

王笑冉, 郑攀. 发作性睡病动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 143–148.

Wang XR, Zheng P. Research progress on animal models of paroxysmal narcolepsy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 143–148.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 03. 021

发作性睡病动物模型研究进展

王笑冉, 郑攀*

(河南中医药大学基础医学院, 郑州 450046)

【摘要】 发作性睡病(narcolepsy, NRL)是一种觉醒-睡眠紊乱的慢性神经系统疾病,其具体病因及发病机制尚未明确,中、西医治疗存在困难。动物模型是研究发作性睡病的神经病理学机制,挖掘潜在治疗靶点及方法的重要手段。本文对目前已有的发作性睡病动物模型的制备方法、模型评价及适用范围等进行总结,旨在为该病的基础实验研究提供造模参考,并对优化发作性睡病动物模型的制备方向提供思路。

【关键词】 发作性睡病;动物模型;研究进展

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0143-06

Research progress on animal models of paroxysmal narcolepsy

WANG Xiaoran, ZHENG Pan*

(Basic Medical College, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】 Narcolepsy is a chronic nervous system disease with arousal sleep disorder. Its specific pathogenesis is unclear and it is difficult to treat by traditional Chinese and western medicines. Animal models are important to study the neuropathological mechanism and potential treatment of paroxysmal narcolepsy. This article summarizes the preparation method, evaluation, and application scope of existing animal models of paroxysmal narcolepsy to provide a reference for basic experimental research of the disease. It also provides ideas to optimize the preparation of paroxysmal narcolepsy animal models.

【Keywords】 narcolepsy; animal model; research progress

发作性睡病一词,由 Gelineau 于 1880 年首次提出,本病是一种原因不明的中枢性睡眠障碍,以白天不可抗拒的短期嗜睡发作和异常的快速动眼睡眠(猝倒、睡眠幻觉和睡眠瘫痪)为典型特征,多于儿童或青年期起病^[1]。由于对此病缺乏认识,常出现漏诊而延误治疗,严重影响患者的工作学习生活,甚至造成意外事故危及生命。选择合适的动物模型用于研究该病发病机制,发掘潜在的治疗靶点显得尤为重要。本文对目前已有的发作性睡病模型进行综述,总结其诱发机制、模型应用的优缺点等,以便研究者可以据此选择更贴合实验目的的造

模方法,获得更准确的研究结果。

1 自发性动物模型

自发性动物模型指实验动物未经任何人工干预,在自然状态下发生的、或由基因突变的异常表现通过遗传育种保留下来的动物疾病模型^[2]。目前,已证实的 NRL 自发性模型为犬类动物模型。早在上世纪八十年代,人们在犬身上发现与人类发作性睡病极为相似的症状^[3-4]。1999 年, Lin 等^[5]揭示了犬发作性睡病是由于食欲素受体 2 (orexin receptor 2, OX2R) 的基因突变。家族性发作性睡病

【基金项目】 河南省科技厅科技攻关项目(182102310299);河南省中医药科学研究专项(20-21ZY2021);河南中医药大学研究生创新基金(YJS2018B06)。

【作者简介】 王笑冉(1995—),女,硕士,研究方向:方剂作用机理与配伍规律研究。E-mail: wxr18300671729@163.com

【通信作者】 郑攀(1977—),男,博士,主任医师,教授,硕士生导师,研究方向:方剂作用机理与配伍规律研究及儿科神经疾病研究。
E-mail: wwwzp2020@126.com

呈常染色体隐性遗传存在于杜宾犬和拉布拉多猎犬的品系中,由 OX2R 基因的外显子跳跃突变引起,而散发性犬发作性睡病与脑脊液中食欲素多肽显著降低有关。其表现为突然的肌张力丧失和快速动眼睡眠(rapid eye movement sleep, REM)发作,首次出现在青春期前,成年后症状相对减轻^[6-7]。自此各种基于下丘脑泌素/食欲素系统(hypocretin, Hcrt)的动物模型根据不同的研究目的被建立。

