

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.6.05

# 重组猪 $\alpha$ -干扰素喷干粉剂的制备及其效果评价

韩国英<sup>1</sup>, 刘刚<sup>1</sup>, 王兴业<sup>1</sup>, 王茂超<sup>1</sup>, 郭海岩<sup>1</sup>, 曹瑞兵<sup>2</sup>, 刘晓东<sup>1,3</sup>

(1. 山东仙普爱瑞科技股份, 山东高密 261500;

2. 南京农业大学农业部 动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095;

3. 青岛农业大学动物科技学院 预防兽医学山东省重点实验, 青岛 266000)

[收稿日期] 2016-12-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 06-0033-08 [中图分类号] S859.79

**[摘要]** 为制备一种高活性、低价格重组猪 $\alpha$ -干扰素(PoIFN- $\alpha$ ), 采用喷雾干燥技术制备出重组猪 $\alpha$ -干扰素(rPoIFN- $\alpha$ )喷干粉剂, 并通过对rPoIFN- $\alpha$ 喷干粉剂的稳定性, 安全性, 治疗效果等质量标准进行综合评价。结果显示, 本试验制备的重组猪 $\alpha$ -干扰素喷干粉剂质量稳定性, 有效期暂定为两年; 除10倍剂量rPoIFN- $\alpha$ 喷干粉剂导致猪肝脏轻微脂肪样病变, 其余各较低剂量rPoIFN- $\alpha$ 喷干粉剂对猪无毒副作用; 人工感染和临床应用试验表明rPoIFN- $\alpha$ 喷干粉剂对猪腹泻具有显著的治疗效果, 为PoIFN- $\alpha$ 喷干粉剂的工程化生产及其在养猪业中的应用提供参考。

**[关键词]** 重组猪 $\alpha$ 干扰素喷干粉剂; 喷雾干燥技术; 猪腹泻

## Preparation and Effect Evaluation of Recombinant Porcine Interferon Alpha Spray Dried Powder

HAN Guo-ying<sup>1</sup>, LIU Gang<sup>1</sup>, WANG Xing-ye<sup>1</sup>, WANG Mao-chao<sup>1</sup>, CAO Rui-bing<sup>2</sup>, LIU Xiao-dong<sup>1,3</sup>

(1. Shandong Xianpuairui Science and Technology Company Limited, Gaomi, Shandong 261500, China; 2. Key Laboratory of Animal Disease

Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China;

3. Shandong Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266000, China)

**Abstract:** To prepare high-activity and low-price recombinant porcine interferon alpha (PoIFN- $\alpha$ ), the recombinant porcine interferon alpha (rPoIFN- $\alpha$ ) spray powder was prepared by spray drying technology, and its stability, safety and treatment effect were studied in detail, respectively. The results showed the rPoIFN- $\alpha$  spray powder had distinct quality advantages in stability, suggesting that expiration time of the spray-drying rPoIFN- $\alpha$  preparation was 24 months; 5-fold dose/only the following does did not produce any toxic effect on swine, whereas, 10-fold dose could lead to mild fatty degeneration in swines' livers cells; The cure rate of artificially infected and clinical treatment showed rPoIFN- $\alpha$  spray powder had obvious curative effect against diarrhea. This study will pave the way for the production of the engineered porcine interferon in the large scale and their application in pig farming industry.

**Key words:** recombinant porcine interferon alpha spray powder; spray drying technology; diarrhea

猪  $\alpha$ -干扰素 (porcine interferon  $\alpha$ , poIFN- $\alpha$ ) 属于 I 型干扰素, 有 17 个基因亚型, 分别定位于猪 1 号染色体上, 目前已全部被克隆测序<sup>[1-2]</sup>。目前, 猪  $\alpha$ -干扰素在大肠杆菌<sup>[3-4]</sup>、毕赤酵母<sup>[5]</sup> 和动物细胞<sup>[6]</sup> 等表达系统中均实现了表达。重组猪  $\alpha$ -干扰素 (recombinant porcine interferon  $\alpha$ , rpoIFN- $\alpha$ ) 蛋白活性分析表明其对口蹄疫病毒<sup>[7]</sup>、猪呼吸与繁殖综合征病毒<sup>[8-9]</sup>、传染性胃肠炎病毒<sup>[10]</sup> 和猪伪狂犬病病毒<sup>[11]</sup> 等均具有抑制作用, 并与多种抗原配伍免疫具有免疫佐剂功能<sup>[12-14]</sup>。因此, 作为广谱抗病毒药可用于猪病毒性疾病的防治。

