

# 一种 PTEN 基因下调的孤独症幼鼠模型构建的改良方法

党伟利<sup>1,2</sup>, 梁绿圆<sup>1,2</sup>, 曹佳蕾<sup>1,2</sup>, 丁申奥<sup>1,2</sup>, 魏炳琦<sup>1,2</sup>, 邱霞<sup>1,2</sup>, 马丙祥<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 河南中医药大学第一附属医院儿科医院, 郑州 450099; <sup>2</sup> 河南中医药大学儿科医学院, 郑州 450046)

**摘要** 目的 构建一种丙戊酸(VPA)和PTEN腺病毒(ADV)联合应用的PTEN基因下调ASD幼鼠模型(VPA-ADV),并与VPA和ADV两种传统模型进行比较,证明此模型在针刺治疗ASD造模的优势。**方法** 将怀孕12.5 d的Wistar大鼠随机分为2组,分别给予VPA(600 mg/kg)和等剂量的生理盐水作为VPA和正常组。记录新生幼鼠体质量、睁眼时间、尾巴畸形情况。正常组幼鼠随机分为3组,每组10只,设置为:正常(NS)组、病毒(ADV)组、病毒阴性对照(ADV-NC)组;VPA组幼鼠20只,随机分为2组,每组10只,设置为丙戊酸(VPA)组、丙戊酸结合病毒干扰(VPA+ADV)组。观察5组幼鼠出生后的体质量、尾长、弯尾、负趋地性反射时间、骨骼畸形情况、21日龄神经行为学表现、脑组织电镜髓鞘结构;通过免疫组化、Western blot、q-PCR方法检测PTEN、PI3K、AKT、GSK3 $\beta$ 、MBP表达水平。**结果** 与NS组孕鼠活产幼鼠对比,VPA组孕鼠活产幼鼠畸形率显著增加,体质量增长慢,尾长增长慢,负趋地性反射时间长( $P < 0.05$ )。3个模型组较NS组体重增长慢,尾长增长慢,负趋地性反射时间长( $P < 0.05$ ),且VPA+ADV组表现最为显著。3组模型旷场试验跨中央格时间、跨边缘格次数、跨边缘格时间与NS组差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。自我捋毛实验中VPA+ADV组互动次数最少( $P < 0.05$ ),且挖掘、自我捋毛次数最多( $P < 0.05$ )。三箱社交实验中,VPA+ADV组进入社交箱平均次数以及停留时间最短( $P < 0.05$ ),其在水迷宫实验中找到平台所用的时间越长、穿越第三象限次数越少( $P < 0.05$ )。透射电镜观察胼胝体区髓鞘板层结构显示NS组结构清晰完整。与NS组相比,ADV-NC组髓鞘结构近似,3个模型组髓鞘结构分层、断裂,存在ASD病理改变及髓鞘损伤,其中VPA+ADV组髓鞘增厚、分层明显,严重的可见崩解。免疫组化、Western blot及q-PCR结果均表明VPA+ADV组的PTEN表达下调约50%,最为明显。AKT、MBP均表达增高,GSK3 $\beta$ 表达降低( $P < 0.05$ )。免疫组化和Western blot结果表示3个模型组与NS组PI3K表达无统计学差异,但q-PCR结果表示3个模型组的PI3K-mRNA表达显著提高( $P < 0.05$ ),其中VPA+ADV组变化最为显著。**结论** VPA+ADV新型PTEN-ASD模型更符合ASD髓鞘发育异常的表现,且较2种传统模型有着造模价格低、活产率高、PTEN基因下调明显的优势。

**关键词** PTEN;孤独症;动物模型;丙戊酸

**中图分类号** Q 95-33

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2025)03-0462-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.03.011

2024-12-10 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81973904);河南省特色骨干学科中医学学科建设项目(编号:STG-ZYX06-202144、STG-ZYXKY-2020023);2023年度河南省中医学“双一流”创建科学研究专项课题(编号:HSRP-DFCTCM-2023-2-08、HSRP-DFCTCM-2023-3-06、HSRP-DFCTCM-2023-05-08);河南省中医药科学研究专项课题(编号:2023ZY2057、2021ZY2111)

作者简介:党伟利,女,副主任医师,硕士生导师;

马丙祥,男,主任医师,教授,通信作者,E-mail:mbx1963@126.com

孤独症谱系障碍(autistic disorder, ASD),简称孤独症,又称自闭症,其病因中遗传因素约占50%,多基因遗传约占50%,单基因突变或拷贝数变异约占10%<sup>[1]</sup>,这表明临床表型的异质性是多种遗传结构变异累加的结果,单个基因仅发挥较小的风险因素。尽管单基因仅占病因的一小部分,但单基因突变为寻找ASD的病因提供了新的起点。磷酸酶和张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog gene, PTEN)作为ASD的风险基因之一,越来越受到重视。PTEN蛋白是ASD相关基因产物信号网络

cells, ROS might play a more significant role in mediating the apoptosis and autophagy induced by usnic acid in NCI-H358 cells.

**Key words** usnic acid; A549; NCI-H358; cell cycle; ROS; apoptosis; autophagy

**Fund program** Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 2020LH08006)

**Corresponding author** Liu Jinlong, E-mail: liujinlongxx@163.com

的一部分,已被认为是 ASD 和相关神经发育障碍的常见潜在病因<sup>[2-4]</sup>。巨头畸形的 ASD 患者的 PTEN 基因突变更为常见,突变率约为 2% ~ 20%<sup>[5]</sup>。PTEN 在 ASD 脑组织中异常表达,通过磷酸化调控与受体结合来导致孤独症产生<sup>[6]</sup>。PTEN 是轴突髓鞘化关键上游调控因子,通过 PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  信号通路影响 ASD 神经行为功能<sup>[7]</sup>。轴突髓鞘异常是 ASD 发生的病理生理学基础,髓鞘结构改变是 ASD 的神经病理学标志<sup>[8]</sup>。该研究在孕鼠腹腔注射丙戊酸(valproic acid, VPA)方法基础上,结合 AD-PTEN-shRNA 基因干扰技术,构建 PTEN 基因下调的 ASD 幼鼠模型(VPA-ASD),与 VPA、ADV 诱导的 ASD 经典动物模型分别对照,并检测 PTEN 基因下调情况及 PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  和 MBP 表达以鉴定和评价模型,如下表 1 所示。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 成年 Wistar 大鼠雌性(200 ~ 250 g)12 只,雄性(300 ~ 350 g)12 只,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,合格证: SCXK(鲁)20190003。河南中医药大学伦理实验动物伦理委员会批准编号:DWLL202109005。

**1.2 实验药物及仪器** 注射用丙戊酸钠(德巴金),0.4 g/支,赛诺菲(杭州)制药有限公司生产,批号:0J6151。RIPA(强)裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);SDS 凝胶配制试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);电镜固定液(武汉 Servicebio 公司)。

