

外源性催产素对 *shank3* 缺陷斑马鱼成鱼社交行为的影响

王 怡 刘春雪 胡纯纯 徐 秀[△]

(复旦大学附属儿科医院儿童保健科 上海 201102)

【摘要】 目的 通过注射外源性催产素对 *shank3* 缺陷(*shank3ab*^{-/-})斑马鱼成鱼进行药物干预,检测不同疗程的催产素对 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼社交偏好缺陷行为的影响。**方法** 利用已构建成功的 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼成鱼及野生型斑马鱼成鱼,在其尾鳍肌肉处注射外源性催产素或生理盐水,分别进行单次注射、短期给药疗程和长期给药疗程的实验。适应 15 min 后,通过 30 min 的社交偏好实验,检测斑马鱼的社交行为,进而评估外源性催产素的疗效。通过实时荧光定量 PCR 检测斑马鱼脑部催产素受体(oxytocin receptor, *oxtr*)的 mRNA 水平。**结果** 外源性催产素单次注射给药的结果显示:注射催产素 30 min 后, *shank3ab*^{-/-} 催产素组在伙伴侧游动的平均距离比显著高于 *shank3ab*^{-/-} 生理盐水组(0.96 ± 0.015 vs. 0.86 ± 0.042 , $P=0.013$);注射催产素 45 min 后, *shank3ab*^{-/-} 催产素组在伙伴侧游动的距离高于 *shank3ab*^{-/-} 生理盐水组,但差异无统计学意义。催产素 7 天短期给药疗程的结果显示: *shank3ab*^{-/-} 催产素组在伙伴侧游动的距离比明显高于 *shank3ab*^{-/-} 生理盐水组(0.94 ± 0.015 vs. 0.88 ± 0.018 , $P=0.006$),疗效可持续 12 h;催产素长期给药疗程的结果显示:给药 14 天后间隔 1 个月对斑马鱼进行行为学检测,发现 *shank3ab*^{-/-} 催产素组与 *shank3ab*^{-/-} 生理盐水组的社交偏好差异无统计学意义。外源性催产素单次给药后,野生型催产素组和野生型生理盐水组相比, *oxtr* 基因 mRNA 水平显著上升($P<0.001$);相比于 *shank3ab*^{-/-} 生理盐水组, *shank3ab*^{-/-} 催产素组的 *oxtr* 基因 mRNA 水平也有上升趋势,但差异无统计学意义。**结论** 应用外源性催产素对 *shank3* 缺陷斑马鱼的社交偏好缺陷行为具有潜在的改善作用,改善的持续时间与给药疗程相关。

【关键词】 *shank3* 基因; 催产素; 斑马鱼; 社交行为; 孤独症谱系障碍(ASD)

【中图分类号】 R-332 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2021.01.004

Effects of exogenous oxytocin on social behaviors in the *shank3* deficient zebrafish

WANG Yi, LIU Chun-xue, HU Chun-chun, XU Xiu[△]

(Department of Child Healthcare, Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 201102, China)

【Abstract】 Objective To study the role of exogenous oxytocin on social behaviors of a *shank3* deficient zebrafish model, and to observe the effects of exogenous oxytocin on adult *shank3ab*^{-/-} zebrafish through multiple pharmacologic means. **Methods** The *shank3*-deficient zebrafish model, carrying loss-of-function mutation in two *shank3* paralogs (referred to *shank3ab*^{-/-}), was generated and maintained as previously described. The adult *shank3ab*^{-/-} zebrafish and wild-type (WT) zebrafish were used in this study. The exogenous oxytocin and 0.9% normal saline were administered by intramuscular (i.m.) injection in the zebrafish caudal fin. WT zebrafish and *shank3ab*^{-/-} zebrafish were treated through three kinds of pharmacologic means: an acute single dose, a single-round short-term administration, and a long-term

上海市青年科技英才扬帆计划(19YF1403800);国家重点研发计划(2016YFC1306205);国家自然科学基金重点项目(61733011)

