分类号：_____ 学校代码：10585

密　级：_____ 学　　号：105852021100122

广州体育学院学术型硕士学位论文

运动对 ASD 大鼠前额叶皮层神经元突触结构重塑的影响及机制初探

课题来源：国家自然科学基金青年项目（32000837）

学科门类：教育学

一级学科：体育学

学科专业：运动康复

研究方向：运动损伤的预防与康复

研 究 生：封纪伟

指导教师：廖八根

二〇二四年六月

学位论文出版授权书

本人完全同意《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》（以下简称“章程”），愿意将本人的学位论文提交“中国学术期刊（光盘版）电子杂志社”在《中国博士学位论文全文数据库》、《中国优秀硕士学位论文全文数据库》中全文发表。《中国博士学位论文全文数据库》、《中国优秀硕士学位论文全文数据库》可以以电子、网络及其他数字媒体形式公开出版，并同意编入《中国知识资源总库》，在《中国博硕士学位论文评价数据库》中使用和在互联网上传播，同意按“章程”规定享受相关权益。

封纪伟

作者签名：_____

2024 年 6 月 24 日

论文题名	运动对 ASD 大鼠前额叶皮层神经元突触结构重塑的影响及机制初探				
研究生学号	105852021100122	所在院系	研究生院	学位年度	2024
论文级别	☑硕士　　□专业学位硕士 □直博(含提前攻博)　　□普博(含论文博士) (请在方框上画钩)				
作者电话		作者 E-mail			
第一导师姓名	廖八根	导师电话			

论文涉密情况：

☑ 不保密

□ 保密，保密期（_____年_____月_____日　至 _____年_____月____日）

广州体育学院
学位论文使用授权声明

本人完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，即：

研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属广州体育学院。广州体育学院拥有在著作权法规定范围内学位论文的使用权，包括：（1）已获学位的研究生必须按学校规定提交学位论文，学校可以采用影印、缩印或其他复制手段保存研究生上交的学位论文；（2）为教学和科研目的，学校可以将公开的学位论文作为资料在图书馆、资料室等场所供校内师生阅读，或在校园网上供校内师生浏览部分内容；（3）学校有权向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版或纸质版，允许学位论文被检索、查阅和借阅。

本人保证遵守上述规定。

（保密的论文在解密后遵守此规定）

作者签名：封纪伟　　导师签名：

日　　期：2024.6.24　　日　　期：2024.6.24

广州体育学院学位论文声明

本人郑重声明：本人所呈交《运动对 ASD 大鼠前额叶皮层神经元突触结构重塑的影响及机制初探》是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明并致谢。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

封纪伟

作者签名：_____　　导师签名：_____

日　　期 2024.6.24　　日　　期：2024.6.24

Dissertation Submitted to Guangzhou Sport University for Master Degree

Effect of Exercise on Synaptic Structure Remodeling of Prefrontal Cortex Neurons in ASD Rats and Its Mechanism

Master Candidate:

Supervisor:

June， 2024

摘要

背景和目的：

自闭症谱系障碍（ASD）是一种以社交沟通困难和重复刻板样行为为主要表现的神经发育障碍疾病，其发生被认为与神经元突触的结构与功能的异常变化密切相关。早期运动干预被认为可有效改善 ASD 社交行为障碍等症状，但其机制并不清楚。既往研究显示运动能促进大脑内侧前额叶皮层（mPFC）神经元突触重塑，并可能与突触后密度蛋白-95（PSD-95）、微管相关蛋白 1A（MAP1A）、微管亲和力调节激酶 1（MARK1）的变化有关。然而目前鲜有运动干预对 ASD 突触结构重塑影响及神经生物学机制的报道。本研究旨在明确 4 周中等强度的游泳结合转轮跑步运动干预是否能改善丙戊酸（VPA）诱导的雄性 ASD 模型大鼠的社交能力，以及是否逆转内侧前额叶皮层异常的突触结构重塑，并进一步检测 PSD-95、MAP1A 和 MARK1 的变化，以探讨运动调节突触可塑的可能机制。

方法：

VPA 动物模型是属于一种比较经典的、应用广泛的 ASD 模型。我们拟建立 ASD 模型大鼠：采用 SD 大鼠妊娠 10、12 天腹腔内注入 VPA（0.3g/kg）生育的雄性鼠作为自闭症模型鼠；而相同条件下注入同一浓度生理盐水的孕鼠，其生育的雄性鼠作为对照大鼠。在仔鼠第 28-35 天时，随机挑选仔鼠分为：正常对照安静组（NS）9 只、正常对照运动组（NSE）10 只、模型安静组（ASD）11 只、模型运动组（ASDE）9 只。其中各组再随机选取 3-4 只（NS 3 只、NSE 4 只、ASD 4 只、ASDE 4 只）进行神经元示踪病毒的 mPFC 区脑立体定位注射，用于树突棘形态观察。运动组进行 7 天的适应性训练，然后进行四周的正式运动干预。运动干预方案为：上午转轮跑步运动（15 转/分钟，每次 30 分钟），下午游泳运动（每次 20 分钟），每周运动干预 5 天，持续 4 周，安静组不进行运动干预。实验结束后进行三箱社交实验检测社交能力。两天后处死大鼠，取大脑内侧前额叶皮层中的边缘前皮质（PrL）和边缘下皮质（IL）进行检测。采用 Western blotting 检测 PrL，IL 区 PSD-95，突触蛋白（Syn）含量；采用 RNA 原位杂交实验（RNASCOPE）检测各组大鼠 PrL 区 *PSD-95*、*MAP1A*、*MARK1*、*PSD-95* 与 *MAP1A* 共标、*MARK1* 与 *MAP1A* 共标、*PSD-95* 与 *MARK1* 共标 RNA 阳性颗粒数；采用共聚焦显微镜观察各组树突棘形态。

结果：

（1）行为学检测结果显示：与 NS 组大鼠对比，ASD 组大鼠在陌生鼠所在箱体中的活动时间显著减少（P＜0.001），中间箱活动时间显著增加（P＜0.001）；运动干预可以有效增加 ASD 组大鼠在陌生鼠所在箱体中的活动时间（P＜0.05），降低中间箱活动时间（P＜0.05）；造模方式和生活方式两个主效应因素对大鼠在空箱的活动时间无显著影响。与 NS 组比较，ASD 组大鼠嗅探陌生大鼠的时间（P＜0.001）和频率（P＜0.05）显著下降，经运动干预后 ASDE 组的嗅探陌生大鼠的时间（P＜0.01）和频率（P＜0.01）较 ASD 组有显著改善；各组大鼠嗅探空笼的时间和频率无显著差异。

（2）树突棘形态检测结果显示：PrL 区 ASD 组对比 NS 组 ，总树突棘密度显著增加（P＜0.001），蘑菇状树突棘密度显著增加（P＜0.01），短粗状树突棘密度显著增加（P＜ 0.001）；经过运动干预后，ASDE 组对比 ASD 组，总树突棘密度明显减少（P＜0.001），蘑菇状树突棘密度显著减少（P＜0.001），短粗型树突棘密度显著减少（P＜ 0.001），各组瘦长型树突棘及 IL 区结果无显著差异。

（3）Western blotting 结果显示：PrL 区 ASD 组与 NS 组相比，PSD95 蛋白表达显著升高（P＜0.05）, Syn 蛋白表达差异不显著；IL 区结果无显著性差异。运动干预后，与 ASD 组相比，PrL 区 ASDE 组 PSD95 蛋白表达显著降低（P＜0.05）, Syn 蛋白表达差异不显著；IL 区结果无显著性差异。

（4）RNASCOPE 结果显示：PrL 区 ASD 组大鼠对比 NS 大鼠组，*PSD-95* RNA 阳性颗粒数显著增加（P＜0.01）、*MAP1A* RNA 阳性颗粒数显著增加（P＜0.001）、*MARK1* RNA 阳性颗粒数显著增加（P＜0.001）、*MAP1A* 与 *PSD-95* 共标 RNA 阳性颗粒数显著增加（P＜0.001）、*MARK1* 与 *PSD-95* 共标 RNA 阳性颗粒数显著增加（P＜0.001）、*MARK1* 与 *MAP1A* 共标阳性颗粒数显著增加（P＜0.001）；经过运动干预后，PrL 区 ASDE 组大鼠对比 ASD 大鼠组，*PSD-95* RNA 阳性颗粒数显著下降（P＜0.01）、*MAP1A* RNA 阳性颗粒数显著下降（P＜0.001）、*MARK1* RNA 阳性颗粒数显著下降（P＜0.05）、*MAP1A* 与 *PSD-95* 共标 RNA 阳性颗粒数显著下降（P＜0.001）、*MARK1* 与 *PSD-95* 共标 RNA 阳性颗粒数显著下降（P＜0.001）、*MARK1* 与 *MAP1A* 共标阳性颗粒数显著下降（P＜0.001）。

结论：

运动干预能有效改善 ASD 大鼠社交相关行为、PrL 区的异常突触重塑。运动干预改善 ASD 大鼠社交行为及树突棘结构重塑在分子水平上可能与

MARK1/MAP1A/PSD-95 相关。

关键词：自闭症障碍谱系；突触结构重塑；MAP1A/PSD-95/MARK1；运动干预

ABSTRACT

Background and purpose

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by social communication difficulties and repetitive stereotyped behaviors, accompanied by various complications, and its occurrence is considered to be closely related to the abnormal changes in the structure and function of neuronal synapses. Early exercise intervention is considered to be effective in improving symptoms such as social behavior disorder in ASD, but its mechanism is not clear. Previous studies have shown that exercise can promote synaptic remodeling of medial prefrontal cortex (mPFC) neurons, which may be related to the changes of postsynaptic density protein -95(PSD-95), microtubule-associated egg 1A(MAP1A) and microtubule affinity-regulated kinase 1(MARK1). However, there are few reports on the effect of exercise intervention on synaptic structure remodeling of ASD and its neurobiological mechanism. The purpose of this study is to find out whether four weeks of moderate-intensity swimming combined with runner running intervention can improve the social ability of male rats with ASD induced by valproic acid (VPA), and whether it can reverse the abnormal synaptic remodeling of medial prefrontal cortex, and further detect the changes of PSD-95, MAP1A and MARK1, so as to explore the possible mechanism of exercise regulating synaptic plasticity.

Methods

VPA animal model is a classic and widely used ASD model. We intend to establish ASD model rats: male SD rats were intraperitoneally injected with VPA(0.3g/kg) on the 10th and 12th day of pregnancy as autism model rats; Under the same conditions, pregnant rats injected with the same concentration of physiological saline were used as control rats. On the 28th-35th day, the offspring rats were randomly divided into normal control group (NS) with 9 rats, normal control exercise group (NSE) with 10 rats, model quiet group (ASD) with 11 rats and model exercise group (ASDE) with 9 rats. Three or four rats (NS 3, NSE4, ASD4, ASD 4) were randomly selected from each group for stereotactic injection into the brain of mPFC region of neuron tracer virus for morphological observation of dendritic spines. The exercise group received 7 days of adaptive training, and then four weeks of formal exercise intervention. The exercise intervention scheme is: running on the wheel in

the morning (15 rpm, 30 minutes each time), swimming in the afternoon (20 minutes each time), 5 days a week for 4 weeks, and no exercise intervention in the static group. After the experiment, three boxes of social experiments were conducted to test social competence. Finally, the rats were killed, and the prefrontal cortex (PrL) and subfrontal cortex (IL) in the medial prefrontal cortex of the brain were detected. The content of PSD-95 and Syn in PrL and IL were detected by Western blotting. RNA in situ hybridization (RNASCOPE) was used to detect the number of RNA positive particles in PrL region of rats in each group, including *PSD-95*, *MAP1A*, *MARK1*, *PSD-95* and *MAP1A*, *MARK1* and *MAP1A*, and *PSD-95* and *MARK1*. The morphology of dendritic spines in each group was observed by confocal microscope.

Results

(1) Behavioral test results show that compared with NS rats, the activity time of ASD rats in the box where strange rats are located is significantly reduced ($P < 0.001$), and the activity time in the middle box is significantly increased ($P < 0.001$); Exercise intervention can effectively increase the activity time of rats in ASD group in the box where strange rats are located ($P < 0.05$) and reduce the activity time in the middle box ($P < 0.05$). The two main factors, modeling mode and lifestyle, have no significant effect on the activity time of rats in empty boxes. Compared with NS group, the time ($P < 0.001$) and frequency ($P < 0.05$) for rats in ASD group were significantly decreased, and the time ($P < 0.01$) and frequency ($P < 0.01$) for rats in ASD group were significantly improved after exercise intervention. There was no significant difference in the time and frequency of sniffing empty cages in each group.

(2) Morphological examination of dendritic spines showed that compared with NS group, the density of total dendritic spines, mushroom-shaped dendritic spines and short and thick dendritic spines in ASD group in PrL area increased significantly ($P < 0.001$). After exercise intervention, compared with ASD group, the density of total dendritic spines, mushroom-shaped dendritic spines and coarse dendritic spines in ASDE group decreased significantly ($P < 0.001$), and there was no significant difference in the results of IL area.

(3)Western blotting showed that the expression of PSD95 protein in ASD group in PrL area was significantly higher than that in NS group ($P < 0.05$), and the level of Syn protein was decreased, but the difference was not significant. Compared with NS group, the expression of PSD95 protein in ASD group in IL area increased, but there was no significant difference. The expression of Syn protein decreased slightly, but

there was no significant difference compared with the control group. After exercise intervention, compared with ASD, the expression of PSD95 protein in ASDE group in PrL area decreased significantly ($P < 0.05$), and the expression of SYN protein increased slightly, but the difference was not significant. The expression of PSD95 and Syn in IL increased slightly, but there was no significant difference between them.

(4)RNASCOPE showed that compared with NS rats, ASD rats in PrL area, *PSD-95* RNA positive particles increased significantly ($P < 0.01$), *MAP1A* RNA positive particles increased significantly ($P < 0.001$), *MARK1* RNA positive particles increased significantly ($P < 0.001$), *MAP1A* and *PSD-95* co-standard RNA positive particles increased significantly ($P < 0.001$), and *MARK1* and *PSD-95* co-standard RNA positive particles increased significantly. After exercise intervention, ASDE rats in PrL area compared with ASD rats, The number of positive particles of *PSD-95* RNA decreased significantly ($P < 0.01$), that of *MAP1A* RNA decreased significantly ($P < 0.001$), that of *MARK1* RNA decreased significantly ($P < 0.05$), that of *MAP1A* and *PSD-95* RNA decreased significantly ($P < 0.001$), and that of *MARK1* and *PSD-95* RNA decreased significantly.

Conclusion

Exercise intervention can effectively improve the social-related behavior and abnormal synaptic remodeling in PrL area of ASD rats. The improvement of social behavior and structural remodeling of dendritic spines by exercise intervention in ASD rats may be related to MARK1/MAP1A/PSD-95 at the molecular level.

Key words: Autism disorder pedigree ; Synaptic structural remodeling ; MAP1A/PSD-95/MARK1 ; Exercise intervention

中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
ASD	Autism spectrum disorder	自闭症谱系障碍
PFC	Prefrontal cortex	前额叶皮层
PrL	Prelimbic cortex	边缘前皮质
PSD	Postsynaptic density	突触后密度致密区
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20	含吐温 20 的 Tris 缓冲盐溶液
VPA	Valproic acid	丙戊酸
WB	Western blotting	蛋白质免疫印迹
PBS	Phosphate-Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
NMDA	N-methyl-D-aspartate receptor	N-甲基-d-天冬氨酸受体
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor	α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体
IL	Infralimbic cortex	边缘下区
ACC	Anterior cingulate cortex	前扣带皮层
PFA	Paraformaldehyde	多聚甲醛
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	聚偏二氟乙烯
mPFC	Medial prefrontal cortex	内侧前额叶皮层
PSD-95	Postsynaptic density protein 95	突触后密度蛋白 95
MAP1A	Microtubule-associated protein 1A	微管相关蛋白 1A
MARK1	Microtubule affinity regulated kinase1	微管亲和力调节激酶 1
MT	Microtubule	微管
MAP	Microtubule-associated protein	微管相关蛋白
LTP	Long-term potentiation	长时程增强
LTD	Long-term depression	长时程抑制
SEM	Standard error of mean	标准误
Rpm	Revolutions per minute	转/分钟
BLA	Basolateral amygdala	基地外侧杏仁核
GK	Guanylate kinase	鸟苷酸激酶
MAGUK	Membrane-associated guanylate kinase	膜相关鸟苷酸激酶
Syn	Synaptophysin	突触蛋白

目录

1 前言 1

2 文献综述 3

2.1 自闭症概述 3

2.1.1 自闭症的流行病学 3

2.1.2 自闭症的致病因素 3

2.1.3 自闭症的治疗方法 4

2.2 ASD 动物模型 5

2.3 ASD 神经生物学机制 6

2.3.1 前额叶皮层——ASD 治疗的关键脑区 6

2.3.2 突触结构功能异常——ASD 发病的重要机制 7

2.4 运动与 ASD 8

2.4.1 运动干预在 ASD 人体的研究 8

2.4.2 运动干预在 ASD 动物模型的研究 9

2.4.3 运动干预 ASD 神经生物学机制 10

2.5 目前存在的问题及展望 13

3 研究材料与方法 14

3.1 实验动物 14

3.2 实验仪器及试剂 14

3.2.1 实验仪器 14

3.2.2 实验试剂 15

3.2.3 实验前需准备的试剂 16

3.3 实验技术路线图 17

3.4 实验方法 17

3.4.1 构建 ASD 大鼠模型 17

3.4.2 神经元示踪病毒的 mPFC 区脑立体定位注射 18

3.4.3 运动干预方案 18
3.5 测试内容和方法 19
3.5.1 社交行为能力测试 19
3.5.2 树突棘形态观察 19
3.5.3 PrL、IL 区 PSD-95、Syn 蛋白含量 20
3.5.4 PSD-95、MAP1A、MARK1、PSD-95 与 MAP1A 共标、PSD-95 与 MARK1 共标 RNA 阳性颗粒数 21
3.6 统计学处理 23
4 研究结果 24
4.1 三箱社交行为学测试结果 24
4.2 树突棘形态检测结果 25
4.3 内侧前额叶皮层 PSD-95、Syn 蛋白表达变化结果 27
4.4 RNASCOPE 检测实验结果 28
5 讨论与分析 31
5.1 运动干预对 ASD 大鼠社交能力的影响 31
5.2 运动干预对 ASD 大鼠前额叶皮层突触结构可塑性的影响 31
5.3 运动干预改善 ASD 大鼠核心障碍可能的机制 33
6 创新与不足 36
6.1 创新 36
6.2 不足 36
7 结论 37
8 致谢 38
9 参考文献 39