**1.3 仪器** 水迷宫装置及视频分析系统(上海欣

软信息科技有限公司);酶标仪(北京普朗生物科技有限公司);SDS-PAGE 凝胶电泳电转槽(上海天能科技有限公司);曝光仪(美国 Bio-Rad 公司);离心机(德国 Eppendorf 公司),透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司)。

## 1.4 方法

**1.4.1 VPA 溶液配制** 注射用丙戊酸钠 0.25 g 溶于 100 mL 生理盐水配成浓度 250 mg/mL 溶液。

**1.4.2 动物模型的制备** 清洁级成年 Wistar 大鼠雌性 12 只,雄性 12 只,适应环境 1 周。雌雄大鼠按 1:1 比例合笼,雌鼠阴道脱落细胞涂片检测到精子记为受孕第 0 天。孕第 12.5 天时,将受孕雌鼠随机分为 VPA 组 8 只和正常组 4 只,VPA 组孕鼠单次腹腔注射 600 mg/kg 丙戊酸钠,正常组腹腔注射等体积的生理盐水。随机选取正常组幼鼠 30 只,分为正常(NS)组、病毒(ADV)模型组和病毒对照(ADV-NC)组,每组 10 只;随机选取 VPA 组幼鼠 20 只,随机分为 VPA 模型组和 VPA + ADV 组,每组 10 只。

ADV 组为出生后第 1 天,幼鼠乙醚麻醉后,俯卧位固定于手术台,头部备皮,用脑立体定位仪固定头部,消毒,将钻孔器定位于左侧脑室,脑室注射坐标:(X, Y) = (1.5, 1.1) mm 深度约为 2.5 mm,用 5  $\mu$ L 尖头注射器缓慢注射 shRNA-PTEN 腺病毒 2  $\mu$ L,保留 2 min 后退出注射器,局部消毒,每只幼鼠注射 1 次。ADV-NC 组为侧脑室注射同等剂量的 AD-PTEN-shRNA 2  $\mu$ L 作为阴性对照。VPA + ADV 组为 VPA 组幼鼠出生后第 1 天,按照 ADV 组方法处理。

**1.4.3 大鼠 PTEN 基因沉默腺病毒制备** 为了在小鼠体内干扰 PTEN 的表达,使用基于人腺病毒 5 型(Ad5)的携带 PTEN 的异性 shRNA 的纯化腺病毒

表 1 PTEN 基因下调的 ASD 幼鼠动物模型建立、比较与鉴定

Tab.1 Establishment, comparison and identification of animal models of autism with down-regulated PTEN gene

Model	Name	Method	Advantage	Disadvantage
Ideal Model	PTEN conditional knockout mouse model (PTEN-CKO)	Tissue-specific Cre tool mice were mated to obtain PTEN homozygous deletion mice <sup>[9]</sup>	①PTEN germline mutation ②PTEN was down-regulated by 50%	High in price
Model 1	ADV Model	Postnatal intracerebroventricular injection of adenovirus <sup>[10]</sup>	①Virus sequence can be verified repeatedly ②PTEN down-regulated ③Lower in price	Non-PTEN germline mutation
Model 2	VPA Model	Valproic acid (VPA) was injected intraperitoneally at 12.5 days of gestation <sup>[11]</sup>	①PTEN germline mutation ②Cheap price, high live production rate	PTEN was down-regulated by 30%
Constructed Model	VPA-ADV Model	Model 1 combined with Model 2	①Cheaper price, high live birth rate ②PTEN was down-regulated by 50%	

(AD-PTEN-shRNA, 上海汉恒生物科技有限公司), 该病毒使用干扰腺病毒穿梭质粒 pAdEasy-U6-CMV-EGFP, 使用 AdEasy 系统包装。将 shRNA 与穿梭质粒相连接, 进一步转化、鉴定和抽提后, 使用含有腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 的 *E. coli* BJ5183 感受态细胞进行腺病毒载体重组, 并在 293A 中包装。经纯化后的腺病毒滴度为, HBAD-Adeasy-r-PTEN shRNA1-EGFP  $6.0 \times 10^{11}$  PFU/ml, HBAD-EGFP NC 对照  $6.0 \times 10^{11}$  PFU/mL。插入 shRNA 序列如下:

Top strand: GATCCGTTCTCCGAACGTGTCACG-TAATTCAAGAGATTACGTGACACGTTCCGAGAATT-TTTTC

Bottom strand: AATTGAAAAAATTCTCCGAACG-TGTCACGTAATCTCTTGAATTACGTGACACGTTCCG-AGAACC

shRNA 序列插入的酶切位点为: Xho I, Hind III。

## 1.5 实验指标检测

**1.5.1 常规观察** 观察并记录 VPA 组和 NS 组孕鼠孕期天数, 所产幼鼠活产数目; 2 组幼鼠出生后 7、14、21 日龄的体质量、尾长、弯尾、负趋地性反射、骨骼畸形情况。

**1.5.2 幼鼠脑组织切片透射电镜观察** 21 日龄幼鼠每组随机取 3 只幼鼠, 乙醚麻醉, 仰卧位固定于手术台, 取出大脑, 置于冰盒上, 取胼胝体区髓鞘分布密集部位组织保存于电镜固定液中, 用于透射电镜实验。

**1.5.3 幼鼠神经行为学检测** 21 日龄 5 组幼鼠各 10 只分别进行 3 箱社交实验、旷场实验、自我捋毛实验和水迷宫实验的观察。

**1.5.4 免疫组化标本制备及检测** 21 日龄幼鼠每组随机取 3 只幼鼠, 乙醚麻醉, 取出大脑, 置于冰盒上, 取海马区组织保存于 4% 多聚甲醛中做免疫组化实验。

**1.5.5 Western blot 检测** 21 日龄幼鼠每组随机取 3 只幼鼠, 乙醚麻醉, 取出大脑, 置于冰盒上, 取中间部分脑组织。

**1.5.6 qRT-PCR 检测** 21 日龄幼鼠每组随机取 3 只幼鼠, 乙醚麻醉, 取出大脑, 置于冰盒上, 取中间部分脑组织, 其余部分分别装于无 RNA 酶 1.5 mL EPP管和普通灭菌 2 mL EPP 管用于荧光定量 PCR 检测脑组织中 PTEN、PI3K、AKT、GSK3 $\beta$ 、MBP mRNA 相对表达量。

