

针刺治疗对 FMR1 敲除大鼠认知功能及海马神经元结构的影响

林 玮*, 刘德强, 钟秋明, 俞春英, 杨燕燕
(福建中医药大学实验动物中心, 福建 福州 350122)

摘要: 目的 探讨针刺百会、神庭和长强穴对脆性 X 智力迟缓 1 号基因(FMR1)敲除(KO)大鼠认知功能及海马神经元结构的影响及机制。方法 FMR1 KO SD 大鼠与野生 SD 大鼠进行交配繁殖。随机选取 10 只 6 月龄的 SD 大鼠(X^+/X^+ 或 X^+/Y^+)作为野生组;选取 6 月龄 FMR1 KO SD 大鼠(X^-/X^- 或 X^-/Y^+),按随机数字表法分为模型组和针刺组各 10 只。针刺组针刺百会、神庭和长强穴,1 次/d,连续针刺 28 d;野生组和模型组针刺非经非穴区。3 组均连续针刺 28 d。干预完成后采用 Morris 水迷宫实验检测大鼠空间学习与记忆能力,尼氏染色法观察海马脑区神经元结构,Western blot 法检测海马组织 p-PI3K、p-Akt 蛋白相对表达水平。结果 3 组大鼠第 1~4 天定位航行实验逃避潜伏期均呈下降趋势。与野生组比较,第 3 天和第 4 天时模型组定位航行潜伏期均较长($P < 0.05$)。与模型组比较,第 4 天时针刺组定位航行潜伏期较短($P < 0.05$)。与野生组比较,模型组穿越原平台次数和平均速度均较低($P < 0.05$)。与模型组比较,针刺组穿越原平台次数和平均速度均较高($P < 0.05$)。模型组大鼠海马脑区神经元排列松散,结构受损;针刺组神经元排列紧密,形态完整、饱满,边沿清晰,与野生组表现相近。与模型组比较,针刺组 CA1 和 CA3 区神经元数量均较多($P < 0.05$);与野生组比较,模型组和针刺组 CA4 区神经元数量均较少($P < 0.05$)。与野生组比较,模型组海马组织 p-PI3K 和 p-Akt 表达水平均较低($P < 0.05$);与模型组比较,针刺组海马组织 p-PI3K 和 p-Akt 表达水平均较高($P < 0.05$)。结论 针刺百会、神庭和长强穴可改善 FMR1 KO SD 大鼠认知功能,促进海马组织 PI3K/Akt 信号通路表达,抑制海马脑区神经元凋亡。

关键词: 脆性 X 智力迟缓 1 号基因;针刺;神经元;海马脑区;PI3K/Akt 信号通路

脆性 X 智力障碍 1 号基因(fragile X mental retardation 1 gene, FMR1)的动态突变会引发遗传性神经发育障碍疾病——脆性 X 综合征(fragile X syndrome, FXS),该病全球男性发病率约 1/5 000~1/4 000,女性约 1/8 000~1/6 000,我国患者数量也在持续增长^[1-2]。FXS 核心的病理变化体现为 FMR1 基因 5'非翻译区的 CGG 三核苷酸重复序列出现异常增多(重复次数达到或超过 200 次),使得脆性 X 智力障碍蛋白(fragile X mental retardation protein, FMRP)无法正常表达,进而干扰突触可塑性的调节,并对认知功能造成损害^[3]。患者多表现为中重度智力低下、语言迟缓、行为异常,严重影响生活与社交,给家庭和社会带来极大负担^[4-5]。

FXS 作为常见的遗传性神经发育障碍疾病,目前尚无根治手段,临床多以药物治疗为主,虽能暂时缓解不适,但存在毒副作用和无法改善核心的认知障碍与神经病理损伤等问题^[6]。针刺作为中医传统疗法,研究表明其可以改善精神发育迟滞等神经系统疾病患者的认知功能和神经功能^[7-8]。本研究利用 FMR1 基因敲除(KO)大鼠,探讨针刺百会、神庭和长强穴对 FXS 认知功能的影响及潜在作用机制。

