

针刺肾俞足三里 干预绝经后骨质疏松症大鼠模型的影响[※]

李 俐¹ 郑旭仙² 曾雅芬² 余晓雯² 吴明霞^{1*}

(1 福建中医药大学附属第二人民医院针灸科,福建 福州 350003;2 福建中医药大学针灸学院,福建 福州 350122)

摘要:目的 探讨针刺肾俞足三里防治绝经后骨质疏松症(PMOP)的可能作用机制。方法 50只雌性SD大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组、肾俞足三里组和非经非穴组。行双侧卵巢切除手术复制骨质疏松模型。肾俞足三里组、非经非穴组每天针刺1次,留针30 min,10次1疗程,疗程间期5天,6个疗程后同时处死5组大鼠,取右侧胫骨测量胫骨、胫骨上端骨密度;RT-PCR法检测大鼠腰椎c-myc、Cyclin D1和Runx2 mRNA表达。结果 与假手术组比较,模型组胫骨、胫骨上端骨密度降低($P<0.05$);与模型组比较,肾俞足三里组胫骨、胫骨上端骨密度升高($P<0.05$),非经非穴组胫骨、胫骨上端骨密度差异均无统计学意义($P>0.05$);c-myc mRNA表达:肾俞足三里组c-myc mRNA表达与假手术组比较差异无统计学意义($P>0.05$);各实验组Cyclin D1灰度值均值差异均无统计学意义($P>0.05$);Runx2 mRNA表达:与空白组比较,模型组Runx2 mRNA表达降低($P<0.05$),与模型组比较,肾俞足三里组与非经非穴组的表达升高($P<0.05$)。结论 针刺肾俞、足三里穴可改善绝经后骨质疏松的骨密度降低,其作用机制可能与调节腰椎c-myc、Cyclin D1和Runx2 mRNA表达有关。

关键词:肾俞;足三里;绝经;骨质疏松症;骨密度;动物实验;痹证

doi:10.3969/j.issn.1672-2779.2019.01.043

文章编号:1672-2779(2019)-01-0107-05

The Effect of Acupuncture at Shenshu (BL23) and Zusanli (ST36) in the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis Rat Model

LI Li¹, ZHENG Xuxian², ZENG Yafen², YU Xiaowen², WU Mingxia¹

(1. Department of Acupuncture, the Second People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian Province, Fuzhou 350003, China;

2. College of Acupuncture-Moxibustion, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian Province, Fuzhou 350122, China)

Abstract: **Objective** To explore the possible mechanisms of acupuncture at Shenshu (BL23) and Zusanli (ST36) for the treatment of postmenopausal osteoporosis (PMOP). **Methods** Fifty female SD rats were randomly divided into a blank group, a sham-operation group, a model group, a acupoint (BL 23 and ST36) group and a non-acupoint group. The osteoporotic rat model was established by bilateral ovariectomy. The acupoint group and non-acupoint group were given acupuncture once per day. 10 treatments made one session. There were 5 days at the interval between two sessions. All rats were killed and the bone mineral density (BMD) of the right tibias and proximal tibias were obtained after 6 sessions. Meanwhile, the expression of c-myc, Cyclin D1, and Runx2 mRNA in lumbar vertebra were detected by RT-PCR. **Results** BMD of the right tibias and proximal tibias in the model group were lower than those in the sham-operation group ($P<0.05$). Compared with the model group, the BMD of the right tibias and proximal tibias in the acupoint group were obviously increased ($P<0.05$), but no significant difference in the non-acupoint group ($P>0.05$). Compared with the sham-operation group, the expression of c-myc mRNA of the acupoint group had no significant differences ($P>0.05$). The difference in the mean grey values of Cyclin D1 in each experimental group was not statistically significant ($P>0.05$). The expression of Runx2 mRNA in the model group were lower than those in the blank group ($P<0.05$). Compared with the model group, the expression of Runx2 mRNA in the acupoint group and non-acupoint group were obviously increased ($P<0.05$). **Conclusion** Acupuncture at Shenshu (BL23) and Zusanli (ST36) could reduce PMOP and increase BMD. This action is probably associated with the regulation of the expression of c-myc, Cyclin D1, and Runx2 mRNA in lumbar vertebra.

