

• 针灸推拿 •

本文引用: 唐 青, 苏丽红, 林丽莉. 不同刺激量捏脊法对自闭症大鼠海马炎症相关因子及行为障碍的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45 (7): 1264–1270.

不同刺激量捏脊法对自闭症大鼠海马炎症相关因子及行为障碍的影响

唐 青¹, 苏丽红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. 福建中医药大学附属第二人民医院, 福建 福州 350003

〔摘要〕目的 探讨不同刺激量捏脊法对自闭症大鼠海马炎症相关因子和行为障碍的影响。方法 将 40 只自闭症模型大鼠随机分为模型组、固定组、交替组、递增组, 每组 10 只; 同时纳入 10 只正常大鼠为空白组。固定组、交替组、递增组分别采用不同刺激量捏脊法进行干预。干预结束后, 5 组大鼠进行旷场实验和三箱社交实验后处死, 取全脑灌注固定后采用尼氏染色检测海马 CA1、CA2 区尼氏体阳性细胞数量, 免疫组化检测海马 CA1、CA2 区白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-1 受体拮抗剂(IL-1Ra)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达。结果 与空白组相比, 模型组活动距离、活动时间增加($P<0.05$), 社交指数降低($P<0.05$); 模型组和固定组海马 CA1、CA2 区以及交替组 CA2 区尼氏体阳性细胞数量减少($P<0.05$); 模型组海马 CA1、CA2 区 IL-1 β 、TNF- α 表达量升高($P<0.05$), IL-1Ra 表达量降低($P<0.05$); 固定组 CA2 区 TNF- α 表达量升高($P<0.05$)。与模型组相比, 固定组、交替组、递增组活动距离、活动时间减少($P<0.05$), 社交指数升高($P<0.05$); 固定组、交替组、递增组海马 CA1、CA2 区和交替组、递增组 CA2 区尼氏体阳性细胞数量增加($P<0.05$); 固定组、交替组、递增组海马 CA1、CA2 区 IL-1 β 、TNF- α 表达量降低($P<0.05$), IL-1Ra 表达量升高($P<0.05$)。与固定组相比, 交替组与递增组活动距离减少($P<0.05$), 递增组社交指数升高($P<0.05$); 递增组海马 CA1、CA2 区尼氏体阳性细胞数量增加($P<0.05$), IL-1 β 、TNF- α 表达量降低($P<0.05$), IL-1Ra 表达量升高($P<0.05$); 交替组 CA1 区 TNF- α 表达量降低($P<0.05$)。结论 固定、交替、递增刺激量捏脊均能改善自闭症大鼠行为障碍, 改善海马炎症状态, 减轻神经元损伤, 交替、递增刺激量捏脊较固定刺激量捏脊效果显著, 且递增刺激量捏脊与固定刺激量捏脊差异最明显。

〔关键词〕 自闭症; 督脉; 捏脊; 不同刺激量; 炎症因子; 海马; 社交行为

〔中图分类号〕R244.1

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.07.009

Effects of spine-pinching manipulation with different stimulation intensities on hippocampal inflammation-related factors and behavioral disorders in autistic rats

TANG Qing¹, SU Lihong¹, LIN Lili^{1,2*}

1. College of Acupuncture and Massage, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

2. The Second Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China

〔Abstract〕Objective To explore the effects of spine-pinching manipulation with different stimulation intensities on hippocampal inflammation-related factors and behavioral disorders in autistic rats. Methods Forty autistic model rats were randomly divided into a model group, a fixed-intensity group, an alternating-intensity group, and an incremental-intensity group, with 10 rats in each

〔收稿日期〕2024-12-03

〔基金项目〕国家自然科学基金青年项目(81704194); 福建省属公益类科研院所基本科研专项项目(2023R1003006); 福建省中医药重点学科建设项目(034025002005)。

