

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.21.013

头穴丛刺对 APP/PS1 小鼠海马突触可塑性的影响

高伟^{1,2}, 李雪¹, 刘安南¹, 李建辉¹, 叶秋燕¹, 高嘉悦¹, 杨丰鸽¹, 李虹霖^{1,3}✉

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江省哈尔滨市香坊区和平路 24 号, 150040; 2. 江苏护理职业学院; 3. 黑龙江中医药大学附属第二医院

[摘要] **目的** 观察头穴丛刺对阿尔茨海默病(AD)模型小鼠海马突触可塑性的影响, 探讨其治疗 AD 的可能机制。**方法** 将 60 只 APP/PS1 小鼠(AD 模型小鼠)随机分为模型组、空载组、Rab3a 敲低组、针刺组、针刺+Rab3a 敲低组, 空白组为同背景的 C57BL/6 小鼠, 每组 12 只。空载组给予海马区注射未转染沉默 Rab3a 基因的空白载体病毒液, Rab3a 敲低组、Rab3a 敲低+针刺组给予 AAV9-Rab3a 病毒液海马注射特异性敲低 Rab3a, 空白组、模型组、针刺组小鼠在相同海马区注射 2.0 μ l 生理盐水。针刺组和 Rab3a 敲低+针刺组在注射 2 周后给予头穴丛刺治疗, 其余各组小鼠仅给予相同时间、程度的抓握刺激。各组均干预 28 天。采用水迷宫实验检测小鼠逃避潜伏期、穿越平台次数, 旷场实验检测自发行为活动, HE 染色观察海马组织病理形态学变化, 透射电镜观察小鼠海马突触超微结构, 免疫荧光检测海马区脑内相关 Ras 蛋白 3A (Rab3a) 表达, ELISA 法检测海马组织中白细胞介素 12 (IL-12)、白细胞介素 4 (IL-4) 含量; Western Bolt 法检测海马组织 Rab3a、突触后致密蛋白 95 (PSD-95)、突触素 1 (SYN1) 蛋白水平。**结果** 与空白组比较, 模型组、空载组和 Rab3a 敲低组小鼠逃避潜伏期延长、穿越平台次数减少, 旷场实验活动路程及时间均减少, 血清 IL-12 含量增多、IL-4 含量减少, 海马组织 Rab3a 蛋白平均光密度和 PSD-95、Rab3a、SYN1 蛋白水平均降低 ($P < 0.01$); HE 染色可见海马 CA1 区神经元细胞形态不规则, 排列紊乱, 数量减少; 电镜结果显示海马 CA1 区突触结构严重损伤。与模型组相比, Rab3a 敲低组除穿越平台次数无改变, 上述指标均加重 ($P < 0.05$), 且海马 CA1 区神经细胞和突触结构损伤更明显; 而针刺组小鼠上述各指标均改善 ($P < 0.01$), 海马 CA1 区病理损伤减轻, 突触结构修复。与 Rab3a 敲低组比较, Rab3a 敲低+针刺组小鼠上述各指标均有改善 ($P < 0.05$), 海马 CA1 区病理形态及突触结构损伤减轻。**结论** 头穴丛刺可能通过上调海马中 Rab3a 蛋白水平, 改善海马突触超微结构, 调节炎症因子, 进而提高 AD 模型认知功能, 是其治疗 AD 的可能机制之一。

[关键词] 阿尔茨海默病; 头穴丛刺; 百会; 脑内相关 Ras 蛋白 3A; 突触可塑性

阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 是神经退行性疾病, 其关键病理特征为 β -淀粉样蛋白 (amyloid beta, A β) 斑块及 tau 神经原纤维缠结^[1]。临床上, 患者呈现出认知与功能持续衰退的表现, 如记忆减退、言语障碍、行为异常以及决策力受损等, 这些症状对日常生活造成了严重干扰^[2]。有研究显示, 我国 AD 及相关痴呆总人数为 1314 万,

约占全球 AD 患者的 25.5%, 预计到 2030 年我国 AD 患者将达到 2160 万, 这一趋势不仅会显著增加医疗卫生及社会服务负担, 还将对我国社会发展产生深远影响^[3-4]。因此, 进一步探究 AD 的发病机制和治療措施, 已成为当下亟待解决的难题。

头穴丛刺是基于中医学经络理论与神经解剖理论创立的在头部特定治疗区域实施“丛式”针刺治疗的一种疗法, 其在神经系统疾病的治疗领域应用十分广泛^[5]。课题组前期研究显示, 头穴丛刺能够提高 AD 患者认知水平和日常生活能力^[6], 可能通过干预胆碱能系统, 调节神经递质释放, 从而改善 AD 大鼠学习记忆^[7]。现代研究^[8]表明, 突触是中

基金项目: 国家自然科学基金(82105035); 黑龙江省自然科学基金(LH2023H064); 黑龙江省中医药科研项目(ZHY2024-304); 江苏省卫生健康委科研项目(Z2024065); 淮安市基础 Research 计划(指导性)项目(HABZ202325); 淮安市市级自然科学计划(联合专项)项目(HABL202222)

✉ 通讯作者: flyada001@163.com

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。脑内相关 Ras 蛋白 3A (Ras-related in brain 3A, Rab3a) 是小 G 蛋白家族成员, 在突触可塑性调控中占有重要地位, 其主要功能是介导突触囊泡的靶向运输与胞吐释放^[9]。本研究拟通过特异性敲低 Rab3a, 从海马突触可塑性角度探讨头穴丛刺改善 AD 认知功能障碍的可能作用机制, 为其临床治疗 AD 提供依据。本研究经黑龙江中医药大学伦理委员会审议批准 (编号 2023042501)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用 60 只 6 月龄 SPF 级雄性 APP/PS1 小鼠作为 AD 模型^[10], 12 只同月龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠作为对照小鼠, 体质量均为 20~23 g, 均由南京大学模式动物研究所提供, 实验动物许可证: SCXK (苏) 2015-0001。小鼠饲养于黑龙江中医药大学实验中心, 单笼喂养, 温度 (24±2)℃, 湿度 45%~55%, 保持通风, 12 h/12 h 明暗交替, 自由摄食饮水。

