

伸爪试验评价小鼠局灶性脑缺血慢性损伤症状

史文珍,张咏梅,叶夷露,赵蕊,张纬萍,魏尔清
(浙江大学医学院药理学教研室,浙江杭州310058)

[摘要] 目的:评价伸爪试验是否作为一种客观评价小鼠局灶性脑缺血后慢性神经功能变化的方法。方法:在伸爪试验盒内,训练小鼠通过0.5 cm窄缝用左侧前肢抓取食物,3周后,以右侧大脑中动脉阻塞诱导局灶性脑缺血,继续观察4周内伸爪抓取食物的成功率,并与经典的转角试验、神经症状评分和斜板试验比较。实验结束后,观察脑梗死体积及神经元密度。结果:小鼠脑缺血后,抓取食物的成功率下降,转角试验的右转百分率增加,神经症状评分增加,斜板滞留角下降。斜板滞留角在脑缺血后5 d恢复,其他3个指标在4周内都有显著变化。脑缺血4周的脑梗死体积增加,皮层、海马CA1区以及纹状体神经元密度下降。结论:伸爪试验是一种客观、稳定的指标,可用于评价小鼠局灶性脑缺血后慢性神经功能变化。

[关键词] 脑缺血;疾病模型;动物;伸爪试验;行为学;局灶性脑缺血

[中图分类号] R 743.31 [文献标识码] A [文章编号] 1008-929X(2007)02-0167-07

A skilled reaching test for evaluating long-term neurological deficits after focal cerebral ischemia in mice

SHI Wen-zhen, ZHANG Yong-mei, YE Yi-lu, et al (Department of Pharmacology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] **Objective**: To determine whether the skilled reaching test is an objective method for evaluating long-term neurological deficits after focal cerebral ischemia in mice. **Methods**: In a reaching box, mice were trained to reach food pellets with their left forelimb through a 0.5 cm slit for 3 weeks. Then focal cerebral ischemia was induced by occluding the right middle cerebral artery, and the percentage of success in obtaining food was observed for 4 weeks. In comparison, the neurological deficit score, the holding angle in an inclined board test, and right turns in a corner test were simultaneously performed. At the end of the experiments, brain infarcts and neuron densities were determined. **Results**: After focal cerebral ischemia, the percentage of success in the reaching test was reduced, the right turns in the corner test were increased, the neurological deficit score was increased, and the holding angle in the inclined board test was reduced as well. The holding angle recovered 5 d after ischemia, whereas other 3 indicators remained abnormal until 4 weeks. At the end of the experiments, the brain infarct volumes were increased, and the neuron densities in the cortex, hippocampal CA1 region and striatum were reduced in ischemic mice.

收稿日期:2006-01-09 修回日期:2006-03-28

基金项目:国家自然科学基金(30371637)资助项目。

作者简介:史文珍(1982-),女,硕士研究生。

通讯作者:魏尔清(1952-),男,博士,教授,博导,主要从事神经药理学研究,E-mail:weieq2001@yahoo.com

neuron densities in the cortex ,hippocampal CA1 region and striatum were reduced in ischemic mice.

Conclusion : The skill reaching test is an objective and stable method for evaluating long - term neurological deficits after focal cerebral ischemia in mice.

[Key words] Brain ischemia ;Disease models ,animal ;Skilled reaching test ;Behavior ;Focal cerebral ischemia

[J Zhejiang Univ (Medical Sci) ,2007 36(2) :167 - 173.]

啮齿类动物局灶性脑缺血后 ,感觉、认知等行为功能变化的评价指标很多^[1-4] ,但许多指标只用于评价动物术后短期功能损伤 ,如自发动作、步态^[3]、肢体协调运动等仅适用于术后 1 周之内。小鼠局灶性脑缺血后的转角实验 (corner test)反映触须感觉、前后肢运动及整体姿势的协调 ,在脑缺血后 90 天内均有异常表现^[5]。但转角实验反映的是综合变化 ,而局灶性脑缺血后主要变化是对侧肢体瘫痪(偏瘫) ,因此 ,建立一种可以客观评价肢体损伤的行为学指标非常重要。

