

神经行为学检测和改良 BBB 运动功能评定在脑瘫大鼠运动功能评定中的应用*

李晓捷^{1,2} 郭岚敏^{1,2}

摘要 目的:探讨脑瘫大鼠运动功能评价的最佳方法。方法:采用孕鼠腹腔注射 LPS 制备脑瘫动物模型,随机选取对照组(A 组)足月仔鼠 60 只,LPS 组足月仔鼠 120 只分为早期干预组(B₁ 组)和非干预组(B₂ 组)各 60 只。各组于生后 25d 进行神经行为学检测,B₁ 组中检测出的 CP 鼠(B_{ICP} 组)继续早期干预,B₂ 组中检测出的 CP 鼠(B_{2CP} 组)常规饲养,A 组中随机选取 10 只鼠作为对照组(A' 组);A' 组、B_{ICP} 组和 B_{2CP} 组仔鼠分别于 25d 及 42d 进行神经行为学检测和运动功能评定。结果:①25d B₁ 组鉴定出 7 只 CP 鼠,B₂ 组 13 只 CP 鼠,A 组中无 CP 鼠。②B_{ICP} 组第 25 天与第 42 天各项检测结果比较:悬吊试验、斜坡试验、旷场实验、拒捕反应及改良的 BBB 运动功能评分均有显著性差异($P < 0.01$);B_{2CP} 组和 A' 组大鼠 25d 与 42d 各项检测结果比较无显著性差异($P > 0.05$)。结论:①神经行为学检测可有效鉴定 CP 大鼠的运动功能。②改良 BBB 运动功能评定适用于 CP 大鼠的运动功能评定。③联合应用神经行为学检测与改良 BBB 运动功能评定可全面反映 CP 大鼠运动功能状况。

关键词 早期干预;宫内感染;脑性瘫痪;运动功能评定;Basso-Beattie-Bresnahan 运动功能评定

中图分类号:R742.3, R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-12-1067-04

Application and analyses of neuroethology detection and modified BBB moving function evaluation on estimating cerebral palsy rats'/LI Xiaojie, GUO Lanmin//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2008,23 (12): 1067—1070

Abstract Objective: To explore the best methods to evaluate the motor function of cerebral palsy rats. **Method:** Intraperitoneal injection of LPS was used in pregnant rats to make cerebral palsy model. Sixty full-term neonatal rats were selected as control group (Group A); 120 rats from LPS group were divided randomly and averagely into a intervention group (Group B₁) and a non-intervention group (Group B₂). 25th days after birth, neuroethology examination was taken in each group to identify CP rats. The CP rats in Group B₁ (Group B_{ICP}) continuously received early intervention, while these ones in Group B₂(Group B_{2CP}) were fed normally; and 10 rats were randomly selected from Group A as control group (Group A'). Neuroethology examination and motor function assessment were taken in Group A', Group B_{ICP} and Group B_{2CP} respectively at 25th days and 42nd days after birth. **Result:** ① 7 CP rats were identified in Group B₁, 13 ones in Group B₂, and none in Group A on 25th d. ② The scores of hanging test, slopes test, open-field experiments, resist capture reaction and improved BBB motor function assessment showed significant difference ($P < 0.01$) in Group B_{ICP} between 25th d and 42nd d. There was no significant difference ($P > 0.05$) in Group B_{2CP} and Group A'. **Conclusion:** ① Neuroethology examination could evaluate the motor function of CP rats. ② Improved BBB motor function assessment could be used to evaluate motor function in CP rats. ③ Combing application of neuroethology examination and improved BBB motor function assessment could reveal the overall motor function of CP rats.