近年来, 猪  $\alpha$ -干扰素常用的产品剂型有液态制剂和冻干制剂<sup>[15]</sup>。液态制剂存在热稳定性差, 不易长期保存和远距离运输等问题; 冻干制剂存在产量低, 成本高和制作工艺复杂难以规模化等问题, 均限制了猪干扰素在猪病毒性疾病治疗中的推广和应用<sup>[15]</sup>。本研究选择相对经济而又技术先进的喷雾干燥法将重组猪  $\alpha$ -干扰素液态制剂制成喷干粉制剂, 实现了猪重组猪  $\alpha$ -干扰素低成本规模化生产。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

1.1.1 菌株、病毒、细胞和试剂 重组 poIFN- $\alpha$  毕赤酵母菌株为青岛农业大学动物科技学院预防兽医学山东省重点实验室提供; 牛肾细胞 (MDBK) 购自中国科学院细胞库; 水泡性口炎病毒 (VSV) 和猪流行性腹泻病毒 (PED) 为本实验室保存。DMEM 培养基和胎牛血清均购自 Gibco 公司; 重组猪  $\alpha$ -干扰素冻干制剂按照专利<sup>[16]</sup> 方法制备; 血常规及血液生化指标测定试剂购自四川省迈克科技有限责任公司生产; Sephacryl S-100 购自上海安澜德生物科技有限公司; 人  $\alpha$  干扰素标准品购自中国药品生物制品检定所; 其他化学试剂均为分析纯。

1.1.2 试验动物 30 日龄健康二元杂交猪, 健康 1 日龄未吃初乳二元杂交仔猪, 购自山东莱州市厚德猪食品有限公司猪场。

1.2 主要试验设备 GQ-105 型管式离心机购自辽阳隆达制药机械有限公司。陶瓷膜设备购自安徽普朗膜技术有限公司。LPG150 喷雾干燥机

购自无锡市能达干燥设备有限公司。MEK-6138K 全自动血液学分析仪购自日本光电工业株式会社生产; 魅力 1800 自动血液生化分析仪购自美国 MD 仪器公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂的制备工艺 将储料罐内的发酵液进行离心, 转速为 12000 rpm, 处理量为 1.2 m<sup>3</sup>/h; 离心后, 将上清液通过 30 kDa 陶瓷膜过滤, 控制进口压力为 0.5 MPa, 出口压力 0.2 MPa, 上清液的温度和流速分别为: 40 °C 和 1 m<sup>3</sup>/h, 收集透过液; 透过液用 0.5 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 调至 pH 7.0 左右, 采用直径 1 m, 高 4 m 不锈钢柱, Sephacryl S-100 凝胶, 装柱量为 75 %, S-100 柱用 PBS 平衡 3 倍柱床体积, 上样收集目标蛋白液; 纯化得到的蛋白样品液通过 10 kDa 陶瓷膜过滤脱盐; 在浓缩液中加入赋形剂 10% 海藻糖、保护剂 6% 大豆卵磷脂后, 以 1000 rpm 搅拌 20 min, 得到喷干液; 最终将喷干液进行喷雾干燥, 控制喷雾干燥机的进口温度为 110 °C, 出口温度为 70 °C, 喷液速度为 200 L/h, 得到重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂。

1.3.2 重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂的活性测定 采用细胞病变抑制法, 以 MDBK-VSV 为检测系统, 采用人  $\alpha$  干扰素标准品校准为 IU。

1.3.3 采用正交试验确定赋形剂与保护剂的种类和添加量 选赋形剂的种类, 保护剂的种类, 赋形剂的添加量, 保护剂的添加量四个主要影响因素, 按照 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交试验设计优化参数, 正交试验因素与水平设计见表 1。

1.3.4 喷干后放置 40 °C 加速稳定性试验 根据文献<sup>[17]</sup> 中的方法, 将喷干后重组猪  $\alpha$ -干扰素放置 40 °C 加速稳定性试验。每个月定期采样进行活性检测。

1.3.5 重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂对猪安全性试验 取健康仔猪 20 只, 随机分为 4 组 (3 组试验组和 1 组对照组), 每组 5 头, 第 1~3 组分别灌服重组猪  $\alpha$ -干扰素 10 mL, 分为低 0.05 g/mL、中 0.25 g/mL、高 0.5 g/mL 三种剂量 (即 1 倍剂量, 5 倍剂量和 10 倍剂量), 连续灌服 7 d, 对照组, 灌服生理盐水 10 mL。

