

陈晓芳,王娟,欧萍,等.黑皮质素受体激动剂改善 Shank3 基因缺陷孤独症模型大鼠行为的机制研究[J].中国比较医学杂志,2026,36(6):41-50.

Chen XF, Wang J, Ou P, et al. Possible mechanisms underlying improvement of autism-like behaviors by melanocortin receptor agonists in Shank3-deficient rats [J]. Chin J Comp Med, 2026, 36(6): 41-50.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2026.06.005

# 黑皮质素受体激动剂改善 Shank3 基因缺陷孤独症模型大鼠行为的机制研究

陈晓芳<sup>1#</sup>,王娟<sup>2#</sup>,欧萍<sup>3</sup>,陈思洁<sup>3\*</sup>,黄龙生<sup>1,3\*</sup>

(1.晋江市妇幼保健院,福建 泉州 362200;2.福建医科大学,福州 351022;3.福建省妇幼保健院,福州 350001)

**【摘要】 目的** 探讨黑皮质素受体激动剂(MT-II)改善 SH3 和多个锚蛋白重复结构域 3 (Shank3) 基因缺陷孤独症模型鼠社交缺陷的作用机制。**方法** 利用 Shank3 干扰慢病毒和空载慢病毒注射至仔鼠右侧脑室构建 Shank3 模型鼠和空载鼠各 18 只,Shank3 组随机分为 Shank3+Sal (Sh3-Sal) 组 9 只和 Shank3+MT-II (Sh3-MT-II) 组 9 只,空载组随机分为空载+Sal (V-Sal) 组 9 只和空载+MT-II (V-MT-II) 组 9 只。V-MT-II 组和 Sh3-MT-II 组于第 28 天腹腔注射 3.3 mL/kg MT-II, V-Sal 组和 Sh3-Sal 组腹腔注射 3.3 mL/kg 0.9%氯化钠溶液,通过旷场实验、理毛实验、三箱社交实验及 Morris 水迷宫实验评估其行为学改变;采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)检测下丘脑催产素(OXT)、催产素受体(OXTR)及黑皮质素受体 4 (MC4R)的 mRNA 与蛋白表达水平。**结果** 行为学结果显示,三箱社交实验中与陌生鼠 1 相比,Sh3-Sal 组未表现出社交差异( $P>0.05$ ),而 MT-II 干预后,Sh3-MT-II 组与陌生鼠 2 的社交时间显著增加,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。Morris 水迷宫实验中与 V-Sal 组相比,Sh3-Sal 组表现出显著的学习记忆障碍( $P<0.05$ ),而 MT-II 干预后,Sh3-MT-II 组学习记忆能力明显提高,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。旷场实验和理毛实验结果显示,与 V-Sal 组相比,Sh3-Sal 组周边停留时间及理毛时间均显著增加,差异有统计学意义( $P<0.01$ );MT-II 干预后,旷场中心停留时间及理毛行为与 Sh3-Sal 组无显著差异( $P>0.05$ )。RT-PCR 检测显示,与 Sh3-Sal 组相比,Sh3-MT-II 组 OXT、OXTR 和 MC4R mRNA 表达水平明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );Western blot 法检测显示,与 Sh3-Sal 组相比,Sh3-MT-II 组大鼠下丘脑 OXT 蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$ ),与 V-Sal 组相比,Sh3-Sal 组和 Sh3-MT-II 组大鼠下丘脑 SHANK3 蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),而 OXTR 及 MC4R 蛋白表达水平无显著差异( $P>0.05$ )。**结论** 黑皮质素受体激动剂 MT-II 可能通过激活下丘脑 OXT 系统改善 Shank3 缺陷孤独症模型鼠的社交障碍,提示靶向 OXT/MC4R 通路或为孤独症社交缺陷的潜在干预策略。

**【关键词】** 孤独症谱系障碍;Shank3 缺陷;黑皮质素受体激动剂;行为学;催产素

**【中图分类号】** R741.05;R394.8;R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2026) 06-0041-10

## Possible mechanisms underlying improvement of autism-like behaviors by melanocortin receptor agonists in Shank3-deficient rats

**【基金项目】** 福建省科技创新联合资金项目(2024Y9578);福建省卫生健康重大科研专项(2024ZD01005)。

**【作者简介】** 陈晓芳(1985—),女,硕士,主治医师,研究方向:孤独症的诊断与治疗研究。E-mail:181486902@qq.com

王娟(1998—),女,在读博士研究生,研究方向:孤独症的诊断与治疗研究。E-mail:juanwang0430@163.com

<sup>#</sup>共同第一作者

**【通信作者】** 陈思洁(1996—),女,硕士,住院医师,研究方向:孤独症诊治及康复。E-mail:csj050921@126.com

黄龙生(1983—),男,博士,副主任医师,研究方向:孤独症的康复研究。E-mail:longsheng126@126.com

<sup>\*</sup>共同通信作者

CHEN Xiaofang<sup>1#</sup>, WANG Juan<sup>2#</sup>, OU Ping<sup>3</sup>, CHEN Sijie<sup>3\*</sup>, HUANG Longsheng<sup>1,3\*</sup>

(1. Jinjiang Maternal and Child Health Hospital, Quanzhou 362200, China.

