

# 六味地黄丸促进线粒体自噬调控孤独症大鼠神经炎症及行为障碍的机制

黄鹏珏<sup>1</sup>, 蒋明玥<sup>1</sup>, 吴吉<sup>1</sup>, 印泥娅<sup>1</sup>, 欧阳磊<sup>1</sup>, 朱沁泉<sup>2</sup>, 张涤<sup>2\*</sup>

(1. 湖南中医药大学第一中医临床学院, 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

**[摘要]** 目的:观察六味地黄丸对孤独症大鼠的行为障碍影响,并探究其作用机制。方法:通过对12只SD孕鼠进行丙戊酸钠(VPA)(10只)或生理盐水(2只)腹腔注射的方法选取雄性子代构建孤独症谱系障碍(ASD)模型大鼠和空白组大鼠,随机分为模型组,六味地黄丸低、高剂量组(0.75、1.5 g·kg<sup>-1</sup>),维生素D组(3.7·10<sup>-5</sup> g·kg<sup>-1</sup>)和空白组。各组予以对应浓度药物及等体积生理盐水灌胃2周。干预结束后,三箱社交实验评估社交交互与社交偏好能力;旷场实验观察自发行为和焦虑状态;苏木素-伊红(HE)染色法观察前额组织病理变化;透射电镜观察前额神经元线粒体超微结构;免疫荧光检测前额组织中离子钙结合适配器分子-1(Iba-1)表达;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMPK)、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、磷酸化Unc-51样自噬激活激酶1(p-ULK1)、Unc-51样自噬激活激酶1(ULK1)、FUN14结构域包含蛋白1(FUNDC1)表达差异。结果:与空白组比较,模型组大鼠在三箱社交实验中嗅探陌生鼠1、陌生鼠2的时间显著减少( $P<0.01$ );旷场实验中运动总路程、平均运动速度、中央区域运动路程、中央区域停留时间显著降低( $P<0.01$ );大鼠前额组织显示出神经元细胞大量凋亡,细胞核固缩胞浆红染,神经元细胞成片坏死;神经元内可见线粒体肿胀,基质密度降低,嵴断裂紊乱,自噬溶酶体存在;前额Iba-1阳性细胞率显著增加( $P<0.01$ ),TNF-α、IL-6水平显著升高( $P<0.01$ ),p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1、FUNDC1蛋白表达显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,六味地黄丸各剂量组和维生素D组ASD大鼠在三箱社交实验中嗅探陌生鼠1、陌生鼠2的时间明显增多( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );在旷场实验中运动总路程、平均运动速度、中央区域运动路程、中央区域停留时间明显增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );大鼠前额组织神经元细胞形态恢复,凋亡细胞逐渐减少;神经元内线粒体肿胀减轻,基质密度增加,嵴断裂、紊乱改善,自噬小体增多;前额Iba-1阳性细胞率显著降低( $P<0.01$ ),TNF-α、IL-6含量显著减少( $P<0.01$ ),p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1、FUNDC1蛋白表达显著增加( $P<0.01$ )。结论:六味地黄丸改善ASD大鼠孤独症样行为,减少神经细胞凋亡和神经炎症损伤,其机制可能与促进AMPK/ULK1/FUNDC1通路介导的线粒体自噬有关。

**[关键词]** 六味地黄丸;孤独症;线粒体自噬;神经炎症;腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/Unc-51样自噬激活激酶1(ULK1)/FUN14结构域包含蛋白1(FUNDC1)

[中图分类号] R289;R259;R285 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)02-0052-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251202

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250710.0942.001>

[网络出版日期] 2025-07-10 13:04:40

[增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



## Liuwei Dihuangwan Promote Mitophagy to Modulate Neuroinflammation and Behavioral Impairments in Rat Model of Autism Spectrum Disorder (ASD)

HUANG Pengjue<sup>1</sup>, JIANG Mingyue<sup>1</sup>, WU Ji<sup>1</sup>, YIN Niya<sup>1</sup>, OUYANG Lei<sup>1</sup>, ZHU Qinquan<sup>2</sup>, ZHANG Di<sup>2\*</sup>

(1. The First School of Clinical Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208,

China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

[收稿日期] 2025-04-22

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2024JJ8233);湖南省卫生健康委员会科研课题(202206010043);湖南省中医药科研计划项目(A2023036);湖南省大学生创新创业训练计划项目(S202410541157);湖南省卫生健康高层次人才项目(20230448)

[第一作者] 黄鹏珏, 硕士, 医师, 从事中医药防治儿科疾病研究, E-mail: 2426209962@qq.com

[通信作者] \* 张涤, 主任医师, 从事中医药防治儿科疾病研究, E-mail: 2655357548@qq.com

**[Abstract] Objective:** To observe the effect of Liuwei Dihuangwan on behavioral impairments in the rat model of autism spectrum disorder (ASD) and explore the mechanism of action. **Methods:** Twelve SD pregnant rats were intraperitoneally injected with valproic acid (VPA) (10 rats) or normal saline (2 rats), and male offspring were selected to establish the model of ASD and the control rats. Rats were randomly assigned into model, low-dose ( $0.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and high-dose ( $1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Liuwei Dihuangwan, vitamin D (positive drug,  $3.7\times 10^{-5} \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and blank groups. Each group was administrated with the corresponding concentration of drugs or the same volume of normal saline by gavage for 2 weeks. After the intervention, the three-chamber social test was conducted to evaluate social interaction and social preference. The open field test was carried out to observe spontaneous behavior and anxiety state. Hematoxylin-eosin staining (HE) was used to observe the pathological changes of the prefrontal tissue. Transmission electron microscopy was employed to observe the ultrastructure of mitochondria in prefrontal neurons. Immunofluorescence was used to detect the expression of ionized calcium-binding adapter molecule-1 (Iba-1) in the prefrontal tissue. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was adopted to measure the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6). Western blot was employed to assess the expression differences of phosphorylated adenosine monophosphate-activated protein kinase (p-AMPK), adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), phosphorylated Unc-51-like autophagy-activating kinase 1 (p-ULK1), Unc-51-like autophagy-activating kinase 1 (ULK1), and FUN14 domain-containing protein 1 (FUNDC1). **Results:** Compared with the blank group, the model group spent less time sniffing stranger 1 and stranger 2 in the three-chamber social test ( $P<0.01$ ) and showed reductions in the total distance traveled, average speed, distance traveled in the central area, and time spent in the central area in the open field test ( $P<0.01$ ). In addition, the model group showed extensive apoptosis of neurons, with shrunken nuclei and red-stained cytoplasm, and extensive necrosis of neurons in the prefrontal tissue, mitochondrial swelling, decreased matrix density, disrupted cristae, and autophagic lysosomes in neurons, increases in the rate of Iba-1 positive cells in the prefrontal area ( $P<0.01$ ) and the levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 ( $P<0.01$ ), and down-regulation in the expression of p-AMPK/AMPK, p-ULK1/ULK1, and FUNDC1 ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, low-dose and high-dose Liuwei Dihuangwan and the vitamin D prolonged the time spent sniffing stranger 1 and stranger 2 in the three-chamber social test ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), increased the total distance traveled, average speed, distance traveled in the central area, and time spent in the central area in the open field test ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), restored the morphology of neurons in the prefrontal tissue, decreased the number of apoptotic cells, alleviated the swelling of mitochondria in neurons, increased the matrix density, mitigated the fragmentation and disorder of cristae, and increased the number of autophagosomes. Moreover, the drugs decreased the rate of Iba-1 positive cells in the prefrontal area ( $P<0.01$ ), lowered the levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 ( $P<0.01$ ), and up-regulated the expression of p-AMPK/AMPK, p-ULK1/ULK1, and FUNDC1 ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Liuwei Dihuangwan ameliorate autism-like behaviors and reduce neuronal apoptosis and neuroinflammatory damage in the rat model of ASD by promoting mitophagy mediated by the AMPK/ULK1/FUNDC1 pathway.