Whishaw 等^[6]在 1986 年建立了一种大鼠以前肢通过窄缝抓取食物的实验方法 ,称为伸爪试验(skilled reaching test)。该方法可评价单侧肢体的运动功能 ,区分肢体损伤与修复的细微差别^[7] ,常用于评价大鼠单侧纹状体 6 - 羟多巴胺损伤后的肢体运动功能障碍^[8]等。大鼠局灶性脑缺血后 ,受损侧前肢伸爪定位准确性下降 ,抓食成功率下降 ,直至术后 2 周仍与对照组有明显差异 ,因此 ,可评价大鼠慢性肢体运动功能的恢复^[9]。随后 ,比较了小鼠与大鼠伸爪的特点^[10] ,并观察了小鼠局灶性脑缺血后 2 周内伸爪试验的变化^[11] ,但是 ,尚未与经典的评价方法比较 ,其评价慢性损伤的有效性有待于建立。因此 ,本实验拟在小鼠局灶性脑缺血后 4 周内 ,对伸爪试验变化与其它评价指标比较 ,确定其应用价值。

1 材料和方法

1.1 实验动物 雄性 ICR 小鼠 ,体重 26 ~ 28 g ,由浙江省医学科学院实验动物中心提供(动物合格证号 浙实动单项准第 2001001)。小鼠每日每只喂食 2.5 g 标准鼠饲料 ,使其体重保

持在原体重的 90% ~ 95% ,特殊制作的 15 mg 葡醛内酯片作为训练食物。

1.2 伸爪抓取食物的训练 实验采用长 20 cm ,宽 6 cm ,高 20 cm 的长方形树脂试验盒 ,在盒的前方距底面 1.5 cm 高处 ,有 6.5 cm × 0.5 cm 的长方形缝隙 ,盒外缝隙底处有 6 cm × 1.3 cm 的横板 ,食物置于横板距缝隙 0.6 cm 远、位于窄缝右侧边缘的圆形凹槽内 ,盒内用一档板置于缝隙左侧 ,迫使小鼠用左前肢从缝隙处伸出盒外抓取食物(图 1A)。

第 1 周 ,每天每只动物训练 10 min。第 2 周 ,每天每只动物抓食 20 粒 ,伸爪 5 次内抓到并吃到 1 粒食物 ,记为成功并计数 ,术前共训练 3 周。成功率 = (成功次数 / 20) × 100%。

1.3 局灶性脑缺血诱导 参照文献^[12]方法 ,线栓法阻塞小鼠右侧大脑中动脉造成局灶性脑缺血。以水合氯醛(400 mg/kg ,ip)麻醉小鼠后 ,暴露右侧颈总动脉 ,结扎近心端 ,以细尼龙线(直径 0.128 mm)从颈外动脉分叉处插至颈内动脉约 10 mm ,直至遇到轻微的阻力 ,30 min 后拔出栓线 ,结扎血管 ,缝合皮肤。假手术组小鼠按相同方法手术 ,但不作血管结扎和阻塞。

1.4 行为学评价 脑缺血手术后 ,伸爪、神经症状评分及斜板试验在前两周内每 2 天观察 1 次 ,第 3 ~ 4 周每周观察 1 次。转角试验在第 1 周内每天观察 1 次 ,第 2 ~ 4 周每周观察 1 次。

1.4.1 伸爪试验(skilled reaching test): 脑缺血后 ,每只小鼠每次给予 20 粒食物 ,观察抓食的成功率。

1.4.2 转角试验(corner test): 用于检测综合感觉运动功能 ,包括触须的刺激(感觉/缺损)和后腿站立(运动反应)。参照文献^[5]方法 ,将小鼠放在两块 30 cm × 20 cm × 1 cm 成 30° 夹角

(连接处留一小缝)的木板间。当小鼠进入夹角深处,两侧触须首先触到木板后,向前向上后腿站立,然后转身面向夹角外侧。只有顺着夹角后腿完全站起然后转身,才作为完成1次试验。每只小鼠每次实验重复10次,观察并计算右转身次数的百分率。

