

鸭 α 干扰素的研究*

郑茂林**

(牧医系)

提 要

以鸭胚成纤维细胞——水泡性口膜炎病毒作为鸭干扰素的检测系统,证明北京鸭的脾脏细胞和全血细胞在诱生剂作用下,能够产生鸭外源性干扰素。考虑干扰素的抗病毒活性的效价、操作的简便和提纯的效果,以脾脏细胞诱生法优于全血细胞诱生法。以正交表 $L_9(3^4)$ 安排试验,表明诱生鸭干扰素的最佳条件组合是:水解乳蛋白液—— 2×10^7 脾细胞/毫升——NDV—F系, 39°C 旋转培养20~24小时,鸭脾干扰素的滴度可达2,000单位/毫升以上。10%的小牛血清对于诱生鸭干扰素是必需的。理化和生物学特性的测定证明本研究的抗病毒物质是鸭干扰素。硫酸铵分级盐析法可以对鸭干扰素进行浓缩和粗提纯,滴度可以提高到10,000单位/毫升。

前 言

1957年Isaacs和Lindenmann二人发现了干扰素(Interferon)^[1],现已知干扰素是在诱生剂的作用下,由正常细胞基因组控制产生的一种糖蛋白。干扰素除了具有抗病毒作用外,还具有抗其它微生物、抗肿瘤、抑制细胞生长和参与免疫调节等多种生物学功能。70年代以来,国内外学者在干扰素的基因调控、分子结构、作用机理、与免疫学的关系及用遗传工程的方法生产人类干扰素和临床试用等方面都有很大进展。

在兽医界,国内近年来仅有内源性干扰素对某些动物病毒病防治的研究,未见关于动物外源性干扰素研究的专门报告。国外对多种动物外源性干扰素的研究虽有较多资料,但对于鸭仅见关于鸭胚产生干扰素的文章^[2],未见以鸭白细胞(不论是来自血液或脾脏)诱生外源性干扰素的报道。

本研究即以鸭脾细胞和全血细胞诱生外源性干扰素,寻求较好的诱生方法,测定鸭干扰素的理化及生物学特性,对所诱生的干扰素进行初步的浓缩与粗提。

材 料 与 方 法

(一) 材料

北京鸭来源于广州市郊黄金围鸭场,鸭胚和鸡胚来源于广州市种苗公司,小牛血清

* 本研究是在导师欧守杼教授的指导下完成的。本研究得到中山医科大学第三附属医院传染病科实验室、广东省农科院兽医研究所和本系遗传繁育教研室在材料和技术上的支持,在此深表谢意。

** 本校1979—1982年研究生,本文是硕士学位毕业论文,现在内蒙古农牧学院工作。

来源于广州市畜牧场。细胞培养液采用英国Oxoid的水解乳蛋白（简称LH）、日本产的199和美国的RPMI1640（Difco）配制。

鸡新城疫病毒F系（Newcastle disease virus strain F, NDV-F）、仙台病毒（Sendai virus, SV）和水泡性口膜炎病毒（Vesicular stomatitis virus strain Indiana, VSV）均由中山医科大学第三附属医院传染病科提供。聚次黄嘌呤核苷酸：聚胞嘧啶核苷酸（Polyinosinic acid: Polycytidylic acid, PolyI:C）为广州第五制药厂、广东江门甘蔗化工厂制，批号是790616。

（二）方法

1. 鸭脾干扰素的诱生：无菌摘取鸭脾脏，去除外部的结缔组织，以Hanks'液冲洗3遍→剪碎脾脏，加入含小牛血清10%的营养液吹打过滤制得细胞悬液→稀释到要求的脾细胞浓度→加入干扰素诱生剂，39℃旋转培养20~24小时→离心取上清液，调至pH 2，置4℃酸化5天→中和至pH 7，无菌检查合格即为鸭脾干扰素。

2. 鸭全血干扰素的诱生：参照人全血细胞诱生干扰素的方法^[1]，心脏采血，基本同脾干扰素的诱生方法。

3. 干扰素抗病毒效价的测定：鸭干扰素抗病毒效价的测定在鸭胚成纤维细胞——水泡性口膜炎病毒系统（DEF—VSV系统）中进行，其相对种属特异性的鉴定在鸡胚成纤维细胞——水泡性口膜炎病毒（CEF—VSV系统）中进行。鸡胚和鸭胚细胞的制备采用常规的组织培养方法。测定方法采用细胞病变抑制法（Cytopathic effect inhibition assay, CPEI）^{[1][7]}。以能保护50%的细胞免受VSV破坏的干扰素最高稀释度为一个干扰素活性单位，以单位/毫升或Log₂ CPEI₅₀/ml表示。

