

DOI:10.3724/zdxbyxb-2022-0183

· 原 著 ·

抑制杏仁核沉默信息调节因子2和谷氨酰胺酶表达可改善自闭症大鼠社交行为

张晓侠¹, 刘时璋², 刘晓梅³, 王洁英¹

1. 陕西省人民医院儿童病院, 陕西 西安 710068

2. 陕西省人民医院骨科, 陕西 西安 710068

3. 陕西省人民医院护理部, 陕西 西安 710068

[摘要] 目的:探讨杏仁核中沉默信息调节因子(SIRT)2和谷氨酰胺酶(GLS)调节自闭症大鼠社交行为的潜在分子机制。方法:通过子宫丙戊酸钠暴露建立野生型和SIRT2基因敲除(SIRT2^{-/-})的自闭症大鼠模型,检测不同发育阶段大鼠脑质量,杏仁核中谷氨酸含量及SIRT2、GLS和凋亡相关蛋白的表达水平,并通过三箱社交行为测试评估大鼠社交行为。将GLS的过表达和干扰载体注射到自闭症大鼠杏仁核中,检测大鼠脑质量,杏仁核中谷氨酸含量及GLS蛋白的表达水平,评估大鼠社交行为。结果:丙戊酸钠诱导的自闭症大鼠脑质量增加,杏仁核中谷氨酸含量增加,SIRT2和GLS蛋白表达增加,促凋亡蛋白caspase-3表达增加,抗凋亡蛋白Bcl-2表达减少(均P<0.01)。与野生型大鼠比较,SIRT2^{-/-}大鼠的脑质量和杏仁核中谷氨酸含量减少,杏仁核中SIRT2和GLS蛋白表达水平降低,大鼠社交功能障碍改善(均P<0.01)。GLS过表达大鼠脑质量和杏仁核中谷氨酸含量增加,社交功能障碍加重(均P<0.01);抑制GLS表达则减少脑质量和杏仁核中谷氨酸含量,改善大鼠社交功能障碍(均P<0.01)。结论:丙戊酸钠诱导的自闭症大鼠杏仁核中谷氨酸循环系统异常,这种异常与SIRT2表达上调及其诱导的GLS产量增加有关;敲除SIRT2基因或抑制GLS的表达有助于维持谷氨酸循环平衡,改善大鼠社交行为障碍。



[关键词] 自闭症;杏仁核;谷氨酸;谷氨酰胺酶;沉默信息调节因子2;社交行为;大鼠

[中图分类号] R741 **[文献标志码]** A

Inhibiting silence information regulator 2 and glutaminase in the amygdala can improve social behavior in autistic rats

ZHANG Xiaoxia¹, LIU Shizhang², LIU Xiaomei³, WANG Jieying¹ (1. Children's Hospital, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 2. Department of Orthopedics,

收稿日期:2022-04-29 接受日期:2022-09-30 网络预发表日期:2022-12-09

基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划(2020JM-668)

第一作者:张晓侠,副主任护师,主要从事儿科神经疾病病理研究和护理工作;E-mail:zhuoruxl1@sina.com;https://orcid.org/0000-0002-2621-3982

通信作者:刘时璋,主任医师,教授,硕士生导师,主要从事脊柱损伤、退行性神经疾病病理机制研究;E-mail:1392071798@qq.com;https://orcid.org/0000-0003-0526-9589

Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 3. Nursing Department, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Corresponding author: LIU Shizhang, E-mail: 1392071798@qq.com, <https://orcid.org/0000-0003-0526-9589>

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the underlying molecular mechanisms by which silence information regulator (SIRT) 2 and glutaminase (GLS) in the amygdala regulate social behaviors in autistic rats. **Methods:** Rat models of autism were established by maternal sodium valproic acid (VPA) exposure in wild-type rats and *SIRT2*-knockout (*SIRT2*^{-/-}) rats. Glutamate (Glu) content, brain weight, and expression levels of SIRT2, GLS proteins and apoptosis-associated proteins in rat amygdala at different developmental stages were examined, and the social behaviors of VPA rats were assessed by a three-chamber test. Then, lentiviral overexpression or interference vectors of GLS were injected into the amygdala of VPA rats. Brain weight, Glu content and expression level of GLS protein were measured, and the social behaviors assessed. **Results:** Brain weight, amygdala Glu content and the levels of SIRT2, GLS protein and pro-apoptotic protein caspase-3 in the amygdala were increased in VPA rats, while the level of anti-apoptotic protein Bcl-2 was decreased (all $P < 0.01$). Compared with the wild-type rats, *SIRT2*^{-/-} rats displayed decreased expression of SIRT2 and GLS proteins in the amygdala, reduced Glu content, and improved social dysfunction (all $P < 0.01$). Overexpression of GLS increased brain weight and Glu content, and aggravated social dysfunction in VPA rats (all $P < 0.01$). Knockdown of GLS decreased brain weight and Glu content, and improved social dysfunction in VPA rats (all $P < 0.01$). **Conclusions:** The glutamate circulatory system in the amygdala of VPA induced autistic rats is abnormal. This is associated with the upregulation of SIRT2 expression and its induced increase of GLS production; knocking out *SIRT2* gene or inhibiting the expression of GLS is helpful in maintaining the balanced glutamate cycle and in improving the social behavior disorder of rats.

[**Key words**] Autism; Amygdala; Glutamate; Glutaminase; Sirtuin 2; Social behavior; Rat

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2022, 51(6): 707-715.]

