

张雪原,孔亚敏,马丙祥,等. 孤独症谱系障碍动物模型相关神经生物学研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1141-1149.

Zhang XY, Kong YM, Ma BX, et al. Research progress in the neurobiology of animal models of autism spectrum disorder [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1141-1149.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.017

孤独症谱系障碍动物模型相关神经生物学研究进展

张雪原¹,孔亚敏²,马丙祥^{1,2*},党伟利²,周荣易^{1,2},史文丽^{1,2}

(1. 河南中医药大学儿科医学院,郑州 450046;2. 河南中医药大学第一附属医院儿科,郑州 450003)

【摘要】 孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 是一种以社交和沟通障碍以及重复和限制性行为为特征的神经发育障碍。ASD 的表型异质性使得确定核心症状涉及的确切病因和病理生理机制困难重重,且这些症状通常伴有注意缺陷多动障碍、癫痫发作和感觉运动异常等共患病。动物模型提供了阐明疾病的病因和发病机制的重要平台。越来越多的研究利用如环境暴露、母体免疫激活 (maternal immune activation, MIA) 等诱导的动物模型进行孤独症谱系障碍病因病机的探讨以及药物治疗靶点的筛选。该文综述常见动物模型的不同神经网络机制、脑组织及相关因子变化、症状表型等方面,为今后进行精准动物实验研究提供针对性的动物模型选择,也可阐明疾病神经生物学、开发潜在的治疗药物提供参考。

【关键词】 孤独症谱系障碍;动物模型;环境暴露模型;母体免疫激活

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 08-1141-09

Research progress in the neurobiology of animal models of autism spectrum disorder

ZHANG Xueyuan¹, KONG Yamin², MA Bingxiang^{1,2*}, DANG Weili², ZHOU Rongyi^{1,2}, SHI Wenli^{1,2}

(1. Medical School of Pediatrics, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003)

Corresponding author: MA Bingxiang. E-mail: mbx1963@126.com

【Abstract】 Autism spectrum disorder (ASD) is a range of neurodevelopmental disorders characterized by social and communication problems and repetitive and restrictive behaviors. The phenotypic heterogeneity of ASD makes it particularly difficult to determine the exact etiology and pathophysiology behind the core symptoms, which are usually accompanied by complications such as ADHD, seizures, and sensorimotor abnormalities. Animal models provide important platforms for clarifying the etiology and pathogenesis of diseases. More and more studies are using animal models induced by environmental exposure and maternal immune activation to explore the etiology and pathogenesis of ASD and screen for drug targets. This paper reviews the different neural network mechanisms, changes to brain tissue and related factors, symptom phenotypes, and other aspects of common animal models to provide a reference for those clarifying the neurobiology of ASD and developing potential drugs or therapeutic interventions, and to help with selecting targeted animal models for future precision experimental research.

【Keywords】 autism spectrum disorder; animal model; environmental exposure model; maternal immune activation
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 河南省特色骨干学科项目 (STG-ZYX03-202129, STG-ZYX06-202150)。

Funded by Henan Province Characteristic Backbone Discipline Project (STG-ZYX03-202129, STG-ZYX06-202150)。

【作者简介】 张雪原 (1991—), 女, 硕士, 研究方向: 儿童神经系统疾病防治研究。Email: zxy10173421@163.com

【通信作者】 马丙祥, 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治小儿神经系统疾病。Email: mbx1963@126.com

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 是一组神经发育障碍性疾病,其主要特征是社交互动和交流受损、重复、刻板行为和兴趣受限^[1]。ASD 患者还常伴多种共患病,如智力障碍、言语语言障碍、注意缺陷多动障碍、抽动障碍、睡眠障碍、胃肠道功能障碍、焦虑、癫痫发作等。具有高度致残率,患病率为 1% ~ 2.5%,且呈不断上升趋势^[2]。因本病为终身性疾病,致患儿难以融入社会,职业和其他功能方面受到影响,给患儿及家庭带来极大困难。ASD 的病因错综复杂,目前仍有争论,尚未鉴定出可用于明确临床诊断的标志物。尽管如此,过去几十年的研究已经确定了导致孤独症的各种风险因素,可分为遗传改变(罕见突变、基因变异、缺失、重复、染色体序列重组)和环境暴露(化学品暴露、产前和围产期因素、自然/社会环境)。然而在了解其确切的病理生理学机制和治疗方法方面仍存在不足,因此,有必要通过现有的 ASD 动物模型进行验证。基于已确定的风险因素和 ASD 的可能病因,创建了两类主要类型的动物模型模拟和了解这种疾病行为异常的病理机制,分别是病变模型和遗传模型。病变模型包括产前免疫激活、产前感染、产前丙戊酸、丙酸及其他药物暴露。ASD 动物模型的种类正在迅速扩大,并且在未来几年将不断增加,但仍需简明扼要地系统性评估其神经生物学意义,这篇综述汇总了 ASD 病变动物模型具备的神经生物学特性和药理学靶向治疗潜力,为今后开展病理生理学及治疗靶点等研究选取模型提供针对性选择(见表 1)。

1 丙戊酸 (valproic acid, VPA) 诱发模型

丙戊酸 (VPA) 是一种常用的抗惊厥药和情绪稳定剂,可缓解癫痫发作、偏头痛和躁狂发作等。女性在妊娠期使用可能会使后代出现包括脑组织异常、神经管缺陷、智力障碍和认知行为障碍等诸多缺陷^[3],与后代患 ASD 的病因和表现出的临床症状具有强烈相关性。从机制上讲,VPA 诱导的 ASD 动物模型增强了 Wnt1 信号通路的表达,GSK-3 β / β -catenin 通路被激活后并致胚胎脑神经发育增强,降低了 I κ B α 的表达水平并激活了 NF- κ B 信号通路,从而导致神经延迟发育^[4]。这些揭示了 ASD 中神经前体细胞 (neural precursor cells, NPC) 增殖和神经元过度生产的潜在的分子途径。还有研究发现,Notch 信号通路异常激活,相关分子 Notch1、

