



一种改进的非人灵长类神经功能缺损评价方法

朱 华¹, 卢 珊⁴, 冯 铭³, 李 秦², 刘 颖¹, 代小伟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, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 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 1000730;
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 对文献中的量表进行修改和细化后用于实验猴的神经功能动态量化观察,使其更适于灵长类脑卒中神经功能缺损的评价。方法 成年食蟹猴 12 只,用自体股动脉抗凝血脑内立体注射的方法建立脑出血模型,造模后 1 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,分别在出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 6h,1d,3d,1w 后及干细胞注射后 1d,3d,1w,2w,3w,4w 在每天的固定时间使用文献中的表格和/或改进的表格进行评分,比较造模前后和干细胞注射前后动物受损伤侧上肢神经功能缺损情况评价造模和干细胞治疗效果。结果 造模手术前,所有动物的行为表现均正常,神经功能评分为 0。造模手术后 6h,用修改前后的表格评分均为 31 分左右。但从术后 3d 开始出现评分上的差异。用修改后的表格对动物的神经功能进行评分结果显示干细胞注射后 1 周开始到动物被安乐时,剂量组与对照组之间的神经功能评分出现显著性差异 ($P < 0.05$)。高、低剂量组间未见显著性差异。结论 改进的表格克服了旧表格中分差大,评价标准模糊的缺点,提高了量表评价的敏感性,具有良好的临床相似性和可操作性。为建立标准化神经功能评价量表进行了有益尝试。

【关键词】 脑出血;神经功能评分;食蟹猴;干细胞

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)09-0058-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.09.014

A Proved Neurological Deficit Scale of Non-human Primate

ZHU Hua¹, LU Shan⁴, FENG Ming³, LI Qin², LIU Ying¹, DAI Xiao-wei¹,
AN Yi-hua⁵, ZHAO Chun-hua⁴, WANG Reng-zhi³, QIN Chuan¹

(1. Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Beijing Union Medicine College, Beijing 100021, China;
2. Motac Laboratory, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China; 3. Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China;
4. Institute of Basic Medical Science, PUMC & CAMS, Beijing 100005, China;
5. Beijing Institute of Neurological Surgery, Beijing 100050, China.)

[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。

【Abstract】 Objective Use the proved Non-human Primate Neurological deficit scale to evaluate the effect of Intracerebral Hemorrhage model of Cynomolgus macaques Treatment with Human Bone Marrow Mesenehymal Stem Cells. **Methods** 12 adult male Cynomolgus monkeys were used in this study. The Intracerebral Hemorrhage model were made by using the autologous anticoagulated femoral artery blood injection. 12 monkeys were divided into three groups one week after the surgery. The control group consisted of four animals receiving physiological saline in the volume of 250 μ L 3 mm away from the outside edge of the infarcts. The high-dose and low-dose group receiving Human Mesenehymal Stem Cell(hMSC) with the cell number of 5×10^6 and 1×10^6 at the same place and volume with the control group. Use the Non-human Primate Neurological deficit scale and/or proved to evaluate the effect of the stem cell at the 6h ,1d ,3d ,1week after surgery and 1 3 day and 1 ,2 ,3 ,4 weeks after transplantation. **Result** Compared with the group , the score of the dose-group animals much slower than that in the control group after transplantation($p < 0.05$). There is no significant difference between high-dose and low-dose group. **Conclusion** The proved Non-human Primate neurological deficit scale is more objectively and accurately than the original one and can be used to measure neuronal loss in vivo and to evaluate the effects of therapeutic strategies involving neural or stem cell transplantation.

【Key words】 Intracerebral hemorrhage; Neurological deficit; Cynomolgus macaques; Stem cell

动物模型是研究脑血管疾病损伤机制和防治措施必不可少的工具。评价量表在监测临床卒中病情变化、疗效判断、预测结局及大样本临床试验研究中起重要作用。目前为止国际上尚无一个公认的可用于多中心临床研究的脑卒中评定量表，与之相关的灵长类脑卒中动物模型及神经行为评价方法更是缺乏，严重影响了临床科研资料的可比性。针对这个问题，在进行食蟹猴脑出血模型制作及干细胞治疗的研究过程中，我们对目前灵长类脑卒中模型评价中常用的 KITO^[1]量表进行修改和细化后对实验猴的神经功能进行了动态量化观察，使其更适于灵长类脑卒中神经功能缺损的评价。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年雄性食蟹猴 12 只，购自军事医学科学院实验动物中心，年龄 4 ~ 6 岁，体重 4.2 ~ 4.5 kg。

