

# 重组猪 $\alpha$ 干扰素急性毒性研究

王兴满, 赵俊, 李京培, 刘伯玉, 汤仁树, 俞海洋, 胡勇, 王燕来, 王明丽\*

(安徽医科大学微生物学教研室, 安徽合肥 230032)

**摘要** [目的] 研究小白鼠体内重组猪  $\alpha$  干扰素急性毒性反应, 为临床安全用药提供依据。[方法] 依据急性毒性实验原则, 将小白鼠分为 2 大组: 腹腔注射组和肌肉注射组, 每组又分高、中、低 3 个剂量组, 同时设正常对照组。给药后 14 d 内连续观察小鼠行为活动等指标和毒性反应程度, 取血作血液学检查和生化检查, 以获得重组猪  $\alpha$  干扰素初步毒性资料, 并在实验结束时处死小白鼠进行剖检。[结果] 各组小鼠外部表现及行为特征均正常, 体温和体重的变化也在正常范围之内, 内脏病理解剖无器官病变情况, 血液、生化指标与正常对照组无明显差异。[结论] 该实验设定的猪  $\alpha$  干扰素最高剂量 ( $5.0 \times 10^5$  IU/只) 及其以下剂量, 均对小白鼠无明显毒性作用, 在临床上应用重组猪  $\alpha$  干扰素是安全的。

**关键词** 重组猪  $\alpha$  干扰素; 急性毒性; 小白鼠

**中图分类号** S858.28 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)33-16386-03

## Acute Toxicity of Recombinant Porcine IFN- $\alpha$

WANG Xing-man et al (Department of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032)

**Abstract** [Objective] To observe the acute toxicity of recombinant porcine IFN- $\alpha$  in mice and thus provide a basis for the clinical safety. [Method] According to the principles of acute toxicity, all the mice were divided into two major groups (intraperitoneally injected group and intramuscularly injected group) respectively at high dose, moderate dose and low dose. And the normal control group was also set up. Within 14 d after administration, the behavior of mouse and the degree of toxicity were continuously observed. The hematological indexes and biochemical indexes of blood were detected to obtain the preliminary toxicity data of the recombinant porcine IFN- $\alpha$ . And at the end of the experiment, mice were sacrificed for autopsy. [Result] There was not significant difference in external performance, behavioral characteristics, body temperature, weight, pathological anatomy of visceral organs, hematological indexes and biochemical indexes between the experimental groups and the control group. [Conclusion] The highest dose of porcine interferon- $\alpha$  ( $5.0 \times 10^5$  IU per mouse) in this experiment or the dose lower than this dosage should not have significant toxic effects on mice, and the recombinant porcine IFN- $\alpha$  is safe in clinical application.

**Key words** Recombinant porcine IFN- $\alpha$ ; Acute toxicity; Mice

病毒性传染病对畜禽养殖业危害很大, 目前对该病的防治主要是通过疫苗接种预防, 同时使用抗生素以及抗病毒化学药物治疗。但是, 由于养殖环境不完备, 病毒变异以及滥用抗生素等原因, 传统的预防和治疗途径受到了巨大挑战<sup>[1-4]</sup>。而动物干扰素对病毒性疾病具有较好的防治效果, 最早应用于兽医临床的是白细胞干扰素 (IFN), 但该种 IFN 在体内表达量低, 需采用生化分离的方法获得, 成本高, 很难进行规模化生产。虽然基因工程技术的发展使干扰素实现了规模化生产, 但目前干扰素在国内畜牧业生产上的研究和应用仍然很少<sup>[5-8]</sup>。自 2000 年以来, 应兽用市场的需求, 安徽医科大学微生物教研室开始了动物重组  $\alpha$  干扰素研发工作, 分别获得了 3 项国家发明专利。与病毒疫苗不同的是, IFN 是一种治疗用生物制品, 可连续反复使用。因此, 进行重组猪  $\alpha$  干扰素的安全性试验非常必要。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 试验动物及分组** 小白鼠选择体重为 18 ~ 20 g 的健康 Balb/c 小鼠, 共计 194 只。随机分为 8 组, 每组 10 只, 雌雄各半, 由安徽医科大学动物实验中心提供。