2. Fujian Medical University, Fuzhou 351022. 3. Fujian Maternal and Child Health Hospital, Fuzhou 350001)

**【Abstract】 Objective** To explore the mechanism by which melanotan-II (MT-II) improves social deficits in a Shank3 gene-deficient autism model. **Methods** Rats were divided into control and Shank3-deficient model groups ( $n=18$  per group) treated by microinjection of empty or Shank3-interfering lentivirus, respectively, into the right lateral ventricle of neonatal rats. Shank3-deficient rats were further divided randomly into two groups: Shank3+saline (Sh3-Sal) and Shank3+MT-II (Sh3-MT-II) groups ( $n=9$  per group). Similarly, control rats were divided into control+saline (V-Sal) and control+MT-II (V-MT-II) groups ( $n=9$  per group). On day 28, rats in the V-MT-II and Sh3-MT-II groups received intraperitoneal (i. p.) injections of MT-II (3.3 mg/kg), while rats in the V-Sal and Sh3-Sal groups received i. p. saline (3.3 mL/kg). Behavioral changes were assessed using the open-field test, grooming behavior analysis, three-chamber social test, and the Morris water maze test. mRNA and protein expression levels of hypothalamic oxytocin (OXT), OXT receptor (OXTR), and melanocortin receptor 4 (MC4R) were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blot, respectively. **Results** In the three-chamber social test, Sh3-Sal group rats showed no significant social preference compared with the time spent with stranger rat 1 ( $P>0.05$ ). In contrast, after MT-II intervention, Sh3-MT-II group rats spent significantly longer with stranger rat 2 ( $P<0.01$ ). In the Morris water maze test, rats in the Sh3-Sal group exhibited significant learning and memory impairments compared with the V-Sal group ( $P<0.05$ ), while MT-II intervention significantly improved the learning and memory performance of the Sh3-MT-II group ( $P<0.01$ ). The open field and grooming tests revealed that Sh3-Sal group rats spent significantly longer in the peripheral zone of the open field and exhibited increased grooming behavior compared with the V-Sal group ( $P<0.01$ ). However, MT-II did not significantly alter the center time or self-grooming behavior compared with the Sh3-Sal group ( $P>0.05$ ). mRNA expression levels of OXT, OXTR, and MC4R were significantly higher in the Sh3-MT-II group than in the Sh3-Sal group ( $P<0.05, P<0.01$ ). Hypothalamic OXT protein expression was significantly increased in the Sh3-MT-II group compared with the Sh3-Sal group ( $P<0.05$ ), while hypothalamic SHANK3 protein expression was significantly decreased in both the Sh3-Sal and Sh3-MT-II groups compared with the V-Sal group ( $P<0.05, P<0.01$ ), and protein expression levels of OXTR and MC4R showed no significant changes ( $P>0.05$ ). **Conclusions** The melanocortin receptor agonist MT-II may ameliorate social deficits in Shank3-deficient autistic rats by activating the hypothalamic OXT system. This suggests that targeting the OXT/MC4R pathway could be a potential therapeutic strategy for social deficits in patients with autism spectrum disorder.

**【Keywords】** autism spectrum disorder; Shank3-deficiency; melanocortin receptor agonist; behavior; oxytocin

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

孤独症 (autism spectrum disorder, ASD) 作为一类复杂的神经发育障碍性疾病,其核心症状表现为社会交流障碍以及重复刻板行为。近年来,ASD 的发病率在全球范围内呈现出逐年攀升的态势。流行病学数据显示美国 ASD 的患病率约达 2.2%<sup>[1]</sup>,而我国流行病学调查结果则显示患病率为 0.7%<sup>[2]</sup>~1.8%<sup>[3]</sup>。

尽管 ASD 的病因尚未完全阐明,现有证据表明其发病机制涉及遗传与环境因素的复杂交互作用<sup>[4]</sup>,其中编码突触功能蛋白的基因异常尤为关键。SH3 和多个锚蛋白重复结构域 3 (SH3 and multiple ankyrin repeat domain 3, Shank3) 基因作为

重要的突触支架蛋白编码基因,其缺失或功能丧失已被证实与 ASD 及智力障碍的病理生理过程密切相关<sup>[5]</sup>。值得注意的是,Shank3 基因敲除鼠不仅表现出典型的 ASD 样行为表型,其下丘脑室旁核催产素 (oxytocin, OXT) 神经元数量亦显著减少<sup>[6]</sup>,且脑内 OXT 脉冲式释放的异常被证实直接损害社会交往能力的启动与维持<sup>[7]</sup>。

针对 OXT 神经调节通路的干预策略为 ASD 治疗提供了新方向<sup>[8]</sup>。先前研究表明,外周给予 OXT 可增加中枢 OXT 释放并改善 ASD 模型鼠的社会行为缺陷<sup>[9]</sup>,但由于血脑屏障渗透性低、药物半衰期等药代动力学限制<sup>[10]</sup>,OXT 的临床应用

仍面临重大挑战。近年研究发现,黑皮质素受体(melanocortin receptor, MCR)激动剂可能通过间接调控 OXT 释放发挥治疗潜力, MCR 作为广泛分布于下丘脑及脑干的 G 蛋白偶联受体,其激动剂可选择性激活 OXT 神经元并促进中枢神经肽释放,从而增强亲社会行为<sup>[11]</sup>。特别是强效 MCR 激动剂美拉诺坦(melanotan II, MT-II),因其良好的血脑屏障穿透能力和长半衰期特性<sup>[12]</sup>,展现出优于 OXT 的药理优势。当前针对 MCR 激动剂(如 MT-II)改善 ASD 模型鼠的研究多停留于行为学层面,但其作用是否依赖于特定 MCR 亚型(如黑皮质素受体 4 (melanocortin receptor, MC4R))以及分子机制与 Shank3 基因缺陷的关联性仍亟待阐明。同时慢病毒干扰作为精准调控基因表达的手段,在 ASD 模型中用于验证 OXT/MC4R 通路的因果关系尚未见报道。

基于上述科学问题,本研究拟通过 Shank3 基因缺陷 ASD 的大鼠模型鼠,系统评估腹腔注射 MT-II 对社交认知行为的影响,并进一步验证 MC4R 信号通路在调控 OXT 释放及改善 ASD 核心症状中的关键作用,旨在为 ASD 的靶向治疗策略提供新的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

本实验选用 SPF 级 8~10 周龄的 SD 孕鼠 8 只,体质量为(230±20)g,由福建医科大学实验动物中心提供[SCXK(闽)2022-0001],实验动物质量合格证号为 0005456。大鼠饲养于福建医科大学实验动物中心[SYXK(闽)2022-0003],饲养环境为屏障级,可自由摄取饲料和饮用自来水。饲养环境的室温严格控制在(23±2)℃,湿度保持在 50%~60%,采用 12 h 间断照明方式。同时,每天定期进行紫外杀菌消毒和排风操作,以避免强光和强声对实验动物造成刺激。实验动物的饲养符合国家医学实验动物管理标准,且本实验已获得福建医科大学实验动物伦理委员会的批准(IACUC 2021-044),实验研究中严格遵守 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

实验中使用的试剂包括 Shank3 干扰慢病毒(北京世联博研公司,货号 59312);空载 Shank3

病毒(北京世联博研公司,货号 GL404);BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号 P0012);RT-PCR 试剂(湖南艾科瑞生物公司,货号 AG11619);SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒(湖南艾科瑞生物公司,货号 11702); $\beta$ -actin 鼠单克隆抗体(北京安诺伦生物科技有限公司,货号 YM3028);OXT 兔抗体(英国 Abcam 公司,货号 ab212193);OXTR 兔抗体(英国 Abcam 公司,货号 ab300443);MC4R 抗体(英国 Abcam 公司,货号 ab24233);MT-II(美国 MCE 公司,货号 HY-P0267)。

三箱社交实验设备(上海欣软,型号 XR-XJ117);旷场实验设备(上海欣软,型号 XR-XZ301);Morris 水迷宫实验设备(上海欣软,型号 XR-XM101);摄像记录系统以及动物 anymaze 行为分析软件(Stoelting 公司,型号 60000);高速冷冻离心机(瑞沃德,型号 M1324R);PCR 仪(赛默飞,型号 QuantStudio™3);蛋白电泳仪(北京鼎国昌盛生物技术有限公司,型号 DG-300C);酶标仪(北京新凤机电技术公司,型号 ZS-3 板式酶标仪);荧光显微镜(Nikon,型号 Eclipse Ni-E);Quantity One(美国伯乐公司,版本号 4.3.1)。

