

# 基于生物信息学技术探索丙戊酸盐导致大鼠孤独症样行为的机制

金柳荫 夏玉洁 徐文倩 舒畅 王高华

430000 武汉大学人民医院精神卫生中心

通信作者: 舒畅, Email: shuchangchang75@163.com; 王高华, Email: wgh6402@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2023.02.009

**【摘要】目的** 利用生物信息学技术探索丙戊酸盐导致Wistar大鼠出现孤独症样行为的具体机制。**方法** 选取SPF级Wistar雄性大鼠4只(300~350 g), 雌性大鼠8只(200~250 g), 于8~10周将雌、雄大鼠以2:1的比例合笼过夜。在雌鼠怀孕的第12.5天随机选取4只腹腔注射600 mg/kg的丙戊酸盐, 产下的幼鼠纳入丙戊酸盐组, 并于幼鼠出生后35 d通过旷场实验、高架十字迷宫实验、新物体识别实验和埋珠实验评价造模是否成功。另随机选取4只孕鼠注射等量生理盐水一次, 产下的幼鼠纳入健康对照组。使用GSE42904数据集寻找服用丙戊酸盐和服用甲基纤维素的小鼠脑组织中表达有差异的基因, 采用基因本体论(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)、GO/KEGG(联合LogFC)以及基因探针富集分析(GSEA)对差异基因进行富集分析。利用实时定量聚合酶链式反应(q-PCR)验证差异基因在丙戊酸盐组幼鼠脑组织中的表达情况。最终纳入丙戊酸盐组幼鼠14只, 健康对照组幼鼠7只。**结果** 在旷场实验中, 丙戊酸盐组的中心区累积时间、身体伸直次数少于健康对照组, 在新物体识别实验中的识别指数低于健康对照组, 埋珠实验中的埋珠数量多于健康对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在高架十字迷宫实验中, 丙戊酸盐组与健康对照组进入开放臂次数、运动总距离比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。提示造模成功。对GSE42904数据集进行分析, 符合 $|\text{Log}_2(\text{FC})| > 1$ 且 $P < 0.05$ 的基因有267个, 这些差异基因主要富集于代谢通路。对谷胱甘肽代谢通路中的差异基因谷胱甘肽S-转移酶 $\alpha$  3(*Gsta3*)、 $\gamma$ -谷氨酰转移酶7(*Ggt7*)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(*G6pd*)进行验证, 结果显示, 两组*Gsta3*、*Ggt7*基因的mRNA表达水平比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 丙戊酸盐组*G6pd*基因的mRNA表达水平低于健康对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 在丙戊酸盐大鼠模型中的*G6pd*基因表达存在差异, 该基因的表达变化可能是孤独症谱系障碍发病的一个致病因素。

**【关键词】** 丙戊酸盐; 孤独症谱系障碍; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 谷胱甘肽代谢; 大鼠

## Mechanism of valproate-induced autism-like behavior in mice based on bioinformatics technique

Jin Liუმeng, Xia Yujie, Xu Wenqian, Shu Chang, Wang Gaohua

Mental Health Center of Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430000, China

Corresponding authors: Shu Chang, Email: shuchangchang75@163.com; Wang Gaohua, Email: wgh6402@163.com

**【Abstract】Objective** To explore the mechanism of valproate-induced autism-like behavior in Wistar mice based on bioinformatics technique. **Methods** A total of 4 SPF grade Wistar male mice (300–350 g) and 8 female mice (200–250 g) were selected. The female and male mice were caged overnight at a ratio of 2:1 in 8–10 weeks. The female mice were intraperitoneally injected with 600 mg/kg valproate on the 12.5 days of pregnancy. The newborn mice were included in the valproate group. Open field test, elevated cross maze test, new object recognition test and bead embedding experiment were used to evaluate the success of the model at the 35th day after birth. Another 4 pregnant mice were randomly selected to inject the same amount of normal saline once, and the newborn mice were included in the healthy control group. GSE42904 data set was used to search for genes with different expressions in the brain tissues of mice receiving valproate and methylcellulose. Genetic ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG), GO/KEGG (combined with LogFC) and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) were used for enrichment analysis of differential genes. Quantitative real-time polymerase chain lock reaction (Q-PCR) was used to verify the expression of differential genes in the

brain tissue of model mice in valproate group. Finally, 14 young mice in the valproate group and 7 young mice in the healthy control group were included. **Results** Compared with the control group, the time of entering the central area and the number of body extensions decreased in the open field experiment, the recognition index decreased in the new object recognition experiment, and the number of buried beads increased in the bead embedding experiment, and all the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). In the elevated cross maze test, there was no statistically significant difference between the valproate group and the healthy control group in the number of times of entering the open arm and the total distance of movement ( $P > 0.05$ ), indicating successful modeling. According to the analysis of GSE42904 data set, there are 267 genes in line with  $|\text{Log}_2(\text{FC})| > 1$  and  $P < 0.05$ , and these differential genes are mainly concentrated in metabolic pathway. The differential genes glutathione S-transferase  $\alpha$  3(*Gsta 3*), gamma-glutamyl transferase 7(*Ggt 7*) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (*G6pd*) in the glutathione metabolic pathway were verified. It was found that there was no statistical significance in the difference in mRNA expressions between *Gsta 3* and *Ggt 7* ( $P > 0.05$ ). The mRNA expression level of *G6pd* gene in valproate group was significantly lower than that in healthy control group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** There are differences in the expression of *G6pd* gene in the valproate rat model, and the change in the expression of *G6pd* gene may be a pathogenic factor of autism spectrum disorder.

