

干扰素

Interferon

黎雪如 译 戴寿芝 校

11

宁夏人民出版社

干 扰 索

ION GRESSER 主编

黎雪如 译 戴寿芝 校

宁夏人民出版社出版发行 (银川市解放西街105号)

新华书店经销 宁夏新华印刷厂印刷

开本: 787×1092 1/32 印张: 7 字数: 148千

1987年9月第1版第1次印刷 印数: 1——2,000册

统一书号: 14157·43

定价: 1.65元

INTERFERON

INTERFERON—VOL. 4, 1982

ION GRESSER

Editor-in-Chief

ACADEMIC PRESS INC.

London, New York

作 者

J.Content, Institut Pasteur de Brabant, Labora-
toire de Virologie, Bruxelles, Belgium

I.Gresser, Institut de Recherches Scientifi-
ques sur le Cancer, Villejuif, France

B.Lebieu, Laboratoire de Biochimie des
Proteines, Universite' de Montpellier II, France

P.B.Sehgal, The Rockefeller University, New
York, USA

R.Sundmacher, University Eye Clinic, Frei-
burg, Federal Republic of Germany

M.G.Tovey, Institut de Recherches Scientifi-
ques sur le Cancer, Villejuif, France

D.A.J.Tyrrell, Clinical Research Centre, Mid-
dlesex, UK

J.Vilček, Department of Microbiology, New
York University School of Medicine, USA

目 录

有多少种人类干扰素?

.....Pravinkumar B. Sehgal (1)

干扰素和环核苷酸

.....Michael G. Tovey (28)

干扰素作用的机制: 生物化学和基因学的探讨

.....B. Lebleu 和 J. Content (54)

干扰素能引起疾病吗?

.....Ion Gresser (108)

γ 干扰素的重要性

.....Jan Vilcek (144)

关于干扰素在传染病临床试用方面的若干思索

和设想.....D.A.J. Tyrrell (179)

干扰素对病毒性眼病的防治作用 (节译)

.....Rainer Sundmacher (206)

有多少种人类干扰素？

PRAVINKUMAR B. SEHGAL

-
- I 什么是干扰素？
 - II 经典的答案
 - III 应用蔗糖梯度离心法遇到的问题
 - IV 人类 β 干扰素
 - V 人类 α 干扰素
 - VI 一些意外的发现
 - VII 结束语
-

I 什么是干扰素？

近年来我们实验室的调查研究提出，人类干扰素的种类，实际上比一般已鉴定了的种类多。本篇试图集中力量到这个推断上，并着重于最近研究的一些主要课题。

为了回答本篇标题提出的问题，必须对干扰素的组成有一个确切的定义。正式的定义为：“干扰素必须是一类蛋白质，这类蛋白质通过影响细胞代谢过程中的RNA和蛋白质的合成，而至少在同源细胞中对病毒发挥出非特异性的抗病

毒活性。”（《干扰素术语集》，1980）。干扰素的定义不涉及核苷酸或氨基酸水平上顺序关系的专门概念。干扰素的定义主要是生物学的，故而，它可以是多种多样的不同的蛋白质，通过不同的生化机制，显示共同的生物学的广谱抗病毒作用，而在化学性质上却可以显著不同。同样，虽然迄今为止已研究过的干扰素都是由细胞分泌的蛋白质，然后进入到细胞外间隙，再作用于其它细胞，但干扰素必须是由细胞分泌出来的蛋白质的这一概念并不是基本定义所苛求的内涵。研究干扰素的常规方法有明显的经验倾向性，因为这些方法几乎都检测和鉴定分泌到细胞培养基中的干扰素或者在体内分泌到细胞间隙的干扰素。在理论上，镶嵌在细胞膜上并通过细胞的相互接触对其它细胞产生抗病毒作用的蛋白质，可以称为干扰素。这与分泌和结合在膜上的免疫球蛋白是相似的（见Cheng等，1982引证）。Lin氏等（1982）提出，这种结合在膜上的干扰素，可能是确实存在的。

