

国内外医学科学进展



卫生部医学科学技术局
上海市医学科学技术情报研究所

国内外医学科学进展

编辑出版 卫生部医学科学技术局
上海市医学科学技术情报研究所
(上海市建国西路 602 号)

印 刷 上海市印刷三厂

1982 年 9 月出版

限国内发行

每本定价: 1.80 元

国内外医学科学进展

目 录

1. 多肽蛋白激素结构与功能关系研究的进展……朱尚权 (1~7)
2. 干扰素研究新进展……杜 平 杨蓉芬 (8~14)
3. 骨髓移植的进展……应大明 (15~22)
4. 近年来寄生虫病药物研究进展……陈 昌 (23~34)
5. 蛇毒神经毒素研究的进展……徐 科 (35~39)
6. 抗癌新药研究的最近动向……胥 彬 (40~45)
7. 从肾本质的研究到证本质的研究……沈自尹 (46~51)
8. 脉诊的现代研究……张镜人 杨天权 (52~57)
9. 肿瘤流行病学研究现状……高玉堂 高汝霁 (58~63)
10. 肿瘤免疫的某些进展……余新生 (64~69)
11. 肿瘤预防的一些进展……俞鲁谊 (70~73)
12. 肝癌研究的新动向……汤钊猷 (74~79)
13. 食管癌防治研究进展…河南省食管癌防治研究协作组 (80~85)
14. 原发性支气管肺癌的进展……徐昌文 (86~91)
15. 原发性高血压、卒中病因及预防研究进展……赵光胜 (92~97)
16. 高血压治疗的若干进展……沈家麒 (98~102)
17. 甲型肝炎研究进展……胡孟冬 (103~107)
18. 乙型肝炎疫苗研究进展……张 箐 (108~112)
19. 心绞痛治疗研究的进展……龚兰生 (113~118)
20. 糖尿病进展……钟学礼 (119~129)
21. 风湿病学的进展……江绍基 吴裕炘 (130~137)
22. 小气道功能测定临床应用研究进展……李华德 (138~142)
23. 创伤急救的国内外现状……赵连璧 华积德 (143~149)
24. 骨折治疗中关于固定理论的新进展……柴本甫 (150~155)
25. 烧伤临床与科研进展……史济湘 (156~162)

26. 小儿心理发育研究进展.....郭 迪(163~171)
27. 儿童营养科研进展.....苏祖斐(172~178)
28. 计划生育科研进展.....张德玮 沈启芳(179~186)
29. 围产期高危妊娠监护的进展.....田雪萍等(187~195)
30. 妊娠高血压综合症研究进展.....张振钧(196~204)
31. 原发性开角型青光眼研究进展.....嵇训传(205~212)
32. 激光在医学上的应用进展.....许松林等(213~220)
33. 冷冻治疗与低温医学的研究进展.....徐崇恩(221~228)
34. 核医学几点值得注意的动向.....夏宗勤(229~234)
35. 内窥镜在消化道疾病应用的进展.....唐振铎(235~241)
36. 近年来电子计算机在医学中的应用概况.....史秉璋(242~248)
37. 放射诊断学的新阶段——医学影象学进展和展望
.....张发初 王峭崖(249~255)
38. 矽肺防治研究进展.....胡天锡 李全路(256~262)
39. 精神病院外防治工作进展.....王昌华(263~266)
40. 护理学的进展.....安之璧(267~271)
41. 文献计量学在医学上的应用.....高昌烈(272~278)
42. 卫生服务研究进展.....顾杏元(279~283)

多肽蛋白激素结构与功能关系研究的进展

朱 尚 权

中国科学院上海生物化学研究所

提要 本文从六个方面叙述了多肽蛋白激素结构与功能关系近年来的研究成就：(一)具有生物功能的新激素的分离和纯化。叙述了下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)和松果腺性抑制肽的分离、纯化、鉴定和化学结构，以及 CRF 的结构与功能关系。(二)内分泌中的分子病。胰岛素分子中由于一个氨基酸发生突变使其活力大大降低。胰岛素原分子中一个氨基酸发生突变使它不能转化成活性胰岛素。两种突变都会引起糖尿病。(三)激素的活性碎片和“活性中心”。比较了不同肽类激素的“活性中心”，芳香性氨基酸对“活性中心”的形成可能起着重要的作用。(四)改变激素分子的化学结构。着重介绍了 D 型氨基酸引入到激素分子中以增加激素的活力和提高激素作用的专一性，用酶促方法把猪胰岛素改变为人胰岛素。(五)激素的前体。叙述了激素原和原激素原的发现、结构和转化成激素的过程，并对前体在生物体内的功能进行了讨论。(六)构象与生物功能的关系。以垂体后叶素，尤其是催产素为例，阐明小肽激素具有特定的空间结构，这一结构对激素功能是非常重要的。本文最后对国内研究情况作了简单介绍。

引 言

近 20 年来，多肽和蛋白质激素研究发展迅速。精密的实验技术及仪器设备为这类激素的分离、鉴定和结构测定提供了必要的条件。内源性吗啡肽和胸腺免疫因子等的发现、分离及结构与功能关系的研究就是一个突出的例子。多肽合成技术的发展，导致数以百计的多肽激素如催产素、加压素、增压素 I 和脑啡肽等类似物和上百种胰岛素类似物的合成。加上快速、灵敏的活力测定方法，为阐明多肽蛋白激素的化学结构与生物活力之间的关系提供了大量的信息。通过 X 光晶体结构分析(如胰岛素和胰高血糖素)以及核

磁共振、旋光色散、圆二色性和荧光等的研究，使我们对激素的三维空间结构及溶液中的构象有了进一步的了解。

本文综述近年来有关多肽蛋白激素结构与功能关系研究的概况。

具有生物功能的新激素 的分离和纯化

六十年代后期和七十年代是神经激素和胃肠道激素发展的高潮，多种这类激素先后被分离、鉴定并测定了其氨基酸排列顺序。近年来，由于高效快速的高压液相层析(HP LC)在分离多肽中获得广泛的应用，一些原来因含量极少而难于提纯的激素也被分离纯

