

重组人干扰素 $\alpha 2b$ 体外广谱抗呼吸道病毒药效学研究

王辉强¹, 马琳琳¹, 蒋建东¹, 庞 睿², 陈玉军², 李玉环^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050;

2. 哈药集团生物工程有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要: 评价重组人干扰素 $\alpha 2b$ 体外广谱抗呼吸道病毒的药效。本实验在细胞水平采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测重组人干扰素 $\alpha 2b$ 抗 A 型流感病毒药效。采用细胞病变 (CPE) 法检测重组人干扰素 $\alpha 2b$ 抗 B 型流感病毒、副流感病毒 (HPIV)、呼吸道合胞病毒 (RSV) 和冠状病毒的药效。结果表明, 3 次实验中, 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 对副流感病毒的平均治疗指数为 1476.63、对呼吸道合胞病毒的平均治疗指数为 141.37、对冠状病毒的平均治疗指数大于 2820.76, 药效均强于利巴韦林 (RBV)。重组人干扰素 $\alpha 2b$ 对不同 A 型流感病毒的 RNA 有很强的抑制作用, 药效强于对照药物。重组人干扰素 $\alpha 2b$ 对 B 型流感病毒的治疗指数为 2.74, 治疗效果一般。结果提示, 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 在体外具有很好的广谱抗呼吸道病毒的活性, 且毒性低, 治疗指数高, 有望成为临床治疗呼吸道病毒感染的特效药, 更好的服务于呼吸道病毒感染的预防和治疗。

关键词: 重组人干扰素 $\alpha 2b$; 呼吸道病毒; 细胞病变法; MTT 法; 实时荧光定量 RT-PCR 法

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2014) 11-1547-07

Recombinant human interferon alpha 2b broad-spectrum anti-respiratory viruses pharmacodynamics study *in vitro*

WANG Hui-qiang¹, MA Lin-lin¹, JIANG Jian-dong¹, PANG Rui², CHEN Yu-jun², LI Yu-huan^{1*}

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Harbin Pharmaceutical Group Bio-Engineering Co., Ltd., Harbin 150025, China)

Abstract: This study is to investigate the effect of recombinant human interferon alpha 2b against broad-spectrum respiratory viruses *in vitro*. At the cellular level, the effect of the recombinant human interferon alpha 2b on influenza A virus was detected using real-time fluorescence quantitative RT-PCR. The effects of the recombinant human interferon alpha 2b on influenza B virus, parainfluenza virus, respiratory syncytial virus (RSV) and coronavirus were detected using cytopathic effect (CPE) method. In this study, the therapeutic index of recombinant human interferon alpha 2b anti-HPIV was 1476.63, the therapeutic index of recombinant human interferon alpha 2b anti-RSV was 141.37, the therapeutic index of recombinant human interferon alpha 2b anti-coronavirus was more than 2820.76, and the antiviral effect of recombinant human interferon alpha 2b was better than ribavirin (RBV). Recombinant human interferon alpha 2b has a stronger inhibitory effect on different influenza A virus RNA than drug control. The therapeutic index of recombinant human interferon alpha 2b anti-influenza B virus was 2.74, with modest effect. Recombinant human interferon alpha 2b *in vitro* has broad spectrum antiviral activities, low toxicity and high therapeutic index. Recombinant human interferon alpha 2b is expected to become the efficient medicine in clinical against respiratory viruses, as well as provide

收稿日期: 2014-06-06; 修回日期: 2014-07-10.

基金项目: 综合性新药研究开发技术大平台“生物药效与药理学”研究 (2012ZX09301-002-005); “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项 (2012ZX10004501-004-001).

*通讯作者 Tel: 86-10-63010984, Fax: 86-10-63017302, E-mail: yuhuanlibj@126.com

better services for prevention and treatment of respiratory viruses' infections.

Key words: recombinant human interferon alpha 2b; respiratory virus; cytopathic effect; MTT; qRT-PCR

呼吸道感染是人类最常见的疾病之一,其在临床上,初期可表现为亚临床感染,症状较轻,且多可自愈。一旦病情恶化,可引发多种并发症,严重威胁人们的生命健康。上呼吸道感染约 90% 是由病毒引起的,主要为流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、冠状病毒等^[1],而博卡病毒、麻疹病毒、水痘-疱疹病毒和巨细胞病毒等引发的感染相对少见^[2]。近年来,不断出现一些新型的以感染呼吸道为主的高致病性病毒,如严重急性呼吸综合征冠状病毒、甲型 H5N1 人禽流感病毒、2009 年新甲型 H1N1 流感病毒和 2013 年新甲型 H7N9 流感病毒等^[3, 4]。加之社会人口老龄化、器官移植、免疫抑制剂在免疫相关疾病中的应用、人类获得性免疫缺陷综合征发病率增加和患病人数的累积等因素,使新发或再发呼吸道病毒感染的发病率不断增加,而且有些病毒感染所致的病死率极高,因此这一类型疾病已经成为不容忽视的公共卫生问题。针对呼吸道病毒感染的预防及治疗措施一般相对滞后,且由于病毒容易发生变异,给疫苗研究带来了极大的困难。现有流感疫苗需每年监测抗原变化,只有针对当年流感病毒流行株抗原的疫苗才具有保护作用,保护率仅为 60%~80%,远远不能满足市场需求^[5],目前其他呼吸道感染病毒也尚无可供应用的疫苗。现有治疗药物数量有限,发展较慢,且仍有很多病毒没有可供使用的特效药物。因此,积极开发广谱高效安全的抗呼吸道病毒新药是对科研人员的严峻挑战^[6]。

