

· 论 著 ·

[文章编号]1000-8861(2011)03-0232-03

CpG ODN 联合乙型肝炎疫苗与乙型肝炎疫苗免疫效果对比研究

冯晓异, 杨 喆*, 刘红岩, 徐娅妮, 陈 明, 阳选祥, 卢 松, 浦 勇, 张益丽

[摘要] 目的 探讨 CpG ODN 乙型肝炎疫苗与市售乙型肝炎疫苗对 Balb/c 小鼠的免疫作用效果。方法 将乙肝疫苗、乙肝疫苗+100 μ g CpG ODN 分别肌肉注射到 4~6 周龄, 16~18g Balb/c 小鼠体内, 于第 1 次免疫后 28d 以同样剂量加强免疫 1 次。分别于第 1 次免疫后 28、42、63 d 收集小鼠血清, 用 ELISA 方法检测抗 HBs IgG 抗体。结果 实验组产生的抗 HBs IgG 与对照组 HBs IgG 相比 $P < 0.05$, 具有显著性差异。28、42、63 d 抗 HBs IgG 分别是对照疫苗的 114 倍、4.73 倍、5.41 倍以上。结论 CpG ODN 能够显著增强小鼠对乙肝疫苗的免疫应答, 在较短时间内显著的提高乙肝抗体的产生水平, 免疫效果是乙肝疫苗的 5 倍以上。

[关键词] CpG 脱氧寡核苷酸; 乙肝疫苗; 乙肝抗体水平

[中图分类号] R392.7

[文献标识码] A

Comparative study of immune effects between hepatitis B vaccine and co-recombinant hepatitis B vaccine combined with CpG oligodeoxynucleotide

FENG Xiaoyi, YANG Zhe, LIU Hongyan, XU Yani, CHEN Ming, YANG Xuanxiang, LU Song, PU Yong, ZHANG Yili
Walvax Biotech co. ltd. Yunnan, 650106, China

[Abstract] In this study, we aimed to investigate the immune efficacy in Balb/c mice vaccinated by co-recombinant HBV vaccine combined with CpG oligodeoxynucleotide or HBV vaccine. Balb/c mice were subcutaneously injected with hepatitis B vaccine (2 μ g) combined with CpG ODN or hepatitis B vaccine only, and then boosted 28 days later with the same dose. The levels of serum hepatitis surface antibody (anti-HBs) were detected by ELISA assays when 28, 42, 63 days after the first injection. We found that the level of serum anti-HBs in the mice injected with the combination of CpG ODN and hepatitis B vaccine were significantly higher than that in mice injected with hepatitis B vaccine only ($P < 0.05$). At day 28, 42, and 63, the levels of anti-HBs in hepatitis B vaccine plus CpG ODN group were 114 times, 4.73 times, 5.41 times of that in hepatitis group, respectively, which implied that CpG ODN could induce high levels of anti-HBs in a short time. All the above results indicate that CpG ODN could significantly enhance the immune response of hepatitis B vaccine in Balb/c mice.

[Key words] CpG oligodeoxynucleotide; Hepatitis B vaccine; Anti-HBs level

乙型病毒性肝炎是由乙型肝炎病毒引起的一种世界范围内流行的疾病。据统计, 全球已有 20 多亿人经历了 HBV 感染, 其中有 3.5 亿人未慢性 HBV 携带者, 我国占 1.2 亿, 约 4%。每年有 50~120 万 HBV 感染者死于慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌。目前尚无治疗乙肝的特效药物, 主要以预防为主^[1-2]。

接种疫苗的结果证明病毒携带率减少了 85%~90%, 从 10% 下降到 2% 左右。但约有 10%~15% 接种疫苗者乙肝表面抗体为阴性或达不到保护阈值, 表现为免疫无应答或免疫低应答^[3-4]。

CpG 脱氧寡核苷酸(CpG ODN)是以非甲基化的 CpG 二级核苷酸为核心的, 具有免疫刺激作用的核苷酸序列。CpG ODN 能促进 B 细胞增殖分化并分泌 IL-6, 从而诱导抗体的分泌; 激活单核细胞, 巨噬

细胞, 诱导产生细胞免疫^[5-8]。

本实验以人工合成的寡核苷酸序列 CpG ODN 作为乙型肝炎疫苗的佐剂, 与乙肝疫苗共同注射, 观察其对乙型肝炎疫苗免疫效应的影响; 对比 CpG ODN 为佐剂的乙型肝炎疫苗与市售乙肝疫苗免疫效应的差异进行比较, 为新型佐剂乙肝疫苗的开发提供实验依据。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 Balb/c 小鼠共 40 只, 雌雄各半, 雌性未孕, 4~6 周龄, 购自成都达硕生物技术有限公司。

1.2 试剂 重组(汉逊酵母)乙型肝炎疫苗由云南沃森生物技术股份有限公司制备; 重组乙型肝炎疫苗(酵母)由 GSK 生产; CpG ODN(全程硫代修饰)由长春华普生物技术有限公司合成; 乙型肝炎病毒表面抗体定量分析试剂盒购自中国药品生物制品检定

