

本文引用: 吴 吉, 裴方好, 黄鹏珏, 印泥娅, 欧阳磊, 戴明轩, 朱沁泉, 张 涤. 孤独症谱系障碍肝肾不足证病证结合大鼠模型的构建与评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(7): 1221-1230.

孤独症谱系障碍肝肾不足证病证结合大鼠模型的构建与评价

吴 吉¹, 裴方好², 黄鹏珏¹, 印泥娅¹, 欧阳磊¹, 戴明轩³, 朱沁泉^{4*}, 张 涤^{4*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 广东省深圳市龙岗区人民医院, 广东 深圳 518000;

3. 永州职业技术学院, 湖南 永州 425100; 4. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

〔摘要〕 目的 构建孤独症谱系障碍(ASD)肝肾不足证病证结合大鼠模型, 并进行模型评价。方法 将 13 只 SD 孕鼠随机分为丙戊酸钠(VPA)组(10 只)、对照组(3 只)。VPA 组在第 13 天时腹腔注射 VPA 溶液($600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 对照组注射等体积生理盐水。第 7、14、21 天, 测仔鼠体质量、身长、尾长, 评估生长发育; 第 21 天对两组雄性仔鼠开展行为学检测, 筛选出符合 ASD 表现的仔鼠 32 只, 随机分为 ASD 组(等体积蒸馏水)、ASD 肝肾不足组(等体积蒸馏水)、六味地黄丸组($1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、龙胆泻肝丸组($2.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 另将正常雄性仔鼠设为空白组(等体积蒸馏水), 每组 8 只。每天上午进行灌胃。每天下午, ASD 肝肾不足组、六味地黄丸组、龙胆泻肝丸组予以激素(左甲状腺素钠 $150 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)结合激怒法, 共 14 d。干预后开展行为学检测, HE、尼氏染色观察前额叶病理改变; HE 染色观察股骨病理改变; ELISA 法测血清环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、雌二醇(E_2)、睾酮(T)、游离三碘甲状腺原氨酸(FT_3)、游离甲状腺素(FT_4)、促甲状腺激素释放激素(TRH)、促甲状腺激素(TSH)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、促红细胞生成素(EPO)、1,25-二羟基维生素 D_3 (VD_3)水平; 称重测胸腺指数。结果 与空白组比较, ASD 组、ASD 肝肾不足组存在发育迟缓、发育畸形, 不同程度行为学表现异常和前额叶病理损伤, 胸腺指数下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), ASD 肝肾不足组可见股骨病理损伤; 与 ASD 组、ASD 肝肾不足组比较, 各治疗组仔鼠行为学异常情况、前额叶、股骨损伤情况均得到不同程度的改善, 其中六味地黄丸组改善最为明显。ELISA 结果显示, 与空白组比较, ASD 组 TSH 下降($P < 0.05$), TNF- α 、IL-6 升高($P < 0.01$), VD_3 下降($P < 0.05$); ASD 肝肾不足组血清 cAMP、cAMP/cGMP、 E_2 、 E_2/T 升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), cGMP、T、 FT_3 、 FT_4 、TRH、TSH 下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), TNF- α 、IL-6 升高($P < 0.01$), VD_3 、EPO 下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 ASD 肝肾不足组比较, 六味地黄丸组 cAMP、cAMP/cGMP、TNF- α 、IL-6 降低($P < 0.01$), E_2 、 E_2/T 下降($P < 0.05$), VD_3 、EPO 升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 胸腺指数升高($P < 0.01$); 龙胆泻肝丸组 cAMP/cGMP、 E_2 下降($P < 0.05$), TNF- α 、IL-6 下降($P < 0.01$)。与六味地黄丸组比较, 龙胆泻肝丸组胸腺指数下降($P < 0.05$), EPO 水平下降($P < 0.05$)。结论 孕期腹腔注射 VPA+ 激素结合激怒法刺激干预可以构建 ASD 肝肾不足证病证结合动物模型。

〔关键词〕 孤独症谱系障碍; 六味地黄丸; 病证结合; 以方测证; 肝肾不足; 动物模型

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.07.004

Construction and evaluation of a rat model combining autism spectrum disorder with liver-kidney deficiency pattern

WU Ji¹, PEI Fangyu², HUANG Pengjue¹, YIN Niya¹, OUYANG Lei¹, DAI Mingxuan³,

ZHU Qinquan^{4*}, ZHANG Di^{4*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Longgang District People's Hospital of Shenzhen of Guangdong Province, Shenzhen, Guangdong 518000, China;

〔收稿日期〕 2025-01-16

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金项目(2024JJ8233); 湖南省中医药科研计划项目(A2023036); 湖南省卫生健康高层次人才项目(20230448); 湖南省教育厅科研项目(22A0263); 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); 湖南省大学生创新创业训练计划(S202410541157)。

〔通信作者〕 * 张 涤, 男, 主任医师, E-mail: 2655357548@qq.com; 朱沁泉, 女, 硕士, 主治医师, E-mail: 121088153@qq.com。

