

不同剂量国产重组酵母乙型肝炎疫苗 成年人免疫效果及影响因素研究

张卫 林长缨 韩莉莉 李立秋 高培 林晖 龚晓红 黄芳 唐雅清
马建新 张海燕 王晨 杨鹏 李辉 孙美平 贺雄 庞星火

【摘要】 目的 通过随机双盲对照试验,评价 10 μg 和 20 μg 国产重组酵母(CHO)乙型肝炎(乙肝)疫苗应用于成年人的免疫效果,以及影响免疫效果的个体因素。方法 在北京市 4 个区县范围内选择 18~45 岁未接种乙肝疫苗、乙肝五项指标均为阴性的 642 名成年人作为研究对象,随机分为两组,按照“0-1-6”程序分别接种 10 μg 和 20 μg CHO 乙肝疫苗,通过问卷方法调查每个对象可能影响乙肝疫苗免疫效果的个体因素。于接种第三针 1 个月后采血,以雅培化学发光的方法检测抗-HBs 滴度值,抗-HBs 阴性者采用荧光定量 PCR 方法进一步检测 HBV DNA,利用 logistic 回归分析方法分析影响抗-HBs 阳转的个体因素。结果 10 μg 和 20 μg 两个剂量组抗-HBs 阳转率分别为 88.8%(95%CI: 85.4%~92.2%)和 95.3%(95%CI: 93.0%~97.6%)。按照抗-HBs<100 mIU/ml 为低无应答标准,低无应答率分别为 34.3%和 17.4%;抗体几何平均滴度(GMT)分别为 173.42 mIU/ml 和 588.51 mIU/ml。多因素分析表明:患糖尿病、配偶为乙肝病毒感染者以及大年龄组人群是抗体阳转不利因素,而 20 μg 疫苗剂量有利于抗体阳转。结论 CHO 乙肝疫苗 20 μg 免疫效果优于 10 μg ,乙肝疫苗免疫效果评价应考虑多因素的影响。

【关键词】 乙型肝炎疫苗,国产重组酵母;乙型肝炎表面抗体;随机双盲对照试验;多因素分析

Study on the immuno-effects and influencing factors of Chinese Hamster Ovary (CHO) cell hepatitis B vaccine among adults, under different dosages ZHANG Wei¹, LIN Chang-ying¹, HAN Li-li¹, LI Li-qiu¹, GAO Pei¹, LIN Hui¹, GONG Xiao-hong², HUANG Fang¹, TANG Ya-qing³, MA Jian-xin⁴, ZHANG Hai-yan⁵, WANG Chen⁶, YANG Peng¹, LI Hui⁷, SUN Mei-ping¹, HE Xiong¹, PANG Xing-huo¹.
1 Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013 China; 2 Chinese Center for Disease Control and Prevention; 3 Changping District Center for Disease Control and Prevention; 4 Chaoyang District Center for Disease Control and Prevention; 5 Dongcheng District Center for Disease Control and Prevention; 6 Xuanwu District Center for Disease Control and Prevention; 7 Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College
Corresponding author: PANG Xing-huo, Email: beijingshifanqu@163.com; LI Hui, Email: lihui99360@vip.sohu.com

This work was supported by grants from the Beijing Science and Technology Commission (No. Z0005190043811) and National Science and Technology Support Projects for the “Eleventh Five-Year Plan” of China (No. 2008ZX10002-001, 2009ZX10004-903).

