

本文引用: 叶 勇, 吴 吉, 赵 凡, 朱沁泉, 张 涤. 基于网络药理学结合动物实验探究六味地黄丸治疗孤独症谱系障碍的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(2): 185-196.

基于网络药理学结合动物实验探究六味地黄丸治疗孤独症谱系障碍的作用机制

叶 勇¹, 吴 吉², 赵 凡², 朱沁泉², 张 涤*

1. 湖南中医药大学第一中医临床学院, 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 采用网络药理学、分子对接技术结合动物实验探究六味地黄丸治疗孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)的潜在作用机制。**方法** 通过 TCSP 数据库获取六味地黄丸的有效活性成分及对应的靶基因信息, 通过 GeneCards、OMIM、DrugBank 数据库获取 ASD 疾病靶基因; 将上述靶基因用韦恩图取交集后再用 STRING 数据库构建关键靶点 PPI 网络; 用 Metascape 数据库对关键靶点进行 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析; 用 Autodock 软件对核心靶点及六味地黄丸有效成分进行分子对接。动物实验验证: 选用 8 只 SPF 级 SD 孕鼠, 随机分为空白孕鼠组(1 只)及模型孕鼠组(7 只), 采用腹腔注射丙戊酸钠(valproate, VPA)造模。筛选符合 ASD 疾病模型的 30 只雄性仔鼠, 随机分为模型对照组, 维生素 D 组和中药高、中、低剂量组; 同样筛选出空白仔鼠, 为空白组, 每组 6 只。中药低、中、高剂量组分别予六味地黄丸悬浮液 0.75、1.5、3 g/kg 灌胃; 维生素 D 组予维生素 D 滴剂 1 480 IU/kg 灌胃; 模型组、空白组予等量生理盐水灌胃。均干预 1 次/d, 连续干预 2 周。采用三箱社交实验、旷场实验评估大鼠社交情况; ELISA 检测各组仔鼠海马体糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)、 β -连环蛋白(β -Catenin)水平; Western blot 检测各组仔鼠海马体中 β -Catenin、髓细胞增生原癌基因(cellular myelocytomatosis oncogene, c-Myc)、细胞周期蛋白 D1(cell cycle protein D1, Cyclin D1)蛋白表达水平。**结果** 从六味地黄丸中筛选共得到 74 个活性成分及 205 个药物靶基因, 3 903 个 ASD 疾病靶基因, 127 个关键靶点及蛋白激酶 B α (protein kinase B α , Akt1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等核心靶点。GO 功能富集显示主要作用于有机氮原化合物的细胞反应、突触后膜、突触后神经递质受体活动等, KEGG 通路富集显示调控 TNF、核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、Wnt 等信号通路。分子对接结果显示, 六味地黄丸中的有效成分可与核心蛋白 Akt1 结构稳定。动物实验结果显示, 在社交能力测试阶段, 模型组、维生素 D 组及中药低、中、高剂量组仔鼠接触陌生鼠 1 的时间均短于空白组($P < 0.05$); 给药 2 周后, 维生素 D 组及中药低、中、高剂量组接触陌生鼠 1 的时间延长($P < 0.05$)。在社交新颖性测试阶段, 模型组、维生素 D 组和中药低、中、高剂量组仔鼠接触陌生鼠 2 的时间短于空白组($P < 0.05$); 给药 2 周后, 维生素 D 组及中药低、中、高剂量组接触陌生鼠 2 的时间延长($P < 0.05$)。旷场实验结果提示, 治疗后, 中药低、中剂量组活动总路程及中央区域活动路程均增加($P < 0.05$), 维生素 D 组、中药高剂量组活动总路程增加($P < 0.05$)。与模型组比较, 维生素 D 组及中药低、中、高剂量组 GSK-3 β 水平升高($P < 0.05$), β -Catenin 水平降低($P < 0.05$), β -Catenin、c-Myc 蛋白表达减少($P < 0.05$); 中药低剂量组 Cyclin D1 蛋白表达减少($P < 0.05$)。**结论** 六味地黄丸可有效调控 Wnt 信号通路, 改善 VPA 诱导的 ASD 仔鼠社交行为、焦虑状态。

【关键词】 网络药理学; 分子对接; 六味地黄丸; 孤独症谱系障碍; Wnt 信号通路

【中图分类号】R272

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.02.003

Mechanism of action of Liuwei Dihuang Pill in treating autism spectrum disorder based on network pharmacology and animal experiments

YE Yong¹, WU Ji², ZHAO Fan², ZHU Qinquan², ZHANG Di^{2*}

【收稿日期】2023-12-04

【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项目(202206010043); 湖南省中医药科研课题(A2023036); 湖南中医药大学校级研究生创新课题项目(CX20220803); 卫生健康高层次人次计划项目(ezxm-rsk-2023002)。

【通信作者】* 张 涤, 男, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: 2655357548@qq.com.

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

[Abstract] Objective To explore the potential mechanism of action of Liuwei Dihuang Pill (LWDHP) in treating autism spectrum disorder (ASD) using network pharmacology, molecular docking technology, and animal experiments. **Methods** The active ingredients and corresponding target gene information of LWDHP were obtained through the TCMSD database, and ASD disease target genes were obtained through the databases of GeneCards, OMIM, and DrugBank; the above target genes were intersected with Venn diagram, and then the STRING database was used to construct the PPI network of the key targets; GO and KEGG enrichment analyses of the key targets was performed using the Metascape database. The Autodock software was used for molecular docking of the core targets and active ingredients of LWDHP. Animal experimental verification: Eight SPF SD pregnant rats were randomized into blank pregnant rat group ($n=1$) and model pregnant rat group ($n=7$) which was modeled by intraperitoneal injection of sodium valproate (VPA). Thirty neonatal male rats conforming to the ASD disease model were selected and randomly subdivided into model group, vitamin D group, high-, medium-, and low-dose LWDHP groups, meanwhile, the neonatal rats from blank pregnant rat group were selected as blank group, with six rats in each group. Low-, medium-, and high-dose LWDHP groups were given 0.75, 1.5, and 3 g/kg LWDHP suspension, respectively, vitamin D group 1 480 IU/kg vitamin D drops, and model and blank groups an equal amount of normal saline, once a day by gavage, continuously intervened for two weeks. Then, three-box social test and open field test were conducted to evaluate the social behaviors of rats. ELISA was used to determine the levels of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) and β -catenin in the hippocampus of the neonatal rats in each group; Western blot was used to examine the protein expression levels of β -catenin, cellular myelocytomatosis oncogene (c-Myc), and cell cycle protein D1 (Cyclin D1) in the hippocampus. **Results** A total of 74 active ingredients and 208 drug target genes of LWDHP were obtained, as well as 3903 ASD disease target genes and 127 key targets including core targets of protein kinase B α (Akt1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1), and tumor necrosis factor (TNF), etc.; GO function enrichment showed that LWDHP mainly acted on cellular responses of organic nitrogen-containing compounds, postsynaptic membranes, and postsynaptic neurotransmitter receptor activity, and others; KEGG pathway enrichment showed that it regulated signaling pathways of TNF, nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B), Wnt, and others; the molecular docking showed that the active ingredients in LWDHP could be structurally stable with the core protein Akt1. Animal experiments showed that in the test of social ability, compared with blank group, the neonatal rats in model group, vitamin D group, and low-, medium-, and high-dose LWDHP groups had shorter contact time with unfamiliar rat I ($P<0.05$); after 2 weeks of administration, the contact time with unfamiliar rat I of the neonatal rats in vitamin D group and low-, medium-, and high-dose LWDHP groups was prolonged ($P<0.05$). In the test of social novelty, the neonatal rats in model group, vitamin D group, and low-, medium-, and high-dose LWDHP groups had shorter contact time with unfamiliar rat II compared with those in blank group ($P<0.05$); after 2 weeks of administration, the contact time with unfamiliar rat II of the neonatal rats in vitamin D group and low-, medium-, and high-dose LWDHP groups was prolonged ($P<0.05$). The open field test showed that after treatment, both the total activity distance and activity distance in the central area of the neonatal rats in low- and medium-dose LWDHP groups increased ($P<0.05$), and the total activity distance of the neonatal rats in vitamin D and high-dose LWDHP groups increased ($P<0.05$). Compared with model group, vitamin D group and low-, medium-, and high-dose LWDHP groups showed higher GSK-3 β level ($P<0.05$), lower β -Catenin level ($P<0.05$), and reduced protein expressions of β -Catenin and c-Myc ($P<0.05$); the protein expression of Cyclin D1 in low-dose LWDHP group decreased ($P<0.05$). **Conclusion** LWDHP can effectively regulate the Wnt signaling pathway, and improve the social behaviors and reduce anxiety of rats with VPA-induced ASD.

