DOI:10.16016/j.2097-0927.202302024

番茄红素改善 BTBR 小鼠社交障碍及降低海马炎症

李江辉[1],李达兵[3],朱先玉[1],陈 梅[2],范晓棠[2],毛苹苏[1] 646000 四川 泸州,西南医科大学基础医学院:肿瘤医学研究所[1],基础医学院生理学教研室[3];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[2]

[摘要] **目的** 研究番茄红素(Lycopene,Lyc)对 BTBR T^+ Itpr3^{tf}/J(BTBR)自闭症模型小鼠海马组织中炎症水平、社交缺陷、认知障碍和重复刻板行为的影响。**方法** 7~8 周龄成年雄性健康 C57BL/6(C57)与 BTBR 小鼠随机数字表法分为 4 组($n=8$):C57+Veh 组、C57+Lyc 组、BTBR+Veh 组、BTBR+Lyc 组。C57+Lyc 组和 BTBR+Lyc 组小鼠予以番茄红素(20 mg/kg)灌胃,1 次/d,共 7 d;C57+Veh 组小鼠和 BTBR+Veh 组小鼠给予等体积的玉米油。给药 7 d 后开始三箱社交、雌雄交互、理毛、埋珠、开场实验、新物体识别、筑巢和 Y 迷宫等行为实验。结束后立即收取脑组织样本,进行 RT-qPCR、Western blot 实验。**结果** 行为学结果显示:三箱社交实验中,BTBR+Veh 组小鼠在陌生物体所在的箱体时间更多,表现出对陌生物体更偏好($P<0.05$);而 Lyc 治疗后小鼠表现出对陌生小鼠更偏好($P<0.05$)。理毛、埋珠实验中,BTBR+Veh 组小鼠较 C57+Veh 组小鼠的重复刻板行为显著增多($P<0.05$),Lyc 治疗后显著减少了 BTBR 小鼠的重复刻板行为($P<0.05$)。BTBR+Veh 组小鼠较 C57+Veh 组小鼠海马组织中 NLRP3 炎症小体在 mRNA 和蛋白水平均显著增高($P<0.05$);白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)、IL-18、IL-6、核因子 κB(nuclear factor kappaB,NF-κB)、肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)在 mRNA 水平显著增高($P<0.05$);Lyc 治疗后 BTBR 小鼠各炎症因子均显著降低($P<0.05$)。**结论** 番茄红素治疗通过降低 BTBR 小鼠海马中 NLRP3 炎症小体的水平,改善 BTBR 小鼠三箱社交缺陷和重复刻板行为。

[关键词] 番茄红素;自闭症;NLRP3 炎症小体;海马;社交障碍

[中图法分类号] R285.5;R338.26;R749.94 [文献标志码] A

Lycopene improves social disorder and reduces hippocampal inflammation in BTBR mice

LI Jianghui[1], LI Dabing[3], ZHU Xianyu[1], CHEN Mei[2], FAN Xiaotang[2], MAO Pingsu[1] [1]Institute for Cancer Medicine, [3]Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan Province, 646000; [2]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 lycopene (Lyc) on hippocampal inflammation, social deficits and repetitive stereotyped behaviors in BTBR T^+ Itpr3tf/J autistic mice (BTBR, a mouse strain showing lower sociability as a model for autism spectrum disorder). **Methods** Adult male C57BL/6J (C57) and BTBR mice aged 7-8 weeks were randomly divided into ($n=8$): C57+Veh group, C57+Lyc group, BTBR+Veh group and BTBR+Lyc group. The mice from the C57+Lyc group and BTBR+Lyc group were given 20 mg/kg Lyc by gavage once a day for 7 d, and those of the C57+Veh group and BTBR+Veh mice were given

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82071544)

[通信作者] 毛苹苏,E-mail:maops@swmu.edu.cn

范晓棠,E-mail:fanxiaotang2005@163.com

2097-0927/Copyright © 2022,陆军军医大学(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/)

equal volume of corn oil. Then three-chamber social test, male-female reciprocal social interactions, self-grooming, marble buying, open field test, object recognition test, nest building, and Y-maze test were conducted in these mice. Immediately after the behavioral tests, the mice were sacrificed and their brain samples were harvested for RT-qPCR and Western blotting. **Results** Behavioral results showed that in the three-chamber social test, the mice of the BTBR+Veh group spent longer time in the chamber with the object, showing much curiosity about the object ($P<0.05$), while the mice after Lyc treatment showed a preference for strange mice ($P<0.05$). In the self-grooming and marble burying behavior test, the BTBR+Veh group showed markedly increased repeated stereotyped behaviors than the C57+Veh group mice ($P<0.05$), which could be alleviated by Lyc treatment ($P<0.05$). The hippocampal expression of NLRP3 at mRNA and protein levels ($P<0.05$), and the mRNA levels of IL-1β, IL-18, IL-6, NF-κB, and TNF-α were significantly increased in the BTBR+Veh group mice when compared with the C57+Veh group mice, and Lyc treatment obviously reversed above changes ($P<0.05$). **Conclusion** Lyc treatment improves three-chamber social deficits and repetitive stereotyped behaviors in BTBR mice by reducing NLRP3 inflammasome in the hippocampus of BTBR mice.

[**Key words**] lycopene; autism; NLRP3 inflammasome; hippocampus; social communication disorder

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82071544). Corresponding author: MAO Pingsu, E-mail: maops@swmu.edu.cn; FAN Xiaotang, E-mail: fanxiaotang2005@163.com

自闭症谱系障碍(autism spectrum disorders,ASD)是一种神经发育障碍性疾病,主要表现为社会交往功能受损、重复刻板行为和兴趣狭窄[1]。研究表明自闭症的病理发生与不同脑区持续的神经炎症有关[2],患者大脑尸检结果显示促炎细胞因子处于高水平状态[3]。同时,ASD 症状与免疫功能改变有关,鉴于免疫系统和大脑之间的双向通信关系,提示细胞因子水平能够调节神经元功能和行为过程[4]。炎症小体是参与调节炎症反应的多聚体蛋白平台,其激活导致促炎细胞因子的产生。文献报道了炎症小体在 ASD 中被激活,针对其激活可作为治疗 ASD 一个策略[5]。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3,NLRP3)是最典型的炎症小体,已被证明与中枢神经系统的先天免疫和炎症调节有关,同时促进炎症因子的产生[6]。另一方面,ASD 患者海马结构的改变已被广泛研究报道[7],在儿童及青少年患者的研究中发现海马体积增大。海马结构的改变除了导致社交能力异常,还会增加重复刻板样行为[8]。值得注意的是,有研究报道促进海马神经发生,降低神经炎症有助于恢复 ASD 动物模型的正常社会行为表型[9-10]。

