

☆ 机制探讨 ☆

针刺“内关”改善孤独症大鼠行为缺陷
及神经炎性反应的机制研究党伟利^{1,2}, 梁绿圆^{1,2}, 李予欣^{1,2}, 谭祥汉³, 曹佳蕾^{1,2}, 李致遥^{1,2}, 刘赛丹^{1,2}, 马丙祥^{1,2}(¹河南中医药大学第一附属医院儿科, 郑州 450099; ²河南中医药大学儿科医学院, 郑州 450046; ³美国康奈尔大学威尔医学院, 美国纽约 10065)

【摘要】目的:探讨针刺“内关”对丙戊酸(VPA)诱导的孤独症(ASD)样幼鼠行为障碍、神经元损伤及神经炎性反应的改善作用。**方法:**将受孕SD大鼠随机分为对照组和造模组,造模组于孕第12.5天腹腔注射VPA(600 mg/kg)构建子代ASD模型。子代幼鼠随机分为正常组、模型组、假针刺组、针刺组、溶剂组和阳性药组,每组9只。针刺组从幼鼠第7天起每日针刺双侧“内关”,每周干预6 d,持续15 d。干预结束后,进行水迷宫、三箱社交和自我理毛行为学测试;采用苏木精-伊红和高尔基染色观察海马神经元形态与树突棘密度;Western blot法检测海马突触相关蛋白突触后密度蛋白95(PSD95)、谷氨酸脱羧酶67(GAD67)、囊泡GABA转运体(VGAT)及细胞焦亡相关蛋白NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)、消皮素D N端结构域(GSDMD-NT)、cleaved Caspase-1的表达;ELISA法检测海马组织白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素18(IL-18)含量与乳酸脱氢酶(LDH)活性;荧光探针法检测海马活性氧(ROS)水平;免疫荧光染色观察海马小胶质细胞活化标志物离子钙结合适配分子1(Iba1)阳性表达;TUNEL染色检测海马细胞凋亡。**结果:**与正常组比较,模型组幼鼠体重降低($P<0.01$, $P<0.05$),逃避潜伏期延长($P<0.01$, $P<0.001$),穿越原平台次数和目标象限停留时间减少($P<0.01$, $P<0.001$),社交指数与社交偏好降低($P<0.05$, $P<0.001$),自我理毛次数增加($P<0.001$);海马神经元排列紊乱、树突棘密度降低($P<0.001$);ROS水平、LDH活性及IL-1 β 、IL-18含量升高($P<0.001$);PSD95、NLRP3蛋白表达水平及GSDMD-NT/GSDMD、cleaved Caspase-1/pro-Caspase-1比值升高($P<0.001$),GAD67、VGAT蛋白表达水平降低($P<0.001$);Iba1阳性细胞数及凋亡细胞率增加($P<0.001$)。与模型组比较,针刺组和阳性药组体重升高($P<0.05$),逃避潜伏期缩短($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.05$),目标象限停留时间增加($P<0.05$),社交指数和社交偏好升高($P<0.05$, $P<0.01$),自我理毛次数减少($P<0.05$, $P<0.01$);树突棘密度增加($P<0.05$, $P<0.001$);ROS水平、LDH活性及IL-1 β 、IL-18含量降低($P<0.001$, $P<0.01$);PSD95、NLRP3表达水平及GSDMD-NT/GSDMD、cleaved Caspase-1/pro-Caspase-1比值降低($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.01$),GAD67和VGAT表达水平升高($P<0.001$, $P<0.05$);Iba1阳性细胞数、细胞凋亡率下降($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。阳性药组逃避潜伏期较针刺组缩短($P<0.05$);ROS水平,PSD95、NLRP3、GAD67、VGAT表达水平及cleaved Caspase-1/pro-Caspase-1比值降低($P<0.01$, $P<0.05$);细胞凋亡率下降($P<0.05$)。针刺组较假针刺组、阳性药组较溶剂组体重升高($P<0.05$),逃避潜伏期缩短($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$),穿越原平台次数和目标象限停留时间增多($P<0.05$, $P<0.01$),社交指数和社交偏好升高($P<0.05$),自我理毛次数减少($P<0.05$, $P<0.01$);树突棘密度均增加($P<0.05$, $P<0.001$);ROS水平、LDH活性及IL-1 β 、IL-18含量降低($P<0.01$, $P<0.001$);PSD95、NLRP3表达水平及GSDMD-NT/GSDMD、cleaved Caspase-1/pro-Caspase-1比值降低($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.01$),GAD67和VGAT表达升高($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$);Iba1阳性细胞数、细胞凋亡率下降($P<0.01$, $P<0.001$)。**结论:**针刺“内关”可改善VPA诱导的ASD样幼鼠社交缺陷、重复刻板行为及认知障碍,其机制可能与减轻海马神经元损伤、调节突触蛋白表达平衡、抑制氧化应激

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251268

引用格式:党伟利,梁绿圆,李予欣,等.针刺“内关”改善孤独症大鼠行为缺陷及神经炎性反应的机制研究[J].针刺研究,2026,51(9):1132-1143.

项目来源:国家中医药管理局第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目(No.国中医药人教函[2022]76号);河南省中医药科学研究专项(No. 2024ZY3028)

通信作者:马丙祥, E-mail:mbx1963@126.com

及NLRP3炎性小体介导的神经炎症反应有关。

【关键词】 针刺;孤独症;社交缺陷;重复性刻板行为;认知缺损;海马;神经炎症反应;氧化应激;突触可塑性

Effect of acupuncture at “Neiguan” (PC6) on behavioral deficits and neuroinflammation in rats with autism

Dang Weili^{1,2}, Liang Lüyuan^{1,2}, Li Yuxin^{1,2}, Tan Xianghan³, Cao Jialei^{1,2}, Li Zhiyao^{1,2}, Liu Saidan^{1,2}, Ma Bingxiang^{1,2}
(¹Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450099, China; ²School of Pediatric Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046; ³Weill Cornell Medicine, Cornell University, New York 10065, USA)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the ameliorative effect of acupuncture at “Neiguan” (PC6) on behavioral deficits, hippocampal neuronal damage, and neuroinflammation in young rats with valproic acid (VPA)-induced autism spectrum disorder (ASD). **Methods** Pregnant SD rats were randomly divided into a control group and a model group. The ASD model was established by a single intraperitoneal injection of VPA (600 mg/kg) on gestational day 12.5. After birth, the offspring young rats were then randomly divided into control (CON), ASD model (model), sham-acupuncture (ASD+sham-Acu), acupuncture (ASD+Acu), solvent (DMSO) control (ASD+DMSO), and positive drug bumetanide (ASD+Bu) groups ($n=9$ in each group). Manual acupuncture (uniform reinforcing-reducing manipulation) was applied to bilateral PC6 of newborn rats for 30 min, once daily, 6 d a week, for 15 d (from the 7th day to the 21st day after birth). After acupuncture intervention, behavioral tests including the Morris water maze test, three-chamber social test, and self-grooming test were conducted. The hippocampal tissue was collected for observing changes of neuronal morphology and dendritic spine density by using hematoxylin-eosin and Golgi staining. The expression levels of synapse-related proteins postsynaptic density protein 95 (PSD95), glutamate decarboxylase 67 (GAD67), vesicular GABA transporter (VGAT) and pyroptosis-related proteins NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), gasdermin domain-N-terminal (GSDMD-NT) and cleaved Caspase-1 in the hippocampal tissue were detected by Western blot. The levels of hippocampal interleukin (IL)-1 β , IL-18 and activity of LDH were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The level of hippocampal reactive oxygen species (ROS) were detected by using commercial kits. The activity of hippocampal Iba1-positive cell (microglia) was assessed by immunofluorescence staining, and the cell apoptosis was detected by TdT-mediated dUTP nick-end labeling staining. **Results** Compared with the CON group, the model group showed a significant increase in the escape latency of water maze test, self-grooming times, LDH activity, ROS level, IL-1 β and IL-18 contents, expression of PSD95, NLRP3, ratios of GSDMD-NT/GSDMD and cleaved Caspase-1/pro-Caspase-1, number of Iba1-positive cells and the apoptosis rate ($P<0.01$, $P<0.001$), and a considerable decrease in the body mass, number of platform crossings and time spent in the target quadrant, social index and social preference, number of dendritic spine, and the expressions of GAD67 and VGAT proteins ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$). In comparison with the model group, both the increased and decreased levels of all the indexes mentioned above were reversed in the ASD+Acu and ASD+Bu groups ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$), and the effects of ASD+Acu were evidently superior to those of ASD+Bu in up-regulating the expressions of GAD67 and VGAT proteins ($P<0.05$), but inferior to those of ASD+Bu in shortening the escape latency, reducing ROS level, and down-regulating the protein expressions of PSD95 and NLRP3, ratio of cleaved Caspase-1/pro-Caspase-1, and apoptosis rate ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$). The effects of acupuncture were evidently better than those of the sham acupuncture in increasing the body mass and number of platform crossings, shortening the escape latency, prolonging the time spent in the target quadrant, increasing the social index and social preference, reducing the self-grooming times, elevating the number of dendritic spine, and the expressions of GAD67 and VGAT proteins ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$), and in down-regulating the LDH activity and ROS levels, IL-1 β and IL-18 contents, and the expressions of PSD95 and NLRP3, ratios of GSDMD-NT/GSDMD and cleaved Caspase-1/pro-Caspase-1, Iba1-positive cell number, and the apoptosis rate ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$). Similarly, in comparison with the ASD+DMSO group, the ASD+Bu group showed a significant improvement in the aforementioned behavioral and molecular biological indexes ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$). **Conclusion** Acupuncture at PC6 can improve social deficits, repetitive stereotyped behavior and cognitive impairment in VPA-induced ASD-like young rats, which may be related to its functions in alleviating hippocampal

