β 淀粉样蛋白斑块的高分辨全脑三维定量研究

龙犇^{1,2}, 李向宁^{1,2,3}, 张建平^{1,2}, 陈思琦^{1,2}, 李文伟^{1,2}, 钟秋园^{1,2}, 李安安^{1,2,3}, 龚辉^{1,2,3}, 骆清铭^{1,2*}

1. 华中科技大学-武汉光电国家研究中心, Britton Chance生物医学光子学研究中心, 武汉 430074;

2. 华中科技大学, 工程科学学院, 生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉 430074;

3. 华中科技大学苏州脑空间信息研究院, 苏州 215100

* 联系人, E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2018-11-15; 接受日期: 2019-01-04; 网络发表日期: 2019-01-17

国家自然科学基金(批准号: 91749209)、国家自然科学基金创新群体(批准号: 61721092)和武汉光电国家研究中心主任基金资助

摘要 中枢神经系统中 β 淀粉样蛋白斑块是阿尔兹海默症的主要病理特征之一, 其负荷和数目的变化是病程发展的重要标志. 已有研究主要是对局部脑组织进行二维切片成像, 尚缺少在全脑三维空间对斑块进行高分辨率定量分析的研究方法. 本文建立了适用于哺乳动物三维完整脑内 β 淀粉样蛋白斑块定量分析策略, 包括全脑斑块快速荧光染色方法、基于荧光显微光学切片断层成像技术的高分辨全脑数据获取, 以及斑块自动定位、统计数目等. 与免疫组化染色比较, 证明本方法对直径大于 $10\ \mu\text{m}$ 的斑块检出率为 $97.71\%\pm 0.18\%$. 并以 $0.32\ \mu\text{m}\times 0.32\ \mu\text{m}\times 2\ \mu\text{m}$ 的成像分辨率, 获取了5XFAD转基因小鼠全脑A β 斑块分布数据集, 首次以脑区/核团的三维轮廓划分出立体区域, 定量统计了90个亚区内A β 斑块的数量及分布密度. 本文建立的快速、精准、价廉的方法将有助于全面高效地研究阿尔兹海默症致病机理和药效评估.

关键词 阿尔兹海默症, β 淀粉样蛋白斑块, 全脑, 显微光学切片断层成像, 脑空间信息学

阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)是一种渐进性发展的中枢神经系统退行性疾病, 其病理特征表现为 β 淀粉样蛋白(β -amyloid peptide, A β)斑块和神经纤维缠结; 临床特征表现为记忆、空间导向等认知功能的损伤^[1,2]. A β 斑块数目和负荷的变化是阿尔兹海默症病程发展的重要标志; 对其进行定量分析是深入研究病程时空起源、发生与发展规律的关键^[3,4]. 因为斑块在脑内分布广泛且在不同脑区/核团内呈现不同的病程变化规律^[5,6], 形态、尺寸存在明显差异^[5,7]. 所

以, 利用传统的局部组织切片和低分辨率成像, 难以准确分析斑块的三维结构; 因获取的结果与切片取样位置密切相关, 故利用二维切片进行抽样估算, 难以精确分析斑块在核团甚至全脑的空间分布信息. 为了全面分析A β 的空间分布和形态特征, 迫切需要建立在全脑范围内获取微米分辨率的图像数据并自动分析的研究方法.

利用荧光分子探针标记A β 斑块, 结合光学成像, 有研究获取了组织块的A β 信息^[7-10], 然而采用刚果红

引用格式: 龙犇, 李向宁, 张建平, 等. β 淀粉样蛋白斑块的高分辨全脑三维定量研究. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 140–150

Long B, Li X N, Zhang J P, et al. Three-dimensional quantitative analysis of amyloid plaques in the whole brain with high voxel resolution (in Chinese).

Sci Sin Vitae, 2019, 49: 140–150, doi: 10.1360/N052019-00001

或其衍生物只能标记部分斑块, 低估了总体数目^[10]. 因此需要发展特异、高效的大样本标记方法, 在大组织块甚至全脑范围分析A β 斑块. 随着三维成像^[11,12]和组织透明^[13,14]等技术的发展, 结合免疫组化和荧光标记技术, 在组织块甚至全脑范围研究A β 成为可能^[9,15-17]. 由于完整脑体积大、显微光学成像检测深度有限以及大体积组织染色均匀性不佳等因素影响, 尚未有在亚微米分辨水平定量分析全脑内A β 斑块分布的报道. 近年发展的荧光显微光学切片断层成像(fluorescence micro-optical sectioning tomography, fMOST)技术, 可对数厘米大小样本进行亚微米分辨的三维成像, 获取神经元、血管的真实精细完整形态结构^[18-20], 具有高精度、高通量数据获取的优势, 为开展高分辨全脑研究提供了有力工具.

本研究以5XFAD (five familial Alzheimer's disease)转基因小鼠^[21]为研究对象, 结合全脑荧光染色方法和自主研发的fMOST系列技术^[19,20,22,23], 获取了标记有阿尔兹海默症A β 斑块的三维高分辨全脑结构数据集, 并进行了定量分析, 以验证全脑三维空间精准定量研究A β 斑块的可行性.

