

综述

干扰素生物工程研究进展

杨吉成

(苏州医学院微生物学教研室, 苏州)

生物工程是目前世界上一项新兴技术。具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用的高活性多功能的干扰素 (IFN), 是生物工程研究开发最为活跃的领域之一, 目前集中在基因工程、细胞工程和发酵工程方面。

IFN 基因工程

人 (Hu) IFN- α 、 β 、 γ 的基因工程均已获得成功, 并试用于临床。过去生产 1g IFN- α 约需三亿毫升人血白细胞。用基因工程技术生产, 一个中等规模的实验室每天即可生产 1—2g, 不仅降低了成本, 而且可达工业生产规模, 保证了 IFN 的来源。除用大肠杆菌来进行表达外, 还有人在酵母菌 (真核细胞) 中也获得了表达。我国 1982 年侯云德首次成功地获得了 IFN- α D 基因工程大肠杆菌, 国内外 Hu IFN 基因工程的研究概况列于表 1。目前我国相继已研究出生产 IFN- α 、 β 、 γ 的基因工程菌株, 我国干扰素的研究已进入了一个新的阶段, 也就是研究、开发、应用的阶段^[1-3]。

由于基因工程方法应用于 IFN 的研究及生产制备, 使自然干扰素 (nIFN) 的分子生物学、分类研究和大规模单一成分的纯品 IFN 生产得到迅速广泛的发展。不仅如此, 近年来还应用基因工程技术创造

表 1 人 IFN 基因工程概况

	瑞士	中国	日本	比利时	美国
	Nagate	侯云德	Taniguchi	Fiers	Gray
发表时间	1980年	1982年	1979年	1980年	1982年
IFN类型	α	α	β	β	γ
细胞种类	白细胞	白细胞	DIP ₂	VGS	外周血淋巴细胞
诱生条件	启动后	新城疫病毒	超诱导	启动加超诱导	葡萄球菌肠毒素 B
插入顺序	0	0	0	0	3

了按照人们设计需要的自然界中没有的干扰素类型, 即新型干扰素。它主要包括“IFNs类似物” (analogues) 和“IFNs 杂合体” (IFN hybrids)。

应用蛋白质工程技术, 使 IFN 编码的 DNA 中某个或某几个氨基酸编码子人为地发生变化, 而使产生的 IFN 中某个或某几个氨基酸发生改变被其它氨基酸取代, 这样的 IFN 分子中的氨基酸成分的改变已不同于原来的 nIFN, 故将其称为 IFNs 类似物。其方法主要是采用点突变技术, 麦富智等使 IFN- β 的 17 位半胱氨酸编码子 TGT 变成 AGT 编码丝氨酸, 这样就产生了 IFN- β Ser17, 使第 17 位的半胱氨酸被丝氨酸取代, 从而就不能再被氧化形成二硫键, 大大增强了 IFN- β 的稳定性。Valenzuela 等采用诱导点突变使 IFN- α_2 产生了 Phe-IFN- α_2 等 4 种 IFN- α_2 类似物。Nistsrt 等通过改变了引物延伸条件简化了点突变的 DNA

本文于 1987 年 12 月 24 日收到,

操作，成功地构建了 IFN- α_1 的类似物。Shepard 等把 IFN- β_1 的 141 位的 Cys 变成 Tyr，产生了新的 IFN- β_1 。IFNs 类似物有三种即 IFN- α 类似物，IFN- β 类似物和 IFN- γ 类似物。

利用基因工程方法把来自不同型（或亚型）的 nIFN 部分基因拼接成完整的蛋白基因，这样形成的 IFN 称为 IFNs 杂合体。近年来 Week 等和 Sen 等利用 IFN- α_1 (D) 和 IFN- α_2 (A) 基因中有共同的限制性内切酶切点，用内切酶分别切开两种干扰素基因，再把 IFN- α_1 的一半基因与 IFN- α_2 的另一半基因连接起来形成了多种杂合体。如：IFN- α_2/α_1 (IFN- α AD)，IFN- $\alpha_1\alpha_2$ (- α DA) 等。Weber Has 和 Weisman Charles 利用同源重组法，构建了新的质粒，且能表达出杂合体蛋白。但这一技术只能在具有高度同源性的 IFN 基因间应用。IFNs 杂合体的种类较多，即有亚型间的杂合体，也有 IFN- α 和 IFN- β 成分的杂合体，以后或许能产生类 IFN 间的杂合体或类 IFN 与 nIFN 间的杂合体。

