



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104372105 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 25

(21) 申请号 201410058739. 8

(22) 申请日 2014. 02. 21

(71) 申请人 刘春丽

地址 510120 广东省广州市越秀区沿江西路
151 号

(72) 发明人 刘春丽 董沛坚 陈鸣宇

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

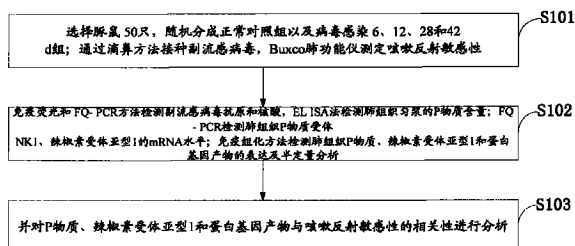
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法

(57) 摘要

本发明公开了一种辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法,包括以下步骤:选择豚鼠 50 只,随机分成正常对照组以及病毒感染 6、12、28 和 42d 组;通过滴鼻方法接种副流感病毒, Buxco 肺功能仪测定咳嗽反射敏感性;检测副流感病毒抗原和核酸、肺组织匀浆的 P 物质含量、肺组织 P 物质受体 NK1、辣椒素受体亚型 1 的 mRNA 水平、肺组织 P 物质、辣椒素受体亚型 1 和蛋白基因产物的表达及半定量分析;并对 P 物质、辣椒素受体亚型 1 和蛋白基因产物与咳嗽反射敏感性的相关性进行分析。本发明的方法简单,得出了神经肽的释放增加提示神经源性炎症的发生, CRS 和神经肽的时空变化以及两者的正相关提示神经源性炎症在 CRS 增高和病毒感染性咳嗽中起重要作用。



1. 一种辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法,其特征在于,该辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法包括以下步骤:

选择豚鼠 50 只,随机分成正常对照组以及病毒感染 6、12、28 和 42d 组;通过滴鼻方法接种副流感病毒, Buxco 肺功能仪测定咳嗽反射敏感性;

免疫荧光和 FQ-PCR 方法检测副流感病毒抗原和核酸, ELISA 法检测肺组织匀浆的 P 物质含量; FQ-PCR 检测肺组织 P 物质受体 NK1、辣椒素受体亚型 1 的 mRNA 水平;免疫组化方法检测肺组织 P 物质、辣椒素受体亚型 1 和蛋白基因产物的表达及半定量分析;

并对 P 物质、辣椒素受体亚型 1 和蛋白基因产物与咳嗽反射敏感性的相关性进行分析。

2. 如权利要求 1 所述的辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法,其特征在于,副流感病毒型的培养、传代、冻存及定量,具体包括以下步骤:

第一步,细胞培养细胞株人恒河猴肾细胞,来源于 ATCC, LLC 细胞是对 PI V3 敏感的细胞,用于毒株的传代培养;

第二步,病毒的培养、传代及冻存副流感病毒型来源于 ATCC, LLC 细胞在培养瓶中长至 70%~80%融合,取病毒悬液 200L 接种于细胞上,每 15min 摇动 1 次,吸附 2h 后倒出病毒液,加入 2%胎牛血清的培养基,于第 2d~3d 开始出现细胞病变,待病变达 50%~60%时收获病毒,将病毒反复冻融 2 次~3 次后 10000r/min 离心 20min,去除细胞碎片,收集上清分装后液氮中冻存;

第三步,空斑技术测定病毒感染滴度,使用常规空斑技术,培养基为 DMEM/F12 培养基,以空斑形成单位 t PFU 来表示病毒感染滴度。

3. 如权利要求 1 所述的辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法,其特征在于,该辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法具体包括以下步骤:

第一步,实验动物及分组,雄性纯白 SPF 级豚鼠,体重 250g~300g 之间,随机分成 5 组,即正常对照组和 4 个病毒感染组,每组 10 只,病毒感染组按病毒感染后天数又分为 6、12、28 和 42d 4 个组;

第二步,动物饲养及病毒接种方法,动物在 SPF 级环境下饲养,感染组动物单独饲养,在适应新的环境 1 周后开始接种病毒,病毒滴鼻,乙醚麻醉后,两侧鼻孔分别滴入 75uL 的扩增冻存好的病毒液,病毒滴度为 33 ± 105 pfu,接种当天同时进行空斑实验再次鉴定接种病毒的滴度,对照组豚鼠滴入病毒培养用培养基 MEM;

第三步,豚鼠咳嗽反射敏感性的测定,应用单腔非限制型小动物体描仪来测定豚鼠的咳嗽反射敏感性,判断咳嗽反射敏感性的指标主要是咳嗽总次数,单腔非限制型小动物体描仪通过采集气流变化信号,计算曲线下面积以及气流半数峰值转换时间,经过模拟方程换算后判断是否为咳嗽动作,还是打喷嚏或者其它不规则的活动,而辣椒素激发溶液浓度为 50mol/L,总量为 1mL,观测记录 10min 内的 CCnt。

4. 如权利要求 1 所述的辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法,其特征在于,豚鼠副流感病毒型感染的病毒学检测,具体方法为:

第一步,直接免疫荧光法检测副流感病毒型抗原,苹果绿荧光视为阳性,副流感病毒型是胞浆发荧光,可呈不规则的颗粒荧光;

第二步, SYBR Green 荧光定量 PCR 方法检测副流感病毒型 RNA 的含量, 副流感病毒型上游引物为 5-TTTGCCCTTGACCGAC-3, 5-AACCCTGCCCTTTGTGC-3, 产物大小为 134bp; GAPDH 作为内参照, 上游引物 5-TGGTGCCAAAAGGGTCA-3 下游引物为 5-CCTCCACAATGCCGAAGT-3, 产物大小为 176bp, 含有和待测样品相同扩增片段的副流感病毒型病毒质粒 DNA 标准品, 病毒核酸含量为 $28 \pm 1015 \text{copies/L}$; 首先提取肺组织病毒 RNA, 测定浓度和变形琼脂糖凝胶电泳鉴定质量后, 每组取 1g RNA 进行反转录反应, RNA 逆转录为 cDNA, 20L 反应体系, 反转录反应条件为: 37#15min 和 85#5s, 最后进行 real-time PCR 反应, 两步法 PCR 扩增标准程序如下: 预变性, 95#30s 1 个循环; PCR 反应, 95#5s, 60#30s, 40 个循环, 结果计算: 用已知浓度的病毒标准品 10 倍稀释, 和未知样品一起进行 PCR 反应, 通过稀释标准品得到的标准曲线来确定未知样品中的病毒拷贝数。

