

Pathol Res Pract. 2009, 205(9): 626-633.

- [11] Licchesi JD, Van Neste L, Tiwari VK, et al. Transcriptional regulation of Wnt inhibitory factor-1 by Miz-1/c-Myc [J]. Oncogene. 2010; 29(44): 5923-5934.

- [12] 王剑,郑洪新,刘研,等. 补肾益髓中药复方对去卵巢骨质疏松症大鼠骨组织 Runx2 mRNA 及蛋白表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(8):890-895, 907.

(本文编辑:李海燕 本文校对:林银英 收稿日期:2018-10-10)

## 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\*

俞萍 郑昌岳 李凤 蒋剑文

(福建省级机关医院康复科,福建 福州 350001)

**摘要:**目的 观察针刺长强穴对自闭症模型大鼠学习记忆功能、海马区  $\beta$ -catenin 和 GSK-3 $\beta$  蛋白表达的影响。方法 选健康成年 Wistar 雄性及雌性大鼠各 10 只,进行雌、雄合笼,随机分为 2 组,一组在怀孕 12 d 时给予母鼠腹腔注射丙戊酸钠,其产下的仔鼠随机分为非针刺对照组 10 只、非穴治疗对照组 10 只、针刺“长强”穴组 9 只。一组产下空白对照组。治疗结束后行水迷宫实验检测及免疫组化技术检测。结果 针刺长强穴组及空白对照组与非针刺对照模型组相比,其平均逃避潜伏期明显缩短 ( $P<0.05$ ),其海马区  $\beta$ -catenin 蛋白阳性细胞率明显下调 ( $P<0.05$ ),其海马区 GSK-3 $\beta$  蛋白阳性细胞率明显上调 ( $P<0.05$ )。结论 针刺“长强”穴可通过调节 Wnt 通路上的  $\beta$ -catenin 和 GSK-3 $\beta$  蛋白产生影响进而提高自闭症模型大鼠学习记忆能力。

**关键词:**自闭症;长强穴;海马;Wnt 通路;动物实验;蛋白表达;郁证

doi:10.3969/j.issn.1672-2779.2019.01.044

文章编号:1672-2779(2019)-01-0111-03

### The Effect of Acupuncture at Changqiang (GV1) on the Related Protein Expression in the Hippocampus of an Autistic Rat Model

YU Ping, ZHENG Chanyue, LI Feng, JIANG Jianwen

(Physiatry Department, Fujian Province Governmental Hospital, Fujian province, Fuzhou 350001, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of acupuncture at Changqiang (GV1) on the learning and memory function in rat models of autism as well as on the  $\beta$ -catenin and GSK-3 $\beta$  protein expression of hippocampus region. **Methods** Choosing 10 healthy adult Wistar male rats and female rats, they were randomly divided into 2 groups. One group was injected with valproate after 12 days of pregnancy, and the birth of rats were randomly divided into a non-acupoint group, a model group, an electroacupuncture at Changqiang group. Another group gave birth to a blank control group. After treatment, the water maze test and immunohistochemical test were performed. **Results** Compared with the non-acupoint group, the average escape latency was significantly shortened ( $P<0.05$ ) by a blank control group and an electroacupuncture at Changqiang group, the hippocampus  $\beta$ -catenin protein positive cells rate significantly lowered ( $P<0.05$ ), and the hippocampus GSK-3 $\beta$  protein positive cells rate significantly raised ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The acupuncture at Changqiang (GV1) can be regulated by Wnt pathway on the  $\beta$ -catenin and GSK-3 $\beta$  protein protein and improve learning and memory ability in rat models of autism.

