

家蚕细胞基因工程人 α 干扰素对小鼠的免疫调节作用

李 放 王 A¹ 王秋娟 高文青²(南京 210009 中国药科大学生理教研室;¹ 中国药科大学生化研究室;² 中国药科大学新中新药筛选中心)

摘要 目的:观察家蚕细胞基因工程 α_1 干扰素(rhIFN- α_1)对小鼠的免疫调节作用。方法:采用测定环磷酰胺 30 mg/kg 免疫抑制小鼠碳粒廓清速率,血清溶血素的方法观察 rhIFN- α_1 0.1, 0.4, 1.2 $\times 10^6$ IU/kg 对校正廓清指数,脾脏和胸腺重量以及溶血血红蛋白值的影响;利用离体胸腺细胞与 rhIFN- α_1 15000, 1500, 150 IU/ml 共孵,观察(rhIFN- α_1)对胸腺细胞的增殖作用。结果:rhIFN- α_1 增强免疫抑制小鼠巨噬细胞对碳粒的吞噬作用,使廓清指数增加($P < 0.01$),脾脏重量增加($P < 0.01$),血红蛋白值有所增加;但 rhIFN- α_1 1.2 $\times 10^6$ IU/kg 却能使正常小鼠的血红蛋白值大幅度增加;rhIFN- α_1 1500, 15000 IU/ml 能促使胸腺细胞增殖,且 15000 IU/ml 能促进 0.1% PHA 的增殖作用($P < 0.05$)。结论:家蚕细胞基因工程人 α_1 干扰素多方面地对小鼠的免疫具有增强作用。

关键词 蚕;干扰素;碳粒廓清指数;体液免疫;细胞免疫

The immune regulation of rhIFN- α in mice

Li Fang(Li F), Wang Ming(Wang M), Wang Qiujuan(Wang QJ), *et al* (*Department of Physiology, Nanjing 210009*)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To observe the immunity effects rhIFN- α_1 (recombined interferon- α_1 using with genes of Chinese silkworm) on mice. **METHOD:** Measuring the serum phagocytic index, weight of the immune organ (spleen and thymus) and hemolytic hemoglobin of rhIFN- α_1 0.1, 0.4 and 1.2 $\times 10^6$ IU/kg in immunatory inhibited mice with cyclophosphamide (30 mg/kg). Observe the proliferation effects of rhIFN- α_1 by incubation of thymus cells with rhIFN- α_1 of 15000, 1500 and 150 IU/ml. **RESULTS:** rhIFN- α_1 enhanced the phagocytosis to carbon in immunatory inhibited mice, and increased the serum phagocyte index ($P < 0.01$); it also increased the weight of spleen ($P < 0.05$) and the hemolytic hemoglobin value. rhIFN- α_1 1.2 $\times 10^6$ IU/kg improved the hemolytic hemoglobin greatly in normal mice; rhIFN- α_1 1500, 15000 IU/ml accelerated the proliferation of lymphocyte in mice, and rhIFN- α_1 15000 IU/ml enhanced the proliferation effects of 0.1% PHA ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** rhIFN- α_1 showed the immunatory improvement in mice at different aspects

KEY WORDS silkworm, rhIFN- α_1 , phagocyte index, humoral immunity, cellular immunity.

生物免疫修饰剂对免疫细胞(包括 T, B, M ϕ , NK 细胞等)具有调节作用。中国人民解放军南京军区南京军事医学研究所用家蚕核多角体病毒作为载体,家蚕

细胞为宿主细胞,利用基因工程方法,高效地表达了人 α 干扰素(rhIFN- α_1)。本文通过碳粒廓清实验,血清溶血素测定以及淋巴细胞增殖反应各项实验,探讨 rhIFN-

α_1 的免疫作用。

1 材 料

家蚕细胞基因工程人 α 干扰素(南京军事医学研究所分子遗传室, 3×10^6 IU/2 ml, 批号 960201)。MTT (噻唑兰)(SERVA 分装, 上海华美生物技术公司, 批号: BS0028)。环磷酰胺(上海第十制药厂)。培养液为加有双抗的 RPMI-1640, 并加入 10 % 小牛血清。印度墨汁(INDIANINK)(上海长江日用粘合材料厂)。

2 动 物

昆明种小鼠, 体重 19 ~ 25 g, 购于中国药科大学动物室。

3 统计方法

t 检验。

4 方法与结果

4.1 非特异性免疫-小鼠碳粒廓清速率的测定^[1, 2]

小白鼠 60 只, 18 ~ 22 g, 按体重随机分成 6 组, 雌雄

表 1 ($n = 10$)

