·基础科研论著·

产后早期免疫激活对小鼠孤独症样行为和胶质细胞的影响

张蓓[1]，王敏囡[2]，尼罗帕[2]，古丽加娜提·阿布拉克木[2]，克日曼·帕尔哈提[2]，何艳红[2]，阿曼古丽·卡德尔[2]，热娜·买买提[2]

1. 新疆医科大学儿科学院，新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐　830054；2. 新疆医科大学第一附属医院儿童保健科

摘　要：目的　观察产后早期免疫激活(EPIA)对雌雄小鼠社会行为的影响，探讨星状胶质细胞和小胶质细胞功能状态在此过程中的可能作用。**方法**　以脂多糖(LPS)诱导的 40 只 EPIA 小鼠作为研究对象，分为雄性对照组、雄性模型组、雌性对照组、雌性模型组各 10 例。各组小鼠于 25～32 日龄进行行为学检测，利用旷场、三箱社交、埋珠实验检测各组小鼠社会行为能力；采用蛋白免疫印迹法检测大脑皮质和海马组织 GFAP、IBA-1、TLR4、NFκB p65 蛋白表达水平。**结果**　行为学检测中，LPS 处理显著降低社交指数($F=14.907$，$P<0.05$)。处理和性别的交互作用在中央区停留时间、埋珠数量上显著($F=5.260$、7.788，$P<0.05$)。雄性 LPS 处理减少中央区停留时间、升高埋珠数量($F=4.261$、20.645，$P<0.05$)。蛋白免疫印迹结果显示 LPS 处理升高 GFAP 蛋白在海马和皮质的表达量($F=50.443$、30.116，$P<0.05$)，升高 IBA-1 蛋白和 TLR4 蛋白在皮质的表达量($F=21.844$、6.215，$P<0.05$)。NFκB p65 结果显示处理和性别的交互作用在皮质显著($F=6.558$，$P<0.05$)，雌性 LPS 处理升高皮质 NFκB p65 蛋白表达量($F=16.317$，$P<0.05$)。**结论**　EPIA 足以在小鼠中产生性别特异性孤独症样行为并增强星状胶质细胞和小胶质细胞反应性。EPIA 诱导孤独症样行为可能与皮质区 TLR4/NFκB 信号通路相关。

关键词：　孤独症谱系障碍；免疫激活；脂多糖；新生小鼠；胶质细胞

中图分类号：R749.94　**文献标识码：**A　**文章编号：**1008-6579(2024)04-0405-07　doi:10.11852/zgetbjzz2023-1149

Effects of early postnatal immune activation on autism-like behaviors and glial cells in mice

ZHANG Bei[1], WANG Minnan[2], NI Luopa[2], Gulijianati ABULAKEMU[2], Keriman PAERHATI[2], HE Yanhong[2], Amanguli KADEER[2], Rena MAIMAITI[2]

1. Academy of Pediatrics, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang Uygur Autonomous Region 830054, China;

2. Department of Child Health Care, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University

Corresponding author: Rena MAIMAITI, E-mail: krena95@aliyun.com

Abstract: Objective　To observe the effects of early postnatal immune activation (EPIA) on social behaviors of male and female mice, and to explore the possible role of the functional state of astrocytes and microglia in this process. **Methods**　Using lipopolysaccharide (LPS) induced EPIA mice as study subjects, mice were divided into the male-control, male-model, female-control, and female-model groups, each containing 10 mice ($n=10$). Behavioral tests were performed at 25 - 32 days of age, and the social behavior ability of mice was evaluated by open field test, three-chamber sociability test, and marble burying test. The expression levels of GFAP, IBA-1, TLR4, and NFκB p65 in the cortex and hippocampus were detected by Western blot ($n=3$). **Results**　In behavioral tests, social index significantly decreased in LPS treatment group ($F=14.907$, $P<0.05$). The interaction effect between treatment and sex was significant in the residence time ($F=5.260$, $P<0.05$) and the number of buried marbles ($F=7.788$, $P<0.05$). LPS treatment decreased the retention time of the central region in male mice ($F=4.261$, $P<0.05$), and increased the number of buried marbles in males ($F=20.645$, $P<0.05$). Western blot results showed that LPS treatment increased the expression of GFAP protein in the hippocampus ($F=50.443$, $P<0.05$) and cortex ($F=30.116$, $P<0.05$), as well as the expression of IBA-1 protein ($F=21.844$. $P<0.05$) and TLR4 protein ($F=6.215$, $P<0.05$) in the cortex. The results of NFκB p65 showed a significant interaction between treatment and sex in the cortex ($F=6.558$, $P<0.05$), and LPS increased the expression of NFκB p65 protein in the cortex in female mice ($F=16.317$, $P<0.05$). **Conclusions**　EPIA is sufficient to induce sex-

基金项目：新疆维吾尔自治区资源共享平台建设项目(PT2215)

作者简介：张蓓(1996-)，女，研究生在读，主要研究方向为儿童发育障碍及行为问题。

通信作者：热娜·买买提，E-mail：krena95@aliyun.com

specific autism spectrum disorder (ASD)-like behavior and enhance astroglial and microglial reactivity in mice. ASD-like behavior induced by EPIA may be related to the TLR4/NFκB signaling pathway in the cortex.

