

文章编号: 1005-0957 (2022) 05-0521-07

· 动物实验 ·

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

赵颖倩¹, 亢恺雯^{2,3,4}, 刘奇¹, 马雪¹, 李杰¹, 鲁刚¹, 王强^{1,3,4}

[1. 陕西中医药大学针灸推拿学院, 咸阳 712046; 2. 陕西中医药大学第二临床医学院, 咸阳 712046; 3. 陕西省针灸药结合重点实验室, 咸阳 712046; 4. 咸阳市神经生物学(针灸)重点实验室, 咸阳 712046]

【摘要】 目的 观察电针干预对帕金森病(PD)小鼠大脑黑质组织中酪氨酸羟化酶(TH)、谷胱甘肽过氧化物酶(Gpx-1)以及氧化应激因子超氧化物歧化酶(SOD)蛋白表达的影响,探讨针刺干预改善帕金森病的作用机制。方法 采用随机数字表法将 40 只健康雄性昆明小鼠分为空白组、帕金森模型(PD)组、针刺组、左旋多巴组,每组 10 只;除空白组外,其余 3 组均采用 MPTP 诱导制作小鼠 PD 模型,造模 2 周后随机选取两组进行电针及西药干预。干预结束后先采用步长实验和游泳实验对各组小鼠进行行为学评价,再采用 Western blot 法检测小鼠脑黑质组织 SOD-2、Gpx-1 和 TH 表达,免疫组化法检测 TH 蛋白的表达。结果 与空白组比较,PD 组小鼠步长距离、游泳时间显著缩短($P < 0.05$);与 PD 组比较,针刺组和左旋多巴组小鼠的步长距离和游泳时间加长($P < 0.05$)。与空白组小鼠比较,PD 组小鼠黑质中 TH 的蛋白量显著减少($P < 0.05$);与 PD 组比较,针刺组小鼠黑质中 TH 蛋白量显著增高($P < 0.05$),左旋多巴组小鼠黑质中 TH 蛋白量无明显变化($P > 0.05$)。与空白组比较,PD 组小鼠脑黑质中 SOD-2 和 Gpx-1 的表达均显著降低($P < 0.05$);与 PD 组比较,针刺组和左旋多巴组 SOD-2 和 Gpx-1 的表达水平显著升高($P < 0.05$)。结论 电针干预能提高帕金森模型小鼠的运动功能,其治疗机制可能是通过降低脑黑质中氧化应激蛋白表达实现。

【关键词】 电针;帕金森病;酪氨酸羟化酶;谷胱甘肽过氧化物酶;超氧化物歧化酶;小鼠

【中图分类号】 R2-03 **【文献标志码】** A

DOI:10.13460/j.issn.1005-0957.2021.13.2010

Effects of Electroacupuncture Intervention on the Expression of Tyrosine Hydroxylase and Oxidative Stress Factor in Substantia Nigra of Parkinson's Disease Model Mice ZHAO Yingqian¹, KANG Kaiwen^{2,3,4}, LIU Qi¹, MA Xue¹, LI Jie¹, LU Gang¹, WANG Qiang^{1,3,4}. 1.School of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2.The Second Clinical Medical School of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 3.Shaanxi Provincial Key Laboratory of Acupuncture Combined with Medication, Xianyang 712046, China; 4.Xianyang Key Laboratory of Neurobiology (Acupuncture-moxibustion), Xianyang 712046, China

[Abstract] **Objective** To observe the effects of electroacupuncture intervention on the protein expression of tyrosine hydroxylase (TH), glutathione peroxidase (Gpx-1), and oxidative stress factor superoxide dismutase (SOD) in the substantia nigra tissue of Parkinson's disease (PD) mice. **Method** Forty healthy male Kunming mice were divided using the random number table method into a blank group, a PD group, an acupuncture group, and a Levodopa group,

基金项目:陕西省陕西省自然科学基金面上项目(2017JM8108);陕西省自然科学基金基础研究计划(2020JM-594);国家自然科学基金项目(81674086)

