

CACNA1H 基因敲除对小鼠孤独症样行为及海马神经元形态学的影响

焦 翠¹, 王俭妹¹, 况海霞¹, 武志红^{1,Δ}, 柳 涛^{1,2,Δ}

(南昌大学第一附属医院 1. 儿科, 2. 医学科研中心, 南昌 330006)

[摘要] **目的:** 研究 *CACNA1H* 基因敲除 (knockout, KO) 对小鼠孤独症样行为及海马神经元形态学的影响。 **方法:** 25 只 3~4 周龄 C57BL/6 背景的 *CACNA1H* KO 小鼠作为实验组, 26 只同年龄同背景的野生型 (wild type, WT) 小鼠作为对照组。通过三箱实验和旷场实验观察小鼠社交、焦虑和重复刻板行为后测量其脑质量与脑体积, 用尼氏染色法 (Nissl staining) 观察海马神经元数目。将 *CACNA1H* 杂合子小鼠与 Thy1-GFP-O 小鼠杂交, 构建 *CACNA1H*^{-/-}-Thy1⁺ (KO-GFP) 及 *CACNA1H*^{+/-}-Thy1⁺ (WT-GFP) 小鼠, 观察海马神经元树突棘密度及成熟度。 **结果:** 三箱实验中, 社交测试阶段, KO 小鼠在陌生鼠箱中的时间比空箱更长 ($F_{1,14} = 95.086, P < 0.05$; Post-Hoc: $P < 0.05$), 探索的偏好指数与对照组相比差异无统计学意义 ($t = 1.044, P > 0.05$); 新社交对象识别测试阶段, KO 小鼠在新陌生鼠箱与陌生鼠箱中的时间差异无统计学意义 ($F_{1,14} = 18.062, P < 0.05$; Post-Hoc: $P > 0.05$), 探索的偏好指数低于对照组 ($t = 2.390, P < 0.05$)。旷场实验中, KO 小鼠在旷场中心活动时间明显少于对照组 ($t = 2.503, P < 0.05$), 自梳理时间明显多于对照组 ($t = -2.299, P < 0.05$)。形态学结果显示, KO 小鼠脑质量/体质量和脑体积与对照组相比差异均无统计学意义 ($t = 0.356, P > 0.05$; $t = -0.660, P > 0.05$), 但其海马齿状回区神经元数目较对照组减少 ($t = 2.323, P < 0.05$), 且 KO-GFP 小鼠海马齿状回区树突棘密度较对照组增加 ($t = -2.374, P < 0.05$), 而成熟度差异无统计学意义 ($t = -1.935, P > 0.05$)。 **结论:** *CACNA1H* KO 小鼠具有孤独症样行为, 可能与海马齿状回区神经元数目减少及树突棘密度增高有关。

[关键词] *CACNA1H*; 小鼠, 基因敲除; 孤独症谱系障碍; 行为测试

[中图分类号] R749.94 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2022)02-0209-08

doi:10.19723/j.issn.1671-167X.2022.02.002

Effects of *CACNA1H* gene knockout on autistic-like behaviors and the morphology of hippocampal neurons in mice

JIAO Cui¹, WANG Jian-mei¹, KUANG Hai-xia¹, WU Zhi-hong^{1,Δ}, LIU Tao^{1,2,Δ}

(1. Department of Pediatrics, 2. Center for Experimental Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of *CACNA1H* gene knockout (KO) on autistic-like behaviors and the morphology of hippocampal neurons in mice. **Methods:** In the study, 25 *CACNA1H* KO mice of 3–4 weeks old and C57BL/6 background were recruited as the experimental group, and 26 wild type (WT) mice of the same age and background were recruited as the control group. Three-chamber test and open field test were used to observe the social interaction, anxiety, and repetitive behaviors in mice. After that, their brain weight and size were measured, and the number of hippocampal neurons were observed by Nissl staining. Furthermore, the *CACNA1H* heterozygote mice were interbred with Thy1-GFP-O mice to generate *CACNA1H*^{-/-}-Thy1⁺ (KO-GFP) and *CACNA1H*^{+/-}-Thy1⁺ (WT-GFP) mice. The density and maturity of dendritic spines of hippocampal neurons were observed. **Results:** In the sociability test session of the three-chamber test, the KO mice spent more time in the chamber of the stranger mice than in the object one ($F_{1,14} = 95.086, P < 0.05$; Post-Hoc: $P < 0.05$), without any significant difference for the explored preference index between the two groups ($t = 1.044, P > 0.05$). However, in the social novelty recognition test session, no difference was observed between the time of the KO mice spend in the chamber of new stranger mice and the stranger one ($F_{1,14} = 18.062, P < 0.05$; Post-Hoc: $P > 0.05$), and the explored preference index of the KO mice was less than that of the control group ($t =$

基金项目: 国家自然科学基金 (31660289)、江西省杰出青年人才资助计划 (20171BCB23091)、南昌大学研究生创新专项基金 (CX2018166) 和江西省自然科学基金 (20202BABL206049) Supported by the National Natural Science Foundation of China (31660289), the Excellent Young Scientist Foundation of Jiangxi (20171BCB23091), the Graduate Innovation Foundation of Nanchang University (CX2018166), and the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20202BABL206049)

Δ Corresponding author's e-mail, 1390959916@qq.com, liutao1241@ncu.edu.cn

网络出版时间:2022-2-26 14:16:09 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20220225.1644.004.html>

2.390, $P < 0.05$). In the open field test, the KO mice spent less time in the center of the open field apparatus than the control group ($t = 2.503$, $P < 0.05$), but the self-grooming time was significantly increased compared with the control group ($t = -2.299$, $P < 0.05$). Morphological results showed that the brain weight/body weight ratio ($t = 0.356$, $P > 0.05$) and brain size ($t = -0.660$, $P > 0.05$) of the KO mice were not significantly different from those of the control group, but the number of neurons were significantly reduced in hippocampal dentate gyrus compared with the control group ($t = 2.323$, $P < 0.05$). Moreover, the density of dendritic spine of dentate gyrus neurons in the KO-GFP mice was significantly increased compared with the control group ($t = -2.374$, $P < 0.05$), without any significant difference in spine maturity ($t = -1.935$, $P > 0.05$). **Conclusion:** *CACNA1H* KO mice represent autistic-like behavior, which may be related to the decrease in the number of neurons and the increase in the density of dendritic spine in the dentate gyrus.

