

中国实验动物学会实验动物模型研发报告

实验动物模型名称（中、英文）	Nec14基因敲除小鼠抑郁和焦虑共病模型（Comorbidity Model of Depression and Anxiety in Nec14 Knockout Mice）		
申请人（单位）名称	彭小忠（中国医学科学院基础医学研究所、中国医学科学院医学实验动物研究所）、冉坤念（中国医学科学院基础医学研究所）、韩为（中国医学科学院基础医学研究所）		
研究机构（人）地址	北京市东城区东单三条五号		
研究机构（人）电话	010-69156434		
主要参与人员及单位	彭小忠（中国医学科学院基础医学研究所、中国医学科学院医学实验动物研究所）、冉坤念（中国医学科学院基础医学研究所）、韩为（中国医学科学院基础医学研究所）、刘梟（中国医学科学院基础医学研究所）、李博洋（中国医学科学院基础医学研究所）、王琳（中国医学科学院基础医学研究所）、胡耕（中国医学科学院基础医学研究所）、舒鹏程（中国医学科学院基础医学研究所）、邱猛生（杭州师范大学）、强伯勤（中国医学科学院基础医学研究所）、阴彬（中国医学科学院基础医学研究所）		
研究起止日期	2017年 10 月 至 2023 年 07 月		
原始资料的保存地点	中国医学科学院基础医学研究所		
联系人姓名	彭小忠 韩为	电话： 010-69156434	邮箱： pengxiaozhong@pumc.edu.cn hanwei.jx2002@163.com
一、摘要（简述研究的目的是和意义，主要造模方法，与临床的相似度及评价方法，概述模型的创新点和应用价值） Nec14（Nectin-like 4）是Nec1（Nectin-like）家族成员，可参与髓鞘结构及突触结构的形成。造模方法：我们利用基因打靶的方式构建了Nec14全身敲除小鼠模型。研究目的：该模型的建立首先可用于探究Nec14的缺失对小鼠行为的影响，特别是在精神类疾病如抑郁和焦虑中的作用；其次是用于探究Nec14在中枢神经系统中的功能。实验方法与结果：我们通过糖水偏好实验、强迫游泳实验、新环境抑制摄食实验、O迷宫实验和旷场实验等行为学测试，发现Nec14基因敲除小鼠模型表现出抑郁样和焦虑样行为。此外，酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）结果显示该模型			

小鼠的多个脑区中五羟色胺（5-hydroxytryptamine, 5-HT）浓度降低，在透射电镜下则观察到该模型脑组织的皮质突触结构发生改变。此外，在Nec14全敲小鼠皮质神经元中特异表达Nec14后能部分回复其行为学表现。以上研究结果表明Nec14可能在抑郁和焦虑障碍中发挥作用，影响小鼠神经递质的释放和突触结构。研究意义：已有结果表明该模型表现出抑郁样和焦虑样行为和类似于抑郁和焦虑障碍的生化与病理指标，为后期研究抑郁症中与突触可塑性相关的机制提供了实验依据，也为Nec14在抑郁症中的进一步功能探索提供了研究载体，为抑郁症的治疗提供了新的潜在靶点。

二、研究报告正文

1、动物模型的命名

中文：Nec14 基因敲除小鼠抑郁和焦虑共病模型

英文：Comorbidity Model of Depression and Anxiety in Nec14 Knockout Mice

2、研究背景

研究背景：

抑郁症是常见的精神疾病之一，患者常表现出持续性的心境低落、兴趣减退、睡眠障碍、食欲紊乱和社交恐惧等临床症状，可诱发肥胖、心血管疾病等并发症，对患者的身心健康及生活质量构成了严重威胁。流行病学调查显示，目前我国抑郁症患者超过 9500 万，抑郁症终身患病率为 6.9%，年发病率为 3.6%⁽¹⁾。抑郁症也是全球范围内主要致残性疾病之一，据世界卫生组织统计，全世界有超过 3 亿抑郁症患者，且全球每年有近 80 万人因抑郁症自杀身亡⁽²⁾。抑郁症占全球非致命性疾病总负担的 10%，并在全球范围内造成的残疾损失年数超过其他疾病⁽³⁾；预计到 2030 年，其造成的经济负担将升至世界首位⁽⁴⁾，给人类的健康和财产均造成极大损失。因此，抑郁症的防治目前是我国乃至世界公共卫生的重要课题之一。虽然针对抑郁症已经开展了大量深入研究，但仍然无法找到其确切的发病机制。

抑郁症和焦虑症高度共病。焦虑症也是世界上最常见的精神障碍之一，症状包括焦虑、恐惧、紧张和担忧等。常见的焦虑障碍包括社交焦虑障碍、广泛性焦虑症、惊恐障碍和广场恐惧症等。COVID-19 大流行使全球焦虑症的患病率急剧增加了 25%⁽⁵⁾。焦虑症影响了超过 3 亿人^(6,7)，是仅次于抑郁症的第二大常见精神疾病⁽⁶⁾。一项全球调查报告显示，45.7%的终生重度抑郁症患者终生患有一种或多种焦虑症⁽⁸⁾。而焦虑症通常也与较高的抑郁症发病率有关⁽⁹⁾，例如社交焦虑障碍患者抑郁症的终生患病率为 20%至 70%，惊恐障碍患者为 50%，广泛性焦虑障碍患者为 43%⁽¹⁰⁾。抑郁症的序贯治疗研究（Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression，STAR*D）的数据表明，抑郁和焦虑在症状水平存在合并症，因为 53% 的重度抑郁症患者有明显的焦虑，并被认为患有焦虑性抑郁症⁽¹¹⁾。

焦虑症和抑郁症有中等遗传性（约 40%），且存在共同遗传风险⁽¹²⁾。而与焦虑和抑郁发展相关的常见非遗传风险因素包括早期生活逆境，以及养育方式和当前的压力暴露等。在神经回路水平上，介导情绪调节的前额叶-边缘通路的改变在焦虑和抑郁症中也都很常见^(13,14)。在涉及情绪调节⁽¹⁴⁾、执行

功能⁽¹⁵⁾和认知控制⁽¹⁶⁾的回路中，各种精神疾病（包括焦虑和重度抑郁症）中有共享的大脑结构和功能改变。尤其是中重度的抑郁症，脑部病变较为明显，其主要表现为：第一个是大脑里面的神经递质，包括五羟色胺（5-HT）、去甲肾上腺素（NA）、多巴胺（DA）等神经递质浓度下降⁽¹⁷⁾；第二个改变就是出现脑萎缩，尤其是大脑和海马的萎缩比较明显^(18, 19)。

Nec14 是 Nec1 家族的成员，它表达广泛，遍及人体脑、脾、肾、前列腺、睾丸、膀胱等组织，其中脑组织表达量最高。目前研究发现，Nec14 与 4.1G 蛋白相互作用的缺失会引起男性不育症⁽²⁰⁾。Nec14 作为肿瘤抑制因子，还可以抑制 ErbB2/ ErbB3 信号通路和半桥粒的分解，其表达水平与胰腺导管腺癌和乳房浸润导管癌恶性进展相关⁽²¹⁾。此外，Nec14 可与 Nec11 或 Nec13 形成异源二聚体，参与神经系统中的重要事件^(22, 23)。在外周神经系统中，神经元上 Nec11、Nec12 和 Nec13 高表达，而 Nec14 在施旺细胞近轴突侧特异性高表达，Nec14 与 Nec1 家族其他成员的相互作用可以调控髓鞘发生，进而影响髓鞘结构⁽²⁴⁾。在髓鞘之外，目前对 Nec14 在神经系统中功能和机制还未有更深入研究，但参考同家族蛋白成员^(25, 26)，可推测 Nec14 在中枢神经系统中具有重要功能。突触连接是神经环路的结构基础，是神经系统发挥功能的重要单位，其与抑郁症的发生发展密切相关。Nec1 家族蛋白因与 Nectin 家族有类似的结构而得名，该家族也被称为细胞黏附分子（cellular adhesion molecules, CADMs），隶属于免疫球蛋白超家族，能够参与突触的形成、轴突导向、神经细胞迁移等，在神经系统功能研究中备受关注⁽²²⁾。Nec14 作为细胞黏附分子中的一员，其在突触中的功能和在精神类疾病如抑郁症和焦虑症中的作用同样值得探究。

研究目的：

本研究通过基因打靶的方式构建了 Nec14 全身敲除小鼠。该模型一方面可用于探究 Nec14 的缺失对小鼠行为的影响，特别是在抑郁样行为和焦虑样行为中的作用；其次是用于探究 Nec14 在中枢神经系统中的功能。我们通过糖水偏好实验、强迫游泳实验、新环境抑制摄食实验、O 迷宫实验和旷场实验等行为学测试，发现 Nec14 基因敲除小鼠模型表现出抑郁样和焦虑样行为。此外，酶联免疫吸附试验结果显示该模型小鼠的多个脑区中五羟色胺浓度降低，并且在电镜下观察到该模型脑组织的皮质突触结构发生改变。此外，Nec14 全敲小鼠皮质神经元中特异表达 Nec14 后能部分回复其行为学表现。以上研究结果表明 Nec14 可能在抑郁症和焦虑症中发挥作用，影响小鼠神经递质的释放和突触结构。