表 1 正交试验因素水平表

Tab 1 Factors and levels used for orthogonal test

因素	A	B	C	D
	赋形剂种类	赋形剂浓度	保护剂种类	保护剂浓度
1	海藻糖	20%	大豆卵磷脂	9%
2	麦芽糊精	15%	赖氨酸	6%
3	乳糖	10%	羟丙基甲基纤维素	3%
4	淀粉	5%	聚乙二醇 20000	1%

从灌服重组猪  $\alpha$ -干扰素前及灌服后的第一天起,对仔猪体重、体温、饮水、眼睑指征、呼吸指征、运动指征、皮肤、粪便、血常规及血液生化指标等方面进行观察检测,灌服后连续观察 14 d。试验结束时剖检仔猪,观察脑、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏等器官及消化道有无病理变化。病变组织,按 1.5 cm×1.5 cm×0.4 cm 大小取材,立即用 10 % 甲醛固定,石蜡包埋后 HE 染色进行病理学检查。

1.3.6 重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂的实验室治疗试验 将 30 头刚出生未吃初乳的仔猪随机分成 3 组,每组 10 头,第 1 组为试验组,即重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂治疗组;第 2 组为对照组,即重组猪  $\alpha$ -干扰素冻干粉剂治疗组;第 3 组为空白对照组,即未进行治疗组。各组仔猪注射器灌服 2 mL PED 病毒液(病毒浓度为  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL),一天 2 次。当仔猪开始出现腹泻症状时,试验组仔猪灌服重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂,每次用量 0.5 g,用生理盐水稀释成 5 mL,每天 1 次;对照组仔猪灌服同等剂量重组猪  $\alpha$ -干扰素冻干粉剂,每天 1 次;空白对照组仔猪灌服同等剂量生理盐水 5 mL。观察治疗效果,统计发病及死亡情况。

1.3.7 重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂的临床应用 莱州市厚德猪食品有限公司猪场仔猪腹泻屡有发生,取相同日龄病猪 110 头,试验组取 10 日龄病仔猪 50 头灌服重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂,每次用量 0.5 g,用生理盐水稀释成 5 mL,每天 1 次;对照组取 50 头仔猪灌服同等剂量重组猪  $\alpha$ -干扰素冻干粉剂,每天 1 次;空白对照组取病 10 头仔猪灌服生理盐水 5 mL。记录干扰素治疗后的痊愈与死亡情况。

1.3.8 统计学处理 试验数据以  $\bar{X} \pm S$  表示,采用 SPSS 13.0 软件对试验数据录入统计,两组间  $t$  检

验, $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂效价的测定 重组猪  $\alpha$ -干扰素在 MDBK-VSV 系统中抗病毒活性为  $2.2 \times 10^6$  IU/mL。喷雾干燥后,干扰素在 MDBK-VSV 系统中抗病毒活性为  $1.74 \times 10^6$  IU/mL,喷雾干燥后与喷雾干燥前的活性比为 79 %。由此可见,重组猪  $\alpha$ -干扰素作为一种高活性蛋白在该干燥过程中的稳定性易于遭受破坏。

2.2 正交试验设计结果与分析 由表 2 可知,极差大小顺序为  $C > D > B > A$ ,可以看出保护剂的种类是影响干扰素干粉剂稳定性的主要因素,其次是保护剂赋形剂的浓度,赋形剂的种类对重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂稳定性的影响相对较小,由正交试验结果得到的最佳工艺组合是  $A_2B_1C_4D_4$ ,即:赋形剂的种类麦芽糊精,添加量 20 %,保护剂的种类聚乙二醇 20000,添加量 1 %。

采用优化后的参数进行喷雾,重复三次试验,喷雾干燥后与喷雾干燥前的活性比维持在  $100 \pm 1.5$  %,可有效保证重组猪  $\alpha$ -干扰素的活性。

2.3 重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂 40 °C 加速稳定性试验结果 由表 3 可知,样品放置了三个月后,活性稳定,并无显著性差异( $P > 0.05$ ),则有效期可暂定为两年。

2.4 重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂对猪安全性试验结果 在试验中,各组猪均无死亡,行为特征灌服药物前后无变化。体重检测中各试验组猪与对照组相似,均无显著差异( $P > 0.05$ )(表 4)。与给药前相比,体温变化与对照组相似,即各组仔猪体温都在  $38.5 \sim 39.5$  °C 内波动,与对照组相比均无显著差异( $P > 0.05$ )(表 4)。

