

☆ XXXX ☆

# 头穴丛刺调节 cAMP/PKA/CREB 信号通路改善 APP/PS1 小鼠海马突触可塑性的机制研究

高伟<sup>1,2</sup>, 李雪<sup>1</sup>, 刘安南<sup>1</sup>, 李建辉<sup>1</sup>, 叶秋燕<sup>1</sup>, 黄颖<sup>1</sup>, 杨丰鸽<sup>1</sup>, 宋婧<sup>1</sup>, 邢丽萍<sup>1</sup>, 李虹霖<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>黑龙江中医药大学, 哈尔滨, 150040; <sup>2</sup>江苏护理职业学院, 江苏淮安, 223003; <sup>3</sup>黑龙江中医药大学附属第二医院, 哈尔滨, 150001)

**【摘要】** 目的:观察头穴丛刺对 APP/PS1 小鼠海马突触可塑性的影响并通过环腺苷酸(cAMP)/蛋白激酶 A(PKA)/环腺苷酸应答元件结合蛋白(CREB)信号通路探讨头穴丛刺改善阿尔茨海默病(AD)的可能机制。方法:将雄性 APP/PS1 转基因小鼠随机分为模型组、针刺组、假针刺组,每组 12 只,同背景的 C57BL/6 小鼠 12 只作为对照组。针刺组给予头穴丛刺治疗,假针刺组取双侧腋下非穴点进行针刺,每次干预 30 min, 1 次/天,共 28 d。采用 Morris 水迷宫和巴恩斯迷宫检测小鼠学习记忆能力,免疫组织化学检测海马组织淀粉样蛋白- $\beta$ (A $\beta$ )沉积,尼氏染色观察海马组织形态学变化,透射电镜观察小鼠海马突触超微结构,高尔基染色观察海马神经元树突棘密度;Western bolt 检测 cAMP、PKA、CREB、磷酸化(p)-CREB、突触后密度蛋白 95(PSD95)、突触素 I (SYN1)的蛋白表达。结果:与对照组相比,模型组 Morris 水迷宫逃避潜伏期延长、穿越平台次数减少( $P < 0.01$ ),巴恩斯迷宫进入目标洞口的潜伏期显著延长,逃生箱目标象限的停留时间缩短,正确进入洞口次数减少( $P < 0.001$ ),A $\beta$ 阳性表达面积百分比增多( $P < 0.01$ ),海马 CA1 区神经细胞和突触结构严重损伤,树突棘密度降低( $P < 0.01$ ),海马 cAMP、PKA、PSD-9、SYN1 蛋白表达及 p-CREB/CREB 显著降低( $P < 0.01$ );与模型组相比,针刺组小鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期缩短、穿越平台次数增多( $P < 0.01$ ),巴恩斯迷宫进入目标洞口的潜伏期显著降低,逃生箱目标象限的停留时间和正确进入洞口次数增加( $P < 0.001$ ),A $\beta$ 阳性表达面积百分比减少( $P < 0.01$ ),海马 CA1 区神经细胞和突触结构均有改善,树突棘密度增加( $P < 0.01$ ),海马 cAMP、PKA、PSD-9、SYN1 蛋白表达及 p-CREB/CREB 显著升高( $P < 0.01$ )。假针刺组与模型组各指标差异均无统计学意义。结论:头穴丛刺可能通过调节 cAMP/PKA/CREB 信号通路增强 APP/PS1 小鼠海马突触可塑性,进而改善 AD 小鼠认知功能。

**【关键词】** 头穴丛刺;阿尔茨海默病;cAMP/PKA/CREB 通路;突触可塑性。

## Study on the mechanism of scalp acupoint cluster puncture in improving hippocampal synaptic plasticity by regulating the cAMP/PKA/CREB signaling pathway in APP/PS1 mice

GAO Wei<sup>1,2</sup>, LI Xue<sup>1</sup>, LIU An-nan<sup>1</sup>, LI Jian-hui<sup>1</sup>, YE Qiu-yan<sup>1</sup>, HUANG Ying<sup>1</sup>, YANG Feng-ge<sup>1</sup>, SONG Jing<sup>1</sup>, XING Li-ping<sup>1</sup>, LI Hong-lin<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; <sup>2</sup>Jiangsu College of Nursing, Huaian 223003, Jiangsu Province; <sup>3</sup>The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150000)

**【ABSTRACT】** **Objective** To observe the effect of scalp acupoint cluster puncture on hippocampal synaptic plasticity in APP/PS1 mice and explore the possible mechanism of scalp acupuncture cluster in improving Alzheimer's disease (AD) through the cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA)/cAMP response element-binding protein (CREB) signaling pathway. **Methods** Male APP/PS1 transgenic mice were randomly divided into the

项目来源:国家自然科学基金资助项目(No:82105035);黑龙江省自然科学基金资助项目(No:LH2023H064);黑龙江省中医药管理局项目(No:ZHY2024-304);江苏省卫生健康委科研项目(No:Z2024065);淮安市自然科学联合专项项目(No:HABL202222)

通信作者:李虹霖, E-mail: flyada001@163.com

model group, acupuncture group, and sham acupuncture group, with 12 mice in each group. In addition, 12 C57BL/6 mice with the same genetic background were used as the control group. The acupuncture group was given scalp acupuncture cluster treatment, while the sham acupuncture group received acupuncture at non-acupoint sites under the bilateral hypochondria. Each intervention lasted 30 minutes, once a day, for a total of 28 days. The Morris water maze and Barnes maze were used to detect the learning and memory abilities of the mice. Immunohistochemistry was employed to detect amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) deposition in hippocampal tissue. Nissl staining was used to observe the morphological changes of hippocampal tissue. Transmission electron microscopy was applied to observe the ultrastructure of hippocampal synapses in mice. Golgi staining was used to observe the dendritic spine density of hippocampal neurons. Western blot was performed to detect the protein expression of cAMP, PKA, CREB, phosphorylated (P)-CREB, postsynaptic density protein 95 (PSD95), and synapsin I (SYN1). **Results** Compared with the control group, the model group showed prolonged escape latency and reduced platform crossings in the Morris water maze ( $P < 0.01$ ), significantly prolonged latency to enter the target hole, shortened residence time in the target quadrant of the escape box, and reduced correct hole entries in the Barnes maze ( $P < 0.001$ ). The percentage of  $A\beta$ -positive expression area increased ( $P < 0.01$ ), neural cells and synaptic structures in the hippocampal CA1 region were severely damaged, dendritic spine density decreased ( $P < 0.01$ ), and the protein expression of cAMP, PKA, PSD-95, SYN1, and p-CREB/CREB ratio significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the acupuncture group showed shortened escape latency and increased platform crossings in the Morris water maze ( $P < 0.01$ ), significantly reduced latency to enter the target hole, prolonged residence time in the target quadrant, and increased correct hole entries in the Barnes maze ( $P < 0.001$ ). The percentage of  $A\beta$ -positive expression area decreased ( $P < 0.01$ ), neural cells and synaptic structures in the hippocampal CA1 region improved, dendritic spine density increased ( $P < 0.01$ ), and the protein expression of cAMP, PKA, PSD-95, SYN1, and p-CREB/CREB ratio significantly increased ( $P < 0.01$ ). No significant differences were observed between the sham acupuncture group and the model group in all tests ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Scalp acupoint cluster puncture may enhance hippocampal synaptic plasticity in APP/PS1 mice by regulating the cAMP/PKA/CREB signaling pathway, thereby improving cognitive function in AD mice.

