

·基础研究·

谷氨酸受体拮抗剂可通过调节脑源性神经营养因子水平改善强迫症模型小鼠的刻板行为

王炜洁, 罗宇翀, 黄东苗, 杨晨, 岳计辉, 王相兰, 温盛霖
(中山大学附属第五医院精神心理科, 广东 珠海 519000)

摘要:【目的】在RU24969强迫症(OCD)小鼠模型中探究NMDA受体拮抗剂氟乙基美金刚(FENM)能否改善强迫样行为及探索其潜在机制。【方法】将32只小鼠随机分成Saline组($n=8$), RU24969组($n=8$), RU+FENM组($n=8$), FENM组($n=8$), 根据不同组别分别给予FENM或等量生理盐水进行预处理, 30 min后再予RU24969或等量生理盐水进行造模。造模后1 h进行行为学测试, 测试结束后取血清检测脑源性神经营养因子(BDNF)的水平。于尾静脉注射伊文思蓝, 并检测脑组织中染料的含量, 评估该模型血脑屏障是否受损。【结果】FENM治疗能够显著改善RU24969模型小鼠的重复刻板绕圈行为($F=39.850, P<0.001$)并缓解其持续运动($F=50.200, P<0.001$), 此外能够显著提高RU24969强迫模型小鼠血清BDNF的水平($F=18.930, P<0.001$)。【结论】NMDA受体拮抗剂FENM可能通过调节BDNF的水平从而缓解强迫症小鼠的刻板行为, 发挥抗强迫疗效, 且RU24969该模型以及FENM治疗对血脑屏障未产生显著影响。

关键词:强迫症; RU24969; 谷氨酸受体拮抗剂; 脑源性神经营养因子; 血脑屏障

中图分类号: R749.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2025)03-0475-11

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2025.0312

Glutamate Receptor Antagonists Attenuate Stereotyped Behaviors via Modulating BDNF Levels in Obsessive-compulsive Disorder Model Mice

WANG Weijie, LUO Yuchong, HUANG Dongmiao, YANG Chen,
YUE Jihui, WANG Xianglan, WEN Shenglin

(Department of Psychiatry, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China)

Correspondence to: WEN Shenglin, E-mail: wenshl@mail.sysu.edu.cn; WANG Xianglan, E-mail: wxiangl@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To explore whether fluoroethylnormemantine (FENM), an NMDA receptor antagonist, could improve compulsive-like behaviors and to investigate its underlying mechanisms in the RU24969-induced obsessive-compulsive disorder (OCD) mouse model. 【Methods】 Thirty-two mice were randomly assigned to four groups: Saline ($n=8$), RU24969 ($n=8$), RU+FENM ($n=8$), and FENM ($n=8$). Mice received FENM or an equivalent volume of saline for pre-treatment, followed by RU24969 or saline for model induction 30 minutes later. Behavioral tests were performed 1 hour after modeling, and serum samples were collected to measure the level of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Evans Blue dye was intravenously injected to assess dye content in brain tissue, thereby evaluating potential blood-brain barrier damage. 【Results】 FENM treatment significantly improved repetitive stereotyped circling behavior ($F=39.850, P<0.001$) and alleviated persistent motor activity ($F=50.200, P<0.001$) in RU24969 model mice. Additionally, FENM treatment significantly increased serum BDNF level in RU24969-induced OCD mice ($F=18.930, P<0.001$).

收稿日期: 2025-01-21

录用日期: 2025-04-02

基金项目: 广东省自然科学基金(2019A1515011308)

作者简介: 王炜洁, 第一作者, 研究方向: 强迫症发病机制及治疗方法, E-mail: wangwj257@mail2.sysu.edu.cn; 温盛霖, 通信作者, 教授, 主任医师, E-mail: wenshl@mail.sysu.edu.cn; 王相兰, 通信作者, 教授, 主任医师, E-mail: wxiangl@mail.sysu.edu.cn

【Conclusions】 FENM, an NMDA receptor antagonist, may alleviate compulsive behaviors in OCD mice by modulating BDNF levels, thereby exerting anti-compulsive effects. Neither the RU24969 model nor FENM treatment significantly affects blood-brain barrier integrity.

Key words: obsessive-compulsive disorder; RU24969; glutamate receptor antagonist; brain-derived neurotrophic factor; blood-brain barrier

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2025, 46(3): 475-485]

强迫症 (obsessive-compulsive disorder, OCD) 是一种严重的精神疾病,表现为反复出现的强迫思维和行为,严重影响患者的社会功能^[1],其病因可能涉及神经递质失衡、脑连接异常、遗传易感性和环境因素等^[2]。目前治疗主要依赖五羟色胺再摄取抑制剂 (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs) 联合认知行为疗法^[3],但疗效有限^[4]。近年来,兴奋性/抑制性神经递质失衡假说成为强迫症病因研究的重点^[5-6]。谷氨酸是大脑主要的兴奋性神经递质,参与多种认知功能的调节^[7],其水平异常^[6]与强迫症状的严重程度相关^[8],也可能因谷氨酸受体的功能受到损害^[9-10]。改善谷氨酸系统可缓解强迫症状,如美金刚可改善执行功能^[11],氯胺酮亦表现出潜在疗效^[12]。本研究关注新型 NMDA 受体拮抗剂氟乙基美金刚 (fluoroethylnormemantine, FENM) 对 RU24969 诱导的强迫小鼠模型的影响。FENM 是美金刚的衍生物,具有不同的谷氨酸受体亲和力^[13],有研究发现其具备减轻应激和神经保护作用^[14-15],但在强迫症治疗方面尚无研究报道。研究发现,强迫症与脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 表达下降相关^[16]。BDNF 影响神经存活和突触可塑性^[17],其外周血水平与强迫症状严重程度相关^[18],且基因多态性 (如 *Val66Met*) 可能影响强迫症易感性和治疗反应^[19]。此外,谷氨酸浓度可与 BDNF 相互影响^[20-22]。血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 调节脑内稳态,其通透性改变可能引起/加剧精神疾病^[23],包括孤独症谱系障碍^[24]、强迫症^[25]、双相情感障碍^[26]及精神分裂症^[27],但在强迫症中的具体作用尚不明确^[28-29]。本研究利用 RU24969 诱导的强迫小鼠模型,探讨 FENM 对强迫行为、血清 BDNF 水平及血脑屏障的影响。结果显示,FENM 缓解小鼠的刻板行为;部分恢复 BDNF 水平,且未显著改变血脑屏障通透性。因此,FENM 可能通过调节谷氨酸系

统和 BDNF 水平发挥抗强迫作用,为强迫症的治疗提供新方向。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

所有实验均严格遵守国家颁布的《医学实验动物管理实施细则》、《实验动物管理条例》以及国际医学期刊要求,并已获得中山大学附属第五医院动物关爱与使用委员会的批准,伦理批准编号:00370。本研究选用 C57BL/6,野生型小鼠品系 (购于百试通生物科技有限公司,合格证书编号:44822700044071),使用 6~8 周龄雄性小鼠,体质量 20~25 g。所有实验小鼠均健康且为无特定病原体 (SPF) 级别,且在标准实验室环境下饲养,具体条件包括:12 h 昼夜交替的受控光照周期、不限制的食物和水供应、室温 22 °C、湿度 60%,并使用玉米芯垫料铺设笼底。

