



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111693716 A

(43)申请公布日 2020.09.22

(21)申请号 202010570568.2

(22)申请日 2020.06.19

(71)申请人 中国科学院昆明动物研究所  
地址 650000 云南省昆明市五华区教场东路32号

(72)发明人 赖仞 唐小芄 常佳佳

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569  
代理人 马云华

(51)Int.Cl.  
G01N 33/68(2006.01)

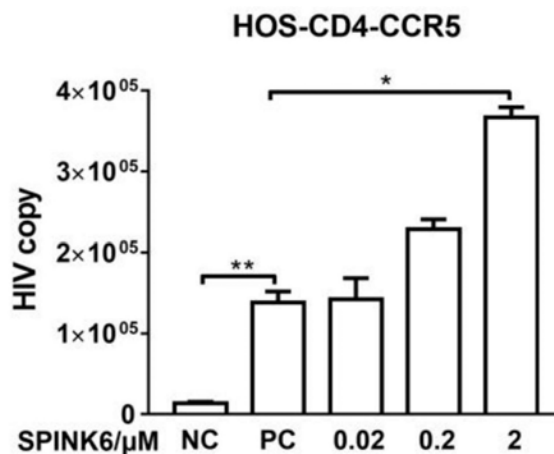
权利要求书1页 说明书5页  
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

SPINK6在作为检测艾滋病的标志物中的应用

(57)摘要

本发明提供了SPINK6在作为检测艾滋病的标志物中的应用,属于生物医学技术领域,SPINK6通过抑制白三烯A4水解酶的环氧化物水解酶活性,促进HIV病毒侵染机体,可作为检测艾滋病的标志物。



1. SPINK6在作为检测艾滋病的标志物中的应用。
2. SPINK6在制备作为LTA4H内源性抑制剂和作为抑炎因子抑制白三烯A4水解酶的环氧化物水解酶活性,在下游相关炎症性疾病调控的药物中的应用。
3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述SPINK6的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,编码所述SPINK6的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示。

## SPINK6在作为检测艾滋病的标志物中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,尤其涉及SPINK6在作为检测艾滋病的标志物中的应用。

### 背景技术

[0002] 获得性免疫缺陷综合征是一种免疫缺陷疾病,是由人类免疫缺陷病毒(HIV)感染引起的一种死亡率较高、危害性极大疾病,T细胞免疫功能缺陷是这种疾病的主要特征。根据2017年的世界卫生组织数据统计,显示世界上有3690万人感染上HIV,并且这一数值还在不断上升中。目前阶段针对HIV感染诊断方式主要是检测HIV感染者体液中病毒抗原和抗体的方法,抗体检测尤其普遍,但在抗体检测应用过程中,面临灵敏度不高以及检测费用昂贵并且HIV病毒的高度变异性的特点,对HIV进行诊断与检测的试剂仍存在不足与缺陷。所以开发探究相关检测标志物具有巨大的社会需求以及重要的社会意义。

[0003] LTB<sub>4</sub>-BLT信号通路参与机体的防御反应和炎症病理过程。免疫效应T细胞通过LTB<sub>4</sub>-BLT信号通路发生迁移,参与机体炎症和免疫反应。LTB<sub>4</sub>是花生四烯酸的代谢产物,具有募集炎症细胞和淋巴细胞到炎症部位的功能,例如它可以激活白细胞并诱导一些细胞因子如IL-2的分泌。LTA<sub>4</sub>H(白三烯A<sub>4</sub>水解酶)是催化LTB<sub>4</sub>生成的关键酶,是抗炎药物设计的重要靶标。目前还未发现LTA<sub>4</sub>H内源性的抑制剂。LTA<sub>4</sub>H分子结构显示,其环氧化物水解酶以及氨肽酶的两个活性口袋部位重叠,因而它的抑制剂往往同时抑制两种活性。当LTA<sub>4</sub>H作为水解酶时,底物LTA<sub>4</sub>结合口袋结合LTA<sub>4</sub>,水解生成炎性介质LTB<sub>4</sub>。当LTA<sub>4</sub>H作为氨肽酶时,另一口袋可以结合趋化三肽,降解趋化三肽,具有炎症抑制的作用。因而LTA<sub>4</sub>H是一个含锌的双功能酶,具有促炎与抑炎的双重活性。LTB<sub>4</sub>具有很高的生理活性,在许多炎症疾病、免疫系统疾病、肿瘤的发生及变态反应以及细胞的增殖和分化过程中发挥着重要作用,对LTB<sub>4</sub>的研究也扩大到转录、HIV以及免疫学方面。BLT是其特异性受体。LTB<sub>4</sub>通过与其受体结合发挥作用。该通路是研究炎症免疫发生机制的新途径,通过干预LTB<sub>4</sub>-BLT信号通路对于免疫抑制、器官移植免疫抑制以及抑制HIV进入细胞都十分有用,可作为一种治疗和干预慢性炎症等疾病的新靶点。

