

低剂量甲醛长期侧脑室给药诱导阿尔茨海默症猕猴模型

(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, 2024-04-26)

<p>名称</p>	<p>中文 低剂量甲醛长期侧脑室给药诱导阿尔茨海默症猕猴模型</p> <p>英文 Long-term lateral ventricle administration of low dose formaldehyde induced rhesus monkey models of Alzheimer's disease</p>
<p>缩略图</p>	
<p>资源描述</p>	<p>使用微量注射器, 通过侧脑室埋管向猕猴脑内连续 12 个月注射低剂量甲醛 (100 μl/天, 5 mM 甲醛), 诱导出现工作记忆损伤、老年斑及神经纤维缠结等 AD 典型症状和病理。</p>
<p>动物模型制作方法</p>	<p>1 脑结构 MRI 精确定位 参照本实验室改进的 MRI 精确定位技术 (深部核团定位误差小于 1 个毫米, 国内外领先, Wu Jing, Wang Wenchao, et al., 2010), 在进行实验前, 先对购买的每只猕猴进行脑部核磁共振扫描, 获取 MRI 脑图谱。基于 MRI 脑图谱, 在猕猴立体定位仪上对侧脑室、内嗅皮层、海马、前额叶联合皮层、初级体感皮层等脑结构进行精确定位。根据定位坐标, 进行侧脑室埋管以及活体脑组织微量取样等后续实验。</p> <p>2 侧脑室埋管 猕猴完全麻醉后, 头部固定在立体定位仪上。在无菌环境下, 沿矢状方向切开头皮, 分离肌肉和结缔组织, 暴露颅骨。根据 MRI 定位坐标, 在颅骨表面用电钻打一直径小于 2 mm 的孔, 将一根长度约为 40 mm 的 21G 304 不锈钢管埋入猕猴侧脑室, 最终判断埋管入侧脑室成功的指标是不锈钢管口流出清澈的脑脊液。用 20G 304 不锈钢针作为堵管插入不锈钢管中, 最后通过医用牙科水泥和钛钉将不锈钢管的颅骨外段固定于颅骨上。手术后, 每只猴子肌肉注射抗生素 7 天。在进行甲醛给药之前, 恢复两周。</p> <p>3 甲醛或生理盐水侧脑室给药 每只猕猴每天通过微量进样泵以 10 μl/min 的速度从埋置好的给</p>

药管注射 100 μ l 甲醛（浓度 5 μ mol/ml），注射完后注射针在原位置停留 5 分钟。每周给药 5 次（周一到周五），持续给药 12 个月。给药时，猕猴保持清醒坐在猴椅上。

