Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng

Research
Medical Engineering—Article

电针刺激促进 *Mecp2*基因敲除的Rett综合征模型大鼠功能恢复

孙艳红[a,b,#]，陈枝芳[c,#]，徐毅[b,d,#]，张月芳[c]，葛志磊[e]，林承列[f]，周宜[f]，赵芳菲[b]，闫美玲[b]，刘馨怡[b]，诸颖[a,b]，高基民[d]，李宏义[g]，王丽华[a,b]，胡钧[a,b]，仇子龙[c,*]，樊春海[e,*]

[a] Bioimaging Center, Shanghai Synchrotron Radiation Facility, Zhang Jiang Laboratory, Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China
[b] Division of Physical Biology, CAS Key Laboratory of Interfacial Physics and Technology, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China
[c] Institute of Neuroscience, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China
[d] School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China
[e] School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China
[f] College of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
[g] Cardiology Department, Beijing Hospital, Beijing 100730, China

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 January 2020
Revised 29 April 2020
Accepted 8 June 2020
Available online 22 March 2022

关键词
神经发育障碍
电针
Rett 综合征
运动功能
社交

摘要

Rett综合征（又称雷特综合征）是一种进行性神经发育障碍性疾病，目前尚缺乏有效的治疗手段。已有研究表明，深部脑刺激可以缓解Rett综合征模型小鼠的一些症状，但这种介入操作需要精细的手术。本研究采用电针刺激（EAS）百会（GV 20）、涌泉（KI 1）和神门（HT 7）穴位，可以减轻*Mecp2*基因敲除的Rett综合征模型大鼠的症状。结果表明，电针不仅延长了Rett综合征大鼠的生存期，而且提高了其行为能力，包括运动能力、运动协调能力和社会交往能力。进一步研究发现，野生型和Rett模型大鼠经电针刺激后，中脑黑质、纹状体和大脑皮层中c-Fos蛋白表达的增加，表明电针刺激能激活这些大鼠脑区神经元的活动，从而促进运动及社交能力的恢复。因此，电针为神经发育性疾病治疗提供了一种安全有效的潜在治疗手段。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. 引言

Rett综合征是一种进行性神经发育障碍，主要发生在女性儿童中，发病率为1/15 000~1/10 000。大多数患有Rett综合征的儿童寿命较短，且伴随着一系列症状，如语言能力低下、生长迟缓、自主活动能力下降、共济失调、严重的社交障碍和手部刻板动作等[1]。目前，由于缺乏有效的治疗方法来改善患者的认知和行为，Rett综合征的有效治疗面临巨大的挑战。使用脑源性神经营养因子（BDNF）或胰岛素样生长因子1（IGF-1）可以缓解Rett综合征的一些症状，然而，这些药物面临是否可以有效地跨越血脑屏障的问题[2–4]。有研究采用物理治疗手段，如海马穹窿深部脑电刺激（DBS）[5]和深部脑磁刺激（DMS）[6]，可以缓解Rett综合征模型小鼠的症状。DMS可促进海马神经发生和突触的可塑性，增强海马神经元活性。在Rett小鼠模型中，DMS可以缓解焦虑相关行为，

* Corresponding authors.
E-mail addresses: zqiu@ion.ac.cn (Z. Qiu), fanchunhai@sjtu.edu.cn (C. Fan).
# These authors contributed equally to this work.

2095-8099/© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
英文原文：Engineering 2022, 12(5): 83–89
引用本文：Yanhong Sun, Zhifang Chen, Yi Xu, Yuefang Zhang, Zhilei Ge, Chenglie Lin, Yi Zhou, Fangfei Zhao, Meiling Yan, Xinyi Liu, Ying Zhu, Jimin Gao, Hongyi Li, Lihua Wang, Jun Hu, Zilong Qiu, Chunhai Fan. Functional Recovery with Electro-Acupuncture Stimulation in an *Mecp2*-Knockout Rat Model of Rett Syndrome. *Engineering*, https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.06.032

显著延长小鼠的寿命[6]。DBS可以恢复Rett模型小鼠的活体海马新生神经元的发生，增强条件恐惧记忆和空间记忆能力。然而，DBS是一种介入性操作，需要外科手术和精确定位。此外，DBS对Rett模型小鼠的社会行为、运动能力、运动协调能力和生长发育未表现出较好的改善作用[5]。

针灸是中国传统医学中的治疗手段，通过用针灸针对特定穴位进行刺激治疗疾病。针灸被世界各国广泛地应用于缓解疼痛。而且，针灸还可用于治疗其他疾病，包括运动障碍、压力性尿失禁和免疫炎症性疾病[7–10]。电针刺激（EAS）是一种利用电针装置输出脉冲电流，作用于中医穴位和经络来加强刺激的技术。EAS可通过受体或神经递质介导的免疫反应，发挥很好的镇痛和抗炎作用[11–12]。EAS还可以通过刺激神经营养因子和神经递质的表达来改善神经退行性疾病（如阿尔茨海默病和帕金森病）的记忆和运动行为能力[13–15]。有研究报道，EAS通过上调催产素（OXT）和精氨酸加压素（AVP）水平——这两种激素与哺乳动物社会行为密切相关，能改善孤独症儿童和实验大鼠的社交行为[16–17]。然而，EAS是否可以用于治疗其他神经发育性疾病仍然不清楚。在这项工作中，我们用EAS治疗Rett模型大鼠，并研究了社交激素、功能蛋白的表达、大脑不同区域的神经活动和行为，从而揭示EAS激活的大脑区域与相关行为变化之间的关系，以及EAS对Rett模型大鼠行为能力的恢复作用。