**【KEYWORDS】** Scalp Acupoint Cluster Puncture; Alzheimer's Disease; cAMP/PKA/CREB Pathway; Synaptic Plasticity.

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种与年龄相关的神经退行性疾病,且病情随时间加重。其临床表现主要是进行性认知功能减退,精神行为异常及日常生活能力下降<sup>[1]</sup>。现有的研究结果显示,我国65岁以上老年人AD患病率约为6.6%,且患病率每5年增长一倍以上,80岁以上老年人患病率超过22%,到21世纪中叶,中国老年人口将增加到4亿,痴呆患者将达到2000万<sup>[2]</sup>。显然,AD已成为危害我国老年人健康、制约健康老龄化进程的重要公共卫生问题。有研究表明突触丢失和功能紊乱与AD的发生有密切关系<sup>[3]</sup>。突触是中枢神经系统可塑性变化最敏感的部位AD患者脑中突触可塑性损害可导致神经元变性、死亡,进而出现认知障碍与学习记忆能力的下降<sup>[4]</sup>。有研究表明,突触功能受损可能早于AD的发生<sup>[5]</sup>。环腺苷酸(Cyclic adenosine monophosphate, AMP)/蛋白激酶A (Protein kinase A, PKA)/环腺苷酸应答元件结合蛋白(cyclic adenosine monophosphate response element binding protein, CREB)信号通路是调控基

因转录、细胞代谢及神经元突触可塑性的重要途径,在增强突触信号传递、保证神经元存活、促进记忆形成和巩固等方面发挥多重作用<sup>[6-7]</sup>。课题组前期研究表明头穴丛刺能够改善AD鼠学习记忆能力,但是否与改善突触可塑性相关尚未明确<sup>[8]</sup>,基于此本研究拟采用APP/PS1小鼠探究头穴丛刺是否调控cAMP/PKA/CREB信号通路增强APP/PS1小鼠海马突触可塑性,进而改善认知功能障碍,为头穴丛刺治疗AD提供更多的理论依据,这与“针灸科学研究联盟”提出的“运用现代科学方法揭示针灸学科学内涵、促进临床与基础研究相互转化”的研究理念一致<sup>[9]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

选取36只SPF级雄性6月龄APP/PS1小鼠(SCXK(苏)2015-0001,南京模式研究所),体质量20~23g,分为模型组、针刺组、假针刺组,对照组为同背景的C57BL/6小鼠,每组各12只。小鼠单笼喂养,自由摄食饮水,温度(24±2)℃,湿度45%~

55%,保持通风,12 h/12 h明暗交替。所有实验设计方案均经黑龙江中医药大学伦理委员会审议批准:(编号:2023042501),实验过程中对动物的处理遵循《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求。

## 1.2 主要实验试剂及设备

一次性使用无菌针灸针(0.18mm×10mm,苏州医疗用品有限公司);Morris水迷宫-恒温型水浴池、巴恩斯迷宫系统(上海玉研科学仪器有限公司);全自动轮转切片机、冰冻切片机(德国Leica);JEM-1400型透射电镜(日本电子公司);电泳仪(北京市六一仪器厂,DYY-12C);Image J软件(美国NIH); $\beta$ 淀粉样蛋白抗体(富士胶片和光(广州)贸易有限公司,货号:017-268710);尼氏染色液(上海碧云天生物技术有限公司,货号:C0117);快速高尔基染色试剂盒(北京博蕾德生物科技有限公司,货号:PK401A)。cAMP(武汉菲恩生物科技有限公司,货号:FNa01241)、PKA、CREB、p-CREB、PSD95、SYN1、 $\beta$ -tubulin抗体、二抗山羊抗兔免疫球蛋白(赛默飞世尔科技公司,货号:MA1-19732、MA1-083、MA5-11192、MA1-046、MA1-046、MA5-16308、A-21082)。

## 1.3 干预方法

对照组、模型组不给予任何治疗,仅给予同样抓握和固定。

针刺组:选取百会穴及其左右各旁开2 mm处,采用0.25 mm×13 mm针灸针向前额方向针刺,快速捻转1 min后,剪刀剪短针柄,胶带固定,让小鼠在鼠笼内自由活动,留针30 min,每日一次,连续治疗28d。

假针刺组:采用华佗牌一次性针灸针(0.25mm×13mm),取双侧腋下非穴点(后正中线旁开20mm,髂嵴上10mm),沿皮平刺2mm,针刺后行90°小幅度捻转1min,留针30min,每日一次,连续治疗28d。

## 1.4 观察指标与检测方法

Morris水迷宫实验观察小鼠学习记忆能力:分为定位航行与空间探索两部分。定位航行时,小鼠每天从不同方位(依次东南西北)面向池壁入水四次,救生平台在第二象限底部,记录其登上平台的逃避潜伏期(超60秒未找到则引至平台,记为60秒)。最后一次定位航行实验结束后进行空间探索实验,撤掉平台,小鼠从原平台对面象限入水点放入,记录跨过原平台位置的次数,通过定位航行的

平台潜伏期、空间探索的相关指标分别评价小鼠学习与记忆能力。

巴恩斯迷宫实验检测小鼠认知功能:实验周期设定为8d,具体分为习惯性适应、空间学习训练及记忆测试三个阶段。实验首日为习惯性适应阶段,在80dB背景白噪音环境中,将小鼠直接置于迷宫平面任其自由探索1min,以减少环境陌生引发的应激反应并适应空间结构与噪音刺激。第2-7d为空间学习训练阶段,将小鼠置于固定象限的起始盒内,开启噪声5s后移除起始盒,允许其在迷宫平面进行3min探索,训练目标为寻找唯一连通逃生箱的目标洞口,若3min内未找到则轻柔引导至逃生箱,在箱内停留30s以强化空间记忆关联,每日训练2次,每次结束后清洁迷宫以消除气味线索干扰。第8d为记忆测试阶段,移除逃生箱后,在同等噪声条件下记录小鼠3min内首次正确进入目标洞口的潜伏期(超过3min按3min计)、在目标象限的停留时间及正确进入目标洞口的次数,以此评估小鼠空间记忆的保持能力。

