

# 帕金森病药物和干细胞治疗临床前动物实验模型选择指南

**[摘要]** 帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是中老年人常见的神经退行性疾病之一, 其临床特征主要表现为静止性震颤, 运动迟缓, 肢体僵硬以及姿势和步态不稳。除了运动障碍, 大部分帕金森病患者还会伴有多种非运动症状, 包括记忆力减退、抑郁、疼痛、嗅觉减退和睡眠障碍等。PD的发病原因尚未明确, 其主要病理特征是以 $\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$ -synuclein) 为主要成分路易氏小体 (Lewy bodies) 的形成, 路易小体不仅存在于黑质, 还扩散至迷走神经背核、蓝斑核等其他脑区, 引起多巴胺能神经元退行性改变。PD的诊断主要依赖临床症状和临床表现, 颅脑CT和MRI检查无明显异常。目前PD的药物治疗包括左旋多巴、多巴胺受体激动剂等, 其他治疗方法还有深部脑电刺激 (Deep brain stimulation, DBS) 和干细胞替代治疗等。由于PD的核心病理改变是中脑特异多巴胺能神经元数量减少, 应用不同来源神经干细胞和多巴胺前体干细胞移植成为目前最有前景的细胞治疗方法。无论是药物, 器械或细胞移植治疗, 都需要用PD动物模型进行临床前实验, 取得可靠治疗效果和安全性后, 才能用于临床治疗。因此本指南首先简述PD的病因、发病机理、临床表现和诊断, 然后重点介绍药物诱导的大鼠、小鼠和非人灵长类PD模型, 转基因PD大鼠和小鼠模型, 以及应用这些动物模型对药物和干细胞产品临床前评估等。本指南将为研发治疗PD的新药和新技术选择动物模型提供理论和实验指导, 同时为研发PD治疗药物提供标准化模型选择框架。

**[关键词]** 帕金森病; 运动障碍; 多巴胺能神经元; 干细胞治疗; 动物模型; 临床前实验

**[中图分类号]** **[文献标志码]** **[文章编号]** 1674-5817(XXXX)XX-0001-24



## Guidelines for Selecting Preclinical Animal Models to Treat Parkinson's Disease with Drugs and Stem Cells

**[ABSTRACT]** Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative diseases in middle-aged and elderly people. Its clinical features mainly include tremor at rest, bradykinesia, abnormal posture and gait. In addition to motor dysfunction, most PD patients also show multiple non-motor symptoms, including memory loss, depression, pain, reduced olfaction, and sleep disorders. The major neuropathological hallmark of PD is the appearance of  $\alpha$ -synuclein-containing Levy bodies in the substantia nigra of the midbrain and other brain regions, causing degeneration and loss of midbrain dopaminergic neurons. The diagnosis of PD mainly depends on clinical symptoms and manifestations, with normal cranial CT and MRI images. L-evodopa replacement therapy is the common treatment method for PD, although deep brain stimulation (DBS) and stem cell therapy are also applied recently. The transplantation of neural stem cells and precursor cells of dopaminergic neurons are the most promising cell therapy because it is proposed to implement restoration of dopamine level in the brain. Before clinical application of any new treatments, preclinical experiments using PD animal models are required for the development of new drugs, novel instruments, and cell transplantation therapy. This guide reviews the etiology, pathogenesis, clinical manifestations and diagnosis of PD, and focuses on the chemical-induced

**[通信作者]** 韩发彬 (1962—), 男, 博士, 教授, 研究方向: iPS 细胞产生, 诱导分化及干细胞移植治疗神经疾病研究。E-mail: fhan2013@126.com。

ORCID: 0000-0003-0220-0471。

陈琳 (1971—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 神经修复学。E-mail: chenlin\_china@163.com。ORCID: 0000000207254156。

陈志国 (1977—), 男, 博士, 教授/研究员, 研究方向: 干细胞与再生医学及疾病机制研究。E-mail: chenzhiguo@gmail.com。

ORCID: 0000-0003-1508-510X。

卢明 (1959—), 男, 博士, 主任医师, 神经疾病干细胞移植治疗, E-mail: lumingcs163@163.com, ORCID: 0000-0002-8275-7490,

李英俊 (1974-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 病理学与病理生理学。E-mail: bjthst@163.com。ORCID: 0009-0003-5971-6599。

rat and mouse PD models, transgenic PD models, non-human primate monkey PD models and behavioral evaluation using these models, providing theoretical and experimental guidelines for the development of new drugs and technologies for treatment of PD.

**[Key words] Parkinson's disease; Motor dysfunction; Dopaminergic neuron; Stem cell therapy; Animal model; Preclinical experiment**

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是中老年人常见的神经退行性疾病之一, 其发病率仅次于阿尔兹海默病, 全球估计有超过 600 万患者<sup>[1]</sup>。PD 病因复杂, 可以分为原发性 PD 和继发性 PD 综合征。原发性 PD 病因不明, 主要由于环境因素和遗传因素导致多巴胺能神经元变性; 继发性帕金森综合征则由明确的外部因素如药物、中毒、脑卒中等疾病引起类似 PD 症状。PD 的主要发病机制是中脑多巴胺能神经元退行性丢失引起, 在中脑黑质内的  $\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$ -synuclein) 异常聚集形成路易氏小体 (Lewy bodies) 是其典型的病理特征。PD 最明显的症状是运动功能失调, 导致震颤、肢体僵硬、运动迟缓, 以及姿势不稳等。利用左旋多巴药物替代治疗和脑深部电刺激可以减缓症状, 但尚无法根治。通过动物模型深入研究和阐明 PD 的关键机制, 为寻找 PD 防治新靶点具有重要的临床意义。

因此, 中国研究型医院学会医学动物实验专家委员会组织中国 30 余家科研院所的 50 多位基础和临床研究专家共同参与制订本指南。本指南将重点介绍: 不同种属 PD 动物模型的特点、建模原理和方法、模拟的病理生理机制及其临床相关性、神经行为学评价技术、各种模型的优缺点及其适用的研究范围; PD 临床前药物试验的设计要点。希望本指南能作为 sICH 临床前动物模型选择和药物评价研究的指导, 以促进我国脑卒中基础研究成果的转化应用。

## 1 PD 病因学

### 1.1 环境因素

PD 是多因素导致的老年神经退行性疾病。发病年龄中位数一般为 60 岁左右, 发病率随着年龄的增长而上升<sup>[2]</sup>, 根据发病年龄的不同, PD 可分为早发性 PD (early-onset parkinson's disease, EOPD) 和晚发性 PD (late-onset parkinson's disease, LOPD), EOPD 发病年龄约为 20 岁, 通常 <45 岁。也可根据发病原因将 PD 分为散发性 PD 和家族性 PD。前者原因不明可能主要由环境因素引起, 后者主要由遗传因素引起。此

外, 环境因素如吸烟, 咖啡因的摄入量, 杀虫剂、除草剂和重金属的接触已被确认为 PD 发病的主要风险因素<sup>[3]</sup>。

1983 年首次发现 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP) 与黑质纹状体退化相关。MPTP 的毒性作用主要由其代谢产物 MPP<sup>+</sup> 引起的, 这是一种线粒体复合物-1 抑制剂, 可以选择性的损伤黑质中的多巴胺能神经元。鱼藤酮 (Rotenone) 和百草枯 (Paraquat) 的分子结构与 MPTP 相似, 研究表明这两种药物不仅可以损伤多巴胺能神经元, 也可以通过抑制线粒体复合物 I 的活性, 引起 PD 的发生, 因此, MPTP、6-OHDA、Rotenone、Paraquat 是诱导 PD 模型的几种常用药物。流行病学调查发现接触这些化学物质与发生 PD 风险之间高度关联<sup>[4]</sup>。此外, 长期暴露于重金属锰作业的工人产生的锰中毒, 其症状与 PD 非常相似, 也是由于锰中毒损伤中脑黑质的多巴胺能神经元引起<sup>[5]</sup>。

### 1.2 遗传因素

自从 1997 年发现帕金森患者的突触核蛋白 (SNCA) 基因突变, 遗传因素越来越受到重视。据估计家族性 PD 的发病率为 10%~20%。目前发现 100 多个基因或位点可能与 PD 发病相关, 此外如果包括常见的敏感遗传突变, 总体的 PD 疾病遗传风险能达到 36%<sup>[6]</sup>。常见的 PD 相关基因包括常染色体显性遗传基因 SNCA, LRRK2, VPS35, 常染色体隐性遗传基因 Parkin、PINK1、DJ1 等, 另外 GBA1 基因突变也是 PD 的一个关键危险因素。此外非典型或复杂 PD 可能与 ATP13A2、DCTN1、DNAJC6、FBX07、PLA2G6、SYNJ1 等基因突变有关, 近来研究发现 CHCHD2、LRP10、TMEM230、UQCRC1、VPS13C 可能是 PD 相关<sup>[7]</sup>。研究认为 PD 发病机制可能主要与  $\alpha$ -synuclein 聚集引起突触功能障碍, 溶酶体或囊泡运输障碍, 线粒体功能障碍和免疫神经炎症等相关<sup>[8]</sup>。

SNCA 突变引起  $\alpha$ -synuclein 聚集和毒性是 PD 发病的一个重要因素。SNCA 突变包括错义变异和重复倍增, 常见的错义变异包括 p.A30G、p.A30P、p.E46K、

p.H50Q、p.G51D、p.A53E、p.A53T和p.A53V等<sup>[7]</sup>。 $\alpha$ -synuclein突变转基因动物模型具有许多PD病理特征，包括突触结构和功能的早期以及进行性损害。LRRK2基因是另一关键PD基因LRRK2是一个大的胞质蛋白，存在于神经突触处，能够与参与囊泡内吞和运输的许多其他蛋白相互作用。LRRK2常见的错义突变包括p.N1437H、p.R1441C/G/H、p.Y1699C、p.G2019S和p.I2020T等。其中最常见的是p.G2019S突变，该突变在PD人群中的患病率为1%以上，并且具有遗传异质性。同时许多与LRRK2相互作用的蛋白也与PD相关，包括SH3GL2、细胞周期蛋白G依赖性激酶（GAK）、RAB7L1、突触蛋白1（SYNJ1）和辅助素（DNAJC6）等。此外，SH3GL2、GAK、DNAJC6和SYNJ1参与网格蛋白包被的囊泡内吞和再循环过程，也与EOPD有关<sup>[7]</sup>。其中SYNJ1突变引起常染色体隐性遗传，它在突触小泡动力学（包括内吞作用和再循环）中发挥着重要作用，在基因敲除小鼠中表现内吞缺陷和网格蛋白包被中间体的显著积累。

溶酶体自噬途径有助于 $\alpha$ -synuclein稳态，溶酶体功能障碍会阻碍 $\alpha$ -synuclein清除，促进 $\alpha$ -synuclein聚集和细胞毒性<sup>[6]</sup>。研究发现PD相关基因与自噬溶酶体相关，如参与溶酶体蛋白lysosomal contents（CTSB）和膜脂（GBA1，SMPD1，GALC）的降解，溶酶体酶的运输（SCARB2）和环境的维持（ATP13A2，TMEM175）等。GBA1编码溶酶体酶-葡萄糖苷酶，水解鞘磷脂和葡萄糖脑苷，产生神经酰胺，GBA1突变导致溶酶体存储功能的紊乱，可以引起 $\alpha$ -synuclein累积，可能是由于葡萄糖神经酰胺和葡萄糖鞘氨醇的积累或者自噬作用<sup>[9]</sup>。SMPD1（编码酸性鞘磷脂酶）和GALC（半乳糖苷神经酰胺酶）也参与鞘脂代谢，PD患者中SMPD1基因突变降低溶酶体活性，促进路易小体中 $\alpha$ -synuclein的累积和聚集<sup>[10]</sup>。SCARB2编码的蛋白质负责将GBA1运输到溶酶体的受体，CTSB编码一种溶酶体半胱氨酸蛋白酶，直接参与 $\alpha$ -synuclein的溶酶体降解。另外ATP13A2（溶酶体转运蛋白）突变能够引起Kufor-Rakeb综合征，是一种青少年起病，认知障碍和核上性凝视麻痹，ATP13A2敲低或过表达能够增强或抑制 $\alpha$ -synuclein的活性<sup>[6]</sup>。

研究发现影响线粒体功能的蛋白也与PD发病相关。PINK1（一种丝氨酸-苏氨酸激酶）可以募集PRKN（一种E3泛素连接酶），引起溶酶体自噬/线粒体自噬，是线粒体稳态所需要的功能。PINK1基因突

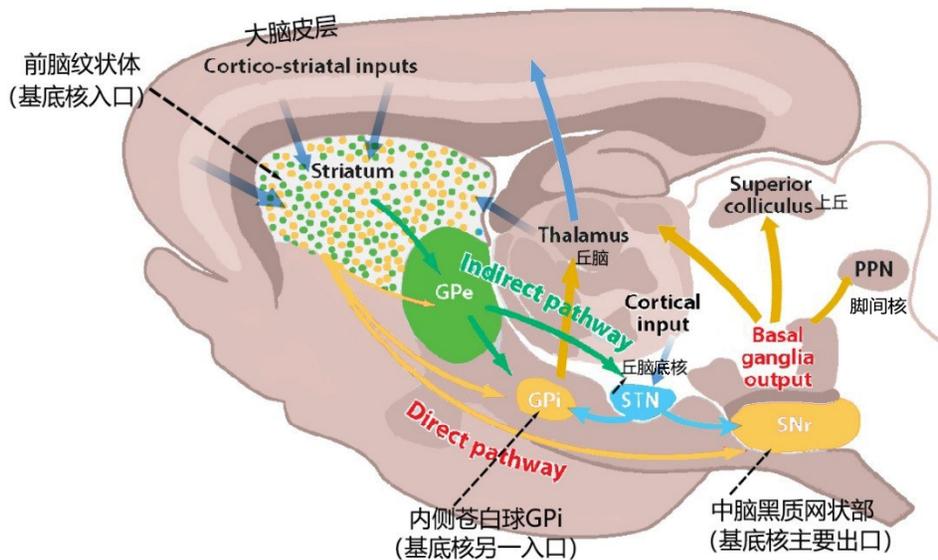
变引起常染色体隐性遗传PD，最常见的错义突变是c.1040T>C（p.Leu347Pro）<sup>[7]</sup>。此外，CHCHD2基因突变引起线粒体损伤，果蝇中CHCHD2缺失会导致与PD病理学相关的线粒体改变和神经细胞表型，从而导致多巴胺能神经元出现年龄依赖性神经变性<sup>[11]</sup>。VPS13C基因突变最初在隐性EOPD中发现，VPS13C基因沉默会改变线粒体形态，降低线粒体膜电位，并增强线粒体自噬作用。参与线粒体功能的PD基因可能作为 $\alpha$ -synuclein的下游基因发挥作用<sup>[6]</sup>。

另外LRP10蛋白可以在高尔基体、内体和内质网之间穿梭。LRP10蛋白定位于囊泡相关结构，与其他蛋白如VPS35，GGA之间相互作用，可调节影响 $\alpha$ -synuclein聚集、胞内转运、细胞间传递等过程<sup>[12]</sup>。Deng等人2016年发现TMEM230可能与PD相关。Lin等人于2020年首次报道UQCRC1突变可能与家族性PD相关，在一个台湾PD家系中发现UQCRC1基因杂合突变p.Y314S与疾病共分离<sup>[13]</sup>。另外有研究发现TMEM230基因突变可能与PD相关，需要进一步验证其致病机制<sup>[14, 15]</sup>。

### 1.3 PD神经环路调控机制

大量研究表明PD发生是多个神经环路受累<sup>[16]</sup>。PD病人脑最明显标志就是中脑黑质的多巴胺能（Dopaminergic，DA）神经细胞大量丢失，进而导致黑质纹状体通路里的多巴胺水平降低<sup>[17]</sup>。脑内的多巴胺主要存在于黑质（Substantia nigra compacta，SNc）和腹侧被盖区（Ventral tegmental area，VTA）。大脑中与PD相关的多巴胺传递通路主要有2条：第一条通路是黑质纹状体通路，此通路中黑质基底节的DA神经元主要投射到尾状核/壳核或背侧纹状体，这条通路负责自主运动的调节和控制，在黑质的DA神经元大量缺失的情况下，会导致震颤和运动困难症状。第二条通路称为中脑皮层通路，多巴胺由腹侧被盖区产生，主要投射至前额皮层等区域，与抉择和学习记忆相关。多巴胺水平过低时会出现学习记忆能力下降、动力不足和情绪障碍等。服用左旋多巴成为临床对症治疗的主要有效手段。左旋多巴进入人脑以后，除了会提高黑质纹状体通路的多巴胺水平之外，也会提高中脑皮层通路的多巴胺水平，导致PD患者产生情绪冲动控制障碍。人体运动是由纹状体和其他几个脑区组成大脑的基底核团来调控，而黑质致密部（substantia nigra pars compacta，SNc）的DA神经元是其中的重要环节，其投射到尾状核/壳核或背侧纹状体，在纹状体释放多巴

