



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 119498255 B

(45) 授权公告日 2025. 11. 25

(21) 申请号 202411492644.7

A01K 67/0278 (2024.01)

(22) 申请日 2024.10.24

A61K 49/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 119498255 A

(56) 对比文件

WO 2024097798 A1, 2024.05.10

AU 2019294699 A1, 2021.01.21

(43) 申请公布日 2025.02.25

审查员 刘文豪

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院
地址 518057 广东省深圳市南山区粤海街
道高新技术产业园南区粤兴一道18号
香港理工大学产学研大楼205室

(72) 发明人 李晓晓 庞瑞康

(74) 专利代理机构 深圳市君胜知识产权代理事
务所(普通合伙) 44268

专利代理师 潘芊颖

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

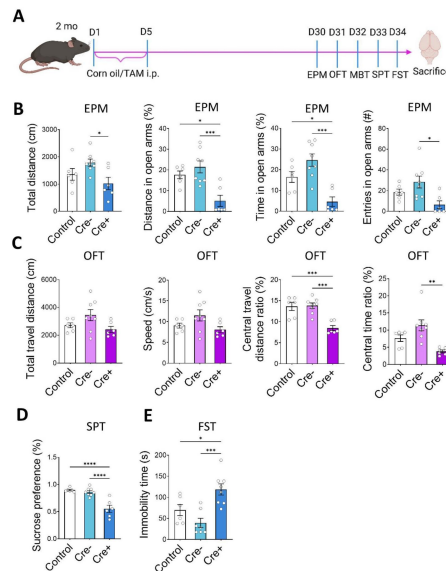
权利要求书1页 说明书7页 附图7页

(54) 发明名称

一种抑郁症小鼠模型及其构建方法与应用

(57) 摘要

本申请涉及生物医药技术领域,具体公开一种抑郁症小鼠模型及其构建方法与应用。其中抑郁症小鼠模型的构建方法包括对小鼠进行小胶质细胞特异性Csf1r杂合敲除。本申请通过小胶质细胞特异性Csf1r杂合敲除诱导小鼠出现抑郁样行为,获得抑郁症小鼠模型,与现有的通过慢性不可预测的轻度压力刺激造成动物抑郁样行为的方法相比较,抑郁的表型稳定且抑郁表型出现快,便于进行抑郁症相关研究的重复实验,可以获得重复性强的实验结果。



1. 一种抑郁症小鼠模型的构建方法,其特征在于,所述抑郁症小鼠模型的构建方法包括:对小鼠进行小胶质细胞特异性Csf1r杂合敲除;

所述小鼠为Cre小鼠;

所述对小鼠进行小胶质细胞特异性Csf1r杂合敲除的步骤包括:将野生型Cre小鼠、第一Cre小鼠和第二Cre小鼠进行交配,得到抑郁症小鼠模型;

所述野生型为基因型是Wildtype的C57BL/6J小鼠;

所述第一Cre小鼠的Csf1r基因的外显子两侧分别插入LoxP位点;

所述第二Cre小鼠的Cx3cr1基因起始密码子处插入creERT2-WPRE-polyA序列。

2. 根据权利要求1所述的抑郁症小鼠模型的构建方法,其特征在于,所述抑郁症小鼠模型的构建方法还包括对所述抑郁症小鼠模型进行基因分型鉴定。

3. 根据权利要求2所述的抑郁症小鼠模型的构建方法,其特征在于,所述基因分型鉴定中鉴定的基因包括Cx3cr1-Cre基因和Csf1r-flox基因。

4. 根据权利要求1所述的抑郁症小鼠模型的构建方法,其特征在于,所述抑郁症小鼠模型的构建方法还包括对所述抑郁症小鼠模型的抑郁样行为进行评估。

5. 根据权利要求4所述的抑郁症小鼠模型的构建方法,其特征在于,所述抑郁样行为的评估方法包括高架十字迷宫实验、旷场实验、糖水偏好实验、强迫游泳实验中的至少一种。

一种抑郁症小鼠模型及其构建方法与应用

技术领域

[0001] 本申请涉及生物医药技术领域,尤其涉及一种抑郁症小鼠模型及其构建方法与应用。

背景技术

[0002] 抑郁症是常见的精神障碍,是致残性疾病。根据世界卫生组织(WHO)的数据,大约有3.8%的人口,包括2.6%儿童和青年,以及5.0%成年人受到抑郁症的影响。抑郁症在中国的患病率持续上升,在女性中的发病率通常高于男性。社会压力、心理压力和生物因素都能引发抑郁症的发生。目前研究抑郁发病的原因和治疗药物的评价一般是用慢性不可预测的轻度压力造成小鼠出现抑郁表型,但该动物模型不稳定,个体差异较大,给实验带来不确定性。

[0003] 因此,现有技术还有待改进。

发明内容

[0004] 鉴于上述现有技术的不足,本申请的目的在于提供一种抑郁症小鼠模型及其构建方法与应用,旨在解决现有的抑郁症动物模型稳定性不高,个体差异大,给实验带来不确定性的问题。

[0005] 本申请的技术方案如下:

[0006] 本申请的第一方面,提供一种抑郁症小鼠模型的构建方法,所述抑郁症小鼠模型的构建方法包括:对小鼠进行小胶质细胞特异性Csf1r杂合敲除。

[0007] 可选地,所述小鼠为Cre小鼠。

[0008] 可选地,所述对小鼠进行小胶质细胞特异性Csf1r杂合敲除的步骤包括:将野生型Cre小鼠、第一Cre小鼠和第二Cre小鼠进行交配,得到抑郁症小鼠模型;所述第一Cre小鼠的Csf1r基因的外显子两侧分别插入LoxP位点;所述第二Cre小鼠的Cx3cr1基因的起始密码子处插入creERT2-WPRE-polyA序列。

[0009] 可选地,所述抑郁症小鼠模型的构建方法还包括对所述抑郁症小鼠模型进行基因分型鉴定。

[0010] 可选地,所述基因分型鉴定中鉴定的基因包括Cx3cr1-Cre基因和Csf1r-flox基因。

[0011] 可选地,所述抑郁症小鼠模型的构建方法还包括对所述抑郁症小鼠模型的抑郁样行为进行评估。

[0012] 可选地,所述抑郁样行为的评估方法包括高架十字迷宫实验、旷场实验、糖水偏好实验、强迫游泳实验中的至少一种。

[0013] 本申请的第二方面,提供一种本申请提供的抑郁症小鼠模型的构建方法构建的抑郁症小鼠模型。

[0014] 本申请的第三方面,提供一种本申请提供的抑郁症小鼠模型在抑郁症理论研究中

的应用。

[0015] 本申请的第四方面,提供一种本申请提供的抑郁症小鼠模型在抑郁症药物筛选中的应用。

[0016] 与现有技术相比,本申请具有如下优势:

[0017] 本申请通过小胶质特异性Csf1r杂合敲除诱导小鼠出现抑郁样行为,获得抑郁症小鼠模型,与现有的通过慢性不可预测的轻度压力CUMS刺激造成动物抑郁样行为的方法相比较,抑郁的表型稳定且抑郁表型出现快,便于进行抑郁症相关研究的重复实验,可以获得重复性强的实验结果。此外,采用本申请的方法制备的抑郁症小鼠模型能模拟小胶质细胞相关的抑郁症和神经炎症相关的抑郁症,为小胶质细胞相关或神经炎症相关的抑郁症的机理研究和药物筛选提供基础。

