

· 论著 ·

重组人干扰素 α -2b 鼻腔喷雾剂预防治疗恒河猴感染 SARS-CoV 的试验研究

高虹 张丽兰 魏强 段招军 涂新明 喻志爱 邓巍 张利萍 鲍琳琳
张滨 佟巍 侯云德 张兵林 黄澜 秦川

【摘要】 目的 评价重组人干扰素 α -2b 鼻腔喷雾剂对恒河猴感染 SARS-CoV 的预防治疗作用。**方法** 采用鼻腔喷雾法(剂量为 60 万单位/鼻孔)研究了重组人干扰素 α -2b 鼻腔喷雾剂对感染 SARS-CoV 的恒河猴预防治疗效果。**结果** 试验组(5 只)和对照组(5 只)相同时间检测的咽拭子等标本中,Real-time PCR 检测和病毒分离均未检出病毒。攻毒后病毒导致机体产生的中和抗体和 IgG 抗体的反应也较对照组弱。血液学指标检测结果表明试验组动物攻毒后各项指标较试验前比较没有显著性改变;病理结果显示试验组 2 只恒河猴肺组织形态基本正常,其余 3 只猴有肺间质性炎,表现肺间隔增厚,单核样细胞为主的炎细胞浸润,其中 1 只增厚的肺间隔有局灶相互融合,这 3 只猴肺部病变与对照组的病变表现相似,且病变累及范围较对照组小;其他各受检脏器均未见明显异常。**结论** 重组人干扰素 α -2b 鼻腔喷雾剂可以有效阻断或减弱 SARS-CoV 对恒河猴的感染。

【关键词】 干扰素 α ; 严重急性呼吸综合征; 冠状病毒科; 预防卫生服务; 治疗结果

Preventive and therapeutic effects of recombinant IFN α -2b nasal spray on SARS-CoV infection in *Macaca mulata* GAO Hong*, ZHANG Li-lan, WEI Qiang, DUAN Zhao-jun, TU Xin-ming, YU Zhi-ai, DENG Wei, ZHANG Li-ping, BAO Lin-lin, ZHANG Bin, TONG Wei, HOU Yun-de, ZHANG Bing-lin, HUANG Lan, QIN Chuan. *Institute of Laboratory Animals Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Corresponding author: QIN Chuan, E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the preventive and therapeutic effects of recombinant IFN α -2b for nasal spray on SARS-CoV infection in *Macaca mulata* (rhesus monkey). **Methods** Ten rhesus monkeys were divided into two groups, 5 in interferon group, and 5 in control group. Before and after SARS-CoV attack, the virus was detected in samples such as pharyngeal swab in all the two groups by Real-time PCR (RT-PCR) and virus isolation was performed. **Results** After virus attack, the level of SARS-CoV-specific IgG and neutralizing antibody were induced by SARS-CoV in the interferon group was weaker than in control group. Hematology items showed no apparent changes after virus attack in treated group. Through pathological examination, the morphology of the lung tissues of two Macaques in the treated group was normal, while the other three displayed the interstitial pneumonia with the thickened septum and infiltration with mononuclear cells. Among which, one monkey showed part of thickened septum fused with each other. These lesions in the interferon treated animals were similar to those seen in the animals in control group, but with smaller scope of pathological changes. No significant abnormality was detected in other organs. **Conclusion** Recombinant IFN α -2b could effectively interdict or weaken SARS-CoV injury in monkeys.

【Key words】 Interferon alfa; Severe acute respiratory syndrome; Coronaviridae; Preventive health services; Treatment outcome

作者单位:100052 北京,中国医学科学院实验动物研究所中国协和医科大学(高虹、魏强、涂新明、邓巍、鲍琳琳、佟巍、张兵林、黄澜、秦川);北京远策药业有限公司(张丽兰、喻志爱、张利萍、张滨);病毒生物技术国家工程研究中心北京金迪克生物技术研究所(段招军、侯云德)

通讯作者:秦川, E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn

SARS 是由冠状病毒亚型变种(SARS-CoV)引起的呼吸系统疾病,以肺部感染病变为主要特征。SARS 病死者尸检病理主要特征表现在肺部出血,间质性肺炎,肺泡增厚等^[1-3]。SARS 主要感染成年人,且感染 SARS 老年人的病死率高。由于这种新发疾病具有快速传播、死亡率高、宿主动物不清,且

