



神经系统研究 手术与造模手册大全

2021

目录

神经环路研究相关手术的具体操作方法.....	1
1 脑立体定位病毒注射实验操作	1
2 光遗传实验光纤埋植手术操作	7
3 在体电生理电极埋植	12
4 套管给药实验操作	17
5 微透析探针植入手术操作	20
神经系统疾病动物造模和评估方法.....	23
1 AD 造模及评估方法	23
2 PD 造模及评估方法.....	33
3 抑郁症造模及评估方法	41
4 PTSD 造模与评估方法	53
5 自闭症造模与评估方法	62
6 颅脑损伤造模及评估方法	76
7 脊髓损伤造模及评估方法	85
8 视神经损伤造模及评估方法	91
9 神经性疼痛模型与评估方法	96

神经环路研究相关手术的具体操作方法

1 脑立体定位病毒注射实验操作

1.1 材料和试剂

- 1) 手术垫
- 2) 玻璃电极
- 3) 培养皿
- 4) 封口膜
- 5) 可吸收海绵
- 6) 棉签
- 7) 手术刀片
- 8) 微量注射器
- 9) 清洁湿巾
- 10) 缝合工具和缝合线
- 11) C57BL/6 小鼠（同窝对照）
- 12) AAV 病毒
- 13) 0.9%NaCl 无菌盐水
- 14) 碘伏
- 15) 异氟烷（4%的诱导和 0.5-1%的维持）
- 16) 镇痛药
- 17) 2%利多卡因
- 18) 眼药膏
- 19) 蒸馏水
- 20) 0.3%庆大霉素
- 21) 兽用伤口粉

1.2 设备

- 1) 异氟烷麻醉系统
- 2) 体温维持仪
- 3) 脑立体定位仪
- 4) 气体麻醉适配器
- 5) 耳杆
- 6) 电动剃毛器
- 7) 电极拉制仪
- 8) 剪刀
- 9) 细头镊子
- 10) 缝合剪刀
- 11) 手术刀手柄
- 12) 无菌玻璃烧杯
- 13) 颅钻
- 14) 钻头
- 15) 注射泵
- 16) 数码显微镜
- 17) 热珠灭菌器

1.3 操作流程

手术装置包括一台脑立体定位仪，该定位仪连接到气体麻醉系统。脑立体定位仪框架上放置有覆盖手术垫的加热垫。用于注射病毒的注射泵固定于定位仪上。显微镜可以不同角度的调节。手术所需的所有材料（包括颅钻）都在脑立体定位仪周围。



1.3.1 手术准备

- 1) 使用电极控制仪设置相应程序控制出一定尖端的电极。



- 2) 检查气体麻醉系统中的异氟烷水平，并在必要时进行填充。



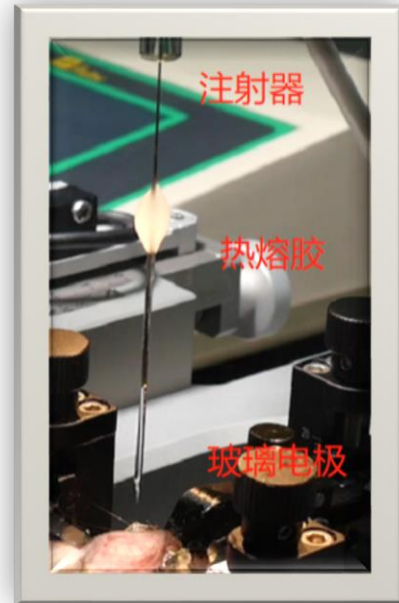
- 3) 将玻璃电极放置在培养皿中（玻璃电极粘在橡皮泥上）并盖上盖子。
- 4) 准备一个装有 10ml 盐水的 25ml 玻璃烧杯，并放入小块可吸收的海绵。
- 5) 打开加热垫（37℃）。

1.3.2 动物准备

- 1) 小鼠称重。
- 2) 在异氟烷诱导盒中麻醉小鼠（4%，1 L / min）。
- 3) 将小鼠嘴部放在麻醉面罩中。
- 4) 给予止痛药（例如 Dolorex 10 mg / ml，在盐水中按 1:20 稀释，每 25g 动物使用 0.1ml）麻醉后皮下注射。
- 5) 剃掉从眼睛到耳朵后面的毛发。
- 6) 将小鼠放在加热垫上，并用适配器固定在脑立体定位仪上，并将异氟烷调整为 0.5-1%。
- 7) 麻醉可通过对脚趾捏合无反应（监测脚趾捏合反应）来确认，手术期间每 20 分钟一次。
- 8) 用棉签蘸少量碘伏清洁头部。
- 9) 在头皮表面下注入 0.1 ml 利多卡因，以提供局部镇痛作用。
- 10) 保护眼睛避光：涂上眼药膏并盖好。

1.3.3 切口和开颅手术

- 1) 从前到后（眼睛之间到颅骨后部）做切口。
- 2) 用蘸有盐水的棉签擦拭切口。
- 3) 将小鼠门齿扣在适配器的齿棒上，套好麻醉面罩，耳杆插入小鼠耳蜗（保证两侧耳杆刻度一致）。
- 4) 找到并标记 Bregma（前囟点）位置。
- 5) 确保头骨干净（没有血液，毛皮或组织）并且干燥（使用干燥的棉签吸收蒸馏水或血液）。
- 6) 将注射泵夹持到定位仪上，用热熔胶将玻璃电极焊接到微量注射器上并安装到微量注射泵上。
- 7) 调节颅骨水平：玻璃电极针尖接触 Bregma 点，将该点设定为原点，而后测量 Bregma 点左右两侧旁开 2.3mm 处颅骨的高度差，小于 0.03mm 则认为左右颅骨水平，大于 0.03mm 则需要调节耳杆的高度来调整水平，前后方向测量 Bregma 点和 Lambda 点的高度差，也需小于 0.03mm，若大于 0.03mm 则上下调整鼻夹的高度（注意：移动颅骨后需要重新定 Bregma 点）。
- 8) 脑图谱中查询目标脑区的坐标。
- 9) 标记目标位置。
- 10) 在目标标记点处用颅钻进行开颅。 如果发生出血，请使用棉签清洁血液，然后使用一块可吸收的海绵来止血。
- 11) 用盐水浸湿的海绵覆盖开颅部位。



1.3.4 病毒注射

- 1) 从冰箱中取出病毒。

- 2) 设置注射泵参数（例如吸取体积 300nL，速度为 800nL/min，模式调为吸入 Withdraw）吸取病毒，使其尖端接触 Bregma 点并设定原点。
- 3) 取走开颅部位湿海绵。
- 4) 将微量注射针移动至目标位点上方，然后下针至目标位点（下针过程保持匀速缓慢），设置注射泵参数（体积 300nL，速度 30nL/min，模式调为泵出 Infuse），开始注射病毒。
- 5) 注射完成后静置 10min，10min 后将微量注射器抬起。
- 6) 用盐水浸湿的海绵覆盖开颅手术。

1.3.5 最终确定和术后护理

- 1) 缝合创口。
- 2) 在缝合线和头部皮肤上涂抹伤口粉末和 0.3% 庆大霉素的混合物。
- 3) 皮下注射 0.5-1 ml 温热无菌盐水。
- 4) 从脑立体定位仪上取下小鼠，然后将其放在加热垫上。
- 5) 小鼠苏醒后，将其转移到笼子中单独饲养。
- 6) 在手术后的前四天每天监视小鼠。

2 光遗传实验光纤埋植手术操作

2.1 材料和试剂

- 1) 滤纸
- 2) 多模光纤
- 3) 陶瓷插芯
- 4) 注射套管
- 5) 1ml 注射器
- 6) 铝箔
- 7) 陶瓷套管
- 8) 套管防尘帽
- 9) 封口膜
- 10) 棉签
- 11) C57BL / 6 小鼠
- 12) aav 病毒 (储存在 -80°C 直至使用滴度为 10^{11} 至 10^{13}pfu/ml)
- 13) 牙科水泥
- 14) 环氧树脂
- 15) 缝合套件
- 16) 泪凝胶
- 17) 碘伏
- 18) 盐水
- 19) 70%乙醇
- 20) 过氧化氢
- 21) 冰
- 22) 镇痛药

2.2 设备

- 1) 切割器

- 2) 光纤剥离工具
- 3) 10 μ L 移液器
- 4) 数字卡尺
- 5) 脑立体定位仪
- 6) 异氟烷麻醉系统
- 7) 体温维持仪
- 8) 加热垫
- 9) 手术工具，包括剪刀，镊子，手术刀
- 10) 颅钻、钻头
- 11) 注射泵
- 12) 微量注射器
- 13) 光纤
- 14) 高压灭菌器

2.3 实验过程

2.3.1 光纤插芯制作

- 1) 使用光纤剥离工具剥离多模光纤。
- 2) 使用切割器对剥离的多模光纤片段进行切割。
- 3) 将光纤插入陶瓷插芯。
- 4) 使用环氧树脂将光纤固定到陶瓷插芯上，磨平凸起的插芯末端。
- 5) 切割另一端至合适的长度，该长度使用数字卡钳测量的适当目标长度，例如，
长度= 6.4 mm（陶瓷插芯）+ 0.5 mm（插芯和颅骨之间的间隙）+ 参考脑图确定所需的目标深度。
- 6) 检测打磨后的光纤：首先把光纤插芯插入套管，不合格的插芯在末端的斑比较小（没磨平，接触不良，耗散大），合格的插芯会有一个圆形集中的光斑。
- 7) 光纤干燥过夜。
- 8) 植入前对光纤高压灭菌。
- 9) 确认每个光纤的透射率，每个光纤的激光透射率必须> 75%。

2.3.2 动物准备

- 1) 小鼠称重。
- 2) 在异氟烷诱导盒中麻醉小鼠（4%，1 L / min）。
- 3) 将小鼠嘴部放在麻醉面罩中。
- 4) 给予止痛药（例如 Dolorex 10 mg / ml，在盐水中按 1:20 稀释，每 25g 动物使用 0.1ml）麻醉后皮下注射。
- 5) 剃掉从眼睛到耳朵后面的毛发。
- 6) 将小鼠放在加热垫上，并用适配器固定在脑立体定位仪上，并将异氟烷调整为 0.5-1%。
- 7) 麻醉可通过对脚趾捏合无反应（监测脚趾捏合反应）来确认，手术期间每 20 分钟一次。
- 8) 用棉签蘸少量碘伏清洁头部。
- 9) 在头皮表面下注入 0.1 ml 利多卡因，以提供局部镇痛作用。
- 10) 保护眼睛避光：涂上眼药膏并盖好。

2.3.3 切口和开颅手术

- 1) 从前到后（眼睛之间到颅骨后部）做切口。
- 2) 用蘸有盐水的棉签擦拭切口。
- 3) 将小鼠门齿扣在适配器的齿棒上，套好麻醉面罩，耳杆插入小鼠耳蜗（保证两侧耳杆刻度一致）。
- 4) 找到并标记 Bregma（前囟点）位置。

- 5) 确保头骨干净（没有血液，毛皮或组织）并且干燥（使用干燥的棉签吸收蒸馏水或血液）。
- 6) 将注射泵夹持到定位仪上，用热熔胶将玻璃电极焊接到微量注射器上并安装到微量注射泵上。
- 7) 调节颅骨水平：玻璃电极针尖接触 Bregma 点，将该点设定为原点，而后测量 Bregma 点左右两侧旁开 2.3mm 处颅骨的高度差，小于 0.03mm 则认为左右颅骨水平，大于 0.03mm 则需要调节耳杆的高度来调整水平，前后方向测量 Bregma 点和 Lambda 点的高度差，也需小 0.03mm，若大于 0.03mm 则上下调整鼻夹的高度（注意：移动颅骨后需要重新定 Bregma 点）。
- 8) 脑图谱中查询目标脑区的坐标。
- 9) 标记目标位置。
- 10) 在目标标记点处用颅钻进行开颅。 如果发生出血，请使用棉签清洁血液，然后使用一块可吸收的海绵来止血。
- 11) 用盐水浸湿的海绵覆盖开颅部位。



2.3.4 病毒注射

- 1) 从冰箱中取出病毒。
- 2) 设置注射泵参数（例如吸取体积 300nL，速度为 800nL/min，模式调为吸入 Withdraw）吸取病毒，使其尖端接触 Bregma 点并设定原点。
- 3) 取走开颅部位湿海绵。
- 4) 将微量注射针移动至目标位点上方，然后下针至目标位点（下针过程保持匀速缓慢），设置注射泵参数（体积 300nL，速度 30nL/min，模式调为泵出 Infuse），开始注射病毒。
- 5) 注射完成后静置 10min，10min 后将微量注射器抬起。
- 6) 用盐水浸湿的海绵覆盖开颅手术。

2.3.5 光纤埋植

- 1) 在病毒注射后，从脑立体定位仪上取下注射泵。
- 2) 根据目标位点坐标的 AP/ML，用颅钻在颅骨上打孔。
- 3) 将光纤插针用夹持器固定到脑立体定位仪上。
- 4) 固定光纤之后需要用光纤尖部接触 Bregma 点，重新移动至目标位点上方（光纤应位于钻头产生的窗口上方）。
- 5) 将光纤下降到适当的 DV 坐标。
- 6) 用牙科水泥固定光纤。注意：牙科水泥轻轻涂抹在光纤纤维的底部周围。
- 7) 缝合皮肤和清洁手术部位。 注入适当的镇痛药并将小鼠放在单独的加热垫上 1 小时。 在将其放到新笼子之前，确保小鼠完全苏醒，小鼠在手术后单独饲养，术后监测健康情况。

3 在体电生理电极埋植

3.1 材料和试剂

- 1) 棉签
- 2) 1 毫升注射器
- 3) 6-8 周大的小鼠
- 4) 牙科水泥
- 5) 接地螺钉
- 6) Kwik-Cast
- 7) 异氟烷
- 8) 2%利多卡因
- 9) 眼药膏
- 10) 美洛昔康
- 11) 0.9%的盐水
- 12) 乙醇

3.2 设备

- 1) #5 镊子
- 2) 弹簧剪
- 3) 钨电极阵列
- 4) 不锈钢 Headpost
- 5) Headpost 夹持器
- 6) 钨电极阵列夹持器

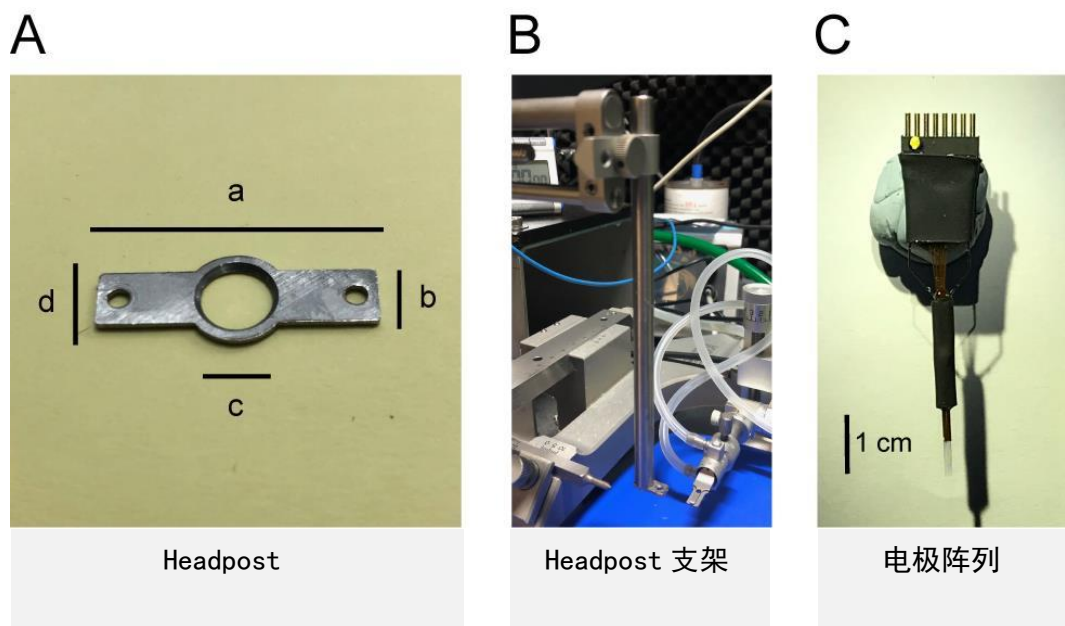


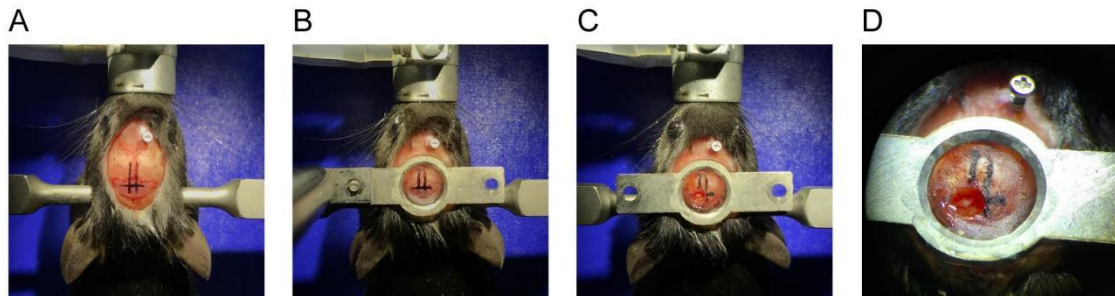
图 A: Headpost 的尺寸: 长度 (a) = 27mm; 宽度 (b) = 6mm; 窗口内径 (c) = 7mm; 窗口外径 (d) = 10mm; 螺丝孔的直径 (M2 x 4mm) = 2mm; 厚度 = 1mm。可以根据需要更改 Headpost 的形状和尺寸。图 B: 固定在脑立体定位仪上的 Headpost 支架。图 C: 钨电极阵列, 电极间距约为 210 μm 。

- 7) 头部适配器
- 8) 耳杆
- 9) 带有麻醉面罩的脑立体定位仪
- 10) 麻醉机
- 11) 颅钻
- 12) 加热垫
- 13) Headstage
- 14) 热珠灭菌器

3.3 实验过程

3.3.1 埋植手术

- 1) 小鼠用异氟烷麻醉（1-4%），并用头部适配器和耳杆固定于脑立体定位上，身体下方放置加热垫。
- 2) 涂上眼药膏以防止干燥。
- 3) 围绕颈部皮下注射美洛昔康（5 mg / kg）。
- 4) 用 70% 乙醇擦拭以清洁头皮。
- 5) 在头皮下注射 2% 利多卡因局部麻醉。
- 6) 切开一个切口以露出头骨。
- 7) 清洁颅骨表面，使其完全干燥。
- 8) 用笔在颅骨上标出目标区域（例如 AP：距 Bregma 约 5.0mm； ML：约 1.0mm）。
- 9) 选择一个接地螺钉朝向颅骨前端的位置（如下图）。



Headpost 埋植手术和开颅手术

图 A：在 Headpost 埋植手术期间暴露出的头骨。此时，已经固定了接地螺钉，并根据立体定位测量结果绘制了 3 条标记线。图 B：Headpost 已经固定。（A-B）在 Headpost 埋植手术当天进行，（C-D）在记录当天进行。

- 10) 使用螺丝刀将接地螺钉小心地拧入颅骨，注意不要太深。可以通过检查大脑表面的凹痕来评估深度，大约 3 圈（约 1.2mm）可保证一个良好位置。在螺钉的底部涂抹少量的牙科水泥。
- 11) 使用连接到脑立体定位仪上的夹持器放置 Headpost，以便可以进行颅骨开窗手术。确保目标区域后方的颅骨充分暴露且没有组织，这样可以有利于 Headpost 后方牙科水泥凝固。
- 12) 涂上牙科水泥以固定 Headpost。为了防止 Headpost 脱落，至关重要的是使颅骨表面尽可能干燥，因此需使用棉签吸走多余液体，然后等到表面变干为止。提起 Headpost 并将牙科水泥涂在其底部表面，然后将其放到颅骨上。涂抹牙科水泥填充 Headpost 和颅骨之间的空隙。围绕 Headpost 圆的内边缘，将牙科水泥从头骨上方扩展到顶部表面，并包住该内边缘。保持开颅手术的目标区域尽可能不含牙科水泥。另外防止牙科水泥接触皮肤，因为这可能会削弱粘固作用。
- 13) 关闭麻醉机，让动物苏醒恢复。

3.3.2 神经记录当天的手术操作

- 1) 在异氟烷麻醉下，将小鼠固定于脑立体定位仪上。
- 2) 根据 Headpost 埋植手术期间的标记，用颅钻进行开颅，开口应足够大以容纳电极阵列。
- 3) 用 Kwik-Cast 覆盖开口。
- 4) 让小鼠苏醒。

3.3.3 神经记录

- 1) 将动物头部固定在头部固定框架中。
- 2) 拆开覆盖手术创口的 Kwik-Cast。
- 3) 使用 30 g 针头和细镊子将硬脑膜切开。
- 4) 将电极放置在目标位置，将表面深度设置为零，然后将其降低到目标脑区中。

- 5) 手术环境应最大程度地减少线路噪声造成的干扰，在记录过程中关闭手术用的光源，并保持电极连接器和脑立体定位仪尽可能靠近。

4 套管给药实验操作

在脑科学基础研究领域中，颅脑给药已经成为大多数动物实验的重要环节。根据实验设计，常见有三种给药方式：单次注射给药、多次反复给药和持续释放给药。前者通常采用立体定位仪配合微量注射泵给药，第二种通常采用套管给药，第三种通常通过植入式缓释泵给药。

本文主要介绍套管给药，它主要用于给小鼠、大鼠、猴等实验动物的目标脑区进行反复多次给药，也可结合配套光纤使用（光遗传），在给药的同时或者给药后继续对目标脑区进行光刺激。

4.1 仪器设备与配件

- 1) 脑立体定位仪
- 2) 显微镜
- 3) 冷光源
- 4) 保温垫
- 5) 手术垫
- 6) 套管夹持器
- 7) 手术器械包
- 8) 酒精棉球
- 9) 干棉球
- 10) 颅钻（包括钻头）
- 11) 异氟烷气体麻醉系统
- 12) 套管给药系统（导管、注射内管、导管帽、PE 管、小螺钉）
- 13) 微量给药系统（微量注射泵、微量注射器）
- 14) 大小鼠剃毛器
- 15) 热珠灭菌器

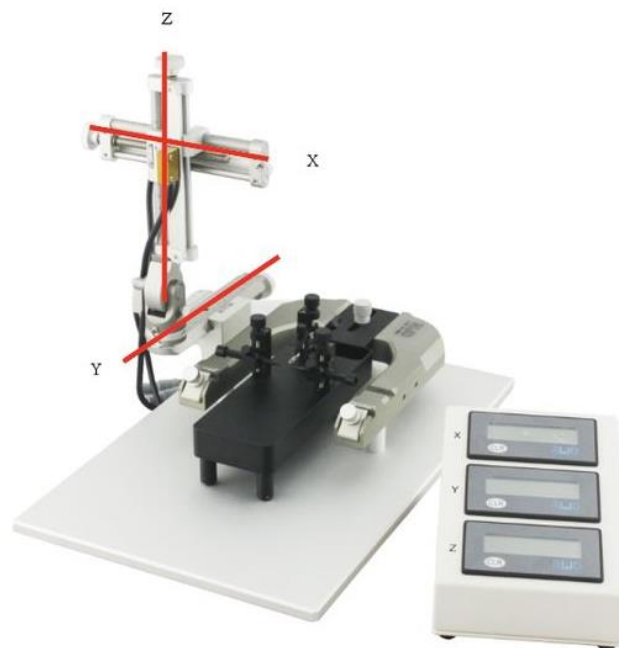
4.2 试剂

- 1) 碘伏

- 2) 酒精
- 3) 双氧水
- 4) 生理盐水
- 5) 牙科水泥（牙托水和牙托粉）
- 6) 抗生素
- 7) 异氟烷（或注射用麻醉药物）

4.3 操作步骤

- 1) 根据脑图谱或文献确定目标脑区的三维坐标：AP 值（Anterior-Posterior, Y 轴，头部到尾部）、ML 值（Medial-Lateral, X 轴，中缝到两侧）和 DV 值（Dorsal Ventral, Z 轴，背侧到腹侧）。



