为 10 μg/ml。

2. 细胞免疫的应答体外刺激物:根据参考文献[2],确定体外刺激的 HBV 多肽位点。多肽由中国医学科学院药物研究所合成,纯度均为 95% 以上。混合肽位点及氨基酸序列见表 1。

表 1 HBsAg 蛋白中的 T 淋巴细胞表位的氨基酸序列

MHC	S 区氨基酸位点	序 列	
I 类	14~22	VLQAGFFLL	
	20~28	FLLTRILTI	
	28~39	TIPQSLDSWWTSL	
	41~49	FLGGTPVCL	
	97~106	LLDYQGMLPV	
	172~180	WLSLLVPFV	
	185~194	GLSPTVWLSV	
	207~216	SIVSFFIPLL	
	II 类	16~31	QAGFFLLTRILTIIPQS
		16~33	QAGFFLLTRILTIIPQSLD
19~28		FFLLTRILTI	
19~33		FFLLTRILTIIPQSLD	
163~174		WEWASVRFWSLS	
213~226		LPLLPIFFCLWVYI	

体外刺激用抗原为大连汉信公司惠赠的乙肝酵母纯化抗原(亚型 *adw2*),浓度为 1.9 mg/ml,经高效液相(HPLC)和银染测定纯度为 99.0% 以上。本研究所用各种 HBV 多肽和抗原均采用鲎试剂法测定细菌内毒素,结果均低于 10 EU/ml(10 μg)。依据预试验结果,确定用乙肝酵母纯化 HBV 抗原作为 PBMC 体外刺激物;应用乙肝抗原和 MHC II 类混合肽作为体外 CD4⁺ T 细胞的刺激物;应用 P28~39 多肽和 MHC I 类混合肽作为 CD8⁺ T 细胞刺激物。各种刺激多肽的工作浓度均为 20 μg/ml,刺激用乙肝抗原的工作浓度为 80 μg/ml。MHC I 类混合肽等量混合。MHC II 类混合肽也等量混合。

3. 细胞免疫测定试剂:人淋巴细胞分离液为挪威 AXIS-SHIELD PoC AS 公司产品,购自深圳达科为公司;RPMI 1640 培养基为 Hyclone 公司产品、人 AB 血清购于 SIGMA 公司;RPMI 1640 完全培养基含 10% 人 AB 血清;ELISPOT 测定人 IFN-γ、IL-2、IL-4 试剂盒为美国 RD 公司产品,购于深圳晶美公司;ELISPOT 检测仪为美国 CTL 公司生产。

4. 细胞分选(MACS)试剂和仪器:CD4⁺、CD8⁺、HLA-DR⁺分选试剂和 AUTOMACS 自动分选仪均购自德国美天妮公司。

5. 试验方法:取试验对象免疫后抗凝外周全血 30 ml,经淋巴细胞分离液密度梯度离心分离外周血单个核细胞(PBMC)后,将其分为 2 份样本,1 份备检,1 份应用 MACS 法分选仪,分选 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞,结果获得 95% 以上纯度的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞。采集并分离研究对象于实验开始后 3、8、21、34、65 d 静脉抗凝血的 PBMC,应用细胞分选仪分选 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞,计数 PBMC、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞,调整细胞浓度为 6×10⁵/ml,上 96 孔板,试验分 2 组进行,即试验组为效应细胞+HBsAg 或多肽(HBsAg 终浓度为 40 μg/ml;多肽终浓度为 10 μg/ml),背景对照组为效应细胞+培养基,同时设阴性对照(培养基)和阳性对照(试剂盒提供)。PBMC 应用抗原刺激后测定 IFN-γ、IL-2、IL-4; CD4⁺ T 淋巴细胞分别应用抗原或 MHC II 类混合肽刺激后测定 IFN-γ、IL-2、IL-4; CD8⁺ T 细胞应用 MHC I 类混合肽或 P28~39 肽刺激后产生的 IFN-γ;其余操作按照 ELISPOT 试剂盒说明书进行。应用 ELISPOT 斑点计数仪进行斑点形成细胞计数(SFC)。设 2 个阴性对照,其 SFC 均值为 2.25,95% CI 上限为 9.36;培养基对照的

