Î¬ÆÕ×ÊÑ¶ http://www.cqvip.com

甲型肝炎病毒 Vero 细胞适应株的选育研究*

陈尔佳[1]，马 波[1]，魏绍忠[2]
（1. 云南沃森生物技术有限公司，昆明 650033；2. 云南润生药业有限公司，昆明 650031）

摘 要：将甲肝患者粪便中分离的甲型肝炎病毒在 Vero 细胞中进行适应性培养，选育高滴度适应株应用于甲肝灭活疫苗研究。在 Vero 细胞上连续传代，测抗原滴度和感染性滴度，满意后按 WHO 推荐的甲型肝炎灭活疫苗规程进行灭活疫苗试制研究。经 Vero 细胞 14 次适应性传代后，病毒抗原滴度可高达 1：2560，感染性滴度为 8.23LogCCID$_{50}$/ml。试制的灭活疫苗 HPSEC 检测在 280 nm 时仅有一个高峰，SDS-PAGE 电泳，在 22kD、26kD 和 33kD 处有三条蛋白带，和 HAV VP3、VP2 和 VP1 的位置相同。ICR 小鼠效力试验表明疫苗剂量 1600 EU/ml 与 Merck 疫苗 50U 效果相似。通过研究获得了 Vero 细胞甲肝病毒适应株 YN5 株，初步证明可作为甲型肝炎灭活疫苗的候选毒株。

关键词：甲型肝炎病毒；YN5 株；Vero 细胞；灭活疫苗
中图分类号：R373·2*1 **文献标识码**：A **文章编号**：1005-5673(2003)04-0001-04

The study on adaptation of hepatitis A virus YN5 strain in Vero cell *CHEN Er-jia*[1], *MA Bo*[1], *WEI Shao-zhong*[2] (1. *Yunnan Wosen Biotech Co., Ltd, Kunming* 650033, *China*; 2. *Yunnan Runsheng Pharmaceutical Co., Ltd, Kunmming* 650031, *China*)

Abstract: YN5 strain was isolated from feces of hepatitis A patients and adapted to vero cells. The adapted YN5 strain was identified as HAV with the specific experiment. Antigenic titers of YN5 strain P14 on Vero cells were 1: 2560, infective titres of that was 8.23LogCCID$_{50}$/ml. The experimental vaccine was made according to WHO requirement for inactivated hepatitis A vaccine. Experimental vaccine was only one peak through HPSEC at 280nm. By SDS-PAGE, YN5 strain contains three peptide components VP1, VP2, VP3, their molecular weights are about 33, 26, 22kD respectively. In addition, the efficiency of the experimental vaccine, ICR mice immunized with 1600EU/ml was same as Merck vaccine (50U). The research provide YN5 strain adapted Vero cell and was a well strain for producing inactivated vaccine.

Key words: Hepatitis A virus (HAV); YN5 strain; Vero cell; Inactivated vaccine

甲型肝炎（简称甲肝）是由甲肝病毒（Hepatitis A virus，HAV）感染人体引起的一种急性传染病，其预防可使用甲肝减毒活疫苗或灭活疫苗。两者相比，甲肝灭活疫苗具有较强的免疫原性，免疫后能诱发高水平的体液免疫，无病毒返祖，疫苗稳定性好，便于保存、运输和使用。目前中国生产的甲肝减毒活疫苗和新批准生产的灭活疫苗均是应用人二倍体细胞（KMBI7 或 2BS 株）制备的。然而甲肝灭活疫苗生产需要的抗原量大，如何通过体外培养 HAV，大量获取制备甲肝疫苗所需的 HAV 抗原，仍然是当前十分重要的研究课题。[1] Vero 细胞是 WHO 推荐的生产人用疫苗的良好细胞基质，且可用于发酵罐培养[2-5]。因此，筛选出能在 Vero 细胞上高效稳定增殖的甲肝灭活疫苗病毒候选株将有利于甲肝灭活疫苗产量的提高和成本的降低。试验以 Vero 细胞为细胞基质，成功筛选出一株可以高效、稳定增殖的甲肝病毒 YN5 株，并进行了灭活疫苗的初步试制研究。[6-9]

