

三种神经功能评分在鼠类局灶性脑缺血模型评价中的比较*

程发峰¹ 宋文婷² 郭少英¹ 钟相根¹ 鲁艺¹ 王庆国^{1,3}

摘要

目的:比较 Garcia JH、Clark 和 Bederson 3 种神经功能评分对鼠类局灶性脑缺血模型的评价意义。

方法:采用线栓法阻塞大鼠和小鼠大脑中动脉,造成局灶性脑缺血模型,并采用脑缺血治疗药物清开灵注射液进行干预。24h 后,分别采用 3 种神经功能评分方法进行评价,测定脑梗死体积比例;分析神经功能评分与脑梗死体积比例的相关性及不同评分间的相关性,并进行比较。

结果:大脑中动脉阻塞模型(MCAO)术后,动物均出现了脑梗死病灶及神经功能的损伤,清开灵注射液治疗可显著减小脑梗死体积并改善神经功能。采用相关性分析发现,大鼠实验中 Garcia JH 评分和 Bederson 评分与梗死体积显著相关,且两种神经评分之间显著相关;小鼠实验 Clark 局灶性功能损伤评分与梗死体积显著相关, Bederson 评分和 Clark 一般功能损伤评分未显示与脑梗死体积相关,但局灶性功能损伤评分与一般功能损伤评分和 Bederson 评分均显著相关。

结论:同 Bederson 评分相比, Garcia JH 评分和 Clark 局灶性功能损伤评分与脑梗死体积具有更好的相关性,更适合作为脑缺血治疗药物疗效评价的指标。

关键词 局灶性脑缺血;神经功能评分;脑梗死体积;清开灵注射液

中图分类号:R743,R743.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2011)-04-0337-05

Comparison of three kinds of neurological function rating systems on focal cerebral ischemia models of rodent animals/CHENG Fafeng, GUO Shaoying, ZHONG Xianggen, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(4): 337-341

Abstract

Objective: To compare 3 kinds of neurological function rating systems, Garcia JH's, Clark's and Bederson's, on rodent models with focal cerebral ischemia.

Method: After cerebral ischemia models were made by middle cerebral artery occlusion (MCAO) with nylon thread in rats and mice. Qingkailing, an effective medicine for cerebral ischemia, was administrated to animals. In 24h, 3 kinds of rating systems were employed to evaluate neurological functions of rats and mice. Meanwhile, the infarction volumes of animal brain were calculated by TTC staining and computer-aided image analysis. The correlations between neurological function scores and brain infarction volumes were calculated and compared with SPSS 16.0.

Result: After MCAO, cerebral infarction lesions and neurological functions deficit were manifested. Qingkailing was proved to be effective on improving neurological functions and decreasing infarction lesions on MCAO animals. Comparison of 3 kinds of neurological function rating systems showed that Garcia JH's and Bederson's scoring system were both correlated with infarction volume significantly in rats, and both of them were correlated with each other significantly; Clark's focal symptoms scoring showed significant correlation with infarction volume in mice; Be-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.04.009

*基金项目:重大新药创制科技重大专项(2009ZX09102-136);国家自然科学基金项目(90709051)

1 北京中医药大学基础医学院,北京,100029; 2 中国中医科学院西苑医院; 3 通讯作者

作者简介:程发峰,男,博士生; 收稿日期:2010-04-01

derson's scoring and Clark's whole symptoms scoring were not correlated with cerebral infarction volume, however, both focal symptoms scoring and whole symptoms scoring were correlated with Bederson's scoring system significantly.

Conclusion: Compared with Bederson's scoring system, Garcia JH's and Clark's focal scoring systems showed better correlation with cerebral infarction volume, which suggested latter two scoring systems are more suitable for evaluating drug efficacy.

