

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.10.07

重组猪干扰素 α 对急性病毒性腹泻仔猪肾脏损伤的保护作用研究

周 炜^{1,2}, 夏兵兵^{1,2}, 吴 博^{1,2}, 何志远^{1,2}, 蒋敏之^{1,2},
许智勇^{2,3}, 赵 俊^{1,2,3*}, 王明丽^{1,2,3*}

(1. 芜湖英特菲尔生物制品产业研究院有限公司, 安徽芜湖 241000; 2. 安徽医科大学科教大楼生物工程实验室, 合肥 230032;

3. 芜湖天明生物技术有限公司, 安徽芜湖 241000)

[收稿日期] 2020-07-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 10-0048-09 [中图分类号] S859.7

[摘 要] 为研究重组猪干扰素 α (rPoIFN α) 在人工感染仔猪病毒性腹泻模型上对肾脏损伤的保护作用, 选取 10 日龄健康三元哺乳仔猪 15 头, 随机分为 rPoIFN α 治疗组 (使用剂量 100 万单位/头)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 感染对照组和正常对照组, 每组 5 头仔猪。rPoIFN α 治疗组和感染对照组仔猪经口饲喂 PEDV 悬液 4 mL (接种量为 $4.0 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀/头), 正常对照组仔猪同步饲喂 4 mL 生理盐水, 建立 PEDV 致哺乳仔猪病毒性腹泻模型。模型建立结果显示, 攻毒后 72 h, 感染对照组仔猪全部出现腹泻、脱水等典型病毒性腹泻症状, 仔猪小肠及肾脏病料组织的 PEDV 核酸检测为阳性。同时发现, 该组仔猪血肌酐水平显著升高 ($P < 0.05$), 尿比重较其他两组偏高, 并检测出颗粒管型和尿蛋白。镜下 HE 染色病理学观察到肾间质组织中出现嗜酸性粒细胞, 提示超敏反应参与对肾脏的损伤。rPoIFN α 治疗组仔猪症状轻微且易恢复, PEDV 核酸检测阳性率仅为 30%。仔猪相关血液及病料组织样本检测结果显示, rPoIFN α 对 PEDV 感染仔猪治疗有效率达到 60%。试验表明, rPoIFN α 可有效治疗 PEDV 感染引起的仔猪腹泻, 同时对肾脏具有明显保护作用。

[关键词] 重组猪干扰素 α ; PEDV; 腹泻模型; 肾脏损伤

Protective Effect of Recombinant Porcine Interferon on Renal Injury of Piglets with Acute Viral Diarrhea

ZHOU Wei^{1,2}, XIA Bing-bing^{1,2}, WU Bo^{1,2}, HE Zhi-yuan^{1,2}, JIANG Min-zhi^{1,2},
XU Zhi-yong^{2,3}, ZHAO Jun^{1,2,3*}, WANG Ming-li^{1,2,3*}

(1. Wuhu Interfell Research Institute, Wuhu, Anhui 241000, China; 2. Department of Microbiology, Anhui Medical University,

Hefei 230032, China; 3. Wuhu Tianming Biotechnology Co. Ltd, Wuhu, Anhui 241000, China)

Corresponding author: ZHAO Jun, E-mail: 1952987441@qq.com; WANG Ming-li, E-mail: 510192280@qq.com

基金项目: 安徽省教育厅高校省级自然科学重大项目 (KJ2012ZD08); 安徽省自然科学基金项目 (1808085MC75)

作者简介: 周 炜, 学士, 从事动物模型及治疗的研究。

通讯作者: 王明丽, E-mail: 1952987441@qq.com; 赵 俊, E-mail: 510192280@qq.com

Abstract: The aim of this study was to investigate the protective effect of recombinant porcine interferon α on kidney injury in piglets model with viral diarrhea. 15 ten-day-old healthy ternary suckling piglets were randomly divided into rPoIFN α treatment group (1 million units per pig), porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection control group and normal control group, 5 piglets in each group. Piglets in the infection control group and rPoIFN α treatment group were orally fed with 4 mL of PEDV virus suspension ($4.0 \times 10^{5.5}$ TCID $_{50}$ per pig) and the normal control group was fed with 4 mL normal saline at the same time. Establishment of porcine viral diarrhea model infected with PEDV. The results showed that 72 hours after virus infection, all the infected control group had typical diarrhea symptoms such as diarrhea and dehydration. The PEDV nucleic acid test of piglets in small intestine and kidney was positive. At the same time, it was found that the serum creatinine level of piglets was significantly increased ($P < 0.05$), the urine specific gravity in the infection control group was higher than that in the other two groups, and there were granular tubules and proteinuria symptoms. Microscopically, eosinophilic granulocytes were observed in renal interstitial tissue by HE staining, indicating the renal injury caused by hypersensitivity. The symptoms of piglets in the rPoIFN α treatment group were mild and easily recovered, and the positive rate of PEDV nucleic acid detection is only 30%. The detection results of blood and pathological tissue samples from piglets showed that the effective rate of rPoIFN α on PEDV infected piglets was 60%. The results showed that rPoIFN α could effectively treat piglet diarrhea caused by PEDV infection, and had a significant protective effect on the kidney.