1.2 主要试剂及仪器

注射用青霉素钠 (华北制药股份有限公司, 批号: F9042114); 戊巴比妥钠 (生兴生物技术有限公司, 批号: 3G223G27); 苏木素伊红 (HE) 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号: G1120); 醋酸铀 (北京沫之东生物技术有限公司, 批号: DJ151); 柠檬酸铅 (上海源叶生物科技有限公司, 批号: V31852-5g); 白细胞介素 12 (IL-12)、白细胞介素 4 (IL-4) ELISA 试剂盒 (武汉赛培生物科技有限公司, 批号: SP13757、SP13767); 突触后致密蛋白 95 (PSD-95) 抗体、突触素 1 (SYN1) 抗体、Rab3a 抗体 (赛默飞世尔科技公司, 货号: MA1-046、51-5200、PA1-770); CY3 标记山羊抗兔 IgG、HRP 偶联山羊抗兔 IgG (Abcam 公司, 批号: ab6939、ab6721); 腺相关病毒 9 型介导的 Rab3a 短发夹 RNA (AAV9-Rab3a-shRNA)、腺相关病毒 9 型介导的阴性对照短发夹 RNA (AAV9-NC-shRNA) 病毒液 (广州派真生物技术有限公司, 批号: 7396、7397); RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、磷酸酶抑制剂、苯甲基磺酰氟 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: P0013B、P0012、ST640-50g、ST506)。

一次性使用无菌针灸针 (0.18 mm×10 mm, 苏

州医疗用品有限公司, 批号: 247063); 63001 型 Morris 水迷宫-恒温型水浴池、63008 型旷场活动测试系统、68528 型脑立体定位仪 (瑞沃德生命科技公司); RM2255 型全自动轮转切片机、CM1860 型冰冻切片机 (德国 Leica 公司); CX41RF 型光学显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); ELX-800 型酶标仪 (美国 BIOTEK 公司); JEM-1400 型透射电镜 (日本电子公司); DYY-12C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); BX53 型荧光显微镜 (日本 OLYMPUS 公司)。

1.3 动物分组及干预方法

将 60 只 APP/PS1 小鼠采用随机数字表法分为模型组、针刺组、Rab3a 敲低组、空载组、针刺+Rab3a 敲低组, 每组 12 只; C57BL/6 小鼠 12 只作为空白组。Rab3a 敲低组和针刺+Rab3a 敲低组利用 AAV9-Rab3a-shRNA 对小鼠进行海马原位注射^[10]: 小鼠麻醉后固定于脑立体定位仪上, 根据小鼠脑立体定位图谱确定海马区注射坐标 (x=1.5 mm; y=2.0 mm; z=2.0 mm), 使用微量注射器吸取 2.0 μl AAV9-Rab3a-shRNA 病毒液, 缓慢注入小鼠海马区, 注射时间为 5 min, 留针 5 min。术后给予青霉素钠腹腔注射 (5 万单位/kg), 每天 1 次, 连续 3 天, 观察小鼠 2 周。空载组: 对小鼠海马区注射 2.0 μl 未转染沉默 Rab3a 基因的空白载体病毒 AAV9-NC-shRNA, 操作及观察时间同上。空白组、模型组、针刺组小鼠在相同海马区注射 2.0 μl 生理盐水, 操作及观察时间同上。

针刺组在注射生理盐水 2 周后, 给予头穴丛刺干预, 取穴: 小鼠“百会”^[11]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 (若掉针及时补针), 每日 1 次, 连续治疗 28 天。针刺+Rab3a 敲低组在给予 AAV9-Rab3a-shRNA 病毒液海马区注射 2 周后给予头穴丛刺治疗 28 天, 具体操作同针刺组。其余各组小鼠仅给予相同时间、程度的抓握刺激。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 Morris 水迷宫实验评价小鼠学习记忆能力

针刺干预结束次日进行 Morris 水迷宫实验: 分为定位航行与空间探索两部分。定位航行实验历时 4 天, 小鼠每天从不同方位 (依次东南西北) 面向池壁入水 4 次, 救生平台在第二象限底部, 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)。第 5 天进行空间探索实验, 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。

1.4.2 旷场实验评价小鼠自发活动和探索行为
水迷宫实验结束次日后进行旷场实验。旷场装置为一个长宽高分别为 50 cm×50 cm×40 cm 的方形观察箱，箱体内壁及底部粘贴哑光不反光壁纸。箱底平面均匀划分为 16 个面积相等的方格，其中中央方格定义为中央区域，其余方格归为外周区域。实验时，将小鼠轻轻放置于箱底中央区域，使其自由探索环境 5 min，期间通过动物行为视频分析软件实时记录小鼠的运动数据，重点采集其在中央区域的活动路程和停留时间。每组小鼠测试结束后，需及时清除粪便，并用 75% 乙醇擦拭清洁箱体内壁及底面，以消除前次实验残留气味对后续测试的干扰。

1.4.3 HE 染色进行海马 CA1 区病理学观察 旷场实验结束当日取材。每组采用随机数字表法选取 4 只小鼠用于 HE 染色和免疫荧光染色。用 0.5% 戊巴比妥钠（50 mg/kg）腹腔注射麻醉后行心脏灌注，完整取出脑组织，分离海马组织。经 4% 多聚甲醛固定 24 h 后脱水，制备 5 μm 切片进行 HE 染色，无水乙醇脱水 3 次，二甲苯透明 2 次，中性树胶封固，光学显微镜下观察海马 CA1 区病理形态并采集图像。

1.4.4 免疫荧光法检测海马区 Rab3a 蛋白表达
石蜡切片经脱蜡、抗原修复后，用含 5% 正常山羊血清的 PBS 封闭 1 h。加入 Rab3a 一抗(1:200)，4℃孵育过夜。次日 PBS 洗 3 次，加入二抗(1:2000)，室温避光孵育 1 h。DAPI 染核后，抗荧光淬灭封片。荧光显微镜观察，Image J 2.0 软件检测 3 个视野平均荧光强度。

1.4.5 透射电镜检测海马 CA1 区突触情况 每组在剩余小鼠中采用随机数字表法选取 4 只小鼠用于透射电镜检测。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 mm³ 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。接着，将其放入 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，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，

把铜网放透射电镜下，20 000 倍观察海马 CA1 区并拍照，采用 Image J 2.0 软件进行分析。

1.4.6 ELISA 法检测血清中 IL-12、IL-4 的含量
将每组剩余的 4 只小鼠麻醉后断头取右脑，在冰台上分离海马组织，海马组织匀浆后，2000~3000 r/min 离心 20 min(离心半径 8.3 cm)，取上清。利用 ELISA 试剂盒检测上清液中 IL-12、IL-4 水平，酶标仪测吸光度值，依据标准曲线计算各因子含量。

