

一种治疗心境障碍的方法

技术领域

- 5 本发明涉及预防或治疗心境障碍的方法，所述方法包括向需要其的客体施用有效量的 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂。

背景技术

- 心境障碍是以焦虑、抑郁或躁郁为代表的精神失常，近年来有增加的倾向，
10 成为很大的社会问题。焦虑和抑郁是最常见的精神障碍，并且是其它神经精神疾病、中风、肿瘤等的并发症。超过 70% 的痴呆患者具有抑郁和/或焦虑症状 (Selbaek, G., K. Engedal and S. Bergh, The prevalence and course of neuropsychiatric symptoms in nursing home patients with dementia: a systematic review. J Am Med Dir Assoc, 2013. 14(3): p. 161-9) 。

- 15 目前，临床上抗焦虑抑郁的药物整体上疗效不理想，特别是对重度焦虑抑郁、神经退行性疾病和中风后抑郁、以及恶性肿瘤患者的焦虑抑郁的疗效果差或基本无效，而且还有起效慢、副作用广泛又严重的缺点。

- 在本申请之前，通常认为磷酸肌醇 (PI) 水平和磷酸肌醇-3 激酶 (PI3K) 的酶活性降低与抑郁症相关。PI3K 缺乏增加了小鼠的焦虑水平，而几类传统抗抑郁药增加了与焦虑和抑郁相关的脑区磷酸肌醇的再合成 (参见，例如：Di Paolo, G. and P. De Camilli, Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. Nature, 2006. 443(7112): p. 651-7; Saito, T., et al., Polymorphism screening of PIK4CA: possible candidate gene for chromosome 22q11-linked psychiatric disorders. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2003. 116B(1): p. 77-83; Balla, A. and T.
20 Balla, Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions. Trends
25 Cell Biol, 2006. 16(7): p. 351-61) 。

令人惊讶的是，本申请的发明人发现：在多种疾病模型小鼠中，通过遗传方法降低 PI4KIII α 或用于锚定 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物的 Efr3a 的表达，或者应用 PI4KIII α 抑制剂能减轻小鼠的焦虑或抑郁程度。所以本申请提供了一个

潜在抗心境障碍的靶点（即，PI4KIII α 蛋白复合体）以及一系列治疗心境障碍的潜在药物。

发明内容

5 在一个方面，本申请提供了一种用于预防或治疗心境障碍的方法，包括向需要其的客体施用有效量的 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂。

在一些实施方案中，所述 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂是小分子化合物、抗体、RNAi 分子或者反义核酸。

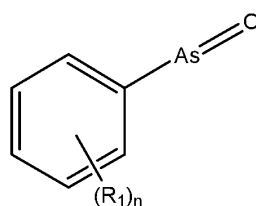
10 在一些实施方案中，所述 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂是 EFR3 特异性抑制剂。

在一些实施方案中，所述 EFR3 特异性抑制剂是 EFR3a 特异性抑制剂或 EFR3b 特异性抑制剂。

在一些实施方案中，所述 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂是 PI4KIII α 特异性抑制剂。

15 在一些实施方案中，所述 PI4KIII α 特异性抑制剂是小分子化合物。

在一些实施方案中，所述小分子化合物具有式 (I) 所示的结构或者其药学上可接受的盐，



式 (I)

20 其中，R₁ 各自独立的选自 (a) H、氘、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 炔基、C₂₋₆ 烯基、C₁₋₆ 烷氧基、C₁₋₆ 卤代烷基、C₁₋₆ 亚烷基-NH₂、C₁₋₆ 亚烷基-NH-C(O)H、-As(O)、-N=NH、N-(C₁₋₆ 烷基)氨基、N,N-(C₁₋₆ 烷基)₂ 氨基、-NH-C(O)H、-NH-S(O)₂H、-C(O)OH、-OC(O)H、-SH、-S(O)₂H、-S(O)₂-NH 或杂环基，并且可选的被 R₂ 或 R₃ 取代，其中 R₂ 和 R₃ 各自独立的选

- 自氨基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基、N-(C₁₋₆烷基)氨基、N-(6-12元芳香基)氨基、N,N-(C₁₋₆烷基)₂氨基、C₃₋₆环烷基、6-12元的芳香基或3-12元的杂环基，并且可选的被一个或多个卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、-NH-C(O)-R₅、-C(O)OR₄、6-12元的芳香基、C₁₋₆烷基、C₂₋₆炔基、C₂₋₆烯基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基、3-6元的杂环基、C₃₋₆环烷基或Bn-O-取代，并且R₄是C₁₋₆的烷基，并且可选的被一个或多个卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、6-12元的芳香基、C₁₋₆烷基、C₂₋₆炔基、C₂₋₆烯基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基、3-6元的杂环基、C₃₋₆环烷基或Bn-O-取代，R₅选自H、C₁₋₆烷基、C₂₋₆炔基、C₂₋₆烯基、C₁₋₆烷氧基或C₁₋₆卤代烷基，或
- (b) 两个相邻碳原子上的R₁形成5-12元的环烷基、芳香基或杂环基，并且可选的被一个或多个卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、6-12元的芳香基、C₁₋₆烷基、C₂₋₆炔基、C₂₋₆烯基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基、3-6元的杂环基、C₃₋₆环烷基或Bn-O-取代，

其中，n为0-5的整数。

- 在一些实施方案中，所述R₁各自独立的选自H、氘、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基、-As(O)、N-(C₁₋₆烷基)氨基、N,N-(C₁₋₆烷基)₂氨基或-C(O)OR₆，其中n为0-2的整数，并且R₆是C₁₋₆的烷基。

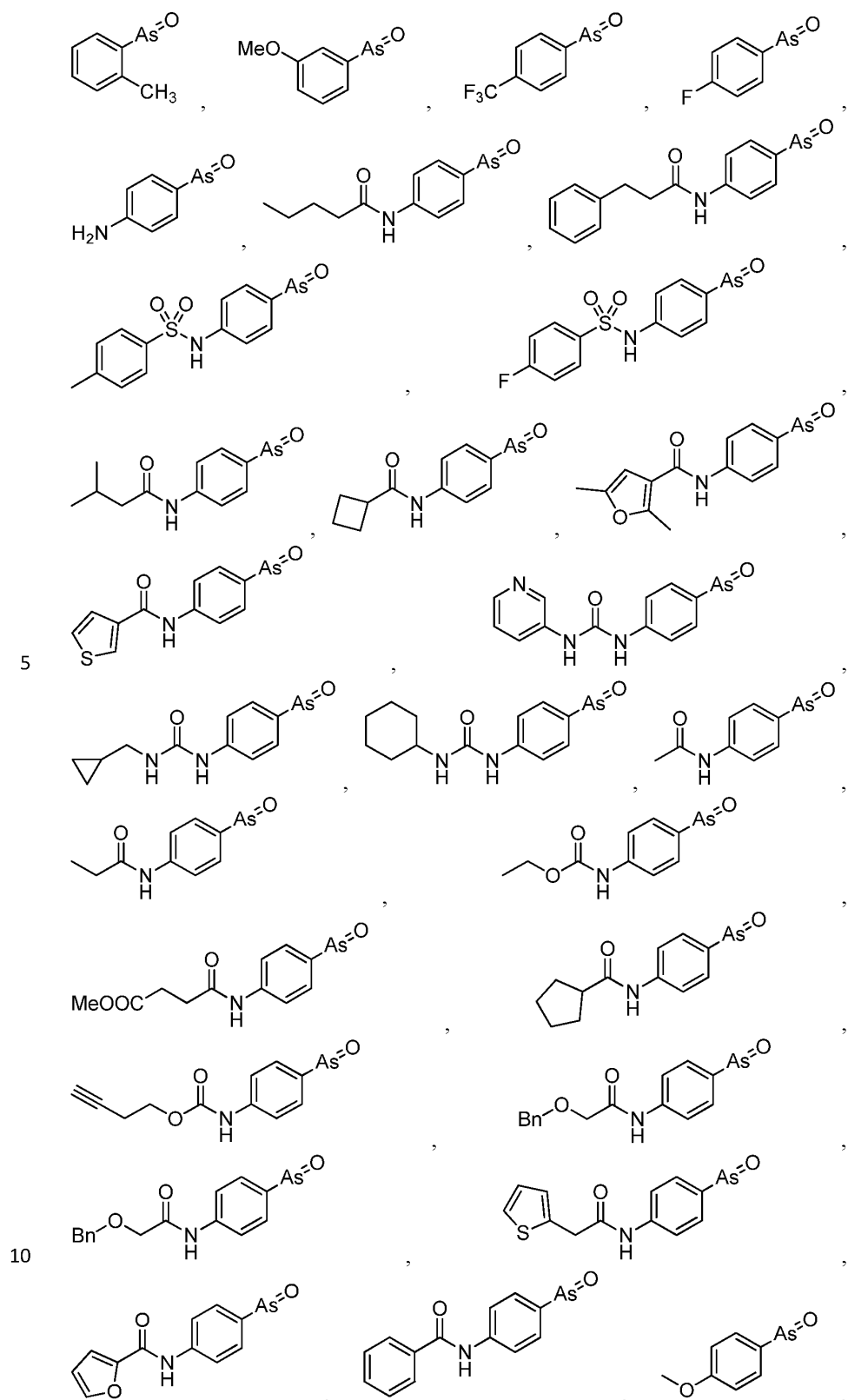
- 在一些实施方案中，所述R₁各自独立的选自H、氘、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆卤代烷基或-As(O)，其中n为0-2的整数。

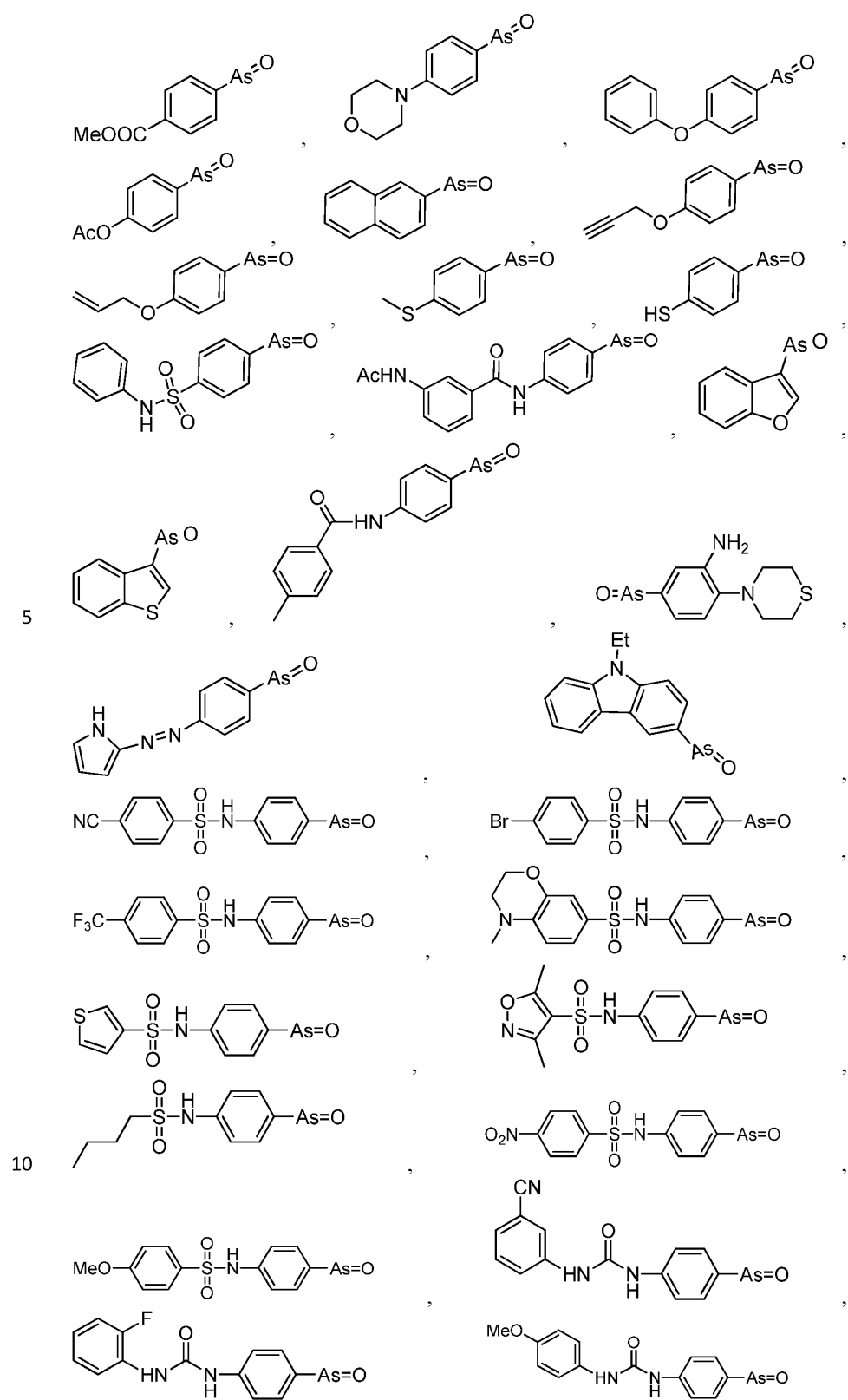
在一些实施方案中，所述R₁各自独立的选自H、氘、卤素、氨基、C₁₋₆烷氧基或C₁₋₆卤代烷基，其中n为1。