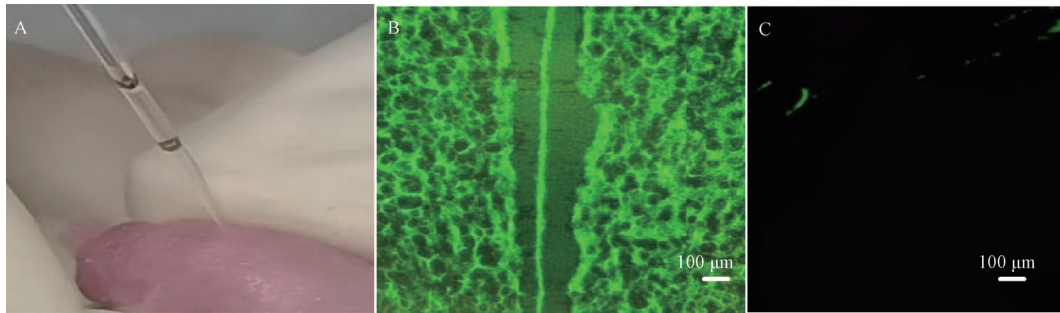
### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 造模与分组

##### (1)造模

选取 8 只 SPF 级 SD 孕鼠,其所产仔鼠共 70 只。在仔鼠出生后 3 日龄(postnatal 3, P3)时,对其进行侧脑室慢病毒注射操作。Shank3 组/空载组:将混合有 GFP 荧光剂的 Shank3 干扰慢病毒/混合有 GFP 荧光剂的空载慢病毒,通过毛细玻璃针精准注射到仔鼠右侧脑室,每只仔鼠的注射剂量为 1  $\mu$ L<sup>[13]</sup>。

依据仔鼠脑立体定位图谱,精确选取注射进针点和进针深度,具体为前囟向后 1 mm,矢状缝向右 1.5 mm,垂直进针 3 mm。注射完成后,将仔鼠置于荧光显微镜下观察侧脑室的荧光表达情况<sup>[14]</sup>。慢病毒注射 3 d 后,各组分别取 1 只仔鼠,断头取脑,制成冰冻切片,在荧光显微镜下观察,成像放大 10 倍后发现,Shank3 仔鼠的侧脑室周围细胞均有明显荧光表达(图 1)。在仔鼠 P21 时进行分笼饲养,随机挑选 40 只雄性幼鼠,其中 4 只幼鼠出现不明原因脱毛情况,予以弃用。



注:A;Shank3 慢病毒右侧侧脑室注射;B;Shank3 慢病毒侧脑室荧光( $\times 10$ );C:空载慢病毒侧脑室荧光( $\times 10$ )。

图 1 Shank3 慢病毒侧脑室注射及侧脑室荧光图片

Note. A, Shank3 lentivirus injection into the right lateral ventricle. B, Fluorescence of Shank3 lentivirus in the lateral ventricle ( $\times 10$ ). C, Fluorescence image of empty lentivirus in the lateral ventricle ( $\times 10$ ).

Figure 1 Shank3 lentivirus injection into the lateral ventricle and fluorescence images of the lateral ventricle

## (2) 分组

在 P28 时,将空载组和 Shank3 组内的幼鼠各随机再各分为两组,分别进行腹腔注射:一组注射 0.9%氯化钠溶液(剂量为 3.3 mL/kg),另一组注射 MT-II(剂量为 10 mg/kg,溶于 0.9%氯化钠溶液,注射体积为 3.3 mL/kg)。由此,实验动物被分为 4 组,分别为:空载+Sal 组(V-Sal,  $n=9$ )、空载+MT-II 组(V-MT-II,  $n=9$ )、Shank3+Sal 组(Sh3-Sal,  $n=9$ )、Shank3+MT-II 组(Sh3-MT-II,  $n=9$ )。每组大鼠均在每天 8:00 进行 MT-II 注射(浓度为 3.3 mg/kg)<sup>[15]</sup>,每天 1 次,连续注射 7 d。

### 1.3.2 行为学检测

#### (1) 三箱社交实验

主要检测受试大鼠社交行为。在社交能力检测阶段,记录 P35 的受试大鼠在 10 min 内停留在装有陌生鼠 1 (stranger1) 的箱室和装有物品 1 (object1) 的箱室所花费的时间。在社交新颖性检测阶段,把另一只陌生鼠 2 (stranger2) 放入第一阶段物品的位置中,比较受试大鼠在 10 min 内分别与 stranger1 和 stranger2 嗅触交流的时间。

#### (2) 旷场实验

检测大鼠焦虑样行为。旷场实验箱为 100 cm $\times$ 100 cm $\times$ 40 cm 黑色不透明的敞箱。选取 P37 的各组仔鼠,分别将其置于旷场箱内,记录每只仔鼠在 10 min 内于中央区域和外周区域的逗留时间。

#### (3) 理毛实验

评估大鼠的重复刻板行为。将 P37 的受试

大鼠置于 100 cm $\times$ 100 cm $\times$ 40 cm 的旷场箱中,让其自由探索 10 min,同时记录大鼠理毛的持续时间。

#### (4) Morris 水迷宫实验

用于评估大鼠长期空间记忆能力。实验分为定位巡航实验和空间探索实验。定位巡航实验:每天从不同象限将测试大鼠放入水中,每天 1 次,连续 5 d,记录各组大鼠寻找平台的平均潜伏期和总游泳距离。空间探索实验阶段,于第 6 天取走目标平台,记录受试大鼠在 60 s 内通过原始目标平台圆形区域的次数以及游泳总距离。

### 1.3.3 RT-PCR 检测下丘脑 OXT、OXTR、MC4R mRNA 表达

收集大鼠下丘脑组织,使用 TRIzol 试剂从下丘脑匀浆液中提取总 RNA,使用 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒将 1000 ng 纯化 RNA 反转录成 cDNA,以  $\beta$ -actin 作为内参,进行 RT-PCR(程序:预变性:95  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s;循环反应 40 次:95  $^{\circ}\text{C}$ , 10 s;60  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s),用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算出 OXT、OXTR、MC4R 的 mRNA 的相对定量结果。引物序列:OXT:上游引物:5'-TGCCAGGAGGAGAACTACC-3';下游引物:5'-TCGGAGAAGGCAGACTCAG-3';OXTR:上游引物 5'-GTCCTGTGCCTCATCTGTTC-3';下游引物:5'-CATAGAAGCGGAAGGTGATGTC-3';MC4R:上游引物 5'-ACGGGTCAGAAACCATCGTC-3';下游引物:5'-TGCAAGCTGCCCAGATACAA-3'; $\beta$ -actin:上游引物 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3';下游引物:5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'。

