

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.001816

两种孤独症谱系障碍大鼠模型的构建及比较

雷雨溪,何慕兰,赖茜,杨亭,陈洁,李廷玉

(重庆医科大学附属儿童医院儿童营养研究室、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、
儿童发育重大疾病国际科技合作基地,重庆 400014)

【摘要】目的:构建并比较丙戊酸钠(valproic acid, VPA)或脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的孤独症大鼠模型,为孤独症研究中动物模型的选择提供科学依据。**方法:**采用孕中期腹腔注射 VPA(G12.5)及 LPS(G9.5)的方法分别构建 VPA 或 LPS 诱导的子代孤独症大鼠模型($n=28$);监测子代生长发育情况;行为学检测子代大鼠孤独症样行为;ELISA 检测 LPS 模型组子代大鼠血浆炎症细胞因子的表达;Western blot 检测 VPA 模型组子代大鼠前额叶皮质 PTEN、p-AKT 及 p-mTOR 蛋白表达水平;高效液相色谱法检测 VPA 模型组子代大鼠前额叶皮质中 5-HT 的浓度。**结果:**2 种动物模型均表现出一定程度的发育迟缓,并出现孤独症相关的行为改变。其中,VPA 模型组孕鼠生育率有所降低,但无统计学差异($\chi^2=3.352, P=0.067$),仔鼠死亡率明显升高($\chi^2=5.561, P=0.018$),仔鼠尾部畸形率高达 87.8%,明显高于对照组($\chi^2=79.109, P=0.000$)。LPS 处理组子代大鼠血浆白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 、干扰素(interferon, IFN)- γ 及肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor, TNF)- α 浓度均明显升高($t=2.108, P=0.049; t=2.312, P=0.033; t=2.809, P=0.016; t=2.110, P=0.049$)。VPA 处理组子代大鼠前额叶皮质 PTEN 蛋白表达水平下调($t=13.320, P=0.006$),p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平增加($t=4.633, P=0.044; t=7.984, P=0.015$),5-HT 浓度较未处理组明显降低($t=2.145, P=0.049$)。**结论:**2 种不同处理大鼠模型均可诱导孤独症样行为,但诱导机制可能存在差异,在科学研究中需要根据研究目的作出适当选择。

【关键词】孤独症样行为;大鼠模型;脂多糖;丙戊酸钠**【中图分类号】**R749.94**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-11-13

Establishment and comparison of two different rat models of autism

Lei Yuxi, He Mulan, Lai Xi, Yang Ting, Chen Jie, Li Tingyu

(Children's Nutrition Research Center, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; China International Science and Technology Cooperation Base for Child Development and Critical Disorders)

【Abstract】Objective: To establish and compare valproic acid(VPA) or lipopolysaccharide(LPS) induced rat model of autism, so as to provide a scientific basis for the selection of animal models in autism research. **Methods:** Rats were injected intraperitoneally with 500 mg/kg VPA or 100 μ g/kg LPS on the gestational day 12.5 or day 9.5 to construct autism model in offspring rat($n=28$). The pups' physical development was continuously monitored, and social interaction, communication ability, stereotype and repetitive patterns of behaviors were detected in the pups. ELISA kits were used to determine the concentrations of plasma inflammatory cytokines(IL-6, IL-1 β , IFN- γ and TNF- α) in the pups with or without LPS treatment. Levels of PTEN, p-Akt and p-mTOR protein expressions in the prefrontal cortex of the pups in the present or absent of VPA treatment were confirmed by Western blot. Concentrations of 5-HT in the prefrontal cortex with or without VPA challenge were detected with high performance liquid chromatography(HPLC). **Results:** Both of the two autism models displayed a developmental delay and autism related behavioral abnormality. Levels of IL-6, IL-1 β , IFN- γ and TNF- α were increased significantly in the rat offspring following LPS treatment($t=2.108, P=0.049; t=2.312, P=0.033; t=2.809, P=0.016; t=2.110, P=0.049$). The VPA challenge significantly decreased the level of PTEN protein expression($t=13.320, P=0.006$), and increased the expression levels of p-AKT and p-mTOR in the pups' prefrontal cortex after the VPA treatment($t=4.633, P=0.044; t=7.984, P=0.015$). The concentration of 5-HT in the prefrontal cortex was also statistically reduced by VPA treatment($t=2.145, P=0.049$). **Conclusion:** The both rat models with LPS or VPA treatment lead to autism-like behaviors, whereas there are different induce molecular mechanisms. Therefore, we should make reasonable choice on the basis of research objectives in scientific study.

【Key words】autism; rat model; lipopolysaccharide; valproic acid

作者介绍:雷雨溪, Email:375730107@qq.com,

研究方向:儿童营养与神经发育障碍。

通信作者:李廷玉, Email:tyli@vip.sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81471518、81771223、81770526)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180704.1128.028.html>
(2018-07-05)

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)是一种广泛的神经发育障碍性疾病,其核心症状为社会交往障碍、语言交流障碍及重复刻板行为。目前认为遗传及环境因素双重作用可致 ASD 发病,但其具体分子机制仍不十分清楚,防治方法十分受限,对 ASD 儿童家庭造成严重的经济负担^[1],因此对于孤独症发病机制及治疗方法的研究显得尤为迫切。动物模型作为一种研究手段,被广泛应用于孤独症的研究。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的孤独症模型和丙戊酸钠(valproic acid, VPA)诱导的孤独症模型是目前运用较多的 2 种动物模型。

VPA 诱导的孤独症模型目前在国内外研究中应用较为广泛。作为一种广谱抗癫痫药, VPA 的孕初期暴露大大提高子代孤独症的患病风险。目前 VPA 导致孤独症的致病机制仍不十分清楚。多项研究表明, PI3K/Akt 信号通路参与 VPA 的孤独症诱导^[2-3]。PI3K/Akt 可通过调控雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)活性,在突触发生、突触可塑性及神经功能方面起重要作用^[4]。同时, PI3K/AKT/mTOR 信号通路可以与 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)相互调控^[5-6],而 5-HT 升高是被确认的第一个孤独症生物学标志物^[7-8]。有研究表明,孤独症儿童前额叶皮质及丘脑 5-HT 合成减少,加重孤独症相关症状的表现^[9]。

