

【DOI】 10.3969 / j.issn.1671-6450.2026.01.015

论著 • 基础

白介素-33 对孤独症重复刻板行为与社交障碍的改善作用及其机制研究

胡利敏 杨嘉涵 段练 高原 李丽丽



基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82001382); 江苏省苏州市姑苏卫生人才计划科研项目(GSWS2021030)

作者单位: 215002 江苏苏州 苏州大学附属儿童医院儿童保健科(胡利敏、杨嘉涵、李丽丽); 215000 江苏苏州 苏州大学苏州医学院基础医学与生物科学学院(段练、高原)

通信作者: 李丽丽 ,E-mail: lilyleen@ 126.com

【摘要】 目的 研究白介素-33(IL-33) 对孤独症模型小鼠 BTBR T+Itpr3tf/J(BTBR) 社交缺陷和重复刻板行为的作用。方法 2025 年 1—6 月于苏州大学附属儿童医院进行实验。选取 6 周龄雄性 BTBR 小鼠 10 只,依据随机数字表法分为 BTBR+Vehicle 组($n=5$)、BTBR+IL-33 组($n=5$),选取 5 只 C57BL/6(B6) 6 周龄雄性小鼠为 B6+Vehicle 组。BTBR+IL-33 组小鼠予以 IL-33(300 ng/只) 腹腔注射, B6+Vehicle 组和 BTBR+Vehicle 组小鼠给予等体积的生理盐水,均 1 次/d,共 7 d; 给药完成后进行行为实验(包括理毛、社交互动、三箱社交、新物体识别等),而后处死小鼠取脑组织样本,以高尔基染色检测树突、透视镜观察大脑组织病理形态学、Western blot 实验检测蛋白表达情况。结果 B6+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠互动时间长于 BTBR+Vehicle 组($t/P=10.523/<0.001$ 、 $7.201/<0.001$),自我理毛时间短于 BTBR+Vehicle 组($t/P=4.750/<0.001$ 、 $14.114/<0.001$)。B6+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠 TS1 均大于 TOB($t/P=14.992/<0.001$ 、 $14.521/<0.001$); B6+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠社交偏好指数均大于 BTBR+Vehicle 组小鼠($t/P=10.570/<0.001$ 、 $10.487/<0.001$),社交新颖性偏好指数均大于 BTBR+Vehicle 组小鼠($t/P=16.768/<0.001$ 、 $14.162/<0.001$)。B6+Vehicle 组小鼠与 BTBR+Vehicle 组小鼠、BTBR+Vehicle 组与 BTBR+IL-33 组小鼠新异物识别指数间差异均无统计学意义($t/P=0.485/0.640$ 、 $0.527/0.612$)。BTBR+Vehicle 组小鼠的树棘突密度、树突复杂度均高于 B6+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠($t/P=2.944/0.021$ 、 $2.734/0.032$)。B6+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠脑中 ULK1 表达量高于 BTBR+Vehicle 组小鼠($t/P=3.324/0.011$ 、 $3.687/0.007$)。B6+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠的 ATG12 的表达量高于 BTBR+Vehicle 组小鼠($t/P=3.792/0.005$ 、 $3.174/0.013$)。BTBR+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠 Beclin1、ATG5、ATG16L1 的表达量差异无统计学意义($t/P=1.083/0.312$ 、 $0.300/0.771$ 、 $1.857/0.101$)。结论 IL-33 通过上调 BTBR 小鼠脑中 ULK1、ATG12 的表达,可改善神经元的结构和功能,并改善 BTBR 小鼠重复刻板行为和社交障碍。

【关键词】 孤独症谱系障碍; 自噬; 白介素-33; 重复刻板行为; 社交障碍; 作用机制; 小鼠**【中图分类号】** R749.94; R395.4**【文献标识码】** A

The ameliorative effects of interleukin-33 on repetitive stereotyped behaviors and social deficits in autism and its mechanisms Hu Limin*, Yang Jiahuan, Duan Lian, Gao Yuan, Li Lili.* Department of Children's Health, Affiliated Children's Hospital of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215002, China

Funding program: National Natural Science Foundation of China (82001382); Talent Research Project of Gusu Health Talent Plan, Suzhou City, Jiangsu Province (GSWS2021030)

Corresponding author: Li Lili, E-mail: lilyleen@ 126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of IL-33 on social deficits and repetitive stereotyped behaviors in the BTBR T+Itpr3tf/J (BTBR) mouse model of autism. **Methods** The experiment will be conducted at the Children's Hospital Affiliated to Soochow University from January 2025 to June 2025. Ten 6-week-old male BTBR mice were selected and randomly divided into the BTBR+Vehicle group ($n=5$) and the BTBR+IL-33 group ($n=5$) according to the random number table method. Five C57BL/6 (B6) mice were selected as the B6+Vehicle group. The BTBR+IL-33 group received daily intraperitoneal injections of IL-33 (300 ng/mouse) for 7 consecutive days, while the B6+Vehicle and BTBR+Vehicle groups were administered an equivalent volume of saline. Following treatment, behavioral tests were conducted, including self-grooming, social interaction, three-chamber social test, and novel object recognition. After the behavioral experiments, brain tissue samples were