1.4.7 Western Blot 法检测海马组织 Rab3a、PSD-95、SYN1 蛋白水平 取 ELISA 实验中每组剩余的 4 只小鼠左侧海马组织 15 mg，加裂解液、磷酸酶抑制剂、苯甲基磺酰氟匀浆，4℃、11 000 r/min 离心 15 min 提取蛋白(离心半径 8.3 cm)。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 Rab3a、PSD-95、SYN1 一抗(稀释比例均为 1:1000)，4℃孵育过夜。次日 TBST 洗涤，加二抗(1:10 000)孵育 1 h，再次洗涤后显影，Image J 2.0 软件分析结果。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。计量资料均符合正态性检验以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间均数比较用单因素方差分析，方差齐用 LSD 检验，方差不齐用 Dunnett's *T* 检验。以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠水迷宫实验检测结果

表 1 示，与空白组比较，模型组、Rab3a 敲低组、空载组小鼠逃避潜伏期延长、穿越平台次数减少(*P*<0.01)。与模型组比较，Rab3a 敲低组逃避潜伏期延长(*P*<0.05)，穿越平台次数差异无统计学意义(*P*>0.05)；针刺组逃避潜伏期缩短、

表 1 各组小鼠 Morris 水迷宫实验结果比较

Table 1 Comparison of Morris water maze results

组别	among groups of mice ($\bar{x}\pm s$)		
	鼠数	逃避潜伏期/s	穿越平台次数/min
空白组	12	30.31±4.59	6.27±1.04
模型组	12	44.36±3.71 ^{a)}	3.62±0.36 ^{a)}
Rab3a 敲低组	12	50.10±3.65 ^{a) b)}	3.44±0.12 ^{a)}
空载组	12	48.12±3.54 ^{a)}	3.54±0.31 ^{a)}
针刺组	12	35.47±4.47 ^{c)}	5.85±1.03 ^{c)}
针刺+Rab3a 敲低组	12	41.76±5.85 ^{d)}	3.96±0.67 ^{d)}

注：a) 与空白组比较，*P*<0.01；b) 与模型组比较，*P*<0.05；c) 与模型组比较，*P*<0.01；d) 与 Rab3a 敲低组比较，*P*<0.05。

穿越平台次数增加 ($P<0.01$)。与 Rab3a 敲低组比较, 针刺+Rab3a 敲低组逃避潜伏期缩短、穿越平台次数增加 ($P<0.05$)。各组小鼠 Morris 水迷宫路线见图 1。

2.2 各组小鼠旷场实验结果比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组、Rab3a 敲低组、空载组小鼠旷场实验活动路程及时间均减少 ($P<0.01$)。与模型组比较, Rab3a 敲低组小鼠旷场实验活动路程及时间减少 ($P<0.05$); 针刺组小鼠旷场实验活动路程及时间增多 ($P<0.01$)。与 Rab3a 敲低组比较, 针刺+Rab3a 敲低组小鼠旷场实验活动路程及时间增多 ($P<0.05$)。各组小鼠旷场实验活动轨迹见图 2。

表 2 各组小鼠旷场实验结果比较

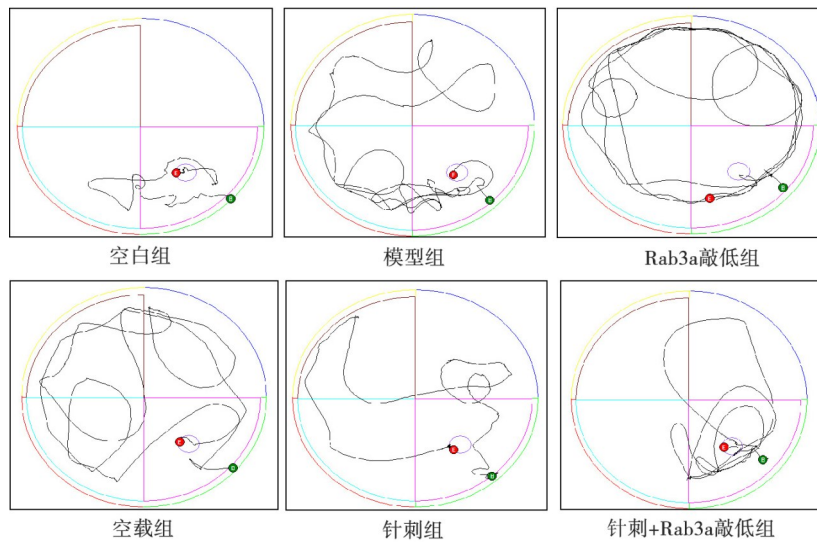
Table 2 Comparison of open-field test results

among groups of mice ($\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	路程/m	时间/s
空白组	12	3.20±1.03	16.65±4.21
模型组	12	1.64±0.62 ^{a)}	7.36±2.31 ^{a)}
Rab3a 敲低组	12	0.99±0.31 ^{a) b)}	4.12±1.95 ^{a) b)}
空载组	12	1.52±0.64 ^{a)}	7.31±2.45 ^{a)}
针刺组	12	2.34±0.53 ^{c)}	11.69±3.27 ^{c)}
针刺+Rab3a 敲低组	12	1.70±0.52 ^{d)}	7.12±2.86 ^{d)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与 Rab3a 敲低组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠海马 CA1 区病理形态比较

