

# 影响人 $\beta$ 干扰素超诱导的因素

熊绍银 吴本传 肖成祖

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

用聚 I: C-环己亚胺-放线菌素 D 系统超诱导生产人  $\beta$  干扰素(HuIFN- $\beta$ ),是一种比较成熟的方法,但其影响因素很多。为了探讨用国产聚 I: C 代替进口产品大量生产干扰素的可能性,以及寻找合适的诱生条件提高干扰素产量,我们对一些影响超诱导的因素进行了比较研究。

## 材料与方 法

### (一) 细胞

用以诱生干扰素的人二倍体成纤维细胞 SM<sub>2</sub> 株,是从近 40 株不同的人胚组织细胞中筛选获得,试验中使用的是 SM<sub>2</sub> 15—40 代的培养物。测定细胞为 Wich 株,由中国预防医学中心病毒研究所赠送。

### (二) 培养液

培养液 Eagle's MEM 为每毫升补充 5—10% 小牛血清,青、链霉素各 200u,卡那霉素 25u,谷胺酰胺 0.293 mg,用 7.5% NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 7.2—7.6。生产液为含 2% 小牛血清的培养液。

### (三) 干扰素诱导剂

日本 YAMASA 公司的聚 I: C,冻干产品,801439 批;天津生化制药厂的聚 I: C,注射液,830102 批;广东江门甘蔗化工厂的聚 I: C,水溶液。

### (四) 代谢抑制剂

环己亚胺是瑞士 FLUKA 公司的产品,210839 批;放线菌素 D 是美国 SIGMA 的产品。

### (五) 细胞培养及超诱导

用 0.25% 胰酶消化已生长 5—7 天的 SM<sub>2</sub> 细胞单层,制备浓度为 27 万/ml 的细胞悬液,每支培养管(面积约 3.5 cm<sup>2</sup>)接种 1 ml,置 37℃ 培养,每两天换液一次,48 小时细胞即形成单

层,第 10 天进行超诱导。超诱导按预试验确定的程序进行:吸出培养管中的培养液,用 Hank's 液洗涤细胞两次,然后同时加入聚 I: C 100  $\mu$ g/ml 和环己亚胺 20  $\mu$ g/ml,置 34℃,4 小时后加入 4  $\mu$ g/ml 放线菌素 D,继续孵育 1 小时,然后弃去诱生液,用 Hank's 液洗涤细胞 3 次,加入 1 ml 生产液,孵育 20 小时收获上清即得粗制 HuIFN- $\beta$ 。

### (六) 干扰素效价测定

测定干扰素效价采用微量染色方法<sup>[1]</sup>。HuIFN- $\beta$  标准品为本组制备的粗制 HuIFN- $\beta$ ,经 G-023-902-527 国际参考标准品标定,效价为 5,000 IU/ml。攻击病毒 VSV 为 Indiana 株。

## 结 果

### (一) 不同胞龄细胞的干扰素产量

根据 SM<sub>2</sub> 细胞的生长曲线(图 1),选择 7、10 和 14 天的培养物作超诱导。结果表明培养 10 天后的细胞,干扰素产量最高(表 1),培养时间过短或过长都会影响干扰素的产量(以下均用 10 天龄的细胞)。

表 1 细胞胞龄对超诱导的影响

胞龄(天)	干扰素效价 *	
	LogIU/ml	IU/10 <sup>5</sup> 细胞
7	3.70	8.5
10	3.92	12.0
14	3.76	8.2

