



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112119977 B

(45) 授权公告日 2021.10.19

(21) 申请号 202011100708.6

A61K 45/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.10.15

A61P 25/24 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112119977 A

(43) 申请公布日 2020.12.25

(73) 专利权人 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院

地址 100850 北京市海淀区太平路27号

(72) 发明人 张纪岩 牛春晓 靳远晗 吴宪 马晨珂 董洁 程倩倩 沈少灵 刘根玉 申卓

(74) 专利代理机构 北京预立生科知识产权代理有限公司 11736

代理人 朱萍 孟祥斌

(51) Int.Cl.

A01K 67/02 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 107012203 A, 2017.08.04

CN 108473961 A, 2018.08.31

CN 110325209 A, 2019.10.11

CA 2830987 A1, 2012.09.27

AU 2016244182 A1, 2016.11.03

Yukihiko Shirayama. Brain-Derived Neurotrophic Factor Produces Antidepressant. 《The Journal of Neuroscience》. 2002,

杨雷雷. 靶向CD317 介导的pDC 清除促进抗肿瘤免疫反应. 《2019第一届全国口腔颌面-头颈肿瘤学术大会-医药卫生科技》. 2019,

审查员 郭晓晶

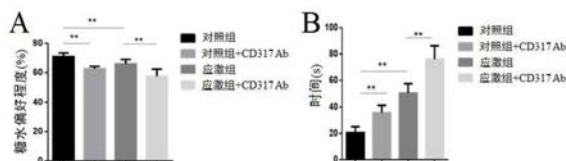
权利要求书1页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

CD317诱导的抑郁和记忆损伤的小鼠模型的构建方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种CD317诱导的抑郁和记忆损伤的小鼠模型的构建方法及其应用。本发明通过对小鼠施用CD317中和抗体,得到抑郁和记忆损伤的小鼠模型,进一步通过动物行为学检测,该小鼠出现随时间增长的抑郁样症状(糖水偏好实验、强迫游泳实验)和记忆功能损伤(水迷宫实验),通过细胞实验进一步验证了上述结果,本发明构建的小鼠模型可用于治疗抑郁或记忆损伤药物的筛选。



1. 一种CD317诱导的抑郁和记忆损伤的小鼠模型的构建方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

对小鼠施用CD317中和抗体,得到抑郁和记忆损伤的小鼠模型。

2. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述小鼠为雄性C57BL/6小鼠。

3. 根据权利要求1或2所述的构建方法,其特征在于,所述CD317中和抗体的施用方式包括静脉注射、腹腔注射、皮下注射、皮内注射和肌肉注射。

4. 根据权利要求3所述的构建方法,其特征在于,所述CD317中和抗体的施用方式为尾静脉注射。

5. 根据权利要求3所述的构建方法,其特征在于,所述CD317中和抗体的注射量为200 $\mu$ g。

6. 根据权利要求3所述的构建方法,其特征在于,所述CD317中和抗体的注射持续时间为3天,每3天补一次抗体。

7. CD317中和抗体在构建抑郁和记忆损伤的小鼠模型中的应用。

8. CD317在制备治疗抑郁或记忆损伤药物中的应用。

9. CD317在筛选治疗抑郁或记忆损伤药物中的应用。

10. 根据权利要求1-6任一项所述的构建方法构建得到的小鼠模型在筛选治疗抑郁或记忆损伤药物中的应用。

11. 根据权利要求1-6任一项所述的构建方法构建得到的小鼠模型筛选治疗抑郁或记忆损伤药物的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

(1) 将待测试药物施用于权利要求1-6任一项所述的构建方法构建得到的小鼠模型中;

(2) 分析待测试药物的治疗效果并进行评价,选择能够明显改善小鼠模型抑郁或记忆损伤的测试药物。

## CD317诱导的抑郁和记忆损伤的小鼠模型的构建方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,涉及一种动物模型的构建方法,尤其是一种CD317诱导的抑郁和记忆损伤的小鼠模型的构建方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 我国正处于快速发展的转型期,城乡居民生活、工作压力不断增大,社会心理问题日益突出。中国的抑郁症患病率为3.02%,三十年内增长了约40倍(Smith K.Mental health:a world of depression.Nature 2014;515(7526):181.)。抑郁症患者往往伴有学习记忆受损等认知障碍,无法正常生活和工作,甚至会自杀。据报道我国每年有25万人自杀,超过80%的自杀源于抑郁症的折磨。既往对应激相关精神心理障碍的研究聚焦于神经内分泌系统,例如下丘脑-垂体-肾上腺轴的过度活化、神经递质代谢异常、神经可塑性受损等。基于上述努力产生了一些抗抑郁药物和辅助治疗方案,但经过正规治疗的抑郁症患者有三分之一并没有疗效,而且药物有严重的副作用和遗留效应,因此,目前亟需根据新机制研发抑郁症治疗的干预手段。

