

重组乙型肝炎疫苗和乙型肝炎表面抗原诱导细胞免疫应答

胡忠玉 何鹏 张瑞 方鑫 朱凤才 邱少辉 李河民 汪华 梁争论 庄辉

【摘要】 目的 探讨重组乙型肝炎(乙肝)疫苗和汉逊酵母菌表达的乙肝表面抗原(rHBsAg)诱导动物和人体细胞免疫应答的动态变化。方法 应用不同剂量 rHBsAg 免疫小鼠(BALB/c, H-2^d), 酶联免疫斑点法(ELISPOT)检测小鼠脾单个核细胞(MNC)体外刺激诱导IFN- γ 的水平;单剂 rHBsAg 免疫后不同时间检测 MNC、CD₈⁺ T 淋巴细胞产生 IFN- γ 水平;同时测定免疫后不同时间细胞毒 T 淋巴细胞反应(CTL)活性;检测免疫单剂和多剂乙肝疫苗后小鼠 MNC 分泌 IFN- γ 、IL-2、IL-5 和抗-HBs 抗体水平;对乙肝感染标志阴性的 4 名成年人按 0、1、2 个月程序接种乙肝疫苗,检测免疫后外周血单个核细胞(PBMC)、CD₈⁺ T 淋巴细胞分泌 IFN- γ 、IL-2 和 IL-4 水平以及抗体动态。**结果** 应用 ELISPOT 法,汉逊 rHBsAg 免疫小鼠 7 d 时,可检测到 IFN- γ 应答,14 d 时达到高峰;CTL 在免疫后 7 d 时可检出,峰值位于 28 d。在 1~8 μ g 免疫剂量范围内,MNCs IFN- γ 免疫应答与剂量呈显著正相关(阳转率: $r = 0.951, P = 0.049 < 0.05$;SFC: $r = 0.996, P = 0.000 < 0.05$),在 1~4 μ g 免疫剂量范围内,CD₈⁺ T 淋巴细胞的 IFN- γ 与剂量也呈显著正相关($r = 0.999, P = 0.025 < 0.05$);三剂乙肝疫苗免疫小鼠诱导细胞免疫和体液免疫应答水平均显著高于单剂(P 值均 < 0.05);成年人接种汉逊乙肝疫苗后不同个体间细胞免疫和体液免疫应答的模式不同,IL-2、IL-4 应答与个体抗体滴度有关。**结论** 用 ELISPOT 法成功测定了汉逊 HBsAg 免疫小鼠后不同淋巴细胞的细胞免疫剂量效应和 CTL 时间动态变化,并分析了成年人的细胞免疫应答特点,为规范疫苗细胞免疫评价提供了基础。

【关键词】 乙型肝炎疫苗;免疫,细胞;乙型肝炎表面抗原

Cellular immune responses of recombinant hepatitis B (rHB) vaccine and HBsAg derived from Hansenula polymorpha cells HU Zhong-yu*, HE Peng, ZHANG Rui, FANG Xin, ZHU Feng-cai, QIU Shao-hui, LI He-min, WANG Hua, LIANG Zheng-lun, 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 study the kinetics of immune response in mice and human immunized with rHB vaccine or rHBsAg derived from yeast cells (*Hansenula polymorpha*). **Methods** With different doses, the level of IFN- γ secreted by spleen mononuclear cells (MNC) including CD₈⁺ T cells by MACs of mice were detected by enzyme-linked immunospot (ELISPOT) methods after stimulation in vitro with HBsAg MHC class I peptide S28-39, respectively. At serial time points, the immunized mice were detected for IFN- γ by ELISPOT as above and for the lymphocytotoxicity test (CTL) by specific lysis assay. The levels of IFN- γ , IL-2, IL-5 and anti-HBs in mice induced by rHB vaccine were detected after single or three doses. Four adults were vaccinated with rHB vaccine according to 0, 1 and 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 CD₈⁺ T cells with high purity obtained by sorting from PBMCs were stimulated with rHBsAg or HBsAg peptides. The SFC of IFN- γ , IL-2 and IL-4 of CD₄⁺ and CD₈⁺ T cells were determined by ELISPOT. **Results** The cytokine of IFN- γ became detectable on day 7 and its peak value appeared on day 14 by ELISPOT. The CTL was detected on day 7 and the maximum lysis of CTL appeared on day 28. The cellular immune response of IFN- γ of MNCs were significantly correlated with the doses vaccinated from

