DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.004
第24卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 9
2002年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2002

文章编号:1000-5404(2002)09-1011-02

论著

重组人白细胞介素-3的长期毒性实验研究

刘晓宏,粟永萍,艾国平,王军平,冉新泽,郭朝华,程天民 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究重组人白细胞介素-3(Recombinant human interleukin-3, rhIL-3)长期应用对正常大鼠的毒性作用。方法 分设rhIL-3低剂量组($5\mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)、中剂量组($10\mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)、高剂量组($250\mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)及溶媒对照共4组,每组20只,每天皮下给药1次至1、1.5、2及3个月后,分别活杀,进行血液、尿液分析和循环免疫复合物检测,骨髓细胞培养,系统解剖及各脏器组织切片观察。结果 整个实验期动物精神食欲良好,无一死亡;血液和尿液生化、外周血象、骨髓造血细胞培养及循环免疫复合物等多项指标检测,各药物剂量及不同时相之间无显著差异;仅高剂量用药3个月后可见骨髓组织有一定程度纤维化改变。心、肝、脾、肺、肾、脑等重要脏器组织均未见异常病理变化。结论 rhIL-3低剂量(拟有效治疗剂量)应用3个月和中、高剂量应用2个月,无毒副作用,具较好安全性;大剂量(高于治疗剂量50倍)长期(3个月)应用可引起骨髓纤维化,但造血细胞体外集落形成能力无明显改变。

关键词:重组人白细胞介素-3;造血因子;长期毒性实验
中图法分类号:R392.12;R979.5 文献标识码:A

Experimental studies on long-term toxicity of recombinant human interleukin-3

LIU Xiao-hong, SU Yong-ping, AI Guo-ping, WANG Jun-ping, RAN Xin-ze, GUO Chao-hua, CHENG Tian-min (Institute of Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the long-term toxicity of recombinant human interleukin-3 (rhIL-3) on normal rats. Methods A total of 80 rats were divided into 4 groups and treated with low ($5\mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$), middle ($10\mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$), high ($250\mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$) dosages of rhIL-3 and menstruum for control respectively by subcutaneaus injection once a day for 1, 1.5, 2 and 3 months. After the animal were sacrificed, the blood and urine samples were tested, and circulating immunocomplex were determinated, the bone marrow cells were cultured, and the histopathological changes were observed. Results Each index in the experimental group was not different from those in the control group except the bone marrow was found in certain degree of fibrosis in the experimental group treated with high dosages of rhIL-3 for 3 months. Conclusion Although rats treated with high dosage of rhIL-3 for 3 months may cause myelofibrosis, rats with the low dosage for 3 months, middle-high dosage for 2 months are well tolerated without obvious side effects.

Key words: rhIL-3; hemopoietic factor; long-term toxicity

重组人白细胞介素-3(rhIL-3)又称多能造血因子,具有促进骨髓红系、粒系及巨核系增殖造血作用。我所研制的rhIL-3纯度≥97%,多批次动物实验证实,对放射损伤和有关抗癌化疗药物引起的造血抑制有良好保护和促进造血作用[1]。本实验按新药长期毒性试验要求进行rhIL-3对大鼠的长期毒性研究[2]。对rhIL-3临床前研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

rhIL-3由本所研制提供,纯度≥97%。血液、尿液常规及生化试剂均为进口试剂盒,采用美国Beckman自动生化检测仪。

1.2 动物分组及处理方法

采用雄性Wistar大鼠,体重(140±20)g,由本校实验动物中心提供。共80只,每组20只。根据国外重组人白细胞介素-3临床Ⅰ/Ⅱ期应用的效果、方法、剂量[3,4],分设rhIL-3低剂量组($5\mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$,治疗剂量)、中剂量组($10\mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$,2倍于治疗剂量)、高剂量组($250\mu g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$,50倍于治疗剂量)的3个剂量组及溶媒对照组,每只动物每天皮下注射给药1次,每周6次,连续给药1、1.5、2及3个月后分4批活杀(每批每组各5只)进行相关检测。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 一般观察 观察记录大鼠精神、行为、活动,摄食量及大、小便情况。

1.3.2 尿分析 活杀前12 h放入代谢笼收集尿液,检测分析尿酸碱度、比重、亚硝酸盐、胆红素、胆素原、糖、蛋白、酮体等多项指标。

1.3.3 血液学指标 取外周血检测RBC、RETIC、Hb、WBC及白细胞分类计数、血小板及凝血时间。无菌取股骨髓计数有核细胞,并作BFU-E、CFU-E和CFU-GM培养。

