

肌萎缩侧索硬化症小鼠模型研究进展

罗莲莲¹, 袁艳春², 王俊岭², 时广森^{1,3}

(1. 遵义医科大学, 珠海 519000; 2. 中南大学湘雅医院神经内科, 长沙 410008; 3. 中科中山药物创新研究院, 中山 528400)

[摘要] 肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种不可逆的致死性神经退行性疾病, 其发病率与人口老龄化进程呈正相关。ALS以运动神经元的渐进性丧失为特征, 导致患者肌肉无力、萎缩直至呼吸衰竭。ALS的致病机制涉及遗传和环境等多种因素, 其中遗传因素尤为重要。目前已发现多个与ALS相关的致病基因, 如铜锌超氧化物歧化酶1编码基因 (Cu/Zn superoxide dismutase, Cu/Zn *SOD1*, 又称 *SOD1*)、转录反应DNA结合蛋白43编码基因 (transactive response DNA-binding protein 43, *TDP-43*)、肉瘤融合蛋白基因 (fused in sarcoma, *FUS*)、9号染色体开放阅读框72基因 (chromosome open reading frame 72, *C9orf72*) 等, 这些基因的突变不仅见于家族性ALS中, 也在散发性ALS中被发现。基于发现的ALS风险基因, 通过多种方式建立了ALS动物模型, 如转基因模型、基因敲入或敲除模型和腺相关病毒过表达模型, 这些模型模拟了包括运动神经元丢失、泛素化包涵体形成及神经肌肉接头退变等人类ALS部分典型病理特征, 但这些模型仍存在局限性: (1) 单一基因突变模型难以全面模拟临床上散发性ALS的复杂多因子致病特征; (2) 模式动物与人类在神经退行性疾病的微环境调节机制和病变速率上存在明显差异, 这可能影响疾病表型的准确重现和药物效果的评估。为更全面地研究ALS的病理机制并推动有效药物的研发, 构建和优化ALS疾病动物模型显得尤为关键。本综述归纳常用的ALS基因突变小鼠模型, 分析各类基因修饰小鼠模型的表型和病理特征, 包括常见转基因、基因点突变敲入、基因敲除以及通过腺相关病毒载体介导的过表达小鼠模型等; 通过对比上述模型的优缺点, 进一步讨论了其在ALS病理机制研究和药物开发中的具体应用情况, 以期ALS研究的模型选择提供参考。

[关键词] 肌萎缩侧索硬化症; 神经退行性疾病; 遗传因素; 基因突变; 小鼠模型

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)03-0290-10



Advances in Mouse Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis

LUO Lianlian¹, YUAN Yanchun², WANG Junling², SHI Guangsen^{1,3}

(1. Zunyi Medical University, Zhuhai 519000, China; 2. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 3. Zhongshan Institute for Drug Discovery, Chinese Academy of Sciences, Zhongshan 528400, China)

Correspondence to: SHI Guangsen (ORCID:0000-0002-9027-6806), E-mail: shiguangsen@zidd.ac.cn

[ABSTRACT] Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an irreversible, fatal neurodegenerative disorder whose incidence is positively correlated with the aging population. ALS is characterized by the progressive loss of motor neurons, leading to muscle weakness, atrophy, and ultimately respiratory failure. The pathogenesis of ALS involves multiple factors, including genetic and environmental influences, with genetic factors playing a particularly significant role. To date, several causative genes have been identified in ALS, such as the Cu/Zn superoxide dismutase 1 (Cu/Zn *SOD1*, also known as *SOD1*) gene, transactive response DNA-binding protein 43 (*TDP-43*) gene, fused in sarcoma (*FUS*) gene, and chromosome open reading frame 72 (*C9orf72*). Mutations in these genes have been found not only in familial ALS but also in sporadic ALS. Based on the identified ALS risk genes, various ALS animal models have been established through multiple approaches, including transgenic models, gene knockout/knock-in models, and adeno-associated virus-mediated overexpression models. These models simulate some typical pathological

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目“Kinesins相关变异介导Cargo结合紊乱、轴突转运异常在ALS发病机制中的研究”(82171431)

[第一作者] 罗莲莲(1999—),女,硕士研究生,研究方向:ALS小鼠模型构建。E-mail: 15875683769@163.com

[通信作者] 时广森(1986—),男,博士,研究员,研究方向:神经药理学。E-mail: shiguangsen@zidd.ac.cn。ORCID: 0000-0002-9027-6806

features of human ALS, such as motor neuron loss, ubiquitinated inclusions, and neuromuscular junction degeneration. However, these models still have limitations: (1) single-gene mutation models are insufficient to fully replicate the complex multi-factorial pathogenesis of sporadic ALS; (2) significant differences in microenvironmental regulation mechanisms and the rate of neurodegeneration between model organisms and humans may affect the accurate reproduction of disease phenotypes and the reliable evaluation of drug efficacy. To better understand the pathogenesis of ALS and promote the development of effective therapies, constructing and optimizing ALS animal models is crucial. This review aims to summarize commonly used ALS gene mutation mouse models, analyze their phenotypes and pathological characteristics, including transgenic mouse models, gene knockout/knock-in mouse models, and adeno-associated virus-mediated overexpression mouse models, and further discuss their specific applications in ALS pathogenesis research and drug development by comparing the advantages and limitations of each model.

[Key words] Amyotrophic lateral sclerosis; Neurodegenerative diseases; Genetic factors; Genetic mutations; Mouse models

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种累及上下运动神经元 (motor neurons, MNs) 的神经退行性疾病, 其特征是大脑和脊髓中的 MNs 进行性丢失导致的运动功能逐渐丧失^[1-2]。近年来, ALS 发病率逐年增长, 全球每年发病率约为 2/100 000, 患病率约为 (6~9) /100 000^[3], 国内每年的发病率和患病率约为 (1.33~2.01) /100 000 和 (2.31~3.58) /100 000^[4], 多见于中老年 (60~79 岁) 人群^[5], 大部分患者在发病后 2~5 年内因呼吸衰竭死亡^[5]。ALS 以躯干、肢体、咽喉肌和呼吸肌的进行性肌无力萎缩为特点, 具有高致残率和致死率^[5]。

遗传、年龄、环境、自身免疫性等多种因素参与 ALS 的发病过程^[5-7], 其中遗传因素起重要作用。家族遗传性 ALS (familial ALS, fALS) 患者约占 ALS 患者的 10%, 其余 90% 则为散发性 ALS (sporadic ALS, sALS) 患者^[8]。在针对双胞胎的研究中 (该研究包含同卵双生和异卵双生, 异卵双生作为对照), 推测 ALS 的遗传度约为 0.61 (0.38~0.78)^[9]。目前已发现 40 多个 ALS 致病基因^[1], 常见的致病基因有铜锌超氧化物歧化酶 1 编码基因 (Cu/Zn superoxide dismutase, Cu/Zn SOD1, 又称 SOD1)、转录反应 DNA 结合蛋白 43 编码基因 (transactive response DNA-binding protein 43, TDP-43)、肉瘤融合蛋白基因 (fused in sarcoma, FUS)、含缬氨酸蛋白编码基因 (valosin-containing protein, VCP)、9 号染色体开放阅读框 72 基因 (chromosome open reading frame 72, C9orf72) 和视神经蛋白编码基因 (optineurin, OPTN), 它们约占 fALS 患者的 60%~70% 以及 sALS 患者的 10%^[10]。在中国,

对这些已知的 ALS 致病基因的研究显示, 其在 fALS 患者和 sALS 患者中的突变率分别为 55.0% 和 11.7%^[11]。遗传突变的多样性及后天致病因素的复杂性进一步增加了 ALS 发病机制研究的难度, 现有的治疗措施仅在一定程度上缓解疾病进展, 无法有效治愈该疾病。