**[Keywords]** Liuwei Dihuangwan; autism; autophagy; neuroinflammation; AMP-activated protein kinase/UNC-51-like kinase 1/FUN14 domain-containing protein 1

孤独症谱系障碍(ASD)是一种以社交沟通障碍、重复刻板行为及兴趣狭窄为主要特征的广泛性神经发育障碍性疾病,儿童时期确诊可伴随终生<sup>[1]</sup>。我国ASD发病率逐渐上升趋近1%<sup>[2]</sup>。尽管目前康复行为<sup>[3]</sup>、心理<sup>[4]</sup>、运动<sup>[5]</sup>及维生素D<sup>[6]</sup>等干预可以改善ASD症状<sup>[7]</sup>,但尚未有可行的治疗方法阻止ASD的发展。ASD的发病机制复杂,近年来认为线粒体功能障碍<sup>[8]</sup>、神经炎症损伤<sup>[9]</sup>是ASD发展的核心因素。线粒体自噬是细胞通过自噬机制选择性地包裹和降解受损的线粒体,从而维持线粒体和细胞内稳态的过程<sup>[10]</sup>。在神经元中,有缺陷的线粒体会加剧功能失调线粒体的积聚、活性氧产生过度、三磷酸腺苷(ATP)合成受损,导致神经元分裂再生障碍,最终可能造成神经细胞的凋亡<sup>[11]</sup>。受损的神经元可通过分子连接诱导小胶质细胞激活,触发神经炎症,并在炎症因子的作用下进一步加重神经元损伤和功能障碍<sup>[12]</sup>。因此,调节线粒体自噬、抑制

炎症损伤是控制ASD进展的关键机制。中医药在治疗ASD时显示出独特优势,不仅能改善社交行为障碍,减轻胃肠道症状、提高睡眠质量<sup>[13]</sup>。六味地黄丸出自宋代的《小儿药证直诀》,具有滋补肝肾、填精益髓的功效,在神经系统疾病中具有调节神经炎症、促进自噬的作用<sup>[14]</sup>。前期研究已证实该药具有增强神经元再生修复的能力<sup>[15]</sup>,但其作用机制尚不明确。本研究基于线粒体自噬在ASD病理进程中的作用,以及六味地黄丸多靶点调节神经保护的 特性,探讨六味地黄丸对ASD的作用机制,以期为中医药防治ASD提供新的治疗靶点和实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级SD孕鼠12只,体质量(330~400)g,购于湖南斯莱克景达动物实验有限公司,动物生产合格证号SCXK(湘)-2019-0004。饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心,室温22~26℃,湿度50%~60%,12h循环光照,空气流

通,自由饮食饮水。

**1.2 伦理** 本实验方案经湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会审查批准,审批号ZYFY202409050。

**1.3 药物与试剂** 六味地黄丸(九芝堂股份有限公司,批号国药准字Z43020145,规格200丸/瓶);维生素D滴剂[国药控股星鲨制药(厦门)有限公司,批号国药准字H35021450];丙戊酸钠(VPA)粉剂(美国Sigma公司,批号P4543);苏木素染液(北京索莱宝科技有限公司,批号34240428002);伊红Y染液[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号F827BA0026];肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)试剂盒(杭州万类生物科技有限公司,批号均为17C025);聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、离子钙结合适配器分子-1(Iba-1)抗体、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMPK)抗体、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)抗体、Unc-51样自噬激活激酶1(ULK1)抗体、内参抗体 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G-辣根过氧化物酶(HRP)抗体(杭州万类生物科技有限公司,批号分别为03A094、T07172406、T05215103、T05142254、T04023067、T01301372、29A044);磷酸化Unc-51样自噬激活激酶1(p-ULK1)抗体、FUN14结构域包含蛋白1(FUNDC1)抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号分别为73o25877、24h8146)。

**1.4 仪器** ZS-SXJ-II型三箱社交实验箱(北京众实迪科技发展有限公司);ZS-KC型旷场实验箱(北京众实迪科技发展有限公司);BX53型荧光显微镜、DP73病理图文拍照系统/成像系统(日本奥林巴斯公司);HITACHI HT7800型透射电子显微镜(日本日立公司);H-2050R型超速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);DYY-7C型电泳仪、DYCZ-24DN型双垂直蛋白电泳仪、DYCZ-40D型转移槽(北京六一生物科技有限公司);ELX-800型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 造模** 将12只12.5 d孕鼠随机分为VPA组(10只)及对照组(2只),VPA组孕鼠腹腔注射 $600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , $250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  VPA<sup>[16]</sup>,对照组孕鼠腹腔注射等剂量生理盐水。实验期间,2只孕鼠(均为VPA组)于注射后48 h内出现流产。VPA组共产下86只仔鼠,将其中40只雄性仔鼠记为模型组;对照组共产下22只仔鼠,将其中10只雄性仔鼠记为空白组。雄性仔鼠7 d体质量为8.05~19.19 g。