4. 鸭干扰素的浓缩和粗提：根据盐析法分离纯化蛋白质的基本原理与方法，参考以硫酸铵分级盐析法提纯人脐血干扰素的方法^[2]，对鸭干扰素进行粗提，第一遍分级盐析采用固体硫酸铵，第二遍采用饱和硫酸铵溶液。

试验结果

（一）不同诱生条件对鸭脾干扰素产生的影响

1. 三因素三水平正交比较试验结果：三因素三水平正交比较如表1。

表1 L₉(3⁴) 因素水平表

因素 水平	A (营养液)	B (脾白细胞浓度)	C (诱生剂)
1	1640	2×10^7 /ml	NDV-F (128血凝单位/ml)
2	199	1×10^7 /ml	SV (128血凝单位/ml)
3	LH	0.5×10^7 /ml	PolyI:C (50微克/ml)

对各因素、水平组合所诱生的干扰素滴度比较表明, 营养液最好的是LH, 其次为1640, 最次为199, LH和1640差异不显著 ($P>0.05$), 而LH和1640二者与199的差异都极显著 ($P<0.01$); 脾白细胞浓度以 2×10^7 /毫升最好, 0.5×10^7 /毫升最差, 三者差异极显著 ($P<0.01$); 诱生剂以NDV—F最好, PolyI:C次之, SV极差, 三者差异极显著 ($P<0.01$)。

依上述结果, 结合经济观点, 鸭脾干扰素诱生的最佳条件组合是LH—— 2×10^7 细胞/毫升——NDV—F。按这种组合用两只鸭分别进行验证, 结果干扰素活性为2805单位/毫升和2288单位/毫升, 证明该组合可靠。

2. 小牛血清与脾干扰素诱生的关系: 按上述组合, 以同一鸭脾细胞悬液进行试验, 营养液中小牛血清含量分别为0%、2%、5%和10%, 其它条件相同, 最后在同一批细胞中测定干扰素效价, 重复试验2次。结果第1次试验干扰素滴度分别是427、407、792和1774; 第2次为354、194、457和2187。说明不加血清和血清浓度低, 都不足以诱生较高滴度的干扰素, 而以10%浓度为好。

(二) 鸭全血细胞诱生干扰素的结果

RPMI 1640为营养液, NDV—F为诱生剂, 鸭全血细胞四次试验产生干扰素的滴度分别是630、478、794和630单位/毫升。说明鸭全血细胞如同人的全血细胞一样^{〔1〕〔4〕}, 也可以诱生干扰素, 但在本试验条件下, 滴度都不高。

(三) 鸭干扰素特性的测定

1. 残留病毒测定: 以NDV—F诱生的鸭干扰素直接进行血球凝集试验, 结果呈阴性; 把它接种于9日龄鸡胚尿囊腔孵育3天后收获尿囊液与羊水、血凝试验亦为阴性, 证明其中不存在残留病毒, 其干扰作用不是由活病毒引起的。

2. 对胰酶的敏感性: 干扰素是一种蛋白质, 对胰酶的作用很敏感^{〔4〕〔6〕}。以0.1%的胰蛋白酶与等量鸭干扰素混合于37°C水浴1小时后, 用含小牛血清5%的营养液稀释20倍, 终止胰蛋白酶的作用, 然后测定其抗病毒效价。四个干扰素样品(抗病毒效价分别为2467、3169、4360和1287)经上述处理后其抗病毒效价均小于20。说明本实验的抗病毒物质对胰蛋白酶的作用十分敏感。

3. 诱生剂的作用: 同一鸭脾的细胞悬液, 一份加诱生剂NDV—F, 另一份不加诱生剂, 相同条件培养后, 在同一批细胞测定其抗病毒效价, 两次试验加诱生剂的为2288和2805单位/毫升, 不加诱生剂的均小于3单位/毫升。证明干扰素的产生必须要有诱生剂的作用。

