DOI:10.16016/j.2097-0927.202404037

ADAM10 抑制剂对孤独症样行为大鼠突触结构和血脑屏障通透性的影响

杨靖媛,李小莉,吴春燕,白亚丽,陈 洁,陈 立 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院儿童生长发育与心理健康中心,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿童神经发育与认知障碍重庆市重点实验室

[摘要] **目的** 探讨解聚素金属蛋白酶 10(a disintegrin and metalloprotease domain 10,ADAM10)抑制剂对孤独症样行为大鼠突触结构和血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)通透性的影响。**方法** 按照随机数字表法将 50 只孕期丙戊酸(valproic acid,VPA)诱导的子代雄性孤独症样行为大鼠分为 2 组(n=25):丙戊酸组(VPA 组)、ADAM10 抑制剂 TAT-Pro-ADAM10(709-729)治疗组(TAT-Pro 组),另取 25 只孕期生理盐水诱导的子代雄性大鼠作为对照组(CON 组)。TAT-Pro 组在生后第 20 天腹腔注射 TAT-Pro-ADAM10(709-729)(3 nmol/g),CON 组和 VPA 组给予等体积的生理盐水。记录造模期间各组子代大鼠体质量及尾长变化。Western blot 检测给药 24 h 后子代大鼠海马组织中的 ADAM10、血管内皮钙黏蛋白(vascular endothelial cadherin, VE-Cad)、咬合蛋白(Occludin)、带状闭合蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)及突触后致密物-95(post-synaptic density, PSD95)、突触素(synaptophysin, SYN)的蛋白表达量。免疫荧光进一步验证 ZO-1 的蛋白表达。生后 24 d 进行旷场、梳毛、三箱社交及水迷宫行为学检测。高尔基染色检测生后 28 d 子代大鼠海马组织中树突棘密度。**结果** 相较于 VPA 组,TAT-Pro 组大鼠体质量及尾长无显著改变,但重复刻板行为、社交能力及学习记忆功能均显著改善(P<0.05),海马组织中 ADAM10 及 PSD95 蛋白表达水平显著降低(P<0.05),VE-Cad、Occludin 蛋白表达水平均显著升高(P<0.05),且树突棘的密度显著降低(P<0.05),未成熟的树突棘也减少。**结论** 突触发育关键期,抑制 ADAM10 过表达可减轻 VPA 诱导的孤独症样行为大鼠的学习记忆功能,且对孤独症样行为大鼠的异常突触结构及 BBB 通透性有一定的修复作用。

[关键词] 孤独症谱系障碍;解聚素金属蛋白酶 10;血脑屏障;突触
[中图法分类号] R322.81; R742.8; R966 [文献标志码] A

Effects of ADAM10 inhibitor on synaptic structure and blood-brain barrier permeability in rats with autism-like behavior

YANG Jingyuan, LI Xiaoli, WU Chunyan, BAI Yali, CHEN Jie, CHEN Li Growth, Development and Mental Health Center of Children and Adolescents, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Child Neurodevelopment and Cognitive Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of a disintegrin and metalloprotease domain 10 (ADAM10) inhibitor on synaptic structure and blood-brain barrier (BBB) permeability in rats with autism-like behavior. **Methods** A total of 50 male offspring rats with prenatal exposure to valproic acid (VPA) to induce autism-like behavior were randomly divided into VPA group and ADAM10 inhibitor, TAT-Pro-ADAM10 (709-729) group (TAT-Pro group), with 25 rats in each group. And another 25 offspring male rats induced by normal saline during pregnancy served as control group (CON group). The TAT-Pro group was given intraperitoneal injection on postnatal day 20 with 3 nmol/g TAT-Pro-ADAM10 (709-729), and equal volumes of normal saline were given to the CON and VPA groups. The changes of body mass and tail length of

[基金项目] 重庆医科大学未来医学青年创新团队支持计划项目(W0037)
[通信作者] 陈 立,E-mail:chenli@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

offspring rats were measured and recorded during modeling. Western blotting was performed to detect the protein levels of ADAM10, vascular endothelial cadherin (VE-Cad), Occludin, zonula occludens-1 (ZO-1), post-synaptic density protein-95 (PSD95), and synaptophysin (SYN) in the hippocampal tissue of the offspring rats in 24 h after administration. The expression of ZO-1 protein was further verified by immunofluorescence assay. Behavioral tests were conducted from postnatal day 24, including open field, grooming, three-chamber social interaction, and water maze tests. The density of dendritic spines in hippocampal tissue in the offspring rats on postnatal day 28 was detected by Golgi staining. **Results** Compared with the VPA group, the TAT-Pro group showed no significant changes in body weight and tail length, but significantly improved repetitive stereotyped behaviors, social skills and learning memory ability ($P<0.05$), reduced protein levels of ADAM10 and PSD95 in hippocampal tissues ($P<0.05$), and elevated levels of VE-cad and Occludin ($P<0.05$). The density of dendritic spines was significantly reduced ($P<0.05$), and the number of immature dendritic spines also decreased in the TAT-Pro group than the VPA group. **Conclusion** Inhibition of ADAM10 overexpression during the critical period of synaptic development can alleviate learning and memory dysfunctions in VPA-induced rats with autism-like behavior, and has a certain restorative effect on abnormal synaptic structures and blood-brain barrier permeability.

[**Key words**] autism spectrum disorder; a disintegrin and metalloprotease domain 10; blood-brain barrier; synapsis

Supported by the Supporting Program for Youth Innovation Group in Future Medicine of Chongqing Medical University (W0037). Corresponding author: CHEN Li, E-mail: chenli@cqmu.edu.cn

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder,ASD)是一组以社交沟通障碍、兴趣或活动范围狭窄及重复刻板行为为核心症状的神经发育障碍,已成为全球罹患率增长最快的疾病之一[1]。起病自童年且贯穿一生,影响 1.0%~2.7%的儿童和成年人,全球约有 7 800 万 ASD 患者,我国患者逾 300 万人[2-5]。ASD 具有高度异质性和复杂性,且发病机制尚不明确,亟待开发更多有效的治疗方案[6]。

