

干扰素的制备与纯化方法

(一)

第二军医大学微生物教研室病毒组

干扰素的制备与效价测定方法

第一节 人白细胞干扰素制备系统的改进研究

人白细胞干扰素的制备系统，是在本世纪60年代后期逐步研究建立起来的[1-3]。建立这个系统的主要贡献在于：首先，可借此在体外制备效价较高的人白细胞干扰素，并从而有可能来更深入地研究它的本质和作用机理[9-12]；其次，亦为将干扰素直接应用于临床防治某些严重的病毒性疾病[1-17]和某些肿瘤疾病[18-21]的研究奠定了基础。但是，原来的这个系统，特别是“国际标准化系统”[22-24]亦存在着一些不足之处，其中最主要的是：它需用新鲜人静脉血（或血库贮存的血）并且需提取出生长活性良好的白细胞来供作诱生（干扰素）的细胞。如所周知，新鲜人静脉血，不仅不易来取，且价格昂贵。提取生长活性良好的白细胞虽不太难，但操作手续较繁，且易影响干扰素的产量[23]。为了克服这些缺点，我们采用北京流研所病毒组的方法[25]应用人脐（带）血代替静脉血，使用抗凝全血代替提取的白细胞进行了研究，并取得了比较满意的结果。现将其研究方法与所获得结果报导如下：

一、实验材料与方 法

（一）、诱生病毒与攻击病毒

1、诱生病毒 系采用的NDV-F系无毒株（取自中国医学科学院流行病学研究所病毒组），其标本以鸡胚尿中液形式保存于低温，其血凝滴度经常稳定在1:640~1:1280之间，大量繁殖传代系采用LH0.5%稀释（ 10^{-2} ~ 10^{-3} ），接种于9日

令鸡胚，置 37°C 孵育 72 小时后收获。

2. 攻击病毒 系采用的 Sindbis 病毒 (取自单位同上，此株病毒曾在鸡胚纤维母细胞上传过 12 代，在人胚肺细胞上传过 2 代，对人胚肺及人胚肌皮纤维细胞均有良好的致病效应，其 TCID_{50} 稳定在 $10^{-6.3} \sim 10^{-6.7}$ 之间。

(二) 诱生细胞与测定细胞

1. 诱生细胞 采用肝素 (Heparin) 抗凝全血中的白细胞作为诱生细胞。此抗凝全血系以无菌手续采自人脐带血。其新鲜程度见表 3 所示。

2. 测定细胞 用传代人胚肺细胞及人胚肌皮细胞测定干扰素。在本试验中，共用三个细胞系 (见表 1 及表 2)，其培养 and 传代方法见本组“常规”。测定时，选用一日良好单层。

(三) 干扰素的制备与测定方法

1. 制备方法 见下图所示 (“人白细胞干扰素改良制备方法”)：

人白细胞干扰素改良制备法

制备抗凝全血

- (1) 以无菌手续将脐血放于含肝素液的瓶内 ($100 \mu\text{s}/\text{ml}$)。
- (2) 置 4°C 不得超过 48 小时。

加病毒诱生剂

- (1) 取 NDV-F 系尿中液种入 9 令鸡胚尿中腔，置 37°C 孵育 72 小时；
- (2) 按每 ml 抗凝全血加入 0.2 ml (约合 100 HAU) NDV-F 系新鲜尿中液。

加强吸附处理

• 2 •

- (1) 将上述混合物置 37°C 水浴 1 小时，使病毒吸附到白细胞上；
- (2) 以 1500 转/分钟离心 15~20 分钟，弃去上清，留其沉淀物。

加养料孵育诱导

- (1) 按抗凝全血量加入 1~2 倍量的 Eagle's 培养基 (内含灭活人血清 2%；卡那霉素 $200\text{ }\mu\text{s/ml}$ ； $\text{pH } 7.4$)；
- (2) 置 $35\sim36^{\circ}\text{C}$ 旋转培养 18~20 小时。

离心及酸处理

- (1) 以 2000 转/分钟离心 30 分钟后，取其上清，弃去沉淀物；
- (2) 以 6N HCl 将其降至 $\text{pH } 2.0$ 后，置 4°C 5 天。

