

邬建飞,蔡端芳,谭友果,等. 喹吡罗诱导的强迫症模型小鼠行为特征与神经机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(3): 342-352.

WU J F, CAI D F, TAN Y G, et al. Study on behavioral characteristics and neural mechanisms of obsessive-compulsive disorder model mouse induced by quinpirole [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(3): 342-352.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.03.003

喹吡罗诱导的强迫症模型小鼠行为特征 与神经机制研究

邬建飞^{1,2}, 蔡端芳^{1,2}, 谭友果^{1,2}, 刘可智^{1,2}, 陈元怀¹, 王蕙琳^{1,2},
刘宇^{1,2*}, 周勇^{1*}

(1. 自贡市精神卫生中心, 四川 自贡 643020; 2. 自贡市脑科学研究院, 四川 自贡 643020)

【摘要】 目的 探讨喹吡罗诱导的强迫症 (obsessive-compulsive disorder, OCD) 小鼠的行为学变化, 再研究不同脑区神经元激活情况, 并通过转录组测序技术检测差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 及富集的生物学通路, 从而探讨 OCD 的发病机制。方法 将 32 只 2 月龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 OCD 组和对照组 ($n = 16$), OCD 组小鼠间隔 1 d 颈部皮下注射喹吡罗 (0.75 mg/kg), 共 19 次, 对照组小鼠注射生理盐水; 造模完成后进行旷场测试、高架十字迷宫实验和大理石掩埋实验; 行为学结束后取材, 利用尼氏染色检测神经元损伤情况, 利用免疫荧光染色检测 c-Fos 和 Iba1 蛋白的表达情况, 利用转录组测序技术筛选 DEGs 和富集相关信号通路; 利用 Western Blot 检测 TNF- α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 和 IL-6 相关炎症因子的表达。结果 喹吡罗诱导的 OCD 小鼠表现出焦虑样行为和强迫样行为; 海马区和下丘脑区神经元出现损伤情况; c-Fos 和 Iba1 蛋白在皮层、纹状体和下丘脑等脑区的表达都增加; 转录组测序结果 OCD 小鼠 DEGs 集于 NF- κ B 信号通路; Western Blot 结果显示 TNF- α 、p-NF- κ B p65 和 IL-6 等促炎症因子表达显著增加。结论 OCD 小鼠多个脑区神经元被异常激活, 小胶质细胞出现功能障碍, NF- κ B 信号通路激活引起的神经炎症伴随着 OCD 的发生过程。

【关键词】 强迫症; 转录组测序; 神经炎症; NF- κ B; TNF- α ; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 03-0342-11

Study on behavioral characteristics and neural mechanisms of obsessive-compulsive disorder model mouse induced by quinpirole

【基金项目】 国家重点研发项目 (2022YFC2009900), 自贡市科技计划项目 (2023YKY11), 自贡市卫生健康委员会科研课题 (22yb001, 24zd008), 自贡市重点科技计划项目 (2022-NKY-01-08, 2023-NKY-02-13, 2023-NKY-02-14), 自贡市医学大数据与人工智能研究院协同创新类项目 (2024-YGY-02-04)。

Funded by National Key Research and Development Program of China (2022YFC2009900), Zigong Science and Technology Program (2023YKY11), Scientific Research Project of Zigong Health Commission (22yb001, 24zd008), Key Science and Technology Plan Project of Zigong (2023-NKY-01-08, 2023-NKY-02-13, 2023-NKY-02-14), Zigong Medical Big Data and Artificial Intelligence Research Institute Collaborative Innovation Category (2024-YGY-02-04).

【作者简介】 邬建飞, 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 神经发育生物学。Email: 179507209@qq.com

【通信作者】 刘宇, 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 神经发育生物学研究精神疾病分子机制。Email: 441514738@qq.com;

周勇, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 精神疾病分子机制。Email: zhouyongedu2500@163.com。

* 共同通信作者

WU Jianfei^{1,2}, CAI Duanfang^{1,2}, TAN Youguo^{1,2}, LIU Kezhi^{1,2}, CHEN Yuanhuai¹,
WANG Yilin^{1,2}, LIU Yu^{1,2*}, ZHOU Yong^{1*}

(1. Zigong Mental Health Center, Zigong 643020, China; 2. Zigong Institute of Brain
Science, Zigong 643020, China)

Corresponding author: LIU Yu. E-mail: 441514738@qq.com; ZHOU Yong. E-mail: zhouyongedu2500@163.com

[Abstract] Objective Exploring the behavioral changes induced by quinpirole in obsessive-compulsive disorder (OCD) mouse, investigating the activation of neurons in different brain regions, and identifying differentially expressed genes (DEGs) and enriched biological pathways through transcriptome sequencing technology to elucidate the pathogenesis of OCD. **Methods** Randomly assign 32 male C57BL/6J mice, aged two months, to an OCD group and a control group ($n = 16$). Administering quinpirole (0.75 mg/kg) via subcutaneous injection to the OCD group mice every other day for a total of 19 injections, while the control group mice received an equivalent volume of saline solution. Following the completion of the model construction, open field testing, elevated plus maze testing, and marble burying tests were conducted. After the completion of behavioral studies, tissue samples were collected. Neuronal damage was assessed using Nissl staining, while the expression of c-Fos and Iba1 proteins was examined through immunofluorescence staining. Transcriptome sequencing technology was utilized to screen for differentially expressed genes and to enrich relevant signaling pathways. The expression of inflammatory cytokines, including TNF- α , NF- κ B p65, phosphorylated NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65), and IL-6, was detected using Western Blot analysis. **Results** Mouse induced with OCD by quinpirole exhibit anxiety-like behaviors and compulsive-like behaviors. Neurons in the hippocampal and hypothalamic regions exhibit signs of damage. The expression of c-Fos and Iba1 proteins is increased in the cortex, striatum, hypothalamus, and other brain regions. Western Blot result indicate a significant increase in the expression of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , p-NF- κ B p65, and IL-6. **Conclusions** In OCD mouse, neurons in multiple brain regions are abnormally activated, microglia exhibit dysfunction, and neuroinflammation induced by the activation of the NF- κ B signaling pathway accompanies the development of OCD.

