DOI:10.16016/j.1000-5404.201907206

二甲双胍治疗改善新生期 BTBR 小鼠海马神经发生缺陷

钟洪雨,王 炼,韩晓雨,许 浩,范晓棠 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)医学心理系军事认知心理学教研室

[摘要] **目的** 研究生后早期二甲双胍治疗对 BTBR $T^{+}Itpr3^{tf}/J$ (BTBR) 自闭症模型小鼠海马神经发生的影响。**方法** 利用随机数字表法将新生健康 C57BL/6J (C57)、BTBR 小鼠分为 4 组($n=5$):C57 生理盐水组、C57 药物处理组、BTBR 生理盐水组、BTBR 药物处理组。生后 7 d(postnatal day 7,P7),两药物处理组予以二甲双胍(200 mg/kg)腹腔注射,每天 1 次,共计 8 次;C57 及 BTBR 生理盐水组予以等量的生理盐水。于 P14 最后 1 次二甲双胍注射 2 h 后,收取脑标本进行免疫荧光染色,检测海马齿状回 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2'-deoxyuridine,BrdU)、Ki67、Sox2/GFAP 及 Prox1 的表达。**结果** 在 P14 时,BTBR 生理盐水组海马齿状回的 BrdU 及 Ki67 标记的增殖神经细胞数量比 C57 生理盐水组显著减少($P<0.05$),而 BTBR 药物处理组 BrdU 及 Ki67 阳性细胞均比 BTBR 生理盐水组明显增多($P<0.05$);BTBR 生理盐水组 SOX2/GFAP 标记的神经干细胞和 Prox1 标记的新生神经元数量均比 C57 生理盐水组显著减少($P<0.05$),而 BTBR 药物处理组上述两种细胞数量比 BTBR 生理盐水组明显增多($P<0.05$)。而二甲双胍早期干预并没有对 C57 小鼠海马神经发生产生显著影响,C57 生理盐水组与 C57 药物处理组 BrdU、Ki67、Sox2/GFAP 及 Prox1 的表达差异无统计学意义。**结论** 生后早期二甲双胍治疗显著改善 BTBR 小鼠海马神经发生缺陷,促进海马齿状回神经元及神经干细胞增殖。

[关键词] 二甲双胍;自闭症;神经发生;海马;小鼠
[中图法分类号] R-332; R749.94; R977.15 [文献标志码] A

Metformin treatment during neonatal period rescues hippocampal neurogenesis in the BTBR $T^{+}Itpr3^{tf}/J$ mouse model of autism

ZHONG Hongyu, WANG Lian, HAN Xiaoyu, XU Hao, FAN Xiaotang Department of Military Cognitive Psychology, Faculty of Medical Psychology, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of metformin (MET) treatment during early postnatal period on hippocampal neurogenesis of neonatal BTBR $T^{+}Itpr3^{tf}/J$ (BTBR) mouse model of autism. **Methods** Healthy C57BL/6J (C57) and BTBR male pups were randomly divided into C57 normal saline group (C57+NS), C57 MET treatment group (C57+MET), BTBR+NS, and BTBR+MET group, with 5 animals in each group. From postnatal day 7 (P7) to P14, MET (200 mg/kg) or normal saline (same volume of sterile saline solution) were intraperitoneally injected into the corresponding mice, once per day. In 2 h after the last injection on P14, all mice were sacrificed, and the brains were collected and sliced coronally. Fluorescent immunostaining was performed to detect the expression of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), Ki67, Sox2/GFAP and Prox1 in the dentate gyrus (DG). **Results** On P14, the numbers of BrdU-labeled cells and Ki67-labeled cells were significantly less in the DG of BTBR+NS group than the C57+NS group ($P<0.05$), while the numbers were obviously increased in BTBR+MET group than the C57+MET group ($P<0.05$). Although there were remarkably less Sox2 and GFAP double-positive cells (neural stem

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31871043)
[通信作者] 范晓棠,E-mail:fanxiaotang2005@163.com

cells) and Prox1-positive cells (newborn neurons) in BTBR+NS group than the C57+NS group ($P<0.05$), the 2 kinds of cells were increased obviously in BTBR+MET group than the BTBR+NS group ($P<0.05$). However, MET treatment showed no effect on the hippocampal neurons, and there were no significant differences in the numbers of BrdU-, Ki67-, Sox2/GFAP- and Prox1-labeled cells between the C57+MET and C57+NS groups. **Conclusion** MET treatment in early postnatal period significantly improves the defects of hippocampal neurogenesis, and promotes the proliferation of hippocampal DG neurons and neural stem cells in BTBR mice.

[**Key words**] metformin; autism; neurogenesis; hippocampus; mice

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31871043). Corresponding author: FAN Xiaotang, E-mail: fanxiaotang2005@163.com

自闭症谱系障碍(autism spectrum disorder,ASD)是一种异质性神经发育障碍疾病,其特征是社会交往和沟通障碍,以及重复刻板样行为[1]。虽然 ASD 的确切病因目前尚不清楚,但越来越多的证据表明自闭症相关行为异常的多因素性质,如神经发生、神经免疫过程以及兴奋-抑制性神经传递的失衡[2-4]。目前全世界约有 1%的儿童受到 ASD 的影响,并且其患病率正在不断上升。尽管 ASD 具有重要意义,但目前仍没有针对 ASD 有效的药物或行为治疗。因此,探索对于 ASD 有效的预防和治疗方法迫在眉睫。