1.2 脑出血模型的制作

使用自体股动脉抗凝血脑内注射方法建立脑出血模型，见参考文献^[2]

1.3 干细胞治疗

1.3.1 动物分组：12 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没有显著性差异。各组剂量见下表。

1.3.2 细胞注射：细胞为 250 μ L 的无色悬液，2 个移植途径，每个移植路径分 3 个点注射，每点移植量为 40 μ L，细胞数约 6.7×10^5 ，移植速度 10 μ L/min。对照组：等体积生理盐水。

1.4 神经功能评分

原始评价量表来源于文献 1，在原表格基础上进行细化修改。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。造模后 6 h，1 d，3 d，1 w 及干细胞注射后 1 d，3 d，1 w，2 w，3 w，4 w 在每天的固定时间使用文献中的表格和改进的表格同时进行评分。表中的“威逼”刺激特指使用钝头钢条轻轻接触或试图接触动物。没有任何捅、刺、扎、拨、挑等的强制外力施加于动物。声音刺激特指使用钝头钢条轻轻敲击动物笼具发出的 70 db 左右的金属碰撞声。接触刺激特指使用毛刷轻轻接触动物肌肤。除轻微的扫刷力量外，没有其他任何强制外力施加于动物。所有评分由同一名有经验的评价者完成。

表 1 人骨髓间充质干细胞移植治疗食蟹猴脑出血实验分组

Tab. 1 The grouping of the animal

组别 Group	时间点 Transplantation time	动物数量 Animal number	注射品 Injection dose
高剂量治疗组(High dose)	造模后 1 周(1 week after surgenry)	4	人骨髓间充质干细胞 5×10^6 (Human mesenehymal stem cells)
低剂量治疗组(Low dose)	造模后 1 周(1 week after surgenry)	4	人骨髓间充质干细胞 1×10^6 (Human mesenehymal stem cells)
模型对照组(Control)	造模后 1 周(1 week after surgenry)	4	PBS

