

• 实验室研究 •

不同种类乙型肝炎重组疫苗诱导免疫应答特点比较

胡忠玉 何鹏 方鑫 邱少辉 梁争论 李河民 庄辉

【摘要】 目的 比较三种乙型肝炎重组疫苗(rHB)[乙型肝炎汉逊酵母重组疫苗(rHP)、酿酒酵母重组疫苗(rSC)和CHO重组疫苗(rCHO)]诱导小鼠细胞和体液免疫应答特点。方法 给3组小鼠(BALB/c, H-2^d)分别皮下接种3种rHB 3 μg,于免疫后第4、7、10、14、25和35 d分离脾单个核细胞(MNC),应用酶联斑点法(ELISPOT)测定MNCs体外刺激后所产生的细胞因子IFN-γ、IL-2斑点形成细胞数(SFC)。刺激物为多肽或HBsAg。同时测定免疫后不同时间的细胞毒T淋巴细胞反应(CTL)活性和小鼠血清抗-HBs水平。结果 应用ELISPOT法,不同种类rHB免疫小鼠后诱导分泌IFN-γ和IL-2峰值均为10-14 d;rHP诱导CTL活性($P=0.000<0.05$)和分泌IFN-γ水平($P<0.05$)均显著高于rCHO和rSC,且rHP于免疫后第10天诱导CTL杀伤率最高(39.8%);rHP组诱导分泌IL-2水平均显著高于其他两种疫苗组($P<0.05$),第7和14天时,rSC组诱导产生IL-2水平均显著高于rCHO组(第7天 $t=4.595, P=0.001<0.05$;第14天 $t=5.721, P=0.000<0.05$);免疫后第7天3种疫苗诱导细胞免疫应答强度依次为rHP最强,rSC其次,rCHO最弱;小鼠血清抗-HBs阳转率和抗体滴度随免疫时间而逐渐上升,第7天时rCHO组抗体显著高于rHP组($P=0.044<0.05$),第14天时rCHO组抗体显著高于rHP组($P=0.009<0.05$)和rSC组($P=0.012<0.05$)。结论 3种疫苗免疫小鼠的应答特点不同,酵母重组疫苗早期诱导细胞免疫应答优于rCHO;rCHO的优势是诱导产生抗-HBs早,且滴度较高。

【关键词】 乙型肝炎;疫苗;细胞因子;酶联免疫斑点法;斑点形成细胞;细胞毒T淋巴细胞反应

Comparison of the kinesis of immune responses in mice vaccinated by different kinds of recombinant hepatitis B vaccines HU Zhong-yu*, HE Peng, FANG Xin, QIU Shao-hui, LIANG Zheng-lun, LI He-min, ZHUANG Hui. *National Institute for Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China

Corresponding author: LIANG Zheng-lun, Email: lzln@yahoo.com

【Abstract】 **Objective** To evaluate the kinesis of cellular and humoral immune responses to different kinds of recombinant hepatitis B(rHB) vaccines in the immunized mice. **Methods** At serial time points, the levels of IFN-γ and IL-2 secreted by spleeny mononuclear cells(MNC) of the vaccinated mice were detected by enzyme-linked immunospot methods(ELISPOT) after stimulation in vitro with HBsAg MHC class I peptide S₂₈₋₃₉ or HBsAg. The lymphocytotoxicity of the immunized mice were also detected (CTL) by a specific lysis assay and the levels of anti-HBs were measured by the Abbott IMX kit. **Results** The peak values of IFN-γ and IL-2 in vaccinated mice were detected by ELISPOT, 10-14 days after immunization. The CTL and the level of IFN-γ induced by rHB vaccine derived from yeast cells(Hansenula polymorpha) (rHP vaccine) were significantly higher than the other two vaccines ($P<0.05$). The maximum lysis of CTL appeared in the vaccinated mice on day 10 after immunization, with the percentage of 39.8%. The levels of IL-2 induced by rHP vaccine were significantly higher than the other two vaccines ($P<0.05$). However, the IL-2 levels in the rSC (saccharomyces cerevisiae) vaccine group were higher as compared with the rCHO vaccine group at day 7 and day 14(7 d $t=4.595, P=0.001<0.05$; 14 d $t=5.721, P=0.000<0.05$) after immunization. The cellular immune response to the rHP vaccine was the strongest while it was the lowest to the rCHO vaccine at day 7 after immunization. The sero-positive rates and the titers of anti-HBs in the vaccinated mice increased with time after vaccination. The titers of anti-

