

人脐血干扰素的研究

I. 人脐血干扰素的制备条件

吴淑华 赵锦铭* 李玉英 侯云德 薛凤举
王惠军 张秀珍 马国良 李翰唐 贾克丽

(中国医学科学院流行病学防治研究所,北京)

本文采用人脐带全血代替成人血白血球生产外源性干扰素,就不同毒株、不同病毒量、不同诱生条件对生产干扰素的影响进行了研究。结果表明,人脐血白血球对新城鸡瘟病毒诱生干扰素的能力比等量成人白血球为高;人脐带全血诱生干扰素的能力也比成人全血为高;转鼓培养时诱生干扰素的滴度比静止培养为高;在5株新城鸡瘟病毒的减毒株中,F株诱生能力最强;每毫升脐血加12.8—1280血凝单位的病毒量能诱生最大量干扰素。生产人脐血干扰素的适宜条件为:收集48小时内脐血,用肝素抗凝,排除乙型肝炎表面抗原阳性血清后混合之,每毫升血加新城鸡瘟病毒F减毒株128血凝单位,37℃水浴作用1小时后1500转/分20分钟离心弃上清,每份血按1:2.5比例加2%人血浆的Eagle's液,pH7.4,在37℃旋转培养24小时后收集上清液,pH2.4℃作用5天后再调至pH7.2左右,粗制干扰素的滴度一般可达8000单位/毫升左右,即每毫升脐血可生产20,000单位干扰素。

干扰素是在干扰素诱生剂作用下,由细胞合成的一种具有抗病毒活性的糖蛋白。外源性干扰素有抗病毒谱广、毒性较小、使用同种干扰素无抗原性等优点。近年来临床使用结果表明:外源性干扰素对流感及其他呼吸道病毒感染^[1-3]疱疹性角膜炎^[4,5]带状疱疹^[6]巨细胞病毒感染^[7]慢性活动性肝炎^[8]均有一定的防治效果。可以认为干扰素是一种很有前途的防治病毒性疾病的生物制剂。

过去,不少作者对人白血球产生干扰素的条件曾进行了大量的研究^[10-15],但提取成年健康人的白血球来源困难,操作繁琐。本文报道用人脐带血代替成人血,用全血代替白血球,就外源性干扰素的生产条件,进行了研究,并获得了较高滴度的干扰素制剂。

材料与方 法

(一) 病毒株

新城鸡瘟病毒(简称NDV)系中国农业科学院畜牧兽医检疫所供给:I系减毒株E₁代(指鸡胚传14代),K系减毒株E₆代,Lasota代减毒株E₆代,F系减毒株E₆代,II系减毒株E₆代。上述病毒在10日龄鸡胚尿囊腔传代,37℃孵育3天后收获的新鲜尿囊液作诱生干扰素用,其血凝滴度为1:640—1:1280,50%鸡胚感染滴度(IgEID₅₀/0.1毫升)为9.0左右。

仙台病毒系联合国卫生组织供给:E₁代,传代方法同上。

滤泡性口腔炎病毒(简称VSV):Indiana株系联合国卫生组织供给,传代历史不详,本实验室在鸡胚单层纤维细胞传代,-20℃保存备用。

(二) 人体二倍体细胞株

73-2,74-1,75-2,75-3,75-11,76-1,76-3,76-4,77-2,77-3,77-4等株来自4个月左右的人胎肺组织。HF-1株来自人工流产2个月多的全胚肌皮肤组织。细胞传代方法见参考文献[16]。

人脐带血(简称脐血):48小时内收集的脐

本文于1977年11月28日收到。

* 中国医学科学院儿科研究所。

血,用肝素抗凝,常规法检查乙型肝炎抗原阴性,混合备用。

人白血球悬液制备:1份全血加2份3%葡萄糖(分子量20—30万),部分试验加3%白明胶,37℃静置一小时,吸取白血球层,1000转/分离心10分钟,弃上清,沉淀物用Hank液洗涤三次,用营养液稀释成每毫升含 $5-10 \times 10^6$ 白血球悬液。