**Keywords:** autism; Changqiang (GV1); hippocampus; Wnt pathway; animal experiment; protein expression; melancholia

儿童自闭症 (children autism, CA) 又可称为孤独症,是指在 3 岁之前发病,其主要表现症状为不同程度的社会交流能力缺陷、语言发育障碍、重复刻板以及狭隘的兴趣等的一种疾病<sup>[1]</sup>。由于自闭症的发病机制尚不明确,目前尚无专门针对自闭症的特异性治疗药物,基础研究中我们发现针刺长强穴可改善自闭症模型大鼠学习和记忆能力<sup>[2]</sup>。已有的研究认为与自闭症关系最密切的脑区形态结构有前额叶皮层和海马等<sup>[3]</sup>。而 Wnt 信号通路通过调控神经元发育,在早期胚胎发育中起了重要作用。因此认为此通路与自闭症患者和动物模型早期脑

的过度发育有关<sup>[4]</sup>。 $\beta$ -catenin 是一种多功能信号蛋白,可进入细胞核内,参与基因的表达,在 Wnt 信号通路中处于重要地位。位于通路上游的 GSK-3 $\beta$  是一个最主要的负性调节因子,有效磷酸化  $\beta$ -catenin,导致  $\beta$ -catenin 的积聚与活化。这两个重要蛋白直接影响着 Wnt 信号通路所起到的生物学功能。鉴于  $\beta$ -catenin 和 GSK-3 $\beta$  在 Wnt 信号通路中的关键作用,本实验拟通过针刺干预自闭症模型大鼠长强穴后,观察这两个信号蛋白在大鼠脑海马内的蛋白表达情况与细胞形态的变化,以希望认识到这些变化与学习记忆功能改善之间的相关性。

#### 1 实验材料

1.1 主要试剂及设备 丙戊酸钠 (Sigma); 一抗  $\beta$ -catenin

\* 基金项目:福建省卫生计生委青年科研课题项目[No.2017-1-35]

(博士德 BA0426); 一抗 GSK-3 $\beta$  (博士德 BA0906); 二抗 sp-9001 (invitrogen sp-9001); DAB (北京中杉 zli-9032); Morris 水迷宫 RB-100AV2.5.1、生物组织脱水机 ZT-14S; 生物组织石蜡包埋机 YB-6LF; RM2015 切片机 (德国莱卡)

## 2 实验方法

**2.1 实验动物模型制备及动物分组** 本课题选取福建中医药大学实验动物中心提供健康成年 Wistar 雄性 300~350 g 及雌性 200~250 g 大鼠各 10 只, 待大鼠熟悉环境 1 周后, 予雌、雄各一只合笼, 饲养在带有托盘的铁笼子中并过夜, 到第二天早晨 9 点左右, 检查到托盘中有阴栓的雌鼠记为胚胎第 1 天 (Embryofoday, E1), 这时将雌、雄分笼, 并将受孕母鼠放入带有木屑的垫料笼中单独饲养。将受孕母鼠按随机数字表法分成 2 组, 1 组 9 只孕鼠, 在 E12 天时给予母鼠 600 mg/kg 的 VPA (用 0.85% 的生理盐水配成 250 mg/mL 的溶液) 腹腔注射<sup>[5]</sup>, 是为模型组; 另外 1 组为 1 对, 进行正常饲养, 是为空白对照组。模型组母鼠产下的仔鼠记为模型鼠; 正常对照组母鼠产下的仔鼠记为正常对照组。第 23 天仔鼠雌雄分笼, 按随机数字法分组, 1~9 号为针刺“长强”穴组, 10~19 号为非针刺对照模型组, 即模型组; 20~29 号为非穴位针刺治疗组。正常对照组生下 12 只, 随机筛选 10 只为空白对照组。

## 2.2 针刺干预

**2.2.1 穴位选择** 参照《实验针灸学》<sup>[6]</sup>中的定位方法取长强穴: 位于大鼠肛门和尾骨部之间的凹陷处; 非穴为: 在大鼠腋中线处, 在肋弓最低点上 1 cm 非经非穴处。

**2.2.2 刺法** 仔鼠生出 23 天后, 针刺长强穴组以 30 号 0.5 寸毫针 (佳健牌, 无锡佳健医疗器械有限公司生产) 直刺约 0.2 寸, 非穴位针刺对照组同样以 30 号 0.5 寸毫针直刺 0.2 寸, 2 组行平补平泻提插手法 1 min。每日于上午 9 时行针刺手法 1 次, 连续针刺 10 日为 1 个疗程, 1 个疗程后休息 2 日再行针刺治疗, 连续 3 个疗程。非针刺模型组、空白对照组仅每日模拟针刺组行抓取动作, 不作治疗, 并在相同条件下饲养。

