

· 学术交流 ·

## 囊泡单胺转运蛋白2缺陷小鼠多巴胺相关的帕金森病表现的研究

蒋颂 田仰华

230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院神经内科

通信作者:田仰华,Email:ayfytyh@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2019.08.008

**【摘要】目的** 观察特定敲除多巴胺能神经元中囊泡单胺转运蛋白2(VMAT2)相关基因的小鼠体内的单胺类神经递质的变化情况,并测定其帕金森病的相关表现。**方法** 取14月龄C57BL/6N背景小鼠(VMAT2<sup>fllox/+</sup>小鼠)作为对照组,取特定敲除多巴胺能神经元中50%的14月龄VMAT2的小鼠(VMAT2<sup>-/-</sup>小鼠)作为实验组,进行一系列行为学测验(各14只雄性小鼠),并利用高效液相色谱电化学法(HPLC-ED)检测两组小鼠(各5~6只)的脑组织中单胺类神经递质的含量,对多巴胺与帕金森病相关表现的关联性进行评价。**结果** VMAT2缺陷小鼠体内的多巴胺含量明显减低,而其他单胺类神经递质未见明显变化。该组小鼠表现出类似帕金森病的运动功能受损和嗅觉障碍,但是在其他的非运动方面,包括情绪改变、认知功能、睡眠等,均未发现明显功能异常。**结论** VMAT2与帕金森病密切相关,而多巴胺更多地参与帕金森病的运动性症状以及嗅觉表现中,对于情绪、认知、睡眠等多种非运动症状的贡献不大,此研究为根据临床表现合理选择神经递质相关药物提供了参考。

**【关键词】** 帕金森病; 囊泡单胺转运蛋白2; 多巴胺; 动物行为学; 运动性症状; 非运动性症状

**Dopamine related Parkinson disease in transgenic mice with a VMAT2-deficiency** Jiang Song, Tian Yanghua

Neurology Department, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

Corresponding author: Tian Yanghua, Email: ayfytyh@126.com

**【Abstract】Objective** To evaluate the alterations of the monoamine concentration in the selective vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) deficient mice, and observe the symptoms of dopamine related Parkinson disease. **Methods** The VMAT2<sup>fllox/+</sup> mice (14 months) with a background of C57BL/6N were selected as the control group. The VMAT2<sup>-/-</sup> mice (14 months) were developed by the Cre/loxP system to obtain conditional ablation of the Vmat2 gene specifically in the dopaminergic neurons, 50% of which were selected as the intervention group. A series of behavioral tests (14 male mice in each group) were carried out, and the monoamine neurotransmitters in the brain tissues of the two groups of mice (5-6 in each group) were detected by high performance liquid chromatography electrochemistry (HPLC-ED). The correlation between dopamine and Parkinson disease was evaluated. **Results** Mice with selected ablation of the Vmat2 gene in dopaminergic neurons showed selective reduction of dopamine concentration in the brain, and with dysfunctions in motor and olfactory abilities, but no significant deficits of other non-motor functions, such as cognition, emotional performances and sleep patterns. **Conclusions** VMAT2 is closely related to Parkinson disease, and dopamine is more involved in the motor and olfactory performance of Parkinson disease, but may not be so strong associated with other non-motor symptoms, such as disturbances in emotion, cognition and sleep. This study implies potentially adjustment of therapeutic strategies of Parkinson disease.

**【Key words】** Parkinson disease; Vesicular monoamine transporter 2; Dopamine; Animal ethology; Motor symptoms; Non-motor symptoms

