

# 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/d,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和认知功能,免疫组织化学染色检测海马组织淀粉样蛋白- $\beta$ (A $\beta$ )沉积,尼氏染色观察海马 CA1 区神经元数量,透射电子显微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 blot 法检测海马 cAMP、PKA、CREB、磷酸化(p)-CREB、突触后密度蛋白 95(PSD-95)、突触素 I (SYN1)的蛋白表达。结果:与对照组相比,模型组小鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期延长、穿越原平台次数减少( $P < 0.01$ ),巴恩斯迷宫进入目标洞口的潜伏期显著延长( $P < 0.01$ )、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( $P < 0.001$ ),海马 CA1 区神经元和突触结构严重损伤,神经元数量、树突棘密度降低( $P < 0.01$ ),海马 cAMP、PKA、PSD-95、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、穿越原平台次数增多( $P < 0.01$ ),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( $P < 0.001$ ),海马 CA1 区神经元和突触结构均有改善,神经元数量、树突棘密度增加( $P < 0.01$ ),海马 cAMP、PKA、PSD-95、SYN1 蛋白表达及 p-CREB/CREB 显著升高( $P < 0.01$ )。假针刺组与模型组比较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, Huai'an 223003, Jiangsu Province; <sup>3</sup>The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001)

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

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250733

引用格式:高伟,李雪,刘安南,等.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[J].针刺研究,2026,51(4):465-473.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82105035);黑龙江省自然科学基金项目(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, acupuncture, and sham acupuncture groups, with 12 mice in each group. In addition, 12 male C57BL/6 mice with the same genetic background were used as the control group. The mice of the acupuncture group received cluster-needle stimulation at “Baihui”(GV20) and 2 spots (2 mm to GV20 on the left and right sides), and those of the sham acupuncture group received cluster-needle stimulation at the bilateral hypochondrial non-acupoints. Following insertion, the needles were twisted rapidly for about 1 min, then retained for 30 min in the acupuncture group. The intervention was conducted once a day, for a total of 28 d. The Morris water maze test and Barnes maze test were used to evaluate the mouse’s learning-memory and cognitive ability. The immunohistochemical staining was employed to detect amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) deposition in the hippocampus. The Nissl staining was used to observe the changes of the number of neurons in the hippocampal CA1 area. A transmission electron microscopy was employed to observe the ultrastructure of hippocampal synapses. The Golgi staining was used to observe the dendritic spine density of hippocampal neurons. The protein expressions of cAMP, PKA, CREB, phosphorylated (p)-CREB, postsynaptic density protein 95 (PSD-95), and synapsin I (SYN1) was detected using Western blot. **Results** Compared with the control group, the model group showed a significant increase in the escape latency of Morris water maze test and the latency to enter the target hole of Barnes maze test and the percentage of  $A\beta$ -positive area ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ), and a striking reduction in the number of target platform crossings in the Morris water maze test, residence time in the target quadrant of the escape box and the number of correct hole entries in the Barnes maze test, number of neurons, dendritic spine density, and the expression levels of cAMP, PKA, PSD-95, SYN1 and p-CREB/CREB ratio ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ). After the intervention, both the increase and decrease of the indexes mentioned above were reversed in the acupuncture group ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ), but not in the sham acupuncture group. Morphological results showed irregular shapes and disordered arrangement of the hippocampal neurons with shrunken nucleoli, atrophied mitochondria, broken mitochondrial cristae, decreased synapses and vesicles in the model group, which was relatively milder in the injury degree, for example, increase in the number of synapses and vesicles, relatively complete mitochondrial cristae, etc., in the acupuncture group. **Conclusion** Scalp-acupoint cluster puncture can improve the learning-memory ability in APP/PS1 mice, which may be associated with its functions in enhancing the hippocampal synaptic plasticity and up-regulating the cAMP/PKA/CREB signaling.