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、李河民、梁争论);江苏省疾病预防控制中心(朱凤才、汪华);北京大学医学部(庄辉)

通讯作者:梁争论,Email: lzlun@yahoo.com

1 μg to 8 μg ($r_{\text{positive rates}} = 0.951, P_{\text{positive rates}} = 0.049 < 0.05$; $r_{\text{SFC}} = 0.996, P_{\text{SFC}} = 0.000 < 0.05$). IFN- γ SFC of CD $_8^+$ T cells were significantly associated with the doses from 1 μg to 4 μg ($r = 0.999, P = 0.025 < 0.05$). The HBsAg specific cellular immune and humoral responses of mice immunized with three doses were significantly higher than that with a single dose ($P < 0.05$). The characteristics of IFN- γ , IL-2 and IL-4 of CD $_4^+$ and CD $_8^+$ T cells were variable between individuals immunized with the same rHB vaccine. The level of IL-2 and IL-4 of responders were significantly related to the titer of anti-HBs. **Conclusion** Data from this study showed the kinesis of cellular immunity in mice and adults vaccinated with rHBsAg or rHB vaccine respectively, and the characteristics of cellular immune response in adults induced by the vaccine. Our data provided the basis of standardizing the analysis of cellular immune response to rHB vaccine.

【Key words】 Hepatitis B vaccine; Immune, cellular; HBsAg

虽然多种生物细胞系统均可成功表达 HBsAg, 但目前我国商品化的重组乙型肝炎疫苗以酿酒酵母和 CHO 细胞表达系统为主, 其中酿酒酵母系统又占据主要市场。近年来, 一种表达量高、成本低新型甲基营养型汉逊酵母表达系统乙肝疫苗成功上市^[1-3]; 但关于该疫苗的免疫原性和免疫效果报道较少^[4,6]。在未联合应用乙肝免疫球蛋白的情况下, 接种汉逊酵母乙肝疫苗后, HBV 母婴传播的阻断率高达 95%^[7]。有报道可能与其诱导 T 淋巴细胞反应 (CTL) 应答高有关^[8]。但以往的研究方法多为细胞增殖实验和 CTL 实验, 不易重复, 且难以准确定量。近期酶联免疫斑点法 (ELISOPT) 应用进展较快。本研究应用汉逊酵母表达的 HBsAg (rHBsAg) 免疫小鼠后, 对小鼠脾单个核细胞 (MNC) 免疫应答、CTL 动态变化、MNC 和 CD $_8^+$ T 淋巴细胞的细胞免疫应答剂量效应以及不同个体成年人接种乙肝疫苗后的免疫应答进行了测定。

材料与方 法

1. HBsAg 和乙肝疫苗: 均由大连汉信生物制药有限公司惠赠。HBsAg: Hansenular Polymorpha 表达的 rHBsAg (adw2 亚型), 浓度为 1.9 mg/ml, 经高效液相 (HPLC) 和银染测定纯度 > 99.0%, 采用鲎试剂法测定细菌内毒素 < 10 EU/ml (10 μg 剂量); 乙肝疫苗每支 10 μg /0.5 ml。

2. 动物: 无特定病原体 (SPF) BALB/c 小鼠 (H-2 d), 6-8 周, 16~18 g, 雌性, 中国药品生物制品检定所实验动物中心提供。

3. 研究对象: 4 名研究对象年龄为 17~20 岁, 乙肝感染标志阴性, 均无乙肝疫苗接种史, 按 0、1、2 个月程序接种重组 (汉逊酵母) 乙肝疫苗 10 μg /剂。本研究经当地医学伦理委员会批准; 每名研究对象均签署知情同意书^[9]。

4. 免疫应答检测方法:

(1) HBsAg 免疫小鼠后 MNCs IFN- γ 应答的剂量效应研究: 将小鼠分为 7 组, 每组 8 只, 分别注射 0.1、0.25、0.5、1、2、4 和 8 μg 的 HBsAg。各组 HBsAg 均用无菌生理盐水稀释至相应的浓度, 每只小鼠背部皮下注射含 HBsAg 溶液 100 μl , 另设 1 组注射等体积的无菌生理盐水对照。小鼠免疫后 7 d 摘眼球放血处死, 无菌取脾, 制备脾细胞悬液; 淋巴细胞分离液分离 MNCs, 计数后调细胞浓度至 $4 \times 10^6/\text{ml}$, 每孔加入 100 μl 细胞, 检测 MNC 经 HBsAg MHC I 类多肽 P $_{28-39}$ 体外刺激后分泌 IFN- γ 水平 (刺激时间为 24 h)。