Author's address Rehabilitation College of Jiamusi University ,Jiamusi,154002

Key words early intervention; intrauterine infection; cerebral palsy ;motor function assessment; Basso, Beattie , Bresnahan functional scale

脑性瘫痪(cerebral palsy, CP),简称脑瘫,是造成儿童肢体残疾的主要疾病之一^[1]。流行病学研究表明宫内感染在新生儿脑白质损伤 (white matter damage, WMD) 的发生机制中起重要作用,是导致脑瘫的重要因素之一^[2]。因此,研究宫内感染致仔鼠脑损伤的发病机制、早期干预及评定方法,对研究有效预防脑瘫的发生、早期诊断、早期治疗、提高脑瘫患儿的生存质量及降低脑瘫患儿的发病率具有重要意义,优化运动功能评定方法是顺利进行上述研究

的重要环节。

1 材料与方法

1.1 材料及研究对象

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金(D2004-50);黑龙江省研究生创新科研资金项目(YJSCX2008-061HLJ)

1 佳木斯大学康复医学院,154002

2 佳木斯大学儿童神经康复实验室

作者简介:李晓捷,女,主任医师,教授

收稿日期:2008-09-02

研究对象为清洁级成熟 Wistar 雌性大鼠 80 只和雄性大鼠 40 只, 体重 200—280g, 由佳木斯大学实验动物中心提供。脂多糖 (LPS 血清型 055:B5, Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备与分组: 将雌性大鼠与雄性大鼠室温($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)下常规饲养, 自由饮食, 明暗周期各半(12h/12h)。环境适应两周后, 于下午 17 时以 2:1(雌:雄)合笼, 次日上午 8 时查阴道涂片, 以查得精子为妊娠第 0 天, 孕鼠另笼饲养。将受孕大鼠随机分为对照组(n=10)、LPS 组(n=48)。给予受孕 17 天的 LPS 组孕鼠 LPS(血清型 055:B5 菌株, Sigma 公司)450 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}$, 连续两天腹腔注射, 对照组孕鼠腹腔注射同剂量的生理盐水。孕 22 天前分娩的仔鼠为早产鼠, 两组均去除早产鼠。随机选取对照组(A 组)仔鼠 60 只, LPS 组(B 组)仔鼠 120 只, 将 LPS 组随机分为干预组(B_1 组)和非干预组(B_2 组)各 60 只。干预组进行早期干预, 非干预组及对照组均常规饲养。25 日龄各组进行神经行为学检测鉴定 CP 鼠, B_1 组中检测出的 CP 鼠(B_{1CP} 组)继续早期干预, B_2 组中检测出的 CP 鼠(B_{2CP} 组)常规饲养, A 组中随机选取 10 只鼠作为对照组(A' 组)常规饲养; 25 日龄及 42 日龄 A' 组、 B_{1CP} 组和 B_{2CP} 组均进行神经行为学检测及运动功能评定。

1.2.2 早期干预。

1.2.2.1 早期触摸: 将 2 日龄 B_1 组仔鼠托至掌心用毛刷从头到尾匀速有力刷动, 每次持续 15min, 每日 1 次, 干预至 2 周龄。

1.2.2.2 早期丰富环境^[3]及一般负荷游泳训练^[4]: 生后 1 周开始给予 B_1 组仔鼠丰富环境刺激(包括转盘、管道、台阶、灯光、摇铃、音乐、秋千、水面等, 每周将环境改变 2 次, 以造成新异刺激)至 6 周龄, 生后 2 周开始给予一般负荷游泳训练至 6 周龄。两种干预方法至少间隔 6h。

1.2.3 神经行为学检测: 包括悬吊试验、斜坡试验、姿势、肌张力、不自主运动、旷场试验和拒浮反应, 采用李晓捷^[5]等脑瘫动物模型的鉴定方法。

1.2.4 改良 BBB 运动功能评定: 改良 BBB 运动功能等级评分 (Basso, Beattie, Bresnahan functional scale, BBB 评分) 系统分为三部分, 分别对大鼠后肢各关节的活动、负重和前后肢协调、步态和协调功能及运动中爪的精细动作等运动功能状况进行评定, 评分细则见表 1。测试在自然光的安静房间内, 应用直径 91cm, 高 18cm 的塑料嬉水池, 池中置粗糙地面。为适应环境, 仔鼠每天暴露于此环境至少持续 1

