·综述·

小鼠局灶性脑缺血模型中行为学测试方法的比较*

赵筱汐[1] 李征松[1] 王 玥[1,2]

脑卒中具有高发病率、致残率和死亡率,严重影响了患者的生存质量,成为个体、家庭和社会的经济负担。由于其有效的治疗时间窗太窄,大约只有1.0%—8.5%的患者有机会接受溶栓治疗。此外,已有150多种对哺乳动物模型有效的药物和干预手段进行了临床试验,可是依旧收效甚微。究其原因,可能是实验人员错误地评价了神经损伤和神经功能之间的关系,脑梗死体积并不一定和功能障碍的程度有相关性,因此,我们需要把一些功能指标的检测也应用于脑卒中治疗的研究中。近年来,已经有越来越多的行为测试被成功地应用于小鼠模型,但是这些测试在脑卒中研究领域还未形成一套标准化的程序。脑卒中在临床中最显著的表现就是感觉运动性功能的损伤,故本文较为详细地介绍了局灶性脑缺血小鼠模型的各种感觉运动性行为测试方法,使之可以作为实验室的参考,以提高实验的可重复性。

1 概述

在缺血模型的行为测试中,需要考虑多种影响因素。由于实验目的、损伤程度不同,脑卒中小鼠模型会出现不同的功能异常,因此需要不同的实验来测试不同的指标,比如吊绳实验用于动物力量的测试,角落实验则同时测试动物姿势、感觉和运动。小鼠品种也会影响行为学测试对脑缺血的敏感性。此外,脑缺血时间、动物的年龄、共患病(如高血压、低血压)也会影响行为学测试结果。比如,脑缺血3—7天后动物可能对行为测试没有足够的敏感性;雄性C57BL/6J小鼠的探索能力会随年龄递增而下降[1];合并糖尿病的脑卒中小鼠通过行为测试发现恢复得更慢[2]。总之,脑缺血模型的行为学测试中,实验者应该考虑多种因素,并根据预实验结果完善测试流程。

2 转筒实验

转筒试验(rotarod test)首先应用于大鼠,后经改良后用于小鼠,检测其运动功能以及共济失调的状态。转筒(直径3.0—3.2cm)被隔板分成几个等分空间,可供多只小鼠同时实验,转筒的高度应保持在既不会使动物跌落受伤,也不会使动物产生恐惧感的水平。小鼠在转筒上会爬动并试图不从转筒上跌落,其在转筒上保持的时间将作为指标记录。转筒的速度可以是匀速或加速,在脑卒中的研究里,加速方式使用最为广泛。

经过几天学习后,动物的滚筒运动能力逐渐提高,测试评分增高,并到达一个稳定的水平[3]。但如果小鼠几天之内未受到训练,它们的测试评分又会下降。所以为了区分运动技能学习还是脑卒中后的康复对测试评分的影响,术前检测和基线水平定位是非常必要的,尤其是对于那些轻度脑卒中的模型。训练则有助于消除动机因素对测试评分带来的影响。通过训练还能很好地识别"问题"模型并在正式实验前用一些刺激手段进行补救:比如针扎尾、点击脚部。但若仍然过早跃下转筒,则只能选择那些最低跌落时间较稳定的动物[4]。

Hunter等[4—8]在不同时间段对不同品系、不同脑卒中模型的小鼠进行转筒实验,结果发现:129sv、Swiss、ddy、C57BL/6等小鼠进行了30min至永久闭塞等一系列不同程度的近端大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)处理后,4天内均可通过转筒实验检测出运动功能的改变;但在脑卒中第28天只有C57BL/6小鼠可通过转筒实验反映脑卒中的程度。另一项研究发现,Swiss小鼠远端MCAO术后5天,使用了转筒实验未检出实验组与假手术组行为学的明显差别[9]。Park等[10]对13周C57BL/6J雄鼠大脑中动脉阻塞术后第2、4、7、14和28天进行转筒实验测试。手术前,训练小鼠在旋转筒上的平衡能力,训练5天(每天3次实验)。将旋速在250s内由4r/min提高至40r/min,并作为术前基线。没有达到基线标准的小鼠将在随后的研究中排除在外。实验第1周内,MCAO小鼠在转筒上停留的时间比假手术小鼠短,1周后差异不明显。