与 VPA 模型不同, LPS 模型模拟孕期感染引起子代孤独症。目前临床孕期各种感染的发生率较高,因而 LPS 诱导的 ASD 模型可能具有更大的研究意义和临床价值。LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要成分,大鼠孕期注射大剂量 LPS 可以激活母体免疫反应,导致母体促炎因子大量分泌。升高的促炎因子可以通过胎盘屏障进入胎血循环,进而引起胎儿的脑发育异常,诱导子代发生孤独症^[10]。而与经典 VPA 诱导的 ASD 模型相比, LPS 诱导的 ASD 模型在造模效度等各方面有哪些优缺点目前并没有系统的认识。因此,本研究拟通过对这 2 种动物模型行为学及相关生物学标志物的检测,初步探讨 2 种 ASD 动物模型的优缺点及各自可能的致病机制,为孤独症疾病研究中动物模型的选择提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 SD 大鼠购

于重庆医科大学实验动物中心,在重庆医科大学附属儿童医院动物中心饲养[SCXK(Yu)2012-0015]。所有动物实验流程均符合本单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.2 实验主要试剂

丙戊酸钠、脂多糖(Sigma);RIPA 裂解液及蛋白定量试剂盒(北京 BioTeke 生物技术公司);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(Bio-Rad);兔抗 PTEN 单克隆抗体、兔抗 p-AKT 单克隆抗体、兔抗 p-mTOR 单克隆抗体(Cell Signaling Technology),小鼠抗 β -actin 单克隆抗体(Santa),HRP-标记的山羊抗兔 IgG、HRP-标记的山羊抗小鼠 IgG(ATGene);白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 、干扰素(interferon, IFN)- γ 及肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor, TNF)- α 酶联免疫吸附试剂盒(四正栢)。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组及模型构建 雌雄大鼠 1:1 合笼过夜,第 2 天早晨检查到阴栓的雌鼠记为孕第 1 天(G_1),并单独饲养。将孕鼠随机分成 4 组:VPA(+)组($n=15$)在 $G_{12.5}$ 腹腔注射 500 mg/kg VPA(250 g/L),VPA(-)组($n=7$)在 $G_{12.5}$ 腹腔注射等剂量的 PBS;LPS(+)组($n=6$)在 $G_{9.5}$ 腹腔注射 100 μ g/kg LPS(50 μ g/mL),LPS(-)组($n=6$)在 $G_{9.5}$ 腹腔注射等剂量 PBS。所产子代大鼠即为孤独症模型大鼠及对照组大鼠($n=28$),各组仔鼠在出生后(postnatal day, PND)21~35 d 时进行行为学实验。

1.3.2 生育率及发育指标监测 记录孕鼠生育情况、仔鼠死亡率、仔鼠尾部畸形率;PND_{2,7,14,21,35},测量各组仔鼠体质量和尾长;PND₁₄₋₁₇,睁眼情况评分,评分标准:睁两只眼 2 分,睁 1 只眼 1 分,未睁眼 0 分。

1.3.3 三箱社交实验 使用自制透明塑料三箱,提前 1 d 将被试大鼠从中间箱放入适应 5 min,让其自由出入。第 2 天正式测试,左侧箱放入 1 只雄性相同周龄大鼠,右侧箱放入 1 个玩具,将被试大鼠再次放入中间箱,测试 5 min,Any-maze 软件及配套摄像系统自动记录其运动轨迹及在三箱的时间。

1.3.4 旷场实验 使用自制正方形黑色塑料箱(50 cm $\times$ 50 cm $\times$ 45 cm),人为将检测区域划分为 9 个相等正方形区域(1 个中间区,8 个周围区),将被试大鼠从中间区放入,测试 10 min,Any-maze 软件及配套摄像系统自动录像并记录其运动轨迹、跨线数及其在中间区活动的时间。观看录像记录每只大鼠自梳理的时间。

1.3.5 水迷宫实验 实验采用 MWM 水迷宫系统(SLY-WMS 2.0),包括一个圆形水槽(直径 130 cm,深 45 cm)和计算机跟踪系统,水槽四周用遮光布包围,内置光源,减少人为移动所产生的错误标记。在池壁四周分别贴上不同形状的标记物以帮助实验动物记住平台所在的位置。电脑软件自动记录实验大鼠从放入水中到找到平台所用的时间及在水中游行的距离。实验共 7 d,分为 3 个阶段的测试和训练。第 1 天,适应:实验大鼠从第一象限放入水中,1 min 后取出大鼠。第 2~6

天,定位航行训练:将平台固定在第三象限正中位置,低于水面 1 cm,向水中加入墨汁至肉眼不能看清水下平台,实验大鼠被从 4 个不同的初始点放入水中:即 N(north),E(east),S(south),W(west),软件记录实验大鼠在迷宫内游动轨迹,时间设定为 1 min。大鼠在 1 min 内找到平台,软件自动停止记录,计为逃避潜伏期时间,若超出 1 min 仍未找到平台,则将实验大鼠引导至平台上增强记忆 20 s。第 7 天为平台探索测试:撤掉平台软件记录实验大鼠在 1 min 内穿越原平台所在位置的次数。在测试过程中,计算机跟踪系统被应用于自动视频和数据采集。

1.3.6 生物标本的采集及处理 各组大鼠 6 周龄时股动脉取血,血标本以 1 000 g 离心 15 min,取上清,冻存于-80 ℃。冰上断头取脑前额叶皮质,冻存于-80 ℃备用。酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血浆 IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 及 TNF- α 水平;脑组织标本送第三军医大学中心实验室,高效液相色谱法检测脑前额叶皮质中 5-HT 的含量。