丙戊酸(valproic acid, VPA)是一种短链脂肪酸,广泛用作抗癫痫药物。临床研究表明,孕期 VPA 暴露与许多疾病风险增加相关,包括发育迟缓、智力障碍和 ASD 等疾病[7-10]。VPA 诱导的 ASD 样模型代表了一种环境病因综合征,与携带单一 ASD 相关基因突变的转基因模型相比,该模型可能更好地代表源自环境/表观遗传的特发性 ASD 病例[11]。因此,孕期 VPA 暴露诱导的子代 ASD 大鼠对研究 ASD 背后复杂的生理及病理学机制具有临床意义和科学价值。血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)在妊娠期间形成,是中枢神经系统内皮细胞在血液和脑组织之间建立的一个选择性过滤器[12]。BBB 的主要功能是通过限制可能对神经元活动产生负面影响的循环溶质、大分子蛋白质和炎症细胞进入脑组织,在中枢神经系统防御中起着关键作用[13]。BBB 异常可能导致外部有害物质进入大脑及神经炎症反应,从而导致神经元的异常兴奋和突触功能改变,影响大脑发育和功能[14-16]。有研究报道,BBB 功能障碍表现为不同程度的脑血管通透性过高、神经血管解耦或血流失调。目前血脑屏障在 ASD 中发现的改变主要集中在血管通透性增加,导致大脑更容易受到外界物质的影响,发生神经炎症和其他有害物质的损害,但尚未发现可以恢复 BBB 功能的疗法[13-14]。有研究发现,孕期 VPA 暴露会通过干扰线粒体-Wnt 信号级联增加 BBB 的通透性[13]。

解聚素金属蛋白酶 10(a disintegrin and metalloprotease domain 10,ADAM10)是解聚素金属蛋白酶家族的一员,在大脑中高水平表达,有 100 多种切割底物。ADAM10 可以通过切割血管内皮细胞粘附蛋白(vascular endothelial cadherin, VE-Cad)从而调节 BBB 的通透性[17],通过切割淀粉样蛋白前体产生分泌型淀粉样蛋白前体 α(secreted amyloid precursor protein-α, sAPPα)调节突触的分子组织结构与活性,也可以通过切割 CX3CL1 调节小胶质细胞介导的突触修剪,是胚胎期及儿童期大脑发育和维持神经网络稳态的重要因子[15, 18]。ADAM10 缺陷与部分生命两端的儿童期神经发育性疾病和老年期神经退行性疾病相关,如癫痫、阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)及亨廷顿综合征(Huntington's disease,HD)等[18-20]。ADAM10 通过调节树突棘发育以及突触可塑性,进而影响社交能力和学习记忆功能[21-22]。ADAM10 抑制剂可有效改善脆性 X 综合征转基因模型小鼠神经结构发育及异常行为[23]。最新研究发现,CNTNAP2 基因突变所致 ADAM10 表达异常可致 ASD 样行为[24]。因此推测,ADAM10 可能是 ASD 发病机制中的一种重要致病因

子和治疗靶点。ADAM10 参与 ASD 发病机制的研究较少,且未见 ADAM10 抑制剂对 ASD 样行为大鼠神经发育及行为的干预研究。本研究拟通过腹腔注射 ADAM10 抑制剂,探讨其对 ASD 样行为大鼠 BBB 通透性、突触发育及学习记忆能力的影响,为进一步制定 ASD 的治疗策略提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

本研究中所用 SD 大鼠从重庆医科大学动物中心[No. SYXK(Yu)2022-0002]购买,饲养于重庆医科大学附属儿童医院实验动物中心 SPF 级动物房内,SPF 室环境温度为(25±2)℃,湿度为(50±5)%,昼夜循环设定为 12/12 h(光照:早 7:00 至晚 7:00;暗室:晚 7:00 至早 7:00),所有动物自由饮水、进食。动物实验流程均经过重庆医科大学实验动物福利伦理审查委员会批准(CHCMU-IACUC20230629005)。

为了排除性别差异,选取了雄性子代大鼠进入相应的对照组、实验组。将 50 只孕期 VPA 诱导(孕 12.5 d 腹腔注射单剂量 VPA 600 mg/kg)的子代 ASD 大鼠按照随机数字表法分为丙戊酸组(VPA 组)、ADAM10 抑制剂 TAT-Pro-ADAM10(709-729)治疗组(TAT-Pro 组),另取 25 只孕期等体积生理盐水诱导的大鼠作为对照组(CON 组)。TAT-Pro 组在生后第 20 天腹腔注射 TAT-Pro-ADAM10(709-729)(3 nmol/g),该抑制肽使用方法参考先前文献报道[18, 23],CON 组和 VPA 组在第 20 天给予等体积的生理盐水。生后第 21、28 天断头并获取海马组织完成分子生物学及形态学检测,生后 24 d 开始行为学检测,获取海马组织及行为学时间参考先前文献报道[18, 23]。

1.2 主要仪器、试剂

VPA(Sigma 公司,美国);TAT-Pro-ADAM10(709-729)(吉尔生化,中国);总蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白含量检测试剂盒(江苏凯基,中国);SDS-PAGE 电泳凝胶配制试剂盒(上海雅酶,中国);ADAM10 Rabbit 抗体(Abcam,英国),VE-Cad Rabbit 抗体(Santa,美国),Occludin Rabbit 抗体(武汉三鹰,中国),ZO-1 Rabbit 抗体(武汉三鹰),PSD95 Rabbit 抗体(武汉三鹰),SYN Rabbit 抗体(华安生物,中国);高尔基染色试剂盒(FD Neuro Technologies, Inc. 美国);0.22 μm PVDF 膜(Millipore 公司,德国);ANY-Maze 视频跟踪系统(Stoelting,美国);免疫荧光激光共聚焦显微镜(Nikon,日本)。

1.3 旷场及梳毛实验

旷场箱被分为中央区和周边区,依次将各组子代大鼠从中央区放入,测试时间 5 min。摄像系统记录每只仔鼠在中央区的时间以评估其探索行为,记录自我梳毛时间来明确是否具有重复刻板行为表现,实验过程中保持安静。每只动物实验完成后用 75%的酒精清洁实验设备。

1.4 三箱实验

在连通的透明三室箱中进行,是评估大鼠社交能力的经典方法。第 1 天,在中间箱放入实验鼠并让其适应 5 min。第 2 天,在两侧箱的金属笼中各放入 1 只同龄、同性别的陌生鼠和 1 个玩具,实验鼠从中间箱放入后在装置中自由探索 5 min。第 3 天,在两侧箱的金属笼中分别放入陌生鼠和与实验鼠同笼同性别的熟悉鼠,实验鼠从中间箱放入使其自由探索 5 min。摄像系统记录实验鼠在每个箱内的活动时间,观察大鼠的社交能力。实验过程中保持安静。每只动物实验完成后用 75%的酒精清洁实验设备。

1.5 Morris 水迷宫实验

每次实验均由电脑自动记录动物从入水点到达平台所需时间,以所需时间作为学习和记忆成绩,若设定时间内未找到站台,计算机停止跟踪,记录时间为 60 s。若大鼠在 60 s 内未找到平台,则将其放在平台停留 10 s。第 1 天为适应训练,在无平台的情况下,让大鼠在迷宫中自由游泳 60 s;第 2~6 天为定位航行实验(非可视训练),分别测试 4 个象限,记录大鼠游泳轨迹及找到平台所需时间;第 7 天为平台探索实验,撤去平台,从离平台所在象限最远的象限将实验鼠放入迷宫,记录实验鼠在规定时间内找到平台所在位置次数。