Group	Dose	BW.		Wt. of Liver/BW. / mg·kg ⁻¹	Wt. of Spleen / BW. / mg·kg ⁻¹	Wt. of Thymus / BW. / mg·kg ⁻¹
		pre-dose/g	death/g			
control		20.8 ± 1.0	22.4 ± 3.2	54 ± 7	3.7 ± 0.9	3.1 ± 0.8
cy	30 mg/kg	20.4 ± 0.9	23.1 ± 3.1	62 ± 6 ^{*1}	2.7 ± 0.4 ^{*2}	1.4 ± 0.3 ^{*2}
rhIFN- α_1	0.1 × 10 ⁶ IU/kg	20.5 ± 1.1	24.1 ± 3.1	64 ± 11 ^{*1}	4.6 ± 1.0 ^{*1, *4}	2.5 ± 0.7 ^{*4}
	0.4 × 10 ⁶ IU/kg	20.9 ± 0.7	23.6 ± 3.1	66 ± 17	4.4 ± 1.4 ^{*4}	3.1 ± 0.9 ^{*4}
	1.2 × 10 ⁶ IU/kg	21.1 ± 1.0	23.8 ± 2.3	60 ± 17	5.7 ± 1.3 ^{*2, *4}	3.0 ± 11 ^{*4}
rhIFN- α_1 + cy	1.2 × 10 ⁶ IU/kg	21.0 ± 0.8	23.0 ± 2.4	59 ± 6	2.9 ± 0.6 ^{*1, *3}	1.5 ± 0.4 ^{*2}
	+ 30 mg/kg					

注: ^{*1}: $P < 0.05$, ^{*2} $P < 0.01$, vs control; ^{*3} $P < 0.05$, ^{*4} $P < 0.01$ vs cy

表 2 ($n = 10$)

Group	Dose	BW		K(× 10 ⁻³)	α
		pre-dose(g)	death(g)		
Control		20.8 ± 1.0	22.4 ± 3.2	4.315 ± 1.47	3.03 ± 0.31
cy	30 mg/kg	20.4 ± 0.9	23.1 ± 3.1	2.196 ± 0.59 ^{*2}	1.96 ± 0.36 ^{*2}
rhIFN- α_1	0.1 × 10 ⁶ IU/kg	20.5 ± 1.1	24.1 ± 3.1	5.379 ± 1.64	2.75 ± 0.50 ^{*4}
	0.4 × 10 ⁶ IU/kg	20.9 ± 0.7	23.6 ± 3.1	8.153 ± 1.83 ^{*2, *3}	2.21 ± 0.80 ^{*4}
	1.2 × 10 ⁶ IU/kg	21.1 ± 1.0	23.8 ± 2.3	6.229 ± 1.91 ^{*1}	3.00 ± 0.20 ^{*4}
rhIFN- α_1 + cy	1.2 × 10 ⁶ IU/kg	21.0 ± 0.8	23.0 ± 2.4	6.893 ± 1.77 ^{*3}	2.94 ± 0.43 ^{*4}
	+ 30 mg/kg				

注: ^{*1}: $P < 0.05$, ^{*2} $P < 0.01$, vs control; ^{*3} $P < 0.05$, ^{*4} $P < 0.01$ vs cy

4.2 体液免疫-血清溶血素的测定^[1]。

小白鼠 60 只, 18 ~ 23 g, 按体重随机分成对照组, rhIFN- α_1 1.2 × 10⁶ IU/kg, 0.4 × 10⁶ IU/kg, 0.1 × 10⁶ IU/kg 组, 环磷酰胺 30 mg/kg, 及 rhIFN- α_1 1.2 × 10⁶ IU/kg 与环磷酰胺 30 mg/kg 合用组。每组雌雄各半。rhIFN- α_1 im,

各半。分别为对照组, 环磷酰胺 30 mg/kg 组, rhIFN- α_1 1.2 × 10⁶ IU/kg, 0.4 × 10⁶ IU/kg, 0.1 × 10⁶ IU/kg 组, 以及 rhIFN- α_1 1.2 × 10⁶ IU/kg 与环磷酰胺 30 mg/kg 合用组, rhIFN- α_1 im, 连续给药 7 d, 而环磷酰胺则为 ip, 测试前连续给 3 d, 给药第 8 天, 每鼠尾静脉 iv, 稀释 5 倍的印度墨汁 0.05 ml/10 g, 而后 3, 6, 9, 12 和 15 min 从眼眶采血, 每次采血 20 μ l, 加入 2 ml 0.1 % Na₂CO₃ 溶液中摇匀, 1 h 后, 在 680 nm 下比色。15 min 采血后立即放血处死, 取肝、脾、胸腺, 称重。计算廓清指数及校正廓清指数 α 。以 3, 6, 9, 12 和 15 min 的 OD 值回归直线得 k, $\alpha = k^{1/3} \times \text{体重} / (\text{肝重} + \text{脾重})$ 。