表 2 正交试验结果与分析  
Tab 2 Results of orthogonal test

试验号	因素				喷干后/喷干前的 $\alpha$ -干扰素活性之比/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	72
2	1	2	2	2	65
3	1	3	3	3	77
4	1	4	4	4	93
5	2	1	2	3	70
6	2	2	1	4	74
7	2	3	4	1	94
8	2	4	3	2	72
9	3	1	3	4	78
10	3	2	4	3	89
11	3	3	1	2	70
12	3	4	2	1	68
13	4	1	4	2	92
14	4	2	3	1	73
15	4	3	2	4	69
16	4	4	1	3	73
$k_1$	76.750	78.000	72.250	76.750	
$k_2$	77.500	75.250	68.000	74.750	
$k_3$	76.250	77.500	75.000	77.250	
$k_4$	76.750	76.500	92.000	78.500	
R	1.250	2.750	24.000	3.750	

表 3 重组猪  $\alpha$ -喷干粉剂的稳定性试验  
Tab 3 Stability test of rpoIFN- $\alpha$  spray dried powder

时间/月	0	1	2	3
活性( $1 \times 10^6$ IU/mL)	2.21 $\pm$ 0.12	2.20 $\pm$ 0.09	2.21 $\pm$ 0.13	2.19 $\pm$ 0.14

表 4 重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂对猪体重和体温的影响  
Tab 4 Effects of ingesting rpoIFN- $\alpha$  spray dried powder on weight and body temperature of swine

组别	试验前体重	试验后 1 周的体重	试验后 2 周的体重	试验前体温	试验后 1 周的体温	试验后 2 周的体温
	/kg	/kg	/kg	/°C	/°C	/°C
对照组	31.3 $\pm$ 1.7	38.6 $\pm$ 1.5	46.4 $\pm$ 1.7	39.1 $\pm$ 0.3	38.8 $\pm$ 0.3	39.2 $\pm$ 0.3
1 倍剂量	31.6 $\pm$ 2.0	38.1 $\pm$ 1.9	46.5 $\pm$ 2.3	38.9 $\pm$ 0.4	39.2 $\pm$ 0.1	39.0 $\pm$ 0.2
5 倍剂量	30.9 $\pm$ 2.2	39.0 $\pm$ 2.5	46.1 $\pm$ 1.1	39.0 $\pm$ 0.4	39.0 $\pm$ 0.2	38.8 $\pm$ 0.2
10 倍剂量	31.4 $\pm$ 1.8	38.3 $\pm$ 1.8	46.9 $\pm$ 2.7	38.7 $\pm$ 0.2	38.9 $\pm$ 0.4	39.3 $\pm$ 0.2

血液常规结果见表 5。在整个试验期间内,各  
组别猪在不同时间点采集的血液所测定的各项指  
标均在正常参考范围之内。且 1、5 和 10 倍剂量组

与空白对照组相比,并无显著性差异( $P>0.05$ )。因  
此干扰素干粉剂在 0.5~5 g 剂量范围对血液常规  
指标无明显的影响。

表 5 重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂对猪血常规的影响

Tab 5 Effect to blood routine after medication in swine

组别	采样时间	WBC $\text{}/(10^9 \cdot \text{L}^{-1})$	RBC $\text{}/(10^{12} \cdot \text{L}^{-1})$	HGB $\text{}/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	HCT/%	MCV/ $\mu\text{L}$	MCH/ $\mu\text{g}$	PLT $\text{}/(10^9 \cdot \text{L}^{-1})$
对照组	试验前	16.1 $\pm$ 1.5	6.3 $\pm$ 0.4	108.6 $\pm$ 6.2	35.2 $\pm$ 2.2	53.3 $\pm$ 2.4	17.1 $\pm$ 1.7	451.3 $\pm$ 100.2
	试验后 2 周	16.4 $\pm$ 1.9	6.3 $\pm$ 0.5	108.1 $\pm$ 6.4	35.5 $\pm$ 1.8	53.5 $\pm$ 2.1	17.4 $\pm$ 1.9	455.3 $\pm$ 99.8
1 倍剂量组	试验前	16.5 $\pm$ 2.0	6.4 $\pm$ 0.5	107.9 $\pm$ 7.1	34.9 $\pm$ 2.8	53.6 $\pm$ 2.6	17.5 $\pm$ 2.1	456.3 $\pm$ 106.4
	试验后 2 周	16.3 $\pm$ 1.7	6.4 $\pm$ 0.3	107.6 $\pm$ 6.8	35.2 $\pm$ 2.2	53.8 $\pm$ 2.1	17.3 $\pm$ 1.8	451.3 $\pm$ 96.4
5 倍剂量组	试验前	16.6 $\pm$ 1.3	6.3 $\pm$ 0.3	108.3 $\pm$ 6.6	35.3 $\pm$ 1.7	53.3 $\pm$ 2.9	17.6 $\pm$ 1.7	457.6 $\pm$ 103.9
	试验后 2 周	16.5 $\pm$ 0.9	6.4 $\pm$ 0.3	108.4 $\pm$ 6.2	34.9 $\pm$ 2.6	53.6 $\pm$ 2.2	17.4 $\pm$ 1.9	455.8 $\pm$ 100.8
10 倍剂量	试验前	16.2 $\pm$ 1.5	6.4 $\pm$ 0.2	107.9 $\pm$ 7.6	35.3 $\pm$ 2.2	53.5 $\pm$ 2.4	17.2 $\pm$ 1.7	456.6 $\pm$ 102.5
	试验后 2 周	16.4 $\pm$ 1.6	6.3 $\pm$ 0.3	107.8 $\pm$ 6.9	35.3 $\pm$ 1.9	53.6 $\pm$ 2.1	17.7 $\pm$ 2.0	453.3 $\pm$ 98.4

