

干扰素作用的分子基础及应用*

陈 兴 编 译

(大连水产学院)

1957年伦敦国家医学研究所的 Isaacs 和 Lindenmann 开始研究病毒的干扰现象^[1]。当动物被一种病毒感染后,就可以避免被另一种病毒继续感染。经研究发现,被病毒感染的动物细胞分泌出一种特殊的蛋白质,称为干扰素。把它提供给其它细胞或动物,可以抵抗病毒的感染。

一、概 况

大量的工作说明,干扰素不是单一的一种蛋白质,它是由数种有关的具有抗病毒等活性的蛋白质组成。干扰素对细胞功能可以产生各种影响,尤其它的抗增殖作用及抗病毒活性引起人们极大的兴趣。

特异的干扰素可以由不同类型的细胞分泌也可以用不同的诱导物接触诱导细胞分泌。现在,已识别出的干扰素有三种类型,分别记作 α 、 β 和 γ 。 α -干扰素是白细胞分泌的, β -干扰素是成纤维细胞分泌的。这两种干扰素都可以由病毒或类似病毒信号的化学物质诱导产生。 γ -干扰素是当T-淋巴细胞与特殊抗原相接触,或是被促细胞分裂剂刺激时产生的,又称免疫干扰素。它在物理、化学性质上完全不同于其它两种干扰素,也很难制备。

所有的干扰素都具有很强的抗病毒活性和一定程度的抗增殖活性。有人观察了 α 、 γ -干扰素对Hela细胞的抗增殖作用后指出,纯净的 γ -干扰素并不比 α -干扰素更有效^[2]。对不同的细胞种群可以观察到不同程度的抗增殖作用。干扰素对细胞分裂的抑制是可逆的,用 α 或 β -干扰素处理细胞,增殖受到抑制;从培养基中除去干扰素后,细胞即恢复生长。 γ -干扰素比较特殊,它有可能杀死某些肿瘤细胞,它的基本功能或许与其它干扰素不同^[3]。干扰素抗

增殖作用的分子基础,目前还不清楚。

近年来,对人类干扰素基因克隆的研究,发现有12个或更多的基因为 α -干扰素编码。有至少2个基因为 β -干扰素编码^[3]。存在多种干扰素基因的原因尚不明了。研究表明, α 、 β -干扰素基因定位于9号染色体,不具有内含子。 γ -干扰素基因定位于12号染色体,有3个内含子和4个外显子。

一些干扰素的氨基酸顺序已经从克隆基因的核苷酸序列推知,几乎所有的已知干扰素都具有165个或166个氨基酸残基,也有155个氨基酸残基的报道^[2]。

Weissman 小组已经得到了重组 α -干扰素的结晶,并进行了X射线衍射测定^[2]。Wetzel, R. 据此推测, α -干扰素为一球状蛋白质,有疏水核,65%以上的结构形式是 α -螺旋与插入的 β 片层相联接。

二、干扰素诱导酶

对于干扰素抗病毒作用的分子机制,正在进行研究。人们希望所获得的知识能从分子水平上阐明干扰素的其它作用,并能为临床治疗提供依据。

干扰素处理的细胞,病毒也可以进入,并且正常脱去外壳^[4]。当病毒产生特异的mRNA并把它们翻译成病毒蛋白时,干扰素的抗病毒作用才逐渐表现出来。用干扰素处理的细胞产生的病毒mRNA和病毒蛋白比未处理细胞要少得多,处理细胞能有效地阻止子代病毒的组装。

* 本文由昆明医学院周秀贞审校。

感染的发生是由于病毒模板和复制病毒的酶不断增加。一旦病毒 RNA 的合成或翻译受到抑制,增殖过程就会受阻,致使子代病毒产生极少或完全不产生。早期对干扰素作用机制的研究,并没有阐明干扰素抗病毒作用是否主要是抑制病毒 RNA 或蛋白质的合成。目前认为,干扰素可能抑制某些病毒的 mRNA 合成,而抑制另外一些病毒的蛋白质合成。