SFC 均值为 1.85, 95% CI 上限为 8.16。阳性样本的 SFC 应 > 10, 同时阳性样本 SFC/培养基 SFC 应 ≥ 2。统计时样本的 SFC 为实测值减去培养基对照的 SFC。

6. 抗-HBs 测定: 采集研究对象 0 d (第一针接种前)、3、8、21、30、34、60、65 和 150 d 的静脉抗凝血, 分离血浆, 应用美国 Abbott 公司生产的 IMX 试剂盒检测抗-HBs, 以 10 mIU/ml 作为抗体阳转标志。

7. HBV 感染标志测定: HBsAg、抗-HBc、抗-HBe、HBeAg、抗-HAV、抗-HIV、抗-HCV 均采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定, 依据说明书判断结果。

8. 统计学方法: 阳转率比较应用 Fisher 确切概率法; SFC 比较应用配对 *t* 检验; 相关性显著性检验应用 *t* 检验。

结 果

1. 细胞因子阳转率动态变化: 由图 1 可见, 人接种乙肝疫苗后 3 和 8 d 时, CD8⁺ T 淋巴细胞的 IFN- γ 阳转率显著高于 CD4⁺ T 淋巴细胞的 IL-2 和 IL-4 (66.7% 和 50.0% : 0% 和 0%)。免疫后 34 和 65 d 时 CD4⁺ T 淋巴细胞的 IL-2 阳转率显著高于 8 d (50.0% 和 62.5% : 0%)。免疫后 65 d 时 CD4⁺ T 淋巴细胞的 IL-4 阳性率显著高于 3、8 和 34 d (75.0% : 0%、0% 和 12.5%)。因此, CD8⁺ T 淋巴细胞 IFN- γ 出现早, 受第 2、3 针乙肝疫苗接种影响变化较小; CD4⁺ T 淋巴细胞 IL-2、IL-4 出现晚, 但与乙肝疫苗的加强免疫有关。

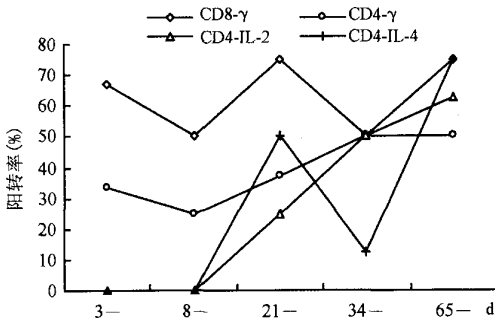


图1 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞体外刺激产生细胞因子动态比较

2. SFC 动态变化: 由图 2、3 可见, 免疫后 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 的 SFC 以 21 d 较高, 但各时间点间差异无统计学意义。CD4⁺ T 细胞分泌 IFN- γ

的 SFC 以 8 d 较高, 各时间点间差异也无统计学意义。表明 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 淋巴细胞分泌 IFN- γ 的 SFC 数目不随 2、3 针乙肝疫苗免疫而升高。