2. 实验部分

根据以前的研究[18]，制备4~5周龄雄性*Mecp2*$^{-/y}$和野生型（WT）SD大鼠。雄性大鼠Rett综合征的典型症状出现相对较早，如存活时间短、运动能力下降和社交能力下降。因此，在本研究中，选用雄性*Mecp2*$^{-/y}$ Rett综合征模型大鼠，其同龄雄性WT大鼠被用作对照。将大鼠轻轻固定在大鼠固定器中[见附录A中的图S1（a）]，让其脚伸直并用医用胶带固定。使用电刺激仪（苏州医疗器械厂Hwato SDZ-V神经和肌肉刺激器），以脉冲宽度为0.2 ms、频率为2 Hz:10 Hz [疏波:密集波，见附录A中的图S1（b）]的疏密波对大鼠穴位进行电针刺激。根据参考文献[19–20]，将针灸针（长13 mm，直径为0.25 mm）插入神门穴（HT 7）、涌泉穴（KI 1）和百会穴（GV 20），针刺深度为3 mm。电针刺激双侧HT 7和KI 1，GV 20留针处理。*Mecp2*$^{-/y}$大鼠和WT大鼠每次刺激20 min，每周电针刺激6次，连续4周。对照组的WT和*Mecp2*$^{-/y}$大鼠也被轻轻固定在大鼠固定器中，不进行电针刺激。

在条件恐惧记忆测试的前一周，参考之前的方法进行旷场实验、滚轮测试[19,21]和三箱社交[22]行为测试。在每次实验之前，将大鼠放到行为测试室适应至少30 min。详细的实验细节见附录A。检测完行为数据后，进行大鼠解剖，取大鼠脑组织，使用冷冻切片机制备厚度为40 μm脑片（Leica CM1950, Leica Biosystems, Germany）[24]。室温下脑切片在含0.25% Triton X-100的5%牛血清蛋白（BSA）中孵育1 h [5]。然后，将切片与抗c-Fos多克隆抗体（ab190289，兔抗，1:5000；Abcam，英国）或神经元前体细胞的微管相关蛋白抗体（Doublecortin，DCX；4604S，兔多克隆抗体1:400；Cell Signaling Technology，美国）和5-溴-2'-脱氧尿苷抗体（BrdU；小鼠单克隆，5292S，1:140；Cell Signaling Technology，美国）在4 ℃下共孵育24 h。次日，清洗脑片后，脑片与二抗（ab150077和ab150116，Alexa Fluor 488和594，1:500；Abcam）在室温下共孵育2 h，然后用4', 6-二氨基-2-苯基吲哚（DAPI；1:1000，碧云天生物技术有限公司，中国）对细胞核进行15 min复染。使用共焦显微镜（Leica Microsystems，德国）获取图像，并通过Image J软件进行分析。

3. 结果与讨论

我们首先研究了EAS是否可以延长Rett大鼠的生存期，因为大多数Rett儿童的特点是生存期比较短[1]。中枢神经系统神经元甲基CpG结合蛋白2（MeCP2）缺乏可导致啮齿动物出现Rett样表型[1,25]。因此，使用具有*Mecp2*基因突变（*Mecp2*$^{-/y}$）的4~5周龄大鼠在神门（HT 7）、涌泉（KI 1）和百会（GV 20）穴位进行电针刺激（*Mecp2*$^{-/y}$+EAS）治疗，每天20 min，持续4周[图1（a）和（b）以及图S1（b）]。根据之前的方法对穴位进行定位[19–20]。此外，用4~5周龄的同窝雄性WT和*Mecp2*$^{-/y}$大鼠作为对照，除了不进行EAS外，进行相同的处理。值得一提的是，EAS治疗的*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的生存期（中位生存期：102天）比*Mecp2*$^{-/y}$大鼠（中位生存期：71天）延长了近44% [图1（c）]。即EAS使*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的中位生存期提高到102天，EAS处理的*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的最长生存时间可达到240天。生长迟缓也是*Mecp2*$^{-/y}$的一个典型的病理学特征，导致体重和脑重量降低。我们发现，穴位EAS还增加了*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的体重和脑重量[图1（d）和（e）]。在30日龄时，WT大鼠[(106.25±17.65) g]和*Mecp2*$^{-/y}$大鼠[(105.33±19.50) g]的体重没有差异。到60日龄时，*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的体重[(205.7±78.6) g]增长比WT大鼠[(309.6±39.6) g]慢，EAS处理的*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的体重

[(276.3±78.6) g]明显高于*Mecp2*$^{-/y}$大鼠。120日龄时，*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的体重[(225.0±42.5) g]不及WT大鼠[(480.3±46.7) g]体重的一半，WT组和*Mecp2*$^{-/y}$组之间存在显著差异（$P < 0.01$）。然而，EAS处理的*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的体重比*Mecp2*$^{-/y}$大鼠增加了近60%，表明EAS改善了*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的生长发育。

接下来，我们在*Mecp2*$^{-/y}$大鼠中通过旷场试验观察了EAS对运动活动的影响，并通过滚轮试验观察了EAS对运动协调能力的影响。先对*Mecp2*$^{-/y}$和WT大鼠进行10 min的旷场试验，用红外相机记录其运动轨迹。具有焦虑样行为的大鼠在中心的探索行为的时间会更少，行走距离更短[26]。如图2（a）~（d）所示，*Mecp2*$^{-/y}$大鼠在试验中的行走距离[(1363.0±447.6) cm]短于WT大鼠[(5482.0±214.1) cm]［图2（a）和（b）］。同时，*Mecp2*$^{-/y}$大鼠在中央区停留的时间较短[(5.78±2.27) s]、中央区距离/总距离的比率[图2（c）和（d）]小于WT大鼠[(29.32±5.99) s]，表明*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的运动能力下降，出现焦虑样行为。与*Mecp2*$^{-/y}$大鼠相比，EAS处理的*Mecp2*$^{-/y}$大鼠在旷场试验中行走的距离更长[(2989.0±668.1) cm]，在中央停留的时间更长[(17.15±13.04) s]。因此，EAS改善了*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的自主活动，主要表现为增加了总活动距离，尤其是增加了在中心区域的距离和时间。