1.6 蛋白质印迹

每组取 4 只大鼠,将 50 mg 海马组织置于 200 μL 组织裂解液(RIPA:PMSF=1 000:1)中,匀浆后在 4 ℃离心 10 min(10 000 ×g),离心后取上清,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白质溶液与 5×SDS 以 5:1的比例混合,然后在 100 ℃高温变性 10 min。电泳分离变性蛋白并转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉在室温下封闭 2 h,用 PBST 洗膜 3 次,在 ADAM10、VE-Cad、Occludin、ZO-1、PSD95 的一抗中 4 ℃孵育过夜,次日在相应二抗中常温孵育 1 h,PBST 洗膜 3 次后使用 Bio-Rad ChemiDoc™ Touch 成像系统进行成像。使用 Image J 软件测量目的蛋白与 β-actin 灰度值比值,相对定量分析目的蛋白表达。

1.7 免疫荧光染色

每组取 5 只大鼠,用 4%多聚甲醛心脏灌注,蔗糖梯度脱水后将海马组织用 OCT 包埋,冰冻切片切取 20 μm 海马组织。用 0.01 mol/L 的 PBS 在常温下漂洗 5 min×3 次,将切片置于封闭液(0.3% Triton+0.1% Tween+PBS)后在常温下孵育 2 h。用 PBS(0.01 mol/L)常温漂洗 5 min×3 次,将切片置入 ZO-1 Rabbit 抗体中(1:200),4 ℃过夜孵育。第 2 天将切片在常温下复温

1 h,然后用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。随后将切片放入含有荧光二抗(Abcam,1∶500)的溶液中,在常温下避光孵育 50 min。取出切片后,用 PBS 液漂洗 3 次,每次 5 min。接着进行 DAPI 复染 10 min,然后用 PBS 在常温下漂洗 2 次,每次 3 min。将切片平整贴于防脱载玻片上,滴上抗荧光淬灭剂封片,于 4 ℃避光保存。采用免疫荧光激光共聚焦显微镜观察拍照。

1.8 高尔基染色

每组取 5 只大鼠,取脑组织标本后迅速浸泡至 AB 混合液中,常温浸泡 6 h 后更换 1 次新的 AB 混合液。室温下 AB 液浸泡避光保存 2 周。取出标本转到 C 液中,24 h 后更换 1 次新的 C 液。室温下 C 液浸泡避光保存 72 h。取出标本后擦除表面的液体,转至-80 ℃冰箱过夜。冰冻切片机的样本盘上滴加少许 OCT 包埋液,使标本固定在样本盘上,将脑组织切成厚度为 100 μm 的薄片。脑组织铺在明胶包被的载玻片,避光下室温保存 2 d。使用双蒸水冲洗切片 4 min×2 次。把切片置于染色混合液(D 液∶E 液∶双蒸水=1∶1∶2)中,在摇床上染色 10 min。使用双蒸水冲洗切片 4 min×2 次。在 50%、75%、95%的乙醇中对切片进行梯度脱水,每个梯度 4 min。使用无水乙醇对切片进行脱水 4 min×4 次。在二甲苯中对切片进行透明 4 min×3 次。用树脂封片剂原液对盖玻片进行封片。光学显微镜下观察神经元树突棘并进行图像分析。在次级树突上 30~100 μm 段内计算树突棘的数量。用 Image J 软件对图像进行分析。

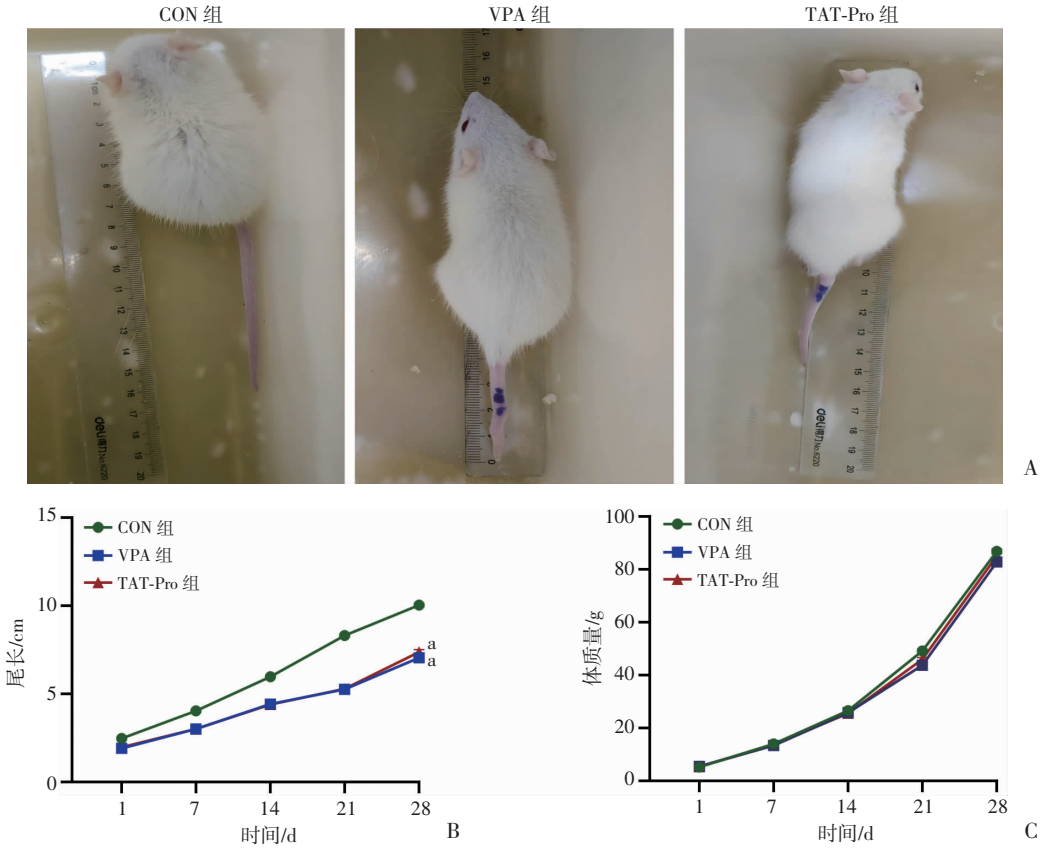
1.9 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行分析,使用 GraphPad Prism 9.0 软件生成图形。采用 $\bar{x}\pm s$ 表示具有正态分布的变量。水迷宫实验逃避潜伏期数据采用双因素方差分析,其余多组数据之间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 ADAM10 抑制剂对孕期 VPA 暴露诱导的子代 ASD 大鼠生长发育无显著影响

本研究监测了子代大鼠生后 1~28 d 的尾长及体质量变化,发现 VPA 及 TAT-Pro 组子代大鼠尾巴均出现明显折尾(图 1A)。VPA 组子代大鼠尾长与 CON 组相比显著缩短($P<0.05$),但 TAT-Pro 组与 VPA 组相比无显著差异,见图 1A、B。3 组仔鼠的体质量变化未见统计学差异(图 1C)。



