

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910016807.3

A61K 31/42 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/22 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 12 月 9 日

[11] 公开号 CN 101596190A

[22] 申请日 2009.7.7

[21] 申请号 200910016807.3

[71] 申请人 山东大学

地址 250100 山东省济南市历城区山大南路
27 号

[72] 发明人 陈哲宇 于 卉 王 越 刘 挺

[74] 专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司
代理人 赵会祥

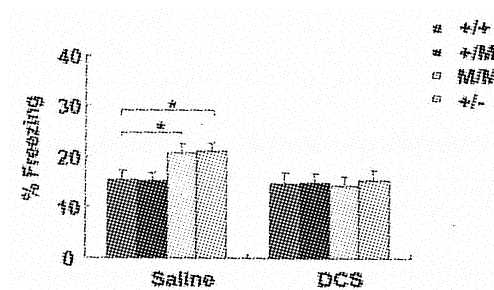
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 5 页

[54] 发明名称

D-环丝氨酸的制药用途

[57] 摘要

本发明提供 D-环丝氨酸的制药新用途，特别是利用 D-环丝氨酸可以促进厌恶记忆和恐惧记忆的消退或遗忘，进而可用于制备预防和/或治疗脑源性神经营养因子基因变异相关的精神疾病和/或症状的药物。包括脑源性神经营养因子基因变异相关的焦虑症、抑郁症、创伤后应激综合症等，这里所说的脑源性神经营养因子基因变异包括该营养因子第 66 位的缬氨酸突变为甲硫氨酸。本发明为临床个体化治疗该类精神疾病提供有效的药物。



-
1. D-环丝氨酸的制药用途，用于制备预防和/或治疗脑源性神经营养因子基因变异相关的精神疾病和/或症状的药物。
 2. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于所述的精神疾病为创伤后应激综合症。
 3. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于所述的精神疾病为抑郁症。
 4. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于所述的精神疾病为焦虑症。
 5. 根据权利要求2所述的用途，其特征在于所述的创伤后应激综合症为脑源性神经营养因子基因变异型创伤后应激综合症。
 6. 根据权利要求1，2，3，4或5所述的用途，其特征在于所述的脑源性神经营养因子基因变异为脑源性神经营养因子第66位的缬氨酸突变为甲硫氨酸。

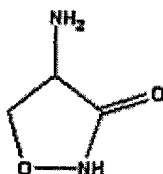
D-环丝氨酸的制药用途

技术领域

本发明涉及 D-环丝氨酸的制药新用途，确切的说是利用 D-环丝氨酸可以促进厌恶记忆和恐惧记忆的消退或遗忘，用于制备预防和/或治疗脑源性神经营养因子基因变异相关的精神疾病和/或症状的药物。

背景技术

D-环丝氨酸，英文名称为 D-Cycloserine，分子式为 $C_3H_6N_2O_2$ ，分子量：102.09。
分子结构式为：



D-环丝氨酸是目前市场上的二线抗结核药物，能抑制结核杆菌生长，其抗菌作用机制是抑制细菌细胞壁粘肽的合成，从而使细胞壁缺损。细菌细胞壁主要结构成分是胞壁粘肽，由 N-乙酰葡萄糖胺（GNAc）和与五肽相连的 N-乙酰胞壁酸（MNAc）重复交替联结而成。胞浆内粘肽前体的形成可被环丝氨酸所阻碍，环丝氨酸通过抑制 D-丙氨酸的消旋酶和合成酶可阻碍 N-乙酰胞壁酸五肽的形成。口服吸收较快，3-4 小时血液浓度达到广泛分布到身体组织和体液之中，脑髓液中的药物浓度与血液中近似。大部分以原型从尿液中排出，约 35% 被代谢。最低抑菌浓度为 25mg/L。

发明内容

本发明提供 D-环丝氨酸的新用途，特别是利用 D-环丝氨酸可以促进厌恶记忆或恐惧记忆的消退或遗忘，特别是针对外界强烈刺激引发的厌恶记忆或恐惧记忆，进而可用于制备预防和/或治疗脑源性神经营养因子基因变异相关的精神疾病和/或症状的药物。包括脑源性神经营养因子基因变异相关的焦虑症、抑郁症、创伤后应激综合症等，这里所说的脑源性神经营养因子基因变异包括该营养因子第 66 位的缬氨酸突变为甲硫氨酸。为临床个体化治疗该类精神疾病提供有效的药物。

附图说明

图 1 CTA 记忆的获得统计图

图 2 CTA 记忆的保留统计图

图 3 未给药时 CTA 记忆的消退统计图

- 图4 腹内侧前额叶和海马部位 c-Fos 免疫组化结果照片
图5 腹内侧前额叶和海马部位 c-Fos 免疫组化结果照片
图6 给药后 CTA 记忆的消退统计图
图7 c-Fos 表达变化与 CTA 消退过程比较图
图8 小鼠不动时间统计图
图9 未给药时“僵直行为”持续时间统计图
图10 给药后“僵直行为”持续时间统计图

具体实施方式

材料与方法

1. 实验动物与分组

为避免小鼠的个体差异,所有实验小鼠是同窝出生、年龄 2~3 月龄的雄性小鼠。**BDNF^{Met/Met}**小鼠和同窝野生型小鼠由 **BDNF^{+/-}×BDNF^{+/-}**小鼠杂交获得,**BDNF^{+/-}**小鼠和同窝野生型小鼠由 **BDNF^{+/-}×BDNF^{+/-}**小鼠杂交获得。(实验用小鼠从美国康奈尔大学购得)
小鼠在光/暗周期为12h/12h,温度18°C~22°C 室内饲养,自由饮食,除了有些实验特别提出限食或限水。所有的实验是在白天进行。根据基因型随机将小鼠分为4组:(1)野生型小鼠(2)**BDNF^{+/-}**小鼠(3)**BDNF^{Met/Met}**小鼠(4)**BDNF^{+/-}**小鼠。根据实验需要更详细的分组在实验方法中特别说明。