【Abstract】 Objective To evaluate the immuno-effect and related influencing factors on 10 μg and 20 μg Chinese hamster ovary (CHO) cell hepatitis B vaccine, using the randomized double-blind controlled trials in adult population. **Methods** A total of 642 adults aged 18-45 years old, non-vaccinated against hepatitis B, and negative on five blood indicators for hepatitis B, were selected as the study objects from four districts in Beijing. The study objects were randomly divided into two groups, and then accepted 10 μg and 20 μg recombinant CHO hepatitis B vaccination by 0-1-6 month schedule. Influencing factors were investigated by means of questionnaire. Blood samples were collected one month after the third dose of vaccination. Anti-HBs level was detected by Abbott chemiluminescence detection method. For the anti-HBs negative person, fluorescent quantitative PCR method was used to find out if the person had been infected with HBV. Logistic

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.07.011

基金项目:北京市科学技术委员会基金(Z0005190043811);“十一五”国家科技支撑计划(2008ZX10002-001, 2009ZX10004-903)

作者单位:100013 北京市疾病预防控制中心(张卫、林长缨、韩莉莉、李立秋、高培、林晖、黄芳、杨鹏、孙美平、贺雄、庞星火);中国疾病预防控制中心(龚晓红);昌平区疾病预防控制中心(唐雅清);朝阳区疾病预防控制中心(马建新);东城区疾病预防控制中心(张海燕);宣武区疾病预防控制中心(王晨);中国医学科学院基础医学研究所(李辉)

通信作者:庞星火, Email: beijingshifanqu@163.com; 李辉, Email: lihui99360@vip.sohu.com

regression analysis was used to find out the influencing factors of anti-HBs seroconversion on every studied subject. **Results** The anti-HBs seroconversion rates on 10 μg and 20 μg dose groups were 88.8% (95% CI: 85.4%–92.2%) and 95.3% (95% CI: 93.0%–97.6%) respectively. Taking the anti-HBs level <100 mIU/ml as the low/non-response standard, the low response and non-response rates were 34.3% and 17.4% respectively. The geometric mean titers (GMT) of anti-HBs were 173.42 mIU/ml for the 10 μg dose group and 588.51 mIU/ml for the 20 μg dose group. Data from the Multivariate analysis showed that: diabetes, spouses infected with hepatitis B virus and old age were unfavorable factors for anti-HBs Seroconversion. 20 μg dose of the vaccine was conducive to seroconversion. **Conclusion** 20 μg CHO hepatitis B vaccine seemed better than 10 μg CHO hepatitis B vaccine while many factors need to be taken into account for evaluation on hepatitis B vaccines.

【Key words】 Recombinant CHO hepatitis B vaccine; Anti-HBs; Randomized double-blind controlled trials; Multivariate analysis

儿童乙型肝炎(乙肝)疫苗免疫接种已经开展20余年,其免疫预防效果显著,儿童乙肝病毒(HBV)感染率大幅度下降,然而,我国成年人乙肝疫苗接种率普遍较低。2006年北京市病毒性肝炎血清流行病学调查表明,18~45岁人群HBV感染率最高^[1],因此,预防控制乙肝的重点人群应包括成年人,特别是中青年。为探讨成年人免疫预防的有关问题,现将“北京市重点传染病成年人免疫预防研究”课题中国产重组酵母(CHO)乙肝疫苗接种于成年人后体液免疫效果报告如下。

对象与方法

1. 研究对象:来源于北京市东城、朝阳、宣武和昌平4个区的年龄18~45周岁成年人。入组标准:①北京市常住人口,能够长期随访;②年龄18~45周岁;③未接种过乙肝疫苗、甲乙肝联合疫苗及乙肝免疫球蛋白;④无急慢性乙肝病史;若曾经检测过“乙肝五项”,则每个指标均为阴性;⑤自愿免费接种乙肝疫苗并同意在接种后采血检测免疫效果;⑥无乙肝疫苗接种禁忌症。

2. 初筛及分组:对符合要求的初筛对象,首先采集每个对象血样,利用雅培I2000化学发光方法检测“乙肝五项”指标,判断标准为:HBsAg S/N值 ≥ 2 为阳性;抗-HBs ≥ 10 mIU/ml为阳性;抗-HBc抑制率 $\geq 50\%$ 为阳性;HBeAg S/CO值 ≥ 1 为阳性;抗-HBe S/CO值 > 1.000 为阴性,S/CO值 ≤ 1.000 为阳性。