1 前言

自闭症谱系障碍（Autism spectrum disorder， ASD）是一种严重的神经发育障碍疾病，以社会交往障碍，重复刻板行为，语言或非语言交流障碍为主，临床上常见的并发症包括智力残疾、胃肠问题、焦虑和抑郁等[1]。研究发现 ASD 发病率具有明显的性别差异，男女比例大致为 4:1，ASD 在美洲发病率约为 0.82%、在欧洲约为 0.64%、在西太平洋达到了 2%[2]，在我国，据有关研究显示，全国 ASD 患病率大约为 0.70%，男孩患病率估计为 0.95%，女孩的患病率为 0.30%，并且患病率正在逐年递增[3]。不仅如此，在我国某些地区，有超过三分之二的家庭需要背负巨大的经济压力，同时我国还存在自闭症相关人才匮乏，社会意识水平低，特殊教育医疗机构少，自闭症人群融入社会难等问题。

ASD 的致病因素与遗传，免疫，妊娠期理化因子，环境等有关[4]，然而具体的致病原因至今不明，没有一个假说能完全解释 ASD 的病因。研究发现许多 ASD 高危基因都涉及突触的结构与功能，树突棘的形成。大量的研究发现在 ASD 人群或动物模型的 mPFC 区存在异常的神经回路[5]、神经元过度的生长[6]、兴奋性和抑制性突触的失衡[7]以及突触和树突棘发育障碍[8]。突触是信息的加工和传递的重要场所，突触的形成，维持和消除，影响着神经回路的建立与重塑[9]。而内侧前额叶皮层（medial PFC）能接收不同脑区的信息输入，同时将其整合传输到其他皮层及皮层下区域，在社交，认知，记忆，情绪调节等能力上发挥重要作用[10]。mPFC 大致可分为三个亚区：前扣带皮层（anterior cingulate cortex，ACC）、边缘前皮层（PrL）和边缘下皮层（IL），亚区间共同协作而侧重功能却有所不同，ACC 多与潜在动作的选择和评估有关，PrL 多与策略表现、目标导向反应、学习联想有关，IL 也与策略表现有关但似乎多在情绪处理中发挥关键作用[11]。因此，前额叶皮层被认为是治疗 ASD 的关键脑区。

ASD 的治疗以药物治疗，行为矫正，心理干预为主[4]。由于 ASD 的病因并未完全阐明，现有的药物治疗只能起到缓解症状的作用，并不能从根本上治愈 ASD。《儿童孤独症治疗康复指南》指出：针对 0-6 岁 ASD 患儿应采用教育干预、行为矫正等康复训练为主，不推荐使用药物治疗。一项 Meta 分析[12]显示，ASD 儿童青少年的社交障碍在运动干预后社交能力得到提升，说明运动干预是改善 ASD 儿童青少年社交障碍的有效方法。与药物治疗对比，运动干预无药物毒副作用、安全有效、类型多样、接受度高。然而，运动干预改善 ASD 症状的生理机制并未完全知晓。在其他精神障碍疾病中，运动干预能有效改善树突棘的数量与树突复杂性、增强突触结构可塑性从而改善症状[13]。而增强突触

结构可塑性从而诱导突触可塑性的变化从而改善 ASD 症状可能是运动干预改善 ASD 患者核心症状的分子机制，然而相关研究较少，需要进一步探究。

突触后密度蛋白 95（PSD-95）是一种位于突触后密度的支架蛋白，参与 N-甲基-D-天冬氨酸（NMDA）、α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸（AMPA）受体的聚集和稳定，与神经发育期间谷氨酸能突触的可塑性密切相关，在信号活性的动态调节以及树突棘的形成、消除、修剪中发挥重要作用[14]。微管（Microtubule，MT）是神经元细胞骨架的重要成分，对轴突和树突的形成、神经发生、突触发生以及树突棘发育和稳定至关重要，在成熟神经元中，MT 网络是沿轴突和树突的长距离细胞内货物运输的轨道，与信号转导和神经连接紧密相关，多种精神障碍类疾病包括 ASD 涉及微管的异常改变[15, 16]。而微管的稳定、聚合和功能受微管相关蛋白（Microtubule-associated protein ，MAP） 的调节，主要包括：MAP1A、MAP1B、MAP2 和 Tau。MAP1A 主要在成熟神经元树突中表达，与树突重塑相关、MAP1B 在早期神经元发育中高度表达，与轴突生长和神经元形态相关、MAP2 也存在于树突中，与神经元中货物分布有关、Tau 会存在于轴突生长锥中，对神经元迁移至关重要[17]。微管亲和力调节激酶 1（Microtubule affinity regulated kinase1，MARK1）可以磷酸化 MAP，当其异常表达时可能会引起微管动力学的改变，从而扰乱正常的神经发育，还可以磷酸化 PSD-95 改变其动力学从而调节树突棘结构可塑性[18]。本课题组前期实验也发现 VPA 诱导的 ASD 大鼠 PFC 区 MAP1A、MARK1 蛋白存在多个磷酸化位点的异常激活[19]。因此进一步探究运动干预对自闭症障碍谱系大鼠前额叶皮层结构可塑性的影响以及 PSD-95、MAP1A、MARK1 的表达在其中的变化具有深远意义。

本研究运用丙戊酸（Valproicacid，VPA）诱导的 ASD 大鼠模型，对其进行 4 周中等强度的转轮跑步运动结合游泳运动干预，通过三箱社交行为学实验，正置激光共聚焦显微镜，免疫蛋白印记实验，RNA 原位杂交实验观察运动对 ASD 模型大鼠社交能力，前额叶皮层树突棘形态，*PSD-95*，*MAP1A*，*MARK1* 的 RNA 表达及共定位情况的影响，以期帮助进一步阐明运动改善 ASD 的分子病理机制。

2 文献综述

2.1 自闭症概述

自闭症（ASD）的概念由美国专家莱奥·坎纳于 1943 年首次提出，是一种严重的精神发育障碍疾病，多起病于婴幼儿时期，核心症状为社会交往障碍，语言交流障碍、刻板重复行为，同时还伴有多种并发症如智力残疾、注意力缺陷以及感觉敏感、胃肠问题、免疫缺陷、焦虑和抑郁、睡眠障碍等[20]。WHO 把 ASD 列为十大儿童精神疾病之一，已经成为严重影响儿童健康的全球公共卫生问题。

2.1.1 自闭症的流行病学

流行病学调查显示，自闭症谱系障碍的患病率近年来呈上升趋势， 在美洲约为 0.82%、在欧洲约为 0.64%、在西太平洋达到了 2%[2]，在我国，目前还没有全国性的 ASD 筛查报告，根据一项流行病学研究显示，在 2014 至 2016 年间，全国 ASD 患病率大约为 0.70%，男孩患病率估计为 0.95%，女孩的患病率为 0.30%[3]。ASD 发病率具有明显的性别差异，男女比例大致为 4:1。此外，据统计 ASD 人群的终身治疗成本在美国大约为 240 万美元至 320 万美元之间，英国为 150 万英镑至 240 万英镑之间[21]，另有研究显示在我国一些地区有 70%的家庭所承担 ASD 治疗费用超过家庭年收入，并且治疗费用还在不断增加[22]。由此可见，ASD 给家庭和社会带来了沉重的经济压力。不仅如此，我国还存在自闭症相关人才匮乏，社会意识水平低，特殊教育医疗机构少，自闭症人群融入社会难等问题。

2.1.2 自闭症的致病因素

ASD 具体的发病机制目前尚不明确。许多研究显示 ASD 的发生与遗传因素密切相关[4]。国外关于双生子研究发现， 同卵双生子同患自闭症的发生率约为 30%～90%， 而异卵双生子同患自闭症的发生率约为 0~5%， 自闭症同胞患病率约为 5%～10%， 远高于一般人群[23, 24]，另有项研究显示从 1982 年到 2006 年间在瑞典出生的 200 多万儿童中，ASD 遗传率估计为 50%[25]，从而证实了 ASD 具有高度的遗传性。而与 ASD 相关的遗传异常可分为三类：（1）至少 5%是由单基因突变引起的，如 *FMR1* 或 *MECP2* 等 （2）大约 10%是拷贝数

变异（CNVs），包括染色体的复制、大片段缺失、倒位和易位 （3）多基因风险因素，由常见变异的积累导致[26]。

ASD 的发生还与许多环境因素有关，例如父母年龄，怀孕期间的免疫因素，药物使用，环境化学品等[20]。父母的年龄越高，发生 ASD 的风险越大，特别是母亲年龄，与年长的父亲相比，年长的母亲对自闭症的发生影响更大[27]。可能是由于生育年龄的增加导致基因组发生改变的风险加大[28]。母亲在孕期间因感染住院也可能导致 ASD 发生的风险加大。细胞因子是已知在免疫系统调节中起作用的信号分子，影响着发育期间的神经元迁移、轴突投射、突触形成和神经元存活[29]。因此，有学者认为可能由于母体孕期感染导致胎儿在发育期间细胞因子水平失调从而对神经行为功能产生不利影响进而增大 ASD 发生的概率[30]。除了暴露在某些具有致畸特性的药物会加大 ASD 的风险外，ASD 和产前药物之间的关系例如一些抗抑郁药、抗哮喘药和抗癫痫药引起了人们的关注。这些药物能够穿过胎盘和血脑屏障，也可以通过母乳传递给儿童，有动物实验证据表明，在产前暴露于上述药物会对后代的神经系统产生不利影响[31-33]。

2.1.3 自闭症的治疗方法

目前 ASD 的治疗手段以心理治疗，行为矫正，药物治疗为主[12]。ASD 的治疗并没有开发出针对性的药物，多应用一些精神兴奋剂、非典型抗精神病药物、抗抑郁药、抗癫痫情绪稳定剂等[34]。对于易怒，冲动，有自残倾向的患者可以使用利培酮，阿立哌唑治疗，对于多动症，注意力障碍的患者可以使用ω-3 脂肪酸，对于部分同时伴有睡眠障碍的患者，有研究表明，使用褪黑素也有不错的效果[35]。此外，齐拉西酮、奥氮平、舍曲林、艾司西酞普兰等药物也被证明为有效，不过由于样本量较少，需要更多的临床证据来确认其有效性和安全性。药物治疗有其便利性，然而许多家长考虑到药物的副作用包括胃肠道和睡眠情绪问题等，并不是很能接受。因此，非药物治疗手段正在引起人们的关注与重视。《儿童孤独症治疗康复指南》也指出：针对 0-6 岁 ASD 患儿应采用教育干预、行为矫正等康复训练为主，不推荐使用药物治疗。研究发现，对自闭症儿童进行运动干预可以有效改善其刻板样行为[36]，提高社会交往能力，减少焦虑情绪。与单纯药物治疗相比，运动康复训练无药物毒副作用，家庭经济负担小，类型多样，患者接受度高，然而由于干预机制并不明确，给运动这种非药物治疗干预 ASD 的疗法的推广带来一些阻碍。

除了药物治疗与运动疗法外，高压氧、中医辨证等治疗手段也有不错的效果。高压氧治疗指在高压（超过常压）的环境下，呼吸纯氧或高浓度氧以治疗缺氧性疾病和相关疾患的方法。研究表明，高压氧治疗能够提高患者的脑部供

氧，促进受损细胞的再生，增强免疫力，抗炎抗菌[37]。目前高压氧治疗多作为辅助治疗手段，有价格低廉的优势，然而其具体治疗机制仍不明确。中医可以运用针灸、推拿、耳穴等方法改善自闭症人群核心症状，促进患儿语言、认知、行为功能障碍的恢复，对 ASD 并发症如睡眠障碍，焦虑抑郁有不错的效果[39]。

2.2 ASD 动物模型

目前，研究 ASD 发病机制的手段主要有两种：一种是在 ASD 人群死后提取其脑组织进行研究，然而样本宝贵获取难度较大。另一种则是 ASD 模型动物的研究。而选择合适的动物模型是研究深入、准确、可信度高的前提。目前 ASD 的动物模型制备方法主要有：遗传学手段、药物因素诱导[40]。遗传学手段包括转基因、基因敲除技术，例如：fragile X mental retardation1 gene (FMR1) 基因模型、methyl-CpG-binding protein2 (MECP2) 基因模型、glutamate receptor ionotropic NMDA 2B (GRIN2B) 模型等[41]。通过这种技术获得的 ASD 模型在各种行为表现上与 ASD 人群一致，然而多是用于研究某一种基因与 ASD 的相关性上，针对性强。且许多基因负责调控多种生理功能，敲除某一基因并不利于 ASD 的特异性研究，此外这种造模方法复杂、操作要求严格、科研成本高，应用具有一定的局限性。药物因素诱导包括化学因素和生物因素，化学因素诱导一般通过孕鼠腹腔注射沙利度胺、米索前列醇、VPA 等药物增加其子代患 ASD 的风险来获得 ASD 模型，生物因素诱导包括肠道菌群 ASD 模型、丙酸 ASD 模型等。然而生物因素诱导产生的 ASD 模型应用相对较少，认可度并不高。通过化学因素诱导而获得 ASD 模型是目前比较常用的一种方法，其中 VPA 动物模型是属于比较经典的一种 ASD 模型，应用广泛、获取容易、操作简单。

VPA 是一种非常有效的抗惊厥和情绪稳定剂，也是一种强效致畸剂，在临床上多用来治疗癫痫、双向情感障碍[42]。研究发现，在怀孕期间前三个月服用 VPA 的女性，其子代患 ASD 的风险会显著加大[43]。在母鼠怀孕第 11.5~13.5 d 时腹腔注射 VPA，获得的子代鼠即为 ASD 模型鼠。观察子代鼠的行为表现，发现其出现社会交往障碍、刻板行为增多、感觉过敏、疼痛敏感性减低，与 ASD 人群的行为表现极其相似，神经递质检测发现其海马区、小脑、前额叶皮质及外周血液中五羟色胺水平也发生改变[44, 45]。值得注意的是，子代 ASD 样行为具有显著的性别差异，与 ASD 磁性鼠相对比，ASD 雄性鼠具有更明显社交及学习障碍[46]，这提示我们在进行 ASD 动物实验时应注意性别差异对结果的影响。同时，合适的 VPA 剂量对提高造模成功率、缩短实验周期、更好地模拟临床 ASD 发病情况尤为重要。孕鼠高剂量的 VPA 注射（400～600 mg/kg）其子

代虽然也表现 ASD 样行为，然而高剂量 VPA 可能导致母鼠产前死亡或子代的数量减少，而低剂量的 VPA 注射其子代的行为表现却似乎有所不同。研究显示，小鼠妊娠期间接受 100~200 mg/kg 的 VPA 单次皮下注射，子代表现对新奇物体的探索和恐惧条件反射异常[47]。可能因为其更加贴近临床用药而导致 ASD 的发生，经郑文霞改良后的方法即在孕期第 10、12d 暴露于中等剂量的 VPA（300 mg/kg）中，子代会表现出更加明显的行为障碍，孕鼠 VPA 给药后不良反应、死亡和流产现象均减少[48]。因此，本研究选择这种方法制备 ASD 模型，并选取子代雄性 ASD 模型鼠作为实验动物。

2.3 ASD 神经生物学机制

2.3.1 前额叶皮层——ASD 治疗的关键脑区

前额叶皮层（prefrontal cortex， PFC）是相互连接的新皮层区域的集合，在解剖学上可以被细分为眼眶和内侧 PFC（the orbital and medial PFC）、背外侧 PFC（the dorsolateral PFC）、腹外侧 PFC（the ventrolateral PFC）和背中部 PFC（the mid-dorsal PFC）。PFC 是脑部的命令和控制中枢，能发送和接收来自几乎所有感觉皮层、运动皮层和许多皮层下脑区的投射，在认知记忆、情绪调节、动机以及社交能力等方面发挥重要作用。其中内侧前额叶皮质（mPFC）是一个具有不同细胞类型和投射的皮质区域。作为控制板，mPFC 既能接收来自不同脑区的输入信息，又能整合信息并传送至其他皮层和皮层下区域，在脑功能调节中发挥重要作用[49]。根据细胞构筑的差异，啮齿动物 mPFC 沿腹轴背侧可分为不同的神经解剖学亚区：前扣带回皮层（anterior cingulate cortex，ACC）、边缘前区皮层（prelimbic cortex，PrL）和边缘下区皮层（infralimbic cortex，IL）。其中，ACC 和 PrL 背侧区也被定义为背侧成分（DmPFC），腹侧 PrL、IL 和背侧脚皮质（dorsal peduncular cortex ，DPC）属于腹侧部（VmPFC），这些区域与人类的 Brodmann 区在连接和功能上具有同源性。

研究表明 ASD 所导致的社交障碍，情绪、认知和语言异常等方面的缺陷与 PFC 区的病变有密不可分的联系。认知控制是一种目标或计划影响行为的精神活动过程，支持灵活、适应性的反应和复杂的目标导向思维，其实施主要依赖于 PFC 区的神经网络。而 PFC 区神经网络功能异常与 ASD 人群的认知控制能力障碍密切相关[50]。另有研究发现在 ASD 人群的早期，PFC 区有神经元的过度生长，与正常儿童相比，ASD 儿童的 PFC 中的神经元增加了 67%，其中背外侧 PFC 增加了 79%，内侧 PFC 增加了 29%[51]。这种异常的生长可能会

使 PFC 区与其他脑区的连接性发生改变，从而导致异常的神经回路，从而造成异常行为的发生。利用基因编辑手段构建的 C 端 *Shank3* 基因敲除鼠出现社交障碍、重复刻板样行为等 ASD 典型症状，其主要原因是 PFC 区锥体神经元的肌动蛋白调节异常从而导致 NMDA 受体和突触转运功能缺失[52]。此外，ASD 人群中 PFC 区表达小清蛋白的中间神经元显著减少，而将富含小清蛋白的中间神经元移植到 ASD 模型大鼠的内侧 PFC 区时，发现大鼠的社会交往和认知灵活性得到有效改善[53]。因此，前额叶皮层被认为是 ASD 治疗的关键脑区。

