☆ 机制探讨 ☆

基于孤束核-蓝斑神经环路探讨电针“内关”“间使”改善APP/PS1小鼠血脑屏障损伤的作用机制

冯智鹏[1]，肖　娟[1]，余超超[2]，张　洵[1]，於赵勰[1]，潘彦坤[1]，杨　硕[1]，沈　峰[1,3,4,5]

[1]湖北中医药大学针灸骨伤学院，武汉 430061；[2]华中科技大学同济医学院附属协和医院康复科，武汉 430022；[3]湖北时珍实验室，武汉 430061；[4]针灸治未病湖北省协同创新中心，武汉 430060；[5]湖北中医药大学附属医院（湖北省中医院）针灸科，武汉 430060]

【摘　要】　目的：观察孤束核（NTS）中酪氨酸羟化酶（TH）神经元及蓝斑（LC）在电针改善APP/PS1小鼠血脑屏障（BBB）损伤中的作用，探讨电针防治阿尔茨海默病（AD）的NTS^{TH}-LC神经环路机制。**方法：**（1）8只4月龄雄性C57BL/6小鼠为对照组，16只同月龄雄性APP/PS1小鼠随机分为模型组、电针组（n=8）。电针组予电针刺激“内关”“间使”，隔日1次，共4周。干预结束后，以Morris水迷宫、新物体识别实验评估各组小鼠学习记忆能力，Western blot法检测海马闭锁蛋白（Occludin）、紧密连接蛋白-5（Claudin-5）、闭锁小带蛋白-1（ZO-1）表达水平，免疫荧光染色法检测NTS和LC中TH/c-Fos共定位、LC中TH/去甲肾上腺素（NE）共定位表达情况。（2）5只TH-cre小鼠，LC注射逆行示踪病毒，观察NTS中的TH神经元是否投射到LC。（3）21只7月龄APP/PS1小鼠，NTS注射化学遗传激活病毒（AAV2/9-hSyn-DIO-hM3D-mCherry-WPRE-hGH-pA）或空载病毒（AAV2/9-Ef1α-DIO-mCherry-WPRE-hGH-pA），LC注射AAVretro-TH-CRE-WPRE-hGH-pA病毒，待病毒表达21 d后，注射空载病毒小鼠（n=6）为空载病毒＋氯氮平-N-氧化物（CNO）＋电针组（mCherry＋CNO＋EA），随机选3只注射激活病毒小鼠用于脑片膜片钳验证病毒功能，剩余小鼠随机分为2组（n=6）：激活病毒＋CNO＋电针组（hM3D＋CNO＋EA）、激活病毒＋盐水＋电针组（hM3D＋saline＋EA），各组均电针“内关”“间使”，每日1次，共15 d。干预结束后，以Morris水迷宫、新物体识别实验评估小鼠学习记忆能力，EB染色法检测小鼠脑组织BBB通透性，免疫荧光染色法检测小鼠LC中TH/c-Fos、TH/NE共定位表达情况。**结果：**（1）与对照组相比，模型组小鼠学习记忆能力显著降低（P<0.01），海马Occludin、Claudin-5和ZO-1蛋白表达明显减少（P<0.01），NTS与LC中TH/c-Fos共定位表达、LC中TH/NE共定位表达明显增多（P<0.01）。与模型组相比，电针组小鼠学习记忆能力提高（P<0.05，P<0.01），海马Occludin、Claudin-5和ZO-1蛋白表达明显增加（P<0.01），NTS与LC中TH/c-Fos共定位表达、LC中TH/NE共定位表达减少（P<0.01，P<0.05）。（2）通过逆行示踪病毒证明，NTS中TH神经元可以投射到LC。（3）与mCherry＋CNO＋EA组和hM3D＋saline＋EA组相比，hM3D＋CNO＋EA组小鼠学习记忆能力显著降低（P<0.01），脑组织EB含量，LC中TH/c-Fos共定位表达、TH/NE共定位表达明显增多（P<0.01）。**结论：**电针“内关”“间使”能改善AD小鼠BBB损伤及学习记忆功能障碍，其作用机制可能与抑制NTS^{TH}-LC神经环路的激活有关。

【关键词】　阿尔茨海默病；电针；孤束核；蓝斑；酪氨酸羟化酶神经元；去甲肾上腺素；血脑屏障

Mechanism of electroacupuncture at “Neiguan”（PC6）and “Jianshi”（PC5）in ameliorating blood-brain barrier damage in APP/PS1 mice based on the nucleus tractus solitarius-locus coeruleus neural circuit

FENG Zhi-peng[1]，XIAO Juan[1]，YU Chao-chao[2]，ZHANG Xun[1]，YU Zhao-xie[1]，PAN Yan-kun[1]，YANG Shuo[1]，SHEN

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250903

引用格式：冯智鹏，肖娟，余超超，等.基于孤束核-蓝斑神经环路探讨电针“内关”“间使”改善APP/PS1小鼠血脑屏障损伤的作用机制[J].针刺研究，2026，51(6)：677-687.

项目来源：湖北省自然科学基金中医药联合基金重点项目（No.2023AFD113）；湖北省中医药重点学科（针灸学）创新项目（No.XK202405）；湖北省时珍人才工程项目（No.鄂卫函〔2024〕256号）

通信作者：沈峰，E-mail：40052958@qq.com

Feng[1,3,4,5] ([1]College of Acupuncture-Moxibustion and Orthopedics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China; [2]Department of Rehabilitation, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022; [3]Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430061; [4]Hubei Provincial Collaborative Innovation Center of Preventive Treatment by Acupuncture and Moxibustion, Wuhan 430060; [5]Acupuncture and Moxibustion Department, Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine [Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine], Wuhan 430060)

【ABSTRACT】 Objective To observe the role of tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons in the nucleus tractus solitarius (NTS) and locus coeruleus (LC) in electroacupuncture (EA)-mediated improvement of blood-brain barrier (BBB) damage in APP/PS1 mice, so as to explore the mechanism of the NTS^{TH}-LC neural circuit underlying the effect of EA on prevention and treatment of Alzheimer's disease (AD). **Methods** (1) Eight 4-month-old male C57BL/6 mice served as the control group, and 16 age-matched male APP/PS1 mice were randomly divided into the model and EA groups (n=8). The EA group received EA stimulation at "Neiguan" (PC6) and "Jianshi" (PC5) once every other day for 4 weeks. After intervention, Morris water maze and novel object recognition tests were used to evaluate learning and memory abilities. Western blot was performed to detect the expression levels of hippocampal tight junction proteins, including Occludin, Claudin-5, and zonula occludens-1 (ZO-1). Immunofluorescence was used to assess the co-localization of TH/c-Fos in NTS and LC, as well as TH/norepinephrine (NE) co-localization in LC. (2) Five TH-cre mice received retrograde tracing virus injection into LC to observe whether TH-positive neurons in NTS project to LC. (3) Twenty-one 7-month-old APP/PS1 mice were injected with chemogenetic activation virus (AAV2/9-hSyn-DIO-hM3D-mCherry-WPRE-hGH-pA) or empty virus (AAV2/9-Ef1α-DIO-mCherry-WPRE-hGH-pA) into the NTS, and AAVretro-TH-CRE-WPRE-hGH-pA virus into the LC. After 21 d of virus expression, 6 mice injected with empty virus were taken as mCherry+CNO+EA group; 3 mice from the activation virus group were randomly selected for brain slice patch-clamp to verify virus functionality. The remaining mice were randomly divided into 2 groups (n=6): hM3D+CNO+EA, and hM3D+saline+EA groups. EA was applied to PC6 and PC5 once daily for 15 d. After intervention, learning and memory abilities were evaluated by Morris water maze and novel object recognition tests. BBB permeability was detected by Evans blue (EB) staining. Immunofluorescence was used to measure TH/c-Fos and TH/NE co-localization in the LC. **Results** (1) Compared with the control group, the model group showed significantly impaired learning and memory abilities (P<0.01), decreased expressions of hippocampal Occludin, Claudin-5, and ZO-1 (P<0.01), and increased TH/c-Fos co-localization (c-Fos expression in TH-positive neurons) in NTS and LC, as well as TH/NE co-localization in LC (P<0.01). Compared with the model group, the EA group exhibited improved learning and memory abilities (P<0.05, P<0.01), increased expressions of hippocampal tight junction proteins (P<0.01), and reduced TH/c-Fos and TH/NE co-localization (P<0.01, P<0.05). (2) Retrograde tracing confirmed that TH-positive neurons in NTS project to LC. (3) Compared with the mCherry+CNO+EA group and hM3D+saline+EA group, the hM3D+CNO+EA group showed significantly impaired learning and memory (P<0.01), increased EB content in brain tissue, and elevated TH/c-Fos and TH/NE co-localization in the LC (P<0.01). **Conclusion** EA at PC6 and PC5 can ameliorate BBB damage and learning/memory deficits in AD mice, and its mechanism may be related to inhibiting the activation of the NTS^{TH}-LC neural circuit.

