

本文引用:王来法,王雪琴,邓玲,等.小胶质细胞抑制剂 Pexidartinib 对小鼠遥远场景性恐惧记忆再巩固的影响

[J]. 新乡医学院学报, 2023, 40(12): 1107-1113. DOI: 10.7683/xxxyxb.2023.12.002.

【基础研究】

小胶质细胞抑制剂 Pexidartinib 对小鼠遥远场景性恐惧记忆再巩固的影响

王来法, 王雪琴, 邓玲, 张辉, 崔艳慧

(长沙医学院神经科学与行为学研究中心,湖南 长沙 410219)

摘要: 目的 探讨小胶质细胞抑制剂 Pexidartinib 对小鼠遥远场景性恐惧记忆再巩固的影响。方法 将 12 只健康 C57BL/6 雄性小鼠随机分为实验组和对照组, 每组 6 只。2 组小鼠均置于场景恐惧反应箱中进行场景性恐惧条件化训练, 构建场景性恐惧模型, 并记录每次电击后小鼠的僵直时间; 7 d 后, 实验组小鼠给予含 Pexidartinib 制剂 PLX3397 的鼠粮喂养, 对照组小鼠给予普通鼠粮喂养, 直至行为实验结果。场景性恐惧条件化训练后第 16 天, 将小鼠重新放入场景恐惧反应箱中进行恐惧记忆唤起, 不给予任何刺激呈现, 小鼠自由探索 5 min 后取出, 记录小鼠在此期间的僵直时间。在恐惧记忆唤起后 24 h, 将小鼠再次置于场景恐惧反应箱中, 使其自由探索 3 min, 并记录其在该时段所呈现的僵直时间。采用僵直时间百分比来表示小鼠的恐惧反应。行为实验结束后, 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉小鼠。2 组各取 3 只小鼠迅速开胸暴露心脏, 将灌注针自心尖插入左心室, 使用 4 ℃ 预冷的 40 g · L⁻¹ 多聚甲醛 (pH = 7.4) 进行灌注, 至小鼠全身不自主抽动消失、全身肢体僵硬为止, 取脑组织, 多聚甲醛溶液固定, 置于蔗糖溶液进行沉糖, 然后用组织包埋剂包埋, 采用免疫组织化学染色法检测 2 组小鼠海马中小胶质细胞数量。2 组其余小鼠迅速断头取脑组织, 冰上分离两侧海马组织, 采用 Western blot 法检测小鼠海马组织中磷酸化溴结构域蛋白 4 (pBRD4)、消皮素 D (GSDMD)、混合谱系激酶结构域样蛋白 (MLKL) 蛋白表达。**结果** 在场景性恐惧条件化训练阶段, 2 组小鼠的僵直时间百分比均随足底电击次数的增加而升高 ($P < 0.05$), 但 2 组小鼠第 1、2、3、4、5 次电击后的僵直时间百分比比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在唤起阶段, 2 组小鼠的僵直时间百分比比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在记忆检测阶段, 实验组小鼠的僵直时间百分比显著低于对照组 ($P < 0.05$)。实验组小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区小胶质细胞数量均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。实验组小鼠海马组织中 pBRD4、GSDMD 和 MLKL 蛋白相对表达量显著低于对照组 ($P < 0.05$)。**结论** 小胶质细胞抑制剂 Pexidartinib 能够损伤遥远场景性恐惧记忆的再巩固, 其作用机制可能与其抑制小胶质细胞的激活及下调 pBRD4、GSDMD 和 MLKL 的表达有关。

关键词: 小胶质细胞;Pexidartinib;遥远场景性恐惧;记忆再巩固;磷酸化溴结构域蛋白 4;消皮素 D;混合谱系激酶结构域样蛋白

中图分类号: R749 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2023)12-1107-07

Effect of microglia inhibitor Pexidartinib on reconsolidation of remote contextual fear memory in mice

WANG Laifa, WANG Xueqin, DENG Ling, ZHANG Hui, CUI Yanhui

(Neuroscience and Behavioral Research Center, Changsha Medical University, Changsha 410219, Hunan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of microglia inhibitor Pexidartinib on reconsolidation of remote contextual fear memory in mice. **Methods** Twelve healthy C57BL/6 male mice were randomly divided into experimental group and control group, with 6 mice in each group. The mice in the two groups underwent contextual fear conditioning training in the contextual fear response box to establish the contextual fear models, and the freezing time of mice after each footshock was recorded. After 7 days, the mice in the experimental group were fed with food containing Pexidartinib formulation PLX3397, while the mice in the control group were fed with regular food until the end of behavioral experiment. On the 16th day after contextual fear conditioning training, the mice were put back into the contextual fear box for recalling the fear memory without any stimulation. The mice were taken out after 5 minutes of free exploration, and the freezing time of mice during this period was recorded. At 24 h after the fear memory was recalled, the mice were again placed in the contextual fear box, allowing them to explore freely for 3 minutes, and the freezing time of mice during this period was recorded; the fear response of mice was indicated by the percentage of freezing time. After the behavioral experiment, the mice were anesthetized by intraperitoneal