作者简介:赵颖倩(1983—),女,讲师,博士,Emial:zhaoyingqian@sntcm.edu.cn

通信作者:王强(1980—),男,副教授,博士,Emial:1107683030@qq.com

with 10 mice in each group. Except for the blank group, the other three groups received 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to induce PD mouse models. Two weeks after the modeling, two groups were randomly selected to receive electroacupuncture and Western medication intervention, respectively. After the intervention, step length and swimming tests were adopted for behavioral assessment for each group. Western blot was used to detect the expression of SOD-2, Gpx-1, and TH in the substantia nigra of mice, and immunohistochemistry was used to detect the protein expression of TH. **Result** Compared with the blank group, the step length and swimming duration were significantly reduced in the PD group ($P < 0.05$). Compared with the PD group, the step length and swimming duration were increased in the acupuncture and Levodopa groups ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the protein expression of TH in mice's substantia nigra was significantly reduced in the PD group ($P < 0.05$). Compared with the PD group, the TH protein expression in mice's substantia nigra was markedly increased in the acupuncture group ($P < 0.05$), but the difference in the Levodopa group was statistically insignificant ($P > 0.05$). Compared with the blank group, the expression levels of SOD-2 and Gpx-1 dropped notably in the substantia nigra of mice in the PD group ($P < 0.05$). Compared with the PD group, the expression levels of SOD-2 and Gpx-1 increased significantly in the substantia nigra of mice in both acupuncture and Levodopa groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture intervention can enhance the motor function of PD model mice, and the treatment mechanism may be associated with the down-regulation of the expression of oxidative stress protein in the substantia nigra.

[Key words] Electroacupuncture; Parkinson's disease; Tyrosine hydroxylase; Glutathione peroxidase; Superoxide dismutase; Mice

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是发病率仅次于阿尔茨海默病的神经系统退行性疾病^[1]。PD多好发于中老年人,临床常根据患者运动体征的改变如静止性震颤、运动迟缓、肌肉僵硬和体态不稳来诊断及针对治疗。其主要病理学特点为中脑黑质致密部多巴胺能神经元选择性变性及缺失,残存神经元中出现以 α -突触核蛋白为主要成分的路易小体^[2],导致纹状体多巴胺耗竭,丘脑功能增强以及皮质运动区的兴奋性传入减少,从而使患者出现运动功能障碍。PD的发病与遗传、环境、免疫、氧化应激等多种因素综合作用有关,氧化应激在其中起着至关重要的作用^[3],但其具体的发病机制尚未明确^[4]。PD在世界范围内影响着近500万人的身体健康,预计2040年全球PD患者人数将增加4倍^[5]。因此,寻找PD相关致病因素,为治疗及预防提供新的策略和靶点已经迫在眉睫。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)小鼠模型是目前应用最广泛的PD模型,研究已证实MPTP小鼠模型在症状及病理学方面均符合临床PD的特征,是一种较理想的PD模型^[6]。

本实验拟通过MPTP皮下缓释构建小鼠PD模型,观察早期电针干预对PD模型小鼠运动障碍改善、小鼠

脑黑质组织中酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)、氧化应激因子超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)-2和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, Gpx-1)蛋白表达的影响,证明“嗅三针”可以通过抑制PD小鼠的氧化应激反应,达到改善PD模型小鼠运动功能障碍的目的。

1 材料与方法

1.1 实验动物与方法

选取40只10周龄清洁级雄性昆明小鼠作为研究对象,体质量(18 ± 5)g,实验使用许可证号为SYXK(陕)2018-001。根据随机数字表法随机分为空白组、PD组、针刺组和左旋多巴组,每组10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)2020-001。环境温度为 $20 \sim 24$ °C,湿度为40%~70%,12 h明暗交替,适应性喂养1周。对动物的处理遵循《关于善待实验动物的指导意见》^[7]。

1.2 主要试剂与仪器

山羊抗鼠SOD2抗体(ab118340,英国Abcam);山羊抗小鼠Gpx-1抗体(PAB7049, Abnova);山羊抗小鼠TH抗体(ab75875, Abcam);山羊抗兔IgG H&L(HRP)抗体(ab3816,英国Abcam);抗生物素蛋白生物素化辣根过

氧化物酶复合物(ZY131095, 泽叶生物);小鼠 TH 免疫组化试剂盒(ab137869, 英国 Abcam);Braford 蛋白浓度测定盒(批号 V900144, biosharp);SDS-PAGE 凝胶制备盒(批号 V900483, biosharp);左旋多巴(72816, 美国 SIGMA);MPTP(M0896, 美国 Sigma)。高速冷冻离心机(美国贝克曼);组织切片机(德国莱卡);SDZ-II 型电针仪(苏州医疗用品厂有限公司);酶标仪(美国 Bio-Rad);Image Pro Plus 6.0 图像分析系统(美国 Media Cybernetics);蛋白电泳转膜系统(美国 Bio-Rad)。