Keywords: autism spectrum disorder; immune activation; lipopolysaccharide; neonatal mouse; glial cells

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)是一种神经发育障碍性疾病,主要特征为沟通和社交障碍、兴趣狭隘和刻板行为。ASD 的发病机制、生物标志物尚不明确。有研究表明产后早期免疫激活(early postnatal immune activation, EPIA)可引起小鼠大脑免疫反应和 ASD 样行为变化,对 ASD 的发病有重要影响[1-2]。星形胶质细胞和小胶质细胞可通过包含 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 κB(nuclear factor kappa B, NFκB)信号通路在内的多种途径调节中枢神经系统炎症[3],两者功能状态与 ASD 认知和行为障碍密切相关[4-5],提示 EPIA 诱导 ASD 样行为改变与星形胶质细胞和小胶质细胞反应性有关。因此,本实验通过建立脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 EPIA 小鼠模型,观察 EPIA 对雌雄小鼠社会行为的影响,探讨星状胶质细胞和小胶质细胞功能状态在此过程中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂 SPF 清洁级 9 日龄 C57BL/6J 新生小鼠 40 只,雌雄各半,体重 3～5g,新生小鼠和母鼠由新疆医科大学实验动物中心提供。LPS 冻干粉购于中国白鲨生物科技公司。行为分析采用上海吉量软件科技有限公司的 DigBehv 动物行为分析系统。BCA 蛋白质浓度测定试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司。SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购于北京博泰斯生物技术有限公司。星状胶质细胞标志物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、小胶质细胞标志物钙离子结合调节分子 1(ionized calcium binding adapter molecule 1, IBA-1)、TLR4 抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司,NFκB p65、HRP 标记山羊抗兔 IgG、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体购于宜康生物技术有限公司。

1.2 EPIA 小鼠模型制备及分组 根据文献[1]的方法造模,新生小鼠于产后第 9 天(postnatal day 9, P9)分别皮下注射 LPS 10mg/kg 或等体积磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)。分为雄性模型组、雄性对照组、雌性模型组、雌性对照组,小鼠在 23 日龄断奶,置于单性别、单处理条件笼中。每组小鼠选自 3～5 窝,所有小鼠均进行行为分析(n=10)。本实验经新疆医科大学实验动物伦理委员会批准(IACUC-20220314-32)。

1.3 行为学检测 各组小鼠于 P25-32 按顺序完成旷场实验、三室社交实验、埋珠实验,各项行为学测试在光周期内的安静恒温环境进行,实验人员避免出现在小鼠的视线之内,维持环境音量在 30dB 以下,行为箱内光照维持在 40lux,温度保持在 21℃。每只小鼠实验结束后用 75%酒精去除行为箱内气味和异物,并用卫生纸擦拭干净。

1.3.1 旷场实验 小鼠背朝实验人员放入行为箱的正中心,让其自由探索 10min;10min 后打开摄像头,记录 10min 内小鼠在行为箱内自由活动数据。

1.3.2 三室社交实验 根据文献[6]设置条件,适应阶段:将实验小鼠背朝实验者放入行为箱的中央室,使其自由活动 10min,充分熟悉环境;社交能力检测阶段:10min 后将小鼠重新放至中央室,在左右两室的束缚器中随机放入一只同种相似年龄段的陌生小鼠,另一个放入一个无气味玩具,使其自由活动 10min 并记录。

1.3.3 埋珠实验 根据文献[7]设置条件,实验时将标准玻璃弹珠(各种款式和颜色,直径约为 1.4cm,重量约为 2g),按 3 排每排 3 个弹珠等距离地轻放在饲养箱左侧垫料上;小鼠背朝实验人员放入饲养箱右侧,自由活动 30min 后取出小鼠,记录弹珠掩埋情况。掩埋面积≥90%记作掩埋。每次实验之间,更换饲养箱和垫料,并用温和的洗涤剂清洗弹珠,蒸馏水彻底冲洗,使用前晾干。