DOI:10.7683/xxvxyxb.2023.12.002

收稿日期:2022-09-18

基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(编号:19C0220,19B069);长沙市自然科学基金资助项目(编号:kq2014117)。

作者简介:王来法(1990-),男,河南辉县人,硕士,助教,主要从事精神类疾病研究。

通信作者:崔艳慧(1987-),女,湖南长沙人,博士,特聘教授,主要从事精神类疾病研究;E-mail:cuiyanhui0110@163.com

injection of pentobarbital sodium, and three mice from the two groups were taken and rapidly opened the chest to expose their hearts, the perfusion needle was inserted into the left ventricle from the tip of heart and then was perfused with $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ paraformaldehyde ($\text{pH} = 7.4$) which precooled at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the involuntary convulsion disappeared and the body limbs of mice were stiff. The brain tissue of mice was taken and fixed with paraformaldehyde solution, and then placed in sucrose solution for dehydration. The brain tissue of mice was coated with tissue embedding agent. The number of microglial cells in the hippocampus of mice in the two groups was detected by immunohistochemistry. The remaining mice in the two groups were taken and quickly decapitated to obtain brain tissues, and the hippocampus tissues of two sides were separated on ice. The expressions of phosphorylated bromodomain-containing protein 4 (pBRD4), gasdermin D (GSDMD) and mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) in the hippocampus of mice were detected by Western blot. **Results** In the stage of contextual fear conditioning training, the percentage of freezing time of mice in two groups increased with the increase of the number of footshock ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the percentage of freezing time of mice after the first, second, third, fourth and fifth footshock between the two groups ($P > 0.05$). There was no significant difference in the percentage of freezing time of mice between the two groups during recall period ($P > 0.05$). The percentage of freezing time of mice in the experimental group was significantly lower than that in the control group at the phase of memory test ($P < 0.05$). The number of microglia in CA1, CA3 and DG regions of hippocampus of mice in the experimental group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The relative expressions of pBRD4, GSDMD and MLKL in hippocampus of mice in the experimental group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Microglia inhibitor Pexidartinib can injury the reconsolidation of remote contextual fear memory, which may be related to its inhibition of microglial cell activation and the down-regulation of the expressions of pBRD4, GSDMD and MLKL.

Key words: microglia; Pexidartinib; remote contextual fear; memory reconsolidation; phosphorylated bromodomain-containing protein 4; gasdermin D; mixed lineage kinase domain-like protein

创伤后应激障碍 (post-traumatic stress disorder, PTSD) 是指个体在经历重大自然灾害或生活创伤性事件之后形成的以强烈持久的恐惧反应为核心的一类精神疾病^[1-2]。PTSD 的主要症状是反复经历创伤、逃避、异常兴奋等情绪体验^[3]。正常人群中 PTSD 的终生患病率为 $6\% \sim 8\%$, 但在重大创伤事件如军事战斗、恐怖袭击、强奸等受害者中, $20\% \sim 30\%$ 的人会发展成 PTSD^[4]。暴露疗法是临床上治疗 PTSD 的主要方法, 但大多数患者治疗不彻底, 缓解后易复发。有研究发现, 已巩固的恐惧记忆经唤起激活后进入一种不稳定状态, 需经过再次巩固才能转变为稳定的记忆即记忆的再巩固过程^[5]; 在此期间可以对记忆进行更新、改写甚至破坏^[6]。已有研究表明, 采用普萘洛尔、茴香霉素等破坏记忆的再巩固, 可造成记忆的缺失, 从而达到治疗恐惧记忆的效果^[7-8]。因此, 了解恐惧记忆再巩固的过程将有助于 PTSD 的治疗。此外, 创伤记忆往往得不到及时的治疗, 大多数患者在接受治疗时记忆已处于远期^[9], 因此, 阐明遥远恐惧再巩固的机制对于 PTSD 的治疗更具有临床意义。研究发现, 神经炎症与 PTSD 的发生发展密切相关; 小胶质细胞被认为是神经炎症的主要参与者, 同时也是脑内应对 PTSD 主要的免疫细胞^[10-11]。Pexidartinib 为一种小胶质细胞抑制剂, 在恐惧记忆消退过程中具有重要作用^[12-13], 但其在记忆再巩固中的作用尚不清楚。研究显示, 溴结构域蛋白 4 (bromodomain-containing protein 4, BRD4)^[14]、消皮素 D (gasdermin D,

GSDMD)^[15] 和混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)^[16] 是调控炎症反应的重要分子。但小胶质细胞抑制剂 Pexidartinib 是否影响炎症相关分子 BRD4、GSDMD、MLKL 水平尚不明确。本研究应用巴甫洛夫恐惧条件化小鼠模型探讨小胶质细胞抑制剂 Pexidartinib 对小鼠远场景性恐惧记忆再巩固以及脑组织中 BRD4、GSDMD、MLKL 水平的影响, 旨在为 PTSD 的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8~10 周龄健康 C57BL/6 雄性小鼠 12 只, 体重 $20 \sim 25\text{ g}$, 购自湖南斯莱克景达有限公司, 随机将小鼠分为实验组和对照组, 每组 6 只, 饲养于安静、整洁且通风良好的环境中, 室温 $22 \sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $55\% \sim 60\%$, 12 h 光/暗循环, 自由摄食饮水, 适应 1 周后进行实验。

