

## 酵母菌 SH<sub>2</sub> 发酵产物增强干扰素抗病毒活性 及其有效成分的初步研究

程志 孙国萍<sup>1</sup> 王淑君 王春生

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

R978.7

R931.71

R979.5

**摘要** 酵母菌 SH<sub>2</sub> 发酵产物(简称 FSH<sub>2</sub>), 用 Sephadex G-75 凝胶层析和 HPLC 色谱层析分离纯化, 收集到一组蛋白。该组蛋白在 PAGE 和 SDS-PAGE 电泳上带型一致, 无蛋白亚基, 分子量范围为 52~72 kD。凝胶上糖蛋白的特异性染色——Schiff's 染色显示阳性染色带; 用 Lowry's 法测蛋白和硫酸-酚法测糖, 显示蛋白与糖的比例约为 3:1。该组蛋白与人  $\alpha$  干扰素作用, 增强干扰素生物学效价分别为 1.6~2.8 倍和 1.4~4.0 倍; 经 Sephadex G-75 凝胶层析的 FSH<sub>2</sub> 蛋白洗脱峰增效 2.01~5.68 倍; 发酵液增效 1.64~6.86 倍。并证实酵母菌 SH<sub>2</sub> 增效干扰素的活性成分为 52~72 kD 分子量范围的胞外糖蛋白(简称 YEGPs)。

**关键词** 酵母菌 SH<sub>2</sub>, 胞外糖蛋白, 抗病毒活性, 干扰素增效剂

由 Isaacs 和 Lindenmann 于 1957 年首次发现的干扰素<sup>[1]</sup>, 是机体体细胞产生的重要细胞因子之一。其所具有的广谱抗病毒、免疫调节及抗肿瘤等多种生物活性已被大量的研究和有效的临床应用所证实。但干扰素同其他药物一样也会产生毒副作用, 且毒副作用的发生及程度与用药剂量相关<sup>[2]</sup>。为提高单位浓度干扰素的抗病毒活性, 本实验室分离到一株酵母菌 SH<sub>2</sub>, 能产生增强干扰素活性的物质, 称为干扰素增效剂(enhancer of interferon)。本实验对酵母菌 SH<sub>2</sub> 发酵产物单独和联合干扰素的抗病毒作用及其有效成分进行了研究。现报道如下:

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

酵母菌 SH<sub>2</sub> 由本实验室分离保存。SH<sub>2</sub> 种子培养基为酵母培养基 YMP。人羊膜传代细胞(Wish cell)、水泡性口炎病毒(VSV)和白细胞干扰素标准品(huIFN- $\alpha$ , 1.2 × 10<sup>4</sup> IU/mL), 均由中国药品生物制品检定所提供。D-MEM 培养基为美国 GIBCOBRL 公司产品。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 酵母菌 SH<sub>2</sub> 发酵产物(FSH<sub>2</sub>)的制备

用新鲜的种子培养基活化 SH<sub>2</sub> 菌株 12 h, 转接发酵培养基, 恒温摇床培养 40 h, 收集发酵液, 离心去菌体。

##### 1.2.2 FSH<sub>2</sub> 对干扰素效价的影响

1.2.2.1 FSH<sub>2</sub> 联合干扰素对细胞病变的抑制作用 参照中国生物制品规程指定的干扰素效价测定方法——微量细胞病变抑制法<sup>[3]</sup>。

1.2.2.2 单独 FSH<sub>2</sub> 对细胞病变的抑制 如上面 2.2.1 所述方法,加 Wish 细胞 6 h 后,不加干扰素,只加不同浓度的 FSH<sub>2</sub> 培养 24 h 后,倾去培养液,加 VSV 攻击,并设病毒对照和细胞对照,培养 24 h,观察 FSH<sub>2</sub> 抑制细胞病变的作用。按干扰素效价计算方法计算 FSH<sub>2</sub> 的抗病毒活性。

### 1.2.3 蛋白质分离、纯化

1.2.3.1 Sephadex G-75 柱层析分离蛋白质 收集 FSH<sub>2</sub> 50 mL,装入透析袋,埋入 PEG6000 内浓缩至 5 mL,然后上 Sephadex G-75 层析柱(1.6 × 60 cm),用 0.05 mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液,以 0.75 mL/min 流速洗脱,蛋白核酸仪 280 nm 检测,收集蛋白洗脱峰。按 2.2.1 方法,测定各峰样对于干扰素效价的增效作用。