**1.6 统计学处理** 运用 SPSS 26.0 软件包进行数

据分析, 分析孕鼠孕期天数、活产幼鼠数目、尾长、负趋地性反射时间、弯尾及骨骼畸形, 及生后 7、14、21 日龄体质量, 计量资料数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。随机设计试验中的两组独立样本均数比较, 计数资料应满足正态分布、方差齐性的检验, 分析采用独立样本 *t* 检验, 若不满足方差齐性, 可用校正 *t* 检验。多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时整体的比较采用 *F* 检验, 多重比较采用 Bonferroni 法; 方差不齐时采用 Welch 近似 *F* 检验, 多重比较采用 Dunnett's T3 法。检验水准  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 孕鼠分娩及出生情况** 经过合笼后共 8 只雌鼠成功受孕并均于 22 d 娩出幼鼠, 未见早产, 其中 3 只雌鼠活产共计 32 只 NS 组幼鼠, 无流产及死产。另外 5 只雌鼠共计生产 56 只 VPA 组幼鼠, 其中死产 5 只, 死产占比 8.9%; 活产 51 只, 弯尾畸形率 62.7%、骨骼畸形率 37.2%、多重畸形率 23.5%, 见图 1。

**2.2 活产幼鼠生长发育情况** 与 NS 组孕鼠活产幼鼠对比, VPA 组孕鼠活产幼鼠体质量轻、体质量增长慢(图 2A), 尾长短、尾长增长慢(图 2B)、负趋地性反射时间长( $P < 0.05$ )(图 2C), 反映出各组幼鼠体质有所差异, 在 VPA 药物影响作用下, 幼鼠体质较弱, 生长发育迟缓, 行动缓慢。

**2.3 组幼鼠生长发育情况** 与 NS 组幼鼠对比, 3 个模型组幼鼠体重轻、体质量增长慢(图 3A), 尾长短、尾长增长慢(图 3B)、7 日龄、14 日龄和 21 日龄负趋地性反射时间长( $P < 0.05$ ), 说明随着个体发育, 运动灵活性差异逐渐减弱(图 3C), 反映出各组幼鼠体质有所差异, 3 组模型幼鼠体质较弱, 生长发育迟缓, 行动缓慢, VPA + ADV 组表现最为显著。

### 2.4 幼鼠神经行为学检测结果

**2.4.1 不同模型下幼鼠旷场试验比较** 应用不同造模方法后结果见图 4, 与 NS 组幼鼠比较, 3 组模型旷场试验跨中央格时间、跨边缘格次数、跨边缘格时间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.4.2 不同模型下幼鼠自我捋毛试验** 自我捋毛试验中, 不同造模方法其自我捋毛次数是不同的, 分析实验数据对比显示, VPA + ADV 组互动次数最少( $P < 0.05$ ), 且挖掘、自我捋毛次数最多( $P < 0.05$ ), 说明 VPA + ADV 组幼鼠刻板行为最明显。见图 5。



图1 孕鼠活产幼鼠出生情况

Fig. 1 Comparison of curved tail and skeletal deformities in pregnant rats with live births

A: Crooked tail deformity; B: Skeletal deformities; C: Multiple deformities; D: teratological rate.

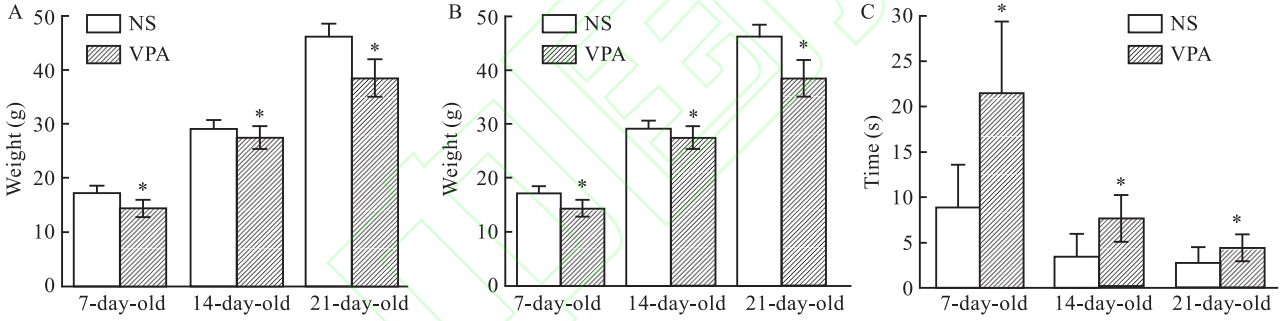
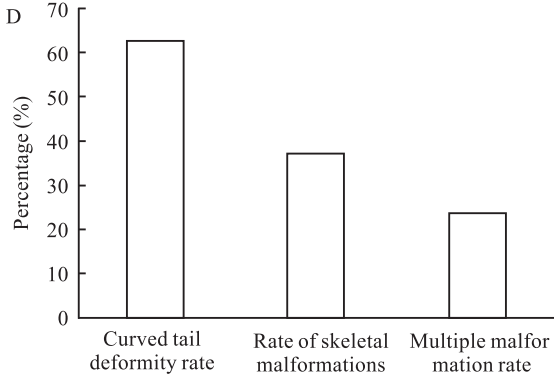


图2 活产幼鼠生长发育情况

Fig. 2 Growth and development of live birth rats

A: Weight comparison of live-born juvenile mice; B: Comparison of tail lengths of juvenile mice; C: Comparison of land-tendency in live-born juvenile mice; \*  $P < 0.05$  vs NS group.

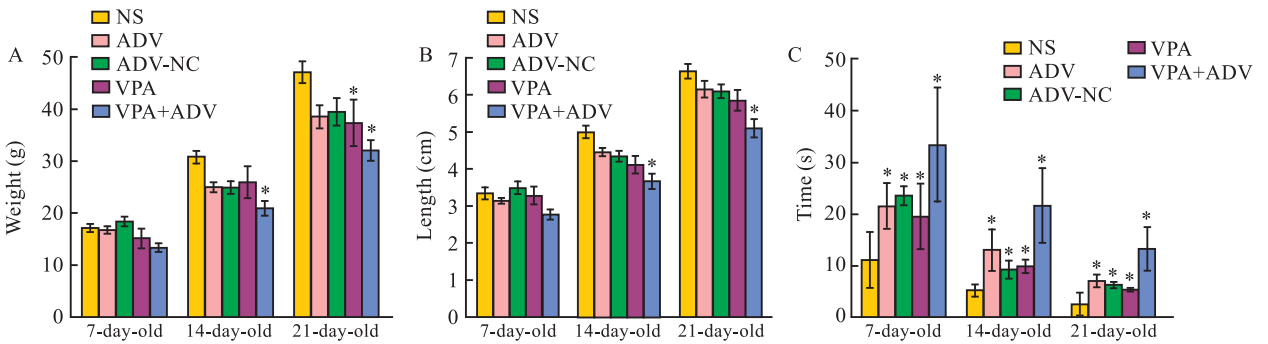


图3 5组幼鼠生长发育情况

Fig. 3 The growth and development of five groups of young rats

A: Weight comparison of juvenile mice; B: Tail length comparison of juvenile mice; C: Comparison of land-tendency in juvenile mice; \*  $P < 0.05$  vs NS group.