Key words: recombinant porcine interferon α ; PEDV; diarrhea model; kidney damage

猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由冠状病毒属中的猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的仔猪以呕吐、水样腹泻、脱水、厌食和迅速消瘦衰竭为临床特征,以肠道扩张、肠壁变薄、胃肠道出血和肠系膜淋巴结肿胀为主要病理变化的高度接触性传染病。1971 年,英国首次报道了该病。我国于 1976 年首次报道,于 1980 年首次分离到 PEDV。2009 年,韩国报道了 PEDV 毒株 S 基因发生变异。该病可感染所有阶段的猪,7 日龄内仔猪感染后损伤最为严重,死亡率高达 100%,育肥猪感染后出现腹泻、消瘦,母猪则表现腹泻、无乳等症状^[1-2]。我国自 2010 年以来, PEDV 感染呈现大面积爆发并伴有高致死率^[3],已对养猪业造成严重危害^[4]。干扰素 (interferon, IFN) 作为一种常用的广谱抗病毒药物,刺激机体产生成百上千种的干扰素刺激基因 (IFN-stimulated gene, ISG) 产物,具有抗病毒、抑制增殖和免疫调节功能,但不是直接灭活病毒,而是诱导机体产生多种具有抗病毒作用的蛋白质,抑

制病毒蛋白的合成,适用于病毒性传染病的紧急预防和早期治疗。

研究表明, PEDV 引发的腹泻可导致仔猪体内的蛋白质代谢紊乱,腹泻仔猪的血清球蛋白、尿素和肌酐水平显著升高 ($P < 0.05$),在引起腹泻造成哺乳仔猪的肠道损伤的同时,通过对感染 PEDV 病毒仔猪的小肠和肝肾组织切片对比观察发现,被感染仔猪除了肠道中小肠绒毛萎缩,大量炎症细胞浸润外,肝肾组织也出现了不同程度的损伤,如肝细胞局部变性坏死,肾小球充血、肾小管上皮细胞脱落坏死等^[5]。

目前尚无有效药物治疗 PED,临床主要以止泻、补液等对症治疗手段维持仔猪存活,但往往预后不良,常以发育迟缓的“僵猪”为结局,经济损失严重。本研究模拟 PEDV 自然粪口感染途径,建立了人工感染 PEDV 哺乳仔猪急性腹泻模型。在此模型上,采用了自行研制的重组猪干扰素 α (recombinant porcine interferon α , rPoIFN α) 进行抗病毒治疗,以观察评价该生物制剂对哺乳仔猪病毒

性腹泻导致肾脏损伤的保护性治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 试验仔猪购自江苏句容康荣有限公司。选择 10 日龄健康三元哺乳仔猪,体重 2.75 ± 0.25 kg,雌雄兼用。对备选试验仔猪采集肛拭子样本,使用 RT-PCR 检测样本 TGEV S 基因、PEDV M 基因和 PoRV VP7 基因片段;采集试验猪血样,使用中和试验方法-固定病毒稀释血清法对上述病毒的中和抗体进行检测,中和抗体 $\leq 1:2$ 为阴性。核酸片段和抗体检测均为阴性的试验猪方可使用。

1.1.2 病毒株 PEDV 由实验室自行分离并测序鉴定,病毒滴度为 $1.0 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀/mL。

1.1.3 重组猪干扰素 α (冻干型) 安徽九川生物科技有限公司提供,批号 20190301,100 万单位/头份,用 2 mL 生理盐水溶解。

1.1.4 主要试剂和耗材 痢菌净(乙酰甲喹)、头孢噻呋钠、复合维生素 B 注射液,均购自合肥中龙神力动物药业有限公司;核酸提取试剂盒(9766)和逆转录试剂盒(6110A),均购自 TaKaRa 公司;5 mL 无菌采血管、注射器、笼具。

1.1.5 试验地点及基本条件 饲养试验在洁净良好的动物房中完成(安徽医科大学实验动物中心)。仔猪采取隔离饲养方式,一猪一笼;试验期间保持通风良好,维持室温在为 $25 \sim 30$ °C,环境湿度为 40% ~ 80%。

1.2 试验分组及动物饲养

1.2.1 动物分组 选取试验仔猪 15 头,随机分组备用。一组为 rPoIFN α 治疗组,5 头;一组为 PEDV 感染对照组,5 头;一组为正常对照组 5 头。三组仔猪饲养条件均相同。

1.2.2 动物饲养 将 7 日龄仔猪单只隔离后,使用人工配制乳(幼儿奶粉、婴儿大米粉、葡萄糖)饲喂,适应性喂养 3 日。在此期间,可观察并淘汰因运输过程出现挤压受伤、因人工配制乳不耐受出现呕吐或腹泻症状以及无法自主从人工自制喂乳器吸食的仔猪。每日饲喂 6 次,攻毒当日饲喂 5 次

(含 10% 葡萄糖溶液补饲),间隔 3 h 饲喂一次,以自制喂乳器(洗耳球尖端剪断后安装在去掉针头的注射器头部,可对仔猪进食量进行准确控制并煮沸消毒。让仔猪自行吸食。同时在人工配制乳中添加复合维生素 B,每日 1 次,0.2 mL/头。

1.3 攻毒及治疗方案

1.3.1 人工感染 PEDV 的剂量与途径 攻毒前仔猪禁食不禁水 12 h,模拟自然感染途径经口饲喂接种病毒。rPoIFN α 治疗组和 PEDV 感染对照组仔猪接种 PEDV 病毒悬液 4 mL,正常对照组同时经口接种等量生理盐水。

