

用扁桃体淋巴细胞生产白细胞干扰素的研究

梁希若 郑志坚 马志贤

(广州医学院微生物学教研室, 广州)

罗瑞仙 邹文华

(广州市医药卫生研究所病毒室, 广州)

本文报告了用手术切除的正常人新鲜扁桃体细胞制备白细胞干扰素, 较适宜的条件是扁桃体在离体后 8 小时内应用, 以 1640 作为培养液, 按每毫升含 10^7 个活细胞、200IU 粗干扰素启动、128IIA 的 NDV 诱导培养 18—24 小时, pH 不低于 7.0, 能较稳定地获得效价平均 $>40,000\text{IU/ml}$ 的粗干扰素。

因粗干扰素效价较高, 用 KCNS-乙醇法进行一次纯化, 部分纯品的比活性即可 $>10^4\text{IU/mg}$ 蛋白, 回收率 50—60%, 产品的各项生物制品指标均符合美国 NIH 标准。

一颗新鲜扁桃体一般可得到 $200—500 \times 10^7$ 个活淋巴细胞, 约相当于 $400—1,000\text{ml}$ 血所分离得到的白细胞量, 这在一定程度上解决了血源困难和价格昂贵的问题, 扩大了生产白细胞干扰素的细胞来源。

关键词 干扰素; 扁桃体; 新城鸡瘟病毒; 滤泡性口腔炎病毒

人白细胞干扰素需用新鲜人血白细胞生产, 而人血来源困难, 价格昂贵, 使生产受到很大的限制。扁桃体与脾脏均含大量的淋巴细胞, 而且其中的 B 细胞约在 50% 以上^[1,2], 因此我们于 1978 年试用外科手术挤切的新鲜正常人扁桃体淋巴细胞代替人血白细胞制备干扰素, 获得成功^[3], 为提高粗干扰素的效价, 我们对某些诱生条件和影响因素进行了探索, 在得到比较稳定能产生较高效价粗干扰素的基础上, 进行了纯化, 实验证明, 扁桃体是生产干扰素的良好材料。

材料和方法

(一) 诱生条件和影响因素

1. 扁桃体离体后的保存时间:

取外科手术(挤切法)切除的新鲜健康人的扁桃体放入无菌小瓶, 每批号的每一颗均等分为 4 份, 加每毫升含 200 单位卡那霉素的 Hank's 液

放 4°C 冰箱保存, 于 4、8、24、48 小时分别各取出四分之一。

(1) 处理扁桃体: 首先将扁桃体用每毫升含 200 单位卡那霉素的生理盐水冲洗 3—5 次, 以除去血液和粘液, 继而用每毫升含 200 单位卡那霉素的 Hank's 液洗一次, 放入无菌平皿内, 剥除包膜等结缔组织, 再洗涤 3—5 次, 至洗出液透明澄清为止, 然后将扁桃体剪至糊状。

(2) 分散和制备细胞: 于已剪碎的扁桃体内加入少量 Hank's 液, 移入无菌带玻璃珠的三角瓶内, 用力振摇使细胞分散, 静止片刻后收集上层细胞悬液, 如此反复 4—5 次, 可将大部分扁桃体细胞分散。集中细胞悬液用 8 层无菌纱布滤过, $1,000—1,500$ 转/分离心沉淀 15—20 分钟, 适当稀释后, 用台盼兰染色, 计数活淋巴细胞数, 用 1640 培养液稀释成 $10^7/\text{ml}$ 细胞悬液。

(3) 诱生干扰素: (A) 启动, 按每毫升细胞悬液加入粗干扰素 200 单位, 放入 37.5°C 水浴中作用 30 分钟, 然后于 37.5°C 旋转(8—12 转/小时)