[Keywords] network pharmacology; molecular docking; Liuwei Dihuang Pill; autism spectrum disorder; Wnt signaling pathway

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)是儿童最常见的发生于发育早期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

狭隘等^[1]。儿童 ASD 发病率为 1.5%~2%,其中男性约是女性的 4 倍;近年来,儿童 ASD 的患病率呈逐年上升趋势,确诊年龄越来越小^[2-3]。ASD 大多患儿

成年后不具备独立生活、学习和工作能力,给家庭和社会带来沉重负担^[4]。ASD 病因非常复杂,近几十年来,尽管研究者致力于 ASD 病因学研究,对 ASD 的认识也越来越多,但其病因学机制尚未完全明确^[5-7]。目前,尚无针对 ASD 核心症状的特效药物,ASD 临床表现及其常见并发症有高度异质性^[8],故 ASD 的药物治疗极具挑战性。而中医药在治疗 ASD 上具有独特的优势。张涤教授认为 ASD 多因先天不足、肝肾阴虚所致,且在临床中肝肾阴虚证为最常见的证型,多选用六味地黄丸加减治疗。因此,本研究采用网络药理学和分子对接技术探究六味地黄丸治疗 ASD 的机制并加以实验验证,为 ASD 的靶向治疗提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 六味地黄丸有效化学成分及作用靶点筛选

采用 TCMSp 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>),筛选六味地黄丸中熟地黄、山茱萸、山药、牡丹皮、泽泻、茯苓的活性成分,并检索活性成分的对靶蛋白。限定检索条件为口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 。再运用 UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/>)将六味地黄丸各药物活性成分的靶蛋白逐一输入 UniProt KB 进行检索,限定物种为“Human”,限定检索结果为“已验证”,选择“Reviewed”,最终得到对应的靶基因信息。

1.2 ASD 相关靶点筛选

在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<http://www.omim.org>)、DrugBank 数据库(<https://www.drugbank.ca/>),以“autism spectrum disorder”为关键词,分别搜索并筛选与 ASD 相关的所有靶点,删去重复靶点,得到 ASD 的相关靶基因。

1.3 关键靶点网络构建

利用韦恩图取六味地黄丸和 ASD 的靶基因交集,即六味地黄丸治疗 ASD 的关键靶点。利用 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)建立关键靶点 PPI 网络,得到六味地黄丸干预 ASD 的核心靶点。

1.4 富集分析

将关键靶点运用 Metascape 数据库(<https://metascape.org/>)进行 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分

析,限定物种为“Homo sapiens”,分别选择生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)及 KEGG 进行富集分析,设置条件 $P < 0.05$ 。

1.5 六味地黄丸活性成分与核心靶点分子对接

通过对六味地黄丸各药物 Degree 值排名靠前的活性成分与核心靶点进行分子对接。运用 ChEMBL Ultra 下载六味地黄丸药物活性成分的结构图,以“cdx”格式保存后再用 Chew3D Ultra 软件最小能量化“Minimize Energy”,以“pdb”格式保存;运用 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)下载六味地黄丸干预 ASD 的核心靶点的 3D 结构图,以“pdb”格式保存;将二者导入 Autodock 软件去水、加氢、加电荷、定义原子类型等,进行分子对接。最后,运用 PyMol 软件将对接结果进行可视化分析。

1.6 实验验证

1.6.1 实验动物 选取健康成年 SPF 级 SD 孕鼠 8 只(体质量 330~400 g),购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号:SCKX (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。饲养系统内环境温度恒定在 22~24 °C,相对湿度恒定在 50%~60%,保证每日周期性光照 12 h。

1.6.2 主要药物及试剂 六味地黄丸悬浮液,药物制备过程如下:取 100 g 六味地黄丸(九芝堂股份有限公司,批号:202211111)药丸研磨成粉,溶解于 100 mL 生理盐水制备成 1 g/mL 的悬浮液。丙戊酸钠(valproate, VPA)粉剂[默克化工技术(上海)有限公司,批号:P4543];维生素 D 滴剂(青岛双鲸药业股份有限公司,批号:2110271);戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:BCP07810); β -连环蛋白(β -Catenin)、糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)ELISA 检测试剂盒(厦门仑昌硕生物科技有限公司,批号分别为:YD-34641、CK-EN30804);BCA 蛋白试剂盒、5 \times 蛋白上样缓冲液、RIPA 裂解液、磷酸化蛋白酶抑制剂、甘氨酸、髓细胞增生原癌基因(c-Myc)抗体、细胞周期蛋白 D1(cell cycle protein D₁, Cyclin D₁)抗体(皮诺飞生物科技有限公司,批号分别为:P0009、PN0033、P0005、P0007、P0098、67447-1-IG、60186-1-IG);磷酸化蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白定量检测试剂盒、山羊抗兔 IgG(H+L)、山羊抗鼠 IgG(H+L)

(塞维尔生物科技有限公司,批号分别为:G2007、G2026、G1213、G1214);蛋白酶抑制剂(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P1030);吐温 20(北京索莱宝科技有限公司,批号:#T8220);ECL 化学发光底物(伯乐生命医学产品有限公司,批号:170-5060);蛋白 Marker(宝日生物技术有限公司,批号:3585A)。

1.6.3 主要仪器 三箱社交行为箱、旷场实验箱、Labmaze3.0 动物行为轨迹分析系统(北京众实迪创科技发展有限公司,型号分别为:ZS-SXJ-II、ZS-KC、1056000-2);卧式冷冻箱(长虹美菱股份有限公司,型号:BCD-318AT);电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司,型号:ME203E/02];台式高速冷冻离心机(北京大龙兴创实验仪器有限公司,型号:D3024R);全自动洗板机(雷杜生命科技有限公司,型号:RT-3100C);涡旋混合器、磁力搅拌器(塞维尔生物科技有限公司,型号分别为:MX-F、MS-150);精密 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司,型号:PHS-3C);暗匣(广东粤华医疗器械厂有限公司,型号:AX-II)。