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、方鑫、邱少辉、梁争论、李河民);北京大学医学部(庄辉)

通讯作者:梁争论,Email: lzln@yahoo.com

HBs in the rCHO vaccine group at day 7 were similar to the rSC vaccine group, but significantly higher than that of the rHP vaccine group ($P = 0.044 < 0.05$). The anti-HBs titers of the rCHO vaccine group at day 14 were significantly higher as compared to the rSC ($P = 0.012 < 0.05$) and rHP ($P = 0.009 < 0.05$) vaccine groups. **Conclusion** The immune responses induced by the three kinds of rHB vaccines were different in their patterns and levels. According to the intensity of early cellular immune response, the two yeast HB vaccines were superior to the rCHO vaccine, especially to the rHP vaccine. In contrast, the rCHO vaccine induced early seroconversion and high levels of anti-HBs.

【Key words】 Hepatitis B; Vaccine; Cytokine; Enzyme-linked immunospot; Spot-forming cell; Lymphocytotoxicity

不同类型乙型肝炎(乙肝)疫苗诱导人体免疫应答的特点不同^[1], 乙肝 CHO 重组疫苗(rCHO)糖基化程度高, 诱导抗体滴度高; 而乙肝酵母重组疫苗无糖基化, 但诱导细胞免疫早。以往应用细胞增殖、ELISA 等对不同乙肝抗原的细胞免疫特点进行比较^[2,3], 但缺少对不同类型乙肝重组疫苗(rHB)的细胞免疫和体液免疫应答进行系统、动态的比较。本研究应用酶联斑点法(ELISPOT)、细胞毒 T 淋巴细胞反应(CTL)等方法, 对不同类型 rHB 接种小鼠后的免疫应答情况进行比较。

材料与方 法

1. rHB: 规格均为每支 10 $\mu\text{g}/0.5 \text{ ml}$ 。乙肝汉逊酵母重组疫苗(rHP)、酿酒酵母重组疫苗(rSC)和 rCHO 分别由大连汉信生物制药有限公司、深圳康泰生物制品股份有限公司和 华北制药金坦生物技术股份有限公司惠赠。

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. 免疫应答的检测方法:

(1) 不同类型 rHB 免疫小鼠后, ELISPOT 检测小鼠脾 MNCs 体外刺激产生 IFN- γ 、IL-2 的动态研究: 每种疫苗应用 60 只小鼠(BALB/c), 随机分为 6 组, 每组 10 只, 背部皮下免疫 rHB 3 μg , 剂量为每只 3 $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$, 另设立接种 150 μl 生理盐水作为阴性对照组。分别于免疫后 4、7、10、14、25、35 d 时摘眼球取血(收集全血, 然后分离血清)处死, 无菌取脾, 制备脾细胞悬液, 用淋巴细胞分离液分离脾单个核细胞(MNC), 计数后调细胞浓度至 $4 \times 10^6/\text{ml}$, 每孔加入 100 μl 细胞, 检测分别用 MHC I 类多肽 P₂₈₋₃₉ 或 HBsAg 体外刺激后 MNCs 后, 其分泌 IFN- γ 及 IL-2 水平(刺激时间为 24 h)。

细胞免疫应答体外刺激物: HBsAg 是汉逊酵母(Hansenula 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), 由大连汉信生物制药有限公司惠赠; HBsAg MHC I 类多肽 S₂₈₋₃₉ (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 $\geq 95.0\%$ 。多肽 S₂₈₋₃₉ 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 剂量)。

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、 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 2-巯基乙醇、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 小鼠 IFN- γ 和 IL-2 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 (Seriese 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 SFC 和 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) 不同类型 rHB 免疫小鼠后 CTL 活性的动态研究:

特异性 CTL 效应细胞的制备: 按方法(1)中分离的脾 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 (再经终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ S₂₈₋₃₉ 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 的完全培养基换取上清。