[0003] 目前针对抑郁症的实验研究主要采用动物模型,例如小鼠,造成小鼠抑郁的主要模型包括慢性不可预见性应激、限制性束缚、社会挫败应激等。不同的模型体现抑郁的不同成因或者机制,因此,建立新的抑郁小鼠模型对研发新的抑郁症治疗干预手段具有重要意义。本发明通过研究社会挫败应激对免疫系统的影响,首次发现社会挫败应激导致 $B220^+CD11c^{int}CD317^+$ 浆细胞样树突状细胞(Plasmacytoid dendritic cells,pDCs)显著减少,继而本发明利用CD317中和抗体清除pDCs,发现可直接导致小鼠抑郁、并伴有记忆受损,成功构建了CD317诱导的抑郁和记忆损伤的小鼠模型,本发明为研究抑郁发生机制和干预策略提供了新的小鼠模型的构建方法。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种CD317诱导的抑郁和记忆损伤的小鼠模型的构建方法,通过该方法构建的抑郁和记忆损伤的小鼠模型,能够应用于抑郁发生机制和干预策略的研究中。

[0005] 本发明的上述目的通过以下技术方案得以实现:

[0006] 本发明的第一方面提供了一种CD317诱导的抑郁和记忆损伤的小鼠模型的构建方法。

[0007] 进一步,所述方法包括如下步骤:

[0008] 对小鼠施用CD317中和抗体,得到抑郁和记忆损伤的小鼠模型。

[0009] 进一步,所述小鼠为雄性C57BL/6小鼠。

[0010] 进一步,所述CD317中和抗体的施用方法包括但不限于静脉注射、腹腔注射、皮下注射、皮内注射和肌肉注射,优选为尾静脉注射。

- [0011] 进一步,所述CD317中和抗体的注射量为200 $\mu$ g。
- [0012] 进一步,所述CD317中和抗体的注射持续时间为3天,每3天补一次抗体。
- [0013] 本发明的第二方面提供了CD317中和抗体在构建抑郁和记忆损伤的小鼠模型中的应用。
- [0014] 在本发明的实施例中,所述的小鼠模型是通过小鼠施用CD317中和抗体,以达到清除小鼠体内的B220<sup>+</sup>CD11c<sup>int</sup>CD317<sup>+</sup>浆细胞样树突状细胞(Plasmacytoid dendritic cells, pDCs)的目的,进而构建得到抑郁和记忆损伤的小鼠模型。
- [0015] 本发明的第三方面提供了CD317在制备治疗抑郁或记忆损伤药物中的应用。
- [0016] 进一步,所述药物包括促进CD317表达的试剂。
- [0017] 进一步,所述的试剂包括CD317基因的表达产物、促进型miRNA、促进型转录调控因子、促进型靶向小分子化合物。
- [0018] 进一步,所述试剂包括以下形式:多核苷酸、多肽、小分子化合物、或其组合物。
- [0019] 进一步,所述治疗抑郁或记忆损伤药物包括但不限于药物组合物。
- [0020] 进一步,所述药物组合物包括药学上可接受的载体和/或辅料。
- [0021] 进一步,所述药物组合物还可包括用以治疗抑郁性疾病的其他精神药物或改善记忆损伤的其他药物,本发明的活性成分(促进CD317表达的试剂)与用以治疗抑郁性疾病的其他精神药物或改善记忆损伤的其他药物可以制备成单独的制剂联合应用,也可将两者制备成一种制剂以组合物的形式应用。
- [0022] 进一步,所述载体和/或辅料包括药学上可接受的载体、稀释剂、填充剂、结合剂及其它赋形剂,这依赖于给药方式及所设计的剂量形式。本领域技术人员已知的治疗惰性的无机或有机的载体包括(但不限于)乳糖、玉米淀粉或其衍生物、滑石、植物油、蜡、脂肪、多羟基化合物(例如聚乙二醇、水、蔗糖、乙醇、甘油),诸如此类,各种防腐剂、润滑剂、分散剂、矫味矫臭剂、湿润剂、甜味剂、香味剂、乳化剂、悬浮剂、保存剂、抗氧化剂、着色剂、稳定剂、盐、缓冲液,诸如此类的也可加入其中,适合的药学上接受的载体及制剂在Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)中有详细的记载,这些物质根据需要用于帮助配方的稳定性或有助于提高活性或它的生物有效性或在口服的情况下产生可接受的口感或气味,在这种药物组合物中可以使用的制剂可以是其原始化合物本身的形式,或任选地使用其药理学可接受的盐的形式。如此配制的药物组合物根据需要可选择本领域技术人员已知的任何适当的方式把药物进行给药,使用药物组合物时,是将安全有效量的本发明的药物施用于人。
- [0023] 本发明的药物组合物的适合的给药剂量根据制剂化方法、给药方式、患者的年龄、体重、性别、病态、饮食、给药时间、给药途径、排泄速度及反应灵敏性之类的因素而可以进行多种处方,熟练的医生通常能够容易地决定处方及处方对所希望的治疗或预防有效的给药剂量。
- [0024] 在一些情况下,为了延长药物的治疗效果,需要减缓从皮下或肌肉内注射的药物吸收的速度。可以通过使用结晶的液体或疏水的非晶形材料混悬液来实现。药物吸收的速度依赖于药物的溶出度,溶出度反过来依赖于晶粒大小和结晶形式。
- [0025] 进一步,所述应用包括一种筛选治疗抑郁或记忆损伤药物的方法。
- [0026] 本发明的第四方面提供了CD317在筛选治疗抑郁或记忆损伤药物中的应用。

[0027] 进一步,所述方法包括如下步骤:

[0028] (1) 将待测试药物施加到表达或含有CD317的体系;

[0029] (2) 检测所述体系中CD317的表达;

