



上肢精准测试系统在食蟹猴脑缺血研究中的应用

朱华¹, 刘颖¹, 李秦², 卢珊⁴, 冯铭³, 肖冲¹,
安沂华⁵, 赵春华⁴, 王任直³, 秦川¹

- (1. 中国医学科学院北京协和医学院比较医学中心, 卫生部比较医学重点实验室, 北京 100021;
2. 中国医学科学院实验动物研究所 Motac 合作实验室, 北京 100050; 3. 中国医学科学院北京
协和医院, 北京 100073; 4. 中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005;
5. 北京神经外科研究所, 北京 100050)

【摘要】 目的 使用上肢精准测试系统对脊髓间充质干细胞治疗脑缺血的疗效进行行为学分析评价。方法 成年食蟹猴 18 只, 手术前 2 个月用上肢精准测试系统对动物进行训练并采集本底数据。采用光化学法制作局部脑缺血模型, 造模后 4 周将动物随机分为对照组、干细胞治疗高剂量组和低剂量组, 分别在缺血灶周围注射生理盐水、脊髓间充质干细胞 5×10^6 /只和 1×10^6 /只, 造模后 1 d、3 d、1、2、3、4 周及干细胞注射后 1 d、3 d、1、2、3、4、5、6、8 周采集行为学实验数据。比较造模前后和干细胞注射前后动物受损伤侧上肢抓取水果块的时间, 结合神经功能评分评价造模和干细胞治疗效果。结果 18 只动物手术后均出现与梗死部位对应的行为学症状。在术后采集数据的各个时间点损伤侧上肢行为学数据与手术前差异均存在极显著性 ($P < 0.01$)。神经功能评分术后 24 h 最高, 随后出现渐进性恢复。干细胞治疗后 3 d 到治疗后第 8 周, 模型组动物与高、低剂量组动物间精准上肢运动测试结果差异均存在显著性 ($P < 0.05$)。神经功能评分在治疗 2 周后出现显著性差异 ($P < 0.05$)。高、低剂量组间差异未见显著性。结论 上肢精准测试系统能客观准确的反应动物神经功能, 在非人灵长类脑卒中动物模型建立和药效学评价方面有广泛应用前景。

【关键词】 光化学法; 行为学; 非人灵长类; 脑卒中; 脊髓间充质干细胞; 食蟹猴

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)08-0053-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.08.013

Application of the Upper Extremity Precision Movement Analysis System in the Stroke Study in Cynomolgus Models

ZHU Hua¹, LIU Ying¹, LI Qin², LU Shan⁴, FENG Ming³, XIAO Chong¹,
AN Yi-hua⁵, ZHAO Chun-hua⁴, WANG Ren-zhi³, QIN Chuan¹

- (1. Center of Comparative medicine, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China; 2. Motac Laboratory, Institute of Laboratory Animal Science, CAMS, Beijing 100021; 3. Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730; 4. Institute of Basic Medical Science, PUMC & CAMS, Beijing 100005; 5. Beijing Institute of Neurosurgery, Beijing 100050)

【Abstract】 Objective To use the upper extremity precision movement analysis system in evaluation of the effect of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSC) in the treatment of non-human primate models of photochemically-

[基金项目] 863 课题, 项目编号: 2006AA02A115。

[作者简介] 朱华, 副主任技师, 研究方向: 病理与病理生理学。E-mail: zhuhua0226@vip.sina.com。

[通讯作者] 秦川, 教授, 博士生导师, 研究方向: 病理与病理生理学。E-mail: chuanqin@vip.sina.com; 赵春华, 教授。E-mail: chunhuaz@public.tpt.tj.cn; 王任直, 主任医师。E-mail: wangrz@126.com; 安沂华, 主任医师。E-mail: riveran@163.com。

