

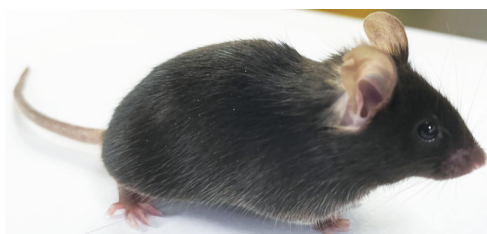


模拟航天失重病理特征的小鼠模型的制备*

梅天豪 陈莹 赵旻 袁野** 童志前**

(温州医科大学老年研究院, 浙江省阿尔茨海默病研究重点实验室, 精神医学学院, 瓯江实验室, 温州 325035)

摘要 **目的** 航天员返回地球后常常出现共济失调、步态紊乱, 是航天医学难题。急需制备一种符合航天失重导致运动失调病理特征的小鼠, 为药物筛选提供新模型。**方法** 将雄性 C57BL/6J 小鼠随机分成: a. 对照组, 野生健康成年小鼠; b. 标准模型组-后肢悬吊组 (hindlimb unloading, HU), 按照常规方法建立后肢悬吊法模型; c. 假手术组 (顶核注射磷酸缓冲液组); d. 模拟病理特征模型组 (顶核注射甲醛组), 该组利用立体定位向健康成年雄性小鼠的小脑顶核内微量注射病理浓度的甲醛 (尾吊组脑部测得的浓度)。造模结束后用转棒、平衡木、步态分析来评估小鼠的运动能力、小脑切片尼氏染色检测顶核神经元死亡、试剂盒及荧光组化检测甲醛生成酶——氨基脒敏感胺氧化酶 (semicarbazide-sensitive amine oxidase, SSAO) 活性及表达。用甲醛荧光探针检测小脑顶核的甲醛浓度。**结果** 后肢悬吊组相较于对照组的小鼠运动平衡能力下降、步态紊乱, 并伴随小脑内 SSAO 活性及表达增强、内源甲醛显著上升、顶核神经元死亡。其次, 模拟病理特征组小鼠的顶核注射病理浓度甲醛注射后, 也出现尾吊标准模型类似的生化及行为变化。**结论** 模拟航天失重的后肢悬吊小鼠小脑内 SSAO 活性和表达增强导致顶核内源甲醛蓄积, 而高浓度的甲醛诱发了小脑顶核神经元死亡而导致运动功能紊乱。特别是顶核注射甲醛制备的小鼠模型与标准组后肢悬吊模型的病理特征基本一致。这可能为航天失重诱发运动紊乱提供了一种潜在的药物筛选动物模型。



C57BL/6小鼠 (*Mus musculus*), 一种广泛使用的实验动物, 适用于Ⅱ型糖尿病、肥胖、代谢综合征、脂肪肝、动脉粥样硬化等多种疾病的模型研究或造模。

关键词 航天失重, 后肢悬吊, 立体定位, 顶核, 内源性甲醛
中图分类号 R85

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0163

近些年来“神舟”系列载人飞船的发射成功及中国空间站的建立, 为中国航天员在太空中长时间工作提供了高科技平台。但航天失重破坏宇航员的感觉、认知、平衡和运动功能, 导致航天员返回地面后出现行走时空间方向感缺失^[1]、肌肉激活模式改变^[2-3]、步态和姿势紊乱、运动协调能力下降^[4], 严重影响宇航员返回地球后的正常生活。如何保障航天员健康是航空航天医学研究的重点及难题。

欧洲、美国、日本、中国等航天中心为探索航天失重对宇航员健康的影响, 开展了在地面模拟航天失重环境动物模型的制备。目前常规方法是后肢悬吊法 (hindlimb unloading, HU) 来制备模拟失

重动物模型^[5], 但也有一些缺点, 如制备时间较长 (一般为2周)、受外界干扰因素多等。急需开发并制备耗时短、简单可行的模拟航天失重病理特征的动物模型。

已有的一些研究发现, 内源甲醛在小脑的蓄积破坏躯体平衡能力^[6]。本文首先探索标准模型组的后肢悬吊小鼠小脑顶核中甲醛是否蓄积、甲醛代

* 国家自然科学基金(82071214, 81974166, 30570566)和北京市自然科学基金(M21004, 7202083)资助项目。

** 通讯联系人。

童志前 Tel: 0577-86699661, E-mail: tzqbeida@163.com

袁野 Tel: 0577-86699872, E-mail: yuanye017@126.com

收稿日期: 2022-04-14, 接受日期: 2022-04-25

谢相关酶的活性及表达,以及甲醛浓度变化与运动功能紊乱之间关系;并进一步采用向健康成年小鼠小脑顶核内注射病理浓度的甲醛(标准模型组小鼠测得的浓度)来重现标准模型组的病理及行为特征。结果显示顶核注射甲醛制备的小鼠模型和后肢悬吊法制备的标准模型的病理及行为较为一致,这为探索航天失重的危害提供了一种药物筛选模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性C57BL/6J小鼠,2月龄,无特定病原体级(specific pathogen free, SPF)。动物进入动物房后适应性喂养1周,分笼饲养,室内温度控制在(25±2)℃,光照周期为12 h,白昼交替(7:00~19:00),动物自由进食及饮水,定期更换垫料。