**2.3 Morris 水迷宫行为学测试** 水迷宫直径为 120 cm, 深为 50 cm, 注入水深为 30 cm, 水温控制在 22 ℃~25 ℃, 通过池壁上的 4 个等分距离点把水池分为 4 个象限, 并在第三象限的中央放置一直径为 12 cm, 略低于水平面 1.5 cm 的圆形黑色平台。水迷宫定位航行试验: 于每日上午 9 时开始, 将大鼠沿着水池壁放入水中, 从第一象限开始, 通过图像采集和处理系统记录大鼠找到平台所用的时间及轨迹, 若大鼠在 60 s 内找到并站上平台, 就进行下一象限测试, 如果大鼠在 60 s 内还未登上平台, 实验人员就帮助大鼠站上平台, 并在平台上站立 10 s,

10 s 后让老鼠置于鼠笼中休息 1 min, 之后再继续进行下一象限测试, 第 2 日开始就从第 2 象限开始, 以此类推, 连续 4 日。

## 2.4 大鼠海马区 $\beta$ -catenin 和 GSK-3 $\beta$ 蛋白表达的观察

**2.4.1 样品采集及处理** 针刺治疗结束后, 参照如下方法进行取材: 抓取大鼠, 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 待大鼠昏迷后, 将其胸腔剪开, 充分暴露心脏, 并剪开大鼠的右心耳放血, 同时将圆头针插入大鼠心尖, 迅速向心脏内推注生理盐水, 直至观察到从剪开的右心耳处流出清亮的液体为止, 大约需推 50 mL; 随后立即换针筒, 保持针头不移位, 向心脏内缓慢灌入 4% 的多聚甲醛, 待大鼠的四肢、尾巴完全僵直时, 拔出针头, 断头, 从枕骨大孔往前剪开皮肤, 沿人字缝分开颅骨, 暴露脑组织, 并迅速剥离脑膜及神经, 使之与颅骨分离, 取出脑组织, 浸没于 4% 多聚甲醛液体中, 参照大脑脑定位定向图谱<sup>[7]</sup>, 冠状面切取前脑 -3.14 mm ~ -6.3 mm 部分约 3 mm 厚脑片, 包埋切片后行免疫组化检测: 首先将组织切片附于经多聚赖氨酸附膜的载玻片上, 60 ℃ 过夜; 之后进行脱蜡、脱水; 接下来进行抗原修复及封闭。甩去多余液体, 不洗; 之后进行滴加一抗、二抗和显色, 最后进行苏木素复染, 并在显微镜下观察。

**2.5 统计学方法** 以上实验所得数据用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。平均逃避潜伏期: 各组间数据采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为有统计意义。

大鼠海马区  $\beta$ -catenin 和 GSK-3 $\beta$  蛋白表达的观察: 空白组、非针刺模型组、针刺长强穴组、非穴治疗组组间采用图片对比观察, 记录阳性细胞率, 采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为有统计意义。

## 3 结果

**3.1 Morris 水迷宫观察结果** 表1结果显示: 在水迷宫实验中, 针刺长强穴组与非针刺对照模型组相比, 其逃避潜伏期所用时间明显缩短 ( $P < 0.05$ ); 而空白对照组与非针刺对照模型组比, 其所用时间也明显缩短 ( $P < 0.05$ ), 其结果均具有统计学意义。