Jagged1、Notch 细胞内结构域 (notch intracellular domain, NICD) 和 Hes1 表达增加,自噬和树突棘生长调节不良从而致 ASD 发病^[5]。基因研究方面,VPA 大鼠大脑内存在较多表达基因及可变剪接基因,这些异常基因与神经系统疾病和神经系统发育有关,影响大鼠的社会行为^[6]。研究结果还表明,在 ASD 模型中,大鼠大脑皮层中的几个谷氨酸能基因与 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 能基因表达的平衡变化形成对比^[7]。此外,与对照大鼠相比,VPA 诱导的大鼠异常社会行为相关基因的 mRNA 表达显著下调(编码 5-HT、脑内神经营养因子、neurexin3 的基因)^[8]。脑组织结构上,VPA 鼠与对照大鼠脑体积减少,小脑和脑干局灶性灰质密度降低^[9],小叶 V1 体积增加, I、IV、X 体积减小,这影响认知行为^[10]。分子机制方面,VPA 诱导的浦肯野细胞 (purkinje cell, PC) 数量显著减少,在雌雄分别于正中副小叶、小脑后部显著,可能对小脑功能连接的大脑皮质区域产生发育影响^[9],因为血氧水平依赖 (blood oxygen level dependent, BOLD) 反应与 PC 数量之间正相关^[11],导致孤独症中观察到运动障碍和行为异常。而室旁核、脑脊液中的 AVP-ir 细胞数量减少,致使与情感和认知方面相关的脑功能减弱^[12]。Pax6 通过丙戊酸盐暴露在胚胎皮层中短暂增加,导致谷氨酸能蛋白在后代产后脑中的表达增加^[13];海马中 GABA 酶、谷氨酸脱氢酶 GAD67 蛋白降低,结合社会行为相关基因下调诱导了孤独症样行为^[8]。海马组织中 Sphk2 和 Slp 上调,影响模型鼠学习及记忆障碍^[14]。肝代谢酶下调从而减少血清多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 反应与 PC 数量之间正相关^[11],导致孤独症中观察到运动障碍和行为异常。而小脑胶质增生,进一步致神经系统损伤和行为改变。此外,肠道菌群影响大脑正常功能,肠道菌群失调,粪便微生物丰富度降低、组成改变,粪便微生物群落的代谢潜能改变^[15],与孤独症谱系障碍 (ASD) 患者患有胃肠道疾病的微生物改变表现一致。

VPA 诱导的啮齿动物模型目前认为是最适合孤独症的动物模型,也是研究直接或间接参与途径的最有效模型。其模型特点:动物性别、鼠龄使海马兴奋性不同;产前较产后诱导新生鼠死亡率低得多,且 ASD 核心症状及组织病理学变化更显著;VPA 以性别依赖性方式/性别特异性差异导致前额多巴胺系统功能减退;对大脑的影响以特定年龄和

表 1 ASD 动物模型构建概况一览表

Table 1 Overview of ASD anima model construction

试剂 Reagent	动物 Animals	孕龄或日龄 Pregnant age or birth day age	剂量 Dose	给药方式 Administration mode	频次 Frequency	神经生物学特点 Characteristic of neurobiology
丙戊酸 Valproic acid	瑞士小鼠、 C57 小鼠、SD 大鼠、Wistar 大鼠 Swiss mice, C57 mice, SD rats, Wistar rats	E 11/12.5 d	600 mg/kg、 400 mg/kg	腹腔注射 Intraperitoneal injection	单次 Single dose	最适合、最有效;神经管缺陷;脑在 mpfc 区域中显示出超连接性和超可塑性、增 加的 NMDA/AMPA 比率 Most suitable and effective. Neural tube defects. The brain showed hyperconnectivity and superplasticity in the mpfc region, and increased NMDA/AMPA ratio.
丙酸 Propionic acid	大鼠 Rats	PN 21 d	250 mg/(kg · d) (po), 500 mg/(kg · d) (ip)	口服、腹腔 注射 Peroral, intraperitoneal injection	3、5、7 次 3, 5, 7 times	双向调控线粒体功能,突触可塑性降低 Bidirectional regulation of the mitochondrial function, reduced synaptic plasticity was observed
脂多糖 Lipopolysaccharide	Wistar 大鼠、 SD 大鼠、 C57BL6/J 小 鼠 Wistar rats, SD rats, C57BL6/J mice	PN 2/3/5 d E 9.5/12/15 d	50 µg/kg、 100 µg/kg	腹腔注射 Intraperitoneal injection	单次 Single dose	肠道微生物种群改变,增加的细胞密度, 锥体神经元的兴奋性增加以及突触后谷 氨酸能对 NMDA 诱导的突触可塑性的反 应 Changes of intestinal microbial population. Increase cell density. Increased excitability of pyramidal neurons and postsynaptic glutamatergic response to NMDA-induced synaptic plasticity
Poly:C	孕鼠、 C57BL6/J 小 鼠 Pregnant rat, C57BL6/J mice	E 12.5 d	20 mg/kg	腹腔注射 Intraperitoneal injection	单次 Single dose	肠道微生物种群改变,浦肯野细胞的空间 局限性缺陷,PSD 畸形、嘌呤能受体下 调以及 ERK1/2 和 CAMKII 磷酸化减少/ 突触复合物异常 Changes of intestinal microbial population. Spatially localized defects in Purkinje cells. PSD malformation, downregulation of purinergic receptors, and reduced ERK1/2 phosphorylation and CAMKII in the/ synaptic complex abnormalities
博尔纳病 病毒 Borna disease virus	新生大鼠 Neonate rats	PN 1 d	20 µL 感染的脑匀 浆 (滴度 10 ⁴ TCID50/g 脑组织, CRP3 (He-80) BDV 毒株) 20 µL of infected brain homogenate (the titer was 10 ⁴ TCID50/g of brain tissue, CRP3 (He- 80) BDV strain) (BDV-infected rats)	颅内注射 Intracranial inoculation	单次 Single dose	中枢神经系统 (CNS) 神经化学递质的发 育和区域异常,海马体损伤和小脑发育 异常,BDV 血清阳性率增加 Development and regional abnormalities of neurochemical transmitters in the CNS. Hippocampal injury and cerebellar dysplasia. The BDV seroprevalence was increased
沙利度胺 Thalidomide	孕猴、Wistar 大鼠 Pregnant monkey, Wistar rats	E 9/11 d	500 mg/kg	口服 Peroral	1 次/2 次 Single/ double dose	听觉敏感,无典型的 ASD 样行为表型,灵 长类动物和啮齿动物之间的不同影响, 可能不是 ASD 的合适动物模型 Auditory sensitivity. No typical ASD-like behavioral phenotype occurred. Differential effects between primates and rodents. Probably not a suitable animal model for ASD
米索前列 醇 Misoprostol	孕鼠 Pregnant rats	PN 7 d	40 µg/kg	皮下注射 Subcutaneously Injection	单次 Single dose	研究较少,未发现显著的 ASD 样行为和 神经功能障碍,大脑形态及神经元未见 缺损 Due to few studies, no significant ASD-like behavior and neurological dysfunction were found. No defect in brain morphology and neurons