缺乏有效治疗方法,所以仍然对全球人类健康构成很大威胁。世界各国仍在积极筛选、研制防治 SARS 的药物或疫苗。恒河猴是目前普遍使用的 SARS 动物模型^[4],重组人干扰素 α -2b 鼻腔喷雾剂对恒河猴感染 SARS-CoV 有很好的预防治疗作用,现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 动物 SPF 级恒河猴,中国医学科学院医学生物学研究所提供(滇实动证第 2003006),体重 2.4 ~ 4.2 kg,3 周龄,5 只/组,雌雄兼用。猴饲养在 BSL-III 实验室[许可证号:SYX(京)2003-0004]内,负压隔离器,压差 -20 Pa,温度 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$,换气次数为 14 ~ 17 次/h,水料自取。试验前动物适应 1 周,选择正常、健康、雌性无孕的猴作为受试动物。

1.2 病毒株 PUMC01 株,中国医学科学院实验动物研究所提供,病毒滴度为 $5.08\text{LgTCID}_{50}/\text{ml}$, -80°C 保存。

1.3 仪器 Roche Real-time PCR (RT-PCR) 仪 (LightCycler)。

1.4 实验方法 10 只猴随机分为 2 组,5 只/组,分为试验组(重组人干扰素 α -2b 鼻腔喷雾剂)和对照组(空白干扰素)。共给予 10 次受试物,分别为攻毒前 19 和 1 h,攻毒后 7、23、31、47、55、71、95 和 119 h。经鼻吸入重组人干扰素 α -2b,0.4 ml/只(60 万单位/鼻孔)。攻毒后 2 ~ 8 天每天取咽拭子做 Real-time PCR 检测;攻毒后 2、5、7 天取咽拭子和血浆作病毒分离;3、7、11、15、19、23 和 27 天取血测血常规、血生化和血凝指标;攻毒后 11、19 和 27 天取血测 IgG;19、27 天取血测中和抗体。攻毒后 27 天动物安乐死,大体解剖,主要脏器进行病理学检查。

1.5 病毒分离方法

1.5.1 血浆:取抗凝血 1 ml,3000 r/min 离心 20 min,分离血浆,接种于长成单层 Vero 细胞的 24 孔培养板上。标本接种培养板 2 孔/份,血浆 100 μl 加于每孔并补充 400 μl 的维持液后放 37°C CO_2 孵箱培养;吸附 1 h 后,取出 24 孔板,吸出标本液,用 PBS(加 2% 双抗)洗两遍,后加 DMEM 维持液补至 2 ml,置 37°C CO_2 培养箱培养,连续观察 7 ~ 10 d。将标本盲传 3 代,观察结果。

1.5.2 组织:取组织标本 0.5 cm^3 剪成细小的碎块,加 DMEM 液(含 2% 双抗)于 1 ml 研磨器中,研磨后吸出匀浆液加于 1.5 ml 离心管。6000 r/min,离心

10 min,取上清。将上清分别接种于生长单层 Vero 细胞的 24 孔板内,2 孔/份;100 μl /孔,并加 400 μl 维持液。 37°C CO_2 孵箱吸附 1 h。吸出液体后用 PBS(加 2% 双抗)洗两遍后加 DMEM 液补至 2 ml, 37°C 孵箱培养 5 ~ 7 d,观察细胞病变。将第一代上清接种于 Vero 细胞传代,盲传 3 代,进行病毒鉴定。

1.6 组织病理学方法 取安乐死猴肺、心、肝、脾、肾等组织做病理学检查,10% 中性甲醛固定;组织经修块,常规梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片厚度 8 ~ 10 μm ,苏木素伊红(HE)染色,光镜下检查。

1.7 RT-PCR 方法 用 RT-PCR 检测 SARS-CoV 核酸(RNA),在 SARS-CoV 接种恒河猴后 1 ~ 8 天每天收集咽拭子,以核酸自动分离纯化系统 MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Cat. No. 3264793) 从 200 μl 样本中提取总核酸,在 BSL-III 实验室内操作。用 LightCycler SARS-CoV Quantification Kit (Cat. No. 03604438) 进行 RT-PCR。具体方法:核酸自动分离纯化系统从 200 μl 样本中提取总核酸,取 5 μl 核酸液加入 LightCycler SARS-CoV Reaction Mix 7.5 μl , Mn(OAc) 21.1 μl , LightCycler SARS-CoV Detection Mix 2 μl , LightCycler SARS-CoV Internal Control RNA 0.5 μl , H_2O 3.9 μl 。按以下条件进行 RT-PCR 反应: 61°C 20 min, 95°C 30 s, 95°C 5 s, 55°C 15 s, 72°C 10 s, 45 个循环。同时设定阳、阴性对照及 5 个标准品。结果判定:阳性对照、阴性对照结果正确则实验成立,根据标准品得出样本的拷贝数。

