

·针灸推拿·

本文引用: 唐 青, 洪燕玲, 苏丽红, 郭榕蕙, 林丽莉. 捏脊疗法对孤独症谱系障碍大鼠不同脑区 BDNF 及 CREB 蛋白表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(2): 259–266.

捏脊疗法对孤独症谱系障碍大鼠不同脑区 BDNF 及 CREB 蛋白表达的影响

唐 青¹, 洪燕玲¹, 苏丽红¹, 郭榕蕙¹, 林丽莉^{1,2*}

1. 福建中医药大学针灸推拿学院, 福建 福州 350122; 2. 福建省中医药科学院, 福建 福州 350001

〔摘要〕 **目的** 探讨捏脊疗法干预孤独症谱系障碍(ASD)模型大鼠对其前额叶、海马及小脑区域中脑源性神经营养因子(BDNF)、环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)表达的影响。**方法** 将 ASD 模型大鼠随机分为模型组、捏脊组, 每组 6 只; 同时随机选取 6 只正常大鼠为空白组。捏脊组在大鼠 23 日龄开始捏脊疗法, 21 次/d, 连续干预 28 d; 空白组和模型组仅模拟抓取和固定。干预结束次日完成旷场实验, 记录活动行为数据(总路程、站立次数、理毛次数), 并于旷场实验次日取材。采用免疫组织化学法和 Western blot 检测前额叶、海马和小脑区域中 BDNF 及 CREB 蛋白表达。**结果** 与空白组相比, 模型组活动总路程增长、站立次数减少、理毛次数增多($P<0.01$); 与模型组相比, 捏脊组活动总路程减少、站立次数增加、理毛次数减少($P<0.05$)。与空白组比较, 模型组前额叶区、海马区、小脑区 BDNF、CREB 蛋白表达均减少($P<0.05, P<0.01$); 与模型组比较, 捏脊组前额叶区、海马区、小脑区 BDNF、CREB 蛋白表达均增加($P<0.05, P<0.01$)。与空白组相比, 模型组前额叶区、海马区、小脑区 BDNF、CREB 蛋白阳性平均光密度均减少($P<0.05, P<0.01$); 与模型组相比, 捏脊组前额叶区、海马区、小脑区 BDNF、CREB 蛋白阳性平均光密度均增加($P<0.05, P<0.01$)。**结论** 捏脊疗法能够有效改善 ASD 大鼠的行为表征, 其作用机制可能与上调 ASD 大鼠前额叶、海马、小脑区的 BDNF、CREB 蛋白表达水平有关。

〔关键词〕 孤独症谱系障碍; 捏脊; 督脉; 多脑区; 脑源性神经营养因子; 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白; 脑神经发育

〔中图分类号〕 R244.1

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.02.009

Effects of spine-pinching manipulation on protein expressions of BDNF and CREB in different brain regions of autistic spectrum disorder rats

TANG Qing¹, HONG Yanling¹, SU Lihong¹, GUO Ronghui¹, LIN Lili^{1,2*}

1. School of Acupuncture & Moxibustion and Tuina, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China; 2. Fujian Academy of Chinese Medical Sciences, Fuzhou, Fujian 350001, China

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the effects of spine-pinching manipulation on the expressions of brain derived neurotrophic factor (BDNF) and cyclic adenosine phosphate response element binding protein (CREB) in the prefrontal, hippocampal, and cerebellar regions of autism spectrum disorder (ASD) model rats. **Methods** The model rats with ASD were randomly divided into model group and spine-pinching manipulation group, with six rats in each group. Additionally, six normal rats were randomly selected as blank group. The spine-pinching manipulation group received spine-pinching manipulation starting from postnatal day 23, 21 times/day, for a continuous intervention of 28 days. The blank and model groups underwent simulated grasping and fixing only. The open field test was conducted the day after the intervention ended, and the activity behavior data (total distance, standing times, and grooming times) were recorded, and the samples were collected on the day after the open field test. The protein

〔收稿日期〕 2024-07-11

〔基金项目〕 国家自然科学基金青年项目(81704194); 福建省自然科学基金项目(2022J01366); 福建省财政厅教育和科研专项项目(x2020002-财政专项); 福建省属公益类科研院所基本科研专项项目(2023R1003006)。

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

expressions of BDNF and CREB in the prefrontal, hippocampus, and cerebellar regions were checked by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Compared with the blank group, the total distance of activity increased, standing times decreased, and grooming times increased in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, the total distance of activity in spine-pinching manipulation group decreased, the standing times increased, and the grooming times decreased ($P<0.05$). Compared with the blank group, the protein expressions of BDNF and CREB in the prefrontal, hippocampus, and cerebellar regions were lower in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the protein expressions of BDNF and CREB in the prefrontal, hippocampus, and cerebellar regions of the spine-pinching manipulation group increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the blank group, the average optical density of BDNF and CREB proteins in the prefrontal, hippocampus, and cerebellar regions of the model group decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the average optical density of BDNF and CREB proteins in the prefrontal, hippocampus, and cerebellar regions of the spine-pinching manipulation group increased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Spine-pinching manipulation can effectively improve the behavioral characteristics of ASD rats, and its mechanism of action may be related to the upregulation of BDNF and CREB protein expressions in the prefrontal, hippocampus, and cerebellar regions of ASD rats.