材料与方法

1 标本的采集与处理

1995 年 3～9 月从昆明医院收集到 6 份甲型肝炎急性患者粪便，分别编号为 YN1～YN6。粪便标本用 Eagle MEM 制成 10% 悬液，按 5% 加入植物活

收稿日期：2003-05-05；**修回日期**：2003-06-14
* **基金项目**：国家高技术研究发展专项经费资助项目（2002AA2Z3313），云南省科技计划资助项目（2001XY01）。
作者简介：陈尔佳（1963-），男，硕士，副研究员，主要从事生物制品的研究、开发与生产。

Î¬ÆÕ×ÊÑ¶ http://www.cqvip.co

性炭，4℃吸附2 h，－60℃冻存过夜，次日融化10 000 r/min离心30 min，取上清加适量抗生素置4℃过夜备用。

2 细胞

2BS细胞系中国药品生物制品检定所提供，为可用于疫苗生产的细胞株，使用23～28代。Vero细胞系中国药品生物制品检定所提供，为WHO推荐的生产人用疫苗的细胞基质，使用132～150代。

3 病毒培养

2BS细胞经常规方法传代，待长成单层并用PBS洗涤后接种标本，接种量为：40 cm^2 培养瓶接种2 ml粪便悬液，37℃吸附21 h，加常量维持液，35℃培养，每周换液，共培养35 d。用胰酶消化液分散细胞，通过1 500 r/min离心15 min弃上清，每瓶用1 ml MEM溶液悬浮沉淀物，经冻融、超声，再通过酶标检测证明为HAV。然后接种于长成单层Vero细胞，接种量为：40 cm^2 培养瓶接种1 ml在2BS细胞上传代收集的冻融超声后的细胞悬液，同法吸附、培养，共培养42d。再收集细胞，每瓶用1 ml MEM溶液悬浮，其后继续用Vero细胞培养增殖，时间逐步缩短至28～32 d。

4 病毒鉴定

4.1 免疫电镜检查

将含HAV的Vero细胞提取液10 000 r/min离心30 min，取上清，然后38 000 r/min离心4 h，沉淀重悬加1∶20稀释的抗-HAV特异血清，37℃中和1h，2～8℃过夜，2 500 r/min离心2 h，沉淀重悬后滴网，磷钨酸负染后镜检。

4.2 耐乙醚试验

将病毒悬液与乙醚4∶1混合，密封后充分振摇，2～8℃过夜后接种Vero细胞，同时取未处理病毒作对照。

4.3 耐酸试验

将病毒悬液调pH至3.0，2～8℃作用8h后调至7.4～7.6，接种Vero细胞，同时取未处理病毒作对照。

4.4 中和试验

用已知含320～1 000 $CCID_{50}$/ml病毒悬液与等量的1∶10稀释的抗-HAV特异性血清混合，37℃中和1 h，接种Vero细胞，培养28～32 d收毒，用酶标法检测甲肝抗原。同时用甲肝抗体阴性血清作对照。

5 感染性滴度测定

取待测的细胞提取液，以10倍系列稀释，选所需的稀释度分别接种4瓶Vero细胞，每瓶1.0 ml在35℃培养28～32 d收毒，用酶标法检测甲肝抗原。按Reed Muench法计算 $CCID_{50}$/ml。

6 实验性灭活疫苗的制备

取种毒培养28 d后的病毒－细胞悬液，经冻融超声、氯仿抽提5次、超滤浓缩、Sepharose-4FF凝胶过柱、1∶4 000甲醛灭活12 d后加氢氧化铝吸附制备而成。