2 结果

2.1 一般状态的观察 对照组猴攻毒后 1 ~ 2 天体温一过性升高,第 3 天全部猴出现精神欠佳、活动减少、摄食量减少,3 只猴出现呼吸短促等临床症状。到攻毒第 7 天有所缓解。干扰素试验组猴未见异常。

2.2 中和抗体 动物攻毒后 19 天,试验组猴中和抗体水平很低,为 1: 5 ~ 1: 10,几何均数(GMT)为 7.6,与对照组比较差异有统计学意义, $P < 0.01$;对照组猴中和抗体滴度为 1: 20 ~ 1: 80,GMT 为 45.9。攻毒组猴中和抗体仍然处于低水平,滴度为 1: 5 ~ 1: 10,GMT 为 10.0,与对照组比较差异有统计学意义, $P < 0.05$;对照组中和抗体滴度为 1: 10 ~ 1: 80,GMT 为 40.0。

2.3 IgG 检测 试验组猴从攻毒后 15 ~ 27 天,产

生低水平抗体或未有抗体产生;此期间对照组猴产生较高抗体,并持续到 27 天安乐死。

2.4 实时定量 RT-PCR 检测 对照组全部猴咽拭子均检出了 SARS-CoV,持续时间为攻毒后 2~8 天。试验组猴咽拭子未检出病毒。拷贝数目见表 1。

2.5 病毒分离 对照组猴咽拭子攻毒后 2 天 3 只(1~3)为阳性,5 天 1 只(1 号)为阳性,7 天 2 只(1,3 号)为阳性。试验组猴咽拭子和所有猴血浆均为阴性。

2.6 血液学指标 试验组猴血常规、血生化、血凝指标等检测结果表明,攻毒后各项指标较试验前比较没有显著性改变;对照组猴攻毒后 ALT(丙氨酸氨基转移酶)、AST(天冬氨酸氨基转移酶)、CK(肌酸激酶)、UREA(尿素氮)、ALP(碱性磷酸酶)与试验前比较差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。

2.7 脏器系数 试验组与对照组比较,未见显著性改变。

2.8 大体解剖 对照组解剖的 2 只猴肺脏为灰白色,有大面积出血,肺脏与胸壁有粘连;试验组 5 只猴肺脏为粉色,4 只猴肺脏有少量出血,其中 1 只猴肺脏与胸壁有粘连。

2.9 组织病理 对照组猴 1、2 号有肺间质性炎,其中 2 号病变范围较 1 号广,表现为以肺间隔增厚、单核样细胞为主的炎细胞浸润为主要特征的肺部病变,病变较单一;其他各受检脏器均未见明显异常。试验组猴 7、10 号肺组织形态基本正常,6、8、9 号有肺间质性炎,表现为以肺间隔增厚、单核样细胞为主的炎细胞浸润为主要特征的肺部病变,病变较单一,9 号增厚的肺间隔有局灶相互融合,6、8、9 号肺部病变与对照组的病变表现一致,而病变累及范围较模型组小;其他各受检脏器均未见明显异常(图 1)。

3 讨论

重组人干扰素 α -2b 具有广谱抗病毒、抗肿瘤、

抑制细胞增殖以及提高免疫功能等作用。干扰素与细胞表面受体结合,诱导细胞产生多种抗病毒蛋白,抑制病毒在细胞内繁殖,提高免疫功能包括增强巨噬细胞的吞噬功能,增强淋巴细胞对靶细胞的细胞毒性和天然杀伤性细胞的功能。