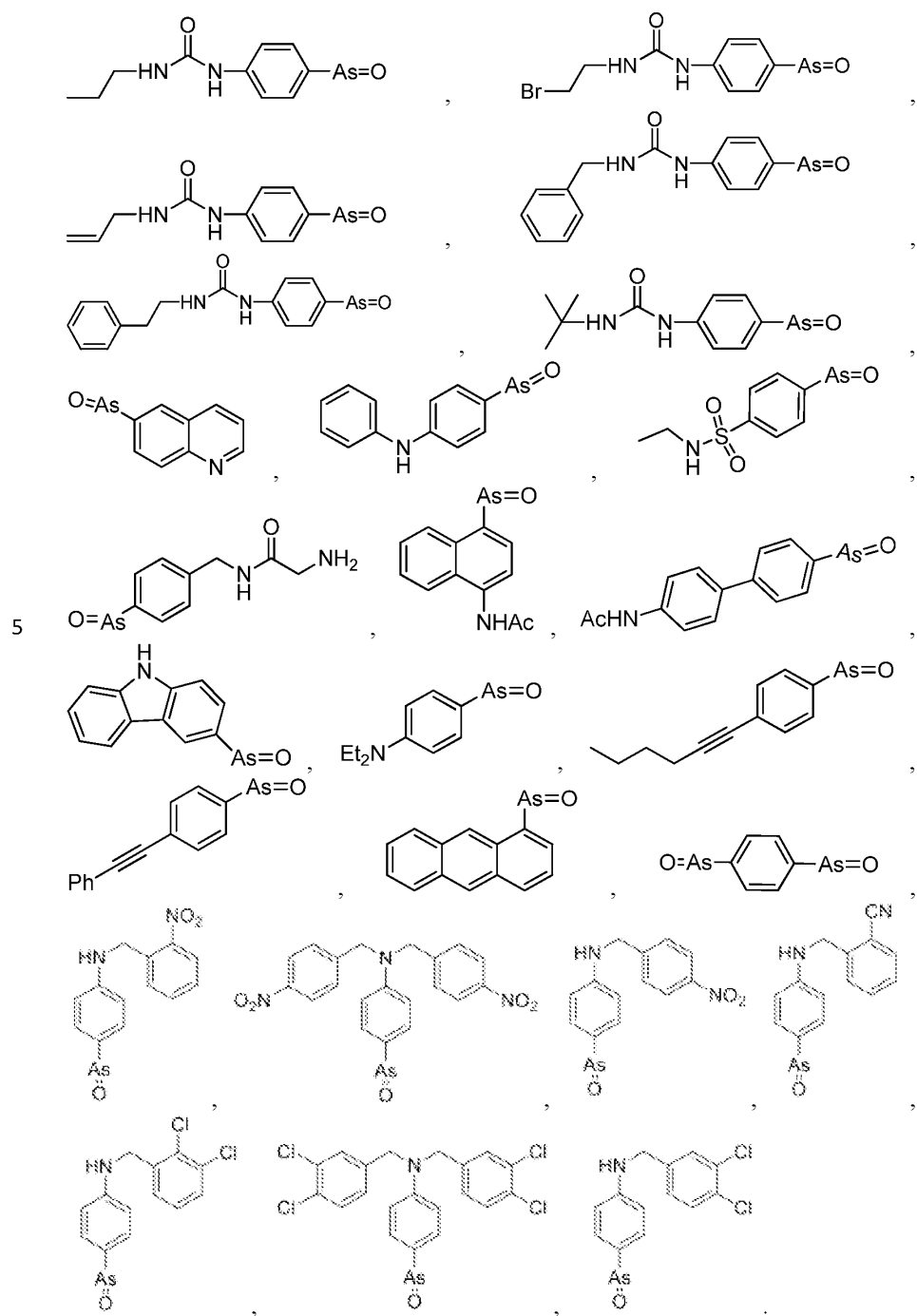
在一些实施方案中，所述R₁位于-As(O)基团的邻位和/或者对位。

- 在一些实施方案中，n是0。

在一些实施方案中，所述小分子化合物选自由以下化合物组成的组：







在一些实施方案中，所述抗体是单克隆抗体或者多克隆抗体。

在一些实施方案中，所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或者全人源抗体。

在一些实施方案中，所述 RNAi 分子是小干扰 RNA (siRNA)、短发夹 RNA (shRNA) 或微小 RNA (miRNA) 的。

在一些实施方案中，所述 RNAi 分子的长度为 18-100 碱基。

在一些实施方案中，所述 RNAi 分子被修饰以增强其稳定性。

5 在一些实施方案中，所述客体是人或者哺乳动物。

在一些实施方案中，所述心境障碍是情绪高昂、情绪低落或者情绪在高昂和低落之间循环。

在一些实施方案中，所述心境障碍是焦虑症、抑郁症、精神分裂症或躁狂症。

10 在一些实施方案中，所述心境障碍是由神经退行性疾病、中风或恶性肿瘤引起的心境障碍。

在一些实施方案中，所述心境障碍是神经退行性疾病引起的焦虑症或抑郁症。

在一些实施方案中，所述 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂通过口服、皮下、肌肉或静脉施用。

15 在一些实施方案中，其进一步包括在向客体施用有效量的 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂之前，诊断所述客体具有心境障碍。

在一些实施方案中，其进一步包括向需要其的客体施用第二试剂。

在一些实施方案中，所述第二试剂是用于治疗心境障碍的试剂。

在一些实施方案中，所述第二试剂是用于治疗神经退行性疾病、中风或恶性肿瘤的试剂。

20 在一些实施方案中，所述 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂在所述第二试剂之前、之后或同时施用。

在另一方面，本申请提供了本申请所述的 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂在制备用于预防或治疗心境障碍的药物中的用途。

在又一方面，本申请提供了本申请所述的 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂用于预防或治疗心境障碍的用途，包括向需要其的客体施用有效量的 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂。

5 附图说明

图 1 示出了各组大鼠在 CUMS 造模及给药阶段的体重变化。

图 2 示出了 PI4KIII α 的 mRNA 表达水平与抑郁程度呈线性正相关。

图 3 示出了 PI4KIII α 抑制剂 PAO 能够预防或减轻 APP/PS1 小鼠的焦虑行为 (WT 是指野生型小鼠, “APP/PS1 0” 是指未用 PAO 治疗的 APP/PS1 小鼠, “APP/PS1 0.3” 是指用 PAO 治疗的小鼠, 剂量 0.3 mg/kg 体重。 “*” 代表 P<0.05)

图 4 示出了 PAO 和 Aricept 对 APP/PS1 小鼠在水迷宫试验中的影响效果。

图 5 示出了 PAO 和 Aricept 对 APP/PS1 小鼠在新奇抑制摄食实验中的影响效果。

图 6 示出了减少 Efr3a 的 mRNA 表达对 APP/PS1 小鼠在黑白箱实验中的影响效果。

图 7 示出了 PAO 衍生物 PI04、PI05 和 PI06 对 ICR 小鼠在被迫游泳实验中影响。黑色和灰色柱分别是各组小鼠第一和第二次游泳实验后 4 分钟内不动的时间总和。

图 8 示出了 PAO 对小鼠神经元损伤导致的抑郁的预防或减轻效果。

图 9 示出了 PAO 及其衍生物对野生型小鼠的焦虑行为的抑制效果。

图 10 示出了果蝇中 Hyccin (FAM126)、RBO、TTC7 和 P4KIII α 的相互作用。图 10A: *rbo-egfp* 转基因以及野生型 (*wt*) 成年果蝇头匀浆的抗 GFP 抗体的免疫共沉淀物的考马斯亮蓝染色。RBO-GFP 的表达受 *rbo* 基因驱动子所驱动; 图 10B: 免疫共沉淀-免疫印迹法(WB) 显示成年野生型果蝇内源性 Hyccin、RBO 和 PI4KIII α (PI4K) 相互共免疫沉淀; 图 10C: 免疫印迹法 (WB) 显示野生型和 *hyccin*^{-/-}, *rbo*^{-/-}, *ttc7*^{*/*} 突变果蝇胚胎细胞膜和胞浆中 RBO 和 Hyccin 的表达水平。

RBO 只表达在细胞膜上，且未出现在以上三个纯合突变体的胚胎中。Hyccin 主要出现在胞浆中，其在 *rbo*^{-/-}和 *ttc7*^{*/*}突变体的胞浆中水平无明显改变，说明 Hyccin 的表达独立于 RBO 和 TTC7 的表达；图 10D：免疫印迹法（WB）显示在 *rbo*^{-/+}和 *hyccin*^{-/+}成年杂合突变果蝇中 Hyccin 的表达量，进一步显示 Hyccin 的表达独立于 RBO；图 10E：WB 显示在相同基因背景的野生型（*wt*）、*rbo*^{-/+}以及 *hyccin*^{-/+}杂合突变成年果蝇，以及对照（*ctrl*）和 4 种 *pi4kIIIα* 无义突变杂合体（*pi4k*^{FQ88/+}、*pi4k*^{FY24/+}、*pi4k*^{GJ86/+}以及 *pi4k*^{GS27/+}）成年果蝇中 PI4KIIIα 和 RBO 的总水平。其中 4 个 *pi4kIIIα* 无义突变体是通过对照果蝇（*ctrl*）进行基因突变剂处理和筛选所得到的。

10 具体实施方式

本发明的如下描述仅旨在说明本发明的各个实施方案。所描述的具体实施例不应被理解为是对本发明的范围的限制。在不偏离本发明的精神和实质的情况下，本领域技术人员可进行各种等同替代、改变或变化，而且应了解本文也包括这些等同实施方案。本文引用的所有文献，包括出版物、专利和专利申请等以全文引用方式并入本文。

在本申请的一个方面，提供了一种用于预防或治疗心境障碍的方法，包括向需要其的客体施用有效量的 PI4KIIIα/FAM126/TTC7 复合物抑制剂。

PI4KIIIα/FAM126/TTC7 复合物抑制剂

本申请所用的术语“PI4KIIIα/FAM126/TTC7 复合物”是指由 PI4KIIIα、FAM126 和 TTC7 三种蛋白组成的复合物，其定位于细胞质膜上并参与体内脂质磷酸化。EFR3a 或 EFR3b 是将 PI4KIIIα/FAM126/TTC7 复合物锚定于细胞质膜的重要分子。

本申请所用的术语“PI4KIIIα/FAM126/TTC7 复合物抑制剂”是指能够降低、减少、消除 PI4KIIIα/FAM126/TTC7 复合物活性的任何物质。在一些实施方案中，PI4KIIIα/FAM126/TTC7 复合物抑制剂是抑制 PI4KIIIα 或 FAM126 或 TTC7 或 EFR3 基因的转录或翻译的抑制剂。在另一些实施方案中，PI4KIIIα/FAM126/TTC7 复合物抑制剂是抑制 PI4KIIIα 磷酸化脂质能力的抑制剂。在另一些实施方案中，PI4KIIIα/FAM126/TTC7 复合物抑制剂是抑制

PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物形成的抑制剂。在另一些实施方案中，PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂是抑制 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物锚定于细胞质膜的抑制剂。

5 在一些实施方案中，所述 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂能够将 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物的活性降低至少 5%、10%、20%、40%、50%、80%、90%、95%或更多。

10 在本申请中，当“活性”与增加或降低一同使用的时候，是指检测到的功能活性，其可以表现为含量变化、或者含量不变但是功能活性变化。在一些实施方式中，所述活性与脂质磷酸化相关。在一些实施方式中，所述活性与心境障碍相关。

在一些实施方案中，所述 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂是小分子化合物、抗体、RNAi 分子或者反义核酸。

在一些实施方案中，所述 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂是小分子化合物。

15 本申请所用的术语“小分子化合物”是指一种分子量小于 3000、2500、2000、1500、1000 或 500 道尔顿的有机化合物，该有机化合物可以是天然的或者是化学合成的。

在一些实施方案中，所述 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂是抗体。

20 本申请所用的术语“抗体”包含可结合某特定抗原的任意免疫球蛋白、单克隆抗体、多克隆抗体、多价抗体、双价抗体、单价抗体或抗体。本申请中的“抗体”一词旨在广泛地涵盖常规的四链抗体以及不具有四条链的较不常规的抗体（例如，天然缺乏轻链的抗体）。

25 一个常规的完整抗体是异四聚体，其包含两条重（H）链和两条轻（L）链。哺乳动物的重链可分为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ，每条重链由一可变区（V_H）和第一、第二、第三恒定区（分别为 C_{H1}、C_{H2}、C_{H3}）组成；哺乳动物的轻链可分为 λ 或 κ ，每条轻链由一可变区（V_L）和一恒定区组成。常规抗体呈“Y”型，“Y”型结构的颈部由两条重链的第二和第三恒定区组成，其通过二硫键结合。“Y”型结构的每条臂包含其中一条重链的可变区和第一恒定区，其与一条轻链的可变区

和恒定区结合。轻链和重链的可变区决定抗原的结合。每条链的可变区均含有三个高变区，称互补决定区（CDR）（轻链的 CDR 包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3，重链的 CDR 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3）。本申请中公开的抗体和抗原结合片段的 CDR 边界可通过 Kabat, IMGT, Chothia 或 Al-Lazikani 命名法命名或识别（Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C.等, J Mol Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C 和 Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196,901 (1987); Chothia, C.等, Nature. Dec 21-28;342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A.等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, 马里兰州 Bethesda (1991); Marie-Paule Lefranc et al, Developmental and Comparative Immunology, 27: 55-77 (2003); Marie-Paule Lefranc et al, Immunome Research, 1(3), (2005); Marie-Paule Lefranc, Molecular Biology of B cells (second edition), chapter 26, 481-514, (2015)）。其中，三个 CDR 由被称为框架区（FR）的侧面连续部分间隔开，框架区比 CDR 更加高度保守并形成一个支架支撑超变环。重链和轻链的恒定区与抗原结合无关，但具有多种效应功能。

抗体依据重链恒定区的氨基酸序列可以分成几类。根据是否含有 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链，抗体可分别分为五个主要的分类或异构体：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。几个主要的抗体分类还可分为亚类，如 IgG1（ γ 1 重链）、IgG2（ γ 2 重链）、IgG3（ γ 3 重链）、IgG4（ γ 4 重链）、IgA1（ α 1 重链）或 IgA2（ α 2 重链）等。

在一些实施方案中，所述抗体是全长抗体或抗原结合片段。

本申请中使用的术语“抗原结合片段”指由含有一个或多个 CDR 的抗体部分但不具有完整抗体结构的抗体片段所形成的一种抗体片段。抗原结合片段的例子包括，但不限于，Fab 片段、Fab'片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、单链抗体分子（scFv）、scFv 二聚体、骆驼化单域抗体（camelized single domain antibody）和纳米抗体。抗原结合片段可以与母体抗体结合相同的抗原。

抗体的“Fab”片段是指由一条轻链（包括可变区和恒定区）和一条重链的可变区和第一恒定区经二硫键结合起来的那部分抗体。

“Fab'”片段是指包含了部分铰链区的 Fab 片段。

“F(ab')₂”片段是指 Fab'的二聚体。

抗体的“Fv”片段由一条轻链的可变区和一条重链的可变区组成。

“单链抗体分子”或“scFv”是指由轻链可变区与重链可变区直接相连或通过一个肽链连接而成的工程抗体。详细介绍可以参见例如 Huston JS 等, Proc Natl Acad Sci USA、85:5879(1988)。

“scFv 二聚体”是指由两个 scFv 形成的聚合体。

“骆驼化单域抗体 (Camelized single domain antibody)” (又称为“重链抗体”或“HCAb (Heavy-chain-only antibodies, HCAb)”)是指含有两个重链可变区而不含有轻链的抗体(Riechmann L和 Muyldermans S., J Immunol Methods. Dec 10;231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., J Biotechnol. Jun;74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; U.S. Patent No. 6,005,079)。重链抗体最初从驼科(骆驼、单峰驼和美洲驼)衍生得到。虽然缺失轻链,但是骆驼化抗体具有抗原结合的全部功能(参见 Hamers-Casterman C. 等人, Nature. 363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK.等, “Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation,” Immunogenetics. 54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. 等人, Immunology. 109(1):93-101 (2003)), 其全部内容通过引用并入本申请。

“纳米抗体”是由一个来自重链抗体的重链可变区和两个恒定区 CH2 和 CH3 组成。

在一些实施方案中,所述抗体是单克隆抗体或者多克隆抗体。

在一些实施方案中,所述抗体是鼠源抗体、兔源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或者全人源抗体。

本申请中使用的术语“全人源”当用于抗体或抗原结合片段时,是指所述抗体或抗原结合片段的氨基酸序列对应于由人或人免疫细胞生产的、或从例如利用人源抗体库的转基因非人动物等非人来源衍生的抗体的氨基酸序列,或者其他编码人源抗体的序列。

本申请中使用的术语“人源化”当用于抗体或抗原结合片段时,是指包括来源于非人动物的 CDR、来源于人的 FR 区,以及来源于人的恒定区(当适用时)

的抗体或抗原结合片段。由于人源化的抗体或抗原结合片段具有更低的免疫原性，其在某些实施方式中可用作人的治疗剂。在某些实施方式中，所述非人动物是哺乳动物（例如，小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、豚鼠或仓鼠）。在某些实施方式中，所述人源化抗体或抗原结合片段除了 CDR 序列是非人源的以外，基本上全部由人源序列组成。

本申请中使用的术语“嵌合”当用于抗体或抗原结合片段时，是指具有来源于一种物种的重链和/或轻链的一部分，而所述重链和/或轻链其余部分来源于不同物种的抗体或抗原结合片段。在一些实施方式中，嵌合抗体可以包括来源于人的恒定区和来源于非人动物（例如小鼠或兔）的可变区。

10 在一些实施方式中，本申请所述抗体是单特异性抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

在一些实施方式中，本申请所述抗体可以进一步地被标记。

在一些实施方式中，本申请所述抗体是 PI4KIII α 或 FAM126 或 TTC7 或 EFR3 的特异性抗体。在一些实施方式中，本申请所述抗体是 PI4KIII α 或 EFR3 的特异性抗体。

15 在一些实施方式中，本申请所述抗体能够抑制 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物的形成、抑制 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物锚定于细胞质膜、或者抑制 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物的磷酸化活性。

