

本文引用: 吴吉, 郝兴宇, 叶勇, 王梓羽, 朱沁泉, 张涤. 基于 BDNF/TrkB/CREB 通路研究六味地黄丸对丙戊酸钠诱导的孤独症谱系障碍模型仔鼠的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(2): 176-184.

基于 BDNF/TrkB/CREB 通路研究六味地黄丸对丙戊酸钠诱导的孤独症谱系障碍模型仔鼠的作用机制

吴吉¹, 郝兴宇¹, 叶勇¹, 王梓羽¹, 朱沁泉², 张涤^{2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007

[摘要] **目的** 基于脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)/酪氨酸激酶受体 B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)/cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)通路, 探讨六味地黄丸对丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)诱导的孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)仔鼠的作用机制。**方法** 将 13 只 SD 孕鼠随机分为两组, 其中 10 只孕鼠在第 12.5 天时腹腔注射 VPA 溶液(600 mg·kg⁻¹)为 VPA 组, 另外 3 只孕鼠注射等体积生理盐水为对照组。第 21 天对两组雄性仔鼠开展行为学检测, 筛选出符合 ASD 疾病模型的仔鼠 30 只, 随机分为模型组(等体积生理盐水), 维生素 D 组(1 480 IU·kg⁻¹), 六味地黄丸高(3 g·kg⁻¹)、中(1.5 g·kg⁻¹)、低(0.75 g·kg⁻¹)剂量组, 每组 6 只。正常雄性仔鼠 6 只, 设为空白组(等体积生理盐水)。各组仔鼠连续灌胃 14 d, 1 次/d, 给药后再次开展行为学检测。尼氏染色观察各组仔鼠海马组织神经元形态学变化, 比色法检测各组仔鼠海马组织中谷氨酸(glutamic acid, GLU)、 γ -氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)含量; qRT-PCR 检测各组仔鼠海马组织中 BDNF、TrkB、CREB mRNA 相对表达。**结果** 与对照组比较, VPA 组仔鼠体质量、身长、尾长更小($P < 0.05$)。与空白组比较, 模型组社交障碍症状明显($P < 0.01$), 焦虑障碍症状明显($P < 0.01$), 重复刻板行为增多($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 海马神经元结构损伤, GLU 升高($P < 0.01$), GABA 下降($P < 0.01$), BDNF、TrkB、CREB mRNA 表达降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 维生素 D 组及六味地黄丸中、低剂量组仔鼠社交能力增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 焦虑障碍减轻($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 重复刻板行为减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 海马神经元结构明显复原, GLU 下降($P < 0.01$), BDNF、TrkB、CREB mRNA 表达增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 六味地黄丸中、低剂量组 GABA 上升($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 六味地黄丸能显著改善 VPA 诱导的 ASD 仔鼠行为表现, 增强海马组织神经元的再生与修复, 其机制可能与平衡 GLU、GABA 水平, 上调仔鼠海马组织中 BDNF/TrkB/CREB 的表达有关。

[关键词] 六味地黄丸; 孤独症谱系障碍; 脑源性神经营养因子; 酪氨酸激酶受体 B; cAMP 反应元件结合蛋白; 谷氨酸; γ -氨基丁酸

[中图分类号] R272.6

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.02.002

Mechanism of action of Liuwei Dihuang Pill on sodium valproate-induced neonatal rat model of autism spectrum disorder based on BDNF/TrkB/CREB pathway

WU Ji¹, HAO Xingyu¹, YE Yong¹, WANG Ziyu¹, ZHU Qinquan², ZHANG Di^{2*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[收稿日期] 2023-06-27

[基金项目] 湖南省科技厅重点领域研发计划项目(2019SK2081); 湖南省卫生健康委员会科研课题(202206010043); 湖南省中医药科研课题(A2023036); 湖南中医药大学研究生创新课题(2022CX157)。

[通信作者]* 张涤, 男, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: 2655357548@qq.com。

[Abstract] Objective To explore the mechanism of action of Liuwei Dihuang Pill (LWDHP) on the neonatal rats with autism spectrum disorder (ASD) induced by sodium valproate (VPA) based on the brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/tyrosine kinase receptor B (TrkB)/cAMP response element binding protein (CREB) pathway. **Methods** Thirteen SD pregnant rats were randomly divided into two groups, with 10 pregnant rats receiving intraperitoneal injection of VPA solution ($600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) on the day 12.5th as the VPA group, and the other 3 pregnant rats receiving injection of equal volume of normal saline as the control group. Behavioral tests were carried out on the male neonatal rats of two groups on the 21th day, then 30 male neonatal rats conforming to the ASD disease model were selected and randomized into model group (equal volume of normal saline), vitamin D group ($1\ 480 \text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}$), as well as high- ($3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium- ($1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low-dose ($0.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) LWDHP groups, with six rats in each group. And six normal male neonatal rats were set as blank group (equal volume of normal saline). The neonatal rats in each group were given the corresponding medicine by gavage once a day, for continual 14 days, and behavioral tests were carried out again after administration. The morphological changes of hippocampal neurons in neonatal rats of each group were observed using Nissl staining; the content of glutamic acid (GLU) and gamma-aminobutyric acid (GABA) in the hippocampal tissue was measured by colorimetry; the mRNA relative expressions of BDNF, TrkB, and CREB in the hippocampal tissue were determined by qRT-PCR. **Results** Compared with the control group, the VPA group had smaller body weight, body length, and tail length ($P<0.05$). Compared with the blank group, the model group showed significant symptoms of social disorders ($P<0.01$), anxiety disorders ($P<0.01$), and increased repetitive stereotyped behaviors ($P<0.05$ or $P<0.01$), structural damage of hippocampal neurons, increased GLU content ($P<0.01$), decreased GABA content ($P<0.01$), as well as reduced mRNA expressions of BDNF, TrkB, and CREB ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, the social ability of neonatal rats in vitamin D group and medium- and low-dose LWDHP groups was enhanced ($P<0.05$ or $P<0.01$), anxiety disorder was alleviated ($P<0.05$ or $P<0.01$), repetitive and stereotyped behaviors were reduced ($P<0.01$ or $P<0.05$), the structures of hippocampal neurons were significantly restored, GLU content was decreased ($P<0.01$), and the mRNA expressions of BDNF, TrkB, and CREB were higher ($P<0.05$ or $P<0.01$). Additionally, GABA content was elevated in medium- and low-dose LWDHP groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** LWDHP can significantly improve the behavioral outcome of VPA-induced ASD neonatal rats, and enhance the regeneration and repair of hippocampal neurons. The mechanism may be related to the balance of GLU and GABA levels as well as up-regulation of BDNF/TrkB/CREB expression in the hippocampal tissue.

