

SARS患者7年随访血清抗体变化规律及胃肠道免疫组化研究

石玉玲 李林海 孙朝晖 陈建芸 廖扬 曾兰兰 张伟 陈晓东 曹诚

【摘要】 目的 连续7年随访严重急性呼吸综合征(SARS)患者血清特异性IgM、IgG及N蛋白抗体滴度变化,应用胃镜观察胃肠道的病理改变并进行免疫组织化学研究。方法 应用免疫荧光(IFA)和双抗原夹心ELISA方法,对SARS患者发病1年后采用每隔1年检测一次血清SARS病毒(SARS-CoV)特异性IgM、IgG及N蛋白抗体滴度;用抗SARS-CoV N蛋白单克隆抗体对SARS恢复期患者胃肠道组织进行免疫组化研究。结果 14例SARS患者特异性IgG抗体1年后平均滴度为1/71(95%CI: 1/58 ~ 1/85),连续追踪7年呈下降趋势,7年后大部分患者IgG抗体滴度消失,特异性IgM抗体1年后消失,N蛋白抗体1年后平均滴度为1/146(95%CI: 1/122 ~ 1/171),与IgG抗体变化同时呈下降趋势。7年后其中9例患者检测N蛋白抗体全部为阴性,另5例临床症状较重的患者,N蛋白抗体仍检测阳性,其中3例N蛋白抗体滴度维持在1/156 ~ 1/210之间,2例N蛋白抗体滴度接近正常。该5例患者行胃镜检测和细胞免疫组化试验,血中N蛋白抗体检测阳性的3例患者胃组织黏液腺上皮细胞免疫组化呈阳性表达,大部呈胞浆着色。其中1例患者在肠组织浆液柱状上皮及间质细胞亦有表达,另2例血清N蛋白抗体检测接近正常的患者,细胞免疫组化为阴性。5例患者病理活检:1例明确诊断为“胃印戒细胞癌并直肠多发转移”、1例“胃息肉”、1例“浅表性胃炎”,其余2例正常。结论 SARS患者血清特异性IgM、IgG、N蛋白抗体在恢复期呈下降趋势,7年后大部分消失;N蛋白抗体变化规律与病情轻重程度有关。

【关键词】 冠状病毒,严重急性呼吸综合征; N蛋白; 单克隆抗体; 免疫组织化学

Study on the changing regularity of special antibody and expression of stomach and enteric involvement on SARS-coronavirus infection in the recovery period of severe acute respiratory syndrome SHI Yu-ling¹, LI Lin-hai¹, SUN Zhao-hui¹, CHEN Jian-yun¹, LIAO Yang¹, ZENG Lan-lan¹, ZHANG Wei², CHEN Xiao-dong², CAO Cheng³. 1 Clinic Laboratory, 2 Pathologists, General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China; 3 Biotechnology Institute, Academy of Military Medical Sciences

Corresponding author: SHI Yu-ling, Email: shiyuling6@sina.com

This work was supported by a grant from the Guangdong Province Technical Project (FD03-03) (No. 2007AA022200).

【Abstract】 Objective To study the change of special antibodies titer IgG, IgM and nucleocapsid to SARS coronavirus (CoV) and observing the expression of stomach and enteric involvement on SARS-CoV infection by monoclonal antibody against N protein of SARS-CoV in the 7-year recovery period among family clustering cases of severe acute respiratory syndrome. **Methods** Special antibody titer to SARS-CoV of 14 patients from 5 different families and their 10 kinfolks continuously tested by IFA and antigen-capturing ELISA methods. Samples were taken in the 1st-7th year periods after SARS patients infected by SARS-CoV, being diluted and measured on it titers of three kinds of antibodies. Immunohistochemical staining with monoclonal antibody (mAb) against N protein of SARS-CoV was used to determine the stomach and enteric tissues among 5 SARS patients with their nucleocapsid antibody titer ascended obviously after 1st-7th year. **Results** When testing the IgG antibody titer of the 14 SARS patients by IFA method, the average titer was 1/71(95%CI: 1/58-1/85) in the 1st year, but began to descend in the following years, and the IgG antibody of the most