(三) 干扰素制备

方法详见结果。

(四) 干扰素滴度测定

采用细胞病变抑制法(CPEI),经培养2—3天成片的二倍体细胞,去除营养液后加2倍或4倍稀释的干扰素0.5毫升,每稀释度接种2—3管,37℃过夜后倾去干扰素溶液,细胞用10—100 TCID₅₀ (50% Tissue culture infecting dose) 的VSV攻击,待对照组病变完全时观察结果,能抑制50%病变的最高稀释度即为一个干扰素单位,以log₂或log₄ CPEI₅₀/0.5毫升表示。

结 果

(一) 成人血和脐血白血球诱生干扰素能力的比较

首先比较了成人血和脐血二种来源的白血球诱生干扰素的能力。将成人健康者(献血员)全血和脐带血分离白血球,分别用Eagle's液pH 7.4制成每毫升含 10×10^6 个白血球的细胞悬液,加等量新城鸡瘟病毒原液(F系减毒株),37℃静止培养24小时后,1500转/分离心20分钟,去沉淀,上清用6N HCl调至pH 2,在4℃放置5天后再用6N NaOH调至pH 7.4,然后测定干扰素滴度,用对干扰素敏感的人肺二倍体细胞株(77-3),测定干扰素的滴度,结果见表1。由表1可见等量脐血白血球产生干扰素滴度比成人白血球为高,二者均差为0.86对数单位($p < 0.001$)。

另外又用脐带血67份,成人血34份制成每毫升含 10×10^6 个白血球的悬液,加等量新城鸡瘟病毒原液(II系减毒株),

表1 人脐血和成人血诱生干扰素能力的比较

标本号	白血球		全血	
	人脐血	成人血	人脐血	成人血
1	5.59*	4.62	5.00	4.62
2	5.62	4.39	5.55	4.00
3	5.52	4.62	5.50	5.11
4	5.50	5.41	5.71	5.11
5	4.87	4.62	6.00	4.77
6	5.33	4.29	5.43	4.62
7	5.19	4.29	3.47	3.85
8	5.77	4.57	4.71	4.00
9	5.52	4.54	5.59	4.88
10	5.38	5.30	5.67	5.00
11	5.46	4.81		
12	5.77	4.13		
13	4.50	4.19		
14	5.18	3.57		
15	5.29	4.29		
16	5.71	4.36		
17	5.50	5.29		
18	5.41	4.43		
19	5.59			
20	5.29			
$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	5.40 ± 0.07	4.54 ± 0.08	5.26 ± 0.23	4.60 ± 0.15
t 测验	$p < 0.001$		$0.05 > p > 0.01$	

* 干扰素滴度 log₂CPEI₅₀/0.5毫升。

37℃静止培养,24小时后收获上清液按上法同样处理后,用对干扰素较不敏感的73-2株测定干扰素滴度,结果等量脐血白血球和成人血白血球诱生干扰素滴度的均差为0.75对数单位,同样说明脐血白血球产生干扰素滴度一般比成人血白血球为高。

(二) 人脐带全血和白血球诱生干扰素能力的比较

为避免白血球的损失和简化干扰素制备过程,我们用全血代替白血球悬液,比较了人脐带全血和同一份脐血提取的相当于全血所含数量的白血球的诱生干扰素的能力,为此我们将同一份脐带血分成两份,一份用于全血产生干扰素,另一份采用3%葡萄糖分离白血球制成每毫升含 10×10^6 白

血球悬液, 相当于每毫升脐带全血中白血球的含量, 然后二者分别加同量新城鸡瘟病毒 II 系减毒株, 37°C 静止培养 24 小时诱生干扰素, 结果见表 2, 在 14 次试验中, 全血产生干扰素滴度均较等量白血球产生干扰素滴度高, 即全血滴度/白血球滴度 > 1。