帕金森病是一种常见于中老年的神经系统变性疾病。其临床表现复杂,包括运动和非运动的多

种症状体征,前者典型表现为静止性震颤、肌强直、运动迟缓和姿势步态障碍,后者则涉及嗅觉、精神、

认知功能等多个方面<sup>[1]</sup>。同时,其病因复杂,尤其牵涉其中的神经递质众多,如单胺类的多巴胺、去甲肾上腺素、5-羟色胺等。目前认为多巴胺与帕金森病密切相关,但是多巴胺是否能涵盖所有帕金森表现,以及其他单胺类神经递质可能负责了哪些症状体征,仍缺乏相关研究。近年来与单胺类神经递质相关的囊泡单胺转运蛋白2(vesicular monoamine transport proteins 2, VMAT2)成为帕金森病的研究热点<sup>[2]</sup>。本研究利用VMAT2转基因小鼠,定向减少其多巴胺能神经元内的VMAT2表达,以特异性降低小鼠体内多巴胺水平。再进行系统的行为学实验测试,观察单一多巴胺减少与帕金森病的众多症状体征之间的关联性,推测其他神经递质所负责的临床表现,探寻使用动物模型来观察特定神经递质与临床表现的研究方法,并期望利用实验结果为临床根据不同的症状体征而选择针对不同神经递质的治疗方案提供指导。

## 一、材料与方法

### (一) 实验动物

对照组为C57BL/6N背景小鼠(VMAT2<sup>lox/+</sup>),实验组为同背景下借助Cre/loxP系统选择性敲除多巴胺能神经元内的VMAT2基因(VMAT2<sup>-/-</sup>)的小鼠,均由德国海德堡大学曼海姆医学院分子生物学实验室提供。神经化学分析脑组织中对照组和实验组各为5~6只小鼠,行为学实验中对照组及实验组各为14只雄性小鼠(以避免荷尔蒙对行为学实验的影响),所有实验小鼠均为14月龄。小鼠饲养在标准动物房内,室温(22±1)℃,湿度为60%,人工控制昼夜12 h节律(亮灯时间:晚7:30—早7:30),行为学实验在暗节律中进行,采用红外灯为实验者照明。所有动物相关饲养及实验均遵循当地动物福利相关法律法规(AZ 35-9185-81-G-193/11, Regierungspasidium Karlsruhe)。

### (二) 行为学测试

1. 抓力测试:小鼠的肌肉状况由前爪的抓力峰值来反映<sup>[3]</sup>。握住小鼠尾部,使其前爪抓稳自动测力计(Bioseb, 法国)的三角形握持柄后,保持小鼠前爪、身体、尾部基本在同一水平面上。实验者向后水平拉小鼠,直至其因抓握不住而松爪,测力计记录下松爪前的抓力峰值。每只小鼠进行6次测量,取6次结果的平均值作为最终结果。

2. 平衡木行走实验:平衡木行走实验用于测试小鼠的运动平衡协调能力<sup>[4]</sup>。实验中所用平衡木长度均为80 cm,但是具有不同的形状和宽度,分别为

宽度为15 mm(方15 mm)或10 mm(方10 mm)的方形平衡木或直径为10 mm(圆10 mm)的圆棍状。平衡木架在离参考平面30 cm高处,出发端置于普通平面上,到达端置于被测试小鼠自己的笼子里,以诱使小鼠通过平衡木走向自己的笼子。实验的前4 d小鼠在方15 mm平衡木上进行适应性训练,练习学会在平衡木上行走。实验当天按照方15 mm、方10 mm、圆10 mm从难到易的顺序,让小鼠依次通过不同的平衡木,记录小鼠通过时间,每根平衡木上进行两次实验,取平均值作为结果,观察其运动协调能力。

3. 步态分析:小鼠的步态分析可通过“印泥法”得到<sup>[5]</sup>。将小鼠前后爪分别涂上两种不同颜色的安全颜料(Marabu GmbH & Co.KG, 德国),将其笼子置于一张记录纸(99 mm×420 mm)的末端作为引诱物,训练小鼠可从记录纸上沿直线走向末端,记录纸上得到小鼠的颜料足迹。分别测其左右两侧的前爪和后爪分别一步的距离(步周长, stride length),取同侧步周长的平均值记录。

4. 旷野实验(暗室):该实验用于评测小鼠的运动能力<sup>[6]</sup>。暗室中,小鼠被置于敞箱(50 cm×50 cm×50 cm)装置的中心位置,可在其中自由探查30 min,连续进行3 d。由Etho Vision 3.0(Noldus Information Technology, 瓦赫宁恩, 荷兰)软件自动记录分析小鼠在测试时间内的运动距离,第1天为适应性训练,取后两天实验结果的平均值作为评测参数。

