

# 治疗性乙型肝炎疫苗研究反思

陈国民

重庆医科大学生物医学工程学院;重庆医科大学第一临床医学院感染性疾病教研组,重庆 400016

**摘要** “治疗性乙肝疫苗”是以乙肝病毒(HBV)的表面抗原(s 抗原)为基础的生物制剂,目的是激发抗 s 抗原免疫反应,终止 HBV 慢性感染。HBV 的 e 抗原与 s 抗原无抗原性关联,对 e 抗原的反应也与病毒及感染细胞的清除无关,因此以 II 期临床试验者血清有关病毒 e 抗原的数据结果,尚不能判断“治疗性乙肝疫苗”是否有效。疫苗的应用是抵御病毒入侵,而治疗性乙肝疫苗是在病毒已经进入人体后应用,在患者肝细胞可能广泛受累的情况下,疫苗一旦打破耐受激发抗 s 抗原免疫反应,除能清除血清中游离的病毒和 s 抗原颗粒外,将直接攻击被感染的肝细胞。由于无法估计慢性 HBV 感染者肝细胞感染程度,所以无法推测免疫反应发生后,免疫病理所致的肝损程度以及相应的风险。在应用上隐含如此风险,是“治疗性乙肝疫苗”走不出实验室的重要因素之一。

**关键词** 慢性 HBV 感染;治疗性乙肝疫苗;免疫耐受;免疫病理

**中图分类号** R512.6

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2013.01.012

## Introspection with Therapeutic Vaccine Researches on Chronic Hepatitis B

CHEN Guomin

College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University; Department of infection diseases, The First Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**Abstract** To provoke an immune response against HBsAg in chronic HBV infections for interrupting the infection processes has been the purpose of therapeutic HBV vaccine. The vaccines research is basically the biological agents with the immunogenicity of HBV HBsAg. Due to the DNA sequence, the molecular structure and immunogenicity of HBsAg in HBV have no connection with those of HBV HBeAg at all; the HBeAg is a free and non-membrane antigen, therefore the anti-HBeAg response has no effect on the immune clearance reactions of HBV and infected hepatocytes in chronic HBV infections. Up to now, only with the clinical data about HBeAg system in serum with patients studied in Phase II clinical investigation, the treatment effectiveness of therapeutic HBV vaccine is still unable to be determined. The applications of vaccines is prophylactic in the sense of preventing viruses or bacteria from invasion, however the effort of therapeutic vaccines is that develops immune responses against persistent viral infections in an immune tolerant situation after exposure. It still remains a vision without the support from scientific rationale. Under the conditions of liver cells widespread infected by HBV in chronic HBV infection, while the anti-HBsAg response had been provoked with the treatment of therapeutic vaccine in these individuals, the free virus and HBsAg antigen particles in serum might be cleared, even the infected liver cells should be directly attacked as with accompanying circumstances, the degree of liver damage associated with the immune pathology as well as a corresponding risk could not possible estimate because of the infected degree of liver cells is hard to be estimated before chronic HBV infection treatment. Since the applications implicate such a risk, it is one of the important factors for the therapeutic HBV vaccine that is unable to get out of the laboratory. The future of therapeutic HBV vaccine seems doomed unless new and applicable immunologic principles are discovered.

**Keywords** chronic HBV infection; therapeutic HBV vaccine; immune-tolerance; immune-pathology

### 0 引言

治疗性乙型肝炎疫苗的研制已有 20 余年,但至今未走向临床。前段时间媒体有关“治疗性乙肝疫苗 II 期临床试验

失败”的报道对该项目有所震动。“治疗性乙型肝炎疫苗”是以 HBV 表面抗原(HBsAg)为基础的生物制剂,目的是激发有效的免疫反应,终止 HBV 慢性感染。而此次报道“治疗性乙

收稿日期:2012-09-18;修回日期:2012-11-26

作者简介:陈国民,教授,研究方向为人类病毒学和病毒性疾病,电子信箱:chenguomin\_2002@vip.163.com

型肝炎疫苗”II 期临床研究结果公布的材料是与 HBV 复制、清除及疾病治愈并无关联的乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)临床结果<sup>[1]</sup>,根本不能判断“治疗性乙型肝炎疫苗”的效果。该项目长时间未能走出僵局,研究者应该反思。