附图说明

[0018] 为了更清楚地说明本申请实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0019] 图1为本申请实施例提供的各组小鼠(WT、Cre⁻、Cre⁺)抑郁样行为测试图:

[0020] A为小鼠抑郁症模型给药及行为学测试时间表;B为小鼠高架十字迷宫行为学结果;C为小鼠旷场实验行为学结果;D为小鼠糖水偏好实验行为学结果;E为小鼠强迫游泳实验行为学结果;

[0021] 图2为本申请实施例提供的各组小鼠(WT、Cre⁻、Cre⁺)mPFC脑区免疫荧光染色图:

[0022] A为各组小鼠Iba1免疫荧光染色结果;B为各组小鼠mPFC脑区小胶质细胞覆盖面积统计;C为各组小鼠mPFC脑区小胶质细胞分支总长度统计;D为各组小鼠mPFC脑区小胶质细胞分支总数量统计;E为各组小鼠mPFC脑区高尔基染色代表图片;F为各组小鼠mPFC脑区树突棘数量统计;G为各组小鼠mPFC脑区Iba1与PSD95免疫荧光共定位代表图片;H为各组小鼠mPFC脑区Iba1中PSD95体积的统计;

[0023] 图3为本申请实施例提供的各组小鼠(Cre⁻、Cre⁺、Cre⁺_PLX)抑郁样行为测试图:

[0024] A为小鼠抑郁症模型给药及行为学测试时间表;B为小鼠高架十字迷宫行为学结果;C为小鼠旷场实验行为学结果;D为小鼠糖水偏好实验行为学结果;E为小鼠强迫游泳实验行为学结果;

[0025] 图4为为本申请实施例提供的各组小鼠(Cre⁻、Cre⁺、Cre⁺_PLX)mPFC脑区免疫荧光染色图:

[0026] A为各组小鼠Iba1免疫荧光染色结果;B为各组小鼠mPFC脑区小胶质细胞覆盖面积统计;C为各组小鼠mPFC脑区小胶质细胞分支总长度统计;D为各组小鼠mPFC脑区小胶质细胞分支总数量统计;E为各组小鼠mPFC脑区高尔基染色代表图片;F为各组小鼠mPFC脑区树突棘数量统计;G为各组小鼠mPFC脑区Iba1与PSD95免疫荧光共定位代表图片;H为各组小鼠mPFC脑区Iba1中PSD95体积的统计;

[0027] 图5为本申请实施例提供的小鼠抑郁症模型mPFC脑区中信号通路分析图:

[0028] A为Cre⁻小鼠和Cre⁺小鼠的差异基因KEGG富集分析;B为NOD家族基因富集热图;C为Cre⁻小鼠和Cre⁺小鼠mPFC脑区中NLRP6/caspase-1/IL-1 β /IL-18通路各分子蛋白表达量差异;D为Cre⁻小鼠和Cre⁺小鼠mPFC脑区Iba1与Caspase-1免疫荧光共定位;E为Iba1与

Caspase-1共定位线性统计;F为Cre-小鼠和Cre+小鼠mPFC脑区NeuN与Caspase-1免疫荧光共定位;G为NeuN与Caspase-1共定位线性统计;H为Cre-小鼠和Cre+小鼠mPFC脑区GFAP与Caspase-1免疫荧光共定位;I为GFAP与Caspase-1共定位线性统计;

[0029] 图6为本申请实施例提供的各组小鼠(Cre-、Cre+、Cre+_VX765)抑郁样行为测试图:

[0030] A为小鼠抑郁症模型给药及行为学测试时间表;B为小鼠高架十字迷宫行为学结果;C为小鼠旷场实验行为学结果;D为小鼠糖水偏好实验行为学结果;E为小鼠强迫游泳实验行为学结果;

[0031] 图7为本申请实施例提供的各组小鼠(Cre-、Cre+、Cre+_VX765)mPFC脑区免疫荧光染色图:

[0032] A为各组小鼠Iba1免疫荧光染色结果;B为各组小鼠mPFC脑区小胶质细胞覆盖面积统计;C为各组小鼠mPFC脑区小胶质细胞分支总长度统计;D为各组小鼠mPFC脑区小胶质细胞分支总数量统计;E为各组小鼠mPFC脑区高尔基染色代表图片;F为各组小鼠mPFC脑区树突棘数量统计;G为各组小鼠mPFC脑区Iba1与PSD95免疫荧光共定位代表图片;H为各组小鼠mPFC脑区Iba1中PSD95体积的统计。

具体实施方式

[0033] 为使本申请的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本申请附图和实施例,对本申请实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本申请的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本申请的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例,都属于本申请保护范围。在不冲突的情况下,下述实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0034] 需要说明,若本申请实施中有涉及“第一”、“第二”等的描述,则该“第一”、“第二”等描述仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示其对相对重要性和隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。另外,各个实施例之间的技术方案可以相互组合,但是必须使本领域普通技术人员能够实现为基础,当技术方案的结合出现相互矛盾或无法实现时应当认为这种技术方案的结合不存在,也不在本申请要求的保护范围之内。

[0035] 小胶质细胞在抑郁症的发病机制中扮演着重要角色。小胶质细胞在脑内的主要功能之一是响应免疫信号,参与炎症反应。当大脑受到损伤或感染时,小胶质细胞会被激活,释放各种炎症因子和细胞因子(如TNF- α 、IL-1 β 和IL-6),这可能导致神经炎症。抑郁症患者常常伴随神经炎症现象,活化的小胶质细胞会促进炎症,从而加重抑郁症状。小胶质细胞在神经可塑性方面也起着关键作用。它们参与突触的形成和修剪,抑郁症与神经可塑性障碍密切相关,小胶质细胞的功能失调可能导致神经连接的异常,进而影响情绪。抑郁症的病理机制可能包括小胶质细胞的过度激活和持续的神经炎症,这可能导致神经元损伤和死亡,并加剧抑郁症状。

[0036] Csf1r(集落刺激因子-1受体,Colony Stimulating Factor 1Receptor)在维持小胶质细胞的功能和生存中扮演着至关重要的角色。小胶质细胞是来源于胚胎的骨髓单核细胞前体,在发育过程中,Csf1r的信号传导对于小胶质细胞的增加和分化至关重要。Csf1r信

号不仅促进小胶质细胞的存活,还参与调节它们的活化状态。小胶质细胞在反应于神经损伤或疾病时,通过Csf1r介导的信号来调节其功能,包括产生和释放各种炎症介质,从而影响神经炎症的进程。在阿尔茨海默病和其他神经退行性疾病中,Csf1r的表达变化可能会直接影响小胶质细胞的功能,从而影响疾病的进展,但在抑郁症中,Csf1r的功能有待探索。

