



8周有氧运动对孤独症小鼠核心行为的改善作用*

刘 组^{1,2)} 薛亚奇¹⁾ 王世娇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 探讨8周有氧运动对丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)诱导的雌雄孤独症小鼠核心行为的改善作用。方法 将实验动物随机分为对照组(CTL)、丙戊酸诱导孤独症组(VPA)和VPA+有氧运动组(VEX), 每组10只。孕鼠在E12.5时腹腔单次注射VPA, 其子代可作为孤独症模型。子鼠出生28 d后开始有氧运动训练。运动结束后次日通过行为学检测方法考察小鼠进行社交能力、重复刻板行为、认知和学习记忆能力、探索行为、情绪等。结果 CTL组小鼠与社会伙伴互动时间长, 对新社会伙伴有明显社交倾向($P<0.01$); VPA组雌雄小鼠对旧社会伙伴均无明显差异; 有氧运动可显著改善孤独症小鼠这一缺陷。与CTL组相比, VPA组小鼠认知指数、目标象限停留时间、穿台次数、中心区域活动距离、开放臂停留时间和白箱活动的距离、时间均显著性降低($P<0.01$), 而寻找平台潜伏期, 埋珠颗数和自梳理时间均显著性增加($P<0.01$); 与VPA组相比, VEX组小鼠在有氧运动干预后认知指数、目标象限停留时间、穿台次数、中心区活动距离、开放臂停留时间均显著性增高($P<0.05$), 埋珠颗数和自梳理时间显著性降低($P<0.01$, $P<0.05$)。结论 孤独症小鼠存在社交和认知能力障碍、重复刻板行为、活动量下降和焦虑情绪现象。8周有氧运动可改善孤独症小鼠社交和认知能力, 缓解刻板重复行为, 提高活动量, 积极调节焦虑情绪。推测有氧运动在孤独症的运动康复中具有重要作用, 可能为临床研究提供理论基础。

关键词 有氧运动, 孤独症谱系障碍, 行为学**中图分类号** Q95-336, R742.8+9**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0135

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)是一种以神经心理和行为缺陷为特征的发育障碍性疾病, 包括孤独症、阿斯伯格综合症、童年瓦解性障碍等, 核心特征为社交障碍和刻板重复行为, 并伴随认知和运动功能障碍、智力低下和注意力障碍等精神或神经性疾病^[1-2]。ASD多发生于3岁前, 脑部不可逆性的异常发育导致患儿成年后无法自主生活。2023年3月24日, 美国疾控中心(CDC)公布, 每36名8岁儿童中就有1名患孤独症疾病^[3]。由于治病原因不明, 临床无特效药, 目前孤独症已严重危害儿童的身心健康和家庭幸福^[4]。因此, 深入研究ASD发生发展, 寻找防控孤独症的有效干预方法是国内外亟需解决的重要问题。

运动作为对全身器官的有益刺激之一, 在提高社交功能领域的作用日益凸显。因其低成本、易开展、副作用小、便于融入教育体系且效果显著等优

势, 运动广泛被应用于儿童青少年身体和精神类疾病的干预康复治疗领域, 也成为ASD非药物干预的首选方法之一。研究表明, 体育锻炼可以改善孤独症患者的社会交往缺陷^[5], 减少攻击行为和刻板行为^[6]。不同类型的运动干预, 包括游泳、骑自行车、散步和慢跑, 已被证明可有效改善ASD患者的社交和认知功能以及行为异常^[7]。此外, 12周(5次/周, 40 min/次)的迷你篮球培训项目(MBTP)可促进孤独症的学龄前儿童身体适配性测试的性能, 特别在速度-敏捷性和肌肉力量方面^[8], 表明12周MBTP可改善ASD学龄前儿童的体能和社会交流。动物实验也表明, 8周的游泳运

* 北京市自然科学基金(7232239)和陕西省社会科学基金(2023Q017)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 15910662635, E-mail: zzpxt@bnu.edu.cn

收稿日期: 2024-04-02, 接受日期: 2024-05-20

动可改善 *Shank3*^{-/-} 孤独症大鼠社交障碍, 提高认知功能^[9]。综上所述, 体育锻炼对 ASD 患者的改善作用主要体现在情绪^[10-11]、社交沟通能力^[12-13]、执行能力^[7]、刻板行为^[14]和运动技能^[5, 15]等方面, 但这些研究均只聚焦于孤独症的某一特定行为, 对孤独症其他核心特征却无系统报道。此外, 这些研究多采用雄性作为实验对象^[16], 运动对雌性孤独症的核心症状的作用未见报道。综上所述, 本文探究 8 周有氧运动对丙戊酸 (valproic acid, VPA) 诱导的孤独症小鼠的社交能力、重复刻板、认知和学习记忆能力, 探索行为和焦虑情绪等核心行为的影响, 以期对 ASD 临床运动康复干预提供新方法和理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

所有雌雄 C57BL/6J 小鼠 3~4 周龄, 体重 (20±1.5) g, 购于西安市辉石生物科技有限公司。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。动物饲养采用标准光照/黑暗循环 (光照时间为上午 8:00 至下午 8:00), 温度 (22±2) °C, 湿度 (55±5) %, 自由进食和饮水。

实验小鼠适应性饲养 2 周后, 按照 1:2 将雄雌小鼠合笼, 有阴栓的雌鼠记为妊娠第 0.5 天 (E0.5), 受孕雌鼠分笼单独饲养。将孕鼠随机分为对照组和孤独症组: 孤独症组 ($n=10$) 于 E12.5 时腹腔注射 500 mg/kg VPA (Sigma, 美国); 对照组 ($n=10$) 于 E12.5 时腹腔注射等量生理盐水溶液。幼鼠出生 28 d 后断乳进行实验分组。实验分组前, 通过行为学实验检测, 将明显存在社交障碍、焦虑行为和学习记忆能力等行为学缺陷的实验小鼠视为造模成功。本实验中除去未成活的幼崽, 生理盐水对照组共获得雌雄幼崽各 10 只, 将其作为本研究的对照组 (Control, CTL); 孤独症造模组各获得 30 只雌雄幼崽, 其中雌性 24 只成模, 雄性 22 只成模, 且均存在折尾现象。本实验诱导模型成模率约为 76.7%, 将造模成功的雌雄小鼠, 分别随机分为 VPA 诱导孤独症组 (VPA) 和孤独症有氧运动组 (VPA+Exercise, VEX), 各 10 只。CTL 和 VPA 诱导孤独症组安静饲养 8 周, VEX 组进行 8 周的有氧运动训练。每窝小鼠均被随机分配到不同的行为学实验中, 每组 10 只。

1.2 有氧运动干预

幼崽出生后 4 周 (PND28) 对运动组小鼠采用动物跑台进行 8 周有氧运动干预。开始以 10 m/min 的速度运动 10 min, 然后递增至 13 m/min 的速度运动 10 min, 最后以 16 m/min 的速度坚持 40 min。训练期间尽可能选取同一时间段进行跑台训练 1 h, 5 d/周×8 周。

1.3 行为学实验

1.3.1 三箱社交实验 (three-chamber sociability test)

三箱实验主要评估社会交往能力。三箱实验将一个 60 cm×40 cm×20 cm 的盒子分为 3 个房间, 侧室通过门与中室相连。先将实验小鼠在室内适应 5 min 后开始测试, 在箱子的一侧放置一个装有同性别年龄的非同笼小鼠 (unfamiliar 1, U1) 的笼子作为社交刺激, 另一侧放置一个相同的空笼子 (empty, E), 实验鼠被放置在中间室, 自由探索 10 min。第二阶段, 将另一只同龄同性别的非同笼小鼠 (unfamiliar 2, U2) 放在空笼中, 作为新的社交刺激, 自由探索 10 min。采用 Smart 3.0 软件 (瑞沃德生命科技有限公司) 进行数据采集分析。测试后用 75% 酒精清洁实验区。社交能力 = (U1 区的探索时间 / (U1 区的探索时间 + 空笼区的探索时间)) × 100%; 社会记忆 = (U2 区的探索时间 / (U1 区的探索时间 + U2 区的探索时间)) × 100%。

