

颅脑外伤实验动物运动方式的选择及神经功能评估研究进展

陈林¹ 杨翊¹ 刘经星¹ 郑伸伸²

¹湖北医药学院附属人民医院康复医学科,十堰 442000;²湖北医药学院附属太和医院康复中心,十堰 442000

通信作者:杨翊,Email:461816193@qq.com

【摘要】近年来,颅脑外伤(TBI)发生率持续上升,幸存者长期遗留神经功能障碍,严重影响日常生活和工作,增加了家庭和社会负担。大量研究表明康复治疗可以提高患者功能,作用机制尚不明确,需要更多实验研究来加强对大脑可塑性的认识。实验研究中,选择合适的运动方式和评估方法非常重要,本文从实验动物运动方式的选择和常用神经功能评估方法进行综述。

【关键词】 颅脑外伤; 运动方式; 神经功能

基金项目:十堰市引导性项目(18Y53)

Fund program:The Leading Project Of Shiyan(18Y53)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.01.019

近年来,颅脑外伤(trumatic brain injury, TBI)发生率持续升高,幸存者长期遗留神经功能障碍,严重影响日常生活和工作,增加了家庭和社会负担。大量研究表明康复治疗可以提高患者功能,但作用机制尚不明确,需要更多实验研究来支持并提高对大脑可塑性的认识。实验研究中,选择合适的运动方式和评估方法非常重要,本文从实验动物运动方式的选择和常用神经功能评估方法角度进行综述。

实验动物康复治疗运动方式

颅脑外伤实验研究中,通常选用啮齿类动物,常用的运动包括跑台、游泳和跑轮。

一、跑台

跑台可定量设定运动时间、坡度和速度等参数。不同实验室参数设置不同,Itoh等^[1]采用22 m/min,30 min/d,共7 d的运动参数;而Shen等^[2]在研究中采用循序渐进的训练方案,30 min/d,共2周。低强度组第1周3 m/min,第2周3 m/min、5 m/min各5 min,8 m/min持续20 min;高强度组第1日3 m/min,第2日3 m/min、6 m/min、9 m/min各10 min,第3日6 m/min、9 m/min、12 m/min各10 min,第4~14日以12 m/min的速度运动30 min。跑台操作简便、安全,可定量设计不同运动方案,且多个动物可同时进行训练,大大提高了实验效率,是国内外广泛使用的一种康复运动方式。但跑台是一种强制运动,实验中动物会产生应激反应,可能会干扰实验结果^[3];而且不同实验室参数设置不同,实验结果差异较大。

二、游泳

游泳是常用的运动方式,可单独训练,也可联合其他运动方式。动物放入水中,在相同温度和时间内游泳,可在尾部增加重物来增加运动强度^[4]。Zhou等^[5]研究发现,冷水游泳能促进内皮祖细胞的增殖,促进海马血管生成,改善颅脑损伤所致的认知障碍。游泳设备简单易得,动物依从性高,多只动物可同时训练,但无法定量评估运动强度,结果可比性较差,且动物对水温会产生应激反应^[5]。

三、跑轮

包括电动跑轮和自主跑轮,电动跑轮通过电力带动动物在跑轮上运动,属于被动强制运动,而目前使用较多的是自主跑轮,可选择不同训练强度和训练时间,利用电脑软件记录动物运动的速度、距离和时间。Griesbach等^[6]在研究中,给予脑外伤大鼠24 h自主跑轮,轮子直径31.8 cm,宽10 cm,阻力100 g,每晚平均距离300~3400 m,1周后发现跑轮组大鼠在水迷宫任务中的表现显著提高。而Griesbach等^[7]在另一研究中对大鼠采用电动跑轮,结果表明在伤后早期电动跑轮运动可能并不利于功能的恢复,提示运动方式的选择和开始时间很重要。跑轮可定量记录运动相关参数,动物依从性好,不产生应激,目前被广泛用于脑外伤实验动物的研究^[8-9]。自主运动中,动物本身是一个重要影响因素,研究时间内部分动物运动较多,部分动物几乎不动,运动强度差别较大,对实验结果产生差异^[3]。

神经功能缺损评估

一、改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)

mNSS^[10-11]包括运动、感觉、平衡、反射4个方面,得分越高,功能障碍越重。试验1,提高动物尾巴和在平坦地面上观察动物运动,最低0分,最高6分;试验2,通过视觉、触觉和本体感觉刺激来评估对感觉刺激的反应,最高2分;试验3,动物在平衡木上行走,评估保持平衡的能力并给予评分,最高6分;试验4,通过耳廓反射、角膜反射、惊吓反射等来评估,最高4分。mNSS从整体层面评估神经功能损伤,可较直观反映大脑损伤程度,目前常用于脑外伤、脑卒中等神经疾病动物模型的研究。