2.3.2 突触结构功能异常——ASD 发病的重要机制

研究发现，很多 ASD 高风险突变基因都涉及突触结构和功能异常。例如 *SHANK*、*TSC1*、*FMR1*、*MECP2* 等，这些基因编码细胞粘附分子、支架蛋白和参与突触转录、蛋白质合成和降解的蛋白质，它们影响突触的各个方面，包括突触形成和消除、突触传递和可塑性，导致突触结构和功能异常[9]。SHANK 蛋白家族是一种支架蛋白，定位于兴奋性突触，由三种主要亚型 Shank1、Shank2 和 Shank3 组成，对突触形成、谷氨酸受体运输和神经元信号传导至关重要，*SHANK* 基因突变与 ASD 密切相关，Shank 的缺失和过表达都会导致突触体数目和成熟的缺陷[54, 55]。另外，*NEXMIF* 已在 SFARI 数据库中被列为 ASD 基因，*NEXMIF* 缺陷小鼠表现出自闭症样行为，包括社交行为缺陷、重复性自我打扮增加、交流障碍以及学习和记忆缺陷，具有 *NEXMIF* 敲低的培养海马神经元以及来自 *NEXMIF* 缺陷大脑的神经元显示未成熟树突棘的增加、树突棘密度显著降低，不仅如此，*NEXMIF* 的缺失还会导致 AMPA、PSD-95 和 gephyrin 等突触蛋白的显著减少[56]。此外，突触神经传递包括兴奋性和抑制性神经传递，在 ASD 致病机理相关研究中也发现存在异常的兴奋性/抑制性（E/I）神经传递比率[57]。神经元突触结构可塑性指在神经发育或外界刺激下，神经元树突棘及突触产生形态及密度等一系列改变，是大脑编码和存储信息能力的基础，其主要评价指标包括树突棘密度、形态及突触数量等。值得注意的是，突触可塑性功能障碍也被认为与情感障碍，神经发育障碍疾病例如精神分裂症密切相关。

树突棘是微小的球状结构，大多数在大脑中接收快速兴奋性突触输入的神经元的树突中伸出。而根据树突棘的头部大小以及有无颈部，可以将树突棘分为：①蘑菇型（mushroom），此类树突棘头部直径远大于颈部直径，稳定性强，可塑性差；②瘦长型（thin），此类树突棘总长度大于头部直径且树突棘头部直径略大于颈部直径，为未成熟树突棘，可塑性强；③粗短型（stubby），此类树突棘总长度与头部直径相当，无明显颈部，功能尚未明确；④丝状伪足

（filopodia），一般被认为是树突棘的前体。其中蘑菇型和短粗型被认为是成熟型，瘦长型和丝状伪足被认为是不成熟型[58]。从出生后，树突棘一直处在形成和修剪的动态平衡，从而保证神经元突触之间的选择性连接，使神经网络在发育中不断完善成熟。这样的动态平衡过程也就是突触结构和功能可塑性改变。研究发现，ASD 人群在出生时神经元树突棘密度与正常人群几乎差不多，但从儿童期开始直至成年以后，ASD 人群神经元树突棘密度显著高于正常人群，从儿童至成年期，正常人群树突棘密度降低了大约 45%，这对于去除一些不必要的突触并使剩余突触的形态和功能成熟来完善神经元回路和正常大脑功能至关重要，但在 ASD 人群中只降低了约 16%[59]，这提示 ASD 人群在发育过程中存在树突棘修剪不足。另有研究发现在 ASD 人群的额叶、颞叶、顶叶皮层第 2 层锥体神经元以及颞叶的第 5 层锥体神经元顶树突的树突棘密度显著增加[60]。因此，突触结构功能异常可能是 ASD 发病的重要机制。

2.4 运动与 ASD

2.4.1 运动干预在 ASD 人体的研究

在临床实践中发现，ASD 人群存在运动量不足、惰性强、耐力差、协调能力和平衡能力弱、运动技能低下、大肌肉力量较差等特点[61, 62]，而运动是良医，运动干预不仅能有效增强体质，促进人体健康，干预场地也灵活多变，可以在社区、家庭和学校实施，干预形式更是多样如动作训练、体育游戏和专项体育等。有研究发现，对自闭症人群使用大肌肉运动干预例如立定跳远、呼啦圈练习、动物模仿等，可以提升自闭症人群的位移运动能力和物体操控运动能力，特别是感觉统合功能[63]。另有研究显示，对 ASD 儿童开展小篮球运动干预（每次 40 min，每周 5 次，12 周），能够有效改善学龄前 ASD 儿童的重复刻板行为[36]。运动干预还可以有效改善 ASD 人群的心理健康，自闭症谱系障碍的儿童自制力出现问题，往往表现为脾气暴躁以及刻板重复、冲动的行为，导致学习障碍和看护障碍。Chan 等通过 4 周的研究表明，内养功 （实验组） 对自制力提高程度高于传统渐进式肌肉放松法 （对照组） ，实验组前扣带皮质 （调节自制力的区域） 的脑电活动增强，而对照组未见此现象，同时，家长报告孩子症状减轻，对脾气和行为的控制力提高[64]。

综上所述，运动干预可以有效改善 ASD 人群的身心健康。值得注意的是，有研究显示中低负荷的有氧运动能够有效降低 ASD 患儿的刻板样行为，而大强度的有氧运动却会加重刻板样行为[65]，这提示在制定运动干预方案时，合理

科学的运动处方（运动频率、运动强度、运动时间、运动方式、运动量）尤为重要。研究显示，对 ASD 人群运动干预建议采取以下试验性方案：频率每周 1~4 次；每次运动持续时间 40~60 分钟，运动强度为中等强度；运动持续 10~14 周[65]。

2.4.2 运动干预在 ASD 动物模型的研究

运动提升小脑区浦肯野细胞的数量。小脑大约占大脑的十分之一，位于后颅窝，与运动控制和运动学习有关，关系着动作是否精准，协调[66]。在自闭症人群中，小脑发育异常已经得到了证实，特别是蚓部的横截面积和浦肯野细胞的减少，影响小脑与其他脑区的交流，从而引起一系列症状[67]。小脑浦肯野神经元是唯一从小脑皮层向外发送输出的神经元，同时抑制小脑或前庭核中的神经元，平行纤维突触处的长期抑制 (LTD) 被认为是小脑依赖性学习的重要机制，通过观察浦肯野神经元可以了解小脑的功能状态[68]。有研究发现，对丙戊酸诱导的 ASD 大鼠模型进行一个 4 周的跑步机运动干预，减轻了浦肯野细胞的损失，运动的协调与平衡性得到了改善[69]。

运动改善 ASD 海马区的神经元凋零。海马位于侧脑室的颞角处，由齿状回和氨角构成，与记忆处理、学习和情绪有关[70]。近年来也有越来越多的学者注意到了海马与 ASD 的联系。ASD 人群出现症状大约在 1 到 2 岁之间，这个时间段正是海马发育的关键时期，在许多 ASD 人群中也发现了海马结构发生了变化，并且差异的变化随着年龄的增加而显著[71]。海马在社交互动、记忆和空间推理中发挥着重要的作用，有学者猜想可能由于海马中认知映射的中断，ASD 人群整合自身和周围环境的能力受损，不能做出合理的决策，从而导致一系列表型的变化[72]。有研究观察到 ASD 模型鼠中海马区存在明显的神经元丢失及变性，细胞形态不理想，对此进行 4 周的游泳训练干预后，海马神经元丢失情况得到改善，抗氧化能力增强，学习已经记忆能力也得到提升[73]。

运动通过改善 mPFC-BLA 回路的兴奋性缓解焦虑情绪。杏仁核是位于颞叶深处的杏仁状结构，包含约 13 个核，杏仁核分为三组深部或基底外侧组，包括外侧核、基底核和副基底核，浅层或皮质样群，包括皮质核和外侧嗅束核，和由内侧核和中央核组成的中央组[74]。杏仁核与情绪、学习和记忆密切相关。在自闭症人群中儿童时期杏仁核的体积比正常人更大，而到成年后，几乎差不多，甚至更小，有学者认为可能是由于在儿童时期，杏仁核过度生长，而成年以后，杏仁核出现萎缩导致[75]。基地外侧杏仁核（basolateral amygdala，BLA）是杏仁核里的一个亚核，主要接受感觉信息，然后投射到其他部位，同样，在一项调查中发现 ASD 人群的 BLA 体积相对同龄人来说更大，并且体积越大，

症状越严重[76]。BLA 有在社交活动中设定焦虑的作用，mPFC-BLA 回路被认为与先天焦虑状态密切相关。有研究显示，14 天的跑步机运动有效缓解了 mPFC-BLA 通路的过度兴奋，并恢复了 mPFC 和 BLA 核的正常 E/I 平衡，除了调节膜兴奋性外，还改变了 BLA 神经元的细胞特性，缓解了焦虑样行为[77]。

2.4.3 运动干预 ASD 神经生物学机制

(1) PSD-95 通过 AMPA、NMDA 受体调节突触可塑性

突触后密度（PSD）是兴奋性突触的树突棘内的致密局部区域，负责接收，解释和储存突触前轴突末端传递的信号，由受体、激酶、结构蛋白和相关的信号分子组成，与突触可塑性密切相关，其中 PSD-95 可能是 PSD 中最丰富的蛋白质[78]。PSD-95 由三个 N 末端 PDZ 结构域（PSD-95、dlg 和闭锁小带-1）、src 同源结构域（SH3）和一个无催化活性的鸟苷酸环化酶结构域（GUK）构成，是 MAGUK 家族的主要成员[79]。MAGUK 家族的其他成员包括 SAP102、SAP97 和 PSD-93，也都负责 AMPA 和 NMDA 受体的募集和稳定。AMPA 受体是哺乳动物大脑中主要的离子型谷氨酸受体，介导快速兴奋性突触传递。AMPA 受体由四个不同基因 *GluA1-4* 编码的高度同源亚单位的四聚体装配体，其进出突触的运输是高度动态的，受亚单位特异性相互作用蛋白以及其细胞质羧基末端（C－末端）结构域上发生的各种翻译和修饰的调节[80]。研究表明，AMPA 受体的调节运输是活动诱导突触传递变化的主要机制，一般来说，突触 AMPA 受体的增加导致长时程增强（LTP ），突触 AMPA 的去除导致长时程抑制（LTD）[81]，而 PSD-95 可以通过直接与 stargazin/TARPs 结合来调节 AMPA 受体从而调节突触可塑性，是突触可塑性过程如 LTP/LTD 的调节剂，影响着树突棘的大小、形状和突触传递的数量。研究显示当 PSD-95 过表达时会导致 AMPA 受体增加且树突棘数量和密度的增加，从而诱导突触发生[82]。另有研究显示，当小鼠缺乏 PSD-95 时，在 mPFC 区域可以观察到 AMPA 介导的电流和 GluA1 蛋白表达水平显著降低，表明 PSD-95 的下调导致突触抑制[83]。NMDA 受体对突触可塑性和皮质发育以及学习和工作记忆等功能过程至关重要。PSD-95 也介导 NMDA 受体的聚集与功能。NMDA 受体由异源四聚体复合物组成，包含 NR1 和 NR2A-D 或 NR3A-D 亚单位的同型二聚体或异型二聚体，亚单位的种类决定了诸如开放通道时间、钙渗透性、衰变时间和对药物的敏感性的不同[84]。例如，与含 NR2A 的 NMDA 受体相比，含 NR2B 的 NMDA 受体具有更慢的动力学和更慢的衰减时间，因此会导致更大的 Ca 流量+在突触内，而 PSD-95 可以通过直接相互作用和稳定特定的含 NR2 的 NMDA 受体到突触后膜来影响 NMDA 受体传递[14]。由于 PSD-95 与 NMDA 和 AMPA 受体的相互作用

和功能影响，PSD-95 长期以来与神经发育过程中谷氨酸能突触的突触可塑性密切相关。并且 PSD-95 还被证明参与了与高风险 ASD 基因的相互作用网络，这些基因包括 *SHANK*、*HOMER*、*Neuroligin* 和 *FMR1*[85, 86]。有研究显示当小鼠敲除 *DLG4* 基因（编码 PSD-95）时，会出现一些异常的交流和社会行为，运动协调受损，以及压力和焦虑相关反应，与在 ASD 人群中观察到的表型一致[87]。

综上所述，PSD-95 的表达影响着 AMPA、NMDA 受体的组成和功能，与突触可塑性密切相关，可能是通过控制树突棘形成/消除/修剪来调节突触强度的关键成分。

(2) 微管、微管相关蛋白与突触可塑性

树突棘因其高水平的肌动蛋白和肌动蛋白相关蛋白而广为人所知，肌动蛋白细胞骨架是控制和调节树突棘形成和动力学的主要细胞骨架结构[88]。活细胞成像证实，树突棘大小或形状的变化与其肌动蛋白细胞骨架的变化有关。有研究表明，肌动蛋白聚合与 LTP 期间树突棘增大有关[89]，而 LTD 涉及通过肌动蛋白解聚导致树突棘收缩[90]。相比之下，微管和微管相关蛋白在树突棘中的存在及其在树突棘可塑性中的作用仍未得到充分探索。早期的电子显微镜研究表明，在紧邻 PSD 的树突棘内存在高度不稳定的微管群体[91]。此外，在富含树突棘的突触体制剂中发现了微管蛋白 mRNA[92]。另有研究发现，使用荧光标记标记物对微管进行成像，动态微管有规律地离开树突轴并进入树突棘，这才显示了树突棘中有微管的存在[93]。微管是由α-β微管蛋白异二聚体组装而成的圆柱形聚合物。微管、肌动蛋白微丝和中间丝构成细胞骨架，细胞骨架是一种动态结构，赋予细胞形状和抗变形能力，细胞骨架结构的严格控制过程涉及神经元的复杂和可塑性形态[94]。研究发现许多 ASD 相关的大脑异常，突触异常和神经元回路中的错误连接，都与微管相关的基因突变有关[17]。研究表明，微管在树突中特别活跃，参与树突棘的形成，在突触可塑性上发挥重要作用。抑制微管的聚合会减少蘑菇型树突棘的数量，同时增加状伪足型树突棘的数量，而增加微管聚合导致了相反的效果：蘑菇状棘的增加以及丝状伪足型树突棘的减少[95]。然而，相关的机制并不清晰，有学者认为突触微管在树突棘中的作用可能与参与调节谷氨酸能突触的神经递质释放有关[96]。

而微管的稳定、聚合和功能受微管相关蛋白的调节主要包括：MAP1A、MAP1B、MAP2 和 Tau。MAP1A 主要在成熟神经元树突中表达，与树突重塑相关、MAP1B 在早期神经元发育中高度表达，与轴突生长和神经元形态相关、MAP2 也存在于树突中，与神经元中货物分布有关、Tau 会存在于轴突生长锥中，对神经元迁移至关重要[17]。虽然 MAP1A 在树突重构中的具体机制尚不清楚，但一般认为其与细胞骨架和突触通道活性之间的串扰有关。有研究发现

MAP1A 基因缺陷小鼠神经元可塑性发生下降，另有研究发现 PSD-95 会与 MAP1A 动态的结合，这种结合可能与其在突触可塑性上的调节密切相关，然而相关机制研究也缺乏[97, 98]。*MARK1* 是 ASD 发生的敏感基因，在自闭症人类尸检报告中，发现了 MARK1 的过表达[99]。目前的研究表明 MARK1 可以在轴突和树突中触发微管断裂并调节线粒体沿微管运输，当 MARK1 过表达或沉默时可以显著缩短小鼠新皮层神经元的树突长度，改变树突运输速度，可能与突触可塑性密切相关[99]。

综上所述，微管、MAP1A、MARK1 在调节突触可塑性上发挥重要作用，本课题组前期实验也发现 VPA 诱导的 ASD 大鼠内侧前额叶皮层 MAP1A、MARK1 蛋白存在多个磷酸化位点的异常激活，并且这种趋势可以被运动干预逆转[19]。因此，进一步探究 MAP1A、MARK1 对研究 ASD 的发生及制定合理的治疗方案具有深远的意义。

(3) 运动锻炼对神经元结构功能重塑的影响

运动锻炼能提高心肺功能、增强肌肉力量、缓解压力、减轻焦虑、抑郁情绪，同时能预防和改善多种慢性疾病，并减轻多种神经系统和神经退行性疾病带来的不利影响。经常练习太极拳可以增强大脑的认知功能以及平衡能力[100]，体操运动可以提高对精细动作的把控[101]，游泳运动可以显著提高协调能力[102]。在老年锻炼人群中发现，运动可以增强学习记忆能力、提高执行能力，对抗年龄增长和疾病导致的智力下降，防止高级认知中枢相关脑区的萎缩[103]。研究显示，中等强度的游泳运动可以使突触密度显著增加及突触结构相关蛋白的表达上升，提高突触可塑性[104]。慢性跑步机运动可以增强小鼠模型中的突触发生和突触传递并增加神经元活性和轴突髓鞘形成，从而改善运动学习[105]。另有研究发现 16 周规律的有氧运动可以使小鼠海马脑区突触数目增加，突触的结构更加清晰，提升 AMPA 受体的突触传递效率[106]。运动还可以增加海马齿状回 Mtss1L 表达，从而引起树突棘密度和兴奋性突触后电流增加[107]。此外，运动干预可以改善脑缺血动物模型的树突棘缺失并促进其功能恢复[108]，还可以抑制氧化应激、修复线粒体损伤和促进生长因子的产生从而改善帕金森患者的运动迟缓、慌张步态表现[109]。在阿尔兹海默症的治疗中，运动疗法可以通过增加突触灵活性来防止海马体积减小，改善空间记忆以及学习能力[110]。随着年龄增长，神经突触会逐渐丢失，而运动锻炼可以有效降低突触的丢失[111]。