番茄红素(Lycopene,Lyc)是自然界中用途最广泛的红色类胡萝卜素之一[11],具有抑制氧化应激[12]、炎症[13]和调节各种细胞生存途径的卓越能力。最重要的是,番茄红素可以穿过血脑屏障到达大脑[14]。在中枢神经系统中,番茄红素对阿尔茨海默病[15]、帕金森病[16]、亨廷顿病[17]、癫痫[18]和抑郁症[19]等疾病具有预防或治疗作用。同时,临床前证据有力地支持了番茄红素优异的神经保护潜力,这主要归因于其抗氧化、抗炎、抗凋亡等特性。BTBR T^{+} $Itpr3^{tf/}$J(BTBR)小鼠具有重复刻板行为、社交障碍等自闭症的核心症状,并且存在先天性免疫反应和适应性免疫反应的功能障碍[20]。据此,本研究采用 BTBR 自闭症模型小鼠,探究番茄红素干预对 BTBR 小鼠自闭行为的影响及海马内炎症水平的调控。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

番茄红素购自上海源叶生物有限公司(批号:M08GB140785,规格:200 mg/支),NLRP3 抗体购自 Abcam 公司(货号:ab263899),β-actin 抗体购自中杉公司(货号:TA-09)。

1.2 动物与分组

7~8 周龄 BTBR 雄性小鼠,购于美国杰克逊实验室[编号 002282,体质量(27.6±1.5) g]。7~8 周龄,C57BL/6 雄性小鼠,体质量(23.5+1.5)g,由陆军军医大学实验动物中心提供。所有动物在陆军军医大学标准 12 h 光照/12 h 黑暗的控制环境中饲养,保证自由摄食及饮水。雌雄交互实验选择 C57 雌鼠作为社交鼠,其余实验用鼠均为雄性小鼠。32 只雄性小鼠分为 4 组($n=8$),包括 C57 对照组(C57+Veh)、C57 番茄红素组(C57+Lyc)、BTBR 对照组(BTBR+Veh)、BTBR 番茄红素组(BTBR+Lyc)。番茄红素溶于玉米油,所有番茄红素组小鼠按 20 mg/kg 剂量连续 7 d 给予番茄

红素灌胃处理,1 次/d;所有对照组小鼠给予等体积的玉米油。所有实验按照陆军军医大学伦理审批要求和实验动物保护原则进行。

1.3 行为学检测

1.3.1 三箱社交实验 将实验小鼠单独放入由透明聚碳酸酯制成 1 个长方形的社会化装置(60 cm×40 cm×22 cm)。2 个分隔墙内的伸缩门允许实验小鼠进入 3 个腔室。测试包括 2 个阶段:习惯化阶段和社会取向阶段。在第 1 阶段,将实验小鼠放在中间腔室,并允许自由探索 3 个腔室 10 min。第 2 阶段,将 1 只陌生小鼠放置在小室的一侧,将 1 个陌生物体放置在另一侧小室的相同位置。小鼠自由探索 10 min。用诺达斯软件 Ethovision 11.0 记录实验小鼠在不同箱体的停留时间以及对小鼠、物体的嗅探时间,并分析偏好系数:箱体偏好系数=(小鼠箱体时间-物体箱体时间)/(小鼠箱体时间+物体箱体时间)×100%,嗅探偏好系数=(嗅探小鼠时间-嗅探物体时间)/(嗅探小鼠时间+嗅探物体时间)×100%。

1.3.2 雌雄小鼠交互实验 每只雄性 BTBR 或 C57 小鼠允许与发情期的雌性 C57 小鼠自由互动 5 min。实验小鼠和雌鼠年龄是匹配的。实验在暗光条件下的(25 cm×25 cm×35 cm)装置中进行。由 1 名对治疗状态不知情的经验丰富的调查员从视频中分析实验小鼠对雌鼠在鼻-鼻、鼻-身体、鼻-生殖器的嗅探时间以及总的嗅探时间。

1.3.3 理毛实验 将小鼠置于标准饲养笼,录像记录小鼠反复自我理毛行为 20 min,分析第 2 个 10 min 的理毛时间。

1.3.4 埋珠实验 将小鼠置于装有 20 颗弹珠(直径 1.5 cm)的饲养笼(27 cm×16.5 cm×12.5 cm)中,弹珠以 4×5 的网格均匀排列于垫料表面。30 min 后统计被覆盖的珠子数量,标准为珠子被覆盖体积>75%。

1.3.5 开场实验 该装置由灰色有机玻璃边和地板组成(40 cm×40 cm×30 cm),小鼠最初放置在中心区域,允许自由探索 30 min,使用诺达斯软件 Ethovision 11.0 记录并分析小鼠的总路程。

1.3.6 新物体识别实验 装置同开场实验装置。实验前 1 d 小鼠放置在该装置中适应 30 min。实验分为 2 个阶段:第 1 个阶段在对角线的位置放置 2 个相同的物体(O),小鼠自由探索 10 min。2 h 后,将其中一个熟悉的物体(O)换成大小与 O 相似,但形状、颜色和纹理完全不同的新物体(N),允许小鼠自由探索 10 min。使用诺达斯软件 Ethovision 11.0 记录小鼠探索熟悉的物体(tO)和新物体(tN)的时间,计算新物体识别系数= tN/(tN+tO)×100%。

1.3.7 Y 迷宫实验 将小鼠置于 Y 型迷宫的 3 个臂(A、B 或 C)的中央区域,允许自由探索迷宫(3 臂,40 cm×9 cm×16 cm),持续记录 8 min。当小鼠的 4 个爪子在 1 个手臂内时,认为小鼠已完全进入手臂。3 个臂之间相互重叠的三重交替被定义为正确的自发交替(spontaneous alternations,SAP)。使用诺达斯软件 Ethovision 11.0 记录 SAPs 的数量和总条目数,并使用以下公式计算 SAP 行为比例(SAP behavior,SAB),SAB=(SAP 数量)/(总手臂条目数-2)×100%。

1.3.8 筑巢实验 将小鼠置于干净、标准饲养笼,保证饮食足够,放入少量的木屑料及 1 块 2.5 g、面积约 5 cm^2 的棉垫。24 h 后拍照记录并进行评分:1 分,超过 90%未撕扯,棉垫几乎没动;2 分,50%~90%未撕扯,棉垫部分被撕扯;3 分,10%~50%未撕扯,一般没有可识别的巢穴;4 分,<10%未撕扯,可识别但平坦的巢穴;5 分:<10%未撕扯,近乎完美的巢穴。