转筒试验相对简单、效果良好,可评价小鼠简单运动功能和共济失调状态,适用于129sv、Swiss、ddy、C57BL/6以及转基因小鼠等不同品系小鼠近端MCAO模型,可对短期损伤进行评估。对长期损伤是否也具有足够的敏感性还待检测。可能不适合检测远端MCAO处理后因皮质损伤而造成的神经功能障碍。

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.07.026

*基金项目:国家自然科学基金(81400948);北京市自然科学基金(7144188);北京市教育委员会科技计划面上项目(KM201410025004)

1 首都医科大学附属北京朝阳医院,北京,100020;2 通讯作者

作者简介:赵筱汐,女,硕士研究生;收稿日期:2015-05-14

3 爬杆实验

爬杆实验（pole test）最初是由Ogawa等人设计，用于评估帕金森病模型中的运动迟缓症，后被用于测试小鼠纹状体损伤的程度。实验中，小鼠被置于高50—55cm，直径8—10mm的杆顶，训练其转身并下杆（小鼠鼻部先下）。从动物转身开始计时（计分），记录下180°转身时间（$T_{转}$）和到达杆底时间（$T_{总}$），若未能转身但也到达杆底，那么$T_{总}$被当做$T_{转}$记录。若动物完成转身但在下降中跌落，则$T_{总}$在跌落时停止计时。但若动物放置后立即跌下，则实验中最长的持续时间设置为$T_{转}$和$T_{总}$。在一次成功爬杆实验中，动物不得停顿，否则实验作废并需重做。为了防止滑落，应将杆打磨粗糙，也可以使用胶带加大摩擦。除此之外，可于杆尖放一纸板防止动物爬过杆尖而非在杆尖转一个弯。

Kronenberg和Royl等[11—12]应用爬杆实验发现C57BL/6，129/SV小鼠近端30—60min MCAO 3周内实验组与假手术组行为学有明显差异。Bouët等[13]发现Swiss小鼠近端MCAO手术后2、3、4、8天$T_{转}$和$T_{总}$均明显高于假手术组。Prinz等[14]对129/SV野生型60min MCAO处理，静脉注射或腹腔注射瑞舒伐他汀治疗，应用爬杆实验检测出这些药物强烈的神经保护作用。Park等[10]对13周C57BL/6J雄鼠MCAO术后第2、4、7、14和28天进行爬杆实验测试。手术前，把小鼠头朝上放置在杆顶时，小鼠均能在基准值1s内把头转为垂直向下，并在4s内爬到地面。手术后，MCAO小鼠的$T_{转}$和$T_{总}$显著增加，并由此说明运动迟缓是脑缺血后纹状体损伤的结果。

爬杆实验简单易行，适用于近端MCAO模型短期行为学测试，而对于长期实验的敏感性还不能确定。

4 吊绳实验

吊绳实验（wire hanging test）是一项比较简单的用于评估动物抓握力、平衡性以及忍耐性的实验。小鼠被训练用前肢抓绳吊起自身，不从高50—60cm的绳上跌落，为了防止其使用后肢借力，可以使用胶带轻柔地黏住其后肢，并且为了防止小鼠跌落时受伤应在其下垫好软物。小鼠在绳上坚持的时间可作为评价的指标。