neuronal damage, regulating the balance of synaptic proteins, and inhibiting oxidative stress and NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation.

【KEYWORDS】 Acupuncture; Autism; Social deficits; Repetitive stereotyped behavior; Cognitive impairment; Hippocampus; Neuroinflammation; Oxidative stress; Synaptic plasticity

孤独症谱系障碍(ASD)是一种复杂的神经发育障碍,核心症状包括社交沟通障碍、兴趣狭窄及重复刻板行为^[1-2]。全球范围内ASD患病率呈上升趋势,给家庭和社会带来沉重负担^[3]。目前ASD的病因尚未完全阐明,普遍认为其发病与遗传、环境因素及神经免疫异常密切相关^[4]。临床缺乏根治ASD的特效药物,主要依赖行为干预和对症治疗,但效果有限且常伴不良反应^[5],因此探索安全有效的替代疗法尤为重要。针灸作为传统非药物疗法,在调节神经系统功能方面具有独特优势。

ASD以社交障碍、刻板行为、言语迟缓为核心表现,中医学认为当属“呆病”“语迟”“无慧”等神志病范畴。基于“心主神明”及“心包代心受邪”理论,手厥阴心包经之络穴内关成为治疗神志疾病的首选穴位。临床研究显示,针刺内关可显著改善抑郁症、焦虑症、阿尔茨海默病及脑卒中后认知障碍等神志相关疾病的核心症状^[6]。这些理论与临床依据共同指向一个明确的穴位特异性假设:针刺内关可能通过调节与“心”“神”相关的核心脑网络功能,改善ASD的核心症状。前期临床观察也提示,针刺内关对改善ASD患儿的言语功能与社交反应具有潜力^[7],然而其是否通过调节脑内神经炎症反应与突触可塑性发挥作用尚需实验证据支持。丙戊酸(VPA)诱导的孕鼠模型是国际公认的ASD动物模型,其子代可出现与人类ASD类似的行为学异常和神经病理改变^[8]。本研究通过建立VPA诱导的ASD幼年大鼠模型,系统观察针刺“内关”对模型大鼠行为学、海马组织结构、突触蛋白表达及神经炎症反应水平的影响,旨在从行为与病理层面验证其治疗作用及机制,为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选取SD雌雄大鼠(8~10周龄)共16只,其中雌鼠12只,雄鼠4只,体质量200~250 g,购自郑州大学(河南省实验动物中心),生产许可证号:SCXK(豫)2022-0001。动物饲养于温度(21±1)℃、12 h/12 h明暗交替的环境中,实验期间大鼠自由饮水与摄食。本实验方案经河南中医药大学实验动物福利与伦理委员会批准(批准号:DWLL202109005)。

实验过程严格按照中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》执行,并遵循相关动物伦理规定^[9]。

1.2 主要试剂与仪器

VPA(上海阿拉丁),布美他尼(美国MCE),二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝),苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、高尔基染色试剂盒、TUNEL细胞凋亡检测试剂盒、4%多聚甲醛(武汉赛维尔),蛋白提取RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京百奥莱博),突触后密度蛋白95(PSD95)抗体、pro-Caspase-1抗体、cleaved Caspase-1抗体(美国CST),囊泡GABA转运体(VGAT)抗体(美国Affinity),NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)抗体(瑞士AdipoGen),谷氨酸脱羧酶67(GAD67)抗体、消皮素D N端结构域(GSDMD-NT)抗体、GSDMD抗体、离子钙结合适配分子1(Iba1)抗体(英国Abcam), β -actin抗体(美国Proteintech),HRP标记山羊抗兔IgG、HRP标记山羊抗小鼠IgG(上海艾博抗),白细胞介素(IL)-1 β ELISA检测试剂盒、IL-18 ELISA检测试剂盒、活性氧(ROS)检测试剂盒(武汉伊莱瑞特),乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒、Cy3标记山羊抗兔IgG(上海碧云天)。

立体定位仪、微量注射泵(美国RWD),0.20 mm×7 mm华佗牌针灸针(苏州医疗用品厂),Morris水迷宫系统、旷场实验系统(上海吉量软件),ZL-024型三箱社交实验系统(北京众实迪创),切片机(金华科迪),BZ-X800型荧光显微镜(日本Keyence),DM500型光学显微镜(德国Leica),组织切片扫描仪(匈牙利3DHitech),垂直电泳仪及转膜系统(美国Bio-Rad),ChampChemi 910型化学发光成像系统(北京赛智生命),Multiskan FC型酶标仪、902-ULTS型超低温冰箱(美国Thermo Fisher Scientific),Synergy H1型荧光酶标仪(美国BioTek),ME204E型精密电子天平(瑞士Mettler Toledo),5427R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf)。

1.3 造模方法及动物分组

ASD动物模型参照前期方法^[8]并加以改进建立。将成年雌雄SD大鼠按3:1比例合笼交配,以雌鼠出现阴道栓并检测到精子的当天记为妊娠第

0.5天。于妊娠第12.5天对7只孕鼠腹腔注射VPA以诱导子代ASD模型,注射剂量为600 mg/kg(使用0.9%氯化钠溶液配制),与之对应的2只正常孕鼠在相同时点注射等体积0.9%氯化钠溶液。将幼鼠出生后第1天记为P1,其中未注射VPA的2只正常孕鼠的子代作为正常组。当幼鼠模型同时满足尾部畸形或躯体发育延迟、社交互动缺陷及重复刻板行为4类特征时,即可判定VPA诱导的ASD大鼠模型构建成功^[10-13]。在P7检测模型是否成功,并将造模成功的幼鼠按照体质量随机分为模型组、针刺组、假针刺组、阳性药组、溶剂组,每组各9只,正常组9只幼鼠与各模型组幼鼠在相同环境下常规饲养。于P7、P14及P21记录各组幼鼠体质量,以评估其发育情况。

1.4 干预方法

正常组、模型组常规饲养,从P7开始,每日给予与针刺组相同的抓取与固定,不施加任何干预措施。

针刺组:因P7对应大鼠脑发育关键期,相当于人类婴儿早期神经可塑性阶段^[14],故针刺组从P7开始,每日针刺双侧“内关”,参照《实验动物常用穴位名称与定位 第2部分:大鼠》^[15]进行取穴。使用针灸针垂直刺入约1~2 mm,施以平补平泻捻转手法(以拇指与食指持针,捻转频率约为2 Hz,即每秒约2个往复)15 s,操作后留针30 min。每日1次,每周干预6 d,休息1 d,持续至P21。

