



早期游泳调节纹状体细胞自噬缓解 *Shank3* 基因敲除大鼠刻板行为*

薛亚奇¹⁾ 刘 纽^{1,2)} 王世娇¹⁾ 把 懿¹⁾ 甄志平^{1)**}¹⁾ 北京师范大学体育与运动学院, 北京 100875; ²⁾ 渭南师范学院体育学院, 渭南 714099

摘要 目的 通过8周游泳运动干预 *Shank3* 基因敲除 (*Shank3*^{-/-}) 诱导的孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 大鼠模型, 基于细胞自噬视角探索运动干预改善大鼠孤独症样行为的机制。方法 根据基因型鉴定结果及运动干预情况将大鼠分为野生对照组 (WC组)、*Shank3*^{-/-}组 (KC组)、野生游泳组 (WS组)、*Shank3*^{-/-}游泳组 (KS组), 每组15只。KS组和WS组进行8周游泳运动锻炼, 5 d/周, 逐步递增至40 min/次并保持。游泳运动干预后24 h进行行为学实验, 包括: 自梳理实验、埋珠实验、孔洞实验。行为学测试12 h后进行取材, 通过透射电镜观察纹状体区域自噬体数量, 免疫荧光染色观察微管相关蛋白1轻链3 (LC3) 蛋白及选择性自噬接头蛋白 (p62) 蛋白表达水平, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) 和免疫印迹法 (Western blot) 检测纹状体组织中B细胞淋巴瘤蛋白2相互作用蛋白1 (Beclin1)、LC3、p62、自噬相关蛋白5 (Atg5)、自噬相关16样蛋白1 (Atg16L)、溶酶体相关蛋白1 (LAMP1) 的蛋白质和mRNA的表达。结果 与WC组相比, KC组大鼠自梳理次数 ($P<0.05$) 及时间 ($P<0.01$) 显著增加, 埋珠数量显著增加 ($P<0.01$), 孔洞探索次数 ($P<0.05$) 及单一孔洞探索次数 ($P<0.01$) 显著增加, 8周游泳运动后, 相比于KC组大鼠, KS组大鼠自梳理时间、埋珠数量及单一孔洞探索次数显著降低。此外, 与WC组相比, KC组大鼠纹状体区域有大量自噬体形成, 同时 Atg5 ($P<0.05$)、Atg16L ($P<0.01$)、p62 ($P<0.01$) 的蛋白质及mRNA表达显著上升, LC3II/LC3I比值上升 ($P<0.01$), Beclin1蛋白显著上升 ($P<0.01$), LAMP1的蛋白质及mRNA表达显著下降 ($P<0.01$)。8周游泳运动后, 相比于KC组大鼠, KS组大鼠 Atg5、Atg16L、p62 的蛋白质及mRNA表达显著下降, LC3II/LC3I显著下降 ($P<0.05$), Beclin1蛋白显著下降 ($P<0.01$), LAMP1的蛋白质及mRNA表达显著上升 ($P<0.05$)。结论 8周早期游泳可以调节纹状体细胞自噬缓解 *Shank3*^{-/-}大鼠刻板行为。

关键词 早期游泳, 孤独症谱系障碍, 大鼠, 细胞自噬, 纹状体

中图分类号 Q95-336, R742.8+9

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0319

CSTR: 32369.14.pibb.20240319

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 是一类常见的、高度遗传且具有异质性的神经发育障碍疾病。其主要核心症状是社交沟通缺陷和重复的行为、兴趣或活动模式^[1]。近年来, ASD的患病率逐年上升, 给家庭和社会带来了巨大的经济和精神负担, 但目前ASD治疗并无有效药物, 寻求有效的预防和干预方案是目前待解决的重要问题。*Shank3* 基因突变被认为是重要的遗传风险因素之一。研究证实, 大约1%的ASD患者携带有 *Shank3* 基因的编码区域或调控区域的突变^[2]。近年来, *Shank3* 基因突变模型已经成为经典的ASD发病机理研究的重要模型^[3]。*Shank3* 基因在

多器官表达, 在纹状体脑区表达最为丰富, 且纹状体脑区与重复刻板行为之间存在密切关联^[4]。因此本研究选用纹状体脑区作为靶向脑区。

细胞自噬是真核生物中进化保守的对细胞内物质进行周转的重要过程, 且与神经发育之间存在密切关系。细胞自噬在神经元生长发育、轴突生长、突触可塑性及结构和功能中具有至关重要的作用^[5]。因此, 自噬功能障碍可能与各种神经发育

* 北京市自然科学基金 (7232239) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-58807842, E-mail: zzpxt@bnu.edu.cn

收稿日期: 2024-07-13, 接受日期: 2024-09-30

疾病之间存在密切关系, ASD 就是其中之一^[6]。对小鼠自噬相关基因 *Atg7* 特异性敲除后, 小鼠出现 ASD 样行为^[7]。ASD 患者、环境诱导的 ASD 动物模型、基因敲除诱导的 ASD 动物模型的大脑中也发现了异常的自噬蛋白质表达水平^[8-10]。因此, 自噬水平异常可能是导致 ASD 的潜在因素之一^[11]。

运动干预是一种有效的 ASD 干预手段, 已得到广泛认可^[12]。其中, 游泳运动结合了丰富环境中的多元感官刺激与运动感觉刺激, 在改善 ASD 病症行为方面扮演重要角色, 同时也是进行早期干预的首选方法之一^[13]。然而, 目前关于运动干预 ASD 产生效果的潜在机制尚未阐明。运动与自噬之间存在密切关系, 它可以通过缓解病理条件下异常的自噬水平改善疾病病理状态^[14]。然而基于自噬视角探索运动干预 ASD 的潜在机制还鲜有研究, 因此本研究通过探讨 8 周游泳运动干预对 *Shank3* 基因敲除 (*Shank3*^{-/-}) 大鼠纹状体区域自噬水平的影响, 为解释运动干预改善 ASD 样行为的潜在生理机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象及分组

实验对象选用 8 日龄 *Shank3* 基因 11~21 号外显

子敲除的雄性 SPF 级大鼠。动物分笼饲养, 饲养温度控制为 (22±2) °C, 湿度为 50%±10%, 明暗交替周期为 12 h, 保证动物可以自由进食、饮水和活动。LAMP1 (ab278043) 抗体购置于 Abcam 公司, LC3 (PM036Y)、p62 (PM045Y)、Atg5 (PM050Y)、Atg16L (PM040Y)、Beclin1 (PD017Y) 抗体购置于 MBL 公司, β -actin (GB12001) 购置于 Servicebio 公司。通过基因型鉴定将动物鉴定分组 (KO: 上游引物 TTGTGCACTGCCTATGTTGACCACT, 下游引物 TAGGCGAGAGAAGATGGTGTGATTTC, 688 bp; W: 上游引物 CTGTTGGCTGAGCCTGGCATAGAG, 下游引物 CTGTTGGCTGAGCCTGGCATAGAG, 559 bp)。根据基因型鉴定结果及运动干预情况将动物分为 4 组: 野生对照组 (WC 组)、*Shank3*^{-/-} (KC 组)、野生游泳组 (WS 组)、*Shank3*^{-/-} 游泳组 (KS 组), 每组 15 只。

1.2 运动方案

在幼鼠 8 日龄时, 对 KS 和 WS 组进行为期 8 周的游泳运动干预, 干预 5 d/周, 具体干预信息见图 1。本研究所采用的游泳运动干预方案是基于实验室前期的早期游泳运动干预方案实施的, 是可靠的早期游泳运动干预方案^[15]。

1.3 行为学测试

行为学测试时间安排在游泳运动干预后 24 h 开始, 详见图 1。

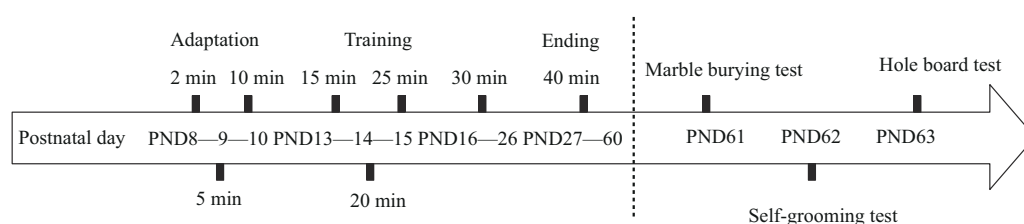


Fig. 1 Swimming exercise intervention program

1.3.1 自梳理实验 (self-grooming test)

