



中国比较医学杂志
Chinese Journal of Comparative Medicine
ISSN 1671-7856, CN 11-4822/R

《中国比较医学杂志》网络首发论文

题目：丙戊酸不同的注射方式诱导小鼠自闭症模型的比较
作者：牛晓洁，李攀，段爱旭
收稿日期：2025-08-19
网络首发日期：2026-05-26
引用格式：牛晓洁，李攀，段爱旭. 丙戊酸不同的注射方式诱导小鼠自闭症模型的比较[J/OL]. 中国比较医学杂志.
<https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20260526.1423.004>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

丙戊酸不同的注射方式诱导小鼠自闭症模型的比较

牛晓洁^{1,2}, 李攀⁴, 段爱旭³✉

(1.山西大同大学医学院人体解剖学教研室, 山西 大同 037009; 2.山西大同大学医学院呼吸病研究所, 山西 大同 037009; 3.山西大同大学护理学院, 山西 大同 037009; 4.山西中医药大学, 太原 030024)

*通信作者 段爱旭 (1970—), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 康复疗法对孤独症儿童疗效的影响。E-mail: 1209512742@qq.com

摘要 目的 比较丙戊酸(VPA)不同的暴露方式诱导的不同性别的自闭症谱系障碍(ASD)在社交、情绪和认知行为上的差异,为VPA暴露诱导ASD模型中实验动物性别和诱导方式的选择提供依据。方法 孕12.5 d的实验小鼠腹腔注射600 mg/kg VPA,其对照组腹腔注射等体积的生理盐水;新生14 d的小鼠皮下注射400 mg/kg VPA,其对照组皮下注射等体积的生理盐水;新生14 d的小鼠腹腔注射400 mg/kg VPA,其对照组腹腔注射等体积的生理盐水。观测给药后实验小鼠的死亡率、流产率;通过三箱社交行为实验、自我捋毛实验、旷场实验、Y迷宫自发交替实验、水迷宫实验,观察VPA不同的暴露方式对不同性别小鼠社交、情绪和认知行为的影响。结果 孕12.5 d注射VPA后,孕鼠的死亡率为50%,流产率为25%,而出出生后不管是皮下还是腹腔注射VPA均无死亡。三箱社交实验、自我捋毛实验和旷场实验结果显示,和对照组相比,无论使用哪种注射方式,雌雄性的VPA小鼠均表现为社交障碍,社交新颖性障碍,重复刻板样行为及焦虑样行为。Y迷宫自发交替实验和水迷宫实验结果显示,雌鼠妊娠期注射VPA及子代皮下注射VPA的雄性小鼠均表现出认知障碍,而子代腹腔注射VPA的雄性小鼠有认知障碍的趋势,但无统计学差异;而不同方式的VPA暴露后,雌性小鼠均无认知障碍。结论 VPA暴露的孕鼠死亡率和流产率较高,而子代皮下或腹腔注射VPA无死亡。雌鼠妊娠期和子代皮下VPA暴露的雄性小鼠均诱发ADS样行为,表现为社交互动减少、重复性刻板行为和焦虑增加、认知功能障碍。而雌性小鼠不稳定。子代腹腔注射VPA小鼠表现为轻微社交及社交新颖性障碍、轻度焦虑样行为,无显著学习能力障碍。

关键词 丙戊酸;自闭症谱系障碍;母鼠妊娠期注射;子代皮下注射;子代腹腔注射

中图分类号 R749.93; R-332; R965

文献标志码 A

Comparison of various valproic acid injection strategies in inducing a mouse autism model

NIU Xiaojie^{1,2}, LI Pan⁴, DUAN Aixu³✉

(1. Department of Human Anatomy, School of Medicine, Shanxi Datong University, Datong 037009, China; 2. Institute of Respiratory Diseases, School of Medicine, Shanxi Datong University, Datong 037009; 3. School of Nursing, Shanxi Datong University, Datong 037009; 4. Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030024)

Abstract Objective To analyze the disparities in social, emotional, and cognitive behaviors between male and female mice with autism spectrum disorder (ASD) induced by various valproic acid (VPA) exposure methods, and to establish a foundation for selecting experimental animal sex and induction method in the VPA-induced ASD model. Methods At 12.5 days of gestation, mice received 600 mg/kg VPA injected intraperitoneally, while the control group received an equivalent volume of normal saline. At 14 days post-birth, mice were administered 400 mg/kg VPA injected subcutaneously, with the control group receiving the same volume of normal saline. Mortality and abortion rates were monitored post-administration, and the impact of various VPA exposure methods on the social, emotional, and cognitive behaviors of male and female mice was examined through a series of three-box social behavior experiments, self-grooming assessments, open field tests, Y-maze trials, and

收稿日期: 2025-08-19

基金项目: 山西省基础研究计划(自由探索类)基金(20210302123340)。

作者简介: 牛晓洁(1988—), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中枢神经的损伤与修复。E-mail: nxj_smile@163.com

网络首发时间: 2026-05-26 15:06:04 网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20260526.1423.004>

water maze evaluations. Results The mortality rate among pregnant rats at 12.5 days of gestation following VPA injection was 50%, and the abortion rate was 25%. No fatalities occurred following postnatal subcutaneous or intraperitoneal VPA administration. The three-box social experiment, self-grooming experiment, and open field experiment indicated that both sexes of VPA mice displayed social impairments, novelty-induced social deficits, repetitive stereotyped behaviors, and anxiety-like behaviors in comparison to the control group, irrespective of the injection method. Y-maze spontaneous alternation and water maze experiments indicated that male mice administered VPA prenatally and subcutaneously postnatally exhibited cognitive deficits, whereas those injected with VPA intraperitoneally postnatally demonstrated a propensity for cognitive impairment without statistical significance; female mice exposed to VPA through various methods did not exhibit cognitive impairments. Conclusions The mortality and abortion rates of pregnant mice exposed to VPA before birth were higher, as no deaths occurred after subcutaneous or intraperitoneal injection after birth. Male mice subjected to postnatal subcutaneous and prenatal VPA administration had autism-like characteristics, including diminished social interaction, repeated stereotyped actions, heightened anxiety, and cognitive impairment; results in female mice were unstable. Postnatal intraperitoneal administration of VPA led to moderate social and social novelty deficits with slight anxiety-like behaviors, with no significant cognitive impairment.

