

# 利用圆二色谱和流式细胞术分析干扰素- $\alpha$ 的构象与其抗病毒活性的相关性

胡茂志<sup>1,2,3\*</sup>, 李文华<sup>4\*</sup>, 严秋香<sup>1</sup>, 杨艳<sup>1</sup>, 孙庆<sup>1</sup>, 潘志明<sup>1,2</sup>, 崔桂友<sup>4</sup>, 焦新安<sup>1,2</sup>

1 扬州大学 江苏省高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

2 扬州大学 江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏 扬州 225009

3 扬州大学 江苏省动物预防医学重点实验室, 江苏 扬州 225009

4 扬州大学旅游烹饪学院 (食品科学与工程学院), 江苏 扬州 225009

胡茂志, 李文华, 严秋香, 等. 利用圆二色谱和流式细胞术分析干扰素- $\alpha$  的构象与其抗病毒活性的相关性. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1651–1659.

Hu MZ, Li WH, Yan QX, et al. Relationship of interferon- $\alpha$  between its conformation and anti-viral property analyzed by circular dichroism and flow cytometry. Chin J Biotech, 2015, 31(11): 1651–1659.

**摘 要:** 利用圆二色谱 (Circular dichroism, CD) 和流式细胞术 (Flow cytometry, FCM) 分析干扰素 (Interferon, IFN)- $\alpha$  的构象与其抗病毒活性之间的关系。以重组人 IFN- $\alpha$  (rIFN- $\alpha$ 2b 和 rIFN- $\alpha$ 2a) 为材料, 变温 CD 谱分析表明, 在 65 °C 以下, 两种 IFN- $\alpha$  的二级结构相对稳定, 当温度高于 65 °C 以后, 两者的二级结构发生不可逆的改变。FCM 分析构象变化前后 IFN- $\alpha$  的抗病毒活性发现, 构象的改变一定程度上减弱了其抗病毒活性。rIFN- $\alpha$ 2b 和 rIFN- $\alpha$ 2a 具有相似的变化趋势。以上结果表明, IFN- $\alpha$  的构象是影响其抗病毒活性的重要因素之一, 同时也验证了 CD 结合 FCM 是分析蛋白质药物构象与其细胞水平上生物学活性相关性的较好组合。

**关键词:** 圆二色谱, 流式细胞术, 干扰素- $\alpha$ , 构象, 抗病毒活性

**Received:** December 19, 2014; **Accepted:** March 23, 2015

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31372414), Analysis and Test Research Project of Jiangsu New Technology and Method (No. BZ201208), Open Project of Key Laboratory of Jiangsu Preventive Veterinary Medicine (No. K13040).

**Corresponding authors:** Xin'an Jiao. Tel/Fax: +86-514-87971136; E-mail: jjiao@yzu.edu.cn

Maozhi Hu. Tel/Fax: +86-514-87979244; E-mail: mzhhu@yzu.edu.cn

\*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (No. 31372414), 江苏省大仪平台分析测试新技术新方法研究课题 (No. BZ201208), 江苏省动物预防医学重点实验室开放课题 (No. K13040) 资助。

网络出版时间: 2015-05-06

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150506.0919.002.html>

# Relationship between interferon- $\alpha$ conformation and its anti-viral activity determined by circular dichroism and flow cytometry

Maozhi Hu<sup>1,2,3\*</sup>, Wenhua Li<sup>4\*</sup>, Qiuxiang Yan<sup>1</sup>, Yan Yang<sup>1</sup>, Qing Sun<sup>1</sup>, Zhiming Pan<sup>1,2</sup>, Guiyou Cui<sup>4</sup>, and Xin'an Jiao<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

<sup>2</sup> Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

<sup>3</sup> Key Laboratory of Jiangsu Preventive Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

<sup>4</sup> College of Tourism & Cuisine (College of Food Science and Engineering), Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

**Abstract:** The relationship between the conformation of interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) and its anti-viral activity were analyzed by circular dichroism (CD) and flow cytometry (FCM) techniques. The recombinant human IFN- $\alpha$  (rIFN- $\alpha$ 2b and rIFN- $\alpha$ 2a) were used. CD spectra from 190 nm to 240 nm indicated that two the IFN- $\alpha$  showed stable secondary structure at 65 °C, but unstable when the temperature was above 65 °C, and the change was irreversible. FCM data of the anti-viral activity of IFN- $\alpha$  indicated that the change of its secondary structures partly weakened its anti-viral activity. The rIFN- $\alpha$ 2b and rIFN- $\alpha$ 2a showed the same phenomenon. These data indicated that the conformation of IFN- $\alpha$  is one of the factors to influence its anti-viral activity and the combination of CD and FCM is a good method to analyze the relationship between the conformation of protein drugs and their biological activities in single cell level.