[0037] 基于此,本申请实施例提供一种抑郁症小鼠模型的制备方法,包括步骤:对小鼠进行小胶质细胞特异性Csf1r杂合敲除获得。其中,小鼠为Cre小鼠。

[0038] 在一些实施方式中,对小鼠进行小胶质细胞特异性Csf1r杂合敲除的步骤可以为:将野生型Cre小鼠、第一Cre小鼠和第二Cre小鼠进行交配,得到抑郁症小鼠模型。其中,第一Cre小鼠的Csf1r基因的外显子两侧分别插入LoxP位点,第二Cre小鼠的Cx3cr1基因起始密码子处插入creERT2-WPRE-polyA序列。

[0039] 通过Cre-Lox基因重组系统对小鼠小胶质细胞中的Csf1r基因进行了杂合敲除。通过第一Cre小鼠的Csf1r基因的外显子两侧插入LoxP位点,在第二Cre小鼠的Cx3cr1基因起始密码子处插入creERT2-WPRE-polyA序列。在野生型Cre小鼠、第一Cre小鼠和第二Cre小鼠的交配过程中,Cre重组酶被表达并可以将两个Loxp位点之间的DNA序列剪除并重新将两端环化连接,进而实现Csf1r基因的特异性敲除。

[0040] 在一些实施方式中,抑郁症小鼠模型的构建方法还包括:对抑郁症小鼠模型进行基因分型鉴定。具体而言,通过对Cx3cr1-Cre基因和Csf1r-flox基因鉴定实现对抑郁症小鼠模型进行基因分型鉴定。Cx3cr1-Cre基因和Csf1r-flox基因鉴定可以使用针对Cx3cr1-Cre基因和Csf1r-flox基因的引物,通过PCR扩增结合凝胶电泳以及测序的方式进行鉴定。

[0041] 在一些实施方式中,抑郁症小鼠模型的构建方法还包括对抑郁症小鼠模型的抑郁样行为进行评估。其中,抑郁样行为的评估方法包括高架十字迷宫实验、旷场实验、糖水偏好实验、强迫游泳实验中的至少一种。

[0042] 本申请实施例还提供一种采用如上所述的抑郁症小鼠模型的制备方法的抑郁症小鼠模型。

[0043] 本申请实施例还提供一种缓解如上所述的抑郁症小鼠模型抑郁样行为的方法:使用Csf1r抑制剂或Caspase-1抑制剂处理抑郁症小鼠模型。具体步骤可以为通过灌胃的方式使用Csf1r抑制剂或Caspase-1抑制剂处理抑郁症小鼠模型。其中Csf1r抑制剂可以选用PLX3397,Caspase-1抑制剂可以选用VX-765。

[0044] 通过实验验证发现Csf1r抑制剂或Caspase-1抑制剂均可以有效缓解抑郁症小鼠模型的抑郁样行为。Csf1r抑制剂缓解抑郁症小鼠模型mPFC脑区中小胶质细胞的激活及减少了对于突触的吞噬,进而缓解抑郁症小鼠模型的抑郁样行为。Caspase-1抑制剂通过抑制NLRP6/Caspase-1/I1-1 β /I1-18信号通路的激活,缓解抑郁症小鼠模型mPFC脑区中小胶质细胞的激活及减少了对于突触的吞噬,进而缓解抑郁症小鼠模型的抑郁样行为。

[0045] 本申请实施例还提供一种如上所述的抑郁症小鼠模型在抑郁症理论研究中的应用。

[0046] 本申请实施例还提供一种如上所述的抑郁症小鼠模型在抑郁症药物筛选中的应用。

[0047] 下面通过具体实施例作进一步说明。

[0048] 实施例1

[0049] 本实施例中采用了以下小鼠品系:C57BL/6 (GemPharmatech);C57BL/6Smoc-Cx3cr1em1 (creERT2-WPRE-polyA) Smoc (上海模型生物,NM-KI-200157) 及C57BL/6Smoc-Csf1rem1 (flox) Smoc (上海模型生物,NM-CKO-200091)。通过交配上述小鼠品系,可以获得小胶质细胞条件性敲低Csf1r的转基因小鼠,使用针对Cx3cr1-Cre和Csf1r-flox的引物进行小鼠基因分型鉴定,最终获得抑郁症小鼠模型。

[0050] 将鉴定正确的小鼠 (Cx3cr1-CreERT2;Csf1r^{f/+}小鼠) 通过腹腔注射进行为期5天的他莫昔芬 (Tamoxifen,以玉米油溶解,浓度为75mg/kg) 或玉米油处理,未做特殊处理的同龄对照的C57BL/6小鼠标记为WT组,使用玉米油处理的Cx3cr1-CreERT2;Csf1r^{f/+}小鼠标记为Cre-组,使用他莫昔芬处理的Cx3cr1-CreERT2;Csf1r^{f/+}小鼠标记为Cre+组。各组小鼠在3月龄时进行行为学测试。分别使用高架十字迷宫、旷场实验、糖水偏好实验及强迫游泳实验对各组小鼠进行抑郁样行为学测试,给药及行为学测试时间线流程如图1中A所示。

[0051] 各组小鼠进行抑郁样行为学测试的结果如图1中B、C、D、E所示。从图1中B可以看出,与对照组和Cre-小鼠相比,Cre+小鼠在高架十字迷测试 (Elevated Plus Maze, EPM) 中表现出总行程、在开放臂行走的距离、停留在开放臂时间和进入开放臂的次数均减少。在旷场测试 (Open Field Test, OFT) 中也得到了类似的结果,Cre+小鼠显示旷场中心行走的距离和停留时间比例减少,而总行程和速度没有统计学差异。在糖水偏好测试 (Sucrose Preference Test, SPT) 中,Cre+小鼠与对照组和Cre-小鼠相比,蔗糖摄入量减少。在强迫游泳测试 (Forced Swimming Test, FST) 中,Cre+小鼠与对照组和Cre-小鼠相比,在水中停止挣扎的时间明显增加。结合上述抑郁样行为学测试结果可以看出,获得的小胶质细胞条件性敲低Csf1r的转基因小鼠表现出明显的抑郁样行为。

[0052] 实施例2

[0053] 采用免疫荧光染色对实施例1中得到的各组小鼠mPFC脑区中的Iba1及PSD95进行染色,观察该脑区中小胶质细胞的形态、数量变化,及与PSD95的共定位情况。采取高尔基染色对小鼠mPFC脑区神经元进行染色,观察该脑区中神经元树突棘的数量及形态,结果如图2所示,使用均数±标准差 (mean±SEM) 表示,***p<0.001,****p<0.0001。

[0054] 从图2中A可以看出Cre+小鼠mPFC脑区小胶质细胞分支数量明显增多。从图2中B、C、D可以看出Cre+小鼠mPFC脑区小胶质细胞覆盖面积明显大于Cre-小鼠,Cre+小鼠mPFC脑区小胶质细胞分支总计长度大于Cre-小鼠,Cre+小鼠mPFC脑区小胶质细胞分支总数量大于Cre-小鼠,进而说明与Cre-小鼠相比,Cre+小鼠的mPFC脑区中的小胶质细胞呈现超分支状态,通过三维重建展示,可见细胞分支增多、变长、覆盖面积增加,且其与PSD95的共定位数量增加。图2中E的高尔基染色结果和图2中F的小鼠mPFC脑区树突棘数量统计显示,与Cre-小鼠相比,Cre+小鼠的mPFC脑区中的神经元上的树突棘显著减少。从图2中G和H可以看出,与Cre-小鼠相比,Cre+小鼠增加了对于突触后蛋白PSD95及树突棘的吞噬。