induced stroke. **Methods** Eighteen adult male cynomolgus monkeys were used in this study. Training the animals for 2 months with mMAP and collect the basic data before the surgery. The infarction models were induced photochemically. The 18 monkeys were divided into three groups at 4 weeks after the surgery. The control group consisted of 6 animals receiving physiological saline in a volume of 250 μ L at 3 mm away from the outer edge of the infarction. The high-dose and low-dose groups received hBMSC with the cell number of 5×10^6 and 1×10^6 cells/animal, respectively, at the same site and volume for the control group. Behavioral data were collected at 1, 3 days, 1, 2, 3, 4 weeks after surgery and 1, 3 days, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 weeks after hBMSC transplantation. A primate neurological deficit scale was used to assess the neurological deficit at the same time. **Results** All 18 animals showed focal neurological signs corresponding to the targeted infarct site after the surgery. The time at that the animals picked up the food was much slower than that before the surgery ($P < 0.01$). The score was 32.3 ± 5.13 at the first post-operatively evaluation. The average score declined but never fully recovered after 4 weeks. From the 3rd day after transplantation, there were significant differences between the control and both low and high dose-groups with the movement analysis system ($P < 0.05$). From the 2nd week after transplantation, there were significant differences between the control and both low and high dose-groups in neurological deficit scores ($P < 0.05$). There was no significant difference between the high-dose and low-dose groups. **Conclusions** The precision movement analysis system used in this study reflects neurological function objectively and accurately, and can be used to measure the neuronal loss in vivo and to evaluate the effects of therapeutic strategies involving neural or stem cell transplantation in the establishment of animal stroke models and evaluation of drug efficacy studies.

【Key words】 Stroke model; Cynomolgus monkey; Behavior; Non-human primate; Bone marrow mesenchymal stem cells

动物模型是研究缺血性脑卒中损伤机制、对神经保护剂疗效作出判断必不可少的工具。啮齿类动物大脑与人的大脑有许多不同,对于相同缺血损伤的反应可能不同。因此,难以明确怎样将动物的给药方案扩大到人体。非人灵长类在种属关系上较接近于人,脑血管的解剖学特点与人类类似,更应引起研究者注意的是非人灵长类可技巧性的使用四肢完成运动任务。利用这些特点制备的灵长类缺血性脑卒中动物模型用于评价干细胞等神经保护剂的效果,不仅可以从组织病理学及影像学方面,更可通过较系统的行为学分析评价其疗效。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年雄性食蟹猴 18 只 [SCXK-(京)2005-005], 购自协尔鑫生物资源研究所,年龄 4~6 岁,体重 4.2~4.5 kg。

1.2 主要仪器及试剂

精准上肢测试系统:透明树脂板上嵌有食槽,每次训练及采集数据时将该装置悬挂于猴笼正面。

1.3 脑缺血模型的制作

使用光化学法制作局部脑缺血模型。具体方法见参考文献[1]。

1.4 干细胞移植

1.4.1 动物及分组:18 只动物分为模型对照组、高剂量组、低剂量组,分组的原则是各组动物间体重差异没有显著性。各组剂量(表 1)。

1.4.2 细胞注射:细胞为 250 μ L 的无色悬液,5 个移植途径,每个移植途径 50 μ L。进针深度 9 mm。每次注射完毕留针 1 min。移植速度 50 μ L/min。对照组注射等体积生理盐水。注射途径、速度、进针深度与剂量组相同。

1.5 行为学数据采集

1.5.1 前期训练:首先使动物消除恐惧心理,诱导动物能从实验者手中抓取水果块。与动物建立感情后,挂上实验装置,将水果块置于食槽中央。逐

表 1 动物分组

Tab. 1 Grouping of the animals

组别 Group	时间点 Time points	动物数量 Animal number	注射品 Injection dose
高剂量治疗组 High dose	造模后 4 周 4 weeks after modeling	6 只	人骨髓间充质干细胞 5×10^6 /250 μ L hBMSC
低剂量治疗组 Low dose	造模后 4 周 4 weeks after modeling	6 只	人骨髓间充质干细胞 1×10^6 /250 μ L HBMMSC
模型组 Control	造模后 4 周 4 weeks after modeling	6 只	生理盐水 250 μ L Saline

Note: hBMSC: Human bone marrow mesenchymal stem cells.