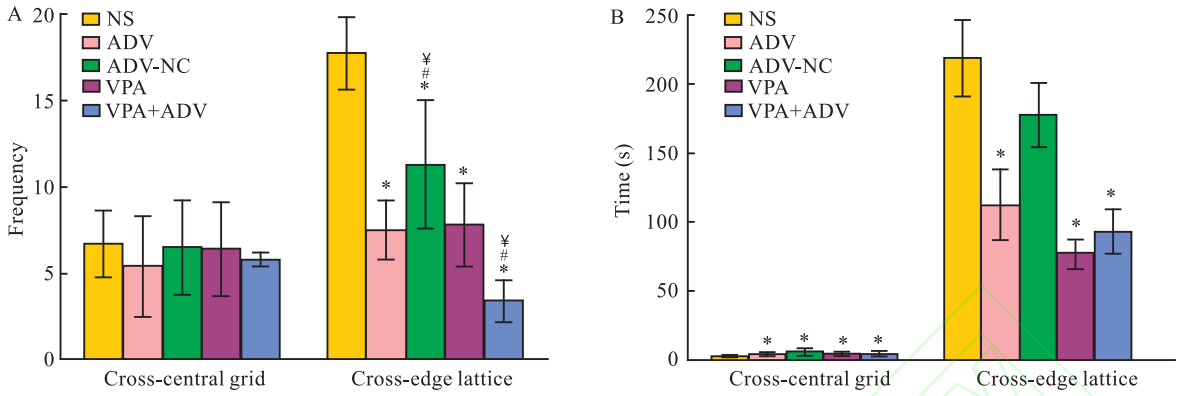


图4 旷场试验比较

Fig. 4 Comparison of open field trials

A: Open field trial 1; B: Open field trial 2; \*  $P < 0.05$  vs NS group; #  $P < 0.05$  vs ADV group; ¥  $P < 0.05$  vs VPA group.

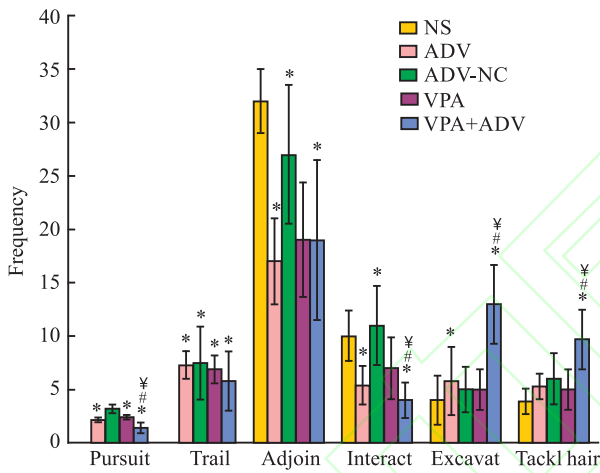


图5 自我捋毛试验比较

Fig. 5 Comparison of self-grooming test

\*  $P < 0.05$  vs NS group; #  $P < 0.05$  vs ADV group; ¥  $P < 0.05$  vs

VPA group.

2.4.3 不同模型下幼鼠三箱社交试验 应用三箱社交试验,对不同模型下动物的社交行为进行了检测,结果见图6,分析发现VPA + ADV组进入社交箱平均次数以及停留时间最短( $P < 0.05$ ),说明VPA + ADV组幼鼠社交障碍最明显。

2.4.4 不同模型下幼鼠水迷宫实验比较 水迷宫实验中找到平台所用的时间越长、穿越第三象限次数越少,说明其学习障碍越显著。结果见图7,几组模型对比结果发现,与NS组相比,VPA + ADV组找到平台时间最长,穿越第三象限次数最少( $P < 0.05$ ),说明VPA + ADV组存在学习记忆障碍,且相较于其它组其学习记忆障碍更明显。

2.5 幼鼠轴突髓鞘电镜结果 透射电镜观察胼胝体区髓鞘板层结构,见图8。如图所见,NS组结构清晰完整。与NS组相比,ADV-NC组髓鞘结构近

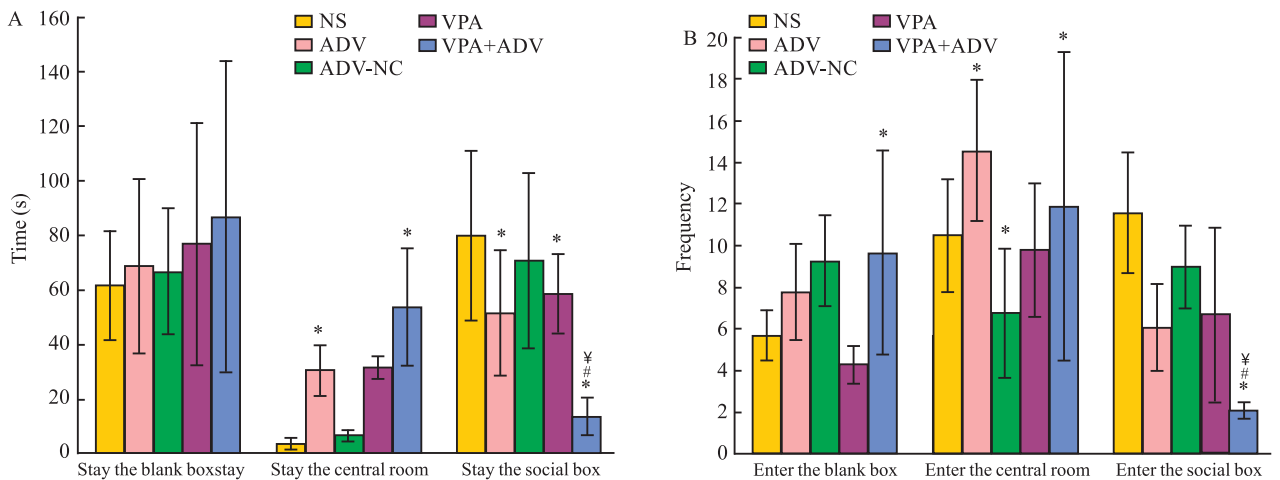


图6 三箱社交试验

Fig. 6 Three chamber sociability test (Social Behavior)

\*  $P < 0.05$  vs NS group; #  $P < 0.05$  vs ADV group; ¥  $P < 0.05$  vs VPA group.

