

·基础研究·

脂多糖对孤独症大鼠行为学发育的影响及病理机制*

王月¹ 段博阳² 余莉³ 吴德^{1,4} 唐久来¹

摘要

目的:探讨发育早期感染对孤独症症状的影响,建立丙戊酸钠SD大鼠孤独症样模型,分析发育早期脂多糖暴露对其孤独症样行为的影响及病理机制。

方法:随机选取9只SD孕鼠中的6只于孕12.5天给予丙戊酸钠600mg/kg腹腔注射建立孤独症模型,另外3只孕鼠作为对照组,给予生理盐水腹腔注射。模型组孕鼠产仔后,第20天随机挑选一半仔鼠作为丙戊酸钠加脂多糖组,给予脂多糖2mg/kg腹腔注射,另一半生理盐水腹腔注射作为丙戊酸钠组,注射生理盐水的孕鼠的子代为对照组。采用随机数字法在3组中随机选取仔鼠各8只,在生后43天进行旷场实验、埋珠实验、Y型迷宫实验和三箱社交实验。生后50天3组仔鼠额叶脑组织进行HE染色和透射电镜病理检测,海马组织进行HE染色。

结果:旷场实验、埋珠实验、Y型迷宫实验、三箱实验结果显示,丙戊酸钠组较对照组的活动总距离长、跨格子数多、埋珠个数多、关闭臂进入次数少、关闭臂探索路程少、关闭臂探索时间少、社交性和社交偏好性降低($P<0.05$);丙戊酸钠加脂多糖组较丙戊酸钠组的活动总距离长、跨格子数多、埋珠个数多、关闭臂进入次数少、关闭臂探索路程少、社交性和社交偏好性降低($P<0.05$)。HE和电镜结果显示,丙戊酸钠加脂多糖组细胞核膜破裂,较丙戊酸钠组细胞结构损伤更为严重。

结论:发育早期脂多糖注射会使孤独症大鼠模型孤独症样行为加重,提示感染可能是导致孤独症谱系障碍儿童症状恶化的原因之一,值得临床关注。

关键词 孤独症谱系障碍;脂多糖类;丙戊酸钠;动物行为学

中图分类号:R749.9,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2022)-09-1158-07

Effects of lipopolysaccharide on behavioral development and pathological mechanism of autism rats/WANG Yue, DUAN Boyang, YU Li, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2022, 37(9): 1158—1164

Abstract

Objective: To investigate the influence of infection in early development on autism behavior by establishing the model of sodium valproate SD rats and intraperitoneal injection with lipopolysaccharide(LPS).

Method: 12.5 days after conception, six of 9 SD rats were randomly selected to receive 600mg/kg sodium valproate intraperitoneal injection in order to establish autism model, and the other three pregnant rats were given normal saline intraperitoneal injection as the control group. On the 20th day after birth, 3 of the young rats in the model group were randomly selected to receive 2mg/kg lipopolysaccharide intraperitoneal injection as sodium valproate plus lipopolysaccharide group, and the other 3 were intraderitoneal injection of normal saline as sodium valproate group, and the offspring of control group were injected with normal saline. Eight young mice were randomly selected from each of the three groups by random number method. 43 days after birth, open field test, marble burying test, Y-maze test and three-box social test were conducted. 50days after birth,

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.09.002

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81472167)

1 安徽医科大学第一附属医院儿科,安徽省合肥市,230022; 2 安徽医科大学第四附属医院; 3 安徽医科大学微生物学教研室病原生物学安徽高校省级重点实验室; 4 通讯作者

第一作者简介:王月,女,硕士研究生; 收稿日期:2021-11-17

HE staining and transmission electron microscopy were performed on the frontal brain tissues of the three groups, hippocampal tissue was stained with HE.

Result: Compared with the control group, the results of the open field test, marble burying test, Y-maze test and three-box social test showed that the total activity distance of sodium valproate group was longer. The number of cross cells was more, the number of buried beads was more, the number of closed arm entry was less, the closed arm exploration distance was less, the closed arm exploration time was less, and the sociability and social preference were lower in the sodium valproate group ($P<0.05$). Compared with the sodium valproate group, the total distance of activity was longer, the number of cross cells was more, the number of buried beads was more, the number of closed arm entry was less, the length of closed arm exploration was less, and the sociability and social preference were lower in the sodium valproate plus lipopolysaccharide group ($P<0.05$). The results of HE and electron microscopy showed that the nuclear membrane rupture in the group of sodium valproate plus lipopolysaccharide is more serious than in the sodium valproate group.

