维普资讯 http://www.cqvip.com

· 论著 ·

SARS 患者恢复期血清中特异性抗体保护作用的研究

李勇 徐军 莫红缨 赖克方 谭亚夏 皮湘颖 任筱兰 曾广翘 刘妙芳 钟南山

【摘要】 **目的** 观察半年恢复期严重急性呼吸综合征(SARS)患者血清中 SARS 抗体对 SARS 病毒介导细胞病变的抑制作用。**方法** 用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 12 例 SARS 恢复期患者血清中 SARS 抗体(IgG)的吸光度(*A*)值;用维持液按 1∶8 稀释恢复期患者的血清,并与分离、培养和鉴定后不同稀释度的 SARS 病毒(SARS-Co V)上清作用,再加入 Vero E6 细胞悬液进行培养,观察 Vero E6 细胞病变的程度。**结果** 12 例恢复期患者半年前的 SARS 抗体 *A* 值范围为 0.79～2.01,半年后的 *A* 值范围为 0.81～2.06。其加入 12 例恢复期血清的 SARS-Co V-Vero E6 细胞病变程度至少降低 25%以上。**结论** SARS 患者半年后恢复期血清的 SARS 抗体滴度有上升趋势,它还可抑制 SARS 病毒介导的细胞病变,对 SARS 病毒有中和作用,推测 SARS 抗体是一种保护性抗体。

【关键词】 严重急性呼吸综合征; 病毒; 抗体; 中和试验
中图分类号:R563.1;R511 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-0603(2004)07-0409-04

Protective effect of specific antibody in serum of convalescent patient with SARS *LI Yong, XU Jun, MO Hong-ying, LAI Ke-fang, TAN Ya-xia, PI Xiang-ying, REN Xiao-lan, ZENG Guang-qiao, LIU Miao-fang, ZHONG Nan-shan. Guangzhou Institute of Respiratory Disease, Guangzhou 510120, Guangdong, China*

【**Abstract**】 **Objective** To investigate inhibitory effect of serum severe acute respiratory syndrome (SARS)-specific antibodies from convalescent patients after half an year of onset on SARS-Co V-mediated cytopathic response. **Methods** SARS-Co V immunoglobulin G(IgG) antibody was determinated by enzyme linked immunoadsorbent assay(ELISA). Twelve serum samples from convalescent patients, diluted by 1∶8 with maintenance medium, were mixed with the three dilution supernatants of SARS-Co V. SARS-Co V were isolated, cultured and identified by the Guangzhou Institute of Respiratory Disease, and cultured with Vero E6 cell suspension. The extent of cytopathic response was observed. **Results** The absorbance (*A*) value of SARS-Co V IgG antibody ranged from 0.81 to 2.06 in patients after half an year of SARS onset, and form 0.79 to 2.01 in patients before half an year of SARS onset. The extent of cytopathic response was decreased by more than 25% in all 12 convalescent patients, as compared with control serum. **Conclusion** The *A* value of SARS-Co V IgG antibody in serum of convalescent patients tended to elevate in half an year after SARS onset. SARS-Co V IgG antibody could inhibit SARS-Co V-mediated cytopathic response, indicating it might be one of protective antibodies.

【**Key words**】 SARS; virus; antibodies; neutralization
CLC number:R563.1;R511 **Document code**:A **Article ID**:1003-0603(2004)07-0409-04

有关全世界范围内严重急性呼吸综合征(SARS)的发病、传播情况及病原体的证明已有过报道[1,2]。SARS 患者表现为,当病毒感染累及下呼吸道而涉及到肺叶时,典型症状有头痛、发热、干咳和呼吸困难;实验室检查可见白细胞降低和转氨酶升高;肺损伤而致呼吸衰竭是致死原因[3]。目前的治疗包括抗病毒治疗、激素治疗和抗生素治疗等[4];香港中文大学医学院利用 SARS 患者康复血清对患者进行治疗,经过 1 个多月的临床试验,其疗效显著[5];WHO 也肯定了血清疗法的有效性[6]。本研究拟通过测定 12 例 SARS 患者康复半年前后血清的特异性抗体,观察该血清中特异性抗体滴度的变化及该抗体是否具有病毒中和作用,以此在体外证明血清疗法的可行性。

1 资料与方法

1.1 材料及标本来源:SARS 患者尸检的脑组织标本由广州呼吸疾病研究所提供;Vero E6 细胞株由香港大学提供。DMEM(dulbecco minimum essential medium)培养基为 Hyclone 产品;胎牛血清为杭州四季青公司产品;RNA 提取、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒均由 Amplimedical Spa-Bioline Division 公司提供。活细胞电脑示频自动跟踪系统由广州呼吸疾病研究所提供。SARS 冠状病毒抗体(IgG)诊断试剂盒由北京华大吉比爱生物技术