表 2 人脐血全血和白血球诱生干扰素滴度的比较

实验次数	干 扰 素 滴 度 *		
	全 血	白 血 球	全血/白血球
1	2.50	2.23	1.12
2	3.25	<2.00	>1.63
3	3.00	<2.00	>1.50
4	4.33	3.00	1.44
5	3.50	3.33	1.05
6	2.60	3.23	1.67
7	>4.00	3.38	>1.12
8	>4.00	3.92	>1.02
9	>4.00	3.86	>1.04
10	>4.00	3.58	>1.18
11	>4.00	3.07	>1.30
12	3.75	3.36	1.12
13	>4.00	3.50	>1.24
14	≥5.00	3.70	≥1.35

* 干扰素滴度 $\log_4 \text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升, 用 73-2 株细胞测定。

(三) 人脐带全血和成人全血诱生干扰素能力的比较

采取成年健康者(献血员)全血和脐带全血, 每份分别加等量新城鸡瘟病毒原液(F系减毒株), 37°C 静止培养, 用对干扰素敏感的人肺二倍体细胞株(77-3)测定干扰素滴度。从表 1 可见脐带全血诱生干扰素滴度为 5.26 ± 0.23 ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$), 成人全血诱生干扰素滴度为 4.60 ± 0.15 ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$), 二者有显著差异 ($p < 0.05$), 说明脐带全血诱生干扰素能力确比成人全血为高。

以上结果说明, 人脐带全血比成人白血球对同一病毒诱生干扰素的能力为高。我们又进一步研究人脐血诱生干扰素的适宜条件。

(四) 静止与转动培养对干扰素产生的影响

将人脐带全血与等量新城鸡瘟病毒(F系)混合后分为 2 份, 1 份于 37°C 倾斜 15 度静止培养, 另一份 37°C 转动培养(8—12 转/小时), 均于 24 小时后, 分别收集上清液, 以比较其诱生干扰素的滴度, 结果见表 3。由表 3 可见, 转动培养诱生干扰素的滴度, 明显高于静止培养滴度, 前者 $\log_4 \text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升为 5.03 ± 0.01 , 后者 $\log_4 \text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升为 4.16 ± 0.12 ($p < 0.001$), 用人脐血提取的白血球进行比较也获得类似结果, 同样说明转动培养比静止培养为好。

(五) 不同病毒及不同病毒株对脐血诱生干扰素能力的比较

表 3 静止和转动培养对干扰素产生的影响

标本号	全血-NDV(F系)		白血球-NDV(H系)	
	转 动	静 止	转 动	静 止
1	5.33*	4.00	4.10 ⁺	2.50
2	5.11	4.00	4.00	3.43
3	4.50	4.13	4.69	4.80
4	4.57	4.50	4.40	3.50
5	5.29	3.63	4.67	2.70
6	5.11	4.62	4.50	4.10
7	5.00	3.81	4.59	4.67
8	5.11	4.59	3.38	3.58
9	5.29	4.19	3.58	3.07
10			3.92	3.36
11			3.86	3.50
$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	5.03 ± 0.01	4.16 ± 0.12	4.15 ± 0.13	3.56 ± 0.22
t 测验	$p < 0.001$		$0.05 > p > 0.01$	

* 干扰素滴度 $\log_4 \text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升, 用 77-3 株细胞测定。

+ 干扰素滴度 $\log_4 \text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升, 用 73-2 株细胞测定。

表 4 为 7 次实验的结果, 均用对干扰素敏感的细胞株, 在同一条件下进行滴定, 由表 4 可见新城鸡瘟病毒各毒株均比仙台病毒有较高的干扰素诱生能力, 而新城鸡

表 4 不同病毒株对脐血诱生干扰素能力的比较

实验 次数	新城鸡瘟病毒					仙台病毒
	F	II	L	K	I	
1	10.88*	10.88	9.50	10.00	8.50	8.40
2	11.17	10.77	10.15	10.00	9.12	9.23
3	11.40	10.24	10.40	10.00		<7.00
4	11.54	10.58	10.88	10.19		7.50
5	10.39	9.88	9.13	9.23	9.30	
6	11.78	10.80	10.48	10.32	9.61	
7	11.52	11.40	11.00	10.11	9.64	
平均	11.24	10.65	10.22	9.98	9.23	<8.03