1.2 主要试剂与仪器

BRD4 多克隆抗体、磷酸化溴结构域蛋白 4 (phosphorylated bromodomain-containing protein 4, pBRD4) 多克隆抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体、GSDMD 多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, MLKL 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 小胶质细胞的标志物离子钙结合衔接分子 1 (ionized

calcium binding adapter 1,Iba1)单克隆抗体购自日本 Wako 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自美国 Jackson 公司,免疫组织化学三抗购自美国 Vectorlaboratories 公司,辣根过氧化物酶显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,蛋白质裂解液购自美国 Thermo Fisher 公司,Western blot 二抗购自美国 LI-COR Biosciences 公司,Pexidartinib 制剂 PLX3397 购自上海超岚化工科技中心(货号:1029044-16-3);组织包埋剂购自美国樱花公司;蔗糖购自上海国药集团化学试剂有限公司;0.22 μm 硝酸纤维素膜购自武汉博士德生物公司,蛋白定量试剂盒购自江苏康为世纪生物科技有限公司;FCT-100M型场景恐惧反应箱(230 mm × 230 mm × 300 mm,材质为不透明亚克力板,地板由 24 根直径为 4 mm 的铜杆构成,每 2 根铜杆中心的间距为 9 mm,通过导线与电刺激器相连给予电击)购自成都泰盟软件有限公司,CM1950 恒温冰冻切片机、DM6B 正置荧光显微镜成像系统购自德国 Leica 公司,双色红外激光成像系统购自美国 LI-COR Biosciences 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 鼠粮制备及使用

将 PLX3397 以 290 mg · kg⁻¹ 的剂量加入事先粉碎的普通鼠粮中,充分搅拌均匀,然后塑形烤干,作为实验组鼠粮,于遥远恐惧记忆唤起前 7 d 开始持续喂食实验组小鼠,直至行为实验结束。另将普通鼠粮粉碎后塑形烤干,作为对照组鼠粮,以保持与观察组鼠粮相同的口感,于遥远恐惧记忆唤起前 7 d 开始持续喂食对照组小鼠,直至行为实验结束。

1.3.2 小鼠场景性恐惧模型的制备及处理

(1)场景性恐惧条件化训练:将小鼠放入 FCT-100M 型场景恐惧反应箱中,使其自由探索 3 min 后进行电击(0.45 mA,持续 1 s),共给予 5 次电击,相邻 2 次电击之间间隔 90 s,最后 1 次电击结束 60 s 后将小鼠从反应箱中取出放回鼠笼,至此完成场景性恐惧模型的构建;记录每次电击后小鼠的僵直时间。(2)恐惧记忆唤起:在场景性恐惧条件化训练后第 16 天,将小鼠重新放入场景恐惧反应箱中,无任何刺激呈现,小鼠自由探索 5 min 后将其取出,记录小鼠在此期间的僵直时间^[17]。(3)记忆检测:在恐惧记忆唤起后 24 h,将小鼠再次置于场景恐惧反应箱中,使其自由探索 3 min,并记录其在该时间段所呈现的僵直时间^[18],采用僵直时间百分比来表示小鼠的恐惧反应,僵直时间百分比 = 小鼠僵直时间/记录总时间 × 100%。

1.3.3 小鼠脑切片及海马组织的制备

行为实验结束后,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉小鼠。2 组各取 3 只小鼠,迅速打开胸腔暴露心脏,将灌注针自心尖插入左心室,迅速剪破右心耳,打开三通阀,先用生理盐水快速冲灌 50 mL,待小鼠肝脏颜色变浅,右心耳中流出清亮的液体后,再使用 4 ℃ 预冷的 40 g · L⁻¹ 多聚甲醛(pH = 7.4)进行灌注,至小鼠全身不自主抽动消失、全身肢体僵硬为止,随后剥取出脑组织,将其浸泡于 40 g · L⁻¹ 多聚甲醛溶液进行固定,置于 4 ℃ 冰箱过夜,随后依次转移至用 0.01 mol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)配制的 150 g · L⁻¹ 蔗糖溶液、300 g · L⁻¹ 蔗糖溶液进行沉糖,然后用组织包埋剂包埋,保存于 -80 ℃ 冰箱待用。2 组其余小鼠迅速断头,快速剔除颅骨并取出脑,在冰上分离两侧海马组织,放入 EP 管中,迅速放入干冰盒内暂存,随后保存于 -80 ℃ 冰箱备用。