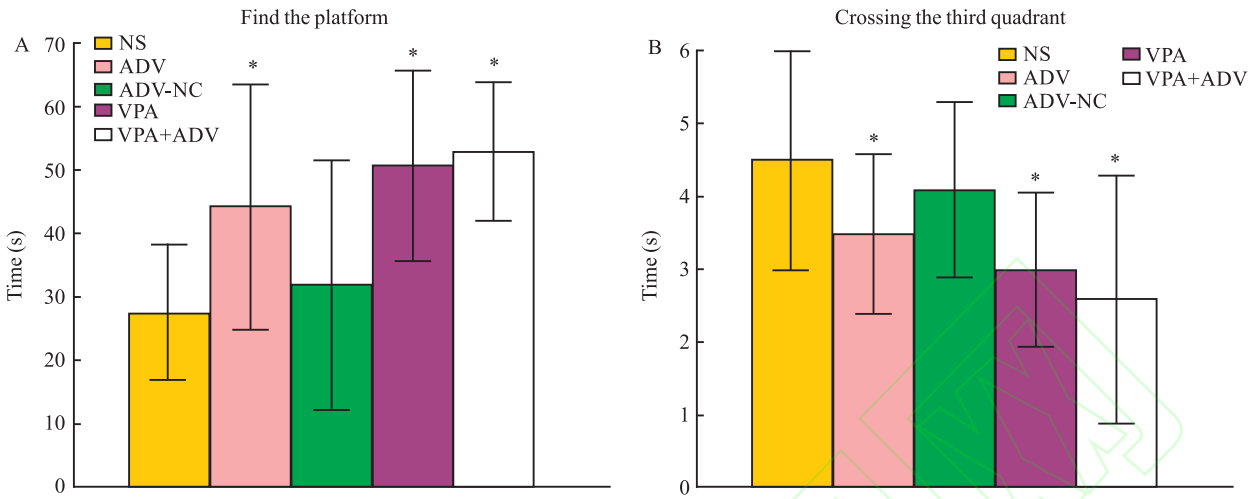


图7 水迷宫实验比较

Fig. 7 Comparison of morris water maze test

\*  $P < 0.05$  vs NS group.

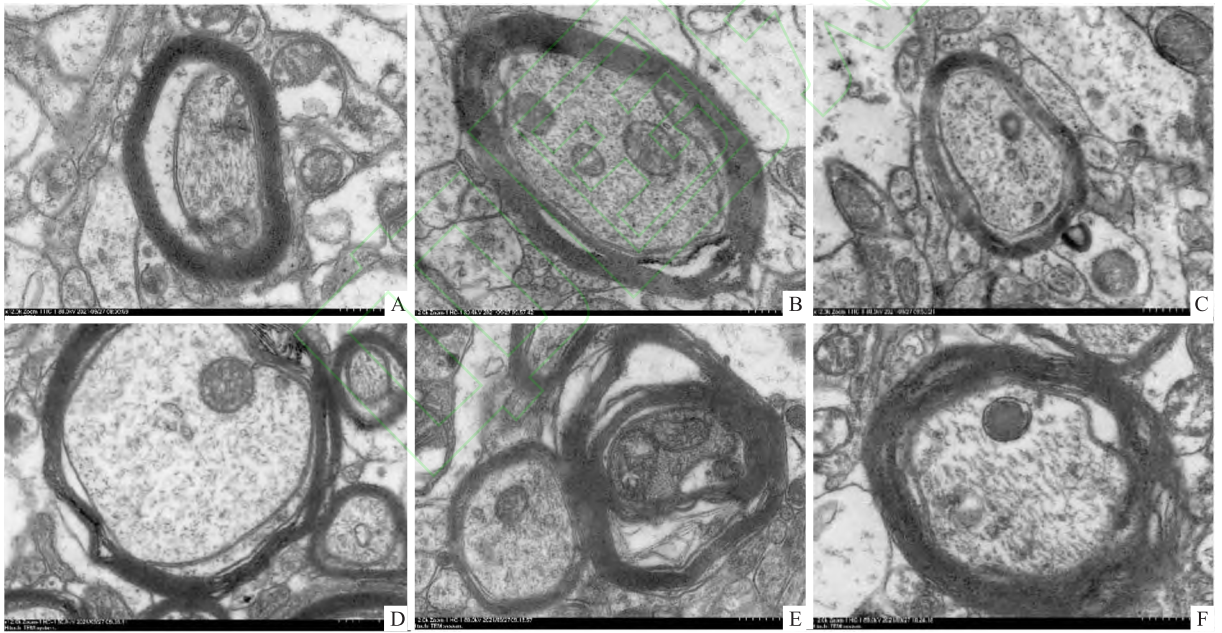


图8 髓鞘电镜图 ×500 nm

Fig. 8 Myelin sheath electron microscope ×500 nm

A: NS group; B: ADV group; C: ADV-NC group; D: VPA group; E, F: VPA + ADV group.

似,3个模型组髓鞘结构分层、断裂,存在 ASD 病理改变及髓鞘损伤,其中 VPA + ADV 组髓鞘增厚、分层明显、严重的可见崩解。

**2.6 免疫组化结果** 图9显示,与 NS 组相比,ADV-NC 组5种目标蛋白表达差异不显著,可见3个模型组 PTEN 阳性区域面积减少,VPA + ADV 组阳性区域面积最少;AKT、MBP 表达阳性区域面积增多,VPA + ADV 组阳性区域面积增多明显;VPA

组、VPA + ADV 组 GSK3β 表达降低;5 组幼鼠脑组织海马区 PI3K 表达差异不显著。

**2.7 Western blot 结果** 从图10、11可见 PTEN 蛋白表达:ADV-NC 组 PTEN 蛋白表达比 NS 组明显下降( $P < 0.05$ ),3个模型组 PTEN 表达下调,但 VPA + ADV 组下调最为显著,与正常组蛋白表达比值为 48.3%,PTEN 蛋白表达下调比例为 51.7% ( $P < 0.05$ )。AKT、MBP 蛋白表达增多,VPA + ADV 组增