我们进一步测试了EAS对*Mecp2*$^{-/y}$大鼠运动协调能力的影响，将*Mecp2*$^{-/y}$和WT大鼠放置在转棒疲劳仪（5~40 r·min^{-1}）的旋转棒上，并根据参考文献中的程序记录大鼠掉落的潜伏期[27]。如图2（e）所示，我们发现*Mecp2*$^{-/y}$大鼠从杆上掉落的潜伏期[(48.80±11.89) s]减少为WT大鼠的三分之一左右[(149.7±15.93) s]。而EAS治疗的*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的潜伏期[(108.8±19.54) s]是*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的两倍以上。同时，EAS处理的WT大鼠的潜伏期[(238.7±20.59) s]也明显高于未进行处理的WT大鼠。结果表明，EAS还能改善*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的运动协调能力。

通过三箱社交试验，观察EAS是否会改善*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的社交行为[22, 28]。在环境适应阶段，将WT或*Mecp2*$^{-/y}$大鼠放置在三箱装置的中间室中，并在左右室的角落配备两个带栅栏的社交笼[图3（a）]。让老鼠自由探索10 min。接下来，一只陌生的老鼠被放在左侧的笼子里，而右侧的笼子仍然是空的，记录大鼠在每个室的停留时间和嗅闻次数。如图3（b）~（d）所示，WT大鼠在有陌生大鼠的活动室中花费的时间[(366.6±36.5) s]比在空的一侧花费的时间[(47.4±13.1) s]更多。然而*Mecp2*$^{-/y}$大鼠则更倾向于在中央室[(384.2±90.1) s]或空笼那边[(158.2±52.6) s]活动。*Mecp2*$^{-/y}$大鼠与不熟悉的大鼠的交流时间[(160.9±48.8) s]显著短于WT大鼠，对陌生大鼠的嗅闻频率（3.8±2.4）也显著低于WT组大鼠（29.6±4.5, $P<0.05$）。经过EAS处理的*Mecp2*$^{-/y}$大鼠和不熟悉的大鼠相互交流的

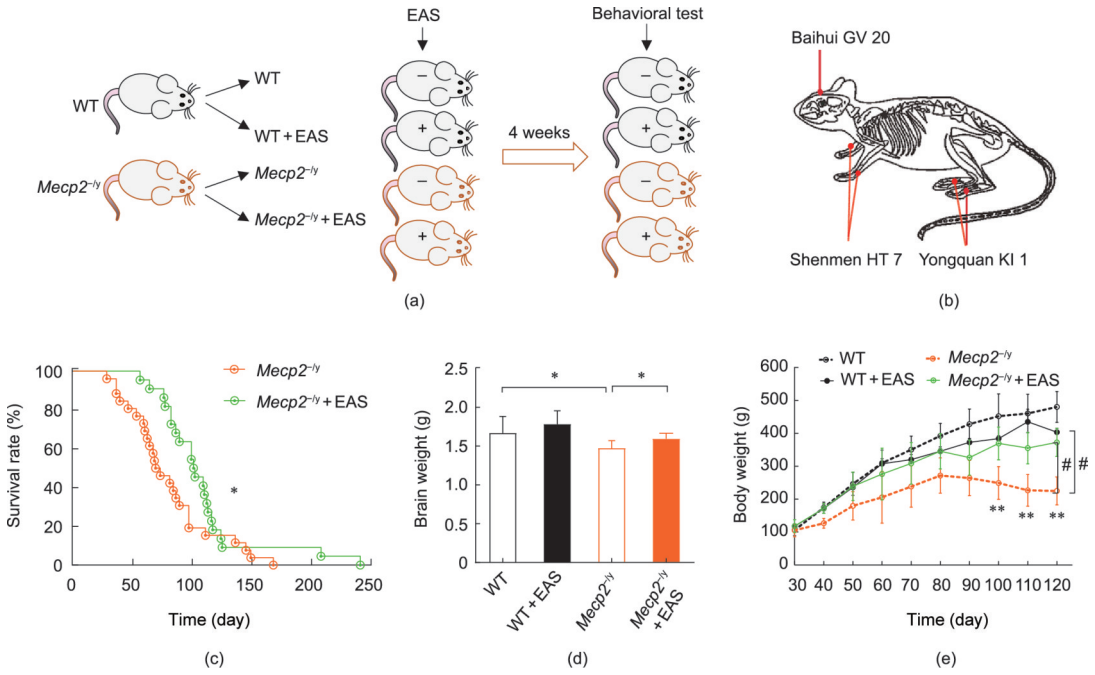

图1. EAS可增加*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的生存期和体重。（a）实验设计流程图；（b）穴位的选择和定位；（c）*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的生存期（$n = 26$；中位生存期：71天）和EAS治疗的*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的生存期（$n = 22$；中位生存期：102天）（long-rank test, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$）；（d）脑重量（WT, $n = 10$; WT+EAS, $n = 10$; *Mecp2*$^{-/y}$, $n = 9$; *Mecp2*$^{-/y}$+EAS, $n = 10$），单因素方差分析（ANOVA; Bonferroni's *post-hoc*）检验（*$P < 0.05$, **$P < 0.01$）；（e）体重[平均值±标准误（SEM）；* 与WT组相比，$P < 0.05$，** $P < 0.01$；# 与*Mecp2*$^{-/y}$组相比，$P < 0.05$，## $P < 0.01$]。

