

黄忠强,刘书华,关雅伦,等. 非人灵长类单侧脑损伤模型运动感知行为的评价研究[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(5): 577-582.

Huang ZQ, Liu SH, Guan YL, et al. Investigation of evaluation method for motion and perception behavior in a nonhuman primate unilateral brain injury model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(5): 577-582.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2019.05.005

非人灵长类单侧脑损伤模型运动感知行为的评价研究

黄忠强, 刘书华, 关雅伦, 李韵峰, 李雪娇, 黄韧, 张钰, 李舸*

(广东省实验动物重点实验室 广东省实验动物监测所, 广州 510663)

【摘要】 目的 通过评价大脑感知和运动行为反应相关脑区功能改变, 是脑科学研究中基于非人灵长类开展脑重大疾病临床转化研究的重要策略, 对解析病生理情况下大脑功能环路调控机制具有重要的意义。**方法** 选取7~9岁雄性食蟹猴, 通过构建右侧颈内动脉注射MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)诱导帕金森模型和左侧大脑中动脉闭塞所致缺血性脑卒中模型, 利用自制的山和谷阶梯任务装置, 评价大脑单侧脑区损伤对对侧感知和运动功能的影响。**结果** 正常猴在连续10 d的山阶梯任务和谷阶梯任务中, 左右手均能够达到满分; 通过右侧颈内动脉注射MPTP构建猴帕金森模型后, PET-CT影像分析表明, 3只实验猴均出现右侧大脑黑质区多巴胺能神经元受损, 在山阶梯任务和谷阶梯任务中, 2只实验猴出现左手运动功能显著损伤, 空间识别能力基本正常, 而1只实验猴不仅出现左手运动能力损伤, 可能也存在空间识别能力异常或右手运动能力损伤; 通过电凝法构建左侧大脑中动脉闭塞所致缺血性脑卒中模型猴, MRI影响分析表明, 实验猴右侧大脑出现典型的缺血梗死灶, 在山阶梯任务和谷阶梯任务中, 实验猴出现右手运动功能损伤, 但空间识别能力基本正常。**结论** 山和谷阶梯任务实验能有效地应用于实验猴单侧脑损伤动物模型的运动感知行为评价。

【关键词】 非人灵长类; 单侧脑损伤; 行为评价

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 05-0577-06

Investigation of evaluation method for motion and perception behavior in a nonhuman primate unilateral brain injury model

HUANG Zhongqiang, LIU Shuhua, GUAN Yalun, LI Yunfeng, LI Xuejiao, HUANG Ren,
ZHANG Yu, LI Ge*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute,
Guangzhou 510663, China)

Corresponding author: LI Ge. E-mail: gonanlee@gdlami.com

【Abstract】 Objective Evaluating motion and perception behavior to investigate the functional changes of brain regions in non-human primates is an important strategy to develop clinical transformation study for major diseases in brain science research. **Methods** In this study, 7- to 9-year-old male cynomolgus monkeys were used to establish a Parkinson's model induced by right internal carotid artery injection of MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and an ischemic stroke model induced by left middle cerebral artery occlusion. The testing apparatus for hill and valley staircase tasks were used to evaluate the effect of unilateral brain injury on contralateral perception and motion function. **Results** In a 10-day evaluation for hill and valley staircase tasks, full scores were marked for the left and right hands of normal

【基金项目】 国家重点研发计划项目(2017YFC1307500); 广东省科技计划项目(2015A020212027, 2016A030313790)。

Funded by the National Key Research and Development Plan Project(2017YFC1307500), and Guangdong Science and Technology Plan Project (2015A020212027, 2016A030313790).

【作者简介】 黄忠强(1990—), 男, 学士, 研究实习生, 研究方向: 神经退行性疾病动物模型及机制研究。Email: 1125385103@qq.com

【通信作者】 李舸(1983—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 神经退行性疾病动物模型及机制研究。Email: gonanlee@gdlami.com

monkeys. After injection of MPTP into the right internal carotid artery, three experimental monkeys showed damaged dopaminergic neurons in the right substantia nigra by PET-CT image analysis. In hill and valley staircase tasks, the left hand motor function of two experimental monkeys was significantly injured, and the spatial recognition ability was normal. One experimental monkey not only had left hand motor ability damage but also showed abnormal spatial recognition ability or right hand motor ability. After left middle cerebral artery occlusion by electrocoagulation, typical ischemic infarction appeared in the right brain in the experimental monkey in MRI analysis. In hill and valley staircase tasks, the right hand motor function of the experimental monkey was impaired, but the spatial recognition ability was normal. **Conclusions** The hill and valley staircase tasks can be effectively applied to evaluate motion and perception behavior in a unilateral brain injury non-human primate animal model.

