·基础研究·

恒河猴脊髓半侧损伤模型的行为学评价方法的研究*

宋 伟[1,2,3] 魏瑞晗[3] 赵 文[3] 赵 璨[3] 季 润[4] 蒲 放[3]

摘要

目的:通过观察恒河猴脊髓神经损伤前、损伤修复后的不同行为学变化,对神经损伤及修复进行宏观的评价,建立一种适用于恒河猴下肢运动行为学评价的实验方法。

方法:为了评估脊髓损伤后的非人灵长类动物的行为学,本文建立了3只恒河猴胸段(T7—T9)脊髓半侧移除模型。本研究基于VICON运动捕捉系统,对脊髓损伤前后的恒河猴设计了步态分析实验。随后,利用FootScan平衡测试分析系统测量分析脊髓损伤前后恒河猴自然站立时双侧下肢的承重情况。

结果:恒河猴脊髓损伤后6周、12周右膝、踝关节活动的角度变化范围小于左侧;脊髓损伤后12周右腿的足底压力较6周有所提高,6周、12周右腿的足底压力均值分别为7.25%、8.43%。

结论:该实验方法适用于非人灵长类动物的行为学评价,对于动物脊髓损伤后修复的研究具有重要意义。

关键词 脊髓半侧损伤;下肢;运动捕捉;行为学评价;下肢承重;恒河猴

中图分类号:R651.2,R681.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2013)-11-985-05

A study on locomotor behavior of rhesus monkey after spinal cord hemisection/SONG Wei, WEI Ruihan, ZHAO Wen, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(11): 985—989

Abstract

Objective: To evaluate the repairing of spinal cord injury(SCI) and observe the behavioural changes before and after spinal cord hemisection in Rhesus monkey, and to establish an experimental method for evaluating lower limbs locomotor behavior in Rhesus monkey.

Method: To evaluate the behavior of spinal cord injury nonhuman primates a segmental thoracic(T7—T9) spinal cord hemi-section was created in three rhesus monkeys. In this study, we designed an experiment of gait analysis according to the characteristics of animal model based on VICON system. Then a bearing analysis of bilateral hindlimbs of monkeys was conducted by using FootScan system.

Result: At 6 weeks and 12 weeks after SCI, the right knee and ankle angle ranges of motion of Rhesus monkeys were smaller than that of left side; At 12 weeks after SCI, right planter pressure increased more than at 6 weeks. The average right planter pressure at 6 and 12 weeks after SCI were 7.25% and 8.43% respectively.

Conclusion: This experimental method was suited to evaluate the bilateral lower limb's behavior of non-human primates,and it has important significance for the research of repairing in animals after SCI.

Author's address Capital Medical University School of Rehabilitation Medicine, China Rehabilitation Research Center, Beijing,100068

Key word spinal cord hemisection; lowerlimb; motion capture; behavior evaluation; body weight support; Rhesus monkey

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.11.001

*基金项目:国家科技支撑计划项目(2012BAI17B00)

1 中国康复研究中心康复工程研究所,北京,100068; 2 首都医科大学康复医学院; 3 北京航空航天大学生物与医学工程学院; 4 国家康复辅具研究中心

作者简介:宋伟女,副教授,高级工程师;收稿日期:2012-12-28

目前全世界脊髓损伤的发病率正在逐年增加。我国的脊髓损伤人数已突破百万，并以每年12万的速度剧增，北京脊髓损伤发病率则达到了60/百万[1]。脊髓损伤后的中枢神经纤维再生问题以及再生纤维的功能重建问题，是全世界医学界普遍关注的重大难题。本研究通过观察动物神经损伤前后的不同行为学变化，对脊髓损伤后植入生物活性材料的恒河猴动物模型下肢运动功能进行行为学评价，为利用行为学评估生物活性材料的修复效果奠定实验基础。

目前，国内外关于恒河猴下肢的行为学评价文献少，且没有形成一个固定通用的评价方法及体系，这就为宏观评价生物活性材料的作用带来了一定困难。为了能够量化评估动物模型脊髓损伤及修复的程度，我们希望可以建立一种非人灵长类动物下肢运动行为学的评价方法，此方法对于评估中枢神经损伤修复有效性的临床前研究有重要意义。