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

group. Meanwhile, 10 normal rats were included as the blank group. The fixed-, alternating-, and incremental-intensity groups received spinal manipulation interventions with varying stimulation intensities. After the intervention, the five groups of rats were sacrificed after the open-field test and the three-chamber social test. The whole brains were perfused and fixed, followed by Nissl staining to determine the number of Nissl-positive cells in the hippocampal CA1 and CA2 regions. Immunohistochemistry was used to examine the expressions of IL-1 β , IL-1Ra, and TNF- α in the hippocampal CA1 and CA2 regions. **Results** Compared with the blank group, the model group showed increased movement distance and time ($P<0.05$) and a decreased social index ($P<0.05$). The number of Nissl-positive cells in the hippocampal CA1 and CA2 regions reduced in the model and fixed-intensity groups, while the alternating-intensity group exhibited a decrease only in the CA2 region ($P<0.05$). The model group displayed elevated expression of IL-1 β and TNF- α ($P<0.05$) and decreased IL-1Ra expression ($P<0.05$) in the hippocampal CA1 and CA2 regions, whereas the fixed-intensity group showed increased TNF- α expression in the CA2 region ($P<0.05$). Compared with the model group, the fixed-, alternating-, and incremental-intensity groups exhibited reduced movement distance and time ($P<0.05$), an increased social index ($P<0.05$), and a higher number of Nissl-positive cells in the hippocampal CA1 and CA2 regions ($P<0.05$). Additionally, these groups demonstrated decreased IL-1 β and TNF- α expression ($P<0.05$) and increased IL-1Ra expression ($P<0.05$) in the hippocampal CA1 and CA2 regions. Compared with the fixed-intensity group, the alternating- and incremental-intensity groups showed decreased movement distance ($P<0.05$), while the incremental-intensity group exhibited a higher social index ($P<0.05$). The incremental-intensity group displayed an increased number of Nissl-positive cells ($P<0.05$), reduced IL-1 β and TNF- α expression ($P<0.05$), and elevated IL-1Ra expression ($P<0.05$) in the hippocampal CA1 and CA2 regions. The alternating-intensity group showed decreased TNF- α expression in the CA1 region ($P<0.05$). **Conclusion** Spine-pinching manipulation with fixed, alternating, and incremental stimulation intensities can all relieve behavioral disorders of autistic rats, alleviate hippocampal inflammation, and reduce neuronal damage. Spine-pinching manipulation with alternating and incremental stimulation intensities yields more significant effects than that with fixed stimulation intensity, with the most pronounced differences observed between incremental and fixed stimulation intensities.

[**Keywords**] autism; Du meridian; spine-pinching; different stimulation intensity; inflammatory factor; hippocampus; social behavior

自闭症又称孤独症,是以社交障碍、交流障碍、重复刻板行为等为主要特征的神经发育障碍性疾病。自闭症目前病因不明,尚无确切有效的治疗方法。近年来研究表明,神经炎症损伤在自闭症的生理病理中发挥重要作用,孕期母体因感染、过敏等因素会引起体内炎症因子升高,并可进一步进入胎儿的血脑屏障破坏其中枢神经系统,长期的慢性炎症环境会导致大量促炎因子的产生,从而干扰大脑神经元发育,增加自闭症发病风险^[1-2]。

自闭症在中医学中属“五迟”范畴,基本病机是神机失用^[3]。基于《素问·骨空论篇》中“故督脉者,起于少腹以下……上额交巅,上入络脑”理论指导,历代医家素有“病变在脑,首取督脉”之说,捏脊疗法具有通督调神之效。作为中医外治疗法之一,近年来该疗法在小儿脑病的临床治疗上应用广泛^[4]。目前,多数以捏脊为干预手段的研究采取固定刺激量捏脊法,部分研究采用刺激量交替性变化的捏脊法^[5]、刺激量阶段性增加的捏脊法^[6]。前期临床研究发现,固定刺激量捏脊法的疗效随疗程次数增加而发生减

弱^[7]。关于刺激量变化捏脊法是否发挥出优于固定刺激量捏脊法的干预效应,且各刺激量变化捏脊法之间是否存在效应差异,尚未可知。故本实验拟通过研究不同刺激量捏脊法对自闭症大鼠神经炎症相关因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-1受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1Ra)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的影响,以期对捏脊疗法的临床实施提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠雌雄各 18 只,体质量(200 $\pm$ 30) g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物生产许可证:SCXK(沪)2022-0004。饲养于福建中医药大学实验动物中心,动物使用许可证号:SYXK(闽)2019-0007。饲养条件为温度(20 $\pm$ 2)℃、相对湿度(50 $\pm$ 5)%、光照与黑暗环境 12 h 交替进行,自由进食和饮水。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:FJTCM IACUC2022185)。

1.2 主要试剂与仪器

尼氏染色液、苏木素染色液(批号:G1436、G1140,北京索莱宝生物科技有限公司);柠檬酸钠抗原修复液(批号:AR0024,武汉博士德生物工程有限公司);一抗 IL-1 β (批号:CQA6579,英国 Cohesion Biosciences 公司);一抗 IL-1Ra、一抗 TNF- α (批号:10844-1-AP、26405-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司);免疫组化 EliVisionTM plus 试剂盒、DAB 显色试剂盒(批号:KIT-9720、DAB-0031,福州迈新生物技术开发有限公司);丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)(批号:P4543,美国 Sigma-Aldrich 公司)。

