

人外源性干扰素的研究

I. 人全血细胞干扰素诱生条件的研究

童葵塘 徐美莲 何志明 王美娟

(上海生物制品研究所) (上海市卢湾区中心医院)

以新城鸡瘟病毒为诱生病毒,用制备冻干血浆剩余的血细胞试制干扰素。制备方法为全血细胞法,每 200 毫升血液的血细胞可制备 200 毫升粗制干扰素,效价大多数在每毫升 1000—2000 单位之间。用人肺纤维母细胞 SL₁ 株为检定细胞,以滤泡性口腔炎病毒为被干扰病毒,建立了干扰素的检测系统,可较稳定地测定干扰素效价。并对制备干扰素的条件包括诱生病毒剂量、培养液成分以及加液量等进行了研究。

自从 1957 年 Isaacs 等发现干扰素以来^[1],由于它具有广谱的抗病毒作用,而且毒性较低,引起普遍重视,各国学者相继进行外源性干扰素和干扰素诱生剂的研究,并取得很大的进展。干扰素诱生剂制备容易,抗病毒谱广,作用时间较长,但大分子诱生剂的治疗剂量和毒性剂量很相近,当给以足量时常有毒性反应,而且反复使用可产生耐受性,因此近年来更重视外源性干扰素的研究。目前国际上试用于临床的干扰素有人血白细胞干扰素,人纤维母细胞干扰素和类淋巴母细胞干扰素,而以前者为主。国外多用从人血中提取白细胞的方法制备干扰素^[2-4],吴淑华等用人脐带血制备干扰素^[5]。我们在综合利用血液的基础上,用制备冻干血浆后剩余的血细胞试制干扰素,建立了效价检测方法,并对有关制备条件进行了研究。

材料和方法

(一) 病毒: 新城鸡瘟病毒 (NDV) II 系或 F 系减毒株,由中国医学科学院病毒学研究所赠给。病毒在 10 天龄鸡胚尿囊腔中传代,培养 72 小时后收获其尿囊液作为诱生病毒。

(二) 滤泡性口腔炎病毒 (VSV) Indiana 株: 由中国医学科学院病毒学研究所赠给,在鸡胚细胞中传代。

(三) 血细胞: 来自上海生物制品研究所采集的健康献血员血液。血细胞(包括红细胞及白细胞)应用时一般在采血后 48 小时左右。

(四) 制备干扰素的基础液: 为 4.1 培养液,上海东风试剂厂出品。配制后经高压灭菌,使用时加 NaHCO₃ 调 pH 至 7.2—7.4,所加的人血清及人血浆采自健康献血员,人胎盘血白蛋白为上海生物制品研究所制品。

(五) 细胞株: 人肺纤维母细胞 SL₁ 及 SL₂ 株以及皮肤细胞 SM₁ 株,为上海生物制品研究所用胎儿组织建立。三株细胞在形态上均为长纤维细胞,但略有差别。生长液为 10% 小牛血清 I 号液 (Eagle 氏 3 份, 0.5% 水解乳蛋白 1 份, NaHCO₃ 的含量为 0.09%)。建株经过及传代方法将另文报道。

(六) 白细胞干扰素制备方法: 分全血细胞法和白细胞提取法。全血细胞法参照吴淑华等报告的方法^[5],但他们用脐血,而我们用献血员的血细胞。操作步骤如图 1 所示。