SARS-CoV 的病毒复制部位主要在下呼吸道,可造成弥漫性肺泡破坏。试验组猴的咽拭子没有发现病毒,而对照组猴的咽拭子有病毒存在,并停留最长达 8 天,这与 Osterhaus^[5] 的试验结果一致。这种现象说明对感染 SARS 的恒河猴以干扰素 α -2b 作预防性处置可以显著减少病毒的复制和分泌。2004 年 3 月 1 日,《自然》杂志发表了一篇短评及学术论文,得出的结果也与本研究相似,称干扰素- α 可能有助于防治 SARS,缓解被感染猴的症状,使它们的传染性降低^[6]。

中和抗体和 IgG 结果表明,重组人干扰素 α -2b 鼻腔喷雾剂有效抑制了病毒的感染和复制,导致机体产生的中和抗体和 IgG 抗体的水平较低,对照组猴没有干扰素的保护,病毒感染机体后,在体内大量复制,诱导产生高滴度的中和抗体和 IgG 抗体,证实病毒感染。血液学指标检测结果表明,试验组猴攻毒后各项指标较试验前比较没有显著性改变;临床观察无不良反应。

SARS 患者病理学早期改变可见肺脏较弥漫的急性渗出性及急性出血性炎症,局部炎症反应细胞主要为单核细胞积聚,上皮细胞脱落,晚期肺间质性炎,表现为以肺间隔增厚、单核样细胞为主的炎细胞浸润为主要特征的肺部病变^[1-3]。对照组猴出现以肺间隔增厚、单核样细胞为主的炎细胞浸润为主要特征的肺部病变,并出现了拟人病变。试验组部分猴(3/5)出现了肺间质性炎,病变累及范围较对照组小,说明重组人干扰素 α -2b 鼻腔喷雾剂可以有效阻断或减弱 SARS-CoV 对恒河猴的感染,对恒河猴有保护作用。

表 1 对照动物实时定量 RT-PCR 结果

Tab. 1 The result of Real-time PCR for control animals

序号 Serial No. of animal	攻毒后不同时间(d)的拷贝数 No. of viralgene copies different days (d) after challenging with the virus						
	2	3	4	5	6	7	8
1	3.303×10^3	3.118×10^3	2.252×10^2	4.791×10^2	2.652×10^2	4.310×10^2	7.162×10^2
2	-	2.299×10^2	2.639×10^2	5.134×10^1	-	-	7.696×10^1
3	-	4.277×10^2	9.453×10^1	3.696×10^1	1.173×10^3	1.348×10^2	-
4	-	1.834×10^2	1.918×10^2	5.778×10^1	4.073×10^2	1.573×10^2	1.820×10^3
5	-	-	-	-	-	3.692×10^1	-

2003 年加拿大科学家曾在小范围 SARS 患者身上使用干扰素, 结果表明患者肺部阴影大大改善^[7]。我国的第一个预防 SARS 的药物干扰素 α -2b 也在 2004 年 4 月 24 日通过“绿色通道”进入了临床实验阶段。这标志着该药物用于治疗 SARS 的前景是光明的。

(本文图 1~6, 见插图 3-1 页)

参 考 文 献

1 陈泳仪, 郑坚, 王瑞林. 2003 严重急性呼吸综合症的病理改变.

中华病理学杂志, 32: 279-281.

2 丁彦青, 王慧君, 申洪. 严重急性呼吸综合征临床病理学观察. 中华病理学杂志, 2003, 32: 195-200.

3 郎振为, 张立洁, 张世杰. 严重急性呼吸综合征 3 例尸检病理分析. 中华病理学杂志, 2003, 32: 201-204.

4 Qin C, Wang JW, Wei Q, et al. SARS coronavirus-infected animal model in Macaca mulata. Pathol, 2005 (in press).

5 Osterhaus A. Antibodies to SARS-like virus hint at repeated infections, Nature, 2004, 427, 185.

6 Haagmans BL, Kuiken T, Martina BE, et al. Pegylated interferon- α protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. Nat Med, 2004, 10: 290-293.