特定区域的方式;另外自主神经活动从胎儿期开始就已经发生变化。该模型的主要限制是缺乏行为、结构、功能和认知桥接参数,且在孤独症的遗传领域的研究很少。

2 丙酸 (propionic acid, PPA) 诱发模型

丙酸(PPA)是一种短链脂肪酸,是肠道微生物组的主要发酵产物,是新陈代谢的正常中间体,存在于天然食物或防腐剂中。PPA 和其他短链脂肪酸影响多种生理过程,如细胞信号传导、神经递质合成和释放、线粒体功能,过度暴露可产生类似于孤独症谱系障碍中所展现的大脑、行为变化及神经炎症反应^[16]。为了探讨 PPA 在 ASD 病因学中的作用,在 Wistar 大鼠脑室内输注 PPA 后观察到氧化应激、神经炎症、细胞凋亡和神经递质失衡增强,存在兴趣减少、社交行为减弱、行为重复、焦虑等孤独症样表现。脑脂质谱、脑脂肪酸代谢水平在脑室内输注丙酸之后改变,且总单不饱和物、总 $\omega 6$ 脂肪酸、总磷脂酰乙醇胺缩醛磷脂、 $\omega 6$: $\omega 3$ 比例降低,分离磷脂物种的总饱和水平提高。由于 $\omega 6$: $\omega 3$ 脂肪酸的严重失衡使得促炎事件的风险增加导致了神经系统疾病,大鼠表现出刻板重复行进运动的频率显著增加。PPA 建模有剂量和时间依赖性效应^[17]。PPA 主要对 ASD 患者的淋巴母细胞系 (lymphoblast cell line, LCL) 亚群的线粒体功能产生双向调节作用,具体取决于浓度、暴露持续时间和微环境氧化还原状态^[18]。

3 母体免疫激活 (maternal immune activation, MIA) 模型

MIA 由细菌或病毒以不同的方式诱导。细菌内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和合成病毒 RNA 多肌苷酸:多胞苷酸 (Poly I:C) 通常用于啮齿动物造模,分别模仿细菌和病毒引起的病理过程。Hameete 等^[19]提出母体免疫激活可能影响胎儿发育的潜在机制之一可能是胎儿中细胞因子浓度的改变,因为细胞因子在神经和免疫系统的功能和发育中发挥作用。这与 Saghaadeh 等^[20]报道的 ASD 患者中促炎细胞因子的荟萃分析结果一致。