[△]Corresponding author E-mail: xuxiu@fudan.edu.cn

网络首发时间:2021-01-04 15:36:32 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1885.R.20201231.1401.036.html>

treatment. Social preference test was performed to evaluate the curative effect of exogenous oxytocin 15 min after injection. The mRNA level of oxytocin receptor (*oxtr*) gene was examined by real-time q-PCR of the whole brain of zebrafish. **Results** Single dose treatment: *shank3ab*^{-/-} zebrafish, treated with exogenous oxytocin (an acute single dose), showed significant improvement in the social interaction (0.96 ± 0.015 vs. 0.86 ± 0.042 , $P=0.013$) within 30 min after administration. We assessed the timeliness of acute exogenous oxytocin effect on social preference with social preference test and observed that social behaviors in *shank3ab*^{-/-} zebrafish model was also improved after 45 min. Though the differences didn't reach statistically significance. Short-term treatment (once daily for 7 days): The group of short-term treatment showed that the distance ratio in the conspecific sector in *shank3ab*^{-/-} zebrafish receiving daily OXT administration was significant higher than those receiving saline (0.94 ± 0.015 vs. 0.88 ± 0.018 , $P=0.006$). The effects lasted more than 12 h after cessation of treatment. Long-term treatment (i.m., once daily for 2 weeks): The results of long-term treatment showed that the abnormal sociability in *shank3ab*^{-/-} zebrafish receiving daily oxytocin administration wasn't changed significantly when tested one month later. The experiment of single-dose group showed that, compared to WT control (receiving saline), WT zebrafish receiving acute single dose of oxytocin showed a significant increase ($P<0.001$) in mRNA level of *oxtr* gene. In addition, there was a rising trend in *shank3ab*^{-/-} zebrafish receiving acute single dose of oxytocin. **Conclusion** Exogenous oxytocin rescues social preference deficits in the *shank3*-deficient zebrafish model. The timeliness for therapeutic efficacy of the abnormal sociability correlated with the courses of treatment.

【Key words】 *shank3*; oxytocin; zebrafish; social behaviors; autism spectrum disorder (ASD)

* This work was supported by the Shanghai Sailing Program for Youth Talents (19YF1403800), the National Key R&D Program of China (2016YFC1306205) and the Key Programme of National Natural Science Foundation of China (61733011).

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 是一类神经发育障碍性疾病, 社交沟通障碍是其核心症状之一^[1]。ASD 至今尚缺乏特效治疗方法, 症状往往伴随患者一生, 致残率高。ASD 的病因十分复杂, 研究表明遗传因素在 ASD 发病中占主导作用^[2-4]。基因的变异 (包括染色体重排、拷贝数变异和编码区序列变异) 被认为是与 ASD 遗传因素相关的主要原因^[5], 突触功能障碍可能是常见的发病机制^[6]。越来越多的证据表明, *shank3* 基因的缺陷与 ASD 之间具有强烈的因果关系^[7-8]。研究显示, *shank3* 基因缺陷是 ASD 最常见的单基因遗传原因之一^[9]。作为突触蛋白中的主要支架蛋白, SHANK3 蛋白位于兴奋性突触的突触后致密区, 对突触的正常发育和功能行使至关重要^[10]。

一直以来, *shank3* 基因缺陷患者的治疗是研究热点和难点, 传统的治疗手段主要以行为干预训练及教育指导为主, 但效果欠佳。近年来, 越来越多的研究者致力于探索利用催产素治疗 ASD 患者的社交缺陷。哺乳动物催产素是一类主要由下丘脑室旁核和视上核合成分泌的神经肽^[11], 大部分释放

到外周血, 对机体的生理功能进行调节。部分内源性催产素经神经元纤维投射到下丘脑等中央或边缘神经系统, 通过结合膜表面的催产素受体 (oxytocin receptor, OXTR) 激活胞内 G 蛋白偶联受体信号通路^[12], 调节不同的神经回路, 进而影响行为的输出。催产素可以通过加强社会记忆、增加社会奖赏机制以及调节社交注意来调节哺乳动物的社交认知和社交行为^[13-15]。2015 年, Penagarikano 等^[16]发现连续 2 周对 ASD 相关基因 *cntnap2* 小鼠模型进行外源性催产素给药 (P7~P21), *cntnap2* 小鼠社交行为缺陷的改善持续到 P30。这项研究为单基因缺陷相关 ASD 的药物研究提供了一个新方向。

目前药物的开发和研究主要集中在体外筛选, 虽然也能成功筛选到药物, 但难以通过体内验证, 因此无法创建整个生物体的复杂网络联系。这些局限性在精神和神经类药物中尤为突出和严重, 因为大脑活动无法在体外模拟和重塑^[17-19]。近年来, 斑马鱼被广泛应用于神经发育障碍性疾病的分子遗传学和药物治疗研究^[20-21]。研究人员已经建立公认且成熟的斑马鱼行为学 (社交、刻板行为、认知

