

· 基础论著 ·

一种乙型肝炎病毒免疫吸附柱的构建

高庆伟 邹汉法 孔亮 李永新 刘莎 王波 王英兰

【摘要】 目的 构建乙型肝炎病毒免疫吸附柱。**方法** 以琼脂糖凝胶为载体,经活化后键合人抗-HBs-IgG。构建流程为:环氧介质的合成、氨基介质的合成、醛基介质的合成、免疫吸附介质的合成、未反应醛基的封尾、装柱。体外观察其对含 HBV 和 HBsAg 血浆的吸附作用。**结果** 活化琼脂糖凝胶与抗-HBs-IgG 的键合率为 85.07%,患者血浆体外吸附实验结果表明,该免疫吸附柱可吸附、除去离体血浆中 58.97% 的 HBsAg 和 53.1% 的 HBV 颗粒。**结论** 乙型肝炎病毒免疫吸附柱可吸附除去离体血浆中部分 HBsAg 和 HBV 颗粒。

【关键词】 乙型肝炎病毒;琼脂糖凝胶;抗-HBs-IgG;键合;免疫吸附

The experimental study of configuring an immunoadsorption column for hepatitis B virus GAO Qing-wei*, ZOU Han-fa, KONG Liang, LI Yong-xin, LIU Sha, WANG Bo, WANG Ying-lan. *Dalian No. 6 People's Hospital, Dalian 116001, China
Corresponding author: GAO Qing-wei, Email: gao-qingwei@163.com

【Abstract】 Objective To configure an immunoadsorption column for hepatitis B virus. **Methods**

After activated by epichlorohydrin, the human anti-HBs-IgG is bonded to the carrier of agarose gel. The configuration process is as such: the synthesis of epoxide matrix, the synthesis and activation of amino matrix, the synthesis of aldehydic matrix, the synthesis of immunoadsorption matrix, the endcapping and reduction of unbonded aldehydic, the blocking of unbonded mass and filling the column. **Results** The bonded rate of activated agarose gel and anti-HBs-IgG is 85.07%. It is showed by the extracorporeal absorbent experiment of patients' plasma that the immunoabsorption column can absorb and eliminate 58.97% of HBsAg and 53.1% of hepatitis B virus particles in extracorporeal plasma. **Conclusions** The immunoabsorption column for hepatitis B virus can absorb and eliminate of HBsAg and hepatitis B virus particles in extracorporeal plasma.

【Key words】 Hepatitis B virus; Agarose gel; Anti-HBs-IgG; Bonded; Immunoadsorption

基金项目:大连市科学技术委员会资助项目(2001480)

作者单位:116001 大连,大连市第六人民医院(高庆伟、李永新、刘莎、王波、王英兰);中国科学院大连化学物理研究所(邹汉法、孔亮);大连市中心血站(孙万里)

通讯作者:高庆伟 Email: gao-qingwei@163.com

我国是乙型肝炎病毒(HBV)感染的高流行区,根据 1992~1995 年全国病毒性肝炎血清流行病学调查,人群中 HBsAg 阳性率平均为 9.75%,约 1.2 亿人,其中慢性乙型肝炎患者约 3000 万。10%~30% 的慢性乙型肝炎患者可能发展为肝硬化,部分患者甚至进一步发展为肝癌。目前国内外慢性乙型肝炎的治疗多局限于药物的应用,而且疗效不尽人意。本研究根据免疫学原理,结合血液净化学理论,将人抗-HBs-IgG 结合于活化琼脂糖凝胶上,构建了抗-HBs-IgG 免疫吸附柱,并在体外观察了其对含 HBV 和 HBsAg 血浆的吸附作用。该项技术已申报了国家发明专利(申请号:03110948.9)。

材料与方法

一、试剂与材料

Sepharose CL-4B 凝胶(瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB 公司产品)、人抗-HBs-IgG(成都蓉生药业有限责任公司产品)、环氧氯丙烷(沈阳联邦试剂厂产品)、戊二醛(北京化学试剂公司产品)、硼氢化钠(中国医药集团上海化学试剂公司产品)、甘氨酸乙酯(中国医药集团上海化学试剂公司产品)、50 ml 吸附柱外壳(杭州科锐企业卫康医疗器械有限公司产品)、HBV DNA 阳性患者血浆 500 ml(我院血液净化中心提供)、蠕动泵(日本 NIPRO FP-960)、特制 DHP060 恒温培养箱(上海实验仪器厂有限公司产品)。

二、方法

1. 环氧介质的合成:用量筒量取 150 ml Sepharose CL-4B 凝胶,倒入砂心漏斗抽滤,再用生理盐水冲洗、抽干后转入 500 ml 烧杯,分别加入生理盐水 180 ml, 2 mol/L NaOH 70 ml,环氧氯丙烷 50 ml,混匀。将此混匀的物料加到锥形瓶中,封口。在摇床中 40℃ 反应 2 h,转速为 200 r/min,反应完成后,倒入砂心漏斗抽滤,再分别用无水乙醇和水冲洗,抽干。

