

错位双链核糖核酸的热原反应

聂实践^{1*} 胡冬琴²

(1 天津科技大学生物工程学院 天津 300222)

2 北京百林康源生物技术公司 北京 100054)

摘要 由于错位 dsRNA 的毒副作用得到降低,因此是一类很有潜力的抗病毒、抗肿瘤物质。研究中利用家兔实验评价了 Poly I: C 和 Poly I: C₁₂U 引起的热原反应。在 10mg/ml、1mg/ml、0.05mg/ml 剂量水平 Poly I: C₁₂U 均未产生发热和其他毒副作用,而 Poly I: C 实验组均有发热现象,甚至有家兔死亡。

关键词 双链核糖核酸(dsRNA) 热原反应

dsRNA(Poly I: C) 是一类很有潜力的抗病毒、抗肿瘤物质,它可以刺激机体产生广谱的内源干扰素,干扰病毒合成、改变细胞骨架、激活蛋白激酶和 2',5'-寡聚腺苷酸合成酶的活力,降解进入机体的病毒,提高机体综合免疫能力,从而达到抑制、治疗恶性疾病的目的。Poly I: C 的抗病毒和抗肿瘤活性实验表明,在动物治疗应用中,发现其对牛痘、疮疹性脑炎、狂犬病有一定疗效,对猪白血病病毒引起的白血病有很好的疗效,对于流感、鼻病毒引起神经病等有预防作用,对多种肿瘤有抑制其形成、发展的作用;在人类治疗应用中,对于疮疹性角膜炎、带状疱疹、迁移性乙型肝炎、慢性神经病等有较好的疗效,对于鼻和流感病毒感染也有缓解症状的功效,近年来在抗肿瘤、抗 AIDS 病的研究方面也取得较好的效果。

但 Poly I: C 在刺激机体产生一系列有益反应的同时,它也产生一系列毒副作用,主要表现为:使机体发热,造血机能下降,促红细胞生成素减少,白细胞减少,对肝、脾细胞的破坏,血压及凝血功能失常,转氨酶升高,肾功能反常等。这些毒性问题大大限制了这类抗病毒药物的开发和应用前景。

多年对 Poly I: C 的研究发现:(1)多聚肌苷酸链(Poly I)对刺激机体产生一系列生物学反应起关键作用,多聚胞苷酸链(Poly C)只起辅助作用。(2)多聚肌苷酸链(Poly I)的长度同生物学反应的强度存在正比关系,因此分子量大的生物学反应强。(3)

Poly I: C 在很短的时间内就可刺激机体产生一系列反应。(4)分子量大、在体内停留时间长是产生对人体毒性的主要原因。图 1 说明了上述关系。

核苷酸碱基对

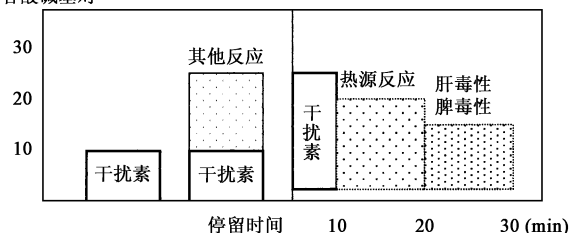


图 1 Poly I: C 分子量和 Poly I: C 在体内停留时间

同生物学反应的关系

在体内停留超过 10min,开始有不良反应发生。在体内停留超过 20min,开始出现肝和脾的损伤。当 Poly I: C 的长度超过 12 个碱基对时,开始出现不良作用。

经过大量的基础性研究后,1983 年 William A. Carter 和 POP Ts'o 提出了让 Poly I: C 错位可降低毒性,并制备出错误的双链核糖核酸(Poly I: C₁₂₋₂₄U、Poly I: C₂₂₋₃₉G 等,以下简称错位 dsRNA),这一系列低毒性的错位 dsRNA,是通过在 Poly C 链中插入尿苷酸(U)或鸟苷酸(G)来实现的。由于 Poly C 链中插入 U 和 G,使错位 dsRNA 的双链结构中碱基配对发生失配现象,为 RNA 酶的作用提供了酶切位点,当大分子的错位 dsRNA 进入体内后,很快会被分解为大小合适的分子片段,从而使错位 dsRNA 保留了原有的生物学反应强度,而毒副作用大大降低。研究还发现,由于错位 dsRNA 进入体内后被酶切成小分子片段,这些小分子的 dsRNA 可以通过许多体内屏障进入体液、黏膜、脊髓液、精液等大