1.3.2 五次社交记忆实验 (five social memory experiments)

五次社会记忆实验用于评估认知能力。五次社会记忆试验分为 5 个阶段, 其中获取阶段、检索阶段和社会新奇阶段用来获取小鼠的社会记忆和社会新颖性。将实验小鼠放入一个正方形盒子中 (50 cm×50 cm×50 cm)。获取阶段, 一只与受试小鼠同性别年龄的非同笼小鼠 1 被放在盒子中, 允许测试对象探索 1 min。10 min 后, 进行检索阶段, 对实验鼠连续进行 3 次 5 min 的试验, 每次测试间隔 10 min。在社交新奇阶段, 将非同笼小鼠 1 替换为另一只同性别年龄的非同笼小鼠 2, 进行社交新奇性测试, 用摄像机记录五次社会记忆实验的行为。采用 Smart 3.0 软件 (瑞沃德公司) 进行数据采集分析。每次测试后, 使用 75% 酒精清洁实验区。

1.3.3 自我梳理实验 (self-grooming test)

小鼠梳理毛发的天性可揭示其复杂的固定梳理动作模式, 用来评估重复行为。将小鼠放置在干净

的空笼中,适应 10 min。记录小鼠在 20 min 测试期间自我梳理的累计时间。梳理行为包括前肢梳理、摩擦清洗颜面、身体腹侧、尾部和生殖器清理等^[6, 17]。

1.3.4 新物体识别实验 (novel object recognition, NOR)

新物体识别实验主要用于评价小鼠的物体识别能力和记忆能力。将两个等同的 A 物体放置在测试箱中的相对两侧,物体距箱壁约 10 cm;随后将小鼠放入测试箱内,自由探究 10 min 后取出。1 h 后,将测试箱内的某个 A 物体(熟悉物体)随机替换为 B 物体(新物体),位置保持不变,放入实验小鼠探究 5 min 后取出。分别记录小鼠对物体 A 与物体 B 的探究时间,计算辨别指数以评估记忆能力,辨别指数(recognition index, RI) = (物体 B 探究时间) / (物体 B 探究时间 + 物体 A 探究时间) × 100%。

1.3.5 Morris 水迷宫实验 (Morris water maze experiment)

水迷宫实验利用小鼠逃离水域的天性来评价小鼠的学习记忆能力,分为两个阶段:定向航行实验阶段和空间探索阶段。实验前 1 周,测试者每天与实验小鼠接触 5 min,减少测试者对小鼠的刺激。实验前 1 天,将实验小鼠放在测试房内适应一晚。

定向航行实验阶段:第 1 天,在水迷宫周围设置固定的标识物,将平台放置在第三象限,露于水面 2 cm,使小鼠能看见平台;时间设置为 120 s,若小鼠 120 s 内找到并躲避到平台上,让小鼠在平台上熟悉环境 15 s,进行下一只小鼠实验;若小鼠未能在 120 s 内找到平台,实验者需引导小鼠爬到平台上并熟悉环境 15 s。实验小鼠每天需从 4 个不同象限位置分别进入水域。获得性训练的第 1~4 天,将平台放于水面下,将小鼠分别于不同象限面朝游泳池壁的姿势放入水,录像观察记录,小鼠找到平台逃避潜伏期和游泳路径,记录潜伏期,绘制曲线。

空间探索阶段:定向航行实验结束 24 h 后撤出平台,设置虚拟平台,小鼠由第一象限面朝游泳池壁的姿势入水,全程 120 s 记录小鼠的移动路径、目标象限停留时间和穿越虚拟平台的次数。

1.3.6 弹珠埋藏实验 (marble-burying test)

挖掘和掩埋是小鼠的一种典型行为,实验最初用于评估啮齿类动物的焦虑行为,但 2009 年 Thomas 等^[17]更偏向于其为测量重复性或强迫性挖

掘行为的测试,并可以定量地检测 ASD 小鼠模型中重复刻板行为。实验时将干净、无味的小鼠垫料加入饲养笼中(30 cm×17 cm×16 cm),深度为 5 cm,将垫料压平压实;标准玻璃弹珠(直径约为 2 cm,重量约为 5 g)轻轻地放在垫料表面,组成一个 4×5 的矩阵,记录 20 min 内小鼠掩埋弹珠的颗数。每次实验均更换鼠笼和垫料,并用 75% 酒精清洗弹珠,使用前晾干。

1.3.7 旷场实验 (open field test, OFT)

旷场实验主要用于评估实验小鼠在新环境的运动量。将实验小鼠放入一个 50 cm×50 cm×50 cm 的正方形盒,采用 Smart 3.0 软件对实验小鼠进行 10 min 数据采集分析。每只实验小鼠测试完后用 75% 酒精清洁实验区。运动活动的评估采用总移动距离和时间进行分析。

1.3.8 黑白箱穿梭实验

黑白箱是一个由有盖的不透明黑箱(30 cm×20 cm×30 cm)和无盖的透明白箱(30 cm×20 cm×30 cm)组成,黑白箱之间开一个 5 cm×7 cm 的门洞。实验记录小鼠在 10 min 内白箱的停留时间和距离。

1.3.9 高架十字迷宫实验 (elevated plus maze, EPM)

高架十字迷宫主要评价啮齿类动物焦虑反应的实验方法,该实验具有操作简单的优点,能直观反映小鼠的条件应答。EPM 由开臂(open arms)和闭臂(closed arms)各两条组成,呈十字形交叉,交叉部分为中央区,臂宽 5 cm,臂长 35 cm,闭臂高 15 cm,迷宫离地高度约 40~55 cm 左右。迷宫距离地面的高度相当于人类站在悬崖边,易导致动物产生恐惧不安的心理,因此通过对比小鼠在开臂和闭臂内的滞留时间和路程来评价小鼠的焦虑行为。

实验前,让实验动物适应实验室环境至少 3 h,以减少动物紧张。将小鼠从饲养笼中取出,背向实验员,轻轻放在十字迷宫的中央区域,动物面向开臂,然后实验员迅速安静地离开;采用 Smart 3.0 分析软件,跟踪动物在高架十字迷宫仪器内的轨迹运动,实验时长为 5 min。实验结束后,用酒精和纸巾清洁迷宫。

1.4 数据统计

行为学实验数据采用 Smart 3.0 软件进行采集。所有实验数据均用 SPSS 软件分析并处理。通过 Shapiro-Wilk 检验研究对象的正态分布情况,采用 Levene 检验来检验组间残差齐性。符合以上条件

的数据运用单因素方差分析法 (one-way analysis of variance, ANOVA); 非正态分布的数据采用非参数检验进行分析。组间比较采用最小显著性差异法 (least significant difference, LSD), 组内比较采用重复测量方差分析, 配对 t 检验。直方图由 GraphPad Prism 8.0 软件绘制。所有结果均以平均值 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ SEM) 表示, 显著性差异选择 $P<0.05$ 水平。

2 结 果

2.1 孤独症自发性恢复情况

为检测孤独症小鼠在8周内的自发性恢复情况

况, 本研究采用三箱实验、新物体识别实验、旷场实验和自梳理实验, 将孤独症小鼠的社交行为、认知能力、运动量和焦虑行为以及刻板重复行为等进行前后8周对比。三箱实验结果显示, 孤独症雌雄小鼠的社交倾向在8周前后并无明显差异 (图 1a, b); 新物体识别结果显示, 孤独症实验小鼠前后8周认知指数并无明显变化 (图 1c); 旷场实验结果显示, 孤独症实验小鼠活动总距离和中心区域停留时间均在8周内无明显改善 (图 1d, e); 自梳理时间在前8周也无明显变化 (图 1f)。综上表明, 本实验孤独症小鼠无明显的自发性恢复情况。

