

消化系统疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001472

干扰素 α -2a 与 α -2b 的免疫原性研究

李运龙, 邱 峰, 赵青青, 龙 锐, 张 莎, 黄 丹

(重庆医科大学附属第一医院药学部, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察干扰素 α -2a(interferon α -2a, IFN α -2a)与干扰素 α -2b(interferon α -2b, IFN α -2b)对昆明小鼠的免疫原性与免疫毒性。**方法:**实验设阳性对照 P 组(环磷酰胺, cytoxan, CTX, 200 mg/kg)、IFN α -2b 高剂量组(A 组, 2 μ g/mL)、IFN α -2b 低剂量组(B 组, 0.5 μ g/mL)、IFN α -2a 高剂量组(C 组, 2 μ g/mL)、IFN α -2a 低剂量组(D 组, 0.5 μ g/mL)以及阴性对照组(溶剂对照组, N 组, 0.1%牛血清蛋白 Bovine serum albumin 0.1%BSA), 每组 8 只腹腔注射给药 5 周。通过血清干扰素(interferon, IFN)浓度、干扰素抗体(antibodies of interferon, Anti-IFN)浓度及肾脏 C3 补体免疫组化进行免疫原性对比;通过小鼠体质量增量、脏器系数、血液学指标、免疫球蛋白以及脾脏组织病理学切片进行免疫毒性对比。**结果:**血清 IFN 浓度 A 组(9.27 ± 0.79)高于 C 组(7.80 ± 1.26)($P=0.000$);B 组(7.91 ± 1.09)高于 D 组(5.97 ± 0.98)($P=0.013$)。血清 Anti-IFN 浓度 A 组(7.49 ± 1.30)低于 C 组(10.31 ± 0.69)($P=0.000$);B 组(6.18 ± 1.02)低于 D 组(8.24 ± 0.74)($P=0.013$)。肾脏 C3 免疫组化 A 组(0.51 ± 0.00)低于 C 组(0.54 ± 0.00)($P=0.000$);B 组(0.42 ± 0.00)低于 D 组(0.47 ± 0.00)($P=0.013$)。体质量增长量 A 组低于 C 组($P=0.015$);B 组低于 C 组($P=0.003$)。脏器系数实验组与阴性对照组 N 组无差异。A、B、C、D 组在白细胞计数(white blood cell count, WBC)、血小板计数(platelet count, PLT)、平均血红蛋白量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)、淋巴细胞计数(lymphocyte count, LY)、淋巴细胞百分比(lymphocytes percentage, LY%)指标上高于 N 组但低于 P 组($P<0.05$)。IgA、IgM、IgG 浓度检测无统计学差异。干扰素实验组脾脏切片未发现病理结构改变。**结论:**IFN α -2a 与 IFN α -2b 的免疫原性有差异;免疫毒性无明显差异。

【关键词】干扰素 α -2a; 干扰素 α -2b; 免疫原性; 免疫毒性**【中图分类号】**R979.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-04-23Immunogenicity on interferon α -2a and interferon α -2b

Li Yunlong, Qiu Feng, Zhao Qingqing, Long Rui, Zhang Sha, Huang Dan

(Department of Pharmacys, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the immunogenicity and the immunotoxicity of interferon α -2a(IFN α -2a) and interferon α -2b (IFN α -2b) on Kunming mice. **Methods:** Kunming mice were randomly divided into six groups (eight mice in each group): positive control group (treated with cyclophosphamide, P group), IFN α -2b high dose group (A group), IFN α -2b low dose group (B group), IFN α -2a high dose group (C group), low dose group (D group) and negative control group (treated with solvent, N group). Mice were treated by intraperitoneal injection for 5 weeks. The serum concentration of IFN α , antibodies of interferon (Anti-IFN) and the immunostaining result of alexin C3 were determined to evaluate the immunogenicity effect. In addition, the body weight, organ index, hematologic traits and histopathological examination were determined to evaluate the immunotoxicity effect. **Results:** For the concentration of serum IFN, group A (9.27 ± 0.79) was higher than group C (7.80 ± 1.26) ($P=0.000$); group B (7.91 ± 1.09) was higher than group D (5.97 ± 0.98) ($P=0.013$). For the concentration of Anti-IFN, group A (7.49 ± 1.30) was lower than group C (10.31 ± 0.69) ($P=0.000$); the group B (6.18 ± 1.02) was lower than group D (8.24 ± 0.74) ($P=0.013$). For the kidney immunohistochemistry, group A (0.51 ± 0.00) was lower than group C (0.54 ± 0.00) ($P=0.000$); group B (0.42 ± 0.00) was lower than group D (0.47 ± 0.00) ($P=0.013$). For the weight gain, group A was lower than group C ($P=0.015$); group B was lower than group C ($P=0.003$). There was no significant difference between the experimental group and the N group when comparing the kidney index, liver index, and spleen index. Levels of WBC, PLT, MCH, and LY in group A, B, C and D were higher than those in the N group, and were lower than those in the group P ($P<0.05$). There was no significant difference among the IgA, IgM and IgG in the immunoglobulin test results. There was no significant pathological change in spleen slices in the experimental group. **Conclusion:** There is significant difference between

IFN α -2a and IFN α -2b for immunogenicity. Moreover, there is no significant difference between IFN α -2a and IFN α -2b for immunotoxicity.**【Key words】**interferon α -2a; interferon α -2b; immunogenicity; immunotoxicity

