

电针调节CD8⁺T细胞对帕金森病模型小鼠黑质区神经元损伤的保护机制研究*

李 华¹ 赵颖倩¹ 郭 婕² 卢苑蓉² 张改月¹ 王 强^{1,3,4}

摘要

目的:观察早期电针干预对CD8⁺T细胞浸润帕金森病(Parkinson's disease, PD)模型小鼠黑质区酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)及CD8⁺T细胞相关细胞因子表达的影响,探讨早期电针对PD的神经元保护效应及机制。

方法:将雄性C57BL/6小鼠随机分为空白组、模型组、电针组、左旋多巴组,每组15只;除空白组外,其余各组均腹腔注射1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)构建PD小鼠模型。造模成功电针组选取“足三里”“悬钟”进行干预14天,治疗结束后进行转棒、旷场测试,并观察黑质区TH表达及CD8⁺T细胞表型标记物CD103⁺T细胞、干扰素 γ (IFN γ)蛋白及颗粒酶B(GzmB)蛋白的表达。

结果:造模结束后,模型组小鼠毛色暗淡无光,精神萧瑟,活动减少,肌肉颤动,而电针组及左旋多巴组小鼠精神状态良好。与模型组相比,电针组及左旋多巴组小鼠掉棒潜伏时间延长($P<0.01$),运动总距离延长且经过区域中心的速度改善($P<0.01$),黑质区TH阳性表达增加($P<0.01$),CD8⁺CD103⁺T细胞共定位表达率降低($P<0.01$),IFN γ 含量下调($P<0.05$, $P<0.01$),GzmB表达下降($P<0.05$, $P<0.01$)。

结论:早期电针干预可以提高PD模型小鼠的运动能力,增加黑质区TH表达并改善神经元损伤,其机制与电针减少黑质区CD8⁺CD103⁺T细胞浸润,进一步抑制IFN γ 、GzmB分泌,最终降低细胞毒性并提高机体免疫功能有关。

关键词 帕金森病;电针;CD8⁺T细胞;酪氨酸羟化酶;表型标记物CD103⁺T细胞;干扰素 γ ;颗粒酶B

中图分类号:R318;R744 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2023)-09-1177-08

Effects of electroacupuncture on the protection of CD8⁺T cell neurons in substantia nigra in Parkinson's disease model mice/LI Hua, ZHAO Yingqian, GUO Jie, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2023, 38(9): 1177—1184

Abstract

Objective: To investigate the effect of early electroacupuncture intervention on CD8⁺T cells infiltrating tyrosine hydroxylase (TH) and expression of CD8⁺T cell-related cytokines in substantia nigra of Parkinson's disease (PD) model mice. To investigate the neuronal protective effect and mechanism of early electrotherapy on PD.

Method: Male C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: blank group, model group, electroacupuncture group and the levodopa group, with 15 mice in each group. PD mouse model was established by intraperitoneal injection of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) except for the blank group. In the EA group, "Zusanli" and "Hanging Zhong" were selected for intervention for 14 days. After the treatment, the rod-shifting and open-field tests were performed to observe the expression of TH and CD8⁺T cell phenotype markers CD103⁺T cells, interferon γ (IFN γ) protein and granzyme B (GzmB) protein in the substantia nigra.

Result: At the end of the modeling, the mice in the model group had dull coat color, bleak spirit, decreased activity and muscle fibrillation, while the mice in the EA and levodopa groups were in a good mental

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2023.09.001

*基金项目:国家自然科学基金项目(81674086);陕西省自然科学基金研究计划(2020JM-594)

1 陕西中医药大学针灸推拿学院,陕西省咸阳市,712046; 2 陕西中医药大学第二临床医学院; 3 陕西省针药结合重点实验室; 4 通讯作者
第一作者简介:李华,女,硕士研究生; 收稿日期:2022-07-25

state. Compared with the model group, the EA group and the levodopa group had prolonged rod dropping latency ($P<0.01$), prolonged total distance and improved speed through the regional center ($P<0.01$), increased TH positive expression in substantia nigra ($P<0.01$), and decreased CD8⁺CD103⁺T cell colocality expression rate ($P<0.01$). The content of IFN γ was down-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$), and the expression of GzmB was down-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$).

Conclusion: Early EA intervention can improve the exercise ability of PD model mice, increase the expression of TH in the substantia nigra, and improve neuronal injury. The mechanism is related to the reduction of CD8⁺CD103⁺T cell infiltration in the substantia nigra, further inhibition of IFN γ and GzmB secretion, and ultimately the reduction of cytotoxicity and improvement of immune function.

