

北京医学院附属人民医院

年 刊



1982

肝紫癜病应用皮质激素治疗并长期随访一例报告

内科 赵景涛
病理科 郭铃新

(正文见60页)

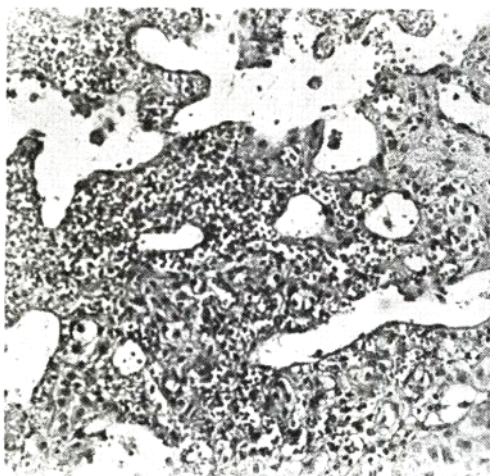


图 1 肝小叶结构不清,有多数被复以内皮细胞的扩张囊腔,腔内有红细胞(H,E染色,均×224)

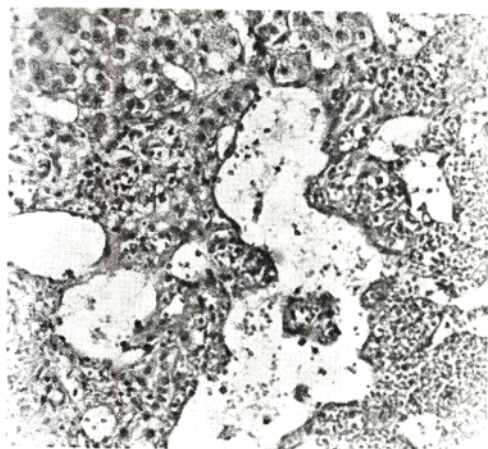


图 2 同图1

对单侧肾缺如合并巨大输尿管芽囊肿胚胎发育异常的探讨(附一例报告)

外科泌尿组 孟广栋 何申戎
病理科 郭铃新 施维明

(正文见127页)



图 5 第I囊,囊壁切片,显示粘膜被复以移行上皮,肌层薄厚不等,有多数毛细血管及炎细胞浸润(H,E染色×78)

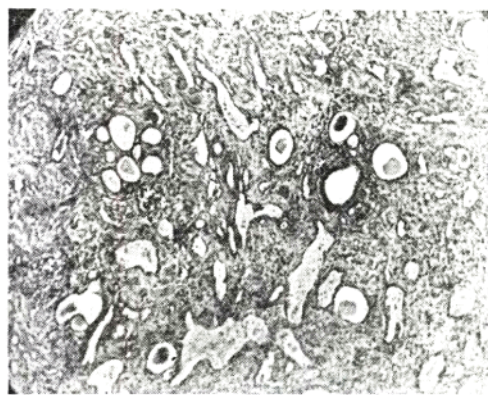


图 6 第VI囊,囊壁可见多数腺腔被覆扁平或立方上皮,间质可见不规则之毛细血管及炎细胞浸润(H,E染色×78)

北京医学院附属人民医院1982年年刊

目 录

肝炎研究

- 血清抗HBc-IgM固相放免检测方法的研究.....肝病研究室~~王~~ (1)
血清抗HBc-IgM临床意义的研究肝病研究室张正等 (5)
无症状携带者血清乙型肝炎表面抗原的纯化及检测方法的定量研究
.....肝病研究室王宇等 (10)
乙型肝炎疫苗阻断新生儿母婴传播的初步观察.....肝病研究室冯百芳等 (15)

肿瘤研究

- 人体乳癌体外培养
——乳癌细胞株(BCaP-37)的建立.....外科肿瘤研究室 (21)
人巨噬细胞对胃癌细胞株体外细胞毒作用的观察 ...外科肿瘤研究室研究生毛一翀 (25)
乳腺癌雌激素、孕激素受体的测定及分析.....外科肿瘤研究室研究生王驰声 (30)

血液病研究

- 急性白血病人持久性植活异基因骨髓1例报告.....血研所陆道培等 (34)
自动图象分析仪的初步应用血研所陈珊珊 (38)
细胞的复苏作用与RNA代谢——抗肿瘤化疗的另一个靶子.....血研所陈珊珊 (40)
人体急性白血病幼稚细胞动力学分析.....血研所赵实诚等 (43)
急性白血病预后因素分析.....血研所赵实诚等 (47)
组织肥大细胞与系统性组织肥大细胞病1例报告与文献复习.....血研所赵实诚等 (51)

内科

- 7571(猪苓多糖)治疗慢性病毒性肝炎的疗效观察内科吴晶新等 (54)
转移因子(Transfer Factor, TF)对乙型病毒性肝炎的治疗观察
.....内科肝炎门诊吴晶新等 (58)

肝紫癜病

- 应用皮质激素治疗并长期随访一例报告.....内科 赵景涛
病理科郭铃新 (60)
三例巨大型胃柿石病.....内科 赵岩生等
放射科杨志昌 (63)
国产甲氧米胍治疗消化性溃疡疗效观察内科黄福祥等 (67)
小牛胸腺肽治疗自身免疫性疾病(变应性亚败血症及系统性红斑狼疮)疗效观察
.....内科范志明 (69)
31年来391例支气管哮喘几个问题的探讨.....内科呼吸组付正恺等 (72)
癫痫发作的急救.....内科周正新 (77)
散发性脑炎41例临床分析.....内科刘晖等 (82)
广东血管圆线虫成虫,第一期幼虫和第三期幼虫扫描电子显微镜的研究
.....内科贺联印 (88)

中华分枝睾吸虫成虫、囊幼及后尾蚴体表超微结构——扫描电镜的观察

..... 内科贺联印 (92)

外科

环孢霉素A (Cyclosporin A) 在大白鼠身上诱发免疫耐受现象

..... 外科普外组李书隽 (95)

用CO₂激光手术刀做部分脾脏切除术——实验研究..... 外科普外组李书隽 (98)

用二甲基亚硝胺 (DMNA) 制造无肝硬化的门脉高压症狗模型

..... 外科普外组李书隽 (101)

部分脾切除对实验性绿脓杆菌败血症的观察..... 外科普外组李书隽 (105)

胃手术后胆汁逆流问题..... 外科普外组杜如显等 (109)

克隆氏病外科治疗的远期疗效观察..... 外科普外组杜如显等
病理科郭铃新等 (112)

精液睾丸酮和双氢睾丸酮对人绒毛膜促性腺素反应 (输精管结扎后 6 例观察)

..... 外科泌尿组朱积川 (117)

电液效应碎石术治疗膀胱结石——体外实验及临床应用..... 外科泌尿组孟广栋等 (122)

对侧肾缺如合并巨大输尿管-芽囊肿胚胎发育异常的探讨 (附-例报告)

..... 外科泌尿组孟广栋等
病理科郭铃新等 (127)

创伤急救的组织与建设..... 外科骨科组冯传汉 (130)