二、Bederson 评分

Bederson评分^[12]共3个试验,测试时间3~5 min,当动物在其中一项测试中未表现异常时,终止测试,得分为最终得分。试验1,提动物尾巴悬吊至地面1 m处,观察前肢屈曲状况,正常动物双前肢伸向地面且没有其他神经功能缺陷,0分;脑外伤大鼠,对侧前肢屈曲,可表现为轻到重度的腕肘屈曲和肩部内

收内旋,1分;试验2,动物放置在软塑料纸上,让其前肢抓牢,提高尾巴,轻推其肩部至前肢滑移,不同方向可重复几次,正常或轻度障碍的动物在不同方向抵抗推力相当,而重度脑外伤动物则表现抵抗侧推力下降,2分;试验3,动物放在地面活动,动物向脑损伤对侧旋转,3分。

三、Garcia 评分

Garcia 评分^[13]共6项测试,每项评分0~3分,评分越高,损伤越轻。试验1,观察动物在笼子里活动5 min,根据动物活跃程度从完全不动到四处走动给予0~3分;试验2,提起尾巴使其悬空,观察四肢运动的对称性,从损伤侧肢体完全不动到四肢等称运动,给予0~3分;试验3,评估前肢不对称使用,抬高尾巴使后肢悬空,仅用前肢行走,从损伤侧完全不动到双侧前肢伸展向前运动给予0~3分;试验4,动物置于铁丝笼表面,抓住其尾巴观察四肢爬行,从向损伤侧转圈到牢牢抓住笼子并向前爬给予0~3分;试验5和试验6,用棉签刺激动物的身体和胡须两侧,观察其反应,从损伤侧对刺激无反应到刺激后动物转头回应,两侧反应相当,给予0~3分。

运动功能评估

一、前肢精细功能的评估

评估精细功能主要包括握力试验(grip strength test)、圆筒试验(cylinder test)、脱粘试验(adhesive removal test)等。

1.握力试验:用于评估前肢肌力,主要设备是1个抓握手柄与压力传感器相连,动物拉住手柄,实验者轻轻水平牵拉直至其前肢与手柄分开,反复测量3~10次,记录最大握力^[14]。也可通过自动测力仪来测量,将动物置于测力台上,动物前肢抓住测力计,通过连接的软件自动测出施加在手柄上的拉力^[15]。握力试验是一种快速、准确测量前肢肌力的方法,测试所需人员少,可降低主观意识干扰,但是测试前要训练动物能够抓住手柄。

2.圆筒试验:基于啮齿类动物对新环境的探索行为,采用圆筒试验来评估其前肢的不对称支撑^[16]。将动物置于直径20 cm×30 cm高的半透明圆柱筒中,动物会探索性的把前肢支撑在筒壁上,从顶部或前面拍摄5~10 min,记录脑损伤同侧前肢(ipsilateral, I)、对侧前肢(contralateral, C)和双前肢(both, B)接触圆筒壁的次数^[17]。对侧前肢不对称使用率=对侧前肢碰壁次数/(同侧前肢碰壁次数+对侧前肢碰壁次数+双前肢碰壁次数)×100%=[(C+B)/2]/(I+C+B)×100%^[18]。为降低误差,应由两名数据分析人员进行双盲分析。

3.脱粘试验:用于评估运动和感觉障碍,将动物置于40 cm×40 cm×50 cm的实验笼中,将直径8 mm的彩色贴纸以同一力度粘于动物双侧前肢上,实验笼下面放一摄像机,记录整个测试过程^[19]。当动物注意到贴纸后(接触时间),会摇动前肢或举至鼻子上,然后慢慢把贴纸去掉(移除时间),当两侧贴纸都被拿掉或达到设定时间,结束测试,试验3~5次,中间间隔5 min。脱粘试验潜伏期为前肢移除贴纸时间而不包括接触时间,数据记录为患侧前肢移除时间减去健侧前肢移除时间。

二、后肢步态和协调功能的评估

主要包括平衡木测试(beam walking test)、足误试验(foot fault test)、旋转试验(rotarod test)和步态分析系统。

1.平衡木测试:用于评估平衡功能,根据动物种类不同,选

择宽1~3 cm、长1 m左右的平衡木,一般为塑料或木制,平衡木另一端放置1个黑箱,记录动物穿过平衡木到达黑箱的潜伏期来评估肢体平衡功能^[20]。也可通过对患侧后肢评分来评估平衡功能,Chen等^[10, 21]用7分制评分:动物在平衡木上不能保持平衡,滑落,1分;动物紧紧抓住平衡木,能保持平衡但不能穿过平衡木,2分;患侧后肢伸长但达不到平衡木表面,3分;通过平衡木脚滑发生率100%,4分;脚滑率在50%~100%之间,5分;少于50%,6分;穿过平衡木只有两步或者更少的脚滑,7分。为更好完成测试,正式测试前可让动物适应性的训练几次,若动物不愿穿过横木,可敲击尾巴来刺激行走^[20]。