Author's address College of Acupuncture and Massage, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang, 712046

Key word Parkinson's disease; electric acupuncture; CD8⁺T cell; tyrosine hydroxylase; phenotypic marker CD103⁺T cell; interferon γ ; granzyme B

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是仅次于阿尔茨海默病的第二大常见的神经系统退行性疾病,也是发展较快的神经退行性疾病^[1-2]。PD的主要病理学特征是中脑黑质致密部多巴胺(dopamine, DA)能神经元变性坏死,引起纹状体DA含量显著性减少,黑质-纹状体通路多巴胺神经支配削弱^[3-4],胆碱能神经功能相对强化,二者之间互对平衡被打破^[5]。而近来研究发现^[6-8],神经退行性疾病的发病机制与神经系统和适应性免疫功能之间的相互作用有关。PD患者的脑脊液及在其死后的脑组织中存在长期T淋巴细胞的浸润^[9-10],尽管PD患者的脑脊液中CD4⁺T细胞活化的比例呈现均衡态,然而CD8⁺T细胞活化比例在增加^[11-13],其活化可以导致黑质纹状体神经变性^[14-15],然而其在PD中的作用机制还亟待研究。

针灸疗法具有疏经通络、调和阴阳、扶正祛邪的作用^[16],可调节机体的特异性和非特异性免疫功能,在神经退行性疾病的治疗中发挥着弥足重要的作用^[17-18]。一方面,其可通过抑制脑内细胞凋亡、促进新生神经元发生及调节T淋巴细胞分化等减轻脑损伤,进而提高机体机能、延缓疾病进程^[19-21];另一方面,亦可恢复因免疫系统紊乱导致的脑损伤,机体内环境紊乱及功能下降,出现如运动迟缓、肢体震颤等一系列临床症状^[22]。本实验通过建立PD小鼠模型,观察早期电针干预对帕金森病模型小鼠CD8⁺T细胞黑质区浸润的神经元改善及运动功能的调节机制,以期针灸疗法对PD早期的预防及治疗机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选取体质量(20 $\pm$ 5)g的9周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠作为研究对象,实验使用许可证号为SYXK(陕)2018-0001。采用随机数字表法对小鼠进行编号,与统计分析软件SPSS 26.0产生的随机数字相匹配,分为空白组、模型组、电针组及左旋多巴组,每组各15只。动物由西安交通大学实验动物中心提供,生产许可证号为SCXK(陕)2020-0001。环境温度为23℃,湿度为50%—60%,通风良好,12h/12h昼夜节律,食水自由摄取。对动物的处理遵循《关于善待实验动物的指导性意见》^[23]。

1.2 主要试剂

MPTP、左旋多巴、抗CD8大鼠单克隆抗体、抗CD103兔单克隆抗体均购自英国Abcam公司(批号分别为:ab145233、ab120573、ab33786、ab224202),干扰素 γ (interferon γ , IFN γ)试剂盒(武汉BOSTER公司,SA1055),抗颗粒酶B兔单克隆抗体(上海泽叶生物科技有限公司,ZY-165Ab),小鼠免疫组织化学检测试剂盒、DAB显色液(武汉博士德生物工程有限公司),SAKURA樱花牌OCT 4583冰冻切片包埋剂(江苏康成白澳生物科技有限公司)。

1.3 仪器

高速冷冻离心机(美国贝克曼);酶标仪、电泳仪、转膜仪、凝胶成像仪(美国Bio-Rad),显微摄像成像系统(德国Lecia),组织切片机(德国Lecia);Image J图像分析系统(美国Media Cybernetics),旷场实验箱、小动物呼吸麻醉机(深圳市瑞沃德生命科

技术有限公司),华佗牌电针治疗仪SDZ-II(济南欧莱博技术有限公司),0.25mm×13mm一次性使用无菌针灸针(苏州医疗用品厂有限公司),小鼠转棒仪XR-6C(上海欣软),Etho Vision行为学记录分析系统(荷兰Noldus)。

1.4 模型制备

适应性饲养7天后,使用0.9%氯化钠溶液配制MPTP溶液(3mg/ml),除空白组腹腔注射等剂量的0.9%氯化钠溶液外,其他组小鼠按照30mg/kg/d的剂量连续腹腔注射给药7天^[24]。小鼠出现立毛、弓背、震颤、倦怠、流涎及运动功能测试障碍,证明模型制备成功。

1.5 干预方法

1.5.1 电针组:造模成功后,开始电针干预。将小鼠俯伏位置于自制小鼠固定器上,腧穴定位参照《实验针灸学》^[25]关于“常用实验动物针灸穴位”的取穴标准,选取双侧足三里及悬钟穴。采用0.25mm×13mm一次性使用无菌针灸针,直刺2mm,同侧穴位接电针仪正、负电极一对导线。疗程:1次/日,7天为一个疗程,休息2天,共进行2个疗程。刺激参数:连续波,频率为2Hz,强度为1mA。空白组及模型组均进行与电针组同等程度的抓取固定,除外不予其他任何干预。

1.5.2 左旋多巴组:于电针干预同日同时进行。左旋多巴药物以3mg/kg的剂量每日与电针组干预同一时间进行腹腔注射^[26],1次/天,7天为一个疗程,休息2天,共进行2个疗程。

1.6 观察指标及检测方法

1.6.1 行为学检测方法:①动物体征观察:于开始造模当天起观察并记录各组小鼠的精神状态、毛色光泽度、饮食物量、体质量变化、肢体运动状态、躯体僵硬程度等行为。②转棒实验:于造模前及电针干预结束前3天进行3次/天的连续转棒训练,使小鼠习得在滚轮上运动的技能。正式实验于电针干预结束后当日进行。具体操作:使小鼠面向墙壁放置于旋转式螺纹滚轮上,适应2min,将滚轮转速设置为30s时达到24r/min,此后以恒速转动,定时300s。小鼠从滚轮上跌落至下方平台时,平台的感应器可自动记录小鼠在棒时间,即掉棒潜伏期。非连续性检测,每次检测间隔时间大于2h,所有实验小鼠每天各检