细胞免疫应答体外刺激物为 HBsAg MHC I 类多肽 P $_{28-39}$ (IPQSLDSWWTSL), 由 CEM 微波多肽合成仪合成, Agilent 制备高效液相分离纯化, 由中国协和医科大学药物研究所提供, 纯度 $\geq 95\%$ 。多肽 S $_{28-39}$ 溶于二甲基亚砜, 浓度为 10 mg/ml, 使用时用完全培养基稀释至相应浓度。采用鲎试剂法测定细菌内毒素, 结果 < 10 EU/ml (10 μg)。

细胞免疫测定试剂: NycoPrepTM 1.077A 淋巴细胞分离液为挪威 AXIS-SHIELD PoC AS 公司产品; RPMI 1640 培养基、胎牛血清为美国 Hyclone 公司产品, RPMI 1640 完全培养基含 10% 胎牛血清、20 mmol/L Hepes、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1 mmol/L 丙酮酸钠、 5×10^{-5} mol/L 2-巯基乙醇、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg /ml; 小鼠 IFN- γ 、IL-2、IL-5 ELISPOT 试剂盒为美国 BD 公司产品; ELISPOT 检测仪为美国 CTL 公司生产的 ImmunoSpot Analyzer (Serie 3B)。

ELISPOT 检测阳性孔判断标准: 对照孔斑点数 ≤ 5 SFC 时, 样本孔斑点数应 ≥ 10 SFC; 对照孔斑点数在 5~10 SFC 之间时, 样本孔斑点数/对照孔斑点数应 ≥ 2 ; 对照孔斑点数 > 10 SFC 时, 样本孔斑点数/对照孔斑点数应 ≥ 3 。

(2) HBsAg 免疫小鼠后 CD₈⁺ T 淋巴细胞 IFN- γ 应答的剂量效应研究: 对小鼠脾 MNC 动态研究中, 免疫 1、2、4 和 8 μg HBsAg 组的 MNCs, 分别用 CD₈⁺ T、MHC II 微型磁珠标记, 通过全自动磁性细胞分选仪 (autoMACs) 分选出 CD₈⁺ T 淋巴细胞计数, 将分离的 MHC II⁺ 细胞作为抗原递呈细胞, 加入至 CD₈⁺ T 淋巴细胞, 调细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 每孔加入 100 μl 细胞, 检测经 P₂₈₋₃₉ 体外刺激后分泌 IFN- γ 的水平。小鼠细胞微型磁珠 (CD₈⁺ 和 MHC II) 分选试剂和 AUTOMACS 自动分选仪均购自德国美天旎公司。小鼠流式抗体试剂 (CD3⁺-FITC、CD₈⁺-PE) 和 Calibur 流式细胞分析仪均为美国 BD 公司产品。

(3) HBsAg 免疫小鼠后 MNCs IFN- γ 应答的动态研究: 40 只小鼠 (BALB/c) 随机分为 4 组, 每组 10 只, 背部皮下免疫 HBsAg (HBsAg 均为无菌生理盐水稀释), 剂量为每只 3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, 另设立免疫 100 μl 生理盐水作为阴性对照组。分别于小鼠免疫后 4、7、14、25 d 时处死, 鼠脾 MNCs 分离和 IFN- γ 检测同前。

(4) HBsAg 免疫小鼠后 CTL 活性的动态研究: 特异性 CTL 效应细胞的制备: 20 只小鼠 (BALB/c) 分为 4 组, 每组 5 只, 背部皮下免疫小鼠 HBsAg 3 $\mu\text{g}/\text{只}$, 另设免疫 100 μl 生理盐水作为阴性对照组。小鼠于免疫后 7、14、28、35 d 时处死, 分离鼠脾 MNCs, 计数后用 RPMI 1640 完全培养基调细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 于 24 孔板上每孔加入 1000 μl 该悬液、经 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 丝裂霉素处理的正常同源小鼠 MNCs (再经终浓度 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ P₂₈₋₃₉ 致敏) 作为饲养细胞 1000 μl ($1 \times 10^6/\text{ml}$), 终浓度为 20 U/ml rIL-2。两种细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 条件下培养 5 d, 在 2 d 时用含 20 U/ml rIL-2 的完全培养基替换上清液。