1 空间工作记忆损伤

动物模型表型数据

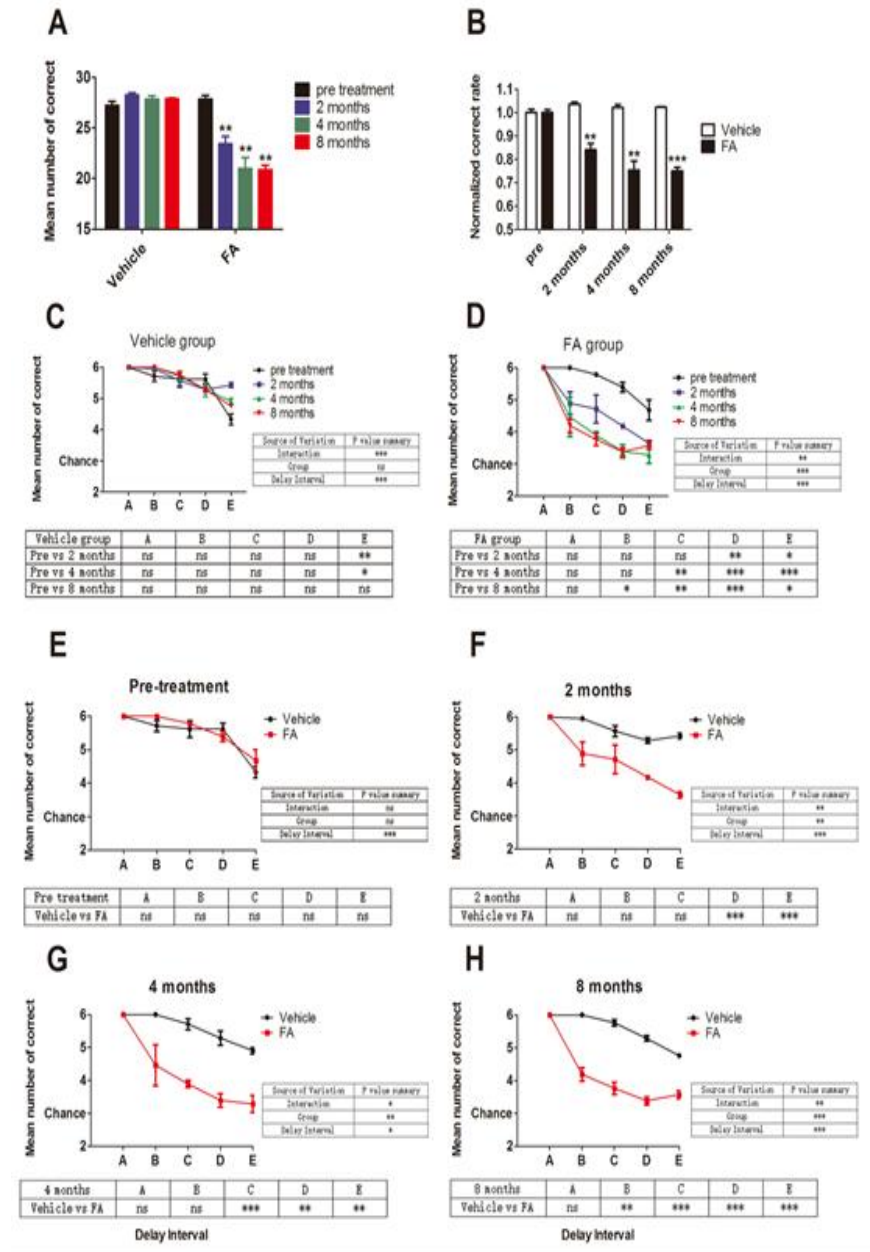


图 1. 恒河猴侧脑室慢性甲醛给药后可变空间延迟反应任务(VSDRT)的表现得分。(A)比较连续 7 天测试在不同时间点的平均反应分数(在静脉注射或 FA 前后 2、4 和 8 个月)。(B)比较各组用药 2、4、8 个月后甲醛和生理盐水对 VSDRT 性能的影响。(C-D)在 5 个不同的延迟间隔下,猴子在 2,4, (E-H)比较 2 (F)、4 (G)和 8 (H)月用药前后 5 个不同延迟时间间隔的两组平均得分。在这个任务中,被试被准随机呈现 5 个不同的延迟间隔(A=0;B = 1 * B';C = 2 * B';D = 3 * B';E = 4 * B'),每天测试 30 多次。甲醛处理对工作记忆能力有显著影响,而生理盐水处理对工作记忆能力无显著影响。