1.2 实验耗材

一次性防滑聚乙烯(PE)手套(海门市扬子医疗器械有限公司),1.5 ml离心管(美国AXYGEN公司,货号:CC-4213-05),阳离子防脱玻片(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:ZLI-9506),一次性盖玻片(江苏世泰实验器材有限公司,货号:10212432C),小鼠双管微量给药系统(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,货号:62028/62128/62228),PE管(1.5 mm×0.5 mm)(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,货号:62329),徕卡一次性窄刀片(徕卡显微系统(上海)贸易有限公司,货号:819)。

1.3 实验仪器和设备

移液器(德国Eppendorf公司,货号:31110008),微量进样器(5 µl)(上海高鸽工贸有限公司),冰冻切片机(德国Leica公司,型号:LEICA CM 1950),倒置相差显微镜及成像系统(德国卡尔·蔡司股份公司,型号:AxiocamERC 5s),酶标仪(美国Molecular DEVICES公司,型号:Spectra Max i3x),超低温冰箱(赛默飞世尔科技(中国)有限公司,型号:905),小型台式高速离心机(德国Eppendorf公司,型号:5430 R),低速离心机(德国Eppendorf公司,型号:5702),小鼠立体定位注射仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司),涡旋振荡器(海门其林贝尔仪器制造有限公司,型号:VORTEX-5),净化工作台(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司,型号:SW-CJ-2FD),小鼠转棒仪(西班牙Panlab公司),步态分析仪(美国Mouse Specifics公司,型号:

DigiGait),超声波破碎仪(美国SONICS,型号:VCX150PB),高度分散匀浆机(上海启前电子科技有限公司,型号:FSH-2A)。

1.4 小鼠分组

动物于造模前进行平衡木和转棒行为实验训练,选取合格的小鼠随机分为4组:a.对照组(不做任何处理);b.后肢悬吊组;c.假手术组(磷酸缓冲液(PBS)注射);d.顶核甲醛注射组。每组8只,单笼饲养。

1.5 后肢悬吊组标准模型

标准模型参照常规的小鼠后肢悬吊法制备^[5]。注意调节绳子长度使小鼠后肢刚好离地,身体长轴与水平地面形成30°的倾斜角度。保证小鼠前爪着地可以在鼠笼的一定范围内活动(自由摄食和饮水)。造模持续2周。造模结束后进行平衡木、转棒、步态分析等行为学评估。

1.6 顶核注射组模型

1.6.1 小脑顶核立体定位

参照《小鼠脑立体定位图谱》确定顶核注射位点坐标($x = -6.25$ mm, $y = \pm 0.75$ mm, $z = -2.25$ mm),向健康野生成年雄性小鼠顶核内注射细胞膜红色荧光探针,检测位点坐标是否准确。

1.6.2 小鼠双侧顶核导管埋入及给药

向顶核注射组的小鼠腹腔内注射2%戊巴比妥钠,待小鼠完全麻醉后,将其固定在立体定位仪上^[7],用刀片剔除头皮上的毛发后进行双侧顶核埋管手术。手术后将套管内芯拔出,插入内导管,为保证药物进入目标脑区,内导管比套管长0.5 mm。用PE管将5 µl微量进样器与内导管露在外面的一端相连,并将含有1.5 mmol/L甲醛的微量进样器固定于微量进样泵上,参数设置为10 min内注射5 µl,注射完后停留5 min,使药物充分扩散。缓慢拔出内导管,插入内芯。给药过程中注意维持小鼠体温,密切观察小鼠状态。每天给药1次,持续14 d。造模结束后进行行为学评估。

1.7 小鼠运动功能检测

1.7.1 平衡木实验

小鼠通过平衡木的时间可用来评估小鼠的平衡和协调能力。8 mm平衡木两端10 cm处分别用无味的笔做标记,两标记之间的距离为80 cm,小鼠通过标记即开始或停止计时。记录小鼠在120 s内通过80 cm距离的时间(潜伏期,s),超过120 s,仍未通过的记为120 s。训练期第1天在训练之前,先把小鼠放入平衡木一端的逃生箱内适应环境

30 min, 适应结束之后将小鼠放在平衡木上距逃生箱 5 cm 处, 小鼠能自行爬回箱内则开始训练, 每天 3 次, 每次间隔 5 min, 造模结束后进行测试, 选取训练期第 3 天和测试期小鼠通过较细平衡木的潜伏期平均值作为造模前后的数据进行统计^[8]。

1.7.2 转棒实验

小鼠在转棒上的停留时间可用来评估小鼠运动协调能力。在造模前先对小鼠进行为期 3 d 的训练。第 1 天先设置 5 r/min 的速度使小鼠适应转棒环境及运动方式 1 min, 期间掉落的小鼠仍然放回继续适应, 间隔 5 min 后开始训练, 以 4 r/min 的初始速度, 匀加速 5 min 至最大速度 40 r/min, 记录这期间小鼠在转棒上停留的时间, 潜伏期不足 1 min 的小鼠放回转棒重新计时, 超过 1 min 后掉落或抓紧转棒后跟随转棒转动 2 周均停止计时, 5 min 内未掉落者记录为 300 s。造模结束后进行正式测试 1 d, 设置条件同造模前训练实验 (5 min 内从 4 r/min 匀加速至 40 r/min)。训练和测试均为每天 3 次, 每次间隔 5 min, 选取训练期第 3 天和测试期的潜伏期平均值进行数据统计^[9]。