1.3.7 Western blot 检测 PTEN,p-Akt 及 p-mTOR 蛋白的表达 含有 1% PMSF 的 RIPA 裂解液提取脑组织前额叶皮质总蛋白,BCA 试剂盒行蛋白定量。8% SDS-PAGE 凝胶电泳进行蛋白分离,100 V 恒压湿转法将分离蛋白转印至 PVDF 膜上。5% BSA 封闭 1 h 后,分别加入一抗孵育(PTEN,1:10 000;p-AKT,p-mTOR, β -actin,1:1 000),4 ℃过夜。PBST 漂洗 3 次后加入相应二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,ECL 发光显影。

1.4 统计学分析

所有统计运算利用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 组间均值比较采用 *t* 检验;率的比较采用卡方检验;各组仔鼠体质量、尾长、睁眼时间及水迷宫潜伏期的评价采用重复测量资料的方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 孕鼠流产率、仔鼠死亡率及尾部畸形率

VPA(+)组的孕鼠生育率仅为 33.3%,低于 VPA(-)组的 85.7%,但无统计学差异($\chi^2=3.352,P=0.067$),见表 1;同时 VPA(+)组仔鼠死亡率(17.07%)也明显高于 VPA(-)组(1.75%)($\chi^2=5.561,P=0.018$);仅 VPA(+)组仔鼠尾部出现畸形,且畸形率高达 87.8%,明显高于 VPA(-)组($\chi^2=79.109,P=0.000$)(图 1)。而 LPS(-)及 LPS(+)2 组孕鼠生育率均为 100%,无流产发生;2 组仔鼠死亡率分别是 5.26%和 1.75%,无统计学差异($\chi^2=0.259,P=0.611$)(表 2)。

2.2 体质量及尾长发育

从出生开始每天监测各组仔鼠的体质量及尾长,结果如图 2A 所示,VPA(+)组仔鼠体质量明显低于 VPA(-)组($F=80.228,P=0.000$),各时间点差异有统计学意义($F=2\,972.047,P=0.000$),且组别与时间点间有交互作用($F=22.858,P=0.000$);同时,VPA(+)组仔鼠的尾长也明显短于

VPA(-)组($F=89.083,P=0.000$,图 2B),各时间点差异有统计学意义($F=3251.449,P=0.000$),组别与时间点间有交互作用($F=42.911,P=0.000$),提示 VPA 可明显导致仔鼠尾巴的畸形。然而,LPS(+)组仔鼠体质量却高于 LPS(-)组(图 2C),组间差异有统计学意义($F=4.673,P=0.036$),各时间点差异有统计学意义($F=1\,659.917,P=0.000$),组别与时间点间有交互作用($F=3.480,P=0.005$);LPS(+)组仔鼠的尾长明显长于 LPS(-)组(图 2D),组间差异有统计学意义($F=35.738,P=0.000$),各时间点差异有统计学意义($F=2\,275.094,P=0.000$),且组别与时间点间有交互作用($F=24.151,P=0.000$)。

表 1 VPA 处理组及其对照组孕鼠生育率、仔鼠死亡率及尾部畸形率比较(n,%)

评价指标	VPA(-)	VPA(+)	χ^2 值	P 值
生育率	85.71(6/7)	33.33(5/15)	3.352	0.067
仔鼠死亡率	1.75(1/57)	17.07(7/41)	5.561	0.018
尾部畸形率	0.00(0/57)	87.80(36/41)	79.109	0.000

表 2 LPS 处理组及其对照组孕鼠生育率、仔鼠死亡率及尾部畸形率比较(n,%)

评价指标	LPS(-)	LPS(+)	χ^2 值	P 值
生育率	100.00(6/6)	100.00(6/6)	-	-
仔鼠死亡率	5.26(3/57)	1.75(1/57)	0.259	0.611
尾部畸形率	0.00(0/57)	0.00(0/57)	-	-

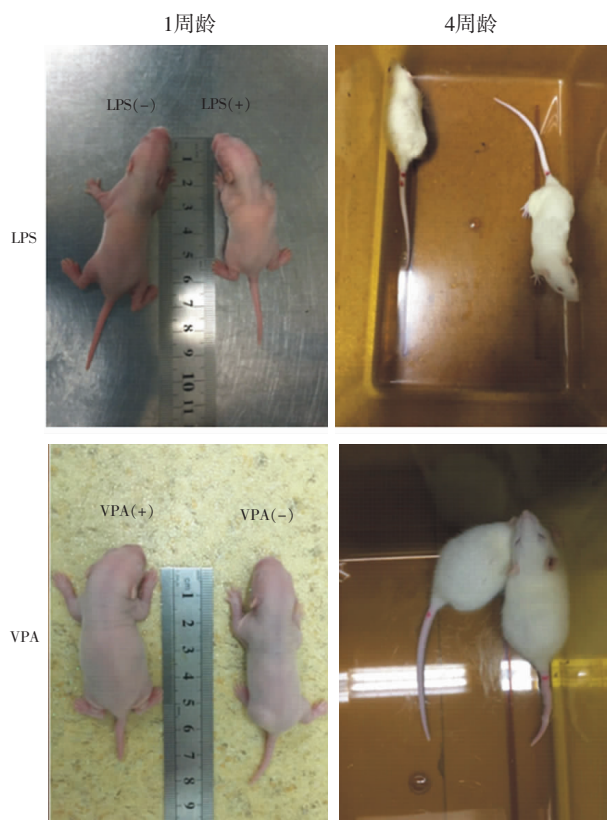
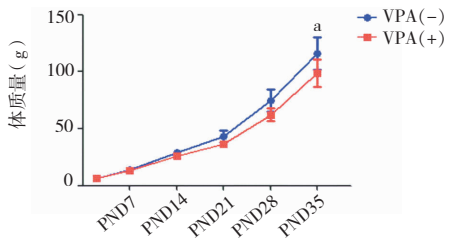
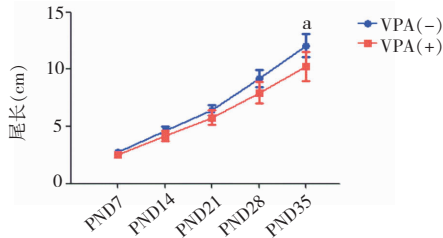