2 基因工程模型

2.1 基因敲除模型

2.1.1 Hcrt/Orexin 基因敲除小鼠

食欲素(orexin),又称下丘脑泌素,是下丘脑外侧区食欲素能神经元合成和分泌的小分子神经肽(Hcrt-1、Hcrt-2 或称 Orexin-A、Orexin-B),其来源于同一种前体多肽并通过蛋白水解产生^[8-9]。人类食欲素原基因(prepro-orexin)由两个外显子和一个内含子组成,通过克隆 prepro-orexin-nlacZ 融合基因替换小鼠 prepro-orexin 基因的第一个外显子获得重组基因并导入 C57BL/6J 小鼠胚胎干细胞,借助杂交建立纯合子 Orexin 基因敲除小鼠。经免疫组化、原位杂交及放射免疫分析方法均证实,该小鼠 Hcrt 神经阳性表达丧失,出现与人类 NRL 相似的嗜睡、睡眠周期缩短及次数增加等症状。表现为 REM 潜伏期缩短,觉醒时间略有减少,觉醒-REM 转换加快,但有正常的非快速动眼睡眠(non-rapid eye movements, NREM)^[10-11]。Mochizuki 等^[12]对 Orexin 基因敲除小鼠进行深入研究,证实其具有正常睡眠-觉醒行为的昼夜节律控制,且受 Orexin 高度刺激的促觉醒单胺类神经递质如去甲肾上腺素和组胺等未见异常。Orexin 基因敲除小鼠证明了 Hcrt 神经元是内源性睡眠/觉醒调节系统的重要组成部分,但代偿表达增强的下丘脑外侧黑色素浓缩激素神经元仍可调节睡眠-觉醒回路,明显干扰了研究对 Orexin 基因本身表达产生嗜睡的解释^[13-15]。

2.1.2 OX2R/OX1R 基因敲除小鼠

Orexin 通过与 G 蛋白偶联受体(OX1R 和 OX2R)结合,参与调节多种生理反应。在大脑皮层,OX1R 和 OX2R 的 mRNA 表达有明显的昼夜节律^[16-17]。Willie 等^[18]通过线性化载体的同源重组,在胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)中用 β 半乳糖苷酶(LacZ)和新霉素抗性(NEO)表达盒替换 OX2R 基因第一个外显子。正确定向的 ES 细胞克隆被分离并注射到 C57BL/6J 囊胚中。纯合型小鼠

无法检测 OX2R mRNA 表达,在睡眠结构上表现出轻度的 REM 睡眠增加和猝倒发作,并出现清醒状态下的 NREM 睡眠侵入。Kalogiannis 等^[19]基于纯合单受体基因敲除杂合子 OX2R/OX1R 构建双重 Orexin 受体基因敲除小鼠,表现出了较 OX2R 基因敲除小鼠更强烈的发作性睡病表型,特征为频繁发作的觉醒-睡眠转换;REM 睡眠潜伏期缩短,时间延长;觉醒时间显著减少并出现猝倒发作,其与 Orexin 基因敲除小鼠行为学相似。对 Hcrt 受体的遗传操作是构建发作性睡病模型的另一种方法。

2.2 转基因模型

2.2.1 Orexin/Ataxin-3 转基因小鼠

Ataxin-3 是脊髓小脑性共济失调 3 型的疾病蛋白,多选用 SD 大鼠或 Wistar 小鼠建模。Beuckmann 研究小组首次构建 Orexin/Ataxin-3 mice,通过在 prepro-orexin 启动子后连接一段在 N 端表达含有多聚谷氨酸片断的 ataxin-3 蛋白,在 C 端连接用于组织学检查的 Myc 癌基因序列,对尾部活检组织的基因组 DNA 进行 PCR 扩增并注射到 Wistar 小鼠受精卵原核中,产成 Orexin/Ataxin-3 转基因系^[20-21]。由于 Hcrt 启动子驱动的细胞毒基因产物 PolyQ-ataxin-33 积累,Hcrt 神经元逐渐选择性地丢失。17 周龄,用 Myc 标记免疫组织化学染色法检测显示转基因小鼠下丘脑外侧区出现 Hcrt 阳性神经元丧失,在乳头核、中央灰质、穹隆周围核、弓状核等同样缺乏 Hcrt 投射。在睡眠结构上,模型小鼠表现出亮期 REM 潜伏期缩短,暗期觉醒时间减少、REM 睡眠时间延长,觉醒-REM 转换加快,但在 24 h 的清醒和 NREM 睡眠时间保持不变。此模型中 Hcrt 神经元消融是渐进性的,减轻了结构性食欲素原基因敲除的代偿作用,更能代表人类发作性睡病的病理改变。