【KEYWORDS】 Alzheimer's disease; Electroacupuncture; Nucleus tractus solitarius; Locus coeruleus; Tyrosine hydroxylase-positive neuron; Norepinephrine; Blood-brain barrier

阿尔茨海默病(AD)是常见的神经退行性疾病,患者逐渐出现记忆丧失、行为改变及运动功能障碍等[1]。随着全球老龄化日益加剧,AD发病率持续上升,预计2050年全球AD病例接近1.52亿[2]。目前尚不明确AD的发病机制,其显著病理特征为Aβ斑块积聚和神经元Tau蛋白过度磷酸化[3]。研究证实血脑屏障(BBB)损伤是AD早期病理特征之一,其功能障碍会促进Aβ积聚和Tau蛋白磷酸化,加剧AD进程[4]。针刺治疗AD具有多靶点、多途径、安全有效等优势[5],是早期防治AD的重要手段,但其潜在治疗机制尚不明确。

孤束核(NTS)是脑干重要的神经核团和主要中继中心,参与调控记忆、情绪等[6]。研究证实,NTS是响应针刺刺激并介导针刺信号进一步中枢输入的主要初级核团之一[7]。蓝斑(LC)不仅是大脑去甲肾上腺素(NE)的主要来源,同时也是AD病变

主要脑区[8]。NE在调节AD突触可塑性、神经炎性反应、BBB通透性中发挥重要作用[9]。已有研究结果显示，NTS中酪氨酸羟化酶（TH）神经元是下丘脑室旁核（PVN）脑区NE的主要来源[10]。为探究电针是否调控NTS^{TH}-LC神经环路改善AD中BBB损伤，从而提高认知功能，本研究运用化学遗传学方法聚焦中枢NTS^{TH}-LC环路，探讨电针改善AD小鼠BBB损伤的潜在作用机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物

SPF级雄性APP/PS1小鼠37只，其中4月龄16只、7月龄21只，4月龄SPF级雄性C57BL/6小鼠8只，体质量30～35 g，购买于华创信诺医药公司，生产许可证号：SCXK（苏）2020-0009。8周龄TH-cre小鼠5只，购买于佳维斯（武汉）生物医药公司。动物喂养在温度22～24 ℃、湿度55%～65%的实验动物中心，自然光照，自由摄食饮水，适应性喂养1周。本研究通过湖北中医药大学动物伦理委员会审批（No.HUCMS510280002），实验过程严格遵守国家科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》的有关规定。

1.2　主要试剂和仪器

紧密连接蛋白-5（Claudin-5）、闭锁蛋白（Occludin）、闭锁小带蛋白-1（ZO-1）、TH、NE、c-Fos一抗，HRP标记的山羊抗兔二抗，含DAPI封片剂，TSA-488、TSA-594染料（武汉Servicebio），氯氮平-N-氧化物（CNO）、跨突触神经元逆行示踪病毒AAV2/8-EF1α-DIO-H2B-EGFP-TVA-WPRE-hGH-pA、AAV2/8-EF1α-DIO-RVG-WPRE-hGH-pA、RV-CVS-ENVA-△G-tdtomato、含hSyn启动子的化学遗传激活病毒AAV2/9-hSyn-DIO-hM3D-mCherry-WPRE-hGH-pA、含Ef1α启动子的化学对照病毒AAV2/9-Ef1α-DIO-mCherry-WPRE-hGH-pA、含TH启动子逆向跨突触表达Cre重组酶病毒AAVretro-TH-CRE-WPRE-hGH-pA（武汉枢密），伊文思蓝（EB，广州赛国），甲酰胺（上海阿拉丁）。

0.25 mm×13 mm一次性针灸针（北京中研太和），酶标仪（深圳Rayto），冷冻高速离心机（湖南湘仪），HANS-100A电针仪及转膜仪（北京华运安特），Morris水迷宫（武汉一鸿），旷场箱（上海玉研），恒温水浴箱（上海一恒），电泳仪（北京六一），激光共聚焦显微镜、病理切片机（武汉Servicebio），脑立体定位仪、玻璃微电极注射泵、小动物呼吸麻醉机（深圳瑞沃德），微量注射泵（美国KD scientific），放大器、数模转换器（美国Axon/Molecular Devices），电极拉制仪（美国Sutter Instruments），正置显微镜（日本Olympus）。

1.3　动物分组及干预方法

实验1：8只4月龄雄性C57BL/6小鼠为对照组，16只同月龄雄性APP/PS1小鼠随机分为模型组、电针组（n=8）。电针组：抓取并固定，电针刺激“内关”“间使”，隔日1次，共4周。对照组、模型组：不电针，与电针组同时段进行同样方式的抓取固定。

实验2：5只TH-cre小鼠作为逆行示踪病毒组，向LC区注射AAV2/8-EF1α-DIO-H2B-EGFP-TVA-WPRE-hGH-pA、AAV2/8-EF1α-DIO-RVG-WPRE-hGH-pA，待病毒表达21 d后，再向LC注射RV-CVS-ENVA-△G-tdtomato，观察NTS中TH神经元是否投射到LC。

实验3：21只7月龄APP/PS1小鼠，NTS注射化学遗传激活病毒（n=15）或空载病毒＋CNO＋电针组（mCherry＋CNO＋EA，n=6），LC注射AAVretro-TH-CRE-WPRE-hGH-pA病毒，待病毒表达21 d后，随机选3只注射激活病毒小鼠用于脑片膜片钳验证病毒功能，剩余小鼠随机分为2组（n=6）：激活病毒＋CNO＋电针组（hM3D＋CNO＋EA）、激活病毒＋盐水＋电针组（hM3D＋saline＋EA）。

mCherry＋CNO＋EA组：APP/PS1小鼠NTS区注射空载病毒AAV2/9-Ef1α-DIO-mCherry-WPRE-hGH-pA，LC区注射AAVretro-TH-CRE-WPRE-hGH-pA，待病毒表达21 d后腹腔注射CNO（1 mg/kg），30 min后予电针刺激“内关”“间使”，每日1次，共15 d。

hM3D＋CNO＋EA组：APP/PS1小鼠NTS区注射化学遗传激活病毒AAV2/9-hSyn-DIO-hM3D-mCherry-WPRE-hGH-pA，LC区注射AAVretro-TH-CRE-WPRE-hGH-pA，待病毒表达21 d后腹腔注射CNO（1 mg/kg），余同mCherry＋CNO＋EA组。

hM3D＋saline＋EA组：APP/PS1小鼠NTS区注射化学遗传激活病毒AAV2/9-hSyn-DIO-hM3D-mCherry-WPRE-hGH-pA，LC区注射AAVretro-TH-CRE-WPRE-hGH-pA，待病毒表达21 d后，腹腔注射无菌0.9%氯化钠溶液（1 mg/kg），余同mCherry＋CNO＋EA组。

