

# 用于乙肝疫苗效力检定的NIH-q小鼠种群的建立

邢瑞昌 宋珍珠 刘双环 李秀华 胡宗汉 李德富

(中国药品生物制品检定所, 北京)

**摘要** 用7个近交系及两个NIH封闭群小鼠分别测定同一样品乙肝疫苗的免疫原性,由不同品系小鼠求出的ED<sub>50</sub>值之间有显著差异,且该反应差异性与小鼠的H-2单倍型密切相关。NIH小鼠H-2基因的杂合性影响乙肝疫苗效力检定结果的准确性。通过对NIH小鼠的遗传选择,建立了H-2单倍型为q,对HBsAg免疫应答性较为一致的NIH-q种群,同时保持了原封闭群动物繁殖力强、生长速度快等优点。

**关键词** 乙肝疫苗 免疫原性 小鼠

用小鼠测定乙肝疫苗的ED<sub>50</sub>值(ED<sub>50</sub>值等于接种疫苗后使50%的动物抗体阳转的疫苗稀释度的倒数),是目前评价乙肝疫苗免疫效价的主要方法<sup>[1]</sup>。Milich<sup>[2]</sup>和Neurath<sup>[3]</sup>等人报告小鼠对HBsAg免疫应答水平与其H-2单倍型密切相关。为了促使乙肝疫苗效力检定方法的标准化,我们在对不同品系或种群的小鼠进行H-2单倍型检查的同时,又以ED<sub>50</sub>值为指标,将不同种群小鼠对乙肝疫苗免疫应答的差异性进行了比较研究。通过遗传选择,建立了H-2单倍型均一为q型,其它基因则尽量保持杂合的NIH-q小鼠种群,具有对乙肝疫苗反应差异小,生殖力强,生长速度快等优点。

## 材料与方法

### 一、实验动物 见表1。

表1 本文使用小鼠品系及来源

Table 1 Strains of Mice Used in the Study

Strain	Inbred/Outbred	Keeper
BALB/c	Inbred	NICPBP
C57BL/6	Inbred	NICPBP
C3H/He	Inbred	NICPBP
DBA/2	Inbred	NICPBP
TA1	Inbred	NICPBP
165	Inbred	NICPBP
DBA/1	Inbred	Inst. Hematology, Tiannji
P:NIH	Outbred	NICPBP
B:NIH	Outbred	Beijing Bio-product Inst.

NIH小鼠引进后由本实验室自行繁殖, 并进行详细系谱记录, 逐只编号, 以便于筛选。

**二、H-2单倍型检查** 小鼠H-2单倍型检查用Terasaki<sup>[4]</sup>微量细胞毒方法进行。H-2单倍型细胞株及抗血清分别由美国Jackson研究所Dr. Carlson及美国NIH提供, 其抗体特异性见表2、3。

**表2** 7种H-2单抗的反应特异性

**Table 2** Specificity of 7 H-2 McAbs

Hybridoma Line	Specificity	Crossreaction
28-14-8	D <sup>b</sup>	L <sup>d, q</sup>
31-3-4	K <sup>d</sup>	—
34-4-21	D <sup>d</sup>	—
28-13-3	K <sup>b</sup>	f
20-8-4	K <sup>b</sup>	K <sup>d, r, s</sup>
16-3-22	K <sup>k</sup>	—
15-5-5	D <sup>k</sup>	K <sup>d, f</sup>

**表3** 8种H-2抗血清的反应特异性

**Table 3** 8 Antisera Against Private K & D Determinants

Antiserum	Specificity	Crossreaction
Anti-K <sup>k</sup>	K <sup>k</sup> , 23	11, 25
E-17	K <sup>a</sup> , 17	v
F-33	K <sup>b</sup> , 33	d
F-31	K <sup>d</sup> , 31	—
F-2	D <sup>b</sup> , 2	—
F-4	D <sup>d</sup> , 4	v
E-30	D <sup>a</sup> , 30	j
E-32	D <sup>k</sup> , 32	—

**三、乙肝疫苗ED<sub>50</sub>检测** 检品为北京生研所生产的853-4批号血源乙肝疫苗, 蛋白含量为18μg/ml, 简称Vaccine A。ED<sub>50</sub>测定根据本所乙肝疫苗效力检定规程进行。小鼠血清中抗-HBs用放免法测定, 统一使用About RIA药盒。