白细胞提取法基本上按 Cantell 氏法^[1-4],小

本文于 1979 年 7 月 13 日收到。

本项目研究承中国医学科学院病毒学研究所赠与毒种并给协助,谨以致谢。

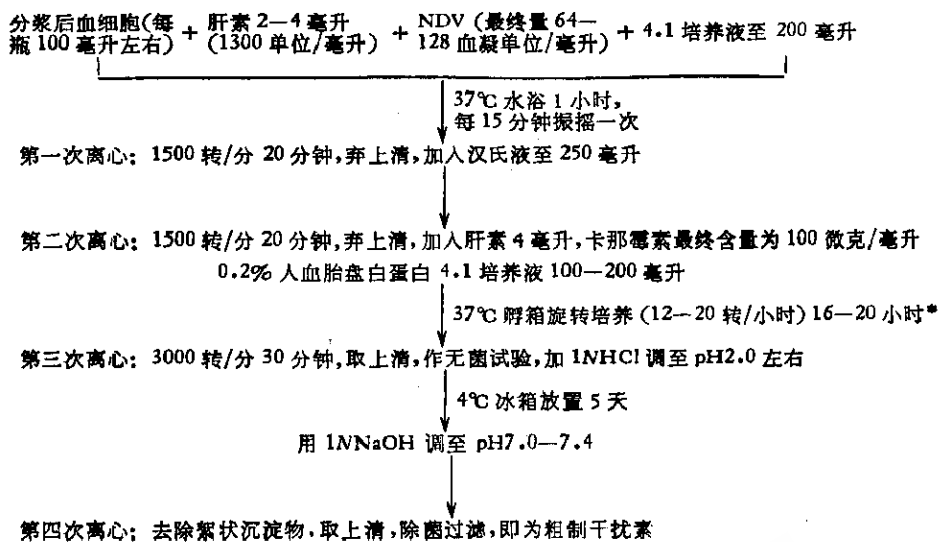


图 1 用全血细胞法制备白细胞干扰素流程图

* 早期少数试验在 34°C 培养, 大多数均在 37°C 培养。

心吸出分浆后血细胞上层的灰黄层, 加入 4 倍量 0.83% NH_4Cl 和 1/10 量 5% EDTA 在 4°C 作用 10 分钟, 离心 1000 转/分 20 分钟, 弃溶血上清, 保留灰黄层, 处理一次后, 加入 2% 人血清 4.1 液及适量肝素进行计数并稀释至 10^7 /毫升左右, 或试验中所需浓度。然后用 NDV 进行诱生, 剂量及诱生方法与全血细胞法相同, 然后加汉氏液洗一次, 加入 0.2% 白蛋白 4.1 培养液至原量并加入肝素使最终含量为 25 单位/毫升, 卡那霉素最终含量为 100 微克/毫升。以后各步与全血细胞法相同。

(七) 干扰素的检测: 取待检的干扰素样品用含 2% 牛血清的 1 号液作 2 倍稀释后接种检定细胞, 每稀释度 3 管, 每管 1 毫升, 16—24 小时后, 倾去干扰素, 加入 100TCID₅₀ VSV (含于 1 毫升 2% 牛血清 1 号液中) 进行攻击。待对照管出现卍—卍病变时 (一般在 48 小时左右) 判定结果。以能抑制 50% 细胞病变的最高稀释度为干扰素的效价。

(八) 胰蛋白酶对干扰素的作用试验: 用 0.1%、0.01% 和 0.001% 的胰蛋白酶 (牌号 Difco) 与等量干扰素混合在 37°C 水浴作用 1 小时后, 立即加入 2% 牛血清 1 号液稀释成 1:40 进行效价测定。

(九) 干扰素的种属特异性测定: 同一批干

扰素用上述检测法, 同时在 SL₁ 人胚肺纤维母细胞和鸡胚细胞中进行效价测定, 比较其结果。

结 果

(一) 全血细胞法与白细胞提取法制备干扰素的比较

一份血细胞, 加入培养液恢复至原来体积作白细胞计数后分成二份。一份提取白细胞后用培养液稀释成相当于全血细胞数 (约为 $4—7 \times 10^6$); 另一份用全血细胞法制备, 结果见表 1。

表 1 全血细胞法与白细胞提取法制备干扰素的比较

试 验	全血细胞法 (效价)	白细胞提取法 (效价)
1	<256*	337
2	317	<64*
3	485	222
4	652	419

* 有明显凝块。

从表 1 可见二种方法除各产生一次凝块外, 其余二次试验结果中全血细胞法效价略高, 但经统计学处理差别不显著 ($t = 2.9, df. = 2, p > 0.05$)。白细胞提取法制