电针方法：采用自制鼠笼固定小鼠，“内关”“间使”定位参照《实验动物常用穴位名称与定位 第3部分：小鼠》[11]，直刺各2～3 mm，针柄接

HANS-100A电针仪，正负极分别接同侧“内关”“间使”，左右两侧交替。连续波、2 Hz、1 mA，留针20 min，每日1次，共15 d。

病毒注射：小鼠戊巴比妥钠(0.06 mL/g)腹腔注射麻醉，脑立体定位仪固定，加热垫维持体温为36.5～37.5 ℃。常规暴露头骨确定Bregma点。参考脑立体定位图谱定位NTS(AP：-7.0 mm，ML：±0.5 mm，DV：-4.5 mm)、LC(AP：-5.3 mm，ML：±0.9 mm，DV：-4.0 mm)。1)逆行示踪病毒组：TH-cre小鼠双侧LC区，玻璃微电极注射泵以50 nL/min注射相关病毒，每侧100 nL。待病毒表达21 d后，同样操作再向双侧LC区注射RV-CVS-ENVA-△G-tdtomato各100 nL。待病毒表达10 d后，灌注取材。2) mCherry＋CNO＋EA组、hM3D＋CNO＋EA组、hM3D＋saline＋EA组：APP/PS1小鼠双侧NTS区，玻璃微电极注射泵以30 nL/min分别注射AAV2/9-Ef1α-DIO-mCherry-WPRE-hGH-pA或AAV2/9-hSyn-DIO-hM3D-mCherry-WPRE-hGH-pA，每侧100 nL。随后在双侧LC区以30 nL/min注射AAVretro-TH-CRE-WPRE-hGH-pA，每侧100 nL。待病毒表达21 d后，进行CNO腹腔注射和电针干预。

1.4　观察指标及检测方法

Morris水迷宫检测学习记忆能力：水迷宫第2象限放置低于水面1 cm的平台。小鼠面朝池壁，每日从各象限放入水中，60 s内游上平台的时间为逃避潜伏期；若期间未找到平台，引导小鼠在平台适应20 s，逃避潜伏期记为60 s。连续训练5 d。第6天撤去平台，选第4象限将小鼠入水，记录60 s内穿越原平台位置次数和原平台象限停留时间(探索目标象限时间)。

新物体识别检测学习记忆能力：小鼠放入一长、宽、高各40 cm的白色箱，上方装有摄像系统。物体采用矩形柱和圆形柱，测试过程中保持物体固定。第1天适应期和第2天熟悉期每次10 min，时间间隔24 h，第3天测试期为5 min。适应期为空箱，熟悉期箱内为2个完全相同的矩形柱，测试期随机撤掉矩形柱中的一个，更换为陌生圆形柱，通过动物行为学分析系统记录和分析数据。认知指数(%)＝新物体探索时间÷(新物体探索时间＋旧物体探索时间)×100%。

Western blot法检测小鼠海马Claudin-5、Occludin、ZO-1蛋白表达水平：行为学测试后，2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠(0.06 mL/g)。每组随机选5只小鼠取海马组织-80 ℃冰箱冻存。检测海马组织总蛋白浓度，电泳，转膜，封闭1 h。加Claudin-5(1∶500)、Occludin(1∶500)、ZO-1(1∶500)一抗，4 ℃孵育过夜。洗膜后加二抗(1∶5 000)室温摇床孵育1 h。洗膜后ECL显影，进行图像分析。以目标蛋白与内参β-actin条带灰度值之比为目标蛋白的相对表达量。

免疫荧光标记法检测NTS与LC中TH/c-Fos、TH/NE共定位表达情况：行为学测试后，每组剩余3只小鼠取脑组织，4%多聚甲醛固定24 h。脱水、透明、浸蜡、组织包埋和切片，片厚约30 μm，脱蜡抗原修复，PBS洗3次，每次5 min。血清封闭30 min后，加入TH一抗(1∶200)，置于湿盒内4 ℃孵育过夜，加HRP标记二抗(1∶500)，室温孵育50 min，加入TSA-488染料，避光孵育10 min，TBST冲洗3次，每次5 min；再置于抗原修复液中微波处理，加c-Fos(1∶200)或NE(1∶200)一抗，置于湿盒内4 ℃孵育过夜，加入HRP标记的二抗，室温孵育50 min，加入相应的TSA-594染料，避光孵育10 min，TBST冲洗3次，每次5 min，含DAPI抗荧光淬灭封片液封片。激光共聚焦显微镜观察其阳性表达，Image J软件分析结果。共表达百分比(%)＝(共表达细胞数量÷TH阳性细胞数量)×100%。

TH-cre小鼠NTS中的TH神经元是否投射到LC：待病毒表达充分后，5只TH-cre小鼠灌注固定取脑切片，共聚焦显微镜分别观察NTS、LC中病毒表达情况。

脑片膜片钳技术验证化学遗传激活病毒功能性：随机选取3只注射化学遗传激活病毒小鼠，麻醉后迅速取大脑，置于冰冷人工脑脊液(ACSF)中。切300 μm厚脑片，转至含ACSF的孵育皿，置于32～34 ℃恒温孵育箱1 h。移到记录室中以ACSF持续灌流，微操纵器将玻璃电极靠近显微镜和红外差分干涉相衬成像系统下的目标神经元，通过负压使电极与细胞膜形成高电阻封接(＞1 GΩ)。轻轻抽吸破电极尖端下的细胞膜，进入全细胞记录模式，记录基线数据。灌流系统加入CNO(1 μmol/L)，持续1 min，记录膜电位变化和动作电位发放情况。

EB染色法检测脑组织BBB通透性：行为学测试后，每组随机取3只小鼠，尾静脉注射2% EB溶液(2 mL/kg)，2 h后麻醉小鼠，心脏灌流0.9%氯化钠溶液至流出液体透明。脑组织称重，置于3 mL甲酰胺中45 ℃恒温水浴48 h，离心15 min取上清。酶标仪检测波长620 nm处吸光度，根据标准曲线计算EB含量。

1.5　统计学方法

采用GraphPad Prism 10.1.2分析数据。数据符合正态分布，以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，采用单因素方差分析进行组间比较，方差齐时，组间多重比较采用LSD检验，方差不齐时，采用Dunnett's $t3$检验。以$P\leqslant0.05$为差异有统计学意义的标准。

2　结果

2.1　各组小鼠Morris水迷宫结果比较

与对照组相比，模型组小鼠逃避潜伏期显著延长、穿越原平台次数显著减少，探索目标象限时间显著缩短($P<0.01$)；与模型组相比，电针组小鼠逃避潜伏期缩短，穿越原平台次数增多，探索目标象限时间延长($P<0.05$)。见图1。

2.2　各组小鼠新物体识别结果比较

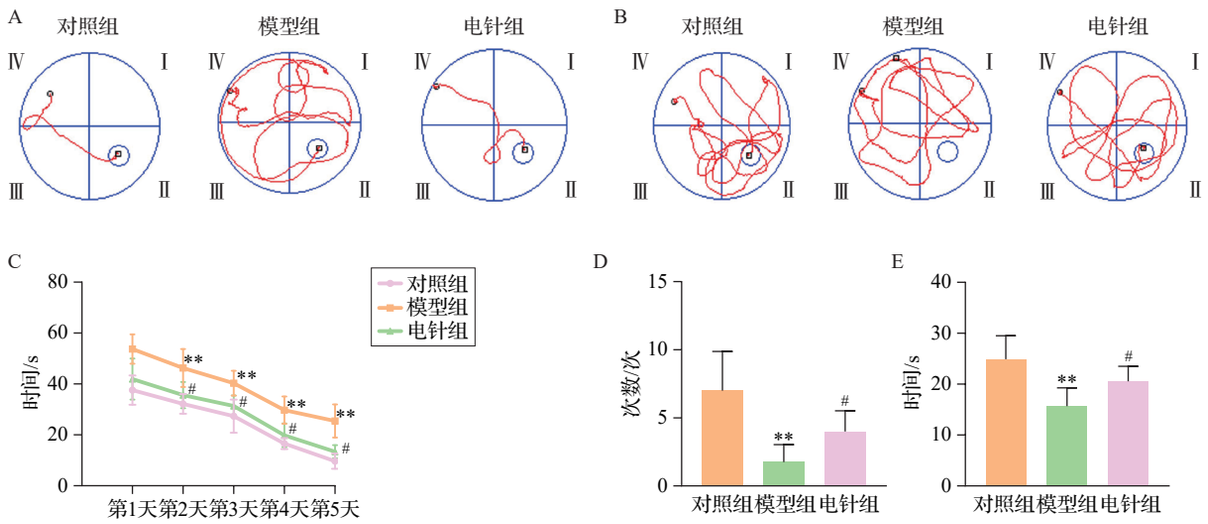
与对照组相比，模型组小鼠认知指数明显降低($P<0.01$)；与模型组相比，电针组小鼠认知指数明显升高($P<0.01$)。见图2。