4. 鸭干扰素本身抗病毒作用的检测: 鸭干扰素样品以营养液稀释100倍与等量含100TCID₅₀的VSV的营养液混合, 37°C水浴30分钟, 然后接种到DEF和CEF中, 同时以不含干扰素的营养液同法与病毒液混合, 水浴后也接入两种细胞作攻毒对照, 待对照细胞发生100%病变时, 观察其它细胞, 结果3个干扰素样品对DEF明显保护, 对CEF却无保护作用。说明干扰素的抗病毒作用不是本身直接产生的, 只能诱导同种属的细胞间接起作用。

5. 对其它病毒的作用: 按照在DEF—VSV系统测定干扰素的方法, 测定鸭干扰

素在DEF中对一种细小核糖核酸病毒DEF适应株的干扰作用。结果表明鸭干扰素可明显干扰这一病毒株, 抗该病毒株的效价都在960单位/毫升以上。证明鸭干扰素的抗病毒作用没有病毒的专一性。

6. 耐热性: 3个干扰素样品56°C水浴30分钟后测定其抗病毒活性, 与未水浴时的抗病毒活性比较, 差异不显著($P>0.05$), 证明鸭干扰素与其它动物的干扰素一样, 对热的作用较稳定^[6]。

7. 鸭干扰素相对种属特异性的测定: 对4个鸭干扰素样品在DEF—VSV系统和在CEF—VSV系统抗病毒效价进行比较(表2)。从表2可明显看出, 在DEF上有较高滴度的鸭干扰素在CEF上仅有很弱的抗病毒作用, 证明鸭干扰素也具有相对的种属特异性。

表2 4个鸭干扰素样品在DEF和CEF所测效价比较

样 品 号	在DEF—VSV系统	在CEF—VSV系统
311	11.27* (2467**)	6.44 (87)
321	11.63 (3169)	5.73 (53)
318	12.09 (4360)	5.39 (42)
328	10.33 (1287)	5.74 (54)
$\bar{x} \pm s$	11.33 $\pm$ 0.75	5.83 $\pm$ 0.44
t检验	$p<0.01$	

* $\text{Log}_{10}\text{CPEI}_{50}/\text{ml}$

** 单位/毫升

8. 耐酸性和对细胞的毒性测定: pH 2酸化5天是制备鸭干扰素必经步骤, 该处理使样品中的病毒致死, 而干扰素活性仍未丧失, 说明它可耐受pH 2。每次测定过程都证明鸭干扰素仅选择性地干扰病毒, 单独接干扰素的细胞不攻毒, 细胞一直生长正常, 说明干扰素本身对细胞无毒害作用。

(四) 鸭干扰素的浓缩与粗提纯

以硫酸铵分级盐析法浓缩和粗提鸭干扰素, 对提纯前后样品的体积、干扰素活性和电泳区带数进行比较见表3。

表3 硫酸铵盐析法提纯鸭干扰素结果

试验次数	体 积			干 扰 素 活 性 效 价				电泳后明显区带		
	体积 (毫升)		缩小倍数	活性效价 (单位/毫升)		提高倍数	回收率 (%)	提纯前	提纯后	糖蛋白带
	提纯前	提纯后		提 纯 前	提 纯 后					
1	630	30	21	776	11481	15	70	8	6	3
2	270	35	7.7	2884	13400	4.7	60	7	4	2

* 第1次为鸭脾干扰素与鸭全血干扰素之混合; 第2次为鸭脾干扰素。

讨 论

本研究所诱生的抗病毒物质的特性测定完全符合干扰素的判别标准, 与人类 α 干扰素的特性类似^[3], 且生产细胞为鸭脾和血液的白细胞, 故可认为是鸭的 α 干扰素。鸭全血和脾脏在诱生剂作用下均可产生干扰素, 但在本实验室条件下, 脾干扰素效价高、杂蛋白含量较低而利于提纯、脾脏法操作较简便, 因而脾脏法更优于全血法。

RPMI1640是最适宜白细胞培养的合成培养基, 水解乳蛋白是天然培养基, 二者在鸭干扰素的生产中效果无明显差异, 但后者价格便宜, 更适宜于大量生产的使用。在人类 α 干扰素生产中, 国际上广泛采用的诱生剂是仙台病毒, 而NDV是多种动物的最好的干扰素诱生剂。鸭 α 干扰素的研究表明NDV—F同样是一个很好的诱生剂, 而仙台病毒诱生能力极差。PolyI:C在人类干扰素的研究中主要用于内源性干扰素和 β 干扰素的诱生, 本试验表明它在鸭 α 干扰素的诱生中效果不好。