胺调控其内神经元的活性从而协调运动（图1）。一旦纹状体缺失了多巴胺，就会引起PD。



注：大脑皮层和丘脑向纹状体提供兴奋性输入（蓝色箭头），纹状体是基底神经节的主要输入核。基底神经节的输出是黑质网状部（Substantia nigra pars reticulata, SNr）和苍白球内侧部（globus pallidus interior, GPi），并且主要投射到大脑皮层额叶区域的丘脑核，上丘核和脚核。直接通路起源于纹状体投射神经元（黄色），其轴突（黄色箭头）直接延伸至GPI和SNr。间接通路起源于纹状体多巴胺能神经元（绿色），其轴突终止于苍白球（globus pallidus, GP，现多称外侧苍白球GPe），接下来GP中的神经元投射到丘脑底核（subthalamic nucleus, STN），丘脑底核投射到GPI和SNr。因此，纹状体多巴胺能神经元通过GP和STN与基底神经节的输出端黑质（SNr）和苍白球内侧（GPI）间接相连，绿色箭头为间接投射通路<sup>[18]</sup>。

Note: Cerebral cortex and thalamus send excitable input to striatum (blue arrows). Striatum is the major nucleus of basal ganglia. Basal ganglia send output to SNr and Gpi, PPN, Superior colliculus and thalamus (yellow arrows). The neuronal axons of the striatum directly extend to GPI and SNr (yellow arrows). The striatum also indirectly extend to Gp/Gpe and STN (Green arrows). STN also extends to GPI and SNr. Thus, the dopaminergic neurons of striatum connect to SNr and GPI of basal ganglia through GP and STN. Neural circuit regulation of dopaminergic neurons in substantianigra of middle brain

图1 黑质多巴胺能神经元相关的神经环路调控

正常情况下，丘脑底核是整个大脑基底核中唯一存在大量兴奋性神经元的核团，其兴奋时激活运动皮质引起运动。而Gpi/SNr是丘脑的控制核团，可以调节皮质运动兴奋程度。Gpi/SNr兴奋时引起丘脑兴奋性降低，运动减少；反之亦然。直接通路起到抑制Gpi/SNr的作用；间接通路起到兴奋Gpi/SNr的作用，抑制运动<sup>[19]</sup>。

在PD患者中，黑质-纹状体多巴胺能减少，引起直接通路抑制、间接通路兴奋，最终引起丘脑抑制，从而引起运动缓慢、强直等运动减少的症状。在PD患者中，Gpi或STN的毁损可以明显减轻运动迟缓，起到治疗PD作用。因此Gpi和STN是目前帕金森病患者行DBS手术的两个作用靶点<sup>[20]</sup>。

## 2 PD患者的临床表现

PD临床特征主要表现是运动迟缓，静止性震颤，僵硬，以及姿势和步态的改变。除了运动障碍，大部分PD患者还会表现出多种非运动症状，包括嗅觉减退，便秘，泌尿功能障碍，直立性低血压，记忆力减退，抑郁，疼痛和睡眠障碍<sup>[21]</sup>。

大部分PD病在60岁以后才发病，仅有不到20%的病人于40岁以前发病，性别分布以男性略多于女性。

### 2.1 震颤

典型的震颤为静止性震颤，频率4~5Hz（范围3~7Hz）。表现为粗大地节律性震颤，多从手指开始，可呈搓丸样动作；上肢较下肢早出现；而下肢的震颤以从踝关节开始者较多见；逐渐蔓延至全身，出现下颌、

口唇、舌及颈震颤。运动时震颤减轻或消失，情绪激动时加重，睡眠中消失。晚期强烈的震颤于运动中也难消失。

## 2.2 僵直

PD病人的僵直是由于肌张力增强而造成的一组临床综合征，为一种特征性的铅管样肌张力增强，常出现于肢体与躯干肌群，同时累及伸肌与屈肌并持续于被动运动的全过程。僵直多自一侧上肢近端开始，逐渐蔓延到远端、对侧，及至全身。病人早期由于腕关节伸肌的强直，病人搁肘于桌面，并使前臂于桌面垂直，前臂及腕肌尽量放松时，腕关节或多或少仍保持于伸直位（正常人呈90°屈曲），谓之“道标手”，有早期诊断价值。因为颈肌强直，嘱病人屈颈时，头只能缓慢地垂下，称“落下试验阳性”。

## 2.3 动作缓慢

动作缓慢是PD病人随意动作显著减少，动作缓慢，尤以走动时为甚。表现为书写困难，而且字越写越小，谓之“写字过小症”。言语减少，语音低沉、单调。目前认为此类症候的严重，症状愈明显。随意动

作的减少可表现为一种特殊的步态形式，即想迈步但就是迈不出，双足象粘于地面一般，称为凝滞步态（freezing of gait）。运动减少的病理生理机制可能为随意运动内在的动态模式混乱的结果。

## 2.4 步态姿势障碍

步态姿势障碍是PD病人行走时上肢的协同摆动动作减少或消失。踝和髋的协同运动障碍，步幅小且擦地而行；加上体态前倾、身体重心前移；故以小步加速前冲如似追逐重心，不能立即止步，称为“慌张步态”，疾病晚期姿态严重失常。

## 2.5 其他症状

除了运动障碍，大部分PD患者还会表现出多种非运动症状，包括嗅觉减退、便秘、泌尿功能障碍、直立性低血压、记忆力减退、抑郁、疼痛和睡眠障碍<sup>[21]</sup>。嗅觉障碍主要表现在嗅觉识别、辨别、察觉阈值和气味记忆等方面的损伤，是PD患者最常见和最具特征的早期非运动症状<sup>[22]</sup>。其他还有皮脂腺分泌过多称为油脂脑（头），汗腺分泌增加或减少，垂涎等。

表1 PD早期和后期出现的运动和非运动症状<sup>[21]</sup>

Table 1 The motor symptoms and non-motor symptoms in early and later stages of PD

分类 Classification	症状 Symptoms	出现时 间 Stages	临床表现 Manifestation
PD的运动症状 Motor symptoms of PD	运动迟缓	早期	自发运动普遍缓慢和缺乏，手臂摆动、面部表情、手势减少，床上翻身困难，声音低下；自主重复运动的速度和幅度逐渐降低，包括手指敲击、握力、旋前-旋后运动、脚趾敲击和足跟踩踏。
	肌强直	早期	肌肉僵硬
	震颤	早期	静止性震颤(4-6Hz)常发生于四肢，嘴唇，下巴，很少发生在头部。在以目标为导向的随意运动中，幅度减少或消失，检查手部震颤时，双手放松，双臂支撑。
	步态改变	早期	手臂摆动减少，拖着一条腿，走路时姿势微弯。
	姿势改变	后期	站立时躯干向前弯曲，双臂外展，肘部弯曲。
	冻结步态	后期	在步态开始，步态期间，转弯或者接近狭窄空间时，突然和短暂的无法进行有效的向前迈步。
	平衡运动	后期	站立和行走时不稳。改变姿势反射，跌倒。
PD的非运动症状 Non-motor symptoms of PD	构音障碍和吞咽困难	后期	构音障碍和吞咽困难
	嗅觉减退	早期	多达70%患者报告嗅觉丧失
	睡眠障碍	早期	快速眼动睡眠行为障碍，失眠，周期性肢体运动，静坐不能，白天嗜睡等。
	神经精神科特征	早期	明显的冷漠，焦虑，抑郁。
	自主神经功能障碍	早期	便秘，胃排空延迟，尿急或尿失禁，勃起功能障碍，直立性低血压，怕热。
	轻度认知障碍	早期	执行和注意力领域轻度认知下降
	疼痛和躯体感觉障碍	早期	疼痛，感觉异常和烧灼感
痴呆	后期	大约30%患者会出现痴呆，患病率随着疾病发展而增加，常伴有幻觉和精神病。	

注：PD，帕金森病

Note: PD, Parkinson's disease

注: PD, 帕金森病

Note: PD, Parkinson's disease

### 3 PD的分子发病机制

PD的发病由老年化、遗传、环境等多种因素共同影响, 目前已研究报道PD的主要病理机制包括 $\alpha$ -synuclein的错误折叠及过表达、氧化应激、线粒体功能障碍、自噬和蛋白酶体功能障碍、神经炎症等。

#### 3.1 $\alpha$ -突触核蛋白的错误折叠及过表达

正常情况下,  $\alpha$ -synuclein以不同的形式(寡聚/单体/聚集)存在, 参与调节突触小泡运输和神经递质释放。在PD发病的情况下, 这些蛋白质错误折叠和聚集, 形成包涵体或者路易小体(Lewy Body, LB)<sup>[22]</sup>。其在大脑中扩散的方式有多种, 如朊病毒样传播、外泌体传播、隧道纳米管样传播等<sup>[23]</sup>。大量临床前动物实验研究表明,  $\alpha$ -synuclein诱导的包涵体、路易小体毒性是多巴胺能神经元死亡的主要因素。

#### 3.2 线粒体功能障碍

PD患者SNc中线粒体复合物I活性受损, 表明散发型PD发病机制中的线粒体功能障碍<sup>[24]</sup>。此外, 家族性PD涉及的许多基因与线粒体功能相关。PARK2和PARK6功能缺失突变损害了参与线粒体自噬清除的蛋白质(如Parkin和PINK-1)功能<sup>[25]</sup>, 导致线粒体质量控制过程的丧失。

$\alpha$ -synuclein也可以在线粒体内积累, 导致复合体I功能障碍。有研究报道, 注射包装A53T突变的人 $\alpha$ -synuclein的腺相关病毒(AAV)到大鼠脑内, 观察发现线粒体断裂和功能障碍; 而在纹状体注射 $\alpha$ -synuclein的小鼠中, 线粒体功能的降低和mtDNA的退化在黑质区也有相似的表现。线粒体功能受损也是LRRK2基因突变诱发PD的一个特征改变。

#### 3.3 氧化应激

PD患者大脑中的氧化损伤表现为脂质过氧化、活性氧(ROS)生成增加, 例如由上述线粒体损伤或通过单胺氧化酶B的多巴胺代谢引起; 还表现为抗氧化防御的减弱, 主要表现为还原型谷胱甘肽水平的降低等。鉴于PD动物模型中线粒体损伤的普遍性, 氧化应激是许多PD模型的共同特征。在炎症引起的PD模型中, LPS被直接注射到大脑, 可介导诱导型氧化氮合酶(iNOS)的表达增加, 引发ROS的产生。在 $\alpha$ -synuclein诱导的大鼠模型中, 给予过表达人A53T的AAV病毒脑内注射, 也表现出了非常明显的氧化应激

加强<sup>[26]</sup>。

#### 3.4 自噬和蛋白酶体功能障碍

氧化应激或错误折叠的异常 $\alpha$ -synuclein主要由两个系统清除: 泛素-蛋白酶体系统(Ubiquitin-proteasome system, UPS)和自噬溶酶体系统<sup>[27]</sup>。UPS清除过程包括两个步骤, 先由泛素对蛋白底物进行标记, 接着蛋白酶对蛋白进行分解。在原发性PD患者脑中, 蛋白酶系统的催化活性降低, 同时20S蛋白酶 $\alpha$ 亚单位的表达降低。在家族性PD病例中, PARK2基因(导致E3泛素连接酶减少)和PARK5基因(导致泛素C末端水解酶减少)突变引起的功能缺失也会导致蛋白酶体系统受损。

自噬包括微自噬, 即溶酶体自身吞噬受损的蛋白质; 大自噬, 即自噬体在与溶酶体融合前吞噬异常蛋白; 以及分子伴侣介导的自噬, 其中分子伴侣靶向并运输受损蛋白至溶酶体。溶酶体蛋白(例如LAMP1和LAMP2A)或分子伴侣(例如某些热休克家族蛋白)水平的降低导致特发性PD中的自噬功能障碍, 而基因突变例如GBA1, 可降低溶酶体酶GBA1和PARK2或PARK6的活性, 损害自噬过程。这些研究结果都提示自噬溶酶体系统参与了家族性PD病例的发病机制。

自噬功能障碍在多种其它模型中被证实存在。在6-羟基多巴胺(6-OHDA)大鼠模型和鱼藤酮大鼠模型中, LAMP1表达和溶酶体蛋白酶活性降低; 鱼藤酮大鼠模型损伤还与自噬空泡的形成有关; 脑内注射了 $\alpha$ -synuclein的小鼠由于自噬受损, 表现出 $\alpha$ -synuclein毒性物质的沉积。然而, 在嗅球中注射AAV- $\alpha$ -synuclein的大鼠表现出自噬标记物的表达增加, 在SNc中注射则导致蛋白酶体系统受损。在转基因PD模型中也观察到继发于受损的线粒体功能和降低的自噬-溶酶体病理特征, 以及纹状体和皮层中自噬空泡的积累。

#### 3.5 神经炎症

多数PD患者的大脑中存在明显的神经炎症, 这可通过星形胶质细胞增生、小胶质细胞增生、免疫细胞浸润、补体激活和促炎细胞因子(如IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ )产生增加来证明, 神经炎症被认为是PD发病的原因之一<sup>[28]</sup>。

PD转基因遗传模型中, 虽然有报道 $\alpha$ -synuclein模型在多巴胺能神经元死亡之前, 纹状体出现小胶质细胞数量和促炎细胞因子增加, 但是 $\alpha$ -synuclein转基因小鼠表现出非常复杂的反应, 且结果不一致。其它转基因模型也类似, 在24个月大的LRRK2(G2019S)转

基因小鼠中, SNc和纹状体中的GFAP免疫反应性增加, 但小胶质细胞数量没有变化; 相比之下, 在GBA1杂合D409V/WT小鼠中, 炎症反应发生在海马中增强, 但在SNc中未存在明显变化。

## 4 药物诱导小鼠和大鼠PD模型 4.1 药物诱导小鼠帕金森病模型

PD的发病机制是复杂的和多因素的, 主要有线粒体损伤、氧化应激、自噬和蛋白酶体功能障碍、神经炎症等, 而且是多个致病机制交织在一起导致发病。任何单一的动物模型都很难同时具有上述全部病理表现和发病机制。通常使用药物诱导PD动物模型, 包括6-OHDA、MPTP, 另外还有百草枯或鱼藤酮<sup>[29]</sup>。后两种现在已经很少使用。这些模型中, 如小鼠急性暴露于神经毒素, 则线粒体功能会遭到破坏, 氧化应激加强, 黑质纹状体多巴胺能细胞快速死亡从而导致运动缺陷, 而慢性暴露于神经毒素可诱导进行性模型, 小鼠神经元中会出现 $\alpha$ -synuclein聚集等现象。本章讨论的小鼠PD模型主要是用MPTP诱导的动物模型, 尽管它在完全重现PD症状方面存在局限, 但与其他毒素诱导的动物模型相比, 它具有成本低廉, 易于操作, 伦理方面的考虑较少, 几乎可以反映人类PD的临床症状<sup>[30, 31]</sup>。

在神经毒素诱导PD模型中, 胶质细胞的激活和炎症信号的变化在MPTP处理后的小鼠中多有报道。胶质细胞增生在6-OHDA造模的小鼠和大鼠、鱼藤酮造模的大鼠的SNpc和纹状体中得到充分证明。用百草枯处理的小鼠也表现出炎症信号通路活化增加。神经毒素可介导小胶质细胞向M1型(促炎型)转变, 激活炎症信号通路, 分泌大量促炎细胞因子, 作用于多巴胺能神经元, 最终导致神经元损伤<sup>[32]</sup>。