CTL 活性测定: 对数生长期的 P815 细胞完全培养基调浓度至 $5 \times 10^6 \text{ cell}/\text{ml}$, 加入终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ P₂₈₋₃₉, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱中培养 4 h。以 Na⁵¹CrO₄ 标记 1.5 h ($7.5 \times 10^6 \text{ Bq}/10^7$ 个细胞)。充分洗涤使靶细胞上清液无残留同位素, 每孔 100 μl 加在 96 孔 V 型底细胞培养板 ($1 \times 10^5/\text{ml}$)。收集诱导 5 d 的效应细胞 ($5 \times 10^6/\text{ml}$), 按 50:1、25:1 和 10:1 效应细胞与靶细胞 (E:T) 的比例, 分别加入上述含靶细胞的培养孔, 每一效靶比例设 3 个复孔。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h, 每孔取上清液 100 μl , 用 γ 计数器测定 cpm 值。杀伤结果以特异性杀伤率表示。特异性杀伤率 (%): (实验孔 cpm

均值 - 最小释放孔 cpm 均值) / (最大释放 cpm 均值 - 最小释放孔 cpm 均值) $\times 100\%$ 。其中最大释放孔加入 100 μl 20% 的 Triton X-100, 最小释放孔加入 100 μl 完全培养基。自发释放应低于 10%。

(5) 乙肝疫苗免疫小鼠单剂和三剂后免疫应答: 20 只小鼠 (BALB/c) 随机分为 2 组, 每组 10 只, 用乙肝疫苗背部皮下免疫, 剂量为每只 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, 另设立免疫 100 μl 生理盐水作为阴性对照组。一组仅免疫单剂; 另一组于免疫后 14 d 加强免疫, 加强免疫后 14 d 接种第三剂, 单剂、三剂免疫后 7 d 时采集脾分离 MNCs 并进行 IL-2、IL-5、IFN- γ 检测, 收集全血分离血清检测抗-HBs。

(6) 成年人接种疫苗后不同个体细胞免疫应答比较: 细胞免疫和体液免疫测定方法参照文献 [9] 方法。

5. 抗-HBs 测定: 采集小鼠全血, 分离血浆, 应用美国 Abbott 公司生产的 ARCHITECT Anti-HBs 化学发光试剂盒检测抗-HBs, 以 10 mIU/ml 作为抗体阳转标志。

6. 统计学分析: 阳转率比较应用 Fisher's 确切概率法, SFC 应用 SPSS 方差分析和独立样本 t 检验, 相关性显著性检验应用二元变量相关性分析 Pearson 相关分析。

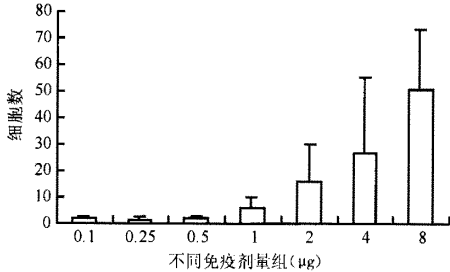
结 果

1. HBsAg 免疫小鼠的细胞免疫应答研究:

(1) 不同剂量 HBsAg 免疫小鼠 MNCs IFN- γ 应答: 免疫小鼠后, 应用 ELISPOT 方法可检测出 IFN- γ 应答的最低剂量为 1 μg , 8 μg 组剂量阳转率最高 (100%)。在 1~8 μg 剂量范围内, IFN- γ 应答阳转率与免疫剂量相关性有统计学意义 ($r = 0.951, P = 0.049$); IFN- γ SFC 与免疫剂量相关性也有统计学意义 ($r = 0.996, P = 0.000$), 见图 1、2 (结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示)。图 1 中 8 μg 剂量组 IFN- γ SFC 与 0.1、0.25、0.5、1 μg 剂量组比较 $P < 0.01$, 与 2 μg 剂量组比较 $P = 0.02 < 0.05$; 在 1~8 μg 剂量范围内, IFN- γ SFC 与免疫剂量相关性有统计学意义 ($r = 0.996, P = 0.000$)。图 2 中 1~8 μg 之间 MNCs IFN- γ 应答阳转率与免疫剂量相关性有统计学意义 ($r = 0.951, P = 0.049 < 0.05$)。

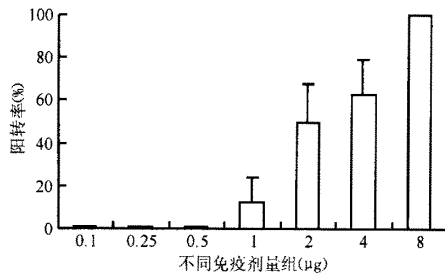
(2) 不同剂量 HBsAg 免疫小鼠脾细胞中 CD₈⁺ T 淋巴细胞 IFN- γ 应答: 应用 MACs 从 MNCs 中分选 CD₈⁺ T 淋巴细胞, 经流式细胞仪分析, CD₈⁺ T 淋巴细