旷场实验检测系统(型号:XR-XJ1117,上海欣软信息科技有限公司);生物组织自动脱水机(型号:ZT-14S1,孝感市亚光医用电子技术有限公司);石蜡切片机、倒置荧光显微镜(型号:BIOCUT、DMI8,德国 Leica 公司)。

1.3 模型制备与分组

自闭症大鼠造模^[8]:选取育龄期雌、雄 Wistar 大鼠各 18 只,于傍晚 18 点将雌、雄大鼠分别以 1:1 合笼过夜,次日早上 8 点检查笼底托盘,若发现淡黄色、凝胶状阴栓记为雌鼠孕 0.5 d,将雌雄分笼饲养。随机选取 14 只孕鼠,在孕 12.5 d 时腹腔注射抗癫痫药 VPA,剂量是 600 mg/kg,所产幼崽经发育行为学检测(体质量、睁眼时间、足底热痛实验、方向趋向性实验、游泳实验)确认为自闭症模型大鼠^[9]。选取自闭症模型大鼠 40 只,根据随机数字表法分为模型组、固定组、交替组和递增组,每组 10 只。另外 4 只孕鼠腹腔注射等量生理盐水,从所产幼崽随机选取 10 只大鼠纳入空白组。

1.4 干预方法

固定组、交替组和递增组于大鼠出生后第 21 天开始捏脊干预,连续干预 4 周。捏脊干预期间,空白组和模型组仅模拟抓取和固定。固定组、交替组、递增组分别采用不同刺激量的捏脊方式进行干预,各组总捏脊遍数一致。固定组 21 遍/次,1 次/d^[7];交替组第 1、3 周 18 遍/次,1 次/d,第 2、4 周 24 遍/次,1 次/d;递增组第 1、2、3、4 周分别 12 遍/次、18 遍/次、24 遍/次、30 遍/次,1 次/d。捏脊操作^[10]:实验员双手中、无名、小指微屈曲,拇、食二指相对用力捏起大鼠脊柱背部两侧皮肤,边捏边逐渐向前推动,自大鼠尾根部捏至大椎穴为一遍捏脊操作。大椎穴参照《实

验针灸学》确定^[11]。捏起大鼠皮肤高度 0.2~0.3 cm。遵循临床捏脊“捏三提一”原则,从第 7 遍起,每捏 3 次随即将捏起处皮肤轻提起 1 次。捏脊始终由同一名实验员完成,捏脊前需反复进行练习,确保捏脊操作的流畅、均匀、柔和。

1.5 取材

大鼠麻醉后,每组随机取 4 只,打开胸腔,暴露心脏,使用眼科剪在心尖处开 1 个小口,将灌流针头从左心室插入主动脉,剪开右心耳,灌注生理盐水约 200 mL,待大鼠肺、肝等脏器颜色苍白,再向左心室灌注 4%多聚甲醛约 100 mL,待大鼠头部及肢体僵硬后断头,取出全脑,置于 4%多聚甲醛溶液固定,用于后续形态学及免疫组化实验。

1.6 观察指标

1.6.1 行为学检测 (1)旷场实验:实验装置是长×宽×高为 75 cm×75 cm×40 cm 的正方体箱子。提前 1 h 将大鼠置于无背景噪声室内适应,实验前用 75%乙醇清洁旷场实验箱。实验员依次将大鼠放入旷场实验箱内,每次 1 只,任其自由活动 5 min,其间记录大鼠在箱内活动距离、活动时间,每只大鼠测试完后用 75%乙醇对旷场实验箱内侧面进行清洁,确保清除排泄物及残留异味。

(2)三箱社交实验:实验装置为亚克力板做成的长方体箱子,通过两个隔板形成左侧、右侧、中间 3 个隔箱,每个隔箱长×宽×高为 30 cm×40 cm×30 cm,隔板开放有可供动物出入的小门,左右两侧隔箱各有 1 个高 18 cm、直径 8 cm 的铁笼,用于将陌生大鼠放入其中。陌生大鼠选择同龄、同性别、体质量差异不大且从未接触过的同类。提前 1 h 将大鼠置于无背景噪声室内适应,再把大鼠放进三箱内自由探索 5 min;5 min 结束后先取出大鼠,然后将陌生大鼠放进左侧隔箱内铁笼,再将被试大鼠放进中间隔箱内,任其自由活动 10 min,每只大鼠测试完后用 75%乙醇对实验箱内侧面进行清洁,确保清除排泄物及残留异味。大鼠探索有鼠笼的时间与探索无鼠笼的时间比值即为社交指数^[12]。

