

• 基础科研论著 •

CB2R 调控小胶质细胞功能对小鼠孤独症样行为的影响

田文茹¹, 杨璧璘², 胡婧仪¹, 刘世丹¹, 邹明扬¹, 武丽杰¹, 孙彩虹¹

1. 哈尔滨医科大学公共卫生学院儿少卫生与妇幼保健学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 哈尔滨市疾病预防控制中心

摘要: **目的** 探讨大麻素受体 2(CB2R)对小胶质细胞活化和焦亡的调控作用,以及对小鼠孤独症样行为的影响,为 ASD 的病因学研究提供科学依据。**方法** 体外实验:将 BV2 小胶质细胞分为对照组、LPS 组、AM1241 组,采用 RT-PCR 法检测炎症因子 mRNA 表达水平,Western Blot 法检测焦亡标记物蛋白表达。体内实验:自 2023 年 10 月—2024 年 7 月,构建 CB2R 敲除鼠(CB2R^{-/-}),将 8 周龄的小鼠分为 WT 组和 CB2R^{-/-}组,采用免疫荧光评估小胶质细胞活化情况,采用 RT-PCR 和 Western Blot 检测焦亡标记物 mRNA 和蛋白表达水平,通过旷场、自梳、埋珠、三箱实验来评估小鼠的焦虑样行为、重复刻板行为和社交功能。**结果** 体外实验:与对照组相比,LPS 组促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 CCL2 的 mRNA 水平升高,抗炎因子 Arg-1 和 IL-13 的 mRNA 水平降低($P<0.05$);与 LPS 组相比,AM1241 组 TNF- α 、IL-6 和 CCL2 的 mRNA 水平降低,Arg-1、IL-10 和 IL-13 的 mRNA 水平增加($P<0.0001$)。与对照组相比,LPS 组中 NLRP3、GSDMD、GSDMD-N、caspase-1 和 cleaved-caspase-1 的蛋白表达明显增加,AM1241 干预后,均显著降低($P<0.05$)。体内实验:与 WT 小鼠相比,CB2R^{-/-}小鼠海马 CA1、CA3 区的 CD86⁺/Iba1⁺ 比值升高,而 CD206⁺/Iba1⁺ 比值降低($P<0.01$);NLRP3、GSDMD、caspase-1、IL-1 β 、IL-18 的 mRNA 水平明显升高($t=2.20、3.12、2.55、2.54、2.30, P<0.05$);NLRP3、GSDMD、GSDMD-N、caspase-1 和 cleaved-caspase-1 的蛋白表达明显增加($t=7.43、2.87、3.86、3.99、6.55, P<0.05$);移动距离、自梳时间和埋珠个数均显著升高,休息时间和社交偏好指数显著降低($P<0.05$)。**结论** CB2R 参与调控小胶质细胞活化和焦亡,影响神经炎症反应,进而导致小鼠出现孤独症样行为,提示 CB2R 可能是 ASD 潜在治疗靶点。

关键词: 大麻素受体 2; 孤独症谱系障碍; 小胶质细胞活化; 小胶质细胞焦亡; 神经炎症反应**中图分类号:** R749.94 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-6579(2025)01-0062-09 **doi:** 10.11852/zgetbjzz2024-1205

Effect of cannabinoid receptor 2 on autism-like behaviors in mice by regulating microglial function

TIAN Wenru¹, YANG Bilin², HU Jingyi¹, LIU Shidan¹, ZOU Mingying¹, WU Lijie¹, SUN Caihong¹

1. Department of Child and Adolescent Health, Public Health College, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150081, China; 2. Harbin Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: SUN Caihong, E-mail: suncaihong2003@163.com

Abstract: **Objective** To explore the regulatory effect of cannabinoid receptor 2 (CB2R) on microglial function and its impact on autism-like behaviors in mice, in order to provide scientific basis for the etiology of ASD. **Methods** In vitro experiment, BV2 microglia were divided into control group, LPS group, and AM1241 group. RT-PCR was used to detect mRNA expression levels of inflammatory factors. Western Blot was used to measure the proteins expression of pyroptosis marker. In vivo experiments, the 8-week-old mice were divided into WT group and CB2R knockout mice (CB2R^{-/-} group). Immunofluorescence staining was used to evaluate the activation of microglia. RT-PCR and western blot were used to detect mRNA and proteins expression levels of pyroptosis marker. Anxiety, restricted and repetitive behaviors, and social function were evaluated by open field, self-grooming, burying marble, and three-chamber test. **Results** In vitro experiments, compared with the control group, the mRNA levels of pro-inflammatory factors TNF- α , IL-6, and CCL2 in the LPS group were increased, while anti-inflammatory factors Arg-1 and IL-13 were decreased ($P<0.05$). Compared with the LPS group, the mRNA levels of TNF- α , IL-6, and CCL2 in the AM1241 group were decreased, while Arg-1, IL-10, and IL-13 were increased ($P<0.0001$). Compared with the control group, the protein expression of NLRP3, GSDMD, GSDMD-N, caspase-1, and cleaved caspase-1 were significantly increased in the LPS group. After intervention with AM1241, the above protein levels were significantly reduced ($P<0.05$). In vivo experiments, compared with the WT group, the CD86⁺/Iba1⁺

基金项目: 国家自然科学基金(82073577); 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才计划(UNPYSCT-2020168)**作者简介:** 田文茹(1999—),女,硕士研究生在读,主要研究方向为儿童发育行为。**通信作者:** 孙彩虹, E-mail: suncaihong2003@163.com

ratios in the hippocampal CA1 and CA3 regions were increased, while the CD206⁺/Iba1⁺ ratios were decreased in the CB2R^{-/-} group ($P < 0.01$). The mRNA expression of NLRP3, GSDMD, caspase-1, IL-1 β , and IL-18 in CB2R^{-/-} group was significantly increased ($t = 2.20, 3.12, 2.55, 2.54, 2.30, P < 0.05$). The protein expression levels of NLRP3, GSDMD, GSDMD-N, caspase-1, and cleaved caspase-1 in CB2R^{-/-} group were significantly increased ($t = 7.43, 2.87, 3.86, 3.99, 6.55, P < 0.05$). The CB2R^{-/-} group showed a significant increase in the numbers of moved distance, self-grooming time and marbles buried in mice, a significant decrease in the resting time and social preference index ($P < 0.05$).

Conclusion CB2R is involved in regulating the activation and pyroptosis of microglia, affecting neuroinflammatory responses, thereby leading to autism-like behaviors in mice, which suggests that CB2R might be a potential therapeutic target for ASD.

