

张艺霖,杜蔡瑶,郭佩雯,等. CB1R 敲除对小鼠 ASD 样行为及突触可塑性的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 1-10.

Zhang YL, Du CY, Guo PW, et al. Effect of cannabinoid receptor 1 knockout on autism spectrum disorder-like behavior and synaptic plasticity in mice [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 1-10.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.001

CB1R 敲除对小鼠 ASD 样行为及突触可塑性的影响

张艺霖,杜蔡瑶,郭佩雯,程泽瑜,高雅,邹明扬,孙彩虹*

(哈尔滨医科大学公共卫生学院儿少卫生与妇幼保健学教研室,哈尔滨 150081)

【摘要】 目的 探究大麻素受体 1(cannabinoid receptor 1, CB1R)对突触可塑性的作用,以及其对小鼠孤独症谱系障碍(autism spectrum disorders, ASD)样行为的影响。**方法** 以 CB1R 敲除(knockout, KO)小鼠和丙戊酸钠(valproic acid, VPA)诱导的 ASD 模型鼠(VPA 小鼠)为研究对象。通过行为学实验评估 CB1R 对小鼠 ASD 样行为的影响;通过微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2, MAP2)染色实验检测神经元结构完整性及树突密度,通过蛋白免疫印迹实验检测突触相关蛋白的表达,以评估 CB1R 对突触可塑性的影响。**结果** 行为学结果显示,VPA 小鼠存在明显的 ASD 样行为;CB1R^{-/-}小鼠在旷场中心区域停留时间比值显著降低($P<0.0001$),埋珠个数及自梳时间显著增加($P<0.01$),与陌生鼠 2 社交时间及探索陌生物体时间显著减少($P<0.001$),探索旧物体时间增加($P<0.05$);CB1R^{+/-}小鼠在旷场中心区域停留时间比值明显降低($P<0.001$),埋珠个数及自梳时间明显增加($P<0.05$)。突触可塑性检测结果显示,VPA 小鼠存在明显的突触可塑性损伤;CB1R^{-/-}小鼠和 CB1R^{+/-}小鼠海马 MAP2 阳性神经元密度显著降低($P<0.05$),突触蛋白 1(synapsin 1, SYN1)表达水平显著升高($P<0.05$)。**结论** CB1R 敲除会导致小鼠出现焦虑和重复刻板行为、社交及认知障碍等 ASD 样行为,以及神经元损伤、树突发育障碍及突触蛋白表达紊乱,提示 CB1R 敲除导致突触可塑性异常是 ASD 样行为发生的病理机制。

【关键词】 孤独症谱系障碍;大麻素受体 1;突触可塑性;ASD 样行为

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0001-10

Effect of cannabinoid receptor 1 knockout on autism spectrum disorder-like behavior and synaptic plasticity in mice

ZHANG Yilin, DU Caiyao, GUO Peiwen, CHENG Zeyu, GAO Ya, ZOU Mingyang, SUN Caihong*

(Department of Child and Adolescent Health, Public Health College, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

【Abstract】 Objective To investigate the regulation of synaptic plasticity by cannabinoid receptor 1 (CB1R) and its effects on autism spectrum disorder (ASD)-like behavior. **Methods** CB1R-knockout (KO) mice and valproic acid (VPA)-induced ASD model mice (VPA mice) were used as study subjects. Behavioral experiments were used to assess the effects of CB1R on ASD-like behavior in mice, neuronal structural integrity and dendritic density were detected by microtubule-associated protein 2 (MAP2) staining experiments, and the expression of

【基金项目】 国家自然科学基金(82173535);黑龙江自然科学基金(LH2023H017)。

【作者简介】 张艺霖(1999—),女,在读硕士研究生,研究方向:儿童发育行为。E-mail:zy115025406831@163.com

【通信作者】 孙彩虹(1977—),女,博士,博士生导师,研究方向:儿童发育行为。E-mail:suncaihong2003@163.com

synapse-associated proteins was detected by Western blot, to assess the effects of CB1R on synaptic plasticity. **Results** Behavioral result showed that VPA mice demonstrated significant ASD-like behavior, while CB1R^{-/-} mice spent a significantly smaller proportion of residence time in the central region of the open field ($P < 0.0001$), showed significant increases in the number of marbles buried and self-grooming time ($P < 0.01$), significantly less time spent socializing with unfamiliar mice 2 and exploring unfamiliar objects ($P < 0.001$), and significantly more time exploring old objects ($P < 0.05$). The relative dwelling time was significantly reduced in CB1R^{+/-} mice ($P < 0.001$), and the number of marbles buried and self-grooming time were significantly increased ($P < 0.05$). Synaptic plasticity assays revealed significant synaptic plasticity impairment in VPA mice. Hippocampal MAP2-positive neuron densities were significantly reduced in CB1R^{-/-} and CB1R^{+/-} mice, and expression levels of synapsin-1 were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** CB1R KO leads to ASD-like behavior such as anxiety and repetitive stereotyped behavior, social and cognitive impairments, as well as neuronal damage, dendritic dysplasia and disrupted synaptic protein expression in mice, suggesting that CB1R is involved in regulating synaptic plasticity as a pathological mechanism for the development of ASD-like behavior.