* 干扰素滴度 $\log_2\text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升。

瘟病毒的五个减毒株对脐血诱生干扰素能力也不相同,其中以 F 系诱生能力最强,平均 $\log_2\text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升为 11.24, II 系和 Lasota 株次之,平均 $\log_2\text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升为 10.22—10.65, I 系、K 系最差,平均 $\log_2\text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升为 9.23—9.98。

新城鸡瘟病毒各毒株与仙台病毒不仅诱生干扰素的能力有差别,而且其溶血活性也不相同,仙台病毒和新城鸡瘟病毒 II 系减毒株溶血活性最大, I 系最小,其他则介于二者之间。

(六) 不同量的新城鸡瘟病毒对脐血诱生干扰素能力的比较

由表 5 可见每毫升人脐血加 12.8—1280 血凝单位 (HAU)/0.25 毫升的病毒量能诱生最大量干扰素,滴度 $\log_2\text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升可达 9.90—10.73,而每毫升人脐血所加病毒量少于 1.28HAU/0.25 毫升,诱生干扰素能力即显著下降,滴度仅为 4.44—7.64,可见每毫升人脐血加 128HAU/0.25 毫升的病毒量比较适宜。

(七) 不同二倍体细胞株对人脐血干扰素抗病毒活性的敏感性比较

同一干扰素制剂在同一条件下,用不同的二倍体细胞株测定滴度,比较其不同细胞对干扰素的敏感性。由表 6 可见,不

表 5 新城鸡瘟病毒不同病毒量对诱生干扰素滴度的影响

实验 次数	病毒量 (HAU/毫升人脐血)						
	1280	640	128	12.8	1.28	0.128	0.0128
1	10.11*	10.12	10.31	10.30			
2	10.19	10.18	10.64	10.50			
3	9.40		9.53	9.13	6.24		<4.00
4			10.62	10.52	8.29		<3.00
5			11.50	11.05	7.70	4.38	
6			11.76	11.05	8.33	4.50	
平均	9.90	10.15	10.73	10.43	7.64	4.44	<3.50

* 干扰素滴度 $\log_2\text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升。

同细胞的敏感性相差很大,其中 75-1 株最不敏感,比 75-2 株低 16—32 倍, HF-1 最为敏感,比 77-2 株平均高 8 倍,比 76-4, 77-3, 77-4 株平均高约 4 倍, 76-1 株对干扰素的敏感性比 75-11 株低 4—16 倍,而 75-2 与 75-3 株之间, 76-4, 77-3, 77-4 各株之间的敏感性相似,我们用 HF-1 细胞测定 14 份脐血干扰素制剂,平均滴度 $\log_2\text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升为 12,以每毫升血制备 2.5 毫升干扰素计算,每毫升脐血可生产 20,000 单位干扰素。

(八) 病毒细胞作用时间与温度对诱生干扰素的影响

由于新城鸡瘟病毒具有溶血活性,以及粗制干扰素中混有大量的鸡胚尿囊液蛋白,为提高纯度,我们比较了病毒细胞不同作用时间与温度对诱生干扰素的影响。

一份脐血加二倍量新鲜病毒液(F系),一组于 37°C 水浴吸附一小时后离心,去上清,血球用 Hanks' 液洗一次后,补充 2% 人血浆 Eagle's 液至原量,而另一组病毒悬液持续存在,不加任何液体,二组均在 37°C 转鼓培养 24 小时后,离心取上清,测定干扰素活性,表 7 为 8 次实验结果。由表 7 可见病毒悬液持续存在时,干扰素的产量稍高于病毒吸附组,平均滴度差为 0.5,即相差不到 1 倍,但是病毒吸附组由