1.6.4 动物造模 在 8 只 SPF 级 SD 孕鼠(孕 13 d)中随机抽取 1 只为空白孕鼠组,余 7 只为模型孕鼠组,模型孕鼠组参照 Schneider^[9]方法,按 600 mg/kg 剂量单次腹腔注射 250 mg/mL VPA 溶液(1 g VPA+4 mL 生理盐水溶液),空白孕鼠组注射等体积生理盐水。模型孕鼠组和空白孕鼠组所生仔鼠分别记为模型仔鼠和空白仔鼠。孕鼠以普通饲料喂养,孕鼠按 1 只/笼待产直至哺乳期,仔鼠按 14~16 只/笼的喂养密度进行哺乳。在三箱社交实验的社交能力测试阶段,接触陌生鼠 1 的时间短于接触物体的时间判定为社交能力缺陷;在社交新颖性测试阶段,接触陌生鼠 2 的时间短于陌生鼠 1 的时间判定为社交新颖性障碍。以仔鼠表现社交能力缺陷或者社交新颖性障碍判定为造模成功^[10]。

1.6.5 模型评价 (1)三箱社交实验^[11]用于评估仔鼠社交行为。用配备摄像头的自动跟踪系统记录被测试仔鼠在三箱内停留的时间及运动轨迹;用 Lab-Maze 分析软件统计仔鼠的社交信息。适应阶段:将实验仔鼠放入行为箱的中央室,打开左右挡板的小

门使其自由活动 10 min,充分熟悉环境。社交能力检测:将仔鼠重新放至中央室,关闭左右挡板的小门,并在左右两室的束缚器中随机放入一只同种相似年龄段的仔鼠(陌生鼠 1),另一个保持空置,打开左右挡板的小门使其自由活动 10 min 并记录。社交新颖性检测:将仔鼠重新放至中央室,关闭左右挡板的小门,取出陌生鼠 1 再次随机放入到任一束缚器中,然后在另一束缚器中放入另一只同种相似年龄段的仔鼠(陌生鼠 2),打开左右挡板的小门使其自由活动 10 min 并记录。(2)旷场实验^[11]用于评估仔鼠自发活动、探索行为和焦虑状态。使用配备摄像头的自动跟踪系统记录 15 min 内仔鼠移动距离和移动持续时间,利用 LabMaze 系统统计和分析不同的观察指标;行为箱整体为 50 cm×50 cm×50 cm 敞口的正方体。适应阶段:实验时将仔鼠背朝实验人员放入行为箱的正中心,让其自由探索 10 min;优先统计在行为箱中仔鼠 15 min 内活动的总路程。在计算机的 LabMaze 软件上根据人为划分的中央区(中央直径约 12 cm 的正方形)和周边区(正方形以外的其他区域),统计仔鼠在中央区运动的距离以及在中央区所待的时间及穿越中央格子的次数。

以上 2 个实验中的每个阶段前均用 75%乙醇清洗行为箱;实验结束将仔鼠放回饲养笼,清洗行为箱并统计实验数据。

1.6.6 动物分组 模型仔鼠 21 d 断乳,剔除雌性仔鼠,将雄性仔鼠通过行为学(三箱社交实验、旷场实验)进行模型评价。筛选符合 ASD 疾病模型的雄性仔鼠 30 只,记为 ASD 组,并随机分为模型组,维生素 D 组,中药高、中、低剂量组,每组 6 只。空白仔鼠同样经过行为学检测筛选出 6 只雄性仔鼠,记为空白组。

1.6.7 动物给药与干预 首先根据儿童与成人之间体表面积换算公式计算给药,然后按照成人与动物之间的药物换算公式计算给药^[12];中药低、中、高剂量组分别予六味地黄丸悬浮液 0.75、1.5、3 g/kg 灌胃;维生素 D 组予维生素 D 滴剂 1 480 IU/kg 灌胃;模型组、空白组予等量生理盐水灌胃。各组仔鼠干预 1 次/d,连续干预 2 周。干预结束后再次开展行为学

实验(三箱社交实验、旷场实验)。

1.6.8 实验取材 行为学检测结束后,用3%戊巴比妥钠(100 mg/kg)腹腔注射深度麻醉。用75%乙醇消毒头部后从颈部断离头部,剪开头皮、颅骨,取出大脑,置于盛有冰的无菌小器皿上,取出海马组织,-80℃保存,备用。

1.6.9 GSK3 β 、 β -Catenin 水平检测 取海马组织匀浆,按照GSK3 β 、 β -Catenin的ELISA试剂盒说明书进行检测。处理完成后在450 nm波长下,酶标仪测定吸光度,根据标准品的浓度标准曲线,然后根据标准曲线计算各样本浓度。

1.6.10 β -Catenin、c-Myc、Cyclin D1 蛋白表达水平检测 取海马组织加入蛋白提取试剂,冰浴彻底匀浆后转移至离心管中,移液器反复吹打,确保匀浆液完全裂解。4℃12 000 r/min(离心半径8 cm)离心15 min,收集上清液,即为总蛋白溶液。每个样品加入蛋白上样缓冲液,涡旋混匀,98℃加热10 min,至样本呈水样后离心,涡旋混匀,离心后点样;将各组蛋白样品在凝胶中电泳,PVDF转膜;取出膜于5%脱脂奶粉,脱色摇床上振荡封闭1 h;加入一抗(1:1 000),4℃孵育过夜,用TBST清洗5次,每次5 min;加入二抗(1:300),孵育1 h。用TBST清洗5次,每次5 min;滴加新鲜配制的ECL混合溶液,发光检测,根据不同的光强度调整曝光条件,显影、定影。

1.7 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.5进行数据分析。计量资料均使用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,数据符合正态分布且符合方差齐性检验采用单因素方差分析,组间多重比较采用LSD法。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 六味地黄丸药物活性成分及靶点筛选

共得到山茱萸、山药、茯苓、熟地黄、泽泻、牡丹皮活性成分74个,其中山茱萸20个、山药16个、茯苓15个、熟地黄2个、泽泻10个、牡丹皮11个。检索山茱萸、山药、茯苓、熟地黄、泽泻、牡丹皮活性成分对应的靶蛋白。运用UniProt数据库,将检索到的靶蛋白逐一转化为对应的靶基因,合并后删去重复值,最终得到靶基因205个。详见表1。

2.2 ASD疾病相关靶点筛选

分别获得ASD疾病相关靶点3 729个、655个、55个,合并以上检索结果并删去重复值,共得到ASD疾病相关靶点3 903个。

2.3 六味地黄丸干预ASD的核心靶点筛选

构建六味地黄丸活性成分与ASD关键靶点的PPI网络图,其含有节点127个,边1 716条,平均节点度值为27。六味地黄丸干预ASD可能通过蛋白激酶B α (protein kinase B α ,Akt1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-1、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等核心靶点起作用。详见图1。

