



神经退行性疾病动物模型的建立与应用

潘吉荣^{1†}, 张玲^{1†}, 王谦¹, 赵大路¹, 黄智滨¹, 魏承志¹, 马旭¹, 秦川^{1,2,3*}

1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021;

2. 国家人类疾病动物模型资源库, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 新发与再发传染病动物模型研究北京市重点实验室, 北京市人类重大疾病动物模型工程技术研究中心, 国家动物模型技术创新中心, 北京 100021;

3. 昌平国家实验室(CPNL), 北京 102206

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn

2023-07-31 收稿, 2023-10-16 修回, 2023-10-16 接受, 2023-10-17 网络版发表

中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2021-I2M-1-034)和国家重点研发计划(2021YFF0703200)资助

摘要 神经退行性疾病的日益增长对家庭和社会造成沉重的负担, 寻找有效的预防和治疗方法, 已经成为全球公共卫生的重要议题。动物模型在研究神经退行性疾病中发挥着至关重要的作用, 为深入理解这些疾病的病理机制、开发新的诊疗策略提供了基础数据。本文阐述了构建常见神经退行性疾病动物模型的方法, 包括阿尔茨海默病、帕金森病和肌萎缩性脊髓侧索硬化症等。这些模型的建立考虑了疾病的遗传背景、病理特征以及进程。传统疾病模型构建方法常常缺乏疾病特异性、表型稳定性和与人类疾病病理进程的一致性。得益于基因修饰技术的发展, 如CRISPR/Cas9技术, 我们能够更精确地模拟人类神经退行性疾病的病理过程, 使得动物模型能够为药物开发和疾病预防策略的探索提供重要工具。本文还探讨了新的动物模型开发进展, 这对于深入理解疾病的发病机制、研究环境因素和基因-环境相互作用、筛选新的药物和开发新的治疗策略至关重要。虽然目前的模型还无法完全反映人类疾病的复杂性, 我们有理由相信, 这些限制将会得到改善, 并展望了基因编辑技术可能改变神经退行性疾病研究的未来。

关键词 动物模型, 神经退行性疾病, 转基因小鼠, 遗传多样性

神经退行性疾病已成为全球公共卫生的重要议题, 其日益增长的患病率给家庭和社会带来了沉重的负担, 寻找有效的预防和治疗方法成为科研和医疗领域的重要工作^[1]。动物模型因其独特的优势, 在揭示疾病病理机制和推动新的诊疗策略开发中扮演了重要角色, 神经退行性疾病病理进程的复杂性使得体外研究难以全面揭示其病理机制, 因此, 建立能够模拟人类神经退行性疾病的动物模型, 成为研究这些疾病的必要手段^[2]。随着科技的发展, 如CRISPR/Cas9基因修饰技术的出现, 我们可以通过

引入特定的基因变异更精确地模拟神经退行性疾病在人类中的病理过程^[3]。然而, 目前的动物模型还无法完全模拟人类神经退行性疾病的复杂性, 但我们相信随着科技的进步, 未来的动物模型将会更加精确地反映神经退行性疾病的真实情况, 为理解疾病机制和开发有效治疗方法提供更强大的工具^[4]。本文系统梳理了神经退行性疾病动物模型的建立方法, 以及这些模型在疾病研究中的应用。我们将特别关注基因修饰技术在动物模型建立中的作用, 以及新型动物模型的开发策略。

引用格式: 潘吉荣, 张玲, 王谦, 等. 神经退行性疾病动物模型的建立与应用. 科学通报, 2023, 68: 4754–4763

Pan J R, Zhang L, Wang Q, et al. The establishment and application of animal models for neurodegenerative diseases (in Chinese). Chin Sci Bull, 2023, 68: 4754–4763, doi: [10.1360/TB-2023-0764](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0764)

1 常见神经退行性疾病的基因修饰动物模型

1.1 阿尔茨海默病模型

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以认知功能障碍和记忆损失为主要特征的神经退行性疾病^[5]。为了深入理解其病理机制和开发有效的治疗策略,科学家们已经创建了一系列的动物模型(表1),例如,早期的穹隆海马伞损害大鼠模型、赖氨酸硫酸盐(kainic acid)诱导的AD模型^[14]等。后来,小鼠模型因其易于操作和基因背景的可控性而被广泛使用^[7]。常见的策略是通过转基因技术,将与AD相关的人类基因,如APP(amyloid precursor protein)和PSEN1,突变导入小鼠基因组。例如,5×FAD模型是通过在一个小鼠中同时表达5个家族性AD相关的突变,即APP基因上的瑞典突变型(K670N/M671L)、佛罗里达型(I716V)、伦敦突变型(V717I)突变和PS1基因上的M146L、L286V突变,快速产生大量的β-淀粉样蛋白沉积^[6]。3×Tg模型则在神经元特异性地表达APP和PSEN1的突变,以及过度磷酸化的TAU蛋白,模拟AD的主要病理特征,包括β-淀粉样蛋白沉积和神经纤维缠结^[15]。