1.3.4 血液生化指标 取血分离血清,采用自动生化检测仪检测尿素(UREA)、肌酐(CRBA)、UREA/CRBA、碱性磷酸酶(ALP)、谷丙转氨酶(GOT)、谷草酸转氨酶(GPT),GOT/GPT,总蛋白(TP)、清蛋白(A)、球蛋白(Globulin, G)、A/G、总胆红素(TB)、结合胆红素(CB)、未结合胆红素(NCB)、胆固醇(TCh)、糖(Glucose)等16项指标,以溶媒对照组所测结果为参考。

1.3.5 循环免疫复合物(CIC)测定 以PE-G法测定血液中的免疫复合物。

1.3.6 系统解剖及组织病理学检查。

1.4 统计学处理

实验结果以$\bar{x}\pm s$表示。采用第四军医大学医用数理软件进行方差齐性检验,单因素方差分析和显著性检验。

基金项目:重庆市院士基金资助项目(4643)
作者简介:刘晓宏(1961-),女,重庆市人,实验师,主要从事基因重组药物蛋白纯化研究。电话:(023)68752355
收稿日期:2001-10-12;修回日期:2002-05-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

整个受试期无一动物死亡，体重逐渐增加。精神、行为、活动、摄食及粪便无异常，无血尿。尿液分析及血液生化指标检测，以溶媒对照组所测为参考，其余三个受试剂量所测结果与之比较均在对照组范围内波动，无明显差异（$P>0.05$），见表 1。外周血象、骨髓象正常，骨髓细胞增殖能力良好。长期（3 个月）给药未见蓄积性增强，见表 2。无循环免疫复合物形成。

表 1 rhIL-3 给药 3 个月后大鼠血液生化指标

Tab 1 Blood biochemical parameters in rats treated with rhIL-3 for 3 months

Group	n	UREA (mmol/L)	CRBA (μmol/L)	UREA/CRBA	ALP (IU/L)	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	GOT/GPT	TP (g/L)
5 μg·kg⁻¹·d⁻¹	5	5.72±0.29	68.8±8.31	83.14±10.6	105.6±9.45	292±44.2	38±6.6	8.4±1.0	85.8±1.2
10 μg·kg⁻¹·d⁻¹	5	6.21±0.73	72.1±4.92	86.23±7.6	112.6±8.43	272±30.5	29±12.1	9.2±0.9	81.3±6.0
250 μg·kg⁻¹·d⁻¹	5	6.11±0.28	71.4±10.11	85.72±10.4	110.0±8.44	239±33.4	30±11.5	8.8±2.0	85.9±6.7
Control	5	5.96±0.33	69.4±8.18	85.87±13.1	111.0±10.55	237±42.5	33±10.2	8.2±2.3	85.2±2.5
Group	n	A (g/L)	G (g/L)	A/G	TB (μmol/L)	CB (μmol/L)	NCB (μmol/L)	TCh (mmol/L)	Glucose (mmol/L)
5 μg·kg⁻¹·d⁻¹	5	29.6±3.4	44.4±4.9	0.67±0.13	3.20±0.5	2.0±1.0	2.02±0.8	1.6±0.3	3.9±1.9
10 μg·kg⁻¹·d⁻¹	5	31.3±2.1	48.8±6.0	0.64±0.10	3.3±1.2	2.2±0.9	2.10±1.0	1.6±0.2	3.8±0.7
250 μg·kg⁻¹·d⁻¹	5	32.5±1.7	51.4±6.5	0.64±0.11	2.9±0.8	1.8±0.4	1.88±0.5	1.7±0.3	2.9±0.5
Control	5	33.4±2.4	51.7±1.4	0.64±0.05	3.3±0.7	1.8±0.8	1.92±0.61	1.8±0.2	3.4±0.8

表 2 rhIL-3 给药 3 个月后外周血象及骨髓细胞培养结果

Tab 2 Effect of rhIL-3 treated for 3 months on peripheral blood cells and cultured bone marrow cells in rats