【**Keywords**】 autism spectrum disorder; CB1R; synaptic plasticity; ASD-like behavior

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorders, ASD) 是起病于婴幼儿早期的一种严重的神经发育障碍性疾病,其核心症状主要表现为社交交流障碍、狭隘兴趣及重复刻板行为。除此之外,部分患儿还伴有不同程度的认知障碍^[1]。目前,ASD 的发病机制不明,但已有研究证明神经系统突触可塑性异常与 ASD 发病的生理机制密切相关^[2-5]。大麻素受体 1 (cannabinoid receptor 1, CB1R) 为中枢神经系统中表达最丰富的 G 蛋白偶联受体^[6],主要在突触前末端高度集中,通过抑制突触前神经递质的释放,进而影响突触可塑性^[7-9]。此外,研究发现 CB1R 高度富集在海马、大脑皮层、小脑和基底神经节^[10],且这些大脑区域被认为与 ASD 的核心症状紧密相关^[11],但目前仍缺乏 CB1R 参与 ASD 发生发展的直接证据。因此,本研究以 CB1R 敲除 (knockout, KO) 小鼠和丙戊酸钠 (valproic acid, VPA) 诱导的 ASD 模型鼠 (VPA 小鼠) 为研究对象,探讨 CB1R 敲除对突触可塑性及 ASD 表型特征的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

30 只 SPF 级 C57BL/6J 小鼠购置于北京维通利华实验动物有限公司 [SCXK (京) 2021-0006], 20 只以 C57BL/6J 为背景的 SPF 级 CB1R 基因敲除小鼠 (CB1R KO) 购置于江苏集萃药康生物科技有限公司 [SCXK (苏) 2023-0009], 以上小鼠均

为 6 周龄,体质量为 (20±5) g,饲养于哈尔滨医科大学公共卫生学院动物实验中心 [SYXK (黑) 2022-016], 保持温度 (22±2) °C, 湿度 (50±10) %, 12 h 光照/12 h 黑暗循环,可自由摄食和饮水。本研究使用的实验动物均为雄性小鼠,实验经哈尔滨医科大学伦理委员会批准 (HMUIRB20200007)。本实验全过程遵守动物实验 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

BCA 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, P0012); 抗荧光淬灭封片液 (上海碧云天生物技术有限公司, P0126); 丙戊酸钠盐 (美国 Sigma 公司, 99-67-2); MAP2 抗体 (英国 Abcam 公司, ab183830); Gephyrin 抗体 (德国 Synaptic System 公司, 147111); 突触蛋白 1 (Synapsin 1, SYN1) 抗体 (德国 Synaptic System 公司, 106011); Vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) 抗体 (德国 Synaptic System 公司, 135303); Postsynaptic Density Protein 95 (PSD95) 抗体 (武汉 proteintech 公司, 20665-1-AP); Vesicular GABA transporter (VGAT) 抗体 (武汉 proteintech 公司, 14471-1-AP) GADPH 抗体 (武汉 proteintech 公司, 60004-1-Ig)。

旷场实验系统、三箱实验系统、新物体识别系统 (瑞沃德生命科技有限公司, SMART 3.0); Morris 水迷宫实验系统 (成都泰盟科技有限公司, WMT-100); 冰冻切片机 (德国 Leica 公司, CM1950); 荧光显微镜 (德国 ZEISS 公司, HAL 100)。

1.3 实验方法

1.3.1 ASD 模型鼠的建立

成年 C57BL/6J 小鼠在夜间按照雌性和雄性 1:1 的比例合笼。第 2 天早晨检查雌鼠是否有阴栓,有阴栓即为孕鼠,并记该天为胚胎 0.5 d。孕鼠在怀孕 12.5 d 时腹腔注射 600 mg/kg VPA,产下的仔鼠即为 ASD 模型鼠(VPA 小鼠)。

1.3.2 CB1R KO 小鼠的基因型鉴定

本研究选择 CB1R 敲除小鼠(CB1R^{-/-}与 CB1R^{+/-})为研究对象,旨在探讨 CB1R 完全缺失和部分缺失对小鼠 ASD 样行为和突触可塑性影响的差异。CB1R KO 小鼠的基因型鉴定方法如下:剪取出生后 5~7 d 鼠崽约 2 mm 脚趾。使用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取小鼠 DNA,步骤按照说明书进行。用特定的 PCR 体系对小鼠 DNA 进行扩增,最后配制 2% 琼脂糖凝胶并进行电泳,鉴定结果图 1 所示,凝胶条带仅显示 336 bp 条带的样本基因型为纯合子,即 CB1R^{-/-}小鼠;扩增条带仅显示 317 bp 条带的样本基因型为野生型,即 WT 小鼠;当扩增条带为两条,样本基因型为杂合子,即 CB1R^{+/-}小鼠。本研究中 CB1R^{-/-}阳性率为 23.5%。

1.3.3 行为学检测

(1)旷场实验,检测小鼠焦虑样行为。测试箱为顶部开口的 450 mm×450 mm×400 mm 黑灰色箱子,场地分为中心和外周区域。使用

SMART-OF 旷场实验系统记录实验鼠 10 min 的活动轨迹。

(2)自梳实验,评估小鼠的刻板行为。记录 10 min 内小鼠在箱子(320 mm×202 mm×135 mm)里梳理自身毛发的时间。

(3)埋珠实验,评估小鼠的重复刻板行为。在厚 4 cm 的垫料上以 5×3 的方式放置 15 个一致的大理石珠,记录实验鼠 10 min 内将 2/3 体积大理石珠子掩埋入垫料的个数。

(4)三箱实验,主要检测实验鼠社交行为。实验分为两个阶段。第一阶段:社交能力检测。记录实验鼠 10 min 内停留在装有陌生鼠 1 的箱室和装有空笼的箱室所花费的时间。第二阶段:社交偏好检测。将陌生鼠 1 放置于第一阶段空笼的位置,空笼中放入陌生鼠 2,比较实验鼠 10 min 内停留在装有陌生鼠 2 的箱室和装有陌生鼠 1 的箱室所花费的时间。

(5)新物体识别实验,用于评估小鼠的短期视觉识别记忆能力。实验包含训练和测试两个阶段。在训练阶段,将小鼠放在包含两个相同物体(A1+A2)的场地中探索 10 min,1 h 后进入测试阶段,用另一个新的物体(B)替换原来一个位置的物体(A1),并测试 5 min。记录并分析小鼠嗅闻新旧物体的时间。