假针刺组:从P7开始,每日给予与针刺组相同的抓取与固定,假针刺措施为非穴位浅刺,即于“内关”旁开2 mm处刺入1 mm,且不施行捻转手法,治疗时间与针刺组相同。

阳性药组:布美他尼临床已广泛用于治疗ASD^[16-17],故以此药作为阳性药。从P7开始,每日腹腔注射布美他尼^[18],剂量为10 mg/kg(使用含1% DMSO的0.9%氯化钠溶液配制),连续注射7 d。

溶剂组:为验证其中DMSO溶液是否对ASD起治疗作用故设置溶剂组。从P7开始,每日腹腔注射含1% DMSO的氯化钠溶液,连续注射7 d。

1.5 观察指标与检测方法

所有行为学测试均在安静、隔音的环境中进行,不同批次幼鼠的测试时间保持一致。测试顺序为水迷宫实验、三箱社交实验及自我理毛实验。

采用Morris水迷宫系统评估幼鼠空间学习与记忆能力:定位航行实验进行连续5 d的训练。每天将幼鼠从4个不同入水点面向池壁放入水中,记录其找到隐藏平台的逃避潜伏期。若120 s内未找

到平台,则引导其至平台并停留10 s。空间探索实验:于第6天撤去平台,任选一入水点将幼鼠放入水中,记录120 s内其穿越原平台位置的次数及在目标象限停留的时间。

三箱社交实验:采用塑料透明三室箱(120 cm×45 cm×40 cm),2块可活动透明塑料板将其隔为3室,每室长约40 cm,摄像头安装于箱子正上方。实验分为两个阶段。社会交往能力测试:在左右室内分别放置空鼠笼和陌生幼鼠1,将待测幼鼠置于中间区域,自由探索10 min,记录其在3个区域中停留的时间及与陌生鼠1和空鼠笼的嗅触交互时间。社会偏好测试:将空鼠笼替换为另一只陌生幼鼠2,再次将待测幼鼠置于中间区域,自由探索10 min,记录其与陌生鼠1(此时为熟悉鼠)和陌生鼠2的嗅触交互时间。检测结束后,用70%乙醇清洁鼠笼,待其干燥后继续测试。在小鼠自由探索时,通过记录其在各区域的停留时间、接触次数及互动行为计算社交指数(社交指数=与陌生鼠1互动时间÷与空鼠笼互动时间,大于1为正常社交,等于1代表社交冷漠,说明大鼠对空笼与陌生鼠无差别对待,小于1为回避社交)和社交偏好(社交偏好=与陌生鼠2互动时间÷与陌生鼠1互动时间,大于1说明能区分新旧,愿意探索新伙伴,小于或等于1说明不能区分新旧),评估其社交能力(社交指数)和社交新奇性认知(社交偏好)。

自我理毛实验:采用与旷场实验同样的木质敞箱,摄像头安装于箱子正上方。将待测幼鼠提前1 h放入行为学检测室适应环境。正式测试时,将幼鼠放置到敞箱中央使其适应性活动5 min,随后录像并观察10 min内其在敞箱中梳理自身各区域的次数。

取材方法:行为学检测后,以异氟烷吸入麻醉幼鼠,在麻醉状态下进行腹主动脉放血安乐死。每组取3只大鼠的脑组织使用组织固定液进行固定,石蜡包埋,用于检测其病理结构;每组取3只大鼠的脑组织使用高尔基固定液进行固定,用于高尔基染色;每组取3只大鼠的脑组织用于分子检测。

HE染色法检测脑组织病理变化:将固定好的脑组织经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后,石蜡包埋。使用轮转式切片机连续冠状切片,厚度为4 μm,选取包含海马CA1区的切片贴于载玻片。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,按照试剂盒说明书操作,苏木精染液染色8 min,自来水返蓝;伊红染液染色5 min。随后再次经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封片。使用光学显微镜在200倍视野下观

察海马CA1区神经元形态与排列结构,每张切片随机选取5个不重叠视野进行观察并拍照。

高尔基染色法检测神经元突触:分离新鲜全脑组织,立即置于高尔基固定液中室温避光处理14 d。经组织处理液保存后,使用振动切片机切成60 μm厚切片。贴片、显影、冲洗后,用甘油明胶封片,使用组织切片扫描仪进行成像,分析树突棘密度。

Western blot法检测海马组织PSD95、GAD67、VGAT及细胞焦亡相关蛋白NLRP3、GSDMD-NT、cleaved Caspase-1的表达:取海马组织50 mg,用RIPA裂解液提取总蛋白,BCA法进行定量。取等量蛋白进行SDS-PAGE电泳分离,并转至PVDF膜。5%脱脂牛奶封闭1 h后,分别加入PSD95(1:2 000)、GAD67(1:2 000)、VGAT(1:2 000)、NLRP3(1:1 000)、GSDMD-NT(1:1 000)、GSDMD(1:1 000)、cleaved Caspase-1(1:1 000)、pro-Caspase-1(1:1 000)、Caspase-1及β-actin(1:2 000)一抗于4℃孵育过夜。TBST洗涤后,与HRP标记的二抗(1:5 000)室温孵育2 h,使用化学发光底物显影,以Image J 1.53软件分析目标条带的灰度值,以β-actin为内参,以目标蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值作为目标蛋白的相对表达量。

ELISA法检测海马组织IL-1β、IL-18含量及LDH活性:取约20 mg海马组织,按1:9加入预冷的PBS(0.01 mol/L, pH 7.4),冰上匀浆。4℃、3 000×g离心20 min,取上清。严格按照试剂盒说明书操作,将标准品倍比稀释,与样品分别加入预包被抗体的微孔板中,每孔100 μL,室温孵育90 min;洗板5次;加入生物素化检测抗体,室温孵育60 min;洗板5次;加入HRP标记的链霉亲和素,室温孵育30 min;洗板5次;加入TMB底物溶液,室温避光显影15 min;最后加入终止液,立即在酶标仪上于450 nm波长处测量各孔的吸光度值。根据标准曲线计算样品中IL-1β和IL-18的含量,单位以pg/mg蛋白表示。取约10 mg海马组织,加入适量LDH检测裂解液,于冰上匀浆,4℃、12 000×g离心5 min,取上清作为待测样品。按照试剂盒说明书,在96孔板中设立空白孔、标准孔和样品孔。将样品与反应混合液于37℃避光孵育30 min,随后在酶标仪上于450 nm波长处测定吸光度值。根据公式计算样品中LDH的活性。

荧光探针试剂盒检测海马组织ROS水平:取约15 mg海马组织,加入适量PBS冰上匀浆,制备10%组织匀浆液。4℃、1 000×g离心10 min,取

上清。按照ROS检测试剂盒说明书,取100 μL组织匀浆上清加入96孔黑板中,再加入100 μL稀释好的DCFH-DA探针工作液,混匀后37℃避光孵育30 min。用荧光酶标仪在激发波长488 nm、发射波长525 nm下检测各孔的荧光强度。同时制作ROS标准曲线,根据曲线计算样品中的ROS水平,结果以相对荧光单位(RFU)/mg蛋白表示。

免疫荧光染色法检测海马组织小胶质细胞活化标志物Iba1阳性细胞数:将石蜡切片脱蜡、水化后,进行抗原修复,并用0.2% Triton X-100通透,3% BSA封闭。加入Iba1一抗(1:200)于4℃孵育过夜。次日,与Cy3标记的二抗(1:100)室温避光孵育1 h,DAPI复染细胞核后封片,在荧光显微镜下观察并拍摄小胶质细胞的活化情况,计数小胶质细胞活化标志物Iba1阳性细胞数。