2. 主要试剂和仪器

2.1 主要试剂

- (1) NaCl、KCl (北方天医化学试剂厂)
- (2) Na₂HPO₄、KH₂PO₄、KOH (天津福晨化学试剂厂)
- (3) 兔多克隆c-Fos 抗体(美国Santa 公司)
- (4) 二抗试剂盒(晶美生物工程有限公司)
- (5) 糖精钠(美国Sigma 公司)
- (6) 多聚甲醛(天津市广成化学试剂有限公司)
- (7) 蔗糖、明胶(天津巴斯夫化学试剂有限公司)
- (8) 戊巴比妥钠(上海化学试剂公司)
- (9) 硫酸铬钾(上海青析化工有限公司)
- (10) 乙二醇、乙醇、甲醇、HCl、H₂O₂(莱阳市康德化工有限公司)
- (11) 高尔基染色试剂盒(美国FD Neuro 公司)
- (12) LiCl、D-Cycloserine、甲苯胺蓝(美国Sigma-Aldrich 公司)
- (13) 封闭用正常山羊血清原液(北京中杉金桥)
- (14) 柠檬酸、柠檬酸钠(天津丰越化学制品有限公司)

2.2 试剂配方

- (1) 10× 磷酸盐缓冲液(PBS) 1L
NaCl (1.37M) 80g, KCl (27mM) 2g, Na₂HPO₄·7H₂O (43mM) 11.5g, KH₂PO₄ (14mM) 2g, 双蒸水 800ml, 混匀后, 定容到1L, PH=7.3
- (2) 4%多聚甲醛1L
多聚甲醛 40g, 1×PBS 600ml, 加热到60°C 时, 加入1M 的NaOH 促其溶解, 定容到1L, PH=7.4
- (3) 防冻液1L

1×PBS 500ml, 乙二醇 300ml, 蔗糖 300g, 定容到1L

(4) 10%蔗糖1L

蔗糖 100g, 1×PBS 600ml, 定容到1L

(5) 20%蔗糖1L

蔗糖 200g, 1×PBS 600ml, 定容到1L

(5) 30%蔗糖1L

蔗糖 300g, 1×PBS 600ml, 定容到 1L

(6) 生理盐水1L

NaCl 9g, 蒸馏水 800ml, 定容到1L

(7) 5M NaOH 250ml

NaOH 50g, H₂O 200ml, 定容到250ml

(8) 1M HCl 250ml

HCl 21ml, H₂O 229ml

(9) 5M NaCl 1L

NaCl 292.5g, H₂O 800ml, 定容到1L

(10) 3%H₂O₂ 10ml

1×PBS 1ml, 30% H₂O₂ 1ml, 甲醇 8ml

(11) 0.1M 枸橼酸溶液1L

枸橼酸 21.01g, 蒸馏水 800ml, 定容到1L

(12) 0.1M 枸橼酸钠溶液1L

枸橼酸钠 29.41g, 蒸馏水 800ml, 定容到1L

(13) 枸橼酸盐缓冲液 500ml

0.1M 枸橼酸溶液 9ml, 0.1M 枸橼酸钠溶液 41ml, 蒸馏水 400ml, 定容到500ml, PH=6.0

(12) 10×TBS 1L

NaCl 87.66g, Tris·Cl 24.2g, 双蒸水 600ml, 定容到1L, PH=7.6

2.3 主要仪器

(1) 台式离心机(美国DENVILLE 公司)

(2) PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪(美国BioRad 公司)

(3) -20℃ 冰箱(青岛海信有限公司)

(4) 立式电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)

(6) 纯水仪(美国Millipore 公司)

(7) 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏试验设备有限公司)

(8) 恒温搅拌器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)

(9) 电子天平(德国Sartorius 公司)

(10) 酶标仪(美国BioRad 公司)

(11) 酸度计(德国Sartorius 公司)

(12) 冰冻切片机(德国美康公司)

(13) 振动切片机(德国莱卡显微系统股份有限公司)

(14) 静音混合器、脱色摇床(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司)

(15) 层析实验冷柜(北京博医康实验仪器有限公司)

(16) 普通光学显微镜、正置荧光显微镜(日本NiKon 公司)

(17) 家用微波炉(广东格兰仕集团有限公司)

(18) 条件性恐惧记忆测试装置(美国Smart 公司)

3. 方法

3.1 行为学检测

所有行为学均在白天进行检测, 测试时间为上午9: 00~15: 00。

3.1.1 条件性味觉厌恶实验 (CTA)

除了按照基因型将小鼠分为4组, 每种基因型的小鼠被随机分为非CTA训练组(饮用糖精钠后, 注射生理盐水)和CTA训练组(饮用糖精钠后, 注射0.15M LiCl)。CTA实验分为三个过程: 适应期、训练期和测试期。适应期为7天, 小鼠单笼饲养, 每天上午9: 00~9: 30给予一瓶自来水, 一个空瓶, 水瓶与空瓶的位置每天交换, 让小鼠习惯每天在固定时间用两个水瓶饮水。每天小鼠饮水前后对水瓶称重, 计算每天小鼠饮水量, 饮水量>1ml小鼠可以继续用于实验。

训练期为1天, 上午9: 00~9: 30给予小鼠两瓶0.5%糖精钠水, 饮用糖水结束后40min, 按照2%体重的剂量, 腹腔注射0.15M LiCl。注射LiCl后几个小时内可明显观察到小鼠活动减少。非条件刺激组在同一时间, 按照2%体重的剂量, 腹腔注射生理盐水。

测试期, 根据不同的实验测试期时间不同。测试时, 上午9: 00~9: 30, 同时给予小鼠一瓶自来水和一瓶0.5%糖精钠水, 两种不同味觉的水瓶位置随即放置, 防止水瓶位置对小鼠的行为造成影响。每天对水瓶称重, 记录小鼠饮水量、饮用糖精钠水量并计算厌恶指数(Aversion index, AI)。AI=饮水量/饮用液体总量×100%, 以厌恶指数评价小鼠对CTA记忆的情况。CTA记忆的获得和保留测试: 训练期后第1, 3, 7, 30天按测试期的方法对小鼠进行测试。第1天的厌恶指数反映小鼠对CTA记忆的获得情况, 第3, 7, 30天的厌恶指数反映小鼠对CTA记忆的保留情况。