1 实验材料

1.1 实验动物 6~10 周龄 SPF 级 FMR1 KO SD 大

鼠(X^-/X^- 或 X^-/Y^+),1 雄 2 雌,购自上海南方模式生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2019-0002。8 周龄 SPF 级 SD 大鼠(X^+/X^+ 或 X^+/Y^+),2 雄 2 雌,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2022-0004。实验大鼠饲养于福建中医药大学实验动物中心 SPF 级动物实验室中,实验动物使用许可证号:SYXK(闽)2023-0004。进行大鼠交配繁殖,并通过基因鉴定后选取 FMR1 KO SD 大鼠(X^-/X^- 或 X^-/Y^+)和野生 SD 大鼠(X^+/X^+ 或 X^+/Y^+)进行干预,见图 1。基因鉴定的 FMR1 引物合成序列见表 1。本实验经福建中医药大学实验动物伦理委员会批准(FJTCM-IACUC-2025044)。

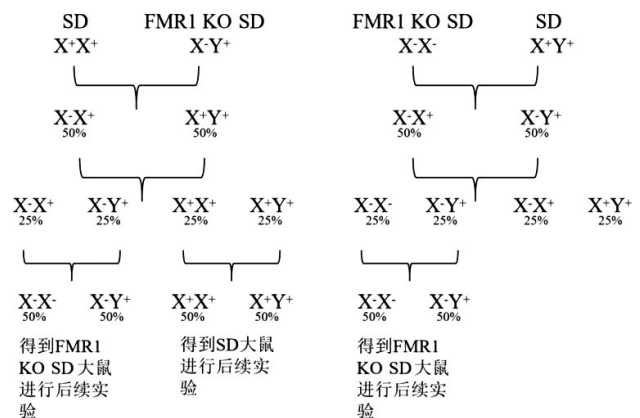


图 1 野生 SD 大鼠与 FMR1 KO SD 大鼠多代交配繁殖图

收稿日期:2025-08-12;接受日期:2025-10-19
基金项目:福建中医药大学校管课题(X2024014)
通信作者:林玮, E-mail: 34945011@qq.com
DOI: 10.13260/j.cnki.fjtc.2025.12005

表 1 FMR1 引物序列

类型	引物序列	产物长度/bp
野生型	F:5'-ACCAGAGCTAGGAGAGGAACA-3'	586
	R:5'-TGTAACACCCATAAATTTCCACA-3'	
突变型	F:5'-GAAAGCAACAACACTACCAAAAACC-3'	586
	R:5'-CTGCAAGAAAAACCACAACAAATTA-3'	

1.2 实验试剂 二甲苯(批号:10023418)、冰醋酸(批号:10000218)、中性树胶(批号:10004160)均购自中国国药集团化学试剂有限公司;固定液(批号:G1101)、甲苯胺蓝染液(批号:G1032)、环保型脱蜡液(批号:G1128)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;4%中性甲醛溶液(北京鼎国昌盛生物技术有限公司,批号:AR-0221);磷酸化磷酸肌醇3-激酶(p-PI3K)抗体(货号:YP0224)、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)抗体(货号:YM8531)、GAPDH 抗体(货号:YM3029)均购自美国 Immunoway 公司。

1.3 实验材料及仪器 华佗牌一次性无菌针灸针(苏州医疗用品厂有限公司,批号:242153);光学显微镜(日本尼康株式会社,型号:ECLIPSE E100);病理切片机(德国徕卡公司,型号:RM2016);Morris 水迷宫装置(上海欣软信息科技有限公司,型号:XR-XM101)。