**四、小鼠生化标记基因检测** 方法见前文<sup>[5]</sup>。

## 结 果

### 一、不同品系小鼠对乙肝疫苗的免疫应答性与H-2单倍型密切相关

从表4结果可看出, 根据对乙肝疫苗免疫应答能力的高低, 7个近交系可分成4组: 第一组为DBA/1; 第二组为TA1, BALB/c和DBA/2; 第三组为C57BL/6, 第四组为C3H/He和615。每两个组之间求出的对疫苗A的ED<sub>50</sub>值之间均存在显著差异 (P<0.05)。以上免疫应答的4个等级与H-2单倍型密切相关, 若依不同品系的H-2单倍型排列, 从高反应到低反应的顺序为: H-2q>H-2d>H-2b>H-2k, 对7个近交系小鼠的H-2检测结果见表5。其中TA1系小鼠在H-2复合体中I区的基因型, 经检测为d或q, 不是k, 对乙肝疫苗反应性与此一致, 基本上TA1系与DBA/2和BALB/c两个品系处同一水平。

### 二、原NIH种群H-2基因的杂合性对乙肝疫苗效力检定的影响

表6结果表明, 在检定所及北京生研所的两个NIH小鼠种群中, H-2单倍型为非q或杂合型的个体分别占87%和85%。H-2基因的杂合性对乙肝疫苗效力检定结果的影响, 从下表结果中可以看出。表7括弧中数字表示该组中具有非H-2q单倍型的小鼠数目, 未注明的H-2单倍型皆为q。第二次试验中用雄鼠测出的ED<sub>50</sub>值与前三个结果比较, 具有显著性差异 (P<0.05)。原因主要是该组1:64这一稀释度中, 9只小鼠中有4只H-2单倍型不是q, 大大降

表4 由7个品系小鼠分别求出的ED50 (Vaccine A)  
 Table 4 A Comparison of ED50 (Vaccine A) Estimated by  
 Using 7 Inbred Strains of Mice

Dilution of Vaccine (疫苗稀释倍数)	Strain 品系						615
	DBA/1	TA1	BALB/C	DBA/2	C57BL/6J	C3H/He	
1:4	10/10	10/10	10/10	10/10	6/10	2/10	1/10
1:16	9/10	7/10	7/10	7/10	4/10	0/10	0/10
1:64	8/10	3/10	3/10	2/10	2/10	0/10	0/10
1:256	6/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
1:1024	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
ED50	213.8	36.3	31.6	27.5	10.5	<4	
95% Conf. Interval (95%可信限)	110.0~	19.1~	17.6~	15.9~	5.09~		
	435.2	69.2	56.8	47.6	12.5		

表5 7个近交系小鼠H-2检测结果  
 Table 5 H-2 Haplotype of 7 Inbred Strains of Mice Based  
 on the Present Study

Strain	Region and Genotype			H-2 Haplotype
	K	I	D	
BALB/c	d	d	d	d
C3H/He	k	—	k	k
C57BL/6	b	—	b	b
DBA/1	q	q	q	q
DBA/2	d	d	d	d
TA1	q	d or q	b	not by
615	k	—	k	k (q)

表6 NIH小鼠的H-2检测结果  
 Table 6 H-2 Typing Result for NIH Mice

NIH Colony	Number of Mice Examined	Number of Mice with the H-2 type			q Gene Frequency
		q	Hybrid	non-q	
PBI	80	64	11	5	87%
BBI	80	61	14	5	85%

表7 用H-2杂合的NIH小鼠对乙肝疫苗A的ED50检测结果

Table 7 The ED50s for the Vaccine A from 2 Assays with H-2 Heterogeneous NIH Mice

Dilution of Vaccine (疫苗稀释倍数)	Test 1		Test 2	
	Male	Female	Male	Female
1:4	20/20(1)	20/20(2)	9/9(1)	9/9
1:16	19/20	17/19	9/9	8/8
1:64	12/18(1)	15/20	7/9	3/9(4)
1:256	7/18(1)	7/19(1)	3/9	2/9
1:1024	2/16	1/19(1)	0/9(2)	0/10
ED50	152.7	136.8	146.5	67.6
95% Conf. Interval (95%可信限)	93.3~250.0	85.9~217.8	80.0~268.5	37.2~123.0

低了该关键稀释度的阳转比例，从而使ED<sub>50</sub>值明显低于正常值。这表明，由于原 NIH 种群中H-2基因不纯，在每组动物数目不够多，动物分配不能随机分布时，就有可能导致结果发生较大的偏差。既在使用参考疫苗的情况下，由于这种现象的发生是随机的，一般会在待检组与参考对照组中同时出现，也就增加了其干扰疫苗相对效力正确性的危险。

### 三、NIH-q小鼠种群的选择及应用

对两个不同来源的NIH小鼠种群，一是淘汰掉了H-2单倍型非q的个体，二是对虽H-2单倍型为q，但子代对HBsAg反应不规律的个体也予淘汰，建立了NIH-q小鼠种群。详见表8。表9是对选择后的NIH小鼠进行生化标记基因的检测结果，表明新建立的种群依然保持了非H-2位点的杂合性，也就为保持原封闭群动物的许多优点确立了遗传基础。