3.1 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱发模型

脂多糖是在革兰氏阴性细菌外膜中发现的免疫激活剂,可充当内毒素。妊娠期感染 LPS (模仿细菌感染) 诱发母体免疫激活 (MIA) 与神经发育障碍

密切相关。在胚胎发育后期注射 $100 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 的 LPS,检测到孕鼠血液中高于正常水平的 TNF- α 和 IL-6 可确认免疫激活成功^[21]。先前的研究表明,产前暴露于 LPS 诱导孕母或后代孤独症样行为^[22],如焦虑过度、社交互动减少以及学习和记忆受损。产前 LPS 暴露诱导 MIA,母体血清 IL-17A、IL-6、IL-17A mRNA 表达上调和产生 IL-17A 的 $\gamma\delta$ T 细胞在子宫富集致后代 ASD 样行为^[23],皮质酮水平升高使胎盘组织受损并导致活胎数减少^[24]。注射 LPS 后,发现幼鼠在神经元发育的关键阶段, Nfe2l2 表达上调,增加了 Iba1 和 CD68+ 细胞数量,并且显著上调了海马体中的促炎细胞因子基因表达,增加了脑内丙二醛水平。在新生 10 日龄 (PND 10) 时,幼崽的超声发声 (ultrasound voice, USV) 减少,表明诱导促炎反应和氧化应激引发社会沟通障碍并显著降低了前脉冲抑制 (pre-pulse inhibition, PPI)^[25]。LPS 激发的幼年雌性表现出与孤独症相关的最显著的神经生物学改变,例如小胶质细胞激活增加和微清蛋白 (parvalbumin, PV) 损伤^[26]。脑功能障碍与促炎细胞因子的改变以及小胶质细胞的数量和/或形态之间存在相关性。产前 LPS 诱导孤独症样效应与多巴胺能系统低活性密切相关^[27]。LPS 模型雌鼠表现出基线运动不足和对苯丙胺的反应性降低,成年后社交能力受损、社会互动减少、记忆力差。而 LPS 雄性表现出空间学习 (获取实验) 和记忆 (探针实验) 障碍^[22]。最近报道人类的 CX3CR1 基因变异导致不规则趋化因子 (fractalkine, FKN) 信号传导中断与神经发育障碍的风险增加有关。可能解释妊娠晚期的急性免疫损伤可以通过降低小胶质细胞 CX3CR1 蛋白表达来改变压裂素信号传导,突出神经元-小胶质细胞压裂素信号传导是神经发育障碍环境危险因素所致结果的相关靶标^[28]。研究发现,产前、产后 LPS 暴露免疫激活可能影响大脑回路中不同的细胞靶点^[29]。LPS 激发新生鼠后,雄性表现抑郁、焦虑、行为重复和工作记忆缺陷;雌性有质子泵抑制剂 (proton pump inhibitors PPI) 缺陷,表现出性别差异^[30]。新生仔鼠 LPS 暴露引发类似于孤独症谱系障碍的性别特异性行为和神经化学改变,构成与该疾病发展相关的性别偏见机制调查的相关模型^[31-33],还可用于评估炎症反应性对孤独症相关行为的作用。

3.2 多肌苷:多胞苷酸 (Poly I:C) 诱发模型

迄今为止,大多数母体免疫激活 (MIA) 研究都

是使用 LPS 和多肌苷:多胞苷酸(Poly(I:C))在啮齿动物中进行。Poly(I:C)是一种双链 RNA,模仿病毒感染可诱导 MIA。在怀孕期间注射 Poly(I:C)的大鼠的后代表现出与孤独症相关的表型,包括焦虑增加、刻板重复行为、社交互动和沟通减少、社会偏好、前驱抑制受损和感觉运动协调降低^[3]。妊娠中期单次皮下注射 0.5 mg/kg 低剂量的 Poly(I:C)虽然对母体、胎儿或新生儿存活或出生后生长发育没有影响,然而,导致胎儿大脑中 TNF- α 的下调、感觉运动门控异常,后代在非空间记忆和学习任务以及活动方面表现出显著的损害^[34]。在怀孕的 C57BL6/J 小鼠 GD 12.5 日接受单次注射 Poly I:C (20 mg/kg),在 MIA 后代海马体和小脑两个大脑区域发现神经炎症反应差异与性别显著相关,仅在雌性中观察到促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 iNOS 的显著反应。同时观察到,PND 28 时特定微生物群中拟杆菌门的增加和疣状菌门的减少,在青春期和成年早期给予 TNF- α 抑制剂可缓解接受 Poly(I:C)暴露的新生儿质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPI)缺乏^[35]。脑组织学检查显示,分泌型糖蛋白 reelin 显著降低,胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达增加,特别是在海马体中小胶质细胞数量增加。这项研究证明产前亚临床感染可以对大脑发育产生深远影响^[36]。不同批次的 Poly(I:C)可以诱导不同的免疫反应,并且对母体生理和妊娠结局产生不同的影响^[37]。研究提示在使用 Poly(I:C)建立 MIA 模型时考虑所用产品的精确分子组成和免疫原性至关重要,应尽量减少分子量变异性和内毒素污染,以便进行更强大的 MIA 建模^[38]。未来可以建立参考数据库,将表型数据与经验获得的高质量信息相结合,这有助于设计、实施和解释基于 poly(I:C)的 MIA 模型。

4 其他

4.1 博尔纳病毒(borna disease virus, BDV)诱发模型

博尔纳病毒(BDV)是一种高度嗜神经性、非节段性、单股负链的 RNA 病毒,是一种可传播的、进行性的、致命的病毒,持续性感染许多哺乳动物的中枢神经系统,可引起马和羊的脑脊髓炎,与人类的神经系统损伤和行为障碍有关^[3]。有学者提出了两种可能 BDV 导致神经病理学的新机制,一是异常的胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor,

IGF)信号传导,IGF 信号传导被干扰后诱导 BDV 感染中的浦肯野细胞丢失。另一种是将 BDV 序列整合到宿主基因组中,BDV 整合子可能会使受感染细胞的转录组紊乱,从而影响 BDV 神经病理学^[39]。BDV 感染是 ASD 的第一个病毒诱导的动物模型,Lewis 新生大鼠中通过 BDV 颅内接种,产生强大的适应性,可以持续感染中枢神经系统(central nervous system, CNS)的神经元使 CNS 神经化学递质的发育和区域异常而不会引起一般细胞死亡^[40]。然而,BDV 感染后,神经元网络活性的活动依赖性增强受到干扰,可能是因为它对蛋白激酶 C 信号通路的影响^[41]。Honda 等^[42]调研了日本 ASD 儿童血清中博尔纳病毒抗体阳性的患病率为 7.4%,且性别之间无明显差异。此基线数据表明年幼儿童对 BDV 感染的高易感性,为此后的研究提供了有价值的支撑。总体来说,BDV 模型独特地结合了系统性脑功能异常(例如:免疫和神经递质紊乱)和选择性损伤(例如:脑病理学和行为缺陷)等特征,可能能够模拟 ASD 中各种假定的致病过程。BDV 模型的未来研究也可能旨在进一步阐明病毒对神经元和神经胶质细胞内分子过程的影响并导致行为缺陷的机制。