本文于 1984 年 5 月 8 日收到。

培养 2 小时; (B) 诱生, 取出已“起动”的细胞悬液, 立即加入 NDV F 系减毒株, 按每毫升加 128 个血凝 (HA) 单位计算。轻轻摇动使混合均匀, 再于 37.5℃ 旋转培养, 18—24 小时后, 2500—3000 转/分离心沉淀 20—30 分钟。小心吸取上清液, 此即为扁桃体粗干扰素, 用 0.5N HCl 调至 pH2.0, 置 4℃ 经 5 天酸化后, 用 0.5N NaOH 再调回 pH 至 7.2 作效价测定。

(4) 效价测定: 用细胞病变抑制法, 以人肌皮或人肺成纤维细胞/滤泡性口腔炎病毒 (VSV) Indiana 株为测定系统^[1]。干扰素效价以 \log_4 表示, 按 Reed 和 Muench 法计算, 能保护半数细胞免受攻击病毒破坏的干扰素稀释度的倒数, 即为干扰素工作单位, 如同时用国际干扰素标化, 即可折合成国际单位。

2. 不同培养液对产生干扰素能力的比较:

用 Eagle's、1640 以及 199 三种不同培养液稀释细胞悬液使分别成每毫升含 10^7 个细胞。诱生、效价测定同 1。

3. 不同单位粗干扰素“起动”:

将细胞悬液分 4 份, 按每毫升加入不同单位 (50、100、200、400) 干扰素进行起动。诱生、效价测定同 1。

4. 干扰素诱生的动态变化:

按 1 法制备同一批扁桃体细胞悬液经诱生后, 分装在 30 支试管中, 放 37.5℃ 旋转培养, 每隔二小时取出二支, 24 小时后再于 36、48 小时各取出二支, 然后同时进行酸化处理, 测定效价。共进行了 6 批实验。

5. 不同年龄组产生干扰素能力的比较:

将扁桃体分为 5—10 岁, 11—20 岁, 21 岁以上三个不同年龄组, 方法同 1。

6. 扁桃体细胞与人血白细胞产生干扰素能力的比较:

用同样的细胞数和同样的诱生方法和试验条件对扁桃体淋巴细胞与外周血白细胞进行对比, 方法同 1。

(二) 干扰素的提纯

粗干扰素不论纯度还是效价都难于适合临床应用, 必须进行提纯。首先按上述 1 的方法处理扁桃体, 制备细胞悬液, 诱生大量粗干扰素。用

作提纯用的粗干扰素除留取 2 毫升酸化后测定效价外, 其余的放于 -20—-30℃ 待提纯用。我们采用 Cantell^[4] 等介绍的 KCNS-乙醇提纯法, 并稍加改良, 方法如下:

1. 初次 KCNS 盐析:

按粗干扰素量的 1/10 加入 5M KCNS, 即最终浓度为 0.5M KCNS-粗干扰素混合物, 摇匀后用 6N HCl 调 pH 至 3.5—3.0, 此时可见到黄白色沉淀物析出, 置 4℃ 过夜, 并经常摇动使沉淀物析出, 干扰素及其它蛋白均在此沉淀物内。2500 转/分离心沉淀 20—30 分钟, 留沉淀。

2. 冷乙醇分级沉淀去除杂蛋白: 本过程需在 0—4℃ 冰浴中进行。

(1) 按原粗干扰素 1/5 量加入 pH4.0 的冷乙醇, 使沉淀物尽快溶解。溶解后最好放在 4℃ 冰箱内 30 分钟。然后, 于 0—4℃ 2500 转/分离心沉淀 30 分钟, 留上清。

(2) 缓慢地加入 0.1N NaOH 于上清液, 调 pH 至 5.0, 此步骤要在冰浴中不停地边加边摇动, 并需用精密的酸度计测 pH 值, 此时可见乳白色沉淀物 (主要为球蛋白) 析出, 于 0—4℃ 2500 转/分离心沉淀 30 分钟, 留上清。

