

检测EB病毒早期抗原的IgA和IgG抗体 (EA-IgA和EA-IgG)免疫酶法的建立及其初步临床应用

湖南省肿瘤医院免疫室 陈秋坡 杜娟 刘新义 袁庆辉

内容提要: 本文介绍我室所建立的EA-IgA和EA-IgG免疫酶检测法,应用此法检测NPC病人血清204份,正常人血清50份,结果治疗前NPC病人血清EA-IgA的阳性率和GMT为75.8%和1:32.73,EA-IgG为87.4%和1:60.63,均显著地高于对照组病人和正常人,其特异性优于VCA-IgA,EA-IgA更好。EA-IgA和EA-IgG抗体滴度随着NPC病程的进展而上升,放疗后抗体滴度下降。与免疫荧光法比较,免疫酶法敏感性高,方法简便,值得推广。

近年来血清EB病毒壳抗原IgA抗体(VCA-IgA)免疫酶法测定已在我国普遍推广,对鼻咽癌的血清学诊断及血清学普查起了重要作用。EB病毒早期抗原(EA)的抗体对鼻咽癌的特异性并不亚于VCA-IgA。Henle等^(1,2)用间接免疫荧光技术检测鼻咽癌患者血清EA抗体,EA-IgG阳性率为80%,EA-IgA为73%,并且与疾病的临床分期及放疗后的预后显著关系。国内1976年就引进了EA-IgG测定法⁽³⁾,1978年又引进了EA-IgA测定法⁽⁴⁾,但其推广的速度远远不及VCA-IgA。究其原因,主要是因为EA抗体测定需要激活靶细胞,方法较为繁复,而且免疫荧光法需要昂贵的荧光显微镜。近两年来国内少数实验室开始摸索建立EA抗体免疫酶测定法,并已开始应用于鼻咽癌普查⁽⁵⁾。本文介绍我室建立的EA-IgA和EA-IgG免疫酶测定技术及其初步临床应用。

材料和方法

血清:放疗前NPC血清190份,放疗后NPC血清14份,恶性淋巴瘤血清32份,头颈部其它恶性肿瘤血清51份,其它部位恶性肿瘤血清27份,正常人血清50份,共364份。血清分离后-20℃保存。

EA抗体测定:靶细胞用Raji细胞,培养于含20%小牛血清和青链霉素各100μ/ml的RPMI1640培养液中。取生长旺盛,活细胞数在90%以上的培养物,调整细胞密度至 0.5×10^6 /ml。24小时后弃一半上清液,加新鲜培养液至原体积量,加IUDR(上海十二

药厂产品,批号80—03—18)和PHA(广州医工所产品,批号820622),使其最终浓度分别为25μg/ml和15μg/ml,黑纸包裹避光置37℃培养72小时后收获细胞,计数活细胞数,如活细胞>80%即可制成靶细胞片。室温凉干后,冷丙酮(4℃)固定10分钟,冷风吹干,-20℃干燥保存。第二抗体用羊抗人IgG(测EA-IgG)或羊抗人IgA(测EA-IgA),用过碘酸氧化法标记辣根过氧化物酶。试验时,将待测血清从1:2.5开始倍比稀释滴加于靶细胞片上,置37℃湿盒温育30分钟。用0.01M PH7.2 PBS洗三次,每次5分钟,再加酶标抗人IgG或抗人IgA抗体(1:10稀释),37℃温育30分钟, PBS洗三次,然后用含二氨基联苯胺(0.05%)和过氧化氢(0.01%)的Tris-HCl缓冲液(pH7.6)室温避光显色10分钟,显微镜检,凡细胞浆及细胞核中出现棕黄色颗粒的细胞即为EA阳性细胞(见附图1,2)。VCA-IgA免疫酶法测定:按刘育希等⁽⁶⁾。

结果和讨论

一、NPC和各对照组血清EA-IgA和EA-IgG免疫酶法测定结果(表一)

由上表可见,NPC放疗前病人血清EA抗体的几何平均滴度(GMT)EA-IgA为1:32.73,EA-IgG为1:60.63,远远高于对照组病人和正常人,差别非常显著。根据各组EA抗体水平,我们将EA-IgA和EA-IgG的阳性滴度标准均定为1:10。按此标准计算,NPC组EA-IgA的阳性率为75.8%,EA-IgG为87.4%,而恶性淋巴瘤,头颈部