5. 嗅觉测试:嗅觉测试将小鼠暴露于两种不同的嗅觉材料中<sup>[5]</sup>。取两只玻璃圆底小皿( $r=20$  mm,  $h=30$  mm)分别盛不同的嗅觉材料,对称居中置于敞箱(40 cm×40 cm×30 cm)中。实验分两轮进行,时间均为2 min。第一轮时两个小皿中均盛取自实验小鼠自己笼子里的木絮垫料,第二轮时将其中一个小皿内垫料换成取自陌生雄性小鼠的笼子的垫料。记录小鼠嗅闻不同小皿的时间(以小鼠鼻子距离小皿<1 cm为有效嗅闻)。小鼠发现陌生气味后,会本能地探查陌生气味材料。记录小鼠对不同嗅觉材料的嗅闻时间的百分比,来评定小鼠对不同气味的区别能力。

6. 明暗箱实验:明暗箱实验利用小鼠对新奇环境的试探特性和对明箱的亮光本能的规避形成的矛盾冲突来考察焦虑状态<sup>[7]</sup>。明暗箱由20 cm×15 cm的完全被遮光的暗箱和30 cm×15 cm的明箱组成,明箱内上方照明亮度为至少600 lux,两箱之间由一通道连接。在实验开始时,小鼠被置于暗箱中,可

在实验的5 min内自由探查暗箱或者明箱,记录实验小鼠进入明箱的总时间及探查明箱的次数。

7.蔗糖水实验:小鼠有喜食甜味食物的天性,可利用蔗糖水测试小鼠是否有食欲减退,反映抑郁行为<sup>[2]</sup>。实验为连续3 d,每天都在暗节律开始后取走小鼠笼中的饮水瓶,断水4 h后,给小鼠同时提供清水和不同浓度的蔗糖水(第1天:0.5%蔗糖水;第2天:1.5%蔗糖水;第3天:1.0%蔗糖水),记录小鼠1 h内的饮用情况,计算小鼠饮用蔗糖水占总饮量的百分比。

8.悬尾实验:将小鼠尾部用胶带悬挂至特定悬尾装置(Bioseb,沙威尔,法国),头朝下悬挂5 min,正常小鼠会有明显的挣扎行为,记录仪可记录小鼠静止不挣扎的时间,反映抑郁行为<sup>[5]</sup>。

9.新物品再认实验:新物品再认实验可反映小鼠的记忆与学习能力<sup>[8]</sup>。该实验在一个40 cm × 40 cm大小的方形无盖敞箱中进行,敞箱中放有两个材质形状一样的物品(圆柱形塑料瓶或者锥形玻璃瓶选其一),小鼠自由探查约5 min后,将小鼠放回自己笼子15 min,再返回敞箱,这时其中一个物品已更换为另外一种物品(如圆柱形塑料瓶换成锥形玻璃瓶,或反之)。记录小鼠探查新老物品的时间,并计算探查新物品所占总实验时间的百分比作为结果,判断小鼠是否有良好的情景记忆以发现新物品。

10.睡眠节律记录:小鼠的睡眠及活动节律可用鼠类“E-motion”记录仪(Infra-E-Motion,德国)记录<sup>[5]</sup>。将记录仪置于小鼠笼子顶部,小鼠在笼中活动时通过记录仪下方,便可被记录下来。连续记录72 h,取3 d的运动量平均值,得到其昼夜活动节律曲线,以评价小鼠的睡眠情况。

### (三)小鼠脑组织中神经递质浓度分析

分别取实验组和对照组小鼠5~6只,断头处死后立刻剥离组织,储存于-80℃超低温冰箱备用。用组织提取针在镜下吸取小鼠如下不同部位:额叶、海马、中脑腹侧被盖区/黑质致密区、纹状体的脑组织,处理后通过高效液相色谱电化学法(HPLC-ED)检测不同部位的单胺类神经递质(多巴胺,去甲肾上腺素,5-羟色胺)的含量(单位:pmol/mg脑组织)。