Conclusion: Injection of lipopolysaccharide at early stage of development can aggravate the autistic behavior in rats with autism, suggesting that infection may be one of the reasons for the deterioration of symptoms in children with ASD, which deserves clinical attention.

Author's address The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui, 230022

Key word autism spectrum disorder; lipopolysaccharides; sodium valproate; ethology

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD), 是一种神经发育障碍性疾病, 是一组复杂的神经发育障碍, 包括孤独症、阿斯伯格综合征、未另行规定的普遍性发育障碍和其他相关疾病^[1]。ASD 大多在幼儿时间发病, 核心症状表现为社会交流障碍、刻板行为、兴趣狭窄^[2], 严重影响婴幼儿的生长发育及生活, 对患儿的家庭也造成深远影响。近几年来患有孤独症谱系障碍的儿童发病率在全世界各个地区都有上升, 我国首次对6—12岁的儿童患病率进行统计, 其患病率为0.7%^[3], 亚洲儿童的患病率由2010年的0.15%上升至2018年的0.36%, 美国2016年3—17岁儿童的患病率为2.5%^[4-5]。由于日益增加的发病率, 对孤独症的病因和发展研究也越来越多。

孤独症谱系障碍作为一种近些年来发病率不断上升的疾病, 其症状多变, 由环境因素和遗传因素共同作用所致^[6-7]。免疫系统与孤独症相关^[8], 有证据表明有自身免疫性疾病家族史的儿童, 孤独症谱系障碍的发病率会增高^[9]。临床上发现, 孤独症患者发生重大炎症反应与应激事件时, 其孤独症样核心行为会加重。有研究表明, 啮齿类动物生长发育早期的免疫激活可致实验动物出现孤独症样行为^[10]。

为明确生长发育早期阶段感染对孤独症症状的影响, 研究采用孕12.5天的孕鼠腹腔注射丙戊酸钠 (sodium valproate, VPA) 建立孤独症模型, 在仔鼠

的生长发育早期阶段注射脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 来模拟一次细菌感染引起的炎症反应, 探讨发育早期感染对孤独症症状的影响及病理机制。

1 材料与方法

1.1 大鼠及饲养条件

清洁级健康成年SD孕鼠 (购于北京维通利华公司, 许可证号: SCXK(京)2016-0006), 实验用鼠共9只, 体重在(290±30)g, 饲养于安徽医科大学实验动物中心, 生长于12h日光和12h黑夜的环境, 饲养的环境湿度保持在45%—55%, 全天温度维持在21—25℃, 给予充分的饲料和干净的水。

1.2 实验方法

清洁级SD孕鼠于孕12.5天时, 随机选取9只孕鼠中的6只给予丙戊酸钠 (Sigma公司, 美国) 600mg/kg 腹腔注射, 另外3只孕鼠给予生理盐水腹腔注射。在注射丙戊酸钠的孕鼠产仔后, 让其仔鼠自然生长发育至第20天, 并于第20天采用随机数字法随机挑选一半仔鼠给予脂多糖 (Sigma公司, 美国) 2mg/kg 腹腔注射, 剩余仔鼠给予生理盐水腹腔注射。其中, 注射脂多糖的丙戊酸钠仔鼠为丙戊酸钠加脂多糖组, 注射生理盐水的丙戊酸钠仔鼠为丙戊酸钠组, 注射生理盐水的孕鼠的子代为对照组, 在生后20天3组分笼饲养。该动物实验流程符合安徽

医科大学动物福利伦理委员会规定,后续进行的实验操作以尽量减轻实验动物疼痛为原则,依照相关实验动物使用指南进行。

1.3 体重监测

在出生后第7、14、21、28、35天测量各组子代大鼠体重。

1.4 行为学实验

1.4.1 旷场实验:旷场实验检测被测动物在空旷的陌生环境时的焦虑行为。旷场实验在高40cm、长宽各100cm的场地进行,将场地分为4×4共16个格子,实验时间5min,使用摄像系统对其在实验场地的路径进行记录,记录实验鼠跨格子数。在每个实验动物完成实验时,使用酒精清洁旷场器具表面。