海马神经发生有助于改善认知功能和调节情绪。有研究表明海马神经发生受损与一些精神疾病有关,如成瘾、抑郁、精神分裂症和 ASD[5-6]。通过结构和功能磁共振成像(MRI),研究者观察到 ASD 患者的大脑特异性神经元生长延迟和神经元发育受限[7]。ASD 患者尸检结果显示大脑海马神经发生、神经元迁移和成熟存在缺陷[8]。此外,在一些 ASD 模型小鼠上也观察到海马神经发生的变化,包括甲基化 cpg 结合蛋白 2(Methyl-CpG-binding protein-2,MECP2)重复综合征小鼠和肌细胞增强因子 2(myocyte enhancer factor-2,MEF2)单倍体功能不全的 ASD 模型小鼠[9]。此外,母体免疫激活的 ASD 小鼠模型也存在海马神经发生缺陷[10]。针对 ASD 相关行为的治疗手段也有效促进了海马神经发生[11]。综上所述,海马区异常的神经发生可能是 ASD 病理生理过程中的关键环节。因此,改善海马神经发生可能是一种减轻 ASD 患者自闭样行为的有效治疗方法。

二甲双胍是一种广泛用于糖尿病治疗的双胍类药物。研究表明二甲双胍能够跨越血脑屏障,通过改善海马神经发生预防糖尿病引起的大鼠记忆缺陷[12]。本课题组前期研究已证实生后早期二甲双胍治疗可有效改善 BTBR 自闭症小鼠社交缺陷和重复刻板行为[13]。此外,在阿尔茨海默症小鼠模型中,二甲双胍可治疗空间记忆损伤和海马神经元死亡,促进海马神经发生[14]。这些数据表明二甲双胍可能通过促进海马神经发生来改善 ASD 模型的行为缺陷。

BTBR $T^{+}Itpr3^{tf}$/J (BTBR)近交系小鼠是一种具有良好特性的 ASD 动物模型,通过改变 C57BL/6J(C57)小鼠 Disc1、Itpr3、T^{+} 3 个基因得到。与 ASD 的临床症状和病理特征相似,BTBR 小鼠不仅表现出缺陷的社交能力和增加的重复刻板行为,而且海马神经发生减少。在本实验中,于生后 7 d(P7)至生后 14 d(P14)每日 1 次二甲双胍腹腔注射,在 P14 观察对 BTBR 小鼠及 C57 小鼠海马齿状回细胞增殖、神经干细胞及新生神经元数量的影响,以期进一步探讨生后早期二甲双胍干预能否改善 BTBR 小鼠海马神经发生。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

二甲双胍购自美国 Sigma 公司;5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2'-deoxyuridine,BrdU)抗体购自美国 BD 公司;Ki67 抗体购自美国 Thermo 公司;Sox2 抗体购自英国 Abcam 公司;胶原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)抗体购自美国 Millipore 公司;Prox1 抗体购自美国 Covance 公司;荧光二抗购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物与分组 BTBR 小鼠购买于美国杰克逊实验室。C57 孕鼠购买于陆军军医大学实验动物中心。所有动物饲养于陆军军医大学实验动物中心标准环境中,自由充分摄取食物和水。实验所用新生雄鼠由上述小鼠繁殖产生。利用随机数字表法选择每窝最多 2 只新生雄鼠用以实验,分为 4 组($n=5$):C57 生理盐水组(SAL)、C57 药物处理组(MET)、BTBR 生理盐水组(BTBR)、BTBR 药物处理组(BTBRMET)。所有实验程序按照陆军军医大学批准的实验动物护理原则和伦理审批要求进行。

1.2.2 药物处理 两药物处理组小鼠于生后 7 d

(出生当天记为 P0)至生后 14 d 予以二甲双胍(200 mg/kg)腹腔注射,每天 1 次,共计 8 次。C57 及 BTBR 生理盐水组予以等量的生理盐水。为评估海马齿回的细胞增殖情况,于 P14 予以 BrdU 腹腔注射(50 mg/kg),并于给药后 2 h 处死。

1.2.3　标本采集　　于 P14 最后 1 次二甲双胍注射 2 h 后灌注取脑,将脑组织于 4%多聚甲醛(4% PFA)溶液中固定 48 h 后转移至 30%蔗糖+4% PFA 中充分脱水。收取 25 μm 厚度的冰冻脑组织切片,-20 ℃保存于防冻液备用。

1.2.4　免疫荧光染色　　选取合适的脑组织切片于 0.01 mol/L PBS 漂洗,后置于 0.3% Triton X-100 37 ℃处理 30 min。分别加入一抗:小鼠来源 BrdU(1∶500);兔来源 Ki67(1∶200);小鼠来源 Sox2(1∶200);兔来源 GFAP(1∶500);兔来源 Prox1(1∶200),4 ℃孵育过夜。二抗分别为抗小鼠 594、抗兔 cy3、抗兔 488 荧光二抗(1∶500),37 ℃孵育 2 h 后,DAPI 复染,自然晾干后荧光封片剂封片。每组各 5 只小鼠,每只小鼠选取相似位置的 5 张大脑切片。