[0030] (3) 选择可以促进CD317表达的测试药物。

[0031] 进一步,所述体系选自:细胞体系、亚细胞体系、溶液体系、组织体系、器官体系或动物体系。

[0032] 进一步,所述待测试药物包括但不限于:针对CD317基因或其上游或下游基因设计的核酸促进物、蛋白促进剂、蛋白结合分子。

[0033] 进一步,步骤(3)中所述的选择的测试药物为与在该测试药物不存在时检测到的表达水平相比升高CD317表达水平的测试药物。

[0034] 进一步,所述检测CD317表达水平的方法包括但不限于:实时荧光定量PCR、原位杂交、基因芯片、蛋白免疫印迹法(Western blot)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、胶体金检测法。

[0035] 进一步,所述的实时荧光定量PCR、原位杂交、基因芯片是用于在基因水平上检测CD317基因的表达水平;所述的蛋白免疫印迹法(Western blot)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、胶体金检测法是用于在蛋白水平上检测CD317蛋白的表达水平。

[0036] 本发明的第五方面提供了本发明第一方面所述的构建方法构建得到的小鼠模型在筛选抑郁或记忆损伤药物中的应用。

[0037] 进一步,所述应用包括一种筛选治疗抑郁或记忆损伤药物的方法。

[0038] 本发明的第六方面提供了本发明第一方面所述的构建方法构建得到的小鼠模型筛选治疗抑郁或记忆损伤药物的方法。

[0039] 进一步,所述方法包括如下步骤:

[0040] (1) 将待测试药物施用于本发明第一方面所述的构建方法构建得到的小鼠模型中;

[0041] (2) 分析待测试药物的治疗效果并进行评价,选择能够明显改善小鼠模型抑郁或记忆损伤的测试药物。

[0042] 本发明的优点和有益效果:

[0043] (1) 本发明首次将CD317中和抗体应用于抑郁和记忆损伤小鼠模型的构建中,提供了一种CD317诱导的抑郁和记忆损伤的小鼠模型的构建方法,根据所述构建方法构建得到的小鼠模型为研究抑郁或记忆损伤的发生机制和干预策略提供了基础。

[0044] (2) 本发明提供的CD317诱导的抑郁和记忆损伤小鼠模型的构建方法具有操作简单、省时省力的优点,而传统的构建方法步骤繁琐、所需构建时间较长。

[0045] (3) 本发明通过研究社会挫败应激对免疫系统的影响,首次发现社会挫败应激导致B220<sup>+</sup>CD11c<sup>int</sup>CD317<sup>+</sup>浆细胞样树突状细胞显著减少,该发现对抑郁和记忆损伤的发病机制的研究具有重要的参考价值。

[0046] (4) 与现有技术相比,本发明采用CD317诱导构建了抑郁和记忆损伤的小鼠模型,通过动物行为学检测和细胞实验验证,该小鼠具有抑郁和记忆损伤的病理特征,可用于治疗抑郁或记忆损伤药物的筛选。

## 附图说明

[0047] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0048] 图1是分别对小鼠的骨髓和脾组织细胞进行流式细胞术得到的结果图,其中,A图:骨髓,B图:脾;

[0049] 图2是不同处理条件小鼠的pDCs细胞数量的统计结果图( $n=12$ , $*P<0.05$ , $**P<0.01$ ),其中,A图:骨髓,B图:脾;

[0050] 图3是分别对小鼠的骨髓和脾组织细胞进行流式细胞术后得到的结果图,其中,A图:骨髓,B图:脾;

[0051] 图4是不同处理条件小鼠的pDCs细胞数量的统计结果图( $n=6$ , $*P<0.05$ , $**P<0.01$ ),其中,A图:骨髓,B图:脾;

[0052] 图5是小鼠的抑郁样行为测试结果图( $n=6$ , $*P<0.05$ , $**P<0.01$ ),其中,A图:糖水偏好实验,B图:强迫游泳实验;

[0053] 图6是小鼠脑免疫细胞流式分析结果图( $n=6$ , $*P<0.05$ , $**P<0.01$ ),其中,A图: CX3CR1,B图:CD11b;

[0054] 图7是对小鼠分别进行水迷宫定位航行实验得到的结果图( $n=5$ );

[0055] 图8是对小鼠分别进行水迷宫空间探索实验得到的结果图( $n=5$ ),其中,A图:进入NW象限的次数统计图,B图:进入NW象限停留时间的统计图,C图:进入平台的次数统计图,D图:进入平台停留时间的统计图。

## 具体实施方式

[0056] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。本领域的普通技术人员可以理解:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照厂商所建议的条件实施检测。

[0057] 实施例1 社会挫败应激导致pDCs减少

[0058] 1、社会挫败应激小鼠模型的构建

[0059] 筛选合格的CD1小鼠:购入的CD1小鼠单笼饲养,在筛选前适应性饲养至少一周。用6-8周龄的雄性C57BL/6小鼠作为入侵小鼠筛选CD1小鼠。筛选的标准如下:

[0060] (1) CD1小鼠在筛选的3天里,至少有连续2天攻击C57BL/6小鼠。

[0061] (2) CD1小鼠在C57BL/6小鼠入侵后最多一分钟开始攻击。

[0062] 构建社会挫败应激模型所用的饲养笼是大鼠饲养笼,中间有透明隔板,可以隔开CD1与C57BL/6,CD1与C57BL/6透过隔板看见对方。6-8周龄雄性C57BL/6小鼠作为入侵者,CD1小鼠作为居住者。挫败期间,将C57BL/6小鼠放在CD1小鼠居住的一侧,每天挫败10分钟,连续挫败10天。挫败结束后,将C57BL/6小鼠转移至另一侧。入侵的C57BL/6每天接触不同的CD1小鼠接受刺激。