1.3 模型制备

PD 模型^[8]采用清洁级成年昆明小鼠,吸入式麻醉机麻醉小鼠(异氟醚溶液诱导浓度 4%,维持浓度 1.5%),手术过程中持续麻醉。小鼠后背部皮下 0.5 cm 左右做横切口,钝性分离皮肤与肌肉,手术植入注满 MPTP 溶液的胶囊渗透压泵,向泵内注射 200 μ L 的 MPTP 溶液,MPTP 含量为 0.5 mg,缓释速度 7 μ L/d,总时长 4 周;空白组小鼠予以同样处理,泵内注射 200 μ L 生理盐水溶液^[9]。小鼠出现震颤、立毛、倦怠及运动测试障碍证明造模成功^[10]。

1.4 干预方法

1.4.1 空白组

仅同步抓取,无其他干预。

1.4.2 PD 组

仅植入注满 MPTP 胶囊渗透压泵,之后不进行任何干预。

1.4.3 针刺组

于造模 2 周后开始采用针刺干预。参照《实验针灸学》^[11]进行穴位定位,取神庭和双侧天枢、上巨虚穴。神庭位于前正中线,额顶骨缝交界线前方;上巨虚穴位于小鼠胫骨外侧,偏下方 6 mm,直刺 3~4 mm;天枢穴位于小鼠前正中线旁开 5 mm,耻骨联合以上 20 mm,直刺 2~3 mm。正极接天枢穴,负极分别接神庭穴 10 min,上巨虚穴 10 min,刺激参数为疏密波,频率为 2~15 Hz,强度为 1 mA,以小鼠肢体轻微震颤为度。每日干预 20 min,1 个疗程为 5 d,后休息 2 d,共治疗 6 个疗程。

1.4.4 左旋多巴组

应用西药左旋多巴,以每日 3 mg/kg 的剂量,对 PD 模型小鼠于造模 2 周后进行灌胃。每日 1 次,治疗 5 d 为 1 个疗程,休息 2 d,共治疗 6 个疗程。

1.5 指标检测

1.5.1 行为学检测

电针干预 6 个疗程结束后第 1 天进行行为学检测,包括步长实验和游泳实验。步长实验具体为,设置泡沫板通道,在通道的底部固定等尺寸的胶水白纸,在实验前对全部的小鼠进行适当的训练,确定出步长,将小鼠后趾使用墨汁染黑后等待其穿过通道,最后测算同侧脚印间距的平均值^[12]。游泳实验具体为,小鼠禁食 12 h 后称重,在小鼠尾部悬挂约为其体质量 10%的保险丝,后将小鼠放入水箱,自投入水内开始,用秒表计算鼻孔下沉水面所需时间,水温 27 $^{\circ}$ C 左右,测定其游泳时间。行为学测试结束后进行心脏灌注取材^[13]。

1.5.2 免疫组化法检测黑质区 TH 表达

用 4%的水合氯醛溶液(每 10 g 体质量注射 0.1 mL)腹腔注射麻醉,麻醉小鼠后,用生理盐水和 4%多聚甲醛溶液经左心室快速灌注固定脑组织,根据小鼠脑立体定位图谱,切除前囟后,于 3~4 mm 的冠状切面,采用脑模具截取黑质部分。制作切片后 BSA 封闭,一抗孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜后 PBS 冲洗,滴加二抗孵育,PBS 冲洗后 DAB 溶液显色并观察。200 倍视野下,每张切片选取 3~4 个视野,Image Pro-Plus 分析并计算 TH 阳性细胞数,阳性细胞为细胞浆染成棕褐色。

1.5.3 Western blot 法检测黑质区 TH、SOD-2 和 Gpx-1 蛋白表达

小鼠脑黑质组织中加入 RIPA 裂解液进行冰上研磨、裂解、离心(15 min)后,然后用考马斯蓝法测定蛋白浓度,继而进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后用 5%脱脂奶粉封闭液孵育 1 h。于 4 $^{\circ}$ C 冰箱分别置于 TH、SOD-2、Gpx-1 和 GAPDH(均为 1:5 000)一抗中孵育过夜、洗膜后,使用相应二抗(1:2 000)避光室温孵育 1 h 后洗膜后,发光显影。结果用 BandsScan5.0 软件进行扫描,分析 TH、SOD-2、Gpx-1 及内参 GAPDH 的灰度值。

