



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106632601 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201611006822.6

(22)申请日 2016.11.16

(71)申请人 中国科学院昆明动物研究所

地址 650223 云南省昆明市五华区教场东路32号

(72)发明人 徐林 黄京飞 周启心 李功华
谭继伟 熊贵静 韩会丽

(74)专利代理机构 昆明今威专利商标代理有限公司 53115

代理人 赛晓刚

(51)Int.Cl.

C07K 7/06(2006.01)

A61K 38/08(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

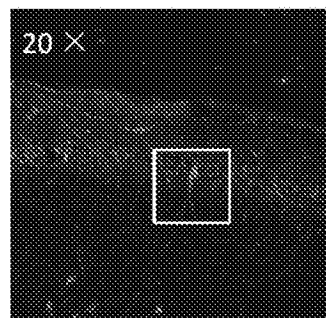
权利要求书1页 说明书9页
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

一种阻断突触长时程增强(LTP)的短肽及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种阻断突触长时程增强(LTP)的短肽及其应用,属生物化学领域。本发明采用生物信息学方法分析不同物种AMPA受体亚单位GluR2的人类同源序列,发现GluR2的C端存在高度保守区域,并据此设计了短肽,其中还包括具有穿透细胞膜能力的短肽修饰肽和标记有荧光基团的短肽修饰肽。该短肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示。本发明的短肽或短肽修饰肽能够阻断突触可塑性LTP表达,而对突触可塑性LTD和NMDA受体功能没有影响。因此,本发明的短肽或短肽修饰肽在制备用于治疗或预防与谷氨酸过度兴奋性疾病或病理性突触可塑性LTP相关疾病的药物中的用途、或在建立与谷氨酸过度兴奋性疾病相关疾病或病理性突触可塑性LTP相关疾病的实验动物模型中的应用。



1. 一种阻断突触长时程增强 (LTP) 的短肽, 其特征在于, 短肽的氨基酸序列为 Lys Glu Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Ile Glu 或 Lys Glu Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Leu Glu, 该短肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的阻断突触长时程增强 (LTP) 短肽, 其特征在于: 在所述短肽的 N 端和/或 C 端添加化学基团、氨基酸、多肽、蛋白质或标记物进行化学或生物修饰得到短肽修饰肽。

3. 根据权利要求 2 所述的阻断突触长时程增强 (LTP) 的短肽, 其特征在于, 在所述短肽的 N 端或 C 端连接上具有穿透细胞膜功能的 Tat 序列 (YGRKKRRQRRR) 形成具有穿透细胞膜功能的短肽。

4. 根据权利要求 3 所述的阻断突触长时程增强 (LTP) 的短肽, 其特征在于, 在所述短肽修饰肽的另一端——N 端或 C 端连接上荧光标记物, 形成被荧光标记并可穿透细胞膜的短肽。

5. 如权利要求 1-4 中任一权利要求所述的阻断突触长时程增强 (LTP) 的短肽或短肽修饰肽的应用。

6. 根据权利要求 5 所述的阻断突触长时程增强 (LTP) 的短肽或短肽修饰肽的应用, 其特征在于: 所述的短肽或短肽修饰肽在用于建立与谷氨酸过度兴奋性疾病相关疾病或病理性突触可塑性 LTP 相关疾病的实验动物模型中的应用, 或者在制备用于治疗或预防与谷氨酸过度兴奋性疾病或病理性突触可塑性 LTP 相关疾病药物方面的应用。

7. 根据权利要求 6 所述的阻断突触长时程增强 (LTP) 的短肽或短肽修饰肽在制备抑制恐惧记忆的提取药物或研究恐惧记忆提取动物模型中的应用。

一种阻断突触长时程增强 (LTP) 的短肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明公开了一种阻断突触长时程增强 (LTP) 的短肽及其应用,特别是在生物医学领域方面的应用,属于生物化学领域。

背景技术

[0002] 神经细胞的突触前膜释放神经递质,作用于神经细胞的突触后膜受体,形成神经细胞之间的突触信息传递。突触信息传递存在可塑性,赋予大脑功能和结构的可塑性,是几乎所有脑高级功能的根本基础。根据神经递质可把突触分为兴奋性突触和抑制性突触。谷氨酸是兴奋性神经递质,其离子型受体主要有NMDA (N-methyl-D-aspartic acid receptor,即N-甲基-D-天冬氨酸受体)和AMPA受体(α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体,AMPA)。NMDA受体在调控突触信息传递的可塑性中起着关键作用,最终表现为AMPA受体功能的长时程上调(long-term potentiation,LTP)或下调(long-term depression,LTD),又统称为突触可塑性。突触可塑性在许多脑高级功能中发挥着重要的作用,如学习和记忆。突触可塑性的异常与谷氨酸过度兴奋性毒性、许多神经系统疾病如创伤后应激综合症、毒品成瘾、癫痫、老年痴呆及抑郁症等密切相关。

[0003] 突触可塑性可分为两个阶段:诱导和表达。突触可塑性的诱导阶段与NMDA受体功能密切相关。NMDA受体激活后可导致钙离子内流,作为著名的第二信使触发系列细胞内信号转导,是突触可塑性诱导的关键步骤。阻断NMDA受体,不仅能阻断突触可塑性LTP和LTD,也潜在损伤许多类型的学习记忆和认知功能。NMDA受体激活后,最终可调节AMPA受体功能如通过磷酸化、或使AMPA受体在突触后膜插入、或使AMPA受体在突触后膜下膜,这些均会导致AMPA受体介导的兴奋性突触后膜电流长时程的增加(LTP)或减少(LTD),是突触可塑性表达的关键步骤。阻断LTP或LTD的表达阶段,由于不影响AMPA受体的基础传递和NMDA受体功能,因而对许多类型的正常学习记忆和认知功能影响不大,不仅能避免谷氨酸过度兴奋性毒性,也可避免异常记忆的巩固。例如经历灾难性事件或战争,可形成病理性突触可塑性LTP,导致恐惧记忆的持久不消退,因而严重影响其生活质量。选择性阻断这种病理性LTP的表达,就能预防和治疗创伤后应激综合症。