目前, 研究者已经利用 ALS 患者中发现的相关基因突变建立了多种 ALS 小鼠模型, 这些模型根据构建方法可大致分为外源转基因、基因点突变敲入、基因敲除以及腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 过表达小鼠模型。动物模型的建立为疾病机制研究和药物研发奠定了重要的基础。本综述旨在综合介绍常用的 ALS 小鼠模型, 总结不同模型的优缺点, 为 ALS 相关基础研究和药物研发的模型选择提供参考。

1 常见转基因小鼠模型

1.1 SOD1 转基因小鼠模型

1993 年, Rosen 等^[12]发现了 ALS 的第一个致病基因 SOD1。SOD1 编码 Cu/Zn SOD1, 是一种抗超氧自由基毒性的关键抗氧化酶, 参与超氧自由基向过氧化氢的转化^[13]。突变后 SOD1 蛋白的抗氧化应激能力下降, 导致蛋白错误折叠并聚集, 从而产生细胞毒性作用, 最终引发 ALS^[13]。已知与 ALS 相关的 SOD1 突变已增加到 185 种以上, 大多为错义突变^[14]。SOD1 突变是亚洲 ALS 患者中最常见的基因突变, 约占 fALS 患者的 30.0% 和 sALS 患者的 1.5%^[15]。

1994 年, Gurney 等^[16]将人源 G93A 突变的 SOD1 插入小鼠基因组中, 获得 SOD1^{G93A} 转基因小鼠。该模型是首个 ALS 小鼠模型, 也是目前应用最为广泛的模

型^[17]。此外,其他常用的*SOD1*基因突变小鼠还包括*SOD1*^{G85R}、*SOD1*^{G37R}和*SOD1*^{H46R}等^[18]。*SOD1*^{G93A}转基因小鼠的表型受基因拷贝数影响,低拷贝数(1~2)模型表现为病程进展缓慢,发病时间在6~12个月龄,该特性使其适用于研究早期发病机制和基因功能;高拷贝数(20~25)模型表现为病程发展较快,发病时间在80~120日龄,该特性使其适用于研究疾病进展和药物筛选^[19]。不同启动子构建的转基因小鼠表型差异较大,使用Thy1启动子构建的高表达人源*SOD1*^{G93A}转基因小鼠却未表现明显的ALS表型^[20]。*SOD1*转基因小鼠,尤其是*SOD1*^{G93A}转基因小鼠,常被用于ALS潜在治疗药物的临床前研究。这些小鼠模型在美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration)批准用于ALS临床治疗的药物[如利鲁唑(Riluzole)和依达拉奉(Edaravone)]的临床前研究中,发挥了重要作用^[21-22]。*SOD1*^{G93A}转基因小鼠也被用于全球首个*SOD1*相关ALS的靶向治疗药物托夫生(Tofersen)的临床前药效评价研究^[23]。

ALS患者大脑和脊髓尸检结果常见病理性蛋白聚集,其中*SOD1*基因突变的ALS患者中,异常聚集的病理性蛋白为*SOD1*蛋白^[24],而其他基因突变的ALS患者多数表现为TDP-43蛋白的异常聚集^[25]。同样地,*SOD1*突变转基因小鼠的ALS标志是MNs中出现*SOD1*阳性、TDP-43阴性且不溶性的聚集物,突变*SOD1*蛋白因错误折叠和聚集进而导致神经毒性。目前,*SOD1*突变ALS小鼠模型主要表现为肌无力、肌肉萎缩、认知缺陷和瘫痪等特征,病理表型包括神经胶质增生,以及早期神经元空泡化、晚期脊髓前角MNs丢失、髓轴突缺失、肌肉去神经支配和神经再支配等进行性神经病理改变^[1,6,26]。

1.2 TDP-43转基因小鼠模型

TDP-43蛋白由*TDP-43*基因编码,是一种DNA和RNA结合蛋白,与神经元可塑性的调节有关,参与基因转录和mRNA处理加工、剪接和运输^[6,26]。TDP-43蛋白主要定位于细胞核,病理状态下会出现细胞质的异常定位和聚集,参与形成胞质包涵体,导致细胞核内TDP-43蛋白缺失,这是ALS的重要病理特征^[6]。研究表明,约97%的sALS患者表现出TDP-43病理特征^[27]。研究发现,在95%的ALS患者的大脑和脊髓的MNs中发现了含有过度磷酸化和泛素化的TDP-43蛋白聚集物^[25]。目前的研究已发现至少48种与ALS相关的*TDP-43*基因突变,约占fALS患者的3%和sALS患

者的1.5%^[28]。

基于已知的*TDP-43*基因突变,目前已建立了大约20个*TDP-43*转基因小鼠模型^[29],常见的突变有*TDP-43*^{A315T}、*TDP-43*^{Q331K}和*TDP-43*^{M331V}等,这些模型均可较好地模拟ALS相关表型^[30-31]。在通过Thy1启动子过表达人源野生型*TDP-43*转基因小鼠中,可发现皮质和脊髓MNs的神经退行性病变,且四肢痉挛性瘫痪表型跟*TDP-43*^{WT}的表达水平相关,纯合转基因小鼠(TAR4/4,约2倍内源性表达量)在出生后14d出现后肢异常反射,而杂合子(TAR4,约1倍内源性表达量)则在出生后14个月才出现类似表型^[32]。此外,在朊病毒蛋白(prion protein, PrP)启动子驱动下,过表达人源*TDP-43*^{WT}、*TDP-43*^{Q331K}和*TDP-43*^{M331V}转基因小鼠的表型差异显著。其中,*TDP-43*^{Q331K}转基因小鼠3月龄时出现运动缺陷症状;而*TDP-43*^{M331V}和低拷贝数*TDP-43*^{Q331K}转基因小鼠均在10月龄时才出现症状,且表现为年龄依赖性加重;*TDP-43*^{WT}转基因小鼠则未观察到明显运动缺陷症状^[31]。对于同样的基因突变,使用不同方法和启动子构建的转基因小鼠的表型也不一样。例如,人源*TDP-43*^{A315T}转基因小鼠模型,与采用细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)和内源性启动子构建的小鼠模型相比,在PrP启动子驱动下,雄性小鼠出现显著的肠道症状,并最终导致猝死;然而其TDP-43蛋白病理表现却不显著^[33-34]。综上,*TDP-43*转基因小鼠具有启动子依赖性、年龄依赖性、转基因拷贝数依赖性以及突变特异性的表型特征。

1.3 FUS转基因小鼠模型

*FUS*基因编码类似TDP-43的DNA/RNA结合蛋白,主要定位于细胞核,在细胞质和细胞核之间穿梭,参与核质转运、RNA代谢、DNA修复、应激反应和线粒体功能^[17,35]。从ALS患者中鉴定出60多种*FUS*突变,多数为错义突变,其中R521C突变最常见^[14]。大多数*FUS*突变聚集分布在蛋白C端的核定位信号(nuclear localization signal, NLS)区域,导致蛋白在核内定位减少并在胞质聚集,胞质聚集蛋白产生细胞毒性,同时造成核内*FUS*蛋白功能丧失^[36]。突变*FUS*蛋白错误定位并参与应激颗粒聚集,从而引发细胞内多种功能障碍和神经炎症^[37]。

*FUS*突变体在小鼠模型中表现出多种行为表型和神经病理学特征,目前已建立野生型以及多个突变型*FUS*(R521C、R521G、R521H、P525L、R514G和