### 4.1 1 模型制作方法

MPTP动物模型被认为是神经毒素诱导的PD动物模型的经典范例。该模型不仅能够复制出中脑多巴胺能神经元的损伤以及各种PD的发病机制, 如氧化应激、活性氧、炎症和能量衰竭等, 也能表现出运动和非运动PD样症状; 部分MPTP造模方法还能形成路易小体; 这些特点都和人的PD实际情况相符。

PD造模常用腹腔注射、皮下注射或静脉注射MPTP给药, 而脑室内注射现在已经极少采用, 所以造模后是产生双侧脑内病变。试剂要现用现配, 注射当天配制好新鲜的MPTP溶液。

MPTP诱导的小鼠PD模型对动物的性别、体重、年龄甚至品系来源均有一定的选择性, 因此在挑选动物的时候要加以注意, 对MPTP最敏感的小鼠品系是C57BL/6, 为获得更好的PD试验结果, 一般选用雄性小鼠、平均体重22g, 周龄 $\geq 8$ <sup>[33]</sup>。根据实验要求和目的, 可分为急性模型、亚急性和慢性模型。

急性快速模型可分为单次注射和多次注射。单次腹腔注射剂量为 $30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 该模型损伤轻, 易恢复; 多次注射的剂量为 $15\text{--}20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 每隔2h注射1次, 一天内共3-4次, 持续1天。该模型损伤快且严重, 模型动物的死亡率也高达50%。急性模型没有包涵体形成。如果静脉注射, 剂量减少, 其换算公式: 静脉剂量=腹腔剂量 $\times 0.7$  (基于生物利用度差异)。

亚急性模型需多次注射, 每次尾静脉或腹腔注射的剂量为 $20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 每天1次, 连续5-7d。该模型的成活率较高, 实验周期较长。亚急性模型的DA神经元死亡率和急性类似, 但实验动物存活良好。亚急性模型也没有包涵体形成。

慢性模型采用雄性C57BL/6N小鼠, 腹腔注射使用低剂量MPTP  $20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 每周3次, 持续1-3个月。该模型死亡率低, 黑质纹状体DA神经元进行性退化, 慢性模型中持续的神经炎症反应和运动障碍, 类似于PD的缓慢进行性神经变性过程。

### 4.1 2 分子病理

MPTP是一种亲脂性分子, 很容易穿过血脑屏障。全身给药后, MPTP可被细胞中的单胺氧化酶B(MAO-B)氧化成1-甲基-4-苯基吡啶鎓(MPP<sup>+</sup>)。MPP<sup>+</sup>才是MPTP造模产生多巴胺能神经毒性的直接化合物。由于它与多巴胺在结构上的相似性, 它很容易被多巴胺能神经元通过多巴胺转运体(DAT)摄取/吸收, 缺乏DAT的小鼠可免于MPTP中毒。MPP<sup>+</sup>可以在囊泡单胺转运蛋白(VMAT)的帮助下转运到突触小泡中, 通过抑制线粒体中的复合物I诱导神经细胞死亡。导致表达Tyrosine Hydroxylase (TH)的多巴胺神经元数目减少, 可用免疫组化方法检测。另外在MPTP诱导的慢性PD模型中, 会有 $\alpha$ -synuclein磷酸化(pS129), 可用WB检测, 这是PD造模病理检测的双重金标准。

对于急性和亚急性模型, 造模之后的数天之内, 黑质TH免疫反应性神经元迅速消失, 多巴胺能神经元死亡率为40-50%。因为MPTP下调TH基因表达, 这种损失可能没有反映实际的DA细胞死亡。后来引入无

偏倚的体视学来计数TH免疫反应性和尼氏染色的神经元,而且在MPTP处理后至少7天染色,能更好的评估DA细胞损失,结果发现单次注射MPTP ( $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )一般导致20–30%的多巴胺能神经元损失。此外,有证据表明亚急性方案导致强烈的DA神经元随时间的恢复,超过8天的亚急性方案只造成24%的DA神经元损失。这些结果提示急性、亚急性损伤模型不足以永久破坏黑质纹状体通路。

#### 4.1 3 动物神经行为学表现与评估

神经行为评估是了解MPTP等药物损伤动物黑质-纹状体多巴胺能神经系统,是否产生PD的运动障碍症状,是研究PD病理机制,药物筛选和治疗效果的关键环节和评价造模是否成功的主要指标。根据PD的运动障碍表现,药物诱导小鼠PD模型的运动障碍测试方法主要有以下几种<sup>[34, 35]</sup>。

##### 4.1.3 1 爬杆试验(Pole Test)

爬杆试验用于评估动物的敏捷性,是运动障碍的一种测量方法。该装置由一根木杆(50厘米高,直径0.5厘米,用纱布包裹以防止打滑)和顶部的一个木球组成。杆的底部铺上垫料,以保护小鼠免受伤害。在适应环境后,小鼠会预先接受三次爬杆训练,以确保所有动物一旦被放在球上就会将头朝下。在爬杆测试期间,记录小鼠从顶部到底部所需的总时间。具体测试方法是將小鼠放置在杆的顶端附近,抬起头,记录转身(第一次测量)和爬下(第二次测量)的时间。这项任务需要熟练的前肢抓握和操纵,这需要完整的基底神经节和红核脊髓通路的激活。因此,这项运动对黑质纹状体功能障碍非常敏感。

另一种测试方法将小鼠置于木球上,分别记录其从球顶爬到杆顶、从杆顶爬到杆中点、从杆中点爬到杆底的时间。如果在3秒内完成记为3分,6秒内完成记为2分,超过6秒或小鼠由杆上掉下记为1分,结果用总分表示。

##### 4.1.3 2 转棒实验(Rotarod Test)

转棒实验被广泛用于评估MPTP诱导小鼠PD模型的运动功能<sup>[33]</sup>。小鼠进行正式转棒行为检测前,需进行5天的训练再进行测量,以适应实验环境和减少因不适应造成的误差,在给药前,所有小鼠均在转速为3~5 r/min旋转棒上接受持续300秒的训练(如C57BL/6建议初始转速5 rpm, FVB/N小鼠需降低至3 rpm)。这一训练过程需重复3轮以上,以达到所有小鼠可以旋转棒上行走。小鼠经MPTP造模后,在300 s内以5

~30 r/min的均匀加速的旋转棒上进行转棒试验,记录跌落的潜伏期。即使有大量的训练,转棒实验还是有较大的个体可变性。另外,转棒表现是否可以精确地反映与MPTP中毒相关的实际多巴胺损失或外周毒性,仍存在一定的争议。

##### 4.1.3 3 步态试验(Stepping test)

步态试验是将不透明跑道框(10×10×50cm)置于记录纸上,跑道终点侧三分之二有不透明顶盖。将每组小鼠两后爪用棉签涂不同颜色墨水以示区别。将小鼠放入跑道内,对记录纸上的足迹进行分析。步距测量至少记录小鼠开始爬行后的连续三步距离。将一只后爪的连续两个脚印点与对侧后爪相应的一个脚印点进行连线,形成一个三角形。测量连续的两个脚印点间距离及对侧脚印点到该连线的垂直距离,即分别为步长和步宽。

步距试验中,PD组小鼠均出现步宽增加、步长缩短现象,与正常组小鼠对比差异具有统计学意义。

##### 4.1.3 4 旷场试验(Open Field Test)

旷场试验评估动物的运动能力、焦虑水平及探索行为。方法是利用50×50×50cm方盒作为场地,底部均匀划分出10 cm×10cm的25个格子。小鼠在安静、光线较暗的环境中测试,摄像机录像监控。小鼠适应环境10分钟后,计算5分钟内小鼠在在盒底部移动的格子数(需三爪以上跨入格内),连续测5次取平均值。旷场试验中,PD组小鼠均出现自由运动减少、爬越格子数减少现象,与正常组小鼠对比差异具有统计学意义。

##### 4.1.3 5 悬挂试验(Wire Hang Test)

悬挂试验是一种评估小鼠运动能力和协调性的行为学测试,通过观察小鼠在悬挂状态下的抓握能力来评分,用于评估如PD等运动功能障碍。将C57BL小鼠的两只前爪抓于一根水平金属线上,小鼠身体处于悬挂状态,观察其两只后爪抓金属线情况并评分,最长评测1分钟。若小鼠能用双后爪抓住金属线记为3分,一只后爪能抓住金属线记为2分,两只后爪均未能抓住金属线或由金属线上掉下记为1分。悬挂试验中,正常对照组小鼠都能够快速上举双后爪并抓住金属线。PD组小鼠出现躯干和四肢震颤、行动迟缓,双后爪不能上举抓住金属线。两组小鼠悬挂试验评分差异具有统计学意义。

#### 4.1 4 应用范围

MPTP模型的应用包括评估非运动性PD症状和电生理学研究。虽然大多数用MPTP造模的小鼠不出现

持续的和进行性的运动功能障碍，MPTP可以导致小鼠的黑质致密部（SNpc）和腹侧被盖区（VTA）超过一半的DA神经元丢失。MPTP可以诱导增加海马和SNpc中总的 $\alpha$ -synuclein，磷酸化的 $\alpha$ -synuclein以及微管蛋白相关单位（Tau）。MPTP小鼠模型的优势之一是可以对转基因小鼠进行研究。例如， $\alpha$ -synuclein和Bax在MPTP模型中的有害作用已经用 $\alpha$ -synuclein和Bax KO小鼠证明。注意以下事项。

MPTP在不同种类的小鼠中表现出不同的敏感性。小鼠中黑质多巴胺细胞损失取决于品系、年龄和性别。C57BL小鼠对MPTP较为敏感，而CF-W小鼠、FVB/N小鼠和BALB/c小鼠对MPTP的敏感性较C57BL小鼠稍差，CF-1和CD-1对MPTP的敏感性最差。目前较常用C57BL/6小鼠进行MPTP诱导PD造模。

另外该模型的损伤效果变异比较大，模型严重程度取决于神经毒素的剂量，给药方式、以及所用的物种和品系。与灵长类动物不同，啮齿类动物（以及不同品系的小鼠）对MPTP毒性不太敏感，需要在几天内多次给药来诱导神经元变性。因此，需要适当的给药时间表。与MPTP相关的一个缺点是由于双侧病变，小鼠模型没有健侧肢体维持生存。因此，需要更多的努力来照顾动物的饮食，防止脱水，以减少死亡率。

MPTP模型的显著优势在于黑质致密部（SNpc）与纹状体展现出的对其高度的敏感性，这一特性使其成为研究PD发病机理中线粒体复合物活性受抑等关键环节的理想造模工具。特别地，MPTP诱导的PD动物模型能够精确模拟出PD患者典型的运动障碍症状<sup>[36]</sup>，为深入理解疾病表现提供了有力支持。然而，值得注意的是，MPTP模型并非PD病理的全貌再现。它无法完全复刻动物体内的PD病理特征，尤其是无法促使 $\alpha$ -synuclein聚集体的形成<sup>[37]</sup>，因此难以观察到路易小体的生成，这在一定程度上限制了其对PD全面病理机制的探索能力。此外，MPTP模型的构建结果深受用药量及给药途径的影响，不同条件下差异显著<sup>[38]</sup>。在小鼠造模过程中，不仅存在较高的死亡率，而且行为和生化指标的可变性较大，这为实验结果的稳定性和可靠性带来了挑战。更为复杂的是，小鼠对MPTP造成的病理损害具有一定的自发修复能力<sup>[39]</sup>，这进一步增加了模型解读的难度和复杂性。

## 4.2 药物诱导大鼠帕金森病模型

6-OHDA是一种选择性破坏儿茶酚胺能神经元的神经毒素，它是与多巴胺和去甲肾上腺素结构相似的

化合物，经由多巴胺代谢产物的羟基化过程在体内自然生成，并已被确认存在于人类的尾状核之中。早在1968年即有报道指出，向大鼠的黑质区域注射6-OHDA会引发黑质至纹状体通路中的多巴胺能神经元发生顺行性变性。自那时以来，利用6-OHDA诱导的PD模型已成为探究该疾病神经元损失及行为改变特征背后病理机制的最广泛应用的动物模型之一<sup>[38]</sup>。利用6-OHDA诱导建立PD模型时，通常是单侧注射，因为双侧注射则会导致较高死亡率<sup>[40]</sup>。这种毒素可以立体定向注射到大鼠的纹状体、前脑中央束（MFB）或直接注射到黑质（SNc）内，能导致大部分SNc致密部多巴胺能神经元变性退化，随着时间的推移形成稳定的运动缺陷。通过检查偏侧倾向性的旋转，可以较明确评估损伤程度和治疗效果。

### 4.2.1 模型制作方法

6-OHDA粉剂一般4℃存放，现用现配。配置6-OHDA溶液需要加入0.02%抗坏血酸抗氧化。6-OHDA须一次性全部配好，然后迅速分装，-80℃保存。使用时配好的6-OHDA可以暂时4℃存放，避光保存。配好的6-OHDA，时效一般为6小时，过时需要再配或者从-80度冰箱中再取。

造模方法是将大鼠麻醉后固定于脑立体定位仪上。剪开头皮后用棉签轻轻擦拭消毒颅骨表面，将前囟（Bregma）和后囟（Lambda）点暴露。调节立体定位仪，将前囟和后囟点的高度调节到一致。以前囟点为原点，找到注射位点所在的坐标。AP（a）：-4.0mm；L：0.8 mm；V：-8.0 mm；齿杆：+3.4，用颅骨钻沿注射坐标位点钻孔，以保证微量注射器进针时不碰到孔壁。使用微量注射器吸取6-OHDA（避光），准确插入注射位点，以0.5-1 $\mu$ l/min的速度将6-OHDA注射到目标脑区，注射剂量为4.0-5.0 $\mu$ l。

### 4.2.2 分子病理

6-OHDA通过破坏黑质纹状体DA系统损伤多巴胺能神经元来模拟PD发生。6-OHDA是一种高度可氧化的多巴胺类似物，通过多巴胺转运蛋白（DAT）和去甲肾上腺素再摄取转运蛋白进行转运。它通过不同的途径发挥细胞毒性作用，主要包括产生自由基，直接抑制呼吸链等。这些不同的机制可能与活性氧（ROS）的产生和细胞色素C的释放有关，所有这些最终导致线粒体功能失调。

由于它不能穿过血脑屏障（BBB），这种神经毒素需被直接递送到靶区域。至少有三种6-OHDA损伤模

型被用于模拟PD: 注射到前脑中央束、黑质致密部或纹状体黑质纹状体通路的末端区域。因为6-OHDA可分别通过DAT和NET进入至多巴胺能和去甲肾上腺素能神经元, 也对去甲肾上腺素能神经元造成损伤, 所以在给予6-OHDA的同时, 给予去甲肾上腺素转运蛋白(NET)抑制剂(如地昔帕明), 能确保对多巴胺能神经元的选择性损伤。6-OHDA注射的脑区, 可以观察到不同形式的神经元变性。如果将这种神经毒素注射到纹状体中, 注射后3小时在纹状体中可以看到轴突去神经样改变, 导致纹状体轴突终末的损伤, 随后纹状体中的6-OHDA导致DA神经元更进一步的退化, SNc区域中的多巴胺能神经元丧失。这种注射会导致逆行性神经元丢失, 这也是在PD患者中观察到的现象。但6-OHDA模型的缺点是不伴有 $\alpha$ -synuclein聚集或路易体样包涵体的形成。

## 4.2 3 神经行为学表现与评分

### 4.2.3 1 阿扑吗啡诱导转圈试验(经典旋转试验)

阿扑吗啡诱导转圈试验(Apomorphine-Induced Rotation Test)是在大鼠的头部或颈部皮下注射0.1 mg·kg<sup>-1</sup>的盐酸阿扑吗啡(Apomorphine), 该药物溶于含1%的抗坏血酸的生理盐水溶液中。药物诱导PD造模后2-3周, 注射阿扑吗啡后, 将大鼠被放置在单独的圆盆中观察记录大鼠转圈次数。该测试长期以来一直是6-OHDA损伤的金标准, 因为旋转数据是客观的、可靠的, 并且清楚地测量了纹状体多巴胺受体的敏感性, 这是由黑质纹状体多巴胺几乎完全单侧缺失造成的。如果30分钟内转圈的次数超过200圈或者每分钟内转圈的次数超过7圈, 表示PD造模成功<sup>[41]</sup>。

该试验基于阿扑吗啡作为多巴胺受体激动剂的特性, 通过激活大脑中的多巴胺受体来诱导转向行为, 可以用来评估多巴胺系统的完整性和动物对药物的反应性, 从而预测药物和手术治疗效果, 如深部脑刺激(DBS)的反应性<sup>[42]</sup>。