1.4 Western blot 实验

行为学检测后使用异氟烷麻醉小鼠,断头取脑,在冰上分离出海马组织。加蛋白裂解液提取总蛋白。BCA 法测蛋白浓度,并调整浓度为 5 mg/mL。在 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)上样 30 μg 总蛋白电泳,将蛋白质电转至 PVDF 膜,封闭结束后,加入一抗 β-actin 抗体(1∶2 000),NLRP3 抗体(1∶1 000)。次日采取 TBST 洗膜 5 次,5 min/次。二抗(1∶2 000)室温孵育 2 h,TBST 洗膜 5 次,5 min/次。ECL 曝光显影。使 Image-Lab 系统对条带进行定量分析。

1.5 RT-qPCR 实验

小鼠行为学检测后使用异氟烷麻醉,断头,立即在冰上分离出海马组织。使用 TRIzol(美国 Invitrogen 公司)从小鼠海马组织中提取总 RNA,反转录成 cDNA,然后使用针对 NLRP3、白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)、IL-18、IL-6、核因子 κB(nuclear factor kappaB,NF-κB)、肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)以及 β-actin 设计的引物进行实验。引物序列见表 1。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计软件,采用双因素方差分析(Two-way ANOVA),以基因型和药物处理作为被试之间的 2 个因素,分别对基因型效应、药物效应及基因型药物交互效应进行了统计学分析,表示为(F,P),组间两两比较采用 LSD 事后 t 检验。三箱社交实验中箱体时间和嗅探时间采取配对 t 检验。检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 番茄红素治疗对成年期 BTBR 小鼠三箱社交缺陷有改善作用

三箱社交实验用于检测小鼠社交行为以及对新鲜事物的偏好程度(图 1A)。结果显示:C57+Veh 组小鼠更多时间在陌生小鼠所在的箱体($P<0.05$);BTBR+Veh 组更多时间在陌生物体所在的箱体($P<0.05$);BTBR 小鼠给予番茄红素治疗后显著偏向于陌生小鼠的箱体(图 1B,$P<0.05$)。

小鼠嗅探时间是检测社交行为更为敏感的指标,C57+Veh 组小鼠对陌生小鼠好奇($P<0.05$);BTBR+Veh 组则对陌生物体更好奇($P<0.05$);BTBR 给予番茄红素治疗后对于陌生小鼠更好奇(图 1C,$P<0.05$)。双因素方差分析显示,基因型药物交互效应对箱体偏好系数[$F(1,28)=23.549$,嗅探偏好系数 $F(1,28)=20.316$,$P<0.05$]有显著影响;药物效应对箱体偏好系数[$F(1,28)=11.569$,嗅探偏好系数 $F(1,28)=10.739$,$P<0.05$]有显著影响;基因型效应对箱体偏好系数[$F(1,28)=25.007$,嗅探偏好系数 $F(1,28)=15.967$,$P<0.05$]有显著影响。LSD 事后检验显示,与 BTBR+Veh 组相比,BTBR+Lyc 组对于箱体偏好系数和嗅探偏好系数得到显著改善(图 1D、E,$P<0.05$)。提示番茄红素治疗对于 BTBR 小鼠三箱社交缺陷有显著改善作用。

2.2 番茄素治疗对 BTBR 小鼠的雌雄互惠社会交往无明显改善作用

雌雄小鼠交互行为用于评估直接嗅探行为,主要评价鼻-鼻、鼻-身体、鼻-生殖器和总的嗅探时间。双因素方差分析显示,4 组间在鼻-鼻、鼻-身体、鼻-生殖器和总嗅探时间上基因型效应差异有统计学意义[$F(1,28)=34.911$,$F(1,28)=50.342$,$F(1,28)=37.423$,$F(1,28)=59.9$,$P<0.05$,图 2];其中鼻-生殖器嗅探时间在基因型药物交互效应差异有统计学意义[$F(1,28)=5.768$,$P<0.05$,图 2C],但不存在药物交互效应;4 组间鼻-鼻、鼻-身体、总嗅探时间在药物效应和基因型药物交互效应差异无统计学意义。

LSD 事后检验显示,与 BTBR+Veh 组小鼠相比,C57+Veh 组小鼠对发情的雌性小鼠在 5 min 内鼻-鼻、鼻-身体、鼻-生殖器和总嗅探时间上表现出更强的兴趣($P<0.05$,图 2D)。与 BTBR+Veh 组相比,番茄红素处理后,BTBR 小鼠在鼻-生殖器的嗅探时间上有一定的改善,但差异无统计学意义(图 2C);鼻-鼻、鼻-身体和总嗅探时间上的雌雄交互缺陷行为差异无统计学意义。提示番茄红素对于 BTBR 小鼠在雌雄交互缺陷无改善作用。