表 6 不同二倍体细胞株对干扰素抗病毒活性敏感性比较

标本号	细 胞 株											
	75-1	75-2	75-3	75-11	76-1	76-3	76-4	77-2	77-3	77-4	HF-1	
1	<3.0*	7.12										
2	<3.0	8.40										
3	<3.0	7.61										
4	<3.0	8.09										
5		7.43	6.38									
6		7.72	7.00									
7		6.50	5.60									
8			8.85	8.74								
9				9.00	<7.0							
10				9.22	<7.0							
11				10.30	6.13							
12				10.42	6.38							
13				10.53		10.42						
14						10.11	7.26					
15							9.00	≤8.00	9.50	9.41	11.29	
16							9.00	8.39	10.39	9.42	10.77	
17							9.62		9.23		11.11	
18							9.43		10.00		11.34	

* 干扰素滴度 $\log_2\text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升。

表 7 病毒细胞作用时间对诱生干扰素的影响

实验次数	病毒持续存在	病毒吸附 1 小时	滴度差
1	8.60*	7.77	0.83
2	>9.00	>9.00	0
3	>9.00	8.50	0.50
4	9.75	8.62	1.13
5	>10.00	>10.00	0
6	10.62	10.48	0.14
7	10.55	9.78	0.77
8	10.33	9.66	0.67

* 干扰素滴度 $\log_2\text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升。

表 8 病毒吸附时间对诱生干扰素的影响

实验次数	1 小时	3 小时
1	8.62*	8.50
2	9.42	8.62
3	9.78	9.38
4	10.48	9.50

* 干扰素滴度 $\log_2\text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升。

表 9 病毒-细胞作用温度对诱生干扰素的影响

实验次数	37°C	4°C
1	8.50*	>9.00
2	9.00	9.61
3	10.11	9.66
4	10.19	10.23

* 干扰素滴度 $\log_2\text{CPEI}_{50}/0.5$ 毫升。

于去尿液,干扰素悬液中蛋白含量却平均降低3倍,即每毫克蛋白干扰素的活性可以提高2倍左右。

关于病毒吸附的时间,1小时与3小时相差不大(表8),吸附的温度4℃与37℃相差不大(表9),但是先在4℃细胞吸附一小时以后在37℃培养溶血比较严重,所以在37℃吸附为宜。

用人脐血生产外源性干扰素的适宜条件:收集48小时内脐血,用肝素抗凝,将乙型肝炎抗原阴性的脐血混合,每毫升血加新城鸡瘟病毒F系减毒株128HAu/0.25毫升的病毒,37℃水浴作用1小时后,1500转/分离心20分钟,弃上清,按每毫升血加2.5毫升2%人血浆的Eagle's液(pH7.4),37℃转动培养(8—12转/小时),24小时后,收集上清液,用6NHCl调至pH2,在4℃放置5天后,再用6NNaOH调至pH7.4,即为粗制干扰素,一般滴度可达8000单位/毫升左右,即每毫升脐血可产生20,000单位左右的干扰素。

讨 论

国外生产人白血球干扰素均采用成人的白血球,干扰素的产量以1000个白血球为计算单位,波动在0.1—2.5单位之间^[17],如以每毫升血平均含800万白血球,提取白血球的回收率最高以50%计算,那么每毫升血可以生产干扰素400—10,000单位。我们采用人脐带全血代替成人周围血白血球,在适宜条件下每毫升脐血平均可以生产20,000单位干扰素。我们的干扰素单位是用病变抑制法测定的,一般来说要比国际单位大,因为国际单位采用最敏感的细胞和空斑抑制法测定干扰素。根据我们过去的经验,空斑抑制法测定干扰素要比病变抑制法高4—8倍。

人脐血生产干扰素单位产量较多的原

因,不仅在于不提取白血球避免了白血球的损失,以及采用了诱生能力较高的F系减毒株,加以转动等培养条件的改进,还在于人脐血白血球诱生干扰素的能力还略高于成人白血球。

Gresser氏等^[18]报道从一例早产儿和一例新生儿的白血球在体外诱生干扰素的能力与成年人白血球一样,Cantell氏等^[19]比较不同年龄的血在体外对仙台病毒诱生干扰素的能力,认为外周血人白血球产生干扰素能力从胎儿到出生后是大致上恒定的。Yamaguchi氏等表明仙台病毒在人白细胞悬液中诱生干扰素的靶细胞是非T淋巴细胞^[20]。至于我们的实验结果,脐带血白血球产生干扰素能力高于成人血白血球的原因尚待进一步研究。

