

HBsAg 疫苗对非溶细胞性和溶细胞性细胞免疫应答的影响

熊一力, 贾彦征, 施理, 张宜俊

熊一力, 贾彦征, 施理, 张宜俊, 中国人民解放军第 458 医院全军传染病中心 广东省广州市 510602
项目负责人: 熊一力, 510602, 广州市东风东路 801 号, 中国人民解放军第 458 医院全军传染病中心. xyili@163.net
电话: 020-87373156 传真: 020-87371180
收稿日期: 2002-11-12 接受日期: 2002-12-05

摘要

目的: 观察 HBsAg 疫苗对细胞免疫应答的影响及其诱生的免疫反应类型。

方法: 低、中、高剂量 HBsAg 疫苗两次免疫小鼠后, 采用酶联免疫法检测鼠血清抗 HBs IgG2a, 并用乳酸脱氢酶分析法检测细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)杀伤靶细胞的活性。

结果: HBsAg 疫苗可诱导小鼠产生抗 HBs IgG2a, 中、高剂量组阳转率(91.1%、100%)显著高于低剂量组(62.5%), P 均 <0.01 ; 低、中、高剂量组部分鼠特异性 CTL 释放率大于 60%, 达到特异性 CTL 活化(60%、60%、56%), 与对照组(0%)比较 P 均 <0.01

结论: HBsAg 疫苗可增强特异性细胞免疫反应, 而且对非溶细胞性和溶细胞性免疫应答均可上调。

熊一力, 贾彦征, 施理, 张宜俊. HBsAg 疫苗对非溶细胞性和溶细胞性细胞免疫应答的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(11):1802-1804

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1802.asp>

0 引言

近年将 HBsAg 疫苗作为治疗性疫苗治疗慢性乙型肝炎(CHB)已有一些令人鼓舞的报道^[1, 2], 但其作用机制是否与纠正 CHB 细胞免疫应答低下有关及究竟是调节非溶细胞性还是溶细胞性免疫应答或二者皆有还有待证实. 本研究用 HBsAg 疫苗免疫正常小鼠后, 测定了不同剂量疫苗对实验鼠抗 HBs IgG2a 产生和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)功能的影响, 以观察 HBsAg 疫苗对细胞免疫应答的影响及其诱生的免疫反应类型. 旨在探讨 HBsAg 疫苗治疗 CHB 的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 实验药品用重组(酵母)乙型肝炎疫苗(recombinant hepatitis B vaccine (yeast), RHBV), 每支 1 mL, 主要含重组(酵母)HBsAg 亚单位 60 μ g, 溶剂均用铝稀释剂 0.5 mg/mL (康泰生物制品有限公司). 实验动物用 6-8 周龄的 SPF 级别 BALB/C 小鼠, 雌雄各半, 体重 16-18 g (购自华中科技大学同济医院实验动物部). 主要试剂和仪器有乙型肝炎表面抗体检测试剂

盒(上海实业科华生物技术公司), HRP 标记羊抗鼠 IgG2a (Serotec 公司), 特异性 HBsAg-T 细胞表位短肽(赛百盛生物工程公司), P815 细胞(中科院上海细胞所), 乳酸脱氢酶检测试剂盒(Sigma 公司), 全自动酶标仪 550 型(Bio-RAD 公司).

1.2 方法

1.2.1 分组和给药方法 将小鼠随机分为以下 4 组, 分别在 0、4 wk 于右后肢肌肉注射给药, 用药 6 wk 时采血, 处死、检测. 空白对照组: 注射同量生理盐水; RHBV 低剂量组: 注射 RHBV 30 μ g/kg (0.5 μ g/只)/次; RHBV 中剂量组: 注射 RHBV 90 μ g/kg (1.5 μ g/只)/次; RHBV 高剂量组: 注射 RHBV 270 μ g/kg (4.5 μ g/只)/次.

