·生物医药前沿·

MDCK 细胞基质与鸡胚基质单价流感疫苗在小鼠中诱导的免疫反应的比较研究

张哲罡[1,2],李兴航[2],张家友[1],赵　巍[2],刘　琛[2],韩　天[2],闫璐瑶[1],夏志武[2],李长贵[3],杨晓明[1,4]
(1 国家联合疫苗工程技术研究中心,武汉 430207;2 武汉生物制品研究所有限责任公司,武汉 430207;
3 中国食品药品检定研究院,北京 100050;4 中国生物技术股份有限公司,北京 100029)

[**摘要**] **目的**:比较鸡胚基质和细胞基质的 H1N1 单价流感疫苗在小鼠体内诱导的免疫反应的差异。**方法**:分别采用鸡胚基质和 MDCK 细胞基质 H1N1 流感疫苗注射 C57BL/6 小鼠,通过体外中和实验,胞内细胞因子染色及多细胞因子检测比较 2 种基质生产的单价流感疫苗诱导的体液及细胞免疫反应的差异。**结果**:体液免疫方面,细胞基质疫苗组血清滴度与鸡胚基质疫苗组血清滴度基本一致。在细胞免疫方面,细胞基质疫苗组的细胞免疫相关细胞因子分泌水平更加显著。**结论**:由于病毒培养基质的不同,2 种流感单价疫苗在诱导免疫反应时间存在一定差异。细胞疫苗具有诱导多种免疫反应的优势,综合细胞工艺的其他优势,说明利用细胞工艺生产流感疫苗将会成为趋势。本实验有助于评价不同基质制备的单价流感疫苗在小鼠中诱导的免疫水平。

[**关键词**] H1N1 流感疫苗;MDCK 细胞基质流感疫苗;鸡胚基质流感疫苗;免疫效果
[**中图分类号**] R963　　[**文献标志码**] A　　[**文章编号**] 1003－3734(2021)06－0514－06

Comparative study of immune responses induced by MDCK cell-based and egg-based influenza vaccines in mice

ZHANG Zhe-gang[1,2], LI Xing-hang[2], ZHANG Jia-you[1], ZHAO Wei[2], LIU Chen[2], HAN Tian[2], YAN Lu-yao[1], XIA Zhi-wu[2], LI Chang-gui[3], YANG Xiao-ming[1,4]
(1 *Wuhan Institute of Biological Products Co., Ltd.*, *Wuhan* 430207, *China*; 2 *National Institute of Engineering Technology Research in Combination Vaccines*, *Wuhan* 430207, *China*; 3 *National Institute for Food and Drug Control*, *Beijing* 100050, *China*; 4 *China National Biotec Group*, *Beijing* 100029, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To compare the difference of immune response induced by egg-based and cell-based H1N1 influenza vaccines. **Methods**: C57BL/6 mice were injected subcutaneously with H1N1 influenza vaccines produced from eggs or MDCK cells, respectively. The cellular and humoral immune responses induced by two type of vaccines were detected by using methods such as serological test, intracellular cytokine staining and multiplex cytokine detection assay. **Results**: In terms of humoral immunity, the serum titer of the cellular vaccine group was basically the same as that of the chicken embryo vaccine group. As to cellular immunity, the secretion level of immune-related cytokines in the cellular vaccine group was more significant. **Conclusion**: Due to the different culture media, the two monovalent influenza vaccines have certain differences in the induction of immune response. Cellular vaccine has the advantage of inducing multiple immune responses, and the combination of other advantages of cellular technology indicates that the use of cellular technology will become a trend to produce influenza vaccine. This study is helpful to evaluate the immune level in mice induced by monovalent influenza vaccines prepared with different

[**作者简介**] 张哲罡,男,博士研究生,主要从事病毒性疫苗研发。联系电话:(027)86637107,E-mail:zhegang.zhang@qq.com。李兴航,男,硕士研究生,主要从事病毒疫苗研究。联系电话:(027)88843621,E-mail:lixinghangsir@163.com。
[**通讯作者**] 李长贵,男,研究员,主要从事疫苗的开发、检定及管理工作。联系电话:(010)53851616,E-mail:changguili@aliyun.com。杨晓明,男,研究员,主要从事疫苗的开发与管理工作。联系电话:(010)84663377,E-mail:yangxiaomin@sinophram.com。

substrates.