[**Keywords**] autism; spine-pinching manipulation; Du meridian; multiple brain regions; brain derived neurotrophic factor; cyclic adenosine phosphate response element binding protein; cranial nerve development

孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD), 又名孤独症, 其患者具有不同程度社交障碍、沟通缺陷、狭隘兴趣及刻板行为的核心特征, 是一种广泛性发育障碍, 也是结合现代心理学、神经病学等相关科学的一个综合性疾病^[1]。近代脑科学研究发现, ASD 患儿存在小脑、海马、皮质等多个脑区的脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)表达异常^[2]。其中, BDNF 是关键的神经营养因子, 对神经元轴突和树突生长、突触可塑性、神经递质释放、学习记忆及认知功能等具有重要的调节作用^[3]。CREB 是 BDNF 介导基因表达的关键调节因子, BDNF 通过与其特异性受体 TrkB 结合, 引发受体的磷酸化反应, 进而激活一系列第二信使传导通路, 这些通路最终指向 CREB 的激活, 激活的 CREB 对受损神经元的修复过程起着促进作用, 有助于改善神经细胞病理状态, 并加速神经功能缺损的恢复进程^[4]。两者在 ASD 患儿大脑神经发育过程中的异常, 影响患儿的认知与行为功能^[5-6]。

捏脊疗法最早见于《肘后备急方·治卒腹痛方第九》记载:“拈取其脊骨皮深取痛引之, 从龟尾至顶, 乃止, 未愈更为之。”其独特之处在于医者运用捏、拿、提等一系列手法刺激背部督脉及两侧膀胱经。其中, 督脉“上至风府, 入属于脑”, 又为“阳脉之海”, 主导全身阳气运行, 又为滋养脑髓、充盈髓海的重要通道, 膀胱经与督脉交于头顶, 其分支“从巅入络脑”, 更有诸五脏六腑之背俞穴分布于背侧膀胱经。故捏脊疗法具有调理脏腑阴阳、行气和血、培固元气、通

督荣脑等功效, 是目前临床治疗小儿脑病常用的中医外治手法之一^[7]。团队前期研究表明, 捏脊疗法对 ASD 大鼠的社交及重复刻板样行为等具有明显的改善效果^[8], 且发现捏脊疗法可上调 ASD 大鼠海马区神经可塑性的相关蛋白^[9], 但尚未研究该疗法对多个相关脑区的同步影响。故本研究通过进一步监测抗癫痫药丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)诱导的 ASD 模型大鼠前额叶、海马及小脑 3 个脑区中 BDNF、CREB 蛋白表达以及其行为学变化, 探讨捏脊疗法改善 ASD 大鼠行为表征的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

本实验选取 6~8 周龄、SPF 级的 Wistar 大鼠作为实验对象, 雌雄各 15 只, 雌性体质量范围为 180~230 g, 雄性体质量为 250~300 g, 均购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物许可证号: SYXK(闽)2019-0007, 喂养于福建中医药大学实验动物中心。动物饲养条件: 恒定温度(22℃)、湿度(50%), 采用 12 h 光照与 12 h 黑暗的交替照明制度, 自由摄食与饮水, 普通饲料喂养。实验已通过福建中医药大学动物实验伦理委员会批准(伦理审批号: 2022-185)。

1.2 主要试剂与仪器

VPA(美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: P4543); 即用型 SABC-POD(小鼠/兔 IgG)免疫组织化学染色试剂盒、DAB 显色试剂盒、ECL 化学发光检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, 批号: SA1020、AR1027-3、AR1191); BCA 蛋白定量试剂盒、PAGE 凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限

公司,批号:P0010、PG112);一抗 BDNF(美国 Abcam 公司,批号:Ab108319);一抗 CREB、一抗 BDNF、山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:28792-1-AP、HZ-1335、SA0001-1、SA0001-2)。