在我们的实验中，用适当的方法诱导人细胞，获得多聚腺苷酸RNA〔poly (A) RNA〕，再用微注射法转移这种RNA到爪蟾卵母细胞（Reynolds等，1975；Sehgal等，1977）中，通常，我们测检分泌到卵母细胞培养基中的蛋白质产物的抗病毒活性（Colman和Morser，1979）。检测蛋白质产物的抗病毒活动性时用疱疹性口炎病毒作为攻击病毒，随后测干扰素对适当的人细胞或其它指示细胞株的细胞损伤之抑制作用（Armstrong，1971；Havell和Vilček，1972）。每个例证中，干扰素的抗病毒活性，均因用了过量的相应的抗人干扰素抗血清而被阻断。故而我们认为，这些蛋白质是人类干扰素。我们在严格的变性的条件下，通过琼脂糖甲基

汞凝胶电泳分离mRNA，利用爪蟾卵母细胞转译试验检测人类干扰素mRNA种类（Sehgal和Sagar，1980）。我们的实验发现，人类mRNA的种类有预想不到的多样性。得到的证据指出，至少某些多样性可以被认为是由于若干新的人类干扰素基因的存在，此类基因的大部分用常规方法检测不出来。

我们用的一些步骤的主要优点在于，我们没有设想干扰素的核酸或其氨基酸顺序的相关性，也没有设想干扰素和它们相应mRNA的物理性质。我们用的这些步骤严格遵循了干扰素的基于其抗病毒作用的基本生物学定义。虽然用抗干扰素抗血清的中和试验已经明确地给我们提供了抗病毒产物的宝贵资料，但是，这一涉及对某些干扰素之间的氨基酸顺序上有相关性的基础假设的过程，并非我们分析中的一个必要步骤。

我们工作中最使人满意的方面是，为解决前几年存在于 β 干扰素领域中的染色体定位问题提供了根据（Tan氏等1974；Morgan和Faik，1977；Slate和Ruddle，1979，1980；Meager和1979a，b）。我们的资料指出，在人-啮齿动物体细胞杂种实验中，以前的研究者关于人 β 干扰素的全部观察基本上是正确的。还指出，较早期的一些矛盾的资料能得到统一的解释。这是由于：① β 干扰素不同的基因存在于人的几个不同的染色体上（至少三个）；②这些基因之不协同的非等同表达（Sehgal等，1981，Sagar等，1982）。虽然还有许多细节等待解决，但我们相信，该情由的主要部分是掌握了。

II 经典的答案

本篇标题提出的问题的经典答案来自两方面的工作，即干扰素蛋白质的纯化和定性，以及最近DNA重组技术用来对各种干扰素c DNA和它们的相应基因所进行的无性繁殖和定性。需要强调的是，用了近乎常规的实验方法来做这些研究，而且，一般仅对那些主要的干扰素分子或干扰素mRNA分子进行了定性。

对不同实验室所得到的人类干扰素所进行的抗原性测定，使我们清楚地认识到有三种性质不同的血清型干扰素（Havell等，1975；De Ley等，1980，1981）。 α 干扰素是由仙台病毒诱导人白细胞培养物得到的制品中的主要抗原物质。 β 干扰素是poly I:C诱导人成纤维细胞培养物得到的制品中主要的或唯一的抗原物质。 γ 干扰素是从免疫刺激的淋巴细胞得到的制品中的主要抗原物质。已经得到了抵抗这三种不同血清型干扰素的抗血清，这些抗血清只能特异地中和相应的干扰素。所以，这些抗血清已经成为快速鉴定人类三种干扰素血清型的有效工具。编码人 α 和 β 干扰素的不同mRNA的存在（Cavalieri等，1977），有力地支持了 α 和 β 干扰素是不同基因的表达，而不仅仅是转译后的某些抗原决定簇上的差别。去年，已有了证实编码人 γ 干扰素mRNA的报道（Wallace等，1981；Taniguchi等，1981）。

在70年代后期，不少实验室成功地将一些人干扰素纯化为均一的均质体（Knight，1976；Rubinstein等，1978；Tan氏等，1979）。用聚丙烯酰胺凝胶电泳对人 α 干扰素的

