

## · 讲座 ·

## 脑卒中实验动物的行为学检测方法

李红玲<sup>1</sup> 赵巧艳<sup>1</sup> 王红莲<sup>1</sup> 李春岩<sup>1,2</sup>

一系列用于评测单侧脑损伤后急性或慢性期感觉运动功能和可塑性的试验已被设计应用, 这些试验对研究中枢神经系统感觉运动区的功能恢复和评价行为结果或药物干预的疗效非常有用<sup>[1]</sup>。现将脑梗死或脑出血实验动物(大鼠或小鼠)常用的行为评测方法介绍如下。

### 1 Longa 评分法<sup>[2]</sup>

0 分: 无神经损伤症状; 1 分: 不能完全伸展手术对侧前爪或后爪; 2 分: 行走时, 向手术对侧转圈; 3 分: 行走时, 向手术对侧倾倒; 4 分: 不能自行行走, 意识丧失。

### 2 Bederson 评分<sup>[3]</sup>

轻抓大鼠尾巴, 提起高于桌面 10cm, 正常大鼠两个前爪伸向桌面。脑损伤大鼠, 其对侧前肢屈曲, 姿势变化从轻度屈腕、伸肘、肩外展, 到严重的腕肘屈曲、肩内旋外展。将大鼠放在一张大、软、有弹性、光滑的记录纸上, 利于爪子抓牢。然后提起尾部, 用手轻推大鼠肩部, 直到前肢滑动几厘米。这一动作在不同方向重复数次。正常或轻度功能障碍的大鼠, 会在不同方向以同样的力抵抗推力。此试验需 3—5min。0 分: 无神经功能缺损; 1 分: 前肢出现任何屈曲成分(即提尾悬空实验阳性), 不伴其他不正常; 2 分: 侧推抵抗力下降(即侧向推力实验阳性), 伴前肢屈曲, 无转圈行为; 3 分: 同 2 级行为, 伴自发性旋转(自由活动向瘫痪侧划圈)。

### 3 平衡木行走试验 (beam-walking test)<sup>[4]</sup>

测定运动整合及协调能力, 平衡木长 80cm, 宽 2.5cm, 平放在距离地面高 10cm 处, 按 Feeney 的记分标准: 0 分: 穿过平衡木, 不会跌倒; 1 分: 穿过平衡木, 跌倒机会少于 50%; 2 分: 穿过平衡木, 跌倒机会大于 50%; 3 分: 能穿过平衡木, 但受累的瘫痪侧后肢不能帮助向前移动; 4 分: 不能穿过平衡木, 但可坐在上面; 5 分: 将大鼠放在平衡木上会掉下来。

### 4 转棒上行走 (rotating-rod walking)<sup>[5]</sup>

转棒长 150cm, 直径 4.5cm, 其中点固定在 3r/min 的转动器上, 分别向左右交替转动, 可评估和训练动态平衡。把大鼠放在转棒上观察: 0 分: 转动过程中, 大鼠可在棒上行走; 1 分: 转动过程中, 大鼠不会掉下来, 时间 60s 以上; 2 分: 转动开始后大鼠从棒上掉下来; 3 分: 转动开始前, 大鼠就从棒上掉下来。

### 5 肌力测验 (或双侧前爪抓握, bilateral forepaws grasp)<sup>[6]</sup>

直径 0.15mm 铁丝绳, 长 46cm, 置于距地面 70cm 高度上, 其下放高 3.5cm 泡沫箱。将大鼠两个前爪放在绳上, 放开, 记录大鼠在绳上的时间。0 分: 挂在绳上 0—2s; 1 分: 挂在

绳上 3—4s; 2 分: 挂在绳上 5s; 3 分: 挂在绳上 5s, 将后腿放在绳上。

### 6 网屏实验<sup>[5]</sup>

网屏为 50cm×40cm 网带, 网眼为 1cm×1cm, 网板的左右和上方都用 25cm 高的木条框边, 网屏距地面高度为 80cm, 下方铺以 12cm 厚的海绵, 先将网屏水平放置, 将大鼠放在其上, 然后缓缓地将其一端抬高, 在 2s 内将此网屏变成垂直位, 保持 5s, 观察是否掉下来或用前爪抓握网屏情况。从而客观评价前爪抓握能力和肌力。0 分: 前爪握住网屏大约 5s 之久, 不会掉下来; 1 分: 暂时握住网屏, 滑落一段距离, 但没有掉下来; 2 分: 在 5s 内掉下来; 3 分: 在网屏转动时, 大鼠即刻掉下来。