2 胞外 A β 蛋白沉积形成的老年斑

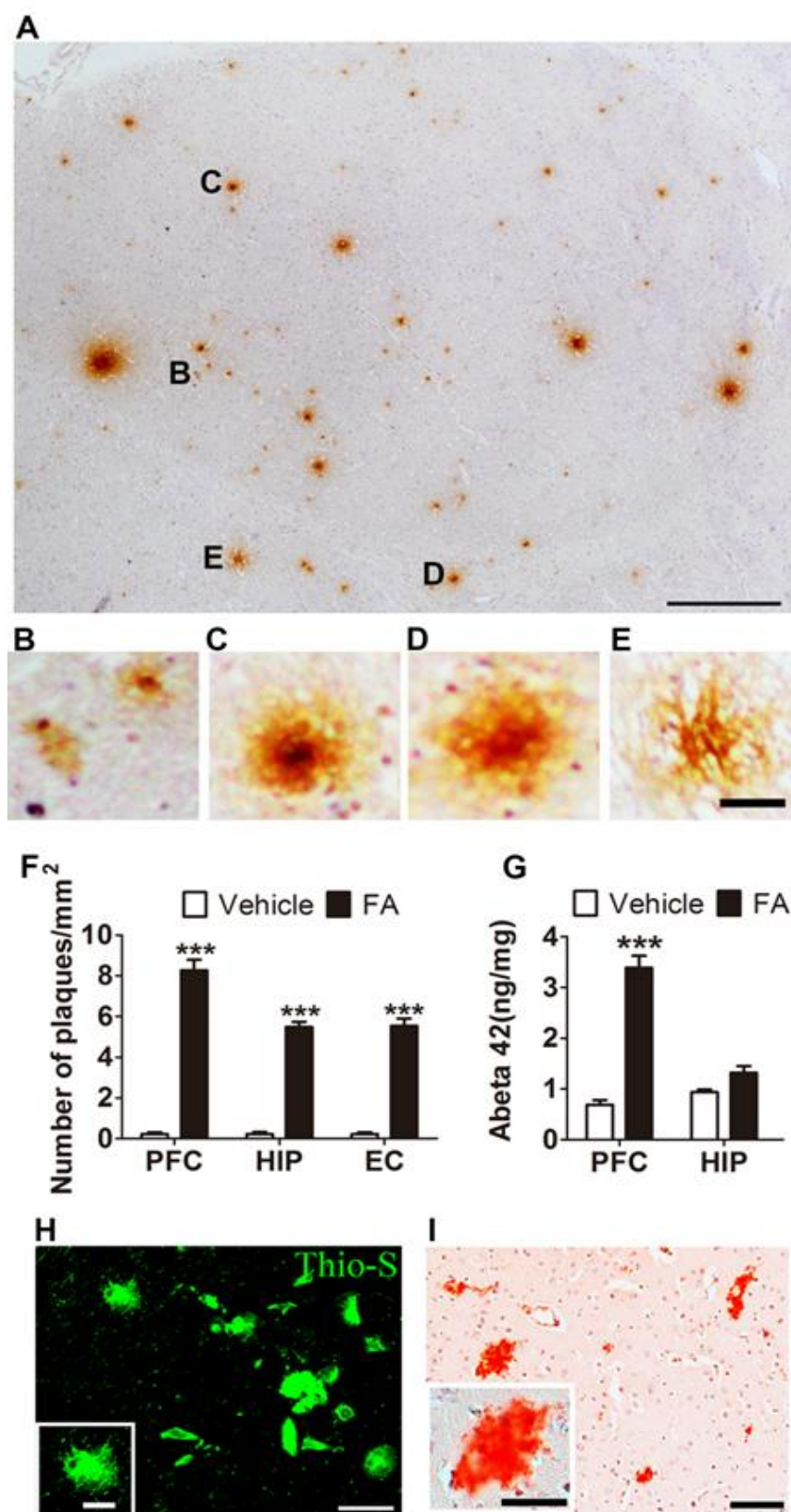


图 2. 甲醛注射的恒河猴大脑中发现细胞外 β 淀粉样蛋白沉积和 $A\beta_{42}$ 多肽含量增加。(A)在注射 FA 的猴子 dIPFC 中识别多个 $A\beta$ +老年斑的代表性图像。6E10 ($A\beta$ 特异性)单克隆抗体免疫组化鉴定斑块。比例尺:500 μ m。(B-E)

(A)大脑区域斑块的高倍放大图，分别用相应的字母(B-E)表示。确定的斑块类型包括弥漫性(B)、核样神经斑块(C)、非核样神经斑块(D)和含有异常神经突起结构的斑块(E)。比例尺为 50 μ m。(F)比较两组在 dIPFC、海马和内嗅皮层中每平方毫米神经样斑块的数量。(G) ELISA 检测两组大鼠 dIPFC 和海马 A β 42 水平。(H-I)在硫黄素 S 染色(H)和刚果红染色(I)下，注射了 FA 的猴子 dIPFC 中观察到的细胞外斑块的典型图像。