1.3.2 重组猪干扰素 α (冻干型)治疗方案

rPoIFN α 治疗组仔猪在饲喂接种病毒 8 h 后,每头猪给予颈部肌肉注射 1 头份剂量的重组猪干扰素 α (冻干型),间隔 24 h 再注射一次,连续注射三次,并同时给予辅助治疗;PEDV 感染对照组仔猪则给予 rPoIFN α 治疗组同等的辅助治疗,但不注射重组猪干扰素 α (冻干型),每头猪给予肌肉注射等量 2 mL 灭菌生理盐水,间隔 24 h 再注射一次,连续注射三次。

1.3.3 防治细菌继发感染 仔猪刚出现呕吐或腹泻症状时,对 PEDV 感染对照组和 rPoIFN α 治疗组所有仔猪同时肌肉注射痢菌净,剂量为每次 2 mg/kg,每日 2 次,间隔 12 h;仔猪攻毒 24 h 后对两组的所有仔猪增加肌肉注射头孢噻呋钠,每次 3 mg/kg,每日 2 次,间隔 12 h。

1.3.4 纠正脱水 仔猪中开始出现呕吐或腹泻症状时,即给予口服补液盐水,仔猪自由饮用。

1.4 观察、检测指标及方法

1.4.1 临床观察、数据统计及样本采集 逐日对每只仔猪仔细观察和详细记录各种临床症状出现的时间至接种病毒后 72 h,在第 72 小时进行前腔静脉采血 2 mL/头和膀胱穿刺取尿 5 mL/头,随后将仔猪麻醉处死并剖检,观察肠道肾脏组织脏器标本的大体外观变化和组织病理变化,对血液和尿液样本进行生化指标检测。

1.4.2 粪便形态评分标准 参考人用布里斯托大便分类法^[6],设定人工感染仔猪流行性腹泻病毒模

型腹泻指数评分标准(表 1),以腹泻指数评分标准达到 2 分以上(含 2 分)为仔猪具有流行性腹泻发病症状。

表 1 腹泻指数评分标准

Tab 1 Diarrhea index scoring criteria	
腹泻指数	临床表现
0	粪便呈条状或粒状;无呕吐,精神正常。
1	粪便呈柔软块状,粪便表面湿润或黏稠;无呕吐,精神正常。
2	粪便呈糊状、无固体块状,粪便黏稠粘附,流动性差,但粪水尚未分离;伴或不伴精神沉郁。
3	粪便呈液状、粪水分离,易流动;伴呕吐和精神沉郁。

1.4.3 治疗有效率临床判定标准 有效:观察至攻毒后第 72 小时,PEDV 感染对照组 3 头以上(含 3 头)仔猪发病腹泻指数达到 3 分,rPoIFN α 治疗组腹泻指数降为 2 分或以下;无效:观察至攻毒后第 72 小时,PEDV 感染对照组 3 头以上(含 3 头)仔猪腹泻指数达到 2 分或以上,rPoIFN α 治疗组腹泻指数较对照组不降低。有效率 = (rPoIFN α 治疗组有效数 - PEDV 感染对照组未发病数)/PEDV 感染对照组发病数 $\times 100\%$ 。

1.5 组织病料病毒核酸检测 剖检 rPoIFN α 治疗组、PEDV 感染对照组和正常对照组仔猪,分别采集其小肠及肾皮质组织,冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$,备用。将组织病料剪碎后用 0.01 mol/L PBS 按 1:10 体积稀释后匀浆,并置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融三次;冻融后的样品

4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 g 离心 15 min,收集上清液并用 0.22 μm 滤器过滤除菌后,RT-PCR 检测 PEDV M 基因。PEDV M 基因扩增引物序列:F1:5' - AACG-GTTCTATTCCCCGTTGATG - 3';R1:5' - TAAAT-GAAGCACTTTCTCACTATC - 3',预期扩增产物大小 663 bp;内参 β -acting 基因扩增引物序列:F2:5' - CCACTGGCATTGTCATGGAC;R2:5' - GAAGAGCGCCTCTGGACAC - 3',预期扩增产物大小 344 bp,以上引物序列均由大连宝生物工程(大连)有限公司合成。将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测观察结果,出现阳性条带送深圳华大基因生物科技有限公司测序。

1.6 数据处理 采用 t 检验对相关数据进行统计学处理,结果 $P < 0.05$ 表示有统计学意义,两者差异有显著性; $P < 0.01$ 表示有高度统计学意义,两者有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 临床观察与腹泻指数评分

2.1.1 临床治疗结果 rPoIFN α 治疗组和 PEDV 感染对照组仔猪均在接种病毒第 24 小时内出现呕吐或粥样腹泻出现发病;第 24 ~ 48 小时间,PEDV 感染对照组有 3 头出现腹泻指数为 3,其余 2 头在第 48 小时时腹泻指数为 2,直至第 72 小时,1 头仔猪腹泻指数为 2,4 头仔猪腹泻指数为 3;主要为黄色水样腹泻,体重快速下降表现外形消瘦。rPoIFN α 治疗组 3 头在第 48 小时时腹泻指数为 2,至第 72 小时时好转为腹泻指数 1,另 2 头仔猪排便正常;正常对照组仔猪始终排便正常(表 2)。