根据此前的预实验结果计算效应量 $d \approx 3.500$,使用 G*power 3.1 软件进行样本量计算,设定效应量 $d \approx 3.500$,显著性水平 $\alpha = 0.050$,统计功效 $1 - \beta = 0.800$,结果显示每组所需样本量 $n = 3$,因小鼠行为学个体差异大我们参考了相关权威文献,在保证数据符合相应实验要求下设定每组 $n = 8$ 。在实验开始前,为最大程度地减少环境因素 (如声音、亮度和人的气味) 对行为实验结果的影响,小鼠在笼中适应环境至少一周。此外,实验者每天以一致的方式抚摸小鼠,确保其熟悉实验者及其气味,从而降低实验过程中潜在的应激反应。随后,实验动物 ($n = 32$) 通过计算机生成的随机数被随机分配到 4 个组中 (每组 8 只)。具体操作为使用 Excel 中的 =RAND() 函数生成随机数序列,依据生成的随机数将小鼠随机分配至生理盐水组 (Saline 组)、RU24969 组、RU+FENM 治疗组和 FENM 组。

1.2 实验药物

RU24969是一种5-HT 1A/1B受体激动剂,能引发小鼠强迫样行为^[30](T8593, TargetMol, Boston, USA),FENM(HY-139048, MedChemExpress, USA)。这两种药品均用无菌生理盐水作溶剂来溶解,且现用现配。参考先前的研究RU24969^[16,31],FENM均按10 mg/kg腹腔注射^[14]。

1.3 行为学

在进行行为学实验前1 h,将小鼠转移至实验室,并让其适应实验环境(实验环境的光照强度:250 lx,噪音水平控制在50~60 dB),为了确保实验结果的一致性,尽可能保持4组小鼠在实验过程中声光等环境条件的一致。实验步骤如下:首先,对4组小鼠进行预给药处理:RU+FENM治疗组和FENM组注射FENM(10 mg/kg,腹腔注射),Saline组和RU24969组注射等体积生理盐水。30 min后,RU24969组和RU+FENM组注射RU24969(10 mg/kg,腹腔注射),Saline组和FENM组注射等量生理盐水。RU24969注射后1 h开始进行行为学测试。

1.3.1 绕圈行为实验 如之前的研究所述^[16,31-32],实验开始时,将小鼠背对实验者轻柔地放置在开放场地的中心,并录制20 min的视频。使用Visutrack software (version 3.0, Xinruan Information Technology Co., Ltd.)对视频进行分析,识别和测量小鼠绕圈次数和绕圈速度。软件识别和计算的程序设定为:当小鼠围绕旷场的中点以及任意中心旋转完成360°的圆周运动时,均记录为1圈,以此测量小鼠的绕圈次数,小鼠的持续绕圈被视为一种异常的重复性、刻板行为,用以评估小鼠是否表现出强迫行为。

1.3.2 旷场实验 实验采用与绕圈行为测试相同规格的不透明塑料箱,将小鼠背对实验者轻柔地放置在旷场的中央,并录制20 min的视频^[16,31],使用Visutrack software (version 3.0, Xinruan Information Technology Co., Ltd.)对视频进行分析,识别并统计小鼠的总运动路程、进入中央区时间、次数,以及在区域内的运动路程。

1.3.3 高架十字迷宫实验 在实验中,小鼠被置于一个由两个开放臂和两个封闭臂组成的高架十字迷宫的中心位置(高架距离地面40 cm,臂长30 cm,宽5 cm,封闭臂的围板高度为15 cm, Aid Biotechnology Co., Ltd.)。实验录制10 min的视频^[33],使用Visutrack software (version 3.0, Xinruan Information

Technology Co., Ltd.)识别并分析小鼠的行为,通过分析小鼠在开放臂上的活动时间比例,可以评估其焦虑程度,该测试旨在通过小鼠对开放和封闭空间的自然回避反应,评估其焦虑水平。

1.3.4 大理石埋珠实验 实验前,准备好铺有5 cm厚度以上洁净玉米芯垫料的自制实验箱(不透明、无异味,尺寸为长35 cm、宽25 cm、高40 cm),在表面均匀地放置5排×4列共20个玻璃珠(直径1 cm,外观一致)。实验持续时间为30 min^[34]。实验结束后,双盲计数小鼠埋珠的数量,以珠子埋入2/3体积为计数标准,并取两者均值作为衡量小鼠焦虑、强迫症或对新奇事物探索表现的指标。

1.3.5 碎巢实验 实验前,准备铺有5 cm厚度洁净玉米芯垫料的小鼠笼具,称量并记录自制5 cm×5 cm筑巢棉花块的初始质量。随后,让小鼠自由活动30 min^[34-35]。实验结束后,双盲人员整理碎巢后的筑巢棉花块,取最大的棉块放入塑封袋中,置于通风干燥的地方保存24 h,随后称量前后棉花的质量差。

1.4 伊文思蓝实验

所有行为学实验结束后,对小鼠进行安乐死前30 min,用双蒸水配置20 mg/mL的伊文思蓝溶液,通过尾静脉注射小鼠(剂量为4 mL/kg)^[36]。麻醉后,通过生理盐水经左心房灌注小鼠,取出脑组织,分离目标脑区或伊文思蓝显著渗出的部位后,加入生理盐水匀浆,进行10 000×g离心30 min。接着,配置浓度梯度为64.00、32.00、16.00、8.00、4.00、2.00、1.00、0.50、0.250和0.125 μg/mL的伊文思蓝溶液,并制作标准曲线。利用波长620 nm的酶标仪测定标准溶液和样品上清液的吸光度值,根据标准曲线计算伊文思蓝的含量,从而作为血脑屏障通透性的衡量指标。

1.5 酶联免疫吸附试验

所有行为学结束后,对小鼠进行麻醉,眼球取血,常温静置30 min后离心(2 000×g, 10min)取上清作为血清进行Elisa实验,使用Mouse BDNF ELISA Kit (E-EL-M0203, Elabscience, Wuhan, China),采用的是双抗体夹心Elisa法。收集血清样本后,按说明书预混合试剂,配制标准品,加入样品和标准品于酶标板中,37℃孵育90 min,而后依次加入生物素化的抗小鼠BDNF抗体和辣根过氧化物酶标记的亲合素37℃孵育1 h,洗净酶标板后加入HRP酶结合物工作液体,37℃孵育30 min,洗净

酶标板后加入底物溶液 TMB, 37 °C 避光孵育 10 min, 加入终止液, 450 nm 波长测定各孔的吸光度。

1.6 蛋白免疫印迹

所有行为学结束后, 对小鼠进行麻醉, 心脏灌注后取脑组织, 加入细胞裂解液(P0013B, Beyotime Biotechnology, China)进行裂解后, 4 °C 离心(12 000×g, 15 min)取上清液, BCA 定量试剂盒检测蛋白浓度(P0012S, Beyotime Biotechnology, China)。配置 SDS 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行蛋白电泳, 随后将蛋白转至 PVDF 膜, 取出 PVDF 膜于快速封闭液(P0252-100 mL, Beyotime Biotechnology, China)中封闭 30 min 后, 加入一抗 Claud-5 (AF5216, Affinity Biosciences, China)、Occludin (GB111401-100, Servicebio Wuhan, China) 4 °C 孵育过夜, 用 TBST 洗膜后, 室温孵育二抗 1 h, 使用成像仪曝光成像, 并用 Image J 分析灰度值。

