网络出版时间: 2025-03-17 21: 39: 21 网络出版地址: https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r. 20250314.1613.010

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¹² 梁绿圆¹² · 曹佳蕾¹² · 丁申奥¹² 魏炳琦¹² · 邱 霞¹² · 马丙祥¹²

(¹河南中医药大学第一附属医院儿科医院,郑州 450099;²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)组和病毒阴性对照(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、GSK3β、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 组体质量增长慢,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 平台所用的时间最长,穿越第三象限次数最少(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 ,GSK3β 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项目(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项目(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%^[1],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^[2-4]。发育畸形的 ASD 患者的 PTEN 基因突变更为常见,突变率约为2%~20%^[5]。 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^[6]。PTEN 是轴突髓 鞘化关键上游调控因子 通过 PI3K/AKT/GSK3β 信 号通路影响 ASD 神经行为功能^[7]。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^[8]。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/GSK3β 和髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, 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) 0.4g/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 μ l 尖头注射器缓慢注射 shRNA-PTEN 腺病毒 2 μ 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 μ 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

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

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

型(Ad5)的携带 PTEN 的异性 shRNA 的纯化腺病毒 (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-I 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 shR-NA1-EGFP 6.0×10¹¹ PFU/ml,HBAD-EGFP NC 对照 6.0×10¹¹ PFU/ml。插入 shRNA 序列如下:

Top strand: GATCCGTTCTCCGAACGTGTCACG– TAATTCAAGAGATTACGTGACACGTTCGGAGAATT– TTTTC

Bottom strand: AATTGAAAAAATTCTCCGAACG-TGTCACGTAATCTCTTGAATTACGTGACACGTTCGG-AGAACG

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 EP 管和普通灭菌 2 ml EP 管用于荧光定量 PCR 检测脑 组织中 PTEN、PI3K、AKT、GSK3β、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 5组幼鼠生长发育情况 与NS组幼鼠对比 3 个模型组幼鼠体质量轻、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)。</p>

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。



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.



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.





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.



Fig. 5 Comparison of self-grooming test

* $P < 0.\ 05\ vs$ NS group;
 ${}^{\#}P < 0.\ 05\ vs$ ADV group;
 ${}^{\Psi}P < 0.\ 05\ vs$ VPA group.

□ NS

VPA



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





Stay the blank boxstay Stay the central room Stay the social box

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; ${}^{\Psi}P < 0.05$ vs VPA group.

A 160



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 Fig. 8 Myelin sheath electron microscope ×500 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



NS VPA ADV VPA+ADV ADV-NC 4 1.4 1.2 1.0 0.6 0.8 0.6 0.4 0.2 0 PTEN AKT MBP GSK3β PI3K



Fig. 11 Changes in protein expression levels in five groups

* $P < 0.\ 05\ vs$ NS group;
 " $P < 0.\ 05\ vs$ ADV group; ${}^{\Psi}P < 0.\ 05\ vs$ 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GSK3β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 GSK3β 表达降低,但 VPA + ADV 组表达最低(*P* < 0.05)。



图 12 PTEN、PI3K、AKT、GSK3β、MBP mRNA 表达 Fig. 12 PTEN PI3K AKT GSK3β MBP mRNA expression * P < 0.05 vs NS group; *P < 0.05 vs ADV group; *P < 0.05 vsVPA 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 et al^[12]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%^[13]。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^[10]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^[10],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 庄 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^[10], 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[14] ,致髓鞘合成 增加^[14]、髓鞘储存障碍^[15] 髓鞘压实减少^[16]。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/GSK3β 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 GSK3β 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^[16]。

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/GSK3β 信号通路的 过度激活,表现为 PTEN 下调,上调 AKT、PI3K,导致 GSK3β 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 • 470 •

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

- 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-3β/PGC-1α 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-dele-

tion 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, Przewłocki 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.
- [16] 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 Weili¹², Liang Lvyuan¹², Cao Jialei¹², Ding Shenao¹², Wei Bingqi¹², Qiu Xia¹², Ma Bingxiang¹²

(¹Dept of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine,

Zhengzhou 450099;²Pediatric Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

Abstract *Objective* To establish a PTEN gene-downregulated ASD juvenile rat model (VPA-ADV) through combined application of valproic acid (VPA) and PTEN adenovirus (ADV) then to compare the newly constructed animal model with two traditional autistic animal models of VPA and AD and ultimately to prove the advantages of this model in animal model establishment of acupuncture treatment for ASD. *Methods* Wista 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 text 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, GSK3ß 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 VPA + ADV model 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 selfgrooming experiment, the number of interactions in VPA-ADV model was the least (P < 0.05), and the number of digging and self-grooming was the most (P < 0.05). In the three-box social experiment, VPA-ADV model had the shortest average number of entries into the social box and the shortest residence time (P < 0.05), the time of finding the platform in the water maze experiment was the longest, and the number of times crossing the third quadrant was the least (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 VPA-ADV model was thickened, stratified, and severe visible disintegration. The results of immunohistochemistry, Western blot and q-PCR showed that the expression of PTEN in VPA + ADV model was down-regulated by about 50% , which was the most obvious. The expression of AKT and MBP increased , and the expression of GSK3 β 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 VPA + ADV model 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