巴恩斯迷宫检测结束后立即取材,小鼠用0.3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,断头取脑。每组随机取3只用于免疫组织化学和尼氏染色,3只用于透射电镜检测,3只用于高尔基染色,剩余3只用于Western blot检测。

免疫组织化学观察海马CA1区A $\beta$ 沉积:小鼠深度麻醉后,断头取双侧海马,脑组织在4%多聚甲醛固定24h的后进行梯度乙醇脱水,透明,石蜡包埋,切片5 $\mu$ m。对石蜡切片依次开展脱蜡、水化与抗原修复操作,随后用PBS进行冲洗。接着滴加A $\beta$ -一抗工作液,并置于4℃环境下孵育过夜。次日取出,再次用PBS冲洗后滴加山羊抗兔IgG二抗工作液,在室温下孵育20分钟,随后进行PBS冲洗。之后采用DAB进行显色处理,再进行苏木精复染,利用梯度乙醇脱水,二甲苯透明、树脂封片。经显微镜拍摄脑组织海马CA1区,获取显微图像后,运用Image J软件统计阳性区域面积占比。

尼氏染色观察海马CA1区神经元数量:取包埋后的海马组织蜡块,切片5 $\mu$ m。将组织蜡片依次浸泡于二甲苯和梯度浓度乙醇中进行脱蜡水化。将载玻片用蒸馏水洗净后,放入甲苯胺蓝溶液中染色40min,温度50~60℃。随后将载玻片用蒸馏水洗净,并依次浸泡于75%乙醇3min、95%乙醇5min、100%乙醇3min进行脱水,然后使用二甲苯透明玻片2次,每次5min。最后在显微镜下进行拍照,同时

计算神经元数量。

透射电镜观察海马CA1区突出超微结构:深度麻醉小鼠并断头取脑,在冰台上分离海马组织,切成约1mm<sup>3</sup>小块,放入2.5%戊二醛固定液于4℃固定过夜。用0.1M二甲胂酸钠缓冲液漂洗3次,每次15分钟,再用1%锇酸固定液室温固定1.5小时后重复漂洗。接着,将其放入50%~100%的乙醇中梯度脱水,各10~15分钟。随后,把组织块先后浸入环氧丙烷、环氧丙烷与包埋剂1:1混合液、纯包埋剂,60℃聚合48小时。切片后将其铺在铜网,先后用2%醋酸铀水溶液暗处染色20分钟、柠檬酸铅染色液染色10分钟。最后,把铜网放透射电镜下,20000倍观察海马C1区并拍照,参照Güldner等<sup>[10]</sup>方法用Image J软件进行分析。

高尔基染色观察小鼠海马神经元树突棘密度:取新鲜的海马组织置于由Solution A和Solution B按等比例混匀的液体,室温避光固定2周后转移至Solution C溶液,并于室温避光固定3天。切取100μm厚的切片,置Solution C溶液室温避光固定3天。Milli-Q水冲洗切片,将切片置于由Solution D、Solution E和Milli-Q配成的混合液(按1:1:2的比例混合)。Milli-Q水冲洗切片,使用梯度乙醇(50%~100%)脱水。二甲苯透明,中性树胶封片。显微镜下观察切片,用Image J计算神经元树突棘密度。

Western blot法检测小鼠海马cAMP、PKA、

CREB、p-CREB、PSD95、SYN1的蛋白表达:取海马组织,加裂解液、磷酸酶抑制剂、苯甲基磺酰氟匀浆,4℃、12000r·min<sup>-1</sup>离心10min(离心半径8.3cm)提取蛋白。BCA法测蛋白浓度后,制胶上样,12%PAGE胶电泳分离蛋白,转膜至PVDF膜。5%脱脂奶粉封闭1h,TBST洗涤后,分别加入cAMP(1:1000)、PKA(1:1000)、CREB(1:500)、p-CREB(1:1000)、PSD-95(1:2000)、SYN1(1:2000)一抗,4℃孵育过夜。次日TBST洗涤,加二抗(1:10000)孵育1h,再次洗涤后显影,ImageJ软件分析结果。

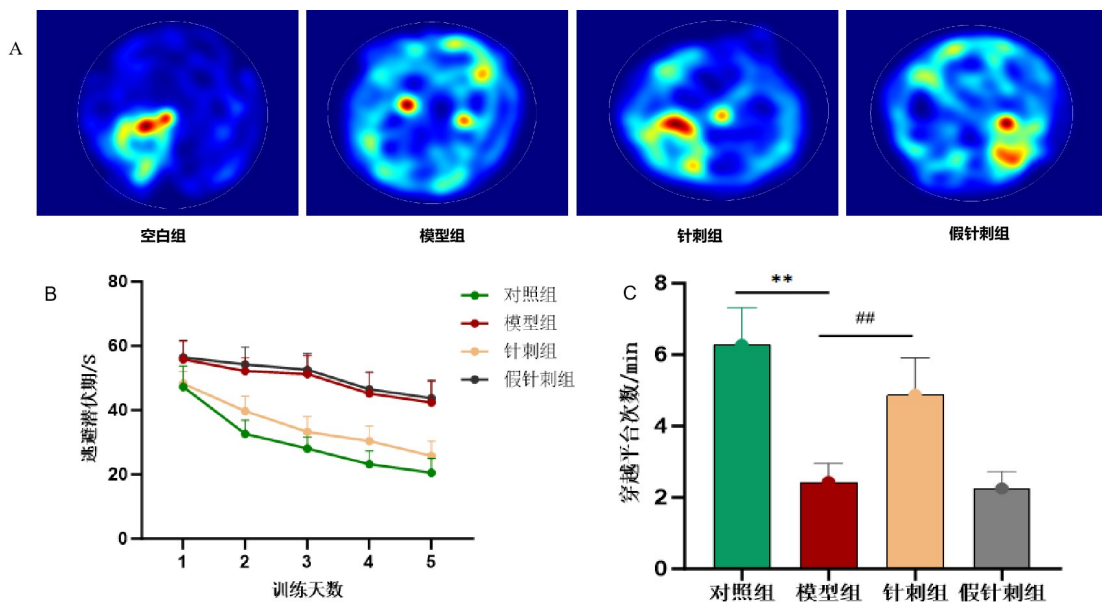
### 1.5 统计学分析

实验数据经SPSS 26.0软件分析,各组计量资料符合正态性检验以均数±标准差()表示,组间均数比较用单因素方差分析,方差齐用LSD检验,不齐用Dunnett's T3检验。P<0.05表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠水迷宫结果比较

