

猪脾细胞干扰素的制备及其某些特性

刘虹 杨学楼

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

提 要

本文报导了猪脾细胞在新城疫病毒-F株(NDV-F)诱生下,能产生抗病毒物质。此物质具有对胰旦白酶敏感,不能通过透析膜等干扰素性质。粗制猪脾细胞干扰素(PSIFN)在乳猪肾原代细胞上的平均效价为 $1.3 \times 10^5 \text{U/ml}$ 。用猪干扰素预处理细胞,再加诱生剂,可提高PSIFN产量。PSIFN对酸(pH2.5),加热(56°C),表面活性剂(0.1%SDS)处理均敏感。比较了PSIFN在几种异种细胞上的抗病毒活性,结果表明:在入胚肺细胞上其效价为 $2.24 \times 10^6 \text{u/ml}$,这比在猪肾细胞上测得的效价高十几倍。在兔肾和小鼠细胞上效价分别为 $3.2 \times 10^3 \text{u/ml}$ 和 $1.15 \times 10^3 \text{u/ml}$ 。上述结果表明猪脾脏可作为生产高效价外源性干扰素的良好细胞来源。

干扰素具有抗病毒,抗肿瘤,抑制细胞分裂,调节免疫活性和相对种属特异性等特点。许多动物机体或细胞在适当的诱生剂作用下,均可产生一定量的干扰素^[1-3],1965年Torlone^[4]报道了猪白细胞干扰素(PLIFN)的产生。国内有杨学楼等从猪血中也制得了PLIFN,其最高效价达 5000u/ml 。自1979年Carter^[5]发现PLIFN在人二倍体细胞上有抗病毒作用以来,人们对能否将PLIFN用于临床防治人类病毒性疾病产生了极大兴趣。由于以前制备的猪IFN效价不高,所以要想进一步开展猪干扰素的研究,首先就需要获得大量的,高效价的干扰素。

众所周知,脾脏含有大量的淋巴细胞,目前认为在淋巴细胞中,T淋巴细胞是产生II型干扰素的靶细胞,B淋巴细胞是产生I型干扰素的靶细胞。所以从理论上说脾脏可作为生产外源性干扰素的材料来源。猪脾来源广泛,但能否作为猪干扰素的材料来源?值得尝试。

本文就猪脾细胞经NDV-F诱导产生干扰素及PSIFN某些特性进行了研究。

材 料 与 方 法

一、细胞制备

1.猪脾细胞悬液 无菌条件下摘取新鲜成年猪脾脏,用Hank's液洗二次,去包膜,

本文于1987年3月16日收到

本实验中得到本所罗经,王汉中,黄文林,孙松柏,吴晰莹,李孟津,邓红等同志的帮助,在此一并致以诚挚的谢意。

剪碎, 研磨或捣碎, 加少量Hank's液移至装有无菌玻璃珠的三角瓶中摇打数次, 经多层纱布过滤, 滤液经2000r/m离心10分钟, 弃上清, 用Hank's液洗细胞二次, 细胞沉淀加少量培养液, 计数, 即得猪脾细胞原液。

2. 小白鼠单层细胞 取刚出生的小白鼠, 用2%来苏尔体表消毒, 无菌水洗三次, 除去内脏和表皮, 按文献[6]方法制备小白鼠单层细胞。

3. 兔肾单层细胞 无菌条件下取新生兔的肾脏, 除去包膜, 剪碎, 用Hank's液洗二次, 按文献[6]方法制备兔肾单层细胞。

4. 乳猪肾原代细胞 取10—20日龄乳猪, 无菌取肾, 除去肾外膜及肾盂部分, 按文献[6]方法制备, 细胞长成单层后进行干扰素抗病毒活性测定。

5. 人胚肺二倍体传代细胞 由湖北省医学科学院病毒所提供。

二、病毒

1. 新城疫病毒F株(NDV-F)由农林部畜牧兽医药品鉴定所提供。该病毒在9—10日龄鸡胚尿囊腔中传代, 其血凝滴度达 $1:160-1:640$ HA/0.25ml的存于冰箱备用。