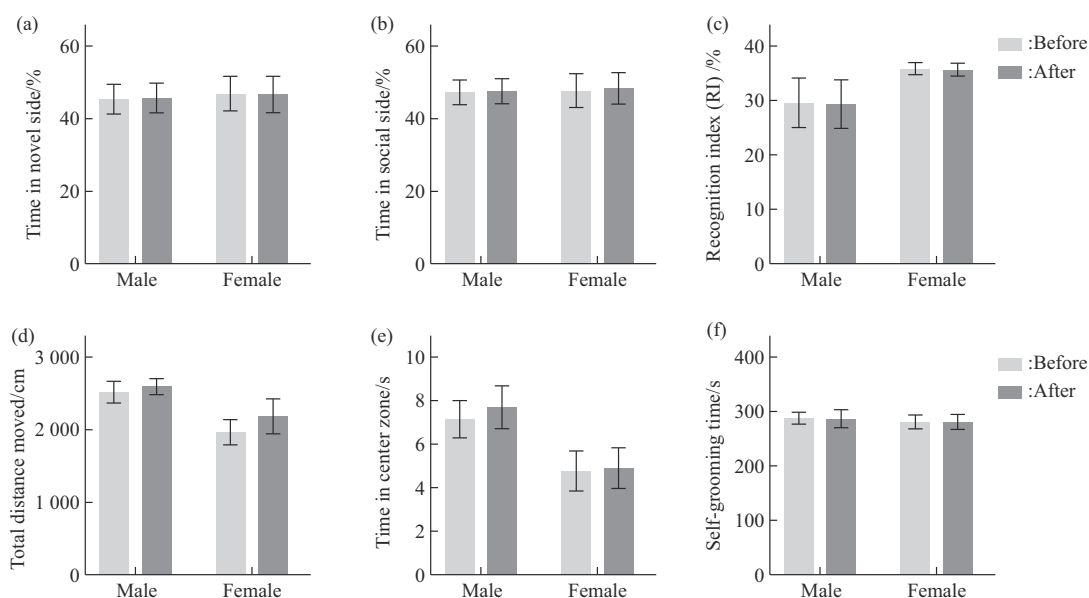


Fig. 1 Behavioral results in mice with autism

Detection of spontaneous recovery in autistic mice before and after 8 weeks using behavioral experimental methods. (a, b) Three-chamber sociability test; (c) novel object recognition; (d, e) open field test; (f) self-grooming test.

2.2 有氧运动改善不同性别孤独症小鼠的社交障碍

五次社交记忆实验和三箱社交实验均能有效评估小鼠的社交能力。五次社交记忆实验结果显示: 与第1次社交相比, CTL组小鼠在第4次社交时在交互区停留的总距离和时间百分比均显著性下降 ($P<0.01$); 与第4次社交相比, 实验小鼠第5次在社交交互区停留的总距离和时间百分比显著性上升 ($P<0.01$); VPA组雌雄小鼠第4次和第5次在社交交互区停留的总距离和时间百分比均无明显变化; 与第1次社交相比, VEX组雌性小鼠第4次社交时在交互区停留的总距离和时间百分比以及雄性小鼠

时间百分比均显著性下降 ($P<0.01$, $P<0.05$); 与第4次社交相比, 实验雌雄小鼠第5次在社交交互区停留的总距离和时间百分比均显著性上升 ($P<0.01$, $P<0.05$, 图2)。

三箱社交实验的第一阶段结果显示: 与空笼 (E) 暴露时间相比, CTL组雌雄小鼠社会伙伴U1互动的的时间更长 ($P<0.01$); VPA组雌雄小鼠社会伙伴U1和空笼子E间的互动无明显差异 ($P<0.01$); VEX组雌雄小鼠与社会伙伴U1互动得时间更长 ($P<0.01$, 图3)。表明VPA诱导的孤独症小鼠表现出社会偏好缺陷, 而有氧运动可改善这种社会偏好缺陷。

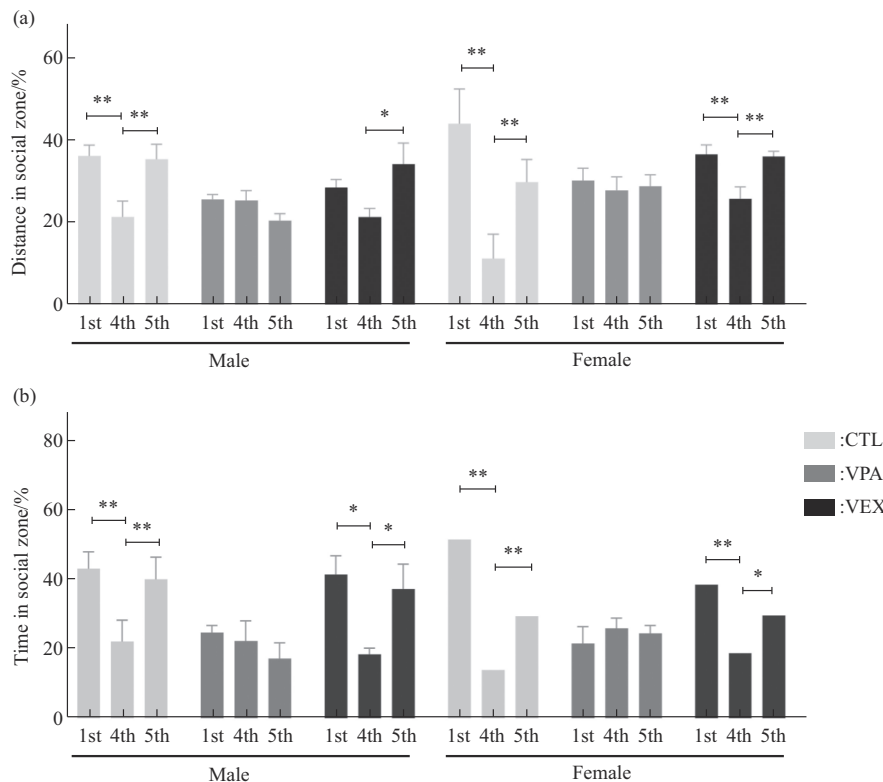


Fig. 2 Results of five social memory experiments in mice

Percentage of experimental mice were in the socialization area for 1st, 4th, and 5th in the experiment in terms of distance and time. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

三箱测试的第二阶段结果显示,与旧伙伴U1暴露时间相比,CTL组雌雄小鼠对新的社会伙伴U2表现出明显的社交倾向($P < 0.01$),VPA组的小鼠则没有显著性改变,VEX组雌雄小鼠有氧运动则显著改善孤独症雌雄小鼠的这一缺陷(图3)。

以上实验表明,VPA诱导的孤独症雌雄小鼠存在显著性的社会记忆缺陷,而8周有氧运动可改善这一缺陷。

2.3 有氧运动改善不同性别孤独症小鼠的刻板行为

自梳理实验可评价小鼠的重复刻板行为。该结果显示,与CTL组相比,VPA组雌雄小鼠自梳理时间显著增加($P < 0.01$),有氧运动干预后显著降低雌雄小鼠的自梳理时间($P < 0.05$,图4)。表明孤独症雌雄小鼠存在显著重复刻板行为,而8周有氧运动干预可显著改善ASD小鼠重复刻板行为。

2.4 有氧运动改善不同性别孤独症小鼠的认知功能

新物体识别测试主要通过实验小鼠对已熟悉物体与新物体的探索时间长短来评价小鼠的认知记忆能力。结果显示:与CTL组相比,VPA组雌雄小

鼠认知指数显著降低($P < 0.01$);与VPA组相比,VEX组小鼠经有氧运动干预后认知指数显著增加($P < 0.05$,图5)。表明孤独症雌雄小鼠存在显著认知缺陷,而8周有氧运动干预后,显著改善ASD小鼠认知功能障碍。

2.5 有氧运动改善不同性别孤独症小鼠学习记忆能力

定位航行实验结果表明,通过训练后小鼠的逃避潜伏期呈逐日下降趋势。VPA组雌雄小鼠找到平台的潜伏期明显长于CTL组,VEX组雌雄小鼠较VPA组能更快更短地找到平台,相对VPA组小鼠表现出优秀的学习记忆能力(图6a~c)。空间探索阶段结果显示:与CTL组相比,VPA组雌雄小鼠在撤除平台后在目标象限停留时间百分比和穿越平台次数显著降低($P < 0.01$,图6d~f);与VPA组比较,VEX组小鼠在目标象限停留时间百分比和穿越平台的次数显著增加($P < 0.01$,图6d~f)。表明孤独症雌雄小鼠学习记忆能力显著性下降,8周有氧运动干预,可显著改善ASD小鼠学习记忆能力。