A:不同子代大鼠尾部畸形情况;B:子代大鼠生后第 1、7、14、21、28 天尾长变化 a:$P<0.05$,与 CON 组比较;C:子代大鼠生后第 1、7、14、21、28 天体质量变化

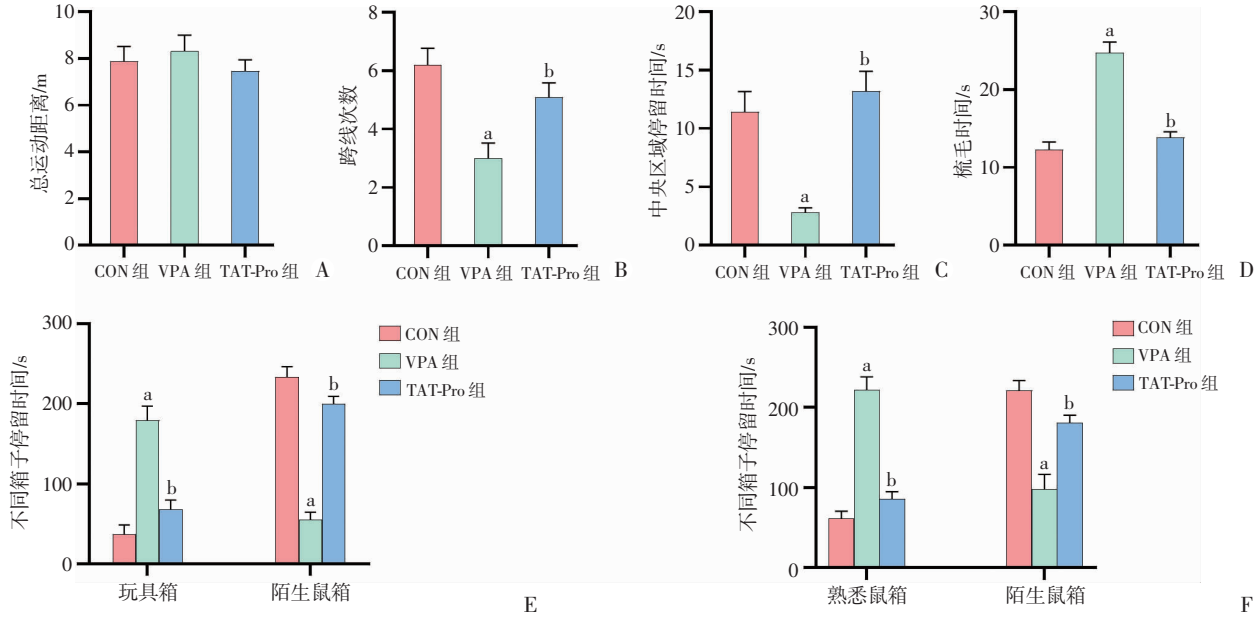
图 1 3 组子代大鼠建模期间尾长及体质量变化($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

2.2　ADAM10 抑制剂可以改善孕期 VPA 暴露引起的子代大鼠 ASD 核心症状

在旷场实验中,首先检测了 3 组子代大鼠的运动总距离,结果发现 3 组的总运动距离没有显著差异(图 2A)。但与 CON 组相比,VPA 组大鼠的跨线次数及在中央区停留时间均显著减少($P<0.05$),TAT-Pro 组跨线次数及在中央区停留时间较 VPA 组显著增多($P<0.05$,图 2B、C)。在梳毛实验中,VPA 组大鼠的梳毛时间较 CON 组显著增加($P<0.05$),TAT-Pro 组梳毛时间较 VPA 组显著减少($P<0.05$),见图 2D。在三箱的社会互动实验中,结果显示与 CON 组相比,VPA 组大鼠在玩具箱中停留的时间更长($P<0.05$),在陌生鼠箱中停留的时间较短($P<0.05$),而 TAT-Pro 组子代大鼠与 VPA 组相比,其在陌生鼠箱中会花费更多的时间($P<0.05$),见图 2E。在三箱的社会新颖性实验中,结果显示与 CON 组相比,VPA 组子代大鼠在熟悉鼠箱中停留的时间更长($P<0.05$),在陌生鼠箱中停留的时间较短($P<0.05$),而 TAT-Pro 组子代大鼠与 VPA 组相比,其在陌生鼠箱中会花费更多的时间($P<0.05$),见图 2F。

2.3　ADAM10 抑制剂可以改善孕期 VPA 暴露引起子代大鼠的学习记忆障碍

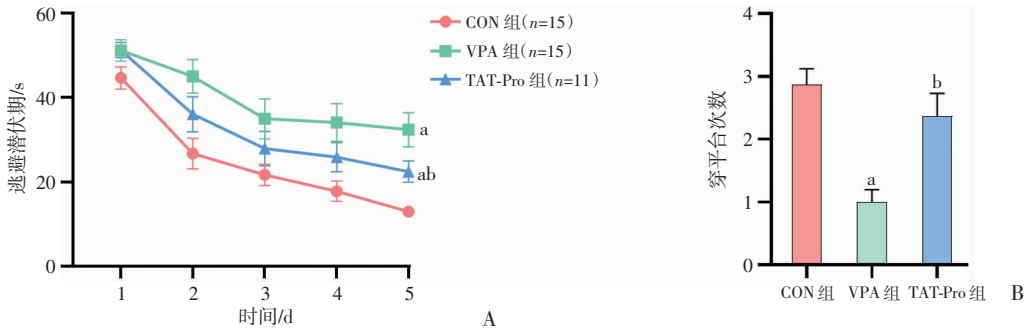
通过对 3 组大鼠在水迷宫中逃避潜伏期的检测,发现 VPA 组显著高于 CON 组($P<0.05$),TAT-Pro 组较 VPA 组显著降低($P<0.05$),见图 3A。通过对平台探索次数的检测,发现 VPA 组平台探索次数显著低于 CON 组($P<0.05$),而 TAT-Pro 组平台探索次数较 VPA 组显著增多($P<0.05$),见图 3B。



a:$P<0.05$,与 CON 组比较;b:$P<0.05$,与 VPA 组比较

A:旷场实验中移动总距离;B:旷场实验在中央区域跨线次数;C:旷场实验在中央区域停留时间;D:梳毛时间;E:在陌生鼠箱与玩具箱中停留的时间;F:在陌生鼠箱与熟悉鼠箱中停留的时间

图 2　3 组子代大鼠旷场及三箱实验($n=11$,$\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,与 CON 组比较;b:$P<0.05$,与 VPA 组比较

A:逃避潜伏期;B:平台探索次数

图 3　3 组子代大鼠水迷宫实验($\bar{x}\pm s$)