旷场实验检测系统(上海欣软信息科技有限公司,型号:XR-XJ1117);生物组织自动脱水机(亚光医用电子技术有限公司,型号:ZT-14S1);石蜡切片机、倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司,型号:BIO-CUT、DMI8);多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司,型号:Multifunctional Enzyme Marker);电泳仪、ChemiDoc™ 成像系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:Mini-PROTEAN、ChemiDoc XRS+)。

1.3 模型制备与分组

ASD 大鼠模型制备参考 SCHNEIDER 等^[10]所采用的方法。将雌雄大鼠按照 1:1 比例进行配对合笼,次日清晨对雌鼠进行检查,一旦发现阴道栓脱落,记为孕 0.5 d,并立即将雌鼠与雄鼠分开单独饲养。根据随机数字表法,将全部孕鼠随机分配至造模组与空白对照组。造模组孕鼠于孕期第 12.5 天腹腔注射 VPA 溶液,剂量为 600 mg/kg,对出生后的 VPA 模型仔鼠进行一系列发育行为学检测(体质量、睁眼时间、方向趋向性功能测试、足底热痛试验、游泳试验),筛选出符合 ASD 特征的个体。而空白对照组孕鼠于同期接受等体积生理盐水注射,其产出的正常仔鼠作为空白对照。筛选合格的 VPA 模型仔鼠,利用随机数字表法平均分配至模型组和捏脊组,每组 6 只。同时,随机选取 6 只正常仔鼠作为空白组。

1.4 干预方法

捏脊疗法干预需两名实验人员参与,具体操作步骤为:实验者 A 佩戴毛线手套以固定仔鼠头部,而实验者 B 则参照临床捏脊疗法的操作规范,以双手拇指与食指指腹相对施力,自仔鼠尾根部沿脊中线向上捏提至大椎穴处(大鼠大椎穴位于后背正中第 7 颈椎与第 1 胸椎之间,参照唐勇主编的《实验针灸学》^[11]确定),此为 1 次捏脊操作。此过程需重复进行 21 遍,自第 3 遍起,每捏 3 次提 1 次。空白组和模型组仅模拟抓取固定,不进行捏脊疗法。干预疗程为 28 d。

1.5 旷场实验

干预完成后进行旷场实验。旷场箱为规格 70 cm×70 cm×40 cm 的黑色方形箱,确保实验环境光线为 80~100 lux 且无背景噪音干扰。实验箱上方设置相机进行录像。实验开始前,将待测大鼠提前 1 h

送入实验室以适应环境,选择大鼠非活跃时段(8:00—16:00)进行实验。实验操作时,将单只待测大鼠置于旷场箱指定位置后,记录大鼠 5 min 在旷场箱内的活动行为数据(包括总路程、站立次数、理毛次数)。

1.6 取材

旷场实验后次日进行取材。通过腹腔注射浓度为 0.3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)对大鼠进行麻醉,麻醉后沿腹中线剖开胸腔,以充分暴露心脏。随后剪开右心耳,用生理盐水缓慢灌注左心室,直至血液完全冲净,肺部及其他内脏呈现苍白。断头后剥离颅骨,使全脑得以充分显露,从嗅球部位将全脑完整剥离。最后将全脑沿中线一分为二:一半置入提前预冷好的 4%多聚甲醛中固定 24~36 h,待进行免疫组织化学检测;另一半则使用镊子钝性分离出海马组织,利用手术刀片切取前额叶与小脑组织,迅速将组织样本转移至-80℃冰箱冷冻。

1.7 指标检测

1.7.1 免疫组织化学法 对组织进行梯度脱水、透明、透蜡、包埋、切片、捞片、摊片和烤片。将完成包埋的蜡块取出进行切片,厚度为 4 μm。再依次放入二甲苯 I (15 min)、二甲苯 II (15 min)、100%乙醇 I (5 min)、100%乙醇 II (5 min)、95%乙醇(5 min)、80%乙醇(5 min)、70%乙醇(5 min)、纯水(5 min)进行脱蜡复水。接着浸入柠檬酸钠溶液中,加盖密封,加热至沸腾状态 20~25 min 后,取出冷却至室温,以 PBS 溶液清洗 3 次,每次 5 min。滴加 3%内源性过氧化物酶溶液孵育,结束后 PBS 溶液清洗 3 次,每次 5 min。后于 37℃烘箱孵育载玻片 20~30 min,同时滴加非特异性染色阻断剂。配制一抗(BDNF 1:400、CREB 1:400),滴至载玻片上后放入 4℃冰箱中孵育过夜。次日于 37℃恒温箱中复温 1 h,使用 PBS 溶液清洗 3 次,每次 5 min。此后,滴加生物素标记的羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物,室温孵育 30 min,再次用 PBS 溶液清洗 3 次,每次 5 min。最后,滴加链霉亲和素-生物素复合物,于室温下孵育 30 min,用 PBS 溶液清洗 3 次,每次 5 min。采用 DAB 染色法,配制显色液,显色完成后放入纯水中终止染色,后用苏木素复染、自来水反蓝。将切片经 80%乙醇(3 min)、95%乙醇(3 min)、100%乙醇 I (3 min)、二甲苯 I (3 min)、二甲苯 II (3 min)脱水,封片。最后使用光学显微镜拍摄,采用 Image J 软件计算平均光密度。