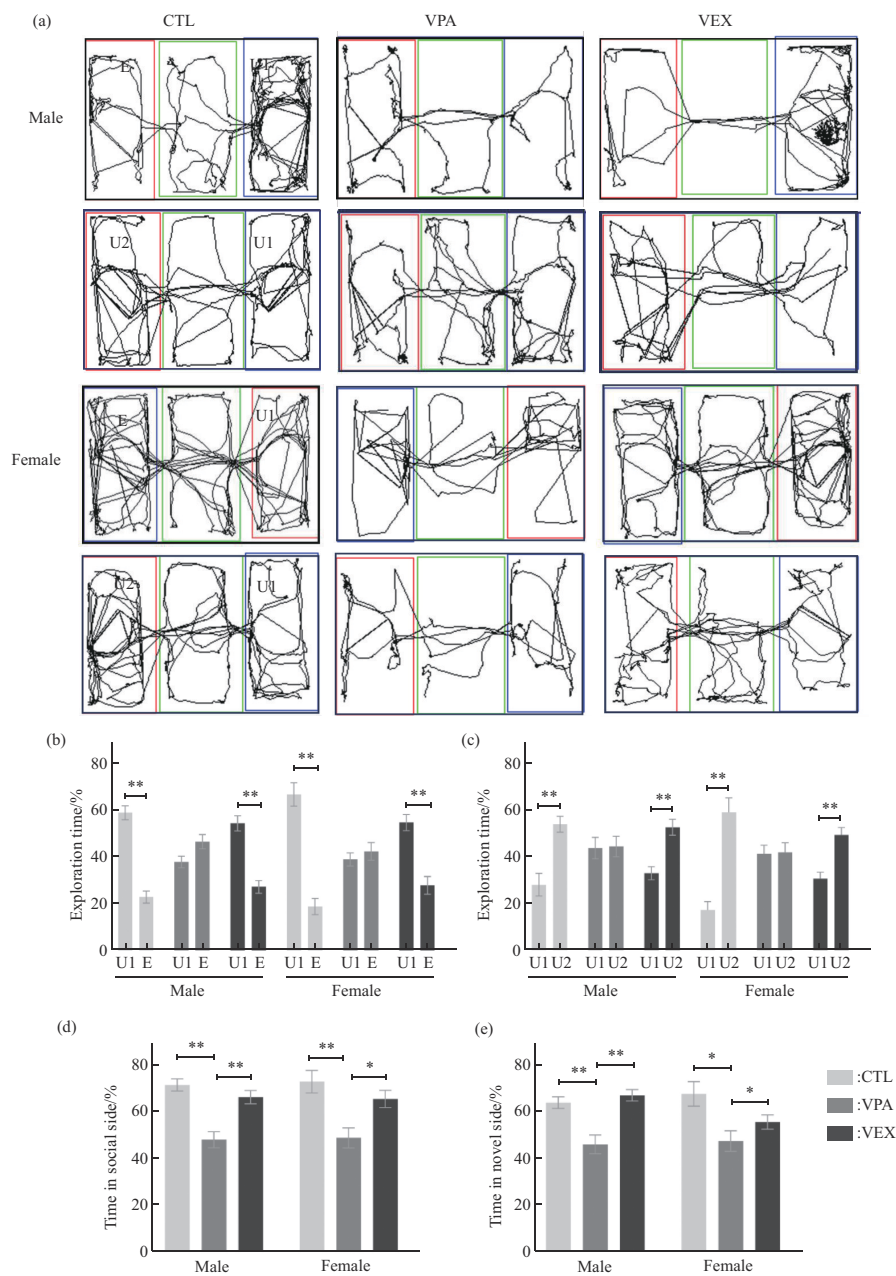


Fig. 3 Results of three-chamber sociability test

(a) Trajectory diagrams of three-box experiments for each group of mice; (b, c) time and percentage of time spent in each area by experimental mice; (d, e) social behavior and social memory of experimental mice. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

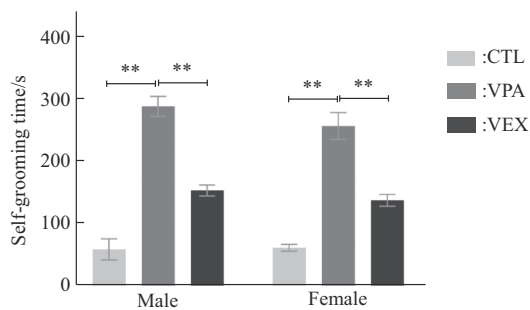


Fig. 4 Self-grooming time in mice
** $P<0.01$.

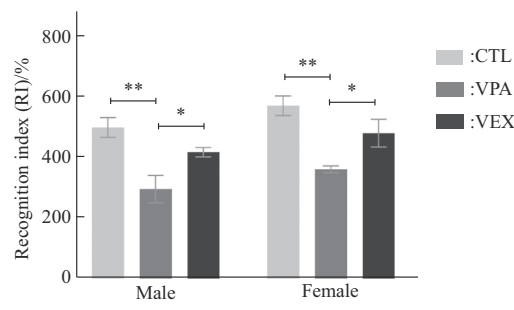


Fig. 5 Cognitive index of mice measured by novel object recognition test
* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