CTA记忆的消退测试: 训练期后按照测试期的方法, 每天对小鼠进行测试, 连续测试15天, 每天的厌恶只是反映小鼠对CTA记忆的消退情况。

3.1.2 强迫游泳 (FST)

强迫游泳实验为评价小鼠的绝望行为的一种常用的实验方法。将小鼠放入一盛水的玻璃烧杯内(高25cm, 直径10cm), 水深8cm, 水温22°C, 测试6min, 观察小鼠在水中的不动时间。小鼠固定不动的漂浮在水中, 只有保持头部漂浮在水面的轻微动作, 认为不动; 相反游泳则是指小鼠努力逃离水面的运动或剧烈的活动。

3.1.3 背景依赖的条件性恐惧记忆

训练时, 小鼠被放入条件训练箱适应3分钟后, 给予2秒足底电击(1.0 mA), 点击后30秒将小鼠放回原笼饲养。通过小鼠的“僵直行为”(freezing behavior)的持续时间来测量条件性恐惧记忆, 即小鼠除了呼吸之外全身僵住一动不动, 不出现任何其他行为反应。背景依赖的条件性恐惧记忆的消退测试: 训练后1天, 小鼠被重新放入条件训练箱, 观察6分钟内小鼠的“僵直行为”持续时间, 连续测试5天。

3.1.4 药物干预

除了按照基因型将小鼠分为4组, 每种基因型的小鼠被随机分为D-环丝氨酸治疗组和生理盐水对照组。在CTA消退实验中: D-环丝氨酸组: 在CTA消退实验测试的第3天, 小鼠饮水结束后30min, 即10: 00腹腔注射D-环丝氨酸(15mg/kg)。生理盐水对照组: 在CTA消退实验测试的第3天, 小鼠饮水结束后30min, 即10: 00腹腔注射生理盐水(15mg/kg)。

在强迫游泳实验中: D-环丝氨酸组: 在强迫游泳实验前30分钟腹腔注射D-环丝氨酸(15mg/kg)。生理盐水对照组: 在强迫游泳实验前30分钟腹腔注射生理盐水(15mg/kg)。

在条件性恐惧记忆实验中: D-环丝氨酸组: 在条件性恐惧记忆消退测试第1天, 测试结束后30分钟腹腔注射D-环丝氨酸(15mg/kg)。生理盐水对照组: 在条件性恐惧记忆消退测试第1天, 测试结束后30分钟腹腔注射生理盐水(15mg/kg)。

3.2 形态学检测

3.2.1 脑组织灌流

- (1) 麻醉小鼠, 腹腔注射戊巴比妥钠(40mg/kg)
- (2) 小鼠仰卧位固定于小鼠固定台, 剪断肋骨, 暴露心脏
- (3) 从左心室插入灌注针, 剪开右心耳

- (4) 快速灌注生理盐水约10min, 5ml/min
- (5) 停止灌注生理盐水, 快速灌注4%多聚甲醛10min, 5ml/min
- (6) 持续灌注4%多聚甲醛30min, 停止灌注
- (7) 小鼠短头取脑, 将脑组织浸入4%多聚甲醛后固定1小时

3.2.2 冰冻切片

小鼠脑组织浸入10%、20%、30%蔗糖溶液梯度脱水, 进行冠状面冰冻切片, 切片厚度40 μ m, 隔3张取1张切片, 切片浸入防冻液, -20 $^{\circ}$ C储存。

3.2.3 c-Fos免疫组织化学染色

- (1) TBS清洗切片, 3 \times 10min
- (2) 抗原修复: 切片浸入枸橼酸盐缓冲液, 微波加热10min, 室温冷却20min
- (3) TBS清洗切片, 3 \times 10min
- (4) 3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶: 切片浸入3% H_2O_2 , 15min
- (5) TBS清洗切片, 3 \times 10min
- (6) 切片浸入10%山羊血清封闭1小时
- (7) 切片浸入1: 500稀释的c-fos抗体, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜
- (8) TBS清洗切片, 3 \times 10min
- (9) 切片浸入二抗, 室温孵育2小时
- (10) TBS清洗切片, 3 \times 10min
- (11) 切片浸入HRP标记链亲和素室温孵育1h
- (12) TBS清洗切片, 3 \times 10min
- (13) DAB 显色 2~5min, 显微镜下观察切片显色反应
- (14) TBS终止显色反应, 蒸馏水冲洗
- (15) 80%、90%、95%、100%梯度酒精脱水, 每一梯度10min
- (16) 二甲苯透明, 2 \times 10min
- (17) 封片

应用Nikon 80i正置荧光显微镜采集图像, NIS-Elements BR图像分析软件计算腹内侧前额叶和海马脑区c-fos阳性细胞数。

3.3 统计学分析

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用SPSS10.0 统计软件进行统计分析, 多组均数间比较采用单因素或双因素方差分析, 均数间两两比较采用LSD 方法, 以 $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

结 果

1. BDNF_{Met}基因变异对小鼠CTA记忆的影响

1.1 BDNF_{Met}基因变异不影响小鼠CTA记忆的获得

所有基因型小鼠在训练期均饮用糖精钠水, 并且各组之间饮水量没有差异 (糖精钠饮用量: 野生型, 1.53 ± 0.17 ml; BDNF^{+/+}Met, 1.76 ± 0.23 ml; BDNF_{Met/Met}, 2.07 ± 0.46 ml; BDNF^{+/+}-, 2.10 ± 0.16 ml; 基因型 $F_{(3,71)} = 2.20$, $P = 0.15$)。给予腹腔注射LiCl之后, 所有小鼠与非CTA训练 (注射生理盐水) 组小鼠相比, 均表现出强烈的对糖精钠水的厌恶 (LiCl $F_{(1,71)} = 262.24$, $P < 0.01$; 基因型 $F_{(3,71)} = 0.23$, $P = 0.87$; LiCl \times 基因型 $F_{(3,71)} = 0.81$, $P = 0.50$) (图 1)。单因素方差分析显示, 条件刺激组各种基因型小鼠之间CTA记忆的获得没有明显差异 (基因型 $F_{(3,39)} = 1.61$, $P = 0.23$) (图 1)。

