

青春期 CLOCK 基因缺陷小鼠的自杀相关行为研究

摘要:

对于人类自杀的研究已经有许多，但至今还未有比较公认的动物自杀模型。本课题以昼夜节律相关基因——CLOCK 基因的缺陷小鼠模型为基础，通过检测自杀特征行为学相关实验探讨其作为自杀动物模型的可能性，并且设计了可能能够直接观察到小鼠自杀的行为学装置，以探究能否实现动物自杀模型的建立，并使用药物进行治疗和验证，为动物自杀模型相关的研究提供参考借鉴。

一、题目的立项依据

1. 立项依据:

自杀是指自发完成的、故意的行动后果，行为者本人完全了解或期望这一行动的致死性后果。自杀占全球过早死亡的 78.1%，是一个重大的社会和医疗问题。这其中，精神疾病是自杀的重要风险因素，而双相情感障碍(bipolar disorder, BD)患者是所有精神疾病中自杀率最高的，大约是普通人群的 20-30 倍^[1]。尽管自杀是一种复杂的行为，不可能在动物中完全复制，但根据跨物种相似性以及自杀相关的性状，使用动物模型可以帮助阐明与自杀思维和行为相关的机制^[2]。内表型(endophenotype)指的是生物状态的可测量指标。自杀的生化内表型包括 HPA 轴、血清素(5-HT)及其受体、炎症因子等的变化，其行为表现为绝望无助、快感缺乏、睡眠失调、冲动性、易怒、攻击性等^[3,4]。如今，在常见的啮齿动物模型，如小鼠中，与自杀相关的四种特性，包括攻击、冲动、易怒和绝望无助^[2]，都分别能够被分别较好地建立和模拟。然而，**尽管从 1980 年开始学者们就尝试建立动物自杀模型^[5]，但直到 2011 年仍没有比较公认的动物自杀模型^[6]**，在此之后也没有动物自杀模型见刊。

自杀同样是 15-29 岁人群的第四大死因。临床证据表明，年轻的自杀意图者，如青少年，在尝试自杀时比成人使用更多的药物、更多地自残行为，表现出更多的冲动性。在啮齿动物中，**产后 36-59 天大致对应于的青少年时期，也许说明在这个时期观察到动物出现自杀行为的可能性更高**。CLOCK 蛋白是控制昼夜节律的分子转录、翻译反馈环的关键蛋白，其 $\Delta 19$ 位点突变的小鼠会产生显性阴性的 CLOCK 蛋白。这样的小鼠表现出快速的情绪循环^[7]，在夜间一段时间的心境正常之后，白天出现过度活跃，表现出更大的冲动性，更少的睡眠，更少的行为绝望^[8]，这样的 **CLOCK^{delta19} 小鼠是一种双相障碍躁狂模型**。此外有研究发现，用 AAV 病毒携带 shRNA 对小鼠腹侧被盖区(VTA)特异性敲低 CLOCK 基因表达可以使小鼠产生躁狂和抑郁的混合表现^[9]，除了躁狂外还存在绝望、无助的抑郁

表型。因此，突变或敲低 *CLOCK* 基因表达构建有自杀特征行为的小鼠模型是一个可能的方向。

2. 参考文献

- [1] Miller J N, Black D W. Bipolar Disorder and Suicide: a Review[J]. Current Psychiatry Reports, 2020, 22(2): 6.
- [2] Malkesman O, Pine D S, Tragon T, et al. Animal models of suicide-trait-related behaviors[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2009, 30(4): 165-173.
- [3] Gould T D, Georgiou P, Brenner L A, et al. Animal models to improve our understanding and treatment of suicidal behavior[J]. Translational Psychiatry, 2017, 7(4): e1092.
- [4] Lamontagne S J, Ballard E D, Zarate C A. Effects of stress on endophenotypes of suicide across species: A role for ketamine in risk mitigation[J]. Neurobiology of Stress, 2022, 18: 100450.
- [5] deCatanzaro D. Human suicide: a biological perspective[J]. Behavioral and Brain Sciences, 1980, 3(2): 265-272.
- [6] Preti A. Animal model and neurobiology of suicide[J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2011, 35(4): 818-830.
- [7] Sidor M M, Spencer S M, Dzirasa K, et al. Daytime spikes in dopaminergic activity drive rapid mood-cycling in mice[J]. Molecular Psychiatry, 2015, 20(11): 1406-1419.
- [8] Logan R W, Ozburn A R, Arey R N, et al. Valproate reverses mania-like behaviors in mice via preferential targeting of HDAC2[J]. Molecular Psychiatry, 2021, 26(8): 4066-4084.
- [9] Mukherjee S, Coque L, Cao J L, et al. Knockdown of Clock in the Ventral Tegmental Area Through RNA Interference Results in a Mixed State of Mania and Depression-Like Behavior[J]. Biological Psychiatry, 2010, 68(6): 503-511.
- [10] Van Enkhuizen J, Minassian A, Young J W. Further evidence for Clock Δ 19 mice as a model for bipolar disorder mania using cross-species tests of exploration and sensorimotor gating[J]. Behavioural Brain Research, 2013, 249: 44-54.
- [11] 曾义准, 张陶, 徐璿. 分析小鼠昼夜节律变化的行为学方法[J]. 遗传, 2022, 44(4): 346-360.