表1 大鼠定位航行试验潜伏期比较 ( $\bar{x} \pm s, s$ )

| 组别      | 只数 | 逃避潜伏期                         |
|---------|----|-------------------------------|
| 空白组     | 10 | 40.78 $\pm$ 2.09 <sup>▲</sup> |
| 模型对照组   | 10 | 54.66 $\pm$ 7.08              |
| 非穴治疗对照组 | 10 | 46.84 $\pm$ 7.08              |
| 针刺长强组   | 9  | 44.18 $\pm$ 6.88 <sup>*</sup> |

注: 针刺长强穴组与模型对照组相比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; 空白组与模型对照组相比, <sup>▲</sup> $P < 0.05$

## 3.2 大鼠海马区 $\beta$ -catenin 和 GSK-3 $\beta$ 蛋白表达的观察

**3.2.1 大鼠海马区  $\beta$ -catenin 蛋白表达的观察结果** 表2结果显示: 针刺长强穴组与非针刺对照模型组相比, 其

海马区  $\beta$ -catenin 蛋白表达的阳性率明显下调 ( $P<0.05$ )；而空白对照组与非针刺对照模型组比，其阳性细胞表达率也明显下调 ( $P<0.05$ )，其结果均具有统计学意义。

表2 大鼠海马区  $\beta$ -catenin蛋白表达的阳性率比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别      | 只数 | $\beta$ -catenin蛋白     |
|---------|----|------------------------|
| 空白组     | 10 | 2.60±0.97 <sup>▲</sup> |
| 模型对照组   | 10 | 5.20±1.03              |
| 非穴治疗对照组 | 10 | 4.20±1.48              |
| 针刺长强组   | 9  | 3.11±1.05 <sup>*</sup> |

注：针刺长强穴组与模型对照组相比较，\* $P<0.05$ ；空白组与模型对照组相比，<sup>▲</sup> $P<0.05$

3.2.2 海马区 GSK-3 $\beta$  蛋白表达的观察结果 表3结果显示：针刺长强穴组与非针刺对照模型组相比，其海马区 GSK-3 $\beta$  蛋白表达的阳性率明显上调 ( $P<0.05$ )；空白对照组与非针刺对照模型组、非穴治疗组相比，其阳性细胞率明显上调 ( $P<0.05$ )，其结果均具有统计学意义。

表3 大鼠海马区 GSK-3 $\beta$  蛋白表达的阳性率比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别      | 只数 | GSK-3 $\beta$ 蛋白        |
|---------|----|-------------------------|
| 空白组     | 10 | 6.00±0.00 <sup>▲*</sup> |
| 模型对照组   | 10 | 2.20±1.03               |
| 非穴治疗对照组 | 10 | 3.80±0.63               |
| 针刺长强组   | 9  | 4.88±1.45 <sup>*</sup>  |

注：针刺长强穴组与模型对照组相比较，\* $P<0.05$ ；空白组与模型对照组相比，<sup>▲</sup> $P<0.05$ ；与非穴组相比，\* $P<0.05$ 。

#### 4 分析与讨论

儿童自闭症，又称儿童孤独症，是一种较为严重的发育障碍性疾病。研究认为，在遗传与环境因素的相互作用下，可引发个体发育早期阶段神经元细胞增殖、分化、凋亡与迁移异常，从而导致相关脑区形态结构异常<sup>[3]</sup>。通过大量的临床治疗和实验研究报道发现针刺长强穴治疗精神发育迟滞儿童，可提高患儿的语言、认知能力和智力<sup>[8]</sup>。长强穴，又名尾闾穴，位于尾骨尖下 0.5 寸，尾骨端与肛门连线的中点处，为督脉之络穴，别走任脉。《难经·二十八难》中首先提出长强与脑的直接联系，其指出：“督脉者，其余下极之俞，并于脊里，上至风府，入属于脑”。长强为督脉的第一个穴，这里的“下极之俞”指的应该就是长强。所以可通过针刺长强，可起到通督调阳的作用，即“长强者长于阳而强于阴，生气通于天，其质造形而通于地”，为纯阳初始，使脏中生春阳气正，舒缓各部器官，具有很好的宁神镇痉，脊强反折，除其痲疾之功效<sup>[9]</sup>。