修回日期: 2002 12 10

* 电子信箱: bifein@public.hta.net.cn

分子药物不能到达的地方,生物学效应的范围得到了扩大。

本研究通过错位 dsRNA 和 Poly I: C 热原反应实验,初步研究 Poly I: C₁₂U 的毒副作用,为其开发成药积累数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 根据国家“药品的安全检查”标准中热原检查法规定,采用国标家兔为实验材料。供试家兔应健康无伤,体重 1.7~ 3.0kg,雌兔应无孕。检查前 7 日应同一饲料饲养,在此期间,体重应不减轻,精神、食欲、排泄等不得有异常现象。未经热原检查过的家兔,应在检查前 7 日预测体温,进行挑选。每隔 1h 测量体温一次,共测 4 次,4 次体温均在 38.0~ 39.6℃ 范围内,且最高最低温的差数不得超过 0.4℃,方可供试验用。将供试家兔分组,每组家兔 5 只,在三个剂量水平实验。

1.1.2 供试品

- (1) 空白对照 磷酸 NaCl 缓冲液, pH 7.3。
(2) 阳性对照: Poly I: C 本实验室制备 (10mg/ml, 1mg/ml, 0.05mg/ml)。
(3) 试验样品: Poly I: C₁₂U 本实验室制备 (10mg/ml, 1mg/ml, 0.05mg/ml), 制备中的原料、试剂、酶液、合成方法、装针条件与 Poly I: C 相同。

1.1.3 器具 试验用的注射器、针头均为一次性的,一切与供试品接触的器皿,均采用适宜的方法除去热原。

1.2 方法

对每组适用的家兔,测定其正常体温后 15min 内,自耳动脉缓缓注入规定剂量并温热至约 38℃ 的供试品溶液(1ml),在注射后 0.5h, 1h, 2h 测量体温,以三次中体温最高的一次减去正常体温,即为该兔体温的升高度数。

2 实验结果

2.1 10mg/ml 剂量组结果

批 号	组 别		试验前体温(℃)			剂量 (mg/ml)	试验中体温(℃)			表观状态
	编号	组 别	第一次测定	第二次测定	平均		0.5h	1.0h	2.0h	
011016	1	control	39.3	39.1	39.2		39.0	39.2	39.2	正常
011016	2	control	39.5	39.4	39.45		39.4	39.3	39.3	正常
011016	3	control	39.0	39.2	39.1		39.0	39.0	39.1	正常
011016	4	control	39.1	39.1	39.1		39.0	39.1	38.9	正常
011016	5	control	39.2	39.0	39.1		39.0	39.2	39.4	正常
	平均		39.22	39.16	39.19		39.08	39.16	39.18	
010811	6	Poly I: C	39.0	39.0	39.0	10	39.5			腹泻死亡
010811	7	Poly I: C	39.0	39.0	39.0	10	39.5	40.1	39.7	精神萎靡
010811	8	Poly I: C	39.4	39.5	39.45	10	39.8	38.8		腹泻
010811	9	Poly I: C	39.0	39.2	39.1	10	40.0	40.0	39.2	精神萎靡
010811	10	Poly I: C	39.05	39.0	39.02	10	39.9	39.6	38.9	精神萎靡
	平均		39.09	39.14	39.11		39.74	39.62	39.27	
010829	11	Poly I: C ₁₂ U	39.2	39.4	39.3	10	39.4	39.3	39.2	正常
010829	12	Poly I: C ₁₂ U	39.2	39.3	39.25	10	39.35	39.3	39.4	正常
010829	13	Poly I: C ₁₂ U	39.0	39.2	39.1	10	39.2	39.25	38.9	正常
010829	14	Poly I: C ₁₂ U	39.1	39.1	39.1	10	39.2	39.2	38.9	正常
010829	15	Poly I: C ₁₂ U	39.3	39.1	39.2	10	39.65	39.15	39.1	正常
	平均		39.16	39.22	39.19		39.36	39.24	39.1	