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验采用雌性5XFAD转基因小鼠(购自美国Jackson实验室, #008730)^[21]; 同窝阴性雌性小鼠作为对照组. 分别用6月龄、10月龄小鼠进行全脑A β 斑块的标记及成像; 共有7只小鼠用于本实验. 小鼠饲养在温度为22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 12 h光照/12 h黑暗的环境中. 所有动物实验均经华中科技大学动物伦理委员会批准.

1.2 组织准备

经腹腔注射1%戊巴比妥钠溶液, 将实验小鼠深度麻醉; 依次使用0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS; Sigma-Aldrich)和4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA; Sigma-Aldrich)溶液经心脏灌注固定小鼠, 解剖取出完整的脑组织, 将鼠脑置于4% PFA溶液中后固定1 d. 随后, 使用0.01 mol/L PBS溶液漂洗1 d; 用于后续实验.

1.3 A β 斑块全脑染色

选用DANIR-8c(donor-acceptor near-infrared 8c)荧光探针染色A β 斑块^[24](北京师宏药物研制中心, 货号072701). 染液中分别加入不同浓度的蔗糖溶液, 以调节组织的渗透性, 增加荧光探针分子渗透速度^[25]. 完整小鼠脑浸泡在染液中, 置于37 $^{\circ}$ C恒温箱中避光、振荡处理. 分别在15%蔗糖的复合染液, 染色1 d; 30%蔗糖的复合染液, 染色2 d; 无蔗糖的复合染液, 染色1 d. 染液由0.01 mol/L PBS溶液、1 μ mol/L DANIR-8c荧光探针、0~30%蔗糖(w/v)、0.1% Triton X-100和0.05%叠氮化钠组成. 全脑染色后, 使用70%酒精(v/v)洗脱非特异性染色.

1.4 组织学处理

为了评估全脑的染色效果, 将染色的5XFAD小鼠脑, 使用振动切片(Leica VT1200S)分别以70和300 μ m的厚度连续切片, 使用倒置共聚焦显微镜(Zeiss LS710, 0.8 NA, 10 $\times$ /20 $\times$)和双光子显微镜(Nikon A1+, 1.1 NA, 25 $\times$ /Water, 日本)成像. 为了验证染色准确性, 对鼠脑进行连续70 μ m切片; 从嗅端到尾端间隔1 mm选取1张脑片进行免疫组织化学染色. 过程简述如下: 0.3% Triton X-100室温孵育1 h进行细胞通透处理; 5%小牛血清蛋白溶液37 $^{\circ}$ C孵育1 h封闭处理; MOAB-2 (mouse IgG_{2b})一抗^[26](Biosensis, M1586, 1:800稀释)溶液4 $^{\circ}$ C孵育过夜; 0.01 mol/L PBS漂洗3次; Alexa Fluor 488二抗37 $^{\circ}$ C孵育2 h; 0.01 mol/L PBS漂洗3次. 最后, 用抗荧光衰减封片剂封片, 使用倒置共聚焦显微镜成像.

1.5 全脑成像

为了获取全脑淀粉样蛋白斑块三维数据集, 采用上述方法对10月龄5XFAD转基因小鼠完整脑进行染色; 再使用琼脂糖凝胶进行组织包埋, 用于fMOST全脑成像^[19,20].

小鼠全脑样本浸入水槽中, 使用水镜(1.0 NA, 20 $\times$ /Water)进行全脑成像. 利用sCMOS相机(scintific complementary metal-oxide semiconductor)以0.32 μ m $\times$ 0.32 μ m $\times$ 2 μ m体素分辨率采集荧光信号, 通过三维精密平台移动, 对样本表面进行逐个马赛克扫描, 待采集完一层成像后, 对已成像部分用振动切片

机切除;而后继续采集下一层图像,循环往复,直到完成完整脑数据的获取。全脑数据集共约6700张冠状切面,原始数据量约10 TB(Terabyte)。

1.6 数据处理与统计分析

先对fMOST获取的原始图像做预处理^[19];再使用Amira软件(v 5.2.2, FEI, 法国)进行可视化、三维数据块轮廓渲染。为了实现斑块的自动定量计数,测试了本实验室开发的神经元全局定位算法(Neuron Global Position System, NeuroGPS)^[22]对斑块计数的准确性,对算法识别与人工识别的斑块进行了统计分析。召回率指算法检出阳性且人工也检出为阳性的样本数量,除以人工检出阳性样本数量。精确度指算法检出阳性且人工也检出为阳性样本数量除以算法检出阳性样本数量^[27]。在此基础上,使用NeuroGPS算法对全脑A β 斑块进行自动计数。最后,利用自主开发的脑空间映射方法(Brain Spatial Mapping Interface, BrainsMapi)^[23,28],将数据集配准至Allen参考小鼠脑图谱^[29,30],完成A β 斑块的自动计数、解剖定位与脑区分割。A β 斑块密度为脑区或核团内的A β 斑块总数目与总体积的比值^[31,32]。

为验证全脑染色的准确性,使用Imaris软件(Bitplane AG, Zurich)对免疫组化和荧光探针染色的共标记比例进行统计;使用Prism软件(GraphPad, USA)绘制图表,统计结果以mean $\pm$ SEM表示。