1.2.2 检测方法 (1)抗 HBs IgG2a 检测采用酶联免疫法先将小鼠待测血清加入 96 孔培养板, 50 μ L/孔(空白孔不加), 37 $^{\circ}$ C 30 min 洗板 5 次后, 每孔加入 1:4 000 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG2a, 37 $^{\circ}$ C 30 min, 再洗板 5 次后加显色剂, 用酶标仪读各孔 A 值. 以空白对照作为阴性对照, 样品 A 值/阴性对照 A 平均值大于或等于 2.1 判为阳性, 阴性对照 A 值 <0.05 按 0.05 计算, 高于 0.05 按实际 A 值计算. (2)CTL 功能检测采用乳酸脱氢酶(LDH)分析法^[3] 取小鼠脾淋巴细胞, 用含 5 μ g/mL 特异性短肽的 1 640 培养基培养, 第 2 d 加 IL-2 1000 U/mL、ConA 5 μ g/mL. 至淋巴细胞成簇生长, 有多个核淋巴细胞时, 收集、计数、调整细胞数至 10^6 /mL, 作为 CTL 反应的效应细胞. 胰酶消化对数生长期的 P815 细胞, 用含 10 μ g/mL 短肽的 1 640 培养液悬浮 P815 细胞, 培养过夜. 加丝裂霉素至 25 μ g/mL, 孵育 45 min, 用 1 640 培养基洗涤 4 次后观察. 若细胞成活率在 95% 以上, 调整细胞数至 10^4 /mL, 作为 CTL 反应的靶细胞. 按效应细胞: 靶细胞 1 000:1 比例, 加入 96 孔细胞培养板, 并补加 1 640 培养基至 100 μ L, 同时设靶细胞的最大释放孔: 以 100 mL/L Tritong X-100 代替效应细胞; 自然释放孔: 以 1 640 代替效应细胞; 培养基本底: 只含 100 μ L 培养基; 校正本底: 含 100 μ L 培养基及 100 mL/L 的 Tritong X-100. 每个样本设 3 个重复孔. 4 h 后观察靶细胞, 若最大释放孔靶细胞未完全破坏, 再加 Tritong X-100-200 mL/L, 待靶细胞完全破坏, 200 g 离心 2 min, 吸出上清, 与 LDH 反应液反应 20 min 后, 加入终止液, 在酶标仪 492 波长上读取每孔 A 值, 检出特异性 CTL 活化过程中 LDH 释放量. 按下式计算特异 CTL 释放率: 自然释放: 自然释放 - 培养基的本底; 最大释放: 最大释放 - 校正本底; 自然释放率: 自然释放 / 最大释放; 最大释放率: 最大释放 / 培养基本底; 校正率最大: 最大释放 /

校正本底; 特异 CTL 释放率: (试验 - 自然释放 - 培养基的本底)/(最大释放 - 自然释放). 计算特异 CTL 释放率, 大于 60% 者为有特异性 CTL 活化.

统计学处理 特异性 CTL 活化鼠数量组间差别用 χ^2 检验和 Fisher's 确切概率法检验.

2 结果

RHBV 免疫可诱导小鼠产生抗 HBs 亚类 IgG2a, 中、高剂量组阳转率显著高于低剂量组 ($P < 0.01$), RHBV 各剂量组部分鼠特异性 CTL 释放率大于 60%, 达到特异性 CTL 活化 ($P < 0.01$), 高剂量组用药 4wk 时, 死亡 1 只鼠, 原因不明(表 1).

表 1 不同剂量 RHBV 免疫小鼠 6wk 时对抗 HBs IgG2a 产生和 CTL 活化的影响 (%)

分组	n (只)	抗HBs IgG2a阳转率	n (只)	特异性TCL活化鼠量
空白对照组	24	0 (0/24)	10	0 (0/10)
RHBV 低剂量组	24	62.5 (15/24)	10	60 (6/10) ^b
RHBV 中剂量组	24	91.1 (22/24) ^a	10	60 (6/10) ^b
RHBV 高剂量组	24	100 (24/24) ^a	9	56 (5/9) ^b

^a $P < 0.01$ vs 低剂量组, ^b $P < 0.01$ vs 空白对照组.