步引导动物从投食处取食。每天上、下午固定时间各进行 1 次。训练期间每日喂食改为 1 次,每次 30 g,训练结束后给与。保证饮水。训练期间监控动物体重,根据体重调整喂食量。

1.5.2 数据采集:所有动物从实验装置中取食状况稳定后进行本底数据采集。方法:将苹果切成 2 cm × 2 cm × 2 cm 大小,摆放在食槽中央,每次 5 块。用秒表记录动物将 5 块水果全部取走的时间。每次数据的采集在 1 d 内完成,共 5 次,每次间隔 2 h。每次采集时,水果块的大小、形状及摆放位置要一致。造模后 1 d、3 d、1、2、3、4 周及干细胞注射后 1 d、3 d、1、2、3、4、5、6、8 周采集实验数据,方法及采集时间与采集本底数据时相同。比较造模前后动物受损伤侧上肢抓取水果块的时间,评价造模效果。比较干细胞注射前后动物受损伤侧上肢抓取水果块的时间,评价干细胞的治疗效果。

1.5.3 神经功能评分:造模后 1 d、3 d、1、2、3、4 周及干细胞注射后 1 d、3 d、1、2、3、4、5、6、8 周使用经过修改、细化的 Kito 灵长类动物神经功能损害评分表对模型动物进行神经功能评分,其中意识 28 分,感觉系统 22 分,运动系统 32 分,骨骼肌共济协调 18 分共 100 分^[6]。

1.5.4 数据处理:使用 SPSS13.0 软件进行数据分

析,统计方法采用相关性分析,单因素方差分析,*P* 值小于 0.05 时认为差异有显著性。

2 结果

2.1 模型制作

18 只动物在麻醉苏醒后均出现了与梗死部位相对应的神经系统定位体征。主要表现为动物苏醒后 6 h 内表现为有意识但情绪低落,对疼痛和声音刺激不反抗。骨骼肌出现共济失调。受损伤侧上肢出现明显的麻痹,不能抓握。跛行。术后 3 d 部分动物的抓握能力有所恢复,但在采集数据的各个时间点,动物受损伤侧上肢抓取水果块的时间与手术前差异均存在极显著性 (*P* < 0.01) (表 2)。神经功能评分在术后 24 h 最高,随后出现渐进性恢复 (表 3)。

2.2 干细胞治疗

干细胞治疗后 1 d 动物的行为学表现已出现好转,但与对照组比较差异无显著性。从治疗后 3 d 开始到治疗后第 8 周,模型组动物与高低剂量组动物间在抓取水果块的时间上差异均存在显著性 (*P* < 0.05) (表 4)。神经功能评分在治疗 2 周后差异出现显著性 (*P* < 0.05) (表 5)。高、低剂量组间差异未见显著性。

表 2 手术前后动物抓取水果块时间的比较 ($s; \bar{x} \pm s; n = 18$)

Tab. 2 Comparison of the times at that the animals pick up the food before and after surgery

时间 Time	术前 B. S	术后 24 h 24 hrs A. S	术后 3 d 3 d A. S	术后 1 周 1 wk A. S	术后 2 周 2 wks A. S	术后 3 周 3 wks A. S	术后 4 周 4 wks A. S
左手 upper left hand	13.4 ± 1.82	150.9 ± 16.27**	105.1 ± 10.73**	87.5 ± 8.96**	64.9 ± 17.09**	58.1 ± 12.82**	48.4 ± 8.40**

Note: ***P* < 0.01, 手术前 ,B. S: before surgery; 手术后 ,A. S: after surgery.

表 3 手术前后神经功能评分结果 $n = 18$

Tab. 3 Comparison of neurological deficit scores before and after surgery

时间 Time	术前 B. S	术后 24 h 24 hrs A. S	术后 3 d 3 d A. S	术后 1 周 1 wk A. S	术后 2 周 2 wks A. S	术后 3 周 3 wks A. S	术后 4 周 4 wks A. S
得分 score	0	32.3 ± 5.13**	29.5 ± 4.69**	25.5 ± 1.00**	24.5 ± 4.44**	23.3 ± 2.83**	22.5 ± 2.87**

Note: ***P* < 0.01; B. S: before surgery; A. S: after surgery.