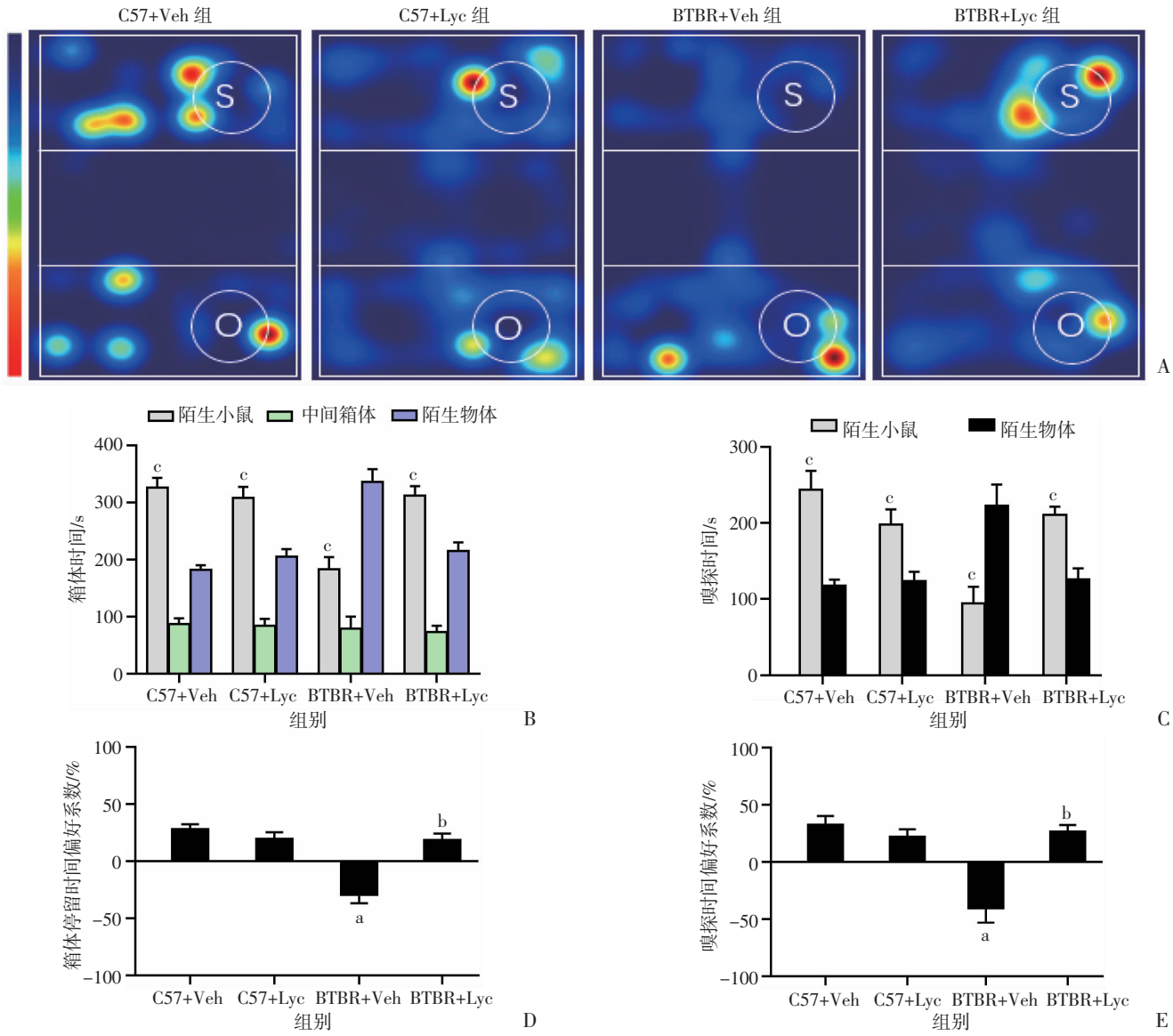
2.3 番茄红素对 BTBR 小鼠的重复刻板行为有明显改善作用

开场实验用于检测番茄红素治疗是否改变小鼠的运动能力(图 3A),从而产生对社交能力产生混杂影响。双因素方差分析显示,30 min 内的各组之间总运动距离在基因型效应[$F(1,28)=29.185$,$P<0.05$]有统计学差异,但基因型药物交互效应和药物效应差异均无统计学意义。LSD 事后检验显示,与 C57+Veh 组相比,BTBR+Veh 组的总运动距离更多($P<0.05$,图 3B),而 BTBR+Lyc 组并没有改变这种增多。且 C57+Veh 组和 C57+Lyc 组之间的运动距离差异无统计学意义,提示番茄红素治疗对小鼠运动能力没有影响。

理毛和埋珠实验用于检测番茄红素治疗能否改善 BTBR 小鼠的重复刻板行为。双因素方差分析显示,4 组间的理毛时间和埋珠数量在基因型效应[$F(1,28)=128.956$,$F(1,28)=8.785$,$P<0.05$]上均有统计学差异,同时埋珠数量在药物效应[$F(1,28)=4.251$,$P<0.05$]有统计学差异,基因型药物交互效应差异无统计学意义。LSD 事后检验显示,与 C57+Veh 组相比,BTBR+Veh 组在理毛时间和埋珠数量上表现出显著增多($P<0.05$,图 3C、D),BTBR+Lyc 组的理毛时间和埋珠数量得到明显的降低($P<0.05$,图 3C、D),提示番茄红素对 BTBR 小鼠的重复刻板行为有改善作用。

表 1 RT-qPCR 引物序列 (5′→3′)

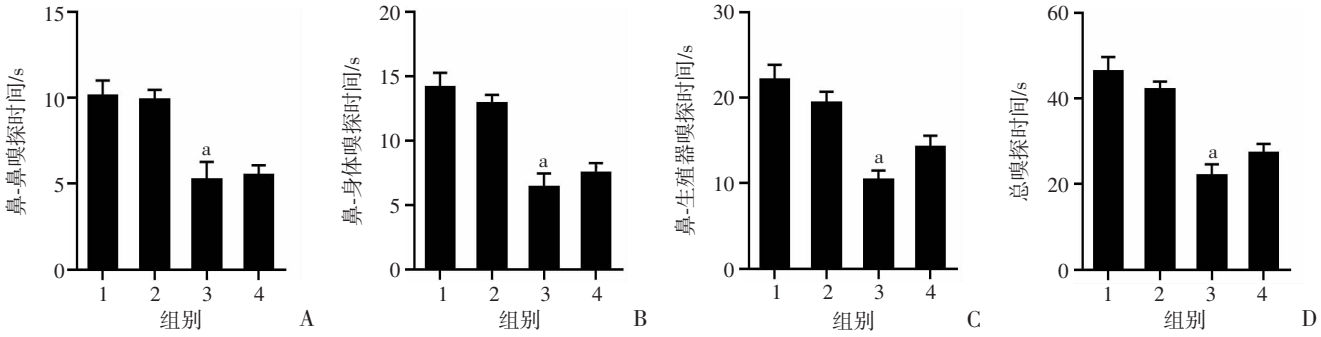
引物	上游	下游
NLRP3	GCTAAGAAGGACCAGCCACA	TCCCAGCAAACCTATCCACT
IL-1β	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	AAGGTCCACGGGAAAGACAC
IL-6	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
NF-κB	ATGGCAGACGATGATCCCTAC	CGGAATCGAAATCCCCTCTGTT
TNF-α	ACGTGGAACTGGCAGAAGAG	GGTCTGGGCCATAGAACTGA
IL-18	TGCATCAACTTTGTGGCAAT	ATAGAGGCCGATTTCCTTGG
β-actin	TCATCACTATTGGCAACGAGC	AACAGTCCGCCTAGAAGCAC



a:$P<0.05$,与 C57+Veh 组比较; b: $P<0.05$,与 BTBR+Veh 组比较;c:$P<0.05$,与陌生物体比较

A:代表性热图 显示每组在 3 个箱体的停留时间,“S”、“O”分别代表陌生小鼠、陌生物体,颜色越红代表在该位置停留时间越长;B、C:分别为小鼠在 3 个箱体停留时间、嗅探时间;D、E:分别为箱体偏好系数、嗅探偏好系数分析