1.4 样本收集 所有行为分析实验完成后,各组小鼠冰上断头取全脑,分离皮质和海马,分别冻存于−80℃备用。

1.5 Western blot 法检测蛋白水平 分别提取皮质和海马组织总蛋白,按 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒说明书检测蛋白浓度,蛋白液与相应体积蛋白上样缓冲液混合均匀,100℃ 煮 10min 使蛋白变性。电泳、转膜、封闭后孵育一抗 4℃过夜。PBST 洗涤 3 次后加入对应的二抗 HRP 标记山羊抗兔抗体或 HRP 标记山羊抗小鼠抗体,室温孵育 1h,PBST 洗涤 3 次后 ECL 显影。使用 Image J 软件计算条带灰度值,所有目标蛋白以 GAPDH 为内参,结果以目的蛋白与内参 GAPDH 蛋白比值表示(n=3)。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 25.0 进行数据分析,组间的差异采用双因素方差分析,交互作用显著时进一步行简单效应分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

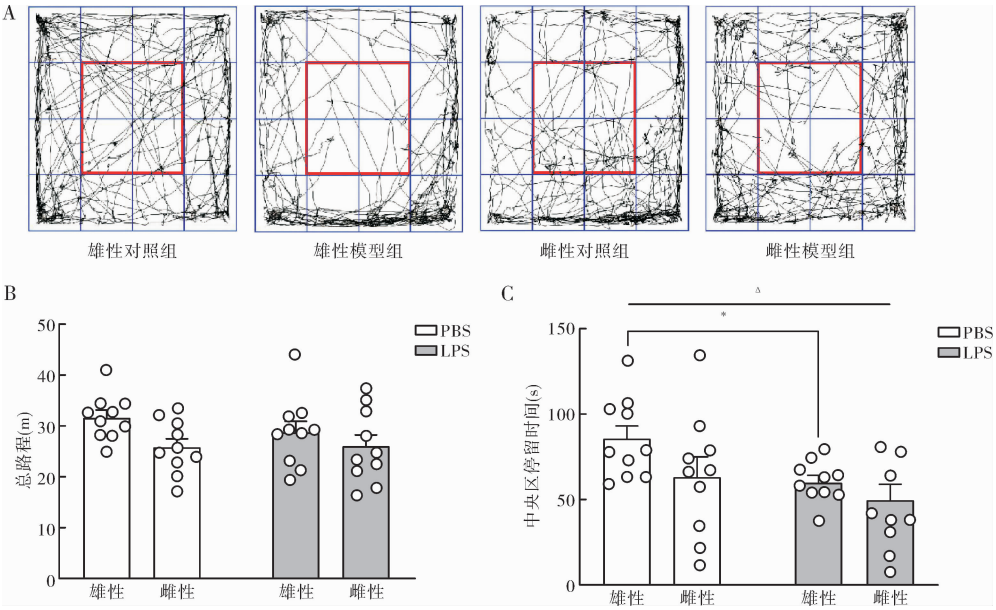
2　结　果

2.1　EPIA 对雌雄小鼠社会行为的影响

2.1.1　旷场实验　本实验主要用来观察实验动物的自主运动能力、焦虑状态等。总路程结果显示处理和性别的交互作用不显著（$P>0.05$），处理的主效应不显著（$P>0.05$）。表明 EPIA 未损害小鼠的运动能力。中央区停留时间显示处理和性别的交互作用显著（$F=5.260$，$P<0.05$），进一步简单效应分析显示 LPS 处理的雄性在中央区的停留时间显著低于 PBS 处理的雄性（$F=4.261$，$P<0.05$）。提示 EPIA 对小鼠焦虑状态的影响存在性别差异。见图 1、表 1。

2.1.2　三室社交实验　实验目的是测试啮齿动物的社交互动行为，社交指数（sociability index，SI）=（探索社交笼的时间－探索非社交笼的时间）/（探索社交笼的时间＋探索非社交笼的时间），即 SI=（探索鼠笼时间－探索玩具笼时间）/（探索鼠笼时间＋探索玩具笼时间）[6]。实验结果显示处理的主效应显著（$F=14.907$，$P<0.05$），LPS 处理显著降低社交指数。提示 EPIA 可以损害雌雄小鼠社交能力。见图 2、表 1。

2.1.3　埋珠实验　本实验是一种经典的基于啮齿动物在不同基质中挖掘和掩埋小物体的自然倾向试验，可用于定量检测小鼠重复刻板行为。埋珠数量结果显示处理和性别的交互作用显著（$F=7.788$，$P<0.05$），进一步简单效应分析显示雄性小鼠中的 LPS 处理显著增加埋珠数量（$F=20.645$，$P<0.05$），提示 EPIA 对小鼠焦虑状态的影响存在性别差异。见图 3、表 1。



注：A 为各组小鼠旷场实验轨迹代表图（中央 4 个小格范围为中央区），B 为各组小鼠自主运动总路程的比较，C 为各组小鼠中央区停留时间的比较。$^{\Delta}$ 表示处理和性别的交互作用 $P<0.05$，* 表示简单效应 $P<0.05$。