**【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%,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2 000万<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, cAMP)/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大鼠学习记忆能力,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方向一致<sup>[9]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

SPF级雄性6月龄APP/PS1小鼠36只,购自南京模式研究所,体质量25~30 g,随机分为模型组、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,环境温度(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:2023042808),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 主要实验仪器与试剂

一次性使用无菌针灸针(0.25 mm×13 mm,苏州医疗用品厂),Morris水迷宫-恒温型水浴池、巴恩斯迷宫系统(上海玉研),全自动轮转切片机、冰冻切片机(德国Leica),JEM-1400型透射电子显微镜(日本电子),光学显微镜(日本OLYMPUS),电泳仪(北京六一),Image J软件(美国NIH)。尼氏染色液(上海碧云天),苏木精染色液、DAB试剂盒(武汉赛维尔),快速高尔基染色试剂盒(北京博蕾德),cAMP抗体(武汉菲恩生),PKA、CREB、磷酸化(p)-CREB、突触后密度蛋白95(PSD-95)、突触素I(SYN1)、淀粉样蛋白- $\beta$ (A $\beta$ )、GAPDH抗体及HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(美国赛默飞世尔)。

## 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”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,胶布固定,让小鼠在鼠笼内自由活动,留针30 min,每日1次,连续治疗28 d。

假针刺组:采用0.25 mm×13 mm针灸针,取双侧肋下非穴点(后正中线旁开20 mm,髻嵴上10 mm),沿皮平刺2 mm,针刺后行90°小幅度捻转1 min,留针30 min,每日1次,连续治疗28 d。

## 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。定位航行实验时,小鼠每天从不同方位(依次东南西北)面向池壁入水4次,救生平台在第2象限底部,记录其登上平台的逃避潜伏期(超60 s未找到则引至平台,记为60 s),连续测5 d。最后1次定位航行实验结束后进行空间探索实验,撤掉平台,将小鼠从原平台对面象限入水点放入,记录其穿越原平台位置的次数。

巴恩斯迷宫实验检测小鼠认知功能:水迷宫实验结束后开始进行。实验周期设定为8 d,具体分为习惯性适应、空间学习训练及记忆测试3个阶段。实验首日为习惯性适应阶段,在80 dB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1 min,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2~7天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5 s后移除起始盒,允许其在迷宫平面进行3 min探索,训练目标为寻找唯一连通逃生箱的目标洞口,若3 min内未找到则将其轻柔引导至逃生箱,在箱内停留30 s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8天为记忆测试阶段,移除逃生箱后,在同等噪声条件下记录小鼠3 min内首次正确进入目标洞口的潜伏期(超过3 min按3 min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。

免疫组织化学法观察海马CA1区A $\beta$ 沉积:小鼠深度麻醉后,断头取双侧海马区域脑组织,在4%多聚甲醛固定24 h后进行梯度乙醇脱水,透明,石蜡包埋,切片(厚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 $\beta$ -1抗工作液(1:200),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(1:500),在室温下孵育20 min,随后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。经显微镜拍摄海马CA1区,运用Image J软件统计阳性区域面积百分比,阳性表达为棕色。

尼氏染色观察海马CA1区神经元数量:将上述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40 min,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3 min、95%乙醇5 min、100%乙醇3 min进行脱水,然后使用二甲苯透明玻片2次,每次5 min。最后在显微镜下进行拍照,计算海马CA1区神经元数量。

透射电子显微镜观察海马CA1区突触超微结构:深度麻醉小鼠并断头取脑,在冰台上分离海马组织,切成约1 mm×1 mm×1 mm小块,放入2.5%戊二醛固定液于4℃固定过夜。用0.1 mol/L二甲胂酸钠缓冲液漂洗3次,每次15 min,再用1%锇酸固定液室温固定1.5 h后重复漂洗。在50%~100%

的乙醇中梯度脱水,各10~15 min。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 h。切片后将其铺在铜网上,先后用2%醋酸铀水溶液暗处染色20 min、柠檬酸铅染色液染色10 min。最后,把铜网放于透射电子显微镜下,20 000倍观察海马CA1区并拍照,参照Güldner等<sup>[10]</sup>的方法用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 d。切取100 μm厚的切片,置Solution C溶液室温避光固定3 d。Milli-Q水冲洗切片,将切片置于由Solution D、Solution E和Milli-Q水配成的混合液(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、PSD-95、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℃、12 000 r/min离心10 min(离心半径8.3 cm)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1 h, TBST洗涤后,分别加入cAMP

(1:1 000)、PKA(1:1 000)、CREB(1:500)、p-CREB(1:1 000)、PSD-95(1:2 000)、SYN1(1:2 000)一抗,4℃孵育过夜。次日用TBST洗涤,加二抗(1:10 000)孵育1 h,再次洗涤后显影,Image J软件分析条带灰度值,以目的蛋白条带与内参GAPDH蛋白条带灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量,并计算p-CREB/CREB比值。