2 结果与分析

2.1 A β 斑块全脑染色方法的建立

为了实现全脑A β 斑块的标记,我们选用DANIR-8c荧光探针进行全脑离体染色。DANIR-8c是一种高灵敏度的小分子荧光探针,在活体/离体条件下均表现出优良的A β 斑块的结合能力^[24]。为了加速探针在大体积样本中的渗透,我们采用“渗透压休克”的样本处理方式,通过在染液中分别加入不同浓度的蔗糖溶液,以调节生物组织的渗透性,增加了荧光探针分子渗透能力^[25]。全脑染色处理过程如图1A所示。通过上述处理,可在4 d内完成小鼠全脑染色。

为了验证染色方法的特异性,分别对6月龄5XFAD转基因阴性和阳性小鼠脑进行了全脑染色,在阴性鼠脑中未发现着色点。在阳性小鼠脑中,可见特异性染色的A β 斑块(图1B和C)。为分析本方法在全脑的

染色均匀性,从嗅端到尾端、脑表面到脑深部的不同位置,选取了8个具有不同解剖结构特征的区域进行对比分析。结果表明,不同脑区内A β 斑块均清晰可辨、背景对比度一致、图像信噪比高(图1D)。表明该方法可以实现全脑范围的均匀染色。

为判定该染色方法是否能够获取A β 斑块的精细三维结构特征,我们对染色的全脑样本进行300 μ m的连续切片,利用双光子成像获取了皮层和海马区域的三维数据块。结果显示,A β 斑块三维结构特征清晰,可识别出致密核心及周围结构,且具有较好的信噪比(图1E)。如图1F所示,在血管附近也可看到A β 沉积,致密斑块的三维结构特征明显,与已有的文献报道吻合^[24]。结果表明,本方法能够在全脑范围内标记出淀粉样蛋白斑块,用于后续的斑块计数及三维形态分析。

2.2 A β 斑块全脑染色准确性的验证

为验证本方法的准确性,我们选用特异性标记A β 沉积的MOAB-2抗体^[26]对全脑染色的AD鼠脑进行免疫组织化学复染。对鼠脑嗅端到尾端的冠状面切片进行统计分析,6月龄AD阳性小鼠的结果显示,全脑染色的红色荧光点和免疫组化染色的绿色荧光点高度重合(图2A-D),表明全脑染色方法的结果与免疫组化的结果一致,能够准确标记A β 斑块。

为了进一步分析本方法的特异性和灵敏度,对探针和免疫组化共标的斑块进行细化分析。这里,我们将A β 斑块以直径大小分为四组:小于20 μ m、20~40 μ m、40~60 μ m和大于60 μ m。如图2E所示,在直径小于20 μ m的组中,DANIR-8c探针染色斑块数目为2841 $\pm$ 238,其中与MOAB-2染色斑块共标的数目为2824 $\pm$ 233,为MOAB-2染色斑块数目(3098 $\pm$ 266)的91.24% $\pm$ 0.54%,为DANIR-8c探针染色斑块数目的99.43% $\pm$ 0.18%。直径为20~40 μ m组中,DANIR-8c探针染色斑块数目为1258 $\pm$ 109,其中与MOAB-2染色斑块共标的数目为1258 $\pm$ 109,为MOAB-2染色斑块数目(1259 $\pm$ 109)的99.91% $\pm$ 0.05%。直径为40~60 μ m的组中,DANIR-8c探针染色斑块数目为302 $\pm$ 23,与MOAB-2染色斑块共标的数目为302 $\pm$ 23,占MOAB-2染色斑块(302 $\pm$ 23)的100%。直径大于60 μ m的组中,DANIR-8c探针染色的斑块数目为38 $\pm$ 9,与MOAB-2染色斑块共标的数目为38 $\pm$ 9,占MOAB-2染色斑块(38 $\pm$ 9)的100%。图2结果来自4只小鼠,每个鼠脑取6张脑片加以统计。

图 1 A β 斑块的全脑染色方法和结果. A: DANIR-8c荧光探针进行全脑染色样本处理过程示意图, 标尺: 5 mm; B, C: 分别为阴性(wild-type, WT)、AD阳性小鼠脑冠状面的染色结果, 标尺: 1 mm; D: AD阳性小鼠脑染色结果, 标尺: 100 μ m; E: AD阳性小鼠脑皮层、海马区域组织块的双光子成像结果, 三维数据块尺寸为512 μ m $\times$ 512 μ m $\times$ 300 μ m, 标尺: 100 μ m; F: 图E左右子图中虚线框示意位置的放大图, 左侧子图标尺: 10 μ m, 右侧子图中箭头指示血管淀粉样沉积, 标尺: 20 μ m. 缩写: ACB, nucleus accumbens, 伏隔核; BLA, basolateral amygdala, 基底外侧杏仁核; DG, dentate gyrus, 齿状回; LS, lateral septal nucleus, 外侧隔核; MM, medial mammillary nucleus, 乳头体内侧核; SSsp, primary somatosensory area, 初级躯体感觉皮层; SUB, subiculum, 下托; TH, thalamus, 丘脑