**【Key words】** Valproate; Autism spectrum disorder; Glucose-6-phosphate dehydrogenase; Glutathione metabolism; Mice

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)是一种常见的神经发育疾病,临床表现以社交困难、刻板行为和兴趣狭窄为主,可能伴随感知觉障碍和情绪障碍<sup>[1-2]</sup>。美国的一项数据报告显示,在2016年,8岁儿童的ASD患病率约为1/54<sup>[3]</sup>,略高于2010年的1/68<sup>[4]</sup>。ASD被认为由遗传和环境相互作用导致。既往研究显示,拷贝数变异导致与突触发生和神经可塑性相关的基因发生突变、生产前后暴露于各种可导致DNA转录和表观遗传修饰改变的环境因素均与ASD的发病有关<sup>[5]</sup>。

丙戊酸盐是一种短链脂肪酸,可通过多种机制增强神经递质GABA的活性,同时抑制钠离子、钾离子等离子通道<sup>[6-7]</sup>。临床研究显示,丙戊酸盐具有抗癫痫、抗惊厥和稳定情绪的作用,因此在临床中被广泛用于双相情感障碍、抑郁症、精神分裂症和各种癫痫发作的治疗<sup>[8-9]</sup>。但流行病学调查显示,妊娠期间服用丙戊酸盐会导致后代出现认知缺陷,发育畸形和罹患ASD的风险也随之增加<sup>[10]</sup>。基于此,Rodier等<sup>[11]</sup>制作了丙戊酸盐诱导ASD的动物模型。

大鼠和小鼠的基因一定程度地具有同源性<sup>[12]</sup>。既往研究通过口服丙戊酸盐来制作小鼠孤独症模型的测序数据例如GSE42904数据集<sup>[13]</sup>,但有关丙戊酸盐导致啮齿类动物孤独症发病机制的深入研究较少。因此,本研究通过构建丙戊酸盐诱导的大鼠孤独症样模型,在对GSE42904数据集进行分析寻找差异基因的同时,利用实时定量聚合酶链式反应(q-PCR)验证这些差异基因在构建大鼠ASD样模型脑组织中的表达是否发生变化,进而探讨丙戊酸盐

导致大鼠出现ASD样行为的可能机制,为后续丙戊酸盐诱导大鼠出现ASD样行为的机制提供一定的研究基础。

#### 一、材料与与方法

1. 实验动物: SPF级Wistar雌性大鼠4只(300~350 g),雌性大鼠8只(200~250 g),均购自湖北省疾控中心,饲养于武汉大学人民医院实验动物中心,自由饮食,12 h/12 h昼夜节律。本研究经武汉大学人民医院实验动物福利伦理审查通过[伦理号:WDRM动(福)第20210708B号]。

2. 主要药品、试剂及仪器: 丙戊酸盐(Sigma公司,美国),柱式RNA提取试剂盒、逆转录试剂以及q-PCR SYBR(南京诺唯赞生物科技有限公司)以及自动视频跟踪系统(EthovisionXT 11.5, Noldus, 荷兰)。

3. 动物模型制备与分组: 参照Schneider等<sup>[14]</sup>的方法,将8~10周成年雌、雄大鼠以2:1比例合笼过夜,次日早晨对雌鼠进行阴道涂片检查,发现阴栓者记为妊娠第1天。在第12.5天时,随机选取4只孕鼠腹腔注射丙戊酸盐溶液一次,剂量为600 mg/kg,浓度为250 mg/ml,之后产下的幼鼠纳入丙戊酸盐组;同时向剩下4只孕鼠注射等量生理盐水一次,之后产下的幼鼠纳入健康对照组。两组幼鼠统一于出生后第21天断奶,同时去除雌鼠只保留雄鼠。最后纳入丙戊酸盐组幼鼠14只,健康对照组幼鼠7只。

4. 行为学实验: 在丙戊酸盐组和健康对照组幼鼠出生后第35 d进行行为学实验,且在实验前1 d将幼鼠放入测试环境中进行适应。在每只幼鼠实验结束后使用75%乙醇擦拭设备,避免气味对下次实验造成干扰。(1)旷场实验<sup>[15]</sup>。将每只幼鼠置于被

分成9个正方形区域的100 m × 100 m开阔场地内,以中心正方形区域为中心区域。使用EthovisionXT 11.5软件记录幼鼠10 min内进入中心区累计时间、身体伸直次数,以评估幼鼠在新异环境中的自发活动和探索行为。(2)高架十字迷宫实验<sup>[16]</sup>。将每只幼鼠放入112 cm × 10 cm × 40 cm高架十字迷宫的中央区,头朝开放臂,使用Ethovision XT 11.5软件记录幼鼠在5 min内进入开放臂次数,以评估幼鼠的焦虑样行为。(3)新物体识别实验<sup>[17]</sup>。将A、B两个相同物体放入100 cm × 100 cm开阔场地内的两个相对角落,同时将幼鼠放入开阔场地10 min,使用EthovisionXT 11.5软件记录幼鼠与A、B物体的接触情况,包括鼻子或嘴巴触及物体的次数和距离物体2~3 cm范围内的探索时间。在24 h后将B物体换成C物体(与A、B物体不同),同时将幼鼠放入开阔场地10 min,记录幼鼠与A、C物体的接触情况。通过计算新物体分辨指数[探索新物体的时间-探索旧物体的时间]/(探索新旧物体的总时间) × 100%]评估幼鼠的学习记忆能力。(4)埋珠实验<sup>[18]</sup>。在鼠笼里铺5 cm厚玉米芯垫料,里面放入直径为15 mm的黑色大理石珠子,共4排,每排5颗珠子,每颗珠子相隔距离相同。将幼鼠放入笼中,摄像30 min,埋入体积>50%以上则记录埋入1颗,统计30 min的埋珠数量评估幼鼠的刻板行为。

