

单克隆抗体治疗日本乙型脑炎的实验研究

张明杰 汪美先
姜绍璋 马文煜

(第四军医大学微生物学教研室, 西安)

提 要

本文应用 JEV-McAb 对感染 JEV 的小白鼠及幼山羊进行实验性治疗, 并对乙脑免疫机理作一初步探讨。结果表明, JEV-McAb 对经不同途径感染各种 JEV 毒株的小白鼠都有较好的保护作用, 其效果明显优于 PcAb。小鼠感染后 120 小时, 大部分已发病, 个别已濒死, 这时给予混合 McAb 或其 $F(ab')_2$, 仍可保护约半数存活。McAb 对感染 JEV 的幼羊也有较好的保护作用。羊脑内注入 JEV 48 小时后, 出现发热不安等症状, 这时由腹腔和椎管两种途径同时给予混合 McAb, 保护率达 100%。存活实验动物脑组织内未分离出病毒; 而死亡动物病毒分离阳性, 脑组织经双 PAP 及 HE 染色证实 JEV 抗原阳性并伴有脑炎的病理改变。中和活性是 JEV-McAb 的主要保护方式, 中和效价高的 McAb 保护率也高。

日本乙型脑炎(简称乙脑)是一种侵犯中枢神经系统(CNS)的病毒性疾 病, 人畜共患。该病主要分布于东南亚和太平洋西部地区。在我国除新疆、西藏外, 其余各地皆有本病流行; 每年报道一万多病例, 病死率达 10% 以上⁽¹⁾。幸存者中约 15.3% 留有不同程度的后遗症⁽²⁾。乙脑严重地威胁着人类的生命健康。自从发现该病以来, 人们一直在不断地寻找特异性治疗措施, 以求降低病死率, 减少后遗症。但是, 迄今仍未找到特异有效的疗法。本文应用日本乙型脑炎病毒(JEV)单克隆抗体(McAb)对感染 JEV 的小白鼠及幼山羊进行实验性治疗, 并对乙脑免疫机理作初步的探讨, 为 McAb 的临床应用提供必要的实验资料及依据。

材料与方 法

一、病毒: JEV 西₁₄株(SA₁₄)、P₃株(P₃)、集贤株(JI)均为本室保存, 经乳鼠脑内连续传三代增毒后供用(表 1)。

二、单克隆抗体及其 $F(ab')_2$ 的制备与活性测定: 2H₄、2F₂、mC₃、mG₉、2D₂、nG₂

本稿于 1986 年 12 月 22 日收到

表1. 所用毒株的来源及毒力
Table 1 The sources and virulence of the virus strains used

Virus strains	Time of isolation	Sites of isolation	Hosts	Log LD ₅₀
P ₃	1949	Beijing	man	9.0
SA ₁₄	1953	Xi an	mosquito	9.5
J1	1981	Northeast China	pig	7.5

等六株JEV杂交瘤细胞系均由徐震洲提供^[3]。按有限稀释法将各细胞系克隆化一次, 用间接免疫荧光试验(IFA)筛选效价最高的克隆, 常规注入2-3月龄BALB/c小鼠腹腔制备腹水。2H₄、2F₂、mC₃三种腹水等量混合后经硫酸铵沉淀, DEAE-Sephadex A50 (pharmcal) 柱层析。所得 IgG 按文献报道的方法进行胃蛋白酶(中国科学院生物化学研究所)消化^[4], 用 Sephadex G150 (pharmcal) 柱层析分离, 其第一峰经 SDS-PAGE分析表明, 为分子量约20,000的F(ab')₂纯品。腹水及其F(ab')₂经 IFA、ELISA间接法、HI、微量组织培养中和试验(NT)等测定其活性。以上试验皆以 SA₁₄ 为抗原, 按本室常规方法进行。