[0004] 迄今为止,还没有选择性阻断突触可塑性LTP表达,但同时又不影响NMDA受体功能及其信号转导的药理学手段的文献报道。突触可塑性LTP在许多病理情况下产生,如经历创伤性事件、缺氧缺血导致的谷氨酸过度兴奋性、癫痫、摄取成瘾性药物等,可导致神经系统持久的病理性改变如创伤或成瘾记忆等。因此,发现选择性阻断突触可塑性LTP的表达,对突触可塑性LTD和NMDA受体功能及其信号转导没有影响的药物或途径的短肽,不仅可作为相关研究领域的新工具,也可作为新途径应用于治疗或预防病理条件下突触可塑性LTP的表达所带来的系列疾病或谷氨酸过度兴奋性毒性。

发明内容:

[0005] 针对以上技术问题,本发明的目的是提供一种能够阻断突触可塑性LTP表达,而对

突触的长时程抑制 (LTD) 和NMDA受体功能没有影响的短肽。

[0006] 本发明提供一种阻断突触长时程增强 (LTP) 的短肽,短肽的氨基酸序列为Lys Glu Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Ile Glu或Lys Glu Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Leu Glu,该短肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示。

[0007] 本发明的短肽可以通过本领域已知的方法人工合成,本发明短肽由GL Biochem (上海)有限责任公司合成。

[0008] 本发明的另一个目的是提供阻断突触长时程增强 (LTP) 短肽修饰肽。通过在短肽N端和C端通过添加化学基团、氨基酸、多肽、蛋白质、标记物等物质进行各种化学或生物修饰,形成短肽修饰肽,以优化改善其稳定性等理化性质、提高或增加其应用性和应用范围。特别地,本发明公开了在不改变本发明短肽的空间结构和稳定性的前提下,在短肽的N端和C端分别进行和穿透细胞膜功能和荧光标记修饰,以增加短肽的穿透细胞功能和荧光标记功能。

[0009] 进一步地,在短肽的N端或C端连接上具有穿透细胞膜功能的Tat序列形成具有穿透细胞膜功能的短肽。

[0010] 进一步地,在具有穿透细胞膜功能的短肽修饰肽的另一端——N端或C端连接上荧光标记物,形成被荧光标记并可穿透细胞膜的短肽。

[0011] 通过生物信息学技术,分析组成AMPA受体亚单位GluR2的人类同源序列在不同物种中的保守区域,其中针对GluR2保守区域中潜在与LTP表达相关的区域进行了分子生物学、神经电生理和行为学实验。其基本理论是如果这些保守区域有重要的功能,那么人工合成该片段短肽,加入到细胞内就能竞争性干扰其正常功能,最终阻断LTP表达。发明人发现这些保守区域中涉及的短肽具有选择性阻断LTP的功效。

[0012] 通过试验证实,本发明的短肽及短肽修饰肽能阻断谷氨酸AMPA受体亚基转运上膜上来阻断LTP,并且可剂量依赖的抑制恐惧记忆的提取。采用条件反射大鼠模型研究恐惧记忆,发现短肽对恐惧记忆的获得没有影响,但能特异抑制恐惧记忆的提取,从而减轻或消除恐惧记忆。这些发现表明短肽能选择性阻断LTP,应用于病理性LTP相关疾病的预防和治疗中,具有良好的应用前景。因此,本发明还提供短肽或短肽修饰肽的应用,特别是短肽或短肽修饰肽在建立与谷氨酸过度兴奋性疾病相关疾病或病理性突触可塑性LTP相关疾病的实验动物模型中应用,或者在制备用于治疗或预防与谷氨酸过度兴奋性疾病或病理性突触可塑性LTP相关疾病药物方面的应用。

[0013] 因此,本发明还提供所述阻断突触长时程增强 (LTP) 的短肽或短肽修饰肽的应用。

[0014] 进一步地,所述的阻断突触长时程增强 (LTP) 的短肽或短肽修饰肽在用于建立与谷氨酸过度兴奋性疾病相关疾病或病理性突触可塑性LTP相关疾病的实验动物模型中的应用,或者在制备用于治疗或预防与谷氨酸过度兴奋性疾病或病理性突触可塑性LTP相关疾病药物方面的应用。

[0015] 进一步地,所述的阻断突触长时程增强 (LTP) 的短肽或短肽修饰肽在制备抑制恐惧记忆的提取药物或研究恐惧记忆提取动物模型中的应用。

[0016] 本发明短肽的工作原理:AMPA受体功能如通过磷酸化、或使AMPA受体在突触后膜插入从而转运到突触内,这些均会导致AMPA受体介导的兴奋性突触后膜电流长时程的增加 (LTP),是突触可塑性表达的关键阶段。短肽进入细胞后,可与AMPA受体的亚基胞内末端及

其下游分子结合,阻止AMPA受体的亚基转运到突触膜上,以及促进突触膜上的AMPA亚基转运到细胞内,从而阻止LTP的表达。

[0017] 本发明的有益效果:

[0018] 1) 本发明的短肽来自于运用生物信息学的方法把筛选出一种新型的短肽,能够选择性地阻断突触可塑性LTP表达,而对突触可塑性LTD和NMDA受体功能没有显著影响。