妇产科

血清唾液酸测定在妇科恶性肿瘤诊断上的初步观察..... 妇产科李自新等 (135)

关于人癌细胞对抗癌药物的敏感性..... 妇产科魏丽惠 (138)

人肿瘤的冻存组织和新鲜组织在裸小鼠内移植的观察..... 妇产科魏丽惠 (143)

HCG放射免疫测定法对滋养叶细胞肿瘤的监护——附17例分析

..... 妇产科周良鸿 (146)

218例新生儿染色体及临床检查..... 妇产科唐军等 (149)

子宫内膜异位症54例临床分析..... 妇产科李平等 (153)

妊娠期心脏病20例死亡分析..... 妇产科马韵玉 (157)

卵巢妊娠 4 例报告..... 妇产科胡永芳 (160)

ONO-802阴道栓剂终止早孕 (并对观察 2 天及 2 周进行比较)

..... 国家计生委科研所张蓓芬 等 (163)
..... 北医人民医院妇产科万焕忠

耳鼻喉科

中西医结合治疗耳聋 (附60例病例报导)..... 耳鼻喉科徐鹤荣 (168)

中西医结合治疗几种常见慢性鼻炎..... 耳鼻喉科徐鹤荣等 (171)

中西医结合治疗急性会厌炎及会厌脓肿..... 耳鼻喉科徐鹤荣等 (174)

膜性喉气管支气管炎 (附一例报告)..... 耳鼻喉科徐鹤荣 (175)

咽部异常感觉症 (梅核气) 治疗的探讨中西医结合治疗200例疗效观察

..... 耳鼻喉科李玉山等 (177)

耳鼻喉科疾患的血清免疫球蛋白水平调查..... 耳鼻喉科郑鸿祥 (181)

中医科

25名健康人的弦脉波形初步分析	中医科周永莹 (186)
脉学研究	
62例高血压患者的弦脉波形观察 (二)	中医科周永莹等 (189)
论痰	中医科蔡玲 (193)
医案医话十则	中医科蔡玲 (196)
月经病诊治一得	中医科李月玺 (202)
蜈蚣、鸡蛋治疗肾炎观察	中医科李月玺 (203)
健脾温肾法治疗水肿的体会	中医科贵宗娟 (204)
温灸治疗肩周炎74例疗效观察	中医科针灸组张琼玉 (205)
放射科	
高雪氏病脾切除术后合并多骨性急性付伤寒性	放射科杨志昌 (207)
骨髓炎的报告	
气性胆囊炎 (附一例报告)	放射科杨志昌 (210)
护理	
长期卧床病人的并发症	护理部白慕荣等 (213)
失用性症候群的预防和护理	
简讯	(215)
附录	(217)

血清抗 HBc-IgM固相放免 检测方法的研究

肝病研究室

乙型肝炎在我国为常见多发病, 由于其特殊的流行病学及临床特点, 使其对人类健康造成较大危害。因此, 对其深入研究以便达到能预防和控制, 是极为重要的。

目前, 在乙肝研究方面, 国外已先后建立了抗 HBc-IgM的固相放免检测技术(1-2), 这一指标对乙肝诊断, 预后估计, 献血员筛选等诸方面均有一定意义。国内尚未见报导。

本文报导首先在国内建立抗 HBc-IgM的固相放免检测方法, 研究有关试验的特点及影响因素。并进一步探讨了方法中所需 HBcAg解决办法。

材 料 和 方 法

材料

器材: FT-1901医用r谱仪, 北京二六一厂生产。聚苯乙烯微量细胞毒实验板(4×10孔), 上海塑料制品三厂生产。微量加液器5ul, 10ul等。

试剂: 马抗人IgM包被液, 以卫生部生物制品研究所马抗人IgM诊断血清(批号807)为原料, 由本室经 SephaexA50 过柱纯化后配制。HBcAg为北医附属人民医院和解放军302医院提纯。标记的 ^{125}I -抗HBc为中国科学院401所标记室标记, 比放6~7 uci/ug。标记的 ^{125}I -抗IgM, 其标记单位同前, 比放30 uci/ug。巯基乙醇(浓度99%)为Roth公司制。0.02M.PBS-Tween20缓冲液为本室配制, PH9.6。抗HAV-IgM试剂盒为美国Abbott公司制。

方法:

系采用固相放免夹心法。首先进行包

被, 包被液为碳酸盐缓冲液(PH9.6)配的马抗人IgM(浓度为10r/ml), 每一聚苯乙烯小管加50ul。(以下加液量均为每一管量)4℃过夜后PBS吐温缓冲液洗三次。然后进行补空包被, 包被液为牛血清白蛋白(1mg/ml)内含正常人IgG(1r/ml), 量为70ul, 室温4小时后PBS吐温缓冲液洗三次。加入被检血清50ul, 室温4小时后PBS吐温缓冲液洗涤三次。加入纯HBcAg50ul(IAHA1:128; 20倍稀释后SPRIA法测P/N>10), 4℃过夜后PBS吐温缓冲液洗三次。最后加入 ^{125}I -抗HBc50ul(约0.3 uci), 37℃4小时至6小时后PBS吐温缓冲液洗涤5次。然后放计数器上检测。

以上流程为测定管。同时, 每份血清作对照管, 以10%小牛血清50ul代替纯HBc-Ag, 流程全部与测定管条件相同。

计算: 试验管有效计数率(P)/对照管有效计数率(N)≥2.1为阳性。

结 果

一、特异性实验

(一) 巯基乙醇破坏实验

Caul报告⁽³⁾, α -2巯基乙醇(2ME)处理血清可特异地破坏IgM, 使之分解失活, 但IgG不受影响。据此, 对抗HBc-IgM及总抗HBc均阳性的两份慢活肝血清进行2ME处理。血清及2ME等量加入, 强烈振荡后置37℃4小时以上。对比血清处理前后抗HBc-IgM及总抗-HBc测值的变化。其结果如表1。

两种浓度2ME破坏2份血清实验, 含有抗HBc-IgM转为阴性, 而总抗-HBc仍为阳

表 1 巯基乙醇对抗HbC—IgM和总抗HbC作用的结果

时 间	结 果	2 ME高浓度(0.2M)		2 ME低浓度(0.06M)	
		抗HbC—IgM(P/N)总抗HbC*		抗HbC—IgM(P/N)总抗HbC*	
作用前	指标值(定性结果)	13.59(+)	66%(+)	7.94(+)	73%(+)
作用后	指标值(定性结果)	1.15(-)	90%(-)	1.19(-)	89.71%(+)

* 总抗HbC以抑制率%表示, $\geq 50\%$ 为阳性。

性。说明了实验的特异性。

(二) 试剂马抗人IgM纯度的验证

用两种方法验证我们所用的马抗人IgM是纯的, 其中不含马抗人IgG。

1. μ 链抗体与马抗人IgM特异性的试剂盒(SPRIA), 第一层包被多使用 μ 链抗体。 μ 链提取较复杂困难。因此, 我们试用纯化的马抗人IgM代替。在儿童医院协助下, 对44例急性甲型肝炎患者进行同一份血清的抗MAV-IgM定性检测结果比较。除第一层包被液一为美国Abbott试剂盒原液, 另一为本室纯化的马抗人IgM外, 其他实验条件基本相同, 结果如表2。

