

偏侧黑质注射 MPP⁺诱导的树鼯帕金森病模型

(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, 2024-10-23)

名称	中文	偏侧黑质注射 MPP ⁺ 诱导的树鼯帕金森病模型
	英文	A tree shrew model of Parkinson's disease induced by unilateral substantia nigra injection of MPP ⁺
缩略图	<p>偏侧黑质注射MPP⁺</p> <p>帕金森病发病进程</p> <p>震颤</p> <p>运动迟缓</p> <p>阿朴吗啡或左旋多巴诱导的旋转与症状改善</p> <p>黑质多巴胺能神经元丢失</p> <p>树鼯作为良好的PD模型动物的生物学基础:</p> <p>1) 与灵长类接近且发达的三维运动模式, 能够良好复制猕猴模型与帕金森病患者的经典运动症状;</p> <p>2) 与灵长类接近的黑质多巴胺能神经元形态与尺寸。</p> <p>典型稳定的帕金森临床症状与药理实验验证</p> <p>经典病理改变</p>	
资源描述	<p>使用经典的 PD 建模药物 MPTP 的代谢物 MPP⁺直接精确损毁树鼯偏侧黑质, 利用数码相机记录和改进版 <i>Kurlan</i> 量表评分, 结合阿朴吗啡与左旋多巴诱导的旋转以及评分改善评价 PD 运动症状, 采用免疫组化染色定量分析黑质多巴胺神经元的数量。</p>	
动物模型制作方法	<p>1 实验流程</p> <p>实验流程分为两个阶段。第一阶段: 我们利用 7 只树鼯 (TS 1-7) 探索偏侧黑质注射 MPP⁺ (MPP⁺ iodide, D048, Sigma, USA) 建立树鼯 PD 模型的适宜剂量。通过树鼯的存活率与运动症状的稳定性寻找适宜的建模剂量。剂量探索实验中, 密切观察树鼯注射 MPP⁺之后的存活情况, 树鼯 PD 运动症状的稳定性是通过术后一个月内每周 1 次的录像以及一个月后每 2 周一次的录像进行评定。第二阶段: 在剂量摸索实验 18 周后, 确定适宜的建模剂量为偏侧黑质单次注射 50 μg MPP⁺, 我们采用该剂量增加 4 只树鼯建立 PD 偏侧模型 (TS 8-11)。受 COVID-19 疫情影响, 所有实验动物相关的操作暂停, 导致这 4 只树鼯的行为录像仅采集到基线, 2, 4, 20 周的数据。</p> <p>2 黑质立体定位注射 MPP⁺</p> <p>树鼯手术操作参考神经毒素诱导的 PD 动物模型相关实验指南 (Tieu, 2011) 以及我们前期积累的经验。术前, 由专业人员将树鼯从笼中取出, 后肢肌注戊巴 (80 mg/kg, 40 mg/ml)。树鼯麻醉后, 在立体定位仪 (68509, RWD, China) 上固定树鼯的头部。利用气体麻醉机将异氟烷混合纯氧 (浓度为 2%) 对树鼯进行深度麻醉。树鼯麻醉后, 头部剃毛, 手术人员使用碘伏与酒精对树鼯头皮消毒, 划开树鼯头皮, 暴露颅骨, 清创并止血, 用 3%双氧水消毒及生理盐水清洗。根据已发表的树鼯脑图谱 (Jiang-Ning Zhou, 2016), 确定树鼯右侧黑质致密部的</p>	

坐标 (AP = -3.88 mm, ML = 2.00 mm, DV = 10.00 mm)。MPP⁺注射前, 再次根据每只树鼯的前囟和后囟位置对黑质最终位置进行确认, 获得每只树鼯实际进针的坐标, 然后颅骨钻打孔。利用玻璃微电极 (World Precision Instruments Inc., WPI, USA) 对准打好的孔, 缓慢刺入树鼯大脑并根据树鼯脑图谱提供的深度确定黑质致密部的给药位置。

我们利用微量注射泵将玻璃微电极内的 MPP⁺-生理盐水溶液以 100 nL/min 速度注射到树鼯右侧黑质致密部。注射完成后, 停针 5 min, 缓慢退出玻璃微电极。然后以相同方法在树鼯左侧黑质致密部注射同体积的生理盐水作为对照。注射完成后, 生理盐水清洗颅骨, 缝合树鼯头皮, 碘伏消毒。术后, 树鼯置于温暖处, 苏醒后放回巢箱。

3 寻找用于建立树鼯偏侧帕金森病模型的 MPP⁺黑质注射适宜剂量

建模前首先需要探索 MPP⁺损毁树鼯偏侧黑质的适宜剂量。7 只雄性成年健康树鼯 (TS 1-7) 用于该实验。一般而言, MPP⁺浓度过高导致动物死亡; 浓度太低, 动物的 PD 运动症状可能会自发恢复。参考猴脑与树鼯脑的平均质量 (猴脑~100 g, 树鼯脑~3 g) 以及猴脑黑质 MPP⁺注射建模剂量 (100 mg/mL-8 μ L), 估算 MPP⁺注射树鼯偏侧黑质建模的合适剂量为 24 μ g, 在该数值上下三倍的范围内设定适宜建模剂量的最小值和最大值, 即 8-72 μ g。因此, 本实验拟设定 40 mg/mL-2 μ L (80 μ g), 30 mg/mL-2 μ L (60 μ g), 25 mg/mL-2 μ L (50 μ g), 20 mg/mL-1.8 μ L (36 μ g), 10 mg/mL-0.5 μ L (5 μ g) 这 5 个建模剂量。我们通过两个关键指标判断建立树鼯 PD 模型的适宜剂量: 1) 生存概率: 树鼯在黑质注射不同剂量 MPP⁺的存活百分比。2) 典型的 PD 症状及其 PD 评分的稳定性: 根据改进版 *Kurlan* 量表的 A 部分对树鼯 PD 症状进行评分。需要说明的是, 目前没有树鼯专用的 PD 运动症状评价标准, 考虑到树鼯在进化发育上是最接近灵长目的实验动物, 以及神经解剖上树鼯的纹状体结构非常接近灵长目, 所以, 我们尝试使用该量表定量树鼯的 PD 运动症状。详细项目及评分标准如下: 震颤 (0-3); 身体姿态 (0-2); 步态 (0-4); 运动迟缓 (0-4); 平衡 (0-2); 整体运动技能 (0-3); 防御性反应 (0-2)。每项基于特定症状的严重程度打分, 7 项评分条目的总分最高为 20 分。分数越高, 表明 PD 运动症状越严重。