中性化待测

待酸化彻底后 (5 天)，再用 6N NaOH 将其调至 $\text{pH } 7.2\sim7.4$ (中性化)。其中有一部分样品曾分别经超速离心 (20000 转/分，20 分钟) 和 (或) 滤过 (Seitz 滤皿) 处理。

2. 测定方法 按国际标准化方法测定，其步骤是：先将待测的干扰素样品用最低限度的 Eagle's 生长培养基 (MEM) 行二倍递次稀释；再按每个稀释度取 1 毫升加到一日令人胚肺或人胚鸡皮纤维母细胞单层管中 (共三管，每个稀释度 1ml/每管)，置 37°C 孵育 20~24 小时；至时，将管中的培养液倒掉，并用 100 个 TCID₅₀ 的 Sindbis 病毒 ($100\text{ TCID}_{50}/\text{ml MEM}$) 攻击，置 37°C 经 48~56 小时孵育后，观察结果。其结果的判定标准是：病毒对照组的细胞致病效应 (CPE) > 75%；细胞对照组的 CPE = 0，即认为测定系统有效。其干扰素效价以“培养保护单位” (Culture-protecting Units，称简“CpU”) 表示，其判定标准是：凡 1 毫升干扰

素标本的最高稀释度仍能保护半数细胞 (50%) 免受“攻击病毒”损害者, 该稀释度的倒数即为干扰素单位。

二、实验结果

(一) 此法产生干扰素的效价

因本实验室目前尚无国际标准化的“参攷干扰素”作为参攷标准, 故曾将按上述方法制备的干扰素样品, 分别在本实验室和中国医学科学院流研所病毒组, 以下列两个“测定系统”进行了测定。

1、用“A组合测定系统”测定的结果 这里的所谓“A组合测定系统”(以下简称“A系统”)。其组成是: 本室测定系统所用的测定细胞是“传代人胚肺纤维母细胞”, 所用的攻击病毒是“Sindbis 病毒”(100/TCID₅₀); 流研所病毒组测定系统所用的测定细胞亦是“传代人胚肺纤维母细胞”, 所用的攻击病毒是“VSV”。用此系统测定的结果, 可归纳于下表(见表1)。

表1 人白细胞干扰素效价测定结果

干扰素样品 编 号	用本室“测定系统”测定的结果 (CPU/ml)		用流研所“测定系统” 测定的结果(CPU/ml)
	48小时观察	56小时观察	48小时观察
1	污 染	污 染	1626
2	≥4000	≥4000	5342
3	8000	8000	6062
4	4000	4000	1844

注：* 見正文說明

△ 皆系重复兩次測定所得之結果（用 Sindbis 病毒攻击）。

△△ 一次測定結果（用 VSV 攻击）。

从表 1 中可以看出：(1) 2 号和 3 号样品的干扰素的效价均较高——2 号可高达 4000~5000 以上，而 3 号则可高达 >6000~8000；(2) 1 号和 4 号样品的干扰素效价用流研所病毒组测定系统测定只有 1500 以上，而用本室测定系统测定可达 4000（4 号样品）。

2. 用“B 组合测定系统”测定的结果 本系统的组成是：本室测定系统所用的测定细胞是“传代人胚皮肤纤维母细胞”（M-S₉），所用的攻击病毒是“Sindbis 病毒”（100 TCID₅₀）；流研所病毒组测定系统所用的测定细胞和攻击病毒均同上（A 系统）。用此系统（B 系统）测定所获之结果见表 2 所示。

表 2 人白细胞干扰素效价测定结果 (二)

LCPU/ml)			
干扰素样品 编 号	用本室“测定系统”测定的结果		用流研所“测定系统” 测定的结果
	40小时观察	50小时观察	48小时观察
5	8000	4600	3480
6	8000	≥4800	3604
7	8000	≥4800	5364

注：* 均为兩次重复测定结果。

△ 系一次测定结果。

表2指明：(1)这三个样品(5、6、7号样品)的干扰素效价用本室“测定系统”测定可高达 >4000 (50小时观察) ~ 8000 (40小时观察)；(2)用流研所病毒组“测定系统”测定只达 >3000 (5号和6号样品) ~ 5000 以上(7号样品)；(3)若取本室“测定系统”在50小时所观察得的结果与流研所病毒组“测定系统”在48小时所观察得的结果相比，则比较接近。

