



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102830236 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 19

(21) 申请号 201210312237. 4

(22) 申请日 2012. 08. 29

(71) 申请人 中国计量学院

地址 310018 浙江省杭州市下沙高教园学源
街 258 号中国计量学院生命科学学院

申请人 浙江省医学科学院

(72) 发明人 胡华军 戴方伟 郑淑娟 宋晓明
萨晓婴

(51) Int. Cl.

G01N 33/96 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种筛选治疗过敏性支气管哮喘药物的方法

(57) 摘要

本发明属于利用实验动物进行治疗支气管哮喘药物筛选的方法,具体涉及利用长爪沙鼠构建过敏性支气管哮喘模型来进行筛选治疗药物的方法,通过检测支气管哮喘反应基本指标来评价模型的可靠性和药物疗效。本发明所构建的长爪沙鼠过敏性支气管哮喘模型,由 IgE 介导哮喘反应过程,症状特征明显,基本符合人类哮喘的生理特点。采用纳米微球富集酶联免疫法检测长爪沙鼠抗原特异性 IgE,实验操作简单,且灵敏度高。利用该模型及建立的筛选方法可以较好地评估候选药物的疗效,因此具有良好的应用前景。

1. 一种利用长爪沙鼠构建过敏性支气管哮喘模型来筛选治疗药物的方法,其特征在于选择长爪沙鼠构建对卵清白蛋白(OVA)过敏支气管哮喘模型,并对长爪沙鼠支气管哮喘反应基本指标的检测来评价模型的可靠性和药物疗效。

2. 一种如权利1中所述对长爪沙鼠支气管哮喘反应基本指标中血清抗原特异性IgE抗体的检测,包括如下步骤:先用偶联OVA的纳米微球(100~1000 μ g OVA:1~5g纳米微球)富集血清中OVA特异性IgE抗体,然后结合酶联免疫技术检测OVA特异性IgE抗体含量。

一种筛选治疗过敏性支气管哮喘药物的方法

技术领域

[0001] 本发明属于利用实验动物进行治疗支气管哮喘药物筛选的方法,具体涉及利用长爪沙鼠构建过敏性支气管哮喘模型来进行筛选治疗药物的方法。

背景技术

[0002] 支气管哮喘 (bronchial asthma, 简称哮喘) 属于过敏性疾病的一种,是由多种细胞特别是嗜酸性粒细胞、肥大细胞和 T 细胞参与的慢性气道炎症。哮喘发病机制复杂,目前全球约有 3 亿哮喘患者,被 WHO 列为疾病中四大顽症之一。现行的以吸入糖皮质激素为首选的治疗方案能控制哮喘症状,但需长期用药,即不能预防及根治,也不能抑制气道重塑的发生,并且长期使用激素治疗会带来如 Cushing 综合征等多种副作用。因此发现新的治疗支气管哮喘药物,是目前面临的机遇与挑战。

[0003] 探索支气管哮喘的发病机制及研究和开发新药都需要一种类似人类症状的动物模型来进行。已开展的哮喘动物模型种类较多,包括猴、马、猪、猫、犬、羊、兔、豚鼠、大鼠、小鼠,其中鼠类应用最普遍,但每种模型都各有优缺点。如豚鼠虽易被致敏,能产生 I 型变态反应,反应程度强于其他动物,但个体差异较大,且其变态反应更多由 IgG 而非 IgE 介导,这与人类的有所不同,且试验中死亡率较高;大鼠、小鼠虽然遗传背景较为清楚,制作哮喘模型时死亡率低,但临床指征不明显;小鼠由于体积小,操作不便,易造成非哮喘性气道阻力增高。此外,对于猫、兔、羊、猪、犬、猴等用于制作哮喘模型时同样有不足,加之价格较昂贵也限制了其应用。尝试建立接近人类变应性哮喘特点的哮喘动物模型的研究工作仍在努力进行。长爪沙鼠又称沙土鼠 (*Meriones unguiculatus*)、蒙古沙鼠 (*Mongolian gerbils*), 隶属啮齿目,仓鼠科,沙鼠亚科,沙鼠属,是中国特有动物资源,目前世界各地长爪沙鼠均由中国引种,国内外将长爪沙鼠看作一种正在被开发的“多能性”的实验动物。但目前还未见利用长爪沙鼠构建过敏性支气管哮喘模型,并建立利用该模型进行筛选治疗药物的方法的报道。

发明内容

[0004] 本发明提供一种利用长爪沙鼠构建过敏性支气管哮喘模型来进行筛选治疗药物的方法,通过对长爪沙鼠支气管哮喘反应基本指标的检测来评价模型的可靠性和药物疗效。具体包括以下步骤:

[0005] 1) 长爪沙鼠哮喘模型的建立与药物治疗分组;

[0006] 2) 呼吸行为观察;

[0007] 3) 血清 OVA 特异性 IgE 抗体检测;

[0008] 4) 肺泡灌洗液嗜酸性粒细胞 (BALF-EOS) 计数;

[0009] 5) 肺组织学检查。

[0010] 其中,步骤 3) 的血清 OVA 特异性 IgE 抗体的检测。先用偶联 OVA 的纳米微球富集血清中 OVA 特异性 IgE 抗体,再结合酶联免疫技术检测 IgE 抗体含量。

[0011] 本发明的目的是利用上述方法进行治疗支气管哮喘药物的筛选。

[0012] 本发明的两个显著特点是：1、采用实验动物为长爪沙鼠。本发明对长爪沙鼠过敏性哮喘易感基因Tim-1(T cell immunoglobulin domain,mucin-like domain gene 1)(该物种基因为发明人克隆获得, GeneBank No. JN657226) 的编码氨基酸序列与大鼠、小鼠、人相应基因的编码序列进行比对,发现长爪沙鼠TIM-1黏蛋白样区(mucin domain)的PTS结构[富含Pro(P)、Thr(T)和Ser(S)氨基酸]所占比例与大鼠、小鼠相比更与人类接近。而PTS区为O-糖基化修饰部位,该功能区对协同TIM-1蛋白免疫球蛋白域与配体的结合,在过敏性疾病发病过程中起重要作用。进一步通过深入的研究发现所构建的长爪沙鼠支气管哮喘模型,症状特征明显,由IgE介导哮喘反应过程,基本反应指标符合人类哮喘的生理特点。并且所构建的长爪沙鼠支气管哮喘模型个体死亡率低,实验操作较小鼠更加方便。2、所建立的纳米微球富集酶联免疫法检测血清中抗原特异性IgE抗体,实验操作简单,且灵敏度高。

附图说明

[0013] 图1为对照组长爪沙鼠肺组织HE染色切片

[0014] 图2为哮喘组长爪沙鼠肺组织肺组织HE染色切片

[0015] 图3为灵芝提取物低剂量组长爪沙鼠肺组织HE染色切片

[0016] 图4为灵芝提取物中剂量组长爪沙鼠肺组织HE染色切片

[0017] 图5为灵芝提取物高剂量组长爪沙鼠肺组织HE染色切片

[0018] 图6为地塞米松组长爪沙鼠肺组织HE染色切片

具体实施方式

[0019] 本发明涉及一种利用长爪沙鼠支气管哮喘模型来进行筛选治疗药物的方法,通过以下实验例加以说明。

[0020] 1 材料和方法

[0021] 1.1 材料

[0022] ZCLA长爪沙鼠,6-8周龄雄性,由浙江省医学科学院实验动物中心提供,饲养于室温环境,明暗周期12小时,自由进食和饮水,实验前适应环境3天。灵芝提取物,由浙江寿仙谷药业有限公司提供。鸡卵清白蛋白(OVA)购自美国Sigma公司。溴化氰活化琼脂糖凝胶FF(CNBR activated sepharose FF)纳米微球购自Pharmacia公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗兔IgG抗体(1mg/mL)、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色液购自Pierce公司。兔抗长爪沙鼠IgE抗体(1mg/mL)、OVA特异性IgE的参考标准血清浓度为0.0、5.0、10、20、40、80、160、320U/mL,由杭州杏之林生物技术有限公司提供。酶标仪购自美国Thermo公司。WH-2000超声雾化器,为汕头市粤华医疗器械厂有限公司生产。

[0023] 1.2 哮喘模型的建立与药物治疗分组

[0024] 雄性ZCLA长爪沙鼠60只随机分成对照组、哮喘组、灵芝提取物高剂量组、灵芝提取物中剂量组、灵芝提取物低剂量组、地塞米松组,每组10只。哮喘组和药物治疗组:于首日、第14天给予腹腔注射含OVA和乳化的氢氧化铝[Al(OH)₃]的生理盐水混悬液致敏,每次给予含OVA2mg+Al(OH)₃5mg的生理盐水混悬液0.2mL。于第21天开始对各组长爪沙鼠均给