1.6.2 海马 CA1、CA2 区尼氏体阳性细胞数量检测

采用尼氏染色检测。组织脱水,浸蜡,包埋,切片,摊片,烤片,脱蜡水化,流水洗 2 次,1 min/次,随后置于尼氏染色液,60 ℃避光染色 25 min。染色结束,流水洗 1 min。95%乙醇分化 60 s,随后脱水透明,显微镜下观察 5 组大鼠染色结果并统计尼氏体

阳性细胞个数。

1.6.3 海马 CA1、CA2 区 IL-1 β 、IL-1Ra、TNF- α 表达量检测 采用免疫组化检测。石蜡切片 4 μ m 后二甲苯脱蜡,酒精梯度脱苯后流水冲洗。放入加热至沸腾的柠檬酸钠溶液 10 min 后取出冷却至室温,PBS 溶液清洗 3 次,每次 5 min。滴加内源性过氧化物酶溶液 10 min 后 PBS 溶液清洗 3 次。滴加非特异性染色阻断剂后置于 37 $^{\circ}$ C 烘箱 60 min。加一抗后放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜。次日 PBS 溶液清洗 3 次后,加二抗置于 37 $^{\circ}$ C 烘箱 40 min,PBS 溶液清洗 3 次后加链霉素置于 37 $^{\circ}$ C 烘箱 40 min,结束后 PBS 溶液清洗 3 次。采用 DAB 染色法显色完成后用苏木素复染、自来水反蓝,中性树胶封片。最后于显微镜下拍摄,使用 ImageJ 软件计算各指标表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计软件分析。计量资料符合正态分布以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,使用单因素方差分析,方差齐用 LSD 法,方差不齐则用 Games-Howell 法。均以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠旷场实验活动距离、活动时间和三箱社交实验社交指数比较

与空白组相比,模型组大鼠活动距离、活动时间增加($P<0.05$),社交指数降低($P<0.05$);与模型组相比,固定组、交替组、递增组大鼠活动距离、活动时间减少($P<0.05$),社交指数升高($P<0.05$);与固定组相比,交替组与递增组活动距离均减少($P<0.05$),递增组社交指数升高($P<0.05$)。详见表 1。

表 1 各组大鼠旷场实验活动距离、活动时间和三箱社交实验社交指数比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Comparison of movement distance, movement time in the open-field test and social index in the three-chamber social test among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	活动距离/mm	活动时间/s	社交指数
空白组	5 445.85 $\pm$ 3 395.64	100.12 $\pm$ 90.80	3.70 $\pm$ 0.85
模型组	13 503.01 $\pm$ 4 047.92*	242.56 $\pm$ 53.14*	1.75 $\pm$ 0.54*
固定组	8 272.00 $\pm$ 2 897.62 [#]	158.67 $\pm$ 72.14 [#]	2.96 $\pm$ 0.61 [#]
交替组	5 298.92 $\pm$ 2 664.97 ^{as}	142.88 $\pm$ 104.02 [#]	3.37 $\pm$ 0.64 [#]
递增组	5 084.69 $\pm$ 2 677.17 ^{as}	141.81 $\pm$ 74.11 [#]	3.56 $\pm$ 0.59 ^{as}

注:与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$;与固定组相比,^{as} $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠海马 CA1、CA2 区尼氏体阳性细胞数量比较

空白组海马 CA1、CA2 区神经元细胞排列紧密有序,形态结构完整,神经元内蓝紫色尼氏体数量丰富,染色均匀。模型组神经元细胞排列松散,形态不规则,细胞萎缩,呈空泡状改变,细胞膜破裂、边界模糊,细胞核深染、固缩,尼氏体浅染、偏移、溶解。3 组捏脊干预组细胞核固缩形态较模型组有所改善,细胞排列、形态尚可。固定组 CA1 区少量神经元形态皱缩,神经元排列较交替组、递增组紊乱;交替组和递增组 CA1、CA2 区尼氏体数量丰富,着色均匀,其中,递增组 CA1 区尼氏体明显深染。详见图 1。

与空白组相比,模型组和固定组海马 CA1、CA2 区以及交替组 CA2 区尼氏体阳性细胞数量减少($P<0.05$);与模型组相比,固定组、交替组、递增组海马 CA1 区和交替组、递增组 CA2 区尼氏体阳性细胞数量增加($P<0.05$);与固定组相比,递增组海马 CA1、CA2 区尼氏体阳性细胞数量增加($P<0.05$)。详见表 2。

