

用人二倍体细胞制备成纤维细胞干扰素

施 坚 李文坤 冯丽萍 李 容

(武汉生物制品研究所)

近年来由于干扰素研究的进展,迫切地要求供应大量的人干扰素。国内用脐带血、人全血、扁桃体等制备白细胞干扰素,用 Namalwa 系制备类淋巴细胞干扰素已有报道^[1]。前者作为大量生产的原材料来源方面和后者在安全性方面都存在有待探讨的问题。我们采用经国家检定批准的人胚肺二倍体细胞株,以 10L 瓶旋转培养细胞制备人成纤维细胞干扰素,每瓶产量平均达 5×10^6 单位。并对制备成纤维细胞干扰素的某些条件进行了实验。

材料与 方法

一、细胞

KMB₁₇: 人胚肺二倍体细胞株,由中国医学科学院医学生物学研究所惠赠。以常规方法传

代,实验中使用 26—35 代细胞。

2BS: 人胚肺二倍体细胞株,由卫生部北京生物制品研究所惠赠。常规方法传代。

二、病毒

NDV:F 系。VSV:Indiana 株。均由中国医学科学院病毒学研究所惠赠。

三、干扰素制备

KMB₁₇ 细胞常规方法传代,接种 100ml 小方瓶静止培养,接种 250ml 圆瓶及 10L 大立瓶旋转培养,转速为 6—9 转/小时,细胞培养 7 天后,去营养液,10L 大立瓶细胞用 Earles' 液洗 2 次,接种 NDV 最终浓度为 64 血凝单位/ml,加无血清维持液,在 37℃ 静止或旋转培养 24 小时,收取上清液,以 1N HCl 调 pH 至 2.0,置 4℃ 经 5 天,以用 1N NaOH 调 pH 至 7.0。

取样保存于一30℃,直至干扰素滴定。

四、干扰素测定

用人胚肺二倍体细胞株 2BS 进行,以 100 个单位的 TCID₅₀VSV 攻击。

五、PEG 处理牛血清

30% PEG (6000)1 份加小牛血清 4 份,混匀立即出现沉淀,置 4℃ 过夜,3000 rpm 30 分钟,取上清培养细胞用。

结果与讨论

一、二株人二倍体细胞产生干扰素的比较

人二倍体细胞 KMB₁₇ 和 2BS 株均为国家检定批准可用于人用疫苗生产的细胞株,细胞种子冻存于液氮内。细胞传代后接种 100ml 小方瓶,以 NDV 诱导,比较二株细胞的干扰素产量,3 次实验结果列于表 1。表明 KMB₁₇ 的干扰素产量比 2BS 的产量约高 1 倍。因此下列实验均选用 KMB₁₇ 细胞进行。Machide 等^[2]曾从 23 株人胚肺二倍体细胞比较干扰素产量,指出不同细胞株干扰素产量存在很大差别,选出

的 HAIN-55 株干扰素产量为 4500 单位/ml。

表 1 KMB₁₇、2BS 二株二倍体细胞干扰素产量比较

| 实验批号 | KMB ₁₇ | | 2BS | |
|------|-------------------|------------------|------|------------------|
| | 细胞代数 | 干扰素产量 (单位/ml) | 细胞代数 | 干扰素产量 (单位/ml) |
| 8107 | 26 | 562.34 | 30 | 169.82 |
| 8110 | 28 | ≥1600 | 32 | 1175 |
| 8112 | 31 | 1203 | 36 | 369 |
| 平均 | | 1121.8 | | 551.2 |

二、不同维持液和细胞培养方法对干扰素产生的影响

人二倍体细胞培养于 Eagle (MEM) 加胰化牛肉水的营养液,病毒诱导时换以无血清维持液: 1) MEM; 2) MEM 加 0.1% 变性猪血清蛋白; 3) 汉-1 液 (18 种氨基酸综合营养液) 加 0.5% 珠蛋白水解物; 4) 汉-1 液加 0.1% 变性猪血清蛋白。表 2 的结果表明 MEM 及 MEM+0.1% 变性蛋白的干扰素产量明显高于汉-1 液。