Keywords: cannabinoid receptor 2; autism spectrum disorder; microglial activation; microglia pyroptosis; neuroinflammatory response

大麻素受体 2 (cannabinoid receptor 2, CB2R) 是最常见的大麻素受体之一, 主要表达在小胶质细胞^[1]。当受到外界刺激时, CB2R 表达上调^[2-3]。较多的证据提示 CB2R 在调节炎症方面具有重要作用^[4], 激活 CB2R 可以减少促炎因子释放, 抑制小胶质细胞 M1 (促炎) 型活化, 同时促进小胶质细胞 M2 (神经保护) 型活化, 从而减轻炎症反应^[5]。细胞焦亡是一种炎症性的细胞程序性死亡, 主要由炎性小体触发。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (nod-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3) 是最具有代表性的炎性小体亚型, NLRP3 激活引起半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cysteine-containing gaspartate-specific proteases-1, caspase-1) 发生自剪切形成 C-Caspase-1 (cleaved-caspase-1), 产生具有生物活性的白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和白介素-18 (interleukin-18, IL-18); 另一方面切割焦亡执行蛋白消皮素 D (gasdermin D, GSDMD), 产生 GSDMD 的 N 端 (n-terminal pore-forming domain of GSDMD, GSDMD-N), 在细胞膜上形成孔隙, 导致焦亡和级联炎症反应^[6]。有研究指出, 激活 CB2R 可以降低 BV2 小胶质细胞中 NLRP3 的表达和活化^[7]。上述信息提示 CB2R 在调节小胶质细胞功能中具有重要作用, 可以改善异常的神经炎症反应。

越来越多的证据显示 CB2R 调节炎症在神经系统疾病中的潜在价值^[8]。孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 是一种严重的神经发育障碍性疾病, 病因不明, 较多研究表明 ASD 存在过度的神经炎症反应^[9]。本课题组前期研究发现, ASD 儿童存在 CB2R 高表达^[10], 提示 CB2R 与 ASD 存在一定的关联。因此, 本研究旨在探讨 CB2R 是否参与调节小胶质细胞功能, 影响神经炎症, 进而导致小鼠出现 ASD 样行为。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

SPF 清洁级 6~7 周龄的

CB2R^{-/-} 小鼠, 购自南京集萃药康实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK (苏) 2023-0009。BV2 小鼠小胶质细胞订购于北京协和细胞资源中心。实验开展于 2023 年 10 月—2024 年 7 月, 经哈尔滨医科大学伦理委员会批准, 伦理审查批号 (HMUIRB20200007)。

AM1241 (美国 Selleck 生物科技有限公司, S1544); NLRP3 抗体 (英国 Abcam 公司, ab263899); Caspase-1 抗体 (英国 Abcam 公司, ab179515); GSDMD 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 39754S); CD86 抗体 (美国 Santa Cruz 公司, sc-28347); CD206 抗体 (美国 R&D 公司, AF2535); Iba1 抗体 (日本 Wako 公司, 019-19741);

1.2 细胞分组与处理 当 BV2 细胞融合度达到 70%~80% 时进行实验, 细胞分为对照组 (空白对照)、LPS 组 (LPS 处理 24h)、AM1241 组 (CB2R 激动剂 AM1241 预处理 3h, 再用 LPS 处理 24h)。

1.3 动物分组 选取 8 周龄、雄性同窝野生型 (WT) 和纯合子 (CB2R^{-/-}) 小鼠用于后续研究, 即动物分组为 WT 组、CB2R^{-/-} 组, 每组 6~8 只。

1.4 行为学实验

1.4.1 埋珠实验 用于检测实验鼠的重复刻板行为。笼底铺满约 4cm 厚的垫料, 垫料表面以 3×5 均匀摆放 15 颗黑色大理石珠 (直径 1.2cm), 记录 10min 内实验鼠埋藏大理石珠的个数, 标准为垫料覆盖大理石珠体积超过 2/3。

1.4.2 自梳实验 用于检测实验鼠的重复刻板行为。实验鼠先适应环境 5min, 随后记录 10min 内实验鼠梳理自身毛发的时间。

1.4.3 旷场实验 用于检测实验鼠的焦虑样行为。使用高清红外线追踪摄像头记录 10min 内实验鼠的运动轨迹, 运动距离及休息时间。

1.4.4 三箱实验 用于检测实验鼠的社交行为。1) 社交能力测试: 将陌生鼠 1 置于下侧箱室, 空笼置于上侧箱室, 之后将实验鼠放入中间, 进行 10min 的

自由活动。社交能力指数=探索陌生鼠 1 的时间/探索空笼的时间。2) 社交偏好测试: 将陌生鼠 1 置于上侧箱室, 陌生鼠 2 置于下侧箱室, 再次将实验鼠放入中间箱室自由活动 10min。社交偏好指数=探索陌生鼠 2 的时间/探索陌生鼠 1 的时间。

1.5 样本收集 行为学结束后, 将实验鼠麻醉, 一部分于冰上分离额叶皮质, 另一部分进行灌注取出脑组织, -80°C 保存备用。

1.6 Western Blot 检测蛋白表达情况 使用 BCA 法提取总蛋白, 电泳、转膜、封闭、 4°C 孵育一抗 NL-RP3(1:1 000), GSDMD(1:1 000), GSDMD-N(1:1 000), Caspase-1(1:1 000), Cleaved-Caspase-1(1:1 000), GAPDH(1:50 000) 过夜, 二抗室温孵育 1h, 超敏 ECL 显色液进行显影。使用 Image J Fiji 软件进行灰度值分析, GAPDH 为参照进行定量分析。

1.7 RT-PCR 检测相关因子 mRNA 表达水平 应用 TRIzol 法提取总 RNA, 按照 Prime Script™ RT reagent Kit(Perfect Real Time)试剂盒进行逆转录。GAPDH 用作内源性对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 确定 mRNA 的表达量。引物序列见表 1。