表 2 改进的神经功能评价表
Tab.2 The proved neurological deficit scale

类别 (Category)	神经功能 (Neural system function)	评分 (Score)
意识 (0 - 28) Consciousness	正常警觉性,有强的攻击性和逃离倾向 Normal, consistently alert, strongly aggressive, escape prone	0
	有意识但情绪稍低落,尚有较强的攻击性 Conscious but clouded, strongly aggressive	2
	有意识且有较弱的攻击性 Conscious, poorly aggressive	4
	有意识且有轻微反抗和明显逃离倾向 Conscious, light opposition, escape prone	6
	有意识但情绪低落且不反抗 Conscious but clouded and accepting	8
	昏昏欲睡,声音刺激能唤醒 Drowsiness, aroused with stimulation	10
	昏昏欲睡,声音刺激能睁眼 Lethargic, eyes open by strong stimulation	16
	昏迷,持续声音刺激能唤醒 Stuporous, aroused with persistent stimulation	20
	轻度昏迷,仅有反射运动 Light coma, reflex movement only	24
	深度昏迷,没有运动 Deep coma, no movement	28
骨骼肌肉协调 Skeletal muscle coordination (0 - 18)	正常,行走正常 Normal, walks normal	0
	总体运动协调性有轻微异常(共济失调发生为一过性间歇性) Light, transient abnormality in motor coordination	2
	最小程度的共济失调,步态有轻微异常 Minimal ataxia, walks with some impairment of gait	4
	共济失调,但能攀登铁笼 Ataxia, but able to climb the cage	6
	受到威逼刺激能够行走,但攀爬困难 Walks with compelling stimulation, but difficulty in climbing the cage	8
	本能的站立,行走几步就倒下 Stands spontaneously, falls within few steps	10
	坐着(不能站立),受到威逼刺激只能旋转身体 Sits, just able to circle with compelling stimulation	12
	坐着或趴着(不能站立或长时间保持坐姿),对威逼刺激有反应 Sits or prostrate, can not stand or sit for long duration, with response to compelling stimulation	14
	只能侧躺或仰面躺,对威逼刺激有反应 Posed lateral or dorsal recumbency, with response to compelling stimulation	16
	没有活动,对威逼刺激几乎没有反应 No movement, almost with no response to compelling stimulation	18
感觉系统 (0 - 22) Sensory system (0 - 22)		
面部反应 Facial sensation	面部对威逼刺激都有协调反应(攻击,威胁,躲避,示好等) Concerted reaction to compelling stimulation (aggression, threaten, escape prone, expressing goodwill)	(0/0)
	面部对威逼刺激的协调反应性降低(攻击,威胁表情明显减少) Decreased in concerted reaction to compelling stimulation (obvious decreases in aggressive or threatening expressions)	(1/1)
	面部对威逼刺激的协调反应性明显降低(示好表情明显减少) Decreased in concerted reaction to compelling stimulation (obvious decreases in expressing goodwill)	(2/2)
	感觉缺失,接触刺激面部任何部位都没有反应 Absent, does not react to compelling stimulation in any area of face	(3/3)
耳颤反射 Pinna reflex	耳朵颤动能力正常 Twitches ear normally	(0/0)
	动耳朵能力轻微降低,对声音刺激有动耳反应 Slightly reduced in ear twitching, twitches ear by sonic stimulation	(1/1)
	动耳朵能力明显降低,对声音刺激没有动耳反应 Obviously reduced in ear twitching, no ear twitching by sonic stimulation	(2/2)
	感觉缺失,接触刺激时不表现出耳朵颤动 Absent, does not move ear by contact stimulation	(3/3)
疼痛反射(下肢) Pain reflex (Lower limb)	脚趾对接触刺激有完全、快速的收缩反应 Strong, quick, complete withdrawal by contact stimulation	(0/0)
	脚趾对接触刺激有较快速的收缩反应 Comparatively quick withdrawal by contact stimulation	(1/1)
	脚趾对接触刺激有较慢的收缩反应 Comparatively slow withdrawal by contact stimulation	(2/2)
	脚趾对接触刺激有弱的、慢的、不完全的、不协调的收缩反应 Weak, slow, incomplete, or inconsistent withdrawal by contact stimulation	(3/3)
	脚趾对接触刺激有极弱的、慢的、收缩反应 Very weak, slow withdrawal by contact stimulation	(4/4)
	感觉缺失,脚趾对接触刺激没有收缩反应 Absent, no withdrawal by contact stimulation	(5/5)
运动系统 (0 - 32) Motor system		
手 Hand	正常 Normal	(0/0)
	轻微运动障碍(速度稍慢、力量稍弱、准性稍差) Light dyskinesia (slow velocity, poor strength, and parasequity)	(1/1)
	力量/技巧减弱(运动障碍相对明显) Reduced strength or skill (comparatively obvious dyskinesia)	(2/2)

续表

类别 (Category)	神经功能 (Neural system function)	评分 (Score)
腿 Leg	较重度的运动障碍(速度很慢、力量很弱、准性很差)或不动 Obvious dyskinesia (very slow velocity , very poor strength , and parasexuality)	(3 / 3)
	麻痹/无运动能力 Paralysis or useless	(4 / 4)
	正常 Normal	(0 / 0)
	轻微运动障碍(速度稍慢、力量稍弱、准性稍差) Light dyskinesia (slow velocity , poor strength , and parasexuality)	(1 / 1)
	膝盖弯曲站立(运动障碍相对明显) Raises with flexion of knee (comparatively obvious dyskinesia)	(2 / 2)
	较重度的运动障碍(速度很慢、力量很弱、准性很差) Obvious dyskinesia (very slow velocity , very poor strength , and parasexuality)	(3 / 3)
	能动 ,但不能站立 Can move , but not against gravity	(4 / 4)
手指 Upper limb toe	能动 ,不能站立 ,但几乎不动 Almost can not move	(5 / 5)
	麻痹/无运动能力 Paralysis or useless	(6 / 6)
	正常 Normal	(0 / 0)
	轻度痉挛和无力(表现为手指抓握时有翘指) Lightly spastic or flaccid (occasionally raised fingers when grasping)	(1 / 1)
	中度痉挛和无力(表现为手指抓握时有持续翘指) Relatively spastic or flaccid (continue to raised fingers when grasping)	(2 / 2)
	明显痉挛和无力 Obviously spastic or flaccid	(3 / 3)
	正常 Normal	(0 / 0)
脚趾 Lower limb toe	轻度痉挛和无力(表现为手趾抓握时有翘趾) Lightly spastic or flaccid (occasionally raised toes when grasping)	(1 / 1)
	中度痉挛和无力(表现为手趾抓握时有持续翘趾) Relatively spastic or flaccid (continue to raised toes when grasping)	(2 / 2)
	明显痉挛和无力 Obviously spastic or flaccid	(3 / 3)
	正常 Normal	(0 / 0)

