

·针灸推拿·

本文引用: 汤文政, 唐佳瑶, 唐青, 郭啸南, 黄千涵, 林丽莉. 捏脊对不同日龄自闭症大鼠海马突触相关蛋白表达及神经可塑性的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(10): 1865-1871.

捏脊对不同日龄自闭症大鼠海马突触相关蛋白表达及神经可塑性的影响

汤文政¹, 唐佳瑶¹, 唐青¹, 郭啸南¹, 黄千涵², 林丽莉^{1,3*}

1. 福建中医药大学, 福建 福州 350122; 2. 澳门科技大学, 澳门 999078; 3. 福建省中医药科学院, 福建 福州 350003

[摘要] **目的** 通过观察捏脊对23、37、51日龄自闭症大鼠行为学及海马区脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、酪氨酸激酶受体B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)、环磷腺苷效应元件结合蛋白(cyclic AMP response element binding protein, CREB)、突触素(synaptophysin, Syn)、突触后致密蛋白-95(postsynaptic density-95, PSD-95)蛋白表达的影响, 探究捏脊对不同发育时期自闭症大鼠神经可塑性的影响。**方法** 随机选取42只由丙戊酸钠诱导的自闭症模型大鼠, 分为模型组、PN23模型组、PN23捏脊组、PN37模型组、PN37捏脊组、PN51模型组和PN51捏脊组, 每组6只; 另选取6只正常大鼠为空白组。捏脊组在指定时间开始捏脊干预, 每日1次, 1次21遍, 连续干预28d; 空白组和模型组仅模拟抓取和固定。各组大鼠于干预前后进行行为学检测, 取材选择海马组织, 采用Western blot检测BDNF、TrkB、CREB蛋白表达水平, 免疫荧光法检测Syn、PSD-95的平均光密度值。**结果** 与空白组比较, 其余各组大鼠的站立次数减少、理毛次数增多($P<0.05$); 与空白组比较, 模型组海马BDNF、TrkB、CREB蛋白表达量降低($P<0.05$, $P<0.01$); 与PN23模型组比较, PN23捏脊组大鼠海马BDNF、TrkB、CREB蛋白表达量升高($P<0.05$, $P<0.01$); 与PN37模型组比较, PN37捏脊组大鼠海马BDNF、TrkB、CREB蛋白表达量升高($P<0.05$, $P<0.01$); 与空白组相比, 模型组Syn、PSD-95的平均光密度均降低($P<0.01$); 与同日龄的模型组比较, 各捏脊组大鼠海马Syn、PSD-95的平均光密度均升高($P<0.01$)。**结论** 捏脊可以改善自闭症大鼠的行为障碍, 上调不同日龄自闭症模型大鼠海马BDNF、TrkB、CREB、Syn、PSD-95蛋白表达量, 改善突触功能, 提高神经可塑性。同时, 提示捏脊对发育早期的自闭症模型大鼠治疗效果较好。

[关键词] 捏脊; 小儿推拿; 自闭症; 突触素; 神经营养因子; 脑功能

[中图分类号] R244.1

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.10.020

Effects of spinal manipulation on the expression of synaptic-related proteins and neuroplasticity in the hippocampus of autistic rats at different ages

TANG Wenzheng¹, TANG Jiayao¹, TANG Qing¹, GUO Xiaonan¹, HUANG Qianhan², LIN Lili^{1,3*}

1. Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China; 2. Macau University of Science and Technology, Macau SAR 999078, China; 3. Fujian Academy of Chinese Medical Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China

[Abstract] **Objective** To observe the effects of spinal manipulation on the behavior and expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), tyrosine kinase receptor B (TrkB), cyclic AMP response element binding protein (CREB), synaptophysin (Syn), and postsynaptic dense-95 (PSD-95) in the hippocampus of 23, 37, and 51-day-old autistic rats, and to explore its impact on neuroplasticity in autistic rats at different developmental stages. **Methods** Forty-two autism model rats induced by sodium valproate were randomly divided into model group, PN23 model group, PN23 spinal manipulation group, PN37 model group, PN37 spinal

[收稿日期] 2024-06-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81704194); 福建省自然科学基金项目(2022J01366)。

