

病毒唑对EHF患者特异性体液免疫反应的影响

肖书渊 朱宝莲 郑志明 向近敏

(湖北医学院病毒研究所, 武汉)

J. Meegan J. W. Leduc J. W. Huggins T. Cosgriff J. I. Smith

(美国军事医学科学院传染病研究所, 美国)

摘 要

本文采用微量酶联免疫吸附技术对病毒唑-安慰剂对照治疗流行性出血热(EHF)双盲法临床试验的EHF患者血清特异性IgG及IgM抗体进行了系统的动态观察并比较了两组患者抗体反应水平的差异,发现病毒唑治疗组两种抗体水平均较安慰剂对照组为低(IgG, $P < 0.001$; IgM, $P < 0.05$),说明患者用药后体内特异性体液免疫反应水平有所下降,从而减少免疫复合物的形成,有利于病情改善。

病毒唑(Ribavirin, 1- β -D-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide)是一种合成核苷酸衍生物^[1],为一新型广谱抗病毒药,组织培养和体内试验均证明能有效地抑制RNA病毒和部分DNA病毒的繁殖,其中包括几种致人类病毒性出血热疾病的病毒^[2,4]。较早的动物实验表明,对Hantaan病毒的自然宿主黑线姬鼠(*A. agrarius*)的无症状感染,病毒唑能阻止肺脏病毒抗原的产生^[5]。以后通过乳鼠致死性发病模型的实验证明该药具有抑制病毒繁殖,减轻症状和促进患病动物恢复的作用^[6],另外,该药治疗EHF患者的临床观察也获得初步有效结果^[7,8]。我们在探讨病毒唑治疗EHF的研究中,对给药组和对照组患者血清作了特异性IgG与IgM抗体滴度的动态观察,以研究病毒唑对EHF患者体液免疫反应的影响,结果如下。

材料和方法

1. 患者资料 64例均为1985年11月—1986年4月间住院患者,由EHF特异性IgM抗体检测和临床观察确诊^[3]。其中男47例,女17例,平均年龄31.8岁(16—60岁)。患者

本稿于1986年9月2日收到。

注:本研究为美国军事科学基金课题之一
(基金号DAMD 17-86-G-6002)

于入院后即开始接受静脉滴注病毒唑或安慰剂治疗(随机、双盲法分组),用药资料详见文献^[8]。于患者住院期间多次(每日或隔日)采集血清标本,首次标本为用药前,冻存于 -70°C 冰箱备检。

2. 血清特异性IgM抗体检测 系采用微量反向间接酶联免疫吸附法(RIELISA)^[3]。所测血清均自1:200起作连续对倍稀释。

3. 血清特异性IgG抗体检测 系微量酶联免疫吸附法(Micro-ELISA),略作改良:①1/5000稀释之混合的EHF病毒单克隆抗体(McAb pool*5, China*2)包被96孔酶标板(Dynatech), 4°C 过夜;②用0.01M PBS(pH7.4,含0.1%Tween-20)洗液吸洗3次后,各孔加Hantaan病毒抗原^[3], 37°C 作用2小时;③洗3次,加待测血清与阴、阳性参考血清并作连续2倍稀释(稀释液为0.01M PBS,含0.1%Tween-20与5%胎牛血清), 37°C 孵育60分钟;④同上吸洗4次,加1/10,000稀释的辣根过氧化物酶-鼠抗人IgG结合物(Accurate产品,批号E3288), 37°C 反应60分钟;⑤吸洗4次,加底物ABTS- H_2O_2 溶液^[3],置 37°C ,40分钟后读取OD值,计算滴度。

4. 结果处理 所检血清标本总数为355份,IgM与IgG测定工作全部由1人在2周左右完成,实验条件严格,由专用酶标仪(BIO-TEK)测定OD值,实验完成后将所有结果输入电脑数据库,开启双盲密码,输入电脑,自动进行分组统计工作并打印结果。

结 果

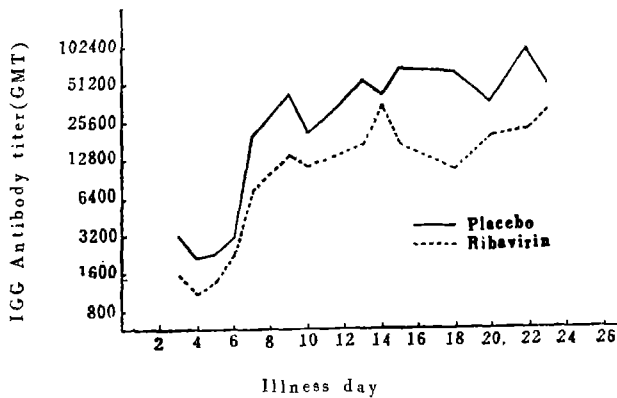


图1 安慰剂组与病毒唑组患者不同IgG抗体反应水平

Fig 1. different IgG antibody Levels of placebo and ribavirin groups

一、两组患者血清特异性IgG抗体水平的比较:分别计算两组相同病日所有标本IgG抗体几何平均滴度(GMT),得出抗体反应的动态曲线如图1。曲线前段(3—4日)的差别系标本太少之故(未列出)。经检验,两组患者平均IgG抗体水平的差别有高度显著性($p < 0.001$),即病毒唑组低于安慰剂对照组。