1.4.2 三箱实验:三箱实验是对实验动物进行社交性测试的主要实验,通过比较陌生鼠和物体的接触时间来衡量实验大鼠的社交性。实验箱体长90cm、宽40cm、高30cm,由2块隔板将箱体分为3个左中右相等大小的空间,隔板下有一定的空间可使实验鼠顺利穿行于3个空间中,左右2个箱子内有2个金属盒,用于盖住大鼠。陌生鼠选用与测试鼠性别相同、年龄相似的鼠,在测试之前2h放入测试环境适应。实验开始前将被测鼠放入三箱中自由行走5min。社交性实验前将左侧金属盒放入陌生鼠1,观察实验大鼠10min,使用动物行为分析系统统计被测鼠在陌生鼠和空笼子的停留时间。社交偏好性实验将左侧金属盒放入陌生鼠2,右侧放入陌生鼠1,测试时间10min,分析被测鼠在两侧陌生鼠的停留时间。

1.4.3 Y型迷宫实验:Y型迷宫实验用于测试实验大鼠的空间记忆能力。Y型迷宫由3个臂组成,呈Y型,各臂之间的夹角为120°,各臂的长度为50cm,高为35cm,宽为20cm,有一隔板可将Y型迷宫其中一臂封闭。Y型迷宫实验分为2个阶段:第一阶段,将Y型迷宫的其中一臂隔断,剩下两臂大鼠可自由进出,可自由穿梭于剩余两臂,让其在两臂适应3min;第二阶段,在适应性实验2h后,将隔断板拿开,使实验大鼠可以自由穿梭于3个臂,测试时间为3min。测算大鼠在第二阶段关闭臂的进入次数以及行走路程。对于有空间识别损害的大鼠,其关闭臂进入的次数、探索的时间、探索的路程有所减少。

1.4.4 埋珠实验:埋珠实验主要用于测试实验大鼠的焦虑程度。鼠类动物爱好挖掘和掩埋物品,利用埋珠实验可检测实验大鼠的焦虑程度,也可检测孤独症大鼠的刻板样行为,对于有刻板行为的大鼠,其掩埋的大理石个数越多,其焦虑程度和刻板行为程度越重。实验装置可用30cm×50cm的鼠笼,鼠笼中铺满垫料,压实,垫料厚度为5cm,在垫料上均匀铺满4×5共20个1cm大理石,实验时间为30min。实验结束后计算掩埋大理石的个数,大理石珠的掩埋程度超过其大小一半时计为一个。

1.5 组织学改变和电镜检测

1.5.1 大鼠脑组织取材:在实验大鼠进行完行为学测试后,各组各取6只进行组织化学染色。先将实验大鼠使用乌拉坦麻醉,实验大鼠处于深度麻醉状态后,常规进行消毒打开胸廓暴露出心脏,剪开右心耳,从左心房注入20ml灌流液进行灌流,使全身血液流出身体。在无菌环境下取出大鼠的脑子,每组3只切取前额叶一部分脑组织放入电镜固定液进行透射电镜检查,剩下的放入组织固定液固定进行后续的HE染色。

1.5.2 HE染色:脑组织与组织固定液固定24h后,进行常规脱水、浸蜡、包埋、切片,切片厚度为5 μ m。切片依次经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,放入苏木素染液6min,盐酸乙醇分化,氨水返蓝,伊红染色2min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,在光学显微镜下观察脑组织病理改变。

1.5.3 透射电镜检查:将脑组织修剪成1mm×1mm大小的组织,经冲洗、固定、冲洗、脱水、包埋、聚合后进行切片,切片厚度100—110nm,后经1%甲苯胺蓝滴染5min,水洗、干燥后封片,定位后制成薄片,再经过染色漂洗后即可进行观察,在透射电子显微镜下观察脑组织的超微结构改变。

1.6 统计学分析

本实验的实验数据使用SPSS 23.0进行统计学分析,重复测量数据资料以均数±标准差表示,采用重复测量数据的方差分析。计量资料数值均以均数±标准差表示,采用单因素方差分析,两样本比较采用两独立样本t检验。计数资料以百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 仔鼠的死亡率