1.7.2 Western blot 检测 以 Western blot 检测大

鼠前额叶、海马、小脑组织区域中 BDNF、CREB 蛋白的相对表达量。6 只大鼠前额叶、海马、小脑组织分别加入对应体积的裂解液,充分研磨匀浆,取上清液。BCA 法测定蛋白浓度,根据所测得的蛋白浓度值制备凝胶,上样后按 10 V 电泳 20 min、80 V 电泳 15~20 min(跑完浓缩胶)、120 V 电泳 30~40 min(跑分离胶)的顺序进行电泳,恒流 400 mA 转膜 20~40 min,封闭 15~20 min 后孵育一抗(BDNF 1:2 000、CREB 1:12 000),再收入 4 ℃冰箱中孵育过夜。回收一抗后用 TBST 溶液洗涤 5 min,重复 3 次。接着加二抗试剂(兔抗 1:5 000、鼠抗 1:2 000)孵育 1 h,结束后用 TBST 溶液洗涤 5 min,重复 3 次。最后采用 Image J 图像分析软件分析各条带的平均吸光度。

1.8 统计学分析

数据分析采用 SPSS 24.0 统计软件进行处理,计量资料采用“ $\bar{x} \pm s$ ”进行表述。对于符合正态性的数据采取单因素方差分析,方差齐者采用 LSD 检验,方差不齐者采用 Games Howell 检验;不符合正态分布的数据采用非参数检验分析。以 $P < 0.05$ 判定差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠旷场实验检测结果

与空白组相比,模型组活动总路程出现显著增长($P < 0.01$)、理毛次数显著增多($P < 0.01$)、站立次数显著减少($P < 0.01$);与模型组相比,捏脊组活动总路程减少($P < 0.05$)、理毛次数减少($P < 0.05$)、站立次数增多($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 3 组大鼠的总路程、站立次数、理毛次数比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Comparison of total distance of activity, standing times, and grooming times among the three groups of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	总路程/mm	站立次数/次	理毛次数/次
空白组	26 178.42±1 483.71	32.83±2.30	2.33±0.61
模型组	34 155.75±1 428.31**	22.17±2.23**	5.50±0.76**
捏脊组	28 259.75±1 420.57 [#]	30.00±1.34 [#]	3.17±0.48 [#]

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$ 。

2.2 3 组大鼠脑组织 BDNF、CREB 蛋白免疫组织化学结果

2.2.1 3 组大鼠前额叶区 BDNF、CREB 蛋白结果

与空白组相比,模型组前额叶区 BDNF、CREB 蛋白阳性平均光密度显著减少($P < 0.01$);与模型组相比,捏脊组前额叶区 BDNF、CREB 蛋白阳性平均光密度显著增多($P < 0.01$)。详见表 2、图 1。

表 2 3 组大鼠前额叶区 BDNF、CREB 蛋白阳性平均光密度比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Comparison of average optical density of BDNF and CREB proteins in the prefrontal region among the three groups of rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	BDNF	CREB
空白组	0.34±0.01	0.91±0.07
模型组	0.28±0.01**	0.60±0.04**
捏脊组	0.34±0.01 ^{##}	1.05±0.04 ^{##}

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,^{##} $P < 0.01$ 。

2.2.2 3 组大鼠海马区 BDNF、CREB 蛋白结果 与空白组比较,模型组海马区 BDNF、CREB 蛋白阳性平均光密度显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,捏脊