二、研究目的、研究目标，解决的关键问题

1. 总的研究框架

(1) 提出假说

在昼夜节律失调的青春期 *CLOCK* ^{Δ 19} 小鼠以及 shRNA 处理的小鼠中，能观察到如攻击性强、冲动、易怒等自杀特征相关行为以及自杀行为，并且可以通过氯氮平等药物缓解。

(2) 研究框架

首先，购买或构建 *CLOCK* ^{Δ 19} 雌雄小鼠，合笼繁育获得产后 36-59 天的青春期雌雄 *CLOCK* ^{Δ 19} 小鼠，对照小鼠为进行同样操作处理的 C57BL/6 小鼠。

其次，分组检测 36-59 天内 $CLOCK^{\text{delta19}}$ 小鼠和对照小鼠 7 天内每天的活动情况，以确定 $CLOCK^{\text{delta19}}$ 小鼠确实出现昼夜节律的变化；并检测自杀特征相关行为学表现，研究 $CLOCK^{\text{delta19}}$ 小鼠在攻击性、冲动性、易怒等方面与对照小鼠的差异。并可补充用 shRNA 方法对青春期正常小鼠特异性敲低 VTA 的 CLOCK 基因表达的组别，并检测习得性无助(Learned helplessness)、强迫游泳(Forced swim test)等行为。

之后，设计可能观察并检测出小鼠出现主动的自杀的行为学范式。如主动被捕食、主动坠亡、主动用利器、毒药等结束生命等，比较 $CLOCK^{\text{delta19}}$ 小鼠和对照小鼠的行为差异，以进一步研究 $CLOCK^{\text{delta19}}$ 小鼠中是否存在直接的自杀行为，并辅以检测小鼠体内 5-HT 水平、HPA 轴激素等的变化。

最后，通过使用临床上常用的能够缓解自杀行为的药物进行治疗，观察能否产生行为的改善，以探究该模型是否与临床药物治疗后的表现相一致。药物包括氯化锂、氯氮平、丙戊酸盐等。

2. 研究内容

(1) 检测小鼠的昼夜节律变化情况^[10,9]。

(2) 检测小鼠的自杀特征相关行为表现。攻击性使用雌性激励的居民-侵入者范式(Resident-Intruder Paradigm with a Female Priming)；冲动性使用操作性延迟强化任务(Operant delayed reinforcement task)；易怒性用在被限制的情况下试图挣扎(Attempts to struggle while being restrained)；补充的 shRNA 组表现为混合表型，可检测习得性无助(Learned helplessness)、强迫游泳(Forced swim test)及蔗糖偏好实验(sucrose preference test)。

(3) 检测直接自杀行为的产生，观察小鼠是否能产生直接的自杀行为。

(4) 检查临床药物治疗对小鼠行为改善的效果，并辅以检测 5-HT、皮质醇等分子在小鼠体内的变化情况。

3. 研究的目的

通过行为学测试、体内 5-HT、CORT 等分子的检测，以及药物治疗等方法，探索并讨论 $CLOCK^{\text{delta19}}$ 小鼠作为一种自杀特征行为的动物模型的可能性，以更好地研究自杀相关的神经环路、临床治疗方法等等，为之后对自杀动物模型的研究提供参考。