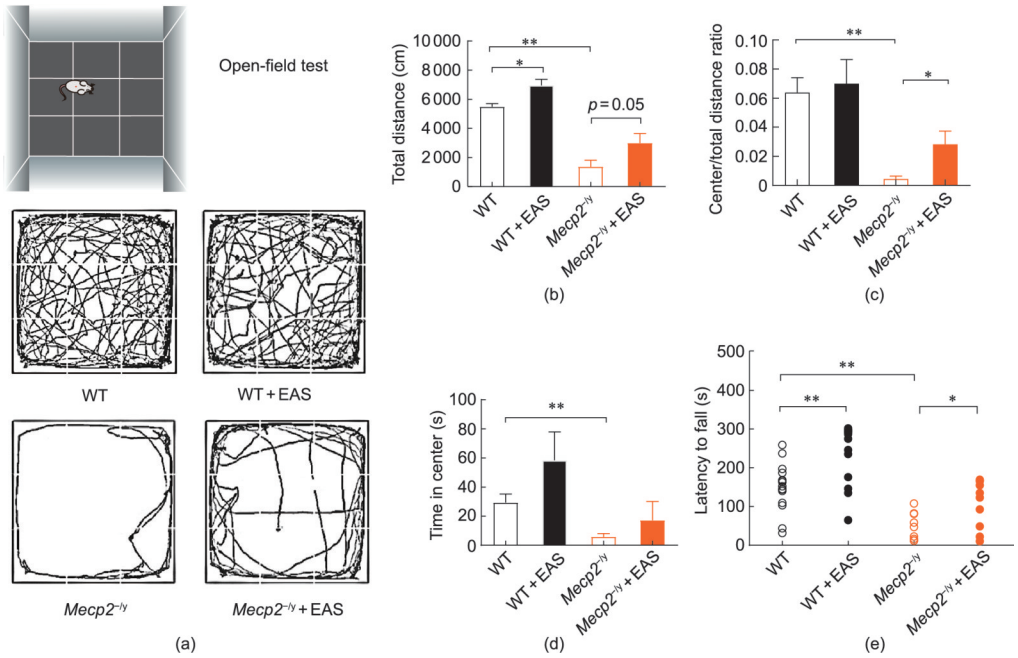

图2. EAS改善*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的运动和运动协调能力。（a）旷场试验中的活动痕迹；（b）在旷场试验中行走的总距离；（c）旷场试验中央区距离与总距之比；（d）旷场试验中央区的时间；（e）滚轮测试中大鼠掉落的潜伏期。所有数据均以平均值±SEM表示。WT，n = 10；WT+EAS，n = 10；*Mecp2*$^{-/y}$，n = 9；*Mecp2*$^{-/y}$+EAS，n = 10；单因素方差分析（Bonferroni's *post hoc*）检验，*P < 0.05，**P < 0.01。

时间[(358.3±78.0) s, P = 0.07]延长，相互交流频次（10.0±3.1, P = 0.08）也出现增加。这些结果表明，EAS能提高*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的社交能力。然而，EAS对*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的社交新奇性的偏好[附录A中的图S2（b）和（c）]没有明显的影响。

中枢神经系统中的某些神经递质在调节哺乳动物的社会行为中起着重要作用。例如，加压素（AVP）和催产素（OXT）与自闭症谱系障碍患者的社会行为和认知密切相关[24,29–30]。在之前的一项研究中发现，自闭症儿童的AVP和OXT水平较低[29–30]。也有其他研究表明，血浆中高水平的OXT会导致焦虑和社交恐惧症。而在*Mecp2*$^{-/y}$大鼠中，我们发现*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的OXT水平[(36.68±4.15) pg·mL^{-1}]高于WT大鼠[（23.51±3.82）pg·mL^{-1}; P< 0.05]。经过EAS治疗的*Mecp2*$^{-/y}$大鼠血清OXT水平[(23.25±3.56) pg·mL^{-1}; P<0.05]则明显低于*Mecp2*$^{-/y}$大鼠[图3（e）]。WT大鼠和*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的AVP水平没有明显差异，但EAS显著降低了WT大鼠的AVP水平，而对*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的AVP水平没有明显的影响[图3（f）]。

为了研究EAS是否会改善记忆能力，我们将老鼠放在条件恐惧箱中，以测试它们的条件恐惧记忆。EAS轻度增强了3 h的场景恐惧记忆（3 h: WT, 21.41%±6.04%; WT+EAS, 24.65%±5.94%; *Mecp2*$^{-/y}$, 9.96%±4.92%; *Mecp2*$^{-/y}$+EAS, 16.71%±8.11%）和条件恐惧记忆（3 h: WT, 28.03%±7.45%; WT+EAS, 33.08%±7.24%; *Mecp2*$^{-/y}$, 0.77%±7.85%; *Mecp2*$^{-/y}$+EAS, 69.39%±11.17%）。但在WT和*Mecp2*$^{-/y}$大鼠中，治疗组和未治疗组之间没有显著的统计学差异[图4（a）~（c）]。由于海马是负责记忆的主要脑区，我们进一步计数脑部海马部位BrdU（标记新生细胞）和DCX（标记未成熟神经元）的阳性细胞，研究EAS对新生海马神经元的影响。在WT和WT+EAS组之间，或*Mecp2*$^{-/y}$和*Mecp2*$^{-/y}$+EAS组之间，BrdU^{+}和DCX^{+}细胞的数量没有明显变化[图4（d）~（f）和附录A中的图S3]，表明EAS对*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的海马神经发生没有明显的作用。

为了进一步研究EAS如何改善社会行为和运动功能，我们检测了脑部不同脑区c-Fos蛋白的表达以观察各脑区的激活情况。c-Fos蛋白是神经元激活的标志蛋白，在各种刺激下可以增强其蛋白表达，包括物理、化学和非致病性环境条件刺激等[32–35]。我们通过量化免疫荧光图像中的c-Fos^{+}细胞来评估大脑的激活[图5（a）和（b）、附录A中的图S4（a）~（d）]。与WT和*Mecp2*$^{-/y}$大鼠（WT; 209.7±27.1; *Mecp2*$^{-/y}$; 154.7±18.2）相比，EAS处理的WT和EAS处理的*Mecp2*$^{-/y}$大鼠大脑皮层的c-Fos^{+}细胞数量显著增加（WT+EAS; 336.7±78.9; *Mecp2*$^{-/y}$+EAS, 336.3±96.2）。在纹状体脑区，EAS治疗组（WT+EAS, 1070.0±113.1; *Mecp2*$^{-/y}$+EAS, 444.80±73.18）的WT或*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的c-Fos^{+}细胞显著高于EAS未治疗组（WT, 825.7±51.2; *Mecp2*$^{-/y}$, 273.20±34.09）。中脑黑质部位也得到了类似的结果（WT, 3551.0±408.7; WT+EAS, 5818±1044; *Mecp2*$^{-/y}$,