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.07.017

基金项目:广东省科技资助项目(FD03-03)(2007AA022200)

作者单位:510010 广州军区广州总医院检验科(石玉玲、李林海、孙朝晖、陈建芸、廖扬、曾兰兰),病理科(张伟、陈晓东);军事医学科学院生物工程研究所(曹诚)

通信作者:石玉玲,Email:shiyuling6@sina.com

SARS patients disappeared in the 7th year. Regarding the IgM titer, it disappeared in most of the SARS patients 1 year later. The average value of nucleocapsid antibody titer was 1/146 (95% CI: 1/122-1/171) in the 1st year, and it descended as the IgG antibody titer did. In 5 cases, differences appeared. The nucleocapsid antibody titer was between 1/156 and 1/210 in 3 cases, and 2 cases were normal. Immunochemical staining with mAb against N protein of SARS-CoV was identified in the stomach and enteric tissues of 5 SARS patients with the nucleocapsid antibody titer increased significantly, 1st-7th year later. The five patients were detected by gastroscopy detection and cell immunohistochemistry test. 3 cases showed N protein antibody positive in the serum, and positive immunohistochemical expression in most of the cytoplasm in the gastric tissue mucous gland epithelial cells. 1 case also expressed in the intestinal tissue slurry columnar epithelium and interstitial cells. The other two cases showed negative on both serum N protein antibody and immunohistochemical expression. The biopsy results of the 5 patients were as follows: 1 case diagnosed as "signet-ring cell carcinoma of the stomach and rectum multiple transfer", 1 case of gastric polyp, 1 case of superficial antral gastritis and 2 cases were normal. **Conclusion** By testing the special IgG, IgM, nucleocapsid antibody to SARS-CoV of the 14 family clustering cases, we found that they all decreased in the 7th year, and most of them disappeared. The nucleocapsid antibody titer was related to pathogenetic condition. SARS-CoV was proved to be still present in stomach and enteric tissues of SARS patients with the nucleocapsid antibody titer increased significantly after the 7th year.

【Key words】 SARS-coronavirus; N protein; Monoclonal antibody; Immunochemical staining

严重急性呼吸综合征(SARS)作为一种新出现的跨地区、跨国界传播的病毒性疾病^[1,2],其发病原理及传染途径仍需深入研究。为进一步了解 SARS 感染的流行病学特点及探讨其传染途径和发病机制,本研究对 14 例 SARS 家庭聚集性患者血清特异性抗体进行连续 7 年的观察,对随访期间 N 蛋白抗体一直处于高水平的 5 例恢复期患者进行重点追踪,用胃肠镜检查观察患者胃肠道的病理改变并进行免疫组化研究。

对象与方法

1. 研究对象:2003 年 2 月 15 日至 2009 年 9 月 26 日在广州市对出现 2 例及以上 SARS 病例家庭,共收集 14 例病例(不含死亡 4 例),涉及 5 户家庭,其中发生 2 例病例的有 3 户,发生 5 例病例的 1 户,发生 7 例病例的 1 户。潜伏期 3~10 d。男性患者 8 例、女性患者 6 例,年龄 22~73 岁,平均年龄 45 岁。以上临床确诊病例均有明确的 SARS 病例接触史,其中 3 例因其他疾病在医院住院,另 11 例是到医院探望和照顾患者。14 例 SARS 恢复期患者 7 年后肺部体检均正常。

2. 病历资料:

[病例 A] 男性 47 岁,于 2003 年 2 月 17 日发热、咳嗽,19 日症状加重入住广州军区广州总医院,20 日出现腹泻,入院诊断为“非典型性肺炎”,70 d 后治愈出院;该病例又于 2009 年 6 月 13 日以腹泻原因待查入院,检查有慢性肠炎、肺间质纤维化等病史,16 日在消化内科行电子胃、十二指肠及结肠镜检查,结合胃肠镜病理活检结果,确诊为“胃印戒细胞