- 2) 将动物麻醉，头部固定到脑立体定位仪上（小鼠需要黑色适配器，大鼠无需适配器，直接固定即可）。
 - 调平颅骨，而后定位至目标脑区利用颅钻钻孔（同时在孔位附近钻 2-3 个小孔，用于旋入颅钉，作为牙科水泥着力点，防止牙科水泥脱落。
 - 同时这些小孔直径需要小于颅钉，这样颅钉才能旋紧，起到提供附着力效果），然后用针轻微刺破目标脑区上方孔德硬脑膜，暴露颅脑。

- 颅钉固定位置硬脑膜无需刺破。
- 将颅钉旋入孔内约三圈，然后将准备好的导管，通过夹持器缓慢植入颅内，再用牙科水泥将螺丝和导管包裹固定。
- 3) 等待牙科水泥凝固后（约 15 分钟左右），移除夹持器（注意不要带动导管），并且缓慢插入导管帽，旋紧；根据实际情况判断是否需要缝合皮肤。
- 4) 动物恢复期，约 2-3 天即可恢复。在此期间，可在皮肤周围涂抹罗红霉素软膏，防止动物发炎感染；同时注意动物状态，适时腹腔注射补充糖盐，使得动物获得足够多能量。
- 5) 将注射内管、PE 管、锁紧螺帽、注射器提前组装好。利用注射泵吸取药物，在 PE 管上标注药液位置（主要用于注射药物过程中观察药物液面是否下降了）。随后取出导管帽，将注射内管缓慢插入导管，利用锁紧螺帽锁紧。
- 6) 设置注射泵的注射量、注射速度，开始注射。注射完毕后，静止约 10 分钟，待药物被充分扩散，然后缓慢拔出注射内管，重新插入导管帽，旋紧。

4.4 注意事项

- 1) 除金属导管帽外，建议对非金属导管帽、导管、注射内管、导管帽芯、锁紧螺帽和 PE 管均可以采用高压蒸汽、紫外、环氧乙烷等方式进行消毒灭菌。
- 2) 使用 PE 管前，可以用大头针将 PE 管的一端接头撑大一点或者用酒精泡一小会，便于插入注射内管。插入注射内管时，务必注意的是，PE 管必须套在白色层外层（非金属管外层），否则易脱落、松动，导致漏液。
- 3) 在将注射内管、PE 管、锁紧螺帽、注射器组装好以后，插入导管前，应将注射液（比如药物）将 PE 管和注射内管充满，勿出现气泡，以保证注射药量的精准。操作方法：需要先向前推注射器，直至注射内管前端有液体冒出，才可将注射内针插入导管，注射药物。

5 微透析探针植入手术操作

5.1 材料和试剂

- 1) 手术垫
- 2) 可吸收海绵
- 3) 棉签
- 4) 手术刀片
- 5) 清洁湿巾
- 6) 缝合工具和缝合线
- 7) C57BL/6 小鼠（同窝对照）
- 8) 0.9%NaCl 无菌盐水
- 9) 碘伏
- 10) 异氟烷（4%的诱导和 0.5-1%的维持）
- 11) 镇痛药
- 12) 2%利多卡因
- 13) 眼药膏
- 14) 蒸馏水
- 15) 速干胶
- 16) 木工胶
- 17) 牙科水泥
- 18) 导管
- 19) 微透析探针
- 20) 螺钉

5.2 设备

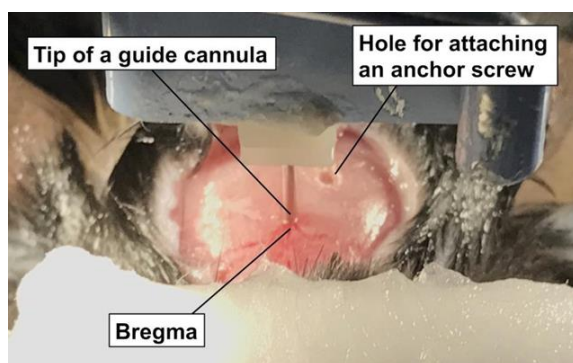
- 1) 异氟烷麻醉系统
- 2) 体温维持仪

- 3) 脑立体定位仪
- 4) 气体麻醉适配器
- 5) 耳杆
- 6) 电动剃毛器
- 7) 剪刀
- 8) 细头镊子
- 9) 缝合剪刀
- 10) 手术刀手柄
- 11) 颅钻
- 12) 钻头
- 13) 数码显微镜
- 14) 热珠灭菌器

5.3 实验过程

- 1) 在异氟烷诱导盒中麻醉小鼠（4%，1 L / min）。
- 2) 将小鼠嘴部放在麻醉面罩中。
- 3) 给予止痛药（例如 Dolorex 10 mg / ml，在盐水中按 1:20 稀释，每 25 克动物使用 0.1 毫升）麻醉后皮下注射。
- 4) 剃掉从眼睛到耳朵后面的毛发。
- 5) 将小鼠放在加热垫上，并用适配器固定在脑立体定位仪上，并将异氟烷调整为 0.5-1%。
- 6) 麻醉可通过对脚趾捏合无反应（监测脚趾捏合反应）来确认，手术期间每 20 分钟一次。
- 7) 用棉签蘸少量碘伏清洁头部。
- 8) 在头皮表面下注入 0.1 ml 利多卡因，以提供局部镇痛作用。
- 9) 保护眼睛避光：涂上眼药膏并盖好。
- 10) 从前到后（眼睛之间到颅骨后部）做切口。
- 11) 用蘸有盐水的棉签擦拭切口。

- 12) 将小鼠门齿扣在适配器的齿棒上,套好麻醉面罩,耳杆插入小鼠耳蜗(保证两侧耳杆刻度一致)。
- 13) 找到并标记 Bregma (前囟点) 位置。
- 14) 确保头骨干净(没有血液,毛皮或组织)并且干燥(使用干燥的棉签吸收蒸馏水或血液)。
- 15) 使用颅钻在颅骨的后部开一个直径约 1 mm 的孔,以固定螺钉,螺钉应安装在套管附近。
- 16) 用夹持器将套管固定至定位仪上,移动至 Bregma 点,定 Bregma 点。



- 17) 移动套管至目标位点上方并接触颅骨,使用油性墨水标记该位置。
- 18) 使用颅钻在标记点上钻一个直径约 1 毫米的孔。
- 19) 将套管进一步缓慢向下移动至目标位点。此操作通常至少需要 1 分钟。手术期间手术区域流血时,请用吸收海绵吸去血液。如果小鼠流血超过全血的十分之一,通常估计为体重的 1/13,则应考虑停止手术。
- 20) 用速干胶暂时将套管固定在颅骨上。
- 21) 当速干胶变硬时,使用牙科水泥密封套管和颅骨之间的间隙。
- 22) 固定好牙科水泥后,从操作臂上拆下套管。
- 23) 使用精密螺丝刀,将螺钉固定到步骤 15 的孔中。
- 24) 用牙科水泥牢固地覆盖头骨和螺钉,然后用螺钉紧固套管,确保套管不能移动。
- 25) 水泥干燥后,用木工胶覆盖牙科水泥表面。
- 26) 胶水硬化后,将小鼠放置到笼中。
- 27) 微透析当天,用麻醉机麻醉小鼠,并用镊子拔出插入套管内的探针。
- 28) 插入新的微透析探针,并用牙科骨水泥固定。

神经系统疾病动物造模和评估方法

1 AD 造模及评估方法

1.1 背景

阿尔茨海默病（AD）是在 1906 年首次由德国精神病学家和神经发病学家 Alzheimer Alois 发现、并以他本人的名字命名的老年痴呆，主要临床表现为记忆力逐渐减退、认知功能发生障碍、行为异常和社交障碍等。AD 是一种慢性神经退行性疾病，其典型的病理改变为神经纤维缠结和老年斑，分别由 Tau 蛋白异常磷酸化和淀粉样蛋白（ β -amyloid protein, $A\beta$ ）沉积引起。

在阿尔茨海默病的研究中，动物模型被广泛应用，它的存在有利于研究阿尔茨海默病的发生机制，并为治疗方案提供理论依据。但各种建模方法构建的动物模型各有优势和不足。

在选择模型之前，科研学者们应该首先考虑他们打算研究的疾病的哪一个特定方面。目前在用的大多数模型都旨在重现阿尔茨海默氏症的一种或多种病理，生化或行为特征。偶发性 AD 是最常见的一种 AD 形式，受遗传和环境风险因素的影响。

研究表明，与年龄和生活习惯有关的危险因素，如压力，吸烟，饮酒，高血压和糖尿病在该疾病中起关键作用。大多数动物模型已被设计为模仿 AD 的遗传形式，但并未显示出所有 AD 病理特征。到目前为止，还没有偶发性 AD 的动物模型。

1.2 阿尔茨海默症的细胞模型

目前很多体外模型已广泛用于 AD 研究中，主要是研究疾病的病理和进展以及药物筛选。AD 研究中使用的细胞系包括原代神经元培养物，癌细胞系和诱导性多能干细胞（iPSC）。不同的细胞模型被用来研究疾病的不同方面。

细胞模型的明显缺点是不能代表人类大脑的复杂环境，因为在人类大脑中还有可能在 AD 病理以及神经元之间的相互作用中起重要作用的非神经元细胞。然而它们可能是 AD 研究和药物发现中的宝贵工具。

1.2.1 原代细胞系

原代细胞系可以从转基因动物或人类患者中提取出来培养。其中永生大鼠海马细胞系已被广泛使用，因为海马是 AD 中受影响最严重的区域。原代皮层培养物也已用于检查 β 淀粉样蛋白寡聚体对神经元功能和细胞凋亡的影响。

人类胚胎肾细胞（HEK293）也被用来建立 tau 相关效应的模型，可以很容易地用 tau 转染。此外，原代培养物也可以用 APP 转染，并且可以提供有关 β 淀粉样蛋白寡聚体的作用的有用信息。

1.2.2 癌细胞系—神经母细胞瘤 (SH-SY5Y)

人神经母细胞瘤（SH-SY5Y）细胞是从胚胎期末成熟神经元细胞的肿瘤中分离出来的，它可以根据各种生长因子而分化为不同的表型。

在 AD 研究中，SH-SY5Y 细胞被分化为神经元样细胞，其形态与成熟神经元相似。然后将这些细胞暴露于有毒的 β 淀粉样蛋白寡聚体中，导致其神经变性。该模型在神经退行性研究中非常流行。但是由于癌症基因的干扰，它不能完全重现疾病的各个方面。

1.3 阿尔茨海默氏症的 iPSC 模型

1.3.1 2D iPSC 神经元培养物

多能干细胞可以通过对成熟的体细胞进行重新编程来生成，并且能够分化为不同的细胞类型。诱导多能干细胞（iPSC）技术可用于模拟阿尔茨海默氏症，研究从家族性阿尔茨海默病（FAD）或散发性阿尔茨海默病（SAD）患者获得的单个神经元细胞。

2011 年，研究人员用带有 PS1 和 PS2 突变的 FAD 患者的原代人类成纤维细胞诱导产生了 iPSC，之后发现该细胞中 β 淀粉样蛋白肽水平升高，这是 AD 病理学的主要特征。2012 年，另一个研究小组利用从 FAD 和 SAD 患者中提取的细胞诱导产生了 iPSC，iPSC 衍生的神经元显示出明显更高的 β 淀粉样蛋白和磷酸化的 tau，但不能重现淀粉样蛋白斑块和 tau 缠结。

iPSC 技术的进步使产生患者特异的神经元成为可能，从而可被用于更有针对性的医疗。使用 iPSC 模型的主要限制则是缺乏成熟和衰老特征，而 AD 是一种与年龄有关的疾病，所以这成为 iPSC 模型的一大缺点。

1.3.2 3D iPSC 脑器官

神经科学的最新进展之一是可以由人 iPSC 产生类器官。脑类器官，也称为迷你脑，是类似于人脑的体外自组织 3D 结构，是神经退行性疾病建模中的宝贵科学工具。在阿尔茨海默氏症的研究中，3D 脑类器官可以重现完整的 β 淀粉样蛋白沉积物，tau 缠结和神经变性。但是它们缺乏细胞多样性，并且突触活性低，免疫系统不完整，这些是 3D 模型的最主要缺陷。

1.4 阿尔茨海默氏症动物模型

阿尔茨海默病（AD）动物模型有多种类型，可大致分为衰老模型、损伤模型和转基因动物模型三大类，在一定程度上模拟了阿尔茨海默病（AD）的症状和病理变化，理想的疾病模型应模仿 AD 的真实发展进程，展现进行性神经变性以及淀粉样斑块和神经原纤维缠结的形成。

1.4.1 AD 衰老模型

1) 自然衰老 AD 模型

饲养实验鼠，让实验鼠自然衰老。随着实验鼠年龄的增长，形态学观察可见自然衰老的实验鼠隔区、斜角带核及 Meynert 基底核神经元萎缩、丧失，同时感觉、运动、学习记忆等多种能力下降。自然衰老 AD 模型的神经系统改变是自然

发生的,接近部分 AD 真实病理改变,但极少形成神经纤维缠结和淀粉样蛋白沉积,并且价格昂贵,健康状况差,造模时间长。

2) 快速老化小鼠 (SAM) 模型

快速老化小鼠 (SAM) 模型是日本学者在繁殖自然 AKP 变异小鼠时筛选出来近交延迟代培养而成,其中 SAMP8 作为 AD 的衰老模型被广泛认可。SAMP8 小鼠寿命短,脑内沉积灶发生率高且时间早,5 个月左右便可出现学习、记忆力减退,神经元减少,神经细胞萎缩,神经递质代谢异常等病理改变。其优势在于既有自然衰老的特征,又有脑部病理改变及学习记忆功能衰退,对 AD 病理模拟的更好,但是价格较贵,生命周期短,多用于智力增长方面的理论和药物研究。

3) D-半乳糖 (D-gal) 衰老模型

D-半乳糖 (D-gal) 衰老模型是由我国学者首先提出的,通过向模型动物腹腔内注射 D-gal,细胞内半乳糖过度堆积将影响正常的细胞代谢,氧化损伤机制造成神经细胞功能结构的改变。D-半乳糖 (D-gal) 衰老模型可以得到较为真实的 AD 病理改变,但是 D-gal 引起的氧化应激反应还未研究清楚,限制了 D-半乳糖 (D-gal) 衰老模型的应用。

1.4.2 AD 损伤模型

1) 胆碱能系统损伤模型

AD 胆碱能系统损伤模型可通过物理和化学的方法造成实验动物脑内胆碱能系统的损伤来进行 AD 模拟。目前,常用的物理方法包括电击与手术,电击实验动物 Meynert 基底核,损坏胆碱能神经元,阻碍神经纤维投射,使动物出现学习、记忆等多种行为缺陷;手术切除实验动物海马穹窿伞,使动物出现学习、记忆障碍。物理方法缺少在病理学方面的表现,如无老年斑、神经纤维缠结等,所以不是 AD 的理想模型。常用的化学方法是向实验动物体内注射不同类型的化学制剂,如东莨菪碱等胆碱能拮抗药物,抑制乙酰胆碱与受体结合,使胆碱能系统紊乱,阻碍信息的获取能力;鹅膏蕈氨酸等毒性抑制剂,可损伤神经通路;亚硝酸钠或乙醇等作用于胆碱能系统,使记忆力出现巩固障碍和再现障碍,化学药物造模也缺乏病理学方面的表现,且有些药效可逆。

2) A β 损伤模型

A β 是老年斑的主要成分，能产生神经元毒素。向实验动物的海马或脑室注射 A β 可使神经元发生坏死，促进凋亡基因表达，诱导胶质细胞的炎症反应，产生血管的淀粉样病变与纤维蛋白的沉积，模拟 AD 的病理现象，形成学习与记忆能力减退的 AD 模型，但是该模型无法模拟 AD 的其他典型病理改变。

3) tau 蛋白损伤模型

过度磷酸化的 tau 蛋白在 AD 神经细胞凋亡中发挥了重要作用，导致神经纤维缠结。通过向实验动物侧脑室微泵注入磷脂酸酶抑制剂，如冈田酸等，特异性抑制丝氨酸或苏氨酸的蛋白磷酸酯酶，使磷酸化的 tau 蛋白呈现双螺旋细丝状病理改变，产生类似 A β 沉积的老年斑改变和神经纤维缠结 AD 模型。

4) 铝中毒损伤模型

铝中毒使神经元退化、变性，产生神经纤维缠结现象。喂食实验动物氯化铝可使其出现认知与记忆障碍，脑组织重量减少，皮质萎缩。研究证实，铝可诱发 tau 蛋白过度磷酸化与 A β 沉积，可制备出神经纤维缠结与老年斑并存的 AD 模型，但不表现出双螺旋细丝状病理改变，胆碱能系统无影响，实验周期较长。

1.4.3 转基因模型

1) APP 单转基因小鼠

通过过表达 APP 基因来产生 APP 转基因小鼠。它们表现出 β 淀粉样蛋白斑块和认知缺陷，但是不能形成神经原纤维缠结。

2) Tau 转基因小鼠

这些模型表达人类 tau 蛋白，并显示神经内 tau 缠结以及行为和运动缺陷，但未形成淀粉样斑块。rTg4510 模型高度表达包含 P301L 突变的人类 tau 蛋白，并逐步形成神经原纤维缠结，造成神经元丢失和行为障碍。

3) APP/Tau 双转基因小鼠

表达 APP 和 Tau 蛋白，并表现出 β 淀粉样蛋白斑块，神经元内 tau 缠结和运动缺陷。

4) APP/PSEN1 双转基因小鼠

表达 APP 和 PSEN1 突变, 只显示 β 淀粉样蛋白斑块。

5) APP/Tau/PSEN1 三重转基因小鼠 (3xTg-AD)

这些模型包含 APP, MAPT 和 PSEN1 中的突变, 并显示蛋白斑和缠结。与单转基因和双转基因模型相比, 该模型动物表现出更严重的病理。

6) 五重转基因小鼠 (5xFAD)

这种广泛使用的 β 淀粉样蛋白模型将 5 个 AD 突变携带到单个转基因系中, 与其他模型相比, 该模型显示出早期淀粉样病理 (2 个月) 和更严重的神经病理。但是不足之处是它缺乏神经原纤维缠结。

7) APP 敲入老鼠

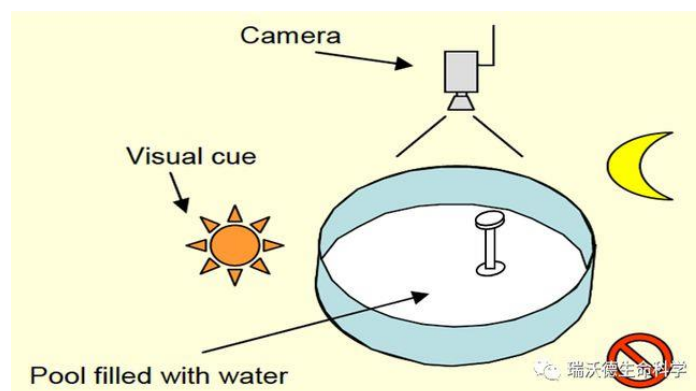
敲入小鼠模型可产生更高水平的 β 淀粉样蛋白, 而不会过度表达 APP。小鼠表现出典型的 β 淀粉样蛋白病理, 神经炎症和记忆障碍。

8) APOE 和 TREM2 模型

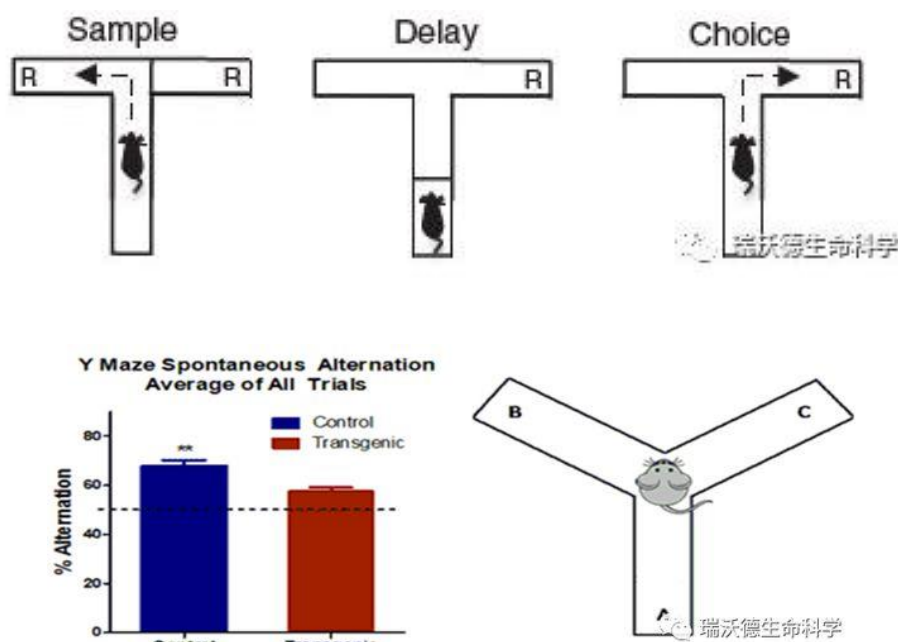
APOE 和 TREM2 是偶发型 AD 的高危致病因子。目前已经改造出了表达人 APOE 的转基因, 敲除和敲入小鼠。新的 TREM2 敲除系也已经成功产生, 以研究与 SAD 相关的基因机制。

1.5 行为学评估方法

1.5.1 Morris 水迷宫 (Morris water maze, MWM)



Morris 水迷宫由英国心理学家 Morris 于 1981 年报道,是目前行为神经科学中最常用的评估方法之一,广泛用于多种神经系统疾病的模型评估及药物干预研究。海马是与空间学习记忆密切相关的大脑区域,MWM 也被证明是与海马突触可塑性和 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体功能密切相关的测试方法。实验动物被放置在一个圆形水池中,水中加入不透明的、无毒的白色颜料或奶粉,水池中包含一个隐藏的逃生平台。实验内容包括定位航行和空间探索。定位航行是随机的将动物从水迷宫的四个象限中放入,使其在水中游泳并找到逃生平台,用视频跟踪软件记录动物寻找到隐藏平台的时间(逃避潜伏期)及路径。空间探索是定位航行后撤去逃生平台,观察动物穿过原平台位置的次数和时间,考查动物对原平台的记忆。



1.5.2 T/Y 迷宫

依据动物天生的探索习性(倾向于每次探索未探索方向),检测动物在 T 型/Y 型迷宫中不同臂的探索情况,结合行为学记录分析软件,可以分析运动速度,穿梭次数,绘制运动轨迹等。相关的实验范式很多,有加入食物奖励的,也有加入气味/声音作为 cue,也有加入 delay 延迟期的,适用于工作记忆,参考记忆检测。