2.2.2 OX2R 转录干扰小鼠

OX2R 对 Orexin-A 和 Orexin-B 表现出同等的亲和力,在大脑皮层、隔核、海马、丘脑内侧核、中缝核和许多下丘脑核(包括组胺能结节乳头核)中的表达显著^[22-23]。基于 Cre-loxP 重组^[24],采用了转录干扰策略在 EL250 细菌细胞中构建靶向载体,使用 loxP 侧翼的基因盒来干扰 OX2R 的产生,利用下丘脑结节乳头核(tuberomammillary nucleus, TMN)神经元 orexin-A 细胞电生理反应的缺失验证该菌株中 OX2R 信号的缺失。进一步将编码 Cre 重组酶的腺相关病毒载体(AAV-Cre)注射到 C57BL/6J 小鼠双侧颞下颌核区,以确定局部恢复 OX2R 表达;并通过 OX2R 转录干扰小鼠与雌性胚系中表达 Cre 重组酶的 Zp3-Cre 小鼠(jackson laboratory)杂交,完全恢复

OX2R 信号^[25]。模型小鼠维持清醒的能力降低,表现为嗜睡和睡眠碎片化;与 Orexin 敲除小鼠不同,OX2R 转录干扰小鼠只有罕见的猝倒发作。用 AAV-Cre 局部恢复 TMN 神经元和邻近下丘脑后部的 OX2R 后嗜睡症状有所减轻,但仍存在睡眠破碎。该模型制备过程是可逆的,可作为自身观察对照,为 NRL 的靶向治疗提供思路,且为开发食欲素受体拮抗剂用于失眠的治疗提供了科学依据。

2.2.3 O/E3 转录因子缺失小鼠

O/E3 属于碱性螺旋-环状转录因子家族,通过控制必需的下丘脑神经递质的表达及下丘脑神经纤维的正常发育,在功能性 Hcrt 能回路的建立过程中起着核心作用^[26]。研究发现 O/E3 在 NRL 和 Hcrt 能群体退化的模型中表达下调^[27]。De La Herrán-Arita 等^[28]使用 pRVKI 载体来构建 O/E3 靶向构建体,并用可选择标记 PGK-neo 取代 O/E3 基因的前 5 个外显子。克隆一个 3.2 kb 的 O/E3 启动子区域的 Xho IBamH I 片段,作为单纯疱疹病毒酪氨酸激酶与 pRVKI 的 PGK-neo 选择标记之间的 5' 同源臂。从 O/E3 基因下游至第 5 外显子的 5.3 kb 的 Spe I-Sal I 片段被克隆为 pRVKI 载体 pGK-neo 选择标记下游的 3' 同源臂。再将 PCR 和 Southern 杂交检测呈阳性,并携带正确的靶向插入的 ES 细胞注射到 C57BL/6Ncr1 小鼠囊胚中,获得 O/E3 缺失的纯合子小鼠。其表现出 REM、NREM 睡眠时间延长,REM 潜伏期缩短,暗期觉醒时间减少,出现睡眠幻觉及厌食症状。免疫组化染色发现,O/E3 缺失导致下丘脑 Hcrt 细胞数量显著减少,局限于后部及穹隆周围区域。脑桥食欲素能神经支配受损,通过静脉注射 Hcrt-1 可逆转发作性睡病表型^[29]。此模型突出了转录因子在控制睡眠-觉醒周期的神经亚群调节中的重要性,为理解复杂的食欲素神经元电路开辟了新的选择。