Figure 1 The whole brain staining method for amyloid plaques. A: The procedures of the whole brain amyloid plaque staining using a DANIR-8c probe; scale bar: 5 mm. B and C: The results of coronal staining in brains from wild-type mice (B) and 5XFAD mice (C); scale bar: 1 mm. D: Enlarged views of the staining in brains from 5XFAD mice; 3D data blocks, 512 μ m $\times$ 512 μ m $\times$ 300 μ m; scale bar: 100 μ m. (E) The two-photon imaging results of amyloid plaques in the cortex and hippocampus of 5XFAD mice brains, 512 μ m $\times$ 512 μ m $\times$ 300 μ m; scale bar: 100 μ m. F: Enlarged views of the stained amyloid plaques (yellow squares from E); the arrowheads in right subgraph indicate vascular deposits; scale bar: left 10 μ m, right 20 μ m. Abbreviations: ACB, nucleus accumbens; BLA, basolateral amygdala; DG, dentate gyrus; LS, lateral septal nucleus; MM, medial mammillary nucleus; SSsp, primary somatosensory area; SUB, subiculum; TH, thalamus

以上结果证实, 本染色方法对直径大于20 μ m的淀粉样蛋白斑块的染色准确性(共标斑块占探针染色斑块的比例)为100%, 检出率(共标斑块占免疫组化染色斑块的比例)高于99.93%. 直径小于20 μ m的斑块准确性达到99.43%, 检出率达到91.24%.

为进一步分析染色的灵敏度, 我们将直径小于20 μ m的A β 斑块又细分为小于5 μ m, 5~10 μ m,

10~15 μ m, 15~20 μ m四组. 统计结果显示, 直径小于5 μ m的斑块, DANIR-8c探针与MOAB-2复染所共标的斑块, 占MOAB-2染色斑块(530 $\pm$ 16)的79.70% $\pm$ 1.68%; 直径5~10 μ m斑块的共标比例为89.32% $\pm$ 0.50%; 直径10~15 μ m斑块的共标比例为94.55% $\pm$ 0.54%; 直径15~20 μ m斑块的共标比例为96.82% $\pm$ 0.46%(图2F). 表明该全脑染色方法对直径为10~20 μ m的淀粉样蛋白

图 2 全脑染色方法的准确性。A: MOAB-2抗体染色和DANIR-8c探针全脑染色的冠状面结果, 标尺: 1 mm; 左列是MOAB-2抗体复染结果, 中列为DANIR-8c探针染色结果, 右列为重叠投影图。B~D: 分别是A图所示区域的局部放大图, 箭头指示A β 斑块, 标尺: 100 μm ; E: 分别由MOAB-2染色、DANIR-8c探针染色及共染方式所得, 不同直径A β 斑块数量的统计结果; F: 不同直径A β 斑块的共染比例的统计; 统计结果以mean $\pm$ SEM表示

Figure 2 Accuracy of the whole brain amyloid plaque staining method. A: Dual labeling with the MOAB-2 antibody and the DANIR-8c probe; scale bar: 1 mm; the left column shows the results of the MOAB-2 antibody staining, the middle column shows the results of the DANIR-8c probe staining, and the right column shows the merged results of the corresponding two channels. B~D: Enlarged views of the dual labeled A β s (white squares from A); arrowheads show the colabeled amyloid plaques; scale bar: 100 μm . E: The total numbers of MOAB-2 stained, DANIR-8c stained and colabeled amyloid plaques in different diameters. F: The proportions of colabeled amyloid plaques using different diameter parameters. All data represent mean $\pm$ SEM

斑块的染色准确性高。

综上, 建立的全脑A β 染色方法对直径大于10 μm

的A β 斑块的染色准确性为99.94% $\pm$ 0.02%, 检出率为

97.71% $\pm$ 0.18%; 对直径小于10 μm 的A β 斑块的染色准

确性为 $98.78\% \pm 0.43\%$, 检出率为 $85.54\% \pm 0.81\%$ 。

2.3 A β 斑块全脑三维分布特征的获取

为了在全脑范围内获取斑块的分布信息, 我们建立了可用于厘米尺度大组织块的三维精细结构信息获取的工作流程: 基于已建立的全脑A β 染色方法标记完整脑, 利用fMOST成像方法^[19,20]获取亚微米分辨率的连续三维数据, 通过自行开发的全自动定位算法^[22]进行脑区定位和自动计数(图3A)。

5XFAD小鼠随病程发展, A β 斑块的数目逐渐增加, 三维结构形态更为复杂。为进一步验证本方法的广泛适用性, 我们选用10月龄的小鼠评估全脑A β 斑块染色、三维数据集获取以及自动计数的性能。如图3B所示, 从嗅端到尾端的冠状面成像结果中图像信噪比较高, 不同脑区/核团淀粉样蛋白斑块的分布密度差异较大。基于fMOST技术的高分辨率($0.32 \mu\text{m} \times 0.32 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$)、全脑连续成像、单细胞水平的空间定位等特点, 我们对该数据集进行了三维重建、自动识别, 给出了矢状方位的重切片结果。如图3C所示, 重切片结果呈现了连续、高信噪比的特征, 可用于分析A β 斑块的脑区分布差异。