3 神经元内磷酸化 Tau 蛋白聚集形成神经纤维缠结

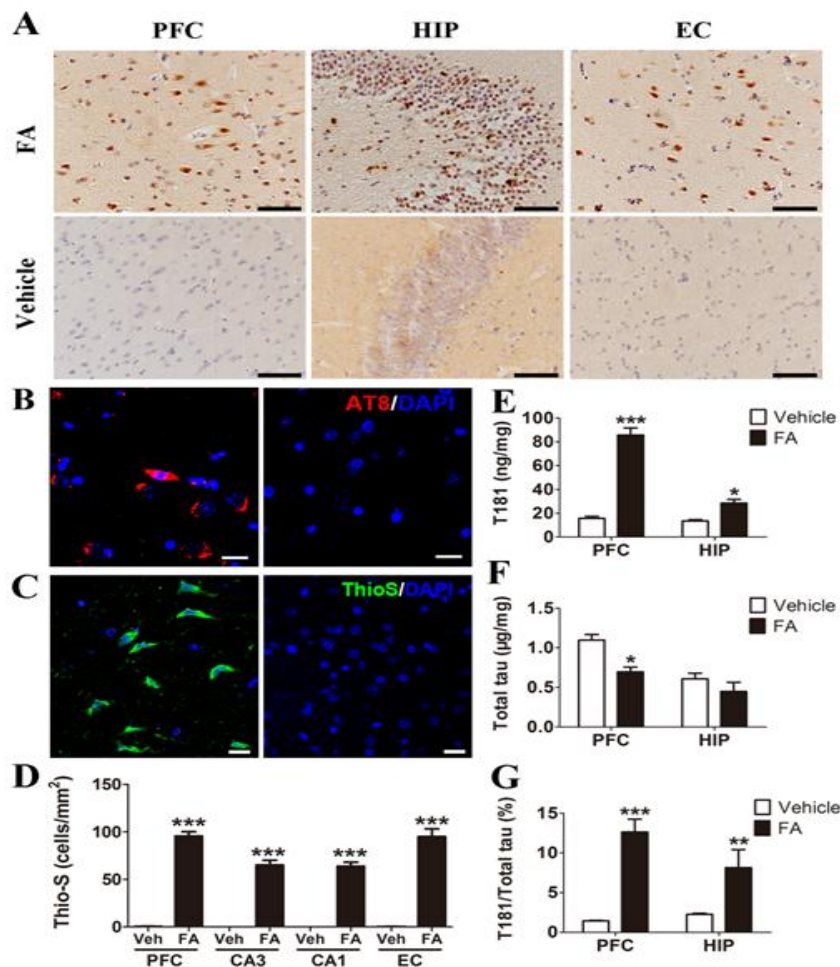


图 3. 注射甲醛的恒河猴大脑中发现 Tau 蛋白超磷酸化和神经原纤维缠结(NFT)样形成。(A)有代表性的显微照片显示在注射了 FA 和载体的猴子的 dIPFC(左)、海马(中)和内嗅皮层(右)用抗 pT181 抗体免疫组化染色 tau-pThr181。所有切片均用苏木精染色细胞核。比例尺:50 μ m。(B) AT8 抗体免疫荧光的代表性图像(红色)显示，注射了 FA(左)而没有注射对照剂(右)的猴子的 dIPFC 中存在成对的螺旋丝(PHF)。比例尺:20 μ m。(C)给药猕猴 dIPFC 中的硫黄素-s 染色(绿色)表明细胞内聚集模式类似于神经纤维缠结形成。在载药猕猴体内未检测到硫黄素-s 染色。(B-C)细胞核与 DAPI 共染色(蓝色)。比例尺:20 μ m。(D) dIPFC、海马 CA3、海马 CA1 和 EC 中硫黄素-s 阳性细胞的定量。(E-F) ELISA 检测注射 FA 或对照剂后恒河猴 dIPFC 和海马中 pT181 tau (E)和总 tau (F)蛋白水平。(G)两组大鼠 dIPFC 及海马区 pT181 与总 tau 的比值(G)。