[0019] 2) 该短肽毒副作用低,特异性高。该短肽可以穿透血脑屏障及进入细胞内,因此,该领域研究人员可以最大限度的使用本发明来开展相关研究。

[0020] 3) 可以在短肽N端和C端通过添加化学基团、氨基酸、多肽、蛋白质、标记物等物质进行各种化学或生物修饰,形成短肽修饰肽,以优化改善其稳定性等理化性质、提高或增加其应用性和应用范围。

[0021] 4) 利用本发明的短肽或短肽修饰肽在制备用于治疗或预防与谷氨酸过度兴奋性疾病或病理性突触可塑性LTP相关疾病的药物或在建立及研究与谷氨酸过度兴奋性疾病相关疾病或病理性突触可塑性LTP相关疾病的实验动物模型中有广泛的应用前景。

附图说明

[0022] 图1为带穿膜肽的短肽KE10短肽的高压液相色谱图;

[0023] 图2为带穿膜肽的对照肽SKE10短肽的高压液相色谱图;

[0024] 图3为带荧光和穿膜肽的KE10 (Tat-KE10-FITC) 短肽的高压液相色谱图;

[0025] 图4为显微镜下,20倍放大所见下海马CA1细胞内分布的Tat-KE10-FITC的分布图。

[0026] 图5为显微镜下,60倍放大所见下海马CA1细胞内分布的Tat-KE10-FITC的分布图。

具体实施方式

[0027] 下面结合实施例进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明,而非限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的方法及未说明配方的试剂均为按照常规条件进行或配置,未注明来源的产品均可通过市场途径获得。

[0028] 实施例1本发明短肽的合成

[0029] 本发明短肽序列KEGYNVYGIE (KE10) 或KEGYNVYGLE (KE10A) 及其对照肽KGAEVGINEA (SKE10) 或修饰肽的合成均通过本领域已知、成熟方法进行,由GL Biochem(上海)有限责任公司合成。如图1、图2和图3中HPLC色谱图所示,所有合成短肽产品经高压液相色谱(HPLC)分析进行纯度鉴定,纯度均大于90%,符合设计要求。

[0030] 实施例2短肽修饰肽

[0031] 本发明公开了在不改变短肽的空间结构和稳定性的前提下,在短肽的N端和C端分别进行和穿透细胞膜功能和荧光标记修饰,以增加短肽的穿透细胞膜的功能和荧光标记功能。

[0032] 将短肽KE10的C端或N端接上可穿透细胞膜的Tat序列(YGRKKRRQRRR),形成Tat-KE10,在此基础上再连接上荧光基团FITC,形成带绿色荧光的Tat-KE10-FITC,配制为3mM的溶液。选用250g雄性SD大鼠,按1ml/kg的体积给予大鼠腹腔注射。注射3小时后将动物用戊巴比妥钠(80mg/kg)进行深麻醉后进行免疫组织荧光检测,具体方法参见单丽丽等发表的论文,简要叙述如下:动物深麻醉后按顺序用生理盐水和4%PFA灌流,再用4%PFA固定24小

时。用30%蔗糖脱水24小时后,以40 μ m的厚度切片。PBS洗脱3次,0.3%Triton孵育30分钟,PBS再次洗脱3次,5%BSA封闭30分钟后表片,随后进行confocol镜检。

[0033] (1) 实验结果

[0034] 如图4和图5所示,腹腔注射短肽Tat-KE10-FITC确实进入了大鼠脑内,并可在海马细胞中检测到,在细胞胞体和树突区域均有分布。

[0035] 实施例3短肽的活性:短肽KE10及KE10A可以阻断突触可塑性LTP的表达,而对突触可塑性LTD无影响。

[0036] (1) 实验方法

[0037] 本实验选用短肽KEGYNVYGLIE (KE10)、KEGYNVYGLE (KE10A) 进行实验;同时,以对照序列短肽KGAEVGINEA (SKE10) 作为对照短肽作系列对照实验。

[0038] 选择使用19-21天SD雄性大鼠,采用离体脑片电生理技术,记录海马CA1区突触可塑性,具体方法参见韩会丽等发表的论文,简要叙述如下:动物乙醚麻醉至肌张力消失后快速断头。剥离颅骨暴露脑表面后将全脑取出,修成所需形状后放入预先冷却至冰水混合并连续充灌95%O₂和5%CO₂的人工脑脊液中切片(400 μ m),在35 \pm 1 $^{\circ}$ C下孵育20-60分钟后,放置室温(22-25 $^{\circ}$ C)。使用人工脑脊液持续循环灌流,调节流速至4-5ml/min。记录电极电阻值为3-4 Ω 。由于短肽本身无法进入细胞膜,因此短肽及对照肽均需使用细胞内给药的方式进行,在此实验条件下,短肽或其对照肽需配制于记录电极内液,电极放置于海马CA1区胞体层,并与细胞膜形成封接(电阻>G Ω),随后给予细胞负压破膜,从而使电极内液中的短肽或其对照肽进入细胞内。在刺激电极上施加一定大小的刺激方波(波宽0.1ms),在记录电极上给予-70mV的稳压,并使用GABA A受体阻断剂阻断抑制性突触电流,从而记录兴奋性突触后膜电流(fieldexcitatory postsynaptic current,EPSC)。以30秒/次的采样频率记录稳定基线10分钟后,施加高频(100Hz,100个刺激方波/串,3串,间隔20秒)刺激方波诱导LTP或施加低频(1Hz,900个刺激方波)刺激方波诱导LTD。

[0039] LTP或LTD取诱导后最后20分钟平均值,所有数据以自身基线为100%作归一化,表示为平均值 \pm 标准误。数据统计采用One-way ANOVA统计差异显著性,并用LSD法比较各加药组与溶剂对照组的差异,显著差异设置为P<0.05,以*标记。