[Keywords] obsessive-compulsive disorder; transcriptome sequencing; neuroinflammation; NF- κ B; TNF- α ; mouse

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

强迫症 (obsessive-compulsive disorder, OCD) 是一种常见的慢性神经精神类疾病,患者通常出现侵入性、持续性观念或重复性、刻板性强迫行为^[1]。流行病学研究显示, OCD 终身患病率约 3%,影响全球约 2 亿人的正常生活,是全球十大致残原因之一,严重影响患者的生活质量和身体健康, OCD 的治疗是神经科学领域的重大挑战^[2]。目前 OCD 的一线治疗方法包括 5-羟色胺再摄取抑制剂 (serotonin reuptake inhibitors, SRIs) 治疗和认知行为疗法,但约有 40% 的患者对现有治疗无反应或反应不佳,因此需要深入研究 OCD 的发病机制,以探索更为有效的治疗方法^[3]。研究显示, OCD 临床症状具有高度异质性,病因复杂, OCD 的发生可能与遗传、神经生物学、外界环境和个体心理等因素存在关联^[4]。神经解剖学

揭示皮质-纹状体-丘脑-皮质 (cortico-striatal-thalamo-cortical, CSTC) 回路主要负责个体情绪、奖励、记忆和计划的执行功能等方面的调控,有研究认为, OCD 的发生与 CSTC 区域功能和结构异常紧密关联,相关通路信号紊乱可能导致患者出现认知控制缺陷和情绪功能障碍^[5]。也有研究指出, OCD 的发生与杏仁核、海马体和扣带回等边缘系统密切相关,这些区域功能异常可能增加强迫性思维和强迫性行为^[6]。

OCD 病理机制尚未研究清楚, OCD 动物模型的广泛建立有利于深入探究强迫症的发病机制,目前研究人员已经在小鼠、大鼠、恒河猴等实验动物上成功建立了 OCD 模型,其中以 OCD 小鼠模型最为常见^[3-7]。研究发现, *Hoxb8*、*Slc1A1*、*SAPAP3* 和 *Slitrk5* 等属于 OCD 候选基因,敲除这

些基因会导致小鼠出现持续性梳理行为和焦虑样行为^[8]。除了转基因 OCD 模型外,药物诱发也是建立 OCD 模型的常用方法,如喹吡罗会诱导小鼠出现重复检查行为,注射 5-羟色胺受体 1B 激动剂会诱导小鼠出现持续性运动和前脉冲抑制缺陷,这些异常重复行为是 OCD 的典型表现^[9-10]。

本研究拟采用喹吡罗诱导 OCD 小鼠模型,然后通过行为学实验检测 OCD 小鼠与对照组小鼠的行为学差异,利用免疫荧光技术和 Western Blot 技术检测皮层、纹状体和下丘脑神经元活动标记物细胞原癌基因 Fos 蛋白 (cellular proto-oncogene Fos, c-Fos) 和小胶质细胞活化标记物离子钙结合适配器分子 1 蛋白 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1) 的表达情况,同时利用有参转录组测序技术挖掘 OCD 小鼠差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 和富集相关信号通路。以期探究 OCD 发病过程中参与调节的信号通路,为 OCD 的临床治疗提供新的启示。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

32 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,2 月龄,体质量 20 ~ 22 g,购买于成都集萃药康生物科技有限公司【SCXK(川)2020-0034】,所有实验在自贡市脑科学研究院实验动物中心完成【SYXK(川)2022-257】。实验动物饲养间温度 22 ~ 25 °C,相对湿度 50% ~ 60%,保持 12 h 暗/12 h 明的循环光照,光照强度为 15 ~ 20 lx,保证小鼠自由采食和饮水。本研究实验设计和所使用动物均获得了自贡市精神卫生中心伦理委员会的批准 (ZPRC-20240320),并确保在实验过程中尽量减轻动物痛苦。

1.1.2 主要试剂与仪器

喹吡罗盐酸盐 (Sigma-Aldrich, Q102); 放射性免疫沉淀检测 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 组织细胞裂解液 (酷来搏, SL1010); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (酷来搏, SK1070); 荧光抗体稀释液 (索莱宝, A1840), Quick Block™ 免疫荧光染色二抗稀释液 (碧云天, P0265); Triton X-100 (碧云天, ST795); 4% 多聚甲醛固定液 (biosharp,

BL539A); Iba1 抗体 (CST, P55008); c-Fos 抗体 (abcam, ab222699); TNF- α 抗体 (Affnity, AF7014); NF- κ B p65 抗体 (Affnity, AF5006); p-NF- κ B p65 抗体 (Affnity, AF2006); IL-6 抗体 (Affnity, DF6087); GAPDH (Affnity, AF7021); 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (abcam, ab228549); Goat Anti-Rabbit IgG H&L antibody (博奥森, bs-0295G); ECL 超敏发光液 (索莱宝, PE0010); 封闭液 (索莱宝, SW3015); 尼氏试剂盒 (索莱宝, G1432); 磷酸盐缓冲生理盐水 (phosphate buffered saline, PBS) 缓冲液 (Gibco, C10010500BT); 三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液与吐温 20 (tris buffered saline with tween 20, TBST) (索莱宝, T1081); 聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) (Merck millipore, IPVH00010); RNA 提取试剂盒 (诺唯赞, RC202-01); 反转录试剂盒 (诺唯赞, R323-01); SYBR Green Master Mix 试剂盒 (诺唯赞, Q121-03)。冰冻切片仪 (徕卡 CM1950, 德国); 实时荧光定量 PCR 仪 (赛默飞 QuantStudio™3, 美国); 行为学仪器 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 中国); 电泳仪 (Bio-Rad, 美国); 化学发光成像系统 (Vilber FUSION Fx6, 法国); 荧光倒置显微镜 (尼康 Ti2-u, 日本); 激光共聚焦显微镜 (尼康 C2, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 OCD 造模

参考 SUN 等^[10] 研究利用喹吡罗盐酸盐构建 OCD 小鼠模型。造模一共维持 38 d, OCD 组小鼠每隔 1 d 颈部皮下注射 0.75 mg/kg 喹吡罗溶液, 对照组小鼠每隔 1 d 注射等量无菌生理盐水。注射喹吡罗会抑制小鼠的运动能力, 故注射药物后让小鼠笼中休息 1 h, 然后进行强迫行为训练。将小鼠放于 25 cm × 16 cm × 19 cm 的训练场内自由活动 2 h, 训练场的一侧分别放置清水和等量的 10% 蔗糖溶液, 间隔 1 h 后调换两个水瓶的位置。

1.2.2 动物行为学检测

OCD 造模完成后, 参考刘培等^[11] 研究进行动物行为学实验。在行为实验开始前, 将小鼠提前 1 h 转移至动物行为室适应环境。每只小鼠测试结束后用 75% 乙醇轻轻擦拭仪器, 确保去除上一只小鼠的气味。除了大理石掩埋实验 (marble

burying test, MBT) 结果人工统计外,其他行为实验利用 Noldus Ethovision XT 15.0 软件进行统计分析。

(1) 旷场实验(open field test, OFT): 旷场为 40 cm × 40 cm × 40 cm 正方体开口箱,测试箱分为观察区、中心区、边缘区 3 个区域,从中心区中心点投放小鼠,记录小鼠 5 min 内的移动距离、理毛次数和进入中心区频率。