表 4 干细胞治疗前后动物抓取水果块时间的比较 ($s; \bar{x} \pm s; n = 6$)

Tab. 4 Comparison of the times at that the animals pick up the food before and after stem cell transplantation

组别 Group	时间 Time	术前 B. S	术后 24 h 24 h A. S	术后 4 周 4 wks A. S	移植 1 天 1 d A. T	移植 3 天 3 ds A. T	移植 1 周 1 wk A. T
模型组 Control		12.4 ± 2.71	160.3 ± 9.19	50.6 ± 9.65	46.8 ± 11.56	44.3 ± 15.75	48.2 ± 13.72
高剂量组 High dose		14.0 ± 6.90	155.5 ± 20.37	47.0 ± 6.45	34.4 ± 17.17	18.6 ± 2.98*	17.7 ± 6.18*
低剂量组 Low dose		13.3 ± 1.97	140.7 ± 24.34	49.3 ± 10.64	32.4 ± 12.89	23.4 ± 8.32*	21.9 ± 5.59*
组别 Group	时间 Time	移植 2 周 2 wks A. T	移植 3 周 3 wks A. T	移植 4 周 4 wks A. T	移植 5 周 5 wks A. T	移植 6 周 6 wks A. T	移植 8 周 8 wks A. T
模型组 Control		42.1 ± 17.48	46.5 ± 7.49	41.5 ± 2.69	49.0 ± 3.39	46.6 ± 14.99	46.5 ± 15.98
高剂量组 High dose		19.1 ± 5.86*	27.8 ± 16.94*	25.3 ± 14.61*	27.1 ± 15.40*	22.2 ± 6.93*	22.8 ± 6.35*
低剂量组 Low dose		23.6 ± 6.12*	22.2 ± 1.60*	15.7 ± 1.81*	20.8 ± 0.72*	18.7 ± 1.94*	20.0 ± 5.90*

Note: * *P* < 0.05, 手术前 ,B. S: before surgery; 手术后 ,A. S: after surgery; A. T: after stem cell transplantation.

表 5 干细胞治疗前后神经功能评分结果 ($n=6$)
 Tab. 5 Comparison of neurological deficit scores before and after stem cell transplantation

组别 Group	时间 Time	术前 B. S	术后 24 h 24 hrs A. S	术后 4 周 4 wks A. S	移植 1 天 1 d A. T	移植 3 天 3 ds A. T	移植 1 周 1 wk A. T
模型组 Control		0	31.9 ± 2.55	22.3 ± 3.77	21.8 ± 2.87	20.3 ± 1.89	20.8 ± 2.83
高剂量组 High dose		0	33.1 ± 3.21	23.1 ± 2.99	20.5 ± 2.22	18.1 ± 1.71	16.8 ± 3.00*
低剂量组 Low dose		0	32.4 ± 1.77	22.6 ± 2.13	20.8 ± 2.38	19.3 ± 2.45	15.8 ± 2.87*
	时间 Time	移植 2 周 2 wks A. T	移植 3 周 3 wks A. T	移植 4 周 4 wks A. T	移植 5 周 5 wks A. T	移植 6 周 6 wks A. T	移植 8 周 8 wks A. T
模型组 Control group		21.0 ± 1.92	20.1 ± 1.42	18.3 ± 1.16	17.9 ± 1.26	17.5 ± 1.00	17.6 ± 2.31
高剂量组 High dose group		12.5 ± 1.71*	11.8 ± 1.50*	10.8 ± 1.72*	9.5 ± 1.98*	10.4 ± 1.71*	9.7 ± 1.16*
低剂量组 Low dose group		11.5 ± 1.52*	11.2 ± 0.96*	10.9 ± 1.88*	10.2 ± 1.46*	10.3 ± 2.38*	10.8 ± 1.92*

*: $P < 0.05$; B. S: 手术前 before surgery; 手术后 A. S: after surgery; 移植后 A. T: after stem cell transplantation.