(二) 影响干扰素产量的因素

为了解供产生干扰素的人胎(带)血的新鲜程度和诱发病毒悬液的新鲜程度对于干扰素产量的影响，我们作了下列初步实验观察。

人脐血贮存时间对于干扰素产量的影响结果见表3所示。

表3 人脐血贮存时间对于干扰素产量的影响

干扰素样品 编 号	4℃ 存 在 时 间 (小 时)	实 验 结 果 (cpU/ml)	
		用“A系统”* 测定的结果	用“B系统”△ 测定的结果
2	24—48	>4000	5242
3	26—96	8000	6062
4	24—48	4000	1844
5	24—96	4600	3480
6	24—48	>4800	3604
7	24—96	>4800	5364

注：* 2、3、4号样品用“传代人胚肺纤维母细胞”测定，

用“Sindbis病毒”攻击；5、6、7号样品用“传代人

胚皮肤纤维母细胞”测定，用“Sindbis病毒”攻击。

△所有的样品皆用“传代人胚肺细胞”测定，用“VSV”

攻击。

上表(表3)表明,人脐(带)血自采集后立即置4℃贮存24~96小时,对于扰素的产量并无明显影响。

3. 诱生病毒悬液新鲜程度对于扰素产量的影响 主要结果见表4。

表4 诱生病毒悬液△新鲜程度对于扰素产量的影响

干扰素样品 编号	诱生病毒悬液 的新鲜程度	实 验 结 果 (CPU/ml)	
		用“A系统”测定 的结果	用“B系统”测定 的结果
2	4℃过夜	>4000	5242
3	现取现用	4000	1844
4	4℃过夜	8000	6062
5	现取现用	>4000	3604
6	低温4周	4600	3480
7	现取现用	4800	5364

注: △NDV-F 系接种9日龄鸡胚尿囊腔致37℃孵育72小时收获的病毒鸡胚尿囊液。

从表4中可看出: 该诱生病毒悬液放4℃过夜及放低温(—15℃左右)4周和现取现用(即从鸡胚中取出即用)其对于扰素的产量都无明显的影响。

三、讨论与小结

(一) 讨论

从上述结果(表1与表2)中可看出,用“改进的制备系统”可制备出比较“高产、稳产”的干扰素。所谓“高产”

稳产”，就是指与国际标准化的“经典制备系统”相比，不仅其所产生的干扰素产量较高，而且较为稳定[22]。那么，这是什么道理呢？我们考虑这可能是因为：

第一、确保了诱生细胞的“质量”。现已查明，在白细胞系统中能够产生干扰素的主要是巨噬细胞，其次是中性多核白细胞（统称“白细胞”）。亦已有试验证明，白细胞产生干扰素产量的高低是与它（白细胞）的生长代谢活性密切相关的[23]。例如，有人用“肝素—右旋糖酐法”（Heparin-dextran）分离出的白细胞，若立即用于诱生，则可产生较高产量的干扰素，而若将其分别置于 4°C 和 37°C 24 小时再诱生时，则其产量就极低[23]。可见，“分离细胞”产生干扰素的活性是很易受温度及其作用时间等因素影响的。因此，可以推测，用抗凝全血诱生干扰素，其产量之所以较高而稳定，这主要可能是由于白细胞处于血染等自然环境中，其生长代谢活性（或其产生干扰素的活性）比较稳定，而不易受外界因素的影响之故。

第二、确保了诱生细胞的“数量”。有人研究了“分离白细胞”的数量对干扰素产量的影响，证明：当每毫升白细胞的数目达到 10^7 时，可产生约 3000 单位/毫升的干扰素，增至 5×10^7 时，可产生约 8000 单位/毫升的干扰素，再增至 10×10^7 时，反而只产生约 4000 单位/毫升的干扰素[24]。因此，一般规定用“分离白细胞”诱生干扰素时，当不应 $< 10^6$ 个白细胞/毫升。当然，用“分离白细胞”诱生干扰素时，除了考虑它的数量以外，还应注意其“质量”。因为在分离过程中，必然会损害一部分白细胞。按照正常成年人血液中的白细胞平均值为 $7000/\text{mm}^3$ 估计，则每毫升抗凝全血约有 7×10^6 个白细胞。因此，这个浓度是足够的。所以，这