5. RNA信息的获取和筛选差异基因:使用基因表达综合数据库(gene expression omnibus, GEO)中的数据集GSE42904获得基因表达数据,使用GEOquery包(2.54.1版本)下载基因表达数据<sup>[19]</sup>,然后使用limma包(3.42.2版本)对数据进行差异分析<sup>[20]</sup>,使用ggplot2包(3.3.3版本)和ComplexHeatmap包(2.2.0版本)进行火山图和热图的制作<sup>[21]</sup>。为减少不同发育阶段对幼鼠基因表达的影响,仅使用该数据集中成年期小鼠的数据进行分析。以该数据集中服用甲基纤维素的6只小鼠为对照组,服用丙戊酸盐的6只小鼠为实验组。采用 $t$ 检验计算基因的 $P$ 值,采用Benjamini-Hochberg法计算调整后的 $P$ 值。以 $\log_2\text{FC} > 1$ 和 $P < 0.05$ 为标准筛选差异基因。

6. 富集分析:使用基因本体论(gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、GO/KEGG(联合LogFC)以及基因探针富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)对差异基因进行富集分析<sup>[22]</sup>。使用clusterProfiler包(3.14.3版本)进行GO、KEGG富集分析并制作网络图<sup>[23]</sup>。使用GOplot包(1.0.2版本)计算 $Z$ 分数,同时使用GOplot包(1.0.2版本)和ggplot

2(3.3.3版本)绘制弦图<sup>[24]</sup>。使用clusterProfiler包(3.14.3版本)进行GSEA分析,以c2.cp.v7.2.symbols.gmt[Curated]为参考基因集绘制山峦图,同时使用基因集数据库MSigDB Collections,以错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.25且调整后 $P < 0.05$ 为显著富集<sup>[25]</sup>。

7. 构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络:将差异基因复制至String数据库建立PPI网络图<sup>[26]</sup>。将节点基因以及差异基因的上下调趋势变化导入cytoscape制作网络互作图,使用插件CytoHubba寻找网络中的20个关键基因并展示<sup>[27]</sup>。

8. 大鼠脑组织获取及q-PCR测定:行为学实验结束后,饲养幼鼠至成年大鼠(11~12周)。选取健康对照组、丙戊酸盐组各4只成年大鼠,采用戊巴比妥钠麻醉后断颈,立即分离获取脑组织,使用超声破碎仪在冰上获得脑组织匀浆,使用柱式RNA提取试剂盒提取脑组织的总RNA,测定RNA浓度及纯度后于-80℃冰箱备用。将含量为0.5 μg的总RNA进行逆转录合成cDNA,将获得的cDNA使用q-PCR进行扩增,检测目的基因的表达情况,目的基因的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

9. 统计学方法:采用SPSS 26.0统计学软件进行数据分析。计数资料用频数、百分数(%)表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验;正态分布的计量资料用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用独立样本 $t$ 检验;不符合正态分布的计量资料用中位数和四分位数 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,组间比较采用Mann-Whitney  $U$ 检验。双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

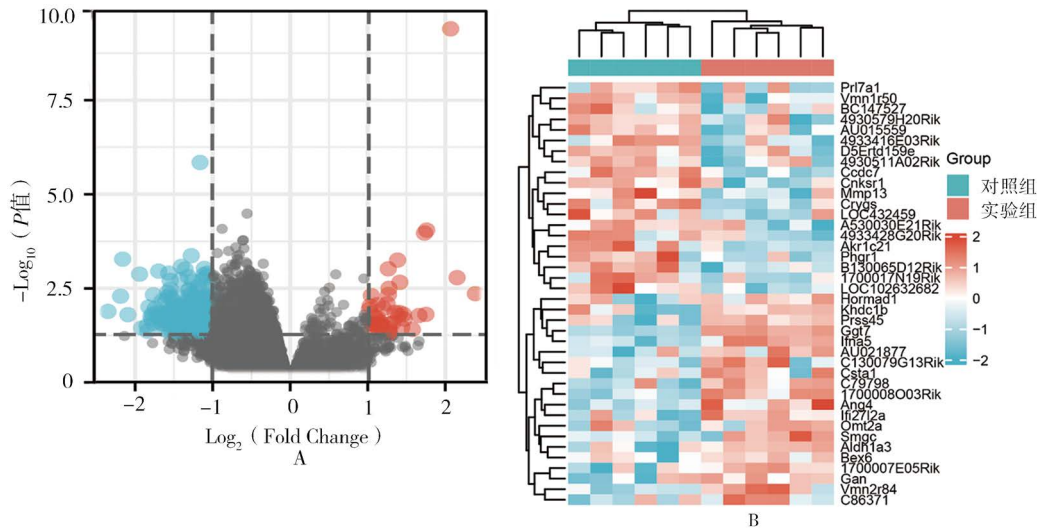
## 二、结果

1. 丙戊酸盐组和对照组幼鼠行为学实验结果比较:丙戊酸盐组在旷场实验中的中心区累积时间、身体伸直次数少于健康对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在高架十字迷宫实验中,丙戊酸盐组与健康对照组进入开放臂次数、运动总距离比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。在新物体识别实验中,丙戊酸盐组的识别指数低于健康对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在埋珠实验中,丙戊酸盐组的埋珠数量多于健康对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示造模成功。

2. 数据库样本的基因表达水平和差异基因筛选结果:共筛选出267个差异基因。与对照组相比,试验组的高表达基因数为43,低表达基因数为224,图中红点表示高表达,蓝点表示低表达,灰点表示表达无差异,见图1A。使用热图对前20个高表达和低表达的基因进行可视化处理,见图1B。