[0004] SPINK6(SerineProteaseInhibitorofKazal-type6)是最近发现的丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的新成员,SPINK6氨基酸序列在多种生物中高度保守,而且在多种重要的组织中都有表达,显示其在进化中的重要性。目前相关的研究主要是关于SPINK6抑制KLK(激肽释放酶)家族的活性而参与的一些疾病的发生发展,关于SPINK6与炎症靶点LTA<sub>4</sub>H作用参与疾病调控的功能方面研究并未报道。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供SPINK6在作为检测艾滋病的标志物中的应用,SPINK6可作为检测艾滋病的标志物。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供了以下技术方案:

[0007] 本发明提供了SPINK6在作为检测艾滋病的标志物中的应用。

[0008] 本发明还提供了SPINK6在制备作为LTA4H内源性抑制剂和作为抑炎因子抑制白三烯A4水解酶的环氧化物水解酶活性,在下游相关炎症性疾病调控的药物中的应用。

[0009] 优选的,所述SPINK6的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0010] 优选的,编码所述SPINK6的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示。

[0011] 本发明提供了SPINK6在作为检测艾滋病的标志物中的应用,SPINK6在HIV侵染的细胞中的表达量显著上调,并且通过抑制白三烯A4水解酶的环氧化物水解酶活性,促进HIV病毒侵染机体,可作为检测艾滋病的标志物。

## 附图说明

[0012] 图1为SPINK6对LTA4H双重酶活性的影响,其中(A)表面等离子共振检测SPINK6与LTA4H之间的相互作用;(B)高压液相色谱检测SPINK6对LTA4H的环氧化物水解酶活性的影响;(C)高压液相色谱检测SPINK6对LTA4H的环氧化物水解酶活性的影响的统计;(D)酶联免疫吸附测定法检测SPINK6对LTA4H的环氧化物水解酶活性的影响;(E) SPINK6对LTA4H的天然三肽底物氨肽酶活性的影响;(数据代表平均值±标准差,n=3,\*\*代表p<0.01,N.S.代表没有显著差异);

[0013] 图2为免疫抑制实验结果,其中加药SPINK6处理THP-1细胞后,用LPS诱导炎症反应,利用酶联免疫吸附测定法检测细胞上清中炎症因子IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 的表达水平(n=3,\*\*代表p<0.01);

[0014] 图3为HIV病人的血浆SPINK6含量,其中对收集的HIV阳性以及阴性志愿者的血浆(各12例)进行酶联免疫吸附实验,检测血浆中的SPINK6蛋白表达水平(n=12,\*p<0.05);

[0015] 图4为HIV病毒感染后细胞内SPINK6的表达水平,其中(A) HIV-1感染CD4T淋巴细胞后,细胞内SPINK6以及LTA4H的表达水平;(B) HIV-1感染人H9T淋巴细胞后,细胞内SPINK6以及LTA4H的表达水平;(C) HIV-1两种病毒亚型感染人HOS-CD4-CCR5,HeLa-T4,Tzm-b1细胞后,SPINK6表达水平;(NC为未被HIV病毒感染,PC为感染组,数据代表平均值±标准差,n=3,\*p<0.05);

[0016] 图5为SPINK6对HIV病毒侵染率的影响,图中是利用SPINK6预处理原代CD4细胞,将HIV-1病毒与细胞进行孵育,检测病毒在细胞中的拷贝数。(NC为未感染组,PC为感染组,数据代表平均值±标准差,n=3,\*p<0.05)。