**2.2 分组及给药** 对雄性仔鼠21 d时进行模型评价,以仔鼠表现出社交障碍或社交新颖性障碍为造模成功标准<sup>[17]</sup>,造模成功率为60%。随机数字表法将符合ASD模型组的仔鼠分为4组,分别为模型组、维生素D组、六味地黄丸低、高剂量组,每组6只。筛选对照组仔鼠作为空白组,每组6只。将六味地黄丸研磨成微细粉末状,溶于蒸馏水,混匀,配制成 $1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混悬液,现用现配,使用前充分摇匀。给药剂量参考《药理实验方法学》人和动物体表面积等效剂量算法,六味地黄丸低、高剂量组分别给予六味地黄丸混悬液 $0.75$ 、 $1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ;维生素D组给予维生素D $3.7\times 10^{-5} \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ;模型组和空白组给予同等体积的蒸馏水,每天1次。各组连续灌胃14 d。给药结束后再次开展行为学评价。

**2.3 三箱社交实验检测大鼠社交行为和社交新颖性** 末次给药后进行检测,实验箱内有3个开口挡板将箱子分为左、中、右3个箱体,左右箱体分别放置1个能容纳大鼠的镂空金属笼子。实验前将受试大鼠放入箱内自由探索10 min。第1阶段社交能力测试:将同龄陌生鼠1放入左箱笼子,观察受试大鼠10 min,记录大鼠在各箱体活动时间及与陌生鼠1、空笼接触嗅探时间。第2阶段社交新颖性测试:将1阶段同龄陌生鼠1放入左箱笼子,同龄陌生鼠2放入右箱笼子,记录大鼠在各箱体活动时间及与陌生鼠1、陌生鼠2接触嗅探时间。陌生鼠1、2均来源于模型鼠,且第1阶段受试大鼠与陌生鼠1、第2阶段受试大鼠与陌生鼠2均为首次接触。

**2.4 旷场实验评估大鼠自发行为和焦虑状态** 旷场箱为顶部开口的正方形不透明箱子,大小为 $100 \text{ cm}\times 100 \text{ cm}$ ,将底部区域等分为16个小正方形,正中间的4个小正方形为中央区域。实验前将大鼠置于箱内自由探索5 min,开始实验后记录大鼠自由活动及运动轨迹的相关数据,观察时间为5 min。每只大鼠测试完毕后,清理箱内分泌物,喷洒75%乙醇消除气味。分析大鼠5 min内运动总路程、平均速度、中央区域运动路程、中央区域运动时间。

**2.5 样本采集与处理** 行为学测试结束后,将全部大鼠禁食不禁水12 h,其中每组3只冰上取同侧前额组织切割为 $1 \text{ mm}^3$ 大小快速置于电镜固定液内,用于透射电镜实验。剩余脑组织固定于4%多聚甲醛中,用于后续实验。余下大鼠前额组织液氮冻存后置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱内保存,用于后续实验。

**2.6 苏木素-伊红(HE)染色检测前额组织病理变化** 取大鼠前额组织,放入4%多聚甲醛中固定

24 h,脱水后包埋切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,放入苏木素-伊红染液中染色,浸入无水乙醇 I、无水乙醇 II、二甲苯 I、二甲苯 II 至透明,封片后镜下观察前额组织形态变化。

**2.7 透射电镜观察大鼠前额线粒体超微结构变化** 将 1 mm<sup>3</sup>的前额组织块浸入电镜固定液 24 h, PBS 缓冲液彻底清洗后使用 1% 饿酸固定,梯度乙醇脱水,环氧树脂渗透包埋,超薄切片后轴染、铅染,透射电镜下对前额神经元线粒体超微结构进行拍照观察。

**2.8 免疫荧光检测前额组织中 Iba-1 的表达** 将前额组织在 4% 多聚甲醛内固定后切片烘干,二甲苯及梯度乙醇脱蜡水化,抗原修复液修复。滴加一抗 Iba1 (1: 500), 4 °C 孵育, PBS 冲洗后滴加二抗 (1: 200), 孵育 60 min。室温滴加 DAPI 复染,盖玻片封片。在荧光显微镜下观察染色效果, Image J 软件分析荧光强度。

**2.9 大鼠前额炎症因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-6) 水平检测** 收集各组前额组织细胞上清液样本,严格按照试剂盒说明书进行操作,全过程设置标准品对照。

**2.10 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测前额组织中相关蛋白表达** 取前额组织,加入制备好的裂解液,在 4 °C 下 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,按试剂盒说明提取蛋白组织。以标准蛋白浓度及对应吸光度

值绘制标准曲线制定蛋白浓度,制备凝胶,分离蛋白转移至 PVDF 膜上,封闭液洗涤,封闭后加入一抗, p-AMPK、AMPK、p-ULK1、ULK1、FUNDC1 (1: 500), 4 °C 进行抗体孵育。清洗 PVDF 膜,加入二抗工作液 (1: 5 000), 再次洗膜,加入 ECL 发光液进行显色, Gel-Pro-Analyzer 软件分析目标条带灰度值。

**2.11 统计学分析** 采用 SPSS 25.0 进行统计分析,数据符合正态分布采用单因素方差分析,以  $\bar{x} \pm s$  表示,不符合正态分布,采用非参数检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 六味地黄丸对 ASD 大鼠社交行为的影响** 与空白组比较,模型组大鼠与陌生鼠 1 接触时间显著减少 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,六味地黄丸各剂量组及维生素 D 组大鼠与陌生鼠 1 接触时间显著增多 ( $P < 0.01$ ),且维生素 D 组大鼠接触陌生鼠 1 时间显著多于其余各药物组 ( $P < 0.01$ )。各组大鼠与空笼接触时间比较差异均无统计学意义。见表 1。

**3.2 六味地黄丸对 ASD 大鼠社交新颖性的影响** 与空白组比较,模型组大鼠与陌生鼠 2 接触时间显著减少,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,六味地黄丸各剂量组及维生素 D 组与陌生鼠 2 接触时间明显增多,且接触陌生鼠 2 时间多于接触陌生鼠 1 时间 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 六味地黄丸对 ASD 大鼠社交行为的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1 Effect of Liuwei Dihuangwan on social behaviors of ASD rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	社交能力检测		社交新颖性检测	
		接触陌生鼠 1 时间	接触空笼时间	接触陌生鼠 2 时间	接触陌生鼠 1 时间
空白组		169.75±10.5	36.97±33.03	191.69±64.30	108.22±57.06
模型组		58.19±5.52 <sup>2)</sup>	26.44±10.92	57.64±21.97 <sup>2)</sup>	178.38±38.52
维生素 D 组	3.7×10 <sup>-5</sup>	143.03±3.13 <sup>4)</sup>	23.22±11.20	158.12±50.01 <sup>4)</sup>	48.80±45.86
六味地黄丸低剂量组	0.75	98.54±8.10 <sup>4,6)</sup>	52.77±15.83	117.14±25.06 <sup>4)</sup>	62.62±40.58
六味地黄丸高剂量组	1.50	122.67±6.02 <sup>4,6)</sup>	32.11±13.21	144.55±59.27 <sup>4)</sup>	63.27±58.42