1.5.3 八臂迷宫



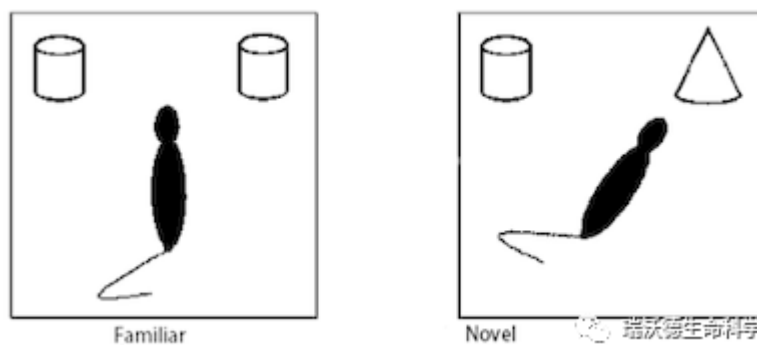
放射性八臂迷宫，不同臂的方向可粘贴不同形状的图案提示，每个臂的尽头有食物装置，食物随机放置，或者将食物与相应图案对应起来，根据动物本能探索 and 取食的策略，记录动物进入每个臂的次数、时间、正确次数、错误次数、路线等参数可以反应空间记忆能力。

1.5.4 Barnes 迷宫



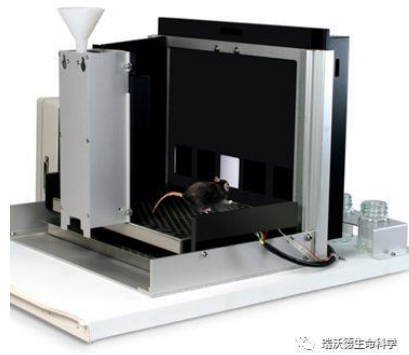
Barnes 迷宫由周边布满孔洞的圆形平台构成，在其中一个洞的底部放置盒子作为动物的躲避场所，可使用光，噪音，风等刺激作为动物找到躲避洞口的动机。实验时将动物放在平台中央，记录动物找到目标洞口的时间，进入错误洞口的次数反应参考记忆，也可以记录重复进入错误洞口的次数反应工作记忆。

1.5.5 新物体识别



将动物在两个或者更多的物体周边停留一段时间进行熟悉，然后用一个新物体代替原来的物体。如果记忆正常，小鼠会花费更长时间去探索新物体；如果探索两种物体花费的时间相同，就可以被视为记忆缺失。

1.5.6 触屏式操作性条件行为系统（触屏式斯金纳箱）



触屏式操作性条件行为系统通过更为复杂的实验任务，关联更高级的认知行为，反应不同脑区之间的相互联系。其中操作性条件行为系统的 5- 选择反应序列任务，通过对动物进行 5 孔视觉刺激的学习记忆训练，在规定时间内对点亮的孔视觉刺激做出正确的探鼻响应，以此得到食物或者饮水奖励，以评估动物高级认知行为差别（如注意力评估等），可用于阿尔兹海默疾病，抑郁，亨廷顿舞蹈症，精神分裂症，注意力缺陷多动障碍，强迫症等疾病研究。

参考文献

1. Modeling Alzheimer's disease: from past to future. Saraceno C. et al. (2013) Front Pharmacol. 4:77.
2. Can mouse models mimic sporadic Alzheimer's disease? Foidl BM. et al. (2020) Neural Regen Res 15(3):401-406
3. An overview of in vitro research models for Alzheimer's disease, Carolindah MN et al. (2013) J of TESMA Regenerative Research 2(2): 8-13
4. Alzheimer's disease: Experimental models and reality, Drummond E. et al.(2017) Acta Neropathol. 133(2):155-175
5. General overview of neuronal cell culture. Gordon J. et al. (2013) Methods Mol Biol. 1078:1-8.

6. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells, Yagi T. et al. (2011) Human Molecular Genetics 20(23):4530–4539
7. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells, Israel MA et al. (2012) Nature 482(73840): 216 -220
8. Translation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells: From Clinical Trial in a Dish to Precision Medicine. Sayed N. et al. (2016) J Am Coll Cardiol. 67(18):2161–2176.
9. Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. Doss MX. et al. (2019) Cells.8(5):403.
10. Brain organoids: a next step for humanized Alzheimer's disease models? Gerakis, Y. et al. (2019) Mol Psychiatry 24: 474–478.
11. Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease, Jankowsky JL. et al. (2017) Mol. Neurodegeneration 12: 89
12. Overview of transgenic mouse models for Alzheimer's disease, Myers A. et al. (2019) Current Protocols in Neuroscience 89:81
13. Mouse models of Alzheimer's disease, Hall AM. et al. (2011) Brain Research Bulletin 88(1): 3-12
14. Alzheimer's disease-like pathology induced by amyloid beta oligomers in nonhuman primates, Forny-Germano L. et al. (2014) The Journal of Neuroscience 34(41): 13629-13643
15. Intracerebral injection of preformed synthetic tau fibrils initiates widespread tauopathy and neuronal loss in the brains of tau transgenic mice. Peeraer E. et al. (2015) Neurobiology of disease 73: 83-95.

2 PD 造模及评估方法

2.1 背景



帕金森病（Parkinson's disease, PD）是一种常见于中老年的中枢神经系统退行性疾病，临床上以静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势平衡为主要特征，其病理表现为黑质致密部多巴胺神经元的损伤和 Lewy 小体的形成。

PD 的发病原因非常复杂，至今仍不清楚。大部分帕金森病患者为散发病例，仅有不到 10% 的患者有家族史，遗传因素、环境因素、衰老、氧化应激等被认为是 PD 的重要诱发原因。

2.2 理想的 PD 研究动物模型应具备的特征：

- 多巴胺能神经元在出生时数量及形态正常，青年时期开始逐渐选择性地减少，减少量超过 50%，且容易通过神经化学和神经生理学的方法检测到；
- 模型应能容易检测其运动功能的损伤，包括运动迟缓、肌僵直和静止性震颤等 PD 的主要症状；
- 模型应能显示出路易小体的形成；
- 如果模型是遗传性的，应基于单一突变而使突变模型有着强大的传播能力；

- 模型应有相对较短的疾病周期(如数月)，以使药物筛选得以经济、快速地进行。

大体上，PD 的动物模型可以分为三类：基于靶向儿茶酚胺能神经元的神经毒素损伤模型、机械损伤模型、转基因模型。目前每个模型都是模拟 PD 的一个或几个病理过程，每种模型都有自己的优点和局限，都不能完全模拟 PD 病理特点和疾病症状，可以根据实验目的选择合适的实验方案。

2.3 神经毒素诱导的 PD 模型

2.3.1 6-羟多巴胺模型 6-OHDA (6-hydroxydopamine,6-OHDA)

6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine,6-OHDA) 不能通过血脑屏障，其结构与 DA 神经递质相似，对 DA 质膜转运蛋白具有高亲和力，诱导 DA 神经元和去甲肾上腺素能神经元变性，通过触发氧化应激相关细胞毒性和小胶质细胞依赖性 DA 神经元炎症，引起其毒性机制。

实验操作：

- 1) Wistar 大鼠，雌雄均可，体重 200–250g，诱导盒内异氟烷气体麻醉。
- 2) 待动物麻倒后，将动物俯卧位固定于小动物立体定位仪上，接上定位仪麻醉面罩。
- 3) 上耳杆时注意对称和稳固，上牙齿固定于门齿棒上，并用压杆压往鼻骨。
- 4) 剪去头部顶毛，切开或剪开皮肤，范围为：两外耳道中线连线前后各 0.5 厘米。
- 5) 用眼科剪去除颅骨表面的结缔组织膜或用手术刀刮去，以使颅骨表面尽可能干净。
- 6) 少量出血时用于棉球压迫止血。稍候干燥，可见到颅骨表面呈白色，前囟、后囟清晰可见。
- 7) 将注射用的 10ul 或 25ul Hamilton 微量注射器固定于立体定位注射仪上颅骨正上方，准备好牙科钻头，钻头直径 0.8mm。
- 8) 损毁部位为单侧黑质或内侧前脑束。以前囟为标准参考点，进针点可选择左侧或右侧。

- 9) 有时前囟不清晰,可分别按压两侧的顶盖骨和额骨,在“按压—放松”的过程中,便可清晰见到前囟。
- 10) 依 Paxson 《The Rat Brain》图谱,注射部位的坐标为:第一点(mfb),门齿棒高于耳杆 3.4mm。前囟后 4.0mm,中线左旁开 0.8mm,颅骨表面下 8.0mm;第二点(SNC),门齿棒低于耳杆 2.3mm,前囟后 4.14mm,中线左旁开 1.2mm,颅骨表面下 7.8mm。
- 11) 用牙科钻钻开颅骨恰至软脑膜表面。
- 12) 用小号针头轻轻挑破软脑膜。此时注意最好不要用钻头直接钻破软脑膜,以免大量出血。
- 13) 每点注射 6-OHDA 溶液 4 μ l (12 μ g),注射速度为 1 μ l / min,留针 10 分钟,缝合皮肤,将术后的大鼠置于安静保温处直至清醒,自由进食饮水。

2.3.2 MPTP 诱导的小鼠模型

MPTP (1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶) 有高度脂溶性,易透过血脑屏障,进入脑后可在神经胶质细胞单胺氧化酶的作用下转化为它的有效成分 MPP⁺。MPP⁺被多巴胺转运体摄取到多巴胺能神经元线粒体内后,可抑制线粒体复合物 I 的活性,会导致多巴胺能神经元变性、死亡。MPTP 的毒性作用存在种属差异,小鼠较为敏感,而大鼠有一定耐受性,因此常用 MPTP 诱导的小鼠模型。MPTP 诱导的小鼠模型建模周期短 (1-2 周),操作简单,可以直接采用腹腔注射或者皮下注射,并且神经元缺失明显以及行为学检测异常显著,是目前最为常用的 PD 动物模型之一。

2.4 机械损伤的大鼠 PD 模型

6-OHDA 损毁 MFB 造成的大鼠 PD 模型有两个明显的弊端:一是神经元急性死亡。6-OHDA 注入后 15 分钟即可检测到 DA 含量的下降,在第 30-60 分钟时更加明显,3-5 天内绝大多数神经元死亡。二是损伤严重。经 APO 诱发旋转 7 圈 / 分以上者,黑质内多巴胺能神经元的死亡率已经超过 90%。可见这种模型对于研究多巴胺能神经元慢性进行性病变的全过程不甚理想。人们发现机械损伤 MFB 同样可以造成黑质内的多巴胺能神经元变性坏死,并且这种变化呈现慢性、进行性过

程。已经建立的造模方法有 MFB 轴突切断术 (medial forebrain bundle axotomy) 和中脑半切术 (hemitransection of midbrain)。

2.4.1 大鼠 MFB 切断术

Wistar 大鼠, 诱导盒异氟烷麻醉后, 置于 RWD 立体定位仪上固定。切开皮肤, 暴露颅骨前囟。选择部位在前囟后 3.8mm, 中线旁开 2.4mm 处打孔。用可伸缩电线刀垂直伸入孔内达颅骨平面下 8mm 处, 固定外套管, 将电线刀的刀刃由外套管中推出 2.0-3.0mm。上提电线刀约 2.5mm, 然后下放回原处。再重复一次, 以保证 MFB 充分切断。然后回收刀刃, 退出电线刀, 缝合皮肤。

2.4.2 中脑半切术

SD 大鼠, 体重 200-250g, 诱导盒异氟烷麻醉后, 置于 RWD 立体定位仪上固定。暴露颅骨前后囟。在前囟后 1mm, 中线旁开 0.5mm 处打孔。将以 4mm 宽的手术刀, 沿与颅骨成 68 度角的方向, 斜插入 9mm, 然后将刀退出。缝合皮肤。

2.5 转基因小鼠模型

转基因模型主要是基于家族性 PD 相关基因的发现, 迄今为止, 已经鉴定了 15 个致病基因和超过 25 个遗传风险因子, 归类为“PARK”基因和“非 PARK”基因。已经证明 c-synuclein 水平过表达, 在病理发展中至关重要。5 个遗传风险因子, 归类为“PARK”基因和“非 PARK”基因。已经证明 c-synuclein 水平过表达, 在病理发展中至关重要。

1) PINK1

PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1, PARK6) 的约 30 种致病突变与 PD 相关。然而, 小鼠 PINK1 缺失不会导致明显的表型, 迄今为止, 开发的 PINK1 敲除 (-/-) 和敲低小鼠模型显示轻度的神经退行性变化。研究显示重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV) 2/7 载体介导的雌性 C57BL/6 小鼠 SN 中 PINK1 的敲低不会引起行为缺陷或 DA 细胞死亡、不增强 α -synuclein 诱导的神经病理学变化, 但是在 PINK1-/- 小鼠中 α -synuclein 诱导的 DA 能细胞死亡和磷酸化增强。PINK1-/- 小鼠 SN 中的 DA 神经元没有丧失, 但纹状体中突触可塑性

受损,表型仅显示总 DA 水平的轻微降低。在 PINK1-/-C57BL/6J 小鼠中观察到 DA 细胞的丧失、神经变性增加,表现为 PD 早期症状。

2) 钙离子非依赖型磷酸酯酶 A2

钙离子非依赖型磷酸酯酶 A2, VIa 亚型 (calcium-independent phospholipase A2, group VIa, iPLA2 β) 基因突变 PLA2G6 发生于 PD 的多种神经疾病中。研究显示,雄性 iPLA2 β -/-小鼠 4 个月时,神经病理学变化很小。12 个月时,小鼠出现运动障碍、小脑神经元损失和纹状体中 α -synuclein 积累。15~20 个月,该模型仍未出现 PD 特有的运动特征,仅显示神经炎症和 PD 相关的神经病理学变化。

3) Tetranectin 基因敲除

Tetranectin 基因敲除 C57BL/6J 小鼠 (TN-/-) 与年龄匹配的 WT 小鼠相比,12 个月时,SNc 中具有较少的 DA 神经元。DAT、二羟苯乙酸水平升高,意味着小鼠纹状体 DA 能终端的代偿性增加。小鼠运动迟缓、旋转速度变慢,运动功能逐渐恶化,伴有中度至重度肢体僵硬和异常姿势,并且无自发行为恢复。两种基因型老年小鼠 (>18 个月) 的 SN 中 α -synuclein 免疫反应性均增加,但 TN-/-小鼠反应更明显,形成 LB 样物质。老年 TN-/-小鼠的纹状体 α -synuclein 水平显著降低。该模型可能是研究 LB 形成、检测 PD 神经保护疗法或其他突触核蛋白病的有价值的模型。

4) PARK2 基因

PARK2 基因 (parkin 基因) 异常导致青少年 PD 综合征。虽然 parkin-/-和 WT C57BL/6J 小鼠在行为测试中没有差异, parkin 缺乏不会引起大量的 SN 变性或 PD 症状,但是 parkin-/-诱发 DA 的半衰期延长,影响纹状体的 DA 释放。幼年 parkin-/-小鼠中 α -synuclein 释放和摄取减少表明 DA 神经传递早期症状的改变,而在老年 parkin-/-小鼠的 α -synuclein 增强可能反映 PD 晚期症状前期 DA 功能的补偿性适应。parkin 的遗传缺陷可能导致 DA 神经元的早发性生理功能障碍。

转基因小鼠可以在一定程度上模拟与 PD 类似的一些神经病理学和行为表型。然而,与 PD 相关大脑区域 (如 SNc 或者蓝斑) 的神经元损失,大多数转基因小鼠不会出现,并且病理学和表型的出现通常和细胞死亡一致,迄今为止的基因敲除小鼠都没有代表 PD 的真实模型。

2.6 病毒载体转基因模型

到目前为止，大多数基因敲除小鼠未能显示出明显的 DA 能细胞损失和 DA 依赖性行为缺陷。而通过向脑中靶向输入病毒载体，局部过表达 α -synuclein，可以克服这一障碍。人 α -synuclein 由第 4 号染色体 SNCA 基因编码。SNCA 基因突变（包括 A30P, E46K, G51D 和 A53T）以及 SNCA 倍增的特异性突变都与 α -synuclein 聚集增加相关联， α -synuclein 模型有助于阐明与 PD 相关的基因对 DA 神经元变性的贡献。

2.7 常用行为学评估方法

2.7.1 转棒实验

使用小鼠转棒仪检测小鼠的运动协调能力。将小鼠置于直径为 3cm 的旋转杆上，转速调整为 30r/min，每次同时测定 5 只小鼠，每个隔室中 1 只。记录小鼠从转棒开始转动至掉落转棒所经历的时间，测定时间为 1min，每次中间休息 1min，连续 5 次，记录 1min 内掉落次数。

2.7.2 旷场实验

即自发活动，是检测 MPTP 损伤后少动的常用指标。旷场实验所用实验箱为尺寸：500×500×300mm 旷场，周壁的颜色为黑色，旷场底面被平均分为 16 个 4×4 个小方格。正上方架摄像头，视野覆盖整个旷场。将动物放置在正中央格，同时进行摄像和计时，时间为 5 min。通过计算机示踪分析系统来分析动物在一定时间内的活动状态。实验室保持安静，室温为 20℃左右，光线充足。观察指标：方格间穿行次数（动物的四肢从一个格进入另一个格为穿行一次）、直立次数（动物双前肢同时离地，或者双前肢放在墙壁上算作直立一次）、中央格停留时间、穿过中央格的次数。

2.7.3 圆筒试验

圆筒试验(cylinder test)又称肢体不对称使用试验，最早应用于大鼠的行为学评价，通过改良用来评估小鼠前肢使用和旋转的对称性，当小鼠一侧的感觉皮层、皮质脊髓束、纹状体受到缺血损害时前肢的使用发生不对称性，进一步观察

会发现离散运动障碍和协调运动也相继发具体操作是将小鼠放置在一个直径 9 cm, 高度 15 cm 的透明圆桶内。当小鼠后腿站立时, 分别记录最初左前肢、右前肢及两侧前肢同时碰触筒壁的次数。当一侧前肢(如右侧)碰触筒壁后, 另一侧前肢(左侧)在右侧未移开时也碰触到了筒壁, 记录一次右侧和一次同时碰触。当两侧前肢交替碰触筒壁时, 记录为同时碰触, 共进行 20 次重复试验。最终得分=(右前肢的运动 - 左前肢运动)/(右前肢运动+左前肢运动) 100%。得分越高说明两侧肢体的不对称程度越明显。这种评分方法即使对于没有经验的评价者也有较高的可信度。

2.7.4 爬杆实验

爬杆实验是评价小鼠运动协调能力的经典方法。通过记录小鼠由杆的顶端往下爬到底部(双前爪着地)所需时间, 比较其运动能力。本实验将小鼠放置于一个木制的粗糙的小球上, 其下端接有一个表面粗糙、截面为圆形的木棒, 木棒下端放置于鼠笼里, 当小鼠头朝下方从木球爬至木棒上, 用秒表记录此刻的时间为 A, 当其爬至木棒最下端时, 记录此刻的时间为 B, 那么小鼠爬完整个木棒所用的时间为 C, C=A-B, 每只小鼠测试俩次, 将俩次爬杆的平均时间作为统计指标。

WHICH BEHAVIORAL TEST FOR PD MODELS?

1599

TABLE 1. Summary of behavioral tasks used with rodent models of PD

Motor test	PD models	Significant motor impairment in test?	Pharmacological reversal by dopaminergic drugs*
Rotarod	Parkin-KO mice ⁴⁹	No	NT
	DJ-1 deficient mice ⁵³	No	NT
	Nurr1 +/− (old) mice ¹¹¹	Yes	NT
	Alpha-synuclein overexpressing (young) mice ¹⁶	No	NT
	alpha-synuclein transgenic, old mice ¹⁰⁹	Yes	NT
	MPTP-treated mice ^{46, 47}	Yes	+
	MPTP-treated mice ^{8, 50, 117}	No	−
	6-OHDA-treated rats ^{44, 45}	Yes	−
	6-OHDA-treated rats with analysis of videotaped foot placements on the rod ⁴⁸	Yes	NT
Open field activity (horizontal)	Dopamine-deficient mice ¹¹⁸	Yes	+
	DJ-1-KO mice ¹¹⁰	Yes	NT
	Nurr1 +/− mice ¹¹¹	Yes	NT
	MPTP-treated mice ^{50, 75, 84}	No	NT
Rearing (vertical)	Rotenone-treated rat ¹¹⁹	Yes	+
	Aphakia mice ⁶⁶	Yes	+
	DJ-1-KO mice ¹¹⁰	Yes	NT
Limb use asymmetry (cylinder test)	Nurr1 +/− mice ¹¹¹	No	NT
	Unilateral 6-OHDA lesions ⁵⁶	Yes	+
Adjusting steps	Unilateral 6-OHDA lesions ^{55, 58, 92}	Yes	+
Beam traversal test	Aphakia mice ⁶⁶⁻⁶⁸	Yes	+
	Parkin-KO mice ⁴⁹	Yes	NT
Pole test	Alpha-synuclein overexpressing mice ¹⁶	Yes	NT
	MPTP treated mice ⁶⁵	Yes	+
Swim test	Aphakia mice ⁶⁶	Yes	+
	MPTP treated mice ⁶⁹	No	NT
Grid test	MPTP treated mice ⁷⁰	Yes	+
	MPTP/P treated mice ⁵⁰	Yes	NT
Forelimb placement test	6-OHDA treated rats ^{55, 71}	Yes	NT
	MPTP/P treated mice (reach test) ⁵⁰	Yes	NT
Adhesive removal test	Parkin-KO mice ⁴⁹	Yes	NT
	DJ-1-KO ⁴⁵	Yes	NT
	Alpha-synuclein overexpressing mice ¹⁶	Yes	NT

*+, pharmacological reversal by dopaminergic drugs; −, no reversal by dopaminergic drugs; NT, not tested.
KO, knockout; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; MPTP/P, MPTP combined with probenecid; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; NT, not tested.

(Meredith GE, et al., Mov Disord. 2006)

参考文献

1. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies[J]. Nature.1997,388(6645):839-40.
2. Gandhi S, Wood NW. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease[J]. Human molecular genetics.2005,14(18):2749-55.
3. Sherer TB, Betarbet R, Greenamyre JT. Environment, mitochondria, and Parkinson's disease[J]. The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry. 2002,8(3):192-7.
4. Jackson-Lewis V, Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. Nat Protoc. 2007;2(1):141–51.
5. Stoker TB1, Greenland JC1, editors. Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical
6. Aspects [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2018 Dec. Chapter 5.
7. <http://omim.org/entry/163890?search=SNCA&highlight=snc>
8. Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, et al. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. Neuron 2002, 34(4):521-33
9. Meredith GE, Kang UJ. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. Mov Disord. 2006;21(10):1595-1606.