2 实验方法

2.1 分组和干预 选取 6 月龄 FMR1 KO SD 大鼠(X^-/X^- 或 X^-/Y^+),按随机数字表法分为模型组和针刺组各 10 只,雌雄各半;随机选取 10 只 6 月龄的 SD 大鼠(X^+/X^+ 或 X^+/Y^+)作为野生组。针刺组参照文献[9]选取百会、神庭和长强穴进行针刺治疗,留针 10 min,隔 3 min 行轻度捻转提插 10 s,1 次/d;野生组和模型组针刺大鼠腋中线、肋弓最低点上 1 cm 处的非经非穴^[9],其他处理同针刺组。3 组均连续针刺 28 d。

2.2 空间学习与记忆能力 干预 28 d 后,采用 Morris 水迷宫实验评估大鼠空间学习与记忆能力。水迷宫圆形水池直径 150 cm、高 55 cm,水深 30 cm,水温(23±2)℃,内壁及底部为黑色,分 4 个象限并设不同形状标记物,逃生平台位于第 3 象限,水漫过逃生平台 1 cm。实验分 2 个阶段:①定位航行实验,于第 1~4 天按第 1~4 象限的顺序,每天将大鼠从不同象限内侧壁放入水中,测试 90 s,记录逃避潜伏期(未找到逃生平台的大鼠记为 90 s,并让其适应平台 15 s),取 4 次均值作为当天数据;②空间探索实验,于第 5 天移除平台,将大鼠从第 1 象限内侧壁放入,测试 90 s,记录大鼠穿越原平台位置的次数,检测其空间记忆提取能力。通过摄像头记录大鼠轨迹,借助 SuperMaze 动物行为学视频分析系统进行分析。

2.3 取材 采用 2%~4% 异氟烷吸入麻醉大鼠,

5 只采用生理盐水进行心脏灌注冲洗后取出全脑,迅速分离出海马组织,放入冻存管,转移至-80℃保存,用于 Western blot 实验。5 只生理盐水心脏灌注冲洗后换成 4% 多聚甲醛灌注,取出全脑,置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,用于观察海马脑区神经元结构。

2.4 海马脑区神经元结构 固定后的脑组织经过包埋、切片后采用尼氏染色法染色。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后,浸入 0.5%~1% 甲苯胺蓝染液(pH 值:4.0~4.5)中 37℃反应 10~20 min,再用 0.5% 冰醋酸水溶液快速分化至背景无色、神经元胞质呈深蓝色,随后经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后滴加中性树胶封片,光学显微镜观察脑部 CA1~CA4 区域切片标本的神经元形态,并对神经元数量进行计数^[10]。

2.5 Western blot 法检测海马组织 p-Akt、p-PI3K 蛋白相对表达水平 取出冻存的海马组织,用预冷的 PBS 洗涤 2~3 次后切成小块。每 50 mg 海马组织,加入约 0.167 mL 预冷的 RIPA 裂解液,研磨后离心取上清液。BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度,加缓冲液、变性后,选用 10% SDS-PAGE 凝胶,上样后常规电泳、转膜,封闭液封闭 1 h,加入一抗(p-PI3K 和 p-Akt 稀释比例均为 1:500;GAPDH 稀释比例为 1:5 000)4℃反应过夜,次日,TBST 洗膜后加入二抗孵育 1 h,TBST 洗膜后加入显影液显影,使用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参计算目的蛋白相对表达水平。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析。计量资料符合正态分布以($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析进行组间比较,方差齐,两两比较采用 LSD-t 法;方差不齐,两两比较采用 Dunnett's T3 法。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 3 组空间学习与记忆能力比较

3.1.1 3 组定位航行潜伏期比较 3 组大鼠第 1~4 天定位航行实验逃避潜伏期呈下降趋势。与野生组比较,第 4 天时模型组定位航行潜伏期较长($P<0.05$)。与模型组比较,第 4 天时针刺组定位航行潜伏期较短($P<0.05$)。见图 2 和表 2。