干扰素 (IFN) 是一种广谱抗病毒剂,大致可分为 3 类: I 型干扰素 (IFN- α 、IFN- β 、IFN- ω), II 型干扰素 (IFN- γ) 以及 III 型干扰素 (IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3)。IFN 是人体非特异性病毒免疫的重要因子之一,就其本质来说,它是机体对病毒感染最早的免疫反应因子,具有广谱抗病毒活性,几乎对所有病毒都有一定程度的抑制作用。一般来说, RNA 病毒比 DNA 病毒对 IFN 敏感;在 RNA 病毒中,正链 RNA 病毒对 IFN 的敏感性又强于负链 RNA 病毒,即使在同一 DNA 或 RNA 病毒中,不同病毒科、病毒属或病毒株对 IFN 的敏感性又有很大差别^[7]。干扰素并不直接杀伤或抑制病毒,而主要是通过细胞表面受体作用产生抗病毒蛋白,从而抑制病毒的复制;同时还可增强自然杀伤细胞 (NK 细胞)、巨噬细胞和 T 淋巴细胞的活力,

通过发挥免疫调节作用从而增强其抗病毒能力^[8]。近年来,干扰素在抗病毒治疗中,尤其是对慢性乙型肝炎和慢性丙型肝炎的治疗,取得了长足的进展。在抗病毒效应中,由于不同病毒的生物特性不同,干扰素体现出不同的抗病毒效应能力。干扰素 α 1 与受体的结合能力较低,只有与 α 2 相伴随时才能有较高的结合能力,因此临床上干扰素 α 1 的抗病毒效果常不如干扰素 α 2。由于干扰素诱导的抗病毒蛋白对病毒复制的抑制多发生在胞浆,而对在细胞核内复制的病毒难以发挥直接的抗病毒效应,因此,干扰素对丙型肝炎病毒的抗病毒作用高于乙型肝炎病毒^[9]。但是,目前应用干扰素进行呼吸道病毒感染的预防和治疗报道较少^[1, 7],所以作者采用 CPE 法、MTT 法和 qRT-PCR 法研究临床用药重组人干扰素 α 2b 在体外细胞水平是否具有广谱抗呼吸道病毒的作用,希望为临床治疗呼吸道病毒感染提供一定的理论基础和依据。

材料与方法

细胞和病毒 人喉癌细胞 (Hep2)、人二倍体细胞 (HEL)、人肺癌细胞 (A549) 及狗肾细胞 (MDCK) 均为本室自行传代保存。冠状病毒 (coronavirus)、副流感病毒 (HPIV-3)、呼吸道合胞病毒 (RSV) 及流感病毒 A/FM/1/47 (H1N1) 购自美国典型菌种保藏中心 (ATCC),本室常规传代, -80 °C 冰箱保存。流感病毒: 磷酸奥司他韦耐药株 A/辽宁振兴/1109/2010 (H1N1) (LNZX)、金刚烷胺耐药株 A/福建同安/196/2009 (H3N2) (FJTA)、A/江西东湖/312/2006 (H3N2) (JXDH) 和 B/济防/13/97 由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所提供,本室常规传代, -80 °C 冰箱保存。

实验试剂和仪器 细胞培养所用 F-12K Nutrient Mixture (1X) 培养基、胎牛血清、Non-Essential Amino Acids (NEAA) 和青链霉素混合液 (100X) (GIBCO 公司),细胞培养所用 Minimum Essential Medium (MEM) 培养基、pH 为 7.2~7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) (北京迈晨科技有限公司)。

注射用重组人干扰素 α 2b, 3×10^6 U/支,批号: 20101102 (哈药集团生物工程有限公司); 阳性对照药磷酸奥司他韦 (oseltamivir phosphate, 中国药品生物制品检定所); 利巴韦林 (ribavirin, RBV), 批号为

22081227 (新乡药业); 金刚烷胺 (amantadine, 批号为 211-560-2)、噻唑蓝 (MTT)、牛血清白蛋白 (BSA) 和甲苯磺酰苯丙氨酰氯甲酮 (TPCK) 处理的胰蛋白酶 (Sigma 公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 北京化工厂)。