## 具体实施方式

[0017] 本发明提供了SPINK6在作为检测艾滋病的标志物中的应用。在本发明中,所述SPINK6通过抑制白三烯A4水解酶的环氧化物水解酶活性,促进HIV病毒侵染机体,可作为检测艾滋病的标志物。

[0018] 在本发明中,所述SPINK6有57个氨基酸,分子量约为6063,分子内具有两对二硫键维持分子内部稳定的结构。在本发明中,所述SPINK6氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,具体如下:

[0019] QGGQVDCGEFQDPKVYCTRESNPHCGSDGQTYGNKCAFCKAIVKSGGKISLKHGPKC。

[0020] 在本发明中,编码所述SPINK6的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示,具体如下:

[0021] tcagggaggacaggttgactgtggtgagttccaggaccccaaggtctactgcactcgggaatctaacc  
cac actgtggctctgatggccagacatatggcaataaatgtgccttctgtaaggccatagtgaaaagtggtgaa  
agatta gcctaaagcatcctggaaaatgctga。

[0022] 本发明还提供了SPINK6在制备作为LTA4H内源性抑制剂和作为抑炎因子抑制白三烯A4水解酶的环氧化物水解酶活性,在下游相关炎症性疾病调控的药物中的应用。本发明对所述药物的剂型没有特殊限定,采用SPINK6在医学上可接受的剂型即可,本发明对所述药物中SPINK6的含量没有特殊限定,采用常规药物中活性物质的含量即可。在本发明中,所述药物以SPINK6为唯一活性物质,本发明对所述药物的制备方法没有特殊限定,采用常规方法制备即可。

[0023] 在本发明中,所述SPINK6抑制IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达,表明SPINK6具有免疫抑制作用,是一个抑炎因子。

[0024] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0025] 实施例1

[0026] SPINK6多肽的诱导表达及活性鉴定

[0027] 将SPINK6对应的序列按照大肠杆菌密码子优化并合成基因,构建PET-32a原核表达载体,表达宿主菌为BL21。设置肠激酶切割位点。将得到的甘油菌进行平板划线活化后,菌液37 $^{\circ}$ C,160rpm小摇过夜,28 $^{\circ}$ C IPTG诱导表达3-5h;SPINK6的扩培过夜,收菌,Bindingbuffer重悬后破碎。使用亲和纯化的方法,利用镍柱纯化融合蛋白后肠激酶酶切融合蛋白,选择最佳酶切条件(将肠激酶的浓度定为0.5U/ml,50 $\mu$ L的反应体系中,设置加入的肠激酶的梯度为1U,SPINK6浓度为10mg/ml;21 $^{\circ}$ C孵育16h)进行SPINK6融合蛋白的大量酶切。利用HPLC高效液相色谱分析与分离进一步纯化蛋白(A液:超纯水+0.1%三氟乙酸,B液:乙腈+0.1%三氟乙酸,本方法使用的是HPLC-C4制备柱分纯,初次进样采用一分钟一个B液梯度)。结果:利用质谱鉴定分子量的大小,显示体外表达得到SPINK6的成熟肽。检测SPINK6对丝氨酸蛋白酶类(rhKLK14,Trypsin)的抑制活性(选取适量SPINK6与所要检测酶类混匀后在室温条件下孵育5-10min后立即加入发色底物,利用酶标仪于405nm处检测酶动力学曲线。设置酶动力学程序:检测持续时间30min,每间隔30s检测一次,发色底物的发射光波长为405nm)。结果:体外表达得到具有丝氨酸蛋白酶类的抑制活性的SPINK6蛋白。

[0028] 实施例2

[0029] 检测SPINK6对LTA4H的结合与活性影响

[0030] (1) 结合实验:

[0031] 表面等离子共振检测SPINK6与LTA4H的相互作用。将LTA4H偶联到芯片上,使用流动相SPINK6浓度二倍稀释(800nM,400nM,200nM,100nM,20 $\mu$ l/min,结合2min),用GraphPadPrism7.0作图得到结合曲线(图1中的A),结果:SPINK6与LTA4H之间有一定的相互作用。

