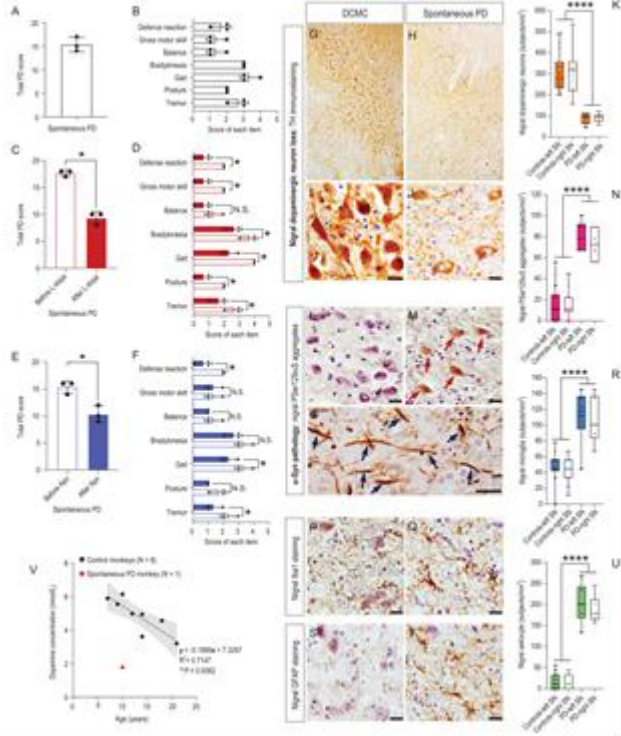
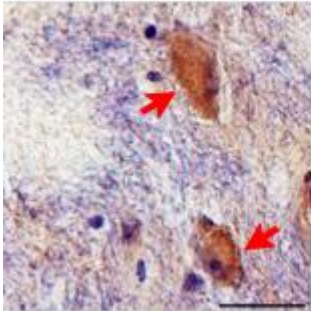
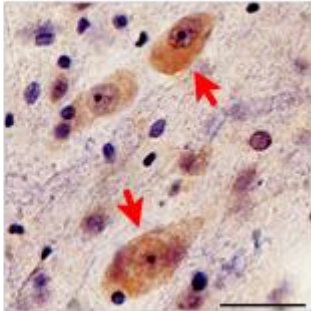


自发罹患帕金森病食蟹猴模型

(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， 2023-03-23)

名称	中文	自发罹患帕金森病食蟹猴模型
	英文	A cynomolgus monkey model with naturally occurring Parkinson's disease
缩略图		
资源描述	我们利用自然筛选的办法，结合行为学录像、行为药理学分析以及病理染色等手段鉴定了一例自发帕金森病的成年雄性食蟹猴（10 岁）。	
动物模型制作方法	1 实验动物 猕猴单笼饲养，标准的明/暗周期，自由取食饮水并由兽医照看。60 只成年猴（包含恒河猴与食蟹猴）参与自发 PD 筛选。 2 行为数据的收集和分析 2.1 我们通过数码相机（Sony HDR-XR260，日本）收集此例自发 PD 食蟹猴的行为录像。在上午 10：00~11：00，位于笼子前方 1 米处的照相机在没有外部干扰的情况下记录单笼猕猴行为 1 小时。实验期共收集行为数据 3 次。 2.2 行为药理学验证实验中，我们采用 L-dopa 和 Apo 进行评估。首先，在 1 小时的视频中，分三段，每段 20 分钟进行 PD 评分，其次，猕猴注射 L-dopa 或 Apo 10 分钟后，拍摄一段新的 1 小时视频。同样分三段，每段 20 分钟进行 PD 评分。在肌肉注射前 5 分钟，按 30 mg/kg 的 L-dopa 溶解于维生素 C 溶液（0.5 mg/2 mL）中，或将 2 mg 的 Apo 溶解于 2 mL（1 mg/mL）的维生素 C 溶液（0.5 mg/2 mL）。 两名训练有素的视频评分者参与视频片段分析。使用改进版的 Kurlan 量表给视频打分。该量表是被广泛接受的用于旧大陆猴 PD 症状评价的量表，包括 4 个部分：A 部分：帕金森病特征；B 部分：药物副作用；C 部分：总体活动水平；D 部分：临床分期。PD 评分依据该量表的 A 部分算出，总分为 20，包括震颤：0-3；姿势：0-2；步态：0-4；运动迟缓：0-4；平衡：0-2；总体运动技能：0-3；防御反应：0-2。两位评分者的得分如果没有明显差异（少于两分），将数据汇总统计；若评分出现较大差异，则最终评分通过一起观看视频来确定。 3 PD 病理特征染色 3.1 TH 染色：猕猴双侧 SN 的冠状切片用 3%H_2O_2（5 min）、3% triton X-100（4 min，中国北京索莱宝）和羊血清（15 min，中国福州迈新）	