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ ;与维生素 D 组比较<sup>5)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>6)</sup> $P < 0.01$ (表 2-表 5 同)

**3.3 六味地黄丸对 ASD 大鼠旷场实验的影响** 与空白组比较,模型组在旷场箱中总运动路程显著降低 ( $P < 0.01$ ),平均运动速度显著降低 ( $P < 0.01$ ),在中央区域运动路程显著缩短 ( $P < 0.01$ ),运动停留时间显著降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,六味地黄丸各剂量组及维生素 D 组在旷场箱中总运动路程明显增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),平均运动速度明显增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),在中央区域运动路程及运动停留时间明显增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),维生素 D 组在中央区

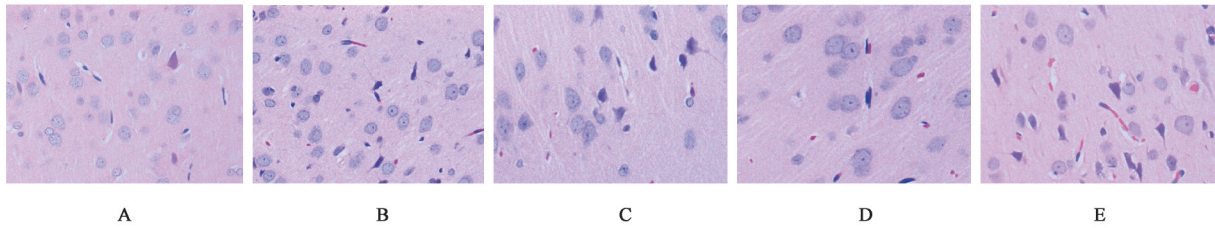
域时间高于其余各组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见增强出版附加材料及表 2。

**3.4 六味地黄丸对 ASD 大鼠前额组织病理改变的影响** 空白组的前额组织内神经元细胞形态正常,凋亡细胞数量较少。与空白组比较,模型组可见神经元细胞大量凋亡,细胞核固缩细胞质红染,神经元细胞成片坏死。与模型组比较,六味地黄丸各组及维生素 D 组干预后神经元细胞形态恢复,凋亡数量逐渐减少。见图 1。

表2 六味地黄丸对ASD大鼠旷场实验运动总路程、平均速度、中央区域路程及中央区域时间的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of Liuwei Dihuangwan on total distance traveled, average speed, distance in central area and time spent in central area of ASD rats in open field test ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	总路程/cm	平均速度/cm·s <sup>-1</sup>	中央区域路程/cm	中央区域时间/s
空白组		853.05±418.62	1.42±0.70	340.27±113.80	281.49±53.55
模型组		281.45±99.01 <sup>2)</sup>	0.47±0.17 <sup>2)</sup>	66.44±26.35 <sup>2)</sup>	50.63±15.62 <sup>2)</sup>
维生素D组	3.7×10 <sup>-5</sup>	706.06±103.14 <sup>4)</sup>	1.12±0.27 <sup>4)</sup>	222.60±49.26 <sup>4)</sup>	177.39±40.00 <sup>4)</sup>
六味地黄丸低剂量组	0.75	573.57±92.79 <sup>3)</sup>	0.96±0.15 <sup>3)</sup>	150.31±39.01 <sup>3)</sup>	95.92±19.22 <sup>3,4)</sup>
六味地黄丸高剂量组	1.50	582.89±165.33 <sup>3)</sup>	0.94±0.16 <sup>3)</sup>	191.30±75.21 <sup>4)</sup>	129.84±43.67 <sup>4,6)</sup>



注:A.空白组;B.模型组;C.维生素D组;D.六味地黄丸低剂量组;E.六味地黄丸高剂量组(图2-图4同)

图1 六味地黄丸对ASD大鼠前额组织HE染色结果的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Liuwei Dihuangwan on HE staining results of frontal tissue in ASD rats (HE,×200)

3.5 六味地黄丸对ASD大鼠前额组织线粒体形态的影响 空白组可见线粒体形态正常,膜完整,嵴结构完整;模型组线粒体肿胀,基质密度降低,嵴紊

乱、断裂、破坏甚至消失,可见少量自噬体;与模型组比较,六味地黄丸各组及维生素D组线粒体肿胀及嵴破坏明显改善,自噬体增多。见图2。

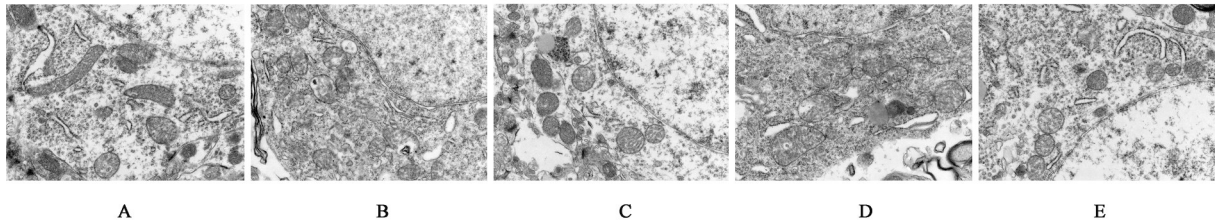


图2 六味地黄丸对ASD大鼠前额组织线粒体结构的影响(扫描电镜,×6 000)

Fig. 2 Effect of Liuwei Dihuangwan on mitochondrial structure in forehead of ASD rats (TEM,×6 000)

3.6 六味地黄丸对ASD大鼠前额Iba-1蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组Iba-1阳性细胞率显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,六味地黄丸各剂量组及维生素D组Iba-1阳性细胞率显著降低( $P<0.01$ );维生素D组Iba-1阳性细胞率明显少于低剂量组( $P<0.05$ )。见图3、表3。

p-ULK1/ULK、FUNDC1蛋白表达显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,六味地黄丸各剂量组及维生素D组p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK、FUNDC1蛋白表达显著升高( $P<0.01$ );维生素D组p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK、FUNDC1蛋白表达较其余药物组显著升高( $P<0.01$ )。见图4、表5。

3.7 六味地黄丸对ASD大鼠前额中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平的影响 与空白组比较,模型组前额中的TNF- $\alpha$ 、IL-6水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,六味地黄丸各剂量组及维生素D前额中的TNF- $\alpha$ 、IL-6含量显著下降( $P<0.01$ );维生素D组前额中的TNF- $\alpha$ 、IL-6含量显著低于六味地黄丸各剂量组( $P<0.01$ )。见表4。