\* 3 次结果的平均值

中国预防医学中心病毒研究所赠送 Wich 细胞;中科院生物物理所聚 I: C 研究室惠赠聚 I: C;黑龙江省祖国医学研究所惠赠刺五加多糖。一并致谢。

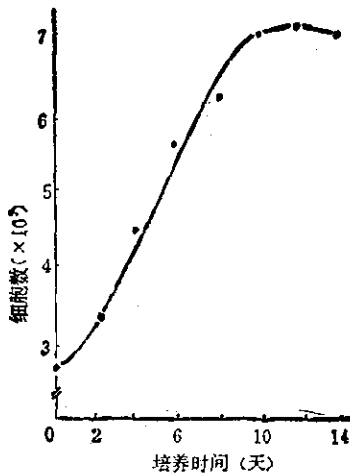


图1 SM<sub>2</sub>细胞在培养管中的生长情况

## (二) 比较不同聚 I:C 的诱生能力

用单诱生或超诱导方法比较国产和进口的聚 I:C 的诱生能力。单诱生方法, 国产聚 I:C 的干扰素产量比日本 YAMASA 聚 I:C 低 3—4 倍。超诱导方法约比日本的低 40% (表 2)。但广东和天津的聚 I:C 对日本 YAMASA 聚 I:C 的显著性测定, 表明其差异还不显著 (*t* 值分别为 1.962 和 1.850)。从表 2 中还可看出, 单诱生能力弱的聚 I:C 用作超诱导后, 干扰素产量大幅度增加(约 180 倍), 而单诱生能力强的聚 I:C 用于超诱导后, 其干扰素产量的增加倍数较少(约 70 倍)。

表 2 不同聚 I:C 的诱生能力

聚 I:C	不同诱生方法的干扰素效价 (LogIU/ml)	
	单诱生 *	超诱导**
广东	1.52	3.74
天津	1.41	3.71
YAMASA	2.07	3.92

\* SM<sub>2</sub> 细胞 7 天培养物, 聚 I:C 100 μg/ml, 37°C 2 小时, Hank's 液洗涤后加入生产液, 20 小时收获上清。4 次结果的平均值。

\*\* 10 次结果的平均值。

## (三) 温度对超诱导的影响

为了观察温度对超诱导的影响, 分别于 34°C、37°C 和变温条件下进行超诱导, 实验分组及结果见表 3。从表 3 结果可见, 在 34°C 和

37°C 超诱导, 其干扰素产量基本无差别。经过降温处理后干扰素产量并未增加, 与 Giard<sup>[2]</sup> 的结果不一致, 其原因尚不清楚。

表 3 温度对超诱导的影响

温度(°C)	干扰素效价 (LogIU/ml) *
34	3.99
37	3.97
34-37-34**	3.93

\* 超诱导 34°C, 加生产液后放 37°C 1 小时, 然后转入 34°C。

\*\* 5 次结果的平均值。

## (四) 小牛血清对超诱导的影响 (见表 4)

1. 诱生液中的血清含量: 诱生液分不加和加有 10% 小牛血清两组, 与每组对应的生产液中的血清含量均为 0 和 2%。表 4 结果表明, 使用不含血清的诱生液干扰素产量较高, 加血清则影响干扰素的产量, 与 Machida 等人<sup>[3]</sup>的结果相符。

表 4 小牛血清对超诱导的影响

溶液中血清浓度(%)		干扰素效价 (LogIU/ml)*
诱生液	生产液	
10	2	3.68
	0	3.51
0	2	3.92
	0	3.74

\* 4 次实验的平均值。

2. 生产液中的小牛血清含量: 当诱生液不含血清, 而在生产液中加入 0—10% 小牛血清, 超诱导的结果表明, 生产液中的血清含量为 2% 时干扰素产量最高, 不加血清时干扰素产量仅为前者的 40%。血清含量超过 5% 则干扰素产量逐渐下降。

## (五) 刺五加多糖的促诱生作用 (见表 5)

刺五加多糖对某些传代细胞株有明显促诱生作用, 对正常的人二倍体细胞 SM<sub>2</sub> 株是否亦如此? 我们于超诱导前分别用 5 和 10 μg/ml 多糖, 于 37°C 与细胞共育 24 和 48 小时, 然后超诱导。表 5 结果提示, 10 μg/ml 多糖预处理细胞 48 小时显示一定的促诱生作用, 预处理

表5 刺五加多糖的促诱生作用

作用时间 (小时)	不同剂量多糖时的干扰素产量(LogIU/ml)*	
	5	10( $\mu\text{g/ml}$ )
24	3.54	3.50
48	3.85	3.92

\* 2—3次结果的平均值

24小时则无效。刺五加多糖的促诱生作用是否与干扰素的起动(Priming)效应相似有待进一步研究。

### (六) 起动对超诱导的影响(见表6)

于超诱导前24小时,分别用不同剂量的粗制HuIPN- $\beta$ 对细胞进行起动诱生,然后超诱导。从表6结果看出,经10—500 IU/ml干扰素起动后,其干扰素产量均有不同程度的增加,但以100 IU/ml用量更合适,可使干扰素产量增加1.5倍。

