病毒学杂志 3，1987
Virologica Sinica

人α和γ干扰素联合应用的抗病毒协同作用

王建陵

（南京中医学院微生物教研室，南京）

严泳楷

（中山医科大学，广州）

提　要

采用病毒产量减少试验，在 A_{549} 细胞上观察α和γ干扰素联合应用的抗病毒协同作用。结果表明：协同倍数为5-16倍；协同作用由干扰素本身的性质所决定，与其它成分无关；α干扰素不能促使γ干扰素加快诱生抗病毒状态的建立；故认为协同作用的产生与两型干扰素的细胞受体不同以及抗病毒的生化途径不同有关。

干扰素的协同作用，自1979年Fleischmann等首次发现以来[1]，受到人们的重视。然而，迄今的研究，多数是用小鼠干扰素进行的。人干扰素联用的抗病毒作用如何？在不同的病毒—细胞系统上是否都具有协同作用？这些问题的阐明，有利于对干扰素的深入研究和临床疗效的提高。

本文采用 VSV-A_{549} 细胞系统为模型，研究了国产人α和γ干扰素联用后的抗病毒作用，并对协同作用的机理进行了初步探讨。

材料和方法

一、材料

1.粗制和部分纯化的人α干扰素：效价分别为 5×10^4Iu/ml和 1×10^6Iu/ml，由广州医学院微生物教研室供应。

2.粗制人γ干扰素　效价 128u/ml，系南京医学院微生物教研室惠赠。

3.人α干扰素国际标准参考制剂：NIH Cat* Ga-23-902-530，效价12，000IU/ml。

4.羊抗人白细胞干扰素抗体　（NIH Cat* G-026-502-568）和羊抗人白细胞干扰素对照血清（NIH Cat*G-027-501-568），以上均系美国国立卫生研究院惠赠。

本文1986年9月17日收到。

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

5.A549细胞 生长液采用含10%小牛血清的Eagle's液，细胞单层用0.02%的Versene消化，经生物学检查无支原体污染。

6.水泡性口炎病毒 Indiana 株，广州市医研所惠赠，在 A_{549} 细胞上滴定效价为 2×10^7pfu/ml。

二、方法

1.TCID50滴定：参照Hooks介绍的方法[2]。

2.干扰素效价的测定：参照Rubinstein的方法[3]。

3.干扰素处理后病毒产量减少试验：96孔板中的 A_{549} 细胞单层经干扰素处理18小时后，倾去孔内液体，每孔攻击200pfu/ml的VSV悬液0.1ml，37°C1小时后每孔再加入维持液0.1ml，24小时后收获病毒液，用空斑法测病毒产量。

4.空斑检测试验：参照Langford介绍的方法[4]。

5.干扰素中和试验：参照Panem的方法[5]。

6.酸、热稳定性试验：按常规进行。

结 果

一、联用干扰素的协同抗病毒作用

采用干扰素—病毒产量减少试验和空斑检测法，将单用α或γ干扰素与两者联用的保护能力进行比较（表1）。干扰素对细胞的保护能力用抑制倍数表示，联合干扰素的抗病毒增强作用以协同倍数表示，计算方法如下；

$$抑制倍数=\frac{无干扰素处理的细胞上清病毒量}{经干扰素处理的细胞上清病毒量}$$

$$协同倍数=\frac{实际算出的干扰素效价}{预计的干扰素效价}$$

表1 人α和γ干扰素的联合制剂对干扰素活性的增强作用

Table 1 potentiation of interferon activity by combined preparations of human interferon-α and interferon-γ

