

	MRI 扫描（至少要求 1.5 T 以上的 MRI 设备）。在磁共振三维重建图像中获得包含丙三醇玻璃管的冠状切面，并以此建立与之垂直的矢状切面和水平切面，形成三维直角坐标系。在中脑寻获低信号的黑质，确定黑质腹内侧为实际给药起点，获得实际给药路径，沿实际给药路径测量黑质区域长度和深度。 2 MPP⁺立体定位注射损毁 按照前述手术流程和要求结合最终给药路径（图 1A）在颅骨上钻孔（直径：1 mm），将吸满 MPP⁺药液或对照溶剂的微量注射器（10 μL）固定于定位臂上，沿给药路径缓慢刺入脑内，进针速度慢于 1 cm/min，抵达给药起点后留针 1 min。模型组猕猴损毁侧黑质给予 MPP⁺（40-100 mg/mL，根据动物的体重和基本状况而定，药品信息：MPP⁺ iodide: D048, Sigma），对照侧黑质给予生理盐水。对照组猕猴偏侧黑质注射生理盐水。黑质长度范围内相等间隔给药 6-8 个点，每个点 1 μL。每点给药速度慢于 1 μL/min，每点给药结束后停针 2 min，退针速度慢于 1 cm/min，每次退针后留针 1 min。给药完成后缓慢退出微量注射器，采用生理盐水清洗颅骨，清创后分层缝合，切口碘伏消毒。 3 PD 行为评分 使用高分辨率摄像设备（HDR-XR260，日本）对猕猴进行笼内行为录像：术前一周、术后每两周进行一次，每次录像约 1 小时。录像由对实验分组不知情的人进行录制和保存，所有录像在重新随机编号后被集中提交进行盲法评分。使用改进的 Kurlan 氏量表的 A 部分对录像进行评分。 4 阿朴吗啡诱导的旋转计数 术前和术后每个时间点的行为录像中，选取各段录像中 15-45 分的 30 分钟录像进行自发旋转的计数。术后 1-8 周及之后每月（以减少药物对受体的影响），进行阿朴吗啡（A4393-100MG, Sigma）肌肉注射后采集行为录像。给药前 5 分钟内，将阿朴吗啡 2 mg 溶解于 2 mL 维生素 C 注射液（0.5 mg/2 mL）中，以每只猕猴 2 mL 的剂量，给清醒猕猴进行腿部或臀部肌肉注射，给药 15 分钟后录像约 1 小时，选取各段录像 15-45 分（对应给药后 30-60 分钟）的 30 分钟录像进行阿朴吗啡诱发旋转计数。定义“旋转一周”：计数开始前任意指定一个初始方向（例如多数为面朝摄像机），在猕猴身体长轴矢量第 n 次和第 n+1 次指向这一初始方向的间隔中，若身体长轴顺时针或逆时针完成净旋转 360 度，则记录顺时针或逆时针旋转圈数+1。 5 生理数据采集 术前、术后 1-8 周、术后每月给猕猴测量呼吸频率和体重。术前、术后 1-4 周、术后每月给猕猴抽取静脉血进行血常规和血生化监测。呼吸测量由实验人员为安静猕猴计数 1 分钟所得。体重称量和血液采集前对猕猴进行兽用氯胺酮（0.5-0.7 mL，0.15 mg/mL）肌注诱导麻醉。静脉血采集通过四肢浅表静脉或股静脉穿刺抽取 2-3 ml 血液进行，抽血前常规消毒，抽血后按压止血。 6 脑组织切片病理染色 脑组织样本制备：灌流后，猕猴全脑组织被完整取出，保存于 4% 的多聚甲醛或福尔马林中。后经 20%和 30%蔗糖溶液梯度脱水后进行冠
--	--