WBC(白细胞),RBC(红细胞),PLT(血小板),MCV(平均红细胞容积),HGB(血红蛋白),HCT(红细胞压积)。

WBC means white blood cell, RBC means red blood cell, PLT means blood platelet, MCV means Mean corpuscular volume, HGB means haemoglobin, HCT means hematocrit.

血清生化检测结果见表 6,1 倍和 5 倍剂量组  
的 GOT、BUN、CREA、GPT、ALP 和 ALB 的平均值与  
对照组的平均值均无显著差异,GOT 为心脏功能指  
标;BUN、CREA 是肾功能的重要指标。GPT、ALP、  
ALB 为常用的肝功能检测指标,故认为 1 倍和 5  
倍剂量组对猪的肾、心脏和肝脏功能无损害;解剖后  
经肉眼观察,1 倍和 5 倍剂量组较对照组仔猪的脑、  
心脏、脾脏、肺脏、肝脏、肾脏等器官及消化道均未

出现明显的病理变化。

在 10 倍剂量组较对照组除 GPT、ALP、T-CHO  
水平均升高,ALB 水平降低,差异均显著( $P<0.05$ ),  
说明肝脏在高剂量组存在损伤。HE 染色可知:对  
照组猪肝索排列整齐,肝细胞大小均匀,无变性坏  
死;10 倍剂量组猪肝脏肝板排列紊乱,肝细胞轻微  
脂肪变性(图 1)。

