

HCV 感染者抗 HCV 抗体产生的不均匀性与 B 细胞优势克隆

唐时幸* 王海涛/鲍作义 张习坦

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

R512.630.3

A

摘要 本文采用抗原捕捉 ELISA 方法检测了 HCV 感染者血清中抗-HCV IgG 抗体轻链 κ 和 λ 的比值, 发现所检测的抗 HCV-NS4、抗 HCV-CP1 和抗 HCV-CP2 抗体轻链的表达呈现明显的偏斜, 65 例抗 HCV 阳性者中 63 例(占 96.9%), 至少一种抗 HCV 抗体 κ/λ 偏离了正常 1:1 的比值, 尤以 λ 链较多, 分别占 85.6%、89.9% 和 70.2%, 但任何一个 HCV 感染者血清抗-HCV 抗体既可能是 κ 链占优势, 也可能是 λ 链为主; 对 6 例抗 HCV 阳性者追踪观察了一年, 发现抗 HCV 抗体 κ/λ 比值稳定不变。提示感染 HCV 后, 病毒抗原可能稳定地刺激单个或少数 B 细胞优势克隆产生抗-HCV 抗体, 表现为 HCV 感染者抗-HCV 抗体产生的不均匀性和 B 细胞优势克隆的存在, 这一结果将有助于深入研究宿主抗 HCV 应答的规律, 为抗 HCV 保护性免疫与 HC 疫苗研究提供线索。

关键词 丙型肝炎病毒, 抗 HCV 抗体, B 细胞克隆 感染

约 50—60% 急性丙型肝炎病毒(HCV)感染者因缺乏适当的免疫保护力而不能清除体内的病毒, 成为慢性 HCV 感染或持续性 HCV 携带者^[1,2], 原因尚不清楚。近年发现, 感染 HIV 后抗-HIV 抗体产生呈稳定的克隆性(stable and clonally restricted antibody response)^[3-5]。目前已用这一优势克隆(clonal dominance)假说解释感染 HIV 后保护性免疫的缺陷, 即早期感染的 HIV 抗原刺激机体单个或少数 B 细胞克隆产生抗-HIV 抗体, 形成 B 细胞优势克隆。HIV 核酸和病毒蛋白变异性较大, 尤其是其包膜蛋白部分的变异, 很容易形成免疫逃脱突变体。但突变病毒蛋白只能刺激早先存在的 B 细胞优势克隆分泌对未突变病毒的抗体, 而无法产生新的抗突变病毒的抗体。因此, HIV 感染者容易成为持续性病毒感染和携带者^[5,6]。本文通过检测抗-HCV IgG 抗体 κ 和 λ 轻链的比值, 探讨了宿主免疫反应与抗病毒的关系, 现将结果报告如下。

材料与方 法

1 **检测用血清** 正常人血清 40 份来自北京 301 医院健康医护人员, 抗-HCV 阴性; 抗-HCV 阳性血清 65 份来自北京解放军中心血站职业献血员; HCV 感染者系列血清由北京医科大学公共卫生学院流行病教研室梁争论博士提供, 每例患者血清共三份, 每份血清相隔 6 个月采集。

2 **HCV 抗原** 为合成的 HCV 多肽, 分别选自 HCV 结构区 C(CP1 和 CP2) 与非结构区 NS4, 其氨基酸序列为:

CP1aa5—46 PKPQRKTKRNTNRRPQDVFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGV

CP2aa39—80 RRGPRLGVRATRKTSESRQPRGRRQPIPKARRPEGRTWAQPGY

NS4 aa1694—1735 IIPDREVLVYREFDEMEECQHLPLYEQGMMLAEQFKQKALGLL

本文于 1994 年 5 月 30 日收到, 11 月 7 日修回

* 现为北京医科大学公共卫生学院流行病教研室博士后, 北京 100083

3 检测血清 IgG 抗体轻链 κ 或 λ 的 ELISA 方法 用 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 稀释羊抗人 IgG (军事医学科学院微生物流行病学研究所李成文同志提供) 成 2 μ g/ml, 加入酶联反应板, 每孔 50 μ l, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜; 弃去包被液后, 用 PBS-T (0.01mol/L 磷酸盐缓冲液/0.1% Tween-20) 洗 5 次; 加入 1:10 稀释的待测血清 50 μ l, 于室温下放微振荡器上振荡 1 小时; 洗 5 次后, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗人 IgG κ/λ 抗体 (分别为 1:700 或 1:7000 稀释, TAGO, Inc. Burlingame, CA, USA), 于室温下振荡 1 小时; 最后加入邻苯二胺 (OPD) 显色 5 分钟, 加入 2mol/L H₂SO₄ 终止反应并测定 OD_{490nm} 值, κ/λ 比值 = OD _{κ} / OD _{λ} 。

4 检测血清抗-HCV IgG 抗体轻链 (κ 或 λ) 的 ELISA 方法 方法同 3, 包被抗原为合成的 HCV 多肽 CP1、CP2 和 NS4, 浓度为 2 μ g/ml。

结 果

1 血清 IgG 总抗体 κ/λ 比值 通常正常人血清 IgG 总抗体的 κ/λ 比值接近 1:1。为此, 我们用羊抗 IgG 抗体包被, 加入纯化的混合人血清 IgG (IVIg), 分别滴定酶标记的羊抗人 IgG κ 或 λ 抗体工作浓度, 发现当 κ 和 λ 抗体的稀释度分别为 1:700 和 1:7000 时, OD _{κ} / OD _{λ} 的比值为 1:1。采用上述滴定好的酶标抗体稀释度, 我们分别测定了 40 份健康医护人员血清 (图 1A) 和 30 份抗-HCV (+) 献血员血清 (图 1B), 结果血清 IgG 抗体 κ/λ 比值如图 1 所示, 其平均值分别为 1.00 \pm 0.10 和 0.99 \pm 0.12, 介于 0.9—1.1 之间, 说明人血清中 IgG 总抗体的 κ/λ 比值是相等的。

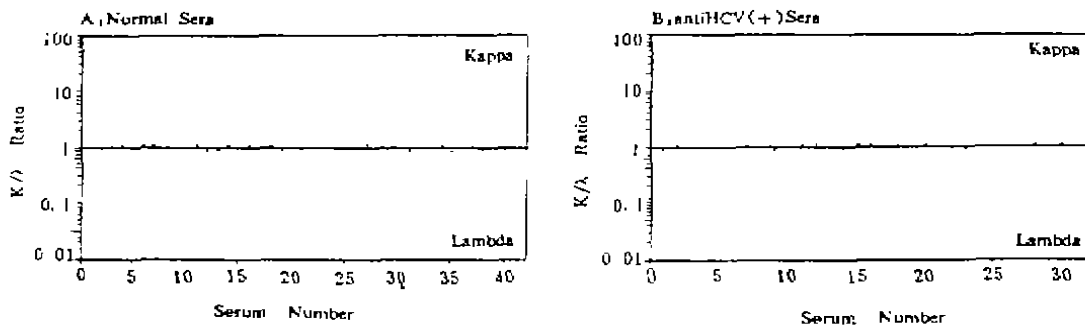


图 1 血清 IgG 总抗体 κ/λ 比值, 用 2 μ g/ml 羊抗 IgG 抗体包被, HRP 标记羊抗人 IgG κ 或 λ 抗体工作浓度分别为 1:700 和 1:7000; 纵坐标为 κ/λ 比值, 横坐标为检测的血清号。

Fig. 1 The kappa/lambda ratio of total Ig in normal and anti-HCV+ sera. Plates were coated with goat antihuman Ig and then incubated with test sera (40 from healthy adults and 30 anti-HCV+ from professional blood donors, 1:10 diluted)