1.2 帕金森病模型

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经退行性疾病,其主要症状是运动功能障碍,包括静止性震颤、肌肉僵硬、运动迟缓和姿势不稳等^[16]。PD的主要病理特征是大脑基底神经节中黑质多巴胺神经元的逐渐丧失,以及在剩余神经元中形成的含有α-突触核蛋白的路易体^[17]。常用的PD动物模型是通过注射神经毒素6-羟多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)或1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-

1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)来诱导黑质多巴胺神经元死亡,这种模型可以有效地模拟PD的运动症状和神经元丧失^[18,19](表2)。然而,这些化学诱导的模型通常无法模拟PD的非运动症状和疾病的进展。因此,基于遗传学的动物模型,特别是转基因和基因敲除小鼠模型,在PD研究中得到了广泛应用。例如,采用α-突触核蛋白基因突变或过表达的转基因小鼠模型,可以模拟PD的神经元丧失和路易体形成^[20,25]。通过家族性PD的遗传学研究,发现了一些与PD密切相关的其他基因,包括帕金森蛋白2(PARK2/Parkin)^[26]、PTEN诱导的脱酮酶1(PINK1)^[27]、DJ-1^[28]和LRRK2^[29],并构建了基于这些基因突变的动物模型。

1.3 肌萎缩性脊髓侧索硬化症模型

肌萎缩性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)表现为运动神经元退化和死亡。主要ALS病因学说及其动物模型见表3,最常见的是超氧化物歧化酶1(superoxide dismutase 1, SOD1)转基因小鼠模型,因为约20%的家族性ALS患者存在SOD1基因突变^[36]。SOD1是一种抗氧化酶,可以清除有害自由基,突变后功能异常,从而引发神经元损伤和死亡,将带有人类SOD1基因突变的DNA片段转入小鼠体内,出现类似ALS患者的病理特征^[30]。近年来还建立了一些新的ALS动物模型,例如基于TDP-43和FUS基因突变的模型^[37,38]。

2 神经退行性动物模型的创建方法

2.1 传统神经退行性动物模型

在神经退行性疾病研究中,传统的动物模型为我

表 1 主要AD病因学说及其动物模型

Table 1 Principal etiological theories and corresponding animal models in AD

病理机制	动物模型	参考文献
淀粉样蛋白假说	5×FAD模型, 表达5个家族性AD相关的突变, 快速产生大量的β-淀粉样蛋白沉积	[6]
Tau假说	3×Tg模型, 神经元特异性地表达APP和PSEN1的突变, 以及过度磷酸化的tau蛋白	[7]
神经炎症假说	5×FAD+LPS模型, 在5×FAD小鼠中注射脂多糖, 诱导神经炎症	[8]
胆固醇代谢假说	ApoE4模型, 携带人类APOE4基因, 模拟胆固醇代谢异常	[9]
神经递质假说	注射抗小鼠p75抗体模型, 破坏乙酰胆碱能神经元, 模拟乙酰胆碱丧失	[10]
感染假说	HSV1-AD模型, 用单纯疱疹病毒感染小鼠, 模拟病毒感染	[11]
血脑屏障破坏假说	PDGFB模型, 模拟AD中的血脑屏障功能障碍	[12]
血管病变假说	Tg-SwDI模型, 表现出显著的微血管病变, 模拟AD中的脑血管病变	[13]

表 2 主要PD病因学说及其动物模型

Table 2 Principal etiological theories and corresponding animal models in PD

病理机制	动物模型	参考文献
α -突触核蛋白调控异常	α -突触核蛋白过表达小鼠模型, 运动协调能力减退, 多巴胺神经元丧失和 α -突触核蛋白包涵体形成	[19]
线粒体功能障碍	MPTP诱导的小鼠或猴模型, 多巴胺神经元的消失和AD类似的运动障碍	[20]
氧化应激	Rotenone或Paraquat诱导的小鼠模型, 导致神经元死亡、氧化应激增加、运动障碍和病理性 α -突触核蛋白沉积	[21]
免疫炎症机制	LPS诱导的小鼠模型, 神经炎症反应, 多巴胺神经元丧失和运动功能障碍	[22]
NM过度累积	α -突触核蛋白过表达小鼠模型, 神经黑色素(neuromelanin, NM)沉积、多巴胺神经元丧失和运动功能障碍	[23]
胃肠相关功能障碍	Rotenone诱导的小鼠模型, 肠道功能异常, 多巴胺神经元丧失和运动功能障碍	[24]

表 3 主要ALS病因学说及其动物模型

Table 3 Principal etiological theories and corresponding animal models in ALS

病理机制	动物模型	参考文献
突触毒性学说	SOD1转基因小鼠, 表现为运动神经元死亡, 肌肉力量减弱和寿命缩短	[30]
轴突输送障碍学说	<i>Dynein</i> cKO小鼠, 表现为进展性运动神经元丧失	[31]
蛋白质处理错误学说	<i>TDP-43</i> 转基因小鼠, 出现运动功能障碍和早期死亡	[32]
线粒体功能障碍学说	<i>Drp1</i> 敲除小鼠, 线粒体动态平衡被破坏和神经元损伤	[33]
神经炎症学说	CD4敲除小鼠, 神经炎症减轻的和生存期延长	[34]
RNA异常学说	<i>FUS</i> 转基因小鼠, 出现运动功能障碍, 寿命短	[35]