实验装置为塑料且不透明的矩形箱体 (长 40 cm, 宽 34 cm, 高 24 cm)。将实验大鼠置于箱内自由活动, 使用红外相机记录 20 min。观察统计每只测试大鼠的活动行为, 自我梳理行为内容包括: 大鼠舔舐身体和毛发、用前爪擦脸、前后爪抓挠躯干^[16]。记录大鼠自梳理行为累计时间和次数。

1.3.2 埋珠实验 (marble burying test)

实验装置为干净的大鼠饲养笼 (长 48.5 cm,

宽 35 cm, 高 20 cm)。将饲养垫料在笼内填充至 4.5 cm, 然后轻轻地将 15 个黑色玻璃弹珠 (直径 15 mm) 以 3×5 的排列等距放置^[17]。在黑暗状态下将大鼠放入进行 30 min 测试。测试完毕后, 记录埋藏的弹珠数量 (>50% 大理石被垫层材料覆盖为有效数量)。

1.3.3 孔洞实验

采用孔洞实验对大鼠进行测试。实验装置为矩形箱子 (长 66 cm, 宽 56 cm, 高 47 cm), 箱子的

底板上有4个直径为3.8 cm、深1 cm的等大圆孔, 圆孔距离两壁的距离分别为14 cm和17 cm。从底部将装置支撑抬高12 cm。将大鼠放入装置进行5 min适应阶段。随后开始正式实验, 将大鼠从装置中心放入, 自由探索10 min^[18]。大鼠两只眼睛穿过孔洞视为1次有效的探索次数。记录大鼠头部探索每个孔洞的次数及所有孔洞的总次数。

1.4 取材及样本采集

动物在进行行为学测试后12 h进行取材。大鼠禁食过夜, 经腹腔注射戊巴比妥钠进行麻醉, 断头取脑, 分离大鼠大脑双侧纹状体, 一部分装入EP管置于液氮保存, 整理后放置于-80℃冰箱备用, 一部分放入电镜固定液。所有动物实验均经北京师范大学动物护理和使用委员会批准, 并符合美国国立卫生研究院《实验动物护理和使用指南》的规定(伦理审批号: ty202304002)。

1.5 透射电镜

将固定好的组织取出, 在1%的锇酸中室温条件下避光继续固定2 h保存。随后使用PBS漂洗3次, 5 min/次。将固定后的组织依次放入不同浓度的乙醇溶液中脱水, 最后用100%丙酮处理3次, 15 min/次。将处理好的组织进行包埋固化。将固化后的组织进行超薄切片, 设置切片厚度为70 nm, 用150目方华膜铜网捞片。将铜网于2%醋酸铀饱和乙醇溶液中避光染色及干燥处理。最后使用HT7700透射电子显微镜进行观察。

1.6 免疫荧光染色

将大脑从固定液中取出, 利用蔗糖溶液梯度脱水, 使用OTC包埋剂进行冰冻包埋。利用冰冻切片机切片, 切片厚度6 μ m, 置于防脱载玻片上。用笔勾画出组织的大致轮廓。使用0.4% Triton透膜15 min, PBS冲洗3次。滴加5% BSA进行封闭, 1 h。将封闭液清除, 在组织上滴加配置好的一抗(LC3 1:500; p62 1:500), 放入湿盒内。室温孵育1 h后于4℃冰箱过夜。次日, 用PBS冲洗3次。然后, 滴加荧光二抗(Alexa 488, GB25301, 1:300; Alexa 594, GB28303, 1:300)混合液, 避光操作, 室温孵育1 h。随后, 使用PBS冲洗3次。最后使用含有DAPI的封片剂进行封片, 放置于荧光显微镜下拍摄。

1.7 免疫印迹法

取大鼠纹状体组织提取蛋白质, 利用BCA法进行蛋白质浓度测定后制备样品。将制备好的样品

加入SDS-PAGE凝胶电泳后转至PVDF膜上, 用5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 随后依次加入抗体, 4℃孵育过夜。次日, 使用TBST洗膜3次后, 加入HRP标记的羊抗兔IgG(E030120, Earthox, 1:5 000)室温摇床孵育1 h, 使用TBST洗膜3次, 滴加化学发光液, 曝光条带, 使用Image J进行分析。

1.8 qPCR

取大鼠纹状体组织, 使用RNA提取试剂盒提取mRNA, 检测RNA的浓度与纯度。使用逆转录试剂盒获取cDNA, 按照SYBR Green试剂盒说明书进行实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)反应, (LC3B: 上游引物 TCCGAGAAGACCTTCAAA-CAGC, 下游引物 AAGAAGGCTTGTTAGCA-TTGAG; p62: 上游引物 GGTGTCTGTGAGAGG-ACGAGGAG, 下游引物 TCTGGTGATGGAGCC-TCTTACTGG; Beclin1: 上游引物 AGGAGTTGC-CGTTGTACTGTTCT, 下游引物 GTGTCTTCAAT-CTTGCCTTTCTCC; LAMP1: 上游引物 CGTTC-AGCACCTCCAACCTATTC, 下游引物 CACTCTT-CCACAGACCCAAACC; β -actin: 上游引物 CCC-ATCTATGAGGGTTACGC, 下游引物 TTAAATG-TCACGCACGATTTC; Atg16L: 上游引物 CAGG-CGTTTCGAGGAGATCATT, 下游引物 ACTATC-ATTCCACGCACCATCA; Atg5: 上游引物 TGTG-CTTCGAGATGTGTGGTT, 下游引物 GTCAAAT-AGCTGACTCTTGGCAA)。通过实时定量PCR仪进行测试, 读取数值, 采用 $\Delta\Delta C_t$ 相对定量的方式表示, 以 β -actin作为内参进行标化处理。

1.9 统计方法

使用SPSS 26.0及GraphPad Prism 9.3软件进行数据统计处理及分析作图。所有研究结果以平均值加减标准误(mean $\pm$ SD)来表示, 所有数据以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基因型鉴定结果

Shank3基因敲除大鼠通过CRISPR-Cas9技术敲除Shank3 11~21号位点产生^[19]。通过鼠尾DNA提取鉴定确认基因型, 688 bp为敲除纯合子(KO), 559 bp为野生型(W), 两者均存在为杂合子(H)(图2)。

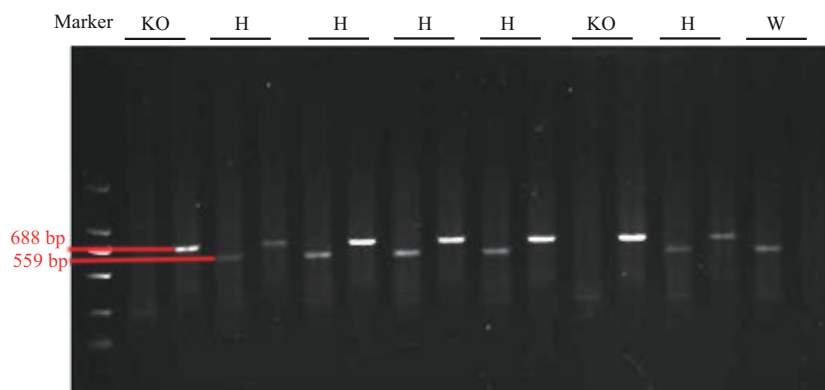


Fig. 2 Genotyping results

K: *Shank3* knockout; H: heterozygote; W: wild type.