如图1水迷宫结果显示,与对照组比,模型组小鼠逃避潜伏期延长、穿越平台次数减少(P<0.01),与模型组相比,假针刺组差异无统计学意义针刺组逃避潜伏期减少、穿越平台次数增加(P<0.01)。见图1。



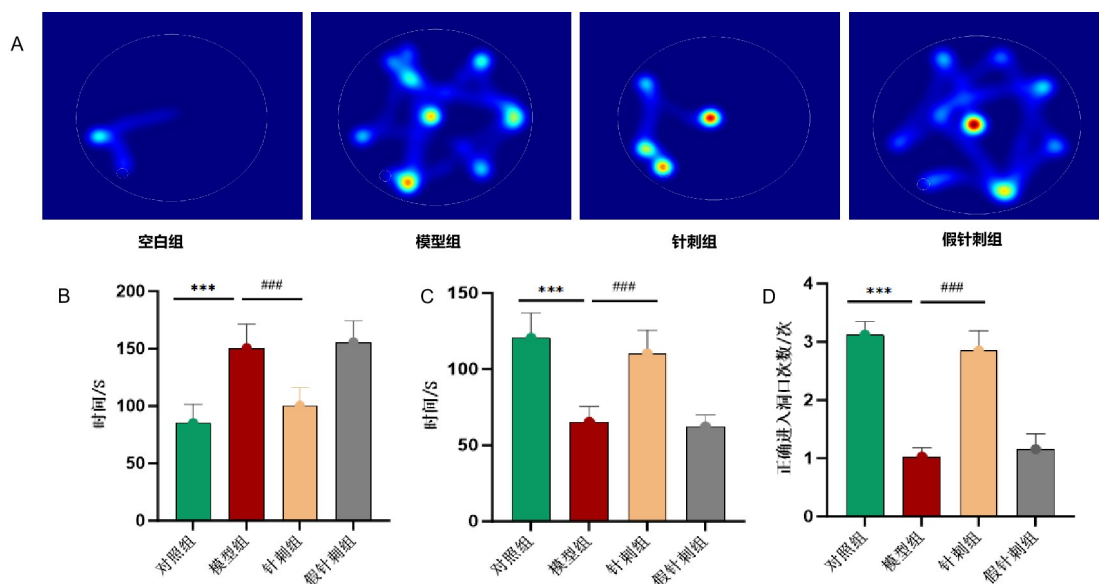
注:A为各组小鼠游泳轨迹热图;B为各组小鼠逃避潜伏期;C为各组小鼠穿越平台次数。与空白组相比,\*\*P<0.01;与模型组相比,##P<0.01。

图1 头穴丛刺对APP/PS1小鼠学习记忆的影响

Fig. 1 Effect of Scalp Acupoint Cluster Puncture on Learning and Memory in APP/PS1 Mice

## 2.2 各组小鼠巴恩斯迷宫结果比较

巴恩斯迷宫结果显示,相比于对照组,模型组小鼠进入目标洞口的潜伏期显著延长,逃生箱目标象限的停留时间缩短,正确进入洞口次数减少( $P < 0.001$ )。与模型组相比,针刺组进入目标洞口的潜伏期显著降低,逃生箱目标象限的停留时间和正确进入洞口次数增加( $P < 0.001$ )。见图2。



注:A为各组小鼠活动轨迹热图;B为各组小鼠进入目标洞口的潜伏期;C为各组小鼠逃生箱目标象限的停留时间;D为各组小鼠正确进入洞口次数。与空白组相比,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组相比,### $P < 0.001$ 。

图2 头穴丛刺对APP/PS1小鼠的巴恩斯实验结果

Fig. 2 Effect of Scalp Acupoint Cluster Puncture on Barnes Maze Test Results in APP/PS1 Mice

## 2.3 各组小鼠A $\beta$ 免疫组织化学结果比较

A $\beta$ 免疫组织化学染色结果显示,与对照组比较,模型组海马区A $\beta$ 阳性表达显著增多( $P < 0.001$ )。与模型组比较,针刺组A $\beta$ 阳性表达显著减少( $P < 0.001$ ),假针刺组差异无统计学意义。见图3。

## 2.4 各组小鼠尼氏染色结果比较

各组小鼠海马CA1区尼氏染色可见,对照组海马尼氏小体数量较多、体积较大,少有丢失情况,神经元形态正常、各细胞排列整齐;与对照组比较,模型组海马神经元细胞形态不规则,排列紊乱,核仁深染固缩,损伤较重,尼氏小体趋近消失,神经元细胞丢失情况严重( $P < 0.01$ );与模型组比较,针刺组损伤程度较轻,海马尼氏小体丰富,神经元细胞形态较为正常,排列相对整齐,数目明显增加( $P < 0.01$ ),假针刺组差异无统计学意义。见图4。

## 2.5 各组小鼠海马区突触超微结构比较

与对照组相比,模型组小鼠海马CA1区突触结构模糊,线粒体萎缩、线粒体嵴断裂消失,突触数目及囊泡减少且分布散乱。针刺组较模型组突触结构改善,突触数目和囊泡增多、排列密集,线粒体嵴

较完整,假针刺组与模型组相似。见图5。

## 2.6 各组小鼠海马区树突棘密度比较

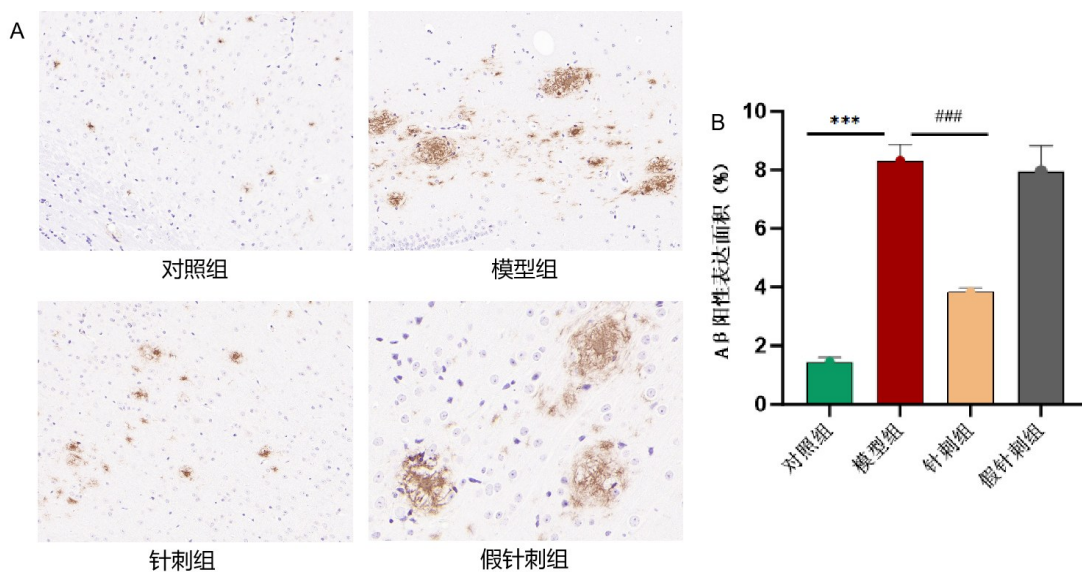
与对照组相比,模型组小鼠海马CA1区神经元树突棘密度显著减少( $P < 0.01$ );与模型组相比,针刺组小鼠海马CA1区神经元树突棘密度显著增加( $P < 0.01$ ),假针刺组差异无统计学意义。见图6。

