

周如真 编著

胸腺激素 的研究与质量 检验技术

中国医药科技出版社

胸腺激素的研究与质量检验技术

周如真 编 著

中国医药科技出版社

登记证号：（京）075号

胸腺激素的研究与质量检验技术

周如真 编著

中国医药科技出版社 出版
（北京西直门外北礼士路甲38号）
（邮政编码 100810）
吉林市蓝天印刷厂 印刷
全国各地新华书店经销

开本787×1092mm1/32 印张10.7
字数 210千字 印数1—3000
1994年10月第1版 1994年10月第1次印刷
ISBN 7-5067-1231-8/R·1088

定价：9.50元

内 容 提 要

本书是国内第一本有关胸腺激素的研究进展与质量检验技术等
专业书籍。全书共分3章11节，第一章为胸腺肽（素）、胎盘肽、转
移因子等生化药物与制剂在国内外最新研究动态与进展情况，分为
综述、生产制备、质量控制、成分分析、药理及临床五节。第二章系
作者30余年的生化药品检验的经验，编著了生化制剂的紫外鉴别与检
查、多肽和核酸含量测定方法、生物活性测定法、电泳法等内容。第
三章为生化药品质量检验及胸腺肽、转移因子注射液两个新质量标准
和生化药品（制剂）质量标准制订的技术与要求，它对新药研究中如
何制订质量标准具有指导及参考价值。

本书内容丰富、新颖、实用，既有理论阐述又有实际操作技术。
因而可供从事生化药品生产、研究工作者参考，又是生化药品质量检
验人员的实验操作手册，还可供临床医生参考，亦可作为生化药品检
验学习班的教材及院校专业师生参考。

前 言

自1949年Lawrance报道在人体之间转移对特异性抗原的细胞介导免疫后，打开了免疫调节疗法及基础免疫机制的新领域。1955年进一步证实白细胞裂解后的溶液，也可以完成迟发性超敏反应的转移，此种活性成分可以用透析方法从裂解后的白细胞提取物中分出。劳伦斯氏将这种成分定名为“转移因子”。以后进一步研究发现，这种分子量小于一万的透析液成分中含有200种以上的不同物质，转移因子是其中的一种。

Goldstein等于1966年报道，从小牛胸腺提取到胸腺素(Thymosin)，此后国内外学者相继从胚胎胸腺、小牛胸腺、猪胸腺等提取制备出数十种胸腺激素制剂。四十多年来，国内外、军内外对此类免疫制剂进行了许多基础与临床研究。应用于临床治疗各种免疫缺陷疾病，均获得了比较好的治疗效果。

鉴于转移因子已开过九届国际和五届全国学术会议，胸腺肽尚未开过专业学术会议。为了提高胸腺肽等制剂质量，为了提高全军生化制剂整体质量水平，保证临床用药安全有效；因此，全军于1993年召开了胸腺素（肽）等生化制剂质量研讨会，围绕如何提高制剂质量这根主线进行了交流与讨论。

本书收录了这次会议的大部分优秀论文，以供同仁参考。为了提高胸腺肽（素）等生化制剂质量检验水平，统一标准、统一方法、统一操作，以便全面衡量各家生产的制剂

质量水平。作者积30余年的生化药品质量检验的经验，对每种检查及检验方法从原理、试剂配制、操作方法及注意事项均作了比较全面的阐述。本书共分三章十一节，包括综述、生产制备、质量控制、成分分析、药理及临床、药品常用的生化检验方法、生物活性测定的常规方法及几种新方法、新生化药品质量标准制订的技术与要求等内容。本书既可作参考资料，又可作实用手册，可供从事生化专业各类人员参考。第二章及第三章亦可作为生化制剂质量检验学习班的教材。