干扰素剂量 (u/ml)		病毒产量($\bar{x}\pm$SD; n=6) (pfu/ml)	抑制倍数	干扰素效价(u/ml) 实际效价	干扰素效价(u/ml) 预计效价	协同效倍
NO IFN	0	$1.5\times10^7\pm0.09\times10^7$				
IFN-α	4	$3.7\times10^6\pm0.35\times10^6$	4.1			
IFN-γ	2	$1.1\times10^7\pm0.14\times10^7$	1.4			
IFN-α+IFN-γ	4+2	$3.1\times10^5\pm0.28\times10^5$	48	40	6	6.7
IFN-α	2	$6.6\times10^6\pm0.23\times10^6$	2.3			
IFN-γ	4	$2.8\times10^6\pm0.25\times10^6$	5.4			
IFN-α+IFN-γ	2+4	$3.7\times10^5\pm0.9\times10^5$	41	32.4	6	5.4
IFN-α	4	$3.1\times10^6\pm0.19\times10^6$	4.8			
IFN-γ	4	$2.8\times10^6\pm0.25\times10^6$	5.4			
IFN-α+IFN-γ	4+4	$9.51\times10^4\pm0.84\times10^4$	158	129	8	16

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

二、粗制的和部分纯化的α干扰素的比较（表2）

表2. 部分纯化的α干扰素的增强作用

Table 2. Effect of partial purification of interferon-a on potentiation

干扰素剂量 (u/ml)		病毒产量 ($\bar{x}\pm SD$; n=6) (PFU/ml)	抑制倍数	干扰素效价(u/ml) 实际效价	干扰素效价(u/ml) 预计效价	协同倍数
NO IFN	0	$1.5\times10^7\pm0.15\times10^7$				
IFN-α	20	$3.3\times10^5\pm0.19\times10^5$	45			
purified IFN-α	20	$3.5\times10^5\pm0.08\times10^5$	43			
IFN-γ	4	$8.5\times10^6\pm1.1\times10^6$	1.8			
IFN-α+IFN-γ	20+4	$8.4\times10^4\pm1.1\times10^4$	179	141	24	5.9
purified IFN-α +IFN-γ	20+4	$8.1\times10^4\pm1.1\times10^4$	185	145	24	6.0

三、干扰素中和试验（表3）；

表3. α干扰素敌抗体对两种干扰素效价的影响

Table 3. Effect of antibodies against human α interferon on interferon titers

处理	干扰素效价 ($\bar{x}\pm SD$; n=3) (u/ml) α干扰素抗体	血清对照	培养基对照	结果
NO IFN	<2	<2	<2	
IFN-α	<4	269±11.7	271±13.2	+
IFN-γ	47.6±5.7	45.6±1.5	47.3±7.5	−
IFN-α+IFN-γ	46.5±4.1	713±7.2	721±13	+/−

四、酸、热稳定性试验（表4）

表4. α和γ干扰素的酸热稳定性试验

Table 4. Test of acid and heat stability of interferon-α and interferon-γ

处理	干扰素效价($\bar{x}\pm SD$; n=3) (u/ml) 对照组	pH2处理1小时	56°C 水浴30分钟	结果
NO IFN	<4	<4	<4	
IFN-α	272±11.2	274.5±19.5	172.3±6.3	−
IFN-γ	49.2±3.5	<4	<4	+
IFN-α+IFN-γ	742±11.2	272.3±12.8	171.8±8.9	−/+

六、干扰素不同时间处理细胞后协同作用比较（表5）；

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

表5. 联用干扰素不同时间处理细胞对于协同作用的影响

Table.5. Effect of time of incubation of cells with combined interferon on potentiation effect

处理	干扰素剂量 (u/ml)	处理时间 (小时)	病毒产量 ($\bar{x}\pm SD$; n=6) (PFU/ml)	抑制倍数	干扰素效价 (u/ml) 实际效价	干扰素效价 (u/ml) 预计效价	协同倍数
NO IFN	0	12	$1.4\times10^7\pm0.26\times10^7$				
IFN-α	5	12	$6.0\times10^6\pm0.88\times10^6$	2.3	5		
IFN-γ	2	12	$1.2\times10^7\pm0.17\times10^7$	1.2	1		
IFN-α+IFN-γ	5+2	12	$2.1\times10^5\pm0.37\times10^5$	67	58	6	9.7
NO IFN	0	24	$1.5\times10^7\pm0.14\times10^7$				
IFN-α	5	24	$7.5\times10^6\pm1.8\times10^6$	2	5		
IFN-γ	2	24	$8.6\times10^6\pm1.2\times10^6$	1.7	2		
IFN-α+IFN-γ	5+2	24	$9.8\times10^4\pm2.1\times10^4$	153	126	7	18

