



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110547257 A

(43)申请公布日 2019.12.10

(21)申请号 201910962290.0

(22)申请日 2019.10.12

(71)申请人 南开大学

地址 300071 天津市南开区卫津路94号南  
开大学

(72)发明人 李树杰 杜鸿雁

(51)Int.Cl.

A01K 67/027(2006.01)

A61K 49/00(2006.01)

A61K 45/00(2006.01)

A61P 11/06(2006.01)

A61P 37/08(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 1/30(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

### (54)发明名称

电压门控质子通道Hv1在治疗过敏性哮喘中的  
功能和应用

### (57)摘要

本发明公开了电压门控质子通道Hv1蛋白在过敏性哮喘产生过程中的作用,建立的良好过敏性哮喘小鼠模型,属于医学领域。通过研究Hv1蛋白,与野生型C57(WT)小鼠对比,我们发现Hv1基因敲除小鼠(KO)在用卵清蛋白(OVA)致敏和刺激后的过敏性气道炎症水平明显高于对照组,即患有过敏性哮喘病症。在检查血清、支气管肺泡灌洗液(BALF)和肺组织病理学后,我们发现Hv1缺乏明显地促进了OVA诱导的炎症细胞募集,增加了过敏性哮喘小鼠Th2细胞因子水平和粘液分泌的产生。进一步的实验发现,Hv1缺乏明显地降低了NOXs的表达,这些结果表明Hv1基因敲除通过抑制ROS的产量使过敏性哮喘的患病率增加。针对Hv1的功能,可用于制备预防,缓解和/或治疗过敏性哮喘的药物。

1. 一种电压门控质子通道Hv1敲除小鼠的用途,其特征在于,用于制备过敏性哮喘模型。
2. 一种电压门控质子通道Hv1敲除小鼠的用途,其特征在于,用于制备非人哺乳动物鼠的过敏性哮喘相关疾病模型。
3. 一种电压门控质子通道Hv1敲除小鼠的用途,其特征在于,所述的敲除电压门控质子通道Hv1还用于增加非人哺乳动物肺组织或呼吸道炎性细胞或嗜酸性粒细胞的数量;或用于增加非人哺乳动物肺组织中细胞因子IL-4、IL-5和IL-13的水平。
4. 一种电压门控质子通道Hv1敲除小鼠的用途,其特征在于,所述的敲除电压门控质子通道Hv1还用于降低非人哺乳动物肺组织中相关蛋白NOX1、NOX2和NOX4的表达。
5. 一种电压门控质子通道Hv1敲除小鼠的用途,所述Hv1敲除小鼠用于筛选治疗过敏性哮喘的潜在物质:检测测试组动物呼吸道或肺组织内炎性细胞数、嗜酸性粒细胞数、炎症细胞因子水平、或血清中抗原特异性IgE型免疫球蛋白的水平,并与对照组比较,其中所述的对照组是给予候选物质的野生型C57小鼠;如果测试组中动物肺组织内炎性细胞数、嗜酸性粒细胞数、炎症细胞因子水平、或血清中抗原特异性IgE型免疫球蛋白的水平在统计学上低于对照组,这表明该候选物质是抗过敏性哮喘的潜在物质。
6. 电压门控质子通道Hv1缺失作为一种引发先天性过敏性哮喘的因素,其特征在于:电压门控质子通道Hv1缺失可增加过敏性哮喘的患病率,用于临床辅助检测。
7. 电压门控质子通道Hv1的激活剂在制备预防,缓解和/或治疗过敏性哮喘药物中的应用。
8. 一种预防,缓解和/或治疗过敏性哮喘的药物,其特征在于:作用于电压门控质子通道Hv1。