仔鼠的死亡率,记录时间从出生到出生后40天,3组间的仔鼠死亡率差异有显著性意义($P < 0.05$);与对照组相比,丙戊酸钠组的死亡率增高,差异有显著性意义($P < 0.05$);与对照组相比,丙戊酸钠加脂多糖的死亡率增高,差异有显著性意义($P < 0.05$)(表1)。

对照组的子代大鼠尾巴外观未见异常;孕期注射过丙戊酸钠的子代大鼠可见尾巴有畸形,其畸形率为93.6%。

2.2 各组仔鼠的体重监测及脂多糖注射量

仔鼠的体重随时间逐渐增长,与对照组相比,丙戊酸钠组的仔鼠生长发育迟缓,体重偏低;与丙戊酸钠组相比,丙戊酸钠加脂多糖组仔鼠在注射过脂多糖后,体重较丙戊酸钠组增长缓慢(表2)。

丙戊酸钠加脂多糖组仔鼠20天的平均体重为32.17g,平均每只注射量为0.064mg。

2.3 脂多糖对丙戊酸钠大鼠在旷场运动实验中自发运动的影响

经旷场实验的数据分析得出,对照组、丙戊酸钠组、丙戊酸钠加脂多糖组仔鼠在旷场实验的活动总距离、跨格子数有显著性差异($P < 0.05$);与对照组相比,丙戊酸钠组的活动总距离和跨格子数明显增多,差异有显著性意义($P < 0.05$);丙戊酸钠加脂多糖组较丙戊酸钠组的活动总距离和跨格子数明显增多,差异有显著性意义($P < 0.05$),见表3。

2.4 脂多糖对丙戊酸钠大鼠社交活动的影响

经三箱实验结果数据分析得出,对照组、丙戊酸钠组、丙戊酸钠加脂多糖组仔鼠的社交性和社交偏好性差异有显著性($P < 0.05$);与对照组相比,丙戊酸钠组的社交性和社交偏好性减小,差异有显著性意义($P < 0.05$);丙戊酸钠加脂多糖组较丙戊酸钠组的社交性和社交偏好性减小,差异有显著性意义($P < 0.05$),见表4。

2.5 脂多糖对丙戊酸钠大鼠刻板行为的影响

经埋珠实验的数据分析得出,对照组、丙戊酸钠组、丙戊酸钠加脂多糖组其埋珠个数差异有显著性意义($P < 0.05$);与对照组相比,丙戊酸钠组的埋珠个数显著增多,差异有显著性意义($P < 0.05$);丙戊酸钠加脂多糖组较丙戊酸钠组的埋珠个数显著增多,差异有显著性意义($P < 0.05$),见表5。

2.6 脂多糖对丙戊酸钠大鼠空间识别的影响

经Y型迷宫实验的数据结果分析得出,对照组、丙戊酸钠组、丙戊酸钠加脂多糖组的关闭臂进入次数、探索时间、探索路程有显著性差异($P < 0.05$);与对照组相比,丙戊酸钠组的关闭臂进入次数、探索时间、探索路程减少,差异有显著性意义($P < 0.05$);丙戊酸钠加脂多糖组较丙戊酸钠组的关闭臂进入次数、探索时间减少,其差异有显著性意义($P < 0.05$);

表1 各组仔鼠的死亡率

组别	仔鼠总数	仔鼠死亡数	仔鼠死亡率(%)
对照组	33	1	3.03
丙戊酸钠组	23	6	26.08 ^①
丙戊酸钠加脂多糖组	24	9	37.50 ^①
χ^2 值			12.023
P值			0.002

注:与对照组相比,① $P < 0.05$ 。

表2 3组仔鼠在出生后不同时间的体重

($\bar{x} \pm s$, g)

组别	出生第7天	出生第14天	出生第21天	出生第28天	出生第35天
对照组	15.36±1.68	26.36±2.43	40.02±5.09	79.74±8.22	131.64±17.42
丙戊酸钠组	14.53±1.70	23.65±3.86	34.77±7.49	71.27±12.08	107.48±16.33
丙戊酸钠加脂多糖组	14.01±1.88	22.73±3.73	34.06±7.78	64.23±10.58	93.67±18.32