2. 滤泡性口膜炎病毒-Indiana株(VSV)

由卫生部武汉生物制品所提供, 在鸡胚成纤维单层细胞上传代, 测定其TCID₅₀^[7], 滴定达 10^7-10^8 TCID₅₀的存入-20℃冰箱中备用。

三、培养基

人胚肺细胞, 兔肾细胞, 新生小白鼠细胞和乳猪肾原代细胞均用含10%小牛血清的Eagle培养液, 另加0.03%谷氨酰胺, pH7.2左右。

维持液为含2%小牛血清的Eagle培养液, 另加0.03%谷氨酰胺, pH7.2左右。

猪脾细胞干扰素制备液用2%小牛血清的RPMI 1640培养液, pH7.2左右。

四、猪脾细胞干扰素的制备方法

基本参照吴旭初^[8]方法, 在猪脾细胞原液中加入猪干扰素(100—600u/ml), 置37℃预处理2小时, 2000r/m离心10分钟, 弃上清, 向沉淀的细胞中加入NDV-F(40—80HA/ml), 37℃吸附1小时, 离心, 弃上清, 加2%小牛血清的RPMI 1640液, 调整细胞浓度 $1-5 \times 10^7$ 个/ml, 经37℃转管培养24小时, 2000r/m离心15分钟, 收获上清, 即为粗制PSIFN。

五、干扰素抗病毒活性的测定

PSIFN抗病毒活性的测定采用胞细胞病变抑制法^[7]。以VSV为攻击病毒。测定时设细胞、干扰素、病毒对照组, 待病毒对照组出现75—100%病变时, 记录结果, 以抑制50%细胞病变的干扰素稀释度作为一个干扰素活性单位, 以u表示。PSIFN在人胚肺细胞上测定效价时, 以人的干扰素标准品(alpha-2-IFN(CSH30500))作对照。PSIFN在猪、兔和鼠细胞上测定效价时, 因无这三种干扰素标准品, 所以未做标准品对照。

结 果

一、猪脾细胞干扰素 (PSIFN) 的制备

1. PSIFN 的诱生及其效价的测定

参照吴旭初^[8]方法, 猪脾细胞经干扰素预处理后, 加NDV-F诱生, 37°C, 24小时后离心收获上清即为粗制PSIFN。同时设猪脾细胞培养物对照组, 采用细胞病变抑制法^[7], 测定PSIFN的效价, 测定系统为乳猪肾原代细胞——滤泡性口膜炎病毒。结果见表1。

表1结果表明: 猪脾细胞在NDV-F诱生下, 可产生高滴度干扰素, 未加诱生剂作用的猪脾细胞则不能自发产生干扰素。

由于粗制PSIFN液中有残存的NDV存在, 为了检测残存NDV对PSIFN效价测定的影响, 将80HA/ml NDV液倍比稀释至1:10240, 然后按干扰素测定方法在人胚肺细胞——滤泡性口膜炎病毒系统上检测各稀释度是否存在诱生干扰素活性, 结果未能测出抗病毒活性, 从而排除了残存NDV对PSIFN效价测定的影响。

表 1 PSIFN 的诱生及其效价

Table 1 Preparation and antiviral activity of PSIFN

实验批号	细 胞 (个/ml)	预处理 PIFN (u/ml)	NDV (HA/ml)	培养基	pH	培养时间 (小 时)	温 度	效 价 (u/ml)	
1	试验组	2×10^7	300	80	4% B.S. 1640	7.4	24	37°C	1.02×10^5
	对照组	2×10^7	0	0	4% B.S. 1640	7.4	24	37°C	0
2	试验组	5×10^7	200	60	2% B.S. 1640	7.4	22	37°C	2.56×10^5
	对照组	5×10^7	0	0	2% B.S. 1640	7.4	22	37°C	0
3	试验组	2.5×10^7	0	60	2% B.S. 1640	7.4	24	37°C	4.09×10^4
	对照组	2.5×10^7	0	0	2% B.S. 1640	7.4	24	37°C	0
4	试验组	1×10^7	0	80	2% B.S. 1640	7.4	24	37°C	1.28×10^4