表6 起动对超诱导的影响

起动干扰素用量 (IU/ml)	干扰素效价(LogIU/ml)*
0	3.88
10	4.06
100	4.27
200	4.35
500	4.39

\* 5次结果的平均值

### (七) SM<sub>2</sub>细胞产生干扰素的累积动态

细胞经超诱导后,于不同间隔时间收集干

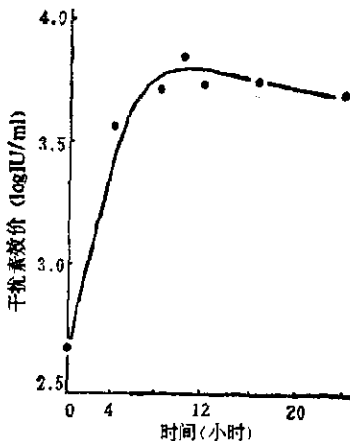


图2 SM<sub>2</sub>细胞超诱导后产生干扰素的累积动态

扰素,测定效价。结果表明,超诱导后细胞产生干扰素很迅速,8—10小时产量即达高峰,至24小时干扰素产量略有下降(图2)。

### (八) 扩大诱生

用面积30 cm<sup>2</sup>的细胞培养瓶,用起动加超诱导方法扩大诱生。10次实验的结果是,干扰素效价波动在7,000—16,000 IU/ml,平均10,900 IU/ml。对3批超诱导后的细胞按Vanwezel的方法<sup>[4]</sup>计数,求得每10<sup>3</sup>细胞的干扰素产量为33 IU。

## 讨 论

文献[5]报告和本试验结果均证明,用于超诱导的细胞在形成单层后仍需要继续培养一段时间(老化),否则会影响干扰素的产量。老化时间可能因细胞株和培养条件而异。静止培养一般为8—10天,转瓶培养可稍延长,而Giard使用微载体转瓶系统,经6—8天培养的细胞(F<sub>4</sub>株)即用于超诱导。

诱生能力强的聚I:C必须在化学结构、分子量、增色效应及溶解温度等方面达到一定标准。而这些影响聚I:C质量的条件通常又难以控制,故不同厂家生产的聚I:C其诱生能力相差悬殊,甚至批间也存在较大差异。目前国内生产的聚I:C,无论单诱生或超诱导其诱生能力均不太高(见表2)。用于注射小鼠诱生的血清干扰素亦分别比日本YAMASA和美国P.L公司的聚I:C低1—2倍(数据未列出)。因此,虽然目前的国产聚I:C具有一定诱生干扰素的能力,但尚不能代替进口聚I:C用于干扰素的大量生产。

Machida<sup>[6]</sup>指出,在一定范围内,聚I:C的S值越大则诱生的干扰素产量越高。用高速离心测得天津、广东和日本YAMASA的聚I:C的S值分别为6.5, 8.0和11.5。与本文报道的诱生干扰素能力的大小(天津聚I:C  $\leq$  广东聚I:C < YAMASA聚I:C)相符。表明聚I:C的诱生能力与其S值的大小密切相关。

小牛血清对干扰素产量的影响比较复杂。不少作者的实验证明,诱生液不加小牛血清干

扰素产量较高；生产液中不含血清或蛋白成分则干扰素的产量偏低，我们的结果支持上述观点。但 Stewart<sup>[7]</sup> 在诱生液和生产液中均加入 2% 小牛血清同样获得了高产。实际上，在生产供临床使用的干扰素时，应避免加入异种血清和过多的蛋白成分，通常代之以 1% 人血清（或血浆）蛋白。

在影响超诱导的若干因素中，诱生细胞是否高产，聚 I:C 质量的优劣以及超诱导方案是否得当是主要的影响因素。在满足上述条件的基础上，启动加超诱导不失为制备 HuIFN- $\beta$  的较好方法。

## 参 考 文 献

- [1] 肖成祖等：中华微生物学和免疫学杂志，5(3)：181，1985。
- [2] Giard, D. J. et al.: *Experimental Biology and Medicine*, 170(2): 155, 1982.
- [3] Machida, H. et al.: *Microbiol. Immunol.* 24(1): 31, 1980.
- [4] Vanwezel, A. L.: *Tissue culture methods and application* (Ed. Kruse, P. F.) Academic NY, p. 372, 1973.
- [5] 侯云德：干扰素及其临床应用，174—175 页，江苏科学技术出版社，1981。
- [6] Machida, H. et al.: *Japanese J. Microbiol.* 20(2): 71, 1976.
- [7] Wiranowska-Stewart, M.: *J. Gen Virol.* 37: 221, 1977.