**Keywords:** circular dichroism, flow cytometry, interferon- $\alpha$ , conformation, antiviral activity

蛋白质药物与小分子药物相比,具有高活性、特异性强、低毒性、生物功能明确、有利于临床应用的特点。由于其成本低、成功率高、安全可靠,已成为医药产品中的重要组成部分。1982年,美国 Likky 公司首先将重组胰岛素投放市场,标志着第一个重组蛋白质药物的诞生。作为治疗性蛋白质药物,不仅需要其氨基酸序列正确,而且,往往还需要正确的空间结构<sup>[1]</sup>。若构象改变,其生物学功能也可能发生变化。在生产、运输、储藏过程中,蛋白质药物由于外界条件的改变,可能会引起变性,进而影响其生物学活性的发挥<sup>[2-3]</sup>。另外,细胞是生命活动的基本单位,药物对机体的作用必然呈现在细胞水平上的变化。因此,探索蛋白质药物在细胞水平上的生物学功能与其空间

结构的相关性,对于药物的临床应用具有重要意义。目前,已经有多种方法可以用于蛋白质结构与功能的研究。其中,圆二色谱 (Circular dichroism, CD) 可以分析溶液状态下蛋白质的构象,能够反映其自然状态的性质,是药物构象研究的常用技术<sup>[4]</sup>。流式细胞术 (Flow cytometry, FCM) 是单细胞水平上研究细胞功能的常用技术<sup>[5]</sup>。两者结合,是研究蛋白质构象与其在细胞水平上的生物学功能的较好组合。

干扰素- $\alpha$  (Interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ) 是由 5 个  $\alpha$ -螺旋组成的球状结构,能够诱导抗病毒活性<sup>[6-7]</sup>。利用基因工程手段获得的重组原核表达产物 rIFN- $\alpha$ 2b 和 rIFN- $\alpha$ 2a 仍然具有该活性<sup>[8-9]</sup>,并已经被批准用于临床治疗<sup>[10]</sup>,如针对乙肝、丙肝、恶性黑色素瘤等疾病<sup>[11-12]</sup>。目前,关于

IFN- $\alpha$  构象的改变在多大程度上影响其抗病毒活性的发挥鲜有明确报道, 另外, 如何评价蛋白质药物的构象与其活性之间的相关性也尚无标准方法可以借鉴。本实验以 rIFN- $\alpha$ 2b 和 rIFN- $\alpha$ 2a 为材料, 利用 CD 和 FCM 技术相结合, 分析其在变温条件下的构象变化, 以及构象变化前后对其抗病毒活性的影响。同时, 探讨 CD 和 FCM 技术组合在分析蛋白质药物的构象与其生物学活性的相关性方面的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

人宫颈癌细胞 HeLa 细胞为江苏省人兽共患病学重点实验室保存。表达绿色荧光蛋白 (Green fluorescence protein, GFP) 的新城疫病毒 NDV (GFP) 由江苏省高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心保存。重组人 IFN- $\alpha$  (rIFN- $\alpha$ 2b 和 rIFN- $\alpha$ 2a) 为厦门特宝生物工程股份有限公司产品; 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 为美国 Gibco 公司产品; 无酚红 DMEM 为美国 Promega 公司产品。

J-810 圆二色谱仪为日本 Jasco 公司产品; FACS Aria 流式细胞仪 (分析软件为 FACSDiva) 为美国 BD 公司产品; TS100-F 倒置显微镜为日本尼康公司产品。Cary5000 紫外分光光度计为美国 Varian 公司产品。