5. 如权利要求 1 所述的辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法, 其特征在于, 检测豚鼠肺组织 P 物质含量的肺组织匀浆液的制备及检测方法, 具有包括以下步骤:

称取 100mg 豚鼠肺组织, 先加 1mol/L 醋酸 3mL, 100# 水浴 10min 以灭活内源性激肽酶活性, 然后按比例加入一定量的 PBS, 用 1ml ~ 3mL 玻璃匀浆器匀浆, 3500r/min 离心 20min, 取上清 -70# 保存; 或水浴后 -70# 保存, 用前匀浆, ELISA 法检测豚鼠肺组织 P 物质的含量。

6. 如权利要求 1 所述的辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法, 其特征在于, SYBR Green real-time PCR 方法检测方法为:

豚鼠肺组织 NK1、VR1mRNA 的相对表达量 NK1 上游引物为 5-CTTCCTCCTGCCCTACATCAAC-3, 5-CTGCCCTGGGTCTGGAAATAC-3, 产物大小为 240bp; VR1 上游引物为 5-TCAAAGACCCGAAACAGGG-3, 5-CTCTACCAGGAGGGTCACCA-3, 产物大小为 224bp, GAPDH 内参照同前, 测定浓度和变形琼脂糖凝胶电泳鉴定质量后, 每组取 1g RNA 进行反转录反应, RNA 逆转录为 cDNA, 20L 反应体系, 反转录反应条件为: 37#15min 和 85#5s, 最后进行 real-time PCR 反应, 两步法 PCR 扩增标准程序如下: 预变性, 95#30s 1 个循环; PCR 反应, 95#5s, 60#30s, 40 个循环, 结果计算: 用已知浓度的病毒标准品 10 倍稀释, 和未知样品一起进行 PCR 反应, 结果计算: 采用 GAPDH 作为内参照和 2-Ct 相对定量法来计算 NK1、VR1mRNA 的表达水平。

7. 如权利要求 1 所述的辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法, 其特征在于, 免疫组化方法检测豚鼠肺组织 P 物质、VR1 和 PGP-9.5 蛋白的表达及免疫组化结果图像分析免疫组化图片用 Leica 显微镜观察、拍照, 进行蛋白表达强度或灰度的比较, 根据以下染色深浅行半定量分析: 0 = 无染色; 1 = 轻度着色; 2 = 中度着色; 3 = 强着色; 4 = 很强着色, 每张片子至少随机分析 5 个高倍视野。

8. 如权利要求 1 所述的辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法, 其特征在于, 统计学处理采用 SPSS160 统计软件进行分析, 数据以均数%标准差或者中位数表示, 符合正态分布并且方差齐时多组间的总体检验采用 One-way ANOVA, 组间比较采用 ANOVA 中的最小显著差异法; 不符合正态分布或者方差不齐时各组间总体检验采用非参数经验 Kruskal-Wallis 法, 两组间比较采用 Bonferroni 的组间比较检验法。

一种辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法

技术领域

[0001] 本发明属于神经源炎症技术领域,尤其涉及一种辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法。

背景技术

[0002] 咳嗽 ;咳嗽反射敏感性 ;神经源性炎症 ;副流感病毒 ;P 物质急性上呼吸道感染 (upper respiratory tract infection, URI) 是急性咳嗽 (3 周以内) 最常见的原因。而感染后咳嗽 (URI 恢复之后,咳嗽迁延不愈大于 3 周,而胸片正常) 是亚急性咳嗽中的最常见原因,一般由病毒感染引起。然而,病毒感染引起的咳嗽,尤其是感染后咳嗽的机制不甚明确,对于治疗更是面临困惑。人类副流感病毒型 (parainfluenza virus type 3, PIV3) 是人类 URI 的一个非常常见的病原,绝大部分人在儿童时代已受副流感病毒型 (PIV3) 感染。血清学监测表示,5 岁及以上儿童 90% 以上有抗人类副流感病毒型 (PIV3) 抗体。仅仅是因为副流感病毒型 (PIV3) 感染,就几乎占美国住院儿童的 11%。副流感病毒型 (PIV3) 感染引起的 URI 频繁伴发咳嗽,而且再感染也常常发生。因此对副流感病毒型 (PIV3) 感染引起咳嗽的机制研究有着重要意义。咳嗽反射敏感性 (cough reflex sensitivity, CRS) 异常增高是机体咳嗽反应的一个十分重要的原因。支气管肺 C 纤维兴奋导致其含有的以 P 物质 (substance P, SP) 为主的神经肽释放引起的神经源性炎症可能在咳嗽反射敏感性 (CRS) 改变以及咳嗽发病中起重要作用。无髓鞘感觉神经 C 纤维相当于兴奋型的非胆碱能 - 非肾上腺素能 (conadrenergic noncholinergic nerve, NANC) 神经。Carr 等发现豚鼠副流感病毒感染后表达 SP 明显增加。Sekizawa 等发现,健康人雾化吸入 SP 并不直接诱导咳嗽,而呼吸道感染患者吸入 SP 则可诱发咳嗽。OConnell 等的临床研究报告,URI 患者吸入辣椒素刺激咳嗽后咳嗽反射敏感性 (CRS) 升高。但是,迄今为止,未发现有关 URI 感染动物的咳嗽和咳嗽反射敏感性 (CRS) 的研究,URI 引起咳嗽反射敏感性 (CRS) 增高的机制还不是很清楚。病毒感染可以引起神经肽的异常表达,但这些神经肽在病毒感染性咳嗽发病中的表达和作用究竟如何均有待明确。辣椒素受体亚型 1 (vanilloid receptor subtype-1, VR1), 是瞬时受体电位通道蛋白的超家族的成员之一。C 纤维最显著特征是纤维末梢上有 VR1 的功能性表达。VR1 受体的活化可诱导 C 纤维末梢释放神经肽 SP 等。有研究发现,慢性咳嗽患者 VR1 显著高于健康者 ;而且,CRS 与支气管黏膜的 VR1 表达呈高度相关 ;气道平滑肌 VR1 的表达也增强。表明 VR1 参与了慢性咳嗽的发病过程。但病毒感染后,VR1 表达是否增高,以及与咳嗽反射敏感性 (CRS) 的关系如何,目前仍未见报道。有研究发现,呼吸道病毒感染引起蛋白基因产物 (protein gene product PGP-9.5) 的表达水平改变,可能是豚鼠肺内发生神经源性炎症的一个标志。