对每名采血对象开展问卷调查,内容主要包括个体基本情况、疫苗接种及免疫反应主要影响因素等。血清学检查和问卷调查合格者作为研究对象。以参与研究的4个区县为基本试验单位,在每个区县内采用随机数字表的方法将初筛合格的研究对象随机分配到10 μg 和20 μg 两个剂量组。研究对象以及参与观察疫苗接种反应的调查者均不知分组情况,每个试验单位内有专人掌握接种对象分组,以做到双盲。

3. 疫苗及接种:研究疫苗使用华北制药金坛生物制品有限公司生产的CHO乙肝疫苗,剂量包括10 μg 和20 μg 两种,批号为A20070531、A20070522,疫苗接种程序为0、1、6个月(0-1-6),在上臂三角肌处接种3针。所使用的研究疫苗均经过中国药品生物制品检定所检定合格。

4. 接种后免疫效果评价:研究中每名对象需要多次采集血样,主要包括初筛时乙肝感染状况血清学检测(3 ml)、第三针接种后1~2个月采集血样(3 ml)以检测抗-HBs滴度,评价体液免疫效果,对抗-HBs阴性者采用荧光定量PCR的方法检测HBV DNA。另外,随机选择其中部分对象(160人+对照)采血8 ml进行细胞免疫功能检测(该结果另文报告)。

5. 质量控制:主要包括①现场调查质控措施:通过优选调查员,岗前培训,调查结果抽查复核,减少失访等措施控制问卷调查质量;②采血质控措施:聘请专业人员采血,避免溶血,规范血样存放和运送;③使用条码:每名对象自始至终使用统一的条码,避免混淆;④实验室检测质控:明确人员分工,采用优质试剂、先进设备检测,应用盲法平行样、质控血清、标准品等措施;⑤统计分析质量控制:数据预审核、双录入建库、逻辑查错等措施。

6. 统计学分析:流行病学调查资料经过审核后以EpiData 3.1软件建立数据库,应用SPSS 13.0软件进行统计学分析,阳转率等的比较采用 χ^2 检验,组间抗-HBs平均滴度及组间计量资料比较分别采用 t 检验,多因素分析采用logistic回归分析方法。

结 果

1. 研究对象一般情况:本研究参加初筛1642人,筛查出642名合格研究对象,其中男性270人,女性372人,随机分成10 μg 和20 μg 两组,每组各321人。

2. 两组间均衡性比较:①性别:10 μg 组女性占56.1%,男性占43.9%;20 μg 组女性占59.8%,男性占40.2%,差异无统计学意义($P > 0.05$)。②民族构成:

10 μg 组汉族、满族、回族、蒙古族人群分布分别占 97.5%、1.2%、0.9%、0.3%，20 μg 组分别占 97.0%、1.7%、0.8%、0.5%，两组民族构成的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。③婚姻状况：10 μg 和 20 μg 组已婚者分别占 85.0% 和 84.4%，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。④体重指数 (BMI)：10 μg 组 BMI = 23.95，20 μg 组 BMI = 24.03，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。⑤年龄：10 μg 组平均年龄 36.86 岁，20 μg 组平均年龄 36.65 岁，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。⑥个人经济收入：两组差异无统计学意义。

3. 抗-HBs 阳转率：研究对象按照“0-1-6”接种程序接种乙肝疫苗后 1~2 个月，采血检测抗-HBs 滴度水平，阴性者进一步检测 HBV DNA，抗-HBs 与 HBV DNA 均阴性者列为阴性。结果发现 10 μg 组 321 名对象中 36 名抗-HBs 阴性，阳转率为 88.8%；20 μg 组 321 名对象中 15 名为阴性，抗体阳转率为 95.3%。20 μg 组显著高于 10 μg 组 ($P < 0.01$)。

