维普资讯 http://www.cqvip.com



论著 文章编号:0253-3626(2007)10-1055-04

# “楼梯测试”评价局灶性脑梗死大鼠前肢功能研究

龚 标[1],李长清[2],任庆华[2],李 静[2],黄思琴[1]

(1. 重庆医科大学中医药学院针灸教研室,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第二医院神经内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探索“楼梯测试”评价局灶性脑梗死大鼠前肢延伸和抓取能力的有效应性。方法:实验选择左利爪 SD 大鼠 18 只,随机分为正常组、假手术组和手术组,每组 6 只;正常组不作任何手术处理,假手术组仅作颈外动脉结扎,手术组用线栓法制成局灶性脑梗死大鼠模型;用树脂玻璃材料做成的可抽取楼梯测试盒比较 3 组大鼠前肢的延伸和抓取能力。结果:所有大鼠经过适当训练均能完成“楼梯测试”实验,3 组在训练的第 7 天组间无统计学差异($P>0.05$);正常组和假手术组在 3 个时间点的抓取能力均无统计学差异 ($P>0.05$); 手术组的术后第 7 天和第 14 天的抓取能力与术前第 1 天比较均有显著性差异 ($P<0.05$),术后第 7 天和第 14 天抓取能力无统计学差异($P>0.05$)。结论:“楼梯测试”能简单和有效的评估局灶性脑梗死大鼠前肢独立伸展技术能力,能客观定量地反映实验大鼠的前爪功能,是研究实验干预脑梗死大鼠前肢功能恢复的方法学手段之一。

【关键词】楼梯测试;局灶性脑梗死;大鼠;前肢;抓取能力

【中国图书分类法分类号】R743.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-03-05

# An study of the “staircase test” evaluating forelimb function of rat model with focal cerebral ischemia

*GONG Biao, et al*

(*Department of Acupuncture, College of Traditional Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To probe the effect of the “staircase test” evaluating the forelimb reaching and grasping function of rat model with focal cerebral ischemia. *Method*: The 18 SD rats were divided into 3 groups randomly: normal group, sham-operation group, and operation group, 6 in each group. Normal group got no operation, sham-operation group just got the ligation of external carotid artery, and operation group was made to the model of focal cerebral ischemia by suture methods. To compare the reaching and grasping effect of the 3 groups forelimb, The removable staircase test made of plexiglas would compare the reaching and grasping effect of the 3 groups rat forelimb. *Result*: All the rats finished the “staircase test” through suitable exercise. There is no statistical significance among the three groups on the 7th day ($P>0.05$); there is no statistical significance about grasping abilities between normal group and sham-operation group at 3 time points ($P>0.05$); the grasping ability of the operation group on the 7th and 14th after operation is more significant than the one of the fist day before operation ($P<0.05$), but the grasping ability on the 7th and the 14th is no statistical significance after operation ($P>0.05$). *Conclusion*: The “staircase test” can evaluate the forelimb independent reaching ability of the rat model with focal cerebral ischemia effectively and simply, it also is credible parameter index for the forelimb reaching ability of rat model with focal cerebral ischemia and one of methodology for researching intervening rats model with focal cerebral ischemia by experiment for resumption.

【Key words】 Staircase test; Focal cerebral ischemia; Rat; Forelimb; Grasping skill

大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)引起的对侧前肢运动功能障碍是其残留的主要症状,因此 MCAO 模型大鼠常做为研究脑梗死后运动功能障碍及其康复机制的主要实验模型。MCAO 模型大鼠的前肢功能障碍表现为残肢延伸受限、残爪伸展受限,残爪抓取能力受限,如何可靠、敏感和简单地定量评价这种前肢功能障碍的程度受到广泛关注。我们参照 Montoya 设计[1]的“楼梯测试”,探讨用单侧前肢独立抓取食物数量的方法评价 MCAO 模型大鼠前肢功

作者介绍:龚 标(1965- ),男,副教授,
主要研究方向:针灸治疗神经内科疾病的基础和临床研究。

基金项目:重庆市科委自然科学基金(2004-54-83)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