Author's address School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029

Key word focal cerebral ischemia;neurological function evaluation;cerebral infarction volume;Qingkailing injection

缺血性脑卒中是一种高发病率、高致死率的疾病。脑缺血动物模型用于缺血性脑卒中治疗的疗效评价已有20年的历史。采用鼠类动物制备局灶性脑缺血模型,是最为常用的研究手段。通过对试验的回顾及和临床对比,大家越来越强调神经功能损伤的评价意义。除测量梗死体积外,功能评分的结果也很重要,它在抗脑缺血药物研究中是一个关键的药效指标^[1-2]。国际脑卒中治疗临床前研究指南(stroke therapy academic industry roundtable pre-clinical recommendations, STAIR)指出,在脑缺血药物研究中,多重指标综合评价很重要,组织学和行为学的结果都应该评价^[3-4]。目前,国内主要采用Bederson 4级评分标准^[5],一定程度上反映了神经功能的损伤,但存在评价不够全面、分级不够细致等缺点。比如,该评分只关注了运动功能,却没有评价感觉功能的变化;只关注了局灶损伤症状,却没有评价全身一般症状。Garcia JH评分^[6]详细评价了受试大鼠的运动功能和感觉功能,建立了评分标准。正常功能时得分最高,18分;功能损伤最严重者得分最低,3分。而Clark评分^[7]分别从一般功能损伤和局灶性功能损伤两个角度进行了评分设计。这两种评分均为国际上应用较广泛的评分标准。本研究采用大鼠和小鼠两种动物制备脑缺血模型,分别采用3种评分标准进行评价,研究几种评分与脑梗死体积及其间的相关性。为了评价几种评分是否适用于药物疗效评估,我们采用已经证实对缺血性脑卒中有治疗作用的清开灵注射液^[8-10],观察其对神经功能评分和梗死体积的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料和药品

健康雄性清洁级SD大鼠,体重230—250g,健康

雄性清洁级昆明小鼠,体重23—25g,购自北京维通利华实验动物公司,合格证号:SCXK(京)2006—0009。大鼠MCAO尼龙线栓,规格2432—100;小鼠MCAO尼龙线栓,规格1620—A,北京沙东生物技术有限公司产品;T71D德国ERBE双极电凝,北京英特仪器公司产品;TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride),南京绿合生化技术有限公司产品;清开灵注射液,北京中医药大学药厂产品,批号为813204A。

1.2 动物分组与给药

动物随机分为3组,假手术组、模型组和给药组。2倍生理盐水稀释清开灵注射液,模型动物按0.9ml/100g尾静脉注射给予稀释清开灵注射液^[11]。大脑中动脉栓塞同时第1次给药,缺血后4h第2次给药。第2天开始,每天给药2次,间隔12h一次。模型组及假手术对照组腹腔注射等体积生理盐水。

1.3 制备大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型

10%水合氯醛(350mg/kg)麻醉大鼠,腹面向上,颈部备皮并消毒。取颈正中切口,钝性分离右侧胸锁乳突肌与胸骨舌肌之间的肌间隙,暴露颈总动脉,眼科弯镊挑出颈总动脉穿丝线备用。在右侧二腹肌及舌骨下挑出颈外动脉,结扎颈外动脉电灼游离。动脉夹夹闭颈总动脉,于颈外动脉游离端剪一小口,并在小口下系一松结。将制备好的线栓经该切口顺颈外动脉插入,颈外动脉游离端拉向外上方,使之与颈内动脉走行平行,拉直与颈内动脉的夹角。将线栓顺颈内动脉走向,轻柔缓慢推进,感到有轻度阻力为止,线栓18mm标记进入颈内动脉与颈总动脉分叉处,系紧预先打好的松结,术中保持体温37℃,1.5h后拔出线栓,术后单笼饲养。待大鼠完全苏醒后,进行神经损伤评分^[12],评分低于2分的大鼠剔

除。假手术组暴露分离CCA、ECA和ICA,但不插入线栓。

小鼠MCAO模型操作方法同大鼠,显微镜下操作,插入线栓头端距颈内动脉与颈总动脉分叉处10mm。

1.4 神经功能评分

造模后24h采用盲法进行神经功能评分。大鼠

和小鼠均进行Bederson评分^[12],另外,大鼠进行Garcia JH评分^[6],小鼠进行Clark评分^[7]。Bederson评分分为四个功能等级,0分:无神经损伤症状;1分:悬尾试验不能完全伸展对侧前爪;2分:前肢抵抗对侧推力能力下降;3分:向对侧转圈。Garcia JH评分从大鼠自主运动、体态对称性、前肢伸展功能、网屏实验、身体双侧触觉、双侧胡须反射等6个方面评定大鼠神经功能损伤程度,功能正常时得分最高,18分,