Key words valproic acid; autism spectrum disorder; prenatal injection; postnatal subcutaneous injection; postnatal intraperitoneal injection

自闭症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 是一种神经系统发育性障碍, 多见于儿童, 且男性患病率高于女性^[1-4]。ASD 典型的临床表现包括社交互动障碍、重复刻板行为、狭隘的兴趣及行为活动受限, 其中社交互动障碍是其核心损伤^[5-7]。研究还发现 ASD 患者常伴随其他一些症状, 如癫痫、焦虑抑郁和认知障碍^[8,9]。据统计, 中国 ASD 患者已超过 1 000 万, 其中儿童超过 300 万。若以 1% 的出生率保守估计, 每年新增的 ASD 患儿数量接近 20 万^[10]。这些儿童和青少年需要针对其日常行为与教育需求进行个性化干预, 给家庭和社会均带来了沉重的经济与心理负担。ASD 病因复杂, 发病机制尚未明确, 也缺乏有效的药物干预手段。目前尚无动物模型能够完全模拟人类 ASD 的复杂性, 科研工作者需要借助多种模型探索其病因及治疗干预策略。丙戊酸 (valproic acid, VPA) 是一种广泛应用于抗癫痫、偏头痛以及双相情感障碍情绪稳定的药物^[11]。临床研究表明, 怀孕期间摄入 VPA, 除了增加神经管缺陷、发育迟缓和认知障碍的发生率外, 还与后代 ASD 发生率的升高密切相关^[12]。RODIER 等^[13]首次引入了母鼠妊娠期 VPA 模型, 通过在孕第 12.5 天的大鼠单次注射高剂量 VPA, 成功诱导出 ASD 样行为表型, 包括社交能力下降、沟通缺陷、重复刻板行为增加、脉冲前抑制受损、痛觉敏感性降低、焦虑加剧及多动等行为^[14,15]。值得注意的是, 孕第 12.5 天大致对应胎儿神经管闭合的关键时期^[16]。此外, 研究也发现, 在啮齿类动物出生后早期阶段 (0~14 d, 大致相当于人类大脑发育的第三个月) 给予 VPA, 同样可干扰大脑发育并诱发 ASD 样行为, 如社交缺陷和感觉处理异常^[17-19]。然而, 无论在母鼠妊娠期还是子代 VPA 模型中, 其暴露的最佳时机与给药方式仍存在争议。因此, 本研究旨在比较不同时机、不同方式的 VPA 暴露对雌雄小鼠社交、情绪及认知行为的影响, 以进一步揭示其在 ASD 造模中的行为表型差异。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠共 20 只, 均为 2 月龄, 体质量 21~23 g, 雌雄各半, 由江苏集萃药康生物科技股份有限公司提供 [SCXK (苏) 2023-0009]。小鼠饲养于山西医科大学实验动物中心 [SYXK (晋) 2024-0007], 进行雌雄合笼繁殖。所有小鼠均可自由摄取标准饲料及清洁饮用水, 饲养环境为 12 h/12 h (光/暗), 室温 22~25 °C, 相对湿度 (55±10) %。本实验严格遵循实验动物伦理 3R 原则, 所有涉及动物的实验方案均获得了山西大同大学实验动物伦理委员会的批准 (2021044)。

1.2 主要试剂与仪器

VPA (货号 T7064) 购自美国 TargetMol 公司, 小鼠三箱社交行为箱购自广东佛山尚信生物实验设备厂; 旷场、Y 迷宫、水迷宫均购自上海欣软信息科技有限公司; 使用 SMART 3.0 (西班牙 Panlab 公司) 视频跟踪程序对实验小鼠行为学进行记录分析。

1.3 实验方法

1.3.1 雌鼠妊娠期注射 VPA 诱导 ASD 模型

将成年雌雄小鼠 17:00 合笼,次日 9:00 检查阴栓,发现阴栓者记为孕 0.5 d,随即单独饲养。于孕 12.5 d 时,对孕鼠单次腹腔注射 VPA (600 mg/kg),对照组则注射等体积生理盐水。待其自然分娩后,子代小鼠断奶并按性别分笼饲养。至 1 月龄时,对子代小鼠进行行为学测试。VPA 组雄鼠 12 只,雌鼠 10 只;对照组雄、雌鼠各 11 只。

1.3.2 子代注射 VPA 诱导 ASD 模型

将成年雌雄小鼠 17:00 合笼,次日 9:00 检查阴栓。检见阴栓者记为孕 0.5 d,随即单独饲养,自然妊娠。子代小鼠于出生后第 14 天接受处理,分别通过两种途径单次注射 VPA (400 mg/kg):一组造模方式为颈部皮下注射,另一组为腹腔注射;对照组则注射等体积生理盐水。所有子代断奶后按性别分笼饲养,并于 1 月龄时进行行为学测试。子代皮下注射 VPA 组雄鼠 12 只,雌鼠 13 只;子代腹腔注射 VPA 组雄鼠 12 只,雌鼠 11 只;对照组雄鼠 13 只,雌鼠 11 只。

1.3.3 给药后流产及死亡情况

孕鼠经腹腔注射给药后,轻柔放回饲养笼,并密切观察 15 min 内的急性行为反应。随后持续监测 24 h 内的生存状况,记录有无死亡现象及流产情况的发生。对于出生后第 14 天接受 VPA 皮下或腹腔注射的子代小鼠,在注射后同样进行了持续的行为反应与生存状态监测。

1.3.4 三箱社交实验

三箱社交实验装置由一个透明的三联箱体构成,包括左、中、右三个尺寸均为 20 cm×40 cm×22 cm 的隔室,相邻隔室间设有一个可供开启或关闭的小门,以控制小鼠的自由穿梭。在左右两个隔室内,各放置一个笼子(5 cm×5 cm×7 cm)。实验分为三个阶段:(1)习惯化阶段:将实验小鼠单独置于中央隔室,随后打开所有小门,允许其在 5 min 内自由探索整个装置,以适应新环境。(2)社交能力测试:习惯化结束后,随机在左侧或右侧隔室的金属笼内放入一只陌生小鼠 1(与实验鼠同品系、性别及年龄),另一侧笼子则为空笼。保持小门开启,允许实验小鼠自由探索 10 min,记录其在三个隔室的停留时间以及对各笼子的嗅探时间,并计算社交偏好指数,偏好指数=(陌生小鼠 1 处停留时间-空笼子处停留时间)/总探索时间。(3)社交新颖性测试:随后,将实验鼠短暂移回中央室并关闭小门。将原先的空笼中放入另一只新的陌生小鼠 2,再次开启小门,允许实验小鼠自由探索 10 min。记录其在三个隔室的停留时间以及对新旧陌生鼠的嗅探时间,并计算社交新颖偏好指数,社交新颖偏好指数=(陌生小鼠 2 处停留时间-陌生小鼠 1 处停留时间)/总探索时间。

1.3.5 自我捋毛实验

将实验小鼠置于清洁的 50 cm×50 cm×40 cm 箱子中,摄像头置于其正上方,实验小鼠自由活动适应 10 min。适应阶段结束后,记录接下来的 10 min 内小鼠进行自我捋毛动作的时间。

1.3.6 旷场实验

旷场实验装置为一个 50 cm×50 cm×40 cm 的方形箱。实验时,将小鼠轻柔置于箱体中央,允许其在箱内自由探索 10 min。通过置于箱体正上方的摄像头记录小鼠在此期间移动的总距离以及在中央区域的活动时间。

1.3.7 Y 迷宫自发交替实验

Y 迷宫为角度互为 120°的三个臂(30 cm×8 cm×15 cm)拼接而成。从 Y 迷宫中心放入实验小鼠,允许其自由探索 5 min,记录小鼠的入臂顺序及入臂总次数,计算自发交替率,自发交替率=连续进入三个不同臂的次数/(进臂总次数-2)。

1.3.8 水迷宫实验

水迷宫实验基于啮齿类动物天性亲水但渴望逃离水环境的特性,通过其在水中寻找隐藏平台的行为来评估空间学习与记忆能力。实验主要分为两个阶段^[20]:(1)定位航行训练:该阶段用于评估小鼠的空间学习能力。迷宫池壁四周设置有不同空间线索。训练时,由一名实验员将小鼠面向池壁托