CTL 活性测定:对数生长期的 P815 细胞完全培养基调浓度至 5×10^6 cell/ml, 加入终浓度为 $20 \mu\text{g/ml}$ P₂₈₋₃₉, 于 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 4 h。以 $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ 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无残留同位素, 每孔 $100 \mu\text{l}$ 加在 96 孔“U”形底细胞培养板 ($1 \times 10^5/\text{ml}$)。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°C , 5% CO_2 培养箱中孵育 4 h, 每孔取上清 $100 \mu\text{l}$, 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 $100 \mu\text{l}$ 20% 的 Triton X-100, 最小释放孔加入 $100 \mu\text{l}$ 完全培养基。自发释放应低于 10%。

(3) 不同类型 rHB 免疫小鼠后抗-HBs 的动态研究: 将方法(1)中收集全血分离血清检测抗-HBs 水平。

4. 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 试剂盒检测抗-HBs, 以 10mIU/ml 作为抗体阳转标志。

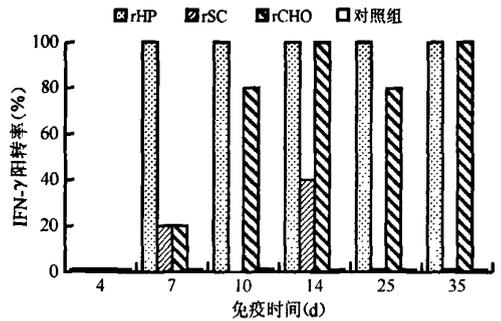
5. 统计学分析: 应用 SPSS 11.0 软件对同组同时时间点不同细胞因子 SFC 进行配对样本的 t 检验, 对不同组间数据进行独立样本的 t 检验和方差分析。

结 果

1. 不同类型 rHB 免疫小鼠诱导 MNC 分泌细胞因子比较: 由图 1~4 可见, 小鼠免疫 rHP 后 7 d, 脾 MNCs 经体外刺激后细胞因子 IFN- γ 和 IL-2 阳转率均达 100%, 并持续至 35 d; 两种细胞因子的 SFC 峰值均位于免疫后 10~14 d 之间。小鼠免疫 rSC 后, IFN- γ 和 IL-2 阳转率和 SFC 峰值均在免疫后 14 d (10 d 时未检测), IL-2 阳转率和 SFC 在 4~35 d 时均较高。14 d 时 IL-2 阳转率高于 IFN- γ , 且 IL-2 的 SFC 显著高于 IFN- γ ($t = 4.764, P = 0.001 < 0.05$), 显示 rSC 是诱导 IL-2 为主的细胞免疫。小鼠免疫 rCHO 后, IFN- γ 阳转率高于 IL-2, SFC 峰值均在免疫后 10 d。

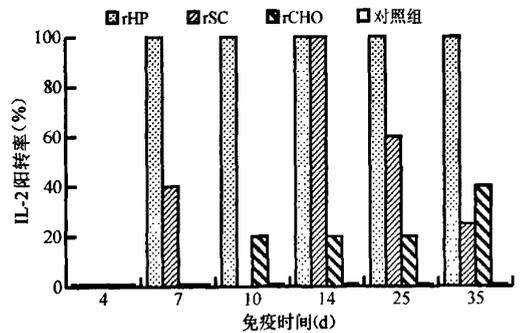
rHP 诱导分泌 IFN- γ 和 IL-2 水平均显著高于 rSC 和 rCHO ($P < 0.05$); 7 d 和 14 d 时 rSC 诱导生成 IL-2 水平均显著高于 rCHO (第 7 天 $t = 4.595, P = 0.001 < 0.05$; 第 14 天 $t = 5.721, P = 0.000 < 0.05$), 14 d 时 rCHO 诱导生成 IFN- γ 水平与 rSC 的