能的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 楼梯测试设备

测试设备如图 1,用透明的树脂玻璃材料制作有利于观察。外壳和里面平台均选用 5mm 厚材料,楼梯选用 3mm 厚材料。盒子外径长 285mm × 高 90mm × 宽 60mm。其一端中心设置一平台长 165mm × 宽 27mm × 厚 5mm, 其底座外径长 165mm × 高 48mm × 宽 21mm,两端封闭,可取出的食物槽在两边,每层楼梯均由 2 层 3mm 厚材料作成,其中 1 层钻取 1 个直径为 12mm 孔,2 层相粘接作成 1 级楼梯, 以此类推作成 6 层楼梯, 并相连成 1 个可以移动的双侧各 6 级的楼梯。将楼梯插入到盒内,食物槽在中心平台的两边。6 级楼梯每个都有 12mm 的园槽, 每个园槽放置 1 个食物小球。用长 60mm × 宽 14mm × 厚 5mm 树脂玻璃作成 1 个挡板封在平台的上方中间,防止老鼠从前端跑掉,做 1 个提插门封住后面防止老鼠从后端跑掉。当把大鼠的头放入盒口时,大鼠乐于进入盒中并爬上平台,同时此盒不宜太长便于提拿鼠尾。

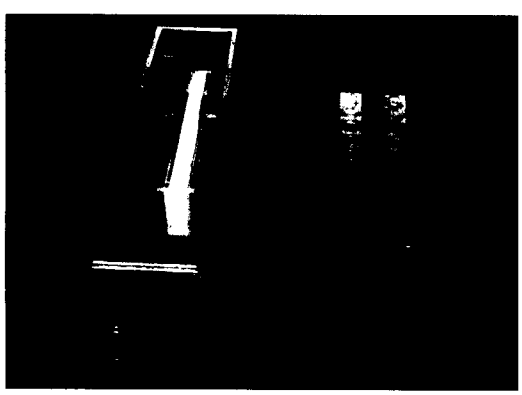


**图 1 "楼梯测试"设备**

### 1.2 动 物

选择左侧为优势爪的雄性 SD 大鼠 18 只(重庆医科大学动物实验中心提供),重 200 ~ 250g,随即分为正常组、假手术组和手术组 3 组,每组 6 只。在自然环境下每组的 6 只大鼠放在一个笼子里, 自由饮水和取食,3 天后进行造模前楼梯测试。

### 1.3 造模前测试

盒子放在平坦的桌子表面, 双侧的楼梯从盒子移出,在每个食物槽中放入 45mg 食物小球 (重庆医科大学动物实验中心提供的鼠料制成), 将自由饮水和禁食 24h 的老鼠放入测试盒内穿过平台,插入两侧的楼梯(如图 2)。测试时间为 1h, 其间每 10min 移出楼梯并计算残留在两边的食物小球, 将刨落在低层的食物小球重新放回食物槽中, 并添加满 12 粒食物小球,计算测试时间内大鼠从两边食物槽获得的食物小球总数。老鼠被重新放回鼠笼,自由饮水和限量给食等待第 2 天同一时间的测试和训练,余类推,经过 7 天的训练,老鼠抓取食物小球的技术、数量和体重都趋于恒定后进入下一步实验。其设计的优点是大鼠乐于进入狭窄的地方以便获得食物,大鼠在中心平台伸展前肢向同侧下面递减的楼梯抓取和获得食物小球,并可几只大鼠同时测试。

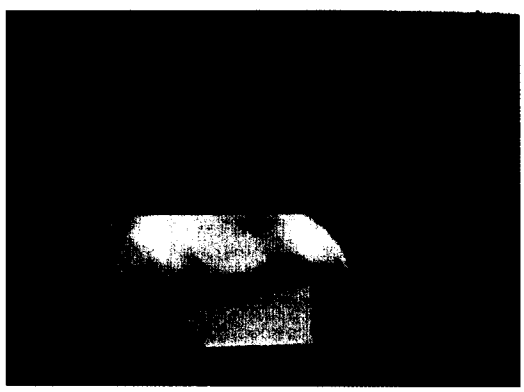


**图 2 "楼梯测试"大鼠前肢延伸和抓取能力**

优势爪的确定:通过对以上 7 天老鼠两侧抓取食物数量的不同,观察老鼠更偏爱使用那侧前肢,确定老鼠的优势爪,选择左利爪的大鼠 18 只纳入下一步测试。

左利爪大鼠左侧测试:测试标准仍为 1h。仅在楼梯左侧放有食物,每 5 min 添加一次,1h 的食物小球最大量仍为 72 粒,再测试 7 天抓取食物的数量作为分析依据,以提供左前爪的伸展能力评估。