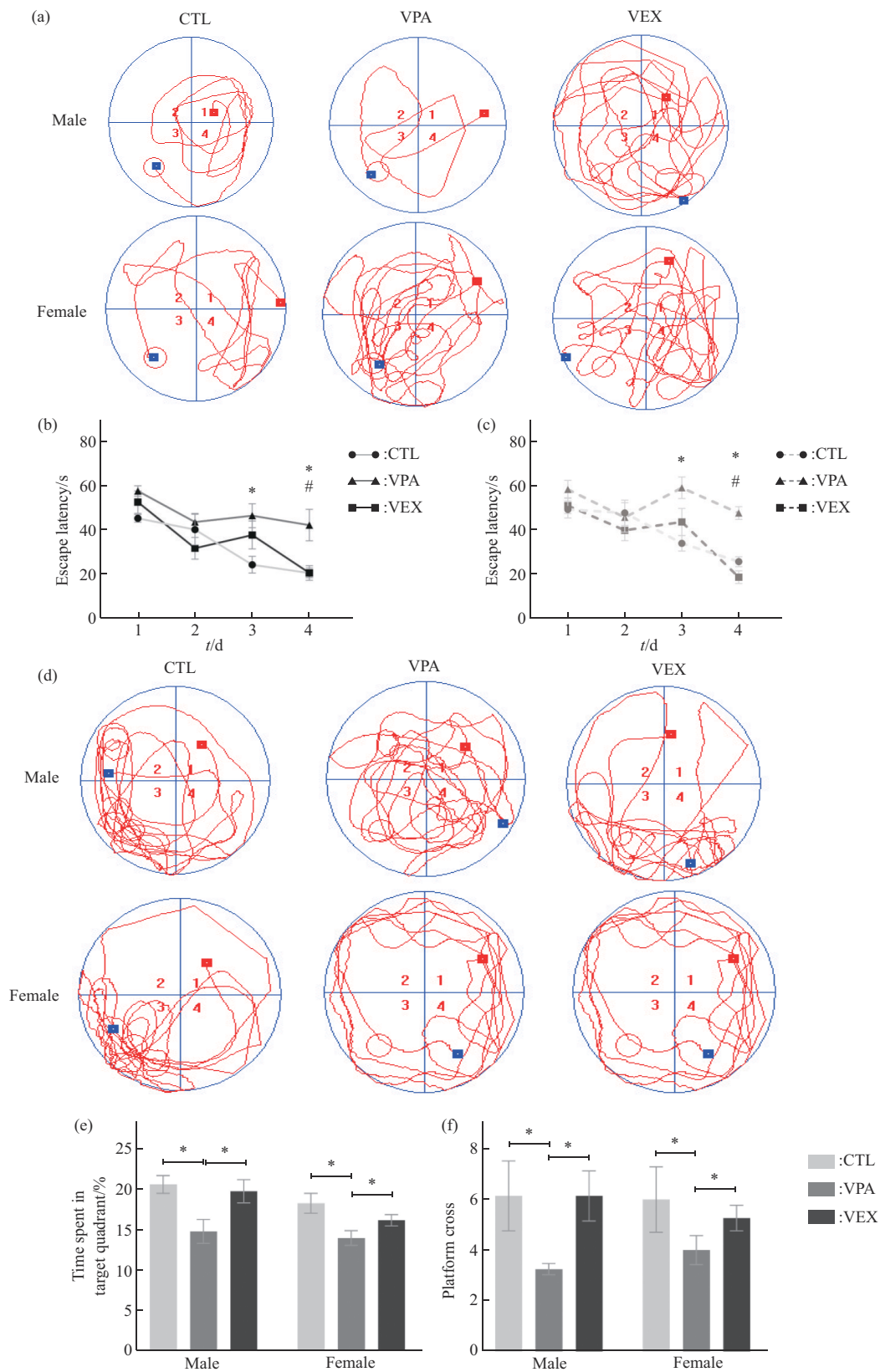


Fig. 6 Results of water maze experiment in mice

(a) Trajectory diagram of the escape latency of experimental mice in the acquisition phase of the water maze. Escape latency of male (b) and female (c) experimental mice in the acquisition phase of the water maze. * $P < 0.05$ CTL vs VPA; # $P < 0.05$ VPA vs VEX. (d) Trajectory diagram of experimental mice in the spatial exploration phase of the water maze experiment. (e) Percentage of time experimental mice stayed in the target quadrant in the spatial exploration phase. (f) The number of times the experimental rats crossed the platform during the spatial exploration phase of the water maze experiment. The target quadrant was the third quadrant. * $P < 0.05$.

2.6 有氧运动改善不同性别孤独症小鼠的活动量和探索行为

旷场实验用来检测小鼠活动量和探索行为。小鼠活动轨迹反应, VPA组雌雄小鼠自由活动的总距离和中心区域停留时间均显著低于CTL组 ($P<$

0.01), 8周有氧运动干预后均显著增加 ($P<0.01$, 图7a~c)。表明VPA诱导的雌雄孤独症小鼠自由活动度显著降低, 有氧运动可显著提升雌雄孤独症小鼠自由活动距离。

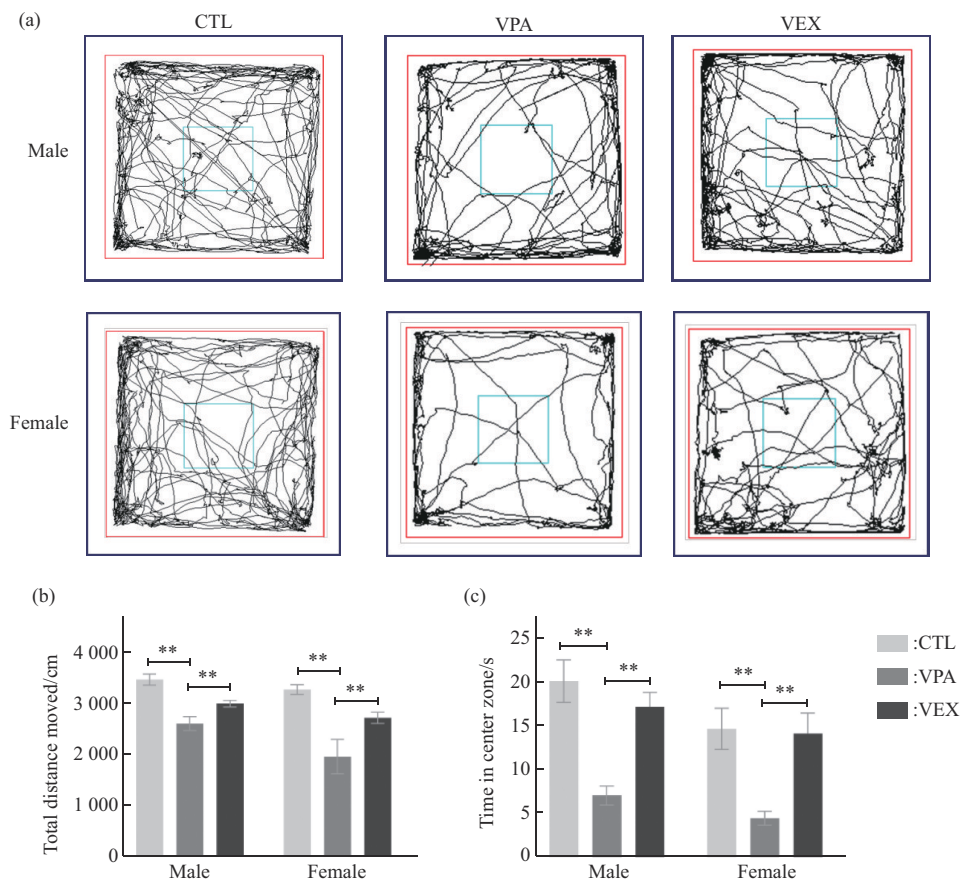


Fig. 7 Results of open field test in mice

(a) Trajectory diagrams of mice in each group in the open field. (b) Total distance that the experimental mice moved in the open field. (c) Time that the experimental mice stayed in the center area of the open field. ** $P<0.01$.

2.7 有氧运动改善不同性别孤独症小鼠的焦虑行为

高架十字迷宫、黑白箱穿梭实验和弹珠埋藏实验均用来评估实验小鼠的焦虑样行为。

高架十字迷宫实验结果表明: 与CTL组比较, VPA组雌雄小鼠进入开放臂的时间及百分比显著降低 ($P<0.01$); 与VPA组相比, VEX组雌雄小鼠在8周有氧运动干预后进入开放臂的时间和百分比均显著性增高 ($P<0.05$, 图8a~c)。

黑白箱穿梭实验结果显示: 与CTL组比较, VPA组雌雄小鼠在白箱中活动距离以及雄鼠在白箱的停留时间均显著性降低 ($P<0.01$), 雌性小鼠在

白箱停留时间虽不具显著性, 但存在下降趋势; 与VPA组比较, VEX组雌雄小鼠在白箱中活动距离和雄鼠在白箱停留时间均显著性提高 ($P<0.01$), 雌性小鼠在白箱停留时间虽不具显著性, 但存在下降趋势 ($P<0.01$, $P<0.05$, 图9a, b)。

弹珠埋藏实验结果显示: 与CTL组比较, VPA组雌雄小鼠埋珠的颗数显著性增高 ($P<0.01$); 与VPA组比较, VEX组雌雄小鼠埋珠的颗数显著性降低 ($P<0.01$, 图10)。