2.4　ADAM10 抑制剂可以上调 VE-cad 蛋白表达量

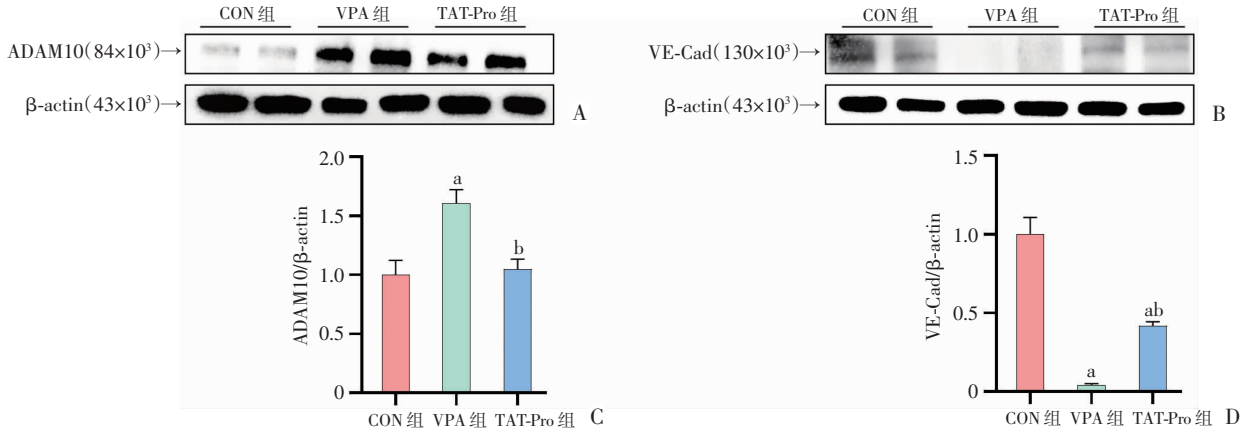
Western blot 检测发现,VPA 组 ADAM10 蛋白表达水平较 CON 组显著升高($P<0.05$),VE-Cad 蛋白表达水平较 CON 组显著降低($P<0.05$);TAT-Pro 组 ADAM10 蛋白表达水平较 VPA 组显著下调($P<0.05$),VE-Cad 蛋白表达水平较 VPA 组显著上调($P<0.05$,图 4)。

2.5　ADAM10 抑制剂可以改善子代 ASD 大鼠 BBB 通透性

Western blot 检测 BBB 通透性相关蛋白发现,VPA 组 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平较 CON 组显著降低($P<0.05$);TAT-Pro 组 Occludin 蛋白表达水平较 VPA 组显著上调($P<0.05$),但 ZO-1 蛋白表达水平较 VPA 组无显著改变,见图 5A~D。进一步,用免疫荧光染色检测 ZO-1 的定位及定量,发现结果与上述 Western blot 结果一致。VPA 组 ZO-1 蛋白表达水平较 CON 组显著降低($P<0.05$),TAT-Pro 组 ZO-1 蛋白表达水平较 VPA 组无统计学差异,见图 5E、F。

2.6　ADAM10 抑制剂可以改善孕期 VPA 诱导的子代大鼠神经元异常

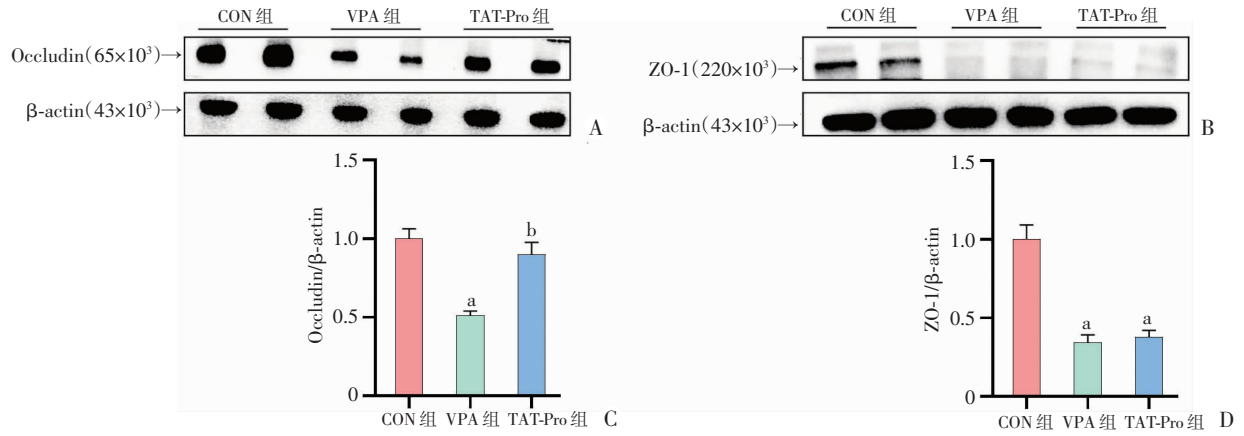
Western blot 检测海马组织中突触蛋白发现,VPA 组 SYN 和 PSD95 蛋白表达水平较 CON 组显著升高($P<0.05$,图 6C、D),TAT-Pro 组 PSD95 蛋白表达水平较 VPA 组显著降低($P<0.05$,图 6B、D),但 TAT-Pro 组 SYN 蛋白表达水平与 VPA 组比较无统计学差异(图 6A、C)。进一步,用高尔基染色检测树突棘密度变化,发现 VPA 组树突棘密度较 CON 组显著升高,且不成熟树突棘显著增多($P<0.05$);TAT-Pro 组树突棘密度较 VPA 组显著降低($P<0.05$),见图 6E、F。



a:$P<0.05$,与 CON 组比较;b:$P<0.05$,与 VPA 组比较

A、B:3 组子代大鼠海马组织中 ADAM10、VE-Cad 电泳结果;C:3 组子代大鼠海马组织 ADAM10 定量分析;D:3 组子代大鼠海马组织 VE-Cad 定量分析

图 4　3 组子代大鼠海马组织中 ADAM10、VE-Cad 的蛋白表达水平($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