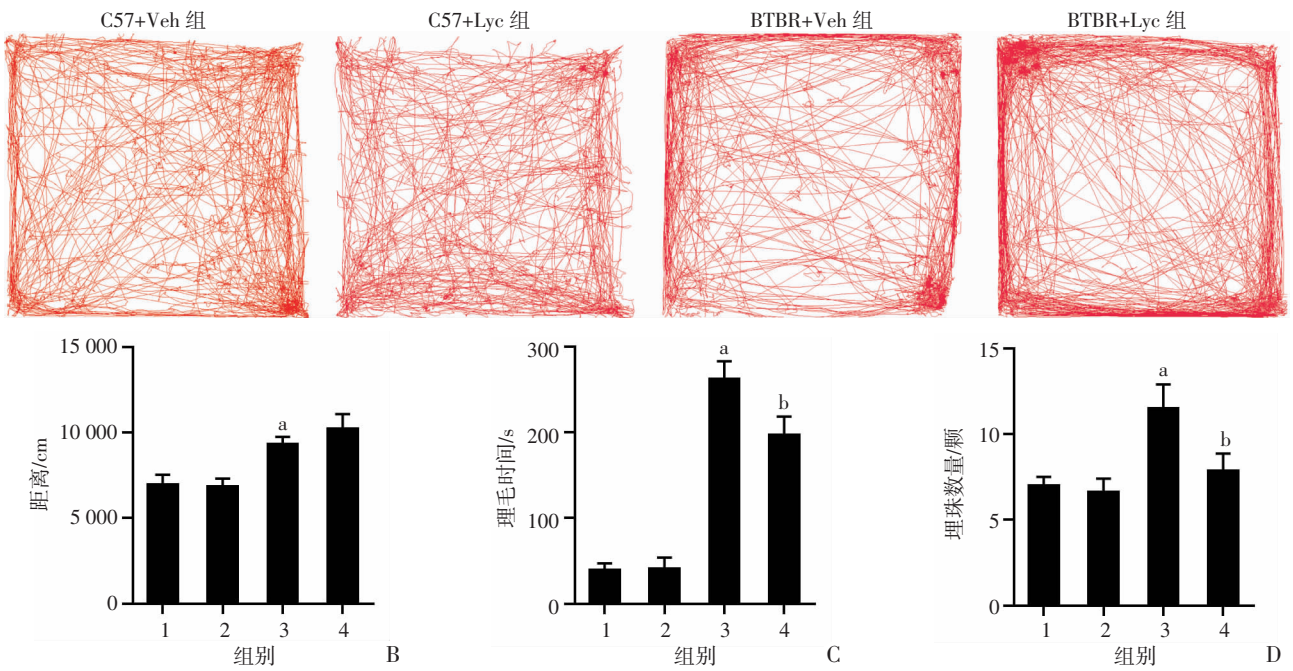
图 1 番茄红素治疗对 BTBR 小鼠三箱社交缺陷的影响 ($n=8,\bar{x}\pm s$)



1: C57+Veh; 2: C57+Lcy; 3: BTBR+Veh; 4:BTBR+Lyc;a: $P<0.05$,与 C57+Veh 组比较

A~D:分别为受试小鼠对雌性小鼠鼻-鼻、鼻-身体、鼻-生殖器和总嗅探时间分析

图 2 番茄红素治疗对 BTBR 小鼠雌雄小鼠交互行为的影响 ($n=8,\bar{x}\pm s$)



1:C57+Veh;2:C57+Lcy;3:BTBR+Veh;4:BTBR+Lyc a:$P<0.05$,与 C57+Veh 组比较;b:$P<0.05$,与 BTBR+Veh 组比较
A:开场实验代表性运动轨迹图(30 min 内);B:开场运动总路程;C、D 分别代表理毛时间、埋珠数量统计图

图 3 番茄红素治疗后对 BTBR 小鼠运动能力及重复刻板行为的影响 ($n=8,\bar{x}\pm s$)

2.4 番茄红素对 BTBR 小鼠短期记忆缺陷没有改善作用

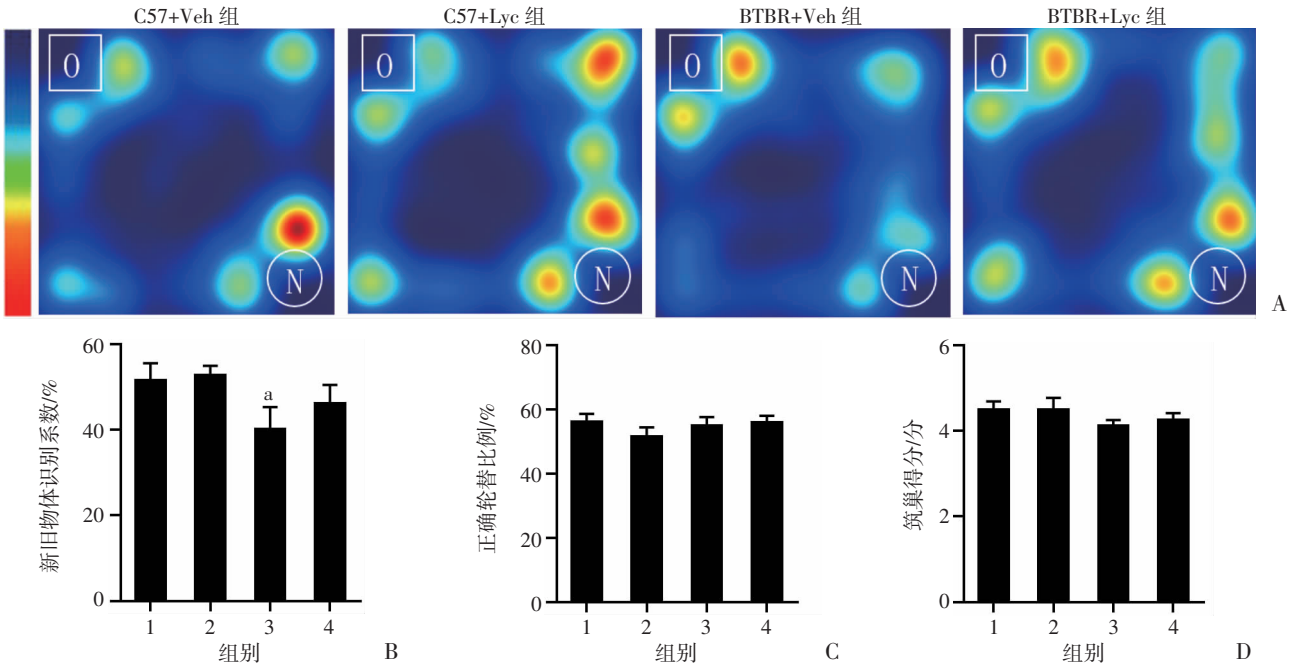
新物体识别实验的目的是测试番茄红素治疗是否对 BTBR 小鼠受损的短期学习记忆有改善作用(图 4A)。双因素方差分析显示,4 组间对新旧物体识别系数在基因型效应[$F(1,28)=5.018$,$P<0.05$]有统计学差异,基因型药物交互效应和药物效应差异均无统计学意义。LSD 事后检验显示,与 C57+Veh 组相比,BTBR+Veh 组新旧物体识别系数存在显著的降低($P<0.05$,图 4B),BTBR+Lyc 组和 BTBR+Veh 组相比新旧物体识别系数差异无统计学意义(图 4B)。提示番茄红素没有改善 BTBR 小鼠短期认知缺陷。

