

·综述·

脑性瘫痪动物模型的行为学检测*

陶德双^{1,2} 李晓捷^{1,3,4} 钟堂武¹ 郭爽^{1,3}

脑性瘫痪(cerebral palsy, CP)简称脑瘫,是一组持续存在的中枢性运动和姿势发育障碍、活动受限症候群,这种症候群是由于发育中胎儿或婴幼儿脑部非进行性损伤所致。脑性瘫痪的运动障碍常伴有感觉、知觉、认知、交流和行为障碍,以及癫痫及继发性肌肉骨骼问题^[1]。目前CP的发病机制尚未完全明了,为了对CP进行有效的预防和诊断治疗,明确CP发生发展机制,标准化的CP动物模型制备是关键。动物选择中主要以鼠、羊、猪、兔等为主。由于大鼠神经解剖与人类极为接近,且大小合适、繁殖力强、抗感染能力强、实验方便和比较经济,而且大鼠情绪反应敏感,便于进行神经行为学观察,因此目前多选用大鼠作为实验动物。CP造模方法大致可分为生后颈总动脉结扎法^[2]、宫内感染法^[3]、胎盘功能不全(placental insufficiency, PI)法^[4]、脑损毁法^[5]等,各模型制备方法通过不同的发病机制模拟CP的发生,造模后的行为学评价对模型制备是否成功至关重要,本文就不同动物不同造模方法选择的行为学评价进行综述。

1 行为学检测方法及其意义

CP的临床诊断主要依靠临床体征、临床表现、病史及相关因素的分析。动物模型则主要通过行为学观察,以量化的行为学指标来判断实验动物的状态和行为异常程度。动物行为学是指借助于实验研究动物的行为,包括动物的运动行为、沟通行为、情绪表达、社交行为、学习行为、繁殖行为等,各类行为并非独立存在,多为相互关联。脑瘫动物模型的行为学检测,主要观察能够反映是否存在中枢神经损伤的运动行为。有报道行为学检查需由3位实验人员分别以单盲法对试验大鼠进行测评,将3组的得分结果取均数后进行统计计算^[6]。也有报道选择一个非该实验人员对大鼠进行连续的行为学测评,如果大鼠在某次测评中出现恰当的记录,则按本次结果记录^[7]。行为学检测应在安静的环境中进行,保持环境温度22℃^[6]。与运动行为相关的大鼠行为学检查方法主要包括以下几种。

1.1 一般情况观察

一般情况观察在动物模型的行为学评价中具有重要的地位,由于其可以直观地观察到动物状态的变化,且观察指标测量相对简易,几乎在各类动物模型的行为学评价中均被选择,是必不可少的观察内容。观察项目一般包括体重、状态、毛发颜色、活动量、自主运动、二便状况、姿势等情况。体重测量具有普遍性。CP模型鼠一般表现包括反应性降低、自发活动减少、运动速度缓慢、出现不同程度的肌张力增强、肌力下降、姿势异常和运动稳定性降低。

1.2 Longa评分法

该方法1989年由Longa首次提出,主要用于评价动物模型的神经行为学缺陷水平。观察内容包括模型大鼠的瘫痪侧前肢伸展是否完全、是否存在向瘫痪侧转圈、倾倒及是否能自发行走。评分原则^[8]从无神经功能缺损为0分到不能行走为4分。大鼠得分越高,表明功能障碍越严重。该评分法是经典的评价脑梗死动物模型方法,主要观察肢体运动功能,在痉挛型CP动物模型的评价中,具有举足轻重的地位。

1.3 姿势反射测验或提尾悬空试验

该方法主要观察模型大鼠前肢对称伸展、抗阻力及肌力等情况^[9]。提起鼠尾,使其离地1m高,正常大鼠两前肢对称向前伸开,模型大鼠则会出现肩部内旋、前肢内收;大鼠置于平滑地板上,分别推其左、右肩向对侧移动,推动模型大鼠时一侧阻力下降;将大鼠两前肢置于一金属网上,然后轻提起大鼠检查两前肢肌力,模型大鼠前肢力量一侧下降,根据程度评分,积分值为0—10分。分值与动物行为障碍严重程度呈正比。该项检测注重肌力及姿势对称性,观察指标相对全面,可用于检测是否符合CP定义中的姿势异常,故其在CP动物模型的评价中,具有重要意义。

1.4 网屏测验

用于评价前爪抓握能力及肌力情况。网屏为50cm×40cm网带,网眼为1cm×1cm,网板的左右和上方都用25cm高的木板框边,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内将此屏风变成垂直位,保持5s,观察大