#### 4 讨论

ASD在中医学中未见具体病名,古籍中归类于“语迟”“童昏”“清狂”“无慧”“目无情”“视无情”等病症范畴,病位在脑,与肝、肾等脏腑关系密切。《辨证奇闻》曰:“脑气不足……必须大补其肝气……肝气足而脑气亦足也”。《景岳全书》曰:“小儿禀赋不足,筋骨软弱,行迟语迟者,总由肝肾精血亏虚,不能荣养筋骨、充达脑窍”。中医学认为,ASD的病机包括肝肾亏虚,脑髓失养等<sup>[18]</sup>,这与现代中医学对

3.8 六味地黄丸对ASD大鼠前额组织p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1、FUNDC1蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组中p-AMPK/AMPK、

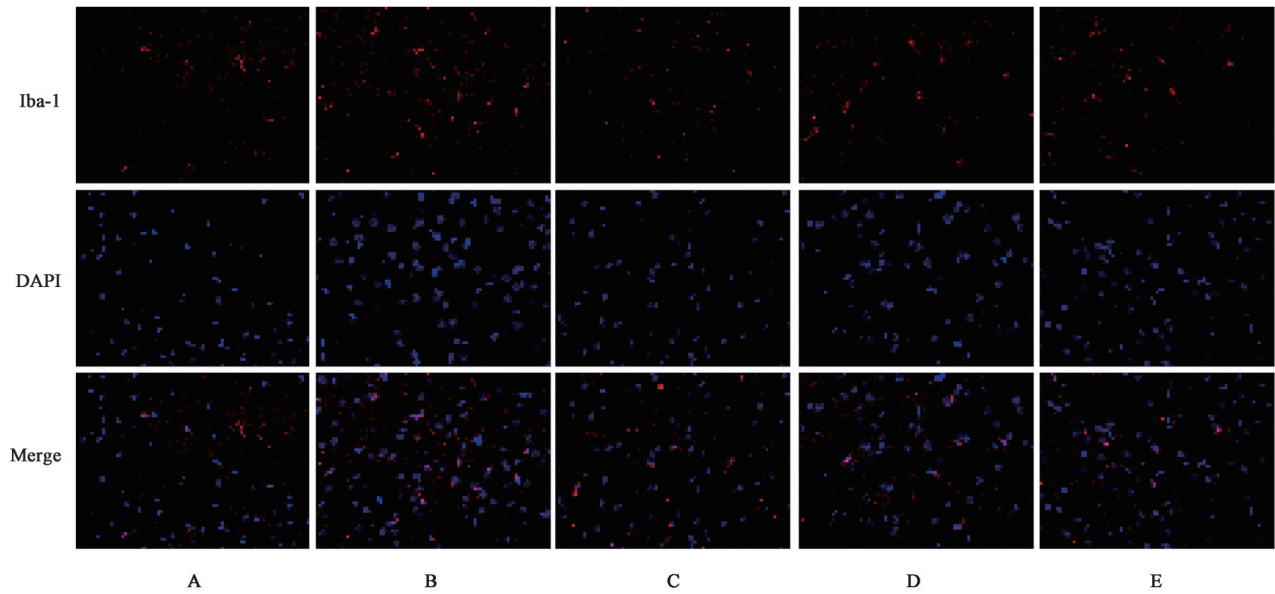


图3 六味地黄丸对ASD大鼠前额小胶质细胞标志物Iba-1染色的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 3 Effect of Liuwei Dihuangwan on staining of forehead microglia marker Iba-1 in ASD rats (IF, ×400)

表3 六味地黄丸对ASD大鼠前额小胶质细胞标志物Iba-1荧光表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Liuwei Dihuangwan on fluorescent expression of forehead microglia marker Iba-1 in ASD rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Iba-1 阳性率/%
空白组		7.67±1.20
模型组		19.67±0.58 <sup>2)</sup>
维生素D组	$3.7 \times 10^{-5}$	9.00±1.00 <sup>4)</sup>
六味地黄丸低剂量组	0.75	16.00±1.00 <sup>4,6)</sup>
六味地黄丸高剂量组	1.50	10.67±1.16 <sup>4)</sup>

表4 六味地黄丸对ASD大鼠前额组织TNF- $\alpha$ 、IL-6水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Liuwei Dihuangwan on levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in forehead tissue of ASD rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TNF- $\alpha$	IL-6
空白组		52.11±0.98	30.39±0.48
模型组		157.00±1.28 <sup>2)</sup>	83.11±1.34 <sup>2)</sup>
维生素D组	$3.7 \times 10^{-5}$	73.42±2.18 <sup>4)</sup>	41.07±0.51 <sup>4)</sup>
六味地黄丸低剂量组	0.75	123.04±1.36 <sup>4,6)</sup>	72.53±1.17 <sup>4,6)</sup>
六味地黄丸高剂量组	1.50	99.06±38.40 <sup>4,6)</sup>	48.69±0.51 <sup>4,6)</sup>

ASD的理解相契合<sup>[19]</sup>。先天禀赋不足、情志失调等因素会导致肝肾亏虚、肝失疏泄、血不容目,此为ASD发生的病机基础,最终表现出智力低下、兴趣狭窄、目光避人、逃避交流等症状。

本研究基于“肝肾亏虚,脑髓失养”理论,提出滋补肝肾,填精益髓的核心治疗原则,选用经典名方六味地黄丸进行治疗。六味地黄丸出自钱乙的《小儿药证直诀》,由熟地黄、泽泻、牡丹皮、山茱萸、

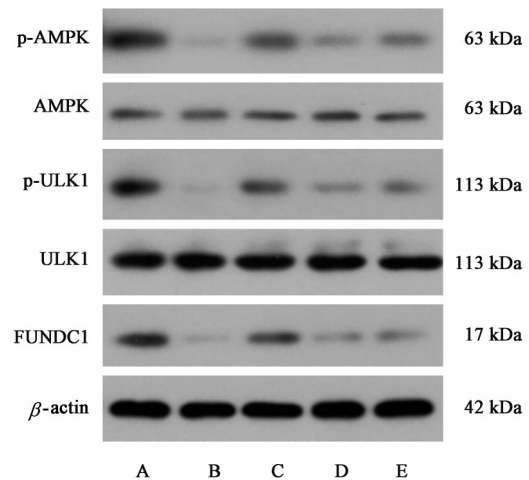


图4 各组大鼠前额组织p-AMPK、AMPK、p-ULK1、ULK1、FUNDC1蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of p-AMPK, AMPK, p-ULK1, ULK1 and FUNDC1 protein expression in forehead tissue of rats in each group

