

☆ XXXX ☆

电针调控 VEGF-C/VEGFR3 信号通路重塑脑膜淋巴管改善帕金森病小鼠运动功能的机制

马 骏¹, 肖 蝶¹, 李含章², 祁 玲¹, 於赵颀¹, 程 好¹, 陶晓亿¹, 严秋曼¹, 石永靖¹,
周 丹^{1,3}, 汪 瑶⁴, 李亚楠^{1,5,6}

(¹湖北中医药大学针灸骨伤学院, 武汉 430060; ²湖北中医药大学护理学院, 武汉 430060;
³武汉市第三医院武汉大学附属同仁医院, 武汉 430060; ⁴湖北中医药大学体育健康学院, 武汉
430060; ⁵湖北时珍实验室, 武汉 430060; ⁶神经系统重大疾病湖北省重点实验室, 武汉 430030)

【摘 要】 目的:探究电针“风府”通过调控血管内皮生长因子 C(VEGF-C)/血管内皮生长因子受体 3(VEGFR3)信号通路促进帕金森病(PD)小鼠脑膜淋巴管(MLV)结构重塑改善 PD 的作用机制。**方法:**采用 A53T 转基因小鼠随机分为模型组、电针组和电针+VEGFR3 抑制剂(SAR131675, 电针+抑制剂)组, 每组 10 只; 另取 C57BL/6J 小鼠 10 只作对照组。电针组取“风府”行电针(2 Hz, 1 mA, 20 min, 隔日 1 次, 共 2 周); 电针+抑制剂组在电针前 30 min 腹腔注射 SAR131675(12.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。通过旷场实验与步态分析评估运动功能; 免疫组织化学法检测黑质区 α -syn 沉积; 免疫荧光染色观察 MLV 标志物淋巴管内皮透明质酸受体-1(LYVE-1)表达以评估 MLV 完整性; Western blot 检测 MLV 组织 VEGF-C、VEGFR3、紧密连接蛋白-1(ZO-1)及颈部深淋巴结(dcLNs) α -突触核蛋白(α -syn)蛋白水平; 实时荧光定量 PCR 检测 MLV 组织 LYVE-1、平足蛋白(Podoplanin)、VEGFR3、VEGF-C 及黑质区细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA 表达。**结果:**与对照组比较, 模型组小鼠旷场实验运动总距离、运动速度, 步态实验步态长度、奔跑速度降低($P<0.01$), 站立时间增加($P<0.01$), 黑质区 α -syn 沉积增加($P<0.01$), MLV 网络断裂、结构不完整, MLV 中 VEGF-C、VEGFR3、ZO-1 蛋白表达及 LYVE-1、Podoplanin、VEGFR3、VEGF-C mRNA 表达降低($P<0.01$), dcLNs 中 α -syn 蛋白表达及黑质 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达升高($P<0.01$)。与模型组比较, 电针组上述指标均改善($P<0.01$, $P<0.05$)。与电针组比较, 电针+抑制剂组上述指标均回调($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论:**电针“风府”可显著改善 PD 模型小鼠运动功能, 其作用机制与激活 VEGF-C/VEGFR3 信号通路, 促进 MLV 结构重塑, 从而加速 α -syn 清除并减轻神经炎症反应有关。

【关键词】 帕金森病; 电针; 脑膜淋巴管; 血管内皮生长因子 C/血管内皮生长因子受体 3; 风府

Mechanism of electroacupuncture in regulating the VEGF-C/VEGFR3 signaling pathway to remodel meningeal lymphatic vessels and improve motor function in Parkinson's disease mice

Ma Jun¹, Xiao Die¹, Li Hanzhang², Qi Ling¹, Yu Zhaoxie¹, Cheng Hao¹, Tao Xiaoyi¹, Yan Qiuman¹, Shi Yongjing¹, Zhou Dan^{1,3}, Wang Yao⁴, Li Yanan^{1,5,6} (¹College of Acupuncture-moxibustion and Orthopaedics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430060, China; ²College of Nursing, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430060; ³Wuhan Third Hospital/Tongren Hospital Affiliated to Wuhan University, Wuhan 430060; ⁴College of Physical Education and Health, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430060; ⁵Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430060; ⁶Key Laboratory of Major Neurological Diseases of Hubei Province, Wuhan 430030)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the mechanism by which electroacupuncture (EA) at “Fengfu” (GV16)

【DOI】 10.13702/j.1000-0607.20260142

引用格式: 马骏, 肖蝶, 李含章, 等. 电针调控 VEGF-C/VEGFR3 信号通路重塑脑膜淋巴管改善帕金森病小鼠运动功能的机制[J]. 针刺研究, XXXX, XX(X): 1-9.

项目来源: 国家自然科学基金项目(No.82405575); 湖北省自然科学基金项目(No.2024AFD305、2024AFD298); 武汉市自然科学基金探索计划项目(No.2024040801020334); 国家资助博士后研究人员计划 C 档资助项目(No.CZC20240445); 中国博士后科学基金资助项目(No.2023M74110); 湖北中医药大学 2025 年度博士研究生创新能力提升计划项目(No.2025BSCX14); 武汉市中医药科研项目(No.WZ24B31)

通信作者: 汪瑶, E-mail: w_yao519@163.com; 马骏, E-mail: Mj-1963@163.com

promotes structural remodeling of meningeal lymphatic vessels (MLVs) and ameliorates Parkinson's disease (PD) in mice through regulating the vascular endothelial growth factor C (VEGF-C)/vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) signaling pathway. **Methods** A53T transgenic mice were randomly divided into model group, EA group, and EA+VEGFR3 inhibitor (SAR131675, EA+inhibitor) group, with 10 mice in each group. Another 10 C57BL/6J mice were used as the control group. Mice in the EA group received EA at GV16 (2 Hz, 1 mA, 20 min, once every other day for 2 weeks). Mice in the EA+inhibitor group received intraperitoneal injection of SAR131675 ($12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 30 min before EA. Motor function was assessed by open field test and gait analysis. Immunohistochemistry was used to detect α -syn deposition in the substantia nigra. Immunofluorescence staining was performed to observe the expression of MLV marker lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) to evaluate MLV integrity. Western blot was used to detect the protein levels of VEGF-C, VEGFR3, and zonula occludens-1 (ZO-1) in MLV tissue, as well as α -synuclein (α -syn) in deep cervical lymph nodes (dcLNs). Real-time quantitative PCR was used to detect the mRNA expression of LYVE-1, Podoplanin, VEGFR3, and VEGF-C in MLV tissue, and interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the substantia nigra. **Results** Compared with the control group, mice in the model group showed decreased total distance traveled and movement speed in the open field test, reduced stride length and running speed in gait analysis ($P < 0.01$), increased standing time ($P < 0.01$), increased α -syn deposition in the substantia nigra ($P < 0.01$), disrupted and structurally incomplete MLV network, decreased protein expression of VEGF-C, VEGFR3, and ZO-1 and mRNA expression of LYVE-1, Podoplanin, VEGFR3, and VEGF-C in MLVs ($P < 0.01$), and increased α -syn protein expression in dcLNs and IL-1 β and TNF- α mRNA expression in the substantia nigra ($P < 0.01$). Compared with the model group, the above indicators in the EA group were improved ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the EA group, the above indicators in the EA+inhibitor group were reversed ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** EA at GV16 can significantly improve motor function in PD model mice, and its mechanism may be related to activating the VEGF-C/VEGFR3 signaling pathway, promoting MLV structural remodeling, thereby accelerating α -syn clearance and alleviating neuroinflammatory responses.