4. 拟解决的关键问题

确定由昼夜节律诱导的双相情感障碍青春期 $CLOCK^{\text{delta19}}$ 小鼠模型是否能建立一种自杀行为动物模型。

三 拟采取的研究方案及可行性分析

1 研究方案

我们将并行进行以下实验：

实验 1——检测小鼠的昼夜节律变化

通过测量节律变化，验证突变或敲低 CLOCK 基因所建立的模型小鼠是否存在昼夜节律的异常。使用跑轮检测法，在 12 小时的光暗循环下对小鼠踏转轮的活动进行 7 天的监测，后持续黑暗记录 15 天，以检测其行为节律性、节律的静息期和黑暗期的时间变化以及其中不同阶段的活动情况。根据跑轮记录到的小鼠在持续黑暗下活动可以计算得到小鼠的内在节律周期。

$$\tau = 24 - \Delta t / n(h)$$

其中 τ 代表周期， Δt 表示活动起跳点迁移的时间， n 表示持续黑暗中的天数；公式中 $\Delta t/n$ 是小鼠跑轮起跳点的斜率^[11]。若小鼠在静息期表现出活动水平的增加，在黑暗期表现出不稳定的活动，表明节律幅度较低。

实验 2——检测小鼠的自杀特征相关行为

(1) 测量雄鼠攻击性(aggressiveness)：雌性激励的居民-侵入者范式(Resident-Intruder Paradigm with a Female Priming)

具体步骤如下：

- a. 雌性激励阶段：将一个雌性小鼠与居民雄鼠放置在同一笼子中，允许它们在一起接触 60 分钟。这个时间段允许雄鼠形成对雌鼠的兴奋和兴趣，激发其攻击行为。
- b. 雌鼠移除阶段：在雌性激励阶段结束后，将雌鼠从笼子中移除，使居民雄鼠暂时失去与雌性的社交机会。
- c. 侵入者雄鼠引入阶段：在雌鼠移除后的 10 分钟内，将一个陌生的侵入者雄鼠 (intruder) 放置到居民雄鼠的领地中。
- d. 观察行为反应：观察和记录居民雄鼠对侵入者雄鼠的攻击行为、防御行为、逃避行为以及社交行为等行为参数。

通过分析和比较小鼠的攻击行为、防御行为、逃避行为、社交行为，可以定量评估小鼠的攻击性。较高的攻击行为和较低的逃避行为通常被视为较高的攻击性。对雌鼠攻击性的检测通常直接从第三步加入陌生侵入者雄鼠开始。

(2) 测量冲动性 (impulsivity)：操作性延迟强化任务 (Operant delayed reinforcement task)

首先，小鼠经过几个训练试次，学会对视觉刺激（光线提示）做出鼻探反应，并且相应的面板按压会使机器将食物投放到舱室中。

在测试中，小鼠被训练在左右两个光纤视觉刺激之间进行选择，其中一个选

择会得到少量的食物，而另一个选择会得到更大数量的食物。随着试次的进行，对与大奖励相关的引入会有一定的延迟。因此，小鼠需要在小但即时的强化剂数量和较大但延迟的强化剂数量之间进行选择。我们通过观察小鼠的选择行为来评估其冲动性和自控能力。小鼠倾向于选择即时但较小的奖励，则表明冲动性较高；而偏向选择延迟但较大的奖励，则表明具有较强的自控能力。

(3) 测量易怒性(irritability): 在被限制的情况下试图挣扎(Attempts to struggle while being restrained)

评估小鼠在人类操作下的挣扎行为，包括从笼中提起尾巴，抓取后颈等行为。当施加适度限制时，小鼠会表现出被动或愤怒的反应。量化其挣扎反应的程度和持续时间可以用作评估易怒性的指标。

(4) 测量焦虑性(anxiety): 高架十字迷宫(Elevated Plus Maze)

高架十字迷宫通常由一个十字形迷宫构成，其中包括两个开放的臂和两个封闭的臂。迷宫的平台较高，以增加小鼠对开放区域的恐惧感。小鼠被放置在迷宫的中央起始区域，然后观察和记录其行为。较高的封闭臂倾向和减少的开放臂探索行为被视为焦虑的指标。通过分析和比较这些行为参数，可以对小鼠的焦虑水平进行评估。