研究意义：

已有结果表明该模型表现出抑郁样和焦虑样行为，以及类似于抑郁症和焦虑症的生化与病理指标，为后期研究抑郁症和焦虑症中与突触可塑性相关的机制提供了实验依据，也为 Nec14 在抑郁症中的进一步功能探索提供了研究载体，为抑郁症和焦虑障碍的治疗提供了新的潜在靶点。

参考文献：

1. Huang, Y., Wang, Y., Wang, H., Liu, Z., Yu, X., Yan, J., Yu, Y., Kou, C., Xu, X., Lu, J., Wang, Z., He, S., Xu, Y., He, Y., Li, T., Guo, W., Tian, H., Xu, G., Xu, X., Ma, Y., Wang, L., Wang, L., Yan, Y., Wang, B., Xiao, S., Zhou, L., Li, L., Tan, L., Zhang, T., Ma, C., Li, Q., Ding, H., Geng, H., Jia, F., Shi, J., Wang, S., Zhang, N., Du, X., Du, X., and Wu, Y. (2019) Prevalence of mental disorders in China: a cross-sectional epidemiological study. *Lancet Psychiatry* **6**, 211-224

2. Organization, W. H. (2017) World Health Organization. *Geneva: World Health Organization*, 1-21
3. Organization, W. H. (2016) Out of the shadows: Making mental health a global development priority. *Geneva: World Health Organization*
4. Friedrich, M. J. (2017) Depression Is the Leading Cause of Disability Around the World. *JAMA* **317**, 1517
5. Organization, W. H. (2022) Mental Health and COVID-19: Early evidence of the pandemic's impact: Scientific brief.
6. (2022) Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Psychiatry* **9**, 137-150
7. (2024) Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Results. Seattle, WA: IHME, University of Washington <https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>
8. Kessler, R. C., Sampson, N. A., Berglund, P., Gruber, M. J., Al-Hamzawi, A., Andrade, L., Bunting, B., Demyttenaere, K., Florescu, S., de Girolamo, G., Gureje, O., He, Y., Hu, C., Huang, Y., Karam, E., Kovess-Masfety, V., Lee, S., Levinson, D., Medina Mora, M. E., Moskalewicz, J., Nakamura, Y., Navarro-Mateu, F., Browne, M. A. O., Piazza, M., Posada-Villa, J., Slade, T., Ten Have, M., Torres, Y., Vilagut, G., Xavier, M., Zarkov, Z., Shahly, V., and Wilcox, M. A. (2015) Anxious and non-anxious major depressive disorder in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *Epidemiol Psychiatr Sci* **24**, 210-226
9. Herr, N. R., Williams, J. W., Benjamin, S., and McDuffie, J. (2014) Does this patient have generalized anxiety or panic disorder?: The Rational Clinical Examination systematic review. *JAMA* **312**, 78-84
10. Kalin, N. H. (2020) The Critical Relationship Between Anxiety and Depression. *Am J Psychiatry* **177**, 365-367
11. Fava, M., Alpert, J. E., Carmin, C. N., Wisniewski, S. R., Trivedi, M. H., Biggs, M. M., Shores-Wilson, K., Morgan, D., Schwartz, T., Balasubramani, G. K., and Rush, A. J. (2004) Clinical correlates and symptom patterns of anxious depression among patients with major depressive disorder in STAR*D. *Psychol Med* **34**, 1299-1308
12. Hettema, J. M. (2008) What is the genetic relationship between anxiety and depression? *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **148C**, 140-146
13. Kovner, R., Oler, J. A., and Kalin, N. H. (2019) Cortico-Limbic Interactions Mediate Adaptive and Maladaptive Responses Relevant to Psychopathology. *Am J Psychiatry* **176**, 987-999
14. Etkin, A., and Schatzberg, A. F. (2011) Common abnormalities and disorder-specific compensation during implicit regulation of emotional processing in generalized anxiety and major depressive disorders. *Am J Psychiatry* **168**, 968-978
15. Goodkind, M., Eickhoff, S. B., Oathes, D. J., Jiang, Y., Chang, A., Jones-Hagata, L. B., Ortega, B. N., Zaiko, Y. V., Roach, E. L., Korgaonkar, M. S., Grieve, S. M., Galatzer-Levy, I., Fox, P. T., and Etkin, A. (2015) Identification of a common neurobiological substrate for mental illness. *JAMA Psychiatry* **72**, 305-315
16. McTeague, L. M., Huemer, J., Carreon, D. M., Jiang, Y., Eickhoff, S. B., and Etkin, A. (2017) Identification of Common Neural Circuit Disruptions in Cognitive Control Across Psychiatric Disorders. *Am J Psychiatry* **174**, 676-685
17. Li, Z., Li, Z., Lv, X., Li, Z., Xiong, L., Hu, X., and Qin, D. (2020) Intracerebroventricular Administration of Interferon-Alpha Induced Depressive-Like Behaviors and Neurotransmitter Changes in Rhesus Monkeys. *Front Neurosci* **14**, 585604

18. Schmaal, L., Veltman, D. J., van Erp, T. G. M., Sämann, P. G., Frodl, T., Jahanshad, N., Loehrer, E., Tiemeier, H., Hofman, A., Niessen, W. J., Vernooij, M. W., Ikram, M. A., Wittfeld, K., Grabe, H. J., Block, A., Hegenscheid, K., Völzke, H., Hoehn, D., Czisch, M., Lagopoulos, J., Hatton, S. N., Hickie, I. B., Goya-Maldonado, R., Krämer, B., Gruber, O., Couvy-Duchesne, B., Rentería, M. E., Strike, L. T., Mills, N. T., de Zubicaray, G. I., McMahon, K. L., Medland, S. E., Martin, N. G., Gillespie, N. A., Wright, M. J., Hall, G. B., MacQueen, G. M., Frey, E. M., Carballedo, A., van Velzen, L. S., van Tol, M. J., van der Wee, N. J., Veer, I. M., Walter, H., Schnell, K., Schramm, E., Normann, C., Schoepf, D., Konrad, C., Zurowski, B., Nickson, T., McIntosh, A. M., Papmeyer, M., Whalley, H. C., Sussmann, J. E., Godlewska, B. R., Cowen, P. J., Fischer, F. H., Rose, M., Penninx, B. W. J. H., Thompson, P. M., and Hibar, D. P. (2016) Subcortical brain alterations in major depressive disorder: findings from the ENIGMA Major Depressive Disorder working group. *Mol Psychiatry* **21**, 806-812
19. Schmaal, L., Hibar, D. P., Sämann, P. G., Hall, G. B., Baune, B. T., Jahanshad, N., Cheung, J. W., van Erp, T. G. M., Bos, D., Ikram, M. A., Vernooij, M. W., Niessen, W. J., Tiemeier, H., Hofman, A., Wittfeld, K., Grabe, H. J., Janowitz, D., Bülow, R., Selonke, M., Völzke, H., Grotegerd, D., Dannlowski, U., Arolt, V., Opel, N., Heindel, W., Kugel, H., Hoehn, D., Czisch, M., Couvy-Duchesne, B., Rentería, M. E., Strike, L. T., Wright, M. J., Mills, N. T., de Zubicaray, G. I., McMahon, K. L., Medland, S. E., Martin, N. G., Gillespie, N. A., Goya-Maldonado, R., Gruber, O., Krämer, B., Hatton, S. N., Lagopoulos, J., Hickie, I. B., Frodl, T., Carballedo, A., Frey, E. M., van Velzen, L. S., Penninx, B. W. J. H., van Tol, M. J., van der Wee, N. J., Davey, C. G., Harrison, B. J., Mwangi, B., Cao, B., Soares, J. C., Veer, I. M., Walter, H., Schoepf, D., Zurowski, B., Konrad, C., Schramm, E., Normann, C., Schnell, K., Sacchet, M. D., Gotlib, I. H., MacQueen, G. M., Godlewska, B. R., Nickson, T., McIntosh, A. M., Papmeyer, M., Whalley, H. C., Hall, J., Sussmann, J. E., Li, M., Walter, M., Aftanas, L., Brack, I., Bokhan, N. A., Thompson, P. M., and Veltman, D. J. (2017) Cortical abnormalities in adults and adolescents with major depression based on brain scans from 20 cohorts worldwide in the ENIGMA Major Depressive Disorder Working Group. *Mol Psychiatry* **22**, 900-909
20. Yang, S., Weng, H., Chen, L., Guo, X., Parra, M., Conboy, J., Debnath, G., Lambert, A. J., Peters, L. L., Baines, A. J., Mohandas, N., and An, X. (2011) Lack of protein 4.1G causes altered expression and localization of the cell adhesion molecule nectin-like 4 in testis and can cause male infertility. *Mol Cell Biol* **31**, 2276-2286
21. Sugiyama, H., Mizutani, K., Kurita, S., Okimoto, N., Shimono, Y., and Takai, Y. (2013) Interaction of Necl-4/CADM4 with ErbB3 and integrin $\alpha 6 \beta 4$ and inhibition of ErbB2/ErbB3 signaling and hemidesmosome disassembly. *Genes Cells* **18**, 519-528
22. Mandai, K., Rikitake, Y., Mori, M., and Takai, Y. (2015) Nectins and nectin-like molecules in development and disease. *Curr Top Dev Biol* **112**, 197-231
23. Mizutani, K., Miyata, M., Shiotani, H., Kameyama, T., and Takai, Y. (2021) Nectins and Nectin-like molecules in synapse formation and involvement in neurological diseases. *Mol Cell Neurosci* **115**, 103653
24. Spiegel, I., Adamsky, K., Eshed, Y., Milo, R., Sabanay, H., Sarig-Nadir, O., Horresh, I., Scherer, S. S., Rasband, M. N., and Peles, E. (2007) A central role for Necl4 (SynCAM4) in Schwann cell-axon interaction and myelination. *Nat Neurosci* **10**, 861-869
25. Sara, Y., Biederer, T., Atasoy, D., Chubykin, A., Mozhayeva, M. G., Sudhof, T. C., and Kavalali, E. T. (2005) Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 260-270
26. Robbins, E. M., Krupp, A. J., Perez de Arce, K., Ghosh, A. K., Fogel, A. I., Boucard, A., Südhof, T. C.,