4 树鼯 PD 运动症状量化与分析

PD 核心运动症状是评价 PD 动物模型是否成功建立的重要标准。我们利用数码摄像机 (SONY HDR-XR260, Japan) 在不受外界因素干扰的室内分别记录树鼯笼内的自由运动, 然后由专业人员对录像进行分析。每次录像从 9: 00 am 到 10: 00 am, 持续 1 小时。实验人员术前 1 周对树鼯录像, 获得基线行为; 术后每隔两周录像, 持续 5 个月。根据上述评分标准对树鼯运动症状进行评分。树鼯的编号与实验处理等信息对评分者而言是双盲的, 在树鼯运动症状评定中, 若出现不明确之处, 评分者需与有经验的实验人员一起观察录像, 进行讨论, 达成一致后再评分。

5 阿朴吗啡诱导树鼯出现的旋转计数

阿朴吗啡 (apomorphine, APO) 是评估偏侧 PD 动物模型行为药理学表现的常用药物。实验中, 首先录像记录树鼩在笼子中自由运动 1 小时的行为, 从 9: 00 am 到 10: 00 am。然后由实验人员小心地取出树鼩, 在树鼩后肢肌注阿朴吗啡 (1 mg/mL, 0.2 mL, 013-18323, Wako, Japan)。注射后将树鼩放回笼子。等待 5 分钟, 再录像记录树鼩的行为 50 min (10: 05 am 到 10: 55 am)。最后, 进行 50 分钟内 APO 诱导的树鼩旋转圈数进行统计。旋转计数中, APO 诱导的旋转行为 (完整一圈为 360°) 定义为: 计数开始前任意指定一个初始方向, 以树鼩身体长轴为中心, 树鼩顺时针或逆时针旋转 360°, 则记为顺时针或逆时针方向的旋转圈数+1。第一阶段参与剂量探索并建模的 2 只树鼩 (TS 6-7) 完成了所有时间点数据采集, 第二阶段由于 COVID-19 疫情原因, 4 只树鼩 (TS 8-11) 仅采集到基线, 2, 4, 和 20 周的旋转数据。

6 左旋多巴疗效的验证

为了进一步验证该模型, 我们给五只右侧黑质 MPP⁺损毁的树鼩 (TS 12-TS 16) 注射了不同浓度的左旋多巴甲酯/卡比多巴-生理盐水溶液, 并通过旋转计数和 PD 总评分的变化评估该模型对左旋多巴的反应及其剂量效应。在啮齿类动物的帕金森氏症模型中, 左旋多巴的常用给药剂量为 6 mg/kg。在此剂量的基础上, 我们尝试将 2、10 和 20 mg/kg 的左旋多巴甲酯 (阿拉丁, S133010) 与 15 mg/kg 的卡比多巴 (阿拉丁, C123671) 联合使用, 以进一步分析剂量效应。第一次测试在 MPP⁺损毁后 2 周进行, 此后每隔一周进行一次测试, 左旋多巴的剂量顺序为 6、2、10、20 mg/kg。测试前, 树鼩肌肉注射 0.1 mL 生理盐水, 录像 2 小时。然后, 注射特定剂量的 0.1 mL 左旋多巴甲酯和卡比多巴-生理盐水溶液, 之后再次录像 2 小时。每隔 10 分钟对树鼩录像中出现的旋转进行计数, 然后计算 120 分钟内的平均旋转次数, 并同时测评每只树鼩注射左旋多巴前后的 PD 评分。

7 PD 病理学染色

7.1 树鼩脑组织固定和振动切片

6 只树鼩 (TS 6-11) PD 建模 5 个月后, 肌注过量戊巴比妥钠 (100 mg/kg, 40 mg/mL) 安乐死。对树鼩心脏分别灌流 0.01M PBS 和 4%多聚甲醛固定树鼩脑。树鼩脑组织保存于 4%多聚甲醛中, 固定 24 h-48 h。黑质是 PD 病理改变最重要的脑区。根据树鼩脑图谱, 树鼩黑质致密部的前后范围包括: bregma -3.75 mm 到 -5.89 mm, 前后 (anterior to posterior, AP) 总长度为 2.14 mm。用 3%琼脂糖包埋树鼩中脑黑质组织块, 然后在振动切片机 (LEICA, VT1000S, Germany) 上切片。为了保证切片的范围覆盖全部黑质致密部, 每只树鼩切片时, 前后长度切片范围定为 2.2 mm, 每张切片的厚度为 40 μ m, 预计每只树鼩可获得 55 张脑切片。因树鼩的个体差异以及仪器误差, 实际获得每只树鼩大约 50 张黑质冠状切片, 我们将每只树鼩连续的 5 张脑切片收集于同一支含有组织防冻液的 Eppendorf 管 (1.5 mL) 中, 形成一套完整的黑质冠状切片, 约 10-11 管, 保存于 -20°冰箱中备用。