表 1 PCR 基因引物序列
Tab. 1 PCR gene primer sequences

基因	引物
TNF- α -F	5'-GCCGGGTAAGCATTGTTCTCT-3'
TNF- α -R	5'-GAGTGGCACAAGGAACTGGT-3'
IL-6-F	5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3'
IL-6-R	5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'
CCL2-F	5'-GCAGGTCCCTGTCATGCTTC-3'
CCL2-R	5'-GTGGGGCGTTAACTGCATCT-3'
Arg-1-F	5'-CAGCACTGAGGAAAGCTGGT-3'
Arg-1-R	5'-CAGACCGTGGGTCTTTCACA-3'
IL-10-F	5'-CAGAGAAGCATGGCCAGAA-3'
IL-10-R	5'-AGGACACCATAGCAAAGGGC-3'
IL-13-F	5'-CAATTGCAATGCCATCTACAGGAC-3'
IL-13-R	5'-CGAAACAGTTGCTTTGTGTAGCTGA-3'
NLRP3-F	5'-TGCCTGTTCTTCCAGACTGGTGA-3'
NLRP3-R	5'-CACAGCACCTCATGCCCGG-3'
GSDMD-F	5'-GTGCTCCACAACCTTCCTGA-3'
GSDMD-R	5'-GTCTCCACCTTGCCCGTAG-3'
Caspase-1-F	5'-ATTGCCTGTAAGTCCTGGTCA-3'
Caspase-1-R	5'-ACTGCTCTTTGGACATCATTTCG-3'
IL-1 β -F	5'-CCCTGCAGCTGGAGAGTGTGG-3'
IL-1 β -R	5'-TGTGCTCTGCTTGAGAGGTGCT-3'
IL-18-F	5'-CTTTGGAAGCCTGCTATAATCC-3'
IL-18-R	5'-GGTCAAGAGGAAGTGATTGGA-3'
GAPDH-F	5'-TCCACTCATGGCAAATTCAG-3'
GAPDH-R	5'-TTTGATGTTAGTGGGGTCTCG-3'

1.8 免疫荧光 PBS 缓冲液漂洗组织切片 3 次, 10% 山羊血清室温封闭 1h, 4°C 孵育一抗 CD86(1:1 000)、CD206(1:1 000)、Iba1(1:1 000) 过夜, 二抗

室温避光孵育 1h, 使用荧光显微镜观察并拍照, Image J Fiji 软件进行数据分析。CD86 阳性细胞数量(CD86^{+})/Iba1 阳性细胞数量(Iba1^{+})表示小胶质细胞 M1 型活化情况, CD206 阳性细胞数量(CD206^{+})/Iba1 阳性细胞数量(Iba1^{+})表示小胶质细胞 M2 型活化情况。

1.9 统计学方法 采用 Graphpad Prism 8.0 软件分析数据。两组之间比较采用 t 检验; 多组间比较使用单因素方差分析, 事后多重比较使用 Tukey 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

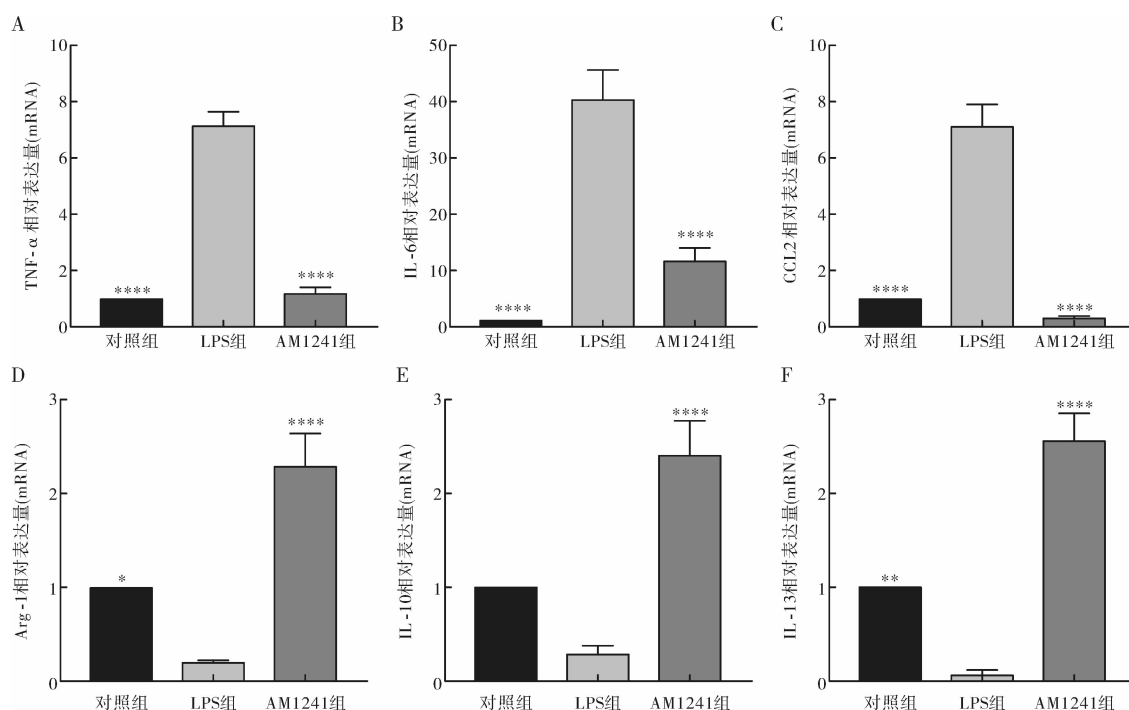
2.1 调节 CB2R 对 BV2 小胶质细胞炎性因子的影响 与对照组相比, LPS 组 BV2 小胶质细胞促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 CCL2 的 mRNA 表达显著增加, AM1241 组 3 种促炎因子的 mRNA 表达较 LPS 组相比明显降低 ($F = 167.00, 41.09, 77.33, P < 0.0001$)。与对照组相比, LPS 组抗炎因子 Arg-1 和 IL-13 的 mRNA 表达显著降低, AM1241 组 Arg-1、IL-10 和 IL-13 的 mRNA 表达较 LPS 组相比明显增加 ($F = 29.68, 26.87, 62.27, P < 0.05$)。见图 1。

2.2 调节 CB2R 对 BV2 小胶质细胞焦亡的影响 与对照组相比, LPS 组 NLRP3、caspase-1、cleaved-caspase-1、GSDMD 和 GSDMD-N 的蛋白表达水平均显著增高, AM1241 组焦亡标记物的蛋白表达较 LPS 组相比明显降低 ($F = 20.18, 29.34, 7.13, 44.49, 7.79, P < 0.05$)。见图 2。

2.3 敲除 CB2R 对小胶质细胞活化的影响 在海马 CA1 和 CA3 区, CB2R $^{-/-}$ 小鼠的 $\text{CD86}^{+}/\text{Iba1}^{+}$ 比值高于 WT 小鼠 ($t = 6.88, 5.04, P < 0.01$), $\text{CD206}^{+}/\text{Iba1}^{+}$ 比值低于 WT 小鼠 ($t = 19.80, 12.64, P < 0.001$)。见图 3。