[0040] (2) 实验结果

[0041] 如表1所示,将短肽KE10、KE10A或SKE10配制于电极内液中,使其终浓度为5 μ M,发现短肽KE10、KE10A可以有效阻断LTP,但随机序列短肽SKE10无此功效。同时尽管KE10、KE10A功效类似,但在相同浓度下KE10的功效远强于KE10A,因此在以下实施例中,均以KE10作为优选短肽为例进行实验。

[0042] 表1. 短肽阻断海马突触可塑性LTP

[0043]

分组	给药方法	给药剂量	脑片数量	LTP幅度	P值
电极内液	电极内液	-	4	159.45 \pm 29.84	-
电极内液+SKE10	电极内液	5 μ M	4	142.16 \pm 28.23	0.83
电极内液+KE10	电极内液	5 μ M	4	87.89 \pm 5.05	<0.001*
电极内液+KE10A	电极内液	5 μ M	4	107.98 \pm 9.67	0.03*

[0044] 如表2所示,将短肽KE10或SKE10配制于电极内液中,使其终浓度为5 μ M,发现与溶

剂对照相比,短肽KE10及随机对照短肽SKE10均对海马突触可塑性LTD无显著影响。

[0045] 表2.短肽及其对照肽对海马突触可塑性LTD无显著影响

[0046]

分组	给药时间	给药剂量	脑片数量	LTD幅度	P值
电极内液	电极内液	-	5	47.86±5.65%	
电极内液+SKE10	电极内液	5μM	5	43.14±12.06%	0.85
电极内液+KE10	电极内液	5μM	5	53.34±9.40%	0.88

[0047] 实施例4短肽修饰肽的活性:短肽KE10的修饰肽Tat-KE10也可以阻断突触可塑性LTP的表达

[0048] (1) 实验方法

[0049] 本实验选用短肽KEGYNVYGIE (KE10) 接上具有穿透细胞膜能力的Tat短肽(YGRKKRRQRRR),形成Tat-KE10进行,同时,以对照序列短肽KGAEVGINEA (SKE10) 接上具有穿透细胞膜能力的Tat短肽,形成Tat-SKE10作为对照短肽做对照实验。

[0050] 选择18-22g雄性昆明小鼠,采用离体脑片电生理技术,记录海马CA1区突触可塑性。脑片制备方法与实施例3的制备方法一致。由于多肽进行穿膜肽修饰后,可自由穿透细胞膜进入细胞内,因此给药方式可以通过循环液给药。在此实验条件下,记录电极放置于海马CA1区树突层,刺激电极放置于Schaffer侧枝。在刺激电极上施加一定大小的刺激方波(波宽0.1ms),记录兴奋性突触后膜电位(field excitatory postsynaptic potential, fEPSP)。以30秒/次的采样频率记录稳定基线20分钟后,施加高频(100Hz,100个刺激方波/串,3串,间隔20秒)刺激方波诱导LTP或施加低频(1Hz,900个刺激方波)刺激方波诱导LTD。数据统计采用One-wayANOVA统计差异显著性,并用LSD法比较各给药组与溶剂对照组的差异。显著差异设置为P<0.05,以*标记。

[0051] (2) 实验结果

[0052] 如表3所示,以1:1000的体积比在脑片孵育液中给予Tat-KE10或Tat-SKE10,使其终浓度分别为1、3、6或12μM,发现Tat-KE10能剂量依赖性地阻断LTP,但随机序列短肽Tat-SKE10对LTP没有明显作用。提示与未经修饰的短肽KE10类似,经穿膜肽修饰的短肽Tat-KE10也具有阻断LTP的功效。

[0053] 表3.短肽剂量依赖性地阻断海马突触可塑性LTP

分组	给药时间	给药剂量	脑片数量	LTP 幅度	P 值
水	循环液孵育 3 小时	-	12	129.07±3.29%	
Tat-SKE10	循环液孵育 3 小时	1.5 μM	5	123.96.8±3.75%	0.88
	循环液孵育 3 小时	3 μM	6	124.3±3.87%	0.86
	循环液孵育 3 小时	6 μM	11	128.86.4±9.2%	0.97
	循环液孵育 3 小时	12 μM	10	126.45±6.34%	0.79
Tat-KE10	循环液孵育 3 小时	1.5 μM	9	118.61±3.75%	0.18
	循环液孵育 3 小时	3 μM	8	109.86±3.52%	0.02
	循环液孵育 3 小时	6 μM	12	108.34±2.18%	<0.001
	循环液孵育 3 小时	12 μM	11	101.79±3.03%	<0.001

[0055] 如表4所示,以1:1000的体积比在脑片孵育液中给予Tat-KE10或Tat-SKE10,达到终浓度6 μ M(为可以特异阻断LTP的剂量),发现无论Tat-KE10或随机序列短肽Tat-SKE10均对LTD没有明显作用,提示与未修饰的短肽KE10类似,Tat-KE10只特异阻断LTP而不干扰LTD。

[0056] 表4.短肽及其对照肽对海马突触可塑性LTD没有显著影响

[0057]

分组	给药时间	给药剂量	脑片数量	LTD幅度	P值
水	提前3小时	-	5	87.88 \pm 3.61%	
Tat-SKE10	提前孵育3小时	6 μ M	5	82.97 \pm 5.58%	0.83
Tat-KE10	提前孵育3小时	6 μ M	5	85.97 \pm 2.58%	0.95

[0058] 实施例5短肽对NMDA受体功能无影响

[0059] 由于带穿膜肽的短肽Tat-KE10功效与未经修饰的短肽KE10一致,且因具有可穿透细胞膜的功能而具有更加方便的给药方式,因此在后续实施例中,用Tat-KE10为例进行实验。