Y 迷宫用于评价工作记忆与认知。双因素方差分析显示,4 组间在正确的自发交替比例没有基因型药物交互效应,也没有药物效应和基因型效应。筑巢是一种与海马相关的先天行为。双因素方差分析显示,4 组间在筑巢得分上不存在基因型效应、基因型药物交互效应和药物效应。LSD 事后检验显示,4 组之间在 Y 迷宫的正确轮替比例和筑巢得分差异均无统计学意义(图 4C、D)。

2.5 番茄红素降低 BTBR 小鼠海马组织中 NLRP3 炎症小体的炎症水平

为了探究番茄红素对 BTBR 小鼠海马组织中 NLRP3 炎症小体及炎性细胞因子的调节,采用 RT-qPCR 和 Western blot 实验进行验证。RT-qPCR 结果双因素方差分析显示,基因型效应对[NLRP3:$F(1,8)=8.082$,IL-1β:$F(1,8)=11.707$,IL-18:$F(1,8)=15.193$,NF-κB:$F(1,8)=336.421$,TNF-α:$F(1,8)=6.003$,$P<0.05$]有显著影响;药物效应对[NLRP3:$F(1,8)=10.679$,IL-18:$F(1,8)=7.909$,NF-κB:$F(1,8)=31.957$,$P<0.05$]有显著影响,但 IL-1β 和 TNF-α 药物效应差异均无统计学意义;基因型药物交互效应对[NLRP3:[$F(1,8)=11.628$,NF-κB:$F(1,8)=20.212$,$P<0.05$]有显著影响,但 IL-1β、IL-18 和 TNF-α 基因型药物交互效应差异均无统计学意义。Western blot 结果进行双因素方差分析显示,NLRP3 存在基因型效应[$F(1,8)=8.082$,$P<0.05$],药物效应和基因型药物交互效应差异均无统计学意义

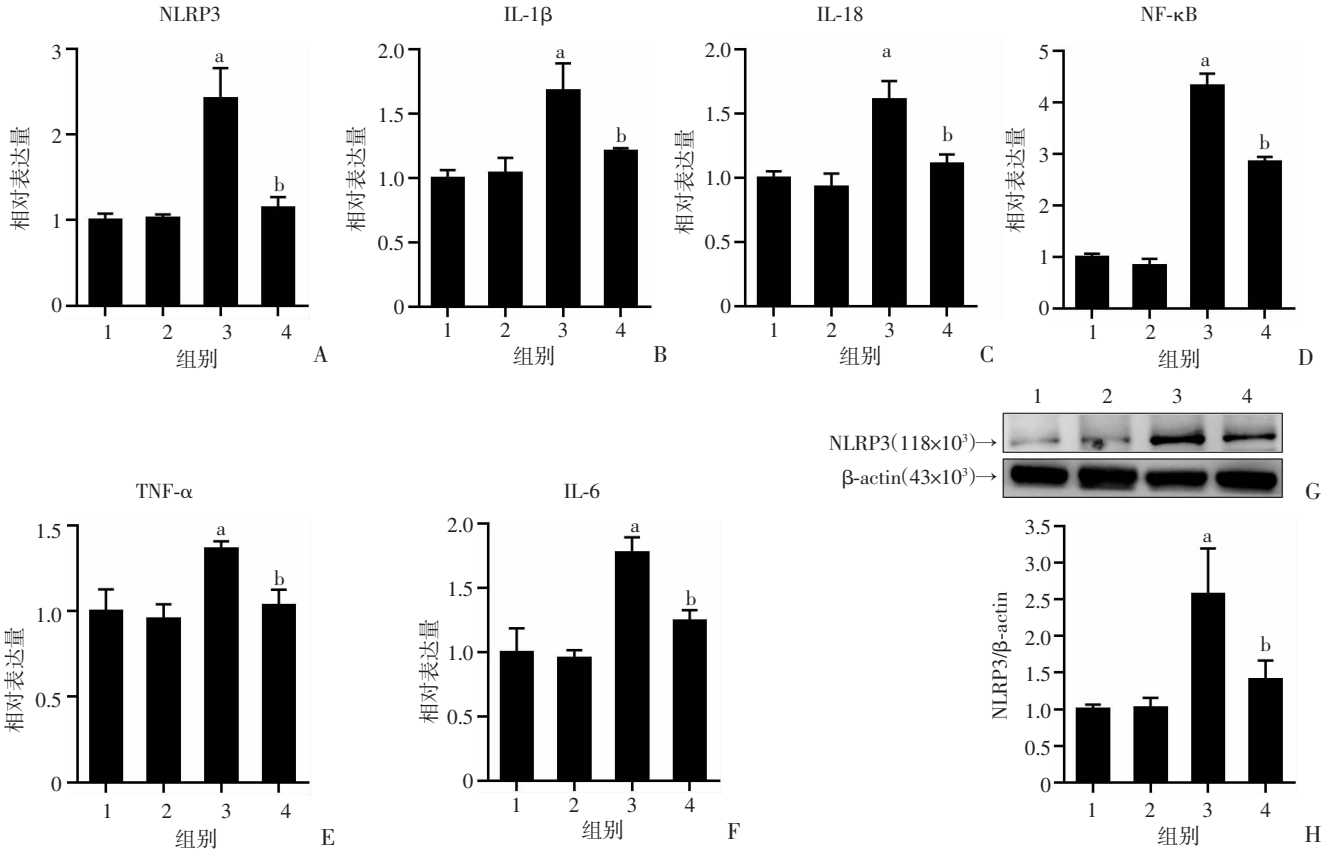
结果显示:与 C57+Veh 组小鼠相比,BTBR+Veh 组中 NLRP3、IL-1β、IL-18、NF-κB、TNF-α、IL-6 mRNA 水平相对表达量显著增加,给予番茄红素干预后,BTBR+Lyc 组的表达量显著降低($P<0.05$,图 5A~F);BTBR+Veh 组中 NLRP3 蛋白表达量与 C57+Veh 组相比显著增加,给予番茄红素干预后,BTBR+Lyc 组显著下降($P<0.05$,图 5G、H)。表明番茄红素可以降低 BTBR 小鼠海马组织中 NLRP3 炎症小体以及 IL-1β、IL-18、NF-κB、TNF-α、IL-6 水平。