### 7 肢体对称试验评分法 (limb symmetry test)<sup>[7]</sup>

将大鼠置于网中, 网眼大小为 2.3cm×2.3cm, 当大鼠在网格中行走时, 计数在 2min 内其前爪漏到网眼中的次数, 即错步数。计算公式: (脑病变对侧前爪的错步数-病变同侧前爪的错步数)/总步数。其分值如为正数表明脑病变对侧功能缺损, 如为负数表明脑病变同侧功能缺损。

### 8 肢体放置试验 (limb placement test)<sup>[8]</sup>

0 分: 无放置; 1 分: 不完全或延迟(大于 2s)放置; 2 分: 立刻并正确放置。

试验 1: 在距桌面 10 cm 高处, 缓慢放大鼠于桌面上, 正常表现为前肢伸展并放在桌面上。试验 2: 大鼠前肢接触桌缘, 头向上 45°, 用下颌支持以防鼻子和鼻毛接触桌面。试验 3: 观察大鼠前肢在面對桌缘时如何放置, 正常大鼠双前肢放在桌面上。试验 4: 观察大鼠身体一侧朝向桌缘移动时, 前后肢的放置。试验 5: 大鼠放在桌子上, 轻轻从后向前推向桌缘, 正常大鼠将抓住桌缘, 病变大鼠前肢掉下。试验 6: 与实验 5 方法相同, 但大鼠推向后桌缘。上述 6 个试验评测前肢, 后肢只在试验 4 和试验 6 中被评测。躯体一侧最高得 16 分。

### 9 前肢放置检测 (measurement of forelimb placing)<sup>[11]</sup>

检查者手持大鼠背部皮肤使四肢悬空, 将胡须刷触桌面角边缘, 测试同侧前肢的活动情况, 未受损者可将前肢迅速放到桌面, 脑损伤时此动作有不同程度的损害。大鼠每侧受

1 河北医科大学第二医院康复科, 河北省石家庄市和平西路 215 号, 050000

2 通讯作者: 李春岩(河北医科大学第二医院神经内科, 河北省石家庄市和平西路 215 号, 050000)

作者简介: 李红玲, 女, 主任医师, 硕士研究生导师, 在读博士

收稿日期: 2005-07-05

测 10 次, 前肢触及桌面角边缘次数的百分率即为该侧得分。抓握大鼠要轻柔, 前肢自由悬垂, 试验前轻轻上下活动大鼠, 尽量让其放松, 如大鼠挣扎, 肌肉紧张或肢体放在试验者手上不记在内。张朋奇等<sup>[9]</sup>认为, 此方法对脑出血行为学的观察较好, 能够反映中枢神经系统损伤后的感觉与运动功能障碍且较敏感, 脑出血 1 周时(仍与对照组差异有显著性意义)可继续反映神经系统受损的体征, 可作为检查大鼠脑出血后较长时间康复治疗效果的方法。而 Bederson 评分在脑出血后 48h 和 72h 差异有显著性意义, 只能持续到第 5 天。

#### 10 修订的前肢放置失败试验 (a modified forelimb foot fault placing test)<sup>[10]</sup>

用于检测前肢功能。一个距地面高 100cm 的格状平面 (10×110)cm<sup>2</sup>, 分隔线直径为 1.0mm, 网眼 9cm<sup>2</sup>, 网格末端与平台 (15×20)cm<sup>2</sup> 相连。在每次实验中要鼓励大鼠, 用声音或刺激让其穿过格子平面。偶尔, 动物会将前肢放入格孔中, 这些错误即前肢放置失败, 记录 1min 内的错误数。

#### 11 平行杠 (parallel bar testing)<sup>[10]</sup>

检测后肢的协调能力, 工具是两个平行杠 (直径 1.0cm, 长 115cm, 间距为 2.5cm, 末端连接在平台上 (15×50)cm<sup>2</sup>。记录双后肢在一个平行杠上的时间, 一只后爪掉下平行杠或摔倒、摇摆等情况, 记录每分钟每米的错误数。