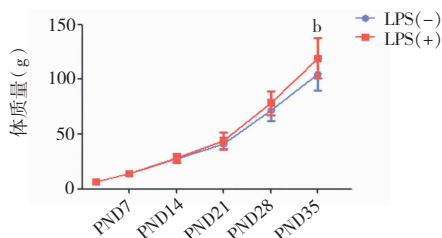
图 1 各组仔鼠不同时期尾部畸形情况



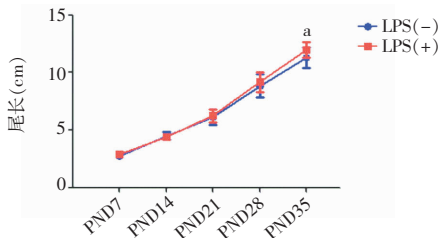
A. VPA(-)组及 VPA(+)组仔鼠体质量变化



B. VPA(-)组及 VPA(+)组仔鼠尾长变化



C. LPS(-)组及 LPS(+)组仔鼠体质量变化



D. LPS(-)组及 LPS(+)组仔鼠尾长变化

与各自对照组比, a: $P=0.000$; b: $P<0.05$

图 2 各组大鼠体质量及尾长的变化趋势

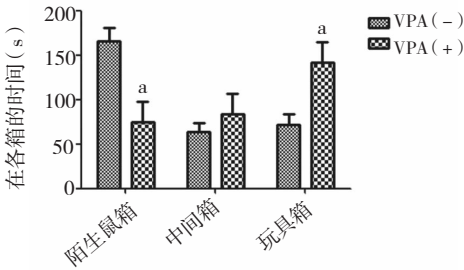
2.3 睁眼时间

仔鼠生后的睁眼时间也是发育的一个指标,分别对 4 组仔鼠生后 14~17 d 睁开眼睛的情况进行了统计分析。VPA (+)组睁眼时间较晚于 VPA(-)组,但无统计学意义($F=3.369, P=0.072$),各时间点间差异有统计学意义($F=243.003, P=0.000$),组别与时间点间有交互作用($F=5.061, P=0.029$);

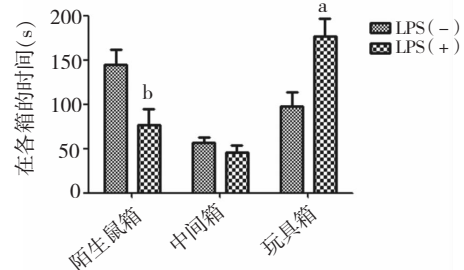
而 LPS(+)组睁眼时间明显晚于 LPS(-)组,组间差异具有统计学意义($F=9.366, P=0.003$),各时间点差异有统计学意义($F=186.033, P=0.000$),组别与时间点间有交互作用($F=6.657, P=0.013$)。提示孕期 LPS 处理可导致仔鼠睁眼时间的滞后(表 3)。

2.4 三箱实验

三箱实验是检测大鼠社会交往能力的一种方法。如图 3A 所示, VPA(+)组仔鼠在陌生鼠箱的时间明显少于 VPA(-)组[(74.975 ± 22.486) s vs. (165.373 ± 15.188) s, $t=3.442, P=0.002$],而在玩具箱的时间却明显多于 VPA(-)组[(141.442 ± 22.890) s vs. (71.320 ± 11.966) s, $t=2.877, P<0.008$],2 组仔鼠处于中间箱的时间无统计学差异[(83.617 ± 22.693) s vs. (63.307 ± 10.316) s, $t=0.873, P=0.391$]。同样, LPS(+)组仔鼠在陌生鼠箱的时间也明显低于 LPS(-)组[(77.050 ± 17.886) s vs. (145.120 ± 16.718) s, $t=2.769, P=0.010$],在玩具箱的时间明显高于 LPS(-)组[(176.900 ± 19.444) s vs. (97.807 ± 15.550) s, $t=3.221, P=0.004$],而在中间箱的时间与 LPS(-)组相比无明显差异[(46.033 ± 7.678) s vs. (57.053 ± 5.998) s, $t=1.150, P=0.261$](图 3B)。上述数据表明,无论是 VPA 还是 LPS 孕期处理均可导致仔鼠社交能力及社交欲望降低。



A. VPA(-)组及 VPA(+)组仔鼠三箱实验



B. LPS(-)组及 LPS(+)组仔鼠三箱实验

与各自对照组比, a: $P<0.01$; b: $P<0.05$

图 3 各组大鼠在三箱实验中所用的时间

表 3 各组仔鼠睁眼时间比较

组别	PND ₁₄	PND ₁₅	PND ₁₆	PND ₁₇	F 值	P 值
VPA(-)	0.069 ± 0.242	1.034 ± 0.906	1.966 ± 0.186	2.000 ± 0.000	3.369	0.072
VPA(+)	0.000 ± 0.000	0.577 ± 0.902	2.000 ± 0.000	2.000 ± 0.000		
LPS(-)	0.179 ± 0.476	1.429 ± 0.836	1.893 ± 0.416	2.000 ± 0.000	9.366	0.003
LPS(+)	0.033 ± 0.183	0.633 ± 0.890	1.833 ± 0.531	1.967 ± 0.831		

2.5 旷场实验

旷场实验是评价实验动物在新异环境中自主行为、探究行为与紧张度的一种方法。检测结果如图 4 所示,无论是 VPA(+)组还是 LPS(+)组的仔鼠在旷场实验中跨线数均明显低于各自的未处理组[(39.330 ± 6.850)次 vs. (61.470 ± 8.258)次, $t=2.073$, $P=0.046$, 图 4A; (80.020 ± 7.763)次 vs. (105.600 ± 9.154)次, $t=2.134$, $P=0.036$, 图 4D];同时 VPA(+)组及 LPS(+)组仔鼠自梳理时间也均明显高于其各自对照组[(50.530 ± 7.823) s vs. (17.150 ± 4.115) s, $t=3.339$, $P=0.002$, 图 4B; (50.820 ± 4.871) s vs. (31.100 ± 5.307) s, $t=2.718$, $P=0.009$, 图 4E];VPA(+)组在中间区的时间明显低于 VPA(-)组[(2.009 ± 0.526) s vs. (5.818 ± 1.216) s, $t=2.375$, $P=0.020$, 图 4C],但 LPS(+)组仔鼠在中间区的时间与 LPS(-)组相比无明显差异[(5.290 ± 0.844) s vs. (4.852 ± 0.820) s, $t=0.368$, $P=0.713$, 图 4F]。表明 VPA 或 LPS 处理的仔鼠对新事物探索能力降低,而自梳理毛发时间延长。