1.6 统计学方法

所以数据采用 SPSS22.0 统计学软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料用均数 \pm 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 4组造模后行为学测试结果比较

与空白组比较,PD组小鼠步长距离减少,游泳时间缩短,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与PD组比较,针刺组小鼠的步长距离显著加长,游泳时间有显著延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与PD组比较,左旋多巴组小鼠的步长和游泳时间也有显著提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表1。

2.2 4组小鼠中脑黑质中 SOD-2、Gpx-1 表达比较

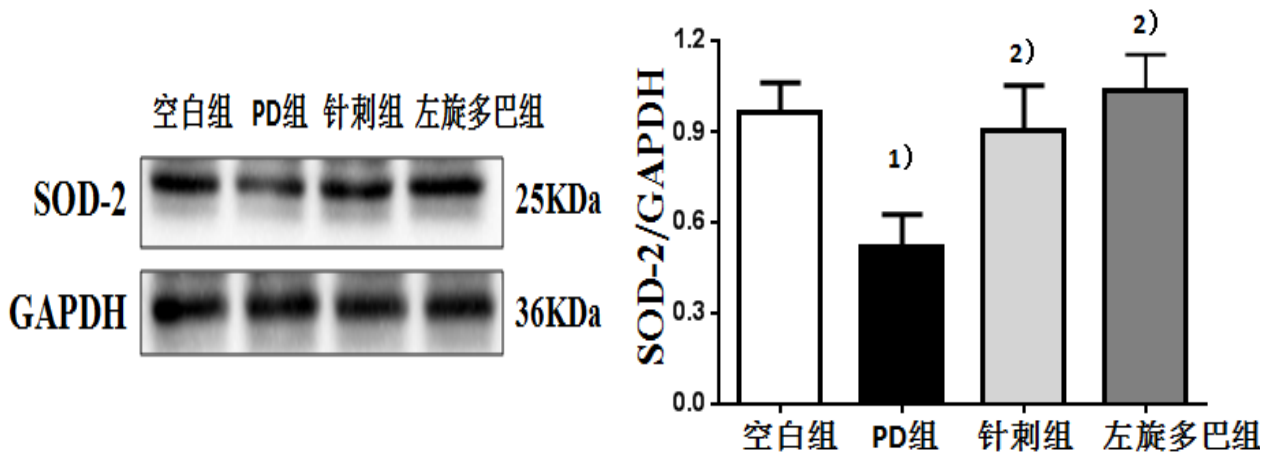
与空白组比较,PD组小鼠黑质中 SOD-2 和 Gpx-1 的蛋白表达量显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

与PD组比较,针刺组黑质中 SOD-2 和 Gpx-1 表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与PD组比较,左旋多巴组的 SOD-2 和 Gpx-1 表达也显著提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见图1、图2。

表1 4组造模后行为学测试结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

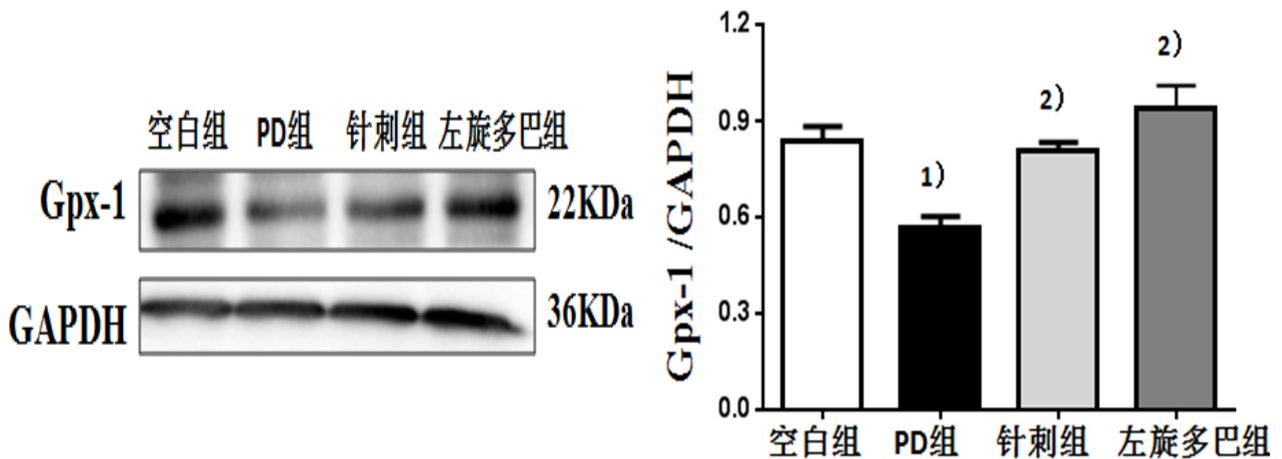
组别	n	步长距离(cm)	游泳时间(min)
空白组	10	8.89±1.12	4.85±0.99
PD组	10	4.23±1.38 ¹⁾	1.81±1.08 ¹⁾
针刺组	10	6.51±1.01 ²⁾	3.14±1.21 ²⁾
左旋多巴组	10	7.32±1.22 ²⁾	3.26±1.51 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与PD组比较²⁾ $P < 0.05$