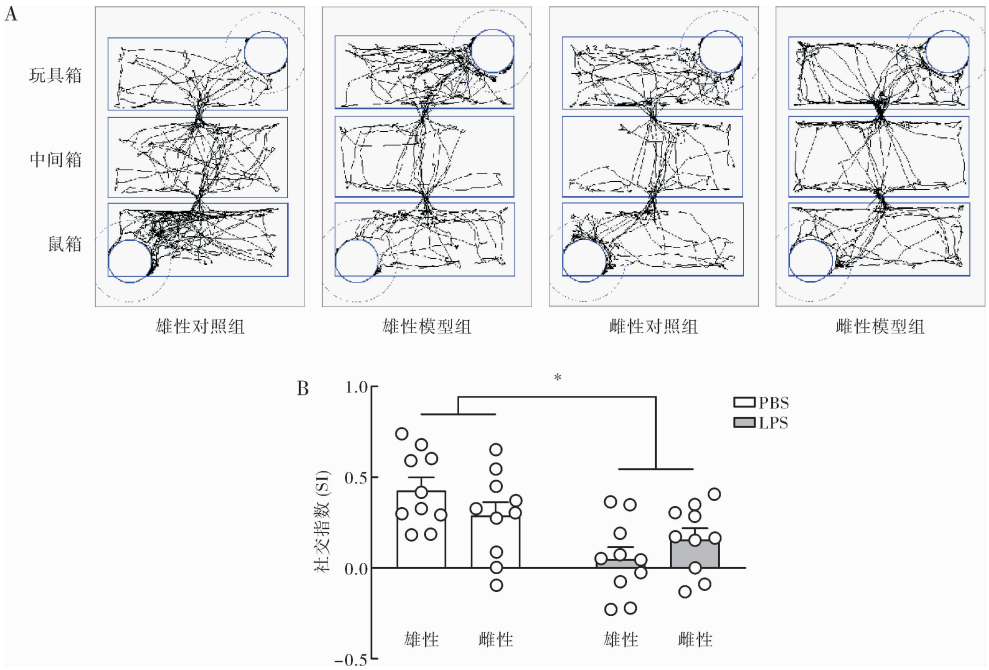
图 1　EPIA 对各组小鼠自主运动能力、焦虑状态的影响

Fig. 1 Effects of EPIA on autonomic motor ability and anxiety-like behavior in mice

表 1　各组小鼠行为学检测的双因素方差分析结果

Tab. 1　Two-way ANOVA results of behavioral tests in mice

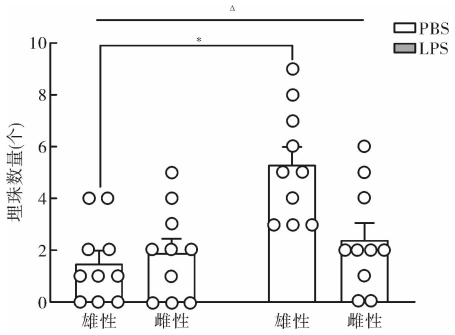
行为学检测	处理		性别		交互作用	
	F 值	*P* 值	*F* 值	*P* 值	*F* 值	*P* 值
旷场实验						
总路程(m)	0.646	0.427	4.966	<0.05	0.585	0.449
中央区停留时间(s)	0.391	0.536	3.675	0.063	5.260	<0.05
三室社交实验						
社交指数	14.907	<0.01	0.055	0.816	3.580	0.067
埋珠实验						
埋珠数量	13.218	<0.01	4.468	<0.05	7.788	<0.01