	状位冰冻切片（Leica CM1850 UV）。切片厚度为 20 μm，染色前保存于 -20 °C。各部为切片从前往后进行，以大致相等的间隔覆盖整个黑质区域。 尼氏染色：切片经二甲苯与梯度酒精脱脂后蒸馏水洗净，放入 nissl 染色液室温下 20 分钟，蒸馏水洗净染液后酒精梯度脱水（70%，80%，95%，各 1 min），特殊分色液中分色 5 min，无水酒精脱水和二甲苯透明，中性树胶封片（镜检奥林巴斯显微镜 CX41，摄像头：奥林巴斯 DP25，软件：CellSens Entry 1.4.1，日本）。 酪氨酸羟化酶免疫组织化学染色：切片经 3%双氧水溶液封闭 10min 后，3% Triton X-100（Solarbio，北京，中国）-0.01 M PBS 室温孵育 4 min 破膜，再被 10%羊血清室温下封闭 15min 后滴加一抗（Anti-Tyrosine Hydroxylase，AB152，Millipore，0.01 M PBS 稀释 1000 倍），4°C冰箱孵育过夜。二抗孵育利用通用二步法试剂盒（PV-9000，中杉金桥）室温分别孵育 20 min 后进行 DAB 显色。之后酒精梯度脱水，二甲苯透明并且中性树胶封片镜检。
动物模型表型数据	1 稳定的症状和旋转行为 脑内给药手术次日，对照组猕猴基本恢复正常，而所有 MPP⁺模型猴立即出现明显的 PD 症状（图 1B），包括姿势障碍、步态异常、运动迟缓、平衡障碍、肢体偏废和防御反应减弱等运动障碍，困倦，探索活动和整理活动减少。姿势障碍主要表现为明显的身体前屈、肘关节屈曲、腕关节和指间关节伸展。步态异常表现为下肢拖拽或伸直，行走变慢。肢体偏废表现为减少或拒绝使用受损上肢，不能使用上肢进行取食、整理和探索活动。术后 1-3 天，模型猴与对照猴的 Kurlan 氏评分差异显著（P=0.032）。 为期 20 周的观察时间内，模型猴出现了持久稳定的 PD 症状：震颤、运动迟缓和姿势障碍（图 1C）。震颤间歇性出现，术后 8 周相对频繁。运动迟缓在模型组猕猴中表现明显。个别猕猴在轻度麻醉（采集静脉血）时四肢被动运动困难，有“铅管样肌强直”和轴性扭转强直等肌张力增高的表现。总体上，模型组 Kurlan 评分均值稳定维持在 7 分左右，而对照组大部分时间为 0 分，模型组评分显著高于对照组（图 1D）。行为评分快速抵达平台期并维持长期稳定。 术后 4 周开始，模型组猕猴产生的不对称自发向左旋转逐渐明显并趋于稳定（图 1E），而且几乎不再出现右侧旋转，与对照组（图 1G）表现明显不同。自发旋转在不受干扰清醒盘坐或行走时发生，警觉和受刺激时旋转更快更频繁，偏向手术同侧。同期，给模型组猕猴肌注 2 mg 阿朴吗啡，可见强烈的躯体扭转和诱发旋转（图 1F），而对照组没有这些表现（图 1H）。扭转行为与肌张力障碍表现类似，发生扭转时，猕猴会停止行走或转圈，头和躯干向手术对侧扭转，全身僵直固定，有时会逐渐失去平衡而倒下。诱发旋转在阿朴吗啡给药后约 15 分钟出现，约 30 分钟到 90 分钟达到高峰，峰值旋转速度可达到约 1 圈/秒，偏向手术对侧。统计分析显示，阿朴吗啡和分组对诱发旋转计数有明显的交互作用（P=0.038），即 MPP⁺模型组比对照组有更多的诱发旋转，显示其多巴胺系统功能明显不对称。重要的是，不对称旋转行为在 20 周时间内保持稳定，没有明显的变化趋势。