以上实验表明, VPA诱导的雌雄孤独症小鼠显著焦虑, 有氧运动可明显减轻孤独症小鼠样焦虑行为。

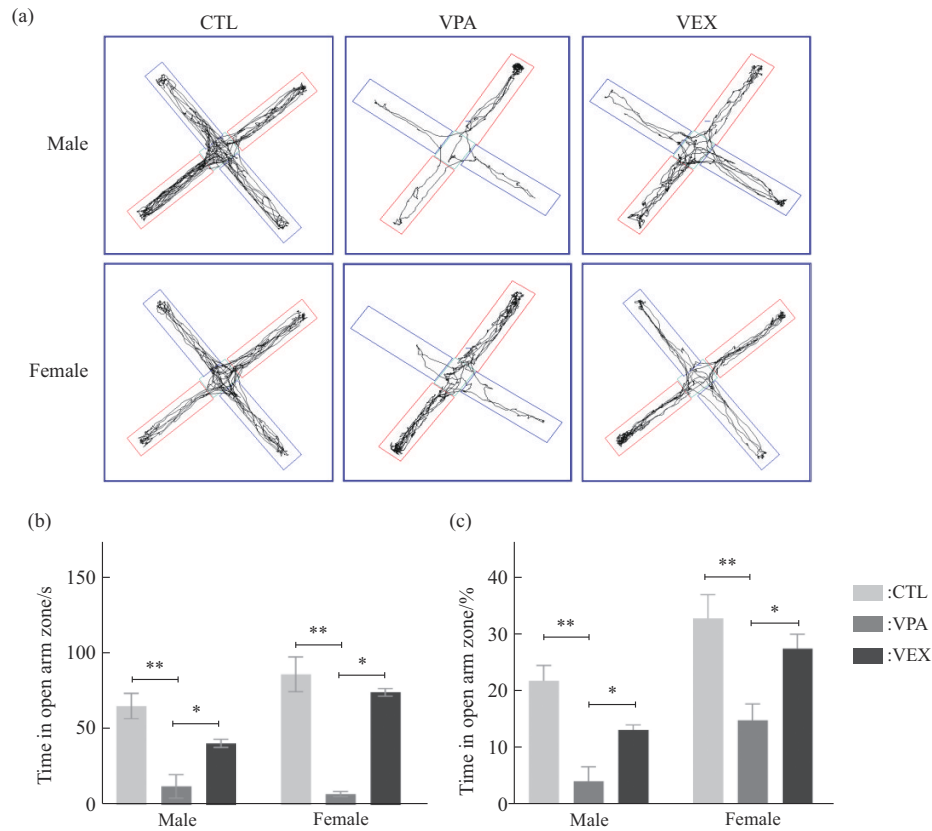


Fig. 8 Results of elevated cross maze experiments in mice

(a) Trajectory diagrams of the cross maze in each group of mice. (b) Time of experimental mice staying in the open arm. (c) Percentage of time of experimental mice staying in the open arm. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

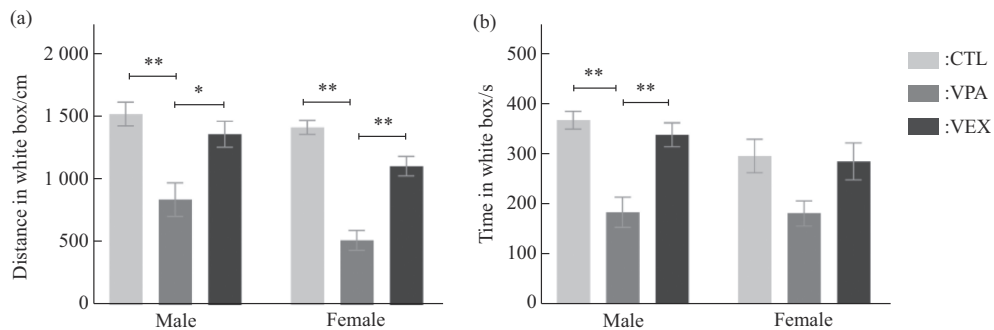


Fig. 9 Results of black and white box shuttling experiments in mice

(a) Total distance of mice in each group; (b) time of stay of mice in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

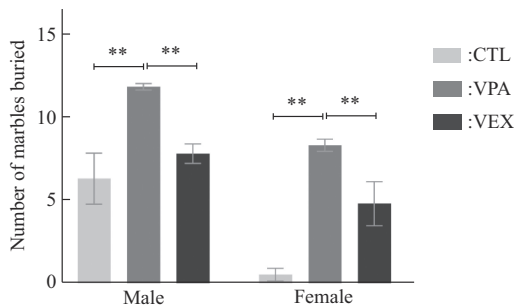


Fig. 10 Results of marble burying experiments in mice

** $P < 0.01$.

3 讨 论

孤独症现在已经严重损伤儿童的身心健康，给家庭和社会带来沉重的负担，引起国内外研究学者的广泛关注。孤独症的明确致病机制与治疗手段暂无确切证实，现有确诊手段也主要是临床医生通过量表的形式进行判断，治疗方式主要通过行为学。由于孤独症存在明显的性别差异且大量研究多以雄性为主要研究对象，致使雌性ASD患者延迟或错

过诊断和最佳的治疗时间,使不同性别间的患病率差距长期存在。因此,本研究采用VPA诱导孤独症模型,探讨8周有氧运动是否能够有效改善孤独症雌雄小鼠的核心行为,通过旷场实验、高架十字迷宫实验、黑白箱穿梭实验、埋珠实验、三箱社交实验、新物体识别、水迷宫和自梳理实验分别对实验小鼠活动量和探索行为、焦虑情绪、社交能力、认知和学习记忆能力及刻板行为进行检测。

3.1 有氧运动显著改善孤独症雌雄小鼠活动量、探索行为和焦虑情绪

孤独症患者超重、肥胖和缺乏运动的发生率比正常儿童更高^[18]。孤独症患者通常不参与体育活动,致使其成年后,体育活动参与程度持续下降^[19]。因此,孤独症儿童和青少年更有可能超重且比正常青少年更缺乏体育活动,尤其是男性患者^[20]。另研究报道,40% ASD年轻人同时患焦虑症。动物实验也发现 *Pogz*^{+/+}诱导的孤独症小鼠在高架十字迷宫中表现出焦虑情绪,其原因可能是因为小鼠大脑腹侧海马(vHPC)投射到内侧脑前额叶皮层(mPFC)的 γ 氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)能中间神经元被特异性地破坏,从而导致焦虑情绪的产生^[21]。产前接触VPA也增加子代焦虑和失乐症样行为,雄性后代海马IL-6和IFN- γ 及前额叶IFN- γ 和IL-17显著增加,雌性后代海马TNF- α 和IFN- γ 也显著增加。此外,雌性ASD小鼠的焦虑程度较雄性低,提示雄性孤独症小鼠更容易产生焦虑情绪,且运动对孤独症的治疗效果雄鼠也较雌鼠更明显^[22]。本研究发现,VPA诱导的雌雄孤独症小鼠经旷场实验、高架十字迷宫实验、黑白箱穿梭实验和弹珠埋藏实验的行为学检测,其在旷场中心区域、白箱区域停留时间和距离、开放臂停留时间和百分比均明显降低,埋藏弹珠颗数均明显增加。表明VPA诱导的雌雄孤独症小鼠活动量和探索行为显著降低,且存在明显焦虑情绪。

目前尚无有效策略用于治疗和控制孤独症的核心症状。积极的生活方式和体育锻炼可改善身体健康和生活质量。焦虑是孤独症患者常见共病,体育锻炼对缓解焦虑具有一定的有效效果。有研究比较8周和16周运动干预对24名儿童(5~18岁)家庭和学校的重度ASD患儿焦虑水平的作用。结果显示,16周的体育锻炼可减少孤独症患儿在学校环境中的焦虑样行为。同样,早期锻炼使VPA诱导的雌雄孤独症后代焦虑和快感缺乏的行为降

低^[22]。运动对孤独症焦虑情绪的改善作用,在动物层面同样得到证实^[8-9],如游泳运动能改善 *Shank3*^{-/-}孤独症大鼠的焦虑样行为^[23]。本研究发现,与VPA诱导的雌雄孤独症小鼠相比,经8周有氧运动干预后,孤独症小鼠在旷场中心区域、白箱停留时间和距离、开放臂停留时间和百分比均明显增加,埋藏弹珠的颗数显著减少。由此表明,8周有氧运动显著改善VPA诱导的雌雄孤独症小鼠活动量、探索行为和焦虑样情绪。