乙型肝炎病毒(HBV)是 20 世纪 60 年代末被发现的,病毒感染人类可分急性与慢性两种类型。除极少数重症之外,大部分急性感染临床症状轻微,可以自愈,被感染者很少察觉感染过程,对人类健康影响不大;慢性感染的发生没有任何临床征兆,但为长期或终生感染,被感染者不但肝脏内有病毒,病毒血症也可持久存在,成为病毒的传染源,更重要的是若干年后,部分慢性感染者可发展为慢性乙型肝炎,相当部分可逐渐发展至肝硬化,甚至肝癌,是中国损害人民健康的重要传染病之一。由于慢性 HBV 感染在中国发生率很高,近 30 年来有关 HBV 感染的临床与基础研究一直是中国生物医学领域研究中的重大项目,“治疗性乙肝疫苗”也是由此而生。“治疗性乙肝疫苗”将疫苗的预防性功能扩展至治疗领域,虽然被国内外一些专家誉为现代免疫学与疫苗学发展的最新方向,但在病毒感染性疾病领域未被临床验证过,至今尚无成熟产品问世。其前景是本文重点关注的问题。

## 1 免疫清除与免疫病理的辩证关系

由于抵御传染性疾病是机体免疫系统的重要功能之一,所以顺理得出免疫功能强就不易患感染性疾病的概念。人们常常希望用药物来增强免疫功能以预防“得病”。其实有的“疾病”恰恰是免疫反应所致,其中包括很大一部分病毒性疾病,因此就有免疫发病机理这个概念。病毒是细胞内寄生物种,病毒必须(感染)入侵细胞才能导致实质上的感染,而机体主要依赖免疫系统对抗病毒感染。正常的免疫反应清除病毒与感染细胞(包括体液免疫与细胞免疫)均会伴随感染细胞的溶解或免疫复合物形成,这两种现象均能导致感染组织或相邻部位的炎症性损害,造成免疫病理现象。免疫病理的程度取决于机体与致病因子双方博弈与平衡的结果。当免疫反应适时适度时,在致病因素被控制或清除的过程中,免疫病理可以不引起临床体征与症状;而当免疫病理过强、过弱或个体感受敏感时,可引发临床上的病症。这两种状况临床表象不同,本质是一致的,都有免疫系统的参与,是免疫功能的效应。如同一般发热、咳嗽、腹泻一样,既是疾病的表现,也是机体对致病因素正常的防御反应。在病毒性疾病中,病毒的免疫清除与组织的免疫病理发生于同一机制,本质上是并行的。只是有些感染过程免疫病理轻微,没有明显的临床症状,因此未被察觉;而有的临床症状比较强烈而被诊断为疾病。两种状况在临床概念上完全不同,一个有病一个“无病”,但体内发生的反应过程与机制是相同的,感染后都可产生获得性免疫,可以抵御同一株病毒的再次入侵与感染。

在一般感染性疾病中,免疫治疗的概念在临床中是十分明确的。当在免疫病理发生过于剧烈可能危及生命或可能造成严重后遗症时,需要用免疫抑制剂控制,减轻与缓解病情,

如肾上腺皮质激素等。在器官移植中治疗免疫排斥反应,也需用免疫抑制剂,如硫唑嘌呤、环孢素 A、他克莫斯等。而在免疫反应过于低下时,一些感染性疾病易扩散,病程延长,或在瘤体增生性疾病时,需要用免疫增强剂促进免疫反应,如免疫球蛋白或卡介苗等。可见免疫治疗的原则是十分明确的,分免疫抑制与免疫增强两类疗法,分别对应不同病况。