3 化学诱导动物模型

3.1 白喉毒素 A(diphtheria toxin chain A, DTA) 诱导模型

白喉毒素是一种具有高度免疫原性的蛋白质,可导致生物神经脱髓鞘。基于 Tet-off 调控系统控制转基因表达的技术,将白喉毒素受体基因特定表达于小鼠 Hcrt 启动子上,构建 Teto DTA 小鼠。用哺乳动物四环素控制的转录激活因子(tetracycline-controlled transactivator, TTA)片段取代 Hcrt/nLacZ 转基因构建体的 nLacZ 基因,并注射到 Teto DTA 小鼠受精卵(C57BL/6 小鼠)的原核中,通过 C57BL/

6J 小鼠培育出稳定的 Hcrt-TTA 转基因品系^[30]。Hcrt 神经元变性由四环素反式激活因子 Tet-off (Teto) 系统控制的,膳食多西环素(doxycycline, DOX)与 TTA 结合,通过 Tet-off 调节蛋白阻止 DTA 的合成。由于 TTA 被连接到 Hcrt 启动子上,从饮食中去除 DOX 会启动 DTA 的合成,仅在 Hcrt 神经元中产生神经毒性^[31-32]。配对的 Hcrt-TTA 小鼠和 Teto DTA 小鼠进行交配产生 Hcrt-TTA/Teto DTA 小鼠,将 10% DOX 粉添加入正常饲料,在产前和出生后 12 周内使用含 DOX 饲料喂养,后换成普通饲料喂养至 14 周,再重复用 DOX 饲料喂养至 25 周。在睡眠结构上,在去除 DOX 饮食后 14 d, Hcrt-TTA/Teto DTA 小鼠出现频繁猝倒发作,主要发生在暗期及亮期的觉醒前期;REM 潜伏期缩短、睡眠时间延长;睡眠-觉醒转换次数增加。行为学上,表现为进食量无改变,但运动减少,体重增加。DAT 诱导模型可通过比较同一个体动物在 Hcrt 神经元消融之前、期间和之后的行为和生理学,来研究 Hcrt 神经元消融过程中 NRL 的症状进展;且 Hcrt 神经退行性病变在青春前期后诱导,更符合人类 NRL 的发病进程。模型小鼠体重增加,但食物摄入未改变,这与人类 NRL 代谢表现类似。实验者可自行控制 Hcrt 神经元消融时间和持续时间,可用于猝倒的药理学研究,在 Hcrt 神经输入受限时的网络重组研究。

3.2 核糖体失活蛋白(saporin, SAP)诱导模型

将内源性配体 Hcrt2 与 SAP 偶联,构建 Hcrt2-sAP 神经毒素。研究证实 Hcrt2-sAP 可与含有 HcrtR2 受体特异性结合,向大鼠下丘脑外侧核注射 Hcrt2-sAP 可破坏 Hcrt 神经元,从而减少脑脊液中 Hcrt 含量,诱导大鼠的发作性睡病行为^[33]。Blanco-Centurion 等^[34]利用 Hcrt2-sAP,将其分别注入大鼠下丘脑外侧和腹侧 0.5 mm 处,当 Hcrt2-sAP 应用于下丘脑外侧时,受损大鼠出现 NRL 表型;而损伤内侧隔区 Hcrt 受体神经元并未观察到 NRL 症状。嗜睡大鼠表现出 REM/NREM 睡眠时间延长;肌张力增加且出现广泛的肢体运动。Arias-Carrión 等^[35]对此模型大鼠进一步研究发现,当 73% Hcrt 受体神经元被成功损毁时,脑脊液中 Hcrt 水平降低 50%。并利用睡眠剥夺法检测下丘脑增食欲素表达,来测试睡眠调节的动态平衡机制,结果显示在损伤后 6 h,增食欲素水平未见增加。Hcrt2-sAP 诱导模型可通过靶向损伤受体神经元,阐明特定的 Hcrt 神经支配在睡眠-觉醒行为中的作用,为探索移植作为 NRL 的治疗手段提供了思路。但由于 Hcrt2-sAP 可消融