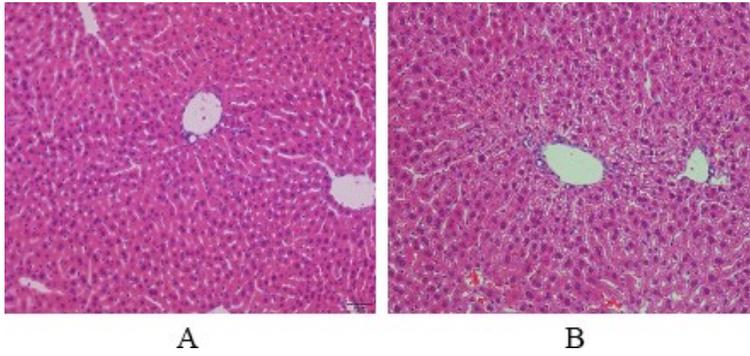
表 6 重组猪  $\alpha$ -干扰素对猪血清生化指标的影响

Tab 6 Effect on serum parameters after medication in swine

组别	采样时间	GOT $\text{}/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	GPT $\text{}/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	ALP $\text{}/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	GLU $\text{}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	ALB $\text{}/(\text{g} \cdot \text{L})$	BUN $\text{}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	CREA $\text{}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	T-CHO $\text{}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$
对照组	试验前	44.6 $\pm$ 3.5	35.5 $\pm$ 2.5	185 $\pm$ 23	6.1 $\pm$ 0.9	39.8 $\pm$ 4.1	3.7 $\pm$ 0.6	90.1 $\pm$ 8.9	2.8 $\pm$ 0.7
	试验后 2 周	43.9 $\pm$ 3.8	35.1 $\pm$ 2.9	180 $\pm$ 26	6.0 $\pm$ 0.9	40.9 $\pm$ 4.4	3.2 $\pm$ 0.8	91.1 $\pm$ 7.9	2.7 $\pm$ 0.6
1 倍剂量组	试验前	43.5 $\pm$ 3.2	34.7 $\pm$ 2.4	183 $\pm$ 25	6.2 $\pm$ 0.9	40.4 $\pm$ 4.7	3.5 $\pm$ 0.7	89.9 $\pm$ 8.9	2.6 $\pm$ 0.5
	试验后 2 周	43.6 $\pm$ 2.9	35.4 $\pm$ 2.1	186 $\pm$ 16	6.1 $\pm$ 0.8	39.9 $\pm$ 4.4	3.8 $\pm$ 0.8	92.1 $\pm$ 7.6	2.7 $\pm$ 0.6
5 倍剂量	试验前	44.9 $\pm$ 2.8	34.1 $\pm$ 2.9	181 $\pm$ 27	6.1 $\pm$ 0.9	40.1 $\pm$ 4.3	3.6 $\pm$ 0.4	91.6 $\pm$ 8.9	2.8 $\pm$ 0.6
	试验后 2 周	42.5 $\pm$ 3.9	34.7 $\pm$ 2.4	183 $\pm$ 25	6.0 $\pm$ 0.8	40.4 $\pm$ 3.7	3.3 $\pm$ 0.9	89.8 $\pm$ 10.1	2.6 $\pm$ 0.5
10 倍剂量	试验前	44.1 $\pm$ 3.3	35.5 $\pm$ 2.5	184 $\pm$ 21	6.0 $\pm$ 0.9	39.9 $\pm$ 4.6	3.8 $\pm$ 0.7	90.8 $\pm$ 7.6	2.7 $\pm$ 0.7
	试验后 2 周	43.5 $\pm$ 4.0	40.7 $\pm$ 3.0*	220 $\pm$ 26*	6.1 $\pm$ 0.9	30.3 $\pm$ 4.3*	3.7 $\pm$ 0.9	89.9 $\pm$ 10.9	3.5 $\pm$ 0.6*

\* 表示差异显著  $P<0.05$ 。CREA(肌酐),GLU(血糖),GOT(谷草转氨酶),ALB(白蛋白),BUN(血尿素氮),ALP(碱性磷酸酶),GPT(谷丙转氨酶),T-CHO(总胆固醇)。

\* means significant difference ( $P<0.05$ ). CREA means creatinine, GLU means glucose, GOT means glutamic oxalacetic transaminase, ALB means albumin, BUN means blood urea nitrogen, ALP means alkaline phosphatase, GPT means glutamate pyruvate transaminase T-CHO means total cholesterol.



A. 对照组; B. 10 倍剂量组  
A. Control group; B. 10-fold dose

图 1 各剂量组的肝脏组织切片 (HE 染色, ×20)

Fig 1 Livers change in different dosage of rpoIFN- $\alpha$  spray dried powder

2.5 重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂的实验室治疗结果  
攻毒后 12~24 h, 所有仔猪均出现腹泻症状。试验组在猪灌服重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂后腹泻症状逐渐减轻, 2~3 d 后全部恢复正常; 灌服重组猪  $\alpha$ -干扰素冻干粉剂治疗对照组, 腹泻症状减轻和恢复程度与试验组一致; 未采取治疗措施的空白对照组则全部死亡, 死亡率为 100%, 结果见表 7。

2.6  $\alpha$ -干扰素干粉剂的临床应用结果 对临床上

仔猪腹泻的病猪, 试验组在猪灌服重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂后, 1 d 后腹泻症状逐渐减轻, 3 d 后全部恢复正常, 50 例病猪中, 治愈 46 例, 治愈率为 92%; 灌服重组猪  $\alpha$ -干扰素冻干粉剂治疗对照组, 腹泻症状减轻和恢复程度与试验组一致, 差异不显著; 未采取治疗措施的空白对照组则全部死亡, 死亡率为 100%, 结果见表 8。

表 7 重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂的实验室治疗结果

Tab 7 Therapeutic efficacy of rpoIFN- $\alpha$  spray dried powder

组别	发病数/头	痊愈数/头	死亡数/头	死亡率/%	治愈率/%
试验组	10	10	0	0	100
对照组	10	10	0	0	100
空白对照组	10	0	10	100	0

表 8 重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂的临床应用结果

Tab 8 Clinical application of rpoIFN- $\alpha$  spray dried powder

组别	发病数/头	痊愈数/头	死亡数/头	死亡率/%	治愈率/%
试验组	50	46	4	8	92
对照组	50	45	5	10	90
空白对照组	10	0	10	100	0