然而这个原则在慢性乙肝患者的处理上使专家们十分矛盾。抑制免疫反应可促使病毒增殖,而增强免疫反应可使肝细胞损害加剧。20 世纪 90 年代国内试行了一种“免疫撤除疗法”,即连续用 1 个月肾上腺皮质激素抑制免疫反应,让病毒充分增殖,然后突然停药解除免疫抑制,在免疫功能恢复过程中配用大剂量干扰素抗病毒,试图彻底清除病毒,但实践效果并不如意。从一般原理分析,既然慢性感染患者体内病毒长期不能清除,还是免疫功能不足,因此各类“免疫促进药物”是国内肝炎患者常用的,但效果均不能令人满意。

随后,国内临床上又出现免疫紊乱概念及相应的免疫调节治疗。由于基础与临床并没有阐明免疫紊乱概念的本质,使得免疫调节治疗也成为十分模糊的措施。哪个药物是真正的免疫调节剂?到底调节了什么?正常的个体或慢性 HBV 感染者存在免疫紊乱或因胸腺素不足而致 T 细胞不成熟的情况吗?T 细胞不成熟又是什么概念?应该出现什么样的临床表现和实验研究指标?这些问题至今没有“共识”。尽管免疫调节治疗概念如此模糊,却被应用于一大批发病机理尚不清楚的疾病,带动了一批在药理作用上同样不清晰的免疫药物与疗法,至今没有获得明确的临床疗效。这种情况需要临床专家们认真反思。

不能把正常免疫反应带来的免疫病理现象归于免疫功能紊乱,也不能把免疫系统本不具备的功能缺位(如进入细胞识别与清除病毒)说成是免疫功能不足或发育不成熟。最根本的是慢性 HBV 感染者与慢性乙型肝炎患者是否存在免疫系统异常而需要免疫治疗,此问题至今悬而未决。

## 2 慢性乙肝病毒感染者的免疫耐受现象

慢性乙肝病毒感染者的免疫系统必定对病毒的 HBsAg 耐受,而 HBsAg 恰恰是免疫系统清除乙肝病毒的靶抗原,因此机体不能有效清除病毒和感染细胞,导致在免疫系统及功能存在的情况下乙肝病毒可以在体内长期寄生,感染者终生处于病毒或病毒抗原血症状态,因此可以从慢性乙肝病毒感染者血液中定量检测乙肝病毒或病毒表面抗原的含量。这在已知人类病毒中是绝无仅有的。艾滋病也可从血液中定量检测,但仅仅在艾滋病患者 CD4 T 细胞被耗竭,免疫系统被严重损害的情况下才发生这类持续的病毒血症。

因为免疫耐受,机体没有对病毒的免疫清除反应,也就不可能发生免疫病理现象,所以慢性 HBV 携带者可以不发生肝组织损害或表现肝炎症状。临床研究也显示,这种慢性 HBV 感染状况不是从急性肝炎转化而来的。一部分人一旦感染 HBV 就进入慢性感染状态,由于无免疫清除反应、无临床症

状,临床上往往难以确定慢性 HBV 感染的发生时间。国内在大规模乙型肝炎疫苗预防接种中发现,有 15%~25% 的疫苗接种者对疫苗无(低)应答<sup>[2,3]</sup>,提示这种对 HBsAg(乙型肝炎疫苗的主要成分)的耐受是“先天的”。一个重要的免疫学机制表明,发育中的胎儿免疫系统接触某种抗原,可以诱导新生儿对该抗原的耐受,提示母亲持续的 HBsAg 血症或病毒血症是可能导致妊娠中胎儿接触抗原的重要因素之一。而慢性 HBV 感染者具有这种持续抗原血症或病毒血症的特征。

绝大部分慢性乙肝病毒感染者初期对病毒的 e 抗原同样耐受,e 抗原也可与病毒表面抗原一样以游离方式在慢性感染者血清中持续存在,此现象再次提示与验证妊娠母亲持续的病毒抗原血症是导致新生儿对该抗原耐受的重要因素。

慢性乙肝病毒感染者不存在病毒核心抗原(HBcAg)血症,因此不易诱导新生儿对病毒 HBcAg 的耐受。对 HBcAg 免疫应答可以清除血清中可能出现游离的核心抗原,但无法作用于隐蔽在病毒颗粒和感染细胞内的核心抗原,不能终止病毒感染,因此没有保护作用。这种对同一病毒不同抗原的免疫分离现象(对 HBsAg 或 HBeAg 耐受而对 HBcAg 不耐受)是慢性乙肝病毒感染者特有的一个重大的免疫学特征。而且这种免疫学特征非常稳定,从慢性感染发展为慢性肝炎,甚至成肝硬化,几乎终生不变。