	处理，兔抗 TH 抗体（1:1000，AB152，Millipore）4 °C 过夜。次日，将切片与二抗（PV-9000，30 min，中国北京中杉金桥）37 °C 孵育。之后，切片 DAB 显色 2 min（DAB-1031Kit，20×，中国福州迈新），苏木精复染细胞核。 3.2 PSer129αS 染色：切片用 10 μM/ mL 蛋白酶 K（中国上海阿拉丁）在 10 mM Tris-HCl，pH=7.8、100 mM NaCl，0.1 % Tween-20（Bio-Rad，美国）37 °C 处理 30 min。之后切片用 3 % H₂O₂（5 min，中国福州迈新）、3 % Triton X-100（4 min，中国北京索莱宝），10 % 羊血清处理（15 min，中国福州迈新），经典的兔抗 PSer129αS 多克隆抗体（1: 100，ab59264，Abcam，美国）4 °C 过夜。次日切片与抗兔/小鼠二抗试剂盒（PV 9000，中国北京中杉金桥）37 °C 孵育 30 min。之后，切片 DAB 显色 2 min（DAB-1031Kit，20×，中国福州迈新），苏木精复染细胞核。 染色后，所有切片用乙醇梯度脱水并用二甲苯透明。中性树脂封片，光学显微镜（奥林匹斯，CX41；照相机：奥林匹斯 DP25；软件：cellSens Entry 1.4.1；日本）采集照片。因大多数黑质多巴胺能神经元位于黑质致密部，我们在 4×物镜（3.5 mm × 2.6 mm）、20×物镜（690.8 μm × 518.1 μm）和 40×物镜（345.4 μm × 259 μm）下鉴定典型的细胞形态并以第三对脑神经 3n 为参考，选定黑质长轴近中心区域用于细胞计数。 通过 ImageJ 软件（National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA）在 40×物镜下对计数区域的黑质多巴胺能神经元（TH 阳性染色细胞）计数，分别获得猕猴对照侧和基因编辑侧的平均细胞密度（个数/mm²），进行统计。
动物模型表型数据	 Figure 1 consists of multiple panels (A-U) illustrating the spontaneous Parkinson's disease (PD) core phenotype in rhesus monkeys. Panels A-F show behavioral data and bar graphs of motor symptoms. Panels G-J show histological images of TH-positive cells in the substantia nigra. Panels K-U show statistical analysis of cell density and morphology. Panel A: Bar graph showing the number of spontaneous PD cases (n=10) compared to control monkeys (n=10). The number of cases is significantly higher (****). Panel B: Bar graph showing the number of spontaneous PD cases (n=10) compared to control monkeys (n=10) for various motor symptoms. The number of cases is significantly higher (****). Panel C: Bar graph showing the number of spontaneous PD cases (n=10) compared to control monkeys (n=10) for various motor symptoms. The number of cases is significantly higher (****). Panel D: Bar graph showing the number of spontaneous PD cases (n=10) compared to control monkeys (n=10) for various motor symptoms. The number of cases is significantly higher (****). Panel E: Bar graph showing the number of spontaneous PD cases (n=10) compared to control monkeys (n=10) for various motor symptoms. The number of cases is significantly higher (****). Panel F: Bar graph showing the number of spontaneous PD cases (n=10) compared to control monkeys (n=10) for various motor symptoms. The number of cases is significantly higher (****). Panel G: Histological image showing TH-positive cells in the substantia nigra of a control monkey. Panel H: Histological image showing TH-positive cells in the substantia nigra of a spontaneous PD monkey. Panel I: Histological image showing TH-positive cells in the substantia nigra of a spontaneous PD monkey. Panel J: Histological image showing TH-positive cells in the substantia nigra of a spontaneous PD monkey. Panel K: Bar graph showing the number of TH-positive cells in the substantia nigra of control monkeys (n=10) compared to spontaneous PD monkeys (n=10). The number of cells is significantly lower in PD monkeys (****). Panel L: Bar graph showing the number of TH-positive cells in the substantia nigra of control monkeys (n=10) compared to spontaneous PD monkeys (n=10). The number of cells is significantly lower in PD monkeys (****). Panel M: Bar graph showing the number of TH-positive cells in the substantia nigra of control monkeys (n=10) compared to spontaneous PD monkeys (n=10). The number of cells is significantly lower in PD monkeys (****). Panel N: Bar graph showing the number of TH-positive cells in the substantia nigra of control monkeys (n=10) compared to spontaneous PD monkeys (n=10). The number of cells is significantly lower in PD monkeys (****). Panel O: Bar graph showing the number of TH-positive cells in the substantia nigra of control monkeys (n=10) compared to spontaneous PD monkeys (n=10). The number of cells is significantly lower in PD monkeys (****). Panel P: Bar graph showing the number of TH-positive cells in the substantia nigra of control monkeys (n=10) compared to spontaneous PD monkeys (n=10). The number of cells is significantly lower in PD monkeys (****). Panel Q: Bar graph showing the number of TH-positive cells in the substantia nigra of control monkeys (n=10) compared to spontaneous PD monkeys (n=10). The number of cells is significantly lower in PD monkeys (****). Panel R: Bar graph showing the number of TH-positive cells in the substantia nigra of control monkeys (n=10) compared to spontaneous PD monkeys (n=10). The number of cells is significantly lower in PD monkeys (****). Panel S: Bar graph showing the number of TH-positive cells in the substantia nigra of control monkeys (n=10) compared to spontaneous PD monkeys (n=10). The number of cells is significantly lower in PD monkeys (****). Panel T: Bar graph showing the number of TH-positive cells in the substantia nigra of control monkeys (n=10) compared to spontaneous PD monkeys (n=10). The number of cells is significantly lower in PD monkeys (****). Panel U: Bar graph showing the number of TH-positive cells in the substantia nigra of control monkeys (n=10) compared to spontaneous PD monkeys (n=10). The number of cells is significantly lower in PD monkeys (****). 图 1. 自发罹患帕金森病的食蟹猴出现经典的 PD 核心表型。(A-B) 典型的 PD 运动症状（包括运动迟缓、静止性震颤与姿势异常等）。(C-F) 经典药理学治疗对 PD 核心症状的改善效果均出现显著性。(G-J) 相比对照，此猴黑质的 TH 阳性细胞（多巴胺能神经元）大量丢失且形态受损。(K) 统计