对于非人灵长类动物脊髓损伤模型的行为学评价主要分为上肢和下肢两个方面。Kazuya等[2]制定了一套开放的评分系统对脊髓损伤后绒猴的运动及感觉功能进行了评估，但由于该研究更注重上肢的评价，因此该评分系统并不适用于我们的动物模型。Courtine等[3]则将绒猴放置在跑台上进行训练，使其可以在特定速度下利用四肢连续行走，并用摄像机进行拍摄。研究者对脊髓损伤前及损伤后1个月及12个月的绒猴的单步步态简化为步态棍棒图，并对步态周期，关节角度等进行了分析。该研究的动物训练，实验设计及数据分析等均为我们的实验提供了一个重要的借鉴，但是由于绒猴的体型较小，成年绒猴身高也仅有10—12cm，其动物训练和实验操作性均较我们的动物模型容易，如何克服大型非人灵长类动物的较低服从性的困难仍是我们亟待解决的一个问题。Hernández-Laín等[4]对胸髓完全离断的猕猴损伤前后的运动感觉功能进行了评价。研究者对未损伤的猴进行踢球训练，损伤后每两周进行一次测试，运动测试的同时记录EMG信号作为客观评估。Babu等[5]则对胸髓半侧损伤的猕猴进行了一系列运动感觉测试，包括平台行走测试，单杠行走测试，栅格行走测试，斜面行走测试，跑台行走测试，下肢抓握测试，并根据每个测试制定了详细的评分标准。该研究是建立在长期持续的训练的基础上而进行的，实验动物的服从性和配合度都较高，但通用性不高且评分系统主观性较大，无法实验客观的量化评估。

我们希望基于已经成熟适用于人体的三维步态分析系统，结合实验动物自身的运动行为方式及实验动物模型的特点，设计一种适用于恒河猴的下肢运动行为学评价方法，寻找到适当的量化参数及指标，对其进行量化分析，以满足课题组当前实验的需求，并为非人灵长类动物的运动行为学评价标准奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制作

实验动物：3只雌性恒河猴（普通级，品种猕猴，品系恒河猴），年龄约为6岁，体重为5—6kg。实验动物来源于军事医学科学院实验动物中心。实验时间点分别为：健康时、脊髓损伤并治疗后6周、脊髓损伤并治疗后12周。

为恒河猴进行脊髓半侧切除手术，手术前一天禁食禁水，手术过程分为四个部分。首先，对猴子进行麻醉。用1ml的氯胺酮肌肉注射进行诱导麻醉，之后按照1—1.5ml/kg 体重的2%戊巴比妥钠比例进行腹腔注射，使猴进入深度麻醉。然后，常规备皮。用碘酒和酒精消毒，将背部、后腿备皮，静脉点滴NaCl葡萄糖溶液（每分钟40滴），该溶液按每250ml加入80万U的青霉素的比例配制。之后，切开肩胛骨下角对应T4位置的皮肤肌肉，用骨膜起子分离骨膜，去除T8棘突，使得T7和T9部分暴露出硬脊膜，切开硬脊膜暴露脊髓，脊髓中线偏右1mm处半侧切除脊髓1cm长，将含活性材料的脊髓重建管置于脊髓切除的位置，缝合硬脊膜。最后，用温生理盐水冲洗伤口，缝合肌肉和皮肤，消毒后用纱布包扎。

1.2 大动物上肢固定装置的设计

依据前期对恒河猴行为的观察，并考虑VICON数据采集系统的要求以及实验安全性，我们设计出一套固定装置，应用Solidworks软件根据需要绘制固定装置。

1.3 VICON系统

①VICON资料处理器。资料处理器的功用在于控制摄影机;②M2摄影机;③Workstation软件;④Bodybuilder资料处理软件。

1.4 FootScan系统

FootScan平衡测试分析系统利用压力传感器获取足底的受力,从而进行平衡分析,为稳定性的评价提供直观、详细、客观的依据。它在显示足底压力分布大小、左右足的力量分配的同时,精细掌握受试者的压力中心位移轨迹。该系统不仅可提供整个测试过程中的平衡信息,也可根据操作者的需要,提取某段特殊时间的数据进行平衡分析,使得设备的使用具有多选操作,更针对性地进行数据处理。

1.5 步态数据的采集

1.5.1 实验动物的固定:将恒河猴双臂背后绑于固定装置的横杆上,让猴子在跑步机的带动下自主行走。在其腋下垫上塑料泡沫以防手臂磨伤。用绳套以活扣的方式套在恒河猴颈部,另一头绑在固定装置上,绳套略松,使其不能挣脱且不勒紧颈部,这样既保证了实验人员的安全又不会影响动物正常的运动。

