

## 用脾脏生产人白细胞干扰素的研究

彭文伟 杨绍基

(传染病学教研室)

1957年Isaacs和Lindenmann发现干扰素(IFN)以来,经20年研究证明IFN系统在生物中普遍存在,是细胞基因自我稳定的产物,通过复杂的作用使细胞维持正常生理功能。初步临床试验结果说明IFN对多种病毒感染性和肿瘤性疾病都有一定防治效果。要进一步弄清IFN对多种疾病的防治效果就必须有大量IFN供临床应用。国内已有用脐带血和扁桃体生产人白细胞干扰素〔Hu IFN- $\alpha$  (Le)〕,但尚未见用脾脏生产的报告。现将我们用脾脏生产Hu IFN- $\alpha$  (Le)的实验研究及与扁桃体、脐带血生产能力进行比较的结果作一报告。

### 料 料 和 方 法

**分离脾白细胞** 将因外伤或功能亢进手术刚切下的脾脏先用大量含庆大霉素40单位/毫升,卡那霉素200微克/毫升的生理盐水洗净,切成1厘米左右的厚片,浸在含4%人血清的1640培养液中,再用手术刀尖背或钢刷将脾髓部分轻轻刮下,使成果酱样。加入上述培养液,每克可先制成10毫升细胞悬液,4℃搅拌30分钟,使白细胞充分分离。用两层无菌纱布过滤,除去组织小块。作白细胞计数后稀释至 $1 \times 10^7$ 细胞/毫升,加入3倍0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,置4℃10分钟后离心,2,000转/分(rpm),15分钟后弃上清。重复一次后加入等量无酚红Earl's液(pH7.2),摇匀,离心2,000rpm,15分钟后弃上清。重复3次后加入原体积上述培养液,摇匀,离心400rpm,3分钟后弃沉淀(除去残存的红细胞),再稀释至白细胞数为 $1 \times 10^7$ 细胞/毫升。

**诱生病毒** 用F系新城鸡瘟病毒(NDV-F)。由中国医学科学院病毒研究所提供,在9~11日龄鸡胚尿囊腔中传代,每只接种1血凝单位(HAu)为1/640,经100倍稀释的NDV-F液0.2毫升,37℃孵育72小时后收集尿囊液,作1%鸡血球凝集单位测定,1 H Au一般为1/320~1/1,280。

**HuIFN- $\alpha$  (Le)的诱生** 已制好白细胞数为 $1 \times 10^7$ 细胞/毫升的人脾白细胞悬液,加入粗制HuIFN- $\alpha$  (Le)使为150单位/毫升,摇匀,37℃水浴1小时,到30分钟时摇匀一次。再加入NDV-F尿囊液,使为80血凝单位/毫升,摇匀,置37℃水浴1小时,再加入1.5~2倍于原体积的上述培养液,置37℃旋转(每小时8~12转)孵育20小时。然后离心3000rpm,30分钟后收集上清液即为粗制HuIFN- $\alpha$  (Le)。

攻击病毒：用印第安纳株疱疹性口炎病毒（VSV—Ind）。由中国医学科学院病毒研究所提供，于9~11日胚龄的原代鸡胚肌皮细胞中传代，当50~80%细胞发生病变时收集维持液，用传代人胚纤维母细胞测定其50%组织培养感染剂量（TCID<sub>50</sub>）。

**HuIFN— $\alpha$ （Le）抗病毒活性效价测定** 用50%细胞病变抑制效应（CPIE<sub>50</sub>）法。培养4天，已长成细胞单层的培养管，除去培养液，加入用维持液（含5%小牛血清，其余成分与培养液相同）作连续2倍稀释的HuIFE— $\alpha$ （Le），37℃孵育24小时后吸去IFN液，加入100TCID<sub>50</sub>VSV—Ind液，置37℃继续孵育至VSV—Ind对照管出现80%以上细胞病变而细胞及IFN对照管无发生病变时判断结果。以能保护50%细胞不发生病变的最高HuIFN— $\alpha$ （Le）稀释度的倒数作为该份标本的抗病毒活性效价，以单位/毫升表示。用中国医学科学院病毒研究所的HuIFN— $\alpha$ （Le）作为标准效价对照。