2.足误试验:用于评估协调功能,动物被放置在高于地面的金属网架上,正常动物行走时,肢体偶尔会从网架上滑落,左右肢“足误”率大致相同,而脑损伤动物患侧肢体“足误”率增高。测试3~5次,每次2.5~5.0 min,记录平均总步数和“足误”数,记录为(脑损伤对侧足误-同侧足误)/总步数×100%^[22]。为更直观定性评分,Metz等^[23]描述了定性评分方法,正确放置6分;部分放置5分;重新放置4分;代替放置3分;轻度滑落2分;明显滑落1分;完全放置错误0分。足误试验广泛用于评估实验动物运动功能障碍,为改变测试难度,测试网架连接可不规则,测试前动物不用训练,缺点是不能同时测试多只动物。

3.旋转试验:用于评估动态平衡和协调功能,根据测试动物选择不同直径的旋转杆,大鼠通常采用直径为3.75英寸的滚轴,小鼠采用1.25英寸的滚轴^[24]。采用塑料板将杆分为几个间隔,可同时对多个动物进行测试^[25]。测试前可先将动物置于静止旋转杆上适应,然后再加速,动物滑下来时会接触传感平台并停止旋转,记录从旋转杆掉下的潜伏期,测试2~4次取平均值,可选择恒速或加速模式^[26]。Chen等^[10]试验中,5 min内速度从每分钟4转上升到每分钟20转。Brody等^[27]选择恒速,恒速旋转中速度的选择至关重要,如果速度太慢,无法察觉损伤动物和正常动物之间的差别。旋转试验基于时间来评估步态,可降低测试者主观影响,但是仪器昂贵,且只记录1个参数;再者通过这项测试,很难区别与步态相关的行为(如协调、平衡、力量和耐力),而这些都会影响在旋转杆上的潜伏期^[17]。

4.步态分析系统:用于评估步态相关的大量参数,如步长、步速、步宽、前后肢支撑等,由狭窄的玻璃走道组成,走道下面安装摄像机,根据拍摄的步态情况,软件可半自动检测脚印并读出相关参数^[19]。每次测试至少进行3次,并记录相关参数,取平均值进行分析^[17]。该系统可全面分析步态,与其他试验相比,结果更加准确,操作也比较方便。但该系统非常昂贵,大大增加了研究成本,且每次只能测试1只动物,手动分析试验结果也要考虑多方面的影响因素,如大鼠体重和步速,增加了实验周期。

总结

不同运动方式和评估方法都有其优缺点,跑台可准确控制运动量,类似人类运动模式,但动物会产生应激;动物对游泳不产生抵触,但难以定量记录运动量;跑轮不产生应激,可定量记录距离、速度等参数,但不同动物运动强度差异大,影响实验结果。圆筒试验、足误试验、脱粘试验、平衡木测试等设备简单,可自制,但都依赖于实验者主观评分,客观性差、指标量化不精确。旋转试验和步态分析系统可量化实验结果,可靠性高,但

滚轴直径、步态分析系统运行速度等都会影响结果的准确性,再者仪器昂贵,目前尚不能广泛应用于实验研究。神经功能缺损评分广泛用于评估整体神经功能损伤程度,仪器简单,但都基于实验者主观观察,定性评分,不同实验者评分可能有偏差,为了降低偏差,可固定两名培训过的分析人员,进行双盲评分。不同运动方案和评估方法对结果会产生重要影响,实验中可综合比较几种评估方法,避开各测试的短板,促进实验结果的可比性与准确性,加快脑外伤康复治疗机制的研究进程。

