

本文引用: 郝兴宇, 谢映, 吴吉, 朱沁泉, 张涤, 蒋屏. 归脾丸对粪菌移植造模的孤独症谱系障碍大鼠行为学及脑5-HT含量的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(6): 936-942.

归脾丸对粪菌移植造模的孤独症谱系障碍大鼠行为学及脑5-HT含量的影响

郝兴宇¹, 谢映², 吴吉¹, 朱沁泉², 张涤², 蒋屏^{2*}

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** 验证归脾丸改善孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)子代大鼠核心症状的疗效,观察其对脑5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)含量的影响,并探讨其疗效与脑5-HT水平的相关性。**方法** 将10只SPF级SD孕鼠随机分为正常孕鼠组(3只)和粪菌移植(fecal microbiota transplantation, FMT)孕鼠组(7只),FMT孕鼠组通过FMT法进行造模。子代鼠出生第28天时,通过行为学检测筛选符合ASD疾病模型的雄鼠30只,随机分为模型组(等体积生理盐水)、归脾丸低剂量组(0.75 g/kg)、归脾丸中剂量组(1.5 g/kg)、归脾丸高剂量组(3 g/kg)、双歧杆菌组(0.5 g/kg),每组6只;正常雄鼠6只,设置为正常组(等体积生理盐水)。各组连续灌胃14 d,1次/d。记录大鼠体质量;采用行为学检测评估疗效;采用ELISA法测定大鼠前额5-HT含量;等级相关分析法分析子代大鼠社交能力及社交新颖性与5-HT的相关性。**结果** 与正常孕鼠组比较,FMT孕鼠组子代鼠睁眼时间延长($P<0.05$)、体质量下降($P<0.05$)。用药前,与正常组比较,模型组社交能力降低($P<0.05$)、社交新颖性降低($P<0.05$)、焦虑程度增加($P<0.05$)。用药2周后,与正常组比较,模型组社交能力降低($P<0.05$)、社交新颖性降低($P<0.05$)、焦虑程度加重($P<0.05$)、体质量及5-HT含量下降($P<0.05$)。与模型组比较,各用药组社交能力增强($P<0.05$)、社交新颖性增强($P<0.05$)、焦虑状态减轻($P<0.05$)、5-HT含量增加($P<0.05$);归脾丸中、高剂量组,双歧杆菌组体质量增加($P<0.05$)。与归脾丸高剂量组比较,归脾丸低剂量组社交能力降低($P<0.05$)、社交新颖性降低($P<0.05$)、体质量及5-HT含量下降($P<0.05$),归脾丸中剂量组5-HT含量下降($P<0.05$),双歧杆菌组社交新颖性降低($P<0.05$)。相关新分析显示,ASD大鼠社交偏好系数及新颖偏好系数与5-HT含量呈显著正相关($P<0.05$)。**结论** 归脾丸可显著改善FMT子代大鼠的ASD样行为,其机制可能与上调脑内5-HT含量有关。

[关键词] 孤独症谱系障碍;归脾丸;5-羟色胺;粪菌移植法;社交能力;社交新颖性

[中图分类号]R272

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.06.002

Effects of Guipi Pill on behavior and brain 5-HT content in rats with autism spectrum disorder modeled by fecal microbiota transplantation

HAO Xingyu¹, XIE Ying², WU Ji¹, ZHU Qinquan², ZHANG Di², JIANG Ping^{2*}

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 verify the efficacy of Guipi Pill in alleviating core symptoms in offspring rats with autism spectrum disorder (ASD), to observe its effects on the content of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the brain, and to explore the correlation between its efficacy and the level of 5-HT in the brain. **Methods** Ten SPF SD pregnant rats were randomized into normal pregnant group ($n=3$) and fecal microbiota transplantation (FMT) pregnant group ($n=7$). The FMT pregnant group was

[收稿日期]2024-01-16

[基金项目]湖南省科学技术厅重点领域研发计划项目(2019SK2081);湖南省卫生健康委员会科研计划项目(D202306048765);中医学湖南省世界一流培育学科。