三、小白鼠的感染及治疗试验: 选7克左右18天龄的昆明种小白鼠, 用 JEV 鼠脑悬液攻击, 腹腔感染的剂量为 $10^{5.0}LD_{50}$, 皮下感染的剂量为 $10^{5.5}LD_{50}$ 。2H₄、2F₂、mC₃、2D₂四种腹水、前三种的混合腹水(M-McAb)及其F(ab')₂均以Hank's液作1:10稀释, 在病毒攻击的前24(-24)小时, 同时(0)以及攻击后第24、48、72、96、120小时分别腹腔一次性注射, 0.2ml/只。同时设病毒对照, McAb对照, PcAb对照。观察三周, 计算保护率。

将M-McAb以Hank's液作系列倍比稀释, 于SA₁₄攻击后第24小时腹腔注射0.2ml/只一次。观察三周, 以保护小鼠50%存活最高稀释度作为M-McAb的保护效价。

四、幼山羊的感染及治疗试验: 由西安农村购买12(±2)天龄3.5公斤左右的雄性幼山羊, 颅内注射 $10^{3.5}LD_{50}$ (小鼠)的SA₁₄鼠脑悬液^[5]0.2ml/只。M-McAb经Hank's液作1:2稀释, 于感染第48小时由腹腔、椎管及腹腔加椎管三种方式注射一次, 2ml/只。每天测量体温, 观察两个月以上, 计算保护率。

五、脑、血、脑脊液中病毒的分离: 选择M-McAb不同时间治疗组以及各对照组的鼠于濒死前解剖取脑, 存活鼠于第三周末取脑。全部幼山羊均于感染前采集血液及脑脊液作为正常对照, 感染后隔天抽血并采集脑脊液。脑组织经匀浆后在BHK₂₁细胞中传代以分离病毒, 血清及脑脊液于三周龄昆明鼠脑内传代增毒, 以分离病毒。

六、单克隆抗体治疗后动物脑组织的病理观察: 死亡羊于濒死前解剖, 存活羊观察2月后处死, 所有羊皆从大脑皮层取材。小鼠于病毒对照组死亡达半数时将各组处死, 分别取脑。将所取组织切修成2~3mm左右小方块, 用95%乙醇85ml、甲醛液10ml、冰醋酸5ml配制的固定液, 4℃冰箱固定12小时^[6], 按常规制成7μm的连续石蜡切片, 以HE和双PAP法染色^[7], 光学显微镜观察。兔抗JEV血清系用密度梯度速率区带离心法提纯的JEV抗原免疫家兔制得, 使用效价1:200; 羊抗兔IgG系本校药厂冰冻干燥制品, 使用效价1:60; PAP复合物系本校病理解剖学教研室制备, 使用效价1:100。

结 果

一、单克隆抗体及其F(ab')₂免疫学活性的测定: JEV-McAb的免疫学活性具有明显的异质性。其IFA效价为10⁻⁴~10⁻⁵, ELISA效价为10⁻⁵~10⁻⁸, mC₃和mG₃具有较高的HI活性, mC₃和2D₂具有介导ADCC效应的功能, 2H₄、2F₂、mC₃特别是前二者具有较高的NT效价, M-McAb的中和活性高于任何单一的McAb。F(ab')₂失去了介导ADCC的功能, 没有HI活性, 但仍具有较高的中和效价(表2)。

二、单克隆抗体及其F(ab')₂对小鼠的治疗实验:

表2 单克隆抗体及其F(ab')₂的免疫学活性

Table 2 Assays for the immunological activity of the McAbs and their F(ab')₂

	IFA	ELISA	HI	NT	ADCC
2H ₄	10 ⁻⁵	10 ⁻⁸	320	2×10 ⁻⁶	—*
2F ₂	10 ⁻⁵	10 ⁻⁸	—	3×10 ⁻⁵	—
mC ₃	10 ⁻⁵	10 ⁻⁸	1,280	5×10 ⁻²	10 ⁻²
mG ₃	10 ⁻⁵	10 ⁻⁸	2,560	—	—
2D ₂	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	—	—	10 ⁻¹
mC ₂	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	—	—	—
M-McAb	10 ⁻⁵	10 ⁻⁸	320	1×10 ⁻⁷	10 ⁻¹
F(ab') ₂	UT**	UT	—	1×10 ⁻⁶	—
PcAb	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	320	5×10 ⁻³	10 ⁻²
Sp2/0	—	—	—	—	—