注:① $F_{组间}=16.64, P < 0.001$;② $F_{时间}=215.2, P < 0.001$;③ $F_{交互}=30.67, P < 0.001$ 。

表3 3组实验大鼠在旷场实验中的行为学比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	总活动路程(m)	跨格子数
对照组	27.93±4.99	88.57±16.99
丙戊酸钠组	35.17±6.87 ^①	113.62±15.29 ^①
丙戊酸钠加脂多糖组	46.54±7.29 ^②	139.71±19.61 ^②
F值	14.676	15.447
P值	<0.001	<0.001

注:与对照组相比,① $P < 0.05$;与丙戊酸钠组比,② $P < 0.05$ 。

表4 3组实验大鼠在三箱实验中的行为学比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	社交性 (陌生鼠1时间/ 空笼子时间)	社交偏好性 (陌生鼠2时间/ 陌生鼠1时间)
对照组	3.29±1.03	2.27±0.29
丙戊酸钠组	2.09±0.62 ^①	1.60±0.54 ^①
丙戊酸钠加脂多糖组	0.73±0.51 ^②	0.47±0.25 ^②
F值	20.834	29.006
P值	<0.001	<0.001

注:与对照组相比,① $P < 0.05$;与丙戊酸钠组比,② $P < 0.05$ 。

表5 3组实验大鼠在埋珠实验中的行为学比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	埋珠颗数
正常组	5.50±1.64
丙戊酸钠组	12.67±3.33 ^①
丙戊酸钠加脂多糖组	16.28±1.98 ^②
F值	33.246
P值	<0.001

注:与对照组相比,①P<0.05;与丙戊酸钠组比,②P<0.05。

丙戊酸钠加脂多糖组较丙戊酸钠组的关闭臂探索路程减少,其差异无显著性意义(P>0.05),见表6。

2.7 大鼠前额叶皮层脑组织的HE染色

对照组大鼠额叶脑组织清晰,结构完整,神经元排列整齐、密集,细胞胞质丰富淡染,无红染,核仁清晰,无核仁固缩、皱缩,细胞间隙正常,无空隙、水肿,无炎症细胞浸润;丙戊酸钠组可见大鼠皮层脑组织排列不紧密,神经元盘列紊乱,细胞胞质深染,细胞膜皱缩,有部分核仁固缩,细胞与周围组织间隙疏松,部分毛细血管旁有水肿,有部分炎症细胞浸润;丙戊酸钠加脂多糖组可见大鼠额叶皮层脑组织疏松,神经元排列明显紊乱,有大量神经元细胞胞质浓缩,核固缩,细胞间隙疏松,大量炎细胞浸润(图1)。

2.8 大鼠海马组织的HE染色

在光镜下观察,对照组海马组织部位的神经元数量较多,神经元呈对称分布,排列整齐,细胞胞质染色淡染,可见核仁,细胞无肿胀;丙戊酸钠组海马组织神经元数量明显减少,有部分神经元胞膜不清晰,神经元分布不对称,排列不整齐;丙戊酸钠加脂多糖组海马组织的神经元有大量丢失,可见部分中断,神经元胞膜不清晰,与周围组织分界不清,神经元排列不整齐(图2)。

2.9 各组大鼠额叶皮层透射电子显微镜表现

对照组大鼠额叶皮层的突触清晰,突触前膜可清晰看到聚集的突触小泡,突触小泡膜明显,神经细胞圆且细胞膜清晰、光滑,细胞内线粒体清楚,线粒体数量多,线粒体嵴未断裂且清晰,较少

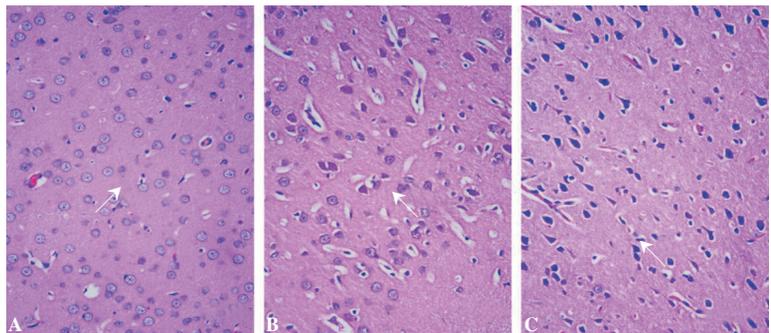
表6 3组实验大鼠在Y型迷宫实验中的行为学比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	关闭臂进入次数	关闭臂探索时间(s)	关闭臂探索路程(m)
正常组	6.50±0.55	56.44±11.22	5.91±1.05
丙戊酸钠组	4.14±1.35 ^①	38.09±11.37 ^①	3.88±1.55 ^①
丙戊酸钠加脂多糖组	2.57±0.97 ^②	22.60±9.60 ^②	2.81±1.22
F值	23.578	13.412	9.690
P值	<0.001	<0.001	0.002