等)检测系统^[20],因此可以构建ASD斑马鱼模型,并通过成熟的行为学检测系统量化药物治疗后的行为学指标,判断是否改善ASD样行为,从而评估药物治疗效。

2019年,Sgritta等^[22]报道催产素单剂量治疗 *shank3b*^{-/-}小鼠模型,其社交偏好缺陷和社交互动能力得到短暂的改善。但尚无研究报道催产素长期治疗 *shank3* 缺陷动物模型的社交行为缺陷。本课题组在前期工作中已成功构建了 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼品系。行为学检测提示,相比于野生型斑马鱼, *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼表现出明显的集群能力降低、社交偏好性降低以及重复、刻板游动增加等孤独症样表型^[23]。催产素是一类高度保守的神经多肽^[24],斑马鱼体内的硬骨鱼催产素-垂体后叶激素运载蛋白与其他物种催产素前体的氨基酸序列高度相似^[25]。本研究利用已构建成功的 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼模型,进行多种形式的外源性催产素干预实验,观察是否改善ASD的核心症状,为今后催产素应用于临床治疗 *shank3* 基因缺陷的ASD患者提供实验基础。

材 料 和 方 法

实验动物 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼(Tu品系)模型由本课题组的刘春雪博士构建^[23]。标准条件饲养野生型(wild-type, WT)斑马鱼和 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼:鱼房恒温28.5℃,采用与斑马鱼睡眠节律相一致的模拟昼夜交替灯光,即每天14h(早7点到晚21点)的光照环境和10h(晚21点到早7点)的黑暗环境。

药物配制及给药处理 催产素多肽序列: NH₂-Gly-Leu-Pro-Cys-Asn-Gln-Ile-Tyr-Cys-OH。将催产素(CAS no.50-56-6,英国 TOCRIS 公司)用无菌水溶解到1 mmol/L 储备溶液中,配成催产素原液。实验开始前,将催产素原液用生理盐水稀释成5 nmol/L 工作液^[26]。选取4.5 mpf的斑马鱼雄鱼进行随机分组: WT-sal组, WT注射生理盐水; WT-OXT组, WT注射催产素; *shank3ab*^{-/-}-sal组, *shank3ab*^{-/-}注射生理盐水; *shank3ab*^{-/-}-OXT组, *shank3ab*^{-/-}注射催产素。分别进行3种疗程的给药处理: 单次、短期及长期。

实时荧光定量 PCR 选取受精后第7天(7 dpf)、受精后第1个月(1 mpf、3.5 mpf、4.5 mpf)的

WT 斑马鱼和 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼,收集单次注射催产素并结束行为学实验的 WT-sal组、WT-OXT组、*shank3ab*^{-/-}-sal组和 *shank3ab*^{-/-}-OXT组斑马鱼,用RNA提取试剂盒(日本 Takara 公司)提取全脑总RNA,37℃连接15 min,逆转录PCR(85℃、5 s)后得到cDNA,实时荧光定量PCR(95℃变性30 s,循环40次,95℃、30 s,60℃、30 s扩增)检测斑马鱼脑内 *oxtr* 的 mRNA 水平(表1)。

表1 实时荧光定量PCR的引物序列

Tab 1 Primer sequence of real-time q-PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')
<i>oxtr</i>	F: TCACACCCAAAGCATCCAAA R: TCACACCCAAAGCATCCAAA
<i>Rpl13a</i>	F: TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC R: AGACGCACAATCTTGAGAGCAG

F: Forward; R: Reverse.

行为学检测 行为学实验均在温度恒定(28.5℃)的行为房中进行。2019年5月开始实验,2019年10月结束实验,实验时段在上午8:30到下午3:30。利用本院斑马鱼平台的斑马鱼行为检测和行为学分析系统(viewpoint)输出原始数据(25帧/s),再进行数据分析。

1 vs. 6 社交偏好实验(图1):用透明插板将实验缸(21 cm×10 cm×7.5 cm)平均分成右侧的伙伴区域以及左侧的实验区域两部分。伙伴区域放入6条代表正常伙伴的 WT 斑马鱼,实验区域放入1条待测的实验鱼,适应15 min后进行30 min的行为学实验录制。数据分析时将实验区域再平均分为伙伴侧(社交区)以及空白区(非社交区)。WT 斑马鱼倾向于紧贴伙伴鱼侧(社交区)游动,在伙伴侧游动的距离和总游动距离的比值越接近1,表示社交倾向性越强。计算公式:社交区游动距离的百分比=[社交区游动距离/(社交区游动距离+非社交区游动距离)]×100%。