*—, no activity

**UT, untested

表3 不同单克隆抗体及其F(ab')₂对SA₁₄腹腔感染鼠的疗效

Table 3 Curative effects of different McAbs and their F(ab')₂ to the mice challenged by SA₁₄ from abdominal cavity

	PcAb	McAb					
		2H ₄	2F ₂	mC ₃	2D ₂	M-McAb	F(ab') ₂
-24	7/15*	12/15	10/15	6/15	5/15	15/15	UT
0	6/15	12/15	11/15	6/15	2/15	15/15	UT
24	3/15	15/15	15/15	3/15	0/15	15/15	UT
48	0/15	11/15	11/15	0/15	0/15	15/15	10/10
72	0/15	11/15	8/15	0/15	0/15	11/15	9/10
96	0/15	10/15	6/15	0/15	0/15	11/15	UT
120	0/15	7/15	3/15	0/15	0/15	7/15	5/10
Control of antibodies	15/15	15/15	14/15	15/15	15/15	15/15	10/10
Control of viruses	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/10

*Number of survivals/number of tested

从表3可以看出, 病毒对照组于感染后6—9天全部死亡; 2D₂仅于感染前24小时给予才有部分保护作用, 感染时给予作用明显减弱, 感染后给予则根本无效。mC₃的作用与PcAb相似, 感染后24小时有一定的保护作用, 但不显著 ($P > 0.05$)。2H₄、2F₂ (除120小时组外)、M-McAb及其F(ab')₂各组的疗效均非常显著 ($P < 0.01$)。抗体对对照组小鼠几乎全部存活, 表明腹水本身对小鼠无毒性作用。

M-McAb对SA₁₄、P₃、JI株的腹腔或皮下感染都有很好的疗效。96小时组可保护半数以上的小鼠存活; 120小时大部分小鼠已发病, 个别已濒死, 这时的保护率仍在26.67%以上(表4)。

表4 M-McAb对各种乙脑毒株不同途径感染鼠的疗效
Table 4 Curative effects of M-McAb to the mice challenged by different JEV strains in different ways

	SA ₁₄		P ₃		JI	
	p. i	s. c	p. i	s. c	p. i	s. c
24	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15
48	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15
72	15/15	15/15	13/15	15/15	15/15	15/15
96	11/15	8/15	7/15	9/15	7/15	8/15
120	7/15	4/15	4/15	5/15	6/15	7/15
Control of viruses	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15

P. i: peritoneal injection

S. c: subcutaneous injection

各种McAb的保护作用差异较大。以感染48小时治疗组为例, 病毒对照鼠于第6—9天全部病死, 发病集中、规律; PcAb使发病推迟2—3天, 病后症状发展较慢, 但最终仍为100%死亡; 2H₄可使发病推迟3—5天, 症状更不典型, 73.33%的小鼠免于死亡。M-McAb治疗的感染小鼠未出现明显的症状, 存活率达100%。F(ab')₂对感染晚期小鼠的疗效优于完整的M-McAb。所有存活鼠脑内均未分离出病毒; 而死亡鼠脑内病毒分离率为100%, 脑组织切片经双PAP及HE染色, 证实有JEV抗原的存在并有明显的脑炎病理学变化。