[Keywords] Liuwei Dihuang Pill; autism spectrum disorder; brain-derived neurotrophic factor; tyrosine kinase receptor B; cAMP response element binding protein; glutamic acid; gamma-aminobutyric acid

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)是儿童最常见的早期神经发育障碍性疾病之一,主要表现为社交障碍、行为重复刻板及兴趣狭隘^[1]。本病全球发病率为1%~2%,男女比例为4:1^[2]。ASD可伴随多种神经行为紊乱,如语言与运动障碍、应激性和攻击性^[3]。ASD的特征性表现使患儿在学校、生活和未来工作等多个方面面临挑战^[4]。ASD发病率不断上升,目前已成为一个世界性的难题。

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是细胞内信号通路转导分子,需要结合酪氨酸激酶受体 B(tyrosine kinase receptor B, TrkB),通过激活 cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)进一步促进各种细胞内信号通路激活^[5]。

维生素 D 能调节神经递质和神经营养因子^[6],也在神经元增殖和突触可塑性中发挥作用^[7]。据报道,ASD 患者的维生素 D 水平较低^[8]。缺乏维生素 D 会使大脑暴露于神经炎症,外源性补充维生素 D 具有改善神经毒性、炎症和 DNA 损伤的作用^[9]。维生

素 D 能调节谷氨酸(glutamic acid, GLU)、 γ -氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA),并改变与 ASD 发病机制相关的免疫功能^[10]。

六味地黄丸主治肾怯失音、囟开不合、神不足^[11]。后世医家多用原方化裁,治疗先天不足、肝肾亏虚所致的多种儿科疾病^[12]。现代研究表明,BDNF/TrkB/CREB 信号通路参与 ASD 的生理病理过程^[13]。因此,本研究提出六味地黄丸可能通过影响 BDNF/TrkB/CREB 信号通路,从而改善 ASD 临床症状的假说,从行为学、神经病理学、分子免疫学等多方面验证假说,为防治 ASD 提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物

健康成年 SPF 级 SD 孕鼠 13 只, (365 ± 35) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号:SCXK(湘)2019-0004;饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心。本实验通过湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会批准,实验动物伦理号:ZYFY 20210813-24。

1.2 药物及主要试剂

丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)粉剂(美国Sigma公司,批号:P4543);六味地黄丸(九芝堂股份有限公司,国药准字:Z43020145,规格:200丸/瓶,批号:202112110);维生素D滴剂(青岛双鲸药业股份有限公司,国药准字:H20113033,规格:400 IU×36粒,批号:2110271)。甲苯胺蓝染液、RIPA裂解液均购自武汉皮诺飞生物科技有限公司,批号分别为SH-2348、P0005;二甲苯、无水乙醇、戊巴比妥钠均购自国药集团化学试剂有限公司,批号分别为10023418、100092683、BCP07810;4%多聚甲醛(北京兰杰柯科技有限公司,批号:BL539A);BSA标准蛋白、磷酸化蛋白酶抑制剂均购自塞维尔生物科技有限公司,批号分别为G2026、G2007;GABA比色法测试盒、GLU比色法测试盒均购自伊莱瑞特生物科技有限公司,批号分别为E-BC-K852-N、E-BC-K118-N;总RNA提取试剂(Trizol法)、qRT-PCR专用预混液均购自南京诺唯赞生物科技有限公司,批号分别为Q712-02、R223-01。

1.3 主要仪器

三箱社交行为箱、旷场实验箱、Labmaze V3.0动物行为轨迹分析系统(北京众实迪科技发展有限责任公司,型号:ZS-SXJ-II、ZS-KC、1056000-2);脱水机、包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JJ-12J、JB-P5);病理切片仪(上海徠卡仪器有限公司,型号:RM2016);高速冷冻离心机(北京大龙兴创实验仪器有限公司,型号:D3024R);电热恒温水槽(精宏科技有限公司,型号:DK-8B);高速组织研磨仪、涡旋混合器(塞维尔生物科技有限公司,型号:KZ-II、MX-F);酶标检测仪(美国Biotek公司,型号:Epoch);PCR梯度基因扩增仪(美国Scilogex公司,型号:SCI1000-G)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

将13只孕鼠分为VPA组(10只)和对照组(3只),VPA组按600 mg/kg剂量单次腹腔注射250 mg/mL VPA溶液(配制方法:1 g VPA粉剂+4 mL生理盐水)^[14],对照组注射等体积生理盐水。两组孕鼠所生仔鼠仍分别记为VPA组和对照组。分别在仔鼠第7、14、21天测体质量、身长、尾长评估生长发育。在雄性仔鼠第21天时,通过行为学进行模型评价。以仔鼠表现出社交能力障碍或社交新颖性障碍为造模成功标准^[15]。筛选符合ASD疾病模型的雄性仔鼠30只,随机分为模型组,六味地黄丸高、中、低剂量组,维生素D组,每组6只。对照组筛选出6只雄性仔鼠,

为空白组。上述分组方法均采用随机数字表法。根据人与大鼠体表面积换算, $A=K \times W^{2/3} \times 10^{-4}$,其中A为体表面积,以 m^2 计算;W为体质量,以g计算;K为常数,随动物种类而不同,大鼠系数为9.1。计算出实验给药剂量:六味地黄丸低、中、高剂量分别为0.75、1.5、3 $g \cdot kg^{-1}$;将丸剂溶于1 mL生理盐水中配制成混悬液灌胃;维生素D组为1 480 $IU \cdot kg^{-1}$;模型组和空白组每日给予同体积生理盐水。每组连续灌胃2周。给药结束后,再次开展行为学检测。