【KEYWORDS】 Parkinson's disease; Electroacupuncture; Meningeal lymphatic vessels; Vascular endothelial growth factor C/vascular endothelial growth factor receptor 3; Fengfu (GV16)

帕金森病(PD)是一种常见的慢性神经退行性疾病,临床常出现运动症状和非运动症状,运动症状包括静止性震颤、肌强直、运动迟缓等,非运动症状包括睡眠障碍、嗅觉减退、便秘、认知障碍、情绪障碍等。其典型病理学特征为中脑黑质多巴胺能神经元内 α -突触核蛋白(α -syn)异常聚集形成路易小体^[1]。流行病学学数据显示,我国PD患者约362万,预计到2030年将占全球PD患病人数的50%^[2-3]。该病致残率高达52.5%,病程长,治疗护理费用高,极大加重了家庭及社会的负担^[4]。

以往认为,中枢神经系统缺乏经典淋巴引流系统,然而近年来在脑膜中发现的脑膜淋巴管(MLV)更新了这一认知。MLV作为脑脊液与间质液中可溶性物质(包括 β -淀粉样蛋白、tau蛋白等)向外周免疫系统引流的关键通道^[5],其发现为神经退行性疾病病理蛋白的清除提供了新视角。研究证实,在阿尔茨海默病及衰老模型中,MLV结构损伤可加剧病理蛋白沉积与认知衰退^[6]。在PD研究领域,已有临床影像学证据表明PD患者MLV结构完整性受损、淋巴引流速度减慢^[7]。动物研究也提示,MLV

功能障碍加剧 α -syn脑内积聚^[8]。在分子调控层面,血管内皮生长因子C(VEGF-C)/血管内皮生长因子受体3(VEGFR3)信号轴是调控淋巴管内皮细胞增殖、迁移及管腔形成的关键通路,在MLV的生成及其功能维持中发挥核心作用^[9]。近期有研究报道,经颅射频波治疗能够通过刺激VEGF对MLV的修复,促进阿尔茨海默病患者脑内tau蛋白和 β -淀粉样蛋白的清除^[10]。基于此,我们推测在PD背景下,VEGF-C/VEGFR3信号通路同样可能通过影响MLV的结构与功能完整性,进而调控大分子 α -syn的外排清除过程。

电针在改善PD运动症状方面具有临床实效^[11],其机制研究多集中于神经递质调节、抗氧化及抗炎等方面^[12-13]。近年证据显示,针刺还可调节淋巴循环、促进组织液引流并发挥免疫调节作用^[14-15]。本课题组前期工作中观察到,电针“风府”可显著改善PD模型小鼠的运动功能,并降低脑内炎性反应水平。基于此,本研究提出假说:电针可能通过调控VEGF-C/VEGFR3信号通路,促进MLV结构与功能重塑,从而加速 α -syn清除、减轻神经炎性反应,

最终发挥PD保护作用。为此,本研究以A53T转基因PD小鼠为模型,通过电针干预,系统探讨电针是否经VEGF-C/VEGFR3信号途径促进MLV新生与功能恢复从而促进 α -syn外排,为电针治疗PD提供新的实验依据与机制解释。

1 材料及方法

1.1 实验动物及分组

雄性SPF级9月龄A53T基因小鼠30只,同窝野生雄性9月龄C57BL/6J小鼠10只,实验动物购自杭州子源实验动物科技有限公司,生产许可证号:SCXK(浙)2024-0004。小鼠饲养温度(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度(50 ± 5)%,明暗周期12 h/12 h。适应性饲养7 d后,采用随机数字表法将A53T小鼠分为模型组、电针组、电针+抑制剂组(VEGFR3抑制剂SAR131675),每组10只;剩余10只C57BL/6J小鼠为对照组。实验过程中对动物的处置遵照中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》及相关实验动物伦理要求^[16],并经湖北贝恩特实验中心动物实验伦理委员会批准,批准号为IACUC(准)-BNB-2025-009。

1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠、苏木精(美国Sigma),DAB显色试剂盒(武汉赛维尔),免疫组织化学二抗(厦门通灵),Trizol试剂、ChamQ SYBRqPCR Master Mix试剂盒(南京诺唯赞),ECL底物液(美国Afinity),DAPI(上海碧云天), β -actin、VEGF-C、VEGFR3、紧密连接蛋白-1(ZO-1)抗体(上海ABMART), α -syn抗体(英国Abcam),淋巴管内皮透明质酸受体-1(LYVE-1)抗体(美国Thermo Fisher),HRP标记羊抗兔、鼠二抗、BCA蛋白定量试剂盒(武汉博士德)。

华佗牌一次性无菌针灸针($0.25\text{ mm}\times 13\text{ mm}$)、HANS-100A型电针仪(南京济生),Multiskan FC型酶标仪(美国赛默飞),旷场实验装置(成都泰盟),步态分析系统TreadScanTM2.0(美国Clever sys),台式高速冷冻离心机(湖南可成),病理切片机(上海徕卡),LF-600S型电泳仪电源(北京方科技),DYCZ-24DN型垂直电泳槽(北京六一),L00686C型eBlot™L1快速湿转仪(南京金斯瑞),化学发光成像系统(杭州申花),QuantStudio6型实时荧光定量PCR仪(美国ABI),低温高速组织研磨仪(武汉赛维尔),生物显微镜(日本尼康),ImageJ软件(美国NIH)。