研究曾经发现，这些 α 干扰素蛋白质是不均一的（Stewart和Desmyter, 1975）。纯化这些蛋白质为均质体后，发现在 α 干扰素的制品中存在8~10种不同的干扰素多肽，这些多肽的一级结构是不同的（Allen和Fantes, 1980; Rubinstein等, 1981）。人 β 干扰素聚丙烯酰胺凝胶电泳提示只存在一种 β 干扰素（Reynolds和Pitha, 1975; Knight, 1976）。纯化由poly I:C诱导人成纤维细胞后所产生的 β 干扰素只有一种，它具有独特的N端氨基酸顺序。该顺序与推断出的人 α 干扰素的顺序不同，但又或多或少与之有关（Knight等, 1980; Zoon等, 1980）。该技术在这个领域中有压倒一切的作用，使人们产生如下强烈印象：人 β 干扰素只有一种。

一种为研究干扰素mRNA简单而高度敏感的爪蟾卵母细胞检测方法的采用（Reynolds等, 1975），已使不少研究者有可能开始为出现于现今一些诱生系统中的这些mRNA分子定性。从而发现人 α 和 β 干扰素mRNA是poly (A) RNA，而且，在蔗糖梯度离心沉淀中它们主要是在12s附近（Sehgal等, 1978a, Morser等, 1979; Berger等, 1980）。重组DNA技术有造诣的研究者们得到这个情报后，开始了干扰素mRNA的cDNA复本之无性繁殖。mRNA从蔗糖梯度离心的12s部分收集。在 α 干扰素方面，Nagata等（1980a）利用了正杂交转译筛（positive hybridization-translation screen，其好处在于研究者可以不预测顺序，也不需要知道这方面的资料）分离出单克隆的cDNA，这种cDNA同具有转译活性的人 α 干扰素mRNA杂交。利用此技术可进一步获得来自12s cDNA部分

的强杂交和弱杂交克隆 (Nagata等, 1980a; Streuli等, 1980)。这两组克隆分别代表 α_1 和 α_2 干扰素基因。此后, 研究者利用 α_1 干扰素的cDNA广泛地寻找人DNA基因库中有关的交叉杂交基因, 并成功地发现和鉴定出约11种“密切相关”的不同基因和伪基因; 约7种有疏远关系的基因和伪基因 (Nagata等, 1980b; Brack等, 1981; 另见 Weissman 1981引证)。所有这些 α 干扰素基因缺乏内含子 (intron), 而且其中许多已能在大肠杆菌得到表达, 产生具有生物学活性的人 α 干扰素。类似地, Goeddel和他的同事们利用单一的 α 干扰素cDNA克隆筛选12s部分的干扰素cDNA并分离出许多 α 干扰素cDNA克隆, 这些克隆相当于8种不同的但能交叉杂交的基因 (Goeddel等, 1980a, 1981)。这些研究者和其他的研究者还利用这些cDNA克隆或利用相当于 α 干扰素DNA顺序的寡核苷酸探针筛选人DNA^A基因库, 分离出了10~12种不同的人 α 干扰素基因和伪基因, 这些基因缺乏内含子 (Lawn等, 1981a, b; Mory等, 1981)。

同样地, 几个研究组利用不依赖于顺序的正杂交转译技术, 在12s部分的cDNA中筛选 β 干扰素cDNA克隆 (12s的cDNA由polyI:C诱导人成纤维细胞产生), 分离出具有一定DNA顺序的 β 干扰素克隆, 该DNA顺序与 β 干扰素Knight氨基酸顺序相当 (Taniguchi等, 1979, 1980a; Derynck等, 1980a)。然后, 这种DNA先后被不少研究者用来筛选cDNA部分和人DNA基因库, 筛选出与cDNA探针交叉杂交的单个基因; 该单个基因也缺乏内含子, 且能在大肠杆菌内表达, 产生具有生物学活性的 β 干扰素。现在, 这

个基因被称为 β_1 干扰素基因 (Sehgal和Sagar, 1980)。同样地, 最近也分离出相当于单个基因的人 γ 干扰素cDNA克隆 (Gray等, 1982)。用这种cDNA克隆筛选人DNA基因而分离出人 γ 干扰素的单个基因, 象大多数哺乳动物的基因那样, 这种基因包含了三个大的内含子和四个外显子 (exon) (Gray和Goeddel, 1982)。