Keywords: Shenshu (BL23); Zusanli (ST36); postmenopausal; osteoporosis; bone mineral density; animal experiment; arthromyodynia

随着经济、医疗水平的提高,人类的平均寿命不断增加,骨质疏松在老年群体中普遍存在。绝经后骨质疏

松症(PostmenoPausal osteoPorosis, PMOP)又称I型骨质疏松症,是指由于绝经后妇女卵巢生理功能以及雌激素水平的下降,使得骨代谢过程失衡,骨吸收大于骨形成而导致的骨量低下、骨组织显微结构破坏、骨强度降低、骨脆性增加。临床主要以疼痛、关节变形甚则骨折为主要表现的一种全身性骨疾病^[1]。因其有较高的致残

※ 基金项目:国家自然科学基金面上项目[No.81373719];福建省自然科学基金[No.2015J01479]

* 通讯作者:wumingxiafz@163.com

率,严重威胁到患者的生命健康及生活质量。中医学认为,骨的生长、发育主要受肾精盛衰影响,而妇女绝经后肾精亏虚故易发“骨痿”“骨痹”“骨枯”等病症。目前临床上主要是运用药物治疗,但药物治疗所产生的副作用较多,部分患者不能耐受或者不能接受。本实验通过观察针刺干预对绝经后骨质疏松症大鼠胫骨骨密度、腰椎 c-myc、Cyclin D1 和 Runx2 mRNA 表达的影响,探讨针刺防治绝经后骨质疏松症的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 7 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 50 只,动物许可证号 (SCXK (沪) 2012-0002),由福建中医药大学实验动物中心提供 (许可证号:SYXK (闽) 2009-0001)。喂养 1 月后,按随机数字表法分为造模组 30 只,假手术组 10 只和空白组 10 只。

1.2 主要试剂、材料及仪器 试剂及材料:cDNA 一链合成试剂盒 逆转录试剂盒 (Vazyme 公司)、PCR Mix PCR 聚合酶 (Vazyme 公司)、Trizol RNA 提取试剂盒 (Vazyme 公司)、琼脂糖-凝胶电泳用 (英国 OXOID 公司)、水合氯醛 (福建中医药大学附属第二人民医院提供)。仪器:双能 X 射线骨密度仪 (美国 HOLOGIC DISCOVERY CI 型)、洗板机 (Wellwash 4 MK2, Thermo 芬兰)、基因扩增仪 (美国 Applied Biosystems 9700 PCR System)、酶标仪 (DENLEY DRAGON Wellscan MK 3, Thermo, 芬兰)、分析软件:Ascent software for Multiskan)、水浴锅 (上海精宏)、华佗牌一次性使用无菌针灸针 (0.25 mm×13 mm, 苏食药器械生产许 2001-0020 号)。

1.3 研究方法

1.3.1 模型制作 参照文献^[2]方法造模:将 30 只大鼠用 10% 的水合氯醛 (3 mL/kg 体质量) 腹腔注射麻醉。腹位固定,沿腹部腹正中线 (腹白线) 剑突下 2 cm 处备皮,以安尔碘消毒,依次切开皮肤、肌肉、腹膜,用镊子轻轻将乳白色组织提出腹腔,即可见被包裹的卵巢,分离后钳夹、结扎输卵管,摘除卵巢。腹腔给予青霉素生理盐水 (2 万 U/mL) 抗炎,分层缝合皮肤,盖软毛巾保温待麻醉苏醒。术后连续做 1 周阴道图片,检测卵巢是否切除干净。假手术组 10 只造模切除卵巢附近的与卵巢大小相近的脂肪组织代替双侧卵巢。大鼠术后均予腹腔注射青霉素生理盐水 (2 万 U/mL) 抗炎,每日注射 0.5 mL,连续 3 日。

术后造模组死亡 2 只,死亡原因考虑麻醉药过敏或麻醉时间过长引起体温过低死亡。术后假手术组死亡 2 只大鼠,死亡原因考虑同上述。将造模组同上述随机分组方法分为模型组 9 只,肾俞足三里组 10 只,非经非穴组 9 只。造模后饲养 90 d。

1.3.2 治疗方法 肾俞足三里组:取肾俞和足三里穴,定

位参照《实验针灸学》^[3]。穴位常规消毒后,用 0.5 寸毫针进行针刺,行提插捻转补法,留针 30 min,每隔 10 min 行针 1 次,每日 1 次,10 次 1 疗程,疗程间期 5 d,共治疗 6 个疗程,持续 90 d。