4. 抗-HBs 低无应答率：按照接种第三针后 1~2 个月血清抗-HBs 滴度值 ≥ 100 IU/L 为正常应答， < 100 IU/L 为低/无应答 (包括无应答和低应答对象，代表免疫反应较差的那部分对象)，则 10 μg 疫苗组低无应答率为 34.3% (110/321)，20 μg 疫苗组低无应答率为 17.4% (56/321)，10 μg 剂量组低无应答率高于 20 μg 组，二者间差异有统计学意义 ($P < 0.0001$)。

为了比较低无应答率在不同性别间是否存在差异，在每个剂量组内进一步细分为男性和女性两个部分。10 μg 组男性低无应答率为 39.0% (55/141)，女性为 30.6% (55/180)，男性低无应答率高于女性，但差异无统计学意义 ($P = 0.113$)；20 μg 组男性低无应答率为 24.8% (32/129)，女性为 12.5% (24/192)，男性低无应答率高于女性，差异有统计学意义 ($P < 0.005$)。

5. 抗-HBs 滴度水平分析：10 μg 组抗-HBs 几何平均滴度 (GMT) 为 173.42 mIU/ml，20 μg 组为 588.51 mIU/ml，20 μg 组显著高于 10 μg 组，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。抗体滴度离散趋势分析表明，10 μg 剂量组第 25 百分位数 (P_{25}) 为 49.27 mIU/ml， P_{75} 为 1000 mIU/ml，四分位数间距为 950.73 mIU/ml；20 μg 剂量组 P_{25} 为 196.48 mIU/ml， P_{75} 为 3430.03 mIU/ml，四分位数间距为 3233.55 mIU/ml。20 μg 剂量组具有更大的变异性 (表 1)。

表 2 为抗-HBs 滴度值在不同分级间的分布情况比较。可见 10 μg 剂量组抗-HBs 滴度值 ≥ 1000 mIU/ml 以上者，占 26.8%，而 $\geq 10\ 000$ mIU/ml 者，占 3.4%；20 μg 剂量组抗-HBs 滴度值 ≥ 1000 mIU/ml 以上者，

占 44.2%，而 $\geq 10\ 000$ mIU/ml 者，占 6.5%。说明 20 μg 剂量组强抗体反应率较高。而在抗体滴度较低人群，特别是无应答的对象，10 μg 剂量组为 11.2%，20 μg 剂量组为 4.7%，显示出 10 μg 剂量组低应答的比例高于 20 μg 组。由表 2 还可见，无论是 10 μg 还是 20 μg 剂量组，CHO 疫苗免疫成年人后抗-HBs 滴度值在 10 000 mIU/ml 以上的比例分别占 3.4% 和 6.5%，具有较高的抗体滴度水平。

表 1 不同剂量组抗-HBs 滴度水平分布比较

剂量组 (μg)	人数	抗-HBs 滴度水平 (mIU/ml)			
		P_{25}	P_{75}	M	GMT (1:)
10	321	49.27	1000.00	306.61	173.42
20	321	196.48	3430.03	758.93	588.51
合计	642	91.21	1482.71	517.84	319.46

表 2 10 μg 和 20 μg 剂量组抗-HBs 滴度分布比较

剂量组 (μg)	抗-HBs 滴度 (mIU/ml)					合计
	< 10	10~	100~	1000~	10 000~	
10 人数	36	74	125	75	11	321
10 构成比 (%)	11.2	23.1	38.9	23.4	3.4	100.0
20 人数	15	41	123	121	21	321
20 构成比 (%)	4.7	12.8	38.3	37.7	6.5	100.0
合计 人数	51	115	248	196	32	642
合计 构成比 (%)	7.9	17.9	38.6	30.5	5.0	100.0

图 1 为不同性别、不同剂量组间抗-HBs 滴度取对数值的 95% 可信区间 (CI) 比较。可见无论男性还是女性接种对象抗体滴度 95% CI 均为 20 μg 组高于 10 μg 组。对于同一个剂量组内女性接种对象抗体滴度均数水平高于男性，但未超过 95% CI 范围，说明差异未达到统计学意义。

