

刘永芳,吴正存,马开利. 非人灵长类帕金森模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 134-142.
Liu YF, Wu ZC, Ma KL. Progression of a Parkinson's disease model in non-human primates [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 134-142.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 020

非人灵长类帕金森模型的研究进展

刘永芳¹, 吴正存¹, 马开利^{1,2*}

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院, 医学生物学研究所, 昆明 650118;
2. 中国医学科学院 & 北京协和医学院, 医学灵长类研究中心 & 神经科学中心, 北京 100005)

【摘要】 帕金森病(Parkinson's disease, PD), 作为全球第二大神经系统退行性疾病, 目前已有的治疗手段仍不能从根本上逆转疾病的进程, 而治疗手段的发现和评价离不开动物模型的建立, 一个可靠、有效的动物模型将有利于 PD 的发病机制、诊断、治疗方法以及药物筛选的研究。啮齿类动物和非脊椎动物已被广泛用于建立 PD 模型, 但其并不能完全呈现人类 PD 的行为学和病理特征, 而非人灵长类(nonhuman primate, NHP)在生理、解剖结构和免疫等方面与人最为接近, 更适合用来探索疾病机理和发现新的治疗方式, 因此, 本文就帕金森病 NHP 模型的建立方法进行综述, 为帕金森病 NHP 模型建立提供参考。

【关键词】 NHP; 帕金森病; 模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0134-09

Progression of a Parkinson's disease model in non-human primates

LIU Yongfang¹, WU Zhengcun¹, MA Kaili^{1,2*}

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China.
2. Medical Primate Research Center & Neuroscience Center, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005)

【Abstract】 Parkinson's disease (PD), the second most prevalent neurodegenerative disorder worldwide, lacks a cure. The discovery and evaluation of treatment method are dependent on nonhuman primate (NHP) models of PD. A reliable and valid animal model can contribute to understanding the pathogenesis, diagnosis, therapy, and drug discovery related to PD. Rodents and invertebrates are commonly used to establish PD models. However, results using rodent and invertebrate models do not accurately represent the behavioral and pathological characteristics of human PD. NHPs are the closest animals to humans in terms of physiology, structure, and immunology, which makes them suitable for studies to understand the mechanisms of disease and establish new therapies. This article reviews the progression of PD models in NHPs, thereby providing a reference for PD model establishment.

【Keywords】 NHP; Parkinson's disease; model

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是帕金森氏综合征广泛运动障碍中最常见的形式,以步态不稳、肌肉僵直、运动迟缓、静止性震颤为特征。新的诊断标准将姿势不稳排除在外。目前,全球 PD 患病人数超过六百万,65 岁以上人群发病率大约为 1.5%^[1],中国占全球发病人数的一半。据统计,随

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-2-001, 2016-I2M-1-004); 云南省科技厅基础研究专项(202001AT070144)。
【作者简介】 刘永芳(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:药理学。E-mail:15846527249@163.com
【通信作者】 马开利(1982—),男,博士,研究员,研究方向:药理学和毒理学。E-mail: mklpume@gmail.com

着人口老龄化,截至 2030 年,全球 50 岁以上发病率将会增加一倍^[2]。已有研究表明,PD 的病理改变主要是中脑黑质多巴胺能神经元的进行性丢失、纹状体多巴胺神经递质的减少以及 α 突触核蛋白包涵体的形成。临床上,PD 患者确诊时已经是疾病的中晚期,丢失了 50%~60% 多巴胺能神经元和 60%~70% 的多巴胺能神经递质,大多出现运动症状,晚期伴有疼痛和抑郁,严重影响患者的生活质量。而疾病早期,多数患者会出现便秘、嗅觉障碍、睡眠障碍等非运动症状^[3]。在确诊之前,这些非运动症状往往并不会和 PD 联系起来。目前,PD 的治疗药物以多巴胺前体药物左旋多巴和多巴胺受体激动剂为主,但随着服用时间的延长,这些药物的疗效会逐渐减弱,并会引起药物引发的震颤^[4]。近些年来,非侵入性的深部脑刺激疗法取得了良好的效果,可以缓解患者的疼痛,干细胞疗法也开始走向临床。但这些治疗手段的发现和评价都离不开动物模型的建立,一个最接近临床 PD 患者发病过程和病理变化的动物模型将有利于 PD 的发病机制、诊断、治疗方法以及药物筛选的研究。

啮齿动物已经广泛用于建立 PD 模型,而非脊椎动物,如果蝇、线虫、斑马鱼,由于其神经元数量少,便于操作,可进行药物高通量筛选,也常用于 PD 模型的建立。非人灵长类 (non-human primate, NHP),在进化上与人类关系更近,大小、行为、生理、生化、免疫功能方面与人类更相似,更适合用于模拟人类疾病模型。最常用来建立 PD 模型的 NHP 有狨猴和猕猴。猴子具有一定的学习、认知、情绪、社交能力^[5]。这使得相比较于啮齿动物和猪,猴子更便于测试精细运动和非运动症状。猴脑和人脑的高度相似使得能用磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 和正电子发射计算机断层显像 (positron emission tomography, PET) 对大脑结构和功能进行非侵入性高分辨率成像。这些证据均表明 NHP 是更适合研究 PD 的动物,因此,本文通过总结和阐明 PD 的 NHP 模型研究现状,为基于 NHP 的 PD 模型的药物评价及机制研究提供参考和依据。