作者介绍: 李运龙, Email: 531554266@qq.com,

研究方向: 干扰素的免疫原性研究。

通信作者: 邱 峰, Email: qiufeng@outlook.com。

基金项目: 国家青年自然科学基金资助项目 (编号: 81202771)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180109.0953.010.html>

(2018-01-09)

病毒性肝炎是由多种肝炎病毒引起的一组传染性疾病,其发病率高、传播途径复杂、具有较强的传染性^[1]。乙型病毒性肝炎和丙型病毒性肝炎发病率高、预后差、易发展为慢性病毒性肝炎,是当前最为突出的公共卫生问题之一^[2]。干扰素 α -2(interferon α 2, IFN α -2)作为广谱病毒抑制剂,是治疗病毒性肝炎的主要药物之一,临床常用 IFN α -2 的 2 种亚型^[3-4];干扰素 α -2a(interferon α -2a, IFN α -2a)与干扰素 α -2b(interferon α -2b, IFN α -2b)。IFN α -2a、IFN α -2b 用于乙型肝炎、丙型肝炎治疗的临床对照研究表明,2 种 IFN α 亚型在临床治疗乙型病毒性肝炎和丙型病毒性肝炎的疗效指标上存在一定的差异^[5-7]。

干扰素是蛋白质类大分子药物,其结构与药物活性密切相关^[8]。国外研究表明,IFN α -2a、IFN α -2b 的结构存在差异,IFN α -2a 第 23 位氨基酸是赖氨酸(Lys),IFN α -2b 第 23 位氨基酸是精氨酸(Arg);IFN α -2b 是唯一在第 106 位为苏氨酸残基的 IFN α 亚型,也是仅有的 O-糖基化人 IFN α 蛋白^[9]。此外,干扰素独特的免疫原性和免疫毒性评价是阐明临床安全性和有效性的关键因素^[10]。例如 Palak 等^[11-12]发现由免疫原性引起的干扰素抗体也是干扰素治疗丙型病毒性肝炎要失败的主要原因,影响疾病的预后与复发。目前针对 IFN α -2a、IFN α -2b 的研究主要集中在聚乙二醇化干扰素与普通干扰素免疫原性的对比^[13],以及治疗成果对比等^[14-15],尚无 IFN α -2a 与 IFN α -2b 的免疫原性及免疫毒性对比研究。

IFN α 作为生物技术药物,临床前安全性评价必须包含免疫原性、免疫毒性评价。一般要求 2 种相关种属动物,在证明相似的情况下一种相关动物即可。按生物制品研究的常规要求,需进行啮齿类(小鼠、大鼠)及非人灵长类动物模型的研究,有研究表明 IFN α 在小鼠、大鼠、猴的反应相似^[16]。本实验以 IFN α -2a 与 IFN α -2b 为研究对象,比较其在小鼠体内的免疫原性、免疫毒性差异,以期对慢性肝炎的干扰素治疗药物选择提供方向。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物及分组 IVC 级昆明小鼠 48 只,雄性体质量(20 $\pm$ 2) g,由重庆医科大学动物实验中心提供并饲养。生产许可证号码:SCXK(渝)2012-0001;使用许可证号码:SCXK(渝)

2012-0001。采用完全随机分组法将 48 只小鼠随机分为 6 组,每组 8 只。分别为阳性对照 P 组(环磷酰胺,CTX,200 mg/kg)、IFN α -2b 高剂量组(A 组,2 μ g/mL)、IFN α -2b 低剂量组(B 组,0.5 μ g/mL)、IFN α -2a 高剂量组(C 组,2 μ g/mL)、IFN α -2a 低剂量组(D 组,0.5 μ g/mL)以及阴性对照组(溶剂对照组,N 组,0.1%BSA)。环磷酰胺作为一般毒性常规阳性对照物,对小鼠的体质量、免疫器官、血液学指标等有明显影响,可作为本实验干扰素免疫毒性检测的阳性对照。

1.1.2 实验试剂 Recombinant Human Interferon alpha-2a (IFN α -2a)、Recombinant Human Interferon alpha-2b (IFN α -2b)购自北京普博斯生物科技有限公司,活性 1.8 $\times$ 10⁸ IU/mg; Complement C3 Antibody 购自美国 Novus Biologicals 公司;牛血清蛋白 BSA、环磷酰胺购自江苏盛迪医药有限公司(国药准字 H32020857);小鼠 α 干扰素酶联免疫分析 ELISA 试剂盒、小鼠 α 干扰素抗体酶联免疫分析 ELISA 试剂盒均购自于北京城林生物科技有限公司;小鼠免疫球蛋白 IgM、IgG、IgA 酶联免疫 ELISA 试剂盒均购自于 RD 公司;4%多聚甲醛容量为 250 mL。

1.1.3 试剂配制及给药 实验前取足量牛血清蛋白 BSA 配成 0.1%BSA 溶液作溶剂,以人临床用药量 3 $\times$ 10⁶ IU 每周 3 次做低剂量,本文所用干扰素活性为 1.8 $\times$ 10⁸ IU/mg,通过等效剂量系数折算法换算为小鼠用量 0.1 μ g/20 g,查动物实验药理学小鼠注射量 0.1 mL/10 g,换算浓度为 0.5 μ g/mL。用配好的 0.1%BSA 溶液作溶剂将两种干扰素配成 0.5 μ g/mL、2 μ g/mL 药液备用。A、B 组小鼠分别腹腔注射 2、0.5 μ g/mL IFN α -2b,C、D 组小鼠分别腹腔注射 2、0.5 μ g/mL IFN α -2a,阴性对照组腹腔注射 0.1%BSA 溶液,阳性对照组给药期间腹腔注射 0.1%BSA 溶液,在实验结束前 24 h 一次性腹腔注射 200 mg/kg 环磷酰胺。给药方法见表 1。

