

## 乙型肝炎 IgA 类 HBsAg 循环免疫复合物的检测及意义

彭 宣 宪

(江西大学生物系微生物学教研室, 南昌330047)

方 亮 谢 天 益

(西安医科大学病毒学研究室, 西安710061)

李 兆 瑞 李 建 生

(西安市传染病医院, 西安 710061)

### 提 要

本文报道用捕捉法 ELISA 检测各型乙肝 IgA 型 HBsAg 循环免疫复合物。结果表明, 慢性乙肝 IgA 型 HBsAg 循环免疫复合物检出率显著高于急性乙肝; 在慢性乙肝中, IgA 型 HBsAg 循环免疫复合物的出现与 HBV e 系统关系密切, 主要存在于 HBeAg 阳性血清中, 并与 HBeAg 滴度有关。故 IgA 型 HBsAg 循环免疫复合物可作为 HBV 慢性感染的血清诊断标志之一; 也可作为反映 HBV 在增殖并有传播危险的标志之一。

**关键词:** 酶联免疫吸附试验 乙型病毒性肝炎 循环免疫复合物 免疫球蛋白 A 乙型肝炎病毒表面抗原

近年来, 对乙型病毒性肝炎循环免疫复合物 (CIC) 的研究报道较多<sup>(1-3)</sup>, 其中特异性 HBsAg/IgM 和 HBsAg/IgG-CIC 的临床意义较大, 引起许多学者的关注和重视<sup>(3,4)</sup>, 但尚未见有关 IgA 型 HBsAg 循环免疫复合物 (HBsAg/IgA-CIC) 临床意义的研究报道。我们在建立检测 HBsAg/IgA-CIC 捕捉法 ELISA 的基础上, 进一步对其意义进行了探讨。

### 材 料 和 方 法

#### 一、实验材料

1. 羊 IgG 抗人 IgA 单扩效价 1 : 100, 卫生部上海生物制品研究所产品。经硫酸盐析-DEAE-32 层析提取 IgG 组分。

2. 辣根过氧化物酶 (HRP) - 抗 HBs 按文献<sup>[5]</sup>将 HRP (Sigma) 标记到马抗 HBs 纯抗体 (卫

本文于1988年7月16日收到

本文临床资料承蒙西安医科大学第一附属医院传染科李义方教授热情指导, 有关实验工作得到西安医科大学病毒研究室全体老师大力支持, 在此一并致谢!

生部北京生物制品研究所产品)的IgG组分上。

3. HBsAg 和 PHSAr 固相放射免疫测定盒 北京中国北方同位素公司产品。
4. HBeAg 和抗 HBe 酶联免疫测定盒 北京中国人民解放军军事医学科学院产品。
5. DG-II 型酶联免疫检测仪 国营华东电子管厂产品。
6. FJ-2003/50Y 免疫计数器 国营西安二六二厂产品。

**二、研究对象** 实验组包括乙型病毒性肝炎患者及无症状携带者共 236 例,按 1984 年 12 月 30 日南宁会议诊断标准分型。病例来自西安市传染病医院,第四军医大学西京医院,西安医科大学第一附属医院传染科同期住院患者。对照组包括 61 例血清标本,其中健康献血员 38 例,非乙型肝炎 16 例,其它与免疫复合物有关的疾病 7 例(类风湿因子强阳性 3 例,系统性红斑狼疮 2 例,麻疹伤寒及流行性出血热各 1 例)。本文为叙述方便将慢性迁延型肝炎,慢性活动型肝炎及肝炎后肝硬化合称为慢性肝病。

**三、HBsAg/IgA-CIC 捕捉法 ELISA 操作过程:** 将羊 IgG 抗人 IgA 包被反应板各孔,每孔 0.1ml(10 $\mu$ g/ml),4 $^{\circ}$ C 24 小时,用 pH7.4, 0.01mol/L 含 0.05% Tween-20 的磷酸缓冲液(PBS-T)洗涤 3 次,每次 3 分钟,甩干;加用生理盐水按 1:10 稀释的血清标本 0.1ml,4 $^{\circ}$ C 24 小时,同上洗涤,甩干;加含 10% 羊血清的 PBS-T 稀释的 HRP-抗 HBs,每孔 0.1ml,25 $^{\circ}$ C 4 小时,同上洗涤,甩干;加新配制的邻苯二胺底物溶液 0.1ml,25 $^{\circ}$ C 避光 15 分钟;硫酸终止反应,测 OD 值。每反应板以试剂空白调零点,并设有阴、阳性对照,每份标本以复孔的平均 OD 值为测定结果,以等于或大于阴性对照的 2.1 倍为阳性。