其他表达食欲素受体的 LH 细胞群体,包括黑色素浓缩激素神经元和含腺苷脱氨酶的神经元等^[36-37],所以此类模型与人类 NRL 的发病机制存在差异。

3.3 硝基还原酶-甲硝唑诱导的斑马鱼模型

Hcrt 能神经元在斑马鱼中表现出调节睡眠和清醒行为的双重功能^[38]。Elbaz 等^[39]将大肠杆菌的硝基还原酶 B(nitroreductase B, nfsB)转基因特异性表达于 Hcrt 能神经元中,构建了时空可控的 Hcrt 能神经元消融的转基因斑马鱼模型。硝基还原酶通过将无害的前体药物甲硝唑(metronidazole, MET)转变为具有毒性的产物,对 Hcrt 神经元进行消融^[40-41]。模型表现出白天 REM 睡眠时间延长,睡眠-觉醒转换次数增加,对外部刺激反应性降低。由于斑马鱼 Hcrt 神经网络只由 20~60 个脑神经元组成,因此造模简单,易于操作^[42],但与人类在解剖结构、生理反应上均存在较大差异。

4 光遗传学模型

Williams 等^[43]在食欲素原启动子下游插入修饰的 Arch-3 gene,用 1.5 kb 的 Arch 片段替换 Hcrt/nLacZ 构建体的 LacZ 基因,将其表达为与增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluoresce protein, EGFP)的融合蛋白,从而获得转基因载体。将转基因显微注射到 BDF1 小鼠受精卵的原核中并培育出稳定的 Hcrt/Arch 转基因品系,黄色光敏 Arch-3 质子泵在 Hcrt 神经元中发挥特异性抑制作用。利用抗 EGFP 抗体进行免疫组织化学双标,证实 Arch 在 Hcrt 神经元中的表达。通过该模型小鼠进行光照可以诱导潜伏期较短的睡眠,但诱导效果与转基因表达程度有关。高水平 Arch 表达影响了 Hcrt 神经元兴奋性,模型小鼠表现出 REM/NREM 潜伏期缩短,REM 睡眠延长,觉醒时间减少。Hcrt/Arch 小鼠允许对 Hcrt 神经元进行短期、可逆的操作,便于评估 Hcrt 神经回路的特定方面及 Hcrt 激活或抑制的后果。

5 免疫介导模型

5.1 脂多糖诱导的 CCR3 基因敲除模型

趋化因子受体 3(chemokine receptor 3, CCR3)是与发作性睡病相关的易感基因,其在发作性睡病患者外周血中的表达水平降低^[44]。CCR3 作为一种 G 蛋白偶联受体,调节免疫细胞的定位及炎症细胞分泌的趋化因子梯度,在中枢神经系统中作为炎症介质发挥作用^[45]。Toyoda 等^[46]发现与 WT 小鼠相

比,CCR3 基因敲除小鼠的 Hcrt 神经元数量减少约 10%,未产生发作性睡病的表现。进一步使用革兰氏阴性菌外膜的主要结构成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为免疫系统刺激物,腹腔注射入 CCR3 基因敲除小鼠,小鼠出现 REM 睡眠时间延长,NREM 睡眠时间缩短而发作次数增加。多项研究证实,LPS 能在给药后 24 h 内改变啮齿动物的睡眠-觉醒模式^[47-49]。LPS 诱导的 CCR3 基因敲除小鼠适用于研究由环境触发因素引起免疫介导的 Hcrt 神经元退化,来理解发作性睡病的免疫发病背景。