[通信作者]* 蒋屏,女,博士,副教授,主任医师,硕士生研究生导师,E-mail:591193554@qq.com。

modeled by FMT method. On the 28th day of birth, 30 male rats were screened by behavioral test to meet the ASD disease model. Then they were randomly subdivided into model group (an equal volume of normal saline), the low-, medium-, and high-dose (0.75 g/kg, 1.5 g/kg, 3 g/kg) Guipi Pill groups, and the Bifidobacterium (0.5 g/kg) group, with six rats in each group. In addition, six normal male rats were set as normal group (an equal volume of normal saline). Each group was given intragastric administration for 14 d, once a day. The body weight of rats was recorded, the efficacy was evaluated by behavioral test, the content of 5-HT in the forehead of rats was determined by ELISA, and the correlation between sociability, social novelty and 5-HT in offspring rats was analyzed by rank correlation analysis. **Results** Compared with the normal pregnant group, the offspring rats in the FMT pregnant group showed longer eye opening time ($P<0.05$) and lower body weight ($P<0.05$). Before treatment, compared with the normal group, the model group showed lower sociability ($P<0.05$) and social novelty ($P<0.05$) but higher degree of anxiety ($P<0.05$). After two weeks of medication, compared with the normal group, the model group showed lower sociability ($P<0.05$), lower social novelty ($P<0.05$), higher degree of anxiety ($P<0.05$), and lower body weight and 5-HT content ($P<0.05$). Compared with the model group, each treatment group showed higher sociability ($P<0.05$), higher social novelty ($P<0.05$), lower degree of anxiety ($P<0.05$), and higher 5-HT content ($P<0.05$). The body weight of the medium- and high-dose Guipi Pill groups and the Bifidobacterium group increased ($P<0.05$). Compared with the high-dose Guipi Pill group, the low-dose Guipi Pill group had lower sociability ($P<0.05$), lower social novelty ($P<0.05$), and lower body weight and content 5-HT ($P<0.05$), meanwhile, the medium-dose Guipi Pill group had lower 5-HT content ($P<0.05$) and the Bifidobacterium group had lower social novelty ($P<0.05$). **Correlation** analysis showed that the social preference coefficient and novelty preference coefficient of ASD rats were significantly and positively correlated with 5-HT content ($P<0.05$). Conclusion Guipi Pill can significantly alleviate ASD-like behavior in FMT offspring rats, and its mechanism may be related to the up-regulation of 5-HT content in the brain.

[**Keywords**] autism spectrum disorder; Guipi Pill; 5-hydroxytryptamine; fecal microbiota transplantation; sociability; social novelty

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)是一种复杂的广泛发育障碍性疾病,其核心症状是社会障碍和重复的、异常的感觉运动行为及狭隘兴趣^[1]。流行病学调查研究显示,目前,在我国儿童中ASD的患病率逐年升高^[2]。自2001年起,ASD已成为我国0~6岁精神障碍儿童致残的首位原因^[3]。男性ASD的患病率更高,男女患病比例接近2:1或3:1^[4-5]。ASD的发病机制较为复杂,与遗传^[6]、炎症反应^[7]、氧化应激和缺氧损伤^[8]、肠道菌群紊乱^[9]等多种因素相关。目前,治疗ASD的药物存在不良反应多、停药易复发等问题^[10]。因此,寻求既能改善ASD核心症状,且疗效持久、不良反应少的药物具有重要临床意义。近年研究发现,在雌鼠孕期改变其肠道菌群,其部分子代鼠可出现ASD样表现,这种造模方法被称为粪菌移植(fecal microbiota transplantation, FMT)法^[11]。

归脾丸出自《严氏济生方·惊悸怔忡健忘门》,具有益气补血、健脾养心的功效。汪受传教授研究发现,用归脾丸加减可有效改善ASD儿童核心症状^[12],且归脾丸可以改变血清5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)含量^[13]。5-HT在中枢神经系统中可以影响学习、记忆、认知等生理功能^[14]。双歧杆菌既可改善

ASD患儿症状^[15],又可以调节血5-HT含量^[16],在所有脑区中,前额叶皮质与社交、情绪、认知控制、记忆等高级功能关系密切^[17]。多个研究发现,ASD患者前额叶结构的改变可能是导致其出现核心症状的病理基础^[18-19]。因此,本研究提出归脾丸可能通过影响前额5-HT含量,从而改善ASD临床症状的假说,并以FMT法建立ASD大鼠模型,以双歧杆菌为阳性对照药,通过行为学、分子生物学等方面验证假说,为ASD的防治提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 动物

SD孕鼠10只,孕期12~14 d,体质量330~400 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。实验动物质量合格证号:SCXK(湘)2019-0004。大鼠饲养于湖南中医药大学第一附属医院动物实验中心SPF级动物房,相对湿度45%~65%,光照/黑暗循环周期12 h,自由饮水、饮食。本研究已通过湖南中医药大学动物伦理委员会批准(批准号:ZYFY20220504-01)。