(2) 高架十字迷宫实验(elevated plus maze test, EPM): 高架十字迷宫是一个十字形平台,由两个开放臂(30 cm × 8 cm),两个闭臂(30 cm × 8 cm × 15 cm)以及一个中心平台(8 cm × 8 cm)共同组成。开始实验时,将小鼠放到中心平台,并保证小鼠面向开放臂。然后用摄像头记录小鼠 5 min 内进入开臂次数及在开臂停留的时间。

(3) MBT: 在 40 cm × 40 cm × 40 cm 的白色塑料箱箱底铺放 5 cm 厚的玉米芯垫料,然后在上面均匀铺上 20(4 × 5) 颗黑色大理石。将小鼠放入箱子中间,然后让小鼠自由活动 30 min,活动结束后对掩埋深度达到 2/3 的大理石数量进行统计。

1.2.3 样本采集

完成动物行为学实验后进行样本采集。用 20% 氨基甲酸乙酯溶液按照 7 mL/kg 对小鼠进行麻醉,然后处死小鼠。剪开小鼠胸腔暴露心脏,用无菌 PBS 缓冲液对小鼠进行充分灌注,迅速剥离小鼠脑组织,清洗后用 4% 多聚甲醛固定,充分固定后用于免疫荧光染色($n = 8$)。另取小鼠脑组织,PBS 缓冲液清洗后迅速投入液氮冷冻,待完全冷冻后保存于 -80 °C 冰箱,用于后续 Western Blot、RT-qPCR 和有参转录组测序($n = 8$)。

1.2.4 尼氏染色

对小鼠脑组织进行固定及梯度蔗糖脱水后,利用冰冻切片机制备 10 μm 厚脑切片并贴附于载玻片。尼氏染色依次过双蒸水(1 min)、70% 乙醇(1 min)、95% 乙醇(5 min)、无水乙醇(10 min)、二甲苯透明(20 min),再经甲基紫 56 °C 染色(10 min)、分化液(1 min)、梯度乙醇脱水及二甲苯透明处理,中性树胶封固后用光学显微镜观察神经元尼氏体及组织结构。

1.2.5 免疫荧光染色

将脑组织制备成 20 μm 切片后进行免疫荧

光染色。主要步骤如下:0.5% Triton X-100 室温透膜 20 min, PBS 漂洗 3 次;封闭液于室温封闭 30 min,吸弃液体,分别加入一抗:Iba1(1:200 稀释)与 c-Fos(1:400 稀释),湿盒 4 °C 孵育过夜;清洗后室温避光孵育二抗(1:1000 稀释)2 h,清洗后 DAPI(1:10 000 稀释)避光染核 15 min,清洗后用封片剂封固,最后利用激光共聚焦显微镜采集多通道荧光图像。

1.2.6 Western Blot

利用 RIPA 组织裂解液(含蛋白酶抑制剂)提取各组小鼠脑组织总蛋白,并通过 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。取等量蛋白样品,经 10% SDS-PAGE 分离胶电泳后转印至 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h;TBST 漂洗后分别与 Iba1、c-Fos、TNF-α、NF-κB p65、p-NF-κB p65、IL-6(均 1:1000 稀释)及 GAPDH 内参抗体(1:5000 稀释)于 4 °C 摇床孵育过夜;次日用 TBST 清洗 3 次(10 min/次),然后室温孵育 HRP 标记二抗(1:5000 稀释)2 h, TBST 清洗后用 ECL 化学发光底物显影成像,Image J2 软件定量分析目标蛋白与 GAPDH 的灰度比值。

1.2.7 有参转录组测序

利用 VAHTS Universal V5 RNA-seq 建库试剂盒构建转录组文库,Illumina Novaseq 6000 平台测序完成后由上海欧易生物技术有限公司进行生物信息学分析。主要包括:原始测序数据利用 fastp 质控过滤低质量 reads 获得 clean reads,利用 DESeq2 对基因表达量进行标准化处理,以 q 值 < 0.05 且差异倍数(fold change) > 2 或 < 0.5 为阈值筛选 DEGs,采用超几何算法对 DEGs 进行 GO 功能注释及 KEGG 通路富集分析。

1.2.8 RT-qPCR

加入 RNA 裂解液后对脑组织进行冰浴匀浆,并按照 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,经分光光度法检测显示 RNA 纯度达标(OD_{260}/OD_{280} 值介于 1.8 ~ 2.0, $OD_{260}/OD_{230} \geq 2.0$)。然后使用反转录试剂盒将各组 RNA 样本逆转录为 cDNA,分装保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。

基于小鼠 GenBank 基因数据库,以 GAPDH 为内参基因,通过 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物(表 1),引物序列由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。采用 SYBR Green 法进行

RT-qPCR 检测, 15 μL 反应体系含上下游引物各 0.5 μL 、SYBR Green Master Mix 7.5 μL 、cDNA 模板 1 μL 及 ddH₂O 5.5 μL , 扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 59.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 进行 39 个循环。所有样本设置 3 个技术重复, 通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
Traf1	F: GGAGAAGCTGCGTGTGTTTG
	R: TGCTCCAAGCTCAGGATGTG
F2r1l	F: GCACAACAAGTGGGTCTACGG
	R: CCCATGGGGTTCACGATCAC
GAPDH	F: CTCATGACCACAGTCCATGC
	R: CACATTGGGGGTAGGAACAC

1.3 统计学分析

本研究图片分析软件为 Image J2, 数据显著性分析软件为 SPSS 21.0, 作图软件为 GraphPad Prism 8.0。利用独立样本 t 检验分析两组间是否存在显著性差异, 实验结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 OCD 小鼠的行为学变化

OFT 结果显示, 喙吡罗诱导的 OCD 组小鼠在旷场中的运动轨迹主要集中在旷场中心区周围, 而对照组小鼠的活动轨迹均匀分布于整个旷场箱(图 1A); OCD 组小鼠在旷场中的总运动距离显著低于对照组小鼠($P < 0.05$, 图 1B); OCD 组小鼠在旷场中的梳理次数极显著高于对照组小鼠($P < 0.001$, 图 1C); OCD 组小鼠进入旷场中心区频率极显著低于对照组小鼠($P < 0.01$, 图 1D)。EPM 结果显示, 对照组小鼠的活动轨迹主要集中在闭臂中, 而 OCD 组小鼠会更频繁的活动在开臂(图 1E); OCD 组小鼠在高架十字迷宫中的总运动距离显著低于对照组小鼠($P < 0.05$, 图 1F); 进入开臂的频率(图 1G)和进入开臂的时间(图 1H)更多, 但没有统计学意义。MBT 结果显示, OCD 组小鼠具有更强的掩埋欲望, 将玉米芯垫料挖掘翻动得更明显(图 1I); 同时 OCD 组小鼠大理石掩埋数量极显著高于对照组小鼠($P < 0.001$, 图 1J)。