表 2 哺乳仔猪人工感染 PEDV 第 72 小时结果

Tab 2 Results of artificial infection with PEDV in suckling piglets at 72 h						
组别	试验头数	病毒感染头数	发病头数	平均腹泻指数	发病率	有效率
rPoIFN α 治疗组	5	5	3	0.6 $\pm$ 0.5 ^{ab}	60% ^{ab}	60% ^a
PEDV 对照组	5	5	5	2.8 $\pm$ 0.4 ^c	100% ^c	0
正常对照组	5	0	0	0	0	/

a:与正常对照组相比有统计意义($P < 0.05$);b:与 PEDV 感染对照组相比有高度统计意义($P < 0.01$);c:与正常对照组相比有高度统计意义($P < 0.01$)

a: compared with the normal control group, there was statistical significance ($P < 0.05$); b: Compared with the control group, there was high statistical significance ($P < 0.01$); c: compared with the normal control group, there was high statistical significance ($P < 0.01$)

2.1.2 剖检结果 剖检发现所有试验发病仔猪主要病理变化发生在肾脏和肠道。三组仔猪肾脏表面无出血点,与正常对照组相比(图 1C),PEDV 感染对照组仔猪肾脏肿大,表面肿胀呈丘壑隆起(图 1A),其体积已超过正常对照组仔猪肾脏约 30%,脏器系数高出正常对照组约 15%,具有统计学意义;rPoIFN α 治疗组肾脏变化则无统计学意义(表 3)。PEDV 感染对照组表现空肠扩张有轻度充气现象,肠壁充血、变薄;结肠和盲肠充气扩张严重,肠壁变薄透明;胃部充气扩张严重(图 2A);rPoIFN α 治疗组空肠无明显扩张,肠壁未见明显充血及变薄,肠壁毛细血管树枝样充血,结肠有轻

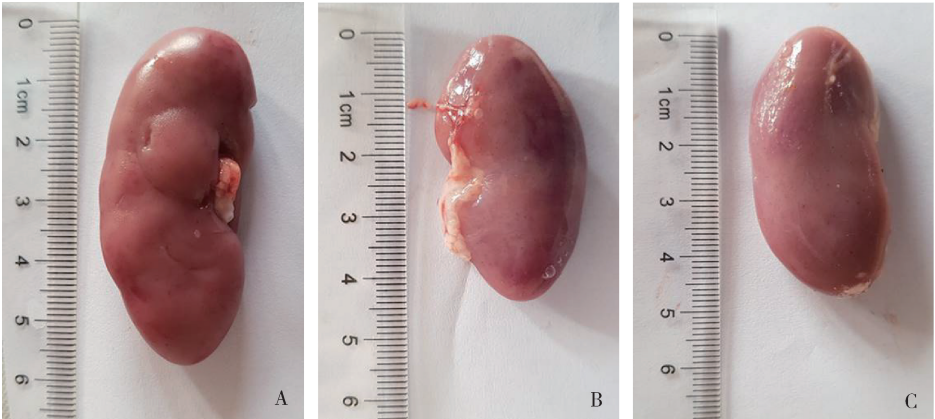
度充气扩张(图 2B)。

表 3 各组仔猪肾脏检测结果

Tab 3 kidney related data of experimental piglets		
分组	肾脏体积(cm^3)	脏器系数
rPoIFN α 治疗	10.35 ± 1.01^{ab}	$(29.89 \pm 3.17)\%^{ab}$
PEDV 对照	14.25 ± 2.31^c	$(33.71 \pm 2.01)\%^c$
正常对照	10.81 ± 0.79	$(29.52 \pm 2.53)\%$

a: 与正常对照组相比无统计意义($P>0.05$); b: 与 PEDV 感染对照组相比有高度统计意义($P<0.01$); c: 与正常对照组相比有高度统计意义($P<0.01$)

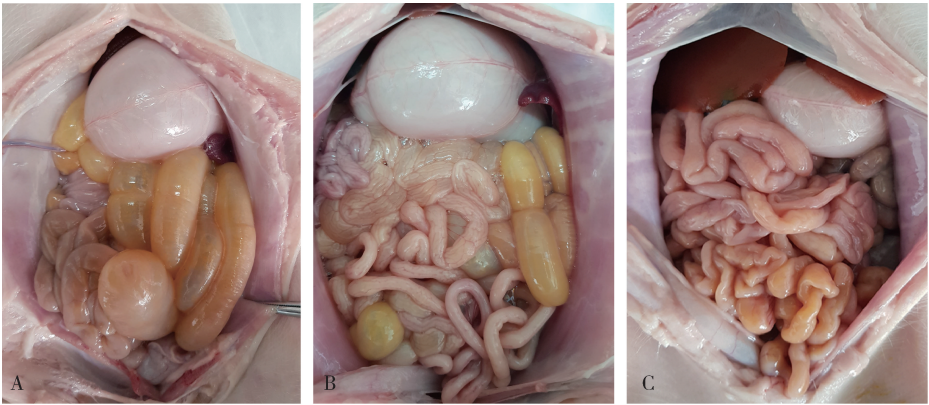
a: Compared with the control group, there was no statistical significance ($P>0.05$); b: compared with the control group, there was a high statistical significance ($P<0.01$). c: compared with the normal control group, there was a high statistical significance ($P<0.01$)



A: PEDV 感染对照组; B: rPoIFN α 治疗组; C: 正常对照组
A.: PEDV control group; B: rPoIFN α treatment group; C: Negative control group