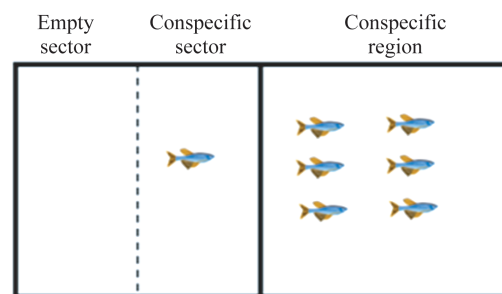
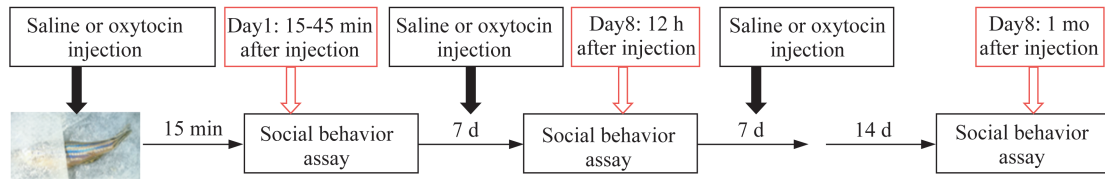


图1 1 vs. 6 社交偏好实验示意图

Fig 1 Sketch map of 1 vs. 6 social preference test

实验方案 单次给药:尾鳍注射催产素或生理盐水 15 min 后,进行 1 vs. 6 社交偏好性实验。短期疗程给药:连续 7 天尾鳍注射催产素或生理盐水,每天一次,第 8 天(距上一次注射 12 h)进行 1 vs. 6 社交

偏好性实验。长期疗程给药:连续 14 天尾鳍肌肉注射催产素或生理盐水,每天一次,结束注射后 1 个月即第 45 天(距上一次注射 1 个月)进行 1 vs. 6 社交偏好性实验(图 2)。



Saline or oxytocin was administered by intramuscular injection in the zebrafish caudal fin.

图 2 斑马鱼给药方案示意图

Fig 2 The administration scheme of zebrafish

统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 6 软件分析和制图。采用单因素方差分析统计社交偏好性实验的数据,然后进行 LSD 多重比较检验(WT-sal 组和 *shank3ab*^{-/-}-sal 组, *shank3ab*^{-/-}-sal 组和 *shank3ab*^{-/-}-OXT 组, WT-sal 组和 WT-OXT 组)。单剂量注射后检测斑马鱼脑内 *oxtr* 表达,采用单因素方差分析,然后进行 LSD 多重比较检验。在不同发育阶段,采用成组 *t* 检验分析 WT 斑马鱼和 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼脑部 *oxtr* 的 mRNA 表达水平。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

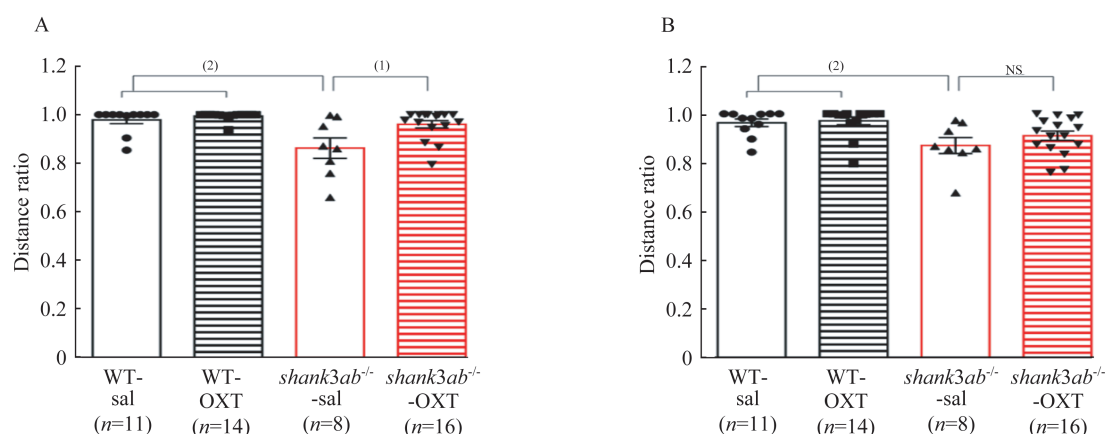
外源性催产素单次给药可改善 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼的社交缺陷行为 在 1 vs. 6 社交偏好性实验中, WT-sal 组的伙伴侧游动距离比为 0.98, *shank3ab*^{-/-}-sal 组为 0.86,后者在伙伴侧游动的距离比显著下降(0.98 ± 0.015 vs. 0.86 ± 0.042 , $P = 0.009$),提示 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼表现出明显的社交缺陷行为。当给予单次催产素药物干预后 15~30 min 内, *shank3ab*^{-/-}-sal 组在伙伴侧游动距离比为 0.86, *shank3ab*^{-/-}-OXT 组则为 0.96,后者在伙伴侧游动的距离比显著升高(0.96 ± 0.015 vs. 0.86 ± 0.042 , $P = 0.013$),社交倾向性明显提高(图 3A)。而 WT-sal 组(0.98 ± 0.015)和 WT-OXT 组(0.99 ± 0.004)在伙伴侧游动距离比的差异无统计学意义,表明催产素能改善 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼的孤独症社交缺陷表型,但并不影响野生型斑马鱼成鱼的正常社交行为。