2.2 三箱社交实验

用于评估仔鼠的社交行为。实验阶段如下^[16]:(1)适应阶段。将待测仔鼠放入行为箱中央室,开放两侧小门,充分适应环境10 min。(2)社交能力检测。仔鼠重新放至中央室,关闭两侧小门,并在一个束缚器中随机放入一只同种、同性别、同年龄段的陌生鼠1,另一个束缚器则保持空置,随后打开小门,记录其自由活动10 min时间内的社交行为。(3)社交新颖性检测。社交能力测试结束后,将仔鼠重新放至中央室,关闭小门,陌生鼠1在束缚器中不变,空置的束缚器中放入一只陌生的同种、同性别、同年龄段的陌生鼠2,再次打开小门,记录其自由活动10 min时间内的社交行为。

2.3 旷场实验

用于评估仔鼠自发活动、探索行为和焦虑状态。将仔鼠放入旷场箱的正中心,充分自由探索10 min;随后用摄像头记录其15 min内在旷场箱中自由活动的的数据。

2.4 弹珠埋藏实验

挖掘和埋藏是鼠的一种典型行为,由THOMAS等^[17]提出,将其作为衡量重复性或强迫性行为的测试,并可对ASD大鼠模型中的重复性刻板行为进行量化。实验时,将干燥清洁的玉米芯垫料倒入干净饲养笼中,深度约为5 cm,将直径约为2 cm的彩色玻璃弹珠轻放在垫料上,等距离分成5排,每排4颗。记录仔鼠在30 min内掩埋弹珠的情况。

2.5 尼氏染色观察仔鼠海马病理形态变化

用3%戊巴比妥钠(100 mg/kg)腹腔注射深度麻醉。打开胸腔,在心尖处扎入留置针,刺破右心耳,阻断腹主动脉,持续快速灌注生理盐水,直至右心耳流出液体清亮透明、肝脏泛白。然后,改为4%多聚甲醛灌注,速度由快到慢,持续数小时后分离脑组织,置于4%多聚甲醛中固定48 h,获取海马,制成蜡块并切片。石蜡切片依次经二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水,自来水洗,甲苯胺蓝染色2~5 min,镜检,自来水清洗,烤干再入染液染色2~5 min,水洗,0.1%冰醋酸分化,自来水洗终止反应,镜检,水洗,烤干,二

甲苯透明 10 min,中性树脂封片后,观察海马形态学变化。

2.6 比色法观察仔鼠海马 GLU、GABA、GLU/GABA 变化

2.6.1 GLU 测定 组织块用冷 PBS 洗涤 3 次,剪成小块置于匀浆管中。加入 RIPA 裂解液彻底匀浆。冰浴 30 min,每隔 5 分钟震荡 1 次。12 000 r/min 离心 10 min(离心半径 10 cm),收集上清液,即为总蛋白溶液。按说明书配制工作液,反应结束后在酶标仪 340 nm 波长下测 OD 值。

2.6.2 GABA 测定 按照组织质量:试剂=1:9 的比例混匀,匀浆后移至 EP 管中,95 °C 水浴 2 h。8 000×g 离心 10 min,取上清液。按说明书配制工作液,反应结束后,酶标仪于 640 nm 波长处测 OD 值。

2.7 qRT-PCR 检测大鼠海马组织中 BDNF、TrkB、CREB mRNA 表达

取海马组织 50 mg 液氮研磨后,提取总 RNA,加样,目的基因及内参分别平行对照上样 3 个孔。500 r/min 离心 30 s(离心半径 10 cm),后将其置于 96 孔 PCR 反应板中,启动 PCR 扩增仪进行扩增循环。PCR 反应条件为 50 °C 反转录 15 min;95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,60 °C 延伸 30 s,40 个循环。以 β -actin 为内参,最终各目的基因相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值为准。PCR 引物由武汉市皮诺飞生物科技有限公司合成。详见表 1。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。若数据符合正态分布,计量资料采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析,不服从正态分布的数据使用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,采用 Mann-Whitney U 检验或 Kruskal-Wallis H 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 VPA 对 SD 仔鼠生长发育的影响

第 7、14、21 天分别测量两组体质量、身长及尾长情况,与对照组相比,VPA 组仔鼠体质量、身长、

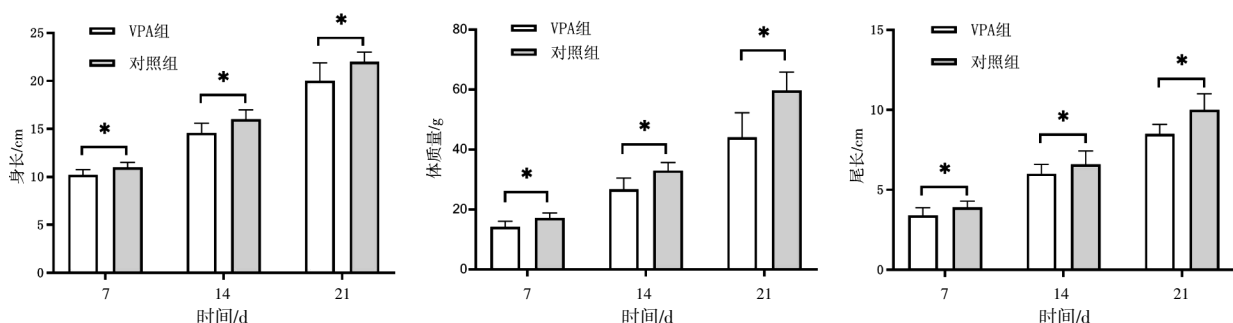


图 1 ASD 模型生长发育评估图

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

表 1 引物序列

引物	正向	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
β -actin	反向	CACGATGGAGGGCCGGACTCATC	240
	正向	TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	
TrkB	反向	CACCAACCATCAGATTTCCTC	262
	正向	TGTCTCTCGTCTCCCATATA	
CREB	反向	AACATACCAGATTGGACAGC	154
	正向	ACGACATTCTCTTGCTGCTTC	
BDNF	反向	TCCCTGGCTGACACTTTTGA	165
	正向	TTCCTCCAGCAGAAAGAGCA	