## 2.7 各组小鼠cAMP、PKA、CREB、p-CREB、PSD95、SYN1蛋白表达比较

Western blot结果显示,模型组较对照组cAMP、PKA、PSD-9、SYN1蛋白表达及p-CREB/CREB蛋白表达降低( $P < 0.01$ ),说明APP/PS1小鼠海马组织中突触相关蛋白表达降低,突触功能受损。与模型组相比,针刺组海马cAMP、PKA、PSD-9、SYN1蛋白表达及p-CREB/CREB显著升高( $P < 0.01$ ),说明经过头穴丛刺干预后,模型组小鼠突触可塑性增强,假针刺组差异无统计学意义。见图7。

## 3 讨论

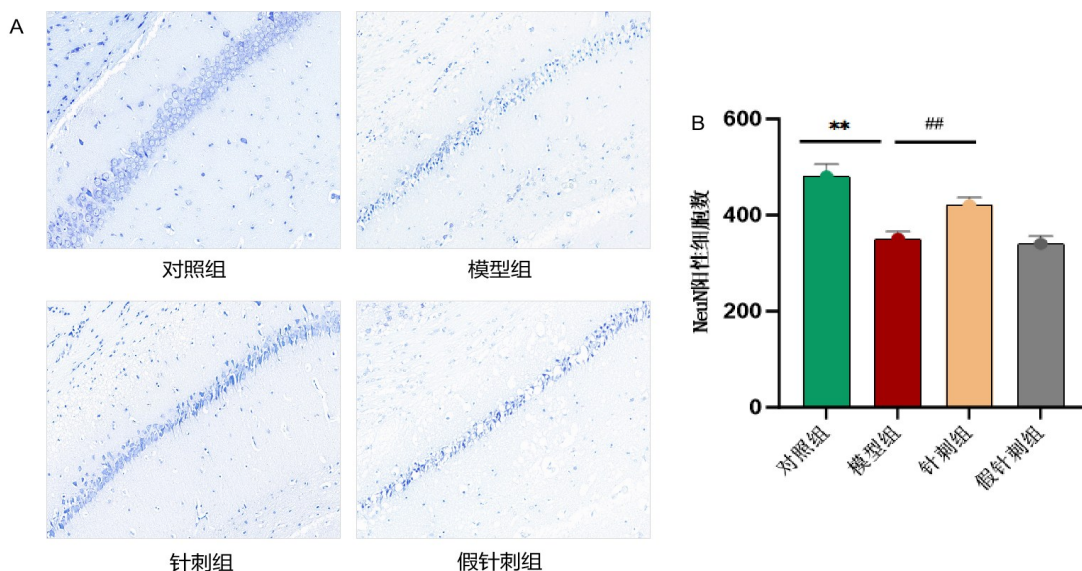
AD在中医中属于“痴呆”“善忘”“呆证”范畴,其病位在脑,病机以肾精亏虚,髓减脑消为



注:A为各组小鼠Aβ免疫组织化学图;B为各组小鼠Aβ阳性表达面积柱状图。与空白组相比,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组相比,### $P < 0.001$ 。

图3 头穴丛刺对APP/PS1小鼠海马Aβ阳性表达的影响(免疫组织化学染色)

Fig. 3 Effect of Scalp Acupoint Cluster Puncture on Hippocampal Aβ Positive Expression in APP/PS1 Mice (Immunohistochemistry staining)



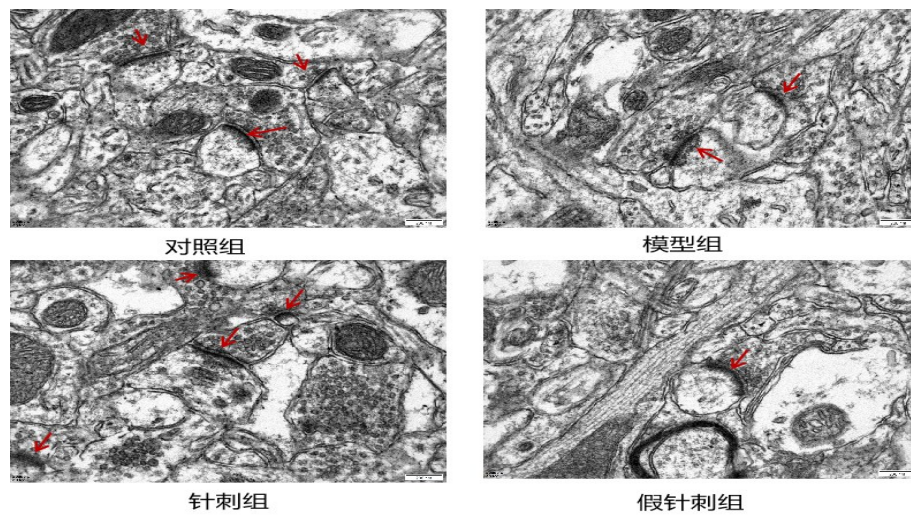
注:A为各组小鼠尼氏染色图;B为各组小鼠海马CA1区神经元数量柱状图。与空白组相比,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组相比,## $P < 0.01$ 。

图4 头穴丛刺对APP/PS1小鼠海马CA1区病理形态的影响(尼氏染色)

Fig.4 Effect of Scalp Acupoint Cluster Puncture on Pathological Morphology of Hippocampal CA1 Region in APP/PS1 Mice (Nissl staining)

主<sup>[10-11]</sup>。头穴丛刺疗法是按照大脑皮质功能定位将头部分为七区,其中顶区、顶前区及额区主治精神行为异常、记忆力障碍及运动障碍等<sup>[12]</sup>。丛刺的方法即在同一治疗区针刺三针及以上,通过这种方式,产生一个“场”,协同作用于大脑皮质相应部位,进而改善神经细胞的兴奋性,调节相应的功能障