表1 Garcia JH大鼠神经功能评分标准

试验	0	1	2	3
自主运动 (将大鼠放入鼠笼中观察5min)	无自主运动	很少运动	运动并触及至少一侧笼壁	运动并触及至少三侧笼壁
体态的对称性 (提起尾部使之悬空,观察四肢状态)	患侧无运动	患侧轻微运动	患侧运动较迟缓	双侧体态对称
前肢伸展运动(悬尾使后肢悬空,前肢移向桌子,使之仅靠前肢行走,观察前肢伸展运动)	左前肢无伸展动作	左前肢轻微伸展	左前肢有伸展运动但不及右侧	两侧伸展对称
网屏实验	-	不能爬上	左侧劣势	正常攀爬
两侧身体触觉反射	-	左侧无反应	左侧反应弱于右侧	反应性相同
两侧胡须触觉反射	-	左侧无反应	左侧反应弱于右侧	反应性相同

表2 Clark评分小鼠一般功能损伤评分(0—28分)

	0	1	2	3	4	6	9	12
毛发	正常	局部异常,特别是眼睛和耳朵	整体异常,皮毛不整洁	-	-	-	-	-
耳朵	正常位置	偶有下垂	保持下垂	-	-	-	-	-
眼睛	正常	湿润,有分泌物	深色分泌物	半闭眼	不睁眼	-	-	-
体态	正常	弓背,不平衡	直立,头或(和)身体着地	侧卧,有拉力时仍保持卧姿	体态不能主动改变	-	-	-
自主运动	正常	安静且平静,活动缓慢	活动少,嗜睡,冷漠	怠惰,昏睡,偶有原地运动	没有自主运动	-	-	-
癫痫发作	无发作	-	-	过度警觉,局促不安	-	易攻击,兴奋性增加	极兴奋或局部抽搐	局部或整体癫痫大发作

表3 Clark评分小鼠局灶功能损伤评分(0—28分)

	0	1	2	3	4
身体的对称性 (在实验台表面)	正常	轻微不对称	中度不对称	明显不对称	极不对称
步态 (在实验台表面)	正常	僵硬,不灵活	跛行	颤抖不稳并跌倒	无走动
攀爬 (45°粗糙表面)	正常	爬行困难,肢体无力	抓握斜面,不下滑也不攀爬	顺斜面下滑,握力不能阻止下滑	无握力,随即下滑
转圈实验 (在实验台表面)	无转圈或随即向两侧转弯	转弯有偏向一侧倾向	只向一侧转弯(不连续)	连续向一侧转弯	转圈,摇摆或不运动
前肢对称性 (小鼠从尾部悬起)	正常	轻微不对称	明显不对称	非常不对称	轻微不对称,肢体不运动
强迫转圈(前肢着于平面,提尾使后肢悬空)	不转圈	有向一侧转圈的倾向	向一侧转圈	缓慢向一侧转圈	无前进行动作
胡须反应性 (从后部轻触)	对称的反应	轻微不对称	明显不对称	同侧无反应,对侧反应降低	双侧本体感觉反射消失

功能损伤最严重者得分最低,3分,见表1。Clark评分分为一般功能损伤和局灶功能损伤,见表2—3。

1.5 TTC法测定脑梗死体积

神经功能评分后,断头取脑,TTC染色。以梗死组织体积占总脑体积的百分比表示脑梗死程度。从距额极3mm处开始,从前往后作冠状位连续切片,每片厚度2mm。将大脑切片浸泡于2%的TTC磷酸缓冲液中,37℃恒温避光10min,正常脑组织染为玫瑰红色,脑梗死区不染色(白色)。将脑片浸泡于4%多聚甲醛磷酸缓冲液内,固定30min后,脑片按脑的前后顺序整齐排列,用扫描仪进行正反两面扫描。利用计算机彩色多媒体图像分析系统测量红、白区域的面积,以如下公式计算梗死体积百分比。

$$\text{梗死比}=(V_c - V_i)/(V_c \times 2) \times 100\%$$

$V_c = d \times \sum A_c$ (A_c :正常侧半脑片面积)

$V_i = d \times \sum A_i$ (A_i :患侧半脑片红色面积)