尾长更小($P<0.05$)。详见图 1。

3.2 六味地黄丸对 ASD 仔鼠社交行为的影响

在社交能力测试阶段,与空白组比较,模型组仔鼠接触陌生鼠 1 的时间更短($P<0.01$)。详见图 2A。给药后,与模型组比较,维生素 D 组,六味地黄丸中、低剂量组仔鼠与陌生鼠 1 接触时间更长($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且六味地黄丸低剂量组在陌生鼠 1 室时间增加($P<0.01$),六味地黄丸高剂量组社交时间差异无统计学意义($P>0.05$)。在社交新颖性测试阶段,与空白组比较,模型组仔鼠接触陌生鼠 2 的时间更短($P<0.01$)。详见图 2B。给药后,与模型组比较,六味地黄丸中、低剂量组与陌生鼠 2 接触时间增加($P<0.01$)。其他各室累计时间,各组间差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 2—3。

3.3 六味地黄丸对 ASD 仔鼠旷场箱中焦虑状态的影响

与空白组比较,模型组仔鼠在旷场箱中总路程更短($P<0.01$),运动速度更慢($P<0.01$),在中央区域运动距离、探索次数、停留时间均更少($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,维生素 D 组,六味地黄丸中、低剂量组在旷场箱中总路程增加,运动速度更快,在中央区域探索次数更多($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。六味地黄丸中、低剂量组在中央区域运动距离、停留时间更长($P<0.01$)。详见表 4。

3.4 六味地黄丸对 ASD 仔鼠重复刻板动作的影响

与空白组比较,模型组埋珠数目较多($P<0.01$)。与模型组比较,六味地黄丸中、低剂量组埋珠数目较

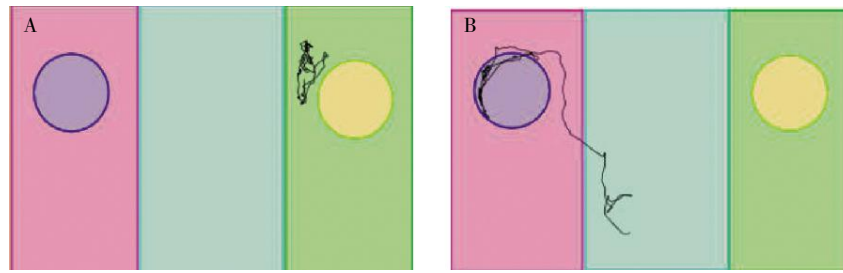


图 2 ASD 仔鼠三箱社交实验轨迹图

注: A.社交能力测试阶段;B.社交新颖性测试阶段。社交能力测试阶段图片左侧为陌生鼠 1、右侧为物体;社交新颖性测试阶段图片左侧为陌生鼠 1、右侧为陌生鼠 2。

表 2 各组仔鼠在 3 个室内停留时间、与陌生鼠 1 和物体交流的时间比较[s, n=6, M(P₂₅, P₇₅)]

组别	室内停留时间					
	陌生鼠 1 室		中央室		物体室	
	给药前	给药后	给药前	给药后	给药前	给药后
空白组	316.83 (270.59, 345.24)	194.74 (150.84, 218.14)	90.48 (62.16, 107.87)	99.95 (55.15, 123.27)	58.4 (42.96, 73.51)	75.63 (36.99, 102.17)
模型组	300.83 (38.36, 592.31)	66.27 (0, 288.00)	61.86 (4.32, 206.29)	128.26 (51.32, 599.98)	63.93 (0, 300.65)	194.07 (0, 352.41)*
维生素 D 组	277.1 (0, 331.60)	218.42 (167.48, 252.83)	67.71 (41.33, 139.46)	118.53 (90.65, 190.73)	135.33 (104.36, 481.00)	162.51 (120.09, 244.87)**
六味地黄丸高剂量组	299.15 (0, 405.81)	244.56 (90.18, 288.00)	111.62 (66.40, 560.94)	101.02 (41.63, 137.61)	75.96 (0, 125.87)	189.71 (138.11, 246.87)**
六味地黄丸中剂量组	41.61 (0, 157.96)	236.17 (180.57, 302.62)	466.91 (196.25, 599.96)	108.28 (84.72, 198.29)	30.06 (0, 190.85)	165.80 (107.44, 183.63)
六味地黄丸低剂量组	214.15 (149.21, 331.28)	316.35 (262.47, 362.61) [#]	90.45 (59.52, 229.74)	91.03 (64.67, 160.72)	216.48 (58.41, 247.66)	92.88 (67.02, 100.99)
组别	社交时间					
	陌生鼠 1		物体			
	给药前	给药后	给药前	给药后		
空白组	130.07(99.39, 166.15)	185.61(145.19, 290.98)	8.04(6.75, 17.50)	27.00(23.97, 34.10)		
模型组	0(0, 9.36)**	1.17(0, 8.6)**	0.15(0, 15.40)	13.25(0, 32.51)		
维生素 D 组	13.12(0, 43.10)	38.67(30.97, 56.11) [#]	16.28(3.81, 113.81)	16.97(12.98, 24.66)		
六味地黄丸高剂量组	21.89(0, 39.27)	24.54(8.03, 33.27)	18.65(11.74, 33.39)	19.12(8.88, 105.29)		
六味地黄丸中剂量组	0(0, 6.1)**	58.60(34.73, 89.85) [#]	0(0, 3.77)	8.27(3.92, 31.68)		
六味地黄丸低剂量组	3.54(0.41, 42.62)	53.34(49.40, 103.37) [#]	2.75(1.62, 36.43)	8.94(1.82, 29.55)		

注:与空白组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$ 。

少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表 5。

3.5 六味地黄丸对 ASD 仔鼠海马组织神经元形态的影响

与空白组比较,模型组脑组织结构中度异常,可见神经元细胞数量减少,部分神经元变性,部分神经元细胞核固缩,胞质内的尼氏小体明显减少,部分神经元可见纤维缠结。与模型组比较,维生素 D 组及六味地黄丸中剂量组脑组织结构轻度异常;六味地黄丸低剂量组脑组织结构基本正常,神经元数量增加,神经元少量变性,尼氏小体数量增多。详见图 3。