2.2 早期游泳缓解*Shank3*^{-/-}大鼠刻板行为

本研究使用自梳理实验、埋珠实验、孔洞实验对大鼠刻板行为进行检验，以探究游泳运动对*Shank3*^{-/-}大鼠ASD样行为的改善作用。

自梳理行为实验是经典的大鼠刻板行为检测方式^[20]。自梳理行为包括：使用前爪摩擦清洗面部，

用后抓抓挠身体腹侧以及头部，抓挠尾部及生殖器清理^[16]。自梳理时间测量（图3a）显示，KC组大鼠在自由活动过程中进行自梳理的时间显著高于WC组（ $P<0.01$ ），KS组大鼠的自梳理累计时长显著低于KC组（ $P<0.05$ ）。自梳理次数统计（图3b）显示，KC组大鼠自梳理次数显著多于WC组大鼠

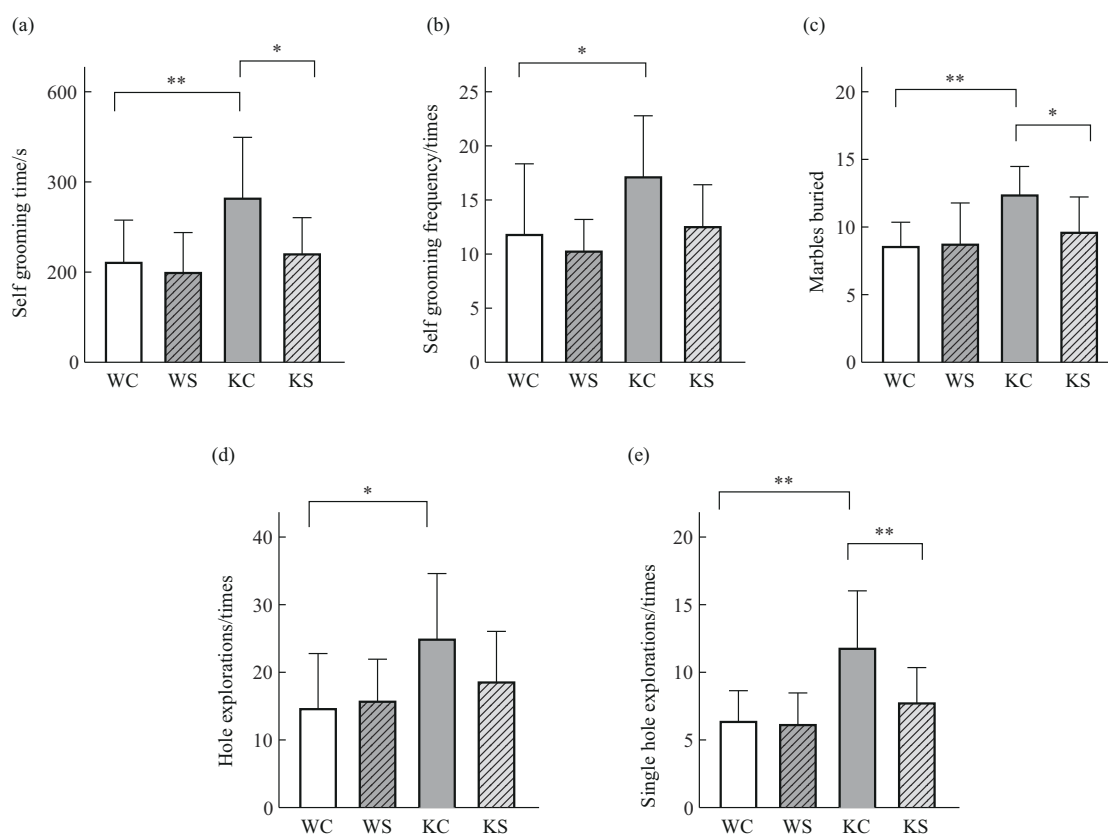


Fig. 3 Results of repetitive stereotyped behaviors of rats in each group

(a) Self-grooming time; (b) number of self-grooming sessions; (c) number of beads embedded; (d) number of hole explorations; (e) number of single hole explorations. $n=12$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

($P<0.05$), 与KC组相比, KS组大鼠的自梳理次数降低, 但结果不具有显著的统计学意义 ($P>0.05$, 图3b)。

埋珠实验可以检测ASD大鼠的焦虑情况及其重复刻板行为^[17]。鼠类动物有天生的爱好, 喜欢挖掘和掩埋物体, 而埋珠实验属于其对外物的固定兴趣模型检测, 过多的埋珠数量反映了动物对物体掩埋的刻板行为。埋珠行为实验结果(图3c)显示: KC组大鼠的埋珠数量显著高于WC组 ($P<0.01$); 游泳运动干预后KS组大鼠的埋珠数量较KC组显著下降 ($P<0.05$), 并且与WC组相比不存在显著的统计学差异 ($P>0.05$)。

孔洞实验可以通过测试记录动物对孔洞的嗅探行为反应动物在空间内部的刻板行为。尤其是对同一位置的多次嗅探行为, 是反映动物重复刻板行为中的重要指征^[21]。结果(图3d)显示, KC组大鼠

自由活动状态下的总探头次数显著高于WC组 ($P<0.05$), 8周游泳运动干预后, KS组大鼠的探头行为降低了, 但结果不具有显著的统计学意义 ($P>0.05$)。随后记录分析各组大鼠对单一孔洞探头的最大次数。结果(图3e)发现, KC组大鼠对同一位置的孔洞出现重复探头行为, 显著高于WC组 ($P<0.01$), 相比于KC组, KS组显著降低了这一行为现象 ($P<0.01$)。

2.3 早期游泳减少*Shank3*^{-/-}大鼠纹状体脑区自噬体数量

电镜下可观察到各组大鼠纹状体区域的自噬体(图4a中黑色箭头所示)。与WC组相比, KC组的自噬体数量显著增多 ($P<0.01$), 8周游泳运动干预后, KS组的自噬体数量相比于KC组显著减少 ($P<0.05$) (图4b)。

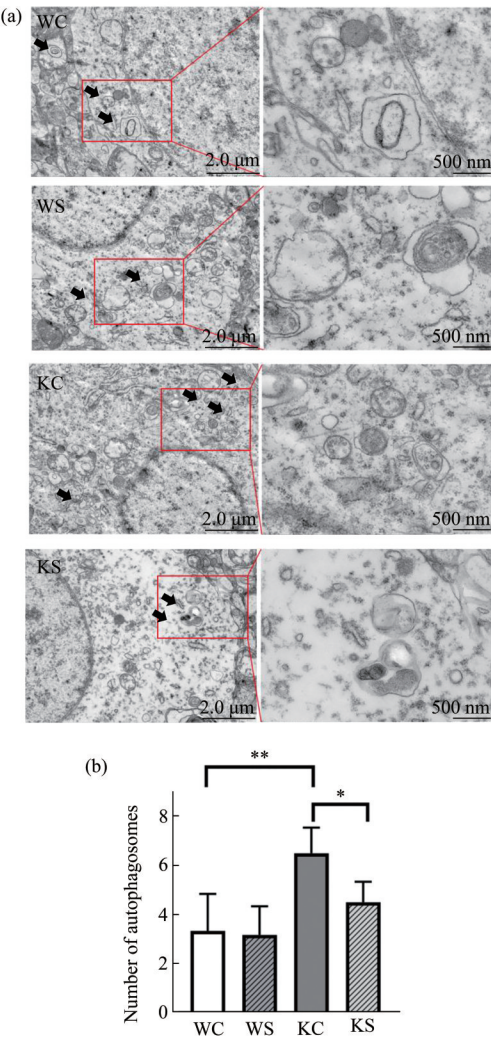


Fig. 4 Number of autophagosomes in each group of rats
(a) Ultrastructure of autophagosome in each group by TEM. (b) Statistical analysis of the number of autophagosomes in each group. The black arrow points to autophagosomes. $n=6$, $*P<0.05$, $**P<0.01$.