所以, 本篇标题提出的问题的经典答案是, 有16~20种左右有关的或交叉杂交的人 α 干扰素基因, 它们全部缺乏内含子; 人 β 干扰素基因只有一种, 也缺乏内含子; 人 γ 干扰素基因也只有一种, 含有内含子。用cDNA探针进行基因克隆的鉴定和染色体图谱法研究指出, 这些 α 干扰素基因多少相互关连地排列在人的9号染色体上 (Nagata等, 1981; Brack等, 1981; Lawn等, 1981a; Owerbach等, 1981; Slate等, 1982); 单一的 β 干扰素基因也位于人的9号染色体上 (Owerbach等, 1981; Pitha等, 1982); γ 干扰素基因则位于人的12号染色体上 (Gray和Goeddel, 1982)。

β 干扰素的基因数尚有争论。有的学者认为只有一个 β 干扰素基因, 位于人的9号染色体上; 有的学者认为, 从DNA重组技术得来的那组信息与某些做得很细致的体细胞遗传学实验是互相冲突的。后者指出, β 干扰素基因至少存在于三种不同的人染色体上 (Tan氏等, 1974; Slate和Ruddle, 1979, 1980)。这种情况引起了两种主要反应。有人认为, 体细胞遗传学实验的解释毕竟是矛盾的 (见Burk, 1980引证), 因而把体细胞遗传学实验看作是错误的而不予考虑。另一方面, 有人开始怀疑, 基因克隆者们的第一次浪潮可能忽略了人干扰素系统的一些实质性部分。能否是这样:

细胞内有若干 β 干扰素基因，它们至少用常规纸上杂交法不能与 β_1 干扰素基因杂交，然而却与血清学上的 β 型干扰素相当？这种情况能否也出现在人 α 干扰素和 γ 干扰素系统？一些蛋白质可能有血清学上的关系，可是，它们的相应核酸不能杂交的情况并非没有先例。我们近两年的实验提示，在人 α 和 β 干扰素系统中，这种情况可能是确实存在的。我们将首先总结我们的 β 干扰素系统的实验，然后转到考虑 α 干扰素的实验。

Ⅲ 应用蔗糖梯度离心法遇到的问题

1978年我们报告了用poly I : C诱导二倍体成纤维细胞（FS-4细胞）得到的人 β 干扰素的poly (A) mRNA，出现在蔗糖梯度离心的12s部分（Sehgal等，1978a）。故而我们推断，这个包含3'末端poly (A)的分子约有850~900个核苷酸的长度。约在此同时，我们与Dr. H. Soreq（一位进修人员）及在洛克菲勒工作的Dr. J. Darnell合作，用聚核苷酸磷酸化酶（PNPase）3'末端处理 β 干扰素mRNA。Dr. Soreq证实了，这种酶在4℃高浓度无机磷的条件下，能以连续进行的方式优先水解球蛋白的mRNA和其它种的mRNA的poly(A)端（Soreq等，1974；另见Littauer等，1980引证）。我们很快证明了，用PNPase去腺苷酸后的 β 干扰素mRNA制品，在爪蟾卵母细胞中仍具有转译活性（Sehgal等，1978b）。Dr. Soreq掌握的PNPase反应是这样的：当mRNA制品用多出一个克分子量的PNPase在4℃条件下孵育20分钟，全部poly (A)端即被去掉；再将此反应混合

