用磁性搅拌法制备人白细胞α-干扰素

柏乃庆　秦兰娣　曹芬

（上海市输血研究所，上海）

PRODUCTION OF HUMAN LEUKOCYTE α-INTERFERON BY MAGNETIC STIRRERS

Bai Nai-Qing　Qin Lan-Di　Chao-Feng

(Shanghai Institute of Blood Transfusion)

目前国际上用临床的干扰素有人白细胞干扰素（IFN-γ）人成纤维母细胞干扰素（IFN-β），类淋巴细胞干扰素（IFN-α），免疫干扰素（IFN-α）以及用基因工程技术生产的各种类型的干扰素，这一工作受到各国红十字会血液中心输血工作者的重视，随着血液成份输血的开展，从全血中分离出单一制品，供应临床患者的需要，由于白血病患者为数不多，再加上白细胞型别复杂，约有100多种抗原，多次输注后易产生输血反应，因此，临床上白细胞的用量有限，势必白细胞就有积余，而白细胞是生产干扰素的一个重要原料，为使积余的白细胞既能得到充分利用，又能为治疗疾疾病提供一种新型药物，故而开展本题的研究。

材料和方法

一、材料

（一）人白细胞：取正常人ACD血液200ml，离心2500转/分，13分钟，分浆吸取白细胞层（内含部分红细胞），再用NH_4Cl-Hanks法移去残留的红细胞，即为白细胞。

（二）化学试剂，溶液和介质：

1. 化学试剂：乙醇（上海化学试剂总厂，分析纯），氯化铵（云岗化工厂，分析纯），硫氰酸钾（北京化工厂，分析纯），谷氨酰胺，（上海生化试剂厂，分析纯），胰酶，Difco。

2. 溶液：NaCl液，Hanks液，PB液和PBS液。

3. 介质：Eagle MEM，Nissui Seiyaku CO LTD 无菌试验用培养基。

（三）诱生病毒：新城鸡瘟病毒（NDV-F系）病毒在10天龄鸡胚尿囊腔中传代，培养72小时后收获尿囊液，血凝滴度1：640～1：1280。

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(四)攻击病毒：滤泡性口腔病毒（VSV），Indiane 株，在鸡胚细胞中传代，攻击时用100TCID$_{50}$。

(五)传代羊膜细胞：生长液为小牛血清-Eagles-谷氨酰胺溶液。

(六)实验动物：家兔，豚鼠，小白鼠，鸡胚。

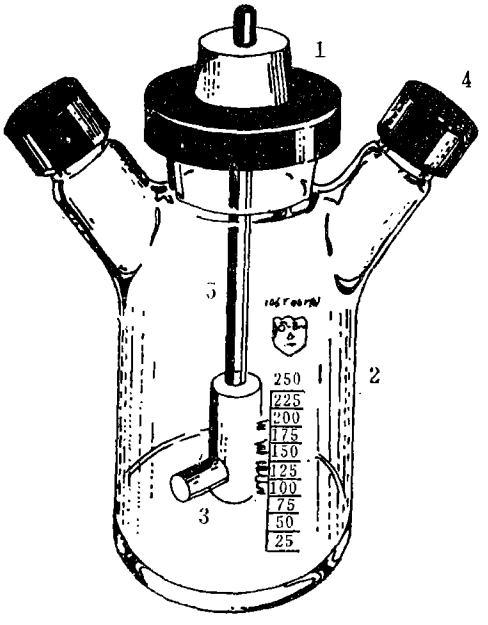
(七)96孔微量滴定板。

二、方法

人白细胞粗制干扰素制备方法：参考文献[5,6,7]方法并加以改良。

1)纯化白细胞：吸出浓缩白膜层加入 6 倍量 0.83%NH_4Cl 溶液，在 4 ℃ 作用10分钟，离心1,500转/分，15分钟，废弃溶血上清，用上述方法再重复一次，保留沉淀再加 9 倍量Hanks 液，离心800转/分，4 分钟，制成纯化白细胞。