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.08.026

*基金项目:佳木斯大学研究生科技创新项目(BC2016-003)

1 佳木斯大学,佳木斯,154007; 2 佳木斯市中心医院; 3 黑龙江省小儿脑瘫防治疗育中心; 4 通讯作者
作者简介:陶德双,女,主治医师; 收稿日期:2018-01-16

1004 www.rehabi.com.cn

鼠是否会从网屏上下来或用前爪抓握住网屏^[10]。评分标准分为4个等级(0分、1分、2分、3分),积分越高,肌力越弱。此检测方法在实际操作中很难完全避免后肢的干扰。大鼠在实际操作中常常是四肢抓握网屏,建议此方法评价一侧肢体瘫痪或是单纯上肢、单纯下肢瘫痪的动物模型检测。

1.5 跳台试验

跳台装置为10cm×15cm×60cm的被动条件反射箱,四周用黑色塑料板,底面铺可通电的铜栅,每间内放置一高4.5cm,直径4.5cm的橡皮垫作为动物回避电击的安全区,当把动物放在平台上时,它几乎立即跳下平台,并向四周进行探索。如果动物跳下平台时受到电击,其正常反应是跳回平台。多数动物可能再次或多次跳至铜栅上,受到电击后又迅速跳回平台。实验时先将动物放在反应箱内的橡皮台上适应3min,然后立即通以40V交流电,记录5min内大鼠第一次跳下平台的时间(跳台潜伏期)及受到电击次数(错误次数)。该实验主要目的是检测大鼠的学习与记忆功能,也可一定程度反映其姿势运动功能^[11]。实验分为第一天的预实验及第二天的正式实验。跳台潜伏期及错误次数为观察指标。多应用于阿尔兹海默病、衰老、帕金森等与认知相关疾病的动物模型评价中,也见于CP动物模型各类干预的评价尤其是对CP大鼠学习记忆能力干预。

1.6 水迷宫实验

水迷宫实验^[12]用于研究与空间学习记忆相关的脑区功能评价,被广泛应用于学习记忆、老年痴呆、海马/外海马研究、智力与衰老、新药开发/筛选/评价、药理学、毒理学、预防医学、神经生物学、动物心理学及行为生物学等多个学科的科学研究和计算机辅助教学等领域,在世界上已经得到广泛认可,是开展行为学研究尤其是学习与记忆研究的首选经典实验。Morris水迷宫为圆形水池,直径100cm,深50cm,水深30cm,水温(24±2)℃,水面覆一层塑料泡沫屑,池壁上4个等距离点将水池分为4个象限,在第三象限中央放置平台,平台无色透明,直径6cm,高28cm,平台没于水面下2cm,水池周围参照物保持不变。实验包括定位航行试验和空间探索试验两个部分。定位航行试验,将大鼠从入水面向池壁置入水槽中,记录大鼠从入水到爬上平台所需的时间,即逃避潜伏期。空间探索试验,将大鼠从第二象限入水点放入水槽,记录60s内其在平台象限的滞留时间。

1.7 平衡木测验

主要用于测试CP模型大鼠的平衡功能。平衡木为长80cm,宽2.5cm的方木棒,平放在离地10cm处,让大鼠在上面行走^[13]。评分标准为6个等级(0分、1分、2分、3分、4分、5分)。积分与平衡能力损伤严重程度成正比。平衡木测验还可观察大鼠的步态,姿势对称性,以及一般状态中的活动量、自主运动、运动稳定性等,目前在CP动物模型行为学评价中

应用广泛。

1.8 足印重复间距分析试验

人类的步态分析是利用力学原理和人体解剖学、生理学知识对人类行走状态进行对比分析的研究方法^[13]。将动物放置于白纸一端,使其朝着目标盒方向行走,主要观察指标为前后爪的重复步态间距。对中枢神经系统受损所致的异常步态进行分析,对于分析病情、选择治疗策略和预后判断十分重要。足印重复间距分析试验主要用于CP模型大鼠的步态分析。

1.9 悬吊试验

用于测试CP模型大鼠的前肢肌力及运动功能。让实验鼠前肢抓住水平放置的玻璃棒(长50cm,直径0.5mm),记录其掉落时间,评分分为5个等级(1分、2分、3分、4分、5分),评分越高肌力及运动功能越好^[14]。与网屏测验作用相似,由于实际操作中大鼠经常使用四肢抓握玻璃棒,很难完全避免下肢对实验结果的影响。所以在实际应用中,建议尽量选择合适的CP动物模型。