### 1.2 利用 CD 谱分析蛋白质构象

为了分析 rIFN- $\alpha$ 2b 和 rIFN- $\alpha$ 2a 在变温过程中构象的变化, 利用圆二色谱仪记录远紫外 (190–250 nm) CD 谱。利用 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液 (Phosphate-buffered saline, PBS) 稀释样品, 浓度均为 0.2 mg/mL。具体参数: 扫描速度

(Scanning speed) 为 100 nm/min, 响应时间 (Response) 为 4 s, 光程 (Cell length) 为 0.2 cm, 带宽 (Band width) 为 1 nm, 灵敏度 (Sensitivity) 为 Standard (100 mdeg), 数据步长 (Data pitch) 为 0.1 nm, 重复测量次数 (Accumulation) 为 4。

在变温过程中, 利用 JULABO F-12 变温附件控制样品架的温度, 用 CDF-426L Pelitier 自动调温附件控制样品温度, 温度范围 (Temperature range) 为 5–80 °C, 变温速度 (Temperature slope) 为 1 °C/min, 延迟时间 (Delayed time) 为 1 min。升温过程中, 每间隔 5 °C 记录一次。升温结束后选择“返回初始温度”, 即返回 5 °C (F5 °C)。变温处理后的样品分别命名为 rIFN- $\alpha$ 2at 和 rIFN- $\alpha$ 2bt。以 PBS 的 CD 谱作为基线, 所有样品的 CD 谱均为扣除背景基线后的结果。

用二级结构分析软件“Secondary Structure Estimation (以 Yang 等<sup>[13]</sup>为参考)”分析以上 CD 谱的二级结构比例, 包括  $\alpha$ -螺旋 (Helix)、 $\beta$ -折叠 (Sheet)、 $\beta$ -转角 (Turn) 和不规则卷曲 (Random coil)。

### 1.3 SDS-PAGE 分析

为了分析变温处理过程中, rIFN- $\alpha$ 2bt 和 rIFN- $\alpha$ 2at 的降解情况。选用 12% 的分离胶, 对变温处理前、后的样品进行 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), 凝胶置于 R-250 染色液中染色 4 h, 然后, 转入脱色液中脱色, 拍照。