表 1 各组小鼠给药情况
Tab.1 Drug administration of mice in each group

组别	给药方式	给药量 (mL/10 g)	给药次数	给药名称
P 组	腹腔注射	0.1	每周 3 次	200 mg/kg CTX
A 组	腹腔注射	0.1	每周 3 次	2 μ g/mL IFN α -2b
B 组	腹腔注射	0.1	每周 3 次	0.5 μ g/mL IFN α -2b
C 组	腹腔注射	0.1	每周 3 次	2 μ g/mL IFN α -2a
D 组	腹腔注射	0.1	每周 3 次	0.5 μ g/mL IFN α -2a
N 组	腹腔注射	0.1	每周 3 次	0.1% BSA

1.2 实验方法

1.2.1 双抗夹心法的建立 严格按照说明书操作进行,设 10 个标准孔,1 个空白孔。设标准孔和空白孔→加样→孵育→洗涤→加酶标试剂→孵育→洗涤→显色→终止→测定。分别用样品稀释液及空白血清稀释 IFN α -2a、IFN α -2b 标准品配置成 2.5、5、10、20、30 ng/mL 浓度梯度做标准曲线预实验,对该方法的特异度进行验证,并分别建立 IFN α -2a、IFN α -2b 的标准曲线。

1.2.2 血清 IFN、Anti-IFN 检测 每周二行小鼠尾静脉采血 0.5 mL, 静置 15~20 min 后于 6 000 r/min、4 ℃离心 20 min 后收集血清, 用 ELISA 双抗夹心法测定血清 IFN 浓度和 Anti-IFN 浓度。

1.2.3 肾脏的 C3 补体免疫组化 实验结束前心脏放血处死动物, 取肾脏称重后 S-P 法免疫组化染色。固定于 4%多聚甲醛溶液中, 石蜡切片常规脱蜡, 置于 pH6.0 的 0.01 mmol/L 枸橼酸钠溶液中 5 min, 3 次, 在 20 ℃用含 H₂O₂ 的甲醇溶液处理 30 min。每张切片滴加 50 μL 稀释后的一抗小鼠 C3 补体抗体, 稀释度为 1:100, 37 ℃孵育 45 min, 用 pH7.4 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 加辣根酶标记的兔抗鼠 IgG 二抗混匀, 37 ℃孵育 15 min。在组织切片中黄褐色颗粒为阳性。按阳性率=IOD/Area × 100%, 计算肾脏 C3 沉积率。

1.2.4 小鼠体质量与脏器系数 每次给药前称重并记录小鼠体质量, 实验结束前称重, 心脏放血处死动物, 迅速取出脾脏、肝脏、肾脏并称重, 计算脏体比。

1.2.5 血液学指标 实验结束前用 EDTA 抗凝管心脏采血处死小鼠, 收集血液行全血血常规分析, 记录白细胞计数 (white blood cell count, WBC)、血小板计数 (platelet count, PLT)、红细胞 (red blood cell, RBC)、血红蛋白 (hemoglobin, HGB)、平均红细胞体积 (mean corpuscular volume, MCV)、平均血红蛋白量 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均血红蛋白浓度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)、红细胞压积 (hematocrit, HCT)、淋巴细胞计数 (lymphocyte count, LY)、淋巴细胞百分比 (lymphocytes percentage, LY%)。

1.2.6 血清免疫球蛋白的测定 实验结束前, 心脏采血处死, 取全血 0.5 mL, 静置 15~20 min 后于 6 000 r/min、4 ℃离心 20 min 后收集血清。按试剂盒提供的 ELISA 方法测定末次血清中的 IgM、IgG、IgA 水平。

1.2.7 组织病理学测定 实验结束前心脏放血处死动物, 取脾脏称重后固定于 4%多聚甲醛溶液中, 经乙醇常规脱水、石蜡包埋、切片, HE 染色采集图像观察免疫器官生理病理变化。

1.3 统计分析

采用 SPSS 17.0 统计软件分析, 数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。血清 IFN、Anti-IFN 检测数据使用重复测量的方差分析。除血清 IFN、Anti-IFN 检测数据外, 其他各组实验数据多样本均数进行单因素方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ELISA 双抗夹心法的验证

经样品缓冲液稀释 IFN α -2a、IFN α -2b 标准品后做标准曲线: $y=0.075x$, $r^2=0.980$; $y=0.074x-0.005$, $r^2=0.983$ 。经空白血清稀释 IFN α -2a、IFN α -2b 标准品后做标准曲线: $y=0.074x$, $r^2=0.983$; $y=0.074x-0.002$, $r^2=0.984$ 。4 条标准曲线无明显差异, 决定系数分别为 0.980、0.983、0.983、0.984。说明小鼠内源性物质不影响检测, 且 IFN α -2a、IFN α -2b 与试剂盒的反应性无差异, 对实验无干扰。

2.2 IFN、Anti-IFN 浓度测定

实验期间对照组并未注射干扰素, 本实验仅进行实验组间免疫原性对比。ELISA 所测血清 IFN α 浓度结果见表 2; 4 组血清 IFN α 浓度水平差异有统计学意义 ($F=50.075$, $P=0.000$)。两两比较显示, 高剂量组 IFN 浓度明显高于低剂量组: A 组高于 B 组 ($P=0.000$); C 组高于 D 组 ($P=0.000$)。相同剂量组间比较, IFN α -2b 组高于 IFN α -2a 组: A 组高于 C 组 ($P=0.000$); B 组高于 D 组 ($P=0.013$)。