1.7 统计分析

数据采用 GraphPad Prism 10.1.2 进行分析处理, 结果以均值±标准差(Mean ± SD)表示。根据数据类型和实验设计, 采用单因素方差分析(ANOVA)进行四组之间的多组比较, 若数据符合正态分布且方差齐性, 使用参数检验; 若数据不符合正态分布或方差不齐, 采用 Kruskal-Wallis 检验进行非参数检验。对于 ANOVA 结果显著的情况, 使用 Tukey 法进行组间两两比较, 或使用 Dunnett 法比较对照组与其他组的差异。P 值 ≤ 0.050 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 FENM 治疗减轻 RU24969 组小鼠持续运动和刻板绕圈行为, 且对正常小鼠不产生影响

图 1A 为实验流程示意图。旷场实验的结果提示: 从旷场运动轨迹图(图 1B)可见, RU24969 组小鼠运动量增加, FENM 治疗干预后, 小鼠的总运动量显著减少, 且使用 FENM 不影响正常小鼠的活动(图 1C), 各组间差异具统计学意义。利用 Tukey 法进行组间两两比较发现, RU24969 组总运动距离显著高于 Saline 组($P < 0.001$), 使用 FENM 治疗后降低($P = 0.0031$), 单独使用 FENM 组和 Saline 组相比, 发现 FENM 不影响正常小鼠的行为($P = 0.989$)

), 小鼠在旷场中的运动速度也得出相近的结论(图 1D), RU24969 组较 Saline 组运动速度显著增加($P < 0.001$), 使用 FENM 治疗后减速($P = 0.0031$), FENM 组与 Saline 组的速度差异不具统计学意义($P = 0.9889$)。

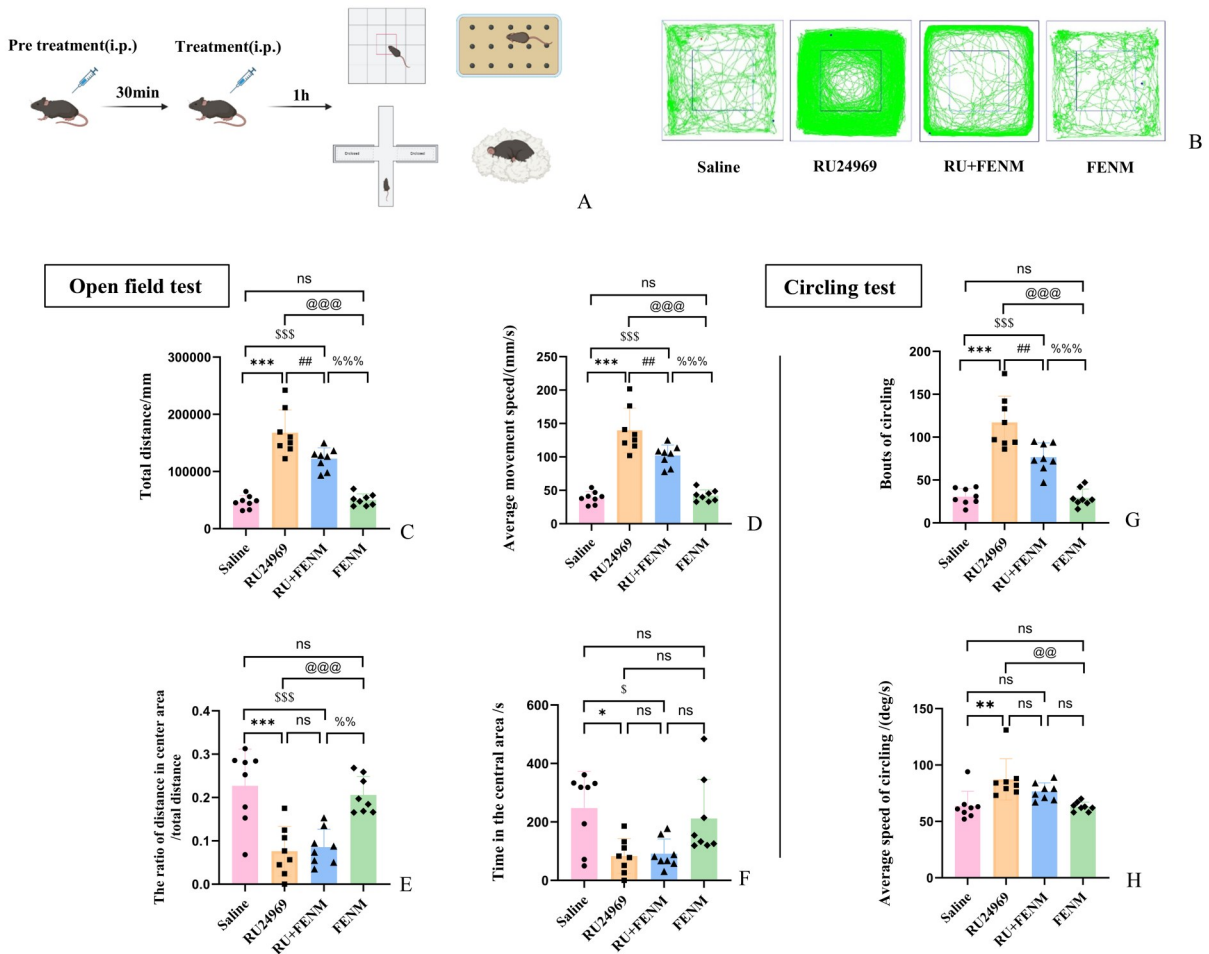
在旷场中央区的运动距离/总距离的比值(图 1E)各组间差异具统计学意义, RU24969 组较 Saline 组显著减少($P < 0.001$), 使用 FENM 治疗后未有显著改善($P = 0.9887$)。小鼠在旷场中央区的停留时间统计中(图 1F), 差异具统计学意义, 其中 Saline 组分别和 RU24969 组、RU+FENM 组比较显著增加($P = 0.0138$, $P = 0.0201$)。

在绕圈实验中, 各组小鼠的绕圈次数(图 1G)差异具统计学意义, RU24969 组显著高于 Saline 组($P < 0.001$)、RU+FENM 组($P = 0.001$)以及 FENM 组($P < 0.001$), 即使用 FENM 治疗后小鼠的绕圈行为有一定的缓解。小鼠的绕圈速度(图 1H)组间具统计学差异, 其中 RU24969 组分别较 Saline 组($P = 0.0029$)和 FENM 组($P = 0.0021$)显著加快。