[0060] (1)实验方法

[0061] 选择使用19-21天SD雄性大鼠,采用离体脑片电生理技术,记录海马CA1区锥体神经细胞的NMDA电流,具体方法参见董志芳等发表的论文。简要叙述如下:脑片制备方法如实施例3。记录时,刺激电极放置于CA1区树突层,记录电极放置于海马CA1区胞体层,并与细胞膜形成封接(电阻>G Ω),随后给予细胞负压破膜。在记录电极上给予+40mV稳压并在循环液中加入AMPA/kinate受体阻断剂CNQX和GABA A受体阻断剂picrotoxin,以记录NMDA电流,刺激电极给予2/3最大刺激量,记录NMDA电流。数据统计采用One-way ANOVA统计差异显著性,并用LSD法比较各给药组与溶剂对照组的差异。显著差异设置为P<0.05,以*标记。

[0062] (2)实验结果

[0063] 如表5所示,以1:1000的体积比在脑片孵育液中给予Tat-KE10或Tat-SKE10,使其终浓度分别为6 μ M,发现短肽及对照肽均对NMDA电流均无影响。

[0064] 表5.短肽及其对照肽对NMDA电流无显著影响

[0065]

分组	给药时间	给药剂量	细胞数量	NMDA电流(pA)	P值
水	提前3小时	-	10	110.90 \pm 11.61	
Tat-SKE10	提前孵育3小时	6 μ M	10	118.36 \pm 13.18	0.67
Tat-KE10	提前孵育3小时	6 μ M	10	119.79 \pm 12.45	0.61

[0066] 实施例6短肽阻断谷氨酸AMPA受体亚基转运上膜

[0067] (1)实验方法

[0068] 为了理解KE10短肽阻断突触可塑性LTP的分子机制,通过分子生物学技术研究了KE10短肽对AMPA受体亚单位GluR2的膜转运影响。具体方法参见韩静等发表的论文。简要说明如下,如前所述制备动物海马脑片,在孵育液(人工脑脊液)中以1:1000体积比加入溶剂对照(水),Tat-KE10或Tat-SKE10,使药物终浓度为6 μ M,孵育120分钟后,在含有Glycine的人工脑脊液中孵育5分钟,随后用不含药物也不含有Glycine的脑脊液洗脱3次,放回含溶剂对照或药物的孵育液中继续孵育30分钟。之后放入含1mg/mL biotin的脑脊液中冰上震荡

孵育30分钟后用洗脱液洗脱3次,丢弃洗脱液,加入匀浆液冰上匀浆,1000rpm,10分钟,4℃离心取上清,重复一次后取50μL保存为总蛋白。剩余上清10000rpm,30分钟,4℃离心,弃上清,加裂解液冰上超声,25000g,15分钟,4℃离心,取上清作为突触体蛋白。用Neutravidin珠子拉下细胞表面结合biotin的蛋白作为突触膜表面的蛋白。以总蛋白中的内参蛋白Tubulin矫正上样量,用western检测蛋白方法检测总蛋白和突触膜表面蛋白中的GluR2。使用ImageJ软件分析条带灰度。比较膜表面GluR2与总蛋白中GluR2的比值。将空白对照的比值作为100%进行归一化,以mean±s.e.m.%表示。数据分析采用One-way ANOVA统计差异显著性,并用LSD法比较各给药组与溶剂对照组的差异以及与空白对照组的差异。显著差异设置为P<0.05,以*标记。

[0069] (2) 实验结果

[0070] Glycine是已知可以诱导LTP并导致GluR2转运到突触膜上的工具药。如表6所示,单独使用Glycine可致使GluR2的膜转运效率增加,实验发现:Tat-KE10短肽可以阻止Glycine诱导的GluR2膜转运效率增加,而对照序列无此效应。

[0071] 表6.短肽可阻断Glycine诱导的GluR2上膜

分组	给药剂量	样品数	膜转运效率	P值(与空白对照相比)	P值(与溶剂对照相比)
空白	-	3	100%		
水+Glycine	-	3	128.38±7.73	0.04	
Tat-SKE10+Glycine	6 μM	3	117.48±3.97	<0.01	0.36
Tat-KE10+Glycine	6 μM	3	70.62±13	0.13	0.035*

[0073] 实施例7短肽的应用:短肽可剂量依赖的抑制恐惧记忆的提取

[0074] 突触可塑性LTP的表达在记忆提取中起着重要作用。已有研究表明,从丘脑和皮层到外侧杏仁核突触的长时程增强(LTP)是编码恐惧记忆的机制(McKernan&Shinnick-Gallagher,1997;Rogan,Staubli,&LeDoux,1997)。因此,采用行为学方法进一步探索了短肽通过阻断突触可塑性LTP的表达,在恐惧记忆中的作用。在条件反射箱中,经历足底电刺激的小鼠,在条件反射箱中会表现出僵立行为。48h后再次把动物暴露在条件反射箱中,小鼠的僵立行为用于评价恐惧记忆。

[0075] (1) 实验方法

[0076] 环境条件恐惧测试用来检测动物对应激事件的恐惧学习和记忆。装置由一个特制可通电的箱子(长×宽×高:30.5厘米×24厘米×24厘米)嵌套在一个通风隔音箱(长×宽×高:63厘米×43厘米×63厘米)里(MED Associates,St.Albans,VT)。将大鼠放在盒中,让其自由探索2分钟,然后给予6次足部电刺激(0.8毫安,2秒),电击选用随机间隔,平均间隔时间为90秒。经过训练形成关联性条件化恐惧,最后一次电刺激后1分钟将大鼠拿回到笼子。小鼠在足部电刺激后会出现暂时的僵立状态,除了呼吸和缓慢的钟摆式动作所有运动停止。记录小鼠在每次足部电刺激后的僵立时间。在小鼠回笼48小时后,将其重新放回到装置里11分钟,不给足部电刺激,记录前6分钟内动物僵立时间,与6分钟相比表示为mean±s.e.m.%,从而反映小鼠的关联性条件化恐惧记忆的程度。数据统计采用One-way ANOVA统