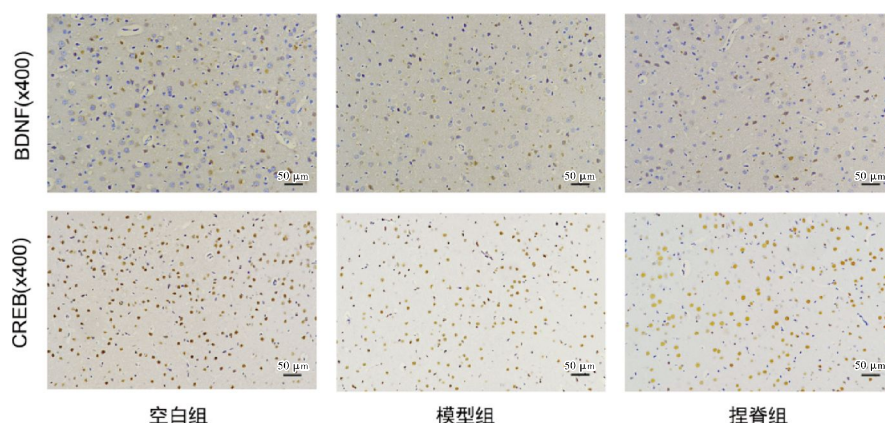


图 1 3 组大鼠前额叶区 BDNF、CREB 蛋白免疫组织化学图

Fig.1 Immunohistochemical images of BDNF and CREB proteins in the prefrontal region of the three groups of rats

组海马区 BDNF、CREB 蛋白阳性平均光密度增多($P<0.05$, $P<0.01$)。详见表 3、图 2。

表 3 3 组大鼠海马区 BDNF、CREB 蛋白阳性平均光密度比较($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Comparison of average optical density of BDNF and CREB proteins in the hippocampus region among the three groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	CREB CA1	CREB CA3	BDNF CA3
空白组	1.08±0.05	1.04±0.08	1.09±0.04
模型组	0.66±0.06**	0.52±0.05**	0.80±0.07**
捏脊组	0.98±0.07 [#]	0.76±0.05 [#]	1.07±0.05 [#]

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

2.2.3 3 组大鼠小脑区 BDNF、CREB 蛋白结果 与空白组比较,模型组小脑区 BDNF、CREB 蛋白阳性平均光密度减少($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,捏脊组小脑区 BDNF、CREB 蛋白阳性平均光密度显著增多($P<0.01$)。详见表 4、图 3。

2.3 3 组大鼠脑组织 BDNF、CREB 蛋白 Western blot 检测结果

2.3.1 3 组大鼠前额叶区 BDNF、CREB 蛋白结果 与空白组比较,模型组前额叶区 BDNF、CREB 蛋

表 4 3 组大鼠小脑区 BDNF、CREB 蛋白阳性平均光密度比较($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 4 Comparison of average optical density of BDNF and CREB proteins in the cerebellar region among the three groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	BDNF	CREB
空白组	0.56±0.04	0.97±0.07
模型组	0.34±0.03**	0.71±0.08*
捏脊组	0.51±0.03 [#]	1.14±0.07 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

白表达水平减少($P<0.05$);与模型组比较,捏脊组前额叶区 BDNF、CREB 蛋白表达水平增多($P<0.05$, $P<0.01$)。详见表 5、图 4。

表 5 3 组大鼠前额叶区 BDNF、CREB 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 5 Comparison of relative protein expressions of BDNF and CREB in the prefrontal region among the three groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	BDNF	CREB
空白组	0.98±0.04	0.97±0.02
模型组	0.83±0.04*	0.86±0.02*
捏脊组	0.96±0.04 [#]	0.99±0.04 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

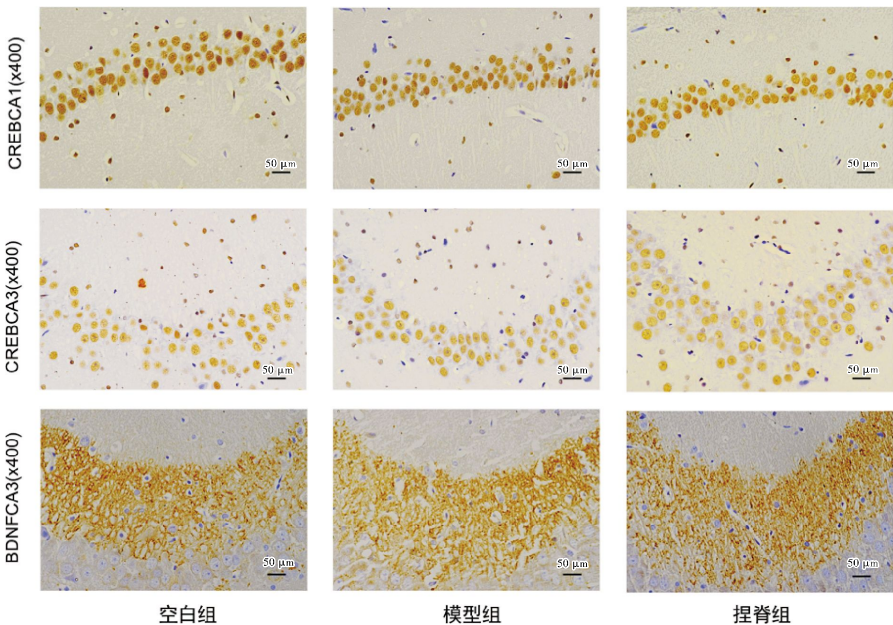


图 2 3 组大鼠海马区 BDNF、CREB 蛋白免疫组织化学图

Fig.2 Immunohistochemical images of BDNF and CREB proteins in the hippocampus region of the three groups of rats