三、单克隆抗体对感染幼山羊的治疗实验: 病毒对照组于感染后第4天体温升至40℃以上, 出现萎靡、竖毛及食欲不振等症状, 第5天出现抽搐、拒食及角弓反张等反应; 第5—7天全部病死, 濒死前全身密布出血点, 尤以耳尖部明显。腹腔治疗组的症状及死亡时间与病毒对照组的差别不大。腹腔加椎管治疗组在第4天的症状与前两组相似, 但从第5天起体温逐渐下降, 精神开始好转。观察两个月以上, 未发现明显的后遗症, 保护率100%。单一椎管治疗组前3周的表现与椎管加腹腔组相似, 但于第4周末又一次突然发作, 并在短期内全部死亡(表5)。

全部幼羊在感染后第一天就可以从血液及脑脊液中分离到病毒, 死前病毒分离率为100%; 存活羊从感染后第5天即治疗后第3天开始病毒分离率逐渐下降, 治疗后第7天病毒分离全转阴, 直至第30天仍未查见病毒。死亡羊脑组织病毒分离阳性, 经双PAP染色

表5 单克隆抗体治疗感染乙脑幼羊的结果
Table 5 Efficacy of the M-McAb in treating the goats challenged by SA₁₁

	Number of tested	Number of survivals	Protective rate(%)	Average life span(day)	P value
p.i	8	0	0	7	
s.i	4	0	0	28	
p.i + s.i	8	8	100	60	0.01
Control of viruses	8	0		7	

p.i: peritoneal injection s.i: spinal injection

发现JEV 抗原较多, HE染色表明有明显的组织学改变。而存活羊的脑组织未见明显异常。

讨 论

一、单克隆抗体是一种有希望的乙脑治疗制剂: McAb对感染 JEV 的小白鼠具有较好的保护作用, 但不同杂交瘤细胞系分泌的 McAb 作用显著不同, 2D₂ 几乎没有保护效果, mC₃与PcAb相似, 2H₄的作用最好; 而M-McAb则比任何单一McAb都要强, 在感染后48小时注射进行实验性治疗, 小鼠存活率达100%; 感染后第5天大部分小鼠已发病, 个别已濒死, 这时给予M-McAb, 仍可保护约半数的小鼠免于死亡。F(ab')₂在感染晚期的疗效较完整抗体好, 这可能与其分子量小, 易于进入病变部位有关^[9]; 此外, 由于其小分子特性, 还可避免应用于异种治疗时的过敏反应。M-McAb对来自人、蚊、猪等宿主的病毒株多种途径的感染都有良好的保护作用。每次试验都设了 McAb 对照组和病毒对照组, 均取得了较为满意的结果。

M-McAb对感染JEV的幼羊也有显著的保护效果。羊脑内注入病毒后第48小时, 出现发热、不安等症兆, 这时由腹腔和椎管两种途径同时给予 M-McAb, 保护率可达100%。乙脑为侵犯中枢神经系统(CNS)的病毒性疾病, 主要病变发生于脑组织。经脑内感染后, 在血液及脑脊液中都可以查到病毒。单纯腹腔注射McAb没有保护作用, 这可能与McAb不能通过血脑屏障有关。Doherty 等报道^[9], 抗体不能通过正常的血脑屏障, 只有当 CNS 感染, 引起脑内压增高, 血脑屏障受损后, 抗体才能通过。单一椎管治疗组在短暂的发热期后症状消失, 血液及脑脊液中病毒分离阴转, 但经约半月的缓解后又突然发病死亡, 脑内病毒分离阳性并伴有明显的脑组织病理改变。产生这种现象的原因还有待于进一步探讨。

二、中和活性是单克隆抗体的主要作用方式: 本文表明, 中和活性与保护作用既密切相关, 又各有其特点。随着中和活性的上升, 保护作用也相应地增强; 但中和与保护的机理又不完全相同。例如 2D₂ 在体外几乎没有中和活性, 但却有一定的体内保护作用; 这似乎与其介导的ADCC效应有关。2H₂、2F₂及其F(ab')₂虽无介导ADCC效应的功能, 但仍有很好的保护效果。mC₃虽然既有介导ADCC效应的活性, 又有一定的中和能力, 但