KEY WORDS *CACNA1H*; Mice, knockout; Autism spectrum disorder; Behavior test

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 是一种较常见的影响患者一生的神经系统发育障碍性疾病, 核心症状是社交沟通和互动不足, 重复刻板行为和/或兴趣狭窄。ASD 在全球范围内普遍流行且发病率逐年上升, 美国疾病预防控制中心的数据显示其患病率约为 1/59^[1], 已成为全球性的难题之一。目前, ASD 的发病机制尚未完全清楚, 因此缺乏特效治疗且预后差, 多需终生照顾, 对患者家庭及社会带来沉重的精神及经济负担。

ASD 的发病机制涉及遗传、免疫、环境及神经生物学等多个方面, 其中遗传因素被认为是最主要的^[2]。约 30% 的 ASD 病例被发现与基因的新发突变有关, 已知与 ASD 高度相关的基因有 53 种, 如 *GIGYF1*、*KDM6B* 和 *PTEN* 等^[3]。*CACNA1H* 基因位于 16p13.3, 其编码的 T 型钙通道 3.2 亚型 ($Ca_v3.2$) 对神经兴奋性、信息传递、细胞增殖分化和神经发生等的调控极为重要^[4-5], 该基因突变可影响 $Ca_v3.2$ 功能, 导致原发性癫痫^[6]、ASD^[7] 和精神分裂症^[4] 等神经精神性疾病的发生。2006 年, 美国哈佛大学的一项研究对 461 例 ASD 患者进行了 *CACNA1H* 基因组靶向测序, 发现 4 个位点存在错义突变^[7]。2019 年的一项研究亦报道了 1 例 *CACNA1H* 基因突变的患者存在 ASD 和全面发育障碍^[8]。既往研究结果虽已提示 *CACNA1H* 与 ASD 存在一定的相关性, 但缺乏生物学证据和动物模型的验证。

树突棘是神经元间行使功能和信息传递的关键部位, 树突棘的形态异常在 ASD 病理过程中扮演着重要角色, 因此, 本研究利用 *CACNA1H* 基因敲除 (knockout, KO) 小鼠 (*CACNA1H*^{-/-}) 及绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记脑神经元的 Thy1-GFP-O 小鼠, 通过多种行为学和神经形态学相结合的方法, 研究 *CACNA1H* 缺失对小鼠 ASD 样行为及海马神经元形态学的影响, 以期对 ASD 临床治疗和药物开发提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级 3 ~ 4 周龄的 *CACNA1H* KO 小鼠 (C57BL/6, 亲代购于美国 Jackson 公司) 25 只 (实验组), 野生型 (wild type, WT) 小鼠 (C57BL/6, 亲代购于上海南模生物公司) 26 只 (对照组), 雌雄不限 (雌: 雄 ≈ 1: 1), KO 小鼠在本课题组已发表的研究中多次应用^[9]。SPF 级 Thy1-GFP-O 转基因小鼠系南昌大学生命科学院梅林教授实验室赠送。动物房维持 12 h/12 h 昼夜循环 (7:00 ~ 19:00), 室温 23 ~ 25 °C, 湿度 50%, 小鼠自由获取食物和饮水。实验动物操作严格遵守《南昌大学实验动物管理办法》, 本研究通过南昌大学实验动物伦理审查 (2017009)。

1.2 动物行为学测试

1.2.1 三箱实验 是反映动物社交行为的经典实验^[10], 可测试小鼠本能的社交互动及对新社交对象识别的能力。箱体大小为 60 cm × 40 cm × 25 cm, 中间由两块隔板将其均分成三格。两隔板上各开一个 6 cm × 6 cm 的门, 任小鼠自由进出。左右箱中各放入一个金属笼, 用于放置陌生小鼠。测试方法参考文献^[11]: 摄像头置于盒子正上方, 测试由适应阶段、社交互动阶段和对新社交对象的识别阶段组成, 每阶段为 10 min, 均安排在上午 (8:00 ~ 12:00) 进行, 每次测试前均预先适应 30 min (以下同)。实验鼠在箱内自由适应 10 min 后, 在一侧金属笼中放入一只同性别且对于实验鼠是陌生的小鼠 (stranger 1, S1), 另一侧金属笼不放任何物品 (object, O), 观察 10 min, 随后在另一侧金属笼中放入一只同性别的、新的陌生小鼠 (stranger 2, S2), 之前的 S1 不取出, 继续观察 10 min。每组测试结束后, 用酒精擦洗盒子后再进行下一只实验鼠的检测 (下同)。对照组取 9 只、实验组取 7 只小鼠进行该实验。探索偏好指数的计算: $Index_{S1-O} = (S1 - O) / (S1 + O)$; $Index_{S2-S1} = (S2 - S1) / (S2 + S1)$ 。