	<p>7.2 免疫组化染色</p> <p>首先选取具有代表性的树鼩中脑黑质切片。保证每只树鼩被挑选的脑片能基本覆盖从前到后全部黑质区域。根据上述振动切片的流程与树鼩脑片的保存策略，我们分别从保存每只树鼩黑质切片的 10 个离心管中各随机挑选 1 张，则每只树鼩共有 10 张脑片用于 TH 免疫组化染色。因此，6 只树鼩共计 60 张脑片，同一切片上的双侧黑质形成自身对照。同理，每只猕猴也按同样方式挑选 10 张脑片用于 TH 免疫组化染色。</p> <p>对于 TH 免疫组化染色，参照以下流程：3% H₂O₂（5 分钟，迈欣，福州，中国），3% triton X-100（4 分钟，Solarbio，北京，中国），10% 山羊血清（15 分钟，中国福州迈新）处理，然后与兔抗 TH 抗体（1:1000，AB152，Millipore，美国）4°C 孵育过夜。第二天，切片在抗兔/小鼠二抗（PV-9000 试剂盒，ZSGB-BIO，北京，中国）37°C 孵育 30 分钟。之后，切片与 DAB（DAB 1031 试剂盒，20×，中国福州迈新）孵育 2 分钟，苏木精复染 1 分钟。染色后，所有切片进行乙醇梯度脱水和二甲苯透明，中性树脂封片，风干，用数字病理切片扫描阅片系统（SQS-40P，深圳市生强科技有限公司，中国）采集每张切片染色的图像。在 40× (402.50 μm × 221.25 μm)，对 MPP⁺损毁侧和健康侧的黑质区域拍照用于计数。使用数字病理切片扫描阅片系统（SQS-40P，深圳市生强科技有限公司，中国）逐一标记黑质健康侧和 MPP⁺损毁侧中 TH 染色呈现阳性的神经元，统计具有完整细胞核且胞体完整的 TH 阳性染色细胞。</p> <p>8 统计</p> <p>我们采用 SPSS 25 和 Graphpad Prism 8.0 进行分析。首先对所有数据进行了正态性检验。方差分析（ANOVA）用于比较六只树鼩（TS 6-TS 11）在不同建模时间的 PD 总分。曼-惠特尼 U 检验用于比较六只树鼩（TS 6-TS 11）在第 2 周和第 20 周的基线和建模阶段的 7 项症状的得分。利用非参数检验（Wilcoxon 配对检验：基线与第 2 周、基线与第 20 周）和配对 t 检验（第 2 周与第 20 周）来比较六只树鼩（TS 6-TS 11）在 APO 诱导的旋转次数上的差异。曼-惠特尼 U 检验用于确定六只树鼩（TS 6-TS 11）双侧 SNpC 中 TH 阳性细胞密度的差异。配对 t 检验用于分析五只树鼩（TS 12-TS 16）在给予左旋多巴和未给予左旋多巴情况下旋转计数的差异，以及给予左旋多巴前后 PD 总分的差异（Wilcoxon 配对检验用于 2 mg/kg 左旋多巴治疗对 PD 总分的影响）。t 检验用于分析四只树鼩（TS 17-TS 20）双侧 SNpC 中 TH 阳性细胞密度的差异。用 t 检验分析 C57 小鼠、Wistar 大鼠、树鼩和猕猴之间黑质多巴胺能神经元（n = 60）的胞体和细胞核的平均直径差异。* P < 0.05, ** P < 0.01 为显著（双尾）。</p>
<p>动物模型表型数据</p>	<p>1 寻找建立树鼩偏侧 PD 模型的 MPP⁺适宜剂量和正式建模</p> <p>剂量摸索实验中，MPP⁺偏侧黑质注射剂量为 5 μg，36 μg，50 μg 的树鼩均存活，剂量超过 50 μg 的树鼩（TS 3-5）迅速死亡（图 1A）。存活的树鼩中，剂量为 5 μg（TS 1）或 36 μg（TS 2）的树鼩不具备稳定的 PD 运动症状（PD 评分在建模 4 周降至 1-2），而剂量为 50 μg 的 2 只树鼩（TS 6-7）PD 症状较稳定，评分稳定在 8-9（图 1B）。因此，</p>

偏侧黑质注射 MPP⁺建立树鼩 PD 模型的适宜剂量可能是 50 μg 。基于此，我们对另外 4 只树鼩（TS 8-11）进行 PD 正式建模，时间同样是 20 周。

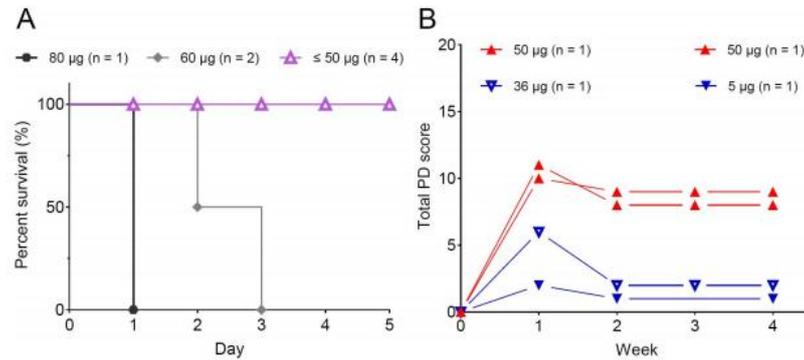


图 1. 探索偏侧黑质注射 MPP⁺建立树鼩 PD 模型的适宜剂量 (n = 7)。 (A) 偏侧黑质注射 MPP⁺的剂量为 80 μg ，术后 1 天树鼩死亡；剂量为 60 μg ，术后 3 天 2 只树鼩相继死亡；剂量分别为 5 μg ，36 μg ，50 μg ，术后树鼩均存活，表明偏侧黑质注射 MPP⁺建立树鼩 PD 模型的适宜剂量可能在 5 μg 至 50 μg 之间。(B) 偏侧黑质注射 MPP⁺的剂量为 5 μg ，36 μg ，50 μg 时，术后一周，所有树鼩的 PD 评分均升高。其中，5 μg 的树鼩评分为 2，36 μg 的树鼩评分为 6，50 μg 的树鼩评分为 10-11；术后 4 周，5 μg 的树鼩评分降为 1，36 μg 的树鼩评分降为 2，50 μg 的树鼩评分稳定在 8-9，趋势不变，保持了 20 周。因此，偏侧黑质注射 MPP⁺建立树鼩 PD 模型的适宜剂量是 50 μg 。图 B 中 MPP⁺注射剂量为 5 μg 的树鼩术后第 3 周曾调换过笼子，可能影响其 PD 行为评分，故未采集术后第 3 周的行为录像。

2 MPP⁺损毁树鼩偏侧黑质出现经典 PD 运动症状

建模后，我们对上述共计 6 只树鼩的 PD 临床症状进行了评估。运动症状是 PD 患者关键的临床诊断依据，也是评价 PD 动物模型是否成功建立的重要指标之一。以树鼩 (TS 11) 为例，相比正常状态 (图 2A)，TS 11 在偏侧黑质 MPP⁺损毁 2 周即出现上肢使用困难 (图 2B)，身体失衡 (图 2C) 和弯腰曲背 (图 2D) 等运动障碍。同时，我们也在录像中观察到明显的运动迟缓，静止性震颤与步态异常等 PD 临床运动症状。根据 UK Parkinson's Disease Society Brain Bank 临床诊断标准，运动迟缓是 PD 必备的诊断指标，同时出现肌僵直、静止性震颤或姿态异常中的一项即可诊断为 PD。因此，MPP⁺损毁偏侧黑质诱导的树鼩 PD 模型已经满足人类 PD 的临床诊断标准。

值得注意的是，树鼩独特的高速运动与大幅跳跃等习惯性动作在 PD 建模 2 周后消失，表明树鼩的运动速度与幅度均明显减小，再次证明树鼩能直接模拟人类 PD 的运动迟缓。加之树鼩出现了接近人类 PD 的静止性震颤，因此，单从对 PD 临床症状的模拟来说，树鼩是明显优于啮齿类且更加接近非人灵长类的 PD 建模动物。

然后是对 6 只树鼩 PD 运动症状的定量分析。目前还没有树鼩专用的 PD 运动症状评价量表。考虑到树鼩在进化上是最接近灵长目的实验动物，而且上面提到树鼩的系列症状与猕猴 PD 模型高度相似，所以我们尝试使用旧大陆猴 PD 运动症状的经典量表，即 *Kurlan* 量表改进版来

评价树鼩的 PD 运动症状。共有 7 项评分条目，涵盖了人类 PD 核心运动症状，如运动迟缓、静止性震颤和姿势异常等，同时兼顾非人灵长类动物自身特点，增加了上肢使用情况与防御反应等。通过前期初步分析，上述 7 条评分项目都能在树鼩上清楚观察到。因此，直接利用该量表对树鼩 PD 运动特征进行定量评价是可靠的。