(5) 测量无助性(hopelessness): 强迫游泳 (Forced Swim Test)

强迫游泳测试基于小鼠在无法逃脱的强迫游泳条件下的行为反应。实验在一个透明的水槽中进行，水槽被填满适温的水，使小鼠无法触及底部或逃离，并在一定时间内记录小鼠表现出绝望不动行为的累计时间，反映其绝望抑郁和无助的水平。

之后，如果我们观察到 $CLOCK^{\text{delta}19}$ 小鼠，以及 VTA 脑区 CLOCK 敲低小鼠相比普通小鼠出现了更明显的自杀特征相关行为，我们将对 $CLOCK^{\text{delta}19}$ 小鼠使用氯化锂、氯胺酮、氯氮平等药物，观察自杀特征相关行为的相关指标是否有所下降。

实验 3——尝试建立小鼠的自杀模型

我们的实验装置分成 3 部分：两个笼子，一个通道。左侧笼子饲养一只小鼠，右侧笼子饲养一只大鼠，两个笼子之间的通道的大小只能允许小鼠通过。大鼠和小鼠是捕食关系，因此通过这一通道对小鼠而言无异于自杀。通道有 4 道门，第 1 道门在白天将会开启 2 个小时，第 2、3、4 道门需要小鼠自己按压杠杆打开。

我们将利用 $CLOCK^{\text{delta}19}$ 小鼠在白天处于躁狂状态，在夜晚处于平静状态的特征。我们将在白天的 12 小时里的 10 个小时对左侧笼子中的小鼠进行电击。几微安 (μA) 到几毫安 (mA) 的电流强度会引起小鼠的注意。当电流强度增加到

一定程度时，小鼠可能会感到不适或疼痛，并出现回避或逃避的行为。这个阈值会因个体差异和实验条件而有所变化，因此需要对具体小鼠确定特异性的阈值。前人研究显示 *CLOCK*^{delta19} 小鼠在躁狂状态会更加冲动，因此它更可能会做出自杀行为。在剩下的 2 个小时里，第 1 道门将会被打开，小鼠可以跑到通道里。第 2、3、4 道门都位于通道右侧，距离右侧笼子足够近，使小鼠在这里可以闻到大鼠的气味（实验中，也可以在门之间加一些含有大鼠气味的物品）。因此，如果小鼠仍然选择打开后三道门，可以被视为一种深思熟虑后的自杀行为，而不是逃避电击的应激行为。

如果我们观察到 *CLOCK*^{delta19} 小鼠的自杀现象，我们将对 *CLOCK*^{delta19} 小鼠使用氯化锂、氯胺酮、氯氮平等药物，观察 *CLOCK*^{delta19} 小鼠的自杀比例是否下降。

我们所有实验的所需小鼠包括:

	自杀模型实验	自杀特征相关实验	自杀特征实验 (绝望行为部分)	自杀模型实验 的药物治疗	自杀特征相关实验 的药物治疗
<i>CLOCK</i> ^{delta19} 小鼠	√	√	×	√	√
<i>CLOCK</i> 敲低小鼠	√	√	√	√	√
普通小鼠	√	√	√	×	×

2 可行性分析

本实验中，小鼠的自杀实验是首次设计的，之前未有文献报导。鉴于即使在人类中，自杀现象出现的频率也极低（约为万分之一），尽管基于精神疾病模型上进行了一定的设计，我们在实验中观察到小鼠自杀的可能性也不高。这也是我们加入测量小鼠的自杀特征相关行为的原因。本实验中，测量小鼠的自杀特征相关行为的相关实验，都是经过检验较为成熟的范式，成功的可能性较大。