2. 氨基介质的合成:将上述制备的环氧凝胶转入 500 ml 烧杯,分别加入生理盐水 50 ml, 13 g/L 己二胺-NaHCO₃缓冲液 450 ml,混匀。将此混匀的物料加到锥形瓶中,封口。在摇床中 50~55℃ 反应 2 h,转速为 200 r/min,反应完成后,倒入砂心漏斗抽滤,再分别用无水乙醇和水冲洗,抽干。

3. 醛基介质的合成:将上述的氨基凝胶转入 500 ml 烧杯,分别加入生理盐水 370 ml, 25% 的戊二醛 30 ml,混匀。将此混匀的物料加到锥形瓶中,封口。在摇床中室温反应 2 h,转速为 200 r/min,反应完成后,倒入砂心漏斗抽滤,再分别用水、2 mol/L 醋酸和水冲洗,最后用 0.1 mol/L pH 8.2 的硼酸盐缓冲液平衡、抽干。

4. 免疫吸附介质的合成:将上述的醛基凝胶转入 500 ml 烧杯,加入生理盐水 50 ml,然后将 600 mg 的抗-HBs-IgG 溶于 250 ml 0.1 mol/L 的硼酸盐缓冲液,加入烧杯中,混匀。将此混匀的物料平均分加到锥形瓶中,封口。在摇床中室温反应 20 h,转速为 200 r/min,反应完成后,倒入砂心漏斗抽滤。

5. 未反应醛基的封尾:将上述的免疫吸附凝胶转入 500 ml 烧杯,分别加入生

理盐水 50 ml 和 40 g/L pH 8.2 的甘氨酸乙酯缓冲液 250 ml,混匀。将此混匀的物料加到锥形瓶中,封口。在摇床中室温反应 2 h,转速为 200 r/min。最后称 5 g 硼氢化钠 4℃ 下分 4 次加入,室温反应 6~8 h。反应完成后,倒入砂心漏斗抽滤,分别用水、0.2 mol/L pH 2.3 的甘氨酸-盐酸缓冲液、含 1 mol/L 氯化钠的 0.1 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液和水冲洗,抽干后得到抗-HBs-IgG 免疫吸附凝胶。

6. 装柱:将 50 ml 免疫吸附凝胶在无菌室内放入内容积为 50 ml 的聚丙烯柱内,封严。上述反应过程见图 1。

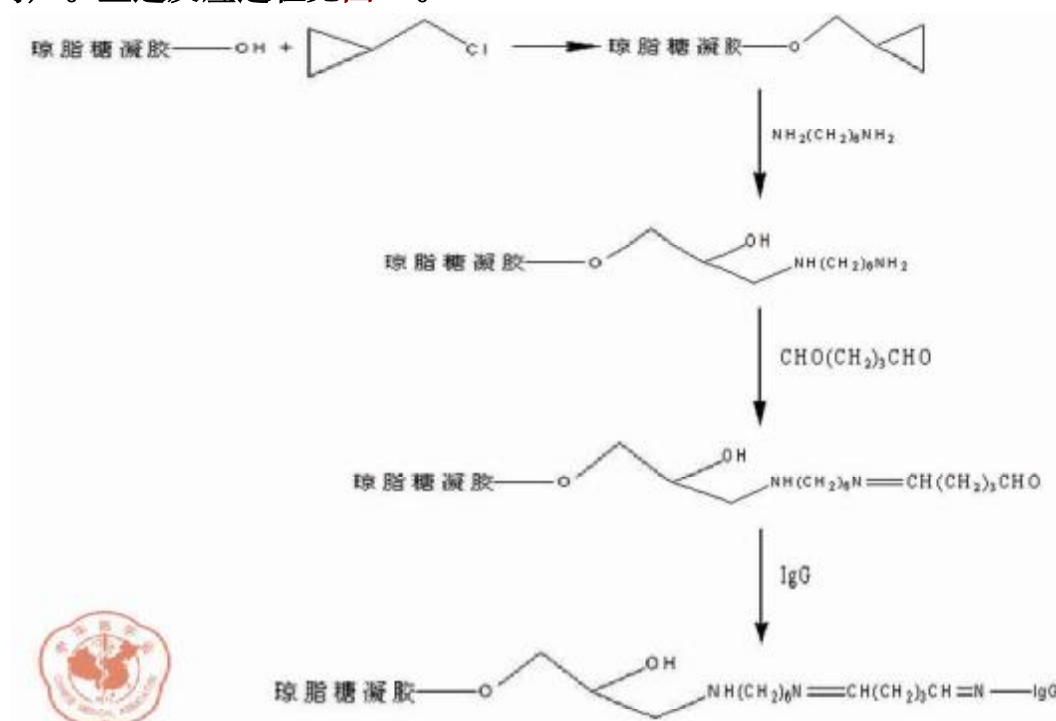


图 1 抗-HBs 免疫吸附凝胶合成方程式

7. 体外免疫吸附实验:在 P2 实验室内将吸附柱与输血器连接,然后将吸附柱置于预先设置 37℃ 的特制 DHP060 恒温培养箱内,在吸附柱与待吸附血浆连接的中间管路上安置蠕动泵,调整流速为 180 ml/h。分别取 50 ml 吸附柱用洗脱液、平衡液以 180 ml/h 流速通过吸附柱,最后将 500 ml 待吸附血浆以同样速度通过吸附柱。吸附前后分别检测抗-HBs-IgG 不同键合量的吸附柱所吸附血浆中 HBsAg、HBV 量的变化。