根据免疫学原理,特异性免疫耐受的发生与免疫反应强弱无关,增强免疫反应并不能打破特异耐受。慢性 HBV 感染者除对病毒 HBsAg 特异耐受外,并不伴行其他常见的免疫相关性疾病,在其他感染性疾病或与免疫机能相关的疾病中表现出正常的免疫反应。因此,除因免疫病理反应过于强烈危及患者生命时,可以用免疫抑制剂如肾上腺皮质激素治疗,没有理由对慢性 HBV 感染者实施一般概念上的免疫治疗。

### 3 治疗性乙肝疫苗研究的理论依据及存在的问题

尽管慢性 HBV 感染者是否需要免疫治疗尚有存疑,但其对 HBsAg 特异耐受是慢性感染状况发生的根本原因。因此,打破机体对 HBsAg 耐受成为中止乙肝病毒慢性感染的唯一因素。疫苗是激发特异性免疫反应最有效的措施。现有的乙肝疫苗虽然是激发抗表面抗原免疫反应的,却是预防性的,并不能激发慢性感染者的免疫系统打破这种耐受,那么通过改变乙肝病毒 HBsAg 的免疫原研制一种新型乙肝疫苗来打破这种耐受,就成为研究人员治疗或终止慢性 HBV 感染的追求目的与探索方向。根据免疫学原理,免疫耐受的基础是由抗原分子的免疫原部分所决定的。将 HBsAg 分子加以改造,赋予新的免疫原,是可能激发机体对已耐受的抗原发生应答的,治疗性乙肝疫苗的设计是符合免疫学原理的。

治疗性乙肝疫苗是 Chisari 提出的,其也是“乙肝免疫发病机理”的创始人。打破表面抗原耐受的研究由 Chisari 等<sup>[4]</sup>在转基因动物中获得了证实,由于没有乙肝病毒慢性感染的动物模型,所以没有随后的治疗性动物试验以及临床试验。国内相关研究出现更早,已有上海、广州、重庆 3 家相关机构的

研究产品进入 I、II 期临床试验。然而随着病毒学和乙型肝炎临床研究的深入,该项目的发展受到了很大阻力。目前看该研究的免疫学原理是合乎逻辑的,但若治疗性乙肝疫苗一旦成功打破耐受激发免疫清除反应,临床上随之出现的免疫病理现象应该如何评估、控制与处理?因此,应对应用后可能出现的疾病风险加以重视。给预防性疫苗加上治疗的功能则是国内外一些专家的发挥,尚无成功或成熟的先例。对此全新的命题,尽管有理论与逻辑上的支撑,仍需要有实践上的可行性论证。

治疗性乙肝疫苗是在病毒已经进入人体后应用。在慢性乙肝病毒感染者体内,病毒因缺乏有效的免疫压力得以逐步扩散,肝细胞可被广泛受累,一般感染细胞膜上分布有 HBsAg,有如插上感染的标记。治疗性疫苗一旦因有效而打破耐受,产生抗 HBsAg 免疫应答,除能清除血清中游离的病毒和游离 HBsAg 颗粒外,将直接攻击被感染的肝细胞。这样导致的免疫病理对肝组织损害可能是灾难性的,原先没有疾病表现的病毒携带者可立即成为肝炎患者,甚至是重症肝炎。由于无法估计病毒携带者的肝脏受累程度,也就无法推测免疫耐受打破会对患者造成的肝损程度。虽然有的专家设想了一个非溶细胞清除细胞内病毒的免疫机制,但至今没有得到理论与实践的支持。在应用上隐含如此风险,是“治疗性乙肝疫苗”走不出实验室的重要因素。

