基于针灸“治神”理论探讨正、负性状态下电针对孤独症谱系障碍模型大鼠的干预效应差异及其多脑区联动特征

陈兰芳[1,2],黄莹[1],吴江昀[3],齐诗仪[1],吴强[1],林丽莉[4],林栋[1,2]*

1.福建中医药大学针灸推拿学院,福建 福州 350108;2.福建中医药大学附属第三人民医院,福建 福州 350108;

3.福建中医药大学康复医学院,福建 福州 350108;4.福建中医药大学附属康复医院,福建 福州 350003

〔**摘要**〕**目的** 观察正、负性状态下电针长强穴对孤独症谱系障碍(ASD)模型大鼠社交行为及海马、杏仁核、小脑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,探讨机体状态对电针干预效应的调节作用。**方法** 于妊娠第12.5天时,取16只妊娠母鼠腹腔注射丙戊酸钠(VPA)溶液(浓度:250 mg/mL,剂量:600 mg/kg),其子代大鼠即为ASD模型大鼠;另取4只妊娠母鼠接受等体积的生理盐水腹腔注射,其子代大鼠即为正常大鼠。对ASD模型大鼠进行发育行为学检测(指标包括体质量、睁眼评分、方向趋向性功能检测、足底热刺痛实验)测定,以判断模型构建是否成功。[将造模成功的ASD大鼠分为模型组、即刻组、正性状态组、正性状态即刻组、正性状态0.5 h组及正性状态1 h组,另设6只正常大鼠为空白组,除空白组、模型组外,其余各组均通过挠痒刺激(15 s挠痒刺激和15 s无刺激交替进行,总时长5 min,1次/d,连续6 d)建立正性状态],采用旷场实验进行检测,以确定正性状态最佳诱导方案。将36只ASD模型大鼠随机分为模型组、电针(EA)组、正性状态(PA)组、正性状态+电针(PA+EA)组、负性状态(NA)组、负性状态+电针(NA+EA)组,每组6只;另设6只正常大鼠为空白组。通过挠痒刺激建立正性状态,足底电击法(电压40 V,单次刺激持续1 s,相邻两次刺激间隔15 s,共刺激20次,总时长5 min,1次/d,连续6 d)建立负性状态,正、负性状态建立后予旷场实验进行评估。正、负性状态建立次日行电针干预:取长强穴,以0.5寸毫针沿尾椎方向斜刺,进针约2 mm,连接电针仪(连续波,频率2 Hz、强度2 mA,通电30 min)进行干预,1次/d,连续7 d。PA+EA组、NA+EA组每天先建立正、负性状态再行电针干预;PA组、NA组每天先建立正、负性状态再给予同等时长固定;EA组每天行电针干预;正常组、模型组每天给予同等时长固定。采用三箱社交试验评估社交行为,免疫组化检测杏仁核、海马、小脑BDNF、CREB蛋白平均光密度,并结合重复测量轮廓分析评估多脑区联动特征。**结果** 与空白组比较,模型组在出生后第7天、第14天及第21天体质量均显著降低($P<0.01$),在出生后第15天、第16天睁眼评分均显著降低($P<0.01$),在出生后第7~10天转体时间均延长($P<0.05$,$P<0.01$),在出生后第9天、第11天及第15天缩足潜伏期均显著延长($P<0.01$)。与空白组比较,模型组总移动距离、跨格次数均显著减少($P<0.01$);[与模型组比较,即刻组总移动距离增加($P<0.05$),正性状态即刻组、正性状态0.5 h组总移动距离、跨格次数均增加($P<0.05$,$P<0.01$)],其中正性状态即刻组增加趋势最明显。与空白组比较,模型组总移动距离、跨格次数均显著减少($P<0.01$);与模型组、NA组比较,PA组总移动距离、跨格次数均显著增加($P<0.01$)。与空白组比较,模型组社交时间显著降低($P<0.01$);与模型组比较,EA组、PA组、PA+EA组、NA+EA组社交时间均升高($P<0.05$,$P<0.01$);与NA组比较,EA组、PA组社交时间均显著升高($P<0.01$);与NA+EA组比较,EA组、PA组社交时间均升高($P<0.05$)。在杏仁核中,与空白组比较,模型组BDNF蛋白平均光密度显著降低($P<0.01$);与PA+EA组比较,NA+EA组BDNF蛋白平均光密度显著降低($P<0.01$)。在海马中,与空白组比较,模型组BDNF、CREB蛋白平均光密度均显著降低($P<0.01$);与PA+EA组比较,NA组BDNF、CREB蛋白平均光密度均降低($P<0.05$,$P<0.01$),NA+EA组CREB蛋白平均光密度降低($P<0.05$)。在小脑中,与空白组比较,模型组CREB蛋白平均光密度显著降低($P<0.01$);与PA+EA组比较,NA组、NA+EA组BDNF蛋白平均光密度均显著降低($P<0.01$)。PA组与PA+EA组杏仁核、海马、小脑蛋白平均光密度表达轮廓平行($F=0.342$,$P=0.719$)且重合($F=0.438$,$P=0.523$),趋势为:小脑>杏仁核>海马;NA组与NA+EA组蛋白平均光密度表达轮廓不平行($F=10.955$,$P=0.004$)。PA组与PA+EA组杏仁核、海马、小脑蛋白平均光密度表达轮廓平行($F=0.321$,$P=0.733$)而不重合($F=6.888$,$P=0.025$),趋势为:海马>杏仁核>小脑;NA组与NA+EA组杏仁核、海马、小脑蛋白平均光密度表达轮廓平行($F=0.668$,$P=0.537$)且重合($F=1.471$,$P=0.235$),趋势为:杏仁核>海马>小脑。**结论** 正、负

〔**收稿日期**〕2026-04-17

〔**基金项目**〕福建省自然科学基金面上项目(2024J01136);福建中医药大学2024年度针灸学科开放课题项目(XZJ2024001);福建中医药大学校管课题临床专项(XB2024040)。

〔**通信作者**〕* 林栋,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:bluelike1@sina.com。

性状态下电针长强穴均可显著改善ASD模型大鼠的社交功能,其机制涉及海马、杏仁核和小脑协同激活BDNF-CREB信号通路。

〔关键词〕针灸状态;治神;孤独症谱系障碍;长强;脑源性神经营养因子;环磷酸腺苷效应元件结合蛋白;多脑区联动
〔中图分类号〕R245　　〔文献标志码〕A

Differential intervention effects of electroacupuncture on autism spectrum disorder model rats under positive and negative states and the multi-brain-region coordination characteristics based on the acupuncture theory of "treating the spirit"

*CHEN Lanfang[1,2], HUANG Ying[1], WU Jiangyun[3], QI Shiyi[1], WU Qiang[1], LIN Lili[4], LIN Dong[1,2]**

1. School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350108, China; 2. The Third Affiliated People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350108, China; 3. School of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350108, China; 4. The Affiliated Rehabilitation Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China