20 在一些实施方案中，所述 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂是 RNAi 分子。

本申请所用的术语“RNAi 分子”是指 RNA 或其类似物，其具有与靶 RNA 充分的序列互补性，以指导 RNA 干扰。在一些实施方式中，还包括可用于生成 RNA 的 DNA。RNA 干扰（RNAi）是指序列特异或选择的过程，通过该过程下调了靶分子（例如，靶基因、蛋白或 RNA）。

25 在一些实施方案中，所述 RNAi 分子是小干扰 RNA（siRNA）、短发夹 RNA（shRNA）或微小 RNA（miRNA）。

本申请所用的术语“小干扰 RNA (siRNA)”是指一种 RNA 分子，优选双链分子，具有约 10~50 个核苷酸的长度，优选约 15~25 个核苷酸的长度，更优选约 17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个核苷酸的长度，所述链任选地具有包括例如 1、2 或 3 个突出的核苷酸（或核苷酸类似物）的突出末端，其能够指导或介导 RNA 的降解。天然产生的 siRNA 通过细胞的 RNAi 机制（例如，Dicer 或其同系物）由更长（例如>25 个核苷酸）的 dsRNA 分子产生，并通过形成 RISC 复合物降解 mRNA。

本申请所用的术语“短发夹 RNA (shRNA)”是指具有茎环结构的 RNA 分子，其包括互补序列的第一区域和第二区域，互补的程度以及区域的方向足以使碱基对出现在区域之间，第一区域和第二区域被环区域连接，环由环区域中的核苷酸（或核苷酸类似物）之间缺少碱基配对而产生。

本申请所用的术语“微小 RNA (microRNA 或 miRNA)”是一种短的、天然存在的非编码的单链 RNA 分子，长度约为 16-26 个核苷酸(nt)（例如约 16-29nt, 19-22nt, 20-25nt, 或 21-23nt），通常在体内参与调控基因表达。在真核细胞中，miRNA 基因通过 DNA 转录酶 II (DNA transcriptase II) 转录为“初产物” (pri-miRNA)，pri-miRNA 很快被一种核糖核酸酶 III (Drosha) 加工为 miRNA “前体” (pre-miRNA)，pre-miRNA 从细胞核转运到细胞质中，然后经另一种核糖核酸酶 III (Dicer) 识别剪切为成熟的 miRNA。成熟的 miRNA 分子与一种或多种 mRNA 部分互补，并且调控蛋白的表达。已知的 miRNA 的序列可以通过公开的数据库获得，例如 miRBase 数据库 (www.mirbase.org)，其中提供了包括 miRNA 序列信息、功能注释、以及预测的基因靶标等信息。在本发明中，miRNA 还包括由人工合成的质粒在细胞中表达的具有类似天然 miRNA 的结构和功能的 RNA 分子，能像天然 miRNA 分子一样靶向对应的 mRNA，阻碍其翻译成蛋白质。

在一些实施方案中，所述 RNAi 分子能够降低 PI4KIII α 的表达，例如，敲减 PI4KA 基因。

在一些实施方案中，所述 RNAi 分子具有 SEQ ID NO: 1 [5'-TGCTCATTAGCAGTAAAGA-3']。

在一些实施方案中，所述 RNAi 分子的长度为 18-100 碱基。

在一些实施方案中，所述 RNAi 分子被修饰以增强其稳定性。

在一些实施方案中，所述 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂是反义核酸。

本申请所用的术语“反义核酸”包括与靶序列完全互补的核苷酸以及具有一个或多个核苷酸错配的那些核苷酸，只要该反义核酸能与所述靶序列特异性杂交即可。例如，本申请的反义核酸包括在至少 15 个连续核苷酸的长度上具有至少 70%或更高，优选 80%或更高，更优选 90%或更高，甚至更优选 95%或更高同源性的多核苷酸。由于形成杂交体，靶基因转录和/或靶 mRNA 翻译减少或被阻断。描述了涉及反义技术的标准方法（参见，例如 Melani 等，Cancer Res.(1991)51:2897-2901）。

在一些实施方案中，所述 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂是 EFR3 特异性抑制剂。

本申请所用的术语“EFR3 特异性抑制剂”是指能够特异性降低、减少、消除 EFR3（即，源自酵母的甲酰基-CoA 还原酶）基因的转录或翻译，和/或 EFR3 蛋白的活性的任何抑制剂。在一些实施方案中，所述 EFR3 特异性抑制剂能够将 EFR3 的活性降低至少 5%、10%、20%、40%、50%、80%、90%、95%或更多。在一些实施方案中，EFR3 的活性是指将 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物锚定至细胞质膜的活性。

在一些实施方案中，EFR3 特异性抑制剂能够在复杂混合物中优选识别 EFR3 蛋白，所述抑制剂与 EFR3 蛋白的结合常数为其与其他非特异性结合蛋白的结合常数的至少 2 倍。在某些实施方案中，EFR3 特异性抑制剂与 EFR3 蛋白的平衡解离常数小于或等于 10^{-5} 或 10^{-6} M。在某些实施方案中，EFR3 特异性抑制剂与 EFR3 蛋白的平衡解离常数小于或等于 10^{-6} 或 10^{-7} M。在某些实施方案中，EFR3 特异性抑制剂与 EFR3 蛋白的平衡解离常数小于或等于 10^{-7} M 或 10^{-8} M。在一些实施方案中，所述 EFR3 特异性抑制剂是 EFR3a 特异性抑制剂或 EFR3b 特异性抑制剂。

在一些实施方案中，所述 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂是 PI4KIII α 特异性抑制剂。

本申请所用的术语“PI4KIII α 特异性抑制剂”是指能够特异性降低、减少、消除 PI4KIII α 基因的转录或翻译，和/或 PI4KIII α 蛋白活性的各类物质。在一些实施方案中，所述 PI4KIII α 特异性抑制剂能够将 PI4KIII α 的活性降低至少 5%、10%、20%、40%、50%、80%、90%、95%或更多。在一些实施方案中，PI4KIII α 5 的活性是指将 PI4KIII α 将脂质（例如，磷酸肌醇（PI））磷酸化（例如，转化为 4-磷酸磷脂酰肌醇（PI4P））的活性。

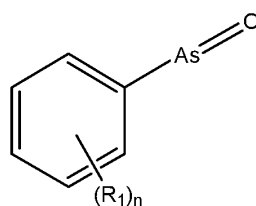
在一些实施方案中，PI4KIII α 特异性抑制剂能够在复杂混合物中优选识别 PI4KIII α 蛋白，所述抑制剂与 PI4KIII α 蛋白的结合常数为其与其他非特异性结合蛋白的结合常数的至少 2 倍。在某些实施方案中，PI4KIII α 特异性抑制剂与 10 PI4KIII α 蛋白的平衡解离常数小于或等于 10^{-5} 或 10^{-6} M。在某些实施方案中，PI4KIII α 特异性抑制剂与 PI4KIII α 蛋白的平衡解离常数小于或等于 10^{-6} 或 10^{-7} M。在某些实施方案中，PI4KIII α 特异性抑制剂与 PI4KIII α 蛋白的平衡解离常数小于或等于 10^{-7} M 或 10^{-8} M。

在一些实施方案中，相比于对 PI4KII（例如，PI4KII α 或 PI4KII β ），PI4KIII α 15 特异性抑制剂对 PI4KIII α 的抑制强至少 1 倍、2 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍或 10000 倍。在一些实施方案中，相比于对 PI4KIII β ，PI4KIII α 特异性抑制剂对 PI4KIII α 的抑制强至少 1 倍、2 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍或 10000 倍。在一些实施方案中，PI4KIII α 特异性抑制剂基本上不抑制 PI4KII（例如，PI4KII α 或 20 PI4KII β ），例如，其 IC₅₀ 大于或等于 10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、60 μ M、80 μ M、100 μ M、150 μ M、200 μ M 或 500 μ M。

在一些实施方案中，PI4KIII α 特异性抑制剂对 PI4KIII α 的 IC₅₀ 小于或等于 100 μ M、80 μ M、50 μ M、30 μ M、20 μ M、10 μ M、5 μ M、3 μ M、2 μ M、1 μ M、0.5 μ M、0.2 μ M、0.1 μ M、0.05 μ M、0.02 μ M、0.01 μ M、0.005 μ M、0.002 μ M 或 25 0.001 μ M。

在一些实施方案中，所述 PI4KIII α 特异性抑制剂是小分子化合物。

在一些实施方案中，本申请所述的小分子化合物具有式（I）所示的结构或者其药学上可接受的盐，



式 (I)

其中, R_1 各自独立的选自 (a) H、氘、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 炔基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 亚烷基- NH_2 、 C_{1-6} 亚烷基- $NH-C(O)H$ 、 $-As(O)$ 、 $-N=NH$ 、 $N-(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 氨基、 $N,N-(C_{1-6} \text{ 烷基})_2$ 氨基、 $-NH-C(O)H$ 、 $-NH-S(O)_2H$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-OC(O)H$ 、 $-SH$ 、 $-S(O)_2H$ 、 $-S(O)_2-NH$ 或杂环基, 并且可选的被 R_2 或 R_3 取代, 其中 R_2 和 R_3 各自独立的选自氨基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷基、 $N-(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 氨基、 $N-(6-12 \text{ 元芳香基})$ 氨基、 $N,N-(C_{1-6} \text{ 烷基})_2$ 氨基、 C_{3-6} 环烷基、6-12 元的芳香基或 3-12 元的杂环基, 并且可选的被一个或多个卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、 $-NH-C(O)-R_5$ 、 $-C(O)OR_4$ 、6-12 元的芳香基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 炔基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷基、3-6 元的杂环基、 C_{3-6} 环烷基或 $Bn-O$ -取代, 并且 R_4 是 C_{1-6} 的烷基, 并且可选的被一个或多个卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、6-12 元的芳香基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 炔基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷基、3-6 元的杂环基、 C_{3-6} 环烷基或 $Bn-O$ -取代, R_5 选自 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 炔基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基或 C_{1-6} 卤代烷基, 或

(b) 两个相邻碳原子上的 R_1 形成 5-12 元的环烷基、芳香基或杂环基, 并且可选的被一个或多个卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、6-12 元的芳香基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 炔基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷基、3-6 元的杂环基、 C_{3-6} 环烷基或 $Bn-O$ -取代,

在一些实施方案中, 所述 n 为 0、1、2 或者 3。在一些实施方案中, 所述 n 为 0、1 或者 2。在一些实施方案中, 所述 n 为 0 或者 1。

在一些实施方案中, 所述 R_1 各自独立的选自 H、氘、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、氨基甲酰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷基、 $-As(O)$ 、 $N-(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 氨基、 $N,N-(C_{1-6} \text{ 烷基})_2$ 氨基或 $-C(O)OR_6$, 其中 n 为 0-2 的整数, 并且 R_6 是 C_{1-6} 的烷基。

在一些实施方案中，所述 R_1 各自独立的选自 H、氘、卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 卤代烷基或 $-As(O)$ ，其中 n 为 0-2 的整数。

5 在一些实施方案中，所述 R_1 各自独立的选自 H、氘、卤素、氨基、 C_{1-6} 烷氧基或 C_{1-6} 卤代烷基，其中 n 为 1。

在一些实施方案中，所述 R_1 位于 $-As(O)$ 基团的邻位或者对位。在一些实施方案中，所述 R_1 是 H。

本申请中所用的术语“取代”，当指化学基团时，指所述化学基团的一个或多个氢原子被去除并且被取代基取代。

10 本申请中所用的术语“取代基”具有本领域公知的通常含义，指共价连接至或者在适合的情况下稠合至母体基团的化学部分。

本申请中使用的术语“ C_n-C_m ”表示碳原子数的范围，其中 n 和 m 是整数并且碳原子数的范围包括端点（即 n 和 m ）和其间的各整数点。例如， C_1-C_6 表示 1 至 6 个碳原子的范围，包括 1 个碳原子、2 个碳原子、3 个碳原子、4 个碳原子、
15 5 个碳原子和 6 个碳原子。

本申请中使用的术语“烷基”，无论是作为其他术语的一部分还是单独使用，指饱和的烃基基团，其可以是直链的或支链的。术语“ C_n-C_m 烷基”指具有 n 至 m 个碳原子的烷基。在某些实施方案中，烷基基团含有 1 至 12、1 至 8、1 至 6、1 至 4、1 至 3 或 1 至 2 个碳原子。烷基基团的示例包括但不限于化学基团如甲
20 基、乙基、*n*-丙基、异丙基、*n*-丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、2-甲基-1-丁基、*n*-戊基、3-戊基、*n*-己基、1,2,2-三甲基丙基等。

本申请中使用的术语“烯基”，无论是作为其他术语的一部分还是单独使用，指不饱和的烃基基团，其可以是直链的或支链的，具有至少一个碳-碳双键。在某些实施方案中，烯基基团含有 2 至 12、2 至 10、2 至 8、2 至 6、2 至 5、2 至
25 4 或 2 至 3 个碳原子。在某些实施方案中，烯基基团还能有 1 至 6、1 至 5、1 至 4、1 至 3、1 至 2 或 1 个碳碳双键。烯基基团的示例包括但不限于化学基团如乙烯基、*n*-丙烯基、异丙烯基、*n*-丁烯基、仲丁烯基等。

本申请中使用的术语“炔基”，无论是作为其他术语的一部分还是单独使用，指不饱和的炔基基团，其可以是直链的或支链的，具有至少一个碳-碳三键。在某些实施方案中，炔基基团含有 2 至 12、2 至 10、2 至 8、2 至 6、2 至 5、2 至 4 或 2 至 3 个碳原子。在某些实施方案中，炔基基团还能有 1 至 6、1 至 5、1 至 4、1 至 3、1 至 2 或 1 个碳碳三键。炔基基团的示例包括但不限于化学基团如乙炔基、丙炔基、丁炔基等。

本申请中使用的术语“环烷基”指至少由 3 个原子组成的环系烷基。术语“n-m 元环烷基”指具有 n 至 m 个形成环的成员的环烷基。此外，该环还可以具有一个或多个双键，但不具有完全共轭的系统。在某些实施方案中，环烷基具有 3 至 8、3 至 6 或 4 至 6 个形成环的碳原子。环烷基的示例包括但不限于环丙烷、环丁烷、环戊基等。

本申请中使用的术语“杂环基”指在环系中的至少一个原子是杂原子而其余环原子是碳原子的环基。术语“n-m 元杂环基”指具有 n 至 m 个形成环的成员的杂环基。本申请中使用的术语“杂环基”包括杂芳基和杂环烷基。此外，该环还可以具有一个或多个双键。在某些实施方案中，杂环基是饱和的杂环烷基。杂原子的示例包括但不限于氧、硫、氮、磷等。

本申请中使用的术语“杂环烷基”指在环系中的至少一个原子是杂原子而其余环原子是碳原子的环烷基。术语“n-m 元杂环烷基”指具有 n 至 m 个形成环的成员的杂环烷基。此外，该环还可以具有一个或多个双键，但不具有完全共轭的系统。在某些实施方案中，杂环烷基是饱和的杂环烷基。杂原子的示例包括但不限于氧、硫、氮、磷等。在某些实施方案中，杂环烷基具有 3 至 8、3 至 6 或 4 至 6 个形成环的碳原子。杂环烷基的示例包括但不限于氮杂环丁烷、氮丙啶、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉、高哌嗪等。

本申请中使用的术语“芳基”或“芳香基”，无论是作为其他术语的一部分还是单独使用，指在形成环的碳原子之间具有交替的双键和单键的单-或多-碳环环系基团。术语“C_n-C_m 芳基”指具有 n 至 m 个形成环的碳原子的芳基。在某些实施方案中，芳基环系在一个或多个环中具有 6 至 12、6 至 10 或 6 至 8 个碳原子。在某些实施方案中，芳基环系具有稠合在一起的 2 个或多个环。芳基基团的示例包括但不限于化学基团如苯基、萘基、四氢萘基、茚满基、茚基等。