### 1.4 利用 FCM 分析抗病毒活性

将 HeLa 细胞 ( $3 \times 10^5$  细胞/mL) 加入 96 孔组织培养板中。37 °C 培养 2 h, 待细胞长成单

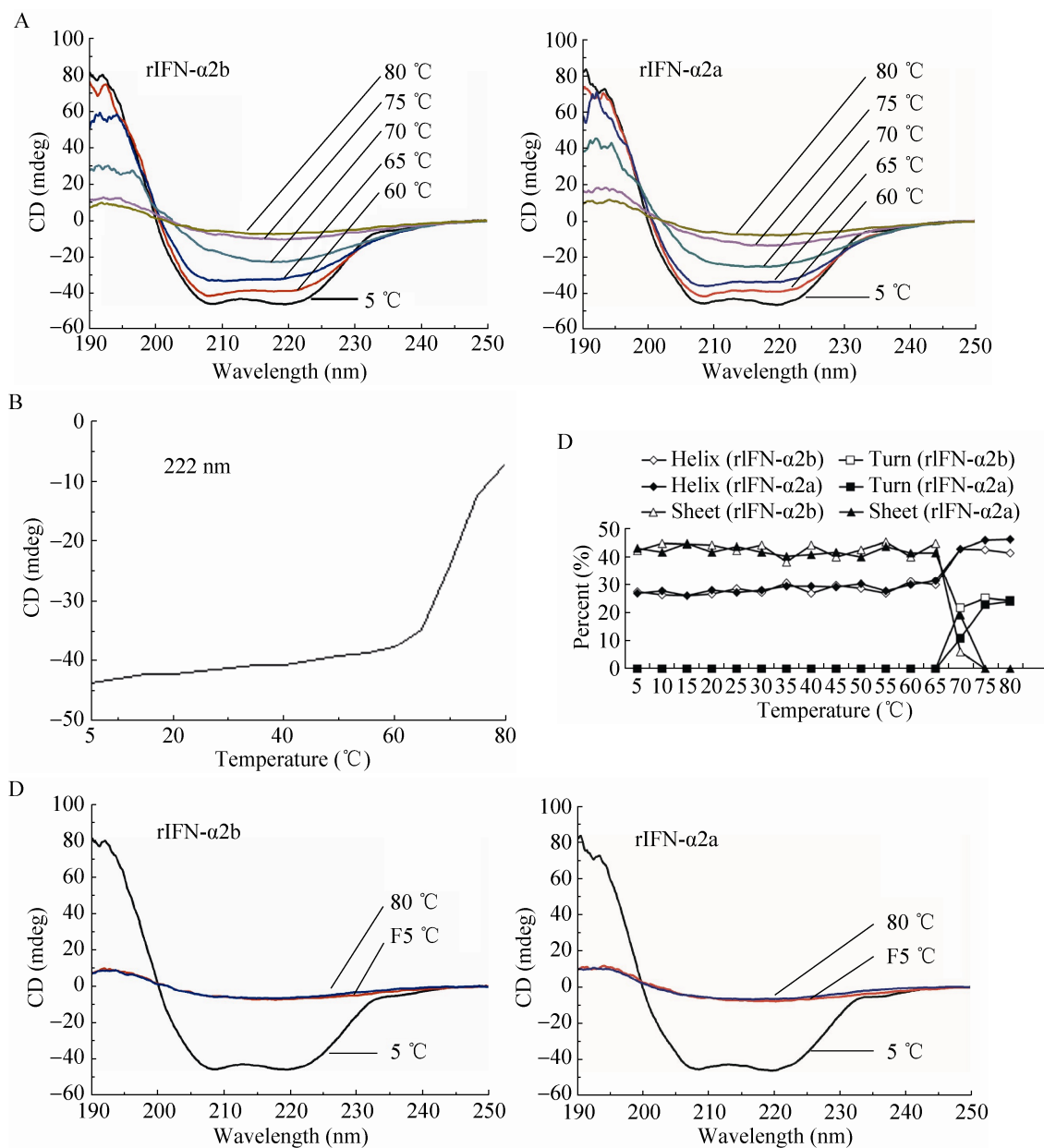


图 1 变温 CD 谱分析

Fig. 1 Circular diachroism (CD) analysis during thermal denaturation. (A) CD spectra of rIFN-α2 at 5 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C and 80 °C, respectively. (B) CD signals of rIFN-α2b at 222 nm during thermal denaturation. (C) CD spectra of rIFN-α2 at the initial 5 °C, 80 °C and the final 5 °C (F5 °C). (D) Secondary structure contents of rIFN-α2.

层后, 将 rIFN-α2a 和 rIFN-α2b 以及 rIFN-α2at 和 rIFN-α2bt 用培养基分别稀释至 25 ng/mL, 再 5 倍梯度稀释后, 分别替换 96 孔板中的培养基。

孵育 18–24 h 后, 弃上清, 分别加入等体积的用培养基稀释的 100 TCID<sub>50</sub> 的 NDV (GFP)。孵育 16 h 后, 收集细胞, 充分洗涤后, 用 FCM 检测

GFP 阳性细胞数量<sup>[14]</sup>。以未用 IFN- $\alpha$  预处理但感染病毒的细胞作为对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 CD 谱分析

结果表明,在整个变温过程中, rIFN- $\alpha$ 2b 和 rIFN- $\alpha$ 2a 具有类似的变化趋势。在 5–60 °C 范围内,两者在 190–250 nm 范围内均呈现稳定的二级结构。在高于 60 °C 以后,随着温度的升高,反映  $\alpha$ -螺旋结构的 208 nm 和 222 nm 处的峰高逐渐降低(图 1A)。从 222 nm 处的变化也可以看出,60 °C 以后变化非常明显(图 1B)。温度又降低到 5 °C (F5 °C) 后,其 CD 谱和 80 °C 时相似(图 1C),说明其二级结构的改变是不可逆的。二级结构比例分析结果(图 2D) 也表明,65 °C 以后二级结构变化最为明显。分别将变温处理后的 rIFN- $\alpha$ 2bt 和 rIFN- $\alpha$ 2at 于 -20 °C 放置不同时间后,检测其构象的变化,结果表明,其 CD 谱与 F5 °C 时一致,这也进一步验证了其构象的不可逆变化。

### 2.2 SDS-PAGE 分析

在 SDS-PAGE 结果(图 2) 中,变温处理后

的 rIFN- $\alpha$ 2bt 和 rIFN- $\alpha$ 2at 依然呈现高浓度的蛋白条带,与变温处理前相似。说明短时间的变温处理未引起明显的蛋白质降解。

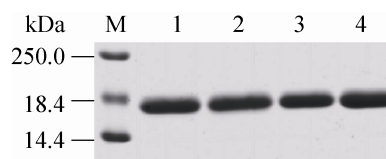


图 2 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE assay. M: protein marker; 1: rIFN- $\alpha$ 2at; 2: rIFN- $\alpha$ 2bt; 3: rIFN- $\alpha$ 2a; 4: rIFN- $\alpha$ 2b.