2.3　各组小鼠海马Occludin、Claudin-5、ZO-1蛋白表达水平比较

与对照组相比，模型组小鼠海马Occludin、Claudin-5和ZO-1蛋白表达明显减少($P<0.01$)；与模型组相比，电针组小鼠海马Occludin、Claudin-5和ZO-1蛋白表达明显增加($P<0.01$)。见图3。

2.4　各组小鼠NTS和LC中TH/c-Fos共定位、LC中TH/NE共定位表达比较

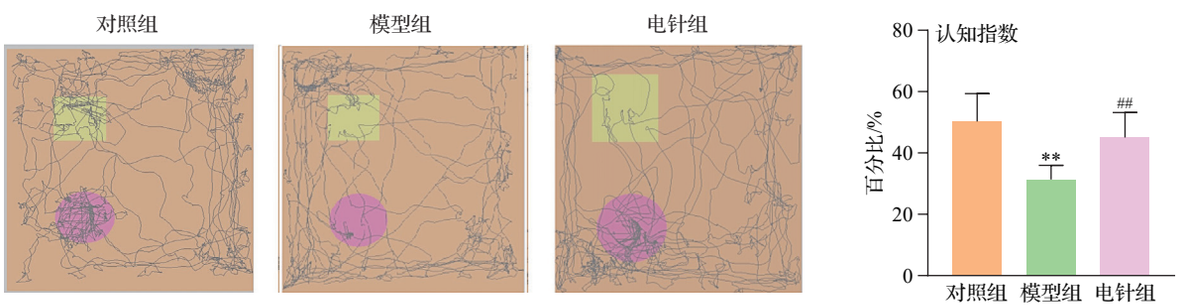
与对照组相比，模型组小鼠NTS与LC中TH/c-Fos共定位表达明显增多($P<0.01$)，LC中TH/NE共定位表达明显增多($P<0.01$)；与模型组相比，电针组小鼠NTS与LC中TH/c-Fos共定位表达明显减少($P<0.01$)，LC中TH/NE共定位表达减少($P<0.05$)。见图4～图6。



注：A.各组小鼠定位航行轨迹图；B.各组小鼠空间探索轨迹图；C.各组小鼠逃避潜伏期；D.各组小鼠穿越原平台次数；E.各组小鼠探索目标象限时间。与对照组相比，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\#}P<0.05$。

图1　各组小鼠Morris水迷宫结果比较($\bar{x}\pm s$，8只鼠/组)

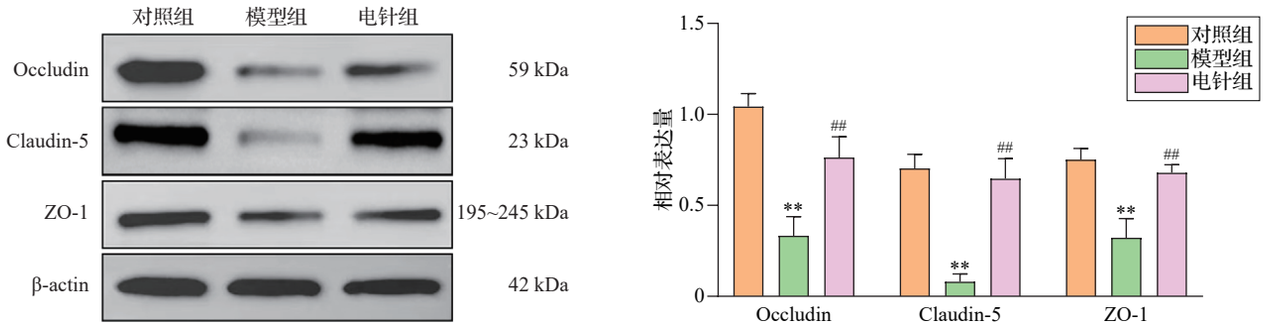
Fig. 1　Comparison of Morris water maze test results of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 8 mice/group)



注：与对照组相比，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\#\#}P<0.01$。

图2　各组小鼠新物体识别检测结果比较($\bar{x}\pm s$，8只鼠/组)

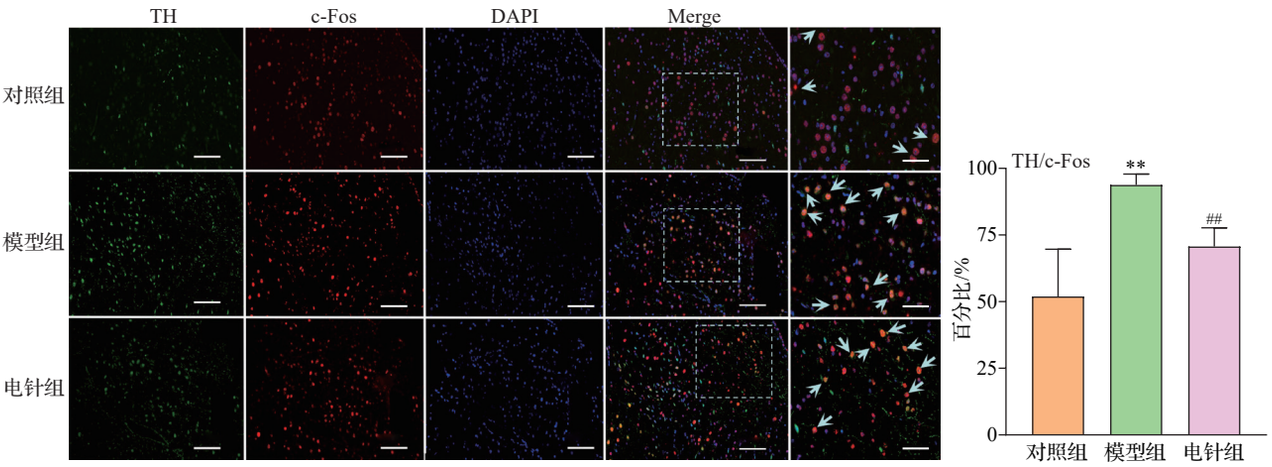
Fig. 2　Comparisons of new object recognition test results of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 8 mice/group)



注：Occludin为闭锁蛋白，Claudin-5为紧密连接蛋白-5，ZO-1为闭锁小带蛋白-1。与对照组相比，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\#\#}P<0.01$。

图3　各组小鼠海马Occludin、Claudin-5、ZO-1蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，5只鼠/组）

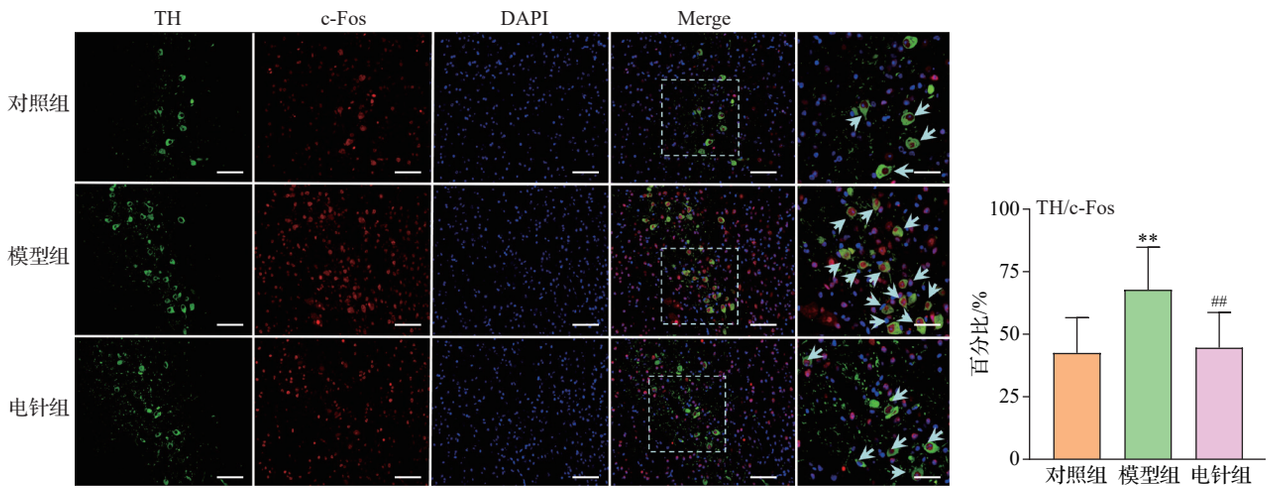
Fig. 3　Comparison of protein expression levels of Occludin, Claudin-5 and ZO-1 in the hippocampus of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 5 mice/group)