### 1.3.4 Western blot 检测下丘脑 OXT、OXTR、MC4R 蛋白表达

大鼠大脑下丘脑组织经裂解提取后获得总蛋白,采用 BCA 法进行定量,经过高温变性后进行 SDS-PAGE 电泳分离,并转印至 PVDF 膜。随后用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h、一抗 4 ℃ 孵育过夜 (OXT 1 : 1000、OXTR 1 : 4000、MC4R 1 : 2000)、TBST 缓冲液 3 次洗涤 (每次 5 min)、二抗 (1 : 5000) 室温孵育 1 h, TBST 再洗涤,通过化学发光显影获取图像,并利用 Quantity One 4.3.1 图像分析软件进行条带灰度值定量分析。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 9 统计软件对数据进行统计分析及制图。多组数据比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 进一步两两比较采用 LSD 法或 Dunnett's *T*3 进行事后检验;若非正态,用四分位数 [M (Q1, Q3)], 非参数 Kruskal-Wallis H 进行组间比较。如无特殊说明,

均为双侧检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

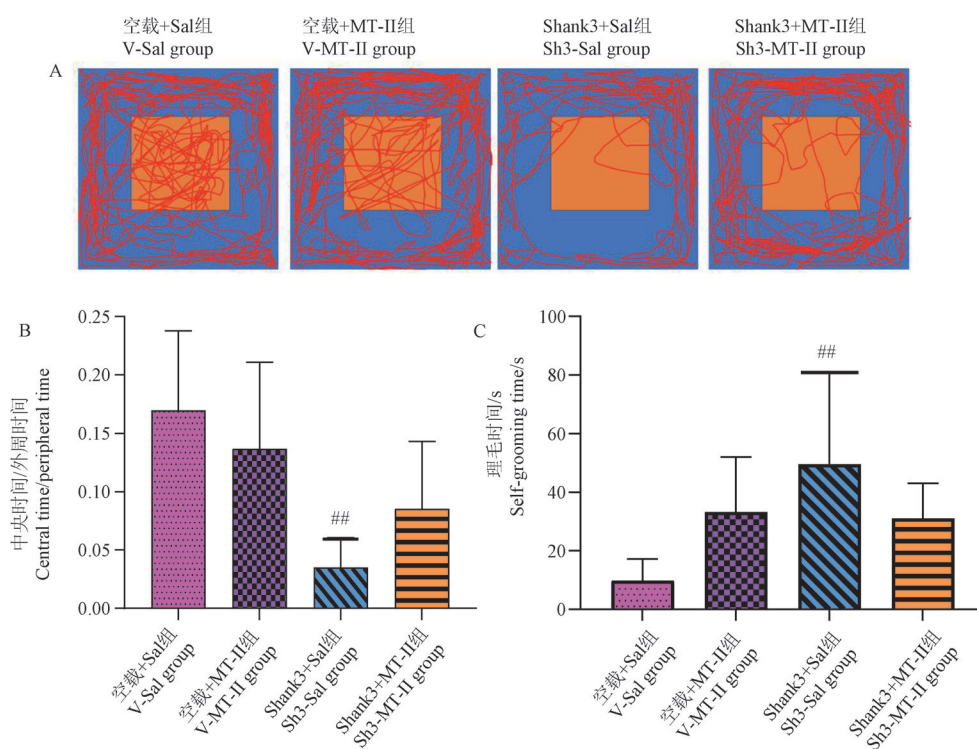
## 2 结果

### 2.1 MT-II 对 Shank3 ASD 大鼠行为的影响

#### 2.1.1 MT-II 对大鼠焦虑样行为和重复刻板行为的影响

在旷场实验中,与 V-Sal 组大鼠相比,Sh3-Sal 组大鼠中央区域活动时间与外周区域活动时间的比值减小,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );然而 Sh3-Sal 组和 Sh3-MT-II 组大鼠相比,中央区域活动时间与外周区域活动时间的比值差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结果提示 Shank3 模型鼠表现出明显的焦虑样行为,空间探索行为减少;而腹腔注射 MT-II 后,上述行为学异常未见明显改善 (图 2A)。

在理毛实验中,与 V-Sal 组大鼠相比,Sh3-Sal 组大鼠的理毛时间明显延长,差异有统计学意义



注:A:旷场实验代表图像;B:大鼠在中心区域时间百分比;C:理毛时间。与空载+Sal组相比,  $^{##}P < 0.01$ 。

图2 各组大鼠的焦虑和刻板行为 ( $n = 9$ )

Note. A, Representative image of the open field test. B, Percentage of time that the rats were in the center area. C, Self-grooming time. Compared with V-Sal group,  $^{##}P < 0.01$ .

Figure 2 Anxiety and repetitive stereotyped behaviors in different groups ( $n = 9$ )

( $P < 0.01$ )。而 Sh3-Sal 组和 Sh3-MT-II 组大鼠的理毛时间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果提示 Shank3 模型鼠的重复刻板行为明显增多,而腹腔注射 MT-II 后,上述行为学异常未见明显改善(图 2B)。