TUNEL染色检测海马组织细胞的凋亡情况:石蜡切片经脱蜡、水化后,使用蛋白酶K进行通透。随后按照TUNEL凋亡检测试剂盒说明书操作,末端转移酶将dUTP标记至DNA断裂末端,37℃避光孵育1 h。DAPI复染后封片,于荧光显微镜下观察并统计凋亡细胞数量。凋亡率(%)=凋亡细胞数量÷总细胞数量×100%。

1.6 统计学处理

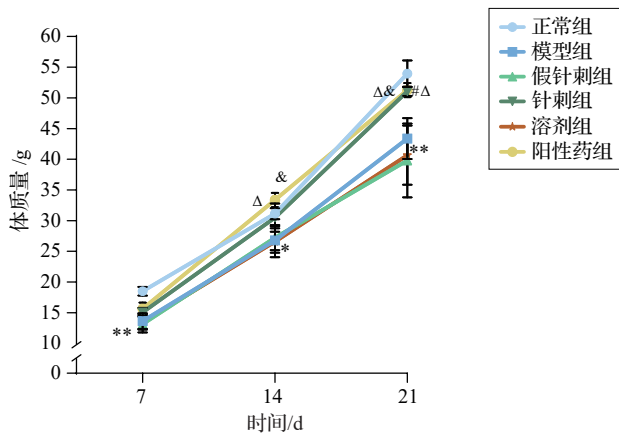
所有实验数据用GraphPad Prism 9.5统计软件进行分析。计量数据符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较用Tukey检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠的ASD核心缺陷比较

与正常组比较,模型组幼鼠从出生后第7天至第21天的体质量降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),表明VPA暴露导致发育迟缓。与模型组比较,针刺组和阳性药组幼鼠体质量在第21天时均升高($P < 0.05$),而假针刺组和溶剂组差异无统计学意义。与假针刺组比较,针刺组幼鼠体质量在第21天时升高($P < 0.05$)。与溶剂组比较,阳性药组体质量在第14、21天时升高($P < 0.05$)。此外,阳性药组体质量与针刺组差异无统计学意义。见图1。

水迷宫结果显示,与正常组比较,模型组逃避潜伏期延长($P < 0.01$, $P < 0.001$),穿越原平台次数和目标象限停留时间减少($P < 0.01$, $P < 0.001$),提示空间学习记忆能力受损。与模型组比较,针刺组



注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$;与假针刺组比较,# $P<0.05$;与溶剂组比较,& $P<0.05$ 。

图 1 各组幼鼠体质量比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

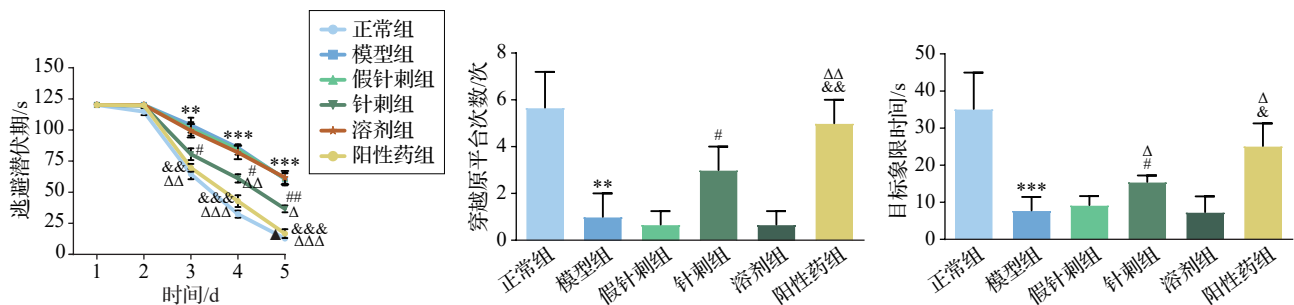
Fig. 1 Comparison of body weight of young rats in the 6 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

和阳性药组逃避潜伏期缩短($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.05$),目标象限停留时间增加($P<0.05$),阳性药组穿越原平台次数增加($P<0.01$),假针刺组和溶剂组差异无统计学意义。与假针刺组比较,针刺组逃避潜伏期缩短($P<0.05$, $P<0.01$),穿越原平台

次数和目标象限停留时间增加($P<0.05$)。与溶剂组比较,阳性药组逃避潜伏期缩短($P<0.01$, $P<0.001$),穿越原平台次数和目标象限停留时间增加($P<0.01$, $P<0.05$)。值得注意的是,阳性药组逃避潜伏期较针刺组缩短($P<0.05$),改善效果更好,而其余两个指标则差异无统计学意义。见图 2。

三箱社交实验结果显示,与正常组比较,模型组社交指数和社交偏好降低($P<0.05$, $P<0.001$)。与模型组比较,针刺组和阳性药组社交指数和社交偏好升高($P<0.05$, $P<0.01$),而假针刺组、溶剂组差异无统计学意义。针刺组较假针刺组、阳性药组较溶剂组的社交指数和社交偏好均升高($P<0.05$)。此外,阳性药组虽稍优于针刺组,但差异无统计学意义。见图 3。

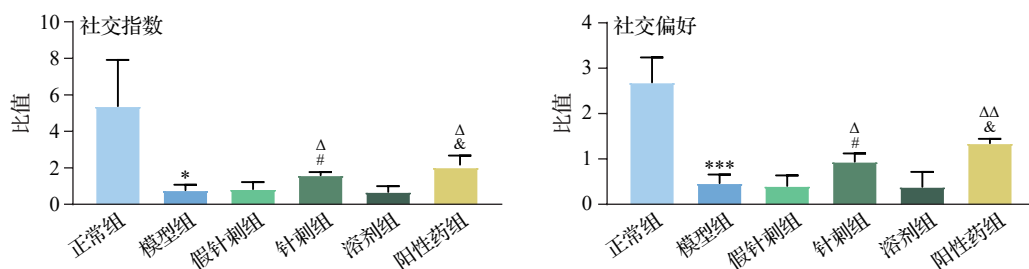
自我理毛实验结果显示,与正常组比较,模型组自我理毛次数增多($P<0.001$)。与模型组比较,针刺组和阳性药组自我理毛次数减少($P<0.05$, $P<0.01$),而假针刺组和溶剂组差异无统计学意义。针刺组较假针刺组、阳性药组较溶剂组的自我理毛次数减少($P<0.05$, $P<0.01$)。阳性药组与针刺组差异无统计学意义。见图 4。



注:与正常组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$;与假针刺组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与溶剂组比较,& $P<0.05$,&& $P<0.01$,&&& $P<0.001$;与针刺组比较,▲ $P<0.05$ 。

图 2 各组大鼠水迷宫实验比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

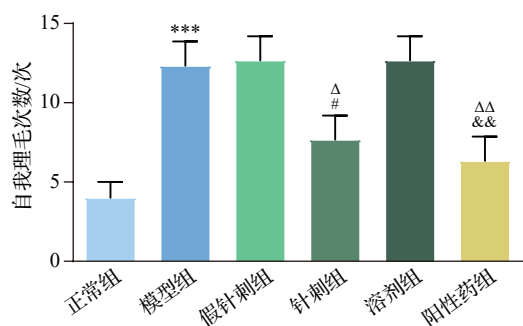
Fig. 2 Comparison of water maze test of rats in the 6 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)



注:与正常组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.001$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与假针刺组比较,# $P<0.05$;与溶剂组比较,& $P<0.05$ 。

图 3 各组大鼠三箱社交实验比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of three-chamber social test of rats in the 6 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)



注:与正常组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,Δ $P<0.05$,
ΔΔ $P<0.01$;与假针刺组比较,# $P<0.05$;与溶剂组比较,
&& $P<0.01$ 。

图4 各组大鼠自我理毛次数比较($\bar{x}\pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of self-grooming times of rats in the 6 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

2.2 各组大鼠海马神经元结构与突触损伤比较

HE染色结果显示,正常组大鼠海马CA1区神经元形态规则,排列整齐,染色均匀;模型组神经元排列紊乱,细胞间隙增大,部分细胞核固缩、深染;针刺组和阳性药组神经元排列较模型组规整,细胞损伤明显减轻。见图5。