### 4.2.3 2 转棒试验

转棒试验是一个由小型发动机驱动的旋转杆, 用于测试在设定速度或一定速度范围内大鼠和小鼠的运动性能。必须训练动物以高于正常行走的速度停留在杆上, 并且当动物掉落时, 压力板被激活, 产生数字读数以标记啮齿动物的最大持续时间, 可以用于评估动物的运动协调性和耐力。

大鼠进行正式转棒行为检测前需进行5天的训练。具体训练过程如下。Day1: 设置转棒速度为匀速10 r·

min<sup>-1</sup>, 训练2次, 每次300秒, 以使大鼠适应在转棒上爬行。设置转棒速度为匀速20 r·min<sup>-1</sup>, 训练1次, 300秒, 以使大鼠适应速度。如果大鼠掉落, 应立即放回转棒继续训练。每次训练间隔30分钟。Day2: 设置转棒速度为匀速20 r·min<sup>-1</sup>, 训练1次, 匀速30 r·min<sup>-1</sup>, 训练2次, 每次300秒。Day3: 设置转棒速度为匀速30 r·min<sup>-1</sup>, 训练2次, 匀速40 r·min<sup>-1</sup>, 训练1次, 每次300秒。Day4: 设置转棒速度为匀加速5~30 r·min<sup>-1</sup>, 训练3次, 5~40 r·min<sup>-1</sup>, 训练1次。以使大鼠适应变加速运动。Day5: 设置转棒速度为匀加速5~40 r·min<sup>-1</sup>, 训练4次。每只大鼠使用后先清理尿液和粪便, 以75%医用酒精擦拭转棒装置, 祛除异味。

### 4.2.3 3 旷场试验

旷场试验(Open Field Test)是利用100cm×100cm×50cm方盒作为场地, 底部均匀划分出50cm×50cm的4个格子。大鼠在安静、光线较暗的环境中测试, 摄像机录像监控。大鼠适应环境10分钟后, 计算5分钟内大鼠在在盒底部移动的轨迹数, 连续测5次取平均值。旷场试验中, PD组大鼠均出现自由运动减少、轨迹数减少现象。

### 4.2.3 4 步态试验

可以测试单侧6-OHDA损伤的大鼠使用前肢的能力。研究者从尾巴根部固定大鼠, 使其后肢和一只前爪离开桌面, 并由研究者保持稳定。然后动物在桌子表面移动, 这样动物必须用剩下的前爪支撑重量。计算承重前爪调整的步数。每只前爪有五次试验。每个调整步骤被定义为正手步骤, 即爪子朝向躯干的运动, 以补偿身体向外的横向运动, 或者反手步骤, 即爪子远离躯干的运动, 以补偿身体向内的中间运动。也可以将前爪以预定速度放在跑步机上进行测试, 以评估步态参数, 如步长、步宽、支撑相、摆动相等。该测试是单侧多巴胺丢失的可靠指标。

### 4.2.3 5 前肢放置试验

前肢放置试验(Forelimb Placement Test)对感觉刺激的运动反应需要背侧纹状体完整的多巴胺能神经支配。在该试验中, 触须的感觉刺激激活了单侧6-OHDA损伤大鼠的运动反应。测试前, 研究人员手握大鼠躯干、使其前肢自由悬空。操作方法为手握大鼠在桌子旁边的空间中上下移动, 使其一侧脸颊的触须刷在桌子边缘, 以触发放置反应。正常情况下, 同侧前肢会响应感官刺激(触须刺激)伸展到桌面。对大鼠进行10次试验。单侧多巴胺缺失的动物不会将爪子

“放置”在受损伤影响的一侧，而未受损的爪子会可靠地“放置”到桌面上。

阿扑吗啡转向行为试验 (Apomorphine-Induced Rotation Test) 是在大鼠的颈部皮下注射  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的盐酸阿扑吗啡 (Sigma-Aldrich)，该药物溶于 1% 的抗坏血酸和 0.9% 的氯化钠溶液中。注射后不久，大鼠被放置在单独的圆盆中。注射后 5 分钟，使用 ANY-maze 软件记录并追踪它们的旋转行为，持续 15 分钟。通过对侧旋转次数中减去同侧旋转次数来计算净旋转次数。只有每分钟显示超过四次净旋转的大鼠才被纳入研究进行进一步分析。

## 4.2 4 应用范围

虽然 6-OHDA 在不同的动物如猴、小鼠、狗和猫中表现出敏感性，但它更常用于某些种类的大鼠。6-OHDA 模型主要用于药物筛选和干细胞移植治疗等研究。如果将 6-OHDA 双侧注射到纹状体中，可能导致动物严重丧失运动能力，口渴和饥饿而死亡。因此，6-OHDA 主要用于单侧损伤 PD 模型的制作。

6-OHDA 模型的显著优势在于其高度的选择性，能够特异性地毁损黑质中的多巴胺能神经元，而对其他类型神经元的影响甚微，这一特性使其成为评估 PD 治疗药物效果的有效工具。然而，该模型亦存在局限性，主要在于 6-OHDA 诱导的 PD 动物所展现的主要运动障碍为偏侧旋转，这未能全面复现 PD 患者的典型临床症状，诸如静止性震颤、运动迟缓、肌肉强直及四肢拘紧等。此外，作为一种急性损伤模型，6-OHDA 模型的造模周期较短，无法体现人类 PD 病情渐进发展、病程绵长的特点<sup>[43]</sup>。

## 5 转基因小鼠帕金森病模型

### 5.1 $\alpha$ -synuclein 转基因小鼠 PD 模型

#### 5.1.1 造模机制

SNCA 基因是首个发现与家族性 PD 发病相关的基因，编码  $\alpha$ -synuclein 蛋白。近 20 年的研究表明  $\alpha$ -synuclein 异常聚集形成斑块 (路易小体)，从而影响神经元和脑组织的正常功能，是 PDPD 的主要病理特征。SNCA 的基因突变 (A53T、A30P、E46K) 或水平增加 (三倍或重复) 导致  $\alpha$ -synuclein 聚集和原纤维化，研究发现  $\alpha$ -synuclein 异常同时影响线粒体功能，导致蛋白酶体及溶酶体损伤，高尔基体运输功能损伤<sup>[44]</sup>。简要制作方法是人的 SNCA 的 cDNA 克隆到小鼠 Thy-1 启动子下游，注射到 C57Bl6/DBA2 小鼠胚

胎，产生过表达 SNCA 的转基因小鼠<sup>[45]</sup>。

### 5.1 2 模型特点

小鼠  $\alpha$ -synuclein 过表达的表型结果取决于驱动转基因表达的启动子，常见的转基因动物模型包括  $\alpha$ -synuclein、Thy1、PrP (WT、A53T、A30P) 转基因小鼠等<sup>[44, 46]</sup>。该模型小鼠黑质纹状体系统的功能表现异常，可观察到  $\alpha$ -synuclein 的异常聚集及路易小体的形成，但黑质、纹状体区多巴胺能神经元损伤的结论尚有争议。该类模型仅能部分反映 PD 患者病理变化和表型特征。

### 5.1 3 模型评估与应用

本类模型通常呈现出运动功能障碍。通常采用开放旷场、转棒、步态、游泳、平衡木、爬杆等实验评估 PD 小鼠的运动功能，同时，本类模型小鼠还存在嗅觉和消化功能障碍，昼夜节律紊乱等症状。该模型可应用于研究家族性  $\alpha$ -synuclein 突变所致 PD 的发病机制、 $\alpha$ -synuclein 功能及针对  $\alpha$ -synuclein 突变的临床前 PD 药物筛选。

### 5.2 LRRK2 转基因小鼠 PD 模型

#### 5.2.1 造模机制

LRRK2 基因突变与 PD 发病密切相关，常见的 LRRK2 基因突变包括 G2019S 和 R1441C/G。LRRK2 能够参与囊泡运输和细胞骨架动态调控，调节线粒体功能，调控神经元轴突生长，LRRK2 基因突变引起磷酸化加强，促进  $\alpha$ -synuclein 及 Tau 蛋白的磷酸化和聚集<sup>[53]</sup>。

### 5.2 2 模型特点

LRRK2 基因突变 R1441G，G2019S 转基因小鼠模型可见  $\alpha$ -synuclein 聚集，纹状体 DA 含量降低，但黑质致密部 (SNpc) 多巴胺能神经元数量正常，轴突有损伤，未见其他神经元的退行性病变<sup>[54, 55]</sup>。LRRK2 基因突变 R1441C 转基因小鼠可见黑质多巴胺能神经元数量显著减少，DA 释放减少<sup>[56]</sup>。该类模型仅能部分反映 PD 患者病理变化和表型特征。

### 5.2 3 模型评估与应用

LRRK2 基因突变小鼠模型呈现年龄依赖性的运动功能障碍，常采用旷场、转棒、步态、游泳、平衡木、爬杆等实验评估 PD 小鼠的运动功能，同时观察小鼠非运动功能 (如胃肠功能障碍) 的变化。该类模型可应用于研究家族性 LRRK2 突变导致 PD 的发病机制，LRRK2 基因同  $\alpha$ -synuclein 的交互作用，和临床前 PD 药物筛选。

表2 过表达不同片段和突变 $\alpha$ -synuclein的小鼠转基因PD模型特点Table 2 The characteristics of the transgenic mouse PD models to express different fragments of the  $\alpha$ -synuclein gene

$\alpha$ -突触核蛋白 $\alpha$ -synuclein	启动子 Promoter	物种 Species	多巴胺能 神经d丢失(%) Loss of dopamine neurons	$\alpha$ -synuclein的病理表型 Pathological Phenotype of SCNA	运动表现 Motor symptoms	非运动表型 Non-motor symptoms
片断(1-130) <sup>[47]</sup>	Rat TH	Mus musculus	~ 50	细胞质内 $\alpha$ -synuclein聚集 (pS129和泛素阴性)	自发运动减少	NA
A30P+A53T <sup>[48]</sup>	Rat TH	Mus musculus	~ 50	$\alpha$ -synuclein阳性包涵体	自发运动减少	NA
A53T <sup>[49]</sup>	Prnp	Mus musculus	~ 40	细胞质内 $\alpha$ -synuclein聚集	自发运动、在棒时间和步幅减少	NA
野生型(SCNA-OVX line) <sup>[50, 51]</sup>	SCNA (BAC)	Mus musculus	~ 30	细胞质内 $\alpha$ -synuclein聚集 (可溶, pS129阴性)	在棒时间和前爪步幅长度降低	粪便重量增加
野生型 <sup>[52]</sup>	SCNA (BAC)	Mus norvegicus	~ 40	$\alpha$ -synuclein阳性包涵体	自发活动和直立活动减少	嗅觉障碍

注:说明:SCNA, $\alpha$ -突触核蛋白基因;NA,未发现  
SNCA, alpha synuclein; NA, not found

### 5.3 Parkin 基因敲除小鼠PD模型

#### 5.3.1 造模机制

Parkin 是最常见的常染色体隐性遗传基因之一。于1977年在常染色体隐性遗传青少年型PD患者中被发现,该基因有12个外显子,全长约1.5 Mb,编码465个氨基酸,与早期PD相关,有研究显示,散发性PD尤其是EOPD患者的Parkin基因突变率高达6.3%~18%<sup>[57, 58]</sup>。Parkin基因编码一种被称为泛素的蛋白质,此蛋白具有E3泛素连接酶的功能,并将其连接到靶标蛋白质上,引起靶标蛋白降解<sup>[29]</sup>。Parkin在细胞质中因自身抑制机制处于非活跃状态,但在线粒体损伤或细胞应激反应等触发因素作用下,细胞质中的Parkin被激活并募集到线粒体外膜上,通过磷酸酶及张力蛋白同源物诱导的蛋白激酶1(PINK1)/Parkin信号通路启动线粒体自噬的过程,在PD的氧化应激、线粒体损伤及蛋白酶体功能紊乱中起重要作用<sup>[59]</sup>,Parkin基因敲除可导致受损线粒体清除障碍,这可能是引发PD的病理基础<sup>[60]</sup>。此外,Parkin可通过泛素化和靶向NLRP3进行蛋白酶体降解来抑制炎症体的启动。若Parkin突变活性丧失,可引起泛素化底物ZNF746/PARIS积累,从而产生线粒体来源的活性氧自由基(mitoROS),促进活性NLRP3炎症体复合物的组装,导致神经毒性底物积聚,损害泛素依赖性的信号转导,最终导致线粒体功能障碍和神经退行性变<sup>[61]</sup>。有研究表明,Parkin基因敲除鼠会出现线粒体功能紊

乱和氧化损伤<sup>[62]</sup>。

#### 5.3 2 模型特点

Parkin基因敲除小鼠主要表现为线粒体功能障碍,包括线粒体膜电位降低和线粒体形态异常<sup>[60, 63]</sup>,Parkin敲除的小鼠模型无法完全模拟PD患者脑中的多巴胺能神经元丢失及病理性 $\alpha$ -synuclein蛋白聚集的病理特征<sup>[64]</sup>,且此小鼠模型在年龄较低时并未出现明显的多巴胺能神经元损失,虽然随着年龄的增长可能会出现多巴胺能神经元退行性变化<sup>[43]</sup>,但是其进程与临床PD患者脑中神经细胞退变死亡的变化并不一致<sup>[64]</sup>。此外,Parkin基因敲除小鼠会出现一定程度的运动功能障碍,但通常较轻,可能需要更敏感的方法来检测<sup>[65]</sup>。

#### 5.3 3 模型评估与应用

此种模型小鼠在行为学和神经病理学方面的症状通常比较轻微,故应选取更有特异性的方法进行评价<sup>[66]</sup>。据文献报道,Parkin基因敲除小鼠的行为测试和神经病理学评估结果大多无明显异常。神经行为学测试包括:旷场测试评估一般运动和趋触性;转棒测试评估运动协调和平衡;握力测试评估前肢力量;足迹模式分析识别步态缺陷;以及埋藏食物和粪便计数以识别前驱症状。Parkin基因敲除小鼠的步幅比野生型长,表明Parkin基因敲除小鼠的运动功能可能有一定程度的轻微障碍<sup>[66]</sup>。在神经病理学方面,Parkin基因敲除小鼠黑质致密部(SNpc)的多巴胺能神经元的

形态或数量没有明显变化<sup>[66]</sup>。鉴于此种模型小鼠随着年龄的增长可能会出现多巴胺能神经元退行性变化,应考虑选用适当年龄的动物<sup>[43]</sup>。此外, Parkin 基因敲除小鼠模型在模拟 PD 患者脑中多巴胺能神经元丢失及病理性  $\alpha$ -synuclein 蛋白聚集的重要病理特征方面存在局限性,模型通常显示出轻微变化甚至没有表型。一些研究表明, Parkin 基因敲除小鼠可能在某些特定条件下表现出敏感性,例如对纹状体多巴胺释放和突触可塑性的影响,以及对系统性 MPTP 处理的易感性增加<sup>[67]</sup>。

虽然 Parkin 基因敲除小鼠模型没有完全复制人类 PD 的主要病理特征,但是此模型在研究线粒体自噬在 PD 发病过程中的机制方面具有一定优势<sup>[59, 60]</sup>。有研究通过 Western blot 等技术检测 Parkin 蛋白的表达缺失以及线粒体自噬相关蛋白的变化,结果表明,与野生型比较, Parkin 敲除小鼠的黑质、纹状体部位 P62 蛋白水平显著增加, P62 (也称为 SQSTM1) 是一个与自噬和蛋白聚集体形成相关的蛋白,能够与泛素化蛋白结合,并在 Parkin 的作用下被降解。这表明 Parkin 的缺失影响了 P62 的正常降解过程,可能与 Parkin 在线粒体自噬中的作用有关<sup>[68]</sup>。

综上所述, Parkin 基因敲除小鼠模型有助于深入了解线粒体自噬导致 PD 的发病机制,在评估 PD 的病理机制和潜在治疗方法方面具有一定的应用价值,但此模型并没有完全复制人类 PD 的主要病理特征,因此在研究中需要根据具体情况设计实验,并谨慎解释模型所得结果。