3. Yongzhou Vocational Technical College, Yongzhou, Hunan 425100, China;

4. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To construct a rat model combining autism spectrum disorder (ASD) with liver-kidney deficiency pattern and to evaluate the model. **Methods** Thirteen pregnant SD rats were randomly divided into the valproic acid (VPA) group ($n=10$) and the control group ($n=3$). On day 13 of pregnancy, the VPA group was intraperitoneally injected with VPA solution ($600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), while the control group was injected with an equal volume of normal saline. On postnatal days 7, 14, and 21, offspring body weight, body length, and tail length were measured to assess growth. On day 21, behavioral tests were conducted on male offspring from both groups to screen for 32 offspring exhibiting ASD-like behaviors. They were randomly divided into ASD group (equal volume of distilled water), ASD liver-kidney deficiency group (equal volume of distilled water), Liuwei Dihuang Pill (LWDHP) group ($1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and Longdan Xiegan Pill (LDXGP) group ($2.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). Additionally, normal male offspring were set as the blank group (equal volume of distilled water), with 8 rats in each group. Gavage administration was performed every morning, and in the afternoons, the ASD liver-kidney deficiency, LWDHP, and LDXGP groups received hormonal stimulation (levothyroxine sodium $150 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) combined with an irritation method for 14 days. After the intervention, behavioral tests were conducted. HE and Nissl stainings were used to observe pathological changes in the prefrontal lobe; HE staining was used to observe pathological changes in the femur; ELISA was used to measure the levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), estradiol (E_2), testosterone (T), free triiodothyronine (FT_3), free thyroxine (FT_4), thyrotropin-releasing hormone (TRH), thyroid-stimulating hormone (TSH), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), erythropoietin (EPO), and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (VD_3) in serum; the thymus index was measured by weighing. **Results** Compared with the blank group, the ASD group and the ASD liver-kidney deficiency group showed growth retardation, developmental malformations, abnormal behavioral manifestations to varying degrees, and pathological damage to the prefrontal lobe, along with a decreased thymus index ($P<0.05$, $P<0.01$). Pathological damage to the femur was also observed in the ASD liver-kidney deficiency group. Compared with the ASD group and the ASD liver-kidney deficiency group, the treatment groups showed varying degrees of improvement in behavioral abnormalities and damage to the prefrontal lobe and femur in the offspring rats, with the most significant improvement observed in the LWDHP group. ELISA results revealed that, compared with the blank group, the ASD group had decreased TSH levels ($P<0.05$), increased TNF- α and IL-6 levels ($P<0.01$), and decreased VD_3 levels ($P<0.05$). The ASD liver-kidney deficiency group exhibited increased serum cAMP, cAMP/cGMP ratio, E_2 and E_2/T ratio ($P<0.05$, $P<0.01$), decreased cGMP, T, FT_3 , FT_4 , TRH, and TSH levels ($P<0.05$, $P<0.01$), increased TNF- α and IL-6 levels ($P<0.01$), and decreased VD_3 and EPO levels ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the ASD liver-kidney deficiency group, the LWDHP group had reduced cAMP, cAMP/cGMP ratio, TNF- α , and IL-6 levels ($P<0.01$), decreased E_2 and E_2/T ratio ($P<0.05$), increased VD_3 and EPO levels ($P<0.05$, $P<0.01$), and an elevated thymus index ($P<0.01$). The LDXGP group showed decreased cAMP/cGMP ratio and E_2 levels ($P<0.05$), along with reduced TNF- α and IL-6 levels ($P<0.01$). Compared with the LWDHP group, the LDXGP group had a decreased thymus index ($P<0.05$) and reduced EPO levels ($P<0.05$). **Conclusion** The animal model of ASD with liver-kidney deficiency pattern can be constructed by intraperitoneal injection of VPA during pregnancy combined with hormone treatment and irritation method.

[Keywords] autism spectrum disorder; Liuwei Dihuang Pill; disease-pattern combination; formula-based pattern validation; liver-kidney deficiency; animal model

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)是儿童最常见的脑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]。近年来,儿童 ASD 的患病率逐年上升^[2]。本病致残率高,难以治愈,已成为一个严峻的公共卫生问题^[3]。中医学认为,ASD 主要病因为先天不足,病机为肝肾不足、脑

髓不充。《儿童孤独症谱系障碍中西医结合干预专家共识》^[4]指出,肝肾不足证是 ASD 临床最常见的证型之一,六味地黄丸加减可作为临床治疗方案之一。六味地黄丸出自钱乙所著《小儿药证直诀·卷下·诸方》,主治“肾怯失音、囟开不合、神不足、目中白睛多”,具有滋补肝肾的功效。张涤教授临床运用六味

地黄丸加减治疗肝肾不足证 ASD 患儿,能有效改善患儿发育迟缓等临床症状^[5]。

因此,本研究拟以孕期丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)腹腔注射构建 ASD 疾病模型^[6],并以激素结合激怒法建立大鼠肝肾不足证,从造模因素、宏观表征、微观指征、以方测证 4 个角度对 ASD 肝肾不足证进行评价,进一步丰富六味地黄丸滋补肝肾治疗 ASD 肝肾不足证的科学内涵,为 ASD 肝肾不足证病证结合临床方案的构建提供客观依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年 SPF 级 SD 孕鼠 13 只(孕 13 d),体重(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 SPF 级动物房,饲养温度(24±2)℃,湿度 30%~60%,明暗周期各 12 h,自由饮水、摄食。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:ZYFY20231110-23。

1.2 药物及主要试剂

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);龙胆泻肝丸(太极集团四川绵阳制药有限公司,国药准字:Z51021885,规格:6 g/袋×10 袋,批号:2212088)。

二甲苯(上海阿拉丁科技生化股份有限公司,批号:1330-20-7);无水乙醇、甲酚紫(国药集团化学试剂有限公司,批号:10009218、71044080);冰醋酸(天津科密欧化学试剂有限公司,批号:FX11610);4%多聚甲醛(北京兰杰柯科技有限公司,批号:BL539A);1,25-二羟基维生素 D₃(1,25-dihydroxy vitamin D₃, VD₃)、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)、雌激素(estradiol, E₂)、雄激素(testosterone, T)、游离三碘甲状腺原氨酸(free triiodothyronine, FT₃)、游离甲状腺素(free thyroxine, FT₄)、促甲状腺激素释放激素(thyrotropin releasing hormone, TRH)、促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH) ELISA 试剂盒[科鹿(武汉)生物科技有限责任公司,批号:23766513、27006143、27021144、27021200、

27006337、27005633、27003550、27003744、27007315、27007337];肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒[万类(沈阳)生物科技有限公司,批号:WLE04、WLE05]。

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(北京众实迪创科技发展有限公司,型号:ZS-SXJ-II、ZS-KC、1056000-2);石蜡切片机(德国徕卡仪器有限公司,型号:RM2235Leic);显微镜(日本 OLYMPUS 公司,型号:BX53);高速冷冻离心机(宁波新芝生物科技股份有限公司,型号:HSC-3020L);电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司,型号:HDPN-11-256);酶标检测仪(美国 Molecular 公司,型号:Cmaxplus)。