表 2 用Abbott试剂盒*及本室制备 Δ 包被液作抗HAV—IgM检测结果比较

试剂盒包被液	本室制备包被液		合 计
	+	-	
+	39	0	39
-	1	4	5
合 计	40	4	44

* μ 链特异性的正常人IgM抗体

Δ 纯化的马抗人IgM

实验结果符合率为97.72%。本室的包被液在一定范围内可代替 μ 链抗体包被液, 进行特异的IgM型抗体的固相放免检测。

2. 马抗人IgM纯度的免疫学证明

在琼脂板中点样, 进行正常人血清免疫电泳, 待各组份分开后, 在其两侧各挖一槽。一侧放入马抗人全血清, 一侧放入本室纯化后马抗人IgM, 作扩散实验, 结果如图1。

中孔为点样孔, 上槽内加马抗人IgM, 出现一条沉淀线。下槽内加马抗人全血清出现多条沉淀线。

另外, 我们还进行了双抗体夹心法的免疫学验证。以小牛血清为阳性对照, 中层抗原为IgM时测值为阴性。中层抗原为纯化的IgG时测值为阳性。也说明了我们包被用的马抗人IgM是纯的。

(三) 各类血清检测结果

取无乙肝感染正常人血清30例检测, 抗HbC—IgM的P/N值全部 < 2.1 。而50例乙肝全部测值为阳性, 最高达30.51。另外, 选取急甲肝等7类共31例非乙肝感染的患者血清检测, 均未测到抗HbC—IgM。

将以上结果总结如表3

二、稳定性试验

(一) 重复性试验

选取4份抗HbC—IgM阳性血清及1份阴性血清作重复性试验, 计算CV值, 结果见表4。

(二) 血清不同稀释度与P/N值的关系

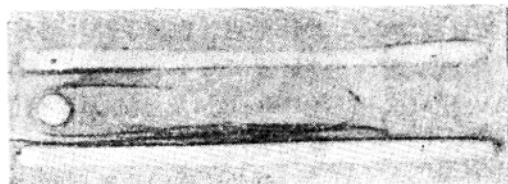


图 1 扩散实验结果

表 3 血清抗HBe—IgM特异性检测结果

组 别	例 数	血 清 GPT	血清抗HBe—IgM的P/N均值(范围)
急性乙型肝炎	50	250~500	12.70(2.94—30.51)
急性甲型肝炎	18	>500	1.28(0.60—1.90)
流行性腮腺炎	4	正 常	1.47(1.26—1.77)
非甲非乙型肝炎(急性2例)	3	异 常	1.13(0.80—1.54)
类 风 湿 病	2	正 常	1.24(0.90—1.57)
胰头癌肝转移	2	>500	0.87(0.74—1.00)
传染性单核细胞增多症	1	>500	0.88
麻 疹	1	正 常	1.46
正 常 人	30	正 常	1.22(0.72—1.99)

表 4 5份标本重复检测抗HBe—IgM P/N值的CV值

标 本 号	抗HBe—IgM的P/N值							
	重 复 检 测 次 数					均 值	标 准 差	CV(%)
	1	2	3	4	5			
A	13.41	15.90	15.95	13.48	13.95	14.54	1.2832	8.83
B	9.95	7.72	8.44	9.63	7.96	8.74	0.9994	11.43
C	10.52	11.00	9.99	10.73	12.04	10.86	0.7585	6.98
D	14.44	13.77	14.83	14.47	13.39	14.58	0.5930	4.07
E	1.40	1.29	1.49	1.47	1.61	1.45	0.1180	8.14

选取一份抗HBe—IgM阳性血清作不同稀释度的检测,其结果如表5。

表 5 一份抗HBe—IgM阳性血清不同稀释度的P/N值

稀 释 度	Ig 血 清 稀 释 倍 数	P/N值	IgP/N
1	0	20.89	1.32
10 ¹	1	16.60	1.22
10 ²	2	11.34	1.05
10 ³	3	6.54	0.82
10 ⁴	4	4.65	0.67
10 ⁵	5	3.51	0.55
10 ⁶	—	1.05(—)	—
10 ⁷	—	1.18(—)	—

以上测值P/N为阳性部分作直线相关分析,计算得直线相关 = -0.9939 (P < 0.001)。P/N值与血清稀释高度紧密负相关。进一步作直线回归分析,计得直线回归方程 $\hat{Y} = 1.3476 - 0.1637X$ 。据上方程作

一回归直线图2所示。

实验中发现,另有一类血清,做一定稀释后抗HBe—IgM的值才达高峰值。例如:一例急性乙肝患者血清做不同稀释度检测其结果如表6。

表 6 一例急乙肝血清不同稀释度抗HBe—IgM的P/N值

血 清 稀 释 倍 数	P/N值
1:1	3.96
1:10 ¹	5.40
1:10 ²	10.52
1:10 ³	3.36
1:10 ⁴	2.08

三、RF因子对实验的干扰

用2份RF因子阳性和抗HBe—IgM也阳性的慢活肝血清,做去除RF因子前后抗

HBc-IgM测值比较。去除前P/N分别为4.34及8.60, 去除后分别为3.22及7.90。

四、从富含Dane颗粒血清中提取HBc-Ag用于SPRIA法检测抗HBc-IgM。

目前国内外HBcAg来源主要靠尸肝超速离心提取, 是很困难的。直接影响了抗HBc-IgM检测的广泛开展。为此我们探讨了HBcAg来源的解决办法。从富含Dane颗粒血清中提取HBcAg的材料与方法可参考本研究室发表的文章⁽⁴⁾。在此报告用同一份血清, 同时进行以肝提纯的HBcAg及血清中提取的HBcAg为试剂的抗HBc-IgM检测, 其他实验条件完全相同, 共测70份, 检测结果如表7。