们提供了理解疾病重要的工具。这些模型主要有化学诱导模型、人脑组织移植模型、自发模型和快速老化模型等。化学诱导模型主要是通过特定的神经毒素模拟神经退行性疾病的病理过程, 例如, PD研究中常见的模型是通过MPTP或6-OHDA特异性地损害黑质多巴胺神经元, 以产生类似PD的症状^[39]; 在ALS研究中使用 β -氨基酪氨酸(β -methylamino alanine, BMAA)诱导的模型^[40]。然而, 这种模型的局限性在于它无法完全模拟人类疾病的复杂性和进程。人脑组织移植模型通过将患者的脑组织移植到实验动物体内, 模拟疾病的病理进程。这种方法的主要优点是能在一定程度上模拟人类疾病的病理变化, 但其操作复杂且伦理问题需要特别考虑^[41]。自发模型基于具有自然发生神经退行性疾病的动物, 通过自然发生的基因突变或人工诱发的基因突变来模拟疾病, 如wobbler小鼠和突变小鼠因基因突变而自然发生类似ALS的疾病^[42]。类似地, 特定品种的狗可能会自然发生一种类似人类ALS的疾病, 这些狗同样可以作为研究对象^[43]。然而, 由于这些模型的可用性和可控性都相对较低, 在研究中的应用也较为有限。快速老化模型通过选择快速老化的动物, 如D-ga-

lactose诱导的衰老模型, 模拟与年龄相关的神经退行性疾病^[44]。这种模型能在短时间内模拟年老相关的神经退行性变化, 但并不能准确模拟特定的疾病。

2.2 基因修饰技术为动物模型构建带来变革

基因修饰技术在过去几十年里发展迅速, 使科学家能够以前所未有的精度对生物体的DNA进行操作, 这对神经退行性疾病的研究产生了深远影响。在动物模型创建领域得到应用的基因修饰技术主要有基因敲入/敲除、RNAi和CRISPR/Cas9技术。基因敲入是将目标基因插入到哺乳动物基因组的特定位置, 而基因敲除则是完全或部分地去除基因组中的特定基因^[45]。它们都是基于同源重组技术, 起源于发酵酵母中的自然修复机制, 其基本原理是利用DNA分子的同源配对和交换能力, 把目的基因精确地插入到染色体的特定位点上。利用同源重组技术制备转基因小鼠的一般步骤包括: 设计并构建含有目标基因(经过修饰或突变的基因)的载体, 该载体两侧为与小鼠基因组中的目标位点具有高度同源性的序列; 将构建好的靶向载体转入胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)中, 然后进行筛选,

找出经过同源重组, 目标基因插入到了正确位置的ES细胞克隆, 注入到小鼠的早期胚胎(通常是囊胚); 然后将这些胚胎移植到代孕小鼠体内, 等待其发育成嵌合小鼠^[46]; 最后, 对后代筛选, 得到携带目标基因的纯合子或杂合子小鼠。在创建神经退行性疾病的动物模型中, 这些技术已经广泛应用。例如, AD的小鼠模型通常通过基因敲入APP^[47]、PSEN1^[48]或PSEN2的突变来创建。RNA干扰(RNAi)通过引导小RNA分子特异性地靶向并降解特定的mRNA分子, 从而在翻译水平上阻止基因表达^[49]。这种技术的一个主要优势是, 它可以在成体动物中应用, 使科学家能够在成体动物的特定组织或细胞类型中暂时性或持久性地抑制基因表达^[50,51]。近年来, CRISPR/Cas9技术发展成为主要的基因修饰技术^[52]。CRISPR/Cas9是一种依赖RNA引导的DNA切割酶, 可以非常精确地在基因组的任何位置引发DNA双链断裂^[3,53]。在细胞修复这些断裂的过程中, 可以引入小的插入或删除, 或者通过同源定向修复引入更复杂的序列变化^[54]。CRISPR/Cas9技术的优点是操作简便、成本低廉, 并且可以同时编辑多个基因, 因此在神经退行性疾病模型的创建中有着广泛的应用。例如, CRISPR/Cas9已经被用于创建模拟人类ALS疾病的C9ORF72基因突变的小鼠模型^[55]。

2.3 多基因育种动物模型

虽然利用新的基因修饰技术构建人类疾病动物模型取得了很大的进展, 但复杂人类疾病常涉及多个基因或数量性状基因座(quantitative trait locus, QTL)^[56]。每个QTL对疾病的影响可能相对较小, 若个体继承了多个QTL, 就可能出现疾病或疾病倾向, AD的小鼠模型的发展体现出了这种多基因/位点修饰的育种过程。