癌(Borrmann' IV型)并腹腔、直肠、乙状结肠多发转移”;8月16日抗N蛋白抗体检测阳性,抗体滴度为1/201,SARS-CoV N蛋白免疫组化在胃底黏液腺上皮细胞、直肠浆液柱状上皮细胞、间质细胞呈阳性表达,癌细胞未着色。

[病例 B] 女性 58 岁,于 2003 年 3 月 9 日因“发热伴腹泻”入广州市第八医院,诊断为“非典型性肺炎”,X 线片显示“肺部感染”,33 d 治愈出院,但出现左侧股骨头坏死;2009 年 9 月抗 N 蛋白抗体检测阳性滴度为 1/160,胃镜病理检查“胃体黏膜显慢性炎症,腺体呈息肉样增生”。SARS-CoV N 蛋白免疫组化在胃黏液腺上皮细胞呈阳性表达。

[病例 C] 男性 36 岁,2003 年 2 月 20 日因“发热”入广州军区广州总医院治疗,诊断为“非典型性肺炎”,16 d 治愈出院;2009 年 8 月检测抗体滴度 1/110,胃镜病理检查“浅表性胃炎”,SARS-CoV N 蛋白免疫组化在胃黏液腺上皮细胞呈阳性表达。

另 2 例 SARS 恢复期患者 2009 年 9 月检测抗 N 蛋白抗体恢复正常为 1/20,胃镜病理检查未见异常,SARS-CoV N 蛋白免疫组化试验为阴性。

3. 检测方法:

(1)标本采集:14 例 SARS 家庭聚集性感染者血清来自广州地区 5 户家庭的长期追踪,1 年后恢复期每年采集血样 1~2 次,连续监测 7 年。5 例 7 年后 N 蛋白抗体检测阳性的 SARS 恢复期患者于追踪第 7 年行胃肠镜取活检组织做 SARS-CoV N 蛋白免疫组化试验。同时设置空白对照(加 PBS 代替一抗)和阴性对照(正常人胃、肠组织切片及普通胃癌、肠癌患者病理切片)。

(2) SARS 特异性 IgG、IgM 抗体检测: 采用间接免疫荧光法 (IFA), 试剂盒由军事医学科学院微生物流行病学研究所提供^[2], 批号: 20030006。将患者血清 56 °C 30 min 灭活, 分别做 1:10、20、40、80、160、320、640、1280、2560 倍比稀释, 稀释后取 20 μ l 分别滴在抗原片不同孔内, 每张抗原片同时设阳性和阴性对照。同时检测 10 份未发病者血清、20 份健康体检者血清、10 份非 SARS 患者血清作为对照组。将抗原片置于 37 °C 120 min 结合, 然后加入抗人免疫球蛋白 IgM 或 IgG 荧光抗体, 进行染色并在荧光显微镜下观察荧光图像及强度, 根据染色形态和荧光强度进行结果判定, 抗体强度 + ~ 卅为阳性, 抗体强度 - ~ 土计为阴性。以最高抗体滴度的阳性结果值为计算值。

(3) N 蛋白抗体滴度检测: 采用双抗原夹心 ELISA 方法, 试剂盒由华美生物工程公司和军事医学科学院生物工程研究所共同研制^[3]。将患者血清分别按上述倍比稀释, 稀释后取 50 μ l 加入包被有 SARS-CoV N 蛋白的酶联孔中, 37 °C 孵育 30 min, 洗板 5 次后, 加入酶标抗原 100 μ l, 37 °C 孵育 30 min, 洗板上同。用 TMB 显色加入终止液后 450 nm 波长测定吸光度 (A) 值, 阴性、阳性和被检样品的 A 值即为计算值, 临界值 (cut off 值) = 0.10 + 0.5 \times 阴性对照均值。被检样品的 A 值大于临界值判为 SARS-CoV N 抗体阳性反应, 小于临界值判为阴性反应。每份标本重复测定 2 次, 其结果均一致。同时检测 10 份患者亲属血清, 并取健康体检者血清 20 份、非 SARS 患者血清 10 份作为对照组。