1.7.3 步态分析

步态分析仪由 Digigait™ 成像和分析软件 (Digigait, Mouse Specifics, Boston, USA) 自动量化动物行走或跑步步态的空间信息, 包括步宽、摆幅、推动力、步进顺序等参数, 本研究只统计了步宽。正式测试前先将小鼠放在跑步机上以 5 cm/s 的速度适应 5 min, 休息 5 min 后开始测试。跑步机的测试速度设为 15 cm/s, 至少采集 5 个步伐。

1.8 小鼠小脑组织学检测

1.8.1 小脑甲醛荧光成像

三组小鼠腹腔内注射 10 μ m/L 的 Na-FA (甲醛荧光探针)^[10], 30 min 后用 2% 戊巴比妥钠溶液深度麻醉, 将小鼠颈椎脱臼处死, 取出小鼠脑组织, PBS 冲洗表面血液及杂质。将不同组的脑组织置于同一玻璃器皿中, 吸干脑组织周围水分后放入成像暗箱平台。以上步骤在冰上避光操作。选择激发和发射滤片 ($\lambda_{ex/em}$ =430 nm/543 nm), 调整软件进行成像。

1.8.2 小脑组织甲醛和甲醛代谢相关酶类的检测

a. 样本制备

行为学评估结束后注射 2% 戊巴比妥钠将小鼠麻醉, 颈椎脱臼处死, 冰上剥离小脑组织。电子天平快速称重脑组织并记录, 加入预冷的 PBS 液 (pH=7.4)。组织匀浆机在冰浴条件下将小脑组织

充分匀浆, 4°C, 12 000 g 离心 5 min, 取上清液备用。

b. 小脑组织蛋白质浓度检测

配制蛋白质标准品和 BCA 工作液, 加样后用酶标仪在 562 nm 处检测吸光度。以蛋白质标准品的浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 制作标准曲线, 根据所得公式计算待测样本的蛋白质浓度。

c. 小脑组织甲醛含量检测

吸取 0.5 ml 样本, 加入等体积的 10% 三氯乙酸, 涡旋 5 s, 放入预冷至 4°C 的离心机中, 10 000 r/min, 离心 30 min。吸取 0.4 ml 上清液加入到新的 EP 管中, 再向管中加入 0.1 ml DNPH (1 g/L) 和 0.5 ml 乙腈, 充分混匀, 60°C 水浴 30 min。再次离心后吸取上清液, 注射到高效液相色谱仪专用测量瓶中检测甲醛含量^[11]。

d. 小脑组织氨基脲敏感胺氧化酶 (semicarbazide-sensitive amine oxidase, SSAO) 活性检测

根据 SSAO 试剂盒说明书进行 (GMS50538.1, 上海杰美基因医药科技有限公司, 上海)。向待测样品中加入 25 μ l 混合液, 37°C 孵育待测样品 20 min。用酶标仪测定 498 nm 波长处的吸光度, 37°C 孵育 1 h 后再次测定 A_{498} 。绘制标准曲线, 根据公式计算待测样本中的 SSAO 活性。

1.8.3 小脑SSAO免疫荧光组化

在行为学检测后, 参照小鼠脑组织切片的方法制备样本^[12]。同时为了防止切片出现冰晶, 使用用蔗糖溶液 (PBS 配制) 脱水。包埋前将脑组织块表面的液体用吸水纸吸干。一抗: VAP-1/SSAO (1 mg/L, ab42885, Abcam, Cambridge, MA), 荧光二抗: Alexa Fluor 488 单抗鼠 IgG (green, 1: 400, Thermo Fisher Scientific); 其他抗体: rabbit IgG (1 mg/L, R&D Systems, Minneapolis, MN)。一抗和二抗孵育后进行脑片免疫荧光染色^[13], 用激光共聚焦显微镜 (BZ-9000, BIOREVO, Keyence, Japan) 进行图像采集。

1.8.4 小脑切片尼氏染色

尼氏体是神经元内合成蛋白质合成的重要部位, 当神经元受到刺激后, 胞体内的尼氏体会明显减少。通常尼氏体能被碱性染料如硫堇、亚甲蓝、甲苯胺蓝和焦油紫等染料染成紫蓝色。本实验使用的是焦油紫法。使用改良后的尼氏体染色法 (C0117, 碧云天, 中国) 对小脑切片进行染色^[14], 再用无水乙醇迅速脱水, 并使用二甲苯透明和中性

树脂封固, 在光学显微镜下观察并拍照。

2 结 果

2.1 后肢悬吊小鼠小脑甲醛蓄积及运动功能受损

小鼠的后肢悬吊, 使其身体长轴与地面呈 30° 角 (图 1a)。采用甲醛荧光探针 Na-FA 的小动物荧光成像观察到第 14 天的后肢悬吊小鼠小脑中内源甲醛荧光强度增强 (图 1b, c), 同时用高效液相

色谱仪 (HPLC) 测得的甲醛浓度急剧上升 (图 1d)。这和以前的研究中失重条件下甲醛含量增加基本一致 [15]。

后肢悬吊第 14 天用转棒 (图 1e) 和平衡木 (图 1g) 检测小鼠的平衡能力, 结果显示较对照组模型组小鼠在棒时间缩短 (图 1f), 通过平衡木的时间延长 (图 1h), 说明模拟失重的后肢悬吊使小鼠平衡协调能力受到了损伤。这和以前的研究结果一致 [16]。