物加温至37℃时，在此后几分钟内，一端的RNA即以同步方式（10个左右核苷酸）被水解（见Littauer等，1980）。所以，我们用PNPase水解（60s 37℃）β干扰素mRNA已除去poly（A）末端的那一端，该反应应将β干扰素mRNA的长度从约900个核苷酸水解到500~600个核苷酸。这个反应既不导致β干扰素转译活性的明显变化，而且，使我们惊奇的是，也不导致蔗糖梯度离心时沉积部位的明显移动。这个结果可用下述两种原因之一来解释，即PNPase未起作用；或者，依靠蔗糖梯度离心沉积来估计RNA长度的分析和梯度技术的分辨力都不够好。我们相信，通过起变性作用的凝胶电泳，可以更好地分析RNA，在一位洛克菲勒进修生A. Sagar的协助下，我们建立和改进了对具有转译活性的干扰素mRNA的电泳方法，首先通过琼脂糖-7 M 尿素凝胶管，接着通过琼脂糖-10 mM CH₃HgOH凝胶（Sehgal和Sagar，1981；Sehgal，1981）。1980年2月洛克菲勒大学的一次报告会上Dr.M.Revel所描述的“14s”和不是那个通常的“10~12s”的人β干扰素mRNA测定（Weissenbach等，1980），帮助我们加快了凝胶实验进程的速度。在Dr.Revel报告会后的10天内，我们很高兴地让他知道，我们用凝胶电泳分离出了两个种系的人β干扰素mRNA，分别长1,300个核苷酸（14s）和900个核苷酸（11s），见图1。然后我们继续证明了，PNPase确实在准确地起作用，而且，β干扰素mRNA 3'-不编码部分大量缺失核苷酸（100~200个）后，不仅有转译活性，还能象自然的poly（A）mRNA那样保持功能上的稳定（Soreq等，1981）。

IV 人类 β 干扰素

A 多种人类 β 干扰素的mRNA

我们发现，在卵母细胞中，由转译产生的来自两种不同mRNA的干扰素，如图1所示，能完全被过量的两种抗 β 干扰素抗血清中和，一种抗血清是Dr.J.Yilcek和他的同事们用不完全纯化的 β 干扰素制备的；另一种抗血清是Dr.Y.H.Tan用纯的人 β 干扰素制备的，这种纯的人 β 干扰素靠近N末端氨基酸的顺序与Knight等（1980）报告的完全一样。所以，当时在诱导的FS—4细胞的胞浆中测到的两种poly(A) mRNA都给人 β 干扰素编了码。