[**Key words**] H1N1 influenza vaccines; MDCK cell-based influenza vaccine; egg-based influenza vaccine; immunogenicity

目前利用细胞工艺生产流感疫苗已成为趋势，其优势在于稳定的生产条件、较好的质量可控性、较少的致敏原、生产不受禽类流感影响、平台化生产更加灵活等[1-2]。美国诺华公司和韩国 SK 公司均已获得了基于 MDCK 细胞的四价流感病毒疫苗的上市批准，国内暂无此类产品上市，这说明细胞基质流感疫苗有着巨大的市场前景[3]。现有资料表明，因为鸡胚工艺与细胞工艺采取的宿主不同，流感病毒在这 2 种宿主中产生出的病毒也是有所区别的，且英国生物制品及标准化控制研究所（National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC）在为疫苗生产厂家提供的毒种和检定标准品时对于鸡胚工艺和细胞工艺也有区分[4]，说明 2 种工艺生产的疫苗对于机体诱导的免疫反应水平可能存在差异，目前已有多份报告揭示了这种差异[5-7]。本实验通过比较不同基质培养的疫苗免疫小鼠后血清中抗体水平及细胞因子水平变化，以更好地评价不同基质生产的 2 种疫苗诱导的免疫水平差异。

材料和方法

1 疫苗

武汉生物制品研究所使用鸡胚工艺生产的 H1N1 流感裂解疫苗，病毒 HA 含量为 15 μg·mL^{-1}；武汉生物制品研究所使用细胞工艺生产的 H1N1 流感裂解疫苗，病毒 HA 含量为 15 μg·mL^{-1}。本实验中用于生产的流感病毒毒种使用 WHO 提供的 A/Brisbane/02/2018（H1N1）pdm09-like virus。

2 药品与试剂

HA 标准品 Influenza Antigen A/Brisbane/02/2018（IVR-190，H1N1，WHO 标准实验室）；96 孔细胞培养板（Corning 公司）；细胞因子检测试剂盒（LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit, BioLegend 公司，货号：740622，规格：100 反应·盒$^{-1}$）；胞内细胞因子检测试剂盒（包含 FITC anti-mouse CD8a Antibody; PE/CY7 anti-mouse CD19 Antibody; Brilliant Violet 421™ anti-mouse IFN-γ Antibody; PE anti-mouse IL-2 Antibody; APC anti-mouse TNF-α Antibody，北京达科为生物技术有限公司，本公司定制组装，规格：100 反应·盒$^{-1}$）。

3 仪器

CytoFLEX S 流式细胞仪（美国贝克曼公司）；培养基 A（VP 培养基 + 双抗 + GlutaMAX）；培养基 B（培养基 A + 2 μg·mL^{-1}胰酶）等。

4 实验动物

C57BL/6 小鼠，雌性，7 周龄，北京维通利华公司，许可证号：SYXK（京）2016-0006，许可证号：SYXK（鄂）2018-0099。小鼠的饲养及实验均在武汉生物制品研究所 SPF 级动物房中进行。

5 多细胞因子检测

5.1 MCP-1，IL-6 和 IP-10 检测组 将小鼠分为 15 μg 鸡胚疫苗组，15 μg 细胞疫苗组，PBS 阴性对照组和空白组，每组 10 只，采用皮下多点注射。在小鼠接种的 3，6，12，24 和 48 h 后采血，分离血清。使用美国 Biolegend 公司的多因子检测试剂盒，将试剂盒中的 Capture Beads 在超声清洗仪上处理 1 min，涡旋 30 s，使 Capture Beads 充分分散开，将 25 mL Wash Buffer 20 X 与 475 mL 蒸馏水混合制备 Wash Buffer 1 X，用 250 μL Assay Buffer 溶解标准液，移入 EP 管内，标记为 S7，再将 S7 以 4 倍比例梯度稀释，并依次标记 S6/S5/S4/S3/S2/S1。将 25 μL 标准品加到相应管，并将血清样品稀释一倍后加入对应的样品管中，每管中加入 25 μL 混匀的 Capture Beads，在振荡器上震荡 2 h，1 000 r·min^{-1}离心 5 min，弃上清。向每管加入 200 μL 1 X Wash Buffer，静置 1 min，再次 1 000 r·min^{-1}离心 5 min，弃上清。向每管加入 25 μL 的检测抗体，选择针对 IFN-γ, TNF-α, MCP-1, IL-1β, IL-6, IL-12, IP-10 这 7 种细胞因子的检测抗体，震荡 30 min，1 000 r·min^{-1}离心 5 min，弃上清。每管加入 200 μL 1X Wash Buffer，静置 1 min，1 000 r·min^{-1}离心 5 min，弃上清。每管加入 150 μL 1 X Wash Buffer，重悬磁珠。应用流式细胞仪进行检测。

