

单位代码: 10222

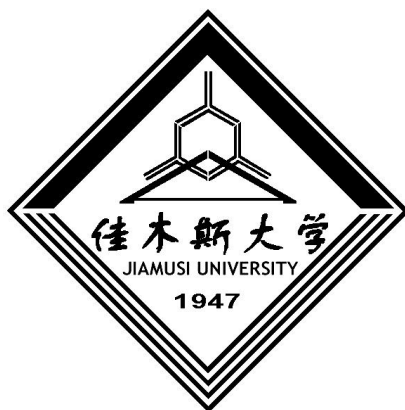
学号: 198083060

分 类 号:

佳木斯大学

硕士学位论文

论文题目: 人参皂苷 Rg1 对孤独症模型鼠行为及
NOX2/ROS 通路的影响



研 究 生 姓 名: 李文霞

学 科 (专 业) : 康复医学与理疗学

导师姓名、职称: 郭岚敏教授

论文答辩日期: 2022 年 5 月 31 日

佳木斯大学硕士学位论文

论文题目：人参皂苷 Rg1 对孤独症模型鼠行为及
NOX2/ROS 通路的影响

研究生：李文霞

学 科：康复医学与理疗学

指 导 教 师：郭岚敏教授 单位：佳木斯大学康复医学院

协助指导教师：李晓捷教授 单位：佳木斯大学康复医学院

姜志梅教授 单位：佳木斯大学康复医学院

张丽华教授 单位：佳木斯大学康复医学院

王菊莉教授 单位：佳木斯市中心医院

庞 伟教授 单位：佳木斯大学康复医学院

郭 津教授 单位：佳木斯大学康复医学院

学习期限：**2019 年 9 月至 2022 年 6 月**

学位授予单位：**佳 木 斯 大 学**

学 术 诚 信 承 诺

本人郑重声明：所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得佳木斯大学或其他教育机构的学位或证书所使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明并表示了谢意。

签名： 李之霞 日期： 2022.5.31

关于论文使用授权的说明

本人完全了解佳木斯大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

(保密的论文在解密后应遵循此规定)

签名： 李之霞 导师签名： 郭晓双 日期： 2022.5.31

目 录

一、摘要.....	2
二、Abstract.....	4
三、前言.....	6
四、文献综述.....	15
五、材料与方法.....	22
六、结果.....	38
七、讨论.....	43
八、结论.....	44
九、参考文献.....	52
十、致谢.....	53
十一、英文缩写.....	54
十二、攻读学位期间发表的学术成果.....	55
十三、附图.....	56

摘 要

目的：探究人参皂苷 Rg1 的干预对孤独症模型鼠异常行为和 NOX2/ROS 通路的影响。

方法：选取清洁级 Wistar 大鼠，雄性 10 只，雌性 20 只。参照 Schneider 等人的孤独症模型制备方法，在母鼠孕 12.5 天时腹腔注射 600 mg/kg 丙戊酸钠（Sodium Valproate, VPA），正常组孕鼠在相同时间点腹腔注射等量的生理盐水。通过对孤独症模型仔鼠进行发育学、行为学测试来鉴定模型是否制备成功。发育学检测方法：通过检测体重、脑重、方向趋向性、睁眼时间；行为学检测方法有三箱实验、社会交流实验、重复刻板行为实验。随机地选取正常组（NS 组）、模型组（VPA 组）、药物组（Rg1 组）仔鼠各 50 只，Rg1 组从第 7 天起每日腹腔注射人参皂苷 Rg1（40 mg/kg, ip），连续 3 周，NS 组、VPA 组每日注射同等剂量的生理盐水。采用 Morris 水迷宫测试学习记忆能力，其他发育行为学检测方法同上；通过 HE 染色法进行形态学检测，观测海马区 CA1、CA3、DG 区病理变化；采用免疫荧光染色法，检测活性氧（Reactiveoxygen Species, ROS）数量；试剂盒检测丙二醛（Malonic Dialdehyde, MDA）表达水平；Western blot 检测 NOX2 氧化酶组成蛋白 NOX2、p-P47phox 表达水平。

结果：1. 孤独症鼠模型鉴定：孤独症模型鼠不同时间节点的体重和脑重均明显低于 NS 组，睁眼时间延迟，前庭和运动发育落后（ $P<0.05$ ）。本实验于 P28 采用三箱实验、社会交流实验和重复刻板行为实验来检测模型鼠孤独症样核心症状。结果表明：孤独症模型鼠重复刻板行为累计时间增加，嗅觉分辨能力下降，对社会性气味偏好降低，社会交往能力和社会新奇性能力障碍（ $P<0.05$ ）。2. 人参皂苷 Rg1 对孤独症模型鼠发育和行为学的影响：结果显示，与 VPA 组相比，Rg1 组仔鼠 P28 时体重明显重于 VPA 组，刻板动作的累计时间减少，嗅闻社交性气味的时间增加，学习和记忆能力显著改善（ $P<0.05$ ）。3. 人参皂苷 Rg1 对孤独症模型鼠海马区形态学及氧化应激的影响：HE 染色显示，VPA 组仔鼠海马组织 CA1、CA3 和 DG 区神经细胞排列疏松、杂乱无序，细胞肿胀。人参皂苷 Rg1 的干预减轻了上述的病理改变。免疫荧光和试剂盒结果显示：于 P7、P28 日龄时 VPA 组仔鼠 ROS、MDA 产生较高（ $P<0.05$ ），在经过人参皂苷 Rg1 干预后，海马区 ROS、MDA 的水平下调（ $P<0.05$ ）。Western blot 检测结果显

示：VPA 组仔鼠海马区 NOX2、p-P47phox 蛋白表达水平于 P7、P28 日龄时均高于 NS 组 ($P<0.05$)。与 VPA 组相比，Rg1 组仔鼠海马区 NOX2、p-P47phox 表达水平均有所下调，但是 NOX2 表达水平下降不明显 ($P>0.05$)，而 p-P47phox 表达水平显著下降 ($P<0.05$)。

结论：1. 孤独症模型鼠海马组织 ROS、MDA 产生增加，NOX2、p-P47phox 蛋白表达水平升高；2. 人参皂苷 Rg1 可以明显减少孤独症模型鼠海马区 ROS、MDA 的生成，抑制 p-P47phox 蛋白表达，发挥神经保护作用；3. 人参皂苷 Rg1 能够改善孤独症模型鼠的学习记忆等方面能力，可能与抑制 NOX2/ROS 通路减少 ROS 的生成有关。

关键词：孤独症；海马；ROS；NOX2 氧化酶；人参皂苷 Rg1

Effects of ginsenoside RG1 on behavior and NOX2/ROS pathway in autism model rats

Abstract

Objective: To investigate the effects of Ginsenoside RG1 intervention on abnormal behavior and NOX2/ROS pathway in autism model rats.

Methods: Clean Wistar rats were selected, including 10 males and 20 females. According to the preparation method of Schneider autism model rats, the female rats were intraperitoneally injected 600 mg/kg sodium Valproate (VPA) at 12.5 days of gestation. The pregnant rats in the normal group were intraperitoneally injected with the same amount of normal saline at the same time. The developmental and behavioral tests of the offspring of the model group were carried out to identify whether the model was successfully prepared. Developmental detection methods: body weight, brain weight, directional tendency, eye opening time; Behavioral testing methods include three box test, social communication test and repeated stereotyped behavior test. 50 mice in the normal group, the model group and the drug group were randomly selected. The drug group was intraperitoneally injected with ginsenoside RG1 (40 mg/kg, IP) from day 7 for 3 weeks, and the normal group and model group were injected with the same dose of normal saline. Morris Water Maze test learning and memory ability, other behavioral development test methods are the same as above; HE staining was used to observe the pathological changes in CA1, CA3 and DG areas of the hippocampus for morphological detection. The number of reactiveoxygen species (ROS) was detected by immunofluorescence staining. MDA expression level was detected by kit. Western blot was used to detect the expression levels of NOX2 and p-P47phox, components of NOX2 oxidase.

Results: 1. Identification of mouse models of autism: the body weight and brain weight of the mice in the autism model were significantly lower than those in the NS group at different time points, and the time to open eyes was delayed, and vestibular and motor development was backward ($P<0.05$). In this study, three box experiment, social communication experiment and repetitive stereotypical behavior experiment were used to detect the core symptoms of ASD in model rats on P28. The results showed that the cumulative time of repetitive behavior increased, the olfactory resolution decreased, the preference for social odor decreased, and the social interaction ability and social novelty ability were impaired ($P<0.05$). 2. Effects of ginsenoside

RG1 on behavioral development in model group: The results showed that compared with VPA group, the body weight of offspring rats in Rg1 group was significantly heavier than that in VPA group at P28, the accumulative time of stereotypic action was reduced, the time of smelling social odor was increased, and the learning and memory ability was significantly improved ($P<0.05$). 3. Effects of ginsenoside RG1 on morphology and oxidative stress in hippocampus of model rats: HE staining showed that nerve cells in CA1, CA3 and DG areas of hippocampal tissue in model group were arranged loosely and disordered, and cells were swollen. After ginsenoside RG1 treatment, the pathological changes were relieved. Immunofluorescence and kit results showed that: At P7 and P28 days of age, the production of ROS and MDA was higher in VPA group ($P<0.05$), and the levels of ROS and MDA in hippocampus were down-regulated after ginsenoside Rg1 intervention ($P<0.05$). Western blot analysis showed that the protein expression levels of NOX2 and p-P47phox in hippocampus of VPA group were higher than those of normal group at P7 and P28 days of age ($P<0.05$). Compared with VPA group, the expression levels of NOX2 and p-P47phox in the hippocampus of Rg1 group were down-regulated, but the protein expression of NOX2 was not significantly decreased ($P>0.05$), while the protein expression of p-P47phox was significantly decreased ($P<0.05$).

Conclusion: 1. The production of ROS and MDA and the expression of NOX2 and p-P47phox protein in hippocampus of autism model mice increased; 2. Ginsenoside RG1 can significantly reduce the production of ROS and MDA in hippocampus of autism model mice, inhibit the expression of p-P47phox protein, and play a neuroprotective role; 3. Ginsenoside RG1 can improve the learning and memory abilities of autism model mice, which may be related to the inhibition of NOX2/ROS pathway and the reduction of ROS production.

Key words: Autism; The hippocampus; ROS; NOX2 oxidase; Ginsenoside RG1

前 言

孤独症谱系障碍（Autism Spectrum Disorder, ASD）是一组以社会交流和社会交往障碍，重复刻板行为和狭隘兴趣为主要特征表现的神经发育障碍性疾病^[1]。ASD 儿童多起病于 3 岁以前，其中约 1/4 的儿童经历 1-2 年的正常发育后出现发育退化现象。除了以上这些核心症状之外，ASD 儿童还往往伴有多种共患疾病如注意缺陷多动障碍（Attention Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD）、癫痫、睡眠障碍及胃肠道疾病等。研究显示 ASD 的患病率呈逐年上升趋势，据美国疾病预防控制中心统计，美国 8 岁 ASD 儿童的患病率从 2014 年的 16.8/1000（1/59）^[2]上升到 2016 年的 18.5/1000（1/54）^[3]，2018 年达到了 22.7/1000（1/44），部分地区像加利福尼亚州 ASD 儿童患病率甚至达到更高值^[4]。世界卫生组织依据中国现有人口数量预测 ASD 儿童数量将在 100 万-150 万左右，已占据了我国各类精神残疾的首位。

目前，公认为环境因素和遗传因素共同作用引起了 ASD 的发生。虽然遗传因素与环境因素发挥作用的具体机制尚不清楚，但是在大量的 ASD 儿童及模型中发现，两者都出现了免疫功能、氧化应激、凋亡及神经递质分泌等方面的异常。之前，对 ASD 发病机制的研究多集中于神经递质、神经炎症方面，在孤独症动物模型及 ASD 儿童的血清中均发现了神经递质及炎症因子的异常^[5,6]。上述研究虽然取得一定的成果，但这些物质的变化不具有特异性，并不能作为 ASD 的生物学标志物。通过神经影像学对 ASD 脑结构的观察研究，在 ASD 的神经解剖学方面取得一定的进展，这为 ASD 的早期诊断和临床的干预治疗提供了依据。但由于 ASD 患者的脑结构异质性较大，使这些影像技术只能作为 ASD 的辅助检查。氧化应激在 ASD 方面的研究兴起较晚，近几年大量的研究显示，ASD 存在氧化-抗氧化失衡的情况。而且活性氧（Reactiveoxygen Species, ROS）生成增加或抗氧化酶的活性减弱，都可能给 ASD 的神经元、蛋白质、脂质等带来不可逆的损伤^[7]。这些发现使氧化应激成为近来研究 ASD 发病机制的一大热点。

ASD 是一种伴随终身的疾病，一般预后较差，对 ASD 患者的生活质量、学习教育及寻求职业等造成严重的影响，无疑也将给患者家庭和社会带来沉重的经济和教育等多方面的压力。随着 ASD 患病率逐年增高，ASD 的预防和治疗已经成为了全球公共卫生共同关注的问题。在 ASD 的医疗方面，目前仍主要是以教育和康复训练为主，药物疗

法为辅。目前尚缺乏针对 ASD 核心症状的药物，药物的应用一般是针对 ASD 严重的伴随症状，短暂地辅助治疗，而且这些药物在使用的同时还需特别关注药物的副作用，如震颤、肥胖及胃肠道反应等。与抗抑郁症、抗精神病和抗癫痫类等的西药相比，自然界草植物药物具有不良反应少、耐药性好和应用范围广的特点，已成为当前开发新型 ASD 药物的热点。其中天然类药物人参皂苷 Rg1 已被证实能够在多种神经系统疾病中发挥神经保护作用，并在改善学习记忆能力和抗抑郁上取得了较好疗效。

本课题采用丙戊酸钠法制备孤独症鼠模型，通过对孤独症模型鼠应用人参皂苷 Rg1 治疗，行为学检测观察孤独症模型鼠行为；HE 染色观察模型鼠海马区神经细胞形态变化；免疫荧光染色和试剂盒分别检测 ROS 数量及 MDA 产生水平；Western blot 检测 NOX2、p-P47phox 蛋白表达水平。来研究人参皂苷 Rg1 对孤独症模型鼠异常行为以及 NOX2/ROS 通路的影响，对探讨 ASD 的发病机制和寻找新型治疗药物，具有一定的临床指导意义。

文献综述

一、ASD 概述

孤独症谱系障碍（Autism Spectrum Disorder, ASD）是一种异质性神经发育障碍疾病，以社会交往和沟通障碍、狭隘兴趣与刻板行为为主要的特征表现^[8]。研究显示，ASD 的患病率呈现全球大幅度上升的趋势，最新数据表明已达到了 1/44^[4]，加上终身伴随、生活自理能力较差的特点，给患者的家庭以及社会带来沉重的负担。目前已经引起全球教育、医疗等各界的关注，成为了全球性的公共卫生问题。

ASD 的病因和发病的机制尚不清楚，这成为了 ASD 在早期预防和临床治疗方面的阻碍。有科学研究表明环境因素和遗传因素共同作用是导致 ASD 发生的重要原因，在遗传因素方面，目前已经确定的 ASD 的易感基因已经达到一百多种，在敲除孤独症动物模型易感基因如 Shank3、FMR1 等后会出现孤独症核心症状样行为表现^[9, 10]，在临床上同卵双胞胎患 ASD 的概率要高于异卵双胞胎，都印证了遗传因素是导致 ASD 的主要因素^[11]。不过，有证据表明只有 20%-25% 的 ASD 儿童确定是遗传因素作用，其中包括 5% 的染色体异常、10%-20% 拷贝数变异和 5% 的单基因疾病^[12]。环境因素在 ASD 的病因中也同样扮演着重要角色，大量的研究显示母亲或父亲年龄偏高、丙戊酸盐摄入、有毒化学品暴露、母体糖尿病、类固醇生成活性增强、免疫激活等因素都会增加后代患 ASD 的风险^[13]。虽然遗传和环境因素导致神经发育受损具体的分子机制尚不清楚，但最近的研究表明，过度氧化应激、神经炎症和表观遗传修饰都参与其中^[14, 15]。特别在氧化应激方面，人们越来越意识到氧化应激可能与 ASD 的病理生理有关，在 ASD 儿童及模型中都发现了活性氧（Reactive oxygen Species, ROS）、脂质过氧化物产物丙二醛（Malonic Dialdehyde, MDA）等氧化应激指标的上调，而负责清除抵抗氧化产物的抗氧化酶的活性反而降低的情况^[7]。氧化-抗氧化失衡可能致使过量的 ROS 造成机体大分子物质的损伤，进而引起神经细胞的损伤。而且有研究显示脑部氧化应激反应水平与 ASD 严重程度相关^[16]，同时也印证了这一观点的正确性。

二、氧化应激

1. 氧化应激的定义

氧化应激可以定义为机体内氧化水平和抗氧化能力失衡的一种状态，偏向于氧化，导致 ROS 产生过量从而对细胞产生破坏作用。机体的 ROS 来源主要是线粒体和一些酶类，ROS 的清除能力取决于机体生成的一些抗氧化酶和外源性抗氧化剂摄入，其中抗氧化酶主要包括超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase，SOD）、过氧化氢酶（Catalase，CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathione Peroxidase，GPx）和谷胱甘肽（Glutathione，GSH）等。它们可以将体内形成的过氧化物转化为毒害较低或者是无害的化学物质，非酶促抗氧化剂是通过直接作用于氧化链反应或者促进抗氧化酶活性来调节氧化作用。ROS 产生过度或者抗氧化酶活性下降都会导致机体过量 ROS 无法得到相应的调控，从而引起重要的细胞器和生物学大分子的破坏，不可逆地损害甚至改变目标分子的正常功能，以及产生与癌症^[17]，神经变性^[18]和衰老^[19]等相关的损伤。所以氧化应激被认为是响应各种信号传导通路和病理生理情况促进细胞死亡的重要因素。脑组织是机体耗氧量最多的部位，占用全身大约 20% 的耗氧量，其所依赖的脂质含量和氧化代谢较高也使其成为最容易受到氧化应激损伤的组织^[20]，因此，氧化应激成为了众多神经系统类疾病发病机制重要的研究方向之一。