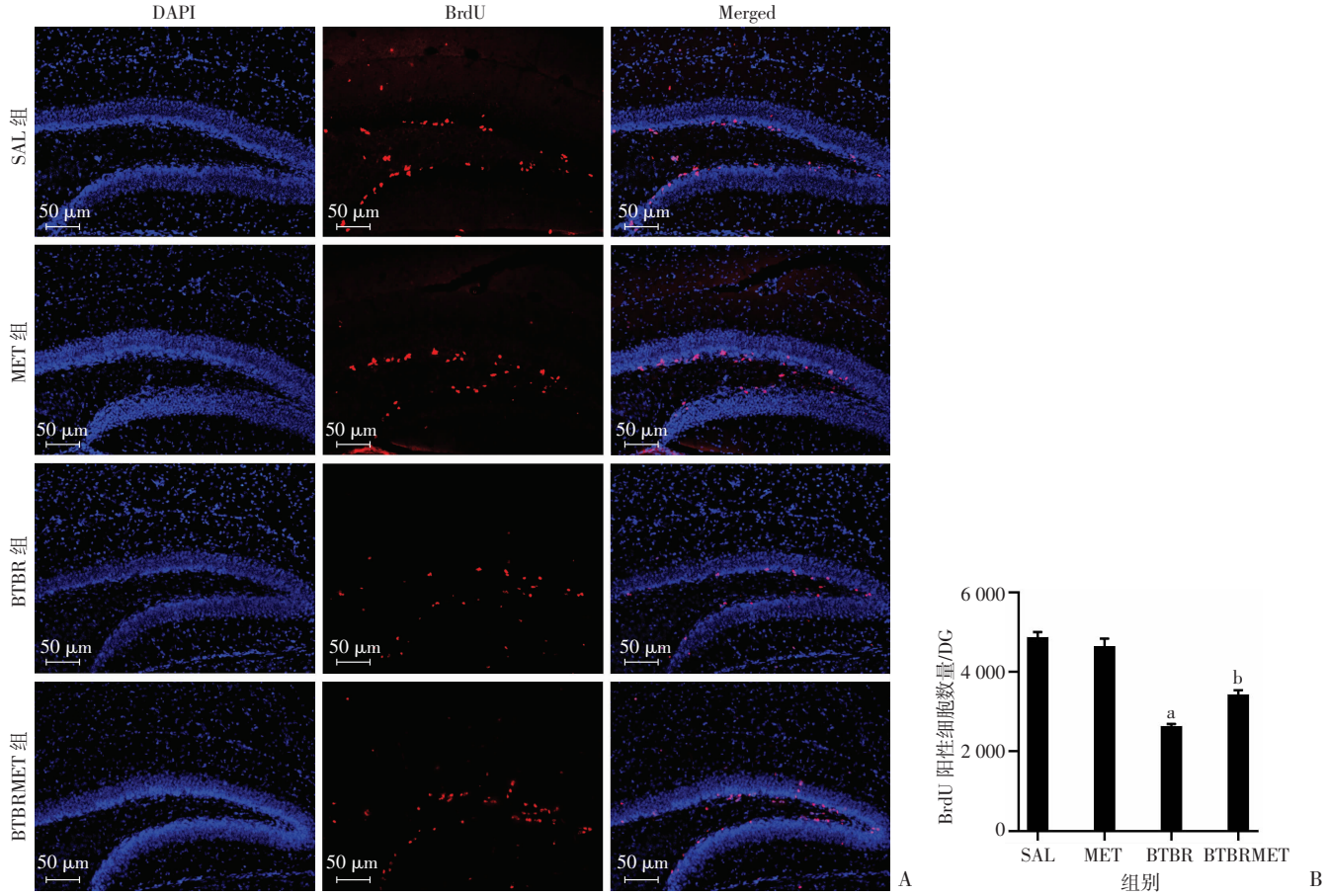
1.3　统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 24.0 统计软件,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD t 检验。检验水准:$\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　生后早期二甲双胍治疗后 BTBR 小鼠海马 BrdU 阳性细胞数量增加

BrdU 作为胸腺嘧啶衍生物,可代替其在 DNA 合成期(S 期)掺入到新合成 DNA 链中,用于标记增殖细胞。免疫组化结果显示:BrdU 阳性细胞主要分布在海马齿状回颗粒下层。与 SAL 组相比,BTBR 组 BrdU 阳性细胞数显著减少(LSD-t=9.956,P<0.05,图 1),而 MET 组 BrdU 阳性细胞数无明显变化。BTBRMET 组 BrdU 阳性细胞数比 BTBR 组明显增多(LSD-t=3.545,P<0.05,图 1)。提示二甲双胍注射后促进 BTBR 海马齿状回神经细胞增殖。



A:免疫荧光染色检测各组海马齿状回细胞增殖能力;B:体视学方法统计各组海马齿状回 BrdU 阳性细胞数量
a:P<0.05,与 SAL 组比较;b:P<0.05,与 BTBR 组比较

