



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 119607358 B

(45) 授权公告日 2025. 09. 30

(21) 申请号 202410285692.2

(22) 申请日 2024.03.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 119607358 A

(43) 申请公布日 2025.03.14

(73) 专利权人 香港理工大学
地址 中国香港九龙红磡育才道11号

(72) 发明人 孙雷 雷婷

(74) 专利代理机构 深圳中一联合知识产权代理
有限公司 44414
专利代理师 方良

(51) Int. Cl.
A61M 21/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 116615215 A, 2023.08.18

US 2010075308 A1, 2010.03.25

审查员 徐昌琦

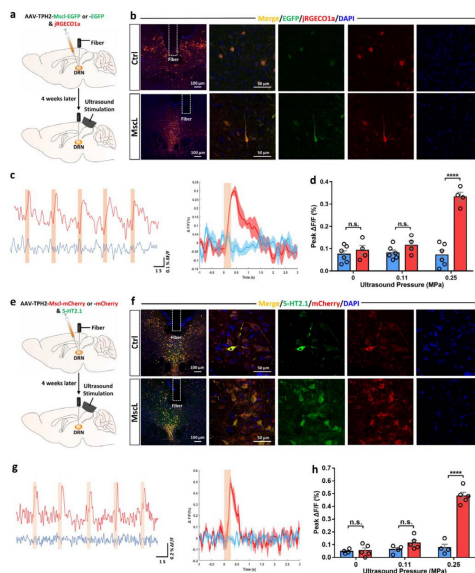
权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

用于治疗抑郁症的系统和产品、应用

(57) 摘要

本申请涉及抑郁症治疗技术领域,尤其涉及一种用于治疗抑郁症的系统和产品、应用。该用于治疗抑郁症的系统包括:表达载体植入单元:用于将能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体植入受试者进行表达;声遗传学调节单元:用于对植入有上述载体的受试者进行超声刺激。本申请利用大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的突变体作为声遗传学工具,利用其在受试者中表达,可以增强血清素能神经元对超声的反应,通过声遗传学调节对受试者具有很好的抗抑郁作用,从而实现治疗抑郁症效果。



1. 一种用于治疗抑郁症的系统,其特征在于,包括:

表达载体植入单元:用于将能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体植入受试者进行表达,所述能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体包括具有Tph2启动子的病毒载体,且植入于所述受试者的中缝背核中表达;

声遗传学调节单元:用于对植入有所述载体的受试者进行超声刺激,所述超声刺激包括:中心频率,0.5~1.0MHz;强度,0.2~0.3MPa;脉冲宽度,450~550 μ s;脉冲重复频率,0.5~1.5kHz;刺激持续时间,250~350ms;刺激间隔,2~4s。

2. 如权利要求1所述的用于治疗抑郁症的系统,其特征在于,还包括:

测试单元:用于测试所述超声刺激的效果。

3. 一种用于治疗抑郁症的产品,其特征在于,包括:

能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体,所述能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体包括具有Tph2启动子的病毒载体,且植入于受试者的中缝背核中表达;

超声波准直器,所述超声波准直器工作参数包括:中心频率,0.5~1.0MHz;强度,0.2~0.3MPa;脉冲宽度,450~550 μ s;脉冲重复频率,0.5~1.5kHz;刺激持续时间,250~350ms;刺激间隔,2~4s。

4. 如权利要求3所述的用于治疗抑郁症的产品,其特征在于,还包括:光学纤维和数据分析软件。

用于治疗抑郁症的系统和产品、应用

技术领域

[0001] 本申请属于抑郁症治疗技术领域,尤其涉及一种用于治疗抑郁症的系统和产品、应用。

背景技术

[0002] 抑郁症(Depression)是一种常见的精神障碍,以显著而持续的心情低落为主要特征,如伴随着对先前有回报的活动失去兴趣和丧失愉悦感,持续绝望,常常影响个体的工作、学习和社交功能,是造成慢性病负担的第二大因素。抑郁症可能是由多种因素引起,包括遗传、生物学、心理社会和环境因素等。

[0003] 在临床上,有许多类型的抗抑郁药用于治疗抑郁症,包括选择性血清素再摄取抑制剂(Selective Serotonin Reuptake Inhibitors,SSRIs)、血清素和去甲肾上腺素再摄取抑制剂(Serotonin and Norepinephrine Reuptake Inhibitors,SNRIs)、单胺氧化酶抑制剂(Monoamine Oxidase Inhibitors,MAOIs)和三环类抗抑郁药(Tricyclic Antidepressants,TCAs),其主要通过增加神经递质(Neurotransmitter)的浓度来缓解抑郁症状,特别是中枢神经系统(Central Nervous System,CNS)中的血清素(Serotonin,又称5-HT)、去甲肾上腺素(Norepinephrine)和多巴胺(Dopamine)。但是有综述显示,这些抗抑郁药的有效率约为50%,其治疗效果一般需要几周以上。

[0004] 临床上也有替代性的非药物神经调控疗法用于治疗抑郁症,包括电休克疗法(Electroconvulsive Therapy,ECT)、迷走神经刺激(Vagus Nerve Stimulation,VNS)(仅适用于成人)和经颅磁刺激(Transcranial Magnetic Stimulation,TMS)。它们为抑郁症的治疗提供了宝贵的贡献,尤其是对抗抑郁药物没有反应的患者;同时,它们也有各自的缺点,包括认知障碍甚至长期记忆丧失的潜在风险、手术侵袭性以及触发抗抑郁作用时间长(通常超过4周)甚至没有反应。

发明内容

[0005] 本申请的目的在于提供一种用于治疗抑郁症的系统和产品、应用,旨在解决如何更好地治疗抑郁症的技术问题。

[0006] 为实现上述申请目的,本申请采用的技术方案如下:

[0007] 第一方面,本申请提供一种用于治疗抑郁症的系统,包括:

[0008] 表达载体植入单元:用于将能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体植入受试者进行表达;

[0009] 声遗传学调节单元:用于对植入有上述载体的受试者进行超声刺激。

[0010] 在一些实施例中,所述能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体包括具有Tph2启动子的病毒载体。

[0011] 在一些实施例中,所述能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体植入于所述受试者的中缝背核中表达。

[0012] 在一些实施例中,所述超声刺激包括:中心频率,0.5~1.0MHz;强度,0.2~0.3MPa;脉冲宽度,450~550 μ s;脉冲重复频率,0.5~1.5kHz;刺激持续时间,250~350ms;刺激间隔,2~4s。