1.3 干预措施

电针组、电针+抑制剂组小鼠予以电针“风府”治疗,参照《实验针灸学》^[17]进行取穴定位,即枕骨顶嵴后枕寰关节背侧凹陷处。将小鼠置于专用固定器内以限制其躯体及头部活动,穴位局部皮肤碘伏消毒,采用一对 $0.25\text{ mm}\times 13\text{ mm}$ 不锈钢针互不接触斜刺入“风府”,针刺深度为3 mm,用胶布固定。接电针仪,将电极夹置于针尾端,连续波,电针频率2 Hz,强度1 mA,持续刺激20 min,隔日1次,总疗程为2周。电针+抑制剂组小鼠在每次电针前30 min给予腹腔注射VEGFR-3抑制剂SAR131675($12.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),隔日1次,总疗程为2周^[18]。因SAR131675难溶于水,故先溶于二甲基亚砜,再以0.9%氯化钠溶液稀释后进行注射。小鼠电针治疗方法、时间同电针组。对照组和模型组小鼠接受适当抓握固定,但不进行电针干预。

1.4 观察指标及检测方法

旷场实验:各组在测试房间适应1 h后放入一个白色规格为 $40\text{ cm}\times 40\text{ cm}\times$ 高35 cm、底部内壁标有16个规格为 $10\text{ cm}\times 10\text{ cm}$ 的白色正方形格子的反应箱中适应5 min。电脑分析软件设置总时间为5 min,将小鼠尽量放置于反应箱正中格子后开始计时,统计各组自主运动的总路程、平均速度、运动总时间等,用于观察各组自主运动的行为学表现变化。

步态测试:步态测试主要用于评估运动功能与协调性^[19]。将每只经训练的小鼠置于以恒定速度15 cm/s运行的电动跑步机上。在10 s的记录期内,系统自动量化每次测试的步频及步幅变化。

取材方法:各组小鼠行为学检测结束后,采用2%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,每组随机取3只小鼠心脏灌流取全脑及脑膜固定,其余小鼠在显微镜下剥取新鲜脑膜(尽量修剪脑模,保留脑膜淋巴管组织)、颈深淋巴结(dcLNs)组织于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用^[20]。

免疫组织化学法检测黑质区 α -syn平均吸光度值:包含中脑区域的脑石蜡切片依次经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水处理后,进行抗原热修复。以3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性,用正常山羊血清封闭非特异性结合位点;滴加1:100稀释的一抗于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,HRP标记的二抗在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min;经DAB显色后,苏木精复染2 min,依次行梯度乙醇脱水、二甲苯透明处理,最后以中性树脂胶封片。经显微镜拍摄脑组织中脑黑质区,获取显微

图像后,对各组小鼠中脑黑质区α-syn的平均吸光度进行统计分析。

免疫荧光染色法检测背侧MLV的LYVE-1阳性表达:取石蜡包埋脑组织切片,经二甲苯脱蜡及梯度乙醇复水后,采用0.01 mol/L EDTA 缓冲液(pH9.0)实施抗原热修复。山羊血清封闭30 min,滴加LYVE-1一抗(1:100),于4℃湿盒中孵育过夜。次日PBS清洗后,滴加Cy3标记的羊抗兔二抗(1:400),37℃避光孵育1 h,DAPI染核封片,PBS冲洗,滴加含DAPI的抗荧光淬灭封片剂封片,在荧光显微镜下观察LYVE-1阳性表达。

Western blot 法 检 测 MLV VEGF-C、VEGFR3、紧密连接蛋白-1(ZO-1)及dcLNs中α-syn蛋白表达:取小鼠取冰冻组织15 mg,经RIPA裂解液匀浆处理后,进行离心并收集上清液。采用BCA法进行蛋白浓度定量,取40 μg样品在沸水浴中变性处理。通过10% SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,随后转印至PVDF膜。使用含5%脱脂奶粉的TBST溶液在室温下封闭2 h。VEGF-C(1:1 000)、VEGFR3(1:2 000)、ZO-1(1:2 000)、α-syn(1:1 000)、β-actin(1:2 000)抗体于4℃孵育过夜;HRP标记二抗(1:10 000)于37℃孵育2 h。经ECL化学发光显影后,利用ImageJ软件分析目标蛋白与β-actin的灰度比值。

实时荧光定量PCR法检测MLV组织LYVE-1、VEGFR3、平足蛋白(Podoplanin)、VEGF-C、细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)mRNA表达水平:取每只小鼠取冰冻组织15 mg,Trizol法提取总RNA,使用超微量紫外分光光度计检测其纯度与浓度。取1 μg RNA,先经gDNA去除处理,随后采用HiScript II Q RT SuperMix试剂反转录合成cDNA。以cDNA为模板,配制荧光定量PCR反应体系(含2 μL cDNA、0.2 μL上/下游引物、5 μL SYBR Green Master Mix、0.2 μL ROX参比染料及ddH₂O补足至10 μL),置于ABI QuantStudio6实时荧光定量PCR仪进行扩增。反应程序为:95℃预变性10 min;95℃变性15 s,60℃退火/延伸60 s,共40个循环;随后进行熔解曲线分析。以内参GAPDH为校正,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算LYVE-1、VEGFR3、Podoplanin、VEGF-C、IL-1β、TNF-α mRNA的相对表达量。所用引物由擎科公司合成,具体序列见表1。

1.5 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	产物长度/bp
LYVE-1	上游 ACGGTGCGATGCTTAGAAG	479
	下游 TCTCAAGTCACCCAGGCTCT	
VEGFR3	上游 CTTATCCCCACCGGAGTTC	238
	下游 CTGTGGCGGGAGTAGATGCT	
Podoplanin	上游 TGCCAGTGTTGTTCTGGGTT	378
	下游 TTGTCTGCGTTTCATCCCCT	
VEGF-C	上游 GCCCCAAACCAGTCACAAT	493
	下游 GCACATTTCCCAGGATTCAG	
IL-1β	上游 AGGCTCCGAGATGAACAACAAA	206
	下游 GTGCCGTCTTTTCATTACACAGGA	
TNF-α	上游 CGGGCAGGTCTACTTTGGAG	166
	下游 ACCCTGAGCCATAATCCCCT	
GAPDH	上游 ATGGCCTTCCGTGTTCTCTAC	167
	下游 AAGTCGCAGGAGACAACCTG	