2.4 早期游泳改善 *Shank3*^{-/-} 大鼠自噬相关蛋白的异常表达

免疫荧光结果显示 (图 5, 6): KC 组大鼠纹状体区域的 LC3 ($P<0.01$)、p62 ($P<0.05$) 蛋白的

相对平均荧光强度显著高于 WC 组。KS 组大鼠纹状体区域的 LC3 ($P<0.01$)、p62 ($P<0.05$) 蛋白相对平均荧光强度显著低于 KC 组。

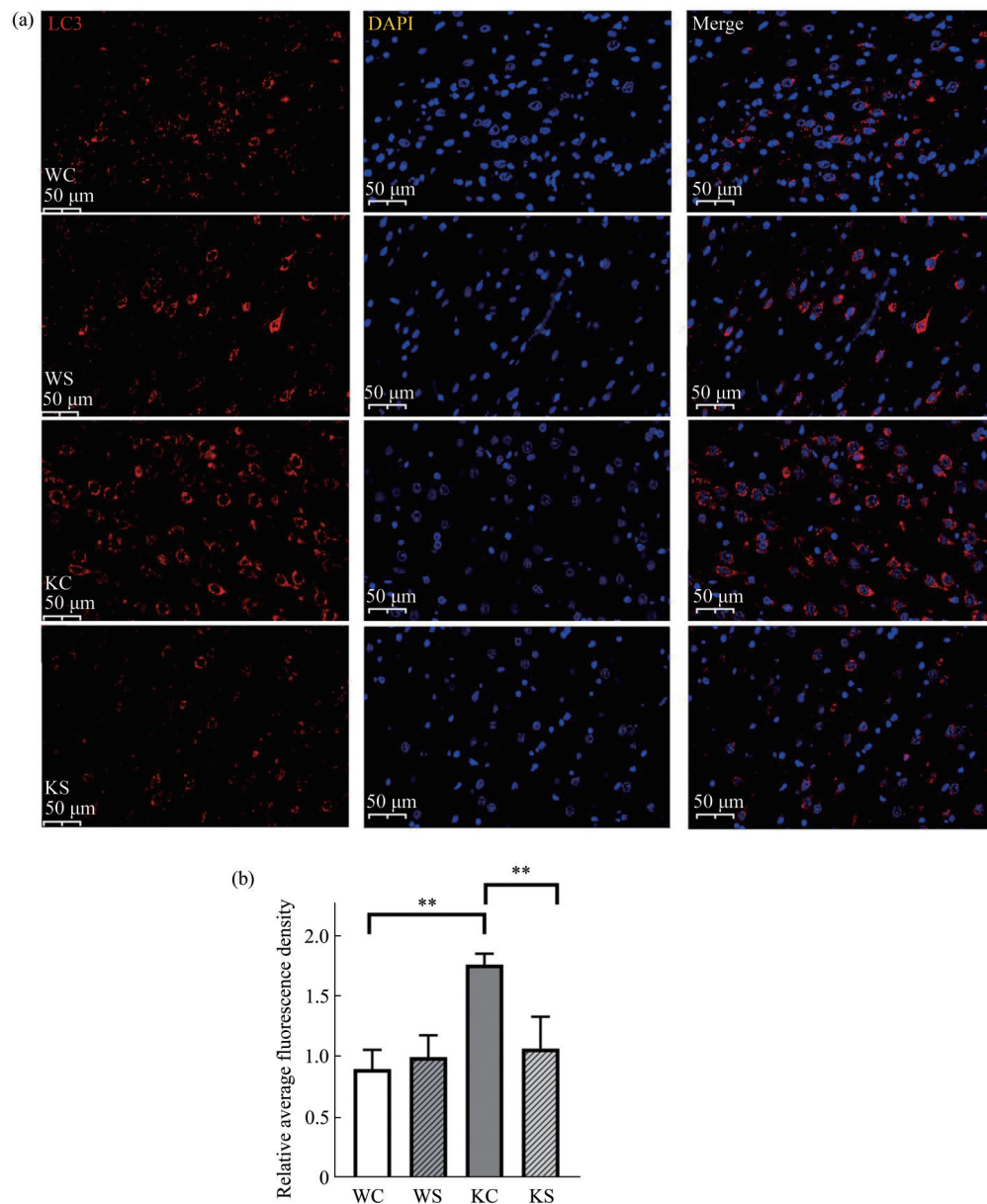


Fig. 5 Expression of LC3 protein in the striatal brain region of rats in each group detected by immunofluorescence

(a) Fluorescence display map; (b) relative average fluorescence density ($n=3$). ** $P<0.01$.

Western blot结果显示, 与 WC 组相比, KC 组大鼠纹状体的 Beclin1 ($P<0.01$)、Atg5 ($P<0.05$)、Atg16L ($P<0.01$)、p62 蛋白 ($P<0.01$) 表达显著增加 (图 7b, c, d, f), KS 组大鼠相比于 KC 组大鼠 Beclin1 ($P<0.01$)、Atg5 ($P<0.01$)、Atg16L

($P<0.01$)、p62 蛋白 ($P<0.01$) 表达显著下降 (图 7b, c, d, f), 且 WS 组大鼠相比于 WC 组大鼠 Beclin1 表达显著增加 ($P<0.01$, 图 7b)。相比于 WC 组大鼠, KC 组大鼠 LC3II/LC3I 比值表达显著提升 ($P<0.01$, 图 7e)。KS 组大鼠的 LC3II/LC3I 比

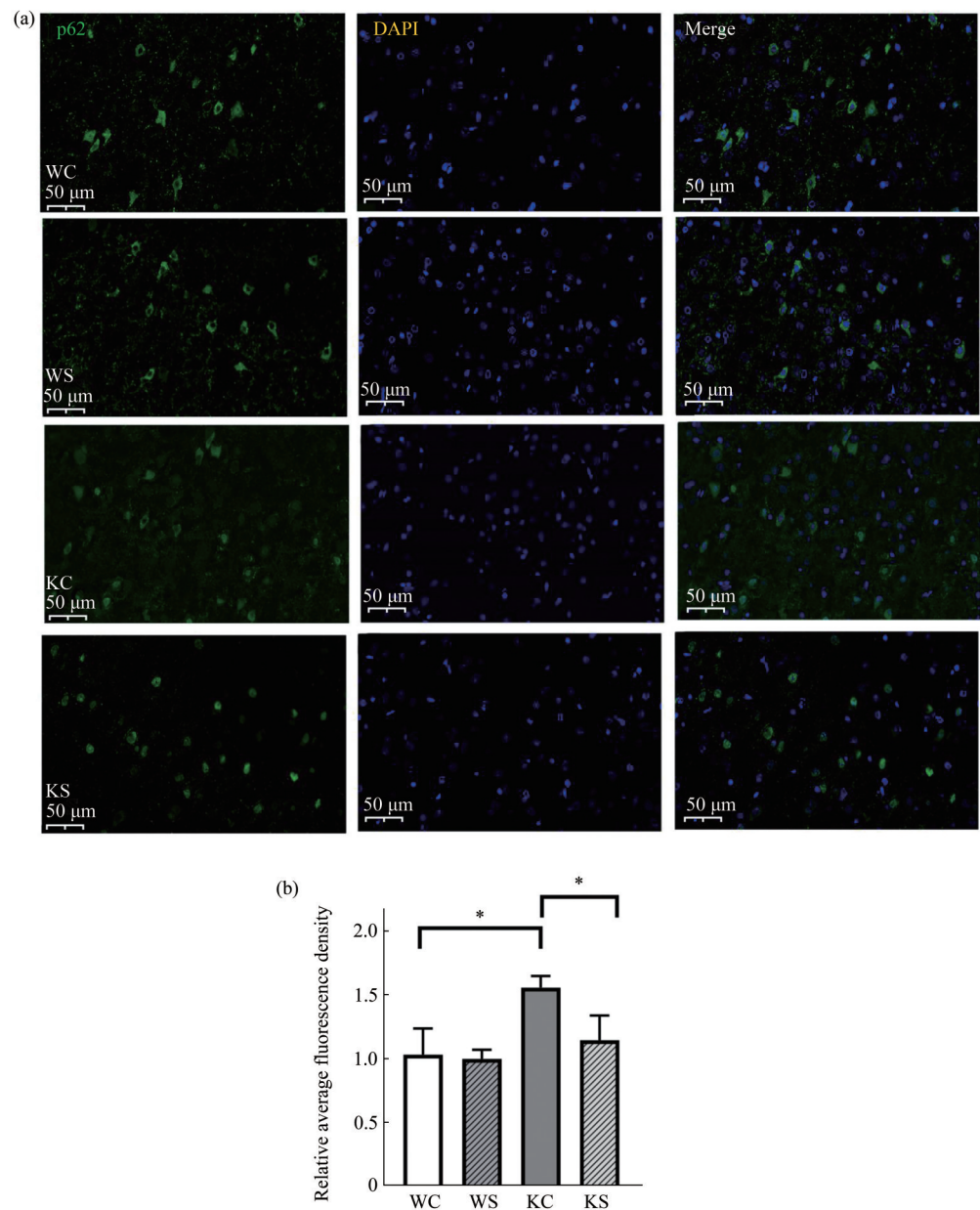


Fig. 6 Expression of p62 protein in the striatal brain region of rats in each group detected by immunofluorescence
(a) Fluorescence display map; (b) relative average fluorescence density ($n=3$). * $P<0.05$.