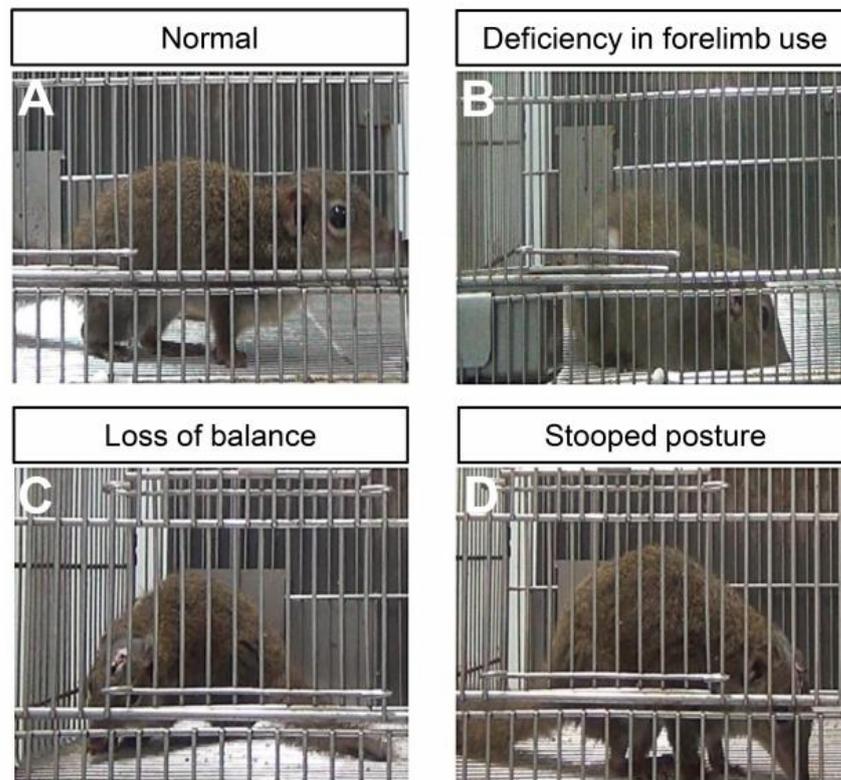


图 2. 树鼩 (TS 11) 偏侧黑质单次注射 50 μg MPP⁺两周后出现明显的 PD 运动障碍。(A) 正常姿态。(B) 树鼩上肢使用困难，经常摔倒。(C) 树鼩失衡，向左侧倾倒。(D) 树鼩弯腰、屈背，脊柱隆起，面部贴向地面。

定量分析结果表明：术后两周，6 只树鼩的评分迅速升至 8-10。从建模第 2 周至 20 周，6 只树鼩各自的 PD 评分趋势平稳，无明显变化(图 3A，其中，TS 8-11 四只动物实验阶段受 COVID-19 影响，仅采集到基线、建模 2、4、20 周的数据，但不影响总体结果)。6 只树鼩 PD 评分的总体平均结果表明，PD 建模过程中 6 只树鼩 PD 评分的平均值趋势稳定，没有明显改变(图 3B)，即 6 只树鼩的 PD 运动症状持续稳定了 5 个月，完全达到了模型实际运用的要求。之后，根据数据的构成特点，对基线、建模第 2 周与第 20 周时树鼩 PD 评分的 7 项评分进行单独比较。结果一致表明，PD 建模 2 周与 20 周时，树鼩的震颤，身体姿态，步态，运动迟缓，失衡，整体运动技能(主要指上肢使用困难)，防御反应受损等各项评分均无显著差异，但都比基线显著升高(图 3C-I)，表明在树鼩的 PD 运动症状可直接用旧大陆猴的经典 PD 量表进行定量的同时，进一步提示树鼩 PD 模型的运动症状比啮齿类模型更接近非人灵长类 PD 模型。