## 电压门控质子通道Hv1在治疗过敏性哮喘中的功能和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于基因的功能与应用领域,特别涉及建立电压门控质子通道Hv1敲除小鼠作为过敏性哮喘模型小鼠,Hv1作为药物靶标在筛选治疗过敏性哮喘疾病的药物中应用,以及Hv1的激活剂在制备和/或筛选预防,缓解和/或治疗过敏性哮喘疾病的药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 哮喘是影响全世界3亿人的主要健康问题之一。在过去的几十年中,过敏性哮喘引起的发病率和死亡率一直在上升。过敏性哮喘是一种复杂的肺部炎症性疾病,其特征在于炎症细胞渗入肺组织、气道高反应性(AHR)、杯状细胞粘液分泌过多以及Th2介导的细胞因子(包括IL-4、IL-5和IL-13)过度表达。Th2型细胞因子对于免疫球蛋白IgE的合成、辅助性T细胞向Th2型的转化、杯状细胞的增生和嗜酸性粒细胞的存活至关重要。据报道,过敏性哮喘与Th1/Th2细胞失衡及其特征性细胞因子谱密切相关。在生理条件下,Th1和Th2细胞的免疫反应保持动态平衡。每当这种平衡被打破,疾病就会发生。虽然过敏性哮喘的病理生理学已经被广泛研究,但是大多数现代药物暂时改善了临床症状,并且仍然没有治愈这种疾病的方法。

[0003] Hv1是一种电压门控质子通道,对质子具有高选择性和高电导率,该通道活性依赖于细胞膜电位和细胞内外的pH值,并且温度与氘元素对该通道蛋白的质子电导率和门控动力学机制也具有较大的影响,该通道已经在先天免疫细胞如吞噬细胞中进行了最彻底的研究。在吞噬细胞的呼吸爆发(respiratory burst)期间,NADPH氧化酶(NOX)将电子转移到细胞外空间,将氧转化为 $O_2^-$ , $O_2^-$ 首先被MPO迅速转化为 $H_2O_2$ ,然后转化为HOCl。Hv1在这过程中把NOX产生的 $H^+$ 离子排出细胞内从而维持细胞内恒定的pH值和NOX蛋白的活性。NOXs产生的ROS在自由基生物学和医学中起着双重作用。一方面,在正常生理条件下,活性氧的产生在吞噬作用、细胞信号传导和体内平衡中起重要作用,并且活性氧随后被正常细胞中的清除系统消除。另一方面,在氧化应激条件下,较高的活性氧含量可能氧化细胞脂质、蛋白质和脱氧核糖核酸,导致许多临床疾病恶化,包括炎症、衰老、癌症、神经退行性疾病和心血管疾病。Hv1最近被证明在肺上皮细胞中选择性表达,并且其在肺上皮细胞中的功能是碱性肺内膜液的再酸化。此外,Hv1也被发现在精子中表达,维持精子内恒定的pH值,对精子的活性起着至关重要的作用。微摩尔量级的二价金属离子(如: $Zn^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ )对Hv1的活性有明显的抑制作用,同时油酸、花生四烯酸等对该通道有明显的激活作用。Hv1只含有电压传感结构域(VSD)没有膜孔结构域。Hv1形成二聚体,并且每个亚基含有自己的传输质子的孔隙。Hv1胞内C端结构域形成超螺旋二聚体结构,该结构域不但是整体蛋白形成二聚体的必要结构域,并且对Hv1在细胞膜上的定位起决定性作用。虽然正如我们所报道的,Hv1已经在癌症治疗中得到有效的探索,但是Hv1在哮喘中的抗炎作用尚不清楚。因此,Hv1在炎症中的潜在作用和机制仍需阐明。

## 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种了OVA诱导的小鼠过敏性哮喘模型,应用于过敏性哮喘发病机制的研究及过敏性哮喘治疗药物的研发。同时说明Hv1与过敏性哮喘之间的关系,进而把Hv1的抑制剂和激活剂等相关药物应用于糖尿病的治疗。

[0005] 本发明的目的通过以下技术方案实现:

[0006] 本发明以野生型C57小鼠(WT)与电压门控质子通道Hv1基因敲除小鼠(KO)为实验对象,研究Hv1基因的功能,发现Hv1基因敲除小鼠相比于WT小鼠表现出更严重的过敏性哮喘症状。在检查小鼠支气管肺泡灌洗液和肺组织后,发现与野生型对照动物相比,Hv1缺乏有效地加重了OVA诱导的炎症细胞募集,增加了Th2细胞因子水平和哮喘小鼠粘液产生。另外,与野生型对照动物相比,Hv1缺乏有效地降低了NOXs的表达。这些结果表明敲除Hv1的小鼠会因ROS生成不足而加剧过敏性哮喘的发展。

[0007] 在本发明的第一方面,提供一种电压门控质子通道Hv1基因敲除小鼠的用途,用于制备过敏性哮喘的模型:增加非人哺乳动物肺组织或呼吸道炎性细胞或嗜酸性粒细胞的数量;或用于增加非人哺乳动物肺组织中细胞因子IL-4、IL-5和IL-13的水平。

[0008] 在本发明的第二方面,提供一种电压门控质子通道Hv1基因敲除小鼠的用途,用于以Hv1为靶向制备预防、缓解和/或治疗过敏性哮喘的药物。

[0009] 在本发明的第三方面,提供一种电压门控质子通道Hv1基因敲除小鼠的用途,用于过敏性哮喘发病机制的研究及制备预防,缓解和/或治疗过敏性哮喘的药物的开发研究。

[0010] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0011] (1) 本发明发现Hv1基因的新功能,即Hv1蛋白具有调节过敏性炎症的功能。

[0012] (2) 基于Hv1在过敏性哮喘中的作用,Hv1的激活剂可用于制备预防/缓解和/或治疗过敏性哮喘的药物。

[0013] (3) 基于Hv1在过敏性哮喘中的作用,敲除Hv1可用于制备过敏性哮喘小鼠模型,用于过敏性哮喘发病机制的研究及制备预防,缓解和/或治疗过敏性哮喘的药物的开发研究。

## 附图说明

[0014] 图1是WT(野生)和Hv1<sup>-/-</sup>(KO)小鼠肺泡灌洗液中各类细胞个数的统计结果图(eosinophils(Eos),macrophages(Mac),neutrophils(Neu),and lymphocytes(Lym)).WTC=WT normal group,WT0=WT OVA-challenged group,KOC=KO OVA-challenged group,KOO=KO OVA.\*P<0.05,\*\*P<0.01vs.WTC;##P<0.01,###P<0.001vs.KOC;\$P<0.05,\$\$P<0.01vs.WT0)。

[0015] 图2是OVA诱导的WT和Hv1<sup>-/-</sup>小鼠的肺组织切片图。

[0016] 图3是OVA诱导的WT和Hv1<sup>-/-</sup>小鼠的Th2细胞因子表达的统计结果图(\*P<0.05,\*\*P<0.01vs.WTC;#P<0.05,##P<0.01,###P<0.001vs.KOC;\$P<0.01vs.WT0.)。

[0017] 图4是OVA诱导的WT和Hv1<sup>-/-</sup>小鼠的NADPH氧化酶基因表达的统计结果图(\*P<0.05,\*\*P<0.01vs.WTC;##P<0.01vs.KOC;\$P<0.05,\$\$P<0.01vs.WT0.)。

## 具体实施方式

[0018] 下面结合实例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于

此。

[0019] 实验用动物及饲养

[0020] 实验动物种属,性别,周龄及来源:C57BL/6 (WT) 小鼠,Hv1-KO小鼠 ( $Hv1^{-/-}$ ),雌性,周龄均为6-8周(除明确说明小鼠周龄外)。C57BL/6小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司;Hv1基因敲除小鼠 (Hv1-KO,南开大学自制)。

[0021] 实验动物饲料为标准维持饲料,购自北京科奥协力饲料有限公司:热量百分比:蛋白质20%,碳水化合物70%,脂肪10%;总的热量质量比3.85kcal/g。