高尔基染色结果显示,与正常组比较,模型组海马神经元树突棘密度降低($P<0.001$)。与模型组比较,针刺组和阳性药组树突棘密度增加($P<0.05$, $P<0.001$),而假针刺组和溶剂组差异无统计学意义。针刺组较假针刺组、阳性药组较溶剂组树突棘密度

均增加($P<0.05$, $P<0.001$)。阳性药组的树突棘密度虽略高于针刺组,但差异无统计学意义。见图6。

2.3 各组大鼠海马组织ROS水平和LDH活性比较

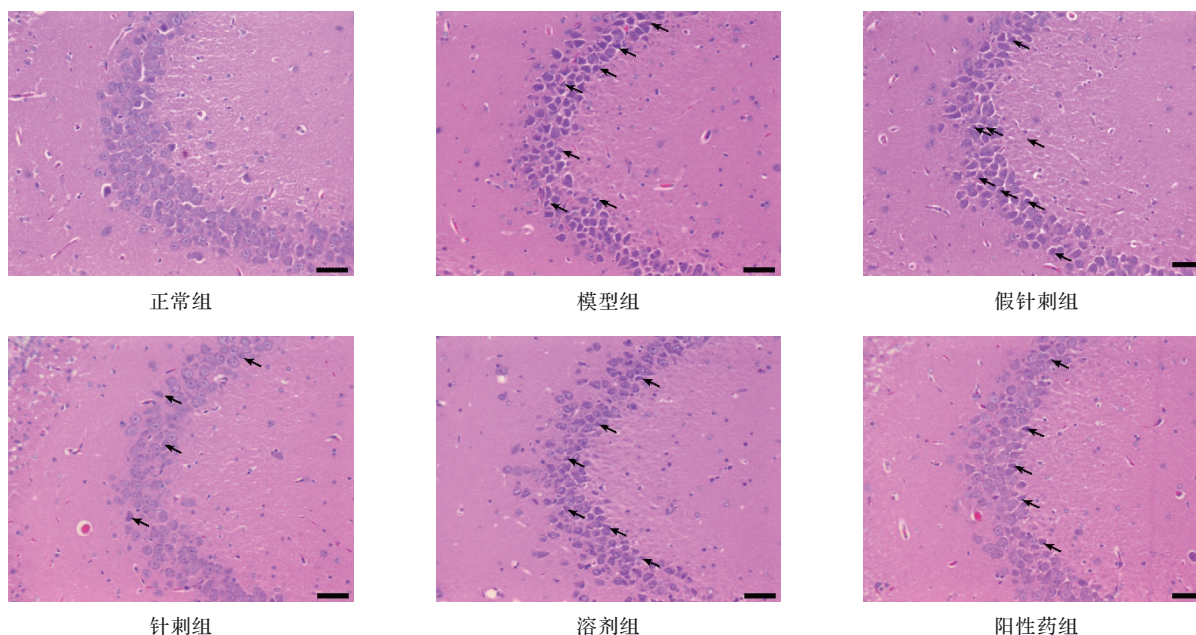
与正常组比较,模型组海马组织ROS水平和LDH活性均升高($P<0.001$)。与模型组比较,针刺组和阳性药组ROS水平和LDH活性均降低($P<0.01$, $P<0.001$),而假针刺组和溶剂组差异无统计学意义。针刺组较假针刺组、阳性药组较溶剂组ROS水平和LDH活性均降低($P<0.01$, $P<0.001$)。阳性药组ROS水平低于针刺组($P<0.01$),而LDH活性差异无统计学意义。见图7、图8。

2.4 各组大鼠海马组织IL-1β、IL-18含量比较

ELISA结果显示,与正常组比较,模型组海马组织IL-1β和IL-18含量升高($P<0.001$)。与模型组比较,针刺组和阳性药组IL-1β和IL-18含量降低($P<0.01$, $P<0.001$),而假针刺组和溶剂组差异无统计学意义。针刺组与假针刺组相比,IL-1β和IL-18含量降低($P<0.01$, $P<0.001$)。阳性药组与溶剂组相比,IL-1β和IL-18含量亦均降低($P<0.001$)。针刺组与阳性药组相比差异无统计学意义。见图9。

2.5 各组大鼠海马组织突触功能标志蛋白PSD95、GAD67、VGAT及NLRP3炎性小体通路相关蛋白表达水平比较

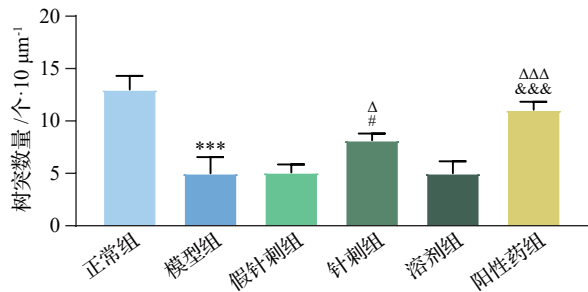
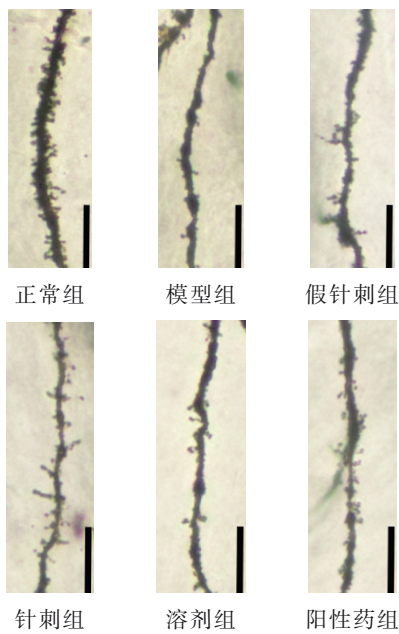
与正常组比较,模型组PSD95、NLRP3蛋白表



注:标尺=50 μm,黑色箭头示神经元发生细胞核固缩、深染。

图5 各组大鼠海马CA1区神经元形态比较(HE染色)

Fig. 5 Comparison of neuronal morphology in hippocampus of rats in the 6 groups (HE staining)

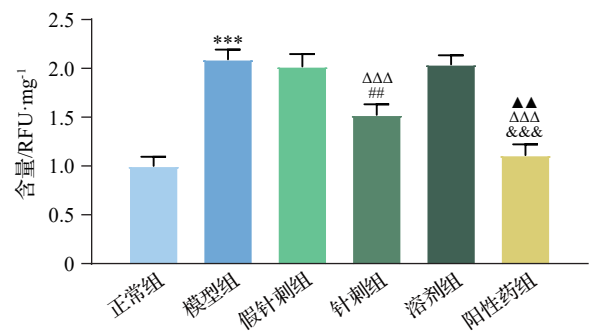


注:标尺=10 μm。与正常组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,Δ $P<0.05$,ΔΔ $P<0.001$;与假针刺组比较, # $P<0.05$;与溶剂组比较, &&& $P<0.001$ 。

图6 各组大鼠海马神经元树突形态及棘密度比较 (高尔基染色, $\bar{x}\pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of dendritic morphology and spine density of rats in the 6 groups (Golgi staining, $\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)

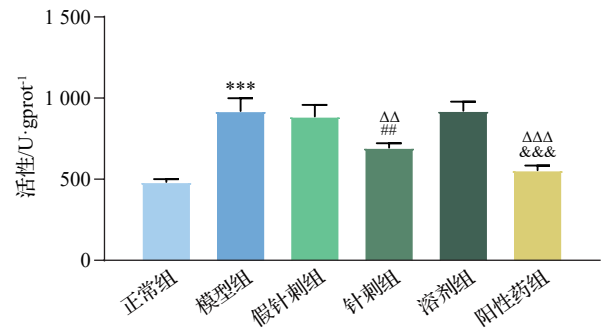
达水平及GSDMD-NT/GSDMD、cleaved Caspase-1/pro-Caspase-1 比值升高 ($P<0.001$), GAD67 和 VGAT 蛋白表达水平降低 ($P<0.001$)。与模型组比较,针刺组和阳性药组 PSD95、NLRP3 表达水平及 GSDMD-NT/GSDMD、cleaved Caspase-1/pro-Caspase-1 比值降低 ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.01$), GAD67 和 VGAT 表达水平升高 ($P<0.001$, $P<0.05$),而假针刺组与溶剂组的上述蛋白表达水平与模型组相比差异无统计学意义。针刺组较假针刺组、阳性药组较溶剂组的 PSD95、NLRP3 表达水平及 GSDMD-NT/GSDMD、cleaved Caspase-1/pro-Caspase-1 比值降低 ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.01$), GAD67 和 VGAT 表达升高 ($P<0.001$, $P<0.01$,