注:LYVE-1为淋巴管内皮透明质酸受体-1,VEGFR3为血管内皮生长因子受体3,Podoplanin为平足蛋白,VEGF-C为血管内皮生长因子C,IL-1β为白细胞介素-1β,TNF-α为肿瘤坏死因子-α。

析。本研究计量资料均符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组数据则用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD法。以 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

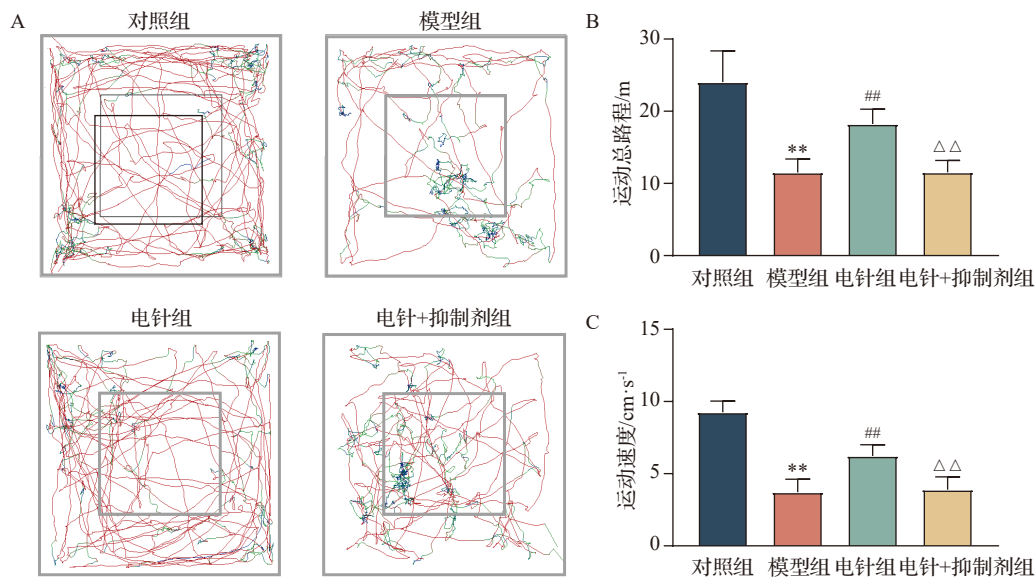
2 结果

2.1 各组小鼠旷场实验结果比较

旷场实验结果显示,与对照组比较,模型组小鼠运动总路程减少、运动速度降低($P<0.01$);与模型组比较,电针组运动总路程显著增加、运动速度明显升高($P<0.01$);与模型组比较,电针+抑制剂组运动总路程及运动速度差异均无统计学意义;与电针组比较,电针+抑制剂组运动总路程及运动速度明显下降($P<0.01$)。见图1。

2.2 各组小鼠步态实验结果比较

与对照组比较,模型组小鼠前肢及后肢的站立时间增加($P<0.01$),前肢及后肢的步态长度减少($P<0.01$),奔跑速度降低($P<0.01$);与模型组比较,电针组前肢及后肢的站立时间减少($P<0.01$),前肢及后肢的步态长度增加($P<0.01$),奔跑速度增加($P<0.01$);与模型组比较,电针+抑制剂组前肢及后肢的站立时间、前肢及后肢的步态长度、奔跑



注:A为各组小鼠旷场运动轨迹图,B为各组小鼠运动总路程,C为各组小鼠运动速度。与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与电针组比较,△△ $P<0.01$ 。

图1 各组小鼠旷场实验运动总路程及运动速度比较($\bar{x}\pm s$, 10只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of total distance traveled and movement velocity in the open field test of mice in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 10 mice/group)

速度差异均无统计学意义;与电针组比较,电针+抑制剂组前肢及后肢的站立时间增加($P<0.01$),前肢及后肢的步态长度减少($P<0.01$),奔跑速度降低($P<0.01$)。见图2。

2.3 各组小鼠黑质区 α -syn 阳性表达比较

与对照组比较,模型组黑质区 α -syn 平均吸光度增加($P<0.01$);与模型组比较,电针组黑质区 α -syn 平均吸光度减少($P<0.01$);与模型组比较,电针+抑制剂组黑质区 α -syn 平均吸光度差异无统计学意义;与电针组比较,电针+抑制剂组黑质区 α -syn 平均吸光度增加($P<0.05$)。见图3。

2.4 各组小鼠 MLV 完整性比较

免疫荧光染色结果显示,MLV 的 LYVE-1 染色结果中红色为 LYVE-1 染色,与对照组比较,模型组 MLV 连接不连续,荧光信号呈现点阵状、节段性缺失、断裂,未形成完整连续的管状引流通路。而电针能够恢复 PD 小鼠 MLV 完整性,可见红色荧光信号沿管壁走行呈现均匀、平滑、无中断的条带状管腔,管径均一,分支走形自然,未见明显的信号断点或斑点状脱失。与模型组比较,电针+抑制剂组 MLV 完整性有一定恢复,但与电针组相比,加用 SAR 明显抑制了电针对 MLV 新生的促进作用。见图4。