为对比A β 斑块在不同脑区的三维信号密度分布特征, 我们选取了与图1D相近、鼠脑内有一定代表性的8个脑区进行分析。在嗅端到尾端, 背侧到腹侧的不同区域, 图像均具有高信噪比, 可定性区分出不同脑区/核团A β 斑块分布密度及斑块形状大小的差异(图3D)。

2.4 A β 斑块全脑分布的定量分析

为定量分析A β 斑块在全脑三维空间的分布情况, 我们选用NeuroGPS算法对A β 斑块进行自动计数, 并通过定量比较自动识别与人工识别的斑块数目, 对计数的准确性进行评估。图4A给出了NeuroGPS算法对纹状体尾壳核局部数据块的自动计数结果: 人工检测到96个斑块, 自动识别到90个斑块, 而未被自动识别的斑块多数位于数据块的边界(图4A)。该数据块的 $100 \mu\text{m}$ 最大值投影结果显示, NeuroGPS算法自动识别A β 斑块的准确性高(图4B)。我们从代表不同A β 斑块尺寸和密度的区域, 各选取5个大小为 $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ 的三维数据块, 进行了自动算法准确性统计分析。结果显示, 最高和最低的召回率分别为 94.23%

$\pm 0.95\%$ 和 $88.50\% \pm 1.45\%$, 最高和最低的精确度分别为 $98.91\% \pm 0.23\%$ 和 $94.65\% \pm 0.98\%$ (图4C)。这些结果表明, 使用NeuroGPS算法可以在三维数据块中进行A β 斑块准确识别, 可用于全脑量化分析。

在对全脑A β 斑块进行自动计数后, 我们利用自行发展的BrainsMapi方法^[23]将三维数据集配准至Allen参考图谱(Common Coordinate Framework version 3, CCFv3)中^[29], 以获取解剖定位和脑区信息。首先, 我们分析了A β 斑块在全脑中的三维分布特征(图5A); 在10月龄5XFAD转基因小鼠脑中, 有约105万个淀粉样蛋白斑块, 平均密度为 $2357 \text{个}/\text{mm}^3$ 。随后, 通过三维配准和解剖结构特征, 定位并分割出脑区的三维轮廓, 如海马体(图5B和C)。在此基础上, 对脑区内的斑块分布进行精确统计和分析。本文对三维全脑12个脑区内斑块分布密度进行了定量统计, 结果见图5D。

为了对A β 斑块的空间分布特点进行更为细化的分析, 我们将主要脑区细分为90个解剖亚区和皮层的不同层, 并分别统计了A β 斑块数目及密度(图5E-G)。结果显示, 在皮层、纹状体、丘脑、海马及脑干的不同亚区内A β 斑块分布不均匀; 皮层第一层(Layer 1, L1)到第六层(Layer 6, L6)的分布密度也有明显差异(图5G)。

3 讨论

本研究建立了一种三维高分辨定量分析完整鼠脑大样本内A β 斑块的方法, 包括发展了全脑A β 斑块荧光染色方法, 采用荧光显微光学切片断层成像技术和全自动定位分析算法, 成功实现了具备全脑尺度空间定位信息的A β 斑块定量研究。

DANIR-8c荧光探针具有良好的渗透组织的能力; 我们在染液中通过添加不同浓度蔗糖溶液进行“渗透压休克”处理, 进一步增加了探针渗透能力。已有研究报道, 使用免疫组化染色, 结合光透明技术, 也可实现对全脑A β 斑块的标记^[9,15-17]。但是, 抗体作为生物大分子, 渗透性较差^[13,14], 且免疫组化实验操作繁琐、周期长、成本高昂。而以往使用刚果红等荧光探针的全脑标记方法^[7-10], 只能标记到有限的A β 斑块。临床及基础研究对A β 斑块的分析中, 主要是对直径约 $10 \sim 50 \mu\text{m}$ 的斑块进行的统计分析^[33-35]。本研究通过免疫组化实验, 验证了DANIR-8c探针可以准确检测直径大于 $10 \mu\text{m}$ 的A β 斑块, 检出率为 $97.71\% \pm 0.18\%$; 这使得在

图 3 $A\beta$ 斑块全脑三维分布数据集的获取和结果. A: 全脑染色、三维数据获取、定量分析的工作流程示意图; B: AD小鼠全脑数据集中, 间隔抽取50 μm 厚的连续冠状面做最大值投影的结果, 红色斑点为 $A\beta$ 斑, 标尺: 1 mm; C: 从外侧到中线, 以不同矢状面展示全脑数据集重切片的结果(100 μm 厚的最大值投影), 标尺: 1 mm; D: $A\beta$ 斑块在不同脑区的三维空间分布, 数据块分别来自图B蓝色线框示意位置, 尺寸均为200 $\mu\text{m}\times 200 \mu\text{m}\times 200 \mu\text{m}$. 缩写: ENTl, entorhinal area, lateral part, 内嗅皮层