单次催产素药物干预后 15~45 min 内, WT-sal 组在伙伴侧游动距离比均值为 0.96, *shank3ab*^{-/-}-sal

组均值为 0.87,后者社交性显著下降(0.96 ± 0.016 vs. 0.87 ± 0.033 , $P = 0.007$),有明显的社交缺陷行为。*shank3ab*^{-/-} 催产素组均值为 0.91,相较于 *shank3ab*^{-/-} 生理盐水组,催产素治疗组的社交倾向性有升高趋势(0.87 ± 0.033 vs. 0.91 ± 0.019 , $P = 0.193$),但差异无统计学意义(图 3B)。WT 生理盐水组(0.96 ± 0.016)和 WT 催产素组(0.97 ± 0.016)的伙伴侧游动距离比差异无统计学意义。以上数据表明外源性催产素单剂量治疗即时改善了 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼异常的社交偏好行为。

外源性催产素短期疗程给药可短期改善 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼的社交缺陷行为 为了增加催产素在斑马鱼体内的浓度,我们连续 7 天给予斑马鱼成鱼外源性催产素进行周期性治疗,第 8 天社交偏好性实验发现, *shank3ab*^{-/-}-OXT 组伙伴侧游动的距离比均值为 0.94,相较于对照的 *shank3ab*^{-/-}-sal 组(均值 0.88), *shank3ab*^{-/-}-OXT 组在伙伴侧游动的距离比升高,社交倾向性差异有统计学意义(0.88 ± 0.018 vs. 0.94 ± 0.015 , $P = 0.006$)。WT-sal 组(0.97 ± 0.007)和 WT-OXT 组(0.97 ± 0.016)的伙伴侧游动距离比组间差异无统计学意义。因此,外源性催产素短期疗程干预治疗能短期改善 *shank3ab*^{-/-} 缺陷斑马鱼的社交偏好缺陷(图 4)。

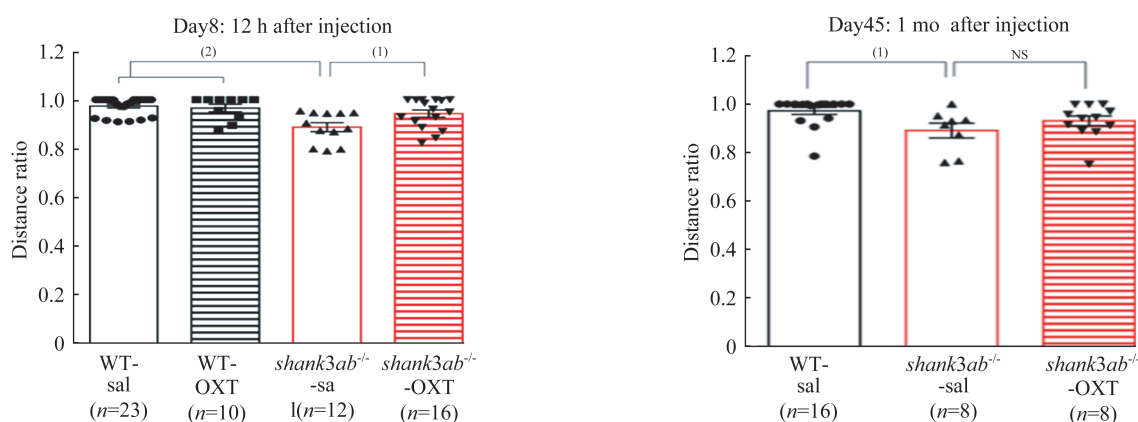
外源性催产素长期疗程干预治疗不能长期改善 *shank3ab*^{-/-} 异常的社交缺陷行为 给予斑马鱼成鱼连续 14 天催产素治疗,1 个月后(Day45)进行社交偏好性实验, *shank3ab*^{-/-}-OXT 组(均值 0.89)相较 *shank3ab*^{-/-}-sal 组(均值 0.93)有倾向于伙伴侧游动的趋势,但差异无统计学意义(0.89 ± 0.031 vs.



