

冯胜蓝,孙晓东,谢丽霞,等. 白藜芦醇改善 α -突触核蛋白 A53T 转基因小鼠运动功能障碍和调节外周免疫的作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 646-654.

Feng SL, Sun XD, Xie LX, et al. Effect of resveratrol on motor dysfunction and peripheral immunity in α -synuclein A53T mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 646-654.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.007

白藜芦醇改善 α -突触核蛋白 A53T 转基因小鼠运动功能障碍和调节外周免疫的作用研究

冯胜蓝^{1,2,3}, 孙晓东^{1,2,3}, 谢丽霞^{1,2,3}, 叶俊杰^{1,2,3}, 覃冰清^{1,2,3}, 许倩倩^{1,2,3},
杜凯丽^{1,2}, 王敏^{1,2}, 桑明^{1,2,3*}

(1. 湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院转化医学中心, 湖北 襄阳 441000; 2. 湖北省帕金森病临床医学研究中心, 湖北 襄阳 441000; 3. 武当特色中药研究湖北省重点实验室, 湖北 十堰 442000)

【摘要】 目的 研究白藜芦醇(resveratrol, RES)对 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -Syn) A53T 转基因小鼠运动功能障碍及外周免疫的影响。**方法** 选取8月龄的A53T转基因小鼠,随机分成4组:对照组(WT)、对照治疗组(WT + RES)、模型组(PD)、模型治疗组(PD + RES)。治疗组每3 d灌胃RES,用药3个月;对照组和模型组给予等量生理盐水。通过爬杆实验、转棒实验、前脚抓力实验、四肢抱紧实验检测各组小鼠运动水平。流式细胞仪检测小鼠T淋巴细胞亚群,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠血清中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-18(IL-18)以及转化生长因子- β (TGF- β)的水平。**结果** 与对照组相比,模型组运动功能评分均较低;与模型组相比,模型治疗组运动功能评价显著改善。流式结果显示,与对照组比,模型组小鼠外周T细胞占比、CD4⁺T细胞占比、CD4⁺/CD8⁺比值均降低,CD8⁺T细胞占比无统计学意义。与模型组相比,模型治疗组T淋巴细胞占比和CD4⁺T细胞占比均显著升高,有统计学意义,CD4⁺/CD8⁺比值也升高,但差异无统计学意义。外周血血清ELISA结果显示,与对照组相比,模型组小鼠IL-6、IL-18均升高,TGF- β 降低,TNF- α 浓度无统计学差异。与模型组相比,模型治疗组IL-6、IL-18浓度显著下降,TGF- β 有所上升,结果无统计学意义。**结论** RES通过调节小鼠外周免疫,减少神经炎症反应,从而显著改善A53T转基因小鼠的运动功能障碍。

【关键词】 白藜芦醇; α -突触核蛋白 A53T 转基因小鼠;帕金森病;运动功能障碍;外周T淋巴细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)05-0646-09

Effect of resveratrol on motor dysfunction and peripheral immunity in α -synuclein A53T mice

FENG Shenglan^{1,2,3}, SUN Xiaodong^{1,2,3}, XIE Lixia^{1,2,3}, YE Junjie^{1,2,3}, QIN Bingqing^{1,2,3}, XU Qianqian^{1,2,3}, DU Kaili^{1,2},
WANG Min^{1,2}, SANG Ming^{1,2,3*}

(1. Center for Translational Medicine at Xiangyang No. 1 People's Hospital, Hubei University of Medicine, Xiangyang 441000, China. 2. Hubei Clinical Research Center of Parkinson's Disease, Xiangyang 441000, 3. Hubei Key laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Shiyan 442000)

Corresponding author: SANG Ming. E-mail: smxd2000@126.com

【基金项目】 湖北省实验动物资源开发及利用项目(2020DFE025),湖北医药学院药护学院团队项目(2017YHKT02),襄阳市第一人民医院科技创新项目(XYY2021M07),湖北医药学院研究生科技创新项目(YC2022008, YC2022003)。

Funded by the Experimental Animal Resources Development and Utilization Project of Hubei Province of China (2020DFE025), the Innovative Team Project (2017YHKT02) from the Institute of Medicine and Nursing at Hubei University of Medicine, Innovative Research Program of Xiangyang No. 1 People's Hospital (XYY2021M07), Innovative Research Program for Graduates of Hubei University of Medicine (YC2022008, YC2022003).

【作者简介】 冯胜蓝(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:神经免疫。Email:1784485381@qq.com

【通信作者】 桑明(1978—),男,硕士研究生导师,博士,研究方向:神经免疫,病原微生物。Email:smxd2000@126.com

【Abstract】 Objective To illustrates the effect of resveratrol on motor dysfunction and peripheral immunity in α -synuclein A53T mice. **Methods** Eight-month-old A53T α -syn transgenic mice were randomly divided into four groups: model group (PD), model treatment group (PD + RES), control group (WT) and control treatment group (WT + RES). The treatment groups were given Resveratrol (RES) by gavage every 3 days for 11 months, while the control and model groups were given an equal volume of normal saline. The motoric function of the animals was analyzed with a forelimb grip strength test, Rotarod test, and Pole climbing test. The proportion of T lymphocyte subsets in different groups of mice was detected by flow cytometry. IL-6, TNF- α , IL-18 and TGF- β in each group were detected by an ELISA kit. **Results** the motor function scores in the PD group were worse than those in the WT group. Compared with the PD group, the motor function score of the PD + RES group was significantly improved. The flow cytometry result showed that compared with the WT group, the T lymphocyte ratio, CD4⁺T cell ratio, and CD4⁺/CD8⁺ ratio were less in the PD group, while the CD8⁺T cell ratio was not significantly different. After RES treatment, T lymphocytes, CD4⁺ cells, and the CD4⁺/CD8⁺ ratio were significantly greater in the PD + RES group than the PD group. The ELISA result showed that compared with the WT group, the IL-6 and IL-18 levels in the PD group were greater, the TGF- β level were less, and the TNF- α level showed no significant statistical difference. After RES treatment, compared with the PD group, the IL-6 and IL-18 levels in the PD + RES group were significantly less, while the TGF- β level was greater; however, the result showed no statistical difference. **Conclusions** Resveratrol can reduce motor disorders, regulate peripheral immune function, and effectively reduce neuroinflammation.