1.6 统计学分析

数据均以均数±标准差表示;SPSS16.0软件进行t检验,分析显著性;用Spearman等级相关分析相关性。

2 结果

2.1 脑梗死体积

大鼠和小鼠在MCAO 24h,脑内均有梗死灶形成,给予清开灵注射液治疗后,梗死体积显著缩小,见表4—5。

2.2 神经功能评分

大鼠和小鼠在MCAO 24h,均表现一定程度的神经功能损伤,给予清开灵注射液治疗后,其神经功能有一定程度的恢复,见表6—7。

2.3 神经功能评分与梗死体积的相关性

Garcia JH评分和Bederson评分与脑梗死体积的相关度分别为-0.671($P < 0.001$)、0.489($P < 0.01$),两种评分间的相关度为-0.584($P < 0.001$)。小鼠实验中,Clark评分的局灶性功能损伤评分与脑梗死体积的相关度为0.342($P < 0.01$),一般功能损伤评分和Bederson评分未显示与脑梗死体积显著相关($P > 0.05$),但局灶性功能损伤评分与一般功能损伤评分和Bederson评分均显著相关,相关度分别为0.672($P < 0.01$)和0.608($P < 0.01$)。见表8—9。

表4 小鼠脑梗死体积 ($\bar{x} \pm s$)

	假手术组	模型组	治疗组
样本数	10	29	29
梗死体积比例(%)	0±0	30±1.8 ^①	14.1±1.8 ^②

①与假手术组比较, $P < 0.01$;②与模型组比较, $P < 0.01$

表5 大鼠脑梗死体积 ($\bar{x} \pm s$)

	假手术组	模型组	治疗组
样本数	10	21	21
梗死体积比例(%)	0±0	23.5±2.2 ^①	11.6±2.2 ^②

①与假手术组比较, $P < 0.01$;②与模型组比较, $P < 0.01$

表6 小鼠神经功能评分 ($\bar{x} \pm s$)

	假手术组	模型组	治疗组
样本数	10	29	29
Clark一般功能损伤评分	0.8±0.341	10.357±0.853 ^①	7.964±0.841 ^②
Clark局灶功能损伤评分	0.4±0.21	14.5±0.696 ^①	11.5±0.933 ^③
Bederson评分	0±0	2.75±0.142 ^①	2.7±0.145

①与假手术组比较, $P < 0.01$;②与模型组比较, $P < 0.05$;③与模型组比较, $P < 0.01$

表7 大鼠神经功能评分 ($\bar{x} \pm s$)

	假手术组	模型组	治疗组
样本数	10	21	21
Bederson评分	0±0	2.476±0.214 ^①	1.381±0.355 ^②
Garcia JH评分	0.5±0.212	9.952±0.362 ^①	13.524±0.616 ^②

①与假手术组比较, $P < 0.01$;②与模型组比较, $P < 0.01$

表8 大鼠神经功能评分与脑梗死体积的相关关系

评分	梗死体积	Bederson评分
Garcia JH评分		
相关度(r 值)	-0.671	-0.584
P	<0.001	<0.001
N	42	42
Bederson评分		
相关度(r 值)	0.489	
P	$P < 0.01$	
N	42	

表9 小鼠神经功能评分与脑梗死体积的相关关系

	梗死体积	Bederson评分	一般功能损伤
Clark局灶性功能损伤			
相关度(r 值)	0.342	0.672	0.608
P	<0.01	<0.01	<0.01
N	58	30	58
Clark一般功能损伤			
相关度(r 值)	0.198	0.187	
P	>0.05	>0.05	
N	58	30	
Bederson评分			
相关度(r 值)	0.337		
P	>0.05		
N	30		

3 讨论

临床上,习惯将脑卒中患者的神经功能损伤大致划分为一般功能损伤和局灶性功能损伤。前者反映的是患者生命状态和整体神经功能,后者则反映局部损伤造成的定位性功能缺陷。Clark^[7]分别从一般功能损伤和局灶性功能损伤两个角度进行了评分设计。功能恢复是脑卒中患者的主要终点结局。在临床神经功能损伤评分中,往往要求对整体意识水平、感觉、视觉、运动、共济等方面进行综合评价。目前评定脑缺血动物功能和行为的方法都有了提高,但是依然有一定的问题。如有些研究往往偏于运动功能,忽视了感觉功能等,不能全面反映神经损伤程度^[13]。运动功能和感觉功能都是神经功能的主要方面,Garcia JH等^[6]详细评价了受试大鼠的运动功能和感觉功能,建立了评分标准。