结果见表 1 及表 2。表明 rhIFN- α_1 有增加非特异性免疫功能的作用, 它增加脾及胸腺重量, 使校正廓清指数较环磷酰胺 30 mg/kg 单独使用增加($p < 0.01$), 能够提高环磷酰胺小鼠的免疫力。

连续给药 7 d, 而环磷酰胺则为 ip, 测试前连续给 3 d; 给药第 4 天, 给以 0.2 ml 20 % 的绵羊红细胞(SRBC)。免疫 4 d 后, 即给药第 8 天, 放血处死, 分离血清。每组的血清混合于试管中, 用生理盐水作对倍稀释(1:25, 1:50, 1:100, 1:400, 1:800)。

取 3 只豚鼠, 颈动脉放血, 37 ℃ 水浴放置 1 h, 用长

针头剥离血凝块,1500r/min 离心 10min,取血清,所得血清混合,用 SRBC 在 4℃下吸收 30min,得补体。

取不同稀释度的血清 1ml 置试管内,放入冰水浴中,依次加入 10%SRBC 悬液 0.5ml,1:10 稀释的豚鼠血清 1ml。另设不加补体而以生理盐水代替的对照管。移置 37℃温箱中,保温 10min,孵毕,放入冰浴以终止反应。2000r/min 离心 10min。取上清液与都氏试剂 (NaHCO₃ 1.0g,氰化钾 0.05g,高铁氰化钾 0.2g,双蒸水 表 3 (n=10)

Group	Dose	B W/ POST-dose	B W/ post-dose	HC ₅₀
Control		22.8 ±1.1	25.6 ±2.5	3.36
cy	30mg/kg	22.1 ±1.0	23.3 ±2.5 ^{*2}	2.66
rhIFN α	0.1 × 10 ⁶ IU/kg	22.2 ±2.2	25.3 ±1.7 ^{*3}	4.28
	0.4 × 10 ⁶ IU/kg	22.0 ±1.9	26.1 ±2.2 ^{*3}	7.41
	1.2 × 10 ⁶ IU/kg	22.1 ±1.2	26.0 ±1.9 ^{*3}	11.11
rhIFN α + cy	1.2 × 10 ⁶ IU/kg + 30mg/kg	22.4 ±1.5	23.3 ±2.5 ^{*2}	2.89

注: ^{*1} P < 0.05, ^{*2} P < 0.01 vs control; ^{*3} P < 0.05, ^{*4} P < 0.01 vs cy

4.3 细胞免疫—淋巴细胞增殖反应^[1]

取 2 只小鼠断颈处死,放入 75%酒精中浸泡,取胸腺,剔除结缔组织,通过消毒的不锈钢筛网将细胞筛入放有 Hank's 液的消毒平皿中,反复用 Hank's 液冲洗以去除血细胞,用 RPMI-1640 稀释使细胞数大约 1 × 10⁷ 个/ml;显微镜下观察细胞生长良好;将其接种于 96 孔培养板,与不同的药物孵育,每孔细胞数相同,体积相等,分为对照组、0.1%PHA + 15000IU/ml rhIFN α_1 、15000IU/ml rhIFN α_1 、0.1%PHA + 1500IU/ml rhIFN α_1 、1500IU/ml rhIFN α_1 、0.1%PHA + 150IU/ml rhIFN α_1 、150IU/ml rhIFN α_1 以及 0.1%PHA 各组。细胞与药物共孵 72h,静置,轻吸弃上清 100 μ l,加入 MTT (1mg/ml)100 μ l,微量振荡器振荡 1min,37℃孵育 3h,轻吸上清,加酸化异丙醇 120 μ l,混匀,570nm 在 DG3022 型酶联免疫分光光度计测定 OD 值。

结果表明家蚕基因工程人干扰素- α (rhIFN α_1)呈剂量依赖性的促使淋巴细胞(主要是 T 淋巴细胞)的增殖,rhIFN α_1 三个剂量与 NS 相比,15000IU/ml 和 1500IU/ml 有显著性差异。见表 4。