3.1.2 3 组穿越原平台次数和平均速度比较 见表 3。

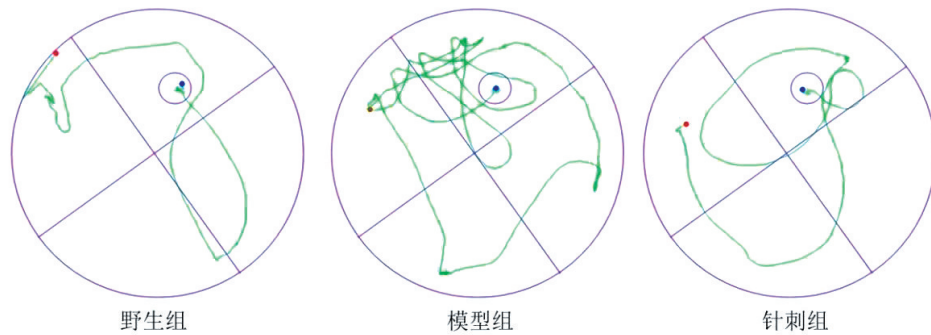


图 2 3 组第 4 天代表性定位航行实验轨迹图

表 2 3 组定位航行潜伏期比较 ($\bar{x}\pm s$)

s

组别	n	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
野生组	10	39.45 ± 13.55	37.03 ± 12.31	24.21 ± 8.15	13.71 ± 5.58
模型组	10	42.10 ± 11.48	38.57 ± 10.55	33.26 ± 10.49 ¹⁾	31.33 ± 4.95 ¹⁾
针刺组	10	42.80 ± 10.66	37.66 ± 14.29	26.70 ± 7.89	20.87 ± 9.23 ²⁾

注:与野生组比较,1) $P < 0.05$;与模型组比较,2) $P < 0.05$ 。

表 3 3 组穿越原平台次数和平均速度比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	穿越原平台的次数/次	平均速度/(mm/s)
野生组	10	1.15 ± 0.19	34.85 ± 11.00
模型组	10	0.70 ± 0.11 ¹⁾	21.62 ± 3.18 ¹⁾
针刺组	10	0.96 ± 0.17 ²⁾	28.80 ± 4.85 ²⁾

注:与野生组比较,1) $P < 0.05$;与模型组比较,2) $P < 0.05$ 。

3.2 3 组海马脑区神经元结构比较 模型组大鼠海马脑区神经元排列松散,神经元结构受损产生空泡样变性;针刺组神经元排列紧密,形态完整、饱满,边沿清晰,与野生组表现相近。见图 3。与模型组比较,针刺组 CA1 和 CA3 区神经元数量较多 ($P < 0.05$);与野生组比较,模型组和针刺组 CA4 区神经元数量均较少 ($P < 0.05$)。见表 4。

3.3 3 组海马组织 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白相对表达水平比较 见图 4 和表 5。

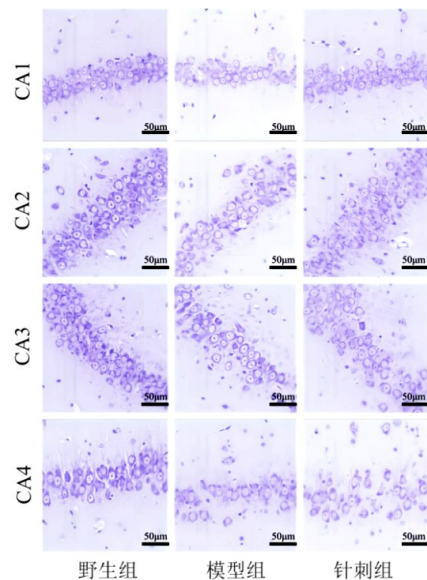


图 3 3 组海马脑区尼氏染色图 ($\times 200$)

表 4 3 组海马脑区神经元数量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CA1	CA2	CA3	CA4
野生组	5	85.40 ± 13.61	73.60 ± 13.09	80.00 ± 9.09	71.00 ± 3.94
模型组	5	62.20 ± 4.14 ¹⁾	55.00 ± 14.14	57.60 ± 12.22 ¹⁾	60.00 ± 5.70 ¹⁾
针刺组	5	83.20 ± 12.93 ²⁾	66.60 ± 13.08	77.00 ± 9.46 ²⁾	62.00 ± 5.83 ¹⁾