### 1.5 统计学分析

实验数据经SPSS26.0软件分析,各组计量资料符合正态性检验,以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间比较用单因素方差分析,方差齐进一步两两比较用LSD检验,不齐用Dunnett's *t*3检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

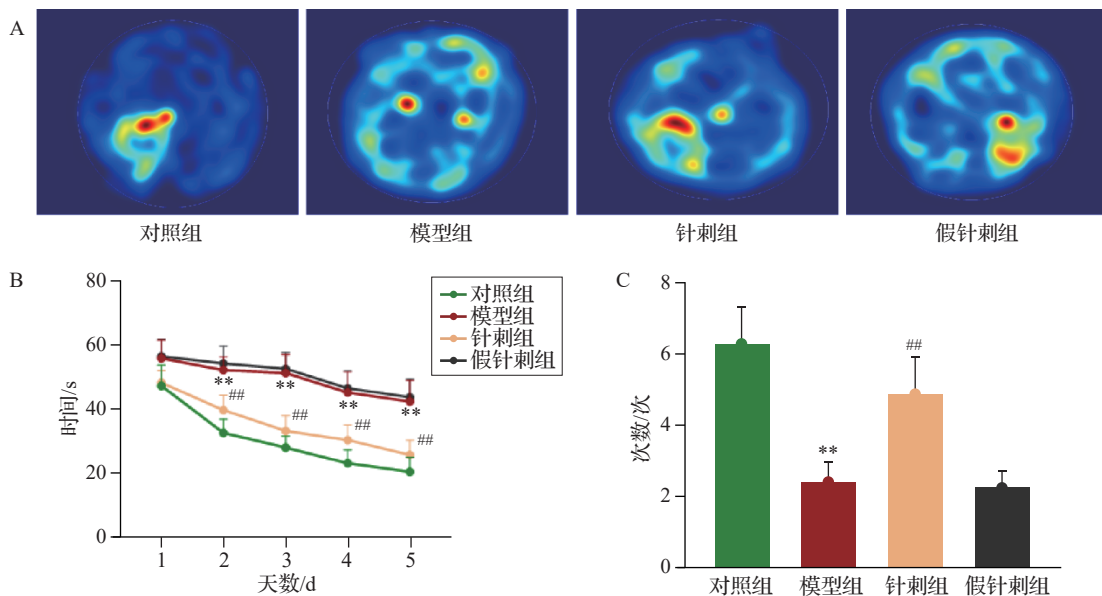
## 2 结果

### 2.1 各组小鼠学习记忆能力比较

与对照组相比,模型组小鼠第2、3、4、5天逃避潜伏期延长,穿越原平台次数减少( $P < 0.01$ )。与模型组相比,假针刺组差异无统计学意义;针刺组逃避潜伏期缩短、穿越原平台次数增加( $P < 0.01$ )。见图1。

### 2.2 各组小鼠认知功能比较

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( $P < 0.001$ ),逃生箱目标象限的停留时间缩短( $P < 0.001$ ),正确进入洞口的次数减少( $P < 0.001$ )。与模型组相比,



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为各组小鼠穿越原平台次数。与对照组相比,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组相比,## $P < 0.01$ 。

图1 各组小鼠学习记忆能力比较(Morris水迷宫实验, $\bar{x} \pm s$ ,12只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of learning and memory abilities of mice in the 4 groups (Morris water maze test,  $\bar{x} \pm s$ , 12 mice/group)

针刺组进入目标洞口的潜伏期显著缩短( $P < 0.001$ ), 逃生箱目标象限的停留时间和正确进入洞口次数增加( $P < 0.001$ ); 假针刺组差异无统计学意义。见图2。

