



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117838684 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 09

(21) 申请号 202311851476.1

(22) 申请日 2023.12.28

(71) 申请人 澳门大学

地址 中国澳门凼仔大学大马路

(72) 发明人 李越

(74) 专利代理机构 北京元本知识产权代理事务

所(普通合伙) 11308

专利代理师 喻蓉

(51) Int. Cl.

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A23L 33/105 (2016.01)

权利要求书1页 说明书18页 附图9页

(54) 发明名称

葛根素在制备治疗脆性X染色体综合症的药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种葛根素在制备治疗遗传性智力与认知功能障碍性疾病的药物中的应用。试验证明,葛根素的抗遗传性智力与认知功能障碍的性能和功效显著,毒副作用小、是一种安全、高效、疗效稳定的治疗脆性X染色体综合症的药物,适于工业化生产,易于推广。本发明为治疗脆性X染色体综合征及由于体内X染色体在遗传过程中因发生变化、突变所导致的相关疾病提供了一种新的药物来源,提供了葛根素的新的药用用途。

1. 一种葛根素在制备治疗遗传性智力与认知功能障碍性疾病的药物或保健品或食品中的应用。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征是,所述遗传性智力与认知功能障碍性疾病为孤独症、脆性X染色体综合征或与相关神经发育障碍性疾病认知功能障碍,优选为脆性X染色体综合征。

3. 如权利要求1或2所述的应用,其特征是,所述药物由葛根素和药学上可接受的载体组成。

4. 如权利要求1或2所述的应用,其特征是,所述药物是通过胃肠道给药或/和非胃肠道给药途径给药。

5. 如权利要求1或2所述的应用,其特征是,所述药物以口服制剂、注射剂或局部给药制剂形式存在。

6. 如权利要求5所述的应用,其特征是,所述口服制剂包括片剂、胶囊剂、丸剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂或溶液剂;所述注射剂包括注射液剂型或注射用冻干粉针剂型;局部给药制剂包括霜剂、软膏剂、喷雾剂、气雾剂或贴剂。

7. 如权利要求1或2所述的应用,其特征是,所述葛根素的纯度超过60%。

葛根素在制备治疗脆性X染色体综合症的药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种治疗遗传性智力与认知功能障碍性疾病的药物的应用,特别涉及一种治疗脆性X染色体综合症的药物的应用,属于药物应用技术领域。

背景技术

[0002] 脆性X染色体综合征(又称Martin-Bell综合征)是由于在人体内X染色体形成过程中脆性X智力低下基因(Fmr1)的突变所导致。在X染色体的一段DNA中,由于遗传的关系有时会发生改变,一种为完全改变,另一种为DNA过度甲基化。如果这两种改变的程度较小,那么患者在临床表现方面可以没有特殊的症状或者只有轻微的症状。反之,如果这两种改变的程度较大,就可能出现如下所述的脆性X综合征的种种症状,例如认知障碍、语言障碍等。

[0003] 脆性X染色体综合征(Fragile X syndrome,FXS)不仅是一种常见的遗传性智力与认知功能障碍性疾病,而且是引起自闭症谱系障碍最常见的单基因缺陷性疾病,主要表现为智力障碍、社交互动障碍与认知障碍等,极大地影响了患者的行为能力与生活质量,迫切需要有效的临床治疗方案。

[0004] FXS疾病的发生主要是由于X染色体上脆性X智力低下基因(Fmr1)突变,导致脆性X智力低下蛋白(FMRP)的功能缺失所引起。人们对脆性X染色体综合征的病因的研究有可能成为解析自闭症成因的有效途径之一,但是该疾病背后的确切病因机制仍然未被阐明。

[0005] 目前临床上对FXS的有效治疗方法欠缺,而且大多数的FXS治疗方法都是基于其某个特定的症状进行,这往往导致缺少足够的对照实验来证明这些方法的有效性。现有的能最大限度地发挥治疗效果的方法是通过精神药理学干预与其他支持性策略相结合的方案,具体包括言语治疗、感觉统合职业治疗、个性化教育计划和量身定制的行为干预。

[0006] 治疗FXS最常用的药物是兴奋剂,但这些药物的功效及其副作用也是因人而异。虽然兴奋剂针对患有FXS的年幼男性的多动症、冲动和注意力不集中的症状有效,但对患有FXS的成年男性疗效却较低。

[0007] 尽管现在已然开展系列针对促代谢型谷氨酸受体(metabotropic glutamate receptor 5,mGluR5)、糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3 β ,GSK-3 β)和 γ -氨基丁酸(γ -Aminobutyric Acid,GABA)受体的药物研究,但是这种单一药物的治疗效果只在动物实验有明显结果,而在临床实验中效果并不明显。单一药物治疗的研究结果说明动物实验与临床试验之间存在差距,提示现有的单一药物的治疗策略未达到临床治疗的需求。另外还使用选择性血清素再摄取抑制剂(Selective serotonin reuptake inhibitors,SSRIs)作为治疗与FXS相关的情绪障碍、焦虑和强迫行为的药物,该类药物在缓解社交焦虑、发脾气和攻击性方面等行为中具有疗效;此外,还使用抗精神病药物治疗FXS,但是抗精神病药物相关的副作用如体重增加、糖尿病、恶心、便秘和迟发性运动障碍等导致效果差。非典型抗精神病药也被用于治疗自伤、攻击性行为和自闭症,虽然非典型抗精神病药物阿立哌唑(aripiprazole)在情绪稳定、注意力和学习成绩方面有所改善,但其应在低剂量下使用,以避免高剂量引起的躁动,而且其产生的副作用也不容小觑。

[0008] FXS是近年来引起高度重视的一种单基因遗传疾病,发病率仅次于唐氏综合征的遗传性智力低下疾病。FXS导致的智力障碍给患者及其家人带来了生理及心理的巨大痛苦,漫长的病程给家庭和社会带来了沉重的负担。迄今为止,依然缺乏有效的治疗药物可以治愈或者缓解该疾病患者的主要不良症状。因此,探索脆性X染色体综合征的病因机制并开发新的治疗药物迫在眉睫。

[0009] 研究FMRP缺失后导致异常表达的基因和蛋白,并考察相关靶点异常表达对神经元在结构,形态和功能的具体影响,可以为综合治疗FXS寻找新的药物干预靶点提供积极的临床应用价值和深刻的社会意义。

[0010] 发明人探索了从豆科植物野葛或甘葛藤的块根中提取得到的异黄酮葛根素治疗FXS,研究其对体内神经干细胞增殖、分化的影响;体外新生神经元树突复杂度的影响以及认知功能调控等,研究结果表明对FXB治疗效果显著。

[0011] 葛根素现代临床多用治疗于冠心病、心绞痛等疾病,目前也有证据表明,葛根素减轻脑缺血、糖尿病的症状、促进神经发生、抑制氧化应激、减轻炎症反应等。葛根素可以通过减少氧化、炎症对AD模型小鼠的学习记忆障碍起保护作用;葛根素还可以促进帕金森病动物模型多巴胺产生细胞的增殖和分化,增加PD小鼠的自发活动和行走距离;葛根素还可以通过激活PI3K/Akt1/GSK-3 β 信号通路保护海马免受缺血再灌注损伤损伤。但是目前葛根素在治疗FXS上的应用尚未见报道。

发明内容

[0012] 本发明的首要目的是针对上述现有治疗FXB的药物存在的技术的问题,提供葛根素(PR)治疗遗传性智力与认知功能障碍性疾病的性能和功效,尤其是针对脆性X染色体综合征治疗的新应用,提供葛根素新的药用用途。

[0013] 为实现上述目的,本发明一方面提供葛根素在制备治疗遗传性智力与认知功能障碍性疾病的药物中的应用。

[0014] 其中,所述遗传性智力与认知功能障碍性疾病为孤独症、脆性X染色体综合征或与相关神经发育障碍性疾病认知功能障碍,优选为脆性X染色体综合征。

[0015] 特别是,所述药物由葛根素和药学上可接受的载体组成。

[0016] 所述葛根素纯度 $\geq 60\%$,优选为超过90%,进一步优选为超过95%。

[0017] 所述药学上可接受的载体通常被认可用于这一目的且作为药剂的非活性成分。有关药学上可接受的载体的汇编可以在《药物赋形剂手册》(Handbook of Pharmaceutical excipients,第2版,由A.Wade和P.J.Weller编辑;American Pharmaceutical Association出版,Washington and The Pharmaceutical Press,London,1994)等工具书中找到。

[0018] 本发明中所述的葛根素在用于治疗脆性X染色体综合征时,可以单独使用,也可以通过含有葛根素的药物组合物的形式使用。

[0019] 本发明所述药物通过胃肠道给药或/和非胃肠道给药途径给药。

[0020] 所述的非胃肠道给药途径选自注射给药、呼吸道给药、皮肤给药、粘膜给药或腔道给药。

[0021] 非胃肠道给药制剂选自注射剂、喷雾剂、气雾剂、贴剂等;胃肠道给药制剂选自片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、丸剂、溶液剂、乳剂或糖浆剂等。

[0022] 本发明提供以葛根素为活性成分,用于治疗脆性X染色体综合征的药物和相应的药物剂型。

[0023] 其中,所述药物以口服制剂、注射剂或局部给药制剂形式存在。

[0024] 特别是,所述口服制剂包括片剂、胶囊剂、丸剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂或溶液剂;所述注射剂包括注射液剂型或注射用冻干粉针剂型;局部给药制剂包括霜剂、软膏剂、喷雾剂、气雾剂或贴剂。

[0025] 其中,所述药物制剂是以所述葛根素为有效活性成分,并包括了药剂学上可接受的其它载体组分。

[0026] 药物中的载体包括赋形剂,如淀粉、水等;润滑剂,如硬脂酸镁等;崩解剂,如微晶纤维素等;填充剂,如乳糖等;粘结剂,如预胶化淀粉、糊精等;甜味剂;抗氧化剂;防腐剂;矫味剂;香料等。

[0027] 在制备口服制剂时可选用的载体可以是淀粉、糊精或环糊精及各种化学修饰环糊精、蔗糖、硬脂酸盐等常规制药辅料。在制备冻干粉针剂时可以通过无菌喷雾干燥、低温真空干燥、冷冻干燥等方法制备。各制剂的后期制备工艺及设备均属于制药领域的常规技术,本发明对此不作限定。

[0028] 本发明中所述药物以片剂、胶囊剂、丸剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、溶液剂、注射剂、喷雾剂、气雾剂、贴剂、凝胶剂、巴布剂形式存在,即药物制剂包括片剂、胶囊剂、丸剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、溶液剂、注射剂、喷雾剂、气雾剂、贴剂、凝胶剂、巴布剂等形式,但不局限于以上形式。