5.2 CD8⁺T 介导的 Hcrt 神经元损伤模型

发作性睡病与人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)等位基因 *HLA-DQB1*06:02* 密切相关,98.4% 的患者携带该基因,在发作性睡病患者的血清和脑脊液中已发现识别中枢神经系统表达不同抗原靶点的自身抗体^[50-52]。Bernard-Valnet 等^[53]培育了在 Hcrt 能神经元(称为 Orex-HA)中特异性表达血凝素(hemagglutinin, HA)作为“新自身抗原”的小鼠,将 Rosa26tm(HA)1lib 小鼠与 Orex-Cre 小鼠杂交,在人食欲素启动子的控制下表达 Cre,通过定量 RT-PCR 方法检测评估 HA 在 Orex-HA 小鼠大脑不同部位的转录情况。然后将自身抗原特异性的 CD8⁺T(CTL)细胞注射到 Orex-HA 小鼠体内,组织学分析显示 Orex-HA 小鼠下丘脑有密集的 T 细胞浸润,在移植后第 5~8 天达到高峰。15 d 后再次接受 CTL,迅速出现明显的发作性睡病表型,包括猝倒发作,REM 潜伏期缩短、时间延长,觉醒次数减少。CTL 与表达 MHC-I 类 Hcrt 神经元直接相互作用,导致细胞溶解颗粒极化,反复注射 CTL 后,这种表型进一步加重^[54]。该模型适用于发作性睡病的自身免疫发病机制研究,且为探究免疫疗法提供了理论基础。

6 总结

NRL 是一种具有遗传易感性、受环境因素影响或触发的疾病,发病机制复杂。动物模型是研发和测试新的 NRL 疗法的基础。目前已开发的动物模型主要通过基因工程或化学诱导等方法,造成下丘脑外侧区 Hcrt 神经元特异性丧失,以模拟人类 NRL 的病理表现和临床特征,但由于实验动物与人类在基因调控、器官结构与细胞类型等存在一定差别,这些模型对 NRL 治疗靶点的预测能力有限,仍需进一步验证。如在 O/E3 转录因子缺失模型中,通过静脉注射 Hcrt-1 可逆转 NRL 表型,但对于人类 NRL

患者使用 Hcrt 神经肽并不可行,因其很难穿越血脑屏障^[55]。NRL 治疗发展的最终目标应是研发出一种针对该病病因,即自身免疫介导的下丘脑外侧区 Hcrt 神经元退化。因此,可进一步构建由自身免疫介导的 NRL 动物模型,更准确地了解免疫系统对 NRL 患者 Hcrt 系统毁损的病理机制,从而为预防、治疗或阻止 NRL 的发作提供相应的治疗靶点。

综上,虽然目前的动物模型不能完全概括人类发作性睡病的所有特征,但在揭示发作性睡病复杂病理机制及潜在治疗策略等方面,动物模型发挥了关键作用。需要强调的是,动物模型应是人体复杂系统的简单表示,模拟疾病的特定方面,而决不是试图复制人类疾病的所有复杂性。每个模型的优势很大程度上取决于该模型的评估目的,未来仍需基于研究目的继续探索更合适的动物模型。

参考文献:

- [1] Barker EC, Flygare J, Paruthi S, et al. Living with narcolepsy: current management strategies, future prospects, and overlooked real-life concerns [J]. *Nat Sci Sleep*, 2020, 16(12): 453-466.
- [2] 周光兴, 高诚, 徐平, 等. 人类疾病动物模型复制方法学 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2008.
- [3] Lucas EA, Foutz AS, Dement WC, et al. Sleep cycle organization in narcoleptic and normal dogs [J]. *Physiol Behav*, 1979, 23(4): 737-743.
- [4] Mitler MM, Dement WC. Sleep studies on canine narcolepsy: pattern and cycle comparisons between affected and normal dogs [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1977, 43(5): 691-699.
- [5] Lin L, Faraco J, Li R, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene [J]. *Cell*, 1999, 98(3): 365-376.
- [6] Hungs M, Fan J, Lin L, et al. Identification and functional analysis of mutations in the hypocretin (orexin) genes of narcoleptic canines [J]. *Genome Res*, 2001, 11(4): 531-539.
- [7] Baker TL, Foutz AS, McNerney V, et al. Canine model of narcolepsy: genetic and developmental determinants [J]. *Exp Neurol*, 1982, 75(3): 729-742.
- [8] Nepovimova E, Janockova J, Misik J, et al. Orexin supplementation in narcolepsy treatment: A review [J]. *Med Res Rev*, 2019, 39(3): 961-975.
- [9] Han F. Sleepiness that cannot be overcome: narcolepsy and cataplexy [J]. *Respirology*, 2012, 17(8): 1157-1165.
- [10] Sakurai T, Moriguchi T, Furuya K, et al. Structure and function of human prepro-orexin gene [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(25): 17771-17776.
- [11] Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation [J]. *Cell*, 1999, 98(4): 437-451.
- [12] Mochizuki T, Crocker A, McCormack S, et al. Behavioral state instability in orexin knock-out mice [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(28): 6291-6300.
- [13] Mickelsen LE, Bolisetty M, Chimileski BR, et al. Single-cell transcriptomic analysis of the lateral hypothalamic area reveals molecularly distinct populations of inhibitory and excitatory neurons [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(4): 642-656.
- [14] Matsuki T, Sakurai T. Orexins and orexin receptors: from molecules to integrative physiology [J]. *Results Probl Cell Differ*, 2008, 46: 27-55.
- [15] Reti IM, Reddy R, Worley PF, et al. Selective expression of narpl, a secreted neuronal pentraxin, in orexin neurons [J]. *J Neurochem*, 2002, 82(6): 1561-1565.
- [16] Sakurai T. Orexin deficiency and narcolepsy [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2013, 23(5): 760-766.
- [17] Eggermann E, Serafin M, Bayer L, et al. Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones [J]. *Neuroscience*, 2001, 108(2): 177-181.
- [18] Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, et al. Distinct narcolepsy syndromes in orexin receptor-2 and orexin null mice: molecular genetic dissection of non-REM and REM sleep regulatory processes [J]. *Neuron*, 2003, 38(5): 715-730.
- [19] Kalogiannis M, Grupke SL, Potter PE, et al. Narcoleptic orexin receptor knockout mice express enhanced cholinergic properties in laterodorsal tegmental neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 2010, 32(1): 130-142.
- [20] Beuckmann CT, Sinton CM, Williams SC, et al. Expression of a poly-glutamine-ataxin-3 transgene in orexin neurons induces narcolepsy-cataplexy in the rat [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(18): 4469-4477.
- [21] Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, et al. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity [J]. *Neuron*, 2001, 30(2): 345-354.
- [22] Lee MG, Hassani OK, Jones BE. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(28): 6716-6720.
- [23] Smart D, Jerman JC. The physiology and pharmacology of the orexins [J]. *Pharmacol Ther*, 2002, 94(1): 51-61.
- [24] Sun R, Cao YQ, Ma JX, et al. Construction and identification of mouse model with conditional knockout of p75 neurotrophin receptor gene in epidermal cells by Cre-loxP system [J]. *Chin J Burns*, 2019, 35(10): 740-745.
- [25] Mochizuki T, Arrigoni E, Marcus JN, et al. Orexin receptor 2 expression in the posterior hypothalamus rescues sleepiness in narcoleptic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(11): 4471-4476.
- [26] Honda M, Eriksson KS, Zhang S, et al. IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin (orexin) [J]. *PLoS One*, 2009, 4(1): e4254.
- [27] Kieslinger M, Folberth S, Dobrev G, et al. EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts [J]. *Dev Cell*, 2005, 9(6): 757-767.
- [28] De La Herrán-Arita AK, Zomosa-Signoret VC, Millán-Aldaco DA, et al. Aspects of the narcolepsy-cataplexy syndrome in O/