1.5 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 , $P < 0.05$ 时认为有显著性差异。

2 结果

造模手术前 ,所有动物的行为表现均正常 ,神经功能评分为 0。造模手术后 6 h 动物在麻醉苏醒后均出现了与血肿部位相对应的神经系统定位体征。主要表现为有意识但情绪低落 ,对刺激不反抗。受到威逼刺激能够行走 ,但攀爬困难。对脚趾疼痛有弱的、不完全的、不协调的收缩反应。左前肢出现明显的麻痹 ,失去运动能力。用修改前后的表格评分均为 31 分左右。但从术后 24 h 开始出现评分上的差异。随着时间的推移这种差异更加明显。干细胞注射前将动物进行随机分组后 ,用原表格评价的分数各组之间虽然没有统计学上的显著性差异 ,但低剂量组的分数比高剂量组和模型组低且标准差较大。改进表格统计的数据较平均 ,因此在注射干细胞后采用改进的表格进行评分。结果显示干细胞注射后 1 周开始到动物被安乐时 ,剂量组与对照组之间的神经功能评分出现显著性差异 ($p < 0.05$)。高、低剂量组间未见显著性差异。

3 讨论

脑卒中临床神经功能缺损程度评分标准在治

疗预后评估方面有很好的参考价值。临床医师根据长期临床经验 ,提出好的脑卒中评定量表应满足以下标准^[3]:1、量表应包括足够的神经功能缺损评定项目 ,而且包含的项目对结局有预测性;2、量表的重测信度和评定者间信度好 ,内部一致性好;3、量表应敏感 ,评分要覆盖神经功能缺损的整个范围;4、使用方便 ,使用者易掌握 ,整个评定时间最好不超过 14 min。为了评分的可信性应该只包括定义明确、容易评分的项目;但为保持量表整体的敏感性 ,量表中应包括能体现各种脑卒中类型的项目。这两者之间就存在着矛盾。所以在制订脑卒中评定量表时应全面考虑综合分析。虽然灵长类动物大脑的构筑、白质与灰质的比值及微血管网络的分布区域与人类类似 ,但种系发生上的差异使评价灵长类动物的神经功能缺损不能简单的平移临床量表^[4,5]。可准确反映灵长类神经功能缺损的量表必须根据灵长类动物的特点结合临床指标而设计^[6]。我们之所以已 Kito 的表格为基础进行改进主要原因有以下几点:1、评分表的格式采用的是临床常用的 glasgow 昏迷评分 ,比较直观。2、内容设置比较全面合理:评分包含 4 各方面:意识、骨骼肌协调、感觉系统和运动系统。其中前 3 项既与临床相关 ,是临床评分表格中的必备项目 ,又体现了动物野外生存应对外界危机各种刺激的反应能力。在运动功能的

检查项目中,首先是将前后肢分开进行评价,因为猴的前肢功能在进化过程中基本独立出来,主要用于抓握和攀爬等,前肢功能损伤会严重降低动物的野外生存能力。另外在每个分项目均有反映肢体

麻痹的内容,并把左右前肢分开评价。我们的实验也证实造模手术主要影响动物对侧上肢的感觉运动功能,同侧则几乎不受影响。因而把左右前肢分开评价非常必要。

表 3 造模及干细胞治疗前后神经功能评分结果

Tab. 3 Neurological deficit score after stroke and human mesenchymal stem cell transplantation