注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与PD组比较²⁾ $P < 0.05$

图1 4组小鼠黑质 SOD-2 蛋白的表达及条带图



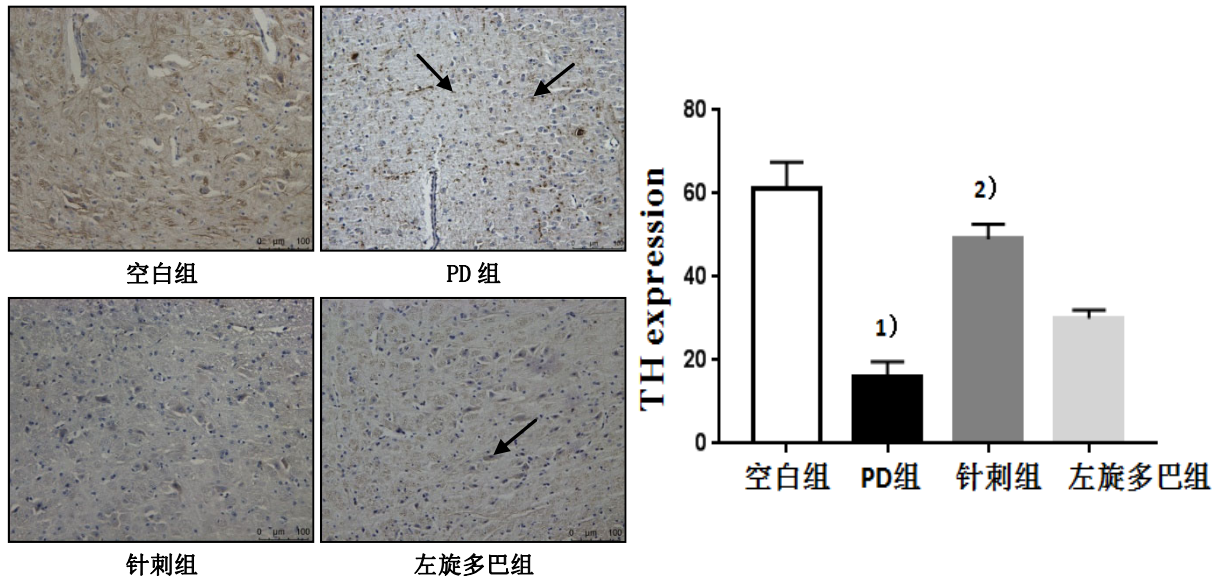
注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与PD组比较²⁾ $P < 0.05$