各种动物干扰素均有相对的种属特异性。Nagano证明同属于Anseriformis目的北京鸭、野鸭和鹅的任一种的干扰素在另外两种中都有活性, 而对属于另一目Galliformes的鸡、火鸡和鹌鹑却无活性^[3]。Wagner证明鸭胚干扰素对东方马脑炎病毒在鸡胚细胞上的空斑形成有轻微但明显的抑制作用^[8]。本研究表明鸭 α 干扰素在CEF中有明显存在但效价很低的抗病毒作用, 与他们的结果一致。

畜禽临床应用干扰素的纯度可以较低, 本研究提纯方法可使干扰素效价达1万单位以上, 估计能为今后进一步研究和试用所采用。虽然未能证明鸭 α 干扰素也是糖蛋白, 但提纯后的样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 以糖蛋白特异的Schiff试剂染色, 表明尚有糖蛋白带, 且为主要区带。

参 考 文 献

- [1] 吴淑华等: 人脐血干扰素的研究 I. 人脐血干扰素制备的条件, 《微生物学报》, 18 (3) 1978, 225—231。
- [2] 杨崇泰等: 人脐血干扰素的研究 I. 人脐血干扰素五种提纯方法的比较及人脐血干扰素若干性质的探讨, 《微生物学报》, 19 (1) 1979, 96—103。
- [3] 侯云德编著: 《干扰素及其临床应用》, 11—12, 28, 江苏科学技术出版社, 1981年。
- [4] 童葵塘等: 人外源性干扰素的研究 I. 人全血细胞干扰素诱生条件的研究, 《微生物学报》, 20 (4) 1980, 440—445。
- [5] Isaacs, A. and J. Lindenmann, (1957). Virus interference I. the interferon. Proc. Roy. Soc. Ser. B. 147: 258—267.
- [6] Lampson, G. P., A. A. Tytell, M. M. Nemes and M. R. Hilleman, (1963). Purification and characterization of chick embryo interferon. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112: 468—478.

- [7] Sellers, R. F. and M. Fitzpatrick, (1962). An assay of interferon produced in rhesus monkey and calf kidney tissue cultures using bovine enterovirus M₁ as challenge. Brit. J. Exp. Pathol. 43 : 674.
- [8] Wagner, R. R. , (1961) ., Biological studies of interferon I, Suppression of cellular infection with eastern equine encephalomyelitis viruses. Virology 13 : 323-337.

A STUDY ON THE DUCK INTERFERON α

Zheng Maolin

(Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine)

ABSTRACT

The present study demonstrated that , using the duck embryo fibroblast—vesicular stomatitis virus system for assay of duck interferon, duck spleen cells and whole blood cells from healthy Beijing ducks could be induced to produce exogenous interferon and to be used as cell sources for their production . Taking into account the titre of the antiviral activity, simplicity of manipulation and efficiency of purification , the method of inducing duck interferon with spleen cells was found to be superior to that using duck whole blood cells. The $L_9(3^4)$ orthogonal comparison tests (three kinds of cell culture media, Lactalbumin hydrolysate, M199, RPMI 1640; three spleen leukocyte concentrations, $2 \times 10^7/\text{ml}$, $1 \times 10^7/\text{ml}$, $0.5 \times 10^7/\text{ml}$; three inducers of interferon, NDV strain F, Sendai virus, Poly I : C) indicated that the best combination of the conditions for inducing duck spleen interferon was Lactalbumin hydrolysate — $2 \times 10^7/\text{ml}$ — NDV strain F. Ten per cent new-born calf serum in the culture media was essential to induce duck interferon. Using this combination, after 20—24 hours' incubation at 39°C on a roller drum , the titre of duck spleen interferon could consistently reach above 2000u/ml. Assay of the physio-chemical properties and biological activities indicated that the antiviral substances of the present study could be identified as the duck interferon α .

The method of salting out with ammonium sulfate could concentrate and purify the duck interferon, and the titre of the final concentrated product could reach 10000u/ml.