[0032] (2) 活性实验:

[0033] 利用HPLC以及Elisa方法检测SPINK6对LTA4H环氧化物水解酶活性的影响(图1中的B-D),利用茚三酮法检测SPINK6对LTA4H水解其天然三肽底物的氨肽酶活性的影响(图1中的E)。HPLC检测SPINK6对LTA4H环氧化物水解酶活性的影响步骤:LTA4甲酯冷冻干燥后活

化(制备LTA4:100 $\mu$ g LTA4甲酯冷冻干燥,加入冰甲醇:NaOH(50%)=9:1的混合液50 $\mu$ l,4 $^{\circ}$ C放置3h,-20 $^{\circ}$ C存放待用);反应组有:LTA4组,LTA4+LTA4H组,LTA4+LTA4H+不同浓度SPINK6组;反应:不同浓度梯度的SPINK6/等量PBS加入LTA4H,37 $^{\circ}$ C孵育15-30min,加入LTA4底物,37 $^{\circ}$ C孵育20min,再加入冰甲醇终止反应;RP-HPLC分析LTB4的生成:C18分析柱,流动相为甲醇:水:乙酸=70:30:0.0025,流速1ml/min,检测波长270nm。Elisa分析LTB4的生成:加入甲醇终止反应后,取出500 $\mu$ l冻干,100 $\mu$ l体积重悬,利用Elisa方法检测LTB4的含量。茚三酮法检测SPINK6对LTA4H水解其天然三肽底物的氨肽酶活性的影响。步骤如下:1.孵育。LTA4H与不同浓度的SPINK6混匀,37 $^{\circ}$ C下孵育20-25min,加入三肽底物(Pro-Gly-Pro),37 $^{\circ}$ C反应20min;2.将体积稀释10倍(终体积为

[0034] 关免疫细胞感染HIV-1后SPINK6表达水平200 $\mu$ l),加入等体积的冰醋酸与茚三酮(25mg/ml于醋酸与6M磷酸中,加热70 $^{\circ}$ C溶解);3.将反应混合物于100 $^{\circ}$ C加热45min,冷却至室温;

[0035] 4.用400 $\mu$ l甲苯萃取,30s震荡,静置片刻,使色素全部转移至甲苯层,用酶标仪于520nm处检测吸光值并用GraphPadPrism7.0作图,采用非配对t检验判定组间差异。

[0036] 结果:SPINK6浓度为0.4 $\mu$ M时就可以显著抑制白三烯A4水解酶的环氧化物水解酶活性,而浓度为10 $\mu$ M时对LTA4H的氨肽酶活性都没有影响。

[0037] 实施例3

[0038] 免疫抑制实验

[0039] 含100ng/ml PMA的1640培养基刺激THP-1贴壁,过夜,更换正常1640细胞培养基,培养24h;饥饿处理6-12h,每孔加药SPINK6孵育5-10min,NC组加等量PBS,加LPS(2 $\mu$ g/ml)孵育6-8h,收取细胞上清,利用Elisa方法检测IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 的含量,用GraphPadPrism7.0作图,采用非配对t检验进行组间的差异性判定(图2)。结果:SPINK6对LPS诱导THP-1细胞产生炎症因子IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 具有抑制作用,即SPINK6具有免疫抑制作用。