化。早在二十五年前,人们已知道促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)存在于下丘脑,但一直未能得到纯品。最近 Rivier 等^[1]通过一系列分离方法,从四十九万只羊的下丘脑分离得到纯的具有刺激促肾上腺皮质激素(AC_{TH})和 β -内啡肽分泌活力的多肽。它是由41个氨基酸组成。从合成的类似物证明,它的羧基端包括酰胺对激素的活力是必需的。而N端自由氨基及部分氨基酸对激素的活力是不重要的。另一方面,CRF的结构与从南美蛙(Phylomedusa Sauvagei)的皮肤分离出来的蛙皮肤肽(Sauvagine)^[2-4]非常相似,其中有一半氨基酸是完全相同的。据报道,这种蛙皮肤肽在体内和体外也能促进 ACTH 和 β -内啡肽的释放和抑制促甲状腺素(TSH)、生长素(GH)和脂肪酸释放激素的分泌。此外,CRF对动物的降血压作用也与蛙皮肤肽相似。因此认为它们是从一个共同的古老基因演化而来的。但是 CRF 的降血压作用所需剂量是刺激 ACTH 和 β -内啡肽的释放所需剂量的100倍以上。

松果腺是具有抑制生殖功能的内分泌腺体,但松果腺中何种物质有此作用,至今仍不清楚。目前有两类物质可供研究,一类是吲哚胺,特别是 N-乙酰 5-甲氧基色胺(又名褪黑色素),它能模拟一些松果腺体的作用。另一类是肽类物质。1963 年 Milcu 等分离出一种松果腺肽,其化学结构类似 8-精催产素(8-Arginine Vasotocin AVT)。后来合成了这一物质,并证明它有抑制动物生殖功能的作用。然而许多报道都证明松果腺中除含上述两种物质外,还含有其它具有抗生殖功能的肽类物质。Orts 等^[5]报道了从牛的松果腺分离出一个三肽,其结构是 Thr. Ser. Lys。它具有很强的抗性腺的能力,有可能成为有前途的避孕药。在松果腺内还含有比上述三肽作用更强的肽类物质,但至今尚未提纯。由于哺乳动物的松果腺是神经内分泌器官,它接受神经支配,并通过分泌激素来调节体

内的多种生理功能。因此这个腺体可能还含有具有其它生物功能的活性肽。这是值得进一步深入研究的课题。

内分泌中的分子病

1979 年, Tager 等^[6]报道了由于胰岛素分子的缺陷而引起糖尿病的例子。他们从糖尿病病人的胰脏分离出突变种的胰岛素。其 B 链第 24 位或第 25 位的苯丙氨酸为亮氨酸所代替,从而导致它与胰岛素受体结合能力及生物活力的降低,甚至能抑制正常胰岛素的作用^[7]。Tager 等^[8]也合成了 B₂₄ 或 B₂₅ 为亮氨酸取代的猪胰岛素,它们与胰岛素受体的结合能力分别约为正常胰岛素的10%和1%,生物活力也相应降低。但两者在高浓度下仍具有完全的活力。Gattner 等^[9]和 Inouye 等^[10]也分别报道了类似的人胰岛素。

1981 年,Robbins 等^[11]报道另一例因胰岛素原发生突变的糖尿病。其分子第 65 位的精氨酸为其它氨基酸取代,使胰岛素原不能转化成正常的活性胰岛素。该文并证明,激素分子的变化是由于合成胰岛素的基因发生突变的结果^[12, 13]。

其他多肽蛋白质激素是否也会有突变种并引起相应的内分泌疾病,目前尚未见报道。但从上述胰岛素分子病的情况来看,这是值得我们注意和研究的问题。

激素的活性碎片和“活性中心”

所谓激素的活性碎片是指具有一定生物活力的激素分子片段,通常可用限制性酶分解或化学降解天然激素分子而获得。小肽激素的活性碎片往往通过化学合成的方法获得。激素活性碎片的研究对于了解激素分子本身及激素与其靶细胞膜上的受体之间相互作用的性质提供了宝贵的资料。

最近对肽激素的研究证明,当肽激素与

其受体发生作用时,一些特异性很不相同的激素往往具有同一功能。这一功能上的交叉活性有时可用这些激素的化学结构相似性,即所谓“同一家族”来解释。但另一方面,一些激素在功能上有交叉,但在化学结构上又完全不同。由于这些激素各有其独特的空间结构,从而使它们表现出某些结构上的同一性。为了描述这一现象,引进了激素“活性中心”的概念。激素的“活性中心”是指激素分子中直接参与与受体结合或/和激发活力的区域。

胰岛素和类胰岛素生长因子 通过胰岛素类似物与其受体相互作用的研究,认为胰岛素的“活力中心”包括 A₁-甘氨酸、A₁₉、B₁₆和 B₂₆-酪氨酸、A₂₁-门冬酰胺、B₁₂-缬氨酸、B₂₄和 B₂₅-苯丙氨酸^[14]。其中聚集于β-折迭层并参予形成二聚体的氨基酸顺序B₂₄-B₂₆ (Phe. Phe. Tyr)尤其重要^[15]。若它们为其它氨基酸取代,将导致胰岛素活力的降低甚至丧失。如胰岛素分子病就是一例。另外,类胰岛素生长因子(IGF)在结构和功能上都与胰岛素相似。在B₂₄-B₂₆上也是三个芳香性氨基酸(Phe. Tyr. Phe)聚集在一起。这可能是它显示胰岛素活力的主要部位。然而在松驰素分子中,这三个芳香性氨基酸的位置为 Trp. Gly. Arg 所占据。因此虽然松驰素的其它结构与胰岛素类似,但它既没有类胰岛素活力,也不能与胰岛素受体结合^[16]。

胰高血糖素 从胰高血糖素的晶体结构模型可清楚地看到,此分子有两个很强的疏水区域。第一个区域聚集了三个芳香性氨基酸,即 Phe-6、Try-10 和 Try-13。第二个区域包括 Phe-22 和 Trp-25^[17]。这些芳香性氨基酸通过α-螺旋结构聚集在一起。前一个疏水区域可能对胰高血糖素的受体结合活力和/或生物活力是必需的。因为胰高血糖素分子的 N-端 21 肽(1~21)虽不含第二个疏水区域,但却具有全部活力^[18]。N-端六肽(1

~6)只有在高浓度下才具有部分的活力^[19]。

ACTH 及其同族激素 ACTH、促黑激素(MSH)和促脂肪酸释放激素(LPH)在化学上是相互关联的激素。它们包含有相同顺序的七肽,即:Met. Glu. His. Phe. Arg. Trp. Gly。根据结构与功能关系研究的资料,认为其中 Phe. Arg. Trp 三肽是这三个激素活化环化酶所必需的^[20]。

促胃酸激素族 促胃酸激素(Gastrin), CCK 和雨蛙肽(Caerulin)的 C-端含有相同的四肽~Trp. Met. Asp. Phe。这四肽片段完全可以模拟促胃酸激素的所有作用。临床上应用的五肽促胃酸激素(Pentagastrin)就是在这四肽的 N-端上引入叔丁氧羰酰-β-丙氨酸基(Boc-β-Ala)以提高它对酶作用的抗性,从而延长它在体内的半衰期。由于这几个激素有交叉活力,因此认为含有两个芳香性氨基酸的四肽是这些激素的“活力中心”。