[0013] 在一些实施例中,还包括:测试单元:用于测试所述超声刺激的效果。

[0014] 第二方面,本申请提供一种用于治疗抑郁症的产品,包括:

[0015] 能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体;

[0016] 超声波准直器。

[0017] 在一些实施例中,所述能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体包括具有Tph2启动子的病毒载体。

[0018] 在一些实施例中,所述超声波准直器工作参数包括:中心频率,0.5~1.0MHz;强度,0.2~0.3MPa;脉冲宽度,450~550 μ s;脉冲重复频率,0.5~1.5kHz;刺激持续时间,250~350ms;刺激间隔,2~4s。

[0019] 在一些实施例中,还包括:光学纤维和数据分析软件。

[0020] 第三方面,本申请提供一种应用,即超声波和能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体在制备用于治疗抑郁症的产品中的应用。

[0021] 本申请第一方面提供的用于治疗抑郁症的系统包括:(1)表达载体植入单元:可以将表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体植入受试者进行表达;(2)声遗传学调节单元:可以对表达载体植入单元中植入有上述载体的受试者进行超声刺激。本申请可以利用大电导机械敏感离子通道的突变体MscL-G22S作为声遗传学工具,利用其在受试者中表达可以增强血清素能神经元对超声的反应,通过声遗传学调节促进血清素的分泌,产生快速有力的抗抑郁作用,可以快速逆转绝望样行为。因此,本申请的系统可以很好地实现治疗抑郁症效果。

[0022] 本申请第二方面提供的用于治疗抑郁症的产品包括:(1)能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体;(2)超声波准直器。本申请可以利用该载体在抑郁症的受试者中表达,这样可以增强血清素能神经元对超声的反应,然后利用超声波准直器通过超声刺激,促进血清素的分泌,从而可以很好地实现治疗抑郁症。

[0023] 本申请第三方面提供的应用,通过异质性过表达超声敏感的大电导机械敏感离子通道MscL-G22S来非侵入性地激活特定的神经元群体,从而使神经元对超声敏感。因此可以利用超声波和能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体制备用于治疗抑郁症的产品。

附图说明

[0024] 为了更清楚地说明本申请实施例中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本申请的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0025] 图1为本申请实施例利用声遗传学调节来增加DRN中的神经元活性和血清素释放的结果图;其中,

[0026] a是病毒注射和光纤植入测定的一种方式示意步骤,具体过程是将遗传编码传感

器AAV-hSyn-jRGECO1a和AAV-TPH2-MscL-EGFP(即MscL组)或AAV-TPH2-EGFP(即Ctrl组)共注射递送到DRN中,然后将光纤植入DRN中,四周后在体内测量超声刺激时的红色荧光强度变化;其中超声刺激参数为:中心频率=1MHz,强度=0.11MPa或0.25MPa,脉冲宽度=500 μ s,脉冲间隔=1ms,刺激持续时间=300ms,刺激间隔=3s。b是在低放大率(比例尺=100 μ m)和高放大率(比例尺=50 μ m)下DRN过表达jRGECO1a和MscL-EGFP(MscL组)或EGFP(Ctrl组)的代表性图像,绿色、红色和蓝色荧光分别表示MscL或EGFP的神经元、jRGECO1a信号和DAPI信号,虚线矩形表示光纤位置。c和d是超声刺激增加DRN中神经元活性图,蓝色和红色分别表示Ctrl组(n=6只小鼠)和MscL组(n=4只小鼠),且c为接受0.25MPa超声刺激的多个脉冲(c的左图)和来自左侧面板的平均jRGECO1a荧光信号(c的右图)时,MscL和EGFP表达小鼠的jRGECO1a荧光迹线,d为jRGECO1a荧光的平均峰值变化(峰值 $\Delta F/F$)对0MPa、0.11MPa、0.25MPa超声刺激的响应;数据显示为平均值 \pm s.e.m.,***p<0.0001;

[0027] e是病毒注射和光纤植入测定的另一种方式示意步骤,具体过程是将遗传编码传感器AAV-hSyn-5-HT2.1和AAV-TPH2-MscL-mCherry(即MscL组)或AAV-TPH2-mCherry(即Ctrl组)共注射递送到DRN中,然后将光纤植入DRN中,四周后在体内测量超声刺激时绿色荧光强度的变化;其中超声刺激参数为:中心频率=0.5MHz,强度=0.11或0.25MPa,脉冲宽度=500 μ s,脉冲间隔=1ms,刺激持续时间=300ms,刺激间隔=3s。f是在低放大率(比例尺=100 μ m)和高放大率(比例尺=50 μ m)下DRN过表达5-HT和MscL(MscL组)或mCherry(Ctrl组)的代表性图像,绿色、红色和蓝色荧光分别表示5-HT信号、表达MscL或mCherry的神经元和DAPI信号,虚线矩形表示光纤的位置。g和h是超声刺激诱导DRN中血清素释放图,蓝色和红色分别表示Ctrl组(n=4只小鼠)组和MscL组(n=5只小鼠),且g为接收0.25MPa超声刺激的多个脉冲(g的左图)和来自左侧面板的平均5-HT荧光信号(g的右图)时,MscL和mCherry表达小鼠的5-HT荧光迹线,h为5-HT荧光的平均峰值变化(峰值 $\Delta F/F$)对0MPa、0.11MPa、0.25MPa超声刺激的响应,数据显示为平均值 \pm s.e.m.,***p<0.0001。

[0028] 图2为本申请实施例利用声遗传学调节选择性激活5-HT^{DRN}神经元并快速逆转绝望样行为的结果图;其中,

[0029] a是病毒注射和超声刺激的示意步骤,具体过程是将遗传编码传感器AAV-TPH2-MscL-EGFP或AAV-TPH2-EGFP递送到DRN中,小鼠恢复后连续14天接受CRS治疗,然后在DRN上方安装一个超声波准直器,一周后超声波准直器中安装定制的可穿戴换能器,并在超声处理时进行与抑郁症相关的行为测试,从测试前15分钟到6分钟测试结束(总共21分钟)接受超声波处理;其中超声刺激参数为:中心频率=0.8MHz,强度=0.3MPa,脉冲宽度=500 μ s,脉冲间隔=1ms,刺激持续时间=300ms,刺激间隔=3s;b是DRN中DAPI的MscL荧光图(比例尺=100 μ m);