Δ NLS等)转基因小鼠模型, 这些小鼠均表现出早期的 MNs 丢失、运动缺陷和轻微行为异常等 ALS 表型^[6,17]。其中, PrP 启动子-人源 *FUS*^{R521C} 转基因小鼠在 2 月龄时即可出现明显的瘫痪和肌肉萎缩。研究显示, 这些小鼠的皮层神经元有严重的树突和突触缺陷、明显的 DNA 损伤修复缺陷, 同时伴随着多种控制细胞活性、轴突引导、树突生长和突触功能的 RNA 转录本表达异常, 尤其是脑源性神经营养因子基因 (brain-derived neurotrophic factor, *Bdnf*)^[38]。利用 Cre 重组酶时空依赖性控制转基因表达, 构建 *hFUS*^{R521G/Syn1} 特异性表达的转基因小鼠。结果显示, 1 月龄小鼠即出现认知缺陷, 并观察到皮层中 MNs 的树突状分支和 MNs 树突的总面积显著减少; 到 6 月龄时, 小鼠进一步出现运动功能障碍、胶质细胞激活、线粒体异常和 FUS 蛋白胞质错误定位^[37]。

与 *TDP-43* 类似, *FUS* 的表达量也与表型高度相关^[25], 过表达人源 *FUS*^{WT} (野生型) 转基因小鼠中, 纯合子 (额外增加约 0.9 倍内源性表达量) 表现为 1 月龄发病, 2 月龄瘫痪, 3 月龄死亡, 出现严重疾病表型; 而杂合子 (额外增加约 0.4 倍内源性表达量) 小鼠则无明显表型。在纯合小鼠中, 病理检查发现 FUS 蛋白的异常聚集和 60% 的 MNs 丢失, 出现以年龄依赖性的进行性 MNs 变性^[39]。在 *FUS* ^{Δ NLS} (去除核定位序列) 转基因小鼠模型中, 小鼠于 12 周龄出现后肢反射异常。如果把 *FUS* ^{Δ NLS} 转基因小鼠进一步与过表达人源 *FUS*^{WT} (野生型) 转基因小鼠杂交, 得到的双转基因小鼠于 8 周龄表现出后肢反射异常, 提示定位缺陷型和野生型的 FUS 蛋白均具有表达量依赖的致病性^[40]。进一步研究表明, 突触稳态的紊乱是该 *FUS* 模型的主要致病因素之一^[41]。

1.4 *C9orf72* 转基因小鼠模型

C9orf72 基因非编码区域的 G₄C₂ 序列重复扩增是欧洲人群 ALS 最常见的致病突变^[42], 约占欧洲人群 fALS 患者的 33.7% 和 sALS 患者的 5.1%^[15]。正常人的该区域 G₄C₂ 重复次数为 2~30 次, 而 ALS 患者出现 30 次以上的重复扩增, 部分患者甚至达到数百至数千次重复^[43]。*C9orf72* 参与核质转运、RNA 加工、核仁的正常功能、无膜细胞器形成、翻译、泛素-蛋白酶体系统和 *TDP-43* 蛋白等的正常功能等^[44]。*C9orf72* 突变有 3 种致病机制^[45]: (1) 双向转录造成毒性 RNA 表达, 形成 RNA-蛋白聚集体; (2) 单倍体剂量不足; (3) 重复相关非 ATG (repeat-associated non-ATG, RAN)

翻译机制产生的二肽重复 (dipeptide repeat, DPR) 蛋白聚集, 进而导致功能毒性。

目前建立的 *C9orf72* 重复突变小鼠模型中, 仅有少部分能复制蛋白错误折叠和聚集表型, 且多数小鼠不能完全复刻 ALS 症状和病理表型。研究发现, 在携带 50、500 或 800 个 G₄C₂ 重复序列的 *C9orf72* 基因 BAC 转基因小鼠模型中, 重复长度的增加会导致 RNA foci 和 RNA-蛋白聚集体水平增加, 促进疾病外显率和严重程度增加, 使发病时间提前^[46]。特别是含有 500 个 G₄C₂ 重复序列的 BAC 转基因小鼠 (C9-500) 在不同研究中有不同的表型。Liu 等^[47] 的研究显示, C9-500 BAC 转基因小鼠出现后肢步态异常 (4 月龄出现)、瘫痪、生存率下降、肌肉去神经支配、MNs 丢失、焦虑样行为以及皮质和海马神经退行性病变; Nguyen 等^[48] 的研究重现了该小鼠的 ALS 样退行性表型; Mordes 等^[49] 在两个独立实验中均未再现生存率降低和运动表型; Nguyen 等^[50] 进一步分析认为, 这种差异可能受环境压力、小鼠遗传背景和处理方式, 包括研究方法、数量规模和性别差异等因素的影响。

2 基因敲入小鼠模型

在 ALS 小鼠模型中, 小鼠表型与突变蛋白的拷贝数密切相关。传统的转基因模型通常将外源基因随机插入到宿主基因组中, 可以表达高拷贝数突变蛋白。虽然这种方法比较容易观察到 ALS 表型, 但也有可能因蛋白过表达而产生非特异性表型, 比如, 野生型 *TDP-43* 过表达即可出现 ALS 样表型。相比之下, 基因突变敲入模型多利用成簇的规律性间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关蛋白 (CRISPR-associated protein, Cas) 基因编辑技术实现精准高效的突变定点敲入, 从而建立内源表达基因的生理水平突变, 表型相对较轻, 发病时间晚, 可以更好地模拟临床疾病早期的变化与发病过程, 有助于探究疾病的发病机制、寻找早期生物标志物和治疗靶点^[51]。

近年来报告的新 ALS 致病基因常使用了 CRISPR-Cas9 基因编辑技术构建的点突变敲入小鼠模型进行研究, 如氯通道 CLIC 样 1 (chloride channel CLIC like 1, *CLCC1*)^[52] 和原钙黏蛋白 α 9 (protocadherin alpha 9, *PCDHA9*)^[53]。*CLCC1* 突变可导致 *CLCC1* 蛋白表达水平降低, 且蛋白水平与小鼠表型严重程度相关。其中, *NM2453/K298A* 双突变小鼠的 *CLCC1* 蛋白水平显著降

低, 在3月龄时即表现出严重的体重减轻、运动异常、MNs丢失和泛素阳性包涵体。上述现象提示, 内质网阴离子通道蛋白CLCC1维持的内质网离子稳态失调促进内质网应激-未折叠蛋白反应, 参与ALS的发病过程^[52]。*PCDH9*^{L700P}纯合敲入小鼠出现小鼠运动功能异常(4月龄时开始出现, 缓慢进展)和生存率下降, 且在老年小鼠中发现肌肉萎缩、去神经支配神经肌肉接头(neuromuscular junction, NMJ)异常、脊髓MNs丢失、星形胶质细胞增生和TDP-43蛋白样病理^[53]。

常见的ALS点突变敲入小鼠模型多表现出一定的年龄依赖性和表型不明显的特征。在*TDP-43*基因C端缺失的敲入模型中发现, 脊髓中MNs仅出现轻度MNs损伤和突触明显缺陷^[53]。在*TDP-43*^{A382T}和*TDP-43*^{G348C}敲入模型中并未有明显的神经退行性病变、TDP-43聚集或细胞质错误定位; 然而突变MNs的突触异常和神经元活性降低, 提示突触功能障碍是ALS发病机制的早期事件^[54]。*TDP-43*^{Q331K}敲入小鼠的表型变化呈阶段性特征, 从约6月龄的中期表现一定程度的运动障碍, 到12月龄的晚期表现执行功能和记忆障碍, 这些表型均呈现表达量依赖性特点^[55]。其中, 纯合*TDP-43*^{M337V}和*TDP-43*^{G298S}敲入小鼠表现表达量与年龄依赖性的MNs变性和胶质增生^[56], 而杂合敲入小鼠无明显表型。此外, *TDP-43*^{N390D}敲入小鼠表现出年龄依赖性的运动障碍、肌肉萎缩、TDP-43错误定位、脊髓MNs丢失和胶质细胞增生等病理特征^[57]。在*FUS*突变的敲入小鼠中, *FUS*^{P525L}和*FUS*^{ΔEX14}小鼠显示出毒性功能的表达量依赖性增加、进行性的和年龄依赖性的MNs丢失, 但无明显运动障碍表型^[58]。