collected. Dendrites were detected by Golgi staining, the pathological morphology of brain tissue was observed by transmission electron microscopy, and protein expression was detected by Western blot. **Results** The interaction time of mice in the B6+Vehicle group and the BTBR+IL-33 group was longer than that in the BTBR+Vehicle group ($\chi^2=10.523, 7.201$, all $P<0.001$), and the self-grooming time was shorter than that in the BTBR+Vehicle group ($\chi^2=4.750, 14.114$, all $P<0.001$). The TS1 of mice in the B6+Vehicle group and the BTBR+IL-33 group was greater than that of TOB ($\chi^2=14.992, 14.521$, all $P<0.001$). The social preference index of mice in the B6+Vehicle group and the BTBR+IL-33 group was greater than that of mice in the BTBR+Vehicle group ($\chi^2=10.570, 10.48$, all $P<0.001$). The social novelty preference index of mice in the B6+Vehicle group and the BTBR+IL-33 group was greater than that of mice in the BTBR+Vehicle group ($\chi^2=16.768, 14.162$, all $P<0.001$). There was no statistically significant difference in the novel object recognition index between the B6+Vehicle group mice and the BTBR+Vehicle group mice, or between the BTBR+Vehicle group mice and the BTBR+IL-33 group mice ($\chi^2=0.485, 0.527, P=0.640, 0.612$). The dendritic spine density and dendrite complexity of mice in the BTBR+Vehicle group were both higher than those in the B6+Vehicle group and the BTBR+IL-33 group ($\chi^2=2.944, 2.734, P=0.021, 0.032$). The expression level of ULK1 in the brains of mice in the B6+Vehicle group and the BTBR+IL-33 group was higher than that in the BTBR+Vehicle group ($\chi^2=3.324, 3.687, P=0.011, 0.007$). The expression level of ATG12 in the B6+Vehicle group and the BTBR+IL-33 group was higher than that in the BTBR+Vehicle group ($\chi^2=3.792, 3.174, P=0.005, 0.013$). There was no difference in the expression levels of Beclin1, ATG5, and ATG16L1 between the BTBR+Vehicle group and the BTBR+IL-33 group ($\chi^2=1.083, 0.300, 1.857, P=0.312, 0.771, 0.101$). **Conclusion** IL-33 ameliorates repetitive stereotyped behaviors and social deficits in BTBR mice by upregulating ULK1 and ATG12 expression, thereby improving neuronal structure and function.

【Key words】 Autistic spectrum disorder; Autophagy; Interleukin-33; Repetitive stereotyped behaviors; Social deficits; Mechanism; Mice

孤独症谱系障碍(autistic spectrum disorder, ASD)通称孤独症或自闭症,是一种神经发育障碍性疾病,其核心症状包括社会交流障碍和限定的兴趣及重复行为^[1]。该病的患病率逐年升高,一项针对我国 6~12 岁儿童的调查研究估计 ASD 患病率为 0.7%^[2],最新数据更新提示 ASD 全球平均患病率达 1%,男性发病率约为女性的 4 倍,并且有 1/3 病例伴有智力缺陷^[3]。目前为止 ASD 的具体发病原因尚不明确,也尚无显著疗效的药物或其他有效治疗途径。研究证明,在神经发育障碍性疾病中,异常神经结构功能通常和信号途径异常有关,但影响神经发育和突触功能相关的基因和信号通路复杂多变,其中自噬相关通路在 ASD 的发病机制中发挥重要调控作用^[4]。神经元自噬对于神经元极性结构的生长和精细化至关重要,自噬通过对树突棘修剪调节神经发育中的精细调节,自噬的丧失或受损导致树突棘修剪受损,这会导致异常的神经回路,最终导致行为异常^[5-6]。

白介素-33(interleukin-33, IL-33)属于 IL-1 细胞因子家族,可作为细胞因子分泌,也可作为细胞损伤或组织损伤时释放的警报素,在调节免疫反应和炎症反应过程中发挥关键作用,促进组织修复及恢复免疫稳态^[7]。近年来 IL-33 在神经系统疾病中的作用受到了广泛关注,研究发现外源性 IL-33 在中枢神经系统疾病中具有神经保护功能,通过调节细胞的自噬活性和凋亡,发挥保护神经的作用^[8-10]。BTBR T+Itpr3tf/J

(BTBR)小鼠不仅具有与 ASD 一致的社交障碍、重复刻板行为等核心症状,而且其大脑发育异常与 ASD 患者相似^[11]。因此,本研究采用 BTBR 小鼠作为 ASD 疾病模型,探究 IL-33 对 BTBR 小鼠自闭样行为改善的作用及机制,报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂、仪器 BTBR 雄性小鼠 12 只,购于美国杰克逊实验室。C57BL/6(B6)雄性小鼠 6 只,购于上海斯莱克实验动物科技有限公司。所有动物在苏州大学附属儿童医院动物房饲养,温度 20~26℃,相对湿度 50%~60%,保持空气新鲜,自由摄食及饮水。主要试剂:GAPDH 抗体(雅酶,中国)、ULK1 抗体(Abcam,美国)、Beclin1 抗体(Abcam,美国)、ATG5 抗体(Abcam,美国)、ATG12 抗体(Abcam,美国)、ATG16L 抗体(Abcam,美国)、重组 IL-33(BioLegend,美国)。主要仪器:PANNORAMIC 全景切片扫描仪;透射电子显微镜(奥林巴斯,日本)。

1.2 实验分组 于 2025 年 1—6 月在苏州大学附属儿童医院进行实验。选取日龄 6 周龄(P42)雄性 BTBR 小鼠 10 只以随机数字表法分为 BTBR+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组各 5 只,选择日龄 6 周龄(P42)雄性健康 B6 小鼠 5 只为 B6+Vehicle 组。干预措施:BTBR+Vehicle 组腹腔注射生理盐水 0.1 ml, BTBR+IL-33 组腹腔注射重组 IL-33 300 ng(0.1 ml 生理盐水稀释), B6+Vehicle 组腹腔注射生理盐水 0.1 ml,各组均

每天 1 次,持续 7 d。

1.3 行为实验 给药处理完成后次日开始理毛测试、社交互动测试、三箱社交实验、新物体识别实验,每天进行 1 项行为实验,其中新物体识别实验分 3 d 进行。测试当天提前 1 h 让小鼠适应测试房间的环境。

1.3.1 自我理毛测试(P50) 评估小鼠的重复刻板行为:参照文献[12]中的方法进行实验,记录 10 min 内受测小鼠自发地用口或前肢梳理和/或自己全身任何部位的动作重复性的时间。