### 4 “e 抗原血清转换”与“治疗性乙肝疫苗”

治疗性乙型肝炎疫苗的应用目的是打破对 HBsAg 的免疫耐受,清除病毒,终止 HBV 慢性感染。这次“治疗性乙肝疫苗”II 期临床研究结果失利,进入三期临床研究受阻,公布的原因是有关 HBeAg 的数据<sup>[1]</sup>。而 HBeAg 与“治疗性乙肝疫苗”作用机制并无关联,因此 HBeAg 血清转换与治疗性乙型肝炎疫苗疗效无关。

HBeAg 是 HBcAg 基因相关的衍生产物,没有独立的基因。HBcAg 分布于病毒核心颗粒与感染细胞内,因慢性 HBV 感染者对 HBcAg 有正常免疫应答与相应抗体,血循环中不存在 HBeAg。HBcAg(c)基因结构中有一段基因称前 c 基因。前 c 和 c 基因共同表达的前 c/c 蛋白比核心抗原要长,加长的部分有跨膜段,可以引导合成的蛋白穿过生物膜,穿透部分经内质网酶的酶解,解离部分就构成 HBeAg,可分泌于血清中。因为 HBeAg 是病毒前 c 和 c 基因的产物,所以是病毒感染的血清标志物之一。虽然 HBeAg 不参与病毒组成,但其水平局部反映了病毒蛋白的合成,因此 HBeAg 的检测曾作为病毒复制标志在临床研究中应用。临床研究显示,患者的 HBeAg 水平与 HBVDNA 并不平行,甚至 HBeAg 转阴的血清 HBVDNA 仍为阳性。因此,HBeAg 水平不代表病毒蛋白或病毒复制增殖受到抑制。由于病毒生命周期中并不需要 HBeAg 参与,HBeAg 作为病毒数量与复制标志在临床实践中应逐步被淘汰。而且 HBeAg 不是膜蛋白,不会成为感染细胞的靶抗原引发免疫病理,因此其水平与肝组织损害也无关。

从免疫学基本原理分析,对一种特异的抗原从耐受转变成不耐受,是因为耐受抗原的免疫原部分发生改变,重新激发免疫应答。在慢性 HBV 感染自然进程中,HBsAg 的前 c/c 基因可能因变异,导致 HBeAg 分子的免疫原部分发生改变,使原先对 HBeAg 耐受的免疫状态转变成不耐受,产生相应的免疫应答,循环中 HBeAg 被清除,血清 HBeAg 阳性转换为抗-HBe 阳性。在 HBV 慢性感染中,随感染时间的延伸,这种转换的自然发生率最终可高达 80%<sup>[9]</sup>。由于 HBeAg 血清转换反映了与病毒相关的抗原被清除,这种血清病毒免疫学标志的改变反映了免疫状态的变化,很容易被认为是机体某种清除病毒的机制被启动,感染状况将逐步被控制;因此在早期临床研究中,出现抗-HBe 是自然好转的表现,在药物治疗中出现 HBeAg 血清转换甚至被看作是一种疗效。

HBeAg 与 HBsAg 是各自独立的抗原,来自不同的病毒基因。慢性 HBV 感染者中 HBeAg 血清转换的发生率可达 80%,而 HBsAg 血清转换不足 5%,说明自然状态下 HBeAg 易发生免疫原性变异,而 s 抗原很少有这种现象。没有任何试验依据与临床资料提示在 HBeAg 血清转换后可以期待 s 抗原血清转换发生。临床资料显示,在接受干扰素治疗的患者中“HBeAg 血清转换”的比例要高些,干扰素能非特异性地抑制病毒蛋白合成,可能促使 HBeAg 免疫原性发生改变,激发机体发生免疫应答。这对于病毒免疫学研究有重大的理论意义,提示人体对原先耐受的某种病毒抗原是可以发生变化而不再耐受的。这为用人工方法促使 HBsAg 的免疫原发生改变,激发免疫反应终止 HBV 慢性感染提供了理论依据与实证,也是研制“治疗性乙型肝炎疫苗”的立论基础。然而 HBeAg 与 HBsAg 并不同源,也不存在交叉免疫,治疗性乙型肝炎疫苗的研究基础是改造 s 抗原分子,疗效需要 s 抗原血清转换来判断,在应用中即使发生 HBeAg 血清转换也与其疗效无关,“继续治疗将可能出现 HBsAg 血清转换”的推论是没有根据的。