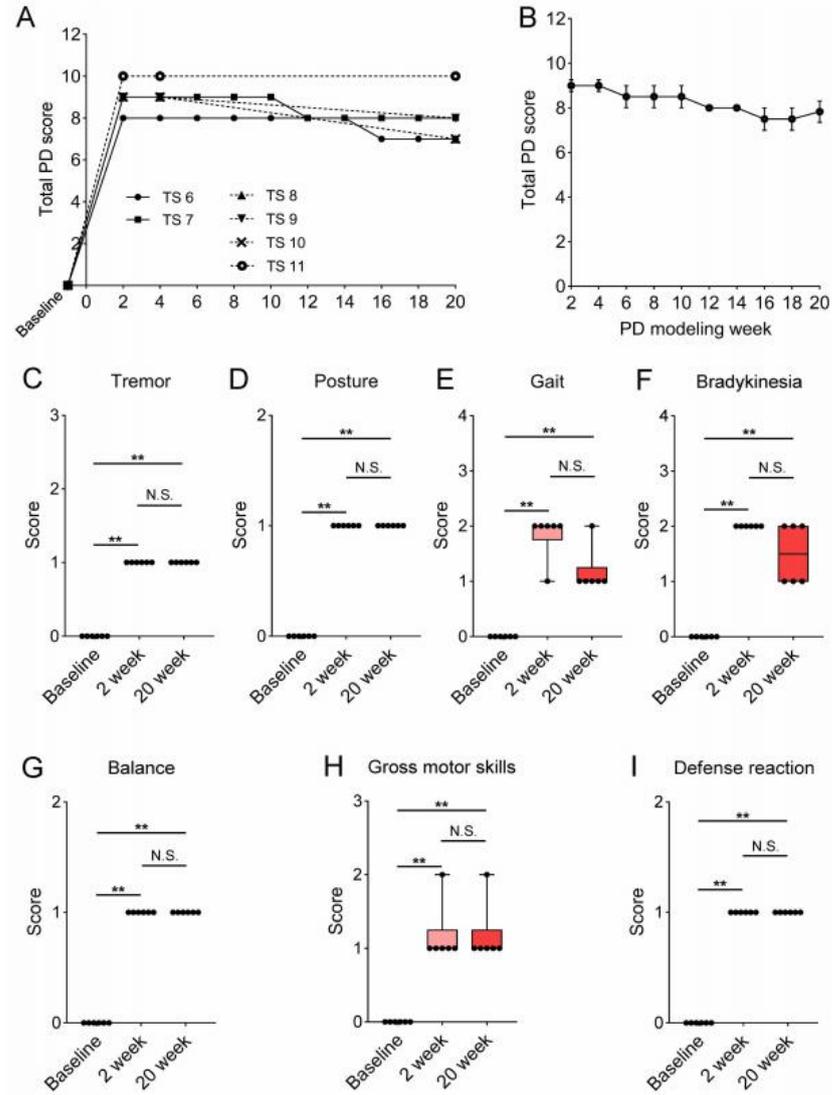


图3. 利用 *Kurlan* 量表改进版对树鼯偏侧黑质单次注射 MPP^+ 出现的 PD 运动症状进行定量分析 ($n = 6$)。 (A) 6 只树鼯 (TS 6-11) 偏侧黑质注射 $50 \mu g$ MPP^+ 后, PD 评分随时间变化的趋势。术后两周, 树鼯就出现典型的 PD 运动症状 (PD 评分 8-10), 在随后 5 个月内 PD 评分无明显变化。其中 4 只树鼯 (TS 8-11) 因 COVID-19 影响未收集到术后第 4 至第 18 周的数据。 (B) 建模过程中 6 只树鼯 PD 评分的总体平均值随时间变化的趋势平稳, 无显著性差异 ($P = 0.11$)。图中数值为 $mean \pm SEM$ 。 (C-H) 基于数据构成的特征, 对共计 6 只 PD 建模树鼯的基线、PD 建模 2 周与 20 周时构成 PD 评分的各项单独评分项进行比较。不论是 PD 建模 2 周还是 20 周, 树鼯的震颤、姿势异常、步态受损、运动迟缓、失衡、上肢使用困难与防御性反应减弱等评分均显著高于基线 (** $P < .01$), 表明树鼯出现了改进版 *Kurlan* 量表定义的所有 PD 运动症状; 而且, PD 建模 2 周与 20 周的各项评分相比无显著差异, 表明所有树鼯的各个 PD 运动症状至少稳定 5 个月。 (C-I) 的箱式图表示中位数与四分位数, 并且每个树鼯的数值用单个点表示。

3 树鼯偏侧 PD 模型出现黑质多巴胺能神经元大量丢失这一 PD 关键病

理特征

行为测试完成后,我们需对树鼯偏侧 PD 模型的病理特征进行鉴定。黑质致密部多巴胺能神经元的形态改变与数量显著丢失是 PD 病人最重要的病理特征。灵长目脑中,黑质致密部富含多巴胺能神经元,胞内具有可溶的、较高浓度的酪氨酸羟化酶 (TH)。因此,TH 免疫组化染色是观察和鉴定灵长类黑质多巴胺能神经元数量和形态的经典方法。基于此,建模 20 周后,处死树鼯取脑,进行中脑黑质冠状切片 TH 免疫组化染色。

TH 免疫组化染色与苏木精复染细胞核的病理图片显示,树鼯黑质多巴胺能神经元胞体与突起呈现棕色,细胞核呈现蓝色,表明经典的 TH 免疫组化流程同样适用于树鼯 (图 4A)。树鼯 MPP⁺损伤侧黑质多巴胺能神经元几乎全部丢失 (图 4B),而作为对照的健康侧 (生理盐水注射)黑质致密部解剖结构完整,可见结构清晰的黑质致密部 (图 4C,黄色虚线区域)与黑质网状部 (图 4C,黑色虚线区域)。在 20 倍视野下,损伤侧黑质几乎见不到存活的多巴胺能神经元 (图 4D);而健康侧黑质致密部存在大量形态清楚,呈现 TH 阳性染色的多巴胺能神经元。其胞体完整、大多呈梭形、突起清晰可见 (棕色染色),蓝色的细胞核居中 (图 4E)。在 40 倍视野下,树鼯 MPP⁺损毁侧黑质的 TH 阳性神经元密度显著低于健康侧 (** P < 0.01),丢失近 95% (图 4F)。综上,树鼯偏侧 MPP⁺损毁模型能够模拟人类 PD 的关键病理特征:黑质多巴胺能神经元明显的形态改变与显著的数量降低。

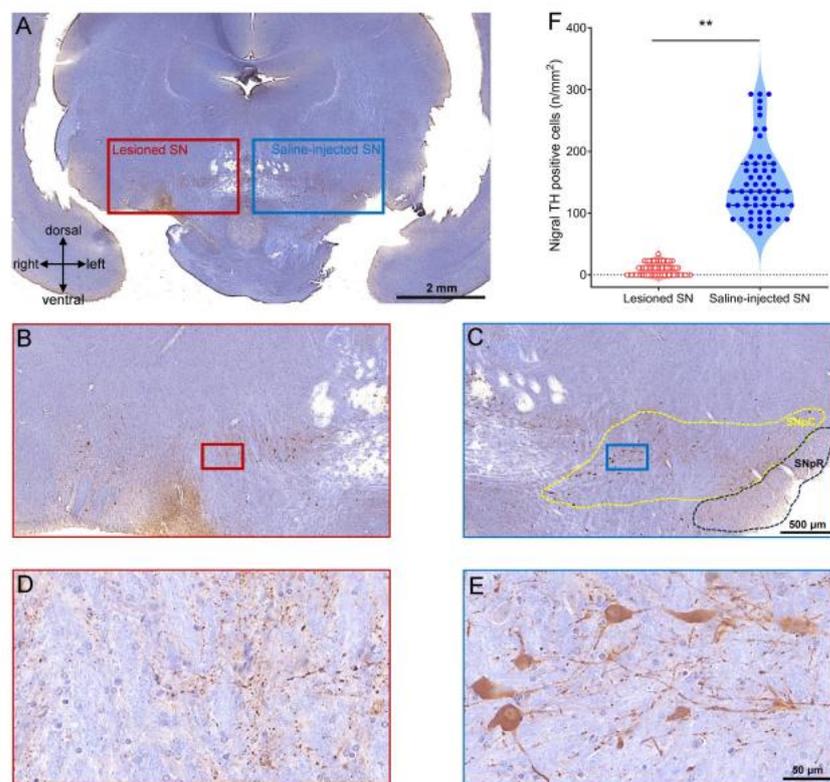
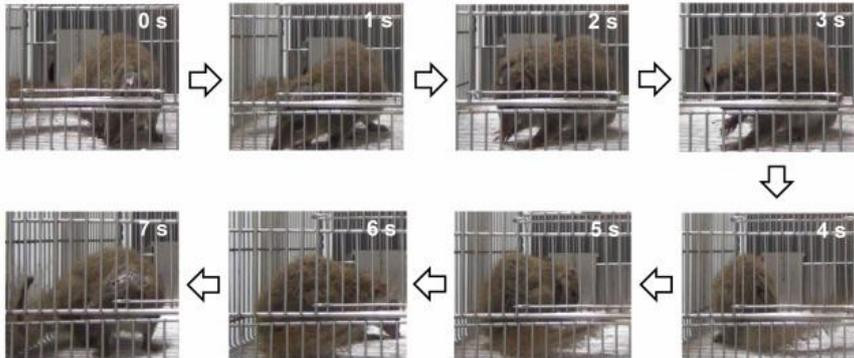