表1 丙戊酸盐组和对照组幼鼠行为学实验结果比较

| 组别    | 只数 | 中心区累计时间<br>[s, $M(P_{25}, P_{75})$ ] | 身体伸直次数<br>[次, $M(P_{25}, P_{75})$ ] | 进入开放臂次数<br>(次, $\bar{x} \pm s$ ) | 运动总距离<br>(cm, $\bar{x} \pm s$ ) | 新物体分辨指数<br>(%, $\bar{x} \pm s$ ) | 埋珠数量<br>(粒, $\bar{x} \pm s$ ) |
|-------|----|--------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 丙戊酸盐组 | 14 | 21.08(15.94, 34.38)                  | 0(0, 0)                             | 14.571 ± 12.043                  | 1 440.506 ± 498.930             | 41.712 ± 25.763                  | 17.929 ± 1.979                |
| 健康对照组 | 7  | 410.20(390.27, 456.89)               | 94.5(72.25, 107.00)                 | 29.000 ± 23.255                  | 1 555.947 ± 215.056             | 79.801 ± 22.278                  | 12.667 ± 5.315                |
| Z/t 值 |    | -381.040                             | -91.408                             | -1.852                           | -0.723                          | -3.113                           | 2.846                         |
| P 值   |    | <0.001                               | <0.001                              | 0.081                            | 0.479                           | 0.006                            | 0.018                         |



注: A为两组小鼠差异基因火山图,其中红点表示高表达的差异基因,蓝点表示低表达的差异基因,灰点表示两组表达无差异的基因;B为两组小鼠前20个高表达和低表达的差异基因热图

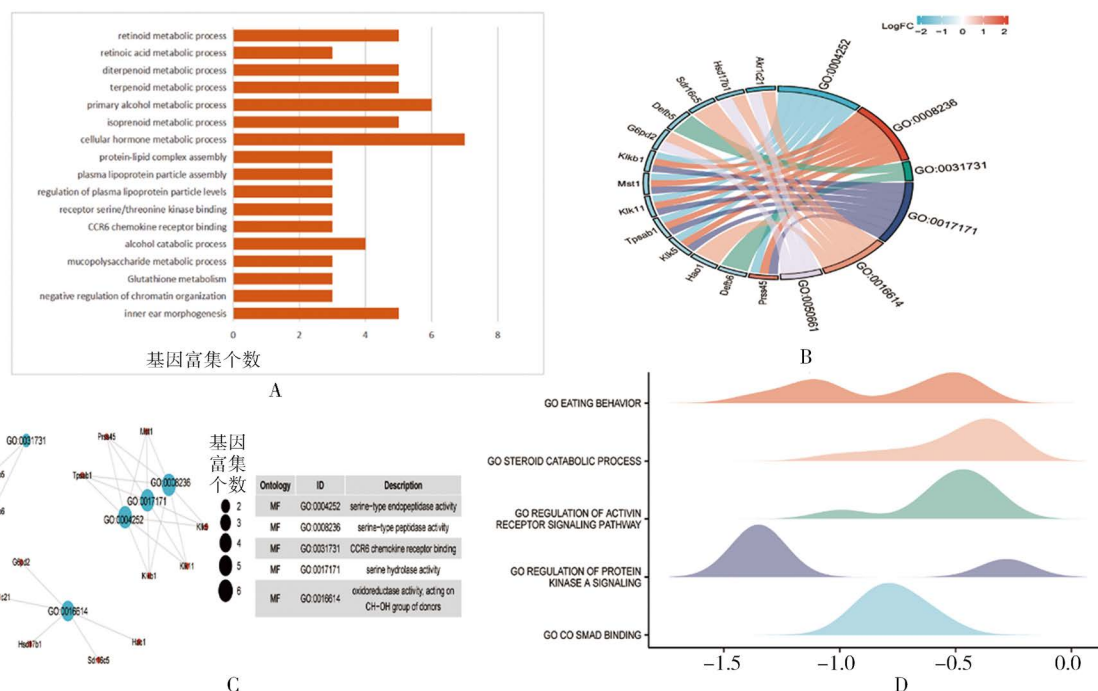
图1 GSEA42904数据库样本中实验组和对照组小鼠的基因表达火山图和差异基因热图

3. 差异基因的富集分析、PPI网络以及关键基因的筛选: 利用GO、KEGG、GSEA数据以及GO/KEGG(联合LogFC)对筛选出的差异基因进行富集分析,结果显示,差异基因主要集中在谷胱甘肽代谢通路、视黄酸代谢通路、类异戊二烯代谢通路等代谢通路,见图2。其中谷胱甘肽S-转移酶 $\alpha$ 3(glutathione S-transferase  $\alpha$  3, *Gsta 3*)、 $\gamma$ -谷氨酰转移酶7(gamma-glutamyl transferase 7, *Ggt 7*)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, *G6pd2*)存在差异且富集于谷胱甘肽代谢通路,见图3、4。*Gsta 3*、*G6pd2*基因位于20个关键基因中,见图5。

4. 丙戊酸盐组和健康对照组成年大鼠谷胱甘肽代谢通路基因的mRNA表达水平比较: 根据差异基因富集分析结果,选择谷胱甘肽代谢通路进行验证,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)基因为内参基因,检测*Gsta 3*、*Ggt 7*、*G6pd*基因的mRNA表达情况。引物序列见表2。两组*Gsta 3*、*Ggt 7*基因的mRNA表达水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );丙戊酸盐组*G6pd*基因的mRNA表达水平低于健康对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表3。

讨论 使用丙戊酸盐制作的ASD动物模型具有较好的结构效度、表面效度和预测效度,模拟了ASD发病的一个环境因素,因此该模型是该领域应用较为广泛的动物模型之一<sup>[28]</sup>。本研究建立了产前暴露于丙戊酸盐的ASD模型,该模型主要表现为较高的焦虑水平和较少的探索活动、对新奇物体的识别能力下降、刻板行为增加,与经典模型行为学结果一致,表明ASD模型建立成功。