1.2.3.2 高效液相色谱(HPLC)纯化 参照彭民的方法<sup>[4]</sup>,将 Sephadex G-75 分离的活性峰,通过 HPLC 纯化(固定相:RPP-PREPC-18 Reversed phase C-18 300A 制备型柱,流动相:PB 0.05 mol/L, pH7.2)每次进样 500 mL,洗脱流速 3 mL/min,紫外检测器 280 nm 检测蛋白洗脱峰,分段收集样品,测定各峰样对于干扰素效价的增效作用。

### 1.2.4 增效蛋白的分子量测定及蛋白质亚基

参照文献<sup>[5,6]</sup>方法改进,使用 5% 浓缩胶和 10% 分离胶,1 份样品加 2 份样品缓冲液,电泳前沸水浴 5 min,室温下 100V 电压进行 SDS-PAGE 电泳 5 h,相同胶浓度和电泳条件下,将样品进行 PAGE 电泳,电泳后用考马斯亮兰 R250 染色,判断蛋白质亚基和蛋白分子量。

### 1.2.5 增效蛋白在 PAGE 电泳凝胶上的糖蛋白染色及糖、蛋白含量测定

如上述方法配凝胶电泳,取出凝胶,按文献<sup>[7]</sup>用 Schiff's 试剂染色。另将增效蛋白用硫酸酚法<sup>[8]</sup>测定中性糖含量,Lowry's 法测蛋白含量。

## 2 结果

### 2.1 FSH<sub>2</sub> 对干扰素效价的影响

将不同浓度的 FSH<sub>2</sub> 与同一浓度干扰素一起处理 Wish 细胞,再以 VSV 攻击,各组干扰素效价结果如表 1。从表中看出,FSH<sub>2</sub> 原液及稀释 2-32 倍时,对干扰素的效价都有增强作用;继续稀释后则无增效活性。

### 2.2 FSH<sub>2</sub> 单独对细胞病变的抑制作用

实验结果显示单独的 FSH<sub>2</sub> 及其系列稀释液,对 Wish 细胞无保护作用,细胞受 VSV 攻击后均被破坏,没有干扰素样的生物活性。

### 2.3 FSH<sub>2</sub> 的 Sephadex G-75 蛋白洗脱图谱及其对干扰素活性的作用

FSH<sub>2</sub> 和培养基经 Sephadex G-75 层析后洗脱结果如图 1。FSH<sub>2</sub> 有两个洗脱峰,培养基只有一个峰,且该峰的出峰时间及峰形与 FSH<sub>2</sub> 第二个峰一致,故可判断 FSH<sub>2</sub> 的峰 1 为 SH<sub>2</sub> 产生的胞外蛋白(YEGPs),峰 2 为培养基的成分;干扰素增效试验发现,峰 1 对干扰素有增效作用,峰 2 及培养基的峰均无此作用,结果见表 2。

### 2.4 Sephadex G-75 峰 1 在高效液相色谱(HPLC)上的层析图

将 FSH<sub>2</sub> 经 Sephadex G-75 分离的峰 1 通过 HPLC 层析分离,有多个蛋白洗脱峰,见图 2。图 3 是在原始洗脱图的基础上,以最大峰面积为 100% 所作的处理图,由此图可见有 8 个洗脱

表 1 酵母菌 SH<sub>2</sub> 发酵液对干扰素活性的增强作用

Table 1 The enhancing effect of FSH<sub>2</sub> on IFN's activity

样品 Sample	干扰素活性 IFN's activity (IU/mL)	增强倍数 Enhancing fold (IFN <sub>a</sub> + FSH <sub>2</sub> )/IFN <sub>a</sub>
IFN <sub>a</sub>	2965	—
IFN <sub>a</sub> + FSH <sub>2</sub>	20340	6.86
IFN <sub>a</sub> + 1/2FSH <sub>2</sub>	13912	4.69
IFN <sub>a</sub> + 1/4FSH <sub>2</sub>	9810	3.31
IFN <sub>a</sub> + 1/8FSH <sub>2</sub>	8434	2.85
IFN <sub>a</sub> + 1/16FSH <sub>2</sub>	4871	1.64
IFN <sub>a</sub> + 1/32FSH <sub>2</sub>	4871	1.64
IFN <sub>a</sub> + 1/64FSH <sub>2</sub>	2965	—