注：A 为各组小鼠三室社交实验轨迹代表图，B 为各组小鼠社交指数(SI)的比较。* 为主效应 $P<0.001$。

图 2 EPIA 对各组小鼠社会行为的影响

Fig. 2 Effects of EPIA on social behavior in mice



注：Δ 为处理和性别的交互作用 $P<0.01$，* 为简单效应 $P<0.001$。

图 3 EPIA 对各组小鼠重复刻板行为的影响

Fig. 3 Effects of EPIA on repetitive stereotypical behavior in mice

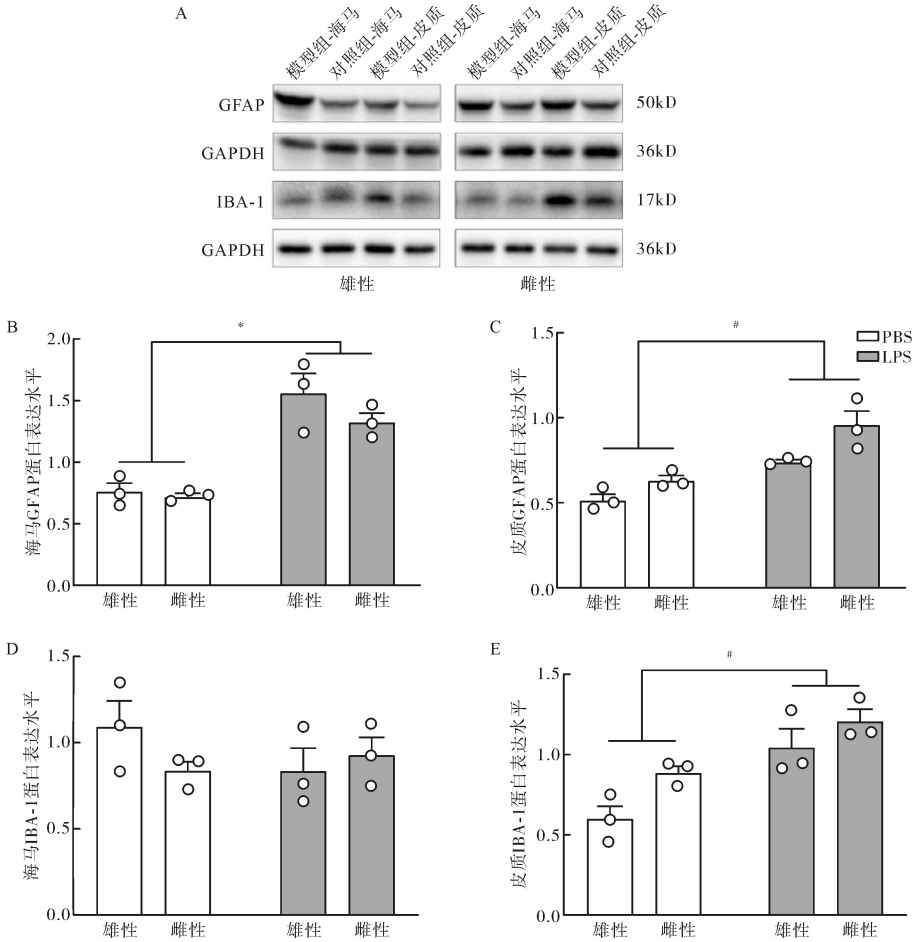
2.2 EPIA 对小鼠海马和皮质中 GFAP、IBA-1 蛋白表达的影响 GFAP 蛋白免疫印迹结果显示处理的主效应在海马、皮质均显著，LPS 处理显著升高 GFAP 蛋白在海马、皮质($F=50.443$、30.116，$P<0.01$)的表达量。IBA-1 结果显示处理的主效应在皮质显著，LPS 处理显著升高皮质 IBA-1 蛋白表达量($F=21.844$，$P<0.05$)。见图 4、表 2。

2.3 EPIA 对小鼠海马和皮质 TLR4、NFκB p65 蛋白表达水平的影响 TLR4 蛋白免疫印迹结果显示处理的主效应在皮质中显著，LPS 处理显著升高皮质 TLR4 蛋白表达量($F=6.215$，$P<0.05$)。NFκB p65 结果显示处理和性别的交互作用在皮质显著($F=6.558$，$P<0.05$)，进一步简单效应分析显示在性别为雌性时，LPS 处理显著升高皮质 NFκB p65 蛋白表达量($F=16.317$，$P<0.05$)。见图 5，表 2。

3 讨 论

近年来，多项研究显示 EPIA 对 ASD 发病有重要影响[8-12]。LPS 诱导的 EPIA 模型鼠是目前具有较高信度和效度的 EPIA 动物模型之一[13]。本研究以 LPS 诱导的 EPIA 模型小鼠为对象，观察 EPIA 对雌雄小鼠社会行为的影响，探讨星状胶质细胞和小胶质细胞功能状态在此过程中的可能作用。

3.1 EPIA 对小鼠 ASD 样行为的影响 行为学结果显示 EPIA 模型小鼠表现出不同程度的焦虑、社会交往障碍、重复刻板行为。表明本实验成功地复制了 ASD 的主要核心症状。与既往动物研究结果类似[1,14]，本实验行为学指标在性别间有明显差异，雄性小鼠 EPIA 更容易表现出焦虑和重复刻板行为。这种 EPIA 对个体社会行为的性别差异性影响可能解释为发育过程中胶质细胞基因表达、形态、成熟度和对免疫激活反应的差异[15]。有研究表明，包括 GFAP 和 IBA-1 在内的促炎标志物在围生期免疫激活诱导的 ASD 样雌雄小鼠中具有一致的升高趋势，但抗炎标志物存在较大的性别差异(雄性小鼠 IL-10、TGF-β1 mRNA 和蛋白水平降低，雌性小鼠



注：A 为 Western blot 法检测各组小鼠海马及皮质 GFAP、IBA-1 蛋白表达电泳图，B、C 分别为海马、皮质 GFAP 蛋白表达水平的比较，D、E 分别为海马、皮质 IBA-1 蛋白表达水平的比较。# 为主效应 $P<0.01$，* 为主效应 $P<0.001$。