表 1 改良 BBB 评分标准

分数	特征	说明
第一部分		
0	不可观察到后肢活动	轻度活动: $\leq 5\%$ 关节活动范围
1	1 或 2 个后肢关节轻度活动	大幅活动: $> 50\%$ 关节活动范围
2	1 个后肢关节大幅活动和另一关节轻度活动	
3	2 个关节大幅活动	2 个关节: 髋和膝
4	所有后肢关节轻度活动	所有关节: 髋、膝、踝
5	2 个后肢关节轻度活动和第 3 个关节大幅度活动	第 3 个关节: 踝
6	2 个后肢关节大幅活动, 第 3 个关节轻度活动	
7	所有后肢关节大幅活动	
8	所有后肢关节全范围活动	
第二部分		
0	足置于不负重位	
1	负重情况下脚掌稳定着地或偶然、频繁、持续性在负重情况下脚背站立, 而无脚掌站立	负重: 足底负重位时或仅在后躯干抬高时, 后肢伸肌收缩
2	偶尔负重脚掌站立, 无前后肢协调运动	偶尔: $> 5\%$ 且 $\leq 50\%$
3	频繁到持续性负重脚掌站立, 无前后肢协调运动	频繁: 51%—94% 观察期; 持续: 95%—100% 观察期
4	频繁到持续性负重脚掌站立, 偶尔前后肢协调运动	6%—50% 协调运动
5	频繁到持续性负重脚掌站立, 且频繁性前后肢协调运动	51%—95% 协调运动
6	频繁负重脚掌站立, 频繁前后肢协调运动, 旋转时主要是脚掌着地, 或频繁脚掌站立, 持续前后肢协调运动, 偶然脚背站立	旋转: 当其触地或抬起时后爪内或外旋
7	持续负重脚掌站立, 持续前后肢协调运动, 持续脚掌站立	
第三部分		
0	无步态, 即前肢向前时无伸趾	
1	步态中持续性脚掌站立, 脚尖在向前运动时无或偶然有抓地能力, 优势爪刚触地时平行	平行: 后爪在刚触地或抬起时与躯干平行
2	持续协调足底步态, 频繁伸趾, 优势爪触地时平行, 抬起时旋转	频繁伸趾: 一半以上足音中无趾拖踏音
3	持续协调足底步态, 频繁伸趾, 优势爪在触地及抬起时均平行	
4	持续协调足底步态, 持续伸趾, 优势爪在触地及抬起时均平行	持续伸趾: 4min 观察期中仅有 ≤ 4 次趾拖音
5	基本内容同 18, 尾在部分或全部观察期中下垂	
6	基本内容同 18, 尾持续上翘, 但躯体不稳定重心侧移	尾上翘: 不触地; 躯体不稳定: 当快速运动时, 出现摇摆、倾斜、滑倒
7	始终有持重的脚步, 前后肢运动协调, 向前时脚趾与地面之间始终保持间隙, 开始触地和离地时, 爪的位置与身体平行, 尾巴始终上翘, 躯体平稳	躯体持续稳定: 无滑倒, 骨盆环与尾在运动时保持一直线

异常标准: 总分 < 22 分为异常

周时间。当仔鼠在测试环境中活动自如, 不再有害怕的表情(蜷缩、尿频、便频、尖叫)时, 适应期结束, 开始进行正式评定。由检测人员采用双盲法同时间从不同方向对每只仔鼠进行评定(4min), 对每只仔鼠的后肢关节(髋、膝、踝部)及躯干运动、足部持重、步态、肢体协调、趾爪触地及抬起程度、躯干摇摆程度及鼠尾位置等进行可操作性的精确定量评分(0—22 分)。改良 BBB 三部分评分累加的平均分数作为检

测结果的评分数值,汇总并进行统计学分析。

1.3 统计学分析

实验全部结束后,整理资料,使用SPSS13.0统计软件处理,资料以均数±标准差表示,两样本均数比较采用t检验,非正态分布或方差不齐时采用秩和检验。

2 结果

2.1 孕鼠分娩及仔鼠一般情况

对照组10只孕鼠,腹腔注射生理盐水后活动、进食均正常,无死亡及提前分娩。对照组共娩出活产足月仔鼠108只,无死产仔鼠。

LPS组48只孕鼠腹腔注射后12只死亡,10只提前分娩,其余26只顺利生产,共娩出活产足月仔鼠138只,死产仔鼠84只。

2.2 25日龄仔鼠行为学检测结果

三组仔鼠悬吊试验、斜坡试验、姿势、肌张力及不自主运动评分比较结果显示:B₂组与B₁组悬吊试验、斜坡试验、姿势比较有显著性差异($P<0.05$);两组与A组比较各项均具有显著性差异($P<0.05$);B₂

