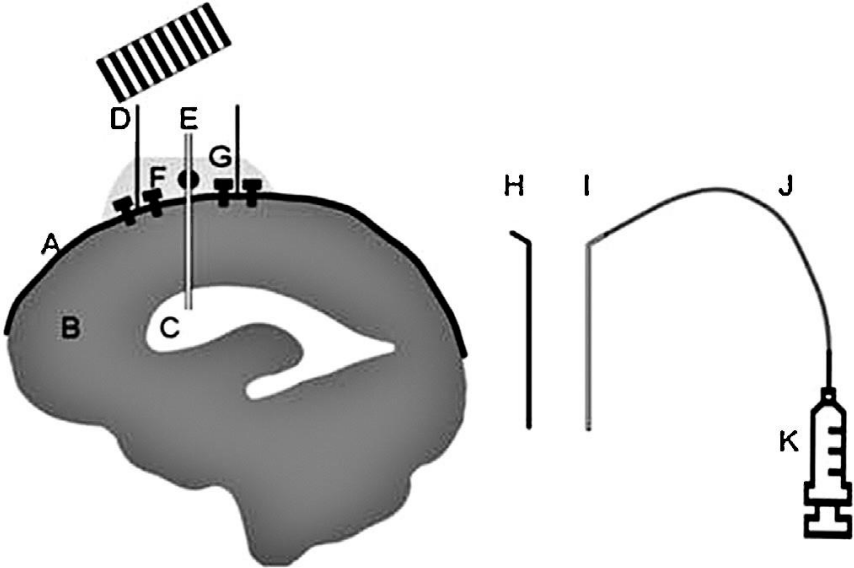


PD 慢性猴模型

(国家非人灵长类实验动物资源库编制，云南省昆明市盘龙区茨坝街道龙欣路 17 号， 650201，
0871-68424851， nhp@mail.kiz.ac.cn， 2023-03-21)

名称	中文	PD 慢性猴模型
	英文	Chronic PD monkey models
缩略图		
资源源描述	利用立体定位技术在成年食蟹猴侧脑室长期埋置一根导管，慢性注射 MPP ⁺ 生理盐水溶液，建成了具备稳定典型帕金森病临床运动症状的食蟹猴帕金森病慢性模型。	
动物模型制作方法	1 手术操作与脑室给药装置 术前，手术室通过紫外灯照射消毒，时间不少于 30 分钟。手术需要在动物深度麻醉的状况下进行。每只猴先肌注硫酸阿托品注射液（0.5 mg/mL，1 mL），10 分钟后再肌注兽用氯胺酮进行快速诱导麻醉（0.15 g/mL，0.5-0.7 mL）。待动物麻醉后再根据体重肌注戊巴比妥钠生理盐水溶液进行深度麻醉（40 mg/mL，20 mg/kg）。麻醉后的动物剃去头部的毛发，然后固定在大动物专用的立体定位仪上（Model 1504 Heavy-Duty Research Stereotaxic for Monkeys, KOPF, 美国），碘伏与医用酒精消毒头皮表面并铺巾。食蟹猴左侧脑室的经验坐标为 AP0（耳杆连线的中点）前 23 mm，左侧旁开 1.5 mm，深度为颅骨下 15-20 mm。切开头皮后清理颅骨表面的肌肉与结缔组织以便充分暴露颅骨并使用生理盐水冲洗血液，3%双氧水消毒清洗。根据坐标确定左侧脑室的位置后用颅骨钻打孔，然后将特制的给药导管固定在定位臂的夹持器上（Electrode Manipulators Models 1460, 1460-61, KOPF, 美国）缓慢埋置入脑（图 1）。根据脑脊液涌出管口的情况确定最终的埋置深度，用不锈钢堵芯插入导管内堵好，并用一个保护套围好后至少通过 3 颗钛钉固定在颅骨上。术后，每只猴持续肌注 5 天青霉素（160 万单位）。	