Group	n	WBC (10^3/mm³)	RBC (10^4/mm³)	PLT (10^4/mm³)	RETIC (%)	HB (g/L)	BFU-E (10^{-5}cells)	CFU-E (10^{-5}cells)	CFU-GM (10^{-5}cells)
5 μg·kg⁻¹·d⁻¹	5	9.16±365	455±23	9.2±2.5	58±8	1.32±0.067	55±18	560±126	32±14
10 μg·kg⁻¹·d⁻¹	5	9.00±294	493±28	9.9±3.2	64±11	1.43±0.078	49±22	580±98	40±22
250 μg·kg⁻¹·d⁻¹	5	9.50±1411	512±20	9.4±3.5	56±9	1.41±0.056	59±10	650±135	39±16
Control	5	9.00±350	482±59	10.0±2.3	62±13	1.4±0.171	51±14	620±101	42±21

系统解剖及组织病理学检查：表皮毛正常；各脏器体积、色泽正常；全身淋巴结无肿大，皮下、粘膜、浆膜无出血斑点；心包腔、胸腔、腹 腔表面光滑无积液。在低剂量组和溶媒对照组用药 3 个月，各有一只肺部有局限性灰白斑点，余未见类似病变。光镜观察心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胰、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、膀胱、睾丸（卵巢），前列腺、子宫、淋巴结、甲状腺、胸腺，视神经等组织切片，均无明显病理改变。仅上述肺部灰白色斑点为化脓性感染病灶。另外，观察到在前 3 批（2 个月内）活杀动物骨髓组织无明显病变，但在高剂量用药 3 个月，可见骨髓组织有一定程度纤维化。

3 讨论

白细胞介素-3 是作用于较早期阶段的具有广谱效应的造血刺激因子，对各种原因引起的继发性造血功能障碍疾病有显著疗效[5~7]。已证实，我所研究的重组人白细胞介素-3 有明显的促进造血作用[1]。尤其对伴有血小板减少者更具促进造血功能全面恢复作用。按国家新药毒性实验要求，对我所研制的重组人白细胞介素-3 进行小鼠急性毒性实验及大鼠长期毒性实验研究。结果表明，小鼠急性毒性实验受试动物无一死亡，7 d 后活杀小鼠，各脏器均无病理性变化。大鼠长期毒性实验过程中未见显著毒性，一般体征、体重、摄食量、尿分析、血液生化及血液学指标检测均无明显变化。极个别动物（对照组和低剂量组各一只）所发生的肺部感染与用药无关。因毒性反应及靶器官主要集中在造血系统方面，在高剂量用药 3 个月，可见骨髓组织有一定程度纤维化改变，这与多数造血生长因子的副作用相类似。当然，骨髓纤维化转归尚需停药后作较长时期观察。

通过本实验并结合文献分析，我们认为 rhIL-3 具有良好造血重建作用，拟有效治疗剂量（5 μg/kg/d）持续应用 3 个月无明显毒副作用，安全性良好。超大剂量长期应用可引起骨髓纤维化，提示应避免超大剂量长期应用。

参考文献：

[1] 刘晓宏，粟永萍，王军平，等. 重组人白细胞介素 3 对环磷酰胺所致犬造血损伤的治疗作用[J]. 中国实验血液学杂志，1998，6(4)：304－306.

[2] 新药（西药）临床前研究指导原则汇编（药学药理毒理学）[M]. 中华人民共和国卫生部药政局，1993. 199－201.

[3] 许利民，张书模. 重组人白介素-3 在几种血液系统疾病中的临床应用[J]. 国外医学输血及血液分册，1996，19(6)：350－353.

[4] D' Hondt V, Weynants P, Humblet Y, *et al*. Dose-dependent interleukin-3 stimulation of thrombopoiesis and neutropoiesis in patients with small-cell lung carcinoma before and following chemotherapy: A placebo-controlled randomized phase Ib study[J]. J Clin Oncol, 1993, 11(11): 2 063－2 071.

[5] Galanakis E, Makis A, Bourantas K L, *et al*. Interleukin-3 and interleukin-4 in childhood brucellosis[J]. Infection, 2002, 30(1): 33－34.

[6] Elbaz O, Shaltout A. Implication of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-3 (IL-3) in children with acute myeloid leukaemia (AML); Malignancy[J]. Hematol Exp, 2001, 5(5): 383－388.

[7] Palmeri S, Leonardi V, Danova M, *et al*. Prospective, randomized trial of sequential interleukin-3 and granulocyte-or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after standard-dose chemotherapy in cancer patients[J]. Haematologica Budap, 1999, 84(11): 1 016－1 023.

（编辑 冷怀明）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net