研究证明,细胞必须在感染前置于干扰素中数小时,才有抗病毒作用。如果在用干扰素处理期间,加入 RNA 或蛋白质合成的抑制剂,细胞就没有抗病毒作用。结论是,细胞要处于抗病毒状态,就必须合成在某种程度上可以阻止病毒复制的新蛋白质。

为了观察加入干扰素后特异蛋白质的合成,有人在细胞培养基中加入有放射活性的氨基酸。合成的蛋白质可以用平板凝胶电泳法分离,用自显影法检测。一些生长旺盛、大量合成各种蛋白质的细胞,用干扰素处理后,很难观察到特异蛋白质的合成;而不再分裂(静止)的细胞,加入干扰素几小时后,可以观察到特异蛋白质的生成。这是因为干扰素加快了为这些蛋白质编码的 mRNA 的合成^[1]。这一发现为“干扰素是通过促进特异蛋白质的合成而发挥抗病毒作用的”这一假说提供了证据。

在新合成的蛋白质中,已识别出两种酶:蛋白激酶和寡核苷酸聚合酶。

蛋白激酶可以专一地使磷酸基从 ATP 转到蛋白质合成因子上。这是一种起始因子,它使蛋白质合成的第一步得以进行。磷酸化后,它不再发挥作用,蛋白质合成停止。

寡核苷酸聚合酶能使 ATP 分子形成通过 2'-5' 磷酸二酯键联接的短腺苷酸链。2'-5' 磷酸二酯键是一种独特的键,自然界中的多聚核苷酸都是通过 3'-5' 磷酸二酯键相联的。这种 2'-5' 寡聚腺苷酸 (2-5A) 的发现,揭示了一类新的有生物活性的寡核苷酸。它们是干扰素作用的重要中间物质。

上述酶是以无活性状态存在于细胞或细胞提取物中,只有加入某种特殊的激活剂,这些酶

才被激活并发挥作用。

三、双股 RNA

双股 RNA 是目前发现的最强的干扰素合成诱导物,它的这种作用引起了科学家的注意。

动物细胞不仅在有活性的和失活的病毒作用下分泌干扰素,而且在接触多种诱导物时也同样分泌。这些诱导物很可能在某些方面类似病毒信号,因而被细胞觉察。以 RNA 作为遗传物质的病毒,是按照碱基互补的规律,通过形成含有双股 RNA 碱基配对区的多核苷酸来复制的。这种双股 RNA 可能就是使细胞产生干扰素的信号。

已发现双股 RNA 强烈抑制用干扰素处理的细胞的蛋白质合成。有人从干扰素处理过的细胞中分离出一种蛋白质合成抑制剂,并证明它分子量低且对热稳定。同时,Lebleu 等也报告,双股 RNA 与这些细胞提取物温育,可引起 mRNA 的降解。

对这一问题的研究,Hovanessian 等做出了突出贡献。他们发现:从干扰素处理细胞提取物中可以很容易地分离出合成低分子量抑制剂的酶。其方法是,使提取物通过挂有双股 RNA 的琼脂糖颗粒组成的柱,酶被柱子保留,其它胞浆蛋白被洗出。再把柱同 ATP 一起温育后,ATP 就被转化为抑制剂^[4]。后来的研究证明,抑制剂能激活核酸酶。这就解释了双股 RNA 如何使 mRNA 降解——它首先激活某个酶,促使 ATP 转化成抑制剂,然后抑制剂又激活核酸酶,使 mRNA 分解。

低分子量抑制剂可用上述方法大量合成。Kerr 等在 1978 年测定了它的结构,证明是通过 2'-5' 磷酸二酯键联接的较短的腺嘌呤核苷酸链^[5]。这正是寡核苷酸聚合酶 (2-5A 聚合酶)的作用产物。其三聚体和较长的寡聚体有同样活性,但二聚体不能激活核酸酶。已知 2-5A 聚合酶仅在与双股 RNA 结合时才有活性,因此,这种酶专一地在含有双股 RNA 的病毒复制结构形成时被激活。