本申请中使用的术语“杂芳基”指其中在芳环中的至少一个环原子是杂原子并且其余的环原子是碳原子的芳基基团。术语“ n - m 元杂芳基”指具有 n 至 m 个形成环的成员的杂芳基。杂原子的示例包括但不限于氧、硫、氮、磷等。在某些实施方案中，杂芳基可以具有 5 至 10、5 至 8 或 5 至 6 个形成环的成员。在某些实施方案中，杂芳基是 5 元或 6 元杂芳基。杂芳基的示例包括但不限于呋喃基、噻吩基、吡啶基、喹啉基、吡咯基、 N -低级烷基吡咯基、吡啶基- N -氧化物、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、吡啶基等。

本申请中使用的术语“烷氧基”，无论是作为其他术语的一部分还是单独使用，指式“-O-烷基”所示的基团。术语“ C_n - C_m 烷氧基”指烷氧基的烷基部分具有 n 至 m 个碳原子。在某些实施方案中，烷基部分具有 1 至 6、1 至 4 或 1 至 3 个碳原子。烷氧基基团的示例包括但不限于化学基团如甲氧基、乙氧基、丙氧基（例如 n -丙氧基和异丙氧基）、 t -丁氧基等。

本申请中使用的术语“卤代烷基”，无论是作为其他术语的一部分还是单独使用，指式“-烷基-X”所示的基团，其中 X 为卤素，选自氟、氯、溴和碘的原子。术语“ C_n - C_m 卤代烷基”指卤代烷基的烷基部分具有 n 至 m 个碳原子。在某些实施方案中，烷基部分具有 1 至 6、1 至 4 或 1 至 3 个碳原子。卤代烷基基团的示例包括但不限于化学基团如卤代甲基、卤代乙基、卤代丙基（例如 n -卤代丙基和异卤代丙基）、 t -卤代丁基等。

本申请中使用的术语“ n 元”，其中 n 是整数，其通常与环系一起使用以描述环系中形成环的原子数。例如，哌啶基为 6 元杂环烷基环的一个示例，吡唑基为 5 元杂芳基环的一个示例，吡啶基为 6 元杂芳基环的一个示例而 1,2,3,4-四氢-萘为 10 元芳基的一个示例。

本申请中使用的术语“卤素”指选自氟、氯、溴和碘的原子。

本申请中使用的术语“氰基”指式“-CN”所示的基团。

本申请中使用的术语“羟基”指式“-OH”所示的基团。

本申请中使用的术语“硝基”指式“-NO₂”所示的基团。

本申请中使用的术语“氨基”指式“-NH₂”所示的基团。

本申请中使用的术语“氨基甲酰基”指式“-HNCONH₂”所示的基团。

本申请中使用的术语“化合物”旨在包括所示结构的所有立体异构体(例如对映体和非对映体)、几何异构体、互变异构体和同位素。

本申请所述的化合物可以是不对称的(例如具有一个或多个立体中心)。除非另外指明,所有的立体异构体,例如对映体和非对映体,都旨在包含在内。可以以光学活化或外消旋的形式分离含有不对称取代的碳原子的本申请的化合物。如何从不具有光学活性的初始原料制备光学活化形式的方法是本领域公知的,如通过拆分外消旋混合物或通过立体选择性合成。在本申请所述的化合物中还可以存在烯烃、碳-碳双键等多种几何异构体,并且在本申请中已经考虑了所有的这些稳定异构体。本申请描述了化合物的顺式和反式几何异构体并且其可以以异构体的混合物或单独的异构体形式分离。

在某些实施方案中,本申请所述的化合物具有(R)构型。在某些实施方案中,本申请所述的化合物具有(S)构型。

可以通过本领域公知的多种方法中的任一对化合物的外消旋混合物进行拆分。示例性的方法包括使用手性拆分酸的分级结晶,手性拆分酸是一种具有光学活性的成盐有机酸。用于分级重结晶方法的适宜的拆分试剂是例如具有光学活性的酸(如,酒石酸、二乙酰酒石酸、二苯甲酰酒石酸、扁桃酸、苹果酸、乳酸的D和L形式)或各种具有光学活性的樟脑磺酸。适于分级结晶方法的其他拆分试剂包括N-甲基苄胺、2-苯甘氨酸、去甲麻黄碱、麻黄碱、N-甲基麻黄碱、环己基乙胺、1,2-二氨基环己烷等的立体异构纯形式。

还可以通过在装有光学活性拆分试剂(例如二硝基苯甲酰基苯基甘氨酸)的柱上通过洗脱进行外消旋混合物的拆分。可以由本领域技术人员确定适宜的洗脱溶剂组合物。

本申请的化合物还包括互变异构形式。互变异构形式是由同时伴有质子的迁移的单键与相邻双键的对换导致的。互变异构形式包括具有相同化学式和总电荷的异构质子化状态的质子的互变异构体。质子互变异构体的示例包括酮-烯醇对、酰胺-亚胺酸对、内酰胺-内酰亚胺对、烯胺-亚胺对和环状的形式,其中质子能够占据杂环系统的两个或多个位置,例如1H-和3H-咪唑、1H-, 2H-和4H-1,2,4-

三唑、1H-和 2H-异𠵼唑以及 1H-和 2H-吡唑。互变异构形式通过适宜的取代能够平衡或空间锁定成一种形式。

本申请的化合物还可以包括中间体或最终化合物中出现原子的所有同位素。同位素包括具有相同原子序数但不同质量数的那些原子。例如，氢的同位素包括氕、氘和氚。

在某些实施方案中，本申请的小分子化合物可以通过有机合成获得。可以使用任意公知的有机合成技术制备并且可以根据多种可能的合成途径合成本申请的化合物，包括其盐、酯、水合物或溶剂化物。

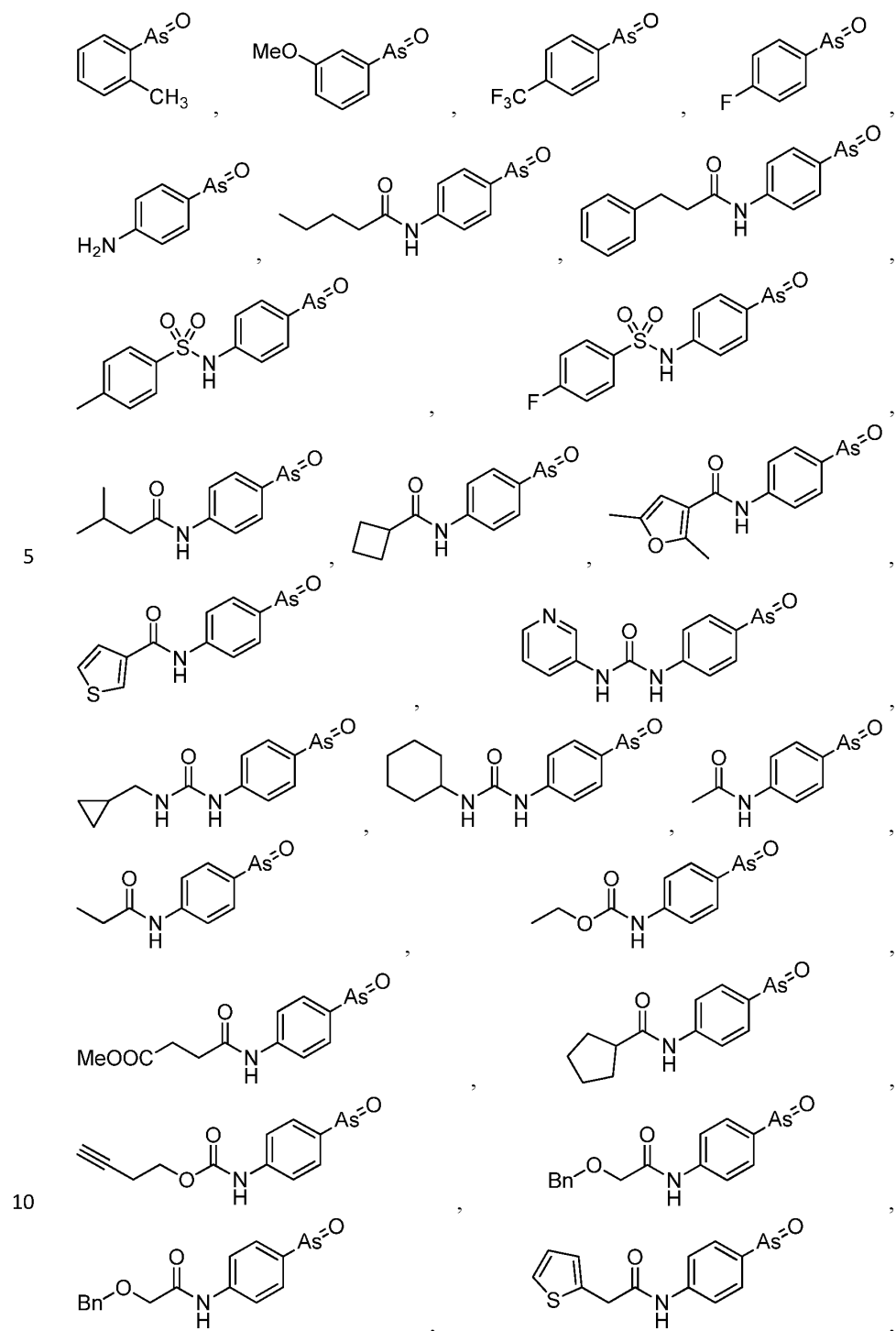
可以在适宜的溶剂中进行制备本申请化合物的反应，有机合成领域的技术人员能够容易地对溶剂进行选择。适宜的溶剂能够在反应进行的温度下（例如是从溶剂的冷冻温度至溶剂的沸腾温度的温度范围）基本上不与初始原料（反应物）、中间体或产物反应。可以在一种溶剂或一种以上溶剂的混合物中进行给定的反应。根据特定反应步骤，本领域技术人员能够针对特定反应步骤选择适宜的溶剂。

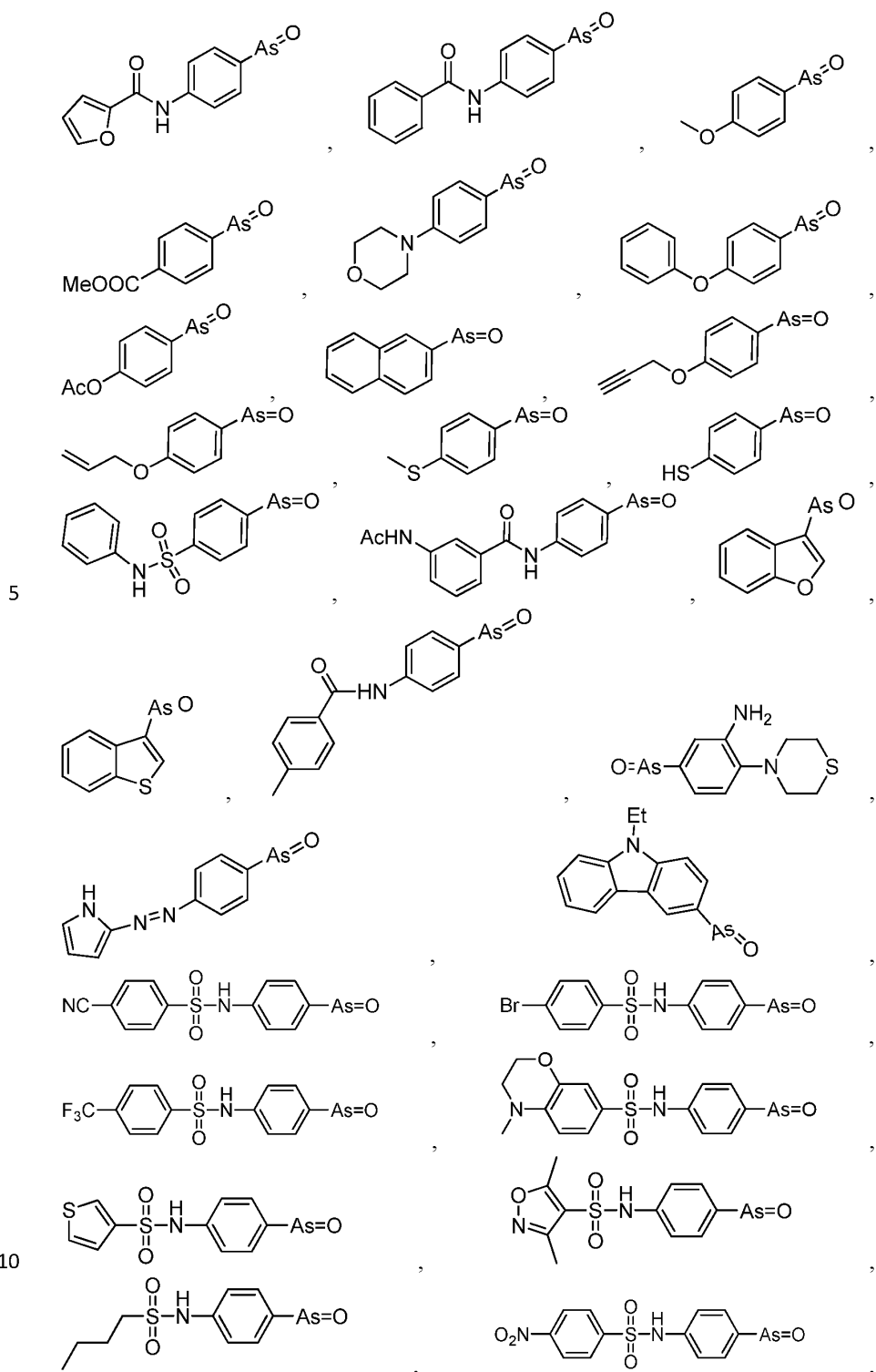
本申请化合物的制备可能涉及各种化学基团的保护和去保护。本领域技术人员能够容易地确定是否需要保护和去保护以及选择适宜的保护基团。保护基团化学可以参见，例如 T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., Wiley & Sons, Inc., New York (1999)，其全部内容通过引用并入本申请。