细胞培养瓶和 96 孔培养板 (美国 Corning 公司); 二氧化碳孵箱 (Model 3111) 和低速离心机 (美国 Thermo 公司); 酶标仪 (ELX808, 美国 BioTeK 公司); 7500-fast real time PCR system (Applied Biosystems 公司); 生物安全柜 (美国 NUAIRE 公司); 倒置显微镜 (奥林巴斯公司)。

维持液配制 流感病毒维持液: 将 40 mL 1% BSA, 5 mL 青链霉素混合液 (100X), 5 mL NEAA 和 1 mg TPCK 处理的胰蛋白酶加入至 500 mL MEM 或 F-12K Nutrient Mixture (1X) 培养基中得到含 0.08% BSA 和 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TPCK 处理的胰蛋白酶的维持液, 于 4°C 保存, 用前预热至 37°C 。副流感病毒、呼吸道合胞病毒和冠状病毒的维持液: 将 10 mL 血清, 5 mL 青链霉素混合液 (100X) 加入至 500 mL F-12K Nutrient Mixture (1X) 培养基中得到含 2% 血清的维持液, 于 4°C 保存, 用前预热至 37°C 。

CPE 判断标准 利用倒置显微镜观察各孔细胞的生长状态, 不同浓度给药的细胞与正常细胞 (未加药细胞) 比较, 以细胞状态改变或死亡比例分别标记为 4+ (细胞死亡比例 75%~100%)、3+ (细胞死亡比例 50%~75%)、2+ (细胞死亡比例 25%~50%)、1+ (细胞死亡比例 0~25%)、0+ (细胞形态未发生变化或全部存活), 标记为 0+ 表示无毒。

qRT-PCR 引物及试剂盒 内参对照 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物: 5'-CTCTGGAAAGCTGTGGCGTGA TG-3' 和 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3'; 甲型流感病毒离子通道蛋白 M2 通用引物: 5'-GACCRA TCCTGTACCTCTGAC-3' 和 5'-GGGCATTYTGGAC AAKCGTCTACG-3' 均由北京 Invitrogen 公司合成。RNA 提取试剂盒 (RNeasy Mini kit) 为 QIAGEN 公司产品, 荧光定量 qRT-PCR 试剂盒 (TransScript™ Green One-Step qRT-PCR SuperMix) 为 TransGen Biotech 公司产品。

细胞毒测定 (MTT 染色法) Hep2 细胞: 以细胞数 1×10^4 或 5×10^3 个/孔加入 96 孔板。在 37°C 孵箱培养 16 h 后, 用 2% FBS 的 F-12K Nutrient Mixture (1X) 培养基按浓度梯度稀释药物平行 3 孔, 加入到培养板中 (原培养基吸弃), 继续培养。给药 72 h (1×10^4 个/孔) 或 96 h (5×10^3 个/孔) 后, 进行 MTT 检

测, 每孔加入 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 10 μL 后于 37°C 放置 4 h, 终止时加入 DMSO 150 μL , 最后测定 490 nm 的吸收值 (OD)。

HEL 细胞: 以细胞数 5×10^4 个/孔加入 96 孔板中。在 37°C 孵箱培养 16 h 后, 用 2% FBS 的 F-12K Nutrient Mixture (1X) 培养基按浓度梯度稀释药物平行 3 孔, 加入到培养板中 (原培养基吸弃), 继续培养。给药 72 h 后, 进行 MTT 检测 (同上)。

A549 细胞: 以细胞数 2×10^4 个/孔加入 96 孔板中。在 37°C 孵箱培养 16 h 后, 用含 1% NEAA 和 0.08% BSA 的 F-12K Nutrient Mixture (1X) 培养基按浓度梯度稀释药物平行 3 孔, 加入到培养板中 (原培养基吸弃), 继续培养。给药 72 h 后, 进行 MTT 检测 (同上)。

MDCK 细胞: 以细胞数 3×10^4 个/孔加入 96 孔板中。在 37°C 孵箱培养 16 h 后, 用含 1% NEAA 和 0.08% BSA 的 MEM 培养基按浓度梯度稀释药物平行 3 孔, 加入到培养板中 (原培养基吸弃), 继续培养。给药 72 h 后, 进行 MTT 检测 (同上)。

实验均设细胞对照孔, 结果用 Reed-Muench 法计算半数有毒浓度 TC_{50} , 计算公式如下:

$$\text{TC}_{50} = \text{Antilog}\left(A + \frac{50-B}{C-B} \times D\right)$$

A: $\log < 50\%$ 累加病变率的药物浓度 B: $\geq 50\%$ 累加病变率 C: $\geq 50\%$ 累加病变率, D: \log 稀释倍数