Stein, V., and Biederer, T. (2010) SynCAM 1 adhesion dynamically regulates synapse number and impacts plasticity and learning. *Neuron* **68**, 894-906

3、动物模型的制备方法

3.1 实验材料

含 *Necl4* 基因组 DNA 的 BAC 克隆、Cre 重组酶和新霉素耐药基因的 DNA 序列、DNA 探针、小鼠胚胎干细胞、8-9 周的 C57BL/6J 雌性小鼠

3.2 实验环境

温度：23-25 °C，湿度：55%。12h/12h 明暗周期。

3.3 实验步骤

(1) *Necl4* 全身敲除小鼠的构建

首先从 Invitrogen 公司获得含有 *Necl4* 的基因组 DNA 的 BAC 克隆，之后用诱导型 Cre 重组酶基因(CRE-ERT2)和新霉素耐药基因（NeoR）取代 *Necl4* 的第一外显子构建基因靶向载体。通过电穿孔方法将线性化的靶向载体导入小鼠胚胎干细胞（ES）中。在新霉素选择后，用限制性内切酶 *Spe* I 酶切 ES 克隆的基因组 DNA，酶切后的野生型等位基因长度为 8.9kb，突变型等位基因长度为 7.3kb。用 3' 侧翼探针进行 Southern 杂交，筛选出 198 个独立的 ES 克隆。最终鉴定出 5 个同源重组克隆，并将其中 2 个克隆注射到囊胚中，产生嵌合体小鼠进行生殖系传递，产生 F1 杂合子小鼠。

(2) 小鼠繁殖与饲养

小鼠以杂合子配种繁殖，放置于 12 小时的明/暗周期的屏障环境中。

(3) 小鼠基因型鉴定

小鼠出生后 7 天至 15 天剪取其脚趾或/和耳朵进行编号，同时将剪取的组织加入 100μl 含有蛋白酶 K 的组织裂解液，置于 56°C 恒温水浴锅中消化（至少 6 小时），消化完成后置于 85°C 金属浴中加热 45 分钟。样品可以直接用于 PCR 鉴定小鼠基因型，或于 4°C 短期保存。

小鼠基因型鉴定所用引物信息如下：

名称	序列（5'→3'）	退火温度	产物长度	延伸时间
N4WT-F	CGGAGCAGAGGGCGGGACTGGACT	63°C	725 bp	60 s
N4WT-R	GGGACAAAGGCGGCGTGGAGAAACG			
N4KO-F	TCAGCAGCCTCTGTTCCAC	57°C	268 bp	30 s
N4KO-R	AATACGCACACCTCCCTCG			

小鼠基因型鉴定 PCR 反应体系 1（*Necl4* WT）：

试剂：TaKaRa LA Taq® with GC Buffer (TaKaRa, RR02AG)

组分	体积
2 x Buffer	5 μ l
dNTP Mix	1 μ l
模板 DNA	0.5 μ l
上游引物 (10 μ M)	0.1 μ l
下游引物 (10 μ M)	0.1 μ l
LA Taq Polymerase	0.5 μ l
ddH ₂ O	up to 10 μ l

小鼠基因型鉴定 PCR 反应体系 2 (Nec14 KO):

试剂: 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix (Vazyme, P222-01)

组分	体积
2 x Buffer	5 μ l
模板 DNA	0.5 μ l
上游引物 (10 μ M)	0.1 μ l
下游引物 (10 μ M)	0.1 μ l
ddH ₂ O	up to 10 μ l

小鼠基因型鉴定 PCR 反应条件 1 (Nec14 WT):

步骤	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}$ C	3 min
变性	94 $^{\circ}$ C	30 s
退火	63 $^{\circ}$ C	30 s
延伸	72 $^{\circ}$ C	60 s
终延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min

} 35 个循环

小鼠基因型鉴定 PCR 反应条件 1 (Nec14 KO):

步骤	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}$ C	3 min
变性	94 $^{\circ}$ C	30 s
退火	57 $^{\circ}$ C	30 s
延伸	72 $^{\circ}$ C	30 s
终延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min

} 35 个循环

以 1 $\times$ TAE 试剂配制 2.0 %琼脂糖凝胶, PCR 反应结束后取产物进行电泳, 观察条带大小确定基因型。如仅反应体系 1 有对应的条带, 则小鼠基因型为野生型 (WT), 如仅反应体系 2 有对应的条带, 则小鼠的基因型为突变型 (KO), 如两个反应体系均有对应的条带, 则小鼠基因型为杂合 (HE), 如

图 1 所示。

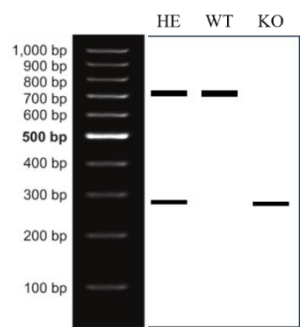


图 1.Necl4 全敲小鼠基因型鉴定示意图

4、动物模型的评价与验证

本动物模型利用行为学实验检测实验动物抑郁样和焦虑样行为的变化，用酶联免疫吸附实验检测神经递质水平的改变，以及通过透射电镜实验观察神经元的突触结构，从行为、生理和病理等方面对动物模型进行了评价。并利用腺相关病毒在 Necl4 全敲小鼠皮质的神经元中特异表达 Necl4，验证 Necl4 对抑郁和焦虑行为的影响。进行行为学测试的小鼠需提前从饲养环境转移到行为学测试实验室，适应 3-5 天后进行实验。实验开始时小鼠的鼠龄为 8-9 周，且雌雄小鼠均有。每次实验测试时，小鼠需提前至少 30 分钟适应测试环境。

4.1 Necl4 在人类抑郁症患者中的表达水平分析和多物种中的同源性分析

有研究人员取前扣带皮层（AnCg）、背外侧前额叶皮层（DLPFC）和伏隔核（nAcc）的组织进行了 RNA 测序（GSE80655）。这些组织来自包括被诊断患有精神分裂症、双相情感障碍或重度抑郁症（Major Depressive Disorder, MDD）的患者，以及对照受试者。我们分析了重度抑郁症患者和对照受试者在三种脑组织中 Necl4 的表达水平。结果显示，Necl4 在 MDD 患者的 AnCg 和 DLPFC 中的表达水平有显著下降，而在 nACC 中稍有下降趋势（图 2A）。此外，我们分析了人类（NP_660339.1）、大鼠（NP_001040572.1）和小鼠（NP_694752.1）来源 Necl4 蛋白氨基酸序列的同源性，显示人源与大小鼠源的 Necl4 同源性均高达 98%（图 2B）。因此后续将利用小鼠模型研究 Necl4 在抑郁症中的作用和机制。