〔**Abstract**〕 **Objective** To observe the effects of electroacupuncture (EA) at Changqiang (GV1) on social behavior and on the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and cAMP response element-binding protein (CREB) in the hippocampus, amygdala, and cerebellum of autism spectrum disorder (ASD) model rats under positive and negative affective states (hereafter referred to as positive and negative states), and to investigate the modulatory effect of organismic state on the intervention effects of EA. **Methods** On gestational day 12.5, 16 pregnant rats were intraperitoneally injected with sodium valproate (VPA) solution (250 mg/mL, 600 mg/kg), and their offspring served as ASD model rats; another 4 pregnant rats received an intraperitoneal injection of an equal volume of normal saline, and their offspring served as normal control rats. The ASD model rats underwent developmental behavioral assessment (including body weight, eye-opening score, negative geotaxis test, and plantar thermal withdrawal test) to determine whether modeling was successful. Successfully modeled ASD rats were divided into the model group, immediate group, positive-state group, positive-state immediate group, positive-state 0.5 h group, and positive-state 1 h group. Another 6 normal control rats were assigned to the blank group. Except for the blank and model groups, all other groups underwent tickling stimulation (15 s of tickling alternating with 15 s without stimulation, for a total of 5 min per session, once daily for 6 consecutive days) to establish a positive state, and the open-field test was used to determine the optimal protocol for inducing the positive state. In the formal experiment, 36 ASD model rats were randomly divided into the model, EA, positive-affect (PA), PA+EA, negative-affect (NA), and NA+EA groups, with 6 rats in each group; another 6 normal rats were assigned to the blank group. A positive state was induced by tickling stimulation and a negative state by foot shock (40 V, 1 s per stimulation, 15 s interval between adjacent stimulations, 20 stimulations, with a total duration of 5 min, once daily for 6 consecutive days), and the positive and negative states were evaluated by the open-field test after induction. On the day after the induction of the positive and negative states, EA was performed: a 0.5-cun filiform needle was inserted obliquely about 2 mm at Changqiang (GV1) along the direction of the coccyx and connected to an electroacupuncture apparatus with continuous wave at 2 Hz and 2 mA for 30 min, once daily for 7 consecutive days. The PA+EA and NA+EA groups were subjected to state induction followed by EA daily; the PA and NA groups were subjected to state induction followed by immobilization for the same duration; the EA group received EA alone daily; and the blank and model groups received immobilization for the same duration daily. Social behavior was assessed by the three-chamber social test; the mean optical density (MOD) of BDNF and CREB proteins in the amygdala, hippocampus, and cerebellum was measured by immunohistochemistry; and multi-brain-region coordination was evaluated by repeated-measures profile analysis. **Results** Compared with the blank group, the model group showed significantly decreased body weight on postnatal days 7, 14, and 21 ($P<0.01$), significantly decreased eye-opening scores on postnatal days 15 and 16 ($P<0.01$), prolonged turning time on postnatal days 7 to 10 ($P<0.05$, $P<0.01$), and significantly prolonged paw withdrawal latency on postnatal days 9, 11, and 15 ($P<0.01$). Compared with the blank group, the model group showed significantly reduced total distance traveled and number of grid crossings ($P<0.01$); compared with the model group, the immediate groups showed increased total distance traveled($P<0.05$), the positive-state immediate, and positive-state 0.5 h groups showed increased total distance traveled and number of grid crossings ($P<0.05$, $P<0.01$), among which the positive-state immediate group showed the most obvious increasing trend. Compared with the blank group, the model group showed significantly reduced total distance traveled and

number of grid crossings (P<0.01); compared with the model and NA groups, the PA group showed significantly increased total distance traveled and number of grid crossings (P<0.01). Compared with the blank group, the model group showed significantly reduced social interaction time (P<0.01); compared with the model group, the EA, PA, PA+EA, and NA+EA groups showed increased social interaction time (P<0.05, P<0.01); compared with the NA group, the EA and PA groups showed significantly increased social interaction time (P<0.01); compared with the NA+EA group, the EA and PA groups showed increased social interaction time (P<0.05). In the amygdala, compared with the blank group, the model group showed a significantly decreased MOD of BDNF (P<0.01); compared with the PA+EA group, the NA+EA group showed a significantly decreased MOD of BDNF (P<0.01). In the hippocampus, compared with the blank group, the model group showed significantly decreased MODs of BDNF and CREB (P<0.01); compared with the PA+EA group, the NA group showed significantly decreased MODs of BDNF and CREB (P<0.05, P<0.01), and the NA+EA group showed a significantly decreased MOD of CREB (P<0.05). In the cerebellum, compared with the blank group, the model group showed a significantly decreased MOD of CREB (P<0.01); compared with the PA+EA group, the NA and NA+EA groups showed significantly decreased MODs of BDNF (P<0.01). For BDNF, the MOD-based expression profiles in the amygdala, hippocampus, and cerebellum were parallel (F=0.342, P=0.719) and coincident (F=0.438, P=0.523) between the PA and PA+EA groups, with a trend of cerebellum > amygdala > hippocampus; the profiles were not parallel between the NA and NA+EA groups (F=10.955, P=0.004). For CREB, the MOD-based expression profiles in the amygdala, hippocampus, and cerebellum were parallel (F=0.321, P=0.733) but not coincident (F=6.888, P=0.025) between the PA and PA+EA groups, with a trend of hippocampus > amygdala > cerebellum; the profiles were parallel (F=0.668, P=0.537) and coincident (F=1.471, P=0.235) between the NA and NA+EA groups, with a trend of amygdala > hippocampus > cerebellum. **Conclusion** EA at Changqiang (GV1) under both positive and negative states can significantly improve the social function of ASD model rats, and the mechanism involves the coordinated activation of the BDNF-CREB signaling pathway in the hippocampus, amygdala, and cerebellum.

〔**Keywords**〕 acupuncture state; treating the spirit; autism spectrum disorder; Changqiang (GV1); brain-derived neurotrophic factor; cAMP response element-binding protein; multi-brain-region coordination

针灸“治神”理论历来为医家所重视,其贯穿针刺全过程,是影响针刺效应的关键因素[1]。《素问·宝命全形论篇》曰“凡刺之真,必先治神,五脏已定,九候已备,后乃存针”,强调施针前需详审患者神气状态,因其关乎经气感应与疗效发挥。针灸临床研究发现,人体机能状态可显著影响针刺效应[2];不同状态下,针刺亦可诱发不同得气针感[3]。然而,现代研究多聚焦于不同病理状态[4],对心理状态调控针刺效应的作用关注不足,若忽略患者心理因素,可能低估针刺疗效,甚至得出针刺低于安慰针对照组的结论[5-6]。因此,本课题组提出“针灸状态学”理论,认为不同的状态能够影响针刺效应,激发不同的中枢响应机制,从而提高或降低针灸临床疗效。

为建立可操作的状态模型,本研究采用挠痒手法建立正性状态,以足底电击建立负性状态。前者可模拟大鼠社交打闹行为,诱发 50 kHz 超声波发声,该类发声与奖赏反馈密切相关,被认为是大鼠的“笑声”,是诱导正性情绪的有效方法[7]。相反,足底电击作为非条件性厌恶刺激,可稳定诱发 22 kHz 超声波发声,该类发声是公认反映疼痛、恐惧及负性情绪的可靠指标[8]。