值相较于KC组表达显著降低 ($P<0.05$, 图 7e)。此外, WS组大鼠LC3II/LC3I比值 ($P<0.05$) 及p62蛋白 ($P<0.01$) 相较于WC组显著升高。KC组大鼠纹状体LAMP1蛋白表达显著低于WC组 ($P<0.01$, 图 7g)。与KC组大鼠相比, KS组大鼠LAMP1蛋白显著提升 ($P<0.05$)。

2.5 刻板行为与自噬相关蛋白变化之间关系密切

Person相关分析结果显示, 大鼠自梳理行为时长, 埋藏弹珠个数, 单一孔洞探索次数与纹状体脑区LC3II/LC3I和p62蛋白表达之间存在显著的正相

关关系 (图 8)。这表明大鼠的刻板行为改善与自噬相关蛋白变化之间存在密切联系。

2.6 早期游泳改善大鼠*Shank3*^{-/-}自噬相关mRNA的异常表达

qPCR结果显示, KC组*Beclin1*的mRNA低于WC组, 但各组大鼠*Beclin1*的mRNA水平之间无显著性差异 ($P>0.05$, 图 9a), KC组大鼠纹状体*Atg5*、*Atg16L*、*LC3B*及*p62*的mRNA水平显著高于WC组 ($P<0.01$, 图 9b, c, d, e)。KS组相比于KC组, *Atg5* ($P<0.01$)、*Atg16L* ($P<0.01$)、

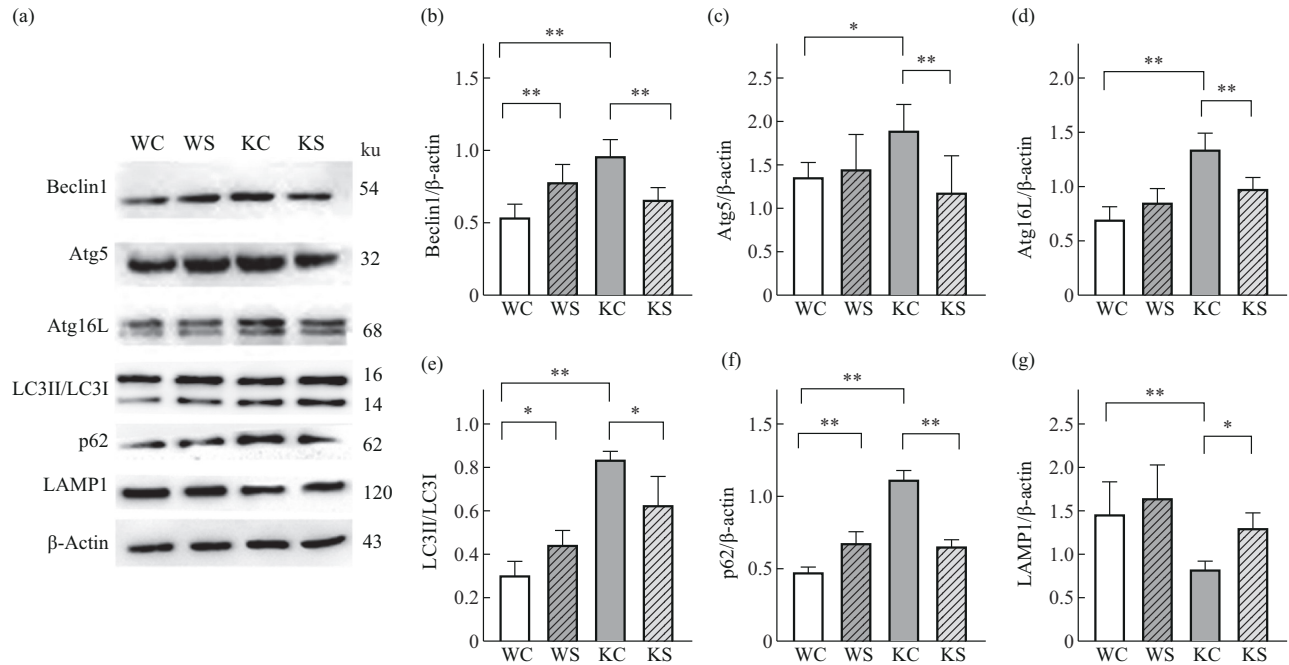


Fig. 7 Expression of autophagy-related proteins in rats of each group

(a) Western blot; (b) Beclin1; (c) Atg5; (d) Atg16L; (e) LC3II/LC3I; (f) p62; (g) LAMP1. $n=6$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

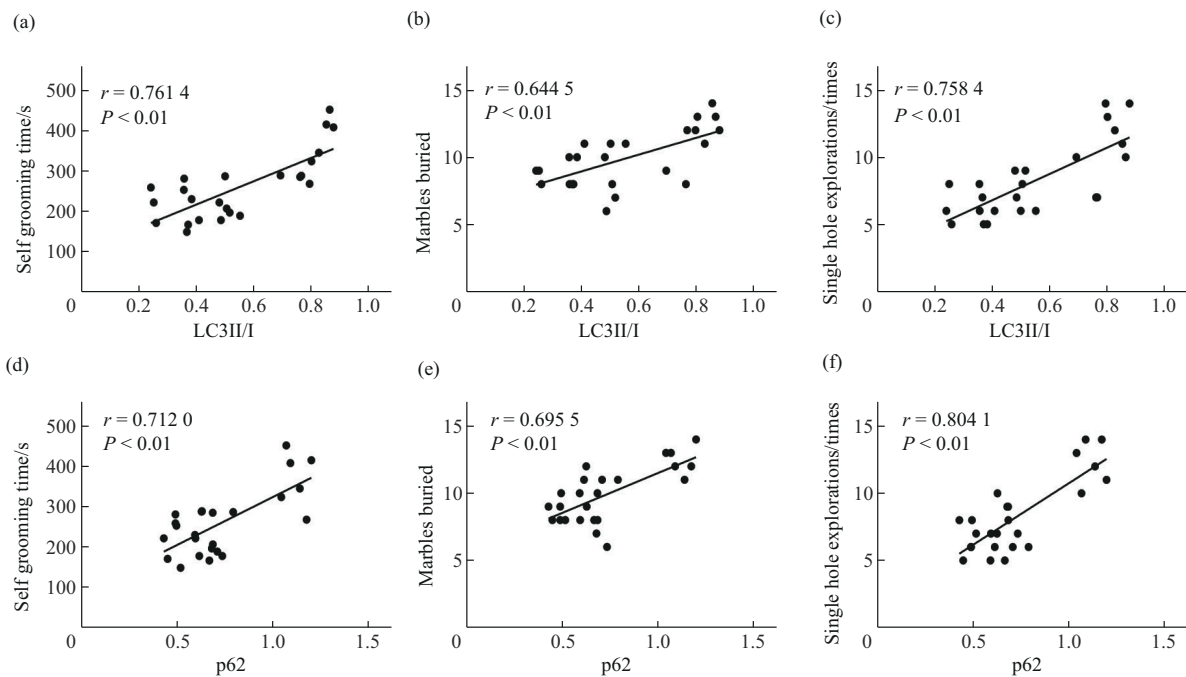


Fig. 8 The correlation analysis of stereotypic behavior with LC3II/LC3I and p62 protein