1.3.4 免疫组织化学(immunohistochemistry,IHC)染色法检测 2 组小鼠海马中小胶质细胞数量

取冷冻保存的包埋脑组织,使用恒冷冰冻切片机于 -20 ℃ 下连续冠状切片,片厚 25 μm,每只小鼠挑选 3 张海马组织切片,置于盛有 0.01 mol · L⁻¹ PBS 的 6 孔板中,置于摇床上,50 r · min⁻¹ 漂洗 3 次,每次 10 min;经体积分数 3% 过氧化氢漂洗 15 min,以去除内源性过氧化物酶,再次经 0.01 mol · L⁻¹ PBS 漂洗后采用牛血清白蛋白室温封闭 1 h,随后加入 Iba1 一抗(滴度为 1 : 1 000),4 ℃ 冰箱孵育过夜;次日漂洗后滴加辣根过氧化物酶标记的二抗(滴度为 1 : 200),室温孵育 2 h,漂洗后滴加三抗(滴度为 1 : 200),室温孵育 1 h;采用辣根过氧化物酶显色试剂盒进行染色,当可清晰观察到小胶质细胞的胞体和突起时停止染色,贴片晾干,经梯度乙醇脱水,二甲苯溶液透明后,滴加中性树脂封片,置于显微镜下观察并拍照,海马部位呈棕色、有胞体和突起表现者为小胶质细胞,应用 Image J 软件分析海马 CA1、CA3 和 DG 区小胶质细胞的数量。

1.3.5 Western blot 法检测小鼠海马组织中 pBRD4、GSDMD 和 MLKL 蛋白表达

取 2 组小鼠一侧海马组织,分别加入 80 μL 裂解液(蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合剂:组织蛋白提取液 = 1 : 100)匀浆 40 s,4 ℃、12 000 r · min⁻¹ 离心 20 min,取上清液,加蛋白定量试剂盒中 A 液和 B 液,37 ℃ 孵育 30 min 后测定上清液蛋白浓度,沸水浴 10 min 使蛋白充分变性,取 40 μg 蛋白用体积分数 9% 分离胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将分离的蛋白质电转移至 0.22 μm 硝酸纤

纤维素膜上,使用脱脂奶粉室温封闭 1 h,滴加 pBRD4 一抗(滴度为 1 : 1 000)、BRD4 一抗(滴度为 1 : 1 000)、GSDMD 一抗(滴度为 1 : 1 000)、MLKL 一抗(滴度为 1 : 1 000)、GAPDH 一抗(滴度为 1 : 4 000),4 ℃ 孵育过夜,使用荧光标记的二抗(滴度为 1 : 20 000)室温孵育 70 min;应用双色红外激光成像系统成像分析并采集图像,Image J 软件分析灰度值,以 GAPDH 为内参蛋白,GSDMD 和 MLKL 蛋白相对表达量以其蛋白灰度值与 GAPDH 蛋白灰度值的比值表示;pBRD4 蛋白相对表达量以 pBRD4 灰度值与总 BRD4(磷酸化和未磷酸化之和)灰度值的比值表示。

1.4 统计学处理

应用 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据统计与分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,恐惧条件化阶段的结果分析采用双因素重复测量方差分析,唤起和唤起后阶段的行为学结果以及分子检测的结果采用双尾 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组小鼠场景性恐惧不同阶段僵直时间百分比比较

在场景性恐惧条件化训练阶段,2 组小鼠的僵直时间百分比均随足底电击次数的增加而逐渐升高,第 2、3、4、5 次电击后的僵直时间百分比均高于第 1 次电击后,第 3、4、5 次电击后的僵直时间百分比均高于第 2 次电击后,第 4、5 次电击后的僵直时间百分比均高于第 3 次电击后,第 5 次电击后的僵直时间百分比均高于第 4 次电击后,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。2 组小鼠第 1、2、3、4、5 次电击后的僵直时间百分比比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。在唤起阶段,2 组小鼠的僵直时间百分比比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。在记忆检测阶段,实验组小鼠的僵直时间百分比显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 2 组小鼠场景性恐惧不同阶段僵直时间百分比比较
Tab.1 Comparison of the percentage of freezing time of mice in different stages of contextual fear between the two groups ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	场景性恐惧条件化训练阶段					唤起阶段	记忆检测阶段
		第 1 次电击后	第 2 次电击后	第 3 次电击后	第 4 次电击后	第 5 次电击后		
对照组	6	7.60 ± 7.75	21.11 ± 12.81 ^a	32.22 ± 17.87 ^{ab}	41.67 ± 16.28 ^{abc}	48.61 ± 16.07 ^{abcd}	76.33 ± 18.34	62.50 ± 26.81
实验组	6	12.96 ± 11.13	23.33 ± 7.13 ^a	39.07 ± 12.75 ^{ab}	46.67 ± 6.21 ^{abc}	51.30 ± 8.24 ^{abcd}	71.83 ± 14.08	28.24 ± 15.94
<i>t</i>		0.757	0.313	0.966	0.705	0.378	0.477	2.691
<i>P</i>		0.951	0.100	0.874	0.964	0.998	0.644	0.022

注:与第 1 次电击后比较^a $P < 0.05$;与第 2 次电击后比较^b $P < 0.05$;与第 3 次电击后比较^c $P < 0.05$;与第 4 次电击后比较^d $P < 0.05$ 。

2.2 2 组小鼠海马组织中 pBRD4、GSDMD 和 MLKL 蛋白相对表达量比较

实验组小鼠海马组织中 pBRD4、GSDMD 和 MLKL 蛋白相对表达量显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图 1 和表 2。