### 5.3 4 分子病理机制

Parkin 基因敲除小鼠模型的分子机制涉及多个方面,主要包括以下几点:线粒体自噬功能障碍: Parkin 是一种 E3 泛素连接酶,其主要功能之一是促进损伤线粒体的自噬清除。由于 Parkin 的缺失,这一过程受到阻碍,导致损伤线粒体的累积,这可能是导致神经退行性变化的关键因素之一<sup>[60]</sup>。氧化应激增加: Parkin 基因敲除可能导致细胞内氧化应激的增加。由于 Parkin 在线粒体稳态调控中的作用,其缺失可能导致线粒体产生的活性氧 (ROS) 增加,从而对细胞造成损伤<sup>[69]</sup>。炎症反应:有研究表明, Parkin 和 PINK1 可以减缓 STING 诱导的炎症反应,这表明 Parkin 不仅在线粒体自噬中发挥作用,还可能参与调节神经炎症反应,这是 PD 病理过程中的重要方面<sup>[70]</sup>。突触功能异常:在 Parkin 基因敲除小鼠中,突触结合蛋白 11

(Syt11) 可能作为 Parkin 的底物,其异常积累可能影响多巴胺能神经元的突触功能,包括突触囊泡循环和多巴胺的分泌,从而促进 PD 的病理进程<sup>[71]</sup>。神经保护作用的缺失: Parkin 在正常情况下具有神经保护作用,能够清除受损的线粒体,防止细胞死亡。在 Parkin 基因敲除小鼠中,这种保护作用的缺失可能导致神经元对各种应激因素更加敏感,从而加速神经退行性变化的过程<sup>[60]</sup>。

### 5.3 5 应用范围

Parkin 基因敲除小鼠模型在评估 PD 的病理机制和潜在治疗方法方面具有一定的应用价值,尤其在用于研究线粒体功能的调控和研究 Parkin 蛋白在线粒体自噬和细胞保护方面具有独特作用<sup>[59, 60]</sup>。虽然有报道表明 Parkin 基因敲除小鼠模型在复制人类 PD 的主要病理特征方面不如 Parkin 基因敲除的非人灵长类动物模型<sup>[64]</sup>,但是因其成本相对较低,此模型在研究线粒体自噬在 PD 发病机制和药物治疗方面具有一定优势。

### 5.4 DJ-1 基因敲除小鼠 PD 模型

#### 5.4.1 造模机制

DJ-1 基因突变是常染色体隐性遗传性早发型 PD (autosomal recessive early-onset parkinsonism, AREP) 发病的常见原因之一。DJ-1 缺乏是家族性 PD 的遗传致病因素<sup>[72]</sup>,可能增加  $\alpha$ -synuclein 聚集和引起线粒体异常<sup>[73, 74]</sup>。此外, DJ-1 参与包括氧化应激与细胞转化在内的多种细胞过程<sup>[75]</sup>,其功能缺失可导致抗氧化能力下降,增加了氧化应激对神经元的损伤。有研究表明, DJ-1 敲除小鼠的内侧前额叶皮层中谷胱甘肽 (GSH) 水平和 GSH/谷氨酸 (Glu) 比率显著增加<sup>[76]</sup>。DJ-1 的失活使神经元更容易受到氧化应激和细胞死亡的影响<sup>[77]</sup>。DJ-1 作为非典型的过氧化物酶,通过氧化半胱氨酸-106 清除过氧化氢。DJ-1 突变与常染色体隐性遗传性 PD 相关<sup>[74]</sup>。此外,也有研究表明, DJ-1 可以通过稳定转录因子 Sox9 来调节星形胶质细胞的增生,在受伤的大脑中,缺乏 DJ-1 会导致星型胶质细胞功能缺陷,从而延迟胶质细胞对大脑的修复作<sup>[42]</sup>。通过靶向敲除 DJ-1 外显子 2 和外显子 3 可构建 DJ-1 基因敲除 (KO) 小鼠 PD 模型<sup>[78, 79]</sup>。

#### 5.4 2 模型特点

DJ-1 基因敲除小鼠模型,在遗传背景特异性、作用机制及动物的行为表现方面具有以下特点: DJ-1 基因突变是常染色体隐性遗传早发型 PD 发病的常见原因,该模型特别适合研究遗传因素在 PD 中的作用<sup>[76]</sup>。

DJ-1 蛋白参与调节线粒体功能, 包括抗氧化应激、抗细胞凋亡以及引发自噬等。DJ-1 基因敲除小鼠表现出线粒体功能障碍, 如线粒体复合物 I 活性降低、线粒体膜电位降低, 以及线粒体片段化和线粒体自噬<sup>[80]</sup>。此模型小鼠中, 黑质部分的多巴胺能神经元反映出的氧化应激损伤有明显增强<sup>[81]</sup>。此外, DJ-1 基因敲除可能影响神经炎症反应, 有研究表明 DJ-1 可增强星形胶质细胞的抗炎功能, 其功能障碍导致 PD 发展中过度的炎症反应, 因此 DJ-1 基因敲除小鼠模型可以用于研究 PD 中的炎症过程<sup>[82]</sup>。在早期 DJ-1 基因敲除的小鼠中, 其自发运动功能(旷场实验)并未发现有明显的异常, 但在任务态依赖性运动中表现出显著的缺陷, 这提示 PD 患者的任务依赖运动障碍的发生可能早于 PD 经典运动障碍<sup>[83]</sup>。

### 5.4 3 模型评估与应用

DJ-1 基因敲除小鼠模型在 PD 研究中的作用主要体现在氧化应激、线粒体功能障碍、神经化学改变、自噬功能异常、运动功能障碍以及信号通路调节方面。DJ-1 基因敲除小鼠表现出对氧化应激的敏感性增加, 特别是在黑质多巴胺能神经元中, 表现出明显的氧化应激损伤增强。DJ-1 的缺失减弱了细胞的抗氧化能力, 增加了氧化应激对神经元的损伤<sup>[80]</sup>。此外, DJ-1 基因敲除小鼠还表现出线粒体功能障碍, 包括线粒体复合物 I 活性降低和线粒体膜电位降低, DJ-1 基因敲除小鼠细胞中还曾观察到断裂的线粒体<sup>[80]</sup>。在神经化学方面, 通过体内磁共振波谱(1H-MRS)和基质辅助激光解吸/电离质谱成像(MALDI-MSI)的互补半定量分析, 发现 DJ-1 基因敲除小鼠的内侧前额叶皮层(mPFC)中的谷胱甘肽(GSH)水平和 GSH/谷氨酸(Glu)比率显著增加, 可能呈现出一种星形胶质细胞补偿机制, 以响应由 DJ-1 功能丧失引起的局部氧化应激升高<sup>[76]</sup>。此外, DJ-1 可作为自噬调节因子参与自噬过程, 在 DJ-1 基因敲除的 PD 动物模型中, 分子伴侣介导的自噬作用受到抑制, 从而加重  $\alpha$ -synuclein 聚集引发 PD<sup>[84, 85]</sup>。总之, DJ-1 基因敲除小鼠模型为研究 PD 的病理机制、评估治疗方法以及探索新的治疗靶点和开发新的治疗方法提供了重要的实验工具。

### 5.4 4 分子病理

DJ-1 基因敲除小鼠模型产生 PD 的分子病理主要包括以下几个方面。氧化应激损伤增加: DJ-1 基因敲除小鼠中, 黑质部分的多巴胺能神经元表现出明显的氧化应激损伤增强。DJ-1 蛋白的缺失导致细胞内氧化

还原稳态失衡, 活性氧(ROS)大量累积, 引发氧化应激, 破坏线粒体稳态, ROS 继续累积, ATP 合成减少, 进一步增加了对线粒体和细胞中蛋白质、脂质以及核酸的损伤。线粒体功能障碍: DJ-1 基因敲除导致小鼠细胞的线粒体形态和功能均受影响, 包括呼吸链受损、线粒体内 ROS 增加、线粒体膜电位降低及线粒体形态改变, 并且溶酶体活性也下降, 缺陷的线粒体自噬减少、聚集增多<sup>[80]</sup>。自噬功能受损: 在 DJ-1 基因敲除的 PD 动物模型中, 分子伴侣介导的自噬作用受到抑制, 从而加重  $\alpha$ -synuclein 聚集。DJ-1 作为自噬调节因子与自噬机制相互作用, DJ-1 的缺失导致自噬受体蛋白 p62 和细胞自噬蛋白 LC3 的自噬依赖性降解受损, 降低了小胶质细胞对  $\alpha$ -synuclein 的吞噬作用。信号通路调节: DJ-1 蛋白的缺失可导致 PI3K/Akt 信号通路的损伤和氧化应激的产生。这条信号通路的损伤与多巴胺能神经元的退行性变化密切相关<sup>[84]</sup>。抗氧化基因调控: DJ-1 可调控多种抗氧化基因表达, 从而增强细胞抗氧化能力。DJ-1 基因敲除可能影响这些基因的表达, 进而影响多巴胺能神经元对氧化应激的抵抗力<sup>[86]</sup>。神经炎症: DJ-1 基因敲除小鼠模型中, 小胶质细胞诱导的对多巴胺能神经元的毒性增加, 并损害了自噬受体蛋白 p62 和细胞自噬蛋白 LC3 的自噬依赖性降解, 降低了小胶质细胞对  $\alpha$ -synuclein 的吞噬作用, 从而加剧神经炎症<sup>[82]</sup>。

### 5.4 5 应用范围

由于 DJ-1 基因敲除小鼠模型可反映 PD 在氧化应激、线粒体功能障碍、自噬功能受损、信号通路调节以及神经炎症相关的分子病理机制, 故此种模型适用于研究氧化应激及线粒体自噬在 PD 发病过程中的作用机制。此外, 由于 DJ-1 基因敲除与神经炎症的发生有关, 因此 DJ-1 基因敲除小鼠模型也适于研究炎症与 PD 发病的关系。

## 6 转基因大鼠帕金森病模型

与小鼠相比, 大鼠的神经系统与人类更相似, 大脑更发达, 脑容量、表面积均比小鼠大。大鼠的智力更高, 对新环境易适应, 有探索性, 易训练, 对惩罚和暗示敏感等的特性, 这些特性使得大鼠被更广泛地用于行为学研究和高级神经活动的研究。

### 6.1 模型制作

#### 6.1.1 过表达 $\alpha$ -synuclein 的大鼠 PD 转基因模型

采用重组腺相关病毒(Recombinant Adeno-

Associated Viral, rAAV) 作为基因  $\alpha$ -synuclein 表达的载体。为了将 rAAV 注射到大鼠的黑质区, 需要引入脑立体定位技术。本实验中利用脑立体定位技术注射表达  $\alpha$ -synuclein 的 rAAV 病毒颗粒到小鼠大脑黑质。

简要方法: 将脑立体定位仪三维坐标臂上的定位针移动到前囟的位置, 以此为原点, 将定位针移动到颅骨上所需的位置: 前囟,  $-5.3\text{mm}$ ; 中线  $+2.2\text{mm}$ ; 颅平面:  $-7.7\text{mm}$ 。使用灭菌 PBS 将表达  $\alpha$ -synuclein 的 rAAV 病毒原液稀释成  $1 \times 10^{13}\text{gc/mL}$ , 用带有外径为  $0.2\text{mm}$  注射针的  $10\mu\text{L}$  Hamilton 微量注射器吸取  $4.5\mu\text{L}$  病毒稀释液, 设置微量注射泵, 参数为流速  $1\mu\text{L}/\text{min}$ , 注射总时间  $4\text{min}$ , 这样 rAAV 总注射量为  $4 \times 10^{10}\text{gc}$ 。将注射器固定在微量注射泵上, 再将注射泵固定在三维定位臂上, 移动定位臂使注射器针头尖端移至定位孔处。缓慢地旋转手轮使定位针伸入到黑质区, 深度为  $7.7\text{mm}$ , 启动注射泵, 开始注射。注射完成后, 将注射针留在脑内  $3\text{min}$ , 以使病毒液充分扩散, 然后缓慢地将注射器针头退出鼠脑。

### 6.1 2 $\alpha$ -synuclein A53T 突变基因转基因大鼠

将人类  $\alpha$ -syn A53T 突变基因插入到脑组织特异启动子 PDGF 的下游, 构建  $\alpha$ -syn A53T 表达载体。用显微注射法将线性化的转基因载体注射到 SD 大鼠的受精卵中<sup>[87]</sup>, 用 Wistar 大鼠作假孕受体, 制备转基因大鼠。

### 6.2 分子病理

$\alpha$ -synuclein 是一种位于突触前末梢的蛋白, 生理条件下调节突触血管的再生和重塑。该基因的两端错义突变 (A53T、A30P) 与家族性 PD 密切相关, 突变的  $\alpha$ -synuclein 可促进自身寡聚物的形成, 增加其神经毒性, 是 PD 特征性病变路易小体 (Lewy body, LB) 的主要成分<sup>[85]</sup>。

### 6.3 行为学表现与评分

#### 6.3.1 阿扑吗啡诱导大鼠转圈行为测试

当大鼠脑内出现 DA 含量降低的现象之后, 在对应脑区的 DA 受体就会代偿性的出现超敏的现象。当注射了 DA 受体激动剂, 如阿扑吗啡后, DA 释放增加, 由于受损侧的脑区 DA 受体超敏, 导致其表现的功能强于健侧, 大鼠出现向健侧转圈的现象。

按  $0.5\text{mg/mL}$  的浓度用生理盐水配制阿扑吗啡, 称取体重后, 按  $0.5\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的量对大鼠进行腹腔注射, 注射完成后将其放入一个新的鼠笼中, 进行拍摄或者直接计数其向健侧转圈次数。时间为  $30\text{min}$ , 若大鼠旋转速度  $>7\text{r}/\text{min}$  或  $>210\text{r}/30\text{min}$ , 则视为成功 PD

模型<sup>[88]</sup>。

### 6.3 2 转棒实验

每只模型大鼠在行为测试前要训练  $5\text{min}$ , 使其能够在大小鼠疲劳转棒仪的转轴上停留, 随后休息  $30\text{min}$  开始实验。将转棒速度调为  $20\text{r}/\text{min}$ 。以  $180\text{s}$  作为实验终止时间。每只大鼠测试 3 次, 记录其在转棒上停留的时间, 取平均值作为该实验鼠的行为测试结果。

除去转圈实验, 转棒实验等常规 PD 模型行为检测方法外, 常用的还有旷场试验、跑台测试、圆柱体试验 (前肢不对称试验) 和阶梯行走试验等<sup>[89]</sup>。

### 6.3 3 步态试验

可以测试单侧 6-OHDA 损伤的大鼠使用前肢的能力。研究者从尾巴根部固定大鼠, 使其后肢和一只前爪离开桌面, 并由研究者保持稳定。然后动物在桌子表面移动, 这样动物必须用剩下的前爪支撑重量。计算承重前爪调整的步数。每只前爪有五次试验。每个调整步骤被定义为正手步骤, 即爪子朝向躯干的运动, 以补偿身体向外的横向运动, 或者反手步骤, 即爪子远离躯干的运动, 以补偿身体向内的中间运动。

6.4 应用范围

对于 PD 的动物模型来说, 可以分为基于神经毒素的模型和遗传学模型, 前者大多都是对脑内多巴胺系统造成急性损伤, 使多巴胺能神经元凋亡, 从而产生类似 PD 的症状, 但是由于 PD 是一种逐渐发生的神经系统疾病, 这种急性损伤的模型在很多方面存在着缺陷, 所以近年来基于遗传学手段建立的 PD 模型得到了广泛应用, 它能一定程度上实现疾病缓慢发生的过程, 其产生的行为学、生理

学及生化指标的改变更加贴近 PD 的发病过程。根据以上 PD 模型描述, 将几种

常用 PD 大小鼠动物模型比较分析总结见表 3。

## 7 药物诱导非人灵长类 PD 模型及应用

### 7.1 非人灵长类模型制作方法

建立具有长期运动行为学改变的灵长类动物模型, 用于研究神经保护性药物的研究。利用不同运动变化评估方法探讨 MPTP 诱导的猴帕金森病模型运动行为学的长期动态变化。MPTP 诱导建立的非人灵长类猴 PD 模型具有典型代表性<sup>[90]</sup>。

一般选择健康的非人灵长类进行模型建立。MPTP 毒性作用存在物种差异, 不同给药方法和给药时间会表现出不同的行为、病理特征<sup>[38]</sup>。非人灵长类模型按