既往研究显示,产前暴露于丙戊酸盐诱导啮齿类动物出现ASD样行为可能与以下机制有关:(1)产前暴露于丙戊酸盐使得啮齿类动物大脑中的H3和H4组蛋白瞬时高乙酰化<sup>[29]</sup>;(2)丙戊酸盐可能间接抑制糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )影响发育中的神经元轴突重塑,从而促进外因子信号传导<sup>[30]</sup>;(3)丙戊酸盐通过 $\beta$ -catenin-Ras-ERK-p21途径影响神经细胞祖细胞的分化和增殖<sup>[31]</sup>;(4)GABA水平升高破坏了发育中的神经元回路并导致ASD样行为表型<sup>[32]</sup>;(5)谷胱甘肽氧化应激失衡在丙戊酸盐诱导的胚胎毒性中起重要作用<sup>[15]</sup>。但相关研究尚未阐明丙戊酸盐神经毒性诱导的孤独症样行为机制,



注: A为经Bonferroni校正后的 $P < 0.05$ 的差异基因功能富集图,从上到下富集到的通路为类维生素A代谢过程、维甲酸代谢过程、二萜代谢过程、萜类代谢过程、初级酒精代谢过程、类异戊二烯代谢过程、细胞激素代谢过程、蛋白质-脂质复合物组合、血浆脂蛋白颗粒组装、调节血浆脂蛋白颗粒水平、受体丝氨酸/苏氨酸激酶结合、CCR6趋化因子受体结合、乙醇分解代谢过程、粘多糖代谢过程、谷胱甘肽代谢、负调控染色质组织、内耳形态发生;B为GO/KEGG(联合logFC)弦图;C为GO、KEGG富集分析网络图,其中包括富集到的通路的类目名称、富集到的基因数量以及关于该通路的功能、从上到下富集到的通路为丝氨酸型肽链内切酶活性、丝氨酸型肽酶活性、CCR6趋化因子受体结合、丝氨酸水解酶活性、作用在CH-OH基团的氧化还原酶活性;D为以c2.cp.v7.2.symbols.gmt [Curated]为数据集进行GSEA的山峦图,从上到下富集到的通路为饮食行为、类固醇分解代谢过程、激活素受体信号通路的调控、蛋白激酶a信号通路的调控、一氧化碳和SMAD的结合过程;GO基因本体论;KEGG京都基因与基因组百科全书;GSEA基因探针富集分析

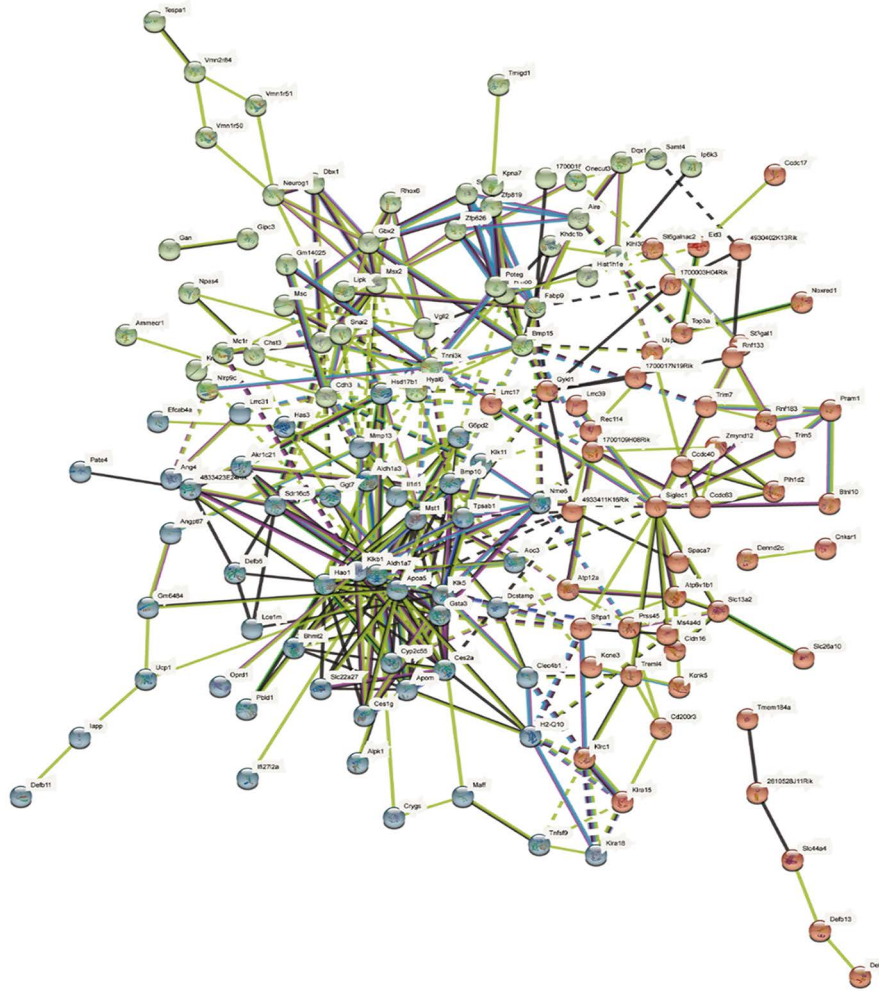
图2 差异基因的GO、KEGG、为GO/KEGG(联合logFC)和GSEA富集分析图