### 2.3 抗病毒活性分析

对于未用 rIFN- $\alpha$  处理的对照组,加入病毒并孵育 16 h 后,GFP 阳性细胞所占比率约为 60%。而预先用 rIFN- $\alpha$  孵育的 4 个组均低于对照组。相对于 rIFN- $\alpha$ 2b 处理组,在高浓度时, rIFN- $\alpha$ 2bt 处理组 GFP 阳性细胞所占比率与之相近,随着浓度的降低,特别是低于 1 ng/mL 时, rIFN- $\alpha$ 2bt 处理组的阳性率逐渐升高,与 rIFN- $\alpha$ 2b 处理组差异显著 ( $P < 0.05$ )。说明 rIFN- $\alpha$ 2bt 的抗病毒活性逐渐降低(图 3)。相对于 rIFN- $\alpha$ 2a 处理组, rIFN- $\alpha$ 2at 处理组也出现类似的变化趋势。

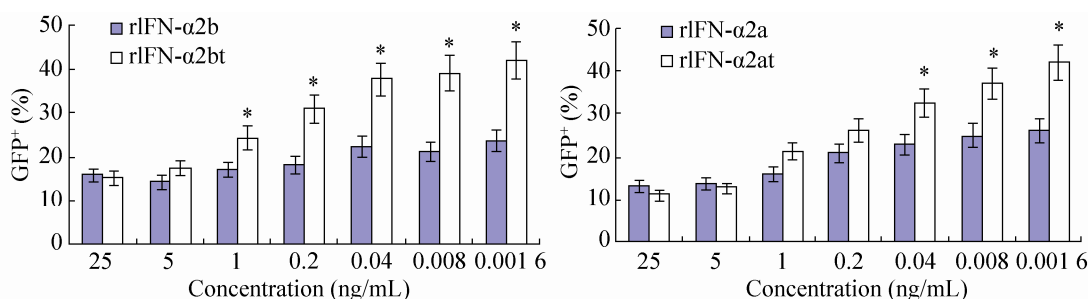


图 3 rIFN- $\alpha$ 2 的抗病毒活性分析

Fig. 3 Antiviral activity of rIFN- $\alpha$ 2 on Newcastle disease virus. Percentage of GFP-positive cells after incubation with serial diluted rIFN- $\alpha$ 2 and then with NDV (GFP).

### 3 讨论

IFN 是动物细胞在受到某些病毒感染后分泌的具有抗病毒活性的蛋白质。它能与周围未感染的细胞上的相关受体作用,促使这些细胞合成抗病毒蛋白,防止进一步感染,从而发挥抗病毒作用。IFN- $\alpha$  包括多个亚型<sup>[15-17]</sup>,其中,IFN- $\alpha$ 2b 和 IFN- $\alpha$ 2a 均为 165 个氨基酸<sup>[18]</sup>,只有第 23 位氨基酸不同 (IFN- $\alpha$ 2a 是精氨酸 R, IFN- $\alpha$ 2b 是赖氨酸 K)。晶体结构表明,IFN- $\alpha$ 2b 是 Zn 离子介导的二聚体球状蛋白,IFN- $\alpha$ 2a 与 IFN- $\alpha$ 2b 的结构相似,均含有 5 个  $\alpha$ -螺旋 (A-E) 和 4 个环 (一长三短)<sup>[6,19]</sup>。在 CD 谱分析过程中,190–240 nm 范围的 CD 谱常用于分析蛋白质二级结构的变化,而 192 nm 的正峰和 208 nm、222 nm 的负峰是  $\alpha$ -螺旋结构的特征峰。本实验 CD 谱分析结果也表明,在低温条件下,两者均呈现明显的  $\alpha$ -螺旋结构。