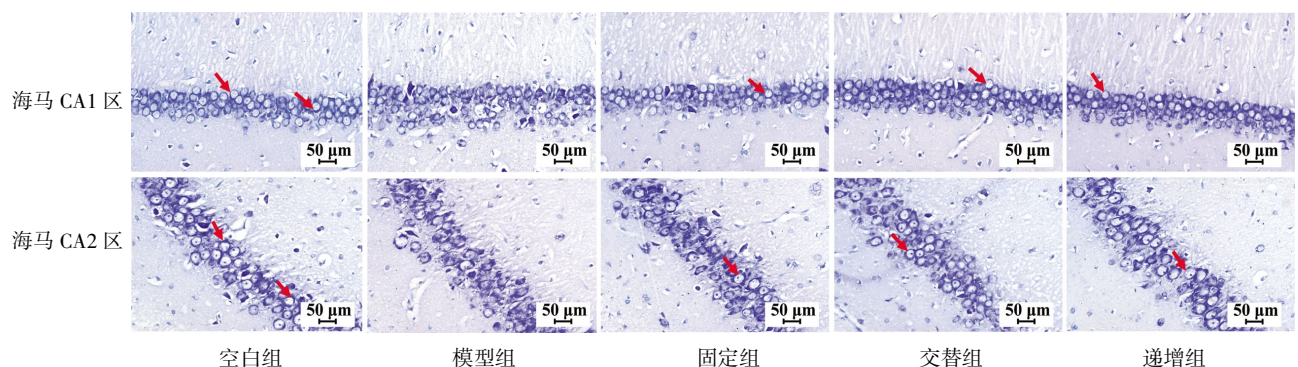


图 1 各组大鼠海马 CA1、CA2 区尼氏染色($\times 400$)

Fig.1 Nissl staining of the hippocampal CA1 and CA2 regions in each group of rats ($\times 400$)

注:箭头所示为尼氏体。

表 2 各组大鼠海马 CA1、CA2 区尼氏体阳性细胞数量比较
($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 2 Comparison of the number of Nissl-positive cells in the CA1 and CA2 regions of the hippocampus among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	CA1 区	CA2 区
空白组	26.25±4.35	20.25±4.79
模型组	12.75±1.70*	7.00±2.16*
固定组	18.00±2.16 [#]	11.25±1.70*
交替组	22.00±3.56 [#]	15.50±3.32 [#]
递增组	23.50±3.00 ^{##}	16.25±2.63 ^{##}

注:与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$;与固定组相比,^{##} $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠海马CA1、CA2 区 IL-1 β 、TNF- α 以及 IL-1Ra 表达比较

与空白组相比,模型组海马 CA1、CA2 区 IL-1 β 、TNF- α 表达量升高($P<0.05$),IL-1Ra 表达量降低($P<0.05$);固定组 CA2 区 TNF- α 表达量升高($P<0.05$)。与模型组相比,固定组、交替组、递增组海马 CA1、CA2 区 IL-1 β 、TNF- α 表达量降低($P<0.05$),IL-1Ra 表达量升高($P<0.05$)。与固定组相比,递增组海马 CA1、CA2 区 IL-1 β 和 TNF- α 表达量降低($P<0.05$),IL-1Ra 表达量升高($P<0.05$);交替组海马 CA1 区 TNF- α 表达量降低($P<0.05$)。详见图 2、表3。