### 3 讨论与小结

病毒性疫病已成为我国养猪业的主要疫病, 严重威胁养猪业的健康发展。对于病毒性疫病, 猪干

扰素等生物制剂是目前市场上治疗的首选药物。当前市场应用的猪干扰素以冻干制剂为主, 但由于冷冻干燥技术上的缺陷, 使其存在成本高和成品价

格昂贵等问题。本研究选择喷雾干燥技术将重组猪  $\alpha$ -干扰素液态制剂制成喷干粉制剂,与冻干制剂相比在成本可以节省 71.4%~80.6%,使其成品价格大大降低,易于基层养殖者的接受,为猪  $\alpha$ -干扰素的普及应用奠定了基础。

基于蛋白、多肽类物质的性质,喷雾干燥过程中的一些因素,如喷嘴的剪切力、液滴干燥时产生的热应力、蛋白或多肽在空气-液体界面的吸附等都会对这些物质的活性造成一定的破坏,为此要添加赋形剂和保护剂减少对成品的活性损伤<sup>[18-19]</sup>。本研究通过优化赋形剂和保护剂的种类和浓度使重组猪  $\alpha$ -干扰素在喷雾干燥过程中的稳定性可以大大提高,喷雾干燥后与喷雾干燥前重组猪  $\alpha$ -干扰素的活性比维持在 100±1.5%,有效期为 2 年以上。

猪  $\alpha$ -干扰素是一种分泌蛋白,分泌蛋白在体内的半衰期很短,若要达到治疗水平,必须持续大剂量使用,有可能会产生一些副作用,进行重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂对猪的安全性试验研究非常重要。本试验结果表明,1 倍和 5 倍剂量重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂的使用均对靶动物无明显毒性反应。10 倍剂量组中猪肝脏产生轻微的脂肪样变,这与蒋佳颖<sup>[20]</sup>等人研究一致,推测可能由于高剂量的干扰素使肝脏功能受到不同程度的损伤,导致肝细胞坏死后产生脂肪样变。由此说明重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂的每次使用剂量低于 2.5 g,对靶动物无毒副作用,具有良好的临床应用前景。

腹泻是猪的一种常见病,它不仅影响猪的正常生长发育,引起较高的死亡率,给广大养殖者带来严重的经济损失;而且该病会给畜产品质量安全和人类健康带来隐患。本试验仔猪人工感染治疗试验和临床应用结果表明感染仔猪灌服重组猪  $\alpha$ -干扰素获得了有效的保护,降低了死亡率,这与陈国华<sup>[21]</sup>等人研究成果一致;并且重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂与冻干粉剂的治疗效果无显著差异,说明重组猪  $\alpha$ -干扰素喷干粉剂具有明显的抗病毒活性,可以作为新型猪  $\alpha$ -干扰素制剂应用于猪腹泻的治疗。

## 参考文献:

- [1] Zanotti C, Razzuoli E, Crooke H, *et al.* Differential Biological Activities of Swine Interferon- $\alpha$  Subtypes [J]. *Journal Interferon Cytokine Research*, 2015, 35(12):990-1002.
- [2] Cheng G, Zhao X, Chen W, *et al.* Detection of differential expression of porcine IFN- $\alpha$  subtypes by reverse transcription polymerase chain reaction [J]. *Interferon Cytokine Research*, 2007, 27(7): 579-587.
- [3] 曹瑞兵, 张素芳, 蔡梅红, 等. 一种新的猪  $\alpha$ -干扰素基因克隆及其在大肠杆菌中表达 [J]. *农业生物技术学报*. 2004, 12(3): 278-282.  
Cao R B, Zhang S F, Cai M H, *et al.* Molecular Cloning of a Novel Porcine Interferon- $\alpha$  and Its Expression in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 2004, 12(3): 278-282.
- [4] Lefèvre F, L'Haridon R, Borrás-Cuesta F, *et al.* Production, purification and biological properties of an *Escherichia coli*-derived recombinant porcine alpha interferon [J]. *Journal of General Virology*, 1990, 71: 1057-1063.
- [5] 葛丽. 猪  $\alpha$  型干扰素基因在毕赤酵母中的分泌表达 [D]. 山东: 山东农业大学动物科技学院, 2003.  
Ge L. Secretive Expression of Porcine IFN- $\alpha$  in Yeast *Pichia pastoris* [D]. Shandong: Shandong Agricultural University, 2003.
- [6] 王彦彬, 崔保安, 陈红英, 等. 猪干扰素  $\alpha$  在昆虫细胞中分泌表达及其抗病毒活性检测 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42(4): 1435-1441.  
Wang Y B, Cui B A, Chen H Y, *et al.* Secreted Expression of Porcine Interferon- $\alpha$  in Insect Cells and Its Antiviral Activity Detection [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(4): 1435-1441.
- [7] Chinsangaram J, Moraes M P, Koster M, *et al.* Novel viral disease control strategy: adenovirus expressing alpha interferon rapidly protects swine from foot-and-mouth disease [J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(2): 1621-1625.
- [8] Chang H W, Jeng C R, Liu J J, *et al.* Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon- $\alpha$  [J]. *Veterinary Microbiology*, 2005, 108(3-4): 167-177.
- [9] 王丹. 重组猪  $\alpha$  干扰素抗猪繁殖与呼吸综合征病毒的应用研究 [D]. 河南: 河南农业大学, 2009.  
Wang D. The Exploratory Development of The Recombinant of