由于编写时间仓促，作者水平所限，若有不当之处，敬请读者批评指正，以便共同提高。

在编写及出版印刷过程中得到中国轻工业出版社周跃泉、李方宇先生和中国人民解放军空军医学高等专科学校潘文干副校长、罗卫国等同志的大力支持，特此表示感谢。

编著者

1994年6月于北京

目 录

第一章 论文集

第一节 综述	(1)
胸腺素(肽)的研制和应用进展	杨文德等 (1)
胸腺素(肽)几项质控指标的研究	
现状与展望	周如真 (3)
转移因子的基础研究	吴玫涵等 (13)
转移因子研究的一些进展	蔡琳昌等 (22)
抗癌特异性转移因子的研究与应用前景	张美义等 (28)
无蛋白血清的研究及其应用进展	陈荣德等 (32)
小角度激光光散射仪及其在	
蛋白质药物研究中的应用	张修健等 (38)
胸腺素的免疫调节功能及临床应用前景	董荣春等 (41)
白细胞介素 2 免疫学检测的进展	王益寿 (48)
第二节 生产制备	(50)
小牛胸腺素注射液的制备和体会	朱学连等 (50)
提高小牛胸腺肽收取率的研究体会	李材棣等 (54)
制作转移因子的经验体会	姜坤元等 (56)
猪脾抗肺癌特异性转移因子的研制	张美义等 (60)
用冷冻浓缩法提高转移因子	
紫外吸收值的探讨	李材棣等 (66)
对反复冻融—透析法, 改良反复冻融	
—透析法提取的转移因子的活力观察	黄楚华等 (67)
胸腺素提取工艺初探	侯淦泉等 (70)

人白细胞乙型肝炎特异性转移因子的研制···安清武等	(72)
第三节 质量控制 ·····	(75)
转移因子质量控制指标的探讨·····顾志勤等	(75)
猪脾转移因子紫外光谱及其与	
多肽含量的相关分析·····曾学清等	(78)
三类转移因子多肽含量标准化的探讨·····王勋楚等	(83)
对转移因子主要成分检测结果的探讨·····刘恩鹏等	(86)
转移因子紫外光谱特征、多肽含量	
和活力的分析·····刘世良	(88)
对转移因子中间体保存方法、含量及	
活性变化的研究·····杨志敏等	(92)
转移因子和胸腺素活性检测的探讨·····罗中华等	(96)
影响PS—TF对E—玫瑰花结形成作用	
因素的探讨·····路萍等	(101)
用MTT—LAI方法鉴定特异性转移	
因子的免疫活性·····王方等	(105)
牛肝细胞生长因子注射液质量	
控制的探讨·····陆江春等	(110)
肝细胞生长因子活性检测(体外法)·····鞠九龙	(115)
生产注射用胎盘多肽的质量监控·····刘月新等	(120)
抗乙肝胎盘特异转移因子的特异	
免疫活性观察·····张光曙等	(123)
第四节 成分分析 ·····	(131)
用高效液相色谱法分离分析	
胸腺因子D的组分·····周如真	(131)
HPLC分离分析人胎盘转移因子	
(HP—TF)组成组分·····周如真	(140)

反相高效液相色谱法研究胸腺

多肽的组成……………周如真等 (144)

用HPLC分离比较灭菌前后的胸腺

激素制剂组成组分……………周如真等 (153)

SDS—PAGE电泳法测定胸腺多肽注射液

的分子量……………戴建平 (172)

用反相高效液相色谱法分析转移

因子注射液的组分……………周如真等 (175)

无蛋白血清的成分及药效探讨……………陈荣德等 (179)

第五节 药理及临床…………… (182)

猪脾转移因子 (PS—TF) 制剂的细胞

免疫调节作用的研究……………赖炳森等 (182)

胸腺肽对 T 淋巴细胞亚群功能影响

的探讨……………陈惠英等 (189)

肝细胞刺激物质治疗大鼠慢性肝损害

时对肝细胞的生物活性作用……………李安信等 (192)

特异胎盘转移因子实验研究

和临床治疗乙肝的应用……………张光曙等 (200)

胎盘因子对小鼠抗衰老作用的研究……………杨道理等 (205)

小牛胸腺肽抗衰老作用临床研究……………马连荣等 (209)

冻干胎盘多肽治疗慢性病毒性

肝炎疗效观察……………周训森等 (214)

胎盘因子注射液超声雾化吸入治疗

老年慢性支气管炎的观察……………杨道理等 (216)

转移因子口服液治疗小儿呼吸道感染……………柏琼等 (221)

胃癌特异性转移因子治疗进展期

胃癌的临床应用……………张沥等 (225)