图2 4组小鼠黑质 Gpx-1 蛋白的表达及条带图

2.3 4组小鼠中脑黑质中 TH 表达比较

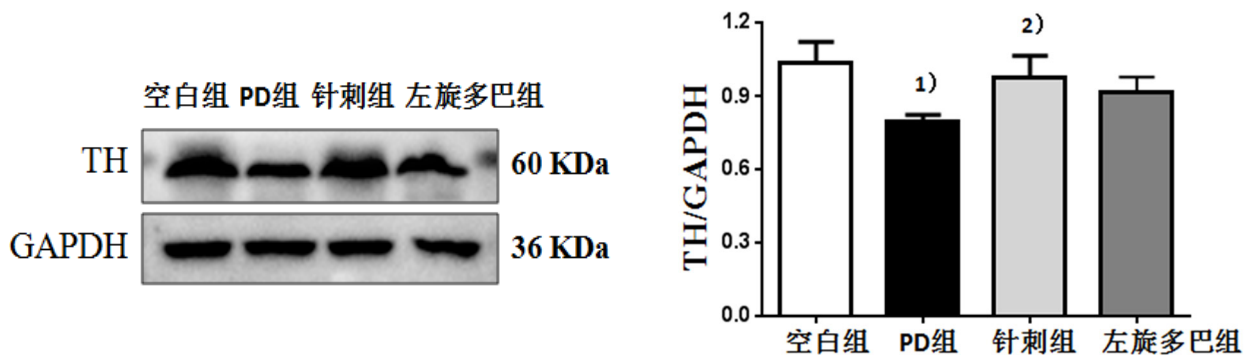
与空白组比较,PD组小鼠黑质中 TH 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与PD组比较,针

刺组黑质中 TH 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与PD组比较,左旋多巴组 TH 表达无显著性变化($P > 0.05$),详见图3、图4。



注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与PD组比较²⁾ $P < 0.05$;黑色箭头示阳性细胞

图3 4组小鼠黑质中TH蛋白免疫组化结果(×200倍)



注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与PD组比较²⁾ $P < 0.05$

图4 4组小鼠黑质中TH蛋白表达及条带图

3 讨论

随着我国进入人口老龄化阶段,老年病之一的帕金森病(PD)患者人群数量逐渐庞大,目前临床主要采用多巴胺类药物进行治疗,但长期使用所致的副作用使患者备受困扰,所以探求发病原因以及寻找新的治疗方式逐渐成为重要的研究方向。PD的主要病理改变为多巴胺(dopamine, DA)能神经元变性、丢失及路易小体(lewy body, LB)的形成,氧化应激、线粒体功能障碍、炎症及机体免疫反应参与其中。钙超载、多巴胺代谢失衡、谷胱甘肽等还原剂水平降低等诸多因素均会导致体内的氧化与抗氧化系统失衡^[14]。氧化反应过程中线粒体中的超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(glutathione, rglutamyl cysteinyl glycine, GSH)可催化活性氧生成二价氧和水,避免细胞损伤^[15]。在许多PD病例中,氧化应激被认为是导致细胞功能障碍和死亡的潜在机制^[16]。PD患者尸检结果表明,其黑质内

8-羟基鸟苷、蛋白质羰基等氧化标志物显著高于其他脑区,表明黑质细胞遭受氧化应激损伤^[17]。在帕金森病中,线粒体功能障碍可能提高发病率,黑质DA神经元更容易发生氧化应激反应,继而导致线粒体DNA突变几率增高,最终会形成不断的恶性循环,导致帕金森病情加重^[18]。本次实验的结果表明,针刺组与PD组相比,针刺组黑质中SOD-2和Gpx-1表达升高,针刺组小鼠的抗氧化能力显著升高,这为其治疗帕金森病提供理论依据。

氧化应激也促进致病蛋白质的聚集,干扰细胞自噬,导致年龄和疾病相关蛋白酶体功能障碍^[19]。在线粒体基因组突变、氧化应激,毒素刺激等因素下,线粒体产生功能失调,这是PD发病关键环节。经典PD模型制备,正是抑制了线粒体复合体I功能导致神经元损伤^[20]。线粒体复合体I被抑制后,不仅影响ATP生成,也导致活性氧(reactive oxygenspecies, ROS)生成

增加,损伤 mtRNA, ATP 合成不足也会导致门冬氨酸及谷氨酸等兴奋性递质增加,对神经元产生毒性^[21]。A β 寡聚体也可干扰线粒体与内质网的钙离子交换,抑制受损线粒体自噬^[22-23]。随着机体的衰老,氧化应激及细胞凋亡增加,产生大量 ROS,线粒体 DNA 损伤加剧,因此年龄是影响 PD 发病最大风险因素^[24]。

黑质中的酪氨酸羟化酶(TH)表达近年来被认为与 PD 发病具有相关性,有报道针灸疗法可以提高脑黑质 TH 的表达^[25],本次实验结果表明,MPTP 诱导的 PD 模型小鼠 TH 含量减少,针刺干预可以提高 TH 的表达,推测可能是通过增加 TH 的表达而提高了多巴胺的合成能力,进而达到改善模型小鼠运动能力的目的。