表3 几种常用PD大小鼠动物模型特点比较

Table 3 Comparison of Characteristics of Several Commonly Used PD Mouse and Rat Animal Models

模型类型 Model type	建模 时间 Modeling time	损伤部位 sites of injury	路易 小体 Lewy body	成模检测 时间 De - tection time	运动行为测试方 法 Motor be - havior testing	可重复性 Repeatability	适用范围 Scope of intervention application
6-OHDA大鼠PD模型 6-OHDA rat PD model	注射后1-3周内 模型稳定	黑质致密部、纹状 体	否	2-4周	旷场,转圈,转 棒,步态运动明 显减少	高(旋转行为与神经元损伤 程度高度一致,成功率> 90%)	DBS、药物、 干细胞治疗 干预
MPTP小鼠PD模型 MPTP mouse PD model	注射后1-2周 内模型稳定	黑质致密部、纹状 体	否	2-4周	旷场,转棒,爬 杆,步态运动明 显减少	中(行为学测试结果可能存 在个体差异)	DBS、药物、 干细胞治疗 干预
SCNA转基因大鼠PD模型 SCNA transgenic rat PD model	过表达野生型 或突变SCNA 基因	根据转基因类型而 定,可影响多个脑 区	是	出生后数 周至数月	旷场,转棒,步态 运动减少	高(转基因技术可重复性强)	基因治疗、药 物干预
Parkin基因敲除小鼠PD模 型 Parkin gene knockout mouse PD model	敲除 Parkin 基 因	根据转基因类型而 定,可能影响多个 脑区	否	出生后数 周	旷场,爬杆,步态 运动减少	高(转基因技术可重复性强)	基因治疗、药 物干预

注:6-OHDA, 6-羟基多巴胺; MPTP, 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶; SCNA,  $\alpha$ -突触核蛋白基因; Parkin, E3泛素-蛋白连接酶; PD, 帕金森病  
6-OHDA, 6-Hydroxydopamine hydrobromide; MPTP, 1-Methyl-4-phenyl- 1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine; SNCA, alpha synuclein ; Parkin,  
parkin RBR E3 ubiquitinprotein ligase; PD, Parkinson's disease

发病急缓和进展快慢分为急性PD模型与慢性PD模型;按损伤模式不同分为偏侧PD模型和双侧PD模型。而慢性双侧PD模型在疾病进展、生理生化方面都与人类PD进展具有相似性,是研究PD最有价值的模型<sup>[91]</sup>。目前非人灵长类MPTP给药方式有皮下、肌肉、静脉、颈内动脉注射和脑室给药<sup>[42]</sup>。同时研究表明,非人灵长类接受相同程序的MPTP注射,因个体差异性而表

### 7.1 1恒河猴

一般采用肌肉注射 $0.2 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 1次/周,持续21周左右或2次/周,持续15周左右<sup>[94]</sup>。老年猴通常比青年猴更易感,但老年猴肌肉注射制备模型时模型猴病情变化不可控<sup>[95]</sup>。研究表明,在静脉注射MPTP的方案中,恒河猴虽能保持相对稳定的症状,但仍然不能模拟PD慢性发生的过程。采用肌注+静脉注射给予MPTP的青年恒河猴呈现了稳定的运动和非运动症状<sup>[96]</sup>。

### 7.1 2食蟹猴

食蟹猴注射方案同恒河猴注射方案相似,虽然食蟹猴和恒河猴同属于猕猴,但是食蟹猴对MPTP的敏感性更强<sup>[92]</sup>。

### 7.1 3狨猴

连续3天进行MPTP皮下注射给药,每天的剂量分

现出不同程度临床症状,即临床症状呈阶梯式非同步发展<sup>[92]</sup>。因此,建立慢性非人灵长类PD模型,采用小剂量、长期进程性MPTP给药方案。且随着给药周期延长,非人灵长类动物个体差异性逐渐表现出来,再根据个体差异性量身定制MPTP给药方案<sup>[93]</sup>。对于不同PD猴模型如恒河猴,食蟹猴,狨猴的特点如表4所示。

别为 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,总积累剂量为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>[97]</sup>。

### 7.2 分子病理

20世纪80年代中期研究者发现化合物MPTP转变为毒性物质后可以透过血-脑屏障,然后被多巴胺能神经元胞体摄取,聚集于线粒体后抑制呼吸链ATP合成,导致氧化应激损伤,进而引发多巴胺能神经细胞凋亡。MPTP是目前公认的可导致模拟人类PD症状的神经毒性的物质<sup>[98]</sup>。

### 7.3 模型评估

非人灵长类动物常见的帕金森临床表现和体征以运动迟缓、姿势步态异常、肌肉僵直、震颤等运动症状为主,同时伴有睡眠障碍、认知缺失等多种非运动症状<sup>[99]</sup>。目前以视频录像为媒介,运用多项测试包括: Kulran 临床评分、上肢精细运动分析、认知记忆

表4 恒河猴,食蟹猴,狨猴PD模型的主要特点

Table 4 Main characteristics of PD models in rhesus monkeys, crab eating monkeys, and marmosets

特性 Characteristic	恒河猴 Rhesus monkey	食蟹猴 Cynomolgus monkey	狨猴 Marmoset
MPTP 敏感性 (ED50 值)	恒河猴对 MPTP 的敏感性存在个体差异。一般肌肉注射 MPTP 的剂量从 0.2 mg/kg 开始, 逐渐增加至 0.5 mg/kg <sup>1,3</sup>	食蟹猴对 MPTP 的敏感性也存在个体差异, 且中老年食蟹猴对 MPTP 的敏感性更高。颈内动脉注射 2-3 mg MPTP 后辅以静脉注射 ( $\leq 0.4$ mg/kg) <sup>2,3</sup>	狨猴对 MPTP 的敏感性相对较低, 通常需要更高的剂量 (如 0.5 mg/kg/周, 连续 5 周) 才能诱导出帕金森病症状 <sup>3</sup>
行为学表型差异 Behavioral phenotype differences	会出现静止性震颤、姿势/意向性震颤、运动迟缓、步态不稳、面部表情减少、姿势僵硬等典型症状, 还可能伴有嗜睡、打哈欠、便秘、生活自理能力下降、发声减少等非典型症状 <sup>1</sup>	会出现明显的帕金森病症状, 如运动迟缓、震颤等, 且症状的严重程度和进展速度因个体而异	会出现运动迟缓、震颤等症状, 但症状的严重程度相对较低
成本评估 Cost assessment	恒河猴体型较大, 饲养成本较高, 且由于其对 MPTP 的敏感性存在个体差异, 建模过程可能需要更多的时间和精力来调整剂量	食蟹猴体型相对较小, 饲养成本略低于恒河猴, 但其对 MPTP 的敏感性也存在个体差异, 建模过程中需要根据个体情况进行调整	狨猴体型最小, 饲养成本相对较低, 但需要更高的剂量才能诱导出症状, 可能会增加药物成本

注: MPTP, 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶; ED50, 半数有效量  
MPTP, 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine; ED50, median effective dose

功能分析和总体运动活动监测, 影像学数据分析、肌电图检测等, 研究 MPTP 诱导的非人灵长类 PD 模型运动行为学的长期动态变化及评估 MPTP 诱导的非人灵长类 PD 模型的稳定性、运动功能缺陷和非运动功能缺陷<sup>[93]</sup>。

### 7.3 1 临床症状动态评价

每日观察记录非人灵长类 PD 样行为改变。将动物转移至行为观察笼, 分别于 MPTP 注射前 (基线), 注射后 3、6 个月及 1、3、6 年于清醒状态下进行行为录像 1 h, 通过结合 Kulran<sup>[100]</sup> 非人灵长类动物 PD 模型临床评分量表对录像中表现出的临床症状进行双盲评分。评分内容包括: 面部表情 (0~3 分)、静止性震颤 (0~3 分)、动作性或意向性震颤 (0~3 分)、姿势 (0~2 分)、步态 (0~3 分)、运动徐缓 (全身) (0~4 分)、平衡与协调 (0~3 分)、总体运动技能 (上肢) (0~3 分)、总体运动技能 (下肢) (0~3 分)、防御反应 (0~2 分)。最小分值为 0 分, 即正常行为为 0 分。当模型猴出现典型 PD 样症状且行为学评分量表评价的积分 8 分时, 则可确定模型成功建立。总分最高为 29 分, 即最为严重。

### 7.3 2 上肢精细运动评价

上肢精细运动能评估 PD 模型猴左右手的精细运动和灵活性。目前实验使用最多的评估方法是孔板取食和 Brinkman 取食。一般操作过程需区分模型猴的左右手, 在规定的时间内进行规定次数的取食测试, 并录像记录被测试猴子取食数量和取食时间等, 从而在一

定程度上评估出实验猴在 PD 相关运动症状上的严重程度<sup>[93]</sup>。

### 7.3 3 全身运动总量分析

大量临床报道指出, 在 PD 病程进展中, PD 患者除运动活动量减少外还伴随的日间嗜睡以及失眠等睡眠障碍。而非人灵长类动物具有和人类相似的睡眠节律。可通过动物颈圈佩戴身体活动监测仪, 对受试动物于饲养笼中每日运动活动总量进行分析<sup>[101]</sup>。还可使用 PrimateScan 灵长类智能精细行为分析系统, 对动物的各项运动进行记录分析<sup>[91]</sup>。

### 7.3 4 认知记忆功能测试

临床上 PD 患者认知记忆功能障碍较为常见。目前非人灵长类通过一些检索任务、视觉任务、延迟反应任务等来衡量模型猴的执行力、变通力、积极能动性等从而评估其认知、记忆功能是否存在障碍<sup>[102]</sup>。

### 7.3 5 非人灵长类帕金森模型中行为学相关其他指标

研究表明, 非人灵长类 PD 模型评估通过行为学分析结合影像学检查以及生物标志物检测, 可以对 PD 有较高的诊断性和预测价值。而病理学检测则可以在组织学层面对 PD 的一些指标进行检测, 能够对于疾病进程进行更准确的预测, 同时可以帮助挖掘一些非运动症状背后的病理机制<sup>[76, 103]</sup>。

### 7.4 应用范围

MPTP 诱导非人灵长类 PD 猴模型可导致不可逆的纹状体损害, 引发持久的精细运动受损, 产生运动功

能障碍如震颤, 肢体僵硬, 行动缓慢等, 可作为PD模型动物的长期动态和治疗评价研究, 为神经细胞修复、细胞移植等提供重要的参考价值。

## 8 药物与干细胞治疗PD适用模型选择基本原则

建立适当的PD动物模型, 对PD的发病机制、病理机制以及治疗方法的研究有重要的意义。由于实验研究的目的不同, 而导致实验选择的动物模型不同。但目前的PD动物模型多以快速达到PD的病理特征为目的, 很难模拟PD缓慢发病, 进行性加重的特征, 与人类PD的发病仍有差距, 因此探寻一种更为理想的PD病动物模型, 更加有利于对PD的研究。

目前的PD动物模型分为神经毒素药物诱导、转基因以及二者联用模型。6-OHDA、MPTP、百草枯和鱼藤酮等可以建立以神经毒性为基础的PD模型。通过 $\alpha$ -synuclein和LRRK2的基因过表达或Parkin、DJ-1以及PINK1等基因的敲除来创建PD的转基因模型也能够表现出部分PD特征。通过二者联用的PD模型, 使得研究PD相关基因与神经毒素间的相互作用成为可能。然而没有一种模型能够完全模拟PD并再现其病理和症状, 但每个模型都有其优缺点。

**神经毒素药物诱导模型**是最早使用在PD研究中的动物模型, 也是目前最常用来评价PD治疗效果的手段之一。该类模型较其他模型优势明显, 其操作相对简单且成本较低, 在实际研究中使用较为广泛。该类模型大多反应晚期、长期的PD状态, 适合研究黑质纹状体内多巴胺能神经元的退行性变化过程及治疗手段的恢复进程。神经毒素模型使用最为广泛, 大, 小鼠是经典的PD动物诱导模型动物。其优点主要为: (1) 大小适中, 其解剖结构与临床症状与PD人最为相似; (2) 饲养条件简单, 成本较低; (3) 操作最为简单, 伦理问题较少。

**PD转基因模型是通过遗传工程表达或敲除PD相关基因产生的动物模型。**SNCA过表达模型最为常见, 使用最为广泛。虽然在这些转基因模型中很少观察到黑质纹状体部位的多巴胺能神经元的退行性变, 但其更适合用于研究PD的病理变化、发病机理以及从基因分子水平揭示PD发病机制。转基因动物最常用的动物包括大鼠, 小鼠, 另外还有秀丽隐杆线虫、果蝇等生物。其主要原因是由于这类动物结构简单, 基因组信息较易获得, 且生命周期较短。灵长类动物在PD研究

中使用较早, 该类动物在每次实验中使用数量较少。其优点是该类动物与人类进化亲缘性最高, 实验结果最为接近, 缺点是饲养、操作复杂, 成本较高, 且使用数量局限, 涉及伦理问题较多<sup>[35]</sup>。

**神经毒素与转基因联合PD模型**, 转基因动物更容易受到神经毒素的作用, 使造模效果更为显著。联用模型利用 $\alpha$ -synuclein过表达和低剂量6-OHDA脑内注射产生, 可以更加深入了解PD中线粒体损伤过程, 还可以展示PD相关基因与机体的相互作用, 了解外界环境是如何诱发PD疾病。因此, 转基因与神经毒素联用PD模型更适合用于研究PD的作用机制<sup>[104]</sup>。一项研究利用小鼠过表达 $\alpha$ -synuclein需要经过12周能够引起50%多巴胺神经变性和运动功能障碍。他们在小鼠过表达 $\alpha$ -synuclein的第8周, 同时注射MPTP, 结果发现联合过表达 $\alpha$ -synuclein与MPTP的小鼠多巴胺神经丢失和运动功能障碍比任何单一处理都明显<sup>[105]</sup>。

## 9 结语与展望

动物模型探索疾病新的治疗方法和措施的必要实验条件。本指南为药物及干细胞治疗PD的动物模型选择提供了详细介绍, 对药物诱导的大小鼠PD模型, 转基因大小鼠PD模型, 非人灵长类猴PD模型, 从建模方法, 造模机制, 模型分子病理机制及神经行为评估都进行了较为系统和详细的描述。但由于篇幅所限, 对于“类器官-动物嵌合模型”和“光遗传学调控DA神经元活性”等前沿技术没有详述。在PD动物模型选择时需兼顾病理模拟度与实验可行性, 建议使用该指南时, 也参考最新发表的相关文献, 在节约人力物力和时间的前提下, 保证动物实验及时完成并取得可信结果。

随着体细胞重编程产生诱导多能干细胞(iPS细胞)技术的发展, 现在已经能从PD病人产生iPS细胞, 并分化为多巴胺神经干细胞及多巴胺神经元。特别是携带遗传基因突变如SCNA, LRRK2, Parkin, PINK1, GBA等基因突变的iPS细胞, 能够通过基因编辑技术校正基因突变并分化为多巴胺神经元, 用于探讨基因突变对神经元表型影响的人体细胞模型, 也可以用基因突变iPS细胞分化的多巴胺神经元细胞模型筛选改善多巴胺神经元表型的小分子药物<sup>[106, 107]</sup>。另外, 利用CRISPR/Cas9基因编辑的iPS细胞模型也能用于研究PD的致病机制和筛选治疗药物。研究报道, LRRK2 G2019S基因突变校正的iPS细胞分化神经元恢复了原

有的神经轴突和树突的长度，GBA N370S 基因突变校正的 iPS 细胞分化多巴胺神经元提高了葡糖脑苷酯酶活性<sup>[108, 109]</sup>。因此，PD 的人体 iPS 细胞模型的建立明显加快了对 PD 发病机制的精确探讨，并为寻找治疗 PD 的药物提供了具有临床应用价值的筛选平台。

[作者贡献声明 Author Contribution]