4.2 特布他林(trbutaline)诱发模型

特布他林是一种 β_2 -肾上腺素受体激动剂,超适应症用于早产的长期管理,与双卵双胞胎孤独症的一致性增加有关。免疫组织化学研究表明,PN 2 至 PN 5 时皮下注射特布他林可发现 PN 30 时大鼠大脑皮层以及小脑和脑皮质白质中的小胶质细胞活化强烈增加。在行为测试中,大鼠表现出对新奇和厌恶刺激的高反应模式^[43]。Bercum 等^[44]报道出一种新的孤独症和癫痫(epilepsy, EP)联合动物模型,孕鼠在整个怀孕期间受到轻度施压联合幼崽在出生后第 2 ~ 5 天注射特布他林可导致严重的异常行为症状,以及 45%的大鼠自发复发性惊厥发作和 100%的癫痫样脑电波。这种 ASD 和 EP 联合的新动物模型使得对共患病的细胞机制和潜在干预策略进行实验研究成为了现实。

4.3 米索前列醇(misoprostol)诱发模型

米索前列醇是一种合成的前列腺素 E1 类似物,高剂量给予孕妇引发子宫收缩可提前终止妊娠,低剂量给予妇女可帮助分娩。早前关于孤独症和妊娠期间使用米索前列醇阳性史的报告显示,米索前列醇暴露组孤独症发生率较高,为 3/

7^[45],表现出孤独症特征的儿童的母亲怀孕期间均有流产药物米索前列醇的暴露史^[46]。Koenig 等^[47]研究未发现孕期暴露于米索前列醇 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 C57BL/6J 小鼠,其后代有显著的 ASD 样行为和神经功能障碍,大脑形态未受严重影响,海马神经元未见缺损,且米索前列醇可以保护神经并减少几种不同细胞类型的凋亡。总之,目前的结果不能支持孕期暴露米索前列醇对小鼠的神经发育毒性,因此,未来应进行对米索前列醇在包括 ASD 在内的神经发育障碍的病因学中是否作用及如何作用作进一步探讨。

4.4 沙利度胺(thalidomide, THAL)诱发模型

沙利度胺是一种治疗多种自身免疫性疾病的新免疫调节药物,最初作为镇静药物研制,由于严重的致畸性而导致人类、非人类灵长类动物和兔子等多种动物躯体缺陷,如眼睛结构异常。妊娠 9 ~ 10 d 口服 500 mg/kg 沙利度胺可诱导出听觉超敏反应、学习能力受损等行为,未发现其他典型的 ASD 样行为表型^[48]。雄性中研究的 Snap25 表达在 VPA 和 THAL 治疗的大鼠的海马和小脑中均升高,致畸物可能通过改变调节大脑正常发育的基因的表达模式来扰乱大脑的个体发育^[49]。在孤独症个体中观察到的感觉和知觉异常中,据报道听觉超敏反应很常见。沙利度胺 ASD 动物模型中听觉脑干的异常揭示了人类孤独症的声音定位和听觉过敏的潜在机制。

5 结语

动物模型在阐明如何导致 ASD 病理生理学的不同机制方面发挥了重要作用。基于流行病学调查,ASD 动物模型大致为药物暴露、母体免疫激活两类。其中 MIA 模型和产前 VPA 暴露模型都一致地概括了孤独症的一般症状和表型。博尔纳病毒、特布他林、米索前列醇、沙利度胺等仅作为环境中异常病原生物的代表模型,为孤独症的一些关键特征的神经病理学和相应的行为异常提供了重要线索。

近年来,日益复杂的临床模型在神经化学、神经生理学和神经影像学的研究下使我们对 ASD 的潜在病因、生物学及神经网络机制有了深入的认识,并对开发治疗新方案和预防策略提供强大支撑。啮齿动物 VPA 模型可能适合检验 ASD 的未来干预措施。肠道微生物群与 MIA 模型中行为之间

的密切关联,对于深入揭示了特定微生物分类群(主要在 PN 28 d)中的 MIA 变化,以描述 ASD 中肠道微生物群谱的明确趋势也至关重要。

目前的药物暴露研究可以为 ASD 的治疗提供有益的治疗策略参考。实验研究中,非诺贝特^[50]、阿戈美拉汀^[51]、米诺环素^[52]均可显著减弱 VPA 前期诱导的小鼠社会互动减少等孤独症谱系障碍样行为。此外,非诺贝特还降低了产前 VPA 诱导的大脑区域氧化应激和炎症,阿戈美拉汀已被证明对 VPA 暴露前动物的行为、神经化学和血脑屏障改变具有改善作用。米诺环素还减弱脑氧化、亚硝化应激、炎症,增加钙含量和血脑屏障通透性。先前研究分析苏拉明(非选择性嘌呤能拮抗剂)对该模型的免疫学机理^[53],另外应用在姜黄素补充改善模型鼠低体重、低脑体积及成熟延迟等方面研究^[54]。在该模型鼠的支持下有学者采用不同剂量的右美沙芬分析改善氧化应激和炎症指标的水平,还包括神经元的损伤评分,以及孤独症模型鼠的前额叶皮层和海马中 pERK1/2 和 NMDA 信号的表达^[55]。Guggulsterone (GST)是一种法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)拮抗剂,通过改变 JAK-STAT/PPAR γ 信号通路异常表达,从而缓解 PPA 诱导的成年大鼠孤独症实验模型的神经化学、形态学、大脑病理和组织学变化,孤独症行为得到改善^[56]。研究证实促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)治疗对 LPS 诱导的孤独症大鼠模型中的 ASD 样症状、学习和记忆过程,神经元损失和神经炎症具有有益作用,通过抑制炎症和神经营养途径发挥作用时存在一些性别特异性^[57]。应用艾塞那肽疗法在 LPS 诱导的孤独症模型中显示出对行为障碍的积极影响,可能是通过抑制炎症和氧化应激以及减少海马胶质病变来发挥其作用。此外,艾塞那肽(Ecenpeptide)也被证明对大脑 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)能和 GABA 能作用有积极影响^[58]。