(收稿日期: 2005-07-12)

· 论 著 摘 要 ·

医用三氧治疗慢性乙型肝炎临床报道

焦秀娟 彭勤

医用三氧治疗经过一个多世纪的发展和完善后, 目前已经成为某些代谢性、感染性和自身免疫性疾病的首选或是辅助治疗方法。我们应用医用三氧成功地治疗了许多患者, 现将两例慢性乙型肝炎病例总结如下。

1 对象和方法

对象: 病例 1: 患者 XXX, 男性, 49 岁, HBsAg 阳性 16 年, 间断乏力、纳差 4 年, 加重 20 d 后入院。该患者无乙肝家族史, 既往未用过抗病毒药物治疗。入院后化验结果显示: 肝功能 ALT 599 U/L, AST 636 U/L, GGT 244 U/L, CHE 4894 U/L, TBIL 90.7 mmol/L, DBIL 42.3 mmol/L, TP 72 g/L, ALB 40 g/L, A/G 1.3; HBV-M 显示 HBsAg、抗-Hbe、抗-HBc 阳性, HBV DNA (PCR) 2.96×10^5 copies/ml, 入院后予以常规护肝、降酶、退黄治疗, 同时予以医用三氧治疗。

病例 2: 患者 XXX, 女性, 45 岁, HBsAg 阳性 17 年, 间断乏力、纳差 4 年, 肝功异常 1 个月后入院。患者自发病以来, 未进行过抗病毒治疗, 仅当肝功能异常时予以一般护肝、降酶治疗。入院时化验结果显示: 肝功能 ALT 110 U/L, AST 108 U/L, GGT 35 U/L, CHE 8730 U/L, TBIL 15.5 mmol/L, DBIL 2.0 mmol/L, TP 79 g/L, ALB 43 g/L, A/G 1.2; HBV-M 显示 HBsAg、抗-HBc 阳性, HBV DNA (PCR) 1.69×10^6 copies/ml。入院后予以甘利欣、阿拓莫兰等治疗, 同时予以医用三氧

治疗。

方法: 三氧治疗: 每周 3 次, 包括: ①基本自血疗法: 抽出患者静脉血 50 ml 然后与 50 ml 一定浓度的三氧混合后, 再回输到患者体内, 医用三氧的浓度由 20 μ g/ml 逐次渐增到 40 μ g/ml。②直肠注气法: 直肠内直接灌入浓度为 20 μ g/ml 的医用三氧。HBV 标志物检测采用 ELISA 法, HBV DNA 定量检测采用荧光 PCR 法, 结果 $< 1 \times 10^3$ copies/ml 为阴性。

2 结 果

2.1 生化指标 病例 1 的 ALT、AST、GGT、CHE 和 TBIL 治疗前是 36 U/L, 38 U/L, 186 U/L, 5373 U/L, 11.9 mmol/L。病例 2 的 ALT 和 AST 治疗前后是 36 U/L, 38 U/L。

2.2 HBV 标志物 病例 2 治疗前为 HBsAg、抗-HBc 阳性, 治疗 26 次后转为 HBsAg、抗-Hbe、抗-HBc 阳性。

2.3 HBV DNA 病例 1 治疗前 HBV DNA 定量为 2.96×10^5 copies/ml, 治疗 9 次后转阴。病例 2 治疗前 HBV DNA 定量为 1.69×10^6 copies/ml, 治疗 37 次后转阴。

3 讨 论

医用三氧可以激活人体免疫细胞的活性, 增加细胞因子的释放, 从而增强机体的免疫能力。Bocci 等的研究表明, 三氧治疗后可以促进机体释放干扰素、白介素、粒细胞集落刺激因子等。这两例患者的疗效证实了医用三氧对乙肝患者的护肝、降酶及抗病毒的作用, 我们将继续随访所有患者的转归, 并扩大研究以进一步证实医用三氧的疗效。

(收稿日期: 2005-05-27)

基金项目: 2004 年度河北省医学实用技术跟踪项目 (38)