注：NTS为孤束核，TH为酪氨酸羟化酶。左侧4列标尺＝100 μm。最右边一列为前一列方框处的放大图，标尺＝50 μm，白色箭头示TH/c-Fos共定位阳性表达。与对照组相比，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\#\#}P<0.01$。

图4　各组小鼠NTS中TH/c-Fos共定位表达比较（免疫荧光染色，$\bar{x}\pm s$，3只鼠/组）

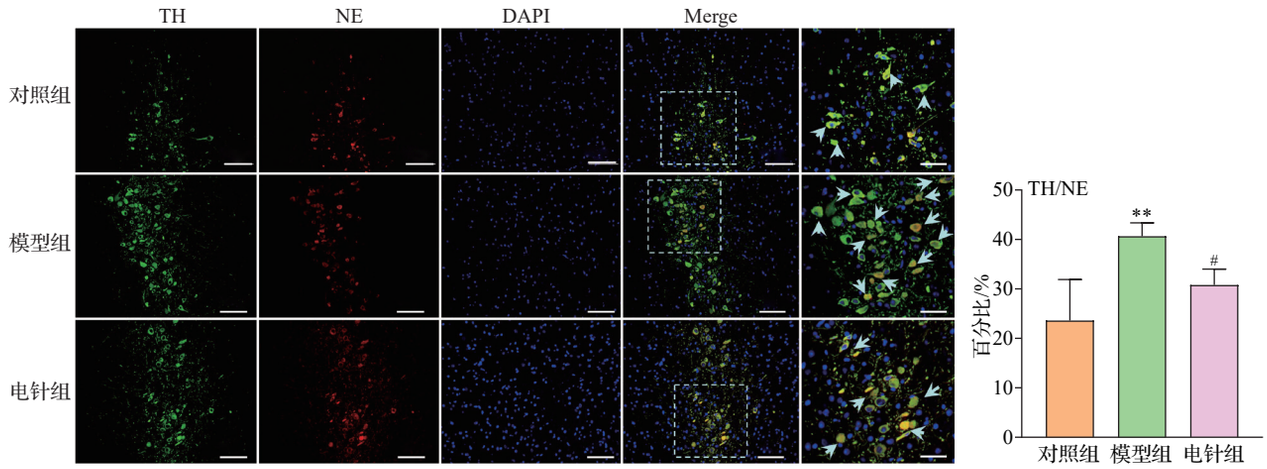
Fig. 4　Comparison of TH/c-Fos colocalization in NTS of mice in the 3 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 3 mice/group)



注：LC为蓝斑，TH为酪氨酸羟化酶。左侧4列标尺＝100 μm。最右边一列为前一列方框处的放大图，标尺＝50 μm，白色箭头示TH/c-Fos共定位阳性表达。与对照组相比，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\#\#}P<0.01$。

图5　各组小鼠LC中TH/c-Fos共定位表达比较（免疫荧光染色，$\bar{x}\pm s$，3只鼠/组）

Fig. 5　Comparison of TH/c-Fos colocalization in LC of mice in the 3 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 3 mice/group)



注：LC 为蓝斑，TH 为酪氨酸羟化酶，NE 为去甲肾上腺素。左侧 4 列标尺＝100 μm。最右边一列为前一列方框处的放大图，标尺＝50 μm，白色箭头示 TH/NE 共定位阳性表达。与对照组相比，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\#}P<0.05$。

图 6　各组小鼠 LC 中 TH/NE 共定位表达比较（免疫荧光染色，$\bar{x}\pm s$，3 只鼠/组）

Fig. 6　Comparison of TH/NE colocalization in LC of mice in the 3 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 3 mice/group)

2.5　NTS 中 TH 神经元是否投射到 LC

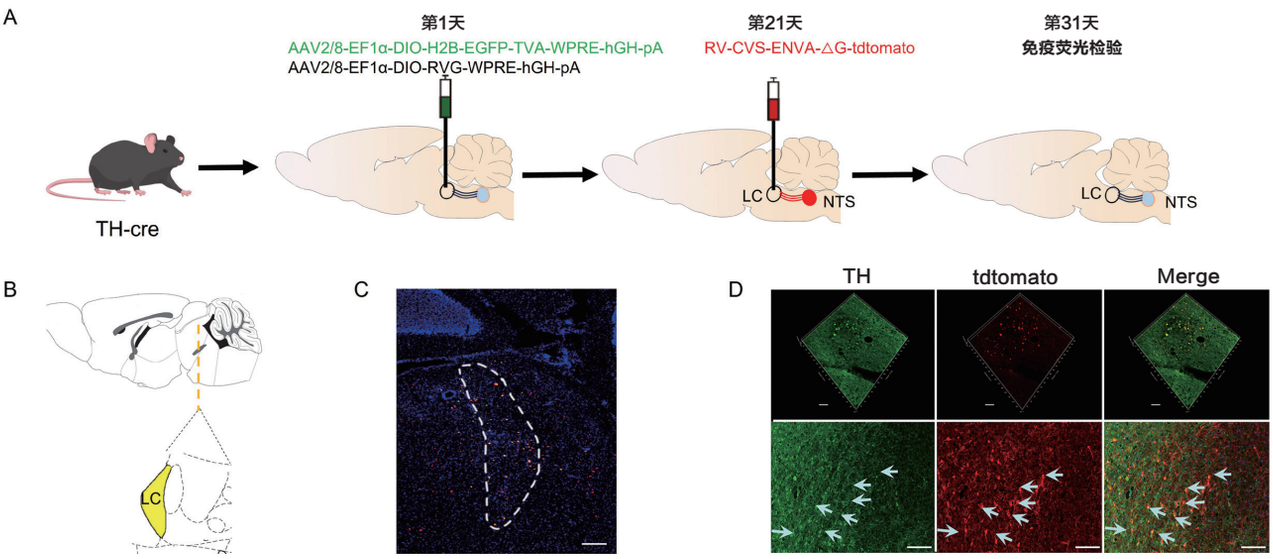
TH-cre 小鼠脑切片免疫荧光结果显示，病毒在 LC 区 TH 神经元胞体大量表达，NTS 区可见大量 TH 与 tdtomato 共标的阳性神经元，表明 NTS 中 TH 神经元可投射到 LC 区，即 NTS 到 LC 有直接的纤维联系。见图 7。

2.6　化学遗传激活病毒功能验证

膜片钳实验结果显示，与基线相比，CNO 处理后 LC 中 TH 神经元动作电位发放频率显著增加（$P<0.01$），即 CNO 与 TH 神经元上的 hM3D 结合，特异性激活了 LC 中 TH 神经元，表明病毒具有功能性。见图 8。

2.7　化学遗传激活对 EA 后小鼠 Morris 水迷宫结果的影响

与 mCherry＋CNO＋EA 组相比，hM3D＋CNO＋EA 组小鼠逃避潜伏期显著延长、穿越原平台次数显著减少，探索目标象限时间显著缩短（$P<0.01$）；与 hM3D＋CNO＋EA 组相比，hM3D＋saline＋EA 组小鼠逃避潜伏期显著缩短，穿越原平台次数显著增加，探索目标象限时间显著延长（$P<$



注：NTS 为孤束核，LC 为蓝斑，TH 为酪氨酸羟化酶。A. 病毒注射方案及实验流程图；B. 目标 LC 区冠状切片解剖定位图解；C. 标尺＝100 μm，病毒在 LC 区 TH 神经元胞体大量表达；D. 标尺＝50 μm，白色箭头示 NTS 区 TH 与 tdtomato 共标的阳性神经元。