以上文献提示运动锻炼可以通过多种途径影响突触的结构和功能可塑性，而 PSD-95、MAP1A、MARK1 可能是运动干预 ASD 神经生物学机制中的重要分子。

2.5 目前存在的问题及展望

近年来 ASD 全球发病率日益增高，由于病因不明且临床表型存在较高异质性，尚无有效的治疗药物，是严重影响儿童健康的重大疾病之一。自闭症也被称为突触综合征，在 ASD 的病程发展中，神经元突触可塑性改变扮演着重要角色，许多 ASD 高危基因涉及编码突触结构与功能，突触结构功能异常可能是 ASD 发病的重要机制，内侧前额叶皮层是社交、认知功能的关键调控者，在 ASD 人群中 PFC 区存在大量的病变，被认为是研究 ASD 发病机理与治疗的关键脑区。运动可以有效改善 ASD 人群的核心障碍及并发症，然而其作用机制却鲜有报道，给运动疗法的推广带来一定的阻碍。研究表明运动改善 ASD 异常行为表现的神经生物学机制可能与神经元突触可塑性密切相关，然而相关研究较少、作用机制并不清晰，前期研究提示运动可能通过调节 PSD-95、MAP1A、MARK1 等途径改善突触可塑性。因此，聚焦 PSD-95、MAP1A、MARK1，探讨运动对 ASD 诱导的内侧前额叶皮层神经元突触结构可塑性的影响和可能作用机制，对了解 ASD 的病理过程、揭示运动干预 ASD 的神经生物学机制、制定合理的治疗方案具有重大意义。

3 研究材料与方法

3.1 实验动物

本实验选用 SPF 级 8～9 周龄 SD（Sprague-Dawley）大鼠雄性 5 只，雌性 10 只，雄性体重为 325±25g，雌性为 225±25 g，由广东省医学实验动物中心提供，许可证号：SCXK（粤）2022-0002，大鼠饲养环境室温 23±1 ℃，湿度(60±5)%，昼夜交替 12 h，可自由进食和饮水。本实验方案经广州体育学院动物实验伦理委员会审查通过，审批编号：2020DWLL-12。

3.2 实验仪器及试剂

3.2.1 实验仪器

表 1 主要实验仪器

序号	名称	生产厂家
1	纯水制备系统	中国，易普易达
2	冰冻离心机	中国，Heal Force
3	多功能酶标仪	美国，biotek
4	电热恒温培养箱	上海，bluepard
5	微量电子秤 BS110S	德国，sartorius
6	PH 检测仪	德国，sartorius
7	摇床 TS-1	中国，其林贝尔
8	电泳仪	美国，Bio-rad
9	电转滤纸	美国，Bio-rad
10	微量移液枪	美国，Eppendorf
11	电泳及转膜设备	美国，Bio-rad
12	-20℃冰箱	日本，松下
13	-80℃冰箱 MDF-382E	日本，三洋
14	化学发光仪	上海天能生命科学有限公司，型号 Tanon 5200
15	磁力搅拌器	美国，SLILOGEX
16	行为学检测系统	上海移数信息科技有限公司
17	恒温水浴锅	美国，CRYSTAL
18	生物样品均质仪	中国，Bioprep-24
19	大鼠转轮式跑步机	济南，YLS-15A
20	制冰机	美国，GRANT

续表 1

序号	名称	生产厂家
21	大鼠脑切片模具	中国深圳，瑞沃德
22	冷冻超薄切片机	德国，Leica UC-7
23	EMSIS CCD 数码相机	德国，VELETA G3
24	脑立体定位仪	深圳市瑞沃德生命科技有限公司
25	微量注射泵	KDscientific
26	微量注射器	Hamilton，SYR5ul 75RN
27	正置荧光显微镜	Leica，型号 DM 4B
28	正置激光共聚焦显微镜	Zeiss，型号 LSM 880
29	大鼠游泳池	上海移数信息科技有限公司，RD1101-MWM-G
30	三箱社交实验箱	上海移数信息科技有限公司，型号 RD1150-SIT
31	ACD 一代原位杂交系统	ACD，货号 310010

3.2.2 实验试剂

表 2 主要实验试剂

序号	名称	生产厂家
1	VPA	Sigma-Aldrich，货号 1069-66-5
2	PSD-95 抗体	Millipore，货号 MAB1596
3	Synaptophysin 抗体	Abcam，货号 Ab32127
4	β-actin 抗体	Proteintech，货号 66009-1-lg
5	Goat anti mouse IgG (H+L)/HRP 抗体	北京博奥森生物技术有限公司，货号 BS-40296G-HRP
6	HRP Goat Anti-Rabbit IgG（H+L）抗体	武汉爱博泰克生物科技有限公司，货号 AS014
7	rAAV-EF1α-DIO-EYFP-EYFP-WPREsH	武汉枢密脑科学技术有限公司，货号 PT-0899
8	rAAV-CMV-CRE-hGH Pa	武汉枢密脑科学技术有限公司，货号 PT-0025
9	BCA 蛋白浓度测定试剂盒增强型	上海碧云天生物技术有限公司，货号 P0009
10	SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司，货号 P0012a
11	Western 及 IP 细胞裂解液	Biosharp Life Sciences，货号 BL509A
12	磷酸酶抑制剂	Biosharp Life Sciences，货号 BL615A
13	蛋白酶抑制剂	Biosharp Life Sciences，货号 BL612A
14	SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	Biosharp Life Sciences，货号 BL502B
15	蛋白预染 marker	Thermo Fisher，货号 26616
16	PVDF 膜	Millipore，货号 IPVH00010
17	化学发光试剂盒	Millipore，WBKLS0500
18	RNAscope Probe-Rn-MAP1A-C3	由 ACD 公司定制
19	RNAscope Probe-Rn-MARK1-C1	由 ACD 公司定制
20	RNAscope Probe-Rn-Dlg4-C2	由 ACD 公司定制

续表 2

序号	名称	生产厂家
21	RNAscope 3-plex Positive Control Probe-Rn	ACD，货号 320891
22	RNAscope 3-plex Negative Control Probe-Rn	ACD，货号 320871
23	RNAscope v2 二代荧光试剂盒	ACD，货号 323100
24	Opal 520 Reagent	ACD，货号 ASOP520
25	Opal 570 Reagent	ACD，货号 ASOP570
26	Opal 690 Reagent	ACD，货号 ASOP690

3.2.3 实验前需准备的试剂

表 3 实验前需准备的试剂

名称	配方
0.01 M PBS 缓冲液	0.85g 氯化钠、0.35g$Na_2HPO4•12H_2O$ 和 0.025g $NaH_2PO4·2H_2O$ 溶于 ddH_2O 中，充分混匀后定容到 1000ml
0.1M PBS 缓冲液	8.5g 氯化钠、3.5g$Na_2HPO4•12H_2O$ 和 0.25g $NaH_2PO4·2H_2O$ 溶于 ddH_2O 中，充分混匀后定容到 1000ml。
1XTBS 缓冲液	0.42g Tris Base、8.5g NaCI， ddH_2O 定容至 1000ml，调 PH 为 7.6。
1XTBST 缓冲液	1 L 的 IXTBS 缓冲液加入 ImlTween-20， 搅拌溶解后现配现用。
1X 转膜液	取 10X 转膜液 100ml 和甲醇 100ml 随后加 ddH_2O 定容至 1000ml 得到 1X 转膜液。
4%多聚甲醛	40g 多聚甲醛加 ddH_2O 800ml 搅拌，65°C 加热 2 小时，溶解后定容至 1000ml，置于 4C 冰箱保存。
麻醉药品	10g 的三氯乙醛水合物加 90ml 的生理盐水溶解后即为 10%水合氯醛。
封闭液	1g 脱脂奶粉和 18ml 的 1XTBST，待粉末完全溶解后加入 1XTBST 定容至 20ml。
1X 电泳液	15.14g Tris Base、93.84g 甘氨酸和 5.0g SDS， ddH_2O 定容至 1000ml， 得到 5X 电泳液。再取 5X 电泳液 200ml 加 ddH_2O 定容至 1000ml 得到 1X 电泳液。
10%蔗糖溶液	10g 蔗糖粉溶于 0.1M PBS 溶液并定容至 100ml。

3.3 实验技术路线图

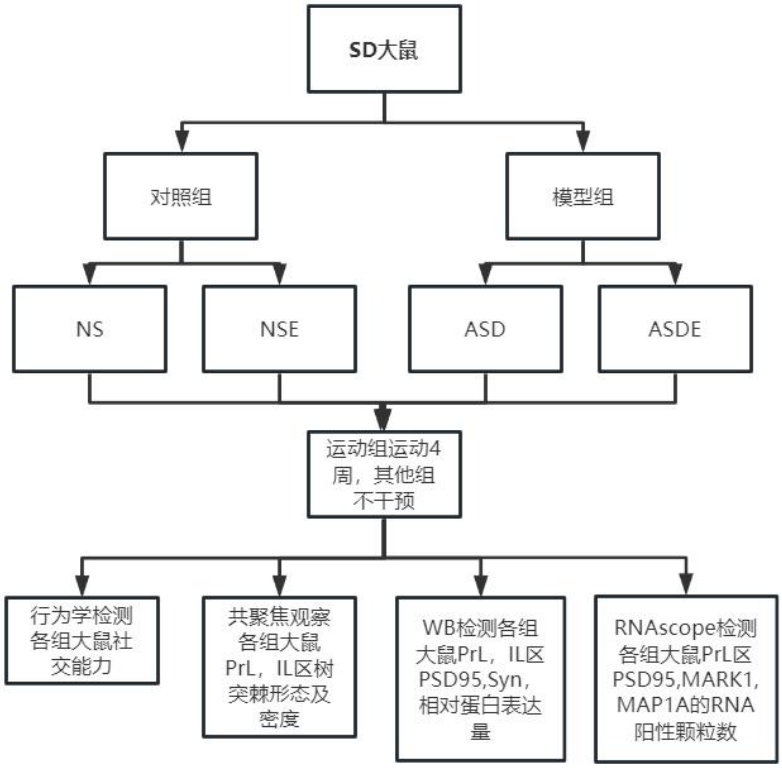

图 1 实验技术路线图

3.4 实验方法

3.4.1 构建 ASD 大鼠模型

本实验依据经郑文霞[48]改良后的方法制备 ASD 大鼠模型。在标准动物房适应一周后，晚上九点将购买的大鼠按照两只雌性鼠一只雄性鼠的比例置于同一笼中，10h 后通过阴道涂片观察雌鼠是否受孕，是则记为受孕第一天，取出孕鼠，单笼饲养。于妊娠第 10、12 天将丙戊酸钠（VPA，生理盐水配置）300 mg/kg 注入孕鼠腹腔，产下雄鼠作为自闭症模型。将同剂量的生理盐水注入雌鼠体内，产下的雄鼠作为对照组。在仔鼠第 28-35 天时，随机挑选仔鼠分为：正常对照组安静组（NS）9 只、正常对照运动组（NSE）10 只、模型安静组（ASD）11 只、模型运动组（ASDE）9 只。

3.4.2 神经元示踪病毒的 mPFC 区脑立体定位注射

神经元示踪病毒脑立体定位通过脑立体定位仪，利用颅骨标记点寻找皮层下所需要观察的脑区，注射病毒标记，以方便后期进行树突棘形态观察。实验前随机选取 3-4 只（NS 3 只、NSE 4 只、ASD 4 只、ASDE 4 只）进行神经元示踪病毒的 mPFC 区脑立体定位注射。

（1）在适应性运动训练前，NS 组和 ASD 组每组随机选取 7 只大鼠进行神经元示踪病毒的 mPFC 区脑立体定位注射；

（2）将大鼠放置于体重器上称重，按其重量准备好相应的巴比妥钠剂量进行麻醉（50 mg/kg），剪除头部毛发；

（3）将脑立体定位仪放置于水平操作台上，固定大鼠的门齿后，接着将左右耳杆分别插入到大鼠的耳道中（在此过程中注意调整适配器与大鼠头部的高度和位置适宜，方便操作耳杆），然后转动耳杆与门齿夹的螺丝锁死（固定效果应达到鼻对正中，头部不动，提尾不掉，头顶处于水平位置）；

（4）75%的乙醇溶液对大鼠脑顶部消毒，外科剪刀剪开脑顶部皮肤，去除皮下结缔组织，使前、后囟部位显现出来，之后观察前、后囟的连线以及大鼠两侧是否与脑立体定位仪的两侧平行，如若没有应及时调整，然后调整微量注射器针头的位置使其位于前囟正上方，再将坐标归零；

（5）将 rAAV-CMV-CRE-hGH Pa 病毒（原液滴度为 5.5 × 10 12 vg/ml）用灭菌的 0.01 mol/L 的 PBS 稀释 20000 倍后，与等体积的 rAAV-EF1α-DIO-EYFP-EYFP-WPREsH 病毒（滴度为 2.57 × 10 12 vg/ml）混合均匀；

（6）上移微量注射器械针头的位置（避免后续操作触碰到针头），根据《大鼠脑立体定位图谱》确定 mPFC 区的位置，用颅骨钻钻动打磨 mPFC 位置，达到能挑开的状态，接着用医用注射器针头打开头骨（在此操作中应特别注意力度，避免力度过大伤到脑部组织，如果头部有出血的情况，用细长的医用棉球吸取即可）；

（7）取下微量注射器吸取 PBS 进行清洗，再吸取病毒，固定注射器于定位仪，连接注射泵，将针头垂直插入到 mPFC 脑区，启动注射泵，待病毒注射完毕后留针 6 分钟后取出；

（8）缝合头部皮肤，消毒处理，放于动物房中，等待其苏醒。

3.4.3 运动干预方案

运动干预方式参照前期实验方案[19]。运动干预组进行 7d 的适应性训练（适应 5 d 休息 2 d），每天 9 : 00 在转轮式跑步机进行 10 min 的适应性跑步训练

（转轮周长 0.65 m，转速每日从 5、8、10、13、15 rpm 依次递增），15 : 00 进行 10 min 适应性游泳训练（水池直径 1.2 m、水温 24 ℃±1 ℃）。然后进行正式运动训练，每天 9 : 00 进行 30 min 的转轮式跑步机训练（转速 15 rpm），15 : 00 进行 20 分钟的游泳训练，每周干预 5 d，一共 4 周。

实验结束后所有大鼠进行三箱社交实验检测社交能力。最后处死大鼠，取大脑内侧前额叶皮层中的边缘前皮质（PrL）和边缘下皮质（IL）进行相关检测。

3.5 测试内容和方法

3.5.1 社交行为能力测试

大鼠社交行为能力采用三箱社交实验。三箱社交实验是一种被广泛认可并使用的行为学测试方法，用来评价 ASD 模型的社交能力。

运动训练结束之后，各组大鼠依次在社交行为测试箱中进行社交能力检测。箱体的大小为 150 cm×50 cm× 40 cm，实验箱用透明亚克力板等分为三个箱体，将一个能装入大鼠的镂空不锈钢笼子分别置于左右箱体的中间部位，用等重量的铁块压住笼子使其固定，两块亚克力板对称分布着一个可开关的小门，能使大鼠自由地穿梭三个箱体。实验开始时，打开两块亚克力板上的小门使三个箱体相通，将受试大鼠放置于中间箱的中心位置（防止其后续进入左右箱体的顺序有变对社交能力检测造成影响），让大鼠在三箱内自由探索 10 min。待大鼠适应完毕后，将同一批雄性陌生大鼠（stranger1）放入左笼中，观察受试大鼠 20 min。记录其在各箱体中的活动时间，与嗅探陌生大鼠或空铁笼的时间和频率。

3.5.2 树突棘形态观察

三箱实验后，戊巴比妥钠（0.05g/kg）将大鼠全身麻醉，4%多聚甲醛（PFA）注入固定，取出大脑，4%PFA 固定 1 晚，后用蔗糖梯度法进行脱水，用冷冻切片机制作 40 微米厚的冠状断面。

每只大鼠选取 3～4 张 PrL 和 IL 区神经元表达了荧光蛋白的脑片，在正置激光共聚焦显微镜下观察神经元树突棘的形态，每张脑片采集 3～5 支树突的清晰 3D 图像；

用显微图像分析软件 Imaris 9.9 分析各组树突棘的密度、形态等指标的变化。

3.5.3 PrL、IL 区 PSD-95、Syn 蛋白含量

采用免疫蛋白印迹（Western blot，WB）测定 PrL、IL 区相对表达量。具体流程如下：

1.样品的制备及蛋白浓度的测定

（1）在脑组织取材前一天对 EP 管、镊子、剪刀、刀片进行消毒，准备好液氮、冰块，取材器械降温预冷处理，在冰上进行整个取材过程（确保蛋白不发生降解）；

（2）三箱实验后，各组随机抓选 3 只大鼠，采用腹腔注射相应剂量巴比妥钠（50 mg/kg）麻醉处理，待其进入深度麻醉状态后断颈处死，取脑后，立刻拿出大鼠脑切片模具，使脑组织与模具贴合，放入负 80°冰箱内快速冷冻 3min，待冷冻完毕后，用刀片切取 mPFC 区脑组织，放入预冷后的 0.01M 的 PBS 中，用镊子分别取出 PrL、IL 区脑组织放入 EP 管内，冷冻处理，待整个取材结束，将 EP 管放入负 80° 冰箱储存，用于 PrL、IL 区 PSD-95、Syn 的 WB 蛋白检测。

（3）为了给蛋白去磷酸化以及避免蛋白降解，需在脑组织添加包含磷酸酶抑制及蛋白酶抑制剂的细胞裂解液（细胞裂解液配方：RIPA 裂解液与蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、0.4M 的 NaF 按 1 比 0.01、0.01、0.05 的比例混合均匀），每 0.1g 脑组织样品配备 1ml 的细胞裂解液；

（4）将装有细胞裂解液及脑组织的 EP 管放入生物均质仪中充分匀浆，至 EP 管中观察不到块状的脑组织（每次研磨 30s，取出观察）；

（5）为了使细胞裂解液与脑组织反应充分，将匀浆后的 EP 管放于冰上裂解 30min，之后置于提前降温到 4°的离心机中离心 15min，取上清液转移至另一 EP 管中；

（6）每组蛋白浓度及上样体积采用 BCA 法确定。

（7）将 5×loading buffer 与上清液按 1：4 混合，放入水（96° ）中变性 600s 制备蛋白样品，根据各组蛋白浓度测定结果提取 30μg 蛋白。