1.3.2 社交互动测试(P51) 评估小鼠的交往能力:参照文献[13]中的方法进行实验,记录 5 min 内受测小鼠主动与陌生小鼠发生互动行为的时间,互动行为包括:嗅探陌生小鼠任何部位、尾随陌生小鼠、前肢支撑在陌生小鼠身上、骑跨陌生小鼠或从其身下穿过、梳理陌生小鼠的身体、拥挤和/或陌生小鼠与之摔跤、撕咬。

1.3.3 三箱社交实验(P52) 评估小鼠社交能力:参照文献[14]中的方法进行实验,将小鼠放进三室实验装置(40 cm×20 cm×20 cm)。社交偏好测试:将测试小鼠放在中心室,左右室随机放入新奇物体(积木块 Ob)和带有陌生鼠 S1(同种同性不同笼)的笼子,观察受测小鼠与两只笼子的互动情况,此过程持续 10 min。新颖偏好测试:左右室随机放入带有陌生鼠 S1、S2(同种同性不同笼)的笼子,观察 10 min 内受测小鼠与陌生小鼠 S1、S2 的互动情况。记录测试小鼠分别与装有积木块和带有陌生鼠笼子的互动时间。TOB 表示与对象的交互时间,TS1 表示与 S1 的交互时间,TS2 表示与 S2 的交互时间。社交性偏好指数=(TS1-TOB)/(TS1+TOB);新颖性偏好指数=(TS2-TS1)/(TS2+TS1)。

1.3.4 新物体识别实验(P53-55) 评价小鼠的学习记忆能力:参照文献[15]中的方法进行实验,第 1 天适应阶段,将小鼠置于一个 40 cm×40 cm×40 cm 的黑色丙烯塑料盒内自由活动 5 min,第 2 天学习过程阶段 2 只完全相同体积黄色三角形积木 A、B 放在距离小鼠起始位置左右各 45 度等距离前方,让小鼠在盒内自由活动 10 min,随意接触了解两个积木块。第 3 天记忆检测,A 或 B 积木块更换为完全不同颜色、形状、大小的积木块 C,将小鼠置于起始位置,使其在盒内自由活动 5 min,分别记录受测小鼠探索 A 积木块时间 Time(A)以及探索 C 积木块活动时间 Time(C),探索行为包括:嗅、前肢搭靠、翻越、攀爬积木块的动作,计算新异物识别指数(novel object recognition index, NOI) = Time(C) / [Time(A) + Time(C)]。

1.4 病理学实验

1.4.1 脑组织切片制作:将小鼠麻醉,左心内注射 PBS

40 ml 和 4% 多聚甲醛 20 ml。取小鼠脑组织,以 OCT 包埋并切片。切片浸入纯水后放入尼氏染色试剂盒(焦油紫法)A 液浸染 15 min,纯水洗涤后放入尼氏染色试剂盒(焦油紫法)B 液进行分化。稍甩干后,切片入三缸无水乙醇各 3~5 s 快速脱水,二甲苯透明 2 min,中性树胶封片,在显微镜下观察。

1.4.2 高尔基染色检测树突:将小鼠麻醉后断头取脑,以高尔基染色试剂盒(g1069, Servicebio, 中国)处理脑组织 5 d,染色后,将组织块切成 50 μm 厚的切片,使用 PANNORAMIC 全景切片扫描仪获得图像。成像完成后以 Image-Pro Plus 6.0 软件分析,每只小鼠选择 3 个视野中形态完整的神经元,获取第 2 或 3 树突分支上树突棘的个数,以 10 μm 树突棘个数为其密度。使用 ImageJ-win64 分析软件中 NeuronJ 及 Sholl analy 插件绘制神经元胞体结构图,以胞体为中心以 10 μm 为间距画 10 个同心圆,计算不同半径上树突与同心圆的交点数之和,进而分析树突的复杂性。

1.4.3 透射电镜观察大脑组织病理形态学:切取 1 mm³ 小鼠大脑皮质组织置于预冷的电镜固定液中(2.5%戊二醛)4℃保存。行电子显微镜组织处理,再以透射电子显微镜获得图像。

1.5 Western blot 实验检测蛋白表达情况 行为学实验完成后(P57),断头取脑,冰上分离脑组织,留取大脑半球,加蛋白裂解液提取总蛋白,Nanodrop 分光光度仪测定蛋白浓度,用 RIPA 裂解液配平浓度,加 5×蛋白上样缓冲液,100℃煮沸 10 min 变性待用。再以 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)上样电泳,完毕后将蛋白质电转至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭,结束后加入一抗 GAPDH 抗体(1:5 000),丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 ULK1 抗体(1:10 000, Abcam),Beclin1 抗体(1:2 000, Abcam),自噬相关基因(auto-phagy-related gene, ATG) 5 抗体(1:2 000, Abcam),ATG12 抗体(1:2 000, Abcam),ATG16L 抗体(1:5 000, Abcam)置于 4℃中过夜。次日采取 TBST 洗膜 3 次,10 min/次。二抗(1:5 000)室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,10 min/次。ECL 曝光显影。使 Image-J 系统对条带进行定量分析。

1.6 统计学方法 使用 Graphpad Prism 10 对实验结果进行统计分析,并绘制图表,符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠自我理毛实验和社交互动实验结果 B6+ Vehicle 组、BTBR + IL-33 组小鼠互动时间长于

BTBR + Vehicle 组 ($t/P = 10.523 / < 0.001$ 、 $7.201 / < 0.001$) ,而自我理毛时间短于 BTBR + Vehicle 组 ($t = 4.750 / < 0.001$ 、 $14.114 / < 0.001$) ,见图 1。

2.2 各组小鼠三箱社交实验结果 B6 + Vehicle 组、BTBR + IL-33 组小鼠 TS1 均大于 Tob ($t = 14.992 / < 0.001$ 、 $14.521 / < 0.001$) ; BTBR + Vehicle 组小鼠 TS1、Tob 间差异无统计学意义 ($t/P = 1.145 / 0.285$) 。 B6 + Vehicle 组、BTBR + IL-33 组小鼠社交性偏好指数均大