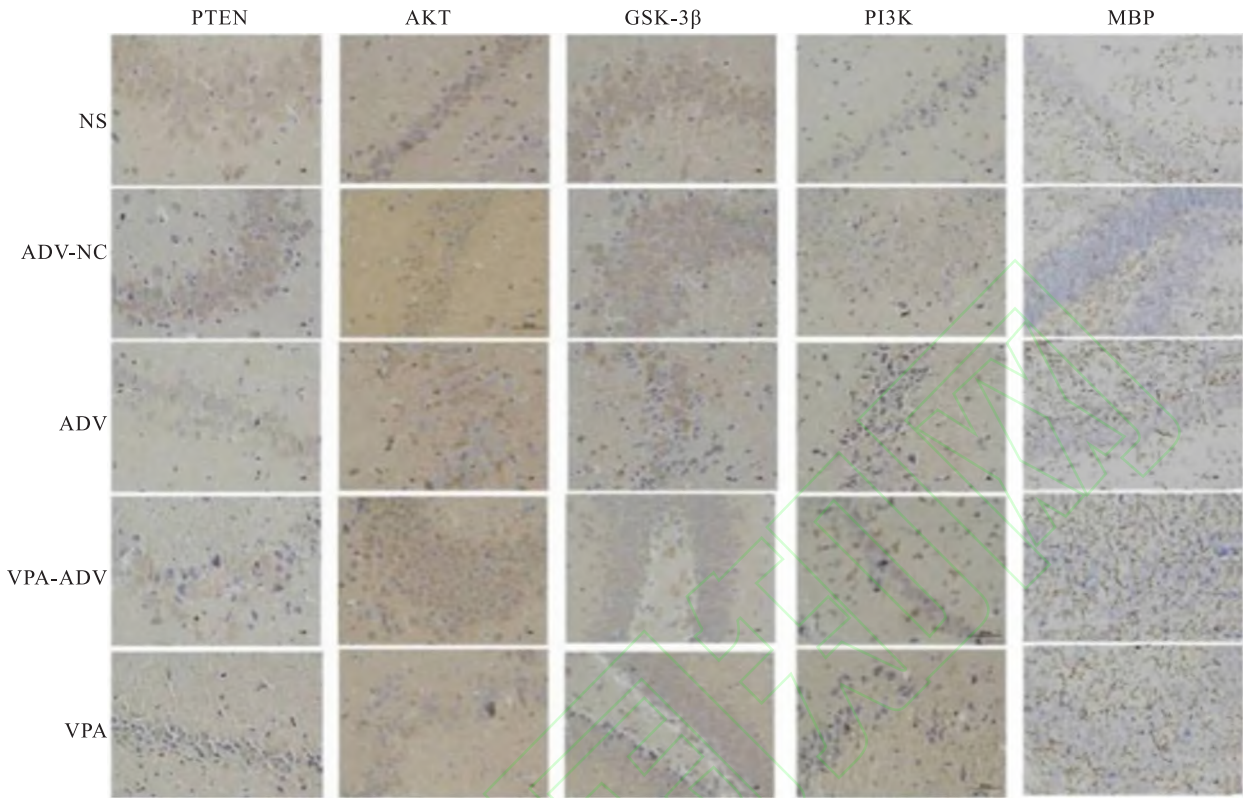


图9 各组幼鼠5种蛋白表达结果 免疫组化 ×200

Fig.9 The expression results of five proteins in each group of young rats IHC ×200

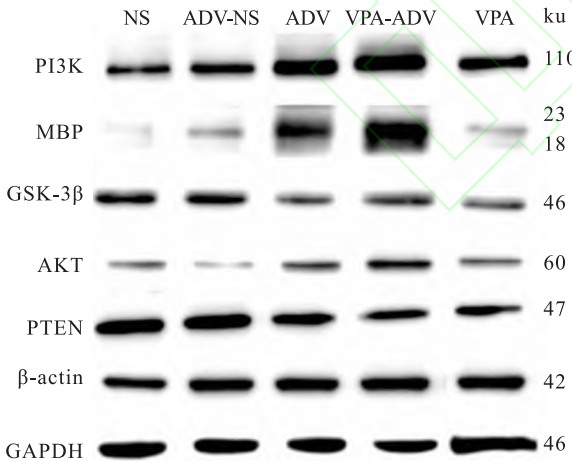


图10 Western blot 结果

Fig.10 Western blot results

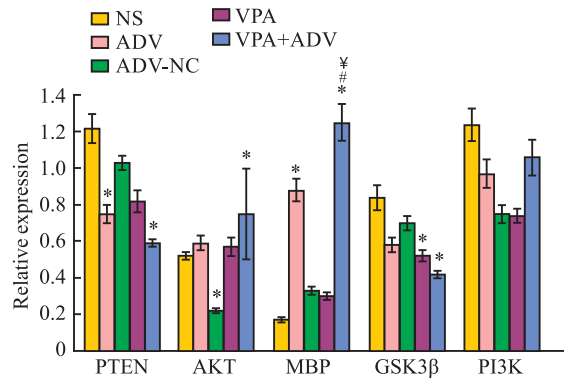


图11 5组蛋白表达水平变化

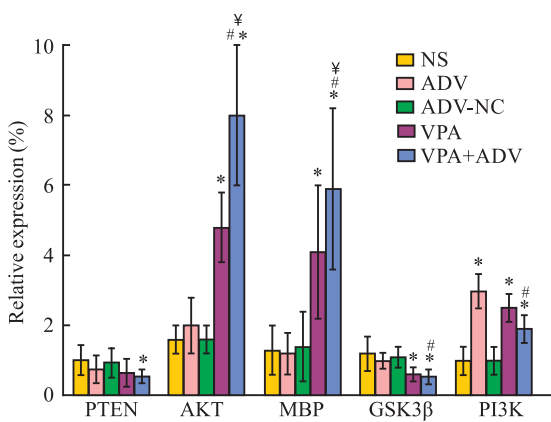
Fig. 11 Changes in protein expression levels in five groups

\*  $P < 0.05$  vs NS group; #  $P < 0.05$  vs ADV group; ¥  $P < 0.05$  vs VPA group.

多最明显,与正常组比值分别为 144.2%、735.2% ( $P < 0.05$ );VPA 组、VPA + ADV 组 GSK3 $\beta$  蛋白表达降低,与正常组蛋白表达比值分别为 61.9%、50%,VPA + ADV 组下调最为显著。PI3K 蛋白表达与正常组相比都有下调,但差异无统计学意义。

**2.8 qRT-PCR 结果** 5 组 mRNA 转录水平结果如图 12,可见PTEN 的表达,与NS组相比,ADV组、

VPA 组、VPA + ADV 组表达降低 ( $P < 0.05$ ),但 VPA + ADV 组表达 PTEN 下调最明显,约 50%。与 NS 组相比,3 个模型组 AKT、PI3K、MBP 表达均升高,但 VPA + ADV 组表达最高 ( $P < 0.05$ )。VPA 组、VPA + ADV 组 GSK3 $\beta$  表达降低,但 VPA + ADV 组表达最低 ( $P < 0.05$ )。

图 12 PTEN、PI3K、AKT、GSK3 $\beta$ 、MBP mRNA 表达Fig. 12 PTEN, PI3K, AKT, GSK3 $\beta$ , MBP mRNA expression\*  $P < 0.05$  vs NS group; #  $P < 0.05$  vs ADV group; ¥  $P < 0.05$  vs

VPA group.