基金项目:广东省广州市科技计划项目(200364718)

作者单位:510120 广州,广州呼吸疾病研究所
作者简介:李勇(1973-),男(汉族),湖南省桃源县人,硕士研究生,主管技师(Email:liyong999@163.net)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

有限公司提供(国药试字 20030004)。

1.2 受试对象:12 例半年恢复期的血清取自广州呼吸疾病研究所,根据广东省卫生厅制订的 SARS 诊治方案[7]所确诊的 SARS 患者,其中男 5 例,女 7 例;年龄 20～60 岁,平均(40.33±11.29)岁;平均病程为(33.67±21.39)d。

1.3 SARS 病毒分离方法:用无菌匀浆器研磨脑组织,加入由足量磷酸盐缓冲液(PBS)制备成的悬液(体积分数为 20%),4 ℃下 3 000×g 离心30 min,加入 500 kU/L 的青霉素,500 mg/L 链霉素,上清液接种于含 Vero E6 细胞的细胞培养瓶中(细胞汇合率约 80%),37 ℃吸附 1 h,然后吸出标本液,加细胞维持液〔DMEM 2%胎牛血清(FCS)〕,置 CO_2 培养箱中 37 ℃下培养,每日镜下观察细胞变化。若不出现病变则进行盲传,连续盲传 3 代。

1.4 SARS 病毒鉴定方法:RNA 提取(按 Amplimedical Spa - Bioline Division 公司的产品说明书操作),随机引物进行逆转录反应,37 ℃、90 min,95 ℃、5 min。取 10 μl 逆转录产物为模板进行第一轮 PCR 反应,引物序列为 C1:5′-GGG TTG GGA CTA TCC TAA GTG TGA-3′,C2:5′-TAA CAC ACA AAC ACC ATC ATC A-3′,反应条件为 95 ℃、2 min,94 ℃、1 min,55 ℃、1 min,72 ℃、1 min,进行 35 个循环,再 72 ℃延伸 5 min。取 1 μl 第一轮 PCR 产物为模板,进行第二轮 PCR,引物序列为 C3:5′-GAA GCT ATT CGT CAC GTT CG-3′,C4:5′-CTG TAG AAA ATC CTA GCT GGA G-3′,与第一轮 PCR 相同条件下进行 30 个循环数。最后取 5 μl PCR 产物,用质量分数为 2%的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

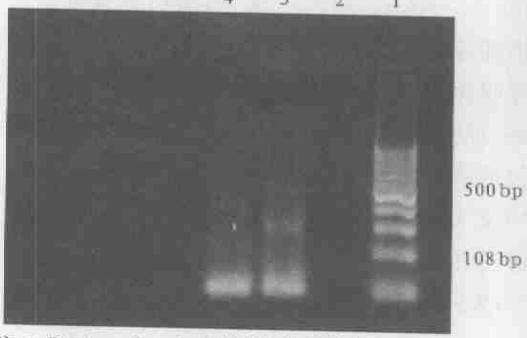
1.5 SARS 病毒滴定方法:用维持液 10 倍系列稀释病毒;将长成单层细胞的培养液倒掉接种于系列稀释的病毒液中,每个稀释度 8 孔,每孔 25 μl。对照孔和感染病毒孔均加入 100 μl 维持液,37 ℃下在体积分数为 5%的 CO_2 孵箱中培养,每日观察并记录出现细胞病变数(CPE)的孔数。采用 KARBER 统计方法,依据公式计算 50%组织细胞感染数。$TCID_{50}=10^{1+d(s-0.5)}$(d=稀释度的 Log10,s=每列中病变孔的比),所得 $TCID_{50}=10^{5.35}$/ml。

1.6 血清 SARS 抗体测定方法:采用酶联免疫吸附法(ELISA)[8],在酶标仪 450 nm 波长下测定吸光度(A)值,若阴性对照 A 均值<0.05 按 0.05 计算。按 SARS 冠状病毒抗体(IgG)诊断试剂盒操作说明书,临界值(cut off)=0.13+阴性对照 A 均值。被检样本 A 值大于临界值判定为 SARS 冠状病毒抗体阳性,小于临界值判定为阴性反应。阳性对照值有效范围为≥0.50,阴性对照值有效范围为≤0.10。