也许就说明了何以用抗凝全血可以产生“高产、稳产”干扰素的另一个原因。

第三、确保了诱生细胞产生干扰素必要“条件”。在“经典制备系统”中，都必须加5%的人血清或0.0022%的人白蛋白，而若不加血清或白蛋白，则就不产生干扰素（或产额极低）^[24]。在“改进制备系统”中，我们加了2%的人血清或血浆。因此，是满足了这个要求的。

除了上述因素外，当然，诱生病毒、培养基、pH、和温度等亦是影响干扰素产生的一些重要因素，而这些因素我们都是充分考虑到，并按要求规定控制的。

(二) 小结

本文报导了“高效价白细胞干扰素制备系统的改进研究”，其要义如下：

1、在“白细胞干扰素制备系统”中，以人脐（带）血代替人静脉血，以抗凝全血代替“分离白细胞”（简称“改进系统”）可制备出“高产、稳产”的人白细胞干扰素。

2、用“改进系统”所制备的干扰素，共测了7个样品，其效价以“A组合测定系统”测定可高达4000~8000单位/毫升，以“B组合测定系统”测定可达>1600~>6000单位/毫升，绝大部分都超过“国际标准化”的水平（约1.5~10倍）。

3、分析讨论了“改进系统”能产生“高产、稳产”干扰素的原因可能是此系统能确保诱生细胞产生干扰素的活性与数量。

第二节 人纤维母细胞干扰素制备系统的研究

人纤维母细胞干扰素制备系统的组成主要包括：“人纤维母细胞类”、“诱导物类”及“培养基”和“环境条件”（

温度、pH)等。虽然,在一定条件下,人纤维母细胞干扰素的产量可远高于人白细胞干扰素的产量,但却很不稳定。Y. H. Tan (1976) 等研究发现,细胞、诱导物及诱导方式和时间等对于干扰素产量的影响极大。现简介如下:

一、实验材料与方方法

(一) 干扰素产生细胞与测定细胞

1. 干扰素产生细胞 主要有:

(1) “108细胞系”——是从人纤维母细胞中专门分离出的一个“高产干扰素细胞系”(约占分离细胞的1%)。

(2) “108细胞系亚株”——包括: 108-11、108-22、108-77、108-177 和 108-355 等。

(3) 三倍体皮肤纤维母细胞——系从一健康女婴儿皮肤活检培养得。

(4) 其他——GM-638 和 GM-637 系从 Camden New Jersey 医学研究所获得。

2. 干扰素测定细胞 采用人皮肤纤维母细胞“三倍体21”(G-21)细胞系。此细胞系对人纤维母细胞干扰素最为敏感。

(二) 诱导物

采用下列大分子合成抑制物作为诱导物 (Inducer):

1. 聚 I:C (poly I:C) 系 P. L chemicals, Milwaukee, Wisconsin 出品。

2. 环己酰胺 (Cycloheximide) 系 Sigma Chemicals, St. Louis Missouri 出品。

3. MDMp (2-[4-methy-2, 6-dinitroanilino]-N-methyl Propionamide) 系 Shell 公司出品。

4. DRB (5,6-dichloro, [β -D-ribofuranosyl Benzimidazole).

(三) 生長培养基

培养细胞和稀释干扰素均用含有 4 m M 谷酰胺 (Glutamine), 50 微克/毫升 Chlorotetra-Cycline 和 10% 灭活 (60°C 90 分钟) 小牛血清的最低限度 Eagle's 培养基。