A: 15–30 min after injection on Day1; B: 15–45 min after injection on Day1. WT-sal group, $n=11$; All data were shown as $\bar{x} \pm s$, and analyzed by one-way ANOVA analysis and post-hoc LSD test. ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$. NS: No significance.

图3 在社交偏好实验中外源性催产素单剂量治疗 *shank3ab*^{-/-}斑马鱼的结果

Fig 3 Effects of social preference test on *shank3ab*^{-/-} zebrafish under acute exogenous oxytocin exposure



All data were shown as $\bar{x} \pm s$, and analyzed by one-way ANOVA analysis and post-hoc LSD test. ⁽¹⁾ $P < 0.01$, ⁽²⁾ $P < 0.001$.

图4 在社交偏好实验中外源性催产素短期疗程治疗 *shank3ab*^{-/-}斑马鱼的结果

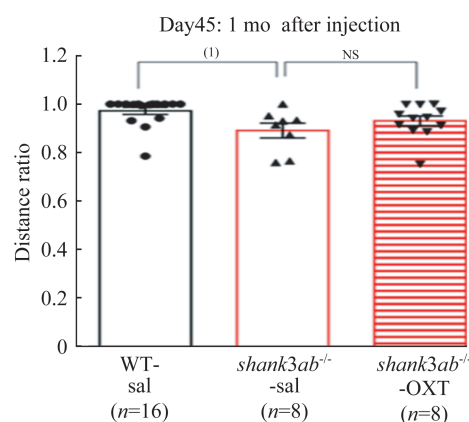
Fig 4 Effects of short-term exposure for exogenous oxytocin on *shank3ab*^{-/-} zebrafish in social preference test

0.93 \pm 0.020, $P=0.213$, 图5)。因此,外源性催产素长期疗程治疗不能长期改善 *shank3* 缺陷斑马鱼异常的社交偏好性行为。

催产素干预 *shank3ab*^{-/-}斑马鱼的 *oxtr* 基因表达

为了分析外源性催产素治疗能够改善 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼社交偏好缺陷的机制,我们通过荧光定量PCR实验检测斑马鱼脑组织中 *oxtr* 基因的mRNA水平。

首先,检测斑马鱼脑组织中 *oxtr* 在不同时间点的表达水平。WT 斑马鱼和 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼在 7 dpf、1 mpf、3.5 mpf 以及 4.5 mpf 这 4 个典型的发育时间段, *oxtr* 转录表达水平呈逐渐上升趋势,且两组间表达水平差异无统计学意义(图 6A)。



All data were shown as $\bar{x} \pm s$, and analyzed by one-way ANOVA analysis and post-hoc LSD test. ⁽¹⁾ $P < 0.05$. NS: No significance.

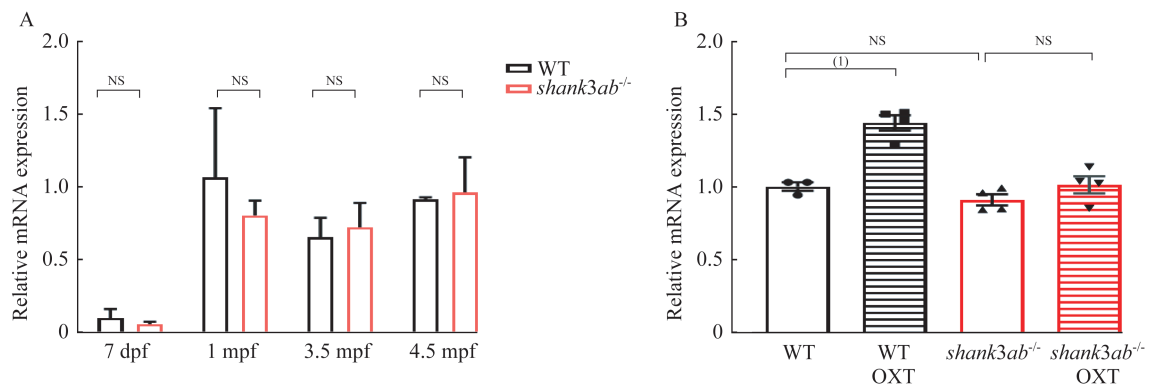
图5 在社交偏好实验中外源性催产素长期疗程治疗 *shank3ab*^{-/-}斑马鱼的结果

Fig 5 Effects of long-term exposure for exogenous oxytocin on *shank3ab*^{-/-} zebrafish in social preference test