[**缩略语**] 谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS); 沉默信息调节因子(silence information regulator, sirtuin, SIRT); 放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay, RIPA); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH); B淋巴细胞瘤蛋白(B-cell lymphoma protein, Bcl); 胱天蛋白酶(cysteine aspartic acid specific protease, caspase); 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR); 含吐温-20的Tris缓冲液(Tris buffered saline with Tween-20, TBST)

自闭症谱系障碍是一种广泛性的发育障碍, 自闭症属于其中最常见的类型。有研究显示, 自闭症发病与神经递质的兴奋性/抑制性信号失衡有关, 其中谷氨酸作为中枢神经系统主要的兴奋性神经递质引起广泛关注^[1-2]。Lenart等^[3]发现, 丙

戊酸钠诱导的自闭症大鼠的大脑皮层中参与下游谷氨酸能信号转导的编码突触前谷氨酸能蛋白vGluT1和mGluR7的表达量提升100倍以上。此外, 高谷氨酸动物模型也显示了刻板重复等自闭症样行为^[4]。GLS是神经系统中催化谷氨酸-谷氨

酰胺循环的重要酶。谷氨酸在星形胶质细胞内由谷氨酰胺合成酶催化生成谷氨酰胺,通过N转运系统以谷氨酰胺的形式释放到突触间隙,再由神经元通过A转运系统摄取谷氨酰胺,并在神经元内通过GLS将其水解为谷氨酸才进入突触囊泡,发挥神经递质作用^[5]。

社交沟通和互动障碍是自闭症的主要临床症状。SIRT2是NAD⁺依赖性脱乙酰酶家族SIRT的一员,通过改变多种重要蛋白的乙酰化水平,调控有丝分裂、细胞分化、细胞稳态、衰老、感染、炎症、氧化应激和自噬等生物学过程,在癌症、心血管和神经系统疾病等发生发展中发挥重要调节作用^[6-9]。近来有研究报道,SIRT2基因敲除(*SIRT2*^{-/-})小鼠相比野生型小鼠表现出更好的社交行为,提示SIRT2蛋白很可能参与了自闭症社交行为的调控^[10]。有研究显示,SIRT2敲低通过降低GLS活性,阻止肝细胞癌细胞的迁移和侵袭,提示SIRT2对GLS代谢具有抑制作用^[11]。基于此,推测SIRT2可能通过激活GLS及其介导的谷氨酸途径促进自闭症的发生。因此,本研究通过自闭症大鼠模型研究SIRT2和GLS在自闭症发生发展过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂和主要仪器

无特定病原体级野生型成年Wistar大鼠(雄性300~350 g,雌性200~250 g)购自重庆医科大学动物实验中心;成年Wistar CRISPR *SIRT2*^{-/-}大鼠(雄性250~280 g,雌性180~220 g)购自苏州泓迅生物科技股份有限公司。丙戊酸钠为美国Sigma-Aldrich公司产品;RIPA细胞裂解液为生工生物工程(上海)有限公司产品;BCA蛋白浓度测定试剂盒为上海碧云天生物技术有限公司产品;兔抗小鼠GAPDH(ab8245)、SIRT2(ab211033)、GLS(ab156876)、Bcl-2(ab241548)、caspase-3(ab214430)和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(二抗,ab6721)均为美国Abcam公司产品;GLS慢病毒过表达载体及其载体对照、GLS慢病毒干扰载体及其干扰对照由南京金斯瑞生物科技有限公司构建并包装。

超净工作台为苏州市电子仪器厂产品;台式高速离心机为海门市其林贝尔仪器制造有限公司产品;逆转录定量PCR仪和电泳仪为美国Bio-Rad公司产品;蛋白转印仪为美国Bio-Rad公司产品;

凝胶成像系统为美国Thermo NanoDrop公司产品。

1.2 子宫丙戊酸钠暴露法构建大鼠自闭症模型

野生型和*SIRT2*^{-/-}大鼠给予充分的饲料和饮水,饲养在12 h光和暗循环、25 °C室温的安静环境中。将成年雌性和雄性大鼠分开适应性饲养一周后按1:1合笼过夜,第二天早晨检查到阴道栓记为胚胎第1天(即孕鼠怀孕第1天),将孕鼠单独饲养。怀孕第12.5天时将孕鼠分为两组:模型组腹腔注射600 mg/kg丙戊酸钠(丙戊酸钠用0.85%等渗氯化钠溶液配成250 mg/mL溶液),对照组仅注射等量等渗氯化钠溶液,其他同模型组。模型组母鼠产下的子鼠记为自闭症模型鼠,对照组母鼠产下的子鼠记为正常对照鼠。子鼠出生当日记为第1天。所有实验动物喂养及实验程序均严格遵照实验动物保护条款。本研究通过陕西省人民医院动物伦理学委员会审查(SXPPH-2021073)。

1.3 实验动物分组及检测指标

根据实验需要,设正常对照组(野生型大鼠)、*SIRT2*^{-/-}对照组(*SIRT2*^{-/-}大鼠)、模型对照组(丙戊酸钠诱导自闭症模型鼠)、*SIRT2*^{-/-}组(丙戊酸钠暴露的*SIRT2*^{-/-}大鼠)、载体对照组(建模第7天时杏仁核内注射50 μL滴度为10¹¹ pfu/mL的GLS慢病毒对照载体)、GLS过表达组(建模第7天时杏仁核内注射50 μL滴度为10¹¹ pfu/mL的GLS慢病毒过表达载体)、干扰对照组(建模第7天时杏仁核内注射40 μL滴度为10¹¹ pfu/mL的GLS慢病毒干扰对照载体)和GLS抑制组(建模第7天时杏仁核内注射40 μL滴度为10¹¹ pfu/mL的GLS慢病毒干扰载体)。