正式实验前训练动物积极地、长时间吊绳是十分必要的。训练期间，小鼠被迫两前肢抓绳，实验者的手渐渐离开小鼠不再托举，使之独立承受自身的重量。若小鼠向绳两端移动则可以在绳两端用板挡住以防止逃脱。实验者应在几次的吊绳实验中让小鼠有10—20s的间隔休息。若小鼠提前松绳则应立即再次将其放回绳上，强迫其抓绳，直至完成训练。关于训练的时间并没有固定的标准，训练良好的小鼠应该符合：只用两前肢吊绳；不在绳上移动；在力竭前会调整姿势以保持吊绳状态。

Kronenberg等[11,14—15]发现129/SV小鼠30min和60min MCAO处理后，再给予神经保护药物治疗，用吊绳实验检测到小鼠短期和长期感觉和运动功能均得到明显恢复。C578BL/6小鼠MCAO处理45min，60min和90min后的第13—19天内，吊绳实验未检测出小鼠的行为学改变。C578BL/6小鼠训练难度较大，小鼠易挣脱且忍耐性较低，从而评估MCAO早期损伤情况比较困难，并不适合应用吊绳实验。但Abe等[16]应用吊绳实验发现雄性和雌性C57BL/6小鼠MCAO处理25min后的第8天，与对照组相比，应用神经保护药物SC51089的治疗组运动功能明显改善。Silva[17]也成功地应用吊绳实验检测出雄性C57BL6/J野生型小鼠和Nox2基因敲除小鼠脑缺血30min再灌注24h行为学有明显差别。

吊绳实验适用于脑卒中后早期和后期损伤的评估，129/SV小鼠是比较合适的动物模型。

5 角落实验

角落实验（corner test）最早用于检测大鼠单侧黑质纹状体损伤后感觉运动性损伤和不对称性，后经改良也可以用于小鼠。然而纹状体和皮质损伤可造成多重感觉和运动不对称（比如触须、肢体运动、姿势倾向），可能会影响角落实验的结果[18]。实验需要两块相连的纸板（30cm×20cm×1cm）成30°角，连接处留有小口吸引小鼠往角落更深处探索爬行。实验开始时，小鼠被置于两板内的中间位置并且头面向夹角。实验中记录下小鼠向深处爬行至胡须与纸板壁触碰后转头行为。近端MCAO小鼠会倾向转向非损伤的一侧[18—19]，而远端MCAO处理后动物倾向转向对侧[20]。角落实验不需提前训练，但建议做好预实验来比较脑卒中前后的实验值以及确认好基线。角落实验的缺点主要在于实验早期的动物会产生厌恶情绪或积极性不足，而多次试验后也会失去积极性。因此，每次试验中给予的休息时间都要足够长。仅有少部分研究工作角落实验持续进行了2周的，但是这种情况下只能通过推或者拉小鼠的尾巴，强制使其进入角落，才能成功完成实验。这种处理所带来的影响尚未研究。此外，如果需要几个时间点的数据，可以将角落装置设计成封闭式，配上红色光源，动物放入后通过摄像头进行记录，这样可以减少动物紧张情绪对实验结果的影响[19]。Zhang等[16,19,21]对C57BL/6和CD1小鼠进行不同强度近端MCAO（从25min至永久栓塞）处理后再进行治疗，2周内治疗组表现出神经功能明显恢复。Swiss小鼠60min近端MCAO处理后，在前8天检出了比较明显的行为学改变[13]。但Ferrara等[6]发现129/SV小鼠的探索积极性差，不适宜用做此实验。Manwani等[22]对C57BL/6型雄鼠进行60min MCAO处理，发现相比爬杆、吊绳和旷场实验，角落实验更能敏感地反映脑卒中后30天小鼠的行为学改变，在老年鼠的测试中也可有效进行。