**1.1.2 药品** 重组猪  $\alpha$  干扰素纯化制品, 由安徽医科大学微生物学教研室自行制备 (详见专利: 2008100201804), 效价为  $1.0 \times 10^6$  IU/ml。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 急性毒性试验** 取小白鼠 160 只, 雌雄各半, 体重 ( $20 \pm 2$ ) g, 平均分为 2 大组; A 大组为腹腔注射组, 分 A1、A2 和 A3 3 个组, 每组 20 只。B 大组为肌肉注射组, 分 B1、B2 和 B3 3 个组, 每组 20 只。A 组与 B 组各设正常对照组, 每组 20 只。分别向 A<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、B<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、B<sub>3</sub> 组注射干扰素: A1 和 B1 组注射  $5.0 \times 10^5$  IU/只, A2 和 B2 组  $2.5 \times 10^5$  IU/只, A3 和 B3 组  $1.25 \times 10^5$  IU/只, 给药后连续观察 14 d, 检查死亡只数。观察各种毒性反应症状, 记录体重变化。试验过程中, 详细记录每只动物各种毒性反应出现和消失的时间, 并从体重、体温、血管指征、眼睑指征、呼吸指征、运动指征、皮肤 (包括毛色)、胃肠指征、肌张力、死亡时间和死亡症状等方面对动物进行观察。在试验结束时, 取血进行血液学和体内生化指标的测定, 然后处死小白鼠对其进行病理解剖。

**1.2.2 数据处理** 用 SPSS 13.0 软件对试验数据进行录入、统计, 结果以均数 ( $\bar{x}$ )  $\pm$  标准差 (S) 表示, 两组间的比较用 *t* 检验。

## 2 结果与分析

**2.1 行为特征变化** 在急性毒性试验中, 小白鼠没有死亡, 各组小白鼠的行为特征在注射干扰素前后无变化。爪、尾呈正常的肉红色, 无糜烂红肿; 行动活跃, 抓耳、舔脚, 头部经常耸动; 毛色正常, 无脱毛现象; 无小便失禁, 触之反应灵敏。

**2.2 体重变化** 由表 1 可见, 从小白鼠的体重变化看, 注射干扰素的各组体重变化与对照组相似, 即比较平缓, 稍有上升趋势, 与对照组相比, 差异不显著。

**2.3 体温变化** 从体温变化看, 给药后各组体温变化与对照组相似, 即小白鼠体温都在  $36^\circ\text{C} \sim 38^\circ\text{C}$ , 体温变化不超过  $2^\circ\text{C}$ , 没有异常的偏高或偏低, 属于正常的波动范围。

**基金项目** 安徽省自然科学基金研究重点项目 (KJ2008A085); 安徽省科技攻关项目 (08010302179)。

**作者简介** 王兴满 (1957 -), 男, 安徽合肥人, 实验师, 从事微生物学方面的研究。\* 通讯作者, E-mail: anhuiweishengwu@ yahoo.com.cn。

**收稿日期** 2009-07-24

表 1 小白鼠急性毒性实验体重变化

Table 1 The weight change of white mice in acute toxicity test

组别 Groups	性别 Sexes	动物数//只 Number of animal	体重//g Weight		
			给药前 Before feeding medicine	给药后 7 d 7 days after feeding medicine	给药后 14 d 14 days after feeding medicine
A1	雄性 Male	10	19.8 ± 1.2	20.1 ± 1.5 <sup>*#</sup>	20.2 ± 1.1 <sup>*#</sup>
	雌性 Female	10	20.3 ± 1.1	20.7 ± 1.8 <sup>*#</sup>	20.5 ± 1.9 <sup>*#</sup>
A2	雄性 Male	10	19.6 ± 1.3	19.9 ± 1.1 <sup>*#</sup>	20.1 ± 1.2 <sup>*#</sup>
	雌性 Female	10	19.9 ± 1.8	20.1 ± 1.7 <sup>*#</sup>	20.1 ± 1.5 <sup>*#</sup>
A3	雄性 Male	10	19.6 ± 1.7	19.9 ± 1.8 <sup>*#</sup>	20.2 ± 1.5 <sup>*#</sup>
	雌性 Female	10	19.3 ± 1.2	19.8 ± 1.2 <sup>*#</sup>	20.1 ± 1.7 <sup>*#</sup>
A 组对照组 Control of A group	雄性 Male	10	19.5 ± 1.5	19.7 ± 1.2 <sup>*#</sup>	19.8 ± 1.4 <sup>*#</sup>
	雌性 Female	10	19.6 ± 1.2	19.6 ± 1.1 <sup>*#</sup>	19.8 ± 1.6 <sup>*#</sup>
B1	雄性 Male	10	19.5 ± 1.4	19.4 ± 1.7 <sup>*#</sup>	19.6 ± 1.2 <sup>*#</sup>
	雌性 Female	10	19.7 ± 1.1	19.6 ± 1.2 <sup>*#</sup>	19.9 ± 1.5 <sup>*#</sup>
B2	雄性 Male	10	19.3 ± 0.8	19.7 ± 0.9 <sup>*#</sup>	19.7 ± 1.1 <sup>*#</sup>
	雌性 Female	10	20.1 ± 1.1	20.2 ± 0.8 <sup>*#</sup>	20.4 ± 0.9 <sup>*#</sup>
B3	雄性 Male	10	19.9 ± 1.1	19.7 ± 0.9 <sup>*#</sup>	20.1 ± 0.7 <sup>*#</sup>
	雌性 Female	10	19.7 ± 1.1	19.6 ± 1.4 <sup>*#</sup>	19.9 ± 0.9 <sup>*#</sup>
B 组对照组 Control of B group	雄性 Male	10	19.9 ± 0.9	20.1 ± 1.1 <sup>*#</sup>	20.2 ± 0.7 <sup>*#</sup>
	雌性 Female	10	19.6 ± 1.1	19.9 ± 0.8 <sup>*#</sup>	19.9 ± 1.1 <sup>*#</sup>