内啡肽 内啡肽是生物体内具有类吗啡活力的内源吗啡肽。它的 N-端五肽正是 Met-脑啡肽的顺序。从脑啡肽的结构与功能关系研究证明,芳香性侧链是受体结合及生物活力所必需的。

从上述例子可以看出,芳香性氨基酸侧链对形成多肽蛋白质激素的“活性中心”是非常重要的。这和激素一受体通过疏水性质相互作用的假设是一致的。应该指出,激素分子中不处于“活性中心”的某些芳香性氨基酸的侧链对维持激素的活性构象也是重要的。此外,聚集在一起的芳香性氨基酸的侧链所构成的疏水面往往位于分子表面,以便有利用它与受体作用。这与其它蛋白质,如酶,是不同的。酶蛋白分子也常常有聚集的芳香性氨基酸基,如苯丙氨酸和色氨酸,但它们往往埋藏于分子的内部。对于不含芳香性氨基酸的促甲状腺释放因子(TRH)是否是例外呢?实际上,TRH 分子(pGlu·His·ProNH₂)中,pGlu 和 Pro 可能已具有类芳香性残基的

作用。

改变激素分子的化学结构

肽类激素结构与功能关系研究的重要内容之一是采用合成、半合成和化学改性等方法,改变激素分子的化学结构。这不仅为激素作用原理的研究提供了各种不同的激素类似物,以阐明激素分子中哪些氨基酸对活性是重要的,哪些是不重要的;同时也是寻找疗效更高、作用更专一的激素类似物的重要途径。近年来,一些激素的类似物已在临床上得到应用。激素在体内很容易被蛋白水解酶降解。为了提高激素对各种蛋白水解酶的抗性,从而延长激素在体内的半衰期,必须在化学合成肽激素类似物时广泛引入不易为酶作用的氨基酸,或在肽的 N-端和 C-端进行某些适当的改变。D-型氨基酸常常被用来达到此目的。例如,吗啡肽分子中,第二位甘氨酸为 D-丙氨酸替换后,其体外活力增加 2~3 倍,体内活力增加 10 倍。促黄体形成激素释放因子(LRH)中第六位甘氨酸为各种 D-型氨基酸取代后,体外活力提高百倍,体内活力最大可提高近 10 倍。在生长素释放抑制因子(Somatostatin)上也发现类似的情况,如第八位的色氨酸为 D-色氨酸取代后,活力增加 8 倍。

D-型氨基酸引入到一些多肽激素分子中的适当位置,不仅可提高激素的生物活力,有时还可提高激素作用的专一性。如临床上用来治疗尿崩症的垂体后叶素,它不仅具有利尿作用,而且有增加血压的作用。对天然激素分子来说,两者活力之比为 1:1,但当其第八位的精氨酸换成 D-精氨酸,而且 N-端氨基用氢代替时,这一类似物的抗利尿作用的活力提高 1 倍,而加压活力只留下 2.75%。换言之,加压活力与抗利尿活力之比从原来 1:1 降到 1:80。若第八位用 D- α - γ -二氨基丁酸代替,抗利尿活力几乎不变,

而加压活力只残留 0.5%,加压活力与抗利尿活力之比为 1:180。

不同动物来源的同一种激素在化学结构上有差异。由于这一差异,使一些动物来源的蛋白激素不能在人体上应用或造成某些不利的后果。例如猪、牛的生长激素不能在人体上发挥作用,而今用遗传工程方法可生产人生长激素。又如临床上使用的胰岛素都是从猪、牛或羊胰中提取,但由于这些种属的胰岛素化学结构与人类胰岛素有差异,如猪胰岛素的化学结构,在 B 链 C 末端是丙氨酸,而人是苏氨酸。虽然这些差异不影响它们在人体的作用,但长期使用就会在人体内产生胰岛素抗体,使临床治疗用药量不断增加。现在通过遗传工程方法生产人的胰岛素,并已获得成功。另一方面,可通过酶的方法将猪胰岛素改造成人胰岛素。Inouye 等^[21]和 Morihara 等^[22]分别报道了这方法。因此临床上应用人胰岛素治疗糖尿病已有可能了。

激素的前体

通过激素生物合成的研究发现,激素的合成过程中存在着比激素分子本身更大的前体,叫激素原(Prohormone)。胰岛素前体—胰岛素原(Proinsulin)是最早被发现并分离、纯化和测定化学结构的激素原^[23]。此后,其他多种激素原也先后被发现和研究^[24, 25, 26]。激素原的活力很低,通过专一的蛋白水解酶作用切除其分子中的一部分后,它们转变成活性激素。

激素原的发现是与生化研究技术和分离分析、鉴定等方法的发展分不开的。这包括蛋白质合成中将带放射性同位素的氨基酸掺入到蛋白中的动力学研究技术。如在研究胰岛素的生物合成时,用患严重低血糖病人的胰岛细胞腺瘤薄片与 H^3 标记的氨基酸在短期培养时,只有少量标记氨基酸掺入到胰岛素分子中,大部分出现在一个分子量比胰岛

素大的蛋白中。这一蛋白经低浓度的胰蛋白酶作用,可转变成胰岛素。这就首次证明了胰岛素原的存在。利用类似的方法证明了其他激素原。mRNA在体外无细胞体系内翻译成蛋白的方法使人们有可能直接鉴定基因翻译的原始产物,这为了解肽激素的生物合成途径提供了重要工具。用得较多的是麦芽核糖核蛋白体体系,这一体系不仅能忠实地翻译mRNA,而且由于这一体系缺乏蛋白水解酶,因而保证了mRNA翻译产物的完整性。按分子大小进行分离的交联葡聚糖凝胶过滤法为激素及其前体的分离提供了有力的工具,而激素放射免疫测定技术又为分离提供了有效、灵敏的检测方法。

从化学上来看,在激素原分子中,激素本身与附加的肽段都是通过两个碱性氨基酸(精氨酸和赖氨酸)形成的二肽相联接。这一特异性的结构保证了激素原转化成激素时酶的专一作用点^[27]。

激素原在体内的功能至今仍不完全清楚。由于激素原没有相应的激素活力或者活力很低,而且它们在分泌细胞内的含量比相应激素低得多,所以它不是分泌细胞贮藏激素的主要形式。对激素的分泌也不可能起调节作用。但它可能有如下几方面作用:

满足基因结构大小的需要 腺体分泌的多肽蛋白激素大多数是通过核糖核蛋白体体系合成的。遗传信息(DNA)的结构基因都很大,要用它来直接合成小肽激素显然是不可能的。因此必需有一个比激素分子大的中间物(即前体)来适应结构基因大小的限制。

一个结构基因隐藏着多种各有其特殊生物功能的多肽或蛋白质的信息 如脂肪酸释放激素(LPH)、ACTH、MSH和内啡肽等是从一个共同的基因翻译出来的前体派生出来的^[28]。

保证激素分子在形成稳定的分泌颗粒前在分泌细胞内不被破坏 胰岛素原从胰岛 β 细胞的粗糙内质网膜释放出来后,转移到高

尔基体,并与高尔基体膜结合形成芽胞样突起,同时经膜上的特异蛋白水解酶作用,将两个碱性氨基酸连成一起的肽键切断,转化成胰岛素和C-肽。此时,胰岛素与 Zn^{++} 结合,逐步形成分泌颗粒储藏起来。胰岛素原的作用很可能就是保证在这一转化过程中激素分子不被其它酶所破坏。

现已知,激素合成过程中存在着比激素原更大的分子,叫原激素原(Preprohormone)。在原激素原分子中,附加到激素原上的肽段含疏水性氨基酸特别多,这有利于它进入到内质网膜内。并推测它可能与膜蛋白一起对识别和启动核糖核蛋白体结合到膜上有作用^[29]。从原激素原转化成激素原是通过结合在膜上的蛋白水解酶水解来完成的。如从原甲状旁腺素原(Prepro PTH)转化成甲状旁腺素原(Pro PTH)是通过微粒体上的酶作用来完成^[30]。

构象与生物功能的关系

七十年代初期,用X光晶体结构分析方法分别阐明了胰岛素和胰高糖素的空间结构。这使我们对这二个激素分子中各个氨基酸和氨基酸侧链在空间的排列位置有所了解,对它们作用的分子基础有了初步的认识,并为这两个激素结构与功能关系的研究提供了许多有用的信息。但至今只有少数几个肽类激素能得到结晶。采用许多物理化学方法研究未能得到结晶的肽类激素在溶液中的构象,已取得很大的成功。催产素就是其中之一。

根据催产素的核磁共振和圆二色性特征,Urry和Walter提出它在溶液中的构象;分子的N端20元环呈 β -反平行折迭区,而C端部分形成第二个 β -折迭区。Lys-加压素,Arg-加压素和Arg-催产素的构象与催产素相似但不完全相同。尤其C-端第二个折迭区域的结构并不那么严格。当催产素与受

体相互作用时,其构象多少有些变化,即所谓“协同效应”。

肽类激素的空间结构对其发挥生物功能是非常重要的。而这空间结构又取决于它的化学结构——氨基酸排列顺序。因此所谓肽类激素的结构与功能的关系无疑应包括激素的化学结构和空间结构两部分。关于这方面的研究近年来已有许多报道。

国内多肽蛋白激素研究概况

表1列举了临床应用的肽类激素的种类、来源和作用与用途。国内许多单位在肽类激素的制备以及临床应用方面做了大量工作并取得成就。在基础理论研究方面也有新的进展。现概述于下:

肽类激素的分离和鉴定 近年来,上海生化所已分离、纯化了鸡、蛇和白鲢的胰岛

素结晶,并测定了它们的化学结构^[31, 32]。由于它们的化学结构与猪胰岛素的结构差异较大,一旦阐明它们的晶体结构,我们将得到更多关于胰岛素如何与其受体发生作用的信息。上海第一医学院潘小平等^[33]报道了从人脑分离出一个新阿片样四肽,其结构是Asn·Ala·Gly·Ala。它与阿片受体有较强的亲和力,并有明显的镇痛作用。1981年,南开大学李健民等报道降钙素的分离并得到结晶。此外,许多生化制药厂也从动物脏器提取出多种肽类激素药物,如胸腺素,胃肠道激素等,并在临床上试用。但这些药物都不是均一的。这可能会影响疗效及产生副作用,因此将它们进一步分离纯化是非常必要的。

合成多肽激素药物 国内自从合成胰岛素以后,多肽合成技术被用来合成多肽激素药物。如催产素、加压素、增血压素Ⅰ、LRH、TRH、脑啡肽和五肽胃泌素等已批量

表 临床应用的主要多肽激素

名 称	来 源	作 用 与 用 途
催产素	脑垂体后叶	催产
加压素	”	抗尿崩症
ACTH	脑垂体前叶	治疗胶原病、关节炎等
LRH	丘脑下部	诊断下丘脑性不育症
TRH	”	诊断甲状腺及垂体功能
生长激素释放抑制素	”	抑制生长激素分泌,亦能抑制胰岛素、胰高血糖素等的分泌
胰泌素	十二指肠	诊断胰腺疾病,胰血管造影
缩胆囊素	”	用于胰外分泌机能检查
肠抑胃肽	幽门、十二指肠	抑制胃蛋白酶原分泌,用于消化性溃疡
五肽胃泌素	合成	促进胃酸分泌,用于胃功能检查
胸腺素 F ₁	胸腺	增强免疫功能
胰岛素	胰脏	降低血糖、治疗糖尿病、精神病等
胰高血糖素	”	治疗低血糖症、休克、心力衰竭
C-肽	”	诊断胰脏功能及其它疾病
副甲状腺素	甲状旁腺	升高血钙、降低血磷、治疗甲状旁腺机能减退
降钙素	甲状腺	降低血钙、血磷、保护骨钙

生产并在临床上应用。此外,胰岛素C-肽、血清胸腺因子、生长激素释放抑制素等也已合成。其中已制备了胰岛素C-肽抗体,这为开展糖尿病及其它疾病的研究建立了基础。

结构与功能关系的研究 胰岛素分子中B₂₂-精氨酸一直被认为是表现活力所必需的。本文作者及其同事^[24]用半合成方法证明B₂₂-精氨酸并不是胰岛素表现活力所必需的,它完全可以用酸性氨基酸(Asp、Glu)代替。曹秋平等^[35]用酶促合成肽键的方法获得结晶的去B链C端六肽胰岛素,这一胰岛素类似物具有40%的天然胰岛素活力,但其受体结合活力只有2~3%。由于两者不平行,我们有理由推测:胰岛素的生物作用不单纯依赖于它与细胞质膜上的受体结合,而与受体结合后的进程,如内部化作用等,可能对胰岛素发挥生物效应起着更重要的作用。另一种可能性是胰岛素发挥生物效应仅要求部分受体参与就已经足够了,这是尚需进一步研究的问题。