2.4 敲除 CB2R 对细胞焦亡的影响 与 WT 小鼠相比, CB2R $^{-/-}$ 小鼠 NLRP3、GSDMD、caspase-1、IL-1 β 、IL-18 的 mRNA 水平均明显升高 ($t = 2.20, 3.12, 2.55, 2.54, 2.30, P < 0.05$)。见图 4。另外, 与 WT 小鼠相比, CB2R $^{-/-}$ 小鼠 NLRP3、caspase-1、cleaved-caspase-1、GSDMD 和 GSDMD-N 的蛋白表达水平均显著增多 ($t = 7.43, 2.87, 3.86, 3.99, 6.55, P < 0.05$)。见图 5。

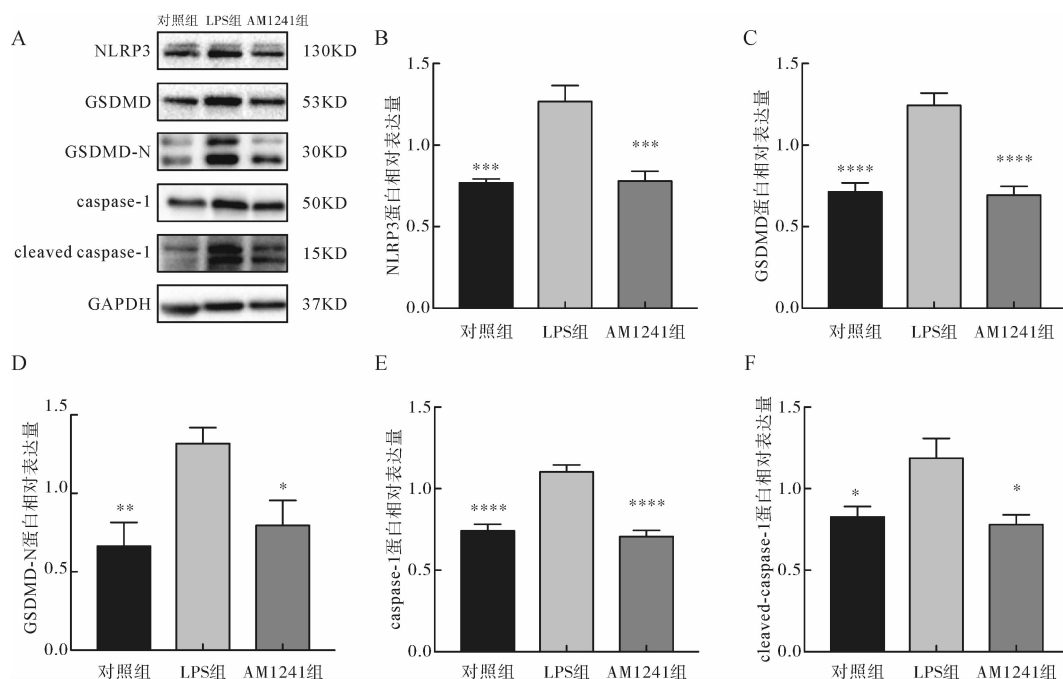
2.5 敲除 CB2R 对小鼠孤独症样行为的影响 旷场实验显示, 与 WT 小鼠相比, CB2R $^{-/-}$ 小鼠活动距离增加, 休息时间减少 ($t = 3.56, 4.68, P < 0.01$)。自梳和埋珠实验显示, 与 WT 小鼠相比, CB2R $^{-/-}$



注:图 A~F 为 BV2 小胶质细胞炎症因子 mRNA 表达水平的比较。与 LPS 组比较(Tukey 检验), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图 1 RT-PCR 检测炎症因子 mRNA 的相对表达量

Fig. 1 Relative expression of inflammatory factors mRNA detected by RT-PCR



注:图 A 为 BV2 小胶质细胞焦亡标记物蛋白表达电泳图;图 B~F 为焦亡标记物蛋白表达水平的比较。与 LPS 组比较(Tukey 检验), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