表7 用两种来源HBcAg对同一份血清测抗HBc-IgM70例总结结果

肝源 HBcAg	血清 HBcAg		合 计
	+	-	
+	40	0	40
-	0	30	30
合 计	40	30	70

注: 各组符合率100%

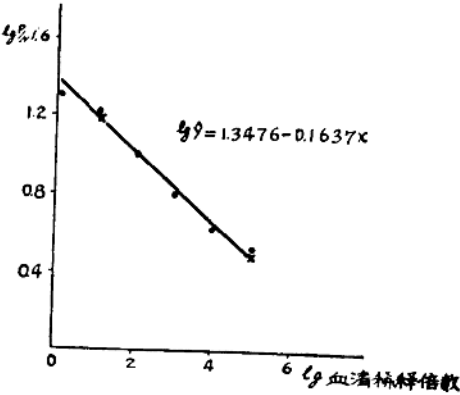


图2 一例抗HBc-AgM阳性血清不同稀释度与P/N值的回归直线。

讨 论

抗HBc-IgM这一血清学指标, 在乙肝的临床及实验室研究中均有重要价值。Tedder等报导⁽⁵⁾它可以用于某些乙型肝炎

的早期诊断。Gerlich⁽⁶⁾, Lemon⁽⁷⁾, Cappel⁽⁸⁾等报导对于HBcAg阳性急乙肝患者, 抗HBc-IgM的检出具有特别重要的意义, 可以提供病原学分型依据, 提高乙肝诊断水平。鹤沼氏⁽⁹⁾认为抗HBc-IgM的动力学观察对急乙肝初染与长期携带后急性发病鉴别有所帮助。Roggendorf⁽¹⁰⁾等认为这一指标的动力学观察可以做为急乙肝预后估计的参考指标。Gerlich⁽⁶⁾等还特别指出了抗HBc-IgM在筛选献血员中的价值。总之, 抗HBc-IgM的检测对乙肝的早期诊断, 对急性乙肝预后估计, 急慢感染鉴别, 筛选献血员及探讨乙肝慢性化发生机制等诸方面均有重要的意义。因此, 建立这项指标的检测是非常重要的。

目前国外已生产抗HBc-IgM的试剂盒, 但来源困难, 价格昂贵, 在我国无法普遍使用。故此我们研究利用国产原料建立了抗HBc-IgM的SPRIA检测方法。

在以巯基乙醇破坏实验中, 不同浓度的2ME可特异地破坏HBc-IgM使其测值阴转。另外, 我们将本室制马抗人IgM包被液与国外μ链抗体的特异包被液对比, 试验结果, 两者符合率很高, 证明了在SPRIA检测IgM抗体中前者可代替后者。并通过血清免疫电泳后扩散方法及双抗体夹心SPRIA法进一步证明我们的马抗人IgM中不含马抗人IgG而是纯的, 从而保证了实验的特异性。因为, 抗HBcIgM是一种乙肝感染后某些情况下出现的特异血清指标, 通过对正常人及各类病种血清共111例进行抗HBc-IgM检测比较, 说明我们的实验设计合理。通过上述各种实验证明了所建立的抗HBc-IgM的SPRIA检测法是特异的。

我们对5份标本进行了重复实验, CV值在允许范围内。我们还做了血清不同稀释度与抗HBc-IgM的P/N值之间的关系研究, 发现了两种不同关系, 说明如果有条件, 每份血清最好做多个稀释度检测。通过上述两个方面证明了我们所设计抗HBc-IgM检测

法是稳定可靠的。

我们还对 RF 因子对实验的干扰进行了探讨。Tedder⁽⁵⁾等报导血清中只有 RF 因子与抗-HBc形成聚合物时才干扰抗HBc-IgM的检测。通过实验我们认为,在SPRIA方法中RF因子对抗HBc-IgM的干扰存在,但不严重。为防止在P/N测值较低时受RF因子干扰,RF因子强阳性时应予去除。

从富含Dane颗粒血清中提取HBcAg是解决其来源的一个办法。在我们室以前研究的基础上,通过扩散后放射自显影,证实了血源与肝源提取HBcAg的同一性。并对血源HBc-Ag提取后的保存时间进行了探讨,在4℃条件可至少保存一个月。我们用肝源及血源HBcAg同时对70份标本进行抗HBc-IgM检测比较,证明在SPRIA法中两者可互相替代,无非特异反应。这一点,对抗HBc-IgM检测的广泛开展创造一个有利条件。

我们准备利用本文所建立的方法,进一步进行有关抗HBc-IgM临床意义的研究。

主要参考文献

1. Gerlich WH. et al; J Med Virol, 4: 227, 1979.
2. Hawkes RA. et al; J Clin Microbiol, 11(6): 581, 1980.
3. Caul ED. et al; J Hygiene, 73:329, 1974.
4. 北医附属人民医院肝病研究室: 北京医学院学报 13(4):267, 1981.
5. Tedder RS. et al; J Hygiene, 86(2):163, 1981.
6. Gerlich WH. et al; J Infect Dis, 142:95, 1980.
7. Lemon SN. et al; J Infect Dis, 143(6): 803, 1981.
8. Cappel R. et al; J Med Virol, 8(3):201, 1981.
9. 沼直雄他: 肝脏, 22:1200, 1981.
10. Roggendorf M. et al; J Clin Microbiol. 13(4):618, 1981.

血清抗HBc-IgM临床意义的研究

肝病研究室 * 张 正 陶其敏 李新富

乙型肝炎是一种在世界上广泛流行的传染病,包括我国在内的亚太地区为高发区,此病危害严重,20年来,对乙肝的研究日趋深入。各国学者正对其进行多方面的研究,以期能尽快掌握其发病规律及转归条件。从血清免疫学的角度近年来国外建立了抗HBc-IgM的检测方法,并研究了这一指标的临床意义。国内尚未见报导。本研究室在1981年在国内建立了抗HBc-IgM的检测方法⁽¹⁾。本文试图通过200余例各类乙型肝炎病毒感染的肝病检测结果,分析讨论抗HBc-IgM的临床意义。

方法与结果

实验采用抗HBc-IgM的SPRIA检测法⁽¹⁾具体操作步骤和器材试剂等从略。

患者血清主要来源为本院内科肝炎门诊及病房。另有一部分北京市第一传染病院,第二传染病院,市儿童医院,市防疫站等单位提供。共对245份血清进行了检测,结果如下。

一、各类乙肝感染抗HBc-IgM检测结果概况

选取各类乙型肝炎患者205例进行抗HBc-IgM检测。(诊断标准参考1978年杭州会议)结果见表1。

从表1可以看出:在急乙肝及慢性活肝,全部测到了抗HBc-IgM其他各类患者中有一定阳性率。

将205例P/N观测值作散点图,可表示

* 1979届研究生

表 1 各类乙肝感染抗 HBc-Ig M检测结果

病 种	检查人数	总 计		低值组(P/N2.1-15)		高值组(P/N>15)	
		抗HBc-IgM		抗HBc-IgM		抗HBc-IgM	
		阳 性 数	%	阳 性 数	%	阳 性 数	%
急性乙型肝炎	50	50	100	31	62	19	38
慢性活动性肝炎	21	21	100	16	76.19	5	23.81
慢性迁延性肝炎	50	47	94	39	78	8	16
HBV无症状携带者	35	22	62.86	20	57.14	2	5.72
肝 硬 化	32	24	75	16	50	8	25
肝 癌	17	12	70.59	7	41.18	5	29.41