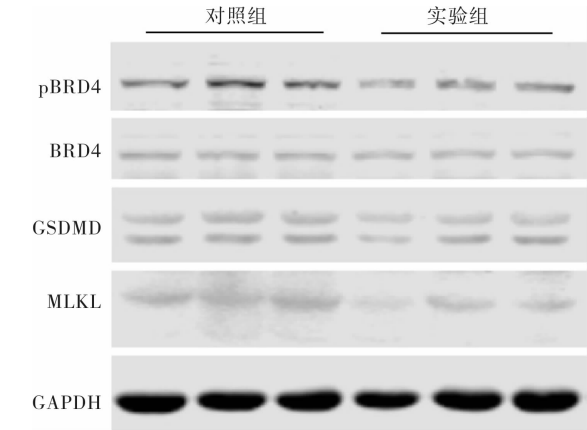


图 1 2 组小鼠海马组织中 pBRD4、GSDMD 和 MLKL 蛋白表达

Fig.1 Expressions of pBRD4, GSDMD and MLKL protein in hippocampus of mice in the two groups

表 2 2 组小鼠海马组织中 pBRD4、GSDMD 和 MLKL 蛋白相对表达量比较

Tab.2 Comparison of the relative expression levels of pBRD4, GSDMD and MLKL protein in hippocampus of mice between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	pBRD4	GSDMD	MLKL
对照组	3	1.56 ± 0.40	0.08 ± 0.02	0.17 ± 0.02
实验组	3	0.81 ± 0.23	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.02
<i>t</i>		2.865	2.936	7.544
<i>P</i>		0.046	0.043	0.002

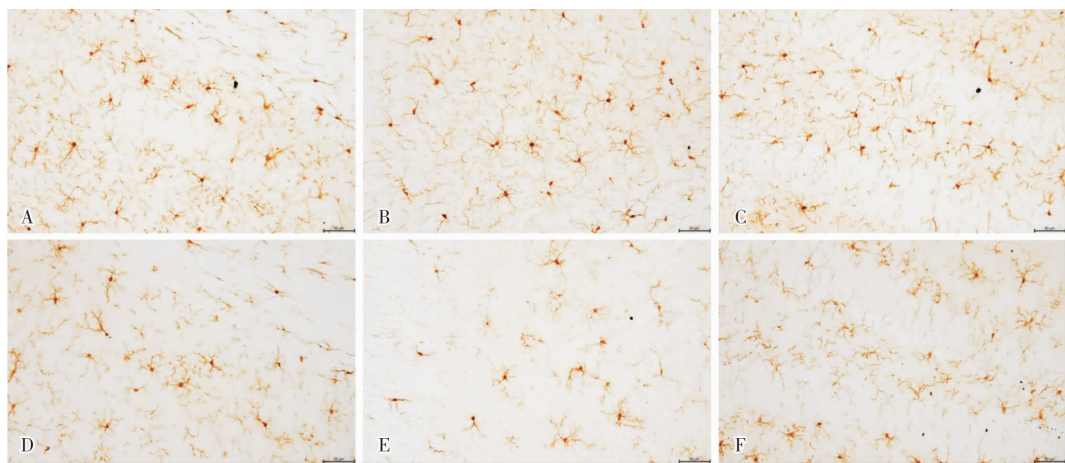
2.3 2 组小鼠海马 CA1、CA3、DG 区小胶质细胞数量比较

实验组小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区小胶质细胞数量均显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 3 和图 2。

表 3 2 组小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区小胶质细胞数量比较

Tab.3 Comparison of the microglial numbers in hippocampal CA1, CA3 and DG of mice between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	小胶质细胞数量		
		CA1 区	CA3 区	DG 区
对照组	3	138.10 ± 2.98	141.30 ± 15.91	159.90 ± 16.12
实验组	3	87.26 ± 6.86	90.84 ± 5.44	78.80 ± 7.40
<i>t</i>		11.760	5.199	7.918
<i>P</i>		0.000	0.007	0.001



A: 对照组小鼠海马 CA1 区小胶质细胞;B: 对照组小鼠海马 CA3 区小胶质细胞;C: 对照组小鼠海马 DG 区小胶质细胞;D: 实验组小鼠海马 CA1 区小胶质细胞;E: 实验组小鼠海马 CA3 区小胶质细胞;F: 实验组小鼠海马 DG 区小胶质细胞。

图 2 2 组小鼠海马 CA1、CA3、DG 区小胶质细胞 (IHC 染色, ×20)

Fig. 2 Microglia in hippocampal CA1, CA3 and DG regions of mice in the two groups (IHC staining, ×20)

3 讨论

PTSD 是与创伤经历有关的精神类疾病,对个人、家庭及社会发展可造成严重影响^[19]。然而,目前尚无治疗 PTSD 的有效方法。研究发现,已巩固的记忆被提取激活后会重新进入不稳定状态,需经再次巩固才能转变为稳定记忆,这个过程即为记忆再巩固^[20]。而被重新激活形成的不稳定记忆更容易被干扰和修改^[21]。因此,寻找能够干预、破坏被激活的遥远记忆再巩固过程以治疗恐惧记忆的有效方法,为临床 PTSD 患者的治疗提供潜在的靶点,具有重要的临床意义。

