论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201409094

雷帕霉素对自闭症大鼠病症行为的改善作用

秦利燕[1,2],戴旭芳[1,3] (400047 重庆,重庆师范大学教育科学学院:重庆市特殊儿童心理诊断与教育技术重点实验室[1],特殊教育系[3];400038 重庆,第三军医大学西南医院输血科[2])

[摘要] **目的** 探讨雷帕霉素(rapamycin)对自闭症大鼠病症行为的改善作用及相关机制。**方法** 采用丙戊酸钠(sodium valproate,VPA)一次性腹腔注射孕12.5 d大鼠制备自闭症幼大鼠模型,雷帕霉素处理组于VPA注射后每天给大鼠口服4 mg/kg雷帕霉素直至断奶。将出生幼鼠分为4组:对照组,VPA处理组,雷帕霉素处理组与VPA联合雷帕霉素处理组。在幼鼠出生后35 d进行社会交往行为检测、神经行为学检测,并分离提取脑组织蛋白通过Western blot分析mTOR磷酸化水平及自噬标志蛋白LC3表达情况;电镜分析前额叶组织中自噬小体形成情况。**结果** 成功制备自闭症大鼠模型。与对照相比,VPA处理组社会交往能力下降、在中央区活动时间增加、站立次数减少($P<0.05$),符合自闭症行为特征;雷帕霉素单独处理组无明显行为学变化;但雷帕霉素联合处理能明显改善VPA处理导致的自闭症行为症状($P<0.05$)。Western blot结果显示,与对照组相比,VPA处理可增强大鼠前额叶、海马及小脑组织中mTOR磷酸化水平,并降低LC3-Ⅱ表达水平;而雷帕霉素联合处理则能抑制上述脑组织中mTOR的磷酸化并增强LC3-Ⅱ表达水平。电镜分析结果表明,VPA处理可减少幼鼠前额叶组织中的自噬小体,而雷帕霉素联合处理则能明显增加自噬小体的形成。**结论** 雷帕霉素可改善自闭症模型大鼠的病症行为,机制可能与抑制mTOR活性并增强细胞自噬相关。

[关键词] 雷帕霉素;自闭症;自噬

[中图法分类号] R749.94; R969; R979.5 [文献标志码] A

Role of rapamycin in improvement of autistic rats

Qin Liyan[1,2], Dai Xufang[1,3] ([1]Chongqing Key Laboratory of Psychological Diagnosis and Educational Technology for Children with Special Needs, [3]Faculty of Education for Children with Special Needs, College of Education Science, Chongqing Normal University, Chongqing, 400047; [2]Department of Blood Transfusion, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of rapamycin on autistic rats and investigate the associated mechanisms. **Methods** Autistic rats were inflicted by intraperitoneal injection of sodium valproate (VPA) after pregnancy for 12.5 d. After VPA injection, pregnant rats were treated with rapamycin *via* oral administration at 4 mg/kg per day until weaning (in 23 d after born). There were 4 groups of newborn rats, that is, control, VPA treatment, rapamycin treatment, VPA + rapamycin treatment groups. The social interaction and neuroethology of the young rats were evaluated in 35 d after born. The levels of phosphorylated Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR) and LC3-Ⅱ in brain tissues were detected by Western blotting. The formation of autophagosomes was observed by electron microscopy. **Results** The autistic rat mode was established successfully. Compared to control rats, the rats treated with VPA showed lower social interaction, longer moving time in central area and reduced standing time ($P<0.05$), which were in accordance with the typical behaviors of autistic rats. Treatment with rapamycin alone resulted in no obvious changes in the social

[基金项目] 国家自然科学基金(31201068)

[通信作者] 戴旭芳,E-mail:xufangd@aliyun.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1530.079.html(2014-12-05)

interaction and neuroethology of young rats, but rapamycin treatment attenuated the VPA-induced autistic-like behaviors ($P<0.05$). Western blotting indicated that VPA treatment enhanced the levels of p-mTOR in the brain tissues of prefrontal lobe, seahorse and cerebellum, but down-regulated the expression of LC3-Ⅱ. However, rapamycin attenuated VPA-triggered up-regulation of p-mTOR and down-regulation of LC3-Ⅱ. Electron microscopy autophagosome decreasement in the prefrontal lobe. **Conclusion** Rapamycin may improve the behaviors of autistic rats through mTOR suppression mediated autophagy enhancement.