(四) 实验方法

1. 细胞培养 将有关细胞用上述培养基在一大瓶中, 按常规培养。

2. 干扰素诱导 将培养过的干扰素产生细胞移入塑料盘孔内, 并分别加入有关诱导物、其剂量、时间、洗涤和培养, 皆按以下各表所示 (见“实验结果”项)。

3. 干扰素测定 先将待测干扰素样品在塑料盘孔中行二倍递次稀释后移入细胞盘孔中, 经 37°C 孵育 18~20 小时后再用 VSV 攻击 (10^6 pfu/AL), 经 37°C 孵育 24 小时后观察结果。

二、有关实验结果

(一) A 组实验结果

此组实验安排及其所获之结果如下表 (表 5) 所示。

表5 五种大分子合成抑制物处理“108细胞系”
的实验结果

诱导物 名称与剂量	处理时间 (小时)	干扰素滴度(单位/毫升)	
		在三倍体21上	在六倍体21上
环己亚胺 (40 μ g/ml)	0~1	4	<1
	0~3	216	38
	0~5	1832	256
	0~7	4865	1021
	0~8	4801	988
D R B (13 μ g/ml)	0~1	160	28
	0~4	802	256
	0~8	462	68
放线菌素D (5 μ g/ml)	0~1	256	48
	0~4	<4	<1
	0~8	<4	<1
polyI: C (125 μ g/ml)	0~1.5	2024	640
	0~3	84,000	8900
	0~4	128,000	N.D.
MDMP (10 ⁻⁴ M)	0~3	16	N.D.
	0~5	560	N.D.
	0~3*	312	N.D.
	0~5*	2560	402

注: Δ 至时, 将处理细胞用最低限度 Eagle's 培养基洗涤 4 次, 每次 5 毫升。

* MDMP 浓度为 10⁻³ M。

从表 5 中可看出: (1) 五种不同的大分子合成抑制物在一定条件下, 都可不同程度地诱导人纤维母细胞 (108 细胞系) 产生干扰素, 这对阐明干扰素的产生机制具有重要意义; (2) 三倍体细胞 (G21) 远比六倍体细胞 (G21) 对人纤维母细
-12-

胞干扰素的敏感性高；(3) 在五种诱导物中，诱导性能最高是 PolyI:C，次高的是环己亚胺；(4) 查明了各种诱导物的最適处理时间，这不仅有理论意义，而且亦有实际意义。

(二) B 組实验结果

此組实验着重研究了上述五种大分子合成抑制物中的四种诱导物对不同细胞系的诱导能力及最適处理时间，其结果见表 6。

表 6 不同诱导物对不同细胞的诱导能力及最適处理时间

細胞类型	环己亚胺 (40 μ g/ml)	DRB (3.6 μ g/ml)	放线菌素 D (5 μ g/ml)	PolyI:C (125 μ g/ml)	干扰素滴定 (毫克/毫升)
	处理时间 (小时)	处理时间 (小时)	处理时间 (小时)	处理时间 (小时)	
GM-638	0-8				<2
GM-638 ⁴	0-8				14
GM-638				0-3	632
GM-637	0-8				>2
				0-3	198.256
人胚胎皮肤细胞	0-8				<2
		0-1			<2
		0-4			<2
			0-1		<2
			0-7		<2
				0-3	640.398
108-11	0-8				<2
				0-3	280
108-22	0-8			0-3	64.000
108-77	0-8				<2
				0-3	420
108-177	0-8				6.205
				0-3	256,400
108-355	0-8				<2
				0-3	356

注：* 在移去诱导物后 8 小时，两份培养液的平均值。

△ 生长成稠密的单层。

由表6可见：(1) 在一定的条件下，poly I:C 的诱导能力远比环己亚胺等的诱导能力强；(2) poly I:C 和环己亚胺都显示各自对不同细胞诱导能力的极大差异；(3) 由此两表可见，干扰素产量的高低，不仅取决于诱导物的种类与性能，而且也取决于细胞的类型与性能。

(三) C组实验结果

本组实验系用 poly I:C、环己亚胺和放线菌素 D 以不同方法处理“108细胞”所获得的结果（见表7）。

表7 用 poly I:C、环己亚胺和放线菌素 D 以不同方法处理“108细胞”所获之结果

Poly I:C (125 μ g/ml)	环己亚胺 (40 μ g/ml)	放线菌素 D (5 μ g/ml)	干扰素滴度* (单位/毫升)
处理时间(小时)	处理时间(小时)	处理时间(小时)	平均效价
0~7	0~7		108,000
			288,000
		0~0.5	12,840
0~7	0~7		256,000
0~7	0~7	6.5~7	288,000
		6.5~7	12,840
0~7	0~7	0~7	<16
0~7	0~7	4~7	1,401,000
0~7	0~7	6.5~7	8,127,000