发明内容

[0003] 本发明实施例的目的在于提供一种辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性

关系的试验方法,旨在解决现有缺少副流感病毒感染后,辣椒素受体亚型 1 是否增高,以及与咳嗽反射敏感性的关系如何的问题。

[0004] 本发明实施例是这样实现的,一种辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法,该辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法包括以下步骤:

[0005] 选择豚鼠 50 只,随机分成正常对照组以及病毒感染 6、12、28 和 42d 组;通过滴鼻方法接种副流感病毒,Buxco 肺功能仪测定咳嗽反射敏感性;

[0006] 免疫荧光和 FQ-PCR 方法检测副流感病毒抗原和核酸,ELISA 法检测肺组织匀浆的 P 物质含量;FQ-PCR 检测肺组织 P 物质受体 NK1、辣椒素受体亚型 1 的 mRNA 水平;免疫组化方法检测肺组织 P 物质、辣椒素受体亚型 1 和蛋白基因产物的表达及半定量分析;

[0007] 并对 P 物质、辣椒素受体亚型 1 和蛋白基因产物与咳嗽反射敏感性的相关性进行分析。

[0008] 进一步,副流感病毒型的培养、传代、冻存及定量,具体包括以下步骤:

[0009] 第一步,细胞培养细胞株人恒河猴肾细胞,来源于 ATCC,LLC 细胞是对 PIV3 敏感的细胞,用于毒株的传代培养;

[0010] 第二步,病毒的培养、传代及冻存副流感病毒型来源于 ATCC, LLC 细胞在培养瓶中长至 70%~80% 融合,取病毒悬液 200L 接种于细胞上,每 15min 摇动 1 次,吸附 2h 后倒出病毒液,加入 2% 胎牛血清的培养基,于第 2d~3d 开始出现细胞病变,待病变达 50%~60% 时收获病毒,将病毒反复冻融 2 次~3 次后 10000r/min 离心 20min,去除细胞碎片,收集上清分装后液氮中冻存;

[0011] 第三步,空斑技术测定病毒感染滴度,使用常规空斑技术,培养基为 DMEM/F12 培养基,以空斑形成单位 t PFU 来表示病毒感染滴度。

[0012] 进一步,该辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法具体包括以下步骤:

[0013] 第一步,实验动物及分组,雄性纯白 SPF 级豚鼠,体重 250g~300g 之间,随机分成 5 组,即正常对照组和 4 个病毒感染组,每组 10 只,病毒感染组按病毒感染后天数又分为 6、12、28 和 42d 4 个组;

[0014] 第二步,动物饲养及病毒接种方法,动物在 SPF 级环境下饲养,感染组动物单独饲养,在适应新的环境 1 周后开始接种病毒,病毒滴鼻,乙醚麻醉后,两侧鼻孔分别滴入 75uL 的扩增冻存好的病毒液,病毒滴度为 3.3×10^5 pfu,接种当天同时进行空斑实验再次鉴定接种病毒的滴度,对照组豚鼠滴入病毒培养用培养基 MEM;

[0015] 第三步,豚鼠咳嗽反射敏感性的测定,应用单腔非限制型小动物体描仪来测定豚鼠的咳嗽反射敏感性,判断咳嗽反射敏感性的指标主要是咳嗽总次数,单腔非限制型小动物体描仪通过采集气流变化信号,计算曲线下面积以及气流半数峰值转换时间,经过模拟方程换算后判断是否为咳嗽动作,还是打喷嚏或者其它不规则的活动,而辣椒素激发溶液浓度为 50mol/L,总量为 1mL,观测记录 10min 内的 CCnt。

[0016] 进一步,豚鼠副流感病毒型感染的病毒学检测,具体方法为:

[0017] 第一步,直接免疫荧光法检测副流感病毒型抗原,苹果绿荧光视为阳性,副流感病毒型是胞浆发荧光,可呈不规则的颗粒荧光;

[0018] 第二步, SYBR Green 荧光定量 PCR 方法检测副流感病毒型 RNA 的含量, 副流感病毒型上游引物为 5-TTTGCCCTTGGACCGAC-3, 5-AACCCTGCCCTTTGTGC-3, 产物大小为 134bp; GAPDH 作为内参照, 上游引物 5-TGGTGCCAAAAGGGTCA-3 下游引物为 5-CCTCCACAATGCCGAAGT-3, 产物大小为 176bp, 含有和待测样品相同扩增片段的副流感病毒型病毒质粒 DNA 标准品, 病毒核酸含量为 $28 \pm 1015 \text{ copies/L}$; 首先提取肺组织病毒 RNA, 测定浓度和变形琼脂糖凝胶电泳鉴定质量后, 每组取 1g RNA 进行反转录反应, RNA 逆转录为 cDNA, 20L 反应体系, 反转录反应条件为: 37#15min 和 85#5s, 最后进行 real-time PCR 反应, 两步法 PCR 扩增标准程序如下: 预变性, 95#30s 1 个循环; PCR 反应, 95#5s, 60#30s, 40 个循环, 结果计算: 用已知浓度的病毒标准品 10 倍稀释, 和未知样品一起进行 PCR 反应, 通过稀释标准品得到的标准曲线来确定未知样品中的病毒拷贝数。