注:与野生组比较,1) $P < 0.05$;与模型组比较,2) $P < 0.05$ 。

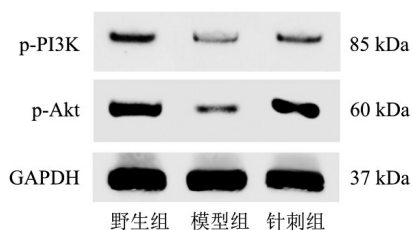


图 4 3 组海马组织 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白条带图

表 5 3 组海马组织 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	p-PI3K/GAPDH	p-Akt/GAPDH
野生组	5	0.45 ± 0.10	0.65 ± 0.20
模型组	5	0.31 ± 0.08 ¹⁾	0.42 ± 0.07 ¹⁾
针刺组	5	0.42 ± 0.14 ²⁾	0.60 ± 0.06 ²⁾

注:与野生组比较,1) $P < 0.05$;与模型组比较,2) $P < 0.05$ 。

4 讨论

传统 FMR1 小鼠模型的神经生物学特性与人类差异较大,而大鼠在海马 CA3 区域的锥体细胞密度明显高于小鼠,且其密度水平、区域分布特征与人类海马 CA3 区锥体细胞的排列规律更相近^[11]。基于 CRISPR-Cas9 技术构建的 FMR1 KO SD 大鼠模型,可较精准模拟人类 FXS 遗传特征,其大脑结构、神经递质系统更接近人类,能准确呈现认知障碍与海马神经元损伤,是理想的动物模型^[12]。Morris 水迷宫实验显示:FMR1 KO SD 大鼠表现出明显空间学习与记忆功能障碍,认知功能下降;针刺百会、神庭和长强穴后,治疗组大鼠逃避潜伏期缩短、穿越原平台次数增多且运动速度提升,提示针刺可有效改善 FXS 相关的空间学习记忆与运动功能。这一方面与针刺可通过调节神经递质释放、增强突触可塑性,改善认知功能有关^[13];一方面与百会、神庭和长强穴 3 穴沿督脉自上而下形成“上开窍、中调神、下通经”的闭环调节轴有关。百会侧重养脑安神,神庭侧重醒神定志,长强侧重通经补肾,既直接靶向脑与脊髓中枢通路改善神经功能,又通过调和全身气血、巩固髓液生成,从“通督脉以充阳、养脑髓以安神、疏经络以利动、调肾气以生髓”多维度改善 FXS 大鼠的认知功能^[14-15]。

病理染色结果显示:模型组大鼠海马脑区神经元结构和活性受损;针刺百会、神庭和长强穴后,大鼠海马 CA1 和 CA3 区域的神经元结构和活性得到改善。CA1 和 CA3 区域是参与空间记忆编码和存储的关键脑区,其神经元结构完整性对认知功能至关重要^[16-17]。针刺可能通过促进神经营养因子(如脑源性神经营养因子)的表达,抑制神经元凋亡,从而保护海马神经元^[18]。FMR1 KO SD 大鼠海马 CA4 区神经元数量减少,提示 CA4 区神经元数量的变化与 FXS 模型的病理改变相关,但当前治疗措施未能改善该区域的损伤。3 组大鼠海马 CA2 区神经元数量比较无明显改变,提示该区域神经元数量可能与模型大鼠的空间学习与记忆能力关联性较小,或其功能受其他因素(如突触连接、神经递质水平)调控更为显著^[19]。