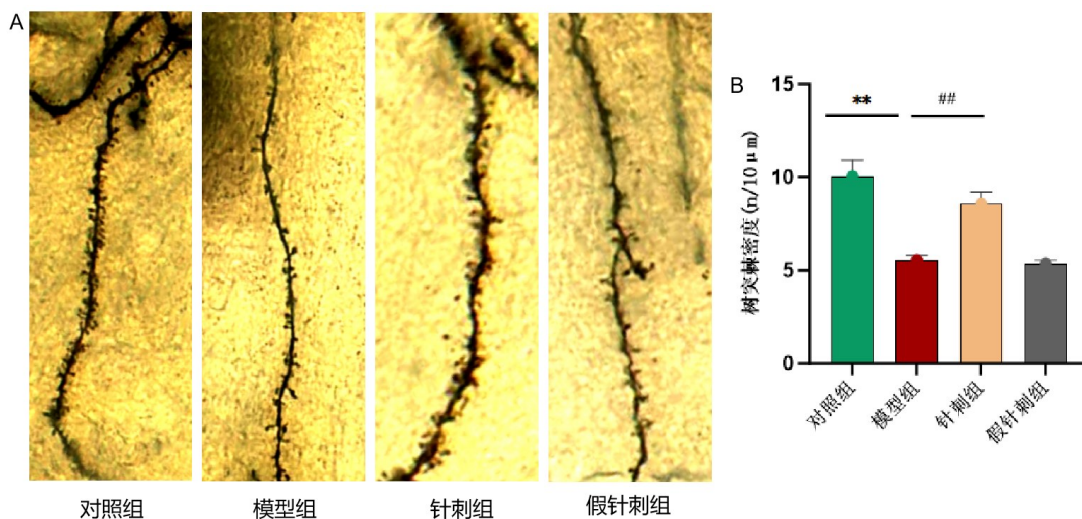
碍<sup>[13]</sup>。百会穴素有“诸阳之会,百脉之所聚,百病所主”之称,其位于巅顶,与脑部紧密相连,是调节大脑功能的关键穴位,同时也是于氏头针中顶区的代表穴位。基于此,本课题选取小鼠“百会穴”及左右旁开2mm各1穴,向小鼠前额部针刺,针刺区域全面覆盖了小鼠的顶区、顶前区和额区,起到了一穴



注:红色箭头表示突触

图5 头穴丛刺对APP/PS1小鼠海马区突触超微结构的影响(透射电镜)

Fig. 5 Effect of Scalp Acupoint Cluster Puncture on Hippocampal Synaptic Ultrastructure in APP/PS1 Mice (transmission electron microscope)



注:A为各组小鼠高尔基染色图;B为各组小鼠海马CA1区树突棘密度柱状图。与空白组相比,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组相比,## $P < 0.01$ 。

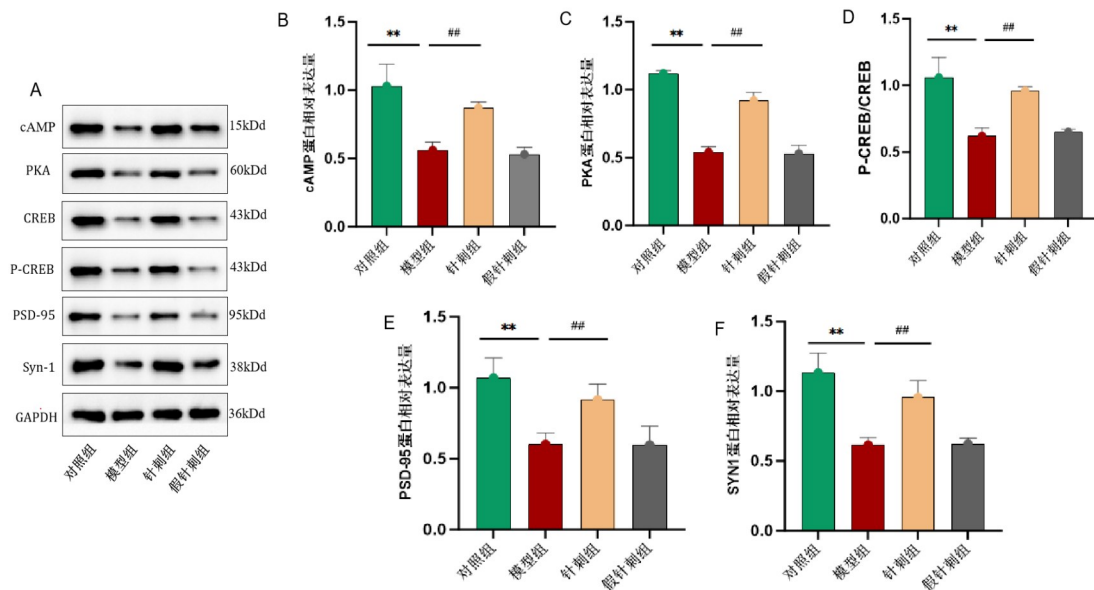
图6 头穴丛刺对APP/PS1小鼠海马区树突棘密度的影响(高尔基染色)

Fig. 6 Effect of Scalp Acupoint Cluster Puncture on Hippocampal Dendritic Spine Density in APP/PS1 Mice (Golgi staining)

带多穴、一经带多经的治疗效果,最大程度发挥头穴丛刺疗法的作用。在本研究中,APP/PS1小鼠经头穴丛刺干预后,水迷宫实验和巴恩斯中逃避潜伏期缩短、穿越平台次数、目标象限停留时间及正确进入洞口次数增加,海马组织形态改善,神经元损伤减轻, $A\beta$ 阳性表达减少。假针刺组与模型组小鼠比较认知功能、海马病理形态及 $A\beta$ 沉积等方面均无显著差异,说明AD小鼠认知功能的改善源于头穴丛刺所作用的特定穴位及区域,而非针刺行为本

身所导致的非特异性效应。王春霞等<sup>[14]</sup>研究显示,头穴丛刺可能通过抑制NF- $\kappa$ B的激活,降低海马组织和血清中 $A\beta$ 含量,减轻脑内炎性浸润,改善AD大鼠认知功能障碍,这一结果与本研究观察到的行为学改善、海马组织形态修复、海神经元损伤减轻数量增加且 $A\beta$ 阳性表达降低的现象相吻合。

突触作为神经元与效应细胞间的信息传递结构,是突触可塑性调控的关键位点<sup>[15-16]</sup>。神经元持续活动可诱导突触可塑性,表现为突触形态结构、



注:A为各组小鼠蛋白代表性条带;B为各组小鼠海马cAMP蛋白表达统计图;C为各组小鼠海马PKA蛋白表达统计图;D为各组小鼠海马p-CREB/CREB统计图。E为各组小鼠海马PSD-95蛋白表达统计图;F为各组小鼠海马SYN1蛋白表达统计图。与空白组相比,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组相比,## $P < 0.01$ 。