取出生第7、14和21天的正常对照组和模型对照组大鼠各4只,检测脑质量、杏仁核谷氨酸含量以及SIRT2、GLS和凋亡相关蛋白的水平,其中出生第21天大鼠进行上述检测前先进行三箱社交行为测试,观察丙戊酸钠对大鼠脑质量、社交行为能力及杏仁核中相关指标的影响。

取正常对照组、*SIRT2*^{-/-}对照组、模型对照组和*SIRT2*^{-/-}组出生第21天的大鼠各4只,三箱社交行为测试评估大鼠的社交行为,并检测脑质量、杏仁核中谷氨酸含量以及SIRT2、GLS蛋白表达水平,观察敲除杏仁核中*SIRT2*对丙戊酸钠诱导的自闭症大鼠的影响。

取正常对照组、模型对照组、载体对照组和

GLS过表达组出生第21天的大鼠各4只,三箱社交行为测试评估大鼠的社交行为,并检测脑质量及杏仁核中谷氨酸含量和GLS蛋白表达水平,观察上调杏仁核中GLS表达对丙戊酸钠诱导的自闭症大鼠的影响。

取正常对照组、模型对照组、干扰对照组和GLS抑制组出生第21天的大鼠各4只,三箱社交行为测试评估大鼠的社交行为,并检测脑质量及杏仁核中谷氨酸含量和GLS蛋白表达水平,观察抑制杏仁核中GLS表达对丙戊酸钠诱导的自闭症大鼠的影响。

1.4 三箱社交行为测试评估大鼠社交行为

实验分为两阶段,每阶段的记录时间均为10 min。第一阶段时,在箱子两端对称的位置放置同样的笼子,其中一个笼子中有一只被测大鼠陌生的同性别大鼠(陌生鼠1),另一个笼子则为空笼子,记录被测大鼠在三个箱子中所待的时间及嗅触陌生鼠1、空笼子的时间。第二阶段时,将另一只被测大鼠陌生的同性别大鼠(陌生鼠2)放入空笼子中,记录被测动物分别在三个箱子中待的时间及嗅触陌生鼠1、陌生鼠2的时间。每次更换被测动物时,清洗三箱装置并喷洒乙醇去除动物残留气味,以免影响实验结果的准确性^[12-13]。

1.5 考马斯亮蓝染色法测定大鼠杏仁核中谷氨酸含量

将已制备好的10%杏仁核匀浆置于低温高速离心机,以 $2400\times g$ 离心10 min,取上清液,用等渗氯化钠溶液按1:4稀释成2%的组织匀浆,取0.05 mL加入测定管,同时设置空白管(双蒸水0.05 mL)和标准管(0.563 g/L蛋白标准液0.05 mL)。上述各管加入 $5\times$ 考马斯亮蓝稀释液3 mL,混匀,于595 nm处测定各管吸光度值(A1)。将10%杏仁核匀浆与谷氨酸试剂盒中试剂1按1:3混匀,使用低温高速离心机以 $2400\times g$ 离心10 min,取组织匀浆上清液待测。取组织匀浆上清液0.5 mL加入测定管,同时设置空白管(加双蒸水0.5 mL)和标准管(加0.2 mmol/L谷氨酸标准液0.5 mL)。按照说明书在上述各管依次加入谷氨酸试剂盒中的试剂,混匀,于340 nm处测定各管吸光度值(A2)。谷氨酸含量($\mu\text{mol/g}$ 蛋白)=[(测定管A2值-测定管A1值)-(空白管A2值-空白管A1值)]÷[(标准管A2值-标准管A1值)-(空白管A2值-空白管A1值)] \times 谷氨酸标准浓度

($200\ \mu\text{mol/L}$) \times 样本测试前稀释倍数 \div 蛋白质含量(g蛋白/L)。

1.6 蛋白质印迹法检测大鼠杏仁核中SIRT2、GLS和凋亡相关蛋白表达

将收集的杏仁核均匀研磨并加入RIPA裂解液,随后 $12\ 000\times g$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心20 min获得裂解物;使用BCA试剂盒测定每个标本的蛋白质含量;随后取部分蛋白溶液与 $4\times$ 蛋白上样缓冲液混匀,煮沸10 min进行变性;在12% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳中分离等量的蛋白质($15\ \mu\text{g/孔}$),并转移到聚偏二氟乙烯膜;将膜用5%脱脂奶粉室温封闭3 h;TBST清洗6次后与以下主要抗体在 $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜[GAPDH(1:5000)、SIRT2(1:2000)、GLS(1:1000)、Bcl-2(1:1000)、caspase-3(1:1000)],TBST清洗6次,与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(1:2000)于室温孵育2 h;TBST清洗6次,加入ECL显色液,避光室温孵育2 min后在凝胶成像系统将蛋白可视化。运用ImageJ软件分析各蛋白的灰度值。

1.7 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。所有测量数值经Shapiro-Wilk正态分布检验,符合正态分布的资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析联合Tukey HSD多重比较法,两组间比较用 t 检验,每个实验数据重复测量三次, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 丙戊酸钠成功诱导自闭症大鼠模型