予 1% OVA 生理盐水滴鼻,每次滴 100 μ L,滴鼻完后进行雾化激发(雾化液为 1% OVA 生理盐水 10mL,每天 1 次,每次持续约 30 分钟,连续 6 天)。地塞米松组:在每天激发前 1 小时,预先腹腔注射地塞米松 5mg/Kg;灵芝提取物高剂量组:于每天激发前 1 小时灌胃给药 50g/kg;灵芝提取物中剂量组:于每天激发前 1 小时灌胃给药 10g/kg;灵芝提取物低剂量组:于每天激发前 1 小时灌胃给药 1g/kg;对照组:以等量生理盐水代替 OVA 致敏和激发。观察并记录每组个体的呼吸行为变化。

[0025] 1.3 纳米微球富集抗原特异性 IgE 酶联免疫检测

[0026] 将 100mgOVA 与 10g 溴化氰活化琼脂糖凝胶 FF 偶联得到 OVA-Sepharose FF 纳米微球,离心后沉淀用 0.01M PBS(PH = 7.4) 缓冲液洗涤 5 次,并重悬于 10mL 的 PBS 中。以 2% 戊巴比妥 0.25mL 腹腔注射麻醉动物,腹主动脉取血 2mL,静置 2 小时后 4000 转/分钟离心 10 分钟,分离血清。取 1mL 血清加入 100 μ L 纳米微球悬液,37 $^{\circ}$ C 混匀 1 小时,离心后沉淀用 PBS 缓冲液洗涤 5 次,向沉淀中加 100 μ L 1 : 500 倍稀释的兔抗长爪沙鼠 IgE 抗体,37 $^{\circ}$ C 混匀 30 分钟,离心后沉淀用 PBS 缓冲液洗涤 5 次,然后向沉淀中加 100 μ L 1 : 1000 倍稀释的 HRP 标记小鼠抗兔 IgG,37 $^{\circ}$ C 混匀 30 分钟,离心后沉淀用 PBS 缓冲液洗涤 5 次,再向沉淀中加 200 μ L DAB 显色液,避光放置 15 分钟,最后加入 50 μ L 2mol/L 的硫酸终止显色,离心后将显色液移 150 μ L 至%孔酶标板,酶标仪检测,根据标准曲线得出样品中特异性 IgE 浓度。

[0027] 1.4 BALF-EOS 及肺组织标本采集与检测

[0028] 将 1.3 中已麻醉动物,切开颈部皮肤,暴露气管,再将左肺和主支气管分离开,结扎右肺叶,行左肺支气管肺泡灌洗,每次 0.5mL,生理盐水灌洗重复进行 2 次,回收率约 80%,并于 4 $^{\circ}$ C 2000 转/分钟,离心 10 分钟,沉淀作涂片并进行瑞氏染色,计数 400 个 BALF 细胞中嗜酸性粒细胞(EOS)的百分比。分离右肺,通过气管插管灌注 10%中性甲醛使肺膨胀,灌注压力为 30cm H₂O(1cmH₂O = 0.098kPa)。将肺浸入 10%中性甲醛中固定。经不同浓度乙醇、二甲苯处理后,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察。

[0029] 1.5 统计学方法

[0030] 采用 SPSS 11.0 统计软件进行数据处理和分析。

[0031] 2 结果

[0032] 2.1 呼吸行为观察

[0033] 哮喘组经抗原激发后,出现搔挠、张口喘息、腹部翕动、易激惹、烦躁不安且喷嚏频频。对照组长爪沙鼠行动敏捷,未见异常。灵芝提取物治疗组经抗原激发后,低剂量组症状明显减轻,中剂量组症状未见异常,高剂量组少量出现轻微症状。地塞米松组个别出现轻微症状。

[0034] 2.2 IgE 及 EOS 含量比较

[0035] 哮喘组长爪沙鼠血清中 IgE 含量均明显高于对照组和 4 个药物治疗组 ($P < 0.05$)。药物治疗组中,灵芝提取物高剂量组、灵芝提取物中剂量组与地塞米松组 IgE 含量明显低于灵芝提取物低剂量组 ($P < 0.05$),但与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。哮喘组 EOS 比例明显高于对照组和 4 个药物治疗组 ($P < 0.05$)。与对照组比较,高剂量组、中剂量组及地塞米松组 EOS 比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。低剂量组 EOS 比例高于高剂量组、中剂量组、对照组、地塞米松组 ($P < 0.05$)。见表 1。

[0036] 表 1 各组长爪沙鼠 IgE、EOS 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IgE(U/mL)	EOS (%)
对照组	10	42±3	0.75±0.15
哮喘组	10	315±12*	35.93±1.15*
[0037] 高剂量组	10	52±4 ^{▲▲}	0.95±0.35 ^{▲▲}
中剂量组	10	46±3 ^{▲▲}	0.78±0.12 ^{▲▲}
低剂量组	10	95±6* [▲]	6.16±0.25* [▲]
地塞米松组	10	42±3 ^{▲▲}	0.78±0.25 ^{▲▲}