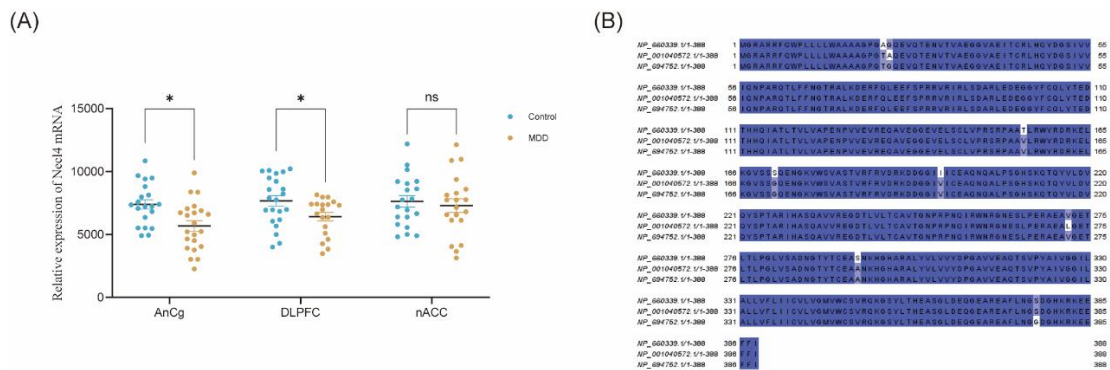


图 2. Necl4 在 MDD 患者中的表达和多物种同源性分析

4.2 糖水偏好测试

糖水偏好测试是一种基于奖励的测试，用作快感缺乏的指标。快感缺乏，或体验快乐的能力下降，是抑郁症的核心症状之一。啮齿类动物对甜食或甜味溶液有着与生俱来的兴趣。在糖水偏好测试中，用“糖水偏好指数”评价动物对甜溶液的偏好度，对甜溶液的偏好下降代表快感缺乏。

本实验需进行 5 天。

第一天将小鼠饲养笼中的一瓶饮用水换成两瓶饮用水，左右各放置一瓶，让小鼠适应两边喝水 24 小时，饲料也左右均放置。

第二天将其中一瓶饮用水换成一瓶糖水（1.5%蔗糖溶液），让小鼠适应 24 小时。

第三天将糖水和饮用水的位置左右互换 24 小时。

第四天撤去糖水和饮用水，小鼠禁水 24 小时，但不撤去饲料。

第五天开始测试。首先轻柔地将小鼠从原来的饲养笼中取出，分别放入独立干净的新饲养笼中，标注上小鼠的编号，将装有饮用水和糖水的瓶子提前称取好重量，分左右放入笼内，每只笼中对应的糖水和饮用水的瓶子做好标记（即小鼠编号），同时笼子的左右也都保证有饲料。6 小时后将饮用水和糖水的瓶子左右互换，再过 6 小时后分别称装饮用水和糖水的瓶子的重量，测试时间一共 12 小时。最后计算出每只小鼠消耗饮用水和糖水的重量。根据公式：糖水偏好指数 = 糖水消耗量 / （糖水消耗量 + 饮用水消耗量）× 100%，分别计算每只小鼠的糖水偏好指数，并对结果进行统计分析。实验过程中应注意避免瓶子中饮用水和糖水的滴漏，造成实验误差。本实验共进行了两次。

第一次实验结果如图 3 所示，结果显示无论是分别统计雌鼠（图 3A）和雄鼠（图 3B），还是雌雄小鼠（图 3C）一起统计，Nec14 WT 小鼠糖水偏好指数都高于 Nec14 KO 小鼠，且两组间有显著性差异，说明 Nec14 的全身敲除可能会导致小鼠的抑郁情绪。

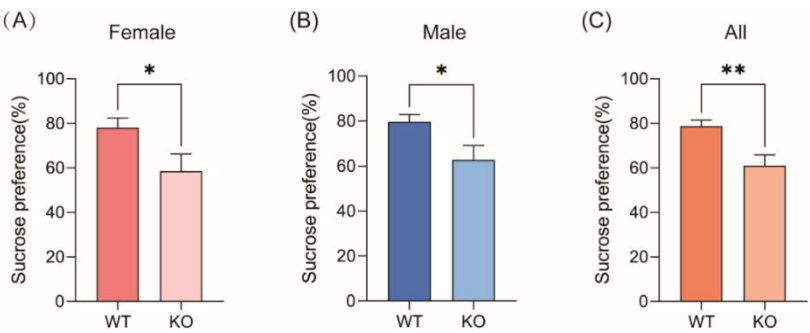


图 3. 第一次小鼠糖水偏好实验结果

A: 雌鼠糖水偏好率统计分析结果，n(WT)=14，n(KO)=11；B: 雄鼠糖水偏好率统计分析结果，n(WT)=12，n(KO)=16；C: 雌雄小鼠糖水偏好率统计分析结果，n(WT)=26，n(KO)=27。（数据以平均值±标准误呈现；*: $P < 0.05$ ，**: $P < 0.01$ ）

第二次实验结果如图 4 所示，本次实验结果中雌雄小鼠整体的糖水偏好率都稍高于第一次，但是趋势与第一次实验结果一致，即 Nec14 KO 小鼠无论雌雄的糖水偏好指数都显著低于 Nec14 WT 小鼠。两次实验结果的一致性表明本实验的结果在 Nec14 KO 小鼠中具有可重复性。

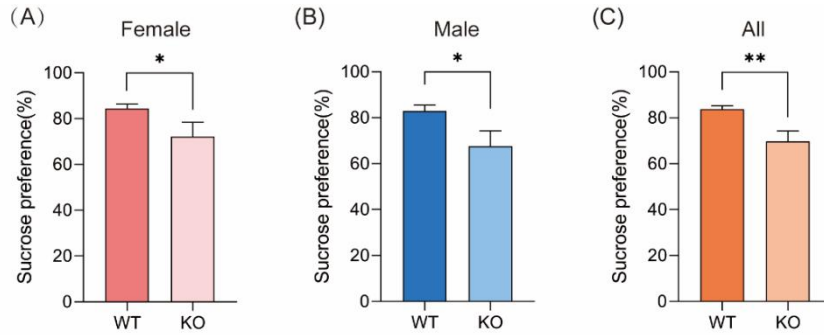


图 4. 第二次小鼠糖水偏好实验结果

A: 雌鼠糖水偏好率统计分析结果, $n(\text{WT})=21$, $n(\text{KO})=14$; B: 雄鼠糖水偏好率统计分析结果, $n(\text{WT})=16$, $n(\text{KO})=17$; C: 雌雄小鼠糖水偏好率统计分析结果, $n(\text{WT})=37$, $n(\text{KO})=31$ 。(数据以平均值±标准误呈现; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)

4.3 强迫游泳实验

强迫游泳实验通过将实验动物置于一个局限的环境中（例如水中），动物在该环境中拼命挣扎试图逃跑又无法逃脱，从而营造出了一个无可回避的压迫环境，经一段时间的实验后，动物即表现出典型的“不动状态”，“不动状态”持续时间反映动物的绝望抑郁心理，“不动状态”持续时间越长代表动物绝望抑郁心理的增强。

本实验采用高 25 厘米，直径 15 厘米的玻璃烧杯，水深 15 厘米，水温 $23 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ，玻璃杯前方为摄像头所在。实验开始时，将小鼠置于烧杯内，自由游泳 6 分钟。前 2 分钟为适应期，后 4 分钟为录像采集时间，由软件 EthoVision XT 8 完成。录像结束后，软件分析小鼠的不动时间并进行统计。小鼠完成测试后，从烧杯中取出小鼠，并用吸水纸轻柔擦拭体表流水，放入铺有干燥垫料的新饲养笼内，避免其与未经测试的小鼠交流。

本实验一共进行两次。其中第一次仅检测了雄鼠，结果如图 5 所示，*Nec14* KO 小鼠的不动时间显著低于 *Nec14* WT 小鼠。

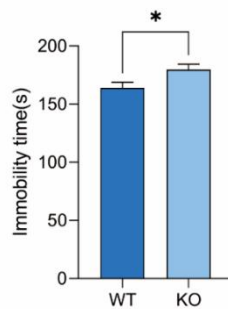


图 5. 第一次小鼠强迫游泳实验结果

图中 $n(\text{WT})=14$, $n(\text{KO})=14$ 。(数据以平均值±标准误呈现; *: $P < 0.05$)

第二次实验结果如图 6 所示，*Nec14* KO 雌鼠（6A）和雄鼠（6B）在水中的不动时间均有显著性增加，雌雄小鼠同时统计的结果（6C）与此一致，提示 *Nec14* 敲除可能导致小鼠的绝望情绪增强。强迫游泳两次结果具有一致性，表明 *Nec14* KO 小鼠在强迫游泳实验中的结果具有可重复性。

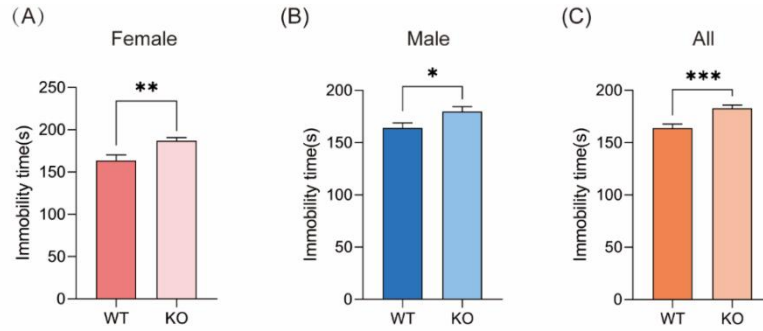


图 6. 第二次小鼠强迫游泳实验结果

A: 雌鼠不动时间统计分析结果, $n(\text{WT})=13$, $n(\text{KO})=13$; B: 雄鼠不动时间统计分析结果, $n(\text{WT})=11$, $n(\text{KO})=11$; C: 雌雄小鼠不动时间统计分析结果, $n(\text{WT})=24$, $n(\text{KO})=24$ 。(数据以平均值±标准误呈现; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