现已发现 IFN- α AD 在人源细胞中的抗病毒活性比 IFN- α D 高 70 倍，与亲本的 IFN- α A 相当，IFN- α DA 比亲本 IFN- α D 低 4 倍，比 IFN- α A 低 300 倍，在小鼠 L929 细胞中，IFN- α AD 比亲本 IFN- α A 或 IFN- α D 高 1000—10000 倍，提供了一个在鼠体内研究 HuIFN 的模型，这些杂合体在抗细胞增殖活性、免疫调节活性等方面均有差异^[4-6]。

有关 IFN 的人工合成，美国国立卫生院 (NIH) 已经合成了 140 个（从第 27 位到 166 位）氨基酸的 IFN 多肽，其抗原性与 nIFN 相同。不仅如此，Edge^[7] 还合成了 IFN- α_1 基因，并获得了正确表达。据 Caruthers 介绍^[8] IFN- γ 基因亦已人工合成成功。

基因工程菌干扰素的缺点除分子过于单一外，还有未被糖基化，不能分泌到胞外，需经溶菌酶裂解释放，其产量一般为 10^8 u/L 菌液，而采用家蚕来生产干扰素就更为理想，可克服上述缺点。Smith

(1983) 首先把 HuIFN- β 基因结合在夜蛾的 NPV 多角体蛋白基因上，在培养的昆虫细胞中获得了表达^[9,10]，其产量为 5×10^8 u/ 10^6 细胞。日本前田进 (1984) 将 HuIFN- α 基因重组在家蚕 NPV DNA 上，并在家蚕中获得了表达^[11]，每条蚕体液中可产生 1.5 ml (4×10^7 u/ml) 的干扰素。治疗一个病人需用 4.5 L 血液，采用基因工程菌，需用 1 L 的大肠杆菌菌液，而采用家蚕只需 2—3 条即可达到^[12]。

众所周知，家蚕脓病是家蚕感染多角体病毒 (NPV) 而引起的，感染 NPV 的细胞核中病毒粒子可增殖到 100 万，或者

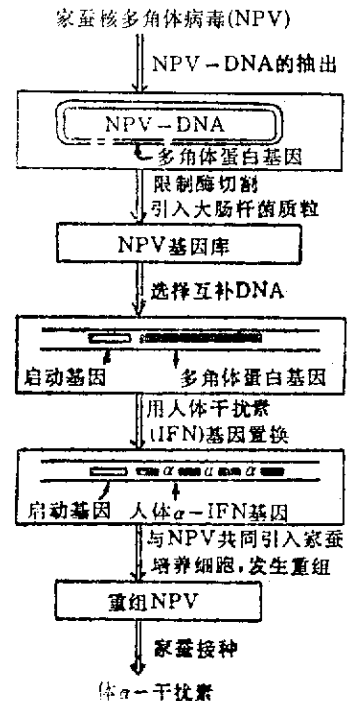


图 1 用 NPV 作载体合成干扰素流程图

以多角体型存在的蛋白质结晶几百到几千个。脓病蚕体内可以合成大量的多角体蛋白质。若用 NPV 作为干扰素基因的载体, 将 Hu IFN- α 基因取代多角体蛋白基因部分, 做成干扰素与 NPV 的 DNA 重组体, 产生重组的 NPA 再感染蚕体, 可合成干扰素, 其程序如图 1 所示^[13]。

人类在数千年驯化蚕的过程中积累了丰富的经验和成果, 蚕内部具有开放式血管系统, 合成的干扰素可分泌到胞外, 而且易于被糖基化。特别是产量高, 浓度大更令人注目。然而就目前情况来看, 由家蚕合成的干扰素量还不到产生多角体蛋白的 1%, 因此进一步改善载体和感染条件, 提高产量有很大潜力。家蚕体液的收集对于蚕业工作者来说是十分简单的。因此随着家蚕人工饲养、自动化喂育及无菌饲育技术的推广和应用, 用这种方法低成本地来大量生产高效价的糖基化干扰素是完全可能的。此外, 该方法一旦建立, 还可用来生产干扰素以外的其它蛋白质。如白细胞介素-2 (IL-2), 肿瘤坏死因子 (TNF), 抗 AIDS 病毒抗体, 肽激素, 病毒抗原疫苗等, 在农业上已有人采用此方法生产出蜘蛛毒蛋白和酯酶蛋白^[14]。这一技术若能在我国得到开发, 将是家蚕史上自我国“丝绸之路”之后的又一重要贡献。不久的将来以家蚕取代大肠杆菌等微生物来生产有用的蛋白质, 将在生物技术开发中起巨大作用^[15]。