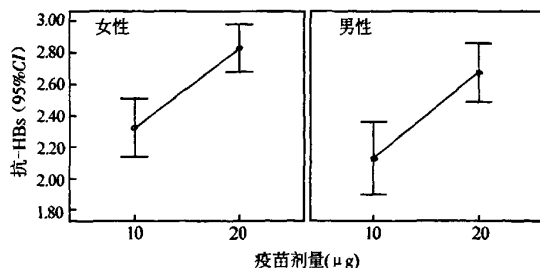


图 1 不同性别、不同剂量组间抗-HBs 滴度对数值的 95% CI 比较

6. 影响因素分析：为进一步分析影响乙肝疫苗抗体阳转的综合因素，以抗体阳转作为因变量，可能影响乙肝疫苗免疫效果的众多因素为协变量，进行 logistic 回归分析，采用前进法将研究变量逐步引入模型。多因素分析结果显示，患糖尿病、配偶为 HBV 感染者、大年龄对象是影响抗-HBs 阳转的不利因素，而较大剂量乙肝疫苗有利于抗体阳转 (表 3)。

7. 不良反应情况：为评价 CHO 乙肝疫苗的安全性，对每名接种对象在接种后 24、48、72 h 内，跟踪随

表 3 乙肝疫苗抗体阳转影响多因素分析

变量	β	s_e	Wald χ^2 值	Exp(β)	95%CI
糖尿病	-1.648	0.773	4.541	0.192	0.049 ~ 0.917
配偶为 HBV 感染者	-2.825	1.121	6.349	0.059	0.009 ~ 0.563
年龄	-0.092	0.032	8.195	0.912	0.901 ~ 0.993
疫苗剂量	0.962	0.327	8.640	2.617	1.400 ~ 4.997
常量	5.619	1.323	18.034	275.673	-

访不良反应发生情况,调查内容包括局部反应和全身反应。在所观察的 642 名研究对象中除个别观察对象有局部一过性疼痛症状外,未见其他不良反应报告。

讨 论

1992 年我国已将乙肝疫苗纳入儿童计划免疫管理,并实施新生儿普遍接种乙肝疫苗的免疫策略,儿童 HBV 感染率较接种前大幅度下降。然而,由于成年人和高危人群 HBV 感染率依然处于较高水平,全人群乙肝发病率和死亡率仍然位居所有传染病的前列。如果单纯依靠新生儿普遍接种乙肝疫苗,免疫人群随着接种人群年龄上移而逐步增加,则控制乙肝仍需要一个相当长时间,根据流行病学数学模型预测,至少需要 50 年时间,与我国制定的 2010 年乙肝控制目标相差甚远。另外,成年人和新生儿属于两个不同类型的免疫反应人群,成年人和高危人群乙肝免疫预防所面临的诸多问题还未根本解决。因此,探讨乙肝疫苗对成年人和高危人群的免疫策略及其模式,观察成年人免疫效果,对我国降低全人群乙肝发病率和死亡率具有十分重要意义。

评价不同剂量乙肝疫苗的免疫效果,组间的可比性是影响结果的关键。本研究在选择研究对象时,先将研究对象分层,然后随机分组,因此 10 μ g 和 20 μ g 两组间性别、民族构成、婚姻状况、BMI、年龄以及个体经济收入等方面的差异均无统计学意义,具有很好的可比性。

本研究 10 μ g 组的抗-HBs 阳转率为 88.8%, 20 μ g 组阳转率为 95.3%,二者差异有统计学意义,表明成年人使用 20 μ g CHO 乙肝疫苗效果优于 10 μ g。该结果与其他重组酵母乙肝疫苗抗体阳转率接近^[2]。