抗副流感病毒活性 (CPE 法) Hep2 细胞以 1×10^4 个/孔接种到 96 孔板中, 培养 16 h 后病毒用病毒稀释液稀释, 药物用维持液稀释, 感染时将 100 μL 滴度为 100 TCID_{50} 的病毒液与 100 μL 含有不同浓度药物的维持液混合后加到细胞中, 待病毒对照组病变达 4+ 时观察结果, 并用 Reed-Muench 法计算半数抑制浓度 IC_{50} (方法同 TC_{50}) 及选择指数 ($\text{SI} = \text{IC}_{50} / \text{TC}_{50}$)。

抗呼吸道合胞病毒活性 (CPE 法) Hep2 细胞以 5×10^3 个/孔接种到 96 孔板中, 培养 16 h 后病毒用病毒稀释液稀释, 药物用维持液稀释, 感染时将 100 μL 滴度为 100 TCID_{50} 的病毒液与 100 μL 含有不同浓度药物的维持液混合后加到细胞中, 待病毒对照组病变达 4+ 时观察结果, 并用 Reed-Muench 法计算半数抑制浓度 IC_{50} (方法同 TC_{50}) 及选择指数 ($\text{SI} = \text{IC}_{50} / \text{TC}_{50}$)。

抗冠状病毒活性 (CPE 法) HEL 细胞以 5×10^4 个/孔接种到 96 孔板中培养 16 h, 100 μL 滴度为 100 TCID_{50} 的病毒液感染细胞 2 h, 2 h 后改用维持液

稀释的药物,继续培养至病毒对照组病变达 4+ 时观察结果,并用 Reed-Muench 法计算半数抑制浓度 IC_{50} (方法同 TC_{50}) 及选择指数 ($SI=IC_{50}/TC_{50}$)。

抗流感病毒 B 活性测定 (CPE 法) MDCK 细胞以 3×10^5 个/孔接种到 96 孔板中培养 16 h,弃培养液后 PBS 洗 1 次 (吸弃),加入 100 μ L 滴度为 100 $TCID_{50}$ 的病毒液,吸附 2 h 后,弃病毒液,加入不同浓度待测药液或阳性对照药处理,每浓度 2 孔,继续培养至病毒对照组病变达 4+ 时观察结果,并用 Reed-Muench 法计算半数抑制浓度 IC_{50} (方法同 TC_{50}) 及选择指数 ($SI=IC_{50}/TC_{50}$)。

抗流感病毒 A 活性测定 (qRT-PCR 法) A549 细胞以 6×10^5 个/孔接种到 6 孔板中,培养 16 h 后,用 PBS 洗 1 次板 (原液弃掉),再用 600 μ L 滴度为 100 $TCID_{50}$ 的病毒液感染细胞,2 h 后加入不同浓度待测药液或阳性对照药处理。培养 48 h 后,吸弃培养基,用 RNeasy Mini Kit 提取细胞内总 RNA,流感病毒 RNA 表达水平用 TransScript™ Green One-Step Qrt-PCR SuperMix 在 7500-fast real time PCR system (Applied Biosystems) 上定量检测,即 20 μ L 反应体系按照 50 $^{\circ}C$ 5 min, 94 $^{\circ}C$ 30 s, 40 个循环 (94 $^{\circ}C$ 5 s, 60 $^{\circ}C$ 15 s, 72 $^{\circ}C$ 10 s) 进行荧光定量反应。计算各浓度药物对流感病毒的抑制率 (%) (抑制率计算公式如下所示),并用 Reed-Muench 法计算半数抑制浓度 IC_{50} (方法同 TC_{50}) 及选择指数 ($SI=IC_{50}/TC_{50}$)。

$$\text{抑制率 (\%)} = 1/2^{\left(\frac{\text{Flu-A Ct}_{\text{病毒对照}} - \text{Flu-A Ct}_{\text{药物组}}}{\text{GAPDH Ct}_{\text{病毒对照}} - \text{GAPDH Ct}_{\text{药物组}}} \right)} \times 100\%$$

统计学分析 采用 SPSS13.0 统计程序的 t 检验比较药物对流感病毒 RNA 的抑制作用。

结果

1 MTT 法测定细胞毒性结果

在进行重组人干扰素 $\alpha 2b$ 的体外药效评价之前,先采用 MTT 法对其在不同细胞中的毒性进行测定。如表 1 所示: Hep2 细胞在 5×10^3 个/孔时,重组人干扰素 $\alpha 2b$ 毒性的 TC_{50} 为 31 337.27 $U \cdot mL^{-1}$; 在 1×10^4 个/孔时,重组人干扰素 $\alpha 2b$ 毒性 TC_{50} 为 125 263.49 $U \cdot mL^{-1}$; HEL 细胞在 5×10^4 个/孔时,重组人干扰素 $\alpha 2b$ 毒性的 $TC_{50} > 3 \times 10^5$ $U \cdot mL^{-1}$; A549 细胞在 2×10^5 个/孔时,重组人干扰素 $\alpha 2b$ 的 $TC_{50} > 3 \times 10^5$ $U \cdot mL^{-1}$; MDCK 细胞在 3×10^5 个/孔时,重组人干扰素 $\alpha 2b$ 的 TC_{50} 为 212 924.29 $U \cdot mL^{-1}$ 。以上结果说明重组人干扰素 $\alpha 2b$ 对各细胞株的毒性较低,与其在临床上用药的安全性相一致。