[0040] 实施例4

[0041] 搜集HIV感染以及未感染人的血浆各12例,删除极端值,作图统计。结果:HIV阳性血浆中SPINK6表达水平显著上调(图3)。

[0042] 实施例5

[0043] 相关免疫细胞感染HIV-1后SPINK6表达水平

[0044] HIV-1感染的人CD4T淋巴细胞(感染72h),人H9T淋巴细胞以及HIV-1YU2以及HIV-1IIIIB感染的人HOS-CD4-CCR5,HOS-CD4-CXCR4,HeLa-T4,THP-1,Tzm-b1,MT-4,C8166的处理细胞样品的获得。 $\beta$ -actin作为控制上样的内参。数据代表平均值 $\pm$ 标准差,并通过非配对t检验判定组间差异(NC:未感染组,PC:感染组,图4)。结果:从免疫印迹实验方面证实在细胞水平上,HIV-1侵染人体的一些免疫细胞后会引引起SPINK6表达上调。HIV-1与CD4T淋巴细胞进行72h孵育后,无论是否有PHA对CD4T淋巴细胞进行活化,在HIV-1感染细胞前后,SPINK6的表达量都呈现显著上调的现象。而LTA4H的表达量没有差别(图4中的A)。针对人H9T淋巴细胞病毒感染实验,HIV-1与细胞进行孵育后,在4h,16h以及72h的孵育后,SPINK6的表达量较HIV-1与细胞孵育0h以及NC组相比,表达量上调,且差异显著,LTA4H的表达量没有差别(图4中的B)。另外,我们选取了HIV-1病毒的两种亚型随机进行靶细胞的感染实验,结果表明,HIV-1YU2以及HIV-1IIIIB侵染人HOS-CD4-CCR5,HeLa-T4,Tzm-b1细胞后,被HIV病毒感染

的HOS-CD4-CCR5, Tzm-b1细胞在24h时,感染前后的SPINK6表达水平差异显著,呈现SPINK6的表达上调(图4中的C)。

[0045] 实施例6

[0046] 绝对定量Real-timePCR检测HIV-1拷贝数

[0047] 提取感染HIV病毒后的靶细胞中的RNA,将各组样品/标准品(用来做标准曲线)的RNA浓度稀释至同一浓度,按照以下表格组份在冰上配制PCR反应液,同时设置无模板的阴性对照。每组重复三次(图5)。结果:SPINK6孵育原代CD4细胞后,HIV-1病毒侵染人HOS-CD4-CCR5细胞后细胞内的病毒拷贝数增加,说明SPINK6通过干预LTB4-BLT信号通路,促进HIV-1病毒侵染HOS-CD4-CCR5细胞。

[0048] Real-timePCR反应体系(反应总体积为20 $\mu$ l):

[0049] 表1反应体系

| 组分                              | 体积                                       |
|---------------------------------|--|
| RNA Template                    | Variable (根据 RNA 浓度 (40 ng/ml) 稀释后所需的体积) |
| Probe                           | 0.8 $\mu$ l                              |
| RNA-direct Mix                  | 10 $\mu$ l                               |
| PCR Forward Primer (10 $\mu$ M) | 0.6 $\mu$ l                              |
| PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M) | 0.6 $\mu$ l                              |

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| 50 mM Mn(OAc) <sub>2</sub> | 1 $\mu$ l  |
| 灭菌水                        | Variable   |
| Total                      | 20 $\mu$ l |

[0052] 表2程序

|                         | 温度   | 时间  |
|-------------------------|------|-----|
| Stage 1: 预变性 循环数: 1     | 95°C | 30s |
| Stage 2: PCR 反应 循环数: 40 | 95°C | 5s  |
|                         | 60°C | 34s |

根据标准品 RNA 模板做出的标准曲线, 可知病毒模板在所侵染细胞中的浓度, 即可知病毒拷贝数

[0054] 由以上实施例可以得出,SPINK6可作为艾滋病检测的一个标志物以及治疗靶点,SPINK6作为LTA4H内源性的抑制剂,对LTA4H环氧化物水解酶活性具有抑制作用且呈现浓度依赖的关系,具有潜在的生物学应用价值。