本研究进一步以孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)为载体,探讨状态对针刺效应的调控。ASD 以社交障碍、刻板行为等为主要症状[9],目前尚无特定治疗方案。中医“病变在脑,首取督脉”,长强穴作为督脉之起始穴与络穴,具有通调督脉、醒脑开窍之功。前期研究表明,针刺长强穴可上调 ASD 模型大鼠前额叶皮层缝隙连接蛋白的表达[10],激活 Wnt/β-catenin、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)等多条信号通路[11-13],促进突触可塑性,提示该穴可能是改善 ASD 行为异常的关键靶点。然而,临床发现,不同患儿对待治疗可表现为不同的临床状态,而不同状态间的临床干预疗效则大相径庭[14]。据此,定义 ASD 模型大鼠的正、负性状态,正性状态代表愉悦、积极的情绪状态,而负性状态代表悲伤、恐惧、消极的情绪状态。通过在不同状态诱导下实施电针干预,模拟 ASD 患儿在临床接受针刺治疗时的两种典型情绪状态,观察正、负性状态下,电针对 ASD 模型大鼠社交行为及杏仁核、海马、小脑 BDNF、CREB 表达的影响,并结合重复测量轮廓分析,从多脑区联动视角揭示不同状态下针刺效应的中枢机制,以期丰富针灸“治神”的现代理论内涵。

1 材料与方法

1.1 实验动物

将体质量 180~200 g 的 Wistar 大鼠(40 只,4~6 周,雄性各半)饲养于 12 h 光照/12 h 黑暗循环、相对湿度 40%~60%、温度(22±1) ℃的环境中。本研

究已通过福建中医药大学动物伦理委员会批准(伦理审查号:FJTCM IACUC2023113),实验过程严格遵循其各项规章制度。

1.2 主要药物与试剂

丙戊酸钠[批号:1069-66-5,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司];兔抗 CREB、兔抗 BDNF、山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG(批号:12208-1-AP、28205-1-AP、SA00004-2、SA00001-1, 武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器

电针治疗仪(型号:SDZ-II,苏州医疗用品厂有限公司);热刺痛仪(型号:PL-200,成都泰盟科技有限公司);旷场实验视频分析系统(型号:XR-XZ301,上海欣软信息科技有限公司);正置荧光显微镜[型号:Eclipse Ci,尼康仪器(中国)有限公司];显微图像采集系统[型号:DFC450 C,徕卡显微系统(上海)贸易有限公司]。

1.4 ASD 模型大鼠制备

参照文献[15]制备 ASD 模型。Wistar 大鼠适应性饲养 1 周后,按雌雄 1:1 合笼过夜,次日检查雌鼠是否出现淡黄色透明阴栓,若发现淡黄色透明阴栓则记为该雌鼠妊娠第 0.5 天,并分笼饲养。于妊娠第 12.5 天时,取 16 只妊娠母鼠腹腔注射丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)溶液(浓度:250 mg/mL,剂量:600 mg/kg),其子代大鼠作为候选模型大鼠。对子代大鼠进行发育行为学测定(包括体质量、睁眼评分、方向趋向性功能检测、足底热刺痛实验),依据 ASD 典型表型筛选 36 只大鼠用于后续状态建立探索。另取 4 只妊娠母鼠在妊娠第 12.5 天时,接受等体积的生理盐水腹腔注射,其子代大鼠即为正常大鼠。

1.5 正性状态诱导方案探索

参照文献[16]采用挠痒刺激建立大鼠正性状态,方法如下:以 15 s 挠痒刺激和 15 s 无刺激交替进行,总时长 5 min,1 次/d,连续 6 d。其中“15 s 挠痒刺激”操作如下:手指在大鼠颈背部轻快挠动 2~3 s,随后将拇指、中指及大拇指从其腋下环至前胸,将大鼠举起至高度刚好能让其迅速仰面翻转,按住其身体,手指快速有力地在其胸腹部挠动后松开。保证 15 s 挠痒刺激周期内重复上述翻转-挠痒 3~4 次。

采用旷场实验检测大鼠正性状态,分组如下。ASD 模型大鼠随机分为 6 组,每组 6 只。(1)模型组:不接受挠痒刺激,每天给予同等时间的模拟抓取,于出生后第 26 天行旷场实验;(2)即刻组:于出生后第 26 天接受挠痒刺激 1 次,刺激结束后即刻行旷场实验;(3)正性状态组:于出生后第 21~25 天接受挠痒刺激,每天 1 次,于出生后第 26 天行旷场实验;(4)正性状态即刻组、正性状态 0.5 h 组及正性状态 1 h组:均于出生后第 21~26 天接受挠痒刺激,每天 1 次,并分别于末次挠痒结束后即刻、0.5 h 及 1 h 行旷场实验。另设 6 只正常大鼠为空白组,每天仅模拟抓取。

1.6 分组与干预

1.6.1 分组 将 36 只 ASD 模型大鼠随机分为模型组、电针(electroacupuncture, EA)组、正性状态(positive affectivity, PA)组、正性状态+电针(PA+EA)组、负性状态(negative affectivity, NA)组、负性状态+电针(NA+EA)组,每组 6 只;另随机挑选 6 只正常大鼠作为空白组。

1.6.2 干预 正性状态建立参照“1.5”的方法;负性状态建立参考足底电击法:将大鼠单独置于电击箱栅格底板上,给予足底电击(电压 40 V,单次刺激持续 1 s,相邻两次刺激间隔 15 s,共刺激 20 次,总时长 5 min,1 次/d,连续 6 d)[17]。正、负性状态建立后通过旷场实验进行评估。正、负性状态建立次日行电针干预。采用自制双极针,将大鼠固定于实验鼠板后,取长强穴,以 0.5 寸毫针沿尾椎方向斜刺,进针约2 mm;连接电针仪进行干预(连续波,频率 2 Hz、强度 2 mA,通电 30 min),1次/d,连续 7 d。PA+EA 组、NA+EA 组每天先建立正、负性状态再行电针干预,PA组、NA 组每天先建立正、负性状态再给予同等时长固定,EA 组每天行电针干预,空白组、模型组每天给予同等时长固定。

1.7 检测指标与方法

1.7.1 发育行为学检测 (1)体质量测定:于出生后第 7、14、21 天称量各组大鼠的体质量。(2)睁眼评分:于出生后第 12~16 天观察各组大鼠的睁眼情况,评分标准:0 分,双眼均未睁开;1 分,仅单只眼睛睁开;2 分,双眼均已睁开。(3)方向趋向性功能检测:于出生后第 7~10 天,将大鼠头朝下置于 25°平滑斜台上,记录其 60 s 内成功转身180°所需时间,超时未完成者记为 60 s。(4)足底热刺痛实验:于出生后第 9、11、13、15 天,将大鼠左后肢足底对准热刺痛仪红外光源(强度 30%),记录从照射开始至大鼠因痛感抬足的时间,以此作为缩足潜伏期,截止时间为 30 s,以防组织烫伤。