1.4 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)^[7];对照组注射等体积生理盐水。两组孕鼠所生仔鼠在日龄 7、14、21 d 时测体质量、身长、尾长,评估生长发育情况。雄性仔鼠日龄 21 d 时,通过三箱社交实验进行模型评价。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^[8-9]。筛选符合 ASD 疾病模型的雄性仔鼠 32 只,随机分为 ASD 组、ASD 肝肾不足组、六味地黄丸组、龙胆泻肝丸组,每组 8 只;从对照组雄性仔鼠中筛选 8 只,记为空白组。上述分组方法均采用随机数字表法。根据课题组前期研究经验^[6],选择六味地黄丸灌胃最佳剂量为 1.5 g·kg⁻¹。临床龙胆泻肝丸儿童给药剂量为 8 g/d,根据人与大鼠体表面积换算^[10], $A=K \times W^{2/3} \times 10^{-4}$,其中:A 为体表面积,以 m² 计算;W 为体质量,以 g 计算,人体质量按 4 岁儿童标准 16 kg 计算,幼鼠体质量按 100 g 计算;K 为常数,大鼠系数为 9.1。计算出龙胆泻肝丸给药剂量为 2.33 g·kg⁻¹。分别将两种丸剂溶于蒸馏水中配制成混悬液灌胃。每天上午,六味地黄丸组、龙胆泻肝丸组灌胃相应药物;空白组、ASD 组、ASD 肝肾不足组灌胃等量蒸馏水。每天下午,ASD 肝肾不足组、六味地黄丸组、龙胆泻肝丸组灌胃左甲状腺素钠(150 μg·kg⁻¹),然后距尾尖约 2 cm 处夹尾 5 min 给予情志刺激,每天 1 次,共 14 d^[11]。给药结束后,再次开展行为学检测。

1.5 发育学评价

在各组仔鼠日龄 7、14、21 d 时,测量体质量、身长、尾长,评估生长发育水平。

1.6 行为学评价

1.6.1 三箱社交实验^[9] 采用三箱社交实验评估社交行为,分 3 个阶段:(1)适应阶段:仔鼠在三箱中适应 10 min;(2)社交能力阶段:仔鼠在中央室,一侧放陌生鼠 1,一侧空置,记录 10 min 社交行为,若与陌生鼠 1 社交时间短于空室时间,提示社交能力障碍;(3)社交新颖性阶段:保持陌生鼠 1,空置笼中放入陌生鼠 2,记录 10 min 社交行为,若与陌生鼠 1 社交时间长于陌生鼠 2,提示社交新颖性障碍。

1.6.2 新事物识别实验^[9] 采用新事物识别实验评估学习记忆能力,分 3 个阶段。(1)仔鼠在行为箱自由活动 5 min 后移出,箱内放置两个相同物体;(2)仔鼠背对物体放入箱中央,记录 10 min 活动;(3)将一个物体替换为新物体,1 h 后记录仔鼠 10 min 活动。新事物指数=新物体探索时间/(新物体探索时间+旧物体探索时间)×100%。

1.6.3 旷场实验^[9] 采用旷场实验评估自发活动、探索行为和焦虑状态。将仔鼠从旷场箱正中放入,自由探索 10 min;随后用摄像头记录其在旷场箱中 15 min 内自由活动的数据,包括在旷场箱中运动总路程、总运动速度、中央区运动路程、停留时间、探索次数。总路程、中央区运动路程越大、运动速度越快、中央区停留时间越长、探索次数越多说明自发活动越活跃,焦虑情绪越低。

1.6.4 弹珠埋藏实验^[9] 采用弹珠埋藏实验评估刻板动作。在行为箱垫料上等距放置 20 颗弹珠,记录仔鼠在 30 min 内埋藏弹珠的情况,玉米垫料覆盖弹珠体积一半计为 1 个,掩埋弹珠数目越多说明刻板动作越严重。

1.7 证候评价

参照《儿童孤独症谱系障碍中西医结合干预专家共识》^[4]中 ASD 肝肾不足证的诊断标准,建立主次症结合的证候评价体系。具体如下:(1)主症评价。通过三箱实验大鼠主动社交时间评估“行为孤僻”;埋珠实验埋珠数目评价“刻板动作”;新事物识别实验记忆指数反映“智力落后”;旷场实验水平运动距离量化“精神呆钝”和“动作迟缓”;穿越中央区次数反映“焦虑状态”。(2)次症评价。测量体质量、身长、尾长评估是否“发育落后”;HE 染色观察股骨结构

判断“骨骼痿软”。(3)微观辨证。参照文献[11–12]检测 cAMP、cGMP、性激素、免疫因子、甲状腺激素及 EPO、VD₃ 水平,构建肝肾不足证生物学指标群。

1.8 检测指标

1.8.1 组织病理学检测 (1)尼氏染色。将固定后的组织进行脱水、透蜡、包埋、切片、脱蜡、甲酚紫染色、冰醋酸乙醇分化、脱水、封片后显微镜下观察拍照。(2)HE 染色。将固定后的组织进行脱水、透蜡、包埋、切片、脱蜡、HE 染色、脱水、封片后显微镜下观察拍照。

1.8.2 血清指标 打开腹腔,取腹主动脉血,室温静置 2 h,3 500 r/min 离心 15 min(离心半径 12.5 cm)后取上清液,分装保存至 -80 ℃冰箱备用。严格按各试剂盒的使用说明检测各组血清中 cAMP、cGMP、E₂、T、FT₃、FT₄、TRH、TSH、EPO、VD₃、TNF-α、IL-6 含量。

1.8.3 胸腺指数 打开胸腔,将胸腺用生理盐水冲洗,并用滤纸吸干,称重。胸腺指数=胸腺质量(mg)/体质量(g)。

1.9 统计学分析

运用 GraphPad Prism 9.0 软件统计并绘制统计图,数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,数据符合正态分布,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐者采用 *One-way ANOVA* 最小显著性差异法 (*LSD*) 进行两两比较,方差不齐者采用 *Kruskal-Wallis* 非参数检验,以 *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 VPA 对 SD 仔鼠生长发育的影响

与对照组相比,日龄 7、14、21 d 时,VPA 组仔鼠体质量更轻,身长、尾长更短 (*P* < 0.01),并且部分仔鼠存在严重生长发育迟缓、短尾畸形、折尾畸形、趾指畸形。详见图 1–2。

2.2 各组仔鼠社交行为比较

与空白组比较,ASD 组、ASD 肝肾不足组仔鼠与陌生鼠 1 社交时间更短 (*P* < 0.01),在空室中独处时间更长 (*P* < 0.01),与陌生鼠 2 社交时间更短 (*P* < 0.01)。与 ASD 组、ASD 肝肾不足组比较,六味地黄丸组仔鼠与陌生鼠 1 社交时间增加 (*P* < 0.01),在空室独处时间减少 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。与 ASD 肝肾不足组比较,六味地黄丸组与陌生鼠 2 社交时间增加 (*P* < 0.05)。详见图 3、表 1。