【Keywords】 resveratrol; α -synuclein (α -Syn) A53T transgenic mice; Parkinson's disease; motor dysfunction; peripheral T lymphocytes

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

帕金森病(Parkinson's disease, PD)也称为震颤麻痹(paralysis agitans),在中老年人群中多发,随着人口老龄化的不断加剧,PD的发病率不断升高^[1]。PD的主要病理特征为中脑黑质和纹状体处多巴胺(dopamine, DA)能神经元进行性丢失以及 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -Syn)的积累,临床上伴随典型运动迟缓、静止性震颤等运动功能障碍^[2]。有研究发现,PD患者的血清及脑脊液中促炎因子IL-6(interleukin-6)、IL-1 β 升高,抗炎因子IL-10降低,说明PD患者存在神经炎症反应^[3]。PD患者的外周血中CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞占比减少,说明PD患者存在免疫调节异常的现象^[4]。目前,PD的具体发病原因及机制尚不明确,缺乏有效的治疗方法^[5]。白藜芦醇(resveratrol, RES)是一种药食同源的天然多酚类化合物,具有抗炎、抗凋亡、抗氧化及神经保护等作用^[6]。同时,RES是沉默信息调节器1(silence information regulator 1, SIRT1)的变构激活剂,具有调控自噬作用^[7]。在PD患者中,SIRT1的酶活性降低,减弱了其抵抗神经毒素的能力,导致神经炎症发生^[8]。研究表明,RES在帕金森动物模型中具有神经保护作用^[9-11]。Pmp-SNCA-A53T转基因小鼠是过表达包含A53T突变的人源SNCA基因的PD模型小鼠,后代纯合子小鼠从8月龄开始

出现进行性运动障碍^[12-13]。该模型很好的模拟帕金森症发病情况,是研究PD发病机制较理想的小鼠模型。研究发现RES对该模型小鼠运动、认知功能和神经病理具有积极改善作用^[14-16]。RES的上述作用机制尚不明确,因此,本实验以RES灌胃治疗A53T转基因小鼠3个月,研究RES对该模型小鼠运动功能、T淋巴细胞亚群和外周炎症因子影响,为应用RES治疗PD提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

12只SPF级8月龄A53T转基因阳性小鼠及12只同窝转基因阴性小鼠,雄性,体重20~30g,本研究所用A53T转基因小鼠是武汉大学张振涛教授实验室【SCXK(鄂)2019-0004】赠予,在襄阳市第一人民医院转化医学中心动物实验室【SYXK(鄂)2022-0093】扩繁和饲养。昼夜各半循环照明,环境相对湿度40%~60%,温度控制范围20~24℃之内,日温差 $\leq 1^\circ\text{C}$,食物供给充足,按照实验动物使用原则(3R原则)给予人道主义关怀。本项目动物实验均通过襄阳市第一人民医院动物伦理委员会审批(2021DW008)。

1.1.2 主要试剂与仪器

白藜芦醇 (1602105-100MG, Sigma-Aldrich, 美国); IL-6 (MM-1011M2)、IL-18 (MM-0169M1)、TNF- α (MM-0132M2) 及 TGF- β (MM-45041M2) ELISA 试剂盒 (江苏酶免实业有限公司), 单抗试剂: APC-Cy7 anti-mouse, Percpcy 5.5 anti-mouse CD3e, FITC anti-mouse CD4, PE anti-mouse CD8a (BD, 美国), SYBR Green PCR Mix (Promega, 美国), 实验所用引物由湖北省武汉市金开瑞生物工程有限公司合成 (武汉), Phospho-alpha-Synuclein (S129) Antibody (PPS091, R&D SYSTEMS, 美国)。SpectraMax i3x 酶标仪 (Molecular Devices, 美国); ABI 7500 PCR 仪 (Life technology, 美国); BD FACS AriaII 流式细胞分析仪 (BD, 美国); XR501 型大小鼠抓力测定仪 (上海欣软信息科技有限公司); XR-6C 型小鼠转棒疲劳仪 (上海欣软信息科技有限公司); 自备一根直径 1 cm、长度 50 cm 的表面粗糙的木杆。

1.2 方法

1.2.1 实验设计

8 月龄 SPF 级 A53T 转基因阳性小鼠 12 只, 随机分成两组, 模型组 (PD), 模型治疗组 (PD + RES); 选取同窝转基因阴性小鼠 12 只, 随机分成两组, 对照组 (WT), 对照治疗组 (WT + RES), 给药组每 3 d 灌胃 1 次 RES (30 mg/kg), 至 11 月龄; 对照组和模型组每 3 d 灌胃等容积生理盐水。在治疗 4 个时间点 (0、1、2、3 月) 进行运动行为学测试, 治疗终点取小鼠外周血进行 T 淋巴细胞亚群和血清炎症因子检测。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测 SNCA 基因表达

剪小鼠尾尖组织, 提取小鼠组织 DNA。按 SYBR Green 试剂盒说明进行扩增, PCR 体系为 20 μ L, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。每个样品设 3 个复孔, 引物序列见表 1。转基因阳