2 CPE 法测定抗病毒药效

在药物的无毒浓度下,采用 CPE 法对重组人干扰素 $\alpha 2b$ 在细胞水平对副流感病毒、呼吸道合胞病毒和冠状病毒的药效进行评价。每个毒株的评价工作都进行了 3 次实验。如表 2 所示,重组人干扰素 $\alpha 2b$ 对副流感病毒的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 39.79 $U \cdot mL^{-1}$,选择指数 SI 为 1 476.63; 对呼吸道合胞病毒的 IC_{50} 为 104.64 $U \cdot mL^{-1}$,选择指数 SI 为 141.37; 对冠状病毒的 IC_{50} 为 122.75 $U \cdot mL^{-1}$,选择指数 SI > 2 820.76。重组人干扰素 $\alpha 2b$ 对 3 种病毒的药效均强于对照药物利巴韦林,说明其具有很好的抗呼吸道病毒活性,有很好的应用前景。

由于 B 型流感病毒缺乏离子通道蛋白 M2,无法利用针对 M2 的通用引物进行 qRT-PCR 的测定,所以仍利用 CPE 法,在流感病毒易感的 MDCK 细胞中进

Table 1 TC_{50} of drugs on cells (MTT). —: Not tested

Cell	$TC_{50} (U \cdot mL^{-1} \text{ or } \mu g \cdot mL^{-1})$			
	Interferon alpha 2b	Ribavirin	Oseltamivir phosphate	Amantadine
Hep2 (5×10^3)	31 337.27 \pm 8 632.93	36.04 \pm 1.73	—	—
Hep2 (1×10^4)	125 263.49 \pm 14 476.83	199.09 \pm 69.83	—	—
HEL (5×10^4)	$> 3 \times 10^5 \pm 0.00$	$> 1\ 000 \pm 0.00$	—	—
A549 (2×10^5)	$> 3 \times 10^5 \pm 0.00$	505.09 \pm 132.06	304.75 \pm 40.79	51.32 \pm 12.39
MDCK (3×10^5)	212 924.29 \pm 2 689.50	642.94 \pm 170.43	118.51 \pm 17.67	38.67 \pm 21.87

Table 2 IC_{50} of drugs on virus (CPE)

Virus	Interferon alpha 2b		Ribavirin	
	$IC_{50} / U \cdot mL^{-1}$	SI	$IC_{50} / \mu g \cdot mL^{-1}$	SI
HPIV-3	39.79 \pm 18.32	1476.63 \pm 395.19	5.09 \pm 0.41	44.93 \pm 7.95
RSV	104.64 \pm 92.89	141.37 \pm 74.16	2.02 \pm 0.43	66.88 \pm 7.26
Coronavirus	122.75 \pm 56.26	$> 2820.76 \pm 1277.42$	10.75 \pm 1.30	$> 93.98 \pm 12.24$

行药效评价。药物在细胞内对流感病毒 B 的抑制作用见表 3。在 MDCK 细胞中, 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 对流感病毒 B/济防/13/97 的 IC_{50} 为 $88\ 332.47\ U \cdot mL^{-1}$, 选择指数 SI 为 2.74; 阳性对照药利巴韦林在 $10\ \mu g \cdot mL^{-1}$ 时对流感病毒 B/济防/13/97 的 IC_{50} 为 $0.11\ \mu g \cdot mL^{-1}$, 选择指数 SI 为 5 934.83; 磷酸奥司他韦在 $40\ \mu g \cdot mL^{-1}$ 时, 金刚烷胺在 $10\ \mu g \cdot mL^{-1}$ 时对流感病毒 B/济防/13/97 均没有抑制作用。结果说明重组人干扰素 $\alpha 2b$ 对 B 型流感病毒的抑制作用不是很好, 具体原因还需进一步深入机制研究。

Table 3 IC_{50} of drugs on influenza virus B (CPE)

Compound	MDCK (3×10^5)	
	$IC_{50}/U \cdot mL^{-1}$ or $\mu g \cdot mL^{-1}$	SI
Interferon alpha 2b	$88\ 332.47 \pm 41\ 837.43$	2.74 ± 1.04
RBV	0.11 ± 0.02	$5\ 934.83 \pm 856.62$
Oseltamivir phosphate	$>40 \pm 0.00$	$>2.95 \pm 0.00$
Amantadine	$>20 \pm 0.00$	$>1.84 \pm 0.00$