起，使其短暂观察（3 s~5 s）某一象限的视觉标记后，轻柔放入水中。每天训练 4 次，每次从不同入水点开始，连续训练 4 d。另一名实验员使用视频追踪系统记录小鼠的逃避潜伏期，即从入水至成功登上平台并在其上停留不少于 10 s 所需的时间。若小鼠在 60 s 内未找到平台，则由实验人员引导其至平台并使其停留 10 s，该次潜伏期记录为 60 s。（2）空间探索实验：在定位航行训练结束后，第 5 天进行，用于评估小鼠的空间记忆保持能力。撤除水中平台后，将小鼠从原平台所在象限的对侧象限放入水中，记录其在 60 s 内穿越原平台位置的次数，作为衡量空间记忆的关键指标。

1.4 统计学方法

实验数据均采用《中国比较医学杂志》参考文献常用格式进行分析，结果以平均数±标准误差（ $\bar{x} \pm \bar{s}$ ）表示，GraphPad Prism 10.0 制图分析，采用双因素方差分析（Two-way ANOVA），Tukey 进行事后分析，两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 VPA 不同的注射方式的小鼠存活的情况

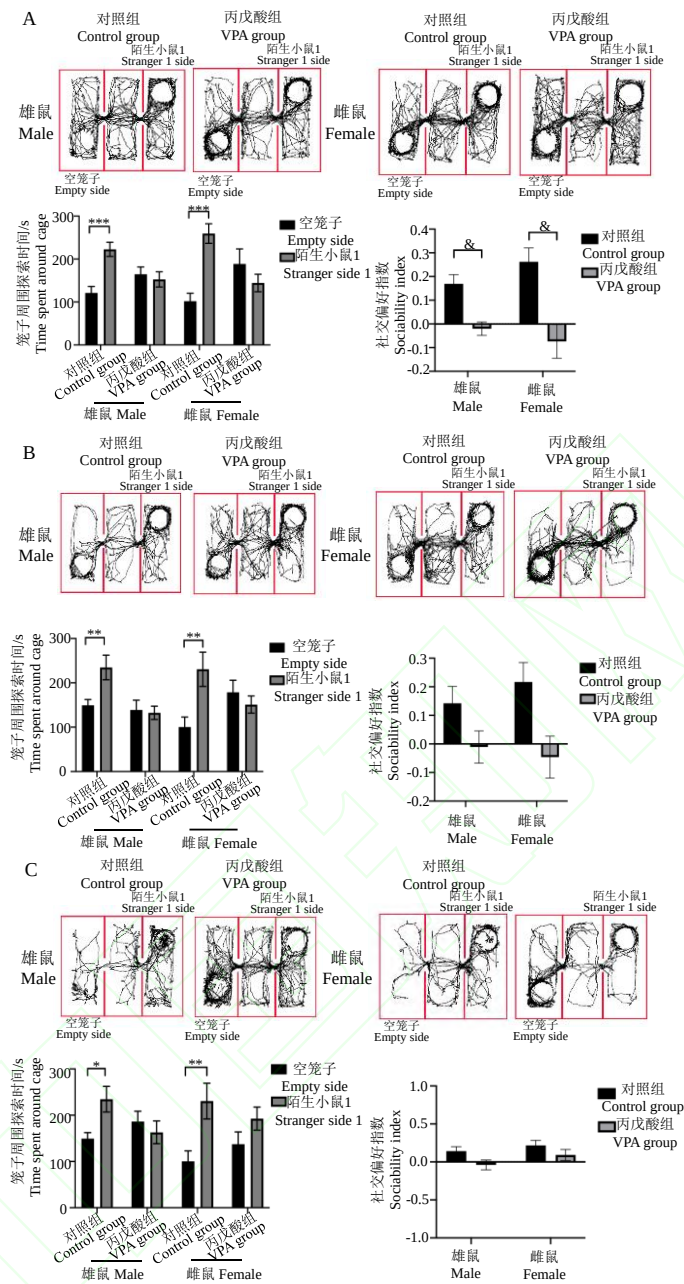
孕鼠在孕 12.5 d 腹腔注射 VPA 后 5 min 内出现了四肢僵硬、活动困难及闭目瘫卧的症状。给药后 24 h 内，孕鼠的死亡率为 50%，持续观察流产率为 25%，存活率为 25%（表 1）。相比之下，出生后第 14 天的子代小鼠在注射 VPA 后，无论是皮下注射还是腹腔注射，24 h 内均未发生死亡，存活率均为 100%（表 1）。

表1 VPA不同注射方式的小鼠存活情况统计（只数/%）
Table 1 Survival statistics of mice based on various vpa injection methods (number/percentage)

时机 Time	给药方式 Administration	组别 Groups	存活 Survival	死亡 Mortality	流产 Abortion	共 Total
产前 Prenatal	腹腔注射 Intraperitoneal injection	对照组 Control group	3（100%）	0	0	3（100%）
		VPA 组 VPA group	3（25%）	6（50%）	3（25%）	12（100%）
产后 Postnatal	皮下注射/腹腔注射 Subcutaneous injection/Intraperitoneal injection	对照组 Control group	24（100%）	0	0	24（100%）
		VPA 组 VPA group	25（100%）	0	0	25（100%）
	皮下注射 Subcutaneous injection	VPA 组 VPA group	23（100%）	0	0	23（100%）
		腹腔注射 Intraperitoneal injection				

2.2 VPA 不同的注射方式对小鼠社交能力的影响

社交行为障碍是 ASD 患者的核心表现。三箱社交行为学是最常用的检测手段。因此，本研究选用三箱社交偏好实验评估 VPA 不同注射方式的雄性、雌性小鼠的社交行为的变化。社交能力测试阶段结果显示，当用空笼子和陌生小鼠 1 作为偏好刺激时，与探索空笼子的时间相比，对照组雄、雌小鼠更偏好探索陌生小鼠 1（图 1A~C，*P*<0.001，*P*<0.01，*P*<0.05），表明其社交能力正常；相比之下，妊娠期 VPA 暴露组和子代皮下注射 VPA 组的雄、雌鼠，以及子代腹腔注射 VPA 组的雄鼠，在探索陌生小鼠 1 与空笼的时间上均无统计学差异（图 1A~C），显示其社交能力存在明显缺陷。然而，在子代腹腔注射 VPA 的雌鼠中，则表现出倾向于探索陌生小鼠 1 的趋势（图 1C）。



注：A~C：妊娠期注射 VPA、子代皮下注射 VPA 和子代腹腔注射 VPA 的雌雄小鼠社交能力测试轨迹图、活动时间及社交偏好指数；与陌生鼠 1 组相比，*** $P<0.001$ ，** $P<0.01$ ，* $P<0.05$ ；与对照组相比，& $P<0.05$ 。

图 1 不同注射方式的雌雄 VPA 小鼠的三箱社交实验 ($n=10\sim13$)