1.4.3 神经症状评分(neurological deficit scoring):缺血后进行神经症状评分,参照 Berder-son 等^[1]的分级法评分,0:无症状;1:提尾时损伤对侧的前肢不能伸直;2:向损伤侧旋转;3:向对侧倾倒;4:无自发活动或意识不清。

1.4.4 斜板试验(inclined board test):用于评价平衡和协调运动功能,本实验室依据 Yonemori 等^[13]的方法并作改进。将小鼠放置在一平板(25 cm×15 cm)上,待小鼠在平板上站稳后,将平板从水平缓慢倾斜至垂直,记录小鼠在平板倾斜时跌落的最大角度(滞留角,holding angle),每只小鼠重复3次,取平均值。

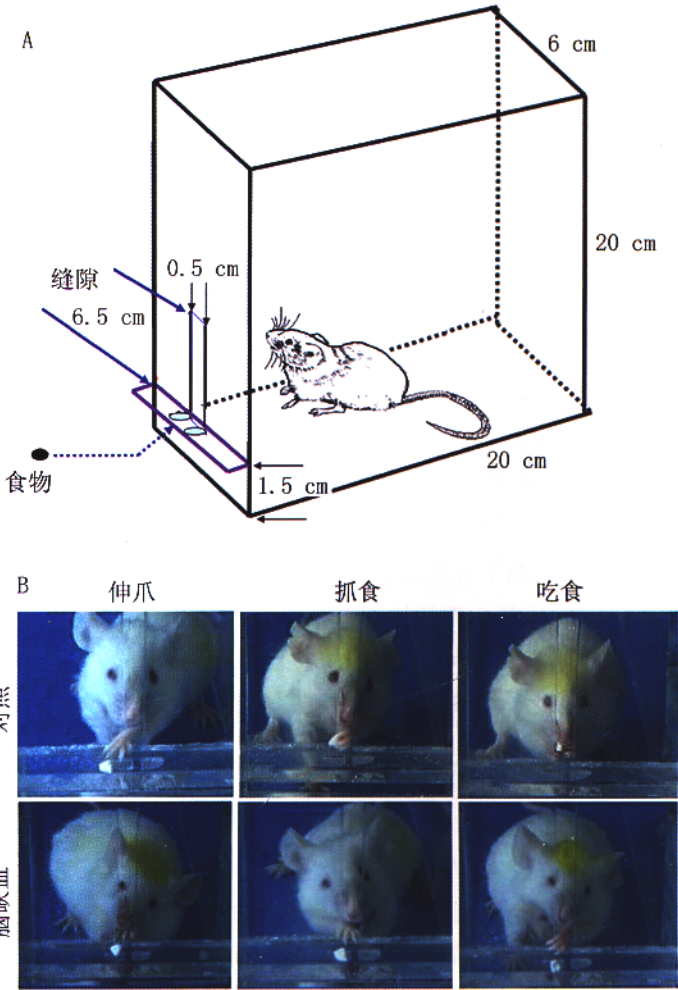
1.5 形态学观察 小鼠局灶性脑缺血后28天,心脏灌流后取脑,先以数码相机(日本富士公司 FinePix S602 Zoom)拍摄脑表面图像,然后作冰冻切片(厚10和20 μm)。20 μm切片以1%甲苯胺蓝染色后,用数码相机拍摄大体图像,用图像分析软件(AnalyPower1.0)计算脑片梗死区域面积,将每一脑片的缺血面积乘以厚度(1 mm),再将各脑片数值相加,得到全脑梗死灶体积的近似值。10 μm切片以1%甲苯胺蓝染色后,在光镜下观察,计数皮层Ⅲ~Ⅳ层(Bregma尾侧1.8~2.0 mm)、海马CA1区、纹状体单位面积下的神经元密度。

1.6 统计学分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 10.0 for windows 进行统计学处理。以单因素方差分析(one-way ANOVA)检验差异显著性,以Dunnett's检验比较组间均数的差异,以配对t-test作缺血侧和非缺血侧神经元比较。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学变化