**提纯与浓缩** 参照 Cantell—Hirvonen 氏法<sup>(1)</sup>和中国医学科学院病毒研究所的方法<sup>(2)</sup>略加改进。整个过程都在4℃下进行。先将解冻的HuIFN— $\alpha$ （Le）经4层无菌纱布过滤，按1/9（V/V）加入5M硫氰酸钾（KCNS），使含0.5M KCNS，边搅拌边滴入3N HCl，降pH至3.5（用pH计测定），分装250升玻璃瓶，静置过夜后离心3,000rpm，30分钟，弃上清。加入原1/5体积95%乙醇，搅拌30分钟，用1N NaOH分次调pH至4.0，5.0，5.6，均为分别静置20分钟后离心3,000rpm，20分钟后弃沉淀。再调pH至8.0，静置20分钟后离心3,000rpm，30分钟后弃上清。加入原1/50体积含0.5M KCNS的0.1M磷酸盐缓冲生理盐水（PBS），pH8.0，搅拌30分钟使其充分溶解后离心3,000rpm，20分钟后弃沉淀。调上清pH至3.0，静置20分钟后离心3,000rpm，20分钟后弃上清。加入原1/500~1/1,000体积的0.01M PBS（pH8.0）溶解沉淀，调pH为7.4，流动透析，使CNS<sup>-</sup>含量低于1微克/毫升。超速离心，30,000g，60分钟后收集上清液即为经部分提纯浓缩的HuIFN— $\alpha$ （Le）。测定抗病毒活性效价，作质检后分装安瓶，凉干，封口，标明批号，置4℃保存。

对制品的质量检定内容包括pH，CNS<sup>-</sup>残留量，抗病毒效价，蛋白质浓度，比活性，NDV—F活力残存试验，HBsAg，细菌培养，真菌培养，人胚纤维母细胞毒性试验，肉眼检测，安全试验，致热原试验和人体试验等14项。

## 结 果

一、外伤脾与病变脾生产HuIFN— $\alpha$ （Le）能力比较：

我们用6个脾脏进行了试验，其中4个为病变脾（3个为晚期血吸虫病脾功能亢进切除的脾脏。一个为地中海贫血切除的脾脏），2个为外伤脾。结果如表1所示。平均每克外伤脾可分离白细胞 $2.1 \times 10^8$ 个，生产HuIFN— $\alpha$ （Le） $3.6 \times 10^5$ 单位。平均每克病变脾可分离白细胞 $1.6 \times 10^8$ 个，生产HuIFN— $\alpha$ （Le） $2.5 \times 10^5$ 单位， $t=1.849$ ， $P>0.10$ 和 $t=0.750$ ， $P>0.20$ ，两者均无显著性差异。说明两者用于生产HuIFN— $\alpha$

(Le), 单位产量差异不大。

表 1 用人脾白细胞生产HuIFN- $\alpha$  (Le)

实 验 号	切 脾 原 因	整 脾 重 (克)	实 验 脾 重 (克)	每克分离 白细胞数 ( $\times 10^8$ )	抗病毒 效价 (单位/毫升)	产 量	生产1单 位IFN需 白细胞数	每 克 产 量 ( $\times 10^6$ 单位)
1	外伤	103.0	22.0	2.0	4771	1,200	751	2.6
2	外伤	110.8	18.0	2.2	7206	1,140	472	4.6
3	晚血	623.5	6.5	1.5	4677	300	684	2.2
4	晚血	290.0	10.0	1.4	4130	450	734	1.9
5	晚血	304.5	20.0	0.9	3604	540	902	1.0
6	地贫	236.0	40.0	2.4	8345	2,400	475	5.0

二, 脾与扁桃体分离白细胞数比较:

扁桃体均取自慢性扁桃体炎患者。6粒扁桃体, 平均每克扁桃体可分离白细胞  $1.8 \times 10^8$  个。平均每克脾可分离白细胞  $1.9 \times 10^8$  个,  $t=0.145$ ,  $P>0.50$ , 无显著性差异。

三, 脾、扁桃体与脐带血生产HuIFN- $\alpha$  (Le) 能力比较:

作6份脐带生产血HuIFN- $\alpha$  (Le) 试验。每生产1单位HuIFN- $\alpha$  (Le) 分别平均需脾白细胞670个, 扁桃体白细胞749个, 脐带血白细胞756个。方差分析,  $F=3.28$ ,  $P>0.05$ , 说明三者生产HuIFN- $\alpha$  (Le) 的能力无显著性差异。

四, 用脾和脐带血生产的HuIFN- $\alpha$  (Le) 提纯浓缩结果比较:

我们对4批脐带血HuIFN- $\alpha$  (Le) 和2批脾HuIFN- $\alpha$  (Le) 进行了提纯浓缩试验。结果如表2所示。分析结果说明用脐带血和脾白细胞制备的HuIFN- $\alpha$  (Le) 提纯浓缩后的回收率与比活性都无显著性差异, 前者  $t=1.665$ ,  $P>0.10$ , 后者  $t=2.578$ ,  $P>0.05$ 。经提纯浓缩的HuIFN- $\alpha$  (Le) 符合质检要求。