山药、茯苓组成,原方名“地黄丸”。全方配伍体现“三补三泻,补泻平衡,补而不滞”的治疗原则。明代薛己首次在《内科摘要》中将此方用于成人肾阴虚证<sup>[20]</sup>。后世清代吴谦将此方用于治疗虚劳、消渴<sup>[21]</sup>。研究证实六味地黄丸具有保护和修复神经细胞的作用。六味地黄丸提取物的干预能够增强AD模型线虫脂联素受体1(AdipoR1)表达,激活AMPK/沉寂信息调节因子(SIRT1)通路调控能量代谢,改善神经元线粒体功能进而发挥神经细胞的保护作用<sup>[22]</sup>。六味地黄汤能够调节DD大鼠腹侧海马区的氧化应激水平,上调AMPK、核转录因子E<sub>2</sub>相

表5 六味地黄丸对ASD大鼠前额组织p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1、FUNDC1蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of Liuwei Dihuangwan on expression of p-AMPK/AMPK, p-ULK1/ULK1 and FUNDC1 protein in forehead tissue of ASD rats ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-AMPK/AMPK	AMPK/ $\beta$ -actin	p-ULK1/ULK1	ULK1/ $\beta$ -actin	FUNDC1/ $\beta$ -actin
空白组		2.36±0.01	0.16±0.01	1.59±0.01	0.84±0.02	794.78±1.16
模型组		0.48±0.01 <sup>2)</sup>	0.19±0.01 <sup>2)</sup>	0.34±0.01 <sup>2)</sup>	0.88±0.03 <sup>1)</sup>	168.95±0.83 <sup>2)</sup>
维生素D组	3.7×10 <sup>-5</sup>	1.89±0.01 <sup>4)</sup>	0.18±0.01	1.05±0.01 <sup>4)</sup>	0.91±0.02 <sup>3)</sup>	555.01±0.76 <sup>4)</sup>
六味地黄丸低剂量组	0.75	0.79±0.01 <sup>4,6)</sup>	0.19±0.01	0.52±0.01 <sup>4,6)</sup>	0.98±0.02 <sup>4,6)</sup>	252.03±0.50 <sup>4,6)</sup>
六味地黄丸高剂量组	1.50	1.15±0.01 <sup>4,6)</sup>	0.17±0.00 <sup>4,5)</sup>	0.81±0.01 <sup>4,6)</sup>	0.90±0.01	346.93±0.54 <sup>4,6)</sup>

关因子2(Nrf2)蛋白表达,减少糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )磷酸化水平,从而减轻抑郁行为<sup>[23]</sup>。

线粒体自噬介导的线粒体消除在炎症、代谢、细胞重编程中起到重要作用<sup>[24]</sup>,自噬体在形成过程中受到自噬基因的协同调节,AMPK参与自噬起始与能量感知的正向调控<sup>[25]</sup>。当细胞能量水平下降时,AMPK经上游调控因子介导发生变构激活。活化的AMPK通过催化亚基与ULK1直接结合,在特定位点对ULK1进行磷酸化并增强其激酶活性<sup>[26]</sup>。激活的ULK1从细胞质基质定向迁移并锚定于线粒体外膜表面,其C端的线粒体定位结构域与外膜蛋白精准识别结合,实现ULK1与线粒体的特异性连接<sup>[27]</sup>。定位于线粒体外膜的ULK1进一步磷酸化FUNDC1,暴露其C端的微管相关蛋白1轻链3(LC3)相互作用区域,该区域可与自噬体膜上的LC3蛋白特异性结合,介导线粒体与自噬体膜的识别与结合,并为自噬体膜的延伸与成熟提供关键的结构支撑<sup>[28]</sup>。在此过程中,线粒体自噬会加剧神经炎症<sup>[29]</sup>。神经元与小胶质细胞可通过炎症因子相互作用<sup>[30]</sup>,这在慢性神经炎症ASD中至关重要。

VPA是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂和钠离子通道阻滞剂,临床主要用于癫痫、双相情感障碍等治疗<sup>[31]</sup>。ASD的核心病理特征如线粒体功能障碍<sup>[32]</sup>、突触异常<sup>[33]</sup>、基因表达失调<sup>[34]</sup>与VPA的作用靶点高度契合。研究表明,VPA可通过代谢产物<sup>[35]</sup>、氧化应激<sup>[36]</sup>、线粒体功能<sup>[37]</sup>激活和调控AMPK进而调控自噬途径。另外,VPA诱导的ASD样模型鼠能更好地代表环境/表观遗传的特发性ASD病例<sup>[38]</sup>,具有与人类ASD相似的症状、细胞、病理表型<sup>[39]</sup>,是公认的较成熟的动物模型。孕鼠妊娠期暴露于VPA其子代在三箱社交实验<sup>[40]</sup>等检测中会出现较少社交互动、重复刻板行为及发育迟缓<sup>[41]</sup>,并且伴有与ASD相关的情绪、认知障碍<sup>[42]</sup>。本研究通过VPA腹腔注射构建ASD大鼠模型。结果显示模型组大鼠表现出社交行为、社交新颖性障

碍,自主行为下降,焦虑状态增加,这与WANG等<sup>[43]</sup>所报道的结果一致。该组大鼠前额p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1、FUNDC1蛋白表达下降,结合病理学观察可见线粒体肿胀、嵴断裂及自噬小体减少,说明本模型证实了ASD大鼠普遍存在线粒体自噬功能受损。经六味地黄丸干预后,上述病理变化得到改善,且p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1、FUNDC1蛋白表达升高,提示线粒体自噬清除率升高,说明六味地黄丸通过AMPK/ULK1/FUNDC1通路激活线粒体自噬功能。

神经炎症是ASD的典型病理特征之一,而小胶质细胞的异常活化是其重要的驱动因素<sup>[44]</sup>。作为中枢神经系统的固有免疫细胞,小胶质细胞通过释放促炎因子等,维持神经元功能稳态<sup>[45]</sup>。ASD环境下,Iba-1的表达水平能够直观反映小胶质细胞的活化状态<sup>[46]</sup>。在ASD大鼠中,观察到Iba-1蛋白表达增加<sup>[47]</sup>,并伴有TNF- $\alpha$ 、IL-6水平增加<sup>[48]</sup>。这种病理改变会加剧神经炎症,进而介导ASD核心症状的病理进程。从实验结果可知,ASD模型大鼠前额中观察到促炎表型优势倾向,表现为小胶质细胞标志物Iba-1蛋白表达增加,TNF- $\alpha$ 、IL-6水平升高,同时在HE染色中观察到神经元凋亡数量增多。经过六味地黄丸治疗后,前额小胶质细胞标志物Iba-1蛋白表达下降,TNF- $\alpha$ 、IL-6水平降低,HE染色神经元凋亡数量减少,形态恢复,说明六味地黄丸能改善小胶质细胞介导的神经炎症,减少炎症因子分泌,这可能与“自噬-炎症”交互作用相关<sup>[49]</sup>。

