

人 α -干扰素批量生产时诱生条件的探讨

曾锡新 陈文健 徐煜庭

(江苏省无锡市红十字中心血站, 无锡 214021)

摘要 α -干扰素诱生过程中, 诸多因素均可影响到干扰素的产量。我们对诱生条件中的关键因素白细胞分散度及pH进行了探讨。结果表明人血清能有效地分散白细胞, 使干扰素效价明显高于对照组($P < 0.05$)。诱生过程中, 定时调节与不调节pH对干扰素效价无明显影响($P > 0.05$)。

关键词 α -干扰素 白细胞分散度 pH

α -干扰素是人白细胞在适宜的诱生剂作用下产生的具有抗病毒繁殖、抗肿瘤及免疫调节等多种生物活性的一种糖蛋白。在其诱生过程中, 白细胞的质与量、温度、pH、细胞分散程度等均可影响到干扰素的产量。我们对白细胞分散度及pH进行了探讨和改进, 从而使 α -干扰素效价明显提高, 产量稳定, 为批量生产 α -干扰素提供了简便易行的工艺流程。

1 材料和方法

1.1 血液成份

1.1.1 人血白细胞: 从含ACD抗凝剂的新鲜正常人血液, 离心分浆, 提取白细胞层。

1.1.2 人AB型血清: 由本站从人AB型血液中提取。

1.2 试剂: RPMI—1640, 美国GIBCO公司生产, 同时加1%卡那霉素(终浓度2万u/ml)、2%人AB型血清, 配成培养液。

1.3 病毒株

1.3.1 鸡新城疫病毒(NDV)F株: 由北京病毒所提供, 用鸡胚培养及直接血凝法检测。

1.3.2 水泡性口炎病毒(VSV)Indine株: 由北京病毒所提供。在鸡胚纤维母细胞中传代及细胞病变法检测, 按Reed-Muench法计算TCID₅₀。

1.4 α -干扰素生产按文献[1]方法进行。

1.5 α -干扰素诱生方法

1.5.1 人血白细胞用0.83%氯化铵溶液洗涤, 离心去除红细胞后, 得到纯化浓缩的白细胞, 再用含人血清(终浓度2%)的培养液分散之, 以不含人血清的

培养液分散白细胞为对照组, 观察干扰素诱生过程中白细胞的凝聚程度及其对效价的影响。

1.5.2 取含 10^7 活细胞/ml 白细胞悬液, 等量分装两只培养瓶进行诱生, 起动后每小时测 pH 一次。测后一瓶调整 pH 至 7.4 ± 0.1 , 另一瓶不调 pH 为对照组。观察干扰素诱生过程中 pH 的变化及其对

效价的影响。

1.6 α -干扰素效价测定按文献[2]方法进行。

2 结果和讨论

2.1 白细胞凝聚程度对干扰素效价影响结果见表 1。

表 1 白细胞凝聚程度对干扰素效价的影响

	白 细 胞 分 散 度			干扰素效价 (Ig IU/ml) $\bar{x} \pm S.D$	P 值
	凝聚程度	凝块状态	光镜下所见*		
实验组	轻微	细丝或小片状, 数毫米长 搅拌数小时后即分散	由几~十几个细胞 凝聚的小块	4.25 ± 0.16	$P < 0.05$
对照组	严重	大片或块状, 可长达数 厘米, 不易再分散。	纤维样物质包裹 大呈白细胞形成凝块	2.33 ± 0.16	

*取凝块置于生理盐水中, 吹打分散后, 制成压片, 镜检

白细胞本身有易凝聚特性。在诱生过程中常凝成大团块, 不易再分散。凝块内白细胞因不能有效地与营养液接触, 交换物质, 使细胞代谢受阻, 干扰素合成减少。同时凝块也降低了白细胞的有效浓度。大量文献已证实, 诱生时白细胞浓度达 1×10^7 ml 时, 方能保持干扰素的高效价^{[1][3]}。文献亦报导了批量生产时, 白细胞凝聚可使干扰素产量下降 89%^[4]。为防止白细胞凝聚, 我们曾采用提高温度、改变 pH 及营养液中各种成份加入的顺序、反复吹打等方法, 但均未成功, 后来改用人血清吹打、分散白细胞, 诱生时无大凝块出现, 且经搅拌数小时后小凝块也消失, 干扰素效价明显提高。结果证明: 人血清能有效地分散白细胞, 保证了批量生产时的高效价及稳产。

2.2 通常生产干扰素的 pH 为 7.2~7.4。白细胞在诱生剂作用下合成干扰素时, 代谢旺盛, 产生大量乳酸^{[5][6]}, 使 pH 下降。干扰素诱生过程中, pH 呈线性下降, 最初 3—4 h, pH 下降快, 为 $0.1 \pm /h$; 后减慢为 $0.05 \pm /h$ 。诱生 18—20 h, pH 下降 0.6 左右。为此, 有些单位通宵值班, 定时调节 pH, 繁琐不便。为简化工艺, 我们连续对照试验了三批, 比较两组的干扰素效价, 结果见表 2。结果表明: 定时调节与不调节 pH 对干扰素效价无明显影响。

NDV 作为干扰素的诱生剂, 但 NDV 液的 pH 约 8.0 左右, 故加入营养液后, 使营养液 pH 高达 7.7—7.8。高 pH 诱生是否会影响干扰素的效价?

为此, 我们又连续试验了四批, 用高 pH (7.8—7.9) 起始诱生, 结果效价都在 2 万 IU/ml 以上, 推测在高 pH 环境中有利于 NDV 的活性, 如吸附、穿入等, 从而有效地刺激白细胞产生大量干扰素。诱生 4 h 后, 干扰素开始并逐渐从白细胞中大量释放出来^[6], 此时 pH 已降至 7.4 左右, 适合白细胞的代谢。这样, 在整个诱生过程中, 从病毒吸附到白细胞产生大量干扰素并释放到细胞外, 都处于一个与之相适应的 pH 环境中, 从而使干扰素产量较高且稳定, 此或许是不调节 pH 组干扰素效价略高的原因。

参 考 文 献

- 1 杜平, 等. 医用干扰素学. 上海: 上海微生物学会干扰素组出版, 1980; 127~136
- 2 杜平, 等. 医用实验病毒学. 北京: 人民军医出版社出版, 1985; 196~201
- 3 KARI CANTELL, et al. Methods in Enzymology Volume 78 Interferons Part A. Sidney Pestka (Eds) New York Academic Press, Inc. 1981; 29~38
- 4 赵海燕, 等. 批量生产临床级人血白细胞干扰素条件的研究. 内部资料, 1982; 26~42
- 5 B. Horowitz. Methods in Enzymology Volume 119 Sidney Pestka (Eds) New York Academic Press, Inc. 1986; 486~495
- 6 侯云德, 等. 干扰素及其临床应用. 北京: 人民卫生出版社出版, 1980; 160~172

收稿日期: 1993-11-22