注: \* 表示与给药前相比,差异不显著( $P > 0.05$ );#表示与对照组相比,差异不显著( $P > 0.05$ )。

Note: \* indicates the difference is not significant ( $P > 0.05$ ) compared with before feeding medicine; # indicates the difference is not significant ( $P > 0.05$ ) compared with control.

**2.4 血液学检查** 给药 14 d 后,处死前,取血测血液学指标。结果表明,各组血液学指标和对照组相比,无显著性差异。

**2.5 体内生化指标检查** 给药 14 d 后,处死前,取血进行血液生化指标检查。由表 2 可知,A1 组雌性小鼠的丙氨酸氨基转移酶(ALT)明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ),其他各组生化

指标与对照组相比,无显著性差异。

**2.6 病理解剖** 试验结束后,对急性毒性试验的小白鼠进行解剖,结果显示,心、肝、脾、肺、肾上腺、胰脏、肠、胃、卵巢和睾丸等重要脏器均未见有意义的中毒性病变,与对照组情况一致。

表 2 小白鼠肝肾功能主要生化指标检查

Table 2 Main biochemical index inspection of white mice hepatic and renal function

组别 Groups	性别 Sexes	ALT//U/L	AST//U/L	BUN//mmol/L	Cre// $\mu$ mol/L
A1	雄性 Male	76.8 ± 8.9	39.2 ± 5.4	8.9 ± 1.2	30.2 ± 4.6
	雌性 Female	89.2 ± 7.8 <sup>*</sup>	38.7 ± 5.1	8.7 ± 1.5	29.8 ± 5.9
A2	雄性 Male	77.2 ± 3.1	37.9 ± 6.8	8.5 ± 1.4	30.8 ± 5.2
	雌性 Female	76.4 ± 6.9	40.1 ± 7.8	8.7 ± 2.1	30.1 ± 6.2
A3	雄性 Male	75.6 ± 9.2	39.8 ± 4.6	8.8 ± 1.7	30.9 ± 4.3
	雌性 Female	74.9 ± 8.3	38.6 ± 5.6	9.1 ± 2.5	30.7 ± 5.4
A 组对照 Control of A group	雄性 Male	78.1 ± 8.3	39.5 ± 4.6	8.9 ± 2.3	29.9 ± 5.6
	雌性 Female	75.4 ± 11.5	38.9 ± 6.3	8.7 ± 1.7	30.5 ± 6.8
B1	雄性 Male	77.9 ± 6.4	38.4 ± 7.7	8.4 ± 0.9	30.7 ± 5.3
	雌性 Female	79.1 ± 5.7	40.2 ± 9.8	8.7 ± 1.5	29.7 ± 5.1
B2	雄性 Male	78.2 ± 7.5	38.5 ± 6.9	8.9 ± 2.8	30.5 ± 6.1
	雌性 Female	77.5 ± 8.6	37.9 ± 9.2	9.0 ± 1.8	30.3 ± 4.9
B3	雄性 Male	76.5 ± 7.1	38.7 ± 5.6	8.7 ± 1.6	29.9 ± 5.9
	雌性 Female	77.9 ± 12.5	39.3 ± 6.5	8.8 ± 2.6	29.7 ± 5.7
B 组对照 Control of B group	雄性 Male	78.4 ± 8.3	38.6 ± 5.5	8.7 ± 2.5	30.5 ± 6.4
	雌性 Female	79.6 ± 9.2	39.5 ± 7.2	8.9 ± 2.4	30.3 ± 6.7

注: \* 表示与对照组相比,具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

Note: \* indicates the difference is significant ( $P < 0.05$ ) compared with control.