1.7.2 旷场实验 采用旷场实验评估情绪状态,以验证正、负性状态建立是否成功。焦虑应激通常导致大鼠总移动距离与跨格次数减少[18],而积极情绪则

使其增加[19]。于出生后第 26 天将大鼠单独放入旷场实验箱中,在无干扰状态下任其自由探索 5 min,利用自动行为追踪与分析系统采集总移动距离与跨格次数。

1.7.3 三箱社交实验 采用三箱社交实验评估大鼠社交行为。实验被划分为 5 min 适应阶段和 5 min 社交行为阶段,具体如下。适应阶段:将实验大鼠置于三室装置的中间室,任其通过活动门自由穿梭于 3 个相互连接的箱室,5 min 后取出大鼠,完成适应阶段实验;社交行为阶段:在两侧附属箱内分别放入同品种、性别以及同日龄的非同笼陌生大鼠和一个陌生未知物体,将实验大鼠置于三室装置的中间室,任其对整个三室环境展开自发性探索行为,5 min 后取出大鼠,完成社交阶段实验[20]。于出生后第 33 天行三箱社交实验。

1.7.4 组织取材 于出生后第 34 天,大鼠经异氟烷麻醉后开胸,完全暴露心脏,以 0.9%氯化钠溶液灌流后断头,剥离头皮,去除颅骨,将大脑沿矢状中线切开,取半侧大脑置于 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片(厚度为 4 μm)。

1.7.5 免疫组化检测杏仁核、海马、小脑 BDNF、CREB 蛋白平均光密度 切片经常规脱蜡、梯度乙醇复水后行抗原修复:将切片浸入柠檬酸钠缓冲液,微波高火加热至沸腾后改为低火维持 20 min,随后自然冷却至室温。PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加 3%H_2O_2,室温孵育 10 min;5%BSA 于 37 ℃封闭 30 min;滴加 100 μL BDNF(1∶200)、CREB(1∶200)一抗 4 ℃孵育过夜;次日室温平衡 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加 100 μL 生物素标记山羊抗小鼠/兔 IgG(1∶200),37 ℃孵育 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加SABC,37 ℃孵育 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加 DAB 显色液显色,纯水终止反应;苏木素复染,纯水洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。于光学显微镜下观察及拍摄,采用 ImageJ 软件对摄取图片的蛋白平均光密度进行测量。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行分析,Graphpad Prism 5.0 软件绘制统计图。连续型计量资料采用 *Shapiro-Wilk* 法检验正态性,*Levene* 法检验方差齐性。符合正态分布且方差齐的数据以“$\bar{x}\pm s$”表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间差异有统计学意义时采用 *LSD* 法进行两两比较;多脑区联动特征采用重复测量轮廓分析,包括平行性、重合性与水平性检验。所有假设检验均为双侧检验,检验水准 α=0.05,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ASD 模型大鼠发育行为学指标比较

与空白组比较,模型组在出生后第 7 天、第 14 天及第 21 天,体质量均显著降低(P<0.01);在出生后第 15 天及第 16 天,睁眼评分均显著降低(P<0.01);在出生后第 7~10 天,转体时间均显著延长(P<0.05,P<0.01);在出生后第 9 天、第 11 天及第 15天,缩足潜伏期均显著延长(P<0.01)。上述结果提示ASD 大鼠模型建立成功。详见图 1。

2.2 正性状态诱导方案探索中各组大鼠旷场行为比较

与空白组比较,模型组总移动距离、跨格次数均显著减少(P<0.01)。与模型组比较,即刻组总移动距离增加(P<0.05),正性状态即刻组、正性状态 0.5 h 组总移动距离、跨格次数均增加(P<0.05,P<0.01),其中正性状态即刻组增加趋势最明显。因此,选择正性状态即刻组作为后续正性状态建立方法。详见图 2。

2.3 正、负性状态诱导后各组大鼠旷场行为比较

与空白组比较,模型组总移动距离、跨格次数均显著减少(P<0.01);与模型组、NA 组比较,PA 组总移动距离、跨格次数均显著增加(P<0.01)。详见图 3。

2.4 各组大鼠三箱社交行为比较

与空白组比较,模型组社交时间显著降低(P<0.01);与模型组比较,EA 组、PA 组、PA+EA 组、NA+EA 组社交时间均升高(P<0.05,P<0.01);与 NA 组比较,EA 组、PA 组社交时间均显著升高(P<0.01);与NA+EA 组比较,EA 组、PA 组社交时间均升高(P<0.05)。详见图 4。

2.5 各组大鼠杏仁核、海马、小脑 BDNF、CREB 蛋白平均光密度比较

在杏仁核中,与空白组比较,模型组 BDNF 蛋白平均光密度显著降低(P<0.01);与 PA+EA 组比较,NA+EA 组 BDNF 蛋白平均光密度显著降低(P<0.01)。在海马中,与空白组比较,模型组 BDNF、CREB 蛋白平均光密度均显著降低(P<0.01);与 PA+EA 组比较,NA 组 BDNF、CREB 蛋白平均光密度均降低(P<0.05,P<0.01),NA+EA 组 CREB 蛋白平均光密度降低(P<0.05)。在小脑中,与空白组比较,模型组CREB

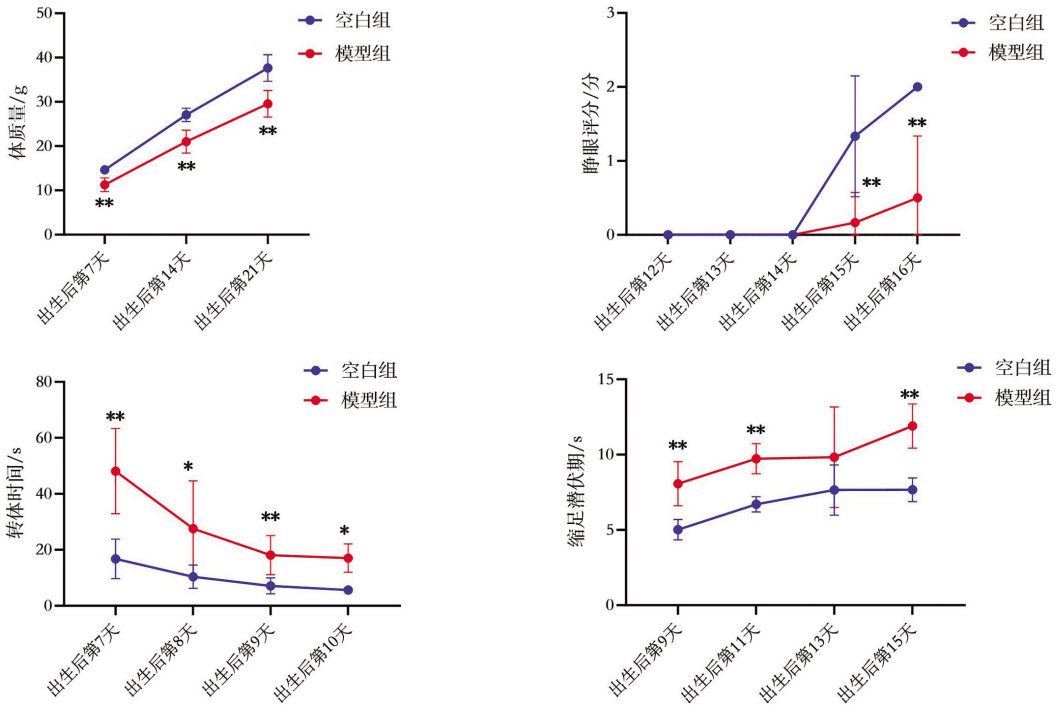


图 1　各组大鼠体质量、睁眼评分、转体时间及缩足潜伏期比较($\bar{x}\pm s$, n=6)