3 药物在 A549 细胞内对流感病毒 RNA 的抑制作用

采用 CPE 法评价药物的抗病毒药效有一定的主观性。随着实验技术的发展, 采用新的实验手段进行

药物抗病毒筛选已经广泛应用。根据文献资料的查询, 本实验室建立了 qRT-PCR 的方法来评价药物对 A 型流感病毒的作用。如图 1~4 和表 4 所示, 对于流感病毒 A/FM/1/47 (H1N1) 株: 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 的 $IC_{50} < 48\ U \cdot mL^{-1}$, 选择指数 SI $> 6\ 250$; 磷酸奥司他韦在 $200\ \mu g \cdot mL^{-1}$ 时抑制效率为 65.59%; 利巴韦林在 $10\ \mu g \cdot mL^{-1}$ 时抑制效率为 54.28%; 金刚烷胺在 $10\ \mu g \cdot mL^{-1}$ 时抑制效率为 86.34%。

Table 4 The inhibition of recombinant human interferon alpha 2b on influenza virus A RNA (IC_{50} , $U \cdot mL^{-1}$) (qRT-PCR)

Virus	Interferon alpha 2b	
	$IC_{50}/U \cdot mL^{-1}$	SI
JXDH	177.92 ± 82.91	$>1\ 891.58 \pm 881.48$
FM1	$<48 \pm 0.00$	$>6\ 250 \pm 0.00$
LNZX	$<48 \pm 0.00$	$>6\ 250 \pm 0.00$
FJTA	82.84 ± 8.87	$3\ 642.31 \pm 389.86$

对流感病毒 A/福建同安/196/2009 (H3N2) 株: 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 的 IC_{50} 为 $82.84\ U \cdot mL^{-1}$, 选择指数 SI $> 3\ 621.44$; 磷酸奥司他韦在 $200\ \mu g \cdot mL^{-1}$ 时抑制效率为 31.32%; 利巴韦林在 $10\ \mu g \cdot mL^{-1}$ 时抑制效率为

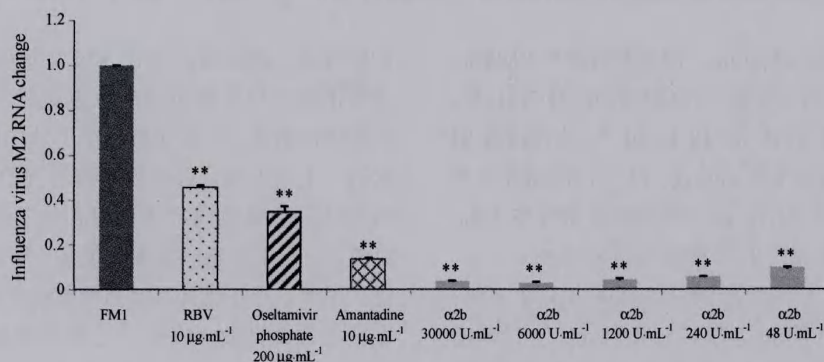


Figure 1 The inhibitory activity of drugs on influenza virus A (FM1) RNA (qRT-PCR). ** $P < 0.01$ vs FM1

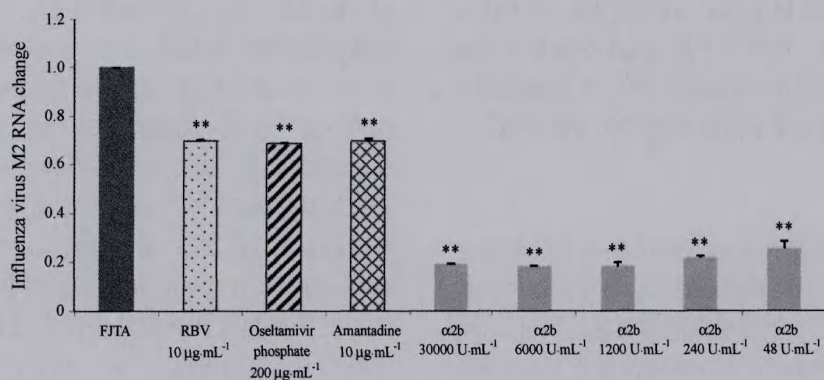


Figure 2 The inhibition of drugs on influenza virus A (FJTA) RNA (qRT-PCR). ** $P < 0.01$ vs FJTA