2.6 水迷宫实验

Morris 水迷宫主要用于测试实验动物对空间位置 and 空间定位的学习记忆能力。检测第 1 天时 VPA(+)组及 LPS(+)组仔鼠的运动距离较其各自对照组无明显差异[(13.131 ± 1.507) m vs. (13.410 ± 0.591) m, $t=0.355$, $P=0.726$, 图 5A; (13.662 ± 5.623) m vs. (12.270 ± 0.507) m, $t=0.918$, $P=0.367$, 图 5D],提示孕期 LPS 及 VPA 处理对仔鼠的运动能力并无影响。在第 2~6 天的定位航行训练中,各组仔鼠的游泳潜伏时间均有不同程度的下降趋势,但 VPA(+)组的潜伏时间自第 3 天开始较 VPA(-)下降趋势减缓,到第 5 天时其较 VPA(-)组明显增加(图 5C),组间差异有统计学意义($F=5.458$, $P=0.028$),各时间点差异有统计学意义($F=9.602$, $P=0.000$),组别与时间点间无交互作用($F=1.950$, $P=0.108$);LPS(+)组的

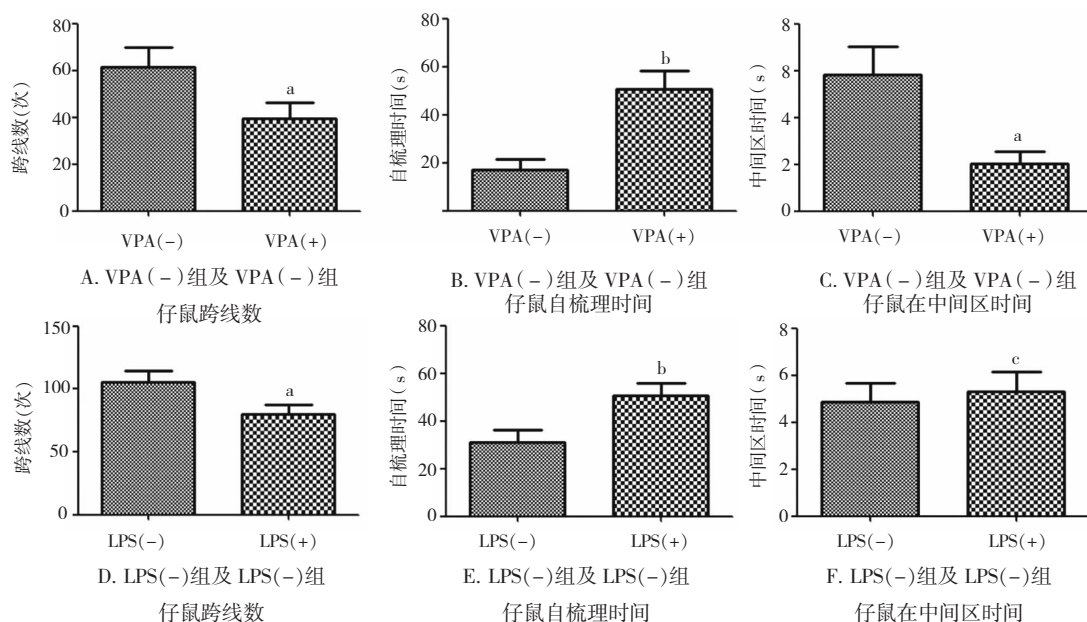
潜伏时间自第 3~5 天均较 LPS(-)组明显增加(图 5F),组间差异有统计学意义($F=11.598$, $P=0.003$),各时间点差异有统计学意义($F=12.633$, $P=0.002$),组别与时间点间无交互作用($F=2.411$, $P=0.134$)。第 7 天的平台探索测试,VPA(+)及 LPS(+)两组仔鼠穿越原平台所在位置的次数均较各自的对照组明显减少(1.080 ± 0.199 次, 1.667 ± 0.187 次, $t=2.102$, $P=0.040$, 图 5B; 0.643 ± 0.138 次, 1.211 ± 0.249 次, $t=2.148$, $P=0.037$, 图 5E)。提示无论是 VPA 还是 LPS 孕期处理均可降低仔鼠的空间学习记忆功能。

2.7 仔鼠血浆 IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 及 TNF- α 浓度变化

ELISA 检测结果如图 6 所示。LPS(+)组仔鼠血浆中 IL-6(图 6A)、IL-1 β (图 6B)、IFN- γ (图 6C)及 TNF- α (图 6D)的浓度[分别为(927.216 ± 175.827)、(27.173 ± 7.035)、(27.814 ± 11.101)、(33.027 ± 12.712) pg/mL]均高于其对照组[分别为(752.420 ± 61.532)、(21.053 ± 1.435)、(15.152 ± 1.646)、(20.434 ± 4.410) pg/mL],差异具有统计学意义($t=2.108$, $P=0.049$; $t=2.312$, $P=0.033$; $t=2.809$, $P=0.016$; $t=2.110$, $P=0.049$)。