图7 各组小鼠海马鼠cAMP、PKA、CREB、p-CREB、PSD95、SYN1蛋白表达水平

Fig. 7 Protein Expression Levels of cAMP, PKA, CREB, p-CREB, PSD95 and SYN1 in Hippocampus of Mice in Each Group

神经传递效率及功能效能的动态重塑,这一过程被视为学习记忆形成的重要生物学基础<sup>[17-18]</sup>。AD的病理进程以突触形态与超微结构损伤为特征,该损伤可导致突触结构与功能可塑性异常。其潜在机制可能涉及突触相关蛋白表达紊乱、神经递质稳态失衡及神经营养因子分泌异常,进而破坏脑内微环境并引发认知功能衰退<sup>[16,19]</sup>。前期研究证实<sup>[9]</sup>,头穴丛刺可通过调节突触传递的核心递质乙酰胆碱(Ach),改善AD模型小鼠的学习记忆能力,蛋白组学分析进一步显示,头穴丛刺干预后的APP/PS1小鼠中,突触囊泡循环通路在KEGG数据库中呈现显著富集,提示该疗法可能通过调控突触可塑性发挥认知改善作用。本次实验观察到,APP/PS1小鼠海马组织存在突触结构模糊、线粒体萎缩,以及突触数量减少、树突棘密度降低等病理改变,这与临床AD患者脑内的突触病理特征相一致<sup>[20]</sup>。而头穴丛刺干预可显著修复突触超微结构,使突触数量、囊泡分布及树突棘密度增加,假针刺组小鼠无显著改变。

cAMP-PKA-CREB信号通路作为细胞内传递外界信号至基因转录的核心途径,其激活过程由细胞外信号与G蛋白偶联受体结合启动,进而激活腺苷酸环化酶(Adenylyl cyclase, AC)并催化cAMP

合成<sup>[21]</sup>。cAMP作为第二信使,通过解离PKA的调节亚基来释放活性催化亚基,后者入核后磷酸化CREB,最终促进PSD-95等突触相关基因的转录,实现对突触可塑性及记忆形成的调控<sup>[22]</sup>。PSD95是突触后膜的关键蛋白,作为支架结构维持突触后结构稳定,参与调控突触可塑性而SYN1则位于突触前膜,负责调节突触小泡释放,同样是突触可塑性的重要调控因子<sup>[23]</sup>。cAMP/PKA/CREB信号通路中,磷酸化的CREB可通过调控这两种蛋白的表达,既影响突触后膜的结构与功能,也调节突触前膜的递质释放过程,从而协同增强突触可塑性<sup>[24]</sup>。在AD病理中,cAMP-PKA-CREB信号通路被显著抑制,由于A $\beta$ 过度沉积导致cAMP生成量减少,继而影响PKA对CREB的磷酸化修饰,同时,磷酸二酯酶对cAMP的降解作用增强,进一步加剧通路功能低下,最终引发突触数量减少和功能退化,这与AD患者的认知衰退症状紧密关联<sup>[25-27]</sup>。研究显示,通过靶向激活cAMP-PKA-CREB信号通路,可改善AD模型中的突触功能,提示其作为潜在治疗靶点的重要价值<sup>[28]</sup>。本研究结果显示头穴丛刺可逆转APP/PS1小鼠海马组织cAMP、PKA、PSD-95、SYN1水平的降低,促进p-CREB/CREB升高,表明头穴丛刺可能是通过增加cAMP表达,驱动PKA的

激活,进一步促进 CREB 的磷酸化,诱导下游功能性蛋白转录,从而在神经元再生、突触形成、学习和记忆中发挥作用,而假针刺组小鼠的 cAMP-PKA-CREB 信号通路未见显著性影响。

综上所述,本研究表明头穴丛刺可以改善 APP/PS1 小鼠认知功能障碍,其机制可能与激活 cAMP/PKA/CREB 信号通路,增强 APP/PS1 小鼠海马突触可塑性,改善突触结构,增加海马神经元树突棘密度相关。但仍具有一定的局限性,未设计 cAMP/PKA/CREB 通路阻断剂对照组,缺乏一定的严谨性,后续将进行进一步补充验证。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突。