### (四)统计学方法

数据均使用SPSS 16.0进行统计学分析,并使用GraphPad Prism 5绘制图表。计量资料符合正态分布,以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,以独立样本的*t*检验进行差异分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 二、结果

1. VMAT2<sup>-/-</sup>小鼠脑组织内不同部位单胺类神经递质含量变化:见表1~3。相较于对照组VMAT2<sup>fllox/+</sup>小鼠,实验组VMAT2<sup>-/-</sup>小鼠脑组织中多巴胺含量减低,尤其在额叶、中脑腹侧被盖区/黑质致密区和纹状体等部位( $P < 0.05$ ),而去甲肾上腺素、5-羟色胺未见明显的含量改变。

表1 小鼠脑组织中多巴胺的含量(pmol/mg,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	额叶	海马	中脑腹侧被盖区/黑质致密区	纹状体
对照组	6	0.24 ± 0.03	0.80 ± 0.23	2.09 ± 0.81	55.42 ± 5.95
实验组	5	0.19 ± 0.03	0.61 ± 0.17	1.14 ± 0.04	44.39 ± 9.77
<i>t</i> 值		2.416	1.876	2.373	2.307
<i>P</i> 值		0.039	0.093	0.045	0.046

表2 小鼠脑组织中去甲肾上腺素的含量(pmol/mg,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	额叶	海马	中脑腹侧被盖区/黑质致密区	纹状体
对照组	6	2.66 ± 0.27	2.69 ± 0.26	3.60 ± 0.95	0.98 ± 0.70
实验组	5	2.44 ± 0.55	2.51 ± 0.18	3.03 ± 0.52	0.73 ± 0.30
<i>t</i> 值		0.876	1.168	1.170	0.745
<i>P</i> 值		0.404	0.277	0.273	0.475

表3 小鼠脑组织中5-羟色胺的含量(pmol/mg,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	额叶	海马	中脑腹侧被盖区/黑质致密区	纹状体
对照组	6	1.91 ± 0.20	1.07 ± 0.19	2.48 ± 0.66	1.82 ± 0.15
实验组	5	1.33 ± 0.39	0.84 ± 0.17	2.11 ± 0.59	1.74 ± 0.45
<i>t</i> 值		3.190	1.774	0.956	0.406
<i>P</i> 值		0.011	0.114	0.367	0.694

2. VMAT2<sup>-/-</sup>小鼠的运动能力变化:见表4。在抓力实验中,VMAT2<sup>-/-</sup>小鼠的前爪抓力弱于VMAT2<sup>fllox/+</sup>小鼠( $P < 0.05$ )。步态分析中,VMAT2<sup>-/-</sup>小鼠较VMAT2<sup>fllox/+</sup>小鼠存在步周长减小,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。旷野实验中,两组小鼠的运动表现差异则未见统计学意义。平衡木行走实验的结果见图1,在宽度为10 mm的方形平衡木及宽度为15 mm的方形平衡木上,相较于VMAT2<sup>fllox/+</sup>小鼠[方10:(12.00 ± 1.67)s;方15:(6.62 ± 1.19)s],VMAT2<sup>-/-</sup>小鼠需要较长的时间[方10:(17.38 ± 3.76)s;方15:(9.96 ± 3.68)s]才能通过平衡木(方10: $t = -4.714$ , $P < 0.01$ ;方15: $t = -3.226$ , $P < 0.01$ );在直径为10 mm的圆棍状平衡木中,两组小鼠的所用时间之间差异无统计学意义[VMAT2<sup>fllox/+</sup>:(12.25 ± 3.13)s;VMAT2<sup>-/-</sup>:

表4 两组小鼠在运动测试中的表现( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	抓力测试(Gr)	步态分析(步周长, mm)				旷野实验[运动距离(cm)]
			前左爪	前右爪	后左爪	后右爪	
对照组	14	83.12 ± 9.07	83.50 ± 8.76	85.11 ± 7.80	82.78 ± 9.27	83.96 ± 7.37	4 034.03 ± 922.10
实验组	14	74.61 ± 11.06	76.46 ± 7.47	75.69 ± 5.77	76.97 ± 6.77	76.14 ± 5.59	3 768.17 ± 1 313.39
t值		2.228	2.167	3.449	1.798	3.005	0.620
P值		0.035	0.041	0.002	0.085	0.006	0.541

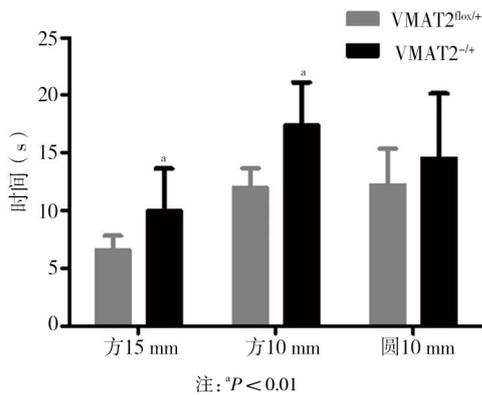


图1 平衡木实验中两组小鼠通过不同直径、形状平衡木所用的时间比较

(14.54 ± 5.61)s ]。

3. VMAT2<sup>-/-</sup>小鼠的嗅觉变化: 见表5。利用不同的嗅觉材料测试小鼠的嗅觉能力, 出于小鼠探查新奇的本能, 当区分出不同气味后, 相较于已知的熟悉气味(取自自己笼子的垫料), VMAT2<sup>flox/+</sup>小鼠会花较多时间探查陌生的气味, 而VMAT2<sup>-/-</sup>小鼠表现出对两种嗅觉材料的探查时间接近1:1, 两组数据之间差异有统计学意义(P < 0.01), 反映出缺乏多巴胺的实验组小鼠难以区分两组不同的气味, 存在嗅觉减退。

4. VMAT2<sup>-/-</sup>小鼠的情感障碍、认知功能或睡眠障碍变化: 见表5、图2~3。表5结果显示, 在反映焦虑状态的明暗箱实验中, 两组小鼠均表现出较少的探查行为, 倾向于待在安全区, 但组间结果差异无统计学意义。在抑郁相关的蔗糖水实验(图2)和悬尾实验(表5)中, 两组小鼠则均表现出喜食蔗

糖水以及面对悬尾会积极挣扎, 无抑郁表现, 且两组之间差异无统计学意义。在新物品识别实验中(表5), 两组小鼠均能发现新物品并表现出对新物品的探查兴趣, 组间差异无明显统计学意义, 未发现VMAT2<sup>-/-</sup>小鼠存在认知功能减退。利用“E-motion”记录仪得到小鼠的昼夜曲线, 见图3, 两组小鼠均在关灯后黑暗中2~4 h左右醒来并开始活动, 在亮灯后2 h左右逐渐减少活动并进入睡眠, 两组小鼠均未发现明显的睡眠障碍。

讨论 VMAT2, 由SLC18A2编辑并表达于中枢神经系统<sup>[9]</sup>, 介导细胞内单胺类神经递质转运至囊泡内并释放至突触间隙<sup>[10]</sup>。这一过程, 一方面完成了单胺类神经递质的生理功能, 另一方面也避免了单胺在细胞内降解并产生一系列细胞毒性代谢产物, 起到了神经保护作用<sup>[11]</sup>。VMAT2缺陷会扰乱上述生理过程, 可能造成神经元死亡, 进而引发神经变性疾病, 比如帕金森病<sup>[12]</sup>。