非经非穴组:取非经非穴进行针刺,定位参照《实验针灸学》^[3]。针刺操作同穴位组,余同穴位组。模型组、假手术组、空白组除套头、抓取操作外,不给予任何处理。

操作由福建中医药大学两名针灸推拿学研究生配合进行,保证各组接受 2 名操作者治疗的大鼠只数相同,期间,各组动物均正常饮食,自由饮水。

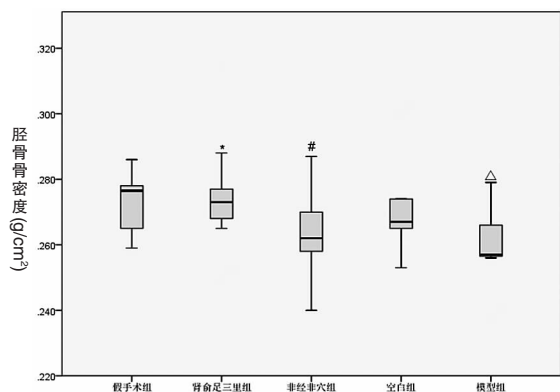
1.3.3 标本采集 治疗结束后,处死大鼠,完整摘取右胫骨,剥离骨周围软组织,生理盐水纱布包裹,放入 PE 密封袋,用于骨密度的测定;取第 1~3 腰椎,无菌纱布浸透 0.9% 盐水后包裹,于液氮中保存,用于 mRNA 的检测。以上标本取材时均按分组编号做好标记。

1.3.4 检测指标 (1) 骨密度:治疗结束后将大鼠处死,取右侧胫骨,采用美国 HOLOGIC DISCOVERY CI 型双能 X 线骨密度仪,测定大鼠右胫骨、右胫骨上端骨密度。由福建省中医药研究院提供检测服务;(2) mRNA 测定:PCR 法检测过程如下:取 L1~L3 椎体加 200 μ L Trizol,研磨后加入 800 μ L 的 Trizol 溶液,混匀后于室温下静置 15 min,加氯仿,静置 10 min 后离心。提取上层水相并加入等体积的异丙醇,混匀后置于低温环境 30 min,后离心 10 min,去上清液,留取沉淀。加乙醇振荡洗涤 RNA 沉淀 1 次,后离心 5 min。再水溶解。用 HiScript[®] II RT SuperMix for PCR 进行逆转录反应。由福州沃森生物技术有限公司合成内参及引物,内参序列:GAPDH (Rat) 140bp 上游:5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACAG-3'。引物序列:Runx2 (rat) 385bp 上游:5'-TGCCATCGTGTGTGAACATAAGA-3',下游:5'-CGTGTGTCAGAAGGAGTCAGGATG-3', c-myc (rat) 220bp 上游:5'-CCGTTCAA-GCAGATGAGCAC-3',下游:5'-GCCAAGGTTGTGAGGTTAGG-3', cyclin D1 (rat) 173bp 上游:5'-GCCGATGA-GAACAAGCAGAT-3',下游:5'-CGGTAGCAGGAGGAAAGT-3',下游:5'-GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC-3'。预变性 (94 $^{\circ}$ C, 5 min)、变性: (94 $^{\circ}$ C, 30 s),退火: (58 $^{\circ}$ C, 30 s)、延伸 (72 $^{\circ}$ C, 20 s)、重复变性→延伸 (30 个循环)、延伸 (72 $^{\circ}$ C, 7 min)。反应完成后取 4 μ L PCR 扩增产物于 0.9% 琼脂糖凝胶电泳进行检测 30 min 后,凝胶成像仪检测条带。

1.3.5 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,各指标计量数值均用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组数据服从正态分布且方差齐性使用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验;任一组数据不符合正态分布的,对秩转换后产生的新变量进行 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

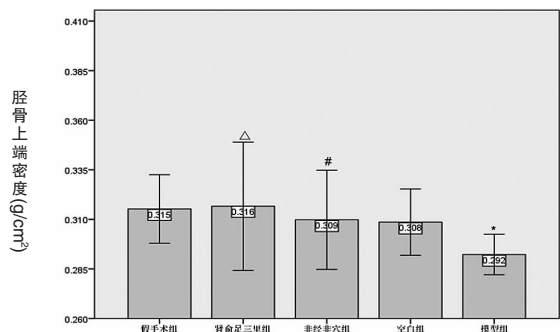
2.1 各组大鼠右胫骨骨密度测定结果比较 结果如图1 (SPSS 18.0 统计学软件制图) 所示: 与假手术组比, 模型组骨密度下降 ($P<0.05$)。与模型组相比, 肾俞足三里组骨密度有显著性差异 ($P<0.05$), 而非经非穴组差异无统计学意义。