2 抗-HCV IgG 抗体 κ/λ 比值 图 2 显示了对 5 份抗-HCV (+) 血清抗 HCV NS4 (图 2A)、抗 HCV-CP1 (图 2B) 和抗 HCV-CP2 抗体 (图 2C) κ/λ 比值测定的结果, 很显然 κ/λ 比值偏离正常的 1:1。其中某一份血清抗-HCV 抗体既可能是 κ 链占优势, 也可能是 λ 链为主, 任何一种抗体 κ/λ 比值偏离正常值 (>0.9 或 <1.1) 者占 96.9% (63/65)。图 3D 显示在所检测的抗 HCV-NS4、抗 HCV-CP1 和抗 HCV-CP2 抗体中, $\kappa/\lambda < 0.9$ 者分别占 65.6%、89.9% 和 70.2%, $\kappa/\lambda = 0.9—1.1$ 者分别占 6.6%、5.1% 和 15.8%, $\kappa/\lambda > 1.1$ 者分别占 27.9%、5.1% 和 14.0%, 说明上述三种抗体均以 λ 链为主。

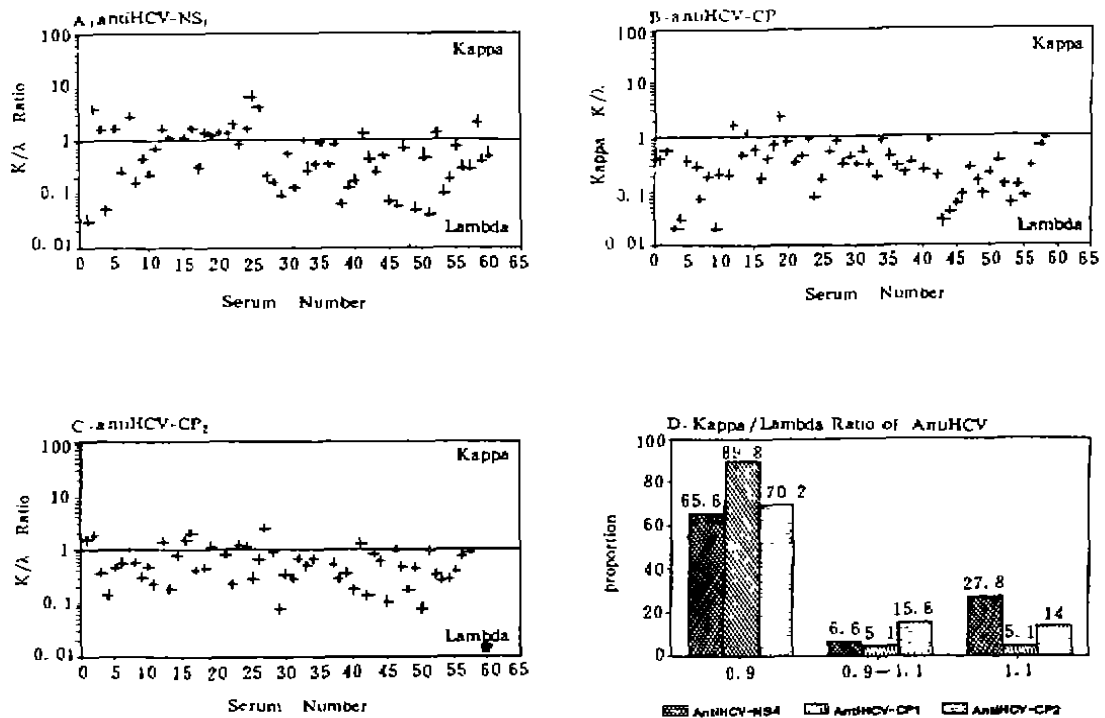


图 2 血清抗-HCV IgG 抗体 κ/λ 比值, 分别用 2 μ g/ml HCV 多肽 NS4、CP1 或 CP2 包被, HRP 标记羊抗人 IgG κ 或 λ 抗体
的工作浓度分别为 1:700 和 1:7000, 图 2A-C 纵坐标为 κ/λ 比值, 横坐标为检测的血清号。图 2D 纵坐标为百分
构成比, 横坐标为 κ/λ 比值。

Fig. 2 The kappa/lambda ratios of antibodies to HCV. Plates were coated with either HCV NS4, CP1 or CP2 peptides and then
incubated with test sera from 65 anti-HCV+ professional blood donors (1:10 diluted). Kappa/lambda ratio of anti-HCV-
NS4 2A; anti-HCV-CP1 2B anti-HCV-CP2 2C, the proportion percentage of kappa/lambda ratio for antibodies to HCV are
shown in figure 2D.

