维普资讯 http://www.cqvip.com

HBV感染中抗-(抗-HBs)独特型抗体的研究

陆群英 邵芯仪 李冰如 王小钧

（杭州市第六人民医院，杭州 310014）

提 要

1.75%聚乙二醇(MW6000)沉淀血清免疫复合物后，采用ELISA法检测上清中抗独特型抗体〔抗-(抗-HBs)〕。56例急性HBV感染患者血清IgM抗-(抗-HBs)，第一周检出率最高(60.00%)，1个月后大部分阴性，IgG抗-(抗-HBs)维持时间略长。IgM抗-(抗-HBs)较HBsAg/IgM和IgM抗-HBc消失早，将有利于急性HBV感染的诊断。27例CAH和29例CPH、IgM和IgG抗-(抗-HBs)阳性率约为38～52%，两型间无显著差异($p>0.5$)。3例无症状HBsAg携带者和12例HBsAg血清疫苗接受者血清，抗-(抗-HBs)阴性。115例HBV感染者中，IgM抗-(抗-HBs)阳性者HBsAg阳性率(93.62)显著高于IgM抗-(抗-HBs)阴性者(52.31%)，$p<0.005$；反之，HBsAg阳性血清IgM抗-(抗-HBs)阳性率(55.55%)显著高于HBsAg阴性血清(9.68%)，$p<0.005$；IgM抗-(抗-HBs)阳性和阴性血清的HBV DNA阳性率有显著差异($p<0.025$)，IgG反应到类似的结果。以上资料表明，抗-(抗-HBs)提示了一些HBV感染患者体内可能存在一种缺陷的反馈机制，导致抗-HBs产生不足而容许更活跃的HBV复制。

本文证明了HBV感染患者血清中存在的抗-(抗-HBs)可能是共同决定簇"a"特异性的，还表明抗-HBs人抗-Id反应可能被纯化人血清HBsAg抑制，提示人抗-(抗-HBs)与抗-HBs结合的位点可能在HBsAg与抗-HBs结合位点内或在其附近，这和一些动物抗-(抗-HBs)的研究结果是一致的。

关键词： HBV感染 "a"特异性共同独特型 抗独特型抗体〔抗-(抗-HBs)〕 ELISA

Jerne[1]的网络学说开辟了免疫学的新领域，近年来，人们对Id-抗-Id(Idiotype-Anti-Idiotype)网络在免疫系统中作用的认识逐渐深入。Troisi等[2]首先发现HBV感染中存在与抗-HBs有关的IgM型抗独特型抗体〔IgM抗-(抗-HBs)〕，之后，Irshad等[3]又证实了IgG抗-(抗-HBs)。本文研究国内HBV感染者以及HBsAg疫苗接受者血清中的抗-(抗-HBs)，观察其与其它HBV感染标志间的关系，并探讨了抗(抗-HBs)的某些免疫学特性。

材 料 和 方 法

一、人病和分型： 患者为1986年1月—1989年3月我院收治或门诊体检者，按1984年南宁会

本文于1989年6月12日收到

维普资讯 http://www.cqvip.com

议修订的血清学和临床诊断标准分型。115例HBV感染患者，包括：56例急性肝炎(AH)，27例慢性活动性肝炎(CAH)，29例慢性迁延性肝炎(CPH)，3例无症状HBsAg携带者。所有CAH以及2例CPH、1例AH经肝活检证实。10例HAV感染患者。2例药物中毒性肝炎，10份类风湿因子阳性（乳胶凝集法）血清。12份HBsAg疫苗获得者血清由浙江医科大学传染病研究所提供。

二、血清IgM、IgG抗-(抗-HBs)以及HBsAg/IgM、HBsAg/IgG免疫复合物检测方法：基本按Troisi[2]方法，用1.75%聚乙二醇（PEG，MW 6000）沉淀被检血清，免疫复合物被沉淀。抗-μ链抗体[4]、羊单抗-HBs-HRP由浙江医科大学传染病研究所提供；葡萄球菌A蛋白(SPA)由上海生物制品研究所提供。人抗HBs-HRP由本室标记，采用过碘酸钠法。简要步骤：被检血清50ul与0.01M、PH7.4 PBS 150ul混合，使聚乙二醇最终浓度达1.75%，混合物4℃过夜；3500转/分，室温离心30分钟，分离上清沉淀，分别用PBS稀释，使血清最终稀释度为1:8，含0.5%牛血清白蛋白(BSA)；稀释物分别加入抗-μ链抗体或SPA包被的聚苯乙烯塑料板，25℃孵育20—24小时；洗涤3次；加羊抗-HBs-HRP，43℃ 4小时；洗涤3次；邻苯二胺底物溶液显色，DG-3022酶联免疫检测仪测OD值，P/N≥12.1判为阳性，阴性对照为正常人血清。