组与A组肌张力和不自主运动比较差异有显著性($P<0.01$),结果见表2。三组仔鼠情感行为能力检测评分结果显示:B₂组与B₁组旷场试验和拒俘反应比较有显著性差异($P<0.01$),B₂组与B₁组与A组比较各项均具有显著性差异($P<0.01$),结果见表3。倾斜板试验显示,B₁组有7只异常,其中3只两项均为阳性,另外4只一项阳性;B₂组仔鼠有13只异常,其中8只两项均为阳性,另外5只一项阳性,A组均为阴性。

经上述神经行为学检测,鉴定出:60只B₁组仔鼠中有7只CP鼠,60只B₂组仔鼠中有13只CP鼠,A组中无CP鼠。

2.3 同组25日龄、42日龄大鼠各项检测评分结果

对照组(A'组)25日龄与42日龄大鼠各项检测评分无显著性差异($P>0.05$);B₁组25日龄与42日龄CP大鼠(B_{1CP}组)各项检测评分结果中悬吊试验、斜坡试验、旷场试验、拒俘反应及改良的BBB评分比较有显著性差异($P<0.01$);B₂组25日龄与42日龄CP大鼠(B_{2CP}组)各项检测评分比较无显著性差异($P>0.05$),结果见表4—5。

表2 三组25日龄仔鼠悬吊试验、斜坡试验、姿势、肌张力及不自主运动评分比较

($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	悬吊试验	斜坡试验	姿势	肌张力	不自主运动
A组	60	4.67±0.38	2.08±0.59	10.00±0.00	10.00±0.00	10.00±0.00
B ₁ 组	60	3.10±1.39 ^①	3.63±1.37 ^①	9.57±1.14 ^②	9.40±1.44	9.87±0.50
B ₂ 组	60	2.13±0.93 ^{③④}	4.75±1.13 ^{③④}	9.12±1.73 ^{③⑤}	9.10±1.66 ^③	9.77±0.65 ^③
F值		129.502	92.562	8.192	7.803	3.669
P值		0.000	0.000	0.000	0.001	0.027

①B₁组与A组比较 $P<0.01$;②B₁组与A组比较 $P<0.05$;③B₂组与A组比较 $P<0.01$;④B₂组与B₁组比较 $P<0.01$;⑤B₂组与B₁组比较 $P<0.05$

表3 三组25日龄仔鼠旷场实验、拒俘反应检验结果比较

检测项目	A组与B ₁ 组比较		A组与B ₂ 组比较		B ₁ 组与B ₂ 组比较	
	平均秩和差	P值	平均秩和差	P值	平均秩和差	P值
旷场实验	39.43	0.000	17.65	0.004	20.22	0.001
拒俘反应	42.35	0.000	28.85	0.000	21.0	0.001

3 讨论

本实验通过早期干预,明显改善了脑瘫大鼠的神经行为及运动功能。早期干预可以上调大鼠皮质

即刻早期基因arc-mRNA表达,减少脑损伤后神经元凋亡数量,从而减轻脑损伤后遗症^[6]。生后早期暴露于丰富环境,并给予多种感觉刺激可使运动皮质和视觉皮质树突长度增加及分枝增多,并使脑组织代谢增强、脑血流变化及结构发生改变,动物的感觉运动功能和学习记忆能力增强^[7]。动物实验证实^[4,8],一般负荷游泳训练可以提高大鼠脑内超氧化物歧化酶含量,提高脑内抗脂质过氧化的作用,有助于脑机

表4 A'组、B_{1CP}组和B_{2CP}组25日龄与42日龄大鼠各项评分比较

($\bar{x}\pm s$)