AD常用的小鼠模型, 如APP/PS1^[57]、5×FAD^[6]和3×Tg^[15], 主要通过在淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)上构建家族性突变来模拟疾病。这些突变, 如APP695、APP751、APP770、瑞典突变型(K670N/M671L)、伦敦突变型(V717I)、印第安纳突变型(V717F)、荷兰突变型(E693Q)和北极突变型(E693G), 都能促使A β 的积累, 从而导致AD^[58]。此外, 研究人员还通过将PS 1/2小鼠与人类APP过表达小鼠组合^[6], 以模拟AD的其他病理学特征。

随着遗传效应更强的基因和位点及其组合的发现, 不同的小鼠品系的排列组合可以进一步完善这些模型。比如, 一些包含免疫系统基因修饰的复合AD模型小鼠

队列就有助于扩展用于研究炎症的小鼠模型。炎症是连接AD与其他慢性疾病的机制^[59,60]。事实上, 许多研究都认为, 神经炎症是AD发病机制的重要组成部分。为了提供系统的研究资源, 许多实验室正在构建一系列与炎症因子相关的转基因小鼠队列, 包括补体系统、细胞因子和趋化因子, 以及促炎细胞因子, 如TNF- α 、IFN- γ 等。比如, 通过将IL-6基因敲除的5×FAD模型小鼠和其他类型的AD小鼠进行配对, 研究者可以观察到炎症因子如何影响AD的易感性^[61]。这些工作为了解复杂人类疾病的发病机制, 特别是多基因或多位点影响的疾病提供了重要工具。

2.4 遗传多样性基因修饰动物模型

基因-环境相互作用是大多数常见疾病的关键因素, 基因操作通常会导致不同遗传背景小鼠的表型差异^[62]。CC(collaborative cross)小鼠通过提供可在不同遗传环境的大量同基因品系来解决这个问题^[63]。多样性远交(diversity outbred, DO)小鼠和重组近交(recombinant inbred, RI)品系可用于构建遗传多样性小鼠模型资源。DO小鼠是来自8个创始近交系的封闭群, 最大限度地提高遗传多样性, 通过随机交配繁殖, 每个DO小鼠都有高度等位基因杂合性^[64]。这种异质性使得研究人员能够完成与疾病表型相关的基因座的高分辨率定位^[65,66]。RI品系是来自2个随机选择的F₂代近交系小鼠之间杂交产生的近交系, 由于RI品系是近交系, 它们可以不断提供实验材料。有研究者通过基于单倍型的全基因组关联分析识别控制B/T细胞比例、CD8⁺ T细胞数量、CD11c和CD23标记物表达水平的位点, 发现CD23表达归因于一个位点的加性遗传效应, 与CD23结构基因Fcer2a有关^[67]。使用10个CC小鼠品系, 以多柔比星(doxorubicin)处理诱导心脏病表型, 发现体现心脏病严重程度的生物标志物心肌钙蛋白I和肌球蛋白轻链3表达受到品系和性别的影响。还有研究发现, 45个与运动表现相关的遗传位点, 其中7个与体重相关, 进一步证明了体重、中枢神经系统和行为之间在遗传水平强相关^[68]。在利用CC小鼠模型研究肠道微生物组(gut microbiome, GM)与焦虑关联时, 全基因组关联分析(genome wide association study, GWAS)揭示了141个与焦虑和抑郁有关的基因, 分析表明GM介导了遗传因素对焦虑的影响。有研究精细定位了与酒精使用障碍和每周饮酒量相关的基因位点, 发现rs56030824 SNP对SPI1 mRNA表达对疾病风险有显著影响^[69]。有研究

人员将APC敲除雄性小鼠与27个CC雌性小鼠品系进行了交配,对F₁代携带野生型腺瘤性息肉病基因的对照小鼠进行了体重比较,发现息肉发展的表型有显著性差异,该变异主要受遗传因素控制^[70]。类似研究提示,遗传多样性在小鼠模型构建中有潜在的重要作用,但是利用CC小鼠进行基因修饰的研究尚不多见。在我们未发表的数据中,将PAP小鼠与21个RI品系杂交以建立遗传多样的AD小鼠模型,APP_{Swe}/PS1_{DeltaE9}小鼠与RI小鼠杂交,获得B6-129等背景的APP_{Swe}/PS1_{DeltaE9} F₁小鼠,并选择3月龄和10月龄的后代小鼠进行实验。Morris水迷宫空间探索结果表明,与同龄C57BL/6J背景小鼠相比,3月龄GD-AD小鼠目标象限停留时间、跨平台次数差异显著。这些老鼠和表型数据是识别影响AD易感性的未知基因的独特资源。可以选择一些品系培育成近交系,进行进一步研究。