参 考 文 献

- [1] Itoh T, Imano M, Nishida S, et al. Exercise inhibits neuronal apoptosis and improves cerebral function following rat traumatic brain injury [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2011, 118(9): 1263-1272. DOI: 10.1007/s00702-011-0629-2.
- [2] Shen X, Li A, Zhang Y, et al. The effect of different intensities of treadmill exercise on cognitive function deficit following a severe controlled cortical impact in rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(11): 21598-21612. DOI: 10.3390/ijms141121598.
- [3] Wogensen E, Malú H, Mogensen J. The effects of exercise on cognitive recovery after acquired brain injury in animal models: a systematic review[J]. *Neural Plast*, 2015, 10(5): 1-22. DOI: 10.1155/2015/830871.
- [4] Thu VT, Kim HK, Han J. Acute and chronic exercise in animal models[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 999(1): 55-71. DOI: 10.1007/978-981-10-4307-9_4.
- [5] Zhou ZW, Li YD, Gao WW, et al. Cold water swimming pretreatment reduces cognitive deficits in a rat model of traumatic brain injury[J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(8): 1322-1328. DOI: 10.4103/1673-5374.213553.
- [6] Griesbach GS, Hovda DA, Molteni R, et al. Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function[J]. *Neuroscience*, 2004, 125(1): 129-139.
- [7] Griesbach GS, Tio DL, Vincelli J, et al. Differential effects of voluntary and forced exercise on stress responses after traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29(7): 1426-1433. DOI: 10.1089/neu.2011.2229.
- [8] Crane AT, Fink KD, Smith JS. The effects of acute voluntary wheel running on recovery of function following medial frontal cortical contusions in rats[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2012, 30(4): 325-333. DOI: 10.3233/RNN-2012-120232.
- [9] Piao CS, Stoica BA, Wu J, et al. Late exercise reduces neuroinflammation and cognitive dysfunction after traumatic brain injury[J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 54(6): 252-263. DOI: 10.1016/j.nbd.2012.12.017.
- [10] Chen S, Hsu C, Huang W, et al. Post-injury baicalein improves histological and functional outcomes and reduces inflammatory cytokines after experimental traumatic brain injury[J]. 2008, 155(8): 1279-1296. DOI: 10.1038/bjp.2008.345.
- [11] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 1005-1011.
- [12] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji 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.
- [13] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-634, 635.
- [14] Evans TM, Jaramillo CA, Sataranatarajan K, et al. The effect of mild traumatic brain injury on peripheral nervous system pathology in wild-type mice and the G93A mutant mouse model of motor neuron disease[J]. *Neuroscience*, 2015, 298(7): 410-423. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.041.
- [15] Hays SA, Ruiz A, Bethea T, et al. Vagus nerve stimulation during rehabilitative training enhances recovery of forelimb function after ischemic stroke in aged rats[J]. *Neurobiol Aging*, 2016, 43(1): 111-118.
- [16] Donega V, Nijboer CH, van Velthoven CT, et al. Assessment of long-term safety and efficacy of intranasal mesenchymal stem cell treatment for neonatal brain injury in the mouse[J]. *Pediatr Res*, 2015, 78(5): 520-526.
- [17] Schönfeld L, Dooley D, Jahanshahi A, et al. Evaluating rodent motor functions: which tests to choose[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, 83(3): 298-312. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2017.10.021.
- [18] 李爱萍,沈夏锋,胡永善,等.早期跑台训练对中重度颅脑外伤大鼠运动功能的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2013, 35(4): 265-268. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.04.006.
- [19] Schönfeld LM, Jahanshahi A, Lemmens E, et al. Long-term motor deficits after controlled cortical impact in rats can be detected by fine motor skill tests but not by automated gait analysis[J]. *J Neurotrauma*, 2017, 34(2): 505-516. DOI: 10.1089/neu.2016.4440.
- [20] Shijo K, Ghavim S, Harris NG, et al. Glucose administration after traumatic brain injury exerts some benefits and no adverse effects on behavioral and histological outcomes[J]. *Brain Res*, 2015, 1614(1): 94-104. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.04.022.
- [21] Chen CJ, Cheng FC, Su HL, et al. Improved neurological outcome by intramuscular injection of human amniotic fluid derived stem cells in a muscle denervation model[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): 124624. DOI: 10.1371/journal.pone.0124624.
- [22] Adkins DL, Ferguson L, Lance S, et al. Combining multiple types of motor rehabilitation enhances skilled forelimb use following experimental traumatic brain injury in rats[J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2015, 29(10): 989-1000. DOI: 10.1177/1545968315576577.
- [23] Metz GA, Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination[J]. *J Neurosci Methods*, 2002, 115(2): 169-179.
- [24] 曾莉,张旻,卜碧涛.实验啮齿类动物行为学评估[J]. *神经损伤与功能重建*, 2008, 3(5): 352-356. DOI: 10.3870/sjsscj.2008.05.013.
- [25] Doll DN, Engler-Chiurazzi EB, Lewis SE, et al. Lipopolysaccharide exacerbates infarct size and results in worsened post-stroke behavioral outcomes[J]. *Behav Brain Funct*, 2015, 11(1): 32. DOI: 10.1186/s12993-015-0077-5.
- [26] Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, et al. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 1994, 11(2): 187-196.
- [27] Brody DL, Mac Donald C, Kessens CC, et al. Electromagnetic controlled cortical impact device for precise, graded experimental traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2007, 24(4): 657-673.

(修回日期:2018-10-12)

(本文编辑:凌 琛)