[0030] c-g是5-HT^{DRN}神经元的声遗传学调节逆转了绝望样行为效果数据,且c为TST测试的静止时间(immobility time),n=6-7只小鼠(组),d为TST测试的挣扎时间(struggling time),n=6-7只小鼠(组),e为FST测试的静止时间,n=6-8只小鼠(每组),f为FST测试的挣扎时间,n=6-8只小鼠(每组),g是OFT测试的运动速度(velocity),n=6-8只小鼠(每组);

[0031] h-j是5-HT^{DRN}神经元的声遗传学调节提高了神经元活性效果数据,且h为低放大率(比例尺=100 μ m)和高放大率(比例尺=50 μ m)下DRN中c-Fos表达的代表性图像,绿色、红色和蓝色荧光分别表示表达MscL或EGFP的神经元、c-Fos阳性信号和DAPI信号,i是DRN中成像

的每个切片的c-Fos阳性细胞计数, j是DRN中c-Fos和EGFP阳性细胞与c-Fos阳性细胞的比例;数据显示为平均值 \pm s.e.m., * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$;

[0032] 而MscL+US组表示注射AAV-TPH2-MscL-EGFP并进行超声刺激组, MscL-US组表示注射AAV-TPH2-MscL-EGFP且无超声刺激组, Ctrl1+US组表示注射AAV-TPH2-EGFP并进行超声刺激组, Ctrl1-US组表示注射AAV-TPH2-EGFP且无超声刺激组。

[0033] 图3为本申请实施例的体内(In vivo)生物安全性评估结果图;其中,

[0034] a是DRN中Iba1的代表性图像(比例尺=100 μ m);b是DRN中GFAP的代表性图像(比例尺=100 μ m);c是DRN中成像的每个切片的Iba1阳性细胞计数, n=4-5只小鼠(每组), d是DRN中成像的每个切片的GFAP阳性细胞计数, n=3-4只小鼠(每组), e是在DRN中低放大率(比例尺=100 μ m)和高放大率(比例尺=20 μ m)的苏木精和伊红(H&E)染色图, n=1只小鼠(每组);数据显示为平均值 \pm s.e.m., 通过双因素方差分析和事后Tukey检验进行统计不显著;且MscL+US组表示注射AAV-TPH2-MscL-EGFP并进行超声刺激组, MscL-US组表示注射AAV-TPH2-MscL-EGFP且无超声刺激组, Ctrl1+US组表示注射AAV-TPH2-EGFP并进行超声刺激组, Ctrl1-US组表示注射AAV-TPH2-EGFP且无超声刺激组。

具体实施方式

[0035] 为了使本申请要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白, 以下结合实施例, 对本申请进行进一步详细说明。应当理解, 此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本申请, 并不用于限定本申请。

[0036] 本申请中, 术语“和/或”, 描述关联对象的关联关系, 表示可以存在三种关系, 例如, A和/或B, 可以表示: 单独存在A, 同时存在A和B, 单独存在B的情况。其中A, B可以是单数或者复数。字符“/”一般表示前后关联对象是一种“或”的关系。

[0037] 本申请中, “至少一种”是指一种或者多种, “多种”是指两种或两种以上。“以下至少一项(个)”或其类似表达, 是指的这些项中的任意组合, 包括单项(个)或复数项(个)的任意组合。

[0038] 应理解, 在本申请的各种实施例中, 上述各过程的序号的大小并不意味着执行顺序的先后, 部分或全部步骤可以并行执行或先后执行, 各过程的执行顺序应以其功能和内在逻辑确定, 而不对本申请实施例的实施过程构成任何限定。

[0039] 在本申请实施例中使用的术语是仅仅出于描述特定实施例的目的, 而非旨在限制本申请。在本申请实施例和所附权利要求书中所使用的单数形式的“一种”、“所述”和“该”也旨在包括多数形式, 除非上下文清楚地表示其他含义。

[0040] 本申请实施例说明书中所提到的相关成分的重量不仅仅可以指代各组分的具体含量, 也可以表示各组分间重量的比例关系, 因此, 只要是按照本申请实施例说明书相关组分的含量按比例放大或缩小均在本申请实施例说明书公开的范围之内。具体地, 本申请实施例说明书中所述的质量可以是 μ g、mg、g、kg等化工领域公知的质量单位。

[0041] 术语“第一”、“第二”仅用于描述目的, 用来将目的如物质彼此区分开, 而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。例如, 在不脱离本申请实施例范围的情况下, 第一XX也可以被称为第二XX, 类似地, 第二XX也可以被称为第一XX。由此, 限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。

[0042] 基于市面上的抗抑郁药有效率较低,而目前常用的非药物神经调控疗法存在认知障碍甚至长期记忆丧失的潜在风险,此外还具有手术侵袭性以及触发抗抑郁作用长时间甚至没有反应;因此,需要开发具有可预测和可控的治疗效果、耐受性和快速作用的新型神经调控方法。

[0043] 利用神经调控方法-光遗传学-能通过异质性过表达光敏蛋白结合精确的时空分辨率操纵特定细胞类型的活动从而使神经元对光的反应敏感,这样为剖析抑郁症等疾病的神经环路异常提供了一种高保真度神经调节工具。在光遗传学中,由于大脑组织的不透明性,需要将光学纤维侵入性地植入目标大脑区域以传递光。而超声神经调控作为一种新兴的神经调控方法,由于其具有非侵入性、穿透深度深、时空分辨率高等优点,受到广泛关注。声遗传学是光遗传学的对应物,它利用低强度超声,通过异质性过表达超声敏感离子通道来非侵入性地激活特定的神经元群体,从而使神经元对超声敏感。

[0044] 本申请实施例中,利用声遗传学调节通过增强特定的抑郁症相关神经元群来作为治疗抑郁症。本申请实施例中的受试者是指有抑郁症的患者,可以是人或者动物,如啮齿类动物或大型动物。

[0045] 具体地,申请实施例使用一种大电导机械敏感离子通道(Mechanosensitive Channel of Large Conductance, MscL)的突变体:MscL-G22S作为声遗传学工具,靶向中缝背核(Dorsal Raphe Nucleus, DRN)中的血清素能神经元(Serotonergic Neurons),即5-HT^{DRN}神经元,并增强它们对超声的反应。中缝背核是血清素能神经元的主要来源,本申请发现中缝背核中血清素能神经元的声遗传学调节增强了中缝背核中的神经元活性和血清素释放。因此,将本申请实施例将MscL-G22S的基因修饰与非侵入性超声刺激相结合,实现特定神经元群体的增强。