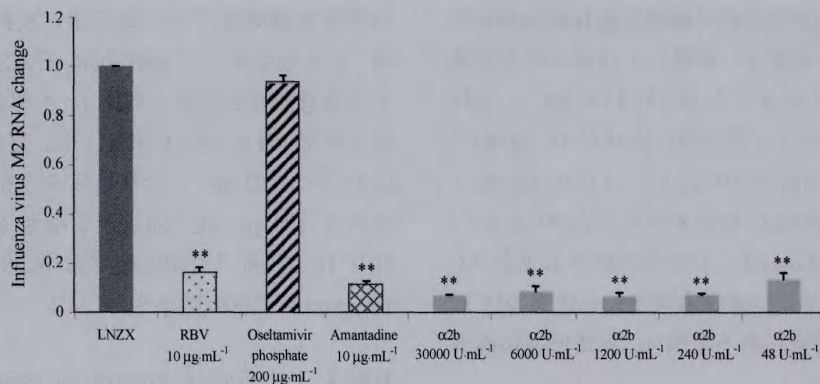


Figure 3 The inhibition of drugs on influenza virus A (LNZX) RNA (qRT-PCR). ** $P < 0.01$ vs LNZX

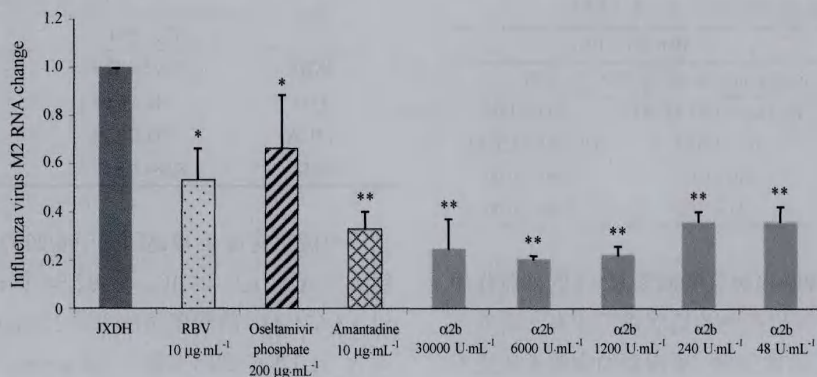


Figure 4 The inhibition of drugs on influenza virus A (JXDH) RNA (qRT-PCR). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs JXDH

30.15%; 金刚烷胺在 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时抑制效率为 30.48%。

对流感病毒 A/辽宁振兴/1109/2010 (H1N1) 株: 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 的 $\text{IC}_{50} < 48 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 选择指数 $\text{SI} > 6250$; 磷酸奥司他韦在 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时抑制效率为 6.47%; 利巴韦林在 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时抑制效率为 83.48%; 金刚烷胺在 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时抑制效率为 88.27%。

对流感病毒 A/江西东湖/312/2006 (H3N2) 株: 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 的 IC_{50} 为 $177.92 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 选择指数 $\text{SI} > 1686.20$; 磷酸奥司他韦在 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时抑制效率为 33.81%; 利巴韦林在 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时抑制效率为 46.53%; 金刚烷胺在 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时抑制效率为 67.03%。

以上结果说明, 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 对多种 A 型流感病毒的 RNA 均有很强的抑制作用, 从而抑制流感病毒的增殖, 其药效优于所选浓度下的对照药物。

讨论

呼吸道病毒感染性疾病是临床最常见的疾病之一, 其病原学复杂、病毒变异性大, 易在人群中造成暴发流行。可引起呼吸道感染的病毒多达 100~200 余种, 包括 RNA 病毒和 DNA 病毒两种类型, 其中最常见致病病毒包括流感病毒、副流感病毒、呼吸道

合胞病毒、腺病毒、鼻病毒及冠状病毒等。近年来, 不断出现一些不同种类的以感染呼吸道为主的新型高致病性病毒, 有些病毒感染所致的病死率极高, 因此这一类型疾病已经成为不容忽视的公共卫生问题。但是针对呼吸道感染得到的预防及治疗措施相对滞后, 由于病毒容易发生变异, 给疫苗研究带来了很大困难。另外现有治疗药物数量有限^[10, 11], 有的病毒缺乏特效药物, 成千上万的患者急需药物预防及治疗。

干扰素 (IFN) 作为一种广谱抗病毒剂, 是目前用于临床治疗最重要的细胞因子之一。干扰素在宿主细胞受到刺激, 如病毒、细菌等各种病原体感染时产生, 并最终启动机体免疫系统的保护机制^[12]。干扰素作用于同一或邻近细胞的 IFN 受体, 激活一系列的抗病级联反应, 从而诱导上百种含干扰素刺激反应元件的基因转录^[13]。这些干扰素激活大量抗病毒相关基因的表达, 如 2', 5'-寡腺苷酸合成酶 (OAS)、蛋白激酶 (PKR)、IFITM3、Mx 蛋白等^[14]。干扰素在对慢性乙型肝炎和慢性丙型肝炎抗病毒治疗方面, 近些年取得了长足的进展。但是, 应用干扰素进行呼吸道感染病毒的预防和治疗仅有少量的文献报道^[1, 7], 主