2.4 关键靶点的富集分析结果

对127个关键靶点进行生物学功能注释分析,得到与ASD关联度较高的富集分析结果。BP主要富集在有机氮原化合物的细胞反应、对异种生物刺激的反应、对有机环化合物的细胞反应、对氧气水平下降的反应、膜电位的调节等。CC主要富集在突触后膜、膜筏、树状体膜、神经元细胞体、血浆膜蛋白复合物等。MF涉及突触后神经递质受体活动、G蛋白联胺受体活性、DNA转录因子结合、蛋白质同聚反应、乙酰胆碱受体活性。详见图2。KEGG富集到30条相关通路,通过气泡图显示相关性较高的信号通路,除去不相关通路,主要涉及TNF、核因子 κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)、Wnt等信号通路。详见图3。

2.5 六味地黄丸活性成分与靶点分子对接验证

分子对接结果显示,MOL005 531(远华蟾蜍精)及MOL000359(豆甾醇)与核心蛋白Akt1结合构象稳定,分别在LYS-17、GLU-85、ARG-86、THR-87及THR-21处形成氢键,2者结合能分别为-7.74、-6.55 kcal/mol。运用PyMol软件对上述分子对接结果进行可视化分析,并以文字形式在对接空间图中对相应对接的氨基酸残基进行标识。详见图4。

2.6 各组仔鼠三箱社交实验结果

2.6.1 社交能力测试 与治疗前比较,维生素D组 and 中药低、中、高剂量组治疗后与陌生鼠1(左)的社交时间均增加($P<0.05$)。与空白组比较,模型组,维生素D组和中药低、中、高剂量组治疗前、治疗后与陌生鼠1(左)的社交时间均降低($P<0.05$)。治疗后,与模型组比较,维生素D组和中药低、中、高剂量组与陌生鼠1(左)的社交时间均增加($P<0.05$);与维生素

表1 六味地黄丸药物活性成分

来源	活性成分编码	活性成分名称	口服生物利用度/%	类药性	
山茱萸	MOL001494	mandenol	42.00	0.19	
	MOL001495	ethyl linolenate	46.10	0.20	
	MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75	
	MOL002879	diop	43.59	0.39	
	MOL002883	ethyl oleate (nf)	32.40	0.19	
	MOL003137	leucanthoside	32.12	0.78	
	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	
	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	
	MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	
	MOL005360	malkangunin	57.71	0.63	
	MOL005481	2,6,10,14,18-pentamethylcosa-2,6,10,14,18-pentaene	33.40	0.24	
	MOL005486	3,4-dehydrolycopen-16-al	46.64	0.49	
	MOL005489	3,6-digalloylglucose	31.42	0.66	
	MOL005503	cornudentanone	39.66	0.33	
	MOL005530	hydroxygenkwanin	36.47	0.27	
	MOL005531	telocinobufagin	69.99	0.79	
	MOL008457	tetrahydroalstonine	32.42	0.81	
	MOL000554	gallic acid-3-o-(6'-o-galloyl)-glucoside	30.25	0.67	
	MOL005552	gemin d	68.83	0.56	
	MOL005557	lanosta-8,24-dien-3-ol,3-acetate	44.30	0.82	
山药	MOL001559	piperlonguminine	30.71	0.18	
	MOL005463	methylecimicifugoside qt	31.69	0.24	
	MOL005458	dioscoreside c qt	36.38	0.87	
	MOL005435	24-methylcholest-5-enyl-3beta-o-glucopyranoside qt	37.58	0.72	
	MOL005438	campesterol	37.58	0.71	
	MOL000953	clr	37.87	0.68	
	MOL005461	doradexanthin	38.16	0.54	
	MOL005440	isofucoesterol	43.78	0.76	
	MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	
	MOL005465	aids180907	45.33	0.77	
	MOL000322	kadsurenone	54.72	0.38	
	MOL005430	hancinone c	59.05	0.39	
	MOL001736	(-)-taxifolin	60.51	0.27	
	MOL000310	denudatin b	61.47	0.38	
	MOL005429	hancinol	64.01	0.37	
	MOL000546	diosgenin	80.88	0.81	
	茯苓	MOL000300	dehydroeburicoic acid	44.17	0.83
		MOL000282	ergosta-7,22e-dien-3beta-ol	43.51	0.72
		MOL000283	ergosterol peroxide	40.36	0.81
		MOL000275	trametenolic acid	38.71	0.80
MOL000287		3beta-hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	38.70	0.81	
MOL000285		(2r)-2-[(5r,10s,13r,14r,16r,17r)-16-hydroxy-3-keto-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta [a]phenanthren -17 -yl] -5 -isopropyl -hex-5-enoic acid	38.26	0.82	
MOL000292		poricoic acid c	38.15	0.75	
MOL000279		cerevisterol	37.96	0.77	
MOL000296		hederagenin	36.91	0.75	
MOL000276		7,9(11)-dehydropachymic acid	35.11	0.81	
MOL000289	pachymic acid	33.63	0.81		

续表 1

来源	活性成分编码	活性成分名称	口服生物利用度/%	类药性	
茯苓	MOL000280	(2 <i>r</i>)-2-[(3 <i>s</i> ,5 <i>r</i> ,10 <i>s</i> ,13 <i>r</i> ,14 <i>r</i> ,16 <i>r</i> ,17 <i>r</i>)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1 <i>h</i> -cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	31.07	0.82	
	MOL000273	(2 <i>r</i>)-2-[(3 <i>s</i> ,5 <i>r</i> ,10 <i>s</i> ,13 <i>r</i> ,14 <i>r</i> ,16 <i>r</i> ,17 <i>r</i>)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1 <i>h</i> -cyclopenta [a]phenanthren-17-yl]-6-methyl-hept-5-enoic acid	30.93	0.81	
	MOL000290	poricoic acid a	30.61	0.76	
	MOL000291	poricoic acid b	30.52	0.75	
	熟地黄	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
		MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76
		MOL002464	1-monolinolein	37.18	0.30
MOL000359		sitosterol	36.91	0.75	
泽泻	MOL000849	16-methoxyalisol b monoacetate	32.43	0.77	
	MOL000831	alisol b monoacetate	35.58	0.81	
	MOL000862	[(1 <i>s</i> ,3 <i>r</i>)-1-[(2 <i>r</i>)-3,3-dimethyloxiran-2-yl]-3-[(5 <i>r</i> ,8 <i>s</i> ,9 <i>s</i> ,10 <i>s</i> ,11 <i>s</i> ,14 <i>r</i>)-11-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-3-oxo-1,2,5,6,7,9,11,12,15,16-decahydrocyclopenta [a]phenanthren-17-yl]butyl] acetate	35.58	0.81	
	MOL000854	alisol c	32.70	0.82	
	MOL000830	alisol b	34.47	0.82	
	MOL000832	alisol,b,23-acetate	32.52	0.82	
	MOL000853	alisol b	36.76	0.82	
牡丹皮	MOL000856	alisol c monoacetate	33.06	0.83	
	MOL007003	benzoyl paeoniflorin	31.14	0.54	
	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	
	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	
	MOL007382	mudanpioside-h _{qt} 2	42.36	0.37	
	MOL007374	5-[[5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl]methylene]barbituric acid	43.44	0.30	
	MOL000098	quercetin	46.43	0.28	
	MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	
	MOL000211	mairin	55.38	0.78	
	MOL007384	paeonidanin _{qt}	65.31	0.35	
MOL007369	4-o-methylpaeoniflorin _{qt}	67.24	0.43		
MOL001925	paeoniflorin _{qt}	68.18	0.40		