四、抗病毒机制

上述研究是在细胞提取物中进行的。至今,还没有足够的证据表明,在完整细胞内有干扰素诱导酶的活性。虽然在病毒感染细胞内没有观察到蛋白激酶的活性,但确有 2-5A 聚合酶被激活的证据。已经从被脑脊髓等病毒感染的又用干扰素处理的细胞中分离出 2-5A。细胞中的 2-5A 含量是毫微克分子水平。

Baglioni 等已证明双股 RNA 能促使干扰素处理过的细胞产生 2-5A、促使核酸酶激活和 mRNA 降解^[1]。因为双股 RNA 是高分子聚合物,不易穿过细胞膜,所以必须使细胞同较高浓度的 RNA 温育再用 Knight 法测定 2-5A。细胞洗过后,测定胞浆中双股 RNA 的量,出乎意料,其含量极少。可见极少量的双股 RNA 就可以使核酸酶激活并使细胞中 mRNA 分解。

用足够剂量的干扰素处理过的细胞,即使每个细胞用几个病毒颗粒感染,它们的生存能力也未见大的变化。干扰素诱导酶的合成,使细胞能够抵抗病毒感染。但是,只有病毒进入细胞时,特殊的抗病毒机制才被激活。这是一种激活防御机制的预备状态。但究竟它如何被感染的各种病毒专一地启动(因为不同的病毒是经由不同途径复制的),尚没有一个共同的机制可以说明。以 RNA 作为遗传物质的病毒,有可能因为形成含有双股 RNA 的复制结构而被细胞察觉。

干扰素诱导酶被激活必须有双股 RNA。用不同大小和不同碱基顺序的多核苷酸,系统研究 2-5A 聚合酶和蛋白激酶的激活,结果发现,含有 50 或更多碱基对的双股 RNA 是有效的激活剂^[6]。可以这样解释:因为正常情况下,具有相似碱基对数目的 RNA 不会出现在胞浆中,所以对碱基数目的严格要求能保证干扰素诱导酶不在非感染细胞中被激活。只要某个感染病毒形成了含有双股 RNA 的复制结构,2-5A 聚合酶就会与其结合。由于合成了 2-5A,被激活的核酸酶就可能使细胞 RNA 分解,损

害细胞。

最近 Baglioni 所在的实验室发现,虽然在细胞感染时可能形成含双股 RNA 的复制结构,但在用干扰素处理的脑脊髓炎病毒感染的人细胞中 mRNA 并没有分解^[1]。他们认为,在这些细胞中的核酸酶被 2-5A 激活,但是只有病毒 RNA 才被降解,可见核酸酶是有选择性的。他们把病毒复制结构同干扰素处理细胞的提取物一起温育时发现,只有病毒 mRNA 被分解,而细胞的 mRNA 不发生显著分解。在同未用干扰素处理的细胞提取物一起温育时,病毒 mRNA 不分解。

另一个实验是用人工底物进行的。在细胞 mRNA 中插入双股 RNA 片段,这个片段使 mRNA 更易降解。2-5A 聚合酶可能由于同双股片段结合而被激活,产生 2-5A,继而激活核酸酶。此过程发生在双股 RNA 片段周围,于是核酸酶(有活性的)在这一区域内浓集起来,处于双股片段附近的单股 RNA 便被分解。细胞 mRNA 分布在其它部位,所以很少被分解。这就解释了为什么只有含双股复制结构的病毒 RNA 被高度专一地分解。

Baglioni 报道过,2-5A 的 2'-5' 磷酸二酯键可被 2'-磷酸二酯酶迅速分解。这一发现解释了以前提出的 2-5A 作用机制。2-5A 即使在 0℃ 同细胞提取物温育也被迅速分解,在 37℃ 时的半衰期更是极为短暂。在细胞中,2-5A 的浓度取决于它的合成与分解之间的平衡。只有形成含双股 RNA 的病毒复制结构时,在合成部位附近才可能有足够浓度的 2-5A 激活核酸酶。细胞经干扰素处理或未经处理,都有数量大致相同的核酸酶和 2'-磷酸二酯酶。干扰素处理只增加 2-5A 聚合酶的浓度。此酶能识别并同具有双股 RNA 的病毒复制结构作用。当培养基中除去干扰素时,2-5 聚合酶的活性下降,且细胞丧失其抗病毒状态。因干扰素诱导的蛋白质合成转瞬即逝,所以培养细胞并不保持高水平的蛋白质。