[0022] 动物饲养及环境条件:所有的实验小鼠均饲养在南开大学生命科学学院SPF级动物房。每12小时交替照明,温度 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,湿度40%-70%,小鼠自由饮水进食。

[0023] 实施例1过敏小鼠肺泡灌洗液中不同细胞的计数

[0024] (1) 将雌性小鼠被随机分为以下四组:正常组(野生型对照组=WTC,KO对照组=KOC,n=15),模型组(野生型造模组=WT0,KO造模组=K00,n=15)。

[0025] (2) 将50 $\mu\text{g}$  OVA溶于100 $\mu\text{L}$  PBS中,再与100 $\mu\text{L}$ 注射用铝混合制成致敏液。在第0、7和14天于造模组小鼠腹腔注射致敏液,在正常组小鼠腹腔注射除OVA的100 $\mu\text{L}$  PBS与100 $\mu\text{L}$ 注射用铝的混合液。

[0026] (3) 从第21天开始,连续7天用1%OVA溶于PBS对模型组小鼠进行雾化,并用PBS对正常组小鼠进行雾化,每次30min。

[0027] (4) 在最后一次雾化24小时后,用50mg/kg戊巴比妥钠麻醉小鼠,气管插管并收集BALF。即将0.8mL冰冷的PBS滴入肺部,连续3次,收集的BALF并立即于 $4^{\circ}\text{C}$ 离心机内离心5分钟,转速为800转/分。将离心后的上清液于 $-80^{\circ}\text{C}$ 储存,直至用于细胞因子测定,细胞沉淀重悬于PBS中,进行细胞总数和差异计数。

[0028] 肺泡灌洗液中不同细胞的数量是判断过敏性哮喘的重要指标。在造模组的小鼠中,炎症细胞的水平与正常组相比显著增加。此外,与WT0组小鼠相比,K00组小鼠的中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和总细胞数显著增加,而巨噬细胞和淋巴细胞的数量差异无统计学意义(图1)。这一结果表明Hv1基因的缺乏加剧了炎症细胞向气道的募集。

[0029] 实施例2过敏小鼠的肺组织病理学

[0030] (1) 将实施例1中的小鼠安乐死后,于无菌条件下立即取出肺部。

[0031] (2) 右肺立即在液氮中冷冻后粉碎,然后储存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 以备进一步使用。

[0032] (3) 左肺用4%多聚甲醛固定24小时。组织脱水后包埋在石蜡中,切割成5 $\mu\text{m}$ 厚的切片进行染色。

[0033] (4) 切片用苏木精和伊红染色检测炎症浸润和血管充血情况,用过碘酸雪夫染色评价杯状细胞增生情况。

[0034] 通过肺组织病理学染色实验能进一步评估小鼠肺组织炎症情况发现,与正常组小鼠相比,造模后的小鼠显示炎症细胞浸润明显,尤其是支气管周围和血管周炎症细胞浸润明显,特别是淋巴细胞和嗜酸性粒细胞浸润明显。K0OVA对照组小鼠的支气管周围和血管周围的炎症细胞浸润程度明显的高于WT0VA对照组小鼠。另外,PAS染色结果显示,与正常组小鼠相比,造模组小鼠支气管上皮组织显示出较多的杯状细胞增生。而KO OVA对照组小鼠的杯状细胞增生和粘液分泌程度明显的高于WT OVA对照组小鼠(图2)。这些结果表明Hv1缺乏加重OVA诱导的肺组织炎症和杯状细胞增殖。

[0035] 实施例3过敏小鼠的细胞因子检测

[0036] (1) 将实施例1中储存于-80℃的上清液稀释一定的倍数后,用小鼠白介素IL-4/IL-5/IL-13 ELISA kit测量BALF中IL-4、IL-5和IL-13的含量。