Figure 3 Acquisition of the 3D dataset of whole brain amyloid plaques. A: The workflow for labeling, imaging and quantifying whole brain amyloid plaques. B: Maximum intensity projections of the representative coronal planes of amyloid plaque distribution in 50 μm thickness; red dots indicate $A\beta$; scale bar: 1 mm. C: Maximum intensity projections of the representative sagittal planes of amyloid plaque distribution from the lateral side to the middle side in 100 μm thickness; scale bar: 1 mm. D: The 3D rendering of the amyloid plaque data blocks from different brain regions (blue squares from B); 3D data blocks, 200 $\mu\text{m}\times 200 \mu\text{m}\times 200 \mu\text{m}$. Abbreviations: ENTl, entorhinal area, lateral part

图 4 NeuroGPS算法自动计数的准确性. A: NeuroGPS算法对斑块的自动识别与定位, 蓝色箭头为自动识别的A β 斑块, 黄色箭头指示未被自动识别的A β 斑块, 数据块大小为200 μm ×200 μm ×200 μm ; B: 100 μm 的最大值投影图, 红点为自动算法定位的斑块中心点, 标尺: 40 μm ; C: 自动计数准确率的统计结果($n=5$), 青色和黄色分别表示召回率和精确度; 缩写: MOp, primary motor area, 初级运动皮层

Figure 4 Accuracy of the NeuroGPS algorithm for the automated counting of A β s. A: Amyloid plaque counting within the data block using the NeuroGPS algorithm; the blue arrows indicate the automatically counted A β s, and the yellow arrows indicate the undetected A β s; 3D data blocks, 200 μm ×200 μm ×200 μm . B: The 100 μm thickness maximum intensity projection of this data block, as detected by the NeuroGPS algorithm; scale bar, 40 μm . C: The accuracy of amyloid plaque counting using the NeuroGPS algorithm; the cyan columns indicate the recall value, and the orange columns indicate the precision value ($n=5$ data blocks for each brain region). Abbreviations: MOp, primary motor area

全脑范围内精准定量研究A β 斑块的分布成为可能. 虽然本方法对直径小于10 μm 的A β 斑块的染色准确性稍差, 但与免疫组化共标的染色比例仍达到85.54%±0.81%, 具有较高的可信度. 与传统做法相比, 本文发展的方法实现了快速、准确和经济地标记全脑范围内的A β 斑块.

已有的研究表明, AD疾病是渐进性变化, 且不同脑区内A β 斑块的分布和三维精细形态存在显著性差别^[5,6]. 常规方法是全脑用手工切片和逐片做免疫组化染色, 因不同脑片在处理过程中会引起不同的形变, 导致获取全脑信息时存在图像配准困难、工作量巨大等问题. 近年来, 有研究利用三维成像技术结合在体探针标记或全脑免疫组化获取了A β 斑块三维数据

集^[7,9,15~17], 但存在着检测效率低、或价格昂贵、耗时长、深部脑区探测精度低等不足. fMOST技术已被证实能够在亚微米分辨水平对小鼠全脑内的神经元和轴突进行成像^[18~20,36]. 本文将fMOST成像方法应用于荧光标记A β 的小鼠全脑样本, 以0.32 μm ×0.32 μm ×2 μm 分辨率实现了小鼠全脑A β 斑块精细信息的获取, 并结合全脑配准、脑区分割以及自动计数等方法的运用, 首次在小鼠全脑范围、按脑区/核团的三维轮廓划分出立体区域、对90个亚区内的A β 斑块数量及密度进行了统计.

综上, 本研究建立了一套在哺乳动物全脑三维空间、以亚微米分辨率准确定位识别和定量统计A β 斑块的方法, 有望为“阿尔兹海默症疾病机理和药物研发

图 5 全脑不同脑区内定量统计 $\text{A}\beta$ 斑块密度的结果。A: $\text{A}\beta$ 斑块的全脑空间分布, 不同颜色点代表不同脑区内检测出的斑块中心点; B, C: 海马区域三维空间分布, 红点代表斑块中心点, 标尺: 1 mm; D: 12个脑区中 $\text{A}\beta$ 斑块的分布密度; E: 不同亚区中 $\text{A}\beta$ 斑块的分布密度; D图和E图对同一脑区的结果采用了同样的色彩进行显示。F: $\text{A}\beta$ 斑块在皮层第一层到第六层的分布, 标尺: 100 μm ; G: 皮层不同亚层内 $\text{A}\beta$ 斑块的分布密度。缩写: AUD, auditory areas, 听觉皮层; ACA, anterior cingulate area, 前扣带回皮层; CTXsp, cortical subplate, 皮质基板; CB, cerebellum, 小脑; HPF, hippocampal formation, 海马体; HY, hypothalamus, 下丘脑; MB, midbrain, 中脑; MY, medulla, 延髓; MOs, secondary motor area, 次级运动皮层; OLF, olfactory areas, 嗅觉; PAL, pallidum, 苍白球; P, pons, 脑桥; RSP, retrosplenial area, 后扣带回皮层; STR, striatum, 纹状体; SSs, supplemental somatosensory area, 次级躯体感觉皮层; VIS, visual areas, 视觉皮层