图 4. MPP⁺精确损毁树鼯偏侧黑质出现 PD 关键的病理特征 (n = 6)。(A) 以 TS 6 为例,显示同一张冠状脑切片的双侧黑质 TH 免疫组化染色与苏木精复染细胞核的病理图片。可见树鼯黑质多巴胺能神经元的胞体与突起呈

	<p>现棕色，细胞核呈现蓝色。(B)为(A)中红色方框区域，即树鼯MPP⁺损毁侧黑质的放大图像，树鼯损毁侧黑质致密部神经元非常稀少。(C)为(A)中蓝色方框区域，即树鼯健康侧黑质的放大图像，可见结构完整、边缘清晰的树鼯黑质致密部(SNpC,黄色虚线区域)和黑质网状部(SNpR,黑色虚线区域)。(D)为(B)中红色方框区域，即树鼯MPP⁺损毁侧黑质的进一步放大图像，黑质多巴胺能神经元几乎全部丢失，没有可辨认的神经元。(E)为(C)中蓝色方框区域，即树鼯健康侧黑质的进一步放大图像，可见大量胞体完整、梭形、突起发达，呈现TH阳性染色(棕色)以及细胞核清晰(蓝色)的多巴胺能神经元。我们确认了图(B)和(C)，(D)和(E)在解剖位置上完全对称。(F)对6只树鼯共计60张中脑冠状切片包含双侧黑质区域的多巴胺能神经元的密度统计表明MPP⁺损毁侧黑质的多巴胺能神经元密度显著低于健康侧黑质(**P<0.01)，数量丢失95%，(F)图表示所有数值分布以及中位数与四分位数。</p>
<p>动物模型的评价</p>	<p>阿朴吗啡诱导偏侧树鼯PD模型出现旋转行为</p> <p>PD评分是对树鼯PD模型临床核心运动症状的直接评价。此外，在偏侧黑质损毁的PD动物模型中，多巴胺D1受体激动剂apomorphine(APO)诱导的旋转是评估黑质致密部多巴胺能神经元丢失与功能异常的经典药理学标准之一。一般而言，偏侧黑质损伤的PD动物模型中，若损伤侧多巴胺能神经元丢失超过90%，APO给药后很可能出现明显的旋转行为，其旋转方向与神经毒素类型、剂量、以及注射的位置等因素有关。术后2周，6只树鼯(TS 6-11)都出现了APO(1 mg/mL, 0.2 mL, im)诱导的旋转，表明6只树鼯损伤侧黑质多巴胺能神经元丢失超过90%。图5显示其中一只树鼯(TS 11)的旋转行为视频截图。</p>  <p>图5. 以树鼯(TS 11)为例，连续的视频截图显示APO诱导的一段持续0-7秒的旋转(TS 11出现向自身右侧360°旋转)。0 sec时，TS 11身体所处方向定义为0°。1-3 sec时，TS 11身体向右侧旋转90°。4-5 sec时，TS 11身体向右侧旋转180°。6-7 sec时，TS 11继续向右侧旋转180°。合计7 sec内，TS 11向自身右侧旋转完整一圈(360°)。</p> <p>图6A对六只树鼯的旋转行为进行了定量分析。与基线相比，在术后第2周和第20周，观察到一些树鼯的APO诱导的旋转显著增加(图4A, *P<0.05)。在PD建模的第20周，树鼯在肌肉注射APO后仍然表现出稳定的旋转行为，表明右侧SNpC多巴胺能神经元的损伤无法恢复，因为在PD建模的第2周和第20周，APO诱导的旋转次数没有显</p>

著差异 (N.S. $P > 0.05$)。根据 APO 诱导的旋转不应少于 4 转/分钟的判断标准, 有 3 只树鼯不符合这一标准。因此, 本实验中 APO 诱导树鼯典型旋转的百分比为 50%。图 4B 显示了在 PD 建模第 2 周至第 20 周的多个取样点中, 给予 TS 6 和 TS 7 两只树鼯 APO 后 0-10 分钟内 APO 诱导的持续旋转, 观察到的趋势一致。

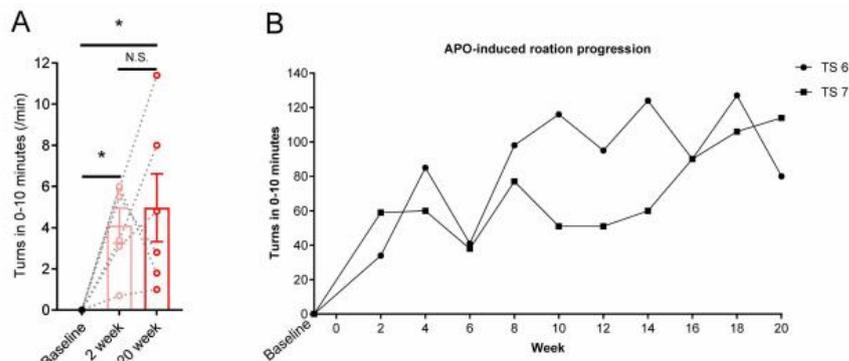


图 6. 在右侧黑质注射 MPP^+ 后, 对树鼯的 APO 诱导的旋转行为进行定量分析。 (A) MPP^+ 注射两周后, 50% 的树鼯表现出 APO 诱导的旋转 (>4 转/分钟), 旋转次数显著高于基线 ($* P < 0.05$)。在建模之前, 没有一只树鼯表现出旋转。APO 诱导的旋转可持续长达 20 周, 第 20 周时的旋转次数明显高于基线时 ($* P < 0.05$)。第 2 周和第 20 周之间的旋转次数差异不大 ($P > 0.05$), 这表明 APO 诱导的旋转是稳定和持久的。数据以平均值 \pm SEM 表示。(B) 从建模后第 2 周到第 20 周, 每隔两周使用 APO 后, TS 6 和 TS 7 在 0-10 分钟内的旋转行为。遗憾的是, 由于 COVID-19 大流行, TS 8-TS 11 的数据没有取样。

除了 APO 诱导的旋转试验外, 我们还对该模型进行了左旋多巴治疗试验, 包括旋转计数和 PD 总分改善两个方面的验证; 同时, 我们设置了不同浓度的左旋多巴, 以揭示疗效的剂量效应。结果显示, 在旋转计数方面, 不同浓度的左旋多巴治疗后, 树鼯表现出不同程度的旋转, 其中 2、6、10 mg/kg 左旋多巴甲酯联合卡比多巴的旋转次数显著高于生理盐水对照组, 而 20 mg/kg 左旋多巴诱导的旋转次数并不显著高于生理盐水对照组, 表现出一定的剂量效应 (图 7A)。在 PD 总评分方面, 不同浓度的左旋多巴治疗后, 树鼯的 PD 总评分均有不同程度的改善, 其中 6、10 和 20 mg/kg 左旋多巴甲酯联合卡比多巴治疗后的评分明显低于治疗前, 而 2 mg/kg 左旋多巴虽然也有改善, 但疗效不显著, PD 总评分的改善也表现出一定的剂量效应 (图 7B)。因此, 我们再次验证了该模型的多巴胺特异性敏感性及其剂量效应。