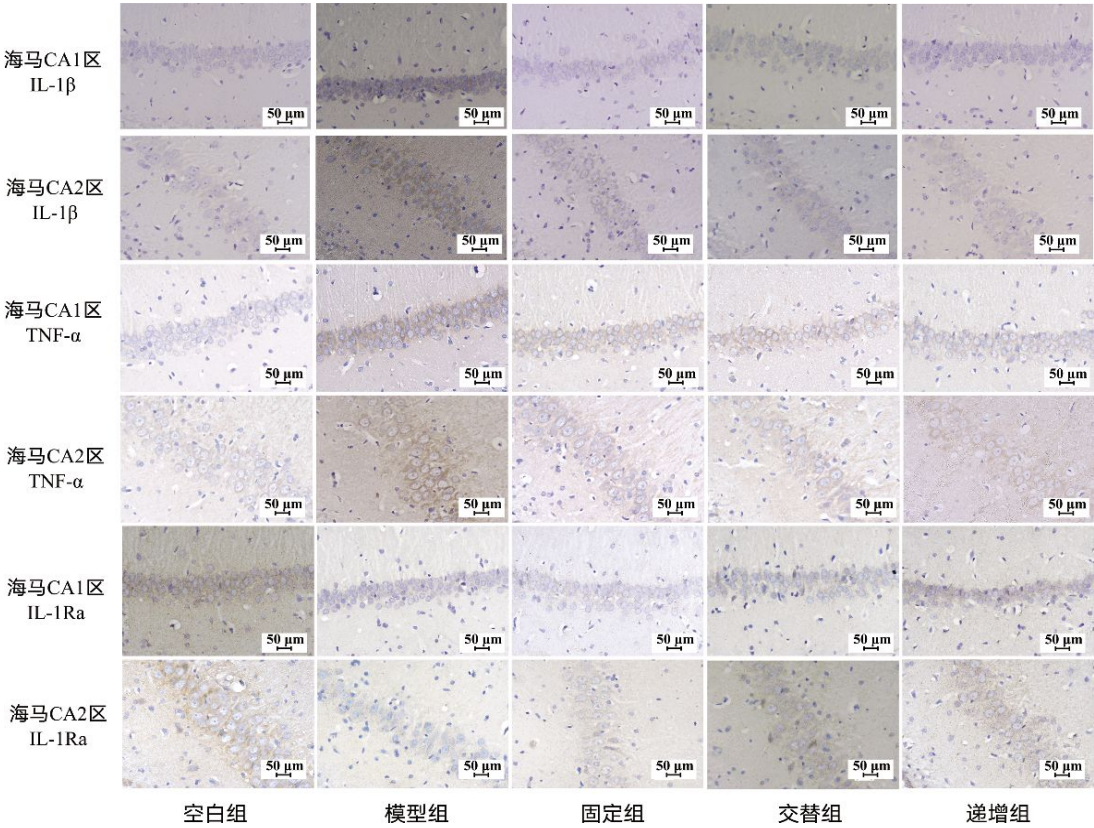


图 2 各组大鼠海马 CA1、CA2 区 IL-1 β 、TNF- α 以及 IL-1Ra 表达(×400)

Fig.2 Comparison of the expressions of IL-1 β , TNF- α , and IL-1Ra in the CA1 and CA2 regions of the hippocampus in each group of rats (×400)

表 3 各组海马 CA1 区、CA2 区 IL-1 β 、TNF- α 以及 IL-1Ra 表达量对比($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 3 Comparison of the expression levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-1Ra in the CA1 and CA2 regions of the hippocampus among different groups ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	IL-1 β 表达量		TNF- α 表达量		IL-1Ra 表达量	
	CA1 区	CA2 区	CA1 区	CA2 区	CA1 区	CA2 区
空白组	14.70±3.19	12.67±0.45	10.88±0.89	11.51±1.64	28.50±5.14	28.48±4.16
模型组	38.76±8.65*	32.37±2.44*	20.22±1.14*	21.29±2.59*	12.19±1.84*	12.80±2.20*
固定组	21.88±2.96 [#]	15.49±2.07 [#]	12.25±0.80 [#]	14.01±1.24 [#]	23.57±2.07 [#]	23.96±1.61 [#]
交替组	20.55±4.22 [#]	14.47±2.69 [#]	11.89±0.74 ^{##}	13.81±1.05 [#]	24.05±2.36 [#]	26.40±2.46 [#]
递增组	14.56±1.54 ^{##}	11.52±1.84 ^{##}	10.67±1.39 ^{##}	11.17±0.56 ^{##}	28.75±3.61 ^{##}	28.63±3.92 ^{##}

注:与空白组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$;与固定组相比,^{##} $P<0.05$ 。

3 讨论

近年来,研究揭示了自闭症与机体免疫功能异常密切相关,其中神经炎症与小胶质细胞的激活是自闭症患者存在的普遍病理特征^[13]。影像学发现,自闭症患儿额叶、海马等多个脑区与正常儿童相比有明显差异^[14]。且转录组学显示,自闭症患儿背外侧前额叶皮质等脑区中抑炎因子 IL-37 以及促炎因子 IL-18 和 TNF- α 的基因表达明显增加^[15]。此外,小鼠脑内持续的炎症状态同样能够导致神经突触修剪功能紊乱,从而出现重复刻板等自闭症样行为^[16]。团队前期在捏脊干预自闭症大鼠的研究中初步验证了捏脊疗法能够有效改善自闭症大鼠焦虑样行为,其作用可能是通过抑制 NF- κ B 通路的过度激活,减轻自闭症模型大鼠海马区炎症反应而实现^[13]。因此,本实验从自闭症大鼠海马炎症相关因子入手,进一步探究了不同刺激量捏脊疗法对治疗自闭症的有效性差异。