备的干扰素透明微黄色,但制备手续繁琐,虽然其效价与全血法没有显著差别,但每200毫升血液只能制备20—40毫升干扰素,而全血细胞法可制得100—200毫升,总产量以全血法为高。因此我们先用全血细胞法制备干扰素。肝素加量不足产生明显的白细胞凝块,加大肝素用量不再出现凝块。

(二) 检测干扰素的细胞选择

我们用 SL_7 、 SL_8 和 SM_1 等三株细胞以三批干扰素在相同条件下进行效价测定。结果如表2。

表2 三株细胞测定干扰素效价的比较

干扰素批号	试验	SL_7	SL_8	SM_1
1	1	652	1706	≥ 1455
	2	202	224	697
	3	269	1096	745
2	1	1706	≥ 2884	≥ 2884
	2	929	1722	2805
	3	925	2735	1294
3	1	≥ 2884	≥ 2884	≥ 2884
	2	1079	1334	3334
	3	2270	3228	3006

从表2可见三株细胞对干扰素的敏感性不同, SL_7 株细胞敏感性最低,在大多数试验中效价比 SL_8 及 SM_1 株细胞低2—3倍,差别有显著性($t = 5.14, p < 0.01$, 和 $t = 5.05, p < 0.01$), SL_8 和 SM_1 的效价差别不明显($t = 1.41, p > 0.05$),由于 SM_1 细胞接种VSV后病变较不明显,出现的时间亦不规则,较难掌握,因此采用 SL_8 株细胞进行干扰素检测。我们还选一批冻存于 -30°C 的干扰素,在不同时间用 SL_8 株细胞多次测定其效价,以观察其变动幅度。结果见表3。

从表3可见。同批干扰素测定7次,效价在1200—3020之间,相差不大,说明

表3 SL_8 株细胞多次测定同一批干扰素效价的结果

试验	干扰素效价
1	1200
2	2048
3	1349
4	2904
5	2071
6	2692
7	3020
几何均值	2062

结果比较稳定。

(三) 干扰素性状的测定

为确定在人肺纤维母细胞中抑制VSV繁殖的物质是否为干扰素,对其性状进行了检定。干扰素是一种蛋白,其活力可被蛋白酶破坏,因此我们用胰蛋白酶进行处理,观察其效价是否受影响。结果见表4。

表4 胰蛋白酶处理干扰素后对其抗病毒作用的影响

试验	胰蛋白酶浓度			不经胰蛋白酶处理
	0.1%	0.01%	0.001%	
1	<40	<40	153	743
2	<40	<40	406	1090

从表4可见用0.1%、0.01%胰蛋白酶处理干扰素后,其抗病毒作用完全消失,用0.001%胰酶处理可明显降低其活力,证明此抗病毒物质为蛋白。另外同一份干扰素,在同种细胞——人胚肺 SL_8 株中测定效价为743,而在异种细胞——鸡胚细胞中对同一病毒则没有抑制作用,说明具有种属特异性。在制备过程中,此物质能在 $\text{pH}2.0$ 条件下5天不被破坏,根据这些特性可以认为此种具有抗病毒作用的物质符合外源性干扰素的基本特征。

(四) 制备条件的研究

1. 不同剂量NDV对诱生干扰素的影响:为了确定诱生干扰素的最适病毒剂量,我们用不同单位的NDV处理同一份血细

胞,在相同的条件下进行诱生,每种病毒剂量均用二瓶细胞进行试验,所得干扰素效价为其几何均值。结果如表 5。

表 5 不同剂量病毒对诱生干扰素的影响

试验	诱生病毒	剂量(血凝单位/毫升)	干扰素效价	检定细胞
1	NDV II 系	768	284	SL ₁
		384	355	
		192	428	
		96	519	
2	NDV F 系	512	1346	SL ₁
		256	1294	
		128	1607	
		64	1770	