而在以往研究中发现, *Gsta 3* 是细胞进行解毒以及抗氧化防御的组成部分<sup>[33]</sup>。相关研究表明, *Ggt 7* 与线粒体的自噬有关, *Ggt 7* 抑制以及线粒体内自噬增加使得相关细胞内的活性氧含量增加<sup>[34]</sup>。*G6pd2* 与还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 的产生有关, 当 *G6pd2* 表达水平出现问题时会使NADPH产生减少、氧化应激通路异常、谷胱甘肽合成酶和谷胱甘肽等改变。本研究结果显示, *Gsta 3*、*Ggt 7* 和 *G6pd2* 基因可能与丙戊酸盐导致的大鼠孤独症样行为有关, 其中 *Gsta 3* 和 *G6pd2* 为关键基因, 和以往有关谷胱甘肽氧化应激与丙戊酸盐所致ASD样行为的研究结果一致, 提示 *Gsta 3*、*Ggt 7*、*G6pd2* 基因可能参与了孤独症的发病机制。

相关研究表明, 谷胱甘肽在氧化应激反应中起着重要作用, 在ASD患者中持续存在与氧化应激有关的神经炎症<sup>[35]</sup>。氧化还原平衡失调引起的氧化应激往往与其调节剂如NADPH、谷胱甘肽、谷胱甘肽过氧化物酶和G6PD等缺乏有关<sup>[36]</sup>。James等<sup>[37]</sup>的研究发现, ASD儿童的蛋氨酸、S-腺苷甲硫氨酸

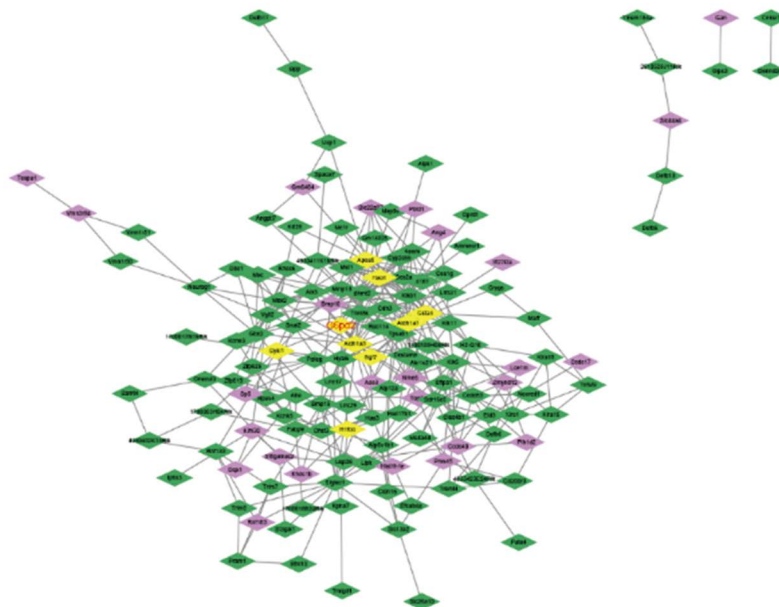
(S-adenosylmethionine, SAM)、同型半胱氨酸和总谷胱甘肽等的基线血浆浓度显著降低, 而S-腺苷同型半胱氨酸(S-adenosine homocysteine, SAH)、腺苷和氧化型谷胱甘肽的浓度显著升高, 表明ASD发病中可能存在谷胱甘肽代谢通路的紊乱, 而该通路与正常的抗氧化活性有关, ASD患者可能存在抗氧化防御机制受损。在动物研究中也发现, 在孕期接受丙戊酸盐腹腔注射的小鼠与对照组相比, 其谷胱甘肽水平降低<sup>[38]</sup>。本研究结果显示, 在数据集中, 实验组与对照组小鼠脑组织中谷胱甘肽代谢通路的基因存在差异, 包括 *Gsta 3*、*Ggt 7* 和 *G6pd2* 共3个基因作为谷胱甘肽代谢通路基因影响ASD的发病机制。

小鼠的 *G6pd2* 基因位于5号染色体, 参与谷胱甘肽代谢; 而成年大鼠的基因为 *G6pd*, 位于X染色体, 参与谷胱甘肽的代谢。本研究使用大鼠作为动物模型, 因此选择 *G6pd* 基因进行验证。 *Gsta 3*、*Ggt 7*、*G6pd* 基因的变化趋势与目前的研究相一致, 表明丙戊酸盐导致的大鼠ASD模型中存在氧化应激的改变, 而 *Gsta 3*、*Ggt 7*、*G6pd* 的表达变化可能处于氧化应激和炎症变化的上游。



注：共显示267个差异基因/蛋白之间的相互作用关系

图3 蛋白质-蛋白质相互作用网络分析图



注：紫色的表示上升基因，绿色表示下调基因，黄色为与G6pd2有关联的基因

图4 蛋白质-蛋白质相互作用网络图的节点联合基因表达的LogFC分析图

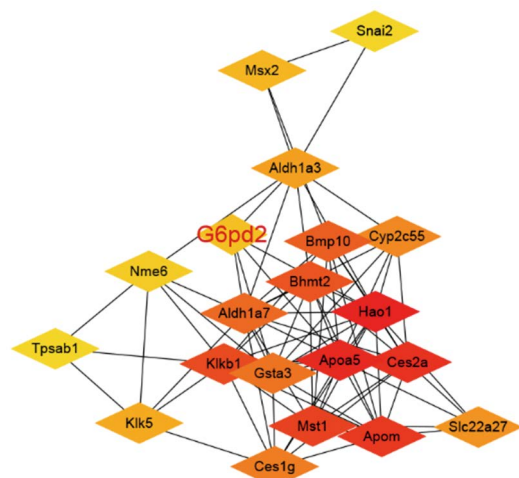


图5 蛋白质-蛋白质相互作用网络图中的20个关键基因

表2 引物序列表

| 基因            | 正向引物                 | 反向引物                 |
|---------------|----------------------|----------------------|
| <i>GAPDH</i>  | TGATGGGTGTAACCCAGCAG | AGTGATGGCATGGACTGTGG |
| <i>Gsta 3</i> | AGCCAGTCTTCACTACTT   | CAAACCTCCATCACTTCTT  |
| <i>Ggt 7</i>  | CCACCTAATTGATTCCG    | GCCTGCCATAGAGTTGAT   |
| <i>G6pd2</i>  | GCCCCTAACTCCTATGTA   | TGTTCTTGCTGACTGCTT   |