### 1.4 局灶性脑梗死造模

造模前通过 7 天左利爪的筛选,筛选后的左利爪大鼠再进行 7 天的左侧测试,共 14 天后,对假手术组和手术组进行手术造模。假手术组仅进行右侧颈外动脉结扎,手术组用线栓法局灶性大鼠大脑右侧中动脉阻塞 (MCAO)2h 后再灌注模型[2],用 Longa 法进行神经病学评分,手术组造模成功的标准为 Longa 评分为 1~3 分[3]。

### 1.5 造模后测试

造模后第 5 天 3 组大鼠同时禁食,第 6 天按造模前的固定时间 3 组大鼠进行"楼梯测试",第 7 天抓取食物粒数作为分析用数据,放回鼠笼后自由取食和饮水;如上方法把第 14 天抓取食物粒数也作为分析用数据。

### 1.6 统计处理

选取各组大鼠在造模术前第 1 天、造模术后第 7 天和第 14 天左前肢抓取食物的数量进行分析,采用 SAS 8.0 软件包进行方差分析和 $t$ 检验。

## 2 结 果

大鼠获得基本技能首先是适应测试,所有的大鼠都能爬上平台,开始会用嘴和舌头获取顶层台阶的一些食物小球,以及开始用前爪从更低的中间台

维普资讯 http://www.cqvip.com



阶的两侧获取小球。训练 3~4 天后，老鼠的抓取食物能力明显增强，有的老鼠甚至 5~6min 就能抓取完放在食物槽中的 12 粒食物小球，训练 7 天后，老鼠抓取食物小球的技术、数量和体重都趋于恒定。

假手术组的大鼠术后不仅没有忘记食物放置的位置，而且能马上恢复到以前的抓取能力；手术组的大鼠仍能记得食物放置的位置，未发现有大鼠遗忘抓取动作的现象。右侧 MCAO 造模成功的手术组大鼠，由于左前肢的运动功能和精细动作受限，开始无法抓取食物小球。随着时间推移，在测试时间内抓取的食物小球数量逐渐增加，没有干预治疗的右侧 MCAO 模型大鼠的左前肢伸展和抓取能力一般只能达到造模前抓取能力的一半。

各组大鼠在造模术前第 1 天、造模术后第 7 天和第 14 天左前肢抓取食物的数量比较见表 1。3 组在训练的第 7 天组间无统计学差异（$F$=0.95，$P$>0.05）；正常组和假手术组在 3 个时间点的抓取能力均无统计学差异（$F$=0.43，F=1.28，$P$>0.05）；手术组的术后第 7 天和第 14 天的抓取能力与术前的第 1 天比较均有显著性差异（$F$=23.72，$P$<0.05），术后第 14 天的抓取能力好于术后第 7 天，但无统计学差异（$t$=2.31，$P$>0.05）。

表 1　三组大鼠抓取食物粒数方差分析（$\bar{x}\pm s$）

| 处理组 | 例数 | 术前第 1 天 | 术后第 7 天 | 术后第 14 天 | $F$ 值 | $P$ 值 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 正常组 | 6 | 70.83 ± 1.17 | 71.33 ± 1.21 | 71.33 ± 0.82 | 0.43 | >0.05 |
| 假手术组 | 6 | 70.17 ± 1.47 | 69.17 ± 1.94 | 70.67 ± 1.51 | 1.28 | >0.05 |
| 手术组 | 6 | 71.17 ± 1.17 | 40.83 ± 11.32 | 48.33 ± 7.74 | 23.72 | <0.05 |
| $F$ 值 | | 0.95 | 39.08 | 49.12 | | |
| $P$ 值 | | >0.05 | <0.05 | <0.05 | | |