[通信作者] * 林丽莉, 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: 438488409@qq.com。

manipulation group, PN51 model group, and PN51 spinal manipulation group, with six rats in each group. Additionally, six normal rats were selected as the blank group. The spinal manipulation group received daily spinal manipulation interventions, 21 repetitions per session, for 28 consecutive days, starting at the specified time points. The blank group and model groups only underwent simulated grasping and fixation. Behavioral tests were conducted on rats in each group before and after the interventions. Hippocampal tissue was selected, and the protein expression levels of BDNF, TrkB, and CREB were checked using Western blot, while the average optical density values of Syn and PSD-95 were measured by immunofluorescence. **Results** Compared with the blank group, the remaining groups showed a decrease in standing frequency and an increase in hair grooming frequency ($P<0.05$). Compared with the blank group, the protein expression levels of BDNF, TrkB, and CREB in the hippocampus of the model groups decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the PN23 model group, the protein expression levels of BDNF, TrkB, and CREB in the hippocampus of PN23 spinal manipulation group increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the PN37 model group, the protein expression levels of BDNF, TrkB, and CREB in the hippocampus of PN37 spinal manipulation group increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the blank group, the average optical density of Syn and PSD-95 in the model groups decreased ($P<0.01$). In comparison with the model groups of the same age, the average optical density of Syn and PSD-95 in the hippocampus of rats in all spinal manipulation groups increased ($P<0.01$). **Conclusion** Spinal manipulation can improve behavioral disorders in autistic rats, upregulate the expression of BDNF, TrkB, CREB, Syn, and PSD-95 in the hippocampus of autistic model rats at different ages, enhance synaptic function, and improve neuroplasticity. Furthermore, it is suggested that spinal manipulation has a better therapeutic effect on autistic model rats in the early stages of development.

[Keywords] spinal manipulation; pediatric massage; autism spectrum disorders; synaptophysin; neurotrophic factors; brain function

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorders, ASD), 又称自闭症, 是一种儿童神经系统异常疾病, 临床表现为情感淡漠、社交障碍、活动及兴趣局限、行为重复刻板等。自闭症的发病机制尚不明确, 且仍缺乏治疗自闭症核心症状的特效药物^[1]。脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)是脑内含量最丰富的神经营养因子之一, 对神经元的分化、存活、生长发育等过程都有重要意义, 并且能够防止神经元受损及死亡。酪氨酸激酶受体 B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)是其主要的功能受体, 在机体所有神经营养因子中, TrkB 与 BDNF 是唯一一对在时空表达上呈现高度一致性的受体配体复合体, 两者均广泛分布于中枢神经系统, TrkB 通过与 BDNF 结合而启动细胞内信号传导, 激活多条下游信号通路, 发挥营养和保护神经的作用^[2]。环磷腺苷效应元件结合蛋白(cyclic AMP response element binding protein, CREB)是一种核转录因子, 参与调控突触和神经元相关基因表达, CREB 的激活也可以促进 BDNF 的转录^[3]。突触后致密蛋白-95(postsynaptic density-95, PSD-95)参与神经细胞间突触连接的建立和塑造, 并且与学习、认知以及记忆等高级脑功能的形成紧密相关^[4]。突触素(synaptophysin, Syn)是一种分布于突触前囊泡膜上的膜结构蛋白, 因其分布具有特异性, 所以可以作为一种突触标识蛋白, 对 Syn 进行定位和定量研究, 可分析突触的分

布、密度以及突触可塑性^[5]。而丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)诱导的自闭症模型大鼠, 在生长过程中中枢神经系统的神经元凋亡和突触发育往往存在异常^[6]。

《素问·骨空论》曰:“督脉者……与太阳起于目内眦, 上额交巅上, 入络脑。”捏脊疗法通过捏、提、推、捻等复合手法, 直接作用于背部足太阳膀胱经和督脉。现代研究认为, 捏脊可以通过刺激脊神经及动静脉丛, 影响脑部发育继而缓解中枢神经系统的功能障碍^[7]。已有研究表明, 捏脊可以调节抑郁症大鼠海马区免疫和炎症相关基因的表达水平, 并改善抑郁症大鼠焦虑情绪^[8]。自闭症病因不清, 一般于 3 岁前起病, 且 6 岁以前儿童大脑发育最快, 此时的大脑具有较强的神经可塑性, 故 0~6 岁治疗效果最佳^[9]。目前, 临床中通过捏脊干预自闭症儿童的最佳时间节点尚不明确, 因此本课题拟在自闭症模型大鼠发育的 3 个时间节点(23、37、51 日龄)介入捏脊干预, 观察捏脊对不同发育时期自闭症大鼠神经可塑性的影响, 为优化自闭症的临床治疗方案提供部分研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