FENM 能够有效缓解小鼠的持续运动和刻板绕圈行为, 但未能显著改善小鼠在旷场实验中的焦虑水平, 单独使用 FENM 不影响正常小鼠的旷场行为。

2.2 FENM 治疗未显著改善小鼠高架十字迷宫实验中进入开放臂的表现

高架十字迷宫实验中的行为指标主要通过小鼠在开放臂和封闭臂之间的选择和活动来推测其焦虑水平。通常, 高焦虑的小鼠更倾向于停留在封闭区域, 避免进入开放臂, 而低焦虑的小鼠则表现出更多的探索行为, 倾向于进入开放区域。在本研究中, 从实验小鼠的运动轨迹图(图 2A)可见, FENM 治疗在一定程度上增加了小鼠在开放臂的探索活动。各组小鼠在高架中的总运动距离统计(图 2B)中, 各组间差异具统计学意义, RU24969 组较 Saline 组($P < 0.001$)和 FENM 组($P < 0.001$)均显著升高, 但与 RU+FENM 组相比差异无统计学意义($P > 0.999$)。小鼠进入开放臂的次数(图 2C)各组间差异具统计学意义, RU+FENM 组较 Saline 组显著增加($P = 0.0007$), 但与 RU24969 组相比未见显著改善($P = 0.6860$)。小鼠在高架上总的运动距离/进入开放臂的次数比值(图 2D)、在开放臂的停留时间(图 2E)以及闭合臂的停留时间(图 2G)各组间差异无统计学意义。小鼠在开放臂的运动距离统计中(图 2F), 组间差异具统计学意义, 其中 RU+



A: Schematic diagram of the experimental procedure. B: Tracking map of the movement trajectories of mice in each group during the open field test. C–F: Show the total distance traveled ($n=8$, $F=50.200$, $P < 0.001$), average speed ($n=8$, $F=50.200$, $P < 0.001$), the ratio of the distance traveled in the center area to the total distance ($n=8$, $F=14.110$, $P=0.001$), and the time spent in the center area ($n=8$, $F=5.595$, $P=0.0039$), for mice in each group during the open field test. G–H: Show the number of circles ($n=8$, $F=39.850$, $P < 0.001$), and the average circling speed ($n=8$, $F=7.368$, $P=0.0009$) of mice in each group during the circling test. Data are presented as means \pm SD, * represents Saline group vs. RU24969 group, # represents RU24969 group vs. RU+FENM group, % represents RU+FENM group vs. FENM group, \$ represents Saline group vs. RU+FENM group, @ represents RU24969 group vs. FENM group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and so on, ns stands for no significance. i. p.: intraperitoneal injection; RU+FENM: drug RU24969+FENM.

图1 FENM治疗减轻RU24969组小鼠持续运动和刻板绕圈行为,且对正常小鼠不产生影响

Fig. 1 FENM treatment alleviated the persistent movement and stereotypical circling behavior in RU24969-treated mice, with no effect on normal mice

FENM组较Saline组和FENM组显著增加($P=0.0095$, $P=0.0084$),而与RU24969组差异无统计学意义($P=0.6512$)。FENM治疗未能显著改善小鼠在高架十字迷宫实验中的表现。

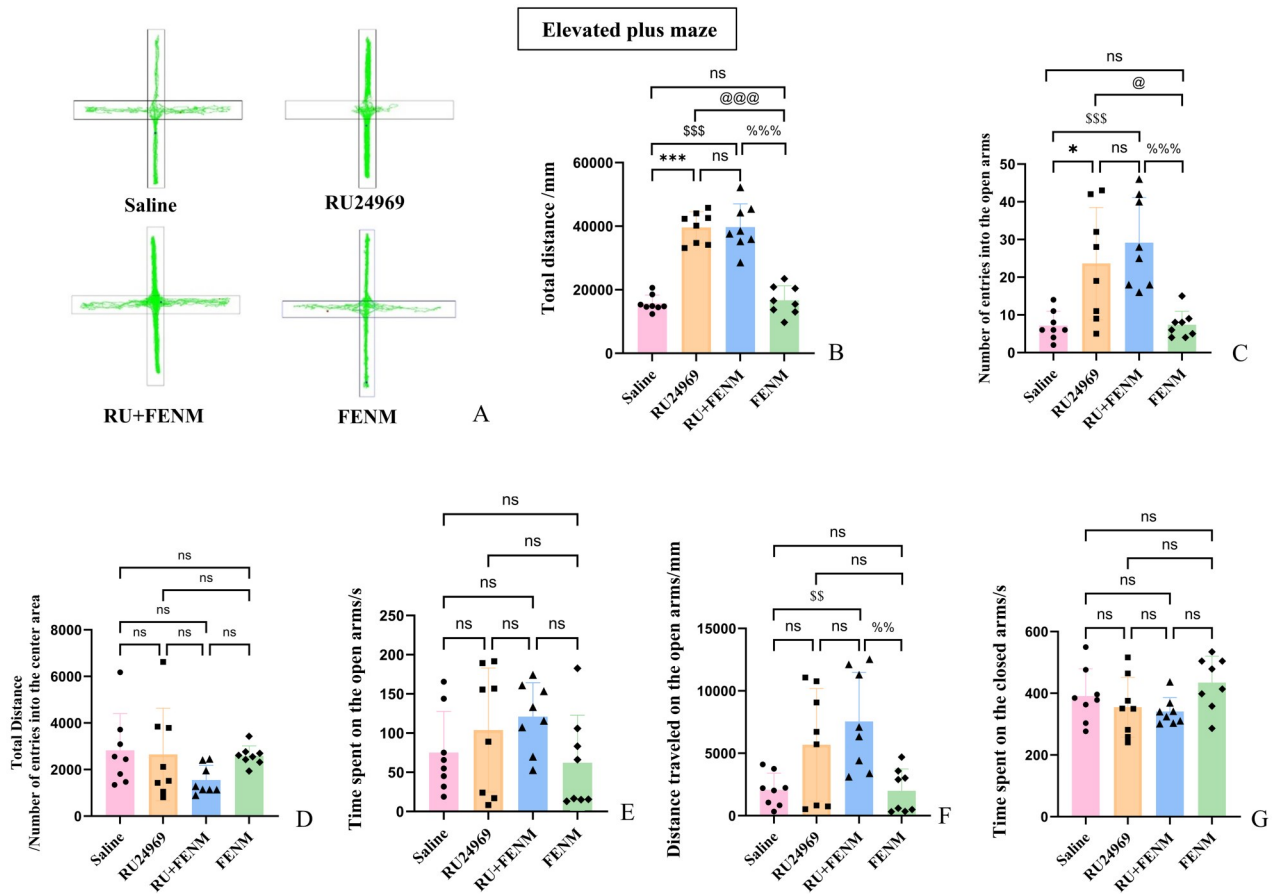
2.3 RU24969处理后小鼠大理石埋珠行为减少

大理石埋珠实验用于评估小鼠的强迫行为和焦虑程度,也可一定程度反映对新奇事物的探索。从图3A可见,RU24969组小鼠在实验结束时,珠子位置几乎未发生变化,埋珠行为较少。对埋珠的

数量进行统计(图3B),组间差异具统计学意义,RU24969组小鼠与Saline组和FENM组相比,埋珠数量显著减少($P=0.0140$, $P=0.0336$),与RU+FENM组小鼠无显著统计学差异($P=0.7026$)这一结果表明,FENM治疗未显著改善RU24969组小鼠挖掘方面的行为表现,且不能证明RU24969组小鼠的强迫行为减轻。

2.4 RU24969处理后小鼠碎巢行为较少,且FENM治疗不能改善

碎巢实验是一项常用的行为学实验,用于评估



A: Movement trajectory maps of mice in each group in the elevated plus maze. B: Total distance traveled by mice in the elevated plus maze ($n=8$, $F=55.570$, $P<0.001$). C: The number of entries into the open arms by mice in each group ($n=8$, $F=10.360$, $P<0.001$). D: The ratio of total distance traveled by mice to the number of entries into the open arms ($n=8$, $H=7.179$, $P=0.0664$). E-F: The time spent in the open arms ($n=8$, $F=1.568$, $P=0.2191$) and the distance traveled ($n=8$, $F=5.968$, $P=0.0028$) by mice in each group. G: The time spent in the closed arms ($n=8$, $F=2.213$, $P=0.1198$) by mice in each group. Data are presented as means \pm SD, $^{\circ}$ represents Saline group vs. RU24969 group, $^{\circ}$ represents RU+FENM group vs. FENM group, $^{\circ}$ represents Saline group vs. RU+FENM group, $^{\circ}$ represents RU24969 group vs. FENM group, $^{\circ}$ $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, and so on, ns stands for no significance. RU+FENM: drug RU24969+FENM.