图 1 试验仔猪肾脏外观观察

Fig 1 Appearance of kidney in experimental piglets



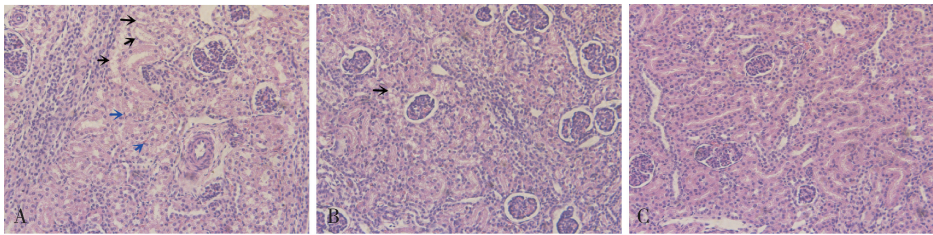
A: PEDV 感染对照组; B: rPoIFN α 治疗组; C: 正常对照组
A: PEDV control group; B: rPoIFN α treatment group; C: Negative control group

图 2 试验仔猪肠道剖检观察

Fig 2 Observation on intestinal dissection of experimental piglets

2.2 肾组织 HE 染色病理学镜下观察结果 观察三组仔猪肾组织制作病理切片发现, PEDV 感染对照组仔猪肾脏样本肾间质中每个视野内有 2 个或

以上嗜酸性粒细胞,同时发现肾小管上皮细胞大量空泡变性(图 3A); rPoIFN α 治疗组则偶见肾小管空泡变性,未见嗜酸性粒细胞(图 3B)。



A: PEDV 感染对照组; B: rPoIFN α 治疗组; C: 正常对照组 黑色箭头: 空泡变性; 蓝色箭头: 嗜酸性粒细胞

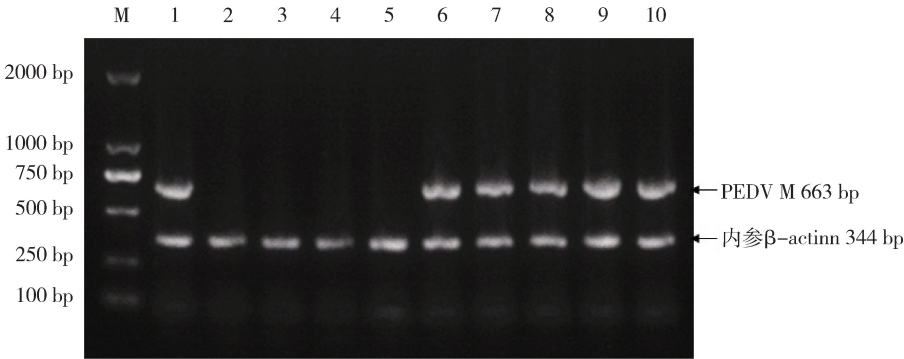
A: PEDV control group; B: Interferon treatment group; C: Negative control group Black arrows: vacuolar degeneration; Bule arrows: eosinophils

图 3 仔猪肾脏病理切片 (200 $\times$)

Fig 3 Pathological section of kidney in piglets (200 $\times$)

2.3 病料组织病毒核酸检测结果 RT-PCR 检测各组小肠与肾皮质组织病料,结果显示, PEDV 感染对照组病料中检测到的 PEDV M 基因核酸含量较高,可扩增出特异性目的条带,扩增产物大小为 663 bp (图 4),将扩增产物进行测序,部分峰图 (图 5) 与

GenBank 公布的 PEDV M 基因序列比对分析,匹配度达到 99%^[8]; rPoIFN α 治疗组发病仔猪相应组织提取的 PEDV M 基因核酸含量降低明显,3 头发病仔猪仅 1 头病料可扩增出特异性目的条带,阳性率约 30%,与 PEDV 感染对照组存在统计学差异。



M: DNA 标准 2000; 1: PEDV M 阳性对照; 2-3: 正常对照组仔猪病料组织; 4-6: rPoIFN α 治疗组发病仔猪病料组织; 7-10: PEDV 感染对照组腹泻指数为 3 的仔猪病料组织

M: DNA Marker 2000; 1: PEDV M positive control; 2-3: Diseased tissue of normal control piglets; 4-6: Diseased tissue of diseased piglets in rPoIFN α treatment group; 7-10: Diseased tissue of diseased piglets with diarrhea index 3 in PEDV control group

图 4 仔猪小肠组织病料 PEDV M 基因 RT-PCR 检测结果

Fig 4 RT-PCR results of PEDV M gene in piglets tissue disease material

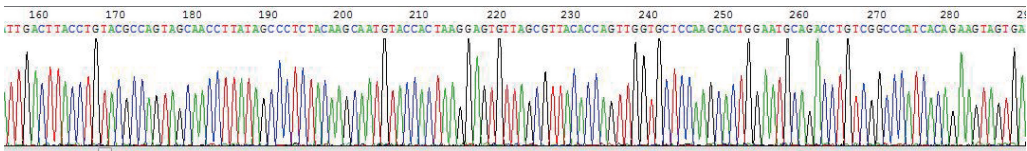


图 5 RT-PCR 扩增 PEDV M 基因测序部分峰图

Fig 5 Sequencing partial peaks of PEDV M gene amplified by RT-PCR

2.4 各组仔猪血液肾功能检测 攻毒后 72 h 所有仔猪无菌采集全血后,分离血清进行肾脏生化指标检测。结果显示,仔猪血肌酐虽然均在参考值以内,但 rPoIFN α 治疗组与 PEDV 感染对照组存在显著差异,与正常对照组无明显差异;三组仔猪的尿素氮和尿酸数据均无明显差异(表 4)。