3 基因修饰动物模型在神经退行性疾病研究中的应用

3.1 加深了对疾病病理机制的理解

基因修饰动物模型在神经退行性疾病研究中扮演了重要角色,它们有助于理解这些疾病的发病机制。例如,在AD的研究中,基因修饰的小鼠模型,如APP/PS1双转基因小鼠,通过过表达与AD有关的APP和PSEN1基因,为揭示AD的发病机制提供了重要的实验模型^[71]。这种模型有效地模拟了AD患者大脑中A β 的过度沉积,为研究A β 在AD发病中的作用提供了直接的实验依据^[6]。近年来的一项研究发现,通过在小鼠体内敲除BACE1基因(β -分泌酶1,产生 β -淀粉样蛋白的关键酶),可以有效地阻止A β 的产生,进而改善由A β 引起的神经损伤和认知障碍^[72]。即使在人类基因中存在与AD相关的突变,也不一定会发展成痴呆。遗传因素仅仅是影响AD风险的多个因素之一。其他因素包括年龄、性别、心血管健康状况、生活方式和环境等也会影响一个人是否会发展成AD。APP、PSEN1和PSEN2突变是已知与早发型AD有关的遗传因素,但这些突变只存在于小部分患者中。大多数AD的患者发病年龄在65岁以上,称为晚发型AD。晚发型AD的遗传因素不太明确,但研究发现APOE ϵ 4等基因型与晚发型AD有关。

3.2 用于药物筛选和疗法开发

基因修饰动物模型已经成为神经退行性疾病药物

筛选和疗法开发中的重要工具。例如,研究人员利用APP/PS1转基因小鼠成功筛选出了许多抑制A β 产生或促进A β 清除的药物,其中包括 β -和 γ -分泌酶抑制剂,以及针对A β 的免疫疗法^[73]。这些研究为AD药物开发提供了新的方向。 α -突触核蛋白转基因小鼠模型在这PD的研究中发挥了关键作用。利用这一模型,研究人员成功筛选出了许多抗氧化剂和抑制 α -突触核蛋白聚集的药物,为PD的药物治疗提供了新的希望^[74]。基因修饰动物模型也在疾病治疗策略的开发中发挥了重要作用。例如,神经元特异性的基因敲入或敲除模型为基因疗法的研究提供了重要工具^[75]。

3.3 环境因素和基因-环境相互作用的研究

环境因素对于神经退行性疾病扮演着重要角色,两者之间存在着较强的交互作用。利用基因修饰动物模型在这一研究领域中发现了一些重要的成果。首先,基因修饰动物模型可以帮助我们理解环境因素是如何通过影响基因表达来导致神经退行性疾病的^[76]。例如,环境压力是导致抑郁症的重要因素。通过使用基因修饰的小鼠模型,研究者发现,环境压力可以导致脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)在海马区的表达下降,进而导致神经元的萎缩和抑郁行为的出现^[77]。其次,基因修饰动物模型可以模拟特定的基因-环境交互作用。例如,通过构建ApoE4转基因小鼠模型,研究者发现,膳食中的高脂肪摄入可以通过改变脂蛋白代谢来增加AD的风险,尤其在带有易感基因ApoE4的个体中^[78]。另外,基因修饰动物模型还可以用来寻找能够调控基因-环境交互作用的药物目标。例如,通过使用基因敲除小鼠模型,研究者发现神经递质调节因子Npas4是环境压力导致的神经元萎缩和抑郁行为的关键介导者^[79],这为开发新的抗抑郁疗法提供了新的靶点。

4 存在的局限与展望

4.1 现有疾病动物模型的局限

动物模型对人类神经退行性疾病的模拟程度并不完美,我们应该意识到动物模型的局限,在使用这些模型时改进或有所取舍。首先,要考虑动物模型的特异性。例如,SOD1转基因小鼠是模拟人类ALS最常用的模型之一^[30],但SOD1基因突变在大部分ALS病例中并不起主导作用,C9orf72、TARDBP和FUS等^[80]至少其他12

种已知的基因突变与ALS有关。其次,要考虑动物模型的适用性。以研究AD的APP/PS1双转基因小鼠为例,这些小鼠确实能产生与AD疾病症状相关的淀粉样斑块,然而,在人类AD病例中,除了淀粉样斑块外,还常伴有神经纤维缠结的形成。而APP/PS1小鼠却未能模拟这一病理变化,这限制了它们在研究AD病理机制研究中的应用。最后,要考虑环境因素的影响,环境因素在许多神经退行性疾病中都起着重要的作用,例如,2019年的一项研究发现,虽然*LRRK2*转基因小鼠可以模拟PD的某些特征,但只有在暴露于某些特定环境因素(例如某些农药)后,这些小鼠才会显示出PD的全部病理特征,表明单一的基因模型无法充分地反映出这种环境因素的影响^[24]。

4.2 新的基因修饰动物模型研究方向

在神经退行性疾病研究中,基因修饰动物模型的应用非常广泛,但现有的模型仍存在一定的局限性。因此,科研人员一直在寻找能更精确地模拟人类疾病的动物模型。以下是几个可能的研究方向:首先,通过利用多基因修饰模型,我们有可能模拟出更加复杂的疾病状态^[81]。例如AD,将主要的致病基因APP、PS1和Tau结合起来,能够模拟出病人大脑中观察到的淀粉样斑块和神经纤维缠结的形成。其次,共病模型将成为重要的研究工具,能够模拟出多种疾病的共存状态。例如许多神经退行性疾病患者可能同时患有心血管疾病,通过共病模型,我们能够更好地理解这些疾病之间的相互影响。最后,遗传多样性小鼠将能够