图2 FENM 治疗未显著改善强迫症小鼠进入开放臂

Fig. 2 FENM treatment did not significantly improve obsessive-compulsive disorder mice in entering the open arms

小鼠的强迫症状、焦虑和应激反应。从本研究的实验结果展示图可见, RU24969 处理后的小鼠几乎没有表现出碎巢行为(图 3C)。对小鼠撕扯下的棉花质量进行统计发现(图 3D), 差异具统计学意义, RU24969 组较 Saline 组和 FENM 组碎巢行为均减少 ($P=0.0493$, $P=0.0136$), 而与 RU+FENM 治疗组相比, 未出现显著改变 ($P=0.9993$)。这一结果表明, FENM 治疗未显著改善 RU24969 组小鼠巢筑方面的行为表现。

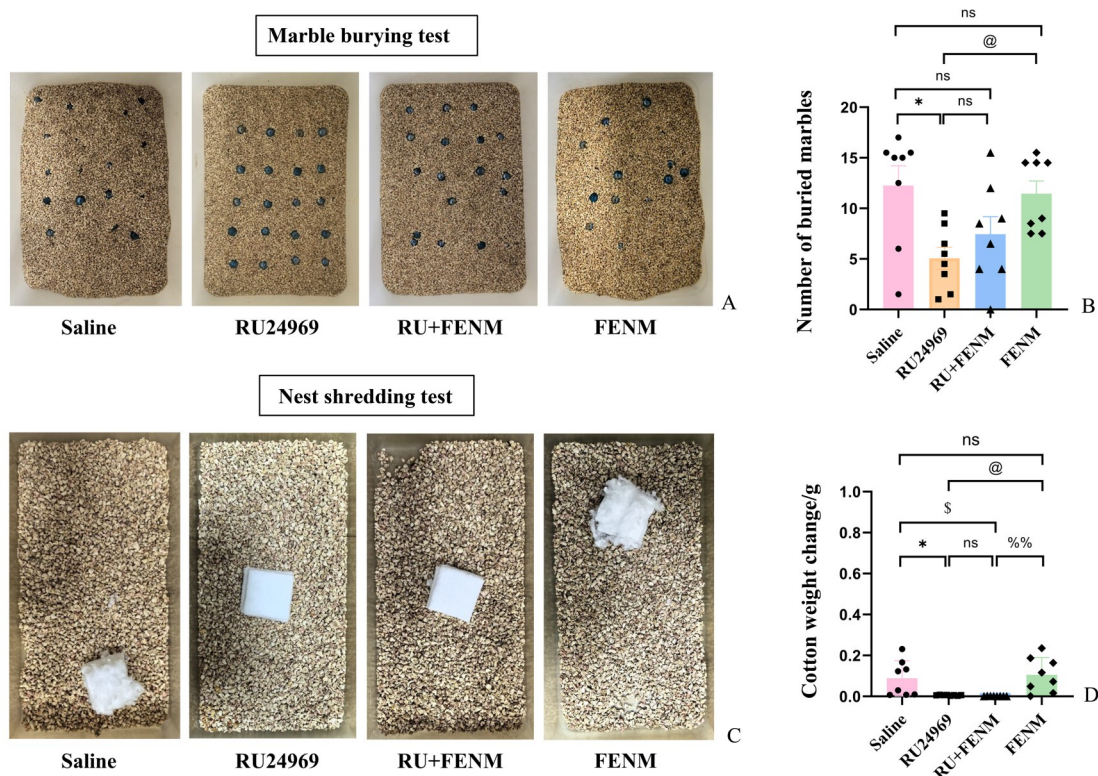
2.5 FENM 治疗能够提高 BDNF 的水平, 且绕圈行为与血清 BDNF 的浓度呈负相关关系

通过检测小鼠血清中 BDNF 的含量发现(图

4A), 各组间的水平有较大的差别, 差异具统计学意义, 其中, RU24969 组小鼠较 Saline 组降低 ($P<0.001$), 使用 FENM 治疗后, BDNF 水平得到提高 ($P=0.001$), 甚至恢复到正常水平, 提示该药物可能是通过 BDNF 发挥治疗作用的。为了探究 BDNF 与绕圈行为的相关性, 将每只小鼠的 BDNF 值和对应的绕圈次数进行相关性分析(图 4B), 发现 BDNF 值越高, 小鼠的绕圈行为越少, 即绕圈行为与血清 BDNF 的含量呈负相关关系。

2.6 RU24969 药物诱导的强迫症小鼠模型并未出现血脑屏障通透性改变

伊文思蓝是一种大分子染料, 通常情况下, 血



A: Result display of marble burying test for mice in each group. B: The number of marbles buried by mice in each group ($n=8$, $F=4.774$, $P=0.0082$). C: Result display of nest shredding test for mice in each group. D: The weight difference of nest material (cotton) before and after nesting in the nest shredding test for mice in each group ($n=8$, $F=6.421$, $P=0.0019$). Data are presented as means \pm SD, * represents Saline group vs. RU24969 group, % represents RU+FENM group vs. FENM group, § represents Saline group vs. RU+FENM group, @ represents RU24969 group vs. FENM group, $^{\dagger}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and so on, ns stands for no significance. RU+FENM: drug RU24969+FENM.

图3 FENM 治疗后强迫模型小鼠未增加埋珠及碎巢行为

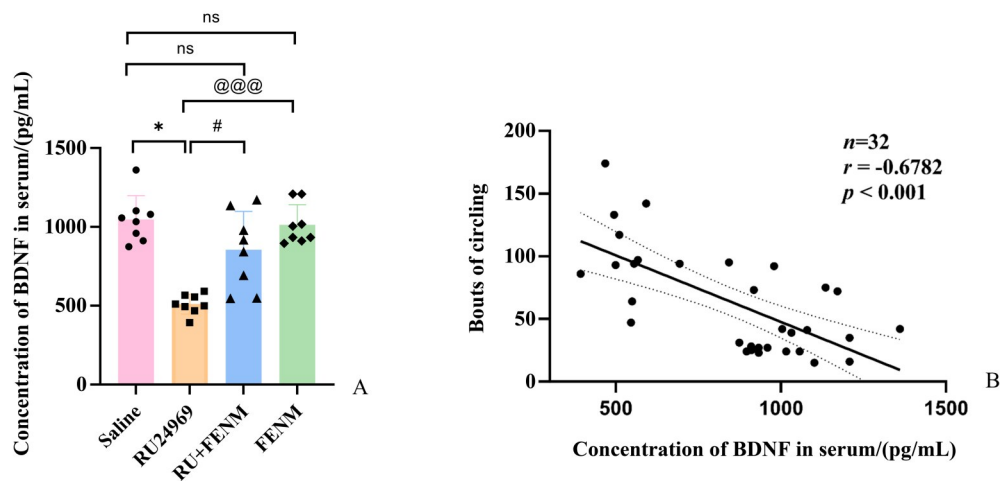
Fig. 3 FENM treatment did not increase marble burying and nest building behavior in obsessive-compulsive disorder model mice