注：* 样品系在除去诱导物后5小时收集的细胞培养液。

△ 测定干扰素系用的“三倍体 21 皮肤纤维母细胞”。

从表7中可见：(1) 当以三种诱导物单独处理“108细胞”时，以 poly I:C 的诱导能力最强，放线菌素 D 最差，环己亚胺

居中；(2)当取三种诱导物中的两种联合处理时，poly I:C 和环己亚胺及 poly I:C 和放线菌素 D 的“联合诱导能力”均超过了 poly I:C 的单独诱导能力；而环己亚胺和放线菌素 D 的联合诱导能力虽比环己亚胺的单独诱导能力强，但却低于 poly I:C 的单独能力；(3)特别有趣的是，当以三种诱导物同时处理 0-7 小时，几乎没有产生干扰素，而当先用 poly I:C 和环己亚胺处理到 0-4 小时再加放线菌素 D 处理 3 小时（即 4~7 小时）时，干扰素的产量高达 1,401,000 单位/毫升；在同样条件下，当缩短放线菌素 D 的处理时间（0.5 小时即 6.5~7 小时）时，干扰素的产量却骤增至 8,127,000 单位/毫升。

三、讨论与小结

总结上述结果可以看出，建立一个高产量的人胚纤维母细胞干扰素制备系统，主要取决于下列四个相互关联的因素：

(一) 诱导物

本文及其它资料都证明，直到目前为止，聚 I:C 是所有诱导物中“诱导活性”最强的一种诱导物。关于聚 I:C “诱导活性”的物质基础问题，目前尚未完全解决，但显然与下列因素有关 [26~27]：

1、活性决定基 所谓“活性决定基”，即指在这种大分子双股 RNA 共聚体中的一些对活性起决定作用的基团或成分，据目前所知，这些“活性决定基”主要有位于核糖上的“2'OH”以及位于嘌呤碱基上的第 7 位 N (“N-7”) 和位于嘧啶碱基上的第 5 位 C (“C-5”)。例如，若置换“N-7”和“C-5”的位置，则就会大大降低干扰素的诱出。当然，其先决条件，这种多聚核苷酸的分子还必须相当高（约 10^6 ）并且必须是双股的螺旋结构。实验证明，低分子的多聚体活性是低的，单股或三股结构活性也是低的。

2、诱导决定基 已有事实证明。特别是，在“聚肌苷酸”链上起诱导作用的并非所有化学基团，而主要只是其中的“多磷酸基”称为“诱导决定基”。此外，还有试验证明，若用“硫代磷酸”来代替这种共聚物中的“磷酸”时，就可使其获得对RNA酶的抗性。

(二) 受诱导细胞

上述事实清楚地表明，在人胚纤维母细胞（包括人胚皮肤和人胚肺纤维母细胞）中，显然是存在着“高产干扰素细胞群”和“低产干扰素细胞群的（详见表6）。因此，这就为今后进一步研究弄清这一现象的本质，并从而为选择“高产干扰素细胞株”提供了一个可能的途径。

(三) 测定细胞

上已提及，三倍体21(G-21)人纤维母细胞对人干扰素特别敏感。当将这种细胞与正常二倍体人纤维母细胞对人干扰素的敏感性（即对干扰素抗病毒活性的敏感性）相比较时，发现前者比后者要大3~7倍^[29]。此外，还进一步研究发现，控制干扰素的效应基因是定位在细胞染色体21(G-21)的远端^[29~30]。

(四) 诱导方法

见《医用微生物学与免疫学基础》第十六章（电视大学讲义，1978）

第三节 干扰素中性红摄入测定法

一、基本原理与优点

(一) 基本原理

“中性红摄入法”是“染料摄入法”(Dye Uptake methods)