2.2 OCD 小鼠不同脑区的尼氏染色变化

通过尼氏染色对两组小鼠皮层、海马区、纹状体和下丘脑的神经元形态变化进行检测。结果显示, 对照组小鼠各脑区的尼氏小体呈现紫蓝色颗粒或斑块, 广泛分布在核周的细胞质中以及树突内, 含量丰富; 而 OCD 组小鼠在海马区和下丘脑出现更多不规则状细胞, 且细胞排列松散、细胞核皱缩、着色更深和细胞结构不完整等损伤神经元表型(图 2)。

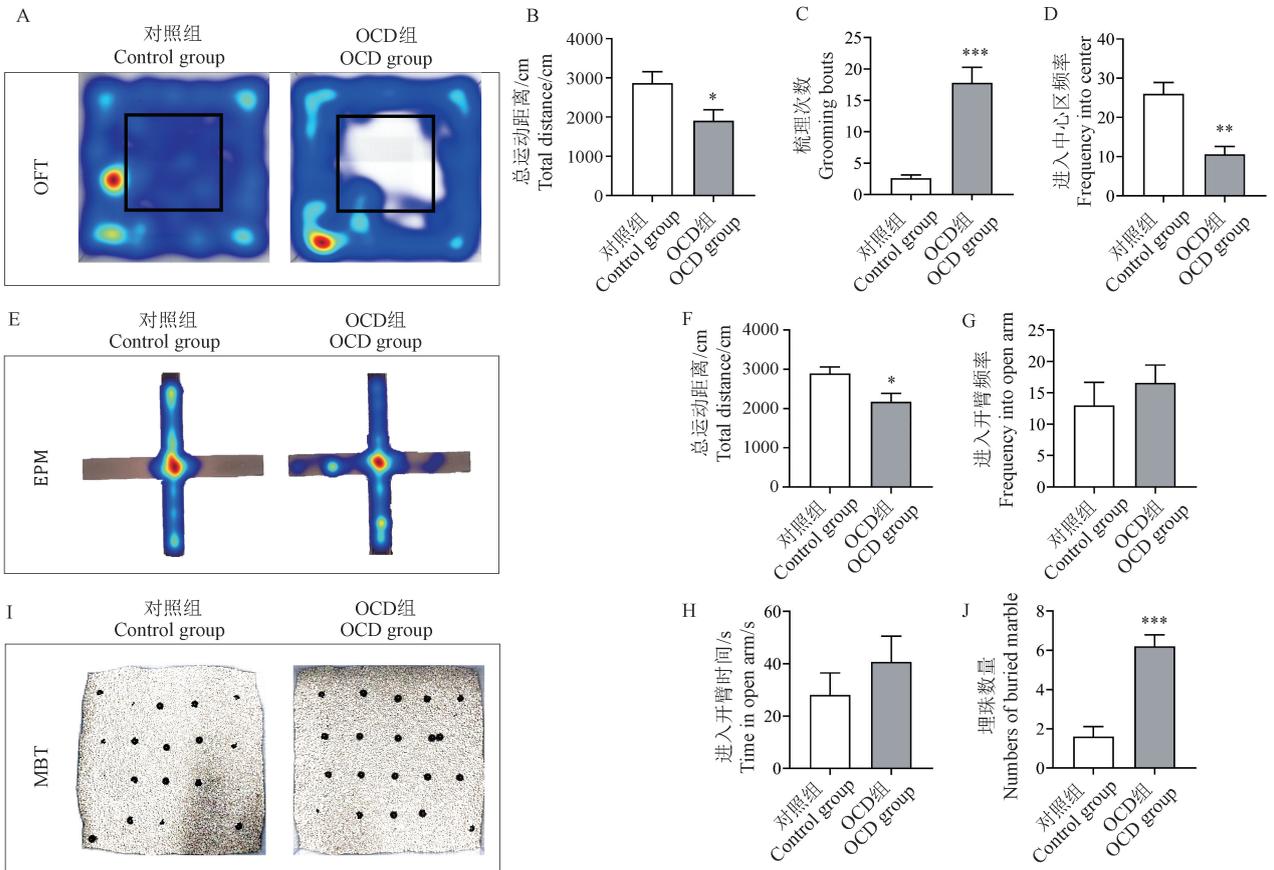
2.3 OCD 小鼠不同脑区的 c-Fos 和 Iba1 蛋白的表达变化

c-Fos 是神经元活性标志物, 在受到刺激后迅速表达, 其常被用作神经系统对各种刺激响应的关键指标; 同时, Iba1 是一种在小胶质细胞中特异性表达的钙结合蛋白, 小胶质细胞是中枢神经系统的主要免疫细胞, Iba1 蛋白的持续激活可能加重神经元损伤。因此利用免疫荧光技术检测 c-Fos 和 Iba1 蛋白在皮层、海马区、纹状体和丘脑的情况, 结果显示, c-Fos 广泛表达于 OCD 组小鼠的皮层、海马区、纹状体和丘脑中(图 3)。Iba1 免疫荧光染色结果显示, 与对照组小鼠相比, OCD 组小鼠的皮层、海马区、纹状体和丘脑中 Iba1 的表达强度明显增加(图 3)。

进一步利用 Western Blot 技术检测 c-Fos 蛋白和 Iba1 蛋白在 OCD 组小鼠和对照组小鼠大脑中的表达情况, 结果显示 OCD 组小鼠大脑的 c-Fos 蛋白的表达量显著增加($P < 0.05$, 图 4), Iba1 蛋白的表达量极显著增加($P < 0.01$, 图 4)。

2.4 OCD 小鼠大脑转录组水平差异

利用转录组测序技术检测两组小鼠的 DEGs 和分析差异基因富集的相关通路。此次转录组测序一共筛选出 113 个 DEGs, 其中显著上调基因 41 个, 显著下调基因 72 个(图 5A)。将 DEGs 与 GO 数据库进行比对, DEGs 注释结果被分为生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)及分子功能(molecular function, MF)三大功能类别, 其中 BP 主要显著富集在血压的负向调节、分子伴侣辅助因子依赖性蛋白重折叠、典型 NF- κB 信号传导的调节等过程, CC 主要显著富集于肌钙蛋白复合体、细胞内环核苷酸激活的阳离子通道复合体和线粒体通透性转换孔复合体等组分, MF 主要显著富集于丝氨酸蛋