如图 1。

图中正常人测值全部为阴性。急乙肝测值较高。携带者约有1/3为阳性。

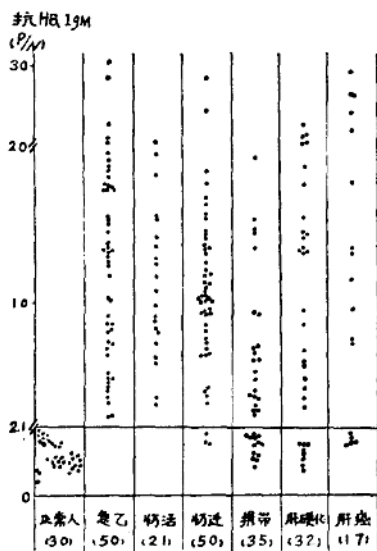


图 1 205例各类乙肝感染抗 HBc-IgM的P/N比值散点图

为了进一步验证上述各类检测结果的可靠性,我们又对40份肝穿验证后患者的血清进行了抗HBc-IgM检测,结果见表2。

表中可看出,HBsAg 阳性的急乙肝和慢活肝患者血清抗 HBc-IgM 全部为阳性。其中肝硬化患者临床诊断为慢活肝,活检有早期硬化。以上结果与仅有临床诊断者血清抗HBc-IgM检测结果基本一致。

二、HBcAg 阴性的急性患者抗HBc-IgM的检测结果

表 2 40份经肝穿验证的患者血清抗HBc-IgM检测结果

疾病分类	HBsAg 阳性			HBsAg 阴性		
	抗HBc-IgM			抗HBc-IgM		
	例数	阳性数	%	例数	阳性数	%
急 肝	4	4	100	10	1	10
慢 迁	7	6	85.71	0	0	0
慢 活	11	11	100	3	0	0
肝 硬 化	5	5	100	0	0	0

选取本院内科门诊患者 9 例,均每年体检正常,未发现过肝炎,本次发病有明显肝炎症状和体征,SGPT>500,HBsAg 阴性,诊为急性肝炎。均在发病两周内取血,进行抗HBc-IgM检测。结果如表 3。

其中 5 例抗HBc-IgM为阳性。6-7两例抗HBc-IgM为阴性,抗-HBs及总抗-HBc为阳性。最后两例在全部三个月随访中未发

表 3 9例HBsAg(-)

急性肝炎血清学检测结果

编号	血 清 SGPT	抗 HBc-IgM		抗HBs		总抗HBc	
		P/N	定性	P/N	定性	P/N	定性
1	>500	7.22	+	1.12	-	86.71	+
2	>500	4.72	+	1.29	-	87.02	+
3	>500	2.18	+	1.11	-	81.86	+
4	>500	3.49	+	1.24	-	77.78	+
5	>500	5.74	+	1.38	-	83.57	+
6	>500	1.69	-	10.81	+	87.68	+
7	>500	0.88	-	4.45	+	79.64	+
8	>500	1.11	-	1.89	-	23.23	-
9	>500	1.31	-	1.34	-	6.62	-

现任何乙肝感染指标。

三、急性乙型肝炎抗 HBc-IgM 的动力学检测

对14例急乙肝患者进行追踪随访。10例临床痊愈者，其中7例抗 HBc-IgM 于病程四个月内降至正常，检测情况如表4。将其测值作动力曲线图，如图2。另外4例转为慢性迁延性肝炎，观察一年左右，抗 HBc-IgM 无下降趋势，有的还有上升。将其测值也做动力学曲线，见图3。与痊愈患者的动力曲线比较，完全不同。

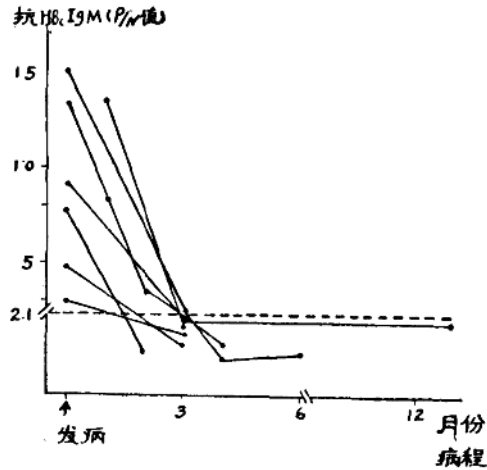


图2 7例乙肝痊愈患者抗 HBc-IgM 动力学曲线

四、乙肝感染患者中抗 HBc-IgM 与其他生化及免疫学指标的关系

在205例各类肝炎病血清一次性观测中，

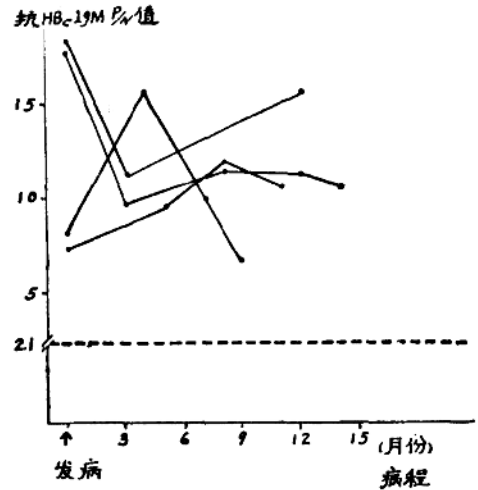


图3 4例急转慢性肝炎患者抗 HBc-IgM 动力学曲线

每份血清在进行抗 HBc-IgM 检测同时，还测了表面系统，e系统，SGPT及TTT指标。95例检测了DNAP（其中携带者34例），47例检测了各类免疫球蛋白定量，C₃及RF因子。发现抗 HBc-IgM 例值与各类血清学指标值上均无统计学相关关系。

另外，对急性乙肝痊愈者10例，急乙肝慢转者4例，慢迁乙肝12例，慢活乙肝6例等四类患者进行追踪观测。每份血清同时测了抗 HBc-IgM，HBsAg，总抗-HBc和SGPT。结果为急乙痊愈患者抗HBc-IgM随同HBsAg和SGPT同时下降而总抗-HBc（主要为IgG）变化不大，痊愈后仍维持一定水平。而后三类患者有相似的动力学曲线。下

表4 7例急性乙肝痊愈患者血清检测结果

例数	抗HBc-IgM(P/N值)							末次观察时抗HBc值 (抑制率%)	末次观察时抗-HBc值 (*P/N PHA*)
	发病	1月	2月	3月	4月	6月	14月		
1	15.01	~	~	2.11	0.93	1.12		97.84	7.8*
2	13.20	8.35	3.78	~	1.28			78.20	1.8*
3	~	13.63	~	1.79				84.36	1.8*
4	7.8	~	1.19	~				19.70	1.32*
5	9.10	~	~	1.96	~	~	1.87	97.72	4.3*
6	4.98	~	1.32					86.50	3.7*
7	2.98	~	~	1.64				91.19	1.8*

注：(～)未能取血观察

面每类各举一例制图进行说明。(急乙型肝炎患者取自本院肝炎门诊病历号170844。慢性迁延性患者取自本院肝炎门诊病历号165270,病程4年,文中仅为最近17个月观测情况。)动力学曲线如图4及图5。