[0063] 2、流式细胞术实验

[0064] 12只雄性C57BL/6小鼠随机分为2组,对照组和应激组,应激组按照社会挫败模型操作挫败10天,10天后,分别取各组小鼠的骨髓和脾进行pDCs的流式细胞术实验。

[0065] pDCs的流式细胞术实验:取出小鼠组织细胞后计数,每个样品取 $1 \times 10^6$ 个细胞,加入1mL FACS洗液,6000rpm离心30s,弃上清,加入100 $\mu$ L FACS洗液重悬。设置裸细胞和不同荧光通道抗体的单标。按照1:100加入荧光抗体(均购自Biolegend公司),裸细胞不加抗体,单标只加对应通道的抗体。4 $^{\circ}$ C避光染色30min。1mL FACS洗液重悬细胞,6000rpm离心30s,弃上清,每管加入200 $\mu$ L 1%多聚甲醛溶液固定细胞,一周内上机检测。

[0066] 3、统计学分析

[0067] 应用SPSS 20.0及Microsoft Excel 2003软件对所有数据进行统计学分析。计量资料结果以均数 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SEM)表示,组间均值用t检验统计分析, $p < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

[0068] 4、实验结果

[0069] 分别对对照组和应激组小鼠的骨髓和脾组织细胞进行流式细胞术实验得到的结果图见图1A和B,结果显示应激组小鼠骨髓和脾组织中的B220 $^+$ CD11c $^{int}$ CD317 $^+$ 浆细胞样树突状细胞(pDCs)显著低于对照组,进行统计学分析发现对照组和应激组骨髓和脾组织中的pDCs的含量存在差异,且差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ) (见图2A和B),进一步表明社会挫败应激会导致pDCs的显著减少。

[0070] 实施例2 CD317诱导构建抑郁和记忆损伤的小鼠模型与流式验证

[0071] 1、CD317诱导构建抑郁和记忆损伤的小鼠模型

[0072] 通过对小鼠施用CD317中和抗体达到清除pDCs的目的,以构建抑郁和记忆损伤的小鼠模型。本实施例通过给小鼠尾静脉注射CD317中和抗体(购自Bio X Cell公司)达到清除pDCs的目的,注射量为每只小鼠200 $\mu$ g,对照组注射等量的同种亚型对照抗体,持续时间3天,每三天补一次抗体。

[0073] 2、流式验证

[0074] 将24只雄性C57BL/6小鼠随机分为4组,对照组、清除pDCs组(对照组+CD317Ab)、挫败组(应激组)和挫败清除pDCs组(应激组+CD317Ab),15天后,分别取各组小鼠的骨髓和脾进行pDCs的流式细胞术实验。

[0075] pDCs的流式细胞术实验:取出小鼠组织细胞后计数,每个样品取 $1 \times 10^6$ 个细胞,加入1mL FACS洗液,6000rpm离心30s,弃上清,加入100 $\mu$ L FACS洗液重悬。设置裸细胞和不同荧光通道抗体的单标。按照1:100加入荧光抗体(均购自Biolegend公司),裸细胞不加抗体,单标只加对应通道的抗体。4 $^{\circ}$ C避光染色30min。1mL FACS洗液重悬细胞,6000rpm离心30s,弃上清,每管加入200 $\mu$ L 1%多聚甲醛溶液固定细胞,一周内上机检测。

[0076] 3、统计学分析

[0077] 应用SPSS 20.0及Microsoft Excel 2003软件对所有数据进行统计学分析。计量资料结果以均数 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SEM)表示,组间均值用t检验统计分析, $p < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

[0078] 4、实验结果

[0079] 实验结果显示,与对照组相比,挫败组、清除pDCs组和挫败清除pDCs组骨髓和脾组织中的B220 $^+$ CD11c $^{int}$ CD317 $^+$ pDCs显著降低(见图3A和B),进一步进行统计学分析的结果见图4A和B,结果显示,挫败组、清除pDCs组和挫败清除pDCs组骨髓和脾组织中的pDCs和对照组骨髓和脾组织中的pDCs具有显著的差异,且差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),表明CD317诱导

构建的抑郁和记忆损伤的小鼠模型中pDCs的成功清除。

[0080] 实施例3 pDCs的清除直接导致小鼠抑郁

[0081] 1、糖水偏好实验

[0082] 在小鼠笼子上左右两边各放置一瓶1%的蔗糖水和纯水,保持自由饮食饮水2天,期间每隔12h将糖水和纯水互换位置,防止产生位置偏好。第3天将糖水和纯水取出,分别称重,并随机放回笼上,使小鼠自由饮用,12h后取下并再次称量剩余溶液的质量。分别计算蔗糖水消耗量和纯水消耗量。糖水偏好程度=糖水消耗量/(糖水消耗量+纯水消耗量)。

[0083] 2、强迫游泳实验

[0084] 将小鼠放入高50cm、直径20cm的圆柱形玻璃缸中,缸内水深保持约40cm,水温保持在(25±1)℃。首先将小鼠在缸内游泳2min,使小鼠适应游泳环境,适应结束后记录小鼠在后4min内的累积不动时间(小鼠在水中停止挣扎,身体呈漂浮状态,或仅有保持身体平衡的微小肢体运动)。