[0046] 重要的是,本申请实施例利用声遗传学调节在小鼠中引发了快速的抗抑郁作用,这反映在悬尾试验和强迫游泳测试(广泛使用的啮齿类动物绝望样行为状态的测量)中,它们不动的时间更少,挣扎的时间更多。此外,没有小胶质细胞和星形胶质细胞的异常激活或者组织损伤的迹象。基于此,本申请实施例首次利用MscL-G22S作为声遗传学工具,试图通过对啮齿类动物特定神经元群体的声遗传学调节来治疗抑郁症,为研究抑郁症提供了一种新的方法,包括用于治疗抑郁症的系统和产品以及应用。具体方案如下。

[0047] 本申请实施例第一方面提供一种用于治疗抑郁症的系统,包括:

[0048] (1) 表达载体植入单元:用于将能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体植入受试者进行表达。该载体可以表达MscL-G22S修饰基因在受试者中表达。

[0049] (2) 声遗传学调节单元:用于对植入有上述载体的受试者进行超声刺激。

[0050] 本申请实施例可以对表达载体植入单元中植入有上述载体的受试者进行超声刺激,利用大电导机械敏感离子通道突变体MscL-G22S作为声遗传学工具,使其在受试者中表达可以增强血清素能神经元对超声的反应,通过声遗传学调节具有很好的抗抑郁作用,从而实现治疗抑郁症效果。

[0051] 在一些实施例中,表达载体植入单元中使用的能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体包括具有Tph2启动子的病毒载体。这样可以更好地在特定神经元类型上进行表达。例如,可以是AAV-TPH2-MscL-EGFP或者AAV-TPH2-MscL-mCherry。

[0052] 在一些实施例中,表达载体植入单元中能表达大电导机械敏感离子通道MscL-

G22S的载体植入于受试者的中缝背核的血清素能神经元中表达。中缝背核是血清素能神经元的主要来源,中缝背核中血清素能神经元的声遗传学调节增强了中缝背核中的神经元活性和血清素释放。

[0053] 在一些实施例中,声遗传学调节单元使用的超声刺激包括:中心频率,0.5~1.0MHz;强度,0.2~0.3MPa;脉冲宽度,450~550 μ s;脉冲重复频率,0.5~1.5kHz;刺激持续时间,250~350ms;刺激间隔,2~4s。上述条件下可以很好地调节血清素能神经元对超声的反应。

[0054] 超声波具有安全、高时空分辨率特点,可以无创地输送到感兴趣的大脑区域,甚至是大脑深部区域。声遗传学调节可以针对特定的神经元群体,使治疗效果更加可控和可预测。

[0055] 在一些实施例中,用于治疗抑郁症的系统还包括测试单元:用于测试超声刺激的效果。例如,测试单元可以包括:光纤光度测定记录、慢性束缚应激、悬尾试验、强迫游泳测试、旷场试验、染色以及数据统计分析工具等。

[0056] 本申请实施例第二方面提供一种用于治疗抑郁症的产品包括:(1)能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体,用于植入抑郁症受试者中,这样可以增强血清素能神经元对超声的反应;(2)超声波准直器,可以产生超声刺激,从而可以很好地实现非侵入性地治疗受试者的抑郁症。

[0057] 本申请实施例可以利用上述能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体载体以超声波准直器,可以可控和可预测、耐受且快速作用的非侵入性地治疗抑郁症。

[0058] 在一些实施例中,能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体包括具有Tph2启动子的病毒载体。

[0059] 在一些实施例中,超声波准直器工作参数包括:中心频率,0.5~1.0MHz;强度,0.2~0.3MPa;脉冲宽度,450~550 μ s;脉冲重复频率,0.5~1.5kHz;刺激持续时间,250~350ms;刺激间隔,2~4s。

[0060] 在一些实施例中,上述用于治疗抑郁症的产品还包括:光学纤维和数据分析软件。光学纤维指用于传导光的人造纤维,简称光纤,可以传输数据。数据分析软件可以在超声波准直器工作后,对受试者实验结果数据分析。

[0061] 本申请实施例第三方面提供一种应用,即超声波和能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体在制备用于治疗抑郁症的产品中的应用。

[0062] 本申请实施例通过异质性过表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S在神经元群体,从而使血清素能神经元对超声敏感。因此可以利用超声波和能表达大电导机械敏感离子通道MscL-G22S的载体制备用于治疗抑郁症的产品。

[0063] 具体地,本申请实施例评估了中缝背核中血清素能神经元的声遗传学调节时的抑郁相关行为,利用声遗传学调节治疗抑郁症。而声遗传学工具即MscL-G22S,可以使神经元对超声敏感。因此,将MscL-G22S的基因修饰与非侵入性超声刺激相结合,实现血清素能神经元群体的增强。

[0064] 下面结合具体实施例进行说明。

[0065] 实施例

[0066] 本申请中,所有实验均在雄性C57BL/6J小鼠上进行。这些小鼠被安置在香港理工

大学的集中动物设施(CAF)中。所有动物实验均由香港理工大学动物伦理小组委员会(ASESC)批准,并按照香港特区政府卫生动物部(实验控制)的指导方针进行。

[0067] 立体定位手术(Stereotaxic surgery):用“鸡尾酒”疗法将氯胺酮(Ketamine)和甲苯噻嗪(Xylazine)联合麻醉小鼠(各用量为:氯胺酮为100mg/kg,甲苯噻嗪为10mg/kg),然后固定在立体定位装置(RWD Life Science Co.,Ltd,深圳市瑞沃德生命科技有限公司)中。用无菌手术刀片去除小鼠头皮,暴露bregma点和lambda点。在清洁和整平颅骨后,注射病毒,并植入光纤或安装超声准直器,具体参加后续实验小节。在所有立体定向手术后,立即将小鼠放在加热垫上,直到它们醒来。在手术7天后,对小鼠进行纤维光度测定或行为测试。

[0068] 病毒注射(Virus Injection):小鼠在立体定位仪上清洁并平整颅骨后,用微型钻孔机(RWD Life Science Co.,Ltd)在目标脑区上方的颅骨上开一个小孔。为了靶向中缝背核的血清素能神经元,通过玻璃移液管以0.1 μ L/min的速率将携带MscL-G22S、且在Tph2启动子控制下的腺相关病毒(例如:AAV-TPH2-MscL-EGFP或者AAV-TPH2-MscL-mCherry)注射到中缝背核中(1 μ L;AP,-4.4mm;ML,0mm;DV,-3.4mm)中。在取出之前,将玻璃移液管放置在适当位置额外5分钟用于输注。为了检测中缝背核中的钙活性或血清素释放,例如,将AAV-hSyn-jRGECO1a(具有红色荧光的遗传编码钙传感器)或AAV-hSyn-5-HT2.1(具有绿色荧光的基于GPCR激活的遗传编码5-HT传感器)注入中缝背核中。