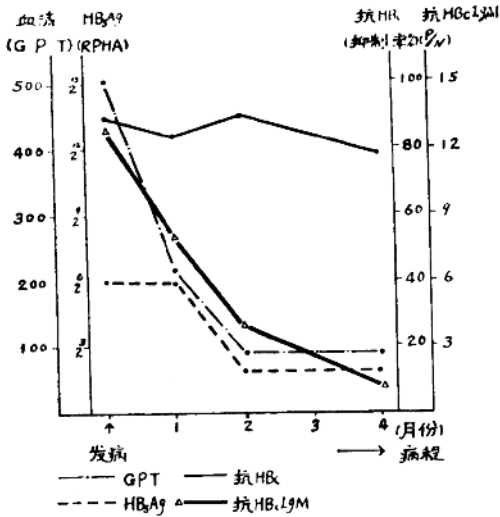


图 4 一例急性乙型肝炎 4 个月观测血清指标动力学曲线

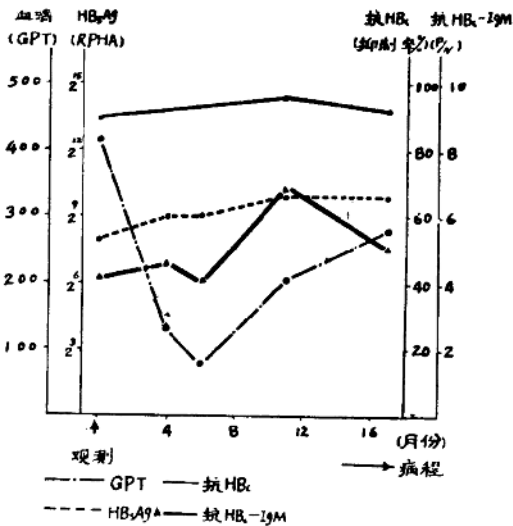


图 5 一例慢性迁延性乙型肝炎 17 个月观测血清指标动力学曲线

两类图比较,表现出两种不同动力学关系。

五、抗 HBc-IgM 在乙肝无症状携带者

中的观测结果。

对 35 例 HBsAg 高滴度无症状携带者检测,其抗 HBc-IgM 阳性率为 62.86%。与急性乙肝组 50 例比较,抗 HBc-IgM 总平均滴度较低,急性乙肝为 12.70%,携带者为 5.51%,但统计学处理差异不显著。

在 35 例携带者中有 7 例 HBsAg $\geq 1:4096$, HBeAg 阳性, DANP 阳性,但未测到抗 HBc-IgM。

六、既往乙肝感染过,目前健康的人抗 HBc-IgM 的检测

选取 21 份查体血清,无肝炎史,无 HBsAg 阳性家族史,历年体检正常, SGPT 正常,表面系统, e 系统, HBcAg 均为阴性。其中 16 例仅总抗 HBc 为阳性*。将以上血清进行抗 HBc-IgM 检测,全部为阴性。将其与 30 份抗-HBc 阴性健康人抗 HBc-IgM 的 P/N 值进行 t 检验,无显著差异 ($P>0.05$)。

七、抗 HBc-IgM 在 HBV 感染者血清中可能长期存在问题

另 5 例抗-HBs 阳性,血清 1:200 稀释抗 HBc 阳性

对肝硬化及肝癌患者不同病程进行了抗 HBc-IgM 检测,发现约有 3/4 患者为阳性。对其中 6 例阳性肝硬化患者追踪观测,得到持续阳性结果。此类患者一般平均病程较长,甚至有的达 20 年以上。

讨 论

抗 HBc-IgM 是急性肝感染的重要血清学指标之一。

在急性乙肝感染中,我们所查阅到的国外文献数百例检测抗 HBc-IgM 结果几乎全部为阳性。患者痊愈后在一定时间内消失。Gerlich 等⁽²⁾。Cappet 等⁽³⁾报告 136 例,抗 HBc-IgM 于 2~5 个月消失。Tedder 等⁽⁴⁾报告 43 例维持 6 个月。鹄沼等⁽⁵⁾报告 5 例于病后 6—9 个月消失。本文检测 50 例 HBsAg 阳性急性乙肝患者,抗 HBc-IgM 阳性率为 100%,并出现早,滴度较高。对 10 例痊愈

者追踪观察, 7例抗HBc-IgM于4个月内消失, 3例在半年时下降原值1/2以上还在追踪中。我们的观察结果基本与文献报告一致。抗HBc-IgM在急乙肝感染中, 是一个重要的血清学标志。较优于其他指标。

另外Roggendorf⁽⁶⁾等还认为这一指标可以做为急乙肝预后估计的参考指标。我们比较了急乙肝痊愈患者与慢转患者的抗HBc-IgM动力学曲线, 发现他们完全不同。提示抗HBc-IgM可能对预测急乙肝的预后和转归是一个重要参考指标。

在HBsAg阳性的急性肝炎中, 抗HBc-IgM检测有特殊重要意义。Lemon等⁽⁷⁾报告, 在255例急性肝炎中, 以抗HBc-IgM作为唯一免疫学指标确诊急乙肝占12.3%。Roggendorf⁽⁶⁾等报告, 抗HBc-IgM能提高HBsAg阴性急乙诊断率31.4%。Gerlich⁽²⁾等报告HBsAg阴性乙肝的抗HBc-IgM下降较HBsAg阳性者为慢。本文对内科门诊初诊9名HBsAg阴性急乙肝患者检测抗HBc-IgM有5名阳性, 可确诊为急乙肝。医院内早期急乙肝的病人较难找到, 因为潜伏期病人不易到医院就诊, 我们可能由于初次采血较迟, 观测例数有限未测到抗HBc-IgM单独作为乙肝三大抗原抗体系统免疫指标中的唯一确诊指标情况, 因此我们测到抗HBc-IgM时, 也出现了抗HBc-IgG。在临床上, 对HBsAg阴性的急乙肝病人, 特别需要进行抗HBc-IgM检测, 可早期对急肝的病原学分型提供依据, 提高急乙肝的诊断率。

Lemon⁽⁷⁾等报告在46例健康人仅1例查到低值抗HBc-IgM, 对其意义未深入研究。刘永良⁽⁸⁾等认为抗HBc滴度大于2⁷有HBV现行感染。我们在既往感染过HBV的健康人21例不论其总抗-HBc滴度如何, 不论其是否有抗-HBs, 均未测到抗HBc-IgM。我们认为抗HBc-IgM也许在区别现行及既往HBV感染中可能比总抗-HBc滴度更有参考价值。

国外一些文献报导, 抗HBc-IgM在迁乙肝中可持续存在若干年, 但滴度较低。Roggendorf⁽⁶⁾等报导在HBsAg阳性慢活肝中, 此指标阳性率可达到89.49%。在HBsAg阳性肝癌中检出率为73.4%。另Tedd-er⁽⁴⁾等报导在6例肝硬化中查到1例抗HBc-IgM阳性。本文在HBV感染的慢迁肝, 慢活肝, 肝硬化及肝癌患者中均能测到抗HBc-IgM的一定阳性率。由于抗HBc-IgM在某些情况下长期存在于各类感染者的血清中, 在一定程度上影响了它作为乙肝早期诊断指标的价值。