(6)Morris 水迷宫,用于评估小鼠长期空间记忆能力。实验分为定位巡航实验和空间探索实

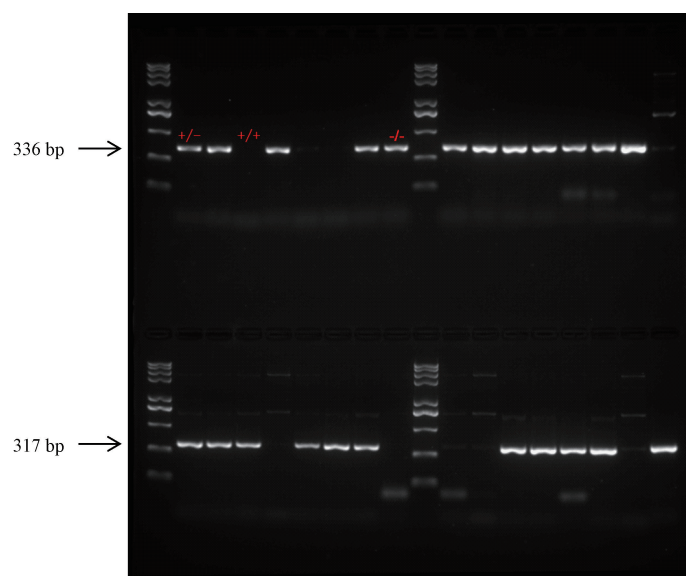


图 1 CB1R 敲除小鼠基因型鉴定的凝胶电泳结果

Figure 1 Gel electrophoresis of CB1R KO mouse genotype identification

验两个阶段,过程如下:定位巡航实验:在前 4 d 进行定位巡航实验,每天从不同象限将测试鼠放入场地,每天上下午各 1 次。记录 60 s 内实验鼠从入水到达平台所用的时间,记为逃逸潜伏期。若测试鼠在 60 s 内未找到平台,则将其引导至平台上记忆 15 s。空间探索实验:在第 5 天上午进行空间探索实验,实验时将平台撤出。待测鼠从定位巡航实验第 1 天放置的象限进入圆池,记录小鼠在 60 s 内通过原始平台的圆形区域的次数作为空间记忆的指标。

1.3.4 脑组织样本的采集与冰冻切片的制备

在行为学后采集小鼠脑组织样本。待实验鼠完全麻醉后断头,冰上分离海马组织, -80°C 保存。制备脑组织冰冻切片用 PBS 缓冲液及 4% 多聚甲醛灌注,取出脑组织后放入 4% 多聚甲醛中过夜固定,之后放入蔗糖溶液中梯度脱水,待结束后置于 OCT 包埋剂中,存入 -80°C 保存。切片时使用冰冻切片机,以冠状面获取海马及皮层区组织切片,切片厚度 $8\text{ }\mu\text{m}$,丙酮固定 20 min 后放入 -80°C 保存。

1.3.5 免疫荧光染色

免疫荧光染色检测 MAP2 的表达。稀释一抗 (1:100) 以覆盖整个脑组织, 4°C 孵育过夜;稀释二抗 (Alexa fluor 594-抗兔),比例为 1:1000,室温避光孵育 1 h;最后用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜观察并拍照 (20 $\times$),并使用 Image J Fiji 1.2 软件分析数据,记录阳性神经元在海马 CA1 区和皮层区所占的面积。

1.3.6 蛋白免疫印迹实验

脑组织蛋白提取按照说明书进行,BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,将各蛋白样品 (10 μL) 加至加样孔;以 200 V 电压电泳,然后 250 mA 恒流转膜 1 h,使用 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1 h;按照说明书稀释一抗, VGAT (1:800)、PSD95 (1:4000)、VGLUT1 (1:2000)、Gephyrin (1:2000)、SYN1 (1:5000)、GAPDH (1:50 000) 4°C 冰箱摇床过夜孵育;TBST 缓冲液漂洗后,室温孵育二抗 1 h,利用超敏 ECL 化学发光显色液和凝胶成像系统显影。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析。组

间比较使用单因素方差分析, Morris 水迷宫实验运用双因素方差分析。差异显著时,则采用 Tukey 方法进行组间事后比较。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义,所有的数据以平均数 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x}\pm s\bar{x}$) 的形式呈现。

2 结果

2.1 CB1R 敲除对小鼠 ASD 样行为的影响

2.1.1 对小鼠焦虑及重复刻板行为的影响

在旷场实验中, VPA 小鼠活动距离显著多于 WT 小鼠 ($P<0.001$),且在中心区域停留时间百分比显著低于 WT 小鼠 ($P<0.05$),表现出明显的焦虑行为; CB1R^{+/−} 和 CB1R^{−/−} 小鼠在中心区域停留时间百分比也显著低于 WT 小鼠 ($P<0.001$)。同时,与 VPA 小鼠相比差异不具有统计学意义 ($P>0.05$) (图 2A~2C)。