5.2 IL-4 和 IL-5 检测组 接种分组、方式、剂量同上，在接种 72 h 后采血，分离血清，细胞因子检测方式同“**5.1**”。

6 胞内细胞因子染色

接种分组、方式和剂量同上，在小鼠接种的 10 d 后断颈处死小鼠，浸泡于 75% 乙醇中。采脾脏，在

35 mm 培养皿中放入 5 mL 小鼠淋巴细胞分离液。研磨脾脏,将悬有脾脏细胞的分离液立即转移到 15 mL 离心管中,加入 500 μL 的 RPMI 1640 培养基。800 g 离心 30 min,吸出 10 mL RPMI 1640 培养基,颠倒洗涤。250 g 离心 10 min 收集淋巴细胞。取六孔细胞培养板,设置刺激孔及未刺激孔,分别加入 1 mL RPMI 1640 培养基(含 10% FBS),再分别加入 1 mL 细胞悬液,混匀。在刺激孔中加入 2 μL Cell Activation Cocktail 及 1 μL Monensin Solution,吹打混匀,37 ℃,5% CO_2 的培养箱中培养 5 h。用 1 mL RPMI 1640 培养基(10% FBS)冲洗六孔板,将细胞收集到离心管中,400 g 离心 5 min,弃上清,涡旋混匀。分别加入 2 mL 细胞染色缓冲液,涡旋混匀,再次 400 g 离心 5 min,弃上清,取重悬的细胞液 100 μL,涡旋混匀。准备流式上样管,做好相应标记。分别按照刺激组和未刺激组,每管管中分别计入 5 μL 的表面标记抗体(CD8a,CD19,IFN-γ,IL-2,TNF-α),涡旋混匀后,室温避光孵育 15 min,每管加入 2 mL 细胞染色缓冲液,涡旋重悬细胞,400 g 离心 5 min,弃上清。每管依次加入 1 mL 固定液,涡旋混匀后,4 ℃冷藏避光孵育过夜。继续加 2 mL Perm 溶液,400 g 离心 5 min,弃上清,再取 2 mL 细胞染色缓冲液重复清洗 1 遍,加入 0.1 mL 的细胞染色缓冲液,涡旋重悬细胞,应用流式细胞仪检测。

7 体外中和实验

将小鼠分为 PBS 组,15 μg 鸡胚苗组和 15 μg 细胞苗,每组各 10 只,采用皮下多点注射,在小鼠接种的 3 周后先眼眶采血,分离血清,存放于 -80 ℃冰箱中,再补种一剂,3 周后将小鼠断颈处死,采血,分离血清。将 MDCK 细胞与 VP 培养基(5% 胎牛血清)混合密度为 $2\sim4\times10^5$ cell·mL^{-1}的细胞混合液,铺入 96 孔板,每孔 100 μL,37 ℃,5% CO_2 孵箱中培养 12 h。将小鼠血清放入 56 ℃水浴锅中,灭活 30 min,准备一块新的 96 孔板,在第 1 列内加入 12 μL 血清与 108 μL 培养基 A 混合,在第 2 ~ 11 列分别加入 60 μL 培养基 A,然后依次对血清进行 2 倍梯度稀释,稀释后 1 ~ 11 列的血清浓度分别为原来的 1/10,1/20,1/40,1/80,1/160,1/320,1/1 280,1/2 560,1/5 120,1/10 240。用培养基 A 在 24 孔板中将 H1N1(Brisbane 株,PFU·mL^{-1} ≈ 2.91×10^7)稀释 10^4 倍。将稀释好的血清以 1∶1 比例与病毒稀释液并混匀,在 12G 孔仅加入培养基 A 用作空白对照,12H 孔仅加入病毒稀释液作为阳性对照。然后将含血清和病毒混合液的 96 孔板放置在 37 ℃,5% CO_2 条件下孵育 1 h。随后将铺满细胞的 96 孔细胞培养板用 PBS 洗净,每孔依次加入 120 μL 上述混合液后放入 34 ℃,5% CO_2 孵箱中过夜培养。隔夜后,将 96 孔细胞培养板用 PBS 洗净,加入 100 μL 培养基 B,放置在 34 ℃,5% CO_2 孵箱培养 4 d。最后向培养了 4 d 的 96 孔板中加入 1% 结晶紫溶液 100 μL 染色 15 min,用流水缓缓冲洗后,被结晶紫染色判定为活细胞,无法染色判定为无活细胞。