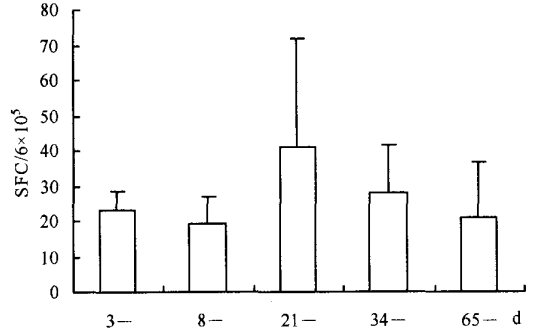


图2 CD8⁺ T 淋巴细胞分泌 IFN- γ SFC 动态比较

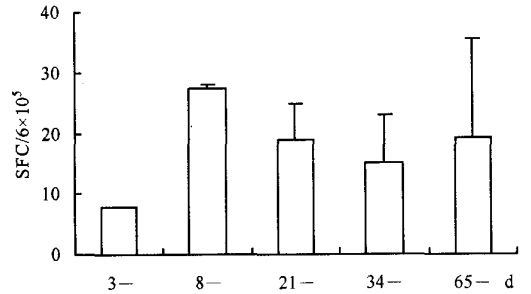


图3 CD4⁺ T 淋巴细胞分泌 IFN- γ SFC 动态比较

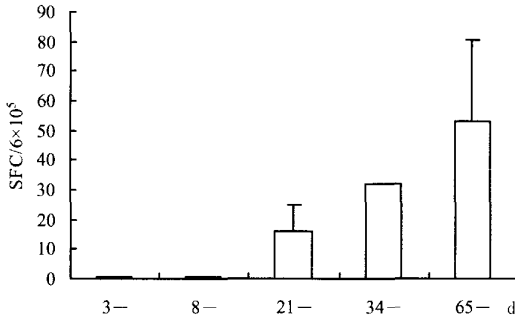
由图 4、5 可见, IL-4 和 IL-2 的 SFC 升高均与 2、3 针免疫有关, 3 针后 IL-2 的 SFC 显著高于 3、8 和 21 d; IL-4 的 SFC 显著高于 3、8、21 和 34 d。

3. 接种 3 针乙肝疫苗后抗体动态变化: 2 例阳性对照样本于试验前抗-HBs 阳性 (分别为 37.8 和 16.6 mIU/ml), 接种 1 针乙肝疫苗后, 在免疫后 8 d 时, 因免疫回忆反应诱导的抗体滴度达最高 (分别为 945.0 和 500.2 mIU/ml), 各增高 25.0 倍和 30.1 倍。2 例阴性对照在接种疫苗前的 30 d 检测 (0、3、8、21 和 30 d), 抗-HBs 均为阴性。

由图 6 可见, 接种乙肝疫苗 2 针后抗-HBs 阳转率显著升高, 于接种 3 针后 3 个月时, 抗-HBs 阳转率升至 90%; 抗-HBs GMT 水平与其阳转率升高的趋势相同, 至接种乙肝疫苗 3 针后 150 d 时, 抗-HBs GMT 为 162.72 mIU/ml (95% CI: 25.06 ~ 1049.50 mIU/ml)。

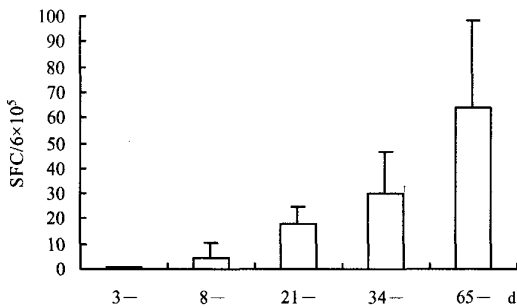
4. 疫苗接种者细胞免疫和体液免疫应答相关性比较: 免疫后 CD4⁺ T-IL-4 阳转率与抗-HBs 阳转率显著性相关 ($r = 0.89, P < 0.05$)。CD4⁺ T 细胞产生 IL-2、IL-4 的 SFC 与抗-HBs 滴度显著性相关 ($r =$

0.98, 0.97, $P < 0.01$).



注:65 d时 IL-4 的 SFC 显著高于 3、8 d ($t = 3.31, P < 0.05$) 以及 21、34 d (t 值分别为 3.63 和 3.75, $P < 0.05$)

图4 CD4⁺ T 淋巴细胞分泌 IL-4 动态比较



注:65 d时 IL-2 的 SFC 显著高于 3、8 d ($t = 2.94, P < 0.05$) 以及 21 d ($t = 2.42, P < 0.05$)

图5 CD4⁺ T 淋巴细胞分泌 IL-2 动态比较

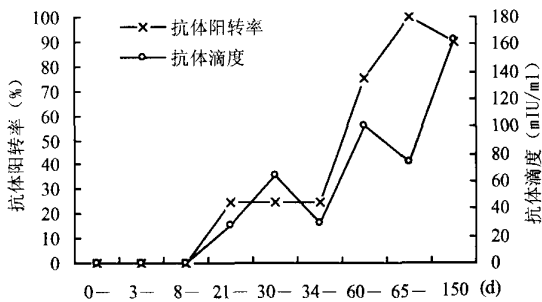


图6 疫苗接种者抗体阳转率和滴度动态

讨 论

既往由于缺乏灵敏和稳定的细胞免疫检测方法,对乙肝疫苗免疫后细胞免疫应答的特点和动态变化了解较少。近来的研究表明,早期诱导细胞免疫应答是疫苗阻断母婴传播的关键。临床试验表明,在未同时注射免疫球蛋白的情况下,5 μg 乙肝酵母重组疫苗的母婴传播阻断率相当于 20 μg 的 CHO