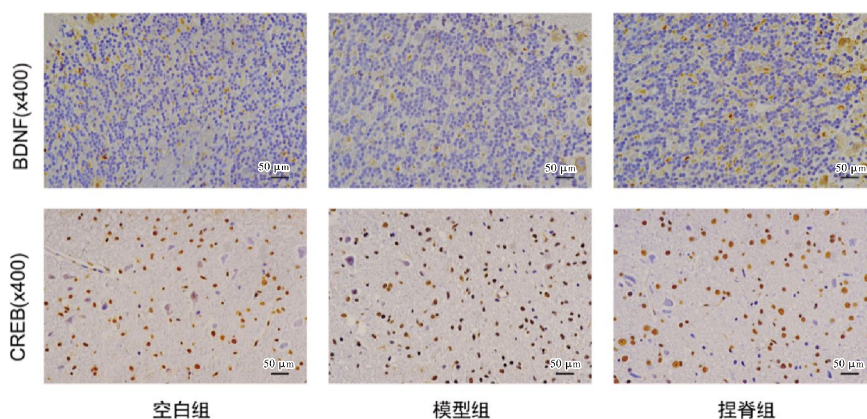


图 3 3 组大鼠小脑区 BDNF、CREB 蛋白免疫组织化学图

Fig.3 Immunohistochemical images of BDNF and CREB proteins in the cerebellar region of the three groups of rats

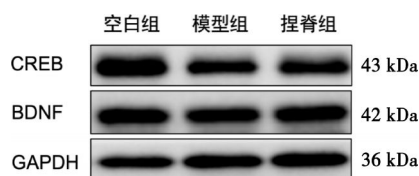


图 4 3 组大鼠前额叶区 BDNF、CREB 蛋白条带图

Fig.4 Protein bands of BDNF and CREB in the prefrontal region of the three groups of rats

2.3.2 3 组大鼠海马区 BDNF、CREB 蛋白结果 与空白组比较,模型组海马区 BDNF、CREB 蛋白表达减少($P<0.05$);与模型组比较,捏脊组海马区 BDNF、CREB 蛋白表达增多($P<0.05, P<0.01$)。详见表 6、图 5。

表 6 3 组大鼠海马区 BDNF、CREB 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Comparison of relative protein expressions of BDNF and CREB in the hippocampus region among the three groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	BDNF	CREB
空白组	0.99±0.04	1.01±0.02
模型组	0.86±0.04*	0.90±0.02*
捏脊组	1.05±0.05 [#]	1.02±0.04 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

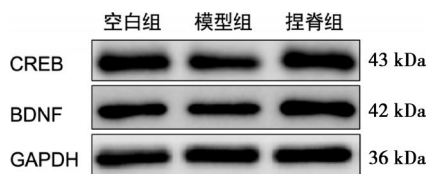


图 5 3 组大鼠海马区 BDNF、CREB 蛋白条带图

Fig.5 Protein bands of BDNF and CREB in the hippocampus region of the three groups of rats

2.3.3 3 组大鼠小脑区 BDNF、CREB 蛋白结果 与空白组比较,模型组小脑区 BDNF、CREB 蛋白表达减少($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,捏脊组小脑区 BDNF、CREB 蛋白表达增多($P<0.05, P<0.01$)。详见表 7、图 6。

表 7 3 组大鼠小脑区 BDNF、CREB 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Comparison of protein relative expressions of BDNF and CREB in the cerebellar region among the three groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	BDNF	CREB
空白组	1.04±0.02	0.95±0.04
模型组	0.82±0.01**	0.77±0.05*
捏脊组	0.97±0.01 ^{##}	0.92±0.09 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

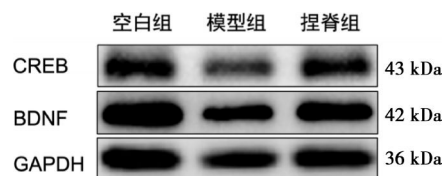


图 6 3 组大鼠小脑区 BDNF、CREB 蛋白条带图

Fig.6 Protein bands of BDNF and CREB in the cerebellar region of the three groups of rats

3 讨论

中医学病名中无“孤独症”,其相关症状可见于“童昏”“无慧”“胎弱”等范畴。ASD 之病机可析为本与标两层:本者,源自先天之不足,脑髓失于濡养;标者,系因肝气失于调畅,气血亏虚,加之脑络瘀阻、痰