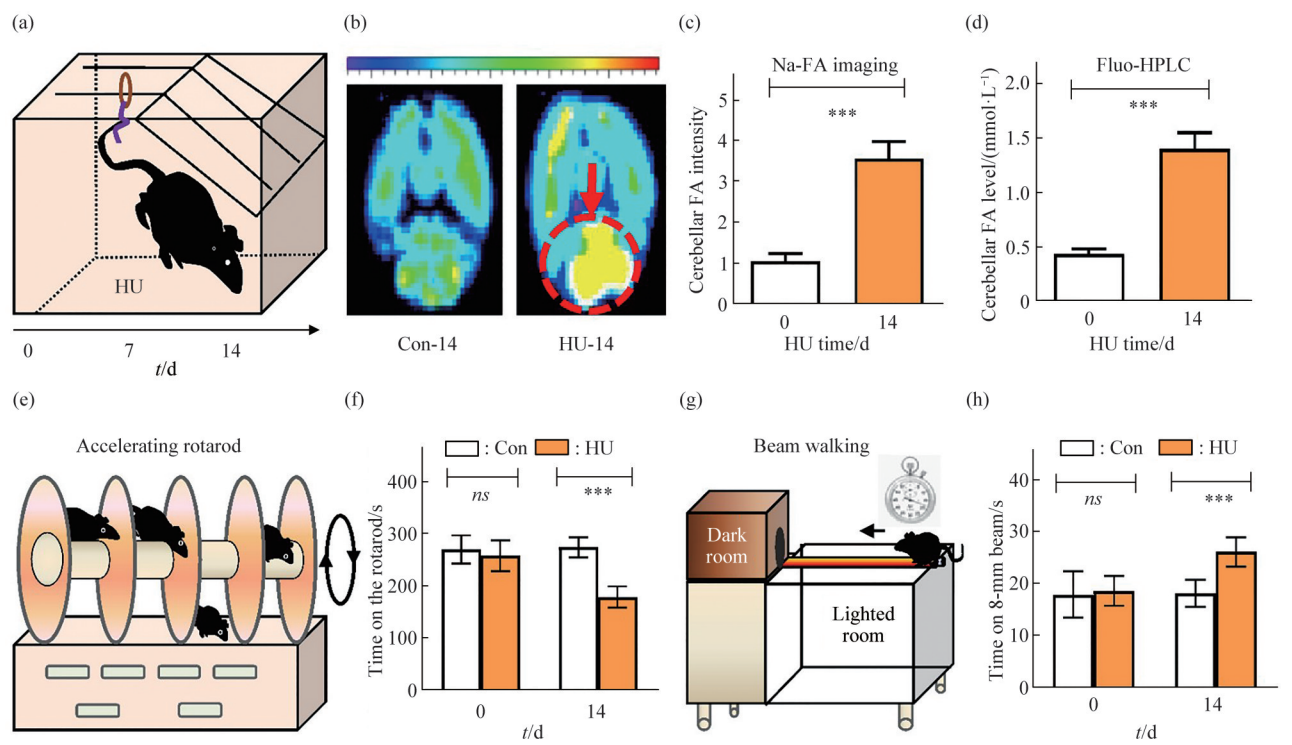


Fig. 1 Move disorders of HU model mice assessed by rotating bar instrument and balance beam

(a) Schematic diagram of mice model of hindlimb unloading (HU). (b) Formaldehyde fluorescence imaging of mouse cerebellum by injection of Na-FA probe on day 7 and 14, respectively. Con, Control; FA, formaldehyde. (c) Elevated fluorescence intensity of FA in cerebellum of HU model. (d) Increased levels of FA in cerebellum of HU model. (e) Schematic diagram of rotating rod instrument. (f) Comparison of staying time between HU and Con group. (g) Schematic diagram of balance beam. (h) Time of crossing balance beam in HU and Con group. *** $P<0.001$, ns $P>0.05$, $n=8$.

2.2 后肢悬吊小鼠脑中甲醛产生酶活性及表达增加

采用组织免疫荧光检测后肢悬吊组和对照组小鼠小脑内SSAO含量, 用SSAO活性试剂盒检测了血液、小脑匀浆中SSAO的活性。结果显示: 与对照组相比, 后肢悬吊组小鼠小脑内SSAO含量增加 (图 2a), 活性增强 (图 2b), 血浆中SSAO的活性增强 (图 2c)。同时, SSAO的组织免疫荧光结果也显示后肢悬吊组小鼠小脑血管壁中SSAO荧光强度较对照组显著增加 (图 2d, e)。

以上结果说明, 后肢悬吊模拟失重确实导致了小鼠运动功能的紊乱, 小脑中的甲醛蓄积可能与模拟失重导致的运动障碍密切相关 [17], 而SSAO表达增加及肌氨酸脱氢酶 (sarcosine dehydrogenase, SARDH) 与甲醛蓄积有着紧密联系 (图 2f) [18]。这提示: 向小鼠的小脑顶核内注射病理浓度的甲醛有可能用来制备类似失重诱发运动紊乱的病理小鼠模型。