7 纯度分析

取灭活后病毒20 μl注入HPLC系统Phenomenex BIOSEP-SEC-S 2000柱中，0.1 mol/L PB为流动相，流速1.0 ml/min，压力约3.2 Mpa，分别用280 nm和254 nm两种波长检测。同时做SDS-PAGE电泳和Vero细胞残余DNA含量检测。

8 剂量确定

分别将试验性疫苗稀释制备成3 200 EU/ml、1 600 EU/ml、800 EU/ml、400 EU/ml 4个剂量。与Merck疫苗（50U，成人剂量）同时免疫ICR小鼠，酶标法测定血清抗HAV抗体以确认最佳疫苗剂量。

结　果

1 甲型肝炎病毒在Vero细胞上的适应性培养与选育

将6份粪便悬液接种于2BS细胞在35℃培养35 d，全程观察期间未见任何细胞脱落或形态异常情况。收集同步培养的病毒液作1∶5稀释后接种2BS细胞进行适应性盲传，培养28 d收样继续传代。在2～4代感染细胞中均观察到特异性荧光。至第5代后，转而接种Vero细胞，初期培养时间42 d，后逐步缩短，即28～32 d。此6份病毒样品在Vero细胞上共传14代。抽查接种于Vero细胞后的第4、6、10、12、14代病毒液的感染性滴度和抗原滴度，结果证实仅有一株能够适应Vero细胞，并随着适应传代次数增加，病毒感染性滴度稳步上升（表1）。

表1 YN5株不同代次增殖情况

Table 1 The titer of HAV(YN5) adapted on Vero cells

Passage	Antigen titer (EIA)	Infectivity titer ($LogCCID_{50}$/ml)
4	1∶2	No done
6	1∶8	4.23
10	1∶128	6.5
12	1∶640	7.33
14	1∶2560	8.23

Î¬ÆÕ×ÊÑ¶ http://www.cqvip.com

第 10 代病毒液的抗原滴度为 1：128，感染性滴度为 6.5LogCCID$_{50}$/ml，说明已成功获得适应于 Vero 细胞的甲型肝炎毒株。至第 14 代时，其抗原滴度可高达 1：2 560，感染性滴度为 8.23LogCCID$_{50}$/ml。因其标本编号为 YN5，故命名为 YN5 株。

2 YN5 株的特异性鉴定

YN5 株 10 代病毒液采用免疫电镜检查，可观察到成堆实心和空心病毒颗粒，直径为 27～30 nm，颗粒间有抗体桥形成（图 1）。经乙醚 2～8℃作用 18 h，或在 pH 3.0 条件下，2～8℃作用 8 h，其感染性滴度与处理前无明显差别，证明 YN5 株病毒具耐乙醚和耐酸性质。中和试验表明 YN5 毒株能被 HAV 抗血清中和，中和后 HAV 抗原检测转为阴性，而病毒对照 HAV 抗原检测是阳性。证明 YN5 株为 HAV。

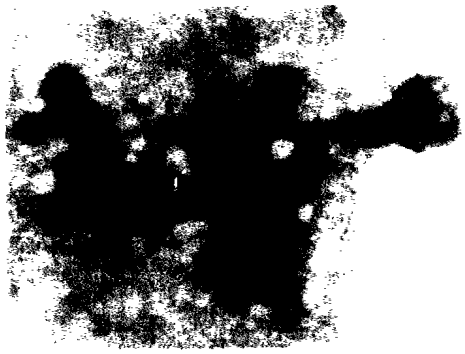

图 1 甲型肝炎病毒免疫电镜照片（YN5 株，×100 000）

Fig. 1 Immune electronic micrograph of HAV (YN5 strain, ×100 000)