注:与对照组相比,①P<0.05;与丙戊酸钠组比,②P<0.05。

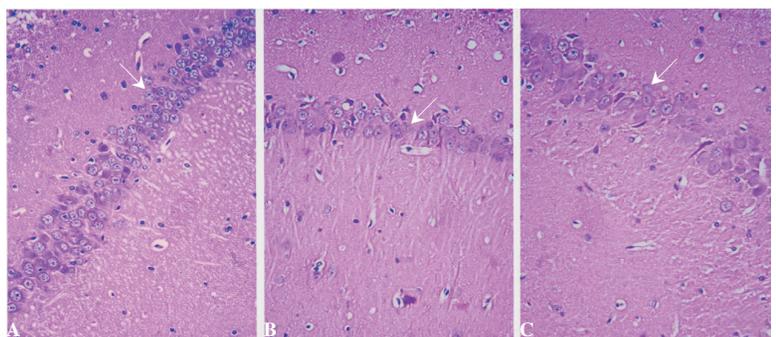
看到胶质细胞;丙戊酸钠组大鼠的额叶皮层微血管周围有部分水肿,可看到部分胶质细胞,胶质细胞膜基层有断裂,神经元细胞间的突触稍不清晰,突触前膜内的突触小泡较少,突触小泡膜不明显,神经元内可见部分线粒体嵴断裂;丙戊酸钠加脂多糖组大鼠的额叶皮层微血管周围有明显水肿,血管基层与周围细胞间有空隙,可看到较多胶质细胞,胶质细胞与周围细胞有明显水肿,可见清晰的空隙,细胞内的线粒体不清晰,线粒体嵴断裂(图3)。

图1 3组大鼠额叶组织 (HE染色,×400)



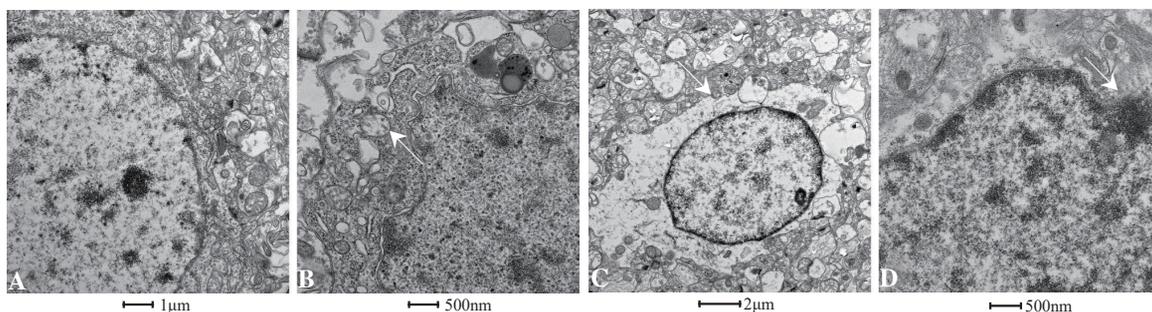
注:A:对照组,细胞核仁清晰,胞质淡染;B:丙戊酸钠组,胞质深染,细胞膜稍皱缩;C:丙戊酸钠加脂多糖组,细胞皱缩,深染(白色箭头处)。

图2 3组大鼠海马组织 (HE染色,×400)