图 1　二甲双胍处理后 P14 BTBR 小鼠海马齿状回 BrdU 阳性细胞增多

2.2　生后早期二甲双胍治疗后 BTBR 小鼠海马 Ki67 阳性细胞数量增加

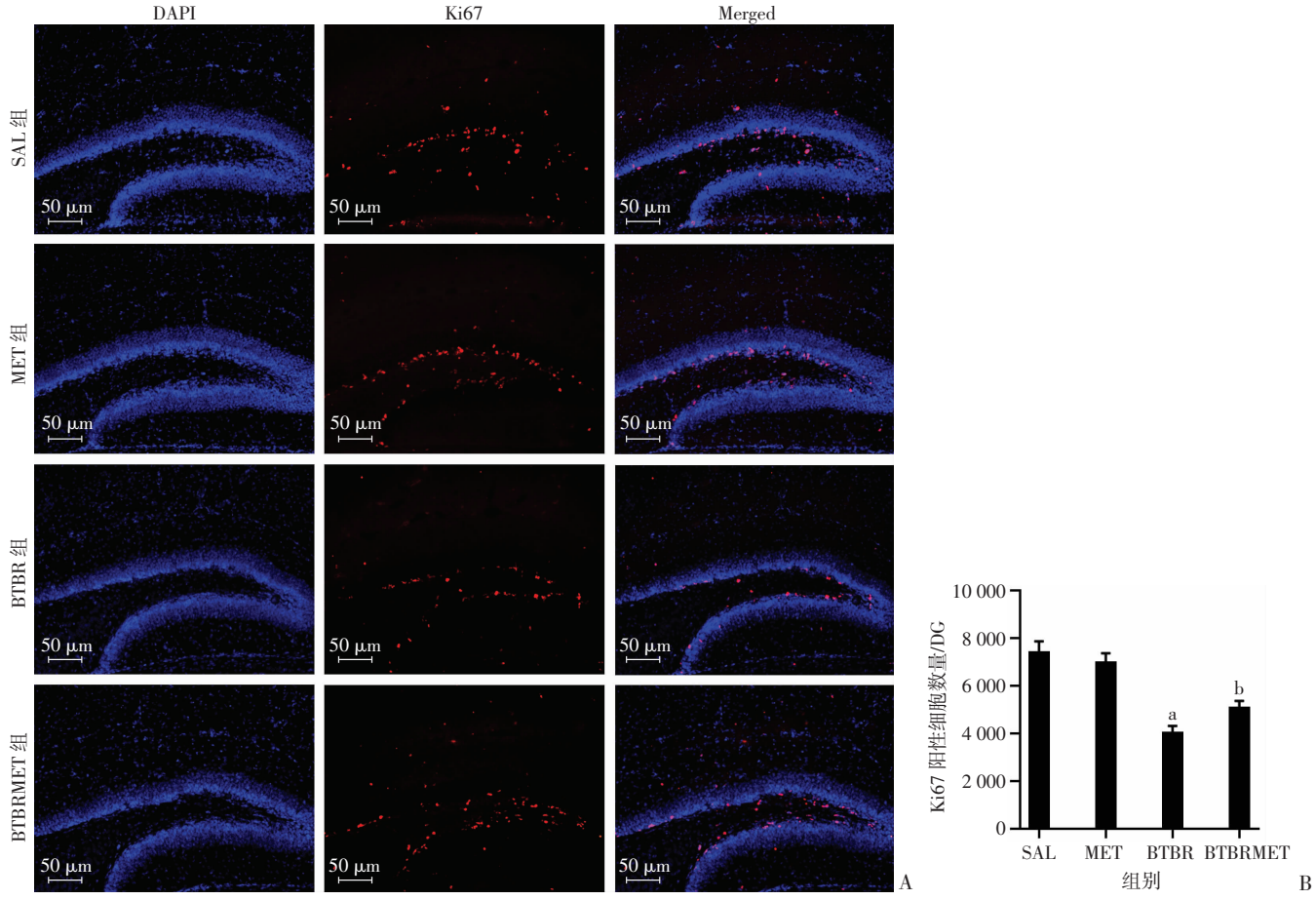
Ki67 作为一种增殖细胞相关的核抗原,用以评估二甲双胍对 P14 BTBR 小鼠海马神经干细胞增殖的影响。经观察各组 Ki67 阳性细胞主要分布在海马齿状回颗粒下层。BTBR 组 Ki67 阳性细胞与 SAL 组相比明显减少(LSD-t=6.929,P<0.05,图 2),MET 组相比于 SAL 组 Ki67 阳性细胞数无明显变化。BTBRMET 组 Ki67 阳性细胞数比 BTBR 组明显增多,差异有统计学意义(LSD-t=2.444,P<0.05,图 2)。这进一步证实,二甲双胍治疗有利于改善 BTBR 海马齿状回神经细胞增殖情况。

2.3　生后早期二甲双胍治疗有利于 BTBR 小鼠海马神经干细胞增殖

Sox2 是维持干细胞所必需的一种转录因子,在干细胞和前体细胞中都有表达;Sox2 和 GFAP 共同标记可用于检测神经干细胞,其中 GFAP 标记的放射状突起方向需垂直并横贯海马齿状回颗粒细胞层。与 SAL 组相比,BTBR 组颗粒细胞层 Sox2 阳性的神经干细胞/早期祖细胞数显著减少(LSD-t=8.270,P<0.05,图 3);而经 MET 处理后 BTBR 组小鼠 GCL 的 Sox2 阳性细胞数明显增多(LSD-t=3.908,P<0.05,图 3)。SAL 组和 MET 组比较 Sox2 阳性细胞数差异无统计学意义。同样,BTBRMET 组 Sox2 和 GFAP 共同标记的神经干细胞数比 BTBR 组明显增多(LSD-t=0.412,P<0.05,图 3),而在 SAL 组和 MET 组之间阳性细胞数差异无统计学意义。结果显示生后早期二甲双胍治疗显著增加了 BTBR 小鼠海马 Sox2 阳性细胞数量以及 Sox2 和 GFAP 共同标记的神经干细胞数量。