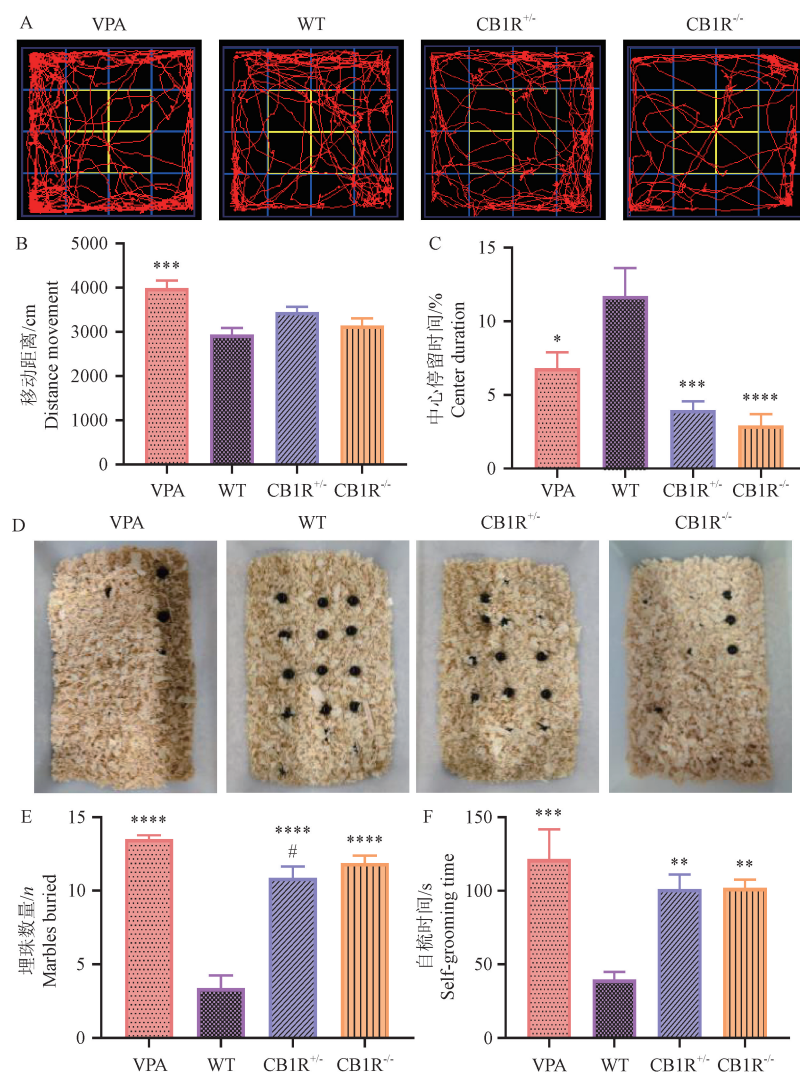
VPA 小鼠埋珠数量与自梳时间均明显高于 WT 小鼠 ($P<0.001$, 图 2D~2F),其重复刻板行为明显。 CB1R^{+/−} 和 CB1R^{−/−} 小鼠埋珠数量显著多于 WT 小鼠 ($P<0.0001$),其中 CB1R^{+/−} 小鼠埋珠数量显著低于 VPA 小鼠 ($P<0.05$, 图 2D); CB1R^{+/−} 和 CB1R^{−/−} 小鼠自梳时间显著高于 WT 小鼠 ($P<0.01$), CB1R^{+/−} 和 CB1R^{−/−} 小鼠自梳时间与 VPA 小鼠相比差异不具有统计学意义 ($P>0.05$) (图 2F)。

2.1.2 对小鼠社交功能的影响

社交能力测试结果 (图 3A~3B) 显示,与空笼柱相比, WT 小鼠更偏好探索陌生鼠 1 ($P<0.001$),其社交功能正常; VPA 小鼠探索空笼柱和陌生鼠 1 的时间无差异 ($P>0.05$),表现出明显的社交功能障碍; CB1R^{+/−} 和 CB1R^{−/−} 小鼠探索空笼柱和陌生鼠 1 的时间无差异 ($P>0.05$),出现类似于 VPA 小鼠的社交功能障碍。社交偏好测试结果 (图 3C~3D) 所示, WT 小鼠探索陌生鼠 2 的时间却显著长于探索陌生鼠 1 的时间 ($P<0.05$),其社交偏好正常; VPA 和 CB1R^{+/−} 小鼠探索陌生鼠 1 和陌生鼠 2 的时间差异不具有统计学意义 ($P>0.05$); CB1R^{−/−} 小鼠探索陌生鼠 2 的时间显著短于探索陌生鼠 1 的时间 ($P<0.001$)。

2.1.3 对小鼠认知记忆的影响

在新物体识别实验中, WT 小鼠更喜欢探索未知的新物体 ($P<0.01$),其短期认知功能正常;



注: A: 小鼠运动轨迹的代表性图像; B: 小鼠移动距离; C: 小鼠在中心区域时间百分比; D: 小鼠埋珠代表性图像; E: 小鼠埋珠个数; F: 小鼠自梳时间。与 WT 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与 VPA 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 2 VPA 小鼠和 CB1R KO 小鼠的焦虑及重复刻板行为 ($n=8$)

Note. A, Representative image of the trajectory of the mice. B, Distance travelled by the mice. C, Percentage of time that the mice were in the center area. D, Representative images of mice marbles burying test. E, Number of marbles buried in mice. F, Self-grooming time in mice. Compared with WT group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared with VPA group, # $P < 0.05$.

Figure 2 Anxiety and repetitive stereotyped behaviors in VPA mice and CB1R KO mice ($n=8$)

VPA 和 CB1R^{-/-} 小鼠表现出更喜欢探索熟知的旧物体 ($P < 0.05$); CB1R^{+/-} 小鼠在探索新旧物体时间百分比上不存在统计学意义 ($P > 0.05$)。具体见图 4A。在 Morris 水迷宫实验中, 各组小鼠间训练潜伏期和测试中穿越平台次数差异均不具有统计学意义 ($P > 0.05$, 图 4B~4D)。