D组比较,中药低、中剂量组与陌生鼠 1(左)的社交时间均增加($P<0.05$);与中药低、中剂量组比较,中药高剂量组与陌生鼠 1(左)的社交时间降低($P<0.05$)。详见图 5、表 2。

2.6.2 社交新颖性测试 与治疗前比较,维生素 D 组和中药低、中、高剂量组治疗后与陌生鼠 2(右)的社交时间均升高($P<0.05$)。与空白组比较,模型组,维生素 D 组和中药低、中、高剂量组治疗前、治疗后与陌生鼠 2(右)的社交时间均降低($P<0.05$)。治疗后,与模型组比较,维生素 D 组和中药低、中、高剂量组与陌生鼠 2(右)的社交时间均升高($P<0.05$);与维生素 D 组比较,中药低、中剂量组与陌生鼠 2(右)

的社交时间均升高($P<0.05$);与中药低、中剂量组比较,中药高剂量组与陌生鼠 2(右)的社交时间降低($P<0.05$)。详见图 6、表 3。

2.7 旷场实验结果

2.7.1 各组仔鼠活动总路程比较 与治疗前比较,维生素 D 组和中药低、中、高剂量组治疗后总路程升高($P<0.05$)。与空白组比较,模型组,维生素 D 组和中药低、中、高剂量组治疗前、治疗后总路程均降低($P<0.05$)。治疗后,与模型组比较,维生素 D 组和中药低、中、高剂量组总路程均升高($P<0.05$);与维生素 D 组比较,中药低、中剂量组总路程均升高($P<0.05$);与中药低、中剂量组比较,中药高剂量组总路

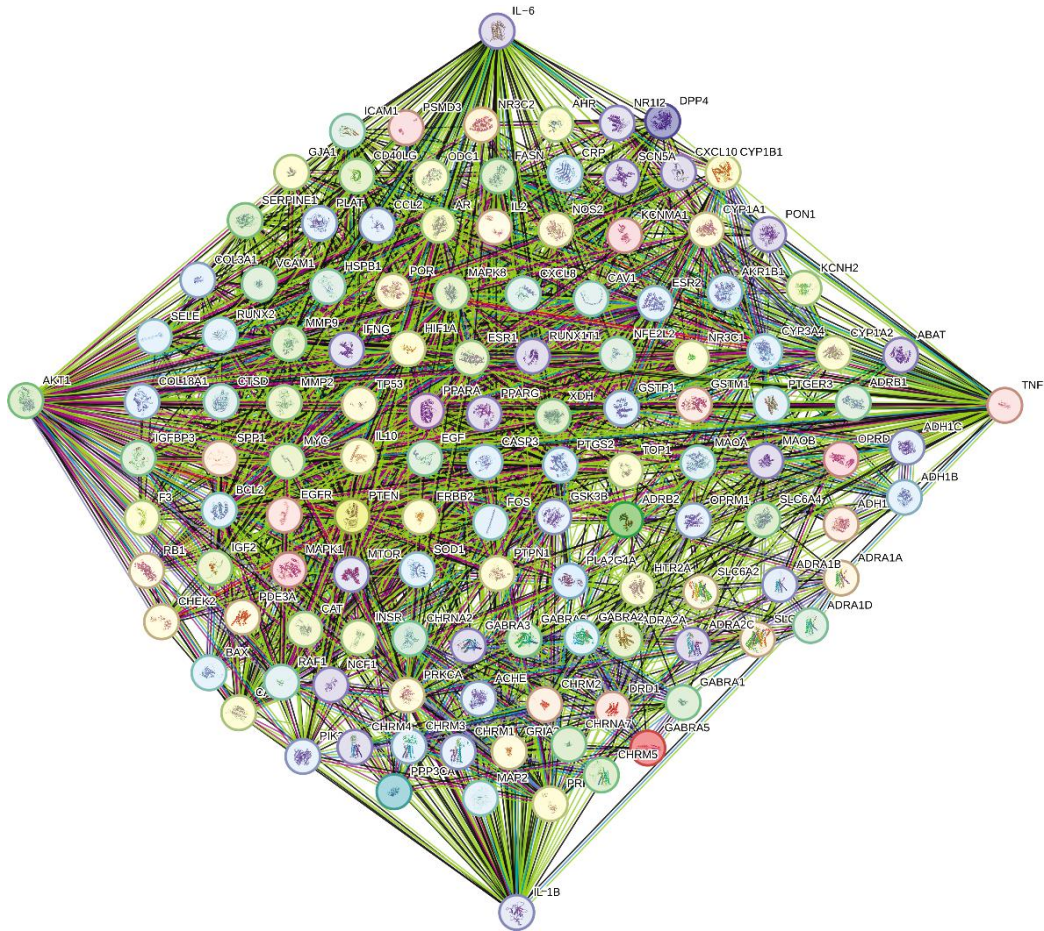


图 1 六味地黄丸干预 ASD 核心靶点筛选

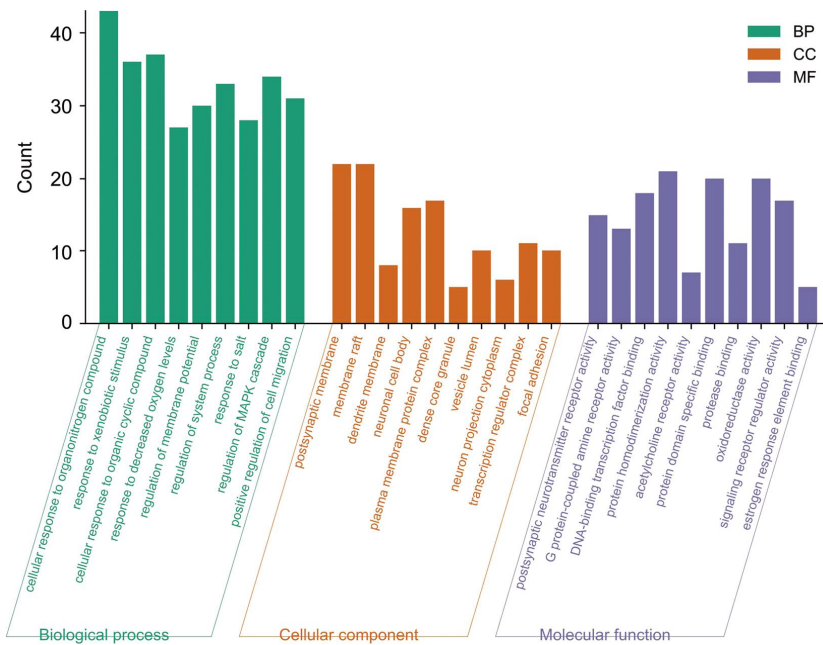


图 2 六味地黄丸干预 ASD 关键靶点的功能富集分析

程降低($P<0.05$)。详见图 7、表 4。

2.7.2 各组仔鼠在中央区域活动路程比较 与治疗前比较,治疗后中药低、中剂量组治疗后中央区域活动路程升高($P<0.05$)。与空白组比较,模型组、维生素 D 组和中药低、中、高剂量组治疗前、治疗后中央

区域活动路程均降低($P<0.05$)。治疗后,与模型组、维生素 D 组比较,中药低、中剂量组中央区域活动路程均升高($P<0.05$);与中药低、中剂量组比较,中药高剂量组中央区域活动路程降低($P<0.05$)。详见表 5。