鉴于人脐血生产外源性干扰素,手续简便,单位产量较高,而且脐血来源也较容易,各地均可获得,便于推广,有一定实用意义。

参 考 文 献

- [1] Merigan, T. C. et al.: *Lancet.*, 1: 563, 1973.
- [2] Soloviev, V. D.: *Bull. WHO.*, 41:683, 1969.
- [3] Кузнецов В. П.: *Образ. и действие Интерферона Рига.* 217, 1972.
- [4] Sundmacher, R. et al.: *Lancet.*, 1: 1406, 1976.
- [5] Jones, B. R. et al.: *Lancet.*, 11: 128, 1976.
- [6] Emödi, G. et al.: *Scand. J. Inf. Dis.*, 7: 1, 1975.
- [7] Arvin, A. M. et al.: *J. Inf. Dis.*, 133: Suppl. A203, 1976.
- [8] Greenberg, H. B. et al.: *N. E. J. M.*, 295: 517, 1976.
- [9] Desmyter, J. et al.: *Lancet*, II: 645, 1976.
- [10] Wheelock, E. F.: *J. Bact.*, 92: 1415, 1966.
- [11] Strander, H. et al.: *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.*, 44: 265, 1966.
- [12] Strander, H. et al.: *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.*, 45: 20, 1967.

- [13] Strander, H.: *Appl. Microbiol.*, 18: 810, 1969.
- [14] Goore, M. Y. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 142: 46, 1973.
- [15] Tovell, D. et al.: *J. Gen. Virol.*, 13: 485, 1971.
- [16] Hayflick, L. et al.: *Exp. Cell. Res.*, 25: 585, 1961.
- [17] Billiau, A. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 140: 485, 1972.
- [18] Gresser, I. et al.: *Prog. Med. Virol.*, 8: 62, 1966.
- [19] Cantell, K. et al.: *J. Immunol.*, 100: 1304, 1968.
- [20] Yamaguchi, T. et al.: *ibid.*, 118: 1931, 1977.

STUDIES ON THE INTERFERON OF THE HUMAN BLOOD FROM THE UMBILICAL CORD

I. THE PREPARATION OF THE INTERFERON BY HUMAN BLOOD FROM THE UMBILICAL CORD.

Wu Shu-hua, Zhao Jin-ming, Li Yu-ying, Hou Yun-de
Xue Feng-ju, Wang Hui-jun, Zhang Xiu-zhen,
Ma Guo-liang, Li Han-tang and Jia Ke-li

(*Institute of Epidemiology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

In the present paper, the production of interferon by whole human blood from umbilical cord instead of leukocytes from adult peripheral blood is described. Different virus strains, virus dosages as well as other conditions influencing the production of interferon are studied. The results obtained show that the interferon-producing ability of human leukocytes from umbilical cord induced by NDV is higher than that of equal amount of adult human leukocytes, while the interferon producing ability of human whole blood from umbilical cord is also higher than that of the adult blood. Interferon titer obtained from roller drum culture is higher than that from stationary culture. Among five attenuated strains of NDV, F' strain possesses the highest interferon-inducing ability. Addition of 12.8-1280 HA units of virus per ml umbilical cord blood induces maximum

yields of interferon.

The optimal conditions for interferon production by human blood from umbilical cord are as follows: The HBS antigen-free blood of umbilical cord must be used within 48 hrs after collection and treatment with heparin. About 128 HA units of F' strain of NDV are added to each ml of blood, after 1 hr adsorption at 37°C the mixture was centrifuged at 1500 r.p.m. for 20 min. The supernate is removed and 2.5 ml of Eagle's solution, pH 7.4, containing 2% human plasma is added to each ml of blood. After 24 hours' incubation at 37°C on a roller drum the supernatant is collected and acidified at pH 2 for 5 days at 4°C, then brought to pH 7.2. The titer of this crude interferon is about 8000 units/ml, namely, about 20,000 units of interferon is obtained from 1 ml of human blood from the umbilical cord.