差异有统计学意义 ($t = 4.530, P = 0.000 < 0.05$)。



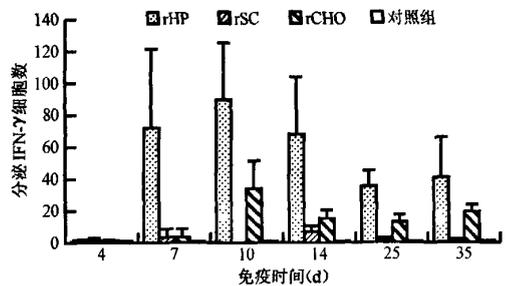
注: 纵坐标代表每组小鼠 MNCs 经 HBsAg MHC I 类多肽 S₂₈₋₃₉ 刺激下分泌 IFN- γ 阳转率

图1 三种 rHB 免疫小鼠后 IFN- γ 阳转率比较



注: 纵坐标代表每组小鼠 MNCs 经 HBsAg 刺激下 IL-2 阳转率

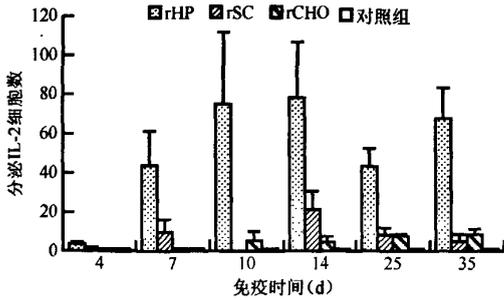
图2 三种 rHB 免疫小鼠后 IL-2 阳转率比较



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; 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示; rHP 组诱导分泌 IFN- γ 水平均显著高于另两种疫苗组 ($P < 0.05$); 14 d 时, rCHO 组诱导生成 IFN- γ 水平显著高于 rSC 组 ($t = 4.530, P = 0.001 < 0.05$)

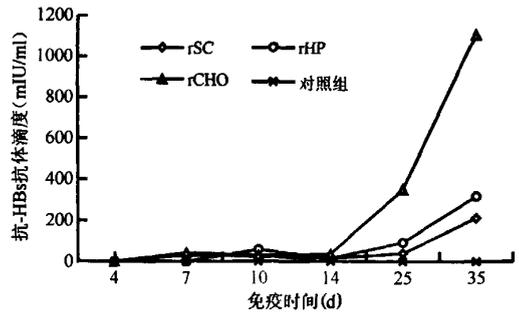
图3 三种 rHB 免疫小鼠诱导 IFN- γ 分泌水平比较

2. 不同类型 rHB 诱导小鼠 CTL 应答比较: 由图 5 可见, rCHO 组和 rSC 组在 4~35 d 时 CTL 杀伤率均较低, 且与阴性对照组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), rHP 组在小鼠免疫后 10 d CTL 杀伤率最高 (39.8%), 显著高于 rSC 组和 rCHO 组 ($P = 0.000 < 0.05$)。



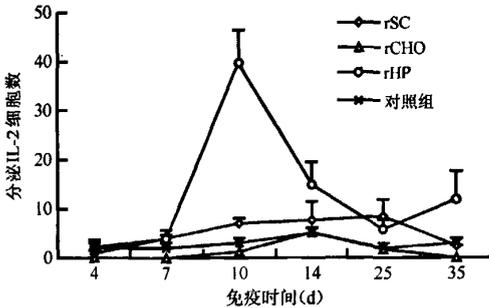
注:纵坐标代表每 4×10^5 MNCs 经 HBsAg 刺激下分泌 IL-2 SFC。rHP 组诱导分泌 IL-2 水平均显著高于另两组疫苗 ($P < 0.01$)；7 d、14 d 时, rSC 组诱导生成 IL-2 水平均显著高于 rCHO 组 (第 7 天 $t = 4.595, P = 0.001 < 0.05$ ；第 14 天 $t = 5.721, P = 0.000 < 0.05$)

图4 三种 rHB 免疫小鼠诱导 IL-2 分泌水平比较



注:7 d 时, rCHO 组抗体 GMT 与 rHP 组差异有统计学意义 ($P = 0.044 < 0.05$)；14 d 时, rCHO 组抗体 GMT 与 rSC 组差异有统计学意义 ($P = 0.012 < 0.05$)；与 rHP 组有统计学意义 ($P = 0.009 < 0.05$)