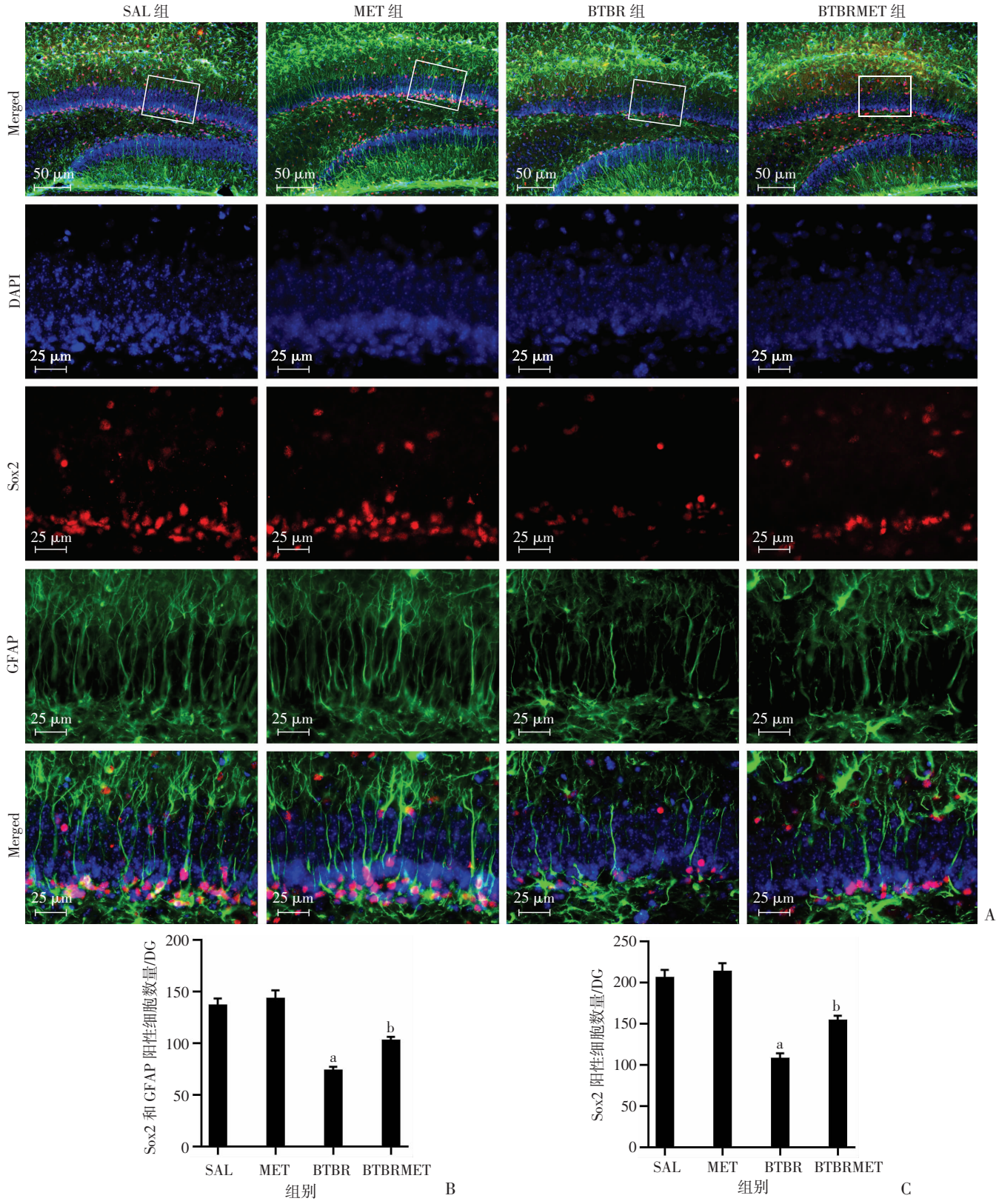
2.4　生后早期二甲双胍治疗显著增加 BTBR 小鼠海马颗粒细胞层新生神经细胞数量

Prox1 为新生神经细胞的标志,免疫荧光结果显示:各组中海马齿状回颗粒层 Prox1 阳性细胞,MET 组与 SAL 组相比差异无统计学意义;而 BTBR 组 Prox1 阳性细胞数比 SAL 组显著减少(LSD-t=10.691,P<0.05,图 4、5),经 MET 处理后 BTBR 小鼠 Prox1 阳性细胞数明显增多(LSD-t=4.338,P<0.05,图 4、5)。



A:免疫荧光染色检测各组海马齿状回细胞增殖能力;B:体视学方法统计各组海马齿状回 Ki67 阳性细胞数量
a:P<0.05,与 SAL 组比较;b:P<0.05,与 BTBR 组比较

图 2　二甲双胍处理后 P14 BTBR 小鼠海马齿状回 Ki67 阳性细胞增多



A:免疫荧光染色检测各组海马齿状回神经干细胞分布;B:体视学方法统计各组海马齿状回 Sox2 和 GFAP 共同标记的阳性细胞数量;C:体视学方法统计各组海马齿状回 Sox2 阳性细胞数量 a:$P<0.05$,与 SAL 组比较;b:$P<0.05$,与 BTBR 组比较