注:ROS为活性氧。与正常组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,ΔΔΔ $P<0.001$;与假针刺组比较, # $P<0.01$;与溶剂组比较, &&& $P<0.001$;与针刺组比较, ▲ $P<0.01$ 。

图7 各组大鼠海马组织 ROS 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, 3只鼠/组)

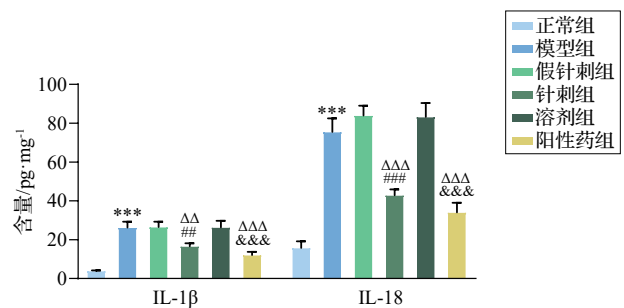
Fig. 7 Comparison of ROS level in hippocampus of rats in the 6 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)



注:LDH为乳酸脱氢酶。与正常组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,ΔΔ $P<0.01$,ΔΔΔ $P<0.001$;与假针刺组比较, ## $P<0.01$;与溶剂组比较, &&& $P<0.001$ 。

图8 各组大鼠海马组织 LDH 活性比较 ($\bar{x}\pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of LDH activity in hippocampus of rats in the 6 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)

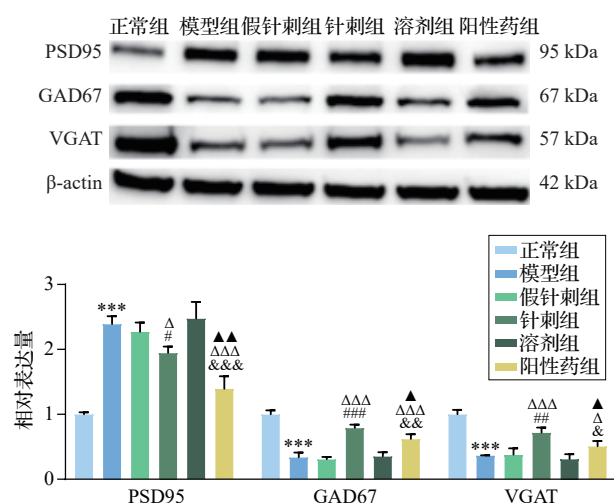


注:IL-1β为白细胞介素-1β,IL-18为白细胞介素-18。与正常组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,ΔΔ $P<0.01$,ΔΔΔ $P<0.001$;与假针刺组比较, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$;与溶剂组比较, &&& $P<0.001$ 。

图9 各组大鼠海马组织 IL-1β、IL-18 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 9 Comparison of IL-1β and IL-18 levels in hippocampus of rats in the 6 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)

$P<0.05$)。值得注意的是,在调节上述蛋白表达方面,与针刺组相比,阳性药组 PSD95、NLRP3、GAD67 和 VGAT 表达水平及 cleaved Caspase-1/pro-Caspase-1 比值降低 ($P<0.01$, $P<0.05$),而 GSDMD-NT/GSDMD 差异无统计学意义。见图 10、图 11。



注:PSD95为突触后密度蛋白95,GAD67为谷氨酸脱羧酶67, VGAT为囊泡GABA转运体。与正常组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,Δ $P<0.05$,ΔΔ $P<0.01$;与假针刺组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与溶剂组比较,& $P<0.05$,&& $P<0.01$,&&& $P<0.001$;与针刺组比较,^ $P<0.05$,^^ $P<0.01$,^^^ $P<0.001$ 。

图 10 各组大鼠海马组织突触功能标志蛋白 PSD95、GAD67、VGAT 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$, 3 只鼠/组)

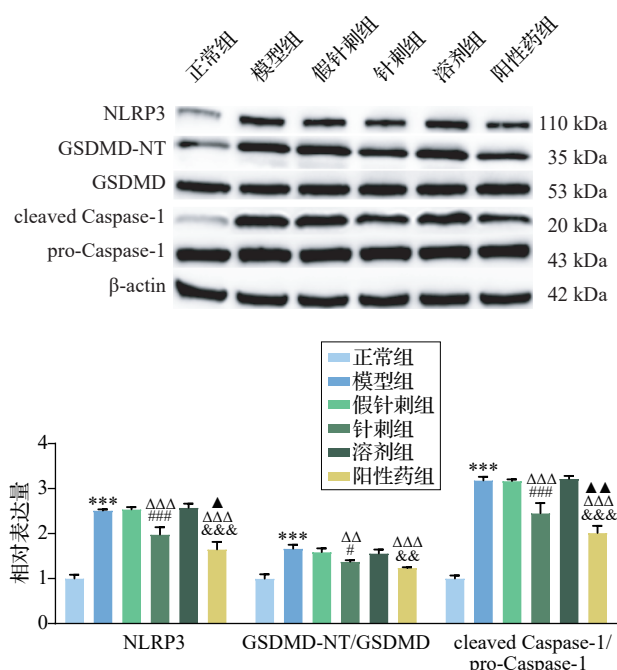
Fig. 10 Comparison of the expression levels of synaptic marker proteins PSD95, GAD67, and VGAT in the hippocampal tissues of rats in the 6 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)

2.6 各组大鼠海马组织小胶质细胞活化与细胞凋亡率比较

与正常组比较,模型组海马组织 Iba1 阳性细胞数、细胞凋亡率增加 ($P<0.001$)。与模型组比较,针刺组和阳性药组 Iba1 阳性细胞数、细胞凋亡率下降 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$),而假针刺组和溶剂组差异无统计学意义。针刺组 Iba1 阳性细胞数、细胞凋亡率较假针刺组下降 ($P<0.01$)。阳性药组上述指标较溶剂组亦下降 ($P<0.01$, $P<0.001$)。阳性药组细胞凋亡率较针刺组进一步下降 ($P<0.05$),Iba1 阳性细胞数差异无统计学意义。见图 12、图 13。

3 讨论

中医学认为 ASD 核心病机在于心神失养、脑窍不通^[19]。《素问·灵兰秘典论》载“心者,君主之官也,



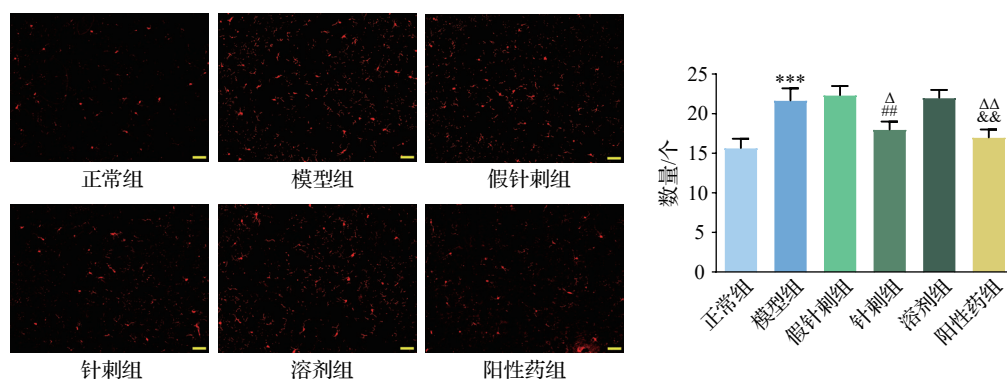
注:NLRP3为NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3, GSDMD-NT为消皮素D N端结构域,GSDMD为消皮素D。与正常组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,Δ $P<0.01$,ΔΔ $P<0.001$;与假针刺组比较,# $P<0.05$,## $P<0.001$;与溶剂组比较,& $P<0.01$,&& $P<0.001$;与针刺组比较,^ $P<0.05$,^^ $P<0.01$ 。

