DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.053

白IgG2α，本实验采用1,3,4,6-四氯3α,6α-二苯苷脲即Iodogen法对其进行碘化标记。Iodogen氧化^{131}I使sc-7269分子发生碘化反应，碘化反应以后用SephadexG-50分离纯化，除去游离碘与其它放射性杂质，收集标记产物蛋白峰洗脱液。碘标记率为27.46%，G-50分离纯化后标记产物的放化纯度>95%。标记产物的比活度为1.02 MBq/μg。我们的实验结果与文献[4]报道基本一致。

抗体的同位素标记技术中最重要的是要保持标记复合物的生物、免疫学活性，否则即使标记工作做得再好也无法将标记抗体应用于下一步的实验或临床领域。在蛋白质、多肽的几种碘化标记法中Iodogen法的标记反应比较温和。本实验结果表明抗-VEGF McAb(sc-7269)经碘化标记以后基本保持了原有的免疫学活性，^{131}I-sc-7269与人膀胱癌T24细胞结合率明显高于人脐静脉血管内皮细胞(59.12% *vs* 7.16%，$P<0.001$)。标记产物在4 ℃保存1周后其免疫学活性无明显改变，其与T24细胞结合率为56.31%，与标记后即时比较差异无显著性($P>0.05$)。

总之，McAb(sc-7269)在Iodogen法碘化标记后能较好地保留其免疫学活性。VEGF在新生血管的形成过程发挥着举足轻重的作用，膀胱癌的发生以及转移过程中都有VEGF诱导的新生血管的形成，针对VEGF阻断新生血管形成来抑制膀胱癌的生长及其转移将成为一种新的研究手段。我们的实验研究结果为将来应用抗-VEGF McAb进行膀胱癌RII的实验和临床研究奠定了基础。提示值得进一步探讨抗-VEGF McAb用于VEGF表达阳性的膀胱癌放射免疫显像(RII)的可行性。

关键词：VEGF；McAb；放射性核素；放射免疫显像
中图法分类号：R817 文献标识码：B

参考文献：

[1] 李忠俊，程绍钧. 人浸润性膀胱癌裸鼠移植瘤模型的建立及其VEGF的表达[J]. 第三军医大学学报，2000,22(11)：1062－1064.
[2] 程绍钧，余裕民. 检验核医学[M]. 重庆：重庆大学出版社，1999.43－62.
[3] Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, *et al*. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess[J]. J Immunol Methods, 1984, 72(1): 77－89.
[4] Lin Y S, Nguyen C, Mendoza J L, *et al*. Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 288(1): 371－378.

（编辑 薛国文）

技术方法

文章编号：1000-5404(2001)07-0866-03

乙肝病毒DNA荧光定量PCR检测及其意义

Detection of HBV DNA with fluorescence quantitative PCR and its clinical significance

曹红卫，卫 国，冯文曦，龚小云，郑 江 （第三军医大学附属西南医院中心实验室，重庆 400038）

提 要：目的 探讨荧光定量PCR法检测的乙肝病毒DNA与乙肝病毒标志物之间的关系。方法 362例血清标本同时进行乙肝病毒标志物和HBV DNA的检测，按照不同的乙肝病毒标志阳性情况分组后，进行乙肝病毒DNA与乙肝病毒标志物的分析研究。结果 乙肝病毒标志物HBsAg HBeAg HBcAb阳性组HBV DNA阳性率97.7%，拷贝数在10^4～10^8之间；HBsAg HBeAb HBcAb阳性组阳性率56%，拷贝数在10^2～10^7之间；HBsAg HBcAb阳性组阳性率54%，拷贝数在10^2～10^7之间；HBsAg HBeAg组阳性率100%，拷贝数在10^7之间；HBeAb HBcAb组3例，有1例阳性，拷贝数10^2；HBsAb组阳性率14.3%，拷贝数在10^3～10^7之间；189例全阴性有2例阳性(1.06%)，拷贝数在10^4～10^5之间。结论 HBV DNA在各种模式的HBV标志阳性血清甚至全阴性的血清中均可检出，但检出率相差甚大，从1.06%～100%；HBV DNA乙肝病毒标志中HBeAg阳性者其HBV DNA阳性率及拷贝数较高；HBsAg及其抗体阳性者仍可检出HBV DNA，说明仅仅依靠乙肝病毒标志进行早期诊断以及判断病人是否具有传染性是不够的。