3 实验性疫苗的纯度检测

HPSEC 分析 280 nm 和 254 nm 均仅有一个峰（图 2），经 EIA 检测证明是甲肝抗原。SDS-PAGE 电泳，在 22 kD、26 kD 和 33 kD 处有三条蛋白带，符合 HAV VP3、VP2 和 VP1 的位置，无明显的其他杂蛋白带（图 3）。且经地高辛标记 DNA 检测试剂盒测定 Vero 细胞残余 DNA 含量，结果表明 DNA 去除率达 71.25%，HAV 抗原 1 600 EU/ml 剂量中 Vero 细胞残余 DNA 含量 <10 ng，符合生物制品标准。

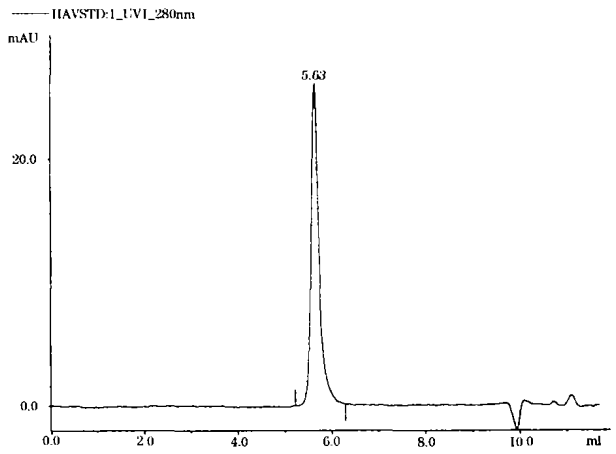

图 2 灭活甲肝疫苗 HPSEC 分析（YN5，280 nm）

Fig. 2 HPLC analysis of inactivated hepatitis A vaccine (YN5 strain, 280 nm)

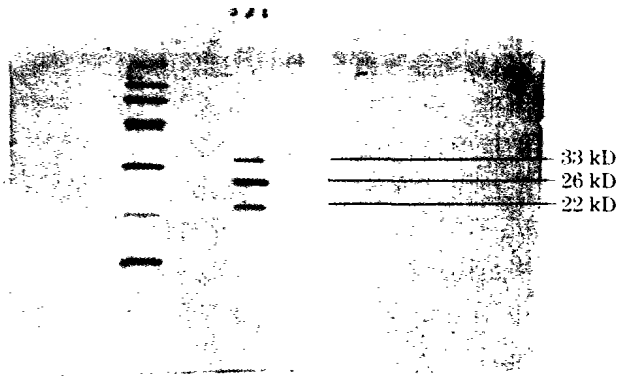

图 3 甲肝病毒 YN5 株 SDS-PAGE 分析结果

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of hepatits A vaccine (YN5 strain)

4 实验性疫苗的免疫原性

分别将实验性疫苗稀释至 3 200EU/ml、1 600 EU/ml、800EU/ml、400EU/ml 四个剂量与 Merck 疫苗（50U，成人剂量）同时免疫 ICR 小鼠，结果见表 2。1 600 EU/ml 剂量阳转率与 Merck 疫苗一致，且 mIU 高于 Merck 疫苗。提示以 1 600 EU/ml 剂量可作为研究的成人剂量标准。

表 2 实验性甲肝灭活疫苗小白鼠效力试验结果

Table 2 The potency test results of ICR mice immunized with inactivated HAV vaccine

Group	Dose (EU/ml)	Conversion case	Conversion rate (%)	mIU
Test 1	3200	10/10	100%	2500
Test 2	1600	10/10	100%	2000
Test 3	800	8/10	80%	1750
Test 4	400	3/10	30%	1250
Merck Vaccine	50 (U)	10/10	100%	1750
Al(OH)$_3$ Control	0	0/10	0	0