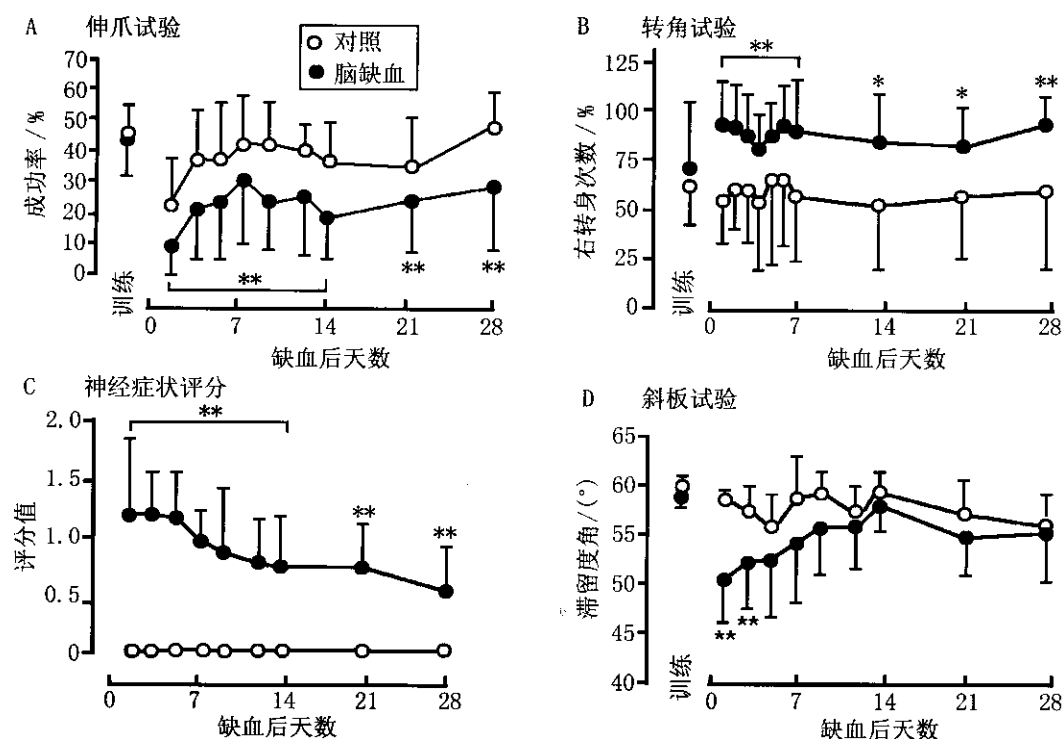
2.1.1 伸爪试验结果:伸爪试验的典型结果见图1B。术前1周对照组平均成功率44.7%±10.6%,手术组平均成功率47%±15.6%。对照



A. 伸爪实验盒用透明树脂制成,长20 cm,宽6 cm,高20 cm。在盒的前方壁的正中央有一条狭长的缝隙(距底面1.5 cm,高6.5 cm,宽0.5 cm),盒内用一挡板置于缝隙左侧。在缝隙底部有1.3 cm宽的平台,此平台正中距缝隙0.6 cm处有两个圆形凹槽,于缝隙右侧边缘的凹槽放置食物片,迫使小鼠从缝隙处伸出左前肢抓取食物;B. 对照组小鼠从缝隙处伸出左前肢,抓取并吃到凹槽内的食物(上图),但脑缺血组小鼠不能伸出左前肢,抓取并吃到食物(下图)

图1 小鼠伸爪试验装置及典型结果

Fig. 1 Schematic diagram of the reaching box for mice and the typical results of skilled reaching test



$\bar{x} \pm s$ 脑缺血组 $n=13$ 对照组 $n=9$;与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图2 小鼠局灶性脑缺血后各行为学指标的变化

Fig.2 Changes in various behavioral indicators after focal cerebral ischemia in mice