图7 rHB 免疫小鼠诱导抗-HBs 抗体滴度比较



注:rHP 组 10 d 时 CTL 显著高于 rSC 和 rCHO 组 ($P = 0.000 < 0.05$)

图5 不同种类 rHB 免疫小鼠后 CTL 比较

3. 不同类型 rHB 免疫小鼠抗-HBs 动态比较:由图 6、7 可见,不同类型 rHB 免疫小鼠 1 针后 7 d, rCHO 组抗-HBs 阳转率和抗体滴度均高于 rHP 组和 rSC 组 (分别为 60%、10% 和 0%；37.7 mIU/ml、15.7 mIU/ml 和 15.9 mIU/ml), rCHO 组抗-HBs 的 GMT 显著高于 rHP 组 ($P = 0.044 < 0.05$)。14 d 时, rCHO 组抗-HBs 的 GMT 显著高于 rHP 组 ($P = 0.009 < 0.05$) 和 rSC 组 ($P = 0.012 < 0.05$)。

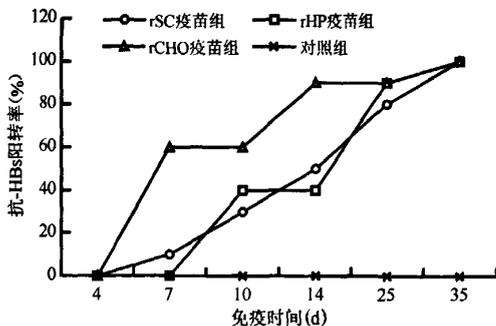


图6 rHB 免疫小鼠诱导抗-HBs 阳转率比较

讨 论

rHB 是将 HBsAg 经过纯化等工艺,加铝佐剂 (氢氧化铝) 吸附而成。不同来源的 HBsAg 具有不同的理化特性和生物学效应,在糖基化程度、游离二硫键数目和诱导免疫应答等方面存在差异。此外,表达系统、纯化工艺等后处理过程及铝佐剂吸附工艺等对 rHB 免疫原性均可能产生影响^[2,4]。

临床研究表明, rCHO 诱导抗-HBs 滴度高于 rSC；小鼠效力研究结果表明, rCHO 的 ED₅₀ (μg) 最小, rSC 较大^[1,5,6]。本研究对小鼠抗-HBs 动态比较结果显示, rCHO 免疫早期 (7 d 时) 即可诱导较高的抗-HBs 血清阳转率和抗体滴度；14 d 时 rCHO 诱导抗体滴度显著高于 rHP 和 rSC, rCHO 后期诱导抗体滴度也高于 rHP 和 rSC。但在 3 种 rHB 中, rCHO 的 HBV 母婴阻断率最低 (10 μg /剂, 约 75%)^[1], 说明仅依据抗体产生的早晚和高低, 不足以解释 rHB 的阻断效果。

TH1 类细胞及其相关细胞因子 IFN- γ 、IL-2 和 IL-12^[7,9], 以及 CD₈⁺ T 分泌 IFN- γ 为机体抗病毒的重要机制^[10,11]。本研究对 3 种 rHB 免疫小鼠的细胞免疫应答动态研究结果表明, 7 d 时 rHP 诱导 T 细胞分泌 IFN- γ 、IL-2 水平显著高于 rSC 和 rCHO, 且 rSC 诱导生成 IL-2 水平显著高于 rCHO 组；但以后 rHP 诱导生成 IFN- γ 、IL-2 的能力显著高于 rCHO 和 rSC。因而早期 T 细胞分泌因子 IFN- γ 、IL-2 能力 rHP 最强, rSC 其次, rCHO 最弱。这与前期研究乙型肝炎重组抗原诱导生成 TH1 类细胞因子早的结果基本一致^[3]。