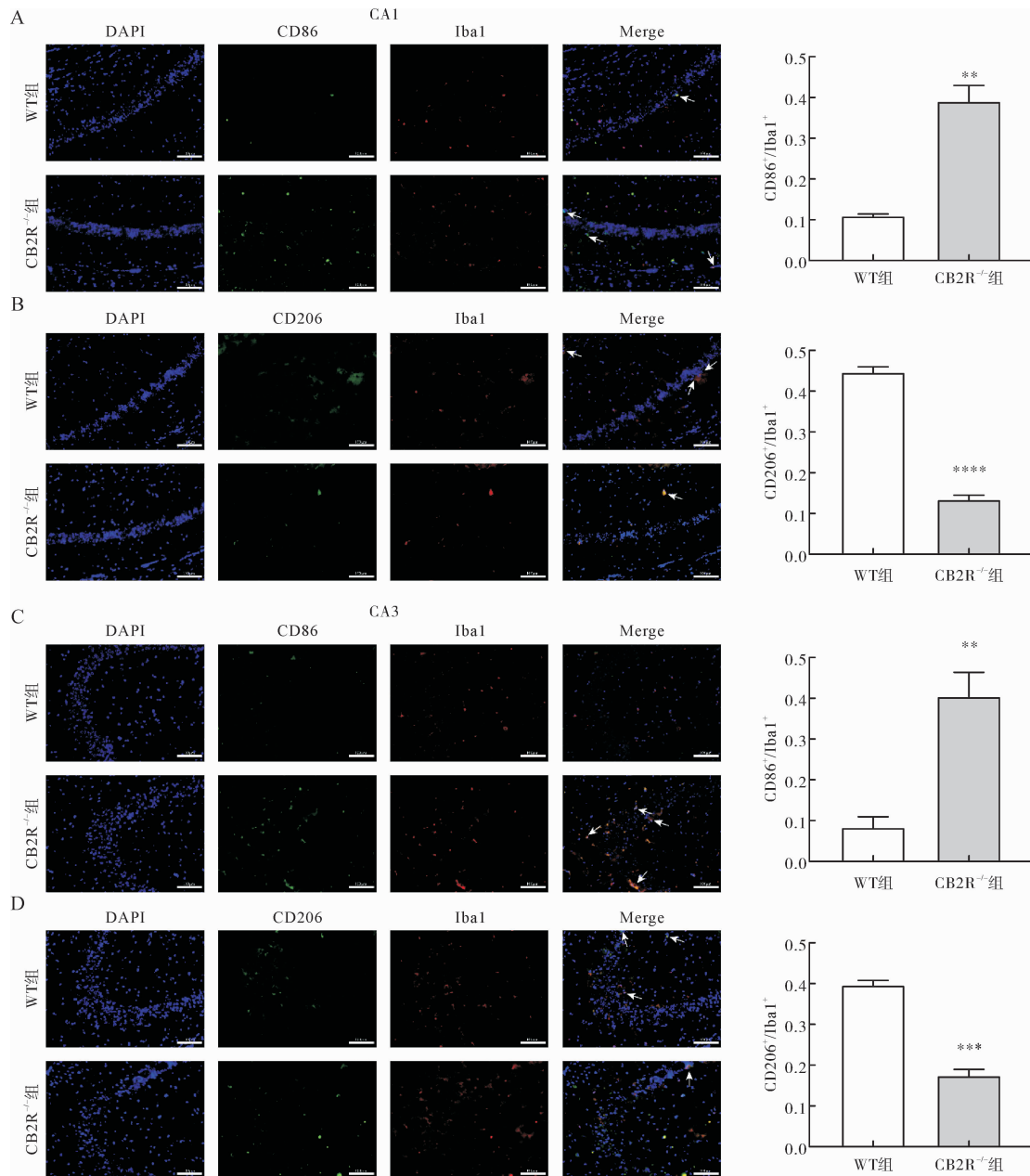
图 2 Western blot 检测焦亡标记物蛋白表达

Fig. 2 Expression of pyroptosis marker proteins detected by Western blot

小鼠的理毛时间和埋珠数量明显增多($t = 6.99$ 、 8.85 , $P < 0.0001$)。

三箱实验的社交能力测试显示, WT 小鼠和

CB2R^{-/-} 小鼠探索陌生鼠 1 的时间多于空箱体($t = 3.70$ 、 3.21 , $P < 0.05$),但两组实验鼠的社交能力指数差异未见统计学意义($t = 1.29$, $P > 0.05$)。社交



注:图 A~B 为海马 CA1 区 CD86、CD206 和 Iba1 免疫荧光染色的代表性图像和统计图(比例尺=100 μ m);图 C~D 为海马 CA3 区 CD86、CD206 和 Iba1 免疫荧光染色的代表性图像和统计图(比例尺=100 μ m)。与 WT 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 3 免疫荧光染色检测小胶质细胞活化

Fig. 3 Microglial activation detected by immunofluorescence staining

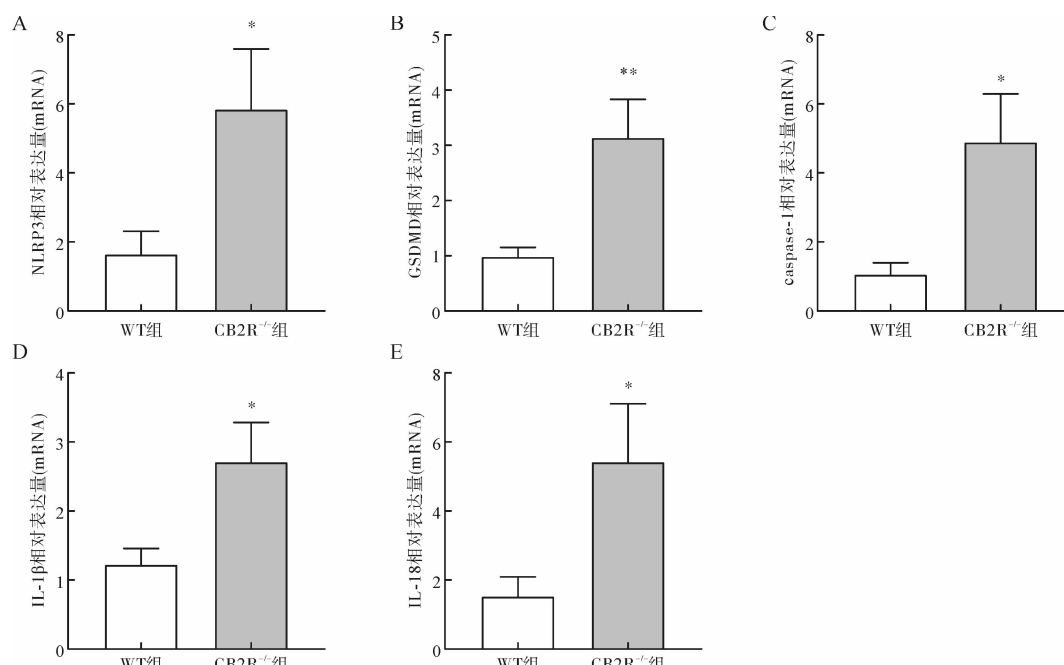
偏好测试显示, WT 小鼠探索陌生鼠 2 的时间多于陌生鼠 1 ($t = 4.01$, $P < 0.05$), 而 CB2R^{-/-} 小鼠探索陌生鼠 1 的时间多于陌生鼠 2 ($t = 4.34$, $P < 0.01$)。与 WT 小鼠相比, CB2R^{-/-} 小鼠的社交偏好指数显著下降 ($t = 2.64$, $P < 0.05$)。见图 6。

3 讨论

3.1 CB2R 对小胶质细胞活化和焦亡的影响

CB2R 作为内源性大麻素受体, 参与多个生物学过程, 包括神经元细胞的分化、增殖和存活, 以及脑源性 T 细胞的凋亡诱导、白细胞干扰等, 在调节免疫

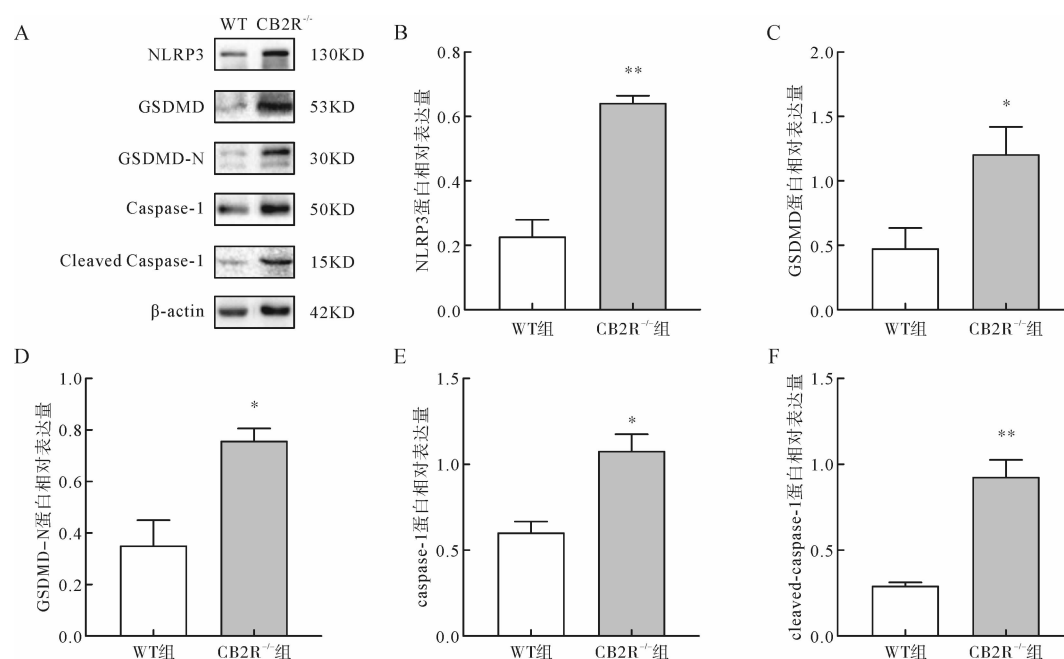
功能和神经炎症反应中起重要作用^[11]。研究表明, 靶向上调 CB2R 可以减少小胶质细胞活化, 继而改善以神经炎症为特征的疾病^[12]。在脊髓损伤模型鼠中, 激动 CB2R 可以促进小胶质细胞向 M2 型转变, 显著抑制神经炎症, 减少小鼠神经元损伤^[13]。CB2R 激动剂可以显著降低认知障碍模型鼠中高表达的促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 水平^[14]。在体外实验中也有类似的结果, Li 等^[13]证明激活 CB2R 使 LPS 刺激的 N9 小胶质细胞促炎细胞因子减少, 抑制 M1 型小胶质细胞活化。本研究发现敲除 CB2R 会导致小胶质细胞活化异常, 即 M1 型活化增多, M2 型活