结 果

一、Sephacrose CL-4B 凝胶与抗-HBs-IgG 键合率

在定量的 150 ml Sepharose CL-4B 凝胶条件下,通过检测键合前后反应液中的 HBsAb-IgG 含量,可以测出键合率。随着 HBsAb-IgG 量的不断增加,其键合率也在加大,但由于所使用的 Sepharose CL-4B 凝胶量及吸附柱外壳体积所限,浓度为 600 g/L 的 HBsAb-IgG 键合率最高,为 85.07%。

二、HBsAb-IgG 键合量与吸附率

为了观察不同量的 HBsAb-IgG 键合后对 HBsAg 和 HBV 的吸附效果,使用上述剂量不同的 HBsAb-IgG 键合后制备的吸附柱对 500 ml HBV DNA 阳性患者血浆进行吸附,同时留取吸附前后的血浆样品分别定量检测 HBsAg 和 HBV。结果显示,随着 HBsAb-IgG 量的不断增加,其吸附率也在增加,在 HBsAb-IgG 浓度为 600 g/L 时,HBsAg 和 HBV 的吸附率最高,分别为 58.97% 和 53.1%。

讨 论

免疫吸附(immunoadsorption)是利用免疫吸附剂通过特异性的抗原抗体反应清除体内各种致病因子净化血液,从而达到治疗目的的一项高选择性的免疫治疗新技术^[1,2]。其过程是将结合特异性抗体(或抗原)的免疫吸附剂填充于柱形装置内^[3],再将其与体外循环装置连通,使血浆在规定的时间内通过此装置,并充分与吸附柱上的抗体(或抗原)相接触,最终将血浆内有害的相应抗原(或抗体)彻底清除出去^[4]。近年来国内外在对狼疮肾炎、器官移植、肾病综合征、多关节炎、肾小球肾炎、血友病、格林巴利综合征等疾病的治疗已取得预期的临床疗效^[5]。

在生物医学材料研究领域,环氧氯丙烷活化是一种常用的方法,被固定的生物活性物质稳定性好,固定化率高^[6]。在慢性乙型肝炎患者或 HBV 携带者血清中 Dane 颗粒数量可高达 10^{13} /ml(约 100 μ g/ml),其中完整的(成熟的)病毒颗粒约占 10^9 个/ml。HBV 的外膜(envelope)成分主要是主蛋白,即 HBsAg,它由多肽组成,不具传染性。每一病毒颗粒的外膜含 300~400 个主蛋白分子,亦称外膜蛋白。其主要功能是:(1)提供保护性免疫的免疫原;(2)病毒籍以附着和侵入细胞;(3)包裹病毒,促使病毒成熟和分泌;(4)阻断宿主免疫反应,使感染持续。实验中选择的键合 HBsAb-IgG 浓度最佳值 600 g/L,此时键合率最高,为 85.07%,每个 HBsAg 可结合多个 HBsAb-IgG^[7]。本研究体外吸附实验结果显示,所构建的乙型肝炎病毒免疫吸附柱能吸附除去离体 HBV DNA 阳性血浆中 HBsAg 和 HBV 颗粒。减少甚至清除血液中的 HBV 及 HBsAg,减轻甚至阻断血液中 HBV 对肝脏的循环感染及相关免疫复合物所致的体内免疫损害,降低乙型肝炎病毒及其相关标志物对机体免疫系统的压力,对于早期 HBV 急性感染、肝脏移植患者及慢性乙型肝炎患者都具有极其重要的治疗意义。

参 考 文 献

- 1 Belak M, Borberg H, Jimenez C, et al. Technical and clinical experience with protein A immunoadsorption columns. *Transfus Sci*, 1994, 15: 419-422.
- 2 Braun N, Bosch T. Immunoadsorption, currents status and future developments. *Expert Opin Investig Drugs*, 2000, 9: 2017-2038.
- 3 Moks T, Abrahmsén L, Nilsson B, et al. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem*, 1986, 156: 637-643.
- 4 刘惠兰. 免疫吸附的临床应用评价. *中国血液净化*, 2004, 3: 236-239.
- 5 Terman DS, Buffaloe G, Mattioli C, et al. Extracorporeal immunoadsorption: initial experience in human systemic lupus erythe-

matosus. Lancet, 1979, 2: 824-827.

- 6 李湛勇, 史林启, 宋正纪. 单克隆抗体免疫吸附剂的制备及对乙型肝炎表面抗原的吸附. 高分子学报, 1998, 4: 449-453.
- 7 Lieberman HM, LaBrecque DR, Kew MC, et al. Detection of hepatitis B virus DNA directly in human serum by a simplified molecular hybridization test; comparison to HBeAg/anti-HBe status in HBsAg carriers. Hepatology, 1983, 5: 285-291.

(收稿日期: 2007-07-13)

(本文编辑: 王丹静)