表 2 不同维持液对干扰素产量的影响

| 干扰素产量 (单位 ml) | 维持液 | | | |
|------------------|-------|------------|---------|----------|
| | MEM | MEM + 变性蛋白 | 汉-1+珠蛋白 | 汉-1+变性蛋白 |
| 实验号 | | | | |
| S261 | 169.8 | 70.8 | <50 | 169.8 |
| S262 | 85.11 | 120.3 | 70.8 | 85.11 |
| 8271 | >800 | 400 | <50 | 66.1 |
| 8272 | >400 | 331 | 70.8 | 85.11 |
| 平均 | 383.7 | 230.5 | 60.4 | 101.5 |

比较静止培养与转瓶培养的细胞干扰素产量,前者用 100ml 小方瓶,后者用 250ml 圆瓶,4 次实验结果看来转瓶培养的细胞的干扰素产量较静止培养稍高。

三、用 PEG 处理的血清培养细胞对干扰素产生的影响

大规模培养人二倍体细胞,需要使用大量牛血清,在制备干扰素时会混入一定量的异种蛋白,为了减少制品中致敏原的含量,可用 PEG 沉淀牛血清中的大分子蛋白^[3]。从多次实验表

明,PEG 处理的血清对 KMB₁₇ 细胞的贴壁、细胞形成单层时间、细胞生长繁殖等,与未处理的血清没有明显区别。牛血清经 PEG 处理后去除的蛋白量在 6.7—9.3%。

用 PEG 处理的牛血清培养的细胞,诱导干扰素的产量与未处理血清培养的细胞的产量没有明显差别(见表 3)。

四、用 10L 瓶旋转培养制备干扰素

KMB₁₇ 株经扩大细胞量培养,接种于 10L 瓶内作旋转培养,一般 3—4 天形成单层,7 天

表3 PEG 处理血清培养细胞对干扰素产量的影响

| 实验号 | 干扰素产量(单位/ml) | |
|--------|--------------|-------|
| | PEG 处理小牛血清 | 小牛血清 |
| 828-1 | >1600 | >1600 |
| 828-2 | 1122 | 1288 |
| 8210-1 | 2570 | 2570 |
| 8210-2 | 2570 | >3200 |

后用 Earles' 液洗 2 次,加入 100 单位/ml 量干扰素,16 小时后加 NDV 诱生干扰素。维持液为 Eagle (MEM) 加 0.1% 变性猪血清蛋白,37℃ 旋转培养 24 小时收获。调 pH 至 2.0,置 4℃ 5 天,调 pH 至 7.0。结果 4 批干扰素效价分别为 2239、3200、2754、5370 单位/ml,平均为 3390 单位/ml。每瓶收获量 1500ml 干扰素,平均产干扰素 5×10^6 单位。

采用人二倍体细胞株制造干扰素,有许多优点,其核型正常无致肿瘤性,细胞种子预先可

以进行系统检定,安全性可靠,冻存于液氮,可提供大量的细胞。我们采用 10L 瓶旋转培养,估计一周可制造数十瓶,适用于大量生产。二倍体细胞还可以进行微载体培养^[4],使用微载体培养的细胞制备干扰素,因单位容积内细胞量大,故可获得较高产量的干扰素。由于不同的细胞株干扰素产量差别悬殊,为了大规模生产干扰素,还应选择一株高产的二倍体细胞株。

参 考 文 献

- [1] 丁志芬等: 中华微生物学和免疫学杂志, 1(2): 90, 1981。
- [2] Machide, H. et al.: *Microbiol. Immunol*, 24(1):31, 1980。
- [3] Bodo, G: *Acta Microbiologica Acad. Sci. Hung.* 28: 263, 1981。
- [4] 施坚等: 中华微生物学和免疫学杂志, 2(2): 100, 1982。