测3次,最后取平均值。③旷场实验:电针干预结束后进行。具体操作:将小鼠温柔抓取,放入四周和底面均为白色的旷场测试箱(无盖方箱,50cm×50cm×40cm)箱底中心,用EthoVision XT10 软件对小鼠运动轨迹进行跟踪并记录10min内小鼠在敞箱中央区域的经过速度及运动距离。主要记录和分析指标:小鼠在10min的运动总距离、在中心区域(25cm×25cm)停留的时间。每只小鼠测试结束后均须清理箱内遗留味道以及排泄物等。实验平行测试3次,每次间隔30min。

1.6.2 免疫组织化学染色检测:于行为学实验评估后进行样本采集。每组取4只小鼠全脑组织用于制作石蜡切片。将25%乌来糖(1.25g/kg)经腹腔注射麻醉小鼠,灌流后于冰上断头,取脑置于4%多聚甲醛固定。将固定好的脑组织进行常规石蜡包埋,制作成厚约5μm病理切片,置于二甲苯中透明脱蜡。按照常规免疫组染色步骤染色后,中性树胶封片并观察。每只小鼠取3张脑组织切片,用Lecia显微成像系统采集分析图像数据,在200倍镜下每张切片随机选取黑质区3个视野进行观察,阳性表达反应物呈棕黄色或棕褐色。用Image-Pro Plus6.0图像分析系统统计每张切片TH阳性表达的吸光度值。

1.6.3 免疫荧光双标法检测:每组取4只小鼠,切片同免疫组织化学染色法。山羊血清封闭,滴加2种一抗混合液,4℃冰箱过夜,PBS冲洗,滴加2种荧光二抗混合液,孵育1h,冲洗,避光,滴加含DAPI抗荧光衰减封片剂封片,在荧光显微镜下观察并采集图像。每只小鼠取3张切片,在200倍镜下每张切片随机选取3个视野,DAPI染色后,细胞核在紫外光激发下为蓝色,CD8阳性表达为相应荧光素标记的红色,CD103阳性表达为相应荧光素标记的绿色,利用Image-Pro Plus6.0图像分析软件进行图像分析,计算平均荧光强度。

1.6.4 酶联免疫吸附法(Elisa)测定:每组取4只小鼠进行颈椎脱臼处死,迅速断头取脑,将全脑置于冰上,取出中脑黑质(前囟尾侧4.6mm—6.2mm)^[27]。按比例加入含有PMSF的裂解液进行匀浆,4℃2500r/min离心15min,取上清备用。加入样品、标准品、生物素抗原、亲和素、显色液A和B、终止液;10min之内读取OD值;采用ELISAcalc 计算软件,选用logistic

曲线(四参数)计算各组织 IFN γ 蛋白表达量。

1.6.5 Western Blot检测: 每组取4只小鼠进行颈椎脱臼处死,迅速断头取脑,将全脑置于冰上取出中脑黑质。取适量黑质组织,裂解匀浆、取上清、定量、变性。制备好的样本通过 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭,一抗(GzmB、 β -actin)4℃过夜,TBST洗膜,二抗室温孵育2h,TBST洗膜,ECL化学发光法显影,Bio-Rad凝胶成像仪曝光成像并拍照印迹,Image J图像分析软件对各组小鼠黑质中的GzmB蛋白条带进行灰度值分析, β -actin为内参蛋白。实验结果用目的蛋白灰度值与内参灰度值的比值表示。

1.7 统计学分析方法

采用SPSS 26.0软件辅助分析数据,符合正态分布或近似正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法。所有检验结果以 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 体征变化情况

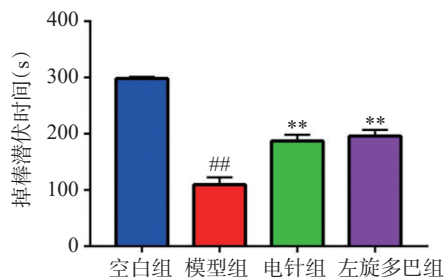
空白组小鼠毛色光滑,眼睛灵动,反应敏捷,鼠尾卷曲灵活,活泼好动;与空白组小鼠相比,随着MPTP腹腔给药次数的增加,模型组小鼠逐渐出现毛色暗淡无光,精神萧瑟,肌肉颤动,活动减少,行走不稳等症状;与模型组小鼠相比,电针组及左旋多巴组小鼠毛色、竖毛、肌肉震颤、活动减少、行走不稳等症状的程度逐渐改善。

2.2 行为学检测结果比较

2.2.1 转棒实验: 与空白组小鼠相比,模型组小鼠掉棒潜伏时间明显缩短($P<0.01$);与模型组小鼠相比,电针组及左旋多巴组小鼠掉棒潜伏时间延长($P<0.01$)(图1)。