除了点突变敲入模型, 定点敲入人源突变基因构建的人源化小鼠模型也用于研究生理水平突变带来的病理改变。如通过定点敲入剪接位点突变以及部分人源*FUS*基因片段至小鼠*FUS*基因, 构建移码突变(*FUS* p.G466VfsX14)的人源化ALS小鼠模型(*FUS* Delta14)。该模型在小鼠12月龄时开始出现运动异常以及MNs丢失, 并不断进展, 病理表现出*FUS*细胞质异常定位^[59]。

3 基因敲除小鼠模型

基因敲除(knock-out, KO)ALS模型相对少见, 这是由于已知致病基因突变中显性突变居多, 致病机制多为毒性获得^[1,36], 基因敲除模型往往不能理想地

反映基因突变的致病机制。但是, 也有部分ALS致病基因通过功能丧失(loss of function, LOF)机制致病, 目前已知的敲除模型有*SOD1*、*FUS*、*C9orf72*、*TDP-43*、*OPTN*、*TANK*结合激酶1(tank-binding kinase 1, *TBK1*)和*SQSTM1*(p62蛋白, sequestosome 1)等^[60]。

类似*C9orf72*转基因小鼠模型, *C9orf72*-KO小鼠的表型在不同的研究中表现不一, 包括纯合和杂合敲除的小鼠。针对这一现象, 研究者进一步探究发现*C9orf72*基因敲除对小鼠自身免疫和存活受环境因素, 如肠道微生物群的影响^[61]。不仅如此, 在*C9orf72*-(G₄C₂)₆₆的小鼠模型中, 敲除*C9orf72*基因会加重小鼠运动障碍和生存期等主要表型^[62], 且纯合敲除比杂合敲除表现出更严重的表型^[61]。*SOD1*-KO小鼠仅在老年表现出MNs缺失和肌肉的过度损失。这种缺失导致特定的神经表型, 如轴突面积减少、NMJ的数量比例增加和乙酰胆碱受体复杂性降低^[63]。神经病理的研究表明, *SOD1*-KO小鼠表现出去神经支配肌肉纤维的轴突萌发和再神经支配在功能上受损^[64]。此外, *SOD1*敲除会干扰单胺能神经传递, 导致动机行为减少^[65]。

相比*C9orf72*和*SOD1*基因, 小鼠*TDP-43*的纯合子缺失会导致胚胎早期致死, 而杂合子缺失的老年小鼠会表现出肌肉无力和运动缺陷, 但没有明显的MNs的病理变化和肌肉萎缩^[66]。在纯合*FUS*-KO小鼠模型中, 小鼠通常只能存活到成年, 且没有表现出明显的ALS表型^[67]。此外, *OPTN*、*TBK1*和*SQSTM1*也是重要的ALS致病基因。纯合*OPTN*缺失或突变可能导致自噬功能障碍和TDP-43的错误定位, 从而导致MNs的神经退行性变^[68]。*TBK1*基因纯合缺失具有胚胎致死性, 而杂合*TBK1*-KO小鼠则能模拟ALS的表型^[69]。*SQSTM1*-KO小鼠出现神经纤维缠结、神经退行性变和行为缺陷^[70]。

4 AAV载体介导的过表达模型

AAV载体介导的过表达常用于*C9orf72*突变的机制研究。通过AAV载体进行脑室注射(G₄C₂)₆₆和(G₄C₂)₁₄₉的*C9orf72*-ALS小鼠模型有神经退行性变和行为障碍的表型, 在这些小鼠神经元中发现了正义和反义的RNA foci, 并观察到多种DPR蛋白包涵体、pTDP-43阳性包涵体及蛋白核质转运缺陷^[71]。*C9orf72*通过RNA翻译会产生5种不同的DPR, 包括poly(GA)、poly(GR)、poly(PA)、poly(PR)和poly(GP)^[72]。为了

研究DPR的致病性,通过AAV载体在小鼠的大脑中表达GFP-poly(GR)₁₀₀或者poly(GR)₂₀₀。结果显示,这2种poly(GR)表现出明显毒性作用,导致小鼠出现年龄依赖性的神经元丢失^[17];并在GFP-poly(GR)₂₀₀过表达小鼠中,发现TDP-43胞质异常聚集和TDP-43包涵体的形成^[73]。poly(GA)₅₀小鼠在皮层、海马体 and 大脑中表现出星形胶质细胞增多、神经元丢失以及行为缺陷^[74]。

通过不同类型启动子的AAV,在神经元和神经胶质细胞中过表达TDP-43^{WT}或TDP-43^{M337V},发现突变型TDP-43在神经元和神经胶质细胞中表现出不同程度的积累,其中在神经元中毒性更强,并表现为年龄依赖性病理^[75]。利用AAV在皮质脊髓神经元、脊髓MNs或前肢骨骼肌中过表达突变型TDP-43(R82L/K83Q、C173S/C175),均可诱导TDP-43包涵体病理,且在脊髓中表达的突变型TDP-43还诱导了脊髓MNs的大量丢失以及严重的神经源性肌肉萎缩^[76]。随着可跨血脑屏障的AAV血清型的发展,有研究通过尾静脉以及眼眶静脉注射AAV9变异型PHP.EB病毒过表达野生型TDP-43,可导致小鼠肢体运动障碍和生存期缩短^[77]。

由于转基因动物构建和繁育的周期较长和成本较高,AAV策略的潜在优势是可以快速筛选和验证候选基因突变在小鼠整体生理水平的致病性。比如,通过鞘内注射AAV-SARM1^{V184G},可诱导小鼠运动障碍(病毒注射第3周后)、外周轴突丢失和神经炎症^[78]。还有研究者在新生小鼠脑内注射AAV-CCNF^{WT}或者CCNF^{S621G},发现野生型和突变型CCNF均可导致小鼠认知行为学异常(病毒注射后3个月)和TDP-43病理改变,且突变型的认知行为异常和病理表型更为严重^[79]。不仅如此,AAV也可用于对已知ALS小鼠模型的遗传修饰,以及进行ALS疾病机制探究和基因治疗的尝试。

5 总结与展望

本文通过回顾不同类型ALS小鼠模型的病理及行为表型,总结了常用的小鼠模型的基本特征(表1)。除了构建方法的不同之外,这些特征主要来自不同基因突变导致的具体变化,进一步印证了以基因为切入点,不断建立并完善ALS疾病模型的重要意义。ALS是一种高临床异质性、多因素和多基因致病的进行性神经退行性疾病,由许多具有不同功能的基因突变引起,致病机制复杂,所以单一的小鼠模型不足以完全