[0037] (2) 将实施例2中储存于-80℃的粉末,用苯酚-异硫氰酸胍法提取总核糖核苷酸。逆转录成cDNA后,用实时荧光定量PCR的方法检测肺组织中IL-4、IL-5和IL-13的表达情况。

[0038] 用酶联免疫吸附试验测定BALF中Th2细胞因子(IL-4、IL-5和IL-13)的水平发现,与对照组小鼠相比,造模组小鼠的IL-4、IL-5和IL-13水平显著增加。KO OVA对照组小鼠的IL-13水平明显高于WT OVA对照组小鼠。而肺组织中Th2细胞因子的基因表达与酶联免疫吸附试验结果相似。实时逆转录聚合酶链反应分析显示,与正常组小鼠相比,模型组小鼠的Th2细胞因子(IL-13)的表达显著增加。而IL-4和IL-5的表达水平无统计学差异(图3)。这些结果表明Hv1缺乏增加了OVA诱导的小鼠哮喘模型中Th2细胞因子的表达。

[0039] 实施例4过敏小鼠中NADPH氧化酶的表达

[0040] 将实施例2中储存于-80℃的粉末,用苯酚-异硫氰酸胍法提取总核糖核苷酸。逆转录成cDNA后,用实时荧光定量PCR的方法检测肺组织中NADPH氧化酶的表达情况。

[0041] 通过实时逆转录聚合酶链反应检测了炎症相关基因在肺组织中的表达。与对照组小鼠相比,造模组小鼠的Hv1基因表达下调。Hv1缺乏后,对过敏性气道炎症和粘液分泌至关重要的NOX1、NOX2和NOX4的基因水平显著降低。与WT OVA对照组小鼠,KO OVA小鼠的NOX1、NOX2和NOX4的基因水平显著降低,而DOUX 1和DOUX 2的水平没有统计学差异(图4)。Hv1缺乏显著降低了哮喘模型中OVA诱导的炎症相关基因的表达。

[0042] 上述结果说明Hv1基因影响小鼠体内炎症水平,对过敏性哮喘有重要作用机制。本发明说明敲除Hv1基因会引起小鼠气道炎症水平上升,促进了OVA诱导的炎症细胞募集,增加了过敏性哮喘小鼠Th2细胞因子(IL-4、IL-5和IL-13)水平和粘液分泌的产生,降低了NOXs的表达,并导致过敏性哮喘病。本发明说明Hv1基因敲除小鼠可作为新的过敏性哮喘小鼠模型使用。

[0043] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所做的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