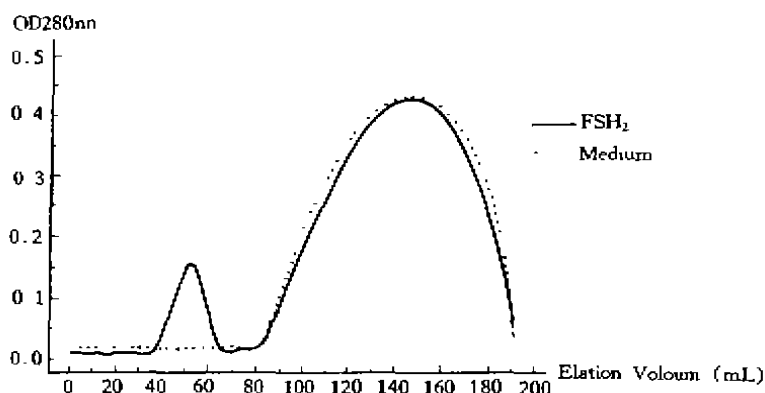


图1 FSH<sub>2</sub> 和培养基的 Sephadex G-75 蛋白洗脱曲线

Fig 1 Elution pattern of SH<sub>2</sub> fermentation and medium on Sephadex G-75

时间间隔较大的峰群,即以此8个峰群所对应的出峰时间,收集8个样品,只有3、7号峰样对干扰素有增效活性,结果见表3,无增效活性的峰样结果未列出。

### 2.5 FSH<sub>2</sub> 增效干扰素活性有效成分的分子量和蛋白亚基

将 HPLC 纯化的 3、7 号峰样进行 SDS-PAGE 和 PAGE 凝胶电泳,结果见图 4、5。在两种电泳条件下的电泳带一致,说明有增效干扰素活性的蛋白质无亚基;3号峰为单一蛋白带,7号峰显示3条染色带,说明7号峰为一混合蛋白。

由 SDS-PAGE 凝胶电泳上蛋白标准的分子量与迁移率间的对数曲线计算,3号峰分子量为 72 kD,7号峰分子量分别为 52、61、66 kD。另外发酵培养基无蛋白带,进一步证明增效成分由 SH<sub>2</sub> 产生。

### 2.6 增效蛋白的糖成分及蛋白与糖的比例

相同条件下进行的 PAGE 凝胶电泳,用 Schiff's 试剂染色,在蛋白质染色带的相应位置有糖的染色带(见图 6),说明增效蛋白为糖蛋白,用硫酸酚法测中性糖含量,Lowry's 法测蛋白,结果见表 4,表明增效蛋白与糖含量比例接近 3:1。

## 3 讨论

对细胞因子的研究是目前分子生物学、免疫学的研究热点。干扰素是发现最早也是研究得最为深入的细胞因子。因为干扰素对许多疾病的确切疗效,也因为机体内源性干扰素生成量极低,外源性干扰素价格昂贵及其副作用,所以长期以来,各国学者、生产商在围绕提高干扰素产量和纯度上进行了大量研究。基因工程技术在干扰素产业上的应用,已使干扰素的工业化成为现实,但它在体内的抗体形成率及药物耐受性的发生率都较高<sup>[9]</sup>。有人试图将其他药物与干扰素联合使用,以提高干扰素的疗效。S. L. .Gupta 等<sup>[10]</sup>报道 RNA 合成抑制物放线菌

表2 FSH<sub>2</sub> 的 Sephadex G-75 蛋白洗脱峰对干扰素的增效作用

Table 2 The enhancing effect of FSH<sub>2</sub> purified by Sephadex G-75 on IFN's activity