表 5 中二次试验均显示当用大剂量病毒(即每毫升血液用 768 或 512 血凝单位)时,产生的干扰素效价较低,随着病毒剂量的减少干扰素效价渐趋增高,用较小剂量的病毒(即每毫升血液用 64 或 96 血凝单位)时效价最高,但其差别并不大。因此我们在实际工作中所用的诱生病毒剂量为 64—128 血凝单位,这样病毒用量少,效价也高。在二次试验中,第二次试验干扰素的效价偏高,可能是由于诱生病毒系和检定细胞株不同之故。

2. 培养液中不同血清组份对干扰素产生的影响:我们用的基础液为 4.1 培养液,比较了含 2% 人血清、2% 人血浆、0.2% 人胎盘血白蛋白和不加血清的培养液对产生干扰素的影响。结果见表 6。

由表 6 可见,四种培养液包括无血清

表 6 培养液中不同血清成份对干扰素产生的影响

试验	无血清	2% 人血清	2% 人血浆	0.2% 人血白蛋白
1	2328	1936	1334	≥1222
2	1355	1503	1267	1446
3	1227	1186	2094	1901
4	1445	2449	2992	2239

4.1 培养液在内产生干扰素的效价基本相同。但为了保证干扰素在制备和保存过程中有较好的稳定性,我们目前还是采用 0.2% 人胎盘血白蛋白作保护剂。

3. 每瓶血细胞加液量对产生干扰素的影响:每个献血者采血 200 毫升,分离血浆后剩余的血细胞约 80—100 毫升,在制备中加入 0.2% 人胎盘血白蛋白 4.1 培养液的数量究竟以多少为宜,我们进行了不同加液量试验,结果见表 7。

表 7 不同加液量对干扰素产生的影响

试验	每瓶血细胞所加培养液量(毫升)	收获的干扰素效价	产生的干扰素总量(效价×液量)
1	100	940	94000
	200	713	142600
	300	380	114000
	500	340	170000
2	100	1928	192800
	200	1600	320000
	300	675	202500
	500	667	333500

从表 7 可见加液量为 100 毫升时,干扰素的效价最高,随着加液量的增加效价渐趋降低,但其中不存在规则的比例关系。如加 200 毫升者与加 100 毫升者相比干扰素效价仅稍低一些,而加 300 毫升者则比加 200 毫升者明显降低。总产量则随着加液量增大而有逐步增高的趋向,二次试验的结果基本一致。加液量多者虽然总产量高,但所收获的干扰素效价低,容积大,不利于制备。因此我们选择每瓶血细胞加液 200 毫升作常规制备,这样收获的干扰素总产量较高而且便于操作。

为了增加干扰素的收获量,我们曾将收获干扰素后的血细胞加 4.1 液到原量,再进行旋转培养或重新用 NDV 诱生后再进行旋转培养。第二次收取培养液,测定干扰素效价,结果效价均很低,达不到原来

水平。表明再次收获意义不大,再用病毒诱生也不起作用。

讨 论

人白细胞干扰素是目前国际上广泛研究和大量制备的主要类型的干扰素,在防治病毒性疾病和某些肿瘤上的效果已比较肯定^[6],并在其作用机制,药理动力学、制备工艺及临床应用等方面积累了一定的经验。目前在制备上的关键问题是血细胞来源有限。国外在综合利用血液的条件下,用分离白细胞法制备的干扰素,效价较高,外观性状亦好,但其缺点是制备手续比较繁重,而且在提取过程中白细胞有损失。国内中国医学科学院流行病防治研究所利用脐带血全血制备干扰素取得良好效果,由于不需提取白细胞,方法较为简便。但脐血数量有限,借以大量制备干扰素有困难。我们采用制备冻干血浆剩余的血细胞,来源较为充裕。用全血细胞法制备干扰素,根据初步的比较试验结果表明有操作简便,能充分利用血液中白细胞的优点,但除血浆外,其它血液有形成分如红细胞等不能充分综合利用,另外制出的干扰素含其他蛋白较多,不利于进一步提纯。因此二种方法各有其特点,那一种更适合于今后大量生产之用,尚待进一步研究。