3.6 六味地黄丸对 ASD 仔鼠海马组织 GLU、GA-

BA、GLU/GABA 表达的影响

与空白组比较,模型组仔鼠海马组织中 GLU 升高、GABA 下降、GLU/GABA 比值升高($P < 0.01$)。与模型组比较,维生素 D 组,六味地黄丸中、低剂量组 GLU 降低($P < 0.01$),GLU/GABA 比值下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),六味地黄丸中、低剂量组 GABA 升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表 6。

3.7 六味地黄丸对 ASD 仔鼠 BDNF、TrkB、CREB mRNA 相对表达的影响

与空白组比较,模型组仔鼠海马中 BDNF、TrkB、CREB mRNA 表达降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型

表3 各组仔鼠在3个室内停留时间,与陌生鼠1、陌生鼠2交流的时间比较[s, n=6, M(P₂₅, P₇₅)]

组别	室内停留时间					
	陌生鼠1室		中央室		陌生鼠2室	
	给药前	给药后	给药前	给药后	给药前	给药后
空白组	126.65 (110.30, 202.56)	64.18 (47.88, 99.37)	74.7 (38.77, 111.70)	150.15 (54.91, 167.89)	271.47 (228.29, 294.71)	265.85 (197.65, 314.12)
模型组	76.92 (41.30, 276.77)	81.1 (0, 268.42)	366.56 (171.17, 469.42)	199.12 (80.11, 400.55)	57.36 (9.52, 81.71)*	165.76 (0, 310.08)
维生素D组	197.14 (129.24, 329.36)	233.91 (193.54, 287.50) [#]	140.24 (72.27, 262.31)	121.13 (90.25, 171.76)	159.88 (88.74, 265.17)	137.49 (117.95, 198.12)
六味地黄丸高剂量组	119.84 (0, 282.74)	92.35 (46.61, 148.78)	176.52 (97.82, 598.22)	166.77 (93.57, 226.62)	100.27 (0, 204.82)	223.97 (185.14, 434.06)
六味地黄丸中剂量组	122.45 (0.20, 333.63)	131.56 (84.92, 204.33)	215.43 (42.98, 458.50)	133.67 (75.95, 216.36)	125.54 (13.54, 226.20)	237.19 (149.88, 297.82)
六味地黄丸低剂量组	262.97 (77.08, 412.07)	108.86 (39.07, 166.85)	160.53 (8.10, 396.08)	77.30 (38.64, 196.02)	10.93 (0, 80.04)*	301.92 (245.56, 371.21)
组别	社交时间					
	陌生鼠1		陌生鼠2			
	给药前	给药后	给药前	给药后		
空白组	17.01(10.67, 39.09)	18.54(12.13, 34.96)	96.02(69.25, 107.15)	109.36(90.22, 132.96)		
模型组	36.25(2.42, 86.13)	19.60(0, 49.51)	14.55(9.08, 35.43)	14.60(0, 28.17)**		
维生素D组	12.15(1.14, 46.6)	40.37(24.25, 51.13)	6.03(0, 12.91)**	32.41(26.04, 37.73)		
六味地黄丸高剂量组	33.19(0.38, 64.23)	33.53(20.28, 40.16)	2.23(0.16, 8.82)**	27.04(25.10, 36.89)		
六味地黄丸中剂量组	0.97(0, 34.59)	28.3(6.50, 46.50)	10.43(3.08, 80.46)	49.00(30.93, 60.27) [#]		
六味地黄丸低剂量组	47.01(15.57, 80.38)	30.80(15.00, 43.04)	50.54(10.12, 73.07)	63.31(43.97, 68.27) ^{##}		

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

表4 各组仔鼠旷场行为学数据统计表

组别	总路程/cm	运动速度/(cm/s)	中央区域运动距离/cm	中央区域探索次数/次	中央区域停留时间/s
空白组	2 317.33±250.46	2.50±0.26	87.68±17.61	11.83±0.79	28.31±13.43
模型组	413.02±54.20**	0.46±0.06**	4.80±1.57**	0.83±0.31**	1.69±1.41*
维生素D组	841.59±69.09 [#]	0.94±0.08 [#]	25.77±4.18	3.17±0.70 [#]	5.69±2.33
六味地黄丸高剂量组	505.33±70.92	0.58±0.08	7.33±3.58	1.33±0.61	1.15±0.49
六味地黄丸中剂量组	978.96±142.36 ^{##}	1.09±0.16 [#]	35.40±4.61 [#]	6.17±0.75 ^{##}	16.51±8.55 [#]
六味地黄丸低剂量组	1 123.27±151.65 ^{##}	1.25±0.17 ^{##}	29.33±3.97 [#]	6.83±0.98 ^{##}	13.62±4.31 ^{##}

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

表5 各组仔鼠埋珠数目比较(颗, n=6, $\bar{x}\pm s$)

组别	埋珠颗数/颗
空白组	1.00±0.45
模型组	14.00±1.48*
维生素D组	9.33±1.31
六味地黄丸高剂量组	12.33±1.74
六味地黄丸中剂量组	6.00±2.03 ^{##}
六味地黄丸低剂量组	7.17±1.25 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

组比较,维生素D组,六味地黄丸中、低剂量组BDNF、TrkB、CREB mRNA表达升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。详见表7。

4 讨论

ASD是基因与环境相互作用的结果,其影响神经发育相关基因的表达,影响突触的形成、修剪以及神经环路的连接等神经可塑性过程,最终可能导致ASD样行为^[7]。妊娠期和围产期是神经系统发育易受影响的关键时期^[18]。一方面,这与大脑早期发育的高度复杂、特异性有关^[19];另一方面,与屏障缺乏或功能不完全有关。母体脂溶性维生素(A、D、E)、色氨酸、与单碳代谢相关的营养素(胆碱、叶酸)^[20],有助于后代中亚稳态表观性等位基因的甲基化,这种甲基化在分化组织中也持续存在^[21]。