图 3 示, 空白组小鼠海马 CA1 区神经元细胞结



注: 绿色点表示起点, 红色点表示终点。

图 1 各组小鼠 Morris 水迷宫实验活动轨迹

Figure 1 Activity trajectories in the Morris water maze of each group of mice

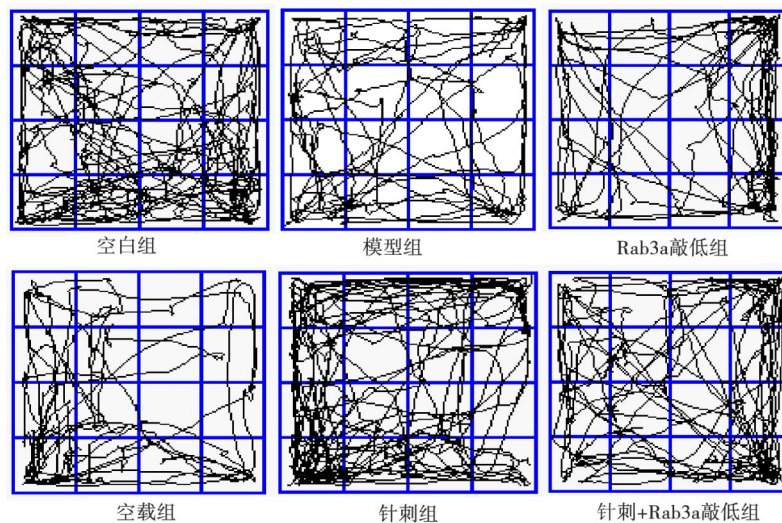


图 2 各组小鼠旷场实验活动轨迹图

Figure 2 Activity trajectories in the open-field test of each group of mice

构完整，形态饱满且排列规整有序。模型组、Rab3a 敲低组、空载组小鼠海马 CA1 区神经元细胞形态不规则、排列紊乱，细胞核体积减小且数量降低，且 Rab3a 敲低组海马组织破坏最显著。针刺组与针刺+Rab3a 敲低组海马 CA1 区轻度组织破坏，神经元形态异常程度较轻，细胞排列仍保持相对规整，仅出现轻度核固缩，神经元数量略有减少。

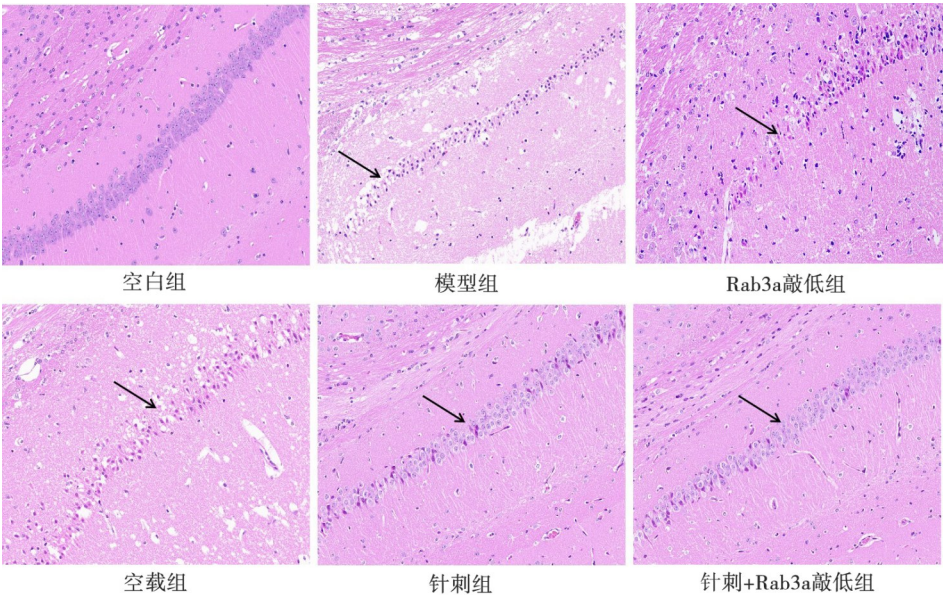
2.4 各组小鼠海马 CA1 区突触超微结构比较

图 4 示，与空白组比较，模型组、Rab3a 敲低

组、空载组小鼠海马 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，Rab3a 敲低组上述损伤更严重。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。针刺+Rab3a 敲低组较 Rab3a 敲低组突触膜和细胞器更完整，突触数目和囊泡略有增加。

2.5 各组小鼠海马区 Rab3a 免疫荧光表达比较

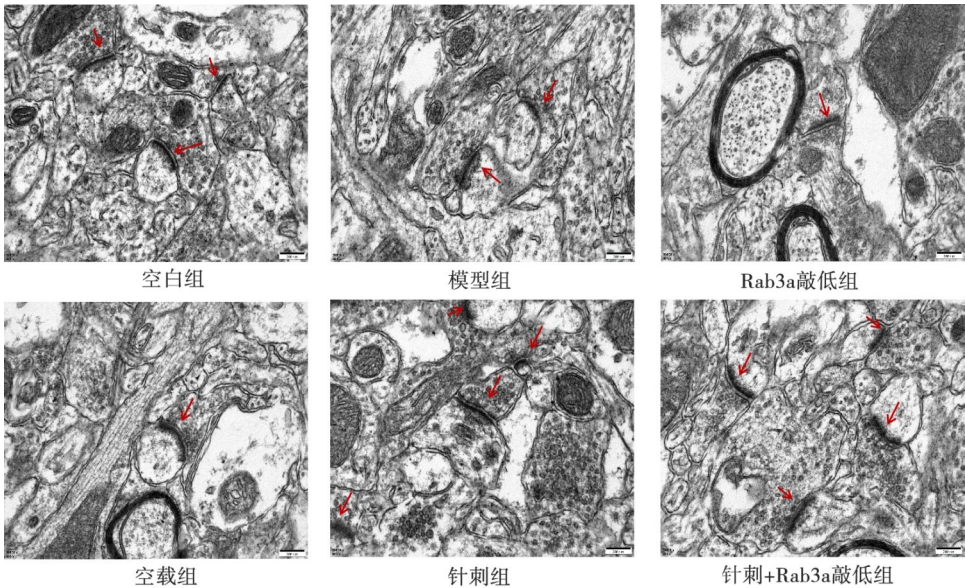
表 3 示，与空白组比较，模型组、Rab3a 敲低



注：黑色箭头处提示海马神经细胞边界不清，排列疏松。

图 3 各组小鼠海马 CA1 区病理形态图 (HE 染色，×200)

Figure 3 Pathological morphology of hippocampal CA1 region in each group of mice (HE staining, ×200)



注：红色箭头标记为突触。

图 4 各组小鼠海马区突触超微结构图 (×20 000)

Figure 4 Synaptic ultrastructure of the hippocampus in each group of mice (×20 000)

组、空载组 Rab3a 蛋白平均光密度均降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, Rab3a 敲低组 Rab3a 蛋白平均光密度降低 ($P<0.05$); 针刺组 Rab3a 蛋白平均光密度显著增强 ($P<0.01$)。与 Rab3a 敲低组比较, 针刺+Rab3a 敲低组 Rab3a 蛋白平均光密度增强 ($P<0.05$)。各组小鼠海马区 Rab3a 免疫荧光染色图见图 5。