表8 对NIH小鼠的遗传选择

Table 8 Genetic Selection from the NIH Mice

NIH Colony	No. of Mice	No. of Mice Eliminated		NIH-q Colony
		non-q Haplotype	Other poor Responder	
P B I	80	16	12	52
B B I	80	19	16	45

**表9** 选择后的NIH小鼠生化检测结果  
**Table 9** A Survey of 9 Biochemical Markers in NIH Mice

Locus	Allele and	Frequency(%)
Car-2	b	100
Es-1	b	100
Es-3	c	100
Id-1	a	100
Ldr-1	a	100
Hbb	s	90
	d	10
Pgm-1	a	10
	b	90
Sep-1	a	60
	b	40
Mup-1	a	70
	b	30

从表10结果中可以看出:

1.用NIH-q小鼠测出的疫苗A的3个ED<sub>50</sub>间无显著差异(P>0.05)。

2.不同性别的同一鼠种测定结果无显著性差异。

3.BALB/c与NIH-q 分别测出的ED<sub>50</sub>之间存在非常显著的差异(P<0.01)。

## 讨 论

一、不同H-2单倍型的小鼠对HBsAg免疫应答性具有明显差异。因此对乙肝疫苗的效力检定结果,必须同时注明使用小鼠的品系,否则结果就失去了明确的意义。一些单位用H-2基因未纯合的NIH小鼠测定乙肝疫苗效力,实验结果经常出现“跳跃”现象,动物遗传因素

的影响是一个应予考虑的重要原因。即使是使用BALB/c等近交系动物,也必须完全保证其基因的纯合性及一致性,否则将对实验结果产生重要影响。在生物医学研究及生物检定中,实验动物是“活的精密仪器”,乙肝疫苗效力测定中小鼠遗传因素的影响是一个很好的例证。

**表10** 用BALB/c及NIH-q小鼠测定疫苗A的ED50  
**Table10** ED50 Estimates for Vaccine A with NIH-q and BALB/c Mice

Test	Animal	n	ED50	Sm	Cont.Limits 95%	
1	NIH-q	♀	19	162.2	0.118	95.1~276.7
		♂	20	142.6	0.117	83.2~239.9
	BALB/C	♀	15	46.8	0.109	28.8~76.4
2	NIH-q	♀	20	134.9	0.107	83.2~218.8
		♂	20	131.2	0.115	78.0~220.3
	BALB/c	♀	10	31.6	0.130	17.6~56.8
		♂	10	32.1	0.105	19.9~51.5
3	NIH-q	♀	10	173.8	0.138	93.2~324.3
	BALB/c	♂	10	41.4	0.147	21.5~80.9

二、在生物测定中是否应使用近交系动物,一直是国内外颇有争议的一个问题。近交系动物的特点是基因的高度纯合性,以及由此形成的遗传上的均一性、一致性,可以大大减少由于个体差异造成的抽样误差。封闭群动物的特点是由于基因杂合而形成的杂交优势,表现为繁殖力高,对环境等外部条件的变化适应能力强。NIH-q种群在一定程度上综合了近交系及封闭群各自的优势,主要具有两个特点:

1.H-2基因的纯合性、一致性,用于乙肝疫苗效力检定,可以避免由于H-2基因杂合引起的实验结果波动或偏差过大的现象。

2.基本保持了原NIH小鼠的杂合性,因此在繁殖能力,生长发育速度、对环境适应性等方面,均明显优于BALB/c等近交系动物。

这种在特殊的个别位点上基因纯合一致的非近交系动物,很可能成为药品生物制品检定中一种十分有用的动物种群模式。

(本论文获中国实验动物学会第一届论文评比一等奖)

### 参 考 文 献

- 1.World Health Organization 1985 Technical Report Series No.725 : 70
- 2.Milich DR, Chisari FV.J Immunology 1982; 129 : 320
- 3.Neurath AR, et al. Journal of Medical Virology 1983; 12 : 227
- 4.Terasaki PI, et al. Amer J Clin Pathol 1978; 69 : 103
- 5.邢瑞昌,等.遗传学报 1986; 13(5) : 383

## Selection of a Mouse Colony for the Potency Testing of HB Vaccine Xing Reizhang, et al

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

By using 7 inbred strains and 2 outbred NIH colonies of mice, the potency testing of Hepatitis B vaccine was performed. Significant differences were found between potency estimates derived from assays using different strains of mice. And it was likely that the variation of immune response to HB vaccine in mice was correlative with the H-2 haplotypes. Based on our experiments, a breeding selection has been made from the NIH colony for eliminating both non-q haplotype-bearing individuals and other poor responders to HB vaccine. This new established colony is hopeful to become a standard stock for potency testing of HB vaccine in China.

**Key words** HB vaccine Immunogenicity mice