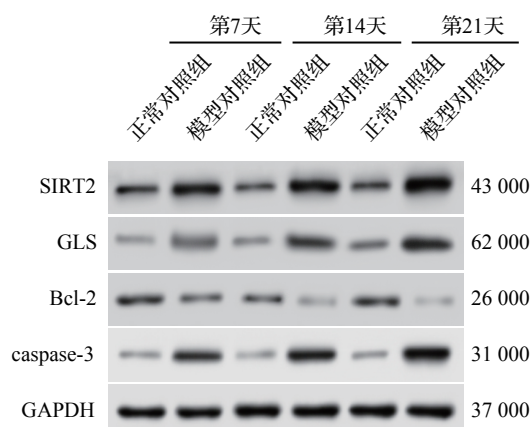
与正常对照组比较,模型对照组出生后第7、14和21天脑质量均显著增加(均 $P<0.01$),杏仁核中谷氨酸含量均增加(均 $P<0.01$),SIRT2、GLS和促凋亡蛋白caspase-3表达均增加(均 $P<0.01$),而抗凋亡蛋白Bcl-2表达均减少($P<0.01$),见表1和图1。第21天时三箱社交行为测试结果显示,第一阶段模型对照组与陌生鼠1接触的时间较正常对照组缩短($P<0.01$),第二阶段模型对照组与陌生鼠2接触的时间较正常对照组缩短($P<0.01$),而与陌生鼠1接触的时间较正常对照组延长($P<0.01$),见图2。结果提示,模型对照组脑质量增加,杏仁核中谷氨酸、SIRT2、GLS和促凋亡蛋白caspase-3表达增加,而抗凋亡蛋白Bcl-2表达减少表现出明显的社交障碍,自闭症模型构建成功。

表 1 不同发育阶段实验大鼠的脑质量和杏仁核中谷氨酸含量及SIRT2、GLS、凋亡相关蛋白表达水平比较

Table 1 Brain weights, amygdala glutamate content, and SIRT2, GLS, apoptosis related proteins levels in rats at different developmental stages

组 别		<i>n</i>	脑质量(g)	谷氨酸(mmol/g)	SIRT2	GLS	Bcl-2	caspase-3
正常对照组	出生后第7天	4	6.0 ± 1.0	132 ± 13	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.08
	出生后第14天	4	9.1 ± 1.3	134 ± 14	1.03 ± 0.09	1.05 ± 0.07	1.09 ± 0.11	1.04 ± 0.08
	出生后第21天	4	14.1 ± 1.3	130 ± 15	1.02 ± 0.09	1.08 ± 0.09	1.06 ± 0.10	1.05 ± 0.09
模型对照组	出生后第7天	4	8.1 ± 1.0**	162 ± 15**	1.79 ± 0.13**	1.54 ± 0.12**	0.80 ± 0.09**	1.83 ± 0.12**
	出生后第14天	4	13.1 ± 1.4**	269 ± 26**	2.42 ± 0.15**	2.56 ± 0.11**	0.54 ± 0.06**	2.69 ± 0.23**
	出生后第21天	4	20.2 ± 2.2**	339 ± 32**	3.25 ± 0.14**	3.19 ± 0.12**	0.21 ± 0.04**	3.77 ± 0.29**
<i>F</i> 值	—	—	4.07	39.02	76.16	124.30	30.82	62.14
<i>P</i> 值	—	—	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

—: 无相关数据; 与正常对照组同一时间点比较, ***P*<0.01. SIRT: 沉默信息调节因子; GLS: 谷氨酰胺酶; Bcl: B淋巴细胞瘤蛋白; caspase: 胱天蛋白酶。



SIRT: 沉默信息调节因子; GLS: 谷氨酰胺酶; Bcl: B淋巴细胞瘤蛋白; caspase: 胱天蛋白酶; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图 1 不同发育阶段正常对照和模型对照大鼠杏仁核中SIRT2、GLS、凋亡相关蛋白表达电泳图

Figure 1 Electrophoresis of SIRT2, GLS and apoptosis related proteins in amygdala of healthy and autism rats at different developmental stages

2.2 敲除杏仁核中SIRT2可改善模型大鼠的社交行为障碍

三箱社交行为测试结果显示,与模型对照组比较, SIRT2^{-/-}组与陌生鼠接触的时间更长 (*P*<0.01),见图2。与正常对照组比较, SIRT2^{-/-}对照组的脑质量无显著变化 (*P*>0.05),但杏仁核中谷氨酸含量减少 (*P*<0.01), SIRT2和GLS蛋白表达水平降低(均*P*<0.01);与模型对照组比较, SIRT2^{-/-}组的脑质量和杏仁核中谷氨酸含量减少(均*P*<0.01),杏仁核中SIRT2和GLS蛋白表达水平降低(均*P*<0.01),见图3和表2。上述结果提示, SIRT2基因

敲除可降低大鼠杏仁核GLS蛋白的表达水平,改善丙戊酸钠诱导的大鼠社交行为障碍。

2.3 杏仁核中GLS表达上调加重模型鼠社交行为障碍

三箱社交行为测试结果显示,在第一阶段, GLS过表达组对陌生鼠1的探索时间较载体对照组进一步缩短 (*P*<0.01);在第二阶段, GLS过表达组对陌生鼠2的探索时间进一步缩短 (*P*<0.01)。见图4。第21天时, GLS过表达组杏仁核中GLS蛋白表达较载体对照组增加 (*P*<0.01),脑质量和杏仁核谷氨酸含量增加 (*P*<0.01),见图5和表3。上述结果提示, GLS过表达会增加大鼠的脑质量和杏仁核谷氨酸含量,加剧自闭症大鼠的社交功能障碍。

2.4 杏仁核中GLS表达下调改善模型大鼠社交行为障碍

三箱社交行为测试结果显示,在第一阶段, GLS抑制组对陌生鼠1的探索时间较干扰对照组明显延长 (*P*<0.01);在第二阶段, GLS抑制组对陌生鼠2的探索时间较干扰对照组也明显延长 (*P*<0.01),见图6。第21天时, GLS抑制组杏仁核中GLS蛋白较干扰对照组表达减少 (*P*<0.01),脑质量和杏仁核中谷氨酸含量下降 (*P*<0.01),见图7和表4。上述结果提示,抑制GLS表达可减少大鼠脑质量和杏仁核中谷氨酸含量,缓解自闭症大鼠的社交功能障碍。