乙肝病毒血清标志物(HBV-M)检测是目前诊断乙型肝炎最常用的指标，主要反映人体对乙肝病毒(HBV)的免疫反应状态，由于不同血清标志模式反映不同的临床意义，非传染病专业的医师很难准确掌握。因此采用简单快捷的诊断指标对乙肝早期诊断、准确判断乙肝患者的带毒状态具有重要意义。许多研究证明，定量检测HBV DNA是衡量乙肝传染性的最精确的指标，是确定HBV感染不同复制状态的非常有价值的检测手段[1,2]。HBV DNA阳性即反映有完整的病毒颗粒复制即具有传染性[3]。荧光定量PCR(FQ-PCR)克服了常规PCR假阳性的缺点，其对HBV DNA的定量检测，可为乙型肝炎提供准确的病原学诊断，并能为乙型肝炎的抗病毒治疗提供可靠的疗效评估。我室对

作者简介：曹红卫(1970－)，女，湖南省长沙市人，主管技师。电话：(023)68754437
收稿日期：2001-04-18；修回日期：2001-06-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

362 例血清标本同时进行 HBV-M 及 HBV DNA 的定量检测, 通过对二者检测结果之间的关系的比较, 探讨 HBV-M 与 HBV DNA 的检出率及拷贝数之间的关系, 以期为乙肝的诊断和治疗提供实验依据。

1　材料和方法

1.1　材料

2000 年 9 月至 2001 年 3 月第三军医大学西南医院门诊及住院病人血清标本 362 例。乙肝血清标志物 ELISA 试剂盒由上海复兴长征医学科学有限公司提供, 检测仪器为西班牙的"变色龙"酶标仪; FQ-PCR 试剂盒由深圳匹基生物技术公司提供, 检测仪器为 BIO-RAD icycler 荧光定量 PCR 检测仪(美国 BIO-RAD 公司生产)。

1.2　HBV DNA 的荧光定量 PCR 检测

实验设施及操作规程严格按照卫生部颁发的《临床基因扩增(PCR)诊断实验室工作规范》要求进行。按试剂盒操作方法提取 HBV-DNA(碱裂解法), 将标准品及所提 DNA 加入反应液(反应液比普通 PCR 多了一条荧光双标记探针), 置于 icycler 荧光定量仪中扩增、检测。扩增条件: 94 ℃ 1 min 预变性, 然后按 95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s, 共做 42 个循环。灵敏度为 2×10^2 拷贝/ml。

1.3　统计学方法

根据 HBV 血清标志物分 7 组, 将各组的 HBV DNA 拷贝数进行对数变换, 以指数表示($\bar{x}\pm s$), 定量测量范围仍用实际检测值表示; 采用 χ^2 检验进行 1、2、3 组间 HBV-DNA 阳性率显著性检验, 采用几何均数 t 检验比较拷贝数; 其它各组样本量小, 未作统计学分析。

2　结果

362 例血清标本根据 HBV-M 检出结果的不同进行分组, 其 HBV-DNA 检测结果, 见表 1。

表 1　**HBV DNA** 荧光定量 **PCR** 检测结果与乙肝标志物检测结果的关系

HBV 血清学标志物	n	HBV DNA 阳性例数	HBV DNA 阳性率	HBV DNA 拷贝数(以指数表示)	定量测定值范围(拷贝/ml)
1. HBsAg HBeAg HBcAb 阳性组	43	42	97.7	6.17±1.25	1.21×10^4 ~ 1.28×10^8
2. HBsAg HbeAb HBcAb 阳性组	66	37	56 *	4.3±1.42 *	2.9×10^2 ~ 5.95×10^7
3. HBsAg HBcAb 阳性组	37	20	54 *	4.27±1.54 *	2.0×10^2 ~ 9.08×10^7
4. HBsAg HBeAg 阳性组	3	3	100	7.42±0.5	7.4×10^7
5. HbeAb HBcAb 阳性组	3	1	33.3	2.37	
6. HBsAb 阳性组	21	3	14.3	4.78±2.59	
7. 阴性	189	2	1.06	4.89±0.85	

*: $P<0.01$ 与 1 组比较

3　讨论

乙肝病毒血清标志物(HBV-M)检测是诊断乙型肝炎最常用的指标, 目前临床最常用的"两对半"指的是 HBsAg、HBeAg、HBcAb、HBsAb、HBeAb, 主要反映人体对乙肝病毒(HBV)感染的免疫状态, 但不能直接反映 HBV 在患者体内的复制情况, 更不能作为判断患者是否具有传染性的直接证据。由于 HBV 感染者不同时期可有多种不同的血清学标志模式, 对于这些模式的不同临床意义, 非传染病专业医师很难准确掌握。