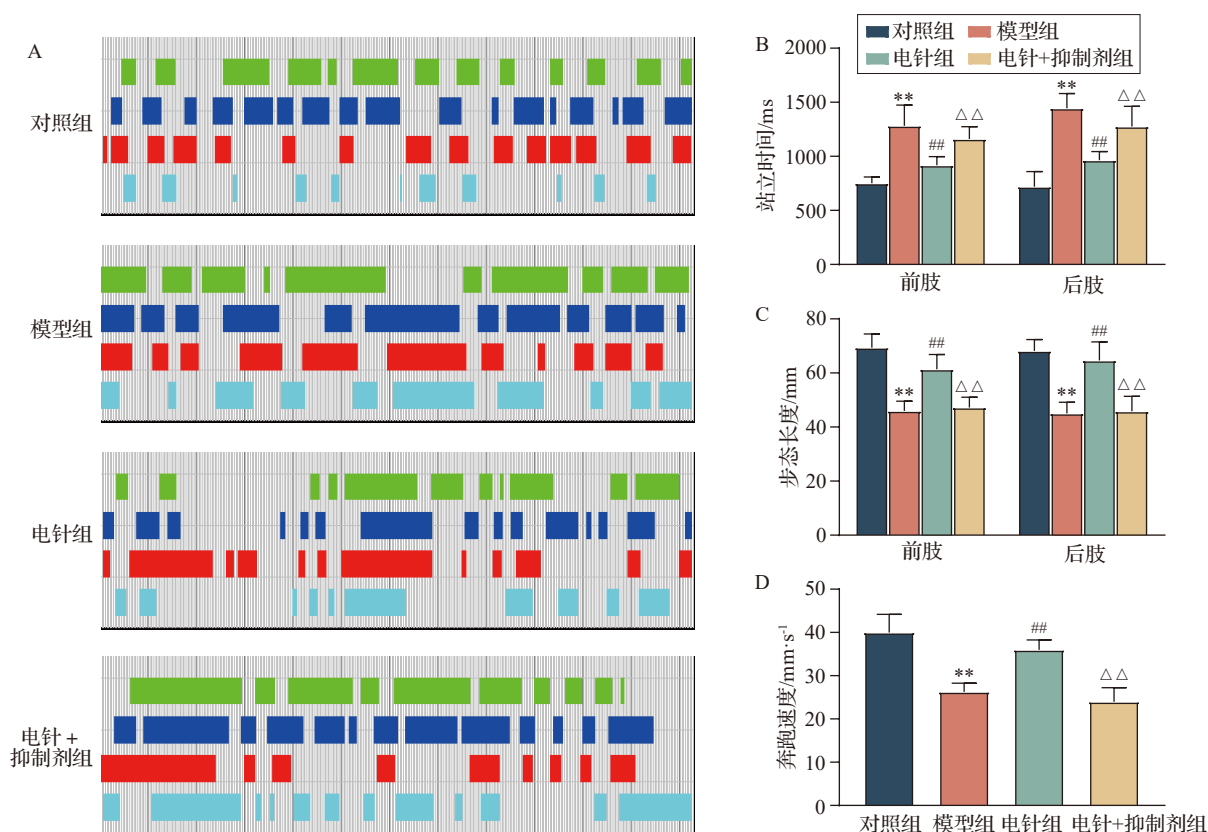
2.5 各组小鼠 MLV 组织 VEGF-C、VEGFR3、ZO-1 及 dcLNs 中 α -syn 蛋白表达比较

与对照组比较,模型组 MLV 组织 VEGF-C、

VEGFR3、ZO-1 蛋白表达降低($P<0.01$),dcLNs 中 α -syn 蛋白表达升高($P<0.01$)。与模型组比较,电针组 MLV 组织 VEGF-C、VEGFR3、ZO-1 蛋白表达升高($P<0.01$),dcLNs 中 α -syn 蛋白表达降低($P<0.01$);电针+抑制剂组各蛋白表达差异均无统计学意义。与电针组比较,电针+抑制剂组 MLV 组织 VEGF-C、VEGFR3、ZO-1 蛋白表达降低($P<0.01$),dcLNs 中 α -syn 蛋白表达升高($P<0.01$)。见图5。

2.6 各组小鼠 MLV 组织 LYVE-1、Podoplanin、VEGFR3、VEGF-C 及黑质 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平比较

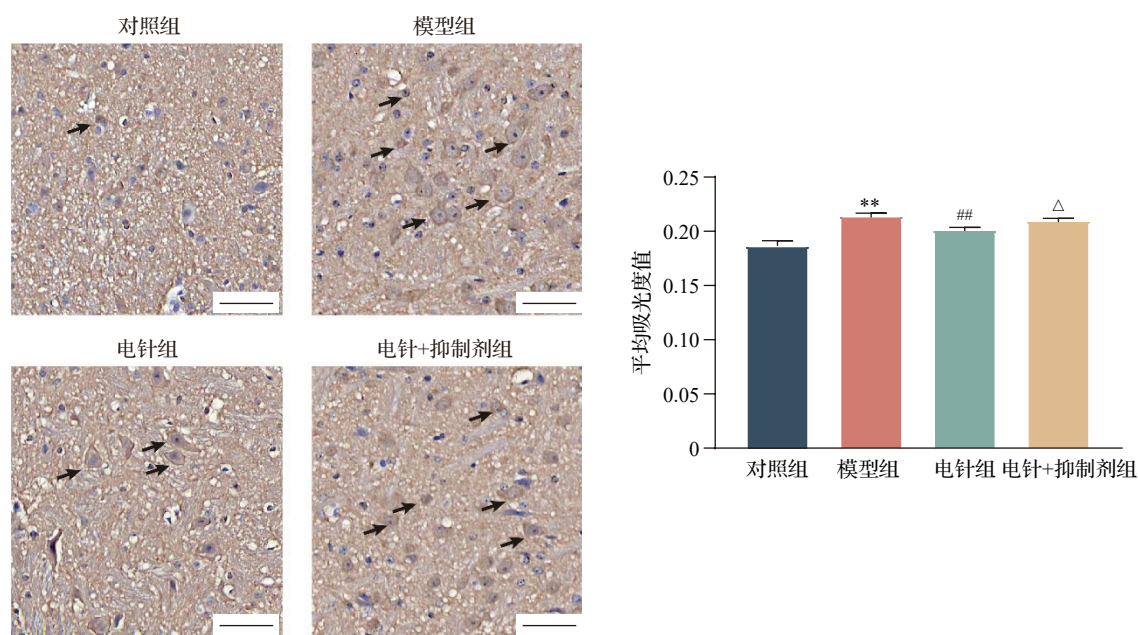
与对照组比较,模型组 MLV 组织 LYVE-1、Podoplanin、VEGFR3、VEGF-C mRNA 表达降低($P<0.01$),黑质 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达升高($P<0.01$)。与模型组比较,电针组 MLV 组织 LYVE-1、Podoplanin、VEGFR3、VEGF-C mRNA 表达升高($P<0.01$),黑质 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达降低($P<0.01$, $P<0.05$);与模型组比较,电针+抑制剂组各 mRNA 差异均无统计学意义。与电针组相比,电针+抑制剂组 MLV 组织 LYVE-1、Podoplanin、VEGFR3、VEGF-C mRNA 表达降低($P<0.01$, $P<0.05$),黑质 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达升高($P<0.05$)。见图6。



注:A为各组小鼠步态运动轨迹图,绿色为右前肢,深蓝色为左前肢,红色为右后肢,浅蓝色为左后肢;B为各组小鼠步态实验站立时间;C为各组小鼠步态实验步态长度;D为各组小鼠步态实验奔跑速度。与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与电针组比较,△△ $P < 0.01$ 。

图2 各组小鼠步态实验站立时间、步态长度、奔跑速度比较($\bar{x} \pm s$, 10只鼠/组)