概括疾病的整个轨迹,亟待更多的研究来探究其发病机制。通过比较不同ALS基因模型的表型和机制可以进一步明晰研究的方向与思路。

一般来说,转基因模型可以有效地过表达突变型或野生型蛋白。ALS转基因模型的动物往往较快速表现出明显的表型和MNs丢失,因此更适合研究疾病的终末期以及药物临床前评估^[25]。然而,转基因模型不能完全反映基因突变的特点,如高表达野生型的SOD1、TDP-43和FUS蛋白同样具有神经毒性^[1,36],并且表达的时间和水平难以控制,拷贝数的不稳定给床前药物研究带来了一定挑战^[55]。相比转基因小鼠模型,基因点突变敲入小鼠模型的蛋白表达量较低且疾病进展相对较慢,这对于避免某些蛋白的剂量依赖性毒性至关重要,有助于深入了解疾病早期症状并揭示关键的基因功能,但缓慢的表型研究会增加研究时间和成本。基因敲除实验中可能存在的遗传物质残留、表型不稳定性以及基因组复杂性问题影响实验结果的准确性。AAV可以达到时间和空间上对基因表达的控制,在未来的研究中,AAV将会更多地运用于探索ALS基因突变的致病性和致病机制,以及筛选潜在基因治疗靶点。但AAV相对载量较小,对基因大小有一定限制,同时也有表达量不太可控导致的非特异性表型等问题。

相比于小鼠模型,灵长类动物模型在模拟复杂的神经系统和病理特征方面具有更高的相似性和准确性。如Yin等^[80]通过AAV将TDP-43^{M337V}突变表达在猴脑中,成功模拟出细胞质中TDP-43聚集的病理特征,但高昂的成本和伦理问题限制了其广泛应用。因此,在短期内,小鼠模型仍旧是ALS疾病研究的主要模型。不同ALS小鼠模型的对比研究为理解疾病的发病机制和评估治疗策略提供了宝贵的信息。各类模型各有其应用特点和价值,具体应用应结合实际需求。不仅如此,考虑到ALS寡基因遗传的特点,多基因改造模型可以更好地模拟ALS的发病过程和病理特征。例如,将多个基因同时转入、利用不同的遗传方式改造鼠杂交或结合遗传改造鼠和AAV注射构建的多重基因改造模型,有望成为未来ALS小鼠模型的发展趋势。与此同时,ALS的发病还受到环境因素影响,如束缚应激、慢性外伤、运动疲劳和营养不良等。因此,建立基因编辑技术结合环境因素的小鼠模型也是未来的发展方向。

表1 常用的肌萎缩侧索硬化症小鼠模型及其表型特征

Table 1 Commonly used mouse models of amyotrophic lateral sclerosis and their phenotypic characteristics

肌萎缩侧索硬化症小鼠模型 ALS mouse model	基因 Gene	氨基酸改变 Amino acid substitution	机制 Mechanism	瘫痪 Paralysis	认知异常 Cognitive impairment	神经元丢失 Neuron loss	神经胶质增生 Gliosis	胞质包涵体 Cytoplasmic inclusion bodies	参考文献 References
转基因小鼠模型 Transgenic mouse model	<i>hSOD1</i>	WT	-	√	-	√	√	SOD1, VAC	[81]
	<i>hSOD1</i>	D90A	-	-	-	√	√	SOD1, VAC	[82]
	<i>hSOD1</i>	G93A	GOF	-	√	√	-	-	[83]
	<i>hTDP-43</i>	WT	-	√	-	√	√	TDP-43, UBI	[32]
	<i>TDP-43</i>	A315T	GOF	-	√	-	√	TDP-43, UBI	[34]
	<i>hTDP-43</i>	Q331K	LOF/GOF	-	-	√	√	×	[31]
	<i>hTDP-43</i>	M337V	GOF	-	-	√	√	×	[31]
	<i>hFUS</i>	WT	GOF	-	√	×	×	×	[84]
	<i>hFUS</i>	R521C	GOF	-	√	-	√	×	[84]
	<i>hFUS</i>	R521C	GOF	√	-	√	√	×	[38]
	<i>hFUS</i>	ΔNLS	GOF	√	-	√	√	FUS	[40]
	<i>hC9orf72</i>	[500] n	GOF	√	√	√	√	DPR, RNA foci, TDP-43	[47]
	<i>hC9orf72</i>	[500] n	-	-	√	×	√	DPR, RNA foci	[85]
基因敲入小鼠模型 Knock-in mouse model	<i>hC9orf72</i>	[500] n	-	-	-	√	√	RNA foci	[48]
	<i>TDP-43</i>	N390D	GOF	-	-	√	√	TDP-43	[57]
	<i>TDP-43</i>	Q331K	GOF	×	√	√	-	×	[55]
	<i>FUS</i>	P517L	GOF	-	-	√	√	FUS	[86]
	<i>FUS</i>	Δ14	GOF	-	-	√	√	FUS	[86]
	<i>FUS</i>	ΔNLS	-	-	-	√	-	FUS	[87]
	<i>C9orf72</i>	(GR)400 或 (PR)400	-	-	-	√	×	DPR	[88]
	<i>CLCC1</i>	K298A	LOF	-	-	√	-	TDP-43, UBI	[52]
	<i>PCDHA9</i>	L700P	-	√	-	√	√	TDP-43	[53]
	<i>TDP-43</i>	WT	-	√	-	√	-	-	[76]
腺相关病毒过表达小鼠模型 Adeno-associated virus-mediated overexpression mouse model	<i>TDP-43</i>	M337V	GOF	√	-	√	√	TDP-43	[75]
	<i>C9orf72</i>	[66] n	GOF	√	√	√	√	DPR, RNA foci, TDP-43	[71]
	<i>C9orf72</i>	[149] n	GOF	√	√	√	√	DPR, RNA foci, TDP-43	[71]
	<i>C9orf72</i>	[100] n	LOF	×	√	√	√	TDP-43	[89]
	<i>SARM1</i>	V184G	-	√	-	-	-	-	[78]

注: *hSOD1*, 人源铜锌超氧化物歧化酶1编码基因; *hTDP-43*, 人源转录反应DNA结合蛋白43编码基因; *TDP-43*, 转录反应DNA结合蛋白43编码基因; *hFUS*, 人源肉瘤融合蛋白基因; *FUS*, 肉瘤融合蛋白基因; *hC9orf72*, 人源9号染色体开放阅读框72基因; *C9orf72*, 9号染色体开放阅读框72基因; *CLCC1*, 氯通道CLIC样1; *PCDHA9*, 原钙黏蛋白α9; *SARM1*, 无菌α和Toll/白细胞介素-1受体基序蛋白1; DPR, 二肽重复; GOF, 功能获得; LOF, 功能丧失; n, C9重复次数; NLS, 核定位序列; UBI, 泛素化; VAC, 空泡化; WT, 野生型; "-", 未描述; "√", 是; "×", 否。

Note: *hSOD1*, Human Cu/Zn superoxide dismutase 1; *hTDP-43*, Human transactive response DNA-binding protein 43; *TDP-43*, Transactive response DNA-binding protein 43; *hFUS*, Human fused in sarcoma; *FUS*, Fused in sarcoma; *hC9orf72*, Human chromosome open reading frame 72; *C9orf72*, Chromosome open reading frame 72; *CLCC1*, Chloride channel CLIC-like 1; *PCDHA9*, Protocadherin alpha 9; *SARM1*, Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1; DPR, Dipeptide repeat; GOF, Gain of function; LOF, Loss of function; n, Number of C9 repeats; NLS, Nuclear localization signal; UBI, Ubiquitination; VAC, Vacuolation; WT, Wild type; "-", Not described; "√", Yes; "×", No.