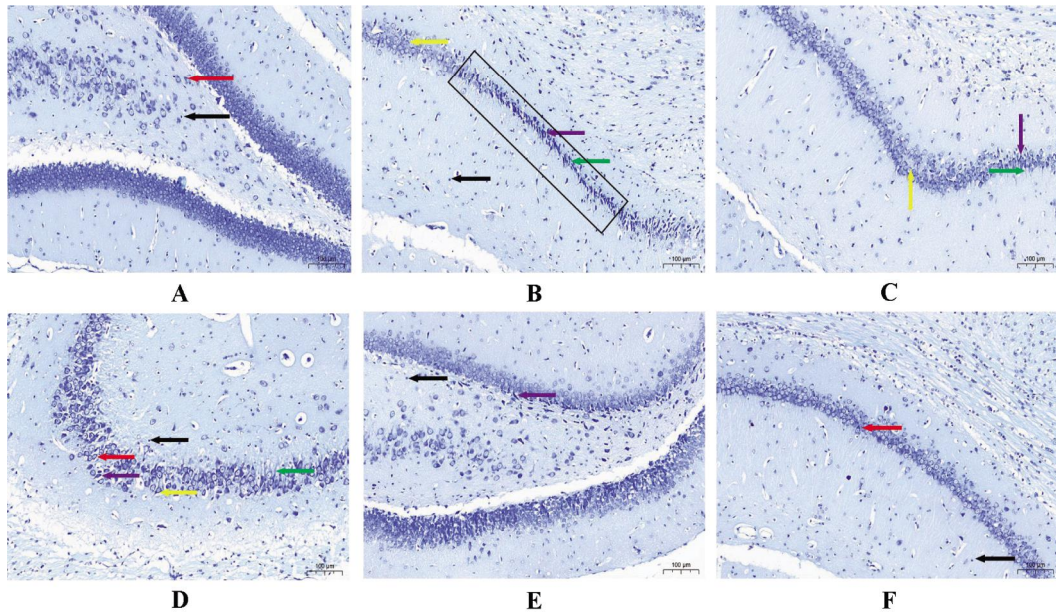


图 3 六味地黄丸对 ASD 仔鼠海马组织病理学的影响(尼氏染色,×200)

注:红色箭头所示为正常的神经元细胞,尼氏小体数量较多,颗粒较大(表明细胞合成蛋白功能强)。黄色箭头所示为细胞质内的尼氏小体。黑色箭头所示为胶质细胞。紫色箭头所示为少量神经元变性,个别神经元固缩。绿色箭头所示为个别神经元可见纤维缠结。黑色方框所示为神经元细胞数量减少。A.空白组;B.模型组;C.维生素 D 组;D.六味地黄丸高剂量组;E.六味地黄丸中剂量组;F.六味地黄丸低剂量组。

表 6 各组仔鼠海马组织 GLU、GABA、GLU/GABA 表达比较

组别	GLU/($\mu\text{mol/g}$)	GABA/($\mu\text{mol/g}$)	GLU/GABA
空白组	262.36±1.87	14.92±1.64	17.83±2.17
模型组	716.68±28.21**	7.45±0.85**	93.95±12.61**
维生素 D 组	495.25±30.36 [#]	8.43±0.94	64.38±3.89 [#]
六味地黄丸高剂量组	589.85±106.32	7.74±0.70	79.74±15.07
六味地黄丸中剂量组	424.34±25.64 [#]	11.14±0.41 [#]	37.49±2.00 [#]
六味地黄丸低剂量组	342.60±25.94 [#]	12.47±0.07 [#]	27.35±2.00 [#]

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

表 7 各组仔鼠 BDNF、TrkB、CREB mRNA 相对表达比较

组别	BDNF	TrkB	CREB
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	0.64±0.10*	0.66±0.08*	0.70±0.05**
维生素 D 组	0.95±0.10 [#]	0.93±0.04 [#]	0.87±0.02 [#]
六味地黄丸高剂量组	0.82±0.06	0.81±0.07	0.82±0.04
六味地黄丸中剂量组	1.05±0.13 [#]	1.07±0.09 [#]	0.96±0.08 [#]
六味地黄丸低剂量组	1.16±0.11 [#]	1.11±0.13 [#]	1.15±0.04 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

VPA 诱导的 ASD 模型鼠具有与人类 ASD 行为、神经病理学、细胞和免疫相似的表型,是目前比较成熟的 ASD 动物模型^[22]。孕鼠腹腔注射 VPA 后,其子代在三箱社交检测等行为学实验中,表现出社交行为减少和社交行为潜伏期增加,埋珠、理毛等重

复刻板动作增加。同时,还表现出与 ASD 相关的某些感觉、情绪和认知障碍^[23]。

维生素 D 是人体必需营养素之一,是类固醇样物质集合的总称。研究发现,维生素 D 在大脑发育中起着至关重要的作用,包括促进神经元分化、增殖和细胞凋亡,调节突触可塑性和多巴胺能系统,减少氧化应激等^[24]。流行病学调查发现,ASD 在空气污染较严重的城市和高海拔地区患病率更高。空气污染、多云天气、季节性因素、出生顺序、妊娠糖尿病、先兆子痫、剖宫产等导致 ASD 的因素,均与维生素 D 缺乏有关^[25]。维生素 D 状态与 ASD 核心症状密切相关^[26]。同时,也有研究证实,补充外源性维生素 D 能发挥预防和治疗 ASD 的作用^[27-28]。

中医学无 ASD 病名,但根据患儿的表现,可归于“童昏”“清狂”“无慧”等范畴。中医学认为,ASD 的主要病因为先天不足,病机为肝肾亏虚、脑髓不充。肾藏精,主生长发育,若小儿先天禀赋不足,肝肾亏虚,精血无以充养形体,则导致生长发育迟缓,可表现为智力低下、言语不清或身材矮小、动作发育落后等;阴无以制阳,相火上扰心神,可见情绪急躁难自控、任性偏执等;肾主骨生髓,肾精充盛则脑髓充盈,若小儿肾精亏虚,无以化髓充脑,神明失用,元神不得滋养,则表现出精神活动异常。张涤教授认为,儿童 ASD 病机多为先天不足、肝肾亏虚,临床应用六味地黄丸加减治疗,能够有效改善患儿核心症