Fig.1　Comparison of body weight, eye-opening score, turning time, and paw withdrawal latency among groups of rats ($\bar{x}\pm s$, n=6)

注：与空白组比较，*P<0.05，**P<0.01。

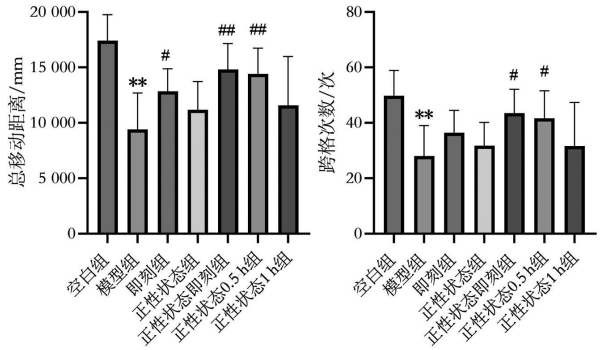


图 2　各组大鼠总移动距离、跨格次数比较($\bar{x}\pm s$, n=6)

Fig.2　Comparison of total distance traveled and number of crossings among groups of rats ($\bar{x}\pm s$, n=6)

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

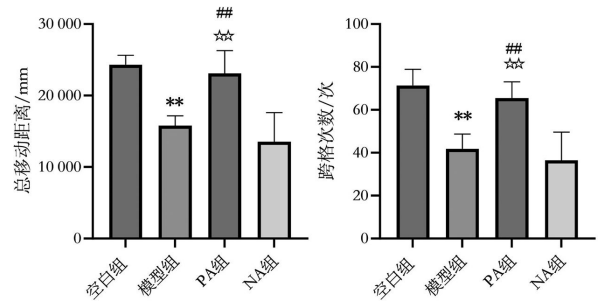


图 3　各组大鼠总移动距离、跨格次数比较($\bar{x}\pm s$, n=6)

Fig.3　Comparison of total distance traveled and number of crossings among groups of rats ($\bar{x}\pm s$, n=6)

注：与空白组比较，**P<0.01；与模型组比较，##P<0.01；与 NA 组比较，☆☆P<0.01。

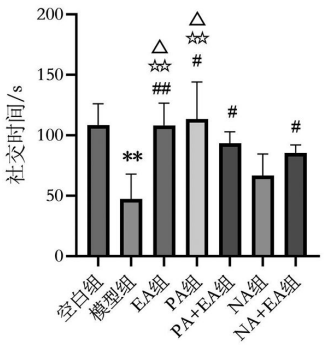


图 4　各组大鼠三箱社交时间比较($\bar{x}\pm s$, n=6)

Fig.4　Comparison of social interaction time in the three-chamber test among groups of rats ($\bar{x}\pm s$, n=6)

注：与空白组比较，**P<0.01；与模型组比较，#P<0.05，##P<0.01，与 NA 组比较，☆☆P<0.01；与 NA+EA 组比较，△P<0.05。

蛋白平均光密度显著降低(P<0.01)；与 PA+EA 组比较，NA 组、NA+EA 组 BDNF 蛋白平均光密度均显著降低(P<0.01)。详见图 5—6。

2.6　各组大鼠杏仁核、海马、小脑 BDNF、CREB 蛋白平均光密度表达轮廓分析

BDNF 蛋白平均光密度表达轮廓分析结果表明，PA 组与 PA+EA 组杏仁核、海马、小脑蛋白平均光密度表达轮廓平行(F=0.342，P=0.719)且重合(F=0.438，P=0.523)，趋势为：小脑>杏仁核>海马；NA 组与 NA+EA 组蛋白平均光密度表达轮廓不平行(F=

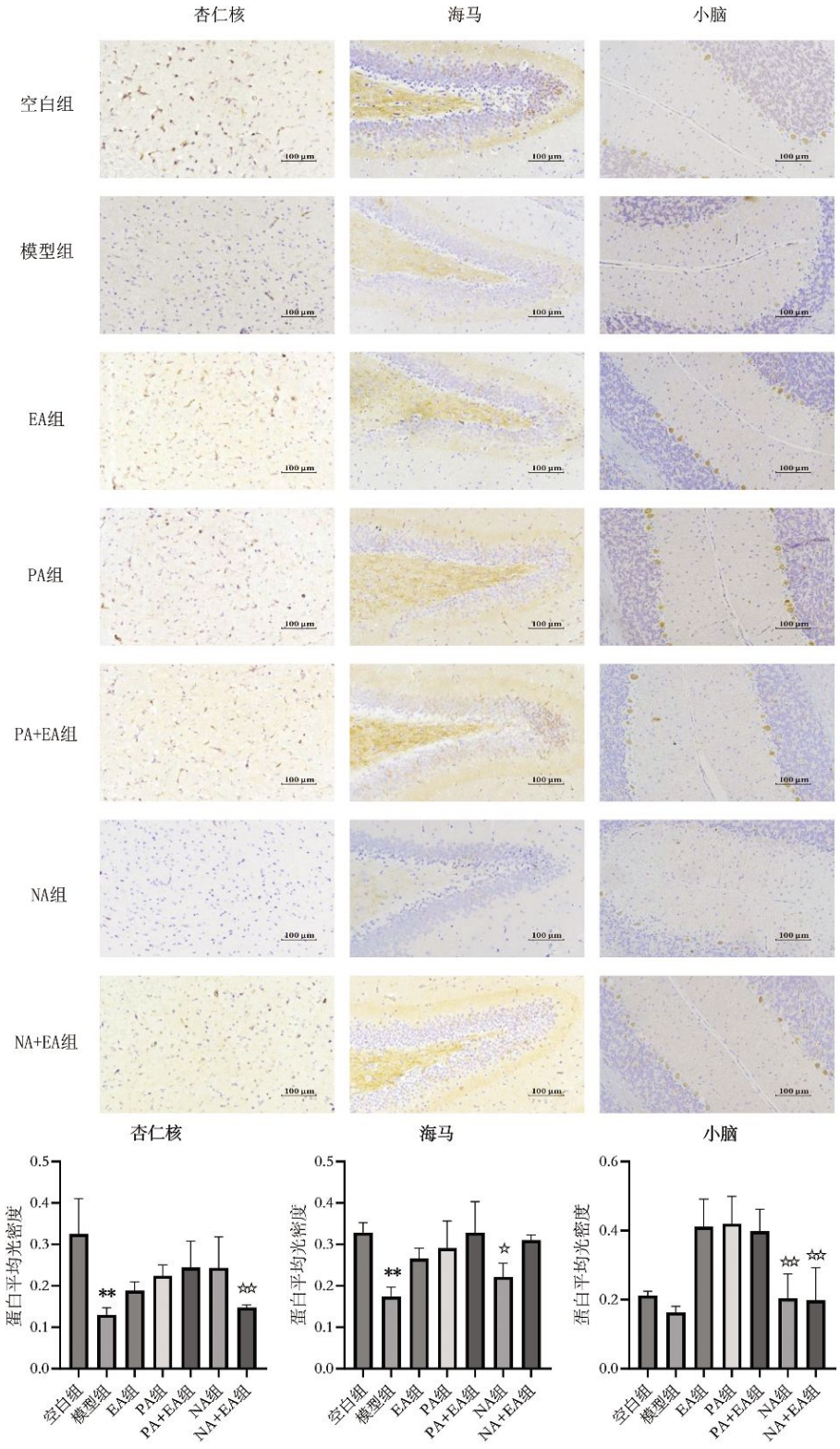


图 5　各组大鼠杏仁核、海马、小脑 BDNF 蛋白平均光密度比较(×100,$\bar{x}\pm s$,n=6)