图 7　NTS-LC TH 神经元投射神经示踪

Fig. 7　Neural tracing of the NTSTH-LC neural circuit

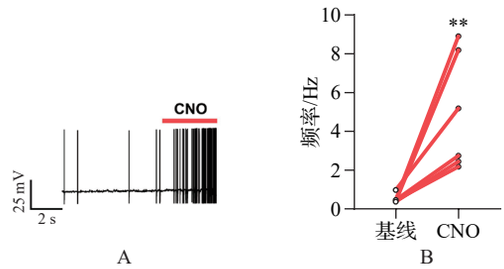
0.01)。见图9。

2.8　化学遗传激活对EA后小鼠新物体识别结果的影响

与mCherry+CNO+EA组相比，hM3D+CNO+EA组小鼠认知指数明显降低($P<0.01$)；与hM3D+CNO+EA组相比，hM3D+saline+EA组小鼠认知指数明显升高($P<0.01$)。见图10。

2.9　化学遗传激活对EA后小鼠脑组织BBB通透性的影响

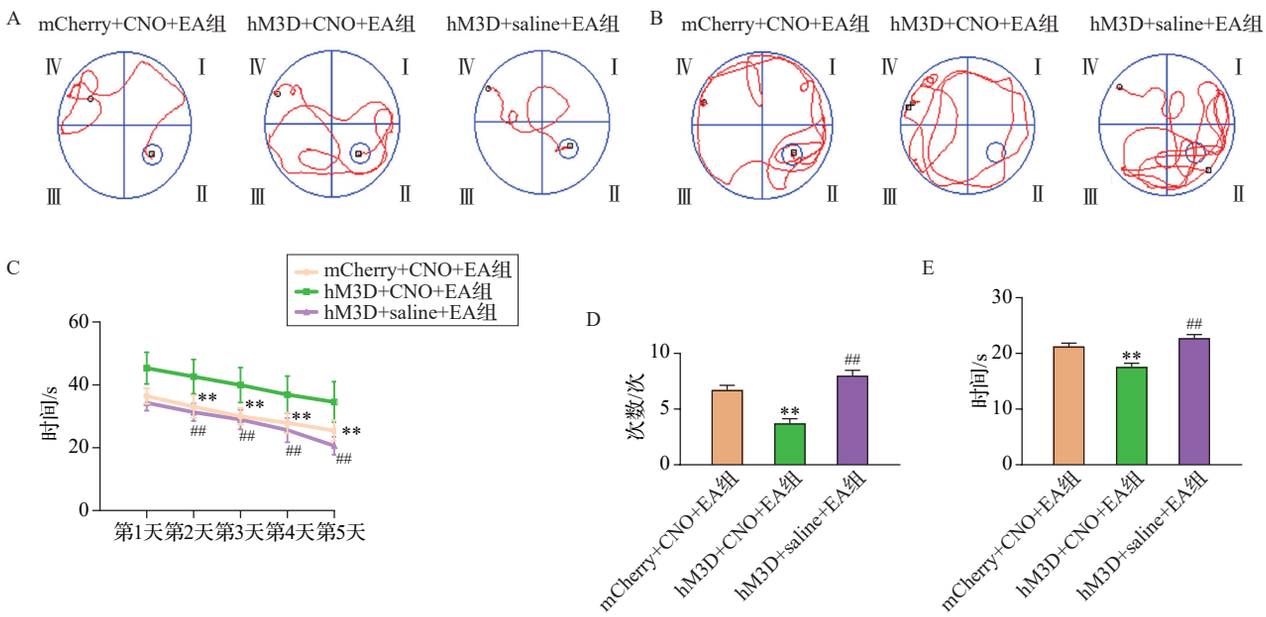
与mCherry+CNO+EA组相比，hM3D+CNO+EA组小鼠脑组织EB含量增加($P<0.01$)；与hM3D+CNO+EA组相比，hM3D+saline+EA组小鼠脑组织EB含量明显减少($P<0.01$)。见图11。



注：CNO为氯氮平-N-氧化物，LC为蓝斑，TH为酪氨酸羟化酶。A.CNO给药前后LC中TH神经元的动作电位示例；B.CNO处理后LC中TH神经元动作电位发放频率图，与基线相比，$^{**}P<0.01$。

图8　化学遗传激活病毒功能验证(6个细胞，3只小鼠)

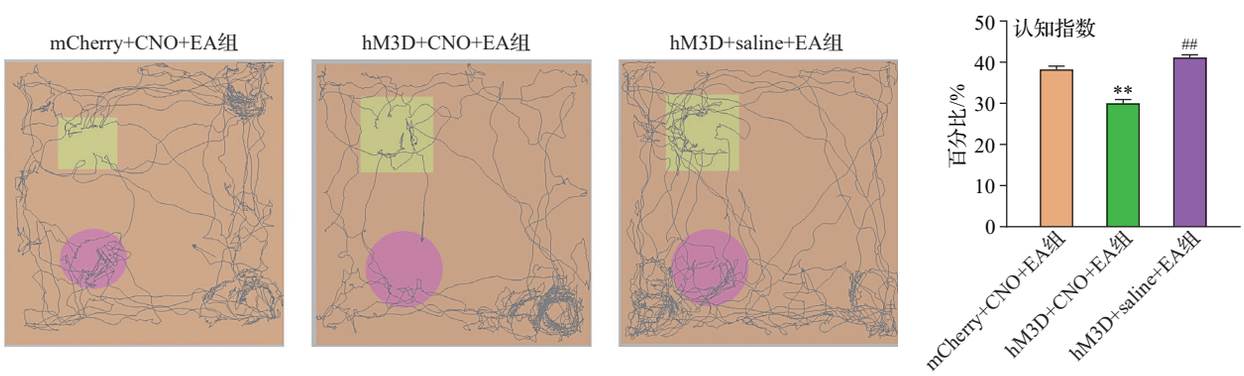
Fig. 8　Functional validation of chemogenetic activating viral vectors (6 cells, 3 mice)



注：A.各组小鼠定位航行轨迹图；B.各组小鼠空间探索轨迹图；C.各组小鼠逃避潜伏期；D.各组小鼠穿越原平台次数；E.各组小鼠探索目标象限时间。与mCherry+CNO+EA组相比，$^{**}P<0.01$；与hM3D+CNO+EA组相比，$^{\#\#}P<0.01$。

图9　各组小鼠Morris水迷宫结果比较($\bar{x}\pm s$，6只鼠/组)

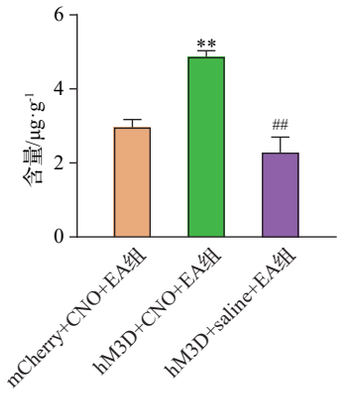
Fig. 9　Comparison of Morris water maze test results of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)



注：与mCherry+CNO+EA组相比，$^{**}P<0.01$；与hM3D+CNO+EA组相比，$^{\#\#}P<0.01$。

图10　各组小鼠新物体识别检测结果比较($\bar{x}\pm s$，6只鼠/组)

Fig. 10　Comparison of new object recognition test result of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)



注：BBB为血脑屏障，EB为伊文思蓝。与mCherry＋CNO＋EA组相比，$^{**}P<0.01$；与hM3D＋CNO＋EA组相比，$^{\#\#}P<0.01$。

图11　各组小鼠脑组织BBB通透性比较（$\bar{x}\pm s$，3只鼠/组）

Fig. 11　Comparison of BBB permeability of brain tissue of mice in the 3 groups（$\bar{x}\pm s$，3 mice/group）