4.4 新环境抑制摄食实验

新环境会抑制小鼠进食, 摄食实验是将饥饿处理 1 天后的小鼠放入新的环境中, 观察小鼠克服对新环境的恐惧后首次摄取食物的潜伏期, 可用于反映动物摄食的消沉程度和焦虑水平。首次摄食潜伏期的延长代表动物的焦虑程度越高。

本实验需进行 2 天。

第一天撤去小鼠饲养笼中的食物, 同时保证饮用水的供应, 饥饿处理 24 小时。

第二天开始测试。本实验采用 40 厘米×40 厘米×30 厘米(长、宽、高)的白色不透明塑料箱作为测试场地。每只小鼠进入测试前用 75 %医用酒精擦拭箱底和侧壁。实验开始时将小鼠单独取出, 放置在塑料箱的角落, 箱底中心放 3 粒实验食物。小鼠需背对食物, 且保持小鼠每次放在同一位置和同一方向。观察记录小鼠首次摄食的时间(即摄食潜伏期), 以动物开始咬食食物为摄食标准, 最长时间不超过 5 分钟, 如 5 分钟时小鼠还没有开始摄取食物, 按照 5 分钟记录。测试完成后将小鼠放入新的饲养笼内, 避免其与未经测试的小鼠交流。

本实验进行了一次, 结果如图 7 所示, 分别统计雌鼠(图 7A)与雄鼠(图 7B)和同时统计雌雄小鼠(图 7C)都显示 *Nec14* KO 小鼠首次摄食的潜伏期比 *Nec14* WT 小鼠长, 且两组间有显著性差异, 说明敲除 *Nec14* 可能会使小鼠的焦虑程度升高。

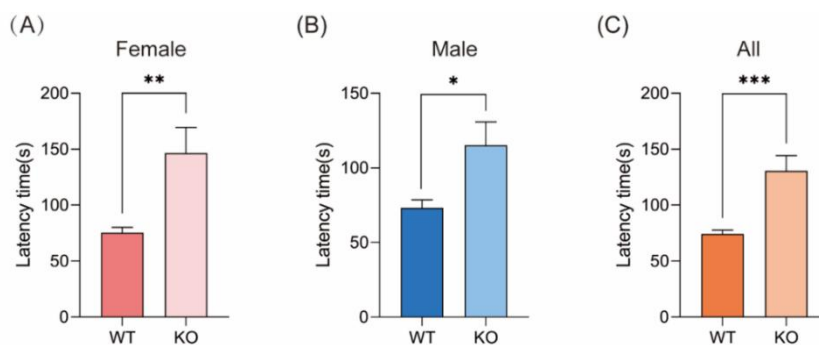


图 7. 小鼠新环境抑制摄食实验结果

A: 雌鼠摄食潜伏期统计分析结果, $n(\text{WT})=23$, $n(\text{KO})=22$; B: 雄鼠摄食潜伏期统计分析结果, $n(\text{WT})=23$, $n(\text{KO})=23$; C: 雌雄小鼠摄食潜伏期统计分析结果, $n(\text{WT})=46$, $n(\text{KO})=45$ 。(数据以平均值±标准误呈现;

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$)

4.5 高架 O 迷宫实验

啮齿动物在开放且高处的环境中通常会感到不安和焦虑，因此更倾向于停留在封闭区域。高架 O 迷宫实验基于动物的这种行为倾向可用于评估动物的焦虑水平。动物在封闭区域停留的时间越长，表明其焦虑水平较高。而动物在迷宫中的总运动距离则可以作为衡量其活动性的指标。

本实验采用不锈钢材质的高架环形迷宫，宫体离地 61 厘米，直径 50 厘米，环形通道宽 5 厘米，封闭区域侧壁高 20 厘米，摄像头位于迷宫正上方。每只小鼠进入测试前用 75 %医用酒精擦拭迷宫内壁及迷宫通道。实验开始时，小鼠头向开放区域，放入闭合区域与开放区域的交界处，开始测试。由软件 EthoVision XT 8 记录小鼠运动轨迹，录像时间 5 分钟，录像结束后，软件分析小鼠总的运动距离和在开放区域内的停留时间，并进行统计。小鼠完成测试后，轻柔放入新的饲养笼内，避免其与未经测试的小鼠产生交流。

本实验一共进行两次。其中第一次仅检测了雄鼠，结果如图 8 所示，与野生型小鼠相比，Nec14 全敲小鼠在开放区域停留的时间显著减少(图 8A)，而总的运动距离两组小鼠之间无明显变化(图 8B)。

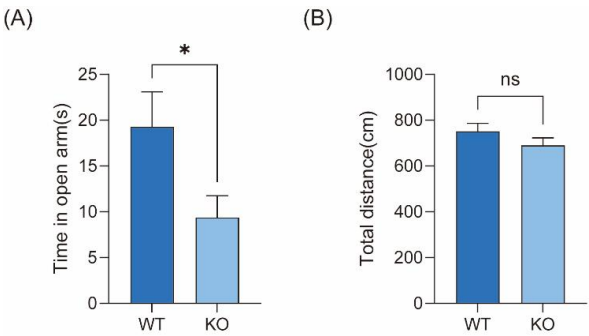


图 8. 第一次小鼠 O 迷宫实验结果

A: 小鼠在开放区域停留时间的统计分析结果， $n(\text{WT})=15$ ， $n(\text{KO})=14$ ；B: 小鼠总的运动距离统计分析结果， $n(\text{WT})=15$ ， $n(\text{KO})=14$ 。（数据以平均值±标准误呈现；ns: $P > 0.05$ ；*: $P < 0.05$ ）

第二次实验结果如图 9 所示，Nec14 全敲的雌鼠（图 9A）和雄鼠（图 9B）在开放区域的停留时间均比野生型小鼠显著缩短，雌雄小鼠同时统计结果与此一致（图 9C）；而 Nec14 全敲小鼠和野生型小鼠总的运动距离之间并无显著差异（图 9D-9F）。以上结果表明 Nec14 敲除小鼠在高架 O 迷宫中的焦虑水平增加，但不影响其自主活动性，且结果具有可重复性。

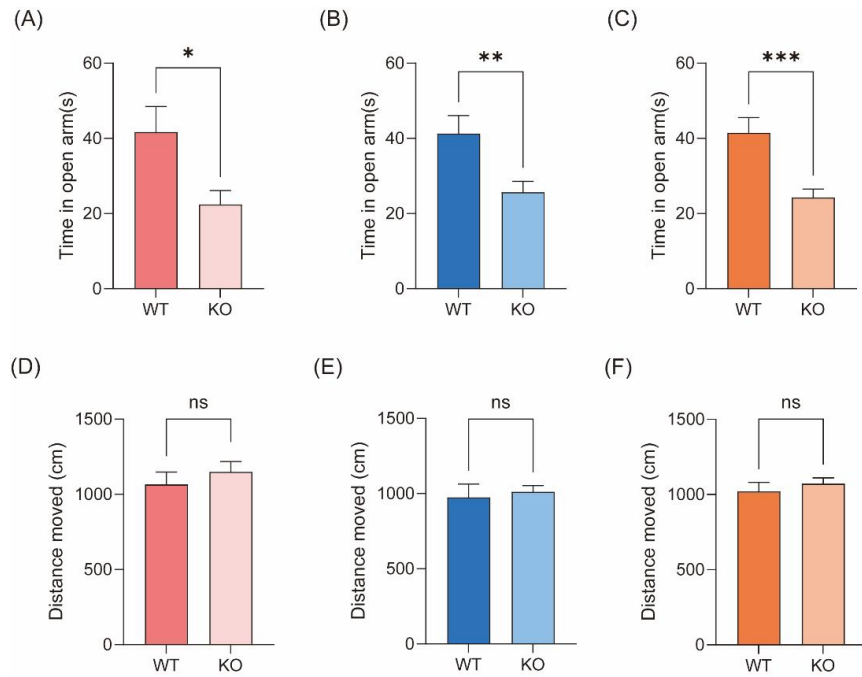


图 9. 第二次小鼠 O 迷宫实验结果

A: 雌鼠在开放区域停留时间的统计分析结果, $n(\text{WT})=10$, $n(\text{KO})=10$; B: 雄鼠在开放区域停留时间的统计分析结果, $n(\text{WT})=10$, $n(\text{KO})=13$; C: 雌雄小鼠在开放区域停留时间的统计分析结果, $n(\text{WT})=20$, $n(\text{KO})=23$; D: 雌鼠总的运动距离统计分析结果, $n(\text{WT})=10$, $n(\text{KO})=10$; E: 雄鼠总的运动距离统计分析结果, $n(\text{WT})=10$, $n(\text{KO})=13$; F: 雌雄小鼠总的运动距离统计分析结果, $n(\text{WT})=20$, $n(\text{KO})=23$ 。(数据以平均值±标准误呈现; ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$)