4 胶质细胞增生及神经元凋亡

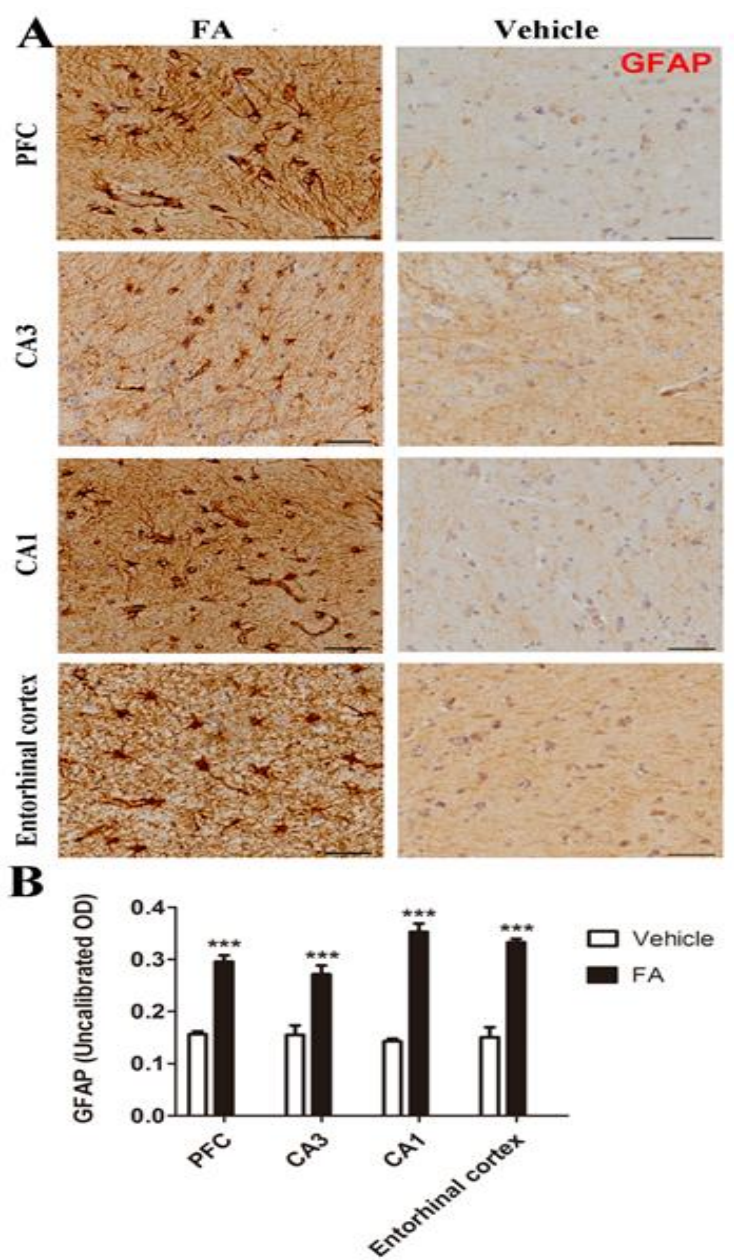


图 4. 在经过甲醛处理的恒河猴大脑中发现了活性胶质细胞增生。(A)抗 gfap 抗体免疫组化染色的代表性显微图显示,注射 FA 的猴子(左图)和载体(右图)的 dlPFC、海马 CA3、海马 CA1 和内嗅皮层星形细胞激活。GFAP, 胶质纤维酸性蛋白。比例尺:50 μ m。(B) dlPFC、海马- ca3、海马- ca1 和内嗅皮层中星形胶质细胞增生的定量。用 ImageJ 软件通过 DAB 反应检测总抗 gfap 免疫组化未标定光密度(OD), 比较 dlPFC 中胶质细胞数量的相对水平。