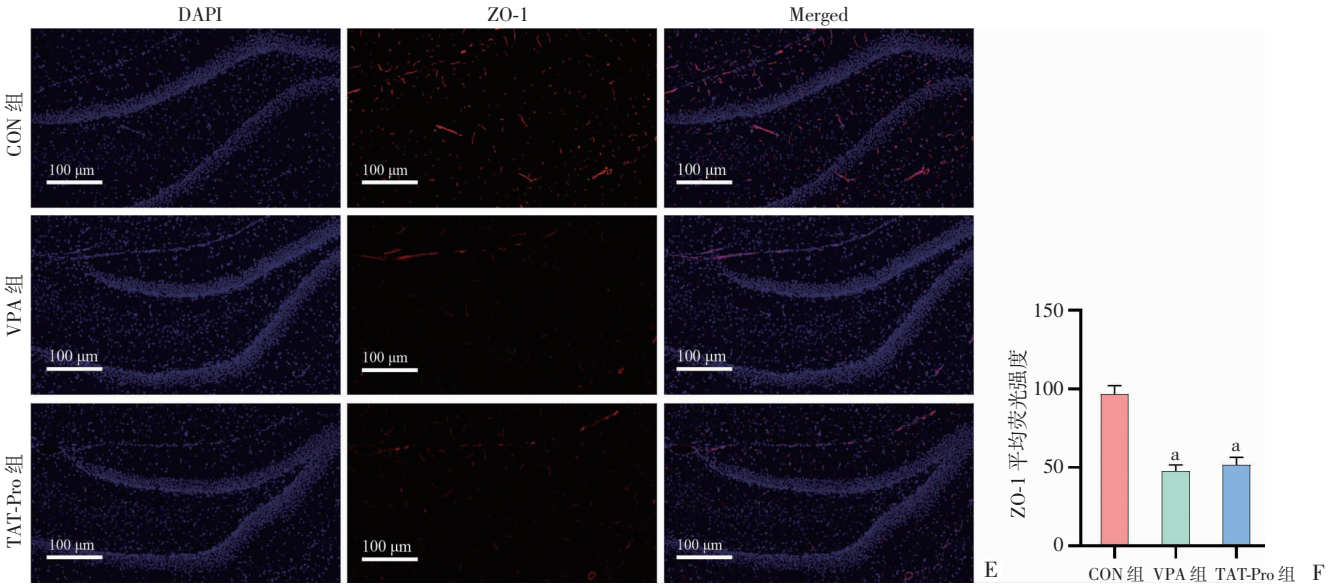


a:$P<0.05$,与 CON 组比较;b:$P<0.05$,与 VPA 组比较

A、B:3 组大鼠海马组织中 Occludin、ZO-1 电泳结果;C:3 组大鼠海马组织中 Occludin 定量分析($n=4$);D:3 组大鼠海马组织中 ZO-1 定量分析($n=4$)

图 5　3 组子代大鼠海马组织中 Occludin、ZO-1 的蛋白表达水平($\bar{x}\pm s$)

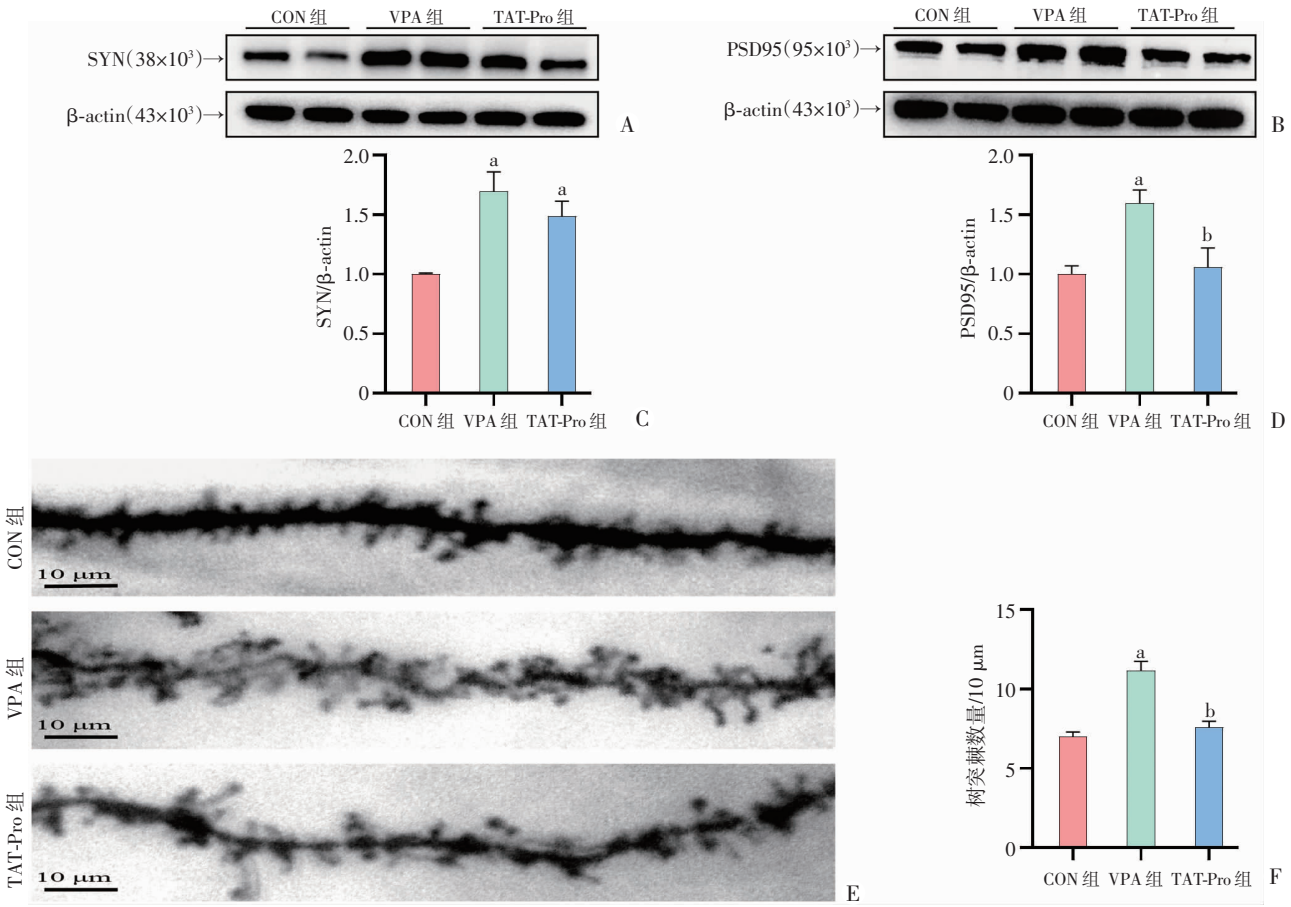
(图 5E、F 续下页)



a:$P<0.05$,与 CON 组比较

E、F:免疫荧光检测 ZO-1 蛋白表达变化及荧光量化分析($n=5$)

续图 5 3 组子代大鼠海马组织中 Occludin、ZO-1 的蛋白表达水平($\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,与 CON 组比较;b:$P<0.05$,与 VPA 组比较

A、B:3 组子代大鼠海马组织中 SYN、PSD95 电泳结果;C:3 组子代大鼠海马组织 SYN 定量分析($n=4$);D:3 组大鼠海马组织 PSD95 定量分析($n=4$);E、F:3 组大鼠海马组织高尔基染色树突棘及量化分析($n=5$)

图 6 3 组子代大鼠海马组织突触结构发育情况($\bar{x}\pm s$)