[0019] 进一步, 检测豚鼠肺组织 P 物质含量的肺组织匀浆液的制备及检测方法, 具有包括以下步骤;

[0020] 称取 100mg 豚鼠肺组织, 先加 1mol/L 醋酸 3mL, 100# 水浴 10min 以灭活内源性激肽酶活性, 然后按比例加入一定量的 PBS, 用 1ml ~ 3mL 玻璃匀浆器匀浆, 3500r/min 离心 20min, 取上清 -70# 保存; 或水浴后 -70# 保存, 用前匀浆, ELISA 法检测豚鼠肺组织 P 物质的含量。

[0021] 进一步, SYBR Green real-time PCR 方法检测方法为:

[0022] 豚鼠肺组织 NK1、VR1mRNA 的相对表达量 NK1 上游引物为 5-CTTCCTCCTGCCCTACATCAAC-3, 5-CTGCCCTGGGTCTGGAATAC-3, 产物大小为 240bp; VR1 上游引物为 5-TCAAAGACCCGGAACAGGG-3, 5-CTCTACCAGGAGGGTCACCA-3, 产物大小为 224bp, GAPDH 内参照同前, 测定浓度和变形琼脂糖凝胶电泳鉴定质量后, 每组取 1g RNA 进行反转录反应, RNA 逆转录为 cDNA, 20L 反应体系, 反转录反应条件为: 37#15min 和 85#5s, 最后进行 real-time PCR 反应, 两步法 PCR 扩增标准程序如下: 预变性, 95#30s 1 个循环; PCR 反应, 95#5s, 60#30s, 40 个循环, 结果计算: 用已知浓度的病毒标准品 10 倍稀释, 和未知样品一起进行 PCR 反应, 结果计算: 采用 GAPDH 作为内参照和 2-Ct 相对定量法来计算 NK1、VR1mRNA 的表达水平。

[0023] 进一步, 免疫组化方法检测豚鼠肺组织 P 物质、VR1 和 PGP-9.5 蛋白的表达及免疫组化结果图像分析免疫组化图片用 Leica 显微镜观察、拍照, 进行蛋白表达强度或灰度的比较, 根据以下染色深浅行半定量分析: 0 = 无染色; 1 = 轻度着色; 2 = 中度着色; 3 = 强着色; 4 = 很强着色, 每张片子至少随机分析 5 个高倍视野。

[0024] 进一步, 统计学处理采用 SPSS160 统计软件进行分析, 数据以均数%标准差或者中位数表示, 符合正态分布并且方差齐时多组间的总体检验采用 One-way ANOVA, 组间比较采用 ANOVA 中的最小显著差异法; 不符合正态分布或者方差不齐时各组间总体检验采用非参数经验 Kruskal-Wallis 法, 两组间比较采用 Bonferroni 的组间比较检验法。

[0025] 本发明提供的辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法, 通过选择豚鼠 50 只, 滴鼻方法接种副流感病毒, 测定咳嗽反射敏感性、副流感病毒抗原和核酸、肺组织匀浆的 P 物质含量、肺组织 P 物质受体 NK1、辣椒素受体亚型 1 的 mRNA 水平、肺组织 P 物质、辣椒素受体亚型 1 和蛋白基因产物的表达及半定量分析; 对 P 物质、辣椒素受体亚型 1 和蛋白基因产物与咳嗽反射敏感性的相关性进行分析。本发明的方法简单, 得出了神

经肽的释放增加提示神经源性炎症的发生,咳嗽反射敏感性和神经肽的时空变化以及两者的正相关提示神经源性炎症在咳嗽反射敏感性增高和病毒感染性咳嗽中起重要作用,较好的解决了现有缺少副流感病毒感染后,辣椒素受体亚型 1 是否增高,以及与咳嗽反射敏感性的关系如何的问题,为临床医学的发展提供了保障条件。

附图说明

[0026] 图 1 是本发明实施例提供的辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法的流程图;

[0027] 图 2 是本发明实施例提供的豚鼠 CRS 测定结果示意图;

[0028] 图 3 是本发明实施例提供的豚鼠肺组织 PIV3RNA 含量测定结果示意图。

具体实施方式

[0029] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0030] 下面结合附图及具体实施例对本发明的应用原理作进一步描述。

[0031] 如图 1 所示,本发明实施例的辣椒素受体亚型 1 的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法包括以下步骤:

[0032] S101:选择豚鼠 50 只,随机分成正常对照组以及病毒感染 6、12、28 和 42d 组;通过滴鼻方法接种副流感病毒,Buxco 肺功能仪测定咳嗽反射敏感性;

[0033] S102:免疫荧光和 FQ-PCR 方法检测副流感病毒抗原和核酸,ELISA 法检测肺组织匀浆的 P 物质含量;FQ-PCR 检测肺组织 P 物质受体 NK1、辣椒素受体亚型 1 的 mRNA 水平;免疫组化方法检测肺组织 P 物质、辣椒素受体亚型 1 和蛋白基因产物的表达及半定量分析;

[0034] S103:并对 P 物质、辣椒素受体亚型 1 和蛋白基因产物与咳嗽反射敏感性的相关性进行分析。

[0035] 结合本发明的具体实施例对本发明作进一步的说明:

[0036] 1、实验试剂及仪器胎牛血清及 MEM、DMEM/F12 培养基购自 Gibco;辣椒素购自 Sigma;P 物质 ELISA 检测试剂盒购自 R&D, RNAisoTMP lus(病毒 RNA 提取试剂盒)、组织总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒及 SYBR Green 荧光定量 PCR 反应试剂盒均购自 TaKaRa, PIV3DFI 免疫荧光检测试剂盒购自 Millipore, VR1 兔抗多克隆抗体、SP 和 PGP-9.5 鼠抗单克隆抗体均购自 Abcam, HRP 标记免疫组化 V 抗购自 Invitrogen;SABC 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物有限公司,单腔非限制型小动物体描仪购自 Buxco;MK3 型酶标仪购自上海赛默飞世儿仪器公司;Leica DM4000 智能型生物显微镜购自 Leica;