世界卫生组织专家会议备忘录^[7]指出,由于目前在输血实践中倾向于不输全血,而输其成分如血浆等供作临床治疗用,估计100万人口城市的输血中心,每年可提供 10^{14} 白细胞作制备干扰素之用,约可制得 10^{11} 单位。如一次剂量为 10^6 单位,即相当于100,000次治疗剂量,这是一个相当可观的数量。输全血在很多情况下并非必要,输血浆或其它成分可能更为方便和安全,并有利于血液的综合利用。目前各生物制品研究所在制备冻干人血浆中,有一

部分分浆后血细胞可供利用以生产白细胞干扰素。

关于干扰素的检测方法,本文采用了较为简便的病变抑制法。用二株人胚肺和一株人胚皮肤肌肉细胞进行检测干扰素试验,其中人肺纤维母细胞SL₂株接种VSV可产生明显病变,用同一批干扰素反复测定的结果比较稳定,因此我们选用它作为检定细胞。此株细胞我们在液氮中冻存了大量种子细胞,可供长期使用。在本研究中,制备的干扰素效价大多在每毫升1000—2000单位之间,低于中国医学科学院病毒学研究所报告的结果。由于不同细胞株对干扰素的敏感性差异很大,所以有必要将我们所测定的效价与国内外其它实验室的结果进行比较。

本实验结果表明,不加任何人血浆成分的4.1培养液,与含人血清、血浆或白蛋白者产生干扰素的效价基本相同。根据制备方法,在病毒诱生后离心一次,再用汉氏液洗一次,因此残留的血浆量是很少的,不足以影响试验结果。早期文献报道^[3],如培养液中没有人血浆成分存在时,产生干扰素的效价很低,与本文的结果不一致。其差别的原因首先是制备方法不同,全血法制备在整个诱生和培养过程中都有大量红细胞存在,显然有少数破坏释出其内容物,是否也能起人血浆蛋白的作用须进一步研究。近来Mogensen等报道^[8]制备白细胞干扰素的培养液中的人血清或血浆可用牛血清白蛋白、酪蛋白或去丙种球蛋白的人血浆代替,并不降低干扰素的产量,说明人血浆成分并不是绝对必需的。我们正在考虑今后在制备液中不加入血白蛋白,因为这些材料来源不易,而且还有污染其它病毒的危险。另一个原因,国内外其他作者用的培养液多为Eagle氏液,而我们用的是4.1培养液,它是酪蛋白的水解物,

也可能影响试验结果。

参 考 文 献

- [1] Isaacs, A. et al.: *Proc. Roy. Soc. Ser. B.*, 147: 258, 1957.
 [2] Cantell, K.: in *Sym. Ser. Immunol. Standard.*, 14: 6, 1970.
 [3] Valenta, J. R. et al.: in *Sym. Ser. Immunol. Standard.*, 14: 80, 1970.

- [4] Cantell, K. et al.: *Texas Reports on Biology Med.*, 35: 138, 1977.
 [5] 吴淑华等: 微生物学报, 18: 225, 1978。
 [6] Dunnick, J. K. et al.: *J. Infect. Dis.*, 139: 109, 1979.
 [7] Memorandum: *Bull. W. H. O.*, 56: 229, 1978.
 [8] Mogensen, K. E. et al.: *Pharmac. Ther. Pt. A.*, 1: 369, 1977.

STUDIES ON HUMAN EXOGENOUS INTERFERON

I. INDUCING CONDITIONS OF HUMAN WHOLE BLOOD CELLS INTERFERON

Tong Kui-tang Xu Mei-lian

(Shanghai Institute of Biological Products, Shanghai)

He Zhi-ming Wang Mei-juan

(Shanghai Lu Wan Area Central Hospital, Shanghai)

Interferon was produced by inducing human whole blood cells with NDV after plasma separation. Two hundred milliliter crude interferon could be prepared from 200 ml blood. The titers of interferon were mostly between 1000—2000 units per ml. Assay of titers of interferon was carried

out in human embryo lung fibroblast cell, SL₆ strain, and VSV was used as challenge virus with reproducible results. The effects of dosage of challenging virus, composition and volume of medium used were also studied.