Figure 5 Quantitative analysis of the whole brain distribution of amyloid plaques. A: The 3D rendering of the whole brain dataset of amyloid plaques in 10-month-old 5XFAD mice. Dots in different colors represent the centers of $\text{A}\beta$ s in different regions. B, C: The anatomical localization and the $\text{A}\beta$ distribution in HPF, the red dots represent the centers of $\text{A}\beta$ s; scale bar: 1 mm. D: Amyloid plaque densities in 12 major brain regions. The color definitions are the same as those shown in A. E: Quantitative statistics of amyloid plaque densities in 90 subregions of the above-mentioned 12 major brain regions. F: A representative image of the different amyloid plaque densities in different cortical layers; scale bar, 100 μm . G: Quantitative statistics of amyloid plaque densities in different cortical layers of the neocortex. Abbreviations: AUD, auditory areas; ACA, anterior cingulate area; CTXsp, cortical subplate; CB, cerebellum; HPF, hippocampal formation; HY, hypothalamus; MB, midbrain; MY, medulla; MOs, secondary motor area; OLF, olfactory areas; PAL, pallidum; P, pons; RSP, retrosplenial area; STR, striatum; SSs, supplemental somatosensory area; VIS, visual areas

等提供全面、高效的定量化研究手段。通过全脑空间精细信息的整合^[37], 对比不同模式下脑部结构与功能的差异, 有助于系统性研究脑部疾病及大脑发育的机

制, 有望为脑部重大疾病如神经遗传与发育性疾病(自闭症等)、精神性疾病(抑郁症等)和神经退行性疾病(阿尔兹海默症等)的临床防治提供关键性技术支撑。

致谢 感谢武汉光电国家研究中心、Britton Chance生物医学光子学研究中心周灿在双光子成像实验中的帮助, 感谢余洁、陈昊在图像预处理方面的帮助, 感谢全廷伟、李宇昕、倪鸿提供的自动计算、三维配准工具, 感谢华中科技大学生物光学成像研究平台对数据获取的支持。特别感谢北京大学张晨教授、田永路博士提供的5XFAD转基因小鼠。

参考文献

- 1 Nussbaum R L, Ellis C E. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *New England J Med*, 2003, 348: 1356–1364
- 2 Goedert M, Spillantini M G. A century of Alzheimer's disease. *Science*, 2006, 314: 777–781
- 3 Barage S H, Sonawane K D. Amyloid cascade hypothesis: pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, 2015, 52: 1–18
- 4 Musiek E S, Holtzman D M. Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and “wingmen”. *Nat Neurosci*, 2015, 18: 800–806
- 5 Duyckaerts C, Delatour B, Potier M C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*, 2009, 118: 5–36
- 6 Lesné S E, Sherman M A, Grant M, et al. Brain amyloid- β oligomers in ageing and Alzheimer's disease. *Brain*, 2013, 136: 1383–1398
- 7 Jährling N, Becker K, Wegenast-Braun B M, et al. Cerebral β -amyloidosis in mice investigated by ultramicroscopy. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0125418
- 8 Amato S P, Pan F, Schwartz J, et al. Whole brain imaging with serial two-photon tomography. *Front Neuroanat*, 2016, 10: 31
- 9 Liebmann T, Renier N, Bettayeb K, et al. Three-dimensional study of Alzheimer's disease hallmarks using the iDISCO clearing method. *Cell Rep*, 2016, 16: 1138–1152
- 10 Whitesell J D, Buckley A R, Knox J E, et al. Whole brain imaging reveals distinct spatial patterns of amyloid beta deposition in three mouse models of Alzheimer's disease. *bioRxiv*, 2018, doi: 10.1101/395236
- 11 Osten P, Margrie T W. Mapping brain circuitry with a light microscope. *Nat Methods*, 2013, 10: 515–523
- 12 Yuan J, Gong H, Li A, et al. Visible rodent brain-wide networks at single-neuron resolution. *Front Neuroanat*, 2015, 9: 70
- 13 Richardson D S, Lichtman J W. Clarifying tissue clearing. *Cell*, 2015, 162: 246–257
- 14 Kim S Y, Chung K, Deisseroth K. Light microscopy mapping of connections in the intact brain. *Trends Cogn Sci*, 2013, 17: 596–599
- 15 Ando K, Laborde Q, Lazar A, et al. Inside Alzheimer brain with CLARITY: senile plaques, neurofibrillary tangles and axons in 3-D. *Acta Neuropathol*, 2014, 128: 457–459
- 16 Hama H, Hioki H, Namiki K, et al. ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci*, 2015, 18: 1518–1529
- 17 Canter R G, Choi H, Wang J, et al. 3D Mapping reveals network-specific amyloid progression and subcortical susceptibility. *bioRxiv*, 2017, doi: 10.1101/116244
- 18 Gong H, Zeng S, Yan C, et al. Continuously tracing brain-wide long-distance axonal projections in mice at a one-micron voxel resolution. *NeuroImage*, 2013, 74: 87–98
- 19 Gong H, Xu D, Yuan J, et al. High-throughput dual-colour precision imaging for brain-wide connectome with cytoarchitectonic landmarks at the cellular level. *Nat Commun*, 2016, 7: 12142
- 20 Jiang T, Long B, Gong H, et al. A platform for efficient identification of molecular phenotypes of brain-wide neural circuits. *Sci Rep*, 2017, 7: 13891
- 21 Oakley H, Cole S L, Logan S, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*, 2006, 26: 10129–10140
- 22 Quan T, Zheng T, Yang Z, et al. NeuroGPS: automated localization of neurons for brain circuits using L1 minimization model. *Sci Rep*, 2013, 3: 1414
- 23 Ni H, Tan C, Feng Z, et al. A robust image registration interface for large volume brain atlas. *bioRxiv*, 2018, doi: 10.1101/377044
- 24 Fu H, Tu P, Zhao L, et al. Amyloid- β deposits target efficient near-infrared fluorescent probes: synthesis, *in vitro* evaluation, and *in vivo* imaging. *Anal Chem*, 2016, 88: 1944–1950
- 25 Seiriki K, Kasai A, Hashimoto T, et al. High-speed and scalable whole-brain imaging in rodents and primates. *Neuron*, 2017, 94: 1085–1100.e6
- 26 Youmans K L, Tai L M, Kanekiyo T, et al. Intraneuronal A β detection in 5xFAD mice by a new A β -specific antibody. *Mol Neurodegener*, 2012, 7: 8
- 27 He Y, Meng Y, Gong H, et al. An automated three-dimensional detection and segmentation method for touching cells by integrating concave points clustering and random walker algorithm. *PLoS ONE*, 2014, 9: e104437
- 28 Li Y, Gong H, Yang X, et al. TDat: an efficient platform for processing petabyte-scale whole-brain volumetric images. *Front Neural Circuits*, 2017, 11: 51
- 29 Kuan L, Li Y, Lau C, et al. Neuroinformatics of the Allen mouse brain connectivity atlas. *Methods*, 2015, 73: 4–17