2. 氧化应激与 ROS

2.1 ROS 的种类

ROS 是指活性氧自由基，也是机体内含氧高活性物质的统称，能够调节组织稳态、细胞信号的传导、分化和生存，是细胞功能的主要调节剂。包含氧自由基和非基氧化剂，如超氧阴离子自由基、羟基自由基和过氧化氢（Hydrogen Peroxide，H₂O₂）^[21]。这些自由基之间可以通过酶促和非酶反应进行相互转换，如 GPxs 可以催化游离的 H₂O₂ 或有机氢过氧化物分别转化为水或相应的醇类^[22]；SOD 可以催化超氧化物转化为氧气和 H₂O₂^[23]。另外，一氧化氮（Nitric Oxide，NO）、过氧化亚硝酸盐、脂质氢过氧化物、硫酸根基、烷氧基自由基、过氧化自由基等含氧自由基能够 ROS 结合形成大量重要的活性氧化还原剂，在多种细胞内外的生理过程中产生了关键作用^[24]。

2.2 ROS 的来源

在机体内，ROS 具有来源方式多样和分布广泛的特点，在细胞质、细胞膜、线粒体、高尔基等细胞区室皆可产生^[25]。在众多来源中，线粒体呼吸链是其最主要的来源方式之一，其产生的 ROS 主要是在正常氧代谢过程中形成的，是 ATP 合成过程中氧化磷酸化的副产物。膜间吞噬细胞酶-激活的酶复合物烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶

(NOX2 氧化酶)，负责吞噬细胞的“呼吸爆发”，是 ROS 的另一个主要来源^[26]。除此之外，单氨基氧化酶、p66shc、 α -甘油磷酸脱氢酶、乌头酶等都可以通过不同的机制而生成 ROS^[27]。

2.3 ROS 的调控

ROS 具有双重调节的功能，发挥作用主要与其溶度的高低有关。生理浓度下的 ROS 可以调节蛋白质磷酸化，离子通道和转录因子，也是甲状腺激素的产生和细胞外基质的交联等生物合成过程所必需的物质，是生命稳态不可或缺的一部分^[28]。但是过量的 ROS 可通过诱导氧化应激、炎症和自噬，造成细胞和组织非特异性损伤，引起一系列病理过程^[29, 38]。有研究显示，ROS 在神经元发育中同样发挥着重要作用，在突触处，ROS 与长时程增强作用 (Longterm Potentiation, LTP) 相关，对于突触可塑性和记忆形成至关重要^[30, 31]。在体外原代神经元培养物中，百里醌诱导小脑颗粒神经元死亡之前，产生的 ROS 呈现增加状态^[32]。另外一项细胞实验发现，能够引起神经元发育障碍的杀真菌剂-噬菌酯是通过引起 ROS 的累积，造成神经元活力丧失^[33]。在慢性脑灌注不足的模型小鼠中研究发现，通过抑制海马体中过量的 ROS 和神经炎症，可以显著改善模型小鼠认知缺陷^[18]。由此可以看出 ROS 与生命健康状态和神经系统性疾病密切相关。

3. 氧化应激与 ASD

最近，越来越多的证据支持氧化应激参与了一些神经系统性疾病的病理机制，特别是在 ASD 中。在临床试验中，Nagwa 等人测量了从 ASD 患者和健康对照组分离的外周血单核细胞 (PBMC) 与氧化应激相关的 84 个基因的转录模式，结果显示 ASD 患者无论疾病的严重程度如何，都会改变 PBMC 的抗氧化状态。此外还显示出 ASD 患者 5 个氧化应激调节基因 (GCLM、SOD2、NCF2、PRNP 和 PTGS2) 的转录失调，FTH1 和 TXN 基因在不同严重程度的 ASD 患者上表现出了区别，严重的 ASD 患者 FTH1 和 TXN 基因 mRNA 丰度低于轻度 ASD 患者^[34]。通过勘测 ASD 儿童血清和脑部的氧化应激相关分子发现，与发育正常的儿童相比，ASD 儿童体内氧化应激产物 ROS、MDA 升高，内源性抗氧化酶活性降低即 SOD, GPx 和 CAT 等活性的改变，上述的变化都说明了 ASD 儿童异常氧化应激水平^[35-37]。此外，一项关于 ASD 儿童的血液氧化应激标志物 Meta 分析从 87 项研究中提取数据，涉及到 4928 名 ASD 儿童和 4181 名健康对照儿童，结果显示 ASD 儿童的血液中氧化谷胱甘肽 (GSSG)、MDA、同型半胱氨酸、S-腺苷同型半胱氨酸、NO 和铜的浓度高于正常儿童。而 GSH、总谷胱甘肽、GSH /

GSSG、tGSH / GSSG、蛋氨酸、半胱氨酸、维生素 B9、维生素 D、维生素 B12、维生素 E 等显著降低，这些结果加强了氧化应激与 ASD 发病机制相关的临床证据^[7]。

在孤独症基础实验中，研究发现 BTBR 敲除的孤独症模型小鼠小脑和中性粒细胞的脂质/蛋白质氧化产物、NOX2 氧化酶和诱导型一氧化氮合酶（Induced Nitric Oxide Synthase, iNOS）表达水平增加，GSH 和酶促抗氧化剂 SOD、GPx 水平降低。在干预谷胱甘肽耗竭剂后，BTBR 型小鼠的重复刻板行为进一步加重，同时伴随着 GSH 水平进一步降低，iNOS 和 NOX2 表达的上调，上述结果说明氧化应激可能在诱导 ASD 的异常行为上发挥一定的作用^[39]。此外，王秀敏等人研究发现糖尿病孕鼠产下的后代出现了孤独症样异常行为表现，他们通过体内外的实验推测该情况发生的机制可能与高血糖介导的持续氧化应激和 SOD2 抑制有关。在产前或产后使用抗氧化剂可以一定程度上改善由母体糖尿病诱导的孤独症样异常行为，更进一步验证这个猜想的正确性^[40]。最近一项研究发现，暴露在苯丙氨酸下的雄性小鼠，可能通过诱导氧化应激和 mTOR 途径的激活而产生孤独症样社会行为，在其脑组织也检测到了 ROS 水平升高和 GSH 水平降低，以及海马体病理改变^[41]。

所以有强有力的证据表明，氧化应激可能是引起 ASD 病理改变和异常行为的主要贡献者。

三、NOX2 氧化酶

1. NOX2 氧化酶种类及分布

NOX2 氧化酶发现于临床上一种名为慢性肉芽肿性疾病（CGD），该疾病以反复发作和严重的细菌和真菌感染以及过度炎症为特征。有研究发现 CGD 的吞噬细胞缺乏“呼吸爆发”，杀菌能力减弱但是其吞噬作用的功能几乎正常^[42, 43]。后来 Segal 等人在 CGD 患者中发现他们体内均缺失一种蛋白。该蛋白最初被命名为 b558，现如今被称为 NOX2^[44, 45]。后来，研究者又从不同种类的细胞中发现了一系列 NOX2 的同源物，它们有 NOX1、NOX3、NOX4、NOX5、DUOX1、DUOX2，与 NOX2 一起被称为 NOX 蛋白家族^[46]。每个 NOX 家族成员都是跨膜蛋白，并保留了一定的构造共性，即 COOH 末端是 NADPH 结合位点；靠近最 COOH 末端跨膜结构域是 FAD 结合区域；都有六个保守的跨膜结构域；以及四个高度保守的血红素结合组氨酸^[47]。

NOX 氧化酶广泛分布于机体各个组织细胞中，单个亚型在特定组织细胞而高表达。例如，NOX1 高表达于结肠上皮细胞^[48]；NOX2 高表达于巨噬细胞^[49]；NOX3 高表

达于内耳^[50]；NOX4 高表达于肾脏^[51]；NOX5 高表达于脾脏和睾丸^[52]；DUOX1/2 高表达于甲状腺^[53]。虽然这些亚型都有产生 ROS 的能力，但每一种亚型都有独特的调控和分布，在各种细胞类型中发挥不同的作用。其中 NOX2 氧化酶是与中枢神经系统性疾病联系最为密切也是近几年研究最为广泛的一种亚基。

2. NOX2 氧化酶的激活机制

NOX2 氧化酶是触发氧化应激的关键酶，也是产生 ROS 的重要来源。是由两个膜结合成分（p22phox 和 NOX2）以及 4 个细胞浆成分（p40phox，p47phox，p67phox 和 Rac）所构成的复合体，其中 NOX2 是其主要的功能亚基^[54]。一般情况下，胞膜亚基 p22phox 和 NOX2 稳定在细胞膜上，p47phox、p67phox 等存在于胞浆中。当细胞受到外界刺激后，胞浆中的 p47phox 发生磷酸化，自抑制区失活，N 端与磷酸化后的 p67phox C 端 Src 同源结构域结合，SH3 结构域在 p-p67phox PBI 结构域与 p40phox 结合的同时与细胞膜上的 p22phox 结合，其 N 端的 phox 同源结构域可以与细胞膜的磷脂结合。Rac 是在与 GTP 结合后激活，然后与 p-p67phox 的 N 端结合，当 4 个细胞浆成分一起募集到细胞膜时，NOX2 与胞浆中的 Rac、p-p67phox 相关结构发生结合，这样就共同组成了具有活性的 NOX2 氧化酶复合体^[55,56]。NOX2 氧化酶活化后可将电子跨胞膜转运给氧分子，再经过下游二级反应产生 ROS。ROS 虽然是机体先天免疫反应的重要组成部分，但同时又可以诱导神经炎症造成组织损伤。确保氧化酶亚基仅在收到适当信号时相互结合形成活性酶复合物是维持机体平衡的关键，胞内亚基的磷酸化作为 NOX2 氧化酶活化和组装的主要调节因子，成为了研究 NOX2 氧化酶活性的一个切入点。

3. NOX2 氧化酶与神经系统疾病的关联

NOX2 氧化酶又称为巨噬细胞 NOX，是 NOX 家族中全身分布最广泛的亚基，如胸腺、小肠、脾、胰腺、神经元、心肌细胞、骨骼肌细胞和肝细胞等均有表达，在中枢神经系统中，高表达于小胶质细胞（中枢神经系统常驻的巨噬细胞）^[57]。有研究显示在活化小胶质细胞中 NOX2 激活更为明显^[60]。各种炎症因子、脂多糖等刺激均可以诱导 NOX2 氧化酶发生活化，活化后产生的 ROS 可转化为 H₂O₂ 或与 NO 反应生成过氧亚硝酸盐，损害神经元与认知功能^[58,59]。此外，NOX2 氧化酶还能够与丝裂原激活蛋白激酶、蛋白激酶 B、核转录因子 κ B 等信号通路相互作用，参与调节炎症反应，产生的炎症因子，再刺激 NOX2 氧化酶的活化，从而形成一个恶性循环^[61-62]。有研究发现小鼠海马体中的 NOX2 氧化酶可能是 LTP 和记忆功能所需的超氧化物产生的来源^[63]。由上可

以看出 NOX2 氧化酶与神经细胞的损伤及学习记忆功能有着密切联系。这一推论在后期大量的细胞动物实验中得到了认证,在毛果芸香碱诱导的癫痫动物模型中,模型鼠在夹竹桃麻素(一种 NADPH 氧化酶抑制剂)干预后可减少癫痫发作次数和减轻海马区神经元的死亡及氧化损伤^[64]。在中风小鼠模型中,NADPH 氧化酶抑制剂显著减少了中风小鼠梗塞体积,提高了中风后的存活率和神经功能的恢复^[65]。此外,Sun 等人在帕金森体内外实验中,均验证了通过促进 NOX2 mRNA 降解可以防止多巴胺能氧化损伤,发挥神经保护作用^[66]。Zhang 等人也在脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导阿尔茨海默病(Alzheimer Disease, AD)的细胞模型中,研究发现人参皂苷 Rg1、抗氧化剂及夹竹桃麻素都达到了显著降低 NOX2 和 NLRP1 炎性体的表达,减少 ROS 和细胞因子的产生,减轻神经元损伤和凋亡的程度。诸多其他神经系统疾病通过抑制 NOX2 氧化酶也取得了较理想的结果^[67]。

4. NOX2 氧化酶与 ASD 的关联

虽然 NOX2 氧化酶在神经系统疾病的研究已经取得一定的进展,但目前在神经发育障碍性疾病的 ASD 上研究还非常的少,国内的尚未见报道 NOX2 氧化酶与 ASD 的关联的相关研究。国外的研究报告显示,ROS 形成的通路与氧化防御之间的调节失衡会对动物模型的发育产生不利影响,导致产后形态缺陷和神经发育等功能障碍,这可能与 ASD 功能异常特别相关,而诱导 ROS 产生的 NOX2 氧化酶可能是发病机制之一^[68]。最近在一项探究环境污染物邻苯二甲酸二酯对 BTBR 型孤独症模型鼠影响的实验中发现,孤独症模型鼠 NOX2、iNOS 等表达水平增加。施加环境污染物后模型鼠异常行为出现加重,生化因子 NOX2、iNOS 等的表达进一步上升,所以推测邻苯二甲酸二酯可能是通过增强氧化应激反应从而加重了孤独症模型鼠异常行为^[69]。在 ASD 患者中性粒细胞中也同样得到了 NOX2 表达水平增加的结果^[70]。此外,Nadeem 等人在 2017 年和 2020 年相继得出 NOX2 在 ASD 患者的 T 细胞和 B 细胞含量升高,并通过体外细胞培养发现 NOX2 的增加与 Toll 样受体 4 密不可分^[71, 72]。但至今尚未见报道针对 NOX2 氧化酶来预防或者治疗 ASD 的研究。

四、ASD 的治疗

由于对 ASD 发病机制的研究尚浅,无法做到针对性的靶向治疗。目前,ASD 的治疗仍然以临床的综合康复治疗为主,药物治疗只作为辅助手段。如今被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于 ASD 患者的药物只有利培酮和阿立哌唑^[73]。抗精神病药物

利培酮和阿立哌唑在 ASD 的治疗上，多项研究证明它们对改善 ASD 儿童的易怒、刻板行为和多动方面有疗效，但是伴有体重增加、血脂异常、高血糖、头昏、攻击性和锥体外系副作用等方面的问题，所以它们只有在治疗有易怒问题的 ASD 患者时才能被审批使用^[74, 75]。其他类型的药物如氟西汀、拉莫三嗪、双丙戊酸钠、哌甲酯、托莫西汀、可乐定等一般都是用于治疗 ASD 患者的共患病（自伤行为、ADHD、癫痫、睡眠等），对于 ASD 核心症状的有效性仍缺乏循证依据，而且在使用过程中也会产生不同程度的不良反应^[76-77]。随着对 ASD 认识地逐渐加深，其药物选择的方向也越来越广，天然类生物活性物质由于具有较高的安全性和耐药性，成为了一种新颖且有吸引力的治疗 ASD 药物选择。

萝卜硫素是一种源自西兰花的异硫氰酸酯，具有抗炎、抗氧化神经保护作用。2014 年 Kanwaljit 等人将萝卜硫素应用在 ASD 患者身上进行了一项安慰剂对照，双盲，随机临床试验。在 ASD 患者应用萝卜硫素 18 周后，经临床全球印象改善量表（CGI-I）评估显示在社交互动，异常行为和言语交流方面都有所改善^[78]。2019 年 Ahmed 等人研究发现，萝卜硫素可以改善 BTBR 型孤独症模型鼠的社交互动和刻板行为，作用机制可能是通过降低中性粒细胞/小脑中的氧化应激指标，提高酶抗氧化防御能力，调节了外周和大脑中的氧化-抗氧化失衡^[79]。随后 Andrew 等人对萝卜硫素在 ASD 患者的疗效进行一项 Meta 分析，结果显示萝卜硫素可以显著改善 ASD 患者的生化标志物，且耐受性非常好，安全有效^[80]。另一种草药姜黄素也是近几年用来治疗神经系统性疾病较为热门的研究药物，因其安全性高，具有抗氧化、抗炎、抗癌和抗菌活性的能力而获得全球认可^[81]。所以人们越来越关注姜黄素在预防和治疗 ASD 的疗效。有研究者在 VPA 诱导的孤独症模型鼠中发现，姜黄素可以上调颞叶大脑皮层脑源性神经营养因子（Brain-derived neurotrophic factor, BDNF）的表达，一定程度的改善模型鼠异常发育和行为^[82-83]。在孤独症其他模型中也取得了较好的疗效，如 Petrilla 等人在 BTBR 型孤独症模型鼠中干预姜黄素 3 周后，显著缓解模型小鼠孤独症样社会缺陷和脑氧化应激状态，而且改善效果呈剂量依赖性^[84]。Ranjana 等人在丙酸诱导的孤独症模型鼠干预姜黄素 4 周，结果显示姜黄素通过抗氧化、抗炎症反应改善了模型鼠的异常行为^[85]。

除此之外，植物来源的生物活性物质木犀草素和白藜芦醇等在实验中显示出优异的神经保护作用，在治疗 ASD 方面也显示出了希望，但由于缺乏临床试验暂时未正式应用治疗 ASD 患者^[86]。考虑到以上天然类药物通过抑制中枢神经系统异常病理反应对

ASD 神经元发挥保护作用，从而改善了 ASD 异常行为。因此推测具有神经保护作用的人参皂苷 Rg1 有可能通过抑制孤独症模型鼠氧化应激反应，降低氧化应激因子的水平从而改善孤独症模型鼠的学习记忆等能力。