2.免疫蛋白印迹

（1）使用洗洁精清洗玻璃板，待表面的污渍去除后用 ddH_2O 润洗，放置于暖箱中干燥，之后组装好玻璃板，检查有无漏液；

（2）先制作分离胶，在适合容量的 EP 管中依次加入分离胶试剂，注意最后添加 TEMED，快速混合均匀，立即用胶头滴管将分离胶转移至前后玻璃板的夹缝中，在离长板上缘 1～2cm 处停止注入分离胶，用合适的移液枪缓慢加入无水乙醇（此过程应仔细操作防止形成气泡），静待其凝胶 40min 后倒尽无

水乙醇，再配置浓缩胶，将浓缩胶加满至长板上缘处，轻轻插上加样梳避免出现气泡，静待其凝胶 30min 后密封保存至 4°冰箱备用；

（3）上样与电泳：提前检测内侧电泳槽是否有漏液现象，从 4°冰箱取出玻璃板固定在电泳槽内，垂直拔出加样梳，在内槽中缓慢加入电泳液将气泡排出。根据各蛋白所需上样量，使用适宜的移液枪将其加入到上样孔内，然后在两侧各加入 5μLMarker，往外槽中加入电泳液后，将正极和负极对准，打开电源。设定 80 V，进行 30 分钟的电泳，当 Marker 走到分离胶的时候将其调节到 120 V，约 90 分钟之后，当溴酚蓝即将离开分离胶底端时，切断电源，电泳结束；

（4）蛋白质转印：在电泳的过程中准备好适当尺寸的 PVDF 薄膜、滤纸、海绵等其他转膜材料。在 PVDF 膜的左上方切出一条切口，用来标示蛋白质序列，然后在甲醇中反应 15 秒，然后用转膜缓冲溶液将其和过滤纸一起浸渍。在完成电泳后，将玻璃片轻轻揭开，然后将其置于转膜缓冲剂中，并将其按“负电极—海绵—滤纸—胶— PVDF 膜—滤纸—海绵—正电极”的顺序进行装配和固定，然后将其置于转槽内，以 200mA、120min 的条件进行转膜；

（5）待转膜结束，将 PVDF 薄膜放置于摇床上，TBST 清洗 5 分钟，反复三次，然后在常温下用 5%脱脂奶粉封闭 60 分钟；

（6）一抗孵育：待封闭及洗涤后，加入突触前标志蛋白 Synaptophysin（Syn，兔来源，以 1:10000 稀释）、突触后标志蛋白 PSD-95（小鼠来源，按 1:1000 的比例稀释）及内参蛋白β-actin（小鼠来源，以 1:10000 稀释）抗体，4℃孵育过夜；

（7）二抗孵育：待一抗孵育及洗涤后，加入山羊抗小鼠（按 1:5000 的比例稀释）、山羊抗兔（按 1:3000 的比例稀释）二抗，室温孵育 2 h；

（8）检测与显影：待二抗孵育及洗涤后，配置 ECL 发光液避光保存。于显影板上将 PVDF 薄膜铺平，均匀滴上发光液，用全自动化学发光系统进行显影拍摄。

3.蛋白含量分析

利用 Image J 软件进行定量分析，并通过计算目标蛋白与内参蛋白的灰阶比来评估其相对表达量。

3.5.4 PSD-95、MAP1A、MARK1、PSD-95 与 MAP1A 共标、PSD-95 与 MARK1 共标 RNA 阳性颗粒数

采用 RNA 原位杂交实验（RNASCOPE）。具体流程如下：

1.样品的制备

（1）三箱实验后，各组随机抓选 3～4 只大鼠，腹腔注射巴比妥钠（50 mg/kg）进行麻醉，固定四肢；

（2）在解剖前使用 0.1M 的 PBS 测试灌注设备，确保设备无故障。镊子提起腹部皮肤，剪开腹部、打开胸腔，沿腹腔两侧朝上剪开形成 U 形，当到达膈肌时，迅速剪开形成气胸，剪断两侧肋弓，用镊子将腹部皮肤向头部左外侧翻起固定，显现心脏，将灌注针从左心室刺入，同时剪开右心耳，当观察到有血液流出时迅速打开灌注机进行灌注，先用 0.1M 的 PBS 清洗干净血液，然后，用 4%PFA 注入，大鼠出现明显硬化和尾部僵硬即可，之后使大鼠头部分离，去除头部皮肤，剪开顶骨，取出脑组织，灌注成功的表现为脑组织呈蜡白色；

（3）将脑组织放入 4%PFA 固定 1 晚，后用蔗糖梯度法进行脱水，包埋，放入负 80°冰箱保存；

（4）将脑组织放入冰冻切片机中（刀片温度-25°，箱体温度-20°），进行冠状面切片，厚度 8μm，每只大鼠挑选 4～5 张含 PrL 区域的脑片，固定于玻片上，然后置于负 80°冰箱储存。

2.RNA 原位杂交

（1）将脑片放置于脑片保存盒中，使用 0.01M 的 PBS 清洗 OCT ，每次 5min，一共两次，清洗完毕后将脑片放入载玻片架上，放进 60 度恒温箱中烤片 30min；

（2）待烤片完毕，置于 4%的 PFA 中反应 13min，然后按顺序置于 50%、75%、100%的乙醇溶液中，逐级脱水，每次 5min，然后室温干燥；

（3）从 4°冰箱中取出双氧水，依次滴在各个脑片上，使其反应 10min，之后使用 0.01M 的 PBS 清洗 3 次，每次 5min；

（4）靶标本的热修复：将 450ml 的 ddH2O 与 50ml 的标本修复液放入烧杯中混合均匀，用保鲜膜封闭瓶口，放入烤箱中加热至沸腾，取出，插入温度计，待温度降低至 98°时，将装着脑片的载玻片架放入修复液反应 min，之后取出用 ddH2O 降温处理，再放入 100%乙醇溶液中干燥，用阻水笔围绕脑切片画阻水圈；

（5）在阻水圈内加入 RNA 蛋白酶，放于杂交炉反应（40°，30min），反应完毕使用 0.01M 的 PBS 清洗 2 次，每次 1min；

（6）从 4°冰箱中取出探针，将 Probe-Rn-MARK1-C1＋Probe-Rn-Dlg4-C2 与 Probe-Rn-MAP1A-C3 按 1：50 的比例混合均匀，靶标本脑片中每份滴加 50ml 的含 C1、C2、C3 的工作液探针，阴性对照组加入 Negative 探针，阳性对照组加入 Positive 探针，放置于杂交炉中孵育 2h，在此过程中，配置清洗液，

将浓缩清洗液与 ddH_2O 按 1：50 的比例混合均匀于烧杯中，待孵育完毕，使用清洗液清洗 2 次，每次 3min；

（7）待清洗完毕后，滴加 AMP1 试剂 1~2 滴，放置于杂交炉反应后（40°，0.5h），清洗液清洗 2 次，每次 3min，再滴加 AMP2 试剂 1~2 滴，放置于杂交炉反应（40°，0.5h），使用清洗液清洗 2 次，再滴加 AMP3 试剂 1~2 滴，放置于杂交炉反应（40°，15min）后，使用清洗液清洗 2 次；

（8）往脑片中滴加 1~2 滴 HRP-C1 试剂，放入杂交炉中反应（40°，15min），在 HRP-C1 试剂反应的过程中配置荧光染料，将浓缩的 Opal 520 Reagent 试剂用 TSA 稀释 15 倍，保存至 EP 管内，用锡箔纸避光保存，待 HRP-C1 试剂反应完成，使用清洗液清洗 2 次，往每份脑片滴加 50ml 的荧光染料，置于杂交炉中（40°，0.5h），之后清洗 2 次，滴加 HRP 阻断剂，放入杂交炉中反应（40°，0.5h），再清洗两次，之后重复此步骤将 HRP-C1 替换成 HRP-C2、HRP-C3，Opal 520 Reagent 替换成 Opal 570 Reagent、Opal 690 Reagent；

（9）关闭杂交炉，取出脑片，用清洗液清洗 2 次，往各个脑片中迅速滴加 DAPI 试剂 1~2 滴，反应 1min，再次使用清洗液清洗 2 次，吸尽表面的水分，将合适剂量的防淬灭封片剂滴加于玻片上，最后小心的将盖玻片盖上以防止产生气泡，用中性树脂封片，放入 4°冰箱内避光保存；

3.分析

使用正置荧光显微镜采集 PrL 区域各通道信号，依次从 5X、10X、20X、40X 倍镜下寻找目标区域，待使用 40X 倍镜时，调整焦距至视野清晰，每张脑片拍摄 2～3 个视野。Imaris 9.9 软件分析各组脑片 MARK1、PSD-95、MAP1A RNA 阳性颗粒数及其共定位情况。

3.6 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析，所有数据用均数±标准误（mean±SEM）表示。多组间比较采用双因素方差分析（Two-way ANOVA），当主效应不显著但交互效应显著时，满足方差齐性检验的数据两两比较采用最小显著性差异法（LSD 法），若方差不齐则采用 Tamhane’s T2 检验法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

4 研究结果

4.1 三箱社交行为学测试结果

如图 2 及表 4 所示，与 NS 组相比，ASD 组大鼠在陌生鼠所在箱体中的活动时间显著减少（P＜0.001），中间箱活动时间显著增加（P＜0.001）；说明运动干预可以有效增加 ASD 组大鼠在陌生鼠所在箱体中的活动时间（P＜0.05），降低中间箱活动时间（P＜0.05）；造模方式和生活方式两个主效应因素对大鼠在空箱的活动时间无显著影响。与 NS 组比较，ASD 组大鼠嗅探陌生大鼠的时间（P＜0.001）和频率（P＜0.05）显著下降，经运动干预后 ASDE 组的嗅探陌生大鼠的时间（P＜0.01）和频率（P＜0.01）较 ASD 组有显著改善；各组大鼠嗅探空笼的时间和频率无显著差异。

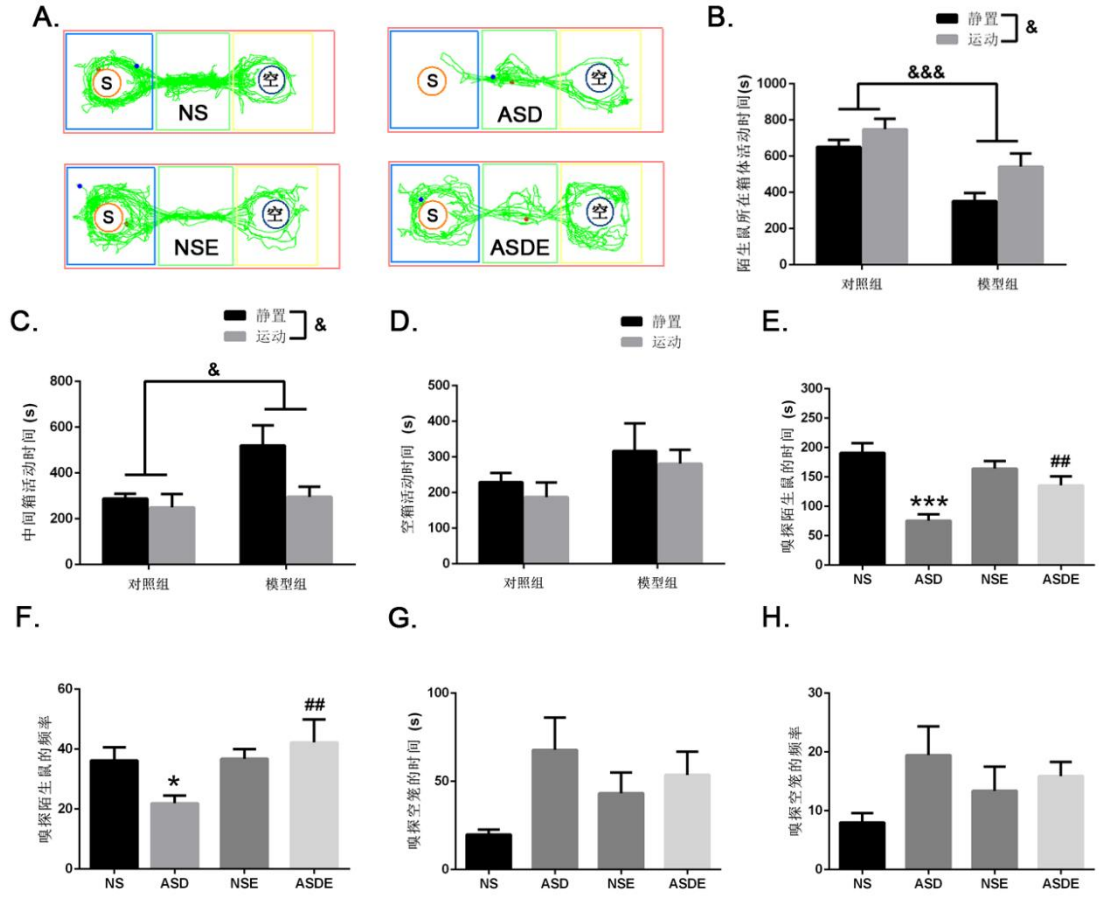

图 2 三箱社交行为学实验结果

A: 各组三箱社交实验活动轨迹（S1 代表 stranger1，空代表空笼子）；B：各组大鼠在陌

生鼠 stranger1 所在箱体活动的时间；C：各组大鼠在中间箱体活动的时间；D：各组大鼠在空箱体活动的时间；E：各组大鼠嗅探陌生鼠 strange1 的时间；F：各组大鼠嗅探陌生鼠 strange1 的频率；G：各组大鼠嗅探空笼子的时间；H：各组大鼠嗅探空笼子的频率，&代表 *P*<0.05； &&&代表 *P*<0.001;*代表对比 NS P<0.05，***代表对比 NS P<0.001，##代表对比 ASD P<0.01。

表 4 三箱实验结果（X±SEM）

组别	N	大鼠在各箱体花费的时间（s）			头部接触次数		大鼠嗅探时间（s）	
		Stranger1	Center	Empty	Stranger1	Empty	Stranger1	Empty
NS	9	669.85±38.55	280.7±21.67	222.84±28.19	36.00±5.00	7.63±1.77	198.51±16.64	18.58±2.84
ASD	11	375.38±58.15***	607.±105.29***	207.97±70.54	19.75±3.16*	10.63±2.42	76.83±15.15***	34.88±7.51
NSE	10	786.40±66.23	277.4±70.51	127.92±12.46	35.75±3.94	7.38±0.96	171.59±14.60	26.94±5.42
ASDE	9	521.05±78.57#	312.9±46.53#	275.20±44.12	42.75±8.71##	14.63±2.31	136.64±17.53##	44.1±10.26

注：*代表对比 NS P<0.05，***代表对比 NS P<0.001，#代表对比 ASD P<0.05，##代表对比 ASD P<0.01。

4.2 树突棘形态检测结果

如图 3，表 5、6 所示，本实验通过共聚焦显微镜观察各组 PrL、IL 树突棘形态及密度情况发现，相对于 NS 组，ASD 组 PrL 区总树突棘密度、蘑菇状树突棘密度、短粗状树突棘密度均显著增加（P＜0.001、P＜0.01、P＜0.001），瘦长状树突棘密度稍有增加，但无明显差异（P＞0.05），IL 区总树突棘密度、蘑菇状树突棘密度、瘦长状树突棘密度均略有下降，但无明显差异（P＞0.05、P＞0.05、P＞0.05）、短粗状树突棘密度略有增加，但无明显差异（P＞0.05）；经过运动干预后，相对于 ASD 组，ASDE 组 PrL 区总树突棘密度、蘑菇状树突棘密度、短粗状树突棘密度均显著下降（P＜ 0.001、P＜ 0.001、P＜ 0.001），瘦长状树突棘密度稍有下降，但无明显差异（P＞0.05），IL 区总树突棘密度、蘑菇状树突棘密度略、瘦长状树突棘密度、短粗状树突棘均略有下降，但无明显差异（P＞0.05、P＞0.05、P＞0.05、P＞0.05）。

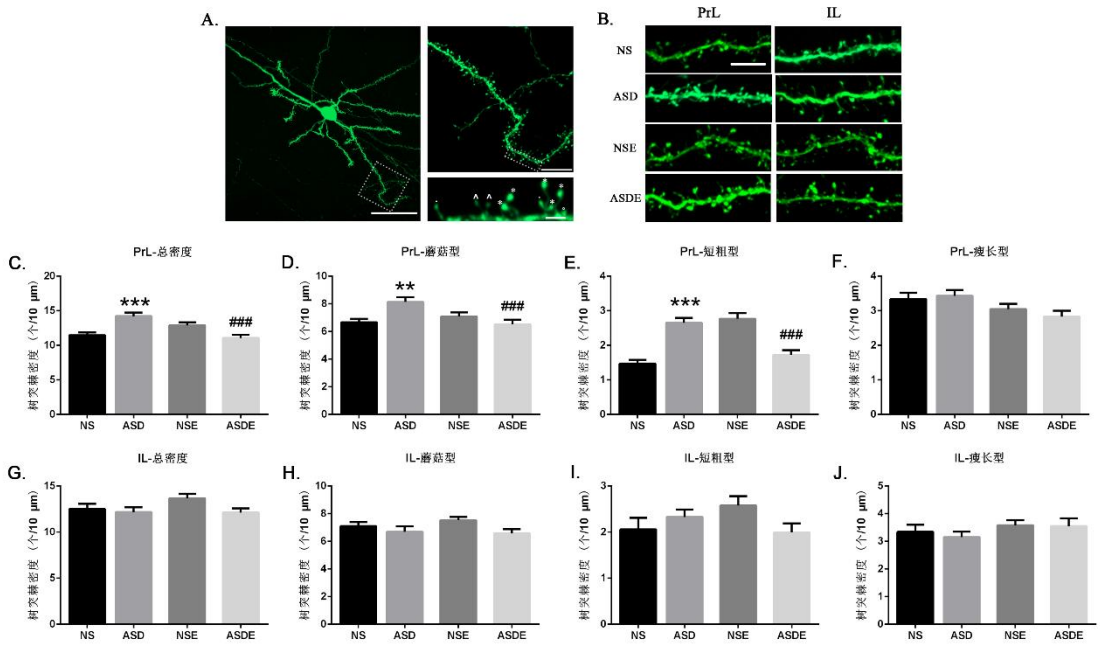

图 3 树突棘形态观察结果

A：神经元、树突和树突附着的代表形态；“○”代表粗短的树突棘，“^”代表丝状伪足。图片分别为 50 微米、10 微米和 1 微米； B：各组 PrL、IL 区树突棘形态代表图；C：PrL 区总树突棘密度；D:PrL 区蘑菇型树突棘密度；E：PrL 区短粗型树突棘密度；F：PrL 区瘦长型树突棘密度；G：IL 区总树突棘密度；H：IL 区蘑菇型树突棘密度；I：IL 区短粗型树突棘密度；J：IL 区瘦长型树突棘密度；**代表对比 NS $P< 0.01$，***代表对比 NS $P< 0.001$;###代表对比 ASD $P< 0.001$。