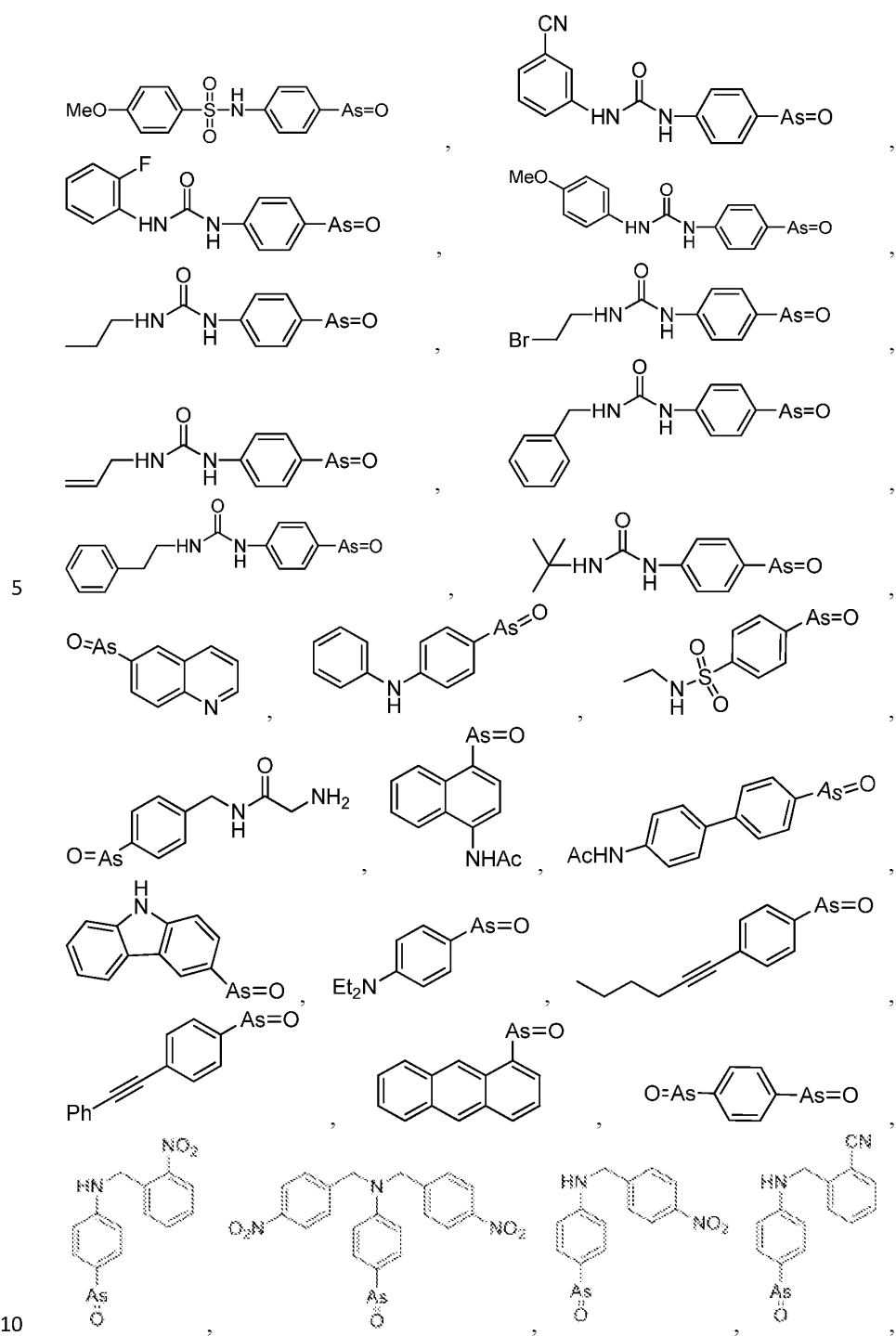
可以根据本领域公知的任意适宜方法对反应进行监测。例如，可以利用光谱法，如核磁共振光谱（例如 ^1H 或 ^{13}C ）、红外光谱、分光光度法（例如 UV-可见）、质谱，或者利用色谱法，如高效液相色谱（HPLC）、液相色谱-质谱（LCMS）或薄层层析（TLC）对产物的形成进行监测。本领域技术人员可以利用多种方法对化合物进行纯化，包括高效液相色谱（HPLC）（例如参见“Preparative LC-MS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization” Karl F. Blom, Brian Glass, Richard Sparks, Andrew P. Combs *J. Comb. Chem.* 2004, 6(6), 874-883，其全部内容通过引用并入本申请）和正相硅胶柱层析。

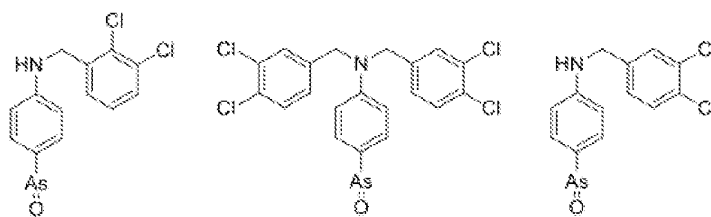
在某些实施方案中，本申请的小分子化合物可以通过商业途径购买获得。

在一些实施方案中，所述小分子化合物是：

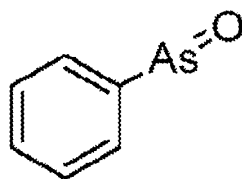








本申请中使用的术语“PAO”是指一种以氧化砷基团与苯环为基本结构的小分子化合物，其具体化学结构如下：



5

心境障碍

本申请所用的术语“心境障碍 (mood disorder)”是指，由于在一定期间内持续的情绪（感情）的不正常而感到痛苦、对日常生活造成某种障碍的状态。

在一些实施方案中，所述心境障碍是情绪高昂、情绪低落或者情绪在高昂和低落之间循环。

本申请所用的术语“情绪高昂”是指躁狂发作的主要原发症状。典型表现为患者自我感觉良好，故而表现得兴高采烈、得意洋洋、无忧无虑等。这种高涨的心境非常具有感染力，常能博得周围人的哄堂大笑。有些躁狂发作的病人可能以易激惹为主要表现，动辄便大发脾气，甚至可出现破坏和攻击行为。

本申请所用的术语“情绪低落”是指产生包括但不限于悲伤和沮丧感的精神状态，其能够引起破坏性行为。患者自觉情绪低沉、苦恼忧伤，情绪的基调是低沉、灰暗的。抑郁发作的情感低落有两个重要特征：其一，“显著而持久”，是指这种低落的情绪通常为本人和（或）他人明显地感觉到，程度可以从闷闷不乐到伤心欲绝不等，持续时间至少 2 周；其二，是这种情感低落“与其现实处境不相称”，是一种歪曲和放大的“低落”，而难以用客观的现实境遇来解释。

20

本申请所用的术语“情绪在高昂和低落之间循环”是指精神状态在情绪高昂和情绪低落之间交替转换。

在一些实施方案中，所述心境障碍是焦虑症、抑郁症、精神分裂症或躁狂症。

本申请所用的术语“焦虑症”包括有或无旷野恐怖的恐慌症、无恐慌症病史的旷野恐怖症、特定恐惧症、社交恐惧症、强迫行为障碍、创伤后紧张症、急性紧张症、广泛性焦虑症、归因于一般医学病症的焦虑症、物质诱发的焦虑症及未另外列出的焦虑症。如本文中所用，术语“焦虑症”包括那些焦虑症的诊断和统计手册（例如，Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) (DSM-IV) (1994, American Psychiatric Association, Washington, D.C.)) 中所述的相关病症。

本领域技术人员应认识到，神经及精神病症且特别是焦虑症存在替代性命名系统、疾病分类系统及分类系统，且这些系统随着医药科学发展而演变。因此，术语“焦虑症”意欲包括其它诊断来源中所述的类似病症。

本申请所用的术语“抑郁症”包括例如单发型或复发型严重抑郁症及心境恶劣性情感病症、抑郁性神经病及官能性抑郁症。本申请的抑郁症包括：忧郁型抑郁症，包括厌食症、体重减轻、失眠及早醒，和精神运动性阻滞；非典型性抑郁症（或反应性抑郁症），包括食欲增加、睡眠过度、精神运动性焦躁或烦躁、焦虑症及恐惧症；季节性情感病症。如本文中所用，术语“抑郁症”包括 DSM-IV 中所述的相关病症。

本申请所用的术语“精神分裂症”，是一种特征在于严重的慢性精神损害的精神类疾病。其症状在成人期的早期出现，随后是一段时期的社交障碍。精神分裂症表现为幻听和幻视、偏执、妄想（阳性症状）、情感迟滞、抑郁、快感缺乏、言语贫乏、记忆力和注意力缺陷以及社交退缩（阴性症状）等等。

本申请所用的术语“躁狂症”是一种以情感高涨或易激惹为主要临床相，伴随精力旺盛、言语增多、活动增多，严重时伴有幻觉、妄想、紧张症状等精神病性症状。躁狂发作时间需持续一周以上，一般呈发作性病程，每次发作后进入精神状态正常的间歇缓解期，大多数病人有反复发作倾向。

在一些实施方案中，所述心境障碍是由神经退行性疾病、中风或恶性肿瘤引起的心境障碍。

在一些实施方案中，所述心境障碍是神经退行性疾病引起的焦虑症或抑郁症，例如，老年痴呆引起的焦虑症或抑郁症。

药物施用和医药用途

5 本申请中使用的术语“药学上可接受的”指在合理的医学判断范围内适宜用于与人和动物的组织接触而无过度的毒性、刺激、过敏反应或者其他问题或并发症，具有合理的收益/风险比的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。在某些实施方案中，药学上可接受的化合物、材料、组合物和/或剂型指由管理机构批准（如美国食品药品监督管理局、中国食品药品监督管理局或欧洲药品局）或者列于普遍认
10 可的药典中（如美国药典、中国药典或欧洲药典）的用于动物（更特别地用于人）的那些。

 本申请中所用的术语“客体”可以包括人类和非人动物。非人动物包括所有的脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物。“客体”也可以是家畜动物（例如，牛、猪、羊、鸡、兔或马），或啮齿类动物（例如，大鼠或小鼠），或灵长类动物
15 （例如，大猩猩或猴子），或家养动物（例如，狗或猫）。“客体”可以是雄性或者雌性，也可以是不同年龄阶段。人类“客体”可以是高加索人、非洲人、亚洲人、闪族人，或其他种族，或不同种族的杂合体。人类“客体”可以是老年、成年、青少年、儿童或者婴儿。

 在一些实施方案中，本申请所述的客体是人或者哺乳动物。在一些实施方案
20 中，本申请所述的客体是人或者非人灵长类动物。

 本申请中公开的 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂可通过本领域公知的给药途径进行施用，例如注射给药（如，皮下注射、腹腔注射、静脉注射（包括静脉滴注或静脉输注）、肌肉注射或皮内注射）或非注射给药（如，口服给药、鼻腔给药、舌下给药、直肠给药或外用给药）。在一些实施方案中，本申请所述
25 的 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂通过口服、皮下、肌肉或静脉施用。在一些实施方案中，本申请所述的 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂通过口服施用。

本申请中使用的术语“治疗有效量”是指，可以缓解或者消除客体的疾病或症状，或者可以预防性地抑制或防止疾病或症状发生的药物的量。治疗有效量可以是将客体的一种或多种疾病或症状缓解到一定程度的药物的量；可以将那些跟疾病或症状成因相关的一种或多种生理或生物化学参数部分或完全恢复到正常的药物的量；和/或可以降低疾病或症状发生的可能性的药物的量。在一些实施方案中，本申请中使用的术语“治疗有效量”是指，可以缓解或者消除客体的心境障碍（例如，焦虑症或抑郁症）的药物的量。

本申请中提供的PI4KIII α /FAM126/TTC7复合物抑制剂的治疗有效剂量依赖于本领域公知的多种因素，例如体重、年龄、过往病史、目前正在接受的治疗、对象的健康状况和药物相互作用的强度、过敏、超敏和副作用，以及给药途径和疾病发展的程度。本领域熟练人员（例如医生或兽医）可根据这些或其它条件或要求相应降低或升高剂量。

在一些实施方案中，进一步包括在向客体施用有效量的PI4KIII α /FAM126/TTC7复合物抑制剂之前，诊断所述客体具有心境障碍。可以使用精神科临床医生常规的诊断方法和标准诊断客户是否具有心境障碍。

在一些实施方案中，治疗进一步包括向需要其的客体施用第二试剂。

在一些实施方案中，所述第二试剂是用于治疗心境障碍的试剂，包括但不限于，三环类抗抑郁药、选择性5-羟色胺再摄取抑制药(SSRI)、或5-羟色胺/去甲肾上腺素再摄取抑制药(SNRI)。

在一些实施方案中，所述第二试剂是用于治疗神经退行性疾病、中风或恶性肿瘤的试剂。在一些实施方案中，治疗神经退行性疾病的试剂包括但不限于左旋多巴(levodopa)、卡比多巴(carbidopa)、司来吉兰(selegiline)、雷沙吉兰(rasagiline)、恩他卡朋(entacapone)、托卡朋(tolcapone)、金刚烷胺(amantadine)、美金刚(memantine)、利鲁唑(riluzole)、溴隐亭(bromocriptine)、培高利特(pergolide)、阿扑吗啡(apomorphine)、罗匹尼罗(ropinitrol)、普拉克索(Pramipexole)、阿托品、东莨菪碱、苯海索(trihexyphenidyl)、苯扎托品(benzatropine)、丙环定(procyclidine)、他克林(tacrine)、盐酸多奈哌齐(donepezil hydrochloride)、氢溴酸加兰他敏(galanthamine)、石杉碱甲(huperzine A)和

利凡斯的明（Rivastigmine）。在一些实施方案中，治疗中风的试剂包括但不限于潘生丁、低分子右旋糖酐、尿激酶、肝素和阿司匹林。在一些实施方案中，治疗恶性肿瘤的试剂包括但不限于环磷酰胺、塞替派、卡莫司汀、顺铂、卡铂、甲氨蝶呤、培美曲塞、卡培他滨、阿糖胞苷、吉西他滨、紫杉醇、多西他赛和长春花碱。

在一些实施方案中，所述 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂在所述第二试剂之前、之后或同时施用。

本申请的还涉及本申请所述的 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂在制备用于预防或治疗心境障碍的药物中的用途以及本申请所述的 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂用于预防或治疗心境障碍的用途。

药物筛选

本申请的还提供了一种筛选 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物抑制剂的方法，包括将备选药物与 PI4KIII α 、FAM126、TTC7 或 EFR3a 的蛋白或者核酸或者 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物接触，并检测备选药物是否能够抑制 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物的形成或者活性。

本申请的还提供了一种筛选用于预防或治疗心境障碍的药物的方法，包括将备选药物与 PI4KIII α 、FAM126、TTC7 或 EFR3a 的蛋白或者核酸或者 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物接触，并检测备选药物是否能够抑制 PI4KIII α /FAM126/TTC7 复合物的形成或者活性。

实施例

实施例 1：口服给予 PAO 在大鼠慢性轻度不可预见性应激刺激模型中的抗抑郁药效

1.1 试验原理

慢性轻度不可预见性应激刺激（Chronic unpredictable mild stress, CUMS）模型是 Willner 等受 Katz 描述的慢性不可预见性应激刺激的启发于 1987 年提出、

并经过适当改动的大鼠抑郁症模型，是目前文献中广泛使用的模型。该模型更现实地模拟了人们日常生活中遭遇的“困难”。在此模型中，应激因子的多变性和不可预测性是模型制造成功的关键。十余种应激因子的顺序在试验全程中随机抽取，使动物不能预料刺激的发生。该模型具有高度的有效性，基本符合抑郁模型的要求，可用于研究其它模型无力解决的问题。在经过长期温和应激刺激之后蔗糖水饮用量的减少反映了内源性抑郁症的中心症状即快感缺乏，同时模拟了其它重症抑郁障碍的症状表现，如运动能力及社会交往能力下降、探索行为能力下降、侵犯攻击能力缺陷、性行为能力下降等。慢性应激介导的行为异常可保持几个月，抗抑郁药的长期应用可纠正这些异常行为，而其它类型的精神类药物则无效。

10 **1.2 试验目的**

本试验的目的是观察待 PAO 口服给药对慢性轻度不可预见性应激刺激模型大鼠的糖水偏爱程度的影响，以判断 PAO 是否具有良好的抗抑郁作用。

1.3 试验材料

1.3.1 受试样品

15 名称：PAO

配制方法：称取所需量的 PAO，用二甲基亚砷（DMSO）配制成浓度为 30 mg/ml 母溶液，然后用水稀释。

灌胃口服给药：给药剂量范围 0.1-3.0 mg/kg，给药溶液的体积为每 100g 体重给 0.5 ml。

20 **1.3.2 阳性对照品**

名称：盐酸文拉法辛缓释胶囊（怡诺思）

规格：150mg/粒

配制方法：取文拉法辛胶囊 2 粒（150mg/粒），碾碎，使用 0.5%CMC-Na 超声后混悬，并用 0.5%CMC-Na 定容至终体积 100ml。

25 **1.3.3 试验动物**

种属：Wistar 大鼠

使用动物数量和性别：60 只，雄性

体重：200~220g（分组前体重）

来源：上海斯莱克实验动物有限公司

1.4 实验方法

5 1.4.1 动物分组

试验前环境适应 5 天，选择健康的体重为 220~250g 的 SD 大鼠作为试验动物，并如下表 1 所示进行分组。

表 1. 动物分组

组别	给药剂量（mg/kg）	动物数
空白对照（饮用水）	0	10
CUMS 模型组（饮用水）	0	10
阳性药文拉法辛	15	10
PAO 灌胃高剂量	3.0	10
PAO 灌胃中剂量	1.5	10
PAO 灌胃低剂量	0.75	10