于 BTBR + Vehicle 组小鼠 ($t = 10.570 / < 0.001$ 、 $10.487 / < 0.001$) ,见图 2A、B。

B6 + Vehicle 组小鼠 TS1 小于 TS2 ($t = 9.632 / < 0.001$) ; BTBR + Vehicle 组、BTBR + IL-33 组小鼠 TS1、TS2 间差异均无统计学意义 ($t/P = 1.416 / 0.427$ 、 $1.743 / 0.257$) 。 B6 + Vehicle 组、BTBR + IL-33 组小鼠社交新颖性偏好指数均大于 BTBR + Vehicle 组小鼠 ($t = 16.768 / < 0.001$ 、 $14.162 / < 0.001$) ,见图 2C、D。

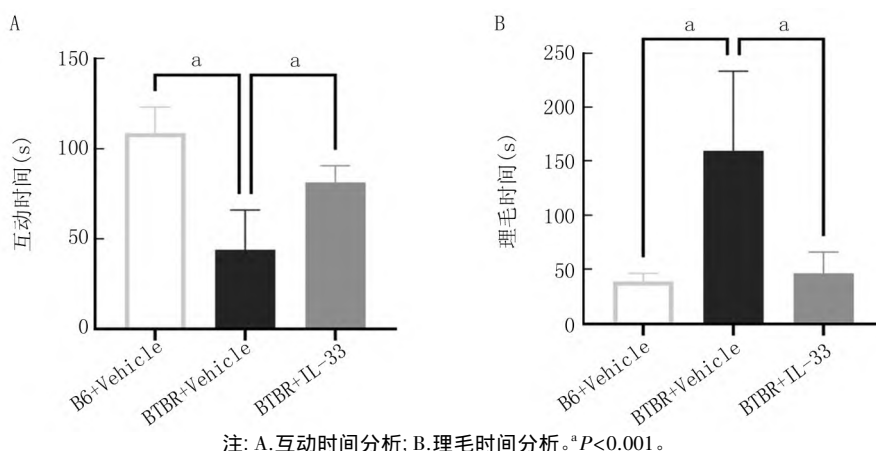
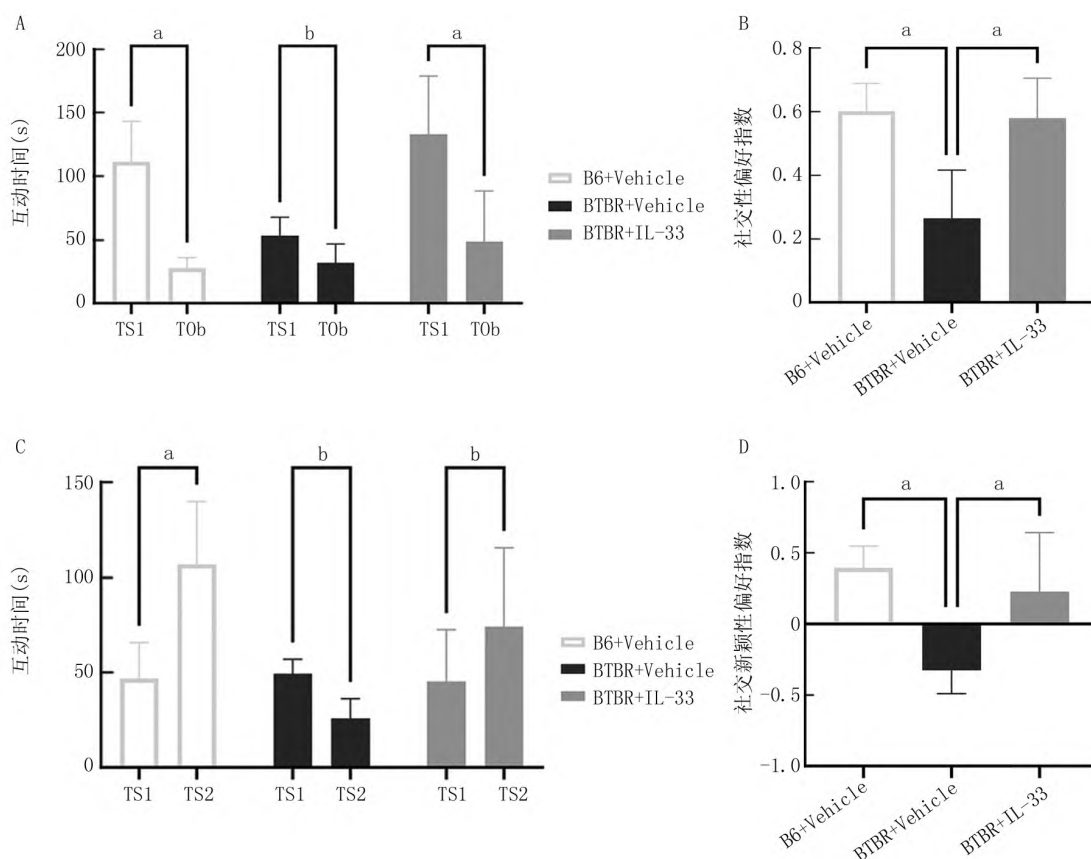


图 1 各组小鼠重复刻板行为及社交互动情况比较

Fig.1 Comparison of repetitive stereotyped behaviors and social interaction among different groups of mice

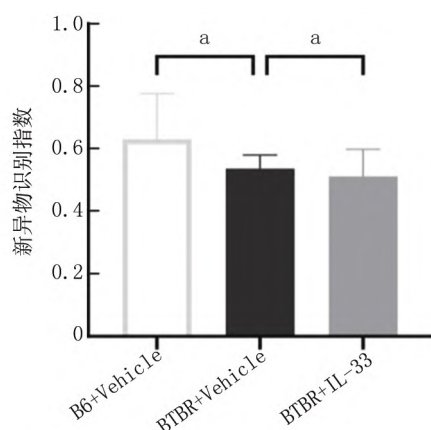


注: A. TS1、Tob 比较; B. 社交性偏好指数比较; C. TS1、TS2 比较; D. 社交新颖性偏好指数比较。 ^a $P < 0.001$, ^b $P > 0.05$ 。