表 5 运动干预前后大鼠 PrL 区各树突棘密度实验结果（X±SEM）

组别	N	总树突棘密度	短粗型树突棘密度	蘑菇形树突棘密度	瘦长型树突棘密度
NS	3	11.48±0.38	1.47±0.11	6.66±0.26	3.34±0.18
ASD	4	14.23±0.49***	2.65±0.14***	8.14±0.35**	3.43±0.17
NSE	4	12.90±0.42	2.77±0.16	7.09±0.29	3.05±0.15
ASDE	3	11.06±0.47###	1.72±0.14###	6.51±0.34###	2.83±0.17

注：**代表对比 NS $P < 0.01$，***代表对比 NS $P< 0.001$； ###代表对比 ASD $P < 0.001$。

表 6 运动干预前后大鼠 IL 区各树突棘密度实验结果（X±SEM）

组别	N	总树突棘密度	短粗型树突棘密度	蘑菇形树突棘密度	瘦长型树突棘密度
NS	3	12.50±0.58	2.06±0.25	7.10±0.30	3.34±0.26
ASD	4	12.17±0.53	2.33±0.16	6.69±0.39	3.15±0.20
NSE	4	13.67±0.48	2.58±0.20	7.52±0.25	3.58±0.19
ASDE	3	12.12±0.45	1.99±0.20	6.58±0.31	3.55±0.28

4.3 内侧前额叶皮层 PSD-95、Syn 蛋白表达变化结果

如图 4 及表 7 所示，相对于 NS 组，ASD 组 PrL 区 PSD95 蛋白表达显著升高（P＜0.05），虽 Syn 蛋白水平有所降低，但无统计学意义（P＞0.05）； IL 区 ASD 组与 NS 组相比，PSD95 及 Syn 蛋白的表达量均有所降低，但都无显著性差异（P＞0.05、P＞0.05）。运动干预后，与 ASD 相比，PrL 区 ASDE 组 PSD95 蛋白表达显著降低（P＜0.05）, Syn 蛋白表达稍有增加，但差异不显著（P＞0.05）；IL 区 ASDE 组 PSD95 及 Syn 的表达量稍有升高，但两者都没有显著性差异（P＞0.05、P＞0.05）。

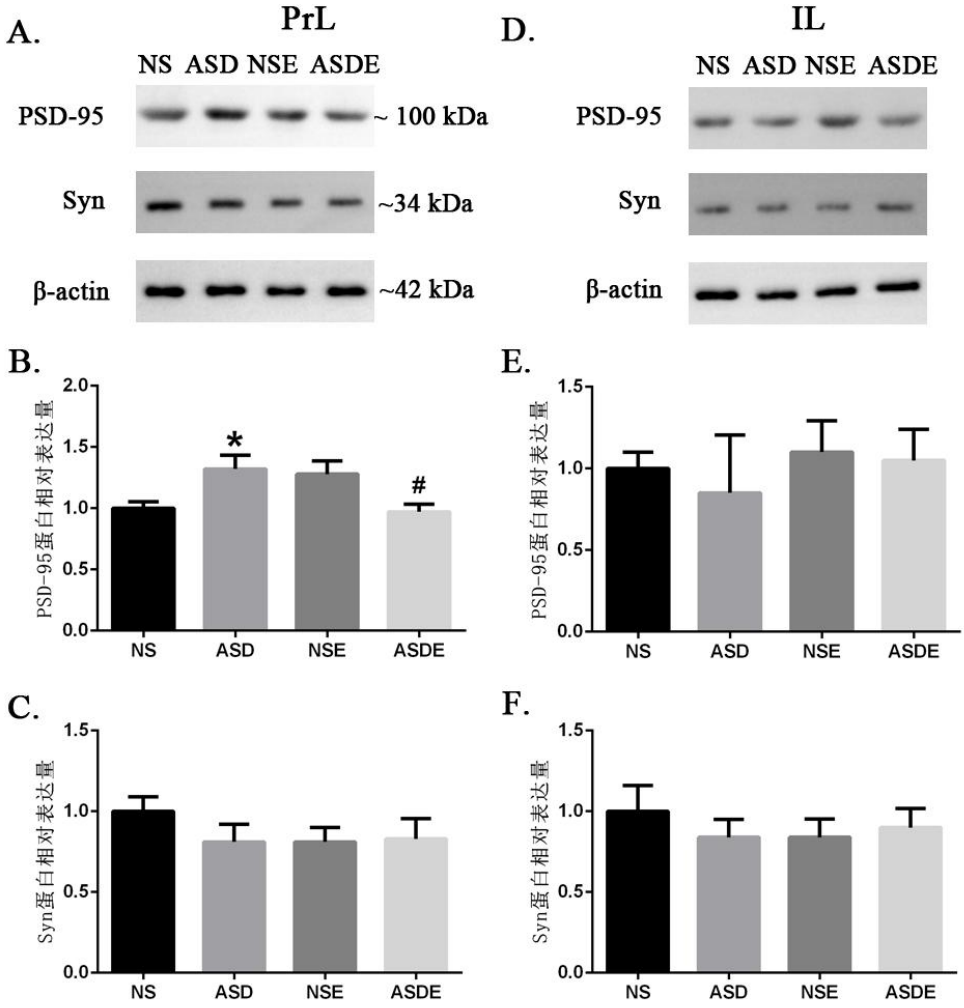

图 4 WB 蛋白条带及结果

A：各组大鼠 PrL 区 PSD-95、Syn、β-actin 蛋白相对表达量代表图； B：各组大鼠 PrL 区 PSD-95 蛋白相对表达量；C：各组大鼠 PrL 区 Syn 蛋白相对表达量；D：IL 区 PSD-95、Syn、β-actin 蛋白相对表达量代表图； E：各组大鼠 IL 区 PSD-95 蛋白相对表达量； F：各组大鼠 IL 区 Syn 蛋白相对表达量；*表示对比 NS $P < 0.05$#表示对比 ASD $P < 0.05$。

表 7 运动干预后各组大鼠 PrL、IL 区 PSD95 Syn 蛋白表达的变化实验结果（X±SEM）

组别	N	PrL 区 PSD95	IL 区 PSD95	PrL 区 Syn	IL 区 Syn
NS	3	1.00±0.05	1.00±0.10	1.00±0.09	1.00±0.16
ASD	3	1.32±0.11*	0.85±0.36	0.81±0.11	0.84±0.11
NSE	3	1.28±0.11	1.10±0.19	0.81±0.09	0.84±0.11
ASDE	3	0.97±0.06#	1.05±0.19	0.83±0.12	0.90±0.12

注：*代表对比 NS P < 0.05；#代表对比 ASD P < 0.05。

4.4 RNASCOPE 检测实验结果

如图 5 及表 8 所示，与 NS 组相比较，ASD 组 PrL 区 *PSD-95* RNA 阳性颗粒数显著增加（P＜0.01）、*MAP1A* RNA 阳性颗粒数显著增加（P＜0.001）、*MARK1* RNA 阳性颗粒数显著增加（P＜0.001）、*MAP1A* 与 *PSD-95* 共标 RNA 阳性颗粒数显著增加（P＜0.001）、*MARK1* 与 *PSD-95* 共标 RNA 阳性颗粒数显著增加（P＜0.001）、*MARK1* 与 *MAP1A* 共标 RNA 阳性颗粒数显著增加（P＜0.001）；经过运动干预后，与 ASD 组相比较，ASDE 组 *PSD-95* RNA 阳性颗粒数显著下降（P＜0.01）、*MAP1A* RNA 阳性颗粒数显著下降（P＜0.001）、*MARK1* RNA 阳性颗粒数显著下降（P＜0.05）、*MAP1A* 与 *PSD-95* 共标 RNA 阳性颗粒数显著下降（P＜0.001）、*MARK1* 与 *PSD-95* 共标 RNA 阳性颗粒数显著下降（P＜0.001）、*MARK1* 与 *MAP1A* 共标 RNA 阳性颗粒数显著增加（P＜0.001）。

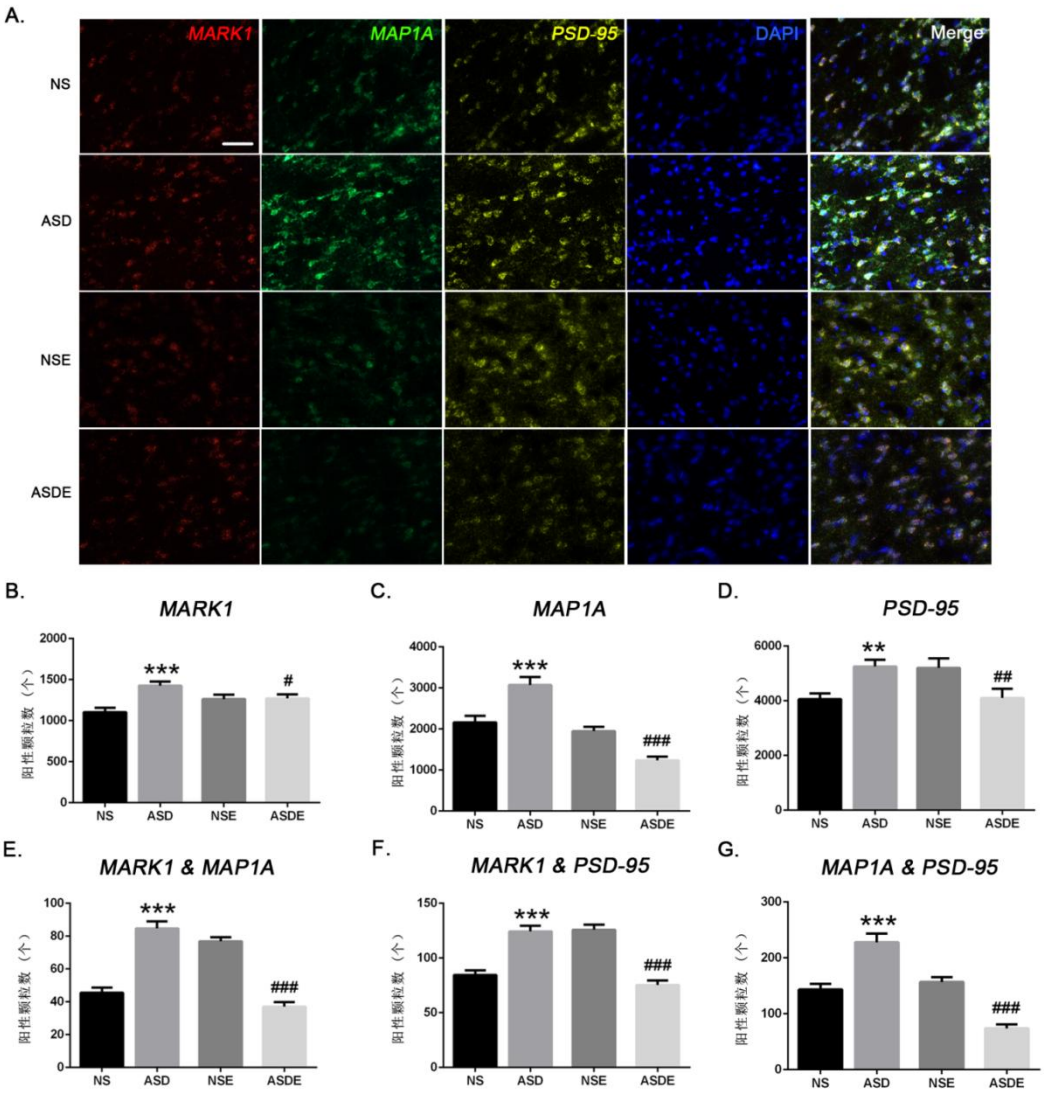

图 5 RNASCOPE 实验结果

A：各组大鼠 RNASCOPE 结果代表图；B：各组大鼠 *MARK1* RNA 阳性颗粒数结果；C：各组大鼠 *MAP1A* RNA 阳性颗粒数结果；D: 各组大鼠 *PSD-95* RNA 阳性颗粒数结果；E: 各组大鼠 *MARK1* 和 *MAP1A* 共标 RNA 阳性颗粒数结果；F: 各组大鼠 *PSD-95* 和 *MARK1* 共标 RNA 阳性颗粒数结果；G：各组大鼠 *MAP1A* 和 *PSD-95* 共标 RNA 阳性颗粒数结果；**代表对比 NS P<0.01，***对比 NS P<0.001;#代表对比 ASD P<0.05，###代表对比 ASD P<0.001。

表 8 运动干预前后各组大鼠 PrL 区 *MARK1 MAP1A PSD95*RNA 阳性颗粒数结果（X±SEM）

组别	N	MARK1	MAP1A	PSD95	MAP1APSD95	MARK1PSD95	MAP1AMARK1
NS	3	1103.57±51.67	2162.91±159.69	4056.31±212.24	143.37±9.93	84.51±4.14	66.71±21.04
ASD	4	1426.23±49.93***	3072.63±195.61**	5253.88±249.23**	227.80±15.66***	124.25±5.37***	84.73±4.32***
NSE	3	1263.28±51.95	1947.18±104.32	5201.83±346.14	156.78±8.84	125.83±4.55	76.85±2.56
ASDE	3	1271.35±48.02$^{\#}$	1236.00±88.72$^{\#\#\#}$	4104.53±338.02$^{\#}$	73.82±7.30$^{\#\#\#}$	75.32±4.29$^{\#\#}$$^{\#}$	37.06±2.71$^{\#\#\#}$

注：**代表对比 NS P<0.01，***代表对比 NS P<0.001;#代表对比 ASD P<0.05，###代表对比 ASD P<0.001。

5 讨论与分析

在本研究使用了被广泛认可并使用的孕期注射 VPA 诱导的 ASD 大鼠模型，给予 4 周游泳联合转轮跑台运动干预，运用三箱社交行为学实验检测运动干预前后 ASD 大鼠的社交能力，通过共聚焦显微镜观察运动干预前后树突棘形态及密度变化，WB 检测运动干预前后 PSD-95、Syn 蛋白相对表达量的改变，RNASCOPE 实验检测运动干预前后 *PSD-95*、*MAP1A*、*MARK1* RNA 阳性颗粒数的变化。我们的结果证明了运动干预能有效改善 ASD 大鼠的社交能力，并对 PrL 区树突棘重塑有积极影响，运动对树突棘重塑的影响在分子层面上可能与 PSD-95/MAP1A/MARK1 有关。

5.1 运动干预对 ASD 大鼠社交能力的影响

研究表明，运动是改善 ASD 人群社交能力及其他核心障碍、并发症的有效手段。三箱社交实验可以通过观察与陌生鼠接触的时间及频率来评价其社交和新奇偏好能力。

三箱社交实验结果显示：与 NS 组相比，ASD 组大鼠在陌生鼠所在箱体中的活动时间显著减少（P＜0.001），中间箱活动时间显著增加（P＜0.001）；说明运动干预可以有效增加 ASD 组大鼠在陌生鼠所在箱体中的活动时间（P＜0.05），降低中间箱活动时间（P＜0.05）；造模方式和生活方式两个主效应因素对大鼠在空箱的活动时间无显著影响。与 NS 组比较，ASD 组大鼠嗅探陌生大鼠的时间（P＜0.001）和频率（P＜0.05）显著下降，经运动干预后 ASDE 组的嗅探陌生大鼠的时间（P＜0.01）和频率（P＜0.01）较 ASD 组有显著改善；各组大鼠嗅探空笼的时间和频率无显著差异。

行为学结果表明 4 周中等强度的游泳运动结合转轮跑步干预可以显著改善 ASD 大鼠社交障碍。

5.2 运动干预对 ASD 大鼠前额叶皮层突触结构可塑性的影响

突触是大脑交流的基本单位，也是信息的加工和传递的重要场所。树突棘是兴奋性突触所在的树突轴上的突起，突触和树突棘是动态的结构，其可塑性对学习和记忆至关重要[9]。而树突棘结构的可塑性与突触功能和可塑性紧密相关，树突棘的增大伴随着突触的长期增强、树突棘的缩小伴随着突触的长期抑

制，其密度和形态的变化影响突触的形成，维持和消除，从而影响着神经回路的建立与重塑[112]。ASD 的发生与突触异常变化密切相关，ASD 人群中主要的神经元结构表型变化包括了树突棘的畸变、修剪，消除发生障碍，在早期的过快的生长和形成[6]。因此，本研究使用正置激光共聚焦显微镜观察神经元树突棘的密度与形态变化来了解运动对 ASD 大鼠突触结构可塑性的影响。mPFC 区能将信息接受、整合、输出到多个脑区如：杏仁核、下丘脑、海马、脑干，是社交，认知功能的关键调控者，还在记忆、决策、情绪调节上发挥重要作用[10, 113-115]。而一般认为啮齿类动物的 PrL 区与 IL 区功能与人类 mPFC 区相似[116]，因此，本研究选择 PrL、IL 亚区作为观察区域。