### 2.1.2 MT-II 对大鼠焦虑样行为和重复刻板行为的影响

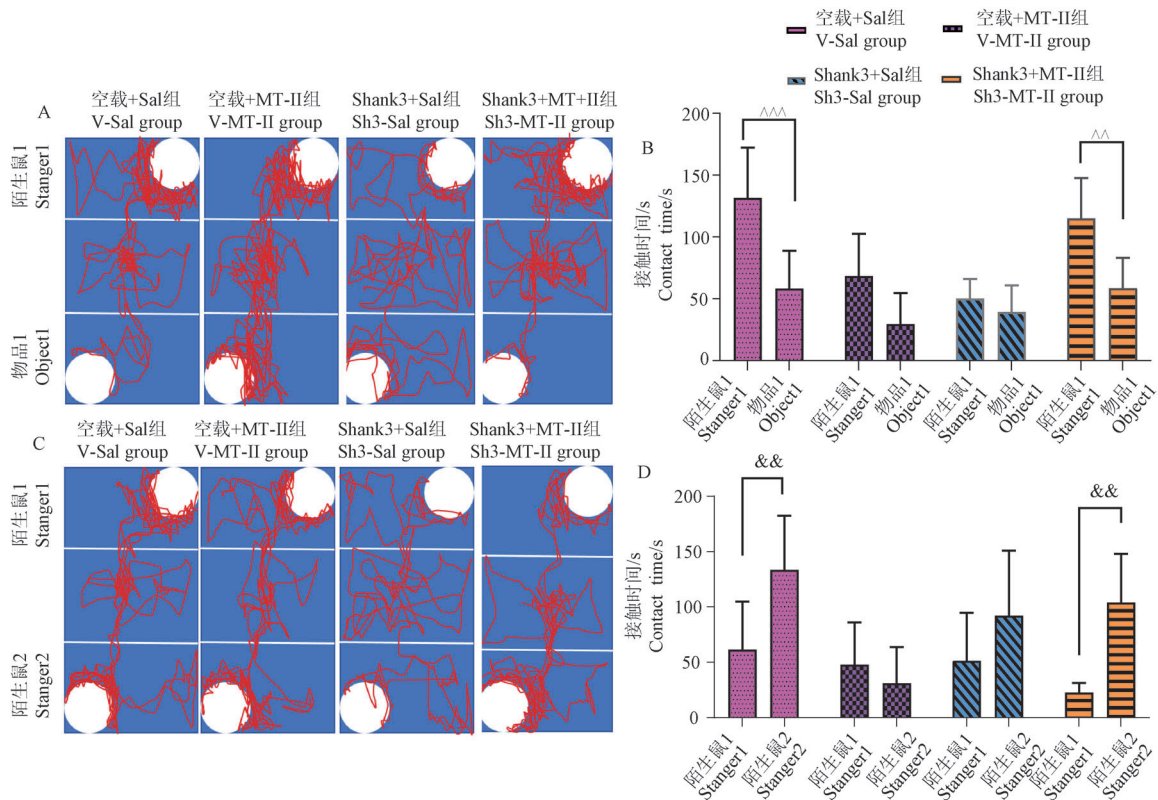
在三箱社交实验社交能力测试中,V-Sal 组大鼠与陌生鼠 1 或物品 1 的接触时间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),即 ASD 模型鼠表现出社交能力低下。与 Sh3-Sal 组大鼠相比,而 V-Sal 组大鼠和 Sh3-MT-II 组大鼠表现出一致的接触陌生鼠 1 时间明显多于物品 1,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),结果提示 Shank3 模型鼠的社交能力低下,而腹腔注射 MT-II 后,上述行为学异常明显改善(图 3A、3B)。

在三箱社交实验社交新颖性检测中,另一只

陌生鼠 2 随之取代物品 1。与 Sh3-Sal 组大鼠相比,V-Sal 组大鼠和 Sh3-MT-II 组大鼠表现出与陌生鼠 2 接触时间多于陌生鼠 1,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );而其余两组实验鼠与陌生鼠 1 或陌生鼠 2 的接触时间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果提示 Shank3 模型鼠的社交新颖性降低,而腹腔注射 MT-II 后,上述行为学异常明显改善( $P < 0.01$ ,图 3C、3D)。

### 2.1.3 MT-II 对 Shank3 ASD 大鼠学习记忆能力的影响

4 组大鼠探索平台的潜伏期时间均持续下降(图 4B)。第 1 天时,各组实验鼠均巡航于迷宫壁周围;第 5 天时,V-Sal 组与 Sh3-MT-II 组大鼠探索路线较另外两组清晰(图 4A);第 6 天时撤去平台,与 Sh3-Sal 组大鼠相比,Sh3-MT-II 组大鼠在平台象限的探索距离和时间均明显延长( $P < 0.01$ )。结果提示 Shank3 模型鼠的学习记忆能力下降,而

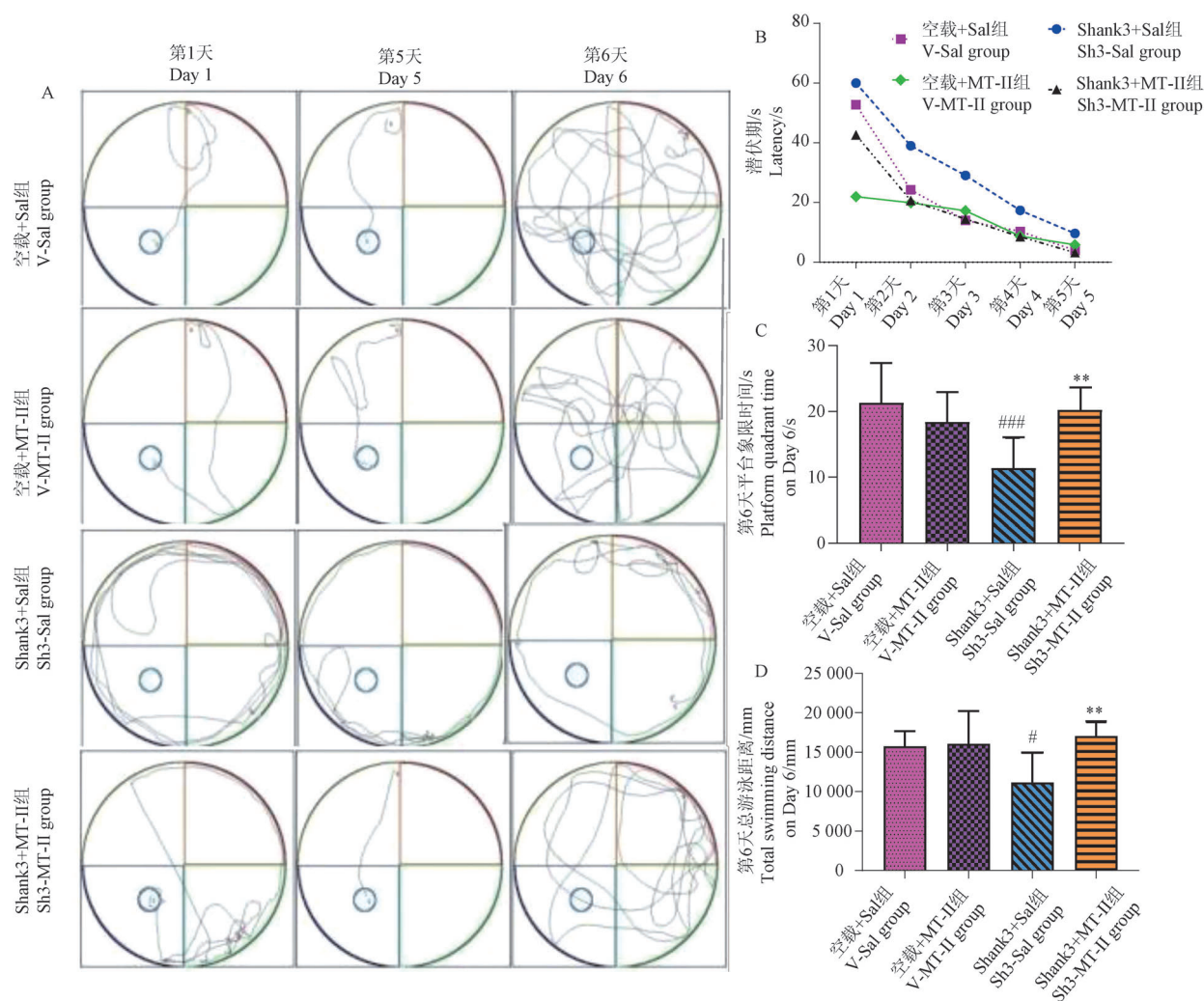


注:A、C:社交能力测试代表图像;B:社交能力测试中的接触时间;D:社交新颖性检测中的接触时间。与陌生鼠 1 相比,~ $P < 0.01$ ,^^ $P < 0.001$ ;与陌生鼠 2 相比,^^ $P < 0.01$ 。