三、中和抑制试验：方法基本同前。但羊抗-HBs-HRP预先经HBsAg中和，方法：2倍浓抗-HBs-HRP使用液与等体积纯化人血清HBsAg（解放军302医院免疫室提供）混合，37℃ 2小时后4℃过夜，对照加10%小牛血清-PBS。抑制率计算：

$$抑制率=100\%\times\left(1-\frac{抑制孔OD值}{对照孔OD值}\right)$$

四、阻断抑制试验：动物抗-HBs血清由本室制备，纯化抗-HBs单克隆抗体，具抗"a"特异性。方法基本同二，加入羊或人抗-HBs-HRP前，先加入各种属抗-HBs溶液，37℃孵育2小时进行阻断。对照孔加相应的正常血清或免疫前血清，单克隆抗体组采用上海瑞金医院病毒室制备的抗-μ单克隆抗体。抑制率计算同前。

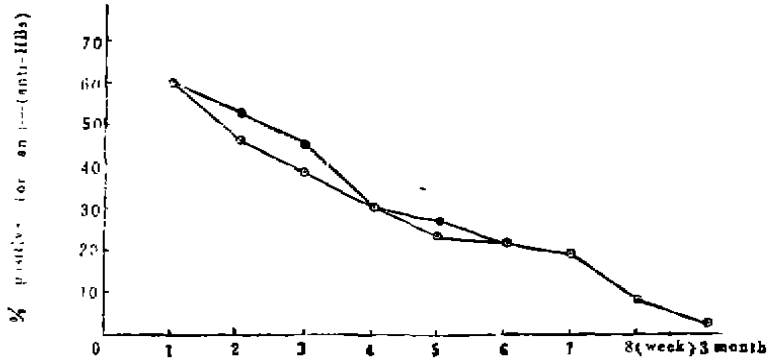
五、其它血清学试验：HBsAg：RPHA法，北京生物制品研究所药盒；抗-HBs、HBeAg、IgM抗-HBc：ELISA法，北京免疫试剂中心药盒；血清HBVDNA：^{32}P探针或生物素探针斑点杂交法，北京医科大学附属医院肝病研究所药盒。

结　果

一、急性HBV感染中抗-(抗-HBs)消长：检测56例HA患者急性期血清，IgM抗-(抗-HBs)阳性24例，IgG型27例，阳性率分别为42.85%和48.21%（1例经肝活检确诊为AH的患者，发病第三周检测血清时已为阴性）。其中20例抗-(抗-HBs)阳性患者恢复期血清被检，除1例、半年后仍阳性外（失追踪），均转阴，其中2例在SGPT尚未正常时已阴转。急性HBV感染病程中抗-(抗-HBs)阳性率见图1。IgM抗-(抗-HBs)在发病第一周出现，并且检出率最高(60.00%)，一个月后明显下降，三个月内基本消失。IgG抗-(抗-HBs)动态与IgM型类似，维持时间略长，1例患者抗-Id转阴后又复阳转，SGPT恢复正常时重又消失，总病程8周。IgM抗-(抗-HBs)较HBsAg/IgM和IgM抗-HBc消失早，15例IgM抗（抗-HBs)阴转时，HBsAg/IgM仍阳性，而HBsAg/IgM阴性血清中，IgM抗-(抗-HBs)无一例阳性。追踪观察的17例患者中，13例IgM抗-HBc较IgM抗-(抗-HBc)消失早，仅1例患者IgM抗-HBC较早转阴，其余病例同时消失。

二、慢性HBV感染和其它观察对象的抗-(抗-HBs)：检测27例CAH、29例CPH、3

维普资讯 http://www.cqvip.com



图：急性HBV感染病程中抗-(抗-HBs)的阳性率
Fig.The prevalence of anti-(anti-HBs)in Dates after onset during acute HBV infection
o—o IgM anti-(anti-HBs) •—• IgG anti-(anti-HBs)

例无症状HBsAg 携带者和12例 HBsAg 血清疫苗接受者血清，结果见表 1 、CPH和 CAH 抗-(抗-HBs)阳性率无显著差异(X^2检验，$P>0.5$)。