1.7 抗体的抑制试验:培养的病毒上清按照 10 倍稀释(10^0～10^{-3});无菌条件下,用维持液将 12 例 SARS 患者恢复期血清进行 1∶8 稀释,接种于两块 96 孔板中;每块板加样顺序如下:①在 A1 至 A6、B1 至 B6 孔,C1 至 C6、D1 至 D6 孔,E1 至 E6、F1 至 F6 孔,G1 至 G6、H1 至 H6 孔,A7 至 A12、B7 至 B12 孔,C7 至 C12、D7 至 D12 孔分别加入患者 1～6 的血清稀释液各 25 μl。E7 至 H12 孔加入 25 μl 维持液。②A1 至 H1、A2 至 H2 孔,A7 至 D7、A8 至 D8 孔,E9 至 H9 孔加入 10^0 的病毒上清 25 μl;A3 至 H3、A4 至 H4 孔,A9 至 D9、A10 至 D10 孔,E10 至 H10 孔加入 10^{-1}的病毒上清 25 μl;A5 至 H5、A6 至 H6 孔,A11 至 D11、A12 至 D12 孔,E11 至 H11 孔加入 10^{-2}的病毒上清 25 μl;E12 至 H12 孔中加入 10^{-3}的病毒上清 25 μl;E7 至 H7、E8 至 H8 孔加入 25 μl 维持液。③室温孵育 60 min,加入 100 μl Vero E6 细胞悬液,通常(10～30)×10^4 个细胞/ml。④37 ℃孵育,每日观察培养细胞的变化,注意有无细胞病变,如细胞变圆、脱落、细胞间空隙增大等。病变程度可分为(+)～(++++),具体的划分标准为:(+)为有≤25%的细胞发生病变,(++)为有 25%～50%的细胞发生病变,(+++)为有 50%～75%的细胞出现病变,(++++)为有 75%～100%的细胞出现病变。

2 结　果

2.1 反转录巢式 PCR:利用 RT-PCR 方法,从细胞培养上清中扩增出长度为 108 bp 的冠状病毒 RNA 聚合酶基因片段(图 1)序列分析表明,获得的 cDNA 序列与 WHO 公布的序列是一致的。



注:1. DNA marker;2. 未经感染的培养上清(阴性对照);3. 阳性对照;4. 尸解组织接种 Vero E6 细胞培养上清;PCR 产物长度为 108 bp

图 1　SARS-CoV 的 RT-PCR 电泳图

Figure 1　SARS-CoV RT-PCR electrophoresis map

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 抗体检测(图 2):用 ELISA 间接法测定 12 例 SARS 恢复期患者 SARS 抗体。半年前 SARS 抗体的 *A* 值范围为 0.79～2.01,均值为 1.29;半年时 SARS 抗体的 *A* 值范围为 0.81～2.06,均值为 1.60;阴性对照均<0.10。

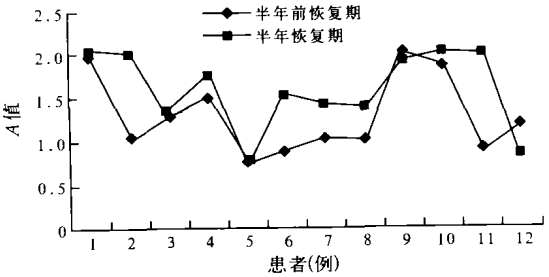


图 2 12 例 SARS 恢复期患者的 SARS 抗体测定

Figure 2 The determination of SARS-CoV antibody in 12 SARS convalescent patients

2.3 细胞病变的抑制试验:观察 4 d 后,将标本用体积分数为 10%的中性甲醛固定后,100 倍光镜下观察(图 3～10)。阳性对照的 Vero 细胞病变与相对应的含 SARS 血清的 Vero 细胞病变相比,细胞间空隙明显增大。12 例 SARS 患者血清在不同浓度培养病毒上清中的 Vero 细胞病变程度见表 1,从结果可以看出,与阳性对照相比,患者例 1～12 的细胞病变程度均降低,至少降低 25%(+)以上。

表 1 12 例 SARS 患者的细胞病变程度

Table 1 The extent of CPE of SARS patients

例序	病毒浓度($10^{5.35}$/ml)			例序	病毒浓度($10^{5.35}$/ml)		
	1	0.1	0.01		1	0.1	0.01
阴性对照	-	-	-	阴性对照	-	-	-
阳性对照	++～+++	+	±	阳性对照	++++	+++	+
例 1	±	-	-	例 7	+～++	-	-
例 2	+	±	-	例 8	+～++	±	-
例 3	±	-	-	例 9	+～++	-	-
例 4	±	-	-	例 10	+～++	±	-
例 5	++	±	-	例 11	++	±	-
例 6	+～++	-	-	例 12	+～++	±	-