尽管角落实验仍有一些不足，但却是在MCAO早期或

晚期能够敏感测试感觉运动性不对称的极少方法之一,特别是对于纹状体明显受损的小鼠。

6 除胶实验

除胶实验(adhesive removal test)可用于评价小鼠感觉运动皮质区、皮质脊髓束以及纹状体受损后感觉运动功能障碍。小鼠每只前爪被贴上一块补丁样粘块(呈0.3cm×0.4cm长方形或呈直径0.3cm的圆形)[13]。左爪和右爪的粘贴顺序应在粘贴每只动物时轮换,并且粘贴的方式、力度要一致。贴完后将其放回饲养笼或透明的Perspex盒中120s,并记录接触和撕去胶带的时间。接触定义为爪子摇晃或用嘴触碰胶带。因为神经损伤使前爪的运动和协调能力都有所下降,单侧脑损伤的小鼠通常先接触并撕去同侧肢体胶带,而对对侧肢体感知能力降低。因此,除胶实验可以通过观察小鼠在实验中接触和首先撕去胶带的情况来反映动物自身感觉的偏向。

为了实现最佳效果,应有持续4—5d的训练。Bouët等[13]给出以下建议:对Swiss小鼠每天训练1次即可使之表现稳定;对于C57BL/6和129SV小鼠则需每天训练2—3次。动物在贴胶带前应放于观察箱中适应60s。理想状态下,应有两位实验员参加,一位固定并安抚小鼠,另一位贴胶带。两个人可以通过从不同角度观察小鼠,从而更准确地获得其接触和清除胶带的时间。小鼠翻身打滚会使判断哪一侧爪接触到了胶带或者胶带何时被除去的难度加大,尤其是小鼠快速运动时。通常情况下,小鼠术后24h即可以开始除胶实验,并且可以每天重复该实验。为了更好地减少随机效应,可以做3次实验,并选取其中最好两次的平均值作为最终得分。

Leconte等[13,23]成功应用除胶实验检测Swiss小鼠60min MCAO后第6周依然存在感觉和运动障碍。但C57BL/6小鼠化学诱导皮质缺血第20天除胶实验无明显的敏感性[24]。Shen等[25]对英国杂种小鼠和野生型小鼠分别进行永久远端大脑中动脉阻塞(pMCAO)手术,除胶实验在pMCAO模型完成后第3、15、30、60天进行。结果发现,与野生型小鼠相比,杂种小鼠pMCAO处理后所有的时间点上梗死体积更为明显,行为学表现也更差。

除胶实验常用于检测近端和远端MCAO处理的小鼠短期或长期的感觉损伤情况,但需要经验且花费时间较多。

7 旷场实验

旷场实验(open field test)广泛用于评价啮齿类动物运动功能和探索能力,其探索模式易被情绪所影响。实验装置由旷场反应箱和数据自动采集、处理系统两部分组成。小鼠旷场反应箱是一个由木头或塑料制成的无障碍方形或圆形场地(至少50cm×50cm或直径50cm),并被围成封闭的空间。小鼠在旷场内可以自由活动,箱子顶部置摄像机记录小鼠的活动。旷场光照为全人工照明。旷场实验根据实验目的可观察后肢站立次数为垂直得分(rearing)、某一肢体越过的格子数为水平得分(crossing)、单位时间内动物在中央格停留时间、尿便次数、修饰次数、运动距离、运动速度、休息时间、中央运动距离和沿边运动距离等。

旷场对于小鼠是一个陌生的环境,它会抑制小鼠的探索欲望。实验中应该使用较暗的光源尽可能地减少小鼠的焦虑并促进其探索行为。此外,多次将小鼠置于旷场中,小鼠也会因为适应而减少其探索积极性,并会改变其行为模式,这种积极性的降低会影响研究者对小鼠缺血损害后的功能恢复情况的观察结果。

Bargiotas等对野生型小鼠pannexin蛋白双敲除小鼠分别进行MCAO处理后48h进行旷场实验。将小鼠放置在区域(72cm×72cm)的中心,并令其探索该区域60s。随后,把小鼠放回原鼠笼。再用60%的乙醇清理区域,在两次实验间需等乙醇挥发干。在旷场测试中,与pannexin蛋白双敲除的小鼠相比,野生型小鼠在中心区所花时间明显较少,反映出更高的焦虑等级。pannexin蛋白双敲除小鼠后肢站立的次数明显多于野生型小鼠,而这两组小鼠跨越格子的次数并无不同,表明MCAO处理48h后,野生型小鼠和双敲除小鼠的运动积极性同等降低。