样品 Samples	干扰素活性 IFN's activity (IU/mL)	增强倍数 Enhancing fold (IFN <sub>α</sub> + Peak1)/IFN <sub>α</sub>
IFN <sub>α</sub>	2040	—
IFN <sub>α</sub> + Peak1	11585	5.68
IFN <sub>α</sub> + 1/2Peak1	7612	3.73
IFN <sub>α</sub> + 1/4Peak1	6549	3.21
IFN <sub>α</sub> + 1/8Peak1	4096	2.01
IFN <sub>α</sub> + 1/16Peak1	2040	—
IFN <sub>α</sub> + SH <sub>2</sub> Peak2	2040	—

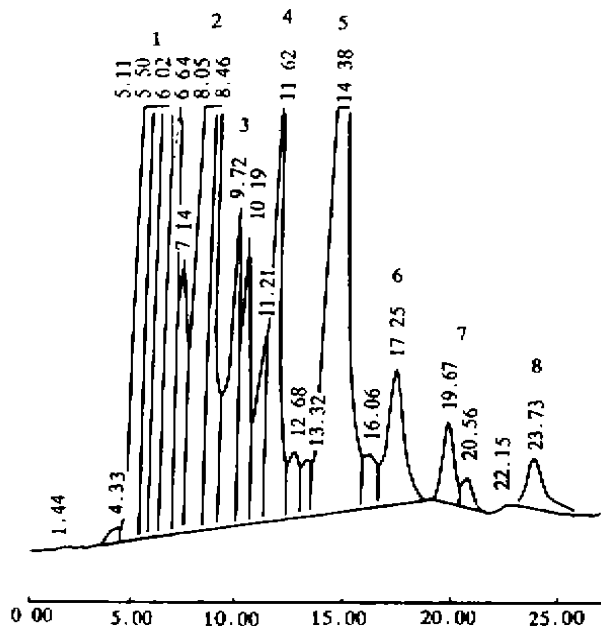


图 2 FSH<sub>2</sub> 在高效液相色谱上的层析图  
Fig 2 Elution pattern of FSH<sub>2</sub> on HPLC

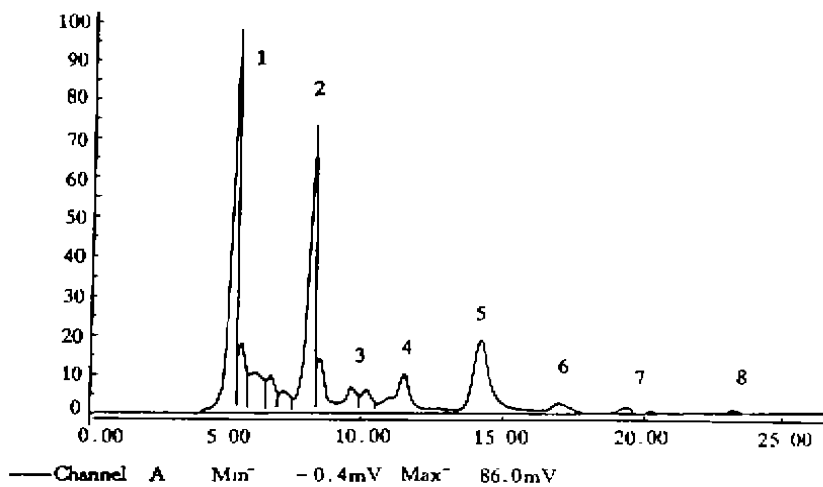


图 3 FSH<sub>2</sub> 在高效液相色谱上的层析处理图  
Fig.3 Treated pattern of FSH<sub>2</sub> on HPLC

素 D 对 IFN 的抗病毒活性有双重作用,与 IFN 一起加入处理细胞时,可阻碍 IFN 抗病毒活性的发挥;在 IFN 处理几小时后再加入,则可增强 IFN 的作用。由于放线菌素 D 强烈的免疫抑制作用,此工作未能展开研究。Fleishmann<sup>[11]</sup>首先发现不同干扰素之间存在协同作用,陈昭烈等<sup>[12]</sup>也用微量细胞病变抑制法研究三种天然人干扰素的联合抗病毒作用。由于细胞因子的网络特性,将 TNF + IFN $\alpha$  或 IFN $\gamma$ <sup>[13]</sup>, IL-2 + IFN $\alpha$ <sup>[14]</sup> 等的联合应用已有报道,但这些细胞因子同样存在着来源限制或耐受性问题。