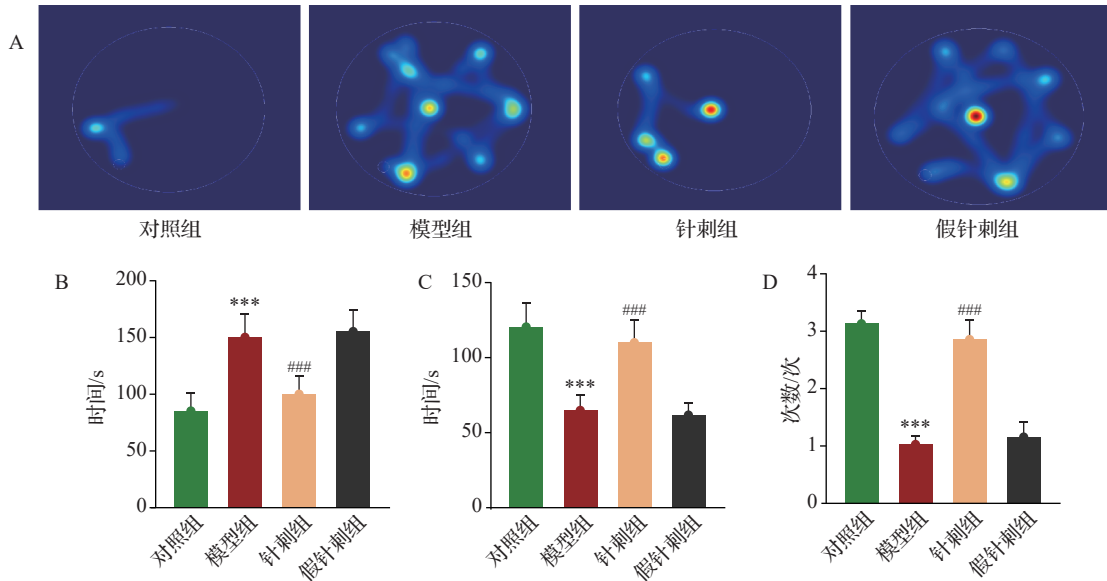
### 2.3 各组小鼠海马CA1区A $\beta$ 阳性表达比较

与对照组比较, 模型组海马CA1区A $\beta$ 阳性表达显著增多( $P < 0.001$ )。与模型组比较, 针刺组海马CA1区A $\beta$ 阳性表达显著减少( $P < 0.001$ ); 假

刺组差异无统计学意义。见图3。

### 2.4 各组小鼠神经元数量比较

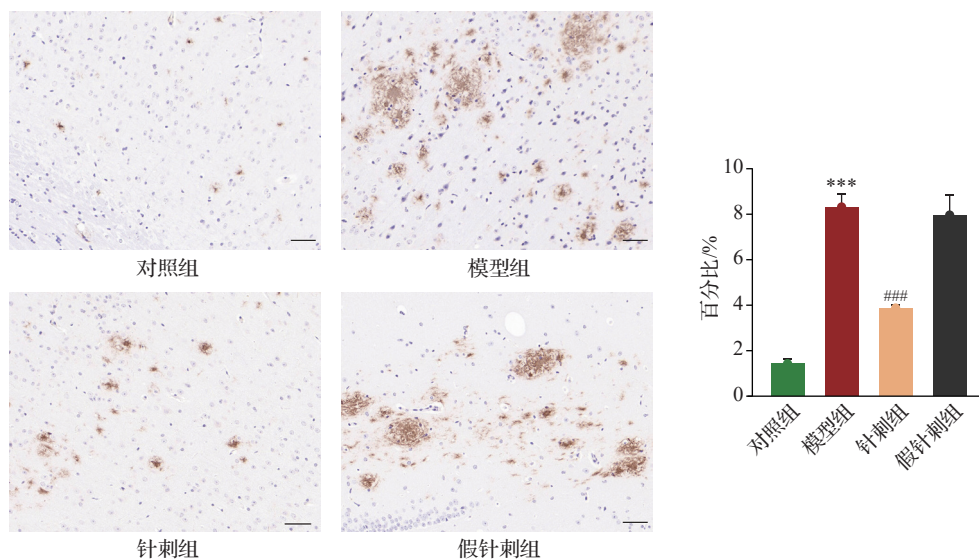
对照组海马CA1区尼氏小体数量较多、体积较大, 少有丢失情况, 神经元形态正常, 各细胞排列整齐。与对照组比较, 模型组海马神经元细胞形态不规则、排列紊乱, 核仁深染固缩、损伤较重, 尼氏小体趋近消失, 神经元丢失情况严重( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 针刺组损伤程度较轻, 海马尼氏小体丰