[作者贡献 Author Contribution]

罗莲莲负责检索文献、提取文献数据和撰写文章;
袁艳春参与检索文献、提取文献数据, 修改文章;
王俊岭参与文章指导和基金支持;
时广森负责监督进度、安排人员和修订稿件。

[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]

[1] WANG H, GUAN L P, DENG M. Recent progress of the genetics of amyotrophic lateral sclerosis and challenges of

- gene therapy[J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1170996. DOI: 10.3389/fnins.2023.1170996.
- [2] BROWN R H, AL-CHALABI A. Amyotrophic lateral sclerosis[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(2): 162-172. DOI: 10.1056/nejmra1603471.
 - [3] MEAD R J, SHAN N, JOSEPH REISER H J, et al. Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, 22(3): 185-212. DOI:10.1038/s41573-022-00612-2.
 - [4] XU L, CHEN L, WANG S F, et al. Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in urban China: a national population-based study[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2020, 91(5):520-525. DOI:10.1136/jnnp-2019-322317.
 - [5] FELDMAN E L, GOUTMAN S A, PETRI S, et al. Amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Lancet*, 2022, 400(10360):1363-1380. DOI: 10.1016/s0140-6736(22)01272-7.
 - [6] ZHU L H, LI S H, LI X J, et al. Pathological insights from amyotrophic lateral sclerosis animal models: comparisons, limitations, and challenges[J]. *Transl Neurodegener*, 2023, 12(1): 46. DOI:10.1186/s40035-023-00377-7.
 - [7] LI C Y, YANG T M, OU R W, et al. Genome-wide genetic links between amyotrophic lateral sclerosis and autoimmune diseases[J]. *BMC Med*, 2021, 19(1):27. DOI:10.1186/s12916-021-01903-y.
 - [8] KIM G, GAUTIER O, TASSONI-TSUCHIDA E, et al. ALS genetics: gains, losses, and implications for future therapies [J]. *Neuron*, 2020, 108(5): 822-842. DOI: 10.1016/j. neuron. 2020.08.022.
 - [9] AL-CHALABI A, FANG F, HANBY M F, et al. An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010, 81(12): 1324-1326. DOI: 10.1136/jnnp.2010.207464.
 - [10] YOUNGER D S, BROWN R H Jr. Amyotrophic lateral sclerosis. [J]. *Handb Clin Neurol*, 2023, 196: 203-229. DOI:10.1016/B978-0-323-98817-9.00031-4.
 - [11] WEI Q Q, CHEN X P, CHEN Y P, et al. Unique characteristics of the genetics epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in China[J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(4):517-525. DOI:10.1007/s11427-018-9453-x.
 - [12] ROSEN D R, SIDDIQUE T, PATTERSON D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Nature*, 1993, 364(6415):59-62. DOI:10.1038/362059a0.
 - [13] PEGGION C, SCALCON V, MASSIMINO M L, et al. SOD1 in ALS: Taking stock in pathogenic mechanisms and the role of glial and muscle cells[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(4): 614. DOI: 10.3390/antiox11040614.
 - [14] LI H F, WU Z Y. Genotype-phenotype correlations of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Transl Neurodegener*, 2016, 5: 3. DOI:10.1186/s40035-016-0050-8.
 - [15] ZOU Z Y, ZHOU Z R, CHE C H, et al. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2017, 88(7): 540-549. DOI:10.1136/jnnp-2016-315018.
 - [16] GURNEY M E, PU H, CHIU A Y, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation[J]. *Science*, 1994, 264(5166): 1772-1775. DOI:10.1126/science.8209258.
 - [17] TODD T W, PETRUCELLI L. Modelling amyotrophic lateral sclerosis in rodents[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2022, 23(4): 231-251. DOI:10.1038/s41583-022-00564-x.
 - [18] CIURO M, SANGIORGIO M, LEANZA G, et al. A meta-analysis study of SOD1-mutant mouse models of als to analyse the determinants of disease onset and progression[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1):216-232. DOI:10.3390/ijms24010216.
 - [19] ACEVEDO-ARZENA A, KALMAR B, ESSA S, et al. A comprehensive assessment of the SOD1G93A low-copy transgenic mouse, which models human amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Dis Model Mech*, 2011, 4(5):686-700. DOI:10.1242/dmm.007237.
 - [20] LINO M M, SCHNEIDER C, CARONI P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(12):4825-4832. DOI:10.1523/JNEUROSCI.22-12-04825.2002.
 - [21] SAITOH Y, TAKAHASHI Y. Riluzole for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Neurodegener Dis Manag*, 2020, 10(6):343-355. DOI:10.2217/nmt-2020-0033.
 - [22] BROOKS B R, BERRY J D, CIEPILEWSKA M, et al. Intravenous edaravone treatment in ALS and survival: an exploratory, retrospective, administrative claims analysis[J]. *EClinicalMedicine*, 2022, 52: 101590. DOI: 10.1016/j. eclim. 2022.101590.
 - [23] MCCAMPBELL A, COLE T, WEGENER A J, et al. Antisense oligonucleotides extend survival and reverse decrement in muscle response in ALS models[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(8): 3558-3567. DOI:10.1172/JCI99081.
 - [24] MACKENZIE I R A, BIGIO E H, INCE P G, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations[J]. *Ann Neurol*, 2007, 61(5):427-434. DOI:10.1002/ana.21147.
 - [25] DE GIORGIO F, MADURO C, FISHER E M C, et al. Transgenic and physiological mouse models give insights into different aspects of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Dis Model Mech*, 2019, 12(1): dmm037424. DOI:10.1242/dmm.037424.
 - [26] TSAI K J, YANG C H, FANG Y H, et al. Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTL-U [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(8): 1661-1673. DOI: 10.1084/jem. 20092164.
 - [27] WATANABE S, OIWA K, MURATA Y, et al. ALS-linked TDP-43^{M337V} knock-in mice exhibit splicing deregulation without neurodegeneration[J]. *Mol Brain*, 2020, 13(1): 8. DOI: 10.1186/s13041-020-0550-4.
 - [28] LANZMASTER D, VEYRAT-DUREBEX C, VOUREC'H P, et al. Metabolomics: a tool to understand the impact of genetic mutations in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Genes*, 2020, 11(5):537. DOI:10.3390/genes11050537.
 - [29] LUTZ C. Mouse models of ALS: past, present and future[J]. *Brain Res*, 2018, 1693(Pt A): 1-10. DOI: 10.1016/j. brainres. 2018.03.024.
 - [30] CHAN G, VAN HUMMEL A, VAN DER HOVEN J, et al. Neurodegeneration and motor deficits in the absence of astrogliosis upon transgenic mutant TDP-43 expression in mature mice[J]. *Am J Pathol*, 2020, 190(8): 1713-1722. DOI: 10.1016/j.ajpath.2020.04.009.
 - [31] ARNOLD E S, LING S C, HUELGA S C, et al. ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(8): E736-E745. DOI:10.1073/pnas.1222809110.
 - [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[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(8): 3858-3863. DOI:10.1073/pnas.0912417107.