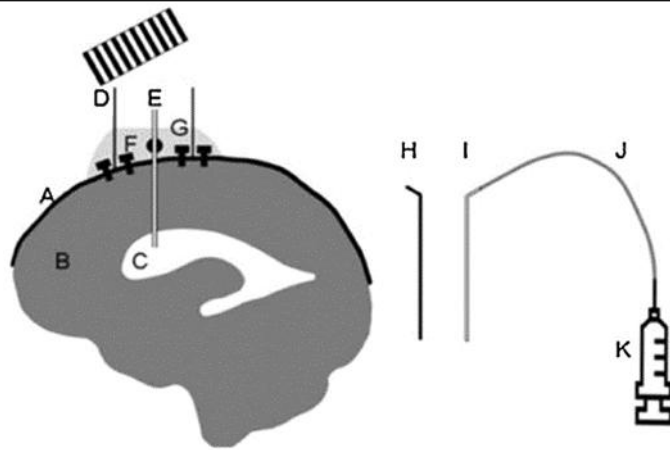


图 1. 猴侧脑室埋管给药装置设计图。该装置的主要部件为一根长 35 mm 植入侧脑室的不锈钢导管 E (21 G, 外径=0.813 mm, 内径=0.584 mm), 不锈钢实心堵芯 H (直径=0.5 mm) 以及不锈钢给药管 I (25 G, 外径=0.508 mm, 内径=0.254 mm)。手术时将导管成功植入侧脑室 C 后可见清亮的脑脊液不断涌出, 然后插入堵芯后利用牙托水泥 G 将导管与钛螺钉 F 一起固定在猴颅骨 A 上。保护套 D 由一个圆柱形的塑料管构成, 顶端带有可以旋开的帽, 不给药时需拧紧并用酒精对其内部消毒; 给药时拧开帽并用镊子拔出堵芯, 插入给药管缓慢注入药液即可 (10 μ L/min)。给药结束后拔出给药管插入经酒精消毒的堵芯, 对保护套内环境再次进行酒精消毒并拧紧帽子。给药过程不用麻醉猴子, 将猴子牵出猴笼让其坐在猴椅上即可完成。A 颅骨; B 脑; C 侧脑室; D 保护套; E 导管; F 钛螺钉; G 牙托水泥; H 堵芯; I 给药管; J 连接管; K 注射器。

2 分组与 PD 建模操作

MPP⁺-生理盐水给药组: 9 只食蟹猴随机分为 3 组, 每组 3 只。每周给药 2 次 (每周二与周五上午)。3 组的给药剂量分别为 0.7 mg/mL (低剂量), 1.4 mg/mL (中剂量) 和 2.1 mg/mL (高剂量), 每次给药 100 μ L。

生理盐水对照组: 3 只食蟹猴, 每周给生理盐水 2 次 (每周二与周五上午), 每次 100 μ L, 连续 4 周。

验证组: 2 只食蟹猴, 每周给 MPP⁺-生理盐水 (2.0 mg/mL, 100 μ L) 2 次 (每周二与周五上午), 连续 4 周。

3 行为数据采集

行为录像采集每周一次 (周三下午 14:00-15:00), 采集设备为数码相机 (Sony HDR-XR260, 日本), PD 症状评分采用改进版 Kurlan 量表的 A 部分, 共有 7 项指标评估 PD 行为。Kurlan 量表被广泛用于评定旧大陆猴的 PD 行为症状。生理盐水组, MPP⁺给药组及验证组的分组情况与给药时间这两个参数对评分者设盲。

4 行为评分统计模型的建立与分析

三个 MPP⁺给药组共 9 只猴子的评分以给药时间为横坐标统一作图 (图 3A), 对曲线的估计采用 SPSS 软件中的回归曲线分析完成。该软件提供了 11 种不同的曲线估计回归模型 (线性, 对数, 反函数, 二次方程, 三次方程, 幂函数, 复合函数, S 曲线, 逻辑斯蒂函数, 生长曲线和指数函数)。我们拟挑选最好数学模型的标准为尽可能与实验数据吻合且具有长时稳定性的同时有较高的 R² 值。