1.2.2 旷场实验 用于观察实验动物的焦虑情绪和重复刻板行为^[12]。开阔旷场大小为 50 cm × 50 cm × 25 cm, 设定中心区域至边缘为 10 cm, 摄像头位于盒子正上方。测试时将实验鼠放在旷场中央, 任其自由活动 20 min。对照组取 17 只、实验组取 18 只小鼠进行该实验[因部分小鼠未记录到 20 min, 自梳理行为(小鼠两个前肢抚摸或刮擦面部、头部或身体以及舔身体的行为)仅分析对照组 15 只、实验组 12 只]。观察指标为小鼠前 10 min 内在旷场中心活动的时间、10 ~ 20 min 内自梳理行为的时间, 以上两种行为学检测项目间隔 1 ~ 2 天进行。

1.3 体质量、脑质量及脑体积测量

行为学实验后, 选取两组中同窝出生的小鼠, 称取其体质量, 予腹腔注射乌拉坦(1.2 g/kg)麻醉, 用 30 mL、4 °C 生理盐水心脏灌流, 断头取脑。滤纸上吸干后天平称取脑组织质量, 然后放入装有 4 °C 生理盐水的小量筒中, 以液面刻度变化反映脑体积大小。

1.4 神经元数目观察

将上述脑组织放入 10% (体积分数) 中性甲醛溶液中固定并脱水后进行石蜡包埋, 制备 3 μm 冠状切片(前囟 -1.64 ~ -2.12 mm)。采用尼氏染色(Nissl staining, A、B 液购于北京 Solarbio 公司), 染色时将切片浸入装有 cresyl violet stain 试剂(A 液)的染缸中, 56 °C 温箱浸染 1 h, 然后用去离子水冲洗数次, 随后置于 Nissl differentiation 液(B 液)中分化数秒至 2 min(背景接近于无色), 最后无水乙醇迅速脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。对照组取 8 只、实验组取 6 只小鼠的脑组织标本, 从每个标本中随机选取 ≥ 3 张切片于图像导航扫描仪(购于日本 Olympus 公司)40 倍镜下观察, 计数海马 CA1 ~ CA4 区及齿状回区神经元数目, 结果以神经元相对数量(与 WT 均值相比)表示。

1.5 海马神经元树突棘观察

1.5.1 构建实验组和对照组小鼠 将成年 *CACNA1H* 杂合子小鼠与 Thy1-GFP-O 小鼠杂交 2 代以上, 将获得的子代基因型为 *CACNA1H*^{-/-}-*Thy1*⁺(KO-GFP) 的小鼠设为实验组, 将 *CACNA1H*^{+/+}-*Thy1*⁺(WT-GFP) 小鼠设为对照组, 每组各 5 只。

1.5.2 海马神经元树突棘密度及成熟度观察 将 KO-GFP 和 WT-GFP 小鼠麻醉后以 30 mL 生理盐水和 30 mL 4% (体积分数) 多聚甲醛心脏灌流, 取脑组织置入 4% 多聚甲醛中固定 6 h。在振动切片机(VT1000S, 购于德国 Leica 公司)上制备 325 μm 脑冠状切片。切片经 4% 多聚甲醛固定 2 h 后, PBS 洗 3 次, 每次 10 min。用抗荧光衰减封片剂(购于北京

Solarbio 公司)封片。应用共聚焦显微镜(购于德国 Zeiss 公司)拍摄 63 × Zoom1.5 Z-stack 叠加下海马齿状回区神经元的二级树突, 树突棘密度以每 10 μm 的树突棘数目表示。平均每只小鼠纳入计数的神经元 ≥ 8 个, 每个神经元随机选取一段长 20 ~ 50 μm 的树突进行分析。成熟度为每段树突上成熟型树突棘个数与总树突棘的比值。

1.6 统计学分析

行为学视频采集软件为 Logitech Webcam, 分析软件为 MATLAB R2016b(MathWorks), 尼氏染色结果分析软件为 Image-Pro Plus 6.0, 树突棘结果分析软件为 ZEN 2010 及 ImageJ, 数据统计软件为 SPSS 17.0, 作图软件采用 GraphPad Prism 7.0 和 Adobe Illustrator CS5。数据均以均数 ± 标准误(standard error, SE)表示, 小鼠在三箱实验中不同箱中的时间比较采用 Two-way 方差分析, 采用 Tukey 事后检验进行两两比较, 其余实验均采用双侧独立样本 *t* 检验分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *CACNA1H* KO 小鼠社交行为学特点