3 HCV 感染者系列血清抗-HCV IgG 抗体 κ/λ 比值 结果见图 3。对追踪观察一年的 6 例 HCV 感染者血清抗-HCV IgG 抗体 κ/λ 比值检测, 表明 HCV 感染者体内抗-HCV 抗体产生是持续稳定的, 其中 HCV 感染者 H6 抗 HCV-CP2 在一年中始终阴性, 抗 HCV-NS4 和抗 HCV-CP1 抗体 κ/λ 比值接近 1:1 正常范围, 这一比值也始终维持不变。

讨 论

目前抗-HCV 抗体检测方法采用标记的抗人 IgG 抗体检测血清中抗-HCV IgG 总抗体, 无法反映抗体产生与 B 细胞克隆的关系。本文采用的抗原捕捉 ELISA 方法, 采用 HRP 标记的抗人 IgG 轻链 κ 或 λ 抗体, 检测血清中抗-HCV 抗体 κ/λ 比值, 能简单而方便地测定抗-HCV 抗体轻链 κ 或 λ 产生的差异。

通常人血清中 IgG 轻链 κ 或 λ 比值接近 1:1, 说明轻链 κ 或 λ 的使用基本上是随机的。但我们用 HCV 结构区和非结构区抗原包被检测抗-HCV 抗体时发现, 所检测的抗 HCV-NS4、