图 11 各组大鼠海马 NLRP3 表达水平及 GSDMD-NT/GSDMD、cleaved Caspase-1/pro-Caspase-1 比值比较 ($\bar{x}\pm s$, 3 只鼠/组)

Fig. 11 Comparison of expression levels of NLRP3, GSDMD-NT/GSDMD, and cleaved Caspase-1/pro-Caspase-1 in hippocampus of rats in the 6 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)

神明出焉”,明确指出心主司人的精神、意识、思维活动。若先天禀赋不足,或后天邪气内扰(如研究中 VPA 可视为“药毒”)导致心气不能上通于脑,痰浊瘀血蒙蔽清窍,则出现神识昏蒙、社交障碍、言语迟缓及刻板行为。本研究选取手厥阴心包经之络穴内关,皆因心包代心受邪,心包经之别络“系于心包,络心系”,故针刺内关能直达病所,宁心安神、豁痰开窍、调畅气血,使心有所主,神有所归,从而改善核心症状。

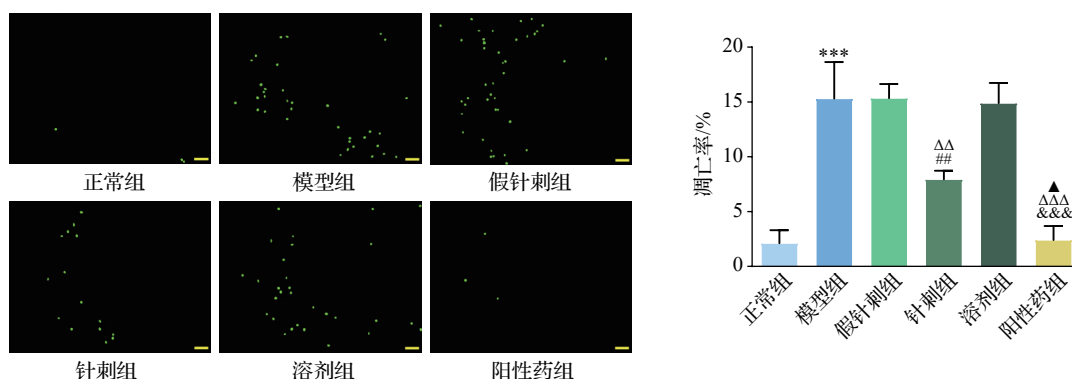
本研究通过 VPA 诱导的 ASD 幼鼠模型,系统评估了针刺“内关”对 ASD 样行为及神经病理的多维度改善作用。结果显示,VPA 暴露成功构建了 ASD 模型,其子代出现典型的 ASD 样行为表型,包括社交互动缺陷、重复刻板行为增加及空间学习记忆受损,这与既往研究结果一致^[20-21]。本研究中,



注: Iba1 为离子钙结合适配分子 1。标尺=50 μm 。与正常组比较, *** $P<0.001$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与假针刺组比较, $^{##}P<0.05$; 与溶剂组比较, $^{&&}P<0.01$ 。

图 12 各组大鼠海马组织中小胶质细胞的活化标志物 Iba1 阳性细胞数比较(免疫荧光法, $\bar{x}\pm s$, 3 只鼠/组)

Fig. 12 Comparison of the number of Iba1 positive cells, an activation marker for microglia, in the hippocampal tissue of rats in the 6 groups (immunofluorescence, $\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)



注: 标尺=50 μm 。与正常组比较, *** $P<0.001$; 与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$; 与假针刺组比较, $^{##}P<0.01$; 与溶剂组比较, $^{&&&}P<0.001$; 与针刺组比较, $^{\Delta}P<0.05$ 。

图 13 各组大鼠海马组织细胞凋亡率比较(TUNEL 染色, $\bar{x}\pm s$, 3 只鼠/组)

Fig. 13 Comparison of apoptosis rate in hippocampal tissue of rats in the 6 groups (TUNEL staining, $\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)

VPA 模型组幼鼠表现出一定程度的发育迟缓, 而针刺“内关”与阳性药物布美他尼干预均能改善其体质质量增长, 提示二者对模型动物的整体生长发育具有积极调节作用; 针刺“内关”能显著改善上述核心行为症状, 尽管其疗效强度略弱于阳性药物布美他尼, 但作为一种非药物干预手段, 显示出良好的治疗潜力。

本研究重点评估了模型鼠海马依赖的空间学习与记忆能力。尽管 DSM-5-TR 诊断标准更强调 ASD 的社交沟通缺陷与重复刻板行为, 但大量临床研究表明, 认知功能障碍是 ASD 个体中普遍存在的共病特征, 严重影响其适应能力和生活质量^[22]。在动物模型中, 评估认知功能尤其是与海马相关的功能具有重要价值, 不仅模拟了 ASD 非核心但至关重要的临床症状, 也为探究 ASD 背后广泛的神经网络连接异常提供了窗口^[23]。本研究中针刺“内关”能有

效改善模型鼠的认知缺陷, 表明其治疗作用可能超越了单一症状的缓解, 有助于促进大脑整体功能的恢复。

在神经病理层面, 海马是学习记忆的关键脑区, 其结构的完整性对于认知功能至关重要。树突棘作为接收突触信号的主要部位, 其密度和动态变化直接与突触可塑性及学习记忆能力相关^[24]。本研究结果显示, VPA 模型幼鼠海马组织形态结构受损, 表现为细胞排列紊乱及树突棘密度降低; 针刺干预有效减轻了海马结构损伤, 增加了树突棘密度, 这为其改善认知功能提供了形态学基础。进一步研究显示 VPA 模型中海马组织兴奋性突触后蛋白 PSD95 表达上调, 而抑制性突触关键蛋白 GAD67 和 VGAT 表达下调。兴奋/抑制 (E/I) 平衡是维持正常脑功能的核心, 其失调被认为是 ASD 的重要病理机制之一^[25]。本研究结果提示模型鼠海马

局部环路存在E/I平衡向兴奋性倾斜的异常,而针刺“内关”能够部分逆转这种蛋白表达的失衡,有助于恢复神经网络的稳定,这可能是其改善ASD行为的又一关键机制。

本研究还从氧化应激和神经炎症反应角度探讨了针刺的作用机制。过量的ROS可导致脂质、蛋白质和DNA损伤,进而诱发神经元功能障碍^[26]。本研究结果显示,VPA模型幼鼠海马ROS水平与LDH活性显著升高,表明存在氧化应激和细胞损伤。针刺干预显著降低了ROS水平与LDH活性,提示其具有抗氧化和保护细胞完整性的效应。在神经炎症反应方面,NLRP3炎性小体的激活是驱动细胞焦亡和神经炎症级联反应的关键环节^[27]。本研究中VPA模型幼鼠的小胶质细胞被显著激活,且NLRP3炎性小体通路被启动,表现为NLRP3、cleaved Caspase-1及GSDMD-NT蛋白表达上调,并促进了下游促炎因子IL-1 β 和IL-18的释放;TUNEL染色结果显示模型组海马细胞死亡增加。TUNEL阳性是DNA断裂的标志,不能特异区分细胞凋亡与焦亡^[28]。但结合本研究观察到的焦亡执行蛋白GSDMD-NT的剪切和Caspase-1的激活,我们认为细胞焦亡通路可能在其中发挥了重要作用。针刺“内关”有效抑制了小胶质细胞的过度活化,下调了NLRP3炎性小体通路关键蛋白的表达,减少了炎症因子释放和细胞死亡。这些结果提示抑制NLRP3炎性小体介导的神经炎症反应与细胞死亡,可能是针刺“内关”发挥神经保护作用的重要机制之一。