3 讨 论

本研究通过分析血清组、病毒组及血清加病毒组 3 组中 Vero E6 的细胞病变情况,旨在观察 SARS 患者恢复期血清中的 SARS 抗体是否具有中和 SARS 病毒的能力。结果显示,在 12 例恢复期患者的血清中,尽管 SARS 抗体的滴度不同,但对同一浓度病毒培养液引起的细胞病变相差显著(如图 4 和图 8 及图 5 和图 9 所示)。这表明患者半年的血清仍对 SARS-CoV 介导的 Vero E6 细胞病变有较强的抑制作用,血清的这种作用可能是通过血清中 SARS-CoV IgG 抗体起作用的。SARS-CoV IgG 具有中和 SARS 病毒的能力,推测 12 例患者至少半年内仍对 SARS 病毒具有免疫力及 SARS 抗体是一种保护性抗体,至少可预防患者在半年内免受二次 SARS-CoV 感染。

检测 SARS 康复患者半年前及半年时的 SARS 抗体,其滴度未见下降,反而多数患者有升高趋势。但本试验中未能观察到不同 SARS 抗体浓度与细胞病变程度的关系,主要与形态学观察难以准确量化有关。

我们知道,特异抗体是病毒感染早期和从感染靶细胞释放出杀伤细胞病毒时期的重要防御机制,因为这期间的病毒处于细胞之外,抗体可以与之结合。一般说来:①它与病毒包膜衣壳蛋结合,改变病毒表面构型,阻挡病毒与靶细胞的接触从而不可能入侵细胞进行增殖;②也可与调理抗体和病毒结合,促进对病毒颗粒的吞噬性廓清;③在补体存在时,还可增强吞噬作用等[9]。就体外试验来说抗体的保护作用因是①所致,这为抗病毒治疗中的血浆疗法在体外提供了证据,其血清有可能对重症 SARS 患者(发病期间)有治疗作用;这也提示由于过早或长期使用激素所产生的免疫抑制作用,会对机体的免疫功能(抗病毒能力)产生不利影响,如合并曲霉菌感染[10],导致肺内病灶延迟出现。

参考文献:

1 Nie Qinghe, Luo Xindong, Zhang Jianzhong, *et al*. Current status of severe acute respiratory syndrome in China [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9: 1635-1645.

2 Drosten C, Günther S, Preiser W, *et al*. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome [J]. N Engl J Med, 2003, 348: 1967-1976.

3 钟南山. SARS 临床诊断现状[N]. 中国医学论坛报, 2003-04-24(17).

4 曹义战, 聂青和. SARS 诊断及治疗的现状与进展[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 441-444.

5 李黔, 李鹏飞, 张鹏, 等. SARS 的临床和治疗进展[J]. 北京大学学报(医学版), 2003, 35: 113-117.

6 WHO. Recommendation on SARS and blood safety[J]. WHO, 2003-05-15.

7 广东省卫生厅. 广东省医院收治非典型肺炎患者工作指引[S]. 2003-03-09.

8 沈洪. 科学直面 SARS 的未知、挫折和挑战[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 403.

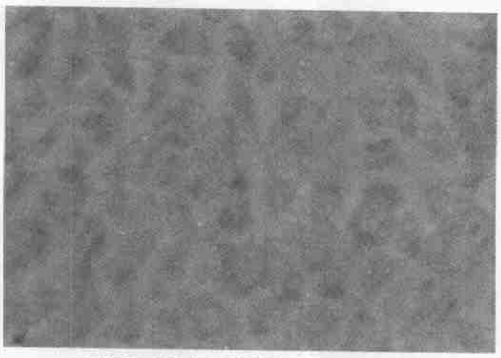
9 周光炎, 主编. 免疫学原理[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2000. 252.

10 Wang Huijun, Ding Yanqing, Li Xin, *et al*. Fatal aspergillosis in a patient with SARS who was treated with corticosteroids[J]. N Engl J Med, 2003, 349: 507-508.