1-甲基-4-苯基-吡啶离子(1-methyl-4-phenyl pyridinium, MPP⁺)是 MPTP 的活性代谢产物,有研究证明,它同 MPTP 一样,对多巴胺能神经元具有损伤作用^[26],其不仅会促使 DA 异常释放,还会导致细胞一系列的氧化应激反应^[27]。近来 MPTP 与胶质细胞活化以及 DA 神经元损伤之间的关系也引起了广泛的关注^[28],其次通过神经行为学实验评价,证明 MPTP 诱导完全可以模拟 PD 患者的运动障碍^[29]。本实验采用缓释模型,总时长 4 周,与腹腔注射急性模型比较,慢性模型更好地模拟了 PD 的病理学特征^[30]。本实验选用游泳实验及步长实验,分别从步态及运动耐力两个角度评价其运动功能。针刺组小鼠的步长距离、游泳时间与 PD 组比较显著加长,针刺干预改善小鼠 PD 典型运动症状。

PD 属于中医学“颤证”“震颤”“痉证”的范畴,早在《素问·至真要大论》中就诸如“诸风掉眩,皆属于肝”“诸痉项强,皆属于湿”等记载^[31]。基于“脑病治肠”理论,在前期研究中发现针刺由、神庭和双侧天枢、上巨虚五穴对 PD 及其以早期便秘为主的非运动症状均有较好的改善作用^[32]。其中神庭为督脉穴,为与足阳明胃经之交会穴,“病变在脑,首取督脉”,其功效是开窍通络止颤;足阳明胃经穴位上巨虚是大肠的下合穴,“邪在腑,取之合”^[33],“合治内腑”,具有调节胃肠功能的作用。天枢穴为大肠募穴,是人体上下气机交汇之处,升清降浊之枢纽,能够通大肠和通肺气,配合上巨虚共同发挥调节胃肠功能作用。以上诸穴合用,“上下同调”可开窍、止颤,通调气机、合胃通腑^[34-35]。本实验结果显示,早期电针干预可抑制 PD 小鼠氧化因子表达,增强机体抗氧化作用,缓解 PD 运动功能障碍,为治疗 PD 提供了新的治疗靶向。

参考文献

- [1] KALIA L V, LANG A E. Parkinson's disease[J]. *Lancet*, 2015, 386(9996):896-912.
- [2] ONO K. The oligomer hypothesis in α -synucleinopathy[J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(12):3362-3371.
- [3] MONZANI E, NICOLIS S, DELL'ACQUA S, et al. Dopamine, oxidative stress and protein-quinone modifications in Parkinson's and other neurodegenerative diseases[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(20):6512-6527.
- [4] GOLDMAN S M. Environmental toxins and Parkinson's disease[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2014, 54:141-164.
- [5] DORSEY E R, SHERER T, OKUN M S, et al. The emerging evidence of the Parkinson pandemic[J]. *J Parkinsons Dis*, 2018, 8(s1):S3-S8.
- [6] ABUSHOUK A I, NEGIDA A, AHMED H, et al. Neuroprotective mechanisms of plant extracts against MPTP induced neurotoxicity: Future applications in Parkinson's disease[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85:635-645.
- [7] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导意见 [EB/OL]. (2006-9-30) [2020-08-17]. http://www.most.gov.cn/xxgk/xinxifenlei/fdzdgnr/fgzcg/fxwj/gfxwj2010before/201712/t20171222_137025.html.
- [8] HU M, LI F, WANG W. Vitexin protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease through PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12:565-573.
- [9] 董志勇. 胶囊渗透压泵控释 IGFBRP1 对小鼠肝肺组织的影响[D]. 太原:山西医科大学, 2011.
- [10] JANG Y, KWON I, SONG W, et al. Modulation of mitochondrial phenotypes by endurance exercise contributes to neuroprotection against a MPTP-induced animal model of PD[J]. *Life Sci*, 2018, 209:455-465.
- [11] 李忠仁. 实验针灸学[J]. 北京:中国中医药出版社, 2003:360-361.
- [12] HSIEH T H, CHEN J J, CHEN L H, et al. Time-course gait analysis of hemiparkinsonian rats following 6-hydroxydopamine lesion[J]. *Behav Brain Res*, 2011,