胞纯度高于 90%。CD₈⁺ T 淋巴细胞 IFN- γ 阳转率在 8 μ g 组最高; 免疫剂量在 1~4 μ g 时, IFN- γ SFC 随免疫剂量的增加呈显著正相关 ($r = 0.999, P = 0.025$), 见图 3、4 (结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示)。图 4 中 8 μ g 剂量组 CD₈⁺ T 淋巴细胞的 IFN- γ SFC 与 1 μ g、2 μ g 剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.01$); CD₈⁺ T 淋巴细胞的 IFN- γ SFC 在免疫剂量为 1~4 μ g 之间与免疫剂量相关性有统计学意义 ($r = 0.999, P = 0.025 < 0.05$)。



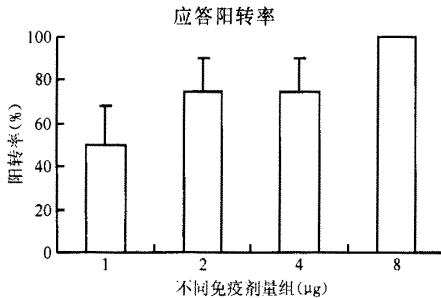
注: 纵坐标代表每 4×10^5 MNCs 中经 HBsAg MHC I 类多肽 S₂₈₋₃₉ 刺激下分泌 IFN- γ SFC

图1 不同剂量 HBsAg 免疫小鼠诱导脾 MNCs IFN- γ SFC



注: 纵坐标代表每组小鼠脾 MNCs 经 HBsAg MHC I 类多肽 S₂₈₋₃₉ 刺激下分泌 IFN- γ 的阳转率

图2 不同剂量 HBsAg 免疫小鼠诱导脾 MNCs IFN- γ 应答阳转率

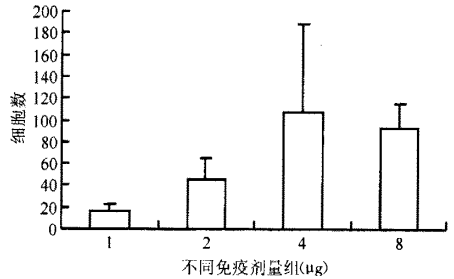


注: 纵坐标代表每组小鼠 CD₈⁺ T 淋巴细胞经 HBsAg MHC I 类多肽 S₂₈₋₃₉ 刺激下分泌 IFN- γ 的阳转率

图3 不同剂量 HBsAg 免疫小鼠诱导脾 CD₈⁺ T 淋巴细胞的细胞免疫应答阳转率

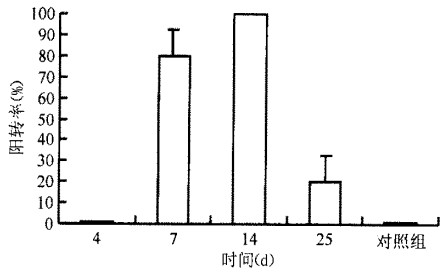
(3) HBsAg 免疫小鼠诱导脾 MNCs 分泌 IFN- γ

水平比较: 免疫后 7 d 时 80% 的小鼠可检测到 IFN- γ , 14 d 时阳转率达 100%, 其后下降。SFC 在 7 d 时达到峰值后随时间下降, 见图 5、6 (结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示)。图 6 中 14 d IFN- γ SFC 与 4 d 组比较 $P = 0.04 < 0.05$, 与 25 d 组比较 $P = 0.03 < 0.05$, 与对照组比较 $P = 0.03 < 0.05$ 。



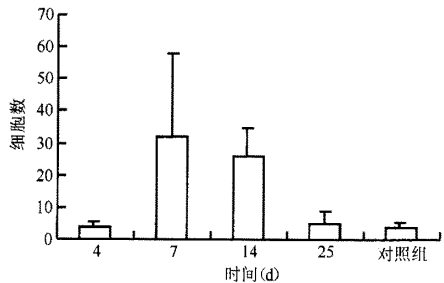
注: 纵坐标代表每 1×10^5 CD₈⁺ T 淋巴细胞中经 HBsAg MHC I 类多肽 S₂₈₋₃₉ 刺激下分泌 IFN- γ SFC