图 3 二甲双胍处理后 P14 BTBR 小鼠海马齿状回神经干细胞增多

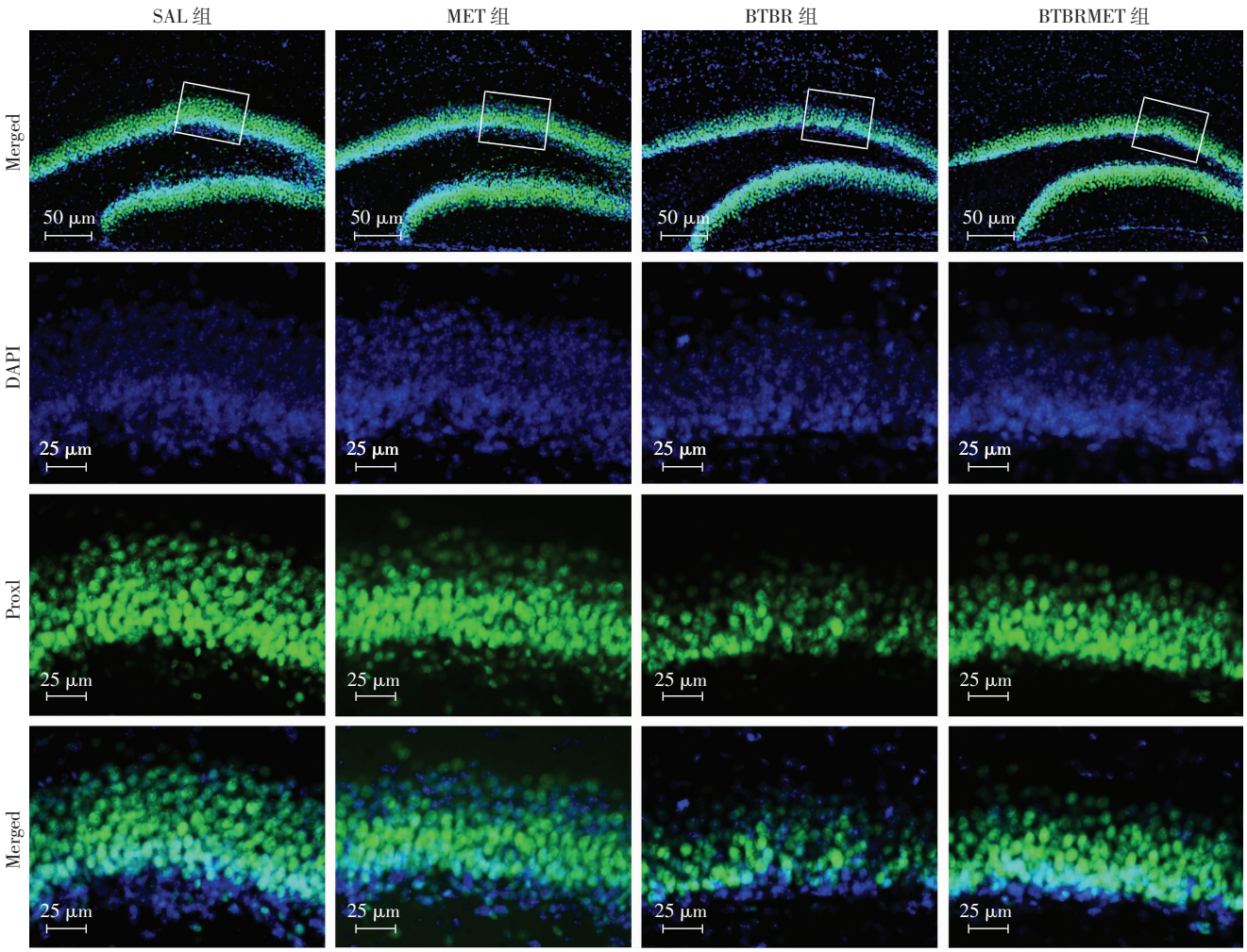
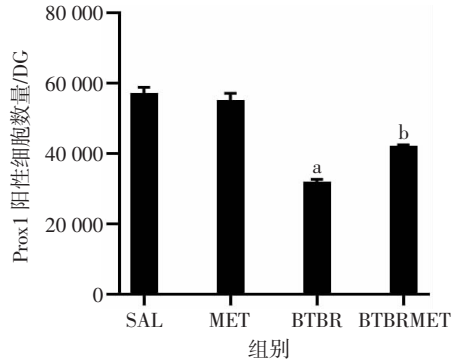


图 4　免疫荧光染色检测各组海马齿状回新生神经细胞分布



a:$P<0.05$,与 SAL 组比较;b:$P<0.05$,与 BTBR 组比较

图 5　体视学方法统计各组海马齿状回 Prox1 阳性细胞数量

3　讨论

在过去几十年里,ASD 的发病率急剧上升,现有的数据显示,自闭症儿童的家庭面临着巨大的经济压力,却没有任何有效的治疗措施。因此,迫切需要明确 ASD 的病因并寻找有效的治疗方法。尽管 ASD 的确切机制尚不清楚,但在人类和动物模型中,神经发生缺陷已被证明与该疾病相关[6]。在哺乳动物的一生中,活跃的神经发生主要发生在脑室下区和海马齿回颗粒下层[15]。这些区域的神经发生缺陷可能会对大脑功能产生重大影响。MRI 证据显示,自闭症患者和健康对照组(年龄 29 个月至 49 岁)在海马齿状回区域存在明显的解剖异常[16]。此外,尸检结果显示 ASD 脑内神经发生、神经细胞迁移和成熟异常,这可能是导致患者症状异质性的重要原因[8]。