1.2 BDNF_{Met} 基因变异不影响小鼠 CTA 记忆的保留

为了检测BDNF_{Met}和BDNF^{+/+}小鼠CTA记忆的保留情况, 在腹腔注射LiCl后3、7和30天分别进行测试, 计算厌恶指数。所有基因型小鼠表现出强烈的对自来水的偏好, 说明小鼠的CTA

记忆至少可以保持1个月,并且各种基因型小鼠之间,CTA记忆的保留没有明显差别(第30天:基因型 $F_{(3,39)}=0.85$, $P=0.43$) (图2)。

1.3 BDNF_{Met}基因变异延迟了小鼠CTA记忆的消退

既然BDNF_{Met}和BDNF_{+/-}小鼠CTA记忆的获得和保留过程并未受到基因变异的影响,那CTA记忆的消退过程怎样呢,因此我们测试小鼠对CTA记忆的消退情况。有趣的是与CTA记忆的获得和保留过程不同,BDNF_{Met/Met}和BDNF_{+/-}小鼠虽然很容易学会了避免饮用与厌恶情绪相关的糖精钠水,但是从第4天到第10天,随着时间的推移,它们不能降低对糖精钠的厌恶,表现为厌恶指数维持较高水平,表明与BDNF_{+/-}和野生型小鼠相比,它们CTA记忆消退过程受损(图3A)。统计学分析显示,条件刺激后第4天到第10天,BDNF_{Met/Met}和BDNF_{+/-}小鼠与野生型小鼠相比,厌恶指数显著性升高(基因型 $F_{(3,599)}=26.89$, $P<0.01$; 天数 $F_{(14,599)}=71.95$, $P<0.01$; 基因型 \times 天数 $F_{(42,599)}=2.62$, $P<0.01$)。但是CTA记忆的自发恢复实验中,各种基因型小鼠之间未发现明显差别(基因型 $F_{(3,119)}=1.10$, $P=0.35$; 天数 $F_{(2,119)}=12.22$, $P<0.01$; 基因型 \times 天数 $F_{(6,119)}=0.89$, $P=0.58$)。非条件刺激组小鼠基因型的不同并未小鼠厌恶指数的不同(基因型 $F_{(3,255)}=1.83$, $P=0.15$; 天数 $F_{(7,255)}=2.54$, $P=0.16$; 基因型 \times 天数 $F_{(21,255)}=0.49$, $P=0.98$) (图3B)。

尽管岛叶和杏仁体参与CTA记忆的获得和消退过程,最近研究指出腹内侧前额叶(vmPFC)在CTA记忆的消退过程中起到重要作用。在CTA记忆消退测试中饮用糖精钠后90分钟,vmPFC部位c-Fos蛋白表达上调,vmPFC脑内注射蛋白合成抑制剂大鼠CTA记忆的消退受损(Mickley et al., 2005)。本实验结果显示,BDNF_{Met/Met}小鼠可以正常获得CTA记忆,但是CTA记忆的消退过程出现延迟。为了进一步研究BDNF_{Met/Met}小鼠CTA记忆消退过程受损的可能机制,我们利用c-Fos免疫组化的方法检测CTA记忆消退过程中vmPFC部位c-Fos表达的变化情况。首先,我们确定非CTA训练组野生型,BDNF_{Met/Met}和BDNF_{+/-}小鼠饮用糖精钠后vmPFC部位c-Fos表达情况。结果显示,三种基因型小鼠vmPFC($F_{(2,14)}=0.06$, $P=0.95$)和海马部位($F_{(2,14)}=0.40$, $P=0.68$) c-Fos阳性细胞数没有明显差别(图4)。

CTA记忆消退测试的第4天,c-Fos免疫组化结果显示,在vmPFC部位,三种基因型小鼠之间c-Fos阳性细胞数有显著性差异($F_{(1,29)}=897.87$, $P<0.01$),具有统计学意义,而海马部位则未观察到这种差异(图5)。更重要的是,野生型小鼠与BDNF_{Met/Met}、BDNF_{+/-}小鼠相比,CTA记忆消退过程中vmPFC部位c-Fos表达显著性增多($F_{(2,14)}=225.62$, $P<0.01$) (图5)。以上结果提示,消退过程本身可以上调c-Fos的表达,但是BDNF_{Met/Met}和BDNF_{+/-}小鼠在消退过程中c-Fos表达上调不明显,提示基因型在消退介导的c-Fos表达上调过程中的作用,并且c-Fos免疫组化的结果与行为学实验结果相一致。

1.4 D-环丝氨酸纠正CTA记忆消退的损伤

在第3天消退测试后,给予小鼠腹腔注射NMDA受体部分激动剂,D-环丝氨酸(15mg/kg)或生理盐水,观察D-环丝氨酸能否纠正BDNF_{Met/Met}和BDNF_{+/-}小鼠延迟的CTA记忆消退过程。之前研究报导应用D-环丝氨酸可以易化多种行为操作模型的消退过程,并且可以不依赖BDNF途径激活NMDA信号通路,因此本实验选择D-环丝氨酸作为纠正CTA记忆消退延迟的药物。与我们前面基因型影响小鼠CTA记忆消退过程结果相反,注射D-环丝氨酸后,观察不到基因型对小鼠CTA记忆消退过程的影响(图6)。第4天到第10天,四种基因型小鼠之间厌恶指数没有明显差别(基因型 $F_{(3,599)}=1.08$, $P=0.36$; 天数 $F_{(14,599)}=103.13$, $P<0.01$; 基因型 \times 天数 $F_{(42,599)}=0.46$, $P=0.10$),提示D-环丝氨酸可以纠正BDNF_{Met/Met}和BDNF_{+/-}小鼠CTA记忆消退过程的缺陷。与应用D-环丝氨酸治疗不同,腹腔注射生理盐水则不能易化四种基因型小鼠CTA记忆的消退过程,第4天到第10天不同基因型小鼠的厌恶指数仍然存在显著性的差别(基因型 $F_{(3,359)}=317.70$, $P<0.01$; 天数 $F_{(14,359)}=60.33$, $P<0.01$; 基因型 \times 天数 $F_{(42,359)}=2.38$, $P<0.01$) (图6)。消退第4天对D-环丝氨酸治疗组和生理盐水对照组小鼠进行c-Fos免疫组化染色发现,生理盐水对照组c-Fos表达变化与CTA消退过程相似(图7)。给予D-环丝氨酸治疗后,四种基因型小鼠c-Fos表达水平未见明显差别($F_{(2,14)}=2.19$, $P=0.11$)