一些研究报告了与 ASD 相关老鼠模型异常树突棘的形态变化，在 VPA 诱导的 ASD 模型鼠中，Mahmood 等人发现海马区整个树突棘密度没有增加、蘑菇状增加、瘦长状和短粗状减少[117]，王菲菲等人发现 PFC 区未成熟状树突棘密度增加并且总树突棘、成熟型蘑菇状和粗短状树突棘密度降低[8]，Isabel Barón-Mendoza 等人在皮层神经元的原代培养物中发现树突棘密度的增加[118]。另外在其他 ASD 模型中，*Shank3* 基因突变型发现海马区树突棘密度增加[119]，*Prkn* 基因敲除小鼠前额叶皮层表现树突分枝和棘数目减少[120]。造成这些结果不一致的原因可能与大脑区域、物种和方法的差异有关[117, 121]，但是都显示出了 ASD 的病理学与树突棘结构的异常变化有关。运动干预改善 ASD 症状的生理机制并未完全知晓，在其他精神障碍疾病如阿尔兹海默症中，运动干预能有效改善树突棘的数量与树突复杂性、增强突触结构可塑性从而改善症状。本实验结果发现：与 NS 组比较，ASD 组 PrL 区的神经元树突棘总密度显著增加，其中以蘑菇型和短粗型形态的树突棘密度增加为主；经运动干预后，与 ASD 组比较，ASDE 组神经元树突棘总密度、蘑菇型和短粗型树突棘密度均显著降低，各组瘦长型树突棘密度无显著变化。此外，IL 区各组神经元树突棘总密度和形态无显著差异。PrL 区与 IL 区的结果不同可能与其各自投射模式、解剖位置、决策行为中参与度不同有关。决策行为涉及多个认知过程，背侧 mPFC （ACC 和 dPrL）参与程度更高，而腹侧 mPFC （vPrL 和 IL）较少，同时背侧 mPFC 与背侧海马、背侧纹状体和前运动皮层连接性更强与特定动作的选择和执行有关，而腹侧 mPFC 与腹侧海马、腹侧纹状体、杏仁核和下丘脑的连接性更强与动机成分和全身状态监测有关[11]。同时在大鼠中虽然 PrL 与 IL 有部分共同的投射区域，但对许多其他大脑投射区域并不相同，PrL 的投射模式似乎更倾向于调节认知功能，而 IL 更倾向调节内脏/自主活动[122]，甚至在调节恐惧情绪时，二者呈现相反的作用[123]。事实上，有研究显示 ASD 社交缺陷与小脑-PrL 神经回路中 PrL 区的兴奋性活动升高有关，抑制 PrL 区兴奋性活动可以有效改善社

交障碍。另有项研究发现在 ASD 模型鼠 mPFC 区存在神经元兴奋性和抑制性（E:I）平衡的改变，通过增加抑制性小白蛋白（PV）神经元兴奋性或降低兴奋性锥体（PYR）神经元兴奋性可以挽救小鼠的社会行为障碍[124]。以上结果说明运动干预能有效调节 PrL 区树突棘结构重塑从而诱导突触可塑性的变化。

5.3 运动干预改善 ASD 大鼠核心障碍可能的机制

基因组分析已经发现了许多 ASD 高风险候选基因如 *CSMD3*、*SHANK3*、*SYNGAP1*、*FMR1* 等。*SHANK3* 基因编码位于兴奋性突触 PSD 上的支架蛋白 SHANK3，通过与其他信号蛋白及支架蛋白如突触处的细胞黏附蛋白、树突棘内的细胞骨架蛋白相互作用，参与突触形成、结构及功能，SHANK3 缺陷鼠是一种经典的 ASD 模型，多项研究发现该模型中存在突触可塑性的缺陷[125, 126]。*SYNGAP1* 编码一种突触间隙蛋白（SynGAP），该蛋白主要定位于新皮质锥体神经元的树突棘、抑制 NMDA 和 AMPA 介导的相关信号通路及对突触可塑性的调节，*SYNGAP1* 单倍不足会使树突棘过早的成熟，破坏 E/I 平衡，导致认知功能缺陷[127]。*CSMD3* 编码同名跨膜蛋白，可能作为胞外或跨膜蛋白的共受体从而调节树突的发育，CSMD3 的缺失会导致小鼠小脑浦肯野细胞形态发生异常、内在兴奋性增加、突触可塑性发生缺陷以及 ASD 样行为[128]。总而言之，许多 ASD 候选基因都涉及了突触异常，然而相关分子是如何介导突触功能在很大程度上仍不清楚，因此探究这些机制对解释 ASD 的病因学以及制定针对性的治疗方案具有深远意义。

PSD-95 可能是 ASD 强力候选基因，一项中国人群的病例对照研究表明编码 PSD-95 的 *DLG4*rs1331 处的突变与 ASD 的发生显著相关[129]。PSD-95 通过与含 NR2B 的 NMDA 受体相互作用调节突触的成熟与功能以及在突触可塑性如 LTP/LTD 起关键诱导作用。并且许多研究观察到在 ASD 模型鼠中存在 PSD-95 的过度表达[130, 131]，而 PSD-95 的过度表达会导致树突棘密度与大小的增加[82]。树突棘的密度对细胞的功能和连接有直接的影响，树突棘密度增加，意味着兴奋性突触密度增加，而突触密度异常的增加会导致局部兴奋性连接过度加强从而影响整个神经回路。有趣的是，mPFC 区 *PSD-95* 缺陷老鼠同样会表现出社交、记忆、学习缺陷，与 ASD 人群的异常行为一致[83]。本实验结果发现：与 NS 组相比较，ASD 组 PrL 区 PSD-95 蛋白相对表达量以及 RNA 阳性颗粒数显著升高；经运动干预后，与 ASD 组相比较，ASDE 组 PrL 区 PSD-95 蛋白相对表达量以及 RNA 阳性颗粒数显著降低。MAP1A 是一种微管晶格结合蛋白，在微管的稳定方面发挥重要作用，而微管涉及突触的发生及树突棘的发育和稳定。

Rachel A. Myers 在对 ASD 人群基因组功能区域的深度重新测序中发现 *MAP1A* 具有显著的过多的罕见错义变异[132]，在另一项 ASD 人群外显子组序列研究中也表明 *MAP1A* 的突变与 ASD 显著相关[133]。研究表明 MAP1A 维持突触可塑性中的发挥重要作用，*MAP1A* 敲除鼠表现学习、记忆以及 LTP 受损，其机制可能是 MAP1A 与 PSD-93/PSD-95 相互作用将含 NR2A/NR2B 的 NMDA 受体锚定在细胞骨架上[97]。本实验结果发现：与 NS 组相比较，ASD 组 *MAP1A*、*PSD-95* 与 *MAP1A* 共定位 RNA 阳性颗粒数显著升高，经过运动干预后，与 ASD 组相比较，ASDE 组 *MAP1A*、*PSD-95* 和 *MAP1A* 共定位 RNA 阳性颗粒数显著下降。最近 *MARK1* 被鉴定为 ASD 的有力候选基因，ASD 相关的单核苷酸多态性序列 rs12410279 调节 *MARK1* 基因转录。MARK1 是一种微管相关激酶，参与轴突和树突中货物沿微管的运输如线粒体、调节神经元的极化与迁移、同时可以磷酸化 MAP 使其从微管上分离，在 ASD 人群尸检报告中也发现了 MARK1 的高表达[99]。研究显示 MARK1 参与了树突棘形态的发生及结构可塑性的调节，MARK1 在 NMDA 受体的下游被激活，MARK1 介导 PSD-95 鸟苷酸激酶（GK）结构域 Ser-561 处的磷酸化，磷酸化的 Ser-561 会促进 GK 和附近的 Src 同源 3（SH3）结构域之间的分子相互作用，导致其内部构象发生变化，增加 PSD-95 的动力学，促进 PSD 的动态重排，利于 LTP/LTD 的调节，当 *MARK1* 在前脑被特异性地敲除后，海马 CA1 锥体神经元树突棘密度显著降低，形态也发生缺陷，同时老鼠表现出空间学习、记忆缺陷以及焦虑减少[134]，值得注意的是 MARK1 似乎还与焦虑相关，ASD 与双向情感障碍都伴有焦虑情绪，且都有 MARK1 的过表达，而当敲除 *MARK1* 后，焦虑情绪得到了有效的改善。本实验研究结果发现：与 NS 组相比较，ASD 组 *MARK1*、*PSD-95* 与 *MARK1* 共定位 RNA 阳性颗粒数显著升高，经过运动干预后，与 ASD 组相比较，ASDE 组 *MARK1*、*PSD-95* 和 *MARK1* 共定位 RNA 阳性颗粒数显著下降。前期课题组从蛋白修饰水平上发现 ASD 大鼠内侧前额叶皮层 MAP1A、MARK1 蛋白存在多个磷酸化位点的异常激活[19]，本实验从转录水平发现 ASD 大鼠 PrL 区 *PSD-95*、*MAP1A* 和 *MARK1* 的 RNA 表达显著升高， *MARK1* 和 *MAP1A*、*MARK1* 和 *PSD-95* 以及 *MAP1A* 和 *PSD-95* 的共定位增加。运动干预可以逆转 ASD 大鼠 PrL 区异常增加的 *PSD-95*、*MAP1A* 和 *MARK1* 的 RNA 表达，降低分子相互作用。我们推测在 ASD 疾病状态下 PrL 区 MARK1、MAP1A 和 PSD-95 分子表达增加，并且在空间上聚集程度加强，促进分子间相互作用，介导树突棘细胞骨架重排，引起结构重塑，兴奋性突触密度增加，神经环路兴奋和抑制比率升高，从而导致 ASD 大鼠社交障碍；这一病理过程可以被运动干预逆转，从而改善 ASD 大鼠行为异常。

综上所述，本研究结果显示：经运动干预后 ASDE 组的嗅探陌生大鼠的时间和频率较 ASD 组有显著改善，PrL 区神经元树突棘总密度、蘑菇型和短粗型树突棘密度均显著降低，各组瘦长型树突棘密度无显著变化，表明运动干预能有效改善 ASD 大鼠 PrL 的异常突触重塑，改善社交相关行为。进一步，我们的研究发现运动改善 ASD 大鼠社交行为及树突棘结构重塑在分子水平上可能与 MARK1、MAP1A 和 PSD-95 相关。运动能有效逆转 ASD 大鼠 PrL 区 PSD-95 蛋白的异常增加，并且通过 RNAscope 观察到运动后 ASD 大鼠 PrL 区 *MARK1*、*MAP1A* 和 *PSD-95* 的 RNA 阳性颗粒数，*MARK1* 和 *MAP1A*、*MARK1* 和 *PSD-95*、*MAP1A* 和 *PSD-95* 的共定位 RNA 阳性颗粒数均显著降低。我们的结果提示运动可能通过 MARK1/MAP1A/PSD-95 调节 PrL 区树突棘结构重塑，从而改善了 ASD 大鼠异常的神经环路，促进了相关社交行为的恢复。

6 创新与不足

6.1 创新

本研究通过 VPA 诱导的 ASD 模型大鼠，探究运动干预对 PrL、IL 区神经元突触结构可塑性的影响及 PSD-95、MAP1A、MARK1 相关分子的变化，发现运动干预能有效调节 PrL 区的树突棘结构重塑，并且这种影响可能与 PSD-95/MAP1A/MARK1 有关，为探究 ASD 的病因学及运动干预改善 ASD 的可能机制提供新的实验依据。

6.2 不足

没有更深入的探究 PSD-95/MAP1A/MARK1 在调节树突棘可塑性上的通路，没有检测 MAP1A、MARK1 在 PrL 区的蛋白表达量，样本量也相对较少，同时，本研究只做了突触结构部分，而在突触功能上没有进行研究，也没有做 MAP1A、MARK1 对改善 ASD 大鼠社交障碍及突触结构可塑性的相关性研究，希望在之后的研究中改善不足之处进行验证。

7 结论

运动干预能有效改善 ASD 大鼠的社交障碍以及 PrL 区树突棘的结构可塑性，这种积极的影响在分子水平上可能与 MARK1、MAP1A 和 PSD-95 相关。

8 致谢

光阴似箭，白驹过隙。开学时的场景仿佛就在眼前，转眼间，已经到了快毕业的时候，回想起这三年的研究生生活的点点滴滴，有许多人需要被感谢。广州体育学院以其优良的学习氛围、严谨的科研氛围教我求学。本论文是在教授以及老师的悉心指导下完成的。三年来，老师们严谨的学术态度、精益求精的工作作风、诲人不倦的高尚师德以及平易近人的人格魅力让我受益匪浅，感谢各位老师们。同时，也要感谢在论文开题，写作时提出的宝贵意见，以及在做实验过程给我的帮助与鼓励。另外，我还要感谢我的父母，在我求学的生涯中一直在给我关心与鼓励。

9 参考文献

[1] Lord C, Elsabbagh M, Baird G, et al. Autism spectrum disorder [J]. Lancet (London, England), 2018, 392(10146): 508-20.

[2] Zeidan J, Fombonne E, Scorah J, et al. Global prevalence of autism: A systematic review update [J]. Autism research : official journal of the International Society for Autism Research, 2022, 15(5): 778-90.

[3] Zhou H, Xu X, Yan W, 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): 961-71.

[4] 刘爱军. 孤独症患儿发病机制及治疗现状 [J]. 现代诊断与治疗，2022, 33(15): 2241-3.

[5] Kelly E, Meng F, Fujita H, et al. Regulation of autism-relevant behaviors by cerebellar–prefrontal cortical circuits [J]. Nature neuroscience, 2020, 23(9): 1102-10.

[6] Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, et al. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models [J]. Acta neuropathologica, 2017, 134(4): 537-66.

[7] Rubenstein J L, Merzenich M M. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems [J]. Genes, brain, and behavior, 2003, 2(5): 255-67.

[8] Wang F, Wang L, Xiong Y, et al. [Mechanism of valproic acid-induced dendritic spine and synaptic impairment in the prefrontal cortex for causing core autistic symptoms in mice] [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2022, 42(1): 101-7.

[9] Guang S, Pang N, Deng X, et al. Synaptopathology Involved in Autism Spectrum Disorder [J]. Frontiers in cellular neuroscience, 2018, 12: 470.

[10] Gangopadhyay P, Chawla M, Dal Monte O, et al. Prefrontal-amygdala circuits in social decision-making [J]. Nature neuroscience, 2021, 24(1): 5-18.

[11] Diehl G W, Redish A D. Differential processing of decision information in subregions of rodent medial prefrontal cortex [J]. eLife, 2023, 12.

[12] 陈甜, 古松, 苏玉莹. 运动干预对孤独症谱系障碍儿童青少年社交障碍影响的网状 meta 分析 [J]. 中国康复医学杂志, 2023, 38(12): 1719-27.

[13] Mu L, Cai J, Gu B, et al. Treadmill Exercise Prevents Decline in Spatial Learning and Memory in 3×Tg-AD Mice through Enhancement of Structural Synaptic Plasticity of the Hippocampus and Prefrontal Cortex [J]. Cells, 2022, 11(2).

[14] Coley A A, Gao W J. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? [J]. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry, 2018, 82: 187-94.

[15] Lasser M, Tiber J, Lowery L A. The Role of the Microtubule Cytoskeleton in Neurodevelopmental Disorders [J]. Frontiers in cellular neuroscience, 2018, 12: 165.

[16] Gąssowska-Dobrowolska M, Kolasa A, Beversdorf D Q, et al. Alterations in Cerebellar Microtubule Cytoskeletal Network in a ValproicAcid-Induced Rat Model of Autism Spectrum Disorders [J]. Biomedicines, 2022, 10(12).

[17] Chang Q, Yang H, Wang M, et al. Role of Microtubule-Associated Protein in Autism Spectrum Disorder [J]. Neurosci Bull, 2018, 34(6): 1119-26.

[18] Wu Q, Sun M, Bernard L P, et al. Postsynaptic density 95 (PSD-95) serine 561 phosphorylation regulates a conformational switch and bidirectional dendritic spine structural