[0029] 本发明与现有技术相比,具有如下的优点、好处:

[0030] 1、本发明对已知化合物葛根素发掘其新的药用价值,将其用于治疗脆性X染色体综合征,并可制备成治疗脆性X染色体综合征的药物,为中药材葛根的应用开拓了新的应用领域,扩大葛根的应用范围。

[0031] 2、本发明使用葛根素进行体内神经干细胞试验,结果表明:葛根素显著抑制Fmr1 KO小鼠体内成体神经干细胞的异常增殖,降低Fmr1 KO小鼠体内处于增殖状态的神经干细胞的密度,降低增殖细胞的占比,而对WT小鼠成体神经干细胞的增殖无影响;葛根素显著促进Fmr1 KO小鼠体内成体神经干细胞的神经元分化,促进降低Fmr1 KO小鼠体内成体神经干细胞新生神经元的成熟,恢复并提高成熟神经元数量,而对WT小鼠成体神经干细胞的分化无影响。

[0032] 3、本发明使用葛根素进行体外新生神经元树突复杂度试验,结果表明:Fmr1 KO小鼠的海马新生神经元相较于WT小鼠海马新生神经元的树突复杂度降低,树突长度减少、树突节点数和树突末端数量均减少。葛根素干预后可以恢复神经元形态;显著促进体外培养Fmr1 KO小鼠的海马新生神经元的树突复杂度,增加Fmr1 KO小鼠海马新生神经元的树突复杂性;增加Fmr1 KO小鼠海马新生神经元树突长度、树突节点数和树突末端数量,新生神经元的树突长度恢复到了WT型小鼠海马新生神经元的树突长度的水平、新生神经元的树突节点数量恢复到WT型小鼠海马新生神经元的树突节点数量的水平、树突末端数量恢复到WT型小鼠海马新生神经元的树突末端数量的水平。

[0033] 4、本发明对Fmr1基因缺陷型动物(Fmr1 KO小鼠)认知功能实验证明,葛根素可以矫正Fmr1 KO小鼠的认知功能障碍与社交互动障碍;葛根素通过调控神经发生提高Fmr1 KO

小鼠的空间记忆能力、矫正Fmr1 KO小鼠的空间记忆能力缺陷,通过调控神经发生改善Fmr1 KO小鼠的空间记忆;葛根素调控成体神经发生改善Fmr1 KO小鼠的模式分离认知功能缺陷;提高Fmr1 KO小鼠的学习记忆力;矫正并改善Fmr1 KO小鼠的社交互动障碍。

[0034] 5、本发明的葛根素的药理作用强,用于治疗脆性X染色体综合征的成效显著,见效快、毒副作用小、安全性好,能够长期服用,具有良好的药用前景。

[0035] 6、本发明的产品原料来源丰富、价廉、临床使用安全,制备工艺简单,可制成各种剂型,且用量小,使用方便,因此易于推广。

附图说明

[0036] 图1A为葛根素调控成年小鼠大脑成体神经干细胞异常增殖的实验方案图;

[0037] 图1B为成年WT/Fmr1 KO小鼠的DG区增殖的成体神经干细胞(SOX2⁺BrdU⁺)代表性显微图,其中蓝色:DAPI;绿色:BrdU;红色:SOX2;比例尺:20 μ m;

[0038] 图1C为神经干细胞增殖实验的增殖的神经干细胞数据分析结果图;

[0039] 图1D为葛根素调控成年小鼠大脑神经干细胞新生神经元分化的实验方案图;

[0040] 图1E为WT/Fmr1 KO小鼠DG区新成熟神经元(NeuN⁺BrdU⁺)的代表性显微图;通过神经元标记物NeuN(绿色)和BrdU(红色)免疫染色评估葛根素对Fmr1 KO小鼠的神经元分化影响;比例尺:20 μ m;

[0041] 图1F为神经干细胞分化实验的新成熟神经元数据分析结果图;

[0042] 图2A为体外培养P0天海马神经元细胞形态显微观察图;

[0043] 图2B为原代海马神经元树突复杂性Sholl分析统计图;

[0044] 图2C为原代海马新生神经元突起交点数Sholl分析统计图;

[0045] 图2D为原代海马新生神经元树突长度Sholl分析统计图;

[0046] 图2E为原代海马新生神经元树突节点数量Sholl分析统计图;

[0047] 图2F为原代海马新生神经元树突末端数量Sholl分析统计图;

[0048] 图3A为小鼠新位置识别实验示意图;

[0049] 图3B为小鼠新位置识别实验判别指数统计图;

[0050] 图4A为小鼠模式分离实验示意图;

[0051] 图4B为小鼠模式分离实验判别指数统计图;

[0052] 图5A为小鼠新物体识别实验示意图;

[0053] 图5B为小鼠新物体识别实验判别指数统计图;

[0054] 图6A为小鼠社交互动实验示意图;

[0055] 图6B为小鼠社交互动实验判别指数统计图。

具体实施方式

[0056] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0057] 本发明具体实施方式中使用实验动物如下:

[0058] 雄性野生型 (Wild-type, WT, 或 $Fmr1^{+/y}$) 小鼠与雌性 $Fmr1$ 基因敲除 (Knock out, KO) 小鼠 ($Fmr1$ KO, 或 $Fmr1^{-/-}$) 均购自美国杰克逊实验室。

[0059] $Fmr1$ 基因敲除 (Knock out, KO), 可以用 $Fmr1$ KO 代表, 也可以用 $Fmr1^{-/-}$ (雌鼠) / $Fmr1^{-/y}$ (雄鼠)。野生型 (Wild-type, WT), 可以用 WT 代表, 也可以用 $Fmr1^{+/+}$ (雌鼠) / $Fmr1^{+/y}$ (雄鼠)。

[0060] $Fmr1$ HET 雌鼠 ($Fmr1^{+/-}$), 雌鼠, 杂合子即为 $Fmr1$ HET 也用 $Fmr1^{+/-}$ 表示。

[0061] 所有小鼠在无特定病原体级 (SPF 级) 动物饲养室, 饲养温度为 22-25℃, 采用 12 小时照明/12 小时黑暗的昼夜节律周期, 小鼠可以自由摄取水和食物, 通过澳门大学动物伦理委员会的批准和认可。

[0062] 脆性 X 染色体综合征的发生主要是由于 X 染色体上 $Fmr1$ 基因突变, 从而导致 FMRP 的功能缺失所引起。为了避免雌鼠生理周期及双条 X 染色体上 $Fmr1$ 基因的不同表达对于生理机能的影响所导致的实验数据与结论偏差, 本研究只选用成年野生型和 $Fmr1$ 基因缺陷型雄鼠作为实验样本。

[0063] 试验例 1 体内神经干细胞的增殖与分化实验

[0064] 一、实验药品

[0065] 葛根素 (PR) CAS: 3681-99-0 萨恩化学技术 (上海) 有限公司

[0066] 5-溴脱氧尿苷 (BrdU) 27847 MCE (MedChemExpress) 公司

[0067] 二、实验方法

[0068] 1、实验用鼠繁殖方法

[0069] 1-1、神经干细胞增殖实验用鼠繁殖

[0070] 将雄性小鼠 ($Fmr1^{+/y}$) 与 $Fmr1$ HET 雌鼠 ($Fmr1^{+/-}$) 进行交配, 可以繁育出以下基因型小鼠, 分别标记为: ① $Fmr1^{+/y}$ (雄); ② $Fmr1^{-/y}$ (雄); ③ $Fmr1^{-/+}$ (雌); ④ $Fmr1^{+/+}$ (雌)。

[0071] 选择后代中标记为①和②的雄性小鼠, 待到 7-8 周时给药, 用以后续细胞增殖实验研究。

[0072] 2、实验分组、给药及取材

[0073] 2-1、神经干细胞增殖实验

[0074] 将饲养 7-8 周后的标记为①和②的雄性小鼠分为 4 组, 每组 3 只。对每组小鼠分别进行腹腔注射给药, 其中: 葛根素的用药剂量为 50mg/kg; 生理盐水则按照葛根素给药浓度计算其体积, 给予相同体积的生理盐水; 每天在同一时间进行腹腔注射给药, 1 次/天, 共 7 天, 4 组具体为:

[0075] A 组: $Fmr1^{+/y}$ + 生理盐水组; (WT+VEH); B 组: $Fmr1^{-/y}$ + 生理盐水组; (KO+VEH); C 组: $Fmr1^{+/y}$ + 葛根素组; (WT+PR); D 组: $Fmr1^{-/y}$ + 葛根素组; (KO+PR)。

[0076] 在葛根素、生理盐水给药期间的第 6 天、第 7 天分别对每只小鼠进行腹腔注射 BrdU, 2 次/天, 共两天, BrdU 剂量为 200mg/kg。

[0077] 葛根素、生理盐水连续给药 7 天后, 在第 8 天对小鼠进行麻醉, 灌注取脑, 然后使用冰冻切片机进行切片, 获得冷冻切片, 以用于后续的神经干细胞激活实验。实验流程如图 1A。

[0078] 对四组小鼠的脑冷冻切片进行免疫组织化学 (冰冻切片) (IHC-Fr) 染色处理, 并按照海马由小到大的顺序进行贴片, 并使用抗荧光淬灭剂进行封片, 获得各组小鼠的染色脑

切片;接着使用神经体视学定量分析方法,即将染色脑切片置于正置显微镜下,打开Stereo Investigator神经体视学软件,对染色脑切片中的DG区域,设置荧光通道:绿色-BrdU⁺,红色-SOX2⁺,蓝色-DAPI,按照载玻片上的脑片顺序进行扫描,扫描结束后对通过不同通道的荧光染色确定SOX2⁺BrdU⁺等阳性靶标,细胞计数,蓝色-DAPI的作用为确定细胞的位置和状态,对完成染色的小鼠脑切片进行阳性靶标的计量。

[0079] 显微镜下扫描脑切片,神经干细胞激活代表性图片如图1B,图中蓝色:DAPI;绿色:BrdU;红色:SOX2⁺;比例尺:20 μ m。

[0080] SOX2⁺阳性的细胞代表神经干细胞,SOX2⁺BrdU⁺双阳性的细胞代表增殖状态的神经干细胞,用Stereo Investigator神经体视学软件计数SOX2⁺、BrdU⁺的密度。SOX2⁺、BrdU⁺的细胞个数与DG体积作比值表明增殖状态细胞的密度(取3次的平均值),实验结果如下:

[0081] A组:Fmr1^{+/y}+生理盐水组中处于增殖状态的干细胞(SOX2⁺BrdU⁺)密度为0.662;B组:Fmr1^{-/y}+生理盐水组中处于增殖状态的干细胞(SOX2⁺BrdU⁺)密度为3.07;C组:Fmr1^{+/y}+葛根素组中处于增殖状态的干细胞(SOX2⁺BrdU⁺)密度为0.427;D组:Fmr1^{-/y}+葛根素组中处于增殖状态的干细胞(SOX2⁺BrdU⁺)密度为0.747。

[0082] 神经干细胞增殖实验数据分析结果显示如图1C。由以上数据分析可知B组相较于A组中增殖干细胞的占比高,但葛根素给药后即在D组中可以看到增殖干细胞的占比几乎恢复到与A组中相似的水平。说明葛根素显著抑制了Fmr1 KO小鼠体内成体神经干细胞的异常增殖。

[0083] 脆性X染色体综合征模型小鼠会表现出成体神经干细胞的异常激活状态,葛根素给药后可以矫正这种疾病表型,由神经干细胞增殖实验结果可知:葛根素对脆性X染色体综合征具有一定的治疗意义,显著抑制脆性X染色体综合征的成体神经干细胞的异常增殖,可以用于治疗脆性X染色体综合征。

[0084] 2-2、神经干细胞的分化实验

[0085] 将饲养7-8周后的标记为①和②的雄性小鼠分为4组,每组3只。对每组小鼠分别进行腹腔注射给药,其中:葛根素的用药剂量为50mg/kg;生理盐水则按照葛根素给药浓度计算其体积,给予相同体积的生理盐水;每天在同一时间进行腹腔注射给药,1次/天,共7天,4组具体为:

[0086] E组:Fmr1^{+/y}+生理盐水组(WT+VEH);F组:Fmr1^{-/y}+生理盐水组(KO+VEH);G组:Fmr1^{+/y}+葛根素组(WT+PR);H组:Fmr1^{-/y}+葛根素组(KO+PR)

[0087] 在葛根素、生理盐水给药期间的第3天、第4天分别对每只小鼠进行腹腔注射BrdU,2次/天,共两天,BrdU剂量为200mg/kg。

[0088] 葛根素、生理盐水连续给药7天,以及中间第3、第4天的BrdU给药结束,等待四周后对小鼠进行麻醉,灌注取脑,整个小鼠脑海马区域以40 μ m的厚度进行连续切片,并以每6张切片选取1张切片的方式对海马区进行系统随机抽样。以用于后续的神经干细胞分化实验,实验流程如图1D。

[0089] 海马齿状回(DG)区域神经细胞的计量范围是相对于前囟,背侧面从-0.94mm至-2.30mm宽度的海马区,腹侧面从-2.30mm至-3.80mm宽度的海马区。对各个实验组小鼠的脑冷冻切片进行免疫组织化学(冰冻切片)(IHC-Fr)染色处理,并使用抗荧光淬灭剂进行封片,获得各个实验组小鼠的染色脑切片;接着使用神经体视学定量分析方法,即将染色脑切

片置于正置显微镜下,打开Stereo Investigator神经体视学软件,设置荧光通道,对染色脑切片中的DG区域按脑片顺序进行扫描,扫描结束后对通过不同通道的荧光染色确定NeuN⁺和BrdU⁺等阳性靶标,蓝色-DAPI的作用为确定细胞的位置,扫描结束后对NeuN⁺和BrdU⁺细胞计数,对完成染色的小鼠脑切片进行阳性靶标的计量,其中绿色-NeuN⁺;红色-BrdU⁺;蓝色-DAPI。

[0090] 显微镜下扫描脑切片,小鼠DG区新成熟神经元(NeuN⁺BrdU⁺)的代表性显微图,如图1E,图1E中DAPI代表所有细胞,BrdU标记的为增殖的细胞,NeuN标记的为成熟神经元;绿色-NeuN⁺;红色-BrdU⁺;蓝色-DAPI⁺。

[0091] NeuN是成熟干细胞的标记物,BrdU标记处于分裂期的神经干细胞,即标记正处于增殖状态的干细胞。NeuN⁺和BrdU⁺双阳性的细胞则代表神经干细胞新分化为成熟的神经元。使用Stereo Investigator神经体视学软件计数NeuN⁺和BrdU⁺的细胞个数。NeuN⁺和BrdU⁺的细胞个数与BrdU⁺的细胞个数作比值表明激活态细胞的占比,实验结果如下:

[0092] E组:Fmr1^{+/y}+生理盐水组中成熟的新生神经元(NeuN⁺BrdU⁺/BrdU⁺)占比为71.0%;F组:Fmr1^{-/y}+生理盐水组中成熟的新生神经元(NeuN⁺BrdU⁺/BrdU⁺)占比为59.2%;G组:Fmr1^{+/y}+葛根素组中成熟的新生神经元(NeuN⁺BrdU⁺/BrdU⁺)占比为72.1%;H组:Fmr1^{-/y}+葛根素组中成熟的新生神经元(NeuN⁺BrdU⁺/BrdU⁺)占比为69.6%。

[0093] 神经干细胞分化实验数据分析结果如图1F,由以上数据分析可知F组相较于E组中成熟的新生神经元数量更少,但葛根素给药后即在第H组中可以看到新生神经元数量的占比几乎恢复到与E组中相似的水平。说明葛根素可以促进Fmr1 KO小鼠体内成体神经干细胞新生神经元的成熟。

[0094] 脆性X染色体综合征模型小鼠会表现出成体神经干细胞分化为成熟神经元的数量减少的现象,进而影响其认知功能,葛根素给药后可以矫正这种疾病表型,提高脆性X染色体综合征的成体神经干细胞分化为成熟神经元的数量,因此说明葛根素对脆性X染色体综合征具有一定的治疗意义,提高脆性X染色体综合征的成体神经干细胞分化为成熟神经元的数量,可以用于治疗脆性X染色体综合征。

[0095] 根据上述定量分析结果可知:SOX2⁺BrdU⁺/Volume百分比显示葛根素可以降低Fmr1 KO小鼠体内神经干细胞的异常增殖,根据NeuN⁺BrdU⁺/BrdU⁺百分比显示葛根素促进其神经元的分化与成熟。由此可知:葛根素可以降低Fmr1 KO小鼠大脑神经干细胞的异常增殖,并促进其分化为成熟神经元,提高成熟神经元数量,矫正Fmr1 KO小鼠神经发生障碍。

[0096] 如上所述,FMRP缺失会导致DG区神经干细胞异常增殖,但减少其向神经元的分化,并损害海马依赖性学习。葛根素给药后,可以使神经干细胞恢复正常的增殖与分化,促进正常的神经发生,降低FMRP缺失所致损害。

[0097] 试验例2葛根素对Fmr1 KO小鼠海马新生神经元树突复杂度作用的影响

[0098] 体外原代培养新生神经元,第四天转染GFP质粒,并每天连续给药直到第七天,封片。Sholl分析结果表明,葛根素可以显著促进体外Fmr1基因缺陷型(Fmr1 KO)新生神经元的树突成熟度,包括树突长度、树突节点数和树突末端数量等。

[0099] 神经细胞胞浆向外伸出树枝状的突起叫树突,树突是从神经元发出的一至多个突起,起始部较粗,反复分支,逐渐变细,呈树枝状,树突外面的细胞膜上有许多受体,因此树突是神经元接受化学信使的部位,其它神经元轴突末端终于树突表面,形成突触。神经元的

树突及其分支越多,则接受冲动的面积越大,即接受化学信使的突触越多。

[0100] 一、实验材料

[0101] 1、实验动物

[0102] 雄性野生型小鼠、Fmr1基因敲除小鼠生长到八周后达到成熟时,将雌鼠Het (Fmr1^{-/+})与雄鼠WT按照1:2比例的合笼繁殖。选用P0天小鼠,取大脑海马进行神经元原代培养。

[0103] 脆性X染色体综合征的发生主要是由于X染色体上Fmr1基因突变,从而导致FMRP的功能缺失所引起。为了避免雌鼠生理周期及双条X染色体上Fmr1基因的不同表达对于生理机能的影响所导致的实验数据与结论偏差,本研究只选用成年野生型和Fmr1基因缺陷型雄鼠作为实验样本。

[0104] 2、培养细胞

[0105] WT和Fmr1 KO小鼠的海马新生神经元,于5%CO₂、37℃培养箱中培养。

[0106] 3、药品

[0107] 葛根素(Puerarin;PR),纯度≥98%,购自萨恩化学技术(上海)有限公司,CAS:3681-99-0。

[0108] 4、主要试剂

试剂	试剂来源	货号
10×多聚赖氨酸	碧云天	HY-K0301
DMEM	GIBCO	C11330500BT
Neuro 神经元培养基	Basal Media	T710KJ
B27	GIBCO	17504044
FBS	Sigma	F2442
DMSO	索莱宝	6768-5
青链霉素	GIBCO	15140-122
[0109] (谷氨酰胺)	GIBCO	2323081
多聚甲醛	生工生物工程	A500684-0500
PBS 磷酸盐缓冲液	Biosharp	BL601A
高纯度质粒大提试剂盒	天根	DP116
大肠杆菌 DH5α	索莱宝	C1100
Rv-GFP 质粒	Addgene	#16664
氨苄青霉素	索莱宝	69-52-3
DEPC	Biosharp	BL5108
胰蛋白酶-EDTA (0.25%), 含酚红	GIBCO	25200056

[0110] 5、主要仪器

[0111] 正置显微镜,Carl Zeiss。

[0112] 二、实验方法

[0113] 1、试剂配制

[0114] 1) LB培养基的配制:取10g NaCl、10g Tryptone(胰蛋白胨粉)、5g Yeast extract

(酵母提取物)溶解于1L的超纯水中,并于高压灭菌后使用。

[0115] 2) LB固体培养基的配制:取胰蛋白胨粉10g、酵母粉10g、NaCl 10g、琼脂粉10-20g,溶解于1L的超纯水中,并于高压灭菌后使用。待培养基液体冷却至50-60℃时,加入50mg/mL氨苄青霉素1mL,使其充分溶解,趁培养基未凝固前,迅速分装于培养皿中(10mL/个),待冷却凝固后,盖上培养皿盖子,倒置(以防水滴在固体培养基上),于4℃冰箱中保存备用。

[0116] 3) 葡萄糖溶液的配制:取18.0g葡萄糖溶解于近100mL的超纯水中,待完全溶解后定容于100mL,0.22μm的微孔滤膜进行过滤除菌后使用。

[0117] 4) 5M NaCl:称取292.5g NaCl,溶解于灭菌超纯水中,稀释到1L。

[0118] 5) SOC(Super Optimal broth with Catabolite repression)培养基的配制:取20g Tryptone(胰蛋白胨)、5g Yeast extract、0.5g NaCl、0.186g KCl、12g MgSO₄、0.95g MgCl₂溶解于近1L的超纯水中,调节pH至7.0,并定容于1L,进行高压灭菌,然后向其中加入试剂配制3)中配制的已除菌的葡萄糖溶液20mL。