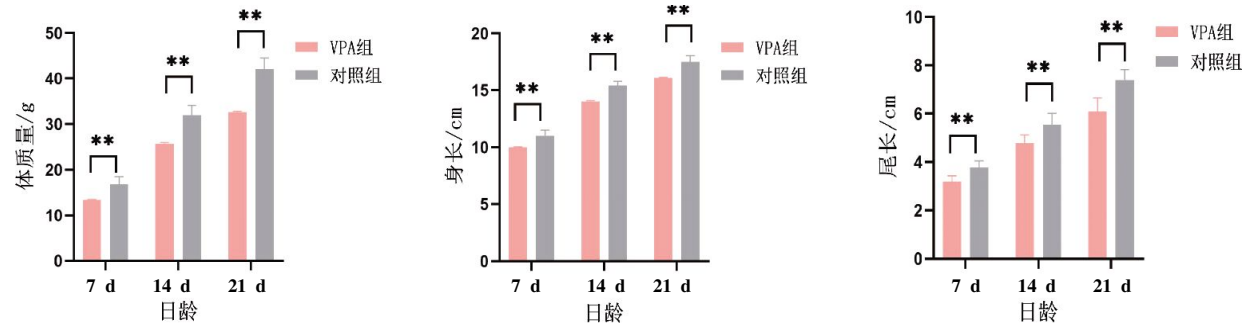


图 1 各组仔鼠生长发育评估图

Fig.1 Growth and development assessment charts each group of offspring rats

注:与对照组比较,**P<0.01。

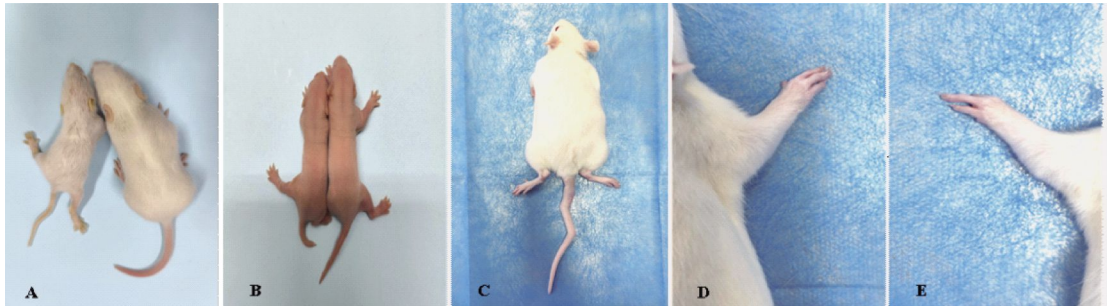


图 2 VPA 组仔鼠生长畸形图

Fig.2 Growth malformation chart of offspring rats in the VPA group

注:A.仔鼠严重发育迟缓;B.仔鼠短尾畸形;C.仔鼠折尾畸形;D、E.仔鼠趾指畸形。

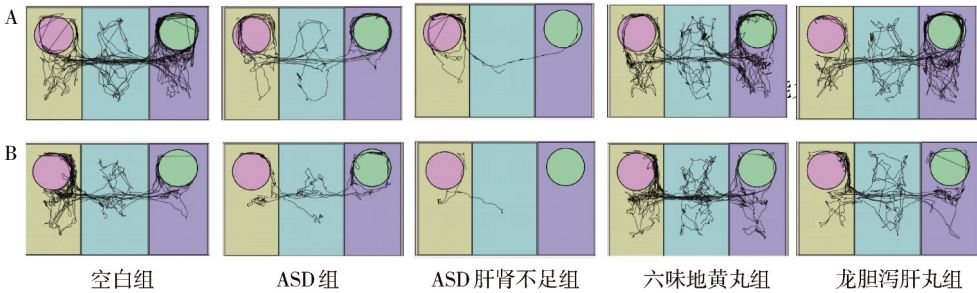


图 3 各组仔鼠三箱社交轨迹图

Fig.3 Three-chamber social interaction trajectories charts in each group of offspring rats

注:A.社交能力阶段;B.社交新颖性阶段。紫色矩形为陌生鼠 1 室,绿色圆形为陌生鼠 1;蓝色矩形为中央室;黄色矩形在社交能力阶段为物体室,在社交新颖性阶段为陌生鼠 2 室;粉色圆形在社交能力阶段为物体,在社交新颖性阶段为陌生鼠 2。

表 1 各组仔鼠社交时间比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Comparison of social interaction time among different groups of offspring rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	社交能力阶段		社交新颖性阶段	
	物体/s	陌生鼠 1/s	陌生鼠 1/s	陌生鼠 2/s
空白组	47.83±17.37	155.20±48.99	47.05±25.47	190.14±78.85
ASD 组	153.78±92.33**	33.58±23.28**	83.70±19.63	63.35±24.07**
ASD 肝肾不足组	177.34±45.74**	31.25±22.51**	85.03±63.43	36.32±31.33**
六味地黄丸组	58.96±38.40▲ ^{##}	100.06±9.70▲ ^{##}	51.93±26.64	102.49±23.47 [#]
龙胆泻肝丸组	134.70±66.25	69.98±13.67	71.81±29.00	63.17±21.09

注:与空白组比较,**P<0.01;与 ASD 组比较,▲P<0.05,▲▲P<0.01;与 ASD 肝肾不足组比较,*P<0.05,##P<0.01。

2.3 各组仔鼠学习记忆能力比较

与空白组比较,ASD 组、ASD 肝肾不足组仔鼠新事物识别指数均降低($P<0.01$)。与 ASD 组、ASD 肝肾不足组比较,六味地黄丸组新事物识别指数升高($P<0.01$)。与六味地黄丸组比较,龙胆泻肝丸组新事物识别指数降低($P<0.05$)。详见图 4。

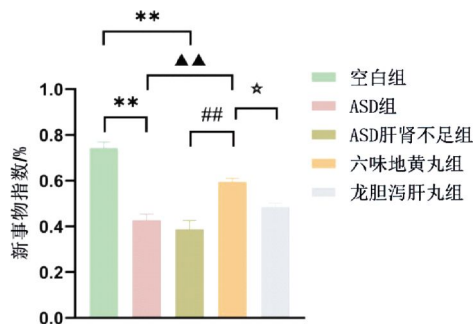


图 4 各组仔鼠新事物识别指数比较

Fig.4 Comparison of novel object recognition indexes among different groups of offspring rats

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与 ASD 组比较,▲ $P<0.01$;与 ASD 肝肾不足组比较,■ $P<0.01$;与六味地黄丸组比较,* $P<0.05$ 。