### 3 结论与讨论

目前,世界上约有 200 多种动物传染病和 150 多种寄生虫病,通过动物或动物产品直接或间接地传染给人类,我国现有畜禽传染病 202 种,其中 1/2 以上为人兽共患病。近年来,人兽共患病在世界流行活跃,新的不断爆发,旧的再度肆虐,使国际社会面临着共同的威胁与挑战。人畜共患病已成

为各国政府和有关国际组织高度关注的重大公共卫生安全问题。最近流行的猪流感病毒、禽流感病毒等人兽共患的病原体已严重威胁人类健康,甚至对人类造成致死性感染<sup>[9]</sup>。目前,对畜禽类传染病的预防和治疗途径,主要是通过疫苗接种防疫和使用抗生素,但由于养殖环境恶劣、病毒变异以及畜禽机体抵抗力下降等原因,使大部分抗生素类药物以及

传统的口服类抗病毒药物,存在药物残留等问题,给人类健康带来负面影响,目前已全面叫停。而传统的疫苗,由于它的高度特异性,常常难以应对病毒变异和新型病毒的出现,给畜禽养殖业带来的巨大危害<sup>[10-12]</sup>。因此,积极治疗禽、畜病毒病将成为人类最为关注的问题。

干扰素是病毒感染后,诱导机体产生的一种广谱抗病毒、抗肿瘤和具有免疫调节作用的蛋白质。其主要通过抑制病毒基因转录或降解病毒RNA来抑制病毒的生长繁殖以及发挥抗肿瘤的活性。按照干扰素的产生细胞,生化特征以及在机体免疫方面所发挥的作用不同,分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 3类。 $\alpha$ 型干扰素在体内外能发挥广谱、高效抗病毒作用,其抑制病毒蛋白质的合成,并能选择性地作用于受感染细胞,而对正常宿主细胞无作用或作用微弱,被认为是当今应用前景最为广阔的生物制剂之一<sup>[13-17]</sup>。 $\alpha$ 型干扰素疗效已被世界各国学者所公认,目前全球有60多个国家和地区,应用人干扰素制剂来治疗大约30多种病毒性疾病。相对而言,动物干扰素的研究则滞后很多,目前主要停留在基础研究和临床试验阶段。笔者是在课题组已研发成熟的重组猪 $\alpha$ 干扰素的基础上,对其进行急性毒性试验,以期为临床使用提供理论依据。在对小白鼠注射重组猪 $\alpha$ 干扰素后,小白鼠外部及行为特征正常;体温和体重的变化也在正常范围之内;内脏病理解剖发现无器官病变情况;血液和生化指标与正常对照组无明显差异。试验结果表明,重组猪 $\alpha$ 干扰素对试验动物没有明显毒性作用,使用是安全的。试验过程中,最大剂量按公斤体重计算时,相当于对猪正常施用剂量的1000倍。因此,重组猪 $\alpha$ 干扰素比临床剂量大1000倍时,对小白鼠不具有急性毒性作用,这为重组猪 $\alpha$ 干扰素的临床安全使用提供了依据。

(上接第16383页)

喹诺酮类药物如氧氟沙星、环丙沙星和诺氟沙星产生了较强的耐药性<sup>[4]</sup>;白同臣等报道,75株菌中大多数对青霉素、林可霉素、链霉素、四环素产生强耐药性<sup>[5]</sup>;曹军平等报道,分离2株大肠杆菌对链霉素、庆大霉素,青霉素均产生强耐药性<sup>[6]</sup>。大肠杆菌耐药性在不同地区或同一地区的不同鸡群间存在差异,而且不断变化,这就要求对当地鸡群耐药性进行检测,建立合理的用药方案。

该试验通过药敏试验显示,该菌对菌必治、阿米卡星、壮观霉素等高度敏感,对呋喃妥因、庆大霉素表现为低度敏感。根据药敏试验结果对该种鸡场病鸡采用菌必治药物治疗,3d后病情得到控制,取得良好效果。临床治疗的结果验证了该种鸡场病鸡为致病性大肠杆菌感染,同时说明,只有通过药敏试验选择敏感性药物对于该病的治疗才能取得良好