1.2 主要药物和试剂

归脾丸(湖南九芝堂股份有限公司,国药批号:Z4302046,批号:2021111177,组成:白术、党参、黄

芪、当归、甘草、茯苓、远志、酸枣仁、木香、龙眼肉、大枣,规格:200丸/瓶);双歧杆菌四联活菌片(杭州远大生物制药有限公司,国药批号:S2006010,批号:2021050398,规格:0.5 g×36片);5-HT试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:FU080-F026876)。ASD儿童粪便(粪便来自湖南中医药大学第一附属医院儿童康复科的ASD患儿,用于造模)。

菌液制备:加入无菌生理盐水稀释粪便,充分搅拌溶液,用筛网过滤,保留上清液,用于灌肠。

1.3 主要仪器

高速组织研磨仪(上海净信实业发展有限公司,型号:JXFSTPRP-48);高速离心机(江苏科析仪器有限公司,型号:TGL-16);台式冷冻离心机、掌上离心机(美国赛洛捷克仪器,型号:CF1524R、S1010E);雪花制冰机(杭州海康威视数字技术股份有限公司,型号:XHJ-300);磁力搅拌器(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号:MS-150);精密pH计(上海雷磁传感器科技有限公司,型号:PHS-3C);酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司,型号:Rt-6100);动物行为学分析系统(北京众实迪科技发展有限公司,型号:Tracking MasterV3.0)。

2 方法

2.1 ASD模型建立

造模方法参照QI等的方法^[1],将10只SD孕鼠随机分为正常孕鼠组(3只)、FMT孕鼠组(7只),适应性喂养孕鼠1d后,FMT孕鼠组以0.2 mL/100 g的5 g/mL菌液灌肠至孕鼠体内,每2天1次,正常孕鼠组予等体积生理盐水灌肠,持续至子代鼠出生后21d。在子代鼠出生第21天时,FMT孕鼠组共产出子代鼠107只,其中雄鼠58只、雌鼠49只;正常孕鼠组产出子代鼠47只,其中雄鼠26只、雌鼠21只。因ASD男性患病率高于女性^[20],故于第21天剔除子代雌鼠,并将子代雄鼠与孕鼠分笼饲养。

参照王剑飞等^[21]总结的模型评价方法,分别记录FMT孕鼠组和正常孕鼠组子代鼠出生后12~16d睁眼情况以及出生第28天时的体质量,用于评估两组子代鼠生长发育情况(从FMT孕鼠组随机选择3组与正常孕鼠组比较)。在子代鼠出生第28天时,通过三箱社交实验^[22]及旷场实验^[23]测试FMT孕鼠组子代雄鼠的社交能力、社交新颖性及焦虑程度。筛

选出造模成功的ASD子代雄鼠(在三箱社交实验中子代大鼠出现社交障碍和/或社交新颖性障碍,判定为造模成功^[22])32只和正常孕鼠组子代雄鼠22只。

2.2 分组及给药

从造模成功的FMT子代ASD大鼠中随机挑选出30只,随机分为模型组、归脾丸低剂量组、归脾丸中剂量组、归脾丸高剂量组、双歧杆菌组,每组6只;从正常孕鼠组中随机选取6只雄性子代大鼠为正常组。按照人与动物的体表面积计算法^[24],归脾丸低、中、高剂量分别为0.75、1.5、3 g/kg,双歧杆菌组予双歧杆菌0.5 g/kg,将丸剂或片剂溶于1 mL生理盐水中配制成混悬液灌胃,正常组、模型组给予等体积生理盐水灌胃,各组大鼠每天给药1次,连续灌胃14d,并再次进行行为学检测,评估疗效。

2.3 行为学检测

2.3.1 三箱社交实验 本实验可用于测试动物的社交能力及社交新颖性。三室社交箱大小为60 cm×40 cm×20 cm,通过开口的挡板将其均分为三室(左室、中央室、右室)。左、右室各放置一个直径为6 cm×6 cm的笼子,用于放置陌生鼠。参考KAIDANOVICH^[25]团队测试方法:用动物行为学分析系统记录待测鼠在左、右室的活动时间,共分为3个阶段,每个阶段10 min。第1阶段为空笼,让待测鼠适应环境。第2阶段1笼放置陌生鼠1,另1笼空置,检测子代鼠社交能力,记录被测鼠嗅探陌生鼠1及嗅探空笼的时间,并计算社交偏好系数=(嗅探陌生鼠1时间-嗅探空笼时间)/(嗅探陌生鼠1时间+嗅探空笼时间)×100%。第3阶段两笼分别放置陌生鼠1、陌生鼠2,检测子代鼠社交新颖性,记录待测鼠嗅探陌生鼠1及嗅探陌生鼠2时间,并计算新颖偏好系数=(嗅探陌生鼠1时间-嗅探陌生鼠2时间)/(嗅探陌生鼠1时间+嗅探陌生鼠2时间)×100%。