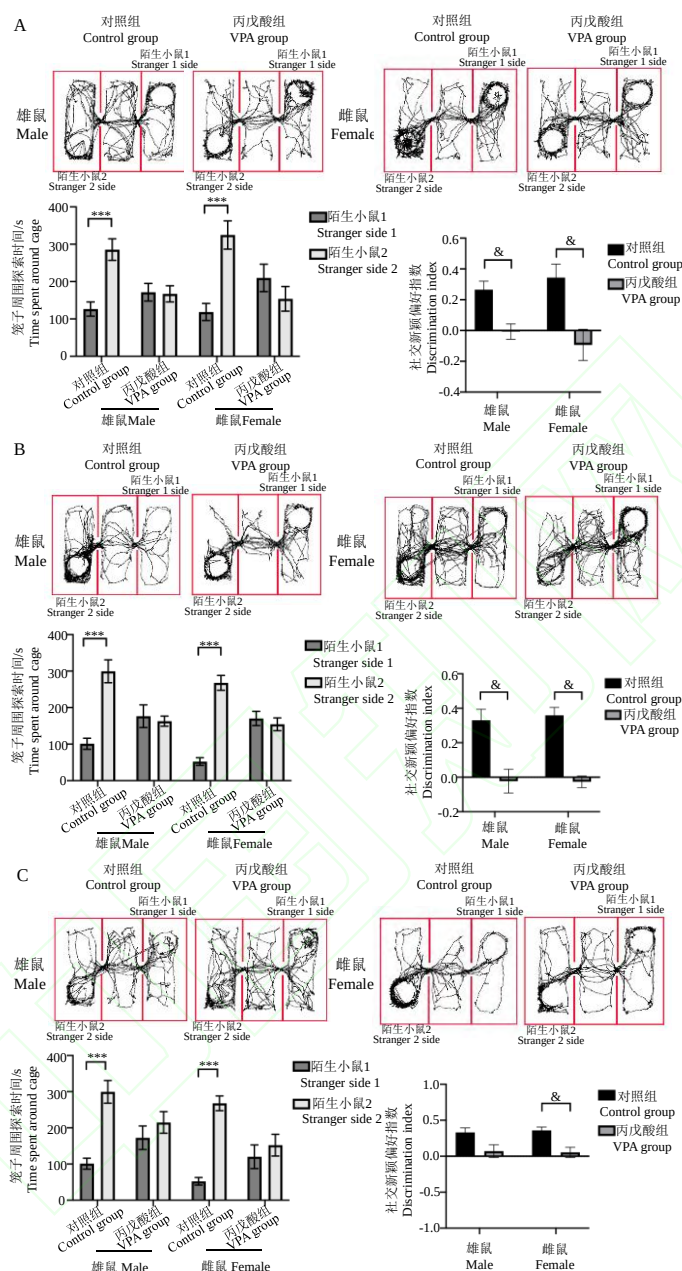
Note: A~C, Trajectory graphs, activity durations and sociability index of male and female mice in the social ability test following prenatal VPA injection, postnatal subcutaneous VPA injection and postnatal intraperitoneal VPA injection, respectively. Compared with the unfamiliar mice 1 group, *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$. Compared with control group, & $P<0.05$.

Figure 1 Three-chamber social assessment of male and female VPA mice with various injection techniques ($n=10\sim13$)

在社交新颖性测试中，当引入新的陌生小鼠 2 后，对照组雄、雌鼠对陌生小鼠 2 的探索时间均显著长于对陌生小鼠 1 的探索时间（图 2A~C， $P<0.001$ ），说明其社交新颖性正常。而妊娠期 VPA 暴露组和子代皮下注射 VPA 组的雄、雌鼠，对两只陌生鼠的探索时间均无显著差异（图 2A，2B）。子代腹腔注射 VPA 组的雄、雌鼠则显示出更愿探索陌生小鼠 2 的趋势，但差异无统计学意义（图 2C）。

这些结果表明，妊娠期 VPA 暴露与子代皮下注射 VPA 可引起明显的社交能力与社交新颖性障

碍；而子代腹腔注射 VPA 对社交行为的影响相对较轻，尤其在雌性小鼠中保留了一定的正常社交偏好。



注：A~C：妊娠期注射 VPA、子代皮下注射 VP 和子代腹腔注射 VPA 的雌雄小鼠社交新颖性测试的轨迹图、活动时间及社交新颖偏好指数；与陌生鼠 2 组相比，*** $P<0.001$ ；与对照组相比，& $P<0.05$ 。

图 2 不同注射方式的雌雄 VPA 小鼠的三箱社交新颖性实验 ($n=10\sim13$)

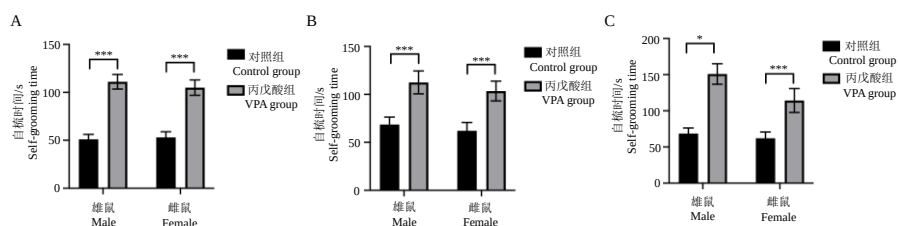
Note: A~C, Trajectory graphs, activity durations and discrimination index of male and female mice in the social novelty test following prenatal VPA injection, postnatal subcutaneous VPA injection and postnatal intraperitoneal VPA injection, respectively. Compared with the unfamiliar mice 2 group, *** $P<0.001$. Compared with control group, & $P<0.05$.

Figure 2 Three-chamber social novelty assessment of male and female VPA mice with various injection techniques ($n=10\sim13$)

2.3 VPA 不同的注射方式对小鼠刻板样行为的影响

重复刻板样行为是自闭症核心症状之一。因此，本研究采用自我捋毛实验评估 VPA 不同注射方式的雄性、雌性小鼠的重复刻板样行为的变化。结果显示，无论哪种注射方式，雄性、雌性 VPA 小

鼠的自我梳理时间均显著高于对照组小鼠（图 3, $P<0.001$, $P<0.05$ ），表明其重复刻板行为明显。



注：A~C：妊娠期注射 VPA，子代皮下注射 VPA 和子代腹腔注射 VPA 的雌雄小鼠自梳时间；与对照组相比，*** $P<0.001$ ，* $P<0.05$ 。

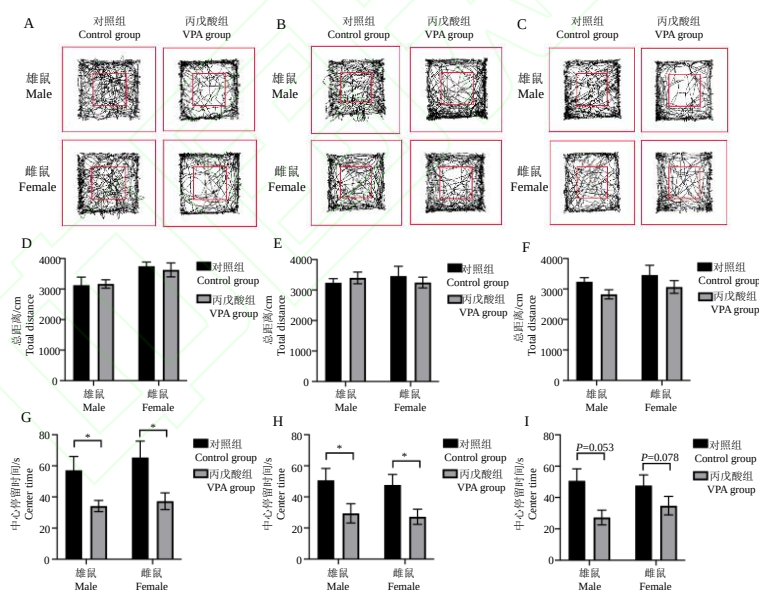
图 3 VPA 不同的注射方式对小鼠刻板样行为的影响 ($n=10\sim13$)

Note: A~C, Self-grooming duration of male and female mice following prenatal VPA injection, postnatal subcutaneous VPA injection and postnatal intraperitoneal VPA injection, respectively. Compared with the control group, *** $P<0.001$, * $P<0.05$.