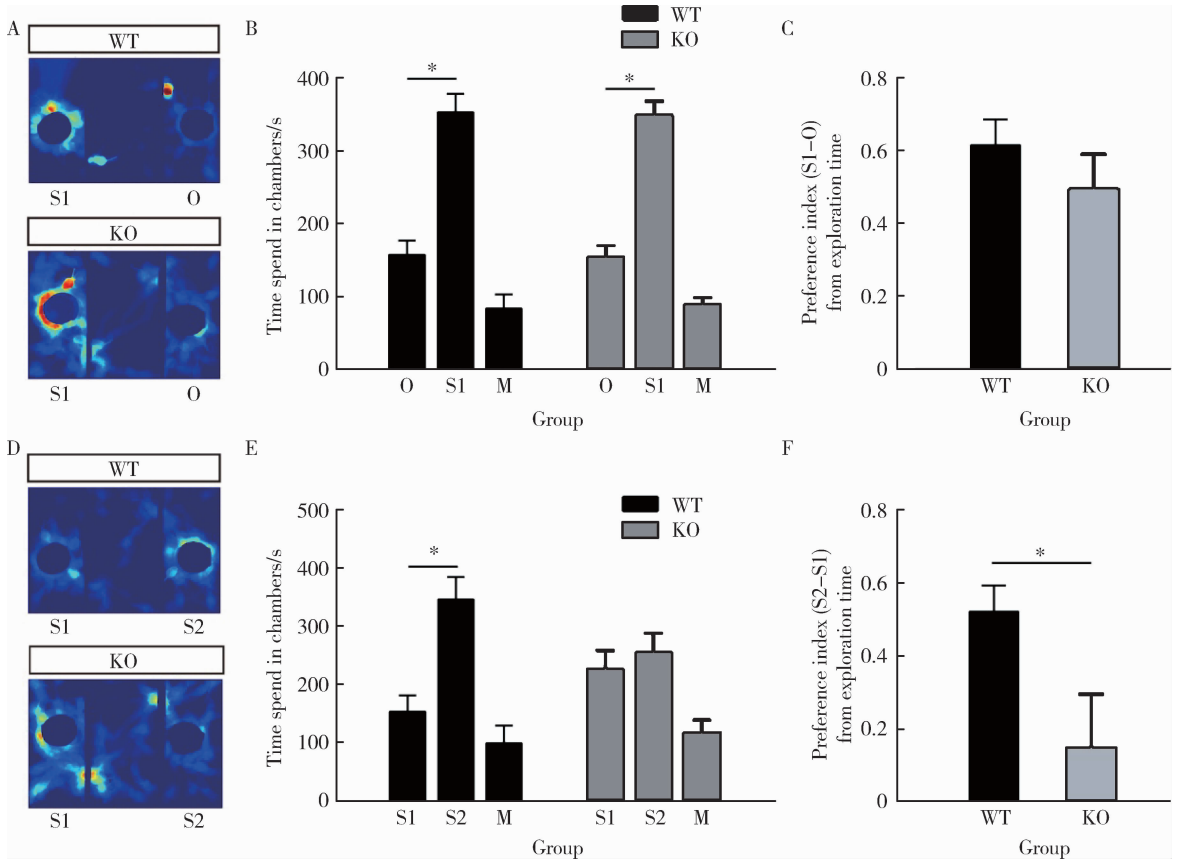
如图 1 和表 1 所示, 在社交互动阶段中, WT 与 KO 小鼠在 S1 箱中的活动时间均比在 O 箱中长(Two-way ANOVA: $F_{1,14} = 95.086, P < 0.05$; Tukey's Post-Hoc test: $P_{WT} < 0.05, P_{KO} < 0.05$), WT 和 KO 小鼠对 S1 探索的偏好指数差异无统计学意义($t = 1.044, P > 0.05$)。在对新社交对象的识别阶段中, WT 小鼠在 S2 箱中的活动时间比在 S1 箱中长, KO 小鼠在 S2 和 S1 箱中的停留时间差异无统计学意义(Two-way ANOVA: $F_{1,14} = 18.062, P < 0.05$; Tukey's Post-Hoc test: $P_{WT} < 0.05, P_{KO} > 0.05$), 且此阶段 KO 小鼠对 S2 探索的偏好指数显著低于 WT 小鼠($t = 2.390, P < 0.05$)。

2.2 *CACNA1H* KO 小鼠焦虑情绪及重复刻板行为学特点

旷场实验结果显示, 与 WT 小鼠相比, KO 小鼠在中心区域活动的时间更少($t = 2.503, P < 0.05$, 图 2A、B, 表 2), 且在旷场中自梳理时间更长($t = -2.299, P < 0.05$, 图 2C, 表 2)。

2.3 *CACNA1H* KO 小鼠体质量、脑质量与体质量比、脑体积及海马神经元计数

如图 3A ~ D 及表 3 所示, 与 WT 小鼠相比, KO 小鼠体质量($t = -0.274, P > 0.05$)、脑质量与体质量比($t = 0.356, P > 0.05$)以及脑体积($t = -0.660, P > 0.05$)的差异均无统计学意义。



A and D, representative heat maps of mice movements in the sociability test session and the social novelty recognition test session in the three-chamber test, respectively; B and E, averaged time (s) spend in each chamber of WT ($n=9$) and KO ($n=7$) mice; C and F, averaged preference index from exploration time of WT ($n=9$) and KO ($n=7$) mice. KO, knockout; WT, wild type; O, object; S1, stranger 1; S2, stranger 2; M, middle. * $P < 0.05$.

图 1 CACNA1H 基因敲除对小鼠社交行为的影响

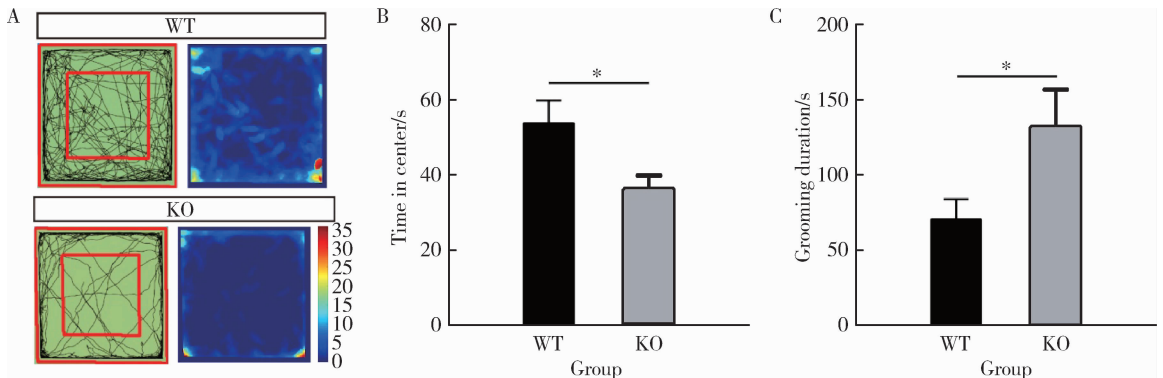
Figure 1 Effects of CACNA1H gene knockout on social behavior in mice

表 1 WT 与 KO 小鼠的三箱实验结果

Table 1 Results of three-chamber test of WT and KO mice

Genotype	Sociability			Social novelty recognition		
	O/s	S1/s	PI	S1/s	S2/s	PI
WT	158.05 ± 19.93	353.36 ± 25.35 *	0.62 ± 0.07	153.24 ± 27.87	346.03 ± 38.77#	0.52 ± 0.08
KO	155.33 ± 15.55	349.44 ± 19.24 *	0.50 ± 0.10	226.18 ± 32.21	254.84 ± 33.45	0.15 ± 0.15 Δ

Values are $\bar{x} \pm SE$. SE, standard error; KO, knockout; WT, wild type; O, object; S1, stranger 1; S2, stranger 2; PI, preference index. * $P < 0.05$, O vs. S1. # $P < 0.05$, S1 vs. S2. $\Delta P < 0.05$, WT vs. KO.