	其中 S 曲线（常用于模拟众多生物学事件中潜在的数学规律）$Y=8.15801e-0.245/x$，$R = 0.73$ 的公式中存在一个上限，即 $\lim_{x \rightarrow \infty} Y=8.15801$，并且最符合实验数据的发展走势。它的 R 值为 0.7301，虽然其 R^2 值并不是最高的（最高为三次方程，R 为 0.7369），但是三次方程并不符合实验数据发展变化的模式，尤其是在更高剂量的时候不符合实际情况。所以我们最后选定 S 曲线作为数学模型，其 95% 的预测区间通过 SPSS 软件计算得到。结合 S 曲线与本实验采用的给药频率（每周两次），将累积剂量与行为评分的关系用 Microsoft Excel 绘制成建模地形图（图 3B）。该图给出的建模指南即行为评分和累积给药量之间的定量关系，而累积给药量又可以拆分为单次给药剂量（毫克）与给药频率（每周的给药次数）的乘积。 5 基本生理状况评估 我们采用体重作为基本生理状况评估指标。每只猴周三下午测定其体重，测定时不用麻醉，只需将猴牵出猴笼并转移至猴椅上去皮称重即可。 6 脑组织切片病理染色 脑组织样本制备：灌流后，猴脑组织被完整取出，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 $^{\circ}\text{C}$。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$^{\circ}\text{C}$ 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 PD 行为症状定量分析 各给药剂量组（0.07 mg，0.14 mg 与 0.21 mg）食蟹猴的 PD 评分在给药的第一个月随时间显著增加（$P=1.1 \times 10^{-10}$）（图 2A：Stage A）。在进行连续给药 13 周后，各组猴停药 6 周。统计发现停药恢复期内时间对 PD 评分无显著性影响（$P=0.19$），说明停药后各组猴的 PD 评分至少能维持 6 周的稳定（图 2A：Stage R1）。之后各组猴进行了首次左旋多巴治疗（30 mg/kg，肌注），其 PD 评分显著改善（R6 与 L，L 与 W，配对 t-检验：$\alpha'=0.05/2$，$\alpha''=0.01/2$，两个 P 值都小于 0.005）。表明各组 PD 猴对首次左旋多巴的治疗很敏感，与临床 PD 患者类似。首次左旋多巴治疗后，各组猴的 PD 评分又迅速恢复到了治疗前水平（图 2A：Stage R2），并且未检测出左旋多巴治疗对后来 PD 评分的显著性影响效应（$P=0.32$）。左旋多巴治疗前后 PD 评分的相似性表明停药恢复期各组

猴的PD行为症状是稳定的,前后至少能维持3个月的稳定(图2A: Stages R1 与 R2)。在该阶段内未发现时间对PD评分的影响效应 ($P=0.07$), 以及时间和分组对PD评分影响的相互作用 ($P=0.31$)。

Kurlan 量表中 7 项 PD 评判标准在每组猴评分的平均分布情况见图 2B, C 和 D。该结果表明食蟹猴出现了三大 PD 临床核心症状: 静止性震颤, 运动迟缓与姿势异常。僵直没有包含在改进版 Kurlan 量表中, 因为僵直无法直接通过录像观察而得知。其中运动迟缓, 姿势异常与步态障碍成为主要表现, 静止性震颤出现比重较少。

我们发现各组建模的食蟹猴 PD 评分增加的斜率相互不平行 ($P=0.02$) (图 2A), 这种趋势的差异可能是因为各组 MPP+ 的给药剂量不同。进一步的分析发现, 三组 PD 评分的增加都和 MPP+ 累积给药量显著相关 ($P=3.2\times 10^{-10}$), 重要的是在相同的 MPP+ 累积给药量时的 PD 评分各组无差异 ($P=0.26$) (图 3A)。因三组 PD 建模猴的评分在相同累积给药量时各组之间无差异, 我们将其视为同一组并与不同累积给药剂量之间的关系进行统计分析发现: 相比基线值, 前两个累积给药量的 PD 评分呈现显著性增加的情况 (0 vs. 0.42 mg: $P=1.1\times 10^{-4}$; 0.42 vs. 0.84 mg: $P=0.02$), 但是之后的累积给药剂量下的 PD 评分无差异 (0.84 mg vs. 1.26 mg: $P=0.07$; 1.26 vs. 1.68 mg: $P=0.67$)。综上, PD 评分与累积给药剂量之间存在显著的定量关系, 而且各组的评分差异在相同累积给药剂量时不显著, 这是定量分析建模过程中存在的数量关系的前提。该建模过程中 PD 评分呈现出一种随累积给药量的增加而逐渐升高的趋势 (从 0 到 0.84 mg), 之后在更高累积给药剂量时会出现一个相对稳定的平台期。