[0038] 注：与对照组比较，*P < 0.05；与哮喘组比较，▲ P < 0.05；与低剂量组比较，△ P < 0.05

[0039] 2.3 肺组织学检查

[0040] 对照组长爪沙鼠肺组织及气道黏膜完整，上皮细胞无明显增生，无明显炎性细胞浸润（图 1）。哮喘组长爪沙鼠肺组织及支气管周围有大量 EOS 等炎性细胞浸润，气道黏膜上皮细胞和黏液腺增生或局部脱落，管壁增厚，管腔内炎性渗出增加（图 2）。灵芝提取物低剂量组支气管周围亦有 EOS 等炎性细胞浸润等现象发生，但程度较哮喘组轻（图 3）。灵芝提取物中剂量组、高剂量组气道炎性改变轻微，黏膜上皮比较完整，无明显细胞浸润（图 4、5）。地塞米松组气道情况与对照组类似（图 6）。

[0041] 3. 结论

[0042] 本实验例对灵芝提取物治疗效果较好地进行评估。说明本发明提供的方法也可用于筛选其它支气管哮喘的治疗药物。

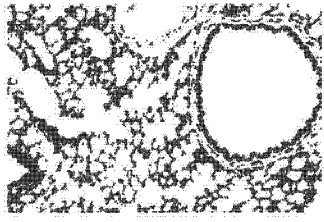


图 1

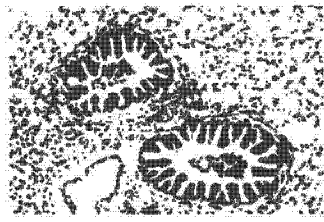


图 2

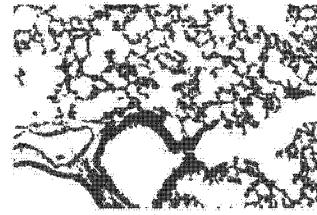


图 3

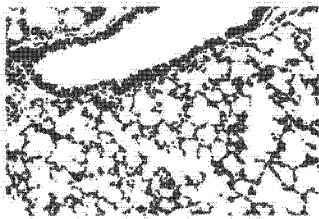


图 4

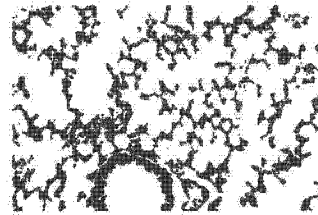


图 5

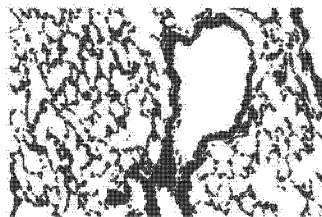


图 6

专利名称(译)	一种筛选治疗过敏性支气管哮喘药物的方法		
公开(公告)号	CN102830236A	公开(公告)日	2012-12-19
申请号	CN201210312237.4	申请日	2012-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	中国计量大学 浙江省医学科学院		
申请(专利权)人(译)	中国计量学院 浙江省医学科学院		
当前申请(专利权)人(译)	中国计量学院 浙江省医学科学院		
[标]发明人	胡华军 戴方伟 郑淑娟 宋晓明 萨晓婴		
发明人	胡华军 戴方伟 郑淑娟 宋晓明 萨晓婴		
IPC分类号	G01N33/96 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于利用实验动物进行治疗支气管哮喘药物筛选的方法，具体涉及利用长爪沙鼠构建过敏性支气管哮喘模型来进行筛选治疗药物的方法，通过检测支气管哮喘反应基本指标来评价模型的可靠性和药物疗效。本发明所构建的长爪沙鼠过敏性支气管哮喘模型，由IgE介导哮喘反应过程，症状特征明显，基本符合人类哮喘的生理特点。采用纳米微球富集酶联免疫法检测长爪沙鼠抗原特异性IgE，实验操作简单，且灵敏度高。利用该模型及建立的筛选方法可以较好地评估候选药物的疗效，因此具有良好的应用前景。

组别	n	IgE(U/mL)	EOS (%)
对照组	10	42±3	0.75±0.15
哮喘组	10	315±12*	35.93±1.15*
高剂量组	10	52±4 ^{△△}	0.95±0.35 ^{△△}
中剂量组	10	46±3 ^{△△}	0.78±0.12 ^{△△}
低剂量组	10	95±6* [△]	6.16±0.25* [△]
地塞米松组	10	42±3 ^{△△}	0.78±0.25 ^{△△}