3 讨论

3.1 ADAM10 在 ASD 发病机制中的作用

ASD 的发病机制非常复杂且具有高度异质性,涉及多种因素,被认为是早期大脑发育和神经重组改变的结果,并受遗传与环境交互作用的影响[25-27],尚缺乏有效的 ASD 病因治疗手段。ADAM10 是 ADAM 跨膜蛋白家族中的一员,在大脑中高水平表达,可以切割 100 多种不同的底物,包括 Notch 家族成员、APP、VE-cad、IL-6 细胞因子受体等[15, 28]。目前,ADAM10 异常表达对多个神经退行性疾病的影响已在 AD[19-20]、HD[18]等疾病模型中相继得到证实。近期研究发现,ADAM10 的异常表达可能是 ASD 发病的重要原因[24]。

孕期 VPA 暴露诱导的子代 ASD 大鼠模型能更好地代表源自环境/表观遗传的特发性 ASD 病例,已被广泛用于 ASD 基础研究,包括靶向药物治疗研究[11, 29]。大量研究表明,孕期 VPA 暴露可以导致子代大鼠出现 ASD 样行为及认知功能障碍[25, 30]。本研究发现,使用 ADAM10 抑制剂 TAT-Pro-ADAM10(709-729)后,不仅可以显著改善孕期 VPA 暴露所引起的 ASD 样行为,也显著改善了子代大鼠的学习记忆功能损害。

3.2 ADAM10 可能通过影响 BBB 功能调节 ASD 病理过程

目前认为,BBB 功能受损为 ASD 患者大脑重要特征之一[14, 29, 31]。其中,BBB 作为神经系统的重要保护屏障,在维持大脑内部环境稳定和神经元正常功能方面起着至关重要的作用[14, 32]。关于 ADAM10 对 BBB 通透性影响的研究甚少。VE-Cad 是内皮粘附连接的主要粘附分子,它在控制内皮通透性、血管完整性和血管生成方面起着至关重要的作用[17]。SCHULZ 等[17]证明 ADAM10 可以通过特异性切割内皮细胞中的 VE-Cad,增加血管内皮通透性,进而影响 BBB 功能。于是推测 ADAM10 过表达可能通过对 BBB 中的连接蛋白 VE-Cad 过度切割,使 BBB 的通透性增加,进而影响 ASD 的发病。本研究结果表明,与 CON 组相比,VPA 组的 ADAM10 表达增加,且代表 BBB 功能的 VE-Cad、Occludin、ZO-1 表达均降低,提示 VPA 组大鼠的 BBB 受损,这与 MEHRA 等[29]的研究是一致的。抑制 ADAM10 的过表达可以减少 VE-Cad 的切割,导致其蛋白表达量增加,同时可以影响 Occlduin 的蛋白表达,改善孕期 VPA 暴露引起的 BBB 功能障碍。提示 ADAM10 可能通过影响 BBB 的功能来调节 ASD 病理过程。

3.3 ADAM10 在突触发育异常中的作用及其与 ASD 的关联

突触发育障碍被认为是 ASD 患者大脑的另一重要特征[1, 15]。突触结构发育异常是影响突触功能的关键因素。大量研究表明,ADAM10 通过切割 APP、CX3CL1 等蛋白影响突触结构发育[15, 28]。目前认为,树突棘是一种微小的膜性生长物,是兴奋性突触传递的主要部位。在中枢神经系统中,树突棘影响突触连接,对神经元回路的形成至关重要[33]。而在 ASD 患者中,树突棘形成异常已有报道[34-35]。本研究表明,孕期 VPA 暴露会使仔鼠海马组织中树突棘密度增加,并以未成熟树突棘为主;且突触蛋白 PSD95 及 SYN 蛋白表达均显著增多,提示孕期 VPA 暴露可以诱导仔鼠的突触结构发育异常,进而影响突触功能。进一步研究发现,孕期 VPA 暴露诱导的子代 ASD 大鼠 ADAM10 异常增高可致突触蛋白表达异常;抑制 ADAM10 过表达,SYN-1 和 PSD-95 蛋白水平显著降低,树突棘密度降至正常水平。提示 ADAM10 过表达可能是导致 ASD 突触发育异常的关键因素。

3.4 局限性及未来研究方向

本研究还存在一些局限性,如动物模型研究不能完全替代临床研究,且本实验尚未揭示 ADAM10 影响 Occludin 及突触蛋白表达的机制,需要通过临床样本研究及更深入的机制研究来进一步验证和解释本研究的假设。

综上所述,本研究为深入了解 ASD 的神经生物学基础提供了新的视角,揭示了 ADAM10 抑制剂在修复 ASD 相关神经结构和功能异常以及改善 ASD 样行为方面的潜在作用,并为 ASD 患者提供了新的参考治疗靶点,为开发 ASD 的新型治疗药物提供了重要线索。未来研究应进一步探讨 ADAM10 抑制剂的治疗剂量和治疗机制,为进一步的药物研发提供更多的数据支持。

参考文献:

[1] LORD C, ELSABBAGH M, BAIRD G, *et al*. Autism spectrum disorder[J]. Lancet, 2018, 392(10146): 508-520. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31129-2.

[2] GBD 2019 Mental Disorders Collaborators. Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet Psychiatry, 2022, 9(2): 137-150. DOI: 10.1016/S2215-0366(21)00395-3.

[3] MAENNER M J, WARREN Z, WILLIAMS A R, *et al*. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2020 [J]. MMWR Surveill Summ, 2023, 72(2): 1-14. DOI: 10.15585/mmwr.ss7202a1.

[4] LORD C, CHARMAN T, HAVDAHL A, *et al*. The Lancet Commission on the future of care and clinical research in autism[J]. Lancet, 2022, 399(10321): 271-334. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01541-5.

[5] 戴旭芳, 秦利燕, 连继勤. 白藜芦醇对孤独症大鼠病症行为的改善作用[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(13): 1360-1365. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201703153.
DAI X F, QIN L Y, LIAN J Q. Resveratrol improves autistic behaviors in rat model[J]. J Third Mil Med Univ, 2017, 39(13): 1360-1365. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201703153.

[6] LI X L, ZHOU P, LI Q, *et al*. Regressive autism spectrum disorder: high levels of total secreted amyloid precursor protein and secreted amyloid precursor protein-α in plasma [J]. Front Psychiatry, 2022, 13: 809543. DOI: 10.3389/fpsyt.2022.809543.

[7] NAU H, HAUCK R S, EHLERS K. Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms[J]. Pharmacol Toxicol, 1991, 69(5): 310-321. DOI: 10.1111/j.1600-0773.1991.tb01303.x.

[8] RASALAM A D, HAILEY H, WILLIAMS J H, *et al*. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder[J]. Dev Med Child Neurol, 2005, 47(8): 551-555. DOI: 10.1017/s0012162205001076.

[9] KOREN G, NAVA-OCAMPO A A, MORETTI M E, *et al*. Major malformations with valproic acid [J]. Can Fam Physician, 2006, 52(4): 441-442, 444, 447.