[0037] 2、细胞培养和副流感病毒型 (PIV3) 的培养、传代、冻存及定量,具体包括以下步骤:

[0038] 第一步,细胞培养细胞株人恒河猴肾细胞,来源于 ATCC, LLC 细胞是对 PIV3 敏感的细胞,用于毒株的传代培养;

[0039] 第二步,病毒的培养、传代及冻存副流感病毒型 (PIV3) 来源于 ATCC, LLC 细胞在培养瓶中长至 70%~80%融合后,取病毒悬液 200L 接种于细胞上,每 15min 摇动 1 次,吸附

2h 后倒出病毒液,加入 2%胎牛血清的培养基,于第 2d~3d 开始出现细胞病变(CPE),待病变达 50%~60%时收获病毒,将病毒反复冻融 2 次~3 次后 10000r/min 离心 20min,去除细胞碎片,收集上清分装后液氮中冻存;

[0040] 第三步,空斑技术测定病毒感染滴度,使用常规空斑技术,培养基为 DMEM/F12 培养基,以空斑形成单位(t PFU)来表示病毒感染滴度;

[0041] 3、具体方法:

[0042] 第一步,实验动物及分组,雄性纯白 SPF 级豚鼠,购自广东省实验动物中心,体重 250g~300g 之间,随机分成 5 组,即正常对照组(vehicle)和 4 个病毒感染组,每组 10 只,病毒感染组按病毒感染后天数(PID)又分为 6、12、28 和 42d4 个组;

[0043] 第二步,动物饲养及病毒接种方法,动物在 SPF 级环境下饲养,感染组动物单独饲养,在适应新的环境 1 周左右后开始接种病毒,病毒滴鼻:乙醚麻醉后,两侧鼻孔分别滴入 75 μ L 的事先扩增冻存好的病毒液,病毒滴度为 3.3×10^5 pfu,接种当天同时进行空斑实验再次鉴定接种病毒的滴度,对照组豚鼠滴入病毒培养用培养基 MEM;

[0044] 第三步,豚鼠咳嗽反射敏感性(CRS)的测定,本发明应用单腔非限制型小动物体描仪(购自 Buxco)来测定豚鼠的咳嗽反射敏感性(CRS),各组动物分别在预定时间进行辣椒素咳嗽激发试验,判断咳嗽反射敏感性(CRS)的指标主要是咳嗽总次数(cough coun, t CCnt),Buxco 系统通过采集气流变化信号,计算曲线下面积(V2)以及气流半数峰值转换时间,经过模拟方程换算后判断是否为咳嗽动作,还是打喷嚏或者其它不规则的活动,而辣椒素激发溶液浓度为 50mol/L,总量为 1mL,观测记录 10min(含雾化时间)内的 CCnt;

[0045] 4、豚鼠副流感病毒型(PIV3)感染的病毒学检测,具体方法为:

[0046] 第一步,直接免疫荧光法检测副流感病毒型(PIV3)抗原,苹果绿荧光视为阳性,副流感病毒型(PIV3)主要是胞浆发荧光,可呈不规则的颗粒荧光;

[0047] 第二步,SYBR Green 荧光定量 PCR(real-time PCR)方法检测副流感病毒型(PIV3)RNA 的含量(copies/mL),副流感病毒型(PIV3)上游引物为 5-TTTGCCCTTGACCGAC-3,5-AACCCTGCCCTTTGTGC-3,产物大小为 134bp;GAPDH 作为内参照,上游引物 5-TGGTGCCAAAAGGTCA-3 下游引物为 5-CCTCCACAATGCCGAAGT-3,产物大小为 176bp,含有和待测样品相同扩增片段的副流感病毒型(PIV3)病毒质粒 DNA 标准品由 TaKaRa 公司合成提供,其病毒核酸含量为 2.8×10^5 copies/L(构建标准品的过程略);首先提取肺组织病毒 RNA,测定浓度和变形琼脂糖凝胶电泳鉴定质量后,每组取 1g RNA 进行反转录反应(RNA 逆转录为 cDNA),20L 反应体系,反转录反应条件为:37 $^{\circ}$ C 15min 和 85 $^{\circ}$ C 5s,最后进行 real-time PCR 反应,两步法 PCR 扩增标准程序如下:预变性,95 $^{\circ}$ C 30s 1 个循环;PCR 反应,95 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 30s,40 个循环,结果计算:用已知浓度的病毒标准品 10 倍稀释(10^2 ~ 10^{11} copies/L),和未知样品一起进行 PCR 反应,通过稀释标准品得到的标准曲线来确定未知样品中的病毒拷贝数;

[0048] 5、检测豚鼠肺组织 SP 含量的肺组织匀浆液的制备及检测方法,具有包括以下步骤;

[0049] 称取 100mg 新鲜豚鼠肺组织,先加 1mol/L 醋酸 3mL,100 $^{\circ}$ C 水浴 10min 以灭活内源性激肽酶活性,然后按比例加入一定量的 PBS,用 1ml~3mL 玻璃匀浆器匀浆,3500r/min 离心 20min,取上清 -70 $^{\circ}$ C 保存;或水浴后 -70 $^{\circ}$ C 保存,用前匀浆,ELISA 法检测豚鼠肺组织 P 物

质 (SP) 的含量 (竞争法测抗体) ;

[0050] 6、SYBR Green real-time PCR 方法检测,豚鼠肺组织 NK1、VR1mRNA 的相对表达量 NK1 上游引物为 5-CTTCCTCCTGCCCTACATCAAC-3,5-CTGCCCTGGGTCTGGAAATAC-3,产物大小为 240bp;VR1 上游引物为 5-TCAAAGACCCGGAACAGGG-3,5-CTCTACCAGGAGGGTCACCA-3,产物大小为 224bp,GAPDH 内参照同前,除了先提取组织总 RNA 和无需标准品做标准曲线外,其余操作方法大致与上文中病毒 RNA 的检测方法相同,均按 TaKaRa 公司的试剂盒说明进行;结果计算:采用 GAPDH 作为内参照和 2-Ct 相对定量法来计算 NK1、VR1mRNA 的表达水平;