在第2阶段,被测鼠与空笼接触时间大于与陌生鼠1接触时间,则认为被测鼠社交能力障碍;在第3阶段,被测鼠与陌生鼠1接触时间大于与陌生鼠2接触时间,则认为被测鼠社交新颖性障碍。每一阶段开始前,都将待测鼠背朝实验人员放入中央室的正中心。

2.3.2 旷场实验 本实验用于评估大鼠的焦虑程度。使用摄像头及自动跟踪系统,记录子代大鼠15 min内在旷场箱(大小约50 cm×50 cm×50 cm)中的移动时间,同时用软件绘制一中心区域(大小约12 cm×

12 cm的正方形)。实验时,将子代大鼠背朝实验人员放入旷场箱的正中心,让其自由探索 10 min;之后取出待测鼠,用 75%乙醇消毒后,再次将待测鼠放入旷场中央,立即打开摄像头,记录 15 min 内子代大鼠在旷场内自由活动数据,其在中心运动时间越少提示其焦虑程度越高。

2.4 ELISA 法测定 5-HT 含量

行为学检测结束后,处死各组大鼠,留取前额组织,用 PBS 液冲洗前额,去除残留血液,并按 1:49 的比例加入 PBS 液,将前额组织在冰上充分研磨,最后将匀浆液体在 8 ℃下,以 5 000 r/min 离心 8 min (离心半径 10 cm),取上清液用于检测。余步骤按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

2.5 统计学分析

采用 GraphPad 9.4.0 软件进行数据处理、统计分析和绘图,计量资料均符合正态分布,以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,两组间数据比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;若不符合正态分布,则采用非参数检验。若两个变量均符合正态分布则采用积差分析,若一变量符合正态分布,另一变量不符合正态分布,则采用等级相关分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 FMT 对两组孕鼠子代鼠生长发育的影响

FMT 孕鼠组子代大鼠的平均睁眼时间晚于正

常孕鼠组($P<0.05$);出生第 28 天时(记为 D28),FMT 孕鼠组子代大鼠平均体质量低于正常孕鼠组($P<0.05$)。详见表 1。

表 1 出生后第 28 天两组孕鼠子代大鼠生长发育情况($\bar{x}\pm s, n=3$)

分组	平均睁眼时间/d	D28 体质量/g
正常孕鼠组	15.11±0.19	83.92±0.96
FMT 孕鼠组	12.49±0.09*	60.82±2.41*

注:与正常孕鼠组比较,* $P<0.05$ 。

3.2 FMT 孤独症模型鼠行为学鉴定

与正常组比较,模型组在中心区运动时间降低($P<0.05$),社交能力检测中与陌生鼠 1 接触时间降低($P<0.05$)、与空笼接触时间增加($P<0.05$),社交新颖性检测中与陌生鼠 1 接触时间增加($P<0.05$)、与陌生鼠 2 接触时间降低($P<0.05$)。社交能力检测中,与接触空笼时间比较,正常组接触陌生鼠 1 时间增加($P<0.05$),模型组接触陌生鼠 1 时间降低($P<0.05$)。社交新颖性检测中,与接触陌生鼠 2 时间比较,正常组接触陌生鼠 1 时间降低($P<0.05$),模型组接触陌生鼠 1 时间增加($P<0.05$)。详见表 2、图 1。

3.3 用药后各组子代鼠体质量情况

与正常组比较,其余各组体质量降低($P<0.05$);与模型组比较,双歧杆菌组,归脾丸中、高剂量组体质量升高($P<0.05$);与双歧杆菌组比较,归脾丸高剂

表 2 用药前正常组与模型组大鼠行为学变化($\bar{x}\pm s, n=6, s$)

分组	旷场实验	社交能力检测		社交新颖性检测	
		接触空笼时间	接触陌生鼠 1 时间	接触陌生鼠 1 时间	接触陌生鼠 2 时间
正常组	43.11±8.23	17.90±3.03	68.53±7.76 ^a	20.53±4.84 ^b	62.62±5.25
模型组	21.52±4.81*	39.20±8.37*	26.06±4.95**	47.77±9.94* ^b	17.89±5.08*

注:与正常组比较,* $P<0.05$;社交能力检测阶段,与接触空笼时间比较,** $P<0.05$;社交新颖性检测阶段,与接触陌生鼠 2 时间比较,^b $P<0.05$ 。