注:图 A~E 为实验鼠焦亡标记物 mRNA 表达水平的比较。与 WT 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 RT-PCR 检测实验鼠焦亡标记物 mRNA 的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of pyroptosis marker mRNA in mice detected by RT-PCR



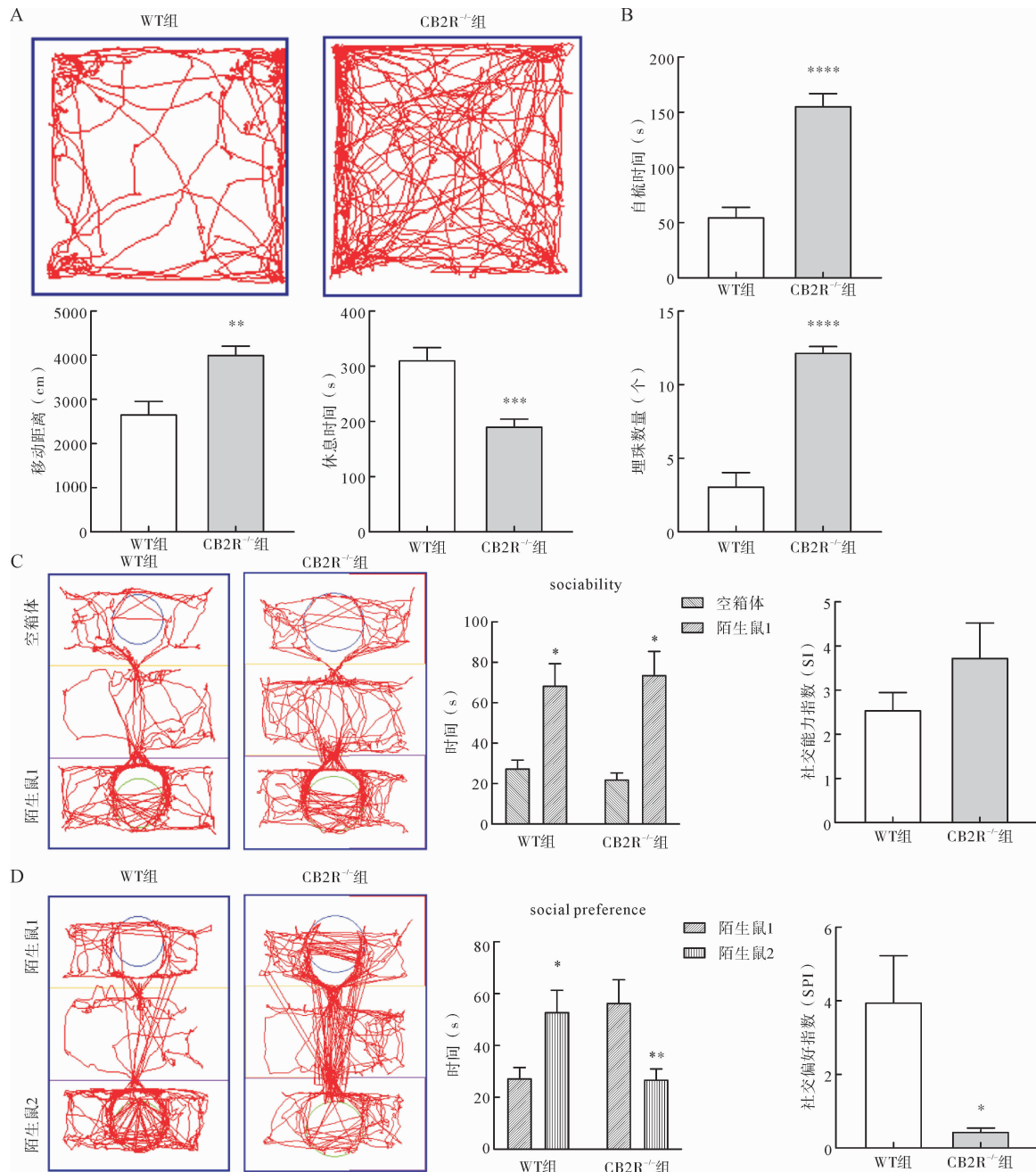
注:图 A 为实验鼠焦亡标记物蛋白表达电泳图;图 B~F 为焦亡标记物蛋白表达水平的比较。与 WT 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 5 Western blot 检测实验鼠焦亡标记物蛋白表达

Fig. 5 Expression of pyroptosis marker proteins in mice detected by Western blot

化减少。另外,在 LPS 的刺激下 BV2 小胶质细胞会释放大量促炎因子,CB2R 激动剂 AM1241 的干预能够改善其异常的炎症反应,具体表现为促炎因子降低,抗炎因子增加。以上结果与既往研究一致,认为 CB2R 可以调控小胶质细胞活化和炎性因子表达从而发挥神经保护作用。

有证据提示 CB2R 对细胞焦亡也具有一定的调控作用。在外周免疫系统中,激活 CB2R 可以降低 NLRP3 蛋白水平以及 Caspase-1 和 GSDMD 的激活,抑制巨噬细胞 NLRP3 介导的细胞焦亡^[15]。国外学者发现激活 CB2R 引起巨噬细胞中 IL-1 β 增多,产生细胞毒性,Caspase-1 的抑制剂可以缓解这