(3) 继用 0.1N NaOH 将上清液调至 pH 5.6—5.8, 此时继续析出白色沉淀物 (主要为白蛋白), 于 0—4℃ 2500 转/分离心沉淀 30 分钟, 留上清。

(4) 再用 0.1N NaOH 调 pH 至 7.4—8.0, 以出现沉淀物最多时为准, 放置 4℃ 冰箱内 2 小时以上, 并经常摇动, 使干扰素在碱性乙醇中重新析出, 于 0—4℃ 2500 转/分离心沉淀 30 分钟, 留沉淀。

3. 再次 KCNS 盐析:

(1) 于沉淀物中加入原粗干扰素 1/50 量的 0.5M KCNS-PBa, 并使之充分溶解。

(2) 用 2N HCl 调 pH 至 3.0, 此时有乳白色沉淀物 (主要为干扰素蛋白) 出现, 于 0—4℃ 2500 转/分离心沉淀 30 分钟, 留沉淀。

4. 透析:

加入原粗干扰素 1/500 量的 PBa 溶解沉淀物, 装入透析袋, 于 4℃ 下对 PBSb 透析 4—5 天, 每 4 小时换液一次, 至无残留 KCNS 为止, 最

后一天需用双蒸水配制的 PBSb 透析。

5. 高速离心:

小心吸出已透析好的干扰素液, 用 2N HCl 调 pH 至 7.4, 高速离心 30,000g 1 小时, 上清液即为部分纯化干扰素, 留取 0.2ml 作生物制品鉴定

注: PBa = 0.1M pH8.0 磷酸缓冲液

PBSb = pH7.3 磷酸盐缓冲液

6. 生物制品鉴定:

按美国国立卫生研究院(NIH)的鉴定标准进行^[1]。

(1) 效价测定: 同前(一)、1(4)。

(2) 纯度检查: 用每毫克蛋白含多少干扰素单位表示。本实验用紫外分光光度计测其在 260 nm 和 280nm 波长的光密度 (OD), 并按下列经验公式计算。

$$(1.45 \times OD_{280nm} - 0.74 \times OD_{260nm})$$

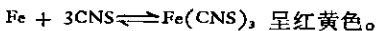
$$\times \text{稀释倍数} = \text{mg 蛋白量/ml}$$

(3) 无菌试验: 将纯化干扰素分别接种于:

(A) 4 支肉汤培养基和 4 支肉渣培养基内, 37℃ 培养, 观察 14 天; (B) 4 支在沙氏葡萄糖琼脂培养基上, 20—28℃ 培养, 观察 14 天。

(4) 余毒检查: 取纯化干扰素以原液及 1:10 两个浓度各接种三只 9 日龄鸡胚尿囊中, 37℃ 培养 3—4 天, 收取尿囊液作鸡血球凝集试验, 并盲目传代三次。

(5) KCNS 残量检查: 用 1% FeCl₃ 溶液检查。



(6) 热原(内毒素)试验: 取体重 1.5—2 公斤家兔 3 只, 每只静脉注射人体使用最大量的 3 倍量干扰素, 每小时测体温一次, 3 小时内每只体温上升不超过 0.6℃, 3 只体温上升相加不超过 1.4℃。

(7) 毒性试验: 取 400g 重豚鼠 2 只, 每只腹腔注射人体使用最大量的 3 倍量干扰素。另取 20g 重小鼠 5 只, 每只静脉注射人体一次使用大量的 3 倍量干扰素, 观察 7 天。

(8) 腺病毒和 HBsAg 检查: 由于本干扰素来源于扁桃体, 还进行了腺病毒的检查。取纯化干扰素以原液、10⁻¹、10⁻² 三种浓度接种于人胚

肾单层细胞, 37℃ 培养, 3 天后进行盲目传代三次, 每次观察 7 天, 检查是否出现病变。同时用 ELISA 法检查 HBsAg。

7. 分装安瓿, 真空冷冻干燥:

经鉴定合格后的干扰素按需要量进行稀释, 并加入一定量的人白蛋白作为保护剂, 然后分装安瓿, 每支 1 毫升, 先放入 -70℃ 冷冻一夜后再冻干, 以保持干扰素的稳定性。

结果与讨论

(一) 影响人扁桃体产生干扰素的某些因素

1. 扁桃体离体后的保存时间与活细胞数对产生干扰素的影响结果见表 1。

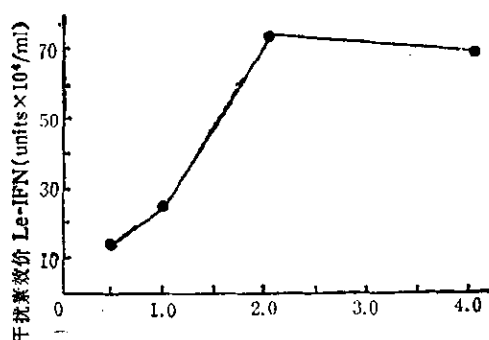
表 1 离体扁桃体保存时间与活细胞数和产生干扰素能力的关系

Table 1 Relationship between the preservation time of tonsils and viable cell counts with capability of production Le-IFN

保存时间 (小时)	实验次数 Numbers of experimentation	干扰素平均 效价 (单位/ml) Average titer of Le-IFN	活细胞平均 数(%) Average viable cell counts
4	8	51,074	98.25
8	8	64,150	96.75
24	8	52,288	94.5
48	8	35,514	93.0

可以看出, 扁桃体离体后, 保存 24 小时仍不影响产生干扰素的能力, 但至 48 小时则大为降低。细胞存活率随保存时间的延长而下降 ($P < 0.01$)。但到 48 小时仍有 93% 存活率。看来, 扁桃体细胞产生干扰素的能力与其存活率并不完全成正比关系。为保证能产较高效价的干扰素, 离体后的扁桃体最好尽快应用, 如有困难可适当剪碎加一定量的 Hank's 液存放 4℃ 冰箱中 24 小时内应用。

2. 1640, 199, Eagle's 培养液对扁桃体产生干扰素能力的结果, 其平均效价分别为 $53,773 \pm 15,913$; $52,832 \pm 9,729$;



干扰素“启动”
Le-IFN priming (units $\times 10^2$ /ml)

图 1 不同单位粗干扰素启动对产生干扰素的影响

Fig. 1 Priming effect of different units of crude Le-IFN on the production of Le-IFN

41,737 \pm 5,991。可见生产扁桃体干扰素用 1640 或 199 均优于 Eagle's 液, ($P < 0.05$), 而 199 与 1640 则无差异 ($P > 0.05$)。

3. 粗干扰素启动: 以不同单位做了 10 次试验, 结果是 400 单位启动平均为 64,461 u/ml, 200 单位为 68,770 u/ml, 100 单位为 25,600 u/ml, 50 单位为 14,686 u/ml, 见图 1。

结果表明, 在 200 单位以下的小剂量干扰素启动活性, 呈剂量依赖关系, 200—400 单位则不随剂量上升。启动以每毫升 200 单位为佳。

表 2 干扰素诱生的动态变化

Table 2 Dynamic change of IFN induction

诱生时间 (小时) Induction time (h)	干扰素平均 效价 Average titer of IFN (u/ml)	诱生时间 (小时) Induction time (h)	干扰素平均 效价 Average titer of IFN (u/ml)
2	252	16	62,273
4	1,280	18	41,140
6	2,560	20	59,470
8	51,140	22	45,646
10	22,410	24	42,944
12	43,060	36	51,215
14	31,572	48	12,237

4. 干扰素诱生的动态变化见表 2。

可以看到加入 NDV 诱生后 4 小时, 扁桃体细胞开始产生干扰素, 此结果与 Tovell^[6]等报告一致。6 小时后效价很快上升, 从 8 小时—14 小时, 效价似有反复; 16—36 小时, 效价变动不大, 看来, 收获粗干扰素在 NDV 诱导后 16—36 小时均可^[7], 我们定在 16—24 小时内收获。

