

干扰素诱生剂的特性及作用机理*

洪 超 明

(卫生部长春生物制品研究所)

一、外源性干扰素的局限性和内源性干扰素

干扰素(IFN)为一类蛋白质,系宿主细胞通过病毒等或其他人工合成的诱生剂的诱导而产生有抑制病毒增殖的作用。产生 IFN 的细胞主要为网状内皮细胞、白细胞和淋巴细胞,其他细胞也可产生。

体外实验证明,IFN 具有提高巨噬细胞、天然杀伤细胞(NK 细胞),以及抗体依赖性(ADCC)细胞毒活力的效应。但外源性 IFN 在机体内半衰期较短,经肌肉注射 3×10^6 单位后,在 24 小时就下降到很低水平^[1]。

目前外源性 IFN- α 、 β 已应用于病毒性疾病与肿瘤的治疗,虽然取得了一定的疗效,但由于用量极大,即使目前国外已成功用地用基因工程方法生产 IFN^[2],仍未能满足临床研究的需求。至于 IFN- γ ,一般认为是来源于 T 细胞,系经非特异性免疫诱生剂或抗原致敏后而产生。这种 IFN 在急性病毒性感染早期产生,对宿主初期免疫应答是重要的。

在 NK 细胞和肿瘤靶细胞接触时产生 IFN- α ,而 NK 细胞是属于 T 细胞的范畴^[3]。目前有些 IFN 诱生剂已证明能够诱生多型 IFN,如 PHA、PPD 和 C. parvum 诱生 IFN- γ 和 IFN- α ,而 ConA 则诱生 IFN- γ 和 IFN- β 。

用 IFN 诱生剂诱导机体自身产生内源性 IFN,是直接可取的途径。用适量良好的诱生剂给病人注射,在每毫升血中 IFN 可达 2000 单位,比直接注射 IFN 所获得的浓度约高 10 倍^[4]。因此,当前对内源性 IFN 的深入探讨是具有重要意义的。

二、IFN 诱生剂

I 型 IFN 诱生剂

1. I 型甲类诱生剂:多系双链 RNA,为良好的诱生剂,在细胞培养或注射动物体内,常诱生 IFN 1000 单位/ml 以上。此类诱生剂包括动、植物病毒、噬菌体及合成双链 RNA 等,即使是微克量(μg),也常具有高度诱生能力。

七十年代以来,合成的多聚肌苷酸、多聚胞苷酸(Poly I: C)为一种最有效的 IFN 诱生剂,曾在实验动物和人体进行广泛试验^[5,6]。Poly I: C 为 Poly I 和 Poly C 的共聚物,为人工合成的双链 RNA,其双链是这类聚核苷酸诱生 IFN 的主要因素。Poly I: C 具多种活性,有一定毒性反应,它可被人血中的核苷酸酶所降解。我国试产的 Poly I: C 加有微量钙离子和卡那霉素,以增加其热稳定性和抵抗人体内核苷酸酶的降解^[7]。

Poly (ICLC)—改进的 Poly I: C: 为了提高 Poly I: C 的稳定性,Levy 等^[8]制备了聚肌胞-聚左旋赖氨酸-羟甲基纤维素复合物 [Poly (ICLC)]。方法如下:将 500 ml Poly I: C 溶液(4 mg/ml)缓慢加入于等量的聚 L 赖氨酸(6 mg/ml 250 ml)和羧甲基纤维素(CMC 2% 250 ml)混合液中,使最终溶液含 Poly I: C 2 mg/ml、聚 L 赖氨酸 1.5 mg/ml 含 CMC 0.5%。Poly (ICLC)为胶状半透明复合物,比 Poly I: C 对酶降解的耐受性高 5—10 倍,因此

* 本文曾经中国医科院病毒所侯云德同志审阅,谨致谢意。

对灵长类能诱生更高滴度的 IFN, 保持时间也较长, 但毒性也相应增大。

2. I 型乙类诱生剂: 乙类为较弱 IFN 诱生剂(<1000 单位/ml), 包括细菌、脂多糖、及低分子量物质等。对高分子量脂多糖的作用曾有较深入的研究, 其活性组分为脂类 A (lipid A)。

低分子量 10 羧甲基纤维素 9 吡啶酮 (10 carboxymethyl-9-acridanone)^[9] 为近年来所发现的一种低分子量 IFN 诱生剂, 分子量只 275, 能诱生高滴度 IFN, 相当于新城鸡瘟病毒的效力。在巨噬细胞培养液中, 用适量诱生剂 (500 μ g/ml) 产生的 IFN- α, β 高达 3000 Iu/ml。给小鼠体内注射或口服此诱生剂, 能保护对 RNA 或 DNA 病毒致死性感染。