SPF 级健康 Wistar 大鼠 50 只, 雌雄各半。雌性大鼠体质量为(250±20) g, 雄性大鼠体质量为(300±

20) g,由上海斯莱克试验动物有限责任公司提供,动物生产许可证号:SYXK(闽)2019-0007。于福建中医药大学实验动物中心动物房饲养(SPF级),温度20~24℃,相对湿度40%~50%,自然照明,大鼠均自由摄食、自由饮水。本实验经福建中医药大学伦理委员会批准许可(伦理审批号:2021-80)。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 旷场实验检测系统(上海欣软信息科技有限公司,型号:XR-XZ301);低温高速离心机(德国Eppendorf公司,型号:5430R);电泳仪、凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司,型号:Mini-PROTEAN,ChemiDoc XRS+);冰冻切片机(上海赛默飞世尔仪器有限公司,型号:NX50);倒置荧光显微镜(德国Leica公司,型号:DMIL)。

1.2.2 主要试剂 BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0010);Marker(美国Thermo公司,批号:26616);鼠单克隆抗体 β -actin、兔多克隆抗体BDNF、兔多克隆抗体TrkB、兔重组抗体PSD-95(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:60008-1-Ig、25699-AP、13129-1-AP、81106-PBS);兔单克隆抗体CREB、鼠多克隆抗体Syn(英国Abcam公司,批号:ab32515、20665-1-AP)。

1.3 造模及分组

自闭症模型大鼠制备参考SCHNEIDER等^[10]的方法。雌雄大鼠以1:1的比例于晚上7点进行合笼,于次日9点检查有无阴栓脱落,有阴栓记为妊娠第0.5天。按照随机数表法将Wistar孕鼠分为模型组孕鼠和空白组孕鼠。模型组孕鼠于孕12.5d时腹腔注射VPA溶液(600 mg/kg,浓度250 mg/mL,生理盐水配制),产下的大鼠经发育行为学检测(体质量、睁眼时间、方向趋向性测试、足底热痛试验、游泳试验)确认为模型大鼠,模型大鼠的体质量较空白组低,睁眼时间晚于空白组,方向趋向性测试、足底热痛试验、游泳试验的表现均弱于空白组。空白组孕鼠于孕12.5d时腹腔注射同等剂量的生理盐水,产下的大鼠为空白大鼠,出生当天记为PN1(postnatal day1)。随机选取6只空白组孕鼠产下的大鼠,记为空白组。随机选取42只模型大鼠,随机分为7组,每组6只,即模型组、PN23捏脊组、PN23模型组、PN37捏脊组、PN37模型组、PN51捏脊组、PN51模型组(组别以介入干预时捏脊组大鼠的日龄命名,空白组和模型组之间不做捏脊干预疗效对比)。

1.4 干预方法

捏脊具体操作方法^[11]:将大鼠从笼中取出来,待大鼠情绪稳定自然平静;操作者采取坐姿,呼吸均匀,肩部放松,在开始捏脊前至上而下轻抚大鼠背部1~3次;操作者左手以毛线手套盖住大鼠头部并以轻柔的方式固定,右手的食指、中指指尖放置于脊柱两侧,拇指指尖放置于脊柱上,食指、中指与拇指相对用力,提起大鼠脊柱两侧的皮肤;拇指指尖紧贴脊柱,食指、中指交替运动,从大鼠脊中线尾根部开始,边捏边向大鼠头部推移,一直捏到大椎穴处停止,计为1遍,手法的刺激强度以大鼠忍耐为度(大鼠不发出尖叫,较平静)。每只大鼠每日干预时长约为3 min。整个实验中,捏脊操作由同一人进行操作,操作者事先经过培训以保证手法稳定性。各捏脊组干预于每天同一时间进行,每日1次,1次21遍,连续干预28 d^[12]。空白组与各模型组大鼠仅模拟抓取和固定,不予干预。

1.5 取材

干预结束第2天,用20%乌拉坦麻醉大鼠,麻醉成功后打开大鼠胸腔,将心脏充分暴露在视野下。用预冷过的生理盐水匀速注入大鼠左心室并同时剪开右心耳,待血液流尽至肺、肝及肠系膜颜色表现为苍白。将大鼠断头处死,取头颅,剪开皮肤,露出颅骨。将大脑沿矢状中线切开,取半侧大脑浸泡于预冷过的4%多聚甲醛溶液中固定24~48 h,以备后续进行免疫荧光检测,另外半侧大脑钝性分离取出海马组织,并立即置于干冰中保存,随后转移到-80℃冰箱中,以备进行免疫蛋白印迹检测。