1.10 翻身实验

检查新生大鼠的原始反射情况,多应用于小日龄动物的行为观察,对记录动物的发育有重要意义。将新生大鼠仰卧位放置,记录其翻身恢复四肢着地的时间,以s为单位,超过1min仍未翻身者视为无法翻正,连续测试10次,记录其成功翻身的次数^[15]。目前制作CP模型大鼠多为5—7日龄,大鼠生后神经系统的发育极快,对大鼠年龄要求比较严格。

1.11 攀绳实验

本实验主要检查大鼠四肢的运动协调能力。选择^[16]一定规格的麻绳从平台垂下,让大鼠沿麻绳爬上平台。记录对大鼠的刺激次数及爬到平台的时间,评分分为6个等级(0分、1分、2分、3分、4分、5分),积分与运动协调能力的损伤程度成正比,即刺激次数越多,爬到平台的时间越长评分越高。

2 不同CP模型选择应用的行为学检测方法

2.1 脑损毁导致CP模型的行为学检测

脑损毁方法是在麻醉状态下将实验动物指定的脑部区域通过机械、化学、电解质等方式进行损毁,待动物恢复到清醒状态以后观察其行为,对比经过脑损毁后的动物和设置为对照组的正常动物所表现出的生理活动或行为方式的不同。脑损毁导致的CP动物模型中可出现典型的肢体瘫痪或功能障碍,可用于评估运动功能障碍及肢体肌力、肌张力,姿势障碍及发育情况的评价,是目前较为理想的CP模型制备方法。曹冉等^[17]用电毁损法与无水乙醇破坏锥体束法分别制作大鼠痉挛型瘫痪模型,术后可见脑损毁对侧肢体呈屈曲痉挛状态,大鼠在主动活动和被动驱赶时呈顺时针转圈,但其选择的动物为成年大鼠,不符合脑瘫定义中的年龄标准。

熊雅南等^[5]应用猕猴运动皮层部分切除术,建立婴幼儿猕猴痉挛型偏瘫CP模型,术后观察肢体运动功能障碍和动静态的姿势异常,徒手检查和参考应用改良人Ashworth量表评定肌张力,应用自编粗大运动及精细运动评估量表检测两组运动障碍的量化指标,较为真切地模拟出人类婴幼儿脑外伤性痉挛型偏瘫CP模型,为CP的病理机制和临床康复治疗的研究提供一个科学的平台,但猕猴造价昂贵,故应用于基础研究受限。刘清忠等^[18]使用手术切除大脑皮质和部分大脑组织的方法建立CP模型,用水迷宫、悬吊试验和斜坡试验比较大鼠神经行为学改变,结果发现丹参酮能促进CP大鼠学习记忆能力。脑损毁导致动物出现典型的肢体瘫痪,通过评价动物模型的姿势、肌力、肌张力、不自主运动等,可以真切地模拟CP临床表现。

2.2 反复宫内感染致仔鼠CP模型的行为学检测

Jung SY等^[19]通过在孕鼠腹腔注射脂多糖诱发宫内感染导致仔鼠CP模型,通过测试转棒试验、跳台实验等提示,发现踏车运动可改善CP动物模型的运动和记忆功能。李晓捷等^[20]制备脂多糖宫内感染致仔鼠CP模型,行为学检测包括悬吊试验、斜坡试验、旷场实验、拒俘反应及改良Berg平衡功能量表(Berg balance scale, BBB)运动功能评定。得出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。以上实验提示,宫内感染导致的仔鼠CP模型存在运动功能异常,可选择使用转棒运动、悬吊实验、斜坡实验及改良BBB运动功能评价等进行运动功能的检测,结合一般情况观察,可以较全面地反映脑瘫模型的姿势、肌力、肌张力及运动功能,而跳台实验虽然可以一定程度反映运动功能,但其主要目的是评价认知记忆功能。