表一

EA-IgA和EA-IgG抗体滴度

组别	例数	检测项目	血清抗体滴度												≥1:5	≥1:10	GMT
			<1:2.5	1:2.5	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	%	%	
放疗前鼻咽癌	190	EA-IgA	12	9	25	12	30	36	18	14	20	8	4	2	89	75.8	32.73
		EA-IgG	8	3	13	18	25	28	19	24	25	14	10	3	94.2	87.4	60.63
恶性淋巴瘤	32	EA-IgA	27	0	1	1	0	0	1	0	2	0	0	0	15.6	12.5	2.24
		EA-IgG	23	0	2	2	0	2	0	2	0	1	0	0	28.1	21.9	3.51
头颈部癌瘤	51	EA-IgA	38	9	1	0	1	2	0	0					7.8	5.9	1.56
		EA-IgG	36	10	1	0	1	3	0	0					9.8	7.8	1.78
其它部位癌	27	EA-IgA	23	4	0	0	0								0	0	1.25
		EA-IgG	22	0	4	1	0								18.5	3.7	1.37
正常人	50	EA-IgA	50	0	0										0	0	1.25
		EA-IgG	50	0	0										0	0	1.25

其它恶性肿瘤，其它部位恶性肿瘤和正常人，EA-IgA阳性率分别为12.5%，5.9%，0%和0%；EA-IgG阳性率分别为21.9%，7.8%，3.7%和0%。NPC组也远远高于其它各组。上述结果说明EA-IgA和EA-IgG免疫酶法测定对NPC有较高的特异性，可用于NPC的协助诊断。

二、EA抗体测定与VCA-IgA免疫酶法测定结果比较（表二）

表二 EA抗体与VCA-IgA抗体滴度比较

组别	例数	EA-IgA		EA-IgG		VCA-IgA	
		阳性率	GMT	阳性率	GMT	阳性率	GMT
放疗前鼻咽癌	190	75.8	32.73	87.4	60.63	94.2	42.87
恶性淋巴瘤	32	12.5	2.24	21.9	3.51	28.1	3.24
头颈部癌瘤	51	5.9	1.56	7.8	1.78	31.37	4.02
其它部位癌	27	0	1.25	3.7	1.37	22.2	2.44
正常人	50	0	1.25	0	1.25	0	1.25

表二显示，NPC组VCA-IgA的阳性率虽然高于EA-IgA和EA-IgG，但对照组病人VCA-IgA的阳性率也较高。据吴洁如等报告，头颈部其它癌VCA-IgA30.3%阳性⁽⁷⁾。上海五官科医院和瑞金医院的资料认为，头颈部其它癌VCA-IgA阳性率达41%，肺癌达28%⁽⁸⁾。因此VCA-IgA对NPC的特异性是相对的。本文资料显示，EA抗体特别是EA-IgA对NPC的特异性优于VCA-IgA。建议今后大力推广EA-IgA和EA-IgG免疫酶测定法，使之与VCA-IgA

测定互相补充，相得益彰，以提高NPC血清学诊断的可靠性。

三、EA抗体滴度与NPC临床分期的关系

表三 EA抗体与NPC临床分期的关系

期别	例数	EA-IgA		EA-IgG		VCA-IgA	
		阳性率	GMT	阳性率	GMT	阳性率	GMT
I期	6	50	8.91	100	20	83	22.45
II期	20	55	16.24	85	44.38	90.5	32.49
III期	147	78	34.56	86.4	59.72	94.6	43.95
IV期	17	82.3	73.74	94.1	147.47	100	60.13
合计	190	75.8	32.73	87.4	60.63	94.2	42.87

本组病例除Ⅲ期外，其它各期例数较少，特别是I期，只有6例。EA-IgA和EA-IgG的阳性率除I期外，有逐步上升趋势。GMT则由I期→Ⅳ期逐步上升，趋势十分明显，经统计学分析，EA-IgAⅡ期与Ⅲ期有显著差异（P<0.05），EA-IgGⅢ期与Ⅳ期有显著差异（P<0.05）。说明EA抗体滴度随着肿瘤负荷的增加而上升，与Henle氏看法一致⁽¹⁾而与曾毅等的结果⁽⁹⁾不同。

VCA-IgA抗体无论是阳性率或GMT均与NPC的临床期别有明显关系，变化趋势与EA相同。

四、NPC放疗前与放疗后EA抗体滴度的变化

本组资料有14例NPC放疗后病人，其血清EA-IgA的阳性率和GMT为64.2%和1:21.02，EA-IgG的阳性率和GMT为57.1%和1:15.61，与放疗前相比均有降低。但统计学分析，只有EA-IgG差异有显著性，而EA-

表四 NPC病人EA抗体免疫酶法测定与免疫荧光法对比

实 验 室	例 数	EA-IgG			EA-IgA		
		阳性标准	阳 性 率	GMT	阳性标准	阳 性 率	GMT
姚曾序 ⁽³⁾ (1976)	90	$\geq 1:10$	84.4	1:40.6	—	—	—
吴学愚 ⁽¹¹⁾ (1978)	291	$\geq 1:10$	79	1:38.29	—	—	—
曾 毅 ⁽⁹⁾ (1978)	76	$\geq 1:2.5$	96.05	1:22.72	$\geq 1:2.5$	48.6	1:2.3
李新章 ⁽¹⁰⁾ (1980)	500	$\geq 1:1$	94.2	1:21.1	—	—	—
本 室 (本文)	190	$\geq 1:10$	87.4	1:60.63	$\geq 1:10$	75.8	1:32.73