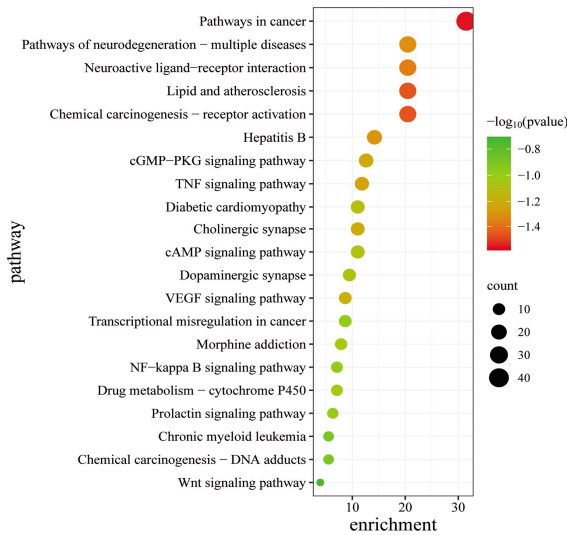


图 3 六味地黄丸干预 ASD 关键靶点的 KEGG 通路富集分析

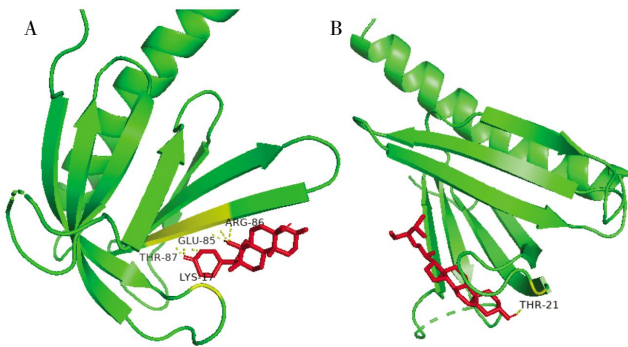


图 4 远华蟾蜍精、豆甾醇与 Akt1 分子对接模式

注:A.远华蟾蜍精与 Akt1 对接模式;B.豆甾醇与 Akt1 对接模式。

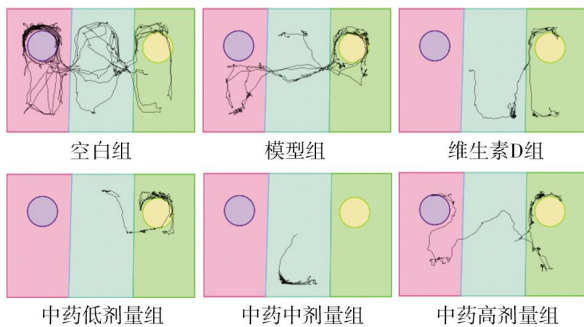


图 5 各组仔鼠社交能力测试轨迹图

表 2 各组仔鼠与陌生鼠 1 的社交时间($\bar{x} \pm s, n=6, s$)

组别	治疗前	治疗后
空白组	154.0±13.8	151.7±17.7
模型组	8.5±3.4 ^b	6.0±2.5 ^b
维生素 D 组	9.0±2.5 ^b	42.8±4.5 ^{abc}
中药低剂量组	12.7±8.2 ^b	72.2±12.4 ^{abcd}
中药中剂量组	14.3±8.2 ^b	70.8±8.9 ^{abcd}
中药高剂量组	15.0±6.7 ^b	36.0±1.4 ^{abef}

注:与治疗前比较,^a $P<0.05$;与空白组比较,^b $P<0.05$;与模型组比较,^c $P<0.05$;与维生素 D 组比较,^d $P<0.05$;与中药低剂量组比较,^e $P<0.05$;与中药中剂量组比较,^f $P<0.05$ 。

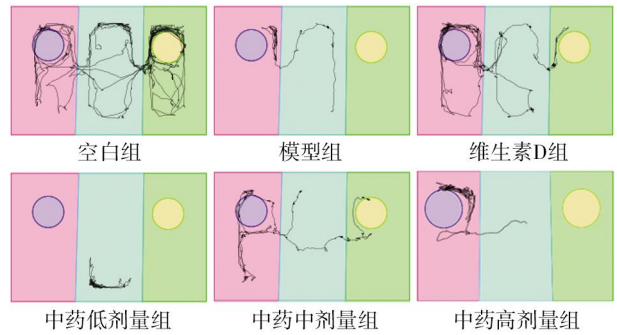


图 6 各组仔鼠社交新颖性测试轨迹图

表 3 各组仔鼠与陌生鼠 2 的社交时间($\bar{x} \pm s, n=6, s$)

组别	治疗前	治疗后
空白组	71.3±10.1	91.8±8.4
模型组	14.2±4.9 ^b	13.5±6.7 ^b
维生素 D 组	13.6±6.3 ^b	35.7±5.9 ^{abc}
中药低剂量组	10.3±5.9 ^b	58.7±15.4 ^{abcd}
中药中剂量组	14.0±5.2 ^b	53.8±10.7 ^{abcd}
中药高剂量组	21.0±4.7 ^b	45.3±11.3 ^{abef}

注:与治疗前比较,^a $P<0.05$;与空白组比较,^b $P<0.05$;与模型组比较,^c $P<0.05$;与维生素 D 组比较,^d $P<0.05$;与中药低剂量组比较,^e $P<0.05$;与中药中剂量组比较,^f $P<0.05$ 。

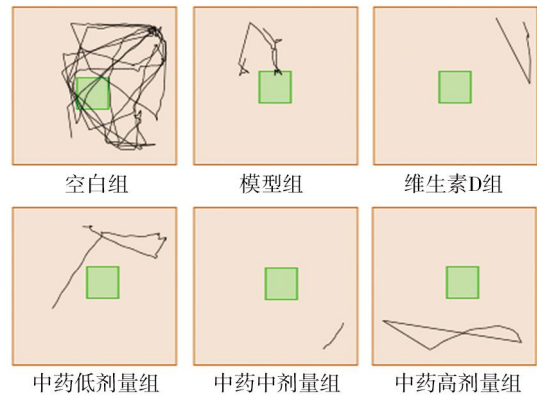


图 7 各组仔鼠旷场实验轨迹图

表 4 各组仔鼠活动的总路程($\bar{x} \pm s, n=6, cm$)

组别	治疗前	治疗后
空白组	2 751.0±263.5	2 609.0±181.1
模型组	513.2±122.0 ^b	440.0±109.1 ^b
维生素 D 组	453.5±116.1 ^b	827.5±149.2 ^{abc}
中药低剂量组	509.2±165.2 ^b	1 144.5±119.1 ^{abcd}
中药中剂量组	471.7±159.1 ^b	1 174.7±186.6 ^{abcd}
中药高剂量组	413.5±88.5 ^b	799.0±189.6 ^{abef}

注:与治疗前比较,^a $P<0.05$;与空白组比较,^b $P<0.05$;与模型组比较,^c $P<0.05$;与维生素 D 组比较,^d $P<0.05$;与中药低剂量组比较,^e $P<0.05$;与中药中剂量组比较,^f $P<0.05$ 。

表5 各组仔鼠中央区域活动路程($\bar{x}\pm s, n=6, \text{cm}$)