研究多肽蛋白激素结构与功能之间的关系的最終目的是试图在分子水平上阐明激素的作用过程。这包括两个方面:一是阐明激素本身的结构对其功能的影响,从而创造出人类所需要的激素类似物,并阐明激素分子本身如何与其受体相互作用。二是激素与靶细胞膜上的受体结合以后如何影响细胞内的进程。目前对这些问题虽有一些了解,但问题远远没有解决。今后的研究势必会朝这些方面努力。

参 考 文 献

- [1] Rivier J et al: Science 213: 1394, 1981
- [2] Montecucchi PC et al: Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 360: 1178, 1979
- [3] Melchiorri P: Trends Pharmacol Sci 20: 391, 1980
- [4] Montecucchi PC: in "Structure and Activity of Natural Peptide" (eds. Voelter W and Weitzel G) p. 225, 1981.
- [5] Orts RJ et al: Biochem Biophys Acta 628: 201, 1980

- [6] Tager H et al: Nature 281: 122, 1979
- [7] Olefsky J et al: J Biol Chem 255: 6098, 1980
- [8] Tager H et al: Proc Natl Acad Sci USA 77: 3181, 1980
- [9] Gattner HG et al: Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 361: 1135, 1980
- [10] Inouye K et al: Experimentia 37: 811, 1981
- [11] Robbins DC et al: Nature 291: 679, 1981
- [12] Bell GI: Nature 284: 26, 1980
- [13] Ullrich A et al: Science 209: 612, 1980
- [14] Blundell T and Horuk R: Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 362: 727, 1981
- [15] Sabesan MN and Harper ET: J Theor Biol 83: 457, 1980
- [16] Piron MA et al: in "Insulin and Related Hormones" (eds. Bandenburg D and Wollmer A) p. 718, 1980
- [17] Sasaki K et al: Nature 257: 751, 1978
- [18] Wright DE et al: J Biol Chem 253: 6338, 1978
- [19] Wright DE et al: J Biol Chem 254: 268, 1979
- [20] Schwyzzer R: Ann New York Acad Sci 297: 220, 1977
- [21] Inouye K et al: J Am Chem Soc 101: 751, 1979
- [22] Morihara K et al: Biochem Biophys Res Comm 92: 396, 1980
- [23] Steiner DF: Diabetes 26: 322, 1977
- [24] Kemper B: in "Endocrinology 1980" (eds. Cumming JA, Funder JW and Mendelsohn FAO) p. 504
- [25] Prentice JG and Ryan RJ: J Clin Endocrinol Metab 40: 303, 1975
- [26] Fiddes JC and Goodman HM: Nature 281: 351, 1979
- [27] Habener JF et al: J Cell Biol 80: 715, 1979
- [28] Silman RE et al: in "Peptides of the Pars Intermedia" Ciba Foundation Symposium 81, p. 180, 1981
- [29] Blobel G and Dobberstein B: J Cell Biol 67: 852, 1975
- [30] Dorner AJ and Kemper B: Biochem 17: 5550, 1978
- [31] 曹秋平等, 中国科学(外文版) 23: 1309, 1980
- [32] 张耀时等, 第四次中国生物化学学术会议论文摘要汇编 1981年第13页
- [33] 李小平等, 上海市生物化学学会一九八〇年年会报告摘要汇编 第94页
- [34] 朱尚权等, 中国科学(外文版) 24: 264, 1981
- [35] 曹秋平等, 科学通报 26: 690, 1981

干扰素研究新进展

杜 平 杨蓉芬

第二军医大学微生物学教研室

提要 本文综合评述近二、三年来国内外对人干扰素在大规模生产、制备、基础理论和临床应用方面的重大研究进展和主要成就。(一)在大规模生产、制备方面:主要介绍并评述了现今以“非基因工程法”、“基因工程法”和“化学合成法”大规模生产、制备干扰素的现状与前景。着重介绍和评述最近(1981)日本一家公司所创建的大规模生产、制备廉价人干扰素的新方法与新成果;以及英国一家公司以大规模、现代化手段生产、制备人干扰素的现况。还简介了干扰素基因工程的基本原则及国际上的研究近况,着重评述这类干扰素的分子产量、安全性和初步临床试用概况。(二)在基础理论研究方面:本文就近一、二年中对干扰素的“型与亚型”、“基因结构”、“基因杂交与移植”、“干扰素与激素”、“干扰素的起源与本质”和“抗病毒蛋白系统”等六个方面作了简介与评述。在“型与亚型”方面,提到了 α 、 β 与 γ 三型干扰素的各自的现知亚型;在“基因结构”方面,指出 α_1 型干扰素基因中无“插入顺序”,但 β_2 型干扰素基因中却有“插入顺序”;在“干扰素与激素”方面,简介了干扰素与ACTH、去甲肾上腺素和内啡肽等激素在结构与功能方面的相互关系;在“干扰素的本质”方面,着重论述“干扰素系统”是生物细胞内“自稳功能”的见解。在介绍“抗病毒蛋白系统”时,还提及我国学者在这方面的贡献。(三)在临床应用方面:概述和评价干扰素对病毒性疾病和某些恶性肿瘤的疗效,并肯定了干扰素对病毒性疾病的疗效,还指出干扰素对癌肿治疗有四个方面的特点。

现今认为,干扰素(Interferon)是一类具有高活性、多功能的诱生蛋白。自1957年 Isaacs 和 Lindenmann 发现干扰素以来,迄今已有20多年的研究史。但是,对人干扰素及其临床应用的研究,还只是60年代后期以来的事。由于现已有大量事实证明人干扰素对许多严重病毒性疾病和恶性肿瘤等确有一定疗效,故引起了医学界的极大重视。干扰素系统极为复杂,近年来对它的研究已发展成为涉及病毒学、细胞学、分子生物学、肿瘤学和免疫学等多学科的一门新兴的边缘科

学——干扰素学(Interferonology)^[1]。目前,国际上对干扰素的研究已进入一个前所未有的新高潮。从事这项研究的有30多个国家,仅美国就有将近40个单位参加这项研究,其中著名的研究所有10多个,著名的大学将近20所,大公司近10个,投资达1亿多美元。日本的研究实力亦相当雄厚,而且成绩显著。我国起步虽较晚,但研究进展亦令人鼓舞。现就近年来、特别是近一、二年,在医用干扰素学方面所取得的重大进展,归纳成以下三个方面,并作评论性的简介。