4.6 开放旷场实验

开放旷场实验也叫做敞箱实验, 可用于检测小鼠的自发活动和探索行为。小鼠天性对新的开阔的环境感到恐惧, 因而主要在边缘区域活动, 在中央区域活动较少, 但动物的探究特性又促使其产生在中央区域活动的动机, 因此也可观察由此而产生的焦虑心理。小鼠在旷场内总的运动距离反应其运动情况。在运动情况不变的前提下, 小鼠在中央区域停留的时间越短表明其焦虑程度越高。

本实验采用 40 厘米×40 厘米×30 厘米白色不透明的塑料箱, 箱子底部均分为 16 个小格, 中心 4 个小格为中心区域, 其余 12 小格为边缘区域。每只小鼠进入测试前用 75 %医用酒精擦拭箱子内壁及底部, 正上方为摄像头所在。实验开始时, 将小鼠放于箱子正中, 由软件 EthoVision XT 8 记录小鼠运动轨迹, 录像时间 5 分钟, 录像结束后, 软件分析小鼠在中心区域的停留时间并进行统计。小鼠完成测试后, 轻柔放入新的饲养笼内, 避免其与未经测试的小鼠产生交流。

本实验一共进行两次。其中第一次仅检测了雄鼠, 结果显示 *Nesl4* 全敲小鼠和野生型小鼠在中央区域停留的时间无显著差异 (图 10A), 总的运动距离也无明显变化 (图 10B)。

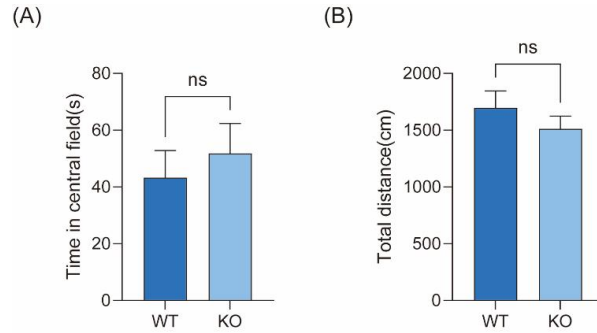


图 10. 第一次小鼠开放旷场实验结果

A: 小鼠在中央区域停留时间的统计分析结果, $n(\text{WT})=15$, $n(\text{KO})=14$; B: 小鼠总的运动距离统计分析结果, $n(\text{WT})=15$, $n(\text{KO})=14$ 。(数据以平均值 $\pm$ 标准误呈现; ns: $P>0.05$)

第二次实验结果如图 11 所示, *Nec14* 全敲的雌鼠 (图 11A) 和雄鼠 (图 11B) 在中心区域的停留时间与野生型小鼠相比无显著变化, 雌雄小鼠同时统计结果与此一致 (图 11C); *Nec14* 全敲小鼠和野生型小鼠总的运动距离也并无显著差异 (图 11D-11F)。以上结果表明, *Nec14* 敲除不影响小鼠在开放旷场中的焦虑水平, 也不影响其自主活动性, 且结果具有可重复性。

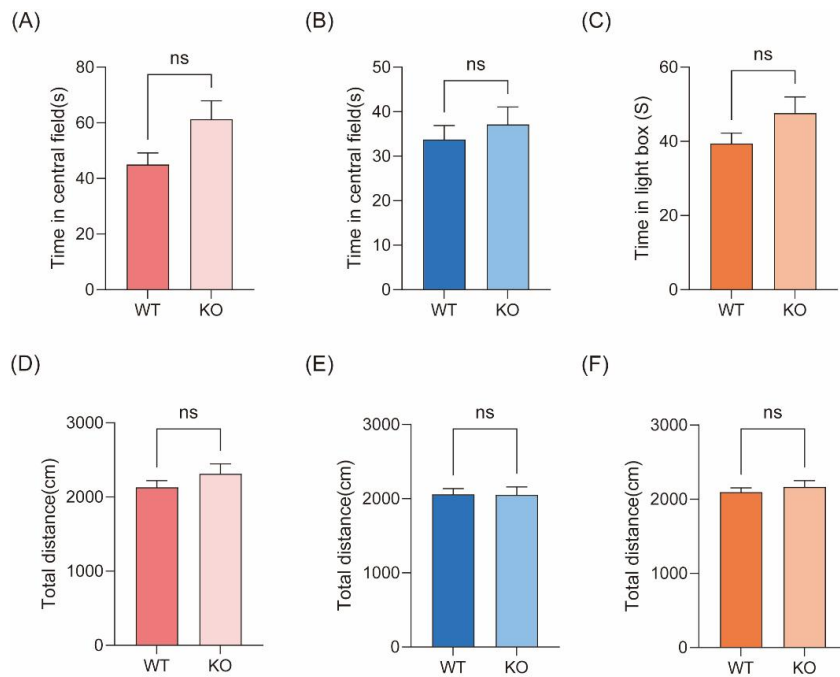


图 11. 第二次小开放旷场实验实验结果

A: 雌鼠在中央区域停留时间的统计分析结果, $n(\text{WT})=10$, $n(\text{KO})=10$; B: 雄鼠在中央区域停留时间的统计分析结果, $n(\text{WT})=10$, $n(\text{KO})=13$; C: 雌雄小鼠在中央区域停留时间的统计分析结果, $n(\text{WT})=20$, $n(\text{KO})=23$; D: 雌鼠总的运动距离统计分析结果, $n(\text{WT})=10$, $n(\text{KO})=10$; E: 雄鼠总的运动距离统计分析结果, $n(\text{WT})=10$, $n(\text{KO})=13$; F: 雌雄小鼠总的运动距离统计分析结果, $n(\text{WT})=20$, $n(\text{KO})=23$ 。(数据以平均值 $\pm$ 标准误呈现; ns: $P>0.05$)

4.7 ELISA 检测小鼠不同脑区抑郁症相关神经递质的浓度

五羟色胺 (5-HT) 和去甲肾上腺素 (NA), 能够参与情绪调节, 抑郁症患者体内 5-HT 和 NA 较

低。本实验中将小鼠多个与抑郁症相关的脑区分离组织并提取匀浆液，分离的脑区包括丘脑（TH）、海马（HIP）、纹状体（STR）、前额叶皮层（PFC）、前扣带回额叶内侧（ACC）、小脑（CB）、嗅球（OLF）、延髓（MY）、脑桥（PO）和中脑（MB），共 10 个脑区。之后利用 ELISA 试剂盒检测溶液中 5-HT(CUSABIO, CSB-E08365m)和 NA(CUSABIO, CSB-E08365m)的浓度。实验结果如图 12 所示，5-HT 在 *Nec14* KO 小鼠的前额叶皮层（PFC）和中脑（MB）中显著下降（图 12A），此外在其他多个脑区中也有一定的下降，推测 *Nec14* KO 小鼠脑组织中多个脑区 5-HT 浓度下降，其下降可能导致小鼠的抑郁情绪增强。而 NA 在 *Nec14* WT 和 *Nec14* KO 小鼠的 10 个脑区中的浓度均无明显差异（图 12B）。

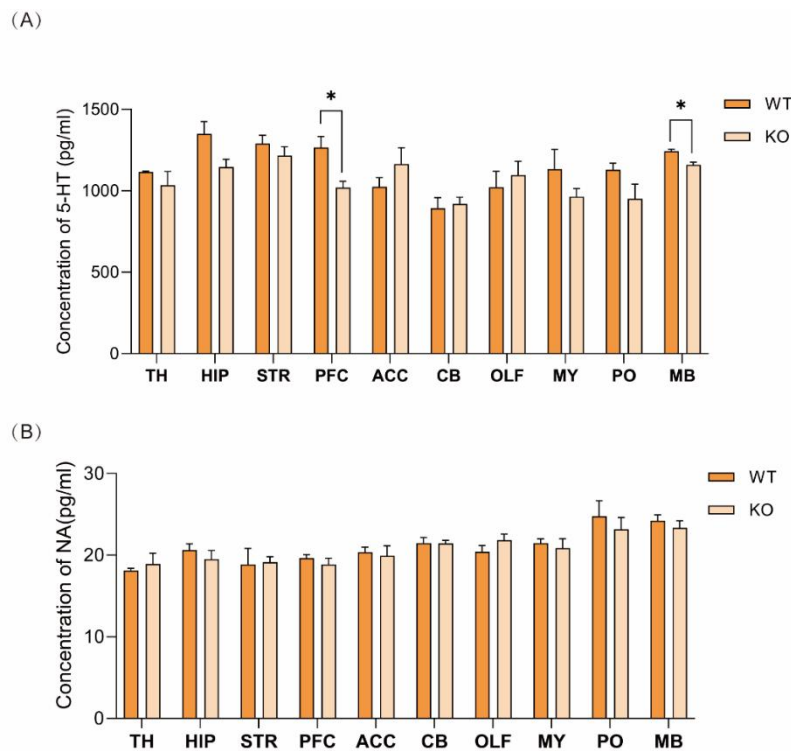


图 12. ELISA 检测小鼠脑组织 5-HT 和 NA 的浓度

A: 小鼠脑组织中 5-HT 的浓度统计分析结果， $n(\text{WT})=4$ ， $n(\text{KO})=4$ ；B: 小鼠脑组织中 NA 的浓度统计分析结果， $n(\text{WT})=4$ ， $n(\text{KO})=4$ 。（数据以平均值±标准误呈现；*： $P < 0.05$ ）