组别	治疗前	治疗后
空白组	98.3±12.3	103.2±12.9
模型组	11.7±6.5 ^b	13.2±5.6 ^b
维生素D组	11.0±5.0 ^b	13.5±5.0 ^b
中药低剂量组	7.8±5.6 ^b	32.8±6.7 ^{abcd}
中药中剂量组	6.2±3.0 ^b	32.5±4.7 ^{abcd}
中药高剂量组	6.5±3.6 ^b	9.3±4.2 ^{bcf}

注:与治疗前比较,^a $P<0.05$;与空白组比较,^b $P<0.05$;与模型组比较,^c $P<0.05$;与维生素D组比较,^d $P<0.05$;与中药低剂量组比较,^e $P<0.05$;与中药中剂量组比较,^f $P<0.05$ 。

2.8 各组仔鼠 GSK3 β 、 β -Catenin 水平比较

与空白组比较,模型组 GSK3 β 水平降低($P<0.05$)、 β -Catenin 水平升高($P<0.05$);与模型组比较,维生素 D 组和中药低、中、高剂量组 GSK3 β 水平升高($P<0.05$)、 β -Catenin 水平降低($P<0.05$);与维生素 D 组比较,中药低剂量组 GSK3 β 水平升高($P<0.05$),中药低、中剂量组 β -Catenin 水平降低($P<0.05$);与中药低、中剂量组比较,中药高剂量组 GSK3 β 水平降低($P<0.05$)、 β -Catenin 水平升高($P<0.05$)。详见表 6。

表6 各组仔鼠 GSK3 β 、 β -Catenin 水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	GSK3 β	β -Catenin
空白组	391.79±41.31	6.26±1.20
模型组	126.05±29.98 ^a	14.50±1.56 ^a
维生素D组	285.16±20.38 ^b	9.66±0.59 ^b
中药低剂量组	338.30±16.22 ^{bc}	6.40±1.17 ^{bc}
中药中剂量组	317.87±14.94 ^b	6.99±0.59 ^{bc}
中药高剂量组	249.00±13.36 ^{abc}	8.58±0.50 ^{abc}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与维生素D组比较,^c $P<0.05$;与中药低剂量组比较,^d $P<0.05$;与中药中剂量组比较,^e $P<0.05$ 。

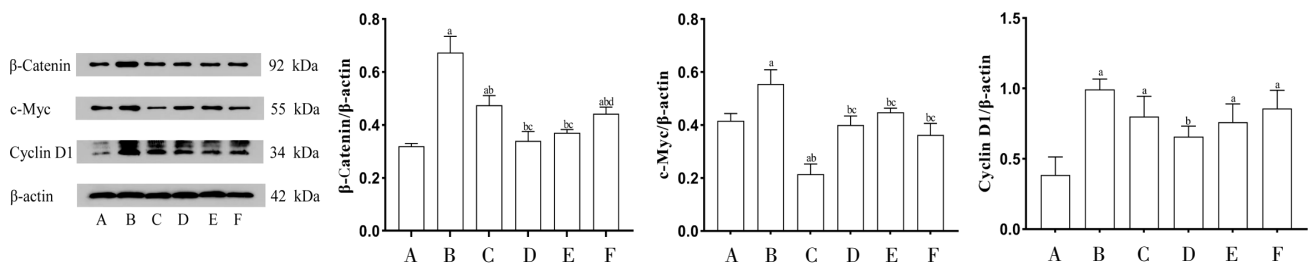
2.9 各组仔鼠 β -Catenin、c-Myc、Cyclin D1 蛋白表达水平比较

与空白组比较,模型组、维生素 D 组和中药高剂量组 β -Catenin 蛋白表达水平升高($P<0.05$);模型组 c-Myc 蛋白表达水平升高($P<0.05$),维生素 D 组 c-Myc 蛋白表达水平降低($P<0.05$);模型组,维生素 D 组和中药中、高剂量组 Cyclin D1 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与模型组比较,维生素 D 组和中药低、中、高剂量组 β -Catenin、c-Myc 蛋白表达水平降低($P<0.05$),中药低剂量组 Cyclin D1 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。与维生素 D 组比较,中药低、中剂量组 β -Catenin 蛋白表达水平降低($P<0.05$),中药低、中、高剂量组 c-Myc 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与中药低剂量组比较,中药高剂量组 β -Catenin 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。详见图 8。

3 讨论

ASD 已成为一个世界性的难题,深入研究其病因及可能的发病机制,为其提供精确有效的个体化治疗,对改善患儿的生长发育、提高生活质量、减轻家庭和社会的精神压力和经济负担以及提高人口素质具有重要意义。张涤教授认为 ASD 多因先天不足、肝肾阴虚所致,且发现肝肾阴虚证是临床中为最常见的证型。目前,国内研究多采用 VPA 诱导 ASD 发病,VPA 模型在所有模型中最为成熟、整体吻合度最高,不但具有 ASD 典型临床表现,而且符合中医先天不足、肾精亏损的特点^[13]。故本研究采用 VPA 诱导 ASD 模型,予六味地黄丸干预治疗。

六味地黄丸出自宋代钱乙的《小儿药证直诀》^[14]。

图8 各组仔鼠 β -Catenin、c-Myc、Cyclin D1 蛋白表达水平比较

注:A.空白组;B.模型组;C.维生素D组;D.中药低剂量组;E.中药中剂量组;F.中药高剂量组。与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与维生素D组比较,^c $P<0.05$;与中药低剂量组比较,^d $P<0.05$ 。

六味地黄丸中以熟地黄为君药;山茱萸、山药为臣药;三药相配,滋养肝、脾、肾,以滋肾阴为主,为“三补”。泽泻利湿泄浊,防熟地黄之滋腻恋邪;牡丹皮清泄相火,制山茱萸之温涩;茯苓淡渗脾湿,助山药之健运;三药相配为“三泻”。“三补”“三泻”共奏补益肝肾之效。方中重用熟地黄,研究表明,熟地黄对中枢神经系统具有抑制作用,其分离所得到的梓醇可通过抗氧化作用保护海马 CA1 区神经元而减少认知障碍^[15]。此外,熟地黄提取物可以上调 p-GSK3 β 蛋白表达,与本研究中六味地黄丸可以上调 GSK3 β 蛋白表达相符^[16]。

研究表明,ASD 主要与遗传因素、突触功能、突触结构和稳态、突触信号通路、神经递质系统及神经元发育等相关^[17]。神经病理学研究表明,ASD 患者的树突棘密度增加且形态异常^[18-19],其中突触后密度蛋白-95 与树突棘形成和突触传递密切相关^[20]。Ca²⁺通道功能缺陷可导致 ASD,与 ASD 相关的突触突变通常会使电压依赖性 Ca²⁺通道门控变得敏感。越来越多的研究表明,ASD 与神经递质谷氨酸、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyrate, GABA)、血清素、多巴胺等紊乱相关^[17]。ASD 儿童的血浆 GABA 和谷氨酸水平发生变化,其 GABA 水平显著升高,而谷氨酸/GABA 比例降低^[17]。诸上说明 ASD 与突触后膜、膜电位的调节及神经递质相关,与本研究中六味地黄丸干预 ASD 的 GO 功能分析相符。