在帕金森病的前期研究中, 众多实验利用VMAT2转基因技术得到了和人类临床表现相似性高的小鼠帕金森病模型。研究中发现若完全敲除VMAT2基因, 缺乏VMAT2的小鼠会难以存活至成年; 若保留至少5%的VMAT2表达, 小鼠可存活至成年, 并表现出帕金森病症状<sup>[13]</sup>。本研究减少50%的VMAT2表达, 并将该改变定位于多巴胺能神经元, 以得到单一的多巴胺浓度减低。通过神经化学分析, 本研究中VMAT2<sup>-/-</sup>小鼠脑组织内多巴胺含量较对照组明显降低, 而其他单胺类神经递质含量基本未受影响, 证实了该动物模型符合预期设计。

帕金森病的运动性症状为特征性表现, 小鼠的

表5 两组小鼠在非运动性测试中的表现( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	嗅觉实验[嗅闻陌生气味所占百分比(%)]	明暗箱实验		悬尾实验[静止不挣扎的时间(s)]	新物品再认实验[探查新物品时间所占百分比(%)]
			待在明箱的时间(s)	探查明箱的次数		
对照组	14	69.74 ± 7.96	21.74 ± 11.06	4.92 ± 2.62	115.92 ± 42.44	67.13 ± 18.29
实验组	14	52.79 ± 11.01	22.23 ± 12.81	5.29 ± 3.27	139.00 ± 42.82	62.46 ± 17.90
t值		4.496	-0.106	-0.316	-1.380	0.683
P值		0.001	0.916	0.755	0.180	0.500

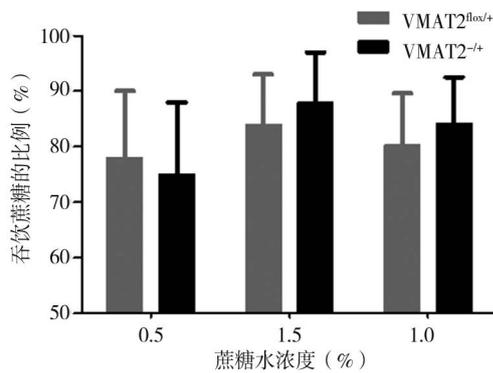


图2 两组小鼠蔗糖水实验结果比较

肌肉状态、行走能力以及步态特点常被用来模拟评估人类的帕金森病运动性临床表现。本研究中 VMAT2<sup>-/-</sup> 小鼠表现出了较差的抓握能力和行走能力，与帕金森病的早期以手指精细动作缓慢、后逐渐发展为全面性的随意运动困难的特点相一致<sup>[14]</sup>，此为运动迟缓相关的运动能力降低。同时，在步态实验中，VMAT2<sup>-/-</sup> 小鼠的步周长较对照组明显缩短，此与帕金森病特征性的“慌张步态”相一致，与肌强直状态相关<sup>[15]</sup>。以上的实验结果基本不受小鼠的情绪状态影响，因所有实验小鼠在进行实验前均给予足够的时间或预实验以适应环境和实验条件，因此该结果表明，多巴胺缺失与帕金森病的运动性表现密切相关，甚至单一缺乏多巴胺即可足够引发相关症状。

据德国的 Braak 教授的理论，帕金森病中的嗅觉减退与嗅觉系统(嗅球、前嗅核)受累相关，即 Braak 分期中的 I 期<sup>[16]</sup>。嗅觉减退作为非运动症状之一，常常出现于帕金森病的早期，可早于运动性症状的出现<sup>[17]</sup>。在本研究中，VMAT2<sup>-/-</sup> 小鼠存在运动能力的减退，也表现出了嗅觉的减退，证实了嗅觉障碍是帕金森病的一项比较稳定的非运动特征，且在运动性症状出现时也已经明显受累，侧面反映

了其早发性；而多巴胺可能与其密切相关，甚至单一的多巴胺水平减低，便可出现嗅觉的减退。

帕金森病的非运动表现还包括很多方面，如情绪障碍、认知减退及睡眠障碍等，这些功能失调往往给帕金森病患者带来很大痛苦，也给其家庭护理带来较大的难度<sup>[18-19]</sup>。本研究分别在帕金森病的 VMAT2 小鼠模型上监测了焦虑、抑郁、物品再认、睡眠等方面，均未发现明显的功能异常。既往也有研究指出，关于帕金森病的情绪障碍不仅与多巴胺，也与其他单胺类神经递质(如去甲肾上腺素)在边缘系统的改变有关<sup>[20]</sup>。考虑到去甲肾上腺素、5-羟色胺在结构上及代谢方面与多巴胺的相似性，也不难理解其在功能的某些方面存在密不可分性。因此，帕金森病的多数非运动性表现不能仅仅以多巴胺水平的降低来解释，与其他的单胺类神经递质可能存在密切关系。