2.2.2 旷场实验: 与空白组小鼠相比,模型组小鼠运动总距离明显缩短,经过区域中心的速度明显减缓($P<0.01$);与模型组小鼠相比,电

图1 掉棒潜伏时间结果比较



注: $\bar{x}\pm s$, $n=15$ /组。与空白组比较## $P<0.01$;②与模型组比较** $P<0.01$ 。

针组及左旋多巴组小鼠运动总距离延长,经过区域中心的速度改善($P<0.01$)(图2)。

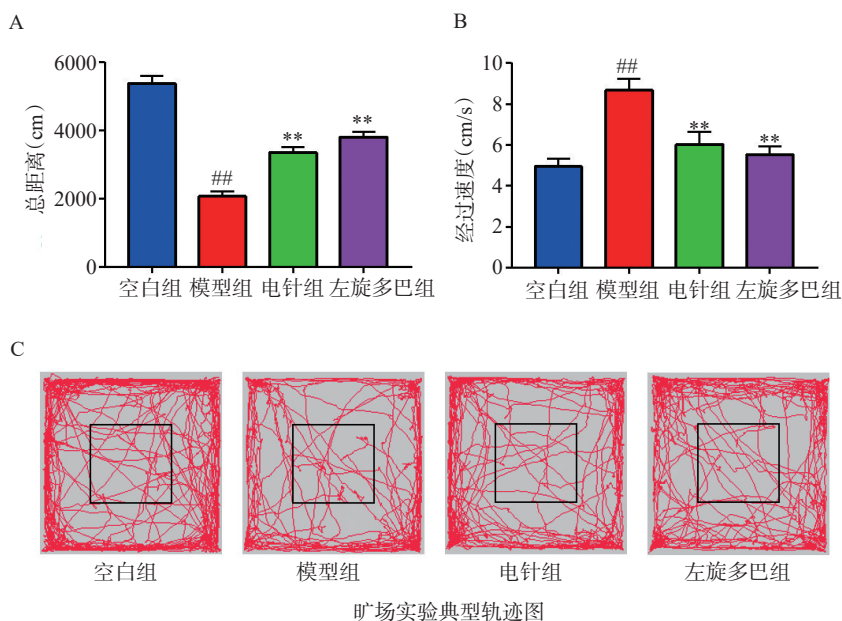
2.3 黑质区酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)阳性表达比较

与空白组小鼠相比,模型组小鼠黑质区TH阳性表达明显下降($P<0.01$);与模型组小鼠相比,电针组及左旋多巴组小鼠TH阳性表达增加($P<0.01$)(图3)。

2.4 黑质区CD8⁺T细胞及其表型标记物CD103⁺T细胞阳性表达比较

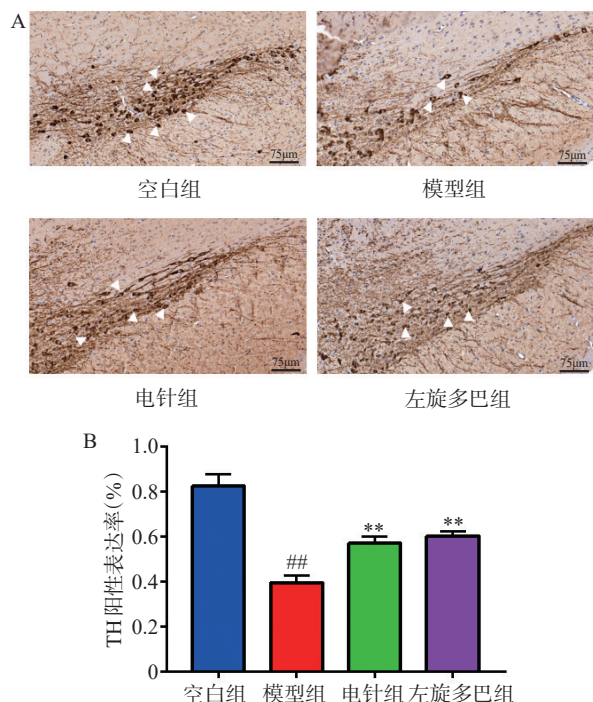
与空白组小鼠相比,模型组小鼠黑质区CD8⁺

图2 旷场实验结果比较



注: $\bar{x}\pm s$, $n=15$ /组。①A:实验小鼠运动总距离;②B:实验小鼠经过中心区域的速度;③C:实验小鼠旷场实验典型轨迹图;④与空白组比较## $P<0.01$;⑤与模型组比较** $P<0.01$ 。

图3 黑质区TH阳性表达比较



注: $\bar{x}\pm s$, $n=4$ /组。①A:实验小鼠黑质区TH阳性表达免疫组化图($\times 200$),其中白色箭头所示棕黄色或棕褐色为阳性表达,紫蓝色为苏木精染的细胞核;②B:实验小鼠黑质区TH阳性表达率(占核染细胞数百分比);③与空白组比较## $P<0.01$;④与模型组比较** $P<0.01$ 。

CD103⁺T细胞阳性表达明显升高($P<0.01$);与模型组小鼠相比,电针组及左旋多巴组小鼠黑质区CD8⁺CD103⁺T细胞阳性表达降低($P<0.05$)(图4)。

2.5 黑质区CD8⁺T细胞细胞因子IFN γ 表达量比较

与空白组小鼠相比,模型组小鼠黑质区IFN γ 表达量增加($P<0.01$);与模型组小鼠相比,电针组及左旋多巴组小鼠黑质区IFN γ 表达量下降($P<0.01$, $P<0.05$)(图5)。