要是在临床上的抗病毒药效评价。目前临床上对呼吸道疾病的病原诊断多采用血常规检测的方法, 检测疾病是由细菌还是病毒引起, 然后对症治疗, 但是仍缺乏广谱抗呼吸道病毒的特效药物, 因此, 具有广谱抗呼吸道病毒活性的干扰素为临床上的病毒性呼吸道疾病的防治提供了希望, 如近期研究发现新型天然 I 型干扰素 Alferon N 可以抑制野生型流感病毒, 同时还可以阻止 H7N9 药物抗性病毒的复制^[15]。

重组人干扰素 $\alpha 2b$ 是目前抗病毒药物中临床疗效显著者之一, 对多种病毒感染性疾病如乙肝、丙肝、带状疱疹和子宫颈糜烂等均有良好的疗效, 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 由于其低免疫原性、符合人体自然状态、高比活性等特点成为临床首选的干扰素 α 亚型。目前对于重组人干扰素 $\alpha 2b$ 对呼吸道病毒是否具有抑制效果还未有较为全面和具体的报道。本研究应用 CPE 法、MTT 法和 qRT-PCR 法等多种方法, 发现临床用重组人干扰素 $\alpha 2b$ 在体外细胞水平上具有广谱抗呼吸道病毒的作用。实验结果显示重组人干扰素 $\alpha 2b$ 在体外对多种野生型流感病毒、耐药流感病毒、副流感病毒、冠状病毒和呼吸道合胞病毒均有很好的抑制活性, 而且重组人干扰素 $\alpha 2b$ 毒性低, 治疗指数高, 治疗效果优于阳性对照药物。因此, 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 在体外药效实验中呈现出很好的广谱抗呼吸道病毒的效果。关于重组人干扰素 $\alpha 2b$ 在体内是否具有同样的抑制效果, 还需进一步确认和研究。在后续研究中作者将开展重组人干扰素 $\alpha 2b$ 体内抗呼吸道病毒感染的药效评价。鉴于本研究发现的其对多种呼吸道病毒较好的抑制作用, 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 有望成为临床治疗呼吸道病毒感染的特效药。

References

- [1] Gao LL, Yu SY, Chen Q, et al. A randomized controlled trial of low-dose recombinant human interferons $\alpha 2b$ nasal spray to prevent acute viral respiratory infections in military recruits [J]. *Vaccine*, 2010, 28: 4445–4451.
- [2] Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Richard N, et al. Mixed respiratory virus infections [J]. *J Clin Virol*, 2008, 43: 407–410.
- [3] Nguyen-Van-Tam JS, Sellwood C. Intervention strategies for emerging respiratory virus infections: policy and public health considerations [J]. *Curr Opin Virol*, 2013, 3: 192–198.
- [4] Shen Z, Chen Z, Li X, et al. Host immunological response and factors associated with clinical outcome in patients with the novel influenza A H7N9 infection [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2013, 20: O493–O500.
- [5] Pica N, Palese P. Toward a universal influenza virus vaccine: prospects and challenges [J]. *Annu Rev Med*, 2013, 64: 189–202.
- [6] Chen HS, Zhang XQ. *Antivirus Drug: Methods and Applications: Vol 20 (抗病毒药物及其研究方法: 第 20 卷)* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 328.
- [7] Yu DX, Chen Q, Zhang LL, et al. A field trial of recombinant human interferon $\alpha 2b$ for nasal spray to prevent SARS and other respiratory viral infections [J]. *Chin J Exp Clin Virol* (中华实验和临床病毒学杂志), 2005, 19: 216–219.
- [8] Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections [J]. *Biofactors*, 2009, 35: 14–20.
- [9] Chevaliez S, Pawlotsky JM. Interferons and their use in persistent viral infections [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2009: 203–241.
- [10] Zu M, Zhou D, Gao L, et al. Evaluation of Chinese traditional patent medicines against influenza virus *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2010, 45: 408–412.
- [11] Zhang Q, Zhao QJ, Xiong RS, et al. Research progress of anti-influenza virus agents [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2010, 45: 289–299.
- [12] de Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 20053–20057.
- [13] van de Sandt CE, Kreijtz JH, Rimmelzwaan GF. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses [J]. *Viruses*, 2012, 4: 1438–1476.
- [14] Wang X, Hinson ER, Cresswell P. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts [J]. *Cell Host Microbe*, 2007, 2: 96–105.
- [15] Liu Q, Ma J, Strayer DR, et al. Emergence of a novel drug resistant H7N9 influenza virus: evidence based clinical potential of a natural IFN- α for infection control and treatment [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2014, 12: 165–169.