Î¬ÆÕ×ÊÑ¶ http://www.cqvip.com

讨　论

甲型肝炎是由甲肝病毒(HAV)引起的急性传染病。病毒主要是通过粪口途径传播,病毒污染食物、水源和饮用品易造成局部瀑发和流行。中国是甲肝感染的高流行区,人群甲型肝炎病毒的自然感染率可达 71%。1988 年初,上海发生的甲肝大流行,发病人数达292 301 例,死亡 11 例。罹患率高达 4 082.6/10 万。这次流行与食用污染的毛蚶有关,引起了国际上对甲肝流行病学和防治策略的重新认识。由于中国经济发展的不平衡,就全国的情况来看,发病仍以儿童为主,推行疫苗接种对甲肝的预防仍十分必要。

从 1993 年起,中国自己生产的甲肝减毒活疫苗开始供应市场的需要,为甲肝的预防作出了重大贡献。后来国外生产的甲肝灭活疫苗引入国内,在使用中确实可以观察到灭活疫苗有其长处,尤其是免疫原性强,热稳定性好等,使国内也开始重视对甲肝灭活疫苗的研究和生产。但甲肝灭活疫苗的制备需要大量的抗原,目前沿用的人二倍体细胞来制备甲肝灭活疫苗仍有不足之处。因此,选用一种敏感、滴度高、抗原性好,易于大量培养的细胞基质就成为甲肝灭活疫苗生产所需要重视的课题。

Vero 细胞是 WHO 推荐用于疫苗生产的良好细胞基质,世界上关于该细胞株的研究报道和生产应用已经很多,包括许多生物培养器,其细胞培养指标都是用 Vero 细胞来表示,所以应用该细胞来生产的疫苗可以得到国内外的认同和推广使用。

作者成功的选育出一株 HAV-Vero 细胞适应株:YN5 株,并经 Vero 细胞传了 14 代,其抗原滴度可高达 1∶ 2 560,感染性滴度可达8.23 $LogCCID_{50}$/ml,有望成为制备甲肝灭活疫苗的候选毒株。根据 WHO 推荐的甲肝灭活疫苗生产规程制备了一批疫苗,其抗原纯度较高。和 Merck 疫苗相比,在以 1 600 EU/ml 的剂量单位免疫 ICR 小鼠时,其阳转率相同,血清抗体 mIU 值相对较高。为今后利用 YN5 株进行进一步的灭活苗研制提供了初步的数据资料。

参考文献:

〔1〕 王丹巧. 甲型肝炎疫苗开发的现状与展望〔J〕. 日本医学介绍 1990,7:305-306.

〔2〕 Bruhl P, Kerschbaum A, Kistner O, et al. Humoral and cell-mediated immunity to vero cell-derived influenza vaccine〔J〕. Vaccine 2000, 19(9-10) :1149-1158.

〔3〕 Srivastava AK, Putnak JR, Lee SH, et al. A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells〔J〕. Vaccine 2001, 19(31) :4557-4565.

〔4〕 董关木,刘增顺,俞永新,等. 狂犬病毒 CTN-1 株在 Vero 细胞上的适应传代研究〔J〕. 微生物学免疫学进展 1995,23(2):82-85.

〔5〕 WHO 关于甲型肝炎疫苗的意见书〔J〕. 国外医学:预防、诊断、治疗用生物制品分册 2000,23(6):249-251.

〔6〕 Parment PA, Emilsson H. Hepatitis A after a single dose of an inactivated hepatitis A vaccine〔J〕. Scand J Infect Dis 2002,34(8) :634.

〔7〕 Andre FE. Randomized, cross-over, controlled comparison of two inactivated hepatitis A vaccines〔J〕. Vaccine 2001, 12; 20(3-4) : 292-293.

〔8〕 Hornick R, Tucker R, Kaplan KM, et, al. A randomized study of a flexible booster dosing regimen of VAQTA in adults: safety, tolerability, and immunogenicity〔J〕. Vaccine 2001, 14; 19(32) : 4727-4731.

〔9〕 Minutello M, Zotti C, Orecchia S, et, al. Dose range evaluation of a new inactivated hepatitis A vaccine administered as a single dose followed by a booster〔J〕. Vaccine 2000, 15; 19(1) :10-15.