据报道,由于 IFN- $\alpha$  独特的物理和化学特性,重组人 IFN- $\alpha$ 2b 在溶液状态下的稳定性较差<sup>[3]</sup>,易受到制备和贮藏等条件的影响,造成药物的修饰<sup>[20]</sup>。目前,关于 IFN- $\alpha$  构象的研究已有众多报道。Johnston 等<sup>[1]</sup>发现,当牛血清白蛋白与 IFN- $\alpha$ 2b 比率为 5 : 1 (W/W) 时, $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠构象发生明显的变化。100 °C 热处理 1 h 后,IFN- $\alpha$ 2b 的  $\alpha$ -螺旋含量由 50%降低到 15%。与人血清白蛋白融合表达的 albinterferon alfa-2b 的甲硫氨酸 696 的氧化作用 (Methionine oxidation) 明显地改变了其空间结构,并且对温度的敏感性增高<sup>[4]</sup>。史新昌等报道,在 60–95 °C 之间,rIFN- $\alpha$ 2a 的二级结构发生改变;在 5–60 °C 范围内则相对稳定<sup>[21]</sup>。本实验动态分析了

IFN- $\alpha$ 2b 和 IFN- $\alpha$ 2a 在变温过程中 CD 谱的变化,不仅证实了 65 °C 左右是其空间结构不可逆变化的拐点,而且也表明 rIFN- $\alpha$ 2a 和 rIFN- $\alpha$ 2b 具有类似的变化趋势。同时,在不改变 rIFN- $\alpha$ 2a 和 rIFN- $\alpha$ 2b 氨基酸序列的情况下,获得了构象不可逆变化的两种蛋白,这为后续的抗病毒活性的研究奠定了基础。

目前,关于 IFN- $\alpha$  抗病毒机制的研究已经取得了较大的进展。例如,IFN- $\alpha$  通过与细胞表面受体复合物 (IRNAR) 结合而介导抗病毒活性<sup>[17,22-24]</sup>,其中,IFNAR1 的结合位点是螺旋 B 和 C 的中心<sup>[25]</sup>,IFNAR2 是主要的配体结合成分<sup>[26]</sup>;另外,IFN- $\alpha$  的 C 端非结构尾巴<sup>[23]</sup>和第 129、122 位的酪氨酸残基<sup>[27]</sup>的变异影响抗病毒活性的发挥;C 端 112–148 位氨基酸残基可能是 IFN- $\alpha$ 2c 诱导抗病毒活性的位点,而 N 端 36–41 是与细胞结合的位点<sup>[28]</sup>;此外,AB 环、螺旋 C 和螺旋 D 参与受体互作<sup>[29]</sup>,N 端 1–95 位氨基酸的变异影响其抗病毒活性<sup>[30]</sup>;除此之外,翻译后修饰也是影响抗病毒活性的重要因素,糖基化的 rIFN- $\alpha$ 2b 的抗病毒活性对温度的敏感性降低<sup>[3]</sup>。但对 IFN- $\alpha$  中发挥抗病毒活性的活性成分尚不完全清楚。因此有学者推测,IFN 分子的抗病毒活性可能是整个活性区与靶细胞上受体结合而发挥作用<sup>[31]</sup>。由于 IFN 的抗病毒活性需要与受体相结合,因此,氨基酸位点的改变和翻译后修饰可能影响其构象,导致与受体结合的能力减弱或者虽然结合但激活下游信号通路的能力受损,以致影响宿主细胞中的抗病毒基因的表达,从而影响宿主的抗病毒作用。因此,研究 IFN 的构象与抗病毒活性之间的相关性具有重要意义。NDV 感染 HeLa 细胞是常用的研

究 IFN- $\alpha$ 2 的模型<sup>[32-34]</sup>。本实验利用该模型, 通过 FCM 技术对病毒感染细胞的分析, 进一步证实了 rIFN- $\alpha$ 2a 和 rIFN- $\alpha$ 2b 空间结构的改变在一定程度上降低了其抗病毒活性的发挥, 这为空间结构的改变影响其抗病毒活性的发挥的论述提供了直接证据。