注: *GAPDH* 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; *Gsta 3* 谷胱甘肽S-转移酶 α 3; *Ggt 7* γ-谷氨酰转移酶7; *G6pd* 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶

表3 丙戊酸盐组和健康对照组成年大鼠谷胱甘肽代谢通路基因的mRNA表达水平比较(2<sup>-ΔΔCt</sup>,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别         | 只数 | <i>Gsta 3</i> | <i>Ggt 7</i>  | <i>G6pd</i>   |
|------------|----|---------------|---------------|---------------|
| 丙戊酸盐组      | 4  | 1.053 ± 0.531 | 1.037 ± 0.317 | 0.233 ± 0.305 |
| 健康对照组      | 4  | 1.095 ± 0.560 | 1.255 ± 0.163 | 1.308 ± 0.595 |
| <i>t</i> 值 |    | -0.101        | 1.184         | -2.783        |
| <i>P</i> 值 |    | 0.923         | 0.294         | 0.050         |

注: *Gsta 3* 谷胱甘肽S-转移酶 α 3; *Ggt 7* γ-谷氨酰转移酶7; *G6pd2* 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶

本研究结果显示,健康对照组和丙戊酸盐组成年大鼠 *Gsta 3*、*Ggt 7* 基因的 mRNA 表达水平比较差异无统计学意义,而丙戊酸盐组中 *G6pd* 基因的表达水平低于健康对照组,差异有统计学意义。*G6pd* 位于 X 染色体,主要功能是产生 NADPH。作为一种电子供体可提供电子而抵御氧化应激的基因, NADPH 是谷胱甘肽代谢通路中的重要基因之一<sup>[39]</sup>。一份病例报告显示,2 例男性患者缺乏 *G6pd* 的同时表现出 ASD 症状,表明 *G6pd* 缺乏可能是 ASD 的致病因素之一。此外,由于 *G6pd* 基因位于 X 染色体,进一步支持了 ASD 患者中男性患病率更高<sup>[40]</sup>。

综上所述,产前暴露于丙戊酸盐会导致大鼠脑组织中 *G6pd* 基因的 mRNA 表达水平降低。本研究

将生物信息学技术与实验研究结合,为以后的研究奠定了基础。但本研究存在不足之处,既对通路的上下游靶基因未进行验证,未详细阐明 *G6pd* 影响 ASD 的具体机制。未来研究可做补充,为 *G6pd2* 作为 ASD 的潜在治疗靶点提供重要的临床依据。

**利益冲突** 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

**致谢** 温州医科大学精神卫生中心的吴林蔓和昆明医科大学的杨芝兰  
**作者贡献声明** 实验设计、数据收集为金柳荫,论文修订为夏玉洁,数据分析为徐文倩,实验指导、论文审校为舒畅,实验构思与设计、论文审校为王高华

### 参 考 文 献

- [1] Yeargin-Allsopp M, Rice C, Karapurkar T, et al. Prevalence of autism in a US metropolitan area[J]. JAMA, 2003, 289(1): 49-55. DOI: 10.1001/jama.289.1.49.
- [2] Oakley B, Loth E, Murphy DG. Autism and mood disorders[J]. Int Rev Psychiatry, 2021, 33(3): 280-299. DOI: 10.1080/09540261.2021.1872506.
- [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. DOI: 10.15585/mmwr.ss6904a1.
- [4] Flax J, Gwin C, Wilson S, et al. Social (Pragmatic) communication disorder: another name for the broad autism phenotype?[J]. Autism, 2019, 23(8): 1982-1992. DOI: 10.1177/1362361318822503.
- [5] Bhandari R, Paliwal JK, Kuhad A. Neuropsychopathology of autism spectrum disorder: complex interplay of genetic, epigenetic, and environmental factors[J]. Adv Neurobiol, 2020, 24: 97-141. DOI: 10.1007/978-3-030-30402-7\_4.
- [6] Mesdjian E, Ciesielski L, Valli M, et al. Sodium valproate: kinetic profile and effects on GABA levels in various brain areas of the rat[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 1982, 6(3): 223-233. DOI: 10.1016/s0278-5846(82)80172-3.
- [7] VanDongen AM, VanErp MG, Voskuyl RA. Valproate reduces excitability by blockage of sodium and potassium conductance[J]. Epilepsia, 1986, 27(3): 177-182. DOI: 10.1111/j.1528-1157.1986.tb03525.x.
- [8] Liu H, Tan M, Cheng B, et al. Valproic acid induces autism-like synaptic and behavioral deficits by disrupting histone acetylation of prefrontal cortex ALDH1A1 in rats[J]. Front Neurosci, 2021, 15: 641284. DOI: 10.3389/fnins.2021.641284.
- [9] Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, et al. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid[J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 479364. DOI: 10.1155/2010/479364.
- [10] Chomiak T, Turner N, Hu B. What we have learned about autism spectrum disorder from valproic acid[J]. Patholog Res Int, 2013, 2013: 712758. DOI: 10.1155/2013/712758.
- [11] Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, et al. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei[J]. J Comp Neurol, 1996, 370(2): 247-261. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960624)370:2<&t; 247: : AID-CNE8&gt; 3.0.CO; 2-2.