Figure 3 The effects of different injection methods of VPA on the stereotypic behavior of mice ($n=10\sim13$)

2.4 VPA 不同的注射方式对小鼠焦虑样行为的影响

为评估 ASD 伴随的焦虑样行为，本研究进行了旷场实验。结果显示，所有组别小鼠在旷场中（图 4A~C）的总运动距离无显著性差异（图 4D~F），表明其运动能力未受影响。然而，与对照组相比，妊娠期 VPA 暴露及子代皮下注射 VPA 的雄性与雌性小鼠在中心区域的停留时间显著缩短（图 4G、4H, $P<0.05$ ），提示其焦虑水平显著升高。而子代腹腔注射 VPA 的小鼠虽表现出中心活动时间减少的趋势，但差异无统计学意义（图 4I）。提示，妊娠期及子代皮下注射 VPA 可诱发显著的焦虑样行为，而子代腹腔注射的影响相对较轻。



注：A~C：妊娠期注射 VPA、子代皮下注射 VPA 和子代腹腔注射 VPA 的雌雄小鼠运动轨迹图；D~F：妊娠期注射 VPA，子代皮下注射 VPA 和子代腹腔注射 VPA 的雌雄小鼠总移动距离；G~I：妊娠期注射 VPA，子代皮下注射 VPA 和子代腹腔注射 VPA 的雌雄小鼠在中心区域的活动时间。与对照组相比，* $P<0.05$ 。

图 4 VPA 不同的注射方式对小鼠焦虑样行为的影响 ($n=10\sim13$)

Note: A~C, Movement trajectory graphs for male and female mice following prenatal administration of VPA, postnatal subcutaneous administration of VPA and postnatal intraperitoneal administration of VPA, respectively. D~F, Total locomotion distances traveled by male and female mice following prenatal administration of VPA, postnatal subcutaneous administration of VPA and postnatal intraperitoneal administration of VPA, respectively. G~I, Duration of activity in the central zone for male and female mice following prenatal administration of VPA, postnatal subcutaneous administration of VPA and postnatal intraperitoneal administration of VPA, respectively. Compared with the control group, * $P<0.05$.

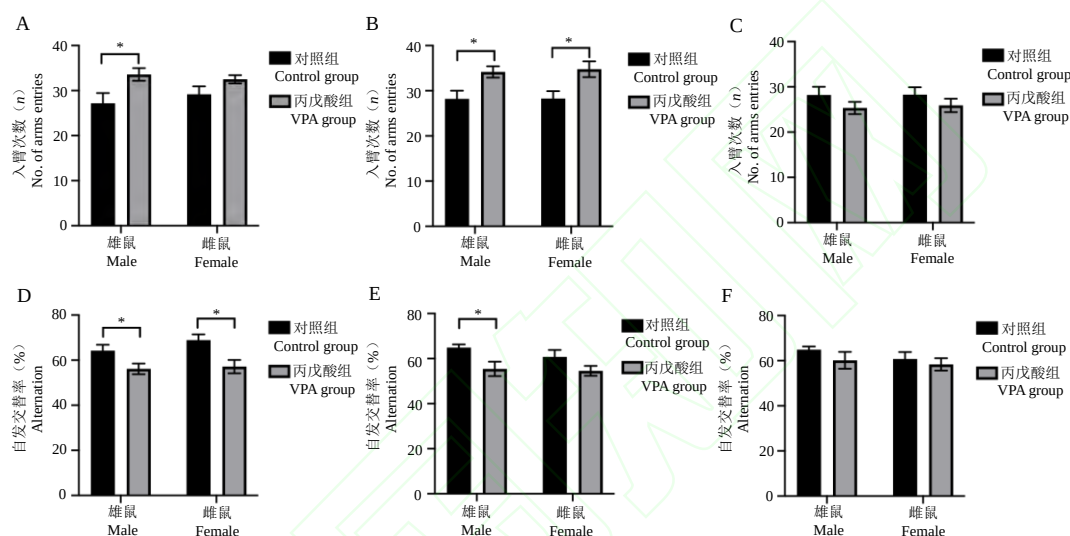
Figure 4 The impact of various VPA injection techniques on the anxiety-related behavior of mice ($n=10\sim13$)

2.5 VPA 不同的注射方式对小鼠认知样行为的影响

ASD 小鼠常常展现出偏执性行为,即对于认定的环境和事物很难再做出改变,也可以说是一种逆向学习能力受损。因此,本研究采用 Y 迷宫自发交替实验和水迷宫实验进行检测。

2.5.1 VPA 不同的注射方式对小鼠 Y 迷宫自发交替实验的影响

Y 迷宫自发交替实验结果显示,妊娠期 VPA 暴露和子代皮下注射 VPA 的雄性、雌性小鼠的总入臂次数较对照组显著升高(图 5A, 5B, $P<0.05$),而子代腹腔注射 VPA 的雄性、雌性小鼠的总入臂次数无差异(图 5C)。统计自发交替率结果发现,妊娠期 VPA 暴露和子代皮下注射 VPA 的雄性、雌性小鼠的入臂正确率较对照组明显降低(图 5D, 5E, $P<0.05$),而子代腹腔注射 VPA 的雄性、雌性小鼠的入臂正确率无显著差异(图 5F)。这些结果表明,妊娠期 VPA 暴露和子代皮下注射 VPA 的雄性、雌性小鼠学习能力障碍;而子代腹腔注射 VPA 对学习能力的影



注: A~C: 妊娠期注射 VPA、子代皮下注射 VPA 和子代腹腔注射 VPA 的雌雄小鼠入臂次数; D~F: 妊娠期注射 VPA, 子代皮下注射 VPA 和子代腹腔注射 VPA 的雌雄小鼠自发交替率; 与对照组相比, * $P<0.05$ 。