转移因子治疗银屑病 260 例的临床观察…… 韩萍等 (232)

转移因子治疗带状疱疹 123 例临床观察…… 韩萍等 (234)

第二章 质量检验技术

第一节 鉴别与检查…… (236)

几种生化药品的紫外鉴别试验…… (236)

生化制剂色泽和溶液澄清度检查…… (238)

注射剂澄明度检查…… (239)

酸度、碱度、酸碱度检查…… (245)

水分测定法…… (250)

第二节 活力测定法…… (254)

一、E-玫瑰花环试验…… (255)

二、淋巴细胞转化试验…… (258)

三、白细胞移动抑制试验…… (261)

四、用化学发光法测定小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬活性 (体内法) …… (263)

五、小鼠巨噬细胞吞噬功能试验…… (266)

六、豚鼠巨噬细胞移动抑制试验…… (266)

七、碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶 (APAAP) 法… (268)

第三节 含量测定法…… (269)

一、多肽 (蛋白质) 含量测定法…… (269)

(一) 半微量凯氏定氮法…… (269)

(二) 福林-酚试剂法…… (272)

(三) 改良的双缩脲法…… (274)

(四) 紫外分光光度法…… (275)

二、核糖核酸含量测定法…… (278)

(一) 紫外分光光度法·····	(278)
(二) 比色法·····	(280)
(三) 定磷法·····	(286)
第四节 电泳法 ·····	(288)
一、原理·····	(289)
二、影响迁移率的因素·····	(289)
三、纸电泳·····	(291)
四、醋酸纤维薄膜电泳·····	(296)
五、聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	(298)
六、SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳法测蛋白 及酶的分子量·····	(307)

第三章 生化药品检验与质量标准

第一节 生化药品质量检验 ·····	(311)
第二节 生化药品（制剂）质量标准 制订的技术与要求 ·····	(321)
附：一、转移因子注射液（暂行质量标准）·····	(325)
二、胸腺肽注射液（暂行质量标准）·····	(329)

第一章 论文集

第一节 综 述

胸腺素（肽）的研制和应用进展 (摘要)

解放军总医院北京兴华生物新技术开发中心

杨文德 赵 相

部分纯化胸腺素（肽）研制的主要进展是工艺的改进、简化、酸化、小分子化、联产高产化和胸腺多源化。生产设备简单，生产周期缩短，产品活性高，副作用小。为迅速增长的临床需求提供了大量优质的胸腺素（肽）。联产并高产多例，仅举其一。姚明树就是用SC液制胸腺匀浆，3000rpm离心30分钟，取上清物（胞质）调至pH3，搅提5h、离心、上清80℃温浴30分钟，冷至20℃，离心，上清用乙醇分级沉淀，合并上清，用10kd膜超滤得胸腺素（24.5克/公斤）或用6kd膜超滤得胸腺肽（12.5克/公斤）。取沉淀物（胞核）用12倍0.9%NaCl液悬浮搅拌4h，加5%SDS液1.7倍，室温中搅拌3h，冰箱中过夜，边搅边加0.75倍固体NaCl并搅至全溶，4000rpm离心2分钟，上清过滤加等量95%冷乙醇，取沉淀用乙醇、丙酮各洗2次，真空干燥得絮状胸腺DNA。

纯化胸腺素（肽）的进展形势也很喜人。国内外都已成

成功地分离纯化或人工合成了多种高活性小分子胸腺素(肽)。如胸腺28肽(胸腺素 $\alpha 1$)比 F_5 活性高10~1000倍,既能诱导T细胞成熟,又能增加MIF、 α -IFN、 γ -IFN和IL-2等多种活性因子的生成。其抗血清还能使艾滋病毒失活,阻断该病毒在 H_2 细胞中的复制。陈枢青(1992)用高效液相制备柱制得比Low(1984)用分析柱得到大得多的 $\alpha 1$ 。基因工程和人工合成品活性类似天然品。TP-11的活性中心 TP_5 和活性比 TP_5 高10倍的〔Phe36〕 TP_5 ,稳定性高1000倍的〔CLe33〕 TP_5 以及比 TP_5 分子更小活性更高的 TP_3 ,我国学者陈正英(1989)亦均已合成成功。杨士珍(1991)还成功地合成了血清胸腺因子(STF),其ERFC增高率316%(略高于Bach所赠天然STF)。刘培楠(1983)纯化的TP-A活性比 F_5 高20倍。刘士廉等纯化的TP- C_3 等比TP-A活性高150~500倍。