1.6 行为学检测

将旷场实验箱(规格为72 cm×72 cm×40 cm的长方体,四周及底部均为黑色)放置于环境光线强度为80~100 lux的无背景噪声室内。实验前用75%乙醇清洁旷场实验箱。选取大鼠非活动期(8:00—16:00)进行,将大鼠依次放入旷场实验箱中心区域内,每次1只,每只大鼠活动时长为5 min,人工记录大鼠在箱内站立、理毛等行为。每只大鼠测试完用75%乙醇对旷场实验箱内进行彻底消毒清洁,清除动物排泄物及异味,避免影响下一只大鼠。均在PN22及干预结束次日进行旷场实验。

1.7 指标检测

1.7.1 Western blot 检测大鼠海马组织BDNF、TrkB、CREB蛋白的相对表达量 将海马组织从-80℃冰

箱中取出称重,加入蛋白裂解液后离心提取上清液进行蛋白量检测。根据说明书进行 SDS-PAGE 凝胶配制,上样,100 V 电泳 60 min,湿转,TBST 溶液洗膜,封闭15 min 后孵育一抗 BDNF(1:1 000)、TrkB (1:1 000)、CREB(1:2 000)、Syn(1:2 000)、PSD-95(1:2 000)、 β -actin(1:5 000);与 PVDF 膜一起放入密封袋中置于摇床,4 °C 孵育过夜后,用 TBST 溶液清洗 3 次,1 次 5 min,二抗比例(兔二抗 1:10 000,鼠二抗 1:5 000)温室孵育 1 h 后 TBST 溶液清洗 3 次,1 次 5 min;洗膜显影,用 Image Lab 软件分析各条带的灰度值。

1.7.2 免疫荧光检测大鼠海马组织 Syn、PSD-95 的平均光密度值 从-20 °C 冰箱取出海马冷冻切片,于室温复温约 1 h,采用 PBS 溶液清洗后滴加适量封闭液(10% TritonX-100:羊血清:PBS 为 2:5:43),37 °C 烘箱封闭 1 h 后加入一抗[Syn(1:100),PSD-95(1:200),(一抗稀释液,0.3% TritonX-100:羊血清为 99:1)]置于 4 °C 冰箱孵育过夜;次日洗涤后滴加二抗[抗 Syn(1:200),抗 PSD-95(1:400)],37 °C 烘箱孵育 1 h,洗涤后滴加适量 DAPI;最后使用 $\times 100$ 荧光显微镜观察,并通过 Image J 软件计算 Syn、PSD-95 的平均光密度。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。计量资料均采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,符合正态分布的两两比较采用 t 检验,不满足正态分布的两两比较采用非参数检验,满足正态分布的组间比较采用单因素方差分析,方差齐进行 LSD 检验,方差不齐则用 Dunnett T3 法。以 $P < 0.05$ 为数据差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠旷场实验指标检测结果

与空白组比较,其余各组大鼠站立次数均减少($P < 0.01$),大鼠理毛次数均增多($P < 0.05, P < 0.01$)。详见图 1—2。

2.2 各组大鼠海马组织 BDNF、CREB、TrkB 蛋白相对表达结果

与空白组比较,模型组大鼠海马 BDNF、TrkB、CREB 蛋白表达水平均降低($P < 0.05, P < 0.01$);与 PN23 模型组比较,PN23 捏脊组大鼠海马 BDNF、TrkB、CREB 蛋白表达水平均升高($P < 0.05, P < 0.01$);与 PN37 模型组比较,PN37 捏脊组大鼠海马 BDNF、TrkB、CREB 蛋白表达水平均升高($P < 0.05, P < 0.01$);

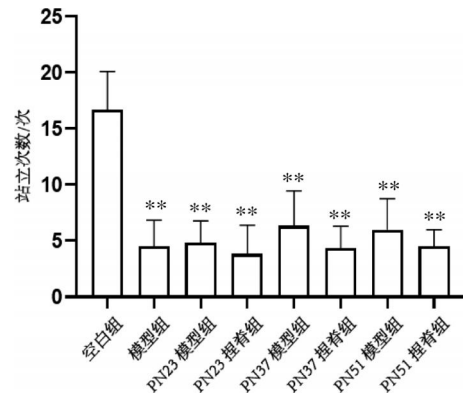


图 1 各组大鼠站立次数比较($n=6$)

Fig.1 Comparison of standing frequency among different groups of rats ($n=6$)

注:与空白组比较,** $P < 0.01$ 。

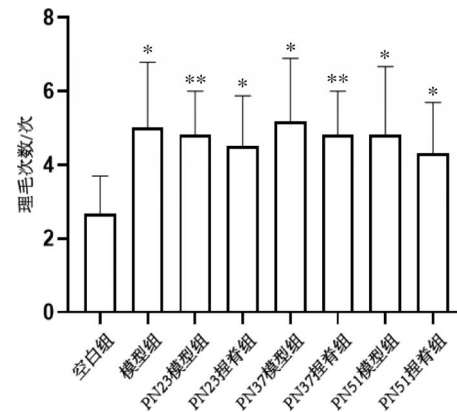


图 2 各组大鼠理毛次数比较($n=6$)