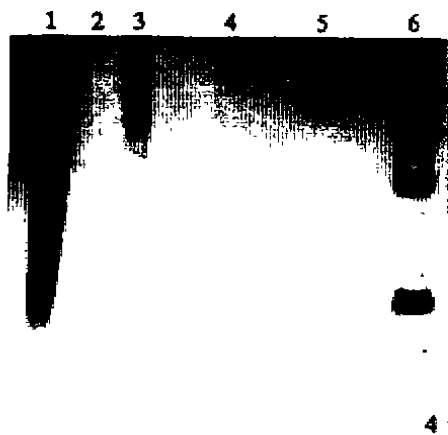


图4 YEGPs的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.4 SDS-PAGE pattern of YEGPs

1. FSH<sub>2</sub>
2. Medium
3. Sephadex G-75 peak-1 of FSH<sub>2</sub>
4. HPLC peak-3 of FSH<sub>2</sub>
5. HPLC peak-7 of FSH<sub>2</sub>
6. Standard proteins (Phosphorylase B 97 400, Albumin 66 200, Ovalbumin, 42 700, FSH<sub>2</sub> Carbonic anhydrase 31 000, Lysozyme 14 400)

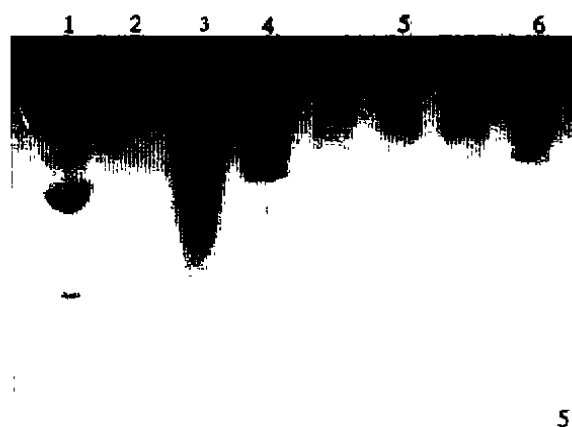


图5 YEGPs的 PAGE 电泳图谱

Fig.5 PAGE pattern of YEGPs

1. Standard proteins (as left)
2. Medium
3. FSH<sub>2</sub>
4. Sephadex G-75 peak-1 of FSH<sub>2</sub>
5. HPLC peak-3 of FSH<sub>2</sub>
6. HPLC peak-7 of FSH<sub>2</sub>

诱导机体产生干扰素,无疑是利用干扰素治疗疾病的有效方法。干扰素诱生剂的研究报道极多,如中药多糖类<sup>[15]</sup>、微生物菌体成分<sup>[16]</sup>、植物提取或人工合成的 dsRNA 等<sup>[17]</sup>。

从增强单位浓度干扰素生物活性展开研究,此类报道仅见 Fish EN<sup>[18]</sup>利用人工合成的干扰素受体识别肽增强 IFN $\alpha$  的抗病毒活性,以及 R.K. Maheshwari<sup>[19]</sup>报道的通过加入不同浓度的氨离子,改变培养细胞内的 pH 值,可以增强干扰素抗囊膜病毒的活性。而从微生物提取干扰素增效物质尚未见报道。

酵母菌 SH<sub>2</sub> 发酵物具有增强干扰素抗病毒活性作用,其增效成分为一组糖蛋白,无蛋白亚基,分子量范围为 52 kD~72 kD。在确定增效成分为蛋白质之前,我们尝试用 RNase 和 DNase 消化处理发酵液,并不能消除它对干扰素的增效作用,从而排除有效成分为 RNA 或 DNA 的可能。另外进行了 49 株细菌及 60 株酵母菌发酵产物的增效试验,未发现增效菌株。

表3 FSH<sub>2</sub> 经 HPLC 纯化后各峰样对干扰素活性的影响Table 3 The enhancing effect of FSH<sub>2</sub> purified by HPLC on IFN's activity