[10] SMITH V, BROWN N. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism[J]. Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2014, 99(5): 198. DOI: 10.1136/archdischild-2013-305636.

[11] NICOLINI C, FAHNESTOCK M. The valproic acid-induced rodent model of autism[J]. Exp Neurol, 2018, 299: 217-227. DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.04.017.

[12] SHARON G, SAMPSON T R, GESCHWIND D H, *et al*. The central nervous system and the gut microbiome [J]. Cell, 2016, 167(4): 915-932. DOI: 10.1016/j.cell.2016.10.027.

[13] MARTIN M, VERMEIREN S, BOSTAILLE N, *et al*. Engineered Wnt ligands enable blood-brain barrier repair in neurological disorders [J]. Science, 2022, 375(6582): eabm4459. DOI: 10.1126/science.abm4459.

[14] FIORENTINO M, SAPONE A, SENGER S, *et al*. Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders[J]. Mol Autism, 2016, 7: 49. DOI: 10.1186/s13229-016-0110-z.

[15] ZHENG Y P, VERHOEFF T A, PEREZ PARDO P, *et al*. The gut-brain axis in autism spectrum disorder: a focus on the metalloproteases ADAM10 and ADAM17[J]. Int J Mol Sci, 2020, 22(1): 118. DOI: 10.3390/ijms22010118.

[16] 柴伟娜, 程崇杰, 蒋理, 等. 膜粘连蛋白Ⅱ通过保护血脑屏障促进小鼠颅脑创伤后早期神经功能的恢复[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(18): 1808-1815. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201703101.
CHAI W N, CHENG C J, JIANG L, *et al*. Recombinant annexin A2 improves early neurological function through blood-brain barrier protection in mice after controlled cortical impact[J]. J Third Mil Med Univ, 2017, 39(18): 1808-1815. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201703101.

[17] SCHULZ B, PRUESSMEYER J, MARETZKY T, *et al*. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin [J]. Circ Res, 2008, 102(10): 1192-1201. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.169805.

[18] VEZZOLI E, CARON I, TALPO F, *et al*. Inhibiting pathologically active ADAM10 rescues synaptic and cognitive decline in Huntington's disease[J]. J Clin Invest, 2019, 129(6): 2390-2403. DOI: 10.1172/JCI120616.

[19] NAKAMURA M, LI Y H, CHOI B R, *et al*. GDE2-RECK controls ADAM10 α-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein[J]. Sci Transl Med, 2021, 13(585): eabe6178. DOI: 10.1126/scitranslmed.abe6178.

[20] ZENG J Y, CHEN L, WANG Z, *et al*. Marginal vitamin A deficiency facilitates Alzheimer's pathogenesis [J]. Acta Neuropathol, 2017, 133(6): 967-982. DOI: 10.1007/s00401-017-1669-y.

[21] SAFTIG P, LICHTENTHALER S F. The alpha secretase ADAM10: a metalloprotease with multiple functions in the brain[J]. Prog Neurobiol, 2015, 135: 1-20. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2015.10.003.

[22] PROX J, BERNREUTHER C, ALTMEPPEN H, *et al*. Postnatal disruption of the disintegrin/metalloproteinase ADAM10 in brain causes epileptic seizures, learning deficits, altered spine morphology, and defective synaptic functions[J]. J Neurosci, 2013, 33(32): 12915-12928, 12928a. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5910-12.2013.

[23] PASCIUTO E, AHMED T, WAHLE T, *et al*. Dysregulated ADAM10-mediated processing of APP during a critical time window leads to synaptic deficits in fragile X syndrome[J].

Neuron, 2015, 87(2): 382-398. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.06.032.

[24] ZHANG Q, XING M G, BAO Z K, *et al*. Contactin-associated protein-like 2 (CNTNAP2) mutations impair the essential α-secretase cleavages, leading to autism-like phenotypes[J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 51. DOI: 10.1038/s41392-024-01768-6.

[25] LUO L J, LI T Y, WU Q H, *et al*. Retinoic acid administration normalizes aberrant microglial activation via regulating TREM2 transcription in the PFC of valproic acid induced autism rat[J]. Neurosci Lett, 2023, 803: 137193. DOI: 10.1016/j.neulet.2023.137193.

[26] EPIS R, MARCELLO E, GARDONI F, *et al*. Blocking ADAM10 synaptic trafficking generates a model of sporadic Alzheimer's disease[J]. Brain, 2010, 133(11): 3323-3335. DOI: 10.1093/brain/awq217.

[27] BAUMAN M L, KEMPER T L. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions[J]. Int J Dev Neurosci, 2005, 23(2/3): 183-187. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2004.09.006.

[28] APPEL D, HUMMEL R, WEIDEMEIER M, *et al*. Pharmacologic inhibition of ADAM10 attenuates brain tissue loss, axonal injury and pro-inflammatory gene expression following traumatic brain injury in mice[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 661462. DOI: 10.3389/fcell.2021.661462.

[29] MEHRA S, AHSAN A U, SHARMA M, *et al*. Gestational fisetin exerts neuroprotection by regulating mitochondria-directed canonical Wnt signaling, BBB integrity, and apoptosis in prenatal VPA-induced rodent model of autism[J]. Mol Neurobiol, 2024, 61(7): 4001-4020. DOI: 10.1007/s12035-023-03826-6.

[30] ZOHNY S M, HABIB M Z, MOHAMAD M I, *et al*. Memantine/aripiprazole combination alleviates cognitive dysfunction in valproic acid rat model of autism: hippocampal CREB/BDNF signaling and glutamate homeostasis[J]. Neurotherapeutics, 2023, 20(2): 464-483. DOI: 10.1007/s13311-023-01360-w.

[31] ZHANG Y H, YUAN X S, WANG Z P, *et al*. The canonical Wnt signaling pathway in autism[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2014, 13(5): 765-770. DOI: 10.2174/1871527312666131223114149.

[32] LIEBNER S, DIJKHUIZEN R M, REISS Y, *et al*. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease[J]. Acta Neuropathol, 2018, 135(3): 311-336. DOI: 10.1007/s00401-018-1815-1.

[33] MA S R, ZUO Y. Synaptic modifications in learning and memory—A dendritic spine story[J]. Semin Cell Dev Biol, 2022, 125: 84-90. DOI: 10.1016/j.semcdb.2021.05.015.

[34] MARTÍNEZ-CERDEÑO V. Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models[J]. Dev Neurobiol, 2017, 77(4): 393-404. DOI: 10.1002/dneu.22417.

[35] LO L H Y, LAI K O. Dysregulation of protein synthesis and dendritic spine morphogenesis in ASD: studies in human pluripotent stem cells[J]. Mol Autism, 2020, 11(1): 40. DOI: 10.1186/s13229-020-00349-y.

(收稿:2024-04-11;修回:2024-05-20)

(编辑 李 玥)