[0119] 6) 氨苄青霉素溶液的配制(50mg/mL):称取2.5g氨苄青霉素置于50mL塑料离心管中,加入近50mL灭菌超纯水充分混合溶解之后,定容至50mL,0.22μm滤膜过滤除菌,小份分装(1mL/管)后,置于-20℃保存。

[0120] 7) 4%多聚甲醛(PFA):取40g PFA粉末置于1L烧杯中,再加入1L PBS磷酸盐缓冲液,搅拌器搅拌,搅拌过程中再添加6mg NaOH,直至完全溶解,再用盐酸调pH值至7.0-7.4,冷却,分装,置于-20℃冰箱保存。

[0121] 8) 多聚赖氨酸的配制:将10×多聚赖氨酸按照1:9的稀释方式用灭菌的超纯水稀释成1×多聚赖氨酸,并用0.22μm的微孔滤膜进行过滤除菌,然后置于4℃进行保存。注意多聚赖氨酸可以循环使用,但再次使用时用过滤,若出现浑浊或者染菌应丢弃。

[0122] 9) 神经元相关培养基

[0123] ①号培养基,取材培养基:DMEM-F12+1%青链霉素;

[0124] ②号培养基,种板培养基:DMEM-F12+10%FBS+1%青链霉素;

[0125] ③号培养基,4h换液-培养阶段培养基:NeuroGro+2%B27+1%青链霉素+0.5mM L-Glu;

[0126] 消化液:胰蛋白酶-EDTA(0.25%),含酚红,直接使用。

[0127] 2、实验分组及给药

[0128] A组:WT+VEH,WT型P0天海马神经元+0.005%DMSO;

[0129] B组:KO+VEH,Fmr1 KO型P0天海马神经元+0.005%DMSO;

[0130] C组:WT+PR,WT型P0天海马神经元+终浓度为10μM的PR;

[0131] D组:KO+PR,Fmr1 KO型P0天海马神经元+终浓度为10μM的PR。

[0132] 分别对两种WT与Fmr1 KO神经元细胞进行空白处理、给药处理,其中:WT+VEH组(空白组,A组),在培养基中加入0.005%DMSO,WT型神经元细胞+0.005%DMSO;KO+VEH组(B组),Fmr1 KO型神经元细胞+0.005%DMSO;给药处理(给药组,C、D组)在培养基中加入终浓度为10μM的PR,即WT+PR组,WT型神经元细胞+终浓度为10μM的PR;KO+PR组,Fmr1KO型神经元细胞+终浓度为10μM的PR。

[0133] 3、质粒转化

[0134] 3-1) 将DH5α感受态大肠杆菌细胞及Rv-GFP质粒置于冰浴中。

[0135] 3-2) 将DH5 α 感受态细胞100 μ L加入到1个1.5mL离心管;接着加入质粒Rv-GFP (1 μ L),轻弹管体,使质粒与感受态细胞充分混匀;然后置于冰浴中静置30min。

[0136] 3-3) 将离心管于42 $^{\circ}$ C的水浴中放置60-90s,然后快速转移离心管于冰浴中2-3min,注意该过程不要摇动离心管。将Rv-GFP的质粒导入大肠杆菌体内,从而大量扩增。

[0137] 3-4) 向另一个15mL离心管中加入900 μ L SOC培养基,再加入步骤3-3)中导入质粒的DH5 α 感受态细胞,混匀后于37 $^{\circ}$ C摇床振荡(180rpm,90min),进行导入质粒的感受态细胞的培养。

[0138] 3-5) 吸取步骤3-4)中的培养混合液(100 μ L),加入含氨苄青霉素(终浓度50 μ g/mL)的LB固体培养基上,并用无菌接种环轻轻将细胞均匀涂开;然后倒置培养皿,37 $^{\circ}$ C培养箱培养12-16h,即可观察到菌落。

[0139] 3-6) 向已高压灭菌的1个250mL锥形瓶中加入含氨苄青霉素(50 μ g/mL)的LB液体培养基200mL,备用。

[0140] 3-7) 用已高压灭菌的枪头挑取步骤3-5)中培养的单个菌粒,加入到步骤3-6)的锥形瓶中,于37 $^{\circ}$ C下培养,200rpm,摇菌12-16h。

[0141] 3-8) 摇菌后的菌液,进行离心(15min,4500rpm,4 $^{\circ}$ C),弃上清,留菌体沉淀,将沉淀于-40 $^{\circ}$ C保存,用于提取质粒。

[0142] 4、质粒提取

[0143] 采用高纯度质粒大提试剂盒,按照试剂盒的说明和实验方法并进行质粒提取,具体如下:

[0144] 4-1) 将质粒提取试剂盒的溶液P1在使用前先加入RNaseA,混匀,于2-8 $^{\circ}$ C保存。

[0145] 4-2) 向“3、质粒转化”中步骤3-8)中提取的留有菌体沉淀的离心管中加入步骤4-1)中的混合溶液,涡旋,悬浮细菌细胞沉淀;然后向离心管中加入质粒提取试剂盒的溶液P2,立即混匀,使菌体充分裂解,室温放置5min。

[0146] 4-3) 向离心管中加入质粒提取试剂盒的溶液P4,立即充分混匀,至溶液出现白色分散絮状沉淀;室温放置4-5min后,离心(7800rpm,15min),使白色沉淀离心至管底;然后将全部溶液小心倒入过滤器CS1中(注意避免倒入大量沉淀而阻塞过滤器),推动推柄过滤,滤液收集在干净的50mL的离心管中。

[0147] 4-4) 向滤液中加入0.35倍滤液体积的异丙醇、1/2倍异丙醇体积的NaCl,上下颠倒充分混匀;于温度4 $^{\circ}$ C,转速7800rpm离心90min,轻轻倒掉上清液,将离心管倒置在吸水纸上,吸干液体后,向离心管中加入70%乙醇充分漂洗沉淀;再于4 $^{\circ}$ C,7800rpm,离心15min,轻轻倒掉上清液,将离心管倒置在吸水纸上,重复1-2次,充分漂洗沉淀。

[0148] 4-5) 将离心管敞口室温放置30min,使乙醇充分挥发,加入DEPC水涡旋混匀,提取得到RV-GFP质粒。

[0149] 用DNA微量测定仪检测RV-GFP质粒的浓度与纯度,测定结果如下:

[0150] 质粒浓度:5789.9ng/微升 $A_{260}/280=1.953A_{260}/A_{230}=2.110$

[0151] 提取的质粒做好标记(日期,质粒种类,浓度),于-20 $^{\circ}$ C冰箱保存,备用。

[0152] 5、细胞培养

[0153] 5-1) 将直径为14mm细胞爬片放入24孔板中,加入适量体积(200-300微升)的1 \times 多聚赖氨酸包被液,进行包被(8h以上),于实验前回收包被液,并用灭菌超纯水洗涤爬片2-3

次;

[0154] 5-2) 将神经元培养的①号培养基分装至分别标记编号的培养皿、EP管中,并于冰上预冷;

[0155] 5-3) 取出P0天(0-24h内新出生的小鼠)小鼠,酒精消毒后取小鼠尾巴组织保存至1.5mL的EP管中;再剪下小鼠头部,其中:雄性WT和Fmr1 KO小鼠,分为4组,即WT+VEH、KO+VEH、WT+PR、KO+PR组,每组为三只小鼠,即n=3,四组共12只小鼠,具体分组如表1所示,其中DMSO浓度为0.005%;PR浓度为10 μ M。

[0156] 表1神经元细胞实验分组

A 组: WT+VEH			B 组: KO+VEH		
A1:	A2:	A3:	B1:	B2:	B3:
WT1+DMSO	WT2+DMSO	WT3+DMSO	KO1+ DMSO	KO2+ DMSO	KO3+ DMSO
C 组: WT+PR (10 μ M)			D 组: KO+PR (10 μ M)		
C1:	C 2:	C 3:	D1:	D 2:	D 3:
WT1+PR	WT2+PR	WT3+PR	KO1+ PR	KO2+ PR	KO3+ PR

[0158] 5-4) 切除脑干后将全脑从中间分成左右两个半球,海马的位置在半球的腹内侧,全程在体视镜下操作,使用显微镊子将脑膜剥落,然后再将两侧的海马进行剥离;将大脑迅速放入到①号培养基中,分离海马,并将大脑两侧海马转移到对应编号的EP管,于细胞操作间内将海马剪成小段1-2mm³的小块,分别收集至15mL离心管中,加入300 μ L消化液(GIBCO, 25200056),然后于37 $^{\circ}$ C含有5%CO₂培养箱孵育5min。

[0159] 5-5) 孵育后离心(1500r/1min),去除上清液;再向各15mL离心管内加入2mL②号培养基,轻轻吹打至无组织块,然后将细胞悬液过40 μ m筛网,收集细胞悬液于新的15ml离心管内,使得上述细胞呈单个细胞状态,再继续吹打均匀,并按照每孔接种(3-5) $\times 10^5$ 个细胞的接种量加入到含有经过包被处理的细胞爬片的24孔板中,进行种板处理,细胞种板时,每孔中培养基体积为1mL,在细胞孵箱中培养4h。

[0160] 5-6) 种板处理4h后,将24孔板内每孔的培养基更换为③号培养基;其中种板处理当天为第0天,此后每隔一天进行半量换液,即半量更换③号培养基,种板第4天进行转染及按照表3的分组进行给药处理,种板第7天进行固定处理。

[0161] 6、细胞转染及给药处理

[0162] 6-1) 准备工作:

[0163] 高压灭菌实验所需材料(不同规格的枪头,1.5mL EP管等,因为是在细胞房操作需要无菌环境),超净台内照射紫外灭菌,保证无菌操作;将③号培养基放到室温,备用;

[0164] 配制转染试剂(24孔板中一个孔的试剂用量配制):灭菌超纯水:17.5 μ L;步骤“4、质粒提取”获得的RV-GFP质粒:1 μ g;2M CaCl₂:2.5 μ L;2 \times HEBS:25 μ L。

[0165] 6-2) 于种板第4天,在转染前1h将孔板内培养基更换为新的③号培养基;

[0166] 6-3) 分别向12支EP管(1.5mL)内加入转染试剂,即每支EP管内依次加入质粒(1 μ g),水(17.5 μ L),2 \times HEBS(25 μ L),混匀后,再滴加CaCl₂溶液(2.5 μ L),混匀后室温静置10min;制得DNA-CaCl₂-HBS混合体系;