1 神经毒素诱导模型

1.1 MPTP 模型

MPTP,全称 1-甲基-4 苯基-1,2,3,6-四氢吡啶,其可通过血脑屏障,被胶质细胞膜上的单胺氧

化酶 B (monoamine oxidase B, MAO-B) 代谢为 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridine ion, MPP^+),后者可由多巴胺转运体 (dopamine transporter, DAT) 转运至细胞内,与线粒体复合物 I 结合,损伤氧化呼吸链,选择性损伤多巴胺能神经元^[6]。因此,MPTP 是最常用的制备 PD 模型的神经毒素。不同猕猴物种对 MPTP 的敏感性不同,同一物种间不同猴子个体敏感性也有差异。食蟹猴和恒河猴同属于猕猴。食蟹猴对 MPTP 的敏感性强于恒河猴^[7]。Potts 等^[7]通过回顾 108 只猕猴静脉注射 MPTP 的方案,给出建议:①单次 MPTP 注射后,3~8 周内运动障碍会自发恢复,因此建议最后一次 MPTP 注射后,至少 8 周内每周进行一次症状评估;②多次低剂量注射 MPTP,可以减少并发症的发生;③可根据动物的行为学调整 MPTP 剂量,直到出现“明显运动障碍”为止。在静脉注射 MPTP 的方案中,猴子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。Seo 等^[8]在此基础上作了改进,建立起一个稳定的慢性 NHP 帕金森模型:一周两次小剂量 (0.2 mg/kg),左股骨区肌肉注射给药,给药 48 周后,模型猴的纹状体和黑质 TH 阳性神经元明显丢失,同时还发现模型猴中的 T 淋巴细胞慢性浸润到了脑部。类似的, Masilamoni 等^[9]采用慢性 MPTP 给药方案 (0.2~0.5 mg/kg,肌肉注射,一周一次,持续 21 周),在猴子模型中重现了 PD 病人脑中多巴胺能神经元退变的模式。另有团队采用前 17 周每周一次肌肉注射给予 0.2 mg/kg 剂量的 MPTP,后 4 周调整为 0.5 mg/kg 的给药方案,也建立出了稳定的猕猴帕金森模型^[10]。慢性给药方案中,模型猴中脑腹侧神经元丢失多于背侧,而急性方案中腹侧和背侧丢失情况差不多。颈静脉注射所需要的 MPTP 剂量一般会比皮下给药的剂量要小。一周一次 0.5 mg/kg MPTP 皮下注射狨猴,总剂量 2.5 mg/kg 和 6 mg/kg 时,并未发现脑部明显的病理变化,行为学也不明显并且还发生恢复^[11-12]。皮下连续给予 MPTP,似乎能有更好的 PD 症状和病理表现。采用连续 3 d 分别 2 mg/kg、2 mg/kg、1 mg/kg 皮下注射的给药方法,模型猴的左右两侧大脑损伤程度不一致,行为学特征持续了 1 年以上^[13]。

老年猴通常比青年猴更易感。老年恒河猴单侧给予 MPTP,可诱导出中度帕金森症状。5~9 岁恒河猴所需要的 MPTP 剂量是 20~23 岁猴的三

倍^[14]。普遍认为,老年动物可能更能模拟 PD 病人的实际情况,但也存在不同看法。Shi 等^[15]发现给老年恒河猴 0.2 mg/kg 剂量肌肉注射 MPTP,第 1 次连续注射 15 d,间隔 8 周后,第 2 次连续注射 30 d,期间模型猴病情变化不可控,于是采用青年恒河猴分两段给予 MPTP:肌注+静脉注射,呈现了稳定的运动和非运动症状^[16]。以往的 MPTP 模型研究中,大多检测到猴子脑中有 α 突触核蛋白 (α -synuclein, α -syn) 沉积,但没有发现磷酸化的 α -syn 聚集体。但近几年有研究者将 MPTP 给予恒河猴后,发现可产生 p- α -syn 和路易病理,但无法重现特发性 PD 尾状核-壳核渐变的特征^[17]。NHP 的 MPTP 模型总结见表 1。

1.2 6-OHDA 模型

6-OHDA,中文名称 6-羟多巴胺,是一种多巴胺(dopamine, DA)类似物,可竞争性抑制 DAT 对 DA 的摄取,进入细胞后可抑制线粒体复合物 I 和线粒体复合物 IV 的活性。6-OHDA 不能通过血脑屏障,一般需要进行脑立体定位注射。对猴脑要进行多点注射,以保证药物的均匀分布和减少自发恢复的发生。DA 神经递质的丢失、行为学的改变与 6-OHDA 剂量呈正相关性。关于 6-OHDA 关注的一个问题是注射部位的选择。研究人员将 180~216 μ g 的 6-OHDA 多点注射到猴猴的皮层和尾状核进行比较,发现二者引起注意力发展方向不同^[18]。单侧注射到猴猴纹状体内,5 月后病变侧 DA 能神经元丢失 46%,运动功能和感觉功能出现异常^[19];注射到黑质,能引起多巴胺能神经元丢失 80%,非多巴胺能神经元丢失 77%,猴子出现姿势改变,记忆障碍^[20]。有人认为,单侧模型并不能完全模拟 PD 的症状。2004 年, Milton 等^[21]发现左侧注射的 PD 模型猴子表现出空间和运动症状的单方面缺陷,而双侧注射的 PD 模型可能表现出双侧的精神障碍。2015 年, Santana 等^[22]分两个阶段对猴猴内侧前脑束 5 个位点进行脑立体定位注射 6-OHDA,总剂量为 120 μ g,发现产生了持续的帕金森症状。另外研究采用静脉注射的给药方式,以 50 mg/kg 剂量全身应用 6-OHDA,引起了心脏交感神经去支配^[23]、炎症、氧化应激、PPAR γ 激活^[24]、近端结肠儿茶酚胺损失^[25]。