## 参考文献

- [1] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPELTO M, et al. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397 (10284): 1577-1590.
- [2] 中国老年保健协会阿尔茨海默病分会, 中国中药协会脑病药物研究专业委员会, DU Y F, et al. Chinese expert consensus on integrated traditional Chinese and Western medicine diagnosis and treatment of Alzheimer's disease (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Behavioral Medicine and Brain Science*, 2024, 33(2): 97-108.  
中国老年保健协会阿尔茨海默病分会, 中国中药协会脑病药物研究专业委员会, 杜怡峰, 等. 阿尔茨海默病中西医结合诊疗中国专家共识[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2024, 33(2): 97-108.
- [3] 於来康, 吕媛媛, 顾博雅, 等. 有氧运动对 APP/PS1 小鼠海马突触超微结构和功能的可塑性作用[J]. *中国体育科技*, 2023, 59(2): 18-24.  
YU L K, LYU Y Y, GU B Y, et al. Impact of aerobic exercise on the synaptic ultrastructure and function in hippocampus from APP/PS1 mice (in Chinese) [J]. *China Sport Science and Technology*, 2023, 59(2): 18-24.
- [4] DEJANOVIC B, SHENG M, HANSON J E. Targeting synapse function and loss for treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2024, 23(1): 23-42.
- [5] PENG L, BESTARD-LORIGADOS I, SONG W H. The synapse as a treatment avenue for Alzheimer's Disease [J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(7): 2940-2949.
- [6] MO J Y, LIAO W G, DU J Y, et al. Buyang Huanwu decoction improves synaptic plasticity of ischemic stroke by regulating the cAMP/PKA/CREB pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 335: 118636.
- [7] ZHAO Z H, LIU P, ZHANG H L, et al. Gastrodin prevents stress-induced synaptic plasticity impairment and behavioral dysfunction *via* cAMP/PKA/CREB signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2025, 141: 156661.
- [8] 李虹霖, 高伟, 夏昆鹏, 等. 头穴丛刺对阿尔茨海默病大鼠海马区 ChAT、AChE 表达的影响[J]. *中国针灸*, 2019, 39 (4): 403-408.
- [9] LI H L, GAO W, XIA K P, et al. Effects of cluster needling at the scalp points on the expression of ChAT and AchE of hippocampus in rats with Alzheimer's disease (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2019, 39 (4): 403-408.
- [9] Acupuncture Scientific Research Alliance. 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.
- [10] 罗泳茵, 单晓倩, 宋京京, 等. 基于神经元细胞周期重启探讨针灸防治阿尔茨海默病的机制[J]. *针刺研究*, 2024, 49 (11): 1205-1212.  
LUO Y Y, SHAN X Q, SONG J J, et al. Research progress of mechanism of acupuncture and moxibustion on prevention and treatment of Alzheimer's disease based on the neuronal cell cycle re-entry (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(11): 1205-1212.
- [11] 栗晨璐, 杨晓坤, 高誉珊, 等. 基于内体-溶酶体系统探讨电针“百会”“涌泉”改善 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力的作用机制[J]. *针刺研究*, 2023, 48(8): 791-798.  
LI C L, YANG X K, GAO Y S, et al. Electroacupuncture at “Baihui” (GV20) and “Yongquan” (KI1) improves learning-memory ability of APP/PS1 double transgenic mice by regulating endosomal-lysosomal system (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(8): 791-798.
- [12] 朱荣华, 朱新汉, 窦正川, 等. 头穴丛刺留针结合上肢智能康复机器人对脑卒中恢复期患者肩关节功能影响的临床研究[J]. *针刺研究*, 2024, 49(10): 1077-1083.  
ZHU R H, ZHU X H, DOU Z C, et al. Clinical study on the effects of cluster needling at scalp points with needle retaining combined with the training of the upper-limb intelligent rehabilitation robot on shoulder function in stroke patients during convalescence (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(10): 1077-1083.
- [13] 高胤桐, 倪金霞, 武晓娜, 等. 从“头气有街”探讨头穴丛刺法治疗缺血性中风[J]. *中医杂志*, 2019, 60(15): 1282-1287.  
GAO Y T, NI J X, WU X N, et al. Discussion on the treatment of ischemic stroke by scalp cluster needling from “the pathway of head Qi” (in Chinese) [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 60(15): 1282-1287.
- [14] 王春霞, 丁园, 吴迪, 等. 头穴丛刺调控核因子  $\kappa$ B 活性改善阿尔茨海默病大鼠认知功能障碍的机制[J]. *针刺研究*, 2023, 48(6): 585-591.  
WANG C X, DING Y, WU D, et al. Cluster needling of scalp points improves cognitive dysfunction by regulating NF- $\kappa$ B activity in rats with Alzheimer's disease (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(6): 585-591.
- [15] 胡韵韵, 吕育洁, 孟志鹏, 等. 基于 cAMP/PKA/NMDAR 信号通路探讨黑逍遥散对 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马神经元突触可塑性的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024,

- 30(17): 27-34.
- HU Y Y, LYU Y J, MENG Z P, et al. Hei Xiaoyaosan affects synaptic plasticity of hippocampal neurons in APP/PS1 double transgenic mice of AD *via* cAMP/PKA/NMDAR signaling pathway (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2024, 30(17): 27-34.
- [16] 任德琳, 魏玉婷, 苏明莉, 等. 针刺调节突触可塑性治疗阿尔茨海默病机制的研究进展[J]. 针刺研究, 2024, 49(8): 858-866.
- REN D L, WEI Y T, SU M L, et al. Progress of researches on the mechanism of acupuncture treatment for Alzheimer's disease by modulating synaptic plasticity (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2024, 49(8): 858-866.
- [17] MAGEE J C, GRIENBERGER C. Synaptic plasticity forms and functions[J]. Annu Rev Neurosci, 2020, 43: 95-117.
- [18] BHEMBRE N, BONTHRON C, OPAZO P. Synaptic compensatory plasticity in Alzheimer's disease [J]. J Neurosci, 2023, 43(41): 6833-6840.
- [19] STYR B, SLUTSKY I. Imbalance between firing homeostasis and synaptic plasticity drives early-phase Alzheimer's disease [J]. Nat Neurosci, 2018, 21(4): 463-473.
- [20] MCGEACHAN R I, MEFTAH S, TAYLOR L W, et al. Divergent actions of physiological and pathological amyloid- $\beta$  on synapses in live human brain slice cultures [J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 3753.
- [21] 黄志华, 秦朝生, 李爱国, 等. 右美托咪定调节 cAMP/PKA/CREB 信号通路对创伤性脑损伤大鼠学习记忆功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2025, 45(1): 123-127.
- HUANG Z H, QIN C /Z) S, LI A G, et al. Effects of dexmedetomidine regulating cAMP/PKA/CREB signal pathway on learning and memory function in rats with traumatic brain injury (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2025, 45(1): 123-127.
- [22] 陈逢义, 王艳平, 向庆伟. 天麻素调节 cAMP/PKA/CREB 信号通路对阿尔茨海默病大鼠认知障碍的影响[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(7): 1714-1717.
- CHEN F Y, WANG Y P, XIANG Q W. Effect of gastrodin on cognitive impairment in rats with Alzheimer's disease by regulating cAMP/PKA/CREB signaling pathway (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2024, 44(7): 1714-1717.
- [23] 胡韵韵, 吕育洁, 孟志鹏, 等. 基于 cAMP/PKA/NMDAR 信号通路探讨黑逍遥散对 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马神经元突触可塑性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(17): 27-34.
- HU Y Y, LYU Y J, MENG Z P, et al. Hei Xiaoyaosan affects synaptic plasticity of hippocampal neurons in APP/PS1 double transgenic mice of AD *via* cAMP/PKA/NMDAR signaling pathway (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2024, 30(17): 27-34.
- [24] MO J Y, LIAO W G, DU J Y, et al. Buyang Huanwu decoction improves synaptic plasticity of ischemic stroke by regulating the cAMP/PKA/CREB pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 335: 118636.
- [25] ZHANG K X, ZHANG J W, JIANG Y H, et al. Danggui-Shaoyao-San can ameliorate Alzheimer's disease by inhibiting hippocampal neuron apoptosis: findings from serum pharmacology[J]. Drug Des Devel Ther, 2025, 19: 911-929.
- [26] HOU Z T, YANG X Y, LI Y, et al. Electroacupuncture enhances neuroplasticity by regulating the orexin A-mediated cAMP/PKA/CREB signaling pathway in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 8694462.
- [27] MOSALAM E M, ATYA S M, MESBAH N M, et al. Neuroprotective effects of cilomilast and chlorogenic acid against scopolamine-induced memory deficits *via* modulation of the cAMP/PKA-CREB-BDNF pathway[J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(7): 3108.
- [28] YAO Y H, LIU Q Q, DING S K, et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi stems and leaves flavonoids promote neuroregeneration and ameliorate memory loss in rats through cAMP-PKA-CREB signaling pathway based on network pharmacology and bioinformatics analysis[J]. Heliyon, 2024, 10(6): e27161.

收稿日期:2025-07-10 修回日期:2025-08-03

编辑:李天娇