plasticity [J]. The Journal of biological chemistry, 2017, 292(39): 16150-60.
[19] Tu G, Guo Y, Xiao R, et al. Effects of Exercise Training on the Phosphoproteomics of the Medial Prefrontal Cortex in Rats With Autism Spectrum Disorder Induced by Valproic Acid [J]. Neurorehabilitation and neural repair, 2023, 37(2-3): 94-108.
[20] Lyall K, Croen L, Daniels J, et al. The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders [J]. Annu Rev Public Health, 2017, 38: 81-102.
[21] Rogge N, Janssen J. The Economic Costs of Autism Spectrum Disorder: A Literature Review [J]. Journal of autism and developmental disorders, 2019, 49(7): 2873-900.
[22] 许占斌, 王佳, 孙笑一, et al. 黑龙江省孤独症谱系障碍儿童家庭经济负担现状 [J]. 中国学校卫生, 2018, 39(03): 335-7+42.
[23] Marshall C R, Noor A, Vincent J B, et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder [J]. American journal of human genetics, 2008, 82(2): 477-88.
[24] Hu V W, Devlin C A, Debski J J. ASD Phenotype-Genotype Associations in Concordant and Discordant Monozygotic and Dizygotic Twins Stratified by Severity of Autistic Traits [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(15).
[25] Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, et al. The familial risk of autism [J]. JAMA, 2014, 311(17): 1770-7.
[26] Masini E, Loi E, Vega-Benedetti A F, et al. An Overview of the Main Genetic, Epigenetic and Environmental Factors Involved in Autism Spectrum Disorder Focusing on Synaptic Activity [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21).
[27] Idring S, Magnusson C, Lundberg M, et al. Parental age and the risk of autism spectrum disorders: findings from a Swedish population-based cohort [J]. International Journal of Epidemiology, 2014, 43(1): 107-15.
[28] Waye M M Y, Cheng H Y. Genetics and epigenetics of autism: A Review [J]. Psychiatry and Clinical Neurosciences, 2017, 72(4): 228-44.
[29] Deverman B E, Patterson P H. Cytokines and CNS development [J]. Neuron, 2009, 64(1): 61-78.
[30] Lee B K, Magnusson C, Gardner R M, et al. Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders [J]. Brain Behav Immun, 2015, 44: 100-5.
[31] Bercum F M, Rodgers K M, Benison A M, et al. Maternal Stress Combined with Terbutaline Leads to Comorbid Autistic-Like Behavior and Epilepsy in a Rat Model [J]. J Neurosci, 2015, 35(48): 15894-902.
[32] Borue X, Chen J, Condron B G. Developmental effects of SSRIs: lessons learned from animal studies [J]. Int J Dev Neurosci, 2007, 25(6): 341-7.
[33] Schneider T, Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism [J]. Neuropsychopharmacology, 2005, 30(1): 80-9.
[34] Han Y M Y, Chan M M Y, Shea C K S, et al. Neurophysiological and behavioral effects of multisession prefrontal tDCS and concurrent cognitive remediation training in patients with autism spectrum disorder (ASD): A double-blind, randomized controlled fNIRS study [J]. Brain stimulation, 2022, 15(2): 414-25.
[35] 随广红, 孙凌. 儿童孤独症谱系障碍治疗的研究进展 [J]. 中国妇幼保健，2020, 35(11): 2148-50.
[36] 董晓晓, 陈爱国, 刘智妹, et al. 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 [J]. 中国体育科技, 2020, 56(11): 25-31.
[37] 蒋念, 龚尧, 杨小明, et al. 高压氧治疗儿童孤独症的新进展 [J]. 现代预防医学，2014, 41(04): 686-9.
[38] 张英华, 解丙坤, 洒盼盼. 高压氧辅助治疗孤独症患儿的临床效果 [J]. 医疗装备，2019, 32(10): 121-2.
[39] 姚雪春, 李亚平, 李征, et al. 中医治疗儿童孤独症谱系障碍研究进展 [J]. 河南中医，2023, 43(02): 299-303.
[40] 李亚青, 苗明三, 匡淑一, et al. 基于中西医临床病证特点的孤独症谱系障碍动物模型分析 [J]. 中药药理与临床: 1-17.
[41] 周荣易, 党伟利, 周正, et al. 孤独症谱系障碍动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报，2019, 27(03): 380-6.
[42] Ornoy A, Echefu B, Becker M. Valproic Acid in Pregnancy Revisited: Neurobehavioral, Biochemical and Molecular Changes Affecting the Embryo and Fetus in Humans and in Animals: A Narrative Review [J]. Int J Mol Sci, 2023, 25(1).
[43] Bromley R L, Mawer G E, Briggs M, et al. The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs [J]. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, 2013, 84(6): 637-43.
[44] Nicolini C, Fahnestock M. The valproic acid-induced rodent model of autism [J]. Experimental neurology, 2018, 299(Pt A): 217-27.
[45] Silverman J L, Yang M, Lord C, et al. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism [J]. Nature reviews Neuroscience, 2010, 11(7): 490-502.
[46] 赵刚, 武丽杰. 丙戊酸钠诱导孤独症模型大鼠发育及行为性别差异的研究; proceedings of the 中国中西医结合学会精神疾病专业委员会第十四届学术年会暨首届国际中西医结合精神病学研究进展培训班, 中国湖南长沙, F, 2015 [C].
[47] Wei R, Li Q, Lam S, et al. A single low dose of valproic acid in late prenatal life alters postnatal behavior and glutamic acid decarboxylase levels in the mouse [J]. Behavioural brain research, 2016, 314: 190-8.
[48] 郑文霞, 胡宇玲, 陈笛, et al. 丙戊酸钠诱导小鼠自闭症模型的改良 [J]. 南方医科大学学报，2019, 39(06): 718-23.
[49] Hiser J, Koenigs M. The Multifaceted Role of the Ventromedial Prefrontal Cortex in Emotion, Decision Making, Social Cognition, and Psychopathology [J]. Biol Psychiatry, 2018, 83(8): 638-47.
[50] Solomon M, Yoon J H, Ragland J D, et al. The development of the neural substrates of cognitive control in adolescents with autism spectrum disorders [J]. Biol Psychiatry, 2014, 76(5): 412-21.
[51] Courchesne E, Pierce K, Schumann C M, et al. Mapping early brain development in autism [J]. Neuron, 2007, 56(2): 399-413.
[52] Qin L, Ma K, Wang Z J, et al. Social deficits in Shank3-deficient mouse models of autism are rescued by histone deacetylase (HDAC) inhibition [J]. Nature neuroscience, 2018, 21(4): 564-75.
[53] Donegan J J, Boley A M, Lodge D J. Embryonic stem cell transplants as a therapeutic strategy in a rodent model of autism [J]. Neuropsychopharmacology, 2018, 43(8): 1789-98.
[54] Harris K P, Akbergenova Y, Cho R W, et al. Shank Modulates Postsynaptic Wnt Signaling to

Regulate Synaptic Development [J]. J Neurosci, 2016, 36(21): 5820-32.
[55] Monteiro P, Feng G. SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder [J]. Nature reviews Neuroscience, 2017, 18(3): 147-57.
[56] Gilbert J, O'Connor M, Templet S, et al. NEXMIF/KIDLIA Knock-out Mouse Demonstrates Autism-Like Behaviors, Memory Deficits, and Impairments in Synapse Formation and Function [J]. J Neurosci, 2020, 40(1): 237-54.
[57] Zhao H, Mao X, Zhu C, et al. GABAergic System Dysfunction in Autism Spectrum Disorders [J]. Frontiers in cell and developmental biology, 2021, 9: 781327.
[58] Golden S A, Russo S J. Mechanisms of psychostimulant-induced structural plasticity [J]. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2012, 2(10).
[59] Tang G, Gudsnuk K, Kuo S H, et al. Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits [J]. Neuron, 2014, 83(5): 1131-43.
[60] Hutsler J J, Zhang H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders [J]. Brain research, 2010, 1309: 83-94.
[61] 尤娜, 杨广学. 自闭症诊断与干预研究综述 [J]. 中国特殊教育, 2006, (07): 26-31.
[62] 董继峰, 杜文. 体育锻炼对青少年自闭症康复治疗辅助作用研究 [J]. 体育世界(学术版), 2012, (09): 80-1.
[63] 裴晶晶, 袁雷, 李学恒. 大肌肉群运动干预对孤独症儿童感觉统合功能的影响 [J]. 天津体育学院学报, 2019, 34(06): 527-32+52.
[64] Chan A S, Sze S L, Siu N Y, et al. A chinese mind-body exercise improves self-control of children with autism: a randomized controlled trial [J]. PloS one, 2013, 8(7): e68184.
[65] Schmitz Olin S, McFadden B A, Golem D L, et al. The Effects of Exercise Dose on Stereotypical Behavior in Children with Autism [J]. Med Sci Sports Exerc, 2017, 49(5): 983-90.
[66] Delgado-García J M. [Structure and function of the cerebellum] [J]. Revista de neurologia, 2001, 33(7): 635-42.
[67] Wang S S, Kloth A D, Badura A. The cerebellum, sensitive periods, and autism [J]. Neuron, 2014, 83(3): 518-32.
[68] Hirano T. Purkinje Neurons: Development, Morphology, and Function [J]. Cerebellum (London, England), 2018, 17(6): 699-700.
[69] Kim J E, Shin M S, Seo T B, et al. Treadmill exercise ameliorates motor disturbance through inhibition of apoptosis in the cerebellum of valproic acid-induced autistic rat pups [J]. Molecular medicine reports, 2013, 8(2): 327-34.
[70] Tatu L, Vuillier F. Structure and vascularization of the human hippocampus [J]. Frontiers of neurology and neuroscience, 2014, 34: 18-25.
[71] Barnea-Goraly N, Frazier T W, Piacenza L, et al. A preliminary longitudinal volumetric MRI study of amygdala and hippocampal volumes in autism [J]. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry, 2014, 48: 124-8.
[72] Banker S M, Gu X, Schiller D, et al. Hippocampal contributions to social and cognitive deficits in autism spectrum disorder [J]. Trends in neurosciences, 2021, 44(10): 793-807.
[73] 马晓平. 游泳训练抑制孤独症大鼠炎症反应及细胞凋亡 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(07): 3377-84.
[74] SAH P, FABER E S L, ARMENTIA M L D, et al. The Amygdaloid Complex: Anatomy and

Physiology [J]. 2003, 83(3): 803-34.
[75] 李晋, 梁斯晨, 张嵘. 杏仁核异常与孤独症患者社会交往障碍的关系 [J]. 生理科学进展, 2013, 44(02): 42-5.
[76] Seguin D, Pac S, Wang J, et al. Amygdala subnuclei development in adolescents with autism spectrum disorder: Association with social communication and repetitive behaviors [J]. Brain and behavior, 2021, 11(8): e2299.
[77] Luo Z, Chen J, Dai Y, et al. Treadmill exercise modulates the medial prefrontal-amygdala neural circuit to improve the resilience against chronic restraint stress [J]. Communications biology, 2023, 6(1): 624.
[78] Cho K O, Hunt C A, Kennedy M B. The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein [J]. Neuron, 1992, 9(5): 929-42.
[79] Kim E, Sheng M. PDZ domain proteins of synapses [J]. Nature reviews Neuroscience, 2004, 5(10): 771-81.
[80] Schwenk J, Harmel N, Brechet A, et al. High-resolution proteomics unravel architecture and molecular diversity of native AMPA receptor complexes [J]. Neuron, 2012, 74(4): 621-33.
[81] Anggono V, Huganir R L. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity [J]. Current opinion in neurobiology, 2012, 22(3): 461-9.
[82] El-Husseini A E, Schnell E, Chetkovich D M, et al. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses [J]. Science (New York, NY), 2000, 290(5495): 1364-8.
[83] Coley A A, Gao W J. PSD-95 deficiency disrupts PFC-associated function and behavior during neurodevelopment [J]. Scientific reports, 2019, 9(1): 9486.
[84] Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease [J]. Nature reviews Neuroscience, 2013, 14(6): 383-400.
[85] De Rubeis S, He X, Goldberg A P, et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism [J]. Nature, 2014, 515(7526): 209-15.
[86] Tsai N P, Wilkerson J R, Guo W, et al. Multiple autism-linked genes mediate synapse elimination via proteasomal degradation of a synaptic scaffold PSD-95 [J]. Cell, 2012, 151(7): 1581-94.
[87] Feyder M, Karlsson R M, Mathur P, et al. Association of mouse Dlg4 (PSD-95) gene deletion and human DLG4 gene variation with phenotypes relevant to autism spectrum disorders and Williams' syndrome [J]. The American journal of psychiatry, 2010, 167(12): 1508-17.
[88] Tada T, Sheng M. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis [J]. Current opinion in neurobiology, 2006, 16(1): 95-101.
[89] Okamoto K, Nagai T, Miyawaki A, et al. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity [J]. Nature neuroscience, 2004, 7(10): 1104-12.
[90] Zhou Q, Homma K J, Poo M M. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses [J]. Neuron, 2004, 44(5): 749-57.
[91] Chicurel M E, Harris K M. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus [J]. The Journal of comparative neurology, 1992, 325(2): 169-82.

[92] Chicurel M E, Terrian D M, Potter H. mRNA at the synapse: analysis of a synaptosomal preparation enriched in hippocampal dendritic spines [J]. J Neurosci, 1993, 13(9): 4054-63.

[93] Kapitein L C, Yau K W, Hoogenraad C C. Microtubule dynamics in dendritic spines [J]. Methods in cell biology, 2010, 97: 111-32.

[94] Dent E W. Of microtubules and memory: implications for microtubule dynamics in dendrites and spines [J]. Molecular biology of the cell, 2017, 28(1): 1-8.

[95] Gu J, Zheng J Q. Microtubules in Dendritic Spine Development and Plasticity [J]. The open neuroscience journal, 2009, 3: 128-33.

[96] Waites C, Qu X, Bartolini F. The synaptic life of microtubules [J]. Current opinion in neurobiology, 2021, 69: 113-23.

[97] Takei Y, Kikkawa Y S, Atapour N, et al. Defects in Synaptic Plasticity, Reduced NMDA-Receptor Transport, and Instability of Postsynaptic Density Proteins in Mice Lacking Microtubule-Associated Protein 1A [J]. J Neurosci, 2015, 35(47): 15539-54.

[98] Reese M L, Dakoji S, Bredt D S, et al. The guanylate kinase domain of the MAGUK PSD-95 binds dynamically to a conserved motif in MAP1a [J]. Nature structural & molecular biology, 2007, 14(2): 155-63.

[99] Maussion G, Carayol J, Lepagnol-Bestel A M, et al. Convergent evidence identifying MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1 (MARK1) as a susceptibility gene for autism [J]. Human molecular genetics, 2008, 17(16): 2541-51.

[100] 张楠楠, 吕晓标, 倪伟, et al. 长期太极拳锻炼改善中老年人认知能力的作用 [J]. 中国临床康复, 2006, (26): 7-9.

[101] 于瀛, 亓丰学, 张莉清. 运动对脑可塑性的影响：基于脑血流动力学的证据; proceedings of the 第十二届全国体育科学大会, 中国山东日照, F, 2022 [C].

[102] 赵颂佳. 游泳对 5-6 岁学龄前儿童动作协调能力的影响研究 [D]; 北京体育大学, 2019.

[103] Heyn P, Abreu B C, Ottenbacher K J. The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: a meta-analysis [J]. Archives of physical medicine and rehabilitation, 2004, 85(10): 1694-704.

[104] 马春莲, 丁海超, 梅志强, et al. 中等强度游泳运动对海马突触可塑性的调节 [J]. 体育科学, 2018, 38(03): 34-9+47.

[105] Chen K, Zheng Y, Wei J A, et al. Exercise training improves motor skill learning via selective activation of mTOR [J]. Science advances, 2019, 5(7): eaaw1888.

[106] 於来康, 顾博雅, 李岩, et al. 有氧运动调节 APP/PS1 小鼠海马 CaMKIIα、AMPAR 活性,增加突触可塑性 [J]. 北京体育大学学报，2017, 40(01): 41-5+89.

[107] Chatzi C, Zhang Y, Hendricks W D, et al. Exercise-induced enhancement of synaptic function triggered by the inverse BAR protein, Mtss1L [J]. eLife, 2019, 8.

[108] Yamaguchi N, Sawano T, Fukumoto K, et al. Voluntary running exercise after focal cerebral ischemia ameliorates dendritic spine loss and promotes functional recovery [J]. Brain research, 2021, 1767: 147542.

[109] Xu X, Fu Z, Le W. Exercise and Parkinson's disease [J]. International review of neurobiology, 2019, 147: 45-74.

[110] Pahlavani H A. Exercise therapy to prevent and treat Alzheimer's disease [J]. Frontiers in aging neuroscience, 2023, 15: 1243869.

[111] Li Y, Zhao L, Gu B, et al. Aerobic exercise regulates Rho/cofilin pathways to rescue

synaptic loss in aged rats [J]. PloS one, 2017, 12(2): e0171491.

[112] Penzes P, Cahill M E, Jones K A, et al. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders [J]. Nature neuroscience, 2011, 14(3): 285-93.

[113] Padilla-Coreano N, Batra K, Patarino M, et al. Cortical ensembles orchestrate social competition through hypothalamic outputs [J]. Nature, 2022, 603(7902): 667-71.

[114] Phillips M L, Robinson H A, Pozzo-Miller L. Ventral hippocampal projections to the medial prefrontal cortex regulate social memory [J]. eLife, 2019, 8.

[115] Zhang H, Chaudhury D, Ma Y, et al. A Key Noradrenergic Brainstem-Mesolimbic Circuit: Resilience to Social Stress [J]. Chronic stress (Thousand Oaks, Calif), 2019, 3.

[116] Laubach M, Amarante L M, Swanson K, et al. What, If Anything, Is Rodent Prefrontal Cortex? [J]. eNeuro, 2018, 5(5).

[117] Mahmood U, Ahn S, Yang E J, et al. Dendritic spine anomalies and PTEN alterations in a mouse model of VPA-induced autism spectrum disorder [J]. Pharmacological research, 2018, 128: 110-21.

[118] Yang E J, Ahn S, Lee K, et al. Early Behavioral Abnormalities and Perinatal Alterations of PTEN/AKT Pathway in Valproic Acid Autism Model Mice [J]. PloS one, 2016, 11(4): e0153298.

[119] Durand C M, Perroy J, Loll F, et al. SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism [J]. Molecular psychiatry, 2012, 17(1): 71-84.

[120] Huo Y, Lu W, Tian Y, et al. Prkn knockout mice show autistic-like behaviors and aberrant synapse formation [J]. iScience, 2022, 25(7): 104573.

[121] Wang M, Li H, Takumi T, et al. Distinct Defects in Spine Formation or Pruning in Two Gene Duplication Mouse Models of Autism [J]. Neurosci Bull, 2017, 33(2): 143-52.

[122] Vertes R P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat [J]. Synapse (New York, NY), 2004, 51(1): 32-58.

[123] Giustino T F, Maren S. The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear [J]. Frontiers in behavioral neuroscience, 2015, 9: 298.

[124] Selimbeyoglu A, Kim C K, Inoue M, et al. Modulation of prefrontal cortex excitation/inhibition balance rescues social behavior in CNTNAP2-deficient mice [J]. Science translational medicine, 2017, 9(401).

[125] Jacot-Descombes S, Keshav N U, Dickstein D L, et al. Altered synaptic ultrastructure in the prefrontal cortex of Shank3-deficient rats [J]. Molecular autism, 2020, 11(1): 89.

[126] Delling J P, Boeckers T M. Comparison of SHANK3 deficiency in animal models: phenotypes, treatment strategies, and translational implications [J]. Journal of neurodevelopmental disorders, 2021, 13(1): 55.

[127] Clement J P, Aceti M, Creson T K, et al. Pathogenic SYNGAP1 mutations impair cognitive development by disrupting maturation of dendritic spine synapses [J]. Cell, 2012, 151(4): 709-23.

[128] Xi K, Cai S Q, Yan H F, et al. CSMD3 Deficiency Leads to Motor Impairments and Autism-Like Behaviors via Dysfunction of Cerebellar Purkinje Cells in Mice [J]. J Neurosci, 2023, 43(21): 3949-69.

[129] Wang J, Li L, Shao S S, et al. Association analysis of genetic variant of rs13331 in PSD95

gene with autism spectrum disorders: A case-control study in a Chinese population [J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban, 2016, 36(2): 285-8.

[130] Isshiki M, Tanaka S, Kuriu T, et al. Enhanced synapse remodelling as a common phenotype in mouse models of autism [J]. Nature communications, 2014, 5: 4742.

[131] Jasien J M, Daimon C M, Wang R, et al. The effects of aging on the BTBR mouse model of autism spectrum disorder [J]. Frontiers in aging neuroscience, 2014, 6: 225.

[132] Myers R A, Casals F, Gauthier J, et al. A population genetic approach to mapping neurological disorder genes using deep resequencing [J]. PLoS genetics, 2011, 7(2): e1001318.

[133] Satterstrom F K, Walters R K, Singh T, et al. Autism spectrum disorder and attention deficit hyperactivity disorder have a similar burden of rare protein-truncating variants [J]. Nature neuroscience, 2019, 22(12): 1961-5.

[134] Kelly-Castro E C, Shear R, Dindigal A H, et al. MARK1 regulates dendritic spine morphogenesis and cognitive functions in vivo [J]. bioRxiv : the preprint server for biology, 2023.