由于其中和效价较低, 所以保护作用也较差^[10]。由此可见, 中和活性是 JEV-McAb 的主要作用方式(表6)。

表6 JEV-McAb的保护效果与中和活性
Table 6 The protective effect and neutralizing activity of the McAb

	NT	rate of protection(%)		ADCC
		-24	48	
2H ₄	2×10 ⁻⁶	80.00	73.33	—
2F ₂	3×10 ⁻⁵	66.67	73.33	—
mC ₃	5×10 ⁻³	40.00	0	10 ⁻²
2D ₂	—	33.33	0	10 ⁻¹
M-McAb	1×10 ⁻⁷	100	100	10 ⁻¹
F(ab') ₂	1×10 ⁻⁶	UT	100	—
PcAb	5×10 ⁻³	40.67	0	10 ⁻²

三、多株单克隆抗体混合使用可以增强其保护效果: McAb 具有高度的抗原特异性, 一种McAb仅针对某一特异的抗原位点。所以, 应用McAb进行免疫学分析与鉴定抗原结构具有特殊重要的意义。但作为治疗制剂, 除特异性外保护效果也显得非常重要。将不同位点特异性的McAb混合使用, 既保留了McAb的特异性, 又克服了其作用单一的缺点。本文表明, M-McAb 的中和活性及保护效果都优于任何单一的 McAb, 保护效果的增高与中和活性的上升成正比。这不但证明中和活性是JEV-McAb 的一种重要作用方式, 而且为寻找高效价的乙脑疫苗及McAb治疗制剂提供了一个重要的依据。

参 考 文 献

- [1] WHO, 1984, *Chronical* 38(4):191.
- [2] 李军等, 1976, 中华流行病学杂志, 1:51
- [3] 徐震洲等, 1985, 中国免疫学杂志, 7(6):17.
- [4] Nisonoff, A. et al, 1960, *Arch. Biochem. Biophys.* 88: 241.
- [5] 党正孙, 汪美先, 1955, 中华医学杂志, 21(5):413.
- [6] 盛鹏, 1985, 第三军医大学学报, 7(1):1.
- [7] Van Moorden S, Polnk JM. 1983, *Immunocytochemistry, Practical Application in pathology and Biology*. P. 11-42, Bristol wright PSG.
- [8] Buchegger, F. et al, 1983, *J. Exp. Med.*, 18(2):413.
- [9] Doherty, PC. et al, 1981, *J. Neuroimmunol.*, 1:227.
- [10] 张明杰等, 1987, 中华微生物学与免疫学杂志, 7(4):

EXPERIMENTAL STUDIES IN THE TREATMENT OF JAPANESE B ENCEPHALITIS BY MONOCLONAL ANTIBODIES

Zhang Ming-jie

Wang Mei-xian

Jiang Shao-chun

Ma Wen-yu

(*Dep. of Microbiology, the 4th Military Med. College, Xian*)

The anti-JEV McAb is tried out to treat the mice and goats which have infected by JEV. The results show that the JEV-McAbs have an excellent curative effect to several JEV-infected mice. It is evidently better than that of the PcAb. After 120 hours of infection, most of the mice have already had the signs of JE, some were nearly dead. If McAb or their F(ab')₂ were given even at this time, approximately half of the mice could be saved from JE. M-McAb has an evident protective effect in the goats too. After 48 hours of challenge by JEV in the brain, feverish and restless symptoms have appeared. If M-McAb was given via both peritoneal and spinal even at this moment, the survival rate was 100%. The dead animal's brains were positive in virus isolation, and had many JEV antigens with evident brain tissue damages as detected with double PAP and HE stains. The survivals were not. After more than 2 month's observation, no harmful reaction and side effect appeared. The protective effect of the JEV-McAb is closely related to their NT activity. The higher the NT titre, the better the protection. So it is inferred that NT activity is the main mechanism of the protection of JEV-McAb.