综上所述,六味地黄丸通过AMPK/ULK1/FUNDC1信号通路,实现改善ASD大鼠社交行为、激活线粒体自噬功能、降低神经炎症及缓解神经元损伤的多途径协同作用,在防治ASD发生发展中效果明确。但研究中仍存在局限性。不同种属在自噬通路调控方面存在差异,使得转化临床医学价值受限。且自噬与炎症相关机制尚未明确,未来仍需进一步探究内在联系。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [ 1 ] OISON L, BISHOP S, THURM A. Differential diagnosis of autism and other neurodevelopmental disorders [J]. *Pediatr Clin North Am*, 2024, 71(2): 157-177.
- [ 2 ] ZHOU H, XU X, YAN W L, et al. Prevalence of autism spectrum disorder in China: A nationwide multi-center population-based study among children aged 6 to 12 years [J]. *Neurosci Bull*, 2020, 36(9): 961-971.
- [ 3 ] QIN L, WANG H J, NING W J, et al. New advances in the diagnosis and treatment of autism spectrum disorders [J]. *Eur J Med Res*, 2024, 29(1): 322.
- [ 4 ] WOOD J J, WOOD K S, ROSENAU K A, et al. Practitioner adherence and competence in MEYA, a free online self-instruction program in modular psychotherapy and counseling for children's autism-related clinical needs [J]. *J Autism Dev Disord*, 2025, 55(2): 472-486.
- [ 5 ] JIA S Q, GUO C C, LI S F, et al. The effect of physical exercise on disordered social communication in individuals with autism spectrum disorder: A systematic review and Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Front Pediatr*, 2023, 11: 1193648.
- [ 6 ] 黄浩宇, 杜晓亮, 王静, 等. 基于微生物-肠-脑轴的维生素D改善孤独症症状效果评价研究 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2025, 51(3): 149-155.
- HUANG H Y, DU X L, WANG J, et al. Evaluation of the effect of vitamin D on improving autism symptoms based on the microbiota-gut-brain axis [J]. *Chin J Neurol Psychiatr Dis*, 2025, 51(3): 149-155.
- [ 7 ] DOS SANTOS C L, BARRETO I I, DA SILVA A C F, et al. Behavioral therapies for the treatment of autism spectrum disorder: A systematic review [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2024, 80: 100566.
- [ 8 ] FRYE R E, RINCON N, MCCARTY P J, et al. Biomarkers of mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis [J]. *Neurobiol Dis*, 2024, 197: 106520.
- [ 9 ] THOMAS S D, ABDALLA S, EISSA N, et al. Targeting microglia in neuroinflammation: H3 receptor antagonists as a novel therapeutic approach for Alzheimer's disease, parkinson's disease, and autism spectrum disorder [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2024, 17(7): 831.
- [ 10 ] ONISHI M, YAMANO K, SATO M, et al. Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy [J]. *EMBO J*, 2021, 40(3): e104705.
- [ 11 ] KOVACHEVA E, GEVEZOVA M, MEHTEROV N, et al. The intersection of mitophagy and autism spectrum disorder: A systematic review [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(5): 2217.
- [ 12 ] ZHU Y L, ZHANG J N, DENG Q J, et al. Mitophagy-associated programmed neuronal death and neuroinflammation [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1460286.
- [ 13 ] 董官盛. 中医药治疗儿童孤独症谱系障碍研究进展 [J]. *基层中医药*, 2025, 4(3): 129-133.
- DONG G S. Research progress on treatment of autism spectrum disorder in children with traditional Chinese medicine [J]. *Basic Tradit Chin Med*, 2025, 4(3): 129-133.
- [ 14 ] YUAN Y, LIU Y M, HAO L, et al. The neuroprotective effects of Liuwei Dihuang medicine in the APP/PS1 mouse model are dependent on the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1188893.
- [ 15 ] 吴吉, 郝兴宇, 叶勇, 等. 基于BDNF/TrkB/CREB通路研究六味地黄丸对丙戊酸钠诱导的孤独症谱系障碍模型小鼠的作用机制 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(2): 176-184.
- WU J, HAO X Y, YE Y. Mechanism of action of Liuwei Dihuang pill on sodium valproate-induced neonatal rat model of autism spectrum disorder based on BDNF/TrkB/CREB pathway [J]. *J Hunan Univ Chin Med*, 2024, 44(2): 176-184.
- [ 16 ] LEE Y J, HAN P L. Early-life stress in D2 heterozygous mice promotes autistic-like behaviors through the downregulation of the BDNF-TrkB pathway in the dorsal striatum [J]. *Exp Neurobiol*, 2019, 28(3): 337-351.
- [ 17 ] 方靖靖, 黄昆仑, 全涛, 等. 孤独症谱系障碍实验模型研究进展 [J]. *生物技术进展*, 2023, 13(4): 509-523.
- FANG J J, HUANG K L, TONG T, et al. Research progress on experimental models of autism spectrum disorders [J]. *Prog Biotechnol*, 2023, 13(4): 509-523.
- [ 18 ] 孙娅男, 周子晴, 魏凤香, 等. 儿童孤独症谱系障碍病因学研究进展 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2022, 14(10): 1822-1826.
- SUN Y N, ZHOU Z Q, WEI F X, et al. Research progress on etiology of autism spectrum disorders in children [J]. *J Mol Diagn Ther*, 2022, 14(10): 1822-1826.
- [ 19 ] 赵宁侠, 宋虎杰, 杜晓刚, 等. 中医儿科临床诊疗指南·孤独症谱系障碍 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(7): 3231-3236.
- ZHAO N X, SONG H J, DU X G, et al. Guidelines for clinical diagnosis and treatment of pediatrics in traditional Chinese medicine: Autism spectrum disorders [J]. *Chin J Tradit Chin Med*, 2023, 38(7): 3231-3236.
- [ 20 ] 王珑, 郭彦麟, 孙钰, 等. 薛己运用六味地黄丸规律新探 [J]. *中医学报*, 2019, 34(2): 255-258.
- WANG L, GUO Y L, SUN Y, et al. Exploration of Xue Ji's application of Liuwei Dihuang pill [J]. *Acta Chin Med*, 2019, 34(2): 255-258.
- [ 21 ] 郑东京, 鲍身涛, 王羽依, 等. 基于《医宗金鉴》探讨糖尿病足溃瘍的辨治 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2020, 15(11): 1983-1986, 1991.
- ZHENG D J, BAO S T, WANG Y N, et al. Discussion on differentiation of treatments of diabetic foot based on the Golden Mirror of Medicine [J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2020, 15(11): 1983-1986, 1991.
- [ 22 ] 雷霞, 王加朋, 佟玉良, 等. 六味地黄丸对阿尔茨海默病秀丽隐杆线虫模型的神经保护作用 [J]. *中成药*, 2024, 46(2): 615-619.
- LEI X, WANG J P, TONG Y L, et al. Neuroprotective effect of Liuwei Dihuang pill on *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2024, 46(2):