## 参考文献

- [1] NEUMANN G, NODA T, KAWAOKA Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus[J]. *Nature*, 2009, 459(7249): 931-939.
- [2] 郭元吉. 正确面对禽流感病毒对人类健康的威胁[J]. *传染病信息*, 2006, 19(1): 7-9.
- [3] 王汝都, 白建, 马海利. 近期鸡新城疫的流行特点及其防制[J]. *中国畜牧兽医*, 2005, 30(4): 60-62.
- [4] 高迎春, 魏秀丽, 蔡芳芹. 动物应用抗菌药的风险及防制对策[J]. *中国兽药杂志*, 2006, 40(2): 43-48.
- [5] 夏春, 吴志光, 汪明. 肉鸡IFN- $\alpha$ 基因的克隆、序列分析以及在大肠杆菌中的表达[J]. *农业生物技术学报*, 2000, 8(4): 377-381.
- [6] 万建青, 吴文学, 夏春. 毕赤酵母表达猪干扰素 $\gamma$ 基因及其抑制蓝耳病病毒效果[J]. *生物工程学报*, 2002, 18(6): 683-686.
- [7] 曹瑞兵, 周斌, 陈溥言, 等. 猪 $\gamma$ 干扰素的基因克隆、改造、表达及其活性测定[J]. *南京农业大学学报*, 2003, 26(2): 71-75.
- [8] 曹瑞兵, 周国栋, 周海霞, 等. 猪 $\beta$ 干扰素在毕赤酵母中的分泌表达及其对伪狂犬病毒的抑制作用[J]. *微生物学报*, 2006, 46(3): 412-417.
- [9] WANG T T, PALESE P. Unraveling the mystery of swine influenza virus[J]. *Cell*, 2009, 137(6): 983-985.
- [10] MAHAN S M, BARBET A F, BURRIDGE M J. Development of improved vaccines for heartwater[J]. *Dev Biol (Basel)*, 2003, 114: 137-45.
- [11] GHOSH S, AZHAHLANAMBI P, DE LA FUENTE J. Control of ticks of ruminants, with special emphasis on livestock farming systems in India: present and future possibilities for integrated control-a review[J]. *Exp Appl Acarol*, 2006, 40(1): 49-66.
- [12] TONIUTTO P, FABRIS C, PIRISI M. Antiviral treatment of hepatitis C[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2006, 7(15): 2025-35.
- [13] TAS F, KURUL S, CAMLICA H, et al. Intermediate dose interferon alpha in adjuvant treatment for high-risk melanoma: a single institution's experience[J]. *Med Oncol*, 2006, 23(4): 471-477.
- [14] GATTONI A, PARLATO A, VANGIERI B, et al. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (2 of 2 parts) [J]. *Clin Ter*, 2006, 157(5): 457-468.
- [15] MARCUS P I, ROJEK J M, SEKELLICK M J. Interferon induction and/or production and its suppression by influenza A viruses[J]. *J Virol*, 2005, 79(5): 2880-2890.
- [16] DUNN G P, KOEBEL C M, SCHREIBER R D. Interferons, immunity and cancer immunoeediting[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(11): 836-848.
- [17] RUTTANAPUMMA R, ANZAI M, TAKEGAWA M, et al. High level expression of biologically active canine interferon-alpha subtype 4 using a baculovirus [J]. *J Vet Med Sci*, 2006, 68(12): 1347-1349.

的治疗效果。

## 参考文献

- [1] 吴清民. 兽医传染病学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [2] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [3] MARCELINO T S, STEPHEN J G. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16srna genes by PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 625-630.
- [4] 徐树强, 杨安龙, 吴兆林, 等. 扬州地区鸡大肠杆菌的分离鉴定与药敏试验[J]. *江苏农业科学*, 2006(6): 330-331.
- [5] 白同臣, 曲海波, 吴金, 等. 鸡大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2007(9): 78-79.
- [6] 曹军平, 姜小勇, 麦倍华, 等. 鸡眼炎型大肠杆菌分离鉴定与药敏试验[J]. *中国动物检疫*, 2006, 23(9): 36-37.
- [7] PANG X H, CHU X L, SU J Q, et al. Screening and efficacy observation of traditional Chinese medicine against chicken pathogenic *Escherichia coli* [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2009, 10(1): 140-144.