表 3 各组小鼠海马区 Rab3a 免疫荧光表达比较

Table 3 Comparison of Rab3a immunofluorescence expression in the hippocampus among groups of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	平均光密度
空白组	4	410.85±80.37
模型组	4	220.26±45.58 ^{a)}
Rab3a 敲低组	4	110.39±20.46 ^{a) b)}
空载组	4	185.34±56.29 ^{a)}
针刺组	4	375.28±40.77 ^{c)}
针刺+Rab3a 敲低组	4	225.26±50.47 ^{d)}

注: Rab3a, 脑内相关 Ras 蛋白 3A。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与 Rab3a 敲低组比较, $P<0.05$ 。

2.6 各组小鼠血清 IL-12、IL-4 含量比较

表 4 示, 与空白组比较, 模型组、Rab3a 敲低组、空载组小鼠血清 IL-12 含量升高、IL-4 含量降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, Rab3a 敲低组小鼠血清 IL-12 含量升高、IL-4 含量降低 ($P<0.05$); 针刺组小鼠血清 IL-12 含量降低、IL-4 含量升高 ($P<0.01$)。与 Rab3a 敲低组比较, 针刺+Rab3a 敲

低组小鼠血清 IL-12 含量降低、IL-4 含量升高 ($P<0.05$)。

表 4 各组小鼠血清中 IL-12、IL-4 含量比较

Table 4 Comparison of IL-12 and IL-4 levels in serum

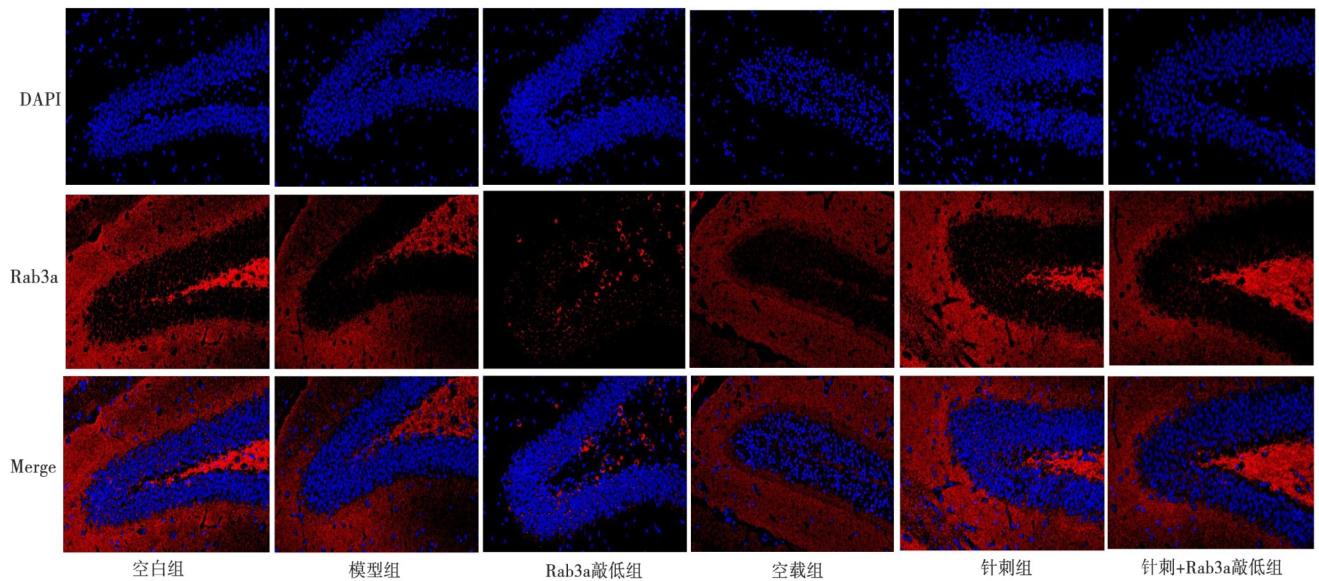
among groups of mice		(ng·L ⁻¹ , $\bar{x}\pm s$)	
组别	鼠数	IL-12	IL-4
空白组	4	32.18±8.42	150.27±25.63
模型组	4	75.52±10.36 ^{a)}	85.41±10.13 ^{a)}
Rab3a 敲低组	4	90.24±15.47 ^{a) b)}	57.28±8.64 ^{a) b)}
空载组	4	69.43±8.25 ^{a)}	75.37±10.26 ^{a)}
针刺组	4	45.21±10.16 ^{c)}	130.15±11.74 ^{c)}
针刺+Rab3a 敲低组	4	63.16±15.28 ^{d)}	92.24±15.25 ^{d)}

注: IL-12, 白细胞介素 12; IL-4, 白细胞介素 4。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与 Rab3a 敲低组比较, $P<0.05$ 。

2.7 各组小鼠海马组织 Rab3a、PSD-95、SYN1 蛋白水平比较

表 5 示, 与空白组比较, 模型组、Rab3a 敲低组、空载组小鼠海马组织 PSD-95、Rab3a、SYN1 蛋白水平平均降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, Rab3a 敲低组小鼠海马组织 PSD-95、Rab3a、SYN1 蛋白水平降低 ($P<0.05$); 针刺组小鼠海马组织 PSD-95、Rab3a、SYN1 蛋白水平平均升高 ($P<0.01$)。与 Rab3a 敲低组比较, 针刺+Rab3a 敲低组小鼠海马组织 PSD-95、Rab3a、SYN1 蛋白水平升高 ($P<0.05$)。各组小鼠海马组织 Rab3a、PSD-95、SYN1 蛋白电泳图见图 6。



注: Rab3a, 脑内相关 Ras 蛋白 3A; 图中 Rab3a 蛋白荧光阳性物质呈红色, 以点状分布于大鼠海马区域。

图 5 各组小鼠海马区 Rab3a 免疫荧光表达图 (×200)

Figure 5 Rab3a immunofluorescence expression in the hippocampus of each group of mice (×200)