其次,检测催产素单次治疗组和生理盐水组的 WT 及 *shank3ab*^{-/-} (均为 4.5 mpf) 斑马鱼成鱼脑组织内 *oxtr* 基因 mRNA 即时水平,结果显示:相对于 WT-sal 组,WT-OXT 组的 *oxtr* 基因 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.001$),而 *shank3ab*^{-/-}-OXT 干预组相对 *shank3ab*^{-/-}-sal 组有升高趋势,但差异无统计学意义(图 6B)。综上所述,外源性催产素干预会引起斑马鱼 *oxtr* 基因 mRNA 水平的即时上升。

讨 论

本研究表明外源性催产素治疗能够改善 *shank3*



A: Relative mRNA expression level of *oxtr* gene at different time points (7 dpf, 1 mpf, 3.5 mpf and 4.5 mpf), normalized to 7 dpf-WT (independent-samples *t* test); B: Relative mRNA expression level of *oxtr* gene after acute oxytocin exposure, normalized to WT-sal (one-way ANOVA analysis and post-hoc LSD test). Each group: $n=3$. Data were shown as $\bar{x} \pm s$. ⁽¹⁾ $P < 0.001$. NS: No significance.

图6 单剂量外源性催产素干预后斑马鱼脑内 *oxtr* 基因 mRNA 水平的比较

Fig 6 Comparison of relative mRNA expression of *oxtr* gene in the brain of zebrafish after acute oxytocin exposure

缺陷动物模型的异常社交偏好性行为,社交缺陷改善的持续时间与给药周期相关。本研究首次发现长期疗程的外源性催产素治疗对 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼成鱼的社交缺陷行为没有长期影响,揭示了 *oxtr* 在 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼脑内的时间表达分布,为今后深入研究催产素治疗 *shank3* 缺陷动物模型提供了实验基础。

本研究发现外源性催产素单剂量治疗能够即时改善 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼异常的社交偏好性行为。外源性催产素可以通过血脑屏障,到达中枢神经系统。催产素治疗社交缺陷的问题之一是半衰期短,催产素在哺乳动物脑内的半衰期约为 20 min^[27]。因此单剂量给予 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼鱼鳍肌肉注射催产素后 30 min 内社交缺陷得到改善,注射后 45 min 时社交缺陷改善不明显。我们推测通过血脑屏障进入中枢神经系统的部分外源性催产素,在注射后 45 min 时可以有效结合 OXTR 的催产素浓度已经急剧下降,进而不能对社交行为产生改善。

为了提高催产素在脑内的浓度,本研究对 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼进行了持续 7 天的短期催产素干预后,其社交偏好性行为改善效应延长到给药后 12 h,较单剂量注射的改善时长明显增加。然而,持续 14 天的长期疗程结果显示,长期疗程给药并不能明显改善 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼的社交缺陷。我们推测,催产素疗效所致社交偏好缺陷的改善可能随着药物代谢而结束,因而在成年 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼上无法观察到远期疗效。

催产素的亲社会影响主要通过 OXTR 介导^[28],

本研究检测了 7 dpf(幼鱼期)、1 mpf(青少年期)、3.5 mpf(成年早期)以及 4.5 mpf(成年期)等 4 个发育时期 WT 以及 *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼脑内 *oxtr* 的 mRNA 水平,发现两者之间无任何差异。我们推测 *shank3* 缺陷斑马鱼脑内 OXTR 未出现异常,因而能与外源性催产素有效结合,进而影响社交缺陷的改善。单剂量催产素干预后, *shank3ab*^{-/-} 斑马鱼脑内 *oxtr* 的 mRNA 水平虽有上升趋势,但差异无统计学意义,而催产素干预后 WT 斑马鱼脑内 *oxtr* 的 mRNA 水平有显著变化,差异有统计学意义,这两者的差异还需进一步研究。

最新研究表明 *Shank3* 缺陷影响稳态可塑性,稳态可塑性作为神经可塑性的主要形式之一,外界环境变化时神经系统维持在一定范围内活动,从而维持脑功能相对于外界环境变化时的稳定^[29]。下丘脑分泌的神经肽催产素是介导跨感知觉模态可塑性的关键分子,触觉剥夺后的小鼠给予催产素改善初级躯体感觉皮层可塑性的同时,也改善了初级视觉皮层的发育,继而维持感知觉神经网络的稳定性^[30]。 *shank3* 基因缺陷人群有严重的感知觉异常^[31]。靶向敲除外周躯体感觉神经元 *shank3* 基因的小鼠,除表现出严重的感知觉异常,也出现严重的社交缺陷,经药物干预后均有所改善^[32]。因此,我们推测催产素可能通过改善 *shank3* 基因缺陷受损的感知觉稳态可塑性,从而改善 *shank3* 缺陷斑马鱼的社交缺陷。