## 3　讨　论

MCAO 局灶性脑梗死模型大鼠是研究脑梗死的主要模型，其大脑皮质因缺血而引发的对侧前肢运动功能障碍是其残留的主要症状，表现为残肢延伸受限、残爪伸展受限、残爪抓取能力受限。研究局灶性脑梗死大鼠大脑皮质和皮质下运动系统支配的运动功能的较敏感测试方法，即有效评估因脑缺血引发的前肢功能受限的实验测试方法有多种，如从狭小的食物管道寻找食物[4]，或从笼子外面的食物盘寻找食物[5-7]，所有这些实验设计都有一个共同的意图，就是大鼠被迫去寻找食物和不被测试的前肢被限制，以便被测试前肢能被有效评估[8,9]。有人使用粘胶带来限制不被测试的前肢、也有人在屈肌注射麻醉剂、甚至使用手链限制前爪伸出栏笼，这些限制非观察侧前肢的方法不能使实验大鼠在自然状态下接受残肢功能测试，限制了其使用。有的实验设计以抓取食物小球的分解动作评价前肢精细动作[10-15]，而“楼梯测试”是一种双侧前肢独立伸展训练和收集单侧前肢独立抓取食物数量的方法，可通过评估食物小球抓取动作客观的反映实验大鼠的前爪功能[16-20]。我们的实验研究验证了该测试方法能简单、可靠、定量地反映其观察前肢（爪）功能变化，非观察肢体在测试时处于自然状态，是研究实验干预脑梗死大鼠前肢功能恢复的方法学手段之一[21-23]。

Montoya 设计的“楼梯测试”是观察大鼠大脑不同部位损伤对前肢运动功能的影响，如嗅球、视神经、运动皮质、小脑等，并未观察损伤后不同时间点的前肢功能比较，观察时间也只是简单要求 15min 以上。我们用“楼梯测试”方法研究 MCAO 模型的前肢功能障碍，首先根据大鼠每天能维持体重的食物需求量 30~35g/d[15]设计观察时间为 1h，这是因为在我们的实验中观察大鼠主动抓取的食物数量接近 72 粒可以维持体重，体重的波动在 10%以内，并筛选出左利爪的大鼠观察右侧 MCAO 模型大鼠左前肢功能；其次是比较了 MCAO 后 7 天和 14 天的前肢抓取能力，确定了 MCAO 后 7 天的大鼠前肢抓取能力可反应其前肢功能障碍情况，为实验干预 MCAO 模型大鼠前肢功能康复提供了观察时间点。

选择单一雄性大鼠，是因为在楼梯测试之初，我们也选有雌性大鼠，但是雌性大鼠不能完成造模前的测试，有些雌性大鼠每天抓取的食物数量很少，不能维持体重，甚至体重下降到 30%以上，即使延长测试时间或增加测试次数也无济于事。

（通讯作者：李长清，重庆医科大学附属第二医院神经内

维普资讯 http://www.cqvip.com



科教授,博士生导师,电话:023-63812802,E-mail:licq9217@163.com)

## 参 考 文 献

[1] Montoya CP,Campbell-Hope LJ,Pemberton KD,et al. The "staircase test":a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats[J]. Neuroscience Methods,1991;36(2-3):219-228.

[2] 罗 勇, 董为伟. Wistar 大鼠插线法局灶性脑缺血/再灌注模型的实验研究[J]. 重庆医科大学学报,2002;27(1):1-4.

[3] 龚 彪,李长清,黄 剑.SD 大鼠线栓法局灶性脑缺血/再灌注模型的改进[J]. 重庆医学,2006;35(4):313-315.

[4] Pisa M. Motor functions of the striatum in the rat:critical role of the lateral region in tongue and forelimb reaching[J]. Neuroscience,1988;24(2):453-463.