基金项目: 国家 863 课题(2006AA02Z487)

作者单位: 650106, 云南沃森生物技术股份有限公司

* 通信作者: 杨 喆, E-mail: master-yz@163.com

所; 乙型肝炎病毒表面抗体诊断试剂盒购自上海科华生物技术有限公司。

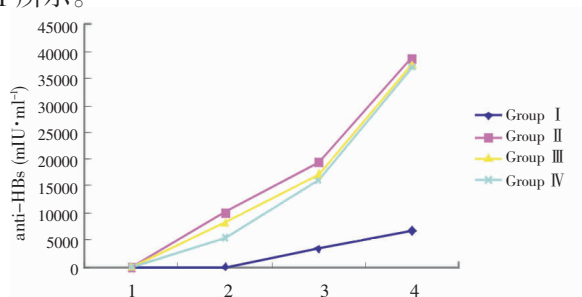
1.3 动物分组及免疫 将 Balb/c 小鼠随机分为四组, 每组 10 只, 雌雄各半, 注射途径为左胫前肌肉注射, 注射剂量为 0.1 ml/只, 免疫程序为 0 d、28 d 免疫。I 组为对照组, 注射重组乙型肝炎疫苗(酵母), 含乙肝表面抗原 2 μg ; II、III、IV 组为实验组, 注射 CpG ODN 佐剂+重组(汉逊酵母)乙型肝炎疫苗, 含乙肝表面抗原 2 μg , CpG ODN 100 μg 。

1.4 IgG 抗体效价的检测 分别采集免疫后第 28、42、63 天血清, 用乙型肝炎病毒表面抗体诊断试剂盒检测血清中抗-HBs 抗体。

1.5 统计学分析 对实验数据进行, 结果以均数 \pm 标准差表示, 各检测指标组间均数比较采用 *t* 检验, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

对各组实验数据进行统计学分析, 实验组产生的抗-HBs 抗体与对照组产生的抗-HBs 抗体水平具有显著性差异($P < 0.05$)。结果表明 CpG ODN 乙肝疫苗有效的提高了乙肝抗体产生水平, 结果如图 1、表 1 所示。



Mice were immunized with different vaccines and the serum was collected, then anti-HBs were detected with ELISA. The rate of anti-HBs was significantly increased in groups I, II, III ($P < 0.05$, vs group IV), but no significant difference was found among the three experiment groups.

图 1 免疫后小鼠血清抗乙肝抗体的变化

Fig 1 Changes of anti-HBs in serum of the immunized mice

表 1 比较各组别乙肝抗体水平

Tab 1 Comparison of anti-HBs levels in different groups

Sample	anti-HBs(mIU/ml)			
	0 day	28 th day	42 th day	63 th day
Group I	0	47.11	3365.1	6864.6
Group II	0	10193.3	19428.4	38766.7
Group I/group II	0	216	5.77	5.64
Group III	0	8373.54	17077.2	37537.4
Group III/group I	0	177	5.07	5.47
Group IV	0	5404.39	15928.9	37182.6
Group IV/group I	0	114	4.73	5.41

实验组第 28 天抗-HBs 抗体水平是对照组的 114 倍以上, 第 63 天实验组抗-HBs 抗体可高达 30 000 mIU/ml, 且是对照组的 5 倍以上。说明与市售乙型肝炎疫苗相比, CpG ODN 佐剂+乙肝疫苗能刺激机体快速产生抗-HBs 抗体, 且抗体水平远高于对照组。

3 讨论

乙型肝炎是严重危害人类健康的疾病, 注射乙型肝炎疫苗是预防乙肝的主要手段, 现市售乙型肝炎疫苗保护率可达 90% 以上, 但接种人群中仍存在 10%~15% 的低应答或无应答人群, 或某些免疫功能受损的疾病, 如艾滋病、糖尿病、服用免疫抑制剂者、严重肾脏病患者等人群, 以上人群注射普通乙型肝炎疫苗未能达到免疫保护的作用, 具有被感染的危险。如何提高此类人群对乙肝疫苗的免疫应答成为预防和治疗乙型肝炎的关键^[9-11]。

CpG-ODN 最为疫苗佐剂可与 Toll 样受体结合, 刺激树突状细胞表达 IL-2, TNF- α , IFN- α , 再激活 NK 细胞分泌 IFN- γ 。其中 IFN- γ 在抗机体感染和病毒清除过程中发挥重要作用; TNF 和 IL-6 能促进 B 细胞生成, 并在 Th1 细胞的协同作用下激活 T 细胞表现为强烈的免疫反应^[5-8]。