注: 与模型组比较, $^*P<0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P>0.05$; 与假手术组比较, $^{\Delta}P<0.05$

图1 大鼠胫骨骨密度比较

2.2 各组大鼠胫骨上端骨密度测定结果比较 结果如图2 显示: 与假手术组相比, 模型组骨密度均值降低 ($P<0.05$)。与模型组相比, 肾俞足三里组骨密度均值有显著性差异 ($P<0.05$), 而非经非穴组骨密度均值差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注: 与假手术组比较, $^*P<0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P>0.05$

误差条形图: ± 1 SD

图2 大鼠胫骨上端骨密度比较

2.3 mRNA测定凝胶成像仪检测条 如图3 所示。

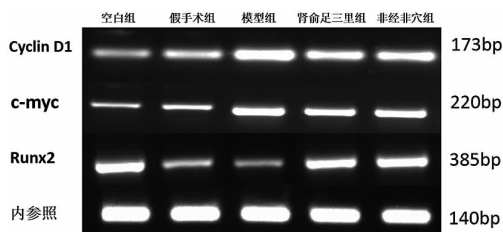
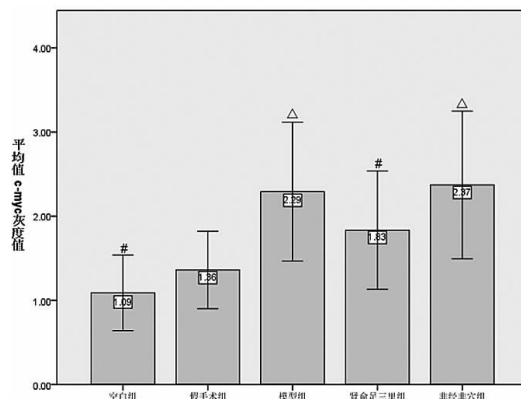


图3 mRNA测定凝胶成像仪检测条

2.4 各组大鼠腰椎c-myc、Cyclin D1和Runx2 mRNA表达结果比较

2.4.1 c-myc mRNA测定比较 结果如图4 所示: 与假手

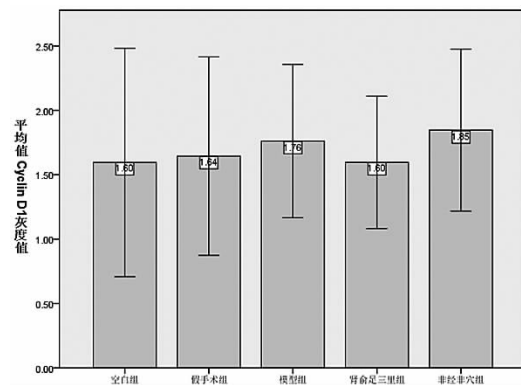
术比较, 空白组 ($P>0.05$), 模型组 ($P<0.05$), 肾俞足三里组 ($P>0.05$), 非经非穴组 ($P<0.05$)。



注: 与假手术组比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与假手术组比较, $^{\Delta}P>0.05$
误差条形图: ± 1 SD

图4 c-myc mRNA灰度值比较

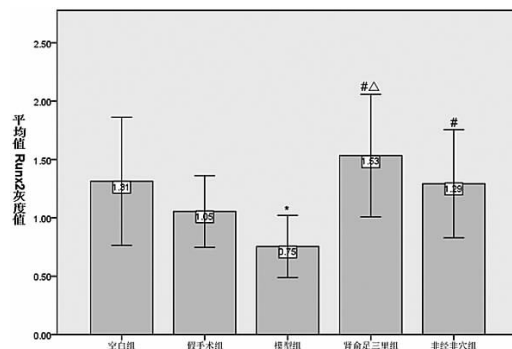
2.4.2 Cyclin D1 mRNA 测定比较 结果如图5 所示: Cyclin D1 灰度值均值非经非穴组>模型组>假手术组>肾俞足三里组>空白组 ($P>0.05$), 差异均无统计学意义。