图4 不同剂量 HBsAg 免疫小鼠诱导脾 CD₈⁺ T 淋巴细胞 IFN- γ SFC



注: 纵坐标代表每组小鼠脾 MNCs 经 HBsAg MHC I 类多肽 S₂₈₋₃₉ 刺激下分泌 IFN- γ 的阳转率

图5 HBsAg 免疫小鼠后不同时间脾 MNCs 产生 IFN- γ 阳转率



注: 纵坐标代表每 4×10^5 MNCs 经 HBsAg MHC I 类多肽 S₂₈₋₃₉ 刺激下分泌 IFN- γ SFC

图6 HBsAg 免疫小鼠后不同时间 MNCs 产生 IFN- γ SFC

(4) HBsAg 免疫小鼠脾 MNCs 特异性 CTL 活性: 由图 7 可见, 在不同效靶比时, CTL 杀伤率均为随时间逐渐升高, 在 28 d 时达到高峰, 之后开始

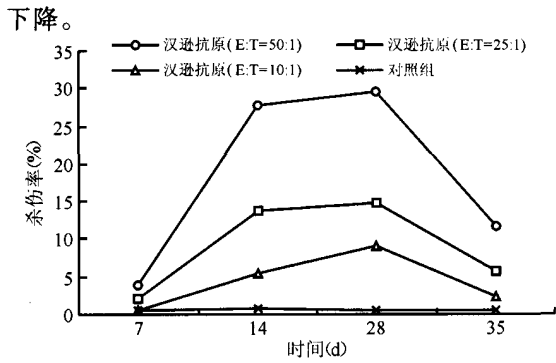
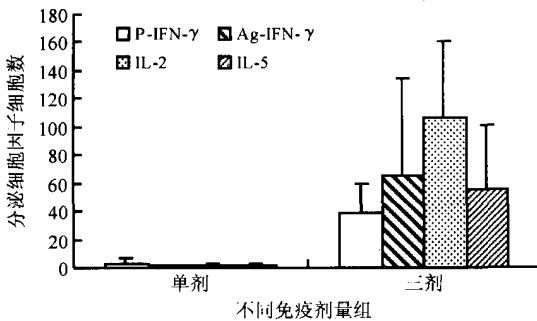


图7 HBsAg 免疫 BALB/c 小鼠诱生的 CTL 反应

(5) 乙肝疫苗免疫小鼠单剂和三剂后免疫应答比较: 小鼠免疫三剂乙肝疫苗后诱生抗原特异性 IL-2、IL-5、IFN- γ SFC 均显著高于单剂 ($P < 0.05$), 见图 8; 小鼠分别免疫单剂 (1 $\mu\text{g}/\text{剂}$) 和三剂乙肝疫苗后, 免疫单剂疫苗组细胞免疫应答均未发生阳转, 而三剂组 IFN- γ 、IL-2、IL-5 和抗-HBs 均发生阳转; 且抗体滴度三剂组也显著高于单剂组 ($t = -2.604$, $P = 0.029 < 0.05$), 见图 9 和表 1。图 8 中小鼠免疫三剂后诱生 P-IFN- γ 水平与单剂比较 $t = 6.431$, $P = 0.000 < 0.05$; 小鼠免疫三剂后诱生 Ag-IFN- γ 水平与单剂比较 $t = 3.124$, $P = 0.012 < 0.05$; 小鼠免疫三剂后诱生 IL-2 水平与单剂比较 $t = 6.557$, $P = 0.000 < 0.05$; 刺激下小鼠免疫三剂后诱生 IL-5 水平与单剂比较 $t = 3.867$, $P = 0.006 < 0.05$; 差异均有统计学意义。图 9 中小鼠免疫三剂疫苗后抗-HBs 滴度水平与单剂比较 $t = -2.604$, $P = 0.029 < 0.05$ 。



注: 纵坐标分别代表每 4×10^5 脾 MNCs 中经 HBsAg MHC I 类多肽 S₂₈₋₃₉ 刺激下分泌 IFN- γ SFC (以 P-IFN- γ 表示)、HBsAg 刺激下分泌 IFN- γ SFC (以 Ag-IFN- γ 表示) 和 IL-2、IL-5 SFC

图8 小鼠免疫不同剂乙肝疫苗后 IL-2、IL-5 和 IFN- γ SFC 比较

2. 成年人不同个体接种乙肝疫苗后细胞免疫应答的转归: 不同个体间细胞免疫和体液免疫应答的差异均较大。在接种汉逊乙肝疫苗后, 免疫后 3-8 d 时 CD₈⁺ T 淋巴细胞体外刺激即可产生 IFN- γ ,