五、人参皂苷 Rg1

1. 人参皂苷 Rg1 的生物学活性

人参是我国传统的中草药之一，它在提高抵抗力、开发智力、保护心脑血管系统、抗氧化及抗肿瘤等方面发挥重要作用，具有很高的营养及药用价值。研究发现人参无论是作为食品还是药物产品都非常安全，如今普遍用来制作食品、保健产品及疾病的预防^[87-89]。人参皂苷 Rg1 是其主要的有效活性成分之一，它是一种四环三萜衍生物的单体，主要从人参的根部提取和纯化。研究表明人参皂苷 Rg1 对中枢神经系统有一定的调节作用，它能够平衡大脑皮层兴奋和抑制过程，从而减少大脑兴奋时的疲惫性，提高学习记忆和认知能力，达到益智功效^[90,91]。作用于脑组织时，人参皂苷 Rg1 的渗透性良好，能够透过血脑屏障，到达额叶中区、海马区以及侧脑室^[92]，发挥抗炎、抗氧化、抗凋亡、抗衰老、雌激素样等作用保护神经系统。

2. 人参皂苷 Rg1 在神经系统疾病的治疗作用

人参皂苷 Rg1 已被证明是 AD、抑郁症、缺氧缺血性脑病、帕金森等神经系統性疾病潜在的神经保护剂。国内外研究发现，人参皂苷 Rg1 在 LPS 诱导的帕金森模型鼠中，能够抑制小胶质细胞的过度活化，黑质内炎性因子和 i-NOS、COX-2 蛋白的表达，发挥神经保护作用^[93]。在 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病模型鼠中，人参皂苷 Rg1 能够显著改善模型鼠的认知功能，降低 A β 堆积及 MDA 水平，提高抗氧化蛋白酶的活性^[94]。能够通过抑制自然老化鼠中 NADPH 氧化酶活性、ROS 的生成和 NLRP1 炎症小体的表达，从而对海马神经元的老化损伤起到一定的保护作用^[95,96]。在抑郁症模型大鼠中改善了腹内侧前额叶皮层内神经元退化，能够预防和显著缓解大鼠慢性应激引起的抑郁样行为^[97,98]。人参皂苷 Rg1 还可以改善氯化锂-匹罗卡品诱导的癫痫大鼠海马区神经元形态不完整，细胞间隙增大及排列紊乱的情况，下调氧化应激和炎症因子（MDA、IL-1 等）的表达，降低癫痫大鼠的癫痫发作等级^[99]。此外，研究表明临床上用于治疗脑梗死的通心络胶囊所含的人参皂苷 Rg1 是其具有减轻脑组织损伤、改善神经系统功能、促进脑梗后神经血管再生等多重功效的有效成分之一^[100]。开心散中的人参皂苷 Rg1 也能够发挥抗痴呆、抗抑郁的作用，在阿尔茨海默病和抑郁症的临床试验中取得了不错疗效

[101]。抗癌药物康艾注射液、治疗脑梗死的复方参龙胶囊等有效成分都含有人参皂苷 Rg1^[102, 103]。可见利用人参皂苷 Rg1 治疗神经系统方面的疾病是可行的。

目前，人参皂苷 Rg1 在 AD、帕金森、脑缺血缺氧性脑病及抑郁症等中枢系统疾病方面的研究较为广泛，但尚不清楚其在 ASD 的应用效果以及可能机制。本研究旨在通过在 VPA 诱导的孤独症模型鼠身上应用人参皂苷 Rg1，来探讨人参皂苷 Rg1 对孤独症模型鼠学习记忆等能力及 NOX2/ROS 通路的影响，以期望为 ASD 的临床治疗及发病机制提供新的研究思路。

材料和方法

一、材料

1. 实验动物

在佳木斯大学实验动物饲养中心购买健康成年的清洁级 Wistar 大鼠 30 只，其中雌性 20 只，体重在 150-210 g 之间，雄性 10 只，体重在 180-230 g 之间，许可证号：SCXK（吉）-2020-0002。在光线、温度、湿度适宜的条件下饲养两周，适应环境。实验期间给予充分的饲料和水，并严格按照佳木斯大学实验动物保护条款及实验程序规定饲养动物。

2. 主要试剂

丙戊酸钠粉末	美国 Sigma 公司
人参皂苷 rg1（sg8330）	索莱宝生物科技公司
4%多聚甲醛	哈尔滨宝信生物
10%水合氯醛	索莱宝生物科技公司
PBS 粉末	武汉赛维尔生物科技
p47 phox Antibody	EterLife UK
NOX2 antibody	EterLife UK
Goat Anti-rabbit IgG/HRP antibody	索莱宝生物科技公司
BSA	roche
TWEEN 20	索莱宝生物科技公司
蛋白 Marker	Therm（Fermentas）
β -actin	佰思诺生物科技公司
GAPDH	佰思诺生物科技公司
BCA 蛋白定量检测试剂盒	佰思诺生物科技公司
磷酸化蛋白酶抑制剂	佰思诺生物科技公司
HRP 标记山羊抗大鼠	佰思诺生物科技公司

3. 主要仪器及设备

电子天平	梅特勒-托利多仪器有限公司
台式离心机	上海安亭科学仪器厂
冷冻离心机	heal force
纯水仪	重庆艾科浦
涡旋混合器	天悦电子
包埋机	武汉俊杰电子
病理切片机	上海徕卡仪器
正置光学显微镜	日本尼康
冰箱	西门子
电泳仪	北京六一仪器厂

二、实验方法

1. 孤独症模型制备

选取 Wistar 大鼠，雌性 20 只，雄性大鼠 10 只，当雌鼠体重达到 180 g 以上，雄鼠体重达到 250 g 以上，按照 2: 1 或 1: 1 的雌雄比例于下午 17 点进行合笼，次日早晨 7 点检查阴道口，以查到阴栓或精液为妊娠第 0.5 天，然后立即将孕鼠和雄性大鼠分笼饲养。参照 Schneider 等人的孤独症模型鼠建立的方法^[104]，随机选取 15 只母鼠在孕 12.5 天时腹腔注射 600 mg/kg VPA（用生理盐水按 250 mg/mL 比例配成溶液），产下的仔鼠为孤独症模型鼠；剩下 5 只孕鼠在孕 12.5 天时腹腔注射同等剂量的生理盐水，产下的仔鼠则为正常组，记为 NS 组。将仔鼠出生当天记为第一天（P1），于 P21 断奶，与母鼠分笼饲养。

2. 人参皂苷 Rg1 药物干预

在 P7 时，随机选取 100 只孤独症模型鼠，50 只 NS 组仔鼠。将孤独症模型仔鼠按照随机数字表法分为两组，50 只作为模型对照组，记为 VPA 组，50 只进行人参皂苷 Rg1 干预，记为 Rg1 组。Rg1 组仔鼠从 P7 天开始每日腹腔注射人参皂苷 Rg1 40 mg/kg^[105]（10 mg/mL，生理盐水配制），连续 3 周，VPA 组和 NS 组仔鼠每日腹腔注射等量生理盐水。三组仔鼠饲养在相同环境（垫料干燥、饲料和饮水充足）。

3. 发育学检测

3.1 体重检测

于 P7、P14、P21、P28 时，随机地选取 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠各 10 只，称重并记录各组仔鼠不同时间点的体重（g）。

3.2 睁眼时间检测

于 P12、P13、P14、P15、P16 时，随机地选取 NS 组、VPA 组仔鼠各 10 只，观察仔鼠睁眼状况并记录得分。所采用评分标准具体如下：若 2 只眼睛均未睁开记为 0 分；睁开 1 只眼睛记为 1 分；睁开 2 只眼睛记为 2 分。

3.3 方向趋向性检测（倾斜板试验）

于 P7、P8、P9、P10 时，随机地选取 NS 组、VPA 组仔鼠数量各 10 只，将仔鼠头朝下放置在倾斜度在 20-25°之间的光滑倾斜板上，观察并记录仔鼠完成转身 180°的活动情况及所用时间（s）。仔鼠完成转身时间的长短反应动物前庭感觉及运动机能发育情况。

3.4 脑重测定

于 P7、P14、P21、P28 时，随机地选取 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠各 6 只，首先腹腔注射 10%水合氯醛（0.4 mL/100 g 体重）进行麻醉，当仔鼠四肢无法站立及捏尾部无反应时在其剑突下剪开上腹壁，开胸充分暴露心脏，然后从左心尖处进针，剪开右心耳，先用生理盐水冲洗，见仔鼠四肢和口周发白、肝脏发黄后再换 4%多聚甲醛溶液进行固定，待仔鼠全身僵硬后进行断头取脑。去除嗅球以及延髓以下组织，在电子天平上称重并记录三组仔鼠不同时间点的脑重。

4. 行为学检测

4.1 社会交往试验---三箱试验

于 P28 随机地选取 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠各 6 只。准备一个由三个箱室所构成的箱子，每个箱室规格为 20 cm×40 cm×22 cm，箱子内部由透明的树脂玻璃隔板隔开，隔板可以部分开放，开放空间可以满足仔鼠随意进入各个箱室。在左右两侧箱室相同位置各放一个规格相同的笼子，笼子大小可以容纳一只大鼠。在正式实验开始前打开两个隔板可开放区，将被测鼠从中间箱室放入，使其可以自由在三个箱室自由活动，适应环境 5 min。实验前 10 min 社交能力测试：将陌生鼠 1（与被测鼠鼠龄相近，不同窝的仔鼠）随机放进左侧或右侧箱室的笼子里，另外一侧笼子空置；将测试鼠从中间箱室放入，同时撤掉可活动的玻璃树脂板，让测试鼠在三个箱室里自由活动 10 min；记录

测试鼠与陌生鼠 1 或空置笼子之间的接触时间，当测试鼠出现嗅笼子或陌生鼠、用前肢勾住笼子或前肢搭到笼子上及与陌生鼠相互打闹等动作时计时。

实验后 10 min 社交新颖性测试：陌生鼠 2（与测试鼠鼠龄相近，不同窝的仔鼠）放入另一侧空置的笼子中，将测试鼠从中间箱室放入，同时撤掉玻璃树脂板，测试鼠在三个箱室里自由活动 10 min；记录测试鼠分别与陌生鼠 1 和陌生鼠 2 的接触时间，记录时间方式同上。

三箱实验利用的是鼠的群居性和社会性并形成社交记忆的原理^[106]，发育正常的鼠具有一定的社交能力，面对空笼和同类时跟愿意接触同类；当面对熟悉鼠和陌生鼠时更愿意接近陌生鼠，表现出一定的社交新奇性能力。所以当测试鼠在实验前 10 min 中与空笼的接触大于与陌生鼠 1 的接触时间时，说明测试鼠社交能力较差；当测试鼠在实验后 10 min 中与陌生鼠 1 的接触大于与陌生鼠 2 的接触时间时，说明测试鼠社交新奇性较差。

4.2 社会交流测试

于 P28 时，随机地选取 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠各 10 只，进行社交气味和非社交性气味分辨测试：先预备好蘸取生理盐水、酒精和鼠尿这三种液体的棉签，然后将测试鼠放到洁净无气味的箱子里，按照生理盐水、酒精和鼠尿的顺序将棉签依次放置到检测鼠能够触及到的地方，观察并记录测试鼠嗅闻蘸有不同液体棉签的持续时间。

4.3 重复刻板行为检测

于 P28 时，随机地选取 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠各 10 只，将测试鼠放置在 45 cm×45 cm×35 cm 的干净无气味的箱子中自由活动 10 min，保持周围环境安静，观察并记录测试鼠刻板动作（转圈、跳跃、梳理毛发、摇头和后两脚站立等）的累计时间。

4.4 学习记忆能力检测---Morris 水迷宫测试

于 P24、P25、P26、P27、P28 时，随机选取 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠各 10 只，进行水迷宫测试。水迷宫是一个半径 75 cm 的圆形水池，内壁为黑色，深度为 40 cm，整个水池可平均分为四个象限（SW、NW、SE 和 NE）。把逃生平台放置在一个象限的正中央，距泳池边缘 15 cm 的地方。在逃生平台所在象限，箱壁等高的位置固定 1 个五角星标记物（高逃生平台约 20 cm），作为逃生平台的空间参考。测试时将水池中的温度保持在 22±2℃，逃生平台浸没在水面以下 1 cm 的高度，用幕布将水池围成一

圈，将测试人员与测试鼠隔开，避免对其造成干扰。在训练期间所有参数保持不变，测试时鼠的运动轨迹全程录制。

4.4.1 定位航行实验：逃生平台放到 SW 象限正中，将测试鼠首先放入离平台最远的象限 NE 中，放入时测试鼠背对实验人员面朝池壁，然后按照顺时针的方向依次放入其他象限。从测试鼠入水开始到爬上平台的时间记为逃避潜伏期。最长的游泳时间设定为 60 s，若测试鼠 60 s 仍无法爬上平台，则由实验者用手引导它爬上平台，并在平台上进行 10 s 视觉提示，对平台位置进行空间学习和记忆，同时判定测试鼠该象限逃亡失败。若测试鼠 60 s 内爬上了平台，同样在平台进行 10 s 视觉提示，并判定测试鼠该象限逃亡成功，然后将测试鼠从池中取出。测试鼠从池中取出后，立即用毛巾擦干，然后放回饲养笼里。观察并记录测试鼠从每个象限到平台所需时间，该天的逃避潜伏期为四个象限的逃避潜伏期平均值。所有测试均在每天相同的时间点进行，以减少因时间变化而导致的误差。

4.4.2 空间探索实验：在最后一次定位航行训练 24 h 后进行空间探索实验，实验前先撤掉水池中的逃生平台，并将原来放置平台的象限作为目标象限，将测试鼠放入离目标象限距离最远的象限 NE 中，观察并记录测试鼠 60 s 内穿越目标象限的次数。

5. 形态学检测

5.1 脑组织的准备

随机地选取 P28 天 NS 组、VPA 组、Rg1 组的仔鼠各 3 只，灌注方法与称量脑重时相同，最后将采取的脑组织置于 4%多聚甲醛中再固定备用。

5.2 石蜡包埋

将固定好的脑组织用梯度酒精（30%、50%、70%、80%、90%、100%）进行脱水，每个梯度脱水 1-2 h，将脱水后的组织依次放在二甲苯酒精混合液、二甲苯（I、II）、二甲苯石蜡混合液各 1 h，然后用石蜡液进行包埋。

5.3 HE 染色

用切片机将包埋好的石蜡块切成厚度约为 4 μm -5 μm 的薄片，然后进行如下步骤：石蜡切片脱蜡水洗。依次放置于二甲苯（I、II）各 20 min-无水乙醇（I、II）各 10 min-酒精梯度（95%、90%、80%、70%）各 5 min-蒸馏水洗；苏木素-伊红染色；脱水封片：将切片依次放入 95%酒精（I、II）、无水乙醇（I、II）和二甲苯（I、II）各 5 min 脱水至透明，取出稍晾干，进行封片；显微镜下病理分析并进行图像采集。

6. 免疫荧光 ROS 检测

6.1 组织的提取

随机选取 P7 NS 组、VPA 组, P28 天 NS 组、VPA 组、Rg1 组的仔鼠各 3 只, 用水合氯醛进行麻醉后, 直接断头取出去除嗅球以及延髓以下组织的部分, 放入-80℃冰箱备用。

6.2 ROS 检测步骤

6.2.1 组织固定: 当组织在 4%多聚甲醛固定 24 h 以上后, 取出修整。

6.2.2 脱水: 分别置于 15%、30%的蔗糖溶液内, 4℃冰箱脱水沉底。

6.2.3 OCT 包埋: 先用滤纸将组织表面水分吸干, 然后将切面朝上放在包埋台上, 在组织周围滴上 OCT 包埋剂, 进行速冻包埋, 当 OCT 变白变硬后可进行切片。

6.2.4 切片: 先将组织面修切平整再进行切片, 切片厚度在 8-10 μm 之间, 然后将切片组织贴于载玻片上, 放入-20℃冰箱保存备用。

7. 海马组织 MDA 含量的检测

随机选取 P7 NS 组、VPA 组, P28 天 NS 组、VPA 组、Rg1 组的仔鼠各 6 只, 采用试剂盒测定海马组织匀浆液中 MDA 的表达水平, 来查探机体内脂质过氧化的程度及细胞的损伤程度。腹腔注射水合氯醛待仔鼠四肢无法站立捏尾无反应后断头, 开颅分离出仔鼠海马组织, 放入离心管, 置于-80℃冰箱备用。具体的检测步骤严格遵照试剂盒说明书进行。

8. 海马区 NOX2、p-P47phox 蛋白表达水平的检测

8.1 组织总蛋白提取

组织块先用低温 TBS 洗涤 2-3 次, 以去除血污, 然后再切割成小块放于匀浆器, 加入 10 倍组织体积的试剂 (使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂)。在冰面上彻底匀浆后, 将匀浆液转移至 1.5 ml 离心管中, 振荡, 冰浴 30 min, 期间用移液器反复吹打, 确保细胞完全裂解。最后离心 5 min, 收集上清, 即为总蛋白溶液。采用 BCA 法进行蛋白浓度测定。完成后将蛋白放入沸水中煮 5 min, 冷却后放入-80℃冰箱备用。

8.2 SDS-PAGE 电泳

清洗玻璃板-灌胶与上样-加足够的电泳液后上样电泳, 电泳至溴酚蓝刚跑出即可终止。

8.3 转膜

准备 6 张 7×9 cm 的滤纸和一张大小适中用甲醇活化过的 PVDF 膜，在加有转移液的盆里放入转膜用的夹子，两块海绵垫，一根玻棒，滤纸和已经活化的 PVDF 膜。将夹子打开使黑的一面保持水平，在垫子上垫海绵、三层滤纸。剥离胶盖于滤纸上，将膜盖于胶上，除去气泡。在膜上盖三张滤纸并除去气泡，最后盖上另一个海绵垫。