- [ 12 ] Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository[ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1): 207-210. DOI: 10.1093/nar/30.1.207.
- [ 13 ] Nilsson S, Helou K, Walentinsson A, et al. Rat-mouse and rat-human comparative maps based on gene homology and high-resolution zoo-FISH[ J ]. *Genomics*, 2001, 74(3): 287-298. DOI: 10.1006/geno.2001.6550.
- [ 14 ] Schneider T, Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism[ J ]. *Neuropsychopharmacology*, 2005, 30(1): 80-89. DOI: 10.1038/sj.npp.1300518.
- [ 15 ] Dellu F, Piazza PV, Mayo W, et al. Novelty-seeking in rats: biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man[ J ]. *Neuropsychobiology*, 1996, 34(3): 136-145. DOI: 10.1159/000119305.
- [ 16 ] Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents[ J ]. *Nat Protoc*, 2007, 2(2): 322-328. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
- [ 17 ] Reger ML, Hovda DA, Giza CC. Ontogeny of Rat Recognition Memory measured by the novel object recognition task[ J ]. *Dev Psychobiol*, 2009, 51(8): 672-678. DOI: 10.1002/dev.20402.
- [ 18 ] de Brouwer G, Wolmarans W. Back to basics: a methodological perspective on marble-burying behavior as a screening test for psychiatric illness[ J ]. *Behav Processes*, 2018, 157: 590-600. DOI: 10.1016/j.beproc.2018.04.011.
- [ 19 ] Davis S, Meltzer PS. GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor[ J ]. *Bioinformatics*, 2007, 23(14): 1846-1847. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm254.
- [ 20 ] Xia X, McClelland M, Wang Y. WebArray: an online platform for microarray data analysis[ J ]. *BMC Bioinformatics*, 2005, 6: 306. DOI: 10.1186/1471-2105-6-306.
- [ 21 ] Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data[ J ]. *Bioinformatics*, 2016, 32(18): 2847-2849. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw313.
- [ 22 ] Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[ J ]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57. DOI: 10.1038/nprot.2008.211.
- [ 23 ] Yu G, Wang LG, Han Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[ J ]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284-287. DOI: 10.1089/omi.2011.0118.
- [ 24 ] Walter W, Sánchez-Cabo F, Ricote M. GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis[ J ]. *Bioinformatics*, 2015, 31(17): 2912-2914. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv300.
- [ 25 ] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(43): 15545-15550. DOI: 10.1073/pnas.0506580102.
- [ 26 ] Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible[ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362-D368. DOI: 10.1093/nar/gkw937.
- [ 27 ] Chin CH, Chen SH, Wu HH, et al. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome[ J ]. *BMC Syst Biol*, 2014, 8 Suppl 4: S11. DOI: 10.1186/1752-0509-8-S4-S11.
- [ 28 ] Mabunga DF, Gonzales EL, Kim JW, et al. Exploring the validity of valproic acid animal model of autism[ J ]. *Exp Neurobiol*, 2015, 24(4): 285-300. DOI: 10.5607/en.2015.24.4.285.
- [ 29 ] Kataoka S, Takuma K, Hara Y, et al. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid[ J ]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2013, 16(1): 91-103. DOI: 10.1017/S1461145711001714.
- [ 30 ] Munji RN, Choe Y, Li G, et al. Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors[ J ]. *J Neurosci*, 2011, 31(5): 1676-1687. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5404-10.2011.
- [ 31 ] Jung GA, Yoon JY, Moon BS, et al. Valproic acid induces differentiation and inhibition of proliferation in neural progenitor cells via the beta-catenin-Ras-ERK-p21Cip/WAF1 pathway[ J ]. *BMC Cell Biol*, 2008, 9: 66. DOI: 10.1186/1471-2121-9-66.
- [ 32 ] Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, et al. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations[ J ]. *Physiol Rev*, 2007, 87(4): 1215-1284. DOI: 10.1152/physrev.00017.2006
- [ 33 ] Ilic Z, Mondal TK, Guest I, et al. Participation of liver stem cells in cholangiocarcinogenesis after aflatoxin B(1) exposure of glutathione S-transferase A3 knockout mice[ J ]. *Tumour Biol*, 2018, 40(5): 1010428318777344. DOI: 10.1177/1010428318777344.
- [ 34 ] Wang X, Zhang L, Chan F, et al. Gamma-glutamyltransferase 7 suppresses gastric cancer by cooperating with RAB7 to induce mitophagy[ J ]. *Oncogene*, 2022, 41(26): 3485-3497. DOI: 10.1038/s41388-022-02339-1.
- [ 35 ] Ross MA. Could oxidative stress be a factor in neurodevelopmental disorders?[ J ]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2000, 63(1/2): 61-63. DOI: 10.1054/plef.2000.0192.
- [ 36 ] Mondal A, Mukherjee S, Dar W, et al. Role of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency and its association to Autism Spectrum Disorders[ J ]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(10): 166185. DOI: 10.1016/j.bbdis.2021.166185.
- [ 37 ] James SJ, Cutler P, Melnyk S, et al. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism[ J ]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 80(6): 1611-1617. DOI: 10.1093/ajcn/80.6.1611.
- [ 38 ] Al-Amin MM, Rahman MM, Khan FR, et al. Astaxanthin improves behavioral disorder and oxidative stress in prenatal valproic acid-induced mice model of autism[ J ]. *Behav Brain Res*, 2015, 286: 112-121. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.02.041.
- [ 39 ] Allahverdiyev AM, Bagirova M, Elcecek S, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: a method to detect primaquine-induced hemolysis in vitro[ EB/OL ]. (2012-11-14) [ 2022-05-01 ]. <https://www.intechopen.com/chapters/40928>.
- [ 40 ] Al-Salehi SM, Ghaziuddin M. G6PD deficiency in autism: a case-series from Saudi Arabia[ J ]. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 2009, 18(4): 227-230. DOI: 10.1007/s00787-008-0721-9.

(收稿日期: 2022-07-04)

(本文编辑: 赵金鑫)