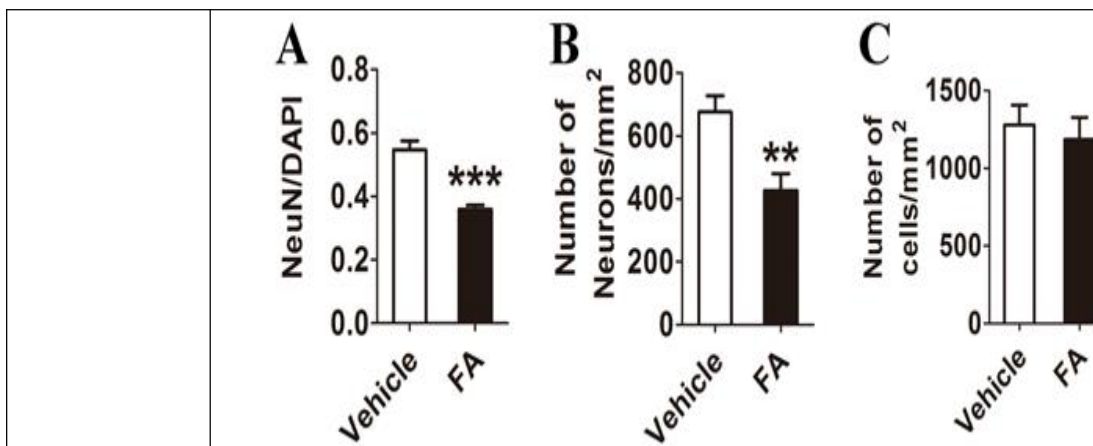


图 5. 注射 FA 后，恒河猴 dIPFC 出现神经元损失。(A)注射 FA 或赋形剂后恒河猴 dIPFC 中神经元(NeuN 标记)与所有细胞(DAPI 标记)的比例。(B)恒河猴 dIPFC 单位面积神经元总数(mm²)。(C)恒河猴 dIPFC 中单位面积的细胞总数(mm²)。

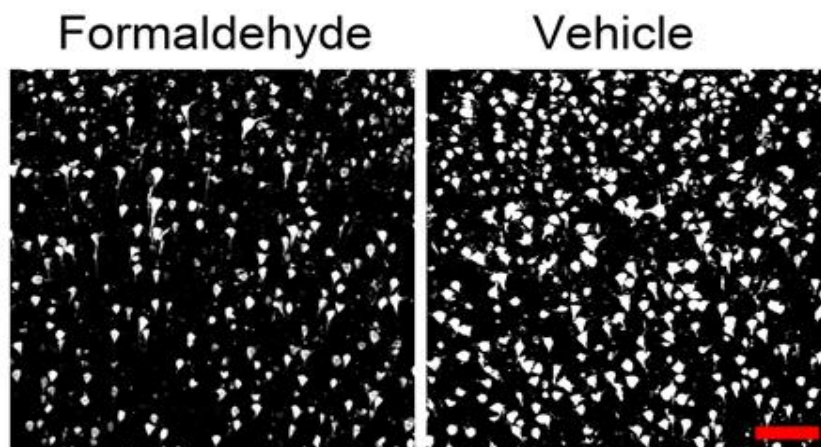


图 6. 注射甲醛后，恒河猴 dIPFC 出现神经元损失。具有代表性的显微图显示，注射甲醛的猴和对照的 dIPFC 中神经元(白色)用抗 neuron 抗体染色。dIPFC:背外侧前额皮质。比例尺:100μm。

动物模型的评价

1 AD 核心认知损伤，空间工作记忆的检测

可变空间延迟反应任务(VSDRT)已被广泛用于测量大脑的视觉空间工作记忆能力，该功能在 AD 中严重受损。在测试过程中，猴子被放置在一个声音减弱的房间里的威斯康星州通用测试仪器(WGTA)中，并且总是在喂食之前的同一天的同一时间进行测试。

VSDRT 包括两个阶段，一个训练阶段和一个测试阶段。在训练阶段，猴子最初被训练为 2 井空间延迟反应任务，进行 1000 次试验。在每次试验开始时，猴子会看到实验者在猴子面前的木板上的两个食物井中的一个放置诱饵作为奖励。然后用两块相同的木板盖住这两个食物井，并在猴子和食物井之间拉下一个不透明的屏风，间隔一定的时间。在这段时间结束后，屏幕被举起来，动物可以自由地从两个井中选择一个词。奖励是准随机分配在左右井之间的 30 次试验，构成了每天的训练课程。延迟间隔的增加或减少取决于动物的正确反应率是否大于