[**Key words**] rapamycin; autism; autophagy

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31201068). Corresponding author: Dai Xufang, E-mail:xufangd@aliyun.com

自闭症(autism)又称儿童孤独症,是以婴幼儿期就表现出交往障碍、语言障碍和(或)重复刻板行为为主要临床特征的一种脑发育障碍综合征,其发病率为2/1 000~6/1 000[1]。目前我国约有60多万自闭症儿童,男孩多于女孩,并且发病率还呈上升趋势[2]。自闭症的发病原因复杂,涉及遗传、免疫、环境、饮食、教育等多个方面,至今尚未完全阐明[3]。

研究表明,Tsc1基因敲除小鼠具有自闭症类似症状,但详细的分子机制尚不明确[4]。由于Tsc1基因是Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR)信号通路的重要中间分子[5],该基因缺失后会导致mTOR活性升高,进而引起细胞内多种代谢途径的改变,尤其是细胞自噬被抑制。因此本课题组设想mTOR活性升高导致的细胞自噬水平下降可能是引起自闭症发病的重要原因。为证明这一假说,本研究以自闭症大鼠为模型,观察脑组织中细胞自噬水平变化情况,并探讨mTOR抑制剂雷帕霉素(rapamycin)对自闭症大鼠病症行为的改善作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所用Wistar大鼠由第三军医大学实验动物中心提供。成年清洁级Wistar雄性大鼠(体质量300~350 g) 12只,雌性大鼠(体质量200~250 g) 12只,饲养于第三军医大学实验动物中心。

1.2 药品及试剂

丙戊酸钠(sodium valproate,VPA)、LC3抗体购自Sigma公司,磷酸化mTOR抗体、GAPDH抗体购自Cell Signaling公司,BCA蛋白浓度测定试剂盒和细胞裂解液购自江苏碧云天生物技术公司,PVDF膜购自美国Bio-Rad公司,蛋白Marker购自北京中衫公司。

1.3 动物模型制备与分组

参照Schneider等[6]的方法,将雌、雄大鼠合笼过夜,次日早晨对雌鼠进行阴道涂片检查,发现阴栓者记为妊娠第1天(E1),并将孕母鼠单独饲养。将孕鼠分为4组,分别为对照组、VPA处理组(即模型组)、雷帕霉素处理组及VPA联合雷帕霉素处理组,每组3只。VPA处理组与VPA联合雷帕霉素处理组在E12.5 d时给孕鼠腹腔注射VPA,剂量为600 mg/kg;同时给对照组与雷帕霉素处理组孕鼠腹腔注射等量的生理盐水;雷帕霉素处理组及VPA联合雷帕霉素处理组在E12.5 d后每天给孕鼠口服雷帕霉素(4 mg/kg)直至仔鼠断奶,其他小组口服等剂量溶剂(麻油)。VPA处理组孕鼠产下的仔鼠即为孤独症模型组,而对照组孕鼠产下的仔鼠为正常对照组。幼鼠出生后第1天记为P1。各组幼鼠统一于出生后23 d(P23)断奶。

1.4 社会交往行为检测

在幼鼠出生后35 d,分别从每组各选择6只进行检测。检测鼠均为雄性,出生时间相差不超过1 d,体质量差别小于15 g,分笼饲养。检测在大小为60 cm×60 cm×60 cm的透明三室箱内进行。实验前1 d,所有被检测鼠放入检测室适应环境。实验时将1只被测鼠放入中间小室先适应10 min。然后在左侧小室放置空铁丝笼子,右侧小室放入陌生幼鼠并用同样的铁丝笼子罩住。打开中间小室进入左、右小室的通道,摄像记录10 min内被检测鼠的行为,通过Any-Maze软件系统分别统计被检测鼠自梳理(非社交行为)、嗅铁丝笼子和陌生鼠(社交行为)时间。