图 2 各组小鼠三箱实验中社交行为比较

Fig.2 Comparison of social behaviors among the groups of mice in the three-chamber social test

2.3 各组小鼠新物体识别实验结果 B6+Vehicle 组与 BTBR+Vehicle 组小鼠、BTBR+Vehicle 组与 BTBR+IL-33 组小鼠新异物识别指数间差异均无统计学意义 ($t/P=0.485/0.640, 0.527/0.612$) ,见图 3。



注: ^a $P>0.05$ 。

图 3 各组小鼠学习记忆能力比较

Fig. 3 Comparison of learning and memory abilities among different groups of mice

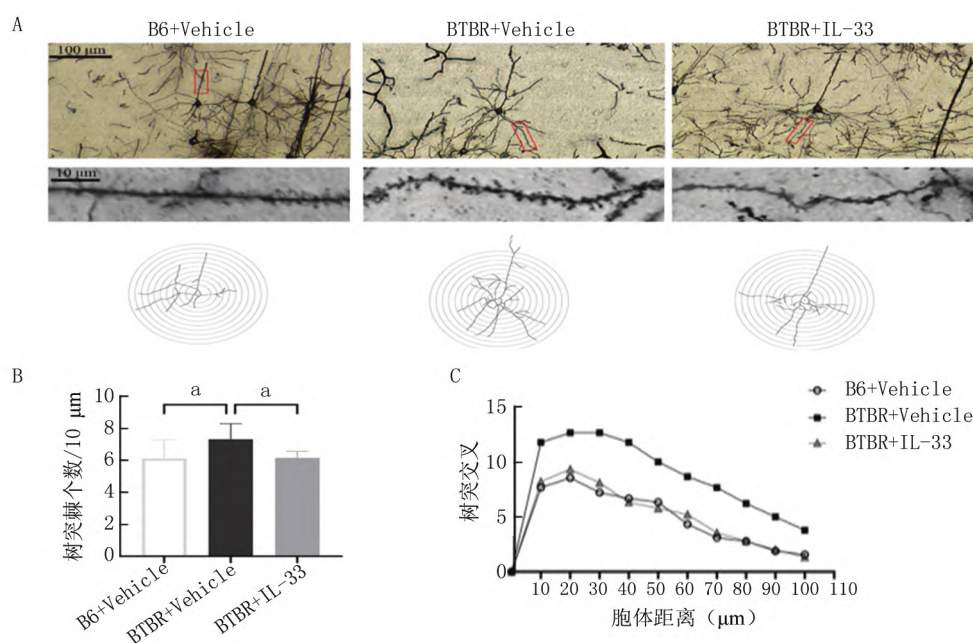
2.4 各组小鼠大脑组织病理形态学变化 BTBR+Vehicle 组小鼠的树棘突密度高于 B6+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠 ($t/P=2.944/0.021, 2.734/0.032$) ; BTBR+Vehicle 组小鼠的树突复杂度均高于 B6+Vehicle 组、

BTBR+IL-33 组小鼠 ,见图 4。

2.5 各组小鼠大脑组织超微结果变化 B6+Vehicle 组视野内神经元有水肿 ,膜完整 ,自噬数量相对较多 ,可见自噬小体 (AP) 1 个 ,自噬溶酶体 (ASS) 2 个 ; BTBR+Vehicle 组小鼠的神经元呈轻度固缩 ,膜完整 ,自噬数量较少 ,ASS 个别存在 ; BTBR+IL-33 组小鼠的神经元呈轻度水肿 ,膜完整 ,胞内基质均匀 ,自噬数量相对较多 ,可见 AP 1 个、ASS 2 个。3 组神经元自噬水平存在差异 ,见图 5。

2.6 IL-33 对自噬相关蛋白的影响 B6+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠脑中 ULK1 的表达量高于 BTBR+Vehicle 组小鼠 ($t/P=3.324/0.011, 3.687/0.007$) 。 BTBR+Vehicle 组、B6+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠大脑中 Beclin1 表达差异无统计学意义 ($t/P=0.301/0.771, 1.083/0.312$) ,见图 6。

B6+Vehicle 组和 BTBR+Vehicle 组、BTBR+Vehicle 组和 BTBR+IL-33 组小鼠的 ATG5 的表达量差异均无统计学意义 ($t/P=0.451/0.663, 0.300/0.771$) 。 BTBR+Vehicle 组小鼠 ATG16L1 的表达量小于 B6+Vehicle 组小鼠 ($t/P=5.238/0.001$) ; BTBR+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠 ATG16L1 的表达量差异无统计学意义 ($t/P=1.857/0.101$) 。 B6+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠的 ATG12 的表达量大于 BTBR+Vehicle 组小鼠 ($t/P=3.792/0.005, 3.174/0.013$) ,见图 7。