性小鼠的基因型是通过使用适当的内源参照基因片段, 将每个未知样本的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值与已知的纯合子和杂合子对照进行比较确定的。计算方法如下, 将样本差异以内参基因均一化, $\Delta C_t = C_{t_{目的基因}} - C_{t_{内参基因}}$; 然后, 将待测样本与对照样本比较得出 $\Delta\Delta C_t$, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{处理样本}} - \Delta C_{t_{对照样本}}$; 利用公式计算获得待测样本的 RQ 值 (倍数变化) = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.2.3 免疫组化检测 P- α -Syn (S129) 蛋白在小鼠中脑组织中的表达

取小鼠中脑组织, 4% 的多聚甲醛固定、石蜡包埋, 5 μ m 连续切片。采用免疫组织化学方法检测中脑组织中 P- α -Syn 蛋白的表达。阳性染色为棕黄色。首先选择在低倍镜观察整个组织切片, 圈定 4 个细胞染色清晰、组织结构良好的区域视野, 最后选择高倍镜观察。

1.2.4 小鼠行为学测试

(1) 爬杆实验: 记录小鼠从爬杆顶部爬至杆底的时长, 每只小鼠重复 3 次, 取平均值。(2) 转棒实验: 将小鼠置于恒定转速 (30 r/min, 以正常小鼠 3 min 内掉下为标准) 的转棒仪上, 记录小鼠掉落时所转的总路程, 每只小鼠重复 3 次, 取平均值。(3) 抓力实验: 依次将小鼠放于抓力测试仪上, 抓住鼠尾, 当小鼠前爪在仪器抓杆上抓牢后, 以匀速匀力向后拉, 待小鼠松爪, 记录小鼠前爪最大拉力, 每只小鼠重复 3 次, 取平均值。(4) 下肢抱紧实验: 尾根部悬吊小鼠并坚持 15 s 后, 根据后肢抱紧的严重程度进行评分, 进行评分从 0 到 3 计算: 0 = 后肢远离腹部, 向外张开; 1 = 观察期间一侧下肢部分向腹部内缩回至少 50%; 2 = 在观察期双下肢部分向腹部内缩回至少 50%; 3 = 观察期间两后肢完全向腹部内缩少于 50%。评分为 0.5 分属正常数值, 在连续 3 d 的 3 个独立实验后, 取平均值。

1.2.5 外周血 T 淋巴细胞及其亚群检测

采用多色抗小鼠单克隆抗体 (mAbs) 联合试剂 APC-Cy7 anti-mouse CD45, Percpcy 5.5 anti-mouse CD3, FITC anti-mouse CD4, PE anti-mouse CD8 和匹配的同型对照, 在灌胃 RES 治疗 3 个月后, 取血至 EDTA 抗凝小管中, 进行抗体染色, PBS 清洗两次后, 进行流式细胞术检测, 计数 1×10^5 个细胞。所有样本均采用 BD FACS Aria II 流式细胞仪进行检测, 应用 Flow J 软件对检测结果进行分析。

1.2.6 外周血血清炎症因子检测

取外周血后, 分离血清, -20 $^{\circ}$ C 保存, 测定前复

表 1 引物列表

Table 1 List of primers

基因名称 Gene name	引物类型 Primer type	序列 (5' $\rightarrow$ 3') Sequence (5' $\rightarrow$ 3')
内参基因 Internal positive control	上游 Forward	CACGTGGGCTCCAGCATT
	下游 Reverse	TCACCAGTCATTCTGCCTTTG
突触核蛋白基因 SNCA	上游 Forward	TGACGGGTGTGACAGCAGTAG
	下游 Reverse	CAGTGGCTGCTGCAATG

融,混匀,2000 r/min 转速离心 20 min,取上清后按 ELISA 试剂盒说明书进行操作。检测 IL-6、IL-18、TNF- α 及 TGF- β 表达。

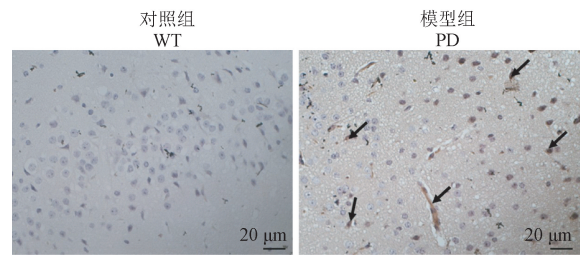
1.3 统计学分析

应用 SPSS 24.0 统计学软件对数据进行统计学分析并整理,连续变量用均值表示,计量资料采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 帕金森病 A53T 转基因小鼠鉴定

荧光定量 PCR 检测 A53T 转基因阳性小鼠的 SNCA 基因鉴定结果如表 2 所示;免疫组化检测小鼠中脑中 P- α -Syn(S129)蛋白的表达,结果与对照组相比,A53T 小鼠的 P- α -Syn 蛋白表达显著增多(图 1),表明本实验所用小鼠基因型正确符合要求。



注:免疫组化法检测 P- α -Syn 蛋白在中脑组织中的表达。

图 1 A53T 转基因小鼠鉴定

Note. The protein levels of P- α -Syn in midbrain tissue was detected using immunohistochemical.