90%(30次试验中有27次正确)。在1000次的试验训练阶段结束时,猴子已经完全掌握了任务。

在测试阶段,为了量化每只猴子的记忆能力,动物被训练为一个可变延迟反应任务,在该任务中,延迟周期准随机地变化为5个不同的延迟时间周期(即a, B, C, D和E; $A = 0 \times b$; $B = 1 \times B$; $C = 2 \times b$; $D = 3 \times b$; $E = 4 \times B$),每天测试30次。开始的B值取决于训练阶段:如果猴子在训练阶段的表现不高,测试阶段的B值从1秒开始。否则,测试阶段的B值从一个较高的数字开始,这是由有经验的教练决定的。直到连续3天达到90%-99%正确率或以上的稳定表现,B值每步增加1秒。如果正确率达到100%则B值立刻增加一秒,如果某B值连续3天低于90%,B值降低1秒。我们用猴子可以连续至少5天稳定达到90%-99%正确的最大B值来代表它的记忆容量。

2 免疫组化及免疫荧光病理验证

通过免疫组化及免疫荧光技术验证AD核心病理老年斑、神经纤维缠结、神经元凋亡及胶质细胞增生。

免疫组化染色,石蜡切片置于载玻片上,65°C烘烤过夜。然后,切片分别用二甲苯和分级醇的两次10分钟变化进行脱蜡和复水。处理后的切片在高压锅中柠檬酸缓冲液中加热2分钟,进行抗原提取。然后用70%甲酸处理7min,用3%过氧化氢甲醇灭活切片内源性过氧化物酶10min,然后用2%牛血清白蛋白(BSA)在0.5% Triton X-100中在37°C下封闭切片30min。用阻断液稀释一抗,与切片4°C孵育过夜。然后用hrp标记的山羊抗兔/小鼠二抗在室温下处理切片2小时,用3,3'-二氨基联苯胺(DAB, MXB, 中国)在显色液中显影,并用苏木精(Sigma, 美国)反染色进行细胞核鉴定。阴性对照实验中,只遗漏了一抗。最后,分别用分级醇和二甲苯进行脱水和清除,然后用中性树胶和盖片覆盖。使用奥林巴斯CX41RF显微镜(奥林巴斯,东京,日本)分析载玻片,并使用配套的奥林巴斯DP25显微镜数码相机拍摄图像。

振荡切片用于免疫荧光染色。染色前,用0.06%高锰酸钾在室温下猝灭自身荧光10分钟。然后将所有游离切片在室温下2% BSA和0.5% Triton X-100中阻塞1h。用阻断液稀释一抗,4°C孵育过夜,然后与相应的荧光二抗在室温孵育2h。用4',6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI, Sigma, USA)染色15min。对照实验中省略一抗。载玻片采用Fluoromount-G (SouthernBiotech, USA)安装,并在激光扫描共聚焦显微镜(A1, 尼康, 日本)上成像。

3 模型质量描述

注射了甲醛的猴子有显著的空间工作记忆损伤。三个与记忆(和AD)相关的大脑区域(海马体、内嗅皮层和前额叶皮层)组织病理学分析显示,淀粉样A β +神经样斑块的存在,神经纤维超微结构缠结样形成,tau蛋白磷酸化增加,神经元损失和反应性胶质细胞增生。)接受体外注射FA的猴子。ELISA检测显示pT181的含量和A β 42在甲醛处理猴的前额叶和海马区显著升高。表明甲醛可诱导AD样主要病理标志物和认知障碍。

动物模型应用案例	外源性甲醛导致 AD 相关认知功能损伤及病理发生发展的机制机理、防治措施及早诊指标的研究，环境诱导 AD 发生发展的研究，甲醛导致猕猴 AD 病理与 AD 患者间的时空特分布征研究。	
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	2014 年 1 月 1 日至 2017 年 12 月 31 日	
最新修订时间	2022 年 12 月 2 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：</p> <p>1. Rongwei Zhai, Joshua Rizak, Na Zheng, Xiaping He, Zhenhui Li, Yong Yin, Tao Su, Yingge He, Rongqiao He, Yuanye Ma, Meifeng Yang, Zhengbo Wang*, Xintian Hu*. Alzheimer's Disease-Like Pathologies and Cognitive Impairments Induced by Formaldehyde in Non-Human Primates. Current Alzheimer Research, 2018.11.2, 15(14): 1304~1321.</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 (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)".</p> <p>c. 动物模型贡献者信息 姓名：王文超 单位：中国科学院昆明动物研究所 电话：18725025713 邮箱：wangwenchao@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。	