2.3 缺氧缺血所致CP模型大鼠的行为学检测

Wei L等^[21]通过对7日龄的SD大鼠单侧颈总动脉结扎造成缺氧缺血脑损伤,模拟痉挛性CP模型,生后30d用Morris水迷宫评估大鼠的学习记忆能力,并在出生后42d进行足误差和肢体放置实验,评价感觉运动功能。CP模型大鼠在进行上述感觉运动功能评价时较对照组存在显著性差异。Fan等^[22]同样采用上述方法制备CP大鼠模型,在造模3周后使用Longa评分法评价模型大鼠,发现模型大鼠在神经行为学方面存在显著缺陷,他提出使用该评分法可以较好地检测CP模型大鼠的运动功能。章马兰等^[23]对缺氧缺血所致的痉挛型CP大鼠模型,进行一段时间的针刺训练后,使用斜坡试验及网屏试验检测运动功能,发现模型大鼠运动协调能力明显改善。罗义等^[24]通过对缺氧缺血导致的CP模型大鼠进行不自主运动、悬吊实验、斜坡实验、倾斜板试验与肌张力测定的同时,进行Morris水迷宫实验,提出“与前面几项评价方法比较, Morris水迷宫试验对鉴定该脑瘫模型同样适用可靠”。Gu Y等^[25]选择迷宫实验和Object-in-place task检测缺

氧缺血大鼠的记忆情况。王向野等^[26]则对该类模型从空间学习认知记忆功能(Morris水迷宫)测试和神经行为学(足印重复间距分析试验和平衡木试验)两方面,对CP模型大鼠进行评价。此外,余艳等^[27]对该类模型一般状态、步长分析及提尾悬空摇摆试验进行观察分析;王江涛等^[28]采用5日龄Wistar大鼠通过结扎双侧颈总动脉制备CP模型,选择悬吊试验、斜坡试验、旷场试验、拒俘反应、肌张力测试、不自主运动进行评价,发现实验组与对照组相比,上述测试差异有显著性($P < 0.05$),该实验选择大鼠日龄较小,且进行了双侧静脉结扎,损伤程度更为严重。该实验通过拒俘反应检查原始反射。检查原始反射还包括:觅食反射、惊吓反射、翻正反射等,一般用于生后1—3日龄的大鼠。

陈飞等^[29]通过钳夹孕21—22d大鼠子宫动脉,模拟胎鼠宫内缺氧缺血、生长受限建立的CP大鼠模型,参照Apgar评分观察新生大鼠,以及体重、行为学检测包括翻身实验、悬吊实验、斜坡实验、旷场活动等。Ruff等^[4]采用孕鼠双侧子宫动脉结扎(bilateral uterine artery ligation, BUAL),导致仔鼠出现宫内发育迟缓,采用抓力实验及旷场试验进行行为学评价。Reid等^[30]在孕鼠19天时进行双侧子宫动脉结扎,造成发育中胎鼠大脑乏氧和生长受限。仔鼠出生后出现运动功能障碍,采用抓力实验及转棒实验评价大鼠的运动协调功能。

3 小结

目前国际上尚无公认标准的脑瘫动物模型制备方法,常用的各种模型制备方法均有其优缺点,应针对研究方向和研究重点选择适宜的动物及动物模型制备方法。由于CP的核心表现是运动功能障碍,故临床检测时应尽量选择能反映运动功能障碍、姿势异常及不自主运动等方面的实验,如Longa神经功能评分法,抓力实验,悬吊实验,斜坡试验,提尾悬空摇摆试验,平衡木实验等。其中Longa神经功能评分法重点检测动物模型的下肢运动功能;悬吊实验、抓力实验重点检测动物模型的上肢运动功能。平衡木实验可以反映前庭平衡功能,而迷宫实验、跳台实验及避暗实验等,重点利于检测记忆认知功能,主要应用于特殊干预状态时进行疗效评估的选择,在标准化CP模型评价时不是必备项目。

参考文献

- [1] 李晓捷,唐久来,马丙祥,等. 脑性瘫痪的定义、诊断标准及临床分型[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,19(29):1520.
- [2] Yao D, Zhang W, He X, et al. Establishment and identification of a hypoxia-ischemia brain damage model in neonatal rats[J]. Biomed Rep, 2016, 4(4):437—443.
- [3] 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,(12):6—10.
- [4] Ruff CA, Faulkner SD, Rumajogee P, et al. The extent of