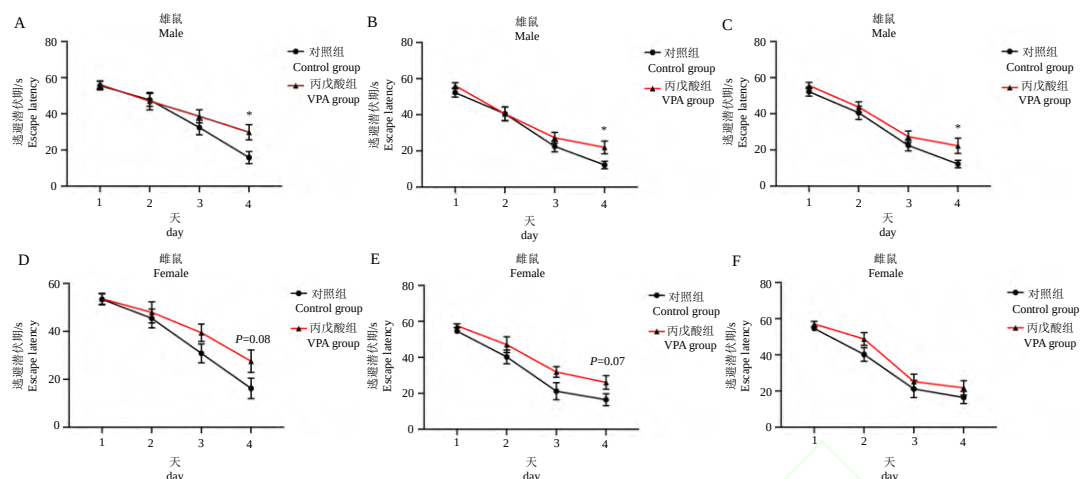
图 5 VPA 不同的注射方式的小鼠 Y 迷宫实验 ($n=10\sim13$)

Note: A~C, Frequency of arm entries for male and female mice following prenatal administration of VPA, postnatal subcutaneous administration of VPA and postnatal intraperitoneal administration of VPA, respectively. D~F, Spontaneous alternation rate of male and female mice following prenatal administration of VPA (B), postnatal subcutaneous administration of VPA (D) and postnatal intraperitoneal administration of VPA (F), respectively. Compared with the control group, * $P<0.05$.

Figure 5 Y-maze experiment of mice with different injection methods of VPA ($n=10\sim13$)

2.5.2 VPA 不同的注射方式对小鼠水迷宫实验的影响

水迷宫结果显示,定位航行第 4 天,妊娠期和子代 VPA 暴露的雄性小鼠登上隐藏的逃生平台的时间明显长于对照小鼠(图 6A~C, $P<0.05$),而雌性小鼠无显著差异(图 6D~F)。第 5 天去掉逃生平台进行空间探索检测小鼠的记忆能力。结果发现妊娠期 VPA 暴露和子代皮下注射 VPA 的雄性小鼠穿梭初始平台区域的次数均明显下降(图 7A、7B, $P<0.05$),表明其空间记忆受损;所有雌性组别及子代腹腔注射 VPA 的雄性小鼠在该指标上与对照组无显著性差异(图 7A~C)。以上结果表明,妊娠期 VPA 暴露及子代皮下注射 VPA 会导致雄性小鼠的空间学习与记忆能力受损。

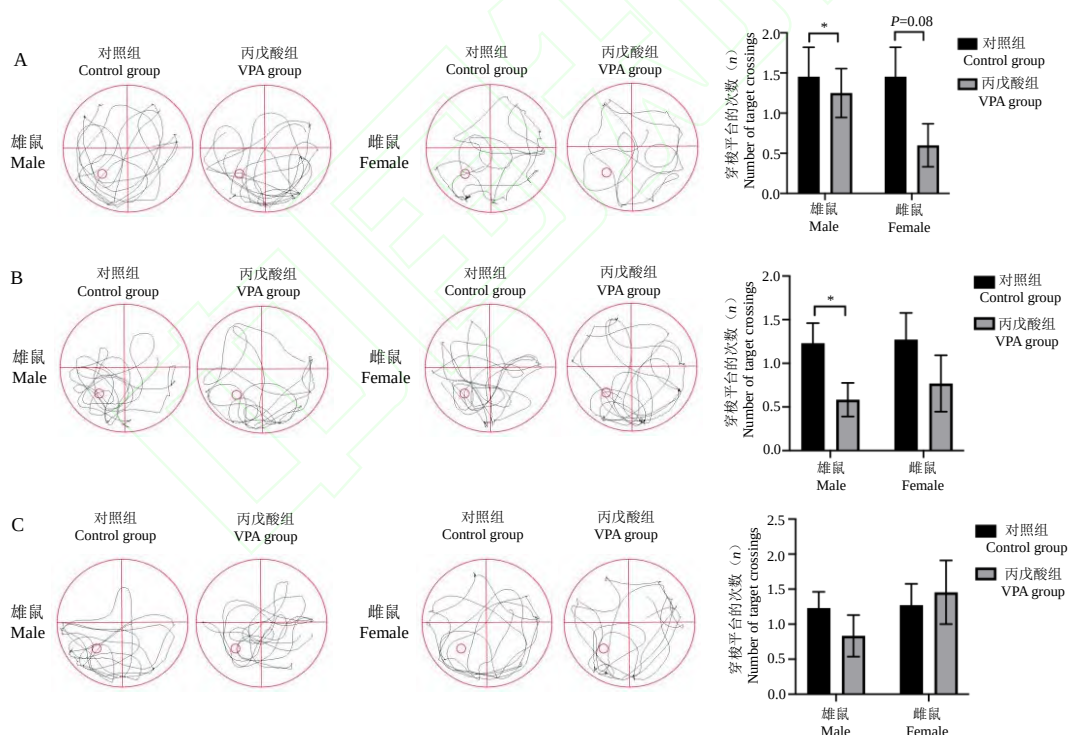


注：A~C：妊娠期注射 VPA，子代皮下注射 VPA 和子代腹腔注射 VPA 的雄性小鼠到达平台的时间；D~F：妊娠期注射 VPA，子代皮下注射 VPA 和子代腹腔注射 VPA 的雌性小鼠到达平台的时间；与对照组相比，* $P<0.05$ 。

图 6 VPA 不同的注射方式的小鼠水迷宫实验——定位巡航训练阶段 ($n=10\sim13$)

Note: A~C, Duration for each cohort of male mice to attain the platform following different VPA administration regimens: prenatal administration of VPA, postnatal subcutaneous administration of VPA, postnatal intraperitoneal administration of VPA. D~F, Duration for each cohort of female mice to attain the platform following different VPA administration regimens: prenatal administration of VPA, postnatal subcutaneous administration of VPA, postnatal intraperitoneal administration of VPA. Compared with the control group, * $P<0.05$.

Figure 6 Morris water maze test of mice with different VPA injection routes: place navigation training phase ($n=10\sim13$)



注：A~C：妊娠期注射 VPA，子代皮下注射 VPA 和子代腹腔注射 VPA 的雌雄小鼠穿越平台的轨迹图及平台穿越次数；与对照组相比，* $P<0.05$ 。

图 7 VPA 不同的注射方式的小鼠水迷宫实验——空间探索阶段 ($n=10\sim13$)

Note: A~C, Trajectory diagrams and platform crossing durations for each cohort of male and female mice following prenatal administration of VPA, postnatal subcutaneous administration of VPA and postnatal intraperitoneal administration of VPA, respectively. Compared with the control group, * $P<0.05$.