PI3K/Akt 通路是调控神经元存活与功能的关键通路,PI3K/Akt 通路激活时,PI3K 催化生成的 PIP3 会招募并协助激活 Akt,活化的 Akt 通过调控凋亡相关蛋白,抑制神经元凋亡;而该通路被抑制时,促凋亡蛋白被启动,导致神经元大量凋亡,同时还会影响神经元能量代谢与突触传递效率,引发认知功能障碍^[20-21]。本研究结果显示:模型组大鼠海马组织 p-PI3K 和 p-Akt 表达水平降低;针刺百会、神庭和长强穴后,大鼠海马组织 p-PI3K 和 p-Akt 表

达水平升高。提示针刺改善 FXS 大鼠认知功能障碍的机制可能与其对 PI3K/Akt 通路的调控有关。

综上所述,针刺百会、神庭和长强穴可提高 FMR1 KO SD 大鼠空间学习与记忆能力,改善认知功能,激活海马组织 PI3K/Akt 信号通路,抑制海马脑区病理改变和神经元凋亡。

参考文献

- [1] HAGERMAN P J, HAGERMAN R J. The fragile-X premutation: a maturing perspective [J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 74 (5): 805-816.
- [2] JACQUEMONT S, HAGERMAN R J, LEEHEY M, et al. Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates [J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 72 (4): 869-878.
- [3] 戚庆炜,周希亚,常清贤,等.脆性 X 综合征携带者筛查遗传咨询专家共识[J]. *生殖医学杂志*, 2024, 33(5): 563-568.
- [4] HALL S S, BURNS D D, LIGHTBODY A A, et al. Longitudinal changes in intellectual development in children with fragile X syndrome [J]. *J Abnorm Child Psychol*, 2008, 36(6): 927-939.
- [5] 蒋祝,谭建新,谭娟,等.脆性 X 综合征遗传学诊断方法研究进展[J]. *检验医学*, 2024, 39(2): 107-113.
- [6] PROTIC D, HAGERMAN R. State-of-the-art therapies for fragile X syndrome [J]. *Dev Med Child Neurol*, 2024, 66(7): 863-871.
- [7] 周海荣,吴文英,李锦嫦,等.靳三针联合重复经颅磁刺激对精神发育迟缓患者认知发育及脑电活动的影响[J]. *上海针灸杂志*, 2020, 39(10): 1274-1279.
- [8] 周琳.智七针联合康复训练对精神发育迟缓患儿智力水平和认知能力的改善效果分析[J]. *针灸临床杂志*, 2017, 33(12): 12-15.
- [9] 李忠仁. *实验针灸学*[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003: 325-327.
- [10] 焦翠,王俭妹,况海霞,等. CACNA1H 基因敲除对小鼠孤独症样行为及海马神经形态学的影响[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2022, 54(2): 209-216.
- [11] WATSON J F, VARGAS-BARROSO V, MORSE-MORA R J, et al. Human hippocampal CA3 uses specific functional connectivity rules for efficient associative memory [J]. *Cell*, 2025, 188 (2): 501-514.
- [12] GRUSS M, BRAUN K. Alterations of amino acids and monoamine metabolism in male Fmr1 knockout mice: a putative animal model of the human fragile X mental retardation syndrome [J]. *Neural Plast*, 2001, 8(4): 285-298.
- [13] MA S Q, HUANG H P, ZHONG Z, et al. Effect of acupuncture on brain regions modulation of mild cognitive impairment: a meta-analysis of functional magnetic resonance imaging studies [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 914049.
- [14] 王婧吉,翟艳,王娟,等.电针“百会”“神庭”对血管性痴呆大鼠学习记忆能力和海马突触结构与相关蛋白表达水平的影响[J]. *安徽中医药大学学报*, 2022, 41(3): 51-56.
- [15] 张学君,杨晓丹,赵锦燕,等.针刺长强穴调控炎症反应改善脑性瘫痪大鼠运动和学习记忆能力的机制研究[J]. *福建中医药*, 2023, 54(7): 16-20.
- [16] ARBAB T, PENNARTZ C M A, BATTAGLIA F P. Impaired hippocampal representation of place in the Fmr1-knockout mouse model of fragile X syndrome [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8889.