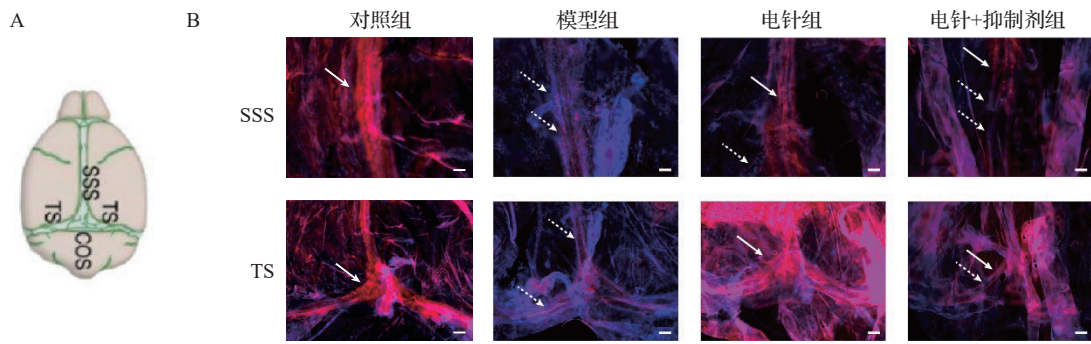
Fig. 2 Comparison of stance duration, stride length, and running velocity in gait analysis of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 10 mice/group)



注:标尺=50 μm 。与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与电针组比较,△ $P < 0.05$ 。

图3 各组小鼠黑质区 $\alpha\text{-syn}$ 阳性表达比较(免疫组织化学, $\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

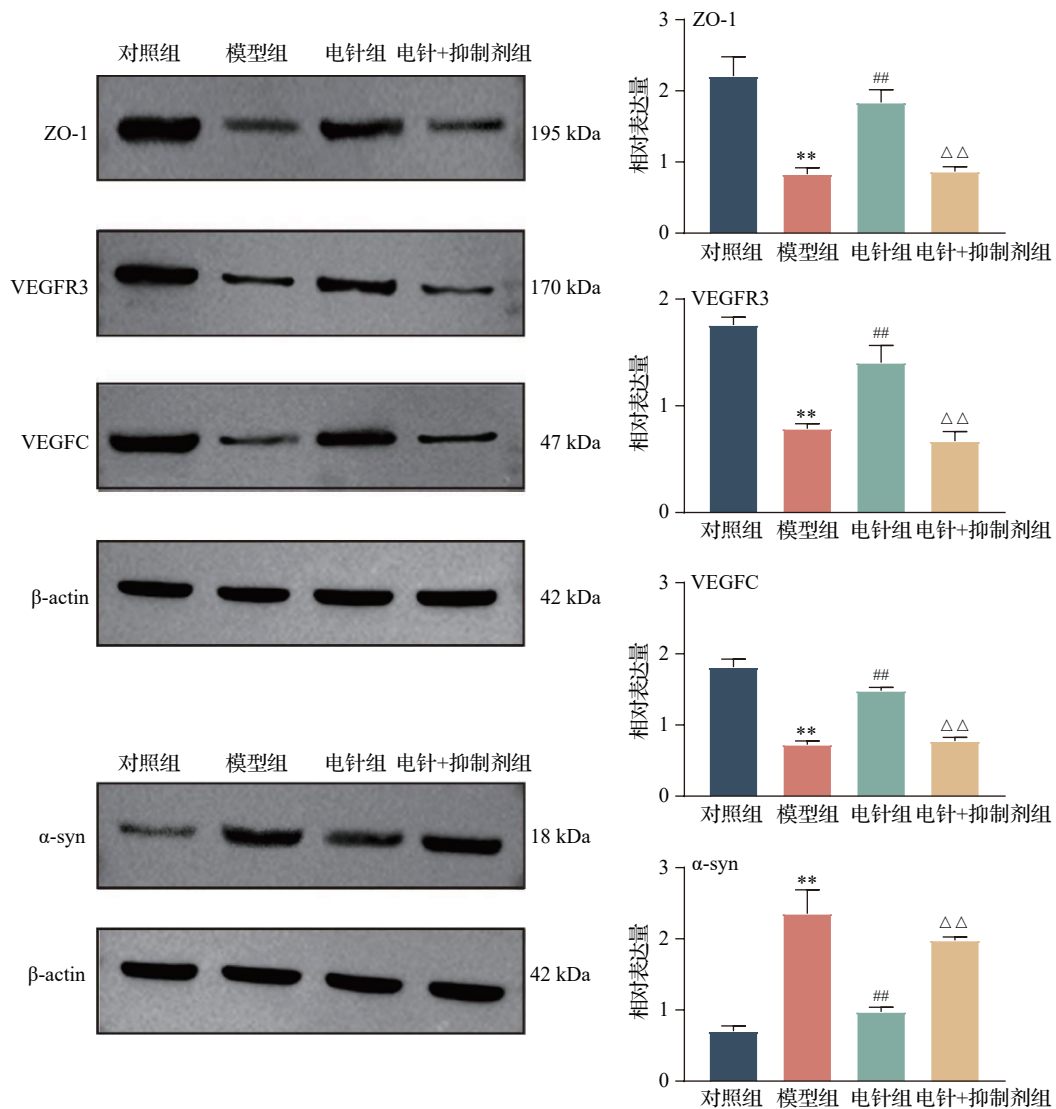
Fig. 3 Comparison of $\alpha\text{-syn}$ positive expression levels in the substantia nigra of mice in the 4 groups (immunohistochemistry, $\bar{x} \pm s$, 3 mice/group)



注:上图标尺=100 μm ,下图标尺=200 μm 。A为MLV形态示意图,SSS为MLV矢状窦,TS为MLV横窦,COS为MLV窦会;B为各组小鼠MLV形态学改变,上图为SSS,下图为TS;红色为LYVE-1染色,蓝色为DAPI染色,实线白色箭头示MLV结构完整表现,虚线白色箭头示MLV结构断裂表现。

图4 各组小鼠MLV形态比较(免疫荧光染色)