5. 在不同年龄组中, 11—20 岁、21—30 岁这两个年龄组的扁桃体细胞产生干扰素的能力高于 6—10 岁组, 见表 3。是否与 10 岁前儿童免疫的能力较低有关, 有待于进一步探讨。

表 3 不同年龄组产生干扰素能力的比较

Table 3 Comparison of yields of Le-IFN by tonsillar lymphocytes from different age groups

年龄(岁) Age	例数 No. of cases	干扰素平均效价 Average titer of IFN (u/ml)
6—10	8	43,732
11—20	18	74,473
21—28	15	74,990

6. 扁桃体细胞产生干扰素的能力似乎略高于人血白细胞, 但经统计学处理, $P > 0.05$, 两者差异不大, 见表 4。这可能是由

表 4 人血白细胞与扁桃体细胞产生干扰素能力的比较

Table 4 Comparison of yields of Le-IFN by human peripheral leucocytes and tonsillar lymphocytes

	标本例数 No. of sample	平均效价 Average titer of IFN (u/ml) $\bar{x} \pm SD$	P 值 P Value
血白细胞 Peripheral leucocytes	8	45,753 \pm 15,447	>0.05
扁桃体细胞 Tonsillar lymphocyte	7*	54,915 \pm 9,560	

* 每个标本均由 5—6 个标本混合 (共 40 批号)
Each sample mixed from 5—6 cases (Total 40)

于两种材料的变异度均较大,且例数较少,但结果提示, t 值为 1.11,扁桃体细胞产生干扰素的能力似有比人血白细胞较高的倾向。

另外,近二年来在制备粗干扰素的条件下,我们又作了一些改进,如诱导过程中 pH 的变化,使 pH 保持 7.2 左右;在 1640 培养液中再加入少量半胱氨酸以稳定干扰素蛋白的—SS—键,使每批粗干扰素的效价更趋稳定。

(二) 干扰素的提纯

Cantell 等提出的 KCNS-乙醇法提纯干扰素是一种简便高效的方法。我们的实验结果表明,要获得高效价临床级的部分纯化干扰素,关键在于要有较高效价的粗干扰素。如粗干扰素的效价 $< 10^4 \text{IU/ml}$,则必需经再次 KCNS 盐析,回收率亦较低,为 23—40%,如粗干扰素效价 $> 4 \times 10^4 \text{u/ml}$,则一次 KCNS 盐析,经冷乙醇分级沉淀,即至 pH7.4—8.0,离心沉淀,取沉淀物用原 1/100 粗干扰素量的 pH7.3PBS 溶解,即可获得合乎临床级的 α 干扰素,比活性 $> 10^6 \text{IU/mg}$,有时可达 $4 \times 10^6 \text{IU/mg}$,回收率约为 50—60%。经生物制品鉴定,各项指标均符合要求,加检腺病毒及 HBsAg 均为阴性。

此外,我们曾研究了部分纯化的扁桃体干扰素的某些理化及生物学特性,结果表明,扁桃体干扰素是一种蛋白质,其活性部分等电点分别在 pH6.2、pH6.4,分子量分别为 19,000 和 38,000,与文献报道人白细胞干扰素的分子量 21,000 和 15,000 并具有两个活性部分的情况相似,但扁桃体干扰素的分子量稍大些,关于人干扰素有两种分子量的问题,Stewart 认为可能是干扰素由多种活性物质所组成,由亚单位组成二聚体,从我们实验结果看,分子量 19,000 可能是单体,38,000 可能是二聚