#### 12 爬绳试验 (the rope climbing test)<sup>[10]</sup>

检测双前肢和后肢的协调性。一条直径为 1.5cm 编制的绳索, 从平台 (15×50)cm<sup>2</sup> 上悬吊 1m 高, 实验前训练大鼠爬 1/3 长, 然后记录爬绳失败次数及完成所用时间。

#### 13 梯试验 (ladder climbing test)<sup>[10]</sup>

方法同上, 用一根木棍, 直立 1m 高, 每隔 3cm 放一个木棒做梯子, 记录大鼠爬梯失败次数及完成爬梯所用时间。

#### 14 爬行试验 (a climbing test)<sup>[8]</sup>

用宽 80mm, 高 153mm, 倾斜 81° 的梯子, 记录大鼠开始爬行的时间及整个爬行时间。每个实验包括 3 个连续的爬行, 时间上限为 90s。

#### 15 前爪伸屈试验 (paw reaching test)<sup>[8]</sup>

用一特制的树脂玻璃盒, 中心部竖起一平台, 侧方为一个带有 6 个台阶的梯子。每级台阶上放 8 个 45mg 食物做成的食饵。将禁食 24h 的动物放在平台上, 记录 20min 内大鼠用左右爪抓取食团的数量。

#### 16 移动和站立活动 (locomotor and rearing)<sup>[8]</sup>

活动场地用聚乙烯塑料制成, 底部 47.5cm×35.5cm 大小, 装在木制笼子附近, 每个笼子顶部为一个半透明窗子, 其中部装有一个黑白充电照相机, 站立活动检测器安装在每个笼子的侧壁上, 由红外线发光二极管和光电二极管构成 48 个间隔 1cm 的红外电子束分布在动物的活动场地。检测器高度

可调, 实验高度为 12.5cm, 7 个带有试验场地的笼子、录像装置和 7 个进行同步照相分析的检测器, 来自照相机和检测器的信号被加工后输入美国康派克公司生产的控制器内。记录时间为 4 个连续 15min, 在盒子中心和周围部位 (盒子每边 6cm 范围) 所探测的距离数字, 应用 CCDACT 软件进行分析, 动物的移动应用 STAT 分析, 站立活动应用 STATR 分析。

#### 17 跑梯试验 (ladder rung walking task)<sup>[11-12]</sup>

用于评测感觉运动功能的失去和恢复。大鼠自发步行, 从开始处沿水平梯子 (每个横撑间间距不等) 到达目标点, 每个横撑的安排应是变化的, 以预防动物学习, 照相机放在侧腹面以记录动物完成情况, 爪的活动同时被记录, 然后进行分析。

试验前 1 天, 大鼠被训练如何穿越梯子, 用一个与训练梯同样的方式学习, 但在试验时则用一个不规则的梯子, 每个试验要穿越 5 次。然后将结果记录并分析, 0—6 七个级别: 0, 完全不能; 1, 明显掉落; 2, 轻度滑掉; 3, 重新放置; 4, 错误放置; 5, 部分放置; 6, 正确放置。错误得分=错误数/总数×100

#### 18 技巧性前肢应用 (skill forelimb use)<sup>[13]</sup>

一个升高的平台, 两边有一系列小的下降的阶梯, 每个阶梯上有 3 个食团, 设计为: 仅用左爪取左侧梯子上的食物, 右侧的食团用右爪抓取。前爪灵活性的检测可通过记录每个爪子取食物的次数。手术前可训练大鼠抓取食物, 然后将被剥夺食物的大鼠 (自由喂养大鼠体重的 85%) 放在阶梯试验房中, 每天 2 次, 每次 15 min, 共 8 天。脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 后每天进行 2 次训练, 5 个成功天后, 记录最后 5 个试验中每侧爪子抓取食物的次数作为前爪的灵活性评估。感觉忽略的试验也可进行此评估。