Wnt 通路是一条对个体的早期发育，是脑发育尤其重要的信号通路。Wnt 信号在动物胚胎的早期生长和形态发育、器官形成、组织再生和其它生理过程中，具有至关重要的作用<sup>[10]</sup>。多种神经性疾病都可能与 Wnt 信号

通路的异常有关<sup>[11]</sup>。通路上的  $\beta$ -catenin 作为一种黏附因子，功能主要为介导细胞间黏附和参与基因的表达，在通路中处于关键地位。位于信号通路  $\beta$ -catenin 上游的 GSK-3 $\beta$  是一个主要负调节因子，阻止其下游的  $\beta$ -catenin 降解，使神经元增值过快、数量增加，导致神经元形成错误的联系<sup>[12]</sup>，从而使自闭症患者表现出社会交往障碍、刻板行为模式及情绪焦虑等方面的异常<sup>[12]</sup>。本实验通过针刺干预自闭症模型大鼠后，其长强穴治疗组在水迷宫试验中其定位航行试验逃避潜伏期所用的时间明显缩短，表明针刺长强穴后自闭症模型大鼠的学习记忆能力有所提高；其海马区 Wnt 通路上的  $\beta$ -catenin 表达下调、GSK-3 $\beta$  表达上调，从而使亢进的 Wnt 通路趋于正常。这些指标提示从脑内在结构到外在行为表现都说明针刺长强穴对自闭症模型大鼠具有治疗作用。观察这两个信号蛋白在大鼠脑内海马区的蛋白表达与细胞形态的变化，以希望认识到这些变化与学习记忆功能改善之间的相关性，但其具体作用机制尚不明了，有待进一步研究其相关性。

#### 参考文献

- [1] 陈秀洁. 儿童运动障碍和精神障碍的诊断与治疗[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:749-754.
- [2] 张学君,洪霖,洪钰竺,等. 电针后海穴对自闭症模型大鼠学习和记忆能力的影响[J]. 福建中医药大学学报,2013,23(1):13-15.
- [3] Stanfield A C, McInosh A M, SPeneerM D, et al. Toward aneuroanatomyofautism:Asystematicreviewandmeta-analysisofstructural magnctieresonance imaging stUdies[J].EurPsychlatry,2008,23(4):1-11.
- [4] 陈明军,于剑锋,柴继侠,等. wnt 通路信号蛋白  $\beta$ -catenin 和 GSK-3 $\beta$  在孤独症模型大鼠脑中表达的变化[J]. 神经解剖学杂志,2009,25(4):361-368.
- [5] 张应花,贾云杰,张天然,等. wnt/ $\beta$ -catenin 信息通路对孤独症模型大鼠重复刻板样行为的影响[J]. 中国临床解剖学杂志,2015,33(4):430-433,443.
- [6] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:326.
- [7] 诸葛启钊. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:16-20.
- [8] 吴强,韩平,王振宇,等. 针刺长强穴治疗精神发育迟滞患儿 57 例多中心临床研究报告[J]. 中华中医药杂志,2011,26(11):2668-2671.
- [9] 朱震亨. 格致余论[M]. 北京:人民卫生出版社,1963:48-53.
- [10] 尹定子,宋海云. Wnt 信号通路:调控机理和生物学意义[J]. 中国细胞生物学学报,2011,33(2):103-111.
- [11] M ajum der M, D utta S, Barm an R N, et al. Association between autism and variants in the win- gless -type MMTV integration site family member 2 (WNT2) gene[J]. Intemational Journal of Neuropsychopharmacology,2010,13(4):443-449.
- [12] Kalkman H O.A review of the evidence for the canonical Wnt-pathway in autism spectrum disorders[J]. Molecular Autjism 2012,3(15):81-90.
- [13] 陈天红,孙莉. Wnt 信号通路在自闭症疾病中的作用[J]. 华夏医学,2016,5(3):162-166.

(本文编辑:李海燕 本文校对:陈永华 收稿日期:2018-09-14)