(a) LC3II/I and self-grooming time, (b) LC3II/I and marbles buried, (c) LC3II/I and single hole exploration, (d) p62 and self-grooming time, (e) p62 and marbles buried, (f) p62 and single hole exploration. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

LC3B ($P<0.05$)、*p62* ($P<0.05$) 的 mRNA 水平显著降低 (图 9b, c, d, e)。KC 组大鼠纹状体 *Lamp1* 的 mRNA 水平显著低于 WC 组 ($P<0.01$, 图

9f), 相比于 KC 组, KS 组 *Lamp1* 的 mRNA 水平显著提升 ($P<0.01$, 图 9f)。

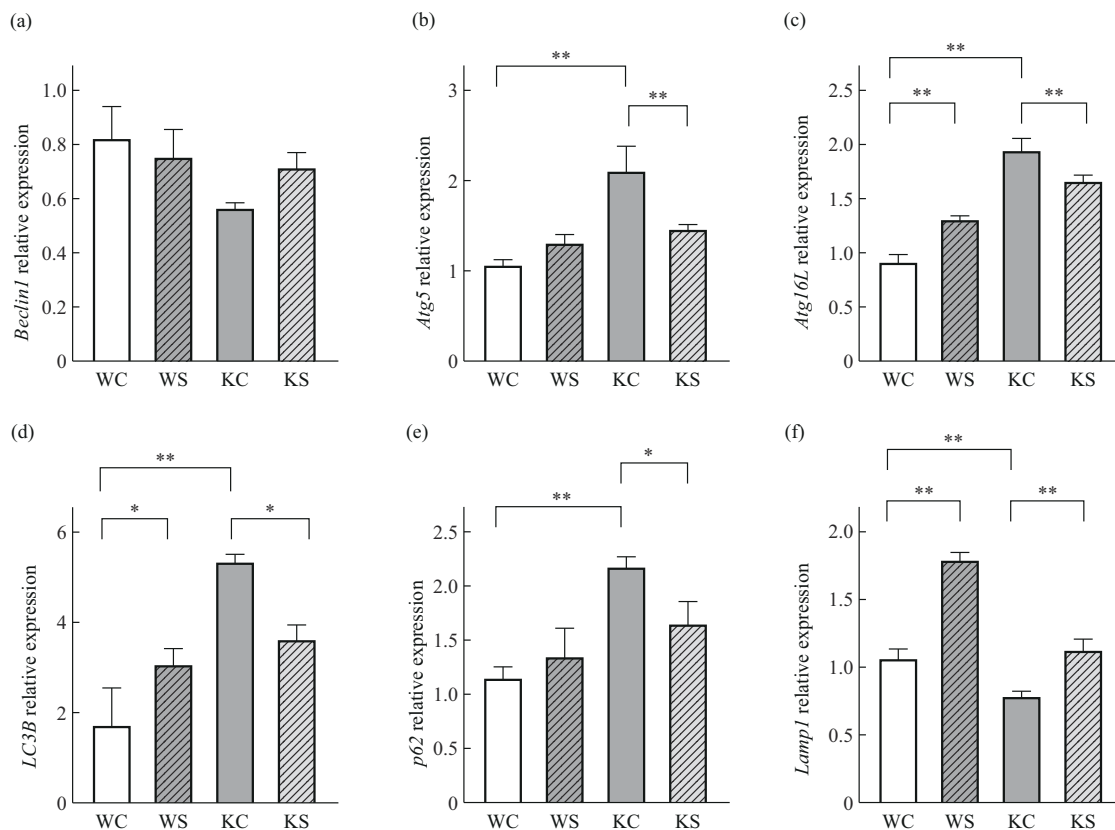


Fig. 9 Autophagy-related mRNA expression in rats of each group

(a) *Beclin1*; (b) *Atg5*; (c) *Atg16L*; (d) *Lc3B*; (e) *p62*; (f) *Lamp1*. $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$.

3 讨 论

刻板行为和狭隘的兴趣活动范围是ASD的典型核心症状之一。本研究通过3种行为学测试手段对Shank3^{-/-}大鼠所表现出的刻板行为进行检测。结果发现,Shank3^{-/-}大鼠展现出频繁重复梳理躯体毛发、对物体重复埋藏,以及在空间中对同一区域重复探索的行为,8周游泳运动干预改善了上述行为,以及对同区域的重复探索行为。刻板行为的主要表现包括:a.重复刻板的躯体运动;b.坚持相同性,缺乏弹性地坚持常规或仪式化地语言或非语言行为模式;c.固定兴趣;d.对感觉输入的过度反应及不足,在环境感受方面有不同寻常的兴趣^[22]。刻板重复的行为模式使得ASD患者的行为表现异于常人,加剧了患者的社会沟通方面的缺陷、焦虑情绪表现,限制了他们对新环境探索的欲望和能力^[23]。尽管刻板行为的发生发展机制以及其潜在脑功能神经环路问题尚未被完全阐明,但神经影像学研究发现,ASD患者的刻板行为严重程度与纹状体功能连接异常及体积容量增大呈正相关。

与正常发育儿童纹状体的尾状核体积慢慢减小不同,ASD儿童随生长发育纹状体的尾状核体积呈现相反趋势^[24-25]。在动作执行过程中,需要直接通路和间接通路激活协同配合进行运动控制,直接通路和间接通路激活的异常与刻板行为增加有密切关联^[4, 26]。这些发现证实了纹状体脑区与刻板行为之间的密切联系。

细胞自噬是细胞的一种自我保护机制。在自噬成膜期,Beclin1属于Atg6同系物,是一种公认的自噬调节因子,它与参与磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)复合物的形成,对自噬过程至关重要^[27]。Atg5及Atg16在自噬体形成的过程中也发挥重要作用,Atg5、Atg16及Atg12蛋白可以形成复合物。Atg12-Atg5-Atg16复合物和LC3(Atg8同源物)磷脂酰乙醇胺(PE)缀合物在隔离膜的延伸和闭合中起着重要作用^[28]。LC3是自噬研究过程中被使用最广泛的蛋白质标志物,参与了自噬体膜的形成,其包括两种可相互转化的形式即LC3I和LC3II^[28]。在Western blot实验中可以比较组间LC3II水平,或者计算LC3II/LC3I的比值来评价自

噬^[29]。p62蛋白也被称为SQSTM1, p62蛋白可连接LC3蛋白和泛素化的底物, 将要被降解的泛素化蛋白聚集物引导至自噬体中, 并在自噬溶酶体中降解。自噬过程的第三阶段, 自噬体与溶酶体融合降解, 溶酶体的检测十分重要。目前已识别的25个溶酶体膜蛋白都是高糖基化的, 含量最高的溶酶体膜蛋白就是LAMP1和LAMP2^[29-30]。本研究结果显示, *Shank3*^{-/-}大鼠纹状体区域自噬过程相关蛋白质表达异常自噬体堆积。在生命周期的神经发育过程中, 细胞自噬扮演着重要的角色。通过条件性敲除GABA能神经元前体中的mTOR会增加细胞自噬并抑制其增殖, 导致皮层中间神经元数量减少^[31]。发育期的神经元细胞自噬水平对健康脑发育有重要作用^[32]。而ASD患者神经发育异常或许与其发育周期中异常的自噬水平存在关联。大脑发育是一个复杂的过程, 出生后早期发育过程中发生的事件(学习和经验)可能会调节大脑的功能成熟并决定成年后大脑功能的完整性^[33]。发育期的适度运动会的大脑带来诸多正向影响^[34]。