项目	A'组			B _{1CP} 组			B _{2CP} 组		
	25日龄	42日龄	P	25日龄	42日龄	P	25日龄	42日龄	P
悬吊试验	4.90±0.15	5.00±0.00	0.446	1.00±0.00	2.57±0.54 ^①	0.000	1.00±0.00	1.15±0.38	0.153
斜坡试验	2.00±0.59	1.67±0.49	0.092	6.43±0.79	4.29±0.49 ^①	0.000	6.54±0.88	6.00±0.58	0.077
姿势	10.00±0.00	10.00±0.00	1.000	6.86±1.35	7.00±1.41	0.850	6.08±1.26	6.23±1.42	0.773
肌张力	10.00±0.00	10.00±0.00	1.000	6.00±0.00	6.00±0.00	1.000	6.00±0.00	6.00±0.00	1.000
不自主运动	10.00±0.00	10.00±0.00	1.000	8.86±1.07	8.86±1.07	1.000	8.92±1.04	8.92±1.04	1.000

①B_{1CP}组42日龄与25日龄比较 $P<0.01$

表5 A'组、B_{1CP}组和B_{2CP}组25日龄与42日龄大鼠各项秩和检验结果

项目	A'组			B _{1CP} 组			B _{2CP} 组		
	25日龄	42日龄	P	25日龄	42日龄	P	25日龄	42日龄	P
旷场实验	9.7	11.3	0.60	4.2	10.8	0.003	11.9	15.2	0.25
拒俘反应	10.1	11.0	0.74	4.0	11.0	0.001	11.5	15.5	0.12
改良BBB评定	10.5	10.5	1.00	5.0	10.0	0.001	12.6	14.4	0.53

能的改善和加快运动后的恢复，并可一定程度上提高脑组织神经活动的稳定性和对运动的适应性。

临幊上脑瘫一旦被确诊，姿势、肌张力、平衡能力、协调控制能力、步态等方面的表现不能达到正常水平，但经过有效的综合康复尤其是早期干预，可以使这些症状明显改善。脑瘫类型中痉挛型脑瘫较常见，临幊表现为肌张力增高、尖足交叉、膝过伸展、髋关节屈曲、关节活动度小等症状^[9]，经过有效治疗后可以使肌张力减低，尖足、膝过伸展、髋关节屈曲等症状减轻，关节活动增大，平衡和协调能力增加，精细运动改善等等。本实验采用国内外较为公认的神经行为学检测方法结合改良的孙叶强方法^[5,10]，作为脑瘫动物模型的鉴定方法，成功鉴定出CP鼠，说明神经行为学检测方法可靠。

神经行为学检测中的悬吊试验主要反映上肢功能和躯干平衡功能情况，通过定量的评分，可以明显反映出干预前后上肢和躯干的运动功能改善情况；斜坡试验、姿势、肌张力和不自主运动可反映大鼠躯体的运动功能，但由于大鼠体积较小及其自身发育特点，异常表现的观测和评定较难实施；旷场试验和拒俘反应属于情感行为能力检测，反映大鼠的兴奋性及本能攻击性，但仅就此项检测对大鼠的运动功能改善情况反映不够充分；倾斜板试验可以反映大鼠的姿势控制能力，但仅此一项反映脑瘫大鼠的运动功能改善情况也不够充分。

近年来，国内外学者主要将 BBB 运动功能评定方法用于中枢神经系统损伤大鼠后肢运动功能评定，BBB 运动功能评定法是 Basso, Beattie, Bresnahan 运动功能评定方法的简称，其最主要的优点是可在不同实验室之间通用，且误差甚小，已在国际范围应用，是目前评价中枢神经系统损伤及修复的最佳方法之一^[11-12]。BBB 评分系统分为三部分^[13]：第一部分评定动物后肢(HL)各关节活动；第二部分评定动物 HL 的持重和协调功能；第三部分评定动物运动中步态、尾的位置及爪的精细动作。在本实验中将 BBB 运动功能评定方法稍加改良，即将三部分分别进行评定，累加求和，以适应脑损伤动物模型的运动功能评定。该评定法操作简单，结果具体量化，能够客观反映脑瘫大鼠干预前后后肢关节、步态、爪的精细动作等细微的运动功能改善情况，但不能充分反映大鼠前肢运动功能状况。