ELISA 所测血清 Anti-IFN 浓度结果见表 3; 4 组血清 Anti-IFN 浓度水平差异有统计学意义 ($F=62.554$, $P=0.000$)。两两比较显示, 高剂量组 Anti-IFN 浓度明显高于低剂量组: A 组高于 B 组 ($P=0.001$); C 组高于 D 组 ($P=0.000$)。相同剂量组间比较, IFN α -2b 组低于 IFN α -2a 组: A 组低于 C 组 ($P=0.000$); B 组低于 D 组 ($P=0.013$)。

2.3 肾脏的 C3 补体免疫组化

实验结束前心脏放血处死动物, 取肾脏做免疫组化染色切片, 取肾小球部位于显微镜 100 倍镜下如图 1 所示, 在组织切片中黄褐色颗粒为 C3 补体阳性。阴性对照组 N 组的阴性结果记为 0, A、B、C、D 组标本阳性个数 8/8 (100%)。计算 C3 阳性百分比=IOD/Area × 100%, A 组 (0.51 ± 0.00)、B 组 (0.42 ± 0.00)、C 组 (0.54 ± 0.00)、D 组 (0.47 ± 0.00)。组间 $F=222.038$, $P=0.000$ 。两两比较显示, A 组高于 B 组 ($P=0.000$); A 组低于 C 组 ($P=0.000$); B 组低于 D 组 ($P=0.013$); C 组高于 D 组 ($P=0.000$)。

2.4 不同处理小组小鼠体质量增长差异及脏器指数差异

实验终点各组小鼠体质量增长差异及脏器指数数据见表 4。

表 2 每周各组小鼠 IFN 浓度水平 (ng/L)

Tab.2 The IFN concentration of mice in each group after dosing (ng/L)

组别	1周	2周	3周	4周	5周
A组	15.20 ± 2.52	15.23 ± 1.42	11.06 ± 0.63	9.27 ± 0.79	15.43 ± 0.90
B组	11.59 ± 1.55 ^a	11.69 ± 1.57 ^a	8.29 ± 1.23 ^a	7.91 ± 1.09 ^a	11.60 ± 1.07 ^a
C组	13.70 ± 1.48 ^a	13.25 ± 1.26 ^a	9.94 ± 1.12 ^a	7.80 ± 1.26 ^a	14.21 ± 1.80 ^a
D组	10.84 ± 1.22 ^c	10.67 ± 1.13 ^c	9.64 ± 1.04 ^c	5.97 ± 0.98 ^{bc}	11.34 ± 1.60 ^c

注: Mauchly 的球形检验: $P=0.033 < 0.05$, 不满足球形度检验, 使用 Greenhouse-Geisser 和 Huynh-feldt 法矫正自由度; $F_{\text{区组}}=50.075$, $P_{\text{区组}}=0.000$; $F_{\text{时间}}=118.353$, $P_{\text{时间}}=0.000$; $F_{\text{交互}}=1.243$, $P_{\text{交互}}=0.271$; a: 与 A 组比较, $P=0.000$; b: 与 B 组比较, $P=0.013$; c: 与 C 组比较, $P=0.000$

表 3 给药后每周各组小鼠 Anti-IFN 浓度水平(ng/L)
Tab.3 The anti-IFN concentration of mice in each group after dosing(ng/L)

组别	1周	2周	3周	4周	5周
A组	9.17 ± 0.85	8.81 ± 1.41	7.49 ± 1.30	5.53 ± 0.78	10.29 ± 0.77
B组	7.62 ± 0.74 ^a	8.25 ± 1.42	6.18 ± 1.02 ^a	5.10 ± 0.99	8.76 ± 0.94 ^a
C组	13.50 ± 1.68 ^a	11.16 ± 0.83 ^a	10.31 ± 0.69 ^a	6.79 ± 1.09 ^a	13.39 ± 1.80 ^a
D组	9.80 ± 0.92 ^{bc}	10.58 ± 1.27 ^b	8.24 ± 0.74 ^{bc}	5.48 ± 0.56 ^c	13.77 ± 1.51 ^b

注:Mauchly 的球形检验 $P=0.20>0.05$, 满足球形度检验; $F_{\text{区组}}=62.554, P_{\text{区组}}=0.000; F_{\text{时间}}=139.778, P_{\text{时间}}=0.000; F_{\text{交互}}=6.600, P_{\text{交互}}=0.000$; a: 与 A 组比较, $P=0.000$; b: 与 B 组比较, $P=0.013$; c: 与 C 组比较, $P=0.000$

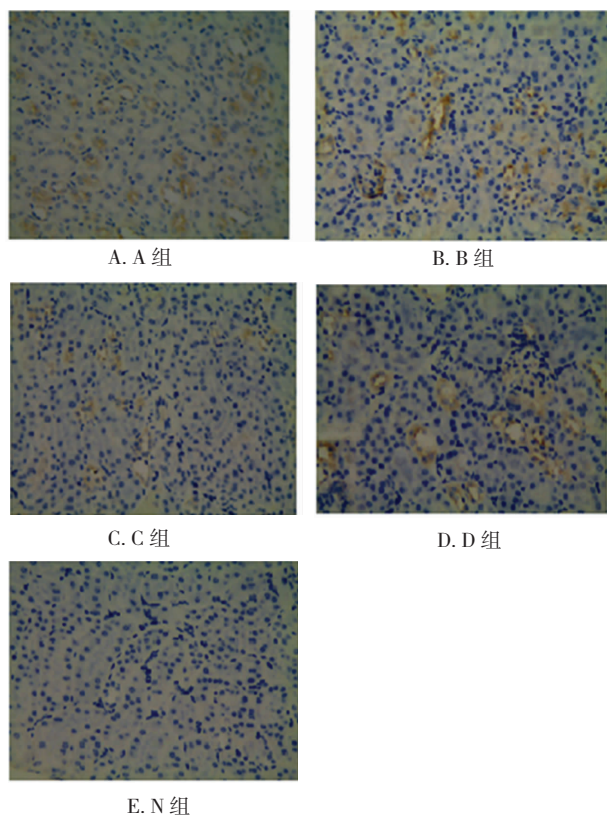


图 1 A、B、C、D、N 组小鼠 C3 补体免疫组化染色结果(100×)