2.6 黑质区GzmB表达水平比较

与空白组小鼠相比,模型组小鼠黑质区GzmB表达水平升高($P<0.01$);与模型组小鼠相比,电针组及左旋多巴组小鼠黑质区GzmB表达水平下降($P<0.05$, $P<0.01$)(图6)。

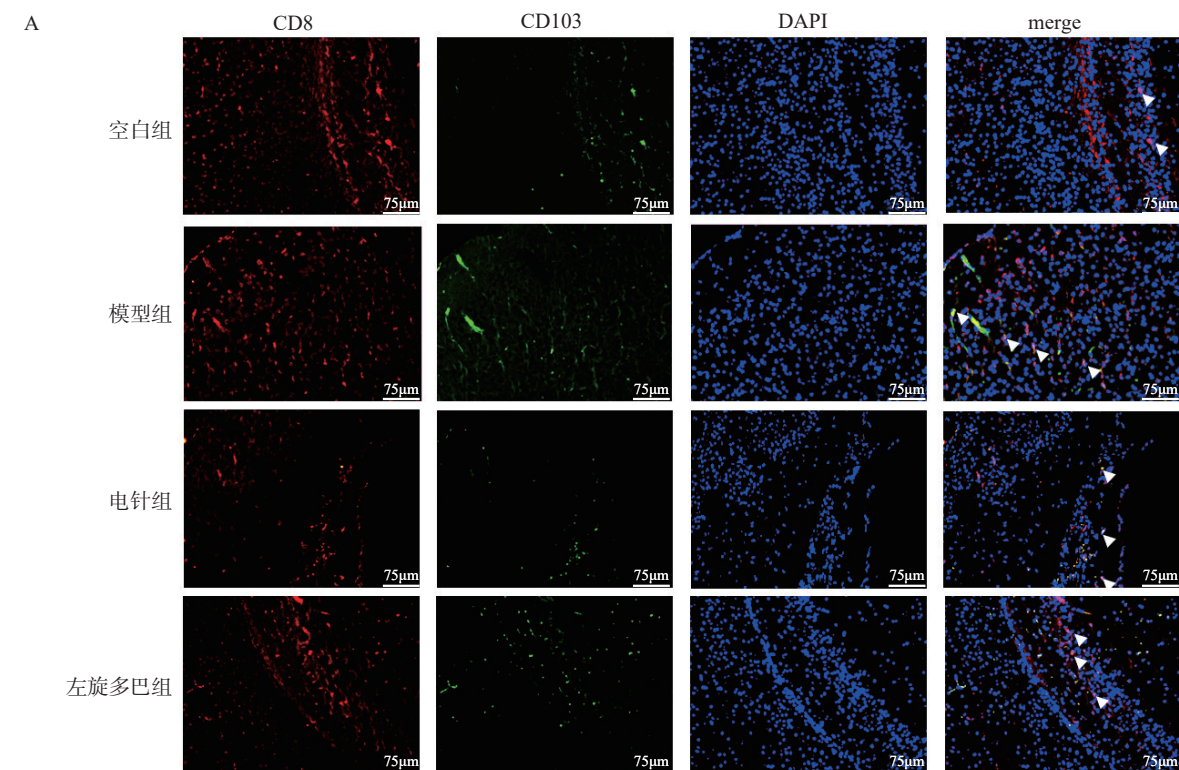
3 讨论

根据PD临床症状,祖国传统医学将本病归属于“颤证”范畴,其病因病机可归纳为情志不遂、饮食不节致气血亏虚,导致筋脉失养。王肯堂《证治准

绳·杂病》云:“颤,摇也;振,动也。筋脉约束不佳而莫能任持。”亦有《黄帝内经·素问》曰“阳明者,五脏六腑之海,主润宗筋,宗筋主束骨而利关节也。”本实验选择多血多气之足三里穴及髓之会悬钟穴。因为足三里穴为足阳明经的下合穴,是六腑气血深注于下肢三阳经的部位,针刺之不仅可以解肌散风,还可以行气活血、舒筋利节。伍以髓之会穴悬钟,共司濡宗筋、束骨、利关节之功。此外,有研究者^[31-33]结合多年的临床经验予PD患者电针刺激足三里、悬钟、阳陵泉、三阴交等穴,结果发现患者震颤、平衡功能障碍等运动症状缓解,患者日常生活能力提高。同时,电针刺激PD模型大鼠的足三里、风府等穴,可调节模型大鼠免疫功能,促进多巴胺释放,增加活化小胶质细胞数量并抑制氧化应激以及细胞凋亡,从而改善PD模型大鼠的运动障碍^[34-36]。本研究通过转棒及旷场实验结果显示,电针干预可以延长PD模型小鼠掉棒潜伏时间,增加旷场运动总距离及运动速度,改善PD模型小鼠运动功能。提示电针干预对PD模型小鼠的运动障碍存在一定疗效。