图 3 各组大鼠的三箱实验( $n=9$ )

Note. A/C, Representative image of the sociability test. B, Contact time in sociability test. D, Contact time in social preference test. Compared with stranger1, ~ $P < 0.01$ , ^^ $P < 0.001$ . Compared with strange2, ^^ $P < 0.01$ .

Figure 3 Three chamber test in rats( $n=9$ )



注:A:各组大鼠运动轨迹的代表图像;B:各组大鼠5 d的潜伏期时间;C:第6天各组大鼠在平台象限的时间;D:第6天各组大鼠总游泳距离。与Shank3+Sal组相比, \*\* $P<0.01$ ;与空载+Sal组相比, # $P<0.05$ , ### $P<0.001$ 。

图4 各组大鼠的 Morris 水迷宫实验( $n=9$ )

Note. A, Representative images of the movement trajectories of each group of rats. B, Latency time of each group of rats over 5 days. C, Time spent by each group of rats in the platform quadrant on the 6th day. D, Total swimming distance of each group of rats on the 6th day. Compared with Sh3-Sal group, \*\* $P<0.01$ . Compared with V-Sal group, # $P<0.05$ , ### $P<0.001$ .

Figure 4 Morris water maze experiment of rats in each group( $n=9$ )

腹腔注射 MT-II 后,上述行为学异常明显改善( $P<0.01$ ,图4C、4D)。

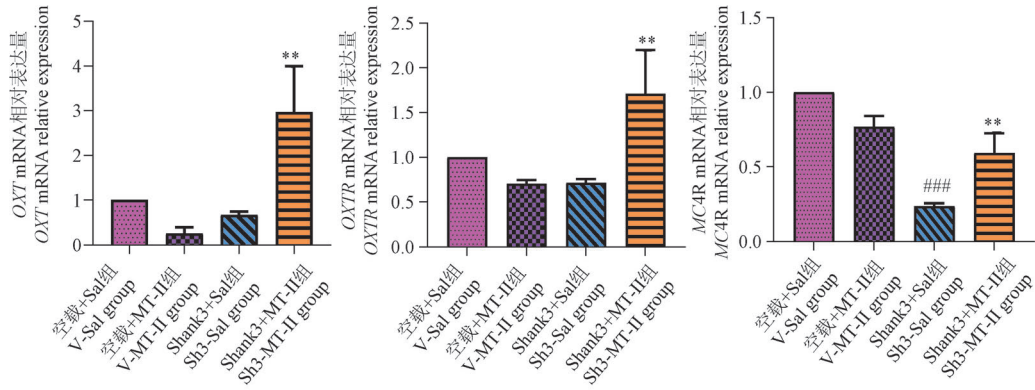
## 2.2 MT-II 对 Shank3 ASD 大鼠下丘脑 OXT、OXTR、MC4R mRNA 表达的影响

与 Sh3-Sal 组大鼠相比,Sh3-MT-II 组大鼠下丘脑内 OXT、OXTR 和 MC4R mRNA 表达均明显升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ );与 V-Sal 组大鼠相比,Sh3-Sal 组大鼠下丘脑内 MC4R mRNA 表达水平明显低于 V-Sal 组( $P<0.001$ )。结果提示 Shank3 模型鼠下丘脑的 OXT、OXTR 和 MC4R mRNA 表达低,而腹腔注射 MT-II 后,上述 mRNA

的表达明显改善( $P<0.01$ ,图5)。

## 2.3 MT-II 对 Shank3 ASD 大鼠下丘脑 OXT、OXTR、MC4R 及 SHANK3 蛋白表达的影响

结果见图6,与 Sh3-Sal 组大鼠相比,Sh3-MT-II 组大鼠下丘脑内 OXT 蛋白表达升高( $P<0.01$ );V-MT-II 组大鼠下丘脑内 OXT 蛋白表达水平较 V-Sal 组升高( $P<0.05$ );与 V-Sal 组大鼠相比,Sh3-Sal 组和 Sh3-MT-II 组大鼠的 SHANK3 蛋白表达水平均明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ );4 组实验鼠下丘脑的 OXTR、MC4R 的表达水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结果提示 Shank3 模

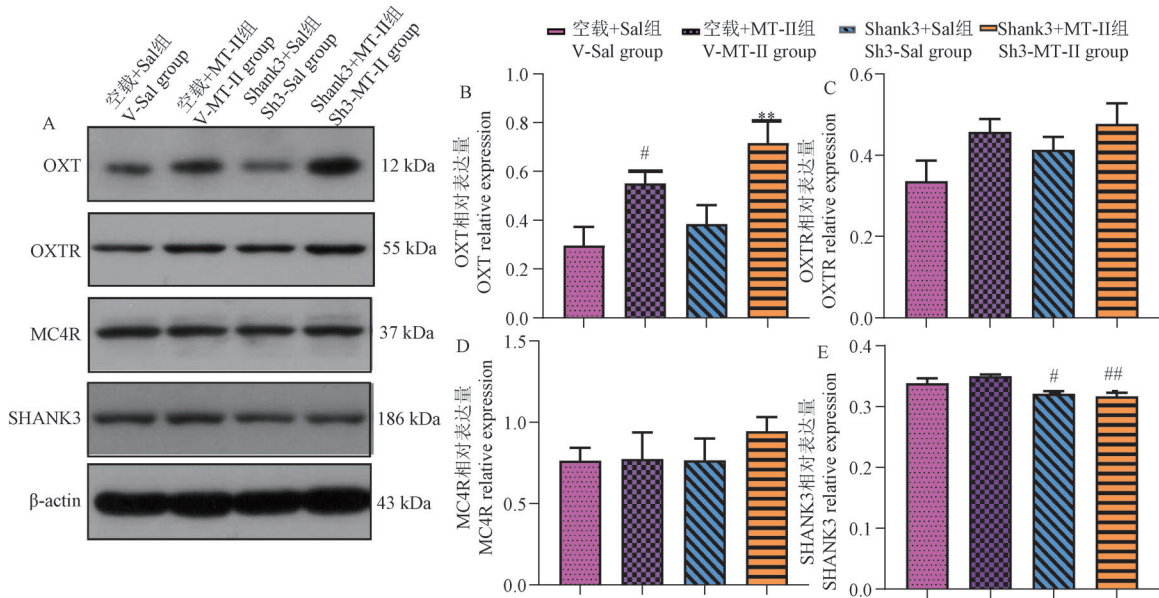


注:与 Shank3-Sal 组相比, \*\* $P < 0.01$ ;与空载+Sal 组相比, ### $P < 0.001$ 。

图 5 各组大鼠下丘脑 OXT、OXTR、MC4R mRNA 表达情况( $n=3$ )

Note. Compared with Shank3-Sal group, \*\* $P < 0.01$ . Compared with V-Sal group, ### $P < 0.001$ .