8 血凝抑制实验

将小鼠分为 PBS 组 10 只,15 μg 鸡胚苗组和 15 μg 细胞苗组各 20 只,注射方式同步骤“**7**”,于免前采血眼眶采血 1 次,分离血清,存放于 -80 ℃冰箱中。在第 6 周采得的各组小鼠血清 20 μL 于 EP 管中,每管加入受体裂解酶 80 μL,37 ℃水浴过夜。将过夜的血清转入 56 ℃水浴锅 1 h,灭活裂解酶。向每管中加入 10 μL 鸡纯血球,放入 4 ℃冰箱 1 h。将血清 6 000 r·min^{-1}离心 10 min,取上清。将 96 孔血凝板铺满 25 μL PBS(除第 1 列外),取 50 μL 收获的上清液加入第 1 列,再从第 1 列吸取 25 μL 上清液加入下 1 列混合均匀,按上述步骤将血清依次进行梯度稀释。取稀释至血凝 3 孔的标准抗原,加入血凝板,每孔 50 μL,充分混匀,室温水平放置 1 h,将血凝板倾斜 45°,观察血凝孔凝血完整表示该浓度下的血清不足以完全结合抗原,反之表示该浓度下的血清可以与抗原完全结合。

9 数据统计

数据经过 SPSS 软件处理,计算出 t 值与相应 P 值用于分析,制图使用软件 GraphPad Prism。

结　果

1 多细胞因子检测结果

1.1 MCP-1, IL-6, IP-10 检测组结果 细胞组中 IL-6 浓度在接种疫苗 3 h 达到 15.84 pg·mL^{-1},随后持续下降,至 48 h 浓度为 0.65 pg·mL^{-1},略低于空白对照组与 PBS 组浓度,鸡胚组中 IL-6 浓度则在 6 h 达到峰值 3.14 pg·mL^{-1},随后降低,至 48 h 维持在 1.14 pg·mL^{-1},细胞组与鸡胚组细胞组引起的 IL-6 在 48 h 的分泌量差异具有显著性($t=20.867$,$P<0.05$)。细胞组和鸡胚组在接种后 IP-10 浓度均在 6 h 达到峰值,分别为 173.8 和 118.72 pg·mL^{-1},差异具有显著性($t=5.558$,$P<0.05$),随后 IP-10 浓度缓慢降低至略高于 PBS 组及空白对照组。细胞

组中 MCP-1 浓度在接种疫苗 3 h 达到 67.28 pg·mL^{-1},在 6 h 仍维持在 60.40 pg·mL^{-1},随后开始降低,鸡胚组中 MCP-1 浓度在 3 和 12 h 均维持在 35 pg·mL^{-1}以上。其他时间的检测结果如图 1 所示。