本实验通过对 25 日龄与 42 日龄各组脑瘫大鼠联合应用神经行为学检测及改良 BBB 运动功能评定，各项检测评分结果显示：干预组脑瘫大鼠 25 日龄与 42 日龄神经行为学检测比较，姿势、肌张力和

不自主运动干预前后无显著性差异($P>0.05$)，悬吊试验、斜坡试验、旷场实验、拒俘反应及改良 BBB 运动功能评定干预前后有显著性差异($P<0.01$)。非干预组脑瘫大鼠和对照组大鼠 25 日龄与 42 日龄比较，各项评分比较均无显著性差异($P>0.05$)。上述结果说明，联合应用神经行为学检测及改良 BBB 运动功能评定，可全面反映大鼠的运动功能状况。

根据以上结果与分析，神经行为学检测方法项目繁多，所需检测器械复杂，检测时间较长，对于全面反映脑瘫大鼠的运动功能及其改善情况较为繁琐。而改良 BBB 运动评定法虽然操作简单，不需特殊设备，评分结果具体量化，但此方法具有一定的局限性，不能对大鼠上肢进行运动功能评定。因此，建议可联合应用悬吊试验和改良 BBB 运动功能评定以更为适用、简便、客观的反映脑瘫大鼠的运动功能状况。悬吊试验和改良 BBB 运动功能评定囊括了大鼠前肢运动、躯干平衡、后肢关节活动、肢体负重情况、姿势、前后肢协调、步态、尾的位置、爪的精细运动等所有的运动状况，可较全面准确反映出脑瘫大鼠的运动功能障碍及干预前后细微的变化情况。

参考文献

- [1] 李树春,李晓捷.儿童康复医学[M].第1版.北京:人民卫生出版社,2006.179-186.
- [2] 邵肖梅.早产儿脑损伤和脑性瘫痪[J].实用儿科临床杂志,2003,18(3):163-165.
- [3] 袁宝莉,李瑞林,郭亚乐,等.早期丰富环境对脑白质损害新生大鼠脑发育的影响[J].中国儿童保健杂志,2004,12(1):61-64.
- [4] 赵晓慧.不同负荷游泳训练对大鼠脊髓超氧化物歧化酶和丙二醛的影响[J].中国临床康复,2005,9(4):180-171.
- [5] 李晓捷,高晶,孙忠人.宫内感染致早产鼠脑瘫动物模型制备及其鉴定的实验研究[J].中国康复医学杂志,2004,19(12):885-889.
- [6] Pinaud R, Lin R, Lyb G, et al. Upregulation of the immediate early gene arc in the brains of rats exposed to environmental enrichment implications for molecular plasticity[J]. Brain Res, Mol Brain Res, 2001, 91:50-56.
- [7] LIU D,Diorio J,Day JC,et al.Maternal care,hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats [J].Nat Neurosci, 2000,3(8):799-805.
- [8] 姚军成,赵志伟,宗有智.不同负荷游泳训练对大鼠大脑及小脑皮质 SOD 含量的影响[J].西安体育学院学报,2005,22(2):68-71,75.
- [9] 陈秀洁,李晓捷.小儿脑性瘫痪的神经发育学治疗法[M].第1版.郑州:河南科学技术出版社,2004.104-120.
- [10] 李晓捷,吕智海,孙忠人,等.早期丰富环境刺激对脑瘫大鼠脑发育的影响[J].中国康复医学杂志,2006,21(12):1061—1064.
- [11] Thomas AJ, Nockels RP, Pan HQ, et al. Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats [J]. Spine,1999, 24:2134-2138.
- [12] Ma M,Basso DM,Walters P,et al. Behavioral and histological outcomes following graded spinal cord contusion injury in the C57BL/6 mouse[J].Exp Neurol,2001,169(2):239-254.
- [13] 王新家,孔抗美,叶卫莲,等.大鼠胸段脊髓损伤后两种不同行为评分方法的比较研究[J].汕头大学医学院学报,2004,17(4):199-201.