(图 7)。D-环丝氨酸治疗组与生理盐水对照组相比, $\text{BDNF}_{\text{Met/Met}}$ 和 $\text{BDNF}_{+/-}$ 小鼠c-Fos表达水平显著性升高, 具有统计学差异 ($F_{(3,19)}=124.49$, $P<0.01$)。

2. BDNF_{Met} 基因变异对小鼠抑郁样行为的影响

2.1 BDNF_{Met} 基因变异增加了生理盐水组小鼠在强迫游泳实验中不动时间

为了观察 BDNF_{Met} 基因变异对小鼠抑郁样行为的影响, 我们进行了强迫游泳实验, 以不动时间反应小鼠的抑郁样行为。结果发现, 应激前, $\text{BDNF}_{\text{Met/Met}}$ 小鼠, $\text{BDNF}_{+/-}$ 小鼠与野生型小鼠相比, 不动时间显著性增加 ($F_{(3,31)}=3.78$, $P<0.05$) (图 8), 提示 BDNF_{Met} 基因变异小鼠抑郁样行为增加。

2.2 D-环丝氨酸减少 BDNF_{Met} 基因变异小鼠在强迫游泳实验中不动时间

在强迫游泳实验前30分钟腹腔注射D-环丝氨酸后, 发现 $\text{BDNF}_{\text{Met/Met}}$ 小鼠, $\text{BDNF}_{+/-}$ 小鼠在强迫游泳中的不动时间显著性减少, 并且与野生型小鼠相比没有显著性差异 ($F_{(1,39)}=0.45$, $P=0.72$) (图 8)。这些结果提示D-环丝氨酸可以减少 $\text{BDNF}_{\text{Met/Met}}$ 小鼠和 $\text{BDNF}_{+/-}$ 小鼠抑郁样行为。

3. BDNF_{Met} 基因变异对小鼠背景依赖的条件性恐惧记忆的影响

3.1 BDNF_{Met} 基因变异损伤了小鼠背景依赖的条件性恐惧记忆的消退

既然 BDNF_{Met} 和 $\text{BDNF}_{+/-}$ 小鼠表现出CTA记忆的消退过程延迟, 并且D-环丝氨酸可以纠正这些缺陷, 那么 BDNF_{Met} 和 $\text{BDNF}_{+/-}$ 小鼠的恐惧记忆的消退会怎样呢, 因此我们测试小鼠对背景依赖的条件性恐惧记忆的消退情况。与CTA记忆的消退测试结果相同, $\text{BDNF}_{\text{Met/Met}}$ 和 $\text{BDNF}_{+/-}$ 小鼠条件性恐惧训练后, 随着时间的推移, 它们不能降低对背景依赖的条件性恐惧记忆, 表现为“僵直行为”持续时间维持较高水平, 表明与 $\text{BDNF}_{+/+}$ 和野生型小鼠相比, 它们背景依赖的条件性恐惧记忆消退过程受损 (图 9), 并且有显著性差异 (第5天, 基因型 $F_{(3,31)}=3.42$, $P<0.05$)。

3.2 D-环丝氨酸可以纠正背景依赖的条件性恐惧记忆的消退

在第1天消退测试后, 给予小鼠腹腔注射NMDA受体部分激动剂, D-环丝氨酸 (15mg/kg) 或生理盐水, 观察D-环丝氨酸能否纠正 $\text{BDNF}_{\text{Met/Met}}$ 和 $\text{BDNF}_{+/-}$ 小鼠损伤的背景依赖的条件性恐惧记忆消退过程。与我们前面基因型影响小鼠背景依赖的条件性恐惧记忆消退过程结果相反, 注射D-环丝氨酸后, 第5天各种基因型小鼠背景依赖的条件性恐惧记忆消退过程没有明显差别 ($F_{(3,31)}=0.05$, $P=0.99$) (图 10), 提示D-环丝氨酸可以纠正 $\text{BDNF}_{\text{Met/Met}}$ 和 $\text{BDNF}_{+/-}$ 小鼠背景依赖的条件性恐惧记忆消退过程的缺陷。与应用D-环丝氨酸治疗不同, 腹腔注射生理盐水则不能易化四种基因型小鼠背景依赖的条件性恐惧记忆的消退过程, 第5天不同基因型小鼠的“僵直行为”持续时间仍然存在显著性的差别 ($F_{(3,31)}=3.33$, $P<0.05$) (图 10)。