时间 Time	分组 Group	最低分 Minimum		最高分 Maximum		Mean ± SD		P
		旧表 Unproved	新表 Proved	旧表 Unproved	新表 Proved	旧表 Unproved	新表 Proved	
造模后 6 hn = 12		28	28	35	37	31.32 ± 2.12	31.54 ± 1.87	0.355
造模后 1 dn = 12		27	28	31	33	28.83 ± 2.97	29.37 ± 2.13	0.131
造模后 3 dn = 12		25	27	29	31	27.94 ± 3.34	29.01 ± 2.41	0.145
造模后 1w(移植前) n = 4	HDG	23	25	30	31	26.55 ± 3.44	26.75 ± 2.17	0.432
	LDG	22	24	27	28	23.33 ± 4.31	25.25 ± 1.89	0.102
	CG	25	27	29	30	25.22 ± 3.78	26.83 ± 2.37	
移植后 1wn = 4	HDG		14		20		17.50 ± 2.65	0.040*
	LDG		14		20		16.00 ± 2.83	0.021*
	CG		22		26		23.75 ± 1.71	
移植后 2wn = 4	HDG		14		21		17.50 ± 2.89	0.040*
	LDG		13		20		17.25 ± 3.10	0.033*
	CG		20		25		23.00 ± 2.45	
移植后 2wn = 4	HDG		12		16		13.50 ± 1.92	0.002*
	LDG		11		16		14.25 ± 2.22	0.005*
	CG		18		23		20.25 ± 2.06	
移植后 4wn = 4	HDG		3		12		8.00 ± 3.74	0.003*
	LDG		8		12		10.00 ± 1.83	0.012*
	CG		15		20		16.75 ± 2.22	

注: HDG: 高剂量组。LDG: 低剂量组。CG: 模型对照组。*: $P < 0.05$

Note: HDG: high dose group. LDG: low dose group. CG: control group

感觉和反射功能在神经功能评价中占有非常重要的地位,但往往因为无法准确检查而不被包括在检查项目中。原表格中虽然对深浅感觉和各项反射功能进行了列项,但评价标准比较模糊,而且每个条目之间分差较大,当动物症状不明显时量表的敏感性减低。即损伤程度越轻,改进表格与原表评分结果之间的差异越显著。我们的评分结果也证实了这一点:术后 3 d 即症状最严重的时期,两个评分表间的差异不显著。从术后 7 d 开始两种评分方法出现了统计学上的差异。

改进的表格对原表格所列条目进行了逐级细化;对给与动物的刺激进行分类并对每种刺激明确定义,使评价者易于掌握和准确打分。这样即使是神经功能的细微恢复(如由表现为手指抓握时持续翘趾的中度痉挛和无力到偶尔翘趾的轻度痉挛和无力)也能表现出来。而正是这些细微功能对于动物的整体神经功能恢复评价具有重要作用。

灵长类脑卒中模型能较好的模拟人类脑血管疾病,但因涉及动物伦理、实验成本等原因使用较少,更缺乏标准的模型制作方法和神经功能评价方法。改进的量表在原表格包括运动、感觉和反射功能等信息的基础上,对原有条目进行细化和规范,克服了旧表

格中分差大,评价标准模糊的缺点,即使动物的行为学症状不明显时也能评价出差异,使量表的敏感性大为提高。改进的量表可信度增高、可实施性增强,具有良好的临床相似性和可操作性。为建立标准化神经功能功能评价量表进行了有益尝试。

参考文献:

- [1] Kito G, Nishimura A, Susumu T, et al. Experimental thromboembolic stroke in cynomolgus monkey [J]. J Neurosci Methods 2001, 105(1): 45-53.
- [2] 朱华, 李秦, 冯铭, 等. 食蟹猴脑出血模型的建立及评价 [J]. 中国比较医学杂志. 2009, 19(7): 29-32.
- [3] Hantson L, DeWeerd W, DeKeyser J, et al. The European stroke Scale [J]. Stroke, 1994, 25: 2215-2219.
- [4] 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.
- [5] Marshall JW, Ridley RM. Assessment of cognitive and motor deficits in a marmoset model of stroke [J]. ILAR J, 2003, 44(2): 153-160.
- [6] Marshall JW, Ridley RM. Assessment of functional impairment following permanent middle cerebral artery occlusion in a non-human primate species [J]. Neurodegeneration, 1996, 5(3): 275-286.

(修回日期) 2011-01-26