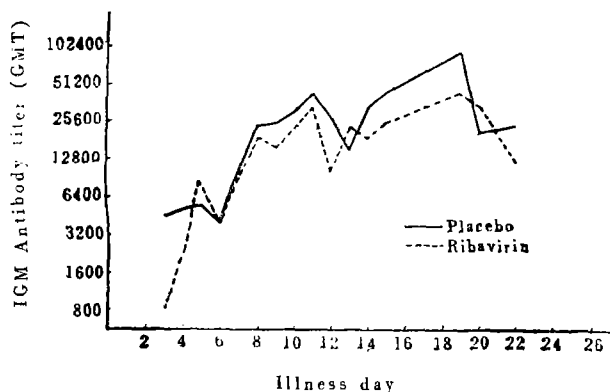


图 2 安慰剂组与病毒唑组患者 IgM 抗体的不同水平
Fig 2 different IgM Levels of placebo and ribavirin groups

二、两组患者血清特异性 IgM 抗体水平的比较：同上处理结果，按两组患者每日血清 IgM 的 GMT 分别绘制动态反应曲线，见图 2。经检验两组间差别有显著性意义 ($p < 0.05$) 病毒唑组低于对照组。其中第 3、4 病日结果系标本量太少之故，未列入统计。

讨 论

本试验结果表明，病毒唑治疗组 EHF 患者血清特异性 IgG 与 IgM 抗体滴度均低于安慰剂对照组，以 IgG 抗体更为明显 ($p < 0.001$)，且降低较早 (图 1)。分析体液免疫降低的原因，可能有三点：(1) 病毒唑抑制 EHF 病毒的繁殖，减少病毒抗原的释放，从而降低了免疫刺激效应^[8]；(2) 病毒唑有直接抑制体液免疫反应的作用^[13]，其机制不明；(3) 病毒唑干扰核酸-蛋白质的合成过程，使感染期间合成免疫球蛋白的趋势部分受抑，这似乎与该药能降低实验动物和患者血红蛋白水平的研究结果一致^[8, 12]。

EHF 的发病机理仍不清楚，但许多资料表明不同地区的肾综合征出血热 (HFRS) 患者均存在循环免疫复合物与补体的激活^[9-11]，而且，组织病理学研究提示除肾脏外，其他组织如红细胞、血小板和血管内皮细胞也有广泛的免疫复合物沉积，并伴有相应的血管改变和组织损伤。本研究发现病毒唑治疗组的 IgG 和 IgM 水平低于安慰剂对照组，这在客观上有助于减少该病患者循环免疫复合物的形成，从而减轻症状和肾脏损害。事实上，与本研究相应的临床研究结果 (待发表) 提示该药能提高血小板水平，减少尿蛋白排出的量与时间，并改善其他反映肾功能的指标，这说明病毒唑在 EHF 这一具体疾病的治疗中，降低体液免疫反应也应为其作用机制之一。

另外，本文结果也为 EHF 发病的免疫病理学说提供了间接证据。

参 考 文 献

- [1] Sidwell RW et al., 1972, *Science*, 177:705-706.
- [2] Kirsi JJ et al., 1983, *Antimicrob Agent Chemother*, 24:353-361.
- [3] 肖书渊等, 1986, 中国免疫学杂志 2(4):218-221.
- [4] Huggins JW et al. 1984, Efficacy of ribavirin against virulent RNA virus infections. In: Smith RA et al eds., *Clinical applications of ribavirin*, Orlando, FL; Academic Press, 49-63.
- [5] Lee HW et al., 1981, *Korean J Virol*, 11:13-19.
- [6] Huggins JW et al. 1986, *J Infect Dis* 153(3):489-497.
- [7] 刘恒耀等, 1986, 中华医学会病毒学会第1次全国学术会议论文集, 烟台, p.56.
- [8] Huggins JW et al. 1986, Double-blind, placebo-controlled Clinical trial of ribavirin therapeutic efficacy in the treatment of EHF. In Lang, W et al eds., *Proceedings of the 10th international congress of infectious and parasitic disease*, Munich, July.
- [9] Yan, D et al., 1981, *J Immunol* 127:1064-1067.
- [10] Jokinen EJ et al., 1977, *Lancet* 1:1012-1013.
- [11] Penttinen K et al., 1981, *J Infect Dis* 143:15-21.
- [12] Canonico PG et al., 1984, The toxicology and pharmacology of ribavirin in experimental animals. In: Smith RA et. eds., *Clinical application of rivavirin*, Orlando, FL; Academic Press 65-77.
- [13] Peavy DL et al., 1981, *J Immune* 3: 861-864.

EFFECT OF RIBAVIRIN ON THE SPCEIFIC HUMOUR AL IMMUNITY RESPONSES OF EHF PATIENTS

Xiao Shu-Yuan, Zhu Bao-Lien, Zheng Zhi-Ming,
Hsiang Chin-Min

(*Virus Research Institute, Hubei Medical College, Wuhan*)

James Meegan, James W. LeDuc, John W. Huggins,
Thomas Cosgriff, Joseph I. Smith

(*U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Disease, U.S.A.*)

Using a micro-ELISA technique, the serum specific IgG and IgM antibody of the EHF patients were measured sequentially as a part of a double-blind, placebo-controlled clinical trial of ribavirin therapeutic efficacy in the treatment of EHF. The results showed a significant decrease of antibody levels in the ribavirin-treated group ($p < 0.001$ in IgG, $p < 0.05$ in IgM). It suggests that ribavirin has an inhibition effect on the EHF patients' antibody responses. Therefore it may reduce the formation of the circular immune complexes which are supposed to be responsible for this peculiar disease,