胸腺素(肽)的临床应用亦日益广泛,1974年国外开始 F_5 的I期临床试验,1987年在美国已广泛用于临床,1990年前苏联还用TP治疗切尔诺贝利核事故病人取得很高疗效。1987年仅国内临床应用胸腺素(肽)累计数已达2000余例,1991年尚未完全统计累计数已达66个病种7477例,其中病毒性肝炎3266例(单用PTM治疗慢活肝145例,治愈率74.5%)。自身免疫性疾病2323例(用TM结合脱敏治疗支气管哮喘800例,治愈491例)。免疫功能缺陷、难治性感染1212例(多种抗生素无效,注射TM6天后肺炎被控,体温正常)。肿瘤、放射伤害和衰老696例(TP配合放化疗治疗272例恶性肿瘤患者,放化疗反应减轻,疗效提高,寿命延长。Et、Ea显著低下的老年人连注TP20天,便可恢复到和青壮年一样)。 $\alpha 1$ 治疗慢乙肝的缓解率比 α -IFN高1倍。 TP_5 每次静滴50mg,每周

3次，连注30天，治疗艾滋病患者6例，获症状减轻，体重增加，免疫功能增强，部分疗效可保持8个月。

展望未来：部分纯化胸腺素（肽）先进工艺的普及和提高，纯化制品的扩大临床试用和各种不同制品的活性差异的进一步研究开发，将为人类健康长寿，不断作出新的贡献。

胸腺素（肽）几项质控指标 的研究现状与展望

总后卫生部药检所

周如真

一、概述

1966年Goldstein等⁽¹⁾首先报道自小牛胸腺提取到激素样物质，命名为胸腺素（Thymosin）。1968年开始自小牛胸腺提取组分5（ThymosinF₅—TF₅），1974年开始应用于临床。1972年法国的Bach等首先报道了依赖于胸腺的血液胸腺因子的存在，称为循环血胸腺荷尔蒙或称胸腺活性物质（Thymic activity, TA）和胸腺因子（Thymic factor, TF），又名血清胸腺因子（Serum thymic factor, STF）结构为9肽⁽²⁾。提取的胸腺素，根据纯化步骤和程度可分为不同的胸腺素组分。目前临床常用的胸腺素制剂为胸腺素组分5（TF₅），是由40~50种80℃热稳定的多肽组成的混合物，分子量为1000~15000道尔顿（D），等电点（PI）在3.5~9.5之间。对分离到的多肽进行免疫活性测定，有活性的胸腺因子称为胸腺激素，无活性的因子称为胸腺多肽，

如胸腺多肽 B 等⁽³⁾。

1978年王耀⁽⁴⁾报道,小牛胸腺素 F₅分子量为 12,000 D 的蛋白质,含 108 个氨基酸,其中 50% 为酸性氨基酸,不含特殊氨基酸。这一蛋白质分子中可分出二条分子量为 3200 D 和二条分子量为 2400 D 的多肽链,对热稳定,80℃ 加热 15 分钟不变性。小牛胸腺素 F₅含 12 种对热稳定的多肽,其分子量在 1200~14000 D 之间,还含有不到 1% 的单核苷酸、低聚核苷酸、糖和脂。刘士廉等于 1979 年开始了小牛胸腺组织小肽分离,用 Sephadex G15 柱纯化和生物活性的研究。

1975 年 Bach 报道从猪血清中分离纯化出血清胸腺因子 (STF) 是 9 个氨基酸的肽。1977 年金以丰等⁽⁵⁾以猪胸腺为原料,制出了高活性的胸腺激素,并试用于临床。他们第一次从猪胸腺中提纯了其中的两个活性成分,分别命名为猪胸腺素 T₁ 和 E₁。T₁ 和 E₁ 含芳香族氨基酸较少,不含糖及核苷酸类物质。T₁ 和 E₁ 在 260nm 波长处的光吸收度无明显变化,在 280nm 波长处光吸收度较低。猪胸腺素为 8~9 种中性和酸性蛋白的混合制剂,分子量在 9000~68000 D 之间。何兆雄等⁽⁶⁾报道猪胸腺素注射液为多肽混合物,分子量在 15000 D 以下。陈紫榕等⁽⁷⁾制备的猪胸腺素 F₅分子量小于 15000 D, PI 在 7.0~7.5 之间。