3.2 有氧运动显著改善孤独症雌雄小鼠社交障碍

社交互动兴趣缺乏是孤独症固有症状,最普遍的症状之一,包括做出适当反应和对他人刺激做出相应回应。孤独症患者一般表现出特定行为,如喜欢独自玩耍、避免与他人接触、对他人做出不恰当反应、避免与他人进行眼神接触、缺乏面部反应、对社交线索的理解能力差、不能适当建立同伴关系、缺乏社交情感互惠和分享乐趣、存在接受他人观点和维持与他人对话的困难等^[3],这些缺陷均使孤独症患者难与家人、同伴和其他成年人建立维持人际关系^[24]。本研究发现,VPA诱导的ASD雌雄小鼠第1次、第4次和第5次在社交区域的停留时间和距离,对空笼和社会伙伴及新社会伙伴间停留时间百分比均无显著性差异。这表明,VPA诱导的孤独症雌雄小鼠均存在显著性社会交互缺陷、社会偏好缺陷和记忆缺陷。体育锻炼对ASD儿童的社会互动和沟通能力有积极影响,特别表现在社会技能、沟通、及时反应和表达频率方面。也有学者通过Meta分析发现,体育活动对孤独症儿童的社会互动能力、交流能力、运动技能和孤独症严重程度有明显积极影响^[25]。另对50名孤独症患者进行体育活动干预后发现,孤独症儿童的社会技能和社会互动在训练中期和后期均有整体改善,在沟通、合作、社会互动和自我控制方面也出现明显改善^[26]。对229例2.3~17.3岁的ASD患儿进行研究,发现接受48周体育干预后ASD患儿的社会交往问题、注意力缺陷、情绪反应、刻板言语和运动行为以及睡眠障碍均得到改善^[27]。也有研究发现,对16名孤独症男孩进行10周游泳运动,其游泳技能和社交沟通能力均得到有效改善^[28]。这一积极作用在动物层面也得到验证,通过8周早期游泳运动干预 *Shank3* 基因外显子11~21敲除的孤独症雄性大鼠,发现 *Shank3* 缺陷的雄性大鼠社会记忆缺陷明显得到改善^[29]。表明运动对 *Shank3* 基因缺陷雄性ASD大鼠有积极作用,这为预防和恢复神经发育

障碍可能提供了一种新治疗策略,与本研究结果一致。本实验发现:经8周有氧运动训练干预的雌雄孤独症小鼠与其第1次社交相比,第4次社交时在交互区停留总距离和时间百分比以及雄性小鼠时间百分比均显著下降;与第4次社交相比,第5次社交在交互区停留总距离和时间百分比均显著上升;与空笼暴露时间相比,VEX组雌雄小鼠与社会伙伴U1互动的的时间更长;与旧伙伴U1暴露时间相比,VEX组雌雄小鼠对新的社会伙伴U2表现出明显的社交倾向。表明8周的有氧运动可显著性地逆转VPA诱导的孤独症雌雄小鼠社会交互缺陷、社会偏好缺陷和记忆缺陷。

3.3 有氧运动显著改善孤独症雌雄小鼠认知功能和刻板行为

积极的生活方式和身体活动与儿童成年期的健康和睡眠质量密切相关。对平均年龄为(8.93±1.69)岁的115名ASD男性和14名ASD女性进行为期8~48周为期不等的中低高强度的体育锻炼,每周3次,结果发现,ASD患者在体育锻炼干预后刻板行为出现次数减少1.1次,表明体育锻炼是减少ASD患儿刻板行为的有效工具。此外,动物实验也发现,通过对VPA诱导的孕鼠子代产后56 d进行8周间隔训练和连续训练,产后84~89 d进行学习记忆的认知功能测试发现,VPA诱导的孤独症雌性小鼠较雄性小鼠表现好,间隔训练明显改善ASD雌性小鼠的认知功能,而间隔训练和连续训练均能显著ASD雄性小鼠的认知功能。分析其可能原因是雌雄小鼠机体的异同^[30-31]。本研究发现,雌雄孤独症小鼠经新物体识别和自梳理实验检测,其认知指数显著降低,自梳理时间显著升高,经8周的有氧运动干预后,ASD雌雄小鼠认知指数显著升高,自梳理时间显著降低,表明8周有氧运动显著改善VPA诱导的雌雄孤独症小鼠认知功能下降和重复刻板行为。综上所述,体育锻炼对孤独症样行为具有积极作用,持续体育活动可能产生更大的改善效果,但仍需进一步的科学研究证明。

4 结 论

VPA诱导的雌雄小鼠严重存在活动量降低、社交能力和认知能力障碍、焦虑情绪以及刻板重复行为。8周有氧运动干预可提高孤独症雌雄小鼠活动量、改善社交和认知能力缺陷以及刻板重复行为,积极调节焦虑情绪。推测有氧运动在孤独症的康复中具有重要作用,但其具体的机制还有待补

充。因此,本团队将进一步通过机体代谢和神经机制等方面对有氧运动的改善作用进行深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Shultz S, Klin A, Jones W. Neonatal transitions in social behavior and their implications for autism. *Trends Cogn Sci*, 2018, **22**(5): 452-469
- [2] Kuo S S, van der Merwe C, Fu J M, *et al.* Developmental variability in autism across 17 000 autistic individuals and 4 000 siblings without an autism diagnosis: comparisons by cohort, intellectual disability, genetic etiology, and age at diagnosis. *JAMA Pediatr*, 2022, **176**(9): 915-923
- [3] Hirota T, King B H. Autism spectrum disorder: a review. *JAMA*, 2023, **329**(2): 157-168
- [4] Lord C, Brugha T S, Charman T, *et al.* Autism spectrum disorder. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, **6**(1): 5
- [5] Sarabzadeh M, Azari B B, Helalizadeh M. The effect of six weeks of Tai Chi Chuan training on the motor skills of children with Autism Spectrum Disorder. *J Bodyw Mov Ther*, 2019, **23**(2): 284-290
- [6] Simmons D H, Titley H K, Hansel C, *et al.* Behavioral tests for mouse models of autism: an argument for the inclusion of cerebellum-controlled motor behaviors. *Neuroscience*, 2021, **462**: 303-319
- [7] Liang X, Li R, Wong S H S, *et al.* The effects of exercise interventions on executive functions in children and adolescents with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med*, 2022, **52**(1): 75-88
- [8] Yoshizaki K, Asai M, Nakayama A. Impaired social facilitation on voluntary exercise of BALB/cCrSlc mice, a proposed as an autism spectrum disorder model. *Neurosci Res*, 2021, **163**: 63-67
- [9] Fairburn D J, Baiaomonte B A, Gray B E, *et al.* Voluntary exercise attenuates nociceptive abnormalities with no significant alterations of social interaction deficits in the BTBR mouse model of autism. *Behav Brain Res*, 2022, **420**: 113727
- [10] Lai M C, Szatmari P. Sex and gender impacts on the behavioural presentation and recognition of autism. *Curr Opin Psychiatry*, 2020, **33**(2): 117-123
- [11] Lord C, Elsabbagh M, Baird G, *et al.* Autism spectrum disorder. *Lancet*, 2018, **392**(10146): 508-520
- [12] Kodak T, Bergmann S. Autism spectrum disorder: characteristics, associated behaviors, and early intervention. *Pediatr Clin North Am*, 2020, **67**(3): 525-535
- [13] Baranova J, Dragunas G, Botellho M C S, *et al.* Autism spectrum disorder: signaling pathways and prospective therapeutic targets. *Cell Mol Neurobiol*, 2021, **41**(4): 619-649
- [14] Manoli D S, State M W. Autism spectrum disorder genetics and the search for pathological mechanisms. *Am J Psychiatry*, 2021, **178**(1): 30-38
- [15] Doreswamy S, Bashir A, Guarecuco J E, *et al.* Effects of diet, nutrition, and exercise in children with autism and autism