表1 慢性HBV感染患者和其它观察对象抗-(抗-HBs)阳性率
Table 1 the Prevalence of Anti-(Anti-HBs) in the Patients with Chronic HBV Infection and other Observed Objects

Group	Total number	No.positive (%)	
		IgM	IgG
CAH	27	12(44.44)	14(51.85)
CPH	29	11(37.93)	13(44.83)
Asymptomatic HBV carriers	3	0(0)	0(0)
HBsAg vaccine receivers	12	0(0)	0(0)

三、抗-(抗-HBs) 检测方法的特异性：检测10份类风湿因子 (RF) 阳性血清、10例 HAV感染者急性期血清，10例正常人血清，均无阳性显色，2 例药物中毒性肝炎阴性。

四、抗-(抗-HBs)与其它 HBV 标志的关系：表 2 表明了 IgM抗-(抗-HBs)阳性和阴性血清中其它HBV标志的阳性率。IgM抗-(抗-HBs)阳性血清中HBsAg阳性率为93.62%显著高于 IgM抗-(抗-HBs)阴性者(52.31%)，X^2 检验，$P<0.005$。两者 HBV DNA 阳性率差异有显著性 ($P<0.025$)，但 HBeAg、IgM抗-(抗-HBs)阳性率无显著差异($P>0.25$)，比较 IgG 抗-(抗 HBs)阳性和阴性血清得到类似结果。反之，比较 HBsAg 阳性和阴性血清抗-(抗-HBs)阳性率，提示 HBsAg 阳性血清抗-(抗-HBs)阳性率高于HBsAg 阴性者(见表 3)($P<0.005$)。2 例抗-HBs阳性血清，抗-(抗-HBs)阳性和阴性各 1 例。

五、中和抑制试验：用纯化人血清 HBsAg，预先中和羊抗-HBs-HRP，检测 12 份 IgM、IgG 抗-(抗-HBs) 均阴性的血清，表明羊抗-HBs 人抗-Id 反应可被 HBsAg 抑制，IgM 反应抑制率为33.89%～86.69%，IgG 反应为 15.88%～100%（见表 4 ），抑制组和对照组 OD 值有显著差异（配对资料 T 检验，$P<0.001$)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 IgM抗-(抗-HBs)阳性和阴性血清其它HBV标志阳性率比较

Table 2 the Comparison of the Positive Percentage of other HBV Marks between IgM Anti-(anti-HBs) Positive and Negative Sera

Group	HBsAg		HBeAg		IgM anti-HBc		HBVDNA	
	No. tested	No. positive (%)	No. tested	No. positive (%)	No. tested	No. positive (%)	No. tested	No. positive (%)
IgM anti-(anti-HBs) positive	47	44(93.62)	47	15(31.92)	47	42(89.36)	11	9(81.82)
IgM anti-(anti-HBs) negative	65	34(52.31)	65	21(32.31)	65	53(81.54)	10	3(30.00)

表3 血清HBsAg和抗-(抗-HBs)的关系

Table 3 the Relation between Serum HBsAg and Anti-(anti-HBs)

Group	number	No. IgM anti-(anti-HBs) positive(%)	No. IgG anti-(anti-HBs)
HBsAg positive	81	45(55.55)	47(58.03)
HBsAg negative	31	3(9.68)	6(19.36)

表4 HBsAg和不同种属抗-HBs对抗-HBs抗-Id反应的作用

Table 4 Effect of HBsAg and Anti-HBs from Different Species on Anti-HBs Anti-ID Reaction

Inhibitor	Titer*	Dilution for use	No. detection	Inhibition% IgM	Inhibition% IgG
Purified HBsAg	1:32	neat	12	33.89～86.69	15.88～100
Human anti-HBs	neat	1:10	8	13.70～70.39	19.23～58.54
Guinea-pig anti-HBs	1:400	1:100	8	35.00～73.17	33.33～68.18
Chicken anti-HBs	1:100	1:10	12	17.07～79.56	27.84～66.67
Monoclone anti-HBs	1:60	neat	12	80.00～100	43.40～100

六、阻断抑制试验：分别观察豚鼠、鸡、人抗-HBs血清对酶标记羊抗-HBs与人抗-(抗-HBs)结合反应的阻断作用，以及抗-HBs单克隆抗体对酶标记人抗-HBs与人抗-抗-HBs结合反应的阻断作用，从表4可以看出，各种属抗-HBs均可完全或部分阻断抗-HBs抗-Id反应。相应的各种属非免疫血清无此作用，抑制组和对照组OD值有显著差异（配对资料T检验，$P<0.001$）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨 论