近年来,一些自闭症小鼠模型显示,海马的神经发生有显著变化。MECP2 转基因小鼠表现出成熟神经细胞减少和成年海马异常[9]。$Shank3^{+/\Delta C}$ 和 $Cntnap2^{-/-}$ 转基因小鼠也被发现腹侧齿回成年神经发生显著减少[17]。此外,有证据显示,BTBR 和丙戊酸(valproic acid,VPA)自闭症小鼠模型的成年海马神经发生减少[18-19]。这些结果显示,海马的神经发生可能与 ASD

患者和动物模型的行为缺陷有关。成年海马神经发生受损不仅导致社交能力异常,还增加了重复刻板样行为[20]。我们之前的研究同样证实了成年 BTBR 和 VPA 暴露小鼠海马区 BrdU 和 DCX 标记的细胞数量显著减少,而生后早期肝脏 X 受体激动剂 TO901317 治疗可以显著挽救这些自闭症模型小鼠的神经发生缺陷[21]进而改善 BTBR 小鼠自闭样行为。这些结果显示,促进海马神经发生可能成为 BTBR 小鼠自闭样行为改善的有效靶点。

迄今为止,大多数 ASD 的临床前研究只检测了对成年自闭症动物模型的急性治疗效果。很少实验研究早期干预对 ASD 的治疗效果。脆性 X 综合征小鼠模型的早期社交训练可以挽救成年行为和树突棘形态的缺陷[22]。另一项临床前研究表明,维生素 D 治疗可以预防妊娠期母体免疫激活的 ASD 模型小鼠的自闭样行为[23]。我们最近的研究表明,P7~P14 给予二甲双胍可以挽救成年 BTBR 小鼠的行为异常[13]。除此以外,生后早期肝脏 X 受体激动剂治疗可以显著改善成年 BTBR 及 VPA 自闭症模型小鼠的神经发生及行为缺陷[21]。以上结果显示,生后早期对自闭症小鼠给予药物干预可以导致长期效应,明显改善成年小鼠的自闭样行为,治疗效果比成年急性药物治疗更加持久且显著,提示我们更多地关注 ASD 的早期治疗。

二甲双胍是一种经典的双胍类糖尿病治疗药物,已有研究表明二甲双胍干预有助于促进海马成年神经发生,延缓阿尔茨海默病(AD)的神经退行性变[24];OU 等[14]也进一步证明了二甲双胍可治疗 AD 小鼠空间记忆损伤和海马神经元死亡,促进海马神经发生。在糖尿病模型小鼠中,二甲双胍延长治疗也可促进其海马神经细胞增殖和分化[25]。本实验结果证实生后早期二甲双胍治疗可促进 BTBR 小鼠海马神经发生,与之前的报道一致,其潜在机制值得进一步探索。

BTBR 近交系小鼠是临床前研究中常用的小鼠模型,除了表现出异常的社会交往和高水平的重复行为,同样有海马神经发生缺陷。为探讨生后早期二甲双胍对海马神经发生的治疗效果,本研究采用 P7~P14 二甲双胍早期干预,这与人类从妊娠最后 3 个月到出生后最初几年的时间大致相同,在 P14 对海马齿状回增殖神经元以及神经干细胞进行了检测。结果显示,生后早期二甲双胍治疗可显著增加 BTBR 小鼠海马齿状回 BrdU、Ki67 标记的增殖细胞,Sox2 和 GFAP 共标的神经干细胞,以及 Prox1 标记的新生神经细胞数量。而对于神经发生正常的 C57 小鼠没有显著影响。由此可见,在发育关键期进行药物治疗可有效改善海马神经发生。而这也为前期实验结果显示生后早期二甲双胍改善成年 BTBR 小鼠行为缺陷提供了可靠依据,揭示了海马干细胞库的维持及海马结构变化对于成年行为改善的重要作用。

综上所述,生后早期二甲双胍治疗可明显改善 BTBR 小鼠海马神经发生,促进神经细胞增殖以及神经干细胞库的维持。这可能与二甲双胍早期治疗后成年 BTBR 小鼠行为改善有紧密联系,为自闭症治疗的关键时期和研究靶点提供了新思路。

参考文献:

[1] CURRAIS A, FARROKHI C, DARGUSCH R, *et al*. Dietary glycemic index modulates the behavioral and biochemical abnormalities associated with autism spectrum disorder[J]. Mol Psychiatry, 2016, 21(3): 426-436. DOI:10.1038/mp.2015.64.

[2] CHRISTENSEN D L, MAENNER M J, BILDER D, *et al*. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 4 years—early autism and developmental disabilities monitoring network, seven sites, United States, 2010, 2012, and 2014[J]. MMWR Surveill Summ, 2019, 68(2): 1-19. DOI:10.15585/mmwr.ss6802a1.

[3] CARPITA B, MUTI D, DELL´OSSO L. Oxidative stress, maternal diabetes, and autism spectrum disorders[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 3717215. DOI:10.1155/2018/3717215.

[4] LEE B K, GROSS R, FRANCIS R W, *et al*. Birth seasonality and risk of autism spectrum disorder[J]. Eur J Epidemiol, 2019, 34(8): 785-792. DOI:10.1007/s10654-019-00506-5.

[5] CASTILLA-ORTEGA E, SERRANO A, BLANCO E, *et al*. A place for the hippocampus in the cocaine addiction circuit: Potential roles for adult hippocampal neurogenesis[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2016, 66: 15-32. DOI:10.1016/j.neubiorev.2016.03.030.