2.8 仔鼠前额叶皮质 PTEN、p-Akt 及 p-mTOR 蛋白表达水平及 5-HT 浓度检测

Western blot 结果显示,VPA(+)组子代大鼠前额叶皮质中 PTEN 蛋白表达水平较 VPA(-)组明显降低[(0.045 ± 0.004) vs. (0.128 ± 0.005), $t=13.320$, $P=0.006$, 图 7B],p-Akt 及 p-mTOR 蛋白表达水平较 VPA(-)组明显升高[(3.281 ± 0.419) vs. (1.336 ± 0.023), $t=4.633$, $P=0.044$, 图 7C];[(0.012 ± 0.003) vs. (0.005 ± 0.002), $t=7.984$, $P=0.015$, 图 7D]。同时,利用高效液相色谱法检测前额叶皮质中的 5-HT 含量发现,VPA(+)组大鼠前额叶皮质中 5-HT 浓度较其对照组明显降低,差异具有统计学意义[(9.824 ± 0.624) nmol/mg vs. (12.034 ± 0.852) nmol/mg, $t=2.145$, $P=0.049$, 图 7E]。



与各自对照组比, a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$; c: $P = 0.713$

图 4 旷场实验检测各组仔鼠跨线数、自梳理时间及处于中间区的时间

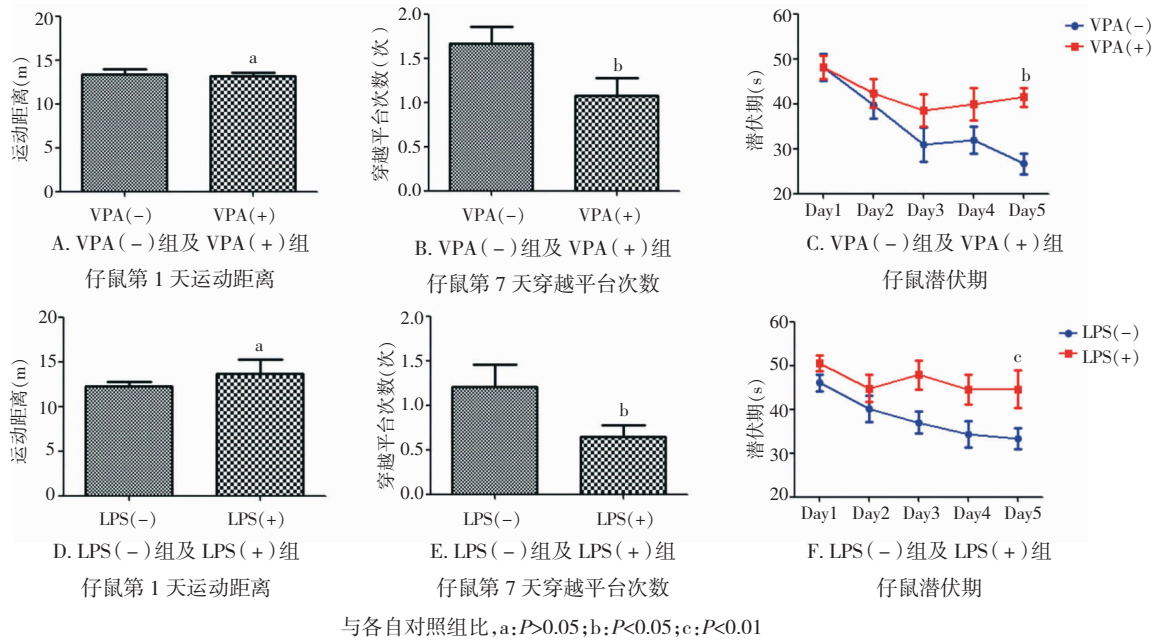


图 5 水迷宫实验测试各组仔鼠的学习记忆能力

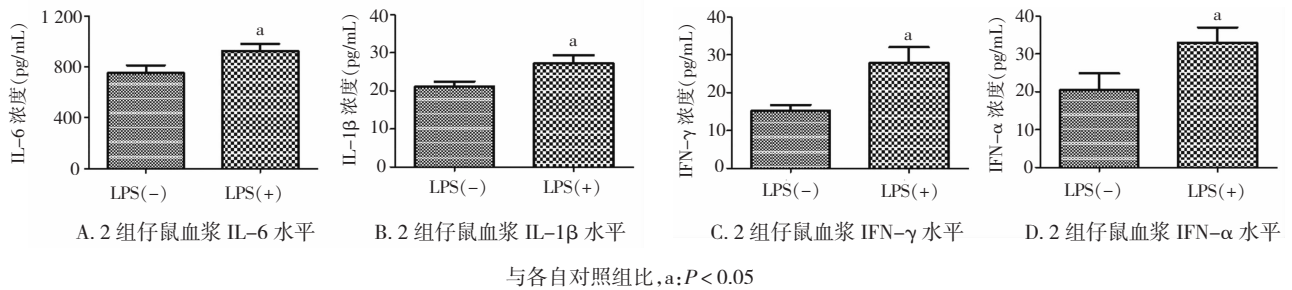
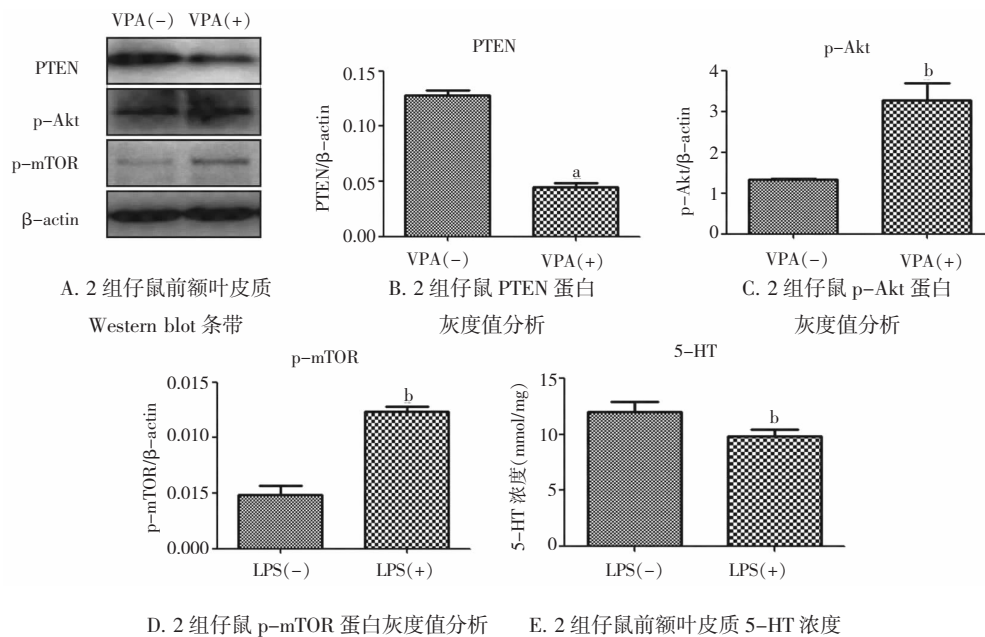
图 6 ELISA 检测 LPS(+) 组及其对照组仔鼠血浆 IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 、及 TNF- α 浓度的变化