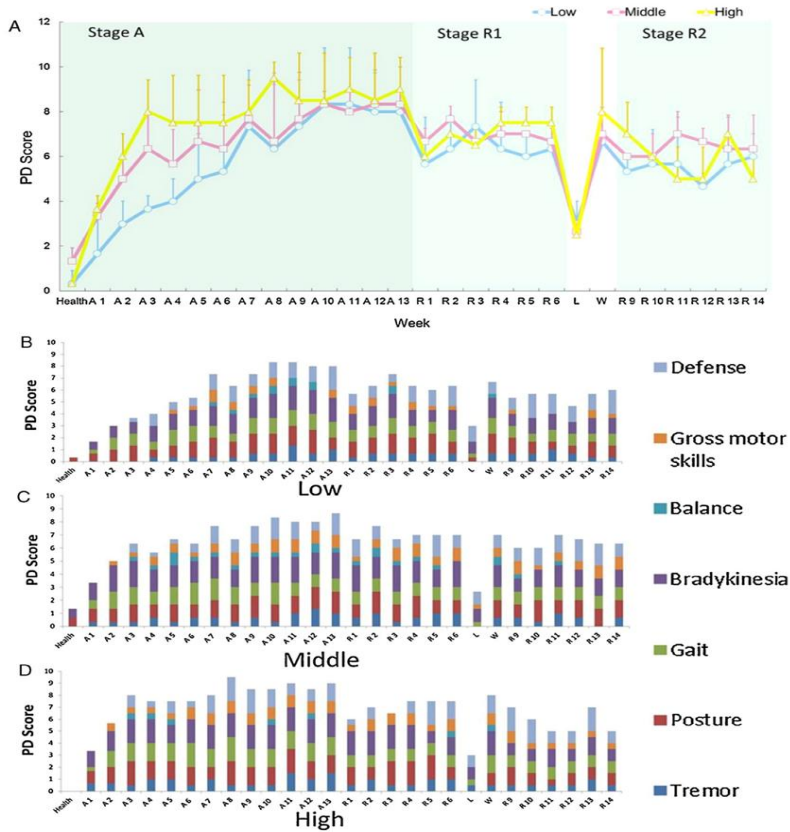


图 2. 建模及停药恢复期食蟹猴 PD 评分的变化及其 PD 症状在三个给药剂量组平均评分中的分布情况。(A)MPP⁺给药组食蟹猴 PD 评分的变化。Stage A: MPP⁺给药阶段。Stage R1: 不进行 MPP⁺给药的自发恢复阶段; Stage R2: 左旋多巴治疗后的自发恢复阶段。X 坐标轴说明: Health: MPP⁺给药前各组候 PD 评分的基线水平; A: 给药的周数; R: 不进行 MPP⁺给药的自发恢复周数; L: 左旋多巴治疗; W: 洗脱时期。(B), (C) 与 (D) 分别给出了三个给药剂量组 PD 症状的分布情况。该 7 项 PD 猴行为症状取自 Kurlan 量表。图 A 的数值都为平均值±标准差。

我们对 PD 评分与累计给药量之间的关系用多种数学模型进行估计并结合实际情况发现 S 曲线最合适。即 $Y=8.15801e^{-0.245/x}$, $R=0.73$ 。其中 Y 表示 PD 评分, X 表示累积 MPP⁺给药量。该数学模型存在一个上限, 即 $\lim_{x \rightarrow \infty} Y=8.15801$, 刚好可以模拟实验中出现的建模平台期。根据该数学模型我们绘制了建模地形图 (图 3B)。该地形图中将累积给药量拆分为三个维度: (1) 给药频率 (每周几次), (2) 单次给药剂量 (毫克) 以及 (3) 给药时间 (共给药多少周), 也就是累积给药量的计算公式, 即累积给药量 $X=\text{单次给药剂量} \times \text{给药频率} \times \text{给药周数}$ 。在图 3B 中采用的是本实验的实际数据, 即每周给药 2 次, 分 3 个给药剂量, 共给药 13 周。