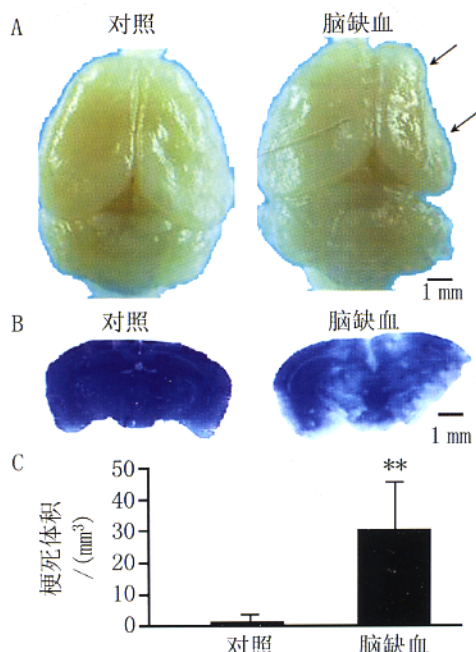
组小鼠在术后第1天成功率有所下降($22.7\% \pm 16.4\%$),但从第2天开始逐渐恢复,到第28天恢复至术前水平($47.8\% \pm 10.6\%$)。脑缺血小鼠从术后第1天开始抓食成功率明显下降,仅为 $8\% \pm 12.5\%$,从第2天开始逐渐有所恢复,但28天内仍显著低于对照组小鼠(图2A $P<0.01$)。

2.1.2 转角试验结果:对照组术后28天内,在转角试验中左右方向转位次数基本相同,48.6%为右转,51.4%为左转。脑缺血小鼠术后第1天到28天内,转角试验中右转次数持续显著增加(图2B $P<0.05 \sim 0.01$)。

2.1.3 神经症状评分结果:对照组小鼠术后28天内无神经症状。手术组小鼠术后28天内神经症状评分显著升高,虽有下降趋向,但未能恢复正常(图2C $P<0.01$)。

2.1.4 斜板试验结果:对照组小鼠术后28天内滞留角无显著变化。脑缺血小鼠在术后3天内滞留角显著下降(图1D $P<0.05$),但从术后5天开始逐渐恢复(图2D)。

2.2 梗死体积术后28天,脑表面大体摄影显示缺血侧半球有明显萎缩(图3A)冠状脑片病



A. 脑表面大体摄影;B. 甲苯胺蓝染色照片(距前囟1.8 mm) C. 统计结果 $\bar{x} \pm s$ 脑缺血组 $n=13$ 对照组 $n=9$;与对照组比较, ** $P<0.01$

图3 小鼠局灶性脑缺血4周后的脑损伤

Fig.3 Brain injury 4 weeks after focal cerebral ischemia in mice

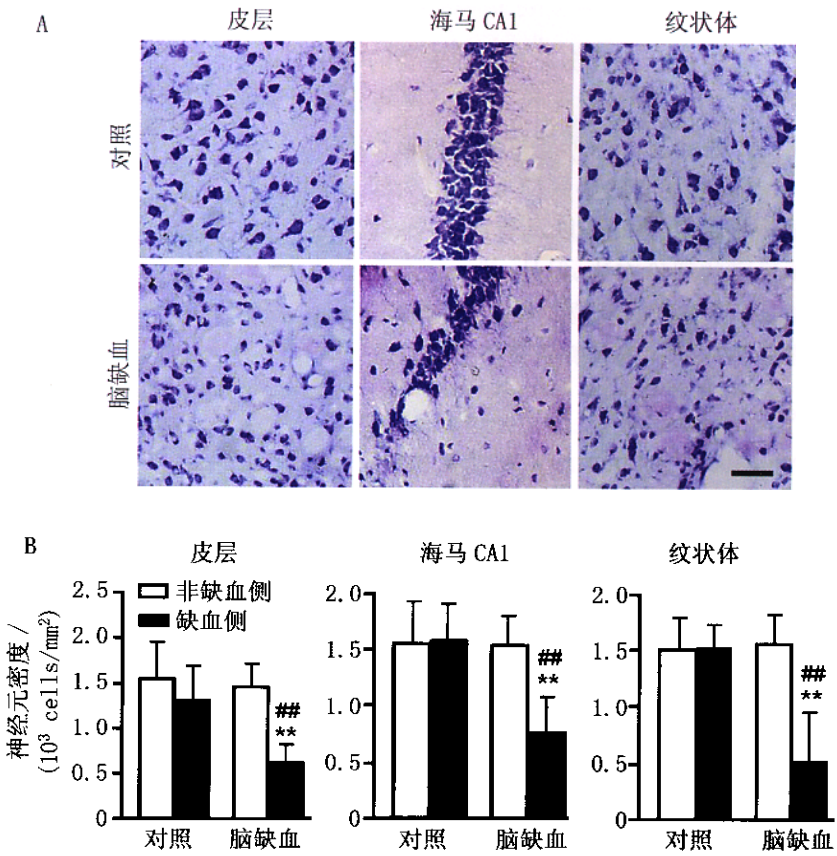
理学观察也显示缺血侧半脑的萎缩, 顶颞叶皮层、纹状体大部分、海马等脑区有明显的脑组织缺损(图 3B)。统计结果表明, 缺血侧半球梗死体积显著增加(图 3C, $P < 0.001$)。