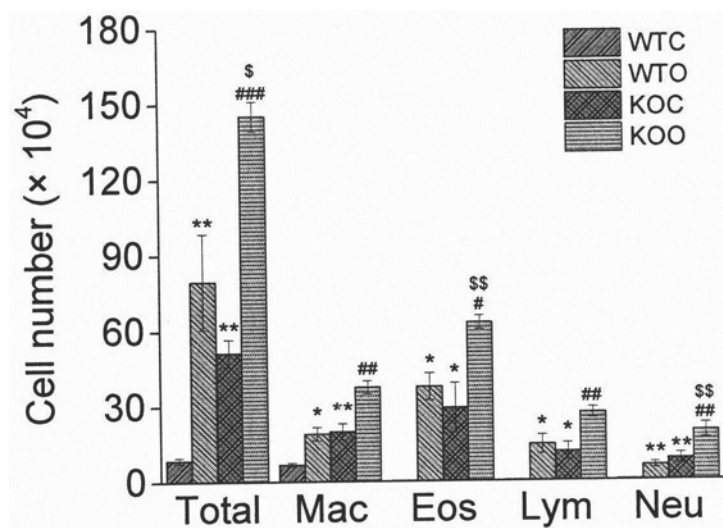


图1

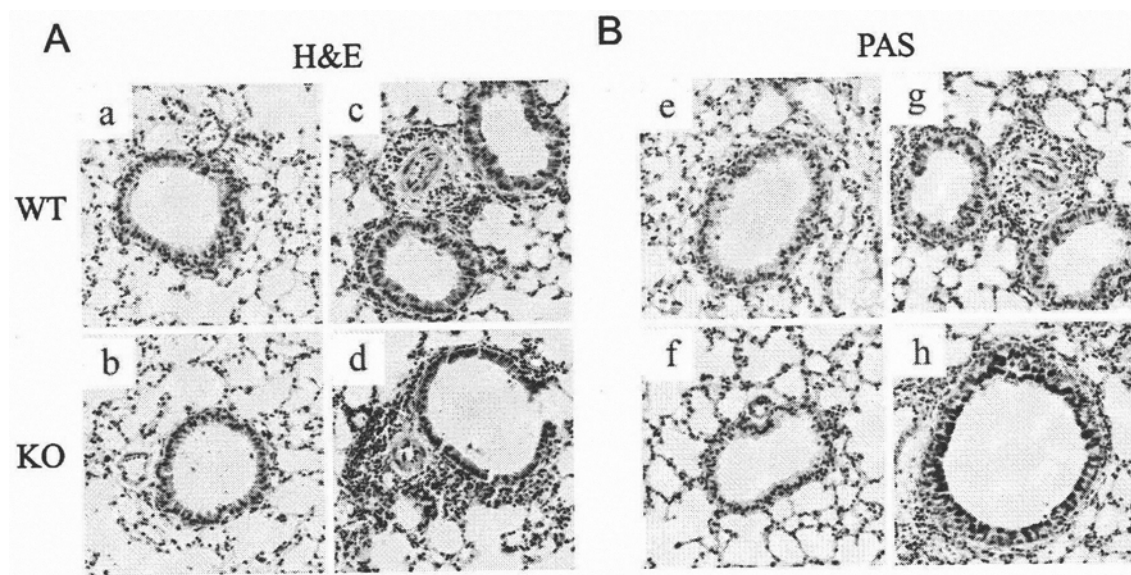


图2

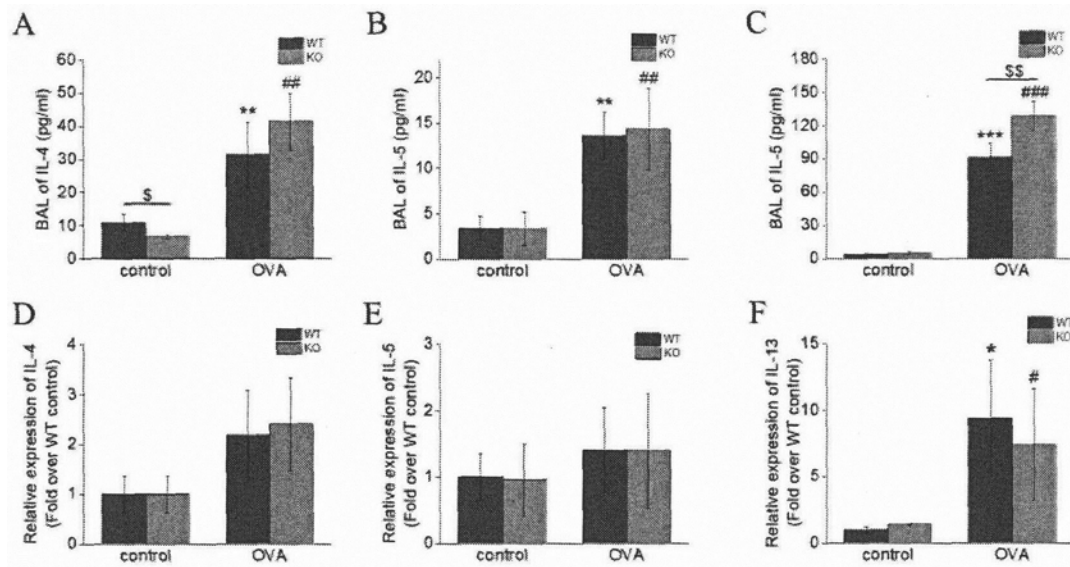


图3

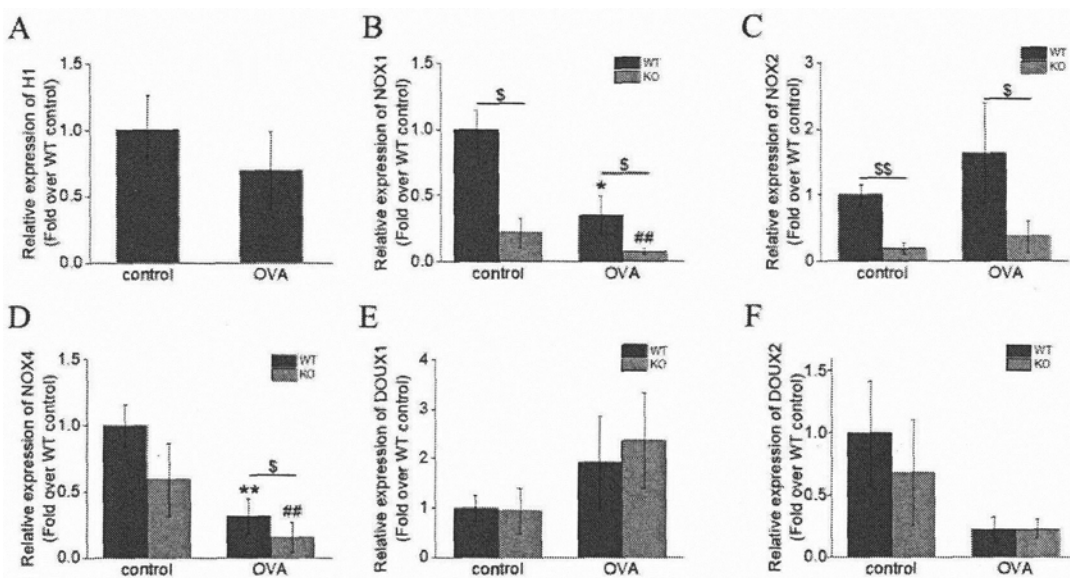


图4



专利名称(译)	电压门控质子通道Hv1在治疗过敏性哮喘中的功能和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110547257A</a>	公开(公告)日	2019-12-10
申请号	CN201910962290.0	申请日	2019-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	南开大学		
申请(专利权)人(译)	南开大学		
当前申请(专利权)人(译)	南开大学		
[标]发明人	李树杰 杜鸿雁		
发明人	李树杰 杜鸿雁		
IPC分类号	A01K67/027 A61K49/00 A61K45/00 A61P11/06 A61P37/08 G01N33/535 G01N1/30		
CPC分类号	A01K67/027 A01K2227/105 A01K2267/03 A61K45/00 A61K49/0008 A61P11/06 A61P37/08 G01N1/30 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了电压门控质子通道Hv1蛋白在过敏性哮喘产生过程中的作用，建立的良好过敏性哮喘小鼠模型，属于医学领域。通过研究Hv1蛋白，与野生型C57(WT)小鼠对比，我们发现Hv1基因敲除小鼠(KO)在用卵清蛋白(OVA)致敏和刺激后的过敏性气道炎症水平明显高于对照组，即患有过敏性哮喘病症。在检查血清、支气管肺泡灌洗液(BALF)和肺组织病理学后，我们发现Hv1缺乏明显地促进了OVA诱导的炎症细胞募集，增加了过敏性哮喘小鼠Th2细胞因子水平和粘液分泌的产生。进一步的实验发现，Hv1缺乏明显地降低了NOXs的表达，这些结果表明Hv1基因敲除通过抑制ROS的产量使过敏性哮喘的患病率增加。针对Hv1的功能，可用于制备预防，缓解和/或治疗过敏性哮喘的药物。