[0055] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。





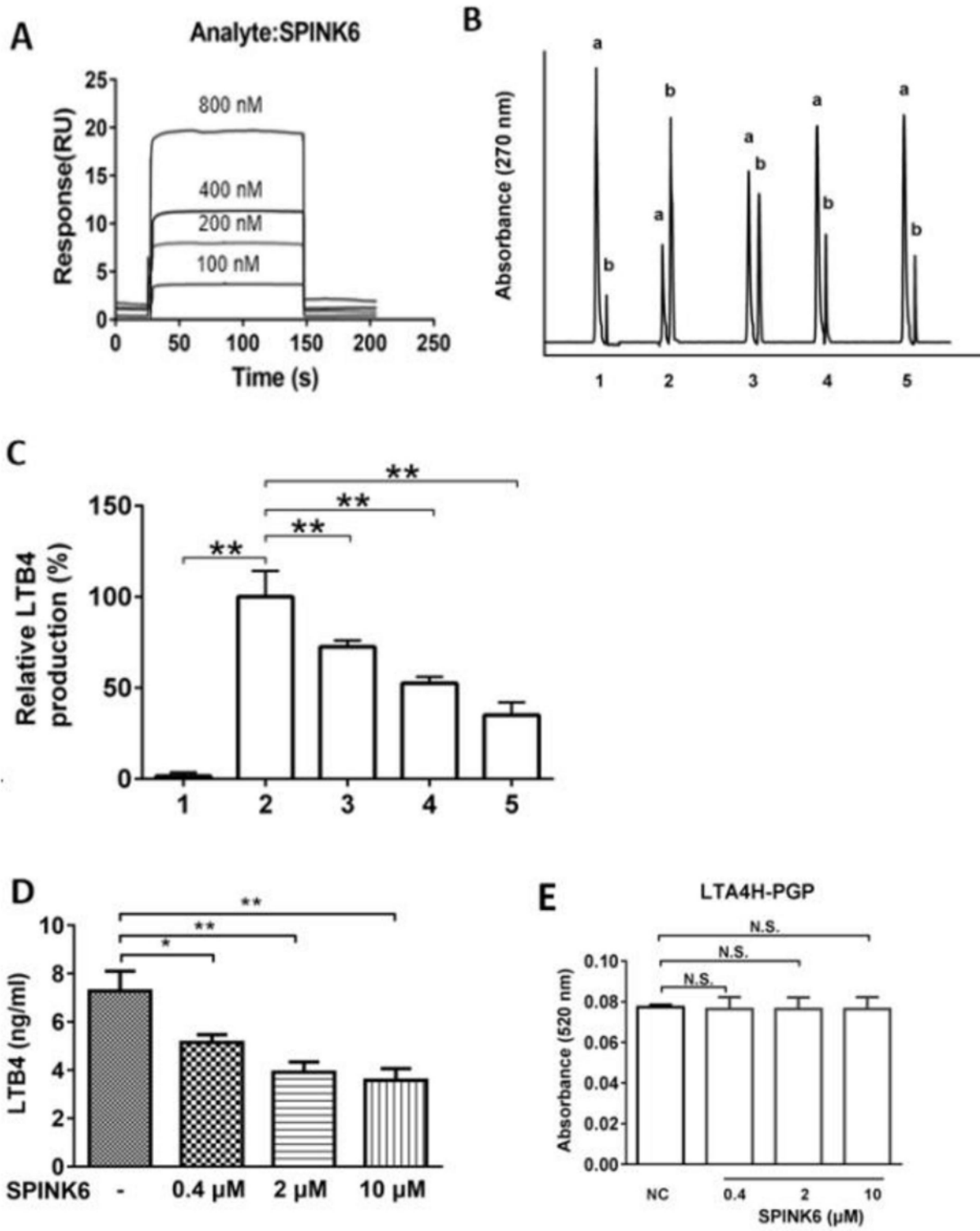


图1

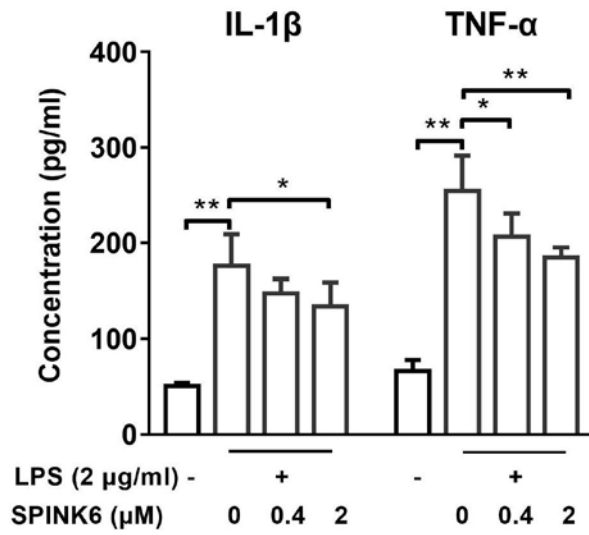