3 抑郁症造模及评估方法

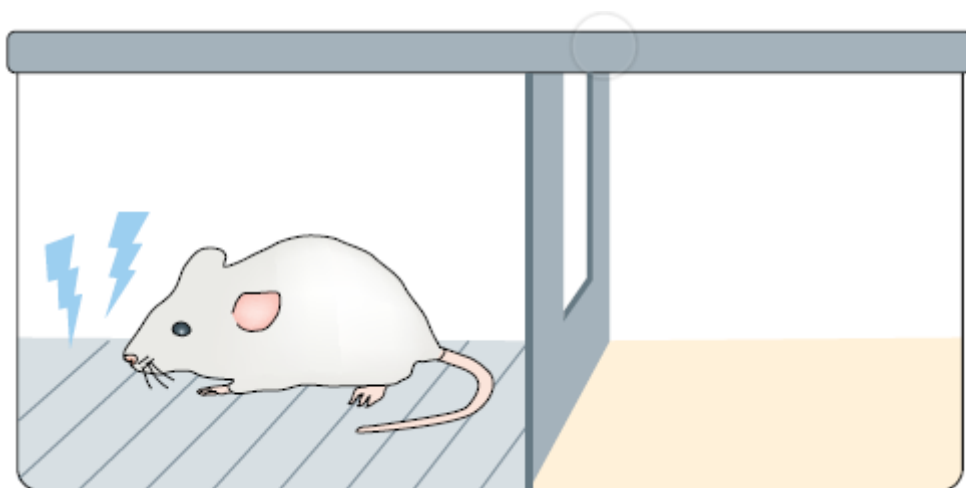
3.1 背景

抑郁症现在已经成为各个年龄段中一种越来越普遍的疾病，其主要症状是情绪低落，动力不足，兴趣和愉悦感缺失。此外，还会出现各种附加的症状，如睡眠障碍，消化系统疾病和其他身体问题，严重的甚至会出现自杀倾向。全球有超过 2.64 亿名患者，每年有近 80 万人因自杀死亡。

目前主流的研究方法是通过构建各种抑郁症样动物模型，尤其是啮齿类动物模型，去探究抑郁症的发病机理和干预治疗方法。抑郁动物模型的建立基于以下三个基本原则：表面有效性 face validity（表型类似于人类患者），结构有效性 construct validity（用来诱导动物疾病表型的机制如何很好地反映人类目前了解的疾病病因，重现导致人类病理的过程）以及预测有效性 predictive validity（衡量模型可用于预测人类疾病目前未知方面的程度）。

3.2 常见的抑郁造模方法

3.2.1 习得性无助（Learned helplessness）

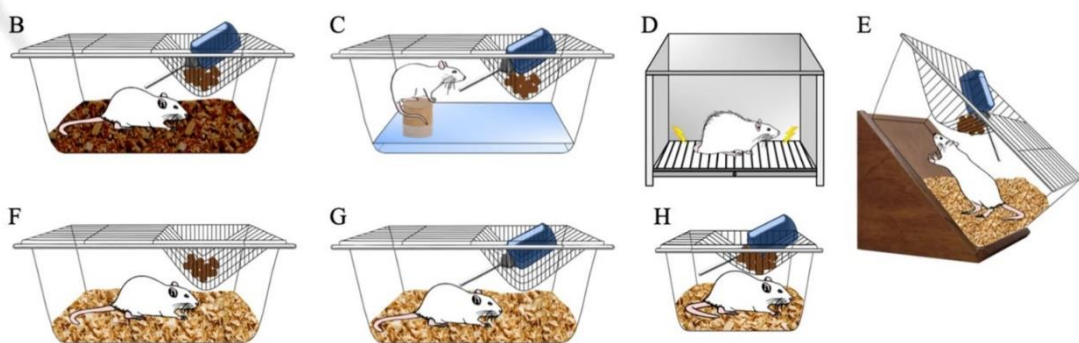


（Anand Gururajan, et al., Nat Rev Neurosci 2019）

将实验动物置于可提供电击刺激的穿梭箱内,最初给予随机的不可逃避的电刺激,经过一定次数后,再给予实验动物可以逃避的电刺激,实验动物呈现无助表现,不再逃避,因而称获得性无助。重点在于使实验动物意识到刺激的不可控并产生消极情绪。证据显示人类同样可以呈现类似表现。研究显示,实验动物出现获得性无助与去甲肾上腺素减少、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 及其 mRNA 减少、 β 钙离子/钙调素依赖的蛋白激酶 II (β -Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, β -CaMKII) 下调等相关。

Protocol: 连续两天的电击造模(每天一次,每次包含 360 次足底电击,电流强度 0.3mA, 单次足底电击持续时间 1 - 3s 随机, 每两次电击间隔 1-15s 随机,), 在电击造模结束 24 小时后, 再进行一次测试来评估 LH。试验在穿梭箱中进行, 穿梭箱设有网格地板和分隔两个隔间的门。该测试包括 30 次可避免的足部电击试验。每次试验都以 5 秒长的光刺激开始, 然后是 10 秒的电击 (0.1-0.3 mA)。试验间隔为 30 s。当老鼠在光刺激提示下穿梭于其他隔间时, 记为主动逃避。当它在电击期间来回穿梭时, 记录逃脱潜伏期视为被动逃避。当老鼠无法逃脱时, 被记为逃逸失败。只要动物进入另一个隔间, 电击就终止了。在 30 个试验中, 超过 15 个失败被定义为 LH。(Salvatore Lecca, et al., Nat Med 2016)

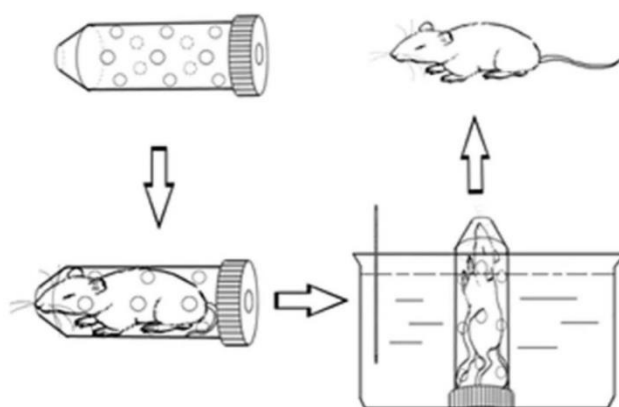
3.2.2 慢性温和压力 (chronic mild stress)



(Anand Gururajan, et al., Nat Rev Neurosci 2019)

慢性轻度应激（CMS）模型可能是最有效的抑郁症动物模型。它的目的是模拟慢性抑郁样状态，这种状态会随着时间的推移逐渐响应压力而发展，并且它们可以提供更自然的诱导。CMS 涉及在至少 2 周内使动物暴露于一系列温和且不可预测的压力源（如冷热刺激、震荡夹尾、昼夜颠倒、禁食禁水、笼伴侣的变化以及其他类似的单独无害操作）。据报道，该模型可导致行为，神经化学，神经免疫和神经内分泌学方面的长期变化类似于奖励功能的变量，包括颅内自我刺激的减少，反映出慢性慢性但非急性抗抑郁药可以逆转的快感缺乏症。值得注意的是，该 CMS 模型可用于筛选和测试潜在的抗抑郁化合物并开发新的治疗策略。对小鼠施加不规则的温和刺激，使之达到抑郁状态。

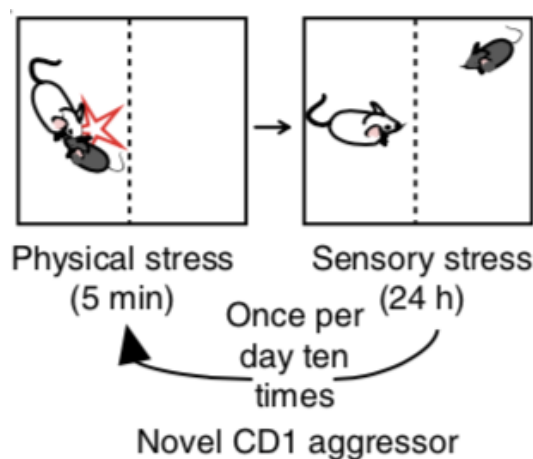
3.2.3 慢性束缚压力（chronic restraint stress）



（Anand Gururajan, et al., Nat Rev Neurosci 2019）

慢性束缚应激模型是将啮齿类动物重复地置于束缚管内，限制其行动自由一段时间而造模。最终啮齿类动物表现出快感缺失、体重减轻、饮食减少等抑郁样症状，这些均可以被抗抑郁药所改善。这种模型制作简便，作为一种非损伤性刺激，与人类的疾病过程有相似性，因此是一种常用的应激模型，实验中经常联合慢性温和应激模型造模。该模型广泛用于研究啮齿类动物不同脑区（如海马、前额叶皮质、杏仁核及伏隔核等）形态、激素水平及行为学的改变。

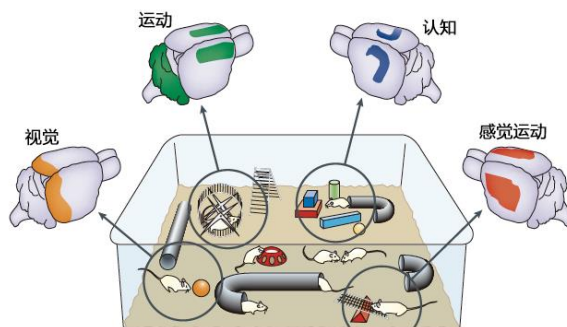
3.2.4 长期的社交失败 (chronic social defeat stress)



(Zachary S. Lorsch, et al., Nat. Neurosci. 2019)

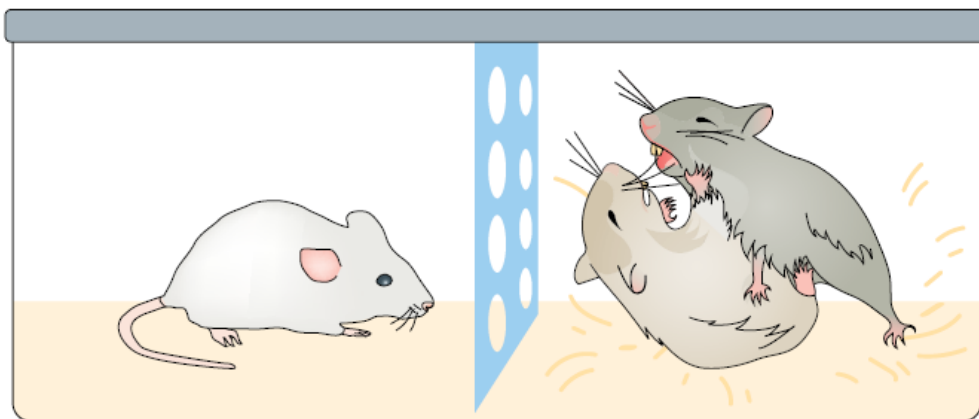
将一只体型弱小的小鼠 A 放到一只比 A 强壮一倍的小鼠 B 的窝里，让 B 疯狂攻击 A 10 分钟，然后把 A 和 B 在 B 的窝里共同饲养 24 小时，但是两只小鼠被透明的有孔玻璃板隔开。对于小鼠 A 来说，这种痛苦体验需要持续十天，而且每天面对的是不同的但一样凶残的小鼠 B。整整 10 天，可怜的小鼠 A 不仅要遭受身体上的攻击，而且还日日被恐惧感包围，因为它必须与殴打过它的 B 做邻居。这种范式就像是校园霸凌或家庭暴力的动物版。经过 10 天的刺激后，小鼠 A 不仅会躲避和 B 一个品种的小鼠，甚至会躲避跟自己一个品系的小鼠，这种行为称为社交躲避。除了这种表现，A 还会对之前钟爱的糖水失去以往的兴趣。（通常对 C57 小鼠造模时，选择 CD1 小鼠作为攻击鼠。）

3.2.5 丰富环境剥夺 (loss of enrichment)



对于小鼠来说，利用丰富环境对它的奖赏特性，首先将小鼠暴露于丰富的环境中一个月，然后将其取出并放入普通环境中。通过剥夺丰富环境，小鼠表现出增加的蔗糖消耗和体重增加，这与利用以上方法建立的小鼠模型的表现截然相反，但是却类似于非典型抑郁症患者的行为。

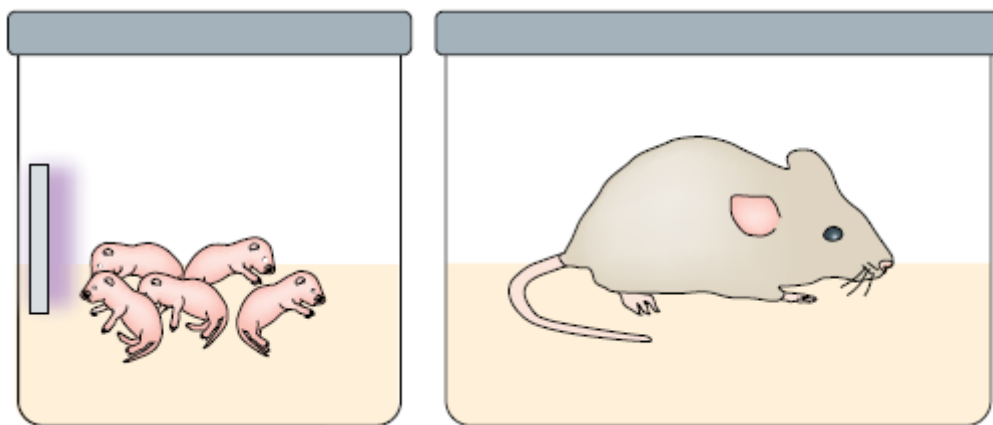
3.2.6 社交压力的传递 (social transmission of stress)



(Zachary S. Lorsch, et al., Nat. Neurosci. 2019)

在校园霸凌或家庭暴力中，遭受暴力侵害的人可不是唯一遭受心理创伤的人，与暴力行为相关而且目睹暴力行为的人也可能会留下心理伤害。而在小鼠中，这种范式也有实现的方式，将一个盒子用一个透明的玻璃板隔开，然后在盒子一侧上演社交挫败压力中描述的攻击场景，而目击小鼠就在盒子另一侧目睹整个攻击过程。用这种方法，目击小鼠就可能会表现出与被攻击者相似的社交躲避和兴致缺失的样子。

3.2.7 早期生活压力 (early life stress)



(Anand Gururajan, et al., Nat Rev Neurosci 2019)

此模型可以模拟精神疾病的发展进程。母子分离(maternal separation, MS)是在出生后一定时间将幼鼠从母亲身边分离喂养,并观察小鼠成长过程及状态。研究表明其机制可能与影响 HPA 轴响应性、皮质酮和促肾上腺皮质激素(ACTH)减少伴有糖皮质激素受体改变、诱发 5-HT 变化并下调。

3.2.8 手术造模-嗅球损伤模型(Olfactory bulbectomy model, OBX)

嗅球位于端脑前端,与边缘系统功能有关,影响行为、情绪和内分泌。大鼠切除双侧嗅球后嗅觉丧失,被动回避学习能力下降,应激反应增强,攻击行为增强,强迫游泳实验中静止时间延长。这些行为均可以被抗抑郁药逆转。模型鼠病变的机制与抑郁症患者类似。该模型的神经生化机制改变包括单胺神经递质浓度和谷氨酸受体功能。此外,也存在海马体内 BDNF 水平降低,血清皮质酮降低,炎症因子、凋亡蛋白增多及氧化损伤等现象。此模型抑郁效果明显、可靠性好,且抑郁动物的病理生理改变与人类抑郁相似,对检测抗抑郁药有较高的选择价值。常用于抗抑郁药的次筛以及作用机制研究。但对实验手术技术要求高,实验中动物死亡率较高,模型有品系差异。

3.2.9 药物诱发造模-糖皮质激素/皮质酮诱导模型(Glucocorticoid/corticosterone model)

皮质类固醇（CORT）的水平失调是压力的有力指标。CORT 不仅可以作为诊断工具，而且可以通过合成激素皮质酮在药理上操纵它来引起动物的焦虑抑郁状态。在多次重复 CORT 给药的动物中，强迫游泳和悬尾测试中不动时间更长，蔗糖的偏好性更低，其机制或与改变 miRNA 有关。

3.2.10 遗传型造模

遗传型抑郁动物模型所使用的动物来自于自然突变或近交系，脑内机制与抑郁患者相似，对抗抑郁药的反应更为良好。

1) Flinders sensitive line (FSL) 大鼠模型

最初选择性培育 FSL 大鼠是为了得到抗胆碱酯酶个体，后发现 FSL 大鼠表现出类似于人类抑郁样症状，还发生了食欲及精神运动功能减退等行为学方面的改变，昼夜节律出现异常，五羟色胺、多巴胺、胆碱能及神经肽 Y 均发生改变，但 HPA 轴、 γ -氨基丁酸水平及认知功能正常。此模型大鼠和抑郁症患者的行为学表现、神经化学和药理学机制类似，是一种非常有效的检测抗抑郁药的动物模型。

2) Wistar-Kyoto strain (WKY) 大鼠模型

该品系大鼠源自自发性高血压大鼠，后来表现出和抑郁症患者类似的激素水平、行为学及生理学的异常，故被作为一种遗传型的抑郁症模型。动物在强迫游泳试验中静止时间长而稳定，出现社交回避症状，HPA 轴功能亢进，血清皮质酮增多。该品系大鼠中缝背核及前额叶皮质的五羟色胺水平出现了与抑郁症患者类似的异常，海马体积减少，脑与血清的 BDNF 含量较低，对 SSRIs 类抗抑郁药不敏感。

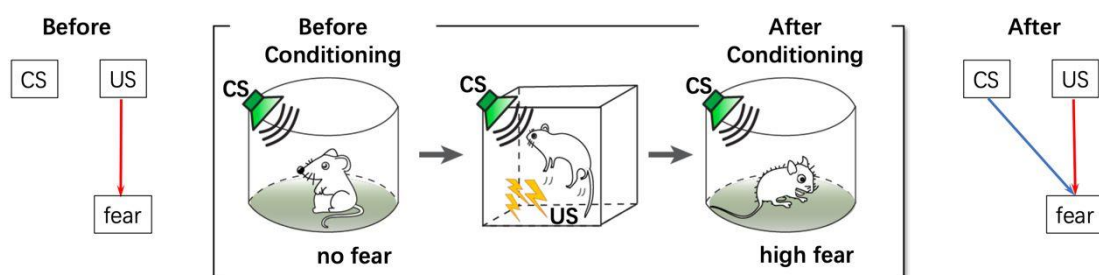
3.2.11 转基因模型

Tph1/Tph2 转基因鼠, 通过色氨酸羟化酶 (tryptophan hydroxylase, TPH) 降低 5-HT 水平, 悬尾实验 TST 中的不动时间增加, 产生抑郁表现。Vmat1 和 Vmat2 转基因鼠, 改变囊状单胺转运蛋白使脑内 5-HT 减少。

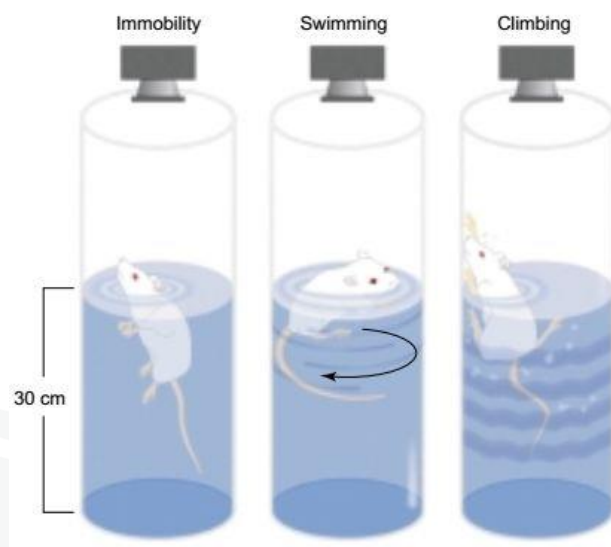
3.3 行为学评估方法

抑郁的监测和评价指标主要通过评价实验动物在情绪和认知、绝望行为、焦虑症状、快感缺乏等方面的表现。以下介绍一些常用评价指标。

3.3.1 条件性恐惧 (Fear conditioning)



实验将小鼠置于训练箱内, 应用约 55dB 的噪声匹配中等亮度的灯光进行刺激, 使小鼠将恐惧与灯光相联系, 表现出相应恐惧行为, 并可用心率等生理学指标进行监测。相较于对照组, 抑郁小鼠的恐惧表现较轻。这一方法可用来衡量实验动物的恐惧反应、记忆力和焦虑表现。



3.3.2 强迫游泳实验 (Forced swim test, FST)

实验基于小鼠天生厌恶游泳的特点，将小鼠放入局限且不可逃避的压迫环境，正常状态下，小鼠将通过游泳在水中寻找逃生路径，设计出行为无助情境，以衡量小鼠的抑郁样行为。在实验中，将小鼠放入水中强迫游泳 6 至 10 分钟，通过记录：1) 不动时间：即小鼠在水中停止挣扎，仅将头露出水面漂浮的时间；2) 游泳时间：即小鼠四肢划动、拍打及俯冲时间；3) 攀爬时间：小鼠抓爬玻璃缸壁的时间。一段时间后，抑郁样小鼠将表现为停止游泳，漂浮在水面上，表现为“放弃寻找逃生径”的“behavioral despair”行为绝望。

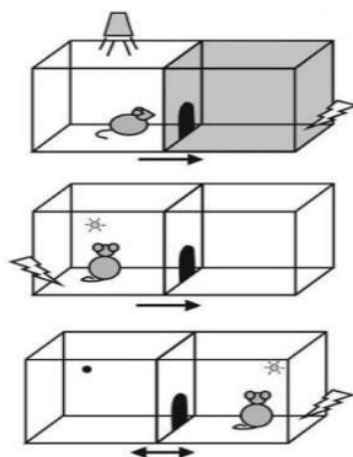
3.3.3 悬尾实验 (Tail suspension test, TST)



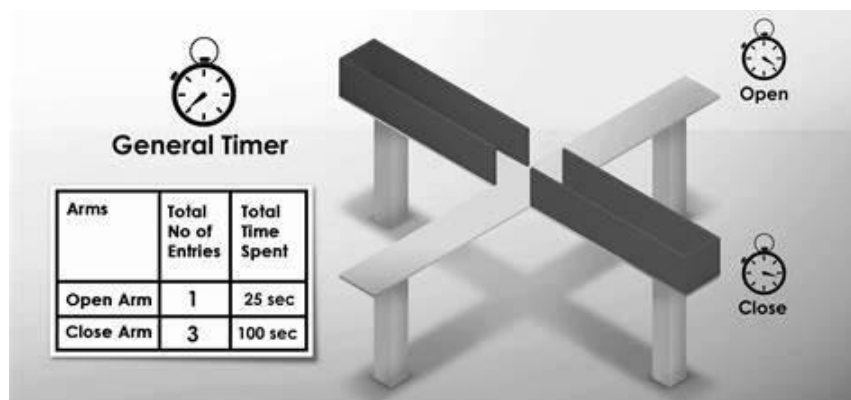
该实验将小鼠从尾部悬起倒挂在离地近 10cm 的箱中 5-10 分钟，使小鼠无法接触地面。通过监控观察并记录小鼠放弃挣扎并保持不动状态的时间。在悬尾试验与强迫游泳实验中小鼠所表现出的 Immobility（不动）状态，被研究者们视作实验动物不想为逃跑做出任何努力而表现出的绝望行为并记录静止不动时间。

3.3.4 电击逃避(Shock avoidance)

实验单向出口装置内,通过电极刺激鼠尾或电网刺激鼠爪,促使小鼠穿过装置逃离刺激。刺激方法为 5s 内随机间隔 100 次 0.6mA 电击,记录小鼠逃离装置时间。对照组可立即逃离或<5s,抑郁小鼠可达 10~19s,重度抑郁的可达 20~30s。