祁岩超等⁽⁸⁾报道用 4~9 个月龄的正常胎儿胸腺组织制备的人胎儿胸腺素分子量为 6000~7000 D。

近年来研究证明,胸腺中有生物活性的多肽类物质,分子量一般在 10000 D 以下。

二、含量测定

胸腺素(肽)制剂中多肽(蛋白质)的浓度可以从它们的物理性质如折射率、紫外吸收或用化学方法如定氮、双缩

脲、福林一酚等方法测定求算，其中最基本和常用的方法为定氮法、双缩脲法和福林一酚法，这是一般实验室中经常使用的方法。

1. 半微量凯氏定氮法

胸腺素（肽）为含氮的有机化合物，按中国药典1990年版二部附录规定操作，测得氮的含量后，再求算多肽（蛋白质）的含量。

此法精确度高，可以消除 NH_3 的干扰，仪器简单，但操作麻烦、费时，消耗样品量较仪器法大。

2. 福林一酚试剂法

自1951年Lowry⁽⁹⁾报道用福林一酚试剂(Folin phenol Reagent)法测定蛋白质含量以来，国内学者在研究制备胸腺素（肽）制剂中应用福林一酚试剂法测定制剂的多肽含量^(10, 11)。

福林一酚法灵敏度高（5~25 μg ），比双缩脲法高100倍，比紫外法高10~20倍，显色稳定，操作方便、迅速，不需要复杂仪器。但是， NH_3 、还原糖、酚类及柠檬酸有干扰。

3. 双缩脲法

国内有些学者用改良的双缩脲法测定胸腺素等制剂中多肽的含量^(8, 12)。在碱性条件下，多肽（三肽到蛋白质）的肽键与 Cu^{++} 络合显兰色。此法不敏感，要求在30分钟以内完成测定。

4. 紫外分光光度法

董丽宁等⁽¹³⁾用紫外分光光度法测定胸腺素注射液的含量，以同一批胸腺素注射液经定氮测定其含量后，作为对照品，制备标准曲线。将样品稀释成适宜浓度，于 $256 \pm 1\text{nm}$ 波长处测定最大光吸收度，从标准曲线求出样品的含量。

此法，测定速度快、简便，样品用量少，无机盐类及 NH_3 不干扰，同时灵敏度较高，重现性较好。但准确度较差，仪器要求比较高。

5. 福林—酚法与定氮法的比较

盛义朝⁽¹⁴⁾报道，同一批制品分别用半微量定氮法、福林—酚法测定注射用胸腺肽含量，结果差别很大，定氮法比福林—酚法高2.2~2.6倍。主要由于这类多肽结构中含色氨酸、酪氨酸甚微，造成福林—酚法结果偏低。若以同类制品作对照品，误差甚小。

三、活力测定

对胸腺激素的分离、纯化、生产及临床应用都迫切需要解决制剂的活力测定问题。活力检测对于鉴定胸腺素制剂的活性和验证其临床疗效有重要意义。

对于制剂的活力测定，近年来国内外广大学者进行了多方面的研究。目前常用的方法有体外法，如E-玫瑰花结形成试验，淋巴细胞转化试验，末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)法，巨噬细胞移动抑制试验。体内法，如小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能法等。现将有关内容简述如下。

(一) E-玫瑰花结形成试验

人体E-玫瑰花结(环)试验为最常用的方法之一，此法为Wara—Ammann于1975年建立。玫瑰花结测定法(Rosette assay或Rosettes inhibiting reaction)也叫Q转换测定(Q-Conversion assay)。按方法学可分为总玫瑰花结(Et)和活性玫瑰花结(Ea)形成试验，又可分为常量法及微量法。

1. 总玫瑰花结(Et)形成试验

(1) 原理 人外周血(或脐血)中的前T细胞在体外