2. 预处理对 PSIFN 产量的影响

在加入诱生剂之前, 以PSIFN预处理猪脾细胞, 其后按PSIFN制备方法进行, 在人胚肺细胞上测粗制PSIFN抗病毒活性, 结果见表2。

实验结果表明: 干扰素预处理脾细胞可提高干扰素产量, 当用200—500u/ml的PIFN预处理时, 干扰素产量是对照组的4—8倍。

表 2 预处理对 PSIFN 产量的影响
Table 2 The influence of pretreating on PSIFN production

实验批号	细胞浓度 (个/ml)	预处理 PIFN (u/ml)	NDV-F (HA/ml)	PSIFN 体 积 (ml)	效 价 (u/ml)	倍 数 预处理/ 对照	
1	预处理组	5×10^7	200	80	20	5.12×10^6	8
	对 照 组	5×10^7	0	80	20	6.4×10^5	
2	预处理组	2×10^7	300	50	30	1.28×10^6	4
	对 照 组	2×10^7	0	50	30	3.2×10^5	
3	预处理组	2.5×10^7	200	60	100	1.6×10^5	≈ 4
	对 照 组	2.5×10^7	0	60	100	4.09×10^4	

二、PSIFN的基本特性

1. 酶对 PSIFN 抗病毒活性的影响

将粗制 PSIFN 进行 1 : 100 稀释, 分为四份, 一份作为对照, 另三份分别加入 DNA 酶 (60u/ml), 牛胰 RNA 酶 (10 μ g/ml) 和胰蛋白酶 (0.15%), 将四份样品置于 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时。在人胚肺细胞上测其抗病毒活性。结果见表 3。

表 3 酶对 PSIFN 效价的影响
Table 3 The influence of enzymes on PSIFN antiviral activity

实验批号	DNase 60u/ml	RNase 10 μ g/ml	胰蛋白酶 0.15%	对 照	胰蛋白酶 处理失活率
1	5120	5120	400	5120	92%
2	1280	1280	80	1280	93%
3	—	—	128	1024	88%

结果表明: PSIFN 对胰蛋白酶敏感, 不被 DNase 和 RNase 所破坏。

2. 理化因素对 PSIFN 抗病毒活性的影响

将粗制 PSIFN 分为五份, 一份作对照, 其余四份分别按下列条件处理:

- ① pH2.5, 4 $^{\circ}$ C 放四天, 调 pH7.4 左右。
- ② 56 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时。
- ③ 0.1% SDS 室温处理 1 小时, 过滤除菌。

表 4 理化因素对 PSIFN 抗病毒活性的影响
Table 4 The influence of physical and chemical factors on PSIFN activity

实验批号	对 照	0.1% SDS	pH2.5	加 热 56 $^{\circ}$, 1hr	透 析
效 价 u/ml					
1	6.4×10^5	6.4×10^2	1.28×10^4	6.4×10^3	5.12×10^5
2	2.56×10^5	8×10^2	1×10^3	1.6×10^3	1.8×10^5
3	5.1×10^6	—	6.4×10^3	1.28×10^4	—

④ 0.02mol/LPBS, pH7.4, 4°C 透析三天, 过滤除菌。

处理后的样品在人胚肺细胞上测抗病毒活性。结果见表 4。

结果表明: PSIFN 经酸 (pH2.5)、56°C 或 0.1% SDS 处理后, 其活性大大降低, 显示出高度的不稳定性。PSIFN 经透析后活性虽有所下降, 但仍有 70—80% 活性存在。所以可认为 PSIFN 不能通过透析膜。

三、PSIFN 在异种细胞上的抗病毒活性

按前述方法, 测定粗制 PSIFN 在异种细胞上的抗病毒活性。结果见表 5。

表 5 PSIFN 在异种细胞上的抗病毒活性
Table 5 Antiviral activities of PSIFN on various heterogenic cells