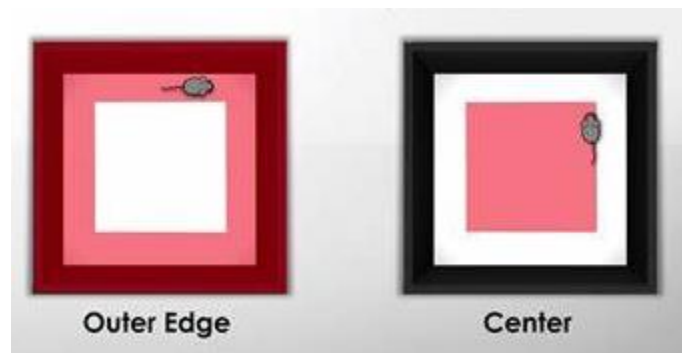


3.3.5 高架迷宫(Elevated plus maze, EPM)



EPM 实验是在高架 Y 型迷宫的基础上发展而来的。EPM 由开臂 (open arms) 和闭臂 (closed arms) 各两条组成,呈十字形交叉,交接部分为中央区,距地面有一定高度。其原理是由于面对新事物开臂小鼠会产生好奇心去探究,而它们有嗜暗的天性 (闭臂),两者之间发生探究与回避的冲突行为,产生焦虑心理。整个迷宫距离地面的高度相当于人类站在悬崖边,易导致动物产生恐惧不安的心理。可以通过对比小鼠在开臂和闭臂内的滞留时间和路程来评价小鼠的焦虑行为。

3.3.6 旷场实验 (Open field test, OFT)



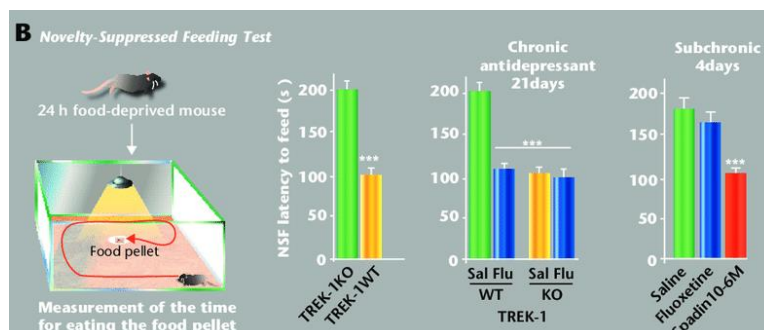
旷场实验主要用来观察实验动物的自主运动能力、对新异环境的探索行为、紧张度、躁狂、焦虑以及抑郁行为。例如动物对新开阔环境的恐惧而主要在周边区域活动，在中央区域活动较少，但动物的探究特性又促使其产生在中央区域活动的动机。

3.3.7 糖水偏好实验 (Sucrose preference test)

同时给予小鼠水和适当浓度糖水，记录小鼠对二者摄取量，记录基线摄取量，造模后再次监测并记录。相较于对照组，抑郁小鼠呈现对糖水的偏好程度下降或无偏好。



3.3.8 新奇抑制摄食实验 (Novelty-suppressed feeding test)



该实验通过测量禁食小鼠在新环境中接近和食用食物的潜伏期，以进行抑郁相关评估。方法为小鼠禁食（不禁水）24h 后，背对食物放进测试场，计算小鼠开始食用食物的潜伏期。

对于上述实验,需注意实验次数及频率。此外,还可以不断监测小鼠体重变化,也可以一定程度上反映小鼠的精神状态。

参考文献

1. Anand Gururajan, et al. The future of rodent models in depression research. Nat. Rev. Neurosci. 20, 686-701 (2019).
2. Ignas Cerniauskas et al. Chronic Stress Induces Activity, Synaptic, and Transcriptional Remodeling of the Lateral Habenula Associated with Deficits in Motivated Behaviors. Neuron 104, 899-915 (2019).
3. Scott J Russo, et al. Neurobiology of resilience. Nat. Neurosci. Rev. 15, 1475-1484 (2012).
4. Shuichi Chiba, et al. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 39, 112-119 (2012).
5. Zachary S. Lorsch, et al. Stress resilience is promoted by a Zfp189-driven transcriptional network in prefrontal cortex. Nat. Neurosci. 22, 1413-1423 (2019).
6. Fang Zhang, et al. The caspase-1 inhibitor AC-YVAD-CMK attenuates acute gastric injury in mice: involvement of silencing NLRP3 inflammasome activities. Scientific Reports 6, 24166 (2016).
7. 7.A.Sequeira-Cordero, et al.Behavioural characterisation of chronic unpredictable stress based on ethologically relevant paradigms in rats. Scientific Reports 9, 17403 (2019).
8. Wang, Qingzhong et al. The recent progress in animal models of depression. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry vol. 77 (2017): 99-109.
9. Lecca, Salvatore et al. Rescue of GABAB and GIRK function in the lateral habenula by protein phosphatase 2A inhibition ameliorates depression-like phenotypes in mice. Nature medicine vol. 22,3 (2016): 254-61.

4 PTSD 造模与评估方法

4.1 背景

创伤应激障碍（PTSD）：指个体经历、目睹或遭遇到一个或多个强烈的精神创伤性事件后出现并持续存在的精神障碍，给健康和创伤事件发生后的生活重建，造成很大的困难与阻碍，是一种严重损害劳动能力的精神疾病。PTSD 患者常常伴发“噩梦”惊醒。

临床表征：反复重现闯入性创伤体验；对类似创伤的情境或线索持续回避；负面心境及情绪淡漠；高警觉和焦虑。

动物的生存依赖于将预警信号和危险联系起来，对预警信号形成恐惧记忆，以便提前做出反应。当预警信号不再与危险相关时，动物逐渐解除这种联系，逐渐消退恐惧记忆，以适应新的生存环境。恐惧记忆消退缺陷被认为和人类创伤后应激障碍（PTSD）等精神障碍有紧密关系。目前关于动物恐惧记忆的研究主要集中在杏仁核及其相关脑区。

4.2 常见的造模方法

4.2.1 足底电击

足底电击常被用于构建焦虑、抑郁和创伤后应激障碍的动物模型。将动物放置于带不锈钢格栅地板的电击箱内，通过不可避免和不可预测的足底电击方式给予刺激。电流强度（1.0–3.0 mA）与持续时间（2–20 秒），以诱发持续症状。通过再次暴露于休克室和条件刺激，电击可能与上下文和/或暗示的创伤提示（联想恐惧）相结合，并与新环境中的中性刺激相结合（非联想恐惧）。在应激强化的恐惧学习中，在 A 环境中反复受到强烈的足底电击之前，当只有一次较弱的应激源刺激时，在 B 环境中啮齿类动物的恐惧反应增加了。即使在 A 环境消退训练之后，这种非相关性敏化效应也会使 B 环境中的僵直反应持续 3 个月。

足底电击作为创伤后应激障碍模型的优势在于其可控制的输出和电击参数（电流强度、持续时间、次数和刺激间期），可重复的上下文和线索，可调节的环境线索，以及可减少的应激习惯。

4.2.2 束缚/固定压力应激

束缚和固定包括将啮齿动物限制在封闭的室内，以限制其在一段时间内的活动。束缚应激通常是通过将动物置于有机玻璃或离心管中来进行的。固定压力应激是通过将动物放入啮齿动物固定袋或将动物的四肢和头部以俯卧姿势固定在木板上来实现的。相对而言，固定压力应激对于动物的活动限制强于束缚的应激方式，会引起动物更加强烈的反应。

4.2.3 水下创伤（Underwater trauma）

水下创伤模型是一种动物短暂暴露于高强度压力的模型，大鼠连续 4 天强制在水迷宫中游泳 5min，在第四次游泳后用专用金属网（20cm*10cm*15cm）将动物浸入水下 45s。暴露的大鼠表现出即时和持续性（应激后 7-30 天）增强的听觉惊吓反应（ASR）和高架十字迷宫（EPM）中的焦虑样行为。应激后 7 天血浆中皮质酮（CORT）水平下降，表明创伤后 HPA 轴信号持续降低。水下创伤作为创伤后应激障碍模型的优点是其可重现的背景和行为学相关的压力。

4.2.4 连续单一刺激（single prolonged stress paradigm, SPS）

是一种多模式创伤应激暴露协议，包括连续暴露于三个应激源（2 小时的约束，20 分钟的强迫游泳，暴露于乙醚直到失去意识）。该方案最初设计的目的是通过三种不同的途径——心理（抑制）、生理（强迫组团游泳）和药物（乙醚）来引起强大的应激反应。

暴露 7 天后或再次接触 SPS 观察到大多数的行为和细胞层面的变化，表明时间依赖性和经验依赖性敏化。与创伤后应激障碍患者的研究结果一致，应激后一天，海马、杏仁核和前额叶皮质出现神经元凋亡和自噬失调，表明形态学改变先于行为改变。PTSD 表型需要三种应激源的结合，因为任何两种应激源的结合并不会引起 SPS 范式中观察到的所有效应。SPS 作为创伤后应激障碍模型的一个优势是它将应激源组合起来产生协同效应。

4.2.5 社交失败压力（Social defeat stress, SDS）

SDS 常被用于啮齿类动物的抑郁和创伤后应激障碍模型。SDS 有三种变体：居住者-入侵者（resident-intruder），社会失败压力（创伤见证或替代社会失败），笼子

中的居民-入侵者。而在居民-入侵者范例中，实验啮齿动物(入侵者)每天暴露(5-10天;每天5-10分钟)对一个新的优势同种(居住者)，亲眼目睹的社会失败应激是由每天不可逃避的感官接触与经历身体社会失败的新啮齿动物引起的。在这两个过程中，通过与居住者24小时的感官(视觉、嗅觉和听觉)接触，通过穿孔屏幕分隔，从属关系可能会得到加强。笼中居住者-入侵者模式将啮齿动物引入与新居住者的感官接触，持续6小时，包括1到3个1分钟不可预知的身体接触时间。由于领地是在足够的生活空间中建立起来的，并且在有性伴侣和性经历的情况下增强，侵入者要么被介绍给一个单独居住的居住者，要么取代住在笼子里的同居伴侣。

4.2.6 捕食者应激 (Predator stress)

将啮齿类动物暴露于与物种相关的捕食者或它们的气味中。应激源的变化包括捕食者暴露应激、捕食者心理社会应激(predator-based psychosocial stress, PPS)和捕食者气味应激(predator scent stress, PSS)。

在捕食者暴露应激 PPS 模型中，啮齿动物在不可逃避的暴露环境中适应5分钟，然后在无保护/保护(笼中)的猫或雪貂下暴露5-60分钟。PPS模型由急性和慢性成分组成，结合了第一天(光照周期)和第11天新猫暴露期间1小时的急性固定(在黑暗周期期间)，与31天长期不稳定的居住条件产生风险因素协同效应。

PSS模型包括不可避免地暴露于狐狸/山猫的尿液、脏猫砂、雪貂布或三甲基噻唑啉(一种从狐狸粪便中分离出来的合成化合物)中5至15分钟。

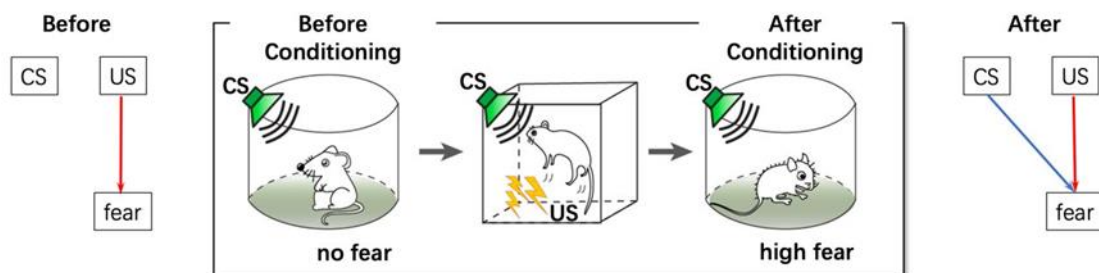
4.2.7 早期生活压力 (early life stress, ELS)

ELS(例如儿童时期虐待或忽视)会使成年后遭受创伤发展为PTSD的风险明显增加。ELS主要以母子分离(maternal separation, MS)为主要模型，是在出生后第1-10d将幼鼠与母亲每天分开数小时，然后在幼崽成年期再次暴露于压力源，观察其行为学等改变。ELS会引起空间记忆受损，焦虑和恐惧反应增加，持续性HPA轴功能障碍等。ELS模型主要基于幼儿时期生活中的不良事件对成年后遭受

创伤发展成为 PTSD 的易感性研究，是研究青少年创伤对 PTSD 影响的重要模型之一。

4.3 行为学评估方法

4.3.1 条件恐惧和恐惧记忆消退 (fear conditioning / fear extinction)



研究恐惧记忆的经典方法是基于巴甫洛夫条件反射所建立的恐惧条件化范式 (fear conditioning paradigm)。恐惧记忆的获取依赖条件刺激 (conditioned stimuli, CS) 和厌恶刺激 (aversive stimuli) 的联结。其中，条件刺激指不会对被试对象引起情绪反应的普通刺激。大部分 CS 都是视觉刺激，如不同颜色的灯光和几何

形状、中性面孔、动物图片等。另外，声音刺激、触觉刺激、嗅觉刺激、味觉刺激也得到广泛使用。在虚拟现实的研究中，场景线索也可以作为条件刺激呈现。厌恶性刺激又称为非条件化刺激 (unconditioned stimuli, US)，通常会直接对机体产生威胁并能够引发机体的内生性防御反应，即非条件化反应

(unconditioned response, UR)，包括电击、刺耳的噪音、咽喉吹气、难闻的气味等。

A	Day 1			Day 2		Day 3		
	CFC			Extinction Training		Extinction Retrieval		
Mouse group	CFC			Extinction Training		Extinction Retrieval		
Extinction	CS + US			CS		CS		
NonExt (CFC)	CS + US			HC		CS		
NonShock	CS			CS		CS		

经典的恐惧记忆范式通常包含恐惧记忆习得、消退、消退测试三个阶段。习得期间，一种或多种不带情绪色彩的中性刺激（neutral stimuli）作为条件刺激反复呈现给实验对象。通常，在其中一或两种 CS 之后（通常是随机选取的）会伴随 US 的出现（如足底电刺激）。匹配负性刺激的 CS 被称为 CS+，而总不伴随厌恶刺激的 CS 则称为 CS-。当被试反复学习条件刺激和非条件刺激的联结后，单独呈现 CS+也能诱发与 US 匹配时类似的恐惧反应，而 CS-则不能引起相同反应，即被试对象成功习得了对 CS+的恐惧记忆。

消退训练通常在恐惧记忆习得后立即（即时消退）或 24 h 后进行（延迟消退）。消退阶段的材料呈现通常与习得阶段相同，但所有的条件刺激 CS 都不再匹配厌恶刺激 US；在消退测试阶段，向实验对象呈现所有实验材料，以探测个体对 CS+和 CS-的消退效果。然而，常规的消退方法常常会使恐惧发生不同程度的恢复。恐惧恢复可能发生于以下 3 种情况：随着时间的推移，恐惧产生自发恢复（spontaneous recovery）；单独呈现厌恶刺激时恐惧发生恢复，称为恐惧重建（reinstatement）；或当个体重新回到条件化的场景中时，恐惧再次出现，称为恐惧的续新（renewal）。

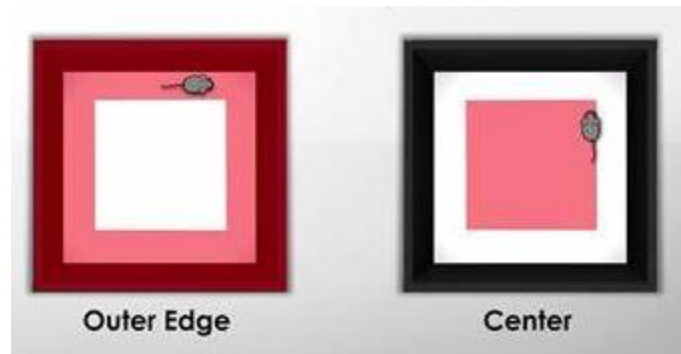
4.3.2 黑白箱（light-dark box, LDB）



在明暗箱中，啮齿类动物喜欢在暗箱活动，但动物的探究习性促使其试图去探究明箱。然而，明箱的亮光刺激又抑制动物在明箱的探究活动。焦虑的动物在明箱的活动时间明显减少。

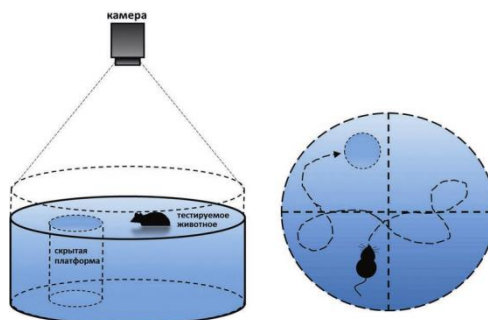
通过记录动物穿箱次数；明箱停留时间、停留时间百分比等指标来评估动物的焦虑状况。

4.3.3 旷场实验 (Open field test, OFT)



旷场实验主要用来观察实验动物的自主运动能力、对新异环境的探索行为、紧张度、躁狂、焦虑以及抑郁行为。例如动物对新开阔环境的恐惧而主要在周边区域活动，在中央区域活动较少，但动物的探究特性又促使其产生在中央区域活动的动机。

4.3.4 水迷宫 (Morris water maze, MWM)



水迷宫实验是一种强迫实验动物（大鼠、小鼠）游泳，学习寻找隐藏在水中平台的一种实验，Morris 水迷宫主要用于测试实验动物对空间位置感和方向感（空间定位）的学习记忆能力，被广泛应用于学习记忆、老年痴呆、海马/外海马研究、智力与衰老、新药开发/筛选/评价、等领域。

分为获得性训练、探查和对位训练 3 个过程:

获得性训练 (Acquisition phase) 理论上将水池分为 4 个象限, 平台置于其中一个象限区的中央。

(1) 将动物 (大鼠或小鼠) 头朝池壁放入水中, 放入位置随机取东、西、南、北四个起始位置之一。记录动物找到水下平台的时间 (s)。在前几次训练中, 如果这个时间超过 60s, 则引导动物到平台。让动物在平台上停留 10s。

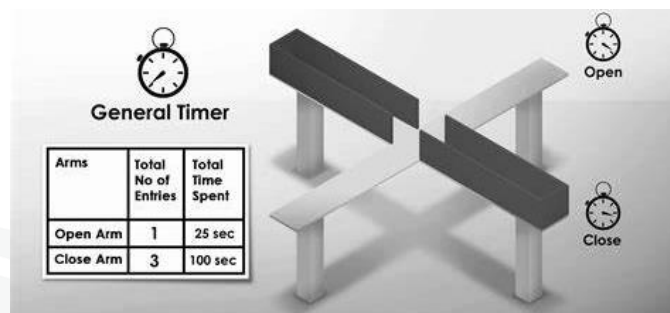
(2) 将动物移开、擦干。必要时将动物 (尤其是大鼠) 放在 150W 的白炽灯下烤 5min, 放回笼内。每只动物每天训练 4 次, 两次训练之间间隔 15~20min, 连续训练 5d。

探查训练 (probe trial 1) 最后一次获得性训练结束后的第二天, 将平台撤除, 开始 60s 的探查训练。将动物由原先平台象限的对侧放入水中。记录动物在目标象限 (原先放置平台的象限) 所花的时间和进入该象限的次数, 以此作为空间记忆的检测指标。

对位训练 (reveral phase) 测定动物的工作记忆 (working memory)。探查训练结束后的第二天, 开始维持 4 天的对位训练。将平台放在原先平台所在象限的对侧象限, 方法与获得性训练相同。每天训练 4 次。每次记录找到平台的时间和游泳距离以及游泳速度。

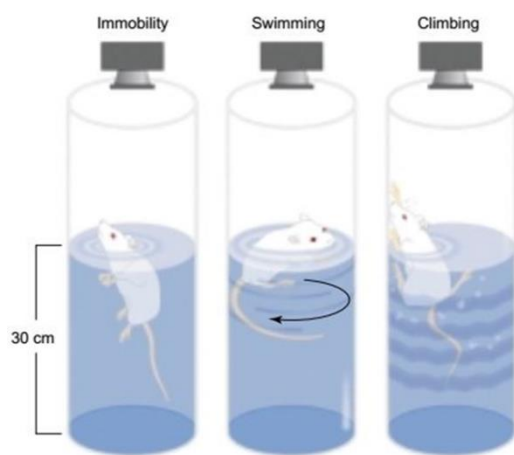
对位探查训练 (probe trial 2) 最后一次对位训练的第二天进行。方法与上述探查训练类似。记录动物 60s 内动物在目标象限 (平台第二次所在区) 所花时间和进入该区的次数。

4.3.5 高架迷宫 (Elevated plus maze, EPM)



EPM 实验是在高架 Y 型迷宫的基础上发展而来的。EPM 由开臂（open arms）和闭臂（closed arms）各两条组成，呈十字形交叉，交接部分为中央区，距地面有一定高度。其原理是由于面对新事物开臂小鼠会产生好奇心去探究，而它们有嗜暗的天性（闭臂），两者之间发生探究与回避的冲突行为，产生焦虑心理。整个迷宫距离地面的高度相当于人类站在悬崖边，易导致动物产生恐惧不安的心理。可以通过对比小鼠在开臂和闭臂内的滞留时间和路程来评价小鼠的焦虑行为。

4.3.6 强迫游泳实验 (Forced swim test, FST)



实验基于小鼠天生厌恶游泳的特点，将小鼠放入局限且不可逃避的压迫环境，正常状态下，小鼠将通过游泳在水中寻找逃生路径，设计出行为无助情境，以衡量小鼠的抑郁样行为。在实验中，将小鼠放入水中强迫游泳 6 至 10 分钟，通过记录：1）不动时间：即小鼠在水中停止挣扎，仅将头露出水面漂浮的时间；2）游泳时间：即小鼠四肢划动、拍打及俯冲时间；3）攀爬时间：小鼠抓爬玻璃缸壁的时间。一段时间后，抑郁样小鼠将表现为停止游泳，漂浮在水面上，表现为“放弃寻找逃生径”的“behavioral despair”行为绝望。

参考文献

1. Verbitsky, A., Dopfel, D., & Zhang, N. (2020). Rodent models of post-traumatic stress disorder: behavioral assessment. *Translational psychiatry*, 10(1), 132.
2. Pitman, R. K., Rasmusson, A. M., Koenen, K. C., Shin, L. M., Orr, S. P., Gilbertson, M. W., Milad, M. R., & Liberzon, I. (2012). Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(11), 769–787.
3. Yehuda, R., Hoge, C. W., McFarlane, A. C., Vermetten, E., Lanius, R. A., Nievergelt, C. M., Hobfoll, S. E., Koenen, K. C., Neylan, T. C., & Hyman, S. E. (2015). Post-traumatic stress disorder. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15057.
4. Lisieski, M. J., Eagle, A. L., Conti, A. C., Liberzon, I., & Perrine, S. A. (2018). Single-Prolonged Stress: A Review of Two Decades of Progress in a Rodent Model of Post-traumatic Stress Disorder. *Frontiers in psychiatry*, 9, 196.
5. Abdallah, C. G., Averill, L. A., Akiki, T. J., Raza, M., Averill, C. L., Goma, H., Adikey, A., & Krystal, J. H. (2019). The Neurobiology and Pharmacotherapy of Posttraumatic Stress Disorder. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 59, 171–189.
6. 安献丽;郑希耕. (2008). 创伤后应激障碍的动物模型及其神经生物学机制. *心理科学进展*, 16(03), 371-377.
7. 孙浩然,徐艳玲,李长江,连波,王艳郁,孙琳.创伤后应激障碍的啮齿类动物模型研究进展[J].*中国实验动物学报*,2020,28(02):254-259.
8. 夏文然,陈思,王亮.条件化恐惧记忆消退的神经振荡机制[J].*生物化学与生物物理进展*,2019,46(03):276-286.