细 胞 工 程

(一) IFN 诱生细胞

1. IFN- α, γ 诱生细胞: 一般认为 IFN- α 是 B 淋巴细胞产生, IFN- γ 是由 T 淋巴细胞及 NK 细胞产生。常用健康人外周血淋巴细胞, 也可用健康人脾脏, 扁桃体中的

淋巴细胞来生产 IFN- α 或 IFN- γ , 诱生 IFN- α 时常用新城疫病毒 (NDV-F 系), 诱导 IFN- γ 时常用 PHA, ConA, PWM 等。在我国用人外周血白细胞生产 IFN- α 以成都生物制品研究所为定点单位, 上海、广州、西安等地也有小批量生产。用人脐血生产 IFN- α , 在我国早已试用于临床, 效果良好。在上海、长春、西安、沈阳、南京、苏州、河南等地均有少量生产。从临床效果来看, 结合我国国情开发上述细胞来源的干扰素是可行的。

为了扩大干扰素的来源以满足临床需求, 近年来广州、武汉等地开展了用猪脾脏、猪血制备干扰素的研究。在苏联应用较早, 我国开始以外用剂型进行临床观察, 均获得一定疗效。今后还可综合利用小牛血、小牛脾脏来生产干扰素, 因经试验对人源细胞无明显种属间的差异, 值得进一步研究和利用。

2. IFN- β 的诱生细胞: IFN- β 的细胞一般用人成纤维细胞, 常用人二倍体细胞、人胚肺、人胚肌皮细胞及人胚阴茎包皮细胞等。国外早已用于生产和临床。美国 Seorl 药厂用人成纤维细胞生产 IFN- β , 日产量在 5×10^8 u 以上。我国军事医学科学院用微载体悬浮培养生产鼠 IFN- β 及人 IFN- β , 武汉生物制品研究所也有生产人 IFN- β 的报道。近来, 王晓鸣等还将人 IFN- β_1 基因的重组质粒在 CHO 细胞中进行了表达, 故微载体法为大量培养重组 IFN 基因的 CHO 工程细胞, 进而为生产 IFN- β , 开辟了途径^[16-18]。

3. 类淋巴细胞 IFN 的诱生细胞: 国际上公认的 IFN 高产的类淋巴细胞是 Namalva 细胞, 这是一株由 EB 病毒转化的人 B 淋巴细胞。最初来源于一名患 Burkitt 淋巴瘤的东非女孩。于 1972 年建株。英国 Wellcome 公司应用 1000, 2000 和 4000L 发

酵罐来进行生产(为IFN α - β 的混合型)。日本淋源生化所将BALL-1类淋巴细胞(属B淋巴细胞)采用注入新生地鼠体内增殖的方法来生产IFN,每只地鼠可生产 $1-2 \times 10^7$ u IFN,相当于10000ml人血白细胞的IFN产量^[1]。上海第二军医大学现用30L发酵罐生产Namalva细胞干扰素^[19],苏州医学院用自建的S_{8.01}白血病细胞(来自急淋患者外周血)和S_{7.11}白血病细胞(来自急粒-单型患者外周血)进行了干扰素诱生试验^[20]。干扰素效价可达4800IU/ml,经中药促诱生剂处理,可使产量提高10—20倍,虽略低于Namalva细胞,但仍有生产潜能^[21-23]。

总之,非基因工程IFN的生产也大有可为,我国人口众多,血源和其它脏器来源的细胞丰富,若能充分利用,其产量可观,效益颇大,而且只需少量投资就可见显著效益。这既符合国情,又符合多、快、好、省的原则,应给予支持和资助,以利尽快开发和利用。

(二) IFN单克隆抗体(McAb)杂交瘤细胞

1980年以来先后研制成功了小鼠抗人IFN- α ^[28,30]、IFN- β ^[31]和IFN- γ ^[32-34]的McAb,该McAb可用于抗体亲和层析柱以纯化相应的IFN,有较高的经济价值和实用价值,是基因工程干扰素的“配套产品”。我国上海第二军医大学已建立IFN- γ McAb。

(三) 导向IFN

IFN全身治疗肿瘤、乙型肝炎等疾病时,需加大剂量,然而毒性增加,若将IFN偶联于相应的特异McAb上,注射体内后,由McAb作导向可使局部靶器官IFN的浓度增高,从而达到治疗的目的^[2]。

发 酵 工 程

(一) 细菌发酵工程

国外利用重组的IFN基因工程菌已大量生产IFN- α 、 β 、 γ ,并获得了晶体纯品,而且已商品化供实验研究和临床试用。美国和加拿大已获准应用^[35]。我国长春生物制品所采用HCD-3培养基和IFN- α D工程菌(侯云德建立的)在日本的MSJ-U₃型30L发酵罐中进行高密度培养实验,效价可达 9.8×10^7 IU/L^[36],上海生物制品研究所也用此工程菌在高密度(GMD)培养基中进行试验,其效价为 79.48×10^6 u/L^[37],目前国家已投资1300万元,由这两个单位解决基因工程干扰素(rIFN)的后加工和处理问题。目前基因工程干扰素的纯化方法已基本建立,纯度可达96%,回收率为95%^[38],目前正在向卫生部报批外用。“七五”规划要求在1990年达到300L规模。待取得经验后再普及推广。苏州生化制药厂正在与美国一家厂方谈判,准备引进基因工程干扰素全套设备和技术。