8.4 免疫反应

在室温下，将转好的膜在脱色摇床上用 5% 的脱脂牛奶（0.5% TBST 配制），封闭 1 h。稀释一抗（TBST 溶解的 5% 脱脂牛奶，磷酸化蛋白使用 TBST 溶解的 5% BSA），4℃ 孵育过夜，或者 4℃ 孵育抗体 3 h。然后用 TBST 在室温下脱色摇床上洗三次，每次 5 min。稀释二抗（用 TBST 将二抗稀释 3000 倍）后，在室温下孵育 30 min，然后用 TBST 在室温下脱色摇床上洗三次，每次 5 min。

8.5 化学发光

将 PVDF 膜蛋白面朝上，与由 ECLA 和 ECLB 两种试剂等体积配制的混合液充分接触，1-2 min 后，去尽残液，包装好，再放置在暗匣中曝光，最后进行显影和定影。

8.6 凝胶图像分析

胶片进行扫描保存，用 PhotoShop 整理去色，测定灰度值。

9. 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析，将符合正态分布的数据用均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，两组间比较采用两独立样本的 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析及 LSD 检验。当数据不符合正态分布时，采用中位数和四分位间距（M, IQR）表示，两组间比较采用秩和检验，多组间比较采用多样本秩和检验，误差线表示 95% 置信区间。当 $P < 0.05$ 时，认为差异具有统计学意义。

结 果

一、孕鼠分娩及仔鼠存活情况

VPA 组孕鼠在注射丙戊酸钠后有 2 只出现流产现象，其余均顺利生产，孕鼠最多娩出 12 只，最少娩出 3 只。在母鼠喂养期间吃仔鼠情况较多，死亡仔鼠达到 26 只。NS 组孕鼠均足月正常娩出仔鼠，未见吃鼠现象。单只正常孕鼠娩出仔鼠在 7-16 只之间。VPA 组仔鼠与 NS 组仔鼠相比，体格弱小，体重较轻，出现尾巴异常形态（短小或 1-3 个弯曲），手指畸形及后肢僵硬的情况。

二、孤独症鼠模型鉴定

1. VPA 组和 NS 组仔鼠发育学检测结果比较

1.1 体重

于 P7、P14、P21、P28 时，VPA 组仔鼠体重均明显低于 NS 组，差异具有显著性（ $P<0.05$ ）。见表 1，图 1。

表 1 NS 组和 VPA 组仔鼠不同日龄体重的比较（ $\bar{x} \pm s$ ）

日龄（d）	例数	NS 组（g）	VPA 组（g）	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
P7	10	14.66±1.17	12.32±0.69	5.425	0.000
P14	10	31.40±2.04	26.33±1.26	6.672	0.000
P21	10	51.45±2.83	38.71±4.68	7.365	0.000
P28	10	75.86±5.85	50.65±2.88	12.232	0.000

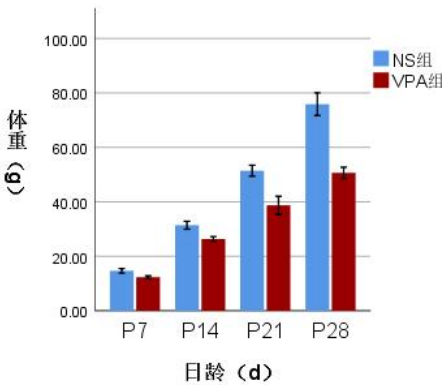


图 1 NS 组和 VPA 组仔鼠不同日龄体重的比较

1.2 睁眼时间

NS 组仔鼠睁眼时间早于 VPA 组，于 P13 开始出现睁眼，P15 全部完成睁眼，而 VPA 组仔鼠在 P14 时才开始睁眼且数量较少，于 P16 才全部完成睁眼。于 P13、P14、P15 时 VPA 组仔鼠睁眼时间得分均低于 NS 组，差异显著 ($P<0.05$)。P12、P16 两组睁眼时间得分无显著差异 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 NS 组和 VPA 组仔鼠不同日龄睁眼时间得分的比较 (M, IQR)

日龄 (d)	例数	NS 组 (分)	VPA 组 (分)	Z 值	P 值
P12	10	0 (0)	0 (0)	0.000	1.000
P13	10	0 (1)	0 (0)	-2.179	0.029
P14	10	2 (1)	0 (0)	-3.542	0.000
P15	10	2 (0)	1 (1)	-3.453	0.001
P16	10	2 (0)	2 (0)	0.000	1.000

1.3 方向趋向性

VPA 组仔鼠在倾斜角度为 25°的倾斜板上完成转身 180°所需要的时间明显长于 NS 组，于 P7、P8、P9 和 P10 时两组间均具有显著差异 ($P<0.05$)。见表 3，图 2。

表 3 NS 组和 VPA 组仔鼠不同日龄方向趋向性比较 ($\bar{x} \pm s$)

日龄 (d)	例数	NS 组 (s)	VPA 组 (s)	t 值	P 值
P7	10	48.91±11.66	69.10±18.43	-2.926	0.009
P8	10	24.37±8.30	48.16±16.65	-4.042	0.001
P9	10	18.72±8.81	29.95±7.54	-3.063	0.007
P10	10	9.96±4.41	16.50±6.81	-2.548	0.020

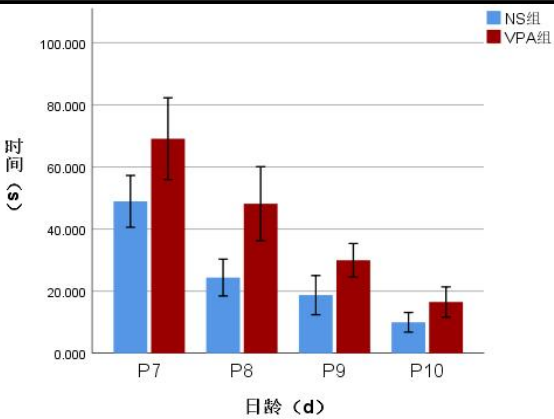


图 2 NS 组和 VPA 组仔鼠不同日龄方向趋向性比较

1.4 脑重

P7、P14、P21 和 P28 不同时间点，VPA 组仔鼠脑重与 NS 组相比相对较轻，具有显著差异 ($P<0.05$)。见表 4，图 3。

表 4 NS 组和 VPA 组仔鼠仔鼠不同日龄脑重的比较 ($\bar{x} \pm s$)

日龄 (d)	例数	NS 组 (g)	VPA 组 (g)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
P7	6	0.527±0.046	0.452±0.060	2.437	0.035
P14	6	0.895±0.049	0.800±0.057	3.081	0.012
P21	6	1.005±0.039	0.891±0.052	4.297	0.002
P28	6	1.100±0.063	0.994±0.020	3.756	0.004

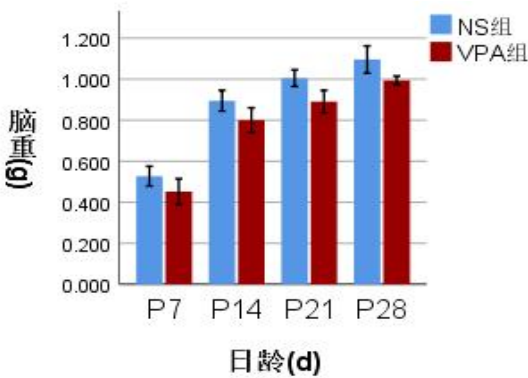


图 3 NS 组和 VPA 组仔鼠不同日龄脑重的比较

2. VPA 组和 NS 组仔鼠行为学检测结果比较

2.1 社会交流测试

NS 组仔鼠嗅闻鼠尿时间最长，酒精时间最短，嗅闻三组气味累积时间两两比较时均有明显差异 ($P<0.05$)；而 VPA 组仔鼠对气味的分辨能力差，三组气味嗅闻时间差异不明显 ($P>0.05$)；与 NS 组仔鼠相比，VPA 组嗅闻生理盐水累计时间无显著差异 ($P>0.05$)；嗅闻酒精累计时间长于 NS 组，嗅闻鼠尿累计时间短于 NS 组，差异显著 ($P<0.05$)。见表 5，图 4。

表 5 NS 组与 VPA 组仔鼠社交气味反应时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

气味类型	例数	NS 组 (s)	VPA 组 (s)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
生理盐水	10	7.56±1.78	6.80±2.45	-0.793	0.438
酒精	10	3.78±1.35 ^a	5.49±2.15	-3.841	0.048
鼠尿	10	11.06±2.69 ^{ab}	6.51±2.61	-3.841	0.001
<i>F</i> 值		32.511	0.819	-	-
<i>P</i> 值		0.000	0.451	-	-

注：a: 与嗅生理盐水时间相比， $P<0.05$ ；b: 与嗅酒精时间相比， $P<0.05$ 。

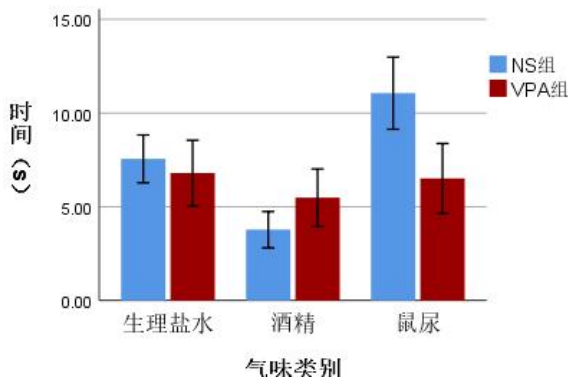


图 4 NS 组与 VPA 组仔鼠社交气味反应时间比较

2.2 重复刻板行为检测

VPA 组仔鼠转圈、蹦跳、理毛发、后肢站立等动作的累计时间比 NS 组长，差异显著 ($P<0.05$)。见表 6，图 5。

表 6 NS 组与 VPA 组仔鼠重复刻板累计时间的比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	例数	NS 组 (s)	VPA 组 (s)	t 值	P 值
重复刻板累计时间	10	109.77±19.62	222.96±25.08	-11.240	0.000

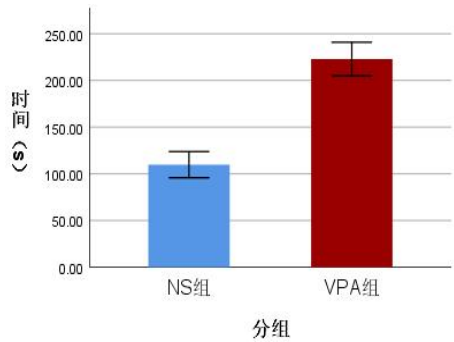


图 5 NS 组与 VPA 组仔鼠重复刻板动作累计时间的比较

2.3 社会交往测试

2.3.1 社交能力比较：结果显示，NS 组仔鼠在前 10 min 的社交能力测试中，与陌生鼠 1 接触的时间明显长于与空笼，差异显著 ($P<0.05$)。而 VPA 组仔鼠与陌生鼠 1 的接触时间和与空笼接触时间上无明显差别 ($P>0.05$)。与 NS 组仔鼠相比，VPA 组仔鼠接触空笼的时间较长，与陌生鼠 1 接触的时间较短，差异显著 ($P<0.05$)。见表 7，图 6。

表 7 NS 组和 VPA 组仔鼠社交能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	空笼 (s)	陌生鼠 1 (s)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
NS 组	6	141.66±27.70	261.71±54.53	-4.808	0.001
VPA 组	6	220.90±30.63	177.53±37.52	-2.193	0.053
<i>t</i> 值		-4.700	3.115	-	-
<i>P</i> 值		0.001	0.011	-	-

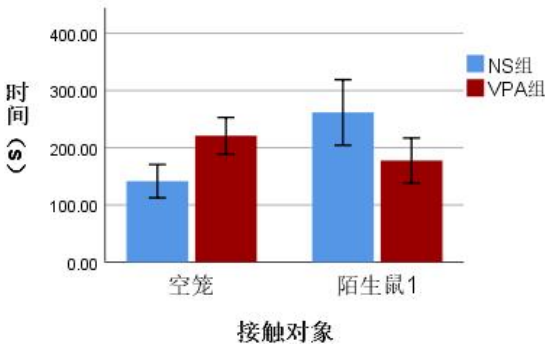


图 6 NS 组和 VPA 组仔鼠“社交性”比较

2.3.2 社交新奇性比较：结果显示，NS 组仔鼠接触陌生鼠 2 的时间明显比接触陌生鼠 1 的时间长 ($P<0.05$)。VPA 组仔鼠社交新奇性结果正好相反，接触陌生鼠 1 的时间明显比接触陌生鼠 2 的时间长 ($P<0.05$)。与 NS 组仔鼠相比，在接触陌生鼠 1 时，VPA 组仔鼠接触时间长于 NS 组仔鼠的接触时间；在接触陌生鼠 2 时，VPA 组仔鼠接触时间短于 NS 组仔鼠的接触时间，差异显著 ($P<0.05$)。见表 8，图 7。

表 8 NS 组和 VPA 组仔鼠仔鼠“社交新奇性”比较 ($\bar{x} \pm s$)

接触对象	例数	NS 组 (s)	VPA 组 (s)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
陌生鼠 1	6	130.11±36.43	237.14±60.89	-3.695	0.004
陌生鼠 2	6	270.83±27.51	117.51±38.66	7.914	0.000
<i>t</i> 值		-7.550	4.063	-	-
<i>P</i> 值		0.000	0.002	-	-

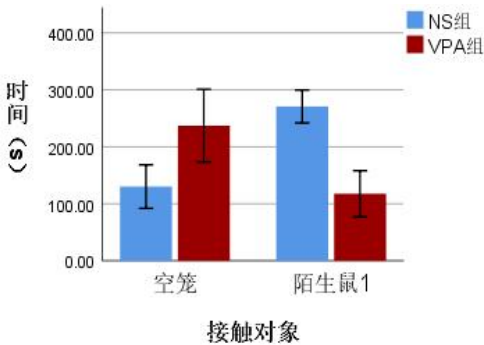


图 7 NS 组和 VPA 组仔鼠“社交新奇性”比较

三、三组仔鼠发育和行为学的比较

1. 体重

与 VPA 组仔鼠相比, 在 P7、P14 和 P21 时, Rg1 组仔鼠体重没有明显变化 ($P>0.05$)。P28 时, Rg1 组仔鼠体重明显重于 VPA 组, 差异显著 ($P<0.05$)。与 NS 组相比, 在 P7、P14、P21、P28 Rg1 组仔鼠体重明显轻于 NS 组 ($P<0.05$)。见表 9, 图 8-9。

表 9 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠不同日龄体重的比较 ($\bar{x}\pm s$)

日龄 (g)	例数	NS 组 (g)	VPA 组 (g)	Rg1 组 (g)	F 值	P 值
P7	10	14.66 \pm 1.17 ^a	12.32 \pm 0.69	12.54 \pm 1.01	17.403	0.000
P14	10	31.40 \pm 2.04 ^a	26.33 \pm 1.26	25.31 \pm 2.35	28.224	0.000
P21	10	51.45 \pm 2.83 ^a	38.71 \pm 4.68	42.29 \pm 5.04	23.400	0.000
P28	10	75.86 \pm 5.85 ^a	50.65 \pm 2.88 ^b	60.83 \pm 5.86	62.850	0.000

注: a: Rg1 组 VS NS 组, $P<0.05$; b: Rg1 组 VS VPA 组, $P<0.05$ 。

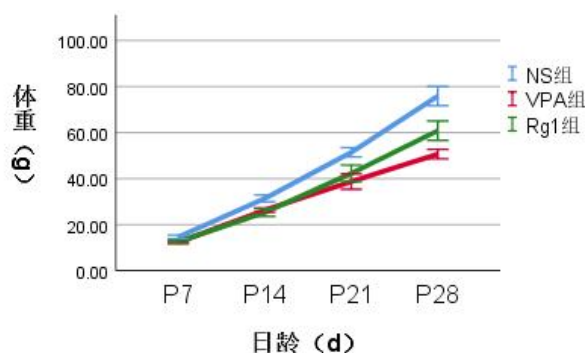


图 8 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠不同日龄体重增长趋势

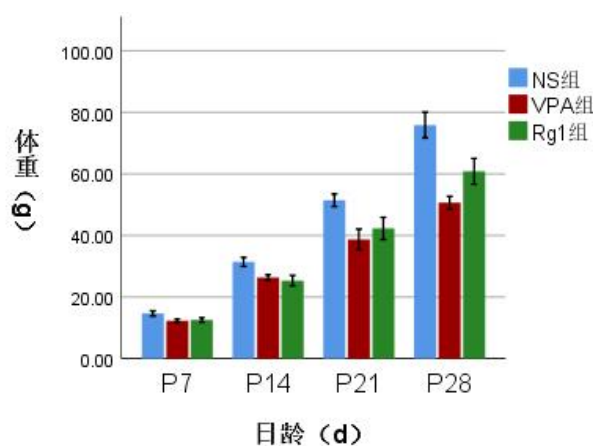


图 9 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠不同日龄体重比较

2. 脑重

结果显示：P7、P14、P21 和 P28 时，Rg1 组和 VPA 组相比，两组仔鼠脑重无显著性差异（ $P>0.05$ ）；Rg1 组和 NS 组相比，NS 组仔鼠脑重明显重于 Rg1 组（ $P<0.05$ ）。见表 10，图 10。

表 10 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠不同日龄脑重的比较（ $\bar{x}\pm s$ ）

日龄（d）	例数	NS 组（g）	VPA 组（g）	Rg1 组（g）	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
P7	6	0.527±0.046 ^a	0.452±0.060	0.436±0.062	4.471	0.030
P14	6	0.895±0.049 ^a	0.800±0.057	0.823±0.054	5.111	0.020
P21	6	1.005±0.039 ^a	0.891±0.052	0.879±0.040	14.814	0.000
P28	6	1.100±0.063 ^a	0.994±0.020	1.020±0.051	7.116	0.007