10 1.4.2 动物造模及给药方法

1.4.2.1 基础糖水偏爱检测

适应性饲养大鼠 1 周，随后进行基础糖水偏爱试验。在开始的 24 小时内所有动物均给予 1%的蔗糖水：两个瓶子里均盛有 1%的蔗糖水，同时放在笼子的左右角。在接下来的 24 小时中，同时给予 1%的蔗糖水和普通饮用水：一个瓶子内为 1%的蔗糖水，另一个瓶子内为普通饮用水，仍同时放在笼子的左右角。接着禁食禁水 23 小时，随后进行糖水偏爱试验：同时给予 1%的蔗糖水和普通饮用水，通过称水瓶重量来测量动物在 1 小时内蔗糖水和普通饮用水的饮用量。据动物体重、液体消耗量和糖水消耗量将动物如表 1 所示进行均匀分组，随后进行慢性轻度不可预见性应激刺激（“CUMS”）。

20 1.4.2.2 CUMS 抑郁造模

对除空白对照组之外的其它组进行 CUMS 抑郁造模。每周十余种应激刺激因子交替给予大鼠，使大鼠不可预见每次应激因子刺激持续的时间和接下来将给

予的刺激。实验的刺激因素如下：2 次 7 小时的闪光刺激；1 次 17 小时的不洁垫料环境（将 150ml 的水倒在垫料上）；1 次 3 小时和 1 次 5 小时的间歇性噪音刺激；1 次夜间光照（光照持续 36 小时）；1 次 7 小时和 1 次 22 小时鼠笼倾斜；1 次 17 小时的群养（5 只鼠一笼），1 次 17 小时的陌生气味环境饲养；1 次 7 小时陌生异物环境；3 次分别持续 19、22 和 24 小时的禁食，每次禁食后给予 2 小时有限的饲料供应；4 次分别持续 17、19、20 和 21 小时的禁水，每次禁水后放置空瓶 1 小时（表 2）。

表 2. CUMS 刺激时间安排

	时 间	刺激时间安排（刺激种类时间不变，时间表随试验调整）
周 一	9:00	单笼饲养，给药
	11:00	供给食物夹尾
	12:00	停止夹尾，放樟木块，倾斜鼠笼
周 二	10:00	去除樟木块，放置异物（玻璃杯或者塑料杯），给药
	16:00	拿走水、食物和异物，持续光照（开关打开）
周 三	9:00	3 小时白噪音，给药
	12:00	供给食物和水，冰粒（200 ml）/笼
周 四	9:00	换笼子，7 小时左右白噪音，给药后称体重，禁食、水
		配置糖水，准备每笼一瓶水和糖水，水瓶称重
	16:00	倾斜鼠笼，打开闪光灯
周 五	9:00	关闭闪光灯，供给 1 小时水和糖水（1-5 号鼠），水瓶称重
	10:30	供给 1 小时水和糖水（6-10 号鼠），水瓶称重
	11:30	供给食物，6 小时白噪音
		给药，清洗水瓶，送动物房消毒
周 六	16:00	停止白噪音，持续夜间光照（开关打开）
	10:00	供给水，给药，倾斜鼠笼
	16:00	拿除水，停止倾斜鼠笼，打开闪光灯
周 日	9:00	关闭闪光灯，供给水，给药，拿除食物，45-50℃热水（150ml/笼）
	16:00	五只一笼群养

10

1.4.2.3 给药方法

在 CUMS 刺激造模的前 2 周，不进行大鼠的 PAO 给药。在 CUMS 造模 2 周后的首个周一起口服给予大鼠 PAO 或文拉法辛，同时空白组及模型组大鼠也

开始给予饮用水，按照表 1 中的剂量给药，每天给药 1 次，连续给药至 CUMS 程序结束。给药期间继续 CUMS 刺激。

1.4.3 抑郁行为指标——糖水偏爱程度检测

每周在禁食禁水后测定液体消耗量（均于周五测定），记录每只动物的体重（周四记录）、液体摄入总量、摄水量和糖水摄入量。计算每鼠糖水偏爱百分比（计算公式如下：[偏爱=（糖水摄入量/液体总摄入量）×100%]）和每克体重的糖水消耗量。此实验周期为 9 周。

1.4.4 统计方法

使用 SPSS 软件进行统计分析，数据以平均值±标准误差（ $\bar{x} \pm s.e.m.$ ）表示，其它各组动物与空白组动物的体重差异通过双因素方差分析（Two way ANOVA）进行统计检验；给药 1 周和 2 周后其它各组与模型组的糖水偏爱值差异及其它各组与空白对照组的糖水偏爱值差异均使用 Unpaired *t* test 检验显著性，*P* < 0.05 标记为*，*P* < 0.01 标记为**。

1.5 试验结果

1.5.1 CUMS 造模及给药后体重的变化

初始分组时，各组动物体重相似，无显著性差异。随着 CUMS 的进行，除未处理的空白组外，其它组动物因为均进行了 CUMS 抑郁造模，体重增重均显著变缓（表 3，图 1）。自刺激第一周开始，经 CUMS 刺激的其它各组动物的体重在每周的测量中均低于空白对照组（表 3，图 1），说明本试验使用 CUMS 进行抑郁造模是非常有效的，很好地模拟了抑郁症发病过程中的体重降低。

表 3. 各组大鼠在 CUMS 造模及给药阶段的体重情况

时间	空白对照	模型对照	文拉法辛	PI 高剂量	PI 中剂量	PI 低剂量
分组时	251.8	245.2	251.1	253	250.9	251.4
CUMS 1 周	251.7	232.2	234	233	234.9	235.2
CUMS 2 周	282.6	247.1	252.3	247.6	254.4	254.4
CUMS 3 周	299.7	245.8	251.5	248.1	252.3	255.5
CUMS 4 周	316.9	256.5	264.3	261.3	260	266

CUMS 5 周	333.7	258	268.1	263.3	262.3	269.6
CUMS 6 周	348.4	262.7	269.3	264.2	269.1	272.5
CUMS 7 周	333.2	268.4	273.3	266.8	273.3	279
CUMS 8 周	352.8	262.7	276	272.9	278.5	283.9

1.5.2 PAO 多次给药的抗抑郁药效

初始分组时，各组动物糖水偏爱程度相似。给药 6 周后，3 和 0.75 mg/kg 剂量的 PAO 和文拉法辛均有提高大鼠糖水偏爱值的趋势，与模型组大鼠具有显著性差异(P<0.05 或 P<0.01)，并且其糖水偏爱值与空白对照组大鼠相近(P>0.05)（表 4）。本试验结果表明，在大鼠 CUMS 抑郁模型中，PAO 口服给药可起到显著的抗抑郁效果，其起效时间略晚于经口灌胃给予文拉法辛。

表 4. PAO 对 CUMS 大鼠糖水偏爱的影响（每组 n=10， $\bar{x} \pm s.e.m.$ ）

时间	空白对照	模型对照	文拉法辛	PAO 高剂量	PAO 中剂量	PAO 低剂量
CUMS 5 周	0.90±0.10	0.85±0.22	0.90±0.08	0.81±0.21	0.72±0.30	0.87±0.15
CUMS 6 周	0.87±0.25	0.83±0.22	0.94±0.04*	0.84±0.17	0.78±0.20	0.88±0.14
CUMS 7 周	0.89±0.05*	0.79±0.1	0.92±0.07**	0.90±0.06*	0.86±0.08	0.91±0.11*
CUMS 8 周	0.90±0.07*	0.72±0.23	0.90±0.07*	0.86±0.10	0.81±0.14	0.92±0.06*
** P<0.01, * P<0.05 与模型组比较						

1.6 结论

每天口服给予 1 次 3 和 0.75 mg/kg 剂量的 PAO 或者阳性药文拉法辛 6 周后显示出增加 CUMS 抑郁模型大鼠的糖水偏爱程度，并将糖水偏爱值增加至与正常大鼠相似的程度，体现了抗抑郁药效作用。口服 1.5 mg/kg 剂量的 PAO 也有增加糖水偏爱程度的趋势。

实施例 2：PAO 的抗焦虑抑郁药效的进一步验证和机理研究

2.1 小鼠的品系、育种和繁殖

本发明使用的小鼠品系有 C57/6B 和 ICR 野生型小鼠、Efr3a^{-/-}小鼠（Efr3a 的第二个外显子被无条件敲除并导致之后的遗传密码移位）、
5 Pi4kaGt(RRO073)^{Byg/+}（简称 Pi4k^{-/+}）小鼠和 APP/PS1 小鼠。

Pi4kaGt(RRO073)^{Byg/+}小鼠是由美国突变小鼠资源与研究中心（Mutant Mouse Resource and Research Center）的 Pi4kaGt(RRO073)^{Byg/+}小鼠（MMRRC, Cat. #016351-UCD）与 C57/6B 小鼠回交 5 代以上后的小鼠，该小鼠的 PI4KA（编码 PI4KIII α ）基因上插入了一个转座子并引入 polyA，能使 PI4KA 的转录被提前终止。
10 APP/PS1 小鼠是双转基因小鼠，基因型是 B6.Cg-Tg（APP^{swe}, PSEN1^{dE9}）85Dbo/Mmjax（MMRRC ID 034832-JAX），其是一种阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD）的模型小鼠。

在本申请中，各种小鼠都用标准大小的鼠笼饲养，每笼 5 只，偶尔一笼有 4 只或 6 只。无特别规定时，小鼠自由进食和喝水。

2.2 激素诱导小鼠焦虑抑郁模型的建立

ICR 小鼠口服皮质酮（Corticosterone, GC，即 11 β , 21-二羟基孕烯-3, 20-二酮），一月后可得小鼠抑郁模型。用羟丙基- β -环糊精(hydroxypropyl- β -cyclodextrin, β -CD) 助溶，配制成 GC 浓度为 35 μ g/ml 的水溶液，其中 β -CD 的浓度为 0.45%。

取 60 只雄性 C57B/6 的 WT 小鼠分成六组，每组各 10 只，在小鼠 3 月龄时，
20 在四组小鼠的饮用水被上述 GC 溶液替换，另两组继续给予普通饮用水，并每周记录小鼠的体重变化和饮水量。继续一月后，分别从喂食 GC 溶液和水的小鼠中各随机抽选两组给予 PAO 溶液灌胃。PAO 采用每天定时灌胃给药方式，以 0.2 和 0.4mg/kg 体重的剂量进行给药，总体积 300 μ l，给药一个月后，即小鼠 5 月龄时进行小鼠的行为学实验分析。

2.3 PAO 或其衍生物的配置

PAO 母液配置：取 PAO ≤ 30 mg 放入 1.0 ml 的纯 DMSO 溶剂中，超声或振荡至 PAO 完全溶解。然后用水稀释至所需要的浓度，DMSO 的浓度最终浓度为 0.1%。

在某些实施例中，PAO 或其衍生物溶解于中链甘油三酸酯中，母液浓度是 1.0 mg/g，灌胃时，用中链甘油三酸酯稀释到特定浓度。

2.4 小鼠行为实验方法

2.4.1 强迫游泳（Forced Swimming Test, FST）

强迫游泳实验（通过将实验动物置于一个局限的环境中（如水中），动物在该环境中拼命挣扎试图逃跑而又无法逃脱，从而提供了一个无可回避的压迫环境，一段时间后，动物即表现出典型的“不动状态”，一种被称之为“行为绝望状态”的抑郁模型。实验在一个内径 15 cm，高度 30 cm 的透明塑料圆柱体中进行，注水高度 15 cm，可适当调整高度，以小鼠尾巴不能触底，小鼠不能跳出水罐的高度为宜。实验时水温应保持在 22°C-25°C 之间，强迫游泳图像采集系统应置于 FST 装置前侧，距离水罐一定距离并能清楚记录小鼠在水里的四肢运动状态为宜。每次需计时 6 min，分析小鼠在第 2 min 至第 6 min 时间内的不动时间，实验后及时取出小鼠擦干，若实验过程中小鼠发生溺水现象应及时将其取出并停止对该鼠进行 FST 实验。实验进行过程中，应当营造并保持绝对的无音环境。小鼠在一定时间内的不动状态持续越长，则表明小鼠的抑郁程度更深。

2.4.2 黑白箱实验（the light/dark box test, LDB）

黑白箱实验利用动物嗜暗特性（趋黑箱）和探索特性（趋白箱）进行动物焦虑行为评估的一种实验。LDB 由大小一致的九宫格的白箱（27×27 cm）和大小一致的六宫格黑箱（18×27 cm）组成，整体（45×27×27 cm）呈矩形箱，无盖，白箱和黑箱中间由开小窗（7.5×7.5 cm）的板隔开。在箱子正上方放置图像采集系统记录设定时间内小鼠在黑白箱内的穿梭的距离和轨迹，进出黑白箱的次数和分别在黑箱或白箱内逗留的时间。若小鼠进出黑白箱次数越频繁，在各个箱内的穿梭距离越长或在黑箱中逗留的时间越久则小鼠的焦虑程度越深。实验开始前应用锡箔纸包住鼠笼，但须有用于空气交换的开口，遮光半小时后再开始实验，目的是为了小鼠提前适应暗环境，消除小鼠的实验恐慌和焦虑状态，然后逐一依

次将老鼠放置于白箱或黑箱的中心位置，面对着小窗，记录小鼠在 5 分 30 秒内的穿梭黑白箱的次数，在黑白箱中的穿梭距离和在各个箱的停留时间，待图像采集完之后进行行为学分析，每次实验做完一只小鼠后都应用 70%乙醇彻底擦拭黑白箱中小鼠能接触的位置，待酒精气味完全散发干以后开始下一只小鼠实验，
5 从而避免前一只小鼠的气味对后一只小鼠行为造成不必要的误导和干扰。整个实验进行过程中，应当营造并保持绝对的无音环境。

2.4.3 高架十字迷宫实验 (the elevated plus maze, EPM)

高架十字迷宫是评价啮齿类动物焦虑反应的实验方法之一，相较于伤害性刺激所致小鼠焦虑行为检测（如，电刺激、噪声刺激、饮食剥夺和暴露在捕食者气味等），该实验具有操作简单，伤害性小等优点，并能直观反应小鼠的条件应答。
10 EPM 由两条开放臂和两条闭合臂组成，呈十字形交叉，交叉部分为中央区，距地面约 75 cm。原理是由于面对新事物（开臂）小鼠会产生好奇心去探索，而它们又有嗜暗的天性（闭臂），两者之间发生探究与回避的冲突行为，产生焦虑心理。实验时，将单只老鼠面朝向闭合臂放置于中央区，记录小鼠在 5 分 30 秒内的
15 进出开放臂和闭合臂的次数以及在各个臂所停留的时间。小鼠进入开放臂和闭合臂的次数越频繁或在闭合臂停留的时间越长，则小鼠的焦虑程度更深。每次做完一只小鼠都应用 70%乙醇彻底擦拭高架十字迷宫中小鼠能接触到的位置，待酒精气味散发完以后开始下一只实验，以避免前一只小鼠的气味对后一只小鼠行为造成不必要的误导和干扰。整个实验进行过程中，应当营造并保持绝对的无音
20 环境。

2.4.4 新奇抑制摄食实验 (novelty-suppressed feeding test, NSF)

新奇抑制摄食实验是检测啮齿类动物禁食后饥饿状态下在新奇的环境中产生摄食和对新环境恐惧的矛盾冲突。实验场地是 30×30 cm 正方形、高 20 cm 的白色不透明有机玻璃盒，在盒底中心放置一粒正常小鼠食物。小鼠禁食 24 小时
25 后，将单只小鼠头部朝玻璃盒角方向随机放入玻璃盒的一角。观察小鼠在玻璃盒中的活动，直到小鼠开始啃吃食物，取出小鼠，并记录小鼠从被放入玻璃盒到开始啃吃食物的时间（摄食潜伏期）。除非另有设计或规定，如果 5 min 小鼠都没啃吃食物，也取出小鼠，该小鼠的摄食时间记录为 5 min。摄食潜伏期越长，提示焦虑程度越深。

2.4.5 慢性轻度不可预见性应激刺激模型 (chronic unpredictable moderate stress, CUMS)