2 转基因模型

目前已有的 PD 转基因模型主要基于 α 突触核

蛋白野生型及其 A53 T 突变型(第 53 位氨基酸由丙氨酸突变为苏氨酸)。同时,利用病毒载体局部或全身过表达制作转基因动物的方式,因方便、快捷而受到科研人员的青睐,并且,有效病毒载体递呈系统及高效的递送方式的选择是转基因动物成功的关键。

2.1 递呈系统的选择

目前,常用的转基因制备的病毒载体有腺相关病毒(adeno-associated viral vector, AAV)和慢病毒(lentivirus, LV)。

2.1.1 AAV 病毒系统

AAV 是单链 DNA 病毒,包装容量大约 4.7 kb,对外源基因的表达能力中等。因其不整合到宿主基因组中,因此目的基因可能在宿主传代的过程中丢失。目前共发现 12 种血清型(AAV1-AAV12),不同血清型对组织的特异性不同。神经领域使用较多的血清型有 2、5、8、9 型。AAV2 型主要针对神经系统;AAV5 型针对肺、眼、神经系统;AAV8 型针对肝、肌肉、眼、神经系统;AAV9 型针对肺、肝、肌肉、心脏和神经系统,且 AAV9 型在 NHP 脑部轴突中可以进行双向运输^[26]。运用失去复制能力的 AAV 假病毒已成为趋势,尤其是以 2 型为核心,其他型为衣壳蛋白的血清型病毒。Allocca 等^[27]发现 AAV2/5 型载体可容纳的基因组可扩大到 8.9 kb。Gerits 团队比较了不同血清型和不同启动子下报告基因在恒河猴新皮层的转导效率,发现钙调蛋白激酶 II(CaMKII α 0.4)启动子下,病毒的传播效率为:rAAV2/5>>rAAV2/7>rAAV2/8>rAAV2/9>>rAAV2/1,转导细胞的比例为:rAAV2/1>rAAV2/5>rAAV2/7=rAAV2/9>rAAV2/8^[28]。与啮齿动物不同,通用巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子在恒河猴脑中效果最差。而另一研究组给 6 只猕猴右壳核和同侧内囊注入相同剂量的病毒,发现 rAAV2/1、rAAV2/2 和 rAAV2/5 在大脑中的总体扩散没有显著差异。而在大脑和远端神经元结构(脊髓和周围神经)中,rAAV2/1 和 rAAV2/5 在每个细胞中的载体拷贝数高于 rAAV2/2^[29]。利用 AAV2/9 递送基因发现,无论动物年龄,转导的最主要的细胞类型都是星形胶质细胞和小胶质细胞。据此,综合考量与实际案例来看^[30-32],目前,AAV2/5 型和 AAV2/9 型可能更适合作为 PD 造模的血清型,AAV2/1 也可作为参考。

2.1.2 LV 病毒

LV 是一种由人免疫缺陷病毒改造而来的单链

RNA 病毒,包装容量<9 kb,能随机整合在宿主基因组中。2001 年,美国科学家将灭活的慢病毒注射进猕猴体外受精的胚泡中,制备了第一只携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的转基因猴“安迪”,但绿色荧光蛋白基因并不在其生殖细胞中表达^[33]。2008 年, Yang 等^[34]在 4~8 细胞期的胚胎中注射携带亨廷顿基因的高滴度的慢病毒,第一个亨廷顿恒河猴模型诞生,但至此,尚未证明基因能向后代传递。2009 年,日本科学家将灭活的 $5.6 \times 10^9 \sim 5.6 \times 10^{11}$ /mL 滴度的 EGFP-慢病毒注射到猕猴最早时期的胚胎中,EGFP 在猕猴后代中多个器官中表达,实现了种系的传递^[35]。

2.2 递送方式

2.2.1 局部注射

在 NHP 中,脑立体定位普遍针对黑质和纹状体,而未见有报道直接采用脑室注射。2003 年, Kirik 等^[30]率先用 AAV2 型载体通过脑立体定位注射的方式向黑质内递送野生型及 A53T 突变型的 α -syn, 16 周后发现 A53T 突变引起 30%~60% 的黑质多巴胺能神经元丢失,存活的黑质神经元细胞中 90%~95% 的细胞有阳性 α -syn 包涵体。利用 rAAV2/5 型载体在成年猴腹侧中脑中表达人野生型 α -syn,然而神经变性仅局限于尾状核多巴胺能神经纤维^[31],并且他们还证实过表达人 A53T 能导致黑质多巴胺能细胞死亡^[36]。这证明 A53T 毒性强于野生型 α -syn。Koprich 等^[32]利用 AAV2/1 型载体让黑质内过表达 α -syn A53T 突变体发现病毒滴度为 1.7×10^{12} 时没有显著性的病理变化;而当滴度达到 5.1×10^{12} 时黑质多巴胺能神经元减少 50%,纹状体多巴胺减少 60%,且病毒表达持续至少 4 个月。这些证据表明,成年猴脑立体定位注射 AAV 载体可以实现局部的目的基因表达,并能表现出一定的相关表型,且可通过调整病毒滴度来控制目的基因的表达量。