- 615-619.
- [23] 黄芳, 谭子虎, 单楠, 等. 六味地黄汤通过调节 AMPK/Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2 通路减轻糖尿病抑郁大鼠 vHIP 髓鞘损伤及抑郁样行为[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(2): 38-46.  
HUANG F, TAN Z H, SHAN N, et al. Liuwei Dihuang decoction alleviates myelin injury in vhip and depression-like behavior of diabetes mellitus combined with comorbid depression rats via AMPK/Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2 pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(2): 38-46.
- [24] WANG S L, LONG H J, HOU L J, et al. The mitophagy pathway and its implications in human diseases [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 304.
- [25] GE Y C, ZHOU M, CHEN C, et al. Role of AMPK mediated pathways in autophagy and aging [J]. Biochimie, 2022, 195: 100-113.
- [26] PARK J M, KIM D H. A paradigm shift: AMPK negatively regulates ULK1 activity [J]. Autophagy, 2024, 20 (4) : 960-962.
- [27] BANERJEE C, PUCHNER E M, KIM D H. ULK1 seen at the single-molecule level during autophagy initiation [J]. Autophagy, 2024, 20(3): 707-708.
- [28] CAI C, GUO Z Z, CHANG X, et al. Empagliflozin attenuates cardiac microvascular ischemia/reperfusion through activating the AMPK $\alpha$ 1/ULK1/FUNDC1/mitophagy pathway [J]. Redox Biol, 2022, 52: 102288.
- [29] JIAO L, SHAO W X, QUAN W Q, et al. iPLA2 $\beta$  loss leads to age-related cognitive decline and neuroinflammation by disrupting neuronal mitophagy [J]. J Neuroinflammation, 2024, 21(1): 228.
- [30] SUZUMURA A. Neuron-microglia interaction in neuroinflammation [J]. Curr Protein Pept Sci, 2013, 14(1) : 16-20.
- [31] MISHRA M K, KUKAL S, PAUL P R, et al. Insights into structural modifications of valproic acid and their pharmacological profile [J]. Molecules, 2021, 27(1): 104.
- [32] NAKAGAMI Y, NISHI M. MA-5 ameliorates autism-like behavior in mice prenatally exposed to valproic acid [J]. Behav Pharmacol, 2023, 34(8): 488-493.
- [33] CHEN L, FU Q, DU Y, et al Transcriptome analysis and epigenetics regulation in the hippocampus and the prefrontal cortex of VPA-induced rat model [J]. Mol Neurobiol, 2024, 61 (1): 167-174.
- [34] LEUNG C S, ROSENZWEIG S J, YOON B, et al. Dysregulation of the chromatin environment leads to differential alternative splicing as a mechanism of disease in a human model of autism spectrum disorder [J]. Hum Mol Genet, 2023, 32(10): 1634-1646.
- [35] AVERY L B, BUMPUS N N. Valproic acid is a novel activator of AMP-activated protein kinase and decreases liver mass, hepatic fat accumulation, and serum glucose in obese mice [J]. Mol Pharmacol, 2014, 85(1): 1-10.
- [36] CHAUDHARY S, PINKY, PARVEZ S. Neuroprotective effects of natural antioxidants against branched-chain fatty acid-induced oxidative stress in cerebral cortex and cerebellum regions of the rat brain [J]. ACS Omega, 2022, 7 (43): 38269-38276.
- [37] GUO S S, ZHANG S, ZHUANG Y X, et al. Muscle PARP1 inhibition extends lifespan through AMPK $\alpha$  PARylation and activation in Drosophila [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2023, 120(13): e2213857120.
- [38] NICOLINI C, FAHNESTOCK M. The valproic acid-induced rodent model of autism [J]. Exp Neurol, 2018, 299 (Pt A) : 217-227.
- [39] RODIER P M, INGRAM J L, TISDALE B, et al. Linking etiologies in humans and animal models: Studies of autism [J]. Reprod Toxicol, 1997, 11(2/3): 417-422.
- [40] 孔明慧, 鲁力铭, 向蕾颖, 等. 自闭症动物模型社会互动行为的评估及干预研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34 (10): 169-178.  
KONG M H, LU L M, XIANG L Y, et al. Research progress on evaluation and intervention of social interaction behavior in animal models of autism [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34 (10): 169-178.
- [41] WATANABE S, KUROTANI T, OGA T, et al. Functional and molecular characterization of a non-human primate model of autism spectrum disorder shows similarity with the human disease [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5388.
- [42] TAKAYAMA K, TOBORI S, ANDOH C, et al. Autism spectrum disorder model mice induced by prenatal exposure to valproic acid exhibit enhanced empathy-like behavior via oxytocinergic signaling [J]. Biol Pharm Bull, 2022, 45 (8) : 1124-1132.
- [43] WANG J, XU C, LIU C, et al. Effects of different doses of lithium on the central nervous system in the rat valproic acid model of autism [J]. Chem Biol Interact, 2023, 370: 110314.
- [44] HUGHES H K, MORENO R J, ASHWOOD P. Innate immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder (ASD) [J]. Brain Behav Immun, 2023, 108: 245-254.
- [45] LIAO X L, YANG J X, WANG H Q, et al. Microglia mediated neuroinflammation in autism spectrum disorder [J]. J Psychiatr Res, 2020, 130: 167-176.
- [46] LIAO X L, LIU Y T, FU X, et al. Postmortem Studies of Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder: A systematic review [J]. Mol Neurobiol, 2020, 57 (8) : 3424-3438.
- [47] ZHANG Y Y, LI H, LI B L, et al. Dachaihu decoction ameliorates abnormal behavior by regulating gut microbiota in rats with propionic acid-induced autism [J]. Front Microbiol, 2025, 16: 1535451.
- [48] LUHACH K, KULKARNI G T, SINGH V P, et al. Cilostazol attenuated prenatal valproic acid-induced behavioural and biochemical deficits in a rat model of autism spectrum disorder [J]. J Pharm Pharmacol, 2021, 73(11): 1460-1469.
- [49] ALIREZAEI M, KEMBALL C C, WHITTON J L. Autophagy, inflammation and neurodegenerative disease [J]. Eur J Neurosci, 2011, 33(2): 197-204.

[责任编辑 周冰冰]