(二) 细胞发酵工程

英国Wellcome公司用Namalva细胞生产类淋巴细胞干扰素,生产规模已达4000L,1984年北京生物制品研究所用Namalva细胞在50L发酵罐中进行了生产^[38],最近上海第二军医大学用日本MJ-3型30L细胞培养罐生产Namalva细胞干扰素,效价可达 $10-14 \log_2$ IU/ml^[39]。

Edy等已用50L的细胞培养罐进行了IFN- β 的生产,武汉生物制品研究所用二倍体细胞,采用微载体培养法大量生产IFN- β ^[39],最近军事医学科学院用自制的Mc-1型微载体进行L929鼠细胞悬浮培养^[40],用启动加超诱导法进行INF- β

的诱生, 其效价可达 10log IU/ml, 获得了高效表达。

综上所述, 干扰素生物工程具内容

多, 效益大, 应用前景广阔的特点, 应注重研究, 大力开发和利用。

参 考 文 献

- [1] 威中田: 国外医学, 生物制品分册, 2:49, 1986.
- [2] 侯云德: 第六次全国IFN学术会议论文集, p.9, 1987.
- [3] Devos, R. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 10:2487, 1982.
- [4] 杜平: 第六次全国IFN学术会议论文集, p.14, 1987.
- [5] Week, P. K. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 9:6153, 1981.
- [6] Sen, G. C. et al.: *J. Virol.*, 50:446, 1984.
- [7] Edge, E. et al.: *Nature*, 292:756, 1981.
- [8] 刘新恒等: 生物科学动态, (4):1, 1983.
- [9] Smith, G. E. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 13:2156, 1983.
- [10] Smith, G. E. et al.: *J. Virol.*, 45:215, 1983.
- [11] 前田进: 细胞工学, 4(9):767, 1985.
- [12] 黄君霆: 国外农学——蚕业, (2):2, 1986.
- [13] 吉武成美: 日本蚕丝新闻, 第1948号(日文), 1984.
- [14] 李奕仁: 国外农学——蚕业, 第1期, p.50, 1987.
- [15] 杨吉成: 实验和临床病毒学杂志, (待发表).
- [16] 李广善等: 中华微生物学和免疫学杂志, 6(4):238, 1986.
- [17] 熊绍荣等: 微生物学通报, 13(3):117, 1986.
- [18] 王晓鸣: 第六次全国IFN学术会议论文集, p.98, 1987.
- [19] 郭葆玉: 第六次全国IFN学术会议论文集, p.101, 1987.
- [20] 杨吉成: 江苏医药, 9(10):8, 1983.
- [21] 杨吉成: 中华微生物学和免疫学杂志, 4(5):329, 1984.
- [22] 杨吉成: 中华微生物学和免疫学杂志, 5(4):247, 1985.
- [23] 杨吉成: 中华微生物学和免疫学杂志, 6(3):157, 1986.
- [24] 杨吉成: 中华免疫学杂志, 2(4):229, 1986.
- [25] 杨吉成: 免疫学杂志, (4):240, 1986.
- [26] 杨吉成: 中西医结合杂志, 6(4):231, 1986.
- [27] 杨吉成: 苏州医学院学报, (2):20, 1985.
- [28] 杨吉成: 第六次全国IFN学术会议论文集, p.160, 1987.
- [29] Morser, J. et al.: *J. Gen. Virol.*, 53:257, 1981.
- [30] Staehelin, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1848, 1981.
- [31] Hochkeppel, et al.: *Eur. J. Biochem.*, 118:437, 1981.
- [32] Hochkeppel, et al.: *Nature*, 296:258, 1982.
- [33] Rabin, By et al.: *J. Immunol.*, 130:1019, 1983.
- [34] Le, J. et al.: *J. Immunol. Methods*, 69:61, 1984.
- [35] 张继林: 国外医学情报, (1):101, 1987.
- [36] 郭德本等: 第六次全国IFN学术会议论文集, p.103, 1987.
- [37] 童葵塘等: 第六次全国IFN学术会议论文集, p.105, 1987.
- [38] 李财等: 第六次全国IFN学术会议论文集, p.117, 1987.
- [39] 丁志芬等: 中华微生物学和免疫学杂志, 3(2):96, 1983.
- [40] 肖成祖等: 第六次全国IFN学术会议论文集, p.111, 1987.