蛋白质药物的空间结构与其生物学功能的相关性分析, 对其生产、运输、临床应用等均具有重要指导作用。温度的变化引起的变性是经常遇到的问题。虽然关于温度影响 rIFN- $\alpha$  构象以及高温处理后其抗病毒活性的研究已有相关报道, 但很少有学者将两者结合起来分析, 即构象的改变与其生物学活性的相关性的研究尚未见明确报道。CD 谱可以分析溶液状态下的蛋白质药物的空间结构, 以此技术获得的数据更接近蛋白质的天然状态的性质。FCM 技术能够在单细胞水平上分析细胞特性的变化, 更能直观、简便地反映细胞水平上的变化情况。本实验通过分析表明, 利用 CD 和 FCM 技术相结合可以较好地分析 IFN- $\alpha$  的空间结构与其抗病毒活性的相关性, 并且分析结果与报道的一致。该方法的建立为蛋白质药物的空间结构和功能分析奠定了技术基础。

## REFERENCES

- [1] Johnston MJW, Nemr K, Hefford MA. Influence of bovine serum albumin on the secondary structure of interferon alpha-2b as determined by far UV circular dichroism spectropolarimetry. *Biologicals*, 2010, 38(2): 314-320.
- [2] Pan MJ, Kalie E, Scaglione BJ, et al. Mutation of the IFNAR-1 receptor binding site of human IFN- $\alpha$ 2 generates type I IFN competitive antagonists. *Biochemistry*, 2008, 47(46): 12018-12027.
- [3] Ceaglio N, Etcheverrigaray M, Kratje R, et al. Influence of carbohydrates on the stability and structure of a hyperglycosylated human interferon alpha mutein. *Biochimie*, 2010, 92(8): 971-978.
- [4] Chou DK, Krishnamurthy R, Manning MC, et al. Effects of solution conditions on methionine oxidation in albinterferon alfa-2b and the role of oxidation in its conformation and aggregation. *J Pharm Sci*, 2013, 102(2): 660-673.
- [5] Crawford TQ, Jalbert E, Ndhlovu LC, et al. Concomitant evaluation of PMA+ionomycin-induced kinase phosphorylation and cytokine production in T cell subsets by flow cytometry. *Cytometry A*, 2014, 85(3): 268-276.
- [6] Oritani K, Kincade PW, Zhang C, et al. Type I interferons and limitin: a comparison of structures, receptors, and functions. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001, 12(4): 337-348.
- [7] Diress A, Lorbetskie B, Larocque L, et al. Study of aggregation, denaturation and reduction of interferon alpha-2 products by size-exclusion high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and biological assays. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(19): 3297-3306.
- [8] Escudier B, Bellmunt J, Nrrier S, et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. *J Clin Oncol*, 2010, 28(13): 2144-2150.
- [9] Yang YF, Zhao W, Xia HM, et al. Long-term efficacy of interferon alpha therapy on hepatitis B viral replication in patients with chronic hepatitis B: a meta-analysis. *Antivir Res*, 2010, 85(2): 361-365.
- [10] Wang YS, Youngster S, Grace M, et al. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. *Adv Drug Deliver Rev*, 2002, 54(4): 12018-12027.