2.10　化学遗传激活对EA后小鼠LC中TH/c-Fos、TH/NE共定位表达的影响

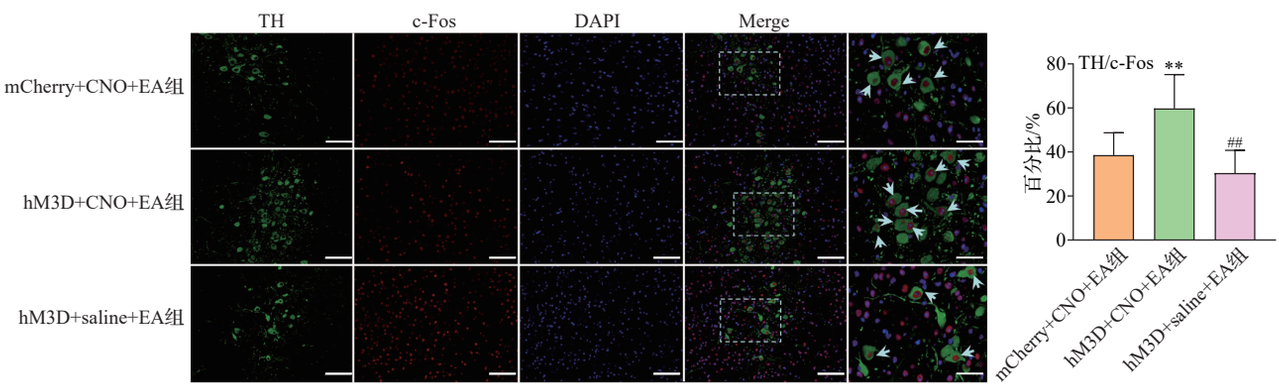
与mCherry＋CNO＋EA组相比，hM3D＋CNO＋EA组小鼠LC中TH/c-Fos共定位表达、TH/NE共定位表达明显增多（$P<0.01$）；与hM3D＋CNO＋EA组相比，hM3D＋saline＋EA组小鼠LC中TH/c-Fos共定位表达、TH/NE共定位表达明显减少（$P<0.01$）。见图12、图13。

3　讨论

中医认为AD属于神志失常的典型疾病之一，病位在脑，与心密切相关。张锡纯首次提出“心脑共主神明”理论，认为神明藏于脑而发于心，神志活动的产生是由脑而达于心，由心而发于外[12]。可见，AD主要病因是脑髓空虚，关键病机是心神失常。《灵枢》首提“心包代心受邪”思想，认为心为君主之官，由心包包裹，邪气犯心，首犯心包，明确指出心包经是祛邪护心、养心安神的关键。心包经穴治疗神志病古代医籍多有记载，如《千金方》“惕然不能动，失智，内关主之”。现代数据挖掘结果也表明“内关”“间使”是临床治疗AD常用的腧穴[13-14]。课题组前期研究显示电针“内关”“间使”可改善AD大鼠认知功能障碍[15]。

AD认知障碍与BBB功能稳态关系密切[16]。BBB主要由微血管内皮细胞、星形胶质细胞及周细胞等组成，其功能与内皮细胞紧密连接蛋白相关，通过恢复BBB中Claudin-5、Occludin、ZO-1表达可增加Aβ清除率，改善AD模型小鼠认知功能。本研究实验1结果显示，与模型组相比，电针组小鼠海马Claudin-5、Occludin和ZO-1蛋白表达明显增加，空间学习记忆能力提高，表明电针可通过上调海马BBB紧密连接蛋白表达，促进BBB功能恢复，改善AD小鼠认知障碍。

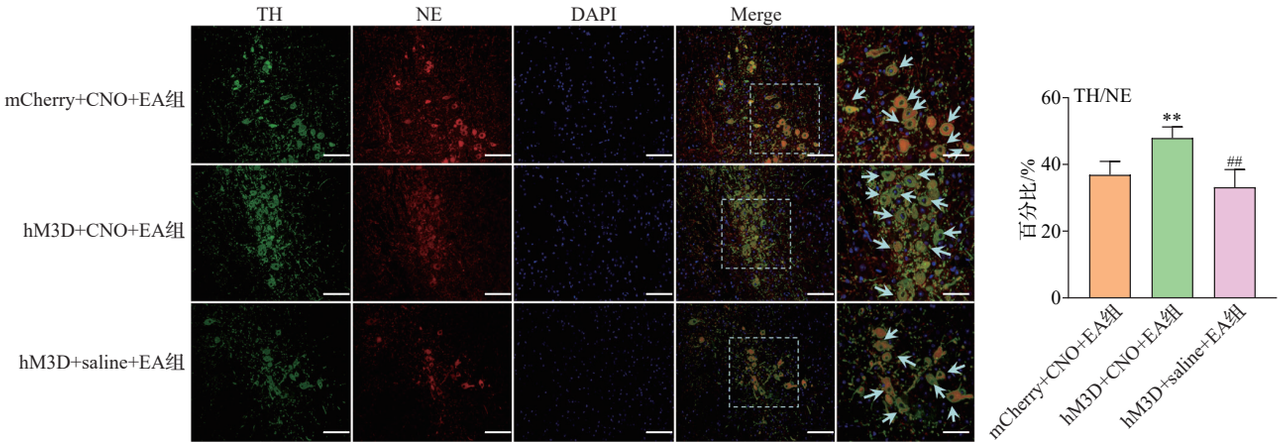
NTS位于延髓背侧，是脑干重要的整合中枢[17]。研究证实，NTS是响应外周针刺刺激并介导针刺信号传入中枢的重要神经核团，通过接受和整合外周信号并与多个脑区功能连接，参与针刺调节多种生理功能[18]。LC是大脑NE产生的主要核团，与脑内多个区域存在神经环路连接，如LC-内嗅皮质、LC-杏仁核及LC-海马神经环路，调节认知、觉醒、疼痛和压力等[19]。同时LC也是AD病理发生的主要脑区之一，当LC病变时NE能神经元失调会加剧炎性反应、BBB损伤和认知障碍[20]。激活LC中的NE能神经元会引起其投射区域轴突NE释放增加，从而导致相应区域NE水平升高[21]。研究结果



注：LC为蓝斑，TH为酪氨酸羟化酶。左侧4列标尺＝100 μm。最右边一列为前一列方框处的放大图，标尺＝50 μm，白色箭头为TH/c-Fos共定位阳性表达。与mCherry＋CNO＋EA组相比，$^{**}P<0.01$；与hM3D＋CNO＋EA组相比，$^{\#\#}P<0.01$。

图12　各组小鼠LC中TH/c-Fos共定位表达比较（免疫荧光染色，$\bar{x}\pm s$，3只鼠/组）

Fig. 12　Comparison of TH/c-Fos colocalization in LC of mice in the 3 groups（immunofluorescence staining，$\bar{x}\pm s$，3 mice/group）



注：LC为蓝斑，TH为酪氨酸羟化酶，NE为去甲肾上腺素。左侧4列标尺＝100 μm。最右边一列为前一列方框处的放大图，标尺＝50 μm，白色箭头为TH/NE共定位阳性表达。与mCherry＋CNO＋EA组相比，$^{**}P<0.01$；与hM3D＋CNO＋EA组相比，$^{\#\#}P<0.01$。

图13　各组小鼠LC中TH/NE共定位表达比较（免疫荧光染色，$\bar{x}\pm s$，3只鼠/组）

Fig. 13　Comparison of TH/NE colocalization in LC of mice in the 3 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 3 mice/group)

显示，NE与星形胶质细胞上α1去甲肾上腺素受体（α1-NAR）结合，引发细胞内Ca^{2+}信号增强，触发其活化状态，并启动炎性信号通路，如核因子-κB（NF-κB）、丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）途径[22]，分泌肿瘤坏死因子α（TNF-α）等促炎细胞因子，进一步加剧炎性反应，损伤BBB。此外，星形胶质细胞异常活化会释放一氧化氮（NO）和活性氧（ROS），导致紧密连接蛋白磷酸化、降解，破坏BBB完整性[23]。已有研究结果显示，NTS与LC之间存在解剖与功能连接[24]。TH是NE合成的限速酶，其活性和表达水平直接影响NE的生成[25]。c-Fos是神经元激活的标志，在神经元激活时会快速释放表达[26]。实验1免疫荧光染色结果显示，与模型组相比，电针组小鼠NTS与LC中TH阳性神经元c-Fos表达减少，LC中TH/NE共定位表达减少，表明电针改善AD小鼠认知障碍可能与抑制NTS与LC中TH神经元活性、下调NE水平、进而通过抑制星形胶质细胞活化、减轻BBB损伤有关。同时，实验2中TH-cre小鼠NTS^{TH}-LC神经环路的逆向病毒示踪结果，也为该环路的存在提供了直观证据。