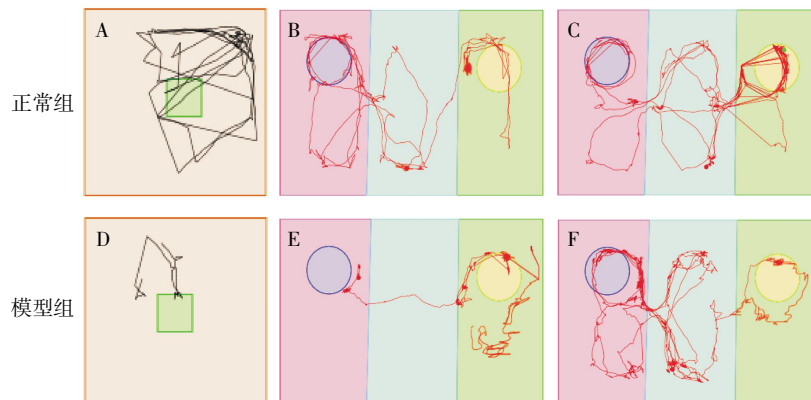


图 1 正常组与模型组行为学检测

注:A.旷场实验;B.社交能力;C.社交新颖性;D.旷场实验;E.社交能力;F.社交新颖性。

量组体质量升高 ($P<0.05$); 与归脾丸高剂量组比较, 归脾丸低、中剂量组体质量降低 ($P<0.05$)。详见表 3。

表 3 用药后各组体质量比较 ($\bar{x}\pm s, n=6, g$)

组别	体质量
正常组	165.25±4.59
模型组	125.72±3.93*
双歧杆菌组	130.57±1.47**
归脾丸高剂量组	141.12±1.09** [Ⓢ]
归脾丸中剂量组	134.48±1.15** [▽]
归脾丸低剂量组	129.82±1.72* [▽]

注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, ** $P<0.05$; 与双歧杆菌组比较, [Ⓢ] $P<0.05$; 与归脾丸高剂量组比较, [▽] $P<0.05$ 。

3.4 用药后各组大鼠行为学变化

与正常组比较, 其余各组在中心区运动时间降低 ($P<0.05$); 在社交能力检测中, 模型组和归脾丸各剂量组与空笼接触时间升高 ($P<0.05$), 其余各组与陌生鼠 1 接触时间降低 ($P<0.05$); 在社交新颖性检测中, 其余各组与陌生鼠 2 接触时间降低 ($P<0.05$), 模型组与陌生鼠 1 接触时间升高 ($P<0.05$), 归脾丸低剂量组与陌生鼠 1 接触时间降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 用药组在中心区运动时间增加 ($P<0.05$); 在社交能力检测中, 用药组与空笼接触时间降低 ($P<0.05$), 用药组与陌生鼠 1 接触时间升高 ($P<0.05$); 在社交新颖性检测中, 用药组与陌生鼠 1 接触时间降低 ($P<0.05$), 用药组与陌生鼠 2 接触时间升高 ($P<0.05$)。与双歧杆菌组比较, 在社交新颖性检测中, 归脾丸高剂量组接触陌生鼠 2 时间增加 ($P<0.05$)。与归脾丸高剂量组比较, 在社交能力检测中, 归脾丸低剂量组与陌生鼠 1 接触时间降低 ($P<0.05$); 在社交新颖性检测中, 归脾丸低剂量组与陌生鼠 2 接触时间降低 ($P<0.05$)。

在社交能力检测中, 与接触空笼时间比较, 模型组与接触陌生鼠 1 时间降低 ($P<0.05$), 其余各组接触与陌生鼠 1 时间均升高 ($P<0.05$)。在社交新颖性检测中, 与接触陌生鼠 2 时间比较, 模型组接触陌生鼠 1 时间升高 ($P<0.05$), 其余各组接触陌生鼠 1 时间均降低 ($P<0.05$)。详见表 4。

3.5 用药后各组大鼠前额组织 5-HT 含量情况

与正常组比较, 其余各组前额 5-HT 含量降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各用药组前额组织 5-HT 含量升高 ($P<0.05$); 与归脾丸高剂量组比较, 归脾丸低、中剂量组前额组织 5-HT 含量降低 ($P<0.05$)。详见表 5。

表 5 各组大鼠前额 5-HT 的含量比较 ($\bar{x}\pm s, n=3, \text{pg/mL}$)

组别	5-HT
正常组	12.88±1.04
模型组	5.30±0.22*
双歧杆菌组	8.09±0.01**
归脾丸高剂量组	9.20±0.62**
归脾丸中剂量组	7.26±0.08** [▽]
归脾丸低剂量组	6.79±0.15** [▽]

注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, ** $P<0.05$; 与归脾丸高剂量组比较, [▽] $P<0.05$ 。