[0167] 6-4) 将DNA-CaCl₂-HBS混合体系分别滴加至种板后的24孔板的每个孔内,然后将24孔板放在细胞孵箱中培养1h。

[0168] 6-5) 将24孔板放到超净工作台,使用PBS缓冲液(常温)冲洗细胞两次(洗去沉淀,减少细胞死亡);

[0169] 6-6) 按照分组更换③号培养基,其中A组、B组:每孔加入1mL③号培养基+0.005% DMSO;给药组(C、D组):每孔加入1mL③号培养基+葛根素(终浓度为10 μ M)。

[0170] 6-7) 然后将24孔板放回细胞孵箱中培养生长,即进行神经元培养。

[0171] 7、神经元的固定、封片与计量

[0172] 7-1) 神经元培养到第七天后,将24孔板从细胞培养间取出,每孔吸出0.5mL培养基,再向每孔中加入4%多聚甲醛(0.5mL),常温放置,固定20min后将孔中所有液体全部吸出,再向每孔中加入4%多聚甲醛(1mL),常温放置固定15min;然后吸走孔中液体,并用PBS洗涤3次,5min/次;

[0173] 7-2) 取一个普通的载玻片(长),在其上两个不同的位置上分别滴加15 μ L(通常为10-20 μ L)的抗荧光淬灭剂,然后将步骤7-1)中固定并洗涤后的附有神经元的细胞爬片从24孔板中取出,有细胞的一面朝下,固定在载玻片上,然后于正置显微镜下观察,计量tracing(实时描绘);其中:显微镜荧光调到绿色通道,随机选取表达绿色荧光的神经元,计量树突长度,树突节点,树突末端等。

[0174] 使用正置显微镜下荧光场观察GFP⁺的神经元细胞形态变化(图2A)。分析PR对WT或Fmr1 KO小鼠海马新生神经元的树突复杂度的影响,使用体视学分析系统对GFP⁺的新生神经元进行实时描绘,并用神经形态学分析系统量化神经元形态结构,即对GFP⁺的新生神经元树突长度(图2D)、树突节点数(图2E)、树突末端个数(图2F)的量化。

[0175] 8、结果分析

[0176] 采用GraphPad Prism软件进行双因素方差分析(Two-way ANOVA)或SPSS统计分析软件进行多变量方差分析(MANOVA)进行阈值分析,数据处理结果以Mean \pm SEM表示,当P<0.05时认为有显著性水平差异,具有统计学意义。

[0177] 8A) 葛根素对WT、Fmr1 KO小鼠海马新生神经元细胞形态的影响

[0178] 新生神经元细胞形态的显微镜观察结果如图2A,由图2A可知,与WT+VEH相比,KO+VEH的神经元细胞的树突复杂度低,树突长度短,树突分支少;给予PR后,与KO+VEH相比,KO+PR的神经元细胞树突复杂度增加,树突长度增长,树突分支增多;与WT+VEH相比,KO+PR的神经元细胞的形态可以恢复到与WT型小鼠海马新生神经元类似的水平。

[0179] 在体外培养的神经元中,通过使用磷酸钙转染法对神经元细胞进行转染,在培养过程中加入PR进行药物干预。使用神经体视学分析方法对表达绿色GFP荧光的神经元进行形态分析发现,Fmr1 KO小鼠的海马新生神经元相比WT,在形态上存在明显差异,即Fmr1 KO神经元树突复杂性网络复杂性低于WT神经元,葛根素给药干预后Fmr1 KO型海马新生神经元细胞的形态可以恢复到与WT型小鼠海马新生神经元类似的水平(图2A)。

[0180] 实验结果表明,PR对Fmr1 KO小鼠海马新生神经元树突形态有改善作用:PR可以显著促进体外Fmr1 KO小鼠海马新生神经元的树突复杂度,包括树突长度、树突节点数和树突末端数量等。

[0181] 8B) 葛根素对WT、Fmr1 KO小鼠海马新生神经元复杂度的影响

[0182] 采用Sholl分析方法对WT或Fmr1 KO小鼠海马新生神经元复杂度进行考察,Sholl分析实验方案示意图如图2B所示;Sholl分析方法鉴定海马新生神经元复杂度的统计分析

结果如图2C。

[0183] Sho11 Analysis以神经元胞体为圆心(不包括胞体)开始画一系列同心圆(如图2B),得到随离胞体距离变化的神经元突起交点(Intersections)个数,以此来反映神经元的复杂性。通过计算与每个圆相交的分支数,得出对不同区域的神经元树突和轴突的分支模式,从而定量表征被成像神经元形态特征,分析结果如图2C。

[0184] WT+VEH;KO+VEH;WT+PR;KO+PR在等距离下距离胞体交点数最小值均值-最大值均值分别是[3.23,6.66][2.10,5.00];[5.26,7.74];[4.47,6.75]。实验结果表明Fmr1 KO小鼠的新生神经元比WT小鼠的新生神经元的复杂性低,葛根素可以显著增加Fmr1 KO小鼠海马新生神经元的树突复杂性。

[0185] 8C) 葛根素对WT、Fmr1 KO小鼠海马新生神经元树突长度的影响

[0186] 对海马新生神经元树突长度采用Sho11分析方法进行,Sho11分析方法鉴定海马新生神经元树突长度的统计分析结果如图2D。

[0187] 由图2D可知:WT+VEH;KO+VEH;WT+PR;KO+PR组的树突平均长度依次为:2920.32 μm ;1865.10 μm ;3596.69 μm ;2801.01 μm ;实验结果表明Fmr1 KO小鼠的新生神经元的树突长度与WT小鼠新生神经元树突长度相比,较短,而PR可以显著提高Fmr1 KO小鼠新生神经元的树突长度。与WT+VEH相比,给予PR的Fmr1 KO小鼠新生神经元的树突长度恢复到了WT型小鼠海马新生神经元的树突长度的水平。

[0188] 8D) 葛根素对WT、Fmr1 KO小鼠新生神经元树突节点数量的影响

[0189] 对海马新生神经元树突节点采用Sho11分析方法进行,Sho11分析方法鉴定海马新生神经元树突节点数量的统计分析结果如图2E。

[0190] 由图2E可知:WT+VEH;KO+VEH;WT+PR;KO+PR组的树突节点数平均个数依次为:19.60;8.65;21.74;15.82;实验结果表明:Fmr1 KO小鼠的新生神经元比WT小鼠具有更少的树突节点数量,PR给药干预后可以显著增加Fmr1 KO小鼠新生神经元的树突节点数量。与WT+VEH相比,给予PR的Fmr1 KO小鼠海马新生神经元的树突节点数量恢复到WT型小鼠海马新生神经元的树突节点数量的水平。

[0191] 8E) 葛根素对WT、Fmr1 KO小鼠新生神经元树突末端数量的影响

[0192] 对海马新生神经元树突末端采用Sho11分析方法进行,Sho11分析方法鉴定海马新生神经元树突末端数量统计分析结果如图2F。

[0193] 由图2F可知:WT+VEH;KO+VEH;WT+PR;KO+PR组的树突末端数平均个数依次为:27.42;14.06;30.93;23.78;实验结果表明:Fmr1 KO小鼠的新生神经元比WT小鼠具有更少的树突末端数量数量,PR给药干预后可以显著提高Fmr1 KO小鼠新生神经元的树突末端数量。与WT+VEH相比,给予PR的Fmr1 KO小鼠的树突末端数量恢复到WT型小鼠海马新生神经元的树突末端数量的水平。

[0194] 试验例3认知功能调控试验

[0195] 采用动物认知功能检测方法证明,葛根素可以矫正Fmr1基因缺陷型小鼠(Fmr1 KO)的认知功能障碍与社交互动障碍。为了进一步研究葛根素对认知障碍的改善作用是否通过促进成体神经发生发挥作用,本发明使用神经发生特异性阻断剂替莫唑胺(temozolomide, TMZ)进行干预。由于替莫唑胺具有通过阻断神经发生作用,进而剥夺葛根素对Fmr1基因缺陷型小鼠(Fmr1 KO)认知功能障碍的治疗作用。本发明的结果表明,葛根素

可以抑制、治疗由神经发生特异性阻断剂替莫唑胺导致的对Fmr1基因缺陷型小鼠 (Fmr1 KO) 的神经发生的阻断作用。因此,葛根素可以通过调控神经发生治疗脆性X染色体综合征小鼠的认知功能障碍。

[0196] 一、新位置识别实验

[0197] 新位置识别实验是用于检测小鼠空间记忆能力的经典行为学。为了探索葛根素是否能够矫正脆性X染色体综合征模型小鼠的空间记忆能力,使用腹腔注射葛根素的方式对小鼠进行给药干预后,进行新位置识别实验测试。

[0198] 为了进一步研究葛根素对空间记忆的改善作用是否通过促进成体神经发生发挥功能,使用神经发生特异性阻断剂替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 提前阻断神经发生,并与葛根素联合给药之后,进行新位置识别实验测试。

[0199] 1材料与方法

[0200] 1.1材料:

[0201] 一个正方形旷场:不同物体 (A物体、B物体),面巾纸,75%的酒精,两个计时器。

[0202] 1.2实验动物、药物:

[0203] 7-8周龄Fmr1 KO和WT小鼠。

[0204] 葛根素 (Puerarin; PR), 纯度 $\geq 98\%$, 购自萨恩化学技术(上海)有限公司, CAS: 3681-99-0。

[0205] 替莫唑胺 (Temozolomide; TMZ), 购自selleck公司, CAS No. 85622-93-1。

[0206] 2实验分组及给药

[0207] 2.1实验分组: WT+VEH: WT小鼠腹腔注射生理盐水; KO+VEH: Fmr1 KO小鼠腹腔注射生理盐水; WT+PR: WT小鼠腹腔注射葛根素; KO+PR: Fmr1 KO小鼠腹腔注射葛根素; WT+PR/TMZ: WT小鼠腹腔注射替莫唑胺及葛根素; KO+PR/TMZ: Fmr1 KO小鼠腹腔注射替莫唑胺及葛根素, 共6组, 每组7-9只 (即 $n=7-9$)。

[0208] 2.2给药方式:

[0209] ①: WT+VEH, KO+VEH组: 7-8周龄WT、Fmr1 KO小鼠每天腹腔注射一次生理盐水, 连续注射7天。

[0210] ②: WT+PR, KO+PR组: 7-8周龄WT、Fmr1 KO小鼠每天腹腔注射一次葛根素, 连续注射7天, 给药剂量为30mg/kg

[0211] ③: WT+PR/TMZ, KO+PR/TMZ组: 6周龄的WT、Fmr1 KO小鼠在第6周, 第7周, 第8周和第9周的前三天每天腹腔注射一次替莫唑胺 (TMZ), 在第9周每天腹腔注射一次葛根素 (PR), 连续注射7天, PR的给药剂量为30mg/kg。