5 自闭症造模与评估方法

5.1 背景

自闭症谱系障碍是一种高度异质性神经发育障碍性疾病，近年来其患病率不断升高，但该病的病因及发病机制尚不清楚，从动物模型出发探索其病因和发病机制是必然趋势。在此 brainnews 编辑部总结了国内外常用的自闭症啮齿动物模型。

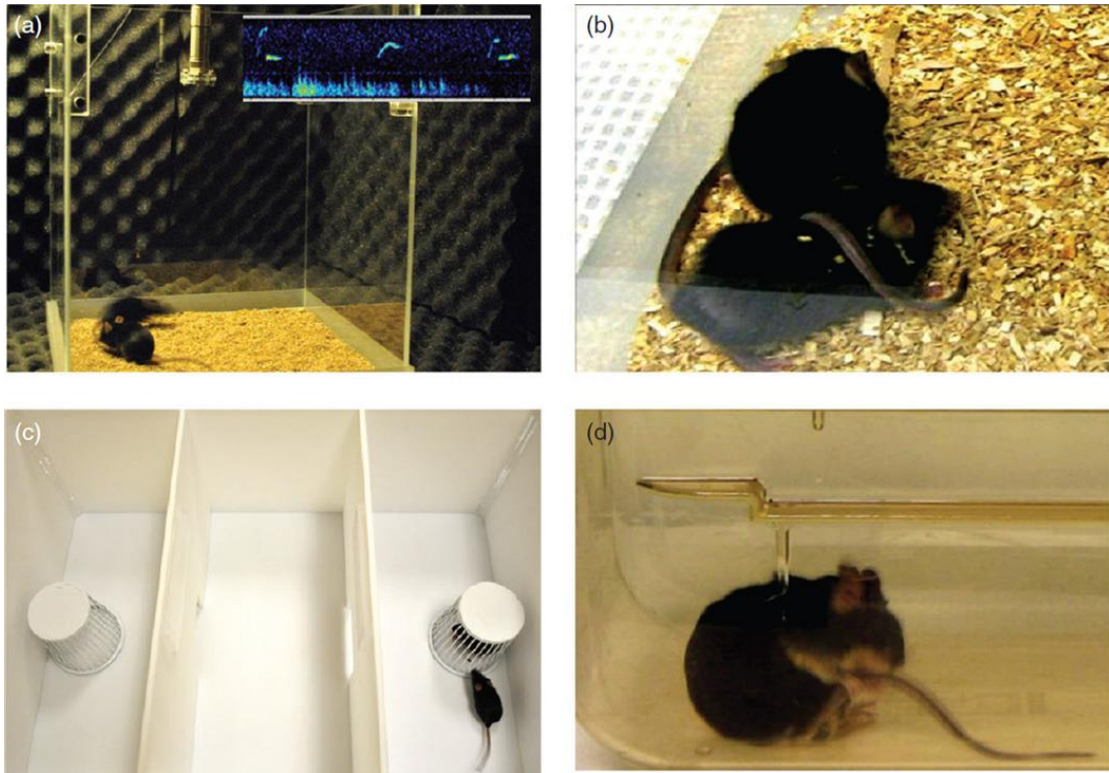
5.2 自闭症动物模型

5.2.1 基因遗传小鼠模型

1) Cntnap2 基因敲除小鼠

CNTNAP2 基因位于 7 号染色体上，编码 CASPR2 (CONTACTIN-ASSOCIATED PROTEIN 2) 蛋白，主要以细胞粘附分子和受体的形式在脊椎动物的神经系统中发挥功能。Cntnap2 KO 小鼠表现出社交互动减少，重复行为增多，以及青少年的超声波发声减少等自闭症样行为。

除了 ASD 相关行为的这些缺陷外，Cntnap2 ^{-/-} 小鼠还表现出异常的神经元皮层迁移，皮层中的异步神经元放电，抑制性中枢神经元数量减少，过度活跃和癫痫发作。



(Kazdoba TM, Leach PT, Crawley JN. Behavioral phenotypes of genetic mouse models of autism. Genes Brain Behav. 2016)

2) Neuroligins(NLGNs)相关的 ASD 模型

Neuroligins 是位于突触后膜上的细胞粘附分子，与突触前的伴侣蛋白 neurexins 相互作用，通过影响突触形成来促进突触神经传递。一些研究表明，Neuroligin 参与突触的调节和规范，而不是突触的形成。在已知的人体内表达的 5 种 NLGN 基因中（NLGN1、NLGN2、NLGN3、NLGN 4X 及 NLGN 4Y），NLGN3 和 NLGN4 与 ASD 症状关系最为密切。在连锁和先证者案例研究中使用氨基酸测序，已经在自闭症患者中发现了 NLGN3 和 NLGN4 序列的缺失和移码。Neuroligin-3 敲入（R451C）小鼠，在 451 位点用精氨酸替换半胱氨酸。NLGN3 基因敲入主要影响 GABA 抑制性突触的功能而导致脑内递质水平的失衡及脑发育紊乱。NLGN3KI（即基因敲入）小鼠增强抑制性突触传递，并伴随着社会交往缺陷和空间学习能力增强。

NLGN3 KO 小鼠表现出正常的社交能力，但在恐惧调节和嗅觉方面存在缺陷，以及过度活跃和总脑容量减少。Nlgn4 KO 小鼠表现出 ASD 核心症状中的社

会交往和社会交流障碍两种异常行为,但没有发现重复的行为和其他 ASD 临床症状。

3) Neurexin 相关的 ASD 模型

Neurexins 是一类细胞黏附蛋白,发现于突触的突触前末端,编码 α 和 β 神经毒素,与 Neuroligin 结合,在突触的黏附、分化和成熟中具有重要作用。许多关联研究已经确定了位于染色体 2 上的 NRXN1 基因在智力残疾和其他综合征中的突变,包括几个自闭症病例。Neurexin-1 α KO 小鼠表现出更多的梳理,减少的运动活动和增加的攻击性。

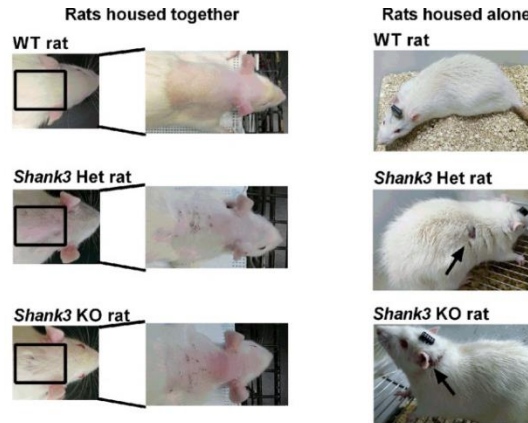
4) Shanks 相关的 ASD 模型

Shanks 是一类突触后密度蛋白,可同多种离子型和代谢型谷氨酸受体相互作用,并与肌动蛋白细胞骨架相联系。Shank3 的突变与 ASD 和 Phelan-McDermid 综合征有关,其特征包括全脑发育迟缓、智力残疾、言语延迟或缺失和轻微畸形等特征。

目前已构建了多种针对 Shank3 的多种动物模型,Shank3 正在成为 ASD 研究的热点基因。每种 Shank3 亚型都产生了突变小鼠,Shank3 基因的各个区域都缺失,其中一些表现出社会性缺陷,而其他的表现出正常的社会性。社交能力降低、超声波发声减少和重复自我梳理频率高,社交能力降低、超声波发声减少和高水平的重复自我修饰取决于哪种异构体被删除。

5) 其他

除上述基因相关的模型外,国内外报道尚有 methyl-CpG-binding protein2 (MECP2) 基因模型、fragile X mental retardation1 gene (FMR1) 基因模型、tuberous sclerosis complex 1/2 (TSC1/2) 基因模型等,这些基因均是在 ASD 临床个体中发现并经基因敲除动物模型验证,是对 ASD 的基因遗传性的有力佐证,也是研究基因靶点调控的重点基因。



(Altered Behaviors and Impaired Synaptic Function in a Novel Rat Model With a Complete Shank3 Deletion. Front Cell Neurosci. 2019)

5.3 特发性动物模型

5.3.1 BTBRT+ tf / J 小鼠模型

BTBRT+Itpr3tf/J (BTBR)近交系小鼠是目前公认的最具 ASD 核心临床特征且能够稳定子代复制的动物模型,通过改变 C57BL/6J(C57)小鼠 Disc1、Itpr3、T+ 3 个基因得到。

在行为学实验中 BTBRT+ tf / J 小鼠主要表现出交互性社交行为减少、发声能力降低和高度刻板重复的自我理毛行为,这与人类的 ASD 核心症状极为类似。此外, BTBR 小鼠的一个重要的解剖学特点是脑胼胝体缺失,海马连合减少。BTBR 小鼠的一些行为特点与 ASD 一致,最突出的是其解剖特点与许多 ASD 胼胝体的研究一致。

5.3.2 BALB /cByJ 小鼠模型

BALB /cByJ 是另一种近交小鼠品系,与具有高社交性的近交小鼠品系例如 C57BL /6J 和 FVB /NJ 小鼠相比,显著表现出社交障碍和刻板行为。影像学上, BALB /cByJ 小鼠亦表现出胼胝体体积的缩小。BALB /cByJ 小鼠需特定的

对照组，且不能完全呈现 ASD 的全部典型临床症状，目前研究和应用相对较少。

5.4 环境因素诱导的模型

5.4.1 丙戊酸 (valproic acid, VPA)

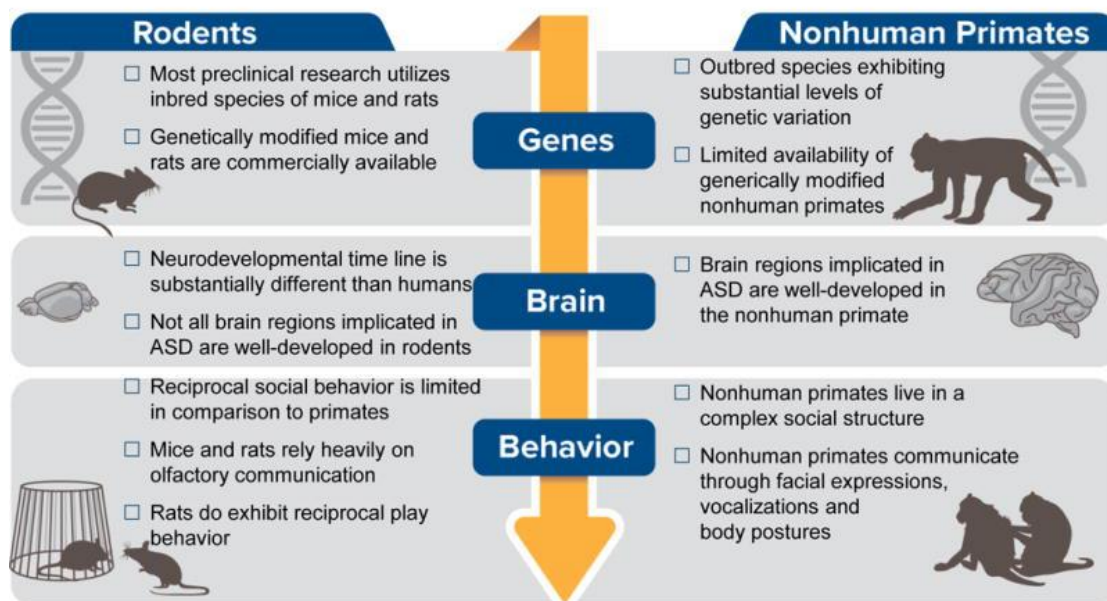
VPA 是一种常用的抗癫痫药物，也用于治疗双相情感障碍和神经性疼痛，主要通过调节 γ -氨基丁酸的浓度减低神经元的兴奋性而发挥药效。研究发现，早期妊娠阶段服用 VPA 后其子代存在较高的罹患 ASD 的风险。在动物实验中，研究者通过母鼠孕期 VPA 暴露模拟出新生鼠的典型 ASD 模型，表现出刻板、重复行为增加、对疼痛敏感性减低探索性活动减少、社会交流行为减少等典型行为异常，该模型也是国内报道较多的动物模型。

5.4.2 母体免疫激活 (maternal immune activation, MIA) 模型

流行病学研究证实孕期尤其是孕前 3 月内的感染是后代发生 ASD 的一个重要危险因素。据此，研究者将孕期母鼠暴露于多核糖核苷酸—多聚胞苷酸 (I:C) (polyriboinosinic-polyribocytidylic acid, Poly IC)、脂多糖、模拟病毒、细菌感染等环境，激活母体免疫系统，诱导 MIA 模型。研究发现，MIA 动物模型的后代所表现的行为特点与 ASD 的核心症状相似：社交能力的降低以及行为学实验中高度重复刻板的理毛和挖掘行为（埋珠实验）。

5.5 非人灵长类动物模型

Preclinical Models of ASD



(Bauman MD, Schumann CM. Advances in nonhuman primate models of autism: Integrating neuroscience and behavior. Exp Neurol. 2018)

5.5.1 遗传模型

尽管目前有大量针对 ASD 相关基因的转基因小鼠模型,但对特定基因突变如何导致一系列分子异常,神经回路改变以及最终行为发展改变的了解仍然很少。基因修饰工具的最新进展也使探索与人类更紧密相关的物种中 ASD 的遗传风险因素成为可能。与 ASD 相关的基因,例如 MECP2 和 SHANK3,已被靶向产生 ASD 的非人类灵长类动物模型。

甲基 CpG 结合蛋白 2 (MeCP2) 在转录调控和 microRNA 加工中具有关键作用。在 90% 的 Rett 综合征患者中发现了 MECP2 基因的突变, Rett 综合征是一种具有自闭症表型的严重发育障碍。

中科院上海神经科学研究所仇子龙和孙强等基于慢病毒感染策略,构建了大脑中过表达人类 MeCP2 的转基因食蟹猴 (Macaca fascicularis), 这些转基因猴子表现出重复性循环运动的频率增加, 焦虑增加, 社交互动减少和相对较弱的认知等 ASD 样行为并呈现出转基因的种系稳定遗传。

杂合的 SHANK3 突变和缺失是 ASD 中最常见的遗传突变之一。由 CRISPR/Cas9 诱导的 SHANK3 突变猕猴表现突变猴表现出明显的睡眠障碍、运

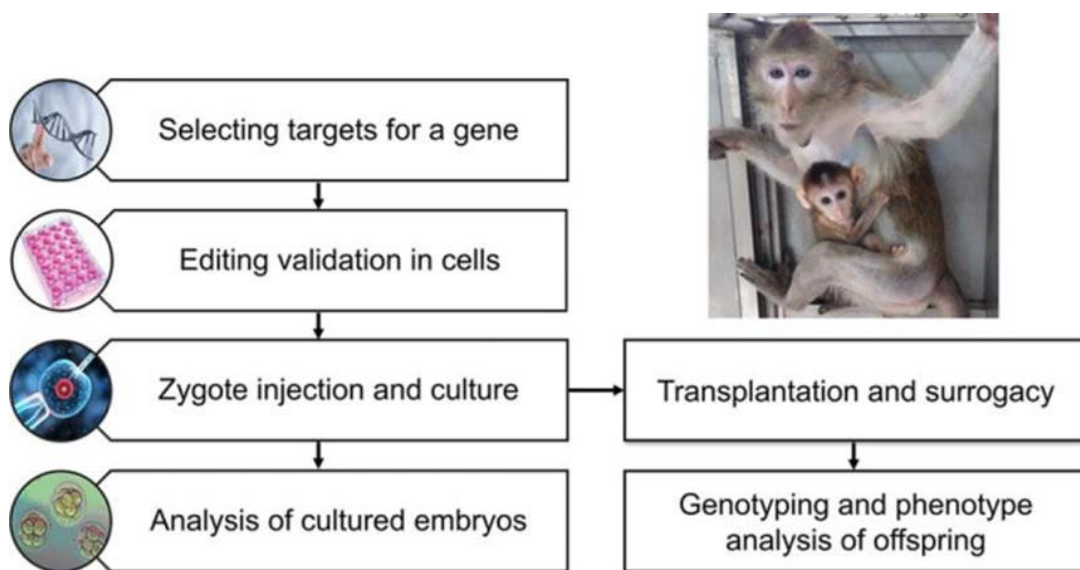
动缺陷、重复行为增加及社交和学习障碍等，比啮齿类动物模型更加接近 ASD 样行为和神经表型。

5.5.2 环境模型

最近的证据表明，产前环境，尤其是母体胎儿的免疫环境，可能是 ASD 病因学研究的一个有前途的领域。

在妊娠中后期，来自母亲的 IgG 同型抗体通过胎盘运输，以便为免疫系统未成熟的胎儿提供保护。然而，除了免疫保护性抗体外，对胎儿“自身”蛋白起反应的自身抗体也可以穿过胎盘，导致潜在的新生儿自身免疫性疾病。

最近发现的这些抗体的蛋白靶标在神经发育中起着关键作用，支持了产前暴露于抗脑自身抗体可能扰乱大脑发育轨迹并最终导致自闭症的假设。一项研究发现，恒河猴在产前暴露于特异性 ASD 相关的母源抗体下，其后代表现出与新动物的不适当的社交方式，以及在与熟悉的同龄人的相互社交互动中的缺陷。



(Zhao H, Jiang YH, Zhang YQ. Modeling autism in non-human primates: Opportunities and challenges. Autism Res. 2018.)

怀孕期间的孕产妇感染与后代自闭症的风险增加有关。这种相关性在啮齿动物怀孕期间通过实验激活母体免疫系统会产生具有异常大脑和行为发育的后代得到很好的证实。为了弥合临床人群与母体免疫激活（MIA）啮齿动物模型之间的差距，研究者们开发出一种 MIA 非人类灵长类动物模型。在妊娠期间注射了 poly

IC 的怀孕恒河猴产生的后代具有异常的运动刻板印象和重复行为，以及异常的社交互动。

5.5.3 非人类灵长类 ASD 模型的表型鉴定

与其他物种的疾病模型相似，非人类灵长类 ASD 模型的表型分析通常包括生物化学，分子，细胞，行为分析和脑成像。

猴子的行为分析通常是通过在自然和设计实验环境中对视频记录的行为数据进行评分来进行的。经常检查的行为包括积极的社交接触，例如梳毛和坐在一起，环境探索，攻击行为和刻板行为。刻板行为是重复和非自愿的运动，例如拍手，身体摇摆和摇头。

眼睛示踪测定法可用于评估非人类灵长类动物大脑的神经回路活动。视觉注意力是一种能力，可以专注于视觉世界的相关方面，而同时忽略分散注意力的方面。眼神异常被认为是 ASD 的关键特征之一。以类似于人类的方式，非人类的灵长类动物可以通过眼动追踪系统对社交信息处理和面部表情识别进行一定程度的测量，不适用于啮齿动物。非侵入性脑电图（EEG）可用于记录自由活动的猴子中皮层神经元的网络活动。

脑部成像，例如 MRI / fMRI 和扩散张量成像（DTI），通常用于分析脑部结构并用于人类的纵向随访研究。功能磁共振成像（fMRI）通常用于评估执行特定任务时大脑活动的变化。在猴子中已经报道了使用 MRI 对正常脑生长模式进行纵向评估的方法。

使用 MRI 对 ASD 患者的大脑结构进行的研究还发现，儿童早期时期的大脑发育异常。MECP2 缺乏猴子表现出异常的大脑发育，包括特定大脑区域的灰质体积减少和皮质厚度减少。

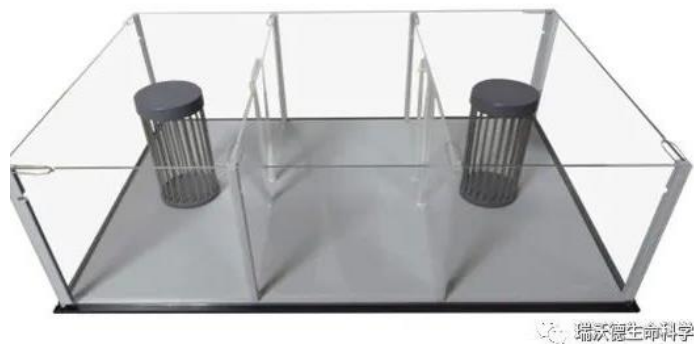
5.6 行为学评估方法

5.6.1 刻板行为检测

刻板动作行为，包括啮咬（用牙齿咬笼子，嚼木屑，无目的咀嚼）、将前爪举到嘴边或面部、舔（不包括理毛）、理毛行为、摇头、摇动爪子、用后腿站立

及阶段性的发声，将所观察到的各项动作行为计数及其总和作为评估刻板运动的指标。实验时可使用行为学视频追踪系统，实时记录动物相关行为。

5.6.2 社交行为检测

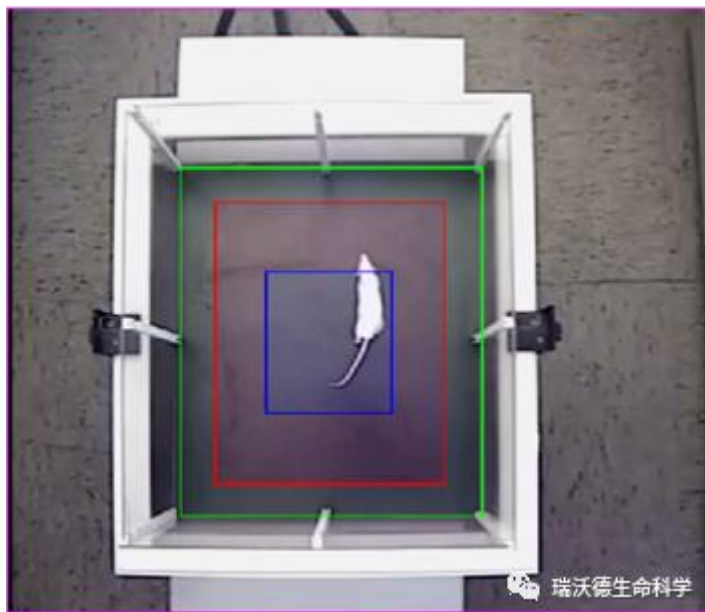


(SMART 视频追踪系统&三箱社交)

三箱社交，箱体两侧分别放测试动物熟悉过和首次接触的動物，检测小鼠靠近装有陌生小鼠金属笼的时间，以此判断小鼠的社交能力。在实验中通常比较小鼠靠近装有熟悉小鼠的金属笼时间与陌生小鼠金属笼的时间，来判断动物的社交能力。

5.6.3 焦虑行为检测

1) 旷场实验



在社交孤立（将动物从社会群体中分离出来）和广场恐惧（旷场区域远大于动物的生活环境）因素作用下，啮齿类动物本能地喜欢在周边区域活动，不喜欢在中央区域活动。如果动物在中央区域探索的路程和时间减少、垂直探究活动增加，则表明有致焦虑作用。