[0051] 7、免疫组化方法检测豚鼠肺组织 P 物质 (SP)、VR1 和 PGP-9.5 蛋白的表达及免疫组化结果图像分析 (半定量方法) 免疫组化图片用 Leica 显微镜观察、拍照,进行蛋白表达强度 (灰度) 的比较,根据以下染色深浅行半定量分析:0 = 无染色;1 = 轻度着色;2 = 中度着色;3 = 强着色;4 = 很强着色 (几乎呈黑色),每张片子至少随机分析 5 个高倍视野,所有片子均由 2 个不知情的专业人士分析;

[0052] 8、统计学处理采用 SPSS160 统计软件进行分析,数据以均数%标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或者中位数 (四分位数间距) 表示,符合正态分布并且方差齐时多组间的总体检验采用 One-way ANOVA,组间比较采用 ANOVA 中的最小显著差异法 (LSD);不符合正态分布或者方差不齐时各组间总体检验采用非参数经验 Kruskal-Wallis 法,两组间比较采用 Bonferroni 的组间比较检验法;相关性检验采用 Spearman 直线相关分析法分析;结果豚鼠咳嗽反射敏感性 (CRS) 测定结果图 2 结果显示,病毒感染组豚鼠对辣椒素刺激引起咳嗽敏感,感染后 6、12、28 和 42d 组 CRS 均较正常对照组明显升高 ($P < 0.05$),感染后 42d 组较对照组升高最为明显 ($P < 0.01$);

[0053] 肺组织病理学结果肺组织外观无特殊,光镜下主要是感染组在急性期可见一些气道炎症表现,即气道上皮的肿胀和少许脱落,腺体分泌增加,支气管壁和肺实质周围炎症细胞浸润,主要是巨噬和淋巴细胞的浸润增加;而随着感染后时间延长气道炎症逐渐恢复,未见明显肺实质的炎症表现 (常规病理切片图省略),

[0054] 副流感病毒型 (PIV3) 感染的病毒学检测结果:

[0055] 副流感病毒型 (PIV3) 在 LLC-MK2 细胞中培养的 CPE 作用副流感病毒型 (PIV3) 引起细胞病变的典型表现为,感染后 2d 左右细胞开始逐渐肿胀、变圆和聚集,最后 4d ~ 5d 左右直至贴壁细胞破碎、坏死和脱落;

[0056] 直接免疫荧光技术检测副流感病毒型 (PIV3) 病毒抗原结果,与对照组比,副流感病毒型 (PIV3) 感染的 LLC 培养细胞可见广泛的绿色阳性病毒核蛋白抗原的表达;而多数急性感染期 6 和 12d 组豚鼠肺组织可见散在绿色的病毒核蛋白抗原的表达;

[0057] Real-time PCR 方法检测肺组织副流感病毒型 (PIV3)RNA 含量感染组豚鼠肺组织副流感病毒型 (PIV3)RNA 含量在感染后第 6d 浓度最高,随着感染后时间推移,病毒核酸含量呈逐步降低趋势,很低水平表达维持至感染后 42d (与感染后 6d 比,分别 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),见图 3;

[0058] 豚鼠肺组织匀浆 SP 含量的检测结果与对照组相比,感染组豚鼠肺组织 P 物质 (SP) 含量感染后 6d 起即有明显升高并达到最高峰 ($P < 0.01$),此后直至感染后 42d 均维持在高水平 ($P < 0.05$),见表 1,5Real-time PCR 方法检测豚鼠肺组织 NK1 和 VR1 的 mRNA 相对表达量结果 PIV3 感染后豚鼠肺组织 NK1 的 mRNA 水平除了感染后 6d 组豚鼠因

为个体差异大而升高没有统计学意义外,其它感染组其 mRNA 水平较对照组均有明显升高 ($P < 0.05$),于感染后 28d 达到高峰 ($P < 0.01$),到感染后 42d 仍维持高水平 ($P < 0.01$),VR1 的 mRNA 水平较对照组在感染后均明显升高 ($P < 0.05$),而在 28 和 42d 升高更为突出 ($P < 0.01$),见表 1;

[0059]

Group	SP(pg/mg) ^a	NK1 ^a	VR1 ^a
Vehicle	19.50±4.68	1.00±0.47	1.00±0.34
PID 6	31.95±6.35**	1.82±1.06	1.82±0.53*
PID 12	29.32±7.45*	2.07±0.93*	2.00±0.81**
PID 28	27.91±11.50*	2.29±0.94**	2.04±0.82**
PID 42	27.12±5.00*	2.21±0.74**	1.83±0.73*

[0060] 表 1:荧光定量 PCR 方法检测 PIV3 感染豚鼠肺组织 NK1、的 mRNA 相对含量。

[0061] 豚鼠肺组织神经肽 P 物质 (SP)、VR1 和 PGP-9.5 蛋白的免疫组化结果与对照组相比,感染组豚鼠肺组织可见深黄色阳性反应物,表达强的阳性反应颗粒颜色较深,阳性反应细胞数量也显著多于对照组,按抗体说明书,P 物质 (SP) 以支气管上皮、黏膜及分泌物表达为主;VR1 以细胞质和细胞膜表达;PGP-9.5 是细胞浆表达;免疫组化半定量结果见表 2;

[0062]

Group	SP	VR1	PGP-9.5
Vehicle	1.14(0.00)	1.14(0.00)	1.29(1.50)
PID 6	2.25(0.75)*	1.71(1.00)	2.14(1.50)
PID 12	2.25(0.75)*	1.67(1.50)	2.00(0.50)
PID 28	2.38(1.50)**	2.14(1.00)*	2.43(1.00)
PID 42	1.88(0.75)	2.20(1.50)*	2.80(0.50)*