- spectrum disorder: a literature review. *Cureus*, 2020, **12**(12): e12222
- [16] Zucker I, Beery A K. Males still dominate animal studies. *Nature*, 2010, **465**(7299): 690
- [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] Curtin C, Anderson S E, Must A, *et al.* The prevalence of obesity in children with autism: a secondary data analysis using nationally representative data from the National Survey of Children's Health. *BMC Pediatr*, 2010, **10**: 11
- [19] Garcia-Pastor T, Salinero J J, Theirs C I, *et al.* Obesity status and physical activity level in children and adults with autism spectrum disorders: a pilot study. *J Autism Dev Disord*, 2019, **49**(1): 165-172
- [20] McCoy S M, Morgan K. Obesity, physical activity, and sedentary behaviors in adolescents with autism spectrum disorder compared with typically developing peers. *Autism*, 2020, **24**(2): 387-399
- [21] Cunniff M M, Markenscoff-Papadimitriou E, Ostrowski J, *et al.* Altered hippocampal-prefrontal communication during anxiety-related avoidance in mice deficient for the autism-associated gene *Pogz*. *Elife*, 2020, **9**: e54835
- [22] Barzegari A, Amouzad Mahdizadeh H, Hanani M, *et al.* Adolescent swimming exercise following maternal valproic acid treatment improves cognition and reduces stress-related symptoms in offspring mice: role of sex and brain cytokines. *Physiol Behav*, 2023, **269**: 114264
- [23] An S, Zhen Z, Wang S, *et al.* Intestinal microbiota is a key target for load swimming to improve anxiety behavior and muscle strength in shank 3^{-/-} rats. *Mol Neurobiol*, 2023. DOI: 10.1007/s12035-023-03670-8
- [24] Kato Y, Kuwabara H, Okada T, *et al.* Oxytocin-induced increase in N, N-dimethylglycine and time course of changes in oxytocin efficacy for autism social core symptoms. *Mol Autism*, 2021, **12**(1): 15
- [25] Huang J, Du C, Liu J, *et al.* Meta-analysis on intervention effects of physical activities on children and adolescents with autism. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, **17**(6): 1950
- [26] Zhao M, Chen S. The effects of structured physical activity program on social interaction and communication for children with autism. *Biomed Res Int*, 2018, **2018**: 1825046
- [27] Toscano C V A, Ferreira J P, Quinaud R T, *et al.* Exercise improves the social and behavioral skills of children and adolescent with autism spectrum disorders. *Front Psychiatry*, 2022, **13**: 1027799
- [28] Pan C Y. Effects of water exercise swimming program on aquatic skills and social behaviors in children with autism spectrum disorders. *Autism*, 2010, **14**(1): 9-28
- [29] 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
- [30] Ghahremani R, Mohammadkhani R, Salehi I, *et al.* Sex differences in spatial learning and memory in valproic acid rat model of autism: possible beneficial role of exercise interventions. *Front Behav Neurosci*, 2022, **16**: 869792
- [31] Sabet N, Abadi B, Moslemizadeh A, *et al.* The effect of low- and moderate-intensity interval training on cognitive behaviors of male and female rats with VPA-induced autism. *Heliyon*, 2023, **9**(10): e20641

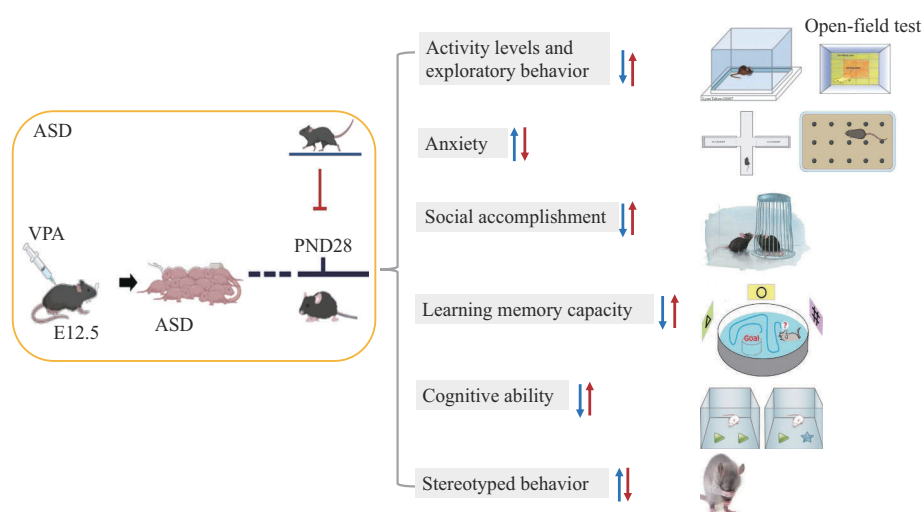
Improvement of Core Behavior in Autism Spectrum Disorder Mice by 8-Week Aerobic Exercise*

LIU Niu^{1,2)}, XUE Ya-Qi¹⁾, WANG Shi-Jiao¹⁾, 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 investigate the effect of 8-week aerobic exercise on the improvement of core behaviors of male and female autistic mice induced by valproic acid (VPA). **Methods** Experimental mice were randomly divided into the control group (CTL), VPA-induced autism group (VPA) and VPA+aerobic exercise group (VEX), with 10 mice in each group. The pregnant mice were injected with VPA intraperitoneally at E12.5, and their offspring were used as autistic mice. Pups were weaned 28 d after birth and began an 8-week aerobic exercise intervention. The day after exercise, mice were tested in behavioral experiments to detect exploratory behavior, social skills, repetitive stereotypic behavior, cognitive ability and mood. The mice were tested for social skills, repetitive stereotyped behaviors, cognitive and learning memory abilities, exploratory behaviors, and emotions by behavioral assays on the following day after the exercise. **Results** Both male and female mice in the CTL group showed a significant decrease in the total distance and percentage of time spent in the interaction zone in the 4th socialization compared to the 1st socialization ($P<0.01$); the total distance and percentage of time spent in the interaction zone in the 5th socialization was significantly increased compared to the 4th socialization ($P<0.01$); in VPA group, both male and female mice showed no significant change in the total distance and

* This work was supported by grants from Beijing Natural Science Foundation (7232239) and Shaanxi Social Science Foundation (2023Q017).

** Corresponding author.

Tel: 86-15910662635, E-mail: zzpzt@bnu.edu.cn

Received: April 2, 2024 Accepted: May 20, 2024

percentage of time spent in the interaction zone in the 4th and 5th socialization; in the VEX group, the total distance and percentage of time spent in the interaction zone by male mice in the 4th socialization was significantly decreased compared to the 1st socialization ($P<0.01$, $P<0.05$); and in the VEX group the total distance and percentage of time spent in the social interaction zone by both male and female mice in the 5th socialization was significantly increased compared to the 4th socialization ($P<0.01$, $P<0.05$). The results of the first phase of three-box socialization experiment showed that male and female mice in the CTL group spent more time socializing with their social partners than in contact with the empty cages ($P<0.01$); there was no difference in the time spent by male and female mice in the VPA group in socializing with their social partners and the empty cages; and male and female mice in the VEX group spent a longer time socializing with their social partners ($P<0.01$). The results of the second phase of three-box test showed that male and female mice in the CTL group showed a significant tendency to socialize with new social partners ($P<0.01$), whereas no significant changes were observed in the mice of VPA group; aerobic exercise significantly ameliorated this deficit in male and female mice with autism. Compared with the CTL group, VPA-induced significant decreases were observed in the total distance freely moved in the central area of the open field, the time and percentage of time spent in the open arm of cross maze, and the distance and time spent in the white box in both male and female autistic mice ($P<0.01$); a significant increase in the number of bead burials and time spent in self-grooming ($P<0.01$); a significant decrease in the cognitive index ($P<0.01$); a significantly longer latency to find the platform, and significantly decreased the percentage of time spent in the target quadrant and the number of times they traversed the platform ($P<0.01$). Compared with the VPA group, after 8 weeks of aerobic intervention, male and female mice in the VEX group showed a significant increase in total distance, open-arm dwell time, and percentage of free movement in the central area of the empty field ($P<0.05$), and a trend toward a decrease in the dwell time of females in the white box was not significant, the number of beads burying and the time of self-combing were significantly lower ($P<0.01$, $P<0.05$); and a significant increase in cognitive index ($P<0.05$), a significantly shorter time to find the platform, and significantly increased percentage of time spent in the target quadrant and the number of times they traversed the platform ($P<0.01$), showing excellent learning memory. **Conclusion** Autistic mice severely suffer from social and cognitive impairments, repetitive stereotyped behaviors, decreased activity level, and the exhibition of anxiety. 8 weeks of aerobic exercise can improve the social and cognitive abilities, alleviate the stereotyped repetitive behaviors, increase the activity level, and positively regulate the anxiety in autistic mice. It is hypothesized that aerobic exercise has an important role in motor rehabilitation of autism, in order to provide a theoretical basis for clinical research.

Key words aerobic exercise, autism spectrum disorder, behavior

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0135