模拟人类疾病复杂的遗传环境,有助于理解在不同的遗传背景下,同一疾病可能会表现出不同的症状和病程^[82]。例如,不同的遗传背景可以显著影响AD的发病机制和病程,这更接近于人群中的实际情况,也有助于我们理解为什么不同的个体对相同的治疗可能会有不同的反应。

随着各种技术手段的进步和相互促进,新的研究方法有望产生。例如利用遗传多样性基因修饰及多基因修饰小鼠开展动物模型的定向育种,将极大地丰富现有模型,并系统地产生动物模型资源,借助系统生物学和生物信息学手段,更加深入和系统地理解疾病的发生和发展。根据作者未发表的数据,将高血压相关基因修饰小鼠与遗传多样性小鼠杂交,得到的子代小鼠血压出现明显的差异,有的品系与原129背景的小鼠相比极显著升高。这组遗传多样性小鼠将成为高血压小鼠模型育种的出发品系,通过基因组选择,定向选育出更加接近人类疾病的模型,选择具有所需基因型的小鼠培育成近交系,得到稳定的、具有人类高血压特征的近交系小鼠种群。使用全基因组关联研究等遗传分析方法,有望找到更多与高血压相关的基因或者突变位点及其组合。

总的来说,多基因修饰模型、共病模型以及遗传多样性模型为神经退行性疾病的研究提供了新的工具,能够帮助我们深入理解这些复杂疾病的发病机制,为开发新的治疗方法提供指导。在未来,我们期待看到更多利用这些模型的创新研究,帮助我们更好地理解和治疗神经退行性疾病。

参考文献

- Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, et al. Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet*, 2017, 390: 2673–2734
- Van Dam D, De Deyn P P. Non human primate models for Alzheimer's disease-related research and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 2017, 12: 187–200
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
- Ren B, Yan F, Kuang Y, et al. Improved base editor for efficiently inducing genetic variations in rice with CRISPR/Cas9-guided hyperactive hAID mutant. *Mol Plant*, 2018, 11: 623–626
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, et al. Alzheimer's disease. *Lancet*, 2011, 377: 1019–1031
- Oakley H, Cole S L, Logan S, et al. Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*, 2006, 26: 10129–10140
- Elder G A, Gama Sosa M A, De Gasperi R. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*, 2010, 77: 69–81
- Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki T R, et al. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2005, 25: 8843–8853
- Sullivan P M, Mezdour H, Aratani Y, et al. Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele

- enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Biol Chem*, 1997, 272: 17972–17980
- 10 Berger-Sweeney J, Stearns N A, Murg S L, et al. Selective immunolesions of cholinergic neurons in mice: Effects on neuroanatomy, neurochemistry, and behavior. *J Neurosci*, 2001, 21: 8164–8173
- 11 Wozniak M A, Mee A P, Itzhaki R F. Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J Pathol*, 2009, 217: 131–138
- 12 Armulik A, Genové G, Mäe M, et al. Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature*, 2010, 468: 557–561
- 13 Davis J, Xu F, Deane R, et al. Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid β -protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic dutch/iowa mutant form of amyloid β -protein precursor. *J Biol Chem*, 2004, 279: 20296–20306
- 14 Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: Mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 1985, 14: 375–403
- 15 Oddo S, Caccamo A, Shepherd J D, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles. *Neuron*, 2003, 39: 409–421
- 16 Jankovic J. Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2008, 79: 368–376
- 17 Braak H, Tredici K D, Rüb U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 2003, 24: 197–211
- 18 Ungerstedt U. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*, 1968, 5: 107–110
- 19 Langston J W, Ballard P, Tetud J W, et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 1983, 219: 979–980
- 20 Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in α -synuclein mice: Implications for neurodegenerative disorders. *Science*, 2000, 287: 1265–1269
- 21 Betarbet R, Sherer T B, MacKenzie G, et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 2000, 3: 1301–1306
- 22 Alam M R, Singh S. Neuromodulation in Parkinson's disease targeting opioid and cannabinoid receptors, understanding the role of NLRP3 pathway: A novel therapeutic approach. *Inflammopharmacology*, 2023, 31: 1605–1627
- 23 Li J Y, Englund E, Holton J L, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med*, 2008, 14: 501–503
- 24 Pan-Montojo F, Anichtchik O, Dening Y, et al. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS One*, 2010, 5: e8762
- 25 van der Putten H, Wiederhold K H, Probst A, et al. Neuropathology in mice expressing human α -synuclein. *J Neurosci*, 2000, 20: 6021–6029
- 26 Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 1998, 392: 605–608
- 27 Valente E M, Abou-Sleiman P M, Caputo V, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in *PINK1*. *Science*, 2004, 304: 1158–1160
- 28 Bonifati V, Rizzu P, van Baren M J, et al. Mutations in the *DJ-1* gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 2003, 299: 256–259
- 29 Paisán-Ruiz C, Jain S, Evans E W, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, 2004, 44: 595–600
- 30 Gurney M E, Pu H, Chiu A Y, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 1994, 264: 1772–1775
- 31 Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, et al. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science*, 2003, 300: 808–812
- 32 Wils H, Kleinberger G, Janssens J, et al. TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 3858–3863
- 33 Wakabayashi J, Zhang Z, Wakabayashi N, et al. The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J Cell Biol*, 2009, 186: 805–816
- 34 Beers D R, Henkel J S, Xiao Q, et al. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 16021–16026
- 35 Qiu H, Lee S, Shang Y, et al. ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects. *J Clin Invest*, 2014, 124: 981–999
- 36 Rowland L P, Shneider N A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*, 2001, 344: 1688–1700
- 37 Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, 2009, 323: 1208–1211
- 38 Neumann M, Sampathu D M, Kwong L K, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 2006, 314: 130–133