旷场实验可以方便地测试脑卒中模型的运动功能和探索行为,操作简便,方法可靠。计算机技术和图像处理技术的引入,使动物行为分析的检测指标增加,且具有高效、无创、灵敏、客观等诸多优点。但在实验过程中,焦虑和适应两大因素有可能影响实验结果。

8 小结

功能性测试对评价脑卒中的治疗效果非常重要。相对于大鼠,小鼠身型更小、智能更低,并且在缺血处理后表现出极强的恢复能力,所以使用小鼠进行行为测试(尤其是长期的行为测试)会更有难度。然而随着小鼠在脑卒中研究领域中越来越广泛的应用,进一步评价其各种行为测试方法的敏感性和可信度是很有必要的。

行为测试不仅是用于评价治疗效果的一种方法,也是作为桥梁来连接动物研究和临床研究的共同标准。局灶性脑缺血小鼠模型的行为学测试主要为感觉运动性行为测试,在目前的研究中,行为学测试方法主要集中于转筒实验、爬杆实验、吊绳实验、角落实验、除胶实验和旷场实验等。这些测试各有其优缺点,有的偏向于测试运动功能,有的偏向于测试感觉功能,除此之外各有一定局限性,如需全面反映小鼠损伤程度,还应结合多种行为测试方法进行实验研究。比较小鼠局灶性脑缺血模型的各种行为学测试方法,对于更全面地反映动物神经功能的损伤以及功能恢复情况,研究局灶性

脑缺血的发病机制、探讨防治措施等研究中均占有十分重要的地位。本文介绍了这几种测试方法，从不同方面对小鼠脑卒中后的损伤进行评估，希望通过对比这些测试方法，得到它们之间的共性与不同，进而获得对其结合应用的实验方法。这些行为学测试方法不仅可以应用于对小鼠感觉运动性行为缺损的检测，而且可以更广泛地应用于对局灶性脑缺血小鼠进行药物治疗后的功能恢复程度的研究中。

但是小鼠局灶性脑缺血模型的行为学测试目前面临两个难题：第一，临床研究大多在治疗介入后2—3周显示出功能性恢复的情况，而这在基础研究中并不常见；第二，小鼠的感觉运动性测试，多源于大鼠的测试方法，因此大多数都具有一定的局限性。针对不同的小鼠品系、脑卒中类型和水平，选择合适的测试方法、时间窗非常的重要。总之，我们还需要进一步探寻各种脑卒中模型行为测试的特点，寻找更为敏感的测试方法。随着旧方法的改进和新方法的发明以及研究的不断深入，相信我们能更好地将基础研究中取得的成果向临床应用转化。

参考文献

[1] Fahlström A, Zeberg H, Ulfhake B. Changes in behaviors of male C57BL/6J mice across adult life span and effects of dietary restriction[J]. Age (Dordr), 2012, 34(6):1435—1452.

[2] Sweetnam D, Holmes A, Tennant KA, et al. Diabetes impairs cortical plasticity and functional recovery following ischemic stroke[J]. J Neurosci, 2012, 32(15):5132—5143.

[3] Homanics GE, Quinlan JJ, Firestone LL. Pharmacologic and behavioral responses of inbred C57BL/6J and strain 129/SvJ mouse lines[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1999, 63(1):21—26.

[4] Jin K, Wang X, Xie L, et al. Transgenic ablation of doublecortin-expressing cells suppresses adult neurogenesis and worsens stroke outcome in mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(17):7993—7998.

[5] Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, et al. Functional assessments in mice and rats after focal stroke[J]. Neuropharmacology, 2000, 39(5):806—816.