2.3 神经元密度 术后 28 天, 缺血侧皮层Ⅲ~Ⅳ区、海马 CA1 区和纹状体神经元发生变性坏死, 尼氏小体减少, 神经元胞体固缩并且染色加深(图 4A)。统计结果表明, 缺血侧各脑区的形态正常的神经元密度显著减少(图 4B, $P < 0.01$)。

3 讨论

本研究表明, 伸爪试验与神经症状评分、转角试验均为评价小鼠局灶性脑缺血慢性损伤的有效方法。小鼠伸爪试验的结果与文献报道相似^[10-11], 是一种反映单侧肢体运动功能的良好指标; 并且, 我们的结果进一步表明其在评价脑缺血慢性损伤中的应用价值。

在采用的 4 项行为学评价指标中, 转角试验用于评价脑缺血后感觉/运动功能综合损伤, 是一种较稳定的指标^[5], 我们在为期 70 天的实验中, 表明该指标仍能反映感觉/运动功能损伤变化^[14], 但是, 转角试验不能准确反映单侧肢体的运动功能变化。神经症状评分是普遍采用的简便评价方法, 我们在小鼠脑缺血慢性损伤中, 发现缺血 42 天后神经症状可恢复正常^[14], 因此, 可用于 6 周内的脑缺血损伤变化。神经症状评分是一种主观判断指标, 不同观察者评判损伤程度的等级不尽一致, 且不能准确描述



$\bar{x} \pm s$, 脑缺血组 $n = 13$, 对照组 $n = 9$; 与非缺血侧(对侧)比较, $^{*}P < 0.01$; 与对照组比较, $^{##}P < 0.01$. 标尺为 50 μm

图 4 小鼠局灶性脑缺血 4 周后脑病理改变(A)及皮层、海马 CA1 区和纹状体神经元密度变化(B)

Fig. 4 Changes in brain morphology (A) and the neuron densities (B) in cortex, hippocampal CA1 region and striatum 4 weeks after focal cerebral ischemia in mice

具体变化特点。斜板试验用于评价整体协调功能, 也是一种简便且可定量的指标, 但是, 该指标变化的恢复较快, 仅能用于 3 天内的急性功能损伤。与上述指标比较, 伸爪试验的优点在于 ①反映脑缺血慢性损伤变化较稳定, 至少可反映 28 天内的变化; ②可观察单侧肢体的运动功能变化, 除了局灶性脑缺血, 还可用于大脑皮质运动区功能研究^[15]以及帕金森病等动物模型^[8]; ③对动物伸爪、抓食及吃食过程可作细致的轨迹分析, 进而发现更多的变化特征^[16]; ④客观性强、可定量分析、无损伤及应激影响。因此, 伸爪试验不仅是评价局灶性脑缺血慢性损伤的一种较好的选择, 也是其他神经精神病

变特征评价的有效方法。

研究脑缺血慢性损伤具有更加重要的临床意义,因此,建立理想的评价方法显得特别重要。我们已经建立一系列评价脑缺血损伤的方法^[17-22],本研究建立的小鼠伸爪试验,为深入研究脑缺血慢性功能损伤以及药物作用,提供了另一种稳定的评价方法。但是,其缺点是实验过程较长,术前需训练动物 3 周,对其伸爪、抓食及吃食等具体动作的计算机分析有待建立。