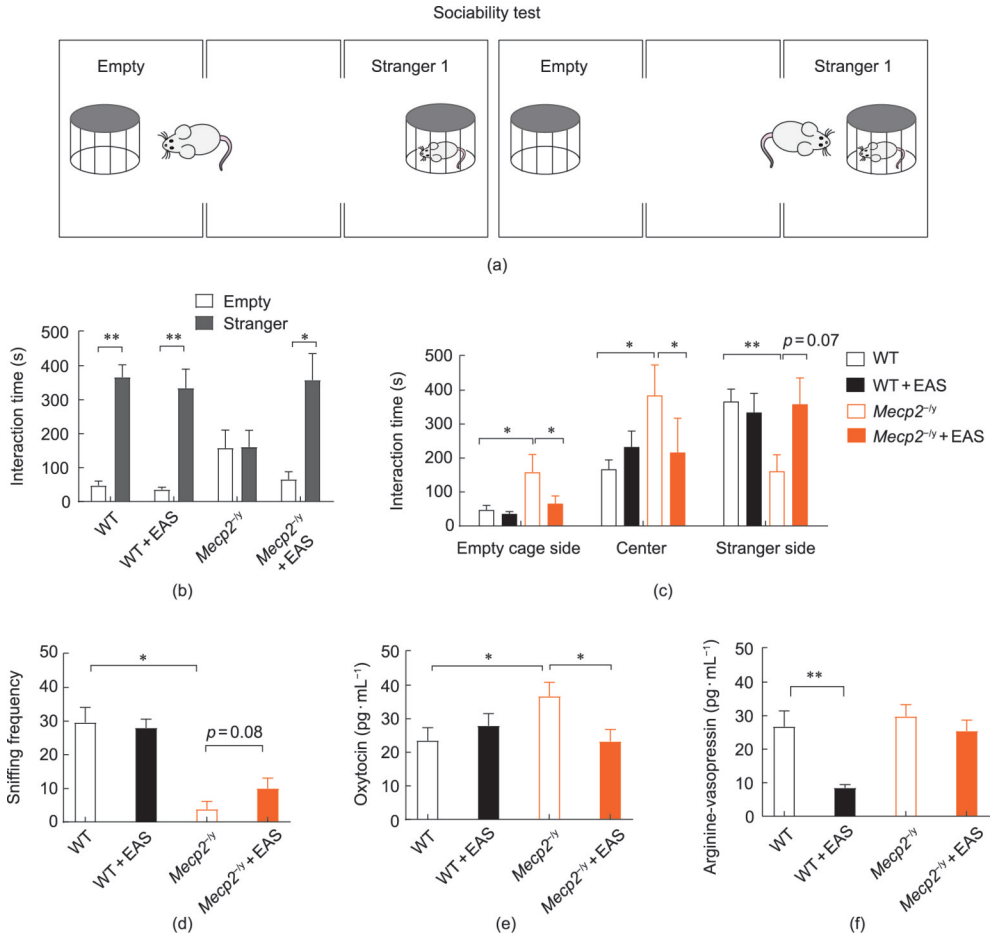

图3. EAS可改善*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的社交行为。（a）三箱社交试验示意图；（b）与空白侧和陌生大鼠侧的交流时间（*$P<0.05$，**$P<0.01$；双侧t检验）；（c）三箱社交试验中不同室中的相互交流时间；（d）与陌生大鼠的嗅闻频次（Kruskal-Wallis试验，*$P<0.05$，**$P<0.01$）；（e）血清催产素水平；（f）血清精氨酸加压素水平。（c）、（e）、（f）单因素方差分析（Bonferroni's *post hoc*）检验（*$P<0.05$，**$P<0.01$）。所有数据均以平均值±SEM表示。WT, $n=10$; WT+EAS, $n=10$; *Mecp2*$^{-/y}$, $n=9$; *Mecp2*$^{-/y}$+EAS, $n=10$。

839.5±93.1; *Mecp2*$^{-/y}$+EAS, 2021.0±443.8）。这些结果表明，EAS可以促进大脑皮层、纹状体和中脑黑质的脑区神经元激活。然而，在海马区域，EAS并没有导致c-Fos^{+}细胞数量的增加（WT, 177.0±17.6; WT+EAS, 244.7±28.3; *Mecp2*$^{-/y}$, 329.00±78.85; *Mecp2*$^{-/y}$+EAS, 323.3±10.9），这表明EAS刺激并没有引起海马部位的激活，海马作为记忆主要功能区没有反应，因此EAS没有出现显著的改善记忆的作用。

Rett综合征作为一种儿童进行性神经发育障碍，会出现包括语言退化在内的一系列症状，如视力低下、生长迟缓、自主活动能力下降、共济失调、严重的社交障碍以及手部的刻板动作等[1]。*Mecp2*基因突变的小鼠和大鼠表现出了Rett综合征的特征性症状[21,36–38]。在本研究中，我们研究了EAS针刺对*Mecp2*$^{-/y}$大鼠病理症状的影响。大鼠和小鼠会因为缺乏MeCP2而出现寿命显著缩短[3,18]，在我们的实验也观察到了这一点。我们发现，特定穴位（HT 7、KI 1和GV 20）的EAS显著改善了*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的运动能力、运动协调能力和社交行为能力[图5（c）]。特别是使*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的中位生存期延长了44%。*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的中位生存期仅为71天。而经过EAS治疗的*Mecp2*$^{-/y}$大鼠，中位生存期提高至102天，最长生存期为240天，表明EAS确实对Rett综合征大鼠模型产生了积极的作用。EAS为治疗Rett综合征提供了一种安全有效的方法，无需考虑手术或血脑屏障等问题。