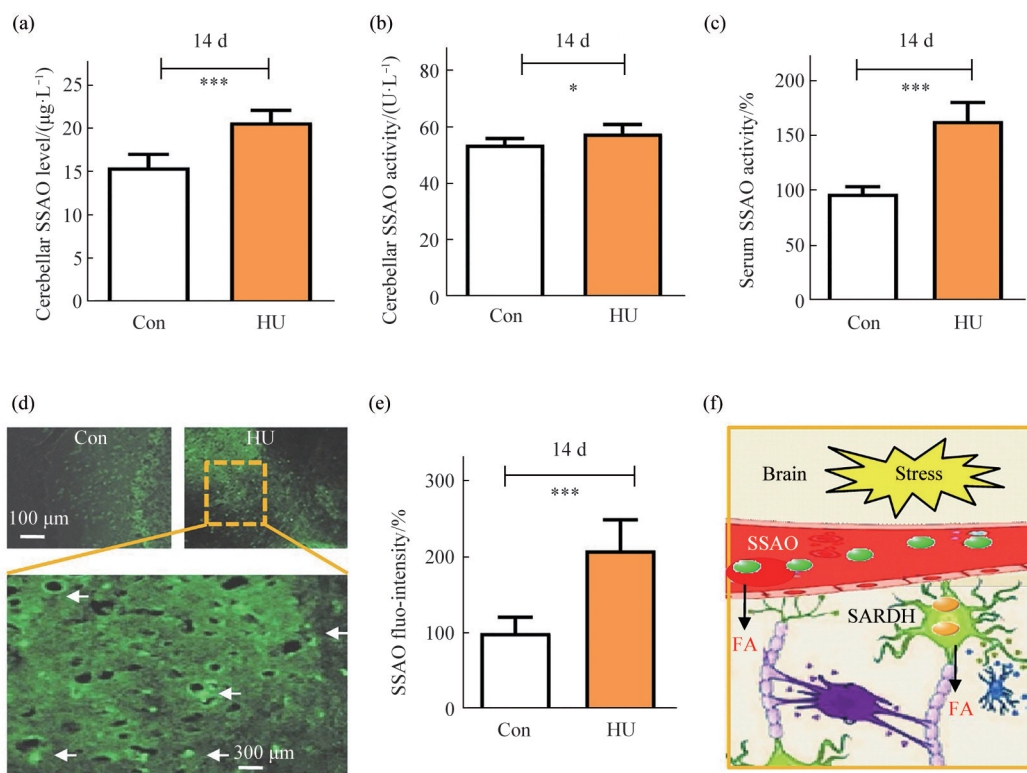


Fig. 2 Increased in the levels of expression and activity of SSAO protein in the cerebellum of HU group detected by using immunofluorescence and SSAO kits, respectively

(a, b) Elevated in the levels of expression and activity of SSAO enzyme in the cerebellum of HU mice than Con mice. (c) Increased in the activity of serum SSAO in HU mice than Con mice. (d, e) Enhanced immunofluorescence of SSAO in the cerebellum of HU mice. (f) Schematic diagram of FA accumulation in the cerebellum caused by increasing SSAO enzyme expression in blood and activating mitochondrial SARDH of neurons. Sarcosine dehydrogenase (SARDH). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, $n = 8$.

2.3 顶核注射病理浓度甲醛小鼠的病理特征及行为变化

为探索是否小脑中甲醛蓄积是后肢悬吊模型小鼠出现运动功能紊乱的关键诱因, 采用立体定位微量注射技术向健康成年雄性小鼠小脑的顶核注射病理浓度 (1.5 mmol/L, 2 µl/侧) 的甲醛, 观察小脑神经元死亡及运动行为变化。

为确定立体定位注射位点的准确性, 将细胞膜红色荧光探针 (DiI, 25 µmol/L, C1036, 碧云天, 中国) 量注射到小脑顶核 (图 3a), 制作冰冻切片后用细胞核蓝色荧光染液 (DAPI, C1002, 碧云天, 中国) 孵育 5~10 min, 激光共聚焦的结果显示小鼠小脑顶核出现红色荧光, 说明注射位置准确。

为检测病理浓度甲醛对小脑顶核神经元的毒性, 将顶核微量注射甲醛后的小鼠脑组织灌注固定, 制作冰冻切片后进行尼氏染色。结果显示: 后肢悬吊组 (HU) 和顶核注射组 (FA-1.5 mmol/L)

的小鼠较对照组 (Con) 的小脑顶核神经元中紫蓝色尼氏体显著减少, 说明神经元死亡增加 (图 3a)。

为检测病理浓度甲醛对小脑运动功能调节的影响, 采用转棒仪、平衡木、步态分析仪检测小鼠的运动功能。结果显示小脑顶核微量注射甲醛后, 小鼠在棒时间缩短 (图 3b), 穿过平衡木的时间延长, 表明平衡能力减弱 (图 3c)。特别是后肢悬吊组 (HU) 和顶核注射组 (FA-1.5 mmol/L) 的小鼠较对照组 (Con) 的步宽明显增加 (图 3d)。以上说明顶核注射组和 HU 组的运动行为紊乱基本一致。