References :

- [1] BEDERSON J B , PITTS L H , 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.
- [2] ZHANG Q , WEI E Q , ZHU C Y , et al. Focal cerebral ischemia alters the spatio - temporal properties , but not the amount of activity in mice [J]. **Behav Brain Res** 2006 ,169(1) :66 - 74.
- [3] LI X , BLIZZARD K K , ZENG Z , et al. Chronic behavioral testing after focal ischemia in the mouse : functional recovery and the effects of gender [J]. **Exp Neurol** 2004 ,187(1) :94 - 104.
- [4] BUITRAGO M M , SCHULZ J B , DICHGANS J , et al. Short and long - term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm [J]. **Neurobiol Learn Mem** 2004 ,81(3) :211 - 216.
- [5] ZHANG L , SCHALLERT T , ZHANG Z G , et al. A test for detecting long - term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia [J]. **J Neurosci Methods** 2002 ,117(2) :207 - 214.
- [6] WHISHAW I Q , O'CONNOR W , DUNNETT S B. The contributions of motor cortex , nigrostriatal dopamine and caudate - putamen to skilled forelimb use in the rat [J]. **Brain** ,1986 ,109(Pt 5) :805 - 843.
- [7] GHARBAWIE O A , GONZALEZ C L , WILLIAMS P T , et al. Middle cerebral artery (MCA) stroke produces dysfunction in adjacent motor cortex as detected by intracortical microstimulation in rats [J]. **Neuroscience** 2005 ,130(3) :601 - 610.
- [8] KLOTH V , KLEIN A , LOETTRICH D , et al. Colour - coded pellets increase the sensitivity of the staircase test to differentiate skilled forelimb performances of control and 6 - hydroxydopamine lesioned rats [J]. **Brain Res Bull** 2006 ,70(1) :68 - 80.
- [9] GHARBAWIE O A , GONZALEZ C L , WHISHAW I Q. Skilled reaching impairments from the lateral frontal cortex component of middle cerebral artery stroke : a qualitative and quantitative comparison to focal motor cortex lesions in rats [J]. **Behav Brain Res** 2005 ,156(1) :125 - 137.
- [10] WHISHAW I Q. An endpoint , descriptive , and kinematic comparison of skilled reaching in mice (*Mus musculus*) with rats (*Rattus norvegicus*) [J]. **Behav Brain Res** ,1996 ,78(2) :101 - 111.
- [11] FARR T D , WHISHAW I Q. Quantitative and qualitative impairments in skilled reaching in the mouse (*Mus musculus*) after a focal motor cortex stroke [J]. **Stroke** 2002 ,33(7) :1869 - 1875.
- [12] MAO Y , YANG G Y , ZHOU L F , et al. Focal cerebral ischemia in the mouse : description of a model and effects of permanent and temporary occlusion [J]. **Brain Res Mol Brain Res** ,1999 ,63(2) :366 - 370.
- [13] YONEMORI F , YAMAGUCHI T , YAMADA H , et al. Evaluation of a motor deficit after chronic focal cerebral ischemia in rats [J]. **J Cereb Blood Flow Metab** ,1998 ,18(10) :1099 - 1106.
- [14] YU G L , WEI E Q , WANG M L , et al. Pranlukast , a cysteinyl leukotriene receptor - 1 antagonist , protects against chronic ischemic brain injury and inhibits the glial scar formation in mice [J]. **Brain Res** 2005 ,1053(1 - 2) :116 - 125.
- [15] BURY S D , JONES T A. Unilateral sensorimotor cortex lesions in adult rats facilitate motor skill learning with the "unaffected" forelimb and training - induced dendritic structural plasticity in the motor cortex [J]. **J Neurosci** ,2002 ,22(19) :5597 - 5606.
- [16] GHARBAWIE O A , AUER R , WHISHAW I Q. Subcortical middle cerebral artery ischemia abolishes the digit flexion and closing used for grasping in rat skilled reaching [J]. **Neuroscience** ,2006 ,

137(4) : 1 107 - 1 118.