除了脑立体定位外,为了探究 α -syn 从肠道逆行传播到大脑的假说, Manfredsson 等^[37]将 AAV2/5-CBA- α -syn 注射到结肠和胃,发现肠神经系统明显的 α -syn 病理,但猴子脑中并没有任何病理出现。

2.2.2 全身给药

(1) 成体全身给药

为了提高转导效率,近几年开始不断尝试宫内感染、出生后进行静脉注射或鞘内给药。2003 年, Garrett 等^[38]将 rAAV2-GFP 注射进羊膜囊, 72 h 后

开始表达和分泌 GFP,并且维持了 1 年以上。rAAV2/9 静脉注射能通过血脑屏障,并长期表达。猕猴围生期后期,研究人员将 scAAV9-CMV-eGFP 通过脐静脉注射进两只猕猴胎儿,病毒转导到了中枢和外周神经系统^[39]。同时,给 P1、P30、P90、3 岁的食蟹猴静脉注射 rAAV2/9-GFP,发现成年猴子比年轻猴子转导效率低^[40]。这些数据表明,幼年比成年神经元更容易受到病毒感染。AAV9 型病毒鞘内给药也可以实现基因的持续表达,长达 4 年^[41]。

(2) 卵母细胞或胚胎时期注射

相比于胎儿或新生儿,更早的时间点还可以选择卵母细胞或胚胎前期。Niu 等^[42]以 10^9 /mL 滴度的人 A53T 突变型慢病毒递送至 M II 期恒河猴卵母细胞,之后进行体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)和胚胎植入,成功制作 6 只 A53T 转基因猴,进一步检测证实 A53T 突变基因在全身器官中表达,并出现了年龄相关的认知缺陷和焦虑,并且 A53T 突变的猴脑比鼠脑具有更广泛的神经变性。其中,值得注意的是,注射时机的选择对转基因猴组织表达的广泛性具有重要的作用。2016 年, Seita 团队用带人类巨细胞病毒即刻早期增强子和鸡 β 肌动蛋白启动子的 GFP 慢病毒表达载体注射食蟹猴,产生了全身表达 GFP 的转基因猴^[43],但发现向受精前的成熟卵母细胞注射 LV 表达系统,可在组织中实现均匀的 GFP 表达,而向受精卵中注射病毒则产生镶嵌表达的转基因猴。2017 年, Tomioka 团队报道,他们使用四环素诱导的慢病毒载体表达系统产生了新型的转基因猴^[44]。

3 基因编辑技术

基因编辑技术,如锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENS)、成簇的规则间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspersed short palindromic repeats, CRISPR),可以实现定点编辑。ZFN 是第一个可编程的核酸酶。1996 年,有报道将模块锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)与 FokI 限制酶非特异切割域融合,ZFN 由此产生。FokI 核酸酶必须二聚体才具有切割功能。ZFP 由包含结合锌原子的半胱氨酸和组氨酸对的 30 个氨基酸残基组成,即 ZF 基序,每个 ZF 基序识别 3~4 bp 的序列,通过将 α 螺旋插入 DNA 大沟来与 DNA 结合。与 ZFN 类似,将

来源于植物病原体的 TAL 效应子模块融合到 Folk 切割域上,称作 TALENS。TALENS 制作核酸酶的方式更简单。CRISPR/Cas 是细菌免疫系统的一部分,这个技术被分为两部分:单个指导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 和一个 Cas 核酸内切酶。最常用的 Cas 核酸内切酶是 Cas 9。ZFN 成本高,效率低;TALENS 效率高、脱靶率低、构建周期短;Cas 9 效率是 TALENS 的 5 倍,实际操作更简单。

目前,这几种技术在哺乳动物中都有一定的应用,但在帕金森猴中的应用仍极为有限。近几年,日本科学家 Coghlan 等^[45]通过基因组编辑技术突变了猕猴的 *SNCA* 基因,产生了第一只帕金森猕猴模型,猕猴在第一年出现睡眠障碍,第二年脑干出现路易病理,第三年发生震颤。2019 年,国内学者杨伟莉等^[46]使用 CRISPR Cas9 技术生成了第一只 *PINK1* 敲除猴,其皮层、纹状体、黑质出现显著神经元退性。基因编辑有着强大的应用前景,但基因编辑技术难度高,仍存在脱靶、镶嵌表达模式、低同源重组的缺点,仍面临要攻关很多问题。

4 PFF 模型/LB 模型

路易小体(Lewy bodies, LB)是 PD 的病理性标志,而 LB 中主要成分为淀粉样纤维聚集体, α -syn 是其中含量最高的成分^[47]。于是 α -syn 聚集体和 PD 的关系令人着迷。现在普遍认为 α -syn 单体和规则整齐的纤维是无毒的,而寡聚体和形成纤维之前的原纤维(preformed fibrils, PFF)是有毒的形式。其 PFF 的制备已经有一定的基础和成形的方案,而寡聚体的制备仍然存在难度。将制备的 α -syn PFF 注射进猴子体内的确产生了 PD 病理。Shimozawa 等^[48]向成年猕猴纹状体内注射 α -syn PFF,三月后, α -syn S129 磷酸化免疫反应检测阳性,而且 α -syn 从纹状体向黑质扩散,诱发了 PD 样 α 突触核蛋白病理,这是第一个猕猴 α -syn 传播模型。有团队向猕猴肠道接种 α -syn PFF,1 个月,在迷走神经和蓝斑背侧运动核检测到少量的病理性 α -syn,研究持续 12 个月,肠神经系统仍有稳定病理性的 α -syn,而脑组织中却并未发现^[37],这说明 α -syn 从外周传递到中枢可能只是偶然事件。