表 4 各组仔猪肾功能检测结果

Tab 4 Renal function test of experimental piglets			
组别	肌酐 CRE /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	尿素氮 BUN /($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	尿酸 UA /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
rPoIFN α 治疗组	70.25 $\pm$ 9.43 ^{ab}	1.79 $\pm$ 1.13	2.67 $\pm$ 2.08
PEDV 对照组	86.00 $\pm$ 6.22 ^c	2.36 $\pm$ 0.32	3.00 $\pm$ 2.65
正常对照组	68.50 $\pm$ 19.09	2.00 $\pm$ 0.60	3.00 $\pm$ 0.00
3 月龄仔猪 参考值 ^[7]	99.10 $\pm$ 5.4	5.67 $\pm$ 0.60	/

a: 与正常对照组相比无统计意义($P > 0.05$); b: 与 PEDV 感染对照组相比有高度统计意义($P < 0.01$); c: 与正常对照组相比有高度统计意义($P < 0.01$)

a: Compared with the control group, there was no statistical significance ($P > 0.05$); b: Compared with the control group, there was a high statistical significance ($P < 0.01$); c: Compared with the normal control group, there was a high statistical significance ($P < 0.01$)

2.5 尿常规检测结果 攻毒后 72 h 所有仔猪从膀胱直接抽取尿液进行尿常规检测,表 5 检测结果显示,与正常对照组相比,rPoIFN α 治疗组和 PEDV 感染对照组尿液 pH 均有所降低,尿比重增加,其中 PEDV 感染对照组尿比重上升明显,提示仔猪脱水状态较 rPoIFN α 治疗组更为严重,并且 PEDV 感染对照组仔猪尿液中出现蛋白尿,尿沉渣镜检出颗粒管型,表明重度腹泻的仔猪肾脏功能严重受损。

表 5 各组仔猪尿常规主要检测结果

Tab 5 The main results of urine routine test of experimental piglets				
组别	pH	尿比重	尿蛋白	镜检
rPoIFN α 治疗组	6.38 $\pm$ 0.48 ^{ab}	1.02 $\pm$ 0 ^{bc}	-	未见异常
PEDV 对照组	6.0 $\pm$ 0 ^a	1.03 $\pm$ 0 ^c	++	草酸钙结晶, 颗粒管型
正常对照组	7.5 $\pm$ 0.71	1.01 $\pm$ 0.01	-	未见异常

a: 与正常对照组相比有高度统计意义($P < 0.01$); b: 与 PEDV 感染对照组相比有统计意义($P < 0.05$); c: 与正常对照组相比有统计意义($P < 0.05$)

a: Compared with the normal control group, there was high statistical significance ($P < 0.01$); b: Compared with the control group, there was statistical significance ($P < 0.05$); c: compared with the normal control group, there was statistical significance ($P < 0.05$)

3 讨论与结论

现有研究已发现,2019 新型冠状病毒引起的新 型冠状病毒肺炎(COVID-19),除了呼吸系统典型 症状外,肾脏也是新型冠状病毒感染的主要靶点之 一,病毒入侵诱发的细胞因子风暴、炎症细胞浸润 和病毒直接攻击肾脏均可以引起肾脏损伤,并且临 床证据也表明,肾脏损伤比例较高^[9]。糖皮质激素 是肾病综合征等肾脏疾病的常用药物,但从已有统 计结果来看,SARS 治疗中激素类药物是引起不良 反应的主要因素^[10],而目前临床专家对糖皮质激 素在 COVID-19 的治疗过程中的作用仍有较大争 议^[11]。因此需要对抗病毒药物能否同时对肾脏起 到保护作用做进一步研究。本研究所采用的 PEDV 同为冠状病毒科冠状病毒属成员之一,基因组是单 股正链 RNA,对易感者感染性极强。虽然 PEDV 主 要临床症状表现为腹泻,但其对肾脏损伤的病理表 现与 COVID-19 相类似,均表现出炎性细胞浸润、 肾小管坏死、空泡变性等^[12-13],可利用该病毒的人 工感染模型来研究干扰素及新型药物对冠状病毒 造成的肾脏损伤所起到保护作用的分子机制。

PEDV 主要利用其 S 蛋白与仔猪肠道细胞表面 受体结合,通过膜融合侵入易感的小肠绒毛上皮细 胞并大量复制^[14],与 SARS、MERS 等冠状病毒感染 机制基本相同。同时发现,这些高致病性病毒的致 病机制与病毒感染宿主后大量上调炎症因子分泌 而抑制干扰素通路有关^[15]。但随着近年来对 IFN 抗病毒相关机制的研究发现,IFN 主要是通过激活 下游干扰素信号通路,转录多种 ISG,启动宿主对病 毒等的防御反应。ISG 根据其功能主要有 3 类,第 一类是具有直接抗病毒功能的 ISG;第二类是增强 宿主对病毒的识别和反应的正调控因子;第三类是 IFN 诱导产生的负调控分子^[16]。如干扰素诱导跨 膜蛋白(interferon-induced transmembrane protein, IFITM)是一种具有广泛抑制病毒感染的 ISG,可通 过抑制病毒与宿主细胞间的膜融合,有效抑制冠 状病毒感染^[17];细胞因子信号转导抑制因子 (suppressor of cytokine signaling, SOCS)是重要的 IFN 负调控因子,通过负反馈方式调节细胞因子启