#### 19 认知功能评测 (cognitive function evaluation)<sup>[14]</sup>

大脑尾状核、皮层和纹状区对运动-感觉信息的处理和整合起一定作用。这些区域在大脑中动脉梗死后很容易受损, 并累及周围区域如肢体的皮层、额叶和颞叶。所以, 大鼠缺血损伤后不仅应用一系列简单实验评估一般感觉和运动功能, 如肢体放置实验、穿越窄平衡杠、不同形状的网地板、身体触觉探索反应 (如在倒立的隔板或转棒上保持姿势)、姿势反射等。一些研究还将认知试验加入评估中。有证据表明认知缺陷可持续超过一般的运动缺陷。

工作和参考记忆试验 (working and reference memory tests) 包括 Morris 水迷宫 (Morris water maze)、放射状迷宫 (the radial arm maze) 和 T 迷宫 (T-maze), 每个试验都是工作和参考记忆的组合。工作记忆是信息的短期记忆; 参考记忆是空间定向和定位能力。

##### 19.1 水迷宫

动物放入水中去发现一个藏于浑浊水面 (加入牛奶或涂料) 下的一个平台。找不到平台者表示有参考记忆缺陷, 可通过增加平台在水中的深度测量完成情况。一般用沙鼠 (不会游泳), 先在浅水中学习, 习惯后再进入深水, 否则会惊慌下沉。这一实验对缺血敏感<sup>[14]</sup>。

水迷宫广泛用于评价空间学习能力。将大鼠放在一个直径 2m, 水温 25℃ 的池子内, 距水面 2cm 处放一直径 10cm 逃离平台。随机将大鼠放在池子的东、南、西、北 4 个不同点。然后用一自动跟踪系统记录大鼠发现平台的潜伏时间和游泳距离、寻找目标的角度、在每个象限和周围花费的时间及游泳的速度。试验前先对大鼠进行训练, 2 次/天, 每次 60s, 连续 12 天。水迷宫多在缺血性卒中 12—14 周时进行<sup>[15]</sup>。

## 19.2 放射状迷宫

本试验用于检测沙鼠的参考记忆和工作记忆。中心区域连接有 8 个手臂样放射棒, 其中 4 个用于装食饵, 其他用于试验。一旦动物知道哪些放射棒上有食饵, 最有效的方法就是只去访问有食饵反馈的放射棒。计算沙鼠接近有食物和无食物放射棒的比率, 用于测量参考记忆功能。整个实验中, 不会再加食物, 因此, 再次访问同一放射棒即为工作记忆的一次错误。这些缺陷不只是记忆问题, 还有意识和更常见的运动缺损存在。此试验可为神经保护性治疗提供疗效依据<sup>[14]</sup>。

## 19.3 T 迷宫

用于工作记忆评测。收集第一个试验的信息以保证第二个试验的成功。大多数版本, 这一任务是允许动物接近一个迷宫的分支, 以获取食物, 在第二个实验中是动物可以接近 2 个迷宫分支, 但如果进入相反的分支, 只能获取一个食物回报。再次进入已访问过的分支(第一个实验中)记为一次错误。工作记忆成分是动物必须记忆哪个分支在第一个实验中进入过, 以便在第二次实验时进入相反的分支。通过增加延长 2 个实验的时间间隔来增加任务难度, 但随时间延长, 准确信息会下降。低温湿治疗可改善此任务技能, 并降低工作记忆出错率<sup>[14]</sup>。

上述 3 个实验的缺点是耗时, 训练和检测均需要长时间完成。因此多种治疗组的大研究不能接受这类实验。一旦某治疗因素可以提供组织学上的保护时, 其亚组动物可用此实验观察组织保护是否可产生功能保护。

## 20 小结

上述实验只能检测缺损后几天或 1—2 周的情况, 楼梯实验可提供一个手指灵活性的检测方法<sup>[16]</sup>。问题是啮齿动物比人类有更大的恢复潜力。许多行为实验在检测功能缺陷时, 表现出足够的敏感性, 同时也存在着广泛的偏差, 有些病例组织学结果和行为学实验相关<sup>[17]</sup>, 另一些则无关或相反<sup>[18-20]</sup>。需要告诫的是: 一种理想的体现神经保护或缺损的方法应是多种方法的综合<sup>[21-24]</sup>。

## 参考文献

- [1] Hua Y, Schallert T, Keep RF, et al. Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat[J]. *Stroke*, 2002,33(10):2478—2484.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. *Stroke*, 1989,20(1):84—91.
- [3] Bederson JB, Pitlis LH, Tsun M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986;17(3):472—476.
- [4] Altumbabic M, Peeling J, Bigio MRD, et al. Intracerebral hemorrhage in the rat: effects of hematoma aspiration [J]. *Stroke*, 1998,29 :1917—1923.