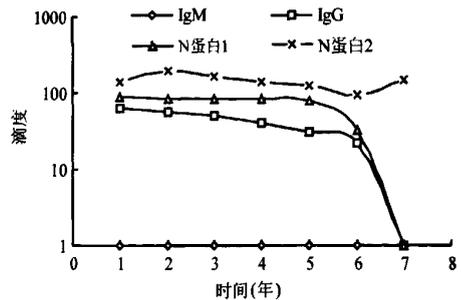
(4) SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体免疫组织化学染色: 抗 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体由军事医学科学院生物工程研究所提供^[4], SARS 恢复期患者及对照组病例石蜡切片由广州军区广州总医院病理科制备; 快捷免疫组化 MaxVision™ 试剂盒 (鼠/兔) 购自福州迈新生物技术开发有限公司; 其他用化学试剂为国产或进口分析纯。采用二步法免疫组化检测: 枸橼酸盐缓冲液抗原热修复, N 蛋白单克隆抗体 (1:100) 4 °C 过夜, 即用型 MaxVision™ 试剂 37 °C 15 min, DAB 显色, 期间每步均用 PBS 洗脱 3 \times 3 min, 其他步骤按常规操作。加 PBS 代替一抗为空白对照, 正常胃、肠组织和非 SARS 病例胃癌、肠癌组织切片为阴性对照。染色评价标准: 无着色者 (-), 阳性细胞数 < 25% 为 (+), 阳性细胞数 \geq 25% 为 (++) , 阳性细胞数 \geq 50% 为 (+++)。

4. 统计学分析: 统计学分析采用 SPSS 11.0 软

件, 抗体滴度的曲线图采用几何均数表示。

结 果

1. SARS 特异性抗体 IFA 检测: 14 例 SARS 患者 1 年后特异性抗体 IgG 平均滴度为 1/71 (95% CI: 1/58 ~ 1/85), IgM 基本消失。同时分别检测 10 例未发病家属成员、10 例非 SARS 住院患者、20 例健康体检者血清, 其特异性 IgG、IgM 抗体全部为阴性。应用 IFA 法连续 7 年检测 14 例 SARS 患者血清特异性 IgM、IgG 抗体消失 (图 1)。



注: N 蛋白 1 显示 9 例患者滴度, N 蛋白 2 显示 5 例患者滴度

图 1 14 例 SARS 患者 1 ~ 7 年特异性 IgM、IgG、N 蛋白抗体滴度变化

2. SARS-CoV N 蛋白抗体检测: 14 例 SARS 患者 1 年后 N 蛋白抗体平均滴度为 1/146 (95% CI: 1/122 ~ 1/171), 与 IgG 抗体变化同时呈下降趋势。但其中 5 例临床症状较重的患者, 连续追踪 7 年 N 蛋白抗体仍检测阳性, 有 3 例患者 N 蛋白抗体滴度维持在 1/156 ~ 1/210 之间, 2 例患者 N 蛋白抗体滴度接近正常。检测 10 例未发病家属、10 例非 SARS 住院患者、20 例健康体检者特异性抗 N 蛋白抗体全部为阴性 (A 值 0.03 ~ 0.07)。SARS-CoV N 蛋白抗体变化规律见图 1。

3. 胃肠组织病理及免疫组化:

[病例 A] 胃组织 HE 染色镜检可见胃黏液腺上皮细胞、异型癌细胞、退变坏死细胞; 慢性炎细胞改变; 胃组织 SARS-CoV N 单克隆抗体试验显示: 胃黏液腺上皮细胞呈阳性表达, 上皮细胞着色为黄褐色以胞浆着色为主 (图 2A); 同一组织中可观察到单核细胞、淋巴细胞、巨噬细胞呈强阳性表达, 胞浆及部分胞核均着色呈聚集分布, 癌细胞未见着色 (图 2B); 肠组织 HE 染色镜检可见癌细胞、肠黏液腺上皮细胞; 免疫组化试验显示肠黏液腺上皮细胞呈阳性表达, 胞浆明显着色呈棕黄色, 癌细胞未见着色 (图 2C)。

[病例 B] 胃组织 HE 染色镜检可见胃黏液腺

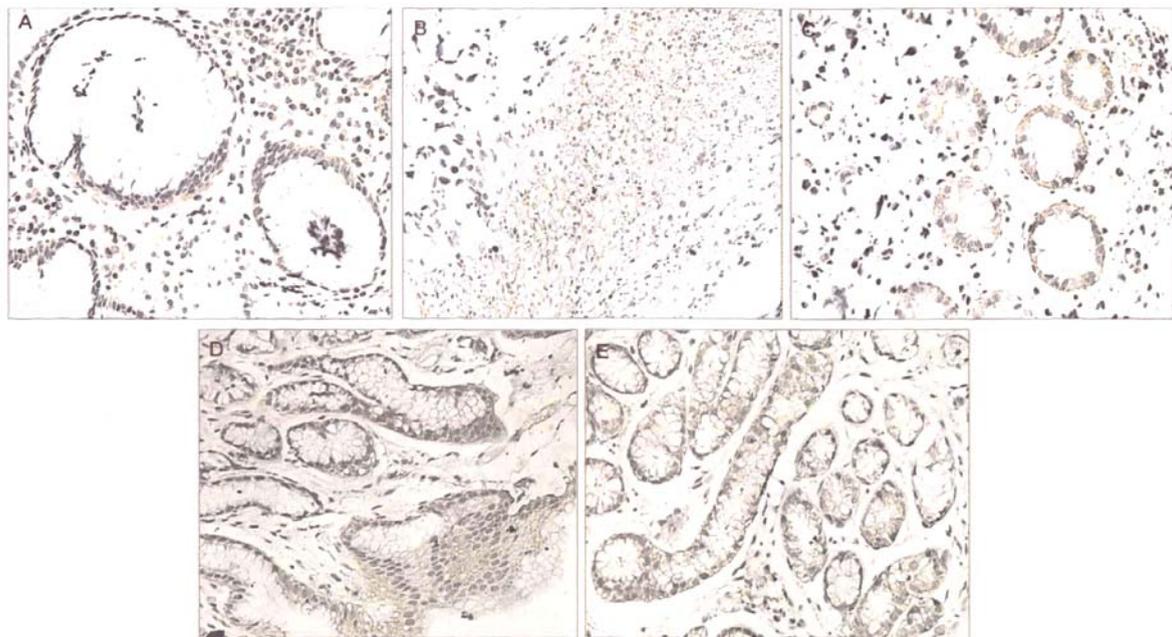


图2 3例SARS恢复期患者胃肠组织病理和免疫组化染色(HE, 200×)

上皮细胞增生;胃组织SARS-CoV N单克隆抗体试验显示:胃黏液腺上皮细胞呈强阳性表达,上皮细胞着色为黄褐色以胞浆着色为主(图2D)。

[病例C] 胃组织HE染色镜检可见胃黏液腺上皮细胞及柱状上皮细胞,未见特征性病理学改变;胃组织SARS-CoV N单克隆抗体试验显示:胃黏液腺上皮细胞及柱状上皮细胞呈强阳性表达,着色为黄褐色以胞浆着色为主(图2E)。

另外2例SARS恢复期患者胃组织HE染色镜检正常,胃组织SARS-CoV N单克隆抗体试验显示均为阴性。空白对照和非SARS胃癌患者、非SARS肠癌患者SARS-CoV N单克隆抗体试验显示均为阴性。