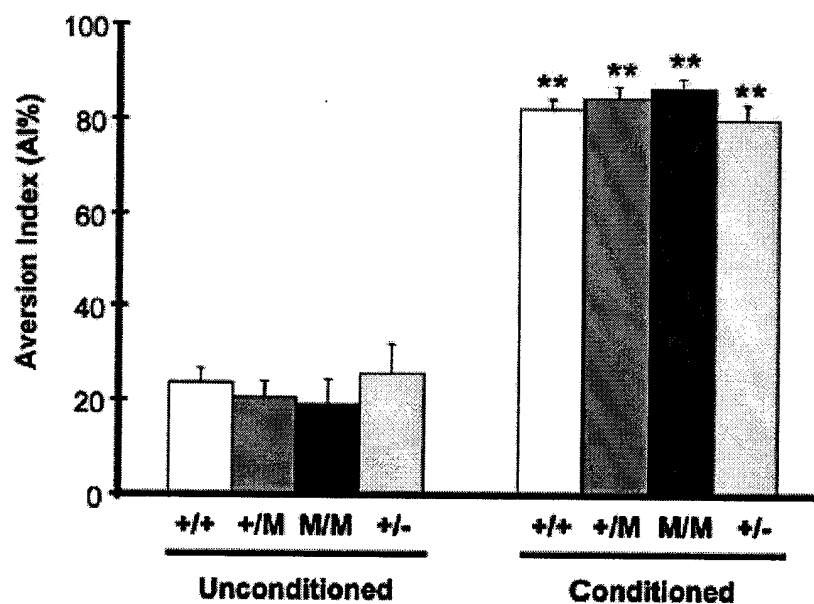


图 1

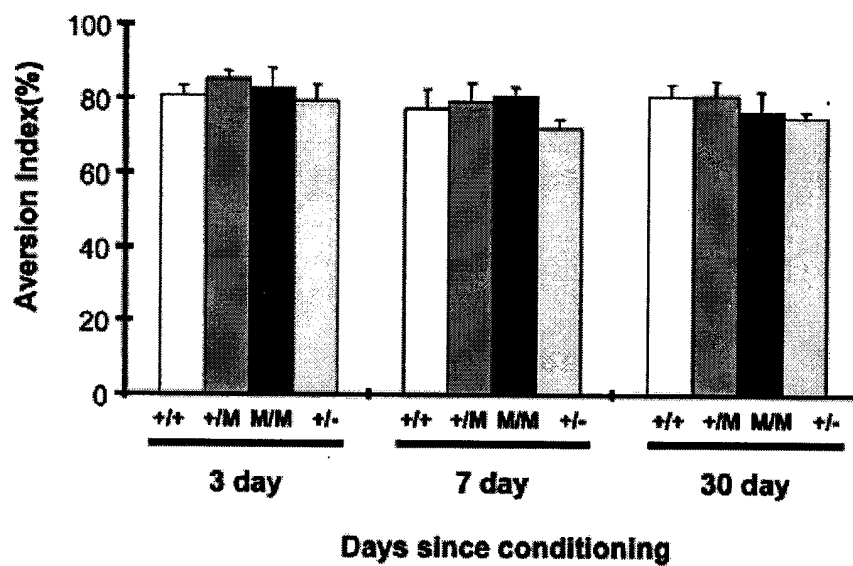


图 2

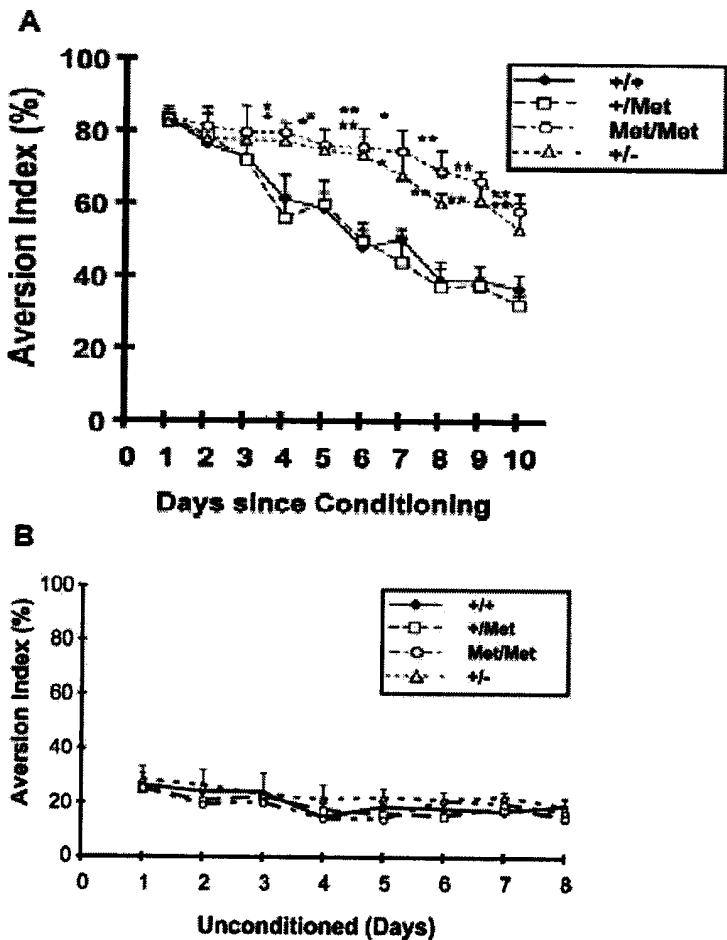


图 3

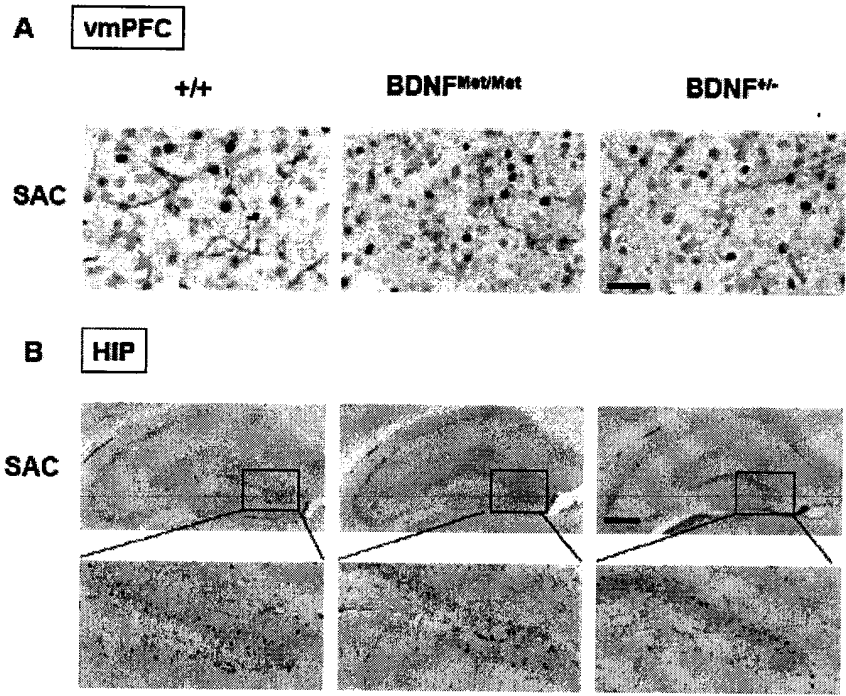