注: 图 A 为旷场实验, 包括轨迹图、运动距离和休息时间的比较; 图 B 为自梳时间和埋珠个数的比较; 图 C 为社交能力测试, 包括轨迹图、实验鼠探索空箱体和陌生鼠 1 的时间比较、社交能力指数比较; 图 D 为社交偏好测试, 包括轨迹图、实验鼠探索陌生鼠 1 和陌生鼠 2 的时间比较、社交偏好指数比较。与 WT 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 6 行为学实验检测实验鼠的孤独症样行为

Fig. 6 Autism-like behaviors in mice detected by behavioral experiments

种细胞毒作用, 提示激活 CB2R 可以诱导巨噬细胞焦亡^[16]。另一方面, 激活 CB2R 可以抑制自身免疫性脑脊髓炎中 BV2 小胶质细胞 NLRP3 炎症小体的形成, 还可以降低 IL-1 β 的 mRNA 表达^[7]。目前已发现在神经系统中 NLRP3 炎症小体和 GSDMD 主要表达于小胶质细胞, 推测 CB2R 可能对与巨噬细胞同源的小胶质细胞焦亡也具有调控作用。本研究的体外实验结果说明, LPS 可诱导 BV2 小胶质细胞

焦亡的发生, 激活 CB2R 后焦亡标记物蛋白表达均降低, 逆转了 BV2 小胶质细胞过度焦亡; 体内实验结果说明, CB2R 敲除后, 小鼠体内 NLRP3、GSDMD、caspase-1 的 mRNA 和蛋白水平升高, IL-1 β 和 IL-18 释放增多。此外, 通过 WB 实验证实焦亡标记物蛋白表达也显著增加。因此, 激动 CB2R 可能通过抑制小胶质细胞焦亡发挥抗炎作用。

3.2 CB2R 对小鼠孤独症样行为的影响 小胶质

细胞导致的免疫失调被认为是 ASD 发病机制的关键因素之一^[17]。研究表明,在 ASD 患者的脑组织和脑脊液中,M1 型小胶质细胞激活增加^[18]。同时,在 ASD 模型鼠的海马区也观察到了小胶质细胞密度显著增多^[19]。此外,使用抗炎药物如米诺环素、阿司匹林及姜黄素进行治疗可以抑制小胶质细胞活化,改善 ASD 相关行为^[20]。国外研究者还发现,相较于健康儿童,ASD 患儿 PBMCs 中 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 、IL-18 的表达量更高^[21]。有研究进一步表明,通过抑制 VPA 模型鼠 NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β 的表达,可以有效改善模型鼠的重复刻板行为、社交障碍和认知缺陷^[22]。因此,有理由推测 CB2R 可能通过影响小胶质细胞活化和焦亡影响 ASD 的发生发展。进一步观察敲除 CB2R 对小鼠行为学的影响,发现敲除 CB2R 后小鼠出现明显的孤独症样行为,具体表现为过度运动、明显的焦虑和重复刻板行为,同时出现社交偏好缺陷。该发现与以往研究结果一致,国外学者发现,在伙伴识别测试中,只有 WT 小鼠喜欢与新伙伴互动,CB2R^{-/-} 小鼠对新伙伴和熟悉伙伴的偏好没有差异,表明 CB2R^{-/-} 小鼠存在社交偏好障碍^[23]。Joanna 团队同样通过 PR 实验证实敲除 CB2R 出现社交记忆受损^[24]。在旷场实验中,特异性敲除多巴胺能神经元中 CB2R 的小鼠也出现焦虑和过度活动现象^[25],并且在大多数研究中,激动 CB2R 倾向于降低健康啮齿动物的运动活动^[26]。此外,本课题组前期已证实,CB2R 还参与调节 ASD 模型鼠社交功能和重复刻板行为。其他研究团队也发现,激活 CB2R 改善 ASD 模型鼠社交行为和焦虑样行为方面的作用^[27]。

综上所述,本研究以 BV2 小胶质细胞和 CB2R^{-/-} 小鼠作为研究对象,发现 CB2R 通过调控小胶质细胞活化和焦亡,影响神经炎症反应,进而导致孤独症样行为,提示未来 CB2R 可作为 ASD 潜在的治疗靶点,该研究为深入探讨 ASD 的病因及发病机制提供了重要证据。本研究还存在一些不足,初步研究了 CB2R 对小鼠孤独症样行为的影响,并未对其在神经损伤和 ASD 模型鼠中的作用进行验证,今后将在 ASD 模型鼠中进一步探讨 CB2R 的神经保护作用。

参考文献

- [1] Sahu P, Mudgal J, Arora D, et al. Cannabinoid receptor 2 activation mitigates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and sickness behavior in mice[J]. *Psychopharmacology*, 2019, 236(6): 1829-1838.
- [2] Carrera J, Tomberlin J, Kurtz J, et al. Endocannabinoid signaling for GABAergic-Microglia (Mis) Communication in the brain aging[J]. *Front Neurosci*, 2021, 14: 606808.
- [3] Hsieh GC, Pai M, Chandran P, et al. Central and peripheral sites of action for CB2 receptor mediated analgesic activity in chronic inflammatory and neuropathic pain models in rats[J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 162(2): 428-440.
- [4] Komorowska-Müller JA, Schmöle AC. CB2 Receptor in Microglia: The guardian of Self-Control[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 19.
- [5] Xin Q, Xu F, Taylor DH, et al. The impact of cannabinoid type 2 receptors (CB2Rs) in neuroprotection against neurological disorders[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(12): 1507-1518.
- [6] Hsu SK, Li CY, Lin IL, et al. Inflammation-related pyroptosis, a novel programmed cell death pathway, and its crosstalk with immune therapy in cancer treatment[J]. *Theranostics*, 2021, 11(18): 8813-8835.
- [7] Shao BZ, Wei W, Ke P, et al. Activating cannabinoid receptor 2 alleviates pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis via activation of autophagy and inhibiting NLRP3 inflammasome[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(12): 1021-1028.
- [8] Kibret BG, Ishiguro H, Horiuchi Y, et al. New insights and potential therapeutic targeting of CB2 cannabinoid receptors in CNS disorders[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 975.
- [9] Saghaizadeh A, Ataeinia B, Keynejad K, et al. A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: Effects of age, gender, and latitude[J]. *J Psychiatr Res*, 2019, 115: 90-102.
- [10] Zou M, Liu Y, Xie S, et al. Alterations of the endocannabinoid system and its therapeutic potential in autism spectrum disorder[J]. *Open Biol*, 2021, 11(2): 200306.
- [11] Sánchez AJ, García-Merino A. Neuroprotective agents: Cannabinoids[J]. *Clin Immunol*, 2012, 142(1): 57-67.
- [12] Palazuelos J, Aguado T, Pazos MR, et al. Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity[J]. *Brain*, 2009, 132(11): 3152-3164.
- [13] Li J, Wang H, Liu D, et al. CB2R activation ameliorates late adolescent chronic alcohol exposure-induced anxiety-like behaviors during withdrawal by preventing morphological changes and suppressing NLRP3 inflammasome activation in prefrontal cortex microglia in mice[J]. *Brain Behav Immun*, 2023, 110: 60-79.
- [14] Çakır M, Tekin S, Doğanyigit Z, et al. Cannabinoid type 2 receptor agonist JWH-133, attenuates Okadaic acid induced spatial memory impairment and neurodegeneration in rats[J]. *Life Sci*, 2019, 217: 25-33.
- [15] Zhang B, Zheng F, Liu A, et al. Activation of CB2 receptor inhibits pyroptosis and subsequently ameliorates cecal ligation and puncture-induced sepsis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 108038.
- [16] Yamaori S, Ishii H, Chiba K, et al. Δ^8 -Tetrahydrocannabinol induces cytotoxicity in macrophage J774-1 cells: Involvement of cannabinoid receptor 2 and p38 MAPK[J].