近期的发表在《新英格兰杂志》上的一项研究表明，在帕金森病的疾病早期服用左旋多巴可能并不能起到疾病修饰效果<sup>[21]</sup>。考虑到在帕金森病的早期，多数表现为非运动性症状，而本研究的结果表明，这些表现可能与体内多巴胺的水平并无完全一致的密切关系，同时，若患者存在 VMAT2 的功能障碍，富余在细胞内的多巴胺会代谢产生细胞毒性作用，反而可能会加速多巴胺能神经元的死亡，进而加重帕金森病的症状。因而，在临床上针对不同的症状，选择不同的治疗方案尤为重要，而这也要求在科研上需要进一步进行相关研究，完善对不同神经递质的功能的理解，建立起帕金森病不同的症状与神经递质之间的关联，以供临床参考。

综上所述，特异性多巴胺水平降低的 VMAT2 功能缺陷小鼠反映了多巴胺水平与帕金森病的运动性症状、嗅觉障碍相关，但其他多数非运动性症状未明显受其直接影响，该研究为帕金森病的临床治疗方案选择提供了新的思路。

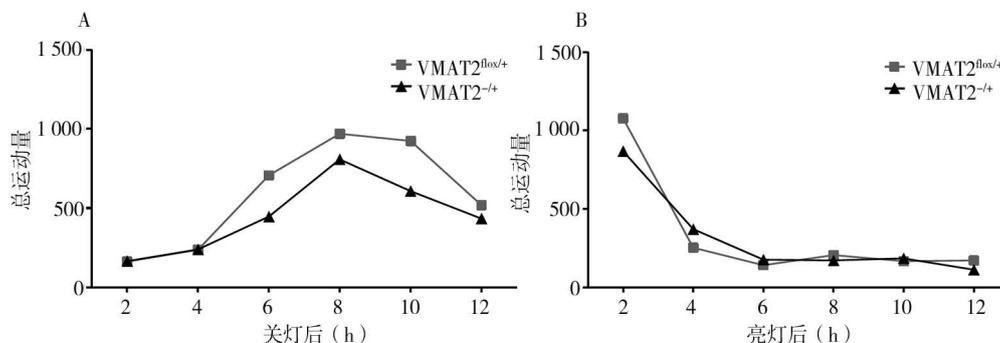


图3 使用E-motion记录的小鼠的昼夜活动节律

**利益冲突** 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

**作者贡献声明** 实验设计、研究实施、数据处理、论文撰写为蒋颂, 论文修订、审校为田仰华

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease[ J ]. *Lancet*, 2015, 386(9996): 896-912. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61393-3.
- [ 2 ] Fukui M, Rodriguiz RM, Zhou J, et al. Vmat2 heterozygous mutant mice display a depressive-like phenotype[ J ]. *J Neurosci*, 2007, 27(39): 10520-10529. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4388-06.2007.
- [ 3 ] Ge X, Cho A, Ciol MA, et al. Grip strength is potentially an early indicator of age-related decline in mice[ J ]. *Pathobiol Aging Age Relat Dis*, 2016, 6(1): 32981. DOI: 10.3402/pba.v6.32981.
- [ 4 ] Mooslehner KA, Chan PM, Xu W, et al. Mice with very low expression of the vesicular monoamine transporter 2 gene survive into adulthood: potential mouse model for parkinsonism[ J ]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(16): 5321-5331. DOI: 10.1128/MCB.21.16.5321-5331.2001.
- [ 5 ] Taylor TN, Caudle WM, Shepherd KR, et al. Nonmotor symptoms of Parkinson's disease revealed in an animal model with reduced monoamine storage capacity[ J ]. *J Neurosci*, 2009, 29(25): 8103-8113. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1495-09.2009.
- [ 6 ] Caudle WM, Richardson JR, Wang MZ, et al. Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration[ J ]. *J Neurosci*, 2007, 27(30): 8138-8148. DOI: 10.1523/jneurosci.0319-07.2007.
- [ 7 ] Hascoët M, Bourin M. The Mouse Light-Dark Box Test[ M ] //Gould T. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. *Neuromethods*, Totowa, NJ: Humana Press, 2009: 197-223.
- [ 8 ] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications[ J ]. *Cogn Process*, 2012, 13(2): 93-110. DOI: 10.1007/s10339-011-0430-z.
- [ 9 ] Eiden L, Schäfer MK, Weihe E, et al. The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine[ J ]. *Pflugers Arch*, 2004, 447(5): 636-640. DOI: 10.1007/s00424-003-1100-5.
- [ 10 ] Lohr KM, Masoud ST, Salahpour A, et al. Membrane transporters as mediators of synaptic dopamine dynamics: implications for disease[ J ]. *Eur J Neurosci*, 2017, 45(1): 20-33. DOI: 10.1111/ejn.13357.