疫苗和 30 μg 的血源疫苗^[3];酵母细胞表达的乙肝抗原诱导 Th1 类细胞因子较 CHO 细胞表达的乙肝抗原和血源乙肝抗原为早^[4]。

近年来建立的 ELISPOT 法为定量分析细胞免疫应答提供了可能,并已应用于新型疫苗的细胞免疫效果评价^[5,8]。本研究表明,成人接种乙肝疫苗后,CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞刺激产生不同细胞因子出现的趋势和强度不同:IFN-γ(CD8⁺、CD4⁺ T 淋巴细胞)出现较早,且水平较为稳定;CD4⁺ T 淋巴细胞产生 IL-2 和 IL-4 较晚,但其升高与第 2、3 针次免疫有关。因此,早期检测细胞免疫应答应选择 IFN-γ。而加强免疫后可选择 IL-4 作为测定指标。

CD4⁺ T 淋巴细胞分泌不同细胞因子的作用不同,外源性 IL-4 可使 CD4⁺ 前体细胞向 Th2 效应细胞分化,而 IFN-γ 则对前体细胞向 Th2 分化过程起抑制作用,因此,IL-4 和 IFN-γ 在决定 CD4⁺ 前体细胞向 Th1 或 Th2 分化过程中起着重要的调节作用。本研究结果表明,IFN-γ 在加强免疫后虽然阳转率保持稳定,但斑点数保持较低水平,不接种 2、3 针疫苗后并不升高,表明高水平的 IL-4 对 IFN-γ 分泌有抑制作用。人体免疫后,IL-4 阳转率与抗-HBs 阳转率呈显著正相关,IL-2、IL-4 水平与抗-HBs 滴度也呈显著正相关。

对于健康成人,接种疫苗后细胞免疫应答主要通过 Th2 途径,诱导抗体产生为主。在评价成人和儿童的预防性乙肝疫苗的细胞免疫应答时,特别在 3 针免疫后,建议检测 IL-4 等 Th2 类细胞因子。我国新生儿接种乙肝疫苗是乙肝免疫的重点,而新生儿免疫系统特点与成人有所不同^[9],其体液免疫发育不成熟,因此,新生儿接种乙肝疫苗后的细胞免疫应答仍是亟待研究的课题之一。

参 考 文 献

- [1] 曹惠霖. 乙型肝炎疫苗免疫持久性及预防效果的研究. 中华实验和临床病毒学杂志, 1995, 9 增刊: 1-4.
- [2] Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. Annu Rev Immunol, 1995, 13(1): 29-60.
- [3] Liang ZL, Li H, Zhang HY. Evaluation on immunogenicity and immune efficacy of different kinds of hepatitis B vaccines. J Microbiol Immunol, 2003, 1(1): 85-87.
- [4] 张弛, 廖雪雁, 冯仁田, 等. 乙型肝炎表面抗原对 BALB/c 小鼠细胞免疫应答的影响. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(6): 634-637.
- [5] Czerkinsky CG, Somville F, Lehmann P, et al. Reverse elispot assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration

of gamma-interferon-secreting cells. J Immunol Methods, 1988, 110(1):29-36.

[6] Fujihashi K, McGhee JR, Beagley KW, et al. Cytokine-specific ELISPOT assay single cell analysis of IL-2, IL-4 and IL-6 producing cells. J Immunol Methods, 1993, 160(2):181-189.

[7] Oran AE, Robinson HL. DNA vaccines, combining from antigen and method of delivery to raise spectrum of IFN- γ and IL-4-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells. J Immunol Methods, 2003, 171(4):1999-2005.

[8] Mollenkopf HJ, Dietrich G, Fensterle J, et al. Enhanced protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine by adsorption onto cationic PLG microparticles. Vaccine, 2004, 22(21-22): 2690-2695.