IgA无论阳性率或GMT，差异均不显著。

五、EA抗体免疫酶法与免疫荧光法检测结果比较

为了考核EA-IgA和EA-IgG免疫酶法测定的效果，我们将本文的结果与国内几个实验室用免疫荧光法测定的结果列表对比如表四。

上表显示，我们用免疫酶法测定EA-IgG，其GMT明显地高于国内四个实验室。虽然从表面上看，我们的阳性率较曾、李二氏的数字低，但这主要与所订的阳性滴度标准高低有关。如果我们也把EA-IgG的阳性滴度标准订为1:2.5，则其阳性率将不是87.4%，而是95.79%，与曾、李报告相仿。至于EA-IgA，我们与曾毅等的报告相差更为悬殊。十分明显，两种EA抗体免疫酶法测定远比免疫荧光法敏感。

上述结果的差异，除了主要决定于两种检测方法敏感性的高低以外，还与所用的靶细胞，特别是靶细胞的激活方法不同有关。我们所用的靶细胞是Raji细胞，激活方法采用Lenoir氏法⁽¹²⁾，即用IUDR25 μ g/ml加PHA15 μ g/ml。此法简单易行，激活72小时后，EA阳性细胞数可达11%—15%，活

细胞数保持在80%以上，用于EA抗体检测，效果良好。

主要参考文献

1. Henle W, et al; J, Nat, Cancer Inst. 51:361, 1973
2. Henle G and Henle W; Cancer 17:10, 1976
3. 姚曾序等：鼻咽癌病人血清两种抗EB病毒抗体的检测 肿瘤防治研究 4:49, 1976
4. 中国医学科学院肿瘤医院病毒室等：鼻咽癌病人的EB病毒免疫球蛋白G和A (IgG和IgA) 抗体的测定 肿瘤防治研究 1:30, 1978
5. 曾毅等：广西梧州市居民的鼻咽癌血清学普查 癌症 1:6, 1982
6. 刘育希等：应用免疫酶法测定鼻咽癌病人的IgA抗体 中华肿瘤杂志 1:8, 1979
7. 吴洁如等：应用免疫酶法检测鼻咽癌病人血清中的免疫球蛋白A抗体 湖南医学院学报 6(2):128, 1981
8. 转引自容秉培等：用免疫酶法检测血清中EB病毒(VCA-IgA)抗体诊断鼻咽癌 上海免疫学杂志 2(5):272, 1982
9. 中国医学科学院肿瘤医院病毒室：鼻咽癌病人的EB病毒免疫球蛋白G和A (IgG和IgA) 肿瘤防治研究 1(1):30, 1978
10. 李新章等：鼻咽癌患者血清中EB病毒早期抗原(EA)的抗体检测试验 中华耳鼻咽喉科杂志 15(2):71, 1980
11. 吴学愚等：鼻咽癌免疫血清学诊断的临床应用，附1015份血清早期抗原的抗体检测分析 上海医学 1(3):138, 1978
12. Lenoir G et al; J, Immunol, Meth 34:23, 1980

(上接第96页)

讨 论

浆细胞肉芽肿在临床上形成肿块，在显微镜下以大量浆细胞浸润为主，是一组独立性疾病，多认为是机体对各种病原的非特异性炎反应，可划为炎性假瘤的一种亚型，而不应视为一般的慢性炎症。它与浆细胞瘤亦为性质不同的两类病变，后者为真性肿瘤。典型病例二者鉴别并不困难⁽⁴⁾，浆细胞肉芽肿之基本结构为肉芽组织，而浆细胞瘤之基本结构是单一的不同分化程度的恶性肿瘤。近年来有用超微结构的特点区别二种不同的

浆细胞及应用免疫组织化学技术区别此二种疾病的报导^(1,2)。因胃浆细胞肉芽肿少见，故无论是术前临床诊断或是术后病理检查，均应想到本病之可能。(本文图见封三)

参 考 文 献

1. Soga J et al, plasma cell granuloma of the stomach, cancer, 25:618, 1970.
2. Issacson, p et al; plasma cell granuloma of the stomach. Human path 9:355, 1978.
3. 陶乃文等，胃浆细胞肉芽肿一例，中华肿瘤杂志，4:293, 1982
4. 李其云，髓外浆细胞肉瘤(附2例报告)，天津医药肿瘤附刊，9(4):250, 1982.