3 讨论

基底外侧杏仁核,也称杏仁体,位于颞极与侧脑室下角之间颞叶前内侧突起的钩回内部和海马

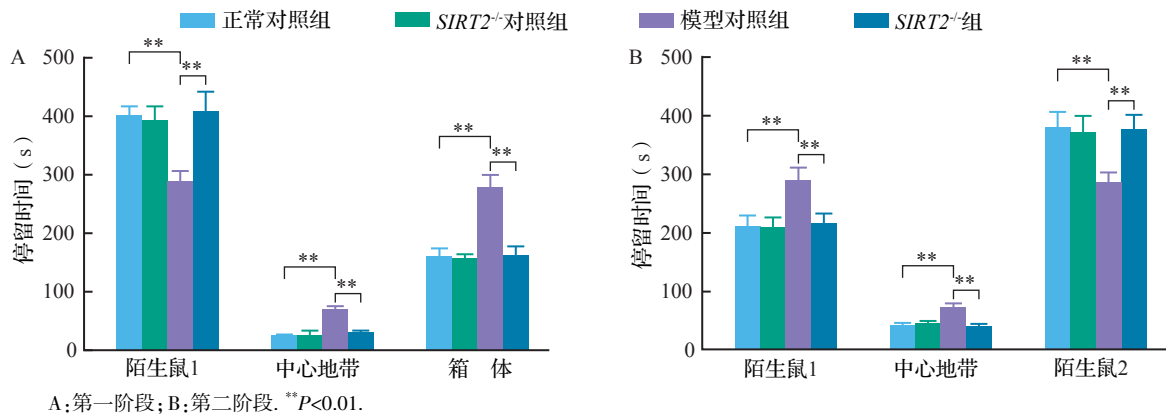


图2 丙戊酸钠暴露模型鼠三箱社交行为测试结果

Figure 2 The effect of sodium valproate on social behaviors of autism rats evaluated by the 3-chambered social approach

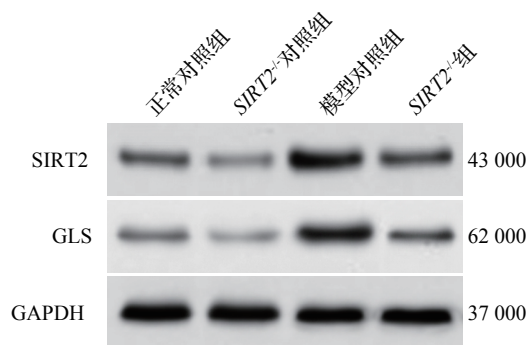


图3 野生型和SIRT2^{-/-}大鼠杏仁核中SIRT2和GLS蛋白表达电泳图

Figure 3 Electrophoresis of SIRT2 and GLS protein expression in amygdala of wild type and SIRT2^{-/-} rats

前方,在机体社交行为中发挥重要功能,是调控社交行为的关键脑区^[14]。大量研究发现,杏仁核可通过与高级皮层的输入输出链接,提示社交互动中的情绪刺激和情绪状态^[14-16]。已有研究显示,杏仁核功能障碍和自闭症密切相关,与年龄匹配

的典型发育儿童比较,自闭症学龄前儿童的双侧杏仁核体积明显更大,可能导致异常信号^[17]。啮齿动物子宫内丙戊酸钠暴露是目前认可度最高的自闭症模型构建方法,其能够较好地模拟自闭症患儿的面部特征和神经结构,并表现出良好的预期效度^[18]。与携带单个孤独症相关基因突变的转基因模型相比,该模型可能更好地代表许多环境和表观遗传起源的特发性孤独症病例,是研究自闭症的神经生物学基础和筛选新的治疗方法的重要工具^[19]。

神经递质的兴奋性/抑制性信号失衡推动着自闭症的发生和发展^[20-22]。其中,谷氨酸作为中枢神经系统主要的兴奋性神经递质,在神经发育、突触传递等过程具有重要作用^[23]。有研究发现,自闭症患者大脑中谷氨酸转运体表达异常,进一步提示谷氨酸能神经传递异常可能在自闭症中发挥重要作用^[24]。一项针对38名自闭症患儿的研究报告显示,谷氨酸和谷氨酰胺循环酶在患儿海马组织中显著增加,提示自闭症可能是一种高谷

表2 丙戊酸钠暴露模型鼠脑质量、杏仁核中谷氨酸含量及SIRT2、GLS蛋白表达变化

Table 2 The effect of sodium valproate on brain weights, amygdala glutamate content, SIRT2 and GLS in autism rats

组别	n	脑质量(g)	谷氨酸(mmol/g)	SIRT2	GLS
正常对照组	4	14.0 ± 1.5	142 ± 15	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.07
SIRT2 ^{-/-} 对照组	4	14.0 ± 1.7	84 ± 8**	0.15 ± 0.03**	0.35 ± 0.05**
模型对照组	4	20.9 ± 2.4**	311 ± 22**	2.96 ± 0.14**	2.39 ± 0.15**
SIRT2 ^{-/-} 组	4	15.1 ± 1.8 [#]	165 ± 14 [#]	1.36 ± 0.13 ^{***#}	1.66 ± 0.13 ^{***#}
F值	—	12.53	155.30	486.90	262.10
P值	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

—:无相关数据.与正常对照组比较,**P<0.01;与模型对照组比较,[#]P<0.01. SIRT:沉默信息调节因子;GLS:谷氨酰胺酶.