- intrauterine growth restriction determines the severity of cerebral injury and neurobehavioural deficits in rodents[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9):e0184653.
- [5] 熊雅南. 运动皮层部分切除术对猕猴痉挛型偏瘫脑瘫模型的建立[D]. 合肥:安徽医科大学,2017.
- [6] 李向哲,王红星,谢财忠,等. 阻断脑源性神经营养因子-酪氨酸激酶受体B通路后运动训练对脊髓损伤大鼠功能恢复的影响研究[J]. *中国康复医学杂志*,2017,32(12):1331—1337,1344.
- [7] 陈林.SD大鼠脑梗死急性期血清HIF-1 α 、VEGF因子的变化特点及相关性研究[D]. 泸州:泸州医学院,2011.
- [8] 张晓钰. 早期“强制性使用”运动疗法对局灶性脑梗死大鼠行为学评分及神经生长因子的影响[J]. *中国康复医学杂志*,2007,(6):509—511,479.
- [9] 吕哲,张颖,时美娟,等. 内质网应激对大鼠局灶性脑缺血再灌注后听皮层损伤的作用[J]. *重庆医学*,2018,47(11):1440—1443,1448.
- [10] 杨敏,余茜,何成松,等. 运动训练对脑梗死大鼠行为学及NF200表达变化的影响[J]. *中国康复医学杂志*,2006,(11):980—984,1057.
- [11] 吴冰洁,刘艳萍,卢宝金,等. 不同运动方式对快速老化小鼠学习记忆能力的影响[J]. *中国康复医学杂志*,2010,25(5):430—434.
- [12] Gómez C, Carrasco C, Redolat R. Adolescent and adult mice display differential sensitivity to the effects of bupropion on the acquisition of a water maze task[J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(1):162—167.
- [13] 荣凯. 偏瘫型脑瘫痉挛性下肢畸形治疗的实验研究[D]. 上海:上海交通大学,2015.
- [14] 黄倩茹,萨喆燕,潘晓华,等. 电针“长强”穴对缺血缺氧脑损伤大鼠行为学的影响[J]. *中国中医药现代远程教育*,2018,16(7):91—93.
- [15] 郭丹,宋锦宁,尹倩雯. 大鼠蛛网膜下腔出血后血清lincRNA-p21的变化水平研究[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*,2017,16(5):412—416.
- [16] 杨丹丹. 骨骼肌高表达syncytin-1诱导小鼠运动神经元损伤的机制及对自噬的影响[D]. 天津:天津医科大学,2017.
- [17] 曹冉. 电毁损法与无水乙醇破坏锥体束法分别制作SD大鼠痉挛性脑瘫模型及其病理改变的实验研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2013.
- [18] 刘清忠,王大斌,韩丽梅,等. 侧脑室注射丹参酮对脑瘫模型大鼠神经行为学的影响[J]. *中国中医急症*,2016,25(7):1281—1284.
- [19] Jung SY, Kim DY. Treadmill exercise improves motor and memory functions in cerebral palsy rats through activation of PI3K-Akt pathway[J]. *J Exerc Rehabil*,2017,13(2):136—142.
- [20] 李晓捷,郭岚敏. 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[J]. *中国康复医学杂志*,2008,23(12):1067—1070.
- [21] Wei L, Ren Q, Zhang Y, et al. Effects of hyperbaric oxygen and nerve growth factor on the long-term neural behavior of neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage [J]. *Acta Cir Bras*, 2017, 32(4):270—279.
- [22] Fan X, Bai XH, Chen J, et al. Protective Effects of Intraventricular Transplanted Human Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells on Hypoxic Ischemic Brain Damages in Rats[J]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2017, 48(2):179—185.
- [23] 章马兰. 针刺对痉挛型脑瘫患儿肌张力影响的临床和实验研究[D]. 广州:广州中医药大学,2017.
- [24] 罗义,王林,焦勤,等. Morris水迷宫指导大鼠痉挛性脑瘫模型构建与评价的实验研究[J]. *西部医学*,2017,29(6):749—752.
- [25] Gu Y, He M, Zhou X, et al. Endogenous IL-6 of mesenchymal stem cell improves behavioral outcome of hypoxic-ischemic brain damage neonatal rats by suppressing apoptosis in astrocyte[J]. *Sci Rep*, 2016, (6):18587.
- [26] 王向野,张志友,杨小朋,等. 神经干细胞侧脑室内移植治疗脑瘫鼠的实验研究[J]. *中国临床神经外科杂志*,2012,17(6):354—357.
- [27] 余艳. 体外扩增人脐带血CD34⁺细胞移植治疗新生大鼠脑瘫模型的研究[D]. 长沙:中南大学,2012.
- [28] 王江涛,毛英丽,李洪华,等. 新生大鼠痉挛型脑瘫动物模型构建及评价的实验研究[J]. *中国妇幼保健*,2011,26(19):2992—2995.
- [29] 陈飞. 针刺对HIBD模型大鼠行为学及BDNF、EPO表达的影响[D]. 广州中医药大学,2013.
- [30] Reid MV, Murray KA, Marsh ED, et al. Delayed myelination in an intrauterine growth retardation model is mediated by oxidative stress upregulating bone morphogenetic protein 4[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2012, 71(7):640—653.