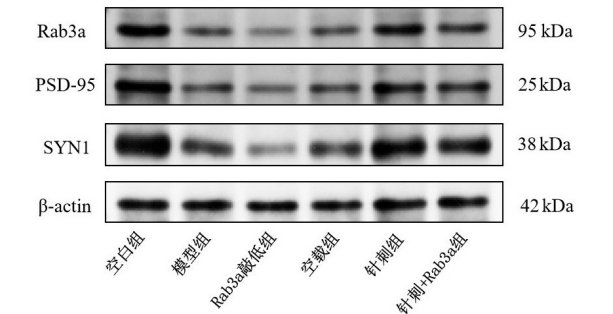
表5 各组小鼠海马组织Rab3a、PSD-95、SYN1蛋白
相对表达量比较

Comparison of relative protein expression of Rab3a, PSD-95,
and SYN1 in hippocampal tissue among groups of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Rab3a	PSD-95	SYN1
空白组	4	1.21±0.25	1.07±0.24	1.18±0.21
模型组	4	0.61±0.04 ^{a)}	0.65±0.08 ^{a)}	0.61±0.08 ^{a)}
Rab3a敲低组	4	0.34±0.08 ^{a) b)}	0.41±0.05 ^{a) b)}	0.37±0.06 ^{a) b)}
空载组	4	0.64±0.03 ^{a)}	0.62±0.13 ^{a)}	0.63±0.08 ^{a)}
针刺组	4	0.91±0.07 ^{c)}	0.95±0.10 ^{c)}	0.94±0.11 ^{c)}
针刺+Rab3a敲低组	4	0.70±0.21 ^{d)}	0.70±0.09 ^{d)}	0.68±0.16 ^{d)}

注: Rab3a, 脑内相关Ras蛋白3A; PSD-95, 突触后密度蛋白95;
SYN1, 突触素1。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$;
c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与Rab3a敲低组比较, $P<0.05$ 。



注: Rab3a, 脑内相关Ras蛋白3A; PSD-95, 突触后密度蛋白95;
SYN1, 突触素1。

图6 各组小鼠海马组织Rab3a、PSD-95、SYN1蛋白电泳图
Figure 6 Electrophoretic bands of Rab3a, PSD-95, and
SYN1 proteins in hippocampal tissue of each group of mice

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^[12]。《类证治裁·卷之三》云:“脑为元神府,精髓之海,实记忆所凭也”,说明记忆与脑髓的充盈状态有关。现代医学认为,AD的核心病理特征包括Aβ沉积和神经原纤维缠结等,早期主要累及海马体,随后逐渐扩散到大脑皮质等其他区域,导致神经元损伤和功能障碍,进而引发认知功能减退^[1]。本研究选用APP/PS1双转基因小鼠作为AD模型、C57BL/6小鼠作为对照,二者存在明确的遗传与功能关联:APP/PS1小鼠以C57BL/6小鼠为背景品系构建,通过转入人类淀粉样前体蛋白(APP)突变基因和早老素1(PS1)突变基因,能较好地模拟AD患者脑内的病理变化,目前已被广泛应用于研究AD、Aβ斑块形成和衰老等相关疾病^[10];而正常C57小鼠脑内无AD样病理改变,且与APP/

PS1小鼠遗传背景同源,能最大程度排除遗传差异干扰。

“头穴丛刺”疗法是按照大脑皮层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、记忆力障碍以及运动障碍等,其功能恢复对于改善AD症状具有重要意义^[13]。丛刺即在同一治疗区针刺三针及以上,通过这种方式,协同作用于大脑皮层相应部位,进而改善神经细胞的兴奋性,调节相应的功能障碍^[14]。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^[15]。针刺百会穴可激发诸阳经之气,促进气血运行,使得清阳之气得以上达脑窍,填补髓海,契合了AD病机中肾精亏虚、髓减脑消的特点^[16]。此外,百会穴左右旁开约2 mm对应大脑皮层额叶及中央旁小叶,关联运动与情感,针刺该区域,能够进一步增强对大脑皮层的刺激,促进局部血液循环和神经细胞的代谢活动,有助于改善大脑的功能状态^[17]。前期研究^[18]表明,头穴丛刺可抑制海马β-淀粉样前体蛋白表达,改善AD模型大鼠学习记忆能力。基于此,本课题选取小鼠“百会”穴及左右旁开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、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。本研究结果显示,与空白组比较,模型组小鼠逃避潜伏期延长、穿越平台次数减少,旷场实验活动路程及时间均减少,说明AD模型小鼠学习记忆能力及认知功能受损;与模型组相比,Rab3a敲低组除穿越平台次数无差异,其余行为学指标进一步加重,空载组各指标差异均无统计学意义,针刺组逃避潜伏期缩短、穿越平台次数、旷场实验活动路程及时间均增加;与Rab3a敲低组比较,针刺+Rab3a敲低组上述指标均在一定程度上得到改善,提示头穴丛刺可显著改善AD模型小鼠学习记忆能力及认知功能,与前期研究结果^[7]一致。

突触是神经元或效应细胞之间相互接触并借以传递信息的结构,也是突触可塑性改变的关键部位。突触可塑性是在神经元持续活动影响下突触形态结构、神经传递强度及效能发生改变的现象,被认为是学习和记忆的重要生物学基础^[19]。突触可塑性损伤是AD重要的病理表现之一,其可能的机制与突触相关蛋白、神经递质水平及营养因子表达异常密切相关^[20]。前期研究表明,头穴丛刺能够

调控突触传递的核心递质乙酰胆碱 (ACh), 改善 AD 模型鼠的学习记忆能力^[7], 提示头穴丛刺干预 AD 可能是通过调控突触可塑性改善其学习记忆。本研究在 APP/PS1 小鼠海马组织中发现突触结构模糊、线粒体萎缩、突触数目及囊泡减少且分布散乱, 这与临床上观察到的 AD 患者脑内突触形态模糊、突触数目降低及线粒体萎缩等情况^[21]是一致的。与模型组相比, Rab3a 敲低组突触损伤进一步加剧, 空载组差异无统计学意义; 而针刺干预后可以改善 AD 模型小鼠突触结构, 增加突触数目和囊泡, 减轻海马区病理损伤。与 Rab3a 敲低组比较, 针刺+Rab3a 敲低组突触结构及数量均得到改善。