Fig.2 Comparison of hair grooming frequency among different groups of rats ($n=6$)

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

与 PN51 模型组比较,PN51 捏脊组 BDNF、TrkB、CREB 蛋白表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。详见图 3、表 1。

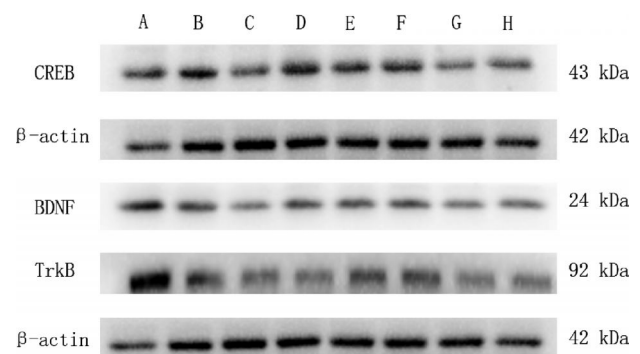


图 3 各组大鼠海马组织 CREB、BDNF、TrkB 条带图

Fig.3 Band diagrams of CREB, BDNF, and TrkB in the hippocampus of each group of rats

注:A.空白组;B.模型组;C.PN23 模型组;D.PN23 捏脊组;E.PN37 模型组;F.PN37 捏脊组;G.PN51 模型组;H.PN51 捏脊组。

表1 各组大鼠海马组织 BDNF、TrkB、CREB 蛋白相对表达水平情况($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Relative expression levels of BDNF, TrkB, and CREB proteins in the hippocampus of each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	BDNF	TrkB	CREB
空白组	1.00±0.22	1.00±0.19	1.00±0.15
模型组	0.74±0.14*	0.50±0.11**	0.83±0.09*
PN23 模型组	0.68±0.14	0.44±0.04	0.83±0.17
PN23 捏脊组	0.94±0.17 [△]	0.66±0.05 ^{△△}	1.06±0.16 [△]
PN37 模型组	0.71±0.19	0.45±0.09	0.87±0.13
PN37 捏脊组	0.96±0.19 [□]	0.70±0.08 ^{□□}	1.06±0.16 [□]
PN51 模型组	1.04±0.12	0.68±0.14	1.04±0.19
PN51 捏脊组	1.11±0.15	0.66±0.11	1.08±0.12

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与PN23 模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与PN37 模型组比较,[□] $P<0.05$,^{□□} $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠海马组织 Syn、PSD-95 免疫荧光检测结果

与空白组比较,模型组 Syn、PSD-95 的平均光密度均降低($P<0.01$);分别与同日龄的模型组比较,各捏脊组大鼠海马 Syn、PSD-95 平均光密度均升高($P<0.01$)。详见图4—6。

3 讨论

自闭症成因复杂。现代研究表明,妊娠期间暴露于 VPA 与许多疾病明显相关,其中在妊娠前3个月暴露于 VPA 是后代患自闭症的高风险因素之一^[13]。因此,VPA 被广泛用于建立自闭症动物模型的诱导剂(在孕鼠妊娠12.5 d 时对其进行 VPA 溶液的腹腔注射),与单一孤独症相关基因突变的模型动物相比,该模型表现更符合环境/表观遗传所引起的特

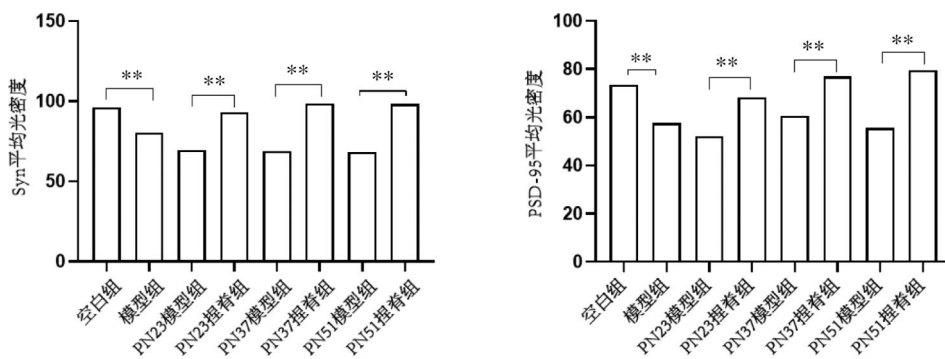


图4 各组大鼠海马组织 Syn、PSD-95 平均光密度值($n=6$)