Figure 5 Expression levels of OXT, OXTR, MC4R mRNA in the hypothalamus of each group of rats( $n=3$ )



注:与 Shank3+Sal 组相比, \*\* $P < 0.01$ ;与空载+Sal 组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

图 6 各组大鼠下丘脑 OXT、OXTR、MC4R 的蛋白表达水平( $n=3$ )

Note. Compared with Shank3-Sal group, \*\* $P < 0.01$ . Compared with V-Sal group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ .

Figure 6 Protein expression levels of OXT, OXTR, MC4R, SHANK3 in the hypothalamus of each group of rats( $n=3$ )

型鼠下丘脑的 SHANK3 表达降低,说明建模成功;下丘脑的 OXT 蛋白表达低,腹腔注射 MT-II 后,上述 OXT 蛋白的表达明显升高( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

当前 ASD 治疗多聚焦行为干预、教育训练等手段,药物治疗缺乏针对性靶点,整体改善核心症状的疗效有限,仍需探索更有效的干预策略。本研究借助慢病毒侧脑室注射技术,成功构建 Shank3 ASD 模型鼠,为疾病机制研究与干预探索

提供可靠的动物模型,并证实 MT-II 通过激活 OXT/MC4R 通路可有效改善模型鼠 ASD 样行为,尤其是社交能力;MT-II 的长半衰期特性更是克服了传统 OXT 治疗的药代动力学局限。经过一系列的实验研究,我们初步考虑 MT-II 可能是通过调节特定信号通路(如相关突触传递、神经发育调控通路),影响大脑神经功能进而改善症状。

既往研究显示,Shank3 基因缺陷大鼠存在社交记忆和学习记忆缺陷,且大鼠模型在神经解剖和行为复杂度上更接近临床中 ASD 儿童的行为

表现,对临床转化的参考价值更高<sup>[15]</sup>。本研究行为学评估表明,Shank3 基因缺陷模型鼠表现出典型的 ASD 样行为表型,包括社交互动能力降低、重复刻板行为频率增加、焦虑样行为加剧以及空间学习记忆功能受损。经腹腔注射 MT-II 干预后,模型鼠的社交探索时间(三箱社交实验)和学习记忆能力(Morris 水迷宫实验)均显著提升。然而,旷场实验和理毛行为分析显示,MT-II 治疗未改善模型鼠的焦虑样行为和重复刻板行为(理毛时间)。与既往研究报道的 MT-II 对 ASD 模型的行为调控效应一致<sup>[16,17]</sup>,对焦虑样行为及重复刻板行为的改善无显著性差异。这一选择性调控现象需结合本研究的分子机制进一步解释:本研究发现 MT-II 可上调下丘脑 OXT、OXTR 及 MC4R 的 mRNA 表达,且 OXT 蛋白水平同步升高,提示 MT-II 可能通过激活 MC4R 促进 OXT 释放。而 OXT 对焦虑行为的调控可能依赖下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA 轴)<sup>[18]</sup>的 CRHBP<sup>[19]</sup>负反馈,其作用存在脑区特异性阈值差异——这可能是本研究中焦虑行为未改善的关键原因,需后续通过脑区特异性 OXT 浓度检测验证。

RT-PCR 检测显示,MT-II 干预显著上调 Shank3 缺陷模型鼠下丘脑 OXT、OXTR 及 MC4R mRNA 表达水平( $P<0.01$ ),Western blot 结果进一步证实 OXT 蛋白表达量同步升高( $P<0.05$ ),但 OXTR 及 MC4R 蛋白水平未见显著变化。结合本研究结果,我们推测可能存在两种机制:

(1)翻译后修饰调控:OXTR 及 MC4R 蛋白的磷酸化、泛素化等翻译后修饰可能影响其稳定性与功能活性,导致 mRNA 水平变化未能完全反映于蛋白表达;

(2)跨脑区蛋白转运:新近研究表明,神经元可通过细胞外囊泡或轴突运输将特定蛋白靶向递送至远端脑区(如海马、前额叶皮层)<sup>[20]</sup>,下丘脑合成的 OXTR 及 MC4R 可能经此途径转运至社交行为调控核心区域<sup>[21]</sup>,致使局部蛋白蓄积未被检测。这一推测与本研究“MT-II 改善社交但未检测到相关脑区 OXT 蛋白升高”的结果吻合,也与既往“MT-II 激活下丘脑 OXT 神经元但微透析未检测 OXT 释放增加<sup>[22]</sup>”的现象一致,后续可通过脑区特异性蛋白追踪实验验证。

此外,MC4R mRNA 在伏隔核、前额叶皮层等

社交调节脑区的广泛分布,提示 MT-II 的作用可能涉及多脑区协同。本研究中 MT-II 腹腔注射后下丘脑 MC4R 蛋白无显著变化,可能与全身给药时药物在脑内的分布特性有关——MT-II 可能优先结合脑室周围器官的 MC4R,通过迷走神经-下丘脑通路间接调控 OXT 释放,而非直接影响下丘脑局部的 MC4R 蛋白表达。因此,后续通过室旁核、腹侧被盖区等关键脑区的定向注射实验,可进一步明确 OXT/MC4R 通路的空间特异性作用机制。

尽管 MT-II 在 ASD 模型中的初步疗效已被观察,但其具体的分子靶点(如 MC4R)、与 Shank3 基因缺陷的病理关联,以及长效改善行为学的神经机制仍不明确。本研究成功建立了 Shank3 缺陷模型鼠,进行了催产素鼻饲干预,通过行为学及相关分子生物学指标检测,揭示了 MT-II 通过激活 MC4R 信号通路显著上调 Shank3 缺陷模型鼠下丘脑 OXT、OXTR 基因表达,并促进中枢 OXT 的瞬时释放,从而改善其社交能力及学习记忆功能。本研究系统阐明 OXT/MC4R 通路在 ASD 中的调控作用,为靶向治疗提供兼具机制深度与临床转化价值的新证据。MT-II 的长半衰期与高血脑屏障穿透性有效规避了传统 OXT 治疗的药代动力学缺陷,结合分子检测(OXT、OXTR 基因表达)与动态表行为学分析,揭示跨脑区蛋白转运与行为改善的时空关联。