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的次数。与对照组相比,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组相比,### $P < 0.001$ 。

图2 各组小鼠认知功能比较(巴恩斯迷宫实验,  $\bar{x} \pm s$ , 12只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of cognitive functions of mice in the 4 groups (Barnes maze test,  $\bar{x} \pm s$ , 12 mice/group)



注:A $\beta$ 为淀粉样蛋白- $\beta$ 。棕色为阳性表达, 标尺=50  $\mu\text{m}$ 。与对照组相比,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组相比,### $P < 0.001$ 。

图3 各组小鼠海马CA1区A $\beta$ 阳性表达比较(免疫组织化学染色,  $\bar{x} \pm s$ , 3只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of positive expression of A $\beta$  in the hippocampal CA1 region of mice in the 4 groups (immunohistochemistry staining,  $\bar{x} \pm s$ , 3 mice/group)

富, 神经元细胞形态较为正常、排列相对整齐、数量明显增加( $P < 0.01$ ); 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、嵴断裂消失, 突触数目及囊泡

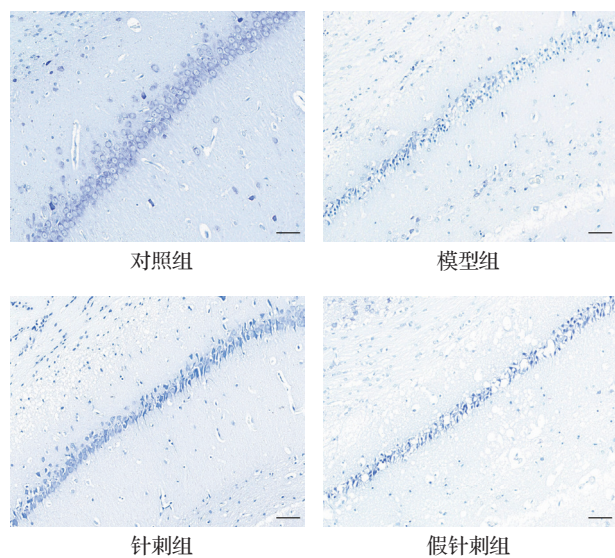
减少且分布散乱。针刺组较模型组突触结构改善, 突触数目和囊泡增多、排列密集, 线粒体嵴较完整; 假针刺组与模型组相似。见图5。

### 2.6 各组小鼠海马组织树突棘密度比较

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、PSD-95、SYN1蛋白表达比较

与对照组相比, 模型组cAMP、PKA、PSD-95、SYN1蛋白表达及p-CREB/CREB蛋白表达比值降低( $P < 0.01$ ), 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-95、SYN1蛋白表达及p-CREB/CREB比值显著升高( $P < 0.01$ ), 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。



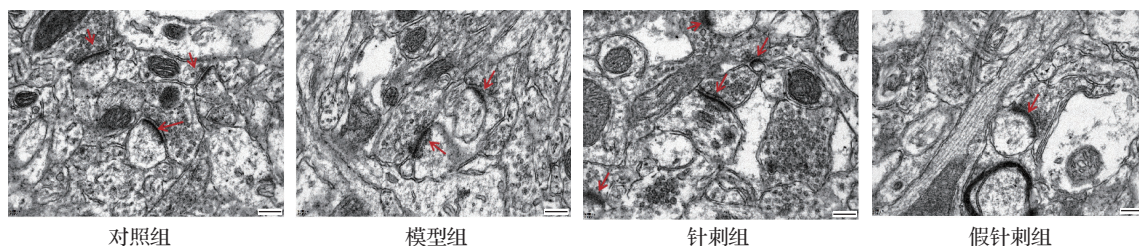
注: 蓝紫色为阳性神经元, 标尺=50 μm。与对照组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组相比, ## $P < 0.01$ 。

图4 各组小鼠海马CA1区神经元数量比较 (尼氏染色,  $\bar{x} \pm s$ , 3只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of the number of neurons in the hippocampal CA1 region of mice in the 4 groups (Nissl staining,  $\bar{x} \pm s$ , 3 mice/group)