Figure 1 Identification of α -synuclein A53T mice

2.2 RES 对 A53T 转基因小鼠运动功能障碍的影响

RES 治疗 3 个月后,与模型组相比,模型治疗组小鼠爬杆总时长显著缩短($P < 0.01$)(图 2A)。与对照组相比,模型组小鼠前脚抓力显著较小($P < 0.05$),RES 治疗后,与模型组相比,模型治疗组小鼠前脚抓力显著增加($P < 0.05$)(图 2B)。同时,与对照组相比,模型组小鼠转棒总路程显著缩短($P < 0.05$),RES 治疗后,与模型组相比,模型治疗组小鼠转棒总路程显著延长($P < 0.05$)(图 2C)。与对照组相比,对照治疗组爬杆时长,抓力大小以及转棒总路程均不具有统计学意义(图 2)。

同时,对小鼠体重进行测量,发现 RES 对小鼠体重无显著差异(图 3A);与对照组相比,模型组小鼠在尾部悬吊之后表现出下肢抱紧行为,这是神经退行性疾病小鼠模型常见的运动障碍特征;RES 治疗后,与模型组相比,模型治疗组小鼠抱紧行为改善(图 3B)。与对照组相比,模型组小鼠四肢抱紧运动功能评分升高($P < 0.005$);RES 治疗后,与模型组相比,模型治疗组小鼠四肢抱紧运动功能评分显著降低($P < 0.01$)。与对照组相比,对照治疗组四肢抱紧运动功能评分无显著性差异(图 3C)。

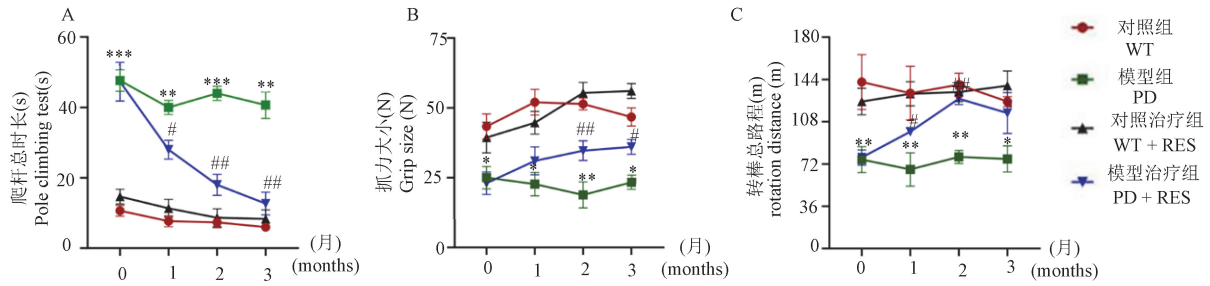
2.3 RES 对 A53T 转基因小鼠外周 T 淋巴细胞及其亚群影响

流式圈门策略及典型示例见图 4 所示。流式检测结果显示:与对照组相比,模型组 T 淋巴细胞占比显著降低,差异具有显著性($P < 0.001$);经 3 个月 RES 灌胃治疗后,与模型组相比,模型治疗组 T 淋巴细胞占比增加,差异具有统计学意义($P <$

表 2 A53T 转基因小鼠 SNCA 基因鉴定

Table 2 SNCA gene identification in α -Synuclein A53T mice

内参校准值 Internal reference calibration value	检测 RQ 值 Detection of RQ values	检测的动物 Animals tested	基因型 Genotype
1.02	0.00	野生对照 Wild contrast	野生型 WT
0.97	1.00	杂合对照 Hybrid control	杂合子 Mut/WT
1.01	1.63	鼠 1 Mouse 1	纯合子 Mut/Mut
1.02	1.48	鼠 2 Mouse 2	纯合子 Mut/Mut
0.98	1.88	鼠 3 Mouse 3	纯合子 Mut/Mut
0.99	1.57	鼠 4 Mouse 4	纯合子 Mut/Mut
1.02	1.61	鼠 5 Mouse 5	纯合子 Mut/Mut
1.04	1.83	鼠 6 Mouse 6	纯合子 Mut/Mut
0.98	1.44	鼠 7 Mouse 7	纯合子 Mut/Mut
1.00	1.72	鼠 8 Mouse 8	纯合子 Mut/Mut
0.99	1.83	鼠 9 Mouse 9	纯合子 Mut/Mut
0.96	1.96	鼠 10 Mouse 10	纯合子 Mut/Mut
1.01	1.74	鼠 11 Mouse 11	纯合子 Mut/Mut
0.99	1.85	鼠 12 Mouse 12	纯合子 Mut/Mut

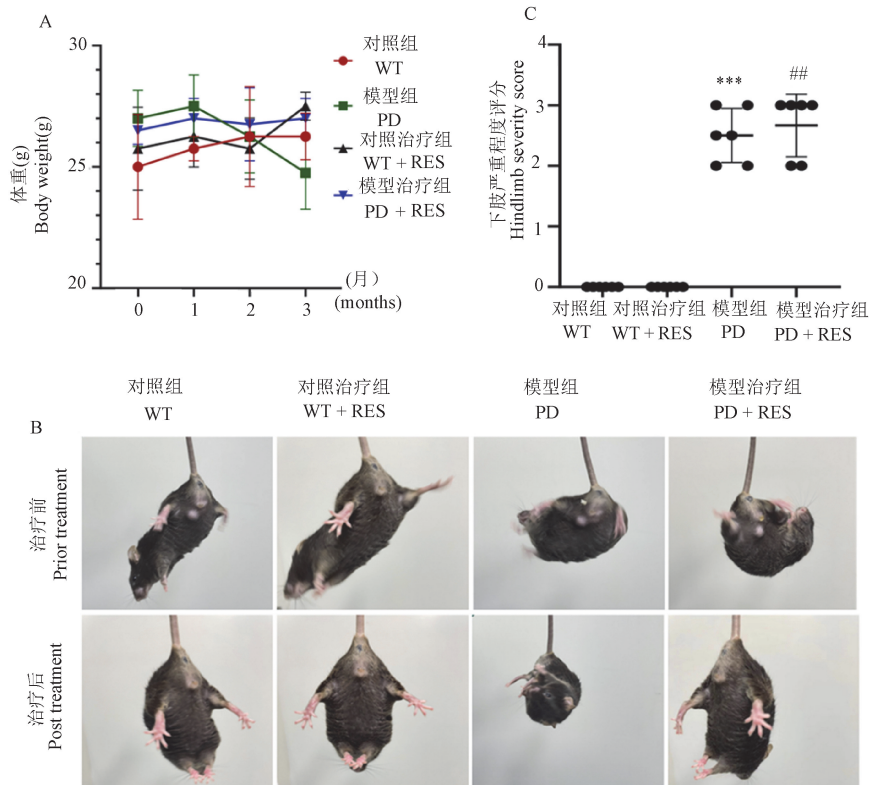


注:A:爬杆实验;B:抓力实验;C:转棒实验。与对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$;与模型组比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下图同)