II 型免疫 IFN 诱生剂

当致敏淋巴细胞再次接触特异性抗原后, 如病毒或非病毒抗原 (PPD, 白喉或破伤风类毒素等), 在淋巴细胞培养液中可诱导 IFN- γ 的产生。淋巴细胞受有丝分裂原的刺激, 如 PHA、ConA、PWM 等, 激活细胞的转化和繁殖, 也诱导 IFN- γ 的产生。IFN- γ 在 pH 2 及 56 $^{\circ}$ C 1 小时被破坏。实验证明, T 细胞受 PHA、ConA 和 PPD 的刺激而产生 IFN- γ , B 细胞则对 PWM 引起反应性。在 T 细胞大约 3 天时诱生 IFN, 而 B 细胞则需 5—7 天, IFN 产量也较少。

最近曾有报道葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 对 T 淋巴细胞为另一种良好的有丝分裂原^[10], (mw 41000—42000), 用人外周血淋巴细胞 (5×10^6 ml), 在 50 μ g/ml SPA 作用下, 置 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 培育 24 小时, 可诱生 IFN 达 100—300 μ /ml。用 SPA 诱生的 IFN- γ 在 24 小时内达高峰, 而用其他有丝分裂原则需 3—5 天。

用人体淋巴细胞的分离实验证明, 大颗粒状淋巴细胞 (LGLS) 含 75—85%, 当和靶细胞接触时, 不仅具有 NK 活性, 同时也产生 IFN^[11]。这些细胞中也含有少量中、小形淋巴细胞 (主要为 T 细胞) 和单核细胞。

三、作用机理

1. 作用理论

一般认为, IFN 诱生剂作用于细胞后, 使 IFN 基因组去抑制而开始转录合成 mRNA, 后者再转译成 IFN。近年来有些学者认为, IFN- α - β 基因位于体细胞第 9 对染色体上^[12]。

IFN 结构基因的多型性: 按抗原性不同, IFN 可分为 α 、 β 、 γ 三种类型, 其中 IFN- α 的亚型有 4 个以上。三种类型的 IFN 系不同的结构基因所编码而转录产生的。

超诱导现象 (superinduction): 当干扰素 mRNA 进行翻译到一定阶段, 由于很快被降解, IFN 合成便停止了。如果在适当时期加入蛋白或核酸代谢抑制剂 (如放线菌素 D), 以阻断蛋白抑制物的合成, 使 mRNA 继续进行转录可产生更多的 IFN。

2. 实验机理

近年来常用于人体的 IFN 诱生剂为 poly (ICLC)。此诱生剂曾广泛应用于实验动物对病毒性疾病或肿瘤的治疗, 证明其诱生 IFN 及佐剂作用促使抗病毒或肿瘤的疗效有所提高。

Houston 等^[13] 于灭活马脑脊髓炎疫苗加入 poly (ICLC) 作恒河猴的免疫实验。注射后 2.5 个月, 实验组比对照组明显地保持较高的抗体水平, 相当于减毒活疫苗的免疫应答。

Stebbing 等^[14] 给小鼠多次接种 poly (ICLC) 作感染脑心肌炎病毒的保护实验, 虽然诱生 IFN 的作用减退, 而由于 poly (ICLC) 胶体复合物的佐剂作用, 在小鼠重新感染这种病毒时, 抗体增高, 抵抗力明显增强。

Moreno 等^[15] 用小鼠感染狂犬病病毒, 比较了疫苗组和疫苗加 poly (ICLC) 组的保护效果。在病毒感染后 24 小时, 单独注射疫苗组无降低死亡率的作用, 而注射疫苗联合 poly (ICLC) 复合物组, 死亡率则明显下降; 甚至在病毒感染 5 天后, 再接种此联合疫苗仍然有效。Baer 等^[16] 用 poly (ICLC) 联合狂犬病疫苗观察恒河猴感染狂犬病毒后的疗效, 证明 poly (ICLC) 联