1：C57+Veh；2：C57+Lcy；3：BTBR+Veh；4:BTBR+Lyc　a：$P<0.05$,与 C57+Veh 组比较

A:代表性热图　显示 4 组小鼠在新旧物体识别中探索物体的时间,“N”“O”分别表示新、旧物体;B~D 分别为新物体识别系数、正确轮替比例、筑巢得分分析

图 4　番茄红素治疗后对 BTBR 小鼠短期记忆缺陷的影响　($n=8,\bar{x}\pm s$)



1：C57+Veh；2：C57+Lcy；3：BTBR+Veh；4:BTBR+Lyc　a：$P<0.05$,与 C57+Veh 组比较；b：$P<0.05$,与 BTBR+Veh 组比较

A~F 分别为海马组织中 NLRP3、IL-1β、IL-18、NF-κB、TNF-α、IL-6 mRNA 表达;G、H:Western blot 检测 NLRP3 表达及定量分析

图 5　番茄红素治疗后对 BTBR 小鼠海马组织中炎症细胞因子的影响　($n=3,\bar{x}\pm s$)

3 讨论

自闭症又称孤独症谱系障碍,是一种影响沟通、社会互动和行为的神经发育障碍疾病。患者可能会在学习记忆、社会互动和行为方面遇到困难,还与焦虑、抑郁和其他心理健康问题联系密切。与此同时,患者及家属还面临与治疗药物和其他干预措施相关的经济负担[21]。而 ASD 的患病率逐年增长,却仍没有治愈方法。因此,探索 ASD 的药物防治措施刻不容缓。

番茄红素是从番茄、西瓜和木瓜中提取的类胡萝卜素,具有较强的抗氧化、抗炎和抗增殖活性。研究表明,番茄红素通过抑制氧化应激、神经炎症、神经元凋亡、恢复线粒体功能等对神经系统疾病有保护作用[22-24]。因此,本研究以 BTBR 自闭小鼠为研究模型,通过番茄红素干预后,检测番茄红素对成年期 BTBR 自闭小鼠模型的自闭行为的作用效果,并探索其可能的作用机制,以期为自闭症患者提供一种潜在的临床治疗方案。结果显示,和 BTBR+Veh 组比较,BTBR+Lyc 组能够显著提高 BTBR 小鼠的三箱社交能力,表现出对陌生小鼠的好奇。雌雄小鼠的交互行为,番茄红素治疗后 BTBR 小鼠在鼻-生殖器的嗅探时间有增加趋势,但没有能够达到统计学差异。在开场实验中,BTBR 小鼠在 30 min 内的总运动距离与 C57 小鼠相比显著增多,番茄红素治疗后没有改变这种差异。同时,番茄红素能够降低 BTBR 小鼠理毛时间和埋珠数量,表明对小鼠重复刻板行为有改善效果。对于 BTBR 小鼠短期记忆缺陷番茄红素干预之后没有改善效果,在筑巢得分,正确轮替比例上 4 组之间没有差异。

与此同时,自闭症与精神疾病和非精神疾病共病有关,包括免疫改变,如外周血免疫细胞产生的促炎细胞因子增加[25]。相关研究表明,ASD 患者一生中表现出炎症状态和免疫异常的改变[3],在免疫系统改变的情况下,炎症因子的产生打破生理平衡,直接或间接对部分行为产生有害影响[25]。NLRP3 炎症小体是先天免疫系统的组成部分,可启动细胞死亡的炎症形式和促炎细胞因子的产生[6]。因此,当 NLRP3 炎症小体的形成,会导致包括 IL-1β 和 IL-18 在内的生物活性细胞因子的裂解和释放[26-28]。另外 NF-κB、TNF-α 和 IL-6 炎症因子对炎症水平的升高发挥重要作用。有研究结果表明 NLRP3 炎症小体以及炎性细胞因子可能是自闭症谱系障碍中社会缺陷和重复行为的潜在生物标志物和治疗靶点[29]。

本实验室前期研究报道了 BTBR 小鼠海马脑区的部分炎性细胞因子表达升高,如 IL-18、IL-1β、IL-6、TNF-α 和 NF-κB[30]。本研究结果显示,在 BTBR 小鼠海马中,上述细胞因子升高,与之前的研究结论一致。同时番茄红素可以降低 BTBR 小鼠海马的炎症水平,其作用效果和番茄红素在其他动物模型上的结论一致。例如番茄红素通过参与抗氧化、抗炎等多种生物活性,减轻丙酸诱导的学习记忆障碍和氧化损伤[31];抑制 NF-κB 信号减轻阿尔茨海默病大鼠早期脉络丛炎症反应[32],这些研究和本研究结果提示,降低海马炎症水平可能是番茄红素改善 BTBR 小鼠自闭表型的机制之一。同时,自闭症与神经发生缺陷的相关性研究虽然取得了重大进展,但仍没有直接证据证明番茄红素与神经发生的关系。因此后期将对这一点进行研究。综上,番茄红素对神经系统疾病和自闭症的潜在治疗作用可能是多因素的,可能涉及多个通路和过程的调节,还需要持续的研究来充分了解番茄红素在这些影响因素下的作用机制,并确定最佳剂量及治疗方案。

番茄红素具有安全,廉价的特点,但目前尚未有用于自闭症的临床研究报道,如果能够明确番茄红素改善自闭症的作用靶点,将是一种潜在的药物选择,从而改善患者的症状,减轻患者以及社会的负担。

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] VARGAS D L, NASCIMBENE C, KRISHNAN C, *et al*. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism[J]. Ann Neurol, 2005, 57(1): 67-81. DOI: 10.1002/ana.20315.

[3] LI X H, CHAUHAN A, SHEIKH A M, *et al*. Elevated immune response in the brain of autistic patients[J]. J Neuroimmunol, 2009, 207(1/2): 111-116. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2008.12.002.

[4] MCCUSKER R H, KELLEY K W. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior[J]. J Exp Biol, 2013, 216(Pt 1): 84-98. DOI: 10.1242/jeb.073411.

[5] SARESELLA M, PIANCONE F, MARVENTANO I, *et al*.