A, representative track and heat maps of mice movements in the open field test; B, the time spend in the center was decreased in KO mice ($n=18$) compared to that of the WT mice ($n=17$); C, the grooming time was significantly increased in KO mice ($n=12$) compared to that of the WT mice ($n=15$). Abbreviations as in Figure 1. * $P < 0.05$.

图 2 CACNA1H 基因敲除对小鼠焦虑及自梳理行为的影响

Figure 2 Effects of CACNA1H gene knockout on anxiety and self-grooming behavior in mice

表 2 WT 与 KO 小鼠的旷场实验结果

Table 2 Results of open field test of WT and KO mice

Parameter	Genotype	Time/s
Anxiety (time in center)	WT	53.87 ± 6.01
	KO	36.30 ± 3.63 *
Repetitive behavior (self-grooming)	WT	69.86 ± 13.53
	KO	131.66 ± 24.92 *

Values are $\bar{x} \pm SE$. Abbreviations as in Table 1. * $P < 0.05$.

表 3 WT 与 KO 小鼠体质量、脑质量/体质量和脑体积测量

Table 3 Body weight, brain weight/body weight, and brain size of WT and KO mice

Genotype	Body weight/g	Brain weight/body weight	Brain size/mL
WT	7.05 ± 0.97	0.06 ± 0.00	0.39 ± 0.00
KO	7.43 ± 0.99	0.06 ± 0.01	0.40 ± 0.02

Values are $\bar{x} \pm SE$. Abbreviations as in Table 1.

尼氏染色计数结果表明,敲除 *CACNA1H* 可导致小鼠海马齿状回区神经元数目显著减少 ($t = 2.323, P < 0.05$), CA1 ~ CA4 区细胞数目差异无统计学意义 (CA1: $t = 0.555, P > 0.05$; CA2: $t = 1.437, P > 0.05$; CA3: $t = 1.176, P > 0.05$; CA4: $t = 1.669, P > 0.05$), 见图 3E、F 及表 4。

2.4 *CACNA1H* KO 小鼠齿状回区树突棘的变化

树突棘通常分为伪足型、细长型、分叉型、蘑菇型

和短粗型,前两种为未成熟型,后三者为成熟型^[13] (图 4A)。两组小鼠齿状回区神经元的树突棘密度和成熟度的变化相比较 (图 4B), KO-GFP 小鼠的树突棘数目高于 WT-GFP 小鼠 [$(10.03 \pm 0.69)/(10 \mu\text{m})$ vs. $(8.32 \pm 0.20)/(10 \mu\text{m})$, $t = -2.374, P < 0.05$, 图 4C]; 两组小鼠树突棘成熟度比例 (WT-GFP: $34.40\% \pm 1.03\%$; KO-GFP: $39.60\% \pm 2.48\%$) 差异无统计学意义 ($t = -1.935, P > 0.05$, 图 4D)。

表 4 WT 与 KO 小鼠海马区尼氏染色神经元相对数

Table 4 Relative number of neurons in the hippocampus of WT and KO mice counted by Nissl staining

Genotype	Hippocampus				
	CA1	CA2	CA3	CA4	DG
WT	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.03
KO	0.95 ± 0.08	0.85 ± 0.06	0.86 ± 0.11	0.86 ± 0.06	0.86 ± 0.05 *

Values are $\bar{x} \pm SE$. DG, dentate gyrus; other abbreviations as in Table 1. * $P < 0.05$.