脑屏障能够有效阻止大多数大分子物质(包括伊文思蓝)进入大脑,从而维持大脑环境的稳定。为了探讨本实验模型是否存在血脑屏障通透性增高的问题,我们对小鼠进行尾静脉注射伊文思蓝染料。结果显示,在小鼠的脑组织切面中未观察到明显的蓝色染料渗出(图5A)。通过测定吸光度并计算小鼠脑组织中的伊文思蓝浓度(图5B),结果显示各组间无显著统计学差异。同时,对脑组织的紧密连接蛋白 *Claud-5* 和 *Occludin* 进行蛋白免疫印迹实验(图5C,5D),对蛋白条带进行量化统计后,两组蛋白各组间均不具有统计学差异。这些结果表明, RU24969 诱导的强迫小鼠模型未出现血脑屏障损伤的情况,且加用 FENM 后,血脑屏障的通透性未发生显著变化,间接证明 FENM 短期内具有一定的安全性。

3 讨论

本研究结果发现, FENM 可缓解小鼠的强迫性行为,尤其是持续运动和刻板绕圈,对正常小鼠无影响,但对小鼠焦虑情绪无显著改善。此外, FENM 治疗可提高血清 BDNF 水平,可能是其发挥作用的关键机制,而血脑屏障通透性未受显著影响,提示本模型未出现血脑屏障损伤, FENM 短期使用对血脑屏障影响不大。这些结果为进一步研究提供了基础。

FENM 作为 NMDA 受体拮抗剂, 相较传统 NMDAR 结合物具有更高亲和力及优化的药代动力学特征^[13]。既往研究发现其可对抗应激诱导的不良行为,并在阿尔茨海默症中展现神经保护作用^[14,37],但尚未用于强迫症治疗。本研究首次探索



A: ELISA measurement of serum BDNF concentrations in mice from each group ($n=8$, $F=18.930$, $P<0.001$). B: Correlation analysis between serum BDNF concentrations and the number of circling behaviors in the open field test ($n=32$, $r=-0.6782$, $P<0.001$). Data are presented as means \pm SD, * represents Saline group *vs.* RU24969 group, # represents RU24969 group *vs.* RU+FENM group, @ represents RU24969 group *vs.* FENM group, * $P<0.001$, and so on, ns stands for no significance. RU+FENM: drug RU24969+FENM; BDNF: brain-derived neurotrophic factor.

图4 FENM 显著提高强迫症小鼠血清BDNF水平,且BDNF水平与绕圈次数具有负相关关系

Fig. 4 FENM significantly increased serum BDNF levels in obsessive-compulsive disorder mice, and BDNF levels were negatively correlated with the number of circling behaviors

FENM 在强迫症中的应用。行为学结果表明, FENM 可缓解小鼠的刻板行为,与 Chen 等^[38]研究一致,但在大理石埋珠及碎巢实验中的效果不佳,与 Chen 等^[31]研究类似。可能原因包括 RU24969 诱导的小鼠运动量增加,进行刻板绕圈而忽视了其他行为任务,或小鼠对新事物的探索欲降低^[34]。这些结果提示 FENM 可能主要对刻板动作有效。

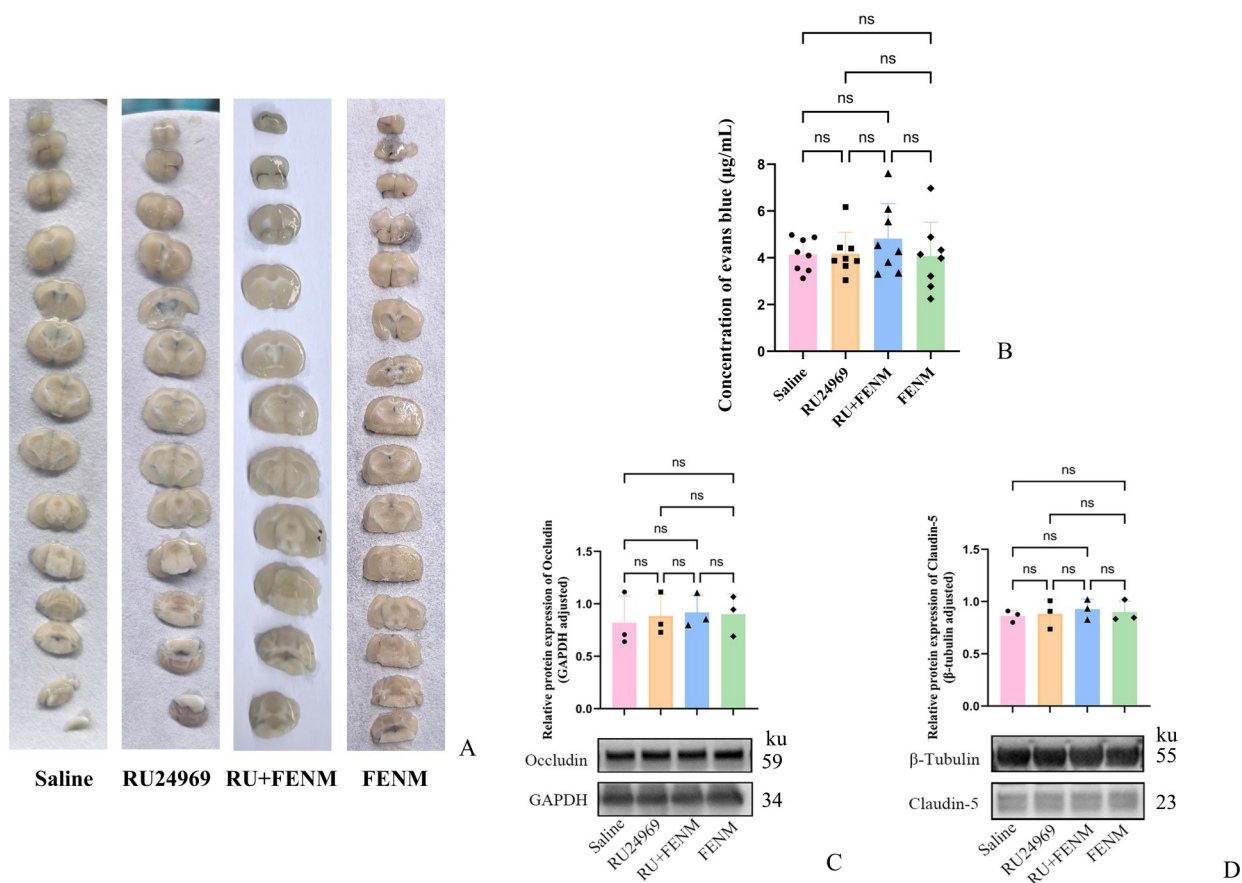
在焦虑相关行为实验中, RU24969 组小鼠在旷场实验中进入中央区的比例和时间减少,表明存在焦虑倾向,与 Oliver 等^[39]研究一致, FENM 治疗后未能改善该行为,与 Chen 等^[14]研究结果相符,可能与模型差异有关。在高架十字迷宫实验中, RU24969 组及 FENM 治疗组开放臂进入次数增加,但可能因运动量增加所致。控制运动量后分析,发现该指标在各组间无统计学差异,因此无法准确评估焦虑水平。这提示 RU24969 小鼠模型的焦虑评估需结合更多实验,如明暗箱测试。