3.6 嗅探偏好系数与 5-HT 含量相关性分析

绘制社交嗅探系数及新颖嗅探系数与 5-HT 含量之间的散点图, 结果显示社交嗅探系数及新颖嗅探系数与 5-HT 有直线相关关系 (社交: $r=0.676, P<0.05$, 新颖: $r=0.862, P<0.05$), 且 5-HT 含量越高, 其社交嗅探系数及新颖嗅探系数越高。详见图 2。

4 讨论

ASD 是一种复杂的脑神经发育障碍性疾病。FMT 诱导的 ASD 模型鼠与人类 ASD 行为学表现、

表 4 用药后各组大鼠行为学变化比较 ($\bar{x}\pm s, n=6, s$)

分组	旷场实验	社交能力检测		社交新颖性检测	
		接触空笼时间	接触陌生鼠时间 1	接触陌生鼠 1 时间	接触陌生鼠 2 时间
正常组	75.51±11.49	20.47±6.74	79.35±7.48 ^a	34.59±6.04 ^b	87.32±7.87
模型组	29.42±6.54*	50.42±8.21*	30.56±5.33**	59.41±7.27* ^b	31.03±5.66*
双歧杆菌组	53.10±9.80**	29.25±3.94 [#]	47.75±5.18** [Ⓢ]	26.12±5.59* ^b	47.85±4.62**
归脾丸高剂量组	58.01±8.68**	35.49±3.26**	58.46±6.78** [Ⓢ]	27.23±5.20* ^b	68.47±11.60** [Ⓢ]
归脾丸中剂量组	52.83±7.36**	34.79±6.77**	50.50±8.74** [Ⓢ]	32.05±4.81* ^b	54.79±8.00**
归脾丸低剂量组	48.48±9.12**	32.45±7.06**	43.54±4.96** [Ⓢ] [▽]	24.06±6.47* ^b	52.63±7.17** [▽]

注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, ** $P<0.05$; 与双歧杆菌组比较, [Ⓢ] $P<0.05$; 与归脾丸高剂量组比较, [▽] $P<0.05$; 社交能力检测阶段, 与接触空笼时间比较, ^a $P<0.05$; 社交新颖性检测阶段, 与接触陌生鼠 1 时间比较, ^b $P<0.05$ 。

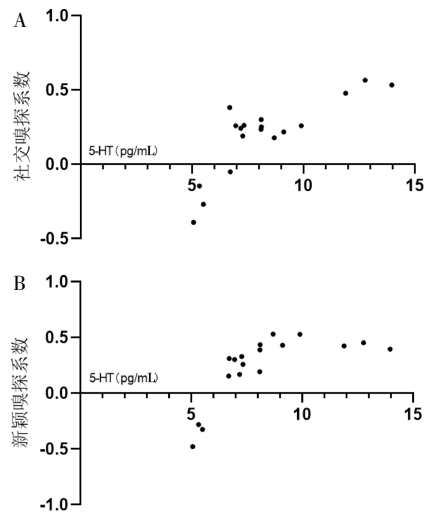


图2 社交嗅探系数、新颖嗅探系数与5-HT含量的关系

注:A.社交嗅探系数;B.新颖嗅探系数。

肠道菌群改变相似,是一种较为新颖的ASD动物模型^[11]。肠道通过神经、内分泌、免疫系统和肠道微生物及其代谢物共同参与肠脑双向交流,这种交流方式被称为“肠脑轴”,而ASD的发生与“肠脑轴”功能紊乱密切相关^[26],肠道菌群在肠脑轴的信号传递中发挥着重要作用。肠道菌群的平衡是脾胃发挥正常生理作用的重要因素^[27]。因此,肠道菌群改变可能使子代大鼠脾胃功能减弱。脾为后天之本,后天之精不足,易致脑髓失充,脑髓失养,引起ASD发病^[28]。因此,当孕鼠及子代鼠肠道菌群紊乱时,可使“肠脑轴”功能异常^[29],最终使子代大鼠出现ASD样改变。本实验结果显示,FMT孕鼠组子代大鼠生长发育迟缓,同时,部分子代大鼠出现社交障碍、社交新颖性减弱、焦虑加重等情志异常的表现,提示FMT可使子代鼠出现ASD样改变,同时出现体质量下降、睡眠时间延长等伴随症状。

ASD无中医病名,根据其临床表现,可归属于中医学“童昏”“语迟”“清狂”“无慧”“胎弱”“视无情”“目无情”等范畴。中医学认为,ASD病位在脑,与心、肝、脾、肾密切相关,其基本病机为脑髓不足、脑神失养^[30]。脑为元神之府,主精神活动,人的各种精神活动如情志、意识等都是由脑所调控。《灵枢·海论》云“脑为髓之海”,《素问·五藏生成篇》云:“诸髓者,皆属于脑”,故脑髓满则脑功能正常。脾为后天之本,为气血生化之源,是维持后天生命活动的根本;脾主运化,可将饮食水谷化为水谷精微,脾气虚,则运化功能异常,后天之精不足,易致脑髓失充,脑髓失养。ASD的病因为心脾亏虚、气机郁滞,而心主血