注: A.高尔基染色结果; B.树突棘密度的统计分析结果; C.树突复杂度的统计分析结果。^a $P<0.05$ 。

图 4 各组小鼠神经元树突棘比较

Fig.4 Comparison of dendritic spines in neurons of each group of mice

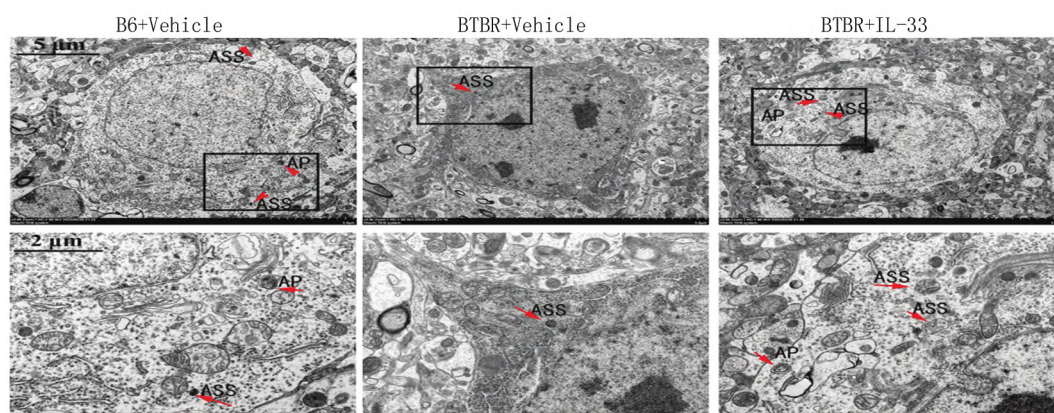
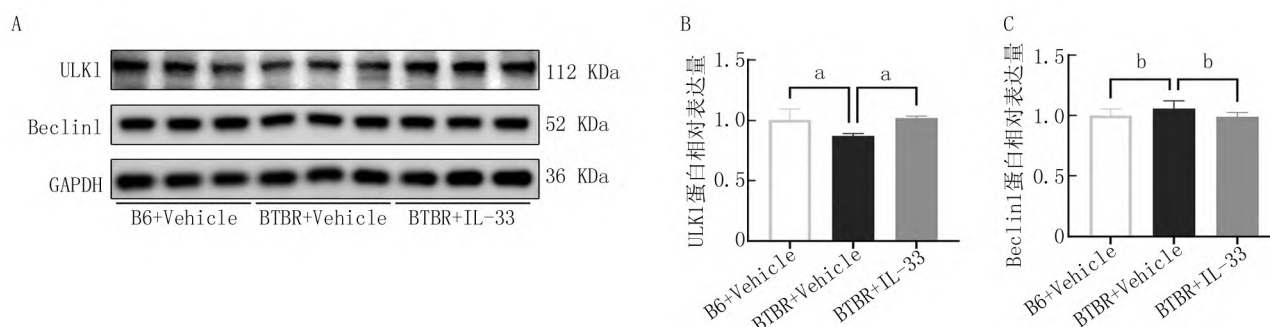


图 5 各组小鼠自噬超微结构的比较

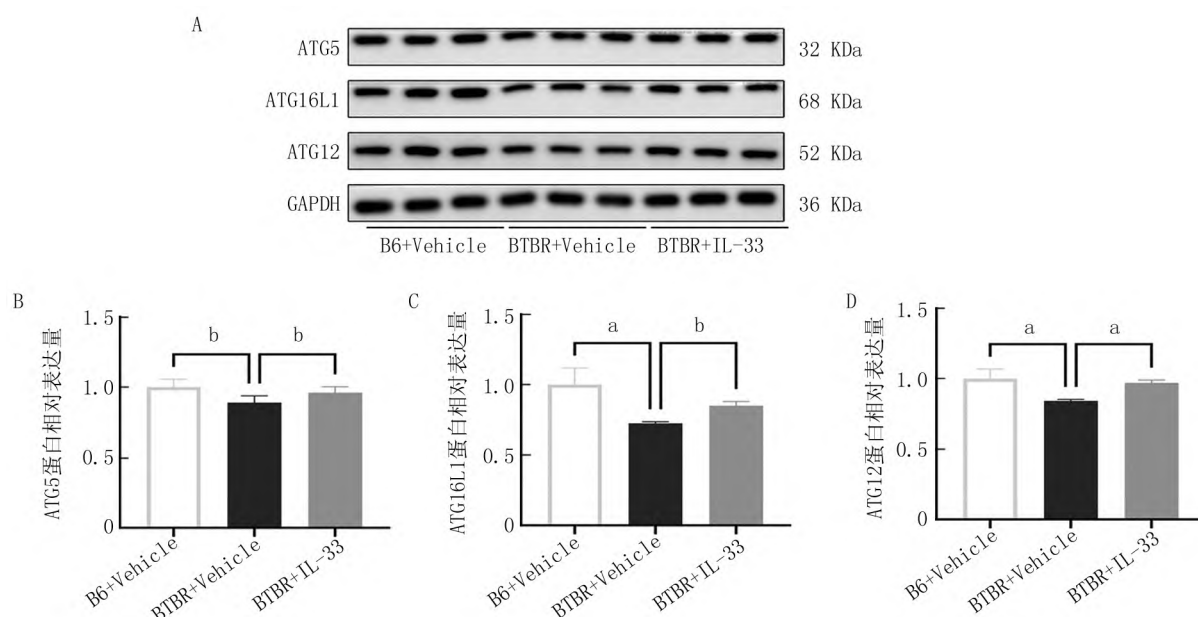
Fig.5 Comparison of autophagic ultrastructural features among different groups of mice



注: A.蛋白电泳结果; B.ULK1 表达比较; C.Beclin1 表达比较。^a $P < 0.05$, ^b $P > 0.05$ 。

图 6 各组小鼠自噬相关蛋白 ULK1、Beclin1 表达的比较

Fig.6 Comparison of the expression of autophagy-related proteins ULK1 and Beclin1 in each group of mice



注: A.蛋白电泳结果; B.ATG5 表达比较; C.ATG16L1 表达比较; D.ATG12 表达比较。^a $P < 0.05$, ^b $P > 0.05$ 。

图 7 各组小鼠自噬相关蛋白 ATG5、ATG12、ATG16L1 表达的比较

Fig.7 Comparison of the expression levels of autophagy-related proteins ATG5 , ATG12 , and ATG16L1 in each group of mice

3 讨论

ASD 是异质性神经发展障碍性疾病,主要核心症状为社会交流障碍、重复行为和限定兴趣,致使 ASD 患者学习及社会互动困难。ASD 确切病因尚不明确,研究证实自噬功能受损是 ASD 发生发展的重要因素^[16]。在哺乳动物细胞中有 3 种不同类型的自噬共存:巨自噬、微自噬和伴侣介导的自噬,巨自噬(以下简称自噬)通过形成双层膜结构的自噬体,将受损的细胞器和蛋白质聚集体包裹并运输至溶酶体降解^[17]。在中枢神经系统中,自噬通过轴突生长、树突棘的形成和修剪、突触组装和囊泡转换在神经元回路的结构重组中发挥作用^[18]。神经元自噬不仅参与树突棘的修剪,还调节神经回路的精细化,从而影响行为和认知功能。自噬途径的改变是神经发育和神经退行性疾病的基础^[19-20]。自噬对于维持神经元的稳态及神经发育具有至关重要的作用,自噬功能失调可能导致神经发育异常,进而引发 ASD 等神经行为学障碍^[4-5, 21]。本研究通过 BTBR 小鼠模型探讨了自噬功能在 ASD 发病机制中的作用,以及 IL-33 对自噬相关蛋白表达的调节机制。