3 讨论

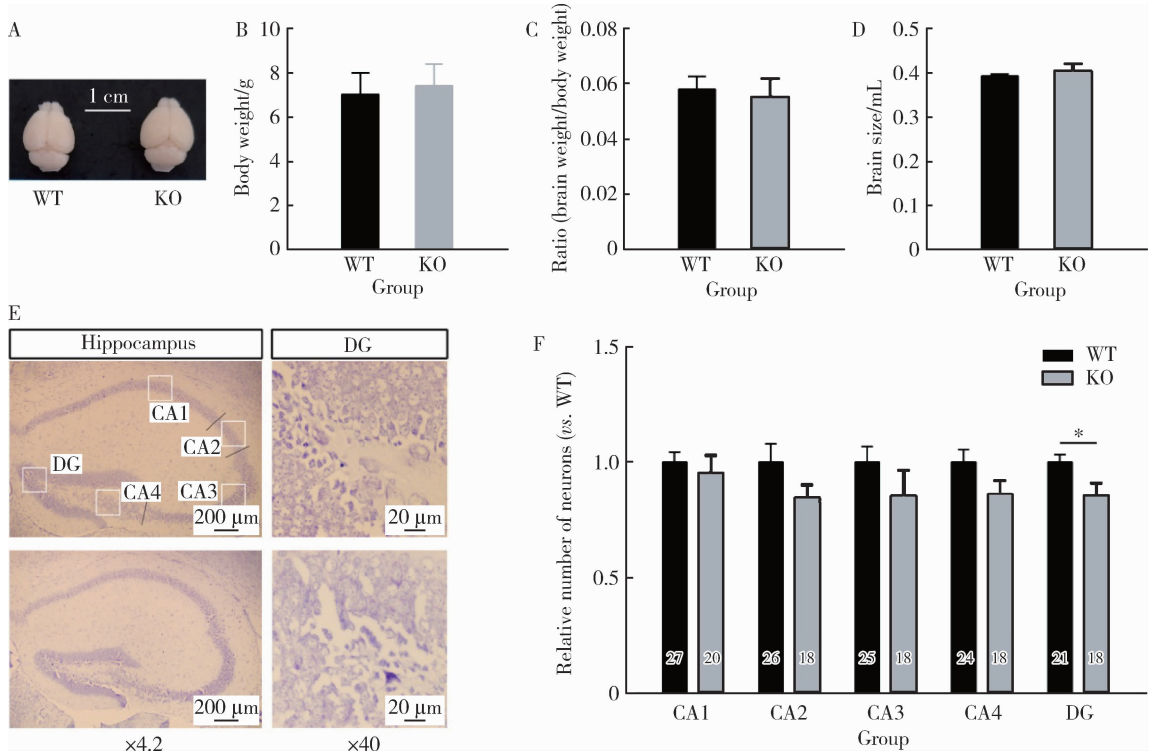
电压门控钙通道 (voltage-gated calcium channel, VGCC) 对调控细胞内和细胞间的信号传导,如基因表达、激素和神经递质释放等过程具有重要作用^[4]。目前包括 *CACNA1H* 基因在内的所有编码 VGCC 的基因均被发现是 ASD 的风险基因,其中部分 VGCC 亚型突变的动物模型已证实具有 ASD 表型,如 Bader 等^[14] 观察到 TS2-neo (Ca_v1.2 编码基因 *CACNA1C* 突变) 小鼠具有明显的社交功能受损、重复刻板行为、焦虑及记忆受损等 ASD 样行为改变。人类基因组测序结果揭示, *CACNA1H* 是 ASD 的风险基因,且电生理实验已证实体外培养

的 *CACNA1H* 突变细胞的 Ca_v3.2 电流密度降低、电压依赖性门控特性改变,从而导致神经元兴奋性降低^[7-8,15-18], 表明 ASD 可能与 *CACNA1H* 突变导致 Ca_v3.2 功能低下有关。本研究在动物模型中发现幼年 *CACNA1H* KO 小鼠具有 ASD 的核心症状,可能与其海马齿状回区神经元数目减少及树突棘密度增加有关。

以往研究表明, *CACNA1H* KO 小鼠具有异常的神经行为表型。Gangarossa 等^[19] 的研究显示, 8 ~ 12 周龄 *CACNA1H* KO 小鼠的自发运动功能与 WT 小鼠无显著不同, 但 KO 小鼠在旷场中心运动的时间显著低于同龄 WT 小鼠, 这表明与 WT 小鼠相比, KO 小鼠更焦虑。本研究使用 3 ~ 4 周龄不限雌雄的

CACNA1H KO 小鼠, 旷场实验结果与 Gangarossa 等^[19]的研究一致, 表明敲除 *CACNA1H* 后, 无论是幼年还是成年时期, 与 WT 小鼠相比, KO 小鼠均存在焦虑倾向, 但具体所涉及的脑区及发病机制尚不清楚。促肾上腺皮质激素释放因子受体 1 可在功能上特异性与哺乳动物 Ca_v3.2 耦联, 激活该受体可抑制

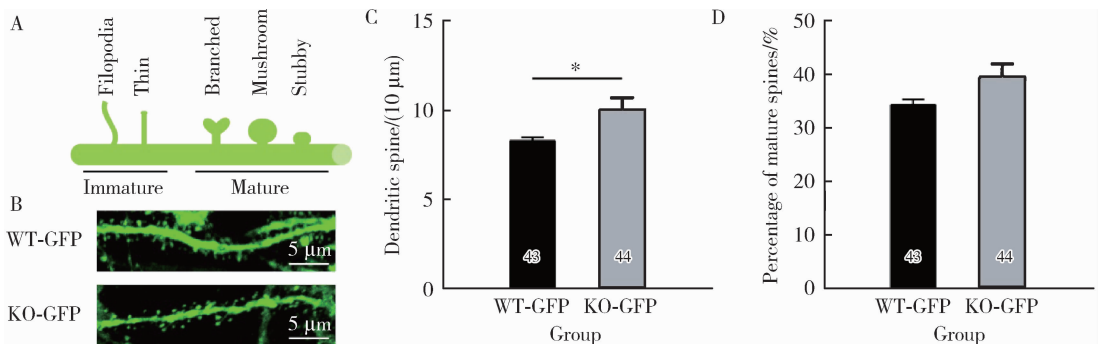
Ca_v3.2 而导致焦虑的发生^[20], 这可能是 *CACNA1H* KO 小鼠具有焦虑倾向的机制之一。Henbid 等^[21]给具有 *CACNA1H* 错义突变的遗传缺失型癫痫大鼠腹腔注射 Ca_v3 拮抗剂 (Z944), 发现该药可逆转其社交缺陷, 表明 Ca_v3.2 有可能成为改善 ASD 患者社交障碍的治疗新靶点。



A, representative brain morphology of WT and KO mice; B, the body weight of WT ($n=9$) and KO ($n=7$) mice; C, the ratio between body weight and brain weight of WT ($n=9$) and KO ($n=7$) mice; D, the brain size of WT ($n=9$) and KO ($n=7$) mice; E, representative Nissl staining figures of hippocampal sections from WT and KO mice (the white squares represent the areas for analysis); F, relative number of neurons in each subregion of the hippocampus in WT ($n=8$) and KO ($n=6$) mice, the number in the histogram represents the number of slices. DG, dentate gyrus; other abbreviations as in Figure 1. * $P < 0.05$.