2.4 各组仔鼠旷场箱中焦虑状态比较

与空白组比较,ASD 组、ASD 肝肾不足组仔鼠在旷场箱中总路程更短($P<0.01$),总运动速度更慢($P<0.05$, $P<0.01$),在中央区路程及探索次数更少($P<0.01$);ASD 肝肾不足组在中央区停留时间更短($P<0.05$)。与 ASD 组比较,六味地黄丸组在中央区路程、探索次数更多($P<0.05$, $P<0.01$)。与 ASD 肝肾不足组比较,六味地黄丸组、龙胆泻肝丸组在中央区路程、探索次数更多($P<0.05$, $P<0.01$)。与六味地黄丸组比较,龙胆泻肝丸组在中央区探索次数更少($P<0.05$)。详见表 2。

2.5 各组仔鼠埋珠数目比较

与空白组比较,ASD 组、ASD 肝肾不足组仔鼠

埋珠数目增多($P<0.01$)。与 ASD 肝肾不足组比较,六味地黄丸组埋珠数目减少($P<0.05$)。详见图 5。

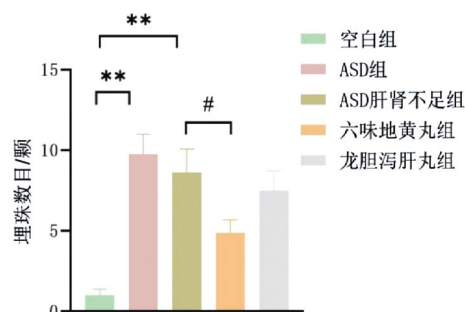


图 5 各组仔鼠埋珠数目比较

Fig.5 Comparison of the number of buried beads among different groups of offspring rats

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与 ASD 肝肾不足组比较,# $P<0.05$ 。

2.6 各组仔鼠前额叶组织神经元形态变化

与空白组比较,ASD 组、ASD 肝肾不足组前额叶均可见神经元变形,细胞核皱缩、深染、排列不齐,其中 ASD 肝肾不足组损伤更显著。与 ASD 肝肾不足组比较,六味地黄丸组、龙胆泻肝丸组神经元变形改善,未见其他明显异常,其中六味地黄丸组改善更显著。详见图 6。

与空白组比较,ASD 组、ASD 肝肾不足组脑组织结构异常,神经元细胞数量减少,部分神经元变性、核固缩,尼氏小体减少。与 ASD 肝肾不足组比较,六味地黄丸组脑组织结构异常减轻,神经元数量增加,少量神经元变性、核固缩,尼氏小体数量增多;龙胆泻肝丸组脑组织结构异常,神经元数量减少,部分神经元变性、核固缩,尼氏小体减少,可见空泡样病变。详见图 7。

2.7 各组仔鼠股骨组织病理学变化

与空白组比较,ASD 组骨小梁部分骨组织变细,但整体结构较为完整;ASD 肝肾不足组骨小梁

表 2 各组仔鼠旷场实验数据比较($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 2 Comparison of open field test data among different groups of offspring rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	总路程/cm	总运动速度/(cm/s)	中央区路程/cm	中央区停留时间/s	中央区探索次数/次
空白组	2 166.93±671.05	3.61±1.12	517.89±251.54	99.58±55.08	54.50±22.28
ASD 组	1 134.22±367.06**	1.89±0.61*	147.08±61.44**	38.84±54.74	16.63±7.01**
ASD 肝肾不足组	1 091.52±477.55**	1.82±0.78**	114.79±69.90**	27.75±44.65*	14.00±9.97**
六味地黄丸组	1 763.54±576.56	2.92±0.95	420.89±221.92▲#	58.05±33.16	40.63±11.19▲##
龙胆泻肝丸组	1 404.98±740.37	2.28±1.30	192.83±77.00#	18.78±13.20	20.75±10.05###

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 ASD 组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与 ASD 肝肾不足组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与六味地黄丸组比较,* $P<0.05$ 。

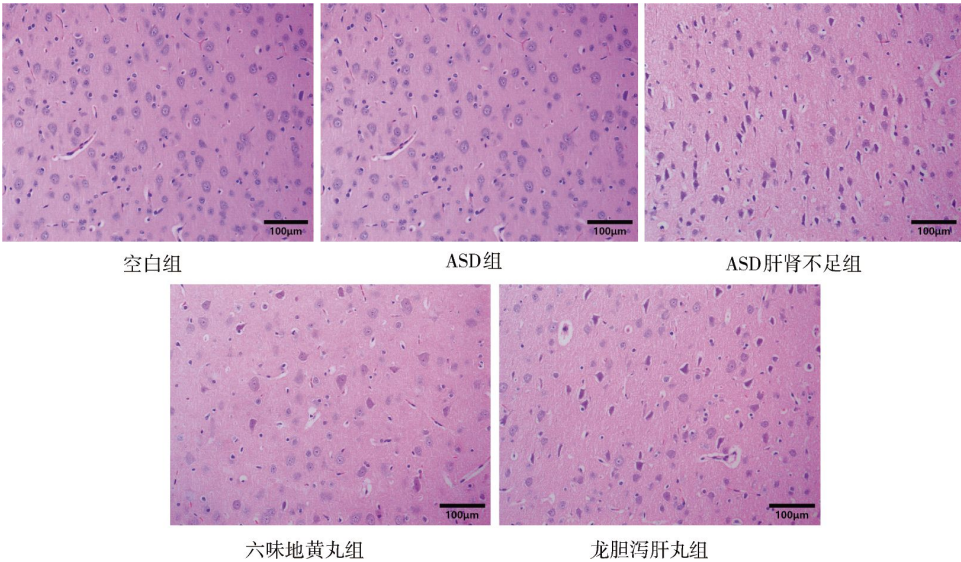


图 6 各组仔鼠前额叶 HE 染色图(×200)

Fig.6 HE staining images of the prefrontal lobe in each group of offspring rats (×200)