状和/或饮食障碍、排便障碍、睡眠障碍等伴随症状。

六味地黄丸出自《小儿药证直诀》。方中重用熟地黄,填精益髓。臣以山茱萸补肝肾,并能涩精;山药脾肾双补。君臣相佐,“三阴并补”。但熟地黄用量独重,以滋补肾精为主。凡补肾精之法,必当泻其“浊”,方可存其清,而使阴精得补。且肾为水火之宅,肾虚则水泛,阴虚而火动。故佐泽泻利湿泄浊,并防熟地黄滋腻;牡丹皮清泄相火,并制山茱萸温涩;茯苓健脾渗湿,补脾而助运。此三药即为“三泻”。全方补泻兼施,滋补肾精而降相火。儿科临床上多用于治疗小儿肾脏疾病。六味地黄丸可通过影响中枢神经递质,改善大鼠运动、学习功能^[29]。代谢组学技术证实,其入血成分中的丹皮酚原苷、莫诺苷等代谢产物,能调节氨基酸代谢、核苷酸代谢和甾体激素类生物合成^[29]。单胺类神经递质是中枢神经系统的重要递质,主要功能为参与学习与记忆、情绪、精神活动以及内分泌活动等^[30]。六味地黄丸可能通过调节大鼠脑中单胺类神经递质含量而改善大鼠运动功能、感觉障碍^[31],或者通过提高脑内胆碱乙酰转移酶活性,增加乙酰胆碱含量,影响中枢神经胆碱能系统,从而改善小鼠学习记忆能力^[32]。本研究显示,六味地黄丸早期干预可不同程度改善仔鼠 ASD 样行为。六味地黄丸高剂量组疗效不显著,推测可能与药物浓度过高,产生药物毒性有关。

ASD 患者不同大脑区域的神经解剖学变化,特别是额叶皮质、海马和小脑,与其行为异常有关^[33]。ELNAHAS 等^[34]证实,VPA 产前暴露引起的 ASD 样行为,与神经生物学异常相关。在神经管关闭时,暴露于 VPA 的雄鼠表现出与 ASD 患者大脑异常相似的病理改变,包括小脑神经元的丢失和锥体细胞树突分枝的改变,提示修剪受损^[35]。本研究发现,VPA 导致仔鼠神经元损伤,从而表现出 ASD 样行为学表型。初步证实六味地黄丸可促进 ASD 仔鼠海马组织损伤神经元的修复,增加尼氏小体数量,恢复神经细胞合成蛋白质的功能。

ASD 的病因涉及许多脑系统,尤其与 GABA、血清素能、GLU 系统有关,且兴奋性(excitability, E)GLU 和抑制性(inhibitory, I)GABA 传递的平衡被打破,在 ASD 发病中起关键作用。研究发现 E/I 升高会引起信息处理和社会行为功能障碍的深度损害^[36]。基于此,临床中运用 GABA 激动剂,通过抑制突触前 GABA 能神经元来治疗 ASD^[37]。本研究发现,ASD 仔鼠海马中 GLU 升高,GABA 下降,E/I 比值升高。六味地黄丸能降低 GLU,升高 GABA,降低 E/I 比值。

说明 VPA 诱导的 ASD 样行为表型,可能与 E/I 失衡有关,而六味地黄丸能使 E/I 平衡恢复而改善 ASD 样行为表型。

BDNF 及其受体 TrkB 在哺乳动物的大脑,尤其是海马和皮质中广泛表达,能刺激细胞内信号转导,对神经元的存活、形态发生和可塑性至关重要^[38]。作为主要的转录因子,CREB 调控与突触、神经元存活相关的基因,在神经保护和神经可塑性中发挥重要的作用。CREB 转录级联失调可促进氧化应激和细胞凋亡^[39]。本研究发现,ASD 仔鼠 BDNF、TrkB、CREB mRNA 表达下降,六味地黄丸能上调其表达,说明 VPA 诱导的 ASD 样行为表型,可能与 BDNF/TrkB/CREB 通路下调有关,而六味地黄丸能上调该通路表达而改善 ASD 样行为表型。

综上所述,ASD 发病机制可能与 E/I 失衡、BDNF/TrkB/CREB 信号通路下调有关。六味地黄丸能显著改善经 VPA 诱导仔鼠的 ASD 样行为表型,增强海马神经元的再生与修复,其机制可能与平衡 GLU 与 GABA 水平、上调 BDNF/TrkB/CREB 信号通路有关。六味地黄丸高剂量组改善作用不显著,可能与药物浓度过高有关。

参考文献

- [1] ASSOCIATION A P. Diagnostic and statistical manual of mental disorders[M]. New York: American Psychiatric Association, 2013.
- [2] BAXTER A J, BRUGHA T S, ERSKINE H E, et al. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders[J]. *Psychological Medicine*, 2015, 45(3): 601-613.
- [3] MASI A, DEMAYO M M, GLOZIER N, et al. An overview of autism spectrum disorder, heterogeneity and treatment options[J]. *Neuroscience Bulletin*, 2017, 33(2): 183-193.
- [4] 邹卓,刘芸,黄浩宇,等. 儿童孤独症谱系障碍流行现状和家庭干预的研究及策略[J]. *中国全科医学*, 2020, 23(8): 900-907.
- [5] IBRAHIM A M, CHAUHAN L, BHARDWAJ A, et al. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative disorders[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(5): 1143.
- [6] SIRACUSANO M, RICCIONI A, ABATE R, et al. Vitamin D deficiency and autism spectrum disorder[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2020, 26(21): 2460-2474.
- [7] PRINCIPI N, ESPOSITO S. Vitamin D deficiency during pregnancy and autism spectrum disorders development[J]. *Frontiers in Psychiatry*, 2020, 10: 987.
- [8] CANNELL J J, GRANT W B. What is the role of vitamin D in autism?[J]. *Dermato-endocrinology*, 2013, 5(1): 199-204.
- [9] ALFAWAZ H A, BHAT R S, AL-AYADHI L, et al. Protective and restorative potency of Vitamin D on persistent biochemical autistic features induced in propionic acid-intoxicated rat pups[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 14: 416.