讨 论

2003年2月至2009年9月对SARS感染病例进行追踪调查,聚集性病例是SARS流行的一个共同特点^[5,6]。本研究中14例属于家庭聚集性病例,涉及5户家庭和3所医院。流行病学接触史是SARS诊断的重要依据,14例有明确病例接触史,其中9例有腹泻症状。14例患者发病前1~2周有医院暴露史和家庭接触史,提示医院暴露史及家庭接触史可能是聚集性病例发生的高危因素。

血清学调查结果显示,IFA和双抗原夹心法检测14例SARS患者血清中3种特异性抗体,IgM类抗体120 d左右全部消失,IgG类抗体和N蛋白抗体360 d仍维持在一定水平,呈缓慢下降趋势。在疾病

发展过程中,IgG类抗体滴度始终高于IgM类抗体滴度。从特异性抗体产生的时间看,IgM类抗体几乎与IgG类抗体同时出现,而N蛋白抗体出现时间最早^[7]。可能与在SARS感染过程中机体免疫功能状态及免疫细胞对抗原的免疫反应强度有关^[8]。免疫功能损伤可能是造成IgM特异性抗体产生迟缓的主要原因。部分SARS重症患者恢复后期血清N蛋白抗体突然升高,提示重症患者N蛋白抗体高峰延迟出现。本研究显示,N蛋白抗体在SARS患者体内可长期存在(7年以上)。

本研究对其恢复后期血清N蛋白抗体突然升高的5例SARS患者,进行连续7年追踪研究。发现其中3例患者血清N蛋白抗体持续阳性,另2例患者于2009年N蛋白抗体转阴。对该5例患者进行胃肠镜检查,取5例胃组织和1例肠组织进行活检,进行SARS-CoV N单克隆抗体免疫组化研究。3例恢复期患者血清N蛋白抗体持续阳性(1/156~1/210),免疫组化研究显示胃黏液腺上皮细胞、单核细胞、淋巴细胞、巨噬细胞对SARS-CoV N单克隆抗体免疫组化呈阳性表达,胞浆及部分胞核均着色,肠组织中肠黏液腺上皮细胞、浆液柱状上皮细胞、间质细胞呈阳性表达,主要为胞浆着色,提示胃肠道上皮细胞可能是SARS-CoV的定植细胞,而癌细胞未见着色。与早期报道的SARS病例尸检组织表达结果一致^[9]。2例血清中N蛋白抗体转阴的患者,胃组织SARS-CoV N单克隆抗体检测结果均为阴性。对该

3例血中N蛋白抗体持续阳性、胃肠组织SARS-CoV N单克隆抗体检测结果呈阳性的SARS恢复期患者进行病例分析,发现[病例A]诊断为“胃印戒细胞癌(Borrmann' IV型)并腹腔、直肠、乙状结肠多发转移”,[病例B]诊断为“胃体黏膜显慢性炎症,腺体呈息肉样增生”,[病例C]诊断为“浅表性胃炎”。3例都有不同程度的胃组织损伤,且[病例A]一直存在腹泻症状,这与Leung等^[10]研究的早期SARS患者约20.3%伴有消化道症状及水样腹泻(大部分呈自限性)一致。在SARS-CoV感染7年之后血中N蛋白抗体持续阳性、胃肠道组织黏液腺上皮细胞胞浆内SARS-CoV N蛋白单克隆抗体均呈阳性表达,预示胃及肠道组织很可能依然存在SARS-CoV隐性感染。