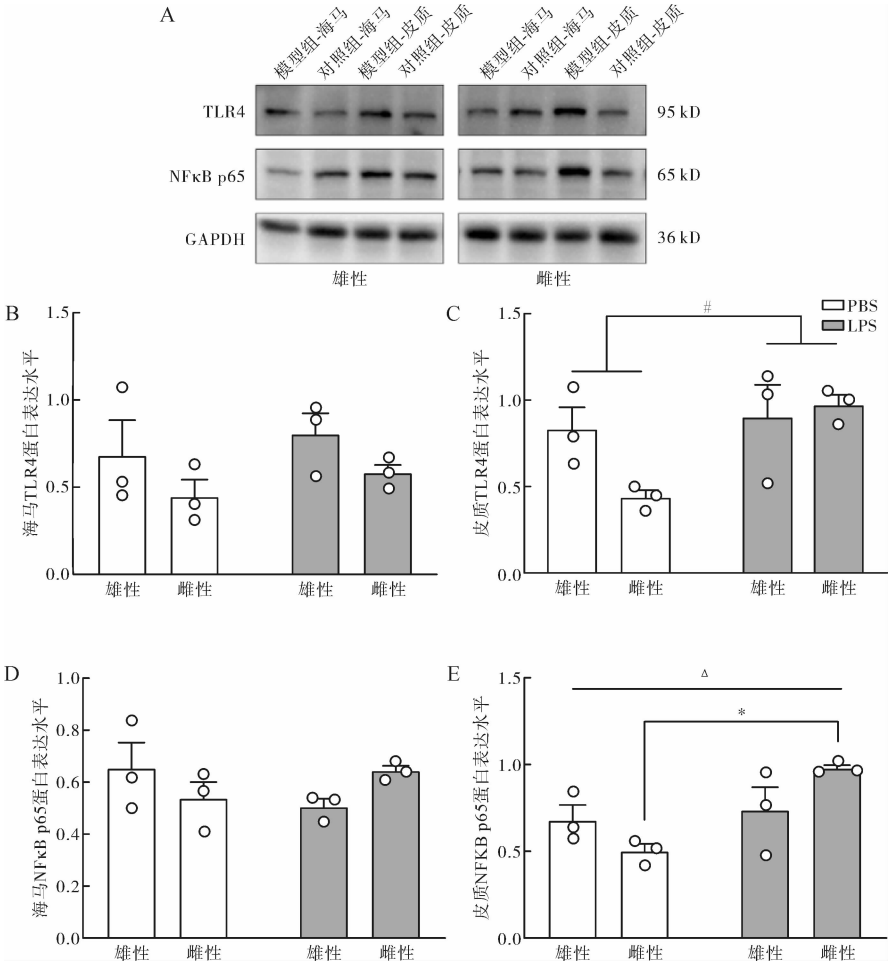
图 4　EPIA 对小鼠海马和皮质中 GFAP、IBA-1 蛋白表达的影响

Fig. 4　Effects of EPIA on the expression of GFAP and IBA-1 protein in the hippocampus and cortex of mice

均升高），抗炎反应的性别差异提高了降低女性 ASD 患病率的可能性[1]。这种围生期免疫激活对性别间个体差异性基因调控的分子机制目前尚不清楚。总的来说，EPIA 对小鼠 ASD 样行为产生性别特异性影响，这可能是性别偏倚性 ASD 的危险因素。

3.2　EPIA 对小鼠大脑胶质细胞的影响　现有研究表明，除经典的神经炎性疾病外（如多发性硬化症和自身免疫性脑炎），中枢神经系统免疫失调可引起包括 ASD 在内的多种精神疾病，胶质细胞激活是调节中枢神经系统炎症的常见途径之一[3,12]。作为中枢神经系统的主要胶质细胞，星状胶质细胞和小胶质细胞密切参与调节突触形成、功能、可塑性、修剪等过程，其功能状态与 ASD 认知和行为障碍密切相关[4-5]。已有临床研究显示 ASD 患者脑组织存在胶质细胞功能紊乱和损伤[16-18]。本研究中，GFAP 在模型组皮质和海马高表达，IBA-1 在模型组皮质中高表达。表明 EPIA 增强小鼠星状胶质细胞和小胶质细胞反应性，且对不同脑区小胶质细胞的影响不同。与 ASD 动物模型研究[1,17,19]中发现的 GFAP、IBA-1 mRNA 和蛋白高表达结果类似，提示 EPIA 可能通过激活星状胶质细胞和小胶质细胞诱导 ASD 样行为。