在HBV无症状携带者中, 不少学者报导了抗HBc-IgM的检出情况。Gerlich⁽²⁾等报告在抗-HBc阳性, 肝活检正常的70例携带者中, 抗HBc-IgM阳性率为82.8%。Dormeyer⁽⁹⁾等报告75例携带者4年追踪观测, 抗HBc-IgM阳性率为81%。一般认为携带者中抗HBc-IgM滴度较低。本文检测35例HBsAg高滴度无症状携带者, 抗HBc-IgM阳性率为62.86%, 其P/N值也较低。在无症状携带者中抗HBc-IgM的临床意义还不十分明确。但它对抗HBc-IgM产生机制的探讨有一定价值。有的学者提出在HBV慢性感染体内有HBV持续复制, HBcAg的持续刺激诱导抗HBc-IgM的产生。除以上可能考虑到的机制外, 我们实验中观察到某些携带者HBV持续活跃复制的指标, 但未测到抗HBc-IgM的存在, 说明抗HBc-IgM产生不仅与HBV持续存在有关, 而且与抗体本身对HBV感染后的免疫反应有关。此问题有待结合细胞免疫进一步深入研究。另外, 在慢性活肝, 肝硬化及肝癌中, 抗HBc是否与肝细胞破坏再生或分化不良有关尚在研究中。总之, 抗HBc-IgM的产生机制及其与乙肝慢性化的关系均有待进一步探讨。

最后, 还要强调一点, 对抗HBc-IgM检测, 重要的是能争取每例进行动力学的纵向观测。了解患者在整个病程中抗HBc-IgM

消长情况。如能配合其他生化和免疫指标观测就更好。只要这样,才能对抗HBc-IgM这一指标在每例各阶段出现的意义作出正确判断,有助于协助和指导临床。

总之,抗HBc-IgM的检测在乙肝的临床及实验研究中有重要意义。

摘 要

本文通过200余例各类乙型肝炎感染的肝病患者的血清学检测,探讨了抗HBc-IgM的临床意义。抗HBc-IgM的动力学观测对急乙肝预后估计有重要参考价值。抗HBc-IgM对急乙肝的确诊,特别是对HBsAg阴性的急肝患者病原学分型有特别重要意义。抗HBc-IgM在区别HBV的近期和既往感染方面也许比抗HBc更有价值。在其他各类乙肝感染中抗HBc-IgM有一定阳性率。由于这一指标可在某类患者血清中长期存在,在一

定程度上影响了它作为乙肝早期诊断指标的价值。要明确抗HBc-IgM在乙肝感染后出现的机制有待更多深入的研究工作。

主要参考文献

- 1.血清抗HBc-IgM固相免疫检测方法的研究(待发表)。
- 2.Gerlich WH. et al: J. Infect Dis, 142:95, 1980.
- 3.Cappet R. et al: J Med virol, 8(3):201, 1981.
- 4.Tedder, RS. et al: J Hygiene, 86(2):163, 1981.
- 5.鹤沼直雄他: 肝脏, 22:1200, 1981.
- 6.Roggerdorf M. et al: J Clin microbiol 13(4):618, 1981.
- 7.Lemon SM. et al: JInfect Dis, 143(6):803, 1981.
- 8.刘永良等: 中华儿科杂志(待发表)。
- 9.Dormeyer HH. et al: Klin Wochenschr 15:59(12):675, 1981.

无症状携带者血清乙型肝炎表面抗原的 纯化及检测方法的定量研究

肝病研究室

实习学生 王 宇

指导教师 陶其敏

前 言

自1965年Blumberg B.S.发现“澳大利亚抗原”⁽¹⁾(现称乙型肝炎表面抗原, HBsAg)后,人们相继提出此抗原与血清型(乙型)肝炎是特异相关的^(2,3),并将血清中是否存在有HBsAg或由它引起的抗体(抗-HBs)作为受过HBV感染的决定性指标,从而逐步建立了一系列测定方法,以期在可供临床广泛应用的基础上不断提高检测的灵敏性和特异性。迄今,对HBsAg的免疫学检测方法已经历了“三代”的发展⁽⁴⁾。第一代是Blumberg用以发现“澳大利

利亚抗原”的琼脂扩散法(SD),仅能测出血清中浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ 的抗原,敏感性差。随后是用对流电泳(CEP)⁽⁵⁾、补体结合(CF)⁽⁶⁾等方法,比SD法敏感2-10倍,为第二代。第三代技术是被动血凝(RPHA)⁽⁷⁾、固相放射免疫(SRIA)⁽⁸⁾等,大大提高了检测HBsAg的敏感性,并应用血凝抑制试验提高了检测的特异性⁽⁷⁾。由于反向被动血凝检测HBsAg敏感性高、操作简便,已成为临床化验及血库筛选献血员的主要方法⁽⁹⁾。而目前应用最敏感的固相免疫方法已能测到 0.2ng/ml 的水平⁽¹⁰⁾。本实验通过对HBsAg定量测定的研究,对

目前我室常规应用的几项检测方法有一较深入的了解。

材料和方法

抗来源: HBsAg阳性血清来自4名HBsAg无症状携带者。RPHA滴度为1:4096, 共820ml。

抗原的纯化: HBsAg的超离心制备过程采用本室改进的KBr密度梯度超速离心方法⁽¹¹⁾。血清用生理盐水1:1稀释后滴加等量的饱和硫酸铵, 4℃冰箱过夜, 5,000转/分×20分钟离心后收取沉淀物对生理盐水透析(100倍稀释后RPHA滴度为1:128)。随后进行KBr区带密度梯度漂浮离心。Backman LB-70型超速离心机, B-XIV区带转头, 容积为650ml, 28,000转/分(60,000Xg)18小时。分管收集样品, 每管10ml, 取HBsAg集中的管经减压透析后进行蔗糖密度梯度速率离心, 18,000转/分×18小时。分管收集, 在接近HBsAg密度时每管收集5ml, 共40管, 其余为每管10ml。

免疫电泳: 在1%离子浓度琼脂板上—端打直径4mm的孔, 分别加入纯化HBsAg和正常人血清, 在巴比妥缓冲系统(PH7.6, 离子强度0.06)中电泳2小时(约走5cm)后距孔4mm处挖槽, 分别加入马抗HBs纯化抗体及马抗正常人全血清, 置37℃, 48小时, 生理盐水浸泡后考马斯亮兰染色观察沉淀线。

紫外吸收光谱分析: 用ShimadzuUV-200对纯化HBsAg在206~300nm波长范围连续扫描, 得到紫外吸收曲线。

电镜的形态学证明: 纯化抗原用3%磷钨酸负染, Hitachi-400电镜放大22,000倍, 照片洗印放大4倍, 共88,000倍观察颗粒大小。

聚丙烯酰胺凝胶电泳: 用过硫酸胺-TEMED系统分别制备7.5%、5.8%、4%及3%不同浓度的聚丙烯酰胺凝胶柱双份。Tris-甘氨酸电泳缓冲液(PH8.3), 每管加纯化