动的 JAK/STAT 信号传导通路^[18],从而可抑制炎症细胞因子的表达而减少炎症损伤。综上所述,给予外源性 IFN α 从理论上可以有效抑制 PEDV 感染以及减轻因病毒感染导致的各重要器官炎症损伤。

本次研究使用 rPoIFN α 治疗 PEDV 感染引发的仔猪急性病毒性腹泻,从试验结果上来看,rPoIFN α 对于 PEDV 感染仔猪具有明显治疗效果,PEDV 感染对照组出现的临床较典型的肠道扩张充血等病理变化与 rPoIFN α 治疗组相比,后者已明显减轻或与正常对照组类同。虽然没有可供参考的 14 日龄仔猪(攻毒 72 h 后仔猪日龄)肾脏生化指标,但三组试验仔猪血肌酐数值与腹泻指数相关,腹泻指数越高,血肌酐数值越高。rPoIFN α 治疗组的仔猪肌酐指标明显降低并且与正常对照组无明显差异;同时因为血肌酐只有在肾小球滤过率下降比例较大时(超过 50%),其数值才会超出正常值范围,因此本研究的三组试验仔猪血肌酐指数虽均在参考值范围内,但由于造成急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的因素多样,单纯基于肌酐水平变化的诊断容易对真实肾功能造成误判^[19]。综合尿常规检测结果,rPoIFN α 治疗组仔猪从生化指标上已基本恢复,与正常对照组仔猪无显著差异。

许慧莹等^[20]报道嗜酸性粒细胞胃肠炎的发病机制常与过敏原引起的机体产生的超敏反应有关。本研究在光镜下观察了经 HE 染色的病理切片发现,PEDV 感染对照组仔猪肠、肾脏组织内均发现数量不等的嗜酸性粒细胞,提示 PEDV 感染仔猪导致的肠、肾脏损伤的发生与发展确与机体的超敏反应有关。同时发现,rPoIFN α 治疗组仔猪肾组织未见嗜酸性粒细胞,提示使用 rPoIFN α 治疗后,因干扰素诱导的 ISG 的负调控作用,可降低机体的超敏反应,从而一定程度上减轻或消除因超敏反应导致的肾脏损伤。此外 PEDV 感染导致的典型肾小管上皮细胞空泡变性在 rPoIFN α 治疗组偶见,同样说明 IFN α 对于治疗急性肾小管损伤具有一定的保护作用。

本次研究发现,使用 rPoIFN α 治疗可明显保护感染 PEDV 仔猪的肾脏及其功能,但使用时机为早

期、足量才能达到明显临床效果。对于肾脏损伤各个时间段的病理变化尚缺少完整研究,并缺乏对于感染组与治疗组仔猪脏器中发病各阶段的病毒核酸定量检测,只能提示 rPoIFN α 早期治疗效果。下一步研究的主要方向之一是对病毒感染量与肾脏损伤程度之间的关联观察及分析。同时需要考虑的是,rPoIFN α 同样也可能因 ISG 的正调控作用导致细胞因子风暴从而加重病情^[21]。此研究为今后指导临床采用 IFN α 治疗新冠病毒等感染,减轻对肾脏损伤提供了试验基础,也为病毒感染导致的 AKI 提供新治疗思路。

参考文献:

- [1] 赵德明,张仲秋,周向梅,等. 猪病学[M]. 北京:中国农业出版社,2014.
Zhao D M, Zhang Z Q, Zhou X M, *et al.* Disease of swine[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014.
- [2] Daesub S, Hyoungjoon M, Bokyu K. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines[J]. Clin and Exp Vac Res, 2015, 4(2): 166–176.
- [3] Su Y, Liu Y, Chen Y, *et al.* A novel duplex TaqMan probe – based real – time RT – qPCR for detecting and differentiating classical and variant porcine epidemic diarrhea viruses [J]. Molecular and Cellular Probes, 2018, 37: 6–11.
- [4] 张月,李玉杰,马慧玲,等. 山东省 2012 年~2016 年猪流行性腹泻病毒分子流行病学调查及对其 ORF3 基因分析[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(5): 447–450.
Zhang Y, Li Y J, Ma H L, *et al.* Epidemiological survey of porcine epidemic diarrhea virus by RT – PCR and the ORF3 gene analysis during 2012 to 2016 in Shandong [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2018, 40(5): 447–450.
- [5] 黄美州. 甘豫地区仔猪泄泻病致病细菌/病毒与其病理生化特性研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2016.
Huang M Z. Pathogenic bacteria/viruses of piglet diarrhea and their pathological and biochemical characteristics in Gansu and Henan province[D]. Beijing: China Agriculture Press, 2016.
- [6] Lewis S J, Heaton K W. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time [J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1997, 32(9): 920–924.
- [7] 刘江伟,张永久,李泽信,等. 长白仔猪血常规及生化指标正常值探讨[J]. 中国比较医学杂志, 2007(07): 393–394, 376.
Liu J W, Zhang Y J, Li Z X, *et al.* Investigation on the normal