本研究中,B6+Vehicle 组小鼠、BTBR+IL-33 组小鼠互动时间长于 BTBR+Vehicle 组,自我理毛时间短于 BTBR+Vehicle 组,说明 IL-33 可改善 ASD 重复刻板行为症状。B6+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠社交偏好指数、社交新颖性偏好指数均大于 BTBR+Vehicle 组小鼠,提示 IL-33 可以改善 BTBR 小鼠的社交行为。在社交偏好实验阶段,BTBR 小鼠的社交行为与 B6 小鼠相似,即花费更多的时间和陌生小鼠互动,而不是积木块,与之前的研究结果一致^[13],说明 BTBR 小鼠的社会识别和嗅觉能力是正常的。在新颖偏好测试阶段,BTBR 小鼠表现出明显的低社交活动,IL-33 处理明显增加了 BTBR 小鼠与陌生鼠 S2 的互动时间,逆转了 BTBR 小鼠的社交新颖性偏好指数,说明 IL-33 可以增强 BTBR 小鼠对社交新颖性的兴趣,改善其社交行为。

本研究中,B6+Vehicle 组小鼠与 BTBR+Vehicle 组小鼠、BTBR+Vehicle 组与 BTBR+IL-33 组小鼠新异物识别指数间差异均无统计学意义,表明 IL-33 对 ASD 模型小鼠的学习记忆能力改善可能有限。在新物体识别测试中,BTBR 小鼠的学习记忆能力和 B6 小鼠之间的差异无统计学意义,IL-33 对 BTBR 小鼠的新物体识别指数没有产生显著影响。调整 IL-33 的剂量或治疗时间长短是否能改善学习记忆能力需要进一步的研究来验证。

本研究中,BTBR+Vehicle 组小鼠的树突棘密度、树突复杂度均高于 B6+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠,说明 BTBR 小鼠的树突棘密度明显升高,而 IL-33

能够显著降低 BTBR 小鼠的树突棘密度,并改善神经元的超微结构。本研究中,B6+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠脑中 ULK1、ATG12 的表达量高于 BTBR+Vehicle 组小鼠,BTBR+Vehicle 组、BTBR+IL-33 组小鼠大脑中 Beclin1、ATG16L1 表达量差异无统计学意义,说明 BTBR 小鼠存在 ULK1 和 ATG12 蛋白表达显著下调,IL-33 可上调 BTBR 小鼠脑中 ULK1 和 ATG12 蛋白表达,但对 Beclin1 和 ATG16L1 蛋白的表达无显著影响。ULK1 和 ATG12 在自噬过程中具有重要作用,其表达降低提示在 BTBR 小鼠神经系统可能存在自噬功能损伤,因自噬功能失调可能导致树突棘修剪异常,影响神经回路的正常发育,最终表现为社交障碍和重复刻板行为^[5]。ULK1 是自噬起始复合物的关键组分,是真核生物自噬过程中最上游的因子,并介导自噬起始^[22]。ULK1 通过 ATG 蛋白的协同作用促进自噬体形成^[23]。IL-33 上调 ULK1 表达可能诱导自噬启动,促进清除受损细胞器和蛋白质。ATG12 属于泛素样蛋白家族,参与自噬体延伸和成熟过程,是自噬过程中的关键蛋白之一,其表达上调可促进自噬体完整形成并提高其功能^[24]。细胞中游离 ATG12 高度不稳定,可经蛋白酶体依赖的方式被降解^[25]。ATG12 与 ATG5 结合形成自噬体必需 ATG12-ATG5 复合体,其缺失会导致自噬体形成减少^[26],继而再招募 ATG16L1 形成 ATG12-ATG5-ATG16L1 复合体,参与自噬体的形成和成熟^[27]。ATG16L1 在 BTBR 小鼠中低表达,但 IL-33 未能显著改变其表达水平,同时 ATG3、ATG5 的表达在 BTBR 小鼠和 B6 小鼠之间无明显差异,表明 IL-33 是通过上调 ULK1 和 ATG12 蛋白表达改善小鼠神经元的结构和功能。

ASD 的发病机制复杂,涉及遗传、环境和神经发育等多种因素。目前 ASD 的治疗主要集中在行为干预和药物治疗,但缺乏针对核心症状的特效药物。本研究中,外源性 IL-33 能够显著改善 BTBR 小鼠的社交行为和重复刻板行为,其原因可能是 IL-33 通过调节自噬相关蛋白表达,增强自噬功能,进而改善 BTBR 小鼠的神经行为学表现,提示调节自噬功能在 ASD 治疗中可能具有一定的潜在作用。通过激活自噬通路,如上调 ULK1 和 ATG12 的表达,可能有助于恢复神经元的正常功能,改善 ASD 患者的社交障碍和重复刻板行为。作为一种具有神经保护作用的细胞因子,IL-33 在调节自噬功能和改善神经行为学障碍方面的潜力值得进一步探索。

4 结论

本研究通过 BTBR 小鼠模型揭示了自噬功能失调

在 ASD 发病机制中的潜在作用 , 并发现 IL-33 能够通过调节自噬相关蛋白的表达改善 ASD 样行为。这些结果不仅为理解 ASD 的神经生物学机制提供了新的视角 , 也为自噬调节在神经系统疾病治疗中的应用提供了实验依据。未来研究应进一步探索自噬功能调节的具体机制及 IL-33 在 ASD 治疗中的潜在价值 , 为 ASD 患者提供更有效的治疗方案。