- [5] 徐莉, 李玲, 陈景藻, 等. 康复训练对大鼠脑梗塞神经功能恢复的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2000,22(2):86—88.
- [6] Dean RL, Scozafava J, Goas JA, et al. Age related differences in behavior across the life span of the C57BL/6J mouse[J]. *Exp Aging Res*, 1981,7:427—451.
- [7] Sondra T, Bland BA, Schallert T, et al. Early exclusive use of the affected forelimb after moderate transient focal ischemia in rat: function and anatomic outcome [J]. *Stroke*, 2000,31:1144—1164.
- [8] Anna-Lena Ohlsson, Barbro B, Johansson. Environment influence functional outcome of cerebral infarction in rats [J]. *Stroke*, 1995,26:644—649.
- [9] 张朋奇, 朱贤立, 赵甲山, 等. 一种大鼠脑内模型的建立与评价[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2005,10(1):33—35.
- [10] Ding J, Li Q, Lai J, et al. Motor balance and coordination training enhances functional outcome in rat with transient middle cerebral artery occlusion [J]. *Neuroscience*, 2004,123:667—674.
- [11] Monika RB, Petra HN, Gerlinde AM, et al. Detection of chronic sensorimotor impairments in the ladder rung walking task in rat with endothelin-1-induced mild focal ischemia[J]. *J Neurosci Methods*, 2004,137:227—233.
- [12] Metz GA, Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder running walking test : a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing and co-ordination[J]. *J Neurosci Methods*, 2002,115:169—179.
- [13] James Peeling, Yan HJ, Dale Corbett, et al. Effect of FK-506 on inflammation and behavioral outcome following intracerebral hemorrhage in rat [J]. *Experimental Neurology*, 2001,167:341—347.
- [14] Dale Corbett, Suzanne Nurse. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia [J]. *Progress in Neurobiology*, 1998,54:531—548.
- [15] Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions [J]. *Nature*, 1982,297:681—683.
- [16] Montoya C, Campbell-Hope L, Pemberton K, et al. The “staircase test” a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats [J]. *J Neurosci Methods*, 1993,36:219—228.
- [17] Hirakawa M, Tamura A, Nagashima H, et al. Disturbance of retention of memory after focal cerebral ischemia in rats[J]. *Stroke*, 1994,25:2471—2475.
- [18] Smith S, Hodges H, Sowinski P, et al. Long-term beneficial effects of BW619C89 on neurological deficit, cognitive deficit and brain damage after middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. *Neuroscience*, 1997,77:1123—1135.
- [19] Yonemori F, Yamada H, Yamaguchi T, et al. A spatial memory disturbance after focal cerebral ischemia in rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996,16:973—980.
- [20] Grabowski M, Brundkin P, Johansson B. Pawreaching, sensorimotor, and rotational behavior after brain infarction in rats[J]. *Stroke*, 1993,24:889—895.
- [21] Nurse S, Corbett D. Direct measurement of brain temperature during and after intraischemic hypothermia: correlation with behavioral, physiological and histological endpoints[J]. *J Neurosci*, 1994,14:7726—7734.
- [22] Dooley P, Evans S, Wells J, et al. Ischemic preconditioning conveys diminishing histological protection concurrent with recovery of function[J]. *Neurosci Abst*, 1996,22:656—664.
- [23] Colbourne F, Corbett D. Delayed postischemic hypothermia: a six month survival study using behavioral and histological assessments of neuroprotection [J]. *J Neurosci*, 1995,15:7250—7260.
- [24] Okada M, Tamura A, Urae A, et al. Long-term spatial cognitive impairment following middle cerebral artery occlusion in rats. A behavioral study [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1995,15:505—512.