表 2 脾与脐带血生产的HuIF- $\alpha$  (Le) 提纯浓缩结果比较

实验号	提 纯 浓 缩 前				提 纯 浓 缩 后				
	量 (毫升)	抗病 毒效价 (单位/ 毫升)	蛋白质 (毫克/ 毫升)	比活性 (单位/ 毫克蛋白)	量 (毫升)	抗病 毒效价 (单位/ 毫升)	蛋白质 (毫克/ 毫升)	比活性 (单位/ 毫克蛋白)	回 收 率 (%)
1	脾 1,200	8,414	3.01	2,795	2.5	1,351,450	1.50	900,967	293 161 34
2	1,000	8,414	3.01	2795	1.8	1,028,180	3.16	325,373	125 122 22
3	脐 2,500	3,690	10.86	340	4.3	969,393	5.78	167,715	544 263 45
4	带 1,000	4,771	6.14	777	1.7	766,977	13.16	58,281	74 161 27
5	血 750	4771	6.14	777	1.8	965,196	6.13	325,373	198 202 49
6	1,0850	3690	10.86	340	20.0	951,919	2.96	321,594	851 258 48

## 讨 论

HuIFN- $\alpha$  (Le) 主要由B淋巴细胞产生。在有一定量巨噬细胞存在的条件下, B细胞可产生较大量HuIFN- $\alpha$  (Le)。在其他条件相同的情况下, HuIFN- $\alpha$  (Le) 的产量与培养物中的B细胞数成正比。脾脏的白髓常出现以B细胞为主的生发中心。红髓的脾索以B细胞为主, 并含有大量巨噬细胞和浆细胞。在脾脏的淋巴细胞中, B细胞占50~65%。脾脏富含B细胞和巨噬细胞, 故用NDV-F诱生时能产生较大量HuIFN- $\alpha$  (Le)。本研究结果说明平均每克外伤脾和病变脾组织分离出来的白细胞生产HuIFN- $\alpha$  (Le) 量分别相当于40毫升和30毫升血液的白细胞生产的HuIFN- $\alpha$  (Le) 量。若按整脾计算, 平均每个外伤脾和病变脾重100克和300克, 生产HuIFN- $\alpha$  (Le) 量分别相当于4,000毫升和9,000毫升血液生产的HuIFN- $\alpha$  (Le) 量。可见, 用人脾生产HuIFN- $\alpha$  (Le) 有产量大, 成本低的优点, 与用扁桃体生产相比还有污染机会较少的优点。

本研究结果说明外伤脾分离白细胞和生产HuIFN- $\alpha$  (Le) 量都稍较病变脾高, 但经统计学处理无显著性差异 ( $P > 0.10$ 和 $P > 0.20$ )

用人脾生产的HuIFN- $\alpha$  (Le) 经部分提纯浓缩后按美国、芬兰和中国医学科学院病毒研究所制定的临床级HuIFN- $\alpha$  (Le) 检定标准作质量检定, 结果符合要求。

Cantell-Hirvonen<sup>(1)</sup>提纯浓缩HuIFN- $\alpha$  (Le) 的回收率为62%, 吴淑华等<sup>(2)</sup>的回收率为63%。本组回收率仅为38%, 可见有待进一步提高。

## 参 考 文 献

- (1) Cantell K and Hirvonen S: Largescale production of human leukocyte interferon containing  $10^8$  units per ml. J Gen Virol 39 (3): 541, 1978
- (2) 吴淑华等: 人白细胞干扰素的制备和纯化. 中国医学科学院学报 (2): 98, 1980

## Investigation of Producing Human Leukocyte Interferon from Spleen

Peng Wenwei    Yang Shaoji

(Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital,  
Zhong Shan Medical College)

### Abstract

The results of this investigation indicated that:

(1) human leukocyte interferon could be produced from human spleens and such preparation might be suitable for clinical use; (2) the differences between the amount of leukocytes isolated from traumatized or diseased spleens and their potential of producing human leukocyte interferon were not statistically significant; and (3) the differences between the capabilities of leukocytes isolated from the spleen, the tonsil and the umbilical cord blood in producing human leukocyte interferon were also not statistically significant. Although the production of human leukocyte interferon from human spleens is by no means simple, it has the advantages of higher yield, lower cost, and lesser chances of contamination. Therefore, it may be of some value in practical use.