EAS是一种电刺激，将针灸针插入远离中枢神经系统（即大脑和脊髓）的穴位，某些穴位的刺激效应可以在体内长距离传导，引起大脑的特定区域出现反应。相比于DBS，EAS是治疗脑部疾病的一种安全的方法，因为它不会因手术对大脑造成直接损伤。此外，EAS的远端操作大大降低了脑部手术不准确操作的错误概率，使EAS的普及成为可能。最重要的是，EAS对行为能力的显著改善和寿命的延长，使其成为Rett综合征治疗的有效手段。我们发现EAS通过激活相关的大脑区域来改善运动功能和社交行为。c-Fos被作为神经元激活的标志，因为其表达通

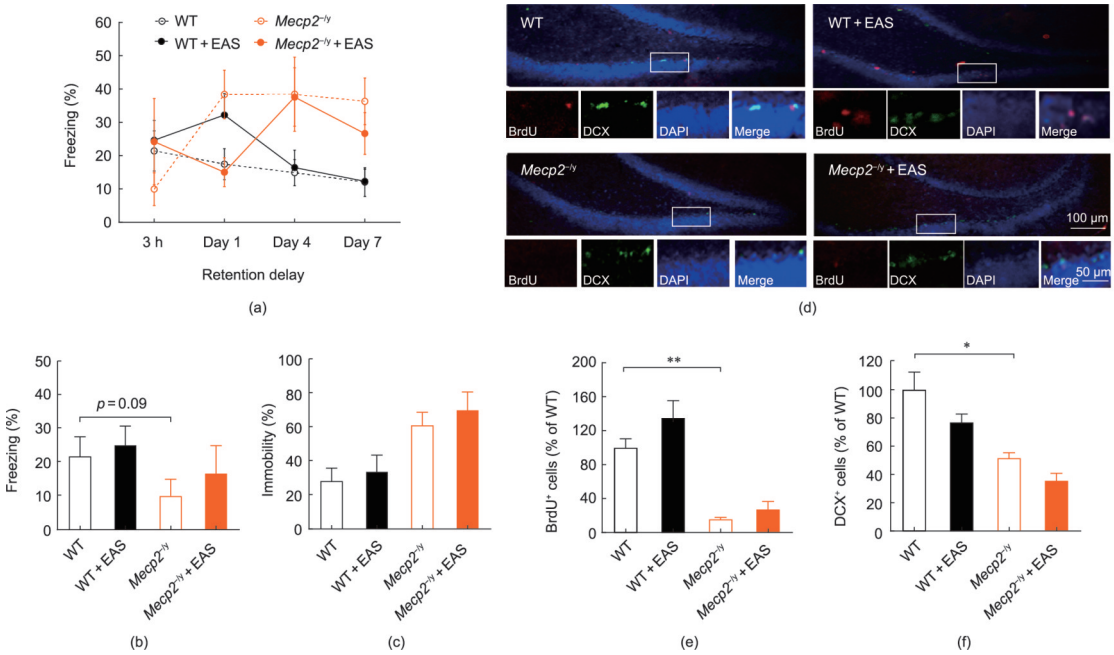

图4. EAS不能改善WT和*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的海马神经发生或条件恐惧记忆。（a）EAS对不同时间组恐惧记忆的影响；（b）3 h时场景恐惧记忆；（c）3 h条件恐惧记忆；（d）低倍（顶部；比例尺，100 μm）和高倍（底部；比例尺，50 μm）下BrdU和DCX细胞的免疫荧光图像，显示各组的BrdU^{+}细胞（红色）、DCX^{+}细胞（绿色）和融合（黄色）；（e）BrdU^{+}细胞数；（f）DCX^{+}细胞的数量。所有数据均以平均值±SEM表示。（a）~（c）WT, n = 10; WT+EAS, n = 10; *Mecp2*$^{-/y}$, n = 9; *Mecp2*$^{-/y}$+EAS, n = 10。（d）~（f）n = 6。单因素方差分析（Bonferroni's *post hoc*）检验，*P < 0.05，**P < 0.01。

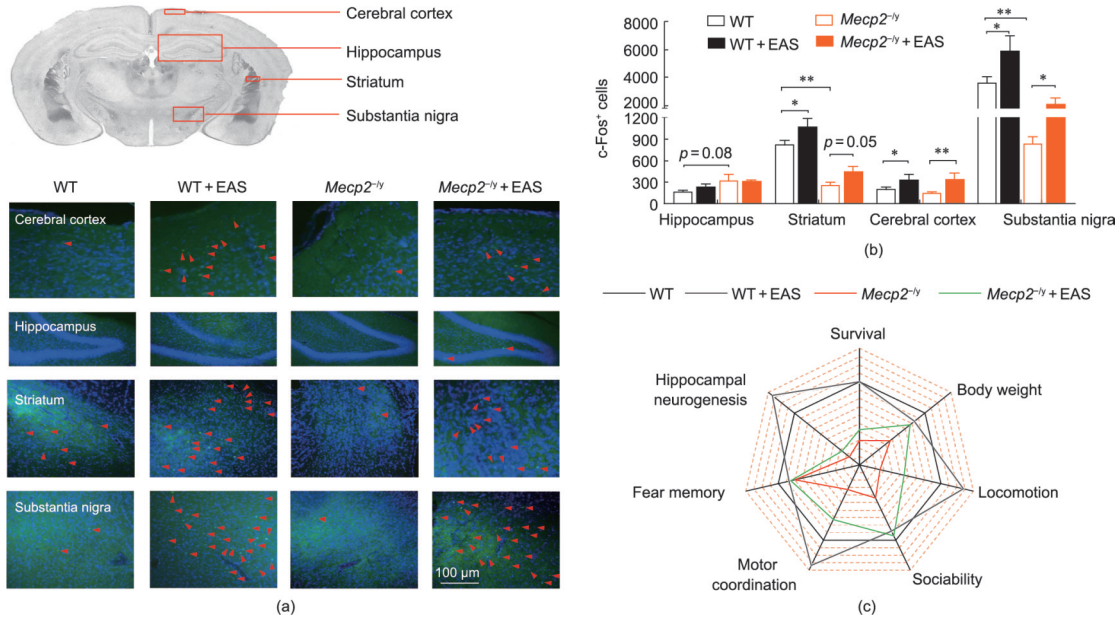

图5. EAS诱导大脑皮层、海马、纹状体和黑质的神经元激活情况。（a）大脑皮质、海马、纹状体和黑质中c-Fos的免疫荧光图像；（b）海马、纹状体、大脑皮层和黑质中的c-Fos^{+}细胞计数；（c）行为能力图。所有数据均以平均值±SEM表示。n = 6，单因素方差分析（Bonferroni's *post hoc*）检验，*P < 0.05，**P < 0.01。