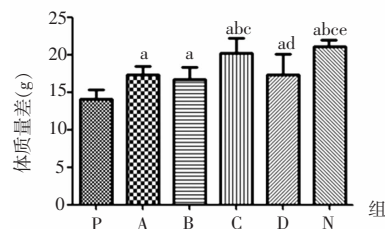
Fig.1 The immunohistochemistry result of alexin C3 in each group optical microscope(100×)

表 4 各组小鼠体质量增长差异及脏器指数差异

Tab.4 The renal body index, liver body index, splenic body index and the weight increase of mouse in each group

组别	体质量差值	肾脏指数	肝脏指数	脾脏指数
P组	14.05 ± 1.72	1.43 ± 0.24	4.92 ± 0.39	0.13 ± 0.05
A组	17.33 ± 1.43	1.36 ± 0.11	3.79 ± 0.22	0.40 ± 0.03
B组	16.67 ± 2.24	1.53 ± 0.18	3.75 ± 0.42	0.80 ± 0.19
C组	20.14 ± 2.68	1.35 ± 0.02	4.05 ± 0.06	0.48 ± 0.06
D组	17.39 ± 3.22	1.39 ± 0.12	4.42 ± 0.12	0.44 ± 0.00
N组	21.00 ± 1.17	1.30 ± 0.08	3.50 ± 0.29	0.42 ± 0.03
F 值	10.393	0.957	10.112	18.394
P 值	0.000	0.481	0.001	0.000

小鼠体质量增长情况如图 2 所示。比较小鼠实验终点体质量与实验初始体质量差值:两两比较显示阳性对照组小鼠体质量增长量明显降低(与 A 组相比, $P=0.050$; 与 B 组相比, $P=0.022$; 与 C 组相比, $P=0.000$, 与 D 组相比, $P=0.004$, 与 N 组相比, $P=0.000$); A 组低于 C 组($P=0.015$)、N 组($P=0.002$); B 组低于 C 组($P=0.003$)、N 组($P=0.000$); C 组高于 D 组($P=0.016$); D 组低于 N 组($P=0.002$)。



a: 与 P 组比较, $P<0.05$; b: 与 A 组比较, $P<0.05$; c: 与 B 组比较, $P<0.05$; d: 与 C 组比较, $P<0.05$; e: 与 D 组比较, $P<0.05$

图 2 各组小鼠用药后体质量增长差值图

Fig.2 The weight increase of mice in each group

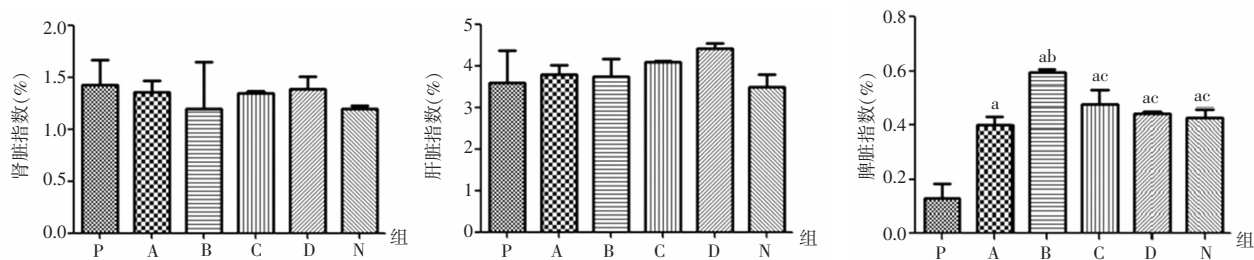
实验终点各组小鼠脏器指数如图 3 所示;肾脏指数组间差异无统计学意义($F=0.957, P=0.481$)。肝脏指数组间 $F=10.112, P=0.001$;各组间方差不齐,采用 Tamhane's T_2 检验各组间比较差异无统计学意义;脾脏指数组间 $F=18.394, P=0.000$;两两比较 P 组低于 A 组($P=0.002$)、B 组($P=0.000$)、C 组($P=0.000$)、D 组($P=0.001$)、N 组($P=0.001$);B 组高于 A 组、C 组、D 组、N 组($P=0.000$)。

2.5 各组小鼠血液学指标变化

实验结束前每组小鼠随机选取 3 只用 EDTA 抗凝管心脏采血处死,收集血液行全血血常规分析各指标(表 5)。经单因素方差分析显示 WBC、PLT、MCV、LY、LY%组间有差异。