[0055] 实施例3

[0056] 在小鼠注射完Tamoxifen或玉米油一周后通过灌胃方式使用40mg/kg的Csf1r抑制剂PLX3397处理Cre+小鼠,以纯水为对照溶剂,连续给药持续3周,随后对各组小鼠 (Cre-、Cre+、Cre+_PLX) 进行行为学测试。分别使用高架十字迷宫、旷场实验、糖水偏好实验及强迫游泳实验对各组小鼠进行抑郁样行为学测试,给药及行为学测试时间线流程如图3中A所示。

[0057] 各组小鼠进行抑郁样行为学测试的结果如图3中B、C、D、E所示。从图3中B可以看出,PLX3397处理的Cre+小鼠在高架十字迷测试中表现出总行程、在开放臂行走的距离、停留在开放臂时间和进入开放臂的次数均明显增加。从图3中C可以看出,PLX3397处理的Cre+小鼠旷场中心行走的距离和停留时间比例增加。从图3中D可以看出,PLX3397处理的Cre+小鼠与Cre+小鼠相比,蔗糖摄入量增加。从图3中E可以看出,PLX3397处理的Cre+小鼠与Cre+小鼠相比,在水中停止挣扎的时间明显减少。结合上述结果说明,Csf1r抑制剂PLX3397可有效缓解小胶质细胞条件性敲低Csf1r引发的抑郁样行为。

[0058] 实施例4

[0059] 采用免疫荧光染色对实施例3中得到的各组小鼠(Cre⁻、Cre⁺、Cre⁺_PLX)mPFC脑区中的Iba1及PSD95进行染色,观察该脑区中小胶质细胞的形态、数量变化,及与PSD95的共定位情况。采取高尔基染色对小鼠mPFC脑区神经元进行染色,观察该脑区中神经元树突棘的数量及形态,结果如图4所示,使用均数±标准差(mean±SEM)表示,***p<0.001,****p<0.0001。

[0060] 从图4中A至D可以看出,与Cre+小鼠相比,PLX3397处理的Cre+小鼠的mPFC脑区中的小胶质细胞呈现正常分支状态,且数量明显减少,通过三维重建展示,可见细胞分支减少、缩短、覆盖面积明显减少,且其与PSD95的共定位数量减少。从图4中E高尔基染色结果和图4中F的小鼠mPFC脑区树突棘数量统计显示,与Cre+小鼠相比,PLX3397处理的Cre+小鼠的mPFC脑区中的神经元上的树突棘显著增多。这说明小胶质细胞条件性敲低Csf1r使小鼠mPFC脑区中小胶质细胞激活,呈现出超分支状态,Csf1r抑制剂PLX3397可有效缓解小胶质细胞条件性敲低Csf1r诱导小鼠mPFC脑区中小胶质细胞的激活及减少了对于突触的吞噬。

[0061] 实施例5

[0062] 提取Cre⁻小鼠和Cre⁺小鼠mPFC脑区中原代小胶质细胞进行RNA高通量测序技术,找出两种小鼠差异基因,并将差异基因进行筛选及富集,寻找出相关信号通路,采用免疫荧光及Western blot方法进行验证,结果如图5所示。

[0063] 从图5中A和B可以看出,与Cre⁻小鼠相比,Cre+小鼠的mPFC脑区的小胶质细胞中主要出现了炎症激活,并相应出现NOD样信号通路的表达异常,且NOD家族中的系列基因出现明显激活,包括NLRP6、NLRP1等。从图C中可以看出,通过Western blot方法证明了在Cre+小鼠的mPFC脑区的小胶质细胞中NLRP6/Caspase-1/I1-1 β /I1-18信号通路明显激活。从图5中D、E、F、G、H和I可以看出,通过免疫荧光对Caspase-1进行染色,分别与Iba1、NeuN、GFAP进行共定位分析,发现在Cre+小鼠mPFC脑区中Caspase-1大多数与Iba1有共定位的情况,这说明NLRP6/Caspase-1/I1-1 β /I1-18信号通路可能是小胶质细胞条件性敲低Csf1r引发小鼠抑郁样行为的重要机制,该通路激活主要发生在模型小鼠的小胶质细胞中。

[0064] 实施例6

[0065] 在小鼠注射完Tamoxifen或玉米油一周后通过灌胃方式使用40mg/kg的Caspase-1抑制剂VX-765处理Cre+小鼠,以纯水为对照溶剂,连续给药持续3周,随后对各组小鼠(Cre⁻、Cre⁺、Cre⁺_VX-765)进行行为学测试。分别使用高架十字迷宫、旷场实验、糖水偏好实验及强迫游泳实验对各组小鼠进行抑郁样行为学测试,给药及行为学测试时间线流程如图6中A所示。

[0066] 各组小鼠进行抑郁样行为学测试的结果如图6中B、C、D、E所示。从图6中B可以看

出,VX-765处理的Cre+小鼠在高架十字迷测试中表现出总行程、在开放臂行走的距离、停留在开放臂时间和进入开放臂的次数均明显增加。从图6中C可以看出,VX-765处理的Cre+小鼠旷场中心行走的距离和停留时间比例增加。从图6中D可以看出,VX-765处理的Cre+小鼠与Cre+小鼠相比,蔗糖摄入量增加。从图6中E可以看出,VX-765处理的Cre+小鼠与Cre+小鼠相比,在水中停止挣扎的时间明显减少。结合上述结果说明,Caspase-1抑制剂VX-765可有效缓解小胶质细胞条件性敲低Csf1r引发的抑郁样行为。

[0067] 实施例7

[0068] 采用免疫荧光染色对各组小鼠(Cre-、Cre+、Cre+VX-765)mPFC脑区中的Iba1及PSD95进行染色,观察该脑区中小胶质细胞的形态、数量变化,及与PSD95的共定位情况。采取高尔基染色对各组小鼠mPFC脑区神经元进行染色,观察该脑区中神经元树突棘的数量及形态。采用Western blot方法对NLRP6/Caspase-1/I1-1 β /I1-18信号通路相关分子蛋白进行检测,观察VX-765对于该通路的影响,结果如图7所示,使用均数 \pm 标准差(mean \pm SEM)表示,***p<0.001,****p<0.0001。

[0069] 从图7中A至D可以看出,与Cre+小鼠相比,VX-765处理的Cre+小鼠的mPFC脑区中的小胶质细胞呈现正常分支状态,且数量明显减少,通过三维重建展示,可见细胞分支减少、缩短、覆盖面积明显减少,且其与PSD95的共定位数量减少。从图7中E高尔基染色结果和图7中F的小鼠mPFC脑区树突棘数量统计显示,与Cre+小鼠相比,VX-765处理的Cre+小鼠的mPFC脑区中的神经元上的树突棘显著增多。这说明小胶质细胞条件性敲低Csf1r使小鼠mPFC脑区中小胶质细胞激活,呈现出超分支状态,Caspase-1抑制剂VX-765可有效缓解小胶质细胞条件性敲低Csf1r诱导小鼠mPFC脑区中小胶质细胞的激活及减少了对于突触的吞噬,并推测可能与其能有效抑制NLRP6/Caspase-1/I1-1 β /I1-18信号通路的激活有关。