SARS-CoV的基因组为单股正链RNA,全长约30 kb,有S、E、M、N等结构蛋白。其中N蛋白是病毒的重要结构蛋白,包含有422个氨基酸的强碱性蛋白,参与病毒的包装过程与病毒RNA结合并与M蛋白相互作用使病毒RNA和N蛋白复合体被包裹进病毒核衣壳中,有提供核信号、参与病毒核心的形成、病毒基因组的复制、转录、翻译,并干扰细胞的正常生长过程^[11]。本研究以N蛋白为研究重点,应用免疫组化技术检测SARS恢复期患者胃肠道组织的SARS-CoV N蛋白。在血清N蛋白抗体持续阳性7年患者的胃及肠道组织黏液腺上皮细胞胞浆内,发现SARS-CoV N蛋白单克隆抗体均为阳性,同时在胃组织中观察到聚集成片的淋巴、单核巨噬细胞内SARS-CoV N蛋白呈强阳性表达,提示SARS-CoV可能与淋巴、单核巨噬细胞表面受体结合,从而诱导淋巴、单核巨噬细胞趋化,对SARS-CoV进行有效清除。值得注意的是,在较长的时间内,潜伏的SARS-CoV没有再次引起SARS感染,也未在人群中传播,这是否因为SARS-CoV在潜伏期毒力减弱,或者是因为淋巴、单核巨噬细胞趋化使胃肠道存在的病毒得以杀灭,还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Wang Y, Yan JW, Shi YL, et al. Lack of association between polymorphisms of MASP2 and susceptibility to SARS

coronavirus infection. *BMC Infect Dis*, 2009, 9(51): 1-10.

- [2] Riley S, Fraser C, Donnelly CA, et al. Transmission dynamics of the etiological agent of SARS in Hong Kong: impact of public health interventions. *Science*, 2003, 300(5627): 1961-1966.
- [3] Si BY, Yang BA, Yu M, et al. Development of IFA method for detecting antibodies of SARS coronavirus. *Med J Chin PLA*, 2003, 28(8): 699-700. (in Chinese)
- 司炳银, 杨保安, 于曼, 等. SARS病毒抗体间接免疫荧光检测方法的建立. *解放军医学杂志*, 2003, 28(8): 699-700.
- [4] Yi YP, Li CF, Shi YL, et al. Over-expression in *Escherichia coli* and purification of nucleocapsid and membrane protein of SARS coronavirus. *Chin J Biotechnol*, 2003, 19(4): 392-396. (in Chinese)
- 易艳萍, 李楚芳, 石玉玲, 等. SARS病毒核衣壳蛋白、膜蛋白在大肠杆菌中的高效表达和纯化. *生物工程学报*, 2003, 19(4): 392-396.
- [5] Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS — associated coronavirus. *Science*, 2003, 300(5624): 1399-1404.
- [6] Shi YL, Yi YP, Li P, et al. Diagnosis of severe acute respiratory syndrome (SARS) by detection of SARS coronavirus nucleocapsid antibodies in an antigen-capturing enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(12): 5781-5782.
- [7] Liu X, Shi YL, Li P, et al. Profile of antibodies to the nucleocapsid protein of the severe acute respiratory syndrome (SARS) — associated coronavirus in probable SARS patients. *Clin Diag Lab Immunol*, 2004, 11(1): 227-228.
- [8] Chang MS, Lu YT, Ho ST, et al. Antibody detection of SARS-CoV spike and nucleocapsid protein. *Bioch Biophys Res Comm*, 2004, 314(4): 931-936.
- [9] He L, Ding YQ, Che XY, et al. Expression of the monoclonal antibody against nucleocapsid antigen of SARS-associated coronavirus in autopsy tissues from SARS patients. *Journal of First Military Medical University*, 2003, 23(11): 1128-1130. (in Chinese)
- 贺莉, 丁彦青, 车小燕, 等. SARS冠状病毒N蛋白单克隆抗体在SARS尸检组织中的表达. *第一军医大学学报*, 2003, 23(11): 1128-1130.
- [10] Leung WK, To KF, Chan Paul KS, et al. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology*, 2003, 125(4): 1011-1017.
- [11] He R, Leeson A, Anton A, et al. Activation of AP-1 signal transduction pathway by SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Bioch Biophys Res Comm*, 2003, 311(4): 870-876.

(收稿日期: 2009-12-14)

(本文编辑: 张林东)