## 结 果

### 一、本捕捉法 ELISA 的特异性

取 20 份 HBsAg/IgA-CIC 阳性血清标本,按常规法进行阻断试验(阻断用抗 HBs McAb 系中国药品生物制品检定所产品)和中和试验(中和用羊抗人 IgA 抗血清系卫生部上海生物制品研究所产品)。按同份血清阻断孔或中和孔与其相对应的对照孔的测定结果来计算其抑制率,对 20 份标本这两种特异性试验的抑制率均大于 50%。

此外,我们用对照组 61 份血清标本,或在正常人血清中分别加入单纯抗 HBs 阳性血清,纯化 HBsAg(宁波免疫试剂厂产品)和热聚人 $\gamma$ 球蛋白(本室自制),其检测结果均为阴性,用试剂空白对照来鉴定 HRP-抗 HBs 是否会与羊 IgG 抗人 IgA 发生非特异性反应,其 OD 值仅为 0.01。

### 二、本捕捉法 ELISA 的重现性

取 5 份 HBsAg/IgA-CIC 阳性血清标本,在相同条件下,每周做一次连做五周,结果各标本 OD 值的变异系数均小于 10%。

### 三、乙型肝炎 HBsAg/IgA-CIC 检出率

对实验组六型乙肝患者 236 例血清标本和对照组 61 例血清标本进行 HBsAg/IgA-CIC 检测。结果表明各型乙肝均不同程度地检出 HBsAg/IgA-CIC,而对照组 61 例血清标本均为阴性,如表 1。实验组各型乙肝 HBsAg/IgA-CIC 检出率与对照组相比较,除急性肝炎和无症状携带者无明显差异外( $P > 0.05$ ),其余均有显著差异( $P < 0.001 - 0.05$ ),实验组各型乙肝之间亦有非常显著差异( $P < 0.001$ )。提示 HBsAg/IgA-CIC 阳

性率与临床病型及 HBV 慢性感染有一定关系。

表 1. 乙肝 HBsAg/IgA-CIC 阳性率

Table 1 The positive rates of HBsAg/IgA-CIC

	Cases	HBsAg/IgA-CIC		P
		No	%	
Control	61	0	0	
Asymptomatic carriers	31	2	6.5	>0.05
Acute HB	60	2	3.3	>0.05
Chronic persistent HB	21	3	14.3	<0.05
Chronic active HB	57	25	43.9	<0.001
Severe HB	18	10	55.6	<0.001
Cirrhosis after HB	49	29	59.2	<0.001

#### 四、慢性肝病 HBsAg/IgA-CIC 与血清 HBsAg 的关系

将 127 例慢性肝病按血清 HBsAg 的 S/N 值分为六个层次：0—, 2.1—, 10.0—, 25.0—, 50.0—, 及 75.0—, 各层次 HBsAg/IgA-CIC 阳性率依次为：12.5% (1/8), 38.9% (7/18), 55.6% (10/18), 57.1% (24/42), 33.3% (8/24) 及 41.2% (7/17)。HBsAg 在中等浓度时 (S/N 值为 10—49.9) 阳性率最高, 但经统计学处理, 六层次间 HBsAg/IgA-CIC 阳性率无显著差异 ( $P > 0.05$ )。提示 HBsAg/IgA-CIC 的存在对血清 HBsAg 的滴度无明显的依赖关系。

#### 五、慢性肝病 HBsAg/IgA-CIC 与 HBV e 系统的关系

##### 1. 与血清 HBeAg S/N 值的关系

慢性肝病 HBsAg/IgA-CIC 阳性率和血清 HBeAg S/N 值在一定范围内似乎呈正比关系, 见表 2。X<sup>2</sup> 检验表明, HBeAg 阳性的任一组的 HBsAg/IgA-CIC 阳性率都显著高于 HBeAg 阴性组 ( $P < 0.01$ )。

表 2 慢性肝病患者 HBeAg 的 S/N 值与 HBsAg/IgA-CIC 阳性率的关系  
Table 2 Relationship between the S/N value of serum HBeAg and the positive rates of HBsAg/IgA-CIC in patients with chronic hepatitis B

	Cases	HBsAg/IgA-CIC		P
		No	%	
0—	47	7	14.9	P < 0.01
2.1—	40	13	40.0	
10.0—	23	20	87.0	P > 0.05
20.0—	17	14	82.4	