神经炎症与 PTSD 的发生发展密切相关,而小胶质细胞作为神经炎症的主要参与者和脑内应对 PTSD 的主要免疫细胞,其分泌的炎症细胞因子肿瘤坏死因子-α 可损伤恐惧记忆的消退,而小胶质细胞抑制剂米诺环素通过抑制小胶质细胞的激活可促进记忆的消退^[22]。也有研究表明,小胶质细胞抑制剂 PLX3397 治疗可促进小鼠的遥远线索性恐惧记忆的消退^[13]。此外,抑制或清除小胶质细胞可缓解小鼠 PTSD 相关行为^[11]。以上研究提示,小胶质细胞在恐惧记忆中具有重要作用。既往研究显示,多种蛋白分子参与调控小胶质细胞的激活,表观遗传调控在其中发挥着重要作用^[23]。pBRD4^[24]、GSDMD^[25]和 MLKL^[26]为调控炎症反应的重要因子,它们与小胶质细胞互相影响,小胶质细胞的激活会导致 pBRD4、GSDMD、MLKL 增加,引起细胞的焦亡、坏死等,从而引起炎症的级联放大;而 pBRD4、GSDMD、MLKL 的增加反过来又会进一步促进小胶质细胞产

生更多的炎症因子,进一步加重炎症反应^[27-29]。有研究显示,BRD4 作为一种表观遗传调控因子,可通过促进 GSDMD 介导的小胶质细胞焦亡诱发级联放大的炎症反应而加剧缺血性卒中病情^[30];此外,BRD4 还可通过调节 MLKL 的表达而促进细胞程序性坏死的过程^[31]。

PLX3397 是一种新型的口服小分子酪氨酸激酶抑制剂,对集落刺激因子 1 受体具有选择性抑制作用,同时也是一种小胶质细胞抑制剂^[32]。研究表明,PLX3397 与药物成瘾、癫痫^[33]、帕金森病^[34]、抑郁症^[35]等多种神经系统疾病有关。但 PLX3397 在 PTSD 治疗中的作用尚不明确。目前,PLX3397 已作为一种用于治疗癌症的药物进入了临床前期研究,如果能证明其对 PTSD 也有一定的治疗作用,则有可能将其用于 PTSD 的治疗,为 PTSD 的治疗带来希望,同时也可减轻 PTSD 患者的家庭和社会经济负担。有研究表明,在对正常小鼠进行线索性恐惧条件化前 5 d,连续给予 BRD4 蛋白抑制剂 JQ1 腹腔注射,损伤了小鼠遥远线索性恐惧记忆的消退^[36];同时,JQ1 可通过抑制神经炎症缓解大鼠的 PTSD 样行为和恐惧记忆^[37]。此外,小胶质细胞焦亡和坏死性凋亡可诱发级联放大的炎症反应,加重疾病病情^[28-29];GSDMD 和 MLKL 分别是细胞焦亡和坏死性凋亡的关键因子^[38-39]。基于此,推测小胶质细胞抑制剂 PLX3397 也有可能影响 pBRD4、GSDMD 和 MLKL 的表达,故本研究采用场景性恐惧条件化小鼠模型来探讨小胶质细胞抑制剂 PLX3397 对遥远场景性恐惧记忆再巩固的影响及可能机制,以期作为 PTSD 的药物治疗提供参考。

“近期记忆”通常被定义为编码后 24 h 之内的记忆^[40];14 d 或更久之前编码的记忆被定义为“遥远记忆”^[41]。故本研究在恐惧条件化第 16 天进行遥远恐惧记忆的唤起。本研究结果显示,在场景性恐惧条件化训练阶段,2 组小鼠的僵直时间百分比均随足底电击次数的增加而逐渐升高,但 2 组小鼠第 1、2、3、4、5 次电击后的僵直时间百分比比较差异无统计学意义,提示 2 组小鼠模型构建成功;而且 2 组小鼠在唤起阶段的僵直时间百分比比较差异无统计学意义,提示 PLX3397 干预并不影响小鼠遥远恐惧记忆的激活;在恐惧记忆唤起后 24 h 进行记忆检测发现,实验组小鼠的僵直时间百分比显著低于对照组,提示 PLX3397 干预损伤了小鼠遥远恐惧记忆的再巩固。

研究发现,抑制小胶质细胞的激活可促进恐惧记忆消退^[13];抑制或清除小胶质细胞可缓解小鼠 PTSD 相关行为^[11]。本研究结果显示,实验组小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区小胶质细胞的数量均显著低于对照组;这一结果与 PLX3397 作为一种小胶质细胞抑制剂的药理学作用是一致的^[42];结合记忆检测结果,推测 PLX3397 干预对小鼠遥远恐惧记忆再巩固的损伤作用可能是通过抑制小胶质细胞的激活来实现的。另外,ZHOU 等^[30]、SONG 等^[43]研究显示,小胶质细胞抑制剂米诺环素可抑制调控炎症反应的重要分子 pBRD4、GSDMD 和 MLKL 的表达。本研究使用小胶质细胞抑制剂 PLX3397 干预后,实验组小鼠海马组织中 pBRD4、GSDMD 和 MLKL 蛋白相对表达量显著低于对照组,这一结果与 ZHOU 等^[30]、SONG 等^[43]的研究结果一致,提示 PLX3397 可能通过抑制 pBRD4、GSDMD 和 MLKL 的表达来损伤遥远场景性恐惧记忆的再巩固。