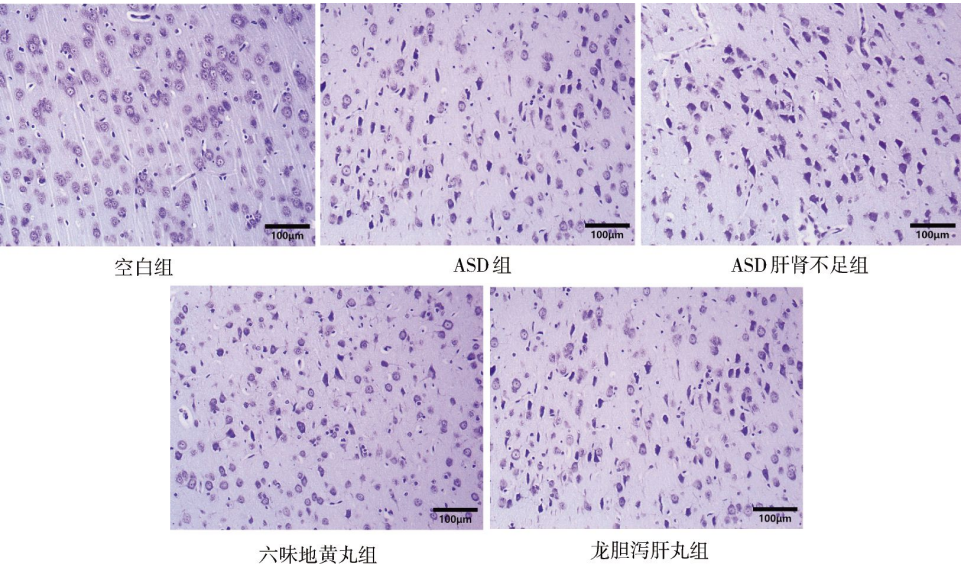


图 7 各组仔鼠前额叶尼氏染色图(×200)

Fig.7 Nissl staining images of the prefrontal lobe in each group of offspring rats (×200)

粗细不均,并出现较为明显的断裂。与 ASD 肝肾不足组比较,六味地黄丸组骨小梁粗细较为均匀,结构较为完整;龙胆泻肝丸组骨小梁部分骨组织变细,但整体结构较为完整。详见图 8。

2.8 各组仔鼠血清环核苷酸水平比较

与空白组比较,ASD 肝肾不足组仔鼠血清 cAMP、cAMP/cGMP 均升高($P<0.01$),cGMP 下降($P<0.05$)。与 ASD 肝肾不足组比较,六味地黄丸组 cAMP、cAMP/cGMP 均降低($P<0.01$),龙胆泻肝丸组 cAMP/cGMP 降低($P<0.05$)。详见表 3。

2.9 各组仔鼠血清激素水平比较

与空白组比较,ASD 肝肾不足组仔鼠血清 T 水

表 3 各组仔鼠血清环核苷酸水平比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Comparison of serum cyclic nucleotide levels among different groups of offspring rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	cAMP/(pg/mL)	cGMP/(pg/mL)	cAMP/cGMP
空白组	797.76±38.77	325.84±32.12	2.47±0.27
ASD 组	997.93±66.68	260.24±80.18	3.97±0.83
ASD 肝肾不足组	1110.02±68.79**	190.77±41.00*	6.01±1.22**
六味地黄丸组	881.87±91.53 [#]	270.98±62.19	3.35±0.54 [#]
龙胆泻肝丸组	977.26±164.34	259.38±55.82	3.94±1.01 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 ASD 肝肾不足组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

平下降($P<0.05$), E_2 、 E_2/T 水平升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与 ASD 肝肾不足组比较,六味地黄丸组、龙胆泻肝

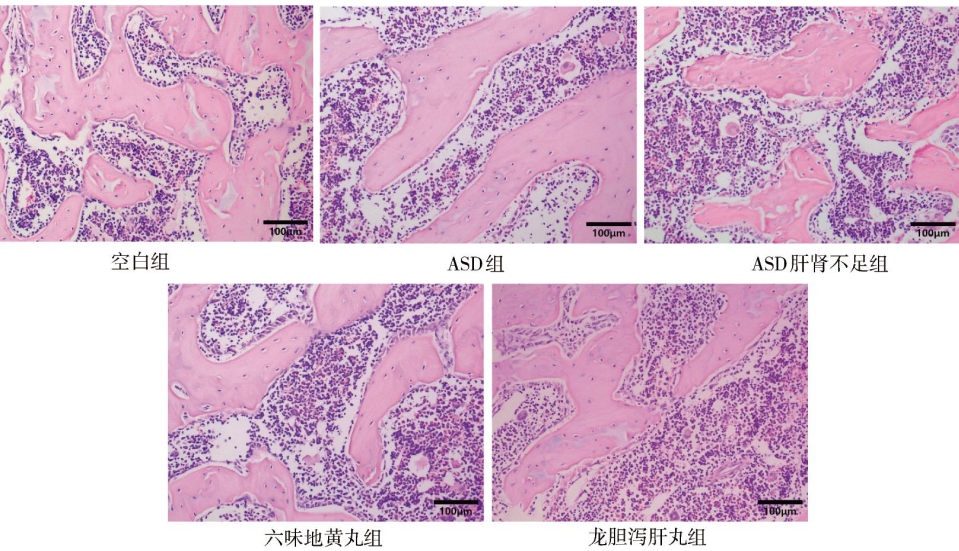


图 8 各组仔鼠股骨 HE 染色图(×200)

Fig.8 HE staining of femur in each group of offspring rats (×200)

丸组 E_2 水平下降($P<0.05$),六味地黄丸组 E_2/T 水平下降($P<0.05$)。详见表 4。

表 4 各组仔鼠血清激素水平比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Comparison of serum hormone levels among different groups of offspring rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	$E_2/(pg/mL)$	$T/(pg/mL)$	E_2/T
空白组	82.38 ± 5.39	251.81 ± 47.00	0.34 ± 0.09
ASD 组	100.43 ± 21.13	171.62 ± 94.18	0.679 ± 0.22
ASD 肝肾不足组	$122.13\pm 34.22^{**}$	$133.25\pm 49.74^*$	$0.98\pm 0.31^{**}$
六味地黄丸组	$87.44\pm 6.40^{\#}$	180.70 ± 57.78	$0.53\pm 0.16^{\#}$
龙胆泻肝丸组	$89.30\pm 6.99^{\#}$	139.86 ± 57.24	0.75 ± 0.34

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 ASD 肝肾不足组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

2.10 各组仔鼠血清甲状腺激素水平比较

与空白组比较,ASD 组 TSH 水平下降($P<0.05$),ASD 肝肾不足组 FT_3 、 FT_4 、TSH、TRH 下降($P<0.05$, $P<0.01$)。与 ASD 肝肾不足组比较,六味地黄丸组 FT_3 、 FT_4 、TSH、TRH 水平升高($P<0.05$, $P<0.01$)。详见表5。