[0212] 3实验步骤

[0213] 该测试是通过评估啮齿类动物根据空间线索识别熟悉物体新位置的能力来测量它们的空间记忆能力。

[0214] 首先, 按照新位置识别实验示意图 (图3A), 实验动物被带到行为学测试实验室, 适应至少1个小时。在训练阶段, 每只动物被单独放置在一个正方形场地中, 两个完全相同的物体被放置在与一面贴有彩色墙纸距离相同的位置上, 允许小鼠自由探索6min, 该训练过程重复3次。在测试阶段, 其中一个已经熟悉的物体的位置被移动到了另一个新的位置上。记录6min内, 实验动物对新旧两个不同位置物体的探索时间。一个正常的动物, 应该花更多

的时间在探索新位置的物体上。判别标准是根据识别新位置物体所花费的时间百分比与识别原位置物体所花费的时间之间的差异来计算的。在测试阶段,对物体的探测定义为动物的鼻子距离物体1cm之内的任何探索行为,包括头部方向、攀爬、嗅探等。判别指数的计算方法为:判别指数=(新位置物体识别时间/总识别时间×100)-(原位置物体识别时间/总识别时间×100)。

[0215] 每只小鼠测试结束后,需要用75%的酒精将场擦拭干净,以消除同类气味干扰对下一只实验小鼠测试行为的影响。

[0216] 4实验结果

[0217] 数据采用GraphPad Prism软件进行双因素方差分析(Two-way ANOVA),数据处理结果以Mean±SEM表示,当P<0.05时认为有显著性水平差异,具有统计学意义。

[0218] WT+VEH;KO+VEH;WT+PR;KO+PR;WT+PR/TMZ;KO+PR/TMZ组的判别指数依次为:31.77%;-21.82%;24.99%;56.22%;-24.28%;-37.43%。小鼠对新位置识别实验统计结果如图3B所示。

[0219] 由实验结果可知:WT小鼠更倾向于探索新物体,而Fmr1 KO小鼠更倾向于探索旧物体,这说明Fmr1 KO小鼠的空间记忆能力有缺陷,葛根素给药后可以矫正这种缺陷,而TMZ可以阻断葛根素对Fmr1 KO小鼠的空间记忆改善作用。说明葛根素可以通过调控神经发生改善Fmr1KO小鼠的空间记忆。

[0220] 二、模式分离实验

[0221] 模式分离实验是一种高级的探索小鼠区分类似事件能力的方式。本实验将探讨葛根素能否通过促进神经发生矫正脆性X染色体综合征模型小鼠的模式分离缺陷。

[0222] 1材料与方法

[0223] 1.1材料:正方形旷场(2个);物体A(2个);物体B(2个),物体A与物体B不相同;面巾纸;75%的酒精;两个计时器。

[0224] 1.2实验动物、药物:与“一、新位置识别实验”的实验动物、药物相同

[0225] 2实验分组及给药

[0226] 2.1实验分组:WT+VEH:WT小鼠腹腔注射生理盐水;KO+VEH:Fmr1 KO小鼠腹腔注射生理盐水;WT+PR:WT小鼠腹腔注射葛根素;KO+PR:Fmr1 KO小鼠腹腔注射葛根素;WT+PR/TMZ:WT小鼠腹腔注射替莫唑胺及葛根素;KO+PR/TMZ:Fmr1 KO小鼠腹腔注射替莫唑胺及葛根素,共6组,每组8-9只(即n=8-9)。

[0227] 2.2给药方式:与“一、新位置识别实验”的药物给药方式相同

[0228] 3实验步骤

[0229] 如图4A,在训练期间,将已编好号的小鼠放置于空场中训练一段时间,随后被单独放置在第一个正方形场地中,有特定的地板图案和两个相同的物体(A物体),并被允许探索10min。30分钟后,同一只动物被放置在第二个正方形场地中,与第一个实验不同的地板模式和两个完全不同的另一套物体(B物体),并被允许探索10min。

[0230] 实验时随机取两次训练壁纸中的一种当作背景,并于测试时的相同位置分别放置一个A物体和一个B物体,并采用录像机录制每只小鼠在该场景下对A物体和B物体的互动情况,测试时间为10min,之后利用计时器对小鼠的互动情况进行计数分析,在测试阶段,对物体的探测定义为动物的鼻子距离物体1cm之内的任何探索行为,包括头部方向、攀爬、嗅探

等。

[0231] 每只小鼠测试结束后用纯净水清洁,以免影响实验结果。根据公式计算判别指数,判别指数=(新物体探测时间/总探测时间)-(旧物体探测时间/总探测时间)×100%,判断小鼠对新、旧物体的偏好。

[0232] 4实验结果

[0233] 数据采用GraphPad Prism软件进行双因素方差分析(Two-way ANOVA),数据处理结果以Mean±SEM表示,当P<0.05时认为有显著性水平差异,具有统计学意义。

[0234] WT+VEH;KO+VEH;WT+PR;KO+PR;WT+PR/TMZ;KO+PR/TMZ组的判别指数依次为:34.97%;-30.12%;25.03%;28.60%;-12.20%;-26.69%。小鼠模式分离实验结果统计图如图4B所示。

[0235] 实验结果表明WT小鼠更倾向于探索新物体,而Fmr1 KO小鼠与WT小鼠表现相反,说明Fmr1 KO小鼠的模式分离有缺陷,葛根素给药后可以矫正这种缺陷。而TMZ可以阻断葛根素对Fmr1 KO小鼠的模式分离改善作用。说明葛根素可以通过调控神经发生改善Fmr1 KO小鼠的模式分离缺陷。

[0236] 由上述实验可知:葛根素可以通过调控成体神经发生改善脆性X染色体综合征模型小鼠的模式分离缺陷。

[0237] 三新物体识别实验

[0238] 这项测试是基于啮齿动物的自然倾向,即喜欢探索新奇的物体而不是熟悉的物体。本实验检测的是小鼠的新物体识别能力,用于探索葛根素能否通过调控成体神经发生矫正脆性X染色体综合征模型小鼠的学习、记忆障碍。

[0239] 1实验材料

[0240] 1.1材料:正方形旷场(1个);物体A(1个);物体B(1个),物体A与物体B不相同;面巾纸。75%的酒精;两个计时器。

[0241] 1.2实验动物、药物:与“一、新位置识别实验”的实验动物、药物相同

[0242] 2实验分组及给药

[0243] 2.1实验分组:WT+VEH:WT小鼠腹腔注射生理盐水;KO+VEH:Fmr1 KO小鼠腹腔注射生理盐水;WT+PR:WT小鼠腹腔注射葛根素;KO+PR:Fmr1 KO小鼠腹腔注射葛根素;WT+PR/TMZ:WT小鼠腹腔注射替莫唑胺及葛根素;KO+PR/TMZ:Fmr1 KO小鼠腹腔注射替莫唑胺及葛根素,共6组,每组8只(即n=8)。

[0244] 2.2给药方式:与“一、新位置识别实验”的药物给药方式相同

[0245] 3实验步骤

[0246] 该测试是以啮齿类动物优先探索陌生物体而非熟悉物体的特点来测量它们的新物体识别能力。新物体识别是记忆任务的一种形式,它不依赖于空间提示。在这个任务中,动物被训练来识别特定对象。

[0247] 如图5A,首先,实验动物被带到行为学测试实验室,适应至少1个小时。在训练阶段,每只动物单独放置在一个走廊长度相同的L型场地中,两个完全相同的物体被放置在两侧走廊尽头,并被允许探索10min。在测试阶段,其中一个已经熟悉的物体被替换成一个新物体,记录10min内,实验动物对新旧两个不同物体的探索时间。一个正常的动物,应该花更多的时间在探索陌生物体上。判别标准是根据识别陌生物体所花费的时间百分比与识别熟

悉物体所花费的时间之间的差异来计算的。在测试阶段,对物体的探测定义为动物的鼻子距离物体1cm之内的任何探索行为,包括头部方向、攀爬、嗅探等。判别指数的计算方法为:判别指数 = (陌生物体识别时间/总识别时间 × 100) - (熟悉物体识别时间/总识别时间 × 100)。

[0248] 每只小鼠测试结束后用纯净水将场景进行清洁以免影响后续小鼠实验结果。

[0249] 4实验结果

[0250] 数据采用GraphPad Prism软件进行双因素方差分析(Two-way ANOVA),数据处理结果以Mean ± SEM表示,当P < 0.05时认为有显著性水平差异,具有统计学意义。

[0251] 小鼠新物体识别实验的结果统计如图5B所示。WT+VEH;KO+VEH;WT+PR;KO+PR;WT+PR/TMZ;KO+PR/TMZ组的判别指数依次为:24.75%;-32.56%;22.04%;26.20%;-24.07%;-26.57%。

[0252] 实验结果表明:WT小鼠更倾向于探索新物体,而Fmr1 KO小鼠与WT小鼠表现相反,这说明Fmr1 KO小鼠的学习记忆能力有缺陷,葛根素给药后可以矫正这种缺陷。而TMZ可以阻断葛根素对Fmr1 KO小鼠的学习记忆改善作用。

[0253] 由上述实验可知:葛根素可以通过调控成体神经发生改善脆性X染色体综合征模型小鼠的记忆力。

[0254] 四、社交互动实验

[0255] 社交互动障碍是自闭症患者最显著的表现形式之一。本实验使用了三箱交互社交行为学测试实验来检测葛根素是否可以通过调控神经发生矫正脆性X染色体综合征模型小鼠的社交行为缺陷。

[0256] 1实验材料

[0257] 1.1材料:长方形的操作箱,金属笼子;两只小鼠;面巾纸;75%的酒精;两个计时器。

[0258] 1.2实验动物、药物:与“一、新位置识别实验”的实验动物、药物相同

[0259] 2实验分组及给药

[0260] 2.1实验分组:WT+VEH:WT小鼠腹腔注射生理盐水;KO+VEH:Fmr1 KO小鼠腹腔注射生理盐水;WT+PR:WT小鼠腹腔注射葛根素;KO+PR:Fmr1 KO小鼠腹腔注射葛根素;WT+PR/TMZ:WT小鼠腹腔注射替莫唑胺及葛根素;KO+PR/TMZ:Fmr1 KO小鼠腹腔注射替莫唑胺及葛根素,共6组,每组8-12只(即n=8-12)。