2.6 各组小鼠免疫球蛋白检测

实验结束前每组选取 5 只小鼠心脏采血处死,取全血 0.5 mL 离心后取血清,通过免疫球蛋白 ELISA 试剂盒检测结果如表 6、图 4 所示。其中 IgM 组间 $F=0.967, P=0.458$;差异无统计学意义。IgG 浓度组间 $F=0.935, P=0.476$;各组间方差不齐,采用 Tamhane's T_2 检验差异无统计学意义;IgA 组间 $F=0.836, P=0.537$;两两比较差异无统计学意义。



a: 与 N 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); b: 与 P 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)

图 3 各组小鼠脏器指数比较指数

Fig.3 Organism index of mice in each group

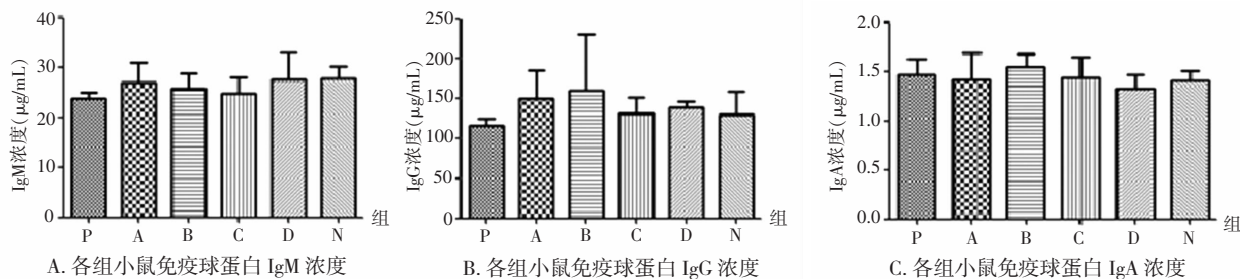


图 4 各组小鼠免疫球蛋白测定

Fig.4 Results of immunoglobulin in each group

表 5 各组小鼠血液学指标

Tab.5 Hematology index of mice in each group

血液学指标	P组	A组	B组	C组	D组	N组	F 值	P 值
WBC($10^9/L$)	0.26 ± 0.18	0.58 ± 0.32	1.16 ± 0.16^{ab}	0.94 ± 0.19^a	1.38 ± 0.13^{abd}	1.71 ± 0.25^{abcd}	18.260	0.000
PLT($10^9/L$)	139.00 ± 77.90	340.30 ± 250.80	642.00 ± 116.9^a	601.30 ± 277.8^a	756.7 ± 153.0^{ab}	943.3 ± 148.4^{abd}	7.347	0.002
RBC($10^9/L$)	7.16 ± 0.96	7.71 ± 0.85	7.32 ± 1.38	7.34 ± 1.22	7.71 ± 0.67	7.71 ± 1.04	0.167	0.971
HGB(g/L)	111.00 ± 3.00	104.30 ± 8.70	98.30 ± 6.70	108.00 ± 6.00	102.00 ± 4.00	113.30 ± 5.10	2.721	0.072
MCV(fL)	50.60 ± 2.10	50.30 ± 4.10	57.00 ± 2.10^{ab}	48.60 ± 0.90^c	51.20 ± 2.40^c	47.00 ± 1.80^c	5.934	0.005
MCH(pg)	15.70 ± 1.30	16.70 ± 1.50	17.00 ± 2.80	16.50 ± 1.60	17.40 ± 1.00	20.50 ± 3.10	2.078	0.139
MCHC(g/L)	309.30 ± 19.60	252.70 ± 22.00	297.30 ± 38.50	276.70 ± 31.30	276.30 ± 28.50	310.70 ± 26.60	1.421	0.285
HCT(%)	29.00 ± 7.00	32.80 ± 11.60	32.40 ± 7.20	32.50 ± 5.10	31.80 ± 7.60	30.90 ± 9.90	0.088	0.993
LY($10^9/L$)	0.12 ± 0.06	0.50 ± 0.26^a	0.97 ± 0.15^{ab}	0.80 ± 0.15^a	1.12 ± 0.11^{abd}	1.37 ± 0.21^{abcd}	21.109	0.000
LY%	47.30 ± 5.00	86.00 ± 1.00^a	83.00 ± 2.00^a	85.00 ± 2.60^a	82.30 ± 1.50^a	80.30 ± 1.50^{ab}	94.286	0.000

注: a, 与 P 组比较, $P < 0.05$; b: 与 A 组比较, $P < 0.05$; c: 与 B 组比较, $P < 0.05$; d: 与 C 组比较, $P < 0.05$; e: 与 D 组比较, $P < 0.05$

表 6 各组小鼠免疫球蛋白测定

Tab.6 Results of immunoglobulin IgM, IgG, IgA in each group

免疫球蛋白	P组	A组	B组	C组	D组	N组	F 值	P 值
IgM	23.80 ± 1.12	26.98 ± 3.93	25.71 ± 3.08	24.80 ± 3.04	27.44 ± 5.74	27.64 ± 2.55	0.967	0.458
IgG	116.33 ± 7.89	159.44 ± 70.27	159.44 ± 70.27	130.69 ± 20.52	138.61 ± 7.27	130.11 ± 28.68	0.935	0.476
IgA	146.33 ± 16.22	141.78 ± 26.41	14.78 ± 13.32	144.02 ± 20.54	132.92 ± 13.94	140.78 ± 9.83	0.836	0.537