本研究 KEGG 通路富集分析结果显示,六味地黄丸可能通过调节 TNF、NF- κ B、Wnt 等信号通路干预 ASD。其中 Wnt 信号通路对大脑发育、神经功能发育及突触功能至关重要^[21]。在几种 Wnt 信号相关基因敲除小鼠模型中,分子、电生理和行为异常与 ASD 表型一致,Wnt 信号通路中的许多关键蛋白都位于突触,并在突触生长和成熟中发挥关键作用^[17]。另外,Wnt 信号通路中的 DISC1 基因可能与汉族 ASD 儿童相关,如 rs4658939 等^[22]。染色体结构域解旋酶 DNA 结合蛋白 8(chromodomain-helicase-DNA binding protein 8, CHD8)通过直接与 β -Catenin 结合或被招募到 β -Catenin 蛋白响应基因的启动子区域来参与经典 Wnt 信号通路^[17]。GSK3 β 是一种在大脑中大量存在的激酶,可促进神经元凋亡,该激酶

的失调会对神经发育产生破坏性影响;GSK3 β 的调节在 Wnt 信号通路的激活中发挥核心作用, β -Catenin 作为 Wnt 信号通路的关键分子,可以激活 Wnt 信号通路下游的重要蛋白分子 c-Myc 及 Cyclin D1,从而导致 ASD 的发生发展^[23]。

本研究发现,ASD 模型小鼠在社交能力测试阶段较空白组接触陌生鼠 1 的时间短,说明 ASD 模型小鼠具有明显社交能力的缺陷。在社交新颖性测试阶段,接触陌生鼠 2 的时间较空白组短,说明 ASD 模型小鼠存在社交新颖性偏好障碍。在旷场实验中,ASD 模型小鼠活动总路程及在中央区域活动路程少于空白组,说明 ASD 模型小鼠具有明显的焦虑状态。经过治疗后 ASD 模型小鼠接触陌生鼠 1 及接触陌生鼠 2 的时间延长,活动总路程及中央区域活动路程均增加,提示六味地黄丸可以改善 VPA 诱导的 ASD 小鼠的社交行为及焦虑状态。另外,ELISA 结果表明,六味地黄丸可以提高 GSK3 β 水平,降低 β -Catenin 水平,中药低、中剂量组较维生素 D 组及中药高剂量组疗效更好。Western blot 结果显示,六味地黄丸可以减少 β -Catenin、c-Myc、Cyclin D1 蛋白的表达水平。综上所述,说明 VPA 诱导 ASD 小鼠,Wnt 信号通路被激活,而六味地黄丸可以通过调控 Wnt 信号传导进而改善 VPA 诱导大鼠的 ASD 样行为表型。

本研究通过网络药理学及分子对接探究六味地黄丸治疗 ASD 的潜在作用机制,并加以实验验证,体现了中医药治疗 ASD 具有多通路、多靶点的优势^[24],为传统经验医学向着现代证据医学的转变提供了一个新的方法。本研究团队后续将进一步研究其他信号通路及体外实验,为 ASD 的靶向治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] THOMAS S D, JHA N K, OJHA S, et al. mTOR signaling disruption and its association with the development of autism spectrum disorder[J]. *Molecules*, 2023, 28(4): 1889.
- [2] ROMAN-URRESTARAZU A, VAN KESSEL R, ALLISON C, et al. Association of race/ethnicity and social disadvantage with autism prevalence in 7 million school children in England[J]. *JAMA Pediatrics*, 2021, 175(6): e210054.
- [3] MORALES HIDALGO P, VOLTAS MORESO N, CANALS SANS

- J. Autism spectrum disorder prevalence and associated sociodemographic factors in the school population: EPINED study[J]. *Autism: the International Journal of Research and Practice*, 2021, 25(7): 1999–2011.
- [4] 吴燕红, 董超群, 岑伊贝妮, 等. 孤独症儿童家庭复原力现状及其影响因素的研究[J]. *军事护理*, 2022, 39(8): 34–37.
- [5] GENOVESE A, BUTLER M G. Clinical assessment, genetics, and treatment approaches in autism spectrum disorder (ASD)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(13): 4726.
- [6] HUGHES H K, ASHWOOD P. Innate immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder (ASD)[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2023, 108: 245–254.
- [7] WANG L, WANG B Q, WU C Y, et al. Autism spectrum disorder: Neurodevelopmental risk factors, biological mechanism, and precision therapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(3): 1819.
- [8] SALLOUM-ASFAR S, ZAWIA N, ABDULLA S A. Retracing our steps: A review on autism research in children, its limitation and impending pharmacological interventions[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2024, 253: 108564.
- [9] 廉彬. 5-羟色胺受体在孤独症样大鼠中的作用及其机制[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [10] 李 燊, 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.
- [11] 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.
- [12] 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: 1439–1442.
- [13] 张亚同, 赵书艺, 杨莉斌, 等. 基于中西医临床病证特点的孤独症谱系障碍动物模型评价[J/OL]. *中国实验方剂学杂志*, 1–8 [2024-01-15] <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20240362>.
- [14] 姜晓晨, 刘福栋, 王桂彬, 等. 六味地黄丸制方考辨及抗肿瘤临证应用浅析[J]. *辽宁中医杂志*, 2023, 50(2): 80–83.
- [15] 陈思琦, 李佳欣, 吴鑫宇, 等. 熟地黄的药理学研究进展[J]. *化学工程师*, 2019, 33(11): 46–50.
- [16] 胡汝明, 谢岳婷, 陈剑川. 基于 AKT/GSK-3 β 信号通路探讨熟地黄提取物对糖尿病肾病大鼠肾小球脏层上皮细胞表型转化的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(10): 2497–2500.
- [17] JIANG C C, LIN L S, LONG S, et al. Signalling pathways in autism spectrum disorder: Mechanisms and therapeutic implications[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7(1): 229.
- [18] WANG Z, QIAO D, CHEN H, et al. Effects of Fmr1 gene mutations on sex differences in autism-like behavior and dendritic spine development in mice and transcriptomic studies[J]. *Neuroscience*, 2023, 534: 16–28.
- [19] LO L H Y, LAI K O. Dysregulation of protein synthesis and dendritic spine morphogenesis in ASD: Studies in human pluripotent stem cells[J]. *Molecular Autism*, 2020, 11(1): 40.
- [20] HERNANDEZ A, DELGADO-GONZÁLEZ E, DURAIRAJ R V, et al. Striatal synaptic changes and behavior in adult mouse upon prenatal exposure to valproic acid[J]. *Brain Research*, 2023, 1815: 148461.
- [21] CARACCI M O, AVILA M E, ESPINOZA-CAVIERES F A, et al. Wnt/ β -catenin-dependent transcription in autism spectrum disorders[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2021, 14: 764756.
- [22] 李 莉, 谈华龙, 周三华. Wnt 信号通路相关基因多态性与汉族儿童孤独症的关系分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(21): 2304–2307.
- [23] WANG L L, CHEN J H, HU Y L, et al. Progranulin improves neural development via the PI3K/Akt/GSK-3 β pathway in the cerebellum of a VPA-induced rat model of ASD[J]. *Translational Psychiatry*, 2022, 12(1): 114.
- [24] 吴 吉, 裴方好, 张 涤, 等. BDNF 信号通路在儿童孤独症谱系障碍中的作用机制及中医药干预研究进展[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(4): 759–766.

(本文编辑 田梦妍)