[0063] 表 2:免疫组化半定量检测豚鼠肺组织 SP、VR1 及 PGP-9.5 蛋白表达含量。

[0064] 与对照组相比,感染组 P 物质 (SP) 蛋白阳性表达在感染后 6、12 及 28d 都明显增强 ($P < 0.05$),以 28d 组增强最为明显 ($P < 0.01$),而在感染后 42d 有所下降,差异没有统计学意义,感染组 VR1 蛋白表达在感染后 28 和 42d 组较正常对照组显著增强 ($P < 0.05$),而感染组 PGP-9.5 表达在感染后 42d 组较对照组明显增强 ($P < 0.05$);

[0065] PIV3 感染豚鼠咳嗽反射敏感性 (CRS) 与神经肽相关性分析:

[0066] 咳嗽反射敏感性 (CRS) 与肺组织 P 物质 (SP) 蛋白含量和 NK1 及 VR1mRNA 水平的相关性分析对于肺组织匀浆 P 物质 (SP) 蛋白含量,病毒感染 6 和 28d 组与咳嗽反射敏感性 (CRS) 呈正相关;对于 NK1mRNA 表达,病毒感染 12、28 和 42d 组与咳嗽反射敏感性 (CRS) 呈

正相关,其中 42d 组相关程度最高 ($r_s = 0.8810, P < 0.01$);对于 VR1mRNA,豚鼠咳嗽反射敏感性 (CRS) 均与之呈正相关 ($P < 0.05$),见表 3;
[0067]

Group		SP	NK1	VR1
PID 6	r_s	0.711*	0.667	0.783*
	P	0.048	0.071	0.022
PID 12	r_s	0.381	0.738*	0.786*
	P	0.352	0.037	0.021
PID 28	r_s	0.805*	0.756*	0.805*
	P	0.016	0.030	0.016
PID 42	r_s	0.667	0.881**	0.810*
	P	0.071	0.004	0.015

[0068] 表 3:咳嗽反射敏感性与肺组织 SP 蛋白含量、NK1 及 VR1mRNA 水平的相关性分析

[0069] 咳嗽反射敏感性 (CRS) 与肺组织 P 物质 (SP)、VR1 和 PGP-9.5 蛋白表达的相关性分析,对于肺组织 P 物质 (SP) 蛋白表达,6、12 和 42d 组与咳嗽反射敏感性 (CRS) 呈正相关 ($P < 0.05$);对于 VR1,12 和 28d 组与 CRS 呈正相关 ($P < 0.05$);而对于 PGP-9;

[0070] 12d 组与咳嗽反射敏感性 (CRS) 密切正相关 ($P < 0.05$),因为每组只有 7 例较理想的免疫组化切片可以进行相关比较,所以 $n = 7$,见表 4;

[0071]

Group		SP	VR1	PGP-9.5
PID 6	r_s	0.765*	0.342	0.609
	P	0.027	0.407	0.147
PID 12	r_s	0.709*	0.737*	0.866**
	P	0.049	0.037	0.005
PID 28	r_s	0.671	0.759*	0.613
	P	0.069	0.029	0.079
PID 42	r_s	0.784*	0.575	0.016
	P	0.021	0.136	0.971

[0072] 表 4:咳嗽反射敏感性与肺组织 SP、VR1 和 PGP-9.5 蛋白表达的相关性分析

[0073] 本发明的神经肽的释放增加提示神经源性炎症的发生咳嗽反射敏感性 (CRS) 和神经肽的时空变化以及两者的正相关提示神经源性炎症在咳嗽反射敏感性 (CRS) 增高和病毒感染性咳嗽中起重要作用。