注:A:对照组,细胞核仁清晰,胞质淡染;B:丙戊酸钠组,胞膜不清晰,胞体小;C:丙戊酸钠加脂多糖组,细胞膜不清晰,与周围组织分界不清(白色箭头处)。

图3 3组大鼠额叶组织的透射电镜图片



注:A:对照组,核膜完整;B:丙戊酸钠组,线粒体嵴断裂;C:丙戊酸钠加脂多糖组,胶质细胞周围水肿;D:丙戊酸钠加脂多糖组,核膜断裂(白色箭头处)。

3 讨论

ASD是一种从婴幼儿时期发展的广泛发育障碍性疾病,主要的核心症状有:社会交流与交流障碍、狭窄的兴趣;除此之外,有的儿童会有其他一些共存疾病,部分患儿有情绪控制异常及焦虑症状等^[11]。目前大多数学者认为孤独症是遗传因素与环境因素共同作用导致的^[6-7]。在孤独症儿童的相关研究可以发现,患有孤独症谱系障碍的儿童其症状反复,在未进行治疗的情况下,症状会逐渐加重,本研究探讨发育早期经历的炎症反应会引起孤独症儿童的症状加重的问题。

丙戊酸钠作为一种常见的一线抗癫痫药物,广泛运用在癫痫治疗上。已有研究显示,孕期使用丙戊酸治疗癫痫的孕妇其子代患有孤独症的概率会增加^[6,12],并且有多次实验验证于孕12.5天的大鼠注射丙戊酸钠会使其产生孤独症样行为^[13],已成为孤独症大鼠的经典模型。本实验于孕12.5天的SD大鼠注射丙戊酸钠的子代的造模结果显示,丙戊酸钠组较对照组自发运动增多,焦虑程度加重,社交活动减少,社交偏好倾向于熟悉的,空间识别能力减弱,刻板行为增加,生长发育缓慢,由此可见,造模的SD大鼠有和孤独症类似的症状和行为,腹腔注射丙戊酸钠的SD大鼠有孤独症样行为。

现有越来越多的证据证明,免疫系统与孤独症的发生、发展有很大相关性^[14],对于有自身免疫系统疾病的家庭孤独症谱系障碍儿童的发生率增高。在儿童生长发育早期,大脑尚未发育完全,相当于在大鼠出生后20天,其突触密度、髓鞘化率增加^[15],此时的儿童易发生感染,此时发生炎症反应是否会引起

症状加重是临床一直关注的焦点问题。本实验观察发育早期大鼠腹腔注射脂多糖对孤独症大鼠模型的影响,结果显示丙戊酸钠仔鼠在发育早期注射脂多糖后,焦虑程度加重、社交活动减少、社交没有倾向于熟悉的鼠,刻板重复行为加重,且空间识别能力减弱。本实验结果显示,在发育早期,丙戊酸钠仔鼠腹腔注射脂多糖可加重丙戊酸钠仔鼠的孤独症样行为。

进一步进行HE染色及透射电镜结果显示,注射脂多糖的丙戊酸钠仔鼠组织细胞结构损坏较不注射脂多糖的丙戊酸钠仔鼠严重,且组织中胶质细胞数量更多,神经突触受损。脂多糖导致孤独症模型大鼠症状加重可能与炎症导致胶质细胞激活相关,有研究指出,脂多糖可导致小胶质细胞激活,并使小胶质细胞向M1型极化^[16-17]。小胶质细胞与突触重塑相关,突触重塑。

严重依赖细胞自噬。丙戊酸钠仔鼠发育早期注射脂多糖引起孤独症样行为加重的机制尚未明确,有可能与神经细胞的自噬相关。国内外均有研究显示,丙戊酸钠诱导的孤独症模型大鼠,其细胞自噬减弱,与纹状体发育后mTOR依赖性信号通路增强相关^[18-19]。对于产前暴露于丙戊酸钠孤独症大鼠模型,有研究显示,其AKT/GSK-3 β 磷酸化的信号紊乱,而PGRN表达的时空规律与其有关^[20],模型大鼠在成年期前其额叶皮层和海马胶质细胞增多^[21]。脂多糖诱导的小胶质细胞炎症与引起自噬的下调以及mTOR信号通路的激活相关^[22]。细胞自噬与孤独症相关行为密切相关,而脂多糖介导的炎症引起孤独症大鼠模型症状加重是否与之相关还未可知。