常对各种物理、化学和非致病性环境条件刺激作出反应[32–35]。EAS增加了WT和*Mecp2*$^{-/y}$大鼠与运动、社会行为相关区域的大脑激活，包括大脑皮层、纹体和中脑黑质。

然而，使用单一的治疗策略来缓解Rett综合征的所有症状是一个巨大的挑战，我们发现EAS对恐惧记忆的作用并不明显。EAS刺激后，海马区c-Fos表达仅有低水平的增加、海马区激活不明显，是EAS没有明显改善记忆能力的主要原因。众所周知，海马是记忆的主要功能区，而纹状体和黑质是运动的主要功能区[24,35]，这很好地解释了为什么EAS改善了社交和运动能力，而不是记忆力。在之前的一项研究中，在Rett模型小鼠脑穹窿部位植入电

极，对Rett小鼠进行电刺激，可以恢复条件恐惧记忆和空间记忆。然而，它并没有改善其他行为能力，如Rett小鼠的运动能力、运动协调能力、社交行为能力和体重[5]。根据DBS和EAS的作用特点，DBS与EAS联合应用可能改善Rett综合征大鼠的社交、运动和记忆能力。此外，为了使恢复Rett综合征病理改变的作用更明显，选择更多的穴位也值得进一步研究。

4. 结论与展望

总之，特定穴位（HT 7、KI 1和GV 20）的EAS显著改善*Mecp2*$^{-/y}$大鼠的运动能力、运动协调能力和社交行为能力。EAS增加了WT和*Mecp2*$^{-/y}$大鼠脑区的激活，包括大脑皮层、纹状体和中脑黑质部位与运动和社会行为相关的区域。EAS为*Mecp2*$^{-/y}$的治疗提供了一种安全有效的方法。我们还设想，EAS与其他疗法（如DBS和DMS）的结合可能会更好地改善Rett综合征大鼠的社交、运动和记忆能力。

致谢

我们要感谢上海中医药大学龙华医院针灸科的裴建主任医师，感谢他对*Mecp2*$^{-/y}$大鼠选穴和电针治疗的指导意见。这项工作得到了科技部项目（2016YFA0400902）、国家自然科学基金项目（11575278、21675167、81690263、21227804）、苏州大学放射医学与防护国家重点实验室项目（GZK1201813）、前沿科学重点研究项目（QYZDJ-SSW-SLH031）、中国科学院和中国科学院青年创新促进会（2012205和2016236）的经费支持。

作者的贡献

仇子龙、胡钧和樊春海对研究进行了构思和指导；孙艳红、王丽华、仇子龙和樊春海设计了这项研究。徐毅、孙艳红、陈枝芳和张月芳进行了实验。林承列、葛志磊、赵芳菲、刘馨怡和闫美玲参加了实验。闫美玲、赵芳菲、高基民、诸颖、李宏义和孙艳红为本研究进行了数据分析。孙艳红、王丽华、仇子龙和樊春海撰写了这篇论文。

Compliance with ethics guidelines

Yanhong Sun, Zhifang Chen, Yi Xu, Yuefang Zhang, Zhilei Ge, Chenglie Lin, Yi Zhou, Fangfei Zhao, Meiling Yan, Xinyi Liu, Ying Zhu, Jimin Gao, Hongyi Li, Lihua Wang, Jun Hu, Zilong Qiu, and Chunhai Fan declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.06.032.

References

[1] Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpGbinding protein 2. Nat Genet 1999;23(2):185–8.
[2] Chahrour M, Zoghbi HY. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. Neuron 2007;56(3):422–37.
[3] Tropea D, Giacometti E, Wilson NR, Beard C, McCurry C, Fu DD, et al. Partial reversal of Rett syndrome-like symptoms in *MeCP2* mutant mice. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106(6):2029–34.
[4] Chang Q, Khare G, Dani V, Nelson S, Jaenisch R. The disease progression of *Mecp2* mutant mice is affected by the level of BDNF expression. Neuron 2006; 49(3):341–8.
[5] Hao S, Tang B, Wu Z, Ure K, Sun Y, Tao H, et al. Forniceal deep brain stimulation rescues hippocampal memory in Rett syndrome mice. Nature 2015; 526 (7573):430–4.
[6] Zhang Y, Mao RR, Chen ZF, Tian M, Tong DL, Gao ZR, et al. Deep-brain magnetic stimulation promotes adult hippocampal neurogenesis and alleviates stressrelated behaviors in mouse models for neuropsychiatric disorders. Mol Brain 2014;7(1):11.
[7] Bonafede M, Dick A, Noyes K, Klein JD, Brown T. The effect of acupuncture utilization on healthcare utilization. Med Care 2008;46(1):41–8.
[8] Liu Z, Liu Y, Xu H, He L, Chen Y, Fu L, et al. Effect of electroacupuncture on urinary leakage among women with stress urinary incontinence: a randomized clinical trial. JAMA 2017;317(24):2493.
[9] Hershman DL, Unger JM, Greenlee H, Capodice JL, Lew DL, Darke AK, et al. Effect of acupuncture vs sham acupuncture or waitlist control on joint pain related to aromatase inhibitors among women with early-stage breast cancer: a randomized clinical trial. JAMA 2018;320(2):167.
[10] Cristian A, Katz M, Cutrone E, Walker RH. Evaluation of acupuncture in the treatment of Parkinson's disease: a double-blind pilot study. Mov Disord 2005; 20(9):1185–8.
[11] Goldman N, Chen M, Fujita T, Xu Q, Peng W, Liu W, et al. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. Nat Neurosci 2010;13(7):883–8.
[12] Torres-Rosas R, Yehia G, Peña G, Mishra P, del Rocio Thompson-Bonilla M, Moreno-Eutimio MA, et al. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. Nat Med 2014;20(3):291–5.
[13] Yun SJ, Park HJ, Yeom MJ, Hahm DH, Lee HJ, Lee EH. Effect of electroacupuncture on the stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. Neurosci Lett 2002;318(2):85–8.
[14] Zhang Y, Lan R, Wang J, Li XY, ZhuDN, MaYZ, et al. Acupuncture reduced apoptosis and up-regulated BDNF and GDNF expression in hippocampus following hypoxia–ischemia in neonatal rats. J Ethnopharmacol 2015;172: 124–32.
[15] Lin R, Chen J, Li X, Mao J, Wu Y, Zhuo P, et al. Electroacupuncture at the Baihui acupoint alleviates cognitive impairment and exerts neuroprotective effects by modulating the expression and processing of brain-derived neurotrophic factor in APP/PS1 transgenic mice. Mol Med Rep 2016;13(2): 1611–7.
[16] Zhang R, Jia MX, Zhang JS, Xu XJ, Shou XJ, Zhang XT, et al. Transcutaneous