Figure 7 Morris water maze test of mice with different VPA injection routes: spatial probe trial phase ($n=10\sim13$)

3 讨论

本研究比较了妊娠期 VPA 暴露、子代皮下注射 VPA 以及子代腹腔注射 VPA 对小鼠社交、情绪与认知行为的影响。结果显示,与子代腹腔注射 VPA 相比,妊娠期 VPA 暴露及子代皮下注射 VPA 诱发了更为严重的 ASD 样表现,主要表现为 ASD 核心症状的显著损害,包括社交互动能力下降、社交新颖性偏好减弱以及刻板行为增加。此外,妊娠期 VPA 暴露和子代皮下注射 VPA 还显著增强了焦虑样行为;并在水迷宫测试中表现出更严重的认知功能障碍,具体表现为到达目标象限的时间延长,以及在平台移除后穿越目标象限的次数减少。相比之下,子代腹腔注射 VPA 虽也引起轻微社交行为减少和刻板样行为增加,但未诱发明显的焦虑样行为,其认知功能亦未见显著改变。

有研究发现,小鼠胚胎 12.5 d 至 13 d 之间的时间相当于人类胚胎期的 20 d~24 d^[16]。这一时期大约是小鼠神经管闭合阶段结束和神经发生阶段开始,是较容易在后代中诱发 ASD 症状的时期^[16]。因此,大部分研究妊娠期 VPA 暴露的时机均选择在胚胎期 9 d, 9.5 d, 11.5 d, 12 d, 12.5 d, 即在神经管闭合时期^[13,21-24]。研究表明,人类或啮齿类动物在妊娠期暴露于 VPA,不仅会导致神经管闭合受损,引起发育性出生缺陷(如脊柱裂)及尾巴异常(简单的弯曲和/或双弯曲尾巴),还会导致社交能力和社交新颖性障碍,重复性刻板行为及焦虑样行为增加,认知能力损伤^[25]。这些发现与本研究妊娠期 VPA 暴露的后代小鼠的行为学结果一致。然而,由于大多数人类病例在妊娠期间并未接触 VPA, VPA 模型与人类 ASD 之间的关联有效性受到一定质疑。因此,大多数的研究者转而采用子代 VPA 暴露方案,通过在不同时间点(如出生后第 2~4 天、第 6~12 天、第 7 天或第 14 天)以不同剂量和周期注射 VPA,以构建 ASD 动物模型^[19,26,27]。因为人类大脑发育的最后三个月大致对应于啮齿动物出生后发育的前 1~2 周。在这一时期,是大脑发育高度活跃的时期,主要涉及小脑、纹状体、额叶皮层和海马体等区域,涵盖神经元迁移、分化、突触发生、胶质形成、髓鞘形成及神经回路精细连接等关键过程。有研究发现, VPA 被认为是通过干扰发育中神经回路的正常形成,从而诱发 ASD 样行为^[19]。本研究采用了出生后 14 d VPA 暴露的方法,诱导了社交和社交新颖性障碍,重复性刻板样、焦虑样行为增加,认知能力降低。这些表型较好地概括了人类及啮齿类在孕期和子代 VPA 暴露所引起的致畸作用与神经发育缺陷,并最终发展为 ASD 样行为^[26,28]。

出生后 VPA 暴露主要有两种给药方式:颈背部皮下注射与腹腔注射。研究结果显示,皮下注射 VPA 可引发明显的社交障碍、重复刻板行为增加、焦虑样行为以及认知功能损伤;而腹腔注射 VPA 虽也导致社交障碍和重复刻板样行为,但未引起显著的焦虑样行为或认知能力改变。造成这种差异的原因可能与两种注射途径的药代动力学特性有关。皮下注射后,药物需经皮下毛细血管逐渐吸收进入血液循环,吸收速度相对较慢,但作用持续时间较长;相比之下,腹腔注射能够通过腹腔内丰富的血管和淋巴系统迅速吸收,起效更快,但药物作用时间较短。因此, VPA 的暴露时效、注射时机以及作用持续时间等因素,均需在后续研究中进一步探讨。

VPA 造模另一个重要的考量是实验动物的性别选择。人类流行病学数据显示,男性 ASD 患病率约为女性的 4 倍^[29]。鉴于这种显著的性别差异,在构建 ASD 啮齿类动物模型时有必要将性别作为关键变量进行分析。为此,本研究分别对雌性与雄性小鼠进行了评估。结果显示,无论是妊娠期 VPA 暴露还是子代 VPA 注射,雌性与雄性小鼠均表现出相似的社交障碍、重复刻板样行为及焦虑样行为,但雌性小鼠的认知能力均未出现显著改变。而且也有其他研究在性别对 VPA 反应的一致性上存在分歧。KAZLAUSKAS 等^[30]报道, VPA 暴露导致雄性大鼠出现社交障碍,而雌性大鼠未表现相同缺陷。MAMALI 等^[31]则发现,雄性和雌性大鼠均表现出多动症状,但仅雄性大鼠伴随社交能力受损和焦虑水平上升。还有研究发现, VPA 暴露后雌雄性小鼠均表现出 ASD 样行为,而雌性小鼠的症状更严重^[23]。这些研究结果的差异,可能与 VPA 的给药剂量、注射时机或行为学测试的评估时间点不同有关,提示在模型构建中需进一步细化实验条件的控制与标准化。

在构建 VPA 动物模型时,实验动物的死亡率与致畸率也是必须重视的因素。本研究发现,无论是孕 12.5 d 接受 VPA 暴露的母鼠,还是出生后 14 d 注射 VPA 的幼鼠,均在注射后出现四肢僵硬和

闭目瘫软等神经抑制症状。已有研究指出^[32], 孕鼠在 VPA 暴露 6 h 后的死亡率为 10.53%, 流产率达 60.53%, 胎鼠出生后死亡率为 12.5%。本研究中, 孕鼠 VPA 暴露 24 h 的死亡率升高至 50%, 流产率为 25%。综合来看, 孕期 VPA 暴露条件下实验动物的总体存活率约为 30%左右。另有研究采用出生后第 4 天颈部皮下注射 VPA 发现, 小鼠死亡率为 22.7%^[25]。相比之下, 本研究中采用出生后第 14 天注射 VPA, 无论是颈部皮下注射还是腹腔注射, 均未引起小鼠死亡。VPA 造模通常选择在神经管闭合期(产前)或神经发育关键期(产后)进行, 这两个阶段均可能引起神经发育迟缓。研究显示^[25], 通过翻正反射与负地趋向性实验评估, 妊娠期及子代 VPA 暴露均导致运动发育异常和小脑损伤。睁眼实验进一步证实, VPA 处理组小鼠出现睁眼延迟^[25]。该研究同时报道^[25], 妊娠期 VPA 暴露导致幼鼠体重下降, 尾巴单曲/双曲畸形比例达 31%; 而子代颈部皮下注射 VPA 则未引起体重下降或尾巴畸形。

综上所述, 从动物福利、模型稳定性及表型可靠性等角度综合考量, 采用子代第 14 天进行颈部皮下注射 VPA 是一种较为理想的造模策略。该方案在无显著死亡、无体质量下降和无尾巴畸形的前提下, 能够有效诱导出包括社交缺陷, 刻板样、焦虑样行为及认知异常在内的 ASD 样行为表现。然而, ASD 是一种具有高度异质性的复杂的神经发育障碍, VPA 动物模型虽广泛应用, 但仍存在一定的局限性。目前尚不清楚不同 VPA 造模方法所诱导的行为与神经差异, 究竟是反映了 ASD 本身的多样性, 还是源于各实验室在操作流程、剂量选择与评估标准上的技术不一致。因此, 未来有必要对妊娠期与子代 VPA 暴露的关键参数(如注射时机、剂量范围、性别差异及行为测试周期等)开展系统性的比较与验证, 以确立最佳造模条件, 进而推动 VPA 诱导的转化动物模型在 ASD 机制研究与药物评价等方面的更可靠应用。