2-5A 聚合酶和蛋白激酶除了在抗病毒状态的作用外,其它功能还不清楚。Stark 等提出

2-5A 聚合酶在细胞分化中起作用,他们发现在最终分化的细胞中,此酶活力升高。近来,在用生长抑制素处理过的人淋巴母细胞中,也观察到 2-5A 聚合酶水平升高。这些细胞中,2-5A 聚合酶活力的增加似乎不通过干扰素分泌这一过程。

五、干扰素与激素

从广义说来,干扰素可以称为激素。它们通过传递特异的信息,使细胞联系起来,病毒侵入的细胞分泌干扰素,使其它细胞“警惕”病毒的感染,处于抗病毒状态。

干扰素与典型的由特化细胞分泌的激素又有不同,大多数细胞可以产生它。虽然已有一些证据说明至少某些干扰素有特异的抗增殖作用,但是仍然不能确切判断干扰素或有关蛋白质是否参与细胞增殖的生理调控^[1]。

很多激素是以非常特殊的方式促进细胞或组织增殖的。神经生长因子和表皮生长因子就是两种具有增殖作用的蛋白质。在培养细胞中这类蛋白质引起特殊的形态变化并加强细胞增殖。相反,因为没分离出特殊的生长抑制因子,所以对其了解甚少。但它们是可能存在的,因为精细地调节组织的生长和分化,只有通过正、负刺激系统方能获得。干扰素或有关蛋白质可能就是这种生长抑制因子,而组织特异性或许是某些种干扰素的特点。

六、临床应用

干扰素具有种属特异性,治疗人类疾病只有来自人体的干扰素纯品才有效。据称,45,000 升血液仅收集干扰素 400 毫克。这样,在临床使用上就有很大的局限性。目前,很多国家致力于干扰素基因工程的研究,有些公司正在探索工业化生产较为廉价的干扰素,并取得了进展^[7]。

病毒性疾病一般是自我抑制的。因为被感染的机体可以产生干扰素作为第一道防线,抑制感染病毒的蔓延。随后发生免疫反应作为长期抵御措施。可是,有严重免疫缺陷的患者,干扰素就可能是抵抗病毒感染的主要力量。一些

肾脏移植术接受者,需要保持免疫抑制以防对外来器官的排斥,他们就是通过注射干扰素从危及生命的病毒感染中被解救出来的。

将来,干扰素可能会用来治疗一些常见病毒性疾病,如,肝炎、流感和感冒。在流感传播时,几粒干扰素就可以制止严重感染,使患者在两天内康复(一般治疗需要一周)。若采用干扰素治疗肝炎是大有好处的。象外阴疱疹等这类顽固的病毒性疾病,用合成药物与干扰素合用可能收到很好的效果。有些病毒诱导干扰素的能力很弱,被感染的细胞还没来得及产生干扰素就被病毒迅速杀死。被这类病毒感染时,最好用干扰素治疗。

除极少数情况外,干扰素不能防止病毒感染。干扰素的保护作用是短暂的,几天内就会消失。比如,多次注射干扰素治疗普通感冒,有可能带来危险。因为加强抵制诱导干扰素的病毒,反过来可能会作用于某些细胞过程。有人解释说,抗病毒态由于干扰了某些正常的细胞活动,所以是短暂的^[1]。

对病毒感染的新生小鼠的研究,提供了干扰素相反作用的实验证据。作为对某种病毒的反应,机体细胞产生了高水平的干扰素,干扰素又引起动物的发育不全、肝坏死和肾小球炎。这些反作用,可以通过注射抗干扰素抗体而专一地消除^[1]。即便如此,人们仍然认为用干扰素治疗一些病毒性疾病的前景是乐观的。