1.5 神经行为学检测

同样在幼鼠出生后35 d检测,分别从模型组与对照组各选择5只进行检测,被检测大鼠的选择标准同1.4。检测在大小为25 cm×25 cm×38 cm的封闭箱内进行,箱子中央12 cm×12 cm区域为中央区。实验前1 d,所有被检测鼠放入检测室适应环境。检测时将被检测鼠放入检测箱中央,摄像记录5 min内被检测鼠的行为,通过Any-Maze软件系统分别统计被检测鼠在中央区活动时间及直立次数。

1.6 Western blot检测

将出生后35 d的幼鼠断颈处死,立即分离前额叶皮层、海马和小脑组织。将各组织分别按100 mg/mL比例加入组织裂解液进行匀浆。冰上静置30 min后于4 ℃ 12 000 r/min离心30 min。取上清,测定蛋白

浓度后置 -80 ℃冰箱备用。将含 50 μg 总蛋白的组织样品经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移到 PVDF 膜上。经 5% 脱脂奶粉封闭后加入一抗 4 ℃孵育过夜,PBST 洗涤后再加入二抗,室温孵育 1 h。再经 PBST 漂洗后加入化学发光液进行曝光显影。

1.7 电镜分析

将出生后 35 d 的幼鼠断颈处死,立即分离前额叶皮层、海马和小脑组织。将各组织分别进行固定、块染、脱水、浸透、包埋后切片,置于铜网上进行透射电镜观察。全部样品处理过程及观察、拍照均在第三军医大学中心实验室完成。

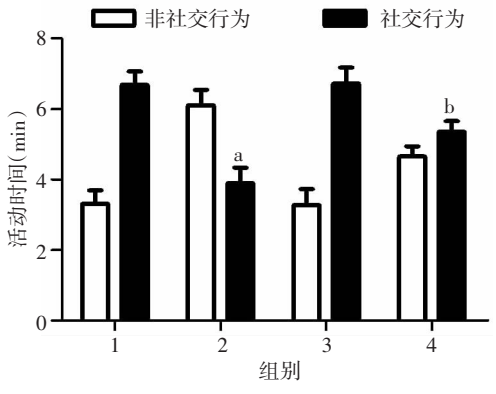
1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 雷帕霉素处理显著改善自闭症大鼠的社会交往能力

社会交往实验分析发现,与对照组相比,VPA 处理组幼鼠社会交往能力显著下降($P<0.05$),体现为自我梳理时间增加,不愿意与陌生幼鼠交往,不愿接触新事物,符合自闭症儿童的行为特点。雷帕霉素单独处理组幼鼠与对照组相比社会交往能力无显著差异;而雷帕霉素联合处理则可以改善 VPA 处理导致的社会交往能力下降($P<0.05$,图 1)。

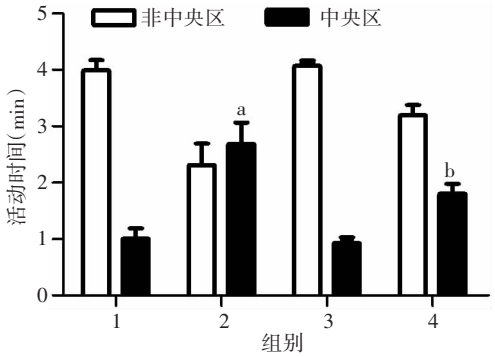


1:对照组;2:VPA 组;3:Rap 组;4:VPA + Rap 组
a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 VPA 组比较

图 1 各组大鼠的社会交往能力分析

2.2 雷帕霉素处理明显改善自闭症大鼠的神经病征行为

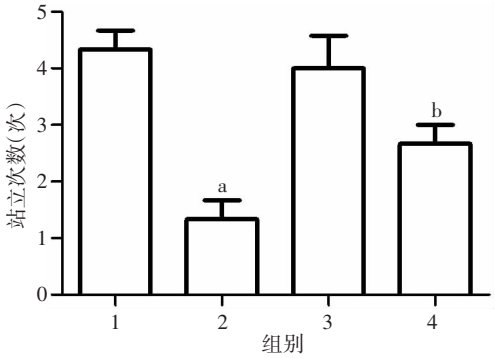
2.2.1 雷帕霉素处理减少自闭症幼鼠在中央区活动时间 如图 2 所示,对照组正常幼鼠在中央区活动时间较短,而 VPA 处理组幼鼠在中央区活动时间明显增加,与对照组存在明显差异($P<0.05$),符合自闭症的行为特点。雷帕霉素单独处理组幼鼠与对照组相比活动方式无显著差异;而雷帕霉素联合处理则可以减少自闭症幼鼠在中央区活动时间($P<0.05$),明显改善自闭症幼鼠的活动方式。