2.7 各组小鼠脾脏组织病理学检查

脾脏切片 HE 染色于显微镜 40 倍镜下采集图像如图 5 所示。阴性对照组 N 组、IFN 各给药组 A、B、C、D 组脾脏结构

完整, 组织结构清晰, 骨髓、红髓清晰, 未见异常; 阳性对照组 P 组小鼠出现不同程度病理损伤, 集中表现为淋巴细胞数目减少、红髓扩张, 呈现不同程度的萎缩。

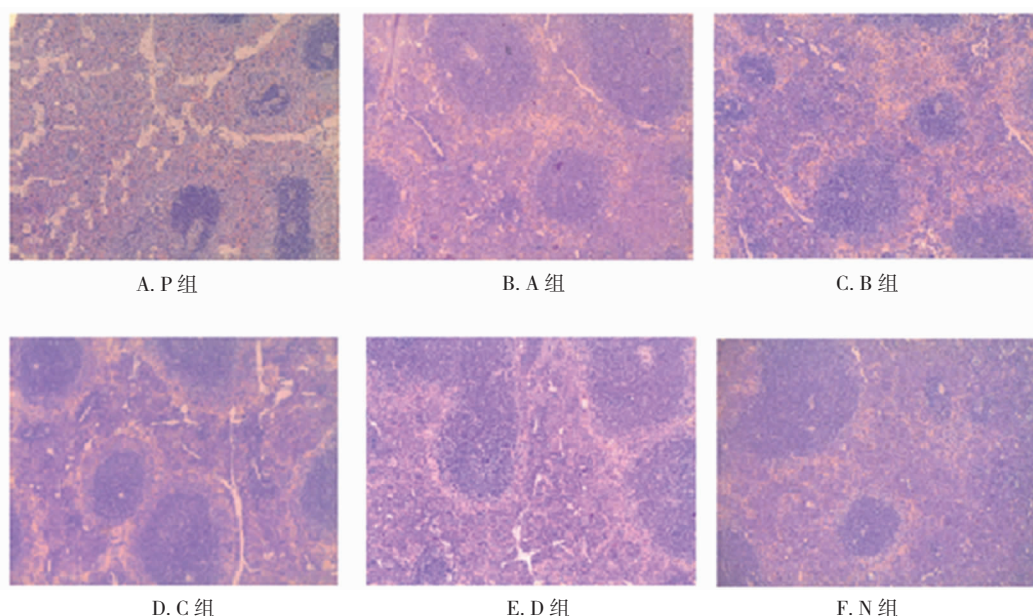


图 5 各组小鼠脾脏组织病理学改变(40 ×)

Fig.5 Morphology changes of spleen after dosing(40 ×)

3 讨 论

干扰素的免疫原性可刺激小鼠产生特异性 Anti-IFN, 与 IFN 结合形成抗原-抗体免疫复合物, 加速 IFN 清除, 免疫复合物又会激活补体系统, C3 水平一定程度上可以反映免疫复合物对补体系统的激活情况^[7]。所以本实验通过检测 IFN 作用昆明小鼠后的血清 IFN、Anti-IFN 浓度以及肾脏 C3 补体免疫组化染色进行免疫原性对比。血清 IFN 浓度检测发现, 2 $\mu\text{g/mL}$ IFN α -2b 组高于 2 $\mu\text{g/mL}$ IFN α -2a 组, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ IFN α -2b 组高于 0.5 $\mu\text{g/mL}$ IFN α -2a 组, 说明注射剂量一定时, IFN α -2b 的血药浓度高于 IFN α -2a。在相同剂量干预下, 血清 Anti-IFN 表达 2 $\mu\text{g/mL}$ IFN α -2b 组低于 2 $\mu\text{g/mL}$ IFN α -2a 组、0.5 $\mu\text{g/mL}$ IFN α -2b 组低于 0.5 $\mu\text{g/mL}$ IFN α -2a 组, 表明 2 种 α 干扰素作为外源性蛋白抗原刺激小鼠产生抗体能力有差异, IFN α -2b 在小鼠体内刺激产生抗干扰素抗体较少。相同剂量下不同干预小组小鼠肾脏 C3 补体沉积存在差异, 2 $\mu\text{g/mL}$ IFN α -2b 组低于 2 $\mu\text{g/mL}$ IFN α -2a 组、0.5 $\mu\text{g/mL}$ IFN α -2b 组低于 0.5 $\mu\text{g/mL}$ IFN α -2a 组, 说明 IFN α -2a 组小鼠 C3 补体沉淀较多, 补体系统活跃度高, 表明注射不同干扰素处理后小鼠肾脏免疫复合物沉淀有差异,

对小鼠补体系统的激活有差异。

文章创新性地综合干扰素血药浓度差异、血清抗体差异、肾脏免疫复合物沉淀差异, 初步探明 IFN α -2b 和 IFN α -2a 两种结构不同的 α 干扰素在小鼠体内表达出免疫原性的差异, IFN α -2b 在小鼠体内血药浓度较高, 刺激小鼠产生抗干扰素抗体的能力较少, 肾脏干扰素抗原抗体免疫复合物沉淀较少, 所以 IFN α -2b 的免疫原性较小。而该免疫原性差异是否由 23 位氨基酸不同以及 IFN α -2b 的 O-糖基化引起还有待研究。限于实验条件, 并未进行小鼠血清中和抗体的检测与对比(细胞病变抑制法)。IFN α -2b 与 IFN α -2a 的免疫原性差异可为临床某些用药选择提供依据, 例如 IFN α -2b 替换 IFN α -2a 治疗慢性难治性丙型肝炎、慢性病毒性肝炎干扰素治疗失败后的干扰素替换等。