误差条形图: ± 1 SD

图5 Cyclin D1灰度值比较

2.4.3 Runx2 mRNA测定比较 结果如图6 所示: 与空白组相比, 模型组 ($P<0.05$); 与模型组相比, 肾俞足三里组 ($P<0.05$)、非经非穴组 ($P<0.05$); 与非经非穴组相比, 肾俞足三里组 ($P>0.05$)。



注: 与空白组比较, $^*P<0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与非经非穴组比较, $^{\Delta}P>0.05$

误差条形图: ± 1 SD

图6 Runx2灰度值比较

3 讨论

绝经后骨质疏松症 (PMOP) 多认为是由于卵巢功能减退而导致的一种常见骨骼疾病, 因其伴随着骨强度下降、骨折易感性增加, 使得致残率与致死率较高。研究发现雌激素是通过受体以及细胞因子的介导, 从而影响成骨细胞与破骨细胞的凋亡, 并可通过促进体内骨保护素的水平升高, 降低骨保护素受体的水平, 从而抑制了破骨细胞对骨的吸收^[4]。绝经后妇女因雌激素水平的降低, 破骨细胞活性增强, 成骨细胞受抑制, 骨吸收和骨形成平衡失调, 导致骨量丢失, 引起骨质疏松^[5]。根据其临床表现及发病的部位, 应当属于中医学“骨痿”“骨痹”“骨枯”的范畴。《素问·痿论》曰:“肾主身之骨髓。肾气热, 则腰背不举, 骨枯而髓减, 发为骨痿。”《备急千金要方·骨极》指出:“骨极者, 主肾也, 肾应骨, 骨与肾合, ……若肾病则骨极, 牙齿苦痛, 手足疼, 不能久立, 屈伸不利, 身痹脑髓痿。”肾为先天之本, 主骨生髓藏精, 其充在骨, 女子七七“天癸”绝, 肾精逐渐衰少, 骨髓化源不足, 不能濡养骨骼而致骨骼脆弱无力, 继而出现腰背酸痛、胫膝酸软等骨质疏松症的典型表现^[6]。PMOP 的发病根源皆在于肾, 病机关键是肾虚精衰, 骨髓空虚, 骨骼失养。又如《医宗必读》指出:“阳虚则血气少, 不能润养宗筋, 故弛纵, 宗筋弛纵则带脉不能收引, 故足痿不用。”《灵枢·决气》曰:“谷入气满, 淖泽注于骨。”脾为后天之本, 气血生化之源, 妇女在绝经前, 身体脾胃虚衰, 运化受碍, 气血乏源, 血不化精, 无以充养先天之精, 则肾虚经绝而骨痿, 致骨骼疏松发生。故本病与脾胃的关系也密切。因此治疗应补肾虚同时兼顾脾胃。本实验取肾之背俞穴肾俞, 配合胃之下合穴足三里, 起到培肾壮骨、健脾益气、强壮体质的作用。针灸治疗绝经后骨质疏松症的疗效及阐明其作用机理, 仍然是目前针刺治疗 PMOP 研究的主要内容之一。

本实验结果显示, 与假手术组相比, 模型组胫骨、胫骨上端骨密度均降低 ($P<0.05$), 证实造模能降低骨密度。与模型组相比, 肾俞足三里组大鼠胫骨、胫骨上端骨密度均升高 ($P<0.05$); 非经非穴组胫骨、胫骨上端骨密度差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。从结果可以看出, 针刺肾俞、足三里可使胫骨、胫骨上端骨密度升高, 这表明针刺肾俞、足三里穴可改善绝经后骨质疏松的骨密度降低。本研究从实验的角度验证了针刺肾俞、足三里穴可改善绝经后骨质疏松的骨密度降低。结合其他实验研究^[7-9]都得出针刺相关穴位可以改善去卵巢大鼠的骨密度水平, 其结论与我们的研究结论一致。

作为 Wnt/ β -catenin 通路的两个下游靶基因, c-myc 和 Cyclin D1 通过一系列的转录后, 可使细胞进入 S 期, 促进成骨细胞增殖分化。c-myc 通过基因启动子上的