5 讨论

干扰素是一种高活性蛋白质。由于它对病毒性疾病的防治效果以及它对治疗肿瘤,引起了许多临床工作者的兴趣。本实验中利用小鼠碳粒廓清实验,发现 rhIFN α_1 能使小鼠脾及血液中吞噬细胞数量增多,免疫器官包括脾及胸腺重量增加。这与文献报导 IFN α 使枯否氏细胞体积增大,数量扩增,H₂O₂ 释放量增表 4

加至 1000ml)反应,在分光光度计 540nm 波长比色,测定血红蛋白值。

结果表 3。表明 rhIFN α_1 能使溶血血红蛋白值增高(rhIFN α_1 3 个剂量组的 HC₅₀ 分别为 4.28,7.41 和 11.11),也即产生抗体增加,表明 rhIFN α_1 使体液免疫功能增强。但就 rhIFN α_1 1.2 × 10⁶ IU/kg 与 cy 30mg/kg 合用组而言,它的 HC₅₀ 为 2.89,与 cy 30mg/kg(2.66)相差不大。

Group	Concentration	OD value
control		0.52 ±0.072
0.1 %PHA		0.71 ±0.084
rhIFN α_1	15000IU/ml	0.79 ±0.073 ^{*2}
	1500IU/ml	0.76 ±0.082 ^{*1}
	150IU/ml	0.61 ±0.103
0.1 %PHA + rhIFN α_1	15000IU/ml	0.92 ±0.065 ^{*2,*3}
	1500IU/ml	0.88 ±0.078 ^{*2}
	150IU/ml	0.71 ±0.096

注: ^{*1} P < 0.05, ^{*2} P < 0.01 vs control; ^{*3} P < 0.05 vs 0.1%PHA group.

加^[3-7],以及腹腔巨噬细胞活化^[8]一致。

杨林花等^[9]发现 IFN α 能使因羟基腺引起的白细胞减少现象有所改善,并且会使细胞发生细胞遗传学反应。实验中,我们发现注射 rhIFN α_1 使细胞免疫力功能增强,淋巴细胞总数(因为取的是胸腺,故主要 T 细胞)增加,MTT 法测得的活细胞数增加。因此,推测注射 rhIFN α_1 后,可增强机体的细胞免疫状态,提高淋巴细胞及 NK 数量与活性,增强自发的细胞介导细胞毒作用从而增强机体抗肿瘤作用。

实验中,rhIFN α_1 能够增加已利用绵羊红细胞作为抗原免疫的小鼠发生大量红细胞溶血,测定的血清溶血素值升高,表明小鼠体液免疫功能增强,抗体产生力增强。同时证明了 rhIFN α_1 能增强肿瘤细胞特异性抗原的表达,也可加强肿瘤抗体的产生,从而在补体和抗体依赖性细胞毒性白细胞的参与下可以增强对肿瘤细

胞的溶解作用。

对家蚕细胞基因工程人 α_1 —干扰素对特定的免疫细胞以及免疫作用机理还需进一步的研究。

参考文献

- 1 徐淑云,卞如濂,陈修主编.药理实验方法学.,1991,1221:1234.
- 2 戴岳,黄罗生,冯国雄,等.地肤子对单核巨噬系统及迟发型超敏反应的抑制作用.中国药科大学学报,1994,25(1):44.
- 3 白咸勇,成令忠,顾云娣,等.干扰素和卡介苗对肝癌大鼠枯否细胞释放 TNF 和 IL-1 的影响.上海医科大学学报,1995,22(3):177.
- 4 成令忠,韩伟,钟翠平,等.肝癌患者用免疫制剂后单核细

胞及枯否细胞体外抗人肝癌细胞效应.上海医科大学学报,1990,17(5):321.

- 5 白咸勇,成令忠.生物免疫制剂对大鼠枯否细胞释放 H_2O_2 的影响.解剖学杂志,1994,17(4):293.
- 6 白咸勇,成令忠.生物免疫制剂对大鼠枯否细胞数量和体积的影响.上海医科大学学报,1994,21(4):258.
- 7 白咸勇,成令忠.免疫制剂对肝癌大鼠单核巨噬细胞增殖作用的影响.解剖学杂志(增刊),1994,17:188.
- 8 Fleischmann CM, Fleischmann, W. R. Jr. Enhanced in vitro macrophage cytotoxicity IFN-treated B16 melanoma cells. J. Biol. Regul. Homeostatic Agents, 1995, 9(4): 139.
- 9 杨林花,候锐刚,乔振华.联合应用 α 干扰素和羟基脲治疗慢性粒细胞白血病疗效的观察.中国内科杂志,1995,34(10):702.

收稿日期:1998-06-23