四 本题目的特色和创新之处

特色：基于昼夜节律相关的双相情感障碍模型 *CLOCK*^{delta19}，结合行为学、RNAi 等方法检测其自杀特征相关行为，并使用经典的临床药物治疗验证。

创新之处：目前还未有合适的动物自杀模型出现。本研究希望通过在已有的

双相情感障碍动物模型下探究其是否存在自杀特征相关行为的表型，并讨论以其为基础模拟部分青春期双相情感障碍人群自杀的表型的可能性。

五 年度研究计划

课题开展：

时间	进度	详情
1 月初~3 月底	小鼠建模	依次合笼并获得多批 <i>CLOCK</i> ^{delta19} 以及对照组（普通小鼠）的幼鼠，出生后 36~59 天进行正式实验；对正常幼鼠 VTA 注射 shRNA 并恢复 1 周后进行实验；
4 月初~5 月底	模型验证	① 一批小鼠进行昼夜节律测试、活动测试
	自杀特征相关行为测试	②一批 <i>CLOCK</i> 基因缺陷小鼠和普通小鼠进行攻击性、冲动性、易怒性、绝望无助相关的行为学测试； ③ 一批 <i>CLOCK</i> 基因缺陷小鼠进行自杀行为范式行为学检测，并记录 5-HT、皮质醇等经典分子的水平变化；
6 月初~7 月底	药物治疗行为学变化测试	④ 一批 <i>CLOCK</i> 基因缺陷小鼠在出生后 3 周开始进行不同的药物治疗，观察青春期行为学改善情况.
8 月初~9 月底	补充实验	补充部分应做实验

六 预期成果

1. 在实验 2（自杀特征相关行为+药物治疗）中：

- （1）如果小鼠出现自杀特征相关行为，且药物治疗后的小鼠自杀的比例降低，则说明我们的实验观察到 *CLOCK*^{delta19} 小鼠相比普通小鼠出现了更明显的自杀特征相关行为，且我们所用的药物对改善自杀特征相关行为有效
- （2）如果小鼠出现自杀特征相关行为，且药物治疗后的小鼠自杀的比例不变或上升，则说明我们的实验观察到 *CLOCK*^{delta19} 小鼠相比普通小鼠出现了更明显的自杀特征相关行为，且我们所用的药物对改善自杀特征相关行为无效。
- （3）如果 *CLOCK*^{delta19} 小鼠没有出现自杀特征相关行为，这说明 *CLOCK*^{delta19} 小鼠不适合进行自杀相关研究。

2. 在实验 3（自杀模型+药物治疗）中：

(1) 如果小鼠出现自杀行为, 且药物治疗后的小鼠自杀的比例降低, 我们的实验成功观察到了 $CLOCK^{\text{delta}19}$ 小鼠的自杀现象, 且我们所用的药物减少了自杀比例

(2) 如果小鼠出现自杀行为, 且药物治疗后的小鼠自杀的比例不变或上升, 我们的实验成功观察到了 $CLOCK^{\text{delta}19}$ 小鼠的自杀现象, 且我们所用的药物没有减少自杀比例

(3) 如果小鼠没有出现自杀行为, 则主要参考实验 2 的实验结果。

七 研究工作基础与工作条件

1. 工作基础和工作条件

(1) 我们较充分地阅读了相关文献。

(2) 技术人员的技术熟练, 有小鼠行为学和立体定位注射的经验。

(3) $CLOCK^{\text{delta}19}$ 小鼠、测量使用的行为学实验的装置、自杀范式的实验装置等易于购买组装; 使用的氯化锂、氯胺酮、氯氮平、丙戊酸盐等药物可以购买。

2. 伦理和动物福利

作为研究人员, 我们将确保我们的实验设计和操作符合伦理和法律要求, 同时我们将最大限度地减轻实验动物的痛苦和不适。

八 问答环节

问: 为什么自杀特征相关行为里没有动物的自残行为?

答: 这是一个很好的想法, 我们可以把自残行为加入到自杀特征相关行为。之前前人没有把自残行为算成自杀特征相关行为, 可能是因为没有成熟的范式来定量测量自残行为。

问: 大鼠和小鼠虽然是捕食关系, 但是没有学习过的小鼠很难知道这一点。我们实验室把猫和小鼠放在一起, 小鼠都不怕猫, 怎么解决这一问题?

答: 可以给小鼠看 VR, VR 的内容是一只小鼠走过通道之后被对面笼子里的大鼠捕食。

问: 如果你们真的在实验里观察到了小鼠的自杀现象, 是否可以在它即将自杀之前阻止它, 从而在以后可以观察自杀倾向产生的频率?

答: 这是一个很好的想法, 我们可以改进我们的实验装置, 在第四道门后加第五道门, 在小鼠即将迈进大鼠的笼子里时让第五道门落下。

小组成员：

刘 颖 SA22234119

李懿轩 SA22234118