TCF4 结合位点与 β -catenin 结合, 调节细胞周期, 促进 G1 到 S 期的转变, 从而促进成骨细胞的增殖。Cyclin D1 作为细胞周期增殖的关键蛋白, 促进细胞周期从 G1 期到 S 转换, 从而调节细胞分化增殖^[10-11]。另外, Runx2 作为调节成骨细胞分化和骨发育的关键转录因子, 能调控膜内和软骨内骨化成骨, 促进骨形成^[12]。

根据实验的结果显示, 肾俞足三里组 c-myc mRNA 表达与假手术组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 说明针刺肾俞、足三里穴产生的作用能防治绝经后骨质疏松症大鼠模型。针刺肾俞、足三里对 Cyclin D1 mRNA 表达差异均无统计学意义, 延长实验周期或者扩大样本量也许能进一步发现他们的关系, 也可能是针刺肾俞、足三里的作用靶向并非是 Cyclin D1。模型组大鼠腰椎 Runx2 mRNA 较空白组降低, 提示腰椎中 Runx2 mRNA 表达降低可能是绝经后骨质疏松症的发病机制之一, 通过针刺肾俞、足三里穴可能通过使腰椎中 Runx2 mRNA 表达升高而防治 PMOP, 肾俞足三里组 Runx2 灰度值虽略大于非经非穴组, 考虑受样本量、干预时间限制, 目前 Runx2 灰度值还不足以体现差异。

“肾主骨”, 肾气虚衰是绝经后骨质疏松症的根本病因, 肾俞穴是肾脏之气输注在背腰部的腧穴, 针之可补肾壮骨、强壮体质, 固护人体先天之本。足三里为胃腑之下合穴, 针之可补益脾胃、强壮机体、培补后天。中医从整体出发, 顾先天及后天之本, 改善 PMOP 病机, 从而达到改善骨质疏松的治疗目的。本实验结果提示该腧穴配合对临床具有较好的参考价值。

参考文献

- [1] 潘芳芳, 周志华, 王永平, 等. 针药并用对绝经后骨质疏松症大鼠血清 E₂、骨密度的影响[J]. 上海针灸杂志, 2012, 31(06):444-446.
- [2] 李恩, 薛延, 王洪复, 等. 骨质疏松鉴定诊断与治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005:625.
- [3] 郭义. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008:417.
- [4] 李金艳, 陈颖, 唐艳丽, 等. 针灸治疗骨质疏松症效应机制研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(3):315-321.
- [5] Dalle Carbonare L, Valenti MT, Zanatta M, et al. Circulating mesenchymal stem cells with abnormal osteogenic differentiation in patients with osteoporosis. Arthritis Rheum, 2009(11): 3356-3365.
- [6] 金珉廷, 郑洪新. 中医肾藏精生髓主骨理论与骨质疏松症[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(3):35-36.
- [7] 王亚军, 刘梅洁, 鞠大宏, 等. 针刺对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨密度、骨形态计计量的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(7):857-859, 871.
- [8] 魏玉芳, 刘钰林, 张姝红, 等. 针刺对去势大鼠骨质疏松模型雌激素及骨密度作用的研究[J]. 针刺研究, 2007(1):38-41.
- [9] 欧阳钢, 唐曦, 莫非, 等. 针刺干预对去卵巢大鼠血清胃饥饿素和骨密度的影响[J]. 针刺研究, 2013, 38(4):277-280.
- [10] Matsubayashi S, Nakashima M, Kumagai K, et al. Immunohistochemical analyses of β -catenin and Cyclin D1 expression in giant cell tumor of bone (GCTB): a possible role of Wnt pathway in GCTB tumorigenesis[J].

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 β -catenin 和 GSK-3 β 蛋白表达的影响。方法 选健康成年 Wistar 雄性大鼠各 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 β -catenin 蛋白阳性细胞率明显下调 ($P<0.05$),其海马区 GSK-3 β 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 β -catenin 和 GSK-3 β 蛋白产生影响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 β -catenin and GSK-3 β 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 β -catenin protein positive cells rate significantly lowered ($P<0.05$), and the hippocampus GSK-3 β protein positive cells rate significantly raised ($P<0.05$). **Conclusion** The acupuncture at Changqiang (GV1) can be regulated by Wnt pathway on the β -catenin and GSK-3 β 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^[1]。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^[2]。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^[3]。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^[4]。 β -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 β 是一个最主要的负性调节因子,有效磷酸化 β -catenin,导致 β -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 β -catenin 和 GSK-3 β 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 β -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]