大规模生产制备

近年来,医学干扰素研究领域内具有“划时代”意义的重大突破之一,是已经研究成功几项能够大规模生产制备廉价人干扰素的方法。从目前的情况看来,除了“基因工程法”可解决大规模生产制备廉价人干扰素制品外,“非基因工程法”亦同样可以解决这个问题。特别是非基因工程法,对我国目前更具有现实意义。因为,用此法研制干扰素所需经济投资较少,而用基因工程法研制则需要很大的投资。

一、非基因工程法^[2-5]

非基因工程法大规模生产、制备人干扰素最重大的成就,主要有以下几项。

首先,本世纪60年代后期和70年代初期所逐步研究建立起来的人白细胞干扰素^[2]。到目前为止,用于临床试治各种病毒性疾病和某些肿瘤研究的,主要是这种干扰素。现已证明,人血库血、废弃的人血浆“下脚料”(灰黄层部分)和人脐(带)血都可用来制备人白细胞干扰素。由于这一来源较易,因此,在芬兰红十字会血液研究中心工作的 Cantell 等人的带动下,现在不少国家都在利用这一来源来制备和研究人白细胞干扰素。美国有人估计,他们这个国家每年可利用大约400万毫升原来都被废弃的人血浆“下脚料”中的白细胞灰黄层制备干扰素。另外,对人脐(带)血的利用也是一个途径。估计上海约有10个妇产科医院,若把脐血全部利用起来,每年大约可制造30~50万毫升粗制干扰素。当然,血库血是一个重要的来源,但成本较高。估计一个百万人居民区的血库中心(约65,000名供血者),大约每年可制备 10^{11} 单位的干扰素。总的说来,利用血源制备干扰素,还存在来源受到限制和价格太高两大问题。也就是说,即使我们把上述全部可利用的“材料”都用来制备这种干扰素(当

然,实际上不可能),亦远远不能满足临床治疗所需要的量。即使开展规模稍大一些的临床试治研究,亦显得很困难。例如,美国一癌症学会拿出200万美元购买约400亿单位人白细胞干扰素,而这一数量亦只够试治大约150个病人。因此,只靠血源人白细胞干扰素是远不能满足临床需要的。

第二,我们认为日本林原生物化学公司在1981年2月份所建成的一座颇具特色的、生产人干扰素的大型工厂及其制备系统^[3]值得介绍。其特点是利用新生地鼠(Hamster)大量增殖人“类淋巴细胞(BALL-1株)”的方法解决了大规模生产人干扰素的细胞扩增问题。其方法大致是,(1)以无菌手续将具有高度产生干扰素能力的BALL-1细胞株移入新生地鼠(出生24小时内)皮下;(2)给该动物注射适量抗地鼠淋巴细胞血清,以抑制其排异作用;(3)饲养3~4周,待移植细胞长成约25~30克的“肿瘤”时,即可采集“瘤体”细胞(人“类淋巴细胞”);(4)按人“类淋巴细胞”干扰素诱导和提纯法制备与纯化干扰素。此法的最大优点是:经济、简便、产量高。平均每只地鼠可生产5,000万国际单位干扰素(相当于2万毫升人外周血的干扰素产量),每年可制备约3,000亿单位以上的人干扰素,其价格亦由原来的每毫升(10^6 单位)30~50美元降至现在的9.75美元(估计可将进一步降至2.4美元左右)。因此,学者们一致认为,此法确实是一场“革命”,它把干扰素的实际应用大大向前推进了一步。

再要提及的是英国 Wellcome 公司目前已建成一座装有1,000、2,000和4,000立升的大“发酵罐”的自动化工厂,以大规模生产另一种人“类淋巴细胞(Namalva株)干扰素(简称 Namalva 干扰素)^[4],年产量可达约41,800亿单位(日产量约400亿单位)。现已证实,Namalva 干扰素的性质同目前研究最多,临床应用最广的人白细胞干扰素几乎完全相同。各项试验亦证明此干扰素是安全的。

但为谨慎起见, Namalva 干扰素目前还只允许用于晚期肿瘤病人。

此外, 美国的 Searl 公司投资在英国的海威克姆建造了一座大型干扰素工厂, 其中一部分 (约 $\frac{2}{3}$) 将用于生产“基因工程干扰素”; 另一部分已用于大规模生产人成纤维细胞干扰素, 其年产量目前可达 1920 亿单位^[6]。日本除了上面所说的林原生化公司外, 还有东来和绿十字药厂以及明治制果公司等都在积极筹划大规模生产干扰素。特别是明治制果公司最近 (1981) 宣布, 他们将采用人羊膜细胞大规模生产干扰素, 估计月产量可达数十亿单位, 并准备进入世界竞争行列。

中国人民解放军第二军医大学目前已研究改进成功适合我国条件的、具有大规模生产潜力的“Namalva 干扰素生产制备系统”, 并可望不久即可进行大量生产。此外, 上海生物制品研究所、北京医科院病毒研究所和北京生物制品研究所等单位亦在积极研究 Namalva 干扰素的大规模生产制备问题。

二、基因工程法^[6-11]

自 1980 年初, 首次宣告干扰素基因工程研究成功后, 其进展异常迅速。目前世界各国参加这项研究的公司已有 30 多家, 特别是一些大的基因工程公司都把干扰素的生产制备研究放在首位。基因工程比较复杂, 整个“工程”的主要环节大致如图 1 所示^[6]。

图 1 表明基因工程的基本程序主要有: (1) 制备“选定基因”; (2) 进行“体外重组”; (3) 转入“异源细胞” (如大肠杆菌细胞); (4) 测定“表达能力”。

干扰素基因工程的基本程序也不外乎以上“四步”, 唯其中的“选定基因”——“干扰素基因”的分离与制备比较特殊, 其主要环节可以图 2 示之^[6]。

从图 2 可见: (1) 所使用的“选定基因”不是直接选用在 DNA 分子上的“干扰素基因”, 而是用制成的“干扰素互补基因” (IF-cDNA); (2) 常用的质粒 (Plasmid) 是