- [33] HERDEWYN S, CIRILLO C, VAN DEN BOSCH L, et al. Prevention of intestinal obstruction reveals progressive neurodegeneration in mutant TDP-43 (A315T) mice[J]. *Mol Neurodegener*, 2014, 9:24. DOI:10.1186/1750-1326-9-24.
- [34] SWARUP V, PHANEUF D, BAREIL C, et al. Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments[J]. *Brain*, 2011, 134(Pt 9): 2610-2626. DOI: 10.1093/brain/awr159.
- [35] MEJZINI R, FLYNN L L, PITOUT I L, et al. ALS genetics, mechanisms, and therapeutics: where are we now?[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13:1310. DOI:10.3389/fnins.2019.01310.
- [36] CHEN C, DING X F, AKRAM N, et al. Fused in sarcoma: properties, self-assembly and correlation with neurodegenerative diseases[J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1622. DOI:10.3390/molecules24081622.
- [37] PELAEZ M C, DESMEULES A, GELON P A, et al. Neuronal dysfunction caused by FUSR521G promotes ALS-associated phenotypes that are attenuated by NF- κ B inhibition[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2023, 11(1): 182. DOI: 10.1186/s40478-023-01671-1.
- [38] QIU H Y, LEE S, SHANG Y L, et al. ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(7): e149564. DOI:10.1172/JCI149564.
- [39] MITCHELL J C, MCGOLDRICK P, VANCE C, et al. Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion[J]. *Acta Neuropathol*, 2013, 125(2): 273-288. DOI: 10.1007/s00401-012-1043-z.
- [40] SHIIHASHI G, ITO D, YAGI T, et al. Mislocated FUS is sufficient for gain-of-toxic-function amyotrophic lateral sclerosis phenotypes in mice[J]. *Brain*, 2016, 139(Pt 9): 2380-2394. DOI:10.1093/brain/aww161.
- [41] SHIIHASHI G, ITO D, ARAI I, et al. Dendritic homeostasis disruption in a novel frontotemporal dementia mouse model expressing cytoplasmic fused in sarcoma[J]. *EBioMedicine*, 2017, 24:102-115. DOI:10.1016/j.ebiom.2017.09.005.
- [42] DEBRAY S, RACE V, CRABBÉ V, et al. Frequency of C9orf72 repeat expansions in amyotrophic lateral sclerosis: a Belgian cohort study[J]. *Neurobiol Aging*, 2013, 34(12): 2890. e7-2892890.e12. DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.009.
- [43] PARAMESWARAN J, ZHANG N, BRAEMS E, et al. Antisense, but not sense, repeat expanded RNAs activate PKR/elf2 α -dependent ISR in C9ORF72 FTD/ALS[J]. *elife*, 2023, 12: e85902. DOI:10.7554/eLife.85902.
- [44] BABIĆ LEKO M, ŽUPUNSKI V, KIRINCICH J, et al. Molecular mechanisms of neurodegeneration related to C9orf72 hexanucleotide repeat expansion[J]. *Behav Neurol*, 2019, 2019:2909168. DOI:10.1155/2019/2909168.
- [45] NGUYEN H P, VAN BROECKHOVEN C, VAN DER ZEE J. ALS genes in the genomic era and their implications for FTD[J]. *Trends Genet*, 2018, 34(6): 404-423. DOI: 10.1016/j.tig. 2018. 03.001.
- [46] BECKERS J, THARKESHWAR A K, VAN DAMME P. C9orf72 ALS-FTD: recent evidence for dysregulation of the autophagy-lysosome pathway at multiple levels[J]. *Autophagy*, 2021, 17(11): 3306-3322. DOI: 10.1080/15548627. 2021.1872189.
- [47] LIU Y J, PATTAMATTA A, ZU T, et al. C9orf72 BAC mouse model with motor deficits and neurodegenerative features of ALS/FTD[J]. *Neuron*, 2016, 90(3): 521-534. DOI: 10.1016/j. neuron.2016.04.005.
- [48] NGUYEN L, MONTRASIO F, PATTAMATTA A, et al. Antibody therapy targeting RAN proteins rescues C9 ALS/FTD phenotypes in C9orf72 mouse model[J]. *Neuron*, 2020, 105(4): 645-662.e11. DOI:10.1016/j.neuron.2019.11.007.
- [49] MORDES D A, MORRISON B M, AMENT X H, et al. Absence of survival and motor deficits in 500 repeat C9ORF72 BAC mice [J]. *Neuron*, 2020, 108(4): 775-783. e4. DOI: 10.1016/j. neuron. 2020.08.009.
- [50] NGUYEN L, LABOISSONNIERE L A, GUO S, et al. Survival and motor phenotypes in FVB C9-500 ALS/FTD BAC transgenic mice reproduced by multiple labs[J]. *Neuron*, 2020, 108(4):784-796.e3. DOI:10.1016/j.neuron.2020.09.009.
- [51] RICH K A, PINO M G, YALVAC M E, et al. Impaired motor unit recovery and maintenance in a knock-in mouse model of ALS-associated Kif5a variant[J]. *Neurobiol Dis*, 2023, 182: 106148. DOI:10.1016/j.nbd.2023.106148.
- [52] GUO L, MAO Q L, HE J, et al. Disruption of ER ion homeostasis maintained by an ER anion channel CLCC1 contributes to ALS-like pathologies[J]. *Cell Res*, 2023, 33(7): 497-515. DOI:10.1038/s41422-023-00798-z.
- [53] ZHONG J, WANG C D, ZHANG D, et al. PCDHA9 as a candidate gene for amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1):2189. DOI:10.1038/s41467-024-46333-5.
- [54] LÉPINE S, NAULEAU-JAVAUDIN A, DENEALT E, et al. Homozygous ALS-linked mutations in TARDBP/TDP-43 lead to hypoactivity and synaptic abnormalities in human iPSC-derived motor neurons[J]. *iScience*, 2024, 27(3):109166. DOI: 10.1016/j.isci.2024.109166.
- [55] WHITE M A, KIM E, DUFFY A, et al. TDP-43 gains function due to perturbed autoregulation in a Tardbp knock-in mouse model of ALS-FTD[J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(4):552-563. DOI: 10.1038/s41593-018-0113-5.
- [56] EBSTEIN S Y, YAGUDAYEVA I, SHNEIDER N A. Mutant TDP-43 causes early-stage dose-dependent motor neuron degeneration in a TARDBP knockin mouse model of ALS[J]. *Cell Rep*, 2019, 26(2): 364-373. e4. DOI: 10.1016/j. celrep. 2018.12.045.
- [57] HUANG S L, WU L S, LEE M, et al. A robust TDP-43 knock-in mouse model of ALS[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, 8 (1):3. DOI:10.1186/s40478-020-0881-5.
- [58] KOROBEYNIKOV V A, LYASHCHENKO A K, BLANCO-REDONDO B, et al. Antisense oligonucleotide silencing of FUS expression as a therapeutic approach in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Nat Med*, 2022, 28(1):104-116. DOI:10.1038/s41591-021-01615-z.
- [59] DEVOY A, KALMAR B, STEWART M, et al. Humanized mutant FUS drives progressive motor neuron degeneration without aggregation in 'FUSDelta14' knockin mice[J]. *Brain*, 2017, 140 (11):2797-2805. DOI:10.1093/brain/awx248.
- [60] DENG Z Q, LIM J, WANG Q, et al. ALS-FTLD-linked mutations of SQSTM1/p62 disrupt selective autophagy and NFE2L2/ NRF2 anti-oxidative stress pathway[J]. *Autophagy*, 2020, 16(5): 917-931. DOI:10.1080/15548627.2019.1644076.
- [61] BURBERRY A, WELLS M F, LIMONE F, et al. C9orf72 suppresses systemic and neural inflammation induced by gut bacteria[J]. *Nature*, 2020, 582(7810): 89-94. DOI: 10.1038/s41586-020-2288-7.
- [62] ZHU Q, JIANG J, GENDRON T F, et al. Reduced C9ORF72 function exacerbates gain of toxicity from ALS/FTD-causing repeat expansion in C9orf72[J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(5):615-624. DOI:10.1038/s41593-020-0619-5.
- [63] POLLOCK N, MACPHERSON P C, STAUNTON C A, et al. Deletion of *Sod1* in motor neurons exacerbates age-related changes in axons and neuromuscular junctions in mice[J]. *eNeuro*, 2023, 10(3): ENEURO. 0086-22.2023. DOI: 10.1523/ ENEURO.0086-22.2023.