由于 HBV 是 DNA 病毒, 因此 HBV DNA 的检测是衡量乙肝传染性的最精确的指标, HBV DNA 阳性即反映有完整的病毒颗粒的复制, 是判断患者具有传染性的直接证据。传统的 HBV DNA PCR 检测技术假阳性率高, 不能为临床提供准确的诊断依据, 1997 年被国家明文禁止用于临床诊断。由于荧光定量 PCR 技术具有的高度特异性及高度敏感性, 克服了常规 PCR 的缺点, 已被国家批准应用于临床诊断。

我室对 362 例不同乙肝病毒血清标志物阳性标本同时进行 HBV DNA 荧光定量 PCR 检测, 结果发现 HBV DNA 在各种模式的 HBV 标志物阳性血清甚至全阴性的血清中均可检出, 但检出率相差甚大, 从1.06%~100%, 其中 HBsAg 和 HBeAg 阳性者 HBV DNA 检出率为 100%, 全阴性血清 HBV DNA 检出率为1.06%。

HBsAg、HBeAg、HBcAb 阳性组(1 组, 即大三阳)与 HBsAg HBeAg 阳性组(4 组)HBV DNA 检出率分别高达 97.7%和 100%, HBV DNA 拷贝数也很高, 说明这两种乙肝病毒血清学标志模式阳性者具有很强的传染性。

比较 1 组、2 组(HBsAg HBeAb HBcAb 阳性组)、3 组(HBsAg HBcAb 阳性组)和 4 组(HBsAg HBeAg 阳性组), 可见 HBV-M 中 HBeAg 阳性者其 HBV DNA 拷贝数均高于其它模式, 说明其传染性也高于其它模式; 2 组与 3 组阳性率及 HBV DNA 拷贝数虽然低于 1 组和 4 组, 但仍然提示较强的传染性, 半数以上患者血清中含有较高拷贝的乙肝病毒颗粒。

HBeAb HBcAb 阳性组(5 组)在其它文献中也有报道, 阳性率为 31.7%(20/63)[4], 本研究中这组 HBV DNA 阳性的只检出 1 例, 拷贝数低于其它各组, 说明这两种抗体阳性情况下 HBV DNA 复制能力较低。

一般来说, HBsAb 具有中和 HBV 病毒的能力而被认为是保护性抗体, 但本实验中 23 例 HBsAb 阳性者中仍有 3 例检出 HBV DNA, 这与文献报道的结果相符[5], 说明 HBsAb 阳性者并非完全没有传染性, 因此对 HBsAb 阳性者判断其是否具有传染性仍需通过检测 HBV DNA 来加以分析。

有文献报道大三阳(HBsAg HBeAg HBcAb 阳性)患者 HBV DNA 阳性率为 100%[5,6], 本研究在 43 例大三阳患者中 1 例血清 HBV DNA 检出阴性, 但其肝功能正常, 有可能是乙肝病毒在肝细胞中全基因整合或仅表达各抗原的基因整合, 在肝细胞内仅有抗原的表达而无病毒颗粒的复制, 因此血清中可检测到 HBsAg 和 HBeAg, 但血清中不一定存在乙肝病毒颗粒。

在 HBV-M 全阴性的人群中, 仍有部分处于"窗口"期的患者(其血清中抗原与抗体等量)。本研究在 189 例 HBV-M 全阴性标本中检出 2 例 HBV DNA 阳性, 这 2 例患者同时伴有转氨酶、总胆红素、结合胆红素和或总胆汁酸的增高, 说明对肝功能已有异常的 HBV-M 全阴性的受检者, 进行 HBV DNA 的检测非常必要。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

FQ-PCR 已用于临床许多项目的检测，是临床基因诊断的有力手段。与传统 ELISA 方法比较，FQ-PCR 用于 HBV 的检测，能更及时、特异、灵敏地反映 HBV DNA 在体内的复制状态，对判断病人是否具有传染性及为乙型肝炎的抗病毒治疗提供可靠的疗效评估。