Fig.4 The average optical density values of Syn and PSD-95 in the hippocampus of each group of rats ($n=6$)

注:** $P<0.01$ 。

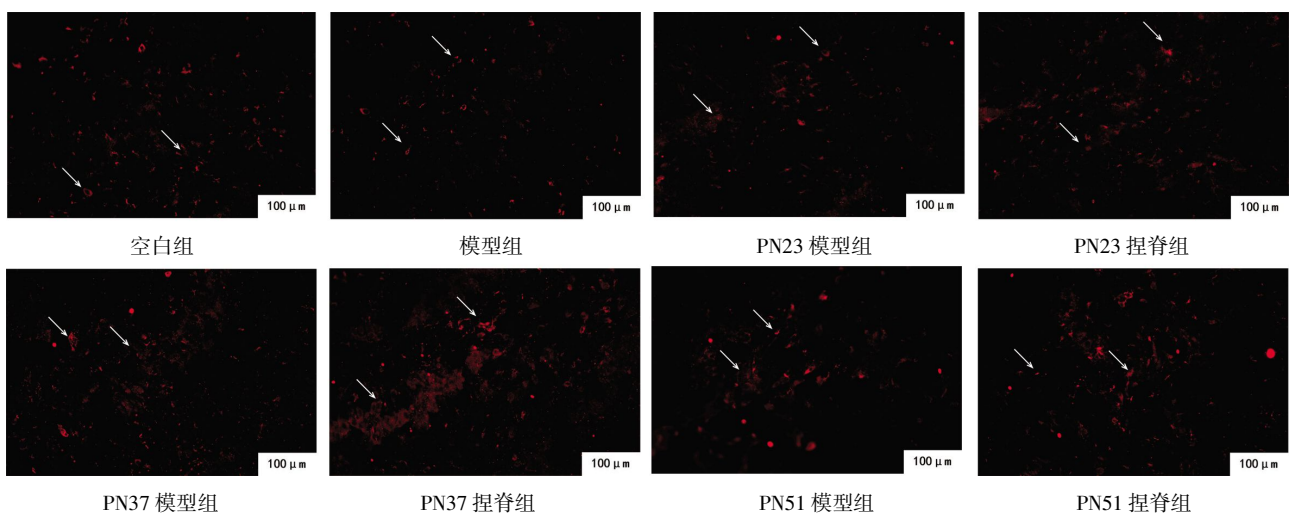


图5 各组大鼠海马 Syn 蛋白表达比较(免疫荧光染色,×200)

Fig.5 Comparison of Syn protein expression in hippocampus among different groups of rats (Immunofluorescence staining,×200)

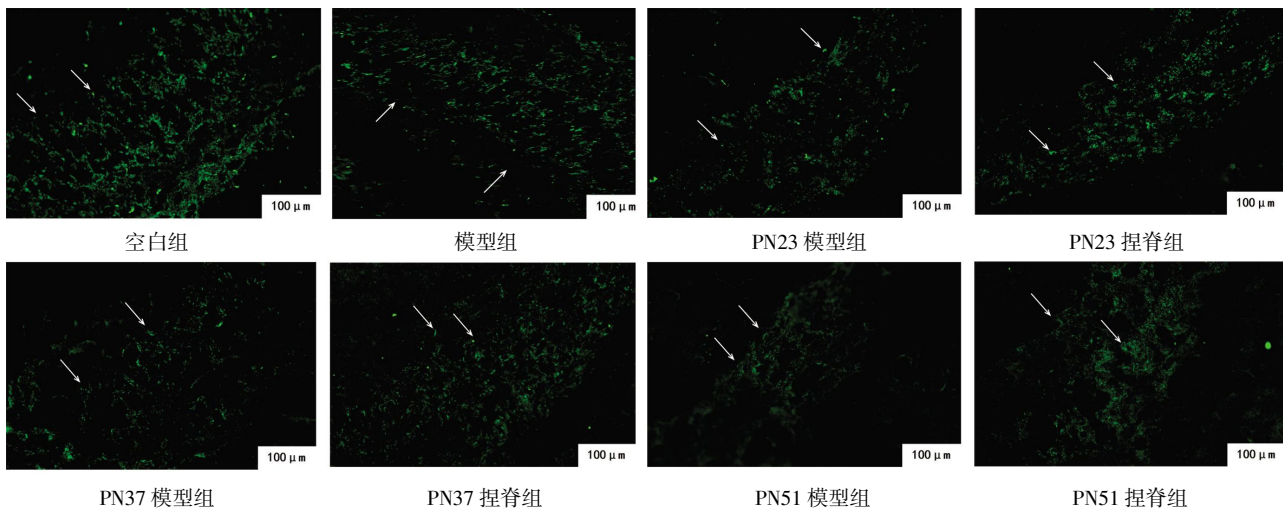


图 6 各组大鼠海马 PSD-95 蛋白表达比较(免疫荧光染色,×200)