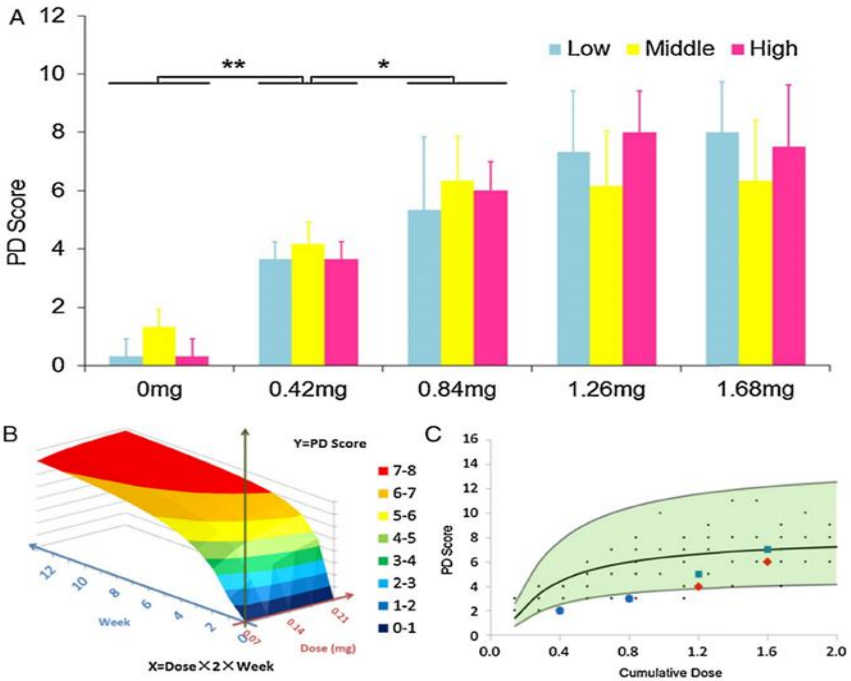


图 3. 食蟹猴左侧脑室 MPP⁺给药建模过程中的 PD 评分结果的定量分析。(A) PD 评分与 MPP⁺累积给药剂量之间的关系。图中每个累积给药剂量下各组之间 PD 评分无显著性差异。多重比较发现累计剂量在 0.84 毫克水平以下时三组的 PD 评分之间存在显著性差异 (** $P<0.01$, * $P<0.05$)。 (B) 基于实验数据的统计模型得到的 S 曲线 $Y=8.15801e^{-0.245/x}$ 绘制的建模地形图。 (C) 另外 2 只食蟹猴的行为数据对该建模地形图的验证。红点和蓝点表示这 2 只食蟹猴的 PD 行为评分变化, 黑点表示原有的 9 只食蟹猴建模过程中的 PD 评分变化。绿色阴影表示 S 曲线 95% 的预测区间。图 A 的数值都为平均值±标准差。

	2 PD 经典病理表型分析 行为实验结束后我们对 MPP⁺给药组食蟹猴进行了 PD 病理学检测。我们发现食蟹猴 PD 模型的中脑黑质区域酪氨酸羟化酶（TH）免疫组化染色结果与经典的 MPTP 猴模型以及 PD 患者的病理改变类似。相比正常对照，MPP⁺给药组食蟹猴的两侧黑质 TH 阳性神经元（TH⁺）的数量丢失大于 50%，组内两侧黑质无显著性差异（图 4AC）。尼氏染色结果表明细胞数和尼氏体的数量都有显著性减少，出现了“染质溶解（chromolysis）”现象（图 4BD）。 Control MPP⁺ Group A Left SNC Right SNC B Left SNC C Cell Count (TH⁺ Cells) D Nissl Body Count 图 4. MPP⁺给药组食蟹猴黑质的病理改变。（A）双侧黑质 TH 免疫组化染色结果。（B）左侧黑质尼氏染色结果。（C）TH 免疫组化染色结果统计分析（$\alpha'=0.05/2$，$\alpha''=0.01/2$，**$P<0.005$）。（D）尼氏染色结果统计分析（*$P=0.0186$）。比例尺：100 μm。图 C 与 D 的数值都为平均值$\pm$标准差。
动物模型的评价	1 良好的基本生理情况 相比外周 MPTP 给药建立的 PD 猴模型的不良反应，MPP⁺直接注入侧脑室内建模有效避免了副作用的出现。其显著的优势在于建模动物的体重在整个建模过程中保持稳定（图 5）。建模开始一个月后，时间效应不影响动物体重的变化（$P=0.16$），体重和时间不存在相互作用（$P=0.40$），而且各组间也不存在显著性差异（$P=0.78$）；在恢复期体重反而增加（$P=0.004$），但时间效应对体重的影响在各组间无差异（$P=0.40$），各组间体重也无显著性差异（$P=0.72$）。这表明 MPP⁺侧脑室给药建模过程中动物的基本生理状况良好并且保持稳定。 Weight (kg) Week Low Middle High

图 5. MPP⁺给药组食蟹猴体重的变化趋势。体重在整个实验过程中维持稳定水平。X 坐标轴说明：Health: MPP⁺给药前各组猴 PD 评分的基线水平；A: 给药周数；R: 不进行 MPP⁺给药的自发恢复周数；L: 左旋多巴治疗；W: 洗脱期。图中的数值都为平均值±标准差。