2.2 CB1R 敲除对小鼠突触可塑性的影响

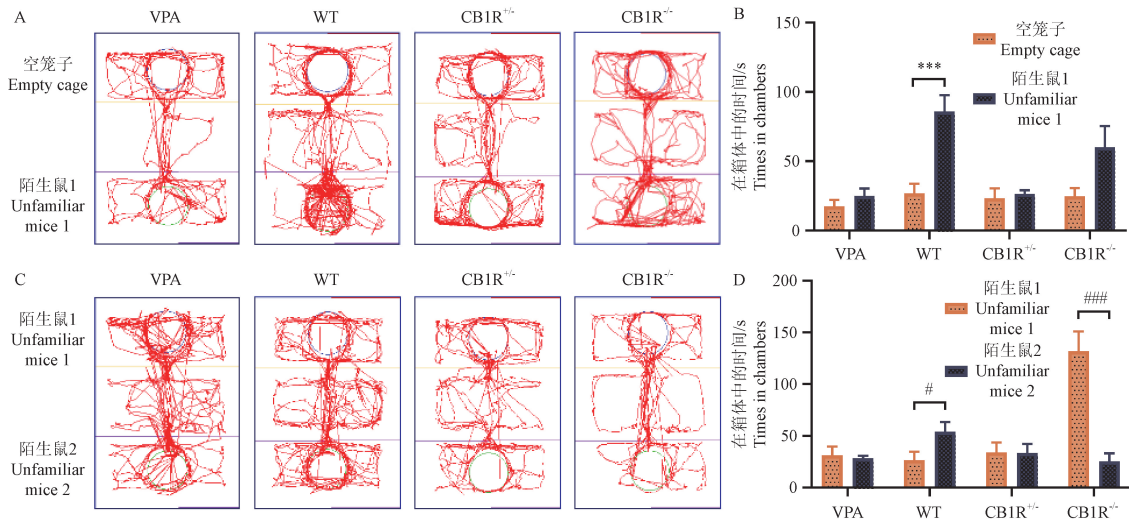
2.2.1 对小鼠神经元突触发育的影响

与 WT 小鼠相比, VPA、CB1R^{+/-} 和 CB1R^{-/-} 小鼠海马 CA1 区和皮层神经元树突出现不同程度

的曲折和破碎 (图 5A), 且 MAP2 阳性面积比均显著降低 ($P < 0.05$); 与 VPA 小鼠相比, CB1R^{+/-}、CB1R^{-/-} 小鼠 MAP2 阳性面积比差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$) (图 5B~5C)。

2.2.2 对小鼠突触相关蛋白表达的影响

如图 6 所示, VPA 小鼠 PSD95 的表达水平显著高于 WT 小鼠 ($P < 0.05$)。CB1R^{+/-} 和 CB1R^{-/-} 小鼠 SYN1 的表达水平显著高于 WT 小鼠 ($P < 0.05$); CB1R^{+/-} 和 CB1R^{-/-} 小鼠 PSD95 的表达水平显著低于 VPA 小鼠 ($P < 0.01$), 其余各项指标

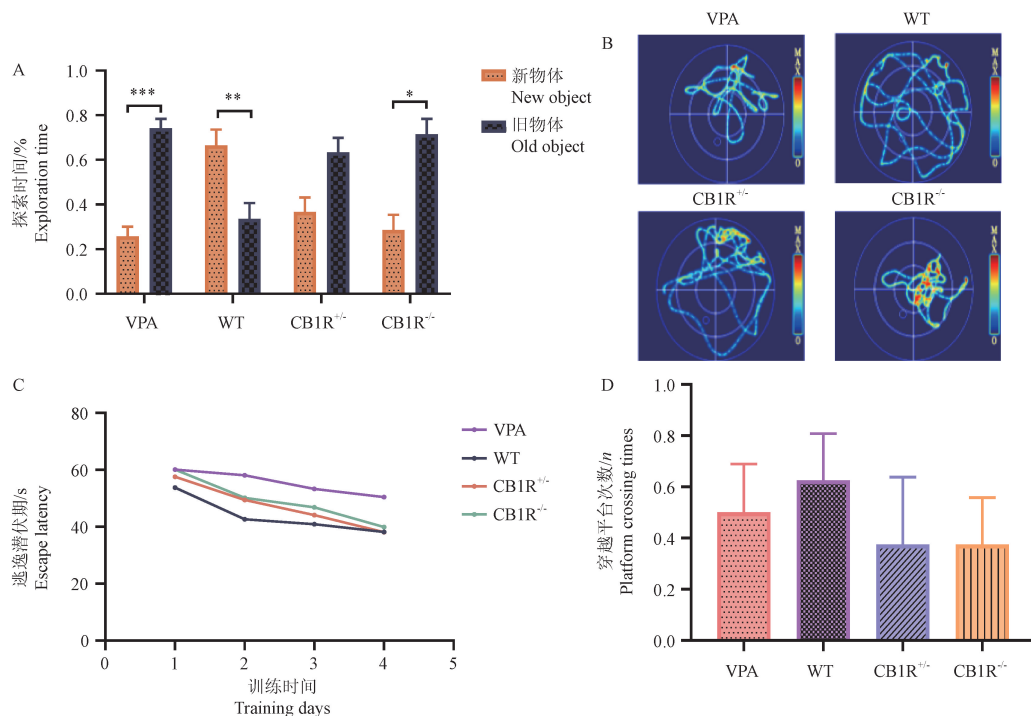


注:A:社交能力测试代表图像;B:社交能力测试中的时间占比;C:社交偏好测试的代表图;D:社交偏好测试中的时间占比。与陌生鼠1相比,*** $P<0.001$;与陌生鼠2相比,# $P<0.05$,### $P<0.001$ 。

图3 VPA小鼠和CB1R KO小鼠的三箱实验($n=8$)

Note. A, Representative image of the sociability test. B, Proportion of time in sociability test. C, Representative image of the social preference test. D, Proportion of time in social preference test. Compared with the unfamiliar mice 1, *** $P<0.001$. Compared with the unfamiliar mice 2, # $P<0.05$, ### $P<0.001$.

Figure 3 Three chamber test in VPA mice and CB1R KO mice ($n=8$)