### 3 讨论

将 PTEN 基因用于 ASD 相关模型的制备中,对模型进行神经细胞学、病理解剖学、电生理和行为观察的综合分析具有丰富的研究价值。但是,条件性基因敲除小鼠 (conditional knockout mice, CKO) 模型并不能完全反映 ASD 患者的情况,特定事件与 PTEN-ASD 的实际病理机制之间的关系尚不清楚,需要进一步深入研究 PTEN 相关的通路对神经元发育与功能的影响。将 PTEN 相关通路的研究结果与 VPA 在 12.5 d 给孕鼠 1 次性腹腔注射 600 mg/kg,从 CKO 模型获得的数据进行相关性分析,对于理解 ASD 的发生和优化 ASD 治疗的时间窗可能有进一步的价值。

采用 VPA 模型制作方法建立 PTEN 下调的孤独症动物模型,按照 Schneider 团队<sup>[12]</sup>的方法,使用可成功制备幼鼠孤独症模型,该方法出生的幼鼠神经行为学出现 ASD 核心症状,电镜结果显示髓鞘损伤,出现增厚、分层,甚至崩解现象,可得到经典的 VPA 致 ASD 的动物模型,但模型 PTEN 基因下调程度达到 30% ~ 40%<sup>[13]</sup>。PTEN 的纯合子缺失导致幼鼠胚胎致死,表明 PTEN 对于胚胎发育是必不可少。PTEN 条件性基因敲除小鼠模型 (PTEN-CKO),可与组织特异性 Cre 工具鼠交配,获得特定组织或细胞中 PTEN 纯合缺失小鼠,可避免全身敲除 PTEN 纯合子小鼠胚胎期死亡的问题,可用于研究 ASD 神经发生、神经胶质分化和小脑发育,由于费用昂贵其应用受到一定限制。ADV 致 PTEN 基因下调的孤

独症动物模型也在临床上使用以作为 ASD 的药物作用靶点机制研究,亦有文献<sup>[10]</sup>列举出病毒干扰序列号,具有可重复性的支持。

本部分实验采用 VPA 诱导 ASD 模型制作方法基础上结合 AD-PTEN-shRNA 基因干扰技术<sup>[10]</sup>,构建 PTEN 基因下调的 ASD 幼鼠模型,此方法是两种成熟有效的 ASD 实验动物模型的结合。本实验中,VPA 组孕鼠未见早产,活产幼鼠数目无差异,但弯尾畸形、骨骼畸形和多重畸形率高,幼鼠体质量轻、尾长短、增长缓慢,趋地性时间长,幼鼠体质较弱,生长发育迟缓,行动缓慢,VPA + ADV 组幼鼠体质较弱,生长发育迟缓,行动缓慢表现最为显著。经实验比较鉴定发现此种模型实验动物模型存活率高,建立后可测定大鼠的运动能力、动物神经行为学及病理结果。ASD 模型幼鼠表现出接触动物的社交时长及对新动物的社交兴趣均较低,异常行为学表现包括重复行为动作的增加、社会交往行为的缺乏和类似焦虑症状的出现,这些症状与人类 ASD 的临床症状相似。

髓鞘结构改变是 ASD 的神经病理学标志<sup>[10]</sup>,具有客观性和准确性,组织切片透射电镜下观察髓鞘病理改变情况,可见髓鞘增厚、局部断裂、分层、甚至崩解。研究显示 PTEN 缺失后少突胶质细胞的前体细胞出现异常增殖、迁移和分化<sup>[14]</sup>,致髓鞘合成增加<sup>[14]</sup>、髓鞘储存障碍<sup>[15]</sup>,髓鞘压实减少<sup>[16]</sup>。本实验在透射电镜观察胼胝体区髓鞘板层结构,与 NS 组相比,3 个模型组均存在 ASD 病理改变,VPA + ADV 组髓鞘损伤最明显,表现为髓鞘增厚、分层明显、严重的可见崩解,符合 ASD 典型的病理改变。PTEN 是轴突髓鞘化关键上游调控因子,通过 PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  信号通路影响 ASD 神经行为功能。PTEN 负性调控 PI3K/AKT 信号通路,激活 AKT,促凋亡的 GSK3 $\beta$  失活,导致少突胶质细胞过度增殖,MBP 表达增多,电镜观察到髓鞘增厚,结构分层、断裂或者崩解<sup>[16]</sup>。

综上所述,应用 VPA 腹腔注射孕鼠结合 AD-VshRNA 干扰建立 PTEN 下调的 ASD 幼鼠模型,模型在神经行为学上存在 ASD 的核心症状表现和学习记忆障碍,免疫组化、蛋白和 mRNA 表达水平上存在 PTEN 下调后 PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  信号通路的过度激活,表现为 PTEN 下调,上调 AKT、PI3K,导致 GSK3 $\beta$  表达降低,髓鞘过度增殖后 MBP 表达明显增多,电镜髓鞘结构上观察到 ASD 典型的病理改变。经鉴定后确定造模成功,VPA + ADV 组属于 3