Rab3a 蛋白是 Rab 蛋白家族的重要亚型之一, 主要参与突触泡的运输和神经递质释放的调控, 在突触可塑性中起关键作用^[22]。Rab3a 定位在突触前末端的突触囊泡膜上, 通过结合三磷酸鸟苷 (GTP) 激活状态或二磷酸鸟苷 (GDP) 失活状态调控囊泡的锚定和释放^[23-24]。而 SYN1 作为突触前囊泡释放的核心效应蛋白, 可介导囊泡动员、拴系及融合过程, Rab3a 可与 SYN1 相互作用, 通过协同调控囊泡动态运输与释放时序, 保障突触前神经信号传递的高效性与稳定性^[25]。PSD-95 作为突触后致密区的支架蛋白, 通过 PDZ 结构域招募谷氨酸受体及电压门控离子通道等方式调控突触后信号整合与可塑性^[26]。Rab3a 虽不直接结合 PSD-95, 但其效应分子 Rabphilin-3A 可直接结合 PSD95 的 PDZ3 结构域, 进而影响突触后信号传递^[27]。在 AD 中 A β 寡聚体可以抑制 GTP 激活状态, 导致突触囊泡释放障碍, 磷酸化的 Tau 蛋白通过紊乱的微管系统间接性阻断 Rab3a 依赖的囊泡轴突运输路径^[28-29]。有研究表明, AD 患者海马神经元中 Rab3a 蛋白表达水平显著下调, 且与突触密度降低及认知评分呈正相关, 在 Rab3a 敲除的小鼠中, 同样出现突触功能受损及学习记忆能力下降^[30]。基于 Rab3a 在突触可塑性和学习记忆中的重要作用, 我们构建了 Rab3a 沉默的 APP/PS1 小鼠模型, 并与未转染沉默 Rab3a 基因的空白载体病毒进行对照, 探究 Rab3a 在头穴丛刺调节突触可塑性、改善 AD 小鼠学习记忆功能中的作用。结果表明, 与模型组相比, Rab3a 敲低组小鼠海马组织破坏更显著, 逃避潜伏期增加、中央区域活动距离及时间减少、Rab3a 蛋白平均光密度降低, PSD-95、Rab3a、SYN1 蛋白表达降低, 说明 Rab3a 敲除后 AD 模型小鼠突触可塑性损伤更加严重, 学习记忆能力下降更明显。

空载组上述各指标与模型组无差异, 说明未转染沉默 Rab3a 基因对模型无影响。而针刺组干预后, 上述各指标均显著改善, 提示头穴丛刺可改善突触可塑性, 从而提高学习记忆能力, 其可能机制是通过 Rab3a 进行调控。同样, 与 Rab3a 敲低组比较, 针刺+Rab3a 敲低组各指标也显著改善, 进一步证明头穴丛刺通过调控 Rab3a 改善 AD 模型小鼠突触可塑性和学习记忆能力。

有研究亦表明, 神经炎症可通过补体系统介导突触修剪, 或经细胞因子调控突触可塑性关键分子等途径破坏突触稳态, 而突触功能障碍又会反馈加剧神经炎症, 形成恶性循环^[21]。其中, IL-12 作为促炎因子, 可能参与神经炎症对突触稳态的破坏过程, IL-4 作为抗炎因子, 则可能通过抑制过度炎症反应缓解这种破坏^[31-32]。本研究结果表明, 与空白组相比, 模型组小鼠血清促炎因子 IL-12 含量升高, 抗炎因子 IL-4 含量降低, 提示 AD 模型存在促炎、抗炎平衡失调。与模型组相比, Rab3a 敲低组炎症失衡进一步加剧, 而针刺组小鼠血清 IL-12 降低、IL-4 升高。针刺+Rab3a 敲低组与 Rab3a 敲低组比较, 亦表现为 IL-12 降低、IL-4 升高。这表明 Rab3a 缺乏时加剧了炎症因子的释放, 而头穴丛刺可以双向调节神经炎症因子。

综上所述, 头穴丛刺可以改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力, 其机制可能与降低脑内炎症水平, 提高 Rab3a 表达, 调节突触囊泡释放, 改善突触结构, 增强突触可塑性相关。本研究聚焦 Rab3a 对 AD 小鼠突触可塑性的影响, 但缺少树突棘密度量化及长时程增强电生理记录, 后续将进一步补充指标并深度挖掘 Rab3a 介导突触可塑性的作用机制。

参考文献

- [1] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPERTO 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.
- [3] 首都医科大学宣武医院国家神经疾病医学中心, 中国疾病预防控制中心慢性非传染性疾病预防控制中心, 国家卫生健康委能力建设和继续教育中心, 等. 中国阿尔茨海默病蓝皮书(精简版)[J]. 中华医学杂志, 2024, 104(29): 2701-2727.
- [4] 林璐, 马辛, 王刚, 等. 中国阿尔茨海默病早期预防指南