- 39 Langston J W, Forno L S, Tetrud J, et al. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol*, 1999, 46: 598–605
- 40 Pablo J, Banack S A, Cox P A, et al. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 2009, 120: 216–225
- 41 Ridley R M, Baker H F, Windle C P, et al. Very long term studies of the seeding of β -amyloidosis in primates. *J Neural Transm*, 2006, 113: 1243–1251
- 42 Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Cizewski Culotta V, et al. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis*, 2001, 8: 933–941
- 43 Awano T, Johnson G S, Wade C M, et al. Genome-wide association analysis reveals a *SOD1* mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 2794–2799
- 44 Cui X, Zuo P, Zhang Q, et al. Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: Protective effects of R- α -lipoic acid. *J Neurosci Res*, 2006, 83: 1584–1590
- 45 Capecchi M R. Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989, 244: 1288–1292
- 46 Thomas K R, Capecchi M R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, 51: 503–512
- 47 Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 1996, 274: 99–103
- 48 de Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, 1998, 391: 387–390
- 49 Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806–811
- 50 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411: 494–498
- 51 Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, 296: 550–553
- 52 Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262–1278
- 53 Doudna J A, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346: 1258096
- 54 Mali P, Yang L, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823–826
- 55 Liu Y, Pattamatta A, Zu T, et al. C9orf72 BAC mouse model with motor deficits and neurodegenerative features of ALS/FTD. *Neuron*, 2016, 90: 521–534
- 56 Khera A V, Chaffin M, Aragam K G, et al. Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nat Genet*, 2018, 50: 1219–1224
- 57 Liu Y, Xu Y, Zhang L, et al. Down-regulated drebrin aggravates cognitive impairments in a mouse model of Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 800
- 58 Selkoe D J, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, 2016, 8: 595–608
- 59 Pugazhenth S, Qin L, Reddy P H. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863: 1037–1045
- 60 Newman A B, Fitzpatrick A L, Lopez O, et al. Dementia and Alzheimer's disease incidence in relationship to cardiovascular disease in the cardiovascular health study cohort. *J Am Geriatrics Soc*, 2005, 53: 1101–1107
- 61 Cao J, Pan J, Zhang D, et al. Effects of interleukin-6 gene knockout on β -amyloid deposition and cognition in 5 $\times$ FAD mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Acad Med Sin*, 2022, 44: 357–365
- 62 Wong A H C, Gottesman I I, Petronis A. Phenotypic differences in genetically identical organisms: The epigenetic perspective. *Hum Mol Genet*, 2005, 14: R11–R18
- 63 Churchill G A, Airey D C, Allayee H, et al. The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits. *Nat Genet*, 2004, 36: 1133–1137
- 64 Chesler E J. Out of the bottleneck: The Diversity Outcross and Collaborative Cross mouse populations in behavioral genetics research. *Mamm Genome*, 2014, 25: 3–11
- 65 Svenson K L, Gatti D M, Valdar W, et al. High-resolution genetic mapping using the mouse Diversity Outbred population. *Genetics*, 2012, 190: 437–447
- 66 Buji R, Korstanje R. The impact of genetic background on mouse models of kidney disease. *Kidney Int*, 2022, 102: 38–44
- 67 Phillippi J, Xie Y, Miller D R, et al. Using the emerging Collaborative Cross to probe the immune system. *Genes Immun*, 2014, 15: 38–46
- 68 Mao J H, Langley S A, Huang Y, et al. Identification of genetic factors that modify motor performance and body weight using Collaborative Cross