[0085] 3、流式细胞术

[0086] (1)分离小鼠脑免疫细胞

[0087] 小鼠腹腔注射麻醉剂,待小鼠深度麻醉后,剪开腹腔和胸腔,注意不要剪到心脏,将输液器扎入左心室,剪破右心耳,开始灌流,直至肝脏完全变白后,灌流结束。剪下小鼠头部,小心剥开头骨,取出脑组织,浸泡在1640培养基中。配置组织消化液,用1640培养基稀释250mg/mL的胶原酶D,使其终浓度为2.5mg/mL。将脑组织剪碎后,每个样品加入2mL消化液,37℃消化40min,用等体积含5%BSA的1640培养基终止消化,冰上放置10min。用40mm滤网过滤细胞悬液,2000rpm,离心5min,弃上清。离心期间,配置percoll分离液。100%percoll分离液由成品percoll分离液与10×PBS按照9:1的比例混匀制得。用1640培养基将100%percoll分离液稀释成40%与70%的percoll分离液。用40%percoll分离液重悬细胞沉淀,每个样品10mL。在试管中加入10mL 70%percoll分离液,将上一步的细胞悬液轻轻滴加至试管中,动作轻柔,不要破坏液面。密度梯度离心,4℃,2000rpm离心20min,升速1降速0。离心结束后,溶液分4层,用真空泵吸取最上层肺细胞杂质,40%与70%percoll分离液之间的即为肺单个核细胞。用1mL移液管吸取中间层细胞,注意不要吸到下层70%percoll分离液。2000rpm离心5min,弃上清,1mL 1640培养基重悬用于后续实验。

[0088] (2)小鼠脑免疫细胞流式细胞术实验

[0089] 取出小鼠组织细胞后计数,每个样品取 $1 \times 10^6$ 个细胞,加入1mL FACS洗液,6000rpm离心30s,弃上清,加入100μL FACS洗液重悬。设置裸细胞和不同荧光通道抗体的单标。按照1:100加入荧光抗体(均购自Biolegend公司),裸细胞不加抗体,单标只加对应通道的抗体。4℃避光染色30min。1mL FACS洗液重悬细胞,6000rpm离心30s,弃上清,每管加入200μL 1%多聚甲醛溶液固定细胞,一周内上机检测。

[0090] 4、统计学分析

[0091] 应用SPSS 20.0及Microsoft Excel 2003软件对所有数据进行统计学分析。计量资料结果以均数±标准误(Mean±SEM)表示,组间均值用t检验统计分析, $p < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

[0092] 5、实验结果

[0093] 实验结果显示,与对照组相比,挫败组、清除pDCs组和挫败清除pDCs组小鼠表现出



明显抑郁行为(见图5A和B),进一步取小鼠脑组织细胞进行流式细胞术实验,发现与对照组相比,挫败组、清除pDCs组和挫败清除pDCs组的CD45<sup>int</sup>CD11b<sup>+</sup>小胶质细胞CX3CR1和CD11b平均荧光强度增高(见图6A和B),说明小胶质细胞明显活化,与行为学实验结果一致,进一步表明pDCs与抑郁相关。

[0094] 实施例4 pDCs的清除直接导致小鼠记忆损伤

[0095] 1、水迷宫实验

[0096] 虽然老鼠是天生的游泳健将,但是它们却厌恶处于水中的状态,同时游泳对于老鼠来说是十分消耗体力的活动,它们会本能的寻找水中的休息场所,寻找休息场所的行为涉及一个复杂的记忆过程。包括收集与空间定位有关的视觉信息,再对这些信息进行处理、整理、记忆、加固、取出,目的是能成功的航行并且找到隐藏在水中的站台,最终从水中逃脱。

[0097] 小鼠Morris水迷宫在线检测系统由一个不锈钢喷塑圆柱形水池和图像采集分析系统两部分组成。水池直径为100cm,高38cm。平台直径6cm,高14cm。水温21-22℃,按东南西北四个方向将水池平均划分为4个象限(NE、SE、SW、NW),前4天每天定于固定时间段,每个时间段训练4次。训练开始时,将平台置于NW象限,从池壁四个起始点的任一点将小鼠面向池壁放入水池,立即围紧围帘。自由录像记录系统记录小鼠找到平台的时间(逃避潜伏期)和游泳路径,4次训练即将小鼠分别从四个不同的起始点(不同象限)放入水中。小鼠找到平台后在平台上休息10s再进行下一次试验;如果60s内找不到平台(潜伏期记为60s),则由实验者将其拿上平台,在平台上休息30s再进行下一次试验。每天以小鼠4次训练潜伏期的平均值作为小鼠当日的学习成绩。第5天为探索实验,撤去平台,选择平台所在象限对角象限作为入水点,记录60s内小鼠的穿台次数。水迷宫实验过程中,水面布光和对外界环境的隔离要求很高,水面的阴影会干扰实验结果,外界工作人员或者其他物体移动会干扰实验动物的记忆,所以水迷宫外的一切物品在实验的始终保持不变,实验人员不能使用香水或者有刺激气味的物品。

[0098] 2、统计学分析

[0099] 应用SPSS 20.0及Microsoft Excel 2003软件对所有数据进行统计学分析。计量资料结果以均数±标准误(Mean±SEM)表示,组间均值用t检验统计分析,p<0.05认为差异具有统计学意义。