1:对照组;2:VPA 组;3:Rap 组;4:VPA + Rap 组
a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 VPA 组比较

图 2 各组大鼠在中央区活动时间分析

2.2.2 雷帕霉素处理增加自闭症大鼠站立次数 如图 3 所示,正常对照组幼鼠的站立次数显著高于 VPA 处理组的自闭症模型鼠($P<0.05$),而雷帕霉素联合处理则可以明显增加自闭症幼鼠的站立次数($P<0.05$)。

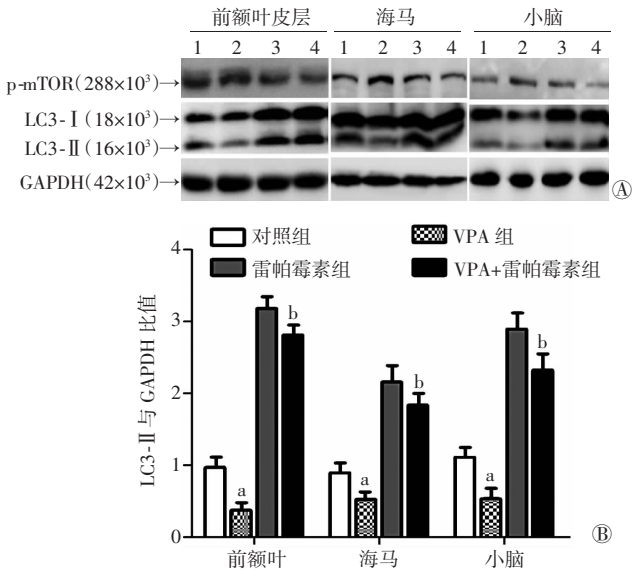


1:对照组;2:VPA 组;3:Rap 组;4:VPA + Rap 组
a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 VPA 组比较

图 3 各组大鼠站立次数分析

2.3 雷帕霉素处理增强自闭症大鼠前额叶皮层、海马和小脑组织的自噬水平

分别分离各组幼鼠的前额叶皮层、海马和小脑组织进行 Western blot 分析。如图 4 所示,与正常对照组相比,VPA 处理组自闭症幼鼠的前额叶皮层、海马和小脑组织中的 mTOR 蛋白磷酸化明显增强,而雷帕霉素可以特异性抑制 mTOR 蛋白磷酸化。对自噬标志性蛋白 LC3-Ⅱ的水平进行分析发现,VPA 处理组 LC3-Ⅱ水平明显降低($P<0.05$),表明在自闭症幼鼠的脑组织中自噬被抑制。使用雷帕霉素处理后,可以明显增加自闭症幼鼠前额叶皮层、海马和小脑组织中 LC3-Ⅱ的水平($P<0.05$),促进自噬发生。对 LC3-Ⅱ的水平进行定量分析也进一步支持了这一结果。



A:Western blot 分析各组大鼠前额叶皮层、海马和小脑组织中 p-mTOR 和 LC3-Ⅱ表达水平　1:对照组;2:VPA 组;3:Rap 组;4:VPA + Rap 组;B:半定量分析结果　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 VPA 组比较