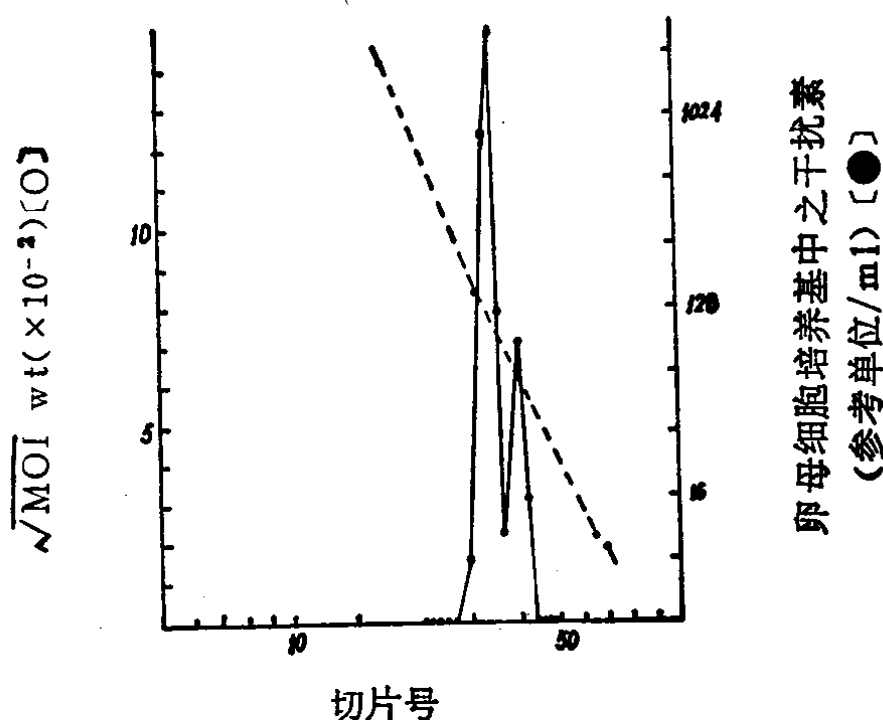


图1 某份人成纤维细胞干扰素mRNA制品的
琼脂糖- CH_3HgOH 凝胶电泳

从诱导的FS-4细胞得到的细胞poly(A)RNA(45 μ g)与 32 P标记的RNA混合,用CH₃HgOH配成10mM,在室温下硼酸盐缓冲液中,RNA通过1.75%琼脂糖-10mMCH₃HgOH圆柱凝胶(0.6 $\times$ 11cm)进行电泳(4mA/管;3.5v cm⁻¹),直到染料接近凝胶管底部(5h)。电泳后,把凝胶放在pH7.4含有100mM β 巯基乙醇和0.01M Tris-HCl的100ml溶液中,室温下在旋转摇动器上摇动40分钟。手工操作把凝胶切成薄片,用Cerenkov计数法检测标记的28s、18s、5s和4s RNA区段(O)上的量,使在凝胶的相应部分洗脱的RNA(洗脱缓冲液含1mM二硫苏糖醇)溶解在2ml蒸馏水中,用爪蟾卵母细胞转译检测法测干扰素mRNA(●)的活性(引自 Sehgal和Sagar, 1980)。

两种RNA的编码部位是相同的,抑或密切相关?通过用已被证实主要含有1.3kb* mRNA的 β 干扰素mRNA制品制得了Northern“贴印斑”,在较松弛的杂交条件和洗涤条件下,用 32 P标记的来自Dr. T. Taniguchi的cDNA克隆的DNA与Northern“贴印斑”杂交,使上述问题得到了答案。这种DNA探针只和长0.9kb的RNA杂交。所以, Knight-Taniguchi DNA的顺序与0.9kb mRNA的顺序是一致的;1.3kb mRNA虽能为人干扰素编码,而且这种干扰素能完全被抗Knight蛋白质抗血清中和,但1.3kb mRNA却不能与DNA探针杂交!这些资料使我们把0.9kb mRNA编码的干扰素产物称为 β_1 干扰素,把1.3kb mRNA编码的干扰素产物称为 β_2 干扰素(Sehgal和Sagar, 1980)。

*kilobase; 千个核苷酸或碱基单位

这些资料还使人们推断出：①至少有两种不同的 β 干扰素存在；②虽然两种 β 干扰素都被抗 β_1 干扰素抗血清中和（最近与Dr. Y. H. Tan合作做的实验就已发现，用抗 β_1 干扰素抗血清中和 β_2 干扰素所用的抗血清量，比中和相应的 β_1 干扰素要多2~5倍），与它们相应的核酸却不能交叉杂交。这些实验也使我们认识到，单用一种 β_1 干扰素cRNA探针，未必能从人DNA基因库中筛检出全部人 β 干扰素基因。

我们用琼脂糖- CH_3HgOH 凝胶方法筛选出了大量的干扰素mRNA，以阐明它们的mRNA种系组成（Sagar等，1982）；并从这些实验中进一步获得了以下两项观察结果。

1. 0.9kb和1.3kb的mRNA，在不同的FS-4细胞株中以不同的方式表达。1973年从Dr. Vilček得到的一批FS-4细胞，主要表达 β_2 干扰素mRNA；1975年秋天从Dr. Vilček得到的第二批细胞则主要表达 β_1 干扰素mRNA。

2. 在用polyI:C诱导FS-4细胞产生的几种mRNA制品中，观察到另外两种 β 干扰素mRNA，分别长约1.8和0.6~0.7kb。为了方便，分别称它们为 β_3 干扰素mRNA和 β_4 干扰素mRNA。从这些实验得出的印象是，至少应该有两种的人 β 干扰素基因和由此产生的4种mRNA。进一步的实验（将在下一节中述及）提出，人 β 干扰素基因至少应增加到三种。

B 多种人类 β 干扰素的基因

在70年代中期，已从人-啮齿动物体细胞杂种的基因实验得到资料，提示人 β 干扰素基因位点存在于人2、5和9号染色体上的不同部位。但这些实验的结果是有争论的。一方面，Tan氏等（1974）以及Slate和Ruddle（1979, 1980）