- mice. [Sci Rep](#), 2015, 5: 16247
- 69 Kapoor M, Chao M J, Johnson E C, et al. Multi-omics integration analysis identifies novel genes for alcoholism with potential overlap with neurodegenerative diseases. [Nat Commun](#), 2021, 12: 5071
- 70 Dorman A, Baer D, Tomlinson I, et al. Genetic analysis of intestinal polyp development in Collaborative Cross mice carrying the Apc Min/+ mutation. [BMC Genet](#), 2016, 17: 46
- 71 Jankowsky J L, Slunt H H, Ratovitski T, et al. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: A comparison of strategies. [Biomol Eng](#), 2001, 17: 157–165
- 72 Luo Y, Bolon B, Kahn S, et al. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation. [Nat Neurosci](#), 2001, 4: 231–232
- 73 Citron M. Alzheimer's disease: Strategies for disease modification. [Nat Rev Drug Discov](#), 2010, 9: 387–398
- 74 Scherzer C R, Eklund A C, Morse L J, et al. Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2007, 104: 955–960
- 75 Sahin M, Sur M. Genes, circuits, and precision therapies for autism and related neurodevelopmental disorders. [Science](#), 2015, 350: aab3897
- 76 Nestler E J, Peña C J, Kundakovic M, et al. Epigenetic basis of mental illness. [Neuroscientist](#), 2016, 22: 447–463
- 77 Duman R S, Monteggia L M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. [Biol Psychiatry](#), 2006, 59: 1116–1127
- 78 Zhao N, Liu C C, Van Ingelgom A J, et al. Apolipoprotein E4 impairs neuronal insulin signaling by trapping insulin receptor in the endosomes. [Neuron](#), 2017, 96: 115–129.e5
- 79 Ramamoorthi K, Fropf R, Belfort G M, et al. Npas4 regulates a transcriptional program in CA3 required for contextual memory formation. [Science](#), 2011, 334: 1669–1675
- 80 Renton A E, Majounie E, Waite A, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. [Neuron](#), 2011, 72: 257–268
- 81 Hasin Y, Seldin M, Lusis A. Multi-omics approaches to disease. [Genome Biol](#), 2017, 18: 83
- 82 Pan J, Zhang L, Huang Z, et al. Strategies for generating mouse model resources of human disease. [Protein Cell](#), 2023, doi: 10.1093/procel/pwad011

Summary for “神经退行性疾病动物模型的建立与应用”

The establishment and application of animal models for neurodegenerative diseases

Jirong Pan^{1†}, Ling Zhang^{1†}, Qian Wang¹, Dalu Zhao¹, Zhibin Huang¹, Chengzhi Wei¹, Xu Ma¹ & Chuan Qin^{1,2,3*}

¹ Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College (CAMS & PUMC), Beijing 100021, China;

² National Human Diseases Animal Model Resource Center, NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, National Center of Technology Innovation for Animal Model, Beijing 100021, China;

³ Changping National Laboratory (CPNL), Beijing 102206, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding author, E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn

The increasing prevalence of neurodegenerative diseases constitutes a significant challenge to public health systems globally. Consequently, the quest for efficacious preventive and therapeutic strategies has assumed center stage in public health discourse. Animal models serve as indispensable instruments in neurodegenerative disease research, offering foundational data that inform our understanding of the pathological mechanisms and contribute to the development of novel therapeutic paradigms. This manuscript delineates the methodologies for constructing animal models germane to prevalent neurodegenerative conditions such as Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis. The establishment of these models incorporates factors like genetic etiology, pathological signatures, and the temporal course of disease progression.

Traditional techniques in model development frequently exhibit shortcomings in disease specificity, phenotypic stability, and alignment with the pathological evolution of human ailments. However, advancements in gene-editing technologies, notably CRISPR/Cas9, facilitate the emulation of human neurodegenerative disease pathologies with increased precision. This augments the relevance of animal models as instrumental tools in pharmaceutical development and the formulation of disease prevention strategies.

In addition to conventional neurodegenerative animal models, the manuscript explores advancements in innovative models including chemical induction models, human brain tissue transplantation models, spontaneous models, and accelerated aging models. A focal point of the discourse is the transformative impact of gene-editing technologies on animal model development, with emphasis on the theoretical foundations and methodologies for creating polygenic breeding models and genetically diverse, gene-edited models.

1. Key gene-editing technologies applied in the domain of animal model creation encompass gene knock-in/knock-out, RNA interference (RNAi), and CRISPR/Cas9. Gene knock-in entails the integration of a target gene into a predetermined genomic location, while gene knock-out involves the excision of a specific gene, either entirely or partially. Both processes are predicated on homologous recombination, leveraging the innate capability of DNA molecules for homologous pairing and exchange to insert the target gene at precise chromosomal loci.

2. Complex human diseases frequently involve an array of genes or quantitative trait loci (QTL), each exerting a modest impact on the disease phenotype. When multiple QTLs are inherited, disease manifestation or predisposition may ensue. The advancement of mouse models for Alzheimer's Disease epitomizes this intricate multi-gene or multi-locus modification process. As stronger genetic drivers and their combinations are identified, the selection and arrangement of divergent mouse strains can refine these models further.

3. The utility of genetically diverse gene-edited animal models lies in their ability to replicate human genetic variability by exploiting the phenotypic differences inherent in mice with assorted genetic backgrounds.

The integration of gene-edited animal models into neurodegenerative disease research enhances our mechanistic understanding of these conditions. The manuscript elucidates emergent research avenues in gene-edited animal models, including the capabilities of polygenic models to emulate intricate disease states and the evolving role of comorbidity models. These tools are pivotal for a comprehensive understanding of disease pathogenesis, the elucidation of environmental and genetic interactions, the screening of pharmaceutical candidates, and the conception of innovative therapeutic interventions. Although existing models fail to capture the full complexity of human diseases, there is a rational expectation that ongoing technological innovations will ameliorate these limitations, thereby influencing the future trajectory of neurodegenerative disease research.

animal models, neurodegenerative diseases, transgenic mice, genetic diversity

doi: [10.1360/TB-2023-0764](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0764)