从基础研究分析,HBV 的增殖和生活周期不受 HBeAg 缺损的干扰,血清 HBeAg 转阴后肝脏内 HBVDNA 与病毒血症仍可持续存在。临床资料证实,HBeAg 阴性的血清样本中可以存在高滴度的 HBVDNA,同时 HBeAg 也不是免疫反应清除感染细胞的靶抗原,与乙型肝炎的免疫病理无关。因此,“HBeAg 血清转换”只能证明某种治疗能诱导 HBeAg 发生变异,打破 HBeAg 耐受,如在干扰素治疗时可能发生的情况。HBeAg 与病毒清除和肝脏病理没有确切的关联。“慢性乙型肝炎防治指南”也明确表明,临床上既存在 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎,也存在 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎,这两种慢性肝炎在发病机制上没有实质性区别。因此,将治疗过程中出现的“HBeAg 血清转换”作为病毒清除与病情好转的指标与概念没有依据。

人类对事物的认识可以有一个过程。“HBeAg 血清转换”作为疗效误导了乙型肝炎治疗研究很长时间,如今已证实血

清 HBVDNA 水平才与患者病毒载量、肝损害程度以及预后密切相关。临床上已将血清 HBVDNA 水平作为疗效指标。

## 5 结论与展望

治疗性疫苗研究理论与机制是合理的,也为基础研究所证实,但至今尚未有成功产品。即使获得这样的疫苗,临床应用上也颇具风险而缺乏可行性。因此,让其回归到免疫预防本意或将发挥出不可估量的价值。在人类实践中早就已知疫苗对预防病毒性疾病的重要作用,但对于疫苗从防御功能向治疗发展及其应用的疾病领域尚在探索过程中,目前并没有成熟或成功的先例,鼓励与崇尚研究,但不宜超前“消费”。

目前应立足于疫苗的原预防的目的。人群中有 10%~20%是对现行应用的乙肝疫苗无应答者,这部分人群才真正期待新型疫苗。协助他们的免疫系统打破对 HBsAg 的耐受,保护他们免受乙肝病毒的感染与损害,不再成为新的乙肝病毒传染源,才可能是消灭乙肝病毒的有效措施。建议治疗性乙肝疫苗的研究应适时调整方向,服务于无应答者这部分人群。

## 参考文献 (References)

- [1] 罗周. 重庆啤酒: 治疗性乙肝疫苗犹如判了死刑的黑天鹅[EB/OL]. [2011-12-12]. <http://news.cntv.cn/20111213/122591.shtml>.  
Luo Zhou. Chongqing Brewery Co.Ltd: Therapeutic HBV vaccine just as the black swan sentenced to death [EB/OL]. [2011-12-12]. <http://news.cntv.cn/20111213/122591.shtml>.
- [2] Zuckerman J N, Sabin C, Craig F, et al. Immune response to a new hepatitis B vaccine in healthcare workers who had not responder to standard vaccine: randomized double blind dose-response study [J]. British Medical Journal, 1997, 314: 329-333.
- [3] 骆抗先. 乙型肝炎: 基础与临床 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006.  
Luo Kangxian. Hepatitis B: Basic biology and clinical science[M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006.
- [4] Vitiello A, Ishioka G, Chisari F V, et al. Development of a lipopeptide-based therapeutic vaccine to treat chronic HBV infection. I. Induction of a primary cytotoxic T lymphocyte response in humans[J]. Journal of Clinical Investigation, 1995, 95(1): 341-349.

(责任编辑 安莹,吴晓丽)

## 《科技导报》“科技职场”栏目征稿

“科技职场”栏目期望通过业内专家撰文,或有关人士讲述自己求职、就业的经历和成功事例,帮助博士生和博士后学会如何应聘、如何创业和发展,给即将走上职场的读者朋友启迪和帮助。欢迎投稿,择优录用,每篇文章约 2200 字。栏目责任编辑:陈广仁,投稿邮箱:chenguangren@cast.org.cn。