既往研究认为, CTL 在 HBV 感染病毒清除中

占主导地位^[12],但近年研究发现,由 TH1 类细胞因子参与的非溶细胞机制在抑制 HBV 复制甚至清除病毒中起了重要的作用^[13-15]。尽管如此,细胞毒性 T 淋巴细胞直接杀伤感染细胞,以及 CTL 过程中释放的细胞因子作用仍然是抑制病毒复制和清除病毒的一种方式^[16]。有报道,加铝佐剂疫苗后免疫后不能检测到 CTL^[4],本研究以 P815-S₂₈₋₃₉ 为靶细胞,通过⁵¹Cr 释放法,检测不同疫苗免疫小鼠后于不同时间诱导的 CTL 活性,以及对 3 种 rHB 体外 CTL 测定,rCHO 和 rSC 未测出 CTL 活性,而 rHP 在免疫后 10 d,诱导较强的对 P815-S₂₈₋₃₉ 的杀伤。前期对 rHP 抗原诱导 CTL 研究表明,峰值位于 14 - 28 d^[17],即未发现铝佐剂对 rHP 诱导 CTL 的抑制作用。

不同类型乙肝疫苗诱导免疫应答特点不同。在诱导抗-HBs 方面,rCHO 疫苗的优势是阳转早,且抗体滴度高,两种酵母疫苗中,rHP 后期诱导的抗体滴度高。抗体滴度越高,持续保护时间越长^[18]。在细胞免疫应答方面,rHP 的优势是诱导分泌因子 IFN- γ 、IL-2 能力和 CTL 活性较强,早期(免疫后 7 d)rSC 分泌 IL-2 的能力强于 rCHO,3 种疫苗早期诱导的细胞免疫应答的差异与临床母婴传播阻断保护率高低相一致^[6]。本研究提示,可针对不同人群采用相应的疫苗,对于高危人群、暴露后预防和母婴阻断宜选用细胞免疫应答产生早且较强的酵母重组疫苗;对阻断 HBV 水平传播,宜选用抗体产生早且后期抗体滴度高的 rCHO。此外,增加免疫剂量和免疫针次是提高酵母重组疫苗保护水平和免疫持久性的重要手段^[17]。

参 考 文 献

[1] 梁争论,李河民,荆庆,等. 国产重组(CHO 细胞)乙型肝炎疫苗抗体反应和母婴传播阻断效果研究. 中国计划免疫,2003,9(6):317-320.

[2] 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.

[3] 张弛,廖雪雁,梁争论,等. 不同来源乙型肝炎表面抗原的细胞免疫学对比研究. 中华微生物学和免疫学杂志,2004,24(1):48-51.

[4] Diminsky D, Schirmbeck R, 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.

[5] 梁争论,李河民,吴小音,等. 中国乙型肝炎疫苗免疫效果和免疫机理的研究进展. 中华实验和临床病毒学杂志,2002,16(1):91-93.

[6] 梁争论,李艳萍,赵桂珍,等. 国产重组乙型肝炎疫苗人体免疫效果观察. 中华微生物学和免疫学杂志,1999,19(1):22-24.

[7] Chedid MG, Deulofeut H, Yunis DE, et al. Defect in TH1-like cells of nonresponders to hepatitis B vaccine. Hum Immunol, 1997, 58(1):42-51.

[8] Vingerhoets J, Vanham G, Kestens L, et al. Deficient T-cell responses in non-responders to hepatitis B vaccination: absence of TH1 cytokine production. Immunol Lett, 1994, 39(2):163-168.

[9] Brunel F, Darbouret A, Ronco J. Cationic lipid DC-Chol induces an improved and balanced immunity able to overcome the unresponsiveness to the hepatitis B vaccine. Vaccine, 1999, 17(17):2192-2203.

[10] Wong P, Pamer EG. CD₈T cell responses to infectious pathogens. Annu Rev Immunol, 2003, 21:29-70.

[11] Thimme R, Wieland S, Steiger C, et al. CD₈T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B infection. J Virol, 2003, 77(1):68-76.

[12] Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. Annu Rev Immunol, 1995, 13(1):29-60.

[13] 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.

[14] 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.

[15] Schultz U, Chisari FV. Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes. J Virol, 1999, 73(4):3162-3168.

[16] 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.

[17] 胡忠玉,何鹏,张瑞,等. 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研究. 中华流行病学杂志,2008,29(7):706-711.

[18] Laplanche A, Courouce AM, Jungers P, et al. Hepatitis B vaccination: how long does protection last? Lancet, 1984, 2(8407):866.

(收稿日期:2008-01-24)

(本文编辑:张林东)