气,心血虚失于濡养则心神失养;脾气虚则生津不足,无法营养四肢经络,加重情志失常、意识紊乱,故治疗应以补心安神、益气健脾、调理脏腑为主要原则^[31]。

归脾丸由白术、茯苓、黄芪、龙眼肉、党参、酸枣仁、当归、远志、木香、甘草、大枣11味药物组成。黄芪、党参甘温,两药合用可补气生血,为君;龙眼肉甘平、当归甘温,以补血为主,龙眼肉亦可养血安神,酸枣仁酸甘性平,可养肝血,与远志合用增强安神定志之功,上4味中药以养血安神定志为主,为臣;白术可燥湿利水、健脾益气,茯苓具有健脾宁心之功;佐木香疏通气机,使全方补而不滞;大枣调和气血,炙甘草可和中缓急,调和诸药,为使。本方药物多归心、脾经,共奏益气补血、健脾养心之功。现代研究表明,归脾丸具有增加免疫、减轻炎症反应、调节中枢神经、改善胃肠功能、调节肠道菌群等药理作用^[32],还可用于治疗儿童ASD^[12]等精神相关的疾病,且均有较好的临床疗效。本实验结果显示,经归脾丸治疗后,各用药组大鼠的社交能力、社交新颖性、焦虑状态及体质量出现不同程度的改善。

5-HT是细胞增殖、分化、迁移、凋亡、突触形成等神经元发育的关键步骤,通过影响神经元和胶质细胞发育而发挥作用^[33]。有研究表明,大脑缺乏5-HT的小鼠表现出社交能力下降及高度重复的行为^[34]。5-HT是肠道菌群代谢产物之一,作为神经递质,脑内5-HT的合成、代谢异常时,可能会使细胞增殖、细胞凋亡、突触生成以及构建神经网络出现障碍,从而导致大脑整体结构组织异常^[35]。本次相关性分析结果提示,前额5-HT的含量与子代大鼠社交嗅探系数及新颖嗅探系数呈现正相关,提示前额5-HT可能参与了子代大鼠核心症状的改善。

综上所述,归脾丸可显著改善FMT子代大鼠的ASD样行为,机制可能是通过归脾丸调节肠道菌群,提高脑内5-HT含量,以维持神经网络功能正常实现的。但本实验尚未对大鼠肠道菌群进行检测,今后需继续研究归脾丸对维持肠道菌群稳定及5-HT系统在保护神经发育中的具体作用。

参考文献

- [1] LORD C, ELSABBAGH M, BAIRD G, et al. Autism spectrum disorder[J]. *Lancet*, 2018, 392(10146): 508-520.
- [2] 刘 贤, 林穗方, 陈文雄, 等. 中国儿童孤独症谱系障碍患病率 Meta分析[J]. *中国儿童保健杂志*, 2018, 26(4): 402-406, 429.