Fig.6 Comparison of PSD-95 protein expression in the hippocampus among different groups of rats (Immunofluorescence staining,×200)

发性孤独症行为缺陷^[14]。在旷场实验中,各模型组大鼠较空白组站立及理毛次数均明显增加,说明模型大鼠对新环境探索兴趣降低,且出现重复刻板行为,处于焦虑状态,符合临床中自闭症患儿的行为特征,表明自闭症模型建立成功。

突触可塑性是神经可塑性的主要表现之一^[15]。突触可塑性取决于突触膜上的特定蛋白质, Syn 作为一种神经元特有的钙结合蛋白;一方面能够调节囊泡的内吞和胞吐,参与神经递质的释放;另一方面能够调节突触可塑性,包括突触的发生、稳定和传递^[16-17]。PSD-95 是与兴奋性突触后膜相邻的致密细胞内结构,可以通过与膜和胞质蛋白结合,成为多蛋白复合物组装的中心^[18]。PSD-95 在突触后信号转导系统的组织装配中有不可替代的作用,与突触稳态和突触可塑性密切相关^[19]。研究表明,小鼠出现自闭症相关表现可能与 Syn 表达下降或功能异常及神经元发育受损有关^[20]。而 PSD-95 的异常表达是自闭症等多种神经发育障碍疾病的原因之一^[21]。免疫荧光检测结果表明,模型组和空白组相比,海马齿状回 Syn 和 PSD-95 平均光密度值均降低;和同日龄的模型组相比,捏脊组的海马齿状回 Syn 和 PSD-95 平均光密度值均升高。结果提示捏脊干预可以上调 Syn 和 PSD-95 表达,提高突触信息交换效率,维持神经可塑性,促进神经系统的正常发育。并且介入时间对 Syn 和 PSD-95 表达的影响较小,从 3 个时间点介入干预均可以显著改善突触功能。

BDNF 对中枢神经系统有保护作用,主要在中

枢神经系统中合成^[22]。在中枢神经发育过程中,神经营养因子和生长因子的表达在时空上遵循特定规律,可以影响细胞分化、神经元发育和存活、神经发生、突触发生和突触可塑性,以保证神经系统正常发育和功能执行^[23]。CREB 参与调控突触和神经元相关基因表达,与神经可塑性关系密切,同时也是认知功能的重要靶点之一^[24]。本实验结果表明,模型组和空白组相比,海马区 BDNF、TrkB、CREB 的蛋白表达均降低,表明自闭症模型鼠海马区神经细胞发育异常,神经递质的合成与释放受到抑制,影响突触功能,海马功能障碍;和 PN23、PN37 的模型组相比,其捏脊组的海马区 BDNF、TrkB、CREB 的蛋白表达水平平均升高,即捏脊干预可以改善神经元病理状态,促进神经细胞正常生长发育,促进神经递质的合成与释放,提高突触可塑性,有助于恢复海马功能。PN23、PN37 的捏脊与模型组间差异更为明显,说明处于发育早期的神经系统有更强的神经可塑性,机体可以更好的响应外界刺激,此时介入捏脊疗法对自闭症大鼠海马影响更显著。

本研究从自闭症的疾病特点和治疗难点出发,探讨早期介入捏脊疗法对自闭症的治疗意义。鉴于大鼠 PN21 的脑发育程度和人类 2~3 岁的脑发育程度相似,PN42 相当于人类的青春期^[25]。因此,本实验选取 PN23、PN37、PN51 作为介入治疗的时间,对应人类从婴幼儿时期到青春期的生长发育阶段。本研究表明,捏脊对 23、37、51 日龄自闭症模型大鼠都有一定治疗效果,并且在与同日龄模型组大鼠

的疗效对照中,23日龄和37日龄自闭症模型大鼠的疗效优于51日龄自闭症模型大鼠,提示捏脊对发育早期的自闭症模型大鼠治疗效果较好,且这与不同发育阶段神经系统的可塑性相关。同时,本课题验证了捏脊疗法能够提高海马区脑神经营养因子的表达,改善突触功能,这提示捏脊疗法或具备广泛的脑功能效应,课题组后续将对前额叶、杏仁核、小脑等不同脑区进行深入研究,以进一步观察捏脊对脑功能的影响。