将 PD 患者脑中提取的 LB 接种到猴子黑质或纹状体内,也可以引起 α -syn 病理和神经退行性病变^[49]。最近,Arotcarena 等^[50]向猕猴的纹状体或肠道注射 PD 患者来源的 α -syn 聚集体,然而迷走神经

中并未发现 α -syn 病理学的改变,该研究同样不支持通过迷走神经和背侧运动核传递 α -syn 的假说。

5 讨论

NHP 的生命周期较长,这使得我们有机会来观察造模过程中的病理变化。目前,MPTP 模型是 PD 模型的金标准。神经毒物模型方法简单,易操作,病理变化一般与剂量呈正相关。由于人类对 MPTP 极其易感,所以使用 MPTP 对实验室和操作人员要求较高,防止造成 MPTP 泄露。而 6-OHDA 不能通过血脑屏障,多采取一次脑立体定位注射,相对安全很多。而神经毒物造成的伤害一般比较直接,一般没有报道有路易小体的形成,且容易错过 PD 前期的发病过程。因此,推荐低剂量、长时间给药。转基因模型通常有一定难度。合格的转基因模型应该具备以下特征:①基因能整合到宿主基因组中;②基因能表达且有生物活性;③种系传递^[51]。因为,AAV 并未整合在基因组中,所以,AAV 载体递送的基因在猴子传代的过程中可能会发生丢失。另外,研究显示小鼠脑中 p- α -syn 水平与黑质纹状体变性程度有关,而与小鼠不同的是,猴子的 p- α -syn 水平与神经变性之间没有相关性^[52]。值得注意的是,猴子本身的 α -syn 就含有 A53T 突变,所以,猴子体内过表达 α -syn A53T 突变的蛋白是否能代表人体内的 A53T 突变表型有待考证。CRISPR 技术与其他基因编辑技术相比,可以实现对特定的基因位点进行编辑,成本也降低,但操作难度大,仍存在脱靶的问题。然而,转基因模型可以从基因水平来研究疾病机理,有神经毒物模型不能替代的优点。路易小体是 PD 患者脑中标志性的病理,而 α -syn 作为其中主要的成分,被认为 PFF 形式是有毒的,现在也有人认为寡聚体毒性更强。重组 α -syn PFF 模型也重现了 PD 中多巴胺能神经元丢失的特征,但其 PFF 制备的质量通常不稳定。PD 患者脑中提取的 LB 产物成分更为复杂,达到 70 多种,不同人员,以及每一批次之间成分的差异可能会导致结果的变异。

6 小结

总之,即使 NHP 也有一定的缺陷,但仍然是与人类最接近的动物,在研究疾病机理、药物临床前安全性评价上仍然具有不可替代的作用,但由于伦理原因,要严守 3R 原则,只在必要的时候使用 NHP。

表 1 非人灵长类 MPTP 模型总结
Table 1 Summary of MPTP NHP model

动物种系、年龄 Animal, Age	给药剂量 Dose	给药途径 Route	病理 Pathology	运动症状 Motor symptom	非运动症状 Non motor symptom
Seo ^[8] 成年食蟹猴 Adult cynomolgus monkeys	0.2 mg/kg, 4~48 周, 一周一次 0.2 mg/kg, for 4~48 weeks, once a week	i.m	SN、尾状核、壳核 TH 减少; T 细胞慢性浸润; 18F-FP-CIT BP 均显着降低 TH expression level was decreased in SN, caudate nucleus and putamen; T cell chronic infiltration; 18F-FP-CIT BP decreased significantly	GA 降低 Reductions in GA	/
Fifel ^[53] 成年恒河猴 Adult rhesus monkeys	0.2 mg/kg, 开始一周 2 次, 快结束时 1~2 d 一次, 18~90 d 0.2 mg/kg, twice a week initially, towards the end of treatment, every 1~2 days	i.m	下丘脑、SCN、视网膜没有病变 No pathological changes in hypothalamus, SCN and retina	/	昼夜节律丧失或减少, 内源性昼夜节律保持完整 Loss or reduction of circadian rhythm, endogenous circadian rhythm remains intact
Villalba ^[54] 恒河猴 Adult rhesus monkeys	总剂量 4.3~8 mg/kg 4.3~8 mg/kg in total	i.m	丘脑变性; CM/Pf 体积改变, 纹状体 ChI 密度和数量降低 Thalamus degeneration; CM/Pf volume changes, striatal ChI density and number decrease	/	/
Gregory Porras ^[55]	0.2~0.5 mg/kg, 一周一次, 21 周 0.2~0.5 mg/kg, once a week, 21 weeks	i.m	/	/	/
Mahmoud ^[56] 普通狨猴 Common marmosets	1.0 mg/kg, 连续 3 d; 2.0 mg/kg, 提前连续 5 d 1.0 mg/kg, for three consecutive days; 2.0 mg/kg, for five consecutive days	s.c.	SNC 腹侧和背侧的 TH-ir 神经元数量减少了约 80%; 树突网状带变性, 尾状核、壳核退变、伏伏核没有 Number of TH-ir neurons in the ventral and dorsal sides of SNC is reduced by about 80%, dendritic reticular zone degeneration, caudate nucleus, putamen degeneration, and nucleus accumbens are not reduced.	/	/
Franke ^[11] 3~4 岁, 狨猴 3~4 years old, marmosets	0.5 mg/kg, 一周一次, 12 周; 0.5 mg/kg, 一周一次, 5 周 0.5 mg/kg, once a week, for 12 weeks; 0.5 mg/kg, once a week, for 5 weeks	s.c	黑质多巴胺能神经元数量大小没有变化, 壳核、尾状核 TH 水平未变 Number of dopaminergic neurons in the substantia nigra remains unchanged, and the level of TH in the putamen and caudate nucleus remains unchanged	不明显, 会恢复; 跳跃能力、运动、手眼协调 Not obvious, will recover; jumping ability, movement, hand-eye coordination	不明显, 会恢复 焦虑、恐惧 Not obvious, will recover Anxiety, fear