以上数据表明, 顶核立体定位注射病理浓度的甲醛可使神经元死亡, 并诱发小鼠表现出运动失调、步态紊乱症状^[19], 与后肢悬吊组小鼠运动功能紊乱的行为特征类似。

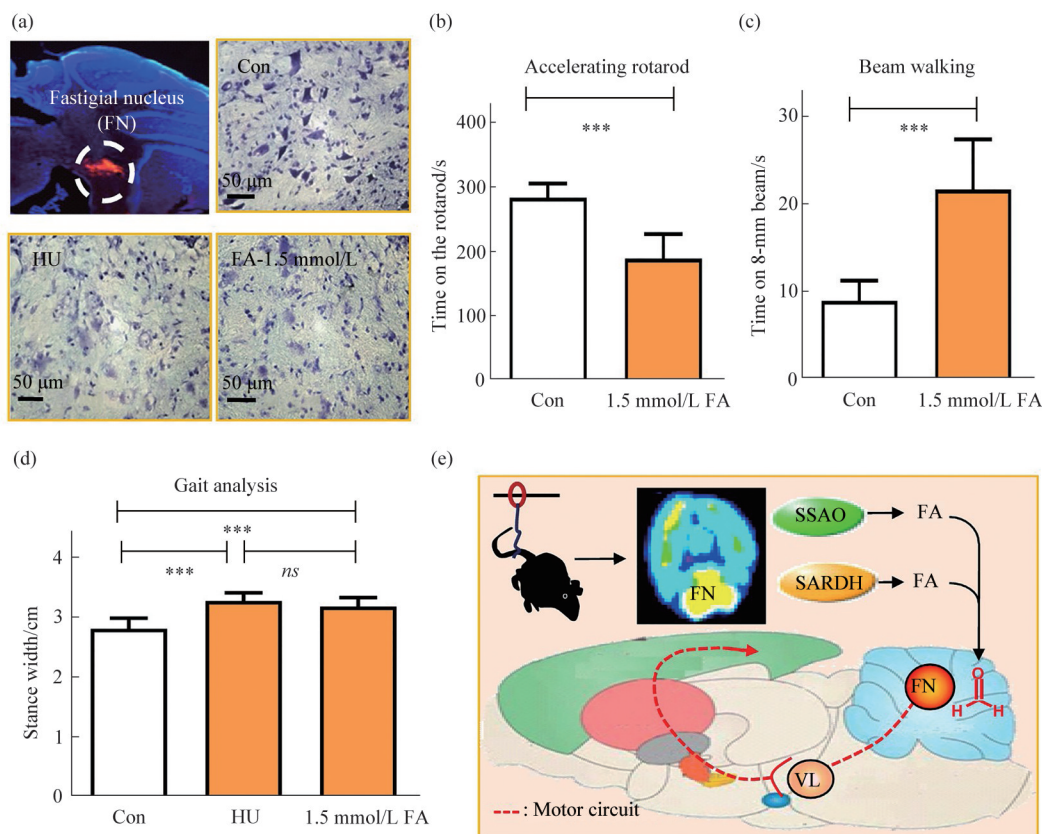


Fig. 3 Mimicking pathological characters of HU model mice by injecting of excessive FA into the fastigial nucleus of male healthy mice

(a) Injection site of the fastigial nucleus (FN) and Nissl staining showed neuronal death after injection of FA into FN of the cerebellum. (b) Decreased in the staying time in the rotarod in FA-injected mice. (c) Decline in the staying time in the beam waling in FA-injected mice. (d) Gait analysis of the stance width in Con, HU model, and FA-injected mice. Con: the wild-type mice; HU: hindlimb unloading; FA: formaldehyde. (e) Presumed mechanisms of HU-induced move disorders through SSAO-derived FA impairing FN-pathway. VL: ventrolateral nucleus of the thalamus. *** $P < 0.001$, ns $P > 0.05$, $n = 8$.

3 讨 论

本研究发现标准模型组的后肢悬吊小鼠小脑顶核中甲醛生成酶——SSAO的活性及表达急剧增加,导致小脑中甲醛蓄积、神经元死亡,并伴随运动功能紊乱;而向健康成年小鼠小脑顶核内注射病理浓度的甲醛可以重现标准模型组的病理及行为特征。这说明航天失重导致小脑内源甲醛蓄积,而过高浓度的甲醛是诱发小脑运动调节功能紊乱的关键原因(图3e)。这提示消除小脑内过多的甲醛可能有助于挽救航天失重诱发的运动功能失调。

人类经过千万年的进化,形成了与地球重力环境相适应的生理结构与功能特点。而宇航员长时间处于航天失重环境下人脑和身体出现结构改变^[20]。

特别是宇航员完成长期太空飞行任务返回地面后,常常出现与神经肌肉系统退化相关的运动功能障碍,如手灵活性降低^[21]、肌肉萎缩、肌肉力量下降^[22-23]、小脑共济失调和空间定向障碍等表现^[24],严重影响航天员的健康和工作效率。急需在地面环境探索和开发能模拟航天失重病理特征动物,为应对航天失重的危害提供新的药物筛选模型。本研究采用后肢悬吊法来制备模拟航天失重小鼠模型^[25-26]。造模2周后,行为学结果显示, HU组小鼠比对照组小鼠通过平衡木的时间延长、在转棒上停留的时间缩短,较难保持身体的平衡;组织生化指标检测结果显示, HU组小鼠脑内和血液中的SSAO活性增强,甲醛代谢紊乱,导致小脑内甲醛急剧蓄积。这说明航天失重诱发了小脑中甲醛蓄

积,而高浓度的甲醛直接诱发神经元死亡,破坏了小脑对运动功能的精细调节功能。

为探索小脑蓄积的甲醛是导致运动功能紊乱的直接诱因,本研究采用了顶核立体定位注射病理浓度的甲醛来制备新型模型,检验是否与标准的后肢悬吊模型的病理特征一致,包括SSAO活性增强^[27],小脑甲醛蓄积,小脑神经元数目减少,出现步态紊乱、平衡功能失调等。结果显示,顶核注射组小鼠的小脑受损及运动功能紊乱与后肢悬吊模型的生化指标、行为特征基本一致,特别是小脑顶核中内源甲醛蓄积^[28]。而过多的甲醛直接诱发神经元死亡,破坏顶核到大脑皮层的运动环路,导致运动功能紊乱(图3e)。