图 4

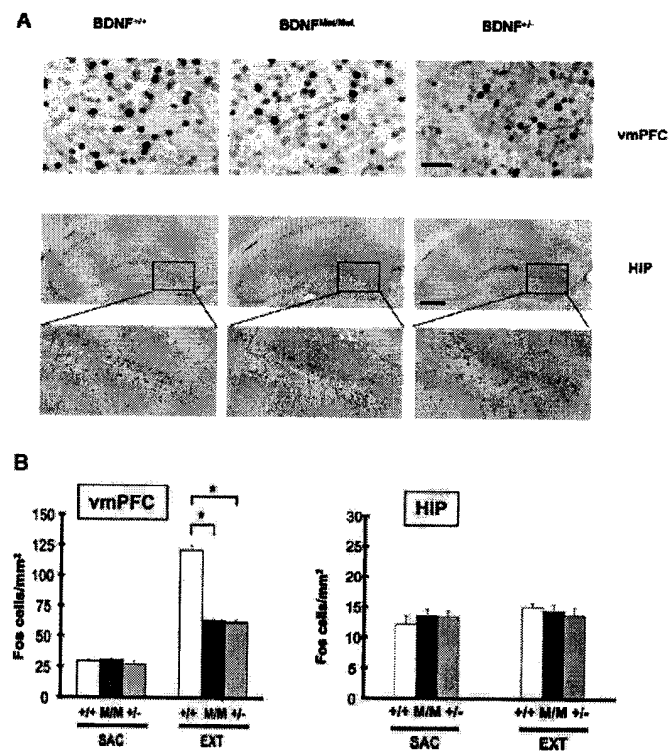


图 5

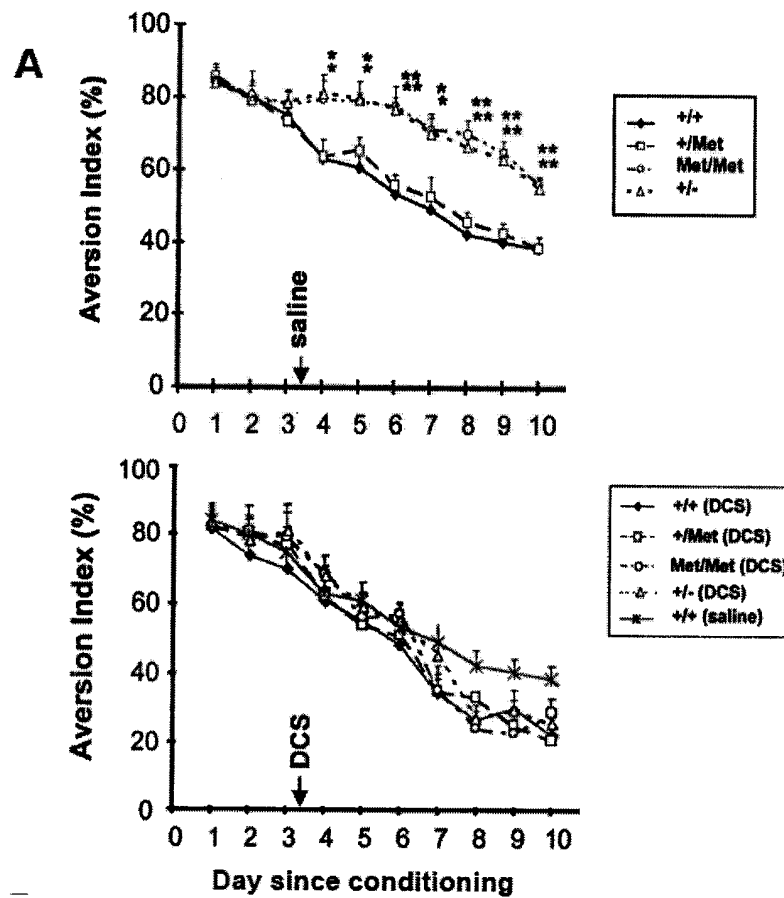


图 6

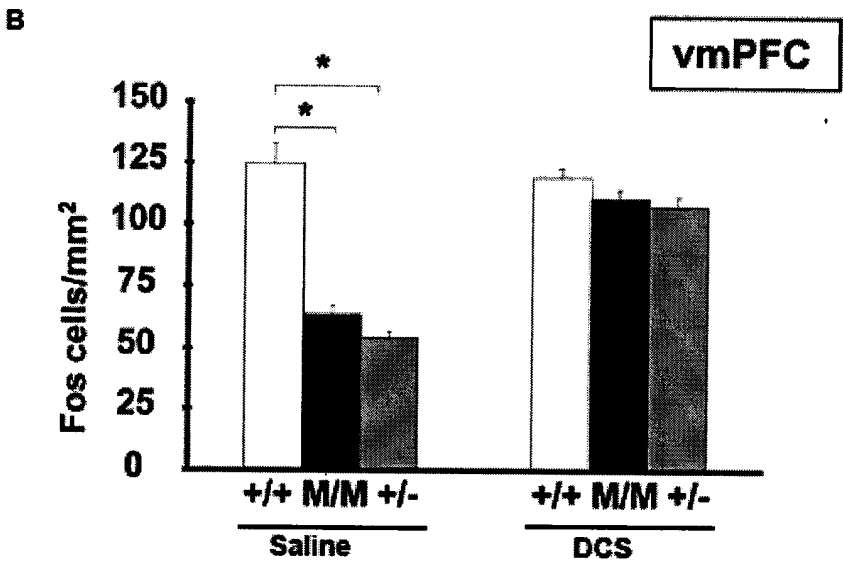
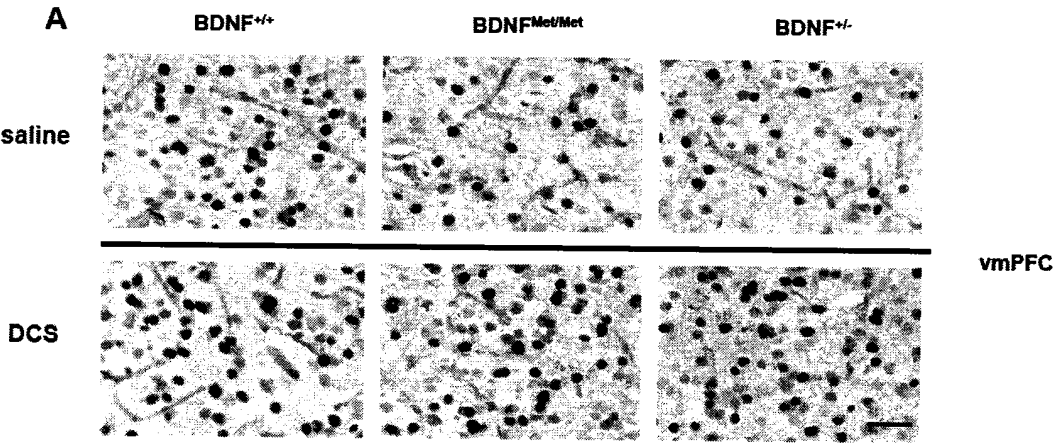