本指南的制订工作由以下 4 个专家组（完整名单附后）共同完成：

组织专家组负责确定执笔专家人选，确认指南主题和范围，组织初稿审阅和终稿修订，召集指南制订工作会议等；

执笔专家组负责相关文献查阅、筛选和核定，以及指南各章节的起草和修订工作等；

共识专家组通过线上会议对指南内容进行研讨和论证，提出意见，达成共识；

《帕金森病药物和干细胞治疗临床前动物实验模型选择指南（2025 年版）》编写专家组名单

组织专家：

韩发彬（山东第一医科大学附属聊城医院干细胞与再生医学实验室，山东省医药卫生干细胞与再生医学转化重点实验室）

陈琳（北京中医药大学东直门医院神经外科/北京市神经修复产业创新研究院）

陈志国（北京宣武医院细胞治疗中心）

卢明（湖南师范大学第二附属医院神经外科）

李英俊（北京通和立泰生物科技有限公司）

执笔专家：

韩发彬（山东第一医科大学附属聊城医院干细胞与再生医学实验室）

陈琳（北京中医药大学东直门医院神经外科/北京市神经修复产业研究院）

陈志国（首都医科大学北京宣武医院细胞治疗中心）

卢明（湖南师范大学第二附属医院神经外科/神经修复学湖南省重点实验室）

李英俊（北京通和立泰生物科技有限公司）

朱德生（北京大学实验动物中心）

许彤辉（复旦大学动物实验中心）

王颖（首都医科大学基础医学院）

宋娜（山东第一医科大学附属聊城医院干细胞与再生医学实验室）

宋昊（山东第一医科大学附属聊城医院干细胞与

再生医学实验室）

刘延明（山东第一医科大学附属聊城医院干细胞与再生医学实验室）

关云谦（首都医科大学北京宣武医院）

卓毅（中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院）

景世元（北京中医药大学东直门医院）

杨伟莉（暨南大学粤港澳中枢神经再生研究院）

朱佳蕾（复旦大学附属妇产科医院药学部）

和占龙（中国医学科学院医学生物学研究所灵长类研究中心）

李晓江（暨南大学粤港澳中枢神经再生研究院）

高进权（暨南大学粤港澳中枢神经再生研究院）

黄瑾（中国人民解放军总医院第七医学中心）

厉保秋（山东弘立医学动物实验研究有限公司）

王红平（四川省药品检验检测研究院/安全评价中心）

王小洪（扬州大学医学院）

芦现杰（山东第一医科大学附属聊城医院干细胞与再生医学实验室）

王伟（山东第一医科大学附属聊城医院干细胞与再生医学实验室）

魏传飞（山东第一医科大学附属聊城医院干细胞与再生医学实验室）

李孟鹏（山东第一医科大学附属聊城医院干细胞与再生医学实验室）

陈瑛（国科赛赋河北医药技术有限公司）

邵奇鸣（江苏鼎泰药研集团股份有限公司）

张红波（南昌大学第二附属医院神经外科）

彭长庚（同济大学医学院/同济大学附属上海市第一康复医院）

卓振建（北京大学深圳研究生院实验动物中心）

魏旭峰（江苏美凤力医疗科技有限公司）

刘静（北京赛赋医药研究院有限公司）

共识专家：

许琴（新疆军区总医院中心实验室）

权福实（吉林大学动物科学学院）

李顺（复旦大学附属公共卫生临床中心）

陈凯（山东省药学院药物安全评价中心）

陆彩霞（中国医学科学院医学生物学研究所）

田永路（北京大学生命科学学院）

韩荣成（中国科学院遗传与发育生物学研究所）

张旺明（南方医科大学珠江医院神经外科）

闫永建 (山东省第二人民医院中毒与职业病科)  
 江万祥 (四川格林泰科生物科技有限公司)  
 李晓红 (蚌埠医科大学第一附属医院)  
 赵太云 (军科正源 (广西) 生物医药科技有限公司)  
 邱亚男 (北京大学第三医院)  
 张丽 (北京大学第三医院神经内科)  
 崔永春 (中国医学科学院阜外医院)  
 张慧灵 (苏州大学药学院药理系)  
 李云涛 (江苏省湖州市中心医院)  
 陈红伟 (北京航空总医院脑脊液病神经外科)  
 商慧芳 (四川大学华西医院神经内科)  
 向光红 (湖南省第二人民医院神经内科)  
 武晋廷 (清华大学玉泉医院)  
 杨善争 (上海跃赛生物科技有限公司)  
 李岳峰 (广东蓝岛生物技术有限公司)  
 魏建设 (河南大学生命科学学院)  
 李晶 (重庆医科大学附属巴南医院药学部)  
 孟庆刚 (上海秋桑冬青医药科技有限公司)  
 张鹏飞 (中国人民解放军总医院神经外科医学部)  
 王翀 (贵州省第三人民医院神经外科)  
 于新 (解放军总医院第六医学中心神经外科)  
 乔立艳 (清华大学玉泉医院神经内科)  
 车珂科 (重庆大学附属人民医院药学部)  
 李新军 (广州医科大学附属惠州医院神经外科)  
 张卫民 (湖南省第二人民医院 (湖南省脑科医院) 神经外科)

**[利益声明 Declaration of Interest]** 所有作者均声明本文不存在利益冲突。

#### [参考文献 References References]

- [1] COSTA H N, ESTEVES A R, EMPADINHAS N, et al. Parkinson's disease: a multisystem disorder[J]. *Neurosci Bull*, 2023, 39(1): 113-124. DOI:10.1007/s12264-022-00934-6.
- [2] LEES A J, HARDY J, REVESZ T. Parkinson's disease[J]. *Lancet*, 2009, 373(9680): 2055-2066. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60492-X.
- [3] KALIA L V, LANG A E. Parkinson's disease[J]. *Lancet*, 2015, 386(9996):896-912. DOI:10.1016/S0140-6736(14)61393-3.
- [4] TANNER C M, KAMEL F, ROSS G W, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease[J]. *Environ Health Perspect*, 2011, 119(6):866-872. DOI:10.1289/ehp.1002839.
- [5] HAN F B, HU B Y. Stem cell therapy for Parkinson's disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1266:21-38. DOI:10.1007/978-981-15-4370-8\_3.
- [6] YE H, ROBAK L A, YU M G, et al. Genetics and pathogenesis of Parkinson's syndrome[J]. *Annu Rev Pathol*, 2023, 18:95-121. DOI:10.1146/annurev-pathmechdis-031521-034145.
- [7] JIA F Z, FELLNER A, KUMAR K R. Monogenic Parkinson's disease: genotype, phenotype, pathophysiology, and genetic testing[J]. *Genes*, 2022, 13(3):471. DOI:10.3390/genes13030471.
- [8] BLOEM B R, OKUN M S, KLEIN C. Parkinson's disease[J]. *Lancet*, 2021, 397(10291): 2284-2303. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00218-X.
- [9] HAN F B, GRIMES D A, LI F, et al. Mutations in the glucocerebrosidase gene are common in patients with Parkinson's disease from Eastern Canada[J]. *Int J Neurosci*, 2016, 126(5):415-421. DOI:10.3109/00207454.2015.1023436.
- [10] SONG N, WANG W, CHEN C, et al. Analysis of SMPD1 gene mutations in Chinese patients with Parkinson's disease[J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2018, 35(3): 319-323. DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2018.03.003.
- [11] BAEK M, CHOE Y J, BANNWARTH S, et al. TDP-43 and PINK1 mediate *CHCHD10*<sup>S59L</sup> mutation-induced defects in *Drosophila* and in vitro[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):1924. DOI: 10.1038/s41467-021-22145-9.
- [12] SONG N, WANG Y, ZHOU L X, et al. Genetic analysis of the LRP10 gene in Chinese patients with Parkinson's disease[J]. *Neurol Sci*, 2023, 44(3): 905-912. DOI: 10.1007/s10072-022-06496-9.
- [13] LIN C H, TSAI P I, LIN H Y, et al. Mitochondrial UQCRC1 mutations cause autosomal dominant Parkinsonism with polyneuropathy[J]. *Brain*, 2020, 143(11):3352-3373. DOI:10.1093/brain/awaa279.
- [14] DENG H, FAN K, JANKOVIC J. The role of *TMEM230* gene in Parkinson's disease[J]. *J Parkinsons Dis*, 2018, 8(4): 469-477. DOI:10.3233/JPD-181421.
- [15] WANG X B, WHELAN E, LIU Z H, et al. Controversy of TMEM230 associated with Parkinson's disease[J]. *Neuroscience*, 2021, 453: 280-286. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.11.004.
- [16] MCGREGOR M M, NELSON A B. Circuit mechanisms of Parkinson's disease[J]. *Neuron*, 2019, 101(6): 1042-1056. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.03.004.
- [17] CHU H Y. Synaptic and cellular plasticity in Parkinson's disease[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(4): 447-452. DOI: 10.1038/s41401-020-0371-0.
- [18] GERFEN C R. Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease[J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(2): 157-158. DOI: 10.1038/nn0206-157.
- [19] LANG A E, LOZANO A M. Parkinson's disease[J]. *N Engl J Med*, 1998, 339(16): 1130-1143. DOI: 10.1056/nejm199810153391607.
- [20] CERNERA S, EISINGER R S, WONG J K, et al. Long-term Parkinson's disease quality of life after staged DBS: STN vs GPi and first vs second lead[J]. *NPJ Parkinsons Dis*, 2020, 6: 13. DOI:10.1038/s41531-020-0115-3.
- [21] TOLOSA E, GARRIDO A, SCHOLZ S W, et al. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease[J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(5): 385-397. DOI:10.1016/S1474-4422(21)00030-2.

- [22] NABIZADEH F, PIRAHESH K, KHALILI E. Olfactory dysfunction is associated with motor function only in tremor-dominant Parkinson's disease[J]. *Neurol Sci*, 2022, 43(7):4193-4201. DOI:10.1007/s10072-022-05952-w.
- [23] UEMURA N, UEMURA M T, LUK K C, et al. Cell-to-cell transmission of tau and  $\alpha$ -synuclein[J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26(10):936-952. DOI:10.1016/j.molmed.2020.03.012.
- [24] ELDEEB M A, THOMAS R A, RAGHEB M A, et al. Mitochondrial quality control in health and in Parkinson's disease[J]. *Physiol Rev*, 2022, 102(4):1721-1755. DOI: 10.1152/physrev.00041.2021.
- [25] HU S L, TAN J Q, QIN L X, et al. Molecular chaperones and Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2021, 160:105527. DOI: 10.1016/j.nbd.2021.105527.
- [26] WANG F J, ZHANG G J, ZHAI Q F. Role and mechanism of molecular hydrogen in the treatment of Parkinson's diseases [J]. *Front Neurosci*, 2025, 19: 1576773. DOI: 10.3389/fnins.2025.1576773.
- [27] NECHUSHTAI L, FRENKEL D, PINKAS-KRAMARSKI R. Autophagy in Parkinson's disease[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(10):1435. DOI:10.3390/biom13101435.
- [28] ARAÚJO B, CARIDADE-SILVA R, SOARES-GUEDES C, et al. Neuroinflammation and Parkinson's disease-from neurodegeneration to therapeutic opportunities[J]. *Cells*, 2022, 11(18):2908. DOI:10.3390/cells11182908.
- [29] CHIA S J, TAN E K, CHAO Y X. Historical perspective: models of Parkinson's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7):2464. DOI: 10.3390/ijms21072464.
- [30] MUSTAPHA M, MAT TAIB C N. MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: a promising direction of therapeutic strategies[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2021, 21(4):422-433. DOI: 10.17305/bjbms.2020.5181.
- [31] 胡毅龙, 赵怡楠, 苗晋鑫, 等. 大小鼠帕金森病行为学评价方法概述及常用动物模型特点分析[J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(7): 942-954. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.013.  
HU Y L, ZHAO Y N, MIAO J X, et al. Overview of behavioral evaluation methods of Parkinson's disease in rat and mouse and analysis of the characteristics of common animal models [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(7): 942-954. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.013.
- [32] KWON H S, KOH S H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes[J]. *Transl Neurodegener*, 2020, 9(1):42. DOI:10.1186/s40035-020-00221-2.
- [33] ZHANG Q S, HENG Y, MOU Z, et al. Reassessment of subacute MPTP-treated mice as animal model of Parkinson's disease[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(10):1317-1328. DOI: 10.1038/aps.2017.49.
- [34] SHETA R, BÉRARD M, MUSIOL D, et al. Behavioral analysis of motor and non-motor impairment in rodent models of Parkinson's disease[J]. *Front Aging Neurosci*, 2024, 16: 1464706. DOI:10.3389/fnagi.2024.1464706.
- [35] LAL R, SINGH A, WATTS S, et al. Experimental models of Parkinson's disease: challenges and opportunities[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 980: 176819. DOI: 10.1016/j.ejphar.2024.176819.
- [36] BAE W Y, CHOI J S, JEONG J W. The neuroprotective effects of cinnamic aldehyde in an MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 551. DOI: 10.3390/ijms19020551.
- [37] JOHNSTON T M, FOX S H. Symptomatic models of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia in non-human Primates[J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2015, 22:221-235. DOI:10.1007/7854\_2014\_352.
- [38] BHURTEL S, KATILA N, SRIVASTAV S, et al. Mechanistic comparison between MPTP and rotenone neurotoxicity in mice[J]. *Neurotoxicology*, 2019, 71: 113-121. DOI: 10.1016/j.neuro.2018.12.009.
- [39] FRANCARDO V. Modeling Parkinson's disease and treatment complications in rodents: Potentials and pitfalls of the current options[J]. *Behav Brain Res*, 2018, 352:142-150. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.12.014.
- [40] GUIMARÃES R P, RIBEIRO D L, DOS SANTOS K B, et al. The 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease[J]. *J Vis Exp*, 2021(176): e62923. DOI:10.3791/62923.
- [41] BJÖRKLUND A, DUNNETT S B. The amphetamine induced rotation test: a re-assessment of its use as a tool to monitor motor impairment and functional recovery in rodent models of Parkinson's disease[J]. *J Parkinsons Dis*, 2019, 9(1):17-29. DOI:10.3233/JPD-181525.
- [42] RAI S N, SINGH P. Advancement in the modelling and therapeutics of Parkinson's disease[J]. *J Chem Neuroanat*, 2020, 104:101752. DOI:10.1016/j.jchemneu.2020.101752.
- [43] 蒙健林, 梁健芬, 张兴博, 等. 帕金森病实验动物模型的研究进展及评价[J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(3): 399-404. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.03.016.  
MENG J L, LIANG J F, ZHANG X B, et al. Research progress and evaluation on animal models of Parkinson's disease[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(3): 399-404. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.03.016.
- [44] DOVONOU A, BOLDUC C, SOTO LINAN V, et al. Animal models of Parkinson's disease: bridging the gap between disease hallmarks and research questions[J]. *Transl Neurodegener*, 2023, 12(1): 36. DOI: 10.1186/s40035-023-00368-8.
- [45] ROCKENSTEIN E, MALLORY M, HASHIMOTO M, et al. Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing alpha-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 68(5): 568-578. DOI:10.1002/jnr.10231.
- [46] CHESSELET M F, RICHTER F, ZHU C N, et al. A progressive mouse model of Parkinson's disease: the Thy1-aSyn ("line 61") mice[J]. *Neurotherapeutics*, 2012, 9(2):297-314. DOI: 10.1007/s13311-012-0104-2.
- [47] WAKAMATSU M, ISHII A, IWATA S, et al. Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human alpha-synuclein in mice[J]. *Neurobiol Aging*, 2008, 29(4): 574-585. DOI: 10.1016/j.