3 讨论

慢性 HBV 感染主要由宿主细胞免疫功能低下, 对 HBV 产生不同程度免疫耐受造成^[4]. 虽然已有一些抗 HBV 药物, 但 HBV 的最终清除要依靠机体的免疫力, 因而寻找对 HBV 特异性的免疫调节剂和特异性主动免疫疗法是治疗本病的重要环节^[5,6]. 目前研制的乙型肝炎免疫调节剂主要有 HBsAg 疫苗、HBsAg/ 前 S₂ 疫苗、HBsAg 复合疫苗和 HBV DNA 疫苗等, 这些疫苗多以 HBsAg 为主要免疫原^[7,8]. 近年国外已有将大剂量 HBsAg 疫苗免疫人和动物后产生较理想直接或间接抗 HBV 作用的报道^[2,9]. 但该作用是否与增强机体特异性细胞免疫应答相关, 是否涉及溶细胞和非溶细胞免疫途径, 尚不清楚. 所以本实验从不同剂量 RHBV 免疫对小鼠抗 HBs IgG2a 产生(代表非溶细胞性细胞免疫)和 CTL 功能(代表溶细胞性细胞免疫)的影响着手, 探讨 HBsAg 疫苗可能的作用机制.

本结果中 HBsAg 疫苗诱导小鼠产生抗 HBs IgG2a, 使特异性 CTL 活化, 且呈一定量效关系, 说明一定剂量的 HBsAg 有增强机体特异性细胞免疫应答的作用, 此结果与我们的另一项实验中 HBsAg 促进 T 淋巴细胞增生, 诱导 IL-2、IFN- γ - 证明上调细胞免疫反应的结果(待发表)基本一致. 而且本结果还表明 HBsAg 疫苗既可上调非溶细胞性细胞免疫, 也可上调溶细胞性细胞免疫. 现已认识到 HBV 感染后首先由功能最强的抗原呈递细胞 - 树突状细胞(dendritic cell, DC) 将 HBV 抗原呈递给 T 淋巴细胞, 并以双信号(抗原和

协同刺激分子)特异激活 T 细胞. 活化的特异 T 细胞则通过非溶细胞性免疫应答(分泌细胞因子 IL-2、IFN- γ 、IFN- α , 促进抗 HBs IgG2a 产生)和溶细胞性免疫应答(特异性 CTL 杀伤感染 HBV 的肝靶细胞)来清除 HBV^[10]. 已有研究证明: HBV 慢性感染者 DC 呈递 HBV 抗原的能力低下, 使 T 细胞活化增生受限, 产生细胞因子等免疫活性物质减少, 特异性 CTL 反应减弱, 造成对 HBV 无应答或低应答^[11]. 由此看, HBsAg 疫苗诱导抗 HBs IgG2a 和使特异性 CTL 活化代表 HBsAg 增强了非溶细胞和溶细胞性特异免疫应答, 应会促进 HBV 清除, 对治疗 CHB 应该有利.

HBsAg 诱导细胞免疫应答的作用点何在呢? 可能是外周组织注射一定量的外源性 HBsAg 时, 可在局部形成足够的免疫原刺激, 使较多的 DC(主要分布在外周组织)被激活, 相继诱导出一系列的细胞免疫应答. 如此分析 DC 功能较好的个体可能会彻底清除 HBV, 而 DC 功能较低者, 可能让 HBV 免疫逃避形成免疫耐受, 所以 HBsAg 对不同个体可能会疗效不一.

多年来, CTL 通过穿孔素或 FasL-Fas 机制杀伤感染 HBV 的靶细胞一直被认为是 CTL 清除 HBV 的主要机制. 近年发现, 活化的 CTL 也可分泌多种细胞因子(IFN- γ 、IFN- α 等), 通过非溶细胞途径清除病毒, 且此途径可能是感染早期清除 HBV 的主要机制^[12-30]. 因而 HBsAg 活化的特异性 CTL 不一定仅与溶细胞免疫有关, 可能是通过非溶细胞和溶细胞两条途径联合清除 HBV. 当然, 这些推测都还有待进一步阐明.