在临床中医外治法治疗过程中,刺激量以及刺激频率的改变均可能对机体生物学效应产生不同的影响,进而导致临床治疗效果的差异^[17]。在当今精准化、规范化的医疗发展趋势下,众多学者注意到了对中医外治法量-效关系深入研究的必要性。HAN^[18]研究发现,不同强度的电针刺激会对大脑神经元产生不同的信号传递。陈碧玮等^[19]提出,针刺过程中其效应的发生发展具有一定的规律,即从作用最大化的最佳诱导期到逐渐消退的半衰期再到消退到峰值二分之一以上的残效期。团队在前期临床研究发现,同属于中医体表刺激的捏脊疗法治疗过程中同样具有“减效”的特点,其在配合康复训练治疗精神发育迟滞患儿的治疗中后期出现治疗效果减弱^[7],推测其原因与捏脊恒定的刺激强度作用于皮肤,使其感觉纤维动作电位频率随着刺激时间的增长而降低有关^[20]。因此,基于捏脊疗法的 4 周干预时间内最短持续时间以 7 d 或大于 7 d 多见的发现结果^[21],本实验进行以 7 d 为基础的不同刺激量捏脊疗法,在前期每天 21 遍固定刺激量(持续 4 周)的基础上,新增两种干预方案:递增刺激量(第 1~4 周分别为每天 12、18、24、30 遍)和交替刺激量(第 1~4 周每天交替 18、24 遍)。

产前暴露于 VPA 的仔鼠是目前动物实验中用来研究自闭症的经典模型,在早期胚胎发育过程中 VPA 暴露会导致子代大脑形态学和生化指标的改

变,以及社交障碍等自闭症样行为的出现^[22]。在本研究中,产前 VPA 暴露诱导的自闭症模型大鼠在旷场实验中表现出活动时间延长、活动距离增加等焦虑样行为。3 种捏脊干预组(固定、交替、递增)均能显著减少模型鼠活动距离和活动时间,其中,递增组在活动时间和交替组在活动距离上的改善优于固定组。三箱社交实验显示模型组社交指数下降,经捏脊干预后各组交互能力均有提升,递增组效果最为显著。尼氏染色表明模型组海马 CA1、CA2 区存在神经元排列紊乱、尼氏体阳性细胞减少等损伤,捏脊干预后各组神经元结构均有改善:固定组、交替组、递增组 CA1、CA2 区尼氏体阳性细胞数量增加,其中递增组尼氏体阳性细胞数量增加最显著。行为学与组织学结果共同提示,3 种刺激量均能有效减轻自闭症大鼠海马神经元的损伤以改善行为障碍,其中递增刺激量捏脊法效果最为明显。

促炎因子和抗炎因子的平衡共同维持神经系统的正常发育与认知功能,其中,IL-1 β 是一种促炎因子,主要由单核细胞和巨噬细胞产生,在机体系统与局部炎症中起着重要作用^[23],是研究炎症状态的最佳生物标志物之一。TNF- α 主要由肥大细胞和活化的单核/巨噬细胞产生,可通过激活 NF- κ B 等通路诱导 IL-6、IL-1 等炎症因子的产生^[24]。IL-1 β 与 TNF- α 在脑内参与免疫反应等中枢神经系统的活动,研究发现,自闭症患者的多个脑区中出现小胶质细胞的激活,并通过释放大量 IL-1 β 、TNF- α 等炎症细胞因子介导大脑神经元的病理损伤^[25]。IL-1Ra 是 IL-1 α 和 IL-1 β 这些 IL-1 促炎因子的抑制剂^[26]。大脑内 IL-1Ra 作为内源性拮抗剂抑制炎症反应以及抗氧化应激,从而保护神经元功能^[27]。本研究结果显示:模型组海马 CA1、CA2 区促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 表达升高,保护因子 IL-1Ra 表达降低,提示自闭症模型大鼠海马 CA1、CA2 区处于炎症状态。经 3 种刺激捏脊干预的固定组、交替组、递增组海马 CA1、CA2 区促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 表达降低,保护因子 IL-1Ra 表达升高,说明捏脊能够抑制海马区神经元细胞的炎症损伤,减轻炎症状态。固定刺激量捏脊与交替刺激量捏脊的效果无明显差异,递增刺激量捏脊干预效果最为显著。固定刺激量捏脊的持续使用可能使机体产生耐受,从而不利于提升干预效果,而递增、交替刺激量捏脊可能通过提高机体的耐受性,进而发挥优于固定刺激量捏脊的干预效果,这

可能也是两种干预方式之间无明显差距的原因。

综上所述,固定、递增、交替刺激量捏脊均能改善自闭症大鼠的行为障碍,减少焦虑样行为,提高社交能力,与其改善海马炎症状态和减轻神经元损伤有关。其中,交替、递增刺激量捏脊较固定刺激量捏脊疗效更佳,且递增刺激量捏脊疗效最佳。