抗原(约含蛋白50μg), 电流强度4mA/管, 以溴酚兰为指示剂, 当指示剂泳动到距管端0.5cm处时停止(约2小时)。凝胶取出后, 一份用10%三氯醋酸固定半小时, 后在考马斯亮兰染色(1份1%考马斯亮兰水溶液加20份10%三氯醋酸)中浸泡过夜, 用10%三氯醋酸脱色至背景无色。将另一份不同浓度的凝胶切成3mm长的小段, 分别置于含0.2ml生理盐水的小小试管中并用细玻璃棒搅碎, 置室温过夜, 抽提凝胶中的蛋白成份, 用RPHA测定各管上清液有无HBsAg。(见图5)

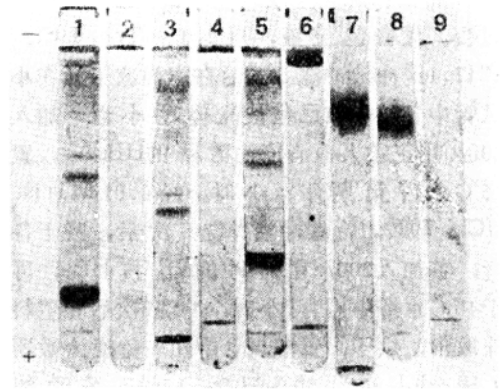


图5 纯化HBsAg的聚丙烯酰胺凝胶电泳照片

2、4、6、7分别为纯化HBsAg在7.5%、5.8%、4%和3%的凝胶中电泳结果。1、3和5为正常人血清在7.5%、5.8%和4%的凝胶中电泳结果。8为3%凝胶与7.5%凝胶相接而成, 用以进行相对含量的比较。9为空白对照, 可看到在胶柱下端有一非特异杂质带。所有电泳均在同一条件下进行。

纯化HBsAg蛋白定量: 在Lomry福林-酚试剂法基础上稍加改变⁽¹²⁾, 并以柠檬酸三钠代替酒石酸钾测定抗原蛋白浓度。以小牛血清白蛋白(北京红星生物化学制剂厂, 批号791228, 凯氏定氮74.8%)作标准曲线⁽¹³⁾, 在国产751型分光光度计650nm波长比色。

RPHA检测HBsAg: HBsAg诊断血清由本室制备。采用双醛法处理绵羊红细胞, 用纯化马抗HBs(卫生部生物制品研究所提

供)致敏醛化血球,用国产微量血凝板和微量稀释棒,同时做血凝抑制试验。

SP-RIA检测HBsAg: ^{125}I 标记的马抗HBs由科学院原子能所标记室提供,比放870 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$,用含50%小牛血清的0.01MTris-HCl缓冲液,PH7.1,稀释到250,000cpm/200 μl (仪器效率50%)。聚苯乙烯塑料珠(来源同上)同洗涤剂洗净后清水冲洗多次,在蒸馏水中浸泡后于37℃烘干。马抗HBs纯化抗体(生物制品研究所,批号813)用0.01MTris, PH9.5, 包被缓冲液稀释到50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。将塑料珠完全浸没在包被液中置室温过夜。倾去包被液,用0.01MTris-HCl, PH7.1缓冲液冲洗5次后在室温凉干。在小试管中各放一粒已包被抗体的小珠,加入200 μl 用正常人血清倍比稀释的HBsAg,置45℃水浴箱孵育2小时。经0.01MTris-HCl, PH7.1, 缓冲液冲洗5次后,吸干各管,各加入200 μl 已稀释的 ^{125}I -抗HBs,再于45℃水浴中温育1小时,冲洗5次后将塑料珠取出,烘干,置塑料管中用 γ -免疫计数器(国产FJ-2003/50)记数。15份正常血清来自血库采集的正常献血员血清作为阴性对照,其操作过程同上。

结 果

抗原的提取:两次区带密度梯度超速离心后的各项测定结果(均为用生理盐水100倍稀释后测定)见图1、图2。在KBr密度梯度离心后选取RPIIA 1:128以上的抗原集中管,其比重在1.20—1.23g/cm³之间,共70ml。在蔗糖密度梯度离心后,取RPHA为1:8192的最高峰管,在蔗糖浓度27—28%之间,共4管20ml,对生理盐水(含0.02%叠氮钠)透析后,存于4℃冰箱备用。

抗原的纯度:纯化抗原的紫外吸收图谱特征与Adamowicz P.H等⁽¹³⁾报导的一致(图3)。由于HBsAg含有较多的色氨酸,在282nm有最高吸收峰,并在290nm处有一特征肩,272nm处有一弱肩。OD₂₈₀/OD₂₈₀

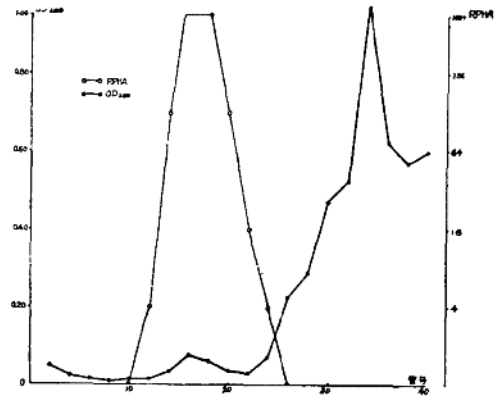


图 1 KBr区带密度梯度超速离心结果

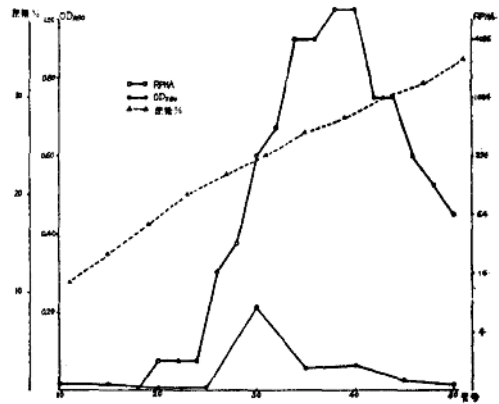


图 2 蔗糖区带密度梯度超速离心结果

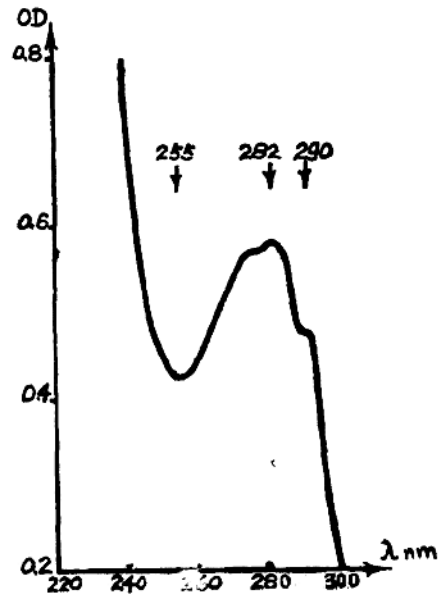


图 3 纯化HBsAg紫外吸收光谱