[6] GILBERT J, MAN H Y. Fundamental elements in autism: from neurogenesis and neurite growth to synaptic plasticity[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11: 359. DOI:10.3389/fncel.2017.00359.

[7] GROEN W B, BUITELAAR J K, VAN DER GAAG R J, *et al*. Pervasive microstructural abnormalities in autism: a DTI study[J]. J Psychiatry Neurosci, 2011, 36(1): 32-40. DOI:10.1503/jpn.090100.

[8] WEGIEL J, KUCHNA I, NOWICKI K, *et al*. The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes[J]. Acta Neuropathol, 2010,

119(6): 755-770. DOI:10.1007/s00401-010-0655-4.

[9] CHEN Z F, LI X, ZHOU J J, *et al*. Accumulated quiescent neural stem cells in adult hippocampus of the mouse model for the MECP2 duplication syndrome[J]. Sci Rep, 2017, 7: 41701. DOI:10.1038/srep41701.

[10] LIU Y H, LAI W S, TSAY H J, *et al*. Effects of maternal immune activation on adult neurogenesis in the subventricular zone-olfactory bulb pathway and olfactory discrimination [J]. Schizophr Res, 2013, 151(1/2/3): 1-11. DOI:10.1016/j.schres.2013.09.007.

[11] ZHANG R Y, CAI Y L, XIAO R, *et al*. Human amniotic epithelial cell transplantation promotes neurogenesis and ameliorates social deficits in BTBR mice[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 153. DOI: 10.1186/s13287-019-1267-0.

[12] MOUSAVI S M, NIAZMAND S, HOSSEINI M, *et al*. Beneficial effects of teucrium polium and metformin on diabetes-induced memory impairments and brain tissue oxidative damage in rats[J]. Int J Alzheimers Dis, 2015, 2015: 493729. DOI:10.1155/2015/493729.

[13] WANG L, CAI Y L, FAN X T. Metformin administration during early postnatal life rescues autistic-like behaviors in the BTBR T+ Itpr3tf/J mouse model of autism[J]. Front Behav Neurosci, 2018, 12: 290. DOI: 10.3389/fnbeh.2018.00290.

[14] OU Z R, KONG X J, SUN X D, *et al*. Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice[J]. Brain Behav Immun, 2018, 69: 351-363. DOI:10.1016/j.bbi.2017.12.009.

[15] APPLE D M, SOLANO-FONSECA R, KOKOVAY E. Neurogenesis in the aging brain[J]. Biochem Pharmacol, 2017, 141: 77-85. DOI:10.1016/j.bcp.2017.06.116.

[16] GROEN W, TELUIJ M, BUITELAAR J, *et al*. Amygdala and Hippocampus enlargement during adolescence in autism [J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2010, 49(6): 552-560. DOI:10.1016/j.jaac.2009.12.023.

[17] COPE E C, BRIONES B A, BROCKETT A T, *et al*. Immature neurons and radial glia but not astrocytes or microglia, are altered in adult Cntnap2 and Shank3 mice, models of autism[J]. eNeuro, 2016, 3(5). DOI:10.1523/ENEURO.0196-16.2016.

[18] ZENG Q H, LONG Z M, FENG M, *et al*. Valproic acid stimulates hippocampal neurogenesis via activating the wnt/β-catenin signaling pathway in the APP/PS1/nestin-GFP triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. Front Aging Neurosci, 2019, 11: 62. DOI:10.3389/fnagi.2019.00062.

[19] JULIANDI B, TANEMURA K, IGARASHI K, *et al*. Reduced adult hippocampal neurogenesis and cognitive impairments following prenatal treatment of the antiepileptic drug valproic acid[J]. Stem Cell Rep, 2015, 5(6): 996-1009. DOI:10.1016/j.stemcr.2015.10.012.

[20] RUSZNÁK K, CSEKÖ K, VARGA Z, *et al*. Long-term stress and concomitant marijuana smoke exposure affect physiology, behavior and adult hippocampal neurogenesis [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 786. DOI: 10.3389/fphar.2018.00786.

[21] CAI Y L, ZHONG H Y, LI X, *et al*. The liver X receptor agonist TO901317 ameliorates behavioral deficits in two mouse models of autism[J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13: 213. DOI:10.3389/fncel.2019.00213.

[22] ODDI D, SUBASHI E, MIDDEI S, *et al*. Early social enrichment rescues adult behavioral and brain abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome[J]. Neuropsychopharmacology, 2015, 40(5): 1113-1122. DOI:10.1038/npp.2014.291.

[23] VUILLERMOT S, LUAN W, MEYER U, *et al*. Vitamin D treatment during pregnancy prevents autism-related phenotypes in a mouse model of maternal immune activation[J]. Mol Autism, 2017, 8: 9. DOI:10.1186/s13229-017-0125-0.

[24] AHMED S, MAHMOOD Z, JAVED A, *et al*. Effect of metformin on adult hippocampal neurogenesis: comparison with donepezil and links to cognition[J]. J Mol Neurosci, 2017, 62(1): 88-98. DOI:10.1007/s12031-017-0915-z.

[25] TANOKASHIRA D, KURATA E, FUKUOKAYA W, *et al*. Metformin treatment ameliorates diabetes-associated decline in hippocampal neurogenesis and memory *via* phosphorylation of insulin receptor substrate 1[J]. FEBS Open Bio, 2018, 8(7): 1104-1118. DOI:10.1002/2211-5463.12436.

(**收稿**:2019-07-26;**修回**:2019-08-31)

(编辑 吴培红)