注：a：Rg1 组 VS NS 组， $P<0.05$ 。

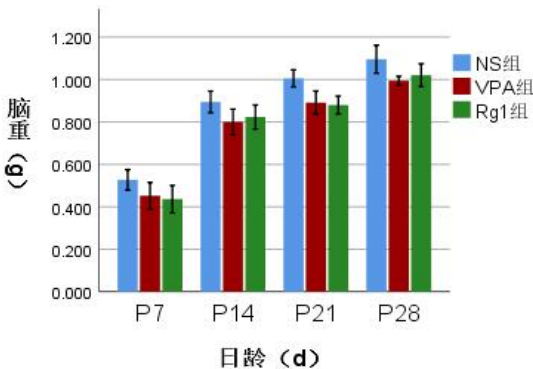


图 10 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠不同日龄脑重的比较

3. 社会交流测试

经过 3 周的人参皂苷 Rg1 干预后，对社会交流的数据进行单因素方差分析，结果显示：Rg1 组仔鼠嗅闻生理盐水、酒精和鼠尿时间三组间两两比较差异明显（ $P<0.05$ ）。在嗅闻生理盐水时间上，Rg1 组仔鼠分别与 VPA 组和 NS 组相比，差异都不显著（ $P>0.05$ ）；在嗅闻酒精的时间上，与 VPA 组相比，Rg1 组嗅闻时间有所减少，但差异不明显（ $P>0.05$ ）；在嗅闻鼠尿的时间上，与 VPA 组相比，Rg1 组嗅闻时间明显增加（ $P<0.05$ ），和 NS 组相比，无显著差异（ $P>0.05$ ）。见表 11，图 11。

表 11 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠社会交流能力的比较（ $\bar{x}\pm s$ ）

气味类型	例数	NS 组（s）	VPA 组（s）	Rg1 组（s）	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
生理盐水	10	7.56±1.78	6.80±2.45	6.33±1.77	0.931	0.407
酒精	10	3.78±1.35	5.49±2.15	4.04±1.45	2.962	0.069
鼠尿	10	11.06±2.69	6.51±2.61 ^a	9.19±2.32	8.082	0.002
<i>F</i> 值		32.511	0.819	18.841	-	-
<i>P</i> 值		0.000	0.451	0.000	-	-

注：a：Rg1 组 VS VPA 组， $P<0.05$ 。

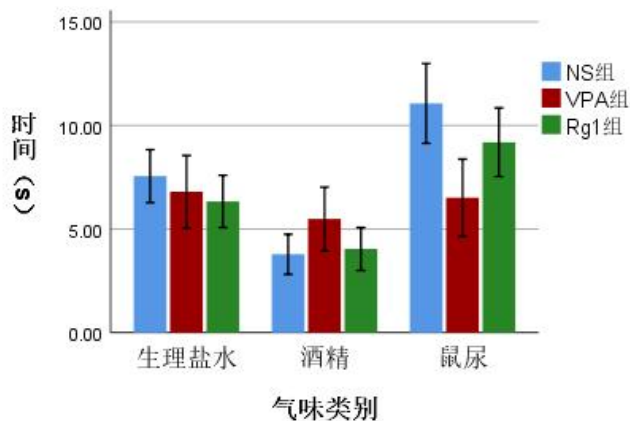


图 11 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠社会交流能力的比较

4. 重复刻板行为测试

人参皂苷 Rg1 干预后，Rg1 组转圈、理毛发、跳跃和后肢站立等刻板动作的累计时间明显比 VPA 组短，两组间差异显著 ($P<0.05$)；和 NS 组相比，Rg1 组重复刻板动作累计时间长于 NS 组 ($P<0.05$)。见表 12，图 12。

表 12 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠重复刻板动作累计时间的比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	例数	NS 组 (s)	VPA 组 (s)	Rg1 组 (s)	F 值	P 值
重复刻板累计时间	10	109.77±19.62 ^a	222.96±25.08 ^b	173.13±34.24	44.160	0.000

注：a：Rg1 组VS NS组， $P<0.05$ ；b：Rg1 组VS VPA组， $P<0.05$ 。

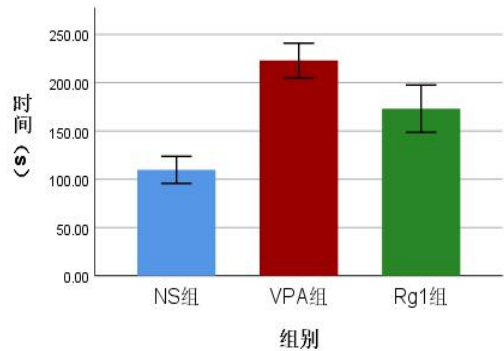


图 12 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠重复刻板动作累计时间的比较

5. 社会交往测试

5.1 三组社会交往能力的比较

实验结果显示，前 10 min 社会交往测试中，Rg1 组仔鼠与陌生鼠 1 接触的时间和与空笼接触的时间相比，差异不明显 ($P>0.05$)。与 VPA 组仔鼠相比，Rg1 组分别接触陌生鼠 1 和空笼的累积时间与 VPA 组之间均无显著差异 ($P>0.05$)，与 NS 组相

比，Rg1 组接触陌生鼠 1 的时间短于 NS 组，和空笼接触的累积时间明显长于 NS 组（ $P>0.05$ ）。见表 13，图 13。

表 13 NS 组、VPA 组和 Rg1 组三组仔鼠“社交性”的比较（ $\bar{x}\pm s$ ）

组别	例数	空笼（s）	陌生鼠 1（s）	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
NS 组	6	141.66±27.70 ^a	261.71±54.53 ^a	-4.808	0.001
VPA 组	6	220.90±30.63	177.53±37.52	-2.193	0.053
Rg1 组	6	208.41±43.85	165.17±43.07	1.723	0.116
<i>F</i> 值		9.006	7.965	-	-
<i>P</i> 值		0.003	0.004	-	-

注：a: Rg1 组 VS NS 组， $P<0.05$ 。

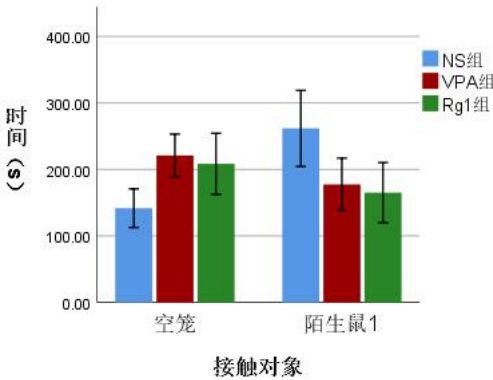


图 13 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠“社交性”的比较

5.2 三组社交新奇性的比较

实验结果显示：后 10 min 的社会新奇性测试中，Rg1 组仔鼠与陌生鼠 1 接触的时间明显长于和陌生鼠 2 接触的时间（ $P<0.05$ ）。与 VPA 组仔鼠相比，Rg1 组仔鼠分别跟陌生鼠 1、陌生鼠 2 接触的时间与 VPA 组仔鼠分别跟陌生鼠 1、陌生鼠 2 接触的时间之间差异不显著（ $P>0.05$ ）；与 NS 组仔鼠相比，Rg1 组仔鼠与陌生鼠 1 接触时间长于 NS 组，与陌生鼠 2 接触的时间短于 NS 组仔鼠，差异显著（ $P<0.05$ ）。见表 14，图 14。

表 14 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠“社交新奇性”的比较（ $\bar{x}\pm s$ ）

组别	例数	陌生鼠 1（s）	陌生鼠 2 组（s）	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
NS 组	6	130.11±36.43 ^a	270.83±27.51 ^a	-3.695	0.004
VPA 组	6	237.14±60.89	117.51±38.66	4.063	0.002
Rg1 组	6	186.75±17.20	132.60±33.85	3.494	0.006
<i>F</i> 值		9.681	37.831	-	-
<i>P</i> 值		0.002	0.000	-	-

注：a: Rg1 组 VS NS 组， $P<0.05$ 。

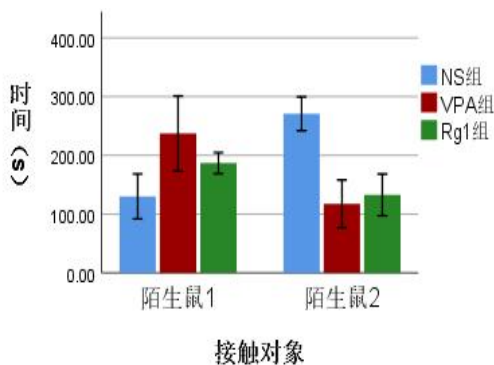


图 14 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠“社交新奇性”的比较

6. 三组空间学习记忆能力的比较

结果显示：与 NS 组相比，VPA 组仔鼠空间学习记忆能力不足，逃避潜伏期所用时间明显增加，穿越目标象限次数显著减少 ($P<0.05$)。经过人参皂苷 Rg1 干预后，与 VPA 组相比，Rg1 组逃避潜伏期所用时间明显缩短，穿越目标象限次数显著增加 ($P<0.05$)。与 NS 组相比，Rg1 组逃避潜伏期所用时间长于 NS 组，但差异不显著 ($P>0.05$)；穿越目标象限次数明显少于 NS 组 ($P<0.05$)。见表 15，图 15-16。

表 15 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠学习记忆能力比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	逃避潜伏期时间 (s)	穿越目标象限的次数
NS组	10	15.70±4.06 ^a	5.90±1.20 ^{ab}
VPA组	10	26.03±6.52 ^c	3.80±1.14 ^c
Rg1 组	10	19.05±8.36	4.90±0.88
F值		6.452	9.487
P值		0.005	0.001

注：a：VPA 组 VS NS 组， $P<0.05$ ；b：Rg1 组 VS NS 组， $P<0.05$ ；c：Rg1 组 VS VPA 组， $P<0.05$ 。

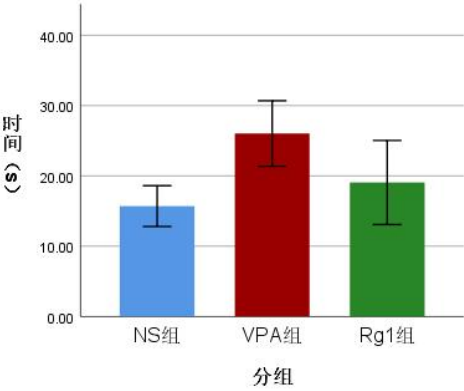


图 15 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠逃避潜伏期比较

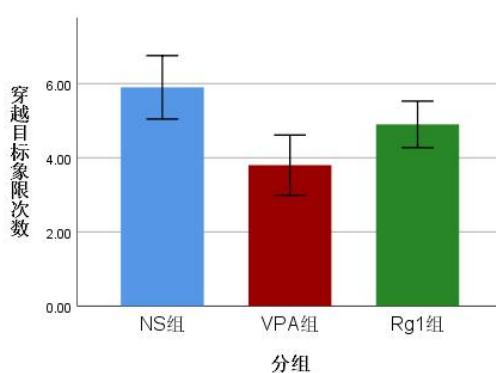
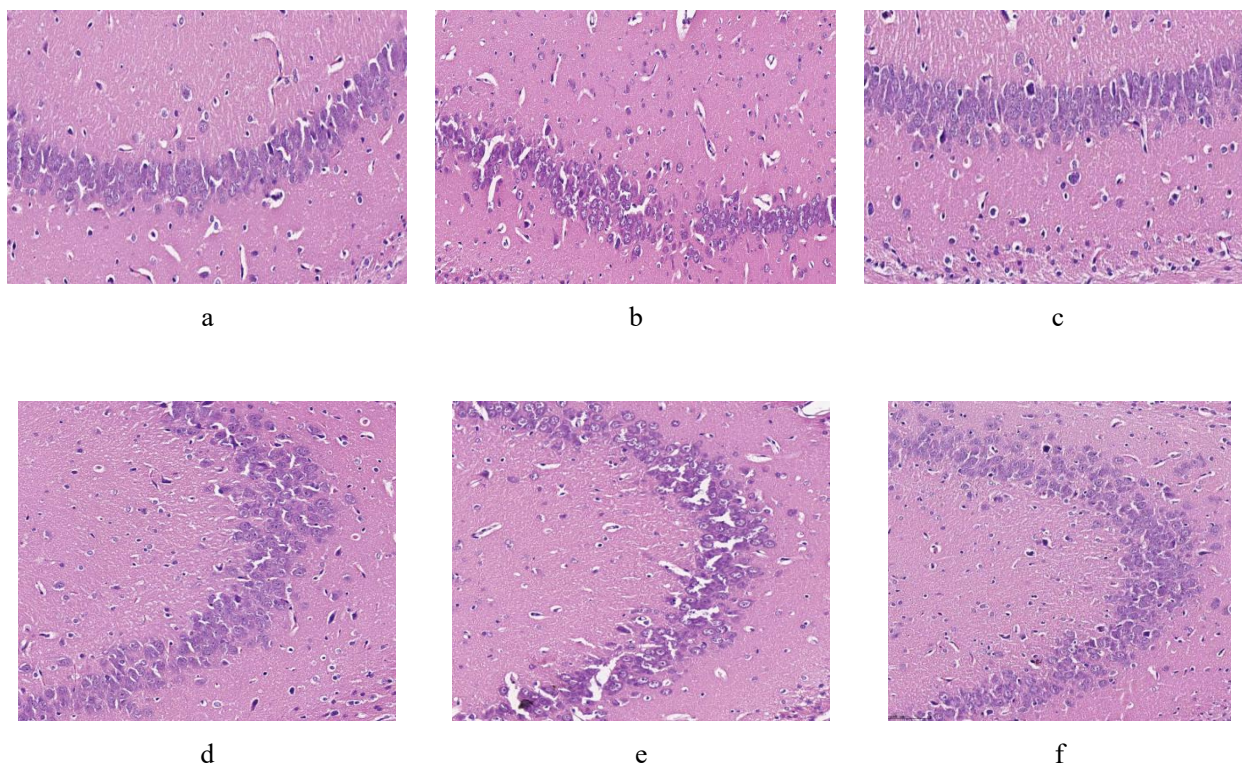
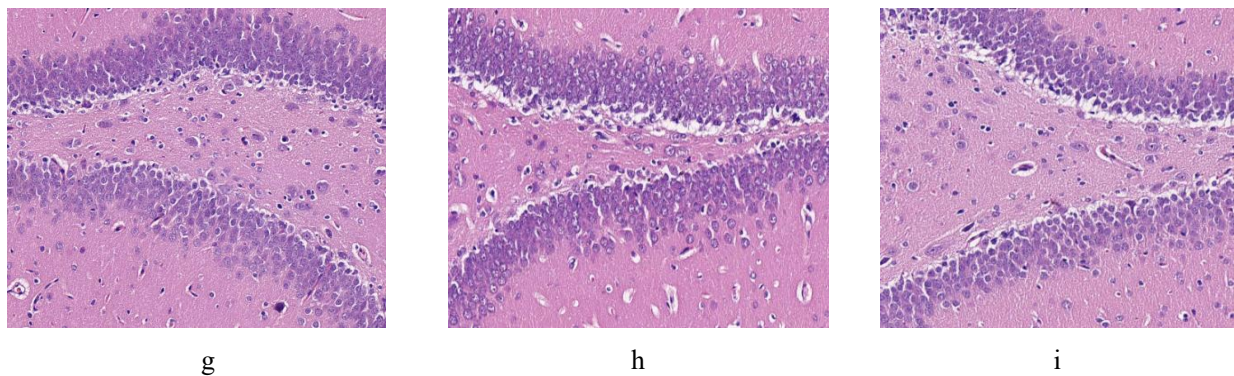


图 16 NS 组、VPA 组和 Rg1 组仔鼠穿越目标象限次数比较

四、三组 HE 染色海马区病理情况的比较

结果显示：NS 组仔鼠海马组织 CA1、CA3 和 DG 区神经细胞排列整齐紧密，细胞形态规则、结构完整，未见明显病变。VPA 组神经细胞排列疏松、杂乱无序，细胞肿胀。Rg1 组神经细胞较 VPA 组排列相对整齐，细胞间隙减小，病理改变减轻。见图 17。





a: NS 组海马 CA1 区; b: VPA 组海马 CA1 区; c: Rg1 组海马 CA1 区; d: NS 组海马 CA3 区; e: VPA 组海马 CA3 区; f: Rg1 组海马 CA3 区; g: NS 组海马 DG 区; h: VPA 组海马 DG 区; i: Rg1 组海马 DG 区。

图 17 NS 组、VPA 组和 Rg1 组海马 CA1、CA3 和 DG 区病理形态 (×200)