计差异显著性,并用LSD法比较各给药组与生理盐水组的差异。显著差异设置为 $P < 0.05$,以*标记。

[0077] (2) 实验结果

[0078] 如表7所示,随着足底电刺激次数的增加,动物表现出的僵立行为也逐渐增加,其中注射Tat-SKE10和Tat-KE10的动物在恐惧条件反射的建立过程中没有显著差异。该结果表明,Tat-KE10对记忆的获取没有显著影响。

[0079] 表7. 短肽对记忆的获取没有显著影响

	分组	水	Tat-SKE10	Tat-KE10
	动物数	8	8	8
[0080] 僵立时间	足底刺激前	0.54±0.32%	0.34±0.15%	0.82±0.32%
	1 st 足底刺激	20.96±4.05%	20.12±5.62%	18.58±3.36%
	2nd 足底刺激	34.54±4.13%	37.13±6.18%	41.31±3.94%
	3rd 足底刺激	49.34±6.41%	52.86±5.76%	59.69±4.84%
	4th 足底刺激	54.89±4.96%	52.19±5.38%	51.39±5.23%
	5th 足底刺激	65.72±5.01%	68.05±3.73%	52.33±4.61%
[0081]	6th 足底刺激	50.47±5.70%	61.54±5.47%	55.93±5.01%

[0082] 如表8所示,恐惧记忆训练结束后,48h后提取恐惧记忆前,给动物注射Tat-SKE10或Tat-KE10,注射时间点为提取前180min。实验结果发现Tat-SKE10对记忆提取没有显著影响,但Tat-KE10能剂量依赖的抑制恐惧记忆的提取。

[0083] 表8. 短肽可剂量依赖的抑制恐惧记忆的提取

分组	给药时间	给药剂量	动物数量	僵立水平	P 值
水	提前 3 小时腹腔注射	1ml/kg	12	66.36±3.18	
[0084] Tat-SKE10	提前 3 小时腹腔注射	1.5 $\mu\text{mol/kg}$	8	70.52±7012	0.74
	提前 3 小时腹腔注射	6 $\mu\text{mol/kg}$	11	66.18±4.59	0.97
	提前 3 小时腹腔注射	12 $\mu\text{mol/kg}$	12	63.64±4.70	0.63
Tat-KE10	提前 3 小时腹腔注射	1.5 $\mu\text{mol/kg}$	9	62.68±6.87	0.69
	提前 3 小时腹腔注射	6 $\mu\text{mol/kg}$	11	47.56±6.66	0.02*
	提前 3 小时腹腔注射	12 $\mu\text{mol/kg}$	12	29.97±5.75	<0.001*

[0085] 综上实验表明,本发明采用生物信息学方法分析不同物种AMPA受体亚单位GluR2的人类同源序列,发现GluR2的C端存在高度保守区域,并据此设计了短肽,其中还包括具有穿透细胞膜能力的和标记有荧光基团的短肽。上述实验表明,短肽中的KEGYNVYIE序列在系统进化中具有高度的GluR2专一性。采用电生理技术研究海马突触可塑性,发现短肽能选择性阻断突触的长时程增强(LTP),对突触长时程抑制(LTD)没有影响。通过对海马细胞膜上的GluR2的检测,发现短肽通过阻断谷氨酸AMPA受体亚基GluR2转运到突触膜上来阻断LTP。采用条件反射大鼠模型研究恐惧记忆,发现短肽对恐惧记忆的获得没有影响,但能特

异抑制恐惧记忆的提取,从而减轻或消除恐惧记忆。这些发现表明利用本发明的短肽或短肽修饰肽在制备用于治疗或预防与谷氨酸过度兴奋性疾病或病理性突触可塑性LTP相关疾病的药物或在建立与谷氨酸过度兴奋性疾病相关疾病或病理性突触可塑性LTP相关疾病的实验动物模型中有广泛的应用前景。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院昆明动物研究所

<120> 一种阻断突触长时程增强(LTP)的短肽及其应用

<130> 2016

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<212> PRT

<213> 人工系列

<400> 1

Lys Glu Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Ile Glu

1 5 10

<210> 2

<212> PRT

<213> 人工系列

<400> 2

Lys Glu Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Leu Glu

1 5 10

Structure: tol-Glut2-A3-Y15-21
Lot No: P121207-4-8081323
Number: 0206049
Column: 2.50*4.6mm,Kromasil-C18-5um
Solvent A: 0.1%TFA in 100%water
Solvent B: 0.1%TFA in 100%acetonitrile

Gradient:

Time	A	B
0.000	98%	2%
25.000	93%	7%
25.100	93%	100%
30.000	99%	99%

Flow rate: 0.8ml/min
Wavelength: 254
Volume: 25ul

Peak No.	Ret Time	Height	Area	Cont.
1	13.755	649.571	9686.815	0.9467
2	14.407	3832.243	15931.247	0.8828
3	14.658	193496.250	1775587.730	98.3897
4	15.145	347.919	3280.942	0.1818