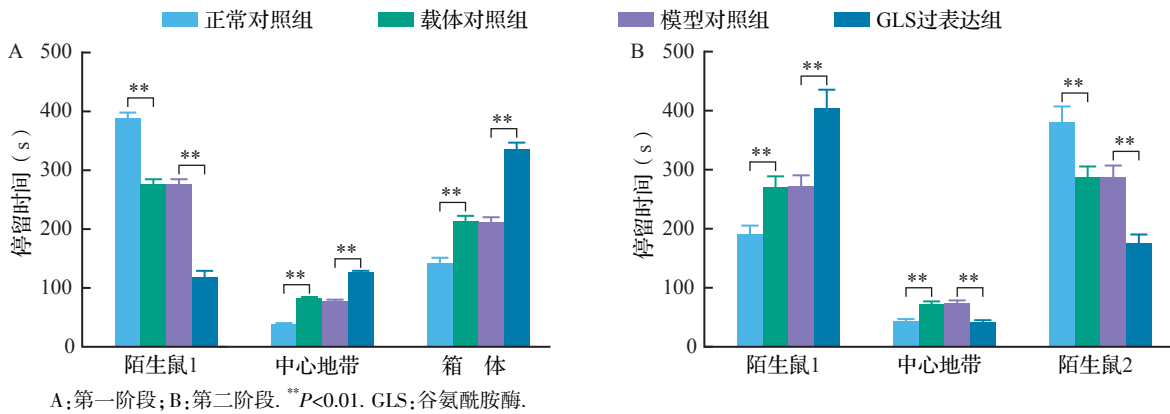


图 4 GLS 过表达模型鼠三箱社交行为测试结果

Figure 4 The effect of GLS overexpression on social behaviors of autism rats evaluated by the 3-chambered social approach

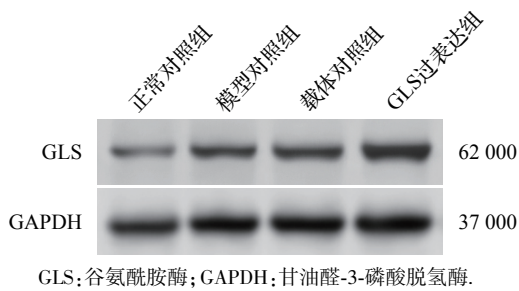


图 5 GLS 过表达对模型鼠杏仁核中 GLS 表达水平的影响

Figure 5 Effect of GLS overexpression on the expression level of GLS in amygdala of autism rats

表 3 GLS 过表达模型鼠脑质量及杏仁核中谷氨酸、GLS 含量变化

Table 3 The effect of GLS overexpression on brain weights, amygdala glutamate content and GLS in autism rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	脑质量(g)	谷氨酸(mmol/g)	GLS
正常对照组	14.1 ± 1.6	122 ± 15	1.00 ± 0.08
模型对照组	19.9 ± 2.3**	321 ± 24**	3.31 ± 0.25**
载体对照组	20.3 ± 2.3**	316 ± 32**	3.28 ± 0.23**
GLS 过表达组	9.5 ± 1.2***	522 ± 38***	5.41 ± 0.44***
F 值	29.49	128.12	164.61
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

—: 无相关数据; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与载体对照组比较, *** $P < 0.01$. GLS: 谷氨酰胺酶。

氨酸病^[25]。近来,有证据表明,谷氨酸-谷氨酰胺循环在自闭症发展中扮演重要角色,其中GLS能将谷氨酰胺在神经元内水解为谷氨酸后进入突触囊泡,发挥神经递质作用^[21,26]。本文资料中,丙戊酸钠暴露的孕鼠所生产的子鼠在出生后不同发育阶段杏仁核中谷氨酸含量逐渐增加,并伴随着

SIRT2和GLS蛋白表达增加,脑质量增加。

SIRT2是组蛋白去乙酰化酶家族成员之一,且是该家族中在脑组织中表达强度最高的,这提示SIRT2在神经系统可能发挥重要作用。研究显示,七氟醚暴露的新生大鼠海马组织中SIRT2蛋白显著上调,用SIRT2抑制剂AK7预处理可逆转七氟醚诱导的大鼠依赖性认知障碍,并减少神经炎症和小胶质细胞活化^[27]。另有研究显示,丙咪嗪、氟西汀和瑞波西汀三种抗抑郁药可下调抑郁症小鼠前额叶皮层中SIRT2蛋白表达,SIRT2的特异性抑制增加了神经可塑性标记^[28]。有学者指出,细胞增殖或凋亡失调都可能导致自闭症。Sheikh等^[29]研究发现,自闭症患者小脑中抗凋亡蛋白Bcl-2的表达显著降低,而凋亡的关键执行者caspase-3表达增加;且他们以往的研究表明,自闭症患者额叶皮层中Bcl-2表达降低,BDNF-Akt-Bcl-2通路受损,表明自闭症患者小脑神经元凋亡增加^[30]。多项动物研究也表明,自闭症模型动物的大脑组织细胞处于应激状态,而各种细胞应激过程(包括氧化应激、线粒体损伤和内质网应激等)诱导的神经元凋亡也是自闭症个体社交行为障碍和病理特征的潜在机制之一^[31-33]。本文资料显示,丙戊酸钠诱导的自闭症大鼠杏仁核中SIRT2和GLS蛋白表达显著增加,促凋亡蛋白caspase-3表达增加,抗凋亡蛋白Bcl-2表达减少,而敲除SIRT2基因的自闭症大鼠杏仁核中SIRT2和GLS蛋白表达减少,谷氨酸含量降低且社交行为障碍缓解。此外,过表达GLS可以促进谷氨酸生成,加重大鼠的社交行为障碍,而抑制大鼠杏仁核中GLS表达可以减少谷氨酸生成,减轻脑质量,缓解大鼠的社交行为障碍。