- 222 (1) : 1-9.
- [13] LEE H Y, HSIEH T H, LIANG J I, *et al.* Quantitative video-based gait pattern analysis for hemiparkinsonian rats[J]. *Med Biol Eng Comput*, 2012, 50 (9) : 937-946.
- [14] SANTAELLA A, KUIPERIJ H B, VAN RUMUND A, *et al.* Inflammation biomarker discovery in Parkinson's disease and atypical parkinsonisms[J]. *BMC Neurol*, 2020, 20(1) : 26.
- [15] ROCHA N P, DE MIRANDA A S, TEIXEIRA A L. Insights into neuroinflammation in Parkinson's disease: From biomarkers to anti-inflammatory based therapies[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015:628192.
- [16] STEPHENSON J, NUTMA E, VAN DER VALK P, *et al.* Inflammation in CNS neurodegenerative diseases[J]. *Immunology*, 2018, 154(2) : 204-219.
- [17] RAZA C, ANJUM R, SHAKEEL NUA. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies[J]. *Life Sci*, 2019, 226:77-90.
- [18] PAJARES M, I ROJO A, MANDA G, *et al.* Inflammation in Parkinson's disease: Mechanisms and therapeutic implications[J]. *Cells*, 2020, 9 (7) : 1687.
- [19] HÖHN A, WEBER D, JUNG T, *et al.* Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence[J]. *Redox Biol*, 2017, 11:482-501.
- [20] DE VIRGILIO A, GRECO A, FABBRINI G, *et al.* Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation[J]. *Autoimmun Rev*, 2016, 15 (10) : 1005-1011.
- [21] GÓMEZ-SUAGA P, BRAVO-SAN PEDRO J M, GONZÁLEZ-POLO R A, *et al.* ER-mitochondria signaling in Parkinson's disease[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3) : 337.
- [22] SHAMOTO-NAGAI M, HISAKA S, NAOI M, *et al.* Modification of α -synuclein by lipid peroxidation products derived from polyunsaturated fatty acids promotes toxic oligomerization: its relevance to Parkinson disease[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2018, 62 (3) : 207-212.
- [23] SEN A, KALVAKURI S, BODMER R, *et al.* Clueless, a protein required for mitochondrial function, interacts with the PINK1-Parkin complex in *Drosophila*[J]. *Dis Model Mech*, 2015, 8(6) : 577-589.
- [24] RODRIGUEZ M, RODRIGUEZ-SABATE C, MORALES I, *et al.* Parkinson's disease as a result of aging[J]. *Aging Cell*, 2015, 14 (3) : 293-308.
- [25] HILL-BURNS E M, DEBELIUS J W, MORTON J T, *et al.* Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome[J]. *Mov Disord*, 2017, 32 (5) : 739-749.
- [26] TRAVAGLI R A, BROWNING K N, CAMILLERI M. Parkinson disease and the gut: new insights into pathogenesis and clinical relevance[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17 (11) : 673-685.
- [27] LEE E, HWANG I, PARK S, *et al.* MPTP-driven NLRP3 inflammasome activation in microglia plays a central role in dopaminergic neurodegeneration[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26 (2) : 213-228.
- [28] CHO H, KANG K. Effects of environmental enrichment on neurotrophins in an MPTP-induced Parkinson's disease animal model: A randomized trial[J]. *Biol Res Nurs*, 2020, 22 (4) : 506-513.
- [29] GENG J, LIU W, GAO J, *et al.* Andrographolide alleviates Parkinsonism in MPTP-PD mice via targeting mitochondrial fission mediated by dynamin-related protein 1[J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176 (23) : 4574-4591.
- [30] HU Z L, SUN T, LU M, *et al.* Kir6.1/K-ATP channel on astrocytes protects against dopaminergic neurodegeneration in the MPTP mouse model of Parkinson's disease via promoting mitophagy[J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 81 : 509-522.
- [31] 王冰. 黄帝内经素问[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1963: 510-515.
- [32] 王渊, 刘智斌, 牛文民, 等. 电针不同穴组对功能性便秘大鼠结肠 c-kit 蛋白及 c-kit mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(11) : 3897-3900.
- [33] 黄帝八十一难经[M]. 北京: 学苑出版社, 2007: 150-163.
- [34] 沈利荣, 王弘东, 沈丽萍, 等. 针灸联合麻仁软胶囊治疗中晚期帕金森病便秘疗效观察[J]. 上海针灸杂志, 2018, 37(12) : 1381-1385.
- [35] 杨戈. 中药穴位贴敷治疗帕金森病便秘的疗效评价[J]. 中国处方药, 2017, 15(1) : 94-95.