实验持续 8-10 周，每天从多种应激刺激因子中随机选取两种给予小鼠。应激刺激因素有：夹尾 15 分钟、强光刺激 4 小时、噪音 10 分钟、鼠笼 45°倾斜 24 小时、倒挂 10 分钟、限制活动空间 4 小时、不清洁垫料环境 24 小时（向垫料中倒入 150 ml 的水）、夜间光照（光照持续 36 小时）、陌生异物环境 7 小时；禁食 24 小时（禁食时取走垫料）；持续禁水 24 小时（禁水时取走垫料）。但是，每周持续禁水只有一次，且禁水与不清洁垫料环境不交叉，持续禁水后称每只小鼠体重，接着测量糖水偏好度。测量糖水偏好度时，单只小鼠放入一个新鼠笼，其中放置两只瓶子，一只含纯水，另一只含 1%糖水，预先分别称量两只瓶的重量。小鼠喝水 15 分钟后，两只瓶子的位置互换，再让小鼠喝水 45 分钟。取出两只水瓶，并分别称量两只瓶的重量。实验结束后，马上给予小鼠供应充分的水和食物。

2.4.6 水迷宫实验 (Morris water maze)

水迷宫实验 (Morris Water Maze, MWM) 装置是由水迷宫、水迷宫图像采集系统和软件分析系统三部分组成。水迷宫主要由盛水的水池（直径=1.2 m）和一个可调节高度并且可以移动位置的圆形透明平台（直径=5 cm）所组成。水池里的含有钛白粉，每次实验开始前应搅拌均匀以至小鼠不能直观地发现池里的平台，实验时水温维持在 20°C 左右。小鼠在水池中的行为由置于水迷宫上方的摄像头采集，传输到与之相连的计算机中，进行线上 (on-line) 或线下 (off-line) 分析和存储。

水迷宫实验主要依次有适应训练、获得性训练、探查训练三个阶段，有时还有反向获得性训练阶段。简要步骤如下：

适应训练：获得性学习开始前一天，调节水温到适宜温度，混匀水池，水池的第三象限放有露出水面 0.5 cm 的平台。将小鼠面朝水池壁放入到水池中，任其自由游泳 1 min，将小鼠取出，擦干。如果小鼠在 1 min 内能爬山平台，则让小鼠在平台上停留 0.5 min。

获得性训练：一般持续 7 天，但也可长可短。将水池分为 4 个象限，平台置于象限一的中间，将小鼠面朝池壁分别从四个象限随机放入水中，在水池的四壁

分别粘贴三角形，正方形，四角星和圆形四个不同的标志物以方便小鼠的记忆和学习。记录小鼠找到水下平台的时间。如果时间达到 60 秒，则引导小鼠上平台，让其在平台上滞留 30 秒，后取出擦干；如果时间未到 60 秒就找到了平台，记录时间，并让其在找到平台后滞留 30 秒再取出并擦干。若小鼠有学习记忆能力，
5 则每天找到平台所花的时间将越来越短。

探查训练：最后一次获得性训练之后的第二天，将象限一中的平台撤走，开始 60 秒的探查训练。分别将小鼠由三，四象限（距离象限一最远）一端放入水中，记录小鼠在象限一（之前放平台的象限）所花的时间占总时间的百分比，以此作为空间记忆的检测指标。实验终止后应及时取出小鼠并擦干。一般在获得性
10 训练中能在各个象限中所花时间最少找到平台又或者在探查训练中象限一所占时间百分比越大的小鼠学习记忆能力越强。实验进行过程中，应当营造并保持绝对的无音环境。

反向获得性训练：探索阶段结束后，将平台置于原来位置的对侧象限，每只动物每天 4 个象限，共训练 4 次，每次训练 60 秒。动物找到隐藏平台后使其在
15 平台上停留 30 秒，若未找到平台，则引导其登上平台停留 30 秒。动物训练间隔 15-20 分钟。

2.5 小鼠大脑 PIK4IIIα 的 mRNA 水平的定量 PCR 分析方法

2.5.1 主要仪器设备与试剂

表 5. 主要仪器设备与试剂

名称	品牌	型号/货号
RNAiso Plus	TAKARA	9109
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser	TAKARA	RR047A
TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)	TAKARA	RR820A
高速冷冻离心机	Thermo	Heraeus Fresco17
PCR 仪	Biorad	C1000™ Thermal Cycler
qPCR 仪	Biorad	CFX96

20

2.5.2 引物信息

表 6. 引物信息

名称	序列
Mouse-β-actin-F	GTACCACCATGTACCCAGGC
Mouse-β-actin-R	AACGCAGCTCAGTAACAGTCC
Mouse-Pi4ka-F	CCTAGCCTAGCACCTGAAGC
Mouse-Pi4ka-R	CGTGTGCATCAACGGTCCA

2.5.3 实验步骤

RAN 抽提：每个脑组织样本（半脑），各加 RNAiso Plus 1000 μl，组织裂解仪研磨（10 转/秒×10 秒/循环×10 循环），室温静置 5 min，12000 g 4℃ 离心 10 min；取上清 900 μl 加入到新鲜 1.5 ml EP 管中，各加 200 μl 三氯甲烷，充分混匀，室温静置 5 min；12000 g 4℃ 离心 15 min，将上清 400 μl 移至新 1.5 ml EP 管中，各加 800 μl 异丙醇，室温静置 10 min；12000 g 4℃ 离心 10 min，弃上清；75%的乙醇 1 ml/管，轻轻混匀，7500 g 4℃ 离心 5 min，弃上清；沉淀室温晾干，各加 50 μl H₂O 溶解。

逆转录：使用去 DNA 的逆转录试剂盒，20 μl 体系。取 1 μg RNA 于 200 μl PCR 管中，加 5×gDNA eraser buffer 2 μl/管，gDNA eraser 1μl/管，H₂O 补至 10 μl。42℃ 2 min 消化 DNA。向该反应液加 PrimeScript RT Enzyme MIX II μl/管，RT primer mix 1 μl/管，5×primeScript buffer2（for real time）4 μl/管，RNase free H₂O 4 μl。37℃ 15 min，85℃ 5 sec，4℃ 的程序进行逆转录。得到的 cDNA 立即使用或-20℃ 保存备用。

实时定量 PCR：用 RNase free H₂O 将 cDNA 稀释 10 倍。反应体系为 TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μl，双向引物（10 μM）各 1 μl，cDNA 模板 2 μl，RNase free H₂O 8.5 μl，总体积 25 μl。反应程序采用两步法：95℃ 预变性 30 sec；PCR 反应 95℃ 5 sec，60℃ 30 sec，共 40 各循环；最后运行溶解曲线程序。每个样本 3 个技术重复。

2.5.4 数据分析：采用△CT 法对目标基因进行相对定量。

2.6 数据分析和统计

SPSS 软件用来进行数据的比较分析。文章中的数据统计都以平均值±标准误差的方式呈现。数据有显著差异的标准是 p 值<0.05。

2.7 实验结果

2.7.1 小鼠大脑 PI4KIII α 的 mRNA 水平与抑郁程度正相关

取 35 只雄性 2 月龄的 ICR 小鼠，进行第一次强迫游泳实验，经历无可回避的压迫。在之后的第七天，这些小鼠经历第二次强迫游泳实验，并记录每只小鼠在第二次强迫游泳总共 6 min 中的最后 4 min 内处于“不动状态”的时间。然后，
5 快速取出每只小鼠的大脑，提取脑组织中的总 RNA，进行逆转录获得 cDNA。
对每只小鼠的 PI4KIII α 和内参 beta-actin 的 cDNA 进行定量 PCR，采用 Δ CT 法进行相对定量，分析计算每只小鼠脑组织中 PI4KIII α 的 RNA 相对内参 RNA 的量。剔除“不动状态”的时间小于 10 s 或大于 160 s 的数据后，以余下的每只小鼠的“不动状态”时间和 PI4KIII α 的 RNA 的相对量分别为 X 和 Y 轴值制作点
10 阵图(图 2)。结果显示小鼠大脑 PI4KIII α 的 mRNA 水平与抑郁程度线性正相关。
该实验结果提示 PI4KIII α 在抑郁严重程度调节或介导中起作用。

2.7.2 PI4KIII α 抑制剂减轻 APP/PS1 小鼠的焦虑和抑郁行为

获取 6 月龄的雄性 APP/PS1 小鼠和同窝野生型雄性小鼠各 9 只，每周一至周五的每天给两组小鼠灌胃 PAO 溶液一次(剂量: 0.3 mg/kg 体重)，周六和周日停药。另取同月龄的雄性 APP/PS1 小鼠 9 只同时给予不含 PAO 的溶液灌胃。
15 两月后，三组小鼠因其它试验目的经历了 8 天的水迷宫训练(training)及之后一天的记忆测试试验。待小鼠月龄达到 10 月时，每只小鼠被转入一个长宽高均为 15 cm 的无盖的不透明有机玻璃盒中，盒底放置一个改装的家用灭蚊拍。当小鼠处于灭蚊拍中央时给予 1 秒电击。之后再放回饲养鼠笼(home cage)。7 天后，
20 给予高架十字迷宫实验，记录每只小鼠在开放臂所处的时间，计算在开放臂所处的时间占总的在高架十字迷宫所处的时间的百分比。如图 3 结果显示，没用 PAO 治疗的 APP/PS1 小鼠在开放臂所处时间的百分比明显比野生型的小，而用 PAO 治疗的 APP/PS1 在开放臂所处时间的百分比明显与野生型的无明显差异。如图 3 所示 PAO 能预防或减轻 APP/PS1 小鼠的焦虑症状。

25 为了探索药物对 APP/PS1 焦虑行为的治疗作用与对 APP/PS1 小鼠学习记忆障碍的治疗作用之间是否存在必然的相互依赖性，我们测试了 PAO 和安理申(Aricept, 盐酸多奈哌齐)对 APP/PS1 焦虑和学习记忆障碍的治疗作用。获取 APP/PS1 与 C57B/6 交配的子代的 4 月龄同窝雄性 APP/PS1 小鼠 32 只，随机平分为两组，周一至周五每天通过灌胃分别给予 PAO(剂量为 0.1 mg/kg 体重，这

组小鼠称为 APP/PS1 PAO 小鼠), Aricept (剂量为 1.0 mg/kg 体重, 这组小鼠称为 APP/PS1 Aricept 小鼠)。另外取 4 月龄同窝雄性 WT 小鼠 16 只和 APP/PS1 小鼠 20 只, 同样灌胃 0.1% DMSO 水溶液。5 周后, 进行水迷宫试验。如图 4 所示, 未用药治疗的 APP/PS1 小鼠在水迷宫中表现最差, WT 小鼠表现最好。PAO 治疗的小鼠在获得性训练和反向获得性训练中的表现都明显比未用药治疗的 APP/PS1 小鼠要好, 表明 PAO 明显改善了 APP/PS1 小鼠学习记忆能力。Aricept 治疗的小鼠在获得性训练中的表现与未治疗的 APP/PS1 小鼠无明显差异, 但在反向获得性训练中的表现与用 PAO 治疗的小鼠的表现一样, 也明显比未治疗的小鼠要好, 表明 Aricept 明显改善了 APP/PS1 的学习记忆能力, 但治疗效果不如 PAO 的好。

各组小鼠在水迷宫试验结束 1 周后, 进入新奇抑制摄食实验。如图 5 所示, 未治疗的 APP/PS1 小鼠摄食潜伏期明显比 WT 小鼠长, 而 PAO 治疗的 APP/PS1 小鼠的摄食潜伏期与 WT 小鼠的无明显差别, 表明 PAO 能明显减低 APP/PS1 小鼠的焦虑水平; 但是 Aricept 治疗的 APP/PS1 小鼠的焦虑水平与未治疗的 APP/PS1 小鼠无明显差异, 甚至更高; 表明尽管 Aricept 能明显改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆能力, 却不能减轻 APP/PS1 小鼠的焦虑水平。所以, 能否改善学习记忆与能否改善焦虑程度无必然联系。

2.7.3 在野生型小鼠中下调 PI4KIII α 可预防或减轻抑郁及焦虑表现

获取 Pi4k^{-/-}与 C57/6B 交配后子代中的 2 月龄野生型(WT)和 Pi4k^{-/-}小鼠(分别 15 只), 转移至行为实验室适应 1 周。第二周起开始进行 CUMS 实验, WT 小鼠从 CUMS 的第 3 周开始体重滞涨, 甚至下降; 而 Pi4k^{-/-}小鼠能持续增长。从 CUMS 的第 6 周起, Pi4k^{-/-}小鼠与 WT 比较有显著性差异(表 7)。糖水偏好方面, 应激刺激前及 CUMS 的前 2 周, 两组小鼠对糖水都有明显偏好, 且无明显差异。从 CUMS 的第 3 周起, 两组小鼠对糖水的偏好度便逐周下降, 但 WT 组比 Pi4k^{-/-}组下降更快, 且在 CUMS 的第 7 周时, WT 组的糖水偏好度显著比 Pi4k^{-/-}组的低(表 8)。该实验结果显示下调 PI4KIII α 表达可以预防或减轻抑郁症状。

CUMS 实验结束后的当天, 给小鼠供应充分的水和食物, 第 2 天早上 9 点开始禁食、供水、取出垫料, 第三天进行新奇抑制摄食实验。结果显示 WT 组平均

摄食潜伏期明显比 Pi4k^{-/+}组的长 (WT: 212±45 s, Pi4k^{-/+}: 154±27 s, T-Test, P<0.05)。该实验结果显示下调 PI4KIIIα 表达可以预防或减轻焦虑症状。

表 7. WT 与 Pi4K^{-/+}小鼠在 CUMS 期间的体重情况 (n=15, mean ± s.e.m.)

时间	WT	Pi4K ^{-/+}
刺激前	24.5±1.2	24.3±1.6
CUMS 1 周	25.1±1.1	24.8±1.4
CUMS 2 周	25.2±1.5	25.2±1.7
CUMS 3 周	25.4±1.7	25.8±1.5
CUMS 4 周	25.6±3.0	26.3±1.3
CUMS 5 周	25.2±2.2	26.8±1.6
CUMS 6 周	25.0±1.7	27.2±2.1*
CUMS 7 周	24.4±2.2	27.5±1.6*
CUMS 8 周	24.1±1.3	27.5±1.5*
CUMS 9 周	23.5±2.0	27.7±1.0**

5 “*” 表示与对应的 WT 小鼠比较有显著性差异, p<0.05

表 8. Pi4k 缺失对 CUMS 小鼠糖水偏爱的影响 (n=15, mean ± s.e.m.)

时间	WT	Pi4K ^{-/+}
刺激前	0.84±0.15	0.85±0.2
CUMS 1 周	0.83±0.15	0.84±0.21
CUMS 2 周	0.81±0.12	0.84±0.17
CUMS 3 周	0.78±0.15	0.83±0.16
CUMS 4 周	0.75±0.1	0.84±0.11
CUMS 5 周	0.72±0.15	0.82±0.17
CUMS 6 周	0.71±0.15	0.80±0.15
CUMS 7 周	0.64±0.12	0.81±0.13*
CUMS 8 周	0.60±0.11	0.80±0.14*
CUMS 9 周	0.53±0.1	0.77±0.10**

10 “*” 、 “**” 表示与对应的 WT 小鼠比较有显著性差异, p<0.05、p<0.01

2.7.4 下调 PI4KIIIα 可预防或减轻神经退行性疾病模型小鼠的抑郁及焦虑表现。

15 为了测试下调 PI4KIIIα 表达是否可以预防或减轻其它疾病, 特别是神经系统疾病伴发的焦虑抑郁, 我们获取 Pi4k^{-/+}与 C57/6B 基因背景的 APP/PS1 交配后子代中的 4 月龄的 “APP/PS1” 和 “APP/PS1; Pi4k^{-/+}” 小鼠各 15 只进行 CUMS 试验, 每周测定两组小鼠对糖水的偏好度。如表 9 结果显示 APP/PS1; Pi4k^{-/+}小鼠对糖水偏好度的下降明显比 APP/PS1 小鼠要慢, 表明下调 PI4KIIIα 表达可以预防或减轻 APP/PS1 小鼠的抑郁症状。

表 9 下调 PI4KIIIα 对经历 CUMS 的 APP/PS1 小鼠的糖水偏爱的影响 (n=15, mean±s.e.m.)