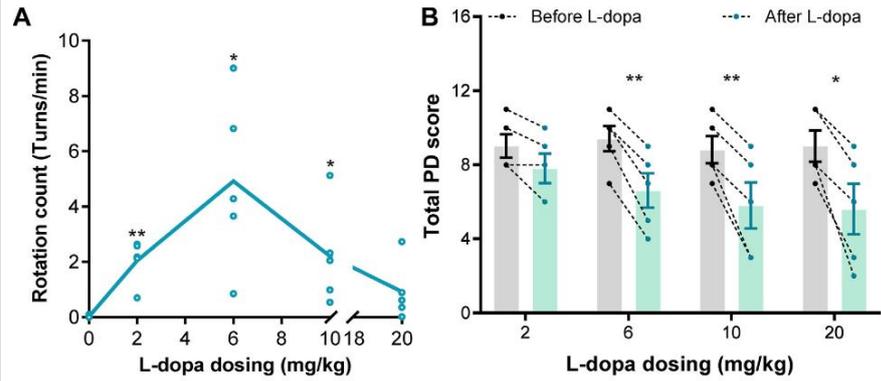


图 7. 树鼯右侧黑质注射 MPP⁺后左旋多巴治疗验证的定量分析。 (A) 树鼯在给予左旋多巴甲酯和卡比多巴时表现出明显的旋转，左旋多巴剂量为 2、6、10 mg/kg 时，旋转次数明显高于生理盐水剂量。数据以平均值与个体值表示。(B) 树鼯在服用左旋多巴甲酯和卡比多巴后，PD 总评分有明显改善，左旋多巴剂量为 6、10、20 mg/kg 时，评分明显低于未服用左旋多巴时。数据以平均值±SEM 表示。* P < 0.05， ** P < 0.01。

为了排除黑质注射生理盐水对树鼯行为和病理的影响，我们又做了一个对照实验，新增 4 只树鼯 (TS 17-TS 20) 右侧黑质注射生理盐水，左侧黑质作为正常对照，进行了行为和病理测试。参照右侧黑质注射 MPP⁺ 的树鼯 PD 模型数据，我们发现树鼯的 PD 评分在注射 MPP⁺ 后 4-6 周趋于稳定。因此，我们观察了注射黑质生理盐水组树鼯 6 周后的行为，并进行了病理染色。结果显示，注射生理盐水的 4 只树鼯的 PD 评分保持在 0 分 (图 8A)，且没有 APO 诱导的旋转 (图 8B)，这表明在黑质注射生理盐水并不能诱发树鼯出现 PD 症状。病理染色结果显示，注射生理盐水的黑质中的 TH 阳性细胞与正常对照组的 TH 阳性细胞在形态和密度上都没有显著差异 (图 8C-H)，这表明注射生理盐水不会导致树鼯黑质发生病理变化。这一结果排除了向黑质注射生理盐水对树鼯帕金森病表型的影响。

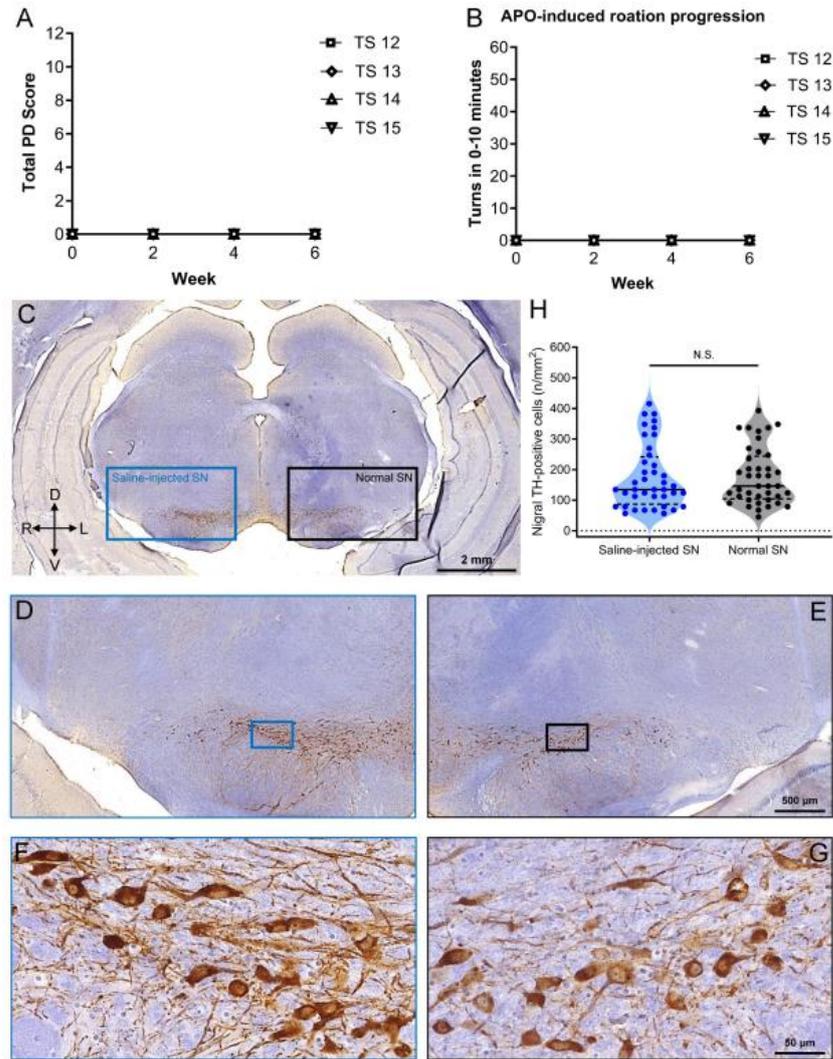


图 8. 单侧黑质注射生理盐水对树鼯帕金森行为和病理特征的影响。 (A) 注射单侧黑质生理盐水的四只树鼯的帕金森病总分在注射生理盐水 6 周前和注射生理盐水 6 周后均保持为 0。(B) 注射单侧黑质生理盐水 6 周前后, 树鼯没有观察到 APO 诱导的旋转行为。(C) TS 17 的冠状脑切片, TH 免疫组化染色, 细胞核苏木精复染。R: 右侧, L: 左侧, D: 背侧, V: 腹侧。(D) 图 C 中注射生理盐水一侧黑质蓝色方框区域的放大图像显示黑质解剖形态完整。(E) 图 C 中正常黑质黑色方框区域的放大图像也显示出完整的黑质解剖形态。(F) 图 D 中注射生理盐水一侧蓝色方框区域的放大图像, 显示黑质中多巴胺能神经元的正常形态。(G) 图 E 中黑色方框区域正常一侧的放大图像, 显示多巴胺能神经元具有完整的体节、发达的 TH 阳性棕色染色过程和清晰的蓝色染色核。图像 (D) 和 (E)、(F) 和 (G) 在解剖位置上对称。(H) 四只树鼯共 40 个中脑冠状切片显示, 多巴胺能神经元密度相同 (N.S.表示不显著, $P > 0.05$)。图 (H) 显示了所有数据点、中位数、第 25 位和第 75 位四分位数。