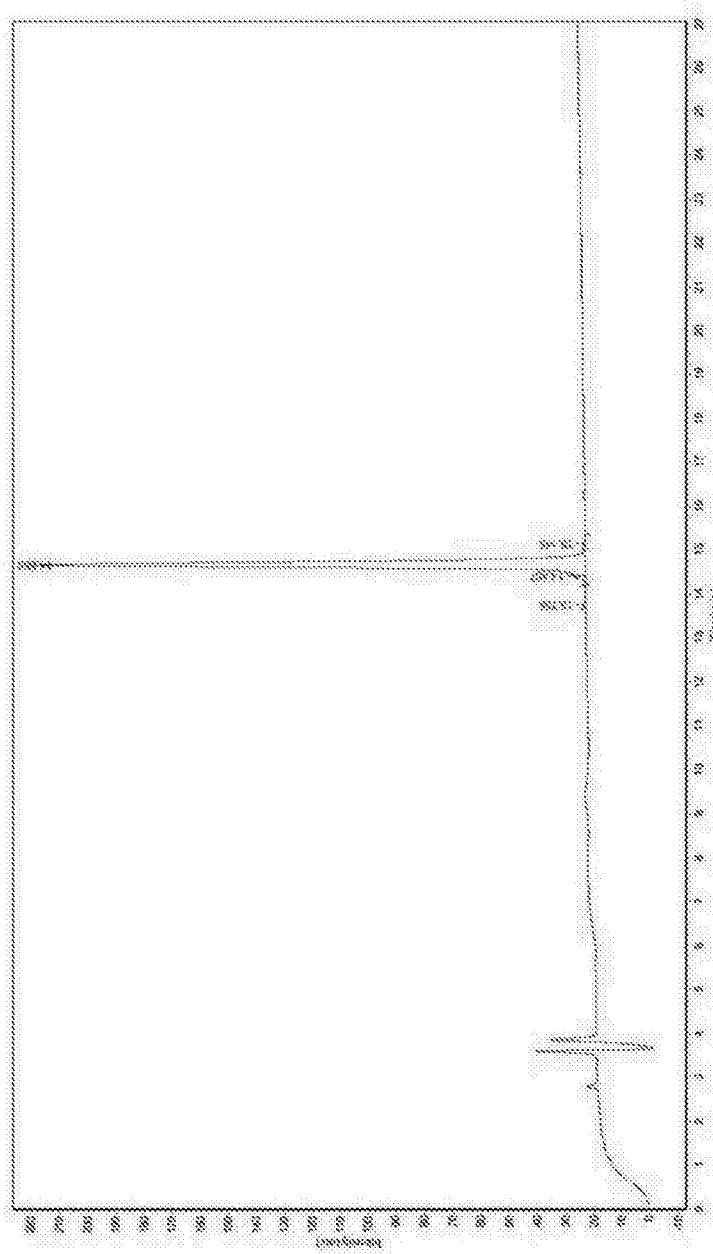


图1

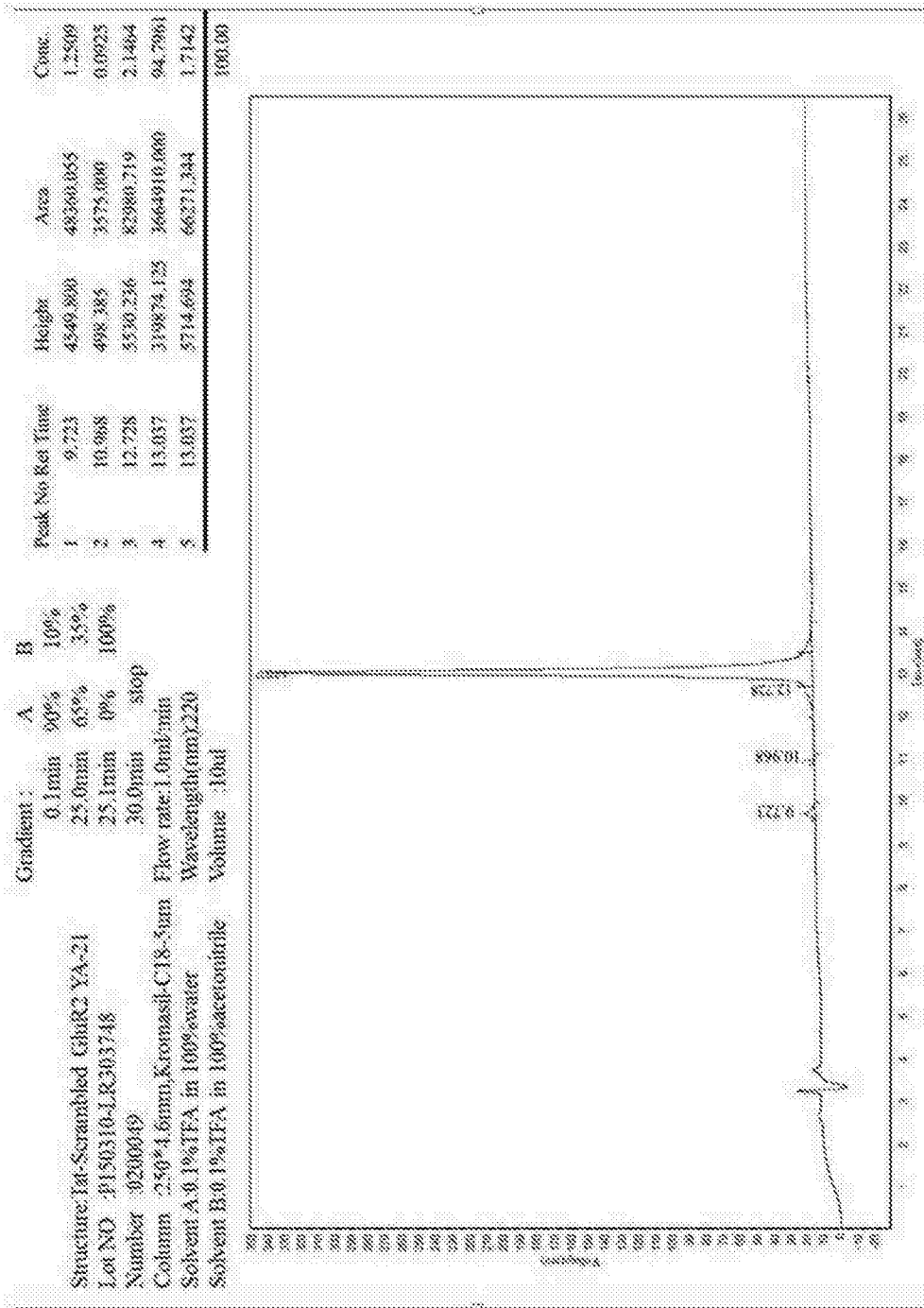


图2

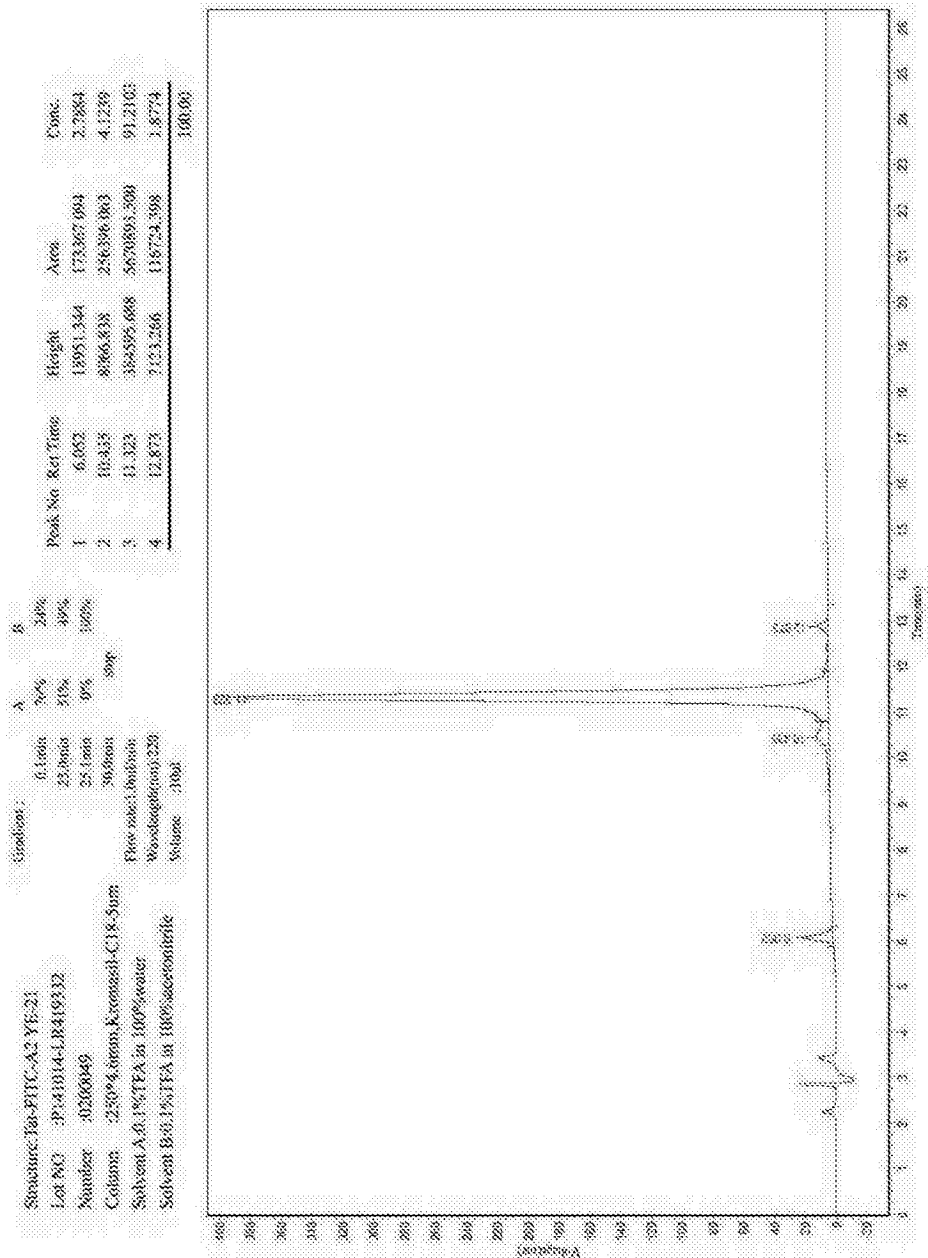