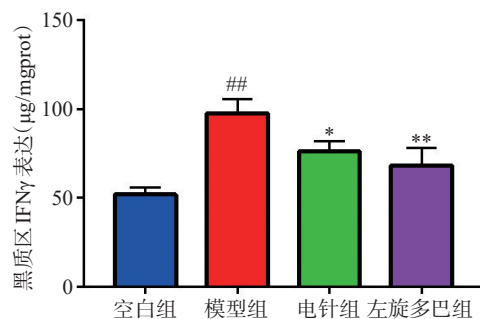
PD的主要病理学特征是中脑黑质致密部DA能神经元变性坏死,引起纹状体DA含量显著减少,胆碱能神经功能亢进^[5],因此减少DA能神经元的丢失可延缓PD病情进展。TH存在于所有多巴胺能细胞中,是包括DA在内催化儿茶酚胺神经递质合成的限速酶^[37]。TH阳性神经元的减少会抑制TH的活性,进而导致DA合成减少,可作为检测DA能神经元的金标准反映神经元的状态、判断PD的病程。有研究表明^[38-39],电针干预可以保护PD模型鼠的多巴胺能神经元变性,并提高黑质区TH的阳性表达。本实验通过免疫组织化学染色发现,PD模型小鼠黑质区TH阳性表达明显下降,电针干预后可增强TH阳性表达,抑制DA能神经元丢失,进而使得黑质区受损神经元得以改善。结合上述电针干预可以提高PD模型小鼠运动能力,我们考虑小鼠黑质区TH的增高可能是改善其运动功能的机制之一。

中枢神经系统的免疫监视可抵御病原体的入侵^[40]。作为免疫反应重要参与者的CD8⁺T细胞可通过其抗原受体与抗原肽和靶细胞表面的同源肽主要组织相容性复合体I(MHC-I)类分子之间结合形成复合物而被激活^[41],从而发挥细胞毒性功能去杀伤

图4 黑质区CD8⁺T细胞及其表型标记物CD103⁺T细胞阳性表达比较

注: $\bar{x} \pm s$, $n=4$ /组。①A: 实验小鼠黑质区CD8⁺T细胞及其表型标记物CD103⁺T细胞免疫荧光双标图(免疫荧光共染, $\times 200$), 红色标记CD8, 绿色标记CD103, 蓝色标记细胞核, merge为三者共标图, 白色箭头指示典型共标细胞; ②B: 实验小鼠黑质区CD8⁺T细胞及其表型标记物CD103⁺T细胞共标率(占核染细胞数百分比); ③与空白组比较^{##} $P<0.01$; ④与模型组比较^{**} $P<0.01$ 。

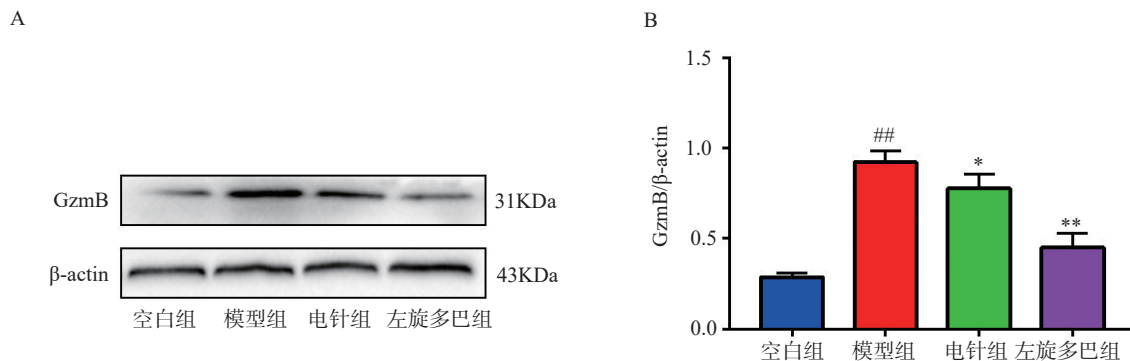
靶细胞。人类脐带血中的CD8⁺T细胞因可长期驻留于特定的组织器官内, 如大脑、皮肤和胃肠道等, 故有组织驻留记忆T细胞的特征, 可在再次接触相同抗原时迅速扩增而进行靶细胞的杀伤^[42]。CD103⁺TRM细胞作为CD8⁺T细胞的特定表面标志物, 是相对特异的T细胞表面分子, 受局部组织微环境中特定信号分子调控, 存在自身抗原特异性T细胞对机体组织造成持续损伤的证据^[43-44]。研究显

图5 黑质区CD8⁺T细胞细胞因子IFN γ 表达量

注: $\bar{x} \pm s$, $n=4$ /组。①与空白组比较^{##} $P<0.01$; ②与模型组比较^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

示^[45], CD8⁺CD103⁺T细胞参与多发性硬化症等神经退行性疾病的发生、发展。在本研究中通过对CD8⁺CD103⁺T细胞进行免疫荧光双重染色, 发现模型组小鼠CD8⁺CD103⁺T细胞的共表达明显高于空白组, 电针可降低, 且具有显著性差异。CD103⁺T细胞表达的降低, 可能是因电针刺激后CD8⁺T细胞在黑质区浸润受阻, 使得TRM细胞的特征未能展现, 作为特定表面标志物的CD103⁺T细胞受CD8⁺T细胞的

图6 黑质区 GzmB 蛋白表达水平



注:①A:实验小鼠黑质区 GzmB 蛋白 Western Blot 代表图;②B:实验小鼠黑质区 GzmB 相对表达量, $\bar{x} \pm s$, $n=4$ /组;③与空白组比较## $P<0.01$;④与模型组比较* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