关键词：乙肝病毒标志物；荧光定量 PCR；HBV DNA
中图法分类号：R446.5　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Kessler H H, Preininger S, Stelzl E, *et al*. Identification of different states of hepatitis B virus infection with a quantitative PCR assay[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(2): 298－300.
[2] Chen T, Luk J M, Cheung S T, *et al*. Evaluation of quantitative PCR and branched-chain DNA assay for detection of hepatitis B virus DNA in sera from hepatocellular carcinoma and liver transplant patients[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(5): 1 977－1 980.
[3] 谢志贤，董　莹，艾桂萍，等. 乙肝病毒 DNA 与乙型肝炎表面抗原含量关系的探讨[J]. 陕西医学检验，2000，15(2)：49.
[4] Noborg U, Gusdal A, Horal P, *et al*. Levels of viraemia in subjects with serological markers of past or chronic hepatitis B virus infection[J]. Scand J Infect Dis, 2000, 32(3): 249－252.
[5] 赖宏芳，付晓野，董玉琳，等. 荧光探针定量 PCR 检测 HBV-DNA[J]. 上海医学检验杂志，2000，15(1)：18－19.
[6] 程　钢，何蕴韶，周新宇，等. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒[J]. 中华医学检验杂志，1999，22(3)：13.

（编辑　冷怀明）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)07-0868-01

肾移植手术中输血构成比的变化

Changes of constitution of blood transfusion during kidney transplantation

段慧玲，藤本秀　（第三军医大学附属新桥医院输血科，重庆 400037）

近年随着对输血不良反应认识的深入，普遍意识到输入全血中所含有的人类白细胞抗原(Human leucocyte antigen, HLA)可致敏受血者产生相关抗体，会影响器官移植后的存活率，因而器官移植术中输血观念发生了较大的变化。现将我院近年来肾移植手术过程中输血构成比的变化情况报告如下。

1　临床资料和方法

本院病案室所存 1997 年 1 月至 1999 年 12 月共 113 例肾移植手术的病历，女 38 例，男 75 例，年龄 12～61 岁。回顾性分析了这些患者输注血液制品的数量和种类。统计逐年输注血液制品的各项数据，对计数资料采用 χ^2 检验，对计量资料采用方差分析。

2　结果

1997－1999 年 3 年间肾移植手术患者接受输注全血量逐年下降，接受输注红细胞的患者例数逐年增多（$P<0.01$）。另外，至 1999 年肾移植手术患者平均接受的输血量（包括全血和红细胞）也有明显降低（$P<0.01$），见表 1。

表 1　1997－1999 年 113 例肾移植患者接受输血情况

时间（年）	例数	输血总量（ml）	平均输血量（ml/例）	输红细胞例数百分比(%)	输红细胞量百分比(%)
1997	36	136 550	3 793	8.33	0.88
1998	39	123 850	3 176	38.46 *	12.92
1999	38	79 050	2 080 *	92.11 #	34.66

*：$P<0.01$ 与 1997 比较；#：$P<0.01$ 与 1998 比较

3　讨论

近年普遍认识到全血中的 HLA 是最具有多态性的系统，HLA 共有 7 个系统 100 多个特异型，其表现型至少在 4 亿个以上。输入 HLA 致敏受血者产生的抗体可能影响器官移植后的存活。另有大量证据表明，巨细胞病毒(CMV)感染与器官移植后急、慢性排斥反应密切相关[1,2]，病毒可来自供者器官、输入血液或血液制品中，因输血而导致的 CMV 感染主要与血液中白细胞携带病毒有关[3]。为了预防受血者发生同种免疫反应或感染某些以白细胞为媒介的病毒性疾病，目前主张不用或少用全血，尽可能选择成分输血。

基于上述认识，我院肾移植术中输血构成比发生了显著的变化。1997－1999 年 3 年间肾移植手术患者输注全血量逐年下降，接受输注红细胞的量逐年增多。接受输注红细胞的患者在接受输血患者中的构成比逐年增高，输注红细胞比例逐年增高。另外，至 1999 年肾移植手术患者平均输血量（包括全血和红细胞）有明显降低。为了提高器官移植后的存活率，减少输血相关的不良影响，尚须加强宣传现代输血新观念，进一步减少全血的输注，推广成分输血。

关键词：输血；肾移植
中图法分类号：R457.1；R699.2　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Akposso K, Rondeau E, Haymann J P, *et al*. Long-term prognosis of renal transplantation after per-emptive treatment of cytomegalovirus infection[J]. Transplantation, 1997, 63(7): 974－976.
[2] Grattan M T, Moreno C E, Stames V A, *et al*. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis[J]. JAMA, 1989, 261(24): 3 561－3 566.
[3] 肖星甫. 巨细胞病毒感染[A]. 见：肖星甫　主编. 输血技术手册[M]. 成都：四川科学技术出版社，1992. 380－381.

（编辑　郭建秀）

作者简介：段慧玲(1964－)，女，云南省昆明市人，主管技师，主要从事成分输血的临床应用方面的研究，发表论文 8 篇。电话：(023)68755794

收稿日期：2000-12-18；修回日期：2001-02-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net