运动作为一种密切影响细胞自噬的手段, 自噬活性的调节情况与运动强度、持续时间、周期性以及运动模式等因素密切相关^[35]。研究发现, 长期运动可以提升大鼠及人体肌肉自噬相关的蛋白质水平^[36]。在本研究中, WS组纹状体自噬相关蛋白质表达提升, 这是由于运动带来的生理现象, 因此WS组并未出现刻板行为。自噬与运动的关系可能主要与运动过程中伴随的能量代谢变化密切相关。在运动过程中当能量需求大于供给时, AMP/ATP的比例发生变化, 进而影响AMPK信号通路被激活, 使mTORC1的活性被抑制, 导致自噬增强, 同时也促进线粒体ATP合成^[37]。多种疾病的发病机制已经与其细胞内部的异常自噬水平联系起来^[38]。而运动干预可以有效缓解病理状态下机体内异常表达自噬水平, 并且改善多种疾病的病理表现状态。本研究结果显示, 8周游泳运动干预后*Shank3*^{-/-}大鼠纹状体区域高表达的自噬过程相关蛋白Beclin1、LC3、p62、Atg5、Atg16表达降低, 且低表达的LAMP1表达升高, ASD样行为得到改善。这些研究结果证实运动对ASD的改善效益与其异常自噬功能缓解有密切关联。

SHANK3是位于兴奋性突触后的支架蛋白, 对突触的结构和功能具有重要影响。*Shank3*基因的突变会导致突触功能紊乱, 影响神经系统的正常发育和功能, 从而表现出ASD的样行为^[39]。运动

作为一种积极的非药物干预手段, 得到了学界的广泛关注与认可^[40]。例如: 12周小篮球运动可以有效改善ASD儿童刻板行为及脑灰质^[41]。本研究证实了早期游泳可以改善*Shank3*^{-/-}大鼠的行为异常。而在众多运动干预项目中, 水中疗法具有其独特的价值和优势。首先, 游泳运动具有早期时效性, 可以在生命周期的早期实施干预, 其次, 水环境包含了丰富的视觉、听觉、触觉、平衡感和本体感觉等多种感官刺激^[42], 这些刺激有助于ASD患者整合这些不同的感觉输入。长期在这样的环境下活动有助于训练和提高他们对各种感官信息的整合和解读能力。早期运动干预与ASD患者“早发现, 早治疗”的理念相契合, 并且生命早期的规律性锻炼对机体炎症免疫产生长期有益影响, 凸显了早期有规律的身体活动的重要性^[43]。

4 结 论

8周早期游泳可以通过调节纹状体细胞自噬缓解*Shank3*^{-/-}大鼠刻板行为。

参 考 文 献

- [1] Levy S E, Mandell D S, Schultz R T. Autism. Lancet, 2009, **374**(9701): 1627-1638
- [2] Leblond C S, Nava C, Polge A, et al. Meta-analysis of SHANK mutations in autism spectrum disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. PLoS Genet, 2014, **10**(9): e1004580
- [3] Tian R, Li Y, Zhao H, et al. Modeling SHANK3-associated autism spectrum disorder in Beagle dogs via CRISPR/Cas9 gene editing. Mol Psychiatry, 2023, **28**(9): 3739-3750
- [4] Tanimura Y, King M A, Williams D K, et al. Development of repetitive behavior in a mouse model: roles of indirect and striosomal basal Ganglia pathways. Intl J Devlp Neuroscience, 2011, **29**(4): 461-467
- [5] Ban B K, Jun M H, Ryu H H, et al. Autophagy negatively regulates early axon growth in cortical neurons. Mol Cell Biol, 2013, **33**(19): 3907-3919
- [6] Lv M, Ma Q. Autophagy in neurodevelopmental disorders. Adv Exp Med Biol, 2020, **1207**: 171-182
- [7] Hui K K, Takashima N, Watanabe A, et al. GABARAPs dysfunction by autophagy deficiency in adolescent brain impairs GABA_A receptor trafficking and social behavior. Sci Adv, 2019, **5**(4): eaau8237
- [8] Tang G, Gudsnek K, Kuo S H, et al. Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. Neuron, 2014, **83**(5): 1131-1143
- [9] Yan J, Porch M W, Court-Vazquez B, et al. Activation of autophagy rescues synaptic and cognitive deficits in fragile X mice. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, **115**(41): E9707-E9716
- [10] Zhang J, Zhang J X, Zhang Q L. PI3K/AKT/mTOR-mediated

- autophagy in the development of autism spectrum disorder. *Brain Res Bull*, 2016, **125**: 152-158
- [11] 张思铭, 陈雨珊. 自噬在孤独症谱系障碍中的研究进展. *生命科学*, 2020, **32**(8): 798-806
Zhang S M, Chen Y S. *Chin Bull Life Sci*, 2020, **32**(8): 798-806
- [12] Wu Y, Ding L, Zhang Q, *et al*. The effect of physical exercise therapy on autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res*, 2024, **339**: 116074
- [13] Byrne G, Ghráda Á N, O'Mahony T. Parent-led cognitive behavioural therapy for children with autism spectrum conditions. A pilot study. *J Autism Dev Disord*, 2023, **53**(1): 263-274
- [14] 甄志平, 薛亚奇, 刘纽. 运动: 一种双向调控疾病中自噬异常的手段. *中国生物化学与分子生物学报*, 2024, **40**(3): 333-340
Zhen Z P, Xue Y Q, Liu N. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2024, **40**(3): 333-340
- [15] Xu D, Meng Y, An S, *et al*. Swimming exercise is a promising early intervention for autism-like behavior in Shank3 deletion rats. *CNS Neurosci Ther*, 2023, **29**(1): 78-90
- [16] 王剑飞, 韩俊海, 张子超. 孤独症谱系障碍小鼠模型行为学检测方法. *遗传*, 2021, **43**(5): 501-519
Wang J F, Han J H, Zhang Z C. *Hereditas: Beijing*, 2021, **43**(5): 501-519
- [17] Thomas A, Burant A, Bui N, *et al*. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology*, 2009, **204**(2): 361-373
- [18] File S E, Wardill A G. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia*, 1975, **44**(1): 53-59
- [19] Song T J, Lan X Y, Wei M P, *et al*. Altered behaviors and impaired synaptic function in a novel rat model with a complete *Shank3* deletion. *Front Cell Neurosci*, 2019, **13**: 111
- [20] Bursten S N, Berridge K C, Owings D H. Do California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*) use ritualized syntactic cephalocaudal grooming as an agonistic signal?. *J Comp Psychol*, 2000, **114**(3): 281-290
- [21] Ellegood J, Crawley J N. Behavioral and neuroanatomical phenotypes in mouse models of autism. *Neurotherapeutics*, 2015, **12**(3): 521-533
- [22] American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013
- [23] Nadig A, Lee I, Singh L, *et al*. How does the topic of conversation affect verbal exchange and eye gaze? A comparison between typical development and high-functioning autism. *Neuropsychologia*, 2010, **48**(9): 2730-2739
- [24] Langen M, Bos D, Noordermeer S D S, *et al*. Changes in the development of striatum are involved in repetitive behavior in autism. *Biol Psychiatry*, 2014, **76**(5): 405-411
- [25] Sato W, Kubota Y, Kochiyama T, *et al*. Increased putamen volume in adults with autism spectrum disorder. *Front Hum Neurosci*, 2014, **8**: 957
- [26] Boučekioua Y, Tsutsui-Kimura I, Sano H, *et al*. Striatonigral direct pathway activation is sufficient to induce repetitive behaviors. *Neurosci Res*, 2018, **132**: 53-57
- [27] Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, *et al*. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep*, 2001, **2**(4): 330-335
- [28] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 2011, **147**(4): 728-741
- [29] 朱琪, 林芳. 自噬的分子标志物. *药学报*, 2016, **51**(1): 33-38
Zhu Q, Lin F. *Acta Pharm Sin*, 2016, **51**(1): 33-38
- [30] Callahan J W, Bagshaw R D, Mahuran D J. The integral membrane of lysosomes: its proteins and their roles in disease. *J Proteomics*, 2009, **72**(1): 23-33
- [31] Ka M, Smith A L, Kim W Y. MTOR controls genesis and autophagy of GABAergic interneurons during brain development. *Autophagy*, 2017, **13**(8): 1348-1363
- [32] Stavoe A K H, Holzbaur E L F. Autophagy in neurons. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2019, **35**: 477-500
- [33] Linkenhoker B A, von der Ohe C G, Knudsen E I. Anatomical traces of juvenile learning in the auditory system of adult barn owls. *Nat Neurosci*, 2005, **8**: 93-98
- [34] Gomes da Silva S, Unsain N, Mascó D H, *et al*. Early exercise promotes positive hippocampal plasticity and improves spatial memory in the adult life of rats. *Hippocampus*, 2012, **22**(2): 347-358
- [35] Schwalm C, Jamart C, Benoit N, *et al*. Activation of autophagy in human skeletal muscle is dependent on exercise intensity and AMPK activation. *FASEB J*, 2015, **29**(8): 3515-3526
- [36] Brandt N, Gunnarsson T P, Bangsbo J, *et al*. Exercise and exercise training-induced increase in autophagy markers in human skeletal muscle. *Physiol Rep*, 2018, **6**(7): e13651
- [37] Costa R, Morrison A, Wang J, *et al*. Activated protein C modulates cardiac metabolism and augments autophagy in the ischemic heart. *J Thromb Haemost*, 2012, **10**(9): 1736-1744
- [38] Zhang Z, Yang X, Song Y Q, *et al*. Autophagy in Alzheimer's disease pathogenesis: therapeutic potential and future perspectives. *Ageing Res Rev*, 2021, **72**: 101464
- [39] Peça J, Feliciano C, Ting J T, *et al*. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, 2011, **472**(7344): 437-442
- [40] Arnell S, Jerlinder K, Lundqvist L O. Parents' perceptions and concerns about physical activity participation among adolescents with autism spectrum disorder. *Autism*, 2020, **24**(8): 2243-2255
- [41] 董晓晓, 陈爱国, 刘智妹, 等. 小篮球运动对学龄前孤独症儿童重复刻板行为及脑灰质体积的影响. *中国体育科技*, 2020, **56**(11): 25-31
Dong X X, Chen A G, Liu Z M, *et al*. *China Sport Sci Technol*, 2020, **56**(11): 25-31
- [42] 黄晨, 孔勉, 张月华, 等. 儿童感觉统合及感觉统合失调. *现代临床医学*, 2019, **45**(2): 145-148
Huang C, Kong M, Zhang Y H, *et al*. *J Mod Clin Med*, 2019, **45**(2): 145-148
- [43] Zhang N, Wang X, Feng M, *et al*. Early-life exercise induces immunometabolic epigenetic modification enhancing anti-inflammatory immunity in middle-aged male mice. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 3103