4 结 论

本研究建立了航天失重病理特征的模型小鼠。此模型较好地模拟了失重环境下病理及运动行为的改变。这为探索失重环境下的运动障碍机制提供了新思路,同时也为应对航天失重危害的药物筛选提供了新的、潜在的动物病理模型。

参 考 文 献

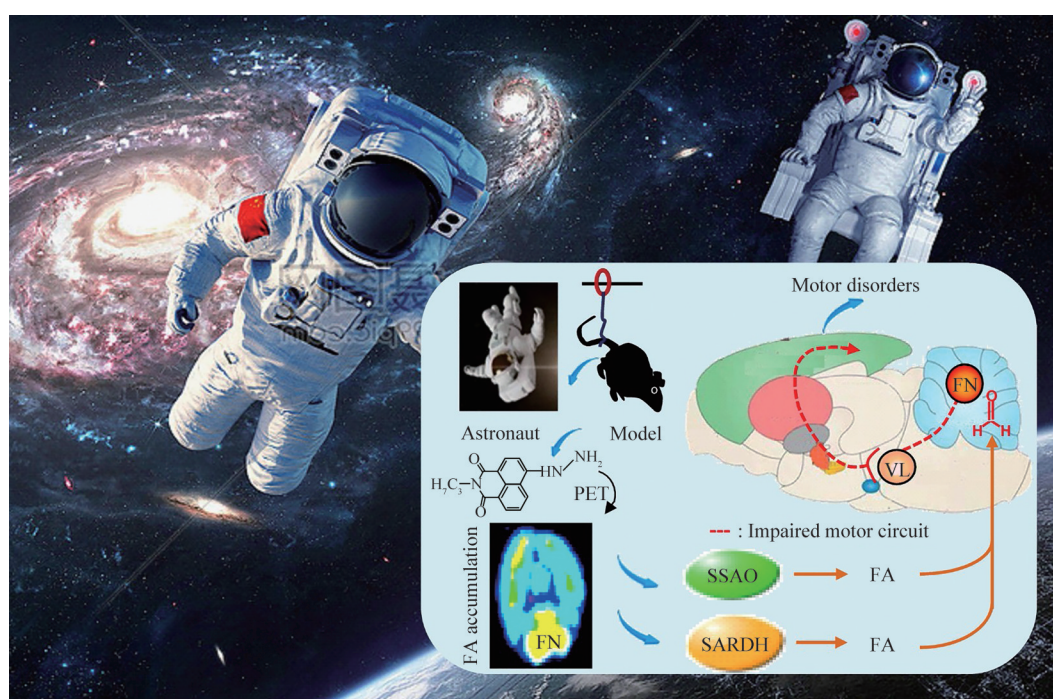
- [1] Glasauer S, Amorim MA, Bloomberg JJ, *et al.* Spatial orientation during locomotion correction of locomotion following space flight. *Acta Astronaut*, 1995, **36**(8-12): 423-431
- [2] Layne C S, McDonald P V, Bloomberg J J. Neuromuscular activation patterns during treadmill walking after space flight. *Exp Brain Res*, 1997, **113**(1): 104-116
- [3] Layne C S, Lange G W, Pruett C J, *et al.* Adaptation of neuromuscular activation patterns during treadmill walking after long-duration space flight. *Acta Astronaut*, 1998, **43**(3-6): 107-119
- [4] Kozlovskaya I B, Grigoriev A I, Stepanov V I. Countermeasure of the negative effects of weightlessness on physical systems in long-term space flights. *Acta Astronaut*, 1995, **36**(8-12): 661-668
- [5] Morey-Holton E R, Globus R K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* (1985), 2002, **92**(4): 1367-1377
- [6] Tulpule K, Dringen R. Formaldehyde in brain: an overlooked player in neurodegeneration?. *J Neurochem*, 2013, **127**(1): 7-21
- [7] 郭振宇,孙红梅,高誉珊,等.脑立体定位注射海人酸剂量用于病后脑损伤模型的最佳剂量实验探究.中国解剖学会2019年年会论文文摘汇编,2019:214
Guo Z Y, Sun H M, Gao Y S, *et al.* 2019 Annual Meeting of Chinese Anatomical Society, 2019:214
- [8] Stanley J L, Lincoln R J, Brown T A, *et al.* The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines. *J Psychopharmacol*, 2005, **19**(3): 221-227
- [9] Serradj N, Jamon M. Postnatal training of 129/Sv mice confirms the long-term influence of early exercising on the motor properties of mice. *Behav Brain Res*, 2016, **310**: 126-134
- [10] Tang Y, Kong X, Xu A, *et al.* Development of a two-photon fluorescent probe for imaging of endogenous formaldehyde in living tissues. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, **55**(10): 3356-3359
- [11] Luo W, Li H, Zhang Y, *et al.* Determination of formaldehyde in blood plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, **753**(2): 253-257
- [12] 肖栩,薛程,王佳,等.大鼠脑组织厚冷冻切片的经验探讨.临床与实验病理学杂志,2019, **35**(5): 608-609
Xiao X, Xue C, Wang J, *et al.* Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2019, **35**(5): 608-609
- [13] 刘健宏,王标,庄向生,等.单克隆抗体与免疫荧光染色技术.福建畜牧兽医,2001, **S1**: 13-14
Liu J H, Wang B, Zhuang X S, *et al.* Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2001, **S1**: 13-14
- [14] 周君,陈勤.神经细胞尼氏体染色方法改良.生物学杂志,2010, **27**(5): 94-95
Zhou J, Chen Q. *Journal of Biology*, 2010, **27**(5): 94-95
- [15] Yu P H, Lai C T, Zuo D M. Formation of formaldehyde from adrenaline *in vivo*; a potential risk factor for stress-related angiopathy. *Neurochem Res*, 1997, **22**(5): 615-620
- [16] 魏洪鑫,宁钧宇.尾吊模拟失重大鼠、小鼠多种器官系统的影响.实验动物科学,2019, **36**(6): 64-68
Wei H X, Ning J Y. *Laboratory Animal Science*, 2019, **36**(6): 64-68
- [17] Songur A, Ozen O A, Sarsilmaz M. The toxic effects of formaldehyde on the nervous system. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2010, **203**: 105-118
- [18] Ai L, Tan T, Tang Y, *et al.* Endogenous formaldehyde is a memory-related molecule in mice and humans. *Commun Biol*, 2019, **2**: 446
- [19] Ge Y. Multiple sclerosis: the role of MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2006, **27**(6): 1165-1176
- [20] Pietsch J, Bauer J, Egli M, *et al.* The effects of weightlessness on the human organism and mammalian cells. *Curr Mol Med*, 2011, **11**(5): 350-364
- [21] Bock O, Schott N, Papaxanthis C. Motor imagery: lessons learned in movement science might be applicable for spaceflight. *Front Syst Neurosci*, 2015, **9**: 75
- [22] Williams D, Kuipers A, Mukai C, *et al.* Acclimation during space flight: effects on human physiology. *CMAJ*, 2009, **180**(13): 1317-1323
- [23] Fitts R H, Riley D R, Widrick J J. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), 2000, **89**(2): 823-839
- [24] Lackner J R, Dizio P. Human orientation and movement control in weightless and artificial gravity environments. *Exp Brain Res*, 2000, **130**(1): 2-26
- [25] 谢满江,程九华,马进,等.浅谈航天生理学实验模型的选择.西北医学教育,2008(3): 517-519
Xie M J, Cheng J H, Ma J, *et al.* Northwest Medical Education, 2008 (3): 517-519
- [26] 付子豪,王臻,吴洁,等.改良的大鼠模拟失重模型制备方法.中国应用生理学杂志,2019, **35**(2): 189-192+186
Fu Z H, Wang Z, Wu J, *et al.* Chinese Journal of Applied Physiology, 2019, **35**(2): 189-192+186
- [27] Boomsma F, Hut H, Bagghoe U, *et al.* Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO): from cell to circulation. *Med Sci Monit*, 2005, **11**(4): RA122-RA126
- [28] 徐浩,崔立然,张玲.甲醛对机体整体内源性代谢产物的影响.解剖学报,2012, **43**(3): 412-416
Xu H, Cui L R, Zhang L. *Acta Anatomica Sinica*, 2012, **43**(3): 412-416