Multiple inflammasome complexes are activated in autistic spectrum disorders[J]. Brain Behav Immun, 2016, 57: 125-133. DOI: 10.1016/j.bbi.2016.03.009.

[6] YANG Y, WANG H N, KOUADIR M, *et al*. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2): 128. DOI: 10.1038/s41419-019-1413-8.

[7] BARNEA-GORALY N, FRAZIER T W, PIACENZA L, *et al*. A preliminary longitudinal volumetric MRI study of amygdala and hippocampal volumes in autism[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2014, 48: 124-128. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2013.09.010.

[8] 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.

[9] 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.

[10] MOIENI M, EISENBERGER N I. Effects of inflammation on social processes and implications for health[J]. Ann NY Acad Sci, 2018, 1428(1): 5-13. DOI: 10.1111/nyas.13864.

[11] GRABOWSKA M, WAWRZYNIAK D, ROLLE K, *et al*. Let food be your medicine: nutraceutical properties of lycopene[J]. Food Funct, 2019, 10(6): 3090-3102. DOI: 10.1039/c9fo00580c.

[12] DAI X Y, ZHAO Y, GE J, *et al*. Lycopene attenuates di(2-ethylhexyl) phthalate-induced mitophagy in spleen by regulating the sirtuin3-mediated pathway[J]. Food Funct, 2021, 12(10): 4582-4590. DOI: 10.1039/d0fo03277h.

[13] DAI X Y, ZHU S Y, LI M Z, *et al*. Potential role of lycopene in the inhibition of di(2-ethylhexyl) phthalate-induced ferroptosis in spleen via modulation of iron ion homeostasis[J]. ACS Pharmacol Transl Sci, 2021, 4(1): 386-395. DOI: 10.1021/acsptsci.1c00001.

[14] JOHNSON E J, VISHWANATHAN R, JOHNSON M A, *et al*. Relationship between serum and brain carotenoids, α-tocopherol, and retinol concentrations and cognitive performance in the oldest old from the *Georgia* centenarian study[J]. J Aging Res, 2013, 2013: 951786. DOI: 10.1155/2013/951786.

[15] LIU C B, WANG R, YI Y F, *et al*. Lycopene mitigates β-amyloid induced inflammatory response and inhibits NF-κB signaling at the choroid plexus in early stages of Alzheimer's disease rats[J]. J Nutr Biochem, 2018, 53: 66-71. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2017.10.014.

[16] PREMA A, JANAKIRAMAN U, MANIVASAGAM T, *et al*. Neuroprotective effect of lycopene against MPTP induced experimental Parkinson's disease in mice[J]. Neurosci Lett, 2015, 599: 12-19. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.05.024.

[17] SANDHIR R, MEHROTRA A, KAMBOJ S S. Lycopene prevents 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial oxidative stress and dysfunctions in nervous system[J]. Neurochem Int, 2010, 57(5): 579-587. DOI: 10.1016/j.neuint.2010.07.005.

[18] BHARDWAJ M, KUMAR A. Neuroprotective effect of lycopene against PTZ-induced kindling seizures in mice: possible behavioural, biochemical and mitochondrial dysfunction[J]. Phytother Res, 2016, 30(2): 306-313. DOI: 10.1002/ptr.5533.

[19] ZHANG F, FU Y Y, ZHOU X Y, *et al*. Depression-like behaviors and heme oxygenase-1 are regulated by lycopene in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation[J]. J Neuroimmunol, 2016, 298: 1-8. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2016.06.001.

[20] ONORE C E, CAREAGA M, BABINEAU B A, *et al*. Inflammatory macrophage phenotype in BTBR T+tf/J mice[J]. Front Neurosci, 2013, 7: 158. DOI: 10.3389/fnins.2013.00158.

[21] HOMBERG JR, KYZAR EJ, NGUYEN M, *et al*. Understanding autism and other neurodevelopmental disorders through experimental translational neurobehavioral models[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2016, 65: 292-312. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2016.03.013.

[22] ZHU N W, YIN X L, LIN R, *et al*. Possible mechanisms of lycopene amelioration of learning and memory impairment in rats with vascular dementia[J]. Neural Regen Res, 2020, 15(2): 332-341. DOI: 10.4103/1673-5374.265565.

[23] CROWE-WHITE K M, PHILLIPS T A, ELLIS A C. Lycopene and cognitive function[J]. J Nutr Sci, 2019, 8: e20. DOI: 10.1017/jns.2019.16.

[24] PAUL R, MAZUMDER M K, NATH J, *et al*. Lycopene—A pleiotropic neuroprotective nutraceutical: Deciphering its therapeutic potentials in broad spectrum neurological disorders[J]. Neurochem Int, 2020, 140: 104823. DOI: 10.1016/j.neuint.2020.104823.

[25] ASHWOOD P, WAKEFIELD AJ. Immune activation of peripheral blood and mucosal CD3+ lymphocyte cytokine

profiles in children with autism and gastrointestinal symptoms [J]. J Neuroimmunol, 2006, 173(1/2): 126-134. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2005.12.007.

[26] AGOSTINI L, MARTINON F, BURNS K, *et al*. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder [J]. Immunity, 2004, 20(3): 319-325. DOI: 10.1016/s1074-7613(04)00046-9.

[27] MARTINON F, AGOSTINI L, MEYLAN E, *et al*. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome[J]. Curr Biol, 2004, 14(21): 1929-1934. DOI: 10.1016/j.cub.2004.10.027.

[28] MARTINON F, TSCHOPP J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases[J]. Cell, 2004, 117(5): 561-574. DOI: 10.1016/j.cell.2004.05.004.

[29] SZABÓ D, TOD P, GÖLÖNCSÉR F, *et al*. Maternal P2X7 receptor inhibition prevents autism-like phenotype in male mouse offspring through the NLRP3-IL-1β pathway [J]. Brain Behav Immun, 2022, 101: 318-332. DOI: 10.1016/j.bbi.2022.01.015.

[30] ZHANG R, CAI Y, 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.

[31] Erten F. Lycopene ameliorates propionic acid-induced autism spectrum disorders by inhibiting inflammation and oxidative stress in rats[J]. J Food Biochem. 2021 Oct;45(10): e13922. DOI: 10.1111/jfbc.13922.

[32] SACHDEVA AK, CHOPRA K. Lycopene abrogates Aβ(1-42)-mediated neuroinflammatory cascade in an experimental model of Alzheimer's disease[J]. J Nutr Biochem, 2015, 26(7): 736-744. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2015.01.012.

(收稿:2023-02-06;修回:2023-03-01)

(编辑 吴培红)