4 参考文献

- 1 Pol S, Couillin I, Michel ML, Driss F, Nalpas B, Carnot F, Berthelot P, Brechot C. Immunotherapy of chronic hepatitis B by anti HBV vaccine. *Acta Gastroenterol Belg* 1998;61:228-233
- 2 Tangri S, Ishioka GY, Huang X, Sidney J, Southwood S, Fikes J, Sette A. Structural features of peptide analogs of human histocompatibility leukocyte antigen class I epitopes that are more potent and immunogenic than wild-type peptide. *J Exp Med* 2001;194:833-846
- 3 Milich DR. Transgenic technology and the study of hepatitis viruses: a review of what we have learned. *Can J Gastroenterol* 2000;14:781-787
- 4 Kakimi K, Lane TE, Chisari FV, Guidotti LG. Cutting edge: Inhibition of hepatitis B virus replication by activated NK T cells does not require inflammatory cell recruitment to the liver. *J Immunol* 2001;167:6701-6705
- 5 De Maria N, Idilman R, Colantoni A, Van Thiel DH. Increased effective immunogenicity to high-dose and short-interval hepatitis B virus vaccination in individuals with chronic hepatitis without cirrhosis. *J Viral Hepat* 2001;8:372-376
- 6 Ambrosch F, Wiedermann G, Kundi M, Leroux-Roels G, Desombere I, Garcon N, Thiriart C, Slaoui M, Thoelen S. A hepatitis B vaccine formulated with a novel adjuvant system. *Vaccine* 2000;18:2095-2101
- 7 McClary H, Koch R, Chisari FV, Guidotti LG. Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. *J Virol* 2000;74:2255-2264
- 8 Dahmen A, Heraog-Hauff S, Bocher WO, Galle PR, Lohr HF. Clinical and immunological efficacy of intradermal vaccine plus lamivudine with or without interleukin-2 in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2002;66:452-460
- 9 Sette AD, Oseroff C, Sidney J, Alexander J, Chesnut RW, Kakimi K, Guidotti LG, Chisari FV. Overcoming T cell toler-

- ance to the hepatitis B virus surface antigen in hepatitis B virus-transgenic mice. *J Immunol* 2001;166:1389-1397
- 10 Kakimi K, Lane TE, Wieland S, Asensio VC, Campbell IL, Chisari FV, Guidotti LG. Blocking chemokine responsive to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 2001;194:1755-1766
 - 11 Raney AK, Eggers CM, Kline EF, Guidotti LG, Pontoglio M, Yaniv M, McLachlan A. Nuclear covalently closed circular viral genomic DNA in the liver of hepatocyte nuclear factor 1 alpha-null hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2001;75:2900-2911
 - 12 Guidotti LG, Morris A, Mendez H, Koch R, Silverman RH, Williams BP, Chisari FV. Interferon-regulated pathways that control hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 2002;76:2617-2621
 - 13 Loirat D, Lemonnier FA, Michel ML. Multi-epitopic HLA-A*0201-restricted immune response against hepatitis B surface antigen after DNA-based immunization. *J Immunol* 2000;165:4748-4755
 - 14 Oka Y, Akbar SM, Horiike N, Joko K, Onji M. Mechanism and therapeutic potential of DNA-based immunization against the envelope proteins of hepatitis B virus in normal and transgenic mice. *Immunology* 2001;103:90-97
 - 15 Heintges T, Petry W, Kaldewey M, Erhardt A, Wend UC, Gerlich WH, Niederau C, Haussinger D. Combination therapy of active HBsAg vaccination and interferon-alpha in interferon-alpha nonresponders with chronic hepatitis B. *Dig Dis Sci* 2001;46:901-906
 - 16 Livingston BD, Newman M, Crimi C, McKinney D, Chesnut R, Sette A. Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of multi-epitope DNA vaccines. *Vaccine* 2001;19:4652-4660
 - 17 Akbar SM, Abe M, Masumoto T, Horiike N, Onji M. Mechanism of action of vaccine therapy in murine hepatitis B virus carriers: vaccine-induced activation of antigen presenting dendritic cells. *J Hepatol* 1999;30:755-764
 - 18 熊一力, 贾彦征, 王洪敏, 刘光泽, 任红, 周智, 张定凤. 乙型肝炎病毒转基因小鼠用于研究治疗乙型肝炎药物初探. *中华肝脏病杂志* 2001;9:19-22
 - 19 Zheng BJ, Ng MH, He LF, Yao X, Chan KW, Yuen KY, Wen YM. Therapeutic efficacy of hepatitis B surface antigen-antibodies-recombinant DNA composite in HBsAg transgenic mice. *Vaccine* 2001;19:4219-4225
 - 20 Pol S, Nalpas B, Driss F, Michel ML, Tiollais P, Denis J, Brecho C. Efficacy and limitations of a specific immunotherapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001;34:917-921
 - 21 Senturk H, Tabazk F, Akdogan M, Erdem L, Mert A, Ozaras R, Sander E, Ozbay G, Badur S. Therapeutic vaccination in chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:72-76
 - 22 Franco A, Guidotti LG, Hobbs MV, Paschetto V, Chisari FV. Pathogenetic effector function of CD4-positive T helper 1 cells in hepatitis B virus transgenic mice. *J Immunol* 1997;159:2001-2008
 - 23 Suri D, Schilling R, Lopes AR, Mullerova I, Colucci G, Williams R, Naoumov NV. Non-cytolytic inhibition of hepatitis B virus replication in human hepatocytes. *J Hepatol* 2001;35:790-797
 - 24 Chen M, Sallberg M, Thung SN, Hughes J, Jones J, Milich DR. Modeling the T-helper cell response in acute and chronic hepatitis B virus infection using T-cell receptor transgenic mice. *Antiviral Res* 2001;52:99-111
 - 25 Akbar SM, Horiike N, Onji M, Hino O. Dendritic cells and chronic hepatitis virus carriers. *Intervirology* 2001;44:199-208
 - 26 Kakimi K, Guidotti LG, Koezka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000;192:921-930
 - 27 Akbar SK, Horiike N, Onji M. Prognostic importance of antigen-presenting dendritic cells during vaccine therapy in a murine hepatitis B virus carrier. *Immunology* 1999;96:98-108
 - 28 Yu JW, Wang GQ, Lu SL. Study of immune function of peripheral blood dendritic cells from chronic hepatitis B patients. *Chin J Infect Dis* 2001;19:144-147
 - 29 Xiong YL, Liu GZ, Jia YZ. Mechanism of immune tolerance with chronic hepatitis B virus infection in hepatitis B virus transgenic mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:642-645
 - 30 Schirmbeck R, Zheng X, Roggendorf M, Geissler M, Chisari FV, Reimann J, Lu M. Targeting murine immune responses to selected T cell- or antibody-defined determinants of the hepatitis B surface antigen by plasmid DNA vaccines encoding chimeric antigen. *J Immunol* 2001;166:1405-1413