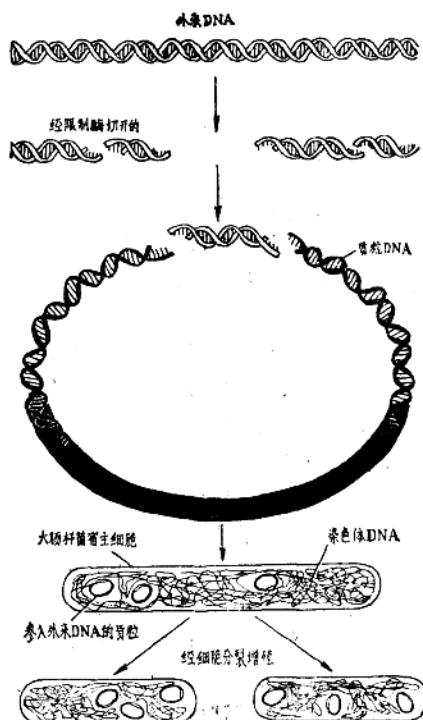


图 1 基因工程的基本程序示意图

PBR₃₂₂, 因在该质粒的某些特定部位有 1 个 PstI (内切酶) 的切割点, 而便于“插入”干扰素 cDNA; (3) 将所制成的人干扰素“杂交基因” (均一性的杂交 DNA) “转化”到大肠杆菌细胞中去以后 (见图 1, 图 2), 即可随着该菌的生长繁殖而产生人干扰素。除大肠杆菌外, 最近又研究成功可把干扰素“杂交基因” (重组体) 引入酵母菌和枯草杆菌细胞内, 同样可大量产生人干扰素 (1~2 亿单位/每升培养基中)^[5-6]。

干扰素基因工程的研究成果是多方面的, 就生产制备与临床应用而言, 主要有这样几个方面: (一) 干扰素产量已大大提高。在 1980 年, 用基因工程法建成的大肠杆菌在每升培养液中的干扰素产量只有约 2×10^4 单位, 即每个大肠杆菌平均只能产生 1~2 个干

扰素分子；而 1981 年在每升培养液中 却能产生 8×10^7 单位(IFN- β)和 2.5×10^8 单位 (IFN- α)，即平均每个大肠杆菌可合成 1 万个以上分子的干扰素。(二)一系列研究证明，用基因工程法使大肠杆菌所产生的人干扰素，在其抗原性、抗病毒活性、抗肿瘤细胞活性和激活 NK 细胞活性等方面，都与天然干扰素相同。(三)临床初步试验证明，这种干扰素对某些恶性肿瘤的疗效是令人鼓舞的。

此外，可能更具有重大理论和实际意义的是，干扰素“家族”中另一个重要成员——人“免疫干扰素”(即 γ 干扰素)的基因工程，在最近(1981)又告研究成功^[12]。这项特别引人入胜的研究工作是由美国加利福尼亚州 Genentech 生物技术公司的分子生物学者完

成的。众所周知， γ 干扰素之所以特别受到人们的重视，主要原因就是它的免疫调节活性(此活性是抗肿瘤的重要作用之一)远比 α 干扰素(如人白细胞干扰素)高(平均高 10~1000 倍)。但是，这一干扰素以“非基因工程法”制备产量较低，且高度纯化亦较难。因此，人们常将这一干扰素比喻成是一顶难以摘取的“皇冠”。而现在借助“基因工程法”已将这顶“皇冠”摘下，所以预计有关这一干扰素的一系列理论和实际问题必将得到迅速解决。

三、化学合成法^[13-14]

化学合成法的研究进展亦非常快。目前化学合成干扰素已完成 80% 以上^[15]。并在不久前(1981)用人工方法合成一个完整的(全合成)、具有良好表达功能的人白细胞干

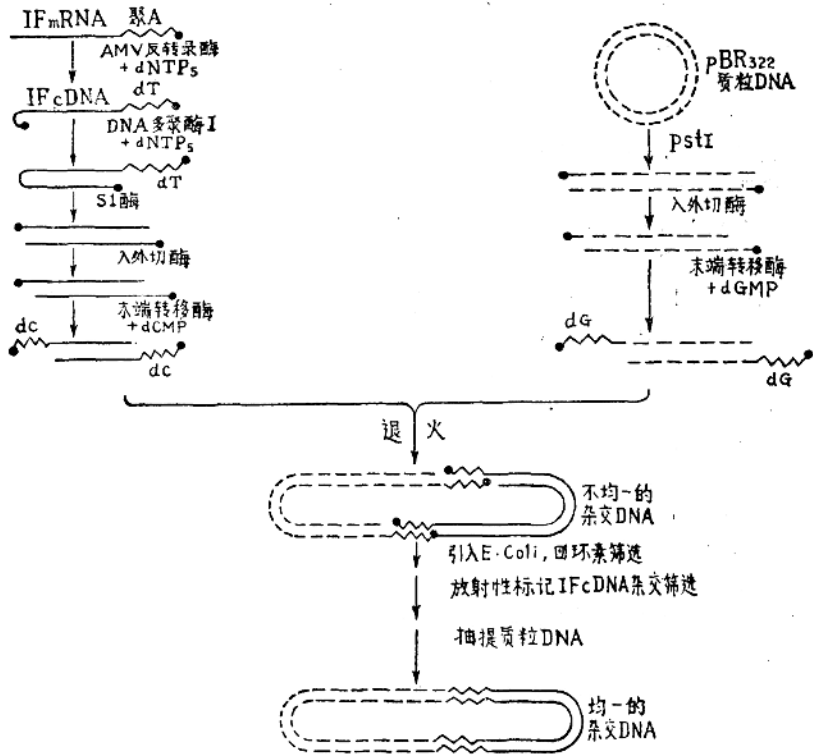


图 2 干扰素互补 DNA 的合成及其插入质粒进行增殖过程

扰素基因^[12]。因此,人们长期以来期待能以人工合成的方法大量制备廉价干扰素的愿望,已不是遥遥无期的幻想了。

此外,干扰素单克隆抗体最近已研究成功^[15-17],并证明用此抗体作成的亲和层析柱,一步即可将人干扰素纯化到均一化的程度。

基础理论研究

干扰素基础理论方面的研究在最近二、三年亦是突飞猛进、成果累累的。主要有下列几个方面。

一、干扰素的型与亚型^[18-19]

1980年,将研究得比较多的几种人干扰素和动物干扰素分成 α (白细胞干扰素和人“类淋巴细胞”干扰素,简称IFN- α)、 β (成纤维细胞干扰素,IFN- β)和 γ (免疫干扰素,IFN- γ)三个类型。现知IFN- α 至少有10个亚型;IFN- β 的mRNA分子量为0.9Kb(1Kb $\approx$ 1,000个碱基)、1.1Kb、1.2Kb和1.9Kb 4种,故其亚型至少亦有4种;IFN- γ 的分子类型目前虽还不太清楚,但已有报道它至少有4种蛋白质,现正在加紧研究中。现有不少事实表明,不同型和亚型干扰素的生物学活性和临床疗效,存在着程度不同的差异。进一步加紧这方面的研究,是具有重要的理论和实际意义的。

二、干扰素的基因结构^[19]