值得注意的是，TLR4/NFκB 信号通路在调控小胶质细胞免疫反应，直接或间接调控星状胶质细胞功能中具有关键作用[3,20]。有动物研究表明，生命早期免疫激活的 ASD 小鼠 TLR4/NFκB 信号通路多种蛋白表达水平升高，诱导小胶质细胞异常激活，进而参与突触过度修剪以降低突触可塑性[21]。同时有临床研究显示，LPS 可激活 ASD 儿童 T 细胞上的 TLR4，通过活化 NFκB 途径增强促炎介质活性氧的生成，为 TLR4/NFκB 信号通路调节 ASD 患者神经炎症提供了证据[20]。本研究中，相比于对照组，模型组小胶质细胞和星状胶质细胞反应性总体增强，皮质区 TLR4、NFκB p65 蛋白表达水平不同程度升高。同样支持上述 TLR4/NFκB 信号通路调节 ASD 患者神经炎症的观点。提示 EPIA 诱导产生 ASD 样行为可能与皮质区 TLR4/NFκB 信号通路相关。



注：A 为 Western blot 法检测各组小鼠海马及皮质 TLR4、NFκB p65 蛋白表达电泳图，B、C 分别为海马、皮质 TLR4 蛋白表达水平的比较，D、E 分别为海马、皮质 NFκB p65 蛋白表达水平的比较。# 为主效应 $P<0.05$，△ 为交互作用 $P<0.05$，* 为简单效应 $P<0.01$。

图 5 EPIA 对小鼠海马和皮质中 TLR4、NFκB p65 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of EPIA on the expression of TLR4 and NFκB p65 protein in the hippocampus and cortex of mice

表 2 各组小鼠 GFAP、IBA-1、TLR4、NFκB p65 蛋白表达水平的双因素方差分析

Tab. 2 Two-way ANOVA of protein expression of GFAP、IBA-1、TLR4、NFκB p65 in mice

蛋白	处理		性别		交互作用	
	F 值	*P* 值	*F* 值	*P* 值	*F* 值	*P* 值
皮质						
GFAP	30.116	<0.01	10.842	<0.05	0.930	0.363
IBA-1	21.844	<0.01	7.506	<0.05	0.586	0.466
TLR4	6.215	<0.05	1.768	0.220	3.760	0.088
NFκB p65	9.934	<0.05	0.126	0.732	6.558	<0.05
海马						
GFAP	50.443	<0.001	1.923	0.203	1.029	0.340
IBA-1	0.522	0.491	0.481	0.508	2.257	0.171
TLR4	0.944	0.360	3.243	0.109	0.004	0.950
NFκB p65	0.104	0.756	0.026	0.876	4.155	0.076

综上所述，EPIA 足以在小鼠中产生性别特异性 ASD 样行为并增强星状胶质细胞和小胶质细胞反应性。EPIA 诱导 ASD 样行为可能与皮质区 TLR4/NFκB 信号通路相关，但具体机制还需要进一步研究。另外，本实验仅进行了 EPIA 后一个时间节点的行为及生物指标检测，尚未能体现出相关指标持续性改变，这将成为下一步的研究重点。

参考文献

[1] Carlezon WA, Kim W, Missig G, et al. Maternal and early postnatal immune activation produce sex-specific effects on autism-like behaviors and neuroimmune function in mice[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 16928.

[2] Smith CJ, Kingsbury MA, Dziabis JE, et al. Neonatal immune challenge induces female-specific changes in social behavior and somatostatin cell number[J]. Brain Behav Immun, 2020, 90: 332-345.

[3] Linnerbauer M, Wheeler MA, Quintana FJ. Astrocyte crosstalk in CNS inflammation[J]. Neuron, 2020, 108(4): 608-622.

[4] Petrelli F, Pucci L, Bezzi P. Astrocytes and microglia and their potential link with autism spectrum disorders[J]. Front Neurosci, 2016, 10: 21.

[5] Pape K, Tamouza R, Leboyer M, et al. Immunoneuropsychiatry—novel perspectives on brain disorders[J]. Nat Rev