图2 RES 治疗后小鼠行为学检测结果

Note. A. Pole climbing test. B. Forelimb grip strength test. C. Rotarod test. Compared with WT group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$. Compared with PD group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Motoric function results of mice after RES treatment



注:A:RES 对小鼠体重的影响;B:下肢抱紧评分根据严重程度从 0 ~ 3;C:小鼠的代表性图像。

图3 RES 治疗后小鼠体重、运动功能评分

Note. A. Effect of RES on body weight of mice. B. The hindlimb clasping score was rated from 0 ~ 3 based on severity. Representative images of mouse littermates treated with RES or vehicle. C. Representative images of mouse littermates treated with RES or vehicle.

Figure 3 Body weight and motor function scores of mice after RES treatment

0.001)(图 5A)。与对照组相比,模型组 Th 细胞 ($CD3^+CD4^+$) 占比显著降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.001$);与模型组相比,模型治疗组 Th 细胞 ($CD3^+CD4^+$) 占比增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.005$)(图 5C)。与对照组相比,模型组 Tc 细胞 ($CD3^+CD8^+$) 占比差异不具有统计学意义;与模型

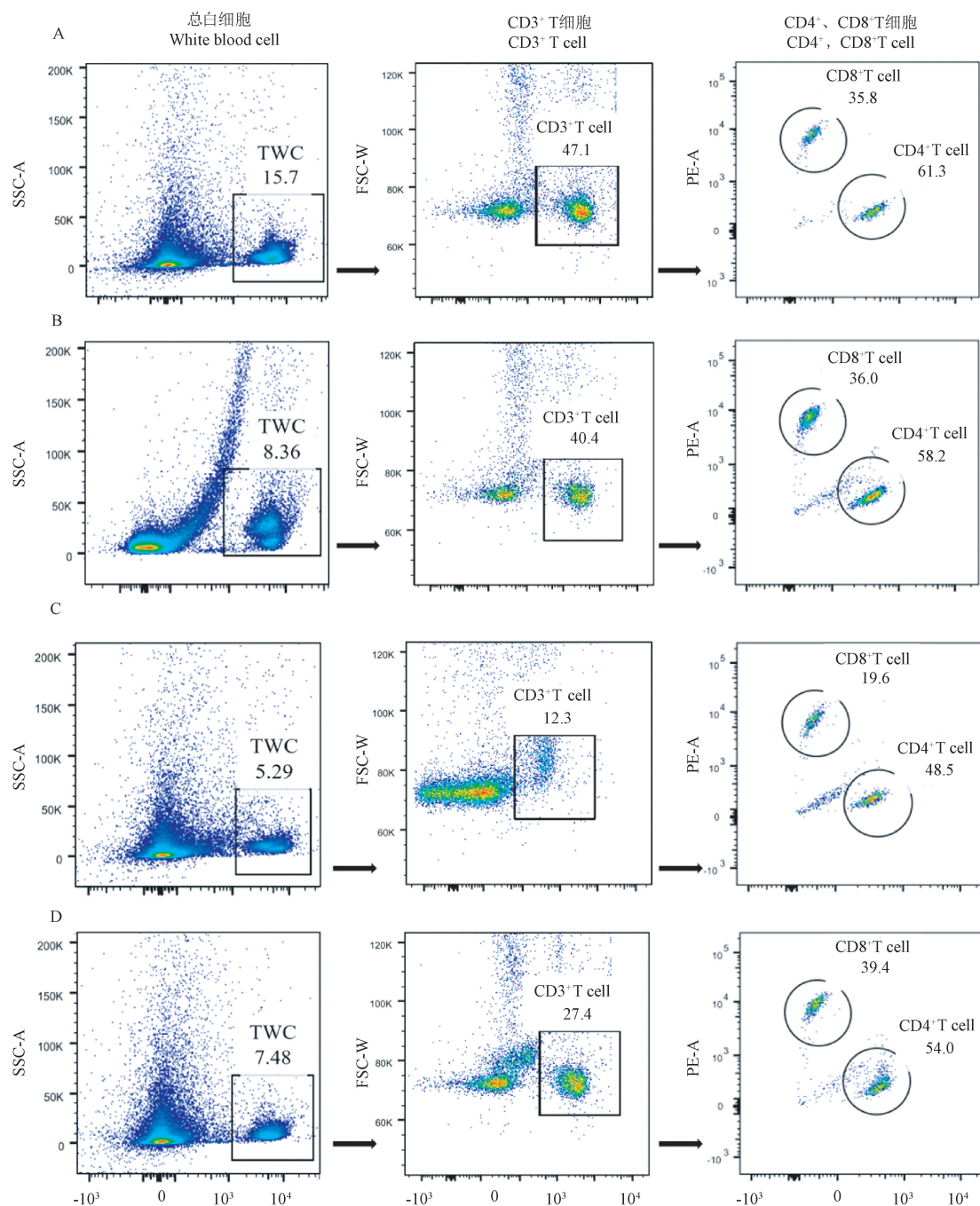
组相比,模型治疗组 Tc 细胞 ($CD3^+CD8^+$) 占比不具有统计学意义(图 5B)。与对照组相比,模型组 $CD4^+/CD8^+$ 比值降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组相比,模型治疗组 $CD4^+/CD8^+$ 比值增加,差异不具有统计学意义(图 5D)。与对照组相比,对照治疗组 T 淋巴细胞占比、 $CD4^+$ T 淋巴细