体。

用 NDV 诱导的扁桃体干扰素能耐 pH 2.0,耐 56℃ 的温度处理,这有别于 γ 干扰素。扁桃体干扰素对胰蛋白酶较敏感。用 1%SDS 在 37℃ 处理 1 小时,活性无影响,与 Vilcek^[8] 的结果相似。此外,用超声波、反复冻融、脂溶剂氯仿、乙醚处理等,均可影响扁桃体干扰素的活性。

人扁桃体干扰素在人纤维母细胞上的活性远远高于在鸡胚肌皮细胞,表明有种属特异性;其活性可被抗白细胞干扰素血清中和;扁桃体干扰素对 DNA 病毒或 RNA 病毒均有抑制作用。

根据以上实验结果,我们认为人扁桃体白细胞干扰素制备系统是可行的,我们已做过三百多次实验,一颗由挤切法切除的新鲜扁桃体,一般可得到 $200—500 \times 10^7$ 个淋巴细胞,如按每毫升人血可分离到 5×10^6 个白细胞计算,则一颗扁桃体约可相当于 400—1,000 毫升血液所分离得到的白细胞量。人血来源困难,价格昂贵,扁桃体淋巴细胞与人血白细胞产生干扰素的能力相当,而扁桃体来自手术切除组织,成本低,若把它收集起来,这是一个相当可观的数目,例如仅广州市第一人民医院,每月平均切除 30 颗扁桃体,最多时可达 80 颗,这就大大地扩大了生产白细胞干扰素的细胞来源。

参 考 文 献

- [1] Alecopoulos, C. et al.: *Acta Haemat*, 55: 95, 1976.
- [2] 梁希若等: 广医通讯, 1: 8, 1979.
- [3] 梁希若等: 第一次全国干扰素会议资料汇编, p. 37, 1980 (广州)
- [4] Cantell, K. et al.: *J. Gen. Virol.*, 39: 541, 1978.
- [5] 侯承德: 干扰素及其临床应用, 江苏科技出版社, 1981.
- [6] Tovell, D. et al.: *J. Can. virol.*, 13: 485, 1971.

[7] Paucker, K. et al.: *Bact. Rev.*, **31**: 145, 1967.

[8] Vilcek, J.: 上海医学, **4** (5): 48, 1981.

PRODUCTION OF LEUCOCYTE (Le)-INTERFERON BY HUMAN TONSILLAR LYMPHOCYTES

Liang Xiruo Zheng Zhijian Ma Zhixian

(Department of Microbiology, Guangzhou Medical College, Guangzhou)

Luo Ruixian Zou Wenhua

(Laboratory of Virology, Medical Institute of Guangzhou, Guangzhou)

Methods of preparation of Le-interferon by human tonsillar lymphocytes were investigated. To obtain stable yield of a relatively high titer of crude interferon, averaging 40,000 I.U./ml, the tonsils should be freshly collected and processed in the laboratory within 8 hours after surgical removal. Other optimal conditions for preparation include: 1) Priming with 200 I. U. of crude interferon per ml 10^7 viable cells before, 2) Inducing with 125 HA units of NDV per ml lymphocytes, and 3) Incubating the culture at 37°C for 18—24 hours using RPMI 1640 and keeping the pH at no lower than 7.0.

Only a single cycle of KCNS-ethanol treatment was sufficient for purification of the crude interferon, because of its relatively high titer in the original interferon preparation. The specific activity of the partial purified interferon preparation

attained 10^6 I.U./mg protein and the rate of recovery was 50—60%. The various technical specifications of the final interferon preparation met the requirements of Leinterferon for clinical application set by NIH of the United States.

Human tonsils are lymphoid tissues rich in lymphocytes. To our experience, about $200-500 \times 10^7$ viable cells could be harvested from each tonsil, a considerable number equivalent to the yield of WBC separated from 400—1000 ml of human peripheral blood. To certain extent, the difficulty of obtaining sufficient human blood and its expensive for producing interferon could be partially overcome.

Key words

Interferon; Tonsil; New castle disease virus; Vesicular stomatitis virus