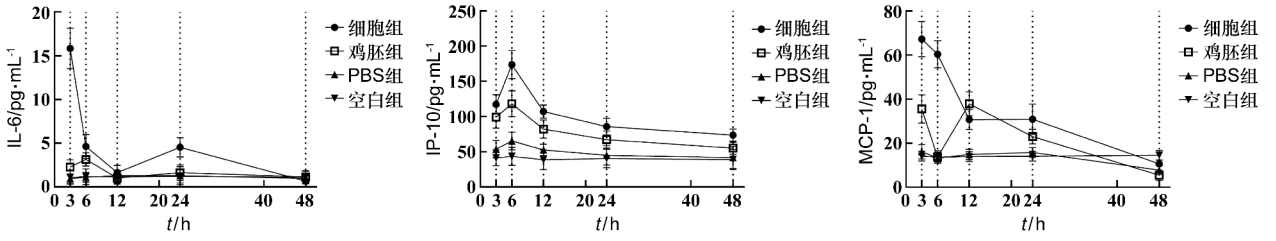


图 1 血清中 IL-6, IP-10 和 MCP-1 浓度随时间的变化

1.2 IL-4,IL-5 检测组结果 在接种后的 72 h 内,细胞组与鸡胚组血清中 IL-4 及 IL-5 浓度均显著上升,但是 2 种疫苗诱导的同种细胞因子在浓度上差异并无显著性($t=0.624$,$P>0.05$,见图 2)。

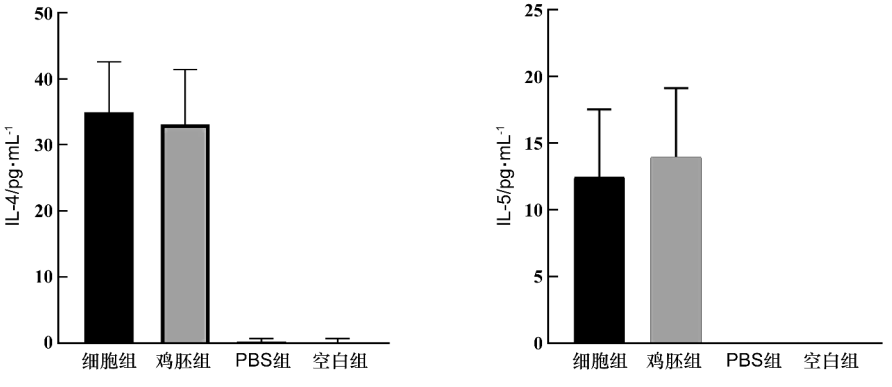


图 2 血清中 IL-4 及 IL-5 浓度的比较

2 胞内细胞因子染色结果

2.1 淋巴细胞分群 细胞组与鸡胚组在接种后,淋巴细胞总数显著上升,且与 PBS 刺激产生的淋巴细胞总数差异均存在显著性($P<0.05$),但是 2 个疫苗组刺激产生的淋巴细胞总数差异没有显著性,且 B 细胞所占比例差异也没有显著性($P>0.05$),但 CD_8^+ T 细胞总数差异存在显著性($t=4.899$,$0.01<P<0.05$,见图 3)。

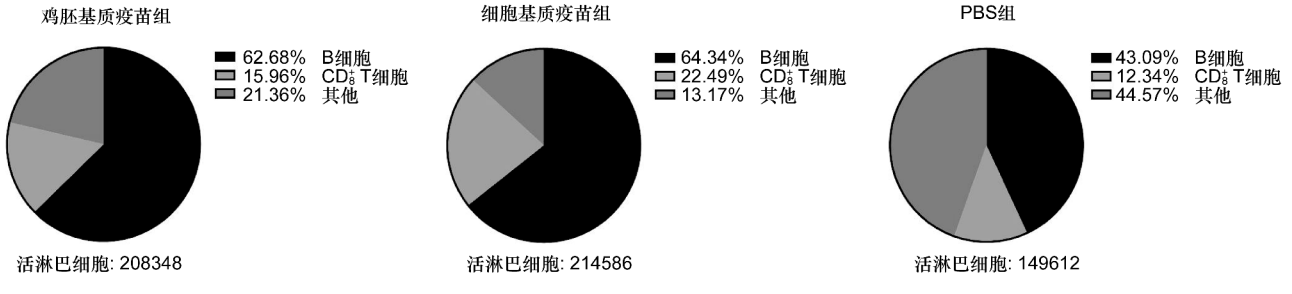


图 3 CD_8^+ T 细胞及 B 细胞在淋巴细胞中所占比例

2.2 分泌 TNF-α, IL-2 和 IFN-γ 的淋巴细胞数量 如图 4 所示,接种后细胞组与鸡胚组中分泌 3 种细胞因子的淋巴细胞数量有较大幅度的分泌增长。其中细胞组与鸡胚组分泌 TNF-α 细胞数量差异存在显著性($t=7.273$,$P<0.05$),分泌 IL-2 的细胞数量差异不存在显著性($t=7.740$, $P<0.05$),而分泌 IFN-γ($t=2.206$,$P>0.1$)的细胞数量差异不具有显著性。