#### 参考文献:

- [1] HIROTA T, KING B H. Autism spectrum disorder: a review [J]. *Jama*, 2023, 329(2): 157.
- [2] 杜江波,丁叶,黄磊,等. 中国国家出生队列孤独症谱系障碍亚队列建设概况 [J]. *中华流行病学杂志*, 2021, 42(4): 591-596.  
DU J B, DING Y, HUANG L, et al. The autism spectrum disorder cohort-the sub-cohort of China national birth cohort [J]. *Chin J Epidemiol*, 2021, 42(4): 591-596.
- [3] 赵亚楠,李智文,李琳,等. 中国 0~6 岁儿童孤独症谱系障碍筛查患病现状 [J]. *中国生育健康杂志*, 2023, 34(5): 423-428.  
ZHAO Y N, LI Z W, LI L, et al. Prevalence of autism spectrum disorder screening among children aged 0~6 years in China [J]. *Chin J Reprod Health*, 2023, 34(5): 423-428.
- [4] MKHITARYAN M, AVETISYAN T, YERITSYAN H, et al.

- Unraveling the genetic and environmental risk factors of autism spectrum disorder through a case-control study in Armenia [J]. Health Sci Rep, 2025, 8(5): e70801.
- [ 5 ] JARAMILLO T C, XUAN Z, REIMERS J M, et al. Early restoration of Shank3 expression in Shank3 knock-out mice prevents core ASD-like behavioral phenotypes [J]. eNeuro, 2020, 7(3): ENEURO.0332-ENEURO.0319. 2020.
- [ 6 ] LYU W, LI Y, YAO A, et al. Oxytocin improves maternal Licking behavior deficits in autism-associated Shank3 mutant dogs [J]. Transl Psychiatry, 2025, 15(1): 76.
- [ 7 ] RESENDEZ S L, NAMBOODIRI V M K, OTIS J M, et al. Social stimuli induce activation of oxytocin neurons within the paraventricular nucleus of the hypothalamus to promote social behavior in male mice [J]. J Neurosci, 2020, 40(11): 2282-2295.
- [ 8 ] 孔明慧, 鲁力铭, 向蕾颖, 等. 自闭症动物模型社会互动行为的评估及干预研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 169-178.
- KONG M H, LU L M, XIANG L Y, et al. Research progress on the evaluation and intervention of social interaction behaviors in animal models of autism [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 169-178.
- [ 9 ] 李明娟, 张嵘. 催产素通过作用于奖赏通路改善孤独症患者的社交障碍 [J]. 生理科学进展, 2021, 52(6): 415-419.
- LI M J, ZHANG R. Oxytocin improves social impairments of patients with autism *via* reward pathway [J]. Prog Physiol Sci, 2021, 52(6): 415-419.
- [ 10 ] SZABÓ J, MLYNÁR M, FEJEŠ A, et al. Intranasal oxytocin in a genetic animal model of autism [J]. Mol Psychiatry, 2024, 29(2): 342-347.
- [ 11 ] MINAKOVA E, LANG J, MEDEL-MATUS J S, et al. Melanotan-II reverses autistic features in a maternal immune activation mouse model of autism [J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0210389.
- [ 12 ] FORD C L, MCDONOUGH A A, HORIE K, et al. Melanocortin agonism in a social context selectively activates nucleus accumbens in an oxytocin-dependent manner [J]. Neuropharmacology, 2024, 247: 109848.
- [ 13 ] 唐彬秩, 屈艺, 赵凤艳, 等. 以慢病毒为载体的整合素  $\beta 8$  RNAi 在新生鼠脑内干扰效率的研究 [J]. 四川大学学报(医学版), 2018, 49(3): 325-330.
- TANG B Z, QU Y, ZHAO F Y, et al. Investigation of lentiviral vectors based integrin  $\beta 8$  RNAi system in neonatal rats' brain [J]. J Sichuan Univ Med Sci Ed, 2018, 49(3): 325-330.
- [ 14 ] BARISELLI S, TZANOULINO S, GLANGETAS C, et al. SHANK3 controls maturation of social reward circuits in the VTA [J]. Nat Neurosci, 2016, 19(7): 926-934.
- [ 15 ] 黄龙生, 刘桂华, 欧萍, 等. “智三针”对 Shank3 慢病毒干扰的孤独症模型鼠行为学影响 [J]. 上海针灸杂志, 2021, 40(9): 1141-1149.
- HUANG L S, LIU G H, OU P, et al. Effects of Zhi San Zhen on the behaviors of Shank3 lentivirus-associated autism model rats [J]. Shanghai J Acupunct Moxibustion, 2021, 40(09): 1141-1149.
- [ 16 ] MODI M E, INOUE K, BARRETT C E, et al. Melanocortin receptor agonists facilitate oxytocin-dependent partner preference formation in the prairie vole [J]. Neuropsychopharmacology, 2015, 40(8): 1856-1865.
- [ 17 ] 梁志健, 张建军, 陈润红, 等. 调元散对孤独症大鼠行为和脑内生化指标的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(8): 22-27.
- LIANG Z J, ZHANG J J, CHEN R H, et al. Effect of Tiaoyuansan on behavior and cerebral biochemical index of autistic rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 22-27.
- [ 18 ] BARBIER M, RAJAMANI K T, NETSER S, et al. Altered neural activity in the mesoaccumbens pathway underlies impaired social reward processing in Shank3-deficient rats [J]. Adv Sci, 2025, 12(17): 2414813.
- [ 19 ] NALEPA I F, NIELSEN V, WOLF T E, et al. Sex differences in the murine HPA axis after acute and repeated restraint stress [J]. Stress, 2025, 28(1): 2447079.
- [ 20 ] MAEJIMA I, SATO K. New aspects of a small GTPase RAB35 in brain development and function [J]. Neural Regen Res, 2025, 20(7): 1971-1980.
- [ 21 ] LINDENMAIER Z, ELLEGOOD J, STUIVE M, et al. Examining the effect of chronic intranasal oxytocin administration on the neuroanatomy and behavior of three autism-related mouse models [J]. Neuroimage, 2022, 257: 119243.
- [ 22 ] PAIVA L, SABATIER N, LENG G, et al. Effect of melanotan-II on brain fos immunoreactivity and oxytocin neuronal activity and secretion in rats [J]. J Neuroendocrinol, 2017, 29(2): 12454.

[ 收稿日期 ] 2025-06-30