- 547–570.
- [11] Baldwin SL, Powell TD, Sellins KS, et al. The biological effects of five feline IFN- $\alpha$  subtypes. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 99(3/4): 153–167.
- [12] Mao LL, Si L, Chi ZH, et al. A randomized phase II trial of 1 month versus 1 year of adjuvant high-dose interferon  $\alpha$ -2b in high-risk acral melanoma patients. *Eur J Cancer*, 2011, 47(10): 1498–1503.
- [13] Yang JT, Wu CC, Martinez HM. Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol*, 1986, 130: 208–269.
- [14] Sun Q, Zhao LX, Song QQ, et al. Hybrid- and complex-type *N*-glycans are not essential for Newcastle disease virus infection and fusion of host cells. *Glycobiology*, 2012, 22(3): 369–378.
- [15] Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, 2004, 202(1): 8–32.
- [16] Chen J, Baig E, Fish EN. Diversity and relatedness among the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res*, 2004, 24(12): 687–698.
- [17] Moll HP, Maier T, Zommer A, et al. The differential activity of interferon- $\alpha$  subtypes is consistent among distinct target genes and cell types. *Cytokine*, 2011, 53(1): 52–59.
- [18] Watson C, Sharp JS. Conformational analysis of therapeutic proteins by hydroxyl radical protein footprinting. *AAPS J*, 2012, 14(2): 206–217.
- [19] Radhakrishnan R, Walter LJ, Hruza A, et al. Zinc mediated dimer of human interferon- $\alpha_{2b}$  revealed by X-ray crystallography. *Structure*, 1996, 4(12): 1453–1463.
- [20] Li YH, Rao CM, Tao L, et al. Improved detection of variants in recombinant human interferon alpha-2a products by reverse-phase high-performance liquid chromatography on a core-shell stationary phase. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 88: 123–129.
- [21] Shi XC, Rao CM, Pei DN, et al. Studies on circular dichroism (CD) spectra of recombinant human interferon alpha 2a. *Chin J Pharm Anal*, 2005, 25(10): 1169–1172 (in Chinese).
- 史新昌, 饶春明, 裴德宁, 等. 重组人干扰素- $\alpha_{2a}$  (IFN- $\alpha_{2a}$ ) 的圆二色谱分析. *药物分析杂志*, 2005, 25(10): 1169–1172.
- [22] Claudinon J, Gonnord P, Beslard E, et al. Palmitoylation of interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) receptor subunit IFNAR1 is required for the activation of Stat1 and Stat2 by IFN- $\alpha$ . *J Biol Chem*, 2009, 284(36): 24328–24340.
- [23] Slutski M, Jaitin DA, Yehezkel TB, et al. Variations in the unstructured C-terminal tail of interferons contribute to differential receptor binding and biological activity. *J Mol Biol*, 2006, 360(5): 1019–1030.
- [24] Stark GR. How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007, 18(5/6): 419–423.
- [25] Roisman LC, Jaitin DA, Baker DP, et al. Mutational analysis of the IFNAR1 binding site on IFN $\alpha_2$  reveals the architecture of a weak ligand-receptor binding-site. *J Mol Biol*, 2005, 353(2): 271–281.
- [26] Chill JH, Quadt SR, Levy R, et al. The human type I interferon receptor: NMR structure reveals the molecular basis of ligand binding. *Structure*, 2003, 11(7): 791–802.
- [27] Wang YX, Jiang CL, Lu CL, et al. Distinct domains of IFN alpha mediate immune and analgesic effects respectively. *J Neuroimmunol*, 2000, 108(1/2): 64–67.
- [28] Kontsek P, Borecky L, Kontsekova E, et al. Mapping of two immunodominant structures on human interferon alpha 2c and their role in binding to cells. *Mol immunol*, 1991, 28(11): 1289–1297.
- [29] Klaus W, Gsell B, Labhardt AM, et al. The three-dimensional high resolution structure of



- human interferon  $\alpha$ -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J Mol Biol*, 1997, 274(4): 661–675.
- [30] Vázquez N, Schmeisser H, Dolan MA, et al. Structural variants of IFN  $\alpha$  preferentially promote antiviral functions. *Blood*, 2011, 118(9): 2567–2577.
- [31] Du XY, Yang L, Zhou YT, et al. Analysis on the structure and function of three IFN- $\alpha$  subtypes. *Chin J Dis Control Prev*, 2004, 8(3): 216–218 (in Chinese).  
杜贤宇, 杨玲, 周业亭, 等. 三种  $\alpha$ -干扰素亚型结构与功能的研究. *疾病控制杂志*, 2004, 8(3): 216–218.
- [32] Löseke S, Grage-Griebenow E, Wagner A, et al. Differential expression of IFN- $\alpha$  subtypes in human PBMC: evaluation of novel real-time PCR assays. *J Immunol Methods*, 2003, 276(1/2): 207–222.
- [33] Fábíán Z, Csatory CM, Szeberényi J, et al. p53-independent endoplasmic reticulum stress-mediated cytotoxicity of a Newcastle disease virus strain in tumor cell lines. *J Virol*, 2007, 81(6): 2817–2830.
- [34] Sánchez-Felipe L, Villar E, Muñoz-Barroso I. Entry of Newcastle disease virus into the host cell: role of acidic pH and endocytosis. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838(1 Pt B): 300–309.

(本文责编 郝丽芳)