表 5 各组仔鼠血清甲状腺激素水平比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Comparison of serum thyroid hormone levels among different groups of offspring rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	$FT_3/(pg/mL)$	$FT_4/(pg/mL)$	$TSH/(ng/mL)$	$TRH/(pg/mL)$
空白组	111.68 ± 47.07	102.13 ± 45.77	0.12 ± 0.02	154.45 ± 26.81
ASD 组	60.46 ± 33.37	54.75 ± 30.87	$0.09\pm 0.02^*$	93.66 ± 54.15
ASD 肝肾不足组	$44.51\pm 11.75^*$	$40.13\pm 10.31^*$	$0.07\pm 0.02^{**}$	$64.27\pm 12.69^{**}$
六味地黄丸组	$108.85\pm 27.87^{\#}$	$101.87\pm 26.80^{\#}$	$0.11\pm 0.02^{\#}$	$150.49\pm 35.98^{\#}$
龙胆泻肝丸组	59.64 ± 35.23	57.16 ± 33.57	0.08 ± 0.01	88.55 ± 32.80

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与 ASD 肝肾不足组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

2.11 各组仔鼠胸腺指数、血清免疫因子水平比较

与空白组比较,ASD 组、ASD 肝肾不足组仔鼠胸腺指数下降($P<0.05$, $P<0.01$),TNF- α 、IL-6 水平升高($P<0.01$)。与 ASD 组比较,六味地黄丸组 IL-6 水平下降($P<0.01$),龙胆泻肝丸组 TNF- α 水平下降($P<0.05$)。与 ASD 肝肾不足组比较,六味地黄丸组、龙胆泻肝丸组胸腺指数升高($P<0.01$),TNF- α 、IL-6 水平下降($P<0.01$)。与六味地黄丸组比较,龙胆泻肝丸组胸腺指数下降($P<0.05$)。详见表 6。

2.12 各组仔鼠血清 EPO、 VD_3 水平比较

与空白组比较,ASD 组 VD_3 水平下降($P<0.05$),ASD 肝肾不足组仔鼠血清 EPO、 VD_3 水平下降($P<0.01$, $P<0.05$)。与 ASD 组比较,六味地黄丸组 VD_3 水平升高($P<0.05$)。与 ASD 肝肾不足组比较,六味地黄丸组 EPO、 VD_3 水平升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与六味地黄丸组比较,龙胆泻肝丸组 EPO 水平下降($P<0.05$)。详见表 7。

表 6 各组仔鼠胸腺指数、血清免疫因子水平比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 6 Comparison of thymus indexes and serum immune factor levels among different groups of offspring rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	胸腺指数	TNF- α /(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)
空白组	3.73 $\pm$ 0.11	47.21 $\pm$ 8.62	31.77 $\pm$ 4.56
ASD 组	3.52 $\pm$ 0.08*	121.88 $\pm$ 15.44**	69.80 $\pm$ 8.22**
ASD 肝肾不足组	3.02 $\pm$ 0.18**	186.86 $\pm$ 28.44**	103.29 $\pm$ 12.99**
六味地黄丸组	3.66 $\pm$ 0.06 ^{##}	87.22 $\pm$ 10.24 ^{##}	46.25 $\pm$ 6.85 ^{▲##}
龙胆泻肝丸组	3.46 $\pm$ 0.12 ^{##*}	76.21 $\pm$ 5.96 ^{▲##}	49.12 $\pm$ 7.87 ^{##}

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 ASD 组比较,▲ $P<0.05$;与 ASD 肝肾不足组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与六味地黄丸组比较,^{*} $P<0.05$ 。

表 7 各组仔鼠血清 EPO、VD₃ 水平比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 7 Comparison of serum EPO and VD₃ levels among different groups of offspring rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	EPO/(pg/mL)	VD ₃ /(pg/mL)
空白组	98.04 $\pm$ 13.29	7 612.49 $\pm$ 95.67
ASD 组	67.15 $\pm$ 9.50	6 162.78 $\pm$ 618.19*
ASD 肝肾不足组	38.42 $\pm$ 12.95**	6 067.63 $\pm$ 251.19*
六味地黄丸组	81.68 $\pm$ 23.30 ^{##}	7 397.78 $\pm$ 207.99 ^{▲#}
龙胆泻肝丸组	43.10 $\pm$ 14.77 [*]	6 955.75 $\pm$ 717.85

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 ASD 组比较,▲ $P<0.05$;与 ASD 肝肾不足组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与六味地黄丸组比较,^{*} $P<0.05$ 。

3 讨论

ASD 以“不看、不应、不语、不指、不当”为核心表现,且多伴发育迟缓^[13]。本病受遗传和环境因素影响^[14]。中医学将 ASD 归属于“五迟五软”“童昏”等范畴,病机关键为肝肾不足、脑髓失养。研究发现,孕期暴露 VPA 后导致子代罹患 ASD 风险增加^[15]。肾精为先天之精,禀受于父母。因此,母亲孕期的亏虚或受药物的干扰会导致子代出现发育迟缓等先天不足的表现^[16]。本研究中,在孕期腹腔注射 VPA 后,孕鼠出现腹部肌肉挛缩、四肢无力瘫软反应,导致孕鼠孕期亏虚,结合 VPA 对胚胎发育的干扰最终导致子代先天不足。激素结合激怒法通过诱导慢性应激和代谢紊乱,模拟 ASD 患者情绪障碍及肝气郁结、肾气不固状态。二者结合既体现 ASD 的生物学发病机制,又契合“肝肾同源”“精血不足”的中医病机理论。同时,研究通过行为学实验证实,VPA 组仔鼠存在社交障碍、刻板行为和狭隘兴趣的 ASD 三大核心特征;发育评估显示,VPA 组仔鼠体格发育显著落

后,且 ASD 肝肾不足组出现形瘦、毛发枯槁及易激惹等肝肾不足证候;新事物识别实验进一步证实其学习记忆能力受损。综上,提示模型构建成功。

脑前额叶皮质(prefrontal cortex, PFC)是 ASD 认知功能障碍的关键脑区^[17]。病理染色结果表明,ASD 组和 ASD 肝肾不足组 PFC 均存在损伤,提示脑髓失养的病理性改变。分子层面,ASD 肝肾不足组 cAMP/cGMP 升高,血清性激素及甲状腺激素紊乱,反映“阴阳失调”的证候特征^[18-19]。此外,胸腺指数降低及免疫因子升高提示免疫功能异常,与中医学“肾主骨生髓”功能受损相符。股骨组织病理结果显示,骨小梁变细断裂,印证“肾精不足则骨痿”的理论。