注:A:OFT热图;B:OFT中总运动距离;C:OFT中梳理次数;D:OFT中进入中心区频率;E:EPM热图;F:EPM中总运动距离;G:EPM中进入开臂频率;H:EPM中进入开臂时间;I:MBT代表图;J:埋珠数量;与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。(下图同)

图1 OCD小鼠的动物行为变化

Note. A. OFT heatmap. B. Total distance in the OFT. C. Grooming bouts in the OFT. D. Frequency into center in the OFT. E. EPM heatmap. F. Total distance in the EPM. G. Frequency into open arm in the EPM. H. Time in open arm in the EPM. I. Representative image of the MBT. J. Numbers of buried marble. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 1 Behavioral changes in OCD mouse

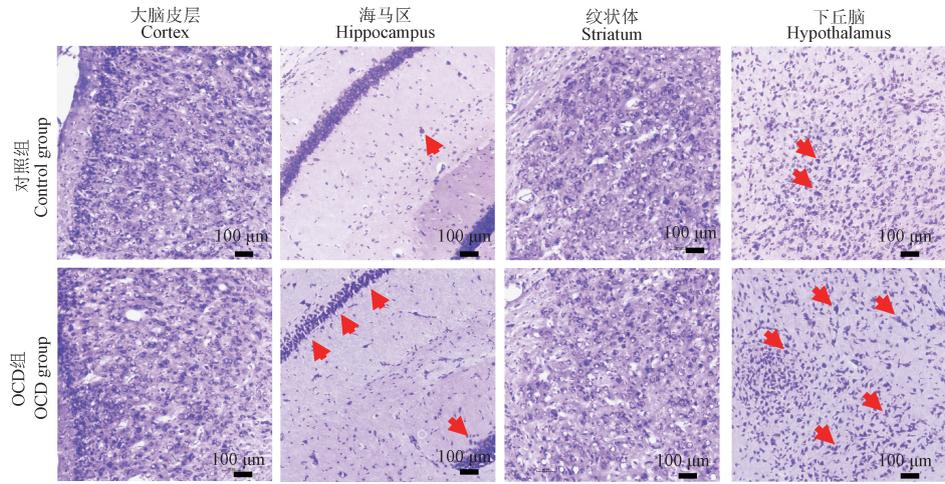
白酶活性、肿瘤坏死因子受体结合和3',5'-环磷酸核苷酸磷酸二酯酶活性等功能(图5B)。利用富集分析和弦图展示GO分类与基因的对应关系,结果发现典型NF- κ B信号传导的调节通路主要与*Traf1*和*F2rl1*两个基因密切相关(图5C)。利用KEGG富集分析探究DEGs参与的信号转导通路,按P值大小用散点图展示5条通路,其中主要包括钙信号传导途径、NF- κ B信号传导途径、鞘脂信号通路、阿片肽信号通路和神经活性配体-受体相互作用等信号通路(图5D),这些信号通路与细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化、细胞迁移、炎症反应、能量代谢调节以及氧化应激等密切相关。

利用RT-qPCR技术检测*Traf1*基因和*F2rl1*

基因在OCD组小鼠和对照组小鼠大脑中的表达情况。结果显示OCD组小鼠大脑中*Traf1*基因和*F2rl1*基因的相对表达量都极显著高于对照组小鼠($P < 0.01$,图6),进一步验证了转录组测序结果的准确性和真实性。

2.5 OCD小鼠大脑炎症因子释放增加

利用Western Blot对TNF- α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65和IL-6等促炎症相关蛋白进行检测。结果显示,与对照组小鼠相比,OCD组小鼠大脑中TNF- α 蛋白的表达极显著增加($P < 0.01$,图7),p-NF- κ B p65蛋白显著增加($P < 0.05$,图7),IL-6蛋白表达极显著增加($P < 0.01$,图7)。

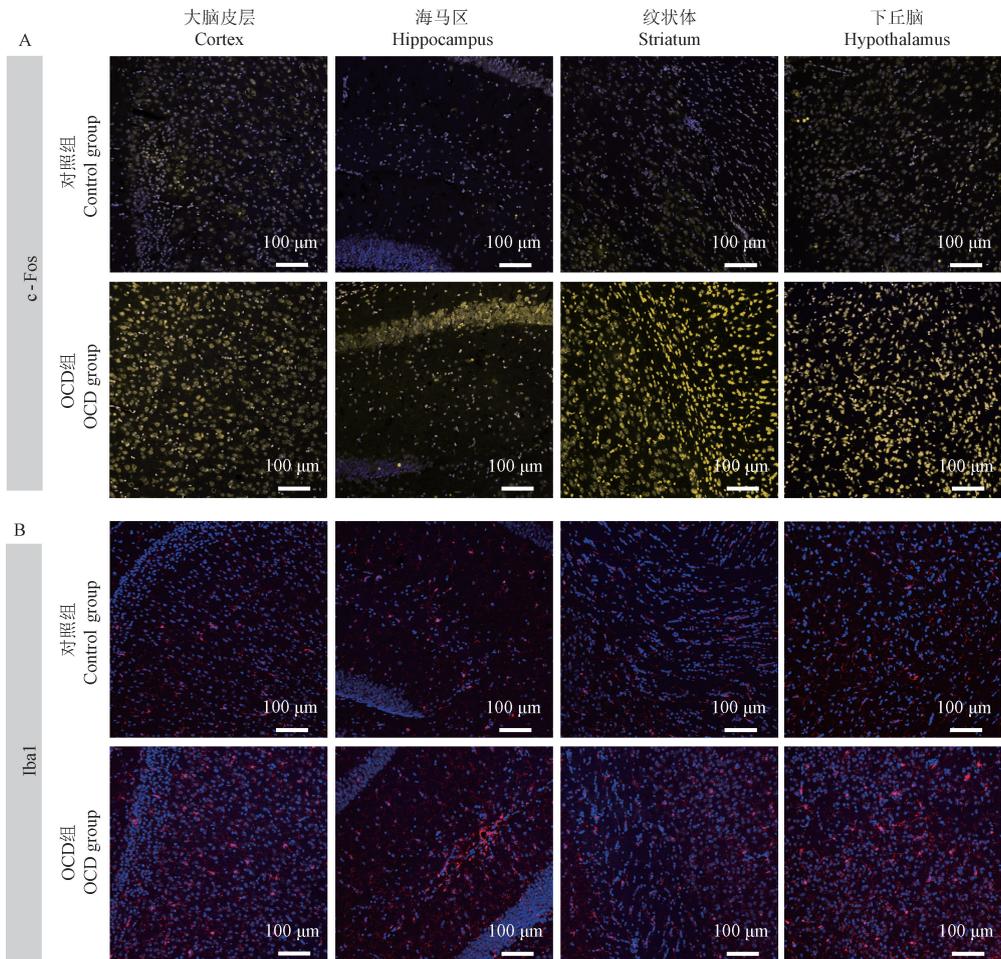


注:红色箭头:损伤神经元。

图 2 OCD 小鼠脑区尼氏染色成像

Note. Red arrows. Damaged neurons.