浊等病理产物蒙蔽神明所致^[11]。现代医学认为,ASD属于神经发育障碍,发病的复杂性涉及遗传、环境及心理等多元因素的综合作用^[12]。而现代研究发现,ASD患儿行为异常与其不同脑区的神经生物学变化有关,例如海马、前额叶皮质、小脑等^[13]。团队前期实验发现,捏脊疗法可明显改善ASD大鼠的社交及重复刻板样行为^[8],并可调节其海马区神经可塑性^[9]。在此基础上,本研究进一步探究捏脊疗法对ASD大鼠多个出现异常变化脑区的同步影响作用。

VPA诱导的ASD模型大鼠存在较高的构建效度及可重复性,与ASD患儿的神经生物学以及临床表型存在高度相似性,是目前较为成熟的ASD动物模型^[14]。本研究发现,与空白组相比,模型组活动总路程出现显著增长、理毛次数显著增多、站立次数显著减少;与模型组相比,捏脊组活动总路程减少、理毛次数减少、站立次数增多。这一发现提示,捏脊疗法能够促进ASD模型大鼠对新环境的探索欲望,减少其刻板行为的发生,并有助于减轻焦虑状态。这些结果进一步支持了捏脊疗法在改善ASD相关行为症状方面的潜在作用。

BDNF作为脑内丰富且功能多样的神经营养因子,通过调节基因表达和细胞信号通路,指导神经元沿着特定谱系分化,形成具有特定功能的成熟神经元,不仅促进轴突生长、树突分支形成,还参与突触的形成与成熟,在神经网络的构建与功能整合、神经保护功能以及神经元生长发育过程中扮演着核心角色^[15]。大量研究证据揭示,ASD患儿体内BDNF的表达存在异常现象^[16],具体表现为ASD患儿血液中BDNF水平的显著下降^[17]。在ASD动物模型,尤其是大鼠模型中,同样观察到多个脑区BDNF表达量的显著降低^[18-19]。而BDNF基因敲除小鼠模型的研究进一步证实,BDNF缺乏会导致异常突触的发生,进而影响模型小鼠的认知与行为功能^[5]。CREB作为重要的核转录因子,是不同通路最后共同作用的蛋白,在中枢神经系统调控中承担核心角色,作为继发性于外源性刺激的信号蛋白能应激表达^[20],其生理功能在各系统中均有广泛表现,并参与介导了脑神经的保护作用^[21]。研究证明,抑制BDNF-CREB信号传导可能与围产期暴露于BDE-47和/或VPA引起的树突状损伤以及随之而来的ASD样行为有关^[22]。CREB作

为BDNF的转录激活因子,属于BDNF-ERK-CREB分子信号级联通路下游,该信号通路与ASD发病的生物学机制密切相关^[23]。本实验结果显示,VPA诱导的ASD大鼠前额叶、海马、小脑区域中均观察到BDNF与CREB蛋白表达水平的显著下降,这一现象提示这些脑区内神经递质的合成与释放在这个过程中受到抑制,导致突触间信息传递功能受损,神经细胞发育异常,进而引发一系列行为功能障碍。

BDNF广泛分布在哺乳动物的海马、大脑皮质和小脑等区域,其中海马与大脑皮质中的BDNF浓度尤为显著^[24]。对于神经系统疾病,针刺可以同时促进大脑海马、皮质及小脑等区域中BDNF的表达量,经由不同通路最后共同作用于CREB,使其磷酸化,从而促进神经再生,并在多个脑区中产生效应,其机制可能与调控BDNF/CREB信号途径关键分子的表达与功能有关,促进神经元的恢复而发挥干预神经系统疾病的作用^[25]。考虑到团队前期研究主要聚焦于海马区^[9,21,26],本研究扩大了观察范围,纳入前额叶和小脑区。本实验结果显示,ASD模型大鼠经过捏脊疗法干预后,其前额叶、海马、小脑区的BDNF与CREB蛋白表达均上调,提示捏脊疗法能有效地对多个脑区神经可塑性相关蛋白产生积极影响。

综上所述,捏脊疗法作为一种非药物干预手段,展现出对ASD大鼠重复刻板行为及焦虑症状的改善潜力,这一作用机制可能与捏脊疗法引发的特定脑区生物标志物上调有关,即前额叶、海马、小脑区域内BDNF、CREB等关键蛋白含量的提升。本研究的局限性在于捏脊疗法干预采用人工手法进行,忽略了捏脊疗法的力度、刺激强度等规范化问题,有待后续研究进一步规范与标准化。

参考文献

- [1] 邓明显, 劳世艳. 自闭症谱系障碍的临床研究新进展(DSM-5新标准)[J]. 中国健康心理学杂志, 2016, 24(4): 481-490.
- [2] 刘 纽, 熊 信, 薛亚奇, 等. 认知功能障碍: 运动、孤独症和脑源性神经营养因子的相互作用[J]. 生物学杂志, 2024, 41(4): 94-101.
- [3] REIM D, SCHMEISSER M J. Neurotrophic factors in mouse models of autism spectrum disorder: Focus on BDNF and IGF-1[J]. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 2017, 224: 121-134.