综上所述,本研究表明针刺“内关”可能通过改善突触功能、抑制氧化应激及NLRP3炎性小体介导的神经炎症反应,多靶点地缓解VPA诱导的ASD样行为及神经损伤。尽管其疗效略弱于经典药物布美他尼,但作为一种安全、经济的非药物干预手段,在ASD的辅助治疗中展现出良好的应用前景。我们观察到针刺干预后NLRP3炎性小体通路关键蛋白表达的下调与行为学、组织学的改善同时发生,这提示该通路可能参与了针刺的起效过程。然而由于本研究中未使用NLRP3或GSDMD的特异性抑制剂、激动剂或基因编辑等手段进行功能获得或缺失实验,目前尚不能确立其因果关系。此外,TUNEL染色所检测的DNA断裂是细胞凋亡与焦亡的共同特征,未来研究需结合更特异的焦亡标志物如GSDMD孔道形成检测加以区分。本研究结果为针刺治疗ASD的机制提供了一个新的、探索

方向,未来工作将通过上述干预方式,在动物和细胞模型中进一步验证该通路的必要性与充分性,以明确其确切角色。未来研究应进一步探索针刺与其他疗法的联合应用,并致力于将其转化为临床实践^[29]。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Wang M, Zhang X Z, Zhong L Y, et al. Understanding autism: causes, diagnosis, and advancing therapies[J]. Brain Res Bull, 2025, 227: 111411.
- [2] 梁绿圆, 党伟利, 苏洁欣, 等. 从“神机”与“气立”探讨孤独症谱系障碍的发病机制[J]. 中医杂志, 2024, 65(3): 256-260.
Liang L Y, Dang W L, Su J X, et al. Discussion on disease mechanism of autism spectrum disorders from the concepts of “vital activity” and “qi configuration” (in Chinese) [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2024, 65(3): 256-260.
- [3] Zeidan J, Fombonne E, Scora J, et al. Global prevalence of autism: a systematic review update [J]. Autism Res, 2022, 15(5): 778-790.
- [4] Yenkovyan K, Mkhitarian M, Björklund G. Environmental risk factors in autism spectrum disorder: a narrative review [J]. Curr Med Chem, 2024, 31(17): 2345-2360.
- [5] Dickson K S, Lind T, Jobin A, et al. A systematic review of mental health interventions for ASD: characterizing interventions, intervention adaptations, and implementation outcomes [J]. Adm Policy Ment Health, 2021, 48(5): 857-883.
- [6] 杨敏, 秦晓光, 毛宇宏, 等. 近10年内关穴临床应用研究进展[J]. 甘肃中医药大学学报, 2025, 42(5): 82-86.
Yang M, Qin X G, Mao Y H, et al. Advancements in the clinical application of Neiguan (PC6) over the past decade (in Chinese) [J]. Journal of Gansu University of Chinese Medicine, 2025, 42(5): 82-86.
- [7] 党伟利, 李伟, 马丙祥. 针刺内关穴干预孤独症谱系障碍言语功能的临床研究[J]. 中国康复医学杂志, 2022, 37(7): 961-963.
Dang W L, Li W, Ma B X. Clinical study on the intervention of acupuncture at Neiguan point on autism spectrum disorder's speech function (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2022, 37(7): 961-963.
- [8] Schneider T, Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism [J]. Neuropsychopharmacology, 2005, 30(1): 80-89.
- [9] 《针刺研究》编辑部.《针刺研究》实验动物福利伦理审查清单[J]. 针刺研究, 2024, 49(2): 220.
Editorial Board of Acupuncture Research. Review list of welfare ethics of experimental animals in *Acupuncture Research* (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2024, 49

- (2):220.
- [10] Cupolillo D, Hoxha E, Faralli A, et al. Autistic-like traits and cerebellar dysfunction in Purkinje cell PTEN knock-out mice [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2016, 41(6): 1457-1466.
- [11] Mohammadkhani R, Ghahremani R, Salehi I, et al. Impairment in social interaction and hippocampal long-term potentiation at perforant pathway-dentate gyrus synapses in a prenatal valproic acid-induced rat model of autism [J]. *Brain Commun*, 2022, 4(5): fcac221.
- [12] Gao Y D, Shonai D, Trn M, et al. Proximity analysis of native proteomes reveals phenotypic modifiers in a mouse model of autism and related neurodevelopmental conditions [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 6801.
- [13] Silverman J L, Yang M, Lord C, et al. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(7):490-502.
- [14] Workman A D, Charvet C J, Clancy B, et al. Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(17): 7368-7383.
- [15] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位 第2部分:大鼠[J]. 针刺研究, 2021, 46(4): 351-352.
China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals. Part 2: rats (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 351-352.
- [16] Fuentes J, Parellada M, Georgoula C, et al. Bumetanide oral solution for the treatment of children and adolescents with autism spectrum disorder: results from two randomized phase III studies[J]. *Autism Res*, 2023, 16(10):2021-2034.
- [17] Persico A M, Asta L, Chehbani F, et al. The pediatric psychopharmacology of autism spectrum disorder: a systematic review — Part II : the future [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2025, 136:111176.
- [18] Lv H, Gu X, Shan X Y, et al. Nanoformulated bumetanide ameliorates social deficiency in BTBR mice model of autism spectrum disorder[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 870577.
- [19] 梁绿圆,王艺萍,曹佳蕾,等. 基于“互藏思想”探析心脾两虚型儿童孤独症[J]. 辽宁中医杂志, 2025, 52(9):48-51.
Liang L Y, Wang Y P, Cao J L, et al. Analysis of children with autism spectrum disorder with deficiency of heart and spleen based on theory of “mutual possession” (in Chinese) [J]. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2025, 52(9): 48-51.
- [20] Lin J, Zhang K Y, Cao X S, et al. iTRAQ-based proteomics analysis of rat cerebral cortex exposed to valproic acid before delivery[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2022, 13(5): 648-663.
- [21] 党伟利, 梁绿圆, 曹佳蕾, 等. 一种PTEN基因下调的孤独症幼鼠模型构建的改良方法 [J]. 安徽医科大学学报, 2025, 60(3): 462-471.
Dang W L, Liang L Y, Cao J L, et al. An improved method for the establishment of an autistic mouse model with down-regulation of PTEN gene (in Chinese)[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2025, 60(3): 462-471.
- [22] Lai M C, Kassee C, Besney R, et al. Prevalence of co-occurring mental health diagnoses in the autism population: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6(10): 819-829.
- [23] Parellada M, Penzol M J, Pina L, et al. The neurobiology of autism spectrum disorders [J]. *Eur Psychiatr*, 2014, 29(1): 11-19.
- [24] 吴展帅, 屈泽强, 周艳平, 等. 鸟苷酸交换因子 kalirin 调节神经可塑性的研究进展 [J]. 神经解剖学杂志, 2025, 41(1): 127-130.
Wu Z S, Qu Z Q, Zhou Y P, et al. Research progress of guanine-nucleotide exchange factor kalirin in mediating neuroplasticity (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2025, 41(1): 127-130.
- [25] Markicevic M, Fulcher B D, Lewis C, et al. Cortical excitation; inhibition imbalance causes abnormal brain network dynamics as observed in neurodevelopmental disorders [J]. *Cereb Cortex*, 2020, 30(9):4922-4937.
- [26] Singh A, Kukreti R, Saso L, et al. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases [J]. *Molecules*, 2019, 24(8):1583.
- [27] Xu W, Huang Y, Zhou R. NLRP3 inflammasome in neuroinflammation and central nervous system diseases [J]. *Cell Mol Immunol*, 2025, 22(4):341-355.
- [28] Zimmerman H, Jenkins T. The correlation between sperm DNA methylation and DNA damage: a comparison of comet and TUNEL[J]. *Front Reprod Health*, 2025, 7:1523386.
- [29] 针灸科学研究联盟. 针灸科学研究行动计划 [J]. 针刺研究, 2025, 50(1):1-2.
Acupuncture Scientific Research Alliance. A plan for acupuncture-moxibustion scientific research (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(1): 1-2.

收稿日期:2025-11-23 修回日期:2026-03-14

网络首发:2026-06-09

编辑:徐晖