参考文献

- [1] HALLMAYER J, CLEVELAND S, TORRES A, et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism[J]. *Archives of General Psychiatry*, 2011, 68(11): 1095-1102.
- [2] BARCO A, MARIE H. Genetic approaches to investigate the role of CREB in neuronal plasticity and memory[J]. *Molecular Neurobiology*, 2011, 44(3): 330-349.
- [3] 胡冠宇. “治神调形”下头针对缺血性中风痉挛大鼠 BDNF/TrkB/CREB 及 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路影响的研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2021.
- [4] 谢峥嵘, 肖豆, 唐雅妮, 等. 电针心包经穴对 MCAO 大鼠血清和脑组织突触素及突触后致密物-95 表达的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(1): 81-85.
- [5] 赵恩聪. 早期电针对 SAMP8 小鼠不同脑区突触素和 PSD-95 表达的影响[D]. 福州: 福建中医药大学, 2020.
- [6] 胡宇玲. 颗粒蛋白前体在 VPA 诱导的 ASD 大鼠脑组织中表达的时空规律及其对神经发育作用的初步研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019.
- [7] 王怡悦, 徐花, 叶芊, 等. 针刺联合捏脊治疗小儿脑瘫临床观察[J]. *河北中医*, 2018, 40(12): 1884-1888.
- [8] 江励华, 王玲玲, 吴颖昕, 等. 捏脊对抑郁模型大鼠行为学的影响: 捏脊治疗抑郁症实验研究之一[J]. *江苏中医药*, 2010, 42(6): 75-77.
- [9] 阿尔祖古丽·牙合甫, 阿斯木古丽·克力木, 热依拉·阿不拉, 等. 综合干预训练对不同年龄段孤独症患儿的效果及对策分析[J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31(4): 732-734.
- [10] SCHNEIDER T, PRZEWOŁOCKI R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Animal model of autism[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2005, 30(1): 80-89.
- [11] 冯燕华, 黄菊, 刘金岚, 等. 中药敷脐治疗小儿乳食积滞型便秘的临床观察[J]. *中国医药导报*, 2022, 19(36): 101-104.
- [12] 林丽莉. 基于肥大细胞应激效应探讨捏脊疗法对皮肤-内源性大麻素系统的影响[D]. 福州: 福建中医药大学, 2019.
- [13] SMITH V, BROWN N. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism[J]. *Archives of Disease in Childhood Education and Practice Edition*, 2014, 99(5): 198.
- [14] NICOLINI C, FAHNESTOCK M. The valproic acid-induced rodent model of autism[J]. *Experimental Neurology*, 2018, 299(Pt A): 217-227.
- [15] GOGTAY N, GIEDED J N, LUSK L, et al. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(21): 8174-8179.
- [16] MIRZA F J, ZAHID S. The role of synapsins in neurological disorders[J]. *Neuroscience Bulletin*, 2018, 34(2): 349-358.
- [17] KOTAJIMA-MURAKAMI H, KOBAYASHI T, KASHII H, et al. Effects of rapamycin on social interaction deficits and gene expression in mice exposed to valproic acid in utero[J]. *Molecular Brain*, 2019, 12(1): 3.
- [18] SHENG M, HOOGENRAAD C C. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: A more quantitative view[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2007, 76: 823-847.
- [19] CHEN X B, NELSON C D, LI X, et al. PSD-95 is required to sustain the molecular organization of the postsynaptic density[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2011, 31(17): 6329-6338.
- [20] GRECO B, MANAGÒ F, TUCCI V, et al. Autism-related behavioral abnormalities in synapsin knockout mice[J]. *Behavioural Brain Research*, 2013, 251: 65-74.
- [21] COLEY A A, GAO W J. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism?[J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2018, 82: 187-194.
- [22] CONNER J M, LAUTERBORN J C, YAN Q, et al. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: Evidence for anterograde axonal transport[J]. *The Journal of Neuroscience*, 1997, 17(7): 2295-2313.
- [23] TAPIA-ARANCIBIA L, ALIAGA E, SILHOL M, et al. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease[J]. *Brain Research Reviews*, 2008, 59(1): 201-220.
- [24] 白龙棠. 基于 cAMP-CREB-BDNF 信号通路探讨蒙药肉蔻-5 味丸对 CUMS 大鼠海马神经保护作用及机理研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [25] QUINN R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years?[J]. *Nutrition*, 2005, 21(6): 775-777.