Fig.5　Comparison of MOD of BDNF in the amygdala, hippocampus, and cerebellum among groups of rats (×100, $\bar{x}\pm s$, n=6)

注:与空白组比较,**P<0.01;与 PA+EA 组比较,☆P<0.05,☆☆P<0.01。

10.955,P=0.004)。CREB 蛋白平均光密度表达轮廓分析结果表明,PA 组与 PA+EA 组杏仁核、海马、小脑蛋白平均光密度表达轮廓平行(F=0.321,P=0.733)而不重合(F=6.888,P=0.025),趋势为:海马>杏仁核>小脑;NA 组与 NA+EA 组杏仁核、海马、小脑蛋白平均光密度表达轮廓平行(F=0.668,P=0.537)且重合(F=1.471,P=0.235),趋势为:杏仁核>海马>小脑。详见图 7。

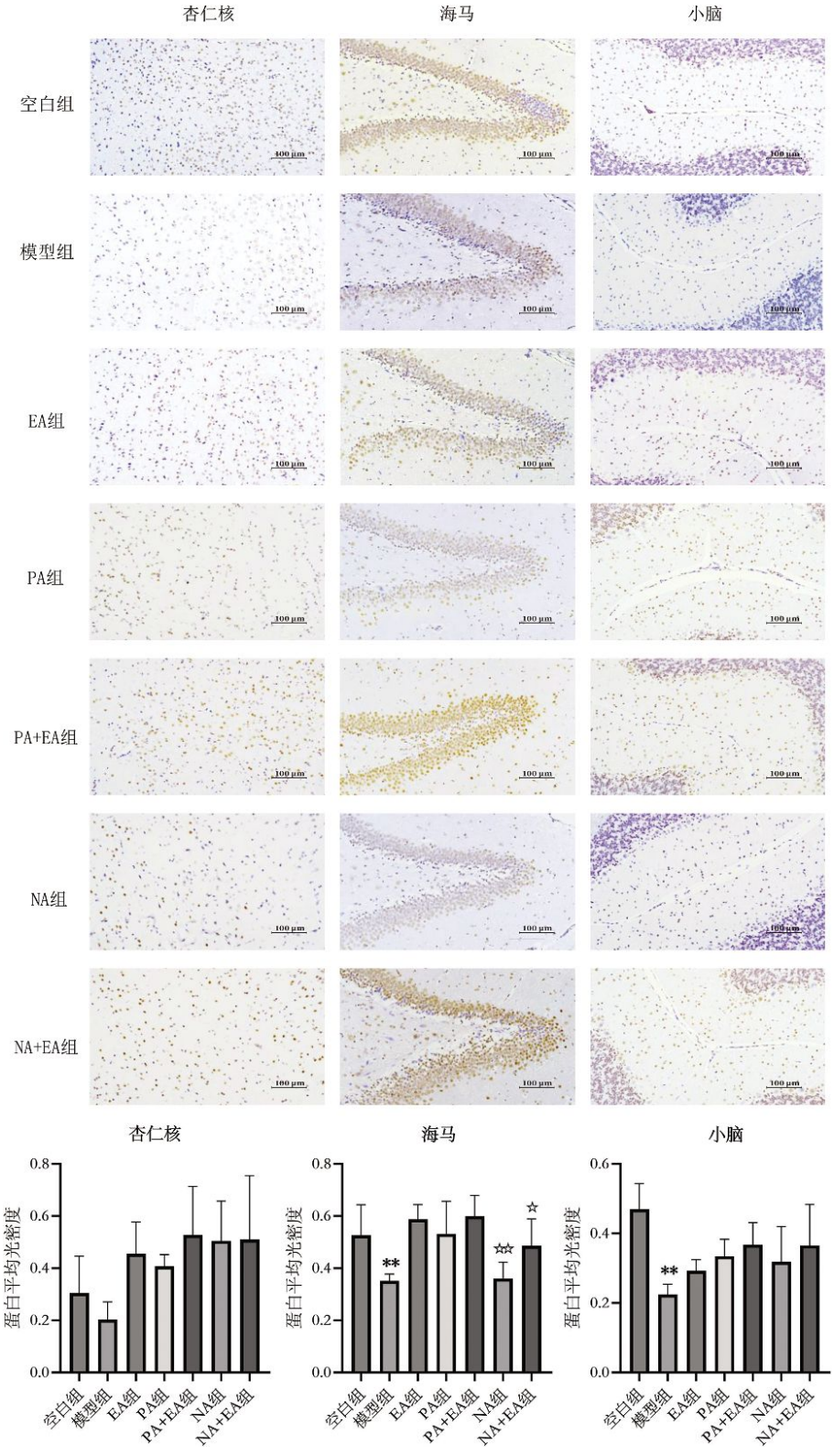


图 6　各组大鼠杏仁核、海马、小脑 CREB 蛋白平均光密度比较(×100,$\bar{x}\pm s$,n=6)

Fig.6　Comparison of MOD of CREB in the amygdala, hippocampus, and cerebellum among groups of rats (×100, $\bar{x}\pm s$, n=6)

注:与空白组比较,**P<0.01;与 PA+EA 组比较,☆P<0.05,☆☆P<0.01。

3　讨论

《素问·宝命全形论篇》曰“凡刺之针,必先治神”,强调针灸干预核心不仅在“刺形”,更在于“调神”。把握针灸干预的时机以及时机背后的机体状态,是针灸效应的关键所在[21]。基于此,本研究提出“针灸状态学”概念,以 ASD 大鼠为模型,采用挠痒刺激建立正性状态,采用足底电击建立负性状态,通过比