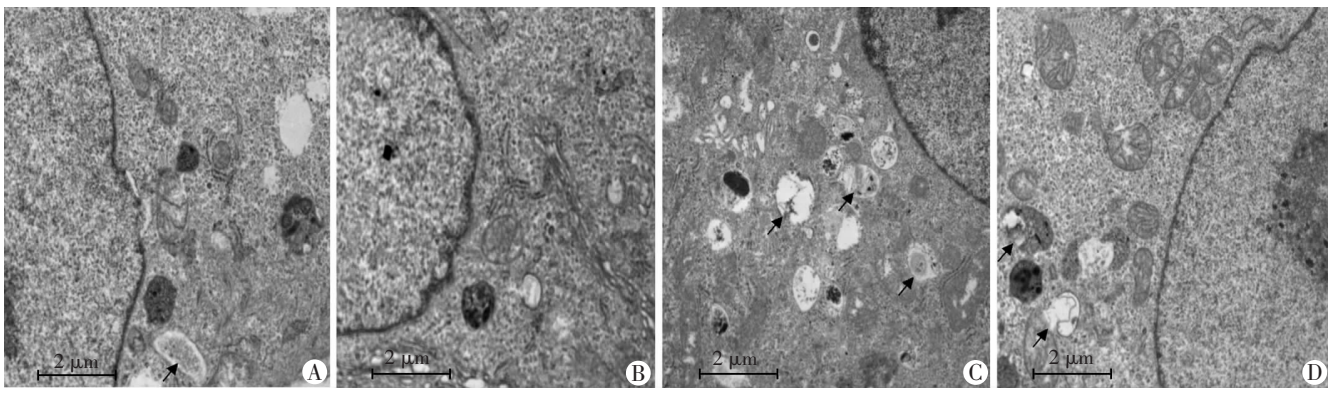
图 4　雷帕霉素处理对自闭症大鼠脑组织中自噬相关蛋白表达水平的影响

为进一步证实自噬在雷帕霉素改善自闭症幼鼠病症行为中的作用,对幼鼠前额叶组织中的自噬小体进行电镜观察,结果见图 5。从图 5 可看出,正常幼鼠前额叶组织中存在少量自噬小体(箭头所示),VPA 处理组则观察不到自噬小体的存在,而雷帕霉素处理组及 VPA 联合雷帕霉素处理均存在大量自噬小体。这一结果说明雷帕霉素处理确实可以增加自闭症幼鼠脑组织中的自噬水平。

3　讨论

在针对自闭症的研究过程中,学者们建立了多种自闭症动物模型,如 Tsc1 基因敲除鼠模型、病毒感染模型、VPA 药物处理模型等[7]。在这些模型中,VPA 一次性注射药物模型是目前公认的一种较理想的自闭症动物模型。该模型可以在行为上模拟自闭症的刻板、重复等行为特征,且脑组织中的神经形态变化也与自闭症尸检报告也相似。社会交往实验是测验模型动物社会交往能力的经典实验,实验中的陌生鼠与空笼子分别代表了新伙伴与新事物,通过分析规定时间内被检测鼠自我梳理、与陌生鼠及空笼子的接触时间,从而判断其社会交往能力[8]。在本研究中,经 VPA 处理的模型鼠社会交往能力明显减弱,与自闭症症状相符。神经行为学检测实验中,在中央区所呆时间长短反映了被测动物的空间认知能力,正常鼠对明亮、开放的新环境具有先天的躲避倾向,喜欢避开中央区、在四周角落中探寻,而对新环境认知能力差的自闭症鼠则停留在中央区的时间就会延长;站立次数反映了被测鼠在新环境中的探索能力,正常鼠站立次数多、探索能力强,而自闭症鼠则站立次数减少、探索能力减弱[8]。本研究中 VPA 处理的自闭症模型鼠也具有相似的行为特征。VPA 诱导大鼠发生自闭症的药理机制目前尚不明确。本实验结果表明,VPA 可以增强大鼠前额叶、海马与小脑组织中的 mTOR 磷酸化,从而增强 mTOR 活性,并抑制自噬的标志性蛋白 LC3-Ⅱ的生成以及自噬小体的形成,这与 TSC 基因敲除自闭症模型鼠中 mTOR 的活性增强具有相似性[4],表明这可能是 VPA 诱导自闭症发生的重要机制。

雷帕霉素是一种新型大环内酯类免疫抑制剂。研究表明,在帕金森、亨廷顿病等神经退行性疾病动物模型中,雷帕霉素对神经元细胞均具有保护作用[9]。在外伤性脑组织损伤动物模型中雷帕霉素处理也可以减少神经细胞的损害[10]。但目前尚未见雷帕霉素处理改善自闭症症状的相关报道。雷帕霉素在细胞内的特