[0070] 综上所述,本申请通过小胶质特异性Csf1r杂合敲除获得抑郁症小鼠模型,并通过实验验证了抑郁症小鼠模型的抑郁样行为。与现有的通过慢性不可预测的轻度压力CUMS刺激造成动物抑郁样行为的方法相比较,抑郁的表型稳定且抑郁表型出现快,便于进行抑郁症相关研究的重复实验,可以获得重复性强的实验结果。另外,通过实验证明小胶质细胞特异性Csf1r杂合敲除可诱导小鼠mPFC脑区中小胶质细胞激活及增加了对于突触的吞噬,引发mPFC脑区中NLRP6/caspase-1/IL-1 β /IL-18通路的激活。并且通过Caspase-1抑制剂和Csf1r抑制剂处理抑郁症小鼠模型可以缓解其抑郁样行为,为小胶质细胞相关或神经炎症相关的抑郁症的机理研究和药物筛选提供基础。

[0071] 应当理解的是,本申请的应用不限于上述的举例,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进和变换都应属于本申请所附权利要求的保护范围。

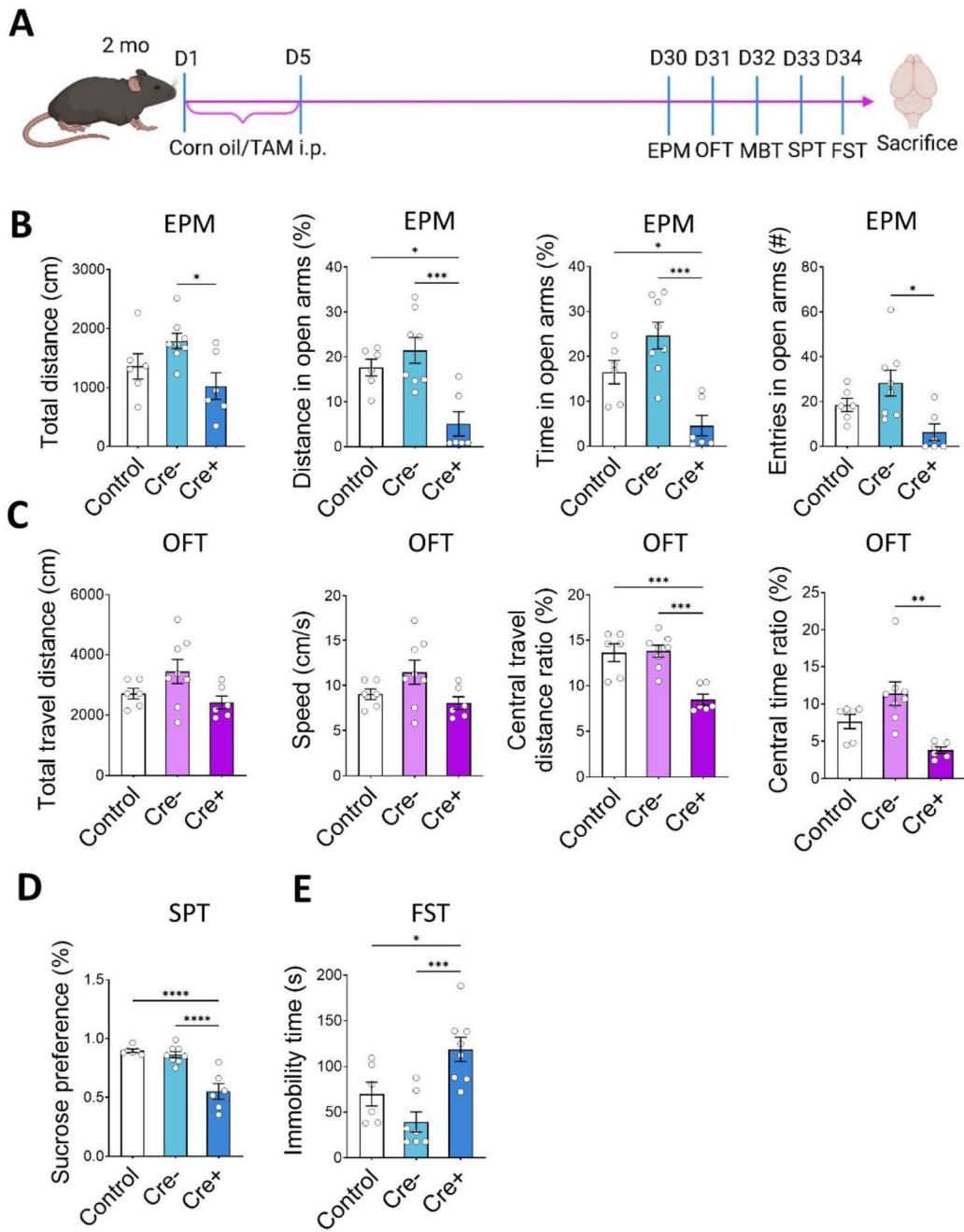


图1

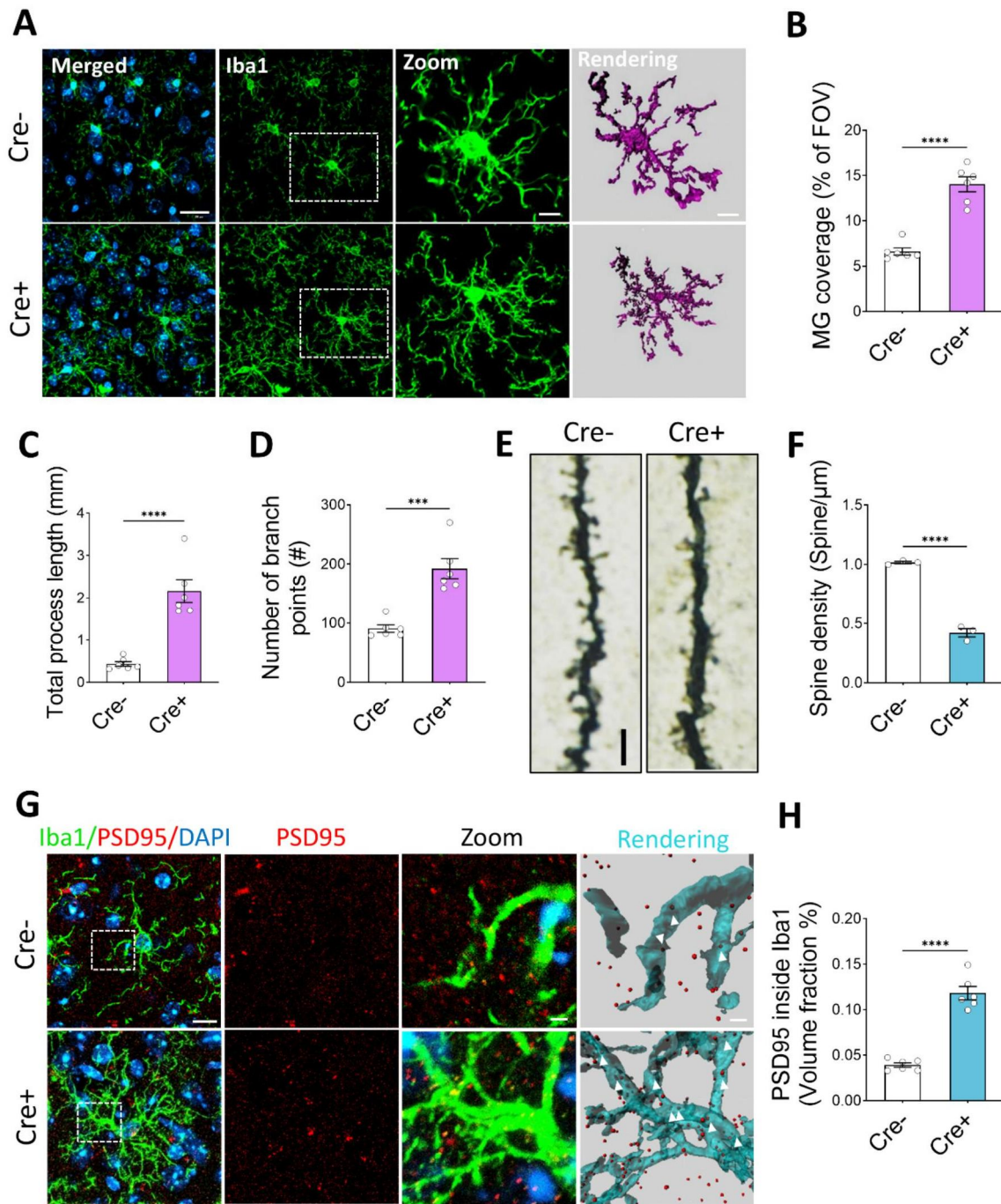


图2

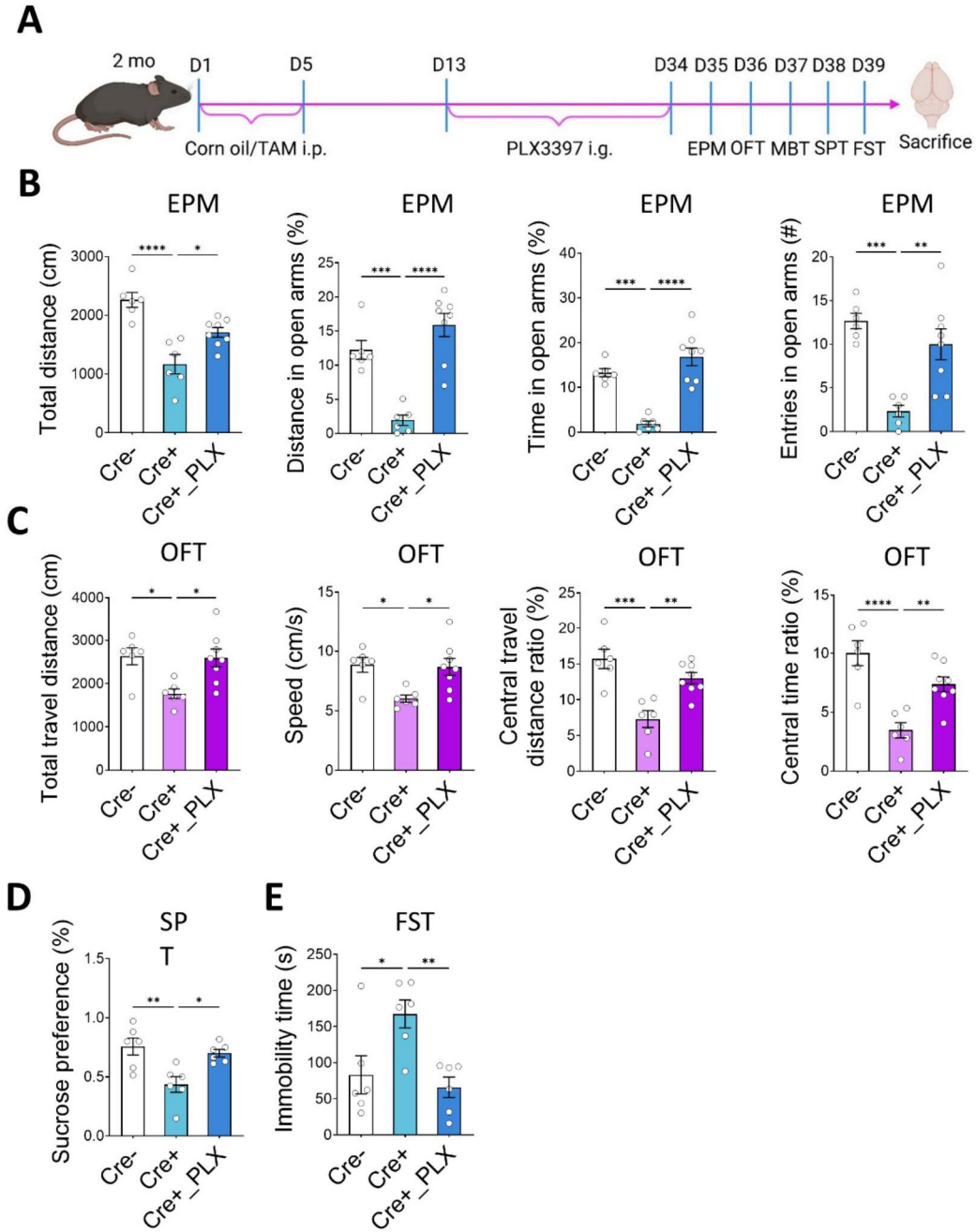