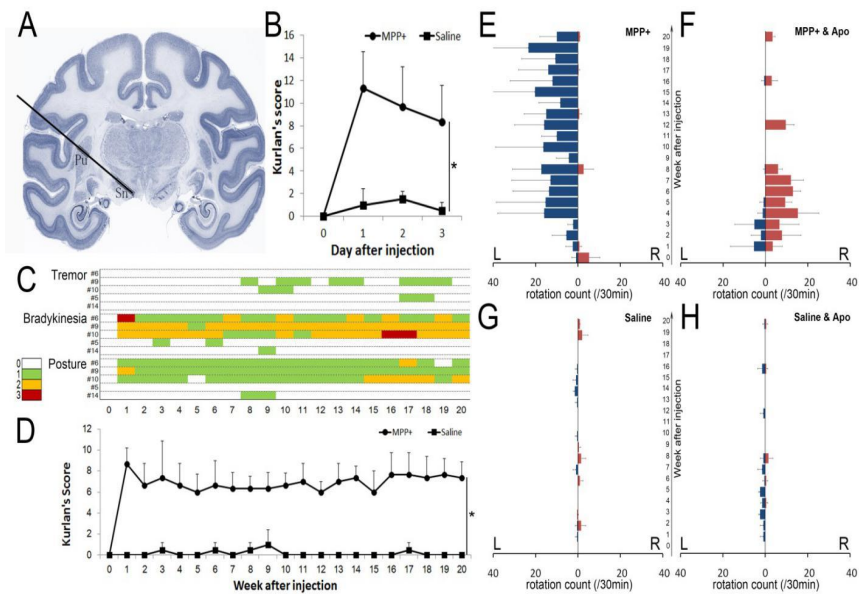
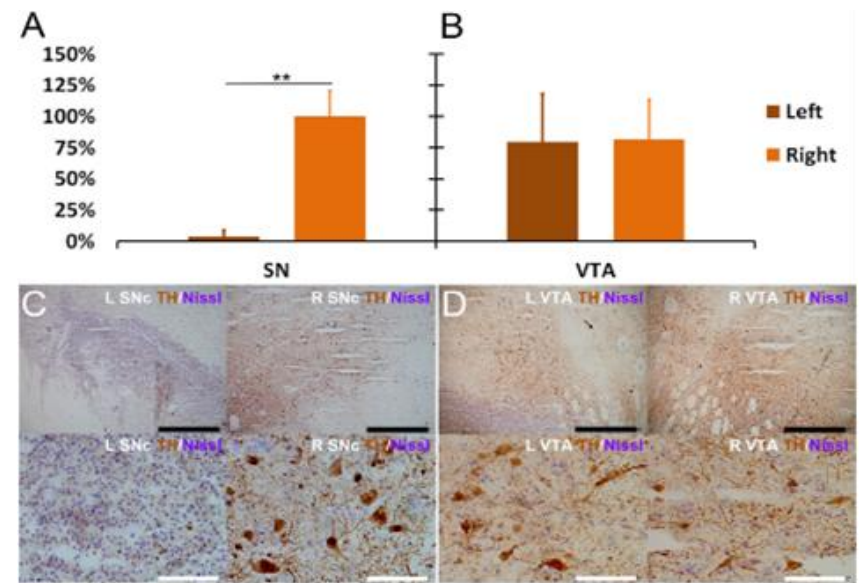
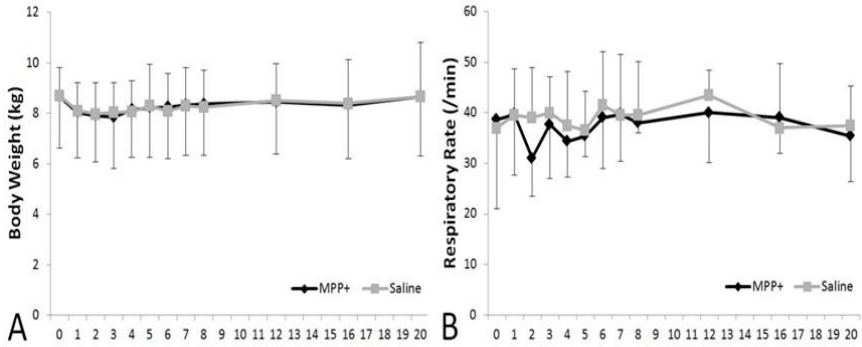


图 1. 模型猴具有稳定的 PD 症状、行为评分和不对称旋转运动。 (A) 选取猕猴脑冠状切面同时经过黑质 (Sn) 和纹状体壳核 (Pu) 的路径 (图中黑线) 作为进针路径。(B) 术后次日, 模型组猕猴评分立即大幅升高, 术后三天逐渐下降; 对照组也有一过性评分增加并恢复; 组间差异显著 (* $P=0.032$)。 (C) Kurlan 量表的单项评分显示模型组猕猴产生长期稳定的震颤、运动迟缓和姿势异常。(D) 术后 20 周内模型组 Kurlan 氏评分总分显著高于对照组 (* $P=0.011$), 两组评分稳定 ($P=0.434$) 且平行 ($P=0.374$)。 (E-H) 模型组与对照组在 20 周观察期内的自发旋转与诱发旋转计数显示, 模型猴持续自发的左侧旋转状态, 阿朴吗啡注射后一过性诱发的右侧旋转, 而对照组只有少量旋转行为。诱发旋转计数存在分组与阿朴吗啡药物之间的交互效应 ($P=0.038$)。时间因素无明显效应 (多变量 Pillai's Trace: $P=0.953$, 左侧单变量: $P=0.751$, 右侧单变量: $P=0.462$), 表明旋转计数保持稳定。图中的数值为平均值 $\pm$ 标准差。