[0100] 3、实验结果

[0101] 定位航行实验的结果见图7,对照组小鼠在水中游泳时找到小平台离开水所需要的时间一天比一天短,体现了学习记忆能力,清除pDCs 15天后的小鼠学习记忆能力能力下降,在第4天时需要比对照组更长的时间才能找到小平台。空间探索实验在第5天撤掉小平台,对照组小鼠会凭借记忆反复到小平台所在的位置去寻找,而清除pDCs 15天后的小鼠去小平台所在的位置次数少、停留时间短,说明对小平台位置的记忆较差(见图8A-D),通过定位航行实验和空间探索实验对小鼠的空间位置感和方向感(空间定位)的学习记忆能力进行测试的结果表明,pDCs的清除直接导致小鼠记忆损伤,进一步也验证了CD317诱导的抑郁和记忆损伤的小鼠模型的成功构建。

[0102] 上述实施例的说明只是用于理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进

和修饰,这些改进和修饰也将落入本发明权利要求的保护范围内。

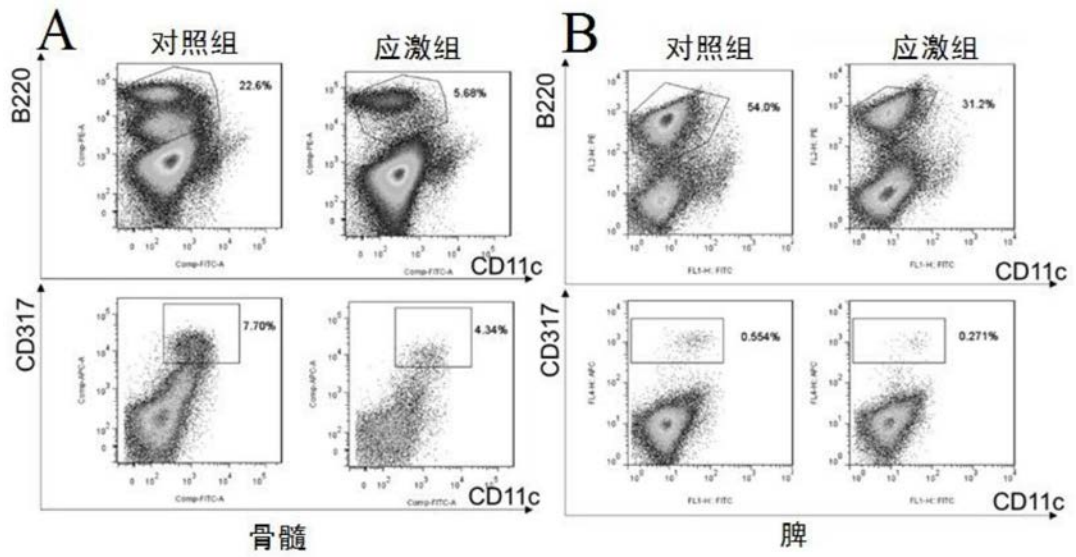


图1

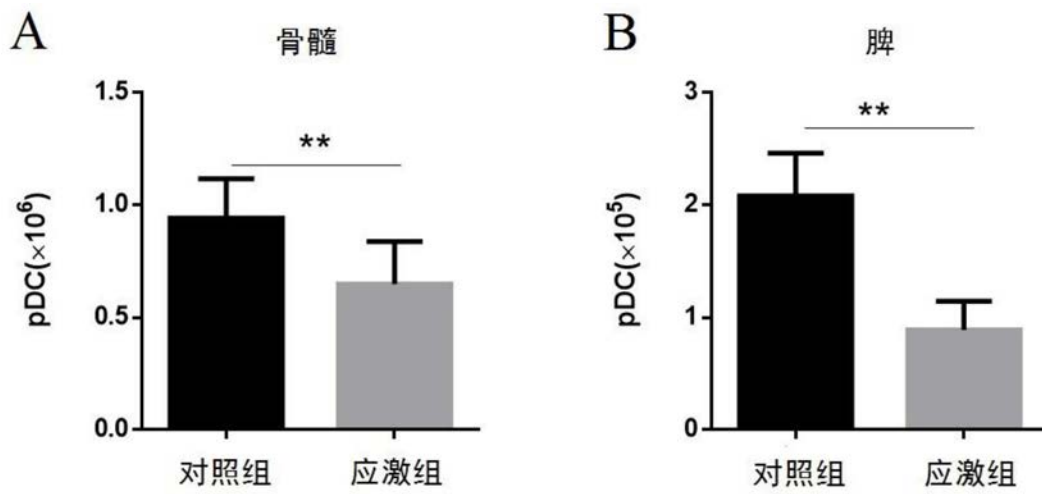


图2

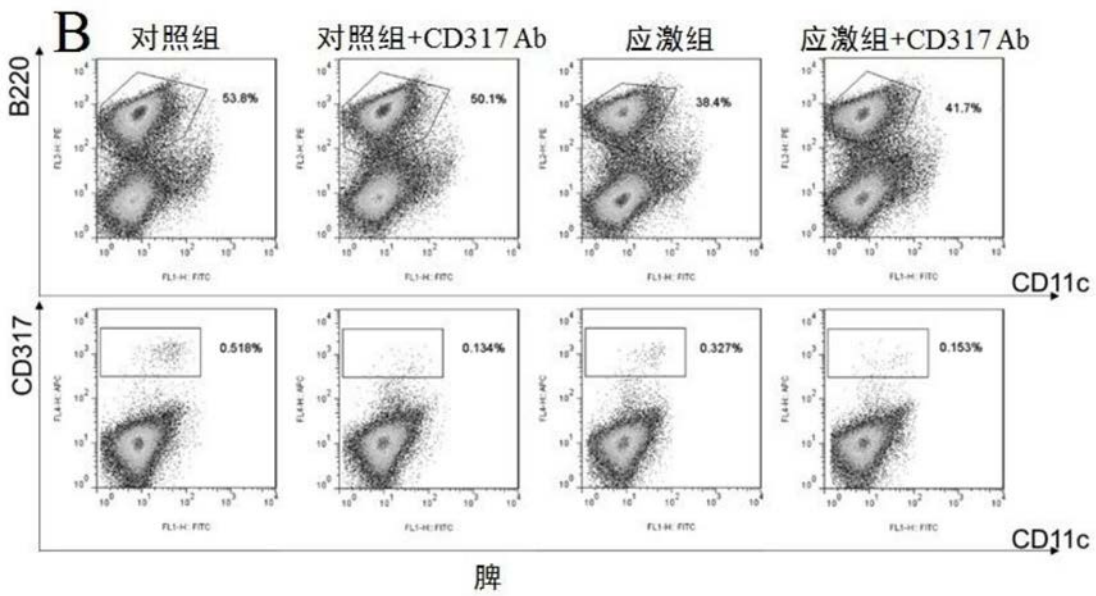
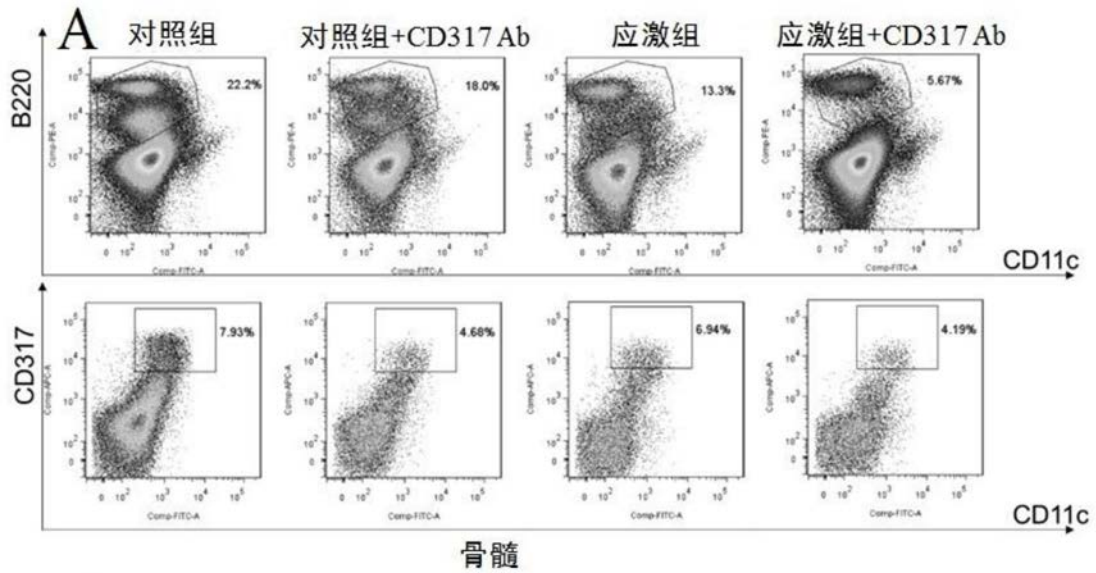