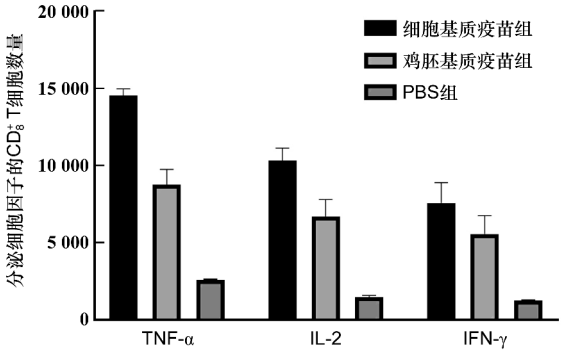


图 4 分泌 TNF-α, IL-2, IFN-γ 细胞因子的 CD_8^+ T 数量

2.3 血清学检测结果 细胞组和鸡胚组在第 1 次接种后,血清中和滴度差异无显著性($P>0.05$),但是在第 2 次接种后,细胞组血清中和滴度明显升高,差异具有显著性,见图 5。

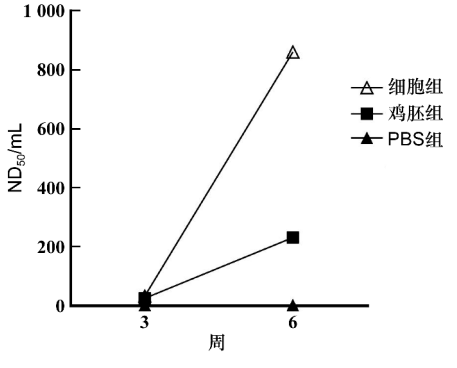


图 5 接种后血清滴度变化

2.4 血凝抑制实验结果 根据现行欧洲药典标准,免疫后血清稀释比例 >1∶40 即表示有保护;免前血清稀释比例≤1∶10,免后≥1∶40 即表示阳转。结果显示细胞组保护率为 100%,阳转率为 95%。鸡胚组保护率为 100%,阳转率为 100%。2 组的血清稀释比例及累计频率图见图 6。

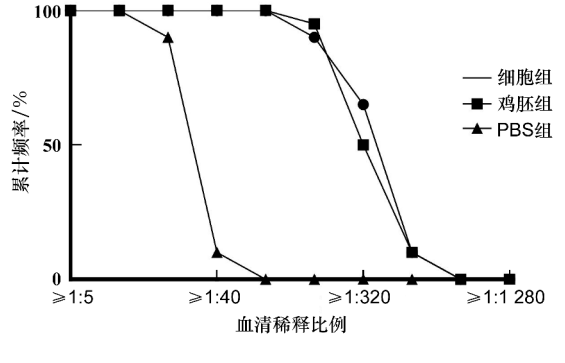


图 6 血清稀释比例与累计频率反向累计图

讨 论

本文从细胞因子分泌水平及细胞分化角度研究了不同培养基质制备的 H1N1 单价流感疫苗诱导的免疫应答水平。免疫接种后,细胞组的天然免疫相关细胞因子 MCP-1, IL-6, IP-10 均在 3 ~ 6 h 达到峰值,且细胞组分泌量比鸡胚组高,3 种细胞因子的分泌量与鸡胚组差异具有统计学显著性,表明细胞基质疫苗在诱导天然免疫时强度更强,这可能与细胞基质疫苗在诱导天然免疫时反应更快有关[8]。细胞基质疫苗能更好地激活天然免疫,其原因可能是因为生产工艺不同,从而导致病毒外壳糖蛋白的种类与折叠存在差异,多项研究表明不同的生产工艺对于流感病毒 HA 蛋白糖基化影响较大,且流感病毒可利用 HA 蛋白上糖基化的变化逃逸人体免疫系统[9-10],说明细胞工艺制备的 H1N1 病毒表面糖基化可能更利于诱导小鼠的天然免疫反应。结合脾脏淋巴细胞的分化,发现细胞疫苗刺激的 CD_8^+ T 细胞的分化更强,数量达到了鸡胚疫苗的 1 倍左右,说明细胞基质疫苗具有更好的细胞免疫特性。且细胞疫苗诱导的分泌 TNF-α, IL-2, IFN-γ 的 CD_8^+ T 细胞数量均高于鸡胚基质疫苗,这 3 种细胞因子对于细胞免疫都具有正向调节作用,说明细胞基质疫苗诱导的细胞免疫较鸡胚基质疫苗更强。