续表 1

动物种系、年龄 Animal, Age	给药剂量 Dose	给药途径 Route	病理 Pathology	运动症状 Motor symptom	非运动症状 Non motor symptom
Verhave ^[57] 普通狨猴, 2~3 岁 Common marmoset, 2 ~ 3 years old	第一周 2 mg/kg, 第二周 1.5 mg/kg, 一周 2 次 in the first week 2 mg/kg, and in the second week 1.5 mg/kg, twice a week	s.c	/	自发运动减少, 临床评分增高, 手眼协调无显著影响 Spontaneous movement decreased, clinical score increased, hand-eye coordination had no significant effect	RBD, MPTP 显著增加了 REM 睡眠期间的内源性肌肉张力 RBD, MPTP significantly increase endogenous muscle tone during REM sleep
Gourav R Choudhury ^[58] 狨猴 Marmosets	2 mg/kg, 连续 5 d 2 mg/kg, for consecutive 5 days	s.c	/	6 月内出现姿势性头部震颤、精细运动、协调逐步恶化 Postural head tremor, fine movement, and coordination gradually deteriorate within 6 months	认知障碍、睡眠紊乱、周期节律紊乱 Cognitive impairment, sleep disturbance, cyclic rhythm disturbance
Kiyoshi Ando ^[13] 普通狨猴 Common marmosets	2, 2, 1 mg/kg, 连续 3 d 2, 2, 1 mg/kg, for consecutive 3 days	s.c	稳定 Stable	跳跃能力持续受损 Continuous impairment of jumping ability	/
Philippens ^[59] 2~3 岁狨猴 2~3 years old marmosets	1 mg/kg, 连续 8 d 1 mg/kg, for consecutive 8 days	s.c	黑质 TH 丢失明显 TH neuron loss significantly in SN	运动能力下降 Motor function decreased	/
Subramanian ^[60] 4~8.5 kg 恒河猴 4~8.5kg, rhesus monkeys	0.5 mg/kg, 最多 4 次 0.5 mg/kg, no more than 4 times	i.v	稳定半帕金森症 Stable hemiparkinsonism	/	/
Rui Zhang ^[61] 恒河猴, 15~18 岁 Rhesus monkeys, 15 ~ 18 years old	0.12 mg/kg	i.v	稳定、适度 尾状核、壳核、运动皮层 Stable, moderate; Caudate nucleus, putamen, motor cortex	运动速度下降、精细活动 Movement speed, fine activity decreased	/
Emborg ^[62] 恒河猴, 5~10 岁、23~25 岁 Rhesus monkeys, 5 ~ 10 years old, 23~25 years old	低剂量, 一次 总剂量 2~4 mg Low dosage, once, 2~4 mg totally	i.v	苍白球病变 黑质 TH 减少 80%~90%, 尾状核、壳核光密度减少 60%~70% Pallor lesions, Substantia nigra TH was reduced by 80%~90%, and the optical density of caudate nucleus and putamen was reduced by 60%~70%	/	/

参考文献:

- [1] Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease; risk factors and prevention [J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(12): 1257–1272.
- [2] Soukup SF, Vanhauwaert R, Verstreken P. Parkinson's disease; convergence on synaptic homeostasis [J]. *EMBO J*, 2018, 37(18): e98960.
- [3] Schapira AHV, Chaudhuri KR, Jenner P. Non-motor features of Parkinson disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18(7): 435–450.
- [4] Radhakrishnan DM, Goyal V. Parkinson's disease: A review [J]. *Neurol India*, 2018, 66: S26–S35.
- [5] Lin MK, Takahashi YS, Huo BX, et al. A high-throughput neurohistological pipeline for brain-wide mesoscale connectivity mapping of the common marmoset [J]. *Elife*, 2019, 8: e40042.
- [6] Langston JW. The MPTP story [J]. *J Parkinsons Dis*, 2017, 7(s1): S11–S19.
- [7] Potts LF, 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.
- [8] Seo J, Lee Y, Kim BS, 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.
- [9] Masilamoni GJ, 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 (Vienna)*, 2018, 125(3): 337–363.
- [10] Masilamoni GJ, Groover O, Smith Y. Reduced noradrenergic innervation of ventral midbrain dopaminergic cell groups and the subthalamic nucleus in MPTP-treated parkinsonian monkeys [J]. *Neurobiol Dis*, 2017, 100: 9–18.
- [11] Franke SK, van Kesteren RE, Hofman S, et al. Individual and familial susceptibility to MPTP in a common marmoset model for Parkinson's disease [J]. *Neurodegener Dis*, 2016, 16(5–6): 293–303.
- [12] Franke SK, van Kesteren RE, Wubben JA, et al. Progression and recovery of Parkinsonism in a chronic progressive MPTP-induction model in the marmoset without persistent molecular and cellular damage [J]. *Neuroscience*, 2016, 312: 247–259.
- [13] 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.
- [14] Ovadia A, Zhang Z, Gash DM. Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys [J]. *Neurobiol Aging*, 1995, 16(6): 931–937.
- [15] Shi L, Huang C, Luo Q, et al. The Association of Iron and the Pathologies of Parkinson's diseases in MPTP/MPP(+)-induced neuronal degeneration in non-human primates and in cell culture [J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 215.
- [16] Shi L, Huang C, Luo Q, et al. Clioquinol improves motor and non-motor deficits in MPTP-induced monkey model of Parkinson's disease through AKT/mTOR pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(10): 9515–9533.
- [17] Pifl C, Schingnitz G, Hornykiewicz O. The neurotoxin MPTP does not reproduce in the rhesus monkey the interregional pattern of striatal dopamine loss typical of human idiopathic Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 1988, 92(2): 228–233.
- [18] Crofts HS, Dalley JW, Collins P, et al. Differential effects of 6-OHDA lesions of the frontal cortex and caudate nucleus on the ability to acquire an attentional set [J]. *Cereb Cortex*, 2001, 11(11): 1015–1026.
- [19] Eslamboli A, Baker HF, Ridley RM, et al. Sensorimotor deficits in a unilateral intra-striatal 6-OHDA partial lesion model of Parkinson's disease in marmoset monkeys [J]. *Exp Neurol*, 2003, 183(2): 418–429.
- [20] Ridley RM, Cummings RM, Leow-Dyke A, et al. Neglect of memory after dopaminergic lesions in monkeys [J]. *Behav Brain Res*, 2006, 166(2): 253–262.
- [21] Milton AL, Marshall JW, Cummings RM, et al. Dissociation of hemi-spatial and hemi-motor impairments in a unilateral primate model of Parkinson's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2004, 150(1–2): 55–63.
- [22] Santana M, Palmér T, Simplício H, et al. Characterization of long-term motor deficits in the 6-OHDA model of Parkinson's disease in the common marmoset [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 290: 90–101.
- [23] Joers V, Dillek K, Rahman S, et al. Cardiac sympathetic denervation in 6-OHDA-treated nonhuman primates [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104850.
- [24] Metzger JM, Matsoff HN, Zinnen AD, et al. Post mortem evaluation of inflammation, oxidative stress, and PPAR γ activation in a nonhuman primate model of cardiac sympathetic neurodegeneration [J]. *PLoS One*, 2020, 15(1): e0226999.
- [25] Shultz JM, Resnikoff H, Bondarenko V, et al. Neurotoxin-induced catecholaminergic loss in the colonic myenteric plexus of rhesus monkeys [J]. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*, 2016, 6(6): 279.
- [26] Green F, Samaranch L, Zhang HS, et al. Axonal transport of AAV9 in nonhuman primate brain [J]. *Gene Ther*, 2016, 23(6): 520–526.
- [27] Allocca M, Doria M, Petrillo M, et al. Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(5): 1955–1964.
- [28] Gerits A, Vancraeynest P, Vreysen S, et al. Serotype-dependent transduction efficiencies of recombinant adeno-associated viral vectors in monkey neocortex [J]. *Neurophotonics*, 2015, 2(3): 031209.
- [29] Ciron C, Cressant A, Roux F, et al. Human alpha-iduronidase gene transfer mediated by adeno-associated virus types 1, 2, and 5 in the brain of nonhuman primates: vector diffusion and biodistribution [J]. *Hum Gene Ther*, 2009, 20(4): 350–360.
- [30] Kirik D, Annett LE, Burger C, et al. Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(5): 2884