图 7 各组仔鼠前额叶皮质 PTEN、p-Akt 及 p-mTOR 蛋白表达水平及 5-HT 含量变化

3 讨论

本研究使用孕期腹腔注射 LPS 或 VPA 的方法构建了子代孤独症大鼠模型,并较为系统地比较了 2 种模型的生长发育情况及行为学表型。结果显示, LPS 处理的孕鼠生育率、仔鼠死亡率、仔鼠尾部畸形率与其对照组相比均无统计学差异,而孕期 VPA 处理会导致孕鼠生育率明显降低、仔鼠死亡率明显升高,且仔鼠出现尾部弯折畸形的比例高达 87.8%,表明孕期高剂量 VPA 暴露严重影响子代的生存率和致畸率,这与其他学者的研究基本一致^[11]。临床研究发现,孕妇使用 VPA 可引起胎儿出现神经管缺陷、先天性颅面部和指(趾)端畸形、唇腭裂、先天性心脏缺陷及低血糖等症状^[12]。由此可见,VPA 导致的胚胎期发育畸形可能是多系统受累的。生长发育监测结果显示,LPS 及 VPA 处理组仔鼠的睁眼时间均晚于其对照组,且 VPA(+)组仔鼠体质量及尾长发育较其对照组明显滞后,提示 2 种模型大鼠都存在一定程度的发育迟缓;但 LPS 处理组仔鼠断乳后的体质量及成年期的尾长超越正常水平。有研究表明,孤独症儿童超重和低体重的发生率均明显高于正常人群^[13-14]。此外,2 组模型大鼠均表现出社会交往、交流障碍,对陌生环境探索欲下降,重复刻板行为及空间学习记忆障碍。提示 LPS 模型和 VPA 模型均成功地复制了孤独症的核心症状。值得注意的是,旷场实验中 LPS 处理组仔鼠在中间区活动的总时间与其对照组无统计学差异,而 VPA 处理组仔鼠的总时间却明显减少,提示 VPA 诱导的 ASD 模型鼠存在明显的焦虑,而 LPS 诱导的焦虑状态不显著。由此说明,不同因素诱导的孤独症模型伴发症状可能存在一定的差异。

多个研究表明,VPA 孤独症模型大鼠脑组织中,PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路活性发生改变,可能参与 ASD 疾病的发生发展^[15]。由于前额叶皮质脑区与认知功能密切相关,本研究检测了 VPA 处理组大鼠前额叶皮质中该信号通路相关蛋白的表达水平,发现 p-AKT 和 p-mTOR 蛋白表达水平明显升高,同时 PTEN 蛋白的表达水平明显降低。PTEN 是一种 PIP3-磷酸酶,PTEN 水平下调可诱导 PI3K/Akt 信号通路激活,从而活化其下游的一系列信号分子,其中包括 mTOR^[16]。此外,Boylan 等^[17]发现,皮质中

mTOR 的过度激活会引起 5-HT 浓度下降。研究证明 5-HT 与睡眠、感觉以及行为相关,5-HT 水平下降可引起感觉障碍和行为问题。研究结果发现,VPA 孕期暴露可明显降低模型大鼠前额叶皮质中 5-HT 浓度。因此推测,VPA 可能下调 PTEN 蛋白表达水平,引起 PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活,进而降低 5-HT 水平,导致孤独症相关症状。

研究表明,LPS 孕期暴露不仅引起母鼠胎盘及羊水中炎性细胞因子(如 IL-6)浓度增加^[18],还可促进胎鼠脑组织^[19]、血清^[20]中炎性细胞因子(如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ)的表达,且这些炎性因子的高水平可持续至成年期^[21],导致仔鼠出现 ASD 表型。目前,免疫失调与神经发育障碍之间的潜在作用机制尚不完全清楚,但有证据指出,母代及其子代的细胞因子水平紊乱与其神经行为发育异常密切相关^[22]。人群研究提示,孤独症儿童血清 IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 及 TNF- α 较正常同龄儿童明显上升,且血清细胞因子的改变与孤独症诊断访谈量表(ADI-R)及孤独症家长评定量表(ABC)的孤独症核心症状及异常行为的严重程度呈正相关;而 IL-1 β 、IL-6 等细胞因子与孤独症患儿的重叠刻板行为相关^[23]。IL-6 参与调节神经元发育、分化及其活性,可对行为产生影响^[24-25]。IL-1 β 和 TNF- α 与少突胶质细胞毒性、轴突生长及海马突触可塑性的稳态相关^[26-27]。Ross 等^[28]的研究证明,IL-1 β 或 IL-6/IL-10 的比值大小与孤独症症状的严重程度具有相关性。IFN- γ 可能通过氧化应激的损伤作用引起 ASD 症状^[29]。实验提示,相较于未处理组,LPS 孕期暴露可明显升高仔鼠血清 IL-6、IL-1 β 、IFN- γ 及 TNF- α 的浓度,与人群研究结果一致。因此推测孕期 LPS 暴露导致子代出现孤独症样症状与其引起子代免疫激活有关。