- Toxicology, 2013, 314(2-3): 254-261.
- [17] Hughes HK, Moreno RJ, Ashwood P. Innate immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder (ASD)[J]. *Brain Behav Immun*, 2023, 108: 245-254.
- [18] Mecha M, Feliú A, Carrillo-Salinas FJ, et al. Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia[J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 49: 233-245.
- [19] 张雪原, 孔亚敏, 马丙祥, 等. 孤独症谱系障碍动物模型相关神经生物学研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(8): 1141-1149.
- Zhang XY, Kong YM, Ma BX, et al. Research progress in the neurobiology of animal models of autism spectrum disorder[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(8): 1141-1149. (in Chinese)
- [20] Arteaga-Henríquez G, Gisbert L, Ramos-Quiroga JA. Immunoregulatory and/or anti-inflammatory agents for the management of core and associated symptoms in individuals with autism spectrum disorder: A narrative review of randomized, placebo-controlled trials[J]. *CNS Drugs*, 2023, 37(3): 215-229.
- [21] Szabo A, O'Connell KS, Akkouch IA, et al. Elevated levels of peripheral and central nervous system immune markers reflect innate immune dysregulation in autism spectrum disorder[J]. *Psychiatry Res*, 2024, 342: 116245.
- [22] Zhao P, Fu H, Cheng H, et al. Acupuncture at ST36 Alleviates the behavioral disorder of autistic rats by inhibiting TXNIP-mediated activation of NLRP3[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2022, 81(2): 127-134.
- [23] Komorowska-Müller JA, Ravichandran KA, Zimmer A, et al. Cannabinoid receptor 2 deletion influences social memory and synaptic architecture in the hippocampus[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 16828.
- [24] Komorowska-Müller JA, Rana T, Olabiyi BF, et al. Cannabinoid receptor 2 alters social memory and microglial activity in an age-dependent manner[J]. *Molecules*, 2021, 26(19): 5984.
- [25] Canseco-Alba A, Schanz N, Sanabria B, et al. Behavioral effects of psychostimulants in mutant mice with cell-type specific deletion of CB2 cannabinoid receptors in dopamine neurons[J]. *Behav Brain Res*, 2019, 360: 286-297.
- [26] Cortez IL, Silva NR, Rodrigues NS, et al. HU-910, a CB2 receptor agonist, reverses behavioral changes in pharmacological rodent models for schizophrenia[J]. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2022, 117: 110553.
- [27] Fyke W, Alarcon JM, Velinov M, et al. Pharmacological inhibition of the primary endocannabinoid producing enzyme, DGL- α , induces autism spectrum disorder-like and co-morbid phenotypes in adult C57BL/J mice[J]. *Autism Res*, 2021, 14(7): 1375-1389.
- 收稿日期: 2024-09-30 修回日期: 2024-12-03 本文编辑: 杨媛媛

(上接第 42 页)

- Wu ML, Deng XM, Lin HZ, et al. Results of Gesell Developmental Scale of 2-to-3 year-old children with autism spectrum disorder or developmental language disorder[J]. *Chin J Child Health Care*, 2022, 30(8): 895-899. (in Chinese)
- [9] Kjellmer L, Fernell E, Gillberg C, et al. Speech and language profiles in 4- to 6-year-old children with early diagnosis of autism spectrum disorder without intellectual disability[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2018, 14: 2415-2427.
- [10] Sansavini A, Favilla ME, Guasti MT, et al. Developmental language disorder: Early predictors, age for the diagnosis, and diagnostic tools. A scoping review[J]. *Brain Sci*, 2021, 11(5): 654.
- [11] Wilson RB, Enticott PG, Rinehart NJ. Motor development and delay: Advances in assessment of motor skills in autism spectrum disorders[J]. *Curr Opin Neurol*, 2018, 31(2): 134-139.
- [12] Posar A, Visconti P. Early motor signs in autism spectrum disorder[J]. *Children (Basel)*, 2022, 9(2): 294.
- [13] Gonzalez SL, Alvarez V, Nelson EL. Do gross and fine motor skills differentially contribute to language outcomes? A systematic review[J]. *Frontiers in psychology*, 2019, 10: 2670.
- [14] West KL. Infant motor development in autism spectrum disorder: A synthesis and Meta-analysis[J]. *Child Development*, 2019, 90(6): 2053-2070.
- [15] Sigman M, McGovern CW. Improvement in cognitive and language skills from preschool to adolescence in autism[J]. *J Autism Dev Disord*, 2005, 35(1): 15-23.
- [16] Brignell A, May T, Morgan AT, et al. Predictors and growth in receptive vocabulary from 4 to 8 years in children with and without autism spectrum disorder: A population-based study[J]. *Autism*, 2019, 23(5): 1322-1334.
- [17] 章丽丽, 刘毅梅, 周白云, 等. 无锡市孤独症谱系障碍儿童 4 年康复随访研究[C]. 厦门: 第十九次全国行为医学学术会议 2017, 189-192.
- [18] 马永娟, 邹明扬, 李齐, 等. 孤独症谱系障碍儿童症状转归及其影响因素的随访研究[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2019, 53(2): 154-158.
- Ma YJ, Zou MY, Li Q, et al. Follow-up study on symptom outcome and its influencing factors of children with autism spectrum disorder[J]. *Journal of Harbin Medical University*, 2019, 53(2): 154-158. (in Chinese)
- 收稿日期: 2024-07-11 修回日期: 2024-11-04 本文编辑: 杨媛媛