样品 Samples	干扰素活性 IFN's activity (IU/mL)	增强倍数 Enhancing fold (IFN $\alpha$ + Peak 1)/IFN $\alpha$
IFN $\alpha$	64	—
IFN $\alpha$ + 0.05MPB	64	—
IFN $\alpha$ + HPLC Peak3	181	2.8
IFN $\alpha$ + 1/2HPLC Peak3	137	2.1
IFN $\alpha$ + 1/4HPLC Peak3	103	1.6
IFN $\alpha$ + 1/8HPLC Peak3	64	—
IFN $\alpha$ + HPLC Peak7	256	4.0
IFN $\alpha$ + 1/2HPLC Peak7	91	1.4
IFN $\alpha$ + 1/4HPLC Peak7	64	—
IFN $\alpha$ + 1/8HPLC Peak7	64	—



图6 Schiff's 染色的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig 6 Polyacrylamide gel electrophoretic pattern of YEG-Ps stained with Schiff's agent

- 1 HPLC peak-3 of FSH<sub>2</sub>
2. HPLC peak-7 of FSH<sub>2</sub>
3. Standard glycoprotein (Ovalbumin)

本试验主要确定增效干扰素活性物质的性质,发酵液由 Sephadex G-75 及 HPLC 纯化过程中,没有计算每步的蛋白质得率及其比活性。所以各步之间增效活性尚不能进行可比性分析。HPLC 纯化后的样品在进一步稀释(如 1:4 稀释)后,并

未显示增效活性,这可能与纯化过程中活性损失、蛋白质得率降低有关。单独的干扰素增效剂不具有抗病毒作用,只有在与干扰素联合应用时,才使干扰素的抗病毒活性提高。说明增效剂对干扰素抗病毒作用的发挥起着调节作用。它究竟是提高细胞表面干扰素受体的表达;或作为干扰素受体的识别肽类物质,使干扰素与受体更易结合或结合更紧密;或作用于干扰素在细胞内信号传递的某一环节,使干扰素诱生的抗病毒蛋白量提高、活性增强。目前只能作出这些推测,其确切机理尚需进一步探讨。

微生物来源方便,从微生物里筛选新的药物,仍是整个医药工业领域开发研究的热点。糖蛋白具有增加溶解度、延长生物学半衰期、增强生物学活性、增强稳定性、降低抗原性等特点,比普通蛋白更具优越性<sup>[20]</sup>。新型糖蛋白类药物的研制与开发被认为是现代医药生物技术前途无量的领域。干扰素增效剂为酵母菌产生的糖蛋白展现了良好的应用前景。

由于本研究所用菌株及其产生的活性物质均是首次发现和报道,许多工作有待深入研究。如它所具有的免疫调节功能(另文报道)、抗肿瘤及其与干扰素联合应用于体内的效果观察;将纯化后的蛋白进行序列分析,再进行 DNA 合成,构建工程菌,提高 SH<sub>2</sub> 产胞外糖蛋白的准确性和专一性,等等。如从分子水平研究该物质的作用机理,极有可能获得有意义的理论突破,并为干扰素的临床应用开辟新的途径。

#### 参 考 文 献

- 1 Isaacs A, Lindenmann J. Virus Interference. I The interferon. Proc R Soc London Ser. B. 1957, 147: 258

表4 增效干扰素活性的 YEGPs 的蛋白和糖含量

Table 4 Concentration of proteins and neutral sugars of YEGP

样 品 Samples	蛋白含量 Protein (μg/mL)	糖含量 Sugar (μg/mL)	蛋白/糖 Protein/Sugar
HPLC-Peak 3	147.9	52.5	2.8
HPLC-Peak 7	130.5	45	2.9