2 排除脑室埋管的非特异性损伤

我们设立了一组生理盐水注射对照，采用同样的手术操作与给药方式，每次侧脑室给盐水 100 μL。主要目的是为了排除上述 MPP⁺给药组的 PD 行为与病理变化是由手术操作引起的可能性。结果发现生理盐水假手术对照的食蟹猴与正常对照相比，没有出现任何 PD 行为症状与病理变化（图 6）。

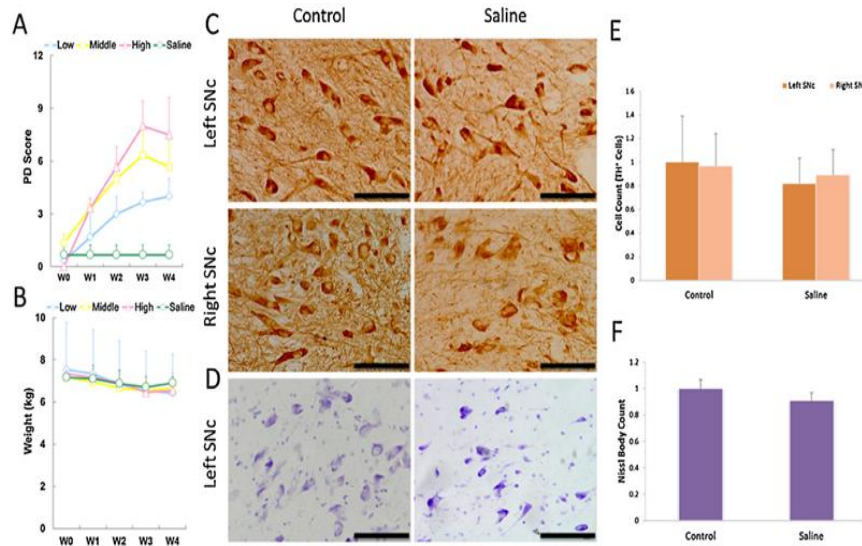


图 6. 生理盐水对照组食蟹猴行为表现和病理结果与正常对照猴无异。（A）生理盐水对照组食蟹猴的 PD 评分（绿线）相比三组 MPP⁺给药组无增加趋势。（B）体重变化。生理盐水对照组与 MPP⁺给药组之间无显著性差异（ $P=0.997$ ）。图 A 与 B 中横坐标的 W 表示周（week）。（C）双侧黑质 TH 免疫组化染色结果。（D）左侧黑质尼氏染色结果。（E）TH 染色统计分析（ $P=0.44$ ）。（F）尼氏染色统计分析（ $P=0.155$ ）。比例尺：100 μm。图 E 与 F 的数值都为平均值±标准差。

3 重复验证

根据建模 S 曲线与地形图，我们对另 2 只食蟹猴的 PD 建模过程进行了验证。我们预期在 4 周内得到 PD 评分为 7 左右的猴模型，根据公式计算出累积给药量 $X=1.6$ mg。我们仍采用每周给药 2 次的频率建模，即得到单次的给药量为 0.2 mg，也就是 2.0 mg/mL，每次给药 100 μL。给药 4 周后，其行为录像采用双盲分析得知最终的 PD 评分为 6 分和 7 分，符合预期的要求，其建模过程中的评分点也几乎全部包含在 S 曲线生成的 95% 的预测区间内（图 3C）。该结果验证了 S 曲线与建模地形图的准确性，验证了该方法定量建模的可行性。

我们在后续的实验中利用该建模策略至少建立了 10 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，也可用于保护帕金森病发生的潜在效应研究。

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	2014 年 10 月	
最新修订时间	2015 年 5 月 21 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. Hao Li, Xiaoguang Lei, Baihui Huang, Joshua D. Rizak, Lichuan Yang, Shangchuan Yang, Jing Wu, Longbao Lü, Jianhong Wang, Ting Yan, Hongwei Li, Zhengbo Wang, Yingzhou Hu, Weidong Le, Xingli Deng, Jiali Li, Lin Xu, Baorong Zhang, Xintian Hu, A quantitative approach to developing Parkinsonian monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>) with intracerebroventricular 1-methyl-4-phenylpyridinium injections, <i>Journal of Neuroscience Methods</i>, Volume 251,2015, Pages 99-107, https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.05.008. 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。	