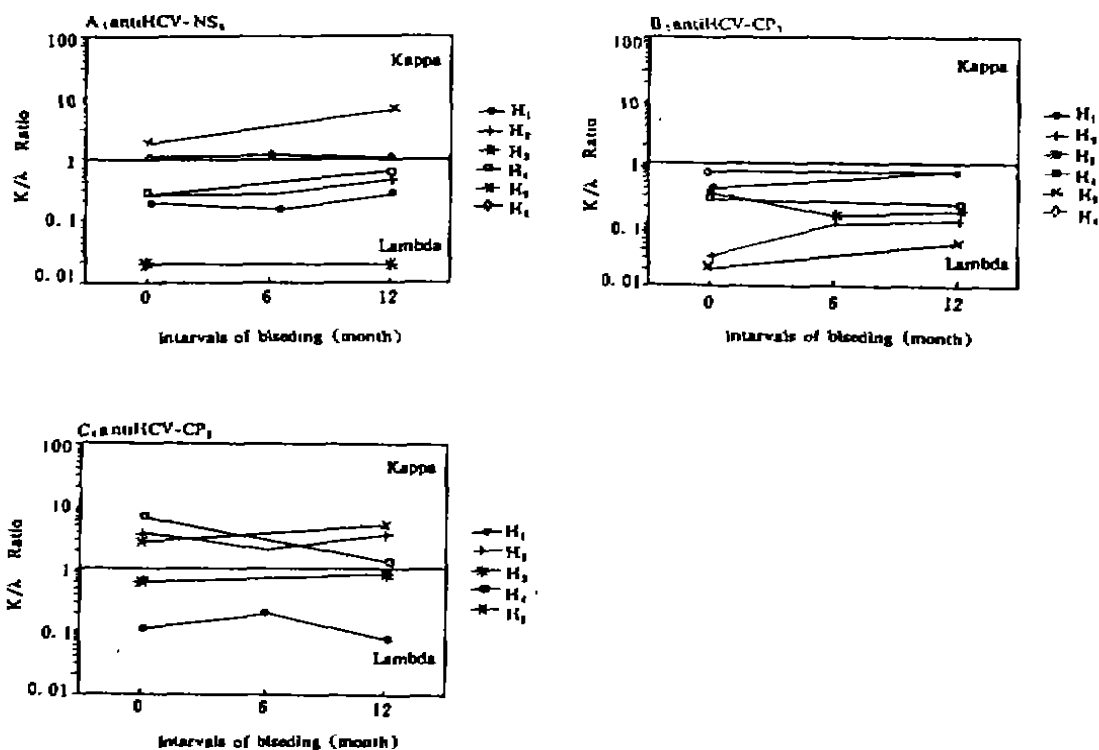


图3 HCV感染者系列血清抗-HCV IgG抗体 κ/λ 比值,分别用2 μ g/ml HCV多肽NS4,CP1或CP2包被,HRP标记羊抗人IgG κ 或 λ 抗体的工作浓度分别为1:700和1:7000,纵坐标为 κ/λ 比值,横坐标为采血检测月份。

Fig. 3 The kappa/lambda ratios of antibodies to HCV NS4,CP1 and CP2 in longitudinal sera. Assays were done as described in Fig. 2. Figure 3A shows the kappa/lambda ratio of anti-HCV-NS4; Figure 3B for anti-HCV-CP1 and figure 3C for anti-HCV-CP2.

抗HCV-CP1和抗HCV-CP2抗体轻链的表达呈现明显的偏向。65例HCV感染者中63例(96.9%)至少一种抗HCV κ/λ 偏离了正常1:1的比值;对6例HCV感染者追踪观察了一年,发现抗HCV抗体 κ/λ 比值稳定不变;但任何一个HCV感染者血清-HCV抗体既可能是 κ 链占优势,也可能是 λ 链为主。提示感染HCV后,病毒抗原可能稳定地刺激单个或少数B细胞克隆产生抗-HCV抗体,表现为HCV感染者抗-HCV抗体产生的不均匀性和B细胞优势克隆的存在。这一结果同研究HIV感染时发现的抗-HIV抗体产生呈稳定的克隆性(stable and clonally-restricted antibody response)的结果非常相似^[3-5]。

我们发现所检测的抗-HCV抗体均以 λ 链较多,分别占65.6%、89.8%和70.2%,其原因尚不清楚。由于本文所用的抗原均为42氨基酸合成的多肽,仅包含几个抗原决定簇,可能更容易刺激产生克隆性的抗-HCV抗体,因而抗体轻链的偏斜可能更加明显。此外,我们发现仍然有5.1-15.5%的抗-HCV阳性者, κ/λ 比值介于0.9-1.1,没有明显的偏斜,其原因可能是ELISA方法的敏感性较差所致,因为ELISA检测时OD值最大为2-2.5,因此,OD阳性与OD

阴性之比最大为20—25,可能难以区分 κ 和 λ 链的细微差别,相信采用放射免疫方法(RIA),抗-HCV抗体轻链的偏斜会显得更加明显。

迄今为止的研究表明,与HAV或HBV感染不同,感染HCV后的机体抗病毒免疫既复杂且不甚明了。大量研究发现约60%以上HCV感染者转为慢性^[1,2];90—100%的HCV感染者均有抗HCV-C、NS3、NS4抗体^[2,7-9],甚至以前检出率很低的抗HCV-E抗体,当用哺乳动物细胞或酵母表达的糖基化E抗原取代前在大肠杆菌表达的抗原后,抗HCV-E抗体的检出率亦高达90—100%^[8];感染HCV,抗-HCV抗体阳性黑猩猩受到相同或不同来源的HCV感染性材料攻击后,仍然会再次发病^[10-12],这与早先发现的HC患者可能有反复多次HC发作的结果相似^[13],说明大多数HCV感染者缺少适当的免疫力而不能清除体内的病毒,易成为持续性HCV感染者。HCV感染者的这些特点与HIV感染有许多相似之处,尤其是可能HCV中和性抗原决定簇所在的包膜蛋白E变异性很大,很容易形成免疫逃脱突变株。本文发现抗-HCV抗体产生的不均匀性和B细胞优势克隆的存在,为深入探讨抗HCV免疫缺陷的原因提供了线索。如果抗HCV-E抗体的产生也是克隆性的,即早期感染的HCV抗原刺激机体单个或少数B细胞克隆产生抗-HCV抗体,形成B细胞优势克隆。由于B细胞优势克隆所分泌的针对未突变病毒的抗体并不能中和体内突变的病毒,甚至无法中和保护性抗原决定簇与之不同的其它基因型HCV株;同时又抑制了针对新的抗突变病毒抗体的产生,这可能是感染HCV后保护性免疫缺陷的原因之一。因此未来的HC疫苗至少应该包括当地几种主要流行的HCV。