- 2 Finter NB.  $\alpha$ -干扰素在病毒性感染疾病中的应用, 国外医药——合成药、生化药、制剂分册, 1993, 14(2): 30
- 3 中华人民共和国卫生部. 中国生物制品规程. 一部. 北京: 中国人口出版社, 1995. 268
- 4 彭民. 抗生物素蛋白结合蛋白的发现及分离纯化. 生物化学与生物物理学报, 1995, 27(4): 437
- 5 J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯著. 金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1996. 888~894
- 6 Herbert Ley. Procedure for gel electrophoresis of low molecular weight proteins. BRL Technical Services, 1981, 23~25
- 7 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用. 第二版. 武汉: 武汉大学出版社, 1994. 303
- 8 鲁子贤主编. 蛋白质和酶学研究方法. 第一册. 北京: 科学出版社, 1989. 37~39
- 9 杜平. 现代临床病毒学. 北京: 人民军医出版社, 1991. 1. 216
- 10 Sohan L Gupta, Berish Y Rubin, Sandra L Holmes. Regulation of interferon action in human fibroblasts: transient induction of specific proteins and amplification of the antiviral response by actinomycin D. Virology, 1981, 111: 331~340
- 11 Fleischmann W R, Georgiades J A, Osborne L C. Potentiation of interferon activity by mixed preparations of fibroblast and immune interferon. Inf Imm, 1979, 26: 248
- 12 陈昭烈. 用微量细胞病变抑制法研究三种天然人干扰素的协同抗病毒作用. 第九次全国干扰素及细胞因子论文集, 1993. 260~261
- 13 毕爱华, 龚非力. 医学免疫学. 北京: 人民军医出版社, 1995. 60
- 14 Mittelman A, Huberman M. A phase I study of recombinant human interleukin 2 and alpha interferon 2a in patients with renal cell cancer, colorectal cancer and malignant melaoma. Cancer, 1990, 66: 664~669
- 15 王汉涛, 鲁进宇, 谭建权. 云芝多糖对小鼠产生细胞因子的促进作用. 中国药理学杂志, 1993, 28(12): 722~724
- 16 Jackson A M, James K. Understanding the most successful immunotherapy of cancer. The immunologist, 1994, 2: 208~215
- 17 许兆祥, 李蕾琴, 曲凤珍. 蛇瓜提起物的抗病毒感染作用和诱生干扰素的活性. 病毒学报, 1986, 2(2): 125~129
- 18 Fish EN. Interferon receptor recognition peptides enhance the biological potency of interferon alphas. FEBS Lett, 1995, 365(1): 87~91
- 19 Maheshwari R K, Sidhu G S, Bhartiya D. Primary amines enhance the antiviral activity of interferon against a membrane virus: role of intracellular pH. J of General Virology, 1991, 72: 2143~2152
- 20 张旭, 黄秉仁. 蛋白质糖基化工程. 生物工程进展, 1995, 15(2): 30~35, 28

## Preliminary Study on Fermentation Broth of Yeast Strain SH<sub>2</sub> Enhancing Biological Activity of Interferon Alpha and Its Active Principle

Cheng Zhi    Sun Guopin    Wang Shujun    Wang Chunsheng

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

**Abstract** The fermentation broth of yeast strain SH<sub>2</sub> (FSH<sub>2</sub>) which could enhance the biological potency of human interferon alpha (huIFN- $\alpha$ ) was detected. Its enhancing ratio was 1.64~6.86 fold. A group of proteins was separated and purified from the fermentation supernatant by chromatography on Sephadex G-75 and HPLC. Each protein showed the similar band on PAGE and SDS-PAGE. Their molecular weights ranged from 52 to 72 kD. The proteins were stained with periodic acid Schiff's agent. Lowry's method and sulfuric acid-phenol method were respectively used to determine the contents of proteins and neutral sugars. The results showed the ratio of protein to sugar was 3:1. These results indicated that the proteins were extracellular glycoproteins (YEGPs) secreted by yeast strain SH<sub>2</sub>. YEGPs could significantly enhance the biological potency of huIFN- $\alpha$ . It was verified by the experiment of cytopathic effect inhibition in Wish cells. The enhancing ratios were 1.6~2.8 fold and 1.4~4.0 fold, respectively. The enhancing ratio of the elution protein of FSH<sub>2</sub> separated by Sephadex G-75 was 2.01~5.68 fold. YEGPs alone could not enhance the potency of huIFN- $\alpha$  and had no biological activity as IFNs.

**Key words** Yeast strain SH<sub>2</sub>, Yeast extracellular glycoproteins (YEGPs), Antiviral activity, Enhancer of Interferon