- [4] 曾 端, 于文娟, 李华芳. 脑源性神经营养因子及相关通路在抗抑郁药中的研究进展[J]. 临床精神医学杂志, 2017, 27(5): 347-350.
- [5] POZZO-MILLER L D, GOTTSCHALK W, ZHANG L, et al. Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice[J]. The Journal of Neuroscience, 1999, 19(12): 4972-4983.
- [6] TYLER W J, POZZO-MILLER L D. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses[J]. The Journal of Neuroscience, 2001, 21(12): 4249-4258.
- [7] 杨 蕾, 李 静. 捏脊在儿科疾病中的临床应用进展[J]. 中医药导报, 2021, 27(3): 164-166, 170.
- [8] 龚梦华, 吴倩雯, 李一纯, 等. 捏脊疗法对自闭症模型大鼠焦虑样行为及 NF- κ B 通路的影响[J]. 云南中医中药杂志, 2023, 44(4): 81-85.
- [9] 吴倩雯. 捏脊对自闭症模型大鼠海马 NF- κ B 信号通路的影响[D]. 福州: 福建中医药大学, 2020.
- [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] 唐 勇. 实验针灸学[M]. 3 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2021: 146.
- [12] 郝宏文, 刘 奕, 卫 利, 等. 王素梅治疗儿童自闭症经验[J]. 中医杂志, 2016, 57(1): 19-21.
- [13] 南 洁, 崔军武, 董效军, 等. 自闭症研究动向综述[J]. 系统医学, 2018, 3(11): 187-189.
- [14] MORIMOTO M, HASHIMOTO T, TSUDA Y, et al. Assessment of oxidative stress in autism spectrum disorder using reactive oxygen metabolites and biological antioxidant potential[J]. PLoS One, 2020, 15(5): e0233550.
- [15] 吴 吉, 郝兴宇, 叶 勇, 等. 基于 BDNF/TrkB/CREB 通路研究六味地黄丸对丙戊酸钠诱导的孤独症谱系障碍模型小鼠的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(2): 176-184.
- [16] 杨恩璐, 孙秉贵. BDNF 及其下游通路 GABA 能神经元发育相关性的研究进展[J]. 生命科学, 2020, 32(6): 544-550.
- [17] FRANCIS K, DOUGALI A, SIDERI K, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in children with ASD and their parents: A 3-year follow-up[J]. Acta Psychiatrica Scandinavica, 2018, 137(5): 433-441.
- [18] COKYAMAN T, KASAP T, ŞEHİTOĞLU H. Serum brain-derived neurotrophic factor in the diagnosis of febrile seizure[J]. Pediatrics International, 2021, 63(9): 1082-1086.
- [19] 张学君, 黄倩茹, 洪 霖, 等. 电针长强穴对自闭症大鼠海马 CA3 区 BDNF 蛋白表达的影响[J]. 康复学报, 2018, 28(4): 27-31.
- [20] 党媛媛, 倪金凤, 刘国玉, 等. 雷帕霉素对自闭症小鼠神经、社交行为及海马区 BDNF、Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 山东医药, 2017, 57(48): 40-42.
- [21] 林 燊, 林 栋, 齐诗仪, 等. 电针不同刺激时长对自闭症大鼠 BDNF-CREB 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(7): 4063-4069.
- [22] 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.
- [23] LI Z X, YOU M D, CHE X Y, et al. Perinatal exposure to BDE-47 exacerbated autistic-like behaviors and impairments of dendritic development in a valproic acid-induced rat model of autism[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 212: 112000.
- [24] 李晨梦. 博尔纳病毒调节 ERK-CREB-BDNF 信号通路导致大鼠成年后焦虑样及自闭症样行为[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.
- [25] 李家鑫, 韦斌垣. BDNF 基因功能性多态 rs6265 与孤独症儿童的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(16): 28-31.
- [26] 齐诗仪, 黄晓真, 林 燊, 等. 电针命门穴对 FMR1 基因敲除小鼠自主行为及海马 CREB 蛋白表达的影响[J]. 福建中医药, 2019, 50(3): 61-65.

(本文编辑 匡静之)