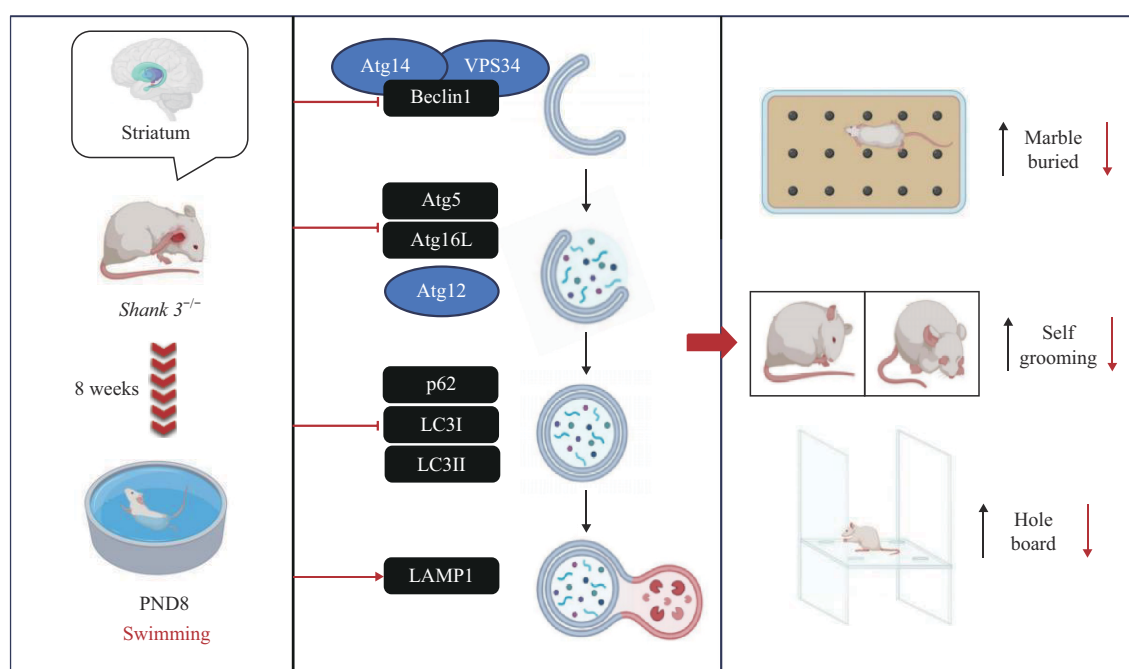
Early Swimming Alleviates Stereotypic Behavior in *Shank3* Knockout Rats by Regulating Striatal Cell Autophagy*

XUE Ya-Qi¹⁾, LIU Niu^{1,2)}, WANG Shi-Jiao¹⁾, BA Yi¹⁾, ZHEN Zhi-Ping^{1)**}

¹⁾College of P.E and Sports, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

²⁾College of P.E, Weinan Normal University, Weinan 714099, China)

Graphical abstract



Abstract Objective To explore the mechanism of exercise intervention in improving autism-like behaviors in *Shank3* gene knockout (*Shank3*^{-/-}) induced autism spectrum disorder (ASD) rat models from an autophagy perspective through 8-week swimming intervention. **Methods** Based on genotype identification and exercise intervention, rats were divided into four groups ($n=15$): wild-type control group (WC), *Shank3*^{-/-} control group (KC), wild-type swimming group (WS), and *Shank3*^{-/-} swimming group (KS). KS and WS groups underwent 8 weeks of swimming exercise, 5 d/week, gradually increasing to and maintaining 40 min/session. Behavioral experiments, including self-grooming test, marble burying test, and hole-board test, were conducted 24 h after the final swimming intervention. Tissue sampling was performed 12 h after behavioral testing. Transmission electron microscopy was used to observe autophagosome numbers in the striatum region. Immunofluorescence staining was employed to observe the expression levels of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and selective autophagy adaptor protein (p62). Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and Western blot were used to detect protein and mRNA expression of Beclin1, LC3, p62,

* This work was supported by a grant from Beijing Natural Science Foundation (7232239).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-58807842, E-mail: zzpxt@bnu.edu.cn

Received: July 13, 2024 Accepted: September 30, 2024

autophagy-related protein 5 (Atg5), autophagy-related 16-like protein 1 (Atg16L), and lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP1) in striatal. **Results** Compared with the WC group, rats in the KC group exhibited significantly higher self-grooming frequency and duration ($P<0.05$), increased marble burying behavior ($P<0.01$), and elevated frequencies in both hole-board exploration and single-hole exploration ($P<0.05$). Following 8 weeks of swimming intervention, the KS group demonstrated significantly reduced self-grooming duration, marble burying behavior, and single-hole exploration frequency compared to the KC group. Furthermore, compared to the WC group, the KC group displayed abundant autophagosomes in the striatum region, along with significantly elevated protein and mRNA expression levels of Atg5, Atg16L, p62, and LC3II/LC3I ratio ($P<0.05$), increased Beclin1 protein levels ($P<0.05$), and markedly decreased LAMP1 protein and mRNA expression levels ($P<0.05$). Following the 8-week swimming intervention, the KS group exhibited significantly reduced protein and mRNA expression levels of Atg5, Atg16L, p62, and LC3II/LC3I ratio ($P<0.05$), decreased Beclin1 protein levels ($P<0.05$), and significantly elevated LAMP1 protein and mRNA expression levels ($P<0.05$) compared to the KC group. **Conclusion** Early 8-week swimming can alleviate stereotyped behaviors in *Shank3*^{-/-} rats by regulating striatal cell autophagy.

Key words early swimming, autism spectrum disorder, rat, cellular autophagy, striatum

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0319

CSTR: 32369.14.pibb.20240319