参考文献

- [1] ZHUANG H B, LIANG Z Y, MA G W, et al. Autism spectrum disorder: Pathogenesis, biomarker, and intervention therapy [J]. MedComm, 2024, 5(3): e497.
- [2] WANG L, WANG B Q, WU C Y, et al. Autism spectrum disorder: Neurodevelopmental risk factors, biological mechanism, and precision therapy[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(3): 1819.
- [3] 崔霞,白雪,王瀚东,等.王素梅基于五脏-五神-五官辨治儿童孤独症经验[J].中医杂志,2022,63(11):1017-1021.
- [4] 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.
- [5] 张碧玉,詹陈菊,郑晓燕,等.摩腹捏脊疗法对小儿肺脾气虚型慢性咳嗽康复护理效果的影响[J].全科护理,2023,21(32):4548-4551.
- [6] 熊英,樊璞,沈楚楚,等.脾虚对哮喘大鼠脂质介质水平影响及捏脊法的干预效应研究[J].中国中医基础医学杂志,2018,24(7):916-919.
- [7] 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,2019:62-72.
- [8] SCHNEIDER T, PRZEWOŁOCKI R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Animal model of autism[J]. Neuropsychopharmacology, 2005, 30(1): 80-89.
- [9] 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.
- [10] 黄惠裕,余真铃,缪少芳,等.捏脊按摩对大鼠缺血缺氧性脑病的干预作用及机制研究[J].福建中医药,2022,53(1):17-21.
- [11] 唐勇.实验针灸学[M].3版.上海:上海科学技术出版社,2021:146-149.
- [12] JIAN J, LI L G, ZHAO P J, et al. TCHis mitigate oxidative stress and improve abnormal behavior in a prenatal valproic acid-exposed rat model of autism[J]. Physiological Genomics, 2022, 54(9): 325-336.
- [13] 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.
- [14] READING R. Patches of disorganization in the neocortex of children with autism[J]. Child: Care, Health and Development, 2014, 40(4): 610.
- [15] TSILIONI I, PATEL A B, PANTAZOPOULOS H, et al. IL-37 is increased in brains of children with autism spectrum disorder and inhibits human microglia stimulated by neurotensin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(43): 21659-21665.
- [16] KIM H J, CHO M H, SHIM W H, et al. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects[J]. Molecular Psychiatry, 2017, 22(11): 1576-1584.
- [17] 高一城,王继红,王海宽,等.推拿治疗量-效关系的研究思路及优化[J].时珍国医国药,2019,30(12):2951-2953.
- [18] HAN J S. Acupuncture: Neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies[J]. Trends in Neurosciences, 2003, 26(1): 17-22.
- [19] 陈碧玮,陈少宗,刘存志.针刺作用量-效关系研究与针灸精准治疗:转化医学视角[J].针刺研究,2023,48(1):32-36.
- [20] 朱兵.系统针灸学:复兴“体表医学”[M].北京:人民卫生出版社,2015:228-230.
- [21] 龚梦华.捏脊的持续效应对自闭症模型大鼠海马内源性大麻素受体及相关水解酶的影响[D].福州:福建中医药大学,2023:28-36.
- [22] ROULLET F I, WOLLASTON L, DECATANZARO D, et al. Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid[J]. Neuroscience, 2010, 170(2): 514-522.
- [23] 张春艳.头穴丛刺结合丰富环境对孤独症大鼠炎症损伤及细胞凋亡的影响[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2019:31-38.
- [24] SZALECKI M, MALINOWSKA A, PROKOP-PIOTROWSKA M, et al. Interactions between the growth hormone and cytokines - A review[J]. Advances in Medical Sciences, 2018, 63(2): 285-289.
- [25] SINISCALCO D, SCHULTZ S, BRIGIDA A L, et al. Inflammation and neuro-immune dysregulations in autism spectrum disorders[J]. Pharmaceuticals, 2018, 11(2): 56.
- [26] SRIVASTAVA D, GHOSHAL U, MITTAL R D, et al. Associations between IL-1RA polymorphisms and small intestinal bacterial overgrowth among patients with irritable bowel syndrome from India[J]. Neurogastroenterology & Motility, 2014, 26(10): 1408-1416.
- [27] 杨倩.白细胞介素1受体拮抗剂对慢性脑低灌注大鼠的认知保护作用及机制研究[D].太原:山西医科大学,2016:13-15.

(本文编辑 匡静之)