Preparation of a Novel Mouse Model Mimicking The Pathological Features of Space Weightlessness*

MEI Tian-Hao, CHEN Ying, ZHAO Hang, YUAN Ye**, TONG Zhi-Qian**

(Institute of Aging, Key Laboratory of Alzheimer's Disease of Zhejiang Province, School of Mental Health, Oujiang Laboratory, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Graphical abstract



Abstract Objective To establish a new mouse animal model that mimics the pathological characteristics of space weightlessness. **Methods** Male C57BL/6J mice were randomly divided into 4 groups. (1) Standard model group: mice with hindlimb unloading (HU); (2) control group: wild-type mice; (3) Sham operation group: mice with phosphate buffer solution (PBS)-injected into fastigial nucleus (FN); (4) new model group: mice with excessive formaldehyde (FA)-injected into FN. All these mice were used to assess the ability of move and balance by using accelerating rotarod, beam walking and gait analysis, respectively. After behaviors tests, cerebellar slices

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (82071214, 81974166, 30570566) and Beijing Natural Science Foundation (M21004, 7202083).

** Corresponding author.

TONG Zhi-Qian. Tel: 86-577-86699661, E-mail: tzqbeida@163.com

YUAN Ye. Tel: 86-577-86699872, E-mail: yuanye017@126.com

Received: April 14, 2022 Accepted: April 25, 2022

were used to examine the death of cerebellar neurons, biochemical detection of FA-generating enzyme: semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO), and cerebellar FA concentration. **Results** Compared with control group, there were a marked elevation in activity and expression of SSAO, an increase in the levels of endogenous FA, and a massive death of cerebellar neurons associated with move disorders in HU model mice. More importantly, the new model mice with injectetion of FA into FN exhibited the similar pathological characteristics as to HU model, including motor disorders and biochemical indexes. **Conclusion** HU-enhanced activity and expression of SSAO in the cerebellum leads to endogenous FA accumulation in the cerebellar FN. Exssesive FA is the direct factor for cerebellar neuron death and motor disorders. Moreover, FA-injection into FN mimics the pathological characteristics of HU model. This may provide a novel experimental animal model for drug screening *via* space weightlessness-induced motor disorders.

Key words space weightlessness, hindlimb unloading, stereotactic, fastigial nucleus, endogenous formaldehyde

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0163