合疫苗与狂犬病疫苗联合抗血清具同等疗效,而此诱生剂不仅诱生 IFN,还有不干扰狂犬病疫苗产生自动免疫的优点。联合的 poly(ICLC)疫苗组比疫苗对照组降低了猴的死亡率 87%。注射 1 次 poly(ICLC)(2 mg/ml)在降低死亡率和注射 3 或 5 次者(每日 1 次)有同等效力。治疗 24 小时后则出现高水平的 IFN,4 天后 IFN 仍保持相当水平。

Harmon 等^[17]曾证明 Poly I: C 有激活巨噬细胞的作用,因而促进某些细胞介导的免疫应答。

培养的脾淋巴细胞,特别是 T 细胞,在有丝分裂原(包括 ConA、PHA、SPA 等)刺激下产生 IFN- γ 。Marcucci 等^[18]分离鼠淋巴细胞作细胞培养,细胞先经 ConA 刺激 3 天,激发后的细胞培养液中 IFN- γ 的剂量提高了 30 倍。

中药黄芪对培养的淋巴细胞可诱生 IFN- γ ,同时刺激淋巴细胞转化,并显著地促进 NK 细胞活性^[19,20]。给小鼠连续口服黄芪水煎液 7 天,每天 0.5 ml。停药后取脾脏检测 NK 细胞活性,证明第 3~5 天 NK 细胞活力比对照组约提高 2 倍。黄芪促进 NK 细胞活性,以剂量 0.01~0.1 mg/ml 效果最好。黄芪与 IFN 互有增强作用,联合处理效应细胞,可使 NK 细胞活力提高 5~6 倍。

四、问题与展望

根据上述 IFN 诱生剂的作用机理,国内外学者曾不断探索实际的应用,认为优良诱生剂的直接接种较外源性 IFN 的大量制备更为方便,但目前仍存在一些问題,有待于深入探讨。

1. 毒性问题

Poly I: C 为国际上公认最好的 IFN 诱生剂之一,但仍存在一定毒性和对机体内核苷酸酶作用的不稳定性。Poly I: C 一般为 4~12 S。虽然分子量愈大疗效愈好,但毒性也随之增加。目前国产的 Poly I: C 加入微量 Ca 离子和卡那霉素提高稳定性^[7];国外改进的 Poly(ICLC)增强了对热和酶的耐受性,且具有良好的佐剂作

用,可联合多种病毒疫苗,促进免疫效果。采用 0.01~0.04 mg/ml 低剂量的诱生剂,一般对人体是安全而能够耐受的。

目前 10 羧甲基纤维素 9 吡啶酮为良好低分子量的 IFN 诱生剂,能诱导相当于病毒所产生高滴度的 IFN。用体内接种或口服法的实验证明,能保护小鼠对 DNA 及 RNA 病毒的致死性感染^[11]。

2. IFN 反应减退(hyporeactivity)现象

当 IFN 诱生剂给机体接种或用于细胞培养,在几天后再次接触诱生剂则出现 IFN 产量下降。此反应减退现象似乎在所有 IFN 诱生剂都会出现。包括病毒、Poly I: C、甚至化学诱生剂如 tilorone。一种 IFN 诱生剂的使用,常常也引起对另一类诱生剂使用时的低反应性。实验证明反应减退现象是由于一种血清因子的出现,分子量和 IFN 相近^[21]。用抗代谢物的实验说明 IFN 诱生剂促进“抑制物”的出现,也可能和 IFN 反应减退现象有关^[22]。

在探讨内源性 IFN 时,IFN 反应减退的机理是其中的一个重要关键,有待于今后进一步深入研究。

3. 有丝分裂激活剂

近年来 IFN- γ 在干扰素方面是一个重要的发展。IFN- γ 抗病毒活性效价较低,但出现早,在血液中维持时间较长,形成良好的抗病毒状态^[23]。这对急性病毒病患者初期的免疫应答是重要的。IFN- γ 激活剂 PHA、ConA、SPA 等^[10]都存在分子量较大和毒性问题,需要通过分子结构和组分提纯分析来解决。近年来曾证明,葡萄球菌细胞壁中的组分肽聚糖(PG)对淋巴细胞有佐剂作用和有丝分裂的激发作用^[24,25]。此组分的分子量较小,毒性较低,更适合用于机体 IFN 的诱导和促进 T、B 细胞的转化,为良好的免疫调节剂,值得进一步探讨。