图 3 *CACNA1H* 基因敲除对小鼠大脑形态及海马神经元数目的影响

Figure 3 Effects of *CACNA1H* gene knockout on brain morphology and the number of neurons of the hippocampus in mice



A, classification of dendritic spines; B, photomicrographs showing representation of dendritic spines in hippocampal dentate gyrus neurons of WT-GFP and KO-GFP mice; C, *CACNA1H* gene knockout significantly increased the density of dendritic spines in KO mice (WT-GFP $n=5$, KO-GFP $n=5$); D, percentage of mature spines in WT-GFP ($n=5$) and KO-GFP ($n=5$) mice. The number in the histogram represents the number of segments of dendrite. GFP, green fluorescent protein; other abbreviations as in Figure 1. * $P < 0.05$.

图 4 *CACNA1H* 基因敲除对小鼠树突棘的影响

Figure 4 Effects of *CACNA1H* gene knockout on dendritic spines in mice

此外, *CACNA1H* KO 小鼠的识别记忆功能也是受损^[19,22]。焦虑与记忆功能受损与 ASD 有一定

关系,但并非其核心症状。社交异常和重复刻板行为是 ASD 的核心症状,在动物模型中主要由三箱实验和自梳理行为来评估。本研究的三箱实验结果显示,KO 小鼠与 WT 小鼠对陌生同类 S1 的探索兴趣均明显多于无生命物体 O,但 KO 小鼠对新的社会刺激 S2 的探索兴趣明显低于对已接触过的社会刺激 S1,证明 KO 小鼠的社交行为存在缺陷。此外,本研究发现 KO 小鼠的自梳理时间比 WT 小鼠显著增多,提示 KO 小鼠具有显著的重复印刻板动作。与此结果不同,Gangarossa 等^[19]在大理石埋藏实验中并未发现 Ca_v3.2 KO 小鼠存在重复或强迫行为,可能与实验动物的年龄不同有关。目前,*CACNA1H* 敲除导致小鼠出现 ASD 样表型的具体机制不明,有待进一步研究。

以往研究表明,ASD 患者大脑质量、体积、神经元数目与正常对照组相比均有显著差异^[23-24],但本研究中,与 WT 小鼠相比,KO 小鼠的体质量、脑质量和脑体积差异均无统计学意义,表明敲除 *CACNA1H* 对幼年期小鼠脑的大体结构无显著影响。小鼠行为异常往往是神经元回路失调和突触功能障碍导致的^[10]。与 ASD 发病有关的脑区包括海马、额叶皮质和杏仁核等。有研究显示,*CACNA1H* 突变可影响正常的神经元功能,特别是神经发生的过程^[25]。例如,Ca_v3.2 可通过激活 Caspase-3 调节早期胚胎脑发育过程中的神经祖细胞的分化^[5]。在 ASD 中已被证实存在海马齿状回形成缺陷以及神经发生失调^[26-27]。由于 Ca_v3.2 在海马齿状回区中大量表达^[28],因此敲除 *CACNA1H* 极有可能影响齿状回区神经元的发生。本研究证实 KO 小鼠海马齿状回区的神经元数目明显少于 WT 小鼠。

树突棘是信号传入的主要神经元结构,其数量、大小和形态是决定突触传递强度和稳定性的关键因素^[29],树突棘数目和形态的改变是 ASD 的重要发病机制之一^[30]。Ca_v3.2 在树突和树突棘大量分布^[31],说明其与树突结构和功能密切相关。以往研究发现,无论是 ASD 患者还是 ASD 模型动物均出现大脑树突棘密度增加,细长型/短粗型比例降低,即不成熟型居多的现象^[29]。2018 年,Huang 等^[32]采用高尔基染色(Golgi staining)方法发现了成年 *CACNA1H* KO 小鼠海马 CA1 区树突棘密度比 WT 小鼠少。Thy1-GFP-O 小鼠的皮层和海马区域有 10%~20% 的兴奋性神经元高表达绿色荧光蛋白,是被广泛应用于树突棘形态分析的小鼠动物模型。本研究证实幼年 KO 小鼠海马齿状回区树突棘密度增加,这一现象与 Huang 等^[32]的研究不同,可能与

小鼠的年龄、研究的脑区域及研究方法不同有关,但与 ASD 患者大脑树突棘改变类似^[29]。因在尼氏染色中发现 KO 小鼠海马齿状回区神经元数目明显少于 WT 小鼠,本研究重点观察了齿状回区神经元的树突棘变化,其他区域的树突棘是否有类似变化还有待进一步研究。此外,本研究发现 KO-GFP 小鼠齿状回区成熟与不成熟树突棘的比例无显著变化,表明树突棘数目的变化可能是导致 KO 小鼠 ASD 样表型的主要机制。兴奋性突触功能障碍是 ASD 的重要发病机制之一,今后我们将进一步对 *CACNA1H* KO 小鼠海马等区域神经元进行电生理记录,观察其树突棘密度改变是否导致神经元兴奋/抑制失衡等变化。

综上所述,本研究观察了幼年 *CACNA1H* KO 小鼠神经行为学、海马齿状回区神经元及树突棘的改变,在动物模型中证实了 *CACNA1H* 基因缺失与 ASD 的相关性,为后期进一步探讨 *CACNA1H* 基因缺失导致 ASD 样表现的分子和细胞机制研究提供了理论基础,并为 ASD 相关药物开发和临床治疗提供新的思路和线索。