1.5.2 标记点的固定:荧光标记点的位置包括髂前上嵴、髂后上嵴、大腿、膝关节、小腿、踝关节、脚后跟、脚趾,左右腿对称位置

1.5.3 跑步机的选取:由于实验动物体型、步幅、步速均小于成人,类似于2—3岁儿童,且术后半侧下肢运动功能受损,因此必须选取起步速度较低的跑步机。本实验采用康复训练跑台,调速范围为0.2—8km/h。

1.5.4 速度的选取:0.2km/h、0.5km/h、0.8km/h、1.1km/h。

1.5.5 实验的时间点:脊髓损伤0周(即健康猴),脊髓损伤后6周,脊髓损伤后12周。

1.5.6 测量指标:关节角度,大腿与小腿之间的夹角及小腿与脚之间的夹角;协调性,损伤腿有无拖拽现象;步态一致性,行走模式的重复性;步长,两脚相邻着地点之间的距离;步高,行走中脚离开地面的最大高度。

1.6 承重数据的采集

实验前,先在FootScan系统中输入猴的相关信息,主要包括出生年月、体重、足码等数据。然后将固定装置放置于压力板两侧,将猴上背后绑于固定装置的横杆上,托起猴再缓慢放下,使其处于正常直立姿势,双足立于压力板上左右基本对称的位置,用压力板采集数据。通过FootScan软件可以很直观的测量双足着力点的位置及区域大小,并且可以读出双足承重比例及重心偏向的位置。每次实验一共采集3次有效承重数据并保存。

1.7 数据处理

用VICON系统自带的软件导入实验数据,对行走过程中某些时刻没有被摄像机采集到的点进行逐帧补点。通过软件计算可以得出关节角度在空间三个方向上的实时变化过程,并能够生成轨迹图和骨架图,可以用骨架图的形式模拟出猴行走过程中下肢在空间上的运动轨迹,也可以非常直观地看到恒河猴在行走过程中腿部有无拖拽现象以及步态的重复性是否良好。

2 结果与讨论

见表1—4,图1—3。

首先,通过对比我们发现实验动物健腿在损伤前后其膝关节活动角度、踝关节活动角度均呈周期性变化,重复性较好,但脊髓损伤后健腿在一个步态周期内其角度变换较损伤前略有不同,且其角度变化范围随着损伤时间的增加而增加。这个变化我们

表1 健康恒河猴不同速度下膝关节、踝关节活动角度的变化

	0.2km/h		0.5km/h		0.8km/h	
	右	左	右	左	右	左
膝关节						
x	18°—50°	−100°—−150°	20°—65°	20°—75°	30°—80°	30°—80°
y	−15°—−45°	−130°—−158°	−5°—−35°	−5°—−35°	−20°—−50°	−20°—−50°
z	−13°—−35°	−10°—−88°	−5°—−10°	40°—11°	3°—−16°	40°—90°
踝关节						
x	110°—160°	30°—80°	300°—500°	5°—35°	200°—1000°	−10°—20°
y	10°—40°	12°—22°	10°—45°	0°—10°	100°—170°	−0.05°—0.03°
z	55°—75°	−50°—−70°	35°—80°	−25°—5°	−100°—−160°	−25°—15°

表2　脊髓损伤后6周恒河猴不同速度下膝关节、踝关节活动角度的变化

	0.2km/h		0.5km/h		0.8km/h		1.1km/h	
	右	左	右	左	右	左	右	左
膝关节								
x	80°—98°	50°—75°	40°—100°	20°—80°	40°—100°	30°—80°	80°—100°	30°—80°
y	30°—38°	−30°—−40°	−30°—−50°	−10°—−45°	−30°—−50°	−20°—−40°	−38°—−45°	−25°—−45°
z	42°—47°	−20°—10°	40°—70°	−20°—10°	42°—−60°	−25°—13°	40°—50°	−30°—15°
踝关节								
x	−55°—−60°	5°—35°	−60°—−40°	−60°—20°	−60°—40°	−60°—20°	−40°—−60°	−10°—−45°
y	−32°—−37°	−4°—2°	5°—30°	−1°—−6°	5°—−25°	−5°—0°	6°—−9°	−1°—−5°
z	40°—48°	−10°—−25°	−30°—−60°	5°—35°	−60°—−30°	0°—30°	−30°—−40°	0°—35°