A:对照组;B:VPA 处理组;C:Rap 组;D:VPA + Rap 组;箭头示自噬小体

图 5　电镜观察各组幼鼠前额叶组织中自噬小体分布情况

异性分子靶点是 mTOR，雷帕霉素可以特异性抑制 mTOR 的磷酸化并抑制其活性[11]。本实验结果也表明，雷帕霉素处理后大鼠前额叶皮质、海马及小脑组织中 mTOR 磷酸化水平明显降低，mTOR 活性明显下降。由于 mTOR 是调节细胞内代谢的关键分子，尤其与细胞自噬的发生密切相关，因此，雷帕霉素处理后神经组织中自噬水平的增加可能是其改善自闭症症状的重要机理。

自噬是细胞中降解长寿命蛋白与细胞器并回收利用相关降解产物的重要分解代谢机制，在细胞的生长、发育与疾病的发生中发挥重要作用[12]。自噬水平的降低是多种神经退行性疾病如帕金森病、阿尔茨海默病、亨廷顿病等发病的重要原因[13]。尽管自噬与自闭症的发病关系目前尚少见报道，但在多种自闭症模型动物中均发现了与自噬发生相关的信号通路的改变。如自闭症模型动物脑组织中 Wnt 信号通路的增强[14]、TSC 基因敲除自闭症模型鼠脑组织中 mTOR 信号通路的激活等[4]，均可降低细胞中的自噬水平。由于 mTOR 通路是自噬发生的关键性上游通路，抑制该通路后可显著增强细胞内的自噬水平，因此本实验选用 mTOR 的特异性抑制剂雷帕霉素来抑制该通路并进而增强神经细胞中的自噬水平。实验结果也证实这一策略具有可行性，从而为自闭症的治疗提供了一定的理论与实验依据。

参考文献：

[1] Napoli E, Duenas N, Giulivi C. Potential therapeutic use of the ketogenic diet in autism spectrum disorders[J]. Front Pediatr, 2014, 2: 69.

[2] 陈文雄. 孤独症70年：从 Kanner 到 DSM-V [J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(11): 1001－1004.

[3] Matson J L, Jang J. Treating aggression in persons with autism spectrum disorders: A review [J]. Res Dev Disabil, 2014, 35(12): 3386－3391.

[4] Tsai P T, Hull C, Chu Y, *et al*. Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice [J]. Nature, 2012, 488(7413): 647－651.

[5] Zhu L, Yang T, Li L, *et al*. TSC1 controls macrophage polarization to prevent inflammatory disease [J]. Nat Commun, 2014, 5: 4696.

[6] Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism [J]. Neuropsychopharmacology, 2005, 30(1): 80－89.

[7] Banerjee S, Riordan M, Bhat M A. Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models [J]. Front Cell Neurosci, 2014, 8: 58.

[8] Shah C R, Forsberg C G, Kang J Q, *et al*. Letting a typical mouse judge whether mouse social interactions are atypical [J]. Autism Res, 2013, 6(3): 212－220.

[9] Takei N, Nawa H. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development [J]. Front Mol Neurosci, 2014, 7: 28.

[10] Liu F, Zhang H, Zhang K, *et al*. Rapamycin promotes Schwann cell migration and nerve growth factor secretion [J]. Neural Regen Res, 2014, 9(6): 602－609.

[11] El-Chemaly S, Goldberg H J, Glanville A R. Should mammalian target of rapamycin inhibitors be stopped in women with lymphangioleiomyomatosis awaiting lung transplantation? [J]. Expert Rev Respir Med, 2014, 8(6): 657－660.

[12] Chen W, Sun Y, Liu K, *et al*. Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia [J]. Neural Regen Res, 2014, 9(12): 1210－1216.

[13] Kesidou E, Lagoudaki R, Touloumi O, *et al*. Autophagy and neurodegenerative disorders [J]. Neural Regen Res, 2013, 8(24): 2275－2283.

[14] Zhang Y, Yuan X, Wang Z, *et al*. The canonical Wnt signaling pathway in autism [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2014, 13(5): 765－770.

（**收稿**：2014-09-15；**修回**：2014-10-16）

（编辑　郭建秀）