- E3-null mutant mice [J]. *Neuroscience*, 2011, 2(183): 134–143.
- [29] Corradi A, Croci L, Broccoli V, et al. Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in *Ebf2*-null mice [J]. *Development*, 2003, 130(2): 401–410.
- [30] Tabuchi S, Tsunematsu T, Black SW, et al. Conditional ablation of orexin/hypocretin neurons: a new mouse model for the study of narcolepsy and orexin system function [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(19): 6495–6509.
- [31] Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, et al. Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(2): 397–406.
- [32] Gossen M, Freundlieb S, Bender G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells [J]. *Science*, 1995, 268(5218): 1766–1769.
- [33] Gerashchenko D, Kohls MD, Greco M, et al. Hypocretin-2-saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(18): 7273–7283.
- [34] Blanco-Centurion C, Gerashchenko D, Salin-Pascual RJ, et al. Effects of hypocretin2-saporin and antidopamine-beta-hydroxylase-saporin neurotoxic lesions of the dorsolateral pons on sleep and muscle tone [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 19(10): 2741–2752.
- [35] Arias-Carrión O, Murillo-Rodríguez E. Cell transplantation: a future therapy for narcolepsy? [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2009, 8(4): 309–314.
- [36] Li Y, Gao X, Sakurai T, et al. Hypocretin/orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron-A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system [J]. *Neuron*, 2002, 36(6): 1169–1181.
- [37] Lecea LD, Kilduff TS, Peyron C, et al. The hypocretins: hypothalamus specific peptides with neuroexcitatory activity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(1): 322–327.
- [38] Prober DA, Rihel J, Onah AA, et al. Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(51): 13400–13410.
- [39] Elbaz I, Yelin-Bekerman L, Nicenboim J, et al. Genetic ablation of hypocretin neurons alters behavioral state transitions in zebrafish [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(37): 12961–12972.
- [40] Curado S, Stainier DY, Anderson RM. Nitroreductase-mediated cell/tissue ablation in zebrafish: a spatially and temporally controlled ablation method with applications in developmental and regeneration studies [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 948–954.
- [41] Pisharath H, Rhee JM, Swanson MA, et al. Targeted ablation of beta cells in the embryonic zebrafish pancreas using *E. coli* nitroreductase [J]. *Mech Dev*, 2007, 124(3): 218–229.
- [42] 杜久林, 杜旭飞. 斑马鱼 hypocretin/orexin 能神经系统的研究进展 [J]. *生命科学*, 2015, 27(7): 827–836.
- [43] Williams RH, Tsunematsu T, Thomas AM, et al. Transgenic archaerhodopsin-3 expression in hypocretin/orexin neurons engenders cellular dysfunction and features of type 2 narcolepsy [J]. *J Neurosci*, 2019, 39(47): 9435–9452.
- [44] Toyoda H, Miyagawa T, Koike A, et al. A polymorphism in *CCR1/CCR3* is associated with narcolepsy [J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 49: 148–155.
- [45] Kothur K, Wienholt L, Brilot F, et al. CSF cytokines/chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders: A systematic review [J]. *Cytokine*, 2016, 77: 227–237.
- [46] Toyoda H, Honda Y, Tanaka S, et al. Narcolepsy susceptibility gene *CCR3* modulates sleep-wake patterns in mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187888.
- [47] Szentirmai É, Krueger JM. Sickness behaviour after lipopolysaccharide treatment in ghrelin deficient mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 36: 200–206.
- [48] Opp MR, Toth LA. Somnogenic and pyrogenic effects of interleukin-1 β and lipopolysaccharide in intact and vagotomized rats [J]. *Life Sci*, 1998, 62(10): 923–936.
- [49] Lancel M, Crönlein J, Müller-Preuss P, et al. Lipopolysaccharide increases EEG delta activity within non-REM sleep and disrupts sleep continuity in rats [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268: R1310–R1318.
- [50] Ahmed SS, Volkmuth W, Duca J, et al. Antibodies to influenza nucleoprotein cross-react with human hypocretin receptor 2 [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(294): 105r–294r.
- [51] Bergman P, Adori C, Vas S, et al. Narcolepsy patients have antibodies that stain distinct cell populations in rat brain and influence sleep patterns [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(35): E3735–E3744.
- [52] Cvetkovic-Lopes V, Bayer L, Dorsaz S, et al. Elevated tribbles homolog 2-specific antibody levels in narcolepsy patients [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(3): 713–719.
- [53] Bernard-Valnet R, Yshii L, Querault C, et al. CD8 T cell-mediated killing of orexinergic neurons induces a narcolepsy-like phenotype in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(39): 10956–10961.
- [54] Pedersen NW, Holm A, Kristensen NP, et al. CD8⁺ T cells from patients with narcolepsy and healthy controls recognize hypocretin neuron-specific antigens [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 837.
- [55] Mieda M, Willie JT, Hara J, et al. Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(13): 4649–4654.

[收稿日期]2021-03-18