- 30 Dong H. The Allen reference atlas: a digital color brain atlas of the C57BL/6J male mouse. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008
- 31 Peng J, Long B, Yuan J, et al. A quantitative analysis of the distribution of CRH Neurons in whole mouse brain. *Front Neuroanat*, 2017, 11: 63
- 32 Zhang C, Yan C, Ren M, et al. A platform for stereological quantitative analysis of the brain-wide distribution of type-specific neurons. *Sci Rep*, 2017, 7: 14334
- 33 Serrano-Pozo A, Mielke M L, Muzitansky A, et al. Stable size distribution of amyloid plaques over the course of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2012, 71: 694–701
- 34 Bittner T, Burgold S, Dorostkar M M, et al. Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss. *Acta Neuropathol*, 2012, 124: 797–807
- 35 Hefendehl J K, Wegenast-Braun B M, Liebig C, et al. Long-term *in vivo* imaging of β -amyloid plaque appearance and growth in a mouse model of cerebral β -amyloidosis. *J Neurosci*, 2011, 31: 624–629
- 36 Li X, Yu B, Sun Q, et al. Generation of a whole-brain atlas for the cholinergic system and mesoscopic projectome analysis of basal forebrain cholinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 415–420
- 37 Luo Q M. Brainsmatics—bridging the brain science and brain-inspired artificial intelligence (in Chinese). *Sci Sin-Vitae*, 2017, 47: 1015–1024 [骆清铭. 脑空间信息学—连接脑科学与类脑人工智能的桥梁. *中国科学: 生命科学*, 2017, 47: 1015–1024]

Three-dimensional quantitative analysis of amyloid plaques in the whole brain with high voxel resolution

LONG Ben^{1,2}, LI XiangNing^{1,2,3}, ZHANG JianPing^{1,2}, CHEN SiQi^{1,2}, LI WenWei^{1,2}, ZHONG QiuYuan^{1,2}, LI AnAn^{1,2,3}, GONG Hui^{1,2,3} & LUO QingMing^{1,2}

1 Britton Chance Center for Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics-Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

2 MoE Key Laboratory for Biomedical Photonics, School of Engineering Sciences, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

3 HUST-Suzhou Institute for Brainsmatics, Suzhou 215125, China

Amyloidosis of the central nervous system is one of the main pathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD). Changes in the number and the load of amyloid plaque (A β) deposition are important indicators of the progression of AD. However, the quantitative analysis of amyloidosis at the subcellular level in the whole brain remains a substantial challenge. In this study, an automatic analysis method was established for assessing amyloid plaques in the whole brain, including convenient whole brain labeling, imaging with a fluorescence micro-optical sectioning tomography system (fMOST) and an automated three-dimensional (3D) analysis method. Validation using immunostaining showed that the detection rate of amyloid plaques larger than 10 μm was 97.71% $\pm$ 0.18%. We achieved a 3D dataset of amyloid plaques in the whole brain of a 5XFAD transgenic mouse at a resolution of 0.32 μm $\times$ 0.32 μm $\times$ 2 μm and quantitatively analyzed the 3D distribution of amyloid plaques in different brain regions and nuclei through automated registration, segmentation and counting. The results indicated that the combination of the fMOST system with a whole brain staining method enables the acquisition and quantitative analysis of a brain-wide dataset of amyloid plaques, which may contribute to elucidating the underlying pathogenesis of AD and therapeutic drug discovery.

Alzheimer's disease, β -amyloid plaques, whole-brain, fluorescence micro-optical sectioning tomography (fMOST), brainsmatics

doi: 10.1360/N052019-00001