- 2889.
- [31] Eslamboli A, Romero-Ramos M, Burger C, et al. Long-term consequences of human alpha-synuclein overexpression in the primate ventral midbrain [J]. *Brain*, 2007, 130(3): 799-815.
 - [32] Koprich JB, Johnston TH, Reyes G, et al. Towards a non-human primate model of alpha-synucleinopathy for development of therapeutics for Parkinson's disease: optimization of AAV1/2 delivery parameters to drive sustained expression of alpha synuclein and dopaminergic degeneration in macaque [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0167235.
 - [33] Wolfgang MJ, Eisele SG, Browne MA, et al. Rhesus monkey placental transgene expression after lentiviral gene transfer into preimplantation embryos [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(19): 10728-10732.
 - [34] Yang SH, Cheng PH, Banta H, et al. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate [J]. *Nature*, 2008, 453(7197): 921-924.
 - [35] Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, et al. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission [J]. *Nature*, 2009, 459(7246): 523-527.
 - [36] Barkholt P, Sanchez-Guajardo V, Kirik D, et al. Long-term polarization of microglia upon α -synuclein overexpression in nonhuman primates [J]. *Neuroscience*, 2012, 208: 85-96.
 - [37] Manfredsson FP, Luk KC, Benskey MJ, et al. Induction of alpha-synuclein pathology in the enteric nervous system of the rat and non-human primate results in gastrointestinal dysmotility and transient CNS pathology [J]. *Neurobiol Dis*, 2018, 112: 106-118.
 - [38] Garrett DJ, Larson JE, Dunn D, et al. In utero recombinant adeno-associated virus gene transfer in mice, rats, and primates [J]. *BMC Biotechnol*, 2003, 3: 16.
 - [39] Mattar CN, Waddington SN, Biswas A, et al. Systemic delivery of scAAV9 in fetal macaques facilitates neuronal transduction of the central and peripheral nervous systems [J]. *Gene Ther*, 2013, 20(1): 69-83.
 - [40] Dehay B, Dalkara D, Dovero S, et al. Systemic scAAV9 variant mediates brain transduction in newborn rhesus macaques [J]. *Sci Rep*, 2012, 2: 253.
 - [41] Hordeaux J, Hinderer C, Buza EL, et al. Safe and sustained expression of human iduronidase after intrathecal administration of adeno-associated virus serotype 9 in infant rhesus monkeys [J]. *Hum Gene Ther*, 2019, 30(8): 957-966.
 - [42] Niu Y, Guo X, Chen Y, et al. Early Parkinson's disease symptoms in α -synuclein transgenic monkeys [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(8): 2308-2317.
 - [43] Seita Y, Tsukiyama T, Iwatani C, et al. Generation of transgenic cynomolgus monkeys that express green fluorescent protein throughout the whole body [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24868.
 - [44] Tomioka I, Nogami N, Nakatani T, et al. Generation of transgenic marmosets using a tetracyclin-inducible transgene expression system as a neurodegenerative disease model [J]. *Biol Reprod*, 2017, 97(5): 772-780.
 - [45] Coghlan AJTNe. Monkeys created with Parkinson's [J]. 2016, 230(3078): 12.
 - [46] Yang W, Liu Y, Tu Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated PINK1 deletion leads to neurodegeneration in rhesus monkeys [J]. *Cell Res*, 2019, 29(4): 334-336.
 - [47] Rocha Cabrero F, Morrison EH. *Lewy Bodies [M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.*
 - [48] Shimozawa A, Ono M, Takahara D, et al. Propagation of pathological α -synuclein in marmoset brain [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2017, 5(1): 12.
 - [49] Recasens A, Dehay B, Bové J, et al. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys [J]. *Ann Neurol*, 2014, 75(3): 351-362.
 - [50] Arotcarena ML, Dovero S, Prigent A, et al. Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates [J]. *Brain*, 2020, 143(5): 1462-1475.
 - [51] Chansel-Debordeaux L, Bezard E. Local transgene expression and whole-body transgenesis to model brain diseases in nonhuman primate [J]. *Animal Model Exp Med*, 2019, 2(1): 9-17.
 - [52] Bourdenx M, Dovero S, Engeln M, et al. Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by α -synuclein overexpression [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2015, 3: 46.
 - [53] Fifel K, Vezoli J, Dzahini K, et al. Alteration of daily and circadian rhythms following dopamine depletion in MPTP treated non-human primates [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86240.
 - [54] Villalba RM, Pare JF, Lee S, et al. Thalamic degeneration in MPTP-treated Parkinsonian monkeys: impact upon glutamatergic innervation of striatal cholinergic interneurons [J]. *Brain Struct Funct*, 2019, 224(9): 3321-3338.
 - [55] Porras G, Li Q, Bezard E. Modeling Parkinson's disease in primates: The MPTP model [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(3): a009308.
 - [56] Iravani MM, Haddon CO, Cooper JM, et al. Pramipexole protects against MPTP toxicity in non-human primates [J]. *J Neurochem*, 2006, 96(5): 1315-1321.
 - [57] Verhave PS, Jongsma MJ, Van den Berg RM, et al. REM sleep behavior disorder in the marmoset MPTP model of early Parkinson disease [J]. *Sleep*, 2011, 34(8): 1119-1125.
 - [58] Choudhury GR, Daadi MM. Charting the onset of Parkinson-like motor and non-motor symptoms in nonhuman primate model of Parkinson's disease [J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202770.
 - [59] Philippens IH, Wubben JA, Finsen B, et al. Oral treatment with the NADPH oxidase antagonist apocynin mitigates clinical and pathological features of parkinsonism in the MPTP marmoset model [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013, 8(3): 715-726.
 - [60] Subramanian T, Lieu CA, Guttalu K, et al. Detection of MPTP-induced substantia nigra hyperechogenicity in Rhesus monkeys by transcranial ultrasound [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2010, 36(4): 604-609.
 - [61] Zhang R, Andersen AH, Hardy PA, et al. Objectively measuring effects of electro-acupuncture in parkinsonian rhesus monkeys [J]. *Brain Res*, 2018, 1678: 12-19.
 - [62] Vermilyea SC, Guthrie S, Hernandez I, et al. α -Synuclein expression is preserved in substantia nigra GABAergic fibers of young and aged neurotoxin-treated rhesus monkeys [J]. *Cell Transplant*, 2019, 28(4): 379-387.