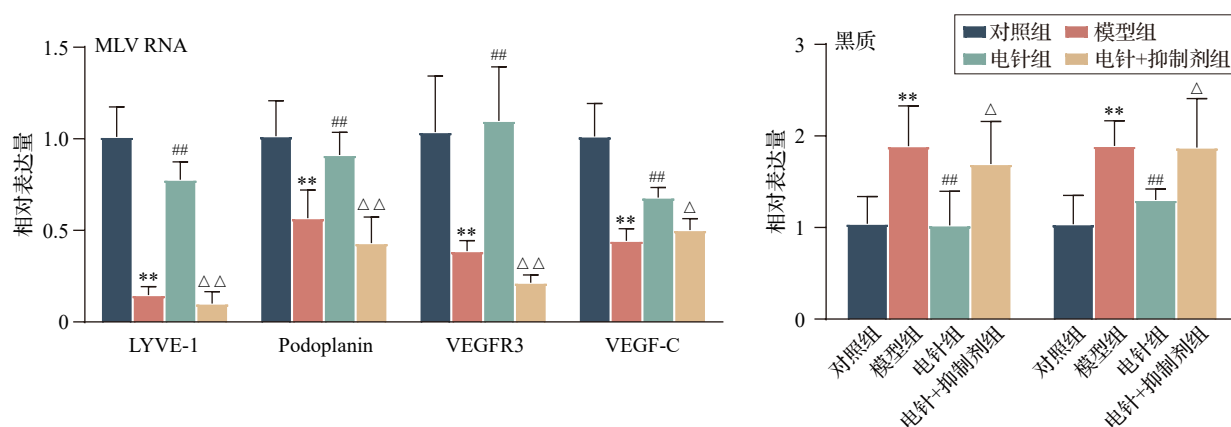
Fig. 4 Comparison of MLV morphology of mice in the 4 groups (immunofluorescence staining)



注:ZO-1为紧密连接蛋白-1,VEGFR3为血管内皮生长因子受体3,VEGF-C为血管内皮生长因子C,dcLNs为颈深淋巴结, α -syn为 α -突触核蛋白。与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与电针组比较,△△ $P<0.01$ 。

图5 各组小鼠MLV组织中VEGF-C、VEGFR3、ZO-1及dcLNs中 α -syn蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of protein expression levels of VEGF-C, VEGFR3, ZO-1 in MLV and α -syn in dcLNs of mice in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 mice/group)



注:LYVE-1为淋巴管内皮透明质酸受体-1,Podoplanin为平足蛋白,VEGFR3为血管内皮生长因子受体3,VEGF-C为血管内皮生长因子C,IL-1 β 为白细胞介素-1 β ,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α 。与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与电针组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

图6 各组小鼠MLV组织LYVE-1、Podoplanin、VEGFR3、VEGF-C及黑质IL-1 β 、TNF- α mRNA表达水平比较
($\bar{x}\pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of mRNA expression levels of LYVE-1, Podoplanin, VEGFR3, VEGF-C in MLV and IL-1 β , TNF- α in substantia nigra of mice in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

3 讨论

本研究通过行为学、病理学及分子生物学等多维度证据,系统探讨了电针治疗PD的新机制。结果首先证实,电针可显著改善PD小鼠的运动功能障碍(旷场实验总路程及速度增加、步态参数改善),并减少黑质区 α -syn的病理性沉积。这一结果与大量前期临床及基础研究结论一致^[21-22],再次肯定了电针风府改善PD的有效性,为本研究的后续机制探讨奠定了可靠基础。从中医理论来看,PD归属于“颤证”“痉证”范畴,髓海失充、风邪内扰是其主要病机,病位在脑。风府隶属督脉,督脉为“阳脉之海”,与脑直接联系。《灵枢·海论》载“脑为髓之海,其髓上在于其盖,下在风府”,《素问·风论》载“风气循风府而上,则为脑风”,均说明风府为“治风要穴”,具有通调脑络、息风止颤之功,临床上风府也常作为治疗PD主穴之一^[23]。本研究结果既与中医理论相契合,也从现代神经生物学角度为该穴的临床应用提供了依据。

随着MLV系统在PD中的作用日益受到关注,已有研究表明,黑质区产生的 α -syn通过类淋巴系统介导的脑脊液-间质液对流,从脑实质转运至脑脊液^[24]。随后,MLV作为脑脊液外排的核心通道,将液体引流至dcLNs,最终进入体循环被清除^[25-26]。临床影像学研究也证实,特发性PD患者MLV结构完整性受损,淋巴引流速度减慢^[7]。因此,MLV-dcLNs轴的结构与功能状态直接决定了 α -syn能否有效外排,是减轻PD脑损伤的关键环节。本研究通过免疫荧光染色结果显示,PD模型小鼠MLV网

络存在明显结构破坏,表现为LYVE-1阳性管腔断裂、稀疏,同时淋巴管内皮标志物LYVE-1和Podoplanin的mRNA表达显著降低,进一步证实PD模型小鼠存在MLV结构损伤。而电针干预可有效逆转这一损伤,恢复MLV形态完整性,并同步上调上述标志物的表达。

为进一步验证MLV在 α -syn清除中的作用,本研究检测了dcLNs中 α -syn蛋白水平。结果显示,电针干预后dcLNs内 α -syn含量显著降低,与黑质区 α -syn沉积减少的趋势一致。这提示PD状态下,脑内 α -syn的绝对生成量增加,dcLNs因自身清除能力下降进而出现 α -syn沉积,而电针可能通过修复MLV结构,促进了 α -syn从脑内向周围淋巴系统的主动转运与清除。神经炎症反应是 α -syn病理进展的关键环节。本研究显示,电针“风府”可显著降低黑质区促炎因子IL-1 β 和TNF- α 的mRNA表达水平,表明电针在促进 α -syn清除的同时,也有效抑制了神经炎症反应。

继而本研究探讨了电针修复MLV的作用机制。结果显示,电针干预后MLV组织中VEGF-C及其受体VEGFR3的蛋白及mRNA表达水平均显著上调,与MLV结构修复同步发生。已知VEGF-C/VEGFR3信号是调控淋巴管内皮细胞存活、增殖及管腔形成的关键信号轴,因此我们推测电针可能通过激活这一通路,促进MLV的结构修复与功能恢复。为确立该通路在电针效应中的必要性,本研究使用VEGFR3特异性抑制剂SAR131675阻断该信号。结果显示,抑制剂干预后,电针所诱导的

MLV 结构修复、 α -syn 清除及抗炎效应均被显著削弱,电针对运动功能的改善作用也随之消失。这证明,VEGF-C/VEGFR3 信号是电针调控 MLV、发挥神经保护作用的重要分子枢纽,MLV 的结构功能完整性是电针发挥效应的必要前提。Antila 等^[27]的研究曾证实,成年小鼠中 VEGFR3 信号持续存在对于 MLV 的维持至关重要,阻断该信号可导致 MLV 退行性变。本研究结果与此高度吻合,并进一步将这一机制拓展至电针干预 PD 的转化应用领域。