- values of blood routine and serum biochemistry in Chang - Bai piglet[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2007(7): 393 - 394,376.
- [8] 吴玉璐,虞凌雪,程群,等.猪流行性腹泻病毒 M 基因的表
达及鉴定[J].中国动物传染病学报,2012,20(6):6-10.
Wu Y L, Yu L X, Cheng Q, *et al.* Identification of M protein
expression of porcine epidemic pidemic diarrhea virus. [J].
Chinese Journal of Veterinary Parasitology, 2012, 20(6): 6-10.
- [9] 胡昭,王强.新型冠状病毒感染相关性肾损伤[J/OL].山东
大学学报(医学版). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1390.R.20200311.1644.002.html>.
- Hu Z, Wang Q. Coronavirus disease 2019 associated kidney
injury [J/OL]. Journal of Shandong University:Health Sciences.
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1390.R.20200311.1644.002.html>.
- [10] 周筱青,王睿,董军,等.小汤山医院 680 例 SARS 患者药品
不良反应分析[J].中国循证医学杂志,2004(10):700-706.
Zhou X Q, Wang R, Dong J, *et al.* Analysis of adverse drug
reaction in 680 patients with SARS in Xiao Tang Shan Hospital
[J]. Chinese Journal of Evidence - based Medicine, 2004(10):
700 - 706.
- [11] 陈倩,裴茂华,王瑶,等.糖皮质激素在新型冠状病毒肺炎
中应用的利与弊[J/OL].武汉大学学报(医学版),2020,41
(4):560-564.
Chen Q, Pei M H, Wang Y, *et al.* Glucocorticoid application in
the treatment of Coronavirus Disease 2019(COVID-19): the pros
and cons [J/OL]. Medical Journal of Wuhan University, 2020,
41(4):560-564.
- [12] Diao B, Feng Z Q, Wang C H, *et al.* Human kidney is a target
for Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
(SARS - CoV - 2) infection [J]. MedRxiv Preprint,2020. doi:
<https://doi.org/10.1101/2020.03.04.20031120>.
- [13] 卓秀萍,朱玲,乔小改,等.人工感染猪流行性腹泻病毒的
哺乳仔猪的病理学观察[J].中国兽医科学,2015,45(2):
202-207.
Zhuo X P, Zhu L, Qiao X G, *et al.* Pathological observation of
suckling piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus
artificially [J]. Chinese Veterinary Science, 2015, 45(2): 202
- 207.
- [14] 孙东波,冯力,时洪艳,等.猪流行性腹泻病毒分子生物学
研究进展[J].动物医学进展,2006,27(10):11-14.
Sun D B, Feng L, Shi H Y, *et al.* Progress on molecular biology
of porcine epidemic diarrhea virus J]. Progress in Veterinary
Medicine, 2006, 27(10):11-14.
- [15] 李亚萍,刘晨瑞,贾晓,等.冠状病毒的病原学及致病机制
[J].临床医学研究与实践,2020,5(S1):12-15.
Li Y P, Liu C R, Jia X, *et al.* Etiology and pathogenesis of corona-
virus[J]. Clinical Research and Practice, 2020, 5(S1): 12-15.
- [16] 宁菲,胡小玉.干扰素诱导基因的表达调控及作用机制[J].
中国免疫学杂志,2019,35(12):1409-1415.
Ning F, Hu X Y. Transcriptional regulation and function of inter-
feron - stimulated genes [J]. Chinese Journal of Immunology,
2019, 35(12): 1409 - 1415.
- [17] 侯志飞,赵学森.干扰素诱导跨膜蛋白抗病毒机制研究进展
[J].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2018,12(3):
212-215.
Hou Z F, Zhao X S. Advances in antiviral study on interferon -
induced transmembrane protein [J]. Chinese Journal of Experi-
mental and Clinical Infectious Diseases (Electronic Version),
2018, 12(3): 212 - 215.
- [18] 朱蕾. SOCS:细胞因子信号传导的负反馈抑制因子[J].国
外医学(免疫学分册),2003(1):1-4.
Zhu L. SOCS: a negative feedback inhibitor of cytokine signaling
[J]. Foreign Medical Sciences (Section of Immunology Foreign
Medical Sciences), 2003(1): 1 - 4.
- [19] 柳晶,季大玺.急性肾脏损伤定义的沿革及其临床应用[J].
中国中西医结合肾病杂志,2016,17(4):356-358.
Liu J, Ji D X. Evolution of the definition of acute kidney injury
and its clinical application [J]. Chinese Journal of Integrated
Traditional and Western Nephrology, 2016, 17(4): 356 - 358.
- [20] 许慧莹,李月红,庄震.嗜酸性粒细胞性胃肠炎一例报道并
文献复习[J].中国全科医学,2018,21(24):3005-3009.
Xu H Y, Li Y H, Zhuang Z. Eosinophilic gastroenteritis: a case
report and literature review [J]. Chinese General Practice, 2018,
21(24):3005-3009.
- [21] 段孜文,赵俊,陈敬贤,等. I 型干扰素抗病毒信号通路失
调介导的病理效应研究新进展[J].国际生物制品学杂志,
2018,41(6):300-305.
Duan Z W, Zhao J, Chen J X, *et al.* Recent advances in the
study of pathological effects mediated by type I interferon
antiviral signaling pathway dysregulation [J]. International
Journal of Biologicals, 2018, 41(6): 300 - 305.

(编辑:李文平)