利益冲突: 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

胡利敏: 设计研究方案 实施研究过程 论文撰写; 杨嘉涵: 实施研究过程 进行统计学分析; 段练、高原: 实施研究过程 资料搜集整理 参与论文撰写、修改; 李丽丽: 设计研究思路 实施研究过程 分析实验数据 论文审核

参考文献

- [1] Hyman SL, Levy SE, Myers SM. Identification, evaluation, and management of children with autism spectrum disorder [J]. *Pediatrics*, 2020, 145(1): 3447. DOI: 10.1542/peds.2019-3447.
- [2] 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): 961-971. DOI: 10.1007/s12264-020-00530-6.
- [3] Zeidan J, Fombonne E, Scora J, et al. Global prevalence of autism: A systematic review update [J]. *Autism Res*, 2022, 15(5): 778-790. DOI: 10.1002/aur.2696.
- [4] Ham A, Chang AY, Li H, et al. Impaired macroautophagy confers substantial risk for intellectual disability in children with autism spectrum disorders [J]. *Molecular Psychiatry*, 2025, 30(2): 810-824. DOI: 10.1038/s41380-024-02741-z.
- [5] Tang G, Gudsnuk K, Kuo SH, et al. Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits [J]. *Neuron*, 2014, 83(5): 1131-1143. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.07.040.
- [6] Kim HJ, Cho MH, Shim WH, et al. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects [J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(11): 1576-1584. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.07.040.
- [7] Cayrol C, Girard JP. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family [J]. *Immunological Reviews*, 2017, 281(1): 154-168. DOI: 10.1111/imr.12619.
- [8] Du LX, Wang YQ, Hua GQ, et al. IL-33/ST2 pathway as a rational therapeutic target for CNS diseases [J]. *Neuroscience*, 2018, 369: 222-230. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.11.028.
- [9] Okano M, Hirahara K, Kiuchi M, et al. Interleukin-33-activated neuropeptide CGRP-producing memory Th2 cells cooperate with somatosensory neurons to induce conjunctival itch [J]. *Immunity*, 2022, 55(12): 2352-2368. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.09.016.
- [10] Qian Z, Jiao M, Zhang N, et al. The IL-33/ST2 axis protects retinal ganglion cells by modulating the astrocyte response after optic nerve injury [J]. *Neurosci Bull*, 2025, 41(1): 61-76. DOI: 10.1007/s12264-024-01279-y.
- [11] Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, et al. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models [J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 134(4): 537-566. DOI: 10.1007/s00401-017-1736-4.
- [12] Pu Y, Yang J, Chang L, et al. Maternal glyphosate exposure causes autism-like behaviors in offspring through increased expression of soluble epoxide hydrolase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(21): 11753-11759. DOI: 10.1073/pnas.1922287117.
- [13] McFarlane HG, Kusek GK, Yang M, et al. Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice [J]. *Genes Brain Behav*, 2008, 7(2): 152-163. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2007.00330.x.
- [14] Pan X, Xiu Y, Huang S, et al. A Compound nutritional supplement relieving the core symptoms of autism rats [J]. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 202, 71(1): 34-45. DOI: 10.3177/jnsv.71.34.
- [15] Su Q, Li T, He PF, et al. Trichostatin A ameliorates Alzheimer's disease-related pathology and cognitive deficits by increasing albumin expression and Abeta clearance in APP/PS1 mice [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2021, 13(1): 7. DOI: 10.1186/s13195-020-00746-8.
- [16] Liu S, Yao S, Yang H, et al. Autophagy: Regulator of cell death [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(10): 648. DOI: 10.1038/s41419-023-06154-8.
- [17] Fleming A, Bourdenx M, Fujimaki M, et al. The different autophagy degradation pathways and neurodegeneration [J]. *Neuron*, 2022, 110(6): 935-966. DOI: 10.1016/j.neuron.2022.01.017.
- [18] Fleming A, Rubinstein DC. Autophagy in neuronal development and plasticity [J]. *Trends In Neurosciences*, 2020, 43(10): 767-779. DOI: 10.1016/j.tins.2020.07.003.
- [19] Yao RQ, Ren C, Xia ZF, et al. Organelle-specific autophagy in inflammatory diseases: a potential therapeutic target underlying the quality control of multiple organelles [J]. *Autophagy*, 2021, 17(2): 385-401. DOI: 10.1080/15548627.2020.1725377.
- [20] Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, et al. Autophagy in major human diseases [J]. *EMBO J*, 2021, 40(19): e108863. DOI: 10.15252/embj.2021108863.
- [21] Angrand L, Masson JD, Rubio-Casillas A, et al. Inflammation and autophagy: A convergent point between autism spectrum disorder (ASD)-related genetic and environmental factors: Focus on aluminum adjuvants [J]. *Toxics*, 2022, 10(9): 518. DOI: 10.3390/toxics10090518.
- [22] Noda NN, Fujioka Y. Atg1 family kinases in autophagy initiation [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(16): 3083-3096. DOI: 10.1007/s00018-015-1917-z.
- [23] Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 585-596. DOI: 10.1042/EBC20170021.
- [24] 刘伟, 田瑞, 周策凡, 等. ATG12 在疾病发生发展中的作用 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2025, 52(5): 1081-1098. DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0506.
- [25] Haller M, Hock AK, Giampazolias E, et al. Ubiquitination and proteasomal degradation of ATG12 regulates its proapoptotic activity [J]. *Autophagy*, 2014, 10(12): 2269-2278. DOI: 10.4161/15548627.2014.981914. DOI: 10.4161/auto.22931.
- [26] Walczak M, Martens S. Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation [J]. *Autophagy*, 2013, 9(3): 424-425. DOI: 10.4161/auto.22931.
- [27] Rao S, Skulsupaisarn M, Strong LM, et al. Three-step docking by WIPI2, ATG16L1, and ATG3 delivers LC3 to the phagophore [J]. *Sci Adv*, 2024, 10(6): ead8027. DOI: 10.1126/sciadv.ad8027.

(收稿日期: 2025-05-22)