[0069] 光纤植入(Optic fiber implantation.):将小鼠的头部固定在立体定位仪上。切除一部分头皮,用微型钻孔机在中缝背核上方的头骨上开一个小孔。然后,将黑色光纤套管(型号,FOC-B--1.25-200-0.37-3.5;Inper Co.,Ltd,中国浙江)植入中缝背核(AP,距前体-4.4mm;ML,0mm;DV,-3.35mm)中,并用牙水泥固定。

[0070] 超声准直器安装(Ultrasonic collimator installation):在固定在立体定位仪上后,切除中缝背核上方的一部分小鼠头皮。将定制的可穿戴超声准直器放置在与目标大脑区域对齐的完整颅骨上,并用牙科水泥固定。

[0071] 超声系统和刺激(Ultrasound system and stimulation):函数发生器的输出(AFG251,Tektronix Inc.,Beaverton,USA)通过BNC接线连接到功率放大器(A075,Electronics&Innovation Ltd.,Rochester,USA)的输入。放大器的输出连接到定制的可穿戴换能器上。然后,将定制的可穿戴换能器安装到与超声凝胶耦合的准直器中。利用水听器测量了二维声场分布。示例性地,一些测试中超声刺激的参数可以是:中心频率,0.8MHz;强度,0.15或0.3MPa;脉冲宽度,500 μ s;脉冲重复频率,1kHz;刺激持续时间,300ms;刺激间隔,3s。

[0072] 光纤光度测定记录(Fiber photometry recording):小鼠用1~2%异氟烷麻醉。使用眼膏防止角膜干燥。使用光纤接插线连接植入光纤和记录系统(Thinker Tech Nanjing Biotech Co.,Ltd,中国南京)。红色钙敏感蛋白jRGECO1a和血清素5-HT的激发波长分别为570nm和480nm。在100Hz下收集数据,并使用定制的MATLAB脚本进行分析。荧光变化($\Delta F/F$)计算为 $(F-F_0)/F_0$,其中 F_0 为基线荧光信号。

[0073] 慢性束缚应激(Chronic restraint stress,CRS):将小鼠单独放入通风良好的50毫升锥形管中,每天约3小时,连续14天,对照小鼠留在笼子。每天CRS后,将受约束的小鼠从管中取出,并立即返回它们的笼子。

[0074] 悬尾试验(Tail suspension test,TST):通过用胶带固定小鼠的尾巴,将小鼠悬浮在水平地板上方25cm处6分钟。由对动物分组不详的观察者进行录像和分析。“静止时间”被定义为它们的身体和四肢都不动的时候。“挣扎时间”被定义为观察到身体剧烈扭动和挣扎的时间。

[0075] 强迫游泳测试(Forced swim test,FST):将小鼠分别放入含有水(24±1°C)的有机玻璃圆柱体(直径12cm,高度25cm)中,水深度10cm,并允许其自由游泳6分钟。每次测试后,清洁圆柱体并用新鲜水重新填充。由对动物分组不详的观察者进行录像和分析。“静止时间”的定义是,在后4分钟内,小鼠在没有任何运动的情况下漂浮。“挣扎时间”是指在后4分钟内观察到前肢快速拍动水面,求生欲强。

[0076] 旷场试验(Open field test,OFT):将小鼠单独放置在立方体塑料室(40cm×40cm×40cm)的中心区域,并允许其自由移动6分钟。对小鼠行为进行录像,并用ToxTrac软件测量小鼠在6分钟内的运动速度。

[0077] 免疫荧光染色(Immunofluorescence staining):

[0078] 用“鸡尾酒”疗法将氯胺酮和甲苯噻嗪混合物麻醉小鼠。麻醉后,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)(Cat.no.,70011044;Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,USA)灌注小鼠,然后4%多聚甲醛溶液(PFA solution)(目录号:sc-281692;Santa Cruz Biotechnology Inc.,California,USA)灌注。提取大脑并在4°C冰箱中用4%多聚甲醛溶液固定过夜。通过振动切片机(VT1200S;Leica Biosystems GmbH,Wetzlar,Germany)从固定的大脑获得厚度为40μm的冠状切片。切片在室温下用封闭溶液(10%正常山羊血清+1%BSA+0.3%Triton在1X PBS中)封闭90分钟,并与准备的抗c-Fos(1:500;Cat.no.,2250;CST,Massachusetts,USA)、Iba-1(1:1000;Cat.no.,17198,CST,Massachusetts,USA)或GFAP(1:1000,Cat.no.,12389;CST,Massachusetts,USA)的一抗溶液在4°C冰箱中孵育过夜。

[0079] 然后用1X PBS洗涤切片(5分钟,3次)。洗涤后,将切片与抗兔Alexa Fluor488、555或633的二抗(1:1000;Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,USA)在室温下孵育90分钟。然后将切片在PBS中洗涤,并通过具有DAPI(Cat.no.,ab104139;Abcam,Cambridge,UK)的封片剂安装在玻片上。通过共聚焦显微镜(TCS SP8 MP;Leica Microsystems GmbH,Wetzlar,Germany)对染色进行可视化,并由对动物处理不知情的观察者用ImageJ软件进行分析。

[0080] 苏木精和伊红染色(Hematoxylin and eosin staining,H&E):用“鸡尾酒”疗法将氯胺酮和甲苯噻嗪混合物麻醉小鼠。麻醉后,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)灌注小鼠,然后用4%多聚甲醛溶液(PFA solution)灌注。提取脑组织,在4°C冰箱中用4%多聚甲醛溶液固定24小时,然后用磷酸缓冲盐溶液洗涤。接下来实验:将脑组织依次用更高浓度的酒精(70%、80%、90%、95%、100%)脱水,用二甲苯透明化,并用石蜡包埋。用切片机(Leica RM2235)从石蜡包埋块中获得5μm厚的冠状脑切片,并用苏木精-伊红染色试剂盒(Solarbio G1121)染色。染色后,切片用梯度酒精再次脱水,用二甲苯再次透明化,并用树脂固定进行显微镜观察。