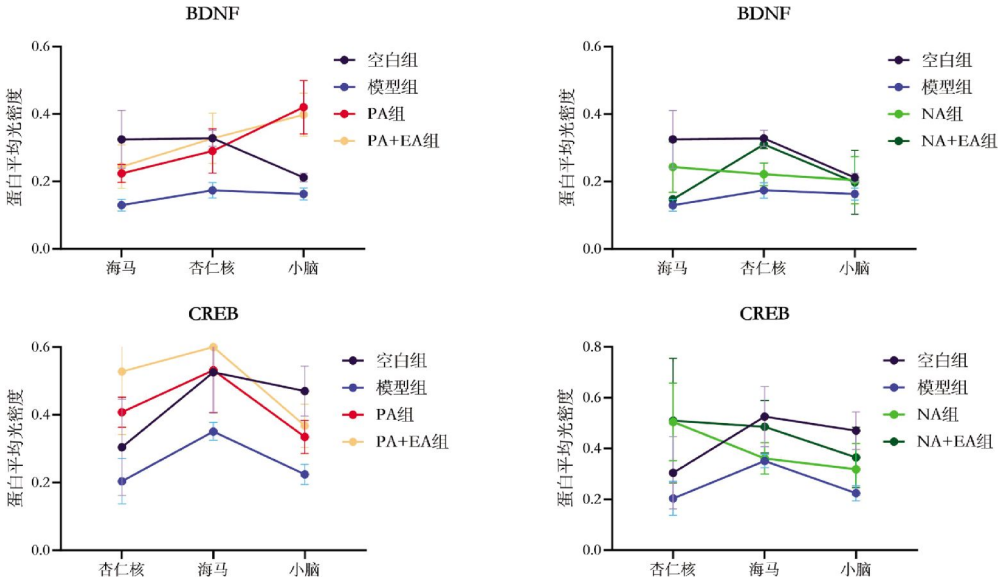


图 7　各组大鼠杏仁核、海马、小脑 BDNF、CREB 蛋白平均光密度表达轮廓分析($\bar{x}\pm s$, n=6)

Fig.7　Profile analysis of MOD of BDNF and CREB protein expression in the amygdala, hippocampus, and cerebellum among groups of rats ($\bar{x}\pm s$, n=6)

较不同状态下电针干预的行为学及脑区-分子差异性,探讨"状态"的中枢响应路径。

本研究结果表明,正、负性状态下的电针干预均能提高 ASD 大鼠的社交能力,以正性状态最为明显,而负性状态则与模型组无差异,提示正性状态本身对社交行为具有改善作用。正性状态下电针在行为学上未能产生预期的叠加效应,这可能与挠痒刺激本身就是一种强有力的基于"社会性愉悦"的非药物疗法有关[22],该刺激可诱导大鼠对人手产生亲和力,并使下丘脑腹内侧核催产素受体表达增加[23-24],其改善作用可能已接近饱和。同时,ASD 是一种多维度神经发育障碍,常伴随焦虑、刻板行为和学习记忆缺陷,电针效应是否通过改善上述维度进而影响社交行为,尚需进一步研究证实。

与现代医学针对细胞病理的靶向干预不同,针灸作为非特异性的外治手段,其作用机制并非依赖单一分子靶点,而是通过机械刺激或温热刺激引发机体多系统、多靶点的生理及生物学反应[25],产生广谱性调节效应。BDNF 响应于外部刺激,可选择性地结合至细胞膜上的特异性受体原肌球蛋白受体激酶 B,触发信号转导级联反应,通过多通路作用最终导致 CREB 蛋白在核内发生磷酸化修饰,激活下游基因的转录[26]。齐诗仪等[27]提出,BDNF-CREB 信号通路可被针灸激活,在海马、杏仁核、皮层等脑区以及血清等外周组织中均有表达,可作为针灸效应的潜在"广谱效应物质"。

本研究通过免疫组化检测海马、杏仁核、小脑中 BDNF 与 CREB 蛋白平均光密度,发现在不同状态下电针脑区-分子具有特异性:与 PA+EA 组比较,杏仁核 NA+EA 组 BDNF 蛋白平均光密度显著降低,CREB 无明显差异;海马 NA 组 BDNF、CREB 蛋白平均光密度均降低;小脑 NA 组、NA+EA 组 BDNF 蛋白平均光密度均显著降低,而 CREB 无明显差异。进一步轮廓分析结果提示"状态-干预"交互作用下的多脑区蛋白表达存在空间分布规律:BDNF 表达方面,PA 组与 PA+EA 组在杏仁核、海马和小脑蛋白平均光密度表达轮廓不仅平行且重合,提示两者在多脑区的 BDNF空间分布模式及整体表达水平上高度一致;而 NA 组与 NA+EA 组在杏仁核、海马和小脑的蛋白平均光密度表达轮廓不平行,表明 NA+EA 干预引发了 BDNF 在多脑区分布模式的偏移。在CREB 表达方面,PA 组与 PA+EA 组在杏仁核、海马和小脑的蛋白平均光密度表达轮廓呈现平行但不重合的特征,两者均表现出"海马>杏仁核>小脑"的空间分布趋势。相比之下,NA 组与 NA+EA 组在杏仁核、海马和小脑的蛋白平均光密度表达轮廓平行且重合,但其空间分布模式发生病理性逆转,表现为以杏仁核组织为峰值的异常趋势。这一结果提示,负性状态诱导了以杏仁核过度激活为特征的异常分子响应模式。杏仁核是恐惧条件反射的核心脑区[28],负责快

速识别威胁性刺激并启动防御反应,被视为情绪加工的“警报系统”;海马主要参与记忆的形成与储存,包括情绪记忆的提取与调节,常被比喻为记忆的“档案馆”[29]。越来越多的证据表明,小脑在情绪识别过程中亦发挥重要作用[30-32],它通过向海马和杏仁核投射信号,改善情绪记忆的储存,还可通过强化与这两个脑区的功能连接,进一步增强情景记忆的形成与稳定性[33]。团队前期研究表明,电针长强穴可改善孤独症大鼠刻板行为,并能激活海马区 BDNF-CREB 信号通路[11],这一结果与本研究相互印证,共同提示 BDNF-CREB 信号通路可能是针刺产生广谱效应的关键响应蛋白。

除分子通路外,针灸的“穴-脑功能”效应研究表明,针刺会影响特定脑区之间的连接模式,其研究方式涵盖脑血流量、脑网络、脑功能活动等不同角度[34-35]。同时,分子生物学研究提示,针刺特定穴位可在不同脑区表现为效应蛋白的时间依赖性及空间分布特点[36]。本研究结果进一步提示,正性状态本身或正性状态下的电针干预在多脑区 BDNF 与 CREB 的表达优势区分别稳定于小脑与海马,且该模式接近正常生理状态下的调控特征;而负性状态本身或负性状态下的电针干预则诱导出以杏仁核 CREB 表达为主的响应趋势,提示状态可显著影响电针干预的中枢响应方向与调控特性。据此推测,正性状态下电针干预可能通过“小脑(BDNF 为主)-海马(CREB 为主)”的协同表达模式促进神经可塑性,二者具有空间-分子相关性。

综上,本研究结果初步表明,正、负性状态下电针长强穴均可显著改善 ASD 模型大鼠的社交功能,其机制涉及海马、杏仁核和小脑中 BDNF-CREB信号通路的激活。本研究基于针灸“治神”理论,提出“针灸状态学”视角,但“神”的客观化表征仍需多维度验证。受样本量及技术手段限制,目前仅证实相关指标的平行变化趋势,尚未在机制层面建立完整的因果链条。未来需结合脑区特异性干预或神经环路示踪技术,进一步解析其上下游调控机制。未来本团队拟采用多元统计分析方法,针对不同状态、干预时序,从中枢、外周等多因素展开分析,拓展针灸状态学的理论内涵。

参考文献

[1] 王文炎, 陈瑞, 梁凤霞. 对“凡刺之真, 必先治神”的思考[J]. 环球中医药, 2021, 14(3): 474-477.