图3

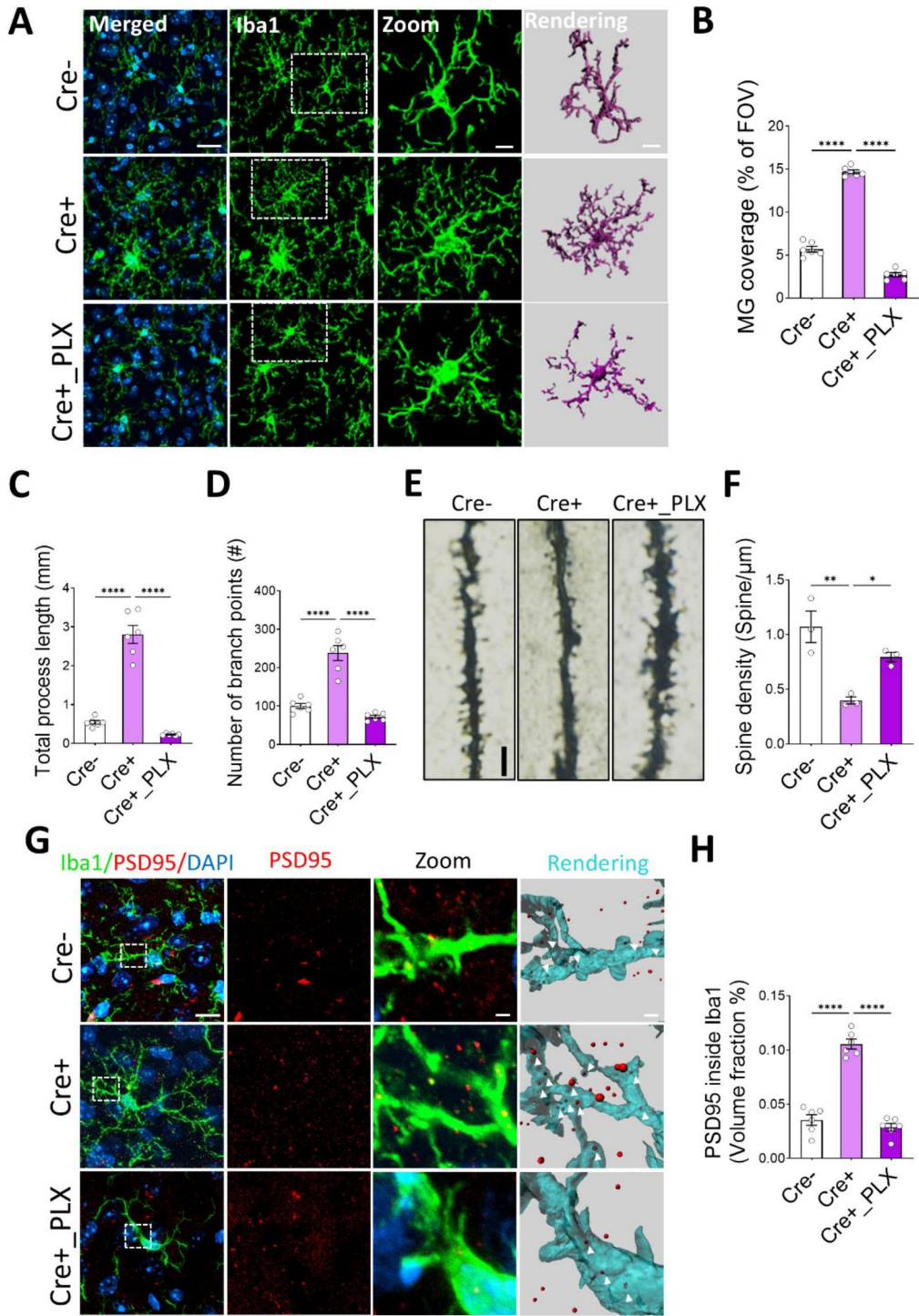


图4

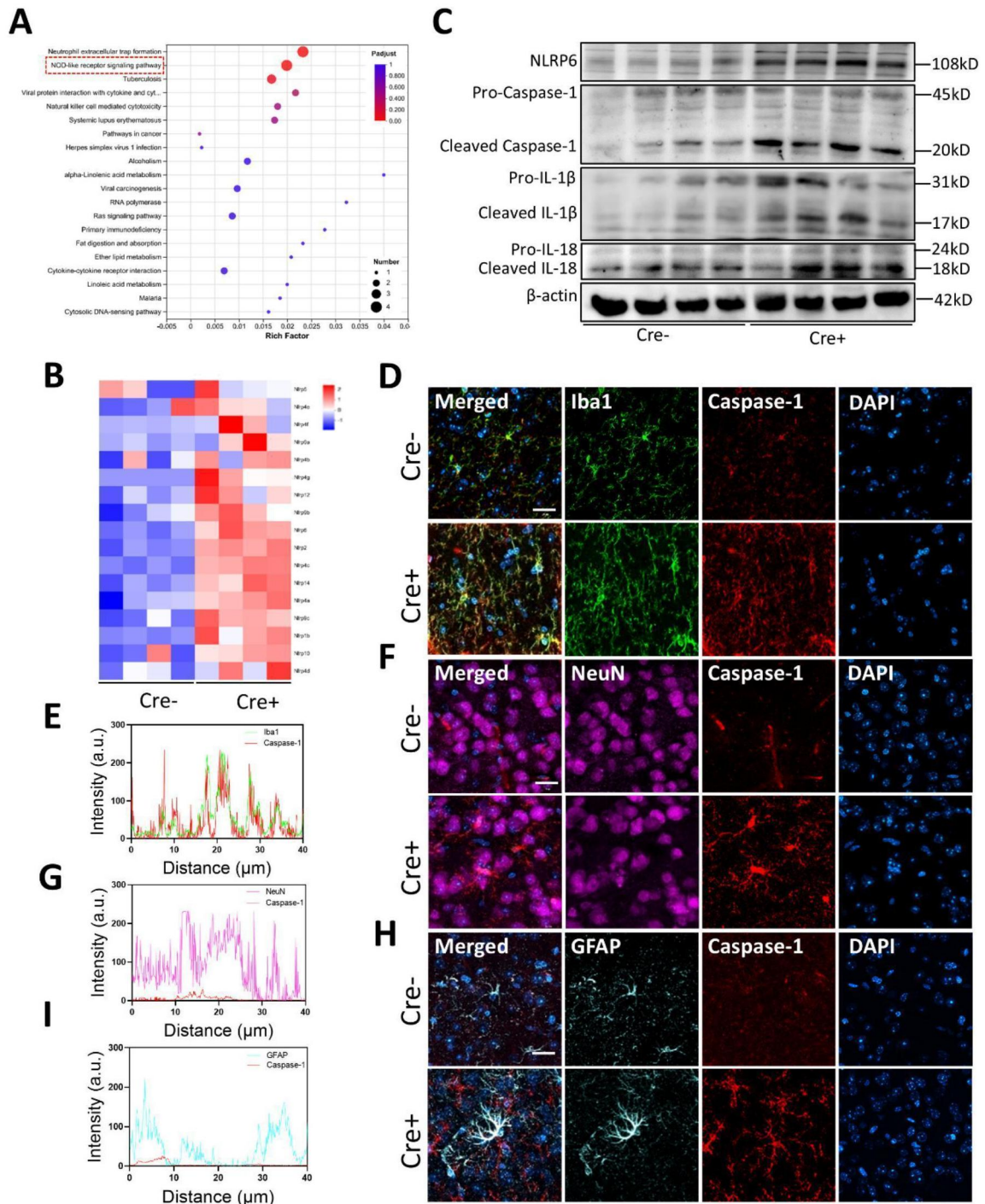


图5

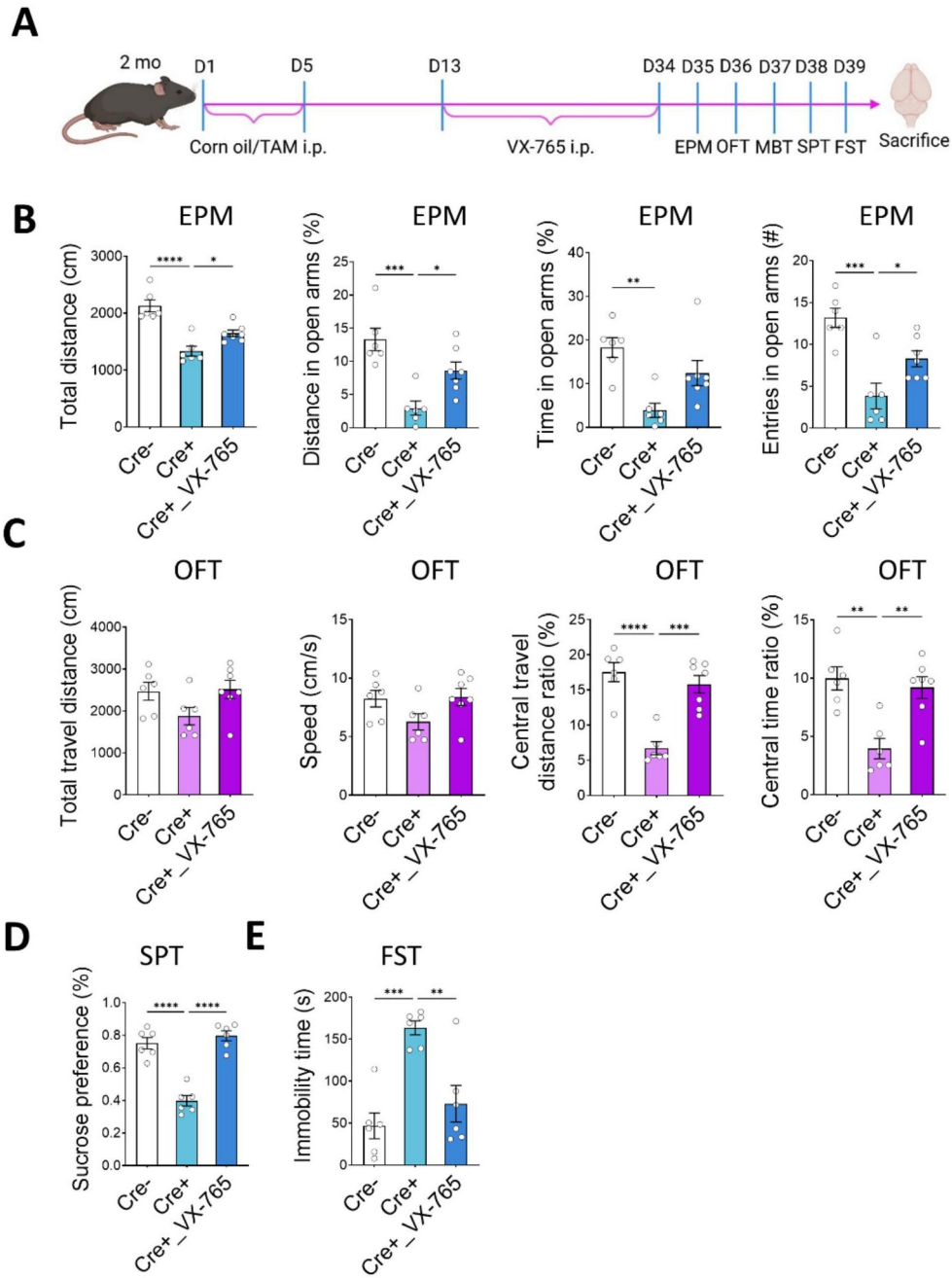


图6

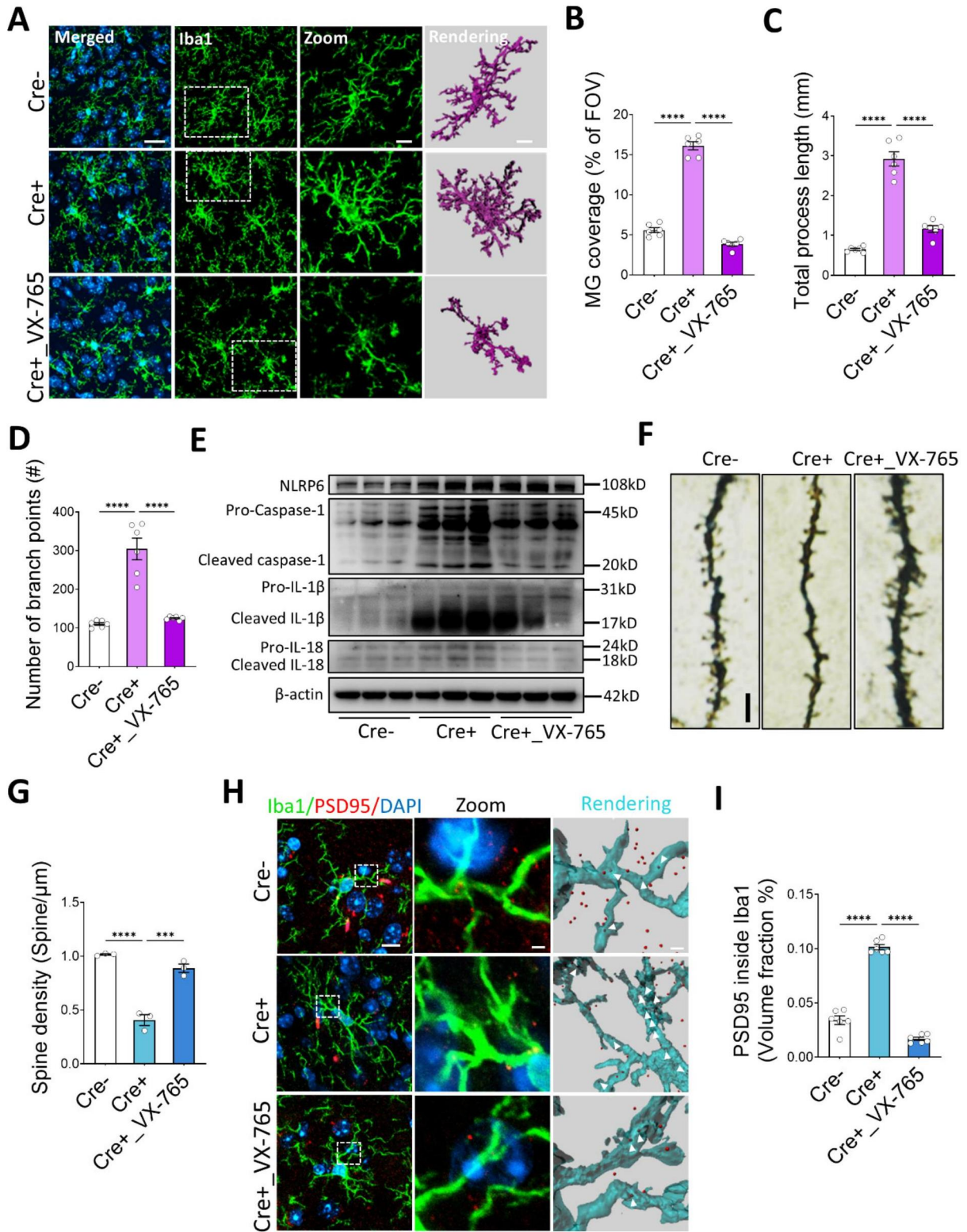


图7