4.8 电镜观察小鼠突触的超微结构

突触连接是神经系统发挥功能的重要组成部分，为了检测 *Nec14* 对突触形态的影响，我们对皮层组织进行了超薄切片，并通过透射电镜进行观察。实验结果如图 13 所示，*Nec14* KO 小鼠皮层组织中不对称突触结构出现明显异常（图 13A），主要表现为与野生型相比，突触间隙均值明显增加（图 13B），累积分布曲线右移（图 13C），但 PSD 厚度无明显改变（图 13D），累积分布曲线也基本一致（图 13E）。

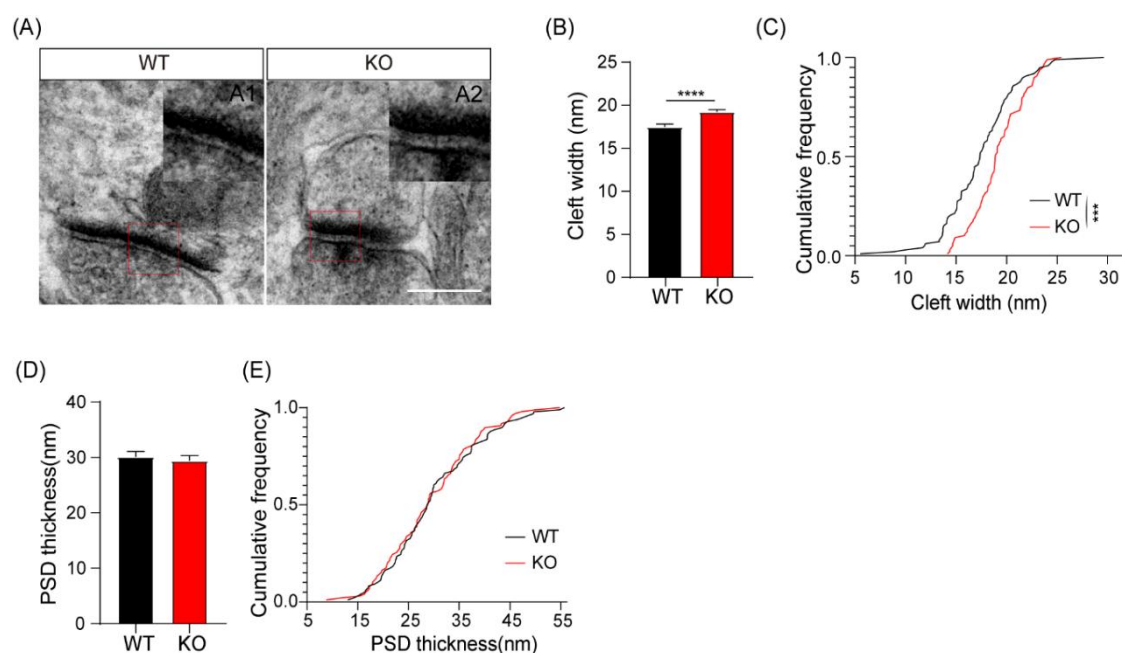


图 13. 透射电镜观测小鼠皮层不对称突触超微结构

A: 小鼠皮层组织不对称突触结构的透射电镜成像结果，白色短线长度表示为 200nm；B&C: 透射电镜成像结果中突触间隙宽度的分析结果，B 为均值比较，C 为累积分布曲线， $n(\text{WT})=98$ ， $n(\text{KO})=98$ ；D&E: 透射电镜成像结果中突触 PSD 厚度的分析结果，D 为均值比较，E 为累积分布曲线， $n(\text{WT})=98$ ， $n(\text{KO})=98$ 。（柱状图数据以平均值 $\pm$ 标准误呈现；***: $P<0.001$ ，****: $P<0.0001$ ）

4.9 特异脑区和神经元表达 Ncl4，并进行行为学检测

前期研究分析结果显示，Ncl4 在 MDD 患者的皮质表达下降，且 Ncl4 缺失后 PFC 脑区的 5-HT 浓度降低，皮质神经元突触结构改变。为了进一步确认 Ncl4 是否在皮质参与调控抑郁情绪，我们在 Ncl4 全敲小鼠左右脑的皮质（AP = 1.0 mm，ML = ± 1.5 mm，DV = -1.5 mm）注射表达 Ncl4 的腺相关病毒（Adeno-Associated Virus, AAV）（图 14A）。表达 Ncl4 的载体同时融合表达绿色荧光蛋白（Green Fluorescent Protein, GFP），并以 Syn 作为载体的特异启动子，使 Ncl4 特异的在神经元中表达，标注为 AAV-Ncl4。同时在 Ncl4 全敲小鼠左右脑的皮质注射仅表达绿色荧光蛋白的载体作为对照，标注为 AAV-GFP。AAV 注射表达 3 周之后，检测 Ncl4 的表达效果（图 14B），之后进行行为学实验。O 迷宫实验结果显示，Ncl4 全敲的雌鼠（14C）和雄鼠（14D）注射表达 Ncl4 的 AAV 之后，其在开放区域的停留时间比对照组显著延长，雌雄鼠一起统计的结果与此一致（14E）；而 Ncl4 全敲的雌鼠（14F）和雄鼠（14G）注射表达 Ncl4 的 AAV 后总的运动距离与对照组相比无显著变化，雌雄鼠一起统计时显示其运动距离增加（14H）。以上结果表明 Ncl4 在皮质区域的表达水平可能影响小鼠的抑郁和焦虑情绪。