CHO 乙肝疫苗接种后抗-HBs 滴度值 > 10 mIU/ml 是抗体达保护水平的标准,滴度值在 10 ~ 99 mIU/ml 之间属于低应答水平,抗体持久性随着时间的推移会逐步衰减。本研究结果表明 10 μ g 组低无应答率为 34.3%,显著高于 20 μ g 组,证明成年人免疫预防应推荐使用 20 μ g 疫苗。低无应答在性别间的差异性比较,无论是 10 μ g 还是 20 μ g 组,均表现为男性低无应答率高于女性,尤其是在 20 μ g 组,男女间低

无应答差异具有统计学意义。

两个剂量组的 GMT 亦表现差异,10 μ g 组 GMT = 173.42 mIU/ml, 20 μ g 组 GMT = 588.51 mIU/ml, 20 μ g 组特别在强抗体反应(滴度值为 1000 mIU/ml 以上)中表现出剂量反应优势。CHO 细胞属于高等真核生物细胞,而酵母属于低等真核生物细胞,CHO 细胞表达的 HBsAg 更接近自然的 HBsAg。CHO 细胞表达的抗原糖基化程度较高,而糖基化程度高的 CHO 疫苗能诱导较强的体液免疫,CHO 疫苗去糖基化后细胞免疫增强而体液免疫下降^[3]。

本研究多因素分析发现,影响成年人 CHO 乙肝疫苗免疫效果的因素除疫苗剂量外,年龄、罹患糖尿病、配偶是 HBV 感染者与乙肝疫苗的抗体阳转有关。其中年龄作为影响疫苗免疫应答的主要因素之一,已经被众多的研究所证实^[4],随着年龄的增长,乙肝疫苗的低/无应答率也会逐步增加。本研究选择 18 ~ 45 岁年龄段的成年人作为研究对象,主要考虑到该年龄段是目前我国乙肝报告发病率的最高年龄段,也是社会劳动力的主要年龄人群,在做好新生儿和基础免疫的前提下,应进一步推行成年人和高危人群的免疫预防。本研究发现糖尿病是接种乙肝疫苗后抗体阳转的不利因素,提示糖尿病患者免疫功能的变化,对这类人群接种乙肝疫苗应加大免疫的剂量。“配偶是 HBV 感染者”是影响抗体阳转多因素分析中另一个影响因素,影响其配偶接种后抗体阳转,可能与长期的夫妻生活,导致配偶免疫耐受有关。从另外一个方面也证明,对 HBV 感染者的配偶接种乙肝疫苗,应该加大疫苗接种剂量,才能获得高保护率。

总之,本项研究证实成年人接种 20 μ g 乙肝疫苗具有较好的抗体阳转率和抗体滴度水平。

参 考 文 献

- [1] Wu J, Zhang W, Han LL, et al. A sero-epidemiological study on hepatitis B among general population in Beijing. Chin J Epidemiol, 2007, 28(6): 555-557. (in Chinese)
吴疆, 张卫, 韩莉莉, 等. 北京市人群乙型肝炎血清流行病学研究. 中华流行病学杂志, 2007, 28(6): 555-557.
- [2] Dong MH, Lin YD, Qian YH, et al. Immunity effect of homemade recombinant yeast derived hepatitis B vaccine in adults. MMJC, 2009, 11(2): 24-26. (in Chinese)
董美华, 林玉娣, 钱燕华, 等. 成人接种国产重组酵母乙肝疫苗的免疫效果分析. 中国现代医药杂志, 2009, 11(2): 24-26.
- [3] Liang ZL, Li HM, Wu XY, et al. Advances in immunity effect and mechanism of hepatitis B vaccine in China. Chin J Exp Clin Virol, 2002, 16(1): 91-93. (in Chinese)
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.
- [4] Fisman DN, Agrawal D, Leder K. The effect of age on immunologic response to recombinant hepatitis B vaccine: a meta-analysis. Clin Infect Dis, 2002, 35(1): 1368-1375.

(收稿日期: 2009-12-29)

(本文编辑: 张林东)