- [64] SHEFNER J M, REAUME A G, FLOOD D G, et al. Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy[J]. *Neurology*, 1999, 53(6):1239-1246. DOI:10.1212/wnl.53.6.1239.
- [65] YOSHIHARA D, FUJIWARA N, KITANAKA N, et al. The absence of the SOD1 gene causes abnormal monoaminergic neurotransmission and motivational impairment-like behavior in mice[J]. *Free Radic Res*, 2016, 50(11): 1245-1256. DOI:10.1080/10715762.2016.1234048.
- [66] KRAEMER B C, SCHUCK T, WHEELER J M, et al. Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(4):409-419. DOI:10.1007/s00401-010-0659-0.
- [67] KINO Y, WASHIZU C, KUROSAWA M, et al. FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2015, 3: 24. DOI:10.1186/s40478-015-0202-6.
- [68] KURASHIGE T, KURAMOUCHI M, OHSAWA R, et al. Optineurin defects cause TDP43-pathology with autophagic vacuolar formation[J]. *Neurobiol Dis*, 2021, 148: 105215. DOI: 10.1016/j.nbd.2020.105215.
- [69] GURFINKEL Y, POLAIN N, SONAR K, et al. Functional and structural consequences of TBK1 missense variants in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Neurobiol Dis*, 2022, 174: 105859. DOI: 10.1016/j.nbd.2022.105859.
- [70] RAMESH BABU J, LAMAR SEIBENHENER M, PENG J M, et al. Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration[J]. *J Neurochem*, 2008, 106(1): 107-120. DOI: 10.1111/j. 1471-4159. 2008.05340.x.
- [71] CHEW J, COOK C, GENDRON T F, et al. Aberrant deposition of stress granule-resident proteins linked to C9orf72-associated TDP-43 proteinopathy[J]. *Mol Neurodegener*, 2019, 14(1):9. DOI:10.1186/s13024-019-0310-z.
- [72] GENDRON T F, BIENIEK K F, ZHANG Y J, et al. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS[J]. *Acta Neuropathol*, 2013, 126(6): 829-844. DOI:10.1007/s00401-013-1192-8.
- [73] COOK C N, WU Y W, ODEH H M, et al. C9orf72 poly(GR) aggregation induces TDP-43 proteinopathy[J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(559): eabb3774. DOI: 10.1126/scitranslmed. abb3774.
- [74] ZHANG Y J, GENDRON T F, GRIMA J C, et al. C9ORF72 poly (GA) aggregates sequester and impair HR23 and nucleocytoplasmic transport proteins[J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(5):668-677. DOI:10.1038/nn.4272.
- [75] YAN S, WANG C E, WEI W J, et al. TDP-43 causes differential pathology in neuronal versus glial cells in the mouse brain[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(10): 2678-2693. DOI: 10.1093/hmg/ DDT662.
- [76] TSUBOGUCHI S, NAKAMURA Y, ISHIHARA T, et al. TDP-43 differentially propagates to induce antero- and retrograde degeneration in the corticospinal circuits in mouse focal ALS models[J]. *Acta Neuropathol*, 2023, 146(4): 611-629. DOI: 10.1007/s00401-023-02615-8.
- [77] JACKSON K L, DAYTON R D, DEVERMAN B E, et al. Better targeting, better efficiency for wide-scale neuronal transduction with the synapsin promoter and AAV-PHP.B[J]. *Front Mol Neurosci*, 2016, 9: 116. DOI: 10.3389/fnmol. 2016. 00116.
- [78] JOSEPH BLOOM A, MAO X R, STRICKLAND A, et al. Constitutively active SARM1 variants that induce neuropathy are enriched in ALS patients[J]. *Mol Neurodegener*, 2022, 17(1): 1-15. DOI:10.1186/s13024-021-00511-x.
- [79] VAN HUMMEL A, SABALE M, PRZYBYLA M, et al. TDP-43 pathology and functional deficits in wild-type and ALS/FTD mutant cyclin F mouse models[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2023, 49(2): e12902. DOI:10.1111/nan.12902.
- [80] YIN P, BAI D Z, DENG F Y, et al. SQSTM1-mediated clearance of cytoplasmic mutant TARDBP/TDP-43 in the monkey brain [J]. *Autophagy*, 2022, 18(8): 1955-1968. DOI: 10.1080/ 15548627.2021.2013653.
- [81] GRAFFMO K S, FORSBERG K, BERGH J, et al. Expression of wild-type human superoxide dismutase-1 in mice causes amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(1): 51-60. DOI:10.1093/hmg/ddt399.
- [82] ANDREAS JONSSON P, GRAFFMO K S, BRÄNNSTRÖM T, et al. Motor neuron disease in mice expressing the wild type-like D90A mutant superoxide dismutase-1[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006, 65(12):1126-1136. DOI:10.1097/01.jnen.000024 8545.36046.3c.
- [83] QUARTA E, BRAVI R, SCAMBI I, et al. Increased anxiety-like behavior and selective learning impairments are concomitant to loss of hippocampal interneurons in the presymptomatic SOD1(G93A) ALS mouse model[J]. *J Comp Neurol*, 2015, 523(11):1622-1638. DOI:10.1002/cne.23759.
- [84] LÓPEZ-ERAUSKIN J, TADOKORO T, BAUGHN M W, et al. ALS/FTD-linked mutation in FUS suppresses intra-axonal protein synthesis and drives disease without nuclear loss-of-function of FUS[J]. *Neuron*, 2020, 106(2): 354. DOI: 10.1016/j. neuron. 2020.04.006.
- [85] PATTAMATTA A, NGUYEN L, OLAFSON H R, et al. Repeat length increases disease penetrance and severity in C9orf72 ALS/FTD BAC transgenic mice[J]. *Hum Mol Genet*, 2021, 29(24):3900-3918. DOI:10.1093/hmg/ddaa279.
- [86] KOROBEYNIKOV V A, LYASHCHENKO A K, BLANCO-REDONDO B, et al. Antisense oligonucleotide silencing of FUS expression as a therapeutic approach in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Nat Med*, 2022, 28(1):104-116. DOI:10.1038/ s41591-021-01615-z.
- [87] PICCHIARELLI G, DEMESTRE M, ZUKO A, et al. FUS-mediated regulation of acetylcholine receptor transcription at neuromuscular junctions is compromised in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(11):1793-1805. DOI: 10.1038/s41593-019-0498-9.
- [88] MILIOTO C, CARCOLÉ M, GIBLIN A, et al. PolyGR and polyPR knock-in mice reveal a conserved neuroprotective extracellular matrix signature in C9orf72 ALS/FTD neurons[J]. *Nat Neurosci*, 2024, 27(4): 643-655. DOI: 10.1038/s41593-024- 01589-4.
- [89] ZHANG Y J, GENDRON T F, EBBERT M T W, et al. Poly(GR) impairs protein translation and stress granule dynamics in C9orf72-associated frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Nat Med*, 2018, 24(8): 1136-1142. DOI:10.1038/s41591-018-0071-1.

(收稿日期:2024-11-04 修回日期:2025-02-13)

(本文责任编辑:丁宇菁)

[引用本文]

罗莲莲, 袁艳春, 王俊岭, 等. 肌萎缩侧索硬化症小鼠模型研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2025, 45(3): 290-299. DOI: 10.12300/j.issn. 1674-5817.2024.161.

LUO L L, YUAN Y C, WANG J L, et al. Advances in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2025, 45(3): 290-299. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.161.