综上所述,本研究提示电针“风府”可能通过调控 VEGF-C/VEGFR3 信号通路,促进 MLV 结构重塑与功能恢复,加速 α -syn 的脑内清除,并减轻神经炎症反应,从而改善 PD 模型小鼠的运动功能。这为理解针刺治疗 PD 的作用机制提供了新视角,也为针对 MLV 途径的 PD 治疗策略开发提供了实验依据。本研究尚存在一定局限性:电针信号如何从“风府”传导至脑内并精确调控 VEGF-C/VEGFR3 通路,其具体上行机制(如是否涉及神经-免疫-体液网络)仍需深入探讨;此外,本研究仅观察单一穴位,未来可通过多穴位、多参数比较进一步优化电针治疗方案。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Mor D E, Tsika E, Mazzulli J R, et al. Dopamine induces soluble α -synuclein oligomers and nigrostriatal degeneration [J]. *Nature neuroscience*, 2017,20(11):1560-1568.
- [2] Qi S, Yin P, Wang L, et al. Prevalence of Parkinson's Disease: A Community-Based Study in China[J]. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2021,36(12):2940-2944.
- [3] Tolosa E, Garrido A, Scholz S W, et al. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease[J]. *The Lancet. Neurology*, 2021,20(5):385-397.
- [4] GBD P S D C. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *The Lancet. Neurology*, 2018,17(11):939-953.
- [5] Da Mesquita S, Fu Z, Kipnis J. The Meningeal Lymphatic System: A New Player in Neurophysiology [J]. *Neuron*, 2018,100(2):375-388.
- [6] Shan X, Lu Y, Luo Z, et al. A Long-Acting Lyotropic Liquid Crystalline Implant Promotes the Drainage of Macromolecules by Brain-Related Lymphatic System in Treating Aged Alzheimer's Disease[J]. *ACS nano*, 2024,18(13):9688-9703.
- [7] Ding X B, Wang X X, Xia D H, et al. Impaired meningeal lymphatic drainage in patients with idiopathic Parkinson's disease[J]. *Nature medicine*, 2021,27(3):411-418.
- [8] 夏丹豪. 帕金森病小鼠模型脑膜淋巴管功能障碍及机制研究[D]. 郑州大学, 2021.
- [9] Keuters M H, Antila S, Immonen R, et al. The Impact of VEGF-C-Induced Dural Lymphatic Vessel Growth on Ischemic Stroke Pathology[J]. *Translational stroke research*, 2025,16(3):781-799.
- [10] Arendash G W, Lin X, Cao C. Enhanced Brain Clearance of Tau and Amyloid- β in Alzheimer's Disease Patients by Transcranial Radiofrequency Wave Treatment: A Central Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [J]. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 2024,100(s1):S223-S241.
- [11] Li K X S W R. Electroacupuncture for motor dysfunction and constipation in patients with Parkinson's disease: a randomised controlled multi-centre trial[J]. *EClinicalMedicine*, 2023,Jan 13(56):101814.
- [12] 蒋金序, 刘洋, 樊慧杰, 等. 电针抑制 Notch1/Hes1 通路介导的小胶质细胞活化对帕金森病小鼠的影响[J]. *中国针灸*, 2025,45(09):1290-1298.
- [13] 祁羚, 张小蕾, 李亚楠, 等. 电针对帕金森病小鼠中脑黑质 SIRT3/NF- κ B/MAPK 信号通路的影响[J]. *针刺研究*:1-8.
- [14] 刘顺畅, 姜春宏, 贺丽丽, 等. 基于 VEGF-C/VEGFR-3 信号通路电针预处理促淋巴管再生修复淋巴水肿的作用机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2024,35(05):1272-1276.
- [15] Wang N, Zhao L, Zhang D, et al. Research progress on the immunomodulatory mechanism of acupuncture in tumor immune microenvironment [J]. *Frontiers in immunology*, 2023,14:1092402.
- [16] 针刺研究.《针刺研究》实验动物福利伦理审查清单[J]. *针刺研究*, 2024,49(02):220.
- [17] 郭义. 实验针灸学[M]. 5. 北京: 中国中医药出版社, 2021.
- [18] 左海燕, 吴生兵, 吴欣, 等. 电针调控血管内皮生长因子 C/血管内皮生长因子受体 3 信号通路改善急性心肌梗死小鼠炎症反应[J]. *针刺研究*, 2022,47(10):851-858.
- [19] Yang L, Huang H, Fan Y, et al. Astragaloside IV ameliorates Parkinson's disease by inhibiting TLR4/NF- κ B-dependent neuroinflammation [J]. *International immunopharmacology*, 2025,160:114972.
- [20] 湛子龙, 吴铭杰, 陈晓婧, 等. 一种同时取硬脑膜及颈深淋巴结的实验方法[J]. *中国组织工程研究*, 2025,29(26):5543-5548.
- [21] 李含章, 李亚楠, 郭磊, 等. 电针对帕金森病小鼠肠道 NEK7/NLRP3 炎症信号通路的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2024,47(10):1466-1473.
- [22] 刘肖瑜, 姜拯坤. 针药并用治疗帕金森病临床观察[J]. *上海针灸杂志*, 2013,32(06):461-463.
- [23] 王彬, 马骏, 王述菊, 等. 帕金森病的针灸疗法规律分析[J]. *湖南中医杂志*, 2017,33(08):153-154.
- [24] Zou W, Pu T, Feng W, et al. Blocking meningeal lymphatic drainage aggravates Parkinson's disease-like pathology in mice overexpressing mutated α -synuclein [J]. *Translational neurodegeneration*, 2019,8:7.
- [25] 肖蝶, 马骏, 祁羚, 等. 脑膜淋巴管促进帕金森病 α -突触核蛋白外排的研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2025,41(16):2604-2610.
- [26] Das Neves S P, Delivanoglou N, Da Mesquita S. CNS-Draining Meningeal Lymphatic Vasculature: Roles, Conundrums and Future Challenges [J]. *Frontiers in pharmacology*, 2021,12:655052.
- [27] Antila S, Karaman S, Nurmi H, et al. Development and plasticity of meningeal lymphatic vessels[J]. *The Journal of experimental medicine*, 2017,214(12):3645-3667.

收稿日期:2026-01-11 修回日期:2026-03-08