- neurobiolaging.2006.11.017.
- [48] RAUSCHENBERGER L, BEHNKE J, GROTEMEYER A, et al. Age-dependent neurodegeneration and neuroinflammation in a genetic A30P/A53T double-mutated  $\alpha$ -synuclein mouse model of Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2022, 171: 105798. DOI:10.1016/j.nbd.2022.105798.
- [49] KIM D Y, SHIN J Y, LEE J E, et al. A selective ER-phagy exerts neuroprotective effects *via* modulation of  $\alpha$ -synuclein clearance in parkinsonian models[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(37): e2221929120. DOI:10.1073/pnas.2221929120.
- [50] LIN X, PARISIADOU L, SGOBIO C, et al. Conditional expression of Parkinson's disease-related mutant  $\alpha$ -synuclein in the midbrain dopaminergic neurons causes progressive neurodegeneration and degradation of transcription factor nuclear receptor related 1[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(27):9248-9264. DOI:10.1523/JNEUROSCI.1731-12.2012.
- [51] RYAN B J, BENGGOA-VERGNIORY N, WILLIAMSON M, et al. REST protects dopaminergic neurons from mitochondrial and  $\alpha$ -synuclein oligomer pathology in an alpha synuclein overexpressing BAC-transgenic mouse model[J]. *J Neurosci*, 2021, 41(16):3731-3746. DOI:10.1523/JNEUROSCI.1478-20.2021.
- [52] NUBER S, HARMUTH F, KOHL Z, et al. A progressive dopaminergic phenotype associated with neurotoxic conversion of  $\alpha$ -synuclein in BAC-transgenic rats[J]. *Brain*, 2013, 136(Pt 2):412-432. DOI:10.1093/brain/aws358.
- [53] CHANG E E S, HO P W, LIU H F, et al. LRRK2 mutant knock-in mouse models: therapeutic relevance in Parkinson's disease [J]. *Transl Neurodegener*, 2022, 11(1):10. DOI:10.1186/s40035-022-00285-2.
- [54] LI Y P, LIU W C, OO T F, et al. Mutant LRRK2(R1441G) BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease[J]. *Nat Neurosci*, 2009, 12(7): 826-828. DOI: 10.1038/nn.2349.
- [55] XIONG Y L, NEIFERT S, KARUPPAGOUNDER S S, et al. Robust kinase- and age-dependent dopaminergic and norepinephrine neurodegeneration in LRRK2 G2019S transgenic mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(7):1635-1640. DOI:10.1073/pnas.1712648115.
- [56] WENG Y H, CHEN C Y, LIN K J, et al. (R1441C) LRRK2 induces the degeneration of SN dopaminergic neurons and alters the expression of genes regulating neuronal survival in a transgenic mouse model[J]. *Exp Neurol*, 2016, 275 Pt 1:104-115. DOI:10.1016/j.expneurol.2015.09.001.
- [57] FERREIRA M, MASSANO J. An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations[J]. *Acta Neurol Scand*, 2017, 135(3):273-284. DOI:10.1111/ane.12616.
- [58] LÜCKING C B, DÜRR A, BONIFATI V, et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(21):1560-1567. DOI: 10.1056/NEJM200005253422103.
- [59] ZHANG P L, CHEN Y, ZHANG C H, et al. Genetics of Parkinson's disease and related disorders[J]. *J Med Genet*, 2018, 55(2):73-80. DOI:10.1136/jmedgenet-2017-105047.
- [60] NODA S, SATO S, FUKUDA T, et al. Loss of Parkin contributes to mitochondrial turnover and dopaminergic neuronal loss in aged mice[J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 136:104717. DOI:10.1016/j.nbd.2019.104717.
- [61] ITIER J M, IBANEZ P, MENA M A, et al. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse[J]. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(18):2277-2291. DOI:10.1093/hmg/ddg239.
- [62] PACELLI C, DE RASMO D, SIGNORILE A, et al. Mitochondrial defect and PGC-1 $\alpha$  dysfunction in parkin-associated familial Parkinson's disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(8): 1041-1053. DOI:10.1016/j.bbadis.2010.12.022.
- [63] 杨辉, 左伋, 刘雯. Parkin、PINK1、DJ-1和线粒体功能障碍与帕金森病[J]. *生命科学*, 2010, 22(10):1009-1012. DOI:10.13376/j.cbls/2010.10.017.
- YANG H, ZUO J, LIU W. Parkin, PINK1, DJ-1 and mitochondria dysfunction with Parkinson's disease[J]. *Chin Bull Life Sci*, 2010, 22(10):1009-1012. DOI:10.13376/j.cbls/2010.10.017.
- [64] HAN R, WANG Q, XIONG X, et al. Deficiency of parkin causes neurodegeneration and accumulation of pathological  $\alpha$ -synuclein in monkey models[J]. *J Clin Invest*, 2024, 134(20): e179633. DOI:10.1172/JCI179633.
- [65] PINTO M, NISSANKA N, MORAES C T. Lack of parkin anticipates the phenotype and affects mitochondrial morphology and mtDNA levels in a mouse model of Parkinson's disease[J]. *J Neurosci*, 2018, 38(4):1042-1053. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1384-17.2017.
- [66] STEPHENSON S E M, AUMANN T D, TAYLOR J M, et al. Generation and characterisation of a parkin-Pacrg knockout mouse line and a Pacrg knockout mouse line[J]. *Sci Rep*, 2018, 8:7528. DOI:10.1038/s41598-018-25766-1.
- [67] KE M J, CHONG C M, ZHU Q, et al. Comprehensive perspectives on experimental models for Parkinson's disease [J]. *Aging Dis*, 2021, 12(1):223-246. DOI:10.14336/AD.2020.0331.
- [68] 李珊珊. parkin 敲除小鼠中P62累积的生理意义的初步研究[D]. 天津:南开大学, 2014. DOI: 10.7666/d.Y2699170.
- Li S S. Preliminary study on physiological significance of P62 accumulation in parkin knockout mice[J]. Tianjin: Nankai University, 2014. DOI: 10.7666/d.Y2699170.
- [69] WANG Z T, CHAN S W, ZHAO H, et al. Outlook of PINK1/Parkin signaling in molecular etiology of Parkinson's disease, with insights into Pink1 knockout models[J]. *Zool Res*, 2023, 44(3):559-576. DOI:10.24272/j.issn.2095-8137.2022.406.
- [70] SLITER D A, MARTINEZ J, HAO L, et al. Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation[J]. *Nature*, 2018, 561(7722):258-262. DOI:10.1038/s41586-018-0448-9.
- [71] WANG C H, KANG X J, ZHOU L, et al. Synaptotagmin-11 is a critical mediator of parkin-linked neurotoxicity and Parkinson's disease-like pathology[J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 81. DOI:10.1038/s41467-017-02593-y.
- [72] BONIFATI V, RIZZU P, VAN BAREN M J, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset Parkinsonism[J]. *Science*, 2003, 299(5604):256-259. DOI: 10.1126/science.1077209.
- [73] XU C Y, KANG W Y, CHEN Y M, et al. DJ-1 inhibits  $\alpha$ -synuclein

- aggregation by regulating chaperone-mediated autophagy[J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9: 308. DOI: 10.3389/fnagi.2017.00308.
- [74] LOPERT P, PATEL M. Brain mitochondria from DJ-1 knockout mice show increased respiration-dependent hydrogen peroxide consumption[J]. *Redox Biol*, 2014, 2: 667-672. DOI: 10.1016/j.redox.2014.04.010.
- [75] HARVEY B K, WANG Y, HOFFER B J. Transgenic rodent models of Parkinson's disease[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2008, 101:89-92. DOI:10.1007/978-3-211-78205-7\_15.
- [76] CHEN W, LIU H H, LIU S J, et al. Altered prefrontal neurochemistry in the DJ-1 knockout mouse model of Parkinson's disease: complementary semi-quantitative analyses with in vivo magnetic resonance spectroscopy and MALDI-MSI[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, 414(28): 7977-7987. DOI:10.1007/s00216-022-04341-8.
- [77] DOLGACHEVA L P, BEREZHNOV A V, FEDOTOVA E I, et al. Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2019, 51(3):175-188. DOI:10.1007/s10863-019-09798-4.
- [78] ANDRES-MATEOS E, PERIER C, ZHANG L, et al. DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(37): 14807-14812. DOI:10.1073/pnas.0703219104.
- [79] HAUSER D N, PRIMIANI C T, LANGSTON R G, et al. The polg mutator phenotype does not cause dopaminergic neurodegeneration in DJ-1-deficient mice[J]. *eNeuro*, 2015, 2(1): ENEURO.0075-ENEURO.0014.2015. DOI: 10.1523/ENEURO.0075-14.2015.
- [80] 郭涌斐, 孙懿, 赵欣, 等. DJ-1 蛋白对线粒体的功能调节在帕金森病中的作用[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(1): 22-26. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2016.01.006.
- GUO Y F, SUN Y, ZHAO X, et al. DJ-1 regulates the function of mitochondria in Parkinson's disease[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2016, 32(1): 22-26. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2016.01.006.
- [81] 王志勇, 汤玲珍, 高天文. DJ-1 抗氧化应激功能研究进展[J]. *第二军医大学学报*, 2012, 33(1):88-91.
- WANG Z Y, TANG L Z, GAO T W. Protective effect of DJ-1 against oxidative stress: an advance[J]. *Acad J Second Mil Med Univ*, 2012, 33(1):88-91.
- [82] CHOI D J, AN J W, JOU I, et al. A Parkinson's disease gene, DJ-1, regulates anti-inflammatory roles of astrocytes through prostaglandin D(2) synthase expression[J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 127:482-491. DOI:10.1016/j.nbd.2019.04.003.
- [83] CHEN L N, CAGNIARD B, MATHEWS T, et al. Age-dependent motor deficits and dopaminergic dysfunction in DJ-1 null mice[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(22):21418-21426. DOI:10.1074/jbc.M413955200.
- [84] 王华林, 刘冉, 纪文亮, 等. DJ-1 在运动改善 PD 行为功能障碍中的作用研究进展[J]. *生命科学*, 2022, 34(2):197-202. DOI:10.13376/j.cbbs/2022023.
- WANG H L, LIU R, JI W L, et al. Research progress on the role of DJ-1 in regulating PD behavioral dysfunction by exercise[J]. *Chin Bull Life Sci*, 2022, 34(2): 197-202. DOI:10.13376/j.cbbs/2022023.
- [85] MASLIAH E, ROCKENSTEIN E, VEINBERGS I, et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders [J]. *Science*, 2000, 287(5456): 1265-1269. DOI: 10.1126/science.287.5456.1265.
- [86] GIANGRASSO D M, FURLONG T M, KEEFE K A. Characterization of striatum-mediated behavior and neurochemistry in the DJ-1 knock-out rat model of Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 134:104673. DOI: 10.1016/j.nbd.2019.104673.
- [87] GORDON J W, RUDDLE F H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei[J]. *Science*, 1981, 214(4526): 1244-1246. DOI: 10.1126/science.6272397.
- [88] WANG M, LI M, GENG X W, et al. Altered neuronal activity in the primary motor cortex and globus pallidus after dopamine depletion in rats[J]. *J Neurol Sci*, 2015, 348(1-2):231-240. DOI: 10.1016/j.jns.2014.12.014.
- [89] TAYLOR T N, GREENE J G, MILLER G W. Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease[J]. *Behav Brain Res*, 2010, 211(1): 1-10. DOI: 10.1016/j.bbr.2010.03.004.
- [90] SHI L Q, HUANG C, LUO Q H, et al. Cloquinol improves motor and non-motor deficits in MPTP-induced monkey model of Parkinson's disease through AKT/mTOR pathway[J]. *Aging*, 2020, 12(10):9515-9533. DOI:10.18632/aging.103225.
- [91] 桂剑. 非人灵长类动物慢性帕金森病模型的制作[J]. 广州:南方医科大学, 2024. DOI: 10.27003/d.cnki.gojyu.2019.000709.
- GUI J. Production of non-human primate chronic Parkinson's disease model[J]. Guangzhou: Southern Medical University, 2024. DOI: 10.27003/d.cnki.gojyu.2019.000709.
- [92] POTTS L F, WU H, SINGH A, et al. Modeling Parkinson's disease in monkeys for translational studies, a critical analysis[J]. *Exp Neurol*, 2014, 256: 133-143. DOI: 10.1016/j.expneurol.2013.09.014.
- [93] 刘书一, 王正波. 非人灵长类帕金森动物模型中的行为学评估[J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(11): 96-103. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.013.
- LIU S Y, WANG Z B. Behavioral assessment of the Parkinson's disease model in non-human primates[J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(11): 96-103. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.013.
- [94] MASILAMONI G J, SMITH Y. Chronic MPTP administration regimen in monkeys: a model of dopaminergic and non-dopaminergic cell loss in Parkinson's disease[J]. *J Neural Transm*, 2018, 125(3):337-363. DOI:10.1007/s00702-017-1774-z.
- [95] HUANG B H, WU S H, WANG Z B, et al. Phosphorylated  $\alpha$ -synuclein accumulations and lewy body-like pathology distributed in Parkinson's disease-related brain areas of aged Rhesus Monkeys treated with MPTP[J]. *Neuroscience*, 2018, 379:302-315. DOI:10.1016/j.neuroscience.2018.03.026.
- [96] 吕海燕, 侯广玉, 朱梅. MPTP 致帕金森病动物模型的研究进展[J]. *实验动物科学*, 2022, 39(4): 64-68. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2022.04.014.

- LYU H Y, HOU G Y, ZHU M. Advances in animal models of MPTP induced Parkinson's disease[J]. *Lab Anim Sci*, 2022, 39 (4): 64-68. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2022.04.014.
- [97] ANDO K, INOUE T, HIKISHIMA K, et al. Measurement of baseline locomotion and other behavioral traits in a common marmoset model of Parkinson's disease established by a single administration regimen of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine: providing reference data for efficacious preclinical evaluations[J]. *Behav Pharmacol*, 2020, 31(1):45-60. DOI:10.1097/FBP.0000000000000509.
- [98] SATEIA M J. International classification of sleep disorders-third edition: highlights and modifications[J]. *Chest*, 2014, 146 (5):1387-1394. DOI:10.1378/chest.14-0970.
- [99] SEO J, LEE Y, KIM B S, et al. A non-human primate model for stable chronic Parkinson's disease induced by MPTP administration based on individual behavioral quantification [J]. *J Neurosci Methods*, 2019, 311: 277-287. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2018.10.037.
- [100] KURLAN R, KIM M H, GASH D M. Oral levodopa dose-response study in MPTP-induced hemiparkinsonian monkeys: assessment with a new rating scale for monkey Parkinsonism[J]. *Mov Disord*, 1991, 6(2): 111-118. DOI: 10.1002/mds.870060205.
- [101] FIFEL K, PIGGINS H, DEBOER T. Modeling sleep alterations in Parkinson's disease: How close are we to valid translational animal models? [J]. *Sleep Med Rev*, 2016, 25: 95-111. DOI: 10.1016/j.smr.2015.02.005.
- [102] SOLARI N, BONITO-OLIVA A, FISONE G, et al. Understanding cognitive deficits in Parkinson's disease: lessons from preclinical animal models[J]. *Learn Mem*, 2013, 20(10): 592-600. DOI:10.1101/lm.032029.113.
- [103] KIM R H, SMITH P D, ALEYASIN H, et al. Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(14): 5215-5220. DOI: 10.1073/pnas.0501282102.
- [104] DAWSON T M, KO H S, DAWSON V L. Genetic animal models of Parkinson's disease[J]. *Neuron*, 2010, 66(5): 646-661. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.04.034.
- [105] SONG L K, MA K L, YUAN Y H, et al. Targeted overexpression of  $\alpha$ -synuclein by rAAV2/1 vectors induces progressive nigrostriatal degeneration and increases vulnerability to MPTP in mouse[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0131281. DOI: 10.1371/journal.pone.0131281.
- [106] LU X J, SONG N, WANG W, et al. Generation of integration-free human iPSC line LCPHi001-A from a Parkinson's disease patient carrying the RecNcil mutation in GBA gene[J]. *Stem Cell Res*, 2021, 56:102514. DOI:10.1016/j.scr.2021.102514.
- [107] VETCHINOVA A S, KAPKAEVA M R, IVANOV M V, et al. Mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons derived from patients with LRRK2- and SNCA-associated genetic forms of Parkinson's disease[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 45 (10):8395-8411. DOI:10.3390/cimb45100529.
- [108] QING X B, WALTER J, JARAZO J, et al. CRISPR/Cas9 and piggyBac-mediated footprint-free LRRK2-G2019S knock-in reveals neuronal complexity phenotypes and  $\alpha$ -Synuclein modulation in dopaminergic neurons[J]. *Stem Cell Res*, 2017, 24:44-50. DOI:10.1016/j.scr.2017.08.013.
- [109] HANSS Z, BOUSSAAD I, JARAZO J, et al. Quality control strategy for CRISPR-Cas9-based gene editing complicated by a pseudogene[J]. *Front Genet*, 2019, 10: 1297. DOI: 10.3389/fgene.2019.01297.
- (收稿日期:XXXX-XX-XX 修回日期:XXXX-XX-XX)

#### [引用本文]

- .帕金森病药物和干细胞治疗临床前动物实验模型选择指南[J]. *实验动物与比较医学*, DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2025.073.
- .Guidelines for Selecting Preclinical Animal Models to Treat Parkinson's Disease with Drugs and Stem Cells[J]. *Laboratory Animal and Comparative Medicine*, DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2025.073.