调控下降,从而对机体产生的损伤减弱,故我们就进一步考虑 CD103⁺TRM 细胞的降低也可能是上述黑质区 TH 增高的一个因素。

CD8⁺T 细胞识别其抗原并被激活时通过涉及一系列“精心策划”的事件实现对靶细胞的杀伤,最终导致靶细胞的凋亡和清除。首先 CD8⁺T 细胞的活化需要 CD4⁺T 细胞提供辅助作用,然而其自身表达的细胞因子,尤其 IFN γ 亦是抗原呈递过程中所需细胞因子的一个重要来源,而 CD8⁺T 细胞是 IFN- γ 的主要来源之一^[46]。此外,活化的巨噬细胞也释放 IFN γ ,促进活化的 CD8⁺T 细胞募集,直接触发靶向细胞的死亡。同时,CD8⁺T 细胞可释放含有细胞毒性的颗粒酶传递促凋亡分子,从而发起对靶细胞的杀伤。其与 MHC-I 类结合促使储存在胞质溶胶中的穿孔素和颗粒酶合成^[47],一旦结合储存在细胞毒性 T 淋巴细胞/靶细胞接触位点的 GzmB 快速分泌^[48],随之 GzmB 在靶细胞中的渗透引发凋亡级联反应,导致靶细胞湮灭。本研究也同样发现,模型组小鼠黑质区 IFN γ 、GzmB 表达显著升高,而电针干预可抑制 IFN γ 、GzmB 分泌,从而减弱 CD8⁺T 细胞对靶细胞的杀伤力。再结合黑质区 CD8⁺CD103⁺T 细胞的共表达下降,初步推测可能存在 CD8⁺T 细胞识别的“记忆”被抚平或抹灭,进而使 IFN γ 的释放及 GzmB 的分泌减少,它们所发挥的杀伤力被弱化,细胞毒性降低,机体免疫功能自稳,TH 的阳性表达顺势升高,DA 能神经元受到保护,黑质区受损神经元得以改善,最终 PD 模型小鼠的运动能力提高。

综上所述,本研究结果表明,早期电针干预可以提高 PD 模型小鼠的运动能力,增加黑质区 TH 表达并改善神经元损伤,其机制可能与电针减少黑质区 CD8⁺CD103⁺T 细胞浸润,抑制 IFN γ 释放及 GzmB 分泌,并进一步降低细胞毒性、提高机体免疫功能有关。

参考文献

- [1] Subbarayan MS, Hudson C, Moss LD, et al. T cell infiltration and upregulation of MHCII in microglia leads to accelerated neuronal loss in an α -synuclein rat model of Parkinson's disease[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1):242.
- [2] Tolosa E, Garrido A, Scholz SW, et al. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease[J]. Lancet Neurol, 2021, 20(5):385—397.
- [3] Chia SJ, Tan EK, Chao YX. Historical perspective: models of Parkinson's disease[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7):2464.
- [4] Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology[J]. Clin Geriatr Med, 2020, 36(1):1—12.
- [5] Yasuhara T. Neurobiology research in Parkinson's disease[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3):793.
- [6] Seo J, Park J, Kim K, et al. Chronic infiltration of T lymphocytes into the brain in a non-human primate model of Parkinson's disease[J]. Neuroscience, 2020(431):73—85.
- [7] Wang P, Yao L, Luo M, et al. Single-cell transcriptome and TCR profiling reveal activated and expanded T cell populations in Parkinson's disease[J]. Cell Discov, 2021, 7(1):52.
- [8] Álvarez-Luquín DD, Guevara-Salinas A, Arce-Sillas A, et al. Increased Tc17 cell levels and imbalance of naïve/effector immune response in Parkinson's disease patients in a two-year follow-up: a case control study[J]. J Transl Med, 2021, 19(1):378.
- [9] Yan Z, Yang W, Wei H, et al. Dysregulation of the adaptive immune system in patients with early-stage Parkinson