综上所述,丙戊酸钠诱导的自闭症大鼠杏仁

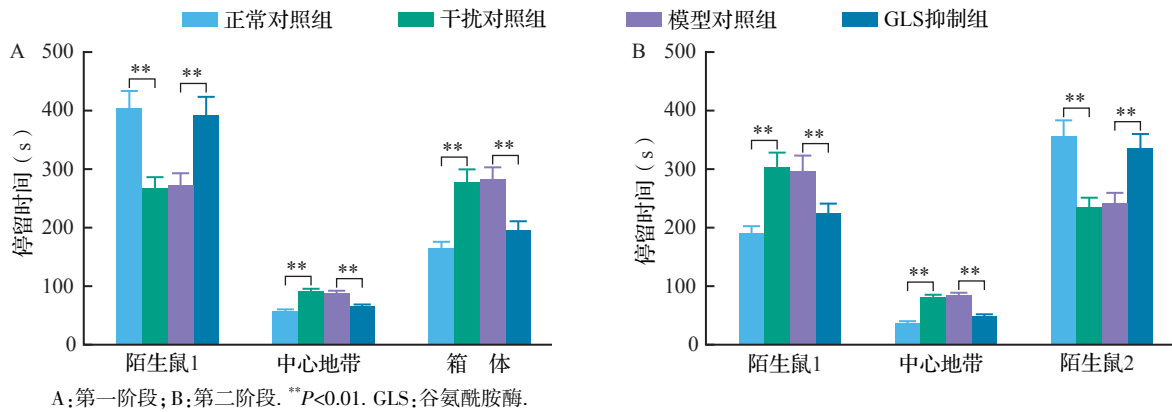


图 6 抑制GLS表达模型鼠三箱社交行为测试结果

Figure 6 The effect of GLS knockdown on social behaviors of autism rats

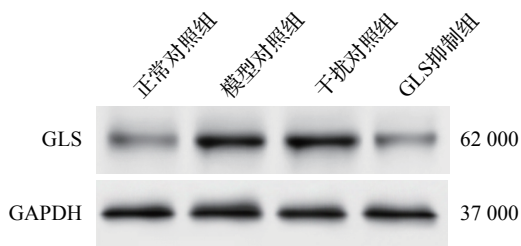


图 7 慢病毒干扰对模型鼠杏仁核中GLS表达水平的影响

Figure 7 Effect of lentivirus-mediated interference on the expression level of GLS in amygdala of autism rats

表 4 抑制GLS表达模型鼠脑质量及杏仁核中谷氨酸、GLS含量的变化

Table 4 The effect of GLS knockdown on brain weights, amygdala glutamate content and GLS in autism rats

($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	脑质量(g)	谷氨酸 (mmol/g)	GLS
正常对照组	14.20 ± 1.50	130 ± 15	1.00 ± 0.10
模型对照组	20.05 ± 2.25	311 ± 25**	3.11 ± 0.25**
干扰对照组	19.88 ± 2.18**	308 ± 38**	3.25 ± 0.26**
GLS抑制组	10.03 ± 1.26***	176 ± 19##	1.37 ± 0.14##
F值	27.47	50.45	155.71
P值	<0.01	<0.01	<0.01

—: 无相关数据; 与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与干扰对照组比较, ## $P < 0.01$. GLS: 谷氨酰胺酶。

核中谷氨酸循环系统异常, 这种异常与SIRT2表达上调及其诱导的GLS产量增加有关; 敲除SIRT2基因或抑制GLS表达可显著减少自闭症大鼠杏仁核谷氨酸含量和脑质量、改善社交行为障碍。因此, 降低杏仁核中SIRT2和GLS的水平可能成为自闭症的潜在治疗手段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] SPRATT P W E, BEN-SHALOM R, KEESHEN C M, et al. The autism-associated gene *Scn2a* contributes to dendritic excitability and synaptic function in the prefrontal cortex[J]. *Neuron*, 2019, 103(4): 673-685.e5.
- [2] FORD T C, NIBBS R, CREWETHER D P. Glutamate/GABA⁺ ratio is associated with the psychosocial domain of autistic and schizotypal traits[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181961.
- [3] LENART J, AUGUSTYNIAK J, LAZAREWICZ J W, et al. Altered expression of glutamatergic and GABAergic genes in the valproic acid-induced rat model of autism: a screening test[J]. *Toxicology*, 2020, 440: 152500.
- [4] WEI H, DING C, JIN G, et al. Abnormal glutamate release in aged BTBR mouse model of autism[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 10689-10697.
- [5] RUMPING L, BÜTTNER B, MAIER O, et al. Identification of a loss-of-function mutation in the context of glutaminase deficiency and neonatal epileptic encephalopathy[J]. *JAMA Neurol*, 2019, 76(3): 342-350.
- [6] WANG Y, YANG J, HONG T, et al. SIRT2: Controversy and multiple roles in disease and physiology[J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 55: 100961.
- [7] CHEN G, HUANG P, HU C. The role of SIRT2 in cancer: a novel therapeutic target[J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(12): 3297-3304.
- [8] TANEJA A, RAVI V, HONG J Y, et al. Emerging roles of Sirtuin 2 in cardiovascular diseases[J/OL]. *FASEB J*, 2021, 35(10): e21841.
- [9] HONG J Y, LIN H. Sirtuin modulators in cellular and animal models of human diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 735044.
- [10] ZHANG Z, ZHANG P, QI G J, et al. CDK5-mediated phosphorylation of Sirt2 contributes to depressive-like behavior induced by social defeat stress[J]. *Biochim*