五、三组仔鼠海马区氧化应激情况的比较

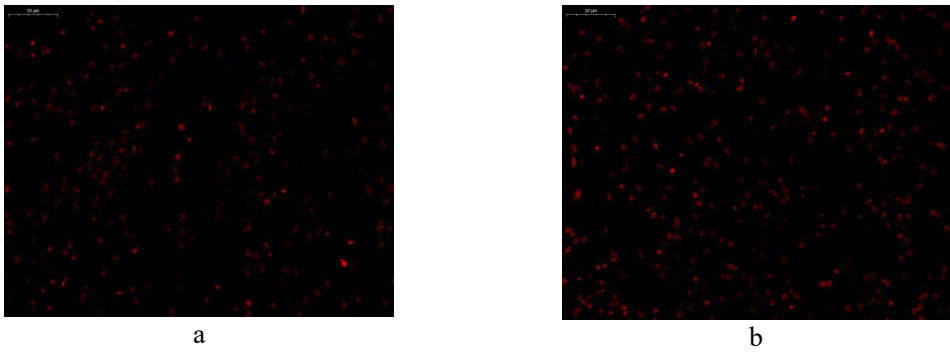
1. ROS 免疫荧光染色结果

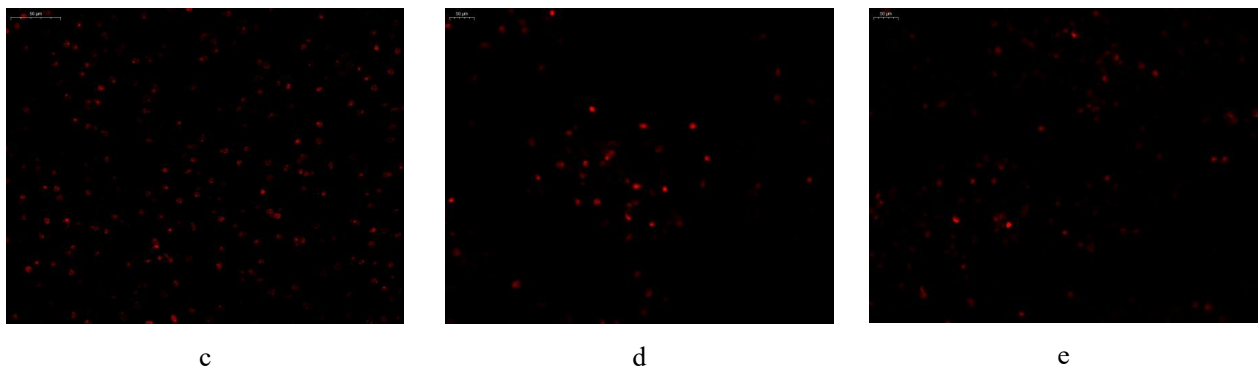
VPA 组仔鼠海马区 ROS 的表达水平于 P7、P28 日龄时均高于 NS 组 ($P<0.05$)。在经过人参皂苷 Rg1 干预后, 与 VPA 组相比, Rg1 组仔鼠海马区 ROS 的表达水平下降, 且具有显著差异 ($P<0.05$); 与 NS 组相比, Rg1 组仔鼠海马区 ROS 的表达水平高于 NS 组 ($P<0.05$)。见表 16, 图 18-20。

表 16 三组仔鼠海马区 ROS 表达的比较 ($\bar{x}\pm s$)

项目	例数	NS 组	VPA 组	Rg1 组	t 值	F 值	P 值
P7 ROS 表达	3	1.31±0.20	3.41±1.27	-	-2.825	-	0.048
P28 ROS 表达	3	1.20±0.04 ^{ac}	3.95±0.27 ^b	1.99±0.05	-	235.061	0.000

注: a: VPA 组 VS NS 组, $P<0.05$; b: Rg1 组 VS VPA 组, $P<0.05$; c: Rg1 组 VS NS 组, $P<0.05$ 。





a: P7 NS 组海马区 ROS 表达; b: P7 VPA 组海马区 ROS 表达; c: P28 NS 组海马区 ROS 表达; c: P28 VPA 组海马区 ROS 表达; d: P28 VPA 组、Rg1 组海马区 ROS 表达; e: P28 Rg1 组海马区 ROS 表达。

图 18 海马区 ROS 表达 (标尺示 50 μm)

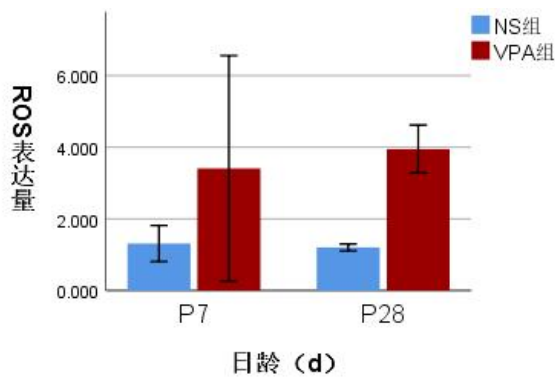


图 19 NS 组和 VPA 组 P7、P28 ROS 表达的比较

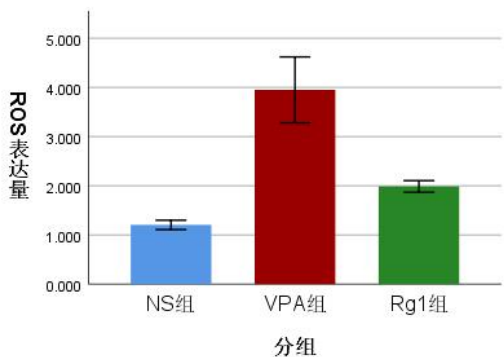


图 20 三组仔鼠 P28 ROS 表达的比较

2. 海马区 MDA 表达水平的比较

VPA 组仔鼠海马区 MDA 的水平于 P7、P28 日龄时均高于 NS 组，差异显著 ($P < 0.05$)，经过人参皂苷 Rg1 干预后，与 VPA 组相比，Rg1 组海马区 MDA 表达水平明

显降低 ($p<0.05$)。与 NS 组相比, Rg1 组海马区 MDA 表达水平高于 NS 组 ($P<0.05$)。见表 17, 图 21-22。

表 17 三组仔鼠海马区 MDA 水平的比较 ($\bar{x}\pm s$)

项目	例数	NS 组	VPA 组	Rg1 组	<i>t</i> 值	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
P7 MDA 表达	6	7.30±0.23	8.14±0.61	-	-3.176	-	0.018
P28MDA 表达	6	7.68±0.27 ^{ac}	9.45±0.22 ^b	8.86±0.15		100.403	0.000

注: a: VPA 组 VS NS 组, $P<0.05$; b: Rg1 组 VS VPA 组, $P<0.05$; c: Rg1 组 VS NS 组, $P<0.05$ 。

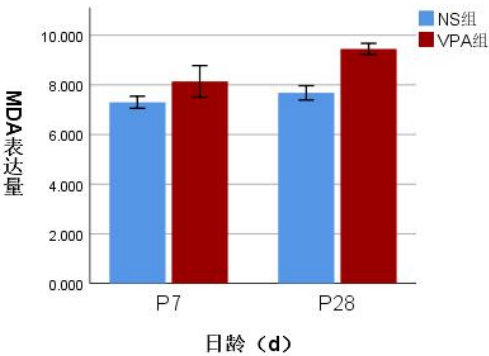


图 21 NS 组和 VPA 组 P7、P28 MDA 表达的比较

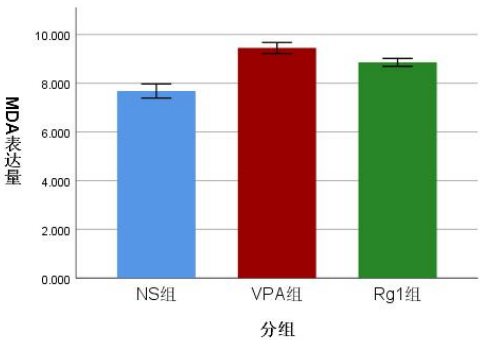


图 22 三组仔鼠 P28 MDA 水平的比较

3. 海马区 NOX2、p-P47phox 蛋白表达水平的比较

VPA 组仔鼠海马区 NOX2、p-P47phox 蛋白表达水平于 P7、P28 日龄时均高于 NS 组 ($P<0.05$)。经过人参皂苷 Rg1 干预后, 与 VPA 组相比, Rg1 组海马区 NOX2 蛋白表达水平有所下降, 但差异不显著 ($P>0.05$), p-P47phox 蛋白表达水平明显下降 ($P<0.05$); 与 NS 组相比, Rg1 组海马区 NOX2 蛋白表达水平高于 NS 组 ($P<0.05$), p-P47phox 蛋白表达水平也高于 NS 组, 但无显著差异 ($P>0.05$)。见表 18-19, 图 23-28。

表 18 三组仔鼠海马区 NOX2 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x}\pm s$)

项目	例数	NS 组	VPA 组	Rg1 组	<i>t</i> 值	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
P7 NOX2 蛋白	3	0.761±0.053 ^a	1.216±0.235	-	-3.264	-	0.031

水平							
P28 NOX2 蛋白水平	3	0.852±0.041 ^{ab}	1.073±0.085	0.964±0.015	-	11.780	0.008

注：a：VPA 组 VS NS 组， $P<0.05$ ；b：Rg1 组 VS NS 组， $P<0.05$ 。

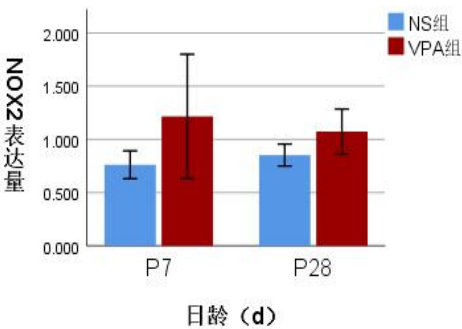


图 23 NS 组和 VPA 组 P7、P28 NOX2 蛋白表达量的比较

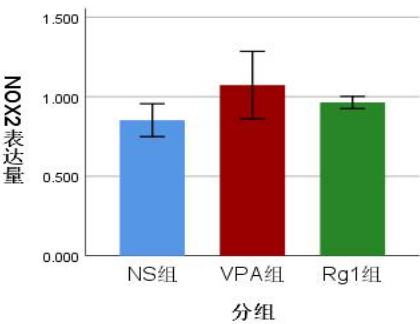


图 24 三组仔鼠 P28 NOX2 蛋白表达量的比较

表 19 三组仔鼠海马区 p-P47phox 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)							
项目	例数	NS 组	VPA 组	Rg1 组	t 值	F 值	P 值
P7 p-P47phox 蛋白水平	3	0.909±0.047	1.135±0.048	-	-5.795	-	0.004
P28 p-P47phox 蛋白水平	3	0.792±0.156 ^a	1.174±0.168 ^b	0.889±0.085	-	5.916	0.038

注：a：VPA 组 VS NS 组， $P<0.05$ ；b：Rg1 组 VS VPA 组， $P<0.05$ 。

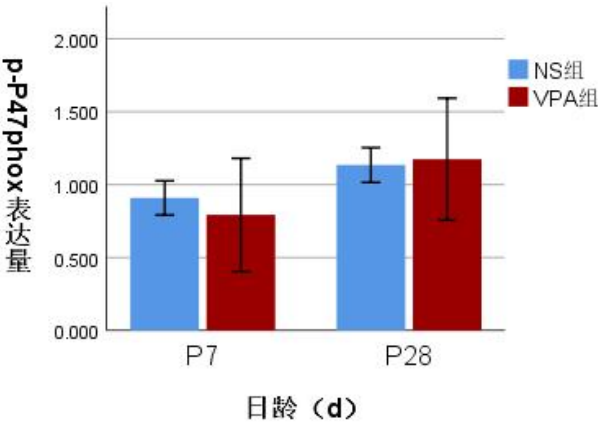


图 25 NS 组和 VPA 组 P7、P28 p-P47phox 蛋白表达量的比较

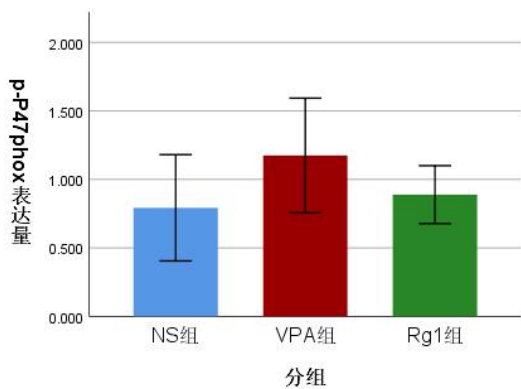
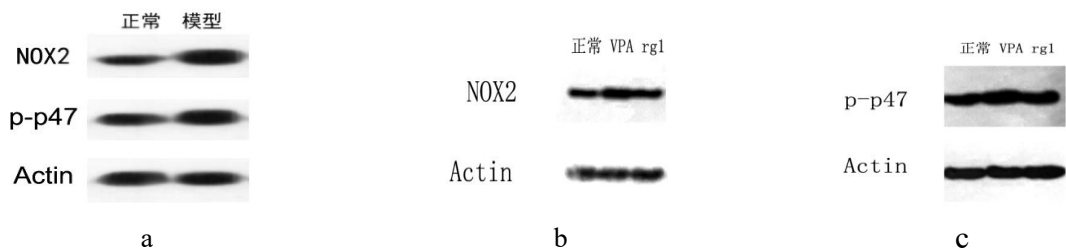


图 26 三组仔鼠 P28 p-P47phox 蛋白表达量的比较



a: NS 组和 VPA 组 P7 NOX2、p-P47phox 蛋白表达量的比较；b: NS 组、VPA 组和 Rg1 组 P28 NOX2 蛋白表达量的比较；c: NS 组、VPA 组和 Rg1 组 P28 p-P47phox 蛋白表达量的比较。

图 27 NOX2、p-P47phox 蛋白表达量

讨 论

一、孤独症鼠模型的制备与模型鉴定

1. 孤独症鼠模型的制备

VPA 是一种短链脂肪酸，广泛用作抗癫痫药物和情绪稳定剂。研究显示母亲在孕早期使用 VPA 会显著增加子女畸形与患 ASD 的风险^[107]。动物实验中，在啮齿类动物产前腹腔注射 VPA 可以导致其所产后代出现畸形、发育迟缓和典型的孤独症样行为，如理毛、跳跃、后肢站立及转圈等刻板行为增多、学习记忆能力下降、社会交流和社会交往能力降低等^[108]。而且有研究发现孤独症雄性模型的某些异常行为和脑部损伤比雌性更明显^[109]。这与临床中的 ASD 患者语言和非语言性交流能力下降、日常行为刻板、社会交往能力下降等行为及男性患病率大于女性相吻合。虽然妊娠期间接触 VPA 诱导人类和啮齿动物孤独症样行为的机制尚不完全清楚，但这种方式具有较好的构建效度、表面效度和一定的预测效度，加上其造模方式简单、花费成本低的特点，使其成为孤独症动物模型应用最为广泛的方法，现已遍及用于 ASD 发病机制、预防及干预的临床前研究^[110]。Kim 等人在母鼠孕 7-15 天不同时间窗接触 VPA 的实验中，研究发现于第 12 天（对应于啮齿动物神经管闭合的时期）接触 VPA 的孕鼠诱发类似人类孤独症样社会行为改变最为显著^[111]。

本实验采用 Schneider 法构建孤独症鼠模型^[104]，于孕鼠妊娠 12.5 天腹腔注射 600 mg/mL（250 mg/mL，生理盐水配置）的 VPA。结果显示，孕鼠注射 VPA 后出现剧烈收缩腹部、摆头、瘫卧、无法行走等现象，后期流产率、吃仔鼠率皆明显高于注射生理盐水的孕鼠，产下仔鼠的数量也低于注射生理盐水的孕鼠。这与之前的 VPA 诱导的孤独症模型实验情况类似。

2. 孤独症模型鼠发育和行为学检测

本实验 VPA 组仔鼠尾部出现短尾或 1-3 个弯曲、后肢僵直不能弯曲、并指畸形的情况，这可能与孕早期接触 VPA 增加胎儿致畸率有关。与 NS 组仔鼠相比，VPA 组仔鼠生长发育明显滞后。在体重和脑重方面，P7、P14、P21、P28 每个时间点均明显低于 NS 组（ $P < 0.05$ ）。孤独症模型鼠脑重低于发育正常同龄鼠的情况虽然和之前提出的 ASD 早期脑容量过度增长有所出入，但是可能是因为本实验两组鼠体质

量差距较大, 而且在先前实验也出现过类似情况^[112, 113]。睁眼时间方面, VPA 组仔鼠睁眼时间延后, NS 组仔鼠于 P13 日开始睁眼, 在 P15 日全部睁开。VPA 组仔鼠睁眼时间开始于 P14 天, 于 P16 天完成睁眼。前庭和运动发育方面, VPA 组仔鼠完成方向趋向性测试的时间明显长于 NS 组。本实验于 P28 天进行孤独症核心症状测试即社会交往、社会交流和重复刻板行为检测, 结果显示在三箱实验的前 10 min 社交能力测试中, VPA 组仔鼠与空笼子的接触时间明显长于与陌生鼠 1 的接触时间。在后 10 min 的社交新奇性测试中, VPA 组仔鼠与陌生鼠 1 和陌生鼠 2 的接触无明显差别, 说明 VPA 组仔鼠的社会交往能力和社交新奇性能力不足。气味是鼠交流信息的重要媒介, 本实验通过测试仔鼠嗅闻蘸取生理盐水、酒精、鼠尿(社交性气味)棉签的时间来检测社会交流能力, 结果显示 VPA 组仔鼠表现出对三种气味无显著的偏好。NS 组仔鼠嗅闻社交性气味鼠尿的时间最长, 酒精最短。说明 VPA 组仔鼠嗅觉分辨能力减弱, 社会交流能力受损。在重复刻板行为测试中, VPA 组仔鼠重复刻板动作的累计时间明显长于 NS 组, 出现长时间高频次的理毛发、转圈、跳跃、后肢站立等动作。在测试学习记忆能力的 Morris 水迷宫实验中, VPA 组仔鼠潜逃潜伏期明显长于 NS 组, 在空间探索时穿越目标象限的次数也显著少于 NS 组。与 NS 组相比, VPA 组仔鼠学习和记忆能力较差。综合来看 VPA 组行为与发育情况与 Schneider 等人的实验结果一致, 与临床上 ASD 患者核心症状相符。