Figure 2 Nissl staining imaging of brain regions in OCD mouse



注:A;c-Fos 蛋白免疫荧光染色;B:Iba1 蛋白免疫荧光染色。

图 3 免疫荧光检测 OCD 小鼠 c-Fos 和 Iba1 蛋白的表达分布

Note. A. c-Fos protein immunofluorescence staining. B. Iba1 protein immunofluorescence staining.

Figure 3 Immunofluorescence detection of c-Fos and Iba1 protein expression and distribution in OCD mouse brain

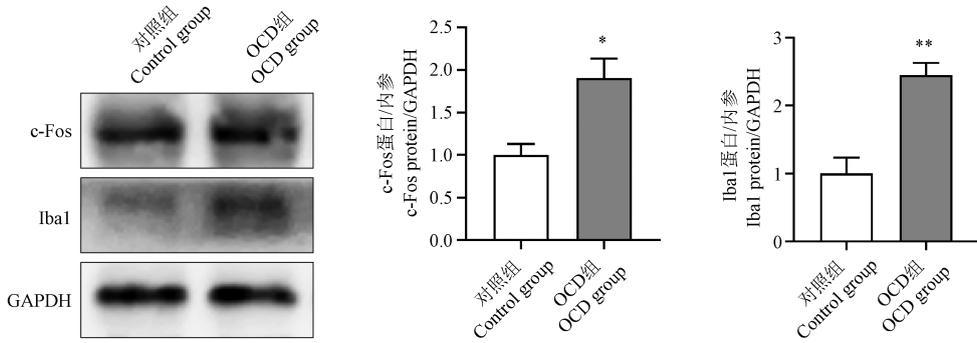
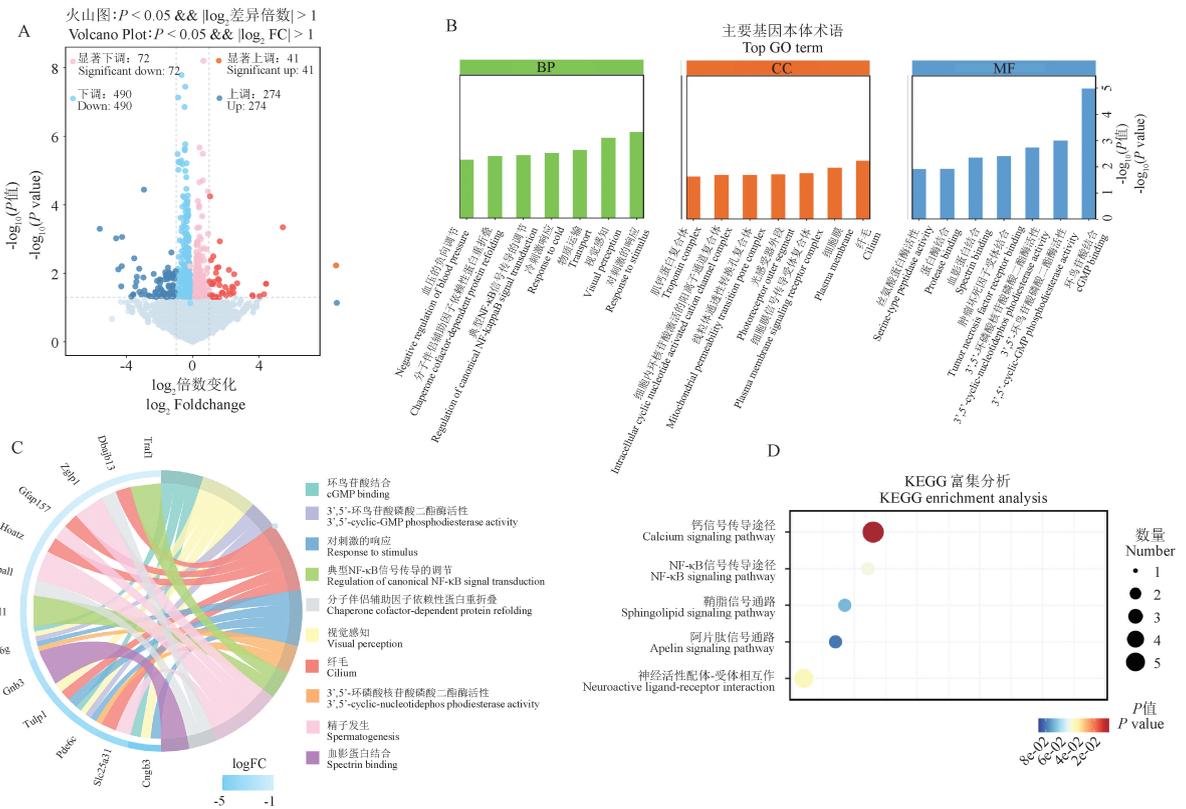


图 4 Western Blot 检测 OCD 小鼠 c-Fos 和 Iba1 蛋白的表达

Figure 4 Western Blot analysis of c-Fos and Iba1 protein expression in OCD mouse brain



注:A:差异表达基因火山图;B:GO 富集分析;C:GO 富集弦图;D:KEGG 富集分析。

图 5 OCD 小鼠大脑转录组测序分析

Note. A. Differential gene expression volcano plot. B. GO enrichment analysis. C. GO enrichment chord plot. D. KEGG enrichment analysis.