时间	APP/PS1	APP/PS1; Pi4K ^{-/-}
刺激前	0.78±0.15	0.83±0.17
CUMS 1 周	0.75±0.15	0.81±0.12
CUMS 2 周	0.73±0.18	0.82±0.16
CUMS 3 周	0.70±0.09	0.79±0.17
CUMS 4 周	0.65±0.11	0.77±0.11
CUMS 5 周	0.61±0.10	0.81±0.19*
CUMS 6 周	0.55±0.11	0.78±0.12*
CUMS 7 周	0.51±0.10	0.75±0.13**

“*”、“**”表示与对应的 APP/PS1 小鼠比较有显著性差异, p<0.05、p<0.01

同样, CUMS 实验结束后的当天, 给小鼠供应充分的水和食物, 第 2 天早上 9 点开始禁食、供水、取出垫料, 第三天进行新奇抑制摄食实验。结果显示 APP/PS1; Pi4k^{-/-}小鼠平均摄食潜伏期明显比 APP/PS1 组的短 (APP/PS1: 242 s, Pi4k^{-/-}: 183 s, T-Test, P<0.05)。该实验结果显示下调 PI4KIIIα 表达可以预防或减轻 APP/PS1 小鼠的焦虑症状。

2.7.5 下调 Efr3a 可预防或减轻神经退行性疾病模型小鼠的抑郁及焦虑表现。

获取 APP/PS1 与 Efr3a^{-/-}交配的子代的同窝 WT, Efr3a^{-/-}, APP/PS1, APP/PS1; Efr3a^{-/-}小鼠分别为 15、4、14 和 9 只。待小鼠达到 8 月龄时, 进行黑白箱实验。如图 6 显示, 与野生型小鼠 (WT) 比较, 8 月龄的 APP/PS1 小鼠在白色箱中穿越宫格的数量 (行走距离) 显著增加, 而同龄的 APP/PS1; Efr3^{-/-}小鼠与 WT 小鼠无明显差异, 但比 APP/PS1 小鼠明显减少。提示 APP/PS1 小鼠的焦虑程度明显比 WT 小鼠高, 敲除一个拷贝的 Efr3a 基因能明显预防或减轻 APP/PS1 小鼠的焦虑程度。

实施例 3: PAO 及其衍生物对小鼠焦虑抑郁的抑制作用

本实验测试了 PI4KIIIa 抑制剂 PAO 及其衍生物对无明显其它疾病状或神经损伤的野生型小鼠的焦虑抑郁的抑制作用。

3.1 PAO 衍生物抑制野生型小鼠的抑郁行为

我们还测试了 PAO 衍生物对 ICR 小鼠在被迫游泳实验中的影响。比如: 在 PAO 苯环的对位上的-H 被-F、-CF₃ 和-I 取代后分别生成的衍生物 PI04、PI05 和

PI06。这三种 PAO 衍生物首先都用中链甘油三酸酯-MIGLYOL 812N (IOI Oleo GmbH) 配置为浓度为 1.0 mg/g 的母液。每天给小鼠进行灌胃给药前用同样的油分 3 步梯度稀释为 0.033 mg/ml 的溶液后,均按 0.3 mg/kg 体重的剂量灌胃给药。对照组 (veichle) 仅给予中链甘油三酸酯。

- 5 取 80 只 2 月龄的 ICR 小鼠,随机平分为 4 组,在被迫游泳实验室适应 1 周后,进行第一次 6 分钟的被迫游泳,记录后 4 分钟的总的不动时间(immobile time),剔除各组总的不动时间小于 10 秒和大于 160 秒的小鼠后,veichle(空白油)、PI04、PI05 和 PI06 组分别留下 16、14、17 和 15 只小鼠。然后,每组每天按 0.3 mg/kg 体重的剂量灌胃给药一次,连续 6 天。第 7 天,进行第二次的 6 分钟被迫游泳实验,每只小鼠在进行被迫游泳实验前 60 分钟按同样剂量给药一次。记录每只小鼠在后 4 分钟的不动时间。如图 7 所示,给空白油的小鼠在第一和第二次被迫游泳实验中的不动时间无明显差别,而 PI04、PI05 和 PI06 组的小鼠在第二次被迫游泳实验中的不动时间都比它们在第一次被迫游泳实验中的不动时间明显减少,表明 PAO 衍生物 PI04、PI05 和 PI06 都能减轻焦虑抑郁的行为表现。

15 3.2 PAO 预防或减轻神经元损伤导致的焦虑抑郁

- 小分子化合物 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 被单胺氧化酶 B (MAO-B) 脱氢生成 MPP^+ 离子,这种离子抑制线粒体复合酶 I,产生细胞毒性,甚至使该细胞死亡。 MPP^+ 离子比较特异地被黑质 (Substantial nigra) 中的多巴胺神经元大量摄取, MMP^+ 阻断线粒体呼吸链的复合体 I,导致多巴胺神经元神经退行性改变。

- 25 取 50 只 4 月龄 C57B6 雄性小鼠,随机分为空白组 (Blank) 10 只,神经损伤后安慰剂组 (PD-ctrl) 20 只,神经损伤后 PAO 治疗组 (PD-PAO) 20 只。MPTP 首先用 DMSO 溶解,然后用生理盐水稀释,丙磺舒用 5% 的碳酸氢钠水溶液溶解。首先,给安慰剂组和治疗组的每只小鼠每天腹腔注射一次 MPTP (供应商: CSN Pharm), 25 mg/kg, 连续 5 天,停药两天,然后又按第一周的方法连续 5 天注射。第三周,每只小鼠每天腹腔先注射一次丙磺舒 (250 mg/kg), 随后注射一次 MPTP

(25 mg/kg), 连续 5 天。空白组前三周仅注射相应的溶剂。第四周, 空白组和安慰剂组每天灌胃 0.1% 的 DMSO 溶液, 而治疗组每天灌胃 PAO, 0.3 mg/kg (PAO 溶于 0.1% DMSO 水溶液), 连续 7 天。

5 第四周的第 6 天所有动物被禁食, 但供水。第 7 天进行糖水偏好实验。结果如图 8A 显示, 空白组小鼠对糖水有明显偏好, 安慰组的小鼠对糖水的偏好有明显减低 (One way ANOVA, $p < 0.05$), 而治疗组对糖水的仍然偏好, 与空白组无明显差异。糖水偏好实验后, 各组小鼠停止注射和灌胃。第六周的第 6 天所有动物被禁食, 但供水; 第 7 天又进行糖水偏好实验, 结果如图 8B 所示, 三组动物的对糖水都有明显偏好, 之间无明显差异。

10 上述实验期间, 安慰剂组共死亡 12 只小鼠, 治疗组死亡 6 只小鼠, 空白组无死亡。

3.3 PAO 及其衍生物抑制野生型小鼠的焦虑行为

取 42 只 3 月龄 ICR 雄性小鼠随机分为 2 组, 第一组 22 只为安慰剂组(vehicle), 每日灌胃安慰剂 (0.1% DMSO 水溶液), 第二组为 PAO 处理组, 每日灌胃 PAO 的 0.1% DMSO 水溶液, 剂量是 0.3 mg/kg 体重, 连续 12 天。第 12 天进行新奇抑制摄食实验 (NSF), NSF 实验前 24 小时, 所有动物被禁止摄食, 但供水。结果如图 9A 所示, 安慰剂组小鼠在进入新环境中后, 平均需要 201.6 ± 21.5 秒 ($n=22$) 开始进食, 而 PAO 处理组平均只需要 159.6 ± 20.3 秒 ($n=20$), 比安慰剂组明显缩短 (T Test, $p < 0.05$)。所以, PAO 能抑制野生型小鼠在新环境中的焦虑行为。

20 另取 47 只 3 月龄的 ICR 小鼠随机分为 3 组, 第一组 16 只为安慰剂组(vehicle), 每日灌胃安慰剂 (0.1% DMSO 水溶液), 第二组 15 只和第三组 16 只, 分别为 PI05 和 PI06 处理组, 每日分别灌胃 PI05 和 PI06 的 0.1% DMSO 水溶液, 剂量是 0.3 mg/kg 体重, 连续 7 天。第 7 天进行新奇抑制摄食实验 (NSF), NSF 实验前 24 小时, 所有动物被禁止摄食, 但供水。结果如图 9B 所示, 安慰剂组小鼠在进入新环境中后, 平均需要 216.6 ± 21.2 秒 ($n=16$) 开始进食, 而 PI05 和 PI06 处理组分别平均需要 194.6 ± 21.7 秒 ($n=15$) 和 154.2 ± 21.2 秒 ($n=16$), PI06 处理组进食的潜伏期比安慰剂组明显缩短 (one way ANOVA, $p < 0.05$), PI05 处理组

有缩短的趋势。

所以, PAO 及其衍生物能抑制野生型小鼠在新环境中的焦虑行为。

实施例 4. 抑制 PI4KIII α 、TTC7、Hyccin 和 RBO 对 PI4KIII α 复合体表达的影响

5 实验材料和方法

果蝇品系和遗传学

用标准的果蝇培养基, 12/12 小时的光照 / 黑暗循环、25°C 环境培养羽化后的果蝇成虫。

使用的果蝇品系有: *rbo*²/Cyo-GFP (*rbo*² 是 *rbo* 基因敲除突变, Cyo-GFP 是表达绿色荧光蛋白 GFP 的平衡染色体, *rbo*^{+/+})、*rbo*²/*rbo*²; *rbo-egfp*/*rbo-egfp* (*rbo*² 突变的纯合和 *rbo-egfp* 转基因纯合的突变体, 该果蝇品系简称为 *rbo-gfp*) (*rbo-egfp* 转基因是由包含完整 *rbo* 的基因组 DNA 片段构建而成的重组 DNA, 在 *rbo* 的终止密码子前插入了编码绿色荧光蛋白 (GFP) 的 DNA 序列, 因此, *rbo-egfp* 转基因表达 RBO-GFP 融合蛋白)、*P[lacW]l(2)k14710*^{k15603}/Cyo-GFP (由转座子 *P[lacW]* 插入形成的 *ttc7* 基因突变体, 也称为 *ttc7*^{+/+})、104577/Cyo-GFP (104577 是 *hyccin* 基因及其附近的 DNA 片段缺失后形成的染色体突变, 也称为 *hyccin*^{+/+})、*pi4k*^{GS27/+}、*pi4k*^{FY24/+}、*pi4k*^{FQ88/+}、*pi4k*^{GJ86/+} (分别是编码 PI4KIII α 蛋白的基因的 4 种无义突变的杂合子, 都有表达绿色荧光蛋白的平衡染色体 FM7, Gr-GFP, 都是美国普林斯顿大学的 Schupbach 实验室构建的)。

20 蛋白质免疫印迹和免疫共沉淀实验

分别收集各基因型 500 个 (用于免疫共沉淀) 和 100 个 (用于蛋白质免疫印迹) 果蝇头部并统一处理。果蝇头置于冰上, 用预冷的含有 1%NP40 和蛋白酶抑制剂的 Tris 缓冲液裂解, 制成匀浆。免疫共沉淀实验根据 Pierce[®] Co-Immunoprecipitation (Co-IP) kit (Thermo Scientific) 试剂盒说明书进行操作。免疫共沉淀的实验产物使用 SDS-PAGE 胶进行分离, 并用考马斯亮蓝进行染色。

使用的一抗包括：抗 GFP (Casico)，抗 RBO 和 PI4KIII α (Zhang 等人, J Neurosci., 2017, 第 4928-4941 页)，抗 Hyccin (由 Abmart (Shanghai) 使用 FAM126 片段 RLPPIKNPRQ 作为抗原生产)，抗 neuroglin (DSHB, clone BP104)，抗 β -actin 和抗 Tubulin (Cell Signaling)。

5 从组织裂解液中分离 PM 片段

果蝇脑组织置于冰上，用预冷的含有 1%NP40 和蛋白酶抑制剂的 Tris 缓冲液处理，然后收集裂解液在 4°C 下 15000 g 离心 1 小时，上清转移至新的 EP 管中，并使用与上述同样的 Tris 裂解液重悬沉淀，上清和沉淀重悬物均进行 SDS-PAGE 胶和蛋白质免疫印迹分析。

10 统计分析

使用软件 GraphPad Prism 进行数据分析。所有数据均以平均值 $\pm$ SEM 表示，且 $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 和 *** $p < 0.001$) 时有统计学意义。

结果

15 PI4KIII α 、TTC7、Hyccin 和 RBO 在细胞膜上相互作用形成蛋白复合体—PI4KIII α 复合体，都是 PI4KIII α 复合体不可或缺的部分。

SDS-PAGE 胶的考马斯亮蓝染色显示 (图 10A)：在表达 RBO-GFP 融合蛋白 (*rbo-gfp*) 的果蝇头匀浆中，抗 GFP 抗体能免疫共沉淀出 PI4KIII α 、TTC7、Hyccin 和 RBO-GFP 蛋白，而在不表达 RBO-GFP 融合蛋白的果蝇头匀浆中则不能。蛋白质谱分析能从与 RBO-GFP 融合蛋白共免疫沉淀的蛋白中鉴定出
20 PI4KIII α 、TTC7 和 Hyccin 蛋白 (表 10)。与此一致的是，蛋白质谱分析抗 RBO 抗体能从野生型的果蝇头匀浆中免疫共沉淀出 PI4KIII α 、TTC7、Hyccin 和 RBO 蛋白 (表 11)；且 SDS-PAGE 胶的蛋白印迹能证实 PI4KIII α 、Hyccin 和 RBO 蛋白相互免疫共沉淀 (图 10B)。

SDS-PAGE 胶的蛋白印迹显示 (图 10C)：RBO 蛋白只表达在细胞膜上，而
25 Hyccin 蛋白在细胞膜和细胞浆中都有，但主要定位在细胞浆中；分别敲除 *hyccin*、

rbo 和 *tte7* 基因都能导致 RBO 缺失，分别敲除 *rbo* 和 *tte7* 基因也导致细胞膜的 Hyccin 蛋白缺失或显著减少，但不明显改变致细胞浆的 Hyccin 蛋白表达量。这表明细胞膜上的 PI4KIII α 、TTC7、Hyccin 和 RBO 蛋白的表达相互依赖，都是 PI4KIII α 复合体不可或缺的部分。但是，细胞浆中 Hyccin 表达不依赖 TTC7 和 RBO。

SDS-PAGE 胶的蛋白印迹显示（图 10D）：敲除一个拷贝的 *hyccin* 能显著减少 Hyccin 的表达总量，但敲除一个拷贝的 *rbo* 基本不改变 Hyccin 的表达总量。

SDS-PAGE 胶的蛋白印迹显示（图 10E）：敲除一个拷贝的 *PI4KIII α* 也能显著减少 RBO 的表达量，进一步表明 PI4KIII α 复合体各组分的相互依赖性。

10 表 10. *rbo-gfp* 与 *wt* 果蝇均浆中与 GFP 抗体共免疫沉淀的特异性 RBO-GFP 相互作用蛋白的质谱分析

	PepCount	CoverPercent	MW(kd)
RBO-GFP	98	52.3%	122
PI4KIII	186	35.5%	244
TTC7	77	43.1%	95
Hyccin	33	32.7%	70

表 11. 野生型果蝇均浆中与 RBO 抗体（而非对照蛋白）共免疫沉淀的 RBO 相互作用蛋白的质谱分析

	PepCount	CoverPercent	MW(kd)
RBO	93	44.8%	95
PI4KA	215	37.8%	244
TTC7	55	30.6%	95
Hyccin	20	25.4%	70