参 考 文 献

- 1 Alter H J, Purcell R H, Shih J W, *et al.* Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321(22):1494—1500
- 2 Dienstag J L, Alter H J. Non-A, non-B hepatitis, evolving epidemiologic and clinical perspectives. *Semin Liver Dis*, 1986;6(1):67—81
- 3 Briault S, Courtas-Capella M, Duarter F, *et al.* Isotype of serum monoclonal immunoglobulins in human immunodeficiency virus-infected adults. *Clin Exp Immunol*, 1988;74(2):182—184
- 4 Amadori A, Gallo P, Zamarchi R, *et al.* IgG oligoclonal bands in sera of HIV-1 infected patients are mainly directed against HIV-1 determinants. *AIDS Res Hum Retro*, 1990;6(5):581—586
- 5 Muller S, Wang H, Silverman G, *et al.* B-cell abnormalities in AIDS; stable and clonally-restricted antibody response in HIV-1 infection. *Scand J Immunol*, 1993;38(4):327—334
- 6 Muller S, Nara P, D'Amelio R, *et al.* Clonal patterns in the human immune response to HIV-1 infection. *Intern Rev Immunol*, 1992;9(1):1—13
- 7 Rott I M ed. *Essential Immunology*, 3rd edition, London, Blackwell Scientific Publications, 1977;33
- 8 阿塔西 M Z, 等主编, 郑昌学, 吴安然, 等译. 分子免疫学(上册). 北京, 科学出版社, 1988;111—120
- 9 Jeffers L J, Hasan F, de Medina M, *et al.* Prevalence of antibodies to hepatitis C virus among patients with cryptogenic chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology*, 1992;15(2):187—190
- 10 Lok A S, Chien D, Choo Q K, *et al.* Antibody response to core, envelope and nonstructural hepatitis C virus antigens, comparison of immunocompetent and immunosuppressed patients. *Hepatology*, 1993;18(3):497—502
- 11 Chien D Y, Choo Q L, Ralston R, *et al.* Antibodies to hepatitis C viral glycoproteins circulate in most chronically infected hepatitis patients. *Lancet*, 1993;342(8876):933
- 12 Prince A M, Brotman B, Huma T, *et al.* Immunity in hepatitis C infection. *J Infect Dis* 1992;165(3):433—443
- 13 Farci P, Alter H J, Govindarajan S, *et al.* Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science*, 1992;

258(5079):135-140

- 14 Farci P, Alter H J, Wong D *et al*. A long-term study of HCV replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med*, 1991; 325 (2):98-104

A Skewed Light Chain Isotype Expression and B-Cell Clonal Dominance of Anti-HCV Response in Hepatitis C Virus Infection

Tang Shixing* Wang Haitao Bao Zuoyi Zhang Xitan

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

* *(School of Public Health, Beijing Medical University, Beijing 100083)*

An antigen capture ELISA in which HCV peptides NS4, CP1 and CP2 derived from HCV NS4 and core gene region, respectively, were used as solid-phase antigens was developed to detect the differences in light chain isotype expression of anti-HCV antibodies. Antibodies in 65 sera of HCV infected professional blood donors against HCV NS4, CP1 and CP2 were characterized by a skewed light chain isotype expression. Sixty-three out of the 65 donors (96.9%) showed at least one of the three anti-HCV antibodies skewed from the normal value of light chain isotype kappa/lambda ratio. The kappa/lambda ratios of anti-HCV in infected donors were found to be unique in each individual and constant over one year follow-up study. The results suggested that anti-HCV response was stable and clonally-restricted in HCV infection.

Key words Hepatitis C virus(HCV), Anti-HCV antibody, B-cell clone