图3

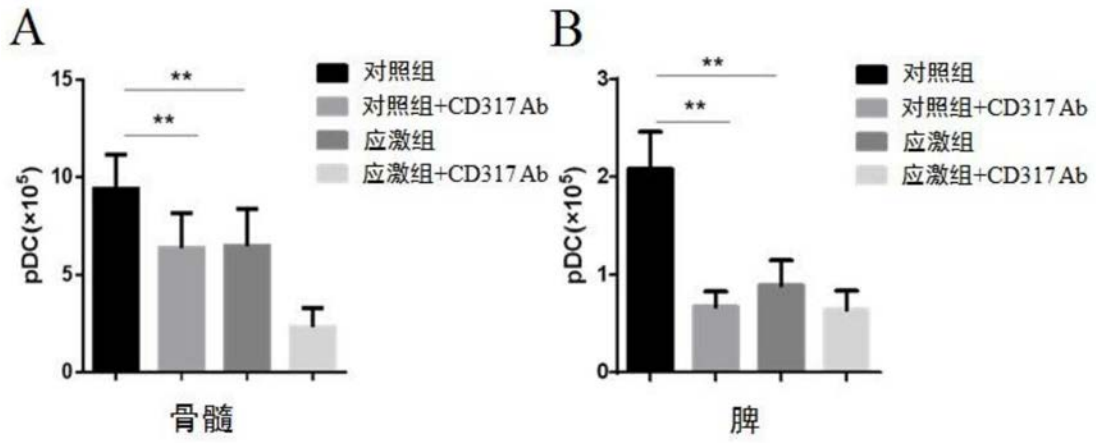


图4

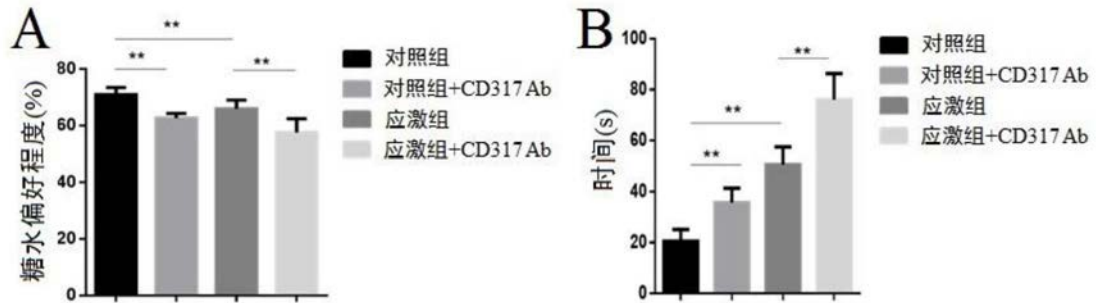


图5

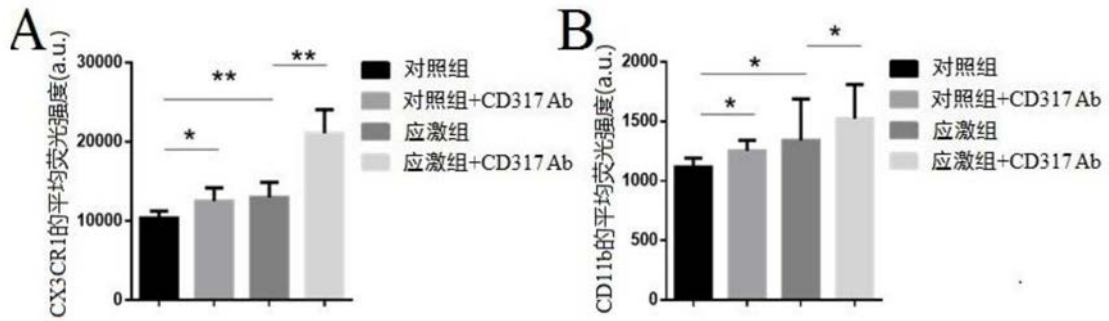


图6

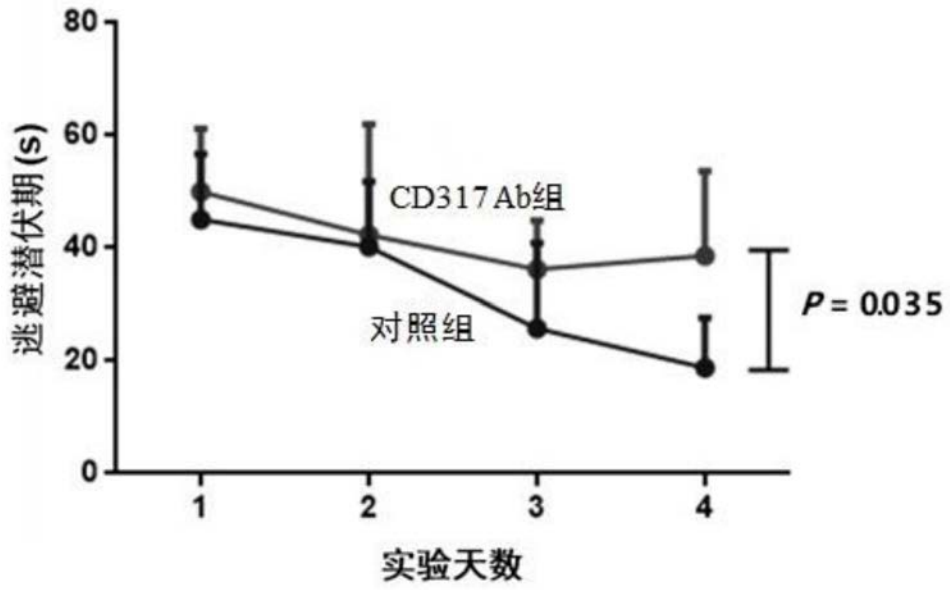


图7

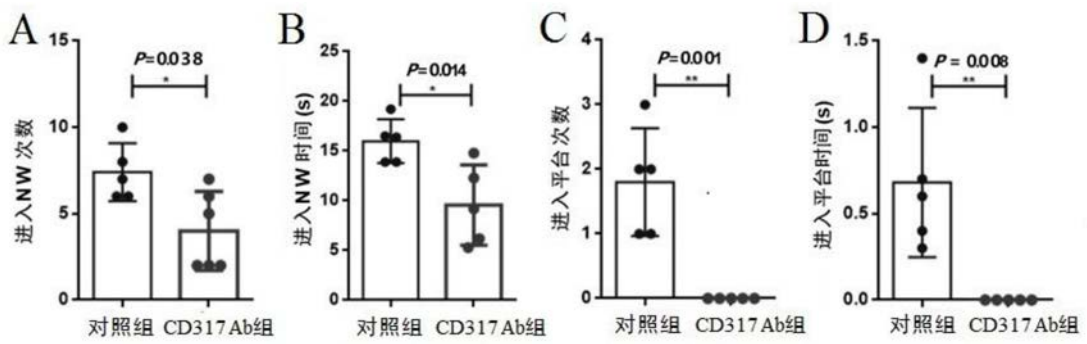


图8