尽管存在用于诊断 ASD 的各种脑部成像和神经行为评估工具,但其诊断基础依赖于临床行为。实验动物模型对于了解包括 ASD 在内的一部分人类疾病的病因和发病机制都很重要。目前的研究将动物模型分为遗传和非遗传模型,其中非遗传模型未来还需在药物诱导 ASD 模型过程中制定剂量、给药途径、注射次数和妊娠时间等一系列范式共识。希望下一步研究在母体免疫模型中不仅对母

体免疫反应进行全面评估,还要提高可重复性工作,并提供对产前免疫激发影响胎儿发育的机制的深入见解,以探索针对免疫系统的新兴临床和临床前治疗,作为 ASD 药物发现工作的有前途的研究领域。

参 考 文 献(References)

- [1] American Psychiatric Association Committee on Nomenclature and Statistics. Diagnostic and statistical manual of mental disorders [M]. Washington: American Psychiatric Association; 1968.
- [2] Pedersen A, Pettygrove S, Meaney FJ, et al. Prevalence of autism spectrum disorders in Hispanic and non-Hispanic white children [J]. Pediatrics, 2012, 129(3): e629-e635.
- [3] Kim KC, Gonzales EL, Lázaro MT, et al. Clinical and neurobiological relevance of current animal models of autism spectrum disorders [J]. Biomol Ther (Seoul), 2016, 24(3): 207-243.
- [4] Go HS, Kim KC, Choi CS, et al. Prenatal exposure to valproic acid increases the neural progenitor cell pool and induces macrocephaly in rat brain via a mechanism involving the GSK-3 β / β -catenin pathway [J]. Neuropharmacology, 2012, 63(6): 1028-1041.
- [5] Zhang Y, Xiang Z, Jia Y, et al. The Notch signaling pathway inhibitor Dapt alleviates autism-like behavior, autophagy and dendritic spine density abnormalities in a valproic acid-induced animal model of autism [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2019, 94: 109644.
- [6] Zhang R, Zhou J, Ren J, et al. Transcriptional and splicing dysregulation in the prefrontal cortex in valproic acid rat model of autism [J]. Reprod Toxicol, 2018, 77: 53-61.
- [7] Lenart J, Augustyniak J, Lazarewicz JW, et al. Altered expression of glutamatergic and GABAergic genes in the valproic acid-induced rat model of autism: a screening test [J]. Toxicology, 2020, 440: 152500.
- [8] Win-Shwe TT, Nway NC, Imai M, et al. Social behavior, neuroimmune markers and glutamic acid decarboxylase levels in a rat model of valproic acid-induced autism [J]. J Toxicol Sci, 2018, 43(11): 631-643.
- [9] Spisák T, Román V, Papp E, et al. Purkinje cell number-correlated cerebellar circuit anomaly in the valproate model of autism [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 9225.
- [10] Payne M, Mali I, McKinnell ZE, et al. Increased volumes of lobule VI in a valproic acid model of autism are associated with worse set-shifting performance in male Long-Evan rats [J]. Brain Res, 2021, 1765: 147495.
- [11] Arafat EA, Shabaan DA. The possible neuroprotective role of grape seed extract on the histopathological changes of the cerebellar cortex of rats prenatally exposed to Valproic Acid: animal model of autism [J]. Acta Histochem, 2019, 121(7): 841-851.
- [12] Wu J, Dai YC, Lan XY, et al. Postnatal AVP treatments prevent social deficit in adolescence of valproic acid-induced rat autism model [J]. Peptides, 2021, 137: 170493.
- [13] Kim KC, Lee DK, Go HS, et al. Pax6-dependent cortical glutamatergic neuronal differentiation regulates autism-like behavior in prenatally valproic acid-exposed rat offspring [J]. Mol Neurobiol, 2014, 49(1): 512-528.
- [14] Zhao G, Gao J, Liang S, et al. Study of the serum levels of polyunsaturated fatty acids and the expression of related liver metabolic enzymes in a rat valproate-induced autism model [J]. Int J Dev Neurosci, 2015, 44: 14-21.
- [15] Mirza R, Sharma B. A selective peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist benefited propionic acid induced autism-like behavioral phenotypes in rats by attenuation of neuroinflammation and oxidative stress [J]. Chem Biol Interact, 2019, 311: 108758.
- [16] Mirza R, Sharma B. Selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor- α protects propionic acid induced autism-like phenotypes in rats [J]. Life Sci, 2018, 214: 106-117.
- [17] Meeking MM, MacFabe DF, Mephram JR, et al. Propionic acid induced behavioural effects of relevance to autism spectrum disorder evaluated in the hole board test with rats [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2020, 97: 109794.
- [18] Frye RE, Rose S, Chacko J, et al. Modulation of mitochondrial function by the microbiome metabolite propionic acid in autism and control cell lines [J]. Transl Psychiatry, 2016, 6(10): e927.
- [19] Hameete BC, Fernández-Calleja JMS, de Groot MWGDM, et al. The poly (I: C)-induced maternal immune activation model; a systematic review and meta-analysis of cytokine levels in the offspring [J]. Brain Behav Immun Health, 2020, 11: 100192.
- [20] Saghaizadeh A, Ataeinia B, Keynejad K, et al. A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: effects of age, gender, and latitude [J]. J Psychiatr Res, 2019, 115: 90-102.
- [21] Batinić B, Santrač A, Divović B, et al. Lipopolysaccharide exposure during late embryogenesis results in diminished locomotor activity and amphetamine response in females and spatial cognition impairment in males in adult, but not adolescent rat offspring [J]. Behav Brain Res, 2016, 299: 72-80.
- [22] Das I, Estevez MA, Sarkar AA, et al. A multifaceted approach for analyzing complex phenotypic data in rodent models of autism [J]. Mol Autism, 2019, 10: 11.
- [23] Yasumatsu K, Nagao JI, Arita-Morioka KI, et al. Bacterial-induced maternal interleukin-17A pathway promotes autistic-like behaviors in mouse offspring [J]. Exp Anim, 2020, 69(2): 250-260.
- [24] Kirsten TB, Lippi LL, Bevilacqua E, et al. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1 β levels in adult rat offspring: relevance to autism [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82244.