- Porcine Protein of IFN- $\alpha$  Against PRRSV [D]. Henan: Henan Agricultural University, 2009.
- [10] Jordan L T, Derbyshire J B. Antiviral action of interferon- $\alpha$  against porcine transmissible gastroenteritis virus [J]. *Veterinary Microbiology*, 1995, 45(1): 59-70.
- [11] Pol J M, Broekhuysen-Davies J M, Wagenaar F, *et al.* The influence of porcine recombinant interferon- $\alpha$  1 on pseudorabies virus infection of porcine nasal mucosa in vitro [J]. *The Journal of General Virology*, 1991, 72(4): 933-938.
- [12] Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, *et al.* Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo [J]. *Immunity*, 2001, 14(4): 461-470.
- [13] Proietti E, Bracci L, Puzelli S, *et al.* Type I IFN as a natural adjuvant for a protective immune response: lessons from the influenza vaccine model [J]. *Journal Immunology*, 2002, 169(1): 375-383.
- [14] Cull V S, Broomfield S, Bartlett E J, *et al.* Coimmunisation with type I IFN genes enhances protective immunity against cytomegalovirus and myocarditis in gB DNA-vaccinated mice. *Gene Therapy*, 2002, 9(20): 1369-1378.
- [15] 房志仲, 张彦文. 干扰素剂型的研究进展 [J]. *天津医科大学学报*, 2006, 12(3): 481-484.  
Fang Z Z, Zhang Y W. Research Progress on the Interferon Dosage Form [J]. *Journal of Tianjin Medical University*, 2006, 12(3): 481-484.
- [16] 董世娟. 一种重组猪  $\alpha$ -干扰素的冻干制剂及其制备方法和用途; 中国, 2009101986661 [P]. 2011-05-18.  
Dong S J. Application and Preparation of a Recombinant Porcine Interferon Alpha Freeze-dried Powder; China, 2009101986661 [P]. 2011-05-18.
- [17] 奚念朱. 药剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 141.  
Xi N Z. *Pharmaceutics* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1978: 141.
- [18] 蒋荣高, 张磊, 王春龙, 等. 喷雾干燥对干扰素  $\alpha$ -2b 稳定性的影响 [J]. *中国药学杂志*, 2005, 40(9): 681-684.  
Jiang R G, Zhang L, Wang C L, *et al.* Effect of Spray Drying on Stability of Recombinant Human Interferon  $\alpha$ -2b [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2005, 40(9): 681-684.
- [19] 蒋荣高, 王立青, 王春龙, 等. 添加剂对喷雾干燥干扰素  $\alpha$ -2b 稳定机制的研究 [J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(11): 841-844.  
Jiang R G, Wang L Q, Wang C L, *et al.* Mechanism of Recombinant Human Interferon  $\alpha$ -2b Stabilization by Additives During Spray-Drying [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2008, 43(11): 841-844.
- [20] 蒋佳颖. 重组猪  $\alpha$  干扰素的分离纯化与安全性研究 [D]. 甘肃: 甘肃农业大学, 2015.  
Jiang J Y. Study on the Isolation and Purification and Safety of Recombinant Porcine Interferon  $\alpha$  to Pig [D]. Gansu: Gansu Agricultural University, 2015.
- [21] 陈国华, 朱耀华. 干扰素对猪腹泻病的治疗试验 [J]. *上海畜牧兽医通讯*, 1998, (3): 22.  
Chen G H, Zhu Z H. Treatment of Diarrhea with Interferon [J]. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 1998, (3): 22.

(编辑:陈希)