胞占比、CD8⁺T 淋巴细胞占比及 CD4⁺/CD8⁺ 比值均不具有统计学意义(图 5)。

2.4 RES 对 A53T 转基因小鼠外周血血清炎症因子的影响

与对照组相比,模型组小鼠血清中 IL-6、IL-18 含量显著增加,差异具有统计学意义($P < 0.005$,

$P < 0.01$);经 3 个月 RES 灌胃治疗后,与模型组相比,模型治疗组小鼠血清中 IL-6、IL-18 含量显著减少,差异具有统计学意义($P < 0.001$, $P < 0.05$)(图 6A,6B)。在各组间血清 TNF- α 含量差异不具有显著性(图 6C)。与对照组相比,模型组小鼠血清 TGF- β 含量显著减少,差异具有统计学意

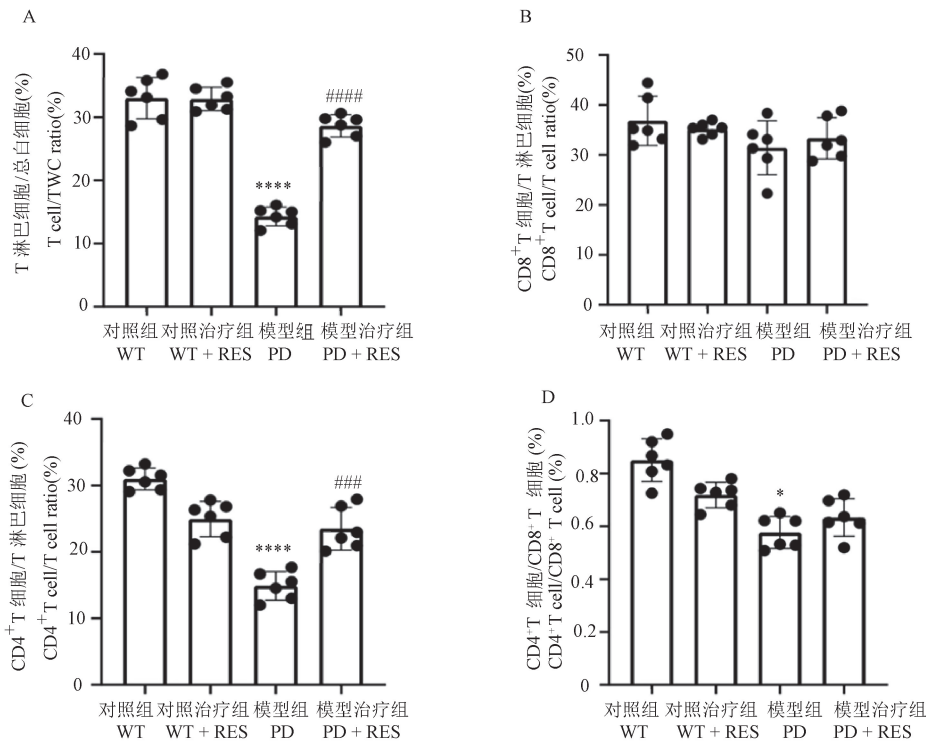


注:A:对照组;B:对照治疗组;C:模型组;D:模型治疗组。

图 4 A53T 转基因小鼠外周血 T 淋巴细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞流式散点图

Note. A. WT. B. WT + RES. C. PD. D. PD + RES.

Figure 4 Flow cytometry results of T lymphocyte, CD4⁺T cell and CD8⁺T cell



注:与对照组比,**** $P < 0.001$;与模型组相比,#### $P < 0.005$,#### $P < 0.001$ 。

图5 A53T 转基因小鼠外周血流式细胞仪检测结果

Note. Compared with WT group, **** $P < 0.001$. Compared with PD group, #### $P < 0.005$, #### $P < 0.001$.

Figure 5 Flow cytometry results of peripheral blood of α -synuclein A53T mice

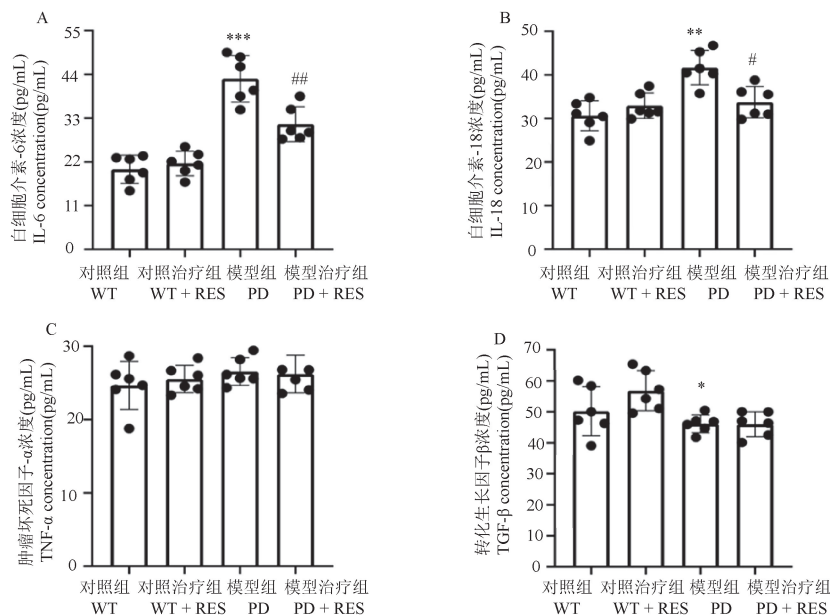


图6 A53T 转基因小鼠血清炎症因子检测结果

Figure 6 Results of serum inflammatory factors in α -synuclein A53T mice

义($P < 0.05$);与模型组相比,模型治疗组小鼠血清中 TGF- β 含量回升,差异不具有统计学意义(图 6D)。与对照组相比,对照治疗组 IL-6、IL-18、TNF- α 及 TGF- β 含量均不具有统计学意义(图 6)。