[0074] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

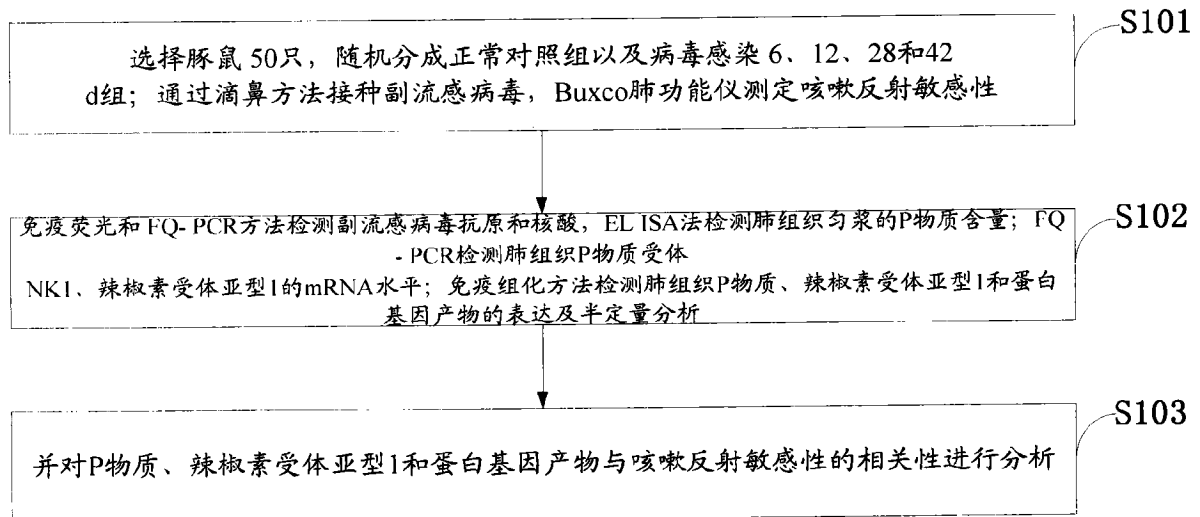


图 1

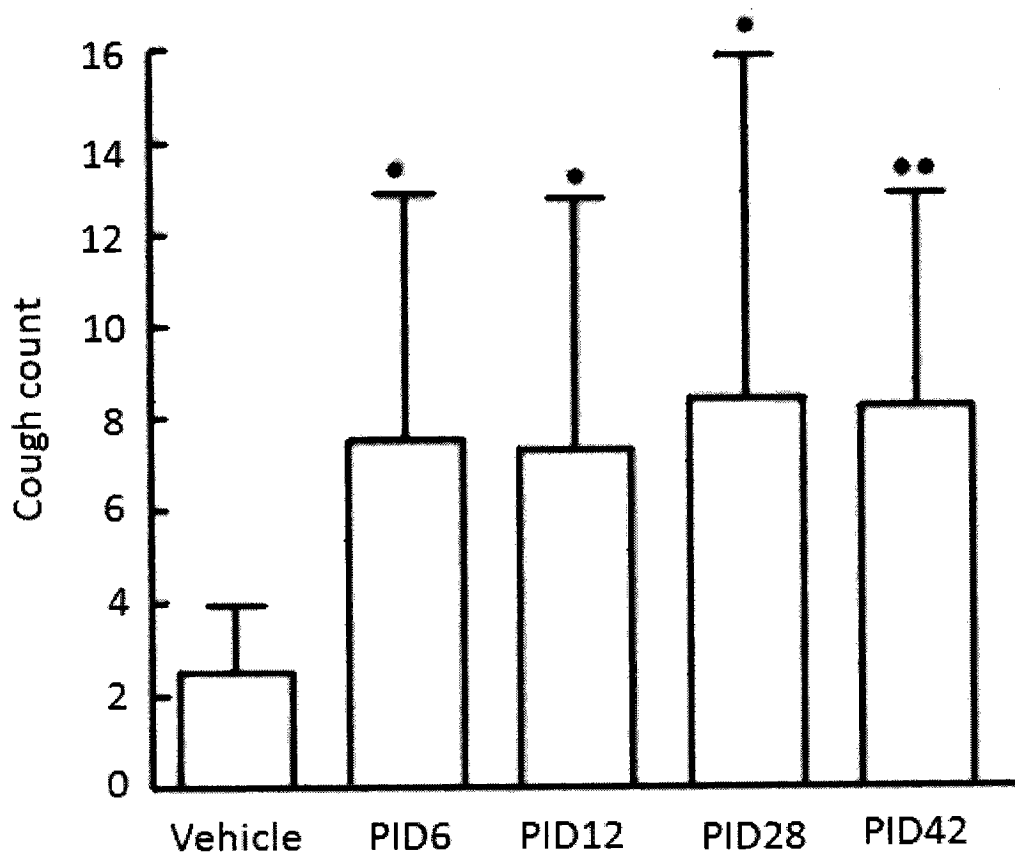


图 2

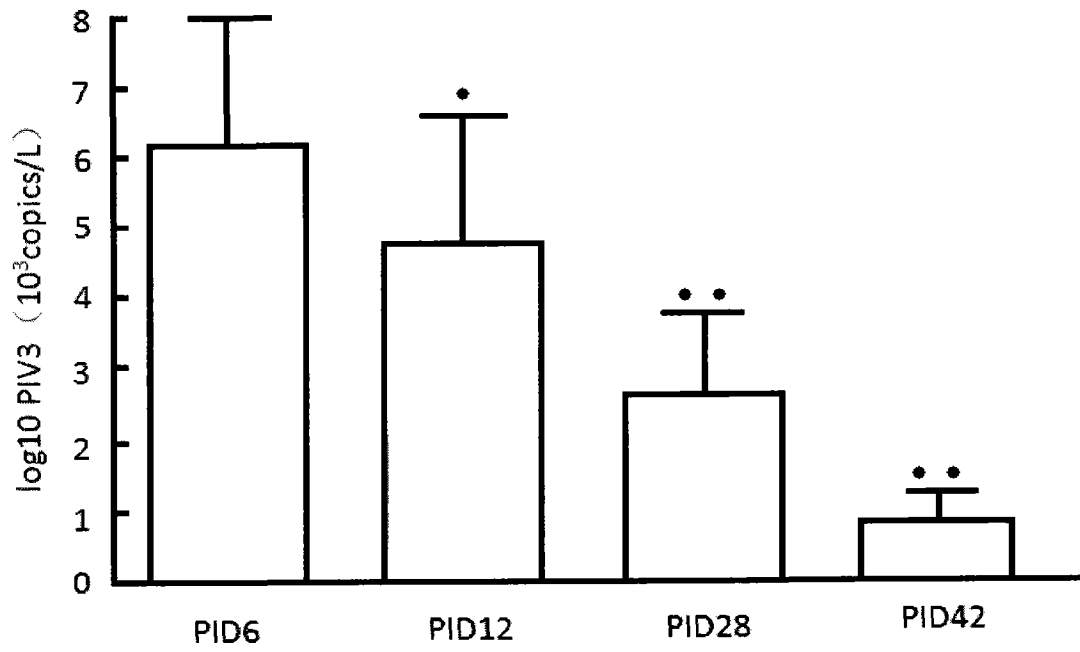


图 3

专利名称(译)	一种辣椒素受体亚型1的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法		
公开(公告)号	CN104372105A	公开(公告)日	2015-02-25
申请号	CN201410058739.8	申请日	2014-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	刘春丽		
申请(专利权)人(译)	刘春丽		
当前申请(专利权)人(译)	刘春丽		
[标]发明人	刘春丽 董沛坚 陈鸣宇		
发明人	刘春丽 董沛坚 陈鸣宇		
IPC分类号	C12Q1/70 C12Q1/68 G01N33/569 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/6893 G01N2800/12		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种辣椒素受体亚型1的变化与咳嗽反射敏感性关系的试验方法，包括以下步骤：选择豚鼠50只，随机分成正常对照组以及病毒感染6、12、28和42d组；通过滴鼻方法接种副流感病毒，Buxco肺功能仪测定咳嗽反射敏感性；检测副流感病毒抗原和核酸、肺组织匀浆的P物质含量、肺组织P物质受体NK1、辣椒素受体亚型1的mRNA水平、肺组织P物质、辣椒素受体亚型1和蛋白基因产物的表达及半定量分析；并对P物质、辣椒素受体亚型1和蛋白基因产物与咳嗽反射敏感性的相关性进行分析。本发明的方法简单，得出了神经肽的释放增加提示神经源性炎症的发生，CRS和神经肽的时空变化以及两者的正相关提示神经源性炎症在CRS增高和病毒感染性咳嗽中起重要作用。