	表明此猴黑质多巴胺能神经元显著丢失达 70%。(L-M) 相比对照, 此猴黑质出现 P_{Ser129}αSyn 聚集。(N) 统计表明此猴黑质 P_{Ser129}αS 聚集的数量显著高于对照。(O) 此猴黑质出现大量 P_{Ser129}αSyn 聚集形成的路易突起。(P-Q) 相比对照, 此猴黑质出现大量小胶质细胞增生激活。(R) 统计表明此猴黑质激活的小胶质细胞数量显著高于对照。(S-T) 相比对照, 此猴黑质出现大量星型胶质细胞增生激活。(U) 统计表明此猴黑质星型胶质细胞数量显著高于对照。(V) 此猴脑脊液中多巴胺的浓度显著低于正常对照猴。比例尺: 空心: 200μm, 实心: 20μm。(A-F) 数值代表均值±标准差, (K), (N), (R), (U) 的数值代表中位数±极值。
动物模型的评价	ab59264 (1:100)  ab51253 (1:1000)  图 2. 利用此猴蓝斑区域的脑片对 P_{Ser129}αS 两种抗体的染色验证。左图为多克隆抗体(ab59264, 1: 100), 右图为单克隆抗体(ab51253, 1: 1000), 可见染色结果类似 (红色箭头指示 P_{Ser129}αS 聚集) 比例尺: 20 μm。 A TCAGATTAGCATCT TCAGATTAGCATCT TCAGATTAGCATCT SDI AS SDLAS p.I835L ATCATATACGAGAGC ATCATATACGAGAGC ATCATATACGAGAGC IINES IIYES p.N1506Y AAAAC TGAAAACTC AAAAC TGAAAACTC AAAAC TGAAAACTC KTEKL KTGKL p.E2381G LRRK2 1 2527 LRR STKc_LRRK2 S_TKc CCR super family B GGTAGAAGGCTTGCTGGGTCTCGATCCAGA GGTAGAAGGCTTGCTGGGTCTCGATCCAGA GGTAGAAGGCTTGCTGGGTCTCGATCCAGA QYFAQQTFIW QYFAQ LTFIW p.Q174L ATP13A2 1 1176 P5-ATPase P-ATPase-V Cation_ATPase super family COG4087 图 3. 此猴具备 PD 风险基因 LRRK2 与 ATP13A2 的错义突变。
动物模型应用案例	无

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	2016年3月1日至2021年3月20日	
最新修订时间	2021年3月20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. Li, H., Su, L.Y., Yang, L. et al. A cynomolgus monkey with naturally occurring Parkinson's disease. Natl. Sci. Rev., 8: nwaa292 (2021). https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa292 2. Li, H., Yao, Y.G., Hu, X.T. Biological implications and limitations of a cynomolgus monkey with naturally occurring Parkinson's disease. Zool. Res., 42(2): 138-140 (2021). https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2021.004 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。	