[5] Dunnett SB,Isacson O,Sirinathsinghji DJ,et al. Striatal grafts in rats with unilateral neostriatal lesions-III. Recovery from dopamine-dependent motor asymmetry and deficits in skilled paw reaching[J]. Neuroscience,1988;24(3):813-820.

[6] Dunnett SB,Whishaw IQ,Rogers DC,et al. Dopamine-rich grafts ameliorate whole body motor asymmetry and sensory neglect but not independent limb use in rats with 6-hydroxydopamine lesions[J]. Brain Res,1987;415(1):63-78.

[7] Whishaw IQ,O'Connor WT,Dunnett SB. The contributions of motor cortex,nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat[J]. Brain,1986;109(Pt5):805-843.

[8] Price AW,Fowler SC. Deficits in contralateral and ipsilateral forepaw motor control following unilateral motor cortical ablations in rats[J]. Brain Res,1981;205(1):81-90.

[9] Gonzalez MF,Poncelet A,Loken JE,et al. Quantitative measurement of interresponse times to assess forelimb motor function in rats[J]. Behav Brain Res,1986;22(1):75-84.

[10] Diener PS,Bregman BS. Fetal spinal cord transplants support the development of target reaching and coordinated postural adjustments after neonatal cervical spinal cord injury[J]. Neurosci,1998;18(2):763-778.

[11] Mckenna JE,Whishaw LQ. Complete compensation in skilled reaching succes with associated impairments in limb synergies,after dorsol column lesion in the rat[J]. Neuroscience,1999;19(5):1885-1894.

[12] Weidner N,Ner A,Salimi N,et al. Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2001;98(6):3513-3518.

[13] Dhakshin R,James M,Mark H. A form of motor cortical plasticity that correlates with recovery of function after brain injury [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006;103(30):11370-11375.

[14] Vergara-Aragon P,Gonzalez CL,Whishaw IQ. A novel skilled-reaching impairment in paw supination on the "good" side of the hemi-Parkinson rat improved with rehabilitation[J]. Neurosci,2003;23(2):579-586.

[15] 宗兆文,廖维宏,伍亚民,等. 大鼠前肢食物小球抓取动作评分的改进和应用[J]. 创伤外科杂志,2004;6(2):123-126.

[16] Kloth V,Klein A,Loettrich D,et al. Colour-coded pellets increase the sensitivity of the staircase test to differentiate skilled forelimb performances of control and 6-hydroxydopamine lesioned rats[J]. Brain Res Bull,2006;70(1):68-80.

[17] Baird AL,Meldrum A,Dunnett SB. The staircase test of skilled reaching in mice[J]. Brain Res Bull,2001;54(2):243-250.

[18] Nikkhah G,Rosenthal C,Hedrich HJ,et al. Differences in acquisition and full performance in skilled forelimb use as measured by the "staircase test" in five rat strains[J]. Behav Brain Res,1998;92(1):85-95.

[19] Whishaw IQ,Woodward NC,Miklyaeva E,et al. Analysis of limb use by control rats and unilateral DA-depleted rats in the Montoya staircase test:movements,impairments and compensatory strategies[J]. Behav Brain Res,1997;89(1-2):167-177.

[20] Gharbawie OA,Gonzalez CL,Whishow IQ. Skilled reaching impairments from the lateral frontal cortex component of middle cerebral artery stroke:a qualitative and quantitative comparison to focal motor cortex lesions in rats[J]. Behav Brain Res,2005;156(1):125-137.

[21] Maclellan CL,Gyawali S,Colboume F. Skilled reaching impairments follow intrastriatal hemorrhagic stroke in rats[J]. Behav Brain Res,2006;175(1):82-89.

[22] Gharbawie OA,Gonzalez CL,Williams PT,et al. Middle cerebral artery (MCA) stroke produces dysfunction in adjacent motor cortex as detected by intracortical microstimulation in rats [J].Neuroscience,2005;130(3):601-610.

[23] Bury SD,Jones TA. Unilateral sensorimotor cortex lesions in adult rats facilitate motor skill learning with the "unaffected" forelimb and training-induced dendritic structural plasticity in the motor cortex[J]. Neurosci,2002;22(19):8597-8606.