IL-2、IL-4 开始升高时间不一, 为 21-65 d; 体液免疫应答在 65 d 时, 2 人抗-HBs 阳转 (2/4)。

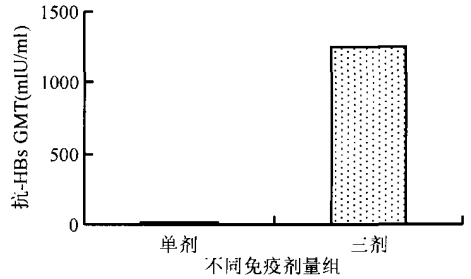


图9 小鼠免疫不同剂量乙肝疫苗后抗-HBs 比较

表1 小鼠免疫不同剂量乙肝疫苗后免疫应答阳转率 (%) 比较

项目	P-IFN- γ	Ag-IFN- γ	IL-2	IL-5	抗-HBs
单剂	0	0	0	0	0
三剂	100	100	100	100	100

讨 论

目前乙肝治疗性疫苗进展较快, 建立规范的疫苗细胞免疫评价方法对治疗性疫苗效力和机制的研究十分重要, 对新型乙肝预防性疫苗的开发亦具指导意义。但至今仍缺乏乙肝疫苗免疫动物和人体后细胞免疫机制和应答的报道, 相关的研究多集中在对现患或恢复期患者的细胞免疫应答方面。虽有人对 2 例接种乙肝疫苗后无应答者用 ELISPOT 测定 IFN- γ 动态的报道^[10], 但缺乏人接种疫苗后不同个体淋巴细胞免疫应答的动态结果。

细胞免疫测定方法对疫苗或治疗性药物的评价影响较大, 早期多应用细胞增殖试验测定接种乙肝疫苗后细胞免疫的应答状况, 但不同研究结果的一致性较差。在乙肝免疫学和治疗性药物的机制中常应用 CTL 法, 传统观点认为, 发挥清除病毒作用的细胞免疫反应主要是 CTL 的溶细胞作用^[11], 但近期利用转基因鼠模型及灵长类动物模型进行的实验均表明^[12,13], CTL 杀伤作用在感染病毒的清除中占主要地位的观念需要改变, 而由 IFN- γ 参与的非溶细胞机制在 HBV 的清除中起主要作用^[14-18]。对 HIV、HBV 的疫苗评价及抗病毒机制的研究中, 多采用 ELISPOT 法测定 IFN- γ 作为评价指标^[19,20]。本研究检测结果显示, 小鼠 CD₈⁺ T 淋巴细胞的 IFN- γ 分泌水平随着免疫剂量和免疫针次的增加而提高。说明适当提高 HBsAg 免疫剂量和增加免疫次数可增强机体的特异性细胞免疫应答强度。

不同测定方法所获得的细胞免疫剂量和免疫应

答时间趋势各异。应用 CTL 法, 免疫小鼠 0.1~10 μg HBsAg 均可产生 CTL 反应, 免疫后 5 d 即能诱导出较强的 HBsAg 特异性 CD_8^+ CTL 反应, 可持续到 4 个月^[21]。我们曾用 ELISA 法检测, 发现于免疫后 10 d 小鼠诱生 IFN- γ 达到高峰^[22]。本研究应用 ELISPOT 法对小鼠免疫 HBsAg 后 MNC 和 CD_8^+ T 淋巴细胞的剂量效应、动态和 CTL 的时间效应进行探讨, 结果单针乙肝疫苗皮下免疫小鼠, MNCs 和 CD_8^+ T 淋巴细胞最佳剂量均为 2~4 μg ; ELISPOT 法最佳检测时间是免疫后 7-14 d; CTL 为 14-28 d; 据此可选择免疫剂量和监测时间进行效力指标的确定。

我们曾报道乙肝疫苗免疫成年人后细胞免疫和体液免疫的结果^[9]。本研究报告不同个体的应答状况, 结果免疫后 3-8 d 即可检测到抗原特异性 IFN- γ 的分泌; IL-4 和 IL-2 应答高的个体, 抗体滴度高。不同个体免疫乙肝疫苗后细胞免疫和体液免疫应答的差异均较大, 应加大样本进行研究。