- [10] MÁČOVÁ L, BIČKOVÁ M, OSTATNÍKOVÁ D, et al. Vitamin D, neurosteroids and autism[J]. *Physiological Research*, 2017, 66 (Suppl 3): S333–S340.
- [11] 钱乙. 小儿药证直诀[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2018: 39.
- [12] 卢红蓉. 钱乙“肾主虚, 无实也”观与六味地黄丸[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(10): 2512–2513.
- [13] LEE Y J, HAN P L. Early-life stress in D2 heterozygous mice promotes autistic-like behaviors through the downregulation of the BDNF-TrkB pathway in the dorsal Striatum[J]. *Experimental Neurobiology*, 2019, 28(3): 337–351.
- [14] SCHNEIDER T, TURCZAK J, PRZEWŁOCKI R. Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Issues for a therapeutic approach in autism[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2006, 31(1): 36–46.
- [15] 李 桑, 吴海涛. 孤独症谱系障碍实验动物模型研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2020, 34(2): 133–141.
- [16] 王剑飞, 韩俊海, 张子超. 孤独症谱系障碍小鼠模型行为学检测方法[J]. *遗传*, 2021, 43(5): 501–519.
- [17] THOMAS A, BURANT A, BUI N, et al. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety[J]. *Psychopharmacology*, 2009, 204(2): 361–373.
- [18] PELCH K E, BOLDEN A L, KWIATKOWSKI C F. Environmental chemicals and autism: A scoping review of the human and animal research [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2019, 127(4): 46001.
- [19] EMBERTI GIALLORETI L, MAZZONE L, BENVENUTO A, et al. Risk and protective environmental factors associated with autism spectrum disorder: Evidence-based principles and recommendations[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2019, 8(2): 217.
- [20] HOMBERG J R, KYZAR E J, SCATTONI M L, et al. Genetic and environmental modulation of neurodevelopmental disorders: Translational insights from labs to beds [J]. *Brain Research Bulletin*, 2016, 125: 79–91.
- [21] DOMINGUEZ-SALAS P, MOORE S E, BAKER M S, et al. Maternal nutrition at conception modulates DNA methylation of human metastable epialleles[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3746.
- [22] CHRISTENSEN J, GRØNBORG T K, SØRENSEN M J, et al. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism[J]. *JAMA*, 2013, 309(16): 1696–1703.
- [23] FONTES-DUTRA M, DELLA-FLORA NUNES G, SANTOS-TERRA J, et al. Abnormal empathy-like pro-social behaviour in the valproic acid model of autism spectrum disorder[J]. *Behavioural Brain Research*, 2019, 364: 11–18.
- [24] KARRAS S N, WAGNER C L, CASTRACANE V D. Understanding vitamin D metabolism in pregnancy: From physiology to pathophysiology and clinical outcomes[J]. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2018, 86: 112–123.
- [25] ALZGHOUL L. Role of vitamin D in autism spectrum disorder[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2019, 25(41): 4357–4367.
- [26] QI X J, YANG T, CHEN J, et al. Vitamin D status is primarily associated with core symptoms in children with autism spectrum disorder: A multicenter study in China[J]. *Psychiatry Research*, 2022, 317: 114807.
- [27] FENG J Y, SHAN L, DU L, et al. Clinical improvement following vitamin D3 supplementation in Autism Spectrum Disorder[J]. *Nutritional Neuroscience*, 2017, 20(5): 284–290.
- [28] SAAD K, ABDEL-RAHMAN A A, ELSEROGY Y M, et al. Vitamin D status in autism spectrum disorders and the efficacy of vitamin D supplementation in autistic children[J]. *Nutritional Neuroscience*, 2016, 19(8): 346–351.
- [29] 李秋菊, 王 萍, 王美佳, 等. 基于中医方证代谢组学技术的六味地黄丸干预脑瘫大鼠模型研究[J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2016, 18(10): 1684–1696.
- [30] LOULA R, MONTEIRO L H A. Monoamine neurotransmitters and mood swings: A dynamical systems approach[J]. *Mathematical Biosciences and Engineering*, 2022, 19(4): 4075–4083.
- [31] 高长玉, 姜志梅, 李博文, 等. 六味地黄丸对脑瘫模型大鼠脑组织单胺类神经递质影响的实验研究[J]. *中医药信息*, 2017, 34(3): 55–57.
- [32] 崔 勇, 王艳杰, 赵丹玉, 等. 六味地黄丸对 APP/PS1 小鼠学习记忆能力及胆碱能系统的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(3): 148–151.
- [33] MORIMOTO M, HASHIMOTO T, TSUDA Y, et al. Assessment of oxidative stress in autism spectrum disorder using reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0233550.
- [34] ELNAHAS E M, ABUELEZZ S A, MOHAMAD M I, et al. Validation of prenatal versus postnatal valproic acid rat models of autism: A behavioral and neurobiological study[J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2021, 108: 110185.
- [35] MARKRAM K, RINALDI T, LA MENDOLA D, et al. Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33(4): 901–912.
- [36] MAROTTA R, RISOLEO M C, MESSINA G, et al. The neurochemistry of autism[J]. *Brain Sciences*, 2020, 10(3): 163.
- [37] DAI Y, ZHANG L L, YU J H, et al. Improved symptoms following bumetanide treatment in children aged 3–6 years with autism spectrum disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Science Bulletin*, 2021, 66 (15): 1591–1598.
- [38] 杨恩璐, 孙秉贵. BDNF 及其下游通路与 GABA 能神经元发育相关性的研究进展[J]. *生命科学*, 2020, 32(6): 544–550.
- [39] AMIDFAR M, DE OLIVEIRA J, KUCHARSKA E, et al. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease[J]. *Life Sciences*, 2020, 257: 118020.