本研究主要研究催产素干预成鱼的疗效,只检测了 *oxtr* 基因的 mRNA 水平,对其他的可能分子机

制未进行分析。后期研究可针对斑马鱼发育早期(即神经发育早期)进行外源性催产素的药物干预,以期获得更显著的改善作用和远期疗效。

作者贡献声明 王怡 研究构思,数据采集,论文撰写和修订。刘春雪 论文修订,构建模型。胡纯纯,徐秀 论文修订。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] ASSOCIATION AP. Diagnostic and statistical manual of mental disorders [M]. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.
- [2] RONALD A, HAPPE F, PLOMIN R. A twin study investigating the genetic and environmental aetiologies of parent, teacher and child ratings of autistic-like traits and their overlap [J]. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 2008, 17(8): 473-483.
- [3] SKUSE DH, MANDY WP, SCOURFIELD J. Measuring autistic traits: heritability, reliability and validity of the social and communication disorders checklist [J]. *Br J Psychiatry*, 2005, 187: 568-572.
- [4] BAI D, YIP B, WINDHAM GC, et al. Association of genetic and environmental factors with autism in a 5-country cohort [J]. *JAMA Psychiatry*, 2019, 76(10): 1035-1043.
- [5] ROSTI RO, SADEK AA, VAUX KK, et al. The genetic landscape of autism spectrum disorders [J]. *Dev Med Child Neurol*, 2014, 56(1): 12-18.
- [6] DE RUBEIS S, HE X, GOLDBERG AP, et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism [J]. *Nature*, 2014, 515(7526): 209-215.
- [7] DURAND CM, PERROY J, LOLL F, et al. SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism [J]. *Mol Psychiatry*, 2011, 17(1): 71-84.
- [8] ZHU L, WANG X, LI XL, et al. Epigenetic dysregulation of SHANK3 in brain tissues from individuals with autism spectrum disorders [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(6): 1563-1578.
- [9] DURAND CM, BETANCUR C, BOECKERS TM, et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(1): 25-27.
- [10] MONTEIRO P, FENG G. SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18(3): 147-157.
- [11] RUAN C, ZHANG Z. Laboratory domestication changed the expression patterns of oxytocin and vasopressin in brains of rats and mice [J]. *Anat Sci Int*, 2016, 91(4): 358-370.
- [12] HAMMOCK E, LEVITT P. Oxytocin receptor ligand binding in embryonic tissue and postnatal brain development of the C57BL/6J mouse [J]. *Front Behav Neurosci*, 2013, 7: 195.
- [13] ENGELMANN M, EBNER K, WOTJAK CT, et al. Endogenous oxytocin is involved in short-term olfactory memory in female rats [J]. *Behav Brain Res*, 1998, 90(1): 89-94.
- [14] WINSLOW JT, INSEL TR. The social deficits of the oxytocin knockout mouse [J]. *Neuropeptides*, 2002, 36(2-3): 221-229.
- [15] FERGUSON JN, YOUNG LJ, HEARN EF, et al. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene [J]. *Nat Genet*, 2000, 25(3): 284-288.
- [16] PENAGARIKANO O, LAZARO MT, LU XH, et al. Exogenous and evoked oxytocin restores social behavior in the Cntnap2 mouse model of autism [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(271): 271r-278r.
- [17] RIHEL J, PROBER DA, ARVANITES A, et al. Zebrafish behavioral profiling links drug to biological targets and rest/wake regulation [J]. *Science*, 2010, 327(5963): 348-351.
- [18] AGID Y, BUZSAKI G, DIAMOND DM, et al. How can drug discovery for psychiatric disorders be improved? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(3): 189-201.
- [19] PANGALOS MN, SCHECHTER LE, HURKO O. Drug development for CNS disorders: strategies for balancing risk and reducing attrition [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(7): 521-532.
- [20] MATHUR P, GUO S. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 40(1): 66-72.
- [21] STEENBERGEN PJ, RICHARDSON MK, CHAMPAGNE DL. The use of the zebrafish model in stress research [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2011, 35(6): 1432-1451.
- [22] SGRITTA M, DOOLING SW, BUFFINGTON SA, et al. Mechanisms underlying microbial-mediated changes in social behavior in mouse models of autism spectrum disorder [J]. *Neuron*, 2019, 101(2): 246-259.