Kennedy 等[6] 用人抗-HBs 和Balb/c 鼠单克隆抗-HBs 免疫家兔产生抗-(抗-HBs)，并证明纯化HBsAg adw、ayw、adr 亚型对抗-HBs Id 抗-Id 反应的抑制效应相似，表明抗-HBs Id 是"a"决定簇特异的，它表达共同的抗-HBs 独特型。我们探讨了人、豚鼠鸡抗-HBs对羊抗-HBs人抗-Id结合反应以及单克隆抗-HBs(抗-"a")对人抗-HBs 人抗-Id结合反应的阻断作用，各种属抗-HBs 均表现对 IgM、IgG 反应的抑制效应，抑制率在13.70%～100%。相反，对照组无此作用。表明本组HBV 感染患者血清中存在的抗-(抗-HBs)可能也是抗-"a"特异共同的Id的。

我们还观察到：羊抗-HBs 人抗-Id 反应可被纯化人血清 HBsAg 抑制，抑制率为15.88%～100%，提示人抗-Id与抗-HBs的结合位点可能在HBsAg与抗-HBs结合位点内或在其附近，这和一些动物抗-(抗-HBs Id) 的研究结果[6,7]是一致的。

我们对115例HBV感染患者血清的研究表明抗-(抗-HBs)与血清HBsAg 和HBV DNA 存在一致性。IgM抗-(抗-HBs)阳性血清HBsAg阳性率(93.62%)明显高于 IgM 抗-(抗-HBs)阴性者(52.31)，$P<0.005$，IgG反应也获得类似结果。反之，HBsAg 阳性血清抗-(抗-HBs)阳性率显著高于HBsAg阴性者，IgM、IgG抗-(抗-HBs)阳性率分别为55.55%对9.68%、58.03%对19.36%，两者有显著差异($P<0.005$)。另外，IgM 抗-(抗-HBs)阳性血清 HBV DNA 阳性率显著高于阴性者(81.82% 和30.00%)，$P<0.025$。Jerne 网络学说中假说之一是，抗-Id可通过对具一致Id的B 淋巴细胞克隆的作用而抑制 Id 抗体的合成。在正常的免疫应答中，当表达在细胞或抗体上独特型达到一定水平时变成免疫原而激发抗-Id的产生。假设由于HBV的亲淋巴作用致使T_4^+细胞功能缺，可能一些患者激发抗-Id产生的阈值太低，例如发生一种缺陷的反馈抑制。在这种情况下，抗-Id可造成抗-HBs不足，以致容许更活跃的 HBV 复制，HBsAg和HBVDNA 浓度增加[2]。HBeAg IgM抗-HBc和HBVDNA一样被认为是HBV复制的标志。我们未观察到抗-(抗-HBs) 阳性和阴性血清间HBeAg和IgM抗-HBc阳性率有显著性差异，原因可能是因为HBeAg和 IgM 抗-HBc不能象HBVDNA那样直接地反映HBV的复制情况，血清HBeAg阴性而HBV DNA 阳性患者占一定比例[8]，有的观察表明肝组织内浆-膜型HBcAg与 e 系统和 IgM 抗-HB^C 无一致关系，而浆-膜型HBcAg一般认为代表病毒活性复制[9]。Troisi[2]报道IgM抗-(抗-HBs)与HBeAg、HBVDNA聚合酶有关，因而另一个可能的原因是，市售国产HBeAg和IgM抗-HBc 检测试剂较之 Abbott 试盒在敏感性和特异性上略为逊色，或者是不同作者所观察HBV感染者各型构成上有差别，这有待于继续探讨。不管怎样，抗-(抗-HBs) 的存在与HBV的活性复制有关。

本文观察56例急性HBV感染患者病程中抗-(抗-HBs) 消长，提示抗-(抗-HBs) 出现较早，发病第 1 周检出率最高(60.00%)，一个月后明显下降，三个月基本消失，其IgM型较HBsAg/IgM和IgM抗-HBc消失早，甚至先于SGPT的恢复，这将有利于急性HBV 感染的诊断。CAH和CPH的抗-(抗-HBc)阳性率无显著异差，这可能因为CPH 多数未经病理检查，而影响其诊断的可靠性。无症状HBsAg携带者和HBsAg血清疫苗接受者抗-(抗