4 结论

小胶质细胞在恐惧记忆的获得、消退中具有重要作用,但其在遥远场景性恐惧记忆再巩固中的作用尚不清楚。小胶质细胞抑制剂 Pexidartinib 能够损伤遥远场景性恐惧记忆的再巩固,其作用可能与其抑制小胶质细胞的激活及下调 pBRD4、GSDMD 和 MLKL 的表达有关。但 Pexidartinib 的具体作用机制以及小胶质细胞是否与 pBRD4、GSDMD 和 MLKL 存在共表达等有待进一步探索。

参考文献:

[1] AL ABED A S, DUCOURNEAU E G, BOUARAB C, et al. Preven-

ting and treating PTSD-like memory by trauma contextualization [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1) : 4220.

[2] JOHNSON L R, MCGUIRE J, LAZARUS R, et al. Pavlovian fear memory circuits and phenotype models of PTSD [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62 (2) : 638-646.

[3] SUMNER J A, NISHIMI K M, KOENEN K C, et al. Posttraumatic stress disorder and inflammation: untangling issues of bidirectionality [J]. *Biol Psychiatry*, 2020, 87 (10) : 885-897.

[4] DUCOURNEAU E G, GUETTE C, PERROT D, et al. Brexpiprazole blocks post-traumatic stress disorder-like memory while promoting normal fear memory [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26 (7) : 3018-3033.

[5] MURKAR A, KENT P, CAYER C, et al. Gastrin-releasing peptide attenuates fear memory reconsolidation [J]. *Behav Brain Res*, 2018, 347 : 255-262.

[6] HUANG B, ZHU H, ZHOU Y, et al. Unconditioned- and conditioned- stimuli induce differential memory reconsolidation and β -AR-dependent CREB activation [J]. *Front Neural Circuits*, 2017, 11 : 53.

[7] ALI VAFAEI A, NAZARI M, OMOUMI S, et al. Corticosterone injection into the basolateral amygdala before and after memory reactivation impairs the subsequent expression of fear memory in rats: an interaction of glucocorticoids and β -adrenoceptors [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2023, 205 : 107829.

[8] ARIHARA Y, FUKUYAMA Y, KIDA S. Consolidation, reconsolidation, and extinction of contextual fear memory depend on de novo protein synthesis in the locus coeruleus [J]. *Brain Res Bull*, 2023, 202 : 110746.

[9] GRÄFF J, JOSEPH N F, HORN M E, et al. Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories [J]. *Cell*, 2014, 156 (1/2) : 261-276.

[10] ENOMOTO S, KATO T A. Involvement of microglia in disturbed fear memory regulation: possible microglial contribution to the pathophysiology of posttraumatic stress disorder [J]. *Neurochem Int*, 2021, 142 : 104921.

[11] LI S, LIAO Y, DONG Y, et al. Microglial deletion and inhibition alleviate behavior of post-traumatic stress disorder in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18 (1) : 7.

[12] PICARD K, CORSI G, DECOEUR F, et al. Microglial homeostasis disruption modulates non-rapid eye movement sleep duration and neuronal activity in adult female mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2023, 107 : 153-164.

[13] CUI X, ZHOU S, XIA G, et al. A multispecies probiotic accelerates fear extinction and inhibits relapse in mice: role of microglia [J]. *Neuropharmacology*, 2021, 193 : 108613.

[14] PÉREZ-CABELLO J A, SILVERA-CARRASCO L, FRANCO J M, et al. MAPK/MAK/MRK overlapping kinase (MOK) controls microglial inflammatory/type-I IFN responses via Brd4 and is involved in ALS [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120 (28) : e2302143120.

[15] CHALLA N V D, CHEN S, YUAN H, et al. GSDMD gene knockout alleviates hyperoxia-induced hippocampal brain injury in neonatal mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20 (1) : 205.