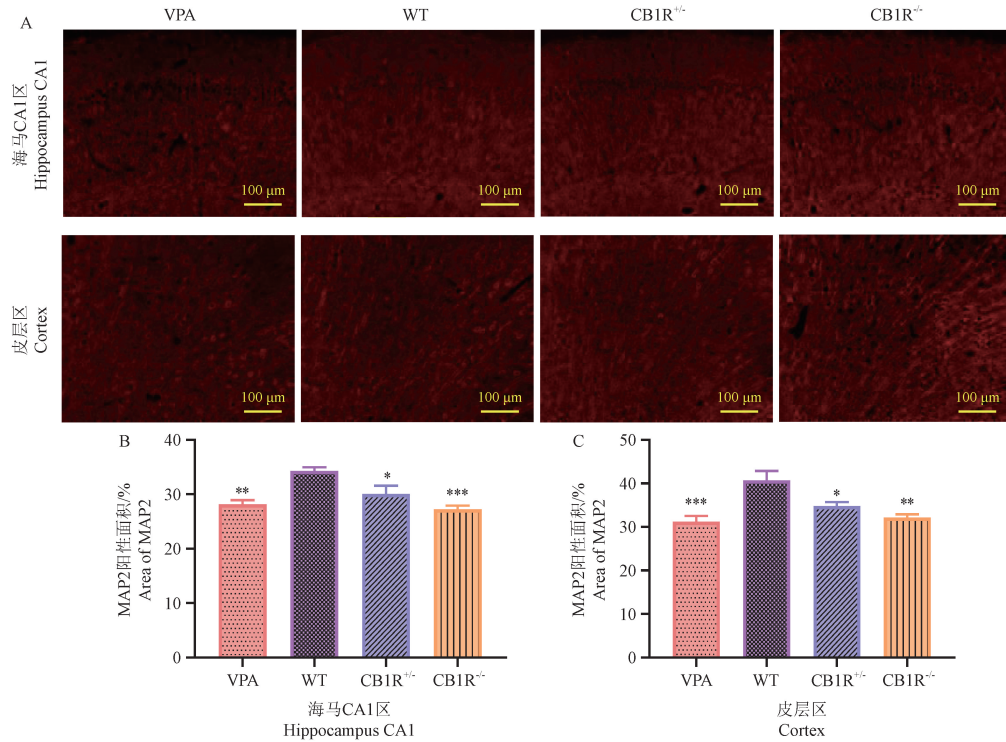


注:A:小鼠探索新旧物体的时间百分比;B:各组小鼠穿越平台追踪的代表性图像;C:各组小鼠到达平台的时间;D:各组小鼠的平台穿梭次数。与探索旧物体时间相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图4 VPA小鼠和CB1R KO小鼠的新物体识别及Morris水迷宫实验($n=8$)

Note. A, Percentage of time spent exploring new and old objects. B, Representative images of tracking across platforms in each group of mice. C, Latency time of mice to reach the platform. D, Number of platform shuttles in each group of mice. Compared with exploring old object, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 4 New object recognition and Morris water maze experiment in VPA mice and CB1R KO mice ($n=8$)

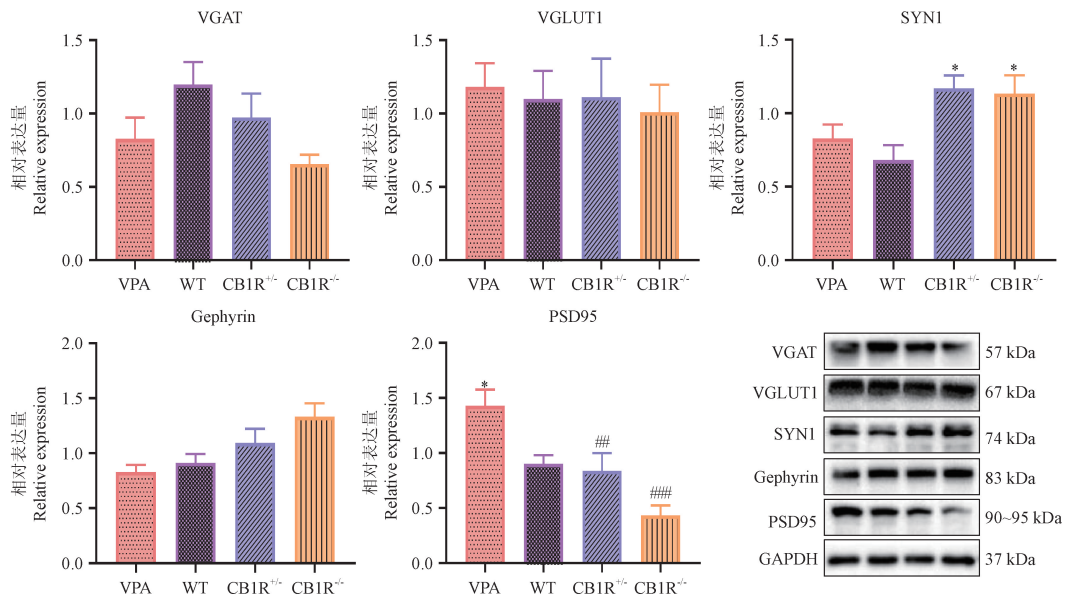


注:A:各组小鼠海马CA1区和皮层神经元MAP2的代表性图像;B:各组小鼠海马CA1区MAP2阳性面积占比;C:各组小鼠皮层区MAP2阳性面积占比。与WT组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图5 VPA小鼠和CB1R KO小鼠海马CA1区和皮层神经元中MAP2的表达($n=6$)

Note. A, Representative images of MAP2 in hippocampal CA1 area and cortical neurons in each group of mice. B, Percentage of MAP2-positive area in hippocampal CA1 area in each group of mice. C, Percentage of MAP2-positive area in cortical area in each group of mice. Compared with WT group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 5 MAP2 expression in hippocampal CA1 region and cortical neurons of VPA mice and CB1R KO mice($n=6$)



注:与WT组相比,* $P<0.05$;与VPA组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

图6 VPA小鼠和CB1R KO小鼠海马中突触相关蛋白的表达水平($n=5$)

Note. Compared with WT group, * $P<0.05$. Compared with VPA group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 6 Expression levels of synapse-related proteins in the hippocampus of VPA mice and CB1R KO mice($n=5$)

在各组小鼠间两两比较差异不具有统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

ASD 是起病于婴幼儿早期的一种严重的神经发育障碍性疾病,潜在的病因机制仍不明确^[12]。研究表明突触可塑性异常可能是 ASD 发病的机制之一。CB1R 作为参与神经发生、细胞分化、神经迁移和轴突延伸的信使^[13-14],在维持突触的动态稳定中发挥重要作用。