综上所述,细胞基质疫苗诱导的特异性 CD_8^+ T 细胞可能对更多含有保守糖蛋白结构的多种流感病毒起作用。流感疫苗能起到保护作用更重要的一环是体液免疫,体外细胞中和实验结果显示,细胞组采得的血清中和能力更强、滴度更高,说明细胞基质疫苗能更好地诱导体液免疫,可能与其具有中和作用的病毒的亲和力更强相关。但该方法具有一定的局限性,主要因为实验结果与所使用的毒株有关,如在细胞中和试验中使用的是相同毒株,则对检测结果的影响相对较小。因此我们在实验过程中增加了血凝抑制实验,相对而言,该实验更有利于鸡胚基质疫苗的检定,但结果提示细胞基质疫苗与鸡胚基质疫苗在保护率和阳转率方面基本一致,且细胞组的滴度与鸡胚组相差未见统计学差异。为了进一步消除这些影响因素,实验中还增加了体液免疫相关的 2 种细胞因子 IL-4 和 IL-5 分泌情况及 B 细胞分化情况的检测[11],发现 2 种疫苗组所诱导的体液免疫在分子水平及细胞水平上检测结果基本一致,未见明显差异。体液免疫试验相关检测结果显示细胞基质

疫苗诱导的体液免疫反应强度与鸡胚组基本一致。综合细胞免疫结果与体液免疫试验结果,说明细胞基质疫苗和鸡胚基质疫苗在体液免疫方面相差不大,但是细胞基质疫苗能有效诱导天然免疫及细胞免疫。该结论提示,细胞基质疫苗除工艺制备上的优势外,还存在能诱导体内的多重免疫应答的优势。此外,该实验还表明了血凝抑制实验与体外中和实验的结果并无明显关系,提示在针对细胞基质流感疫苗的质量检定中,应进一步寻找更加准确的检定方式。

[参 考 文 献]

[1] 张哲罡, 成立, 李长贵, 等. 细胞基质流感疫苗研发的意义及进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(11): 1293 - 1297.

[2] FENG SZ, JIAO PR, QI WB, *et al*. Development and strategies of cell-culture technology for influenza vaccine[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(4): 893 - 902.

[3] HARADA Y, TAKAHASHI H, TRUSHEIM H, *et al*. Comparison of suspension MDCK cells, adherent MDCK cells, and LLC-MK2 cells for selective isolation of influenza viruses to be used as vaccine seeds[J]. *Influ Other Respir Viruses*, 2020, 14(2): 204 - 209.

[4] MIR-SHEKARI SY, ASHFORD DA, HARVEY DJ, *et al*. The glycosylation of the influenza A virus hemagglutinin by mammalian cells[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(7): 4027 - 4036.

[5] LAI CC, WENG TC, CHEN PL, *et al*. Development and characterization of standard reagents for cell-based prepandemic influenza vaccine products[J]. *Hum Vaccines Immunother*, 2020: 1 - 7.

[6] KLEIN NP, FIREMAN B, GODDARD K, *et al*. Vaccine effectiveness of cell-culture relative to egg-based inactivated influenza vaccine during the 2017-18 influenza season[J]. *PLoS One*, 2020, 15(2): e0229279.

[7] RUIZ-ARAGÓN J, GANI R, MÁRQUEZ S, *et al*. Estimated cost-effectiveness and burden of disease associated with quadrivalent cell-based and egg-based influenza vaccines in Spain[J]. *Hum Vaccines Immunother*, 2020: 1 - 7.

[8] SEKIYA T, MIFSUD EJ, OHNO M, *et al*. Inactivated whole virus particle vaccine with potent immunogenicity and limited IL-6 induction is ideal for influenza[J]. *Vaccine*, 2019, 37(15): 2158 - 2166.

[9] DAS SR, HENSLEY SE, DAVID A, *et al*. Fitness costs limit influenza A virus hemagglutinin glycosylation as an immune evasion strategy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(51): E1417 - E1422.

[10] RÖDIG JV, RAPP E, BOHNE J, *et al*. Impact of cultivation conditions on N-glycosylation of influenza virus a hemagglutinin produced in MDCK cell culture[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(6): 1691 - 1703.

[11] VERSTEEG L, WEI JF, LIU ZY, *et al*. Protective immunity elicited by the nematode-conserved As37 recombinant protein against Ascaris suum infection[J]. *PLoS Neglected Trop Dis*, 2020, 14(2): e0008057.

编辑:赵文锐/接受日期:2020 - 07 - 20