[0261] 2.2给药方式:与“一、新位置识别实验”的药物给药方式相同

[0262] 3实验步骤

[0263] 该测试是以啮齿类动物天生喜群居、对新物件具有探索倾向的特点来检测它们的社交行为变化。社会行为测试装置为三室箱,分隔墙由黑色有机玻璃制成,里面有直径7cm的小圆门,动物可以在三箱中自由活动。

[0264] 如图6A,首先,实验动物被带到行为学测试实验室,适应至少1个小时。该实验包括三个阶段:习惯化、社会交往测试和社会新颖性识别。在测试阶段,实验动物第一次被置于中间箱,并允许自由探索左中右三室10min;接下来,一只陌生动物放置在左室侧的钢丝笼中,右室侧钢丝笼中放入玩具,在社会交往测试中,记录10min内,实验动物对玩具和陌生动物的探索时间。在社会新颖性识别测试中,之前曾经互动过的动物保持不变(左室侧),右室

侧内的玩具被置换成一只新的陌生动物(右室侧),记录10min内,实验动物对熟悉动物(左室侧,来自于之前的社会交往阶段)和陌生动物(右室侧,新置换动物)的探索时间。判别标准是根据识别陌生动物所花费的时间百分比与识别玩具(或者识别熟悉动物)所花费的时间之间的差异来计算的。在测试阶段,对物体或者另一只动物的探测定义为动物的鼻子距离物体钢丝笼或另一只动物钢丝笼1厘米之内的任何探索行为,包括头部方向、攀爬、嗅探等。判别指数的计算方法为:判别指数 = (陌生动物识别时间/总识别时间 × 100) - (玩具或者熟悉动物识别时间/总识别时间 × 100)。

[0265] 每只小鼠测试结束后用纯净水将场景进行清洁以免影响后续小鼠实验结果。

[0266] 4实验结果

[0267] 数据采用GraphPad Prism软件进行双因素方差分析(Two-way ANOVA),数据处理结果以Mean ± SEM表示,当P < 0.05时认为有显著性水平差异,具有统计学意义。

[0268] 小鼠社交互动实验的结果统计如图6B所示。WT+VEH;KO+VEH;WT+PR;KO+PR;WT+PR/TMZ;KO+PR/TMZ组的判别指数依次为:33.36%; -18.51%; 42.28%; 35.05%; -37.29%; -30.90%。

[0269] 实验结果表明:WT小鼠更倾向于与新的小鼠互动,而Fmr1 KO小鼠更倾向于与旧的小鼠互动,这说明Fmr1 KO小鼠的社交能力有缺陷,葛根素给药后可以矫正这种缺陷。而TMZ可以阻断葛根素对Fmr1 KO小鼠的社交互动改善作用。由此得出结论,葛根素可以通过调控神经发生矫正脆性X染色体综合征模型小鼠的社交互动障碍。

