

## Alzheimer's AD Animal Models:

### AD 动物模型的制作方法

#### 一、Okadaic acid 慢性损害 AD 模型

Okadaic acid (OA) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸化酶 (1A 和 2A) 的特异性抑制剂, OA 的长期脑室投递可引起动物的记忆严重缺失, 同时导致脑内  $A\beta$  淀粉样沉积斑块形成以及 NFT 样磷酸化 Tau 蛋白出现。

投递装置用 **ALZA 公司的 ALZET 微渗透泵 (Model 2004)**, 使用前充填 OA 溶液。

1. 实验动物: 用 SD 或 Wistar 大鼠, 体重 250~300 克。
2. 材料和试剂: 脑立体定位仪, 微量注射器, 颅钻。OA 选用 Sigma 公司产品, 产品编号是 0-1506, 以 pH7.4 的磷酸缓冲的人工脑脊液配制, 置 4℃ 冰箱备用。
3. 操作程序: 动物麻醉后固定于脑立体定位仪。参照脑立体定位图谱的侧脑室座标, 颅骨钻孔, 装置微渗透泵的投递针, 使针管头端置于侧脑室, 用牙科水泥将其柄部固定在颅骨上, 泵体埋在动物项部皮下, 输送管经头皮下传送。平均投递速度  $0.25\pm 0.02\mu\text{l}/\text{小时}$ , 通常一次埋泵可维持 4 周, 如需要长时间的投递, 更换一次新充填的微渗透泵即可。2~3 周后进行行为试验, 动物将出现工作记忆和参考记忆的损害。术后 6 周免疫组化分析可见经 OA 处理的大鼠脑的纹状体、海马和皮质等部位出现高磷酸化 Tau 蛋白免疫阳性神经元、App 免疫阳性星形胶质细胞和  $A\beta$  淀粉样蛋白免疫阳性斑块。

#### 二、穹窿海马伞损害模型

1. 实验动物: 用雄性大白鼠 (SD 或 Wistar 鼠种), 3~5 个月龄, 体重 250~300 克。
2. 材料和试剂: 脑立体定位仪, 特制刀片, 注射器, 开颅钻。
3. 操作程序: 动物经腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉后, 固定于脑立体定位仪上, 颅顶区被皮常规消毒手术区皮肤, 无菌下操作, 沿颅顶中线作长 2cm 切口, 用湿棉球分离骨膜。于前囟后 2.0mm, 中线旁 1mm 处, 用牙科钻或自制颅钻打开颅骨, 仔细切开硬脑膜, 暴露大脑皮质, 用特制的宽 2mm 双刃刀片 (剃须刀片制作) 按照脑立体定位仪图谱 (Paxinos G and Watson C), 于前囟后 2mm, 中线左侧 1mm 处置刀于脑表面, 然后操作定位仪降刀 4.1mm, 并向外向内各移动 1mm 和 0.5mm。然后再降刀 1mm, 外移 1.5mm, 此时上下抽动刀片数次, 依次切断胼胝体缘、扣带回、背侧穹窿-海马伞 (图 1, 右侧)。留刀三分钟后退出刀片。手术中要避免损伤上矢状窦, 并观察有否出血现象, 关闭头皮。另一种损害方法是分离和移除一部分大脑皮质, 直接暴露穹窿, 直视下切断穹窿或移除一段 (1mm 长) 穹窿。动物存活 1 周至 2 周, 灌注杀死动物, 取基底前脑组织切片, 用胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 免疫组化方法验证, 损伤同侧内侧隔核胆碱能神经元较对照侧减少 50~60% 左右, 斜角带垂直支约减少 40%。同时, 损伤侧海马内胆碱能纤维 (AChE 染色) 明显减少。迷宫测试显示该模型鼠的获取能力和记忆能力均较对照组明显降低。

#### 三、鹅膏蕈氨酸 (Ibotenic acid, IBO) 损害模型

IBO 是一种谷氨酸受体激动剂, 具有强烈的神经兴奋毒性作用, 通过与神经元胞体或树突上的  $***A$  受体相结合导致神经元中毒性损伤而溃变。基于基底前脑神经元丢失在衰老和 AD 有关的认知缺失中的重要作用, 以谷氨酸类似物微量注射到基底前脑导致其神经元溃变和认知缺陷, 在大鼠和猴都已被模拟了。制作 AD 模型最常用的谷氨酸类似物主要有海仁酸 (Kainic acid, KA)、IBO 和使君子氨酸 (quisqualic, QUIS)。其中以 IBO 最为首选, 尽管 IBO 和 QUIS 都能造成基底前脑胆碱能神经元溃变, 但只有 IBO 能恒定地损害动物与学习记忆有关的行为执行。基底前脑细胞对 KA 的敏感性较低, 故用量较大, 易引起动物死亡, 并往往在导致基底前脑细胞损害的同时引起其它部位神经元 (如海马锥体细胞) 的死亡。