RU24969 组小鼠血清 BDNF 水平下降,与此前的研究一致^[16],与绕圈行为呈负相关,提示 BDNF 可能是强迫行为的关键调节因子。FENM 治疗可恢复 BDNF 水平,进一步支持其潜在作用。研究表明, NMDA 受体激活可促进 BDNF 表达,参与神经可塑性调节^[40]。NMDA 受体在神经信号传导中至关重要,其激活可通过 Ca^{2+} 流入启动 ERK、MAPK、

CREB 等信号通路,促进 BDNF 转录与分泌^[41]。但 NMDA 受体过度激活可能导致神经及突触损伤和 BDNF 表达异常,进而引发精神疾病^[22]。临床研究表明,强迫症患者外周血 BDNF 水平低于健康对照组^[42],且与症状严重程度呈负相关^[43]。因此, FENM 可能通过调节谷氨酸系统改善 BDNF 水平,从而缓解强迫症状,这一机制值得进一步探讨。

血脑屏障完整在维持神经系统稳态方面起重要作用^[23,44-45],近年来有研究发现精神疾病可能与血脑屏障异常相关^[24,46-47]。强迫症相关研究主要集中于外周血紧密连接蛋白分析,缺乏直接证据^[25,48]。本研究采用伊文思蓝渗透实验及紧密连接蛋白 *Claudin-5*、*Occludin* 的表达评估血脑屏障通透性。结果显示,各组小鼠脑组织未见显著染料渗出,紧密连接蛋白表达无明显差异, FENM 治疗后亦未导致血脑屏障通透性增加。这表明 RU24969 模型尚无血脑屏障损伤,且 FENM 短期使用对血脑屏障影响有限。此外,也侧面说明 FENM 的作用可能不依赖血脑屏障通透性变化,从而降低神经损伤风险,并提示其治疗效果主要通过调节中枢谷氨酸系统,而非影响外周谷氨酸水平。

综上所述, FENM 可能是通过调节谷氨酸系统影响 BDNF 水平减轻强迫性行为,尤其是持续运动和绕圈行为,但其对焦虑水平的改善效果有限,此



A: Brain section display of mice from each group after Evans blue injection. B: Evans blue dye concentration in the brain tissue of mice from each group ($n=8$, $F=0.6824$, $P=0.5703$). C-D: *Claudin-5* and *Occludin* protein expression analyzed by western blot ($n=3$, $F=0.2106$, $P=0.8863$; $F=0.1297$, $P=0.9398$). Data are presented as means \pm SD, ns stands for no significance. RU+FENM: Drug RU24969+FENM.

图5 4组小鼠的血脑屏障均未出现明显损坏

Fig. 5 The blood-brain barrier in all four groups of mice showed no significant damage

外,该药物对血脑屏障的影响短期内较小,具有一定的安全性。当前的研究局限于动物实验,鉴于其对谷氨酸受体有不同的亲和力,可能较美金刚有更

少的副作用以及更好的疗效,因此具有一定的临床应用潜力和研究前景。

参考文献

[1] Jalal B, Chamberlain SR, Sahakian BJ. Obsessive-compulsive disorder: etiology, neuropathology, and cognitive dysfunction [J]. *Brain Behav*, 2023, 13(6): e3000.

[2] Robbins TW, Vaghi MM, Banca P. Obsessive-compulsive disorder: puzzles and prospects [J]. *Neuron*, 2019, 102(1): 27-47.

[3] Katzman MA, Bleau P, Blier P, et al. Canadian clinical practice guidelines for the management of anxiety, posttraumatic stress and obsessive-compulsive disorders [J]. *BMC Psychiatry*, 2014, 14(Suppl 1(Suppl 1)): S1.

[4] Fineberg NA, Reghunandan S, Simpson HB, et al. Obsessive-compulsive disorder (OCD): practical strategies for pharmacological and somatic treatment in adults [J]. *Psychiatry Res*, 2015, 227(1): 114-125.

[5] Biria M, Banca P, Keser E, et al. Excessive checking in obsessive-compulsive disorder: neurochemical correlates revealed by 7T magnetic resonance spectroscopy [J]. *Biol Psychiatry Glob Open Sci*, 2024, 4(1): 363-373.

[6] Chakrabarty K, Bhattacharyya S, Christopher R, et al. Glutamatergic dysfunction in OCD [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2005, 30(9): 1735-1740.