- disease[J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2021, 8(5):e1036.
- [10] Bhatia D, Grozdanov V, Ruf WP, et al. T-cell dysregulation is associated with disease severity in Parkinson's disease[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1):250.
- [11] Schröder JB, Pawlowski M, Meyer Zu Hörste G, et al. Immune cell activation in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease[J]. *Front Neurol*, 2018(9):1081.
- [12] Garrett F, Agalliu D, Lindestam Arlehamn CS, et al. Autoimmunity in Parkinson's disease: the role of α -synuclein-specific T cells[J]. *Front Immunol*, 2019(10):303.
- [13] Dutta D, Kundu M, Mondal S, et al. RANTES-induced invasion of Th17 cells into substantia nigra potentiates dopaminergic cell loss in MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2019(132):104575.
- [14] Williams GP, Marmion DJ, Schonhoff AM, et al. T cell infiltration in both human multiPle system atrophy and a novel mouse model of the disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2020, 139(5):855—874.
- [15] Wang BY, Ye YY, Qian C, et al. Stress increases MHC-I expression in dopaminergic neurons and induces autoimmune activation in Parkinson's disease[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(12):2521—2527.
- [16] 李忠正, 郭义, 郭永明. 浅谈针灸作用的基本特点[J]. *针灸临床杂志*, 2012, 28(11):5—6.
- [17] Hsu WT, Chen YH, Yang HB, et al. Electroacupuncture improves motor symptoms of Parkinson's disease and promotes neuronal autophagy activity in mouse brain[J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(7):1651—1669.
- [18] Wei TH, Hsieh CL. Effect of acupuncture on the p38 signaling pathway in several nervous system diseases: a systematic review[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13):4693.
- [19] 陶卓滢, 韩佩佩, 王丽岩, 等. 针灸疗法在神经系统疾病治疗中的抗细胞凋亡作用[J]. *上海医药*, 2021, 42(1):44—49.
- [20] 马骏, 王彬, 王述菊, 等. 电针“风府、太冲”穴对帕金森病模型大鼠内质网应激相关蛋白表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2019, 34(7):772—777.
- [21] 谭程方, 黄思琴, 唐成林, 等. 电针联合雪旺氏细胞移植对脊髓压迫性损伤后脊髓内CD4、CD8表达及髓鞘修复的影响[J]. *针刺研究*, 2019, 44(6):391—398.
- [22] 骆仲达, 陈兴华, 唐纯志, 等. 针刺对帕金森病模型大鼠血液T淋巴细胞亚群的影响[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(10):1904—1905.
- [23] 程津津, 任萍萍. 学习《关于善待实验动物的指导性意见》后的体会[J]. *实验动物科学*, 2011, 28(3):78—79.
- [24] 樊申元, 靳二辉. 耐力训练对帕金森模型小鼠中脑线粒体自噬相关基因表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2015, 30(5):437—442.
- [25] 余曙光, 郭义, 王瑞辉, 等. 实验针灸学[M]. 第2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2014:450.
- [26] 赵颖倩, 亢恺雯, 刘奇, 等. 电针干预对帕金森病模型小鼠黑质中酪氨酸羟化酶及氧化应激因子表达的影响[J]. *上海针灸杂志*, 2022, 41(5):521—527.
- [27] 马雪, 乔海法, 王强, 等. 电针对帕金森病小鼠结肠及黑质 α -syn表达的影响[J]. *针刺研究*, 2021, 46(5):362—367.
- [28] 余欢. 基于“肾脑相关”补肾调神针刺法治疗帕金森病的临床观察[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2021.
- [29] 金雯丽. 头针联合体针治疗帕金森病运动功能障碍的临床观察[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2022.
- [30] 王悠杨. 夏光荣治疗帕金森病的临床经验[J]. *中医临床研究*, 2020, 12(15):31—32+36.
- [31] 李含章, 祁玲, 张小蕾, 等. 电针对帕金森病小鼠胰高血糖样肽-1受体/磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B蛋白通路的调控作用[J]. *针刺研究*, 2022, 47(1):27—32.
- [32] Kim ST, Moon W, Chae Y, et al. The effect of electroacupuncture for 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced proteomic changes in the mouse striatum[J]. *J Physiol Sci*, 2010, 60(1):27—34.
- [33] 甘水咏. “双固一通”针法对帕金森病模型大鼠免疫功能调节的研究[D]. 武汉: 湖北中医学院, 2007.
- [34] Nagatsu T, Nakashima A, Watanabe H, et al. Neuromelanin in Parkinson's disease: tyrosine hydroxylase and tyrosinase[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8):4176.
- [35] 祁玲, 汪瑶, 李亚楠, 等. 电针对鱼藤酮诱导的帕金森病大鼠神经炎症反应及Toll样受体4/核因子- κ B信号通路的影响[J]. *针刺研究*, 2021, 46(11):929—934+972.
- [36] 王强, 郭阳, 刘智斌, 等. “嗅三针”对帕金森病小鼠TH表达的影响[J]. *吉林中医药*, 2019, 39(7):937—940.
- [37] Tian J, Dai SB, Jiang SS, et al. Specific immune status in Parkinson's disease at different ages of onset[J]. *NPJ Parkinsons Dis*, 2022, 8(1):5.
- [38] Dersh D, Phelan JD, Gumina ME, et al. Genome-wide screens identify lineage and tumor-specific genes modulating MHC-I- and MHC-II-restricted immunosurveillance of human lymphomas[J]. *Immunity*, 2021, 54(1):116—131.e10.
- [39] Smolders J, Heutinck KM, Fransen NL, et al. Tissue-resident memory T cells populate the human brain[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):4593.
- [40] ToPham DJ, Reilly EC. Tissue-resident memory CD8⁺T cells: from phenotype to function[J]. *Front Immunol*, 2018(9):515.
- [41] Bourdely P, Anselmi G, Vaivode K, et al. Transcriptional and functional analysis of CD1c⁺human dendritic cells identifies a CD163⁺subset priming CD8⁺CD103⁺T cells[J]. *Immunity*, 2020, 53(2):335—352.e8.
- [42] Wakim LM, Woodward-Davis A, Bevan MJ. Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(42):17872—17879.
- [43] Bhat P, Leggatt G, Waterhouse N, et al. Interferon- γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(6):e2836.
- [44] Luo ZW, Xia K, Liu YW, et al. Extracellular vesicles from Akkermansia muciniphila elicit antitumor immunity against prostate cancer via modulation of CD8⁺T cells and macrophages[J]. *Int J Nanomedicine*, 2021(16):2949—2963.
- [45] Lu C, Klement JD, Smith AD, et al. p50 suppresses cytotoxic T lymphocyte effector function to regulate tumor immune escape and response to immunotherapy[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2):e001365.