2 典型的病理表现

其中一只猕猴症状典型, 术后两周取脑进行病理切片检查。中脑和



	纹状体区域分别进行 TH 免疫组化加尼氏染色（图 2）。间隔相似的 5 个切面中 TH 免疫组化切片染色结果显示，给药侧黑质致密部多巴胺能神经元已经几乎完全被损毁（$P=0.001$），各个层面的黑质区域内几乎都无法见到具有完整形态的多巴胺能神经元。相对而言，左右两侧腹侧被盖区（VTA）处的 TH 阳性神经元数量却没有差异（$P=0.763$）。 图 2. 模型猴病理损伤的完全性与特异性。（A）两侧黑质致密部 TH 阳性细胞计数水平差异显著（**$P<0.001$）。（B）两侧腹侧被盖区 TH 阳性细胞计数水平无显著差异（$P=0.904$）。（C）左侧 TH 阳性细胞几乎完全脱失，残留下增多且较小的细胞核（可能为炎症和/或胶质细胞）；右侧 TH 阳性细胞形态完整，纤维发达。（D）双侧腹侧被盖区 TH 阳性细胞形态完整，纤维发达。比例尺：白色：100 μm，黑色：1000 μm。图中的数值为平均值$\pm$标准差。
动物模型的评价	1 良好的基本生理情况 对体重进行跟踪观察（图 3A），未发现其随时间有显著升降趋势（$P=0.088$），未发现组间的趋势差异（$P=0.788$）和水平差异（$P=0.993$）。对呼吸频率进行的跟踪观察（图 3B）结果类似，未发现其随时间有显著升降趋势（$P=0.607$），未发现组间的趋势差异（$P=0.768$）和水平差异（$P=0.811$）。结果提示，体重和呼吸频率在连续观察的 20 周内保持稳定，并且与对照组没有差异。  Figure 3 consists of two line graphs, A and B, showing data over 20 weeks. Graph A plots Body Weight (kg) on the y-axis (0 to 12) against time (0 to 20 weeks) on the x-axis. It compares two groups: MPP+ (black line with circles) and Saline (grey line with squares). Both groups start at approximately 8.5 kg and remain stable, with minor fluctuations. Graph B plots Respiratory Rate (/min) on the y-axis (0 to 60) against time (0 to 20 weeks) on the x-axis. It also compares MPP+ and Saline groups. Both groups start at approximately 40 /min and remain stable, with minor fluctuations. Error bars representing standard deviation are shown for each data point. 图 3. 体重和呼吸频率长期稳定。（A）体重在模型组和溶剂对照组间没有差异，持续至少 20 周未发现变化趋势。（B）呼吸频率在模型组和溶剂对照组间没有差异，持续至少 20 周未发现变化趋势。图中的数值都为平均值$\pm$标准差。 2 血液指标 实验动物的血常规和血生化部分代表性项目的监测结果和统计分析表明，MPP⁺给药与对照组间，在血常规（RBC、WBC、PLT、HGB）和血生化（ALT、AST、CK、TBIL、LDH）中并无组间差异，其中偶然出现的高值并不被认为具有明显的临床诊断意义。 3 重复验证 我们在后续的实验中利用该建模策略至少建立了 40 只偏侧黑质 MPP⁺损毁的恒河猴或食蟹猴 PD 模型，结果的一致性较好。
动物模型应用案例	用于帕金森病新型治疗手段的疗效认定与安全性评价，如黑质损毁同侧纹状体注射基因治疗的病毒或诱导分化的神经干细胞等。
动物模型的安全性评价	动物模型制备过程中的监督管理、处置措施、微生物菌株检测、对环境和生态影响的评估等由中国科学院昆明动物研究所实验动物中心统一管理。建模过程中未见动物出现感染与毒性反应等。

动物模型的保存类型	☒ 建模方法 ☐ 活体 ☐ 生物样本	
资源地点	中国科学院昆明动物研究所	
资源生成时间	2015 年 1 月	
最新修订时间	2015 年 5 月 26 日	
合作及共享方式	合作方式	科研合作
	共享方式	☐ 完全开放共享 ☒ 协议共享 ☐ 暂不共享
知识产权	a. 标注知识产权说明 使用本动物模型时，请在文章中引用以下文献： 1. Lei X, Li H, Huang B, Rizak J, Li L, Xu L, et al. (2015) 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Stereotactic Infusion Completely and Specifically Ablated the Nigrostriatal Dopaminergic Pathway in Rhesus Macaque. PLoS ONE 10(5): e0127953. doi:10.1371/journal.pone.0127953 b. 动物模型标注参考以下规范： 动物模型来源引用参考以下规范： 中文表达方式：数据来源于国家科技基础条件平台—国家非人灵长类实验动物资源库(http://nhp.kiz.ac.cn)； 英文表达方式：National Resource Center for Non-Human Primates, National Science & Technology Infrastructure of China (http://nhp.kiz.ac.cn)。 致谢方式参考以下规范： 中文致谢方式：“感谢国家科技基础条件平台-国家非人灵长类实验动物资源库(http://nhp.kiz.ac.cn)提供动物模型支撑。” 英文致谢方式：Acknowledgement for the animal model support from "National Resource Center for Non-Human Primates, National Science & Technology Infrastructure of China. (http://nhp.kiz.ac.cn)". c. 动物模型贡献者信息 姓名：李浩 单位：中国科学院昆明动物研究所 电话：15808890289 邮箱：lihao@mail.kiz.ac.cn	
其它说明内容	若使用方希望利用该资源的任何材料开展宣传等活动，须事先得到资源管理方的书面授权。	