研究表明,EPO 和 VD₃ 具有重要的神经保护作用^[20-21]。在中医学中,“肾”是一个功能系统,具有藏精、主生长发育、主骨生髓等多种生理功能。“肾精”概念与现代医学中肾脏分泌 EPO、VD₃ 在功能上有相似性,例如 EPO、VD₃ 的神经保护和营养机体作用,与中医学“肾精”主生长发育、滋养脏腑等功能有一定联系。本研究中,ASD 肝肾不足组仔鼠的 EPO 和 VD₃ 水平下降,这可能表明 EPO 和 VD₃ 的缺乏与“先天不足”“肾精亏虚”有一定关联。

六味地黄丸由熟地黄、山茱萸、山药、牡丹皮、茯苓、泽泻组成。本方熟地黄补肾填精,配伍山茱萸、山药,填补三阴,牡丹皮、茯苓、泽泻泄相火、渗脾湿。诸药合用谨守病机,滋补肝肾。故设本方为方证对应组。龙胆泻肝丸由龙胆、柴胡、黄芩、栀子、泽泻、木通、车前子、当归、生地黄、炙甘草组成,有清肝泻火之功。方中龙胆为君,配伍黄芩、栀子清热泻火;泽泻、木通、车前子利水渗湿;当归、生地黄滋养阴血、防止苦寒;柴胡疏肝利胆;炙甘草调和诸药。临床用于治疗 ASD 心肝火旺实证,故设为非方证对应组。本研究结果表明,六味地黄丸能显著减轻社交障碍、焦虑状态、刻板动作,提升记忆认知,减轻 PFC 神经元损伤、改善股骨组织病理学异常,改善阴阳失调、代谢紊乱、免疫失衡和上调 EPO、VD₃,综合缓解 ASD 肝肾不足病证动物模型虚证状态,通过滋补肝肾起到治疗作用。而龙胆泻肝丸能部分改善上述病理变化但不能显著上调 EPO、VD₃ 水平,这表明六味地黄丸对 ASD 肝肾不足证大鼠的神经保护作用可能是通过改善肾脏分泌 EPO、VD₃ 功能实现的,同时

通过以方测证方式验证 ASD 肝肾不足证病证模型的成功建立以及方证对应的疗效。

综上所述,本研究通过孕期注射 VPA+激素结合激怒法构建 ASD 肝肾不足病证结合动物模型,并从多维度证实该病证结合动物模型构建成功。但是,舌脉是中医辨证的重要依据,本研究尚未结合动物舌脉,且对骨骼痿软的评价缺少更规范的客观标准,课题组今后将进一步改进病证模型造模方式,结合小动物四诊仪、小动物 CT 等现代化实验仪器对病证结合动物模型展开更客观的评估,以期为中医药干预 ASD 标准化诊疗体系的构建奠定基础。

参考文献

- [1] JOON P, KUMAR A, PARLE M. What is autism?[J]. *Pharmacological Reports*, 2021, 73(5): 1255–1264.
- [2] WAIZBARD-BARTOV E, FERRER E, HEATH B, et al. Identifying autism symptom severity trajectories across childhood [J]. *Autism Research*, 2022, 15(4): 687–701.
- [3] 达振强, 汪玉凤, 汪利霞, 等. 基于全球疾病负担大数据的中国孤独症谱系障碍患病现状及趋势分析[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2022, 48(5): 38–44.
- [4] 湖南省中医药和中西医结合学会儿科专业委员会. 儿童孤独症谱系障碍中西医结合干预专家共识[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(2): 169–175.
- [5] 邵雨晴, 朱沁泉, 张 涤. 张涤基于魂魄学说论治儿童孤独症经验[J]. *中医药导报*, 2022, 28(4): 168–170, 185.
- [6] 吴 吉, 郝兴宇, 叶 勇, 等. 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小鼠的作用机制[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(2): 176–184.
- [7] ZARATE-LOPEZ D, TORRES-CHÁVEZ A L, GÁLVEZ-CONTRERAS A Y, et al. Three decades of valproate: A current model for studying autism spectrum disorder[J]. *Current Neuropharmacology*, 2024, 22(2): 260–289.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 魏 伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [11] 黄志强, 张建军, 赵丹萍, 等. 肝肾阴虚证候小鼠模型的建立及枸杞菊花方缓解视疲劳的中医功效研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2022, 45(6): 578–586.
- [12] 李瑞暖, 刁丽梅. 探索急性癫痫肝肾阴虚证病证结合动物模型构建思路[J]. *中医药学报*, 2023, 51(2): 88–92.
- [13] 周荣易, 马丙祥, 周 正, 等. 孤独症谱系障碍“五不”行为的中医五脏发生机理探析[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(11): 6390–6394.
- [14] MIANI A, IMBRIANI G, DE FILIPPIS G, et al. Autism spectrum disorder and prenatal or early life exposure to pesticides: A short review[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 18(20): 10991.
- [15] MENG Q, ZHANG W, WANG X, et al. Human forebrain organoids reveal connections between valproic acid exposure and autism risk[J]. *Translational Psychiatry*, 2022, 12(1): 130.
- [16] 陈好远, 沈 灿, 张泽权, 等. 左归丸干预子代先天精亏进展及其“补益先天”探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(17): 51–59.
- [17] MEDIANE D H, BASU S, CAHILL E N, et al. Medial prefrontal cortex circuitry and social behaviour in autism[J]. *Neuropharmacology*, 2024, 260: 110101.
- [18] WANG X, DU Y, WU C T, et al. UHPLC-MS/MS analysis of cAMP and cGMP in rat plasma as potential biomarkers of Yin-Yang disharmony in traditional Chinese medicine[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2021, 11(4): 458–464.
- [19] 冯芮琪, 战丽彬. 阴虚证诊断标准的现代文献研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(7): 1119–1122, 1150.
- [20] HOSNY S A, ABDELMENEM A M, AZOUZ T, et al. Beneficial effect of erythropoietin on ameliorating propionic acid-induced autistic-like features in young rats[J]. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 2023, 56(5): 77–86.
- [21] 于海洋, 陈雨佳, 刘怀全, 等. 基于补肾填精法探讨防治孤独症谱系障碍的潜在靶点: 聚焦维生素 D[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(1): 130–133.

(本文编辑 周 旦)