目前已将5种干扰素的基因DNA顺序完全排列出。有充分的证据表明,不仅不同型的干扰素是由不同基因所编码的,而同一型的干扰素也是由多个基因编码的。特别令人感兴趣的是,现已证实所有 α -干扰素成员(亚型)的基因都和许多真核细胞基因不同,即它们都不存在“插入顺序”(即在基因内部不存在“内涵子”)。这一特点对应用基因工程法在大肠杆菌中产生人干扰素显然很重要。但是,IFN- β_2 基因却被证明有“插入

顺序”;并发现IFN- β_0 是一个“二聚体”(dimer)——其二个分子是通过S-S键联结的。

三、干扰素基因杂交与移植^[20-21]

“基础干扰素学”中另一项最引人注目的重大进展就是最近(1981)已有人成功地把两种性质不同的人干扰素基因“拼接”起来,创造出一种新的基因。例如,C. Weismann等人将一种能在牛细胞中有高表达能力和另一种在该细胞中无表达能力的人干扰素基因作为“亲本”进行分子“杂交”后,创造出一种能在鼠细胞中表达的新基因“杂种”。这项成果的利弊和深远意义,目前还无法估计。此外,同样引人注目的是,最近(1981)还试验成功可把人细胞内的干扰素基因DNA移植到小鼠细胞内,经诱导后可表达人干扰素。这说明,真核细胞基因的确能够移植,其意义是非常深远的。

四、干扰素与激素^[22-23]

目前,有关干扰素与靶细胞膜的相互作用机理问题,已有不少报道。其中最引人注目是关于干扰素与某些激素的相互关系。有人证明:当以干扰素处理某些靶细胞时,干扰素可表现出ACTH和肾上腺素的作用;而更令人惊奇的是,当以ACTH和肾上腺素处理某些靶细胞时,竟然亦可表现出同干扰素一样的抗病毒作用。这到底是怎么回事呢?经进一步研究发现:在IFN- α 中含有ACTH成分。也就是说,分子量为23,000的这种IFN- α 可被再解离为18,500 Mr和4,500 Mr二种“亚分子”,而后者(4,500 Mr)即为ACTH(按ACTH是由39个氨基酸组成的多肽链,从不同种属动物得到的ACTH,其1~23个氨基酸残基的排列顺序都是相同的)。应当指出,这些事实不仅表明干扰素分子的复杂性,亦表明在靶细胞表面及其内部显然存在着干扰素与激素的“共同活化传递途径”(Common transmissible pathways of Cell activation)。

五、干扰素的起源与本质^[24]

把干扰素基因 DNA 的核苷酸序列和蛋白质氨基酸的序列同现代“分子分类学”联系起来考虑,可推导出 HuIFN- α (人 α 干扰素) 和 HuINN- β (人 β 干扰素) 大约起源于距今约 5~10 亿年前的一个共同始祖基因。并由此可进而推知,在现今所有脊椎动物细胞内都有干扰素基因。前已提及,干扰素是一类高活性(比活性可高达 10^9 单位)多功能的蛋白质。如果我们把干扰素的基因起源与

分布同干扰素的生物学功能联系起来考虑,那么,就不难看出它实质上是生物细胞内的一种独特的“防卫性自稳功能”(见图 3)。也就是说,我们可把生物机体的功能概括为“基本生理学功能”、“遗传学功能”和“免疫学功能”(即“自我识别功能”)三大类,而干扰素系统所担负的细胞内的防卫性自稳功能,则是保卫上述三大功能能够正常进行的最基本的功能。

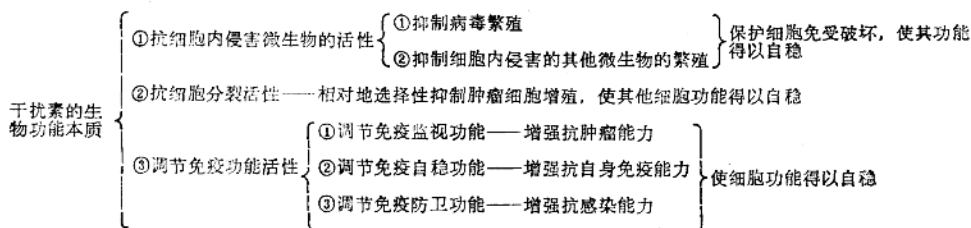


图3 干扰素的生物活性及其对细胞功能的自稳调控作用

六、抗病毒蛋白系统

现已证实,由干扰素分子所诱导的抗病毒蛋白不只是一种,而是一类或一个系统。我国学者对抗病毒蛋白——2-5 寡腺苷酸(2-5 P_3An 及 2-5 P_3A_3)的研究成绩颇著^[25]。我国学者不仅成功地合成了 2-5 P_3An (和 A_3),而且首次证明 2-5 P_3An 能在试管内抑制许多病毒的复制以及 2-5 P_3A_3 能抑制肿瘤细胞生长等方面的作用。

临床应用

迄今用干扰素治疗或预防性治疗的病毒性疾病主要有:流感及其他呼吸道病毒感染、人类疱疹病毒感染及病毒性脑炎和乙型肝炎等多种疾病;用干扰素在临床上试治的肿瘤主要有:成骨肉瘤、多发性骨髓瘤、青少年咽部乳头状瘤、宫颈癌、胸腔瘤、乳房癌、何杰金氏病、非何杰金氏淋巴瘤、黑色素瘤、尖锐湿疣和头颈部肿瘤等 10 多种。总的看来,干扰素对病毒性疾病的防治效果是肯定

的;对肿瘤的疗效虽不如人们原来期待的那么理想,但还是有其独特效果的。这主要表现在:(一)对成骨肉瘤的疗效较佳,例如经干扰素治疗的 28 例患者,五年后,治疗组仍有 50% 的患者未转移,而对照组只有 20% 的患者未转移^[26]。(二)对那些暴露性的局部肿瘤(如颊颌部、鼻部、额部、耳廓部、颈部肿瘤及宫颈癌和膀胱癌等)以“渗透性注入法”将干扰素直接注入瘤体内(对有些病例同时肌注)亦取得了良好的疗效,例如经此法治疗的 30 例这类肿瘤患者,经各项指标鉴定,已治愈者 10 例;基本治愈者 10 例;有一定疗效者 7 例(5 例瘤体明显缩小、边缘清晰,2 例有退行趋势);无效者仅 3 例^[27]。(三)对肿瘤并发病毒性感染的防治效果显著^[28],例如:以高浓度干扰素防治儿童恶性癌肿并发水痘的防治,以干扰素防治的 9 例患者只有 2 例合并感染,1 例死亡;而对照组 9 例竟出现 6 例严重合并感染,2 例死亡;对 45 例恶性肿瘤患者用干扰素治疗以防止合并带状疱疹病毒感染,亦取得了防止扩散、