干扰素具有多种生物学活性, 治疗病毒性肝炎时会产生多种副作用, 例如可能出现的体质量损失、骨髓抑制、精神异常等^[18], 对治疗的有效性安全性产生影响。本实验借鉴药物一般毒性评价中的免疫毒性常规实验, 并选取小鼠体质量增长量、脏器系数、血液学指标、免疫球蛋白以及组织病理学指标来进行免疫毒性对比。实验经体质量及脏器指数检查发现, IFN 并无类似环磷酰胺样体质量损失及免疫抑制的毒性。与阴性对照组相比, 实验组轻微的体质

量增长量降低以及脏器系数改变可能是因为干扰素的抗肝纤维化作用以及免疫调控作用造成。血常规各项指标的结果提示各用药组在 WBC、PLT、MCH、LY、等指标上与阴性对照组 N 组、阳性对照组 P 组均有差异,表明干扰素会造成骨髓抑制作用,但是比环磷酰胺毒性小很多。小鼠免疫球蛋白 IgA、IgM、IgG 检测后分析,实验结果在 IgA、IgM、IgG 中并无差异。最后,本实验还进行了免疫器官脾脏的病理切片及 HE 染色,结果提示阳性对照组 P 组对脾脏有免疫抑制作用,A、B、C、D 组与阴性对照组无差异。综合各项指标的统计分析,IFN α -2a 与 IFN α -2b 的免疫毒未见明显差异。

综上所述,本文初步探明 IFN α -2b 与 IFN α -2a 的免疫原性存在差异,对小鼠存在骨髓抑制方面的免疫毒性影响但无明显差异,为临床慢性肝炎的治疗药物选择提供了方向。为进一步探讨干扰素免疫特性差异对临床疗效的影响,本实验下一步准备进行临床干扰素 α 治疗慢性病毒性肝炎的免疫原性与临床疗效之间的相关性研究。

参 考 文 献

- [1] 梁晓峰. 我国病毒性肝炎流行特征及对策[J]. 临床肝胆病杂志, 2010, 26(6): 561-564.
- [2] 兰小琴. 中国病毒性肝炎区域分布特征的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(10): 2467-2469.
- [3] 中华医学会肝病学会, 中华医学会传染病学分会. 丙型肝炎防治指南(2015 年更新版)[J]. 传染病信息, 2016, 29(1): 1-19.
- [4] 中华医学会肝病学会, 中华医学会传染病学分会. 乙型肝炎防治指南(2015 年更新版)[J]. 传染病信息, 2015, 28(6): 321-340.
- [5] Awad T, Thorlund K, Hauser G, et al. Peginterferon alpha-2a is associated with higher sustained virological response than peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis C: systematic review of randomized trials[J]. Hepatology, 2010, 51(4): 1176-1184.
- [6] Zhao S, Liu E, Chen P, et al. A comparison of peginterferon alpha-2a and alpha-2b for treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus: a meta-analysis of randomized trials[J]. Clin Ther, 2010, 32(9): 1565-1577.
- [7] Singal AK, Jampana SC, Anand BS. Peginterferon alfa-2a is superior to peginterferon alfa-2b in the treatment of naive patients with hepatitis C virus infection: meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Dig Dis Sci, 2011, 56(8): 2221-2226.
- [8] Hermeling S, Aranha L, Damen JM, et al. Structural characterization and immunogenicity in wild-type and immunotolerant mice of degraded recombinant human interferon alpha 2b[J]. Pharm Res, 2005, 22(12): 1997-2006.
- [9] El-Baky NA, Redwan EM. Therapeutic alpha-interferons protein: structure, production, and biosimilar[J]. Prep Biochem Biotechnol, 2015, 45(2): 109-127.
- [10] Patel PK, King CR, Feldman SR. Biologics and biosimilars[J]. J Dermatol Treat, 2015, 26(4): 299-302.
- [11] Scagnolari C, Trombetti S, Solda A, et al. Development and specificities of anti-interferon neutralizing antibodies in patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon-alpha[J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(10): 1033-1039.
- [12] Kuga C, Enomoto H, Aizawa N, et al. Anti-interferon-alpha neutralizing antibody induced telaprevir resistance under the interferon-alpha plus telaprevir treatment in vitro[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 454(3): 453-458.
- [13] 郭 婧, 戎隆富, 程 婷, 等. 聚乙二醇化重组人干扰素 α -2b 免疫原性和药物动力学的研究[J]. 毒理学杂志, 2010, 24(4): 282-284.
- [14] 陈 铿, 张爱民, 谢 敏, 等. 聚乙二醇干扰素 α -2a 与聚乙二醇干扰素 α -2b 治疗慢性乙型肝炎疗效对比分析[J]. 临床消化病杂志, 2013, 25(3): 174-185.
- [15] 韩红彬, 常立杰, 黄玉柱. 重组人干扰素 α -2b 与聚乙二醇干扰素 α -2a 治疗慢性丙型肝炎成本-效果分析[J]. 药品评价, 2016, 13(10): 27-29.
- [16] 富 岩, 马金玲, 孙 丽, 等. 重组人血清白蛋白/干扰素 α 2a 融合蛋白的药效学、药代动力学及安全性评价[J]. 中国医药生物技术, 2012, 7(6): 401-411.
- [17] 王 荣, 刘昌华, 徐道亮, 等. 低补体 C3 血症及肾组织补体 C3 沉积在乙肝相关性肾病中的意义[J]. 实用临床医药杂志, 2016, 20(23): 43-46.
- [18] Flori N, Funakoshi N, Dnuy Y, et al. Pegylated interferon-alpha2a and ribavirin versus pegylated interferon-alpha2b and ribavirin in chronic hepatitis C: a meta-analysis[J]. Drugs, 2013, 73(3): 263-277.

(责任编辑: 冉明会)