表3　脊髓损伤后12周恒河猴不同速度下膝关节、踝关节活动角度的变化

	0.2km/h		0.5km/h		0.8km/h		1.1km/h	
	右	左	右	左	右	左	右	左
膝关节								
x	30°—60°	10°—50°	90°—110°	30°—100°	30°—80°	5°—70°	20°—60°	10°—80°
y	−32°—−50°	−20°—−50°	−56°—−60°	−45°—−70°	−40°—−70°	−30°—−60°	−20°—−50°	−3−°—−70°
z	−5°—25°	10°—50°	2°—16°	−20°—60°	−5°—40°	20°—60°	−17°—−45°	0°—50°
踝关节								
x	−40°—28°	−40°—30°	−56°—−62°	10°—30°	−50°—10°	−40°—20°	−50°—20°	−20°—40°
y	−0.5°—0°	0°—0.2°	0.4°—0.5°	−0.1°—0.1°	−0.5°—0.2°	0°—0.3°	−0.6°—0.1°	0°—0.1°
z	−15°—17°	20°—60°	−36°—−40°	−40°—40°	−30°—20°	20°—60°	−20°—30°	−20°—40°

表4　下肢承重比例　（%）

	健康		脊髓损伤后6周		脊髓损伤后12周	
	左腿	右腿	左腿	右腿	左腿	右腿
1	53.08	46.92	90.65	9.35	81.45	18.55
2	48.35	51.65	94.07	5.93	98.78	1.22
3	45.07	54.93	93.52	6.48	94.49	5.51

注：表中数字1，2，3分别表示第1,2,3只恒河猴。

图1　健康恒河猴在0.5km/h的速度下膝关节活动角度的变化

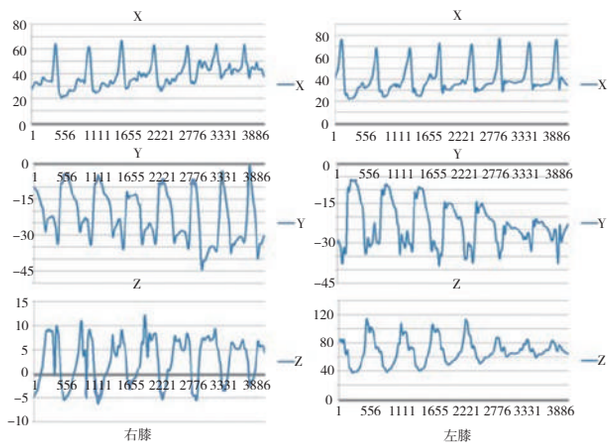
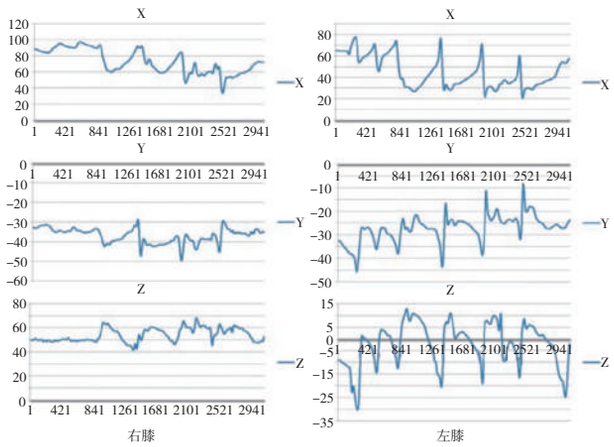


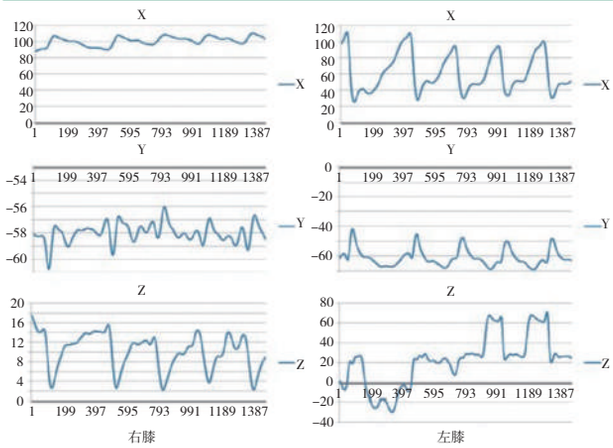
图2　脊髓损伤后6周在0.5km/h的速度下膝关节活动角度的变化



认为是受到了患肢的影响。首先，在脊髓损伤后患肢呈拖拽状态，导致健肢的步态不再象健康时完整自然，此外由于我们的动物模型是完全切除右半侧脊髓，由于继发性损伤的影响，损伤有可能扩大到对侧，从而导致健侧运动功能受到影响。