[0270] 由上述实验可知:葛根素可以通过调控神经发生矫正脆性X染色体综合征模型小鼠的社交缺陷。

[0271] 本发明上述实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

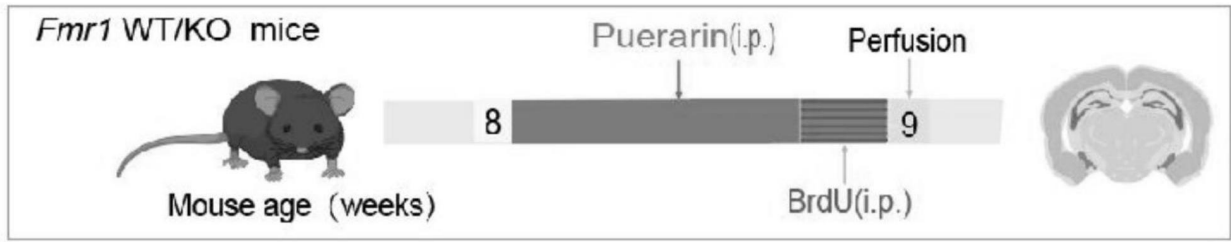


图1A

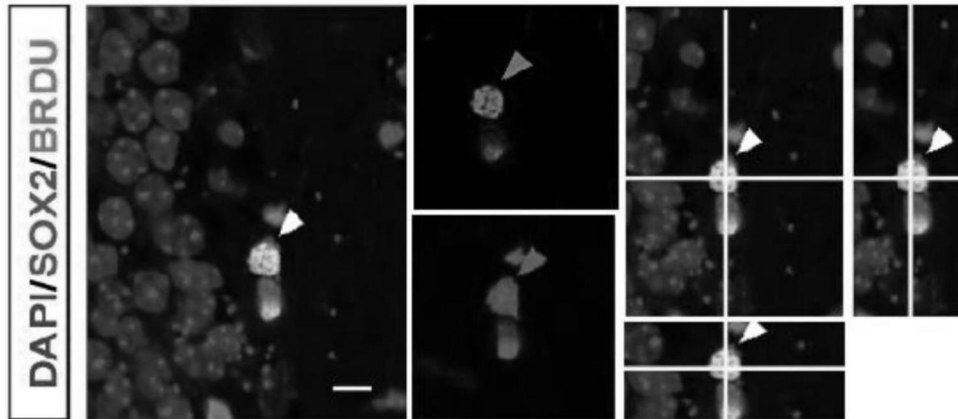


图1B

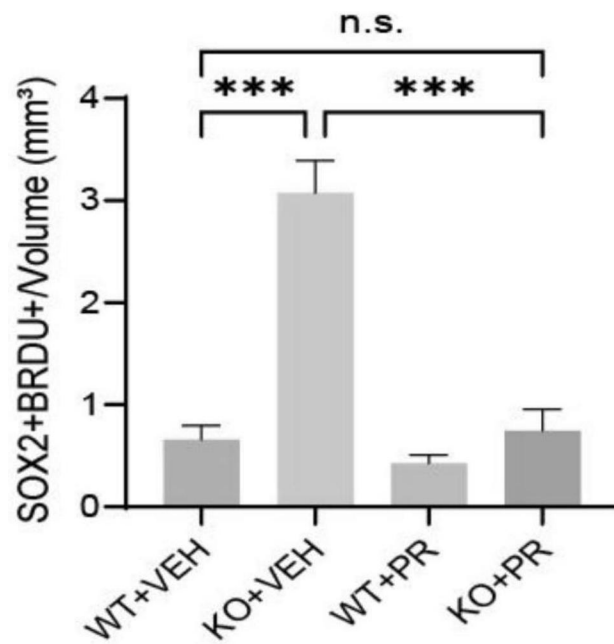


图1C

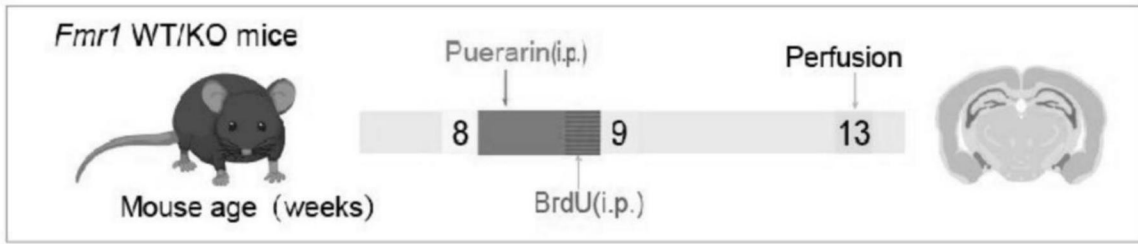


图1D

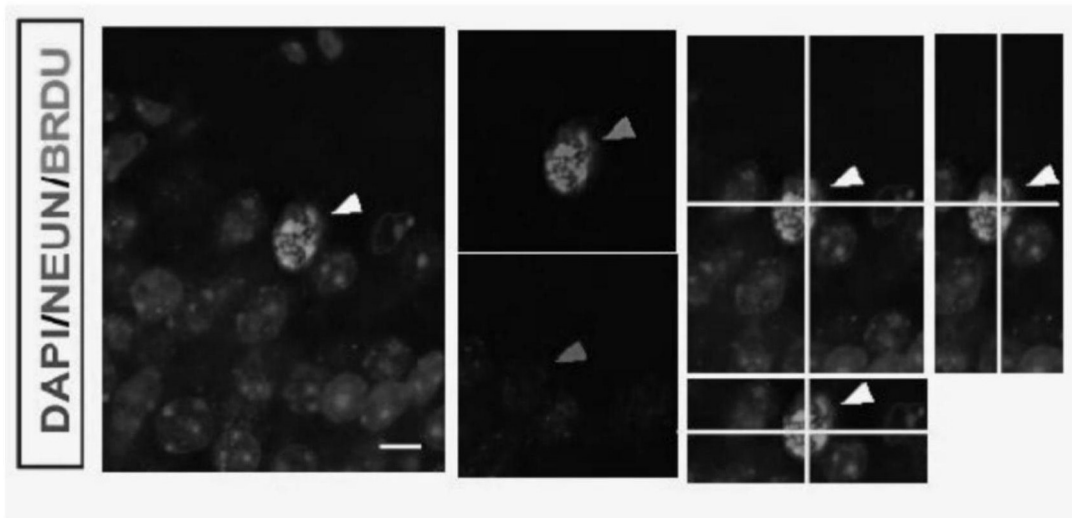


图1E

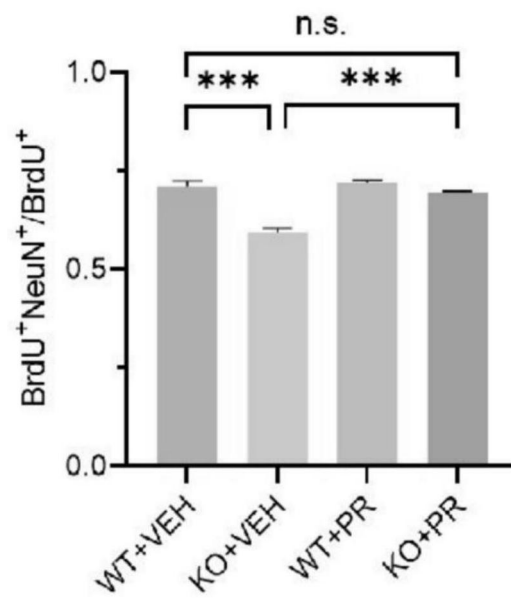


图1F

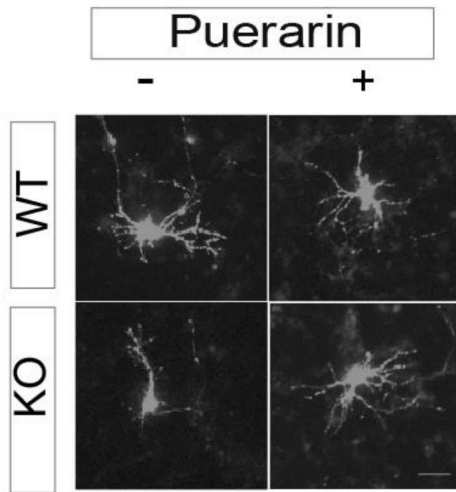


图2A

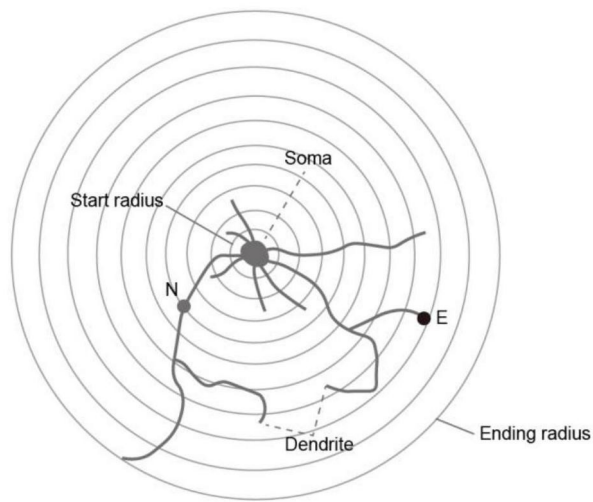


图2B

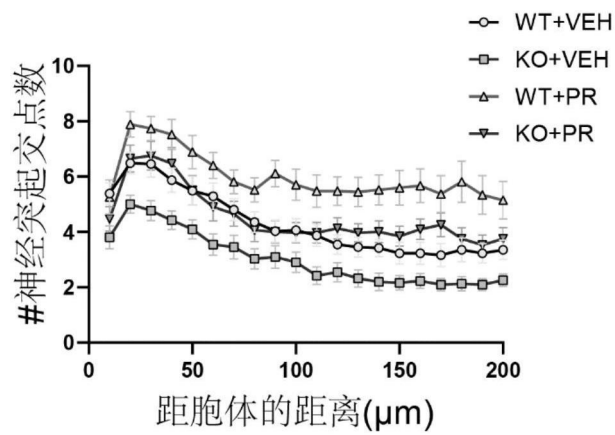


图2C

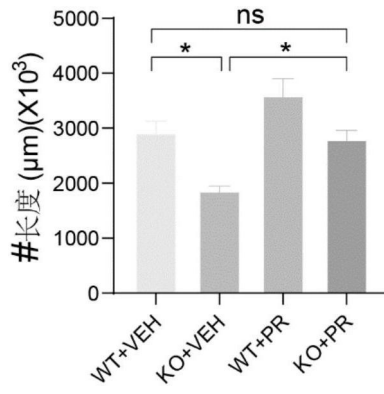


图2D

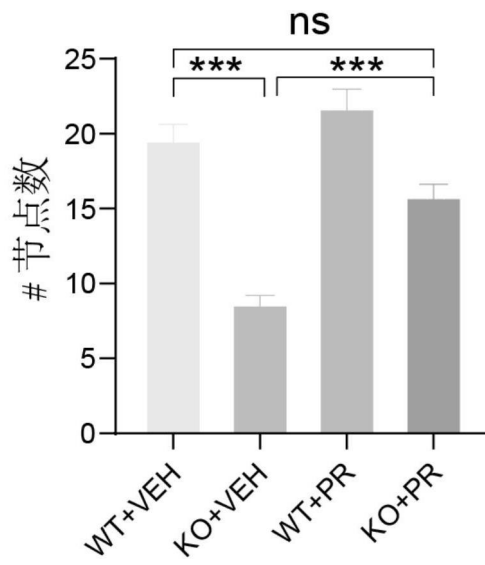


图2E

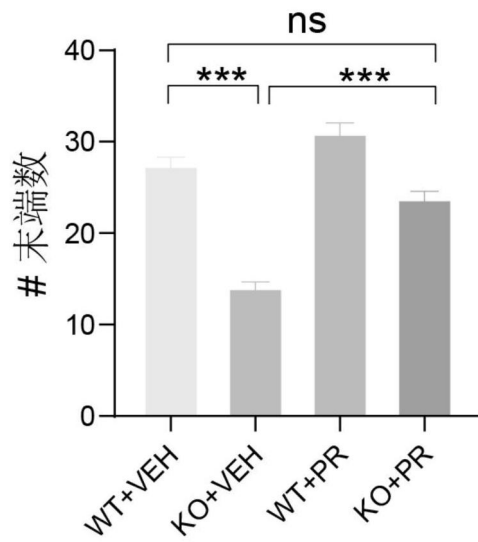


图2F

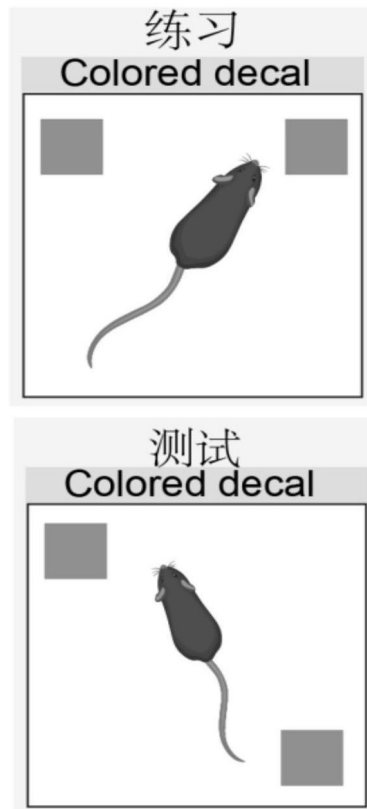


图3A

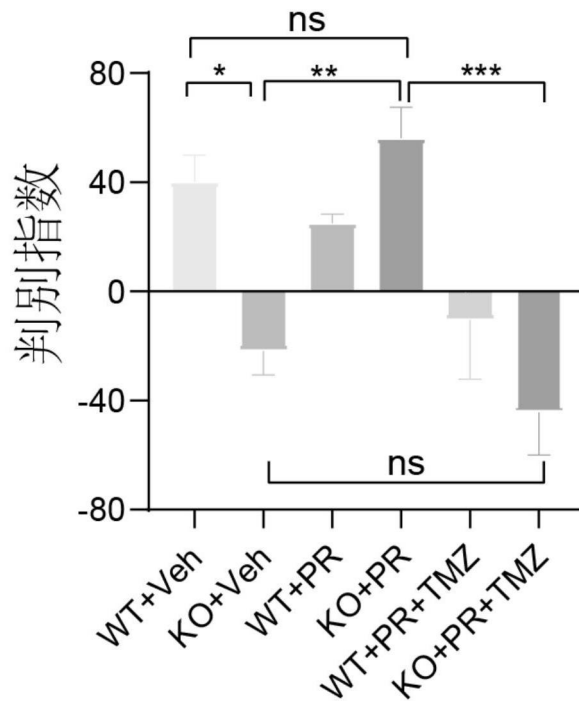


图3B

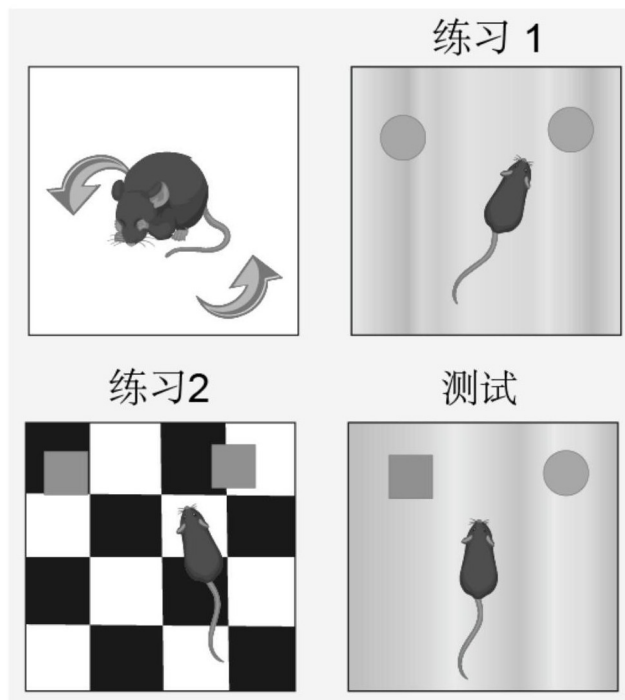


图4A

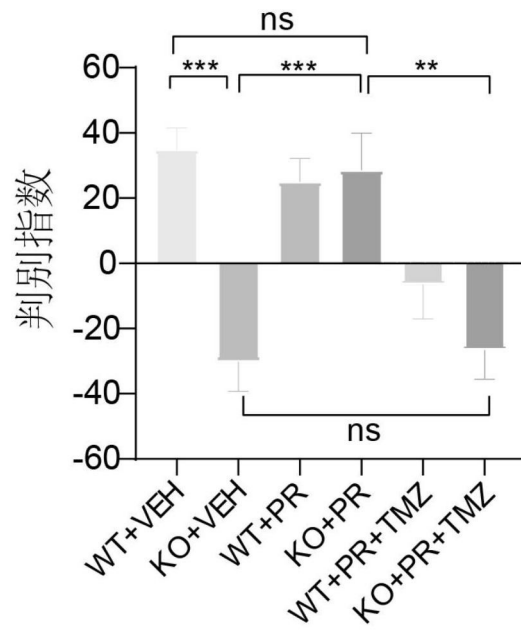


图4B



图5A

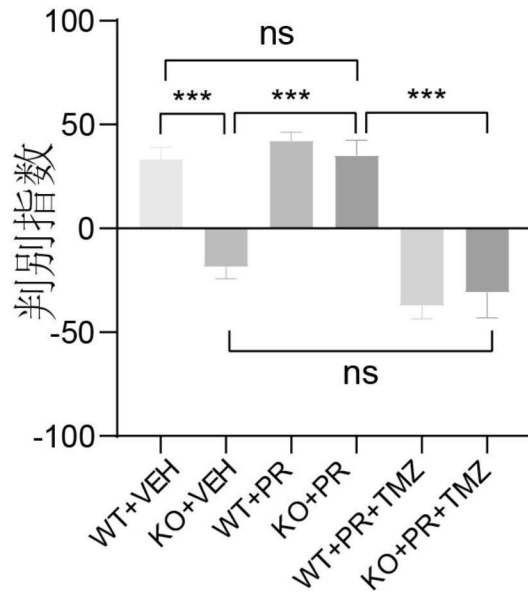


图6B