Figure 5 Transcriptome sequencing analysis of OCD mouse brain

3 讨论

OCD 是一种慢性且病因复杂的精神类疾病,具有高发病率和致残率高的特性,研究显示,过度重复的、侵入性的和不适当的行为是 OCD 临床症状的重要表现,免疫功能障碍是 OCD 发生的重要诱因^[12-13]。研究显示,OCD 小鼠通常会与

OCD 人类相似的强迫性行为,如表现出更长时间和更高频率的自发理毛行为,对特定物体或环境的过度检查,以及突出的抑郁焦虑样行为等^[14-15]。本研究中,OCD 小鼠在 OFT 中和 EPM 中的总运动距离都显著低于对照组小鼠,说明喙吡罗诱导的 OCD 小鼠的运动能力有下降的趋势。OCD 小鼠进入旷场中心的频率显著低于对照组

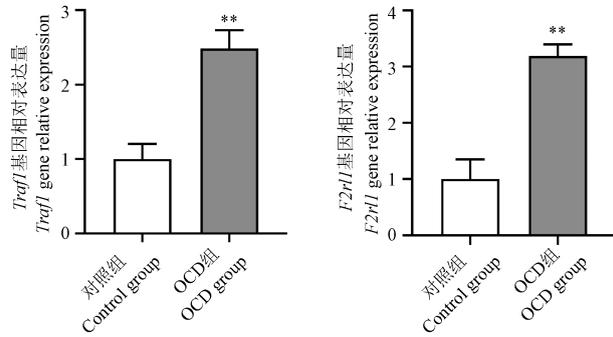


图 6 相关基因的相对表达情况

Figure 6 Relative expression levels of the related genes

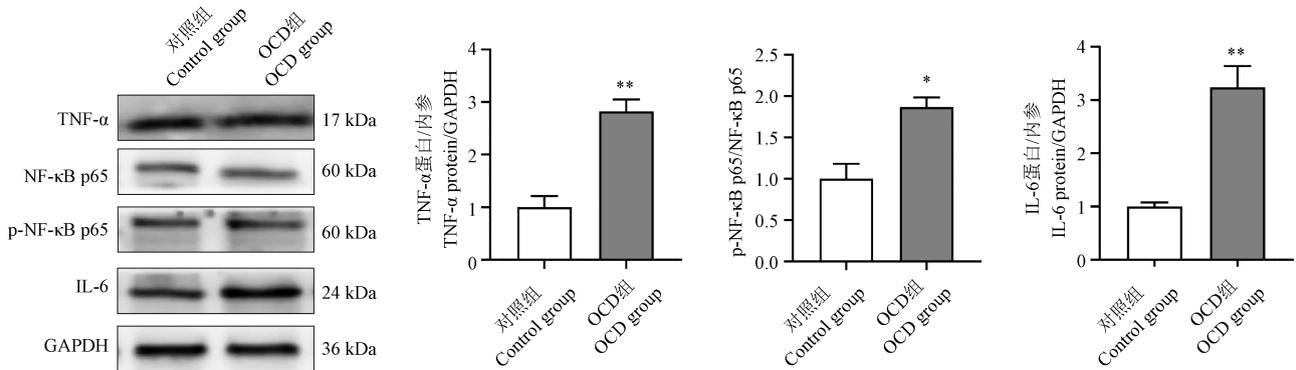


图 7 炎症相关蛋白表达情况

Figure 7 Expression of inflammation-associated proteins

小鼠行为学结果证实喹吡罗会诱导小鼠出现 OCD 行为,这与人类 OCD 患者的强迫检查行为相似,同时喹吡罗诱导 OCD 模型操作简便,所建立的 OCD 模型能够有效用于 OCD 疾病发生的神经机制探究。

c-Fos 基因作为一种即刻早期基因,能够对神经系统受到的刺激快速做出反应,*c-Fos* 表达的增加常用作神经活动的标记,OCD 小鼠神经元被大量激活,*c-Fos* 是研究 OCD 病理机制的重要蛋白之一^[18]。RU24969 处理的小鼠出现明显的强迫症样行为特征,同时,眶额皮质、下边缘皮质、前肢皮质、前扣带皮质、伏隔核、下丘脑和终纹床核等脑区的 *c-Fos* 表达都显著增加^[18]。本研究的免疫荧光结果显示,*c-Fos* 在 OCD 小鼠皮层、海马区、纹状体和下丘脑的表达都明显增强,Western Blot 结果也证实 OCD 小鼠大脑中 *c-Fos* 蛋白表达增加。提示不同 OCD 小鼠模型表现出不同的行为学特征可能是由于不同脑区神经元的异常激活所介导的。小胶质细胞是中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 常驻免疫细胞,其在

小鼠,这与 SUN 等^[10]发现的喹吡罗会减少小鼠进入旷场中心区频率的结果相似。5-HT 受体激动剂 (RU24969) 也是 OCD 的常用造模药物,在 OFT 中,RU24969 小鼠进入中心区频率和在中心区停留时间都显著低于对照组小鼠,说明 OCD 小鼠常发生焦虑样行为^[16]。本研究还发现 OCD 小鼠在 OFT 中的理毛次数显著高于对照组小鼠,MBT 中 OCD 小鼠埋藏大理石数量显著高于对照组小鼠。过度理毛和埋珠数量增加都是衡量啮齿动物出现强迫效应的重要指标^[17]。本研究的

维持大脑先天性免疫、中枢神经系统动态平衡以及预防神经炎症性病理中发挥着关键作用,Iba1 是 M1 型小胶质细胞的标志性蛋白^[19]。文献报道,OCD 小鼠前边缘皮质小胶质细胞的形态和功能发生改变,而逆转小胶质细胞功能障碍可以有效减少 OCD 小鼠的刻板行为^[16]。光遗传学刺激背内侧纹状体或内侧前额叶皮层内的小胶质细胞会诱导 *Hoxb8* 小鼠梳理行为增加,而刺激基底外侧杏仁核或中央杏仁核中的小胶质细胞会导致焦虑加剧^[20]。本研究的免疫荧光结果显示,Iba1 蛋白在 OCD 小鼠不同脑区的表达都显著增加,说明不同脑区小胶质细胞激活影响着不同的 OCD 行为学特征。

小胶质细胞异常激活与神经炎症密切相关,M1 型小胶质细胞会促进神经元产生大量炎症因子和活性氧^[21-22]。研究证实炎症信号级联发生于 OCD 疾病过程,临床证据显示,与健康对照相比,OCD 患者血液中 TNF- α 和 IL-6 的含量显著增加,动物研究也发现 OCD 小鼠额颞叶 TNF- α 水平显著升高^[23-24]。本研究转录组测序对 DEGs 进

行分析,GO 富集分析和 KEGG 分析都发现 OCD 小鼠大脑 NF- κ B 信号传导过程发生改变,GO 富集弦图则提示 NF- κ B 信号通路与 *Traf1* 基因紧密关联,这些结果证实啞吡罗诱导的 OCD 小鼠大脑出现炎症反应和氧化应激。*Traf1* 是 TNF- α 受体相关基因,脑缺血再灌注损伤小鼠神经元中 *Traf1* 的表达显著上调,相反,*Traf1* 缺失能够保护神经元^[25]。*Traf1* 参与 Tnf 受体家族成员下游的信号传导,并激活 NF- κ B 信号通路,从而促进神经炎症反应的发生^[26]。本研究的 RT-qPCR 结果显示 OCD 小鼠脑组织 *Traf1* 基因表达上调,说明 *Traf1* 介导的 TNF- α /NF- κ B 信号通路将被激活。Western Blot 结果也显示 OCD 小鼠脑组织的 TNF- α 、p-NF- κ B p65 和 IL-6 等炎症相关蛋白的表达显著上调,证实 OCD 小鼠神经元发生大量炎症反应,表明免疫系统参与了 OCD 的病理生理学过程,提示控制神经元的炎症反应是治疗 OCD 的潜在方案。