综上所述,孕期 VPA 或 LPS 处理均可引起子代孤独症样行为,但其机制存在差异。VPA 模型可能是通过下调脑 PTEN 蛋白表达水平,激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路而对 5-HT 产生负性调节,引起孤独症的相关症状。其优点在于它能复制出较多的孤独症伴发症状,但 VPA 的致畸作用造成子代的基因突变又存在一定的不稳定性,因而更适合应用于原发性孤独症或研究孤独症的伴发症状。而 LPS 模型通过诱导子代免疫系统紊乱,影响胎儿脑发育及免疫系统稳态,最终使子代产生孤独症相关症状,它可能更适用于研究母体免疫激活引起的孤独症

或研究孤独症个体的免疫失调状态,更贴近于临床。该模型的优点在于孕期 LPS 处理并不影响孕鼠生育率,仔鼠死亡率较低,造模难度低。2 种孤独症大鼠模型模拟了不同机制导致的孤独症样行为,有其各自的优势和缺点,在科学研究中要根据研究所需作出合理的选择。

参 考 文 献

- [1] Mohiuddin S, Ghaziuddin M. Psychopharmacology of autism spectrum disorders: a selective review[J]. *Autism*, 2013, 17(6): 645–654.
- [2] Enriquez-Barreto L, Morales M. The PI3K signaling pathway as a pharmacological target in Autism related disorders and Schizophrenia[J]. *Mol Cell Ther*, 2016, 4: 2.
- [3] Spinelli L, Black FM, Berg JN, et al. Functionally distinct groups of inherited PTEN mutations in autism and tumour syndromes[J]. *J Med Genet*, 2015, 52(2): 128–134.
- [4] Gipson TT, Johnston MV. Plasticity and mTOR: towards restoration of impaired synaptic plasticity in mTOR-related neurogenetic disorders[J]. *Neural Plast*, 2012, 2012: 486402.
- [5] Qiu Y, Huang X, Huang L, et al. 5-HT(1A) receptor antagonist improves behavior performance of delirium rats through inhibiting PI3K/Akt/mTOR activation-induced NLRP3 activity[J]. *IUBMB Life*, 2016, 68(4): 311–319.
- [6] Zamani A, Qu Z. Serotonin activates angiogenic phosphorylation signaling in human endothelial cells[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(16): 2360–2365.
- [7] Muller CL, Anacker AMJ, Veenstra-VanderWeele J. The serotonin system in autism spectrum disorder: from biomarker to animal models[J]. *Neuroscience*, 2016, 321: 24–41.
- [8] Dölen G. Autism: oxytocin, serotonin, and social reward[J]. *Soc Neurosci*, 2015, 10(5): 450–465.
- [9] Chugani DC, Muzik O, Rothermel R, et al. Altered serotonin synthesis in the dentatohalamocortical pathway in autistic boys[J]. *Ann Neurol*, 1997, 42(4): 666–669.
- [10] Kirsten TB, Lippi LL, Bevilacqua E, et al. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1B levels in adult rat offspring: relevance to autism[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82244.
- [11] 李天苏, 潘娜娜, 杨 李, 等. Sprague-Dawley 大鼠孤独症模型的建立及行为学特点分析[J]. *安徽医学*, 2013, 34(7): 865–868.
- [12] Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus[J]. *Reprod Toxicol*, 2009, 28(1): 1–10.
- [13] Zuckerman KE, Hill AP, Guion K, et al. Overweight and obesity: prevalence and correlates in a large clinical sample of children with autism spectrum disorder[J]. *J Autism Dev Disord*, 2014, 44(7): 1708–1719.
- [14] Broder-Fingert S, Brazauskas K, Lindgren K, et al. Prevalence of overweight and obesity in a large clinical sample of children with autism[J]. *Acad Pediatr*, 2014, 14(4): 408–414.
- [15] Qin L, Dai X, Yin Y. Valproic acid exposure sequentially activates Wnt and mTOR pathways in rats[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2016, 75: 27–35.
- [16] Grider MH, Park D, Spencer DM, et al. Lipid raft-targeted Akt promotes axonal branching and growth cone expansion via mTOR and Rac1, respectively[J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(14): 3033–3042.
- [17] Boylan CB, Blue ME, Hohmann CF. Modeling early cortical serotonergic deficits in autism[J]. *Behav Brain Res*, 2007, 176(1): 94–108.
- [18] Jonakait GM. The effects of maternal inflammation on neuronal development: possible mechanisms[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2007, 25(7): 415–425.
- [19] Golan HM, Lev V, Hallak M, et al. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy[J]. *Neuropharmacology*, 2005, 48(6): 903–917.
- [20] Ricci S, Businaro R, Ippoliti F, et al. Altered cytokine and BDNF levels in autism spectrum disorder[J]. *Neurotox Res*, 2013, 24(4): 491–501.
- [21] Zerbo O, Leong A, Barcellos L, et al. Immune mediated conditions in autism spectrum disorders[J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 46: 232–236.
- [22] Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS development[J]. *Neuron*, 2009, 64(1): 61–78.
- [23] Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, et al. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome[J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(1): 40–45.
- [24] Jüttler E, Tarabin V, Schwaninger M. Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity[J]. *Neuroscientist*, 2002, 8(3): 268–275.
- [25] Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, et al. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(1): 297–302.
- [26] Barker V, Middleton G, Davey F, et al. TNF α contributes to the death of NGF-dependent neurons during development[J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4(12): 1194–1198.
- [27] Cacci E, Ajmone-Cat MA, Anelli T, et al. In vitro neuronal and glial differentiation from embryonic or adult neural precursor cells are differently affected by chronic or acute activation of microglia[J]. *Glia*, 2008, 56(4): 412–425.
- [28] Ross HE, Guo Y, Coleman K, et al. Association of IL-12p70 and IL-6:IL-10 ratio with autism-related behaviors in 22q11.2 deletion syndrome: a preliminary report[J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 31: 76–81.
- [29] Tostes MH, Teixeira HC, Gattaz WF, et al. Altered neurotrophin, neuropeptide, cytokines and nitric oxide levels in autism[J]. *Pharmacopsychiatry*, 2012, 45(6): 241–243.

(责任编辑:张辉洁)