讨 论

本文联用粗制的人α和γ干扰素处理细胞，发现抗病毒活性加强了5—18倍。对于协同作用的原因，目前至少有三种假设：其一是α或γ干扰素中混有其它成分参与协同作用；其二是α干扰素能促使γ干扰素加快诱生抗病毒状态；其三是两种干扰素通过与各自的受体结合而相互协同。

本文比较了粗制的与200倍以上纯化的α干扰素的协同作用，发现两者的增强倍数一致。在干扰素中和试验中，联合干扰素经α干扰素抗体作用后，只表现出γ干扰素的活性，说明α干扰素经抗体作用后失去了协同抗病毒活性，两个试验均证实协同作用是α干扰素本身效应。而另一种干扰素不被α干扰素抗体中和，经酸、热处理后失去抗病毒活性，符合γ干扰素特性。联合干扰素经酸、热处理后，其抗病毒活性与单用α干扰素时相同，这就初步排除了γ干扰素中混有参与协同作用的其它成分的可能性。

本文还将干扰素分别作用细胞12小时和24小时后进行比较，表明随着作用时间的延长，γ干扰素抗病毒的实际效价可增加一倍，联合干扰素的协同倍数也增加将近一倍，提示α干扰素不能促使γ干扰素加快诱生抗病毒状态。

前两种假设既已排除，第三种假设将令人重视，即协同作用由干扰素本身性质所决定。而两型干扰素间之所以会有协同作用，可能与两者抗病毒机制不同有关。据文献报道[6]：α和γ干扰素在敏感的细胞上有各自的受体，因而两者不是竞争受体，而是起协同作用。此外，两型干扰素激发细胞产生抗病毒状态的生化途径也不相同。Dianzani[7]认为Ⅰ型（α）干扰素直接诱导AVP-mRNA的转录，而Ⅱ型（γ）干扰素激发细胞建立抗病毒状态涉及多个基因的去抑制。

作者除采用VSV-A_{549}细胞系统外，还在VSV-WISH和HSV-A_{549}细胞系统上进行了研究（未发表），均发现有协同作用，提示干扰素协同作用可能有普遍意义：无论在普通传代细胞还是在肿瘤传代细胞上，也无论是对RNA病毒（如VSV）还是DNA病毒如（HSV-1），均可见协同抗病毒活性。上述结果为进一步研究联合干扰素对其它人类病毒有无协同的抑制作用，以及今后的临床应用提供了资料。

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

参 考 文 献

[1] Fleischmann, W.R.et al., 1979, *Inf. Imm.*26 : 248.
[2] Hooks, J.J.et al., 1980, Laboratory Management : 36.
[3] Rubinstein, S.et al., 1981, *J.Virol.*37 (2) : 755.
[4] Langford, M.P.et al., 1981, *Method in Enzymology* V.78, partA : 339.
[5] Panem, S. et al., 1982 *J.Imm.* 129 (1) : 1-3.
[6] Czarniecki, C.W.et al., 1984, *J.Virol.*49 (2) : 490.
[7] Dianzani, F.et al., 1978, *PSEBM* 159 : 94.

POTENTIATION OF INTERFERON'S ANTIVIRAL ACTIVITY BY COMBINED PREPARATIONS OF HUMAN ALPHA AND GAMMA INTERFERONS

Wang Jian-ling
(*Department of Microbiology, Nanjing College of Chinese Traditional Medicine, Nanjing*)

Yan Yong-kai
(*Sun Yatsen University of Medical Sciences, Guanzhou*)

Potentiation of interferon's antiviral activity was determined by replication inhibition of vesicular stomatitis virus in human lung cancer calls (A549). Combined preparations of human IFN-α and IFN-γ interacted with cells synergistically to cause a much greater level of protection than that expected on the basis of their additive or multiplicative effect. The potentiation was not the artifact of an accelerated development of IFN-γ-induced antiviral resistance in the presence of IFN-α. The rest components in the preparations of IFNS did not play any role in potentiation. It is suggested that potentiation is related to different cellular receptors of the two types of interferon and different biochemical pathways through which interferons exert their antiviral effects.

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