2.2 1mg/ml 剂量组结果

批 号	组 别		试验前体温(℃)			剂量 (mg/ml)	试验中体温(℃)			表观状态
	编号	组 别	第一次测定	第二次测定	平均		0.5h	1.0h	2.0h	
011016	27	Control	38.6	38.4	38.5		38.3	38.5	38.5	
011016	1	Control	39.0	38.8	38.9		38.7	38.6	38.9	
011016	4	Control	39.6	39.5	39.55		39.3	39.2	39.2	
	平均		39.07	38.9	38.98		38.77	38.77	38.87	
010811	16	Poly I:C	39.2	39.4	39.3	1.0	39.4	39.6	39.7	精神萎靡
010811	17	Poly I:C	39.2	39.0	39.1	1.0	39.8	40.4	40.2	精神萎靡
010811	18	Poly I:C	39.0	39.1	39.05	1.0	39.9	40.1	40.2	精神萎靡
010811	19	Poly I:C	38.7	38.8	38.75	1.0	39.6	40.2	40.2	精神萎靡
010811	20	Poly I:C	39.1	39.3	39.2	1.0	39.7	40.2	39.0	精神萎靡
	平均		39.04	39.12	39.08		39.68	40.1	39.86	
010829	21	Poly I:C ₁₂ U	38.8	38.8	38.8	1.0	39.1	39.3	39.2	正常
010829	22	Poly I:C ₁₂ U	39.1	38.9	39.0	1.0	39.6	39.4	39.45	正常
010829	23	Poly I:C ₁₂ U	39.1	39.2	39.15	1.0	39.6	39.55	39.4	正常
010829	24	Poly I:C ₁₂ U	39.1	39.0	39.05	1.0	39.6	39.5	39.35	正常
010829	25	Poly I:C ₁₂ U	39.1	39.0	39.05	1.0	39.5	39.55	39.35	正常
	平均		39.04	38.98	39.01		39.48	39.46	39.35	

2.3 0.05mg/ml 剂量组结果

批 号	组 别		试验前体温(℃)			剂量 (mg/ml)	试验中体温(℃)			表观状态
	编号	组 别	第一次测定	第二次测定	平均		0.5h	1.0h	2.0h	
011016	26	Control	38.5	38.5	38.5		38.4	38.4	38.5	
011016	27	Control	39.35	39.4	39.37		39.45	39.1	39.15	
011016	5	Control	39.1	39.1	39.1		39.1	39.2	39.2	
011016	3	Control	39.3	39.3	39.3		39.2	39.3	39.55	
011016	28	Control	39.1	39.1	39.1		39.1	39.25	39.45	
	平均		39.07	39.08	39.07		39.05	39.05	39.17	
010811	29	Poly I:C	39.2	39.1	39.15	0.05	38.9	39.4	40.7	精神萎靡
010811	30	Poly I:C	39.5	39.5	39.5	0.05	39.5	39.8	40.85	精神萎靡
010811	31	Poly I:C	39.4	39.3	39.35	0.05	39.5	39.8	40.55	精神萎靡
010811	32	Poly I:C	39.3	39.25	39.27	0.05	39.5	39.6	40.25	精神萎靡
010811	33	Poly I:C	39.35	39.5	39.42	0.05	39.4	39.7	40.6	精神萎靡
	平均		39.35	39.33	39.34		39.36	39.66	40.59	
010829	34	Poly I:C ₁₂ U	39.3	39.3	39.3	0.05	39.3	39.7	39.65	正常
010829	35	Poly I:C ₁₂ U	39.35	39.2	39.27	0.05	39.45	39.85	39.5	正常
010829	36	Poly I:C ₁₂ U	39.2	39.0	39.1	0.05	39.3	39.6	39.45	正常
010829	37	Poly I:C ₁₂ U	39.4	39.2	39.3	0.05	39.35	39.45	39.8	正常
010829	2	Poly I:C ₁₂ U	39.4	39.35	39.37	0.05	39.3	39.65	39.65	正常
	平均		39.33	39.21	39.27		39.34	39.65	39.61	