## 3 讨论

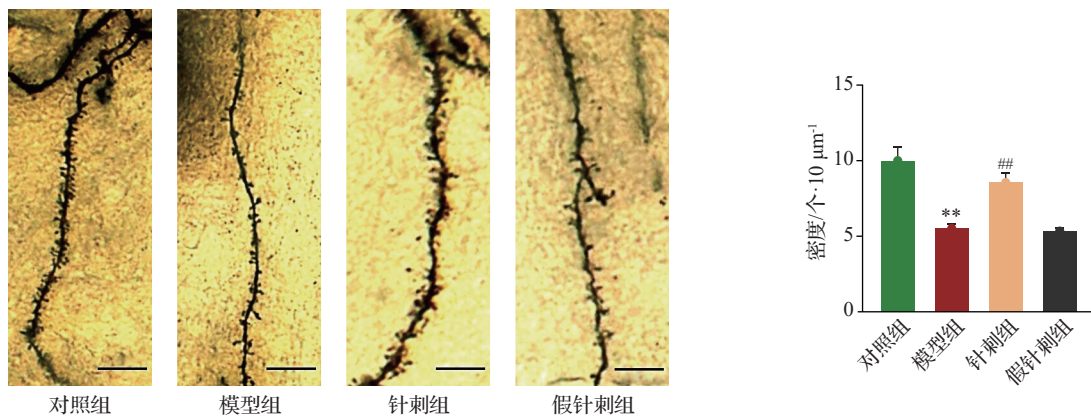
AD在中医学中属于“痴呆”“善忘”“呆证”范畴, 其病位在脑, 病机以肾精亏虚, 髓减脑消为主<sup>[10-11]</sup>。头穴丛刺疗法是按照大脑皮质功能定位将头部分为七区, 其中顶区、顶前区及额区主治精神行为异常、记忆力障碍及运动障碍等<sup>[12]</sup>。丛刺的方法即在同一治疗区针刺三针及以上, 通过这种方式, 产生一个“场”, 协同作用于大脑皮质相应部位, 进而改善神经元的兴奋性, 调节相应的功能障碍<sup>[13]</sup>。百会素有“诸阳之会, 百脉之所聚, 百病所主”之称, 其位于巅顶, 与脑部紧密相连, 是调节大脑功能的关键穴位, 同时也是于氏头针中顶区的代表穴位。基于此, 本课题选取小鼠“百会”及左右旁开2 mm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, 起到了一穴带多穴的治疗效果, 最大程度地发挥头穴丛刺疗法的作用。在



注: 红色箭头示突触, 标尺=200 nm。

图5 各组小鼠海马CA1区突触超微结构比较(透射电子显微镜)

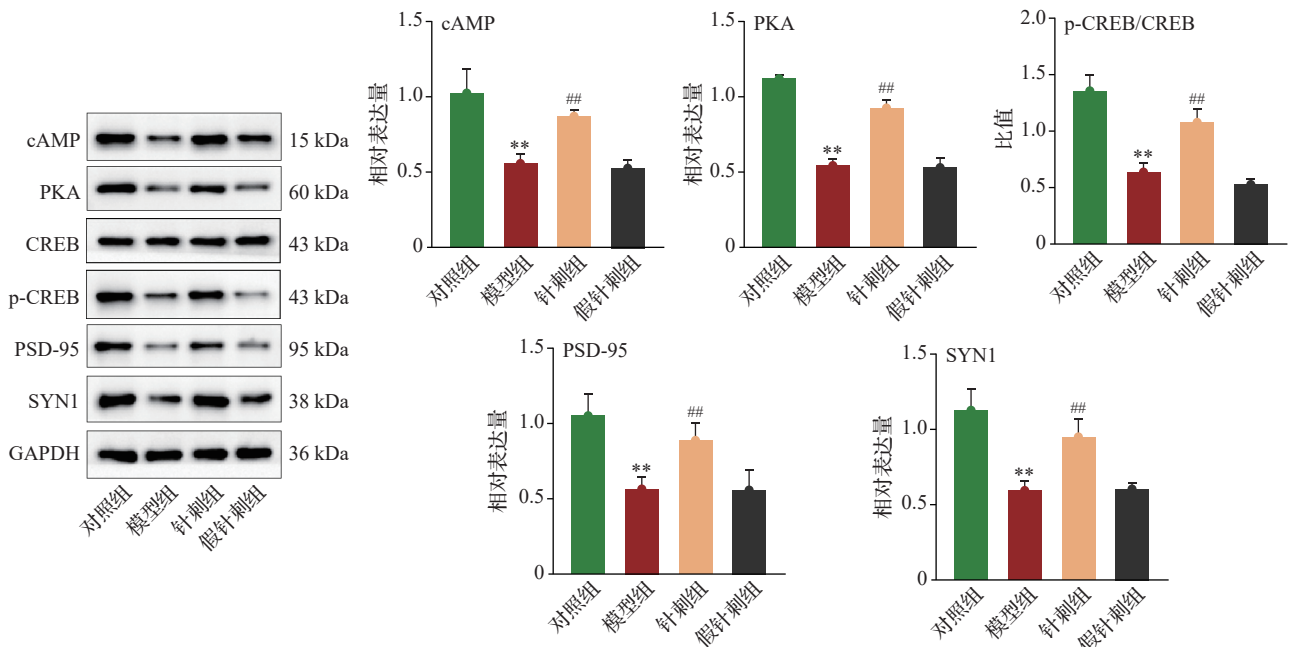
Fig. 5 Comparison of hippocampal synaptic ultrastructure of mice in the 4 groups (transmission electron microscope)