[17] ZHANG Wei - ping ,WEI Er - qing ,ZHU Chao - yang ,et al(张纬萍 ,魏尔清 ,朱朝阳 ,等). Quantitative analysis for evaluating focal ischemia in rats [J]. **Journal of Zhejiang University : Medical Sciences** (浙江大学学报 :医学版) , 2002 ,31(2) : 72 - 76.(in Chinese)

[18] ZHANG Qi ,WEI Er - qing ,ZHU Chao - yang ,et al(张 琦 ,魏尔清 ,朱朝阳 ,等). A novel method for continuously assessing the spatio - temporal properties of locomotor activity in mice [J]. **Journal of Zhejiang University : Medical Sciences** (浙江大学学报 :医学版) , 2004 ,33(6) : 509 - 514.(in Chinese)

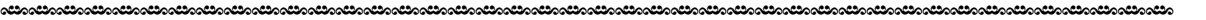
[19] WEI Er - qing(魏尔清). Improving and developing neuropharmacological research methods [J]. **Journal of Zhejiang University : Medical Sciences**(浙江大学学报 :医学版) , 2002 ,31(2) : 65 - 67.(in Chinese)

[20] CHEN Li - ping ,XU Hui - min ,ZHAO Wei ,et al (陈丽萍 ,徐慧敏 ,赵 炜 ,等). Photomac - rography of brain surface for evaluating blood - brain barrier disruption with 24 h after focal cerebral ischemia in mice [J]. **Journal of Zhejiang University Medical Sciences**(浙江大学学报 :医学版) , 2005 ,24(6) : 523 - 528.(in Chinese)

[21] HU Xin ,GE Qiu - fu ,ZHANG Lei(胡 欣 ,葛求富 ,张 磊). Homeostatic conditions affect protective effect of edaravone on ischemic injury in neurons [J]. **Journal of Zhejiang University Medical Sciences**(浙江大学学报 :医学版) , 2006 ,35(2) : 147 - 153.(in Chinese)

[22] SHENG Wen - wen ,ZHANG Wei - ping ,WANG Meng - ling ,et al(盛雯雯 ,张纬萍 ,王梦令 ,等). Incomplete protective effects of minocycline on traumatic brain injury in rats and mice [J]. **Journal of Zhejiang University : Medical Sciences** (浙江大学学报 :医学版) , 2006 ,35(4) : 411 - 418.(in Chinese)

[责任编辑 张荣连]



我校医学院陈新华博士获教育部“春晖杯”大赛一等奖

吸引了来自四大洲 17 个国家和地区百余位参赛者的首届“春晖杯”中国留学人员创新创业大赛 2006 年 12 月 28 日在广州隆重颁奖。浙江大学医学院附属第一医院肝胆胰外科陈新华博士的参赛项目《重大人畜共患肝脏寄生虫高通量快速检测系列》,喜获大赛一等奖。

首届“春晖杯”中国留学人员创新创业大赛是由中国教育部组织,“春晖计划”资助,教育部留学服务中心、科技部火炬高技术产业开发中心、广州留学人员科技交流会组委会办公室和威海经济技术开发区管委会共同主办的。大赛于 2006 年 7 月 17 日正式启动,历时半年,吸引了来自美国、日本、英国、法国、德国、瑞典、韩国、新加坡以及香港等 17 个国家和地区的中国留学人员参赛。参赛项目 269 个,涉及电子信息、生物医药、新材料、新能源与高效节能、农业等领域。大赛的目的是为了贯彻落实我国自主创新战略,发挥留学生的生力军作用,发掘、遴选一批具有高科技含量、有市场前景、适于创业的优秀项目,引导留学人才顺利走上回国创业的成功道路。有 137 位参赛者分获一等奖、二等奖和优秀奖。教育部副部长章新胜、科技部副部长尚勇等相关部门负责人出席颁奖仪式,并向获奖者颁奖。

陈新华博士的参赛项目受到导师郑树森院士的启发和精心指导,同时得到肝胆胰外科和外科实验室同仁们的倾力支持,在顺利通过初审、公示、终评、入围决赛后,终于脱颖而出,获得一等奖。