图2

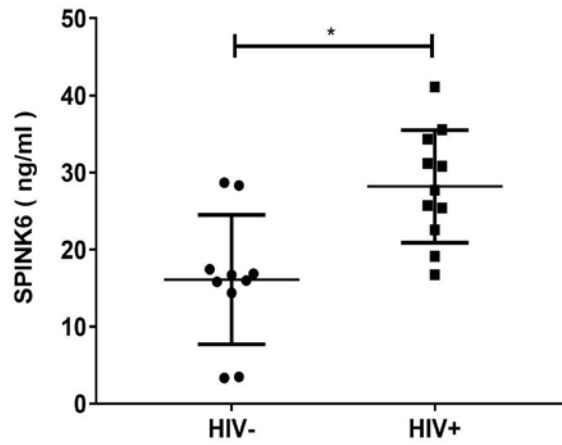


图3

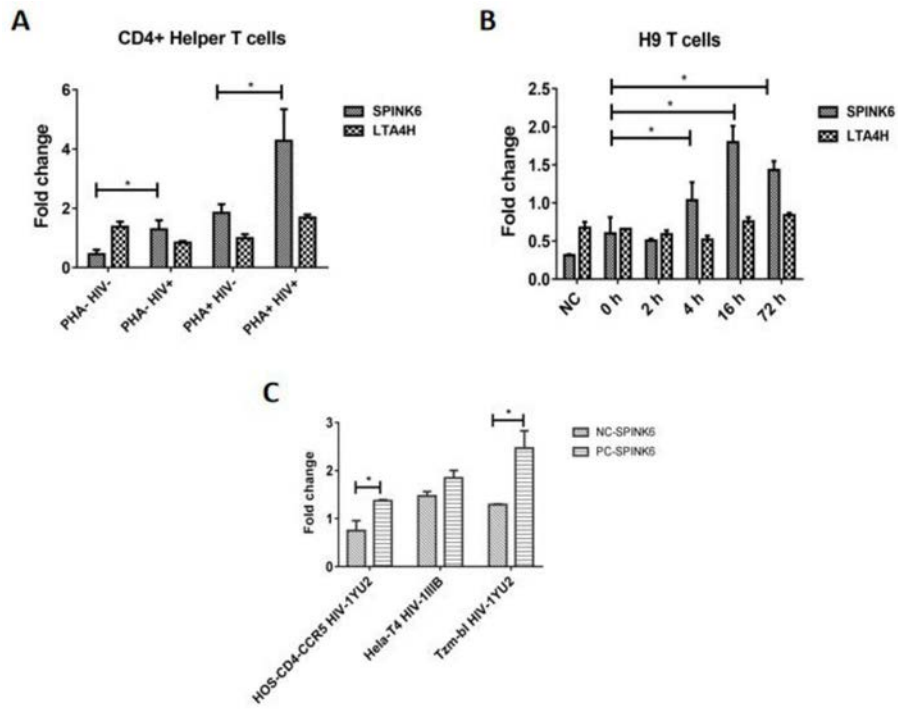


图4

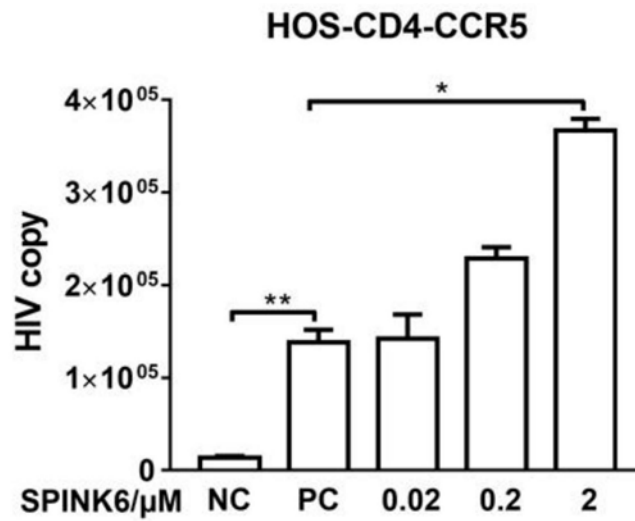


图5