Neurol, 2019, 15(6): 317-328.
[6] Rein B, Ma K, Yan Z. A standardized social preference protocol for measuring social deficits in mouse models of autism [J]. Nat Protoc, 2020, 15(10): 3464-3477.
[7] Santana-Santana M, Bayascas JR, Giménez-Llort L. Sex-dependent signatures, time frames and longitudinal fine-tuning of the marble burying test in normal and AD-pathological aging mice[J]. Biomedicines, 2021, 9(8): 994.
[8] Ellul P, Rosenzwajg M, Peyre H, et al. Regulatory T lymphocytes/Th17 lymphocytes imbalance in autism spectrum disorders: Evidence from a meta-analysis[J]. Mol Autism, 2021, 12: 1-7.
[9] De Giacomo A, Gargano CD, Simone M, et al. B and T immunoregulation: A new insight of B regulatory lymphocytes in autism spectrum disorder[J]. Front Neurosci, 2021, 15: 732611.
[10] Nadeem A, Ahmad SF, Al-Harbi NO, et al. Imbalance in pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines milieu in B cells of children with autism[J]. Mol Immunol, 2022, 141: 297-304.
[11] Kordulewska NK, Kostyra E, Piskorz-Ogórek K, et al. Serum cytokine levels in children with spectrum autism disorder: Differences in pro-and anti-inflammatory balance [J]. J Neuroimmunol, 2019, 337: 577066.
[12] Sabourin KR, Reynolds A, Schendel D, et al. Infections in children with autism spectrum disorder: Study to Explore Early Development (SEED)[J]. Autism Res, 2019, 12(1): 136-146.
[13] Hankittichai P, Buacheen P, Pitchakarn P, et al. Artocarpus lakoocha extract inhibits LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophage cells[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(4): 1355.
[14] Ardalan M, Chumak T, Quist A, et al. Reelin cells and sex-dependent synaptopathology in autism following postnatal immune activation[J]. Br J Pharmacol, 2022, 179(17): 4400-4422.
[15] McCarthy MM. Sex differences in neuroimmunity as an inherent risk factor[J]. Neuropsychopharmacology, 2019, 44(1): 38-44.
[16] DiStasio MM, Nagakura I, Nadler MJ, et al. T lymphocytes and cytotoxic astrocyte blebs correlate across autism brains[J]. Ann Neurol, 2019, 86(6): 885-898.
[17] Crawford JD, Chandley MJ, Szebeni K, et al. Elevated GFAP protein in anterior cingulate cortical white matter in males with autism spectrum disorder[J]. Autism Res, 2015, 8(6): 649-657.
[18] Liao X, Yang J, Wang H, et al. Microglia mediated neuroinflammation in autism spectrum disorder[J]. J Psychiatr Res, 2020, 130: 167-176.
[19] Barón-Mendoza I, García O, Calvo-Ochoa E, et al. Alterations in neuronal cytoskeletal and astrocytic proteins content in the brain of the autistic-like mouse strain C58/J[J]. Neurosci Lett, 2018, 682: 32-38.
[20] Nadeem A, Ahmad SF, Bakheet SA, et al. Toll-like receptor 4 signaling is associated with upregulated NADPH oxidase expression in peripheral T cells of children with autism [J]. Brain Behav Immun, 2017, 61: 146-154.
[21] Xiao L, Yan J, Feng D, et al. Critical role of TLR4 on the microglia activation induced by maternal LPS exposure leading to ASD-like behavior of offspring[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 634837.

收稿日期:2023-11-03　**修回日期**:2024-02-26　**本文编辑**:李少闻

(上接第 404 页)

[7] 李辉,季成叶,宗心南,等.中国 0～18 岁儿童、青少年体块指数的生长曲线[J].中华儿科杂志,2009,47(7):493-498.
Li H, Ji CY, Zong XN, et al. Body mass index growth curves for Chinese children and adolescents aged 0 to 18 years[J]. Chin J Pedintr, 2009, 47(7): 493-498. (in Chinese)
[8] 马冠生,米杰,马军,等.中国儿童肥胖报告[R].北京:人民卫生出版社,2017:5-15.
Ma GS, Mi J, Ma J, et al. Chinese child obesity report[R]. Beijing: People's Health Publishing House, 2017: 5-15. (in Chinese)
[9] 原晨晨,薛琨,郭红卫.全球儿童超重肥胖的流行现状和影响因素[J].卫生研究,2020,49(3):506-510.
Yuan CC, Xue K, Guo HW. Analysis of prevalence and risk factors of overweight and obesity among global children[J]. Journal of Hyciene Research, 2020, 49(3): 506-510. (in Chinese)
[10] Butler EM, Suhag A, Hong Y. Parental perceptions of obesity in school children and subsequent action[J]. Childhood Obesity, 2019, 15: 459-467.
[11] Shen YH, Liu Z, Li WH, et al. The smartphone-assisted intervention improved perception of nutritional status among middle school students[J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(16): 5932.
[12] Parkinson KN, Jones AR, Tovee MJ, et al. A cluster randomised trial testing an intervention to improve parents' recognition of their child's weight status: Study protocol [J]. BMC Public Health, 2015, 15(1): 549-556.
[13] Flores-Pena Y, He MZ, Sosa ET, et al. Study protocol: Intervention in maternal perception of preschoolers' weight among Mexican and Mexican-American mothers[J]. BMC Public Health, 2018, 18: 669.
[14] 王付曼,金曦,冯宁,等.家长对学龄前儿童体型认知的现状和需求分析[J].中国妇幼保健,2016,31(23):5019-5023.
Wang FM, Jin X, Feng N, et al. Cognition status and requirement analysis of parents about physique of preschool children[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2016, 31(23): 5019-5023. (in Chinese)

收稿日期:2023-08-24　**修回日期**:2024-01-08　**本文编辑**:李少闻