参考文献:

- [1] LORD C, ELSABBAGH M, BAIRD G, et al. Autism spectrum disorder [J]. *Lancet*, 2018, 392(10146): 508-520.
- [2] THAPAR A, COOPER M, RUTTER M. Neurodevelopmental disorders [J]. *Lancet Psychiatry*, 2017, 4(4): 339-346.
- [3] SHAW K A, MAENNER M J, BAIO J, et al. Early identification of autism spectrum disorder among children aged 4 years—early autism and developmental disabilities monitoring network, six sites, United States, 2016 [J]. *MMWR Surveill Summ*, 2020, 69(3): 1-11.
- [4] HARSTAD E, HANSON E, BREWSTER S J, et al. Persistence of autism spectrum disorder from early childhood through school age [J]. *JAMA Pediatr*, 2023, 177(11): 1197-1205.
- [5] KAAT A J, SHUI A M, GHODS S S, et al. Sex differences in scores on standardized measures of autism symptoms: a multisite integrative data analysis [J]. *J Child Psychol Psychiatry*, 2021, 62(1): 97-106.
- [6] KISSEL L T, WERLING D M. Neural transcriptomic analysis of sex differences in autism spectrum disorder: current insights and future directions [J]. *Biol Psychiatry*, 2022, 91(1): 53-60.
- [7] HODIS B, MUGHAL S, SAADABADI A. Autism Spectrum Disorder [M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.
- [8] HIROTA T, KING B H. Autism spectrum disorder: a review [J]. *Jama*, 2023, 329(2): 157.
- [9] SHIC F, BRADSHAW J, KLIN A, et al. Limited activity monitoring in toddlers with autism spectrum disorder [J]. *Brain Res*, 2011, 1380: 246-254.
- [10] SUN X, ALLISON C, WEI L, et al. Autism prevalence in China is comparable to Western prevalence [J]. *Mol Autism*, 2019, 10(1): 7.
- [11] ZARATE-LOPEZ D, TORRES-CHÁVEZ A L, GÁLVEZ-CONTRERAS A Y, et al. Three decades of valproate: a current model for studying autism spectrum disorder [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2024, 22(2): 260-289.
- [12] BROMLEY R L, MAWER G E, BRIGGS M, et al. The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2013, 84(6): 637-643.
- [13] RODIER P M, INGRAM J L, TISDALE B, et al. Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei [J]. *J Comp Neurol*, 1996, 370(2): 247-261.
- [14] TARTAGLIONE A M, SCHIAVI S, CALAMANDREI G, et al. Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 159: 107477.
- [15] NICOLINI C, FAHNESTOCK M. The valproic acid-induced rodent model of autism [J]. *Exp Neurol*, 2018, 299: 217-227.
- [16] KIM K C, KIM P, GO H S, et al. The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats [J]. *Toxicol Lett*, 2011, 201(2): 137-142.
- [17] YOCHUM C L, DOWLING P, REUHL K R, et al. VPA-induced apoptosis and behavioral deficits in neonatal mice [J]. *Brain Res*, 2008, 1203: 126-132.
- [18] CHOMIAK T, KARNIK V, BLOCK E, et al. Altering the trajectory of early postnatal cortical development can lead to structural and behavioural features of autism [J]. *BMC Neurosci*, 2010, 11(1): 102.
- [19] REYNOLDS S, MILLETTE A, DEVINE D P. Sensory and motor characterization in the postnatal valproate rat model of autism [J]. *Dev Neurosci*, 2012, 34(2/3): 258-267.
- [20] 张芝霖, 杜蔡瑶, 郭佩雯, 等. CB1R 敲除对小鼠 ASD 样行为及突触可塑性的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2025, 35(4): 1-10.
- [21] ZHANG Y L, DU C Y, GUO P W, et al. Effect of cannabinoid receptor 1 knockout on autism spectrum disorder-like behavior and synaptic plasticity in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2025, 35(4): 1-10.
- [22] FERESHETAN K, CHAVUSHYAN V, DANIELYAN M, et al. Assessment of behavioral, morphological and electrophysiological changes in prenatal and postnatal valproate induced rat models of autism spectrum disorder [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 23471.

- [22] KAWADA K, MIMORI S, OKUMA Y, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress and neurite outgrowth in the model mice of autism spectrum disorder [J]. *Neurochem Int*, 2018, 119: 115-119.
- [23] DOS SANTOS A L G, DE LEÃO E R L P, DE ALMEIDA MIRANDA D, et al. BALB/c female subjected to valproic acid during gestational period exhibited greater microglial and behavioral changes than male mice: a significant contra intuitive result [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2021, 81(1): 37-50.
- [24] ORNOY A, GOROBETS D, WEINSTEIN-FUDIM L, et al. Sex-related changes in the clinical, genetic, electrophysiological, connectivity, and molecular presentations of ASD: a comparison between human and animal models of ASD with reference to our data [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3287.
- [25] ELNAHAS E M, ABUELEZZ S A, MOHAMAD M I, et al. Validation of prenatal versus postnatal valproic acid rat models of autism: a behavioral and neurobiological study [J]. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2021, 108: 110185.
- [26] MONY T J, LEE J W, DREYFUS C, et al. Valproic acid exposure during early postnatal gliogenesis leads to autistic-like behaviors in rats [J]. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 2016, 14(4): 338-344.
- [27] MORAKOTSRIWAN N, WATTANATHORN J, KIRISATTAYAKUL W, et al. Autistic-like behaviors, oxidative stress status, and histopathological changes in cerebellum of valproic acid rat model of autism are improved by the combined extract of purple rice and silkworm pupae [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016(1): 3206561.
- [28] LEE H J, DREYFUS C, DICICCO-BLOOM E. Valproic acid stimulates proliferation of glial precursors during cortical gliogenesis in developing rat [J]. *Dev Neurobiol*, 2016, 76(7): 780-798.
- [29] OSTROWSKI P J, ZACHARIOU A, LOVEDAY C, et al. The CHD8 overgrowth syndrome: a detailed evaluation of an emerging overgrowth phenotype in 27 patients [J]. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*, 2019, 181(4): 557-564.
- [30] KAZLAUSKAS N, SEIFFE A, CAMPOLONGO M, et al. Sex-specific effects of prenatal valproic acid exposure on sociability and neuroinflammation: Relevance for susceptibility and resilience in autism [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2019, 110: 104441.
- [31] MAMALI P M, DIGNON C, NGWENYA A, et al. Sex-specific behavioral features of the prenatal valproic acid rat model of autism spectrum disorder [J]. *Brain Sci*, 2025, 15(4): 388.
- [32] 郑文霞, 胡宇玲, 陈笛, 等. 丙戊酸钠诱导小鼠自闭症模型的改良 [J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(6): 718-723.
ZHENG W X, HU Y L, CHEN D, et al. Improvement of a mouse model of valproic acid-induced autism [J]. *J South Med Univ*, 2019, 39(6): 718-723.