2)诱生干扰素：将每毫升含有 10^7 的白细胞浓缩液中添加 Eagles 液，2 %人血清，0.03%谷氨酰胺，卡那霉素 200 单位，粗制干扰素 100 单位，其诱生混悬液pH为7.2～7.4，将此溶液移入 Bellco 旋转长颈瓶中（Bellco Glass jnc）见图 1，置于37℃中保温，并进行磁性搅拌，速度为80～120转/分，保温 2 小时后加入 NDV-F 32～128血凝单位，继续磁性搅拌，保温15～20小时。离心2500 转/分，30 分钟，收集上清液即为粗制干扰素（pH为6.8～7.0）并用6NHCl 调pH至2.0，于 4℃保存 4 ～ 5 天（为灭活病毒，再用6N NaOH 调pH至7.0）。



1.螺旋帽；2.长颈瓶；3.叶轮装置（磁体和棒）；4.螺旋帽；5.玻璃棒

Fig.1 Bellco Spinner Flasks

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

结　　果

我们从1983年开始制备了90多批粗制干扰素，共91,100毫升，现将五批 α 干扰素结果（见表1）和9批人白细胞干扰素各项指标测定结果报告如下：

表1五批α干扰素结果
Table 1 The results of 5 batch α-interferon

批号	粗制干扰素		
	容量 ml	效价 μ/ml	比活性 μ/mg蛋白
8401—06	10,000	16,384	6,826
8501	6,000	6,400	2,666
8502	8,000	6,400	3,047
8503	8,000	6,000	3,034
8504	8,000	6,400	2,666

表二：人白细胞干扰素测定结果
Table 2 Determination results of human leukocyte interferon

项目 \ 批号	01	02	03	04	05	06	07	08	09
检菌	阴性	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
热原（平均0.5 °C以下）	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
小鼠试验	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
豚鼠试验	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
余毒试验	阴性	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
pH7.05～7.10	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

讨　　论

人白细胞 α干扰素是国际上广泛研究和大量制备的主要类型的干扰素，在防治病毒性疾病，抗肿瘤和调节免疫作用的效果已比较肯定，并在其作用机制，药理动力学和临床应用等方面进行了一些研究，积累了一定的经验[11]。但就国内来看，仍还处于初期阶段。人白细胞精制干扰素的制备方法目前虽有单位报道，但从报道中看来无论在粗制干扰素诱导或精制纯化方面，工艺均比较复杂。为克服这一缺陷，我们吸取了国外的先进经验以及结合我们的条件进行了改良，用磁性搅拌代替转鼓（转床）方式旋转。通过三年多的实验。共制备90多批，九万多毫升粗制干扰素，从表一结果表明，粗制干扰素效价一般为 6400 单位/ml，用上述方法制备了 2000 多支粗制干扰素（2 万单位/每支）1500 多支低滴度干扰素（2 ～ 4 万单位/每支），通过各项指标测定，从表二结果表明符合临床应用的鉴定标准，并已供应临床使用，如乙型肝炎、心肌炎、肺炎、角膜炎、慢性气管炎、出血热、肝癌和原发性肺癌等患者。粗制干扰素除个别患者有发热反应外，其它反应也未发现，通过使用也证明各种病种均有不同程度的疗效，如治疗慢性乙型肝炎，能使患者HBeAg 阴转，出现抗HBe。HBsAg滴度下降，甚至个别阴转。又如治疗肝癌，肺癌，胃癌，喉癌等病人，肿块缩小，食欲增加，精神好转，疼痛缓解，热度消退，详细资料以后报告，从而说明该制品是安全、有效的，从上述的质量控结果以及临床初步使用看来，本制品的工艺是可行的，从而为白细胞的综合利用开避了一条新的途径。

参 考 文 献

[1] Gresser I. 1961, Proc Soc Exp Biol Med 108:799.
[2] Cantell K. 1970, in sym. ser, Immunol Standard, 14:6.
[3] Cantell K, et al. 1977, Texas Reports on Biology Med, 35:138.
[4] 侯云德. 1981, 干扰素及临床应用 p.254
江苏科学技术出版社
[5] 大阪府赤十字血液セソタノ. 研究报告 p.18 昭和57年度
[6] Mogensen K.E, et al., 1977 Pharmac. Ther. Pt. A., 1:369.
[7] Cantell K, et al. 1981, Methods in enzymology, 78:29.
[8] 上海第一医学院微生物教研室病毒组. 1981, 病毒室常规 p89.
[9] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 1979, 中华人民共和国药典附录 53、55、60, 1977 年二部。人民卫生出版社，北京
[10] 中华人民共和国卫生部. 1979, 生物制品规程 血液制品 2—62
[11] Dunnick J.K et al. 1979, J. Infect. Dis, 139:109.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net