##### 2. 与血清 HBV e 系统的关系

将 HBV e 系统组合成四种模式：单纯 HBeAg 阳性, 单纯抗 HBe 阳性, e 系统阳性及 e 系统阴性。各模式 HBsAg/IgA-CIC 阳性率依次为 67.1%, 13.6%, 30.0% 及

16.0%。单纯 HBeAg 阳性组高于其它三组, 差异非常显著 ( $P < 0.01$ ), 见表 3。

表 3 慢性肝病患者 e 抗原/抗体系统与 HBsAg/IgA-CIC 阳性率的关系  
Table 3 Relationship between the e antigen/antibody system and the positive rates of HBsAg/IgA-CIC in patients with chronic hepatitis B

	Cases	HBsAg/IgA-CIC		P
		No	%	
HBeAg (+)	70	47	67.1	} $P < 0.01$ } $P > 0.05$
HBeAb (+)	22	3	13.6	
HBeAg/HBeAb (+)	10	3	30.0	
HBeAg/HBeAb (-)	25	4	16.0	

#### 六、HBsAg/IgA-CIC 与 PHSA<sub>r</sub> 及 HBeAg 的关系

仿张正<sup>[6]</sup>法从同时检测 HBsAg/IgA-CIC、PHSA<sub>r</sub> 及 HBeAg 的 113 例慢性肝病血清标本中选出其中 HBsAg/IgA-CIC 阳性的 52 例排成四种组合模式, 见表 4。在这 113 例血清标本中, HBsAg/IgG-CIC 检出率为 46%, 其中以 HBsAg/IgA-CIC、PHSA<sub>r</sub> 及 HBeAg 同时阳性的模式最高, 为 67.3%。X<sup>2</sup> 检验与其它模式比较均有非常显著差异 (均为  $P < 0.01$ )。

表 4 慢性肝病患者 HBsAg/IgA-CIC (+) 组与 PHSA<sub>r</sub> 及 HBeAg 的关系  
Table 4 Relationship among HBsAg/IgA-CIC, PHSA<sub>r</sub> and HBeAg in the positive patients of HBsAg/IgA-CIC with chronic hepatitis B

HBsAg/IgA-CIC	PHSA <sub>r</sub>	HBeAg	CPH	CAH	HLC	Total
+	+	+	3	15	17	35
+	+	-	0	1	1	2
+	-	+	0	4	8	12
+	-	-	0	1	2	3

CPH, Chronic persistent HB

CAH, Chronic active HB

HLC, Cirrhosis after HB

## 讨 论

我们建立了敏感、特异、重复性好的检测 HBsAg/IgA-CIC 捕捉法 ELISA, 用于六型 236 例乙肝患者和无症状携带者血清标本检测, 发现各型乙肝血清中都存在 HBsAg/IgA-CIC, 其检出率之间有显著差异, 对临床分型和 HBV 慢性感染诊断有重要意义。

目前诊断 HBV 感染, 虽然已有一些敏感的免疫检测标志如 HBsAg、抗 HBs、HBeAg、抗 HBe、IgG-抗 HBe 及 HBsAg/IgM、HBsAg/IgG-CIC 等, 但在急慢性 HBV 感染时这些血清标志都可阳性, 因而认为, 区别 HBV 急慢性感染的血清学标志当推 IgM-抗 HBe, 但亦有不同意见<sup>[7]</sup>。我们发现急性乙肝患者 HBsAg/IgA-CIC 检出率较低, 与非乙肝疾

病及正常人无明显差别,而慢性肝病较高。尽管乙肝临床诊断尚有一定的局限性及非可靠性,但本研究急、慢性乙肝检出率如此悬殊,还是足以说明HBsAg/IgA-CIC不失为一项鉴别急、慢性乙肝的辅助指标,是HBV慢性感染的血清学标志之一。如何看待急性乙肝和慢性肝病之间HBsAg/IgA-CIC检出率的差异呢?我们初步分析认为,由于Ig种类的产生在时间上有先后,通常IgM和IgG明显早于IgA,因此,一般急性病患者体内抗原主要由IgM、IgG中和,形成IgA类免疫复合物的机率就极小,至于无症状携带者与正常人无区别,可能是免疫反应低下所致<sup>[8]</sup>。