[0081] 数据分析(Data analysis):利用软件GraphPad Prism 7.0分析数据和生成图形。示意图用CorelDRAW X8绘制。数据采用双尾不配对t检验或双向方差分析(ANOVA),结合事后Tukey检验。所有数据均以平均值表示±标准误差(SEM)。P值<0.05被认为具有统计学意

义。

[0082] 验证实验1

[0083] 5-HT^{DRN}神经元的声遗传学调节增加了DRN中的神经元活性和血清素释放:

[0084] 本申请实施例研究了声遗传学调节是否可以操纵DRN(比mPFC相对更深的大脑区域)中的神经元活动。本申请实施例将红色钙敏感蛋白jRGECO1a和腺相关病毒AAVs(可以表达MscL-EGFP或EGFP)共注射到DRN中,然后将光纤植入DRN中。四周后,在超声处理时在体内测量红色荧光强度的变化。

[0085] 实验结果如图1所示:在超声刺激之前,MscL组和Ctrl组均表现出相当的基线荧光水平(峰值 $\Delta F/F$,MscL vs. EGFP: $0.093 \pm 0.022\%$ vs. $0.075 \pm 0.015\%$, $p=0.5142$,见图1中的d);当0.11MPa的超声刺激时,MscL组和Ctrl组的jRGECO1a荧光强度没有显著变化(峰值 $\Delta F/F$,MscL vs. EGFP: $0.115 \pm 0.019\%$ vs. $0.082 \pm 0.012\%$, $p=0.1577$,见图1中的d);但0.25MPa的超声刺激重复诱导MscL组的jRGECO1a荧光强度同步升高,而Ctrl组没有(见图1中的c)。当0.25MPa的超声刺激时,表达MscL的小鼠的峰值 $\Delta F/F$ 显著高于只表达EGFP的小鼠(峰值 $\Delta F/F$,MscL vs. EGFP: $0.365 \pm 0.029\%$ vs. $0.072 \pm 0.020\%$, $p=2.4 \times 10^{-5}$,见图1中的d)。这些结果共同表明,声遗传学刺激能够实时增加DRN中的钙活性。

[0086] 基于众所周知的神经元活动增加导致神经递质释放增强的生物学现象,本申请进一步观察到DRN中因超声刺激释放血清素。本申请将5-HT传感器和用于表达MscL或mCherry的AAVs共同注射到DRN中,然后将光纤植入DRN中,接下来在体内测量超声处理时绿色荧光强度的变化。MscL组和Ctrl组在超声刺激前的基线荧光没有明显差异(峰值 $\Delta F/F$,MscL vs. mCherry: $0.054 \pm 0.020\%$ vs. $0.048 \pm 0.009\%$, $p=0.7947$,见图1中的h)。此外,当0.11MPa的超声刺激时,MscL组和Ctrl组之间的5-HT荧光强度没有显著变化(峰值 $\Delta F/F$,MscL vs. mCherry: $0.114 \pm 0.022\%$ vs. $0.063 \pm 0.015\%$, $p=0.1085$,见图1中的h);但0.25MPa超声刺激同步诱导MscL组5-HT荧光强度增强,而Ctrl组没有(见图1中的g)。当超声刺激在0.25MPa时,MscL组的5-HT荧光强度显著升高(峰值 $\Delta F/F$,MscL vs. mCherry: $0.482 \pm 0.028\%$ vs. $0.078 \pm 0.026\%$, $p=1.7 \times 10^{-5}$,见图1中的h)。这些结果表明,5-HT^{DRN}神经元的声遗传学调节以实时方式增加了DRN中的神经元活性和血清素释放。

[0087] 验证实验2

[0088] 5-HT^{DRN}神经元的声遗传学调节选择性激活5-HT^{DRN}神经元并快速逆转绝望样行为:

[0089] 基于5-HT^{DRN}神经元的声遗传学调节以实时方式增加神经元活性并增强DRN中血清素的释放。本申请实施例进一步研究它们的声遗传学调节是否能迅速改善抑郁症相关行为。为了靶向5-HT^{DRN}神经元,本申请实施例在Tph2启动子的控制下将携带MscL-EGFP或EGFP的AAV输注到DRN中。小鼠恢复后,连续14天接受CRS治疗。然后在DRN上方安装一个超声波准直器,一周后将定制的可穿戴换能器安装到超声波准直器中,并在超声处理时观察到抑郁相关行为。

[0090] 实验结果如图2所示:比较MscL-US和Ctrl-US组时,没有观察到TST和FST的明显行为变化,表明声遗传学工具MscL在申请设置中没有影响绝望样状态的基线。但当应用超声刺激时,与表达EGFP的对照组小鼠相比,表达MscL的小鼠在TST中静止时间显著减少(MscL+US组 vs. Ctrl+US组: 53.29 ± 13.74 秒 vs. 134.60 ± 14.51 秒, $p=0.0009$,见图2中的c),挣扎时间更多(MscL+US组 vs. Ctrl+US组: 141.40 ± 12.11 秒 vs. 58.14 ± 10.82 秒, $p=2.1 \times 10^{-5}$,

见图2中的d)。MscL+US组的小鼠在FST中也表现出比Ctrl+US组小鼠更少的静止时间(MscL+US vs. Ctrl+US: 58.50 ± 10.28 秒vs. 121.40 ± 18.02 秒, $p=0.0373$, 图2中的e)和更多的挣扎时间(MscL+US组vs. Ctrl+US组: 129.10 ± 15.17 秒vs. 76.00 ± 13.23 秒, $p=0.0367$, 见图2中的f)。但这些组之间OFT的运动速度没有明显差异(见图2中的g)。这些观察结果表明, 5-HT^{DRN}神经元的声遗传学调节可以迅速逆转应激小鼠的绝望样行为。

[0091] 为了进一步证实针对5-HT^{DRN}神经元的声遗传学调节的选择特异性, 本申请检查了被激活的神经元是否为MscL表达的神经元。见图2中h-j, 结果发现, 声遗传学调节显著提高了DRN中c-Fos蛋白的表达(MscL+US组vs. Ctrl+US组、MscL-US组、Ctrl-US组 = 81.50 ± 5.92 vs. 32.33 ± 5.40 、 28.20 ± 5.21 、 22.60 ± 4.76 , $p=1.6 \times 10^{-5}$ 、 1.0×10^{-5} 和 2.6×10^{-6})。而且重要的是, MscL+US组中c-Fos阳性和绿色EGFP荧光信号之间的共定位($67.78 \pm 3.60\%$)显著高于Ctrl+US组($21.39 \pm 3.74\%$, $p=2.1 \times 10^{-8}$)、MscL-US组($17.60 \pm 2.85\%$, $p=1.3 \times 10^{-8}$)。表明通过声遗传学调节激活的神经元主要是表达MscL的神经元。