- [25] Okano H, Takashima K, Takahashi Y, et al. Ameliorating effect of continuous alpha-glycosyl isoquercitrin treatment starting from late gestation in a rat autism model induced by postnatal injection of lipopolysaccharides [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 351: 109767.
- [26] Cristino LMF, Chaves Filho A, Custódio CS, et al. Animal model of neonatal immune challenge by lipopolysaccharide: a study of sex influence in behavioral and immune/neurotrophic alterations in juvenile mice [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2022, 10:1-11.
- [27] Kirsten TB, Chaves-Kirsten GP, Chaible LM, et al. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide [J]. *J Neurosci Res*, 2012, 90(10): 1903-1912.
- [28] Fernández de Cossío L, Lacabanne C, Bordeleau M, et al. Lipopolysaccharide-induced maternal immune activation modulates microglial CX3CR1 protein expression and morphological phenotype in the hippocampus and dentate gyrus, resulting in cognitive inflexibility during late adolescence [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 97: 440-454.
- [29] Li Y, Missig G, Finger BC, et al. Maternal and early postnatal immune activation produce dissociable effects on neurotransmission in mPFC-amygdala circuits [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(13): 3358-3372.
- [30] Iveta V, Kristyna M, Viera K, et al. Behavioral alterations and decreased number of parvalbumin-positive interneurons in wistar rats after maternal immune activation by lipopolysaccharide: sex matters [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 3274.
- [31] Foley KA, Ossenkopp KP, Kavaliers M, et al. Pre- and neonatal exposure to lipopolysaccharide or the enteric metabolite, propionic acid, alters development and behavior in adolescent rats in a sexually dimorphic manner [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87072.
- [32] Foley KA, MacFabe DF, Kavaliers M, et al. Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to lipopolysaccharide, and prenatal and postnatal exposure to propionic acid, on acoustic startle response and prepulse inhibition in adolescent rats: relevance to autism spectrum disorders [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 278: 244-256.
- [33] Custódio CS, Mello BSF, Filho AJMC, et al. Neonatal immune challenge with lipopolysaccharide triggers long-lasting sex- and age-related behavioral and immune/neurotrophic alterations in mice: relevance to autism spectrum disorders [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(5): 3775-3788.
- [34] Ratnayake U, Quinn T, LaRosa DA, et al. Prenatal exposure to the viral mimetic poly I: C alters fetal brain cytokine expression and postnatal behaviour [J]. *Dev Neurosci*, 2014, 36(2): 83-94.
- [35] Tartaglione AM, Villani A, Ajmone-Cat MA, et al. Maternal immune activation induces autism-like changes in behavior, neuroinflammatory profile and gut microbiota in mouse offspring of both sexes [J]. *Transl Psychiatry*, 2022, 12(1): 384.
- [36] Ratnayake U, Quinn TA, Castillo-Melendez M, et al. Behaviour and hippocampus-specific changes in spiny mouse neonates after treatment of the mother with the viral-mimetic Poly I: C at mid-pregnancy [J]. *Brain Behav Immun*, 2012, 26(8): 1288-1299.
- [37] Mueller FS, Richetto J, Hayes LN, et al. Influence of poly (I: C) variability on thermoregulation, immune responses and pregnancy outcomes in mouse models of maternal immune activation [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 80: 406-418.
- [38] Kowash H, Potter H, Edye M, et al. Poly (I: C) source, molecular weight and endotoxin contamination affect dam and prenatal outcomes, implications for models of maternal immune activation [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 82: 160-166.
- [39] Honda T. Neuropathogenesis of persistent infection with Borna disease virus [J]. *Uirusu*, 2015, 65(1): 145-154.
- [40] Taieb O, Baleyte JM, Mazet P, et al. Borna disease virus and psychiatry [J]. *Eur Psychiatry*, 2001, 16(1): 3-10.
- [41] Schwemmle M, Heimrich B. Viral interference with neuronal integrity: what can we learn from the Borna disease virus? [J]. *Cell Tissue Res*, 2011, 344(1): 13-16.
- [42] Honda T, Sofuku K, Matsunaga H, et al. Prevalence of antibodies against Borna disease virus proteins in Japanese children with autism spectrum disorder [J]. *Microbiol Immunol*, 2018, 62(7): 473-476.
- [43] Donovan APA, Basson MA. The neuroanatomy of autism-a developmental perspective [J]. *J Anat*, 2017, 230(1): 4-15.
- [44] Bercum FM, Rodgers KM, Benison AM, et al. Maternal stress combined with terbutaline leads to comorbid autistic-like behavior and epilepsy in a rat model [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(48): 15894-15902.
- [45] Bandim JM, Ventura LO, Miller MT, et al. Autism and Möbius sequence: an exploratory study of children in northeastern Brazil [J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2003, 61(2A): 181-185.
- [46] Miller MT, Strömland K, Ventura L, et al. Autism with ophthalmologic malformations: the plot thickens [J]. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 2004, 102: 107-120.
- [47] Koenig CM, Walker CK, Qi L, et al. Lack of evidence for neonatal misoprostol neurodevelopmental toxicity in C57BL6/J mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38911.
- [48] Tsugiyama LE, Ida-Eto M, Ohkawara T, et al. Altered neuronal activity in the auditory brainstem following sound stimulation in thalidomide-induced autism model rats [J]. *Congenit Anom*, 2020, 60(3): 82-86.
- [49] Lenart J, Bratek E, Lazarewicz JW, et al. Changes in the expression of SNAP-25 protein in the brain of juvenile rats in two models of autism [J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70(9): 1313-1320.
- [50] Mirza R, Sharma B. Benefits of Fenofibrate in prenatal valproic acid-induced autism spectrum disorder related phenotype in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2019, 147: 36-46.
- [51] Kumar H, Sharma BM, Sharma B. Benefits of agomelatine in