- [3] 徐秀. 孤独症谱系障碍[J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(11): 1099-1100.
- [4] 赵亚楠, 李智文, 李琳, 等. 中国0-6岁儿童孤独症谱系障碍筛查患病现状[J]. 中国生育健康杂志, 2023, 34(5): 423-428.
- [5] GREEN R M, TRAVERS A M, HOWE Y, et al. Women and autism spectrum disorder: Diagnosis and implications for treatment of adolescents and adults[J]. *Current Psychiatry Reports*, 2019, 21(4): 22.
- [6] 贺文香, 周豪钦, 陈晓丽. 孤独症谱系障碍遗传检测意义及方法选择专家建议[J]. 中国实用儿科杂志, 2022, 37(11): 801-803, 832.
- [7] THAWLEY A J, VENEZIANI L P, RABELO-DA-PONTE F D, et al. Aberrant IL-17 levels in rodent models of autism spectrum disorder: A systematic review[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 874064.
- [8] WANG W Y, TANG J H, ZHONG M, et al. HIF-1 α may play a role in late pregnancy hypoxia-induced autism-like behaviors in offspring rats[J]. *Behavioural Brain Research*, 2021, 411: 113373.
- [9] 马焯, 谭李红. 肠道菌群对儿童神经发育的影响研究进展[J]. 儿科药学杂志, 2023, 29(5): 60-64.
- [10] LAMY M, PEDAPATI E V, DOMINICK K L, et al. Recent advances in the pharmacological management of behavioral disturbances associated with autism spectrum disorder in children and adolescents[J]. *Paediatric Drugs*, 2020, 22(5): 473-483.
- [11] QI Z Y, LYU M K, YANG L P, et al. A novel and reliable rat model of autism[J]. *Frontiers in Psychiatry*, 2021, 12: 549810.
- [12] 孟欣, 张晓敏, 韩雪, 等. 汪受传教授治疗儿童孤独症临床证经验[J]. 中医儿科杂志, 2021, 17(5): 10-13.
- [13] 朱吉鹏, 林红军, 郭蛟凤. 归脾汤联合推拿对中老年心脾两虚型原发性失眠患者 IL-2、IL-6、5-HT 及睡眠质量的影响[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2020, 4(12): 58-60.
- [14] TORTORA F, HADIPOUR A L, BATTAGLIA S, et al. The role of serotonin in fear learning and memory: A systematic review of human studies[J]. *Brain Sciences*, 2023, 13(8): 1197.
- [15] ABUAISH S, AL-OTAIBI N M, AABED K, et al. The efficacy of fecal transplantation and Bifidobacterium supplementation in ameliorating propionic acid-induced behavioral and biochemical autistic features in juvenile male rats[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2022, 72(2): 372-381.
- [16] 唐进松, 宋彦丽, 郑洁, 等. 奥曲肽联合双歧杆菌三联活菌肠溶胶囊对老年脑卒中合并消化道出血及血清 5-HT、SPY 水平的影响[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(24): 5927-5929.
- [17] FRIEDMAN N P, ROBBINS T W. The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2022, 47: 72-89.
- [18] LI Y, MA S, ZHANG X, et al. ASD and ADHD: Divergent activating patterns of prefrontal cortex in executive function tasks[J]. *Journal of Psychiatric Research*, 2024, 172: 187-196.
- [19] SATO M, NAKAI N, FUJIMA S, et al. Social circuits and their dysfunction in autism spectrum disorder[J]. *Molecular Psychiatry*, 2023, 28(8): 3194-3206.
- [20] HUANG Y H, ARNOLD S R, FOLEY K R, et al. Diagnosis of autism in adulthood: A scoping review[J]. *Autism*, 2020, 24(6): 1311-1327.
- [21] 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.
- [22] TAKUMI T, TAMADA K, HATANAKA F, et al. Behavioral neuroscience of autism[J]. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2020, 110: 60-76.
- [23] STEIMER T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: Some conceptual issues[J]. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 2011, 13(4): 495-506.
- [24] 徐叔云, 卞如濂. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 62.
- [25] K Aidanovich-BEILIN O, LIPINA T, VUKOBRADOVIC I, et al. Assessment of social interaction behaviors[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2011(48): 2473.
- [26] 韦金盈, 方晓慧, 陈嘉怡, 等. 微生物-肠-脑轴机制与孤独症谱系障碍[J]. 临床与病理杂志, 2023, 43(2): 400-407.
- [27] 聂玉婷, 高利. 基于肠道菌群失调探讨脑系疾病从脾胃论治[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(11): 1390-1394.
- [28] 周云山, 刘玲佳, 丁一芸, 等. 王俊宏从脾论治孤独症谱系障碍经验[J]. 中医学报, 2019, 34(10): 2134-2137.
- [29] 卜婉萍, 林栋. 从肠道菌群-肠-脑轴调控角度探讨针刺长强穴治疗孤独症谱系障碍机制[J]. 福建中医药, 2024, 55(1): 32-34.
- [30] 唐艳鹏, 王晓聪, 张莎莎, 等. 王素梅教授从脾肾不足论治小儿自闭症经验[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(23): 2572-2575.
- [31] 王雷, 丁玉蓉, 汪受传. 汪受传辨治孤独症心脾两虚证的经验[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(8): 3393-3395.
- [32] 叶晓滨. 归脾丸的药理作用和临床应用研究进展[J]. 光明中医, 2021, 36(3): 493-496.
- [33] FABBRI E, BALBI T, CANESI L. Neuroendocrine functions of monoamines in invertebrates: Focus on bivalve molluscs[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2024, 588: 112215.
- [34] KANE M J, ANGOA-PERÉZ M, BRIGGS D I, et al. Mice genetically depleted of brain serotonin display social impairments, communication deficits and repetitive behaviors: Possible relevance to autism[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48975.
- [35] CHEUNG A, KONNO K, IMAMURA Y, et al. Neurexins in serotonergic neurons regulate neuronal survival, serotonin transmission, and complex mouse behaviors[J]. *eLife*, 2023, 12: e85058.