[0092] 验证实验3

[0093] DRN声遗传学调节后的生物安全性评估:

[0094] 离子化钙结合适配分子1(Iba1)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)分别是活化小胶质细胞和星形胶质细胞的典型生物标志物, 其激活被确定为不良组织反应的早期指标。因此, 本申请实施例进行了免疫荧光染色、苏木精和伊红(H&E)染色。

[0095] 实验结果如图3所示: 在MscL+US、Ctrl+US、MscL-US和Ctrl-US组中, 未观察到Iba1或GFAP的表达差异(见图3中的a-d)。此外, 在声遗传学调节后, DRN中没有检测到神经元损失或组织反应变化(见图3中的e)。因而, 这些结果表明, 声遗传学调节能够选择性地激活5-HT^{DRN}神经元, 并迅速逆转绝望样行为, 而且没有组织损伤的迹象。

[0096] 以上所述仅为本申请的较佳实施例而已, 并不用以限制本申请, 凡在本申请的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等, 均应包含在本申请的保护范围之内。

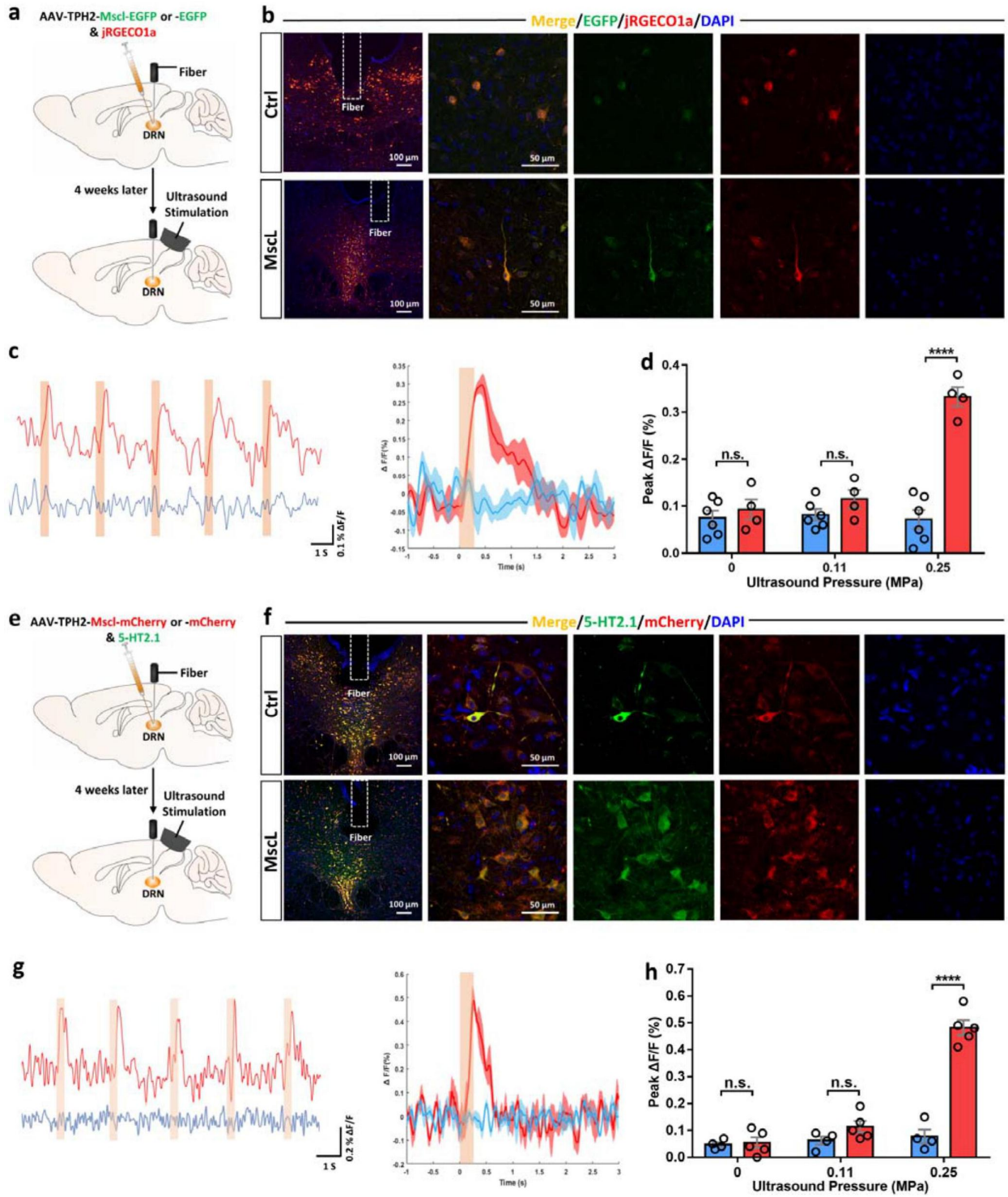


图1

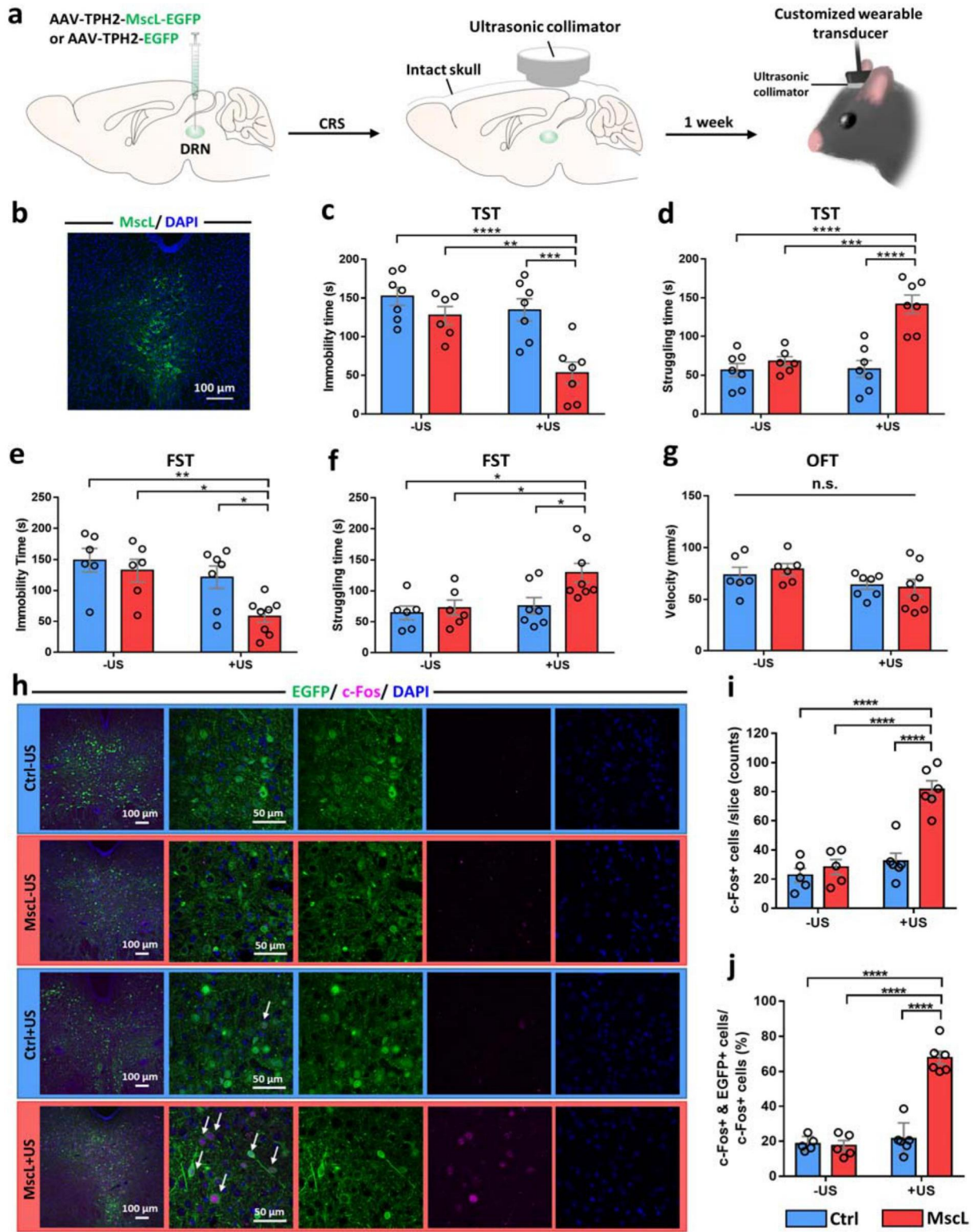


图2

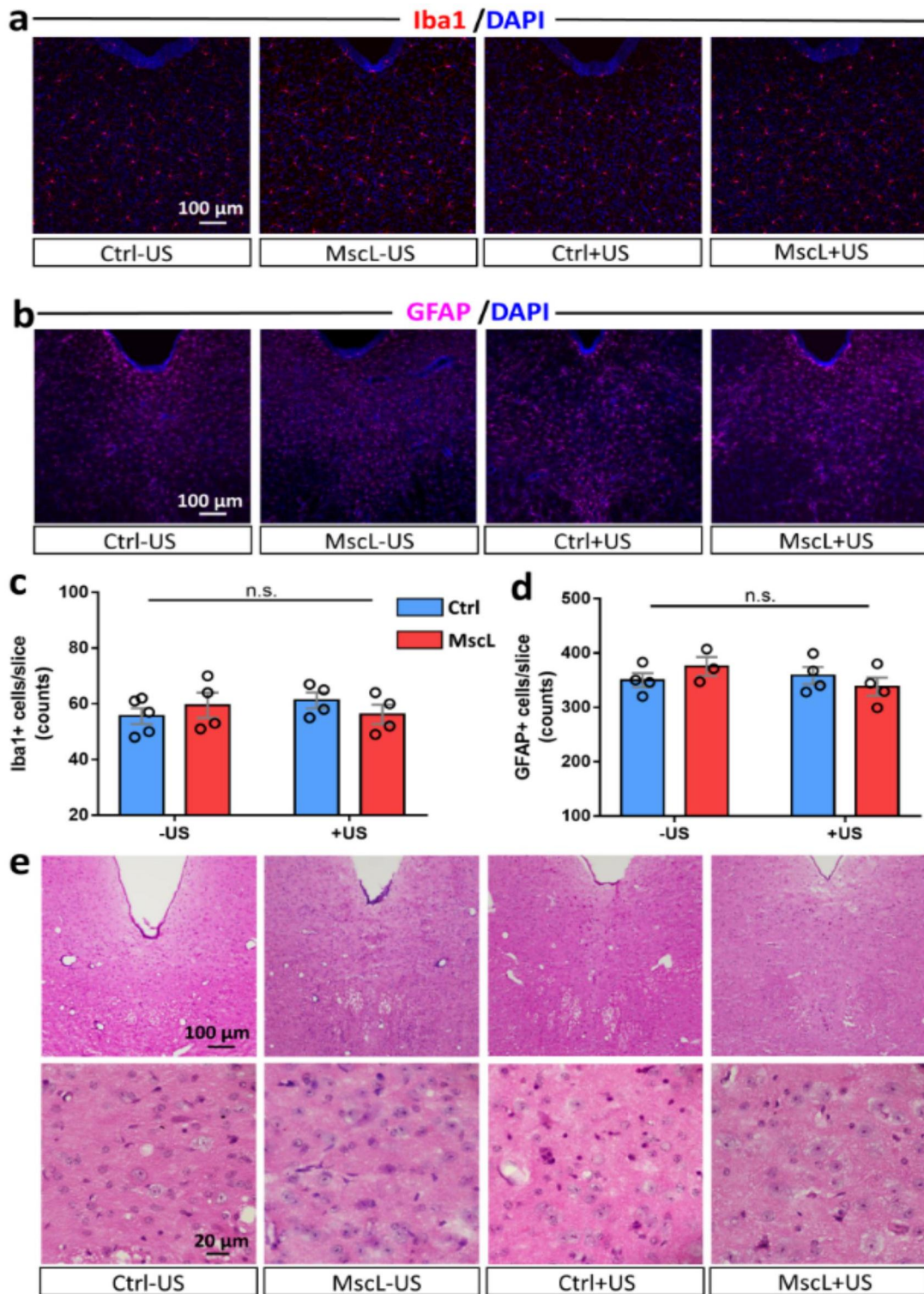


图3