树鼯 SNpC 中多巴胺能神经元的胞体和细胞核的平均直径明显大于 C57 小鼠和 Wistar 大鼠, 但与猕猴相当 (图 9A、C)。为了便于比较不同物种 SNpC 中多巴胺能神经元的大小, 我们将 C57 小鼠、Wistar 大鼠

和树鼩的大小参数转换成相对于猕猴的百分比。结果表明，树鼩的黑质多巴胺能神经元比 C57 小鼠和 Wistar 大鼠的大，在规模上更接近猕猴。具体来说，树鼩的平均体节直径是猕猴的 89.33%，但只是小鼠和大鼠的 60.94%和 64.01%（图 9B）。我们对多巴胺能神经元的分析表明，树鼩的核直径是猕猴的 94.49%。相比之下，C57 小鼠和 Wistar 大鼠的核直径要小得多（分别为猕猴的 70.21% 和 75.85%）（图 9D）。这些发现突显了树鼩和猕猴黑质多巴胺能神经元大小的形态学相似性，从而将它们与啮齿类动物区分开来。值得注意的是，这种大小差异并不是因为体型的不同，因为树鼩和 Wistar 大鼠具有相似的体型和体重特征，但树鼩的黑质多巴胺能神经元明显大于大鼠的黑质多巴胺能神经元。

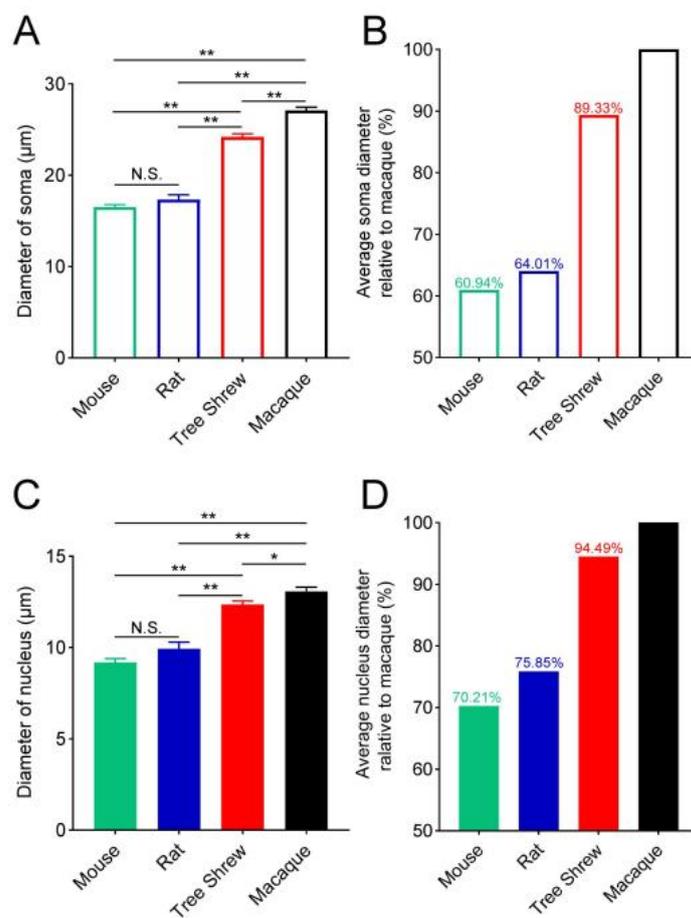


图 9. C57 小鼠、Wistar 大鼠、树鼩和猕猴黑质多巴胺能神经元形态学参数的比较。（A）小鼠、大鼠、树鼩和猕猴黑质多巴胺能神经元的平均胞体直径，其中树鼩的直径远大于啮齿类动物，但与猕猴相对接近。（B）C57 小鼠、Wistar 大鼠和树鼩的平均胞体直径（分子）相对于猕猴（分母）的换算（百分比）。结果显示，树鼩黑质多巴胺能神经元的细胞体尺度比啮齿类动物更接近猕猴。（C）小鼠、大鼠、树鼩和猕猴黑质多巴胺能神经元的平均核直径。结果显示，树鼩的直径远大于啮齿类动物，而与猕猴的直径相对接近。（D）C57 小鼠、Wistar 大鼠和树鼩相对于猕猴的大小参数（百分比）。结果显示，树鼩的黑质多巴胺能神经元核大小与猕猴相比更接近。A 和 C 中的数值以平均值±SEM 表示。* P < 0.05, ** P < 0.01, N.S.表示不显著（P > 0.05）。

	总结：行为观察、PD 症状定量分析、药理学验证以及对照组结果一致表明 MPP ⁺ 损毁单侧黑质诱导出的树鼯偏侧 PD 模型具备典型稳定的所有 PD 临床核心运动症状。	
动物模型应用案例	评价新型潜在治疗手段对帕金森病症状的改善效果及其机理研究。	
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	<input checked="" type="checkbox"/> 建模方法 <input type="checkbox"/> 活体 <input type="checkbox"/> 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	2019 年 6 月 1 日至 2024 年 7 月 31 日	
最新修订时间	2024 年 10 月 18 日	
合作及共享方式	合作方式	科研合作
	共享方式	<input type="checkbox"/> 完全开放共享 <input checked="" type="checkbox"/> 协议共享 <input type="checkbox"/> 暂不共享
知识产权	<p>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： Li, H., Mei, L., Nie, X. et al. The Tree Shrew Model of Parkinson Disease: A Cost-Effective Alternative to Nonhuman Primate Models. Lab. Invest. Sep 27:102145, (2024). https://doi.org/10.1016/j.labinv.2024.102145.</p> <p>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 (https://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. (https://nhp.kiz.ac.cn)".</p> <p>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：0871-65197002 邮箱：lihao@mail.kiz.ac.cn</p>	
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。	