- [ 11 ] Lohr KM, Bernstein AI, Stout KA, et al. Increased vesicular monoamine transporter enhances dopamine release and opposes Parkinson disease-related neurodegeneration in vivo[ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(27): 9977-9982. DOI: 10.1073/pnas.1402134111.
- [ 12 ] Pifl C, Rajput A, Reither H, et al. Is Parkinson's disease a vesicular dopamine storage disorder? Evidence from a study in isolated synaptic vesicles of human and nonhuman primate striatum[ J ]. *J Neurosci*, 2014, 34(24): 8210-8218. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5456-13.2014.
- [ 13 ] Taylor TN, Caudle WM, Miller GW. VMAT2-Deficient Mice Display Nigral and Extranigral Pathology and Motor and Nonmotor Symptoms of Parkinson's Disease[ J ]. *Parkinsons Dis*, 2011, 2011: 1-9. DOI: 10.4061/2011/124165.
- [ 14 ] Frazzitta G, Ferrazzoli D, Maestri R, et al. Differences in muscle strength in parkinsonian patients affected on the right and left side[ J ]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121251. DOI: 10.1371/journal.pone.0121251.
- [ 15 ] Mirelman A, Bonato P, Camicioli R, et al. Gait impairments in Parkinson's disease[ J ]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(7): 697-708. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30044-4.
- [ 16 ] Braak H, Rüb U, Gai WP, et al. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen[ J ]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2003, 110(5): 517-536. DOI: 10.1007/s00702-002-0808-2.
- [ 17 ] Sui X, Zhou C, Li J, et al. Hyposmia as a Predictive Marker of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis[ J ]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 3753786. DOI: 10.1155/2019/3753786.
- [ 18 ] Balestrino R, Martinez-Martin P. Reprint of "Neuropsychiatric symptoms, behavioural disorders, and quality of life in Parkinson's disease"[ J ]. *J Neurol Sci*, 2017, 374: 3-8. DOI: 10.1016/j.jns.2017.01.026.
- [ 19 ] Majbour N, El-Agnaf O. Cognitive impairment in Parkinson's disease[ J ]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(1): 23-24. DOI: 10.1016/S1474-4422(16)30329-5.
- [ 20 ] Remy P, Doder M, Lees A, et al. Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system[ J ]. *Brain*, 2005, 128(6): 1314-1322. DOI: 10.1093/brain/awh445.
- [ 21 ] Verschuur CVM, Suwijn SR, Boel JA, et al. Randomized Delayed-Start Trial of Levodopa in Parkinson's Disease[ J ]. *N Engl J Med*, 2019, 380(4): 315-324. DOI: 10.1056/NEJMoa1809983.

(收稿日期: 2019-06-09)

(本文编辑: 戚红丹)