3 讨论

对实验动物缺血损伤后的行为做出评价是与人类卒中后临床表现特点紧密相关的。1999 年在美国佛罗里达州召开的 STAIR 卒中会议制订了六条评价脑卒中新药的标准,其中第四条强调了神经功能测评的重要性。目前在对神经保护剂的疗效进行评价时,研究者的注意力大多放在缺血后的病理改变上。但早在 1986 年,Bothe 等就已经发现了“隐蔽损伤”现象^[2],即缺血损伤后有时尽管组织病理表现是接近正常甚至是正常的,但已存在功能异常。此时,以缺血面积或细胞的丧失程度做为评价标准显然是不可靠的。因而缺血损伤后行为学检查所显示的功能异常成为确定神经元早期死亡的唯一手段。

目前用于非人灵长类的神经行为评价方法主要有两种:量表法和通过完成任务来测试动物脑缺血损伤后的运动损害、认知障碍、肢体力量及精细运动功能等。专门为猴卒中设计的量表包括卒中临床等级评价量表^[3]、标准神经评定量表^[4,5]、猴栓塞后神经缺陷评价量表等^[6],其中的猴栓塞后神经缺陷评价量表即我们采用的 kito 量表。这个量表专门针对神经系统损伤而设计,与临床卒中病人采用的量表类似。通过完成任务来测试非人灵长类神经功能的方法主要有:抓取食物丸任务^[7,8],主要用于评价手的灵巧度;山和谷阶梯任务^[9],主要用于鉴别运动损害与视觉空间缺陷。精细运动测试主要用于评价肢体力量和精细运动功能,符合本实验的要求。因此采用这种测试方法评价模型动物的神经功能。

用量表对灵长类的神经功能进行评价的优点是比较直观,可分系统对神经功能进行评价,不需要对动物进行训练。但要求评价者有较丰富的经

验,不同的人对同一动物进行评价其结果可能相差较多。精细上肢运动测试方法在实验正式开始前需要花费大量时间对动物进行训练,动物一旦掌握了抓取食物的方法,即可通过时间上的差异对动物手术前后及注射干细胞后的疗效进行比较客观的评价。

我们对文献报道的精细上肢运动测试系统进行了改造,使测试板配有树脂玻璃限制,只有被评价的上肢能接近,通过记录动物取出全部水果块的时间可提供关于肢体力量、精细运动功能方面的全部信息。实验结果显示,食蟹猴光化学法造模后出现了明显的行为学症状。随着时间推移症状有所减轻,2 周左右神经功能评分和精细上肢运动测试都达到稳定状态。表明模型建立方法是稳定可靠的。剂量组行为学在注射干细胞后 3 d 开始改善。神经功能评分和精细上肢运动测试分别在注射后 2 周和 1 周出现显著性差异。在今后的实验中,可通过 2 名有经验的人员分别进行评价,取二者平均值的方法减少量表评价法的主观性。

综上所述,上肢精准测试系统虽然在实验前需要做较多的准备工作,但因其能客观准确的反应动物神经功能,结合神经功能评分,在非人灵长类脑卒中动物模型建立和药效学评价方面有广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] 朱华,李秦,冯铭,等. 光化学法制作食蟹猴局部脑缺血模型[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(9): 32-34.
- [2] Bothe HW, Bosma HJ, Hofer H, et al. Selective vulnerability of hippocampus and disturbances of memory storage after mild unilateral ischemia of gerbil brain [J]. Stroke, 1986, 17: 1160-1163.
- [3] Ben R, Naimath K, Eray T, et al. Chronic ischemic stroke model in cynomolgus monkeys: behavioral, neuroimaging and anatomical study [J]. Neurol Res, 2003, 25(1): 68-78.

(下转第 60 页)

杂的左耳动脉穿刺技术,动物麻醉不必太深,操作较为方便。但通过心脏穿刺造影时穿刺针有可能进入心房或右心室,心脏搏动也可能造成造影剂进入心肌或心包内。本实验中有 2 只动物造影剂少量进入心包,但后面随访 3 个月过程中并未发生死亡。因此,对于双侧股动脉已经结扎的动物,不能行股动脉穿刺造影或左耳中央动脉穿刺造影失败时,尤其在处死前,可考虑进行心脏穿刺造影方法显示动脉瘤。