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

P27kipl、CyclinE 和 CyclinA 在胃癌中的表达及意义

金顺花, 朴熙绪, 金海峰, 朴凤顺, 许强,

金顺花, 朴熙绪, 朴凤顺, 延边大学医学院附属医院消化内科 吉林省延吉市 133000
 金海峰, 延边大学医学院附属医院消化内科 吉林省延吉市 133000
 许强, 延边肿瘤医院 吉林省延吉市 133000
 项目负责人: 金顺花, 133000, 吉林省延吉市局子街 119 号, 延边大学医学院附属医院消化内科.
 电话: 0433-2660061
 收稿日期: 2002-12-30 接受日期: 2003-02-11

摘要

目的: 研究 P27kipl、CyclinE 和 CyclinA 蛋白在胃癌中的表达, 探讨其在胃癌发生、发展中的可能作用及意义。

方法: 在 62 例胃癌中应用免疫组化 S-P 法检测 P27kipl、

CyclinE 和 CyclinA 蛋白表达情况。

结果: P27kipl、CyclinE 和 CyclinA 蛋白在 62 例胃癌中表达阳性率分别为 27.4%、45.2% 和 41.9%; 58 例癌前病变中分别为 44.8%、25.9% 和 22.4%; 25 例正常对照组中 P27kipl 蛋白表达阳性率为 84.0%, CyclinE 和 CyclinA 蛋白未见表达, 胃癌与癌前病变、正常对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。在胃癌中 P27kipl 蛋白与 CyclinE、CyclinA 蛋白表达呈负相关 ($P < 0.05$), CyclinE 蛋白与 CyclinA 蛋白表达呈正相关 ($P < 0.01$)。

结论: P27kip、CyclinE 和 CyclinA 均与胃癌发生有关, 三