[6] Ferrara A, El Bejaoui S, Seyen S, et al. The usefulness of operant conditioning procedures to assess long-lasting deficits following transient focal ischemia in mice[J]. Behav Brain Res, 2009, 205(2):525—534.

[7] Hayakawa K, Nakano T, Irie K, et al. Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(4):871—882.

[8] Wang X, Xu L, Wang H, et al. CD44 deficiency in mice protects brain from cerebral ischemia injury[J]. J Neurochem, 2002, 83(5):1172—1179.

[9] Freret T, Bouet V, Leconte C, et al. Behavioral deficits after distal focal cerebral ischemia in mice: Usefulness of adhesive removal test[J]. Behav Neurosci, 2009, 123(1):224—230.

[10] Park SY, Marasini S, Kim GH, et al. A method for generating a mouse model of stroke: evaluation of parameters for blood flow, behavior, and survival[J]. Exp Neurobiol, 2014, 23(1):104—114.

[11] Ji S, Kronenberg G, Balkaya M, et al. Acute neuroprotection by pioglitazone after mild brain ischemia without effect on long-term outcome[J]. Exp Neurol, 2009, 216(2):321—328.

[12] Royl G, Balkaya M, Lehmann S, et al. Effects of the PDE5-inhibitor vardenafil in a mouse stroke model[J]. Brain Res, 2009, (1265):148—157.

[13] Bouët V, Freret T, Toutain J, et al. Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse[J]. Exp Neurol, 2007, 203(2):555—567.

[14] Prinz V, Laufs U, Gertz K, et al. Intravenous rosuvastatin for acute stroke treatment: an animal study[J]. Stroke, 2008, 39(2):433—438.

[15] Gertz K, Priller J, Kronenberg G, et al. Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow[J]. Circ Res, 2006, 99(10):1132—1140.

[16] Abe T, Kunz A, Shimamura M, et al. The neuroprotective effect of prostaglandin E2 EP1 receptor inhibition has a wide therapeutic window, is sustained in time and is not sexually dimorphic[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(1):66—72.

[17] De Silva TM, Brait VH, Drummond GR, et al. Nox2 oxidase activity accounts for the oxidative stress and vasomotor dysfunction in mouse cerebral arteries following ischemic stroke[J]. PLoS One, 2011, 6(12):e28393.

[18] Zhang L, Schallert T, Zhang ZG, 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.

[19] Hao J, Mdzinarishvili A, Abbruscato TJ, et al. Neuroprotection in mice by NGP1-01 after transient focal brain ischemia[J]. Brain Res, 2008, (1196):113—120.

[20] Lubjuhn J, Gastens A, von Wilpert G, et al. Functional testing in a mouse stroke model induced by occlusion of the distal middle cerebral artery[J]. J Neurosci Methods, 2009, 184(1):95—103.

[21] Chen J, Zhang C, Jiang H, et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25(2):281—290.

[22] Manwani B, Liu F, Xu Y, et al. Functional recovery in aging mice after experimental stroke[J]. Brain Behav Immun, 2011, 25(8):1689—1700.

[23] Leconte C, Tixier E, Freret T, et al. Delayed hypoxic postconditioning protects against cerebral ischemia in the mouse [J]. Stroke, 2009, 40(10):3349—3355.

[24] Tennant KA, Jones TA. Sensorimotor behavioral effects of endothelin-1 induced small cortical infarcts in C57BL/6 mice[J]. J Neurosci Methods, 2009, 181(1):18—26.

[25] Shen F, Degos V, Chu PL, et al. Endoglin deficiency impairs stroke recovery[J]. Stroke, 2014, 45(7):2101—2106.

[26] Bargiotas P, Krenz A, Monyer H, et al. Functional outcome of pannexin-deficient mice after cerebral ischemia[J]. Channels (Austin), 2012, 6(6):453—456.