本次研究证实,丙戊酸钠孤独症仔鼠在发育早

期腹腔注射脂多糖,引起炎症反应,其孤独症样行为恶化。病理及电镜结果提示与LPS导致的额叶损伤有关,但是LPS如何损伤额叶,以及是否存在其他途径导致孤独症症状加重,仍需进一步实验来探究。

参考文献

- [1] Manning-Courtney P, Murray D, Currans K, et al. Autism spectrum disorders[J]. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*,2013,43(1):2—11.
- [2] Lai MC, Lombardo MV, Baron-Cohen S. Autism[J]. *Lancet*,2014,383(9920):896—910.
- [3] Zhou H, Xu X, Yan W, et al. Prevalence of autism spectrum disorder in China: a nationwide multi-center population-based study among children aged 6 to 12 years[J]. *Neurosci Bull*,2020,36(9):961—971.
- [4] Qiu S, Lu Y, Li Y, et al. Prevalence of autism spectrum disorder in Asia: a systematic review and meta-analysis[J]. *Psychiatry Res*,2020(284)112679.
- [5] Kogan MD, Vladutiu CJ, Schieve LA, et al. The prevalence of parent-reported autism spectrum disorder among US children[J]. *Pediatrics*,2018,142(6):e20174161.
- [6] Tordjman S, Somogyi E, Coulon N, et al. Gene × environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms[J]. *Front Psychiatry*,2014(5)53.
- [7] Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, et al. The familial risk of autism[J]. *JAMA*,2014,311(17):1770—1777.
- [8] Miller AH, Haroon E, Felger JC. The immunology of behavior-exploring the role of the immune system in brain health and illness[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(1): 1—4.
- [9] Wu S, Ding Y, Wu F, et al. Family history of autoimmune diseases is associated with an increased risk of autism in children: a systematic review and meta-analysis[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2015(55)322—332.
- [10] Carlezon WA Jr, Kim W, Missig G, et al. Maternal and early postnatal immune activation produce sex-specific effects on autism-like behaviors and neuroimmune function in mice[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 16928.
- [11] Lai MC, Baron-Cohen S. Identifying the lost generation of adults with autism spectrum conditions[J]. *Lancet Psychiatry*,2015,2(11):1013—1027.
- [12] Rasalam AD, Hailey H, Williams JH, et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder[J]. *Dev Med Child Neurol*,2005,47(8):551—555.
- [13] Nicolini C, Fahnestock M. The valproic acid-induced rodent model of autism[J]. *Exp Neurol*, 2018, 299 (Pt A) : 217—227.
- [14] Pangrazzi L, Balasco L, Bozzi Y. Natural antioxidants: a novel therapeutic approach to autism spectrum disorders? [J]. *Antioxidants (Basel)*,2020,9(12):1186.
- [15] Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, et al. Brain development in rodents and humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species[J]. *Prog Neurobiol*,2013(106—107):1—16.
- [16] Gevezova M, Sarafian V, Anderson G, et al. Inflammation and mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2020, 19(5) : 320—333.
- [17] 俸笛,陈保林,肖露,等.妊娠期脂多糖暴露通过激活子代小胶质细胞诱导大鼠孤独症样行为[J]. *中国病理生理杂志*,2020, 36(5):837—846.
- [18] Lieberman OJ, Cartocci V, Pigulevskiy I, et al. mTOR suppresses macroautophagy during striatal postnatal development and is hyperactive in mouse models of autism spectrum disorders[J]. *Front Cell Neurosci*,2020(14)70.
- [19] 刘芬,周波,文敏,等.自噬在孤独症模型大鼠行为学及海马 PSD-95 蛋白表达变化中的作用[J]. *安徽医科大学学报*,2018, 53(11):1746—1750.
- [20] Lan J, Hu Y, Wang X, et al. Abnormal spatiotemporal expression pattern of progranulin and neurodevelopment impairment in VPA-induced ASD rat model[J]. *Neuropharmacology*,2021(196)108689.
- [21] Bronzuoli MR, Facchinetti R, Ingrassia D, et al. Neuroglia in the autistic brain: evidence from a preclinical model [J]. *Mol Autism*,2018(9)66.
- [22] Ye X, Zhu M, Che X, et al. Lipopolysaccharide induces neuroinflammation in microglia by activating the MTOR pathway and downregulating Vps34 to inhibit autophagosome formation[J]. *J Neuroinflammation*,2020,17(1):18.