参考文献

- [1] Baio J, Wiggins L, Christensen DL, et al. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years: Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014 [J]. *MMWR Surveill Summ*, 2018, 67(6): 1-23.
- [2] Bai D, Yip BHK, Windham GC, et al. Association of genetic and environmental factors with autism in a 5-country cohort [J]. *JAMA Psychiatry*, 2019, 76(10): 1035-1043.
- [3] Iakoucheva LM, Muotri AR, Sebat J. Getting to the cores of autism [J]. *Cell*, 2019, 178(6): 1287-1298.
- [4] Andrade A, Brennecke A, Mallat S, et al. Genetic associations between voltage-gated calcium channels and psychiatric disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3537.
- [5] Rebellato P, Kaczynska D, Kanatani S, et al. The T-type Ca²⁺ channel Ca_v3.2 regulates differentiation of neural progenitor cells during cortical development via caspase-3 [J]. *Neuroscience*, 2019, 402: 78-89.
- [6] Souza IA, Gandini MA, Zhang FX, et al. Pathogenic Ca_v3.2 channel mutation in a child with primary generalized epilepsy [J]. *Mol Brain*, 2019, 12(1): 86.
- [7] Splawski I, Yoo DS, Stotz SC, et al. *CACNA1H* mutations in autism spectrum disorders [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(31): 22085-22091.
- [8] Chourasia N, Osso-Rivera H, Ghosh A, et al. Expanding the phenotypic spectrum of *CACNA1H* mutations [J]. *Pediatr Neurol*, 2019, 93: 50-55.
- [9] Feng XJ, Ma LX, Jiao C, et al. Nerve injury elevates functional

- Ca_v3.2 channels in superficial spinal dorsal horn [J]. *Mol Pain*, 2019, 15: 1744806919836569.
- [10] Takumi T, Tamada K, Hatanaka F, et al. Behavioral neuroscience of autism [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2020, 110: 60 – 76.
- [11] Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, et al. Assessment of social interaction behaviors [J]. *J Vis Exp*, 2011(48): e2473.
- [12] Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice [J]. *J Vis Exp*, 2015(96): e52434.
- [13] Harris KM, Jensen FE, Tsao B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at post-natal day 15 and adult ages: Implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation [J]. *J Neurosci*, 1992, 12(7): 2685 – 2705.
- [14] Bader PL, Faizi M, Kim LH, et al. Mouse model of Timothy syndrome recapitulates triad of autistic traits [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(37): 15432 – 15437.
- [15] Iossifov I, O’roak BJ, Sanders SJ, et al. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder [J]. *Nature*, 2014, 515(7526): 216 – 221.
- [16] D’gama AM, Pochareddy S, Li M, et al. Targeted DNA sequencing from autism spectrum disorder brains implicates multiple genetic mechanisms [J]. *Neuron*, 2015, 88(5): 910 – 917.
- [17] Lee YH, Yamrom B, Wigler M, et al. Low load for disruptive mutations in autism genes and their biased transmission [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(41): E5600 – E5607.
- [18] Takata A, Miyake N, Tsurusaki Y, et al. Integrative analyses of de novo mutations provide deeper biological insights into autism spectrum disorder [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(3): 734 – 747.
- [19] Gangarossa G, Laffray S, Bourinet E, et al. T-type calcium channel Ca_v3.2 deficient mice show elevated anxiety, impaired memory and reduced sensitivity to psychostimulants [J]. *Front Behav Neurosci*, 2014, 8: 92.
- [20] Tao J, Hildebrand ME, Liao P, et al. Activation of corticotropin-releasing factor receptor 1 selectively inhibits Ca_v3.2 T-type calcium channels [J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 73(6): 1596 – 1609.
- [21] Henbid MT, Marks WN, Collins MJ, et al. Sociability impairments in genetic absence epilepsy rats from Strasbourg: Reversal by the T-type calcium channel antagonist Z944 [J]. *Exp Neurol*, 2017, 296: 16 – 22.
- [22] Chen CC, Shen JW, Chung NC, et al. Retrieval of context-associated memory is dependent on the Ca_v3.2 T-type calcium channel [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29384.
- [23] Bauman M, Kemper TL. Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism [J]. *Neurology*, 1985, 35(6): 866 – 874.
- [24] Courchesne E, Mouton PR, Calhoun ME, et al. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism [J]. *Jama*, 2011, 306(18): 2001 – 2010.
- [25] Chemin J, Nargeot J, Lory P. Neuronal T-type alpha 1H calcium channels induce neurogenesis and expression of high-voltage-activated calcium channels in the NG108-15 cell line [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(16): 6856 – 6862.
- [26] Cai Y, Tang X, Chen X, et al. Liver X receptor beta regulates the development of the dentate gyrus and autistic-like behavior in the mouse [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(12): E2725 – E2733.
- [27] Ito H, Morishita R, Nagata KI. Autism spectrum disorder-associated genes and the development of dentate granule cells [J]. *Med Mol Morphol*, 2017, 50(3): 123 – 129.
- [28] Bernal Sierra YA, Haseleu J, Kozlenkov A, et al. Genetic tracing of Ca_v3.2 T-type calcium channel expression in the peripheral nervous system [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 70.
- [29] Martínez-Cerdeño V. Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models [J]. *Dev Neurobiol*, 2017, 77(4): 393 – 404.
- [30] Katsarou AM, Galanopoulou AS, Moshe SL. Epileptogenesis in neonatal brain [J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2018, 23(3): 159 – 167.
- [31] Aguado C, Garcia-Madrone S, Gil-Minguez M, et al. Ontogenic changes and differential localization of T-type Ca_v(2+) channel subunits Ca_v3.1 and Ca_v3.2 in mouse hippocampus and cerebellum [J]. *Front Neuroanat*, 2016, 10: 83.
- [32] Huang IY, Hsu YL, Chen CC, et al. Excavolide-B enhances contextual memory retrieval via repressing the delayed rectifier potassium current in the hippocampus [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(11): 405.

(2020-02-18 收稿)

(本文编辑:任英慧)