[7] Mcquate A, Barria A. Rapid exchange of synaptic and

- extrasynaptic NMDA receptors in hippocampal CA1 neurons [J]. *J Neurophysiol*, 2020, 123(3): 1004–1014.
- [8] 郑会蓉, 华冠民, 郭光全, 等. 强迫症共病抠皮障碍患者磁共振波谱分析[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2020, 45(2): 160–164.
- Zheng HP, Hua GM, Guo GQ, et al. Analysis of magnetic resonance spectroscopy in patients with obsessive-compulsive disorder comorbid skin-picking disorder [J]. *J Central South Univ (Med Sci)*, 2020, 45(2): 160–164.
- [9] Akkus F, Terbeck S, Ametamey SM, et al. Metabotropic glutamate receptor 5 binding in patients with obsessive-compulsive disorder [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2014, 17(12): 1915–1922.
- [10] Alonso P, Gratacós M, Segalàs C, et al. Association between the NMDA glutamate receptor GRIN2B gene and obsessive-compulsive disorder [J]. *J Psychiatry Neurosci*, 2012, 37(4): 273–281.
- [11] Askari S, Mokhtari S, Shariat SV, et al. Memantine augmentation of sertraline in the treatment of symptoms and executive function among patients with obsessive-compulsive disorder: a double-blind placebo-controlled, randomized clinical trial [J]. *BMC Psychiatry*, 2022, 22(1): 34.
- [12] Bandeira ID, Lins-Silva DH, Cavenaghi VB, et al. Ketamine in the treatment of obsessive-compulsive disorder: a systematic review [J]. *Harv Rev Psychiatry*, 2022, 30(2): 135–145.
- [13] Beaurain M, Talmont F, Pierre D, et al. Pharmacological characterization of [(18)F]-FNM and evaluation of NMDA receptors activation in a rat brain injury model [J]. *Mol Imaging Biol*, 2023, 25(4): 692–703.
- [14] Chen BK, Luna VM, Shannon ME, et al. Fluoroethylnormemantine, a novel NMDA receptor antagonist, for the prevention and treatment of stress-induced maladaptive behavior [J]. *Biol Psychiatry*, 2021, 90(7): 458–472.
- [15] Couly S, Denus M, Bouchet M, et al. Anti-amnesic and neuroprotective effects of fluoroethylnormemantine in a pharmacological mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2021, 24(2): 142–157.
- [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] Arévalo JC, Deogracias R. Mechanisms controlling the expression and secretion of BDNF [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(5).
- [18] Hao LS, Du Y, Chen L, et al. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for obsessive-compulsive disorder: a meta-analysis [J]. *J Psychiatr Res*, 2022, 151: 676–682.
- [19] Wang S, Xu X, Yan P, et al. Is brain-derived neurotrophic factor (bDNF) val66met polymorphism associated with obsessive-compulsive disorder? a meta-analysis [J]. *Psychiatr Danub*, 2019, 31(2): 141–147.
- [20] Song C, Wu YS, Yang ZY, et al. Astrocyte-conditioned medium protects prefrontal cortical neurons from glutamate-induced cell death by inhibiting TNF- α expression [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2019, 26(1): 33–42.
- [21] Chiu KM, Lin TY, Lee MY, et al. Dexmedetomidine protects neurons from kainic acid-induced excitotoxicity by activating BDNF signaling [J]. *Neurochem Int*, 2019, 129: 104493.
- [22] Gaidin SG, Turovskaya MV, Gavrish MS, et al. The selective BDNF overexpression in neurons protects neuroglial networks against OGD and glutamate-induced excitotoxicity [J]. *Int J Neurosci*, 2020, 130(4): 363–383.
- [23] Alahmari A. Blood-brain barrier overview: structural and functional correlation [J]. *Neural Plast*, 2021, 2021: 6564585.
- [24] Fiorentino M, Sapone A, Senger S, et al. Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders [J]. *Mol Autism*, 2016, 7: 49.
- [25] Işık Ü, Aydoğan Avşar P, Aktepe E, et al. Serum zonulin and claudin-5 levels in children with obsessive-compulsive disorder [J]. *Nord J Psychiatry*, 2020, 74(5): 346–351.
- [26] Kılıç F, Işık Ü, Demirdaş A, et al. Serum zonulin and claudin-5 levels in patients with bipolar disorder [J]. *J Affect Disord*, 2020, 266: 37–42.
- [27] Usta A, Kılıç F, Demirdaş A, et al. Serum zonulin and claudin-5 levels in patients with schizophrenia [J]. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2021, 271(4): 767–773.
- [28] Grassi G, Scillitani E, Cecchelli C. New horizons for obsessive-compulsive disorder drug discovery: is targeting glutamate receptors the answer? [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2024, 19(10): 1235–1245.
- [29] Coelho DRA, Yang C, Suriaga A, et al. Glutamatergic medications for obsessive-compulsive and related disorders: a systematic review and meta-analysis [J]. *JAMA Netw Open*, 2025, 8(1): e2452963.
- [30] Salloum F, Farran M, Shaib H, et al. Establishing an OCD model in BALB/c mice using RU24969: a molecular and behavioural study of optimal dose selection [J]. *Behav Neurol*, 2024, 2024: 4504858.
- [31] 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.
- [32] Yoon Y, Shin H, Byun D, et al. Neural probe system for behavioral neuropharmacology by bi-directional wireless drug delivery and electrophysiology in socially interacting mice [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5521.
- [33] Pádua-Reis M, Nôga DA, Tort ABL, et al. Diazepam causes

- sedative rather than anxiolytic effects in C57BL/6J mice [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 9335.
- [34] Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, et al. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice [J]. *J Vis Exp*, 2013, (82): 50978.
- [35] Eissa N, Jayaprakash P, Azimullah S, et al. The histamine H3R antagonist DL77 attenuates autistic behaviors in a prenatal valproic acid-induced mouse model of autism [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 13077.
- [36] 黄鹏, 吴斌, 高增祥, 等. 人参皂苷 Rb1 调控 MAPK 通路改善小鼠脑缺血再灌注诱导血脑屏障损伤的作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(3): 513-520.
Huang P, Wu B, Gao ZX, et al. Ginsenoside Rb1 improve cerebral ischemia-reperfusion induced blood-brain barrier injury in mice by regulating MAPK pathway [J]. *Drug Eval Res*, 2024, 47(3): 513-520.
- [37] Carles A, Freysson A, Guehairia S, et al. Neuroprotection by chronic administration of fluoroethylnormemantine (FENM) in mouse models of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2025, 17(1): 7.
- [38] Chen BK, Le Pen G, Eckmier A, et al. Fluoroethylnormemantine, a novel derivative of memantine, facilitates extinction learning without sensorimotor deficits [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2021, 24(6): 519-531.
- [39] Oliver BL, Burdette MH, Pahua AE, et al. Acute serotonin 1B/1A receptor activation impairs behavioral flexibility in C57BL/6J mice [J]. *Behav Brain Res*, 2022, 427: 113865.
- [40] Torres VO, Turchan-Cholewo J, Colson MK, et al. B cells upregulate NMDARs, respond to extracellular glutamate, and express mature BDNF to protect the brain from ischemic injury [J]. *Neurobiol Dis*, 2025: 106819.
- [41] Banerjee M, Shenoy RR. Emphasizing roles of BDNF promoters and inducers in Alzheimer's disease for improving impaired cognition and memory [J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2023, 34(2): 125-136.
- [42] D'addario C, Macellaro M, Bellia F, et al. In search for biomarkers in obsessive-compulsive disorder: new evidence on saliva as a practical source of DNA to assess epigenetic regulation [J]. *Curr Med Chem*, 2022, 29(36): 5782-5791.
- [43] Bilgiç A, Sertdemir M, Kılınc İ, et al. Increased serum brain-derived neurotrophic factor and adrenocorticotrophic hormone levels are associated with obsessive compulsive disorder in medication-free children [J]. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 2022, 31(2): 325-335.
- [44] Dyatlova AS, Novikova NS, Yushkov BG, et al. The blood-brain barrier in neuroimmune interactions and pathological processes [J]. *Her Russ Acad Sci*, 2022, 92(5): 590-599.
- [45] 李建斌, 吴锐. 周细胞脱失与神经精神性狼疮血瘀证目征和血脑屏障功能障碍的相关性 [J]. *实用医学杂志*, 2025, 41(6): 790-799.
Li JB, Wu R. Correlation study on pericyte depletion, eye-signs in blood stasis syndrome, and blood-brain barrier dysfunction in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus [J]. *J Pract Med*, 2025, 41(6): 790-799.
- [46] Kealy J, Greene C, Campbell M. Blood-brain barrier regulation in psychiatric disorders [J]. *Neurosci Lett*, 2020, 726: 133664.
- [47] 张永昶, 刘彩燕, 符祥滨, 等. 注意缺陷多动障碍与炎症关系的研究进展 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2024, 50(8): 498-503.
Zhang YC, Liu CY, Fu XZ, et al. Research progress on the relationship between attention deficit and hyperactive disorder and inflammation [J]. *Chin J Nerv Ment Dis*, 2024, 50(8): 498-503.
- [48] Zengil S, Laloğlu E. Evaluation of serum zonulin and occludin levels in obsessive-compulsive disorder and the effect of major depressive disorder comorbidity [J]. *Front Psychiatry*, 2024, 15: 1395235.

(编辑 余菁)