4 小结

不同的造影方法均能显示弹性酶诱导的兔囊状动脉瘤,各种方法均有优缺点。经股动脉穿刺超选造影方法最能清晰显示动脉瘤,但对动物创伤最大,可在介入治疗及处死前造影时选用。耳缘静脉穿刺造影方法对动物创伤最小,但显影最差,可在筛查及多次随访时采用。经左耳中央动脉逆行造影方法亦能清晰显示动脉瘤,但耳中央动脉不易穿刺,对动物麻醉较深,且只适合双侧颈总动脉共同经无名动脉发出的动物。心脏穿刺造影方法由于心脏搏动,造影剂易外渗,在其它动脉造影方法失败时可选用。

参考文献:

- [1] Kadirvel R, Ding YH, Dai D, et al. Intrinsic pathway-mediated apoptosis in elastase-induced aneurysms in rabbits [J]. Am J Neuroradiol, 2010, 31: 165 - 169.
- [2] 王奎重, 刘建民, 黄清海, 等. 改良的胰弹性蛋白酶诱导兔囊状动脉瘤模型 [J]. 中华神经外科杂志, 2010, 26: 744 - 747.
- [3] Krings T, Busch C, Sellhaus B, et al. Long-term histological and scanning electron microscopy results of endovascular and operative treatments of experimentally induced aneurysms in the rabbit [J]. Neurosurgery, 2006, 59: 911 - 923.
- [4] Doerfler A, Becker W, Wanke I, et al. Multimodal imaging in the elastase-induced aneurysm model in rabbits: a comparative study using serial DSA, MRA and CTA [J]. Rofo Fortschr Gebb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr, 2004, 176: 590 - 596.
- [5] Ding YH, Dai D, Lewis DA, et al. Intra-venous digital subtraction angiography: an alternative method to intra-arterial digital subtraction angiography for experimental aneurysm imaging [J]. Neuroradiology, 2005, 47: 792 - 795.
- [6] 祝胜, 刘建民, 王奎重, 等. 兔囊性动脉瘤模型静脉造影的应用经验 [J]. 介入放射学杂志, 2009, 18: 518 - 520.
- [7] Ding YH, Dai D, Lewis DA, et al. Long-term patency of elastase-induced aneurysm model in rabbits [J]. Am J Neuroradiol, 2006, 27: 139 - 141.
- [8] Ding YH, Dai D, Layton KF, et al. Vascular anatomic variation in rabbits [J]. J Vasc Interv Radiol, 2006, 17: 1031 - 1035.
- [9] Miskolczi L, Nemes B, Cesar L, et al. Contrast injection via the central artery of the left ear in rabbits: a new technique to simplify follow-up studies [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2005, 26: 1964 - 1966.
- [10] Ding YH, Dai D, Danielson MA, et al. Intra-arterial digital subtraction angiography through the ear artery for experimental aneurysm imaging [J]. Am J Neuroradiol, 2006, 27: 1700 - 1702.
- [4] Huang J, Mocco J, Choudhri TF, et al. A modified transorbital baboon model of reperfused stroke editorial comment [J]. Stroke, 2000, 31(12): 3054 - 3063.
- [5] Mack WJ, King RG, Hoh DJ, et al. An improved functional neurological examination for use in nonhuman primate studies of focal reperfused cerebral ischemia [J]. Neurol Res, 2003, 25 (3): 280 - 288.
- [6] Kito G, Nishimura A, Susumu T, et al. Experimental thromboembolic stroke in cynomolgus monkey [J]. J Neurosci Methods, 2001, 105(1): 45 - 53.
- [7] Yonas H, Wolfson SK, Dujovny JM, et al. Selective lenticulostriate occlusion in the primate. A highly focal cerebral ischemia model [J]. Stroke, 1981, 12(5): 567 - 572.
- [8] Marshall JW, Ridley RM, Baker HF, et al. Serial MRI functional recovery and long term infarct maturation in a non human primate model of stroke [J]. Brain Res Bull, 2003, 61 (6): 577 - 585.
- [9] Marshall JW, Ridley RM. Assessment of cognitive and motor deficits in a marmoset model of stroke [J]. ILAR J, 2003, 44 (2): 153 - 160.

(修回日期)2011-03-06

(修回日期)2011-01-20

(上接第 56 页)