干扰素能抑制肿瘤的生长、提高天然杀伤细胞(NK)的活性。用组织培养的肿瘤细胞可以观察到抑制肿瘤生长的作用。这是对细胞生长的直接作用。某些肿瘤细胞对干扰素很敏感,马上终止分裂,如果把干扰素从基质中除去,细胞又恢复生长。有人报道, γ -干扰素具有比 α 、 β -干扰素更强的激活 NK 细胞的能力^[8]。

很多报道都肯定了干扰素的抗癌作用。南斯拉夫 Ikić 等人的研究小组,用 α -干扰素治疗膀胱乳头瘤、原发性和继发性乳腺癌、恶性黑色素瘤等患者疗效明显。美国国家肿瘤研究所正在进行临床试验^[1,9]。第一阶段是测定癌患者可以接受又不产生副作用的剂量;进一步的试

验是判断在患者发病的不同阶段以及不同的治疗方案下,干扰素的有效性。乳癌,肺癌及各种骨髓瘤患者都参加了试验性治疗,这些肿瘤都是极常见的。已有报道,有些人用干扰素治疗后有好转的希望。应当指出,不同的肿瘤可能对干扰素或其它药物的反应完全不同。

NK 细胞被干扰素激活,攻击并杀死异体细胞,这可能很适合解释干扰素的抗肿瘤作用。识别异体细胞的分子基础仍不清楚。已经证明,给无毛鼠注射抗干扰素抗体,可以使前列腺癌细胞和一些顽固的肿瘤细胞继续生长。显然,干扰素与抗体的中和作用抑制了对这些细胞的排斥作用^[4]。这一结果说明,干扰素参与了对肿瘤细胞的排斥作用,并且可能是通过激活 NK 细胞这条途径。NK 细胞体系的激活是否只是由于干扰素的刺激而与癌患者的肿瘤细胞完全无关,还有待观察。

一些学者指出,对临床试验的讨论,要避免

夸大疗效。干扰素不是万灵药,但它对某些癌症,或者发病过程中的某个阶段的治疗可能效果较好。有时,干扰素与其它常规药物合用也许更好,进一步的临床试验可能会发现新的治疗途径。随着研究的不断深入,人们将从分子水平上阐明干扰素的抗癌机制。

参 考 文 献

[1] Baglioni, C. et al.: *American Scientist*, 69, 392, 1981.
[2] Friedman, R. M. et al.: *Nature*, 296, 704, 1982.
[3] Gray, P. W. et al.: *Nature*, 298, 859, 1982.
[4] Hovanessian, A. G. et al.: *Nature*, 268, 537, 1977.
[5] Kerr, I. M. et al.: *PNAS*, 75, 256, 1978.
[6] Baglioni, C. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 350, 497, 1980.
[7] 罗明典:《国外医学分子生物学分册》1981 年,第 3 期,第 116 页。
[8] Efrat, S. et al.: *Nature*, 297, 236, 1982.
[9] 高庆生摘译:《生物科学动态》102、61、1982。

(本文于1982年9月17日收到)

科技消息

对玉米应用五种生物工程的评价

工程名称	第一次显示成就 2000 年时供 (kg/ha)		识别通过什么具体方法
加强光合成	1995	497(44%)	CO ₂ 交换的高选择性
细胞或组织培养	1990	195(70%)	筛选抗病株
植物生长调节因子	1994	988(89%)	增加丰产指标
遗传工程	—*	—	移植单一基因
生物固氮	1996	14(66%)	与固氮菌共生

* 遗传工程评价为时尚早 摘自 *Bioscience* 32(8): 675-82 (情)

生物工程应用于水稻的可能性

- I. 细胞与组织培养
 - 1. 在细胞水平上诱导和选择有用突变株
耐盐 抗铅毒 高赖氨酸及高蛋白
低光呼吸 抗病 耐低氧
 - 2. 胚培育 种内与种间杂交
 - 3. 花药与花粉培育 缩短繁殖时间
 - 4. 原生质融合
- II. 遗传工程 固氮基因的掺入