参 考 文 献

- [1] de Roubin MR, Cailas MD, Shen SH, et al. Some factors influencing the proportion of periplasmic hepatitis B virus pre-S2 antigen in the recombinant yeast *Hansenula polymorpha*. J Ind Microbiol, 1992, 9(1): 69-72.
- [2] Gellissen G, Melber K. Methylophilic yeast *Hansenula polymorpha* as production organism for recombinant pharmaceuticals. Arzneimittelforschung, 1996, 46(9): 943-948.
- [3] Shen SH, Bastien L, Nguyen T, et al. Synthesis and secretion of hepatitis B middle surface antigen by the methylophilic yeast *Hansenula polymorpha*. Gene, 1989, 84(2): 303-309.
- [4] Janowicz ZA, Melber K, Merckelbach A, et al. Simultaneous expression of the S and L surface antigens of hepatitis B, and formation of mixed particles in the methylophilic yeast, *Hansenula polymorpha*. Yeast, 1991, 7(5): 431-443.
- [5] Lepetic A, Biscayart C, Seigelchifer M, et al. Persistence of immunity and seroprotection 4 years after a primary vaccination schedule with a *Hansenula polymorpha* recombinant hepatitis B vaccine. Vaccine, 2003, 21(27-30): 4481-4485.
- [6] Kulkarni PS, Raut SK, Patki PS, et al. Immunogenicity of a new, low-cost recombinant hepatitis B vaccine derived from *Hansenula polymorpha* in adults. Vaccine, 2006, 24(17): 3457-3460.
- [7] 梁争论, 李艳苹, 荆庆, 等. 一种新型重组乙型肝炎疫苗(汉逊酵母菌表达)人体安全性、免疫效果考核. 中国计划免疫, 2004, 10(4): 193-197.
- [8] Diminsky D, Schirmbeck, Reimann J, et al. Comparison between hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles derived from mammalian cells (CHO) and yeast cells (*Hansenula polymorpha*): composition, structure and immunogenicity. Vaccine, 1997, 15(6-7): 637-647.
- [9] 胡忠玉, 朱凤才, 何鹏, 等. 成人接种乙型肝炎疫苗后细胞免疫应答的动态变化. 中华流行病学杂志, 2007, 28(4): 326-330.
- [10] Rahman F, Dahmen A, Herzog-Hauff, et al. Cellular and humoral immune responses induced by intradermal or intramuscular vaccination with the major hepatitis B surface antigen. Hepatology, 2000, 31(2): 521-527.
- [11] Milich DR, Jones JE, McLachlan A, et al. Distinction between immunogenicity and tolerogenicity among HBcAg T cell determinants: influence of peptide MHC interaction. J Immunol, 1989, 143(10): 3148-3156.
- [12] Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, et al. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. Immunity, 1996, 4(1): 25-36.
- [13] Guidotti LG, Rochford R, Chung J, et al. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. Science, 1999, 284(5415): 825-829.
- [14] Wong P, Pamer EG. CD_8^+ T cell responses to infectious pathogens. Ann Rev Immunol, 2003, 21: 29-70.
- [15] McClary H, Koch R, Chisari FV, et al. Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic virus to the antiviral effects of cytokines. J Virol, 2000, 74(5): 2255-2264.
- [16] Sette AD, Oseroff C, Sidney J, et al. Overcoming T cell tolerance to the hepatitis B virus surface antigen in hepatitis B virus-transgenic mice. J Immunol, 2001, 166(2): 1389-1397.
- [17] Roh S, Kim K. Overcoming tolerance in hepatitis B virus transgenic mice: a possible involvement of regulatory T cells. Microbiol Immunol, 2003, 47(6): 453-460.
- [18] Thimme R, Wieland S, Steiger C, et al. CD_8^+ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis E infection. J Virol, 2003, 77(1): 68-76.
- [19] Burton CT, Gotch F, Imami N. Rapid qualitative and quantitative analysis of T cell responses in HIV-1 infected individuals receiving successful HAART and HIV-1 sero-negative controls: concomitant assessment of perforin, IFN- γ and IL-4 secretion. J Immunol Methods, 2006, 308(1-2): 216-230.
- [20] Chichester J, Feitelson M, Calkins C. Different response requirements for IFN- γ production in ELISPOT assays by CD_8^+ T cells from mice early and late after immunization. J Immunol Methods, 2006, 309(1-2): 99-107.
- [21] Schirmbeck R, Melber K, Mertens T, et al. Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. J Virol, 1994, 68(3): 1418-1425.
- [22] 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.

(收稿日期: 2007-12-06)

(本文编辑: 尹廉)