[9] Ota MO, Vekemans J, Schlegel-Haueter SE, et al. Hepatitis B immunization induces higher antibody and memory Th2 responses in new-borns than adults. Vaccine, 2004, 22(3-4):511-519.

(收稿日期:2007-02-16)
(本文编辑:张林东)

· 疾病控制 ·

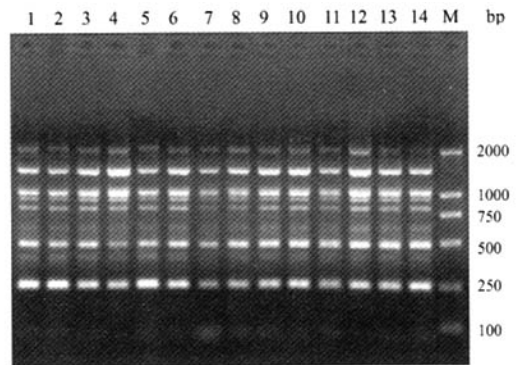
一起食物中毒事件中副溶血弧菌的分子生物学、血清学和毒力研究

沈玄艺 徐景野 闫鹏 宋启发 林辉

对分离自一起食物中毒事件中的 31 株副溶血弧菌的 *tdh* 和 *trh* 毒力基因进行了检测,同时采用血清学分型方法和 ERIC-PCR 基因分型方法进行克隆分析。分离菌株来自病例肛拭(33 份)、食品(59 份)和餐具涂抹(12 份)标本。生化反应鉴定采用 VITEK 系统和 API 20E 生化鉴定条。共分离得到 31 株副溶血弧菌,其中 1 株来自食品,30 株均分离自患者肛拭。ERIC-PCR 分型:引物为 5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3' 和 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'。反应体系为:50 μ l 总体积,10 \times PCR buffer(含 Mg²⁺ 2.5 mmol/L)5 μ l,引物各 40 pmol,dNTP 各 10 μ mol,Taq 酶 2.5 U,模板 1 μ l。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,90 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 60 s,70 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,共 30 个循环,最后 70 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增 *tdh* 和 *trh* 毒素基因:*tdh* 引物为 sense:5'-CGG TTC TGA TGA GAT ATT GT-3' 和 antisense:5'-TCT GGA GTT TCA TCC AAA TA-3'。*trh* 引物为 sense:5'-TCA GTA TCT AAA TCA TTC GC-3' 和 antisense:5'-CAT AAC AAA CAT ATG CCC AT-3'。反应体系同上。毒力试验,副溶血弧菌接种到普通营养肉汤,37 $^{\circ}$ C 培养 18-24 h,每株菌液接种 3 只健康小白鼠,每只小白鼠腹腔注射 0.3 ml,对照组接种无菌营养肉汤,24 h 内观察小鼠死亡情况。

结果与分析:在 59 份食品和 12 份餐具涂抹标本中,在 1 份豆制品标本中检出 1 株副溶血弧菌,流行病学调查证明该食品与发病相关。PCR 扩增 31 株副溶血弧菌 *tdh* 毒素基

因均为阳性,均未扩增出 *trh* 毒素基因,提示 *tdh* 毒素基因编码的热稳定溶血素是主要致病物质。ERIC-PCR 分型 31 株只有 1 个基因型,扩增 DNA 条带共 7 个(图 1)。血清学分型均为 O3。毒力试验结果表明,每组小鼠均有死亡,阳性率为 100%。取死亡小鼠心脏血中细菌分离鉴定为副溶血弧菌。基因分型和血清学分型分析显示,引起这次食物中毒的副溶血弧菌来自于一个克隆,毒力试验证明该克隆具有较强毒力。提示来自于食品和患者的副溶血弧菌为同一克隆,该食品可能为这次食物中毒的传染源。



注:1~13: 13 份分离自患者的菌株 ERIC-PCR 扩增结果; 14:食物; M:DNA 标准

图1 部分副溶血弧菌 ERIC-PCR 基因分型结果

(收稿日期:2006-10-10)
(本文编辑:尹廉)