electrical acupoint stimulation in children with autism and its impact on plasma levels of arginine-vasopressin and oxytocin: a prospective singleblinded controlled study. Res Dev Disabil 2012;33(4):1136–46.
[17] Zhang HF, Li HX, Dai YC, Xu XJ, Han SP, Zhang R, et al. Electro-acupuncture improves the social interaction behavior of rats. Physiol Behav 2015;151: 485–93.
[18] Wu Y, Zhong W, Cui N, Johnson CM, Xing H, Zhang S, et al. Characterization of Rett syndrome-like phenotypes in Mecp2-knockout rats. J Neurodev Disord 2016;8(1):23.
[19] Khongrum J, Wattanathorn J. Laser acupuncture improves behavioral disorders and brain oxidative stress status in the valproic acid rat model of autism. J Acupunct Meridian Stud 2015;8(4):183–91.
[20] Yin CS, Jeong HS, Park HJ, Baik Y, Yoon MH, Choi CB, et al. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. Res Vet Sci 2008; 84(2):159–65.
[21] Bhattacherjee A, Winter M, Eggimann L, Mu Y, Gunewardena S, Liao Z, et al. Motor, somatosensory, viscerosensory and metabolic impairments in a heterozygous female rat model of Rett syndrome. Int J Mol Sci 2018;19(1):97.
[22] Nadler JJ, Moy SS, Dold G, Simmons N, Perez A, Young NB, et al. Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. Genes Brain Behav 2004;3(5):303–14.
[23] Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. Neuropsychopharmacology 2011; 36(2):529–38.
[24] Tian T, Sun Y, Wu H, Pei J, Zhang J, Zhang Y, et al. Acupuncture promotes mTOR-independent autophagic clearance of aggregation-prone proteins in mouse brain. Sci Rep 2016;6(1):19714.
[25] Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R. Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. Nat Genet 2001;27(3):327–31.
[26] Cascio C, McGlone F, Folger S, Tannan V, Baranek G, Pelphrey KA, et al. Tactile perception in adults with autism: a multidimensional psychophysical study. J Autism Dev Disord 2008;38(1):127–37.
[27] Shahbazian MD, Young JI, Yuva-Paylor LA, Spencer CM, Antalffy BA, Noebels JL, et al. Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. Neuron 2002; 35(2):243–54.
[28] Moy S, Nadler J, Young N, Perez A, Holloway L, Barbaro R, et al. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. Behav Brain Res 2007;176(1):4–20.
[29] Andari E, Duhamel JR, Zalla T, Herbrecht E, Leboyer M, Sirigu A. Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. Proc Natl Acad Sci USA 2010;107(9):4389–94.
[30] Bartz J, Simeon D, Hamilton H, Kim S, Crystal S, Braun A, et al. Oxytocin can hinder trust and cooperation in borderline personality disorder. Soc Cogn Affect Neurosci 2011;6(5):556–63.
[31] Hoge EA, Pollack MH, Kaufman RE, Zak PJ, Simon NM. Oxytocin levels in social anxiety disorder. CNS Neurosci Ther 2008;14(3):165–70.
[32] Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA. Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the *c-fos* gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87(17): 6912–6.
[33] Herrera DG, Robertson HA. Activation of *c-fos* in the brain. Prog Neurobiol 1996;50(2–3):83–107.
[34] Morrissey JJ, Raney S, Heasley E, Rathinavelu P, Dauphinee M, Fallon JH. IRIDIUM exposure increases *c-fos* expression in the mouse brain only at levels which likely result in tissue heating. Neuroscience 1999;92(4): 1539–46.
[35] López-Martín E, Bregains J, Relova-Quinteiro JL, Cadarso-Suárez C, Jorge-Barreiro FJ, Ares-Pena FJ. The action of pulse-modulated GSM radiation increases regional changes in brain activity and c-Fos expression in cortical and subcortical areas in a rat model of picrotoxin-induced seizure proneness. J Neurosci Res 2009;87(6):1484–99.
[36] Belichenko NP, Belichenko PV, Li HH, Mobley WC, Francke U. Comparative study of brain morphology in *Mecp2* mutant mouse models of Rett syndrome. J Comp Neurol 2008;508(1):184–95.
[37] Engineer CT, Rahebi KC, Borland MS, Buell EP, Centanni TM, Fink MK, et al. Degraded neural and behavioral processing of speech sounds in a rat model of Rett syndrome. Neurobiol Dis 2015;83:26–34.
[38] Patterson KC, Hawkins VE, Arps KM, Mulkey DK, Olsen ML. MeCP2 deficiency results in robust Rett-like behavioural and motor deficits in male and female rats. Hum Mol Genet 2016;25(15):3303–20.