总之,二十多年来国内外学者对 IFN 诱生剂极其重视,发展很快。近年来进一步应用于临床治疗,但仍存在一定问题。今后 IFN 诱生剂在药理学、分子生物学、及免疫治疗各方面

将会更迅速地发展。

参 考 文 献

- [1] Орлова, Т. Г., в ДР., 1980, *Вопр. Вирусол.* 5: 594—596.
- [2] Merigan, M. C., 1982, 干扰素研究的进展. *新医学*, 9: 451—453.
- [3] Epstein, L. B., 1981, *Interferon 1981*, V. 3, ed. Gresser, I., p. 13, Acad. Press.
- [4] J. L. M., 1979, *Science*, 204: 1184—1185.
- [5] DeClercq, E., et al., 1972, *Infect. Immun.*, 8: 309.
- [6] Field, A. K., et al., 1972, *Medicine*, 51: 169.
- [7] 胡其光, 1982, 天津聚肌胞的实验研究和临床应用. 三届全国干扰素学术会议资料.
- [8] Levy, H. B., et al., 1975, *J. Infect. Dis.*, 132: 434—439.
- [9] Storch, E., et al., 1982, *Eur. J. Immunol.*, 9: 793—794.
- [10] Catalona, W. J., et al., 1981, *Nature*, 291 (5810): 77.
- [11] Saksela, E., 1981, *Interferon 1981*, V. 3, ed. I. Gresser, p. 45, Acad. Press.
- [12] Sehgal, P. B., et al., 1980, *Nature*, 288: 95.
- [13] Houston, W. E., et al., 1976, *Infect. Immun.*, 14: 318—319.
- [14] Stebbing, N., et al., 1980, *Infect. Immun.*, 29: 960—965.
- [15] Moreno, J. A., et al., 1979, *J. Gen. Virol.*, 42: 219—222.
- [16] Baer, G. M., et al., 1979, *Bull. W. H. O.*, 57: 807—813.
- [17] Harmon, M. W., et al., 1975, *J. Infect. Dis.*, 132: 241—249.
- [18] Marcucci, F., et al., 1982, *Eur. J. Immunol.*, 9: 787—788.
- [19] 常春燕等, 1982. 医学研究通讯, 10: 5.
- [20] 金建平等, 1982. 医学研究通讯, 10: 5—6.
- [21] Stringfellow, D. A., 1975, *Infect. Immun.*, 11: 294—302.
- [22] Vilcek, J., et al., 1976, *J. Infect. Dis.*, 133: A22—A29.
- [23] Diandani, F., et al., 1980, *Nature*, 283: 400—402.
- [24] Dziarski, R., et al., 1979, *Infect. Immun.*, 23: 706—710.
- [25] Dziarski, R., et al., 1979, *Ibid.*, 26: 508—514.

核磁共振(NMR)技术在生物膜中的应用

ERIC OLDFIELD

前 言

近四、五年来, 我们研究完整膜结构的能力大大地加强了, 其主要原因是在膜的研究领域中引入了固相核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)的技术(Davis等, 1976; Haberkorn等, 1978)。现在已经可以利用样品快速旋转技术(rapid sample rotation techniques)获得非声处理的类脂膜的高分辨的波谱(Haberkorn等, 1978)或借助于同位素标记和四极-回波脉冲技术(quadrupole-echo pulse technique)详细地研究类脂分子中几乎所有原子的运动速率及运动类型(Davis等, 1976; Huang等, 1980)。此外, 现在已经研究了磷脂中所有其他稳定的核(^{14}N , ^{17}O , ^{31}P)(Sim-

inovitch等, 1980; Rajan等, 1981, 及文中所列的文献; Tsai等, 未发表的资料), 这就使研究者可以把精力集中于他们所希望研究的类脂双层膜系统中的任何部分。以下主要介绍某些有代表性的研究。至于研究中所用的仪器设备及一些技术性的问题, 有兴趣的读者可参考其它有关的文献。

除了类脂双层动力学和固醇、多肽及蛋白质对动力学影响的相当详细的研究工作外, 最近又有许多报道表明, 有可能在完整的生物膜中获得蛋白质本身的固态波谱(Kinsey等, 1981a; Kinsey等, 1981b; Rice等, 1981a)。从 *Halobacterium halobium* (一种极其嗜盐性的细菌), *Escherichia coli*, 和 *Thermus thermophilus* (一种专性喜温种类) 的研究结果, 可以预料, 在