其次，我们对患腿在损伤前后的膝关节活动角度和踝关节活动角度的变化也进行了对比。我们发现随着损伤时间的增加，膝踝关节角度变化的周期性在逐步下降，而患侧肢膝踝活动角度变化范围则经历了先减小后增大的一个变化过程。这是由于术后患肢运动功能被损害，行走过程中基本呈拖拽状态，无任何自主运动，其活动角度变化及节律性均由健肢的带动所致，因此健肢的重复性随着损伤时间的增加略有降低从而导致患肢膝踝活动角度变化重

图3 脊髓损伤后12周在0.5km/h的速度下膝关节角度的变化



复性的降低,而膝踝活动角度的变化在损伤后6周由于健侧肢步态较好导致患侧拖拽时晃动不大,角度变换范围也较健康时变小,到了损伤后12周时由于健肢步态略差导致患肢拖拽状态下有较大的晃动,活动角度变换范围反而较损伤后6周增大。

最后,我们对步态周期时长进行了对比,发现相同速度下损伤后步态周期较健康时减小,这是由于脊髓损伤后实验动物下肢的自主运动及支撑全部由健侧肢完成,整个步态周期的摆动期变短,导致步态周期减小,步频增加。此外,我们还发现在不同速度下同一实验动物的步态情况也略有不同,健康时除最低速度0.2km/h外步态周期重复性均较好,速度为0.8km/h时所得到的数据最好。而损伤后,不同速度下步态周期的重复性差距较健康时大,且最佳数据的获取来自于0.5km/h,这也反映了脊髓损伤对恒河猴下肢运动功能的影响。

在健康状态下,恒河猴的双腿承重基本相同;脊髓损伤后6周,左腿的足底压力均值为92.75%,右腿的足底压力均值为7.25%说明在脊髓损伤后右侧下肢基本丧失对身体的支撑能力,脊髓损伤后12周左腿的足底压力均值为91.57%,右腿的足底压力均值为8.43%。

从所得数据中我们可以得出,在健康状态时,猴身体的重量基本上是由双腿平均分担,在手术脊髓半侧切除后,右腿基本失去承重能力,由左腿主要支撑身体。对比6周和12周的结果可以发现,随着损伤后时间的延长,右腿承重能力有逐渐恢复的趋势。出现这种现象的原因可能是因为在脊髓损伤后,为了主动适应和反映外界环境各种变化,神经系统能发生结构和功能的可塑性改变[6],它体现在受损伤运动皮质及辅助感觉和次级运动结构的不断恢复上,使得脊髓损伤猴的简单动作,如站立,可以在短期内有所恢复。以上结果说明下肢承重测量能够区分出健腿与伤腿,可以用来评价其恢复状况,因此,承重可以作为评价脊髓损伤程度的一个指标。

通过FootScan系统,我们能够测量猴在站立状态时双侧下肢的承重情况,由此反映脊髓损伤状况。尽管实验器材的精度目前尚不足以完成恒河猴在步进时的动态承重测量,但是这同样是未来的一个很好的研究方向,在行走过程中采集下肢承重的分布数据可以更好地评价伤腿的肌肉张力,从而更准确地反映脊髓损伤及恢复情况。

参考文献

[1] 封亚平,朱辉,刘艳生,等. 脊髓损伤治疗现状[J]. 中华神经外科疾病研究杂志,2008,7(3):279—280.

[2] Kitamura K, Fujiyoshi K, Yamane1 J, et al. Human hepatocyte growth factor promotes functional recovery in primates after spinal cord injury [J].PLoS One,2011,6(11):e27706.

[3] Courtine G, Roy RR, Raven J, et al. Performance of locomotion and foot grasping following a unilateral thoracic corticospinal tract lesion in monkeys (Macaca mulatta) [J]. Brain,2005,128:2338—2358.

[4] Hernández-Laína A, Piedrasa MJ, Cavada C. Functional evaluation of paraplegic monkeys (Macaca mulatta) over fourteen months post-lesion[J]. Neuroscience Research, 2011,69: 144—153.

[5] Suresh Babu R, Muthusamy R, Namasivayam A. Behavioural assessment of functional recovery after spinal cord hemisection in the bonnet monkey (Macaca radiata)[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2000,178:136—152.

[6] 李飞平,陈增爱,沈加林,等. 缺血性脑卒中后神经可塑性与运动功能恢复研究进展[J]. 神经病学与神经康复学杂志,2009,6(2): 127—130.