- behavioral, neurochemical and blood brain barrier alterations in prenatal valproic acid induced autism spectrum disorder [J]. *Neurochem Int*, 2015, 91: 34-45.
- [52] Kumar H, Sharma B. Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats [J]. *Brain Res*, 2016, 1630: 83-97.
- [53] Hirsch MM, Deckmann I, Santos-Terra J, et al. Effects of single-dose antipurinergic therapy on behavioral and molecular alterations in the valproic acid-induced animal model of autism [J]. *Neuropharmacology*, 2020, 167: 107930.
- [54] Al-Askar M, Bhat RS, Selim M, et al. Postnatal treatment using curcumin supplements to amend the damage in VPA-induced rodent models of autism [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 259.
- [55] Singla R, Mishra A, Joshi R, et al. Inhibition of the ERK1/2 phosphorylation by dextromethorphan protects against core autistic symptoms in VPA induced autistic rats; *In silico* and *in vivo* drug repurposing study [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(10): 1749-1767.
- [56] Khera R, Mehan S, Bhalla S, et al. Guggulsterone mediated JAK/STAT and PPAR-Gamma modulation prevents neurobehavioral and neurochemical abnormalities in propionic acid-induced experimental model of autism [J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 889.
- [57] Solmaz V, Erdoğan MA, Alnak A, et al. Erythropoietin shows gender dependent positive effects on social deficits, learning/memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the lipopolysaccharide induced rat model of autism [J]. *Neuropeptides*, 2020, 83: 102073.
- [58] Solmaz V, Tekatas A, Erdoğan MA, et al. Exenatide, a GLP-1 analog, has healing effects on LPS-induced autism model: inflammation, oxidative stress, gliosis, cerebral GABA, and serotonin interactions [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2020, 80(7): 601-612.
- [收稿日期] 2022-05-13

一例罕见大熊猫癌症的报道:胰腺导管腺癌(PDAC)

大熊猫为我国特有物种,被誉为“中国国宝”。大熊猫对现生环境适应能力不佳是其濒危的重要内在因素之一,其中,疾病死亡也可能引起大熊猫数量减少。胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)属于胰腺癌中较为常见的一种组织分型,恶性程度极高。在人类中,PDAC 的发生率约占胰腺癌的90%以上,但 PDAC 在野生动物中并不常见。本文介绍了一例大熊猫 PDAC 病理诊断案例,以期为今后野生动物肿瘤的诊断提供参考意见。

本病例,雌性,死亡时 32 岁。对其进行组织病理学观察,胰腺组织内可见大量泡沫样管状腺癌结构;腺上皮呈透明样,细胞核大小差异明显;腺管结构不规则,呈乳头状生长,乳头表面为单层上皮细胞;部分胰腺导管上皮被高柱状黏液细胞取代,黏液细胞呈假复层样柱状上皮结构。Masson 染色可以更清晰地观察到肿瘤组织中细胞核大小差异明显、核异型性、核分裂像,以及杂乱、不规则的腺管结构。据此初步判定该胰腺为高分化或中分化导管腺癌,伴随胰腺上皮内肿瘤的癌前病变。为进一步进行胰腺导管腺癌与慢性胰腺炎的鉴别诊断,本研究进行了肿瘤特异性标记物 CK7、CK19 免疫组化染色,结果显示胰腺组织 CK7、CK19 呈阳性表达,据此判定该大熊猫患 PDAC。

近年来,关于动物原发性 PDAC 的报道较为少见,且报道以胰腺外分泌肿瘤为主,患病动物多见于犬、牛等。野生动物未见相关报道,这可能与野生动物 PDAC 罕见有关。现阶段关于大熊猫疾病的病理报告也很少见,关于大熊猫肿瘤的文章则更少,大熊猫肿瘤的患病风险至今仍是未知数,导致大熊猫肿瘤发生的因素也不清楚,这方面的工作应当进一步推进。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 5(6):582-586; <https://doi.org/10.1002/ame2.12269>)