上述神经功能评分,均不同程度地反映了动物缺血后神经功能的损伤程度。Bederson评分因其操作简单,目前在国内外应用比较广泛^[14-15],但未能显示感觉和整体状态的变化,有其局限性。Garcia JH评分和Clark评分对上述多项神经功能进行了较全面的评价,且可操作性好,在国外脑缺血研究中得到了广泛应用。我们分别制备大鼠和小鼠MCAO模型,采用Bederson评分、Garcia JH评分及Clark评分,进行神经功能评价,研究几种评分与脑梗死体积及其间的相关性。实验结果说明,MCAO术后,动物均出现了脑梗死病灶及神经功能的损伤,采用清开灵注射液治疗后,脑梗死体积和神经功能损伤都得到了显著的减小和改善。采用相关性分析后,发现神经功能评分与脑梗死体积比例均存在不同程度的相关性。其中,大鼠实验中,Garcia JH评分与脑梗死体积的 r 值为0.671,高于Bederson评分的0.489,说明从运动功能、感觉功能及自主运动等方面综合评价,得到的评分与脑梗死病灶有更高的相关度。小鼠实验中,局灶性功能损伤评分与脑梗死体积显著相关, r 值为0.342,且与一般功能损伤评分和Bederson评分均显著相关, r 值分别为0.672,0.608,但后两种评分与脑梗死体积未显示相关性。这可能与大鼠和小鼠解剖结构的区别相关。因此,我们认为在局灶性脑缺血神经功能评价时,应尽量选择Garcia JH评分

和Clark评分等标准,有利于更全面反映动物神经功能的损伤以及改善程度,与局灶病理结果有更好的相关性。

参考文献

- [1] Willing AE. Experimental models: help or hindrance[J]. *Stroke*, 2009,40(3 Suppl):S152—154.
- [2] 谢明,封卫兵,贺年花,等.急性脑卒中患者早期康复疗效观察[J]. *中国康复医学杂志*,2003,18(6):360.
- [3] Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations[J]. *Stroke*,2009,40(6):2244—2250.
- [4] Rother J. Neuroprotection does not work[J].*Stroke*,2008,39(2):523—524.
- [5] 魏尔清,朱朝阳,徐秋琴,等.一种改进的小鼠局灶性脑缺血神经症状定量评价方法[J].*生理学报*,2003,55(6):742—747.
- [6] 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.
- [7] Clark WM, Lessov NS, Dixon MP, et al. Monofilament intraluminal middle cerebral artery occlusion in the mouse[J]. *Neurol res*,1997,19(6):641—648.
- [8] Hua Q, Zhu X, Li P, et al. Refined Qing Kai Ling, traditional Chinese medicinal preparation, reduces ischemic stroke-induced infarct size and neurological deficits and increases expression of endothelial nitric oxide synthase[J]. *Biol pharm bull*, 2008,31(4):633—637.
- [9] 刘清,张谦,郑世文.清开灵注射液治疗急性脑血管病60例临床观察[J].*中医药学刊*,2004,22(6):1131.
- [10] 高永红,邢雁伟,袁拯忠,等.清开灵有效组分对大鼠脑微血管内皮细胞体外缺血再灌注损伤模型核转录因子- κ B的影响[J].*中西医结合学报*,2009,7(2):135—139.
- [11] 张占军,王忠,李澎涛,等.清开灵组分配伍干预局灶性脑缺血大鼠再灌注损伤的实验研究[J].*中国药理学通报*,2006,22(8):964—967.
- [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] Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development[J]. *Stroke*,1999,30(12):2752—2758.
- [14] 邹伟,冯秀娟,朱春燕.头穴丛刺对脑梗死大鼠脑内MMP-9变化的影响[J].*中国康复医学杂志*,2009,24(2):146—149.
- [15] 贾子善,李阔,魏雅萍,等.不同环境干预对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复的影响[J].*中国康复医学杂志*,2007,22(7):578—580.