[2] 陈少宗, 胡浩, 卜彦青. 电针疗法对脑梗塞患者 TXB_2、$PGF_{1\alpha}$ 的影响与其基础状态的数量关系[J]. 中国中医药科技, 2008, 15(3): 166-167.

[3] 林锦文, 齐诗仪, 汤文政, 等. 基于眼电信号非线性动力学特征的针灸“治神”客观化研究[J]. 福建中医药, 2024, 55(8): 42-45.

[4] 赵庆逸, 徐玉东, 尹磊淼, 等. 不同机体状态下针刺对神经递质的调控[J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(10): 29-34.

[5] Gong C Z, Liu W. To be, or not to be: the calculated politics of acupuncture in JAMA[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2017, 23(11): 803-808.

[6] Zhang Q H, Yue J H, Sun Z R, et al. Acupuncture for chronic knee pain: a protocol for an updated systematic review[J]. BMJ Open, 2016, 6(2): e008027.

[7] Panksepp J, Burgdorf J. 50-kHz chirping (laughter) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables[J]. Behavioural Brain Research, 2000, 115(1): 25-38.

[8] Demaestri C, Brenhouse H C, Honeycutt J A. 22 kHz and 55 kHz ultrasonic vocalizations differentially influence neural and behavioral outcomes: implications for modeling anxiety via audi tory stimuli in the rat[J]. Behavioural Brain Research, 2019, 360: 134-145.

[9] Fakhoury M. Autistic spectrum disorders: a review of clinical features, theories and diagnosis[J]. International Journal of Developmental Neuroscience, 2015, 43: 70-77.

[10] 洪钰竺, 张学君, 洪霖, 等. 针刺“长强”穴对自闭症模型大鼠学习记忆能力和前额叶皮层缝隙连接相关蛋白表达的影响[J]. 针刺研究, 2014, 39(3): 173-179.

[11] 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.

[12] 俞萍, 郑昌岳, 李凤, 等. 针刺长强穴对自闭症模型大鼠海马区相关蛋白表达的影响[J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17(1): 111-113.

[13] 张学君, 吴强. 电针督脉不同穴对自闭症模型大鼠学习记忆能力及海马 CA1 区 PSD-95 蛋白表达的影响[J]. 中国针灸, 2013, 33(7): 627-631.

[14] 章思佳, 齐诗仪, 龚萌, 等. 基于眼电生物信号调控的经皮穴位电刺激治疗儿童精神发育迟滞: 随机对照试验[J]. 中国针灸, 2023, 43(5): 517-521.

[15] Schneider T, Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valpr oic acid: animal model of autism[J]. Neuropsychopharmacology, 2005, 30(1): 80-89.

[16] Burgdorf J, Panksepp J. Tickling induces reward in adolescent rats[J]. Physiology & Behavior, 2001, 72(1/2): 167-173.

[17] Li S S, Liao Y J, Dong Y, et al. Microglial deletion and inhibition alleviate behavior of post-traumatic stress disorder in mice[J]. Journal of Neuroinflammation, 2021, 18(1): 7.

[18] 赵中兴, 伍亚民. 一种新的大鼠创伤后应激障碍模型的建立及其行为学检测[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(10): 928-932.

[19] Okabe S, Takayanagi Y, Yoshida M, et al. Gentle stroking stimuli induce affiliative responsiveness to humans in male rats[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 9135.

[20] Rein B, Tan T, Yang F W, et al. Reversal of synaptic and behavioral deficits in a 16p11.2 duplication mouse model via restoration of the GABA synapse regulator Npas4[J]. Molecular Psychiatry, 2021, 26(6): 1967-1979.

[21] 罗健, 邬志雄. 谈"凡刺之真, 必先治神"[J]. 中国针灸, 2016, 36(6): 657-660.

[22] Liu B L, Qiao L N, Liu K, et al. Molecular and neural basis of pleasant touch sensation[J]. Science, 2022, 376(6592): 483-491.

[23] Hayashi H, Tateishi S, Inutsuka A, et al. Oxytocin facilitates human touch-induced play behavior in rats[J]. Current Biology, 2025, 35(12): 2916-2926, e3.

[24] Ishiyama S. The neurobiology of ticklishness[J]. Neuroscience Research, 2025, 217: 104907.

[25] 陈汇霖, 朱兵, 王舒娅. 针灸治疗效应的始动因素: C类多模态伤害感受器[J]. 中国疼痛医学杂志, 2025, 31(8): 576-581.

[26] Ashabi G, Sadat-Shirazi M S, Khalifeh S, et al. NMDA receptor adjusted co-administration of ecstasy and cannabinoid receptor-1 agonist in the amygdala via stimulation of BDNF/Trk-B/CREB pathway in adult male rats[J]. Brain Research Bulletin, 2017, 130: 221-230.

[27] 齐诗仪, 林燊, 杨晓婷, 等. BDNF-CREB信号传导通路与针灸对脑功能的广谱效应物质探讨[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(11): 2812-2814.

[28] Santos T B, Kramer-Soares J C, Oliveira M G M. Contextual fear conditioning with a time interval induces CREB phosphorylation in the dorsal hippocampus and amygdala nuclei that depend on prelimbic cortex activity[J]. Hippocampus, 2023, 33(7): 872-879.

[29] Richter-Levin G. The amygdala, the hippocampus, and emotional modulation of memory[J]. The Neuroscientist, 2004, 10(1): 31-39.

[30] Adamaszek M, D'Agata F, Ferrucci R, et al. Consensus paper: cerebellum and emotion[J]. The Cerebellum, 2017, 16(2): 552-576.

[31] Strata P. The emotional cerebellum[J]. The Cerebellum, 2015, 14(5): 570-577.

[32] Sacchetti B, Scelfo B, Strata P. The cerebellum: synaptic changes and fear conditioning[J]. The Neuroscientist, 2005, 11(3): 217-227.

[33] Fastenrath M, Spalek K, Coynel D, et al. Human cerebellum and corticocerebellar connections involved in emotional memory enhancement[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(41): e2204900119.

[34] Liang P P, Wang Z Q, Qian T Y, et al. Acupuncture stimulation of Taichong (Liv3) and Hegu (LI4) modulates the default mode network activity in Alzheimer's disease[J]. American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias, 2014, 29(8): 739-748.

[35] Chen Y F, Mao M C, Zhu G Y, et al. The changes of neuroactivity of Tui Na (Chinese massage) at Hegu acupoint on sensorimotor cortex in stroke patients with upper limb motor dysfunction: a fNIRS study[J]. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2023, 23(1): 334.

[36] 齐诗仪, 张志灿, 林燊, 等. 基于轮廓分析的电针长强穴对FMR1基因敲除小鼠CREB表达的多脑区联动效应研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(8): 2686-2694.