种模型当中效果相对最好的动物模型,本研究有望为临床科研 ASD 大鼠模型造模提供新方法。

### 参考文献

- [1] Tick B, Bolton P, Happé F, et al. Heritability of autism spectrum disorders: A meta-analysis of twin studies [J]. *J Child Psychol Psychiatry*, 2016, 57(5): 585–95. doi:10.1111/jcpp.12499.
- [2] Masini E, Loi E, Vega-Benedetti A F, et al. An overview of the main genetic, epigenetic and environmental factors involved in autism spectrum disorder focusing on synaptic activity [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8290. doi:10.3390/ijms21218290.
- [3] Winden K D, Ebrahimi-Fakhari D, Sahin M. Abnormal mTOR activation in autism [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2018, 41: 1–23. doi:10.1146/annurev-neuro-080317-061747.
- [4] Lee H, Thacker S, Sarn N, et al. Constitutional mislocalization of Pten drives precocious maturation in oligodendrocytes and aberrant myelination in model of autism spectrum disorder [J]. *Transl Psychiatry*, 2019, 9(1): 13. doi:10.1038/s41398-018-0364-7.
- [5] McBride K L, Varga E A, Pastore M T, et al. Confirmation study of PTEN mutations among individuals with autism or developmental delays/mental retardation and macrocephaly [J]. *Autism Res*, 2010, 3(3): 137–41. doi:10.1002/aur.132.
- [6] Feng C, Chen Y, Zhang Y, et al. PTEN regulates mitochondrial biogenesis via the AKT/GSK-3 $\beta$ /PGC-1 $\alpha$  pathway in autism [J]. *Neuroscience*, 2021, 465: 85–94. doi:10.1016/j.neuroscience.2021.04.010.
- [7] González-Fernández E, Jeong H K, Fukaya M, et al. PTEN negatively regulates the cell lineage progression from NG2+ glial progenitor to oligodendrocyte via mTOR-independent signaling [J]. *eLife*, 2018, 7: e32021. doi:10.7554/eLife.32021.
- [8] Galvez-Contreras A Y, Zarate-Lopez D, Torres-Chavez A L, et al. Role of oligodendrocytes and myelin in the pathophysiology of autism spectrum disorder [J]. *Brain Sci*, 2020, 10(12): 951. doi:10.3390/brainsci10120951.
- [9] Croom K, Rumschlag J A, Molinaro G, et al. Developmental trajectory and sex differences in auditory processing in a PTEN-deletion model of autism spectrum disorders [J]. *Neurobiol Dis*, 2024, 200: 106628. doi:10.1016/j.nbd.2024.106628.
- [10] Lewandowski G, Steward O. AAVshRNA-mediated suppression of PTEN in adult rats in combination with salmon fibrin administration enables regenerative growth of corticospinal axons and enhances recovery of voluntary motor function after cervical spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(30): 9951–62. doi:10.1523/JNEUROSCI.1996-14.2014.
- [11] Deckmann I, Schwingel G B, Fontes-Dutra M, et al. Neuroimmune alterations in autism: A translational analysis focusing on the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2018, 25(5–6): 285–99. doi:10.1159/000492113.
- [12] Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Animal model of autism [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2005, 30(1): 80–9. doi:10.1038/sj.npp.1300518.
- [13] Napoli E, Ross-Inta C, Wong S, et al. Mitochondrial dysfunction in Pten haplo-insufficient mice with social deficits and repetitive behavior: Interplay between Pten and p53 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42504. doi:10.1371/journal.pone.0042504.
- [14] Goebbels S, Oltrogge J H, Kemper R, et al. Elevated phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate in Glia triggers cell-autonomous membrane wrapping and myelination [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(26): 8953–64. doi:10.1523/JNEUROSCI.0219-10.2010.
- [15] Lee E, Lee J, Kim E. Excitation/inhibition imbalance in animal models of autism spectrum disorders [J]. *Biol Psychiatry*, 2017, 81(10): 838–47. doi:10.1016/j.biopsych.2016.05.011.
- [16] 邵笑, 魏从文, 闵敏, 等. RNF43 靶向 PTEN 进行泛素化修饰抑制人胃癌细胞 AGS 增殖与迁移 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(11): 1763–8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.014.

Shao X, Wei C W, Min M, et al. RNF43 targeted PTEN for ubiquitination inhibited the proliferation and migration of AGS in human gastric cancer cells [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(11): 1763–8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.014.

## An improved method for the establishment of an autistic mouse model with down-regulation of PTEN gene

Dang Weili<sup>1,2</sup>, Liang Lüyuan<sup>1,2</sup>, Cao Jialei<sup>1,2</sup>, Ding Shen'ao<sup>1,2</sup>, Wei Bingqi<sup>1,2</sup>, Qiu Xia<sup>1,2</sup>, Ma Bingxiang<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450099; <sup>2</sup>Pediatric Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

**Abstract Objective** To establish a novel autistic juvenile rat model with down-regulation of PTEN gene (PTEN-ASD), to compare the newly constructed animal model with two traditional autistic animal models of Valproic acid (VPA) and adenovirus (ADV), and ultimately to prove the advantages of this model in animal model establishment of acupuncture treatment for ASD. **Methods** Wistar rats at 12.5 days of gestation were randomly divided into 2

groups. VPA rats were given 600 mg/kg of normal saline (NS) intraperitoneally. Weight, eye opening time and tail deformity were recorded. The newborn mice in NS group were randomly divided into three groups (10 rats in each group): normal (NS) group, virus (ADV) group and virus-negative control (ADV-NC) group; VPA group (20 young rats) was randomly divided into 2 groups (10 rats in each group): valproic acid (VPA) group and valproic acid-binding virus interference (VPA + ADV) group. The body weight, tail length, curved tail, geotaxis test time and skeletal deformity of 5 groups of young rats after birth, the neurobehavioral behavior of 21-day-old rats, and the myelin structure of brain tissue under electron microscope were observed, the expression levels of PTEN, PI3K, AKT, GSK3 $\beta$  and MBP were detected by immunohistochemistry, Western blot and q-PCR. **Results** Compared with the NS group, the VPA group had significantly increased malformation rate, slow weight gain, slow tail length growth, and long negative geotaxis reflex time ( $P < 0.05$ ). Compared with the NS group, the weight gain, tail length growth and negative geotaxis reflex time of the three model groups were slower ( $P < 0.05$ ), and the performance of model 3 was the most significant. There were significant differences in the time of crossing the central grid, the number of crossing the edge grid, and the time of crossing the edge grid in the open field test between the three groups and the NS group ( $P < 0.05$ ). In the self-grooming experiment, the number of interactions in Model 3 was the least ( $P < 0.05$ ), and the number of digging and self-grooming was the most ( $P < 0.05$ ). The three-box social experiment model 3 had the shortest average number of entries into the social box and the shortest residence time ( $P < 0.05$ ). The longer it took to find the platform in the water maze experiment, the fewer times it crossed the third quadrant ( $P < 0.05$ ). The structure of the myelin sheath layer in the corpus callosum was observed by transmission electron microscopy. The structure of the NS group was clear and complete. Compared with the NS group, the myelin structure of the ADV-NC group was similar, and the myelin structure of the three model groups was stratified and broken, and there were pathological changes and myelin damage in the ASD. Among them, the myelin sheath of the model 3 was thickened, stratified, and severe visible disintegration. The results of immunohistochemistry, Western blot and q-PCR showed that the expression of PTEN in model 3 was down-regulated by about 50%, which was the most obvious. The expression of AKT and MBP increased, and the expression of GSK3 $\beta$  decreased ( $P < 0.05$ ). However, the results of q-PCR showed that the expression of PI3K-mRNA in the three model groups significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the change of model 3 was the most significant. **Conclusion** The novel PTEN-ASD animal model established by VPA + ADV method is observed to have significant pathological changes that are typical of the manifestation of ASD myelin dysplasia and is determined to have better results than the two traditional autistic animal models.

**Key words** PTEN; autism spectrum disorder; animal model; valproic acid

**Fund programs** National Natural Science Foundation of China (No. 81973904); The Construction Project of Characteristic Core Discipline of Henan Province for Traditional Chinese Medicine (Nos. STG-ZYX06-202144, STG-ZYXKY-2020023); Special Project of "Double First-Class" Scientific Research Project of Traditional Chinese medicine of Henan Province (Nos. HSRP-DFCTCM-2023-2-08, HSRP-DFCTCM-2023-3-06, HSRP-DFCTCM-2023-05-08); Special Project of Scientific Research of Traditional Chinese Medicine of Henan Province (Nos. 2023ZY2057, 2021ZY2111)

**Corresponding author** Ma Bingxiang, E-mail: mbx1963@126.com