图 7

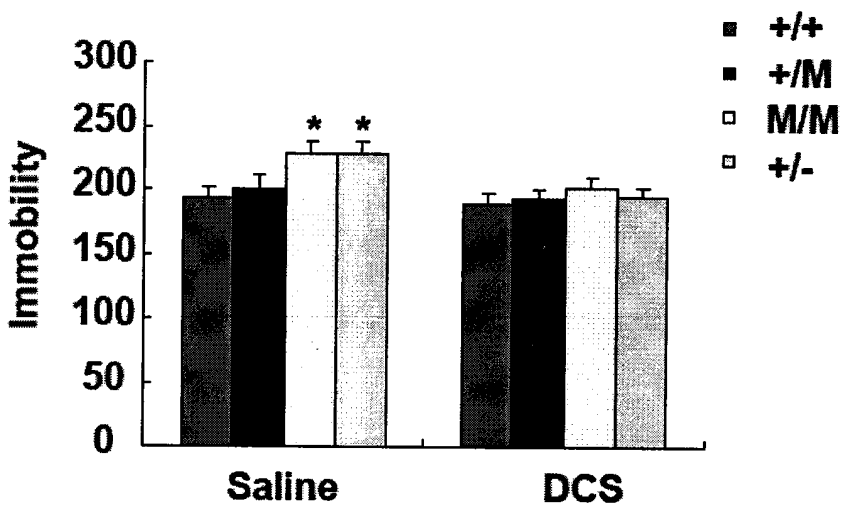


图 8

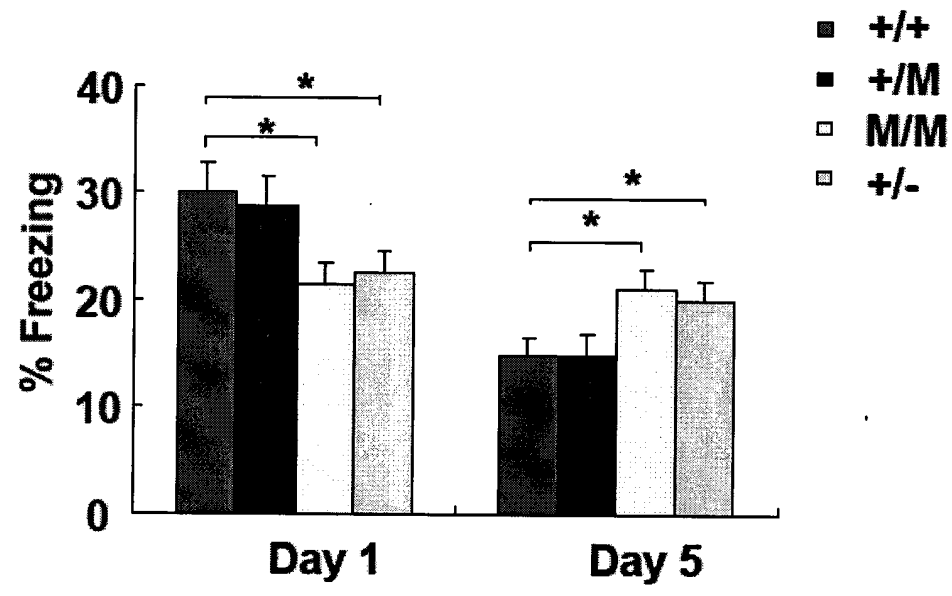


图 9

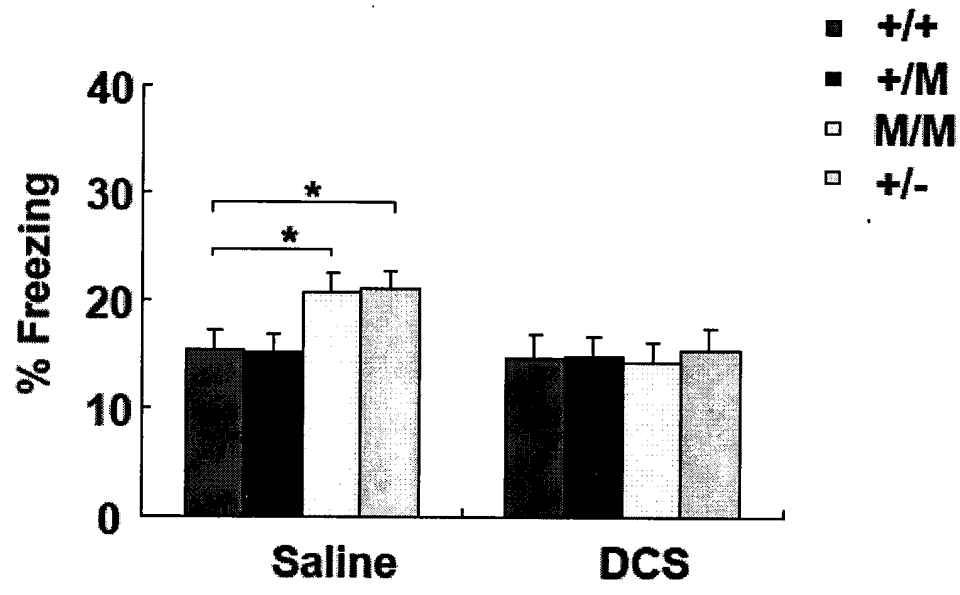


图 10