本文结果提示,慢性肝病HBsAg/IgA-CIC检出率与HBV e系统的关系密切。这与HBV感染时,e系统消长变化过程相一致。单纯HBeAg阳性期,病毒复制活跃,传染性较强,HBsAg/IgA-CIC阳性率最高;随着抗HBe的产生,机体处于抗原抗体共存阶段,此时病毒复制减少,传染性减弱,HBsAg/IgA-CIC阳性率下降;窗口期和单纯抗HBe阳性时,病毒大多被清除或处于静止期,传染性较弱,HBsAg/IgA-CIC阳性率亦最低。我们的资料还表明,慢性肝病患者HBsAg/IgA-CIC检出率与HBeAg S/N值密切相关,见表2。在由HBV e系统组合的四个模式中,HBsAg/IgA-CIC检出率以单纯HBeAg阳性模式最高,与其它三种模式相比较均有非常显著差异,结果如表3所示。将HBsAg/IgA-CIC、PHSAr及HBeAg组合成四种模式,以三者阳性模式非常显著地高于其它三种模式,如表4所示。一般认为,HBeAg及PHSAr与DNA-P及Dane颗粒具有正相关<sup>[9]</sup>,可以说慢性肝病HBsAg/IgA-CIC的检测可作为间接反映HBeAg进而说明Dane颗粒活跃复制的一个辅助指标,检测HBsAg/IgA-CIC所需试剂来源容易,又较经济,易于推广,所以具有一定的实用价值。

虽然迄今为止尚未见其他作者关于检测HBsAg/IgA-CIC的报道,但近年来已相继有一些用抗原非特异性法从肝炎患者CIC中检出IgA复合物的报道:吴谦等<sup>[9]</sup>采用甘氨酸-HCl缓冲液解离肝炎患者CIC后,再以对流电泳和单向扩散法检测解离液,观察到CIC中存在IgA成分;黄湘虎等<sup>[10]</sup>采用PEG沉淀CIC后,用单向扩散法发现各型乙肝中IgA复合物以肝硬化最高(70.6%),重症肝炎次之(57.1%),慢活肝稍低(29.3%),而慢迁肝、急肝、无症状携带者及正常人均阴性;Вегрозепов<sup>[11]</sup>观察到急性乙肝患者有4.3%存在IgA复合物;Aritaka<sup>[12]</sup>用Raji细胞荧光法研究62例急性病毒性肝炎患者CIC,认为乙型肝炎IgA型CIC存在率低。对照这些研究可以认为:(1)本法检测到的HBsAg/IgA-CIC与抗原非特异性法检测到的IgA复合物间有一定相关性;(2)本法比抗原非特异性法更能反应实际存在情况;(3)可能存在HBsAg/IgA-CIC以外的IgA型CIC。因此,用酶联免疫吸附试验来检测乙肝患者血清中各种特异性IgA型免疫复合物将对乙肝的研究起到积极的作用。

## 参 考 文 献

- (1) Thomas, R.C., et al., 1978, *Clin. Exp. Immunol.*, 31: 150
- (2) Gupta, R.C., 1982, *Clin. Exp. Immunol.*, 49: 543
- (3) Carenda, F., 1982, *Lancet*, 2: 235
- (4) Pernice, W., et al., 1979, *Clin. Exp. Immunol.*, 37: 376
- (5) 郭春祥, 郭翎琼, 1983, 上海免疫学杂志, 3(2): 97
- (6) 张正等, 1985, 临床肝胆杂志, 1(2): 90
- (7) 汪伟翔, 徐志一, 1986, 病毒学报, 2(3): 202
- (8) 彭官秀, 方亮, 1988, 中华微生物学和免疫学杂志, 8(6): 378
- (9) 吴谦等, 1981, 上海医学, 4(4): 1
- (10) 黄湘虎等, 1981, 南京医学院学报, 1(1): 12
- (11) Бенгасов, В.С., (生译), 1984, 国外医学微生物学分册, 3: 139
- (12) Aritaka, T., 1985, 转让, 26: 149 (E Abstract)

## Detection and Significance of Circulating HBsAg/IgA Immune Complexes in Patients with Hepatitis B

Peng Xuan-xian et al

(Department of Biology, Jiangxi University, Jiangxi 330047)

Circulating HBsAg/IgA immune complexes were detected in different groups of hepatitis B patients by ACCA-ELISA (antibody class capture assay ELISA). The positive rates of chronic hepatitis B were significantly higher than those of acute hepatitis B. The occurrence of circulating HBsAg/IgA immune complexes was closely associated with HBV e system and the titer of HBeAg.

These results seem to indicate that the immune response to form circulating HBsAg/IgA immune complexes may be a valuable marker of chronic infection of HBV; and it may also be considered as a marker of replication of HBV.

**Key words:** ELISA    Hepatitis B    Circulating immune complex IgA  
HBsAg