为进一步探究NTS^{TH}-LC对电针改善AD小鼠BBB损伤及认知障碍的影响，实验3利用化学遗传技术激活该神经环路，结果显示，与mCherry＋CNO＋EA组相比，hM3D＋CNO＋EA组小鼠LC中TH阳性神经元c-Fos表达明显增多、TH/NE共定位表达明显增多，脑组织EB含量增加，空间学习记忆能力降低；与hM3D＋CNO＋EA组相比，hM3D＋saline＋EA组小鼠LC中TH阳性神经元c-Fos表达明显减少、TH/NE共定位表达明显减少，脑组织EB含量明显减少，空间学习记忆能力提高，验证了NTS^{TH}-LC神经环路过度激活所致BBB损伤在AD认知障碍中的作用，同时也提示电针可通过抑制NTS中TH神经元过度兴奋，减少向LC的投射信号，降低LC区TH神经元活性，改善AD小鼠BBB损伤及认知障碍。

综上，电针“内关”“间使”能够改善AD小鼠认知障碍，其作用机制可能与抑制NTS^{TH}-LC神经环路的激活有关。而中枢NTS^{TH}-LC环路具体如何激活下游通路引起BBB损伤尚不完全清楚，未来将结合NTS-LC-星形胶质细胞途径深入探讨其机制。

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] LI T T, LU L, PEMBER E, et al. New insights into neuroinflammation involved in pathogenic mechanism of Alzheimer's disease and its potential for therapeutic intervention[J]. Cells, 2022, 11(12): 1925.

[3] JU Y J, TAM K Y. Pathological mechanisms and therapeutic strategies for Alzheimer's disease [J]. Neural Regen Res, 2022, 17(3): 543-549.

[4] HOU J H, JIANG D M, CHU M, et al. Blood-brain barrier biomarkers modulate the associations of peripheral immunity with Alzheimer's disease [J]. Transl Psychiatry, 2025, 15 (1): 138.

[5] 程乐，朱才丰，周冰原，等. 针灸治疗阿尔茨海默病研究状况及趋势的可视化分析[J]. 中国针灸，2024，44(4)：469-478.
CHENG L，ZHU C F，ZHOU B Y，et al. Visual analysis on the study status and trends of acupuncture and moxibustion for Alzheimer's disease (in Chinese)[J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion，2024，44(4)：469-478.

[6] HACHEM L D，WONG S M，IBRAHIM G M. The vagus afferent network：emerging role in translational connectomics [J]. Neurosurg Focus，2018，45(3)：E2.

[7] YU Z. Neuromechanism of acupuncture regulating gastrointestinal motility[J]. World J Gastroenterol，2020，26 (23)：3182-3200.

[8] EVANS A K，DEFENSOR E，SHAMLOO M. Selective vulnerability of the locus coeruleus noradrenergic system and its role in modulation of neuroinflammation，cognition，and neurodegeneration[J]. Front Pharmacol，2022，13：1030609.

[9] GIORGI F S，GALGANI A，PUGLISI-ALLEGRA S，et al. Locus coeruleus and neurovascular unit：from its role in physiology to its potential role in Alzheimer's disease pathogenesis[J]. J Neurosci Res，2020，98(12)：2406-2434.

[10] SAYAR-ATASOY N，LAULE C，AKLAN I，et al. Adrenergic modulation of melanocortin pathway by hunger signals[J]. Nat Commun，2023，14(1)：6602.

[11] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位 第3部分：小鼠[J]. 针刺研究，2021，46(4)：445-446.
China Association of Acupuncture and Moxibustion. Nomenclature and location of commonly used acupoints in experimental animals. Part 3：mice (in Chinese) [J]. Acupuncture Research，2021，46(4)：445-446.

[12] 刘孔，娄必丹，俞赟丰，等. 针刺心包经穴治疗阿尔茨海默病的理论探讨[J]. 云南中医中药杂志，2022，43(7)：14-16.
LIU K，LOU B D，YU Y F，et al. Theoretical exploration of acupuncture at pericardium meridian points for treating Alzheimer's disease (in Chinese) [J]. Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica，2022，43 (7)：14-16.

[13] 张丽颖，王洪峰. 基于数据挖掘技术针灸治疗阿尔茨海默病的选穴规律分析[J]. 长春中医药大学学报，2018，34(5)：911-914，1031.
ZHANG L Y，WANG H F. Analysis of acupoint selection for acupuncture treatment of Alzheimer's disease based on data mining technique (in Chinese) [J]. Journal of Changchun University of Chinese Medicine，2018，34(5)：911-914，1031.

[14] 冯诗雨，任路，李莫愁，等. 针灸治疗老年痴呆(肾虚型)腧穴配伍规律研究[J]. 针灸临床杂志，2022，38(12)：59-64.
FENG S Y，REN L，LI M C，et al. Rule of acupoints compatibility for senile dementia (kidney deficiency pattern) (in Chinese) [J]. Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion，2022，38(12)：59-64.

[15] 何川，王丽，潘小丽，等. 基于β2AR/β-arrestin2/NF-κB通路探讨预电针"内关""间使"对阿尔茨海默病样大鼠学习记忆及蓝斑核-海马神经环路的作用机制[J]. 北京中医药大学学报，2024，47(11)：1612-1622.
HE C，WANG L，PAN X L，et al. Exploring the mechanism of pre-electroacupuncture at "Neiguan" (PC6) and "Jianshi" (PC5) acupoints on learning，memory，and locus coeruleus-hippocampal neural circuit in Alzheimer's disease-like rats via the β2AR/β -arrestin2/NF- κB pathway (in Chinese) [J]. Journal of Beijing University of Chinese Medicine，2024，47 (11)：1612-1622.

[16] ZHANG Q，YANG G H，LUO Y，et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease：insights from peripheral immune cells [J]. Immun Ageing，2024，21(1)：38.

[17] DAULATZAI M A. Dysfunctional nucleus tractus solitarius：its crucial role in promoting neuropathogenetic cascade of Alzheimer's dementia：a novel hypothesis [J]. Neurochem Res，2012，37(4)：846-868.

[18] GUO Z L，MALIK S. Acupuncture activates a direct pathway from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla[J]. Brain Res，2019，1708：69-77.

[19] ZHANG K，CHANG Q Q，LI F X，et al. The locus coeruleus-dorsal hippocampal CA1 pathway is involved in depression-induced perioperative neurocognitive disorders in adult mice[J]. CNS Neurosci Ther，2024，30(2)：e14406.

[20] JACOBS H I L，RIPHAGEN J M，RAMAKERS I H G B，et al. Alzheimer's disease pathology：pathways between central norepinephrine activity，memory，and neuropsychiatric symptoms[J]. Mol Psychiatry，2021，26(3)：897-906.

[21] BRETON-PROVENCHER V，DRUMMOND G T，SUR M. Locus coeruleus norepinephrine in learned behavior：anatomical modularity and spatiotemporal integration in targets [J]. Front Neural Circuits，2021，15：638007.

[22] ZHANG H F，ZHANG X，CHAI Y，et al. Astrocyte-mediated inflammatory responses in traumatic brain injury：mechanisms and potential interventions[J]. Front Immunol，2025，16：1584577.

[23] YUE Q，HOI M P M. Emerging roles of astrocytes in blood-brain barrier disruption upon amyloid-beta insults in Alzheimer's disease[J]. Neural Regen Res，2023，18(9)：1890-1902.

[24] LOPES L T，PATRONE L A，LI K Y，et al. Anatomical and functional connections between the locus coeruleus and the nucleus tractus solitarius in neonatal rats[J]. Neuroscience，2016，324：446-468.

[25] ZHU M Y，RAZA M U，ZHAN Y Q，et al. Norepinephrine upregulates the expression of tyrosine hydroxylase and protects dopaminegic neurons against 6-hydrodopamine toxicity [J]. Neurochem Int，2019，131：104549.

[26] ZHANG J P，LIAO D Q，LI L，et al. Reduced c-Fos expression in orexin neurons of the lateral hypothalamic area and the locus coeruleus following injection of spinosin into mice [J]. Folia Morphol (Warsz)，2020，79(3)：429-437.

收稿日期：2025-08-22　修回日期：2025-09-19
网络首发：2025-12-12　　编辑：秦田雨