作者单位: 066000 秦皇岛市第三医院

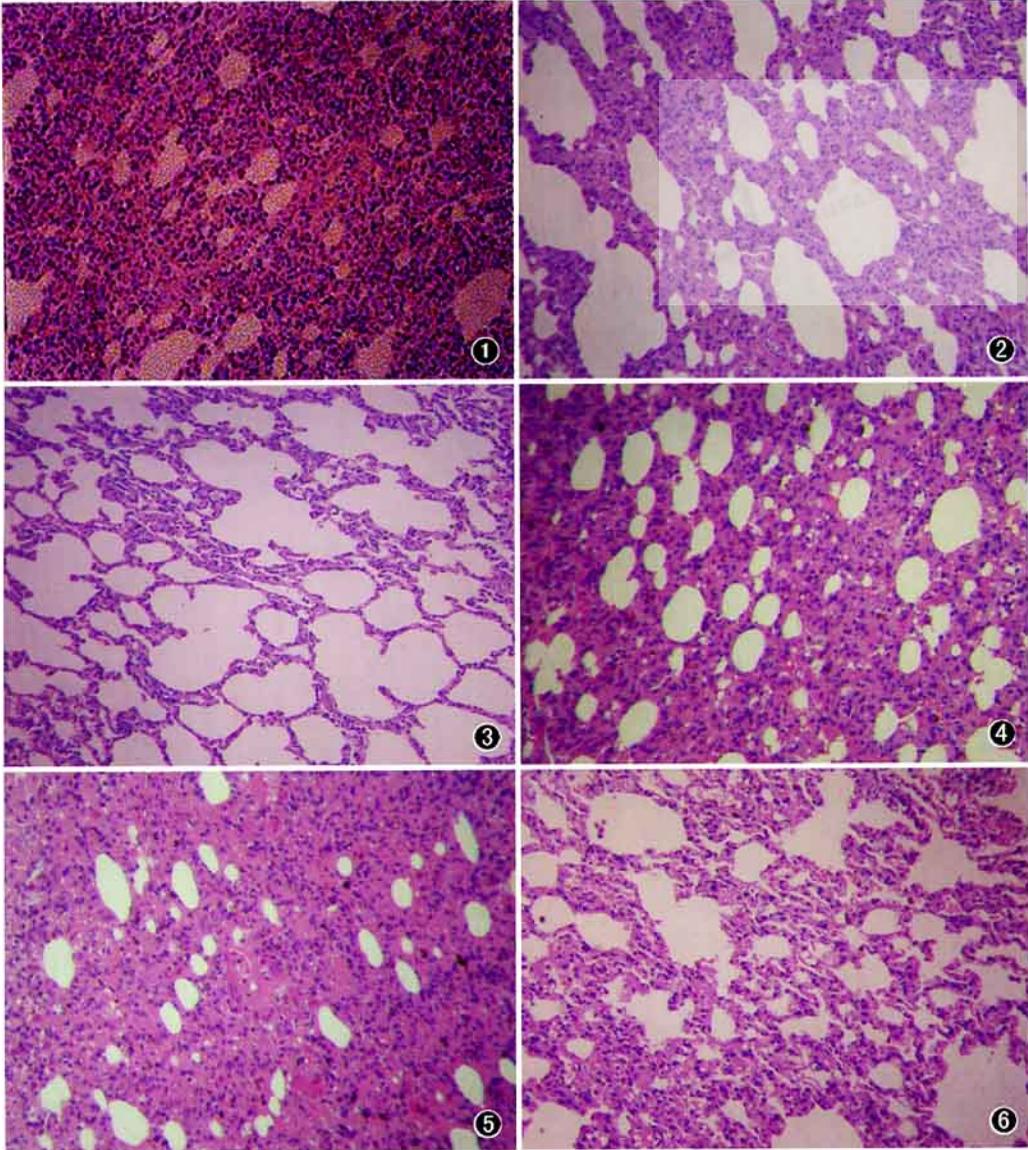


图1 图1 对照组2号肺组织间质性炎,肺间隔增厚伴炎细胞浸润(10×10) 图2 试验组6号肺间质性炎,增厚肺间隔内炎细胞浸润(10×10) 图3 试验组7号肺组织形态基本正常(10×10) 图4 试验组8号肺间质性炎,增厚肺间隔内炎细胞浸润(10×10) 图5 试验组9号肺间质性炎,肺间隔融合伴炎细胞浸润(10×10) 图6 试验组10号肺组织形态基本正常(10×10)

Fig. 1 The interstitial pneumonia with the thickened septum and infiltration with mononuclear cells, in the No. 2 of the controlled group(10×10) Fig. 2 The interstitial pneumonia with the thickened septum and infiltration with mononuclear cells, in the No. 6 of the treated group(10×10) Fig. 3 The morphology of the lung tissues in the No. 7 of treated group was normal(10×10) Fig. 4 The interstitial pneumonia with the thickened septum and infiltration with mononuclear cells in the No. 8 of the treated group(10×10) Fig. 5 The interstitial pneumonia with the thickened septum fused with each other and infiltration with mononuclear cells in the No. 9 of the treated group(10×10) Fig. 6 The morphology of the lung tissues in the No. 10 of treated group was normal(10×10)

插图 3-1