实验批号	人胚肺细胞	兔肾细胞	鼠纤维细胞	猪肾细胞对照
	效价 u/ml			
1	3.2×10^5	1280	1024	4.09×10^4
2	5.12×10^6	5120	1280	2.56×10^5
3	1.28×10^6	—	—	1.02×10^5
平均	2.24×10^6	3.2×10^3	1.15×10^3	1.3×10^5

PSIFN 在人胚肺细胞上的抗病毒活性比在同种细胞上的平均高 17 倍, 而在兔肾细胞及小鼠细胞上则显示出较小的种属交叉活性。

讨 论

本实验证实猪脾细胞经 NDV-F 诱生可产生高效价的干扰素。并且 PSIFN 效价比用同样方法从猪血制备的 PLeIFN 效价高^[2], 其原因可能与细胞来源不同有关, 细胞来源不同, 所含细胞种类亦有所差异, 从而对诱生剂的敏感性不同, 最终影响干扰素的产生。

所制备的 PSIFN 对 0.1% SDS, pH2.5, 56°C 处理均敏感, 这提示有 IFN- γ 存在。但因目前尚无标准的猪干扰素抗血清, 所以还不能证实 PSIFN 究竟是 IFN- γ , 还是 α , γ 两种干扰素。

PSIFN 在几种异种细胞上也具有抗病毒活性, 特别是在人胚肺细胞上的效价比在猪肾细胞上高出 17 倍, 最近 Bonnardiere^[9] 已证实抗人 IFN- α 抗血清也能中和猪 IFN- α , 说明这两种干扰素在氨基酸序列上可能存在着共同的保守区域。这些研究结果提示 PSIFN 有可能冲破种属特异性障碍从而用于临床防治病毒病。这种推测有待于今后工作证实。

在 PSIFN 的诱生过程中, 维持培养液的中性对于得到高效价 IFN 尤为重要。本实验采用 2% 小牛血清的 1640 培养液或含 10mmol/LHEPES 的 2—10% 小牛血清 1640 培养液, 可使整个 PSIFN 产生过程中培养液保持中性。

参 考 文 献

- [1] 侯云德, 1981, 干扰素及其临床应用, P.13. 江苏科学技术出版社.
- [2] 罗经, 1986, 病毒学集刊 No 5, P.81-88.
- [3] Carter, W.A. et al., 1981, *Methods in Enzymology* 78: 48.
- [4] Torlone, V. et al. 1965, *Life Sci.* 4: 1707.
- [5] Cafer W.A. et al, 1979, *Mol. pharmacol.* 15: 685.
- [6] 戴华生, 1983, 新实验病毒学 中国学术出版社.
- [7] 武汉大学病毒系编, 1990, 病毒学技术实验讲义
- [8] 吴旭初等, 1983, 全国病毒生化会议资料
- [9] Bonnardiere, 1986, *Ann Inst. pasteur/virol* vol. 137E, p.178-180.

Production and Some Properties of Porcine Spleen Interferon

Liu Hong Yang Xue-Lou

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Porcine spleen cells induced with Newcastle disease virus F strain could produce an antiviral substance. The substance was sensitive to trypsin and did not penetrate the dialyser. These indicated that it was characteristic of an Interferon.

The antiviral activity of crude porcine spleen cell interferon (PSIFN) was $1.3 \times 10^5 \text{u/ml}$ on porket kidney cells. PSIFN production was significantly enhanced by pretreating cells with porcine IFN.

The crude PSIFN was less stable to low pH treatment, to 56°C and to 0.1% SDS. In addition, the antiviral activity of PSIFN was 17-fold higher when measured on human cells than on homologous cells. The titer of PSIFN was $3.2 \times 10^3 \text{u/ml}$ on rabbit kidney cells and was $1.15 \times 10^3 \text{u/ml}$ on mouse cells.