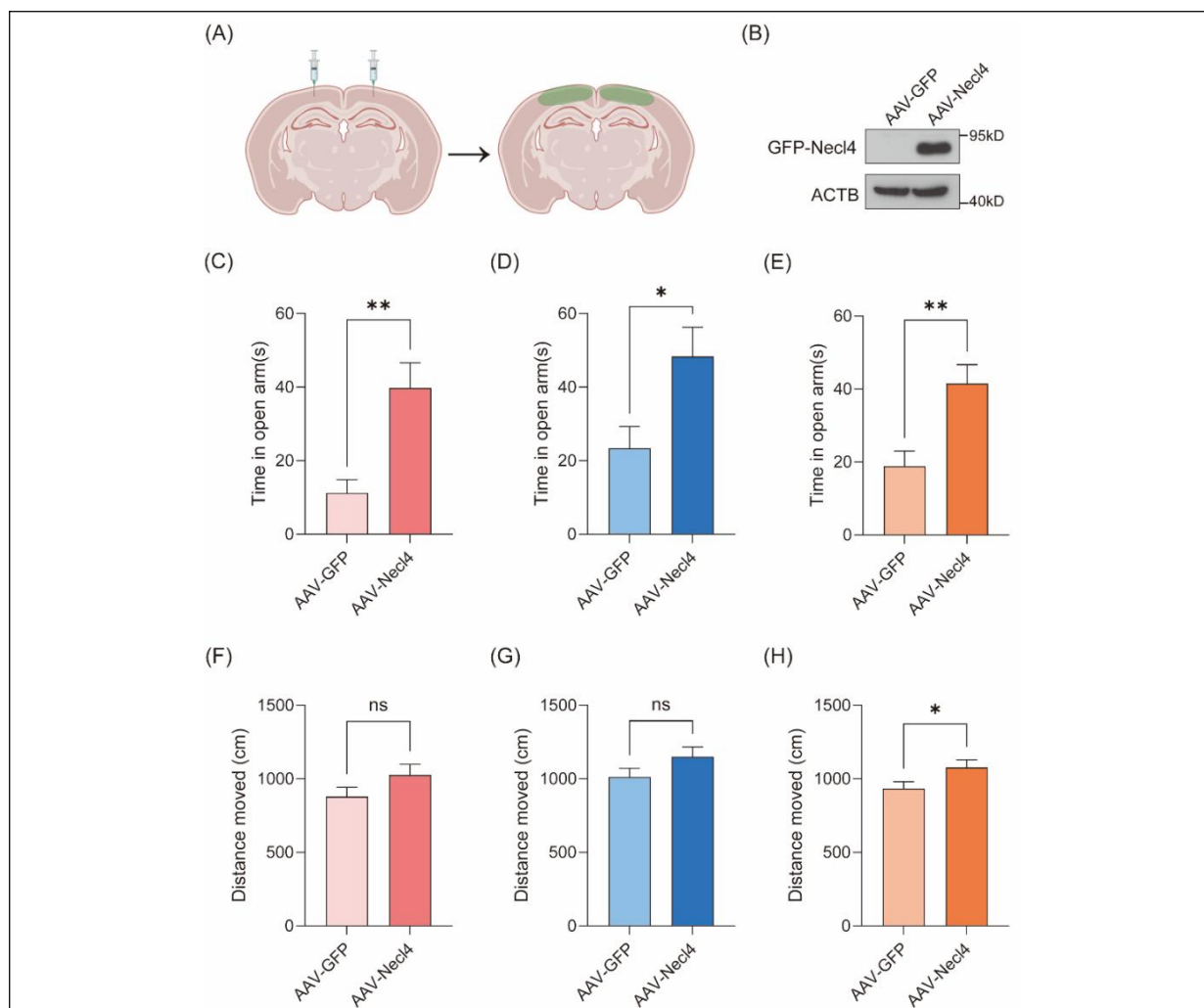


图 14. ELISA 检测小鼠脑组织 5-HT 和 NA 的浓度

A: 小鼠皮质注射 AAV 的示意图; B: 检测注射 AAV 小鼠中皮质 Nec14 的表达; C: 雌鼠在开放区域停留时间的统计分析结果, $n(\text{WT})=10$, $n(\text{KO})=10$; D: 雄鼠在开放区域停留时间的统计分析结果, $n(\text{WT})=7$, $n(\text{KO})=7$; E: 雌雄小鼠在开放区域停留时间的统计分析结果, $n(\text{WT})=17$, $n(\text{KO})=17$; F: 雌鼠总的运动距离统计分析结果, $n(\text{WT})=10$, $n(\text{KO})=10$; G: 雄鼠总的运动距离统计分析结果, $n(\text{WT})=7$, $n(\text{KO})=7$; H: 雌雄小鼠总的运动距离统计分析结果, $n(\text{WT})=17$, $n(\text{KO})=17$ 。(数据以平均值±标准误呈现; ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)

5、动物模型的生物安全性

Nec14 全身敲除小鼠为本实验室早期构建, 前期通过测序、原位杂交、基因型鉴定和蛋白免疫印迹等确认模型小鼠的 Nec14 基因已敲除, 并经海关检疫合格。小鼠在 SPF 级屏障环境中的独立通风笼内饲养, 以杂合子配种繁殖。研究方案已通过中国医学科学院基础医学研究所实验动物管理及伦理委员会的批准和同意 (ACUC-A01-2021-049), 所有程序均符合《北京市实验动物管理条例》。参与研究的人员均经过专业的培训及考核, 并获得《实验动物从业人员上岗证》。研究过程中遵循“3R”原则, 优化实验方案并尽量减少实验动物数量。我们在实验中尽一切努力将它们的痛苦最小化, 小鼠采用麻醉处理后再进行脱颈处死并取组织样品。小鼠尸体放置于研究所实验动物中心提供的动物尸体专用

-20℃冰箱，由研究所实验动物中心统一进行专业化处理。本研究不涉及微生物菌株和细胞的使用，使用的动物全程在实验动物中心饲养繁殖，尸体也由其进行统一处理，实验过程所使用的试剂尽可能选择无毒或者低毒性的产品，且产生的实验垃圾均由研究所统一回收并运往专业的公司处理，尽量减少对环境和生态的影响。

6、讨论和结论

6.1 模型鉴定和评价的技术方法和指标体系

（1）模型鉴定

该模型通过 Southern 杂交和 PCR 实验均证实了生殖细胞的传递。Spe I 酶切小鼠基因组 DNA 后用 3'侧翼探针进行 Southern 杂交，野生型（WT）等位基因长度为 8.9kb，突变型（KO）等位基因长度为 7.3kb，如仅出现 8.9kb 条带则该小鼠为野生型，仅出现 7.3kb 条带则为突变型，出现两种条带则为杂合子（HE）。PCR 实验鉴定结果则是野生型（WT）会扩增出 725bp 的条带，突变型（KO）会扩增出 268bp 的条带，如两种条带都有则为杂合子（HE）。

（2）模型评价

本实验动物模型通过行为学测试、酶联免疫吸附实验和透射电镜实验等实验，从行为、生理和病理等方面进行了评价。行为学测试内容包括糖水偏好测试、强迫游泳实验、新环境抑制摄食实验、O 迷宫实验和旷场实验等。Nec14 敲除小鼠在糖水偏好实验中表现出更低的糖水偏好率提示其快感缺失，在强迫游泳实验中的不动时间增加表明其绝望情绪增强，在新环境抑制摄食实验中的首次摄食时间的显著延长也表明其食欲降低，焦虑情绪增加。

酶联免疫吸附实验是利用 ELISA 试剂盒检测神经递质（5-HT 和 NA）的浓度，这两种因子能够参与情绪的调节。本动物模型的脑组织检测结果显示，Nec14 敲除小鼠在前额叶皮层（PFC）和中脑（MB）中的 5-HT 浓度显著下降，此外在多个脑区的浓度也有轻微下降，因此推测 Nec14 敲除会导致小鼠的抑郁和焦虑情绪增强。

此外，本实验动物模型还通过在 Nec14 全敲小鼠的皮质神经元中特异表达 Nec14，验证了其对小鼠行为学表现的影响。本实验动物模型暂不涉及阳性药物对其指标的证实效应。我们的动物模型现在主要关注其行为特征和生化病理指标等与抑郁症和焦虑症的相似性，更多关注抑郁症可能相关的致病机制，因此暂未研究药物治疗效应。

6.2 该模型与国内外现有模型的异同

啮齿类动物常用的抑郁症造模方式有：应激造模、手术造模、药物造模和基因造模。该模型利用基因敲除致小鼠抑郁模型，属于基因造模。应激造模可分为急性和慢性应激抑郁模型，具体造模方法包括对啮齿动物施加不可控制及不可预测的压力源。手术造模最常用的方式为嗅球切除造模，该模型稳定性好，但这种造模方式是由嗅球皮层损伤产生的，仅能模仿一定数量的抑郁症患者；并且造模中动物死亡率较高。药物造模主要有皮质酮给药、利血平给药等方式。慢性皮质酮给药可通过皮下注射或通过饮用水直接饲喂，持续数周至数月后，啮齿动物可出现绝望行为及快感缺失，以及学习记忆受损和焦虑样行为等。该模型具有简单易行、周期短等优点，但存在一定的副作用。此外，现常见的基

因造模主要基于抑郁症的单胺假说、BDNF 的作用及参与 HPA 轴调控的基因，目前已经建立起相应的转基因动物模型，靶向五羟色胺能系统、去甲肾上腺素能系统以及 HPA 轴调控系统相关的基因，但是本模型关注到一个非经典抑郁症发病机制相关的基因可能参与抑郁症的调控，通过基因打靶的方式构建了 *Nec14* 基因全敲小鼠。

6.3 该模型的技术难点、创新性和应用价值

(1) 技术难点

本模型属于基因造模，需要利用基因打靶工具和保证打靶的准确性。

(2) 创新性

该模型关注到 *Nec14* 在抑郁样和焦虑样行为中发挥的作用，目前除本课题组外，尚无其他文献报道，可为后期研究 *Nec14* 和突触在抑郁症和焦虑症中扮演的重要角色提供更多新依据。

(3) 应用价值

该模型为 *Nec14* 基因全敲小鼠模型，后期可用于研究 *Nec14* 基因在多种疾病中的功能和机制，为抑郁症和焦虑症的治疗提供新的潜在靶点，也为抑郁症和焦虑障碍的药物筛选提供新的实验动物模型。

6.4 该模型的局限性

本模型从行为、生理和病理等方面进行了评价，但尚未进行阳性药验证，使模型在药物筛选的应用中难以评估测试药物的效果和安全性等，以及导致模型与人类疾病的相似性不足，对疾病的再现性和预测性有限。

7、有助于动物模型鉴定和评价的其它材料

(1) Zhu, Y., Li, H., Li, K., Zhao, X., An, T., Hu, X., Park, J., Huang, H., Bin, Y., Qiang, B., Yuan, J., Peng, X., and Qiu, M. (2013) *Nec1-4/SynCAM-4* is expressed in myelinating oligodendrocytes but not required for axonal myelination. *PloS one* 8, e64264.

(2) 胡耕，刘泉，舒鹏程，彭小忠。突触黏附分子 NECL4 对大脑皮质 Ca^{2+} -CaMKII-CDC42 信号通路的影响。基础医学与临床 40,2020,7(7):929-933.

(3) Liu, X., Ran, K., Hu, G., Yin, B., Qiang, B., Han, W., Shu, P., and Peng, X. (2023) Indispensable role of Nectin-like 4 in regulating synapse-related molecules, synaptic structure, and individual behavior. *FASEB J* 37, e22970.