本实验研究所用的 CpG ODN+乙型肝炎疫苗免疫小鼠, 发现 CpG ODN 佐剂乙肝疫苗能显著的增强乙肝疫苗抗体产生水平, 使机体快速产生高滴度的抗体。由表 1 可见, 第一针免疫后实验组抗体水平是对照组的至少 114 倍。且抗体产生持续增加, 初免后第 63 天实验组抗体水平是对照疫苗 5 倍。可见, CpG ODN 乙肝疫苗不仅能刺激机体提高乙肝疫苗的免疫刺激作用, 同时可提前抗体产生时间, 这将有助于高危人群及低免疫应答的人群防御乙肝病毒的感染, 增强疫苗的保护作用, 且对治疗性乙肝疫苗的开发具有重要意义。本研究以小鼠为模型初步探讨了 CpG ODN 乙肝疫苗对小鼠的免疫效应影响, 为 CpG ODN 应用于临床提供了实验基础。

【参考文献】

- [1] Rohit Loomba, T Jake Liang. Novel approaches to new therapies for hepatitis B virus infection [J]. International Medical Press, 2006, 11(1): 1-15.
- [2] Autran B, Carcelain G, Conbadiere B, et al. Therapeutic vaccine for chronic infections [J]. Science, 2004, 305(5681): 205-208.
- [3] Lee KR, Lori JB, et al. Clinical safety and efficacy of a powdered Hepatitis B nucleic acid vaccine delivered to the epi-

(下转第 238 页)

- properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virology*, 2002, 298: 258–270.
- [4] Wootton SK, Yoo D. Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages [J]. *J Virol*, 2003, 77: 4546–4557.
- [5] Lopez OJ, Oliveira MF, Garcia EA, et al. Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14: 269–275.
- [6] 夏平安, 尹彦涛, 李素平, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒重组 N 蛋白的高效表达及间接 ELISA 方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(5): 537–541.
- [7] 何勇琴, 郭桂萍, 潘迎捷, 等. ELISA 法筛查食源性致病细菌特异性抗体的影响因素探讨及其应用 [J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(10): 897–901.
- [8] 殷震, 刘景华. *动物病毒学*[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 250–251.
- [9] 沈国顺, 金宁一, 秦晓光, 等. 表达 PRRS 病毒 GP5、GP3 和猪 IL-18 的核酸疫苗的构建及实验免疫研究[J]. *免疫学杂志*, 2006, 22(6): 629–634.
- [10] Zuckermann FA, Garcia EA, Luque ID, et al. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge [J]. *Vet Microbiol*, 2007, 123: 69–85.
- [11] Labarque G, Reeth KV, Nauwynck H, et al. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy [J]. *Vaccine*, 2004, 22: 4183–4190.
- [12] Misinzo G, Delputte PL, Meerts P, et al. Efficacy of an inactivated PRRSV vaccine: induction of virus-neutralizing antibodies and partial virological protection upon challenge [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 581: 449–454.
- [13] Cancel-Tirado SM, Evans RB, Yoon KJ. Monoclonal antibody analysis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 102(3): 249–262.
- (收稿日期: 2010-11-18; 修回日期: 2010-01-10)
(编辑 金晓琳)

(上接第 233 页)

- dermis by a commercial prototype device [J]. *Vaccine*, 2005, 23(40): 4867–4878.
- [4] Mancini-Bourguin M, Fontaine H, Brechot C, et al. Immunogenicity of a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers [J]. *Vaccine*, 2006, 24 (21): 4482–4489.
- [5] 张政, 王福生. CpG-ODN 免疫学功能及其应用研究[J]. *免疫学杂志*, 2003, 19(3): 122–125.
- [6] 王魁, 陈群, 王兴, 等. 乙肝疫苗联合含 CpG 基序寡脱氧核苷酸和卡介苗对小鼠的免疫应答影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(17): 2078–2081.
- [7] 罗满生, 郑丛龙, 张卓然. CpG ODN 增强 rHBsAg 疫苗对小鼠免疫应答影响的研究[J]. *微生物学杂志*, 2006, 26(3): 16–19.
- [8] 周健, 田德英, 许东, 等. 重组质粒 pZeoSV2(+)/CpG-HBcAg(ISS)对 Balb/c 小鼠的免疫作用[J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(3): 211–219.
- [9] Emir S, Buyukpamuk M, Akyuz C, et al. The comparison of antibody response to different hepatitis B vaccines with and without pre-S2 antigen in children with cancer [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2002, 19(4): 227–233.
- [10] Didici B, Bosnak M, Ucmak H, et al. Failure of therapeutic vaccination using hepatitis B surface antigen vaccine in the immunotolerant phase of children with chronic hepatitis B infection [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18 (2): 218–222.
- [11] BoJian Zheng, MunHon Ng, et al. Therapeutic efficacy of hepatitis B surface antigen-antibodies-recombinant DNA composite in HBsAg transgenic mice [J]. *Vaccine*, 2001, 19(30): 4219–4225.
- (收稿日期: 2010-11-15; 修回日期: 2010-12-23)
(编辑 金晓琳)