- (2024)[J]. 阿尔茨海默病及相关病杂志, 2024, 7(3): 168-175.
- [5]孙忠人, 朱路文, 于致顺. 于氏头穴丛刺针法特色介绍及临床疗效分析[C]//中国针灸学会. 2011 中国针灸学会年会论文集(摘要). 北京: 中国针灸学会, 2011: 1989-1993.
- [6]李虹霖, 徐飞, 夏昆鹏, 等. 头穴丛刺疗法对阿尔茨海默病患者氧化应激相关指标的影响[J]. 吉林中医药, 2016, 36(1): 88-90.
- [7]李虹霖, 高伟, 孙琦月, 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.
- [8]DEJANOVIC B, SHENG M, HANSON JE. Targeting synapse function and loss for treatment of neurodegenerative diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2024, 23(1): 23-42.
- [9]李云, 王雪, 谢俊霞, 等. Rab 蛋白在神经退行性疾病中作用的研究进展[J]. 生理学报, 2021, 73(2): 315-328.
- [10]KLAKOTSKAIA D, AGCA C, RICHARDSON RA, et al. Memory deficiency, cerebral amyloid angiopathy, and amyloid- β plaques in APP+PS1 double transgenic rat model of Alzheimer's disease[J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0195469.
- [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(5): 445-446.
- [12]刘红喜, 路梦颖, 梁晓, 等. 基于髓海理论运用填精益髓法辨治中医脑病[J]. 中医杂志, 2023, 64(18): 1877-1884.
- [13]王春霞, 丁园, 吴迪, 等. 头穴丛刺调控核因子 κ 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.
- [14]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.
- [15]马冉, 孔立红, 齐凤军, 等. 百会穴对脑的作用之古今研究探析[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(2): 425-428.
- [16]孙婷婷, 王颖, 韩为, 等. 百会穴研究热点与前沿趋势可视化分析[J]. 针灸临床杂志, 2025, 41(5): 51-61.
- [17]冯楚文, 屈媛媛, 孙忠人, 等. 电针抑制 NF- κ B 活性改善慢性疲劳综合征大鼠认知功能障碍的实验研究[J]. 针刺研究, 2021, 46(9): 775-781.
- [18]王春霞, 谷栩萌, 孙兴华, 等. 头穴丛刺抑制海马 β -APP 表达改善阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆能力研究[J]. 针灸临床杂志, 2021, 37(10): 66-70.
- [19]MAGEE JC, GRIENBERGER C. Synaptic plasticity forms and functions[J]. Annu Rev Neurosci, 2020, 43: 95-117. doi: 10.1146/annurev-neuro-090919-022842.
- [20]BHEMBRE N, BONTHRON C, OPAZO P. Synaptic compensatory plasticity in Alzheimer's disease[J]. J Neurosci, 2023, 43(41): 6833-6840.
- [21]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.
- [22]MCGEACHAN RI, MEFTAH S, TAYLOR LW, et al. Divergent actions of physiological and pathological amyloid- β on synapses in live human brain slice cultures[J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 3753.
- [23]SAKANE A, MANABE S, ISHIZAKI H, et al. Rab3 GTPase-activating protein regulates synaptic transmission and plasticity through the inactivation of Rab3[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(26): 10029-10034.
- [24]SCHLÜTER OM, KHVOTCHEV M, JAHN R, et al. Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion[J]. J Biol Chem, 2002, 277(43): 40919-40929.
- [25]SPENCER B, DESPLATS PA, OVERK CR, et al. Reducing endogenous α -Synuclein mitigates the degeneration of selective neuronal populations in an Alzheimer's disease transgenic mouse model[J]. J Neurosci, 2016, 36(30): 7971-7984.
- [26]GIOVEDÌ S, DARCHEN F, VALTORTA F, et al. Synapsin is a novel Rab3 effector protein on small synaptic vesicles. II. Functional effects of the Rab3A-synapsin I interaction[J]. J Biol Chem, 2004, 279(42): 43769-43779.
- [27]DORE K, CARRICO Z, ALFONSO S, et al. PSD-95 protects synapses from β -amyloid[J]. Cell Rep, 2021, 35(9): 109194.
- [28]STANIC J, CARTA M, EBERINI I, et al. Rabphilin 3A retains NMDA receptors at synaptic sites through interaction with GluN2A/PSD-95 complex[J]. Nat Commun, 2015, 6: 10181. doi: 10.1038/ncomms10181.
- [29]张菁, 江海天, 韩道滨, 等. Rab 蛋白在阿尔茨海默病发病机制中作用的研究进展[J]. 生理学报, 2023, 75(6): 817-835.
- [30]HUANG M, DARVAS M, KEENE CD, et al. Targeted quantitative proteomic approach for high-throughput quantitative profiling of small GTPase s in brain tissues of Alzheimer's disease patients[J]. Anal Chem, 2019, 91(19): 12307-12314.
- [31]MARKIEWICZ MA, WISE EL, BUCHWALD ZS, et al. IL-12 enhances CTL synapse formation and induces self-reactivity[J]. J Immunol, 2009, 182(3): 1351-1361.
- [32]LYONS A, GRIFFIN RJ, COSTELLOE CE, et al. IL-4 attenuates the neuroinflammation induced by amyloid-beta in vivo and in vitro[J]. J Neurochem, 2007, 101(3): 771-781.

Effect of Scalp Cluster-Acupuncture on Hippocampal Synaptic Plasticity in APP/PS1 Mice

GAO Wei^{1,2}, LI Xue¹, LIU Annan¹, LI Jianhui¹, YE Qiuyan¹, GAO Jiayue¹, YANG Fengge¹, LI Honglin^{1,3}

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, 150040; 2. Jiangsu College of Nursing; 3. The Second Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of scalp cluster-acupuncture on hippocampal synaptic plasticity in model mice of Alzheimer's disease (AD) and to explore its potential therapeutic mechanism for AD. **Methods** Sixty APP/PS1 mice (AD model mice) were randomly divided into a model group, empty vector group, Ras-related protein 3A (Rab3a) knockdown group, acupuncture group, and acupuncture + Rab3a knockdown group, with 12 mice in each group. Another twelve C57BL/6 mice served as the normal control group. Mice in the empty vector group received hippocampal injection of blank AAV9 vector without Rab3a silencing. The Rab3a knockdown group and acupuncture + Rab3a knockdown group were given AAV9-Rab3a viral solution to specifically knock down Rab3a expression in the hippocampus, while the normal control, model, and acupuncture groups received 2.0 μ l of normal saline in the same region. Two weeks after injection, the acupuncture and acupuncture + Rab3a knockdown groups received scalp cluster-acupuncture treatment, while the other groups were given the same handling stimulation for an equal duration and intensity. All interventions lasted for 28 days. The Morris water maze test was used to assess escape latency and platform-crossing times; the open-field test was used to evaluate spontaneous activity. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe hippocampal pathological morphology, and transmission electron microscopy (TEM) was used to examine hippocampal synaptic ultrastructure. Immunofluorescence was employed to detect Rab3a expression in the hippocampus. ELISA was used to determine hippocampal levels of interleukin-12 (IL-12) and interleukin-4 (IL-4), while Western Blotting was used to measure the expression of Rab3a, postsynaptic density protein 95 (PSD-95), and synapsin 1 (SYN1). **Results** Compared with the normal control group, mice in the model, empty vector, and Rab3a knockdown groups showed prolonged escape latency, fewer platform crossings, reduced movement distance and time in the open-field test, increased hippocampal IL-12 and decreased IL-4 levels, as well as decreased average optical density and protein levels of Rab3a, PSD-95, and SYN1 ($P < 0.01$). HE staining showed irregular neuronal morphology, disordered arrangement, and decreased neuronal number in the hippocampal CA1 region, while TEM revealed severe synaptic damage. Compared with the model group, the Rab3a knockdown group exhibited aggravated impairment in the above indicators ($P < 0.05$), with more pronounced neuronal and synaptic structural damage in the CA1 region. In contrast, the acupuncture group showed significant improvement in all these parameters ($P < 0.01$), with reduced hippocampal injury and repaired synaptic structures. Compared with the Rab3a knockdown group, the acupuncture + Rab3a knockdown group also demonstrated improvement in all measures ($P < 0.05$), with attenuated pathological and synaptic structural damage in the hippocampal CA1 region. **Conclusion** Scalp cluster-acupuncture may improve cognitive function in AD model mice by upregulating Rab3a protein expression in the hippocampus, improving synaptic ultrastructure, and modulating inflammatory cytokines. This may be one of the potential mechanisms underlying its therapeutic effect on AD.

Keywords Alzheimer's disease; scalp cluster-acupuncture; Baihui (GV 20); Ras-related protein 3A; synaptic plasticity

(收稿日期: 2025-05-19; 修回日期: 2025-08-27)

[编辑: 邓媛]