3 讨论

近年来大量研究证实 RES 可以减少神经元细胞的凋亡,从而减少神经炎症发生^[17]。RES 作为

SIRT1 基因的激活剂,可激活线粒体自噬,减轻 DA 能神经元中 α -Syn 低聚物的形成,保护神经元,从而改善 PD 模型大鼠运动障碍^[8,18]。本研究显示,RES 缩短 A53T 转基因小鼠爬杆时长,降低小鼠四肢抱紧运动功能评分,增加 A53T 转基因小鼠转棒路程及前脚抓力,说明应用 RES 治疗 PD 有较大潜力,这与已有报道一致。

PD 患者普遍存在免疫功能异常,T 淋巴细胞介导的细胞免疫功能减退^[19]。正常情况下,在中枢神经系统中激活的 T 淋巴细胞较少出现,当中枢神经系统发生炎症反应时,神经元释放促炎因子(IL-1 β 、TNF- α 等),改变血脑屏障通透性,从而在中枢神经系统中产生激活的 T 淋巴细胞,被激活的 T 淋巴细胞会进一步迁移至神经元损伤部位,加速神经炎症的发展^[20]。研究发现,激活的小胶质细胞以及星形胶质细胞会释放 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 等细胞因子,诱导神经炎症的发生,导致 DA 能神经元的损伤以及神经元数量减少^[21-22]。以上研究提示,免疫功能的紊乱及神经炎症的发生是 PD 病理进展的重要方面。研究指出,PD 患者外周血中 CD3⁺T 淋巴细胞占比、CD4⁺T 细胞占比及 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值与健康对照人群相比显著降低^[23],IL-6 作为主要的炎症因子参与炎症反应,是组织损伤程度与炎症反应的重要标志物之一,与健康对照相比,在 PD 患者血浆中 IL-6 的表达增高^[24-25]。IL-18 作为白细胞介素的重要成员,通过参与 CD4⁺T 细胞的增殖与分化过程、增加促炎因子 TNF- γ 的产生发挥免疫应答作用^[26],最近的研究发现 IL-18 可以与小胶质细胞受体结合,加快小胶质细胞的激活,激活的小胶质细胞进一步释放炎性因子,恶性循环的过程导致神经炎症的发生,加速 PD 的进展^[27]。同时,研究指出另一种参与免疫调节的重要成员 TGF- β ,其是具有免疫抑制功能的细胞因子,可以通过对黏附分子的下调作用,参与机体免疫耐受过程。TGF- β 可刺激 T 细胞分化成 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)细胞,分泌 IL-10 等抑制性细胞因子维持机体免疫系统的平衡,这也是 Treg 细胞发挥免疫抑制功能的重要途径之一^[28]。因此,T 淋巴细胞的免疫调节作用和炎症因子异常释放参与 PD 发病进展。

本研究发现 A53T 转基因小鼠与野生型小鼠相比,T 淋巴细胞占比、CD4⁺T 细胞占比、CD4⁺/CD8⁺ 比值均显著降低,说明 A53T 转基因小鼠存在免疫功能减退和免疫系统失调。有研究证实,淋巴细胞

占比下降和 CD4⁺T 细胞百分比减少有关^[29],这说明 A53T 转基因小鼠 CD4⁺T 细胞介导的免疫过程存在异常。CD4⁺/CD8⁺ 比值可以间接反应机体免疫状态,A53T 转基因小鼠与野生型小鼠相比 CD4⁺/CD8⁺ 比值下降,说明 A53T 转基因小鼠存在免疫调节异常。同时,A53T 转基因小鼠与野生型小鼠相比,IL-6、IL-18 表达显著增高,TGF- β 表达降低,一方面说明,A53T 转基因小鼠存在机体内的神经炎症反应;另一方面说明,抗原提呈细胞抗原提呈的过程受到影响,抑制了 T 淋巴细胞及 CD4⁺T 细胞增殖与分化,免疫系统的平衡存在紊乱。RES 治疗后显著增加 T 淋巴细胞占比、CD4⁺T 细胞占比以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值;显著降低了 IL-6、IL-18 炎症因子的表达,说明 RES 可改善 A53T 转基因小鼠的免疫功能异常。

综上所述,Prnp-SNCA-A53T 转基因小鼠可模拟帕金森病的部分外周免疫异常状态,本研究结果证实 RES 可显著改善该模型小鼠的运动功能障碍,通过调节小鼠外周 T 淋巴细胞数量和炎症因子水平,使小鼠免疫状态恢复正常。本研究为 RES 在 PD 的临床应用提供了实验依据。

参 考 文 献(References)