二、孤独症模型鼠海马区形态学改变和氧化应激情况

1. 孤独症模型鼠海马区神经细胞形态改变

海马体是大脑涉及学习和记忆的一个重要区域, 它的不同分区在学习记忆过程中起到不同作用。其中 CA1 区、CA3 区和 DG 区是海马学习记忆功能的关键部位, 也是最常引起神经系统性疾病学习记忆能力受损的区域。海马组织的 CA1 区在获得空间记忆中发挥了重要作用^[114], 主要参与后期检索、巩固和识别。涉及 CA3 区的学习记忆通路对于快速的一次情境学习、基于模式完成的记忆回忆以及空间调整都是必需的^[115]。DG 区主要在情景分离和情景快速召回放方面发挥重要作用^[116]。这两个区域(CA3、DG)主要参与早期检索和记忆编码^[117]。一直以来, 海马被认为是 ASD 相关的重要结构, 研究表明 ASD 的学习记忆、空间推理和社会互动障碍都与海马体息息相关^[118]。在 VPA 诱导的孤独症鼠模型中, 发现模型鼠海马神经元之间间隙增大, 细胞排列无序杂乱, 数量减少^[119]。另外大量的临床试验也报道了 ASD 患儿海

马体积发生变化,但有可能受不同的诊断标准、测试的年龄阶段以及各种研究中的成像技术的影响,实验结果并不一致。Barnea 等人结果显示 ASD 患儿海马体积增大,而另一项报道为 ASD 患者海马体积缩小^[120, 121]。本研究通过 HE 染色从病理上观察到, VPA 组仔鼠海马 CA1、CA3、DG 区神经细胞排列疏松、杂乱无序,细胞肿胀。

2. 孤独症模型鼠海马区氧化应激情况

虽然 ASD 的发病机制目前还不清晰,近年来 ASD 氧化应激异常却逐渐得到证实。在 ASD 患者和模型中皆发现了过高的 ROS、MDA 氧化应激标记物,以及过氧化物酶和总抗氧化能力降低,氧化与抗氧化失衡的状态^[122]。除了我们已知的线粒体来源外, NOX2 氧化酶是脑组织产生 ROS 另一大来源,而且它是唯一一个以生成 ROS 为功能的酶。NOX2 氧化酶的活化是通过细胞内结构 p47phox、p67phox 等发生磷酸化后通过特殊结构相互结合在一起募集到细胞膜与膜结合成分 (p22phox 和 NOX2) 再结合生成具有活性的 NOX2 氧化酶复合体。当 NOX2 氧化酶过度活化时,会产生大量的 ROS 进而造成细胞内核酸、脂质、蛋白质等损伤,引起功能的紊乱。陈飞等人研究发现通过抑制低聚 A β 诱导的阿尔茨海默病模型小鼠中的小胶质细胞激活和 NOX2 氧化酶结构亚基的表达,可以改善模型鼠认知的障碍、神经炎症和神经元损伤^[123]。Ansari 等人通过对患者进行生前认知测试和死后组织病理学评估,研究发现了 NOX2 氧化酶相关氧化还原途径的增加可能参与阿尔茨海默病早期发病机制并促进其进展,而且其活性与个体认知状态之间存在很强的相关性 (随着酶活性的增加,认知能力下降)。蛋白质免疫印迹结果显示, NOX2 氧化酶的关键成分蛋白主要增加了胞浆蛋白的表达,而胞膜成分基本不变^[124]。颜俊强等人研究显示,通过抑制 NOX2 氧化酶可以改善帕金森模型鼠焦虑和抑郁^[125]。目前在孤独症模型鼠小脑以及 ASD 患者的中性粒细胞、T 细胞、B 细胞等都有研究发现 NOX2 氧化酶亚基的表达异常,但在海马区 NOX2 氧化酶的活化情况尚未见报道。为了探索孤独症模型鼠海马区氧化应激情况及潜在的信号通路,本研究于 P7、P28 两个时间点,通过免疫荧光染色测试 ROS 水平、试剂盒检测 MDA 水平、蛋白质印迹法检测 NOX2 和 p-P47phox 蛋白表达。研究结果显示:与 NS 组相比, VPA 组在 P7 和 P28 ROS、MDA 表达水平都明显增加, NOX2 和 p-P47phox 蛋白高表达。说明孤独症模型鼠呈现较高的氧化应激状态且可能与 NOX2 氧化酶有关。

三、人参皂苷 Rg1 对孤独症模型鼠行为及氧化应激的影响

人参皂苷 Rg1 是从人参中提取的有效成分之一, 研究表明人参皂苷 Rg1 能够透过血脑屏障发挥多重神经保护作用, 及提高学习记忆能力, 改善抑郁行为的功效^[126]。越来越多的研究表明, 人参皂苷 Rg1 可以通过抑制 NOX2 氧化酶的活化, 减少 ROS 的产生, 来发挥作用。Xu 等人研究发现, 人参皂苷 Rg1 可以通过抑制 NOX2 氧化酶介导的 ROS 生成, 减轻了 H₂O₂ 诱导的海马神经元衰老和损伤^[127]。在另外一项 LPS 诱导的 HT22 细胞实验中, 人参皂苷 Rg1 干预后, 降低了 NOX2-NLRP1 炎性体激活和 ROS 水平, 减轻了神经元损伤^[128]。在慢性应激和阿尔茨海默病动物模型中, 人参皂苷 Rg1 能够显著改善认知障碍和神经元损伤, 降低海马 ROS 水平和 NOX2 表达^[129, 130]。由此推测, 人参皂苷 Rg1 能够通过抑制 NOX2 氧化酶活性减少 ROS 的产生, 抑制氧化应激, 从而改善 ASD 神经细胞的损伤, 改善孤独症模型鼠的异常行为表现。

本实验选择脑组织类似于人类胎儿妊娠 32-34 周或新生儿婴儿^[131]的 P7 日龄的仔鼠开始进行早期干预, 连续 3 周, 至仔鼠 P28 日龄, 从整个鼠的生命周期来看, 此时至少相当于 2 岁以上幼儿年龄^[132]。结果显示: 人参皂苷 Rg1 干预 3 周后, 与 VPA 组相比, 海马区 ROS、MDA 水平明显降低 ($P < 0.05$)。蛋白质印迹检测的 NOX2 和 p-P47phox 蛋白表达都有所降低, 但 NOX2 蛋白下降趋势不显著 ($P > 0.05$), 而 p-P47phox 蛋白表达水平明显降低, 且具有显著差异 ($P < 0.05$)。由此看出人参皂苷 Rg1 可能通过抑制胞内的 p47phox 蛋白的磷酸化, 来抑制 NOX2 氧化酶活性, 从而降低 ROS、MDA 水平, 发挥神经保护作用。

在发育行为学方面, 人参皂苷 Rg1 干预 3 周后, 改善了孤独症模型鼠体重落后于正常发育鼠的情况, 但是只是在 P28 时差异有统计学意义。在脑重方面, 人参皂苷 Rg1 的干预对孤独症模型鼠脑体质发育影响较小。这可能与人参皂苷 Rg1 干预的时间长短、干预的药物剂量或者样本量少有关, 因为本实验是首次将人参皂苷 Rg1 应用到孤独症模型鼠中, 无法掌握最佳的干预时间及使用剂量。在三箱实验中, Rg1 组与 VPA 组结果趋势相同, 前 10 min 社交能力测试中 Rg1 组分别接触陌生鼠 1 和空笼的时间与 VPA 组之间均无明显差异。后 10 min 社交新奇性测试, 与陌生鼠 2 的接触时间明显短于与陌生鼠 1 接触的时间。说明人参皂苷 Rg1 的干预未能明显改善孤独症模型鼠社会交往能力和社交新奇性能力较差的情况。社会交流测试中,

人参皂苷 Rg1 的干预,增加了孤独症模型鼠嗅闻“社交性”气味鼠尿的时间,减少对酒精的接触。说明人参皂苷 Rg1 能够提高孤独症模型鼠嗅觉分辨能力,改善社会交流能力。重复刻板行为检测结果显示,Rg1 组仔鼠转圈、跳跃、理毛等刻板动作累计时间明显减少,人参皂苷 Rg1 可以一定程度的改善孤独症模型鼠的重复刻板行为。在 Morris 水迷宫测试中,与 VPA 组仔鼠相比,Rg1 组逃避潜伏期所花费时间缩短,且在空间探索测试中穿越目标象限次数有所增加。说明人参皂苷 Rg1 可以改善孤独症模型鼠的学习和记忆的能力,这与 HE 染色显示的人参皂苷 Rg1 干预后缓解了海马区神经细胞体积增大、排列紊乱、细胞间隙较大的情况相对应。

四、小结

本研究观察到 VPA 诱导的孤独症模型出现典型重复刻板行为、社会交往障碍等异常行为,这些行为反应伴随着海马区神经元病理结构变化,氧化应激水平的增高。更重要的是,人参皂苷 Rg1 的治疗改善了孤独症模型鼠社会交流障碍、重复刻板行为,提高了其空间学习记忆能力,同时降低了海马组织的氧化应激标志物 ROS、MDA 的水平,抑制了 NOX2 氧化酶胞内亚基的磷酸化表达水平。上述结果表明人参皂苷 Rg1 可能是通过抑制 NOX2/ROS 通路发挥神经保护作用,可以作为治疗 ASD 良好的新型备选药物。但是由于本研究存在药物干预剂量、干预时间节点单一和样本量较少的问题,无法比对不同剂量、不同节点及不同时长对孤独症模型鼠带来的影响。对于人参皂苷 Rg1 在孤独症模型鼠中最佳使用方式,还有待未来进一步地研究探索。

结 论

1. 孤独症模型鼠海马组织 ROS、MDA 产生增加，NOX2、p-P47phox 蛋白表达水平升高；
2. 人参皂苷 Rg1 可以明显减少孤独症模型鼠海马区 ROS、MDA 生成，抑制 p-P47phox 蛋白表达，发挥神经保护作用；
3. 人参皂苷 Rg1 能够改善孤独症模型鼠的学习记忆等方面能力，可能与抑制 NOX2/ROS 通路减少 ROS 的生成有关。

参考文献

- [1] American Psychiatric Association. The diagnostic and statistical manual of mental disorders[M]. Washington DC: American Psychiatric Publishing Inc, 2013, 58-99.
- [2] Baio J, Wiggins L, Christensen DL. 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.
- [3] Maenner MJ, Shaw KA, Baio J, *et al.* Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016[J]. MMWR Surveill Summ, 2020, 69(4): 1-12.
- [4] Maenner MJ, Shaw KA, Bakian AV, *et al.* Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018[J]. MMWR Surveill Summ, 2021, 70(11): 1-16.
- [5] Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease[J]. Cell Host Microbe, 2018, 23(6): 716-724.
- [6] Theoharides TC, Tsilioni I, Patel AB, *et al.* Atopic diseases and inflammation of the brain in the pathogenesis of autism spectrum disorders[J]. Transl Psychiatry, 2016, 6(6): e844.
- [7] Chen L, Shi XJ, Liu H, *et al.* Oxidative stress marker aberrations in children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis of 87 studies (N=9109)[J]. Transl Psychiatry, 2021, 11(1): 15.
- [8] 毕小彬, 范晓壮, 米文丽, 等. ICD-11 和 DSM-5 中孤独症谱系障碍诊断标准比较[J]. 国际精神病学杂志, 2021, 48(02): 193-196.
- [9] Guo B, Chen J, Chen Q, *et al.* Anterior cingulate cortex dysfunction underlies social deficits in Shank3 mutant mice[J]. Nat Neurosci, 2019, 22(8): 1223-1234.
- [10] Bhakar AL, Dölen G, Bear MF. The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses)[J]. Annu Rev Neurosci, 2012, 35(1): 417-443.
- [11] Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, *et al.* Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study[J]. Psychol Med, 1995, 25(1): 63-77.
- [12] Miles JH. Autism spectrum disorders--a genetics review[J]. Genet Med, 2011, 13(4): 278-294.
- [13] Bölte S, Girdler S, Marschik PB. The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(7): 1275-1297.
- [14] Bjørklund G, Meguid NA, El-Bana MA, *et al.* Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. Mol Neurobiol[J]. 2020, 57(5): 2314-2332.
- [15] Gevezova M, Sarafian V, Anderson G, *et al.* Inflammation and Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder. CNS Neurol Disord Drug Targets[J]. 2020, 19(5): 320-333.
- [16] Manivasagam T, Arunadevi S, Essa MM, *et al.* Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Autism[M]. Adv Neurobiol, 2020, 24: 193-206.

- [17] Grauers Wiktorin H, Aydin E, Hellstrand K, *et al.* NOX2-Derived Reactive Oxygen Species in Cancer[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020(5): 1-15.
- [18] Han B, Jiang W, Liu H, *et al.* Upregulation of neuronal PGC-1 α ameliorates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Theranostics*, 2020, 10(6): 2832-2848.
- [19] Davalli P, Mitic T, Caporali A, *et al.* ROS, Cell Senescence and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016 (2016): 3565127.
- [20] Magistretti PJ, Allaman I. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging[J]. *Neuron*. 2015, 86(4): 883-901.
- [21] Fuloria S, Subramaniam V, Karupiah S, *et al.* Comprehensive Review of Methodology to Detect Reactive Oxygen Species (ROS) in Mammalian Species and Establish Its Relationship with Antioxidants and Cancer[J]. *Antioxidants (Basel)*. 2021, 10(1): 128.
- [22] Jiao Y, Wang Y, Guo S, *et al.* Glutathione peroxidases as oncotargets[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(45): 80093-80102.
- [23] Wang Y, Branicky R, Noë A, *et al.* Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling[J]. *Cell Biol*, 2018, 217(6): 1915-1928.
- [24] Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(3): 909-950.
- [25] Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, *et al.* Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling[J]. *Circ Res*, 2018, 122(6): 877-902.
- [26] Sarniak A, Lipińska J, Tytman K, *et al.* Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2016, 70(0): 1150-1165.
- [27] Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(3): 909-950.
- [28] He L, He T, Farrar S, *et al.* Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(2): 532-553.
- [29] Tauffenberger A, Magistretti PJ. Reactive Oxygen Species: Beyond Their Reactive Behavior[J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(1): 77-87.
- [30] Yang S, Lian G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 467(1-2): 1-12.
- [31] Kishida KT, Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(2): 233-244.
- [32] Stelmashook EV, Chetverikov NS, Golyshev SA, *et al.* Thymoquinone Induces Mitochondrial Damage and Death of Cerebellar Granule Neurons[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2020, 85(2): 205-212.
- [33] Kang J, Bishayee K, Huh SO. Azoxystrobin Impairs Neuronal Migration and Induces ROS Dependent Apoptosis in Cortical Neurons[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12495.
- [34] Meguid NA, Ghozlan SAS, Mohamed MF, *et al.* Expression of Reactive Oxygen Species-Related Transcripts in Egyptian Children With Autism[J]. *Biomark Insights*, 2017, 12: 1-9.

- [35] Melnyk S, Fuchs GJ, Schulz E, *et al.* Metabolic imbalance associated with methylation dysregulation and oxidative damage in children with autism[J]. *Autism Dev Disord*, 2012, 42(3): 367.
- [36] Zoroglu SS, Armutcu F, Ozen S, *et al.* Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes in autism[J]. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2004, 254(3): 143-147.
- [37] Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, *et al.* Oxidative stress in autism: increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin--the antioxidant proteins[J]. *Life Sci*, 2004, 75(21): 2539-2549.
- [38] Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, *et al.* Reactive oxygen species: from health to disease[J]. *Swiss Med Wkly*, 2012, 142: w13659.
- [39] Nadeem A, Ahmad SF, Al-Harbi NO, *et al.* Increased oxidative stress in the cerebellum and peripheral immune cells leads to exaggerated autism-like repetitive behavior due to deficiency of antioxidant response in BTBR T + tf/J mice[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2019, 89: 245-253.
- [40] Wang X, Lu J, Xie W, *et al.* Maternal diabetes induces autism-like behavior by hyperglycemia-mediated persistent oxidative stress and suppression of superoxide dismutase 2[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(47): 23743-23752.
- [41] Xie J, Han Q, Wei Z, *et al.* Phenanthrene induces autism-like behavior by promoting oxidative stress and mTOR pathway activation[J]. *Toxicology*, 2021, 461: 152910.
- [42] Quie PG, White JG, Holmes B, *et al.* In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood[J]. *Clin Invest*, 1967, 46(4): 668-679.
- [43] Holmes B, Page AR, Good RA. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function[J]. *Clin Invest*, 1967, 46(9): 1422-1432.
- [44] Segal AW, Jones OT. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes[J]. *Nature*, 1978, 276(5687): 515-517.
- [45] Segal AW, Jones OT, Webster D, *et al.* Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease[J]. *Lancet*, 1978, 2(8087): 446-449.
- [46] 冷丽丽, 唐圣松. NADPH 氧化酶 NOX 家族的组织分布及生理功能[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2008, 28(01): 19-23.
- [47] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 245-313.
- [48] Szanto I, Rubbia-Brandt L, Kiss P, *et al.* Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease[J]. *Pathol*, 2005, 207(2): 164-176.
- [49] Sumimoto H, Miyano K, Takeya R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(1): 677-686.
- [50] Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, *et al.* NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(44): 46065-46072.