3 结果讨论

(1) 三个剂量组中对照组(空白缓冲液)动物体温均无升高,符合热原检测标准。

(2) 三个剂量组注射阳性对照 Poly I:C 后,动物体温均升高 0.6℃以上,不符合热原检测标准,且实验中出现家兔精神萎靡、腹泻死亡现象,说明 Poly I:C 不单纯引起机体发热,还有其他毒副作用,由于实验条件限制,未能观察体内器官指标。

(3) 三个剂量组注射样品 PolyI: C₁₂U 后,高、

中、低剂量组动物体温变化均在 0.6℃以内,虽然体温略有升高,但符合热原检测合格标准,且实验组未发现家兔精神萎靡、腹泻死亡现象,说明 PolyI: C₁₂U 的毒副作用大大低于 Poly I:C。

参考文献

[1] 聂实践, 胡冬琴. 生物工程进展. 1997, Vol. No. 3, 10~ 13

[2] 热原检查方法, 中华人民共和国药典, 2000 年版, 85~ 86

[3] Steven D O' M, John A A, et al. The effect of combinations of amplitgen and zidovudine or dideoxyinosine against human immunodeficiency viruses *in vitro*. Antiviral Research, 1992, 17: 169

- [4] John A A, Deborah M, et al. A Phase I study of ampliten in human immunodeficiency virus infected subjects. The Journal of Infectious Diseases, 1992, 166: 717~ 722
- [5] William A C, Daniel V, et al. Mismatched double stranded RNA, ampliten, demonstrates antiviral and immunostimulatory activities in HIV Disease. Int. J. Immunopharmac, 1991, Vol. 13, suppl. 1: 69~ 76
- [6] Isadore B, David R, et al. Clinical studies with ampliten. Journal of Biological Response Modifiers 1985, 4: 669~ 675
- [7] James L, Paul OPT's' o. Polyinosinic acid polycytidylic acid and its mismatched analogues. Molecular Pharmacology, 1979, 15: 165~ 173

Research on the Pyrogenic Effect in Rabbit Caused by Double Stranded RNA

Nie Shijian¹ Hu Dongqin²

(1 Tianjin University of Science and Technology Tianjin 300222 2 Brins Live Pro Biotechnology Co. LTD Beijing 100054)

Abstract Mismatched double stranded RNA is one of the potential materials for anti-tumor and anti-virus because the mismatched base pair structure prominently reduce the toxic side effects. The pyrogenic effects in rabbit caused by double stranded RNA (Poly I: C) and its mismatched analogues (Poly I: C₁₂U) were tested. Poly I: C₁₂U have not appeared any toxicity and other side effect, but Poly I: C caused rabbit fever and even death.

Key words Double stranded RNA Pyrogenic effects

(上接第 93 页)

Continuous Cultivation of Recombinant Human Interleukin 11 which Expressed by *Pichia pastoris*

Sun Ying Li Hui Tian Fangxi Zhong Wentao
(Hangzhou Jiuyuan Gene Engineering Co. LTD Hangzhou 310018)

Abstract Continuous fermentation of recombinant human interleukin 11 which expressed by *Pichia pastoris* have been investigated. Continuous production of rhIL-11 by *Pichia pastoris* was demonstrated in a 10L working volume fermentor using glycerol and methanol as the carbon source. The fermentation could be extended for 20 days with a steady-state protein concentration of approximately 400mg/ml. Cell densities (OD₆₀₀) were > 100 at a dilution rate (D) of 0.05h⁻¹.

Key words *Pichia pastoris* Recombinant human interleukin 11 Continuous cuotivation

(上接第 96 页)

Cloning, Sequencing and Prokaryotic Expression of Human Laminin alpha 4 Chain LG3 Module

Lian Jiqin Zhang Yujing Dai Xufang Zhang Yanyu Sun Zhaozeng Li Shize
(The Faculty of Animal Science the Quaternmaster University Changchun 130062)

Abstract Total RNA was extracted from placenta by Trizol reagent, and an unique RT-PCR fragment of human laminin alpha 4 chain LG3 module was obtained. The PCR product then was cloned into PMD-18T vector and sequenced after it was identified by enzyme digestion and PCR amplification. Recombinant LG3 prokaryotic expression vector was constructed through recombination of PET-28a vector and certificated by sequencing, and the finally recombinant LG3 module was got expressed in *E. coli* BL21(DE3) strain.

Key words Laminin LG3 module Clone Expression