注:标尺=10 μm。与对照组相比,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

图6 各组小鼠海马区树突棘密度比较(高尔基染色,  $\bar{x}\pm s$ , 3只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of hippocampal dendritic spine density of mice in the 4 groups (Golgi staining,  $\bar{x}\pm s$ , 3 mice/group)



注:cAMP为环腺苷酸,PKA为蛋白激酶A,CREB为环腺苷酸应答元件结合蛋白,p-CREB为磷酸化环腺苷酸应答元件结合蛋白,PSD-95为突触后密度蛋白95,SYN1为突触素I。与对照组相比,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

图7 各组小鼠海马cAMP、PKA、CREB、p-CREB、PSD-95、SYN1蛋白表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ , 3只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of protein expression levels of cAMP, PKA, CREB, p-CREB, PSD-95 and SYN1 in hippocampus of mice in the 4 groups( $\bar{x}\pm s$ , 3 mice/group)

本研究中,APP/PS1小鼠经头穴丛刺干预后,水迷宫和巴恩斯迷宫实验中逃避潜伏期缩短,穿越原平台次数、进入目标洞口的潜伏期、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,海马CA1区A $\beta$ 阳性表达减少。与模型组小鼠比较,假针刺组认知功能、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核因子 $\kappa$ 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、神经元损伤减轻且数量增加、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、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<sup>[8,20]</sup>证实,头穴丛刺可通过调节突触传递的核心递质乙酰胆碱,改善AD模型小鼠的学习记忆能力,蛋白质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一致<sup>[21]</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>[22]</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>[23]</sup>。PSD-95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>[15]</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>[6]</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,进一步导致通路功能低下,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>[24-26]</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>[27]</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蛋白表达水平的降低,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,而假针刺未对小鼠

的cAMP/PKA/CREB信号通路产生显著性影响。

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。本研究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. 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. The Alzheimer's Disease Branch of the China Geriatric Health Association, The Professional Committee for Brain Disease Drug Research of The Chinese Association of Traditional Chinese Medicine. 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.
- [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, LÜ 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. 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] 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.
- [10] GÜLDNER F H, INGHAM C A. Increase in postsynaptic density material in optic target neurons of the rat suprachiasmatic nucleus after bilateral enucleation [J]. *Neurosci Lett*, 1980, 17(1/2): 27-31.
- [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, LÜ 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] 李雪, 高伟, 张雨桐, 等. 基于泛素化修饰蛋白质组学探讨头穴丛刺治疗阿尔茨海默转基因小鼠的作用机制研究 [J/OL]. *辽宁中医杂志*, 2026-02-24. <https://link.cnki.net/urlid/21.1128.R.20260106.1715.004>.
- LI X, GAO W, ZHANG Y T, et al. Study on the mechanism of scalp-acupoint cluster puncture in treating transgenic Alzheimer’s disease mice based on ubiquitination-modified proteomics (in Chinese) [J/OL]. *Journal of Liaoning University of Chinese Medicine*, 2026-02-24. <https://link.cnki.net/urlid/21.1128.R.20260106.1715.004>.
- [21] MCGEACHAN R I, MEFTA 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.
- [22] 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 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.