- Biophys Acta - Mol Basis Dis**, 2018, 1864(2): 533-541.
- [11] HUANG S, ZHAO Z, TANG D, et al. Downregulation of SIRT2 inhibits invasion of hepatocellular carcinoma by inhibiting energy metabolism[J]. **Transl Oncol**, 2017, 10(6): 917-927.
- [12] JONES K L, PRIDE M C, EDMISTON E, et al. Autism-specific maternal autoantibodies produce behavioral abnormalities in an endogenous antigen-driven mouse model of autism[J]. **Mol Psychiatry**, 2020, 25(11): 2994-3009.
- [13] BIAN W J, BREWER C L, KAUER J A, et al. Adolescent sleep shapes social novelty preference in mice[J]. **Nat Neurosci**, 2022, 25(7): 912-923.
- [14] MEISNER O C, NAIR A, CHANG S. Amygdala connectivity and implications for social cognition and disorders[J]. **Handb Clin Neurol**, 2022, 187: 381-403.
- [15] AERTS T, SEUNTJENS E. Novel perspectives on the development of the amygdala in rodents[J]. **Front Neuroanat**, 2021, 15: 786679.
- [16] NICOLINI C, FAHNESTOCK M. The valproic acid-induced rodent model of autism[J]. **Exp Neurol**, 2018, 299(PtA): 217-227.
- [17] MEHRA S, UL AHSAN A, SETH E, et al. Critical evaluation of valproic acid-induced rodent models of autism: current and future perspectives[J]. **J Mol Neurosci**, 2022, 72(6): 1259-1273.
- [18] DOMÍNGUEZ-BORRÁS J, VUILLEUMIER P. Amygdala function in emotion, cognition, and behavior[J]. **Handb Clin Neurol**, 2022, 187: 359-380.
- [19] ZHU Z, FANG X, CHEN H, et al. Alterations in volumes and MRI features of amygdala in Chinese autistic preschoolers associated with social and behavioral deficits[J]. **Brain Imaging Behav**, 2018, 12(6): 1814-1821.
- [20] YU Y, CHAULAGAIN A, PEDERSEN S A, et al. Pharmacotherapy of restricted/repetitive behavior in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis[J]. **BMC Psychiatry**, 2020, 20(1): 121.
- [21] ZHANG L, HUANG C C, DAI Y, et al. Symptom improvement in children with autism spectrum disorder following bumetanide administration is associated with decreased GABA/glutamate ratios[J]. **Transl Psychiatry**, 2020, 10(1): 9.
- [22] PAVÁL D, MICLUȚIA I V. The dopamine hypothesis of autism spectrum disorder revisited: current status and future prospects[J]. **Dev Neurosci**, 2021, 43(2): 73-83.
- [23] HANSEN K B, WOLLMUTH L P, BOWIE D, et al. Structure, function, and pharmacology of glutamate receptor ion channels[J]. **Pharmacol Rev**, 2021, 73(4): 298-487.
- [24] AIDA T, YOSHIDA J, NOMURA M, et al. Astroglial glutamate transporter deficiency increases synaptic excitability and leads to pathological repetitive behaviors in mice[J]. **Neuropsychopharmacology**, 2015, 40(7): 1569-1579.
- [25] HAMED N O, AL-AYADHI L, OSMAN M A, et al. Understanding the roles of glutamine synthetase, glutaminase, and glutamate decarboxylase autoantibodies in imbalanced excitatory/inhibitory neurotransmission as etiological mechanisms of autism[J]. **Psychiatry Clin Neurosci**, 2018, 72(5): 362-373.
- [26] KOLODNY T, SCHALLMO M P, GERDTS J, et al. Concentrations of cortical GABA and glutamate in young adults with autism spectrum disorder[J]. **Autism Res**, 2020, 13(7): 1111-1129.
- [27] WU Z, ZHANG Y, ZHANG Y, et al. Sirtuin 2 inhibition attenuates sevoflurane-induced learning and memory deficits in developing rats via modulating microglial activation[J]. **Cell Mol Neurobiol**, 2020, 40(3): 437-446.
- [28] MUÑOZ-COBO I, ERBURU M M, ZWERGEL C, et al. Nucleocytoplasmic export of HDAC5 and SIRT2 downregulation: two epigenetic mechanisms by which antidepressants enhance synaptic plasticity markers[J]. **Psychopharmacology**, 2018, 235(10): 2831-2846.
- [29] SHEIKH A M, LI X, WEN G, et al. Cathepsin D and apoptosis related proteins are elevated in the brain of autistic subjects[J]. **Neuroscience**, 2010, 165(2): 363-370.
- [30] SHEIKH A M, MALIK M, WEN G, et al. BDNF-Akt-Bcl2 antiapoptotic signaling pathway is compromised in the brain of autistic subjects[J]. **J Neurosci Res**, 2010, 88(12): 2641-2647.
- [31] DONG D, ZIELKE H R, YEH D, et al. Cellular stress and apoptosis contribute to the pathogenesis of autism spectrum disorder[J]. **Autism Res**, 2018, 11(7): 1076-1090.
- [32] ROSE S, NIYAZOV D M, ROSSIGNOL D A, et al. Clinical and molecular characteristics of mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder[J]. **Mol Diagn Ther**, 2018, 22(5): 571-593.
- [33] LOBZHANIDZE G, LORDKIPANIDZE T, ZHVANIA M, et al. Effect of propionic acid on the morphology of the amygdala in adolescent male rats and their behavior[J]. **Micron**, 2019, 125: 102732.