- [1] Jankovic J, Tan EK. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2020, 91(8): 795-808.
- [2] 霍孝成,张瑜,王普清,等. 帕金森病伴纹状体畸形的研究进展 [J]. 湖北医药学院学报, 2021, 40(4): 437-440.
Huo XC, Zhang Y, Wang PQ, et al. Progress in the study of Parkinson's disease with striatal malformation [J]. J Hubei Univ Med, 2021, 40(4): 437-440.
- [3] Zhang H, Wu J, Shen FF, et al. Activated Schwann cells and increased inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α in patients' sural nerve are lack of tight relationship with specific sensory disturbances in Parkinson's disease [J]. CNS Neurosci Ther, 2020, 26(5): 518-526.
- [4] Hirsch EC, Standaert DG. Ten unsolved questions about neuroinflammation in Parkinson's disease [J]. Mov Disord, 2021, 36(1): 16-24.
- [5] Rahman MH, Akter R, Bhattacharya T, et al. Resveratrol and neuroprotection: impact and its therapeutic potential in Alzheimer's disease [J]. Front Pharmacol, 2020, 11(3): 619024.
- [6] Stacchiotti A, Corsetti G. Natural compounds and autophagy: allies against neurodegeneration [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8(4): 55409.
- [7] Zhang X, Wan F, You W, et al. Comparison of apoptosis between bovine subcutaneous and intramuscular adipocytes by

- resveratrol via SIRT1 [J]. *Animal Biotechnol*, 2020, 31(6): 538–546.
- [8] Li X, Feng Y, Wang XX, et al. The critical role of SIRT1 in Parkinson's disease: mechanism and therapeutic considerations [J]. *Aging Dis*, 2020, 11(6): 1608–1622.
- [9] Khan MM, Ahmad A, Ishrat T, et al. Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease [J]. *Brain Res*, 2010, 13(8): 139–151.
- [10] Wang Y, Xu H, Fu Q, et al. Protective effect of resveratrol derived from *Polygonum cuspidatum* and its liposomal form on nigral cells in parkinsonian rats [J]. *J Neurol Sci*, 2011, 304(1–2): 29–34.
- [11] Su CF, Jiang L, Zhang XW, et al. Resveratrol in rodent models of Parkinson's disease: a systematic review of experimental studies [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12(7): 644219.
- [12] Zhang Z, Kang SS, Liu X, et al. Asparagine endopeptidase cleaves α -synuclein and mediates pathologic activities in Parkinson's disease [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(8): 632–642.
- [13] 张旭, 张如意, 陈晨, 等. 二苯乙烯苷对 A53T α -突触核蛋白转基因小鼠运动功能和黑质多巴胺能神经元的影响 [J]. *神经疾病与精神卫生*, 2017, 17(3): 163–166.
- Zhang X, Zhang RY, Chen C, et al. Effects of tetrahydroxystilbene glucoside on motor function and dopaminergic neurons in substantia nigra of A53T α -synuclein transgenic mice [J]. *J Neurosci Ment Health*, 2017, 17(3): 163–166.
- [14] Zhang LF, Yu XL, Ji M, et al. Resveratrol alleviates motor and cognitive deficits and neuropathology in the A53T α -synuclein mouse model of Parkinson's disease [J]. *Food Funct*, 2018, 9(12): 6414–6426.
- [15] 王嫚诗, 张玲, 秦川, 等. α -突触核蛋白 A53T 突变损伤小鼠认知功能 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(5): 7–13.
- Wang MS, Zhang L, Qin C, et al. α -synuclein A53T mutation impairs cognitive function in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(5): 7–13.
- [16] Malpartida AB, Williamson M, Narendra DP, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's disease: from mechanism to therapy [J]. *Trends Biochem Sci*, 2021, 46(4): 329–343.
- [17] Ma S, Fan L, Li J, et al. Resveratrol promoted the M2 polarization of microglia and reduced neuroinflammation after cerebral ischemia by inhibiting miR-155 [J]. *Int J Neurosci*, 2020, 130(8): 817–825.
- [18] Wu Y, Li X, Zhu JX, et al. Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease [J]. *Neurosignals*, 2011, 19(3): 163–174.
- [19] Schwab AD, Thurston MJ, Machhi J, et al. Immunotherapy for Parkinson's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 137: 104760.
- [20] Levite M. Dopamine and T cells; dopamine receptors and potent effects on T cells, dopamine production in T cells, and abnormalities in the dopaminergic system in T cells in autoimmune, neurological and psychiatric diseases [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2016, 216(1): 42–89.
- [21] Haque A, Samantaray S, Knaryan VH, et al. Calpain mediated expansion of CD4⁺ cytotoxic T cells in rodent models of Parkinson's disease [J]. *Exp Neurol*, 2020, 8(3): 113–315.
- [22] Yang X, Ren H, Wood K, et al. Depletion of microglia augments the dopaminergic neurotoxicity of MPTP [J]. *Faseb J*, 2018, 32(6): 3336–3345.
- [23] Bartels T, De Schepper S, Hong S. Microglia modulate neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. *Science*, 2020, 370(6512): 66–69.
- [24] Li N, Wang JX, Huo TT, et al. Associations of IL-1 β and IL-6 gene polymorphisms with Parkinson's disease [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(2): 890–897.
- [25] Green HF, Khosousi S, Svenningsson P. Plasma IL-6 and IL-17A correlate with severity of motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease [J]. *J Parkinsons Dis*, 2019, 9(4): 705–709.
- [26] Fahmy E, Rabah A, Sharaf S, et al. Interleukin-18 promoter polymorphisms and idiopathic Parkinson disease: an Egyptian study [J]. *Acta Neurol Belg*, 2019, 119(2): 219–224.
- [27] Zhang X, Zhang Y, Li R, et al. Salidroside ameliorates Parkinson's disease by inhibiting NLRP3-dependent pyroptosis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(10): 9405–9426.
- [28] Tesseur I, Nguyen A, Chang B, et al. Deficiency in neuronal TGF- β signaling leads to nigrostriatal degeneration and activation of TGF- β signaling protects against MPTP neurotoxicity in mice [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(17): 4584–4592.
- [29] Jiang S, Gao H, Luo Q, et al. The correlation of lymphocyte subsets, natural killer cell, and Parkinson's disease: a meta-analysis [J]. *Neurol Sci*, 2017, 38(8): 1373–1380.

[收稿日期] 2021-11-05