2) 高架十字迷宫实验/0 迷宫



将动物置于迷宫中央区，在一定时间内观察动物分别进入开放臂和闭合臂的时间和次数。由于开放臂和外界相通，对动物来说具有一定的新奇性，同时又具有一定的威胁性，动物在产生探究好奇心的同时也会产生焦虑反应。如果焦虑水平高，动物则更不愿意去探索开放臂。

3) 明暗穿梭箱实验



动物对明亮地方, 具有天然的厌恶和好奇。药物所致的动物在明亮区域停留时间延长, 表明其具有抗焦虑作用。

在这个实验中, 动物穿箱运动是探索性的行为表现, 它们在明/暗环境中所停留的时间, 是其厌恶程度的反映。

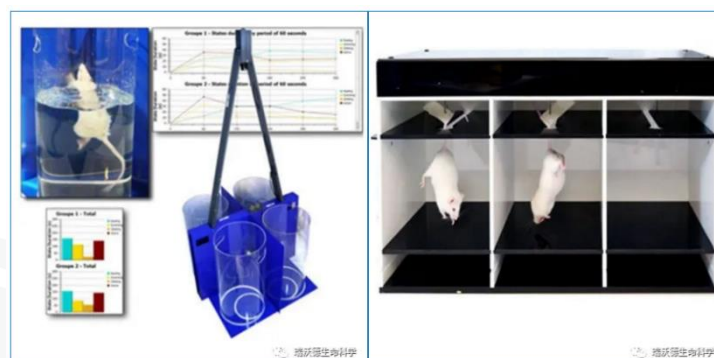
4) 埋珠实验



在笼具里面铺上垫料, 固定间距将玻璃珠放置在垫料上, 玻璃珠被看作一个不熟悉的、具有潜在威胁的物体, 实验鼠将这些威胁物清除的埋珠行为是本能的焦虑样反应的表现, 根据固定时间内埋下(埋入体积大于 50%以上)玻璃珠的数量, 分析动物的焦虑水平。

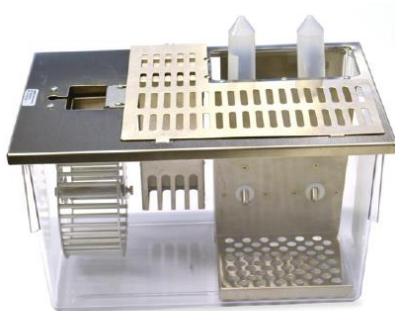
5. 6. 4 抑郁行为检测

1) 悬尾/强迫游泳



倒立悬尾和在光滑的玻璃杯里面游泳，都是让啮齿类动物不适的操作，动物在不适状态下放弃挣扎所需要的时间，可用于评判抑郁状态。抑郁水平高的动物更倾向于“听天由命”，更早放弃挣扎。

2) 糖水偏好

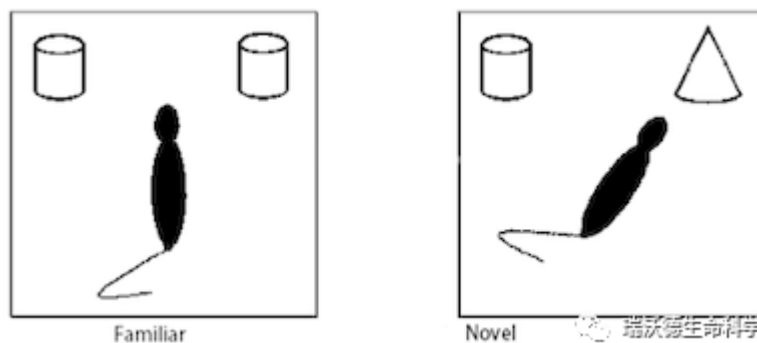


Model 80822S 瑞沃德生命科学

快感缺失是抑郁的表现之一，抑郁表现的动物同时接触糖水和普通饮水时，快感丧失让它们对糖水产生不了明显兴趣。检测指标为一定时间内，糖水和水的饮用量差异。

5.6.5 学习记忆

新物体识别



将动物在两个或者更多的物体周边停留一段时间进行熟悉，然后用一个新物体代替原来的物体。如果记忆正常，小鼠会花费更长时间去探索新物体；如果探索两种物体花费的时间相同，就可以被视为记忆缺失。

学习记忆其他的行为学检测方法，包括 T/Y 迷宫，水迷宫，八臂迷宫等。



自闭症的行为学评价方法，在临床和基础研究中具有重要意义。每种行为学实验各有其优势和局限，综合使用各种方法模型，可为深入研究自闭症的遗传机制、环境机制和药理机制提供有利条件，为制定 ASD 治疗策略提供依据。

参考文献

1. Kazdoba TM, Leach PT, Crawley JN. Behavioral phenotypes of genetic mouse models of autism. *Genes Brain Behav.* 2016;15(1):7-26. doi:10.1111/gbb.12256
2. Nicolini C, Fahnestock M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp Neurol.* 2018;299(Pt A):217-227. doi:10.1016/j.expneurol.2017.04.017
3. Wolfgang MJ, Golos TG. Nonhuman primate transgenesis: progress and prospects. *Trends Biotechnol.* 2002;20(11):479-484. doi:10.1016/s0167-7799(02)02052-8
4. Bauman MD, Schumann CM. Advances in nonhuman primate models of autism: Integrating neuroscience and behavior. *Exp Neurol.* 2018;299(PtA):252-265. doi:10.1016/j.expneurol.2017.07.021

5. Liu Z, Li X, Zhang JT, et al. Autism-like behaviours and germline transmission in transgenic monkeys overexpressing MeCP2. *Nature*. 2016;530(7588):98-102. doi:10.1038/nature16533
6. Bauman MD, Iosif AM, Ashwood P, et al. Maternal antibodies from mothers of children with autism alter brain growth and social behavior development in the rhesus monkey. *Transl Psychiatry*. 2013;3(7):e278. Published 2013 Jul 9. doi:10.1038/tp.2013.47
7. Rose DR, Careaga M, Van de Water J, McAllister K, Bauman MD, Ashwood P. Long-term altered immune responses following fetal priming in a non-human primate model of maternal immune activation. *Brain Behav Immun*. 2017;63:60-70. doi:10.1016/j.bbi.2016.11.020
8. Zhao H, Jiang YH, Zhang YQ. Modeling autism in non-human primates: Opportunities and challenges. *Autism Res*. 2018;11(5):686-694. doi:10.1002/aur.1945
9. 周荣易,党伟利,周正,李华伟,张晰.孤独症谱系障碍动物模型研究进展[J].中国实验动物学报,2019,27(03):380-386.
10. 胡纯纯,刘春雪,徐秀.孤独症谱系障碍动物模型的研究进展[J].中国循证儿科杂志,2015,10(06):463-469.
11. 李燊,吴海涛.孤独症谱系障碍实验动物模型研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2020,34(02):133-141.
12. Nuria D. et al. The autism- and schizophrenia-associated protein CYFIP1 regulates bilateral brain connectivity and behavior. *NATURE COMMUNICATIONS* (2019)
13. Dorian C. et al. Postnatal Tshz3 Deletion Drives Altered Corticostriatal Function and Autism Spectrum Disorder-like Behavior. *Biological Psychiatry*(2019)
14. Wei Cao. et al. Gamma Oscillation Dysfunction in mPFC Leads to Social Deficits in Neuroligin 3 R451C Knockin Mice. *Neuron*(2018)

15. Melanie R. et al. Altered TAOK2 activity causes autism-related neurodevelopmental and cognitive abnormalities through RhoA signaling. Molecular Psychiatry (2019)
16. Gil S. et al. Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. Cell(2019)

6 颅脑损伤造模及评估方法

6.1 颅脑损伤模型的建立

创伤性脑损伤（TBI）被定义为外部机械力对大脑造成的损伤，例如由快速加速或减速、冲击波、挤压、撞击或射弹穿透引起的大脑损伤。它可能导致认知、身体和社会心理功能的暂时或永久性损害[1]。TBI 是 45 岁以下人群死亡和残疾的主要原因[2]。事实上，全世界每年有 1000 万人因 TBI 死亡或住院，估计有 5700 万目前活着的人经历过这种脑损伤[2]。TBI 不是单一的病理生理事件，而是一个复杂的疾病过程[3]，并且导致结构性损伤和功能缺陷，这是由于原发性和继发性损伤引发的[4]。原发性损伤是脑组织在暴露于外力时立即发生机械破坏的结果，包括挫伤、血管损伤（出血）和轴突剪切，神经元的轴突被拉伸和撕裂[5, 6]。继发性损伤在原发性损伤后数分钟至数月内演变，是代谢、细胞和分子事件级联反应的结果，最终导致脑细胞死亡、组织损伤和萎缩[7-9]。

以 RWD 精密打击器使用为例，其他品牌打击器手术操作过程相似。



6.2 手术材料和试剂

- 1) 手术垫
- 2) 可吸收海绵
- 3) 棉签
- 4) 手术刀片
- 5) 清洁湿巾
- 6) 缝合工具和缝合线
- 7) C57BL/6 小鼠 (同窝对照)
- 8) 0.9%NaCl 无菌盐水
- 9) 碘伏
- 10) 异氟烷 (4%的诱导和 0.5-1%的维持)
- 11) 镇痛药
- 12) 2%利多卡因
- 13) 眼药膏
- 14) 蒸馏水
- 15) 0.3%庆大霉素
- 16) 骨蜡

6.3 手术设备

- 1) 异氟烷麻醉系统
- 2) 体温维持仪
- 3) 脑立体定位仪
- 4) 打击器
- 5) 气体麻醉适配器
- 6) 耳杆
- 7) 电动剃毛器
- 8) 剪刀
- 9) 细头镊子

- 10) 缝合剪刀
- 11) 手术刀手柄
- 12) 颅钻
- 13) 钻头
- 14) 热珠灭菌器

6.4 实验过程

A. 动物准备

- 1) 小鼠称重。
- 2) 在异氟烷诱导盒中麻醉小鼠 (4%, 1 L / min)。
- 3) 将小鼠嘴部放在麻醉面罩中。
- 4) 给予止痛药 (例如 Dolorex 10 mg / ml, 在盐水中按 1:20 稀释, 每 25 克动物使用 0.1 毫升) 麻醉后皮下注射。
- 5) 剃掉从眼睛到耳朵后面的毛发。
- 6) 将小鼠放在加热垫上, 并用适配器固定在脑立体定位仪上, 并将异氟烷调整为 0.5-1%。
- 7) 麻醉可通过对脚趾捏合无反应 (监测脚趾捏合反应) 来确认, 手术期间每 20 分钟一次。
- 8) 用棉签蘸少量碘伏清洁头部。
- 9) 在头皮表面下注入 0.1 ml 利多卡因, 以提供局部镇痛作用。
- 10) 保护眼睛避光: 涂上眼药膏并盖好。

B. 切口和开颅手术

- 1) 所有手术器械使用前必须经过高温灭菌。
- 2) 从前到后 (眼睛之间到颅骨后部) 做切口。
- 3) 用蘸有盐水的棉签擦拭切口。
- 4) 将小鼠门齿扣在旋转适配器的齿棒上, 套好麻醉面罩, 耳杆插入小鼠耳蜗 (保证两侧耳杆刻度一致)。旋转适配器可对动物头部进行旋转, 保证打击头与打击部位垂直打击。

- 5) 找到并标记 Bregma（前囟点）位置。确保头骨干净（没有血液，毛皮或组织）并且干燥（使用干燥的棉签吸收蒸馏水或血液）。
- 6) 找到并标记好打击坐标（此步骤建议在脑立体定位仪上进行定位），使用颅钻在打击部位开一个 5mm 直径的窗口，用盐水冲洗该区域，以去除骨头碎片并确保硬脑膜的完整性。



- 7) 将旋转适配器连同动物一起转移到打击器上。
 - 1) RWD 精密打击器采用气动电控原理，连接氮气瓶使用，调节减压阀的压力为 0.6-0.8MPa，开机后设置打击参数（打击速度、深度及停留时间）。
- 8) 小鼠颅脑打击采用 3mm 直径打击头（大鼠采用 5mm）。

68099 II 推荐实验参数					
速度(m/s)	时间(s)	深度轻/中/重(mm)	动物类型	损伤类型	打击头直径(mm)
3.5	0.5	0.5/1.0/>1.5	小鼠	颅脑	3
5.5	0.5	1.0/2.0/3.0	大鼠	颅脑	5
1.5	0.5	0.2/0.5/0.8	小鼠	脊髓	1
2.0	0.5	0.4/0.8/1.2	大鼠	脊髓	2

- 9) 调节打击零界面：将两个导电夹夹至动物身体，并使打击头缓缓下降接触组织表面（此时可观察打击头是否与组织表面呈 90° ，若不是，则可旋转动物头部达到垂直），此时导电夹与打击头形成电流回路，打击头自动停止，仪器自动将该面定为打击零界面。



- 10) 打击：点击“Fire”进行打击。
- 11) 撞击后，再次用无菌盐水冲洗该区域，并通过用无菌棉签进行止血。
- 12) 使用骨蜡密封骨窗，缝合头皮并消毒。
- 13) 关闭异氟烷，并皮下注射镇痛药。将动物从打击器上取下，放在干净的笼子中。

6.5 评估方法

6.5.1 Rotarod Test

TBI 之前，动物在加速（5-20rpm）的转棒上训练 3 天。测试包含 6 次变速，前 10s 使用 5rpm 的初始速度，接下来的 30s 从 5rpm 线性加速到 10rpm，在 40s 到 80s 之间从 10rpm 线性增加到 20rpm。最终得分为六次实验小鼠保持在转棒上的平均时间[10]。

6.5.2 错步实验

小鼠被放置在不同大小的六边形网格上。小鼠在沿着网格行走时，爪子可能会在金属丝之间掉落或滑动，此时被记录为错误步伐。统计小鼠跨越网格的总步数（每只动物前肢的运动步数）和每只动物前肢的错误步数[10]。

6.5.3 mNss 实验

运动试验	
提尾试验	3
前肢屈曲	1
后肢屈曲	1
头部在 30s 内偏离垂直轴>100	1
将大鼠放置于地板上(正常值=0;最大值=3)	3
正常行走	0
不能直线行走	1
向轻瘫侧转圈	2
向轻瘫侧倾倒	3
感觉试验	2
放置试验(视觉和触觉测试)	1
本体感觉试验(深感觉, 向桌子边缘压鼠爪刺激肢体肌肉)	1
平衡木试验(正常值=0;最大值=6)	6
稳定平衡姿势	0
紧抓平衡木边缘	1
紧抱平衡木, 一肢体从平衡木垂落	2
紧抱平衡木, 二肢体从平衡木垂落或在平衡木上旋转(>60 秒)	3
试图在平衡木上平衡但跌落(>40 秒)	4
试图在平衡木上平衡但跌落(>20 秒)	5
跌落;未尝试在平衡木上平衡(<20 秒)	6
反射丧失和不正常运动	4
耳廓反射(接触外耳道时摇头)	1

角膜反射(用棉丝轻触角膜时眨眼)	1
惊恐反射(对快弹硬纸板的噪音有运动反应)	1
癫痫、肌阵挛、肌张力障碍	1
最高分数 18	

- 1) **提尾试验** 大鼠提尾悬空一米，观察头和前后肢偏离、屈曲情况。正常大鼠头与身体垂直轴短时间内无夹角或夹角 $\leq 10^\circ$ 、四肢向地面伸展，均评分为 0 分，如有前肢屈曲、后肢屈曲、头部在 30 秒内偏离垂直轴 $>10^\circ$ 异常分别记 1 分；
- 2) **行走试验** 大鼠被放于大的软垫子上，观察大鼠自由行走行为，正常行走、不能直线行走、向轻瘫侧转圈和向轻瘫侧倾倒四种表现分别予评分 0-3 分；
- 3) **感觉试验**，包括：
 - 视觉实验 实验者将动物握于手中，使其前爪悬空，自桌面上方 10cm 处向桌面缓慢倾斜 45° 靠近(此时桌子位于大鼠前方或患侧)，大鼠正常反应为前肢即刻抓向桌面(0 分)，损伤大鼠则表现为肢体反应延迟(1 分)，前方、左侧或右侧三个试验任意试验出现肢体反应延迟，即或视为视实验障碍(记 1 分)；
 - 触觉实验 将大鼠头向上抬 45° ，前爪悬空，此时大鼠应该既看不见，也不能用胡须触及桌面，用其前爪背侧轻触桌面，刺激深度仅达皮肤和毛发，动物反应及评分同视觉实验，触觉刺激同样分前方及侧方刺激；
 - 本体觉实验 大鼠放于桌面，头朝向桌子边缘，从后方轻轻把大鼠推向桌子的边缘，正常情况下大鼠会抓住桌子的边缘，患侧肢体会掉下来；或将大鼠放于桌面，患侧肢体靠近桌面边缘，将大鼠推向桌子边缘时，观察该侧前后肢放置情况，正常大鼠可抓住桌子的边缘，而患侧大鼠前后肢不能抓住桌边缘。
- 4) **平衡木试验** 平衡木长 170cm、2cm 宽的方木棒，平放在距地面 70 cm 处，将大鼠在平衡木上观察平衡情况，按表 2 评分标准进行评分；
- 5) **反射丧失和不正常运动**
 - 耳廓反射，将大鼠放置于桌面，用手接触外耳道，正常大鼠有摇头反应(0 分)，无摇头反应则为异常(1 分)；
 - 角膜反射：用棉丝轻触角膜时眨眼(0 分)，无眨眼反应则为异常(1 分)；

- 惊恐反射：将大鼠放置于桌面，靠近耳廓快速弹动可发出噪音的硬纸板，正常大鼠可出现逃避运动反应（0分），未出现逃避运动则为异常（1分）；
- 癫痫、肌阵挛、肌张力障碍异常 出现三种之中任意一种症状即可视为异常（1分），三种均不出现则为正常（0分）。

参考文献

1. Maas, A. I., Stocchetti, N. & Bullock, R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol.* 7, 728–741 (2008).
2. Langlois, J. A., Rutland-Brown, W. & Wald, M. M. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J. Head Trauma Rehabil.* 21, 375–378 (2006).
3. Masel, B. E. & DeWitt, D. S. Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *J. Neurotrauma* 27, 1529–1540 (2010).
4. Davis, A. E. Mechanisms of traumatic brain injury: biomechanical, structural and cellular considerations. *Crit. Care Nurs. Q.* 23, 1–13 (2000).
5. Cernak, I. Animal models of head trauma. *NeuroRx* 2, 410–422 (2005). This article comprehensively reviews animal models of TBI and addresses key factors in the development of animal models and neuroprotection for this condition.
6. Gaetz, M. The neurophysiology of brain injury. *Clin. Neurophysiol.* 115, 4–18 (2004).
7. Bramlett, H. M. & Dietrich, W. D. Progressive damage after brain and spinal cord injury: pathomechanisms and treatment strategies. *Prog. Brain Res.* 161, 125–141 (2007).
8. Thompson, H. J. et al. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J. Neurotrauma* 22, 42–75 (2005). This article reviews the lateral fluid percussion model of TBI in small animal species, with a particular emphasis on its validity, clinical relevance and reliability.

9. Marklund, N., Bakshi, A., Castelbuono, D. J., Conte, V. & McIntosh, T. K. Evaluation of pharmacological treatment strategies in traumatic brain injury. Curr. Pharm. Des. 12, 1645–1680 (2006).
10. Wu Y, Wu H, Zeng J, Pluimer B, Dong S, Xie X, Guo X, Ge T, Liang X, Feng S, Yan Y, Chen JF, Sta Maria N, Ma Q, Gomez-Pinilla F, Zhao Z. Mild traumatic brain injury induces microvascular injury and accelerates Alzheimer-like pathogenesis in mice. Acta Neuropathol Commun. 2021 Apr 23;9(1):74.

7 脊髓损伤造模及评估方法

7.1 背景

脊髓在大脑和周围神经的相互联系中起着重要作用。严重的脊髓损伤（SCI）会导致生理功能丧失，甚至瘫痪或死亡[1]。SCI 后，微血管出血伴随着血-脊髓屏障的破坏，随之而来的是水肿、缺血和炎症通路中细胞毒性化学物质的释放[2, 3]。继发性神经退行性事件，例如脱髓鞘，Wallerian 变性和轴突死亡等。临床上大多数脊髓损伤是由与机动车辆事故相关的脊髓瞬时压缩或挫伤引起的，挫伤是一种脊髓钝性损伤，类似于人类临床上典型的 SCI，与脊髓横断模型相比，挫伤的脊髓为研究损伤后的病理生理机制提供了更好的微环境[4]。

以 RWD 精密打击器使用为例，我们描述了脊髓挫伤模型的构建方法，其他品牌打击器手术操作过程相似。



图 1

7.2 手术材料和试剂

- 1) 手术垫
- 2) 可吸收海绵
- 3) 棉签

- 4) 清洁湿巾
- 5) 缝合工具和缝合线
- 6) SD 大鼠 (200–250g)
- 7) 0.9%NaCl 无菌盐水
- 8) 碘伏
- 9) 异氟烷 (4%的诱导和 0.5–1%的维持)
- 10) 镇痛药
- 11) 2%利多卡因
- 12) 眼药膏
- 13) 蒸馏水
- 14) 0.3%庆大霉素

7.3 手术设备

- 1) 异氟烷麻醉系统
- 2) 体温维持仪
- 3) 打击器
- 4) 数码显微镜
- 5) 麻醉面罩
- 6) 电动剃毛器
- 7) 手术器械包
- 8) 热珠灭菌器

7.4 实验过程

7.4.1 动物准备

- 1) 大鼠称重。
- 2) 在异氟烷诱导盒中麻醉大鼠 (4%，1 L / min)。
- 3) 将大鼠嘴部放在麻醉面罩中。

- 4) 给予止痛药（例如 Dolorex 10 mg / ml，在盐水中按 1:20 稀释，每 25g 使用 0.1ml）麻醉后皮下注射。
- 5) 剃掉大鼠背部毛发。
- 6) 将大鼠放在加热垫上并将异氟烷调整为 0.5-1%。
- 7) 麻醉可通过对脚趾捏合无反应（监测脚趾捏合反应）来确认，手术期间每 20 分钟一次。
- 8) 用棉签蘸少量碘伏清洁背部。
- 9) 在头皮表面下注入 0.1 ml 利多卡因，以提供局部镇痛作用。
- 10) 保护眼睛避光：涂上眼药膏并盖好。

7.4.2 脊髓暴露及损伤

- 1) 所有手术器械使用前必须都进行灭菌。
- 2) 用手术刀在胸背侧表面纵向切开，并解剖椎旁肌，露出椎骨 T7-T12。注：T2 的棘突比其他棘突都要长。触摸 T2 的位置，以确定进行开窗操作的大概位置。
- 3) 使用牵开器将脊椎旁肌轻轻拉离脊椎，使用数码显微镜进行椎板去除手术。用咬骨钳咬去 T8，T9 和部分 T10 的骨头，注意不要破坏硬脊膜。注意：为避免用打击器的尖端撞击到椎骨，窗口长宽必须大于 2mm 以上，因为打击器的尖端直径为 2mm。
- 4) 用脊髓适配器固定待损伤节段（T9），脊髓适配器含带齿的两个臂，采取从两侧托住椎骨的方式固定脊髓，并防止打击时的塌陷。注：将带齿的臂轻轻推动以夹紧椎骨，以确保固定稳固。