- [51] Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, *et al.* A Novel Superoxide-producing NAD(P)H Oxidase in Kidney[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(2): 1417-1423.
- [52] Fulton DJ. Nox5 and the regulation of cellular function[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(10): 2443-2452.
- [53] De Deken X, Wang D, Many MC, *et al.* Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family[J]. Biol Chem. 2000 Jul 28, 275(30): 23227-23233.
- [54] Infanger DW, Sharma RV, Davisson RL. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function[J]. Antioxid Redox Signal, 2006, 8(9-10): 583-596.
- [55] 郑远鹏, 鲍秀琦, 孙华, 等. NADPH 氧化酶在帕金森病中的作用[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(08): 872-877.
- [56] Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective[J]. Biochem J, 2005, 386(Pt 3): 401-416.
- [57] Infanger DW, Sharma RV, Davisson RL. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function[J]. Antioxid Redox Signal, 2006, 8(9-10): 583-596.
- [58] Ansari MA, Roberts KN, Scheff SW. A time course of NADPH-oxidase up-regulation and endothelial nitric oxide synthase activation in the hippocampus following neurotrauma[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 77: 21-29.
- [59] Walton JC, Selvakumar B, Weil ZM, *et al.* Neuronal nitric oxide synthase and NADPH oxidase interact to affect cognitive, affective, and social behaviors in mice[J]. Behav Brain Res, 2013, 256: 320-327.
- [60] Cooney SJ, Bermudez-Sabogal SL, Byrnes KR. Cellular and temporal expression of NADPH oxidase (NOX) isotypes after brain injury[J]. Neuroinflammation, 2013, 10: 155.
- [61] JOH YT, LEE JY, LEE J, *et al.* Oleic acid reduces lipopolysaccharide-induced expression of iNOS and COX-2 in BV2 murine microglial cells: possible involvement of reactive oxygen species, p38MAPK, and IKK/NF-kappa B signaling pathways[J]. Neurosci Lett, 2009, 464(2): 93-97.
- [62] Sharma N, Kapoor M, Nehru B. Apocyanin, NADPH oxidase inhibitor prevents lipopolysaccharide induced-synuclein aggregation and ameliorates motor function deficits in rats: Possible role of biochemical and inflammatory alterations[J]. Behav Brain Res, 2016, 296: 177-190.
- [63] Tejada-Simon MV, Serrano F, Villasana LE, *et al.* Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus[J]. Mol Cell Neurosci, 2005, 29(1): 97-106.
- [64] Lee SH, Choi BY, Kho AR, *et al.* Inhibition of NADPH Oxidase Activation by Apocynin Rescues Seizure-Induced Reduction of Adult Hippocampal Neurogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3087.
- [65] Qin YY, Li M, Feng X, *et al.* Combined NADPH and the NOX inhibitor apocynin provides greater anti-inflammatory and neuroprotective effects in a mouse model of stroke[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 104: 333-345.
- [66] Sun X, Zhang H, Xie L, *et al.* Tristetraprolin destabilizes NOX2 mRNA and protects dopaminergic neurons from oxidative damage in Parkinson's disease[J]. FASEB J, 2020, 34(11): 15047-15061.
- [67] Zhang Y, Ding S, Chen Y, *et al.* Ginsenoside Rg1 alleviates lipopolysaccharide-induced neuronal damage

- by inhibiting NLRP1 inflammasomes in HT22 cells[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(1): 782.
- [68] Wells PG, Bhatia S, Drake DM, *et al.* Fetal oxidative stress mechanisms of neurodevelopmental deficits and exacerbation by ethanol and methamphetamine[J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2016, 108(2): 108-130.
- [69] Nadeem A, Ahmad SF, Al-Harbi NO, *et al.* Aggravation of autism-like behavior in BTBR T+tf/J mice by environmental pollutant, di-(2-ethylhexyl) phthalate: Role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and oxidative enzymes in innate immune cells and cerebellum[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 91: 107323.
- [70] Nadeem A, Ahmad SF, Attia SM, *et al.* Oxidative and inflammatory mediators are upregulated in neutrophils of autistic children: Role of IL-17A receptor signaling[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2019, 90: 204-211.
- [71] Al-Harbi NO, Nadeem A, Ahmad SF, *et al.* Elevated expression of toll-like receptor 4 is associated with NADPH oxidase-induced oxidative stress in B cells of children with autism[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84: 106555.
- [72] Nadeem A, Ahmad SF, Bakheet SA, *et al.* Toll-like receptor 4 signaling is associated with upregulated NADPH oxidase expression in peripheral T cells of children with autism[J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 61: 146-154.
- [73] Lamy M, Pedapati EV, Dominick KL, *et al.* Recent Advances in the Pharmacological Management of Behavioral Disturbances Associated with Autism Spectrum Disorder in Children and Adolescents[J]. *Paediatr Drugs*, 2020, 22(5): 473-483.
- [74] Shafiq S, Pringsheim T. Using antipsychotics for behavioral problems in children[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2018, 19(13): 1475-1488.
- [75] Hirsch LE, Pringsheim T. Aripiprazole for autism spectrum disorders (ASD)[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 2016(6): CD009043.
- [76] Zhou MS, Nasir M, Farhat LC, *et al.* Meta-analysis: Pharmacologic Treatment of Restricted and Repetitive Behaviors in Autism Spectrum Disorders[J]. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2021, 60(1): 35-45.
- [77] Yu Y, Chaulagain A, Pedersen SA, *et al.* Pharmacotherapy of restricted/repetitive behavior in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Psychiatry*, 2020, 20(1): 121.
- [78] Singh K, Connors SL, Macklin EA, *et al.* Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD)[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(43): 15550-15555.
- [79] Nadeem A, Ahmad SF, Al-Harbi NO, *et al.* Nrf2 activator, sulforaphane ameliorates autism-like symptoms through suppression of Th17 related signaling and rectification of oxidant-antioxidant imbalance in periphery and brain of BTBR T+tf/J mice[J]. *Behav Brain Res*, 2019, 364: 213-224.
- [80] Zimmerman AW, Singh K, Connors SL, *et al.* Randomized controlled trial of sulforaphane and metabolite discovery in children with Autism Spectrum Disorder[J]. *Mol Autism*, 2021, 12(1): 38.
- [81] Bhat A, Mahalakshmi AM, Ray B, *et al.* Benefits of curcumin in brain disorders[J]. *Biofactors*, 2019,

- 45(5): 666-689.
- [82] 陈淑娟. 姜黄素对孤独症动物模型鼠行为及 BDNF 表达的影响[D]. 佳木斯大学, 2012.
- [83] 黄丹丹. 姜黄素对孤独症鼠模型海马神经元、星形胶质细胞的影响研究[D]. 佳木斯大学, 2019.
- [84] Jayaprakash P, Isaev D, Shabbir W, *et al.* Curcumin Potentiates $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors and Alleviates Autistic-Like Social Deficits and Brain Oxidative Stress Status in Mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7251.
- [85] Bhandari R, Kuhad A. Neuropsychopharmacotherapeutic efficacy of curcumin in experimental paradigm of autism spectrum disorders[J]. *Life Sci*, 2015, 141: 156-169.
- [86] Cruz-Martins N, Quispe C, Kırkın C, *et al.* Paving Plant-Food-Derived Bioactives as Effective Therapeutic Agents in Autism Spectrum Disorder[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 1131280.
- [87] 张鹏. 人参食用对部分生理指标调节作用的研究[D]. 吉林大学, 2017.
- [88] 陆宏隆. 人参与人参类药物治疗癌因性疲乏临床研究的系统评价与 Meta 分析[D]. 广州中医药大学, 2017.
- [89] 于京华, 岳喜典. 人参的保健功能及其在食品中的应用[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(21): 218-224.
- [90] Zhu J, Mu X, Zeng J, *et al.* Ginsenoside Rg1 prevents cognitive impairment and hippocampus senescence in a rat model of D-galactose-induced aging[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e101291.
- [91] 王卫霞, 王巍, 陈可冀. 人参皂苷对动物脑神经保护作用及其机理研究进展[J]. *中国中西医结合杂志*, 2005(01): 89-93.
- [92] 欧阳柳凤, 朱珂璇, 邵晓, 等. 脑内小分子检测技术及人参皂苷入脑的研究进展[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2016, 18(09): 1567-1574.
- [93] 孙宪昌. 人参皂苷 Rg1 通过抑制炎症反应保护黑质多巴胺能神经元的实验研究[D]. 青岛大学, 2016.
- [94] 刘琳, 张凯, 何勐, 等. 人参皂苷 Rg1 对阿尔茨海默病转基因小鼠的神经保护作用[J]. *中草药*, 2020, 51(05): 1264-1272.
- [95] 张碧琼. NADPH 氧化酶介导的 NLRP1 炎症小体激活在海马神经元老化损伤中的作用及人参皂苷 Rg1 的调节作用[D]. 安徽医科大学, 2018.
- [96] 徐谈震. NOX2-NLRP1 信号通路在小鼠脑老化损伤中的作用及人参皂苷 Rg1 的调节作用[D]. 安徽医科大学, 2019.
- [97] Hongluan Y, Cuiqin F, Lejin Y, *et al.* Ginsenoside Rg1 Prevents Chronic Stress-Induced Depression-Like Behaviors and Neuronal Structural Plasticity in Rats[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 48(6): 2470-2482.
- [98] Li Y, Wang L, Wang P, *et al.* Ginsenoside-Rg1 Rescues Stress-Induced Depression-Like Behaviors via Suppression of Oxidative Stress and Neural Inflammation in Rats[J]. *Oxidative medicine and, cellular longevity*, 2020, 2020: 1-15.
- [99] 杜姝, 姜岩, 刘晶, 等. 人参皂苷 Rg1 对癫痫大鼠海马神经元损伤和小胶质细胞活化的影响[J].

- 免疫学杂志, 2021, 37(03): 202-209.
- [100] 陈莉, 潘雪瑛, 杨梦琦. 通心络治疗脑梗死的效应机制研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(14): 6.
- [101] 户京京, 张晓光, 杨建会, 等. 开心散神经系统作用现代研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(01): 61-66.
- [102] 李建英, 李晓彤, 翁红, 等. 康艾注射液中间产品人参提取液中人参皂苷 Rg1 和人参皂苷 Re 的含量测定方法及高效液相指纹图谱研究[J]. 人参研究, 2020, 32(01): 2-5.
- [103] 高亚亚, 柴旭兵, 闫俊, 等. HPLC 法测定复方参龙胶囊中 5 个功效成分的含量[J]. 山西医科大学学报, 2021, 52(02): 201-206.
- [104] Schneider T, Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism[J]. Neuropsychopharmacology, 2005, 30(1): 80-89.
- [105] Yu H, Fan C, Yang L, *et al.* Ginsenoside Rg1 Prevents Chronic Stress-Induced Depression-Like Behaviors and Neuronal Structural Plasticity in Rats[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 48(6): 2470-2482.
- [106] Crawley JN. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism[J]. Brain Pathol, 2007, 17(4): 448-459.
- [107] Christensen J, Grønborg TK, Sørensen MJ, *et al.* Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism[J]. JAMA, 2013, 309(16): 1696-1703.
- [108] Nicolini C, Fahnestock M. The valproic acid-induced rodent model of autism[J]. Exp Neurol, 2018, 299(Pt A): 217-227.
- [109] Al Sagheer T, Haida O, Balbous A, *et al.* Motor Impairments Correlate with Social Deficits and Restricted Neuronal Loss in an Environmental Model of Autism[J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2018, 21(9): 871-882.
- [110] Mabunga DFN, Gonzales ELT, Ji-Woon K, *et al.* Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism[J]. Experimental Neurobiology, 2015, 24(4): 285-300.
- [111] Kim KC, Kim P, Go HS, *et al.* The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats[J]. Toxicol Lett, 2011, 201(2): 137-142.
- [112] Redcay E, Courchesne E. When is the brain enlarged in autism? A meta-analysis of all brain size reports[J]. Biol Psychiatry, 2005, 58(1): 1-9.
- [113] Raznahan A, Wallace GL, Antezana L, *et al.* Compared to what? Early brain overgrowth in autism and the perils of population norms[J]. Biol Psychiatry, 2013, 74(8): 563-575.
- [114] Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory[J]. Cell, 1996, 87(7): 1327-1338.
- [115] Nakashiba T, Young JZ, McHugh TJ, *et al.* Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning[J]. Science, 2008, 319(5867): 1260-1264.
- [116] Nakashiba T, Cushman JD, Pelkey KA, *et al.* Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion[J]. Cell, 2012, 149(1): 188-201.
- [117] Mueller SG, Chao LL, Berman B, *et al.* Evidence for functional specialization of hippocampal subfields

- detected by MR subfield volumetry on high resolution images at 4 T[J]. *Neuroimage*, 2011, 56(3): 851-857.
- [118] Banker SM, Gu X, Schiller D, *et al.* Hippocampal contributions to social and cognitive deficits in autism spectrum disorder[J]. *Trends Neurosci*, 2021, 44(10): 793-807.
- [119] 黄丹丹, 姜志梅, 周玉楠, 等. 姜黄素早期干预对孤独症模型鼠海马神经元和星形胶质细胞的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2021, 36(11): 1351-1356.
- [120] Barnea-Goraly N, Frazier TW, 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.
- [121] Nicolson R, DeVito TJ, Vidal CN, *et al.* Detection and mapping of hippocampal abnormalities in autism[J]. *Psychiatry Res*, 2006, 148(1): 11-21.
- [122] Omotosho IO, Akinade AO, Lagunju IA, *et al.* Oxidative stress indices in ASD children in Sub-Sahara Africa[J]. *Neurodev Disord*, 2021, 13(1): 50.
- [123] Chen F, Yang D, Cheng XY, *et al.* Astragaloside IV Ameliorates Cognitive Impairment and Neuroinflammation in an Oligomeric A β Induced Alzheimer's Disease Mouse Model via Inhibition of Microglial Activation and NADPH Oxidase Expression[J]. *Biol Pharm Bull*, 2021, 44(11): 1688-1696.
- [124] Ansari MA, Scheff SW. NADPH-oxidase activation and cognition in Alzheimer disease progression[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(1): 171-178.
- [125] Yan J, Huang J, Liu A, *et al.* Atorvastatin improves motor function, anxiety and depression by NOX2-mediated autophagy and oxidative stress in MPTP-lesioned mice[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 13(1): 831-845.
- [126] 王卫霞, 王巍, 陈可冀. 人参皂苷对动物脑神经保护作用及其机理研究进展[J]. *中国中西医结合杂志*, 2005, 25(1): 89-93.
- [127] Xu TZ, Shen XY, Sun LL, *et al.* Ginsenoside Rg1 protects against H₂O₂-induced neuronal damage due to inhibition of the NLRP1 inflammasome signalling pathway in hippocampal neurons in vitro[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2): 717-726.
- [128] Zhang Y, Ding S, Chen Y, *et al.* Ginsenoside Rg1 alleviates lipopolysaccharide-induced neuronal damage by inhibiting NLRP1 inflammasomes in HT22 cells[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(1): 782.
- [129] Wang Y, Kan H, Yin Y, *et al.* Protective effects of ginsenoside Rg1 on chronic restraint stress induced learning and memory impairments in male mice[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014, 120: 73-81.
- [130] Zhang H, Su Y, Sun Z, *et al.* Ginsenoside Rg1 alleviates A β deposition by inhibiting NADPH oxidase 2 activation in APP/PS1 mice[J]. *Ginseng Res*, 2021, 45(6): 665-675.
- [131] Vannucci RC, Vannucci SJ. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage[J]. *Ann NY Acad Sci*. 1997, 835: 234-249.
- [132] Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's[J]. *Int J Prev Med*. 2013, 4(6):624-630.

致 谢

经过一年多努力，毕业论文写作终于接近尾声，也代表着研究生三年即将结束，回首研究生生活与学习，心中感慨万千。这三年里，既有彷徨和迷茫，又有开心喜悦，此刻回想，心中唯有感恩与不舍。

首先由衷地感谢我的导师郭岚敏教授，在科研、实习以及生活中对我的帮助，从课题设计到实验实施再到论文写作与修改，走到现在的每一步都离不开郭老师的帮助。同时也要感谢郭老师在为人处事上给了我很多教诲，郭老师在科研以及临床上严谨的工作态度和平易近人的生活态度都使我受益匪浅。无论是实验还是生活问题，每一次与郭老师的交谈，都能够让我找到新的方向。没有郭老师平时的督促和细心教导就没有我现在的进步，在此向郭老师说一声“老师您辛苦了，谢谢您”。

感谢李晓捷教授、姜志梅教授、张丽华教授、王菊莉教授、庞伟教授、郭津教授对我课题设计提出的宝贵意见以及日常学习生活中的指导；感谢朱俊丽老师、周丽老师、陈洪超老师、郭静老师等临床科室带教老师在实习期间对我的帮助；感谢教科办孔祥瑞老师、赵宏博老师的生活和实验的帮助！此外，还要感谢我师姐张晓月，感谢我的同门王思佳和邢晓，感谢我的好朋友们。晓月师姐是我在三年研究生生活中的最重要伙伴之一，每当自己困惑的时候，是晓月师姐帮助和陪伴使我拨开云雾继续前行，希望正在工作的师姐一切顺利；同门间的相互扶持，相互关心，也是我们实验攻克一个个难关法宝之一，非常感谢你们让我感受到了我们小家庭的温暖；还有我的一群可爱又美丽的小伙伴们，感谢有你们让我的研究生生活更加的多姿多彩，充满欢乐。同时，也要感谢我最爱的家人们，你们的支持与理解永远是我前进最大动力。

最后诚挚感谢各位评审专家和老师们不辞辛苦地参加我的硕士毕业论文答辩！在将离校之际，祝愿所有老师和同学在今后的事业和生活上一切顺遂！

英文缩写

ASD	Autism Spectrum Disorders	孤独症谱系障碍
VPA	Sodium Valproate	丙戊酸钠
MDA	Malonic Dialdehyde	丙二醛
BDNF	Brain-derivedneurotrophic Factor	神经营养因子
ROS	Reactiveoxygen Species	活性氧
ADHD	Attention Deficit Hyperactivity Disorder	注意缺陷多动障碍
AD	Alzheimer Disease,	阿尔茨海默病
SOD	Superoxide Dismutase	超氧化物歧化酶
CAT	Catalase	过氧化氢酶
GPx	Glutathione Peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
GSH	Glutathione	谷胱甘肽
iNOS	Induced Nitric Oxide Synthase	诱导型一氧化氮合酶
LTP	Longterm Potentiation	长时程增强作用
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
H2O2	Hydrogen Peroxide	过氧化氢
NO	Nitric Oxide	一氧化氮

攻读学位期间发表的学术成果

附 图



阴栓



VPA 组模型鼠



VPA 组模型鼠



脑重



VPA 造模



方向趋向性



水迷宫测试



三箱实验