ASD 核心症状为社交交流障碍、重复刻板行为,此外,有时也会伴有焦虑、过度活动和认知障碍^[12]。本研究诱导的 VPA 小鼠表现出明显的 ASD 样行为;CB1R^{-/-}小鼠也表现相似的 ASD 样行为,包括焦虑、重复刻板行为,社交能力和社交偏好缺陷以及短期视觉识别记忆受损。与以往研究结果一致,研究指出 CB1R^{-/-}小鼠在高架十字迷宫和明暗箱实验中表现出明显的焦虑行为^[9,15],同时,FANG 等^[16]发现激活 CB1R 可以增加急性应激大鼠在高架十字迷宫开放臂中的时间,对其焦虑有一定改善作用。CB1R 表达量在个体社会行为形成时期达到峰值^[17-18],FYKE 等^[19]通过测量超声交流发现 CB1R 敲除导致小鼠社交功能受损,在三箱实验和直接社交互动测验中也表现出了明显的社交兴趣及探索缺陷。CB1R 还参与调控认知及记忆功能,SARAVIA 等^[20]发现 CB1R^{-/-}小鼠表现出注意力及记忆功能受损;对小鼠施用 CB1R 激动剂能提升其在水迷宫中的空间记忆能力^[21]。此外,本研究表明 CB1R^{+/-}小鼠也表现出部分样的 ASD 行为,包括焦虑、重复刻板行为及社交功能缺陷,但与 VPA 小鼠相比,CB1R^{+/-}小鼠的重复刻板行为表现较轻,也并未出现短期记忆缺陷,这可能是由于保留了部分 CB1R 功能,降低了其 ASD 样行为的损伤程度。综上所述,以上研究均提示 CB1R 参与调控小鼠的 ASD 样行为。

MAP2 作为神经元树突内的主要骨架调节因子,对树突的发育形成起关键性的作用^[22-23]。已发现 ASD 患者额叶新皮层树突中 MAP2 表达缺失^[24],ASD 模型鼠中 MAP2 蛋白表达显著降低^[25]。本研究同样发现 VPA 小鼠海马 CA1 区和大脑皮层 MAP2 阳性面积显著降低,树突结构出

现明显曲折破碎,同时,CB1R KO 小鼠也表现出与 ASD 模型鼠相似的神经元树突结构受损。通过检测突触相关蛋白的表达水平,还发现 VPA 小鼠 PSD95 表达异常,CB1R^{+/-}和 CB1R^{-/-}小鼠 SYN1 表达异常。SYN1 作为突触囊泡膜的主要成分,与神经递质释放和突触发生的调节有关^[26];PSD95 是突触后膜的关键组成部分,在谷氨酸能传递、突触可塑性和树突棘形态发生中发挥了重要作用^[27],其稳定表达共同调节神经系统突触可塑性。人群和动物研究均表明 PSD95 与 SYN1 的失调是 ASD 的神经病理学基础之一^[27-28]。REXRODE 等^[29]研究发现 ASD 儿童海马组织中 SYN1 和 PSD95 蛋白表达降低,进一步导致海马体积改变引起社会记忆功能障碍;在动物研究中,LIU 等^[30]发现 VPA 大鼠前额叶皮层中 SYN1 表达增加,且其长时程增强作用受损,IJIMA 等^[31]认为 VPA 小鼠兴奋性/抑制性平衡受损是由谷氨酸能突触中 PSD95 数量增加导致的。CB1R 定位于突触前膜,研究表明 CB1R 可通过抑制 cAMP-蛋白激酶 A(PKA) 信号通路,减少 SYN1 的磷酸化水平,从而抑制突触囊泡的释放,此外,CB1R 可以通过调节 CaMKII 等激酶活性进一步作用于突触后影响 PSD95 的表达^[32]。有研究证实了激活 CB1R 可以使慢性偏头痛大鼠模型中异常升高的 PSD95 和其他突触信息素恢复至正常水平^[33]。上述研究说明 ASD 中存在树突发育异常及突触蛋白表达异常,同时,CB1R 的敲除导致小鼠也呈现出相似的突触损伤。

本研究以 CB1R KO 小鼠与 VPA 小鼠作为研究对象,初步发现 CB1R KO 小鼠出现 ASD 样行为,且突触可塑性异常,提示 CB1R 表达异常可通过影响突触的结构和功能导致 ASD 样行为的发生。但本研究使用 CB1R KO 小鼠,不能排除外周神经系统中 CB1R 的作用对研究结果的干扰,后期将采用脑靶向干预或神经元条件敲除鼠开展深入研究;同时,本研究仅观察到各组小鼠树突形态与突触蛋白水平表达的变化,未深入探究 CB1R 影响突触可塑性的潜在机制。未来将利用蛋白质组学分析及电生理技术进一步探讨 CB1R 调控突触可塑性的潜在机制。

综上所述,CB1R 敲除会导致小鼠表现出 ASD 样行为,同时伴有神经元损伤、树突发育障

碍及突触蛋白表达紊乱,提示 CB1R 敲除导致的突触可塑性异常可能是 ASD 样行为发生的病理机制,为 ASD 病因学研究提供新的方向和依据。

参考文献:

- [1] MAENNER M J, SHAW K A, BAKIAN A V, et al. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2018 [J]. *MMWR Surveill Summ*, 2021, 70(11): 1–16.
- [2] ALSAQATI M, HEINE V M, HARWOOD A J. Pharmacological intervention to restore connectivity deficits of neuronal networks derived from ASD patient iPSC with a TSC2 mutation [J]. *Mol Autism*, 2020, 11(1): 80.
- [3] CHENG N, ALSHAMMARI F, HUGHES E, et al. Dendritic overgrowth and elevated ERK signaling during neonatal development in a mouse model of autism [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179409.
- [4] QI C, CHEN A, MAO H, et al. Excitatory and inhibitory synaptic imbalance caused by brain-derived neurotrophic factor deficits during development in a valproic acid mouse model of autism [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 860275.
- [5] GAŚSOWSKA-DOBROWOLSKA M, CIEŚLIK M, CZAPSKI G A, et al. Prenatal exposure to valproic acid affects microglia and synaptic ultrastructure in a brain-region-specific manner in young-adult male rats; relevance to autism spectrum disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3576.
- [6] FLETCHER-JONES A, HILDICK K L, EVANS A J, et al. Protein interactors and trafficking pathways that regulate the cannabinoid type 1 receptor (CB1R) [J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 108.
- [7] MORENO E, CAVIC M, KRIVOKUCA A, et al. The endocannabinoid system as a target in cancer diseases: are we there yet? [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 339.
- [8] KASATKINA L A, RITTCHEN S, STURM E M. Neuroprotective and immunomodulatory action of the endocannabinoid system under neuroinflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5431.
- [9] SORIANO D, BRUSCO A, CALTANA L. Further evidence of anxiety-and depression-like behavior for total genetic ablation of cannabinoid receptor type 1 [J]. *Behav Brain Res*, 2021, 400: 113007.
- [10] ZOU S, KUMAR U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 833.
- [11] ECKER C, BOOKHEIMER S Y, MURPHY D G M. Neuroimaging in autism spectrum disorder: brain structure and function across the lifespan [J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(11): 1121–1134.
- [12] PIETROPAOLO S, BELLOCCHIO L, BOUZÓN-ARNÁIZ I, et al. The role of the endocannabinoid system in autism spectrum disorders: Evidence from mouse studies [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2020, 173: 183–208.
- [13] PARAÍSO-LUNA J, AGUARELES J, MARTÍN R, et al. Endocannabinoid signalling in stem cells and cerebral organoids drives differentiation to deep layer projection neurons *via* CB₁ receptors [J]. *Development*, 2020, 147(24): dev192161.
- [14] RUIZ-CONTRERAS H A, SANTAMARÍA A, ARELLANO-MENDOZA M G, et al. Modulatory activity of the endocannabinoid system in the development and proliferation of cells in the CNS [J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(6): 1690–1706.
- [15] MARTIN M, LEDENT C, PARMENTIER M, et al. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2002, 159(4): 379–387.
- [16] FANG G, WANG Y. Transcranial direct current stimulation (tDCS) produce anti-anxiety response in acute stress exposure rats *via* activation of amygdala CB1R [J]. *Behav Brain Res*, 2021, 400: 113050.
- [17] CAO W, ZHU H, LI Y, et al. The development of brain network in males with autism spectrum disorders from childhood to adolescence: evidence from fNIRS study [J]. *Brain Sci*, 2021, 11(1): 120.
- [18] CORBETT B A, VANDEKAR S, MUSCATELLO R A, et al. Pubertal timing during early adolescence: advanced pubertal onset in females with autism spectrum disorder [J]. *Autism Res*, 2020, 13(12): 2202–2215.
- [19] FYKE W, PREMOLI M, ECHEVERRY ALZATE V, et al. Communication and social interaction in the cannabinoid-type 1 receptor null mouse; Implications for autism spectrum disorder [J]. *Autism Res*, 2021, 14(9): 1854–1872.
- [20] SARAIVIA R, FLORES Á, PLAZA-ZABALA A, et al. CB₁ cannabinoid receptors mediate cognitive deficits and structural plasticity changes during nicotine withdrawal [J]. *Biol Psychiatry*, 2017, 81(7): 625–634.
- [21] PATRICIO-MARTÍNEZ A, SÁNCHEZ-ZAVALA R, ANGULO-CRUZ I, et al. The acute activation of the CB1 receptor in the hippocampus decreases neurotoxicity and prevents spatial memory impairment in rats lesioned with β -amyloid 25-35 [J]. *Neuroscience*, 2019, 416: 239–254.
- [22] SORIANO D, VACOTTO M, BRUSCO A, et al. Neuronal and synaptic morphological alterations in the hippocampus of

- cannabinoid receptor type 1 knockout mice [J]. J Neurosci Res, 2020, 98(11): 2245–2262.
- [23] DEGIOSIO R A, GRUBISHA M J, MACDONALD M L, et al. More than a marker: potential pathogenic functions of MAP2 [J]. Front Mol Neurosci, 2022, 15: 974890.
- [24] MUKAETOVA-LADINSKA E B, ARNOLD H, JAROS E, et al. Depletion of MAP2 expression and laminar cytoarchitectonic changes in dorsolateral prefrontal cortex in adult autistic individuals [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2004, 30(6): 615–623.
- [25] GAŚSOWSKA-DOBROWOLSKA M, KOLASA A, BEVERSDORF D Q, et al. Alterations in cerebellar microtubule cytoskeletal network in a ValproicAcid-induced rat model of autism spectrum disorders [J]. Biomedicines, 2022, 10(12): 3031.
- [26] BALDELLI P, FASSIO A, VALTORTA F, et al. Lack of synapsin I reduces the readily releasable pool of synaptic vesicles at central inhibitory synapses [J]. J Neurosci, 2007, 27(49): 13520–13531.
- [27] COLEY A A, GAO W J. PSD95: a synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2018, 82: 187–194.
- [28] FEYDER M, KARLSSON R M, MATHUR P, et al. Association of mouse Dlg4 (*PSD-95*) gene deletion and human DLG4 gene variation with phenotypes relevant to autism spectrum disorders and Williams' syndrome [J]. Am J Psychiatry, 2010, 167(12): 1508–1517.
- [29] REXRODE L E, HARTLEY J, SHOWMAKER K C, et al. Molecular profiling of the hippocampus of children with autism spectrum disorder [J]. Mol Psychiatry, 2024, 29(7): 1968–1979.
- [30] LIU H, TAN M, CHENG B, et al. Valproic acid induces autism-like synaptic and behavioral deficits by disrupting histone acetylation of prefrontal cortex ALDH1A1 in rats [J]. Front Neurosci, 2021, 15: 641284.
- [31] IJIMA Y, BEHR K, IJIMA T, et al. Distinct defects in synaptic differentiation of neocortical neurons in response to prenatal valproate exposure [J]. Sci Rep, 2016, 6: 27400.
- [32] PATZKE C, DAI J, BROCKMANN M M, et al. Cannabinoid receptor activation acutely increases synaptic vesicle numbers by activating synapsins in human synapses [J]. Mol Psychiatry, 2021, 26(11): 6253–6268.
- [33] ZENG X, MAI J, XIE H, et al. Activation of CB1R alleviates central sensitization by regulating HCN2-pNR2B signaling in a chronic migraine rat model [J]. J Headache Pain, 2023, 24(1): 44.

〔收稿日期〕2024-10-16