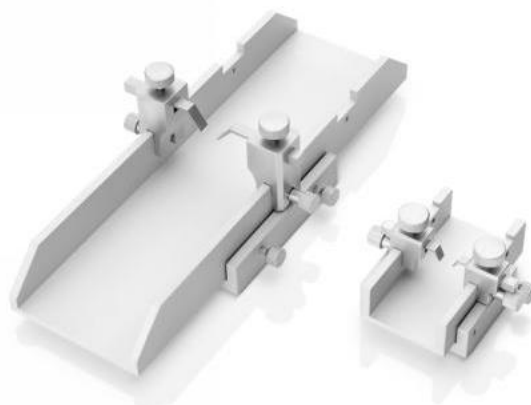


图 2

- 5) 将大鼠的 T9 脊髓中心置于打击器底座上，旋转底座可调节脊髓的角度，打击时需将脊髓调节至与打击头垂直。
- 6) RWD 精密打击器采用气动电控原理，连接氮气瓶使用，调节减压阀的压力为 0.6-0.8MPa，开机后设置打击参数（打击速度、深度及停留时间）。
- 7) 大鼠脊髓打击采用 2mm 直径打击头（小鼠采用 1mm）。

68099 II 推荐实验参数					
速度(m/s)	时间(s)	深度轻/中/重(mm)	动物类型	损伤类型	打击头直径(mm)
3.5	0.5	0.5/1.0/>1.5	小鼠	颅脑	3
5.5	0.5	1.0/2.0/3.0	大鼠	颅脑	5
1.5	0.5	0.2/0.5/0.8	小鼠	脊髓	1
2.0	0.5	0.4/0.8/1.2	大鼠	脊髓	2

表 1

- 8) 调节打击零界面：将两个导电夹夹至动物身体，并使打击头缓缓下降接触组织表面，此时导电夹与打击头形成电流回路，打击头自动停止，仪器自动将该面定为打击零界面。
- 9) 打击：点击“Fire”进行打击。
- 10) 挫伤后，硬脊膜下可以清楚地看到出血。
- 11) 取下动物，并进行缝合。
- 12) 关闭麻醉系统，然后将大鼠放回到笼子中。
- 13) 监视大鼠并通过每日观察是否出现不适的迹象（包括体重减轻，脱水和膀胱功能障碍）提供术后护理。提供 3 ml 的 0.9% 无菌生理盐水皮下补液。在手术后 5 天每天皮下注射预防性抗生素。如果大鼠表现出自残迹象，则口服对乙酰氨基酚镇痛药（65 mg / kg）
- 14) 每天两次挤压小腹来手动排空大鼠膀胱。注意：大多数大鼠在挫伤后 1-3 天会出现血尿。如果 SCI 后流血的尿液不能排空或膀胱中残留大量尿液，则可能导致膀胱炎，感染甚至死亡。

7.5 评估方法

7.5.1 损伤体积

SCI 导致脱髓鞘和脊髓空腔的产生，从而扩大了损伤程度[5]。Luxol 固蓝（LFB）、苏木精和伊红（H&E）染色分别用于识别空洞和有髓白质。使用显微镜拍摄整个损伤区域的图像，可以看出挫伤导致大部分灰质丢失和少量白质保留[6]。

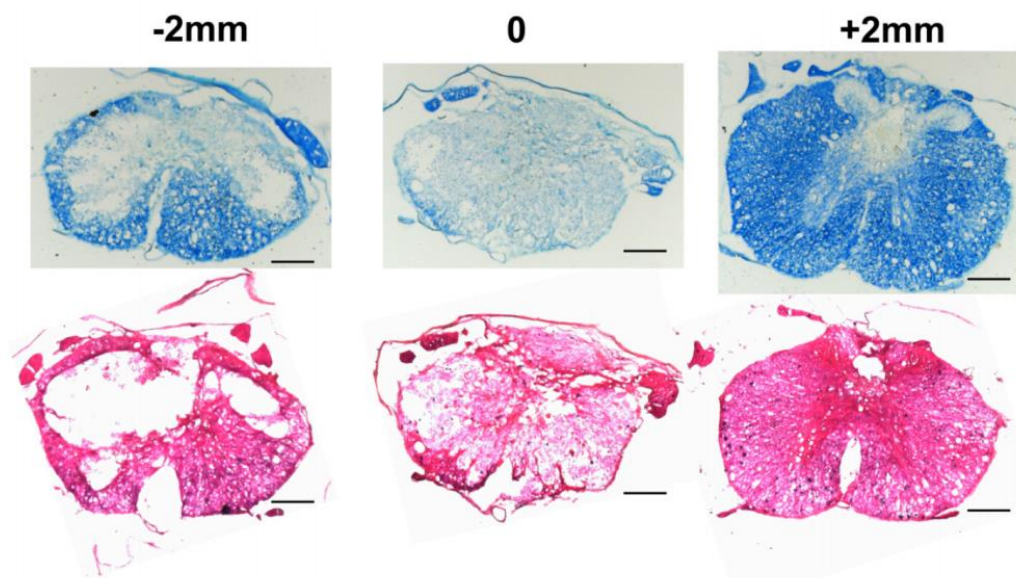


图 3 SCI 后第 6 周的组织学染色。大鼠 SCI 后 LFB 染色（上）和 H&E 染色（下）（-2 毫米、0 毫米和 2 毫米；比例尺 = 250 微米）。

7.5.2 行为学评分

Basso、Beattie 和 Bresnahan (BBB) 开放场地评分用于评估后肢的运动[7]。简而言之，将大鼠放在垫子上（尺寸：100 x 100 x 40 mm），并通过 BBB 测试从 0（无后肢运动）到 21（后肢正常运动）进行评分。BBB 评分低分（0-8）的特点是每个后肢关节运动，中（9-14）和高（15-21）的特点是负重支撑，前肢后肢协调踏步，脚趾间隙，主要爪子位置和尾部位置（有关 BBB 分数的详细说明，请参阅 Basso 等人的参考文献，1996）。实验人员每周在双盲情况下使用摄像机进行记录。然后对每条后肢的每周得分进行平均，得出一个平均分。可以使用双向方差分析 (ANOVA) 和 Bonferroni 事后检验比较不同等级（或处理）的组。

参考文献

1. Singh, A., Tetreault, L., Kalsi-Ryan, S., Nouri, A. and Fehlings, M. G. (2014). Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. Clin Epidemiol 6: 309-331.
2. Mothe, A. J. and Tator, C. H. (2012). Advances in stem cell therapy for spinal cord injury. J Clin Invest 122(11): 3824-3834.
3. Oyinbo, C. A. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. Acta Neurobiol Exp (Wars) 71(2): 281-299.
4. Young, W. (2002). Spinal cord contusion models. Prog Brain Res 137: 231-255.
5. Poon, P. C., Gupta, D., Shoichet, M. S. and Tator, C. H. (2007). Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates. Spine 32: 2853-9.
6. Chiu, C., Cheng, H. and Hsieh, S. E. (2017). Contusion Spinal Cord Injury Rat Model. Bio-protocol 7(12): e2337.
7. Basso, D. M., Beattie, M. S. and Bresnahan, J. C. (1996). Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. Exp Neurol 139(2): 244-256.

8 视神经损伤造模及评估方法

8.1 视神经损伤模型的建立

视神经损伤可导致轴索变性，随后视网膜神经节细胞（RGC）逐渐死亡，从而导致不可逆的视力丧失，临床上此类疾病例如外伤性视神经病变和青光眼中的视神经变性。它的特点是视神经乳头的典型变化、进行性视神经变性和视网膜神经节细胞的丢失，如果不受控制，会导致视力丧失和失明[1-10]。

在正常情况下，视网膜神经节细胞（RGC），即眼睛的投射神经元，在视神经受损后无法再生轴突，很快会发生细胞死亡，从而导致创伤性或缺血性神经损伤或退行性疾病（如青光眼），患者将产生永久性的视觉损失。

因此，节细胞的保护及视神经再生是研究的两个重要方面。视神经损伤模型是外伤性视神经病变、青光眼等重要的实验疾病模型。在该模型中，视神经损伤导致视网膜神经节细胞逐渐凋亡。该疾病模型可用于研究神经元死亡和存活的一般过程和机制，这对于制定治疗措施至关重要。此外，该模型还可以使用药理学和分子方法来识别和测试潜在的治疗方式，以治疗不同类型的视神经病变。

中枢神经损伤修复研究中的许多重大发现，最初都是以视神经损伤为模型开展的。其中最为著名的，是苏国辉和 Aguayo 采用周围神经移植诱发视网膜神经节细胞（以下简称节细胞）再生的开拓性研究[11]。

两种可用于中枢神经元保护和轴突再生研究的视神经损伤模型，即视神经横断 (optic nerve transection) 及夹伤模型 (optic nerve crush)。

8.2 手术材料和试剂

- 1) 手术垫
- 2) 可吸收海绵
- 3) 棉签
- 4) 清洁湿巾
- 5) 缝合工具和缝合线

- 6) C57BL/6 小鼠 (同窝对照)
- 7) 0.9%NaCl 无菌盐水
- 8) 碘伏
- 9) 异氟烷 (4%的诱导和 0.5-1%的维持)
- 10) 镇痛药
- 11) 眼药水
- 12) Proparacaine (局部麻醉药)
- 13) 蒸馏水
- 14) 0.3%庆大霉素

8.3 手术设备

- 1) 异氟烷麻醉系统
- 2) 体温维持仪
- 3) 数码显微镜
- 4) 麻醉面罩
- 5) 手术器械包
- 6) 热珠灭菌器

8.4 实验过程

8.4.1 动物准备

- 1) 小鼠称重。
- 2) 在异氟烷诱导盒中麻醉小鼠 (4%, 1 L / min)。
- 3) 将小鼠嘴部放在麻醉面罩中。注: 为防止手术期间角膜变干, 根据需要使用眼药水。
- 4) 将鼠标移至手术范围, 并向每只眼睛滴入 1 滴 Proparacaine (局部麻醉药)。等待 1-2 分钟, 然后通过后肢捏合确认麻醉深度。
- 5) 确保深度麻醉后, 稍微倾斜小鼠头部, 使待手术眼睛面向操作者。
- 6) 用湿棉签将多余的液体从毛发和眼睛上刷掉。

- 7) 在开始外科手术之前，应使用热珠灭菌器对手术工具进行灭菌。灭菌后等待几秒钟，以使工具冷却。

8.4.2 视神经挤压/横断手术

- 1) 在数码显微镜下沿眼眶内缘小心分离眼眶软组织。
- 2) 按照解剖层次分别牵开眼外肌肉，将白色视神经暴露出，注意不要损伤血管。
- 3) 用镊子将距离眼球约 2mm 的视神经挤压约 3 秒（挤压模型）或用弹簧剪剪断视神经（横断模型）。注意不要损害眼动脉以引起出血。
- 4) 缝合结膜、皮下组织以及皮肤。
- 5) 在小鼠从麻醉中恢复之前，给皮下注射丁丙诺啡进行镇痛。
- 6) 将小鼠放到温暖干燥的区域并进行监测，直到它能够保持直立行走并将其放回干净的笼子。术后三天，每日两次给予全身镇痛药（丁丙诺啡）和局部抗生素软膏。

8.5 评估方法

8.5.1 细胞死亡标志物的免疫染色和定量

使用 caspase-3 或 Bcl-xL 的一抗进行免疫染色，并使用 TUJ-1 抗体对 β III-微管蛋白进行共染色以显示 RGC，然后与适当的荧光标记的二抗一起孵育。进行 DAPI 染色以鉴定视网膜神经元的细胞核。在荧光显微镜下对每个切片中的 Caspase-3+ RGC 进行计数。为了分析 GCL 中的 Bcl-xL 变化，使用 ImageJ 软件评估 GCL 中的荧光强度。

8.5.2 RGC 存活率和轴突再生的定量分析

RGC 存活率在许多文章中都有报道[12-15]。小鼠在灌注后对眼睛和视神经进行解剖，并在 4% 的 PFA 中后固定 2 小时。剖开视网膜，在做了四个切口后，将视网膜整体染色。 β III-tubulin 在 RGCs 中的选择性表达[16]，用 β III-tubulin 进行免疫染色，然后用 Alexa Fluor 488 兔来源的二抗孵育。在荧光显微镜下拍片并使用 ImageJ 软件计算 β III-tubulin+细胞的数量。

参考文献

1. Chierzi S, Strettoi E, Cenni MC, Maffei L (1999) Optic nerve crush: Axonal responses in wild-type and bcl-2 transgenic mice. *J Neurosci* 19(19):8367–8376.
2. Watkins TA, et al. (2013) DLK initiates a transcriptional program that couples apoptotic and regenerative responses to axonal injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(10): 4039–4044.
3. Welsbie DS, et al. (2013) Functional genomic screening identifies dual leucine zipper kinase as a key mediator of retinal ganglion cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(10):4045–4050.
4. Hu Y, et al. (2012) Differential effects of unfolded protein response pathways on axon injury-induced death of retinal ganglion cells. *Neuron* 73(3):445–452.
5. Janssen KT, Mac Nair CE, Dietz JA, Schlamp CL, Nickells RW (2013) Nuclear atrophy of retinal ganglion cells precedes the bax-dependent stage of apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(3):1805–1815.
6. Pelzel HR, Schlamp CL, Nickells RW (2010) Histone H4 deacetylation plays a critical role in early gene silencing during neuronal apoptosis. *BMC Neurosci* 11:62.
7. Fernandes KA, et al. (2012) JNK2 and JNK3 are major regulators of axonal injury-induced retinal ganglion cell death. *Neurobiol Dis* 46(2):393–401.
8. Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A (2012) The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 31(2):152–181.
9. Knöferle J, et al. (2010) Mechanisms of acute axonal degeneration in the optic nerve in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(13):6064–6069.
10. Ribas VT, Koch JC, Michel U, Bähr M, Lingor P (January 5, 2016) Attenuation of axonal degeneration by calcium channel inhibitors improves retinal ganglion cell survival and regeneration after optic nerve crush. *Mol Neurobiol*, 10.1007/s12035-015-9676-2.

11. 11.K.-F. So; A.J. Aguayo (1985). Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. 328(2), 349–354.
12. Yin Y, et al. (2006) Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. Nat Neurosci 9(6):843–852.
13. Kurimoto T, et al. (2010) Long-distance axon regeneration in the mature optic nerve: Contributions of oncomodulin, cAMP, and pten gene deletion. J Neurosci 30(46):15654–15663.
14. Duan X, et al. (2015) Subtype-specific regeneration of retinal ganglion cells following axotomy: Effects of osteopontin and mTOR signaling. Neuron 85(6):1244–1256.
15. Yin Y, et al. (2009) Oncomodulin links inflammation to optic nerve regeneration. Proc Natl Acad Sci USA 106(46):19587–19592.
16. Kermer P, et al. (2000) Caspase-9: Involvement in secondary death of axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. Brain Res Mol Brain Res 85(1-2):144–150.

9 视神经损伤造模及评估方法

9.1 背景

尽管目前对疼痛基本机制的理解取得了巨大进展，但急性和慢性疼痛仍然是一个重要的健康问题。有研究报告指出，超过 1 亿美国人经历过慢性疼痛，超过心脏病、癌症和糖尿病的总和，疼痛每年给美国造成 5000 亿美元的损失。尽管疼痛普遍存在且影响很大，但它极难治疗，在过去的几十年里，很少有基础科学进展有效地转化为临床。

9.2 炎症性疼痛模型

炎症性疼痛的动物模型使用一些不同的刺激物注射到皮肤、爪子、肌肉、关节和内脏器官。这些刺激物产生与中性粒细胞招募有关的急性炎症疼痛，以及与巨噬细胞浸润有关的更持久的疼痛反应。因此，它们被用来模拟急性和慢性炎症的情况。

9.2.1 辣椒素

将辣椒素注射到皮肤、肌肉或关节中会激活含有 TRPV1 的伤害感受器，产生局部神经源性炎症，并诱发疼痛[1, 2]。辣椒素注射会导致反射性行为改变，包括损伤部位周围的热痛和机械痛觉过敏（该部位本身变得镇痛）和损伤部位外的机械痛觉过敏[3]。这些变化分别对应于由伤害感受器和中枢神经元致敏介导的初级和次级痛觉过敏区[4]。

9.2.2 卡拉胶

卡拉胶是一种常用的炎症刺激物，注射到爪子、肌肉和关节中，导致最初的急性炎症，2 周后转变为慢性炎症[5]。该模型已被证明有助于理解急性炎症性疼痛，并可能模拟与组织损伤相关的状况，如扭伤、拉伤和肌炎。

9.2.3 CFA

CFA 注射到尾巴、爪子、肌肉和关节,导致比卡拉胶更慢性的炎症。从行为上看,在损伤部位和损伤部位外都会出现热和机械性痛觉减退,并出现负重减少、自发疼痛行为增强的非反射性疼痛行为和转轮运动减少的情况[6]。CFA 被用来模拟可能发生在类风湿性关节炎或肌腱炎的慢性炎症性疼痛状况。

9.3 神经病理性疼痛模型

神经病理性疼痛是由外周或中枢体感系统的损伤或疾病诱发的[7],通常发生在神经系统受到创伤后。神经病理性疼痛也可以在缺血、代谢紊乱或暴露于各种毒素之后发生[8]。

9.3.1 皮质或丘脑疼痛

通过向体感皮层或丘脑核内显微注射兴奋性毒剂诱发。皮质和丘脑疼痛模型与机械痛觉和热痛觉过敏以及自发性疼痛行为有关,如抬起、摇晃和受影响肢体的负重减轻[9]。

9.3.2 脊髓损伤疼痛

脊髓可能因挫伤、脊髓手术损伤、激光照射导致缺血性损伤或神经递质引起的兴奋性毒性而直接受损[10]。这些模型导致机械和热痛觉过敏,以及自发行为的变化,如位置偏好[11]。

9.3.3 外周神经损伤

直接神经损伤模型包括: 1) 结扎或横切脊神经; 2) 结扎或损伤坐骨神经; 3) 结扎坐骨神经的远端分支(腓骨、胫骨))[12]。作为直接神经损伤的替代方法,可在坐骨神经周围注射炎症刺激物(酵母聚糖)[13]。

9.4 癌症疼痛模型

癌症相关的疼痛由于癌症本身或抗癌治疗发生在患者身上。将癌细胞局部异种移植[14]后模拟肿瘤相关疼痛,行为表现为机械和热敏感性增强,并减少握力

（运动诱发的疼痛），这些症状在癌症疼痛患者中很常见。除了癌症本身带来的疼痛外，用于治疗癌症的化学疗法通常会产生周围神经病变（CIPN）[15]。CIPN模型是通过全身注射化疗药物来实现，行为表现包括机械和热痛觉过敏[16]。

9.5 关节炎（关节）疼痛模型

包括炎症相关与组织损伤相关模型来模拟关节炎疼痛状况。将炎性刺激物（如卡拉胶、辣椒素或 CFA）注射到单个关节最常使用，并导致局部单关节炎症。

9.6 肌肉疼痛模型

通常将刺激物（如卡拉胶、CFA、福尔马林等）注射到肌肉中，后肢是常见的注射部位，但也有注射于颈部和口面部肌肉。这会触发强烈的炎症反应[4;30]来模拟人类的肌炎和肌肉拉伤[17]。这些刺激物导致肌肉和爪子的机械缩回阈值降低、对有害刺激（PEAP）的回避增强以及自主活动减少[18]。

9.7 术后疼痛

通过皮肤、筋膜和后爪或小腿足底肌肉[19]纵向切口诱发术后疼痛模型，这些病理会诱发浅表和深部组织受伤。这些导致热痛觉过敏、机械痛觉过敏和自发性疼痛行为[20]。

9.8 内脏牵拉痛动物模型

造模的方法有：用气囊扩张胃；用套塑料管的线绳拉胃；电刺激内脏大神经等。作为内脏牵拉反应的客观指标有：不同水平中枢的诱发电位，内脏大神经的反射性放电、肋间神经放电、动脉血压、食道运动、动物的胃肠外翻、挣扎、吼叫等。这些模型从不同角度给研究内脏疼痛积累了资料。

9.9 评估方法

热刺激：热板，Hargreaves，后爪回缩反射阈值及潜伏期（PWL，PWT）

机械刺激: von Frey hairs, 压痛刺激

双足平衡测痛仪: 双足承重检测 (Weight Bearing)

疼痛行为观测: LABORAS 系统

参考文献

1. Szolcsanyi, J.; Sebok, B.; Bartho, L. Capsaicin, sensation and flare reaction: the concept of bidirectional axon reflex. In: Jordan, CC.; Oehme, P., editors. Substance P Metabolism and Biological Actions. London: Taylor and Francis; 1985.
2. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. Neuron. 1998; 21:531–543.
3. Simone DA, Baumann TK, Lamotte RH. Dose dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin. Pain. 1989; 38:99–107.
4. O'Neill J, Brock C, Olesen AE, Andresen T, Nilsson M, Dickenson AH. Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. Pharmacol Rev. 2012; 64:939–971.
5. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain. 1988; 32:77–88.
6. Chacur M, Lambertz D, Hoheisel U, Mense S. Role of spinal microglia in myositis-induced central sensitisation: an immunohistochemical and behavioural study in rats. Eur J Pain. 2009; 13:915– 923.
7. Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. Neurology. 2008; 70:1630–1635.

8. Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci.* 2009; 32:1–32.
9. LaBuda CJ, Cutler TD, Dougherty PM, Fuchs PN. Mechanical and thermal hypersensitivity develops following kainate lesion of the ventral posterior lateral thalamus in rats. *Neurosci Lett.* 2000; 290:79–83.
10. Christensen MD, Everhart AW, Pickelman JT, Hulsebosch CE. Mechanical and thermal allodynia in chronic central pain following spinal cord injury. *Pain.* 1996; 68:97–107.
11. Davoody L, Quiton RL, Lucas JM, Ji Y, Keller A, Masri R. Conditioned place preference reveals tonic pain in an animal model of central pain. *J Pain.* 2011; 12:868–874.
12. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain.* 1988; 33:87–107.
13. Chacur M, Milligan ED, Gazda LS, Armstrong C, Wang H, Tracey KJ, Maier SF, Watkins LR. A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. *Pain.* 2001; 94:231–244.
14. Sasamura T, Nakamura S, Iida Y, Fujii H, Murata J, Saiki I, Nojima H, Kuraishi Y. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. *Eur J Pharmacol.* 2002; 441:185–191.
15. Boyette-Davis JA, Cata JP, Driver LC, Novy DM, Bruel BM, Mooring DL, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Dougherty PM. Persistent chemoneuropathy in patients receiving the plant alkaloids paclitaxel and vincristine. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012
16. Cata JP, Weng HR, Dougherty PM. Behavioral and electrophysiological studies in rats with cisplatin-induced chemoneuropathy. *Brain Res.* 2008; 1230:91–98.
17. Malm C, Nyberg P, Engstrom M, Sjodin B, Lenkei R, Ekblom B, Lundberg I. Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopsies. *J Physiol.* 2000; 529(1):243–262.

18. Berberich P, Hoheisel U, Mense S. Effects of a carrageenan induced myositis on the discharge properties of group III and IV muscle receptors in the cat. J Neurophysiol. 1988; 59:1395–1409.
19. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. Pain. 1996; 64:493–501.
20. Pogatzki EM, Niemeier JS, Brennan TJ. Persistent secondary hyperalgesia after gastrocnemius incision in the rat. Eur J Pain. 2002; 6:295–305.



RWD | 瑞沃德

深圳市瑞沃德生命科技有限公司

☎ 400-966-9516 ✉ rwd@rwdls.com 💻 www.rwdls.com

📍 深圳市南山区打石1路深圳国际创新谷7栋A座19-20层