维普资讯 http://www.cqvip.com

-HBs)均阴性。以上资料证实抗-(抗-HBs)与HAV 的活性复制有关。另外，10份正常人血清、10份RF阳性血清、10例 HAV 感染患者急性期血清无阳性反应，说明本试验系统是特异性的。

HBV感染是一极其复杂的过程，了解其中 Id抗-Id 调节的作用将为阐明发病机理提供依据，内影像抗-Id疫苗的产生更为 HBV 感染的防治指出了新的途径。

参 考 文 献

〔1〕 余源等：1983 医学微生物学 人民卫生出版社 第164页。
〔2〕 Traisi CL et al：1985 *Hepatology* 5(5)：758.
〔3〕 Irshad M et al：1987 *J.Immunol. Methods* 96(2)：211.
〔4〕 吕新法等：1986 浙江医科大学学报15(4)：145.
〔5〕 Kennedy RC et al：1982 *Virology* 122：219.
〔6〕 Kennedy RC et al：1984 *Science* 233：930.
〔7〕 Yasmium MT et al：1985 *Immundogy* 55(2)：197.
〔8〕 徐华芳等：1988 中华传染病杂志 6(4)：237.
〔9〕 朱迎春等：1988 解放军医学杂志13(3)：205.

Investigation on Anti-idiotypes Directed against Anti-HBs in HBV Infection

Lu Qun-yin Shan Xin-yi Li Bin-ru Wang Xiao-jun

(*Hangzhou Sixth People's Hosptal, Hongzhou* 310014)

Anti-idiotypes directed against anti-HBs in the supernatant were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after precipitation of immune complexes from sera with polyethylene glycol 6000(PEG). 115 patients with HBV infection were observed. IgM and IgG anti-(anti-HBs) activities existed in acute hepatitis, CAH and CPH. The positive rate of anti(anti-HBs) in the first week after onset was the highest in acute hepatitis(60.%). After one month Later it fell markedly. Therefore detecting anti(anti-HBs) is going to be benefit to the diagnosis of acute HBV infection. The sera from 3 asymptomatic HBsAg carriers and 12 HBsAg serum vaccine recievers were negative for anti (anti-HBs). The positive rates of HBsAg and HBVDNA in the anti (anti-HBs) positive sera were higher significantly than those in the negative sera. The data described above suggest possibly a defective feedback mechanism in some HBV infectious patients. It results in a deficiency of anti-HBs, so that more

维普资讯 http://www.cqvip.com

active replication of HBV is permitted.

The paper proved that anti(anti-HBs)in the sera from the patients with HBV infection is possibly specific for common Id with"a" specificity. Our study also demonstrated that anti-HBs human anti-Id reactions were inhibited by purified human serum HBsAg. This suggests that the combining site of anti (anti-HBs) and anti-HBs is possibly in or nearby one of HBsAg and anti-HBs. These results agree with some data obtained in animal investigation.

Key words: HBV infection Common Id with "a" specificity Anti (anti-HBsId) ELISA

菜白蝶的一种新病毒分类鉴定

Identificaton for a New Virus—Piris rapoe Densovirus

1978年9月武汉病毒研究所保藏室主任孙富林副研究员和该室的几位同志，在武汉市郊区从菜白蝶自然流行病死亡的幼虫中分离出常见的颗粒体病毒，同时在样品中发现一种不易确定的细小粒子，并对该粒子进行了分离和鉴定。通过电镜观察、血清学试验、核酸性质研究以及回接试验等多方面的探讨，表明病毒直径约25毫微米，衣壳由32壳粒组成，病毒粒子外周有12个壳粒围绕，壳粒中空。提纯病毒经吖啶橙染色，荧光显微镜观察呈红色荧光。甲醛反应，OD值增加说明该病毒核酸为单链。DNA病毒粒子沉降系数为132s，回接死亡率为99%，是一种有强烈毒性的病毒。该病毒能在地鼠肾原代细胞培养成功。说明该病毒能在脊椎动物细胞上培养。1990年5月22日由湖北医学院著名病毒学家向近敬教授等七位病毒学家组成的专家组对该项工作进行全面、系统、认真的评价，大家一致认为该项工作数据可靠、结论正确，他们分离的这种浓核病毒是菜白蝶的一种新病毒，经由湖北省情报研究所国际联机检索，以及国内中文检索证明该病毒为病毒研究所首次分离，定名为菜白蝶浓核病毒，该病毒的发现为菜白蝶病毒家族增加了一个新成员（Prisi rapoe Densovirns），本研究成果达到国际先进水平。

（周春莲　张英莲）