- [16] LU X,ZHAN L,CHAI G,*et al.* Hypoxic preconditioning attenuates neuroinflammation via inhibiting NF- κ B/NLRP3 axis mediated by p-MLKL after transient global cerebral ischemia[J]. *Mol Neurobiol*,2023,Epub ahead of print.
- [17] ZHANG W J,HUANG Y Q,FU A,*et al.* The retrotransposition of LI is involved in the reconsolidation of contextual fear memory in mice[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*,2021,20(3):273-284.
- [18] UWAYA A,LEE H,PARK J,*et al.* Acute immobilization stress following contextual fear conditioning reduces fear memory: timing is essential[J]. *Behav Brain Funct*,2016,12(1):8.
- [19] RAUT S B,MARATHE P A,VAN EIJK L,*et al.* Diverse therapeutic developments for post-traumatic stress disorder (PTSD) indicate common mechanisms of memory modulation[J]. *Pharmacol Ther*,2022,239:108195.
- [20] NADER K,SCHAFE G E,LE DOUX J E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval[J]. *Nature*,2000,406(6797):722-726.
- [21] GRELLA S L,FORTIN A H,RUESCH E,*et al.* Reactivating hippocampal-mediated memories during reconsolidation to disrupt fear[J]. *Nat Commun*,2022,13(1):4733.
- [22] YU Z,FUKUSHIMA H,ONO C,*et al.* Microglial production of TNF- α is a key element of sustained fear memory[J]. *Brain Behav Immun*,2017,59:313-321.
- [23] MAURYA S K,GUPTA S,MISHRA R. Transcriptional and epigenetic regulation of microglia in maintenance of brain homeostasis and neurodegeneration[J]. *Front Mol Neurosci*,2023,15:1072046.
- [24] DEY A,YANG W,GEGONNE A,*et al.* BRD4 directs hematopoietic stem cell development and modulates macrophage inflammatory responses[J]. *EMBO J*,2019,38(7):e100293.
- [25] HOU J,HSU J M,HUNG M C. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis in inflammation and antitumor immunity[J]. *Mol Cell*,2021,81(22):4579-4590.
- [26] PASPARAKIS M,VANDENABEELE P. Necroptosis and its role in inflammation[J]. *Nature*,2015,517(7534):311-320.
- [27] WANG J,CHEN J,JIN H,*et al.* BRD4 inhibition attenuates inflammatory response in microglia and facilitates recovery after spinal cord injury in rats[J]. *J Cell Mol Med*,2019,23(5):3214-3223.
- [28] GU L,SUN M,LI R,*et al.* Didymin suppresses microglia pyroptosis and neuroinflammation through the asc/caspase-1/GSDMD pathway following experimental intracerebral hemorrhage[J]. *Front Immunol*,2022,13:810582.
- [29] HE C,LIU Y,HUANG Z,*et al.* A specific RIP3⁺ subpopulation of microglia promotes retinopathy through a hypoxia-triggered necroptotic mechanism[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2021,118(11):e2023290118.
- [30] ZHOU Y,GU Y,LIU J. BRD4 suppression alleviates cerebral ischemia-induced brain injury by blocking glial activation via the inhibition of inflammatory response and pyroptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2019,519(3):481-488.
- [31] XIONG Y,LI L,ZHANG L,*et al.* The bromodomain protein BRD4 positively regulates necroptosis via modulating MLKL expression[J]. *Cell Death Differ*,2019,26(10):1929-1941.
- [32] WANG Y,WERNERSBACH I,STREHLE J,*et al.* Early posttraumatic CSF1R inhibition via PLX3397 leads to time- and sex-dependent effects on inflammation and neuronal maintenance after traumatic brain injury in mice[J]. *Brain Behav Immun*,2022,106:49-66.
- [33] WYATT-JOHNSON S K,SOMMER A L,SHIM K Y,*et al.* Suppression of microgliosis with the colony-stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 does not attenuate memory defects during epileptogenesis in the rat[J]. *Front Neurol*,2021,12:651096.
- [34] ZHANG D,LI S,HOU L,*et al.* Microglial activation contributes to cognitive impairments in rotenone-induced mouse Parkinson's disease model[J]. *J Neuroinflammation*,2021,18(1):4.
- [35] WANG L,WANG X,DENG L,*et al.* Pexidartinib (PLX3397) through restoring hippocampal synaptic plasticity ameliorates social isolation-induced mood disorders[J]. *Int Immunopharmacol*,2022,113(Pt B):109436.
- [36] DUAN Q,HUANG F L,LI S J,*et al.* BET proteins inhibitor JQ-1 impaired the extinction of remote auditory fear memory: an effect mediated by insulin like growth factor 2[J]. *Neuropharmacology*,2020,177:108255.
- [37] WANG W,WANG R,JIANG Z,*et al.* Inhibiting Brd4 alleviated PTSD-like behaviors and fear memory through regulating immediate early genes expression and neuroinflammation in rats[J]. *J Neurochem*,2021,158(4):912-927.
- [38] SHI J,ZHAO Y,WANG K,*et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. *Nature*,2015,526(7575):660-665.
- [39] MARTENS S,BRIDELANCE J,ROELANDT R,*et al.* MLKL in cancer: more than a necroptosis regulator[J]. *Cell Death Differ*,2021,28(6):1757-1772.
- [40] GERSTNER J R,YIN J C P. Circadian rhythms and memory formation[J]. *Nat Rev Neurosci*,2010,11(8):577-588.
- [41] KITAMURA T,OGAWA S K,ROY D S,*et al.* Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory[J]. *Science*,2017,356(6333):73-78.
- [42] COLEMAN L G J,ZOU J,CREWS F T. Microglial depletion and repopulation in brain slice culture normalizes sensitized proinflammatory signaling[J]. *J Neuroinflammation*,2020,17(1):27.
- [43] SONG W,ZHU R,GAO W,*et al.* Blue light induces RPE cell necroptosis, which can be inhibited by minocycline[J]. *Front Med*,2022,9:831463.

(本文编辑:李胜利)