综上所述,啞吡罗会诱导小鼠出现强迫症样行为,并导致不同脑区的神经元活动增加,同时,不同脑区小胶质细胞的异常激活可能是导致 OCD 行为多样性的重要原因。转录组测序结果表明 OCD 小鼠脑组织发生神经炎症反应,TNF- α 、NF- κ B 和 IL-6 等促炎症因子大量表达,因此预防神经炎症可能是治疗 OCD 的关键因素与重要环节。

参 考 文 献(References)

[1] PICKENHAN L, MILTON A L. Opening new vistas on obsessive-compulsive disorder with the observing response task [J]. Cogn Affect Behav Neurosci, 2024, 24(2): 249-265.

[2] JALAL B, CHAMBERLAIN S R, SAHAKIAN B J. Obsessive-compulsive disorder: etiology, neuropathology, and cognitive dysfunction [J]. Brain Behav, 2023, 13(6): e3000.

[3] ZIKE I, XU T, HONG N, et al. Rodent models of obsessive compulsive disorder: evaluating validity to interpret emerging neurobiology [J]. Neuroscience, 2017, 345: 256-273.

[4] SOTO J S, JAMI-ALAHMADI Y, CHACON J, et al. Astrocyte-neuron subproteomes and obsessive-compulsive disorder mechanisms [J]. Nature, 2023, 616(7958): 764-773.

[5] CASADO-SAINZ A, GUDMUNDSEN F, BAERENTZEN S L, et al. Dorsal striatal dopamine induces fronto-cortical hypoactivity and attenuates anxiety and compulsive behaviors in rats [J]. Neuropsychopharmacology, 2022, 47(2): 454-464.

[6] PERTICH Á, EÖRDEGH G, NÉMETH L, et al. Maintained visual-, auditory-, and multisensory-guided associative learning functions in children with obsessive-compulsive disorder [J]. Front Psychiatry, 2020, 11: 571053.

[7] ZHAI R, TONG G, LI Z, et al. Rhesus monkeys exhibiting spontaneous ritualistic behaviors resembling obsessive-compulsive disorder [J]. Natl Sci Rev, 2023, 10(11): nwad312.

[8] AHMARI S E. Using mice to model obsessive compulsive disorder: from genes to circuits [J]. Neuroscience, 2016, 321: 121-137.

[9] SHANAHAN N A, HOLICK PIERZ K A, MASTEN V L, et al. Chronic reductions in serotonin transporter function prevent 5-HT1B-induced behavioral effects in mice [J]. Biol Psychiatry, 2009, 65(5): 401-408.

[10] SUN T, SONG Z, TIAN Y, et al. Basolateral amygdala input to the medial prefrontal cortex controls obsessive-compulsive disorder-like checking behavior [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(9): 3799-3804.

[11] 刘培, 蒋鹏飞, 彭俊, 等. 干眼肝经郁热证小鼠模型的建立与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(3): 302-309.

LIU P, JIANG P F, PENG J, et al. Establishment and evaluation of mouse model of dry eye with liver meridian stagnation heat syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(3): 302-309.

[12] KARAGÜZEL E Ö, ARSLAN F C, UYSAL E K, et al. Blood levels of interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha and cognitive functions in patients with obsessive compulsive disorder [J]. Compr Psychiatry, 2019, 89: 61-66.

[13] HATAKAMA H, ASAOKA N, NAGAYASU K, et al. Amelioration of obsessive-compulsive disorder by intracellular acidification of cortical neurons with a proton pump inhibitor [J]. Transl Psychiatry, 2024, 14(1): 27.

[14] SZECHTMAN H, AHMARI S E, BENINGER R J, et al. Obsessive-compulsive disorder: insights from animal models [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2017, 76: 254-279.

[15] WILSON C, GATTUSO J J, HANNAN A J, et al.

- Mechanisms of pathogenesis and environmental moderators in preclinical models of compulsive-like behaviours [J]. *Neurobiol Dis*, 2023, 185: 106223.
- [16] LUO Y, CHEN X, WEI C, et al. BDNF alleviates microglial inhibition and stereotypic behaviors in a mouse model of obsessive-compulsive disorder [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 926572.
- [17] SINGH S, BOTVINNIK A, SHAHAR O, et al. Effect of psilocybin on marble burying in ICR mice: role of 5-HT1A receptors and implications for the treatment of obsessive-compulsive disorder [J]. *Transl Psychiatry*, 2023, 13(1): 164.
- [18] CHEN X, YUE J, LUO Y, et al. Distinct behavioral traits and associated brain regions in mouse models for obsessive-compulsive disorder [J]. *Behav Brain Funct*, 2021, 17(1): 4.
- [19] QIAN Y, YANG L, CHEN J, et al. SRGN amplifies microglia-mediated neuroinflammation and exacerbates ischemic brain injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2024, 21(1): 35.
- [20] NAGARAJAN N, CAPECCHI M R. Optogenetic stimulation of mouse Hoxb8 microglia in specific regions of the brain induces anxiety, grooming, or both [J]. *Mol Psychiatry*, 2024, 29(6): 1726–1740.
- [21] XIONG Y, CHEN J, LI Y. Microglia and astrocytes underlie neuroinflammation and synaptic susceptibility in autism spectrum disorder [J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1125428.
- [22] PERUZZOTTI-JAMETTI L, WILLIS C M, KRZAK G, et al. Mitochondrial complex I activity in microglia sustains neuroinflammation [J]. *Nature*, 2024, 628(8006): 195–203.
- [23] KONUK N, TEKIN I O, OZTURK U, et al. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in obsessive compulsive disorder [J]. *Mediators Inflamm*, 2007, 2007: 65704.
- [24] KRABBE G, SAKURA MINAMI S, ETCHEGARAY J I, et al. Microglial NFκB-TNFα hyperactivation induces obsessive-compulsive behavior in mouse models of progranulin-deficient frontotemporal dementia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(19): 5029–5034.
- [25] LU Y Y, LI Z Z, JIANG D S, et al. TRAF1 is a critical regulator of cerebral ischaemia-reperfusion injury and neuronal death [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2852.
- [26] GUO Q, JIN Y, CHEN X, et al. NF-κB in biology and targeted therapy: new insights and translational implications [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 53.

[收稿日期] 2024-10-11