图3

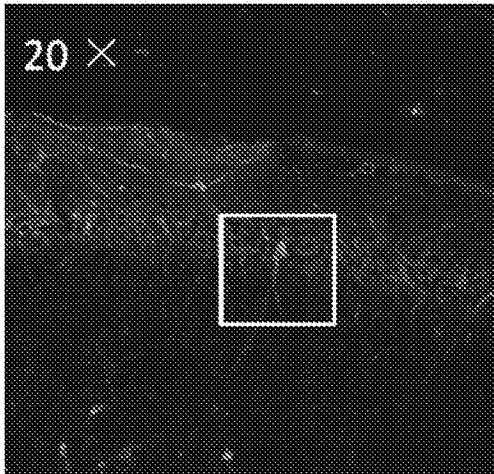


图4

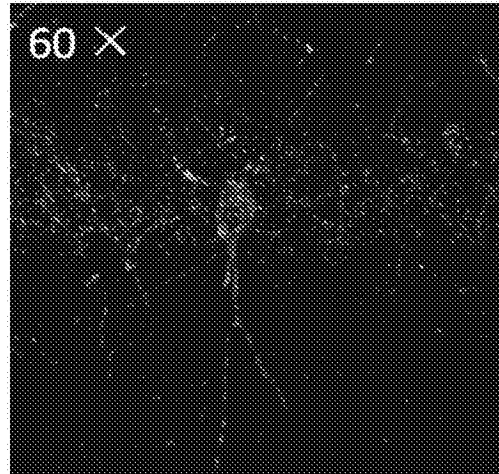


图5