(收稿日期:2004-03-12 修回日期:2004-06-24)

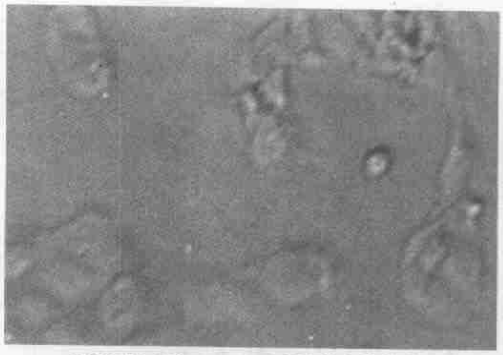
(本文编辑:李银平)

维普资讯 http://www.cqvip.com



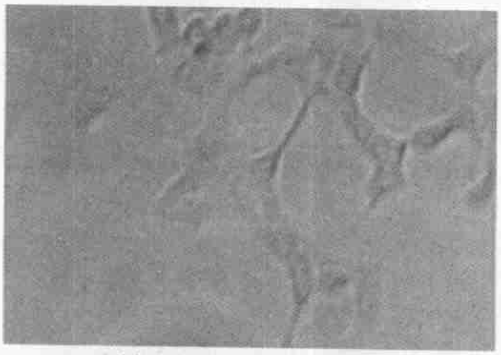
细胞形态整齐，呈鹅卵石样均匀分布，细胞间结合紧密

图3 阴性对照(血清组)
Figure 3 Negative control(serum group)



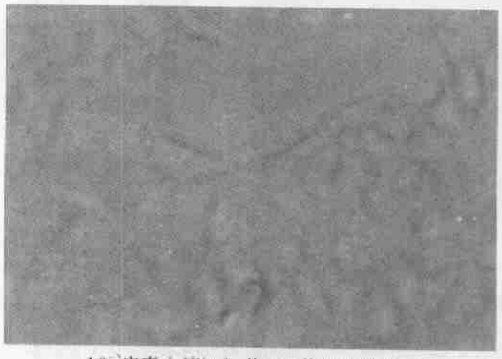
10^{0}病毒上清(++++) >75%的细胞脱落，可见少数变圆而未脱落的细胞

图4 阳性对照
Figure 4 Positive control



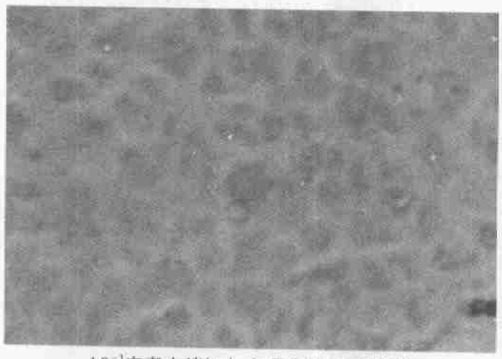
10^{-1}病毒上清(+++) >50%的细胞脱落，细胞形态变化显著

图5 阳性对照
Figure 5 Positive control



10^{-2}病毒上清(+) 约25%的细胞脱落，未脱落的细胞细胞间空隙增大

图6 阳性对照
Figure 6 Positive control

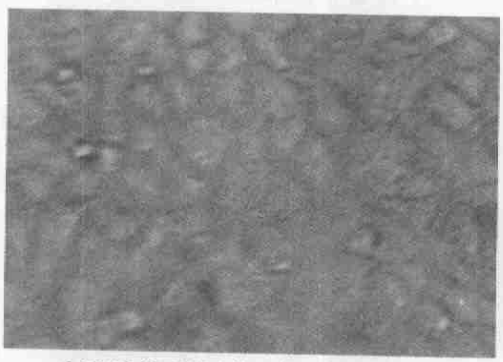


10^{-3}病毒上清(±) 细胞间连接较松散

图7 阳性对照
Figure 7 Positive control

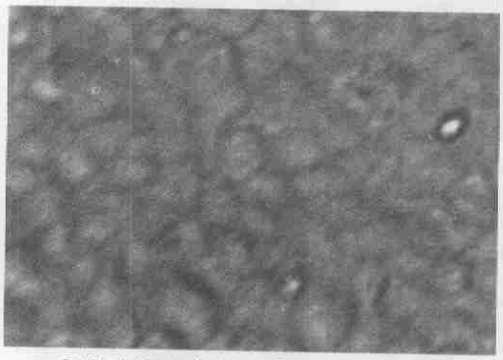
SARS血清+病毒上清10^{0} >25%细胞脱落，可见少数变圆的细胞仍黏附在介质上

图8 11号患者
Figure 8 Patient 11



SARS血清+病毒上清10^{-1} 细胞间连接松散

图9 11号患者
Figure 9 Patient 11



SARS血清+病毒上清10^{-2} 细胞形态较整齐

图10 11号患者
Figure 10 Patient 11