【**Keywords**】 nonhuman primate; unilateral brain injury; behavioral evaluation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脑科学与类脑研究(“脑计划”)是我国“十三五”国家社会发展科技创新规划中重点研究方向之一。在中国脑计划中,针对脑重大疾病开展系统深入的转化医学研究,揭示其发病机制,将推动脑疾病防治的根本进步,并促进相关药物研究与医疗仪器等新兴生物医药产业的发展。作为目前进化地位最高的实验动物,实验猴的脑结构功能与人相似,且具有高级认知和行为学表现,能够一定程度的模仿人类的行为活动,因此,实验猴是脑计划中用于脑认知功能解析和脑重大疾病诊治研究中不可或缺的重要模式动物。

在以实验猴开展的研究中,通过对动物的行为进行评估对于正确理解疾病的机制并准确评价新疗法的有效性和安全性至关重要。科学家们在生理或病理条件下,利用实验猴的行为特征与脑区功能变化的相关性,通过评价动物行为进而反映病生理过程中大脑功能的改变。哺乳动物大脑单侧感知和运动功能的缺陷与对侧相关脑区的损伤程度密切相关^[1],对于实验猴,考虑到动物福利和个体差异等因素,通常构建单侧脑损伤模型,并通过行为学评价对比研究脑健侧和损伤侧功能差异。本研究利用山和谷阶梯任务实验装置,分别对实验猴左右手抓取功能进行测试,评价实验猴单侧大脑损伤对单侧感知空间和运动功能缺陷的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

普通级 7 ~ 9 岁雄性食蟹猴 8 只,分别购自广东春盛生物科技有限公司【SCXK(粤)2014-

0027】和从化市华珍动物养殖场【SCXK(粤)2015-0028】。食蟹猴饲养于广东省实验动物监测所普通级动物实验室【SYXK(粤)2016-0122】,环境为 12/12 h 昼夜周期,湿度 40% ~ 70%,温度 $(21 \pm 2)^\circ\text{C}$,每天饲喂 2 次,其中 1 次饲喂水果。本研究所涉及的动物实验获得广东省实验动物监测所(AAALAC 认证机构)动物实验动物使用与管理委员会(IACUC)批准(批准号 IACUC2018014),并符合中华人民共和国《实验动物管理条例》。

1.1.2 仪器

实验猴单侧脑损伤行为评价所使用山和谷阶梯任务试验装置由广东省实验动物监测所根据文献报道设计开发^[2]。山阶梯装置由猴笼、山阶梯和人员观察挡板组成(图 1)。猴笼正面树脂玻璃面板的左右两侧各开一个仅允许动物单侧上肢通过的狭窄通道,在树脂玻璃面板外放置两个分别从左右两侧向面板中央位置逐渐上升的阶梯,两个阶梯最底层台阶与树脂面板上的狭窄通道齐平,最高层在面板中央汇合,阶梯共 5 层,并由一块树脂玻璃将两个阶梯完全隔开,实验时,猴仅能通过右手伸到右侧或左手伸到左侧的阶梯获取食物奖励。

谷阶梯装置由猴笼、谷阶梯装置和人员观察挡板组成(图 2)。猴笼正面树脂玻璃面板的中央开一个仅允许动物单侧上肢通过的狭窄通道,在树脂玻璃面板外分别放置两个由面板中央位置向两侧逐渐上升的阶梯,两个阶梯最底层台阶在树脂面板中央汇合并与面板上的狭窄通道齐平,阶梯共 5 层,实验时,动物仅能通过右手伸到左侧或左手伸到右侧阶梯获取食物奖励。

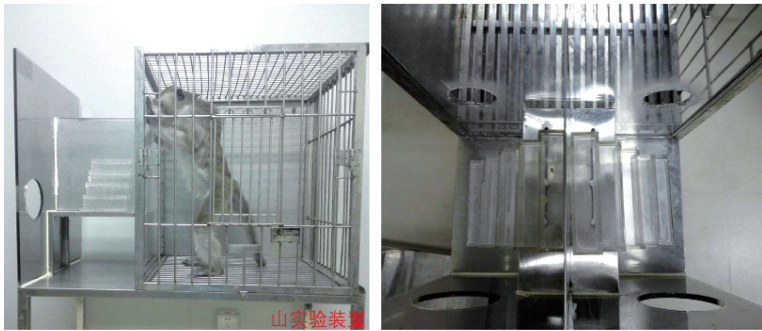


图 1 山阶梯任务试验装置

Figure 1 Testing apparatus for hill staircase tasks



图 2 谷阶梯任务试验装置

Figure 2 Testing apparatus for valley staircase tasks

1.2 方法

1.2.1 食蟹猴单侧脑损伤模型制备

(1)单侧颈内动脉注射 MPTP 诱导食蟹猴帕金森模型

单侧颈内动脉注射 MPTP 诱导食蟹猴帕金森参考文献进行^[3]。3 只用于造模的实验猴(编号为 00231, 00235, 00238)通过右侧颈内动脉注射 MPTP,动物造模 1.5 年后,日常观察显示动物左侧上肢较少抓取食物,且注射阿朴吗啡后出现向左侧转圈的症状,进一步通过 PET-CT 确认动物右侧多巴胺能神经元损伤后,应用于本研究。

(2)电凝法制备食蟹猴单侧大脑中动脉闭塞模型

电凝法制备食蟹猴单侧大脑中动脉闭塞模型参考文献进行^[4]。1 只实验猴(编号为 1931)通过开颅手术,电凝法闭塞左侧大脑中动脉,动物干预 6 个月后,日常观察显示动物右侧上肢较少抓取食物,且右侧肢体活动异常,进一步通过 MRI 确认动物左侧大脑出现缺血性梗死灶后,应用于研究。

1.2.2 测试方法

(1)实验前准备

挑选健康的实验猴,头部姿势端正,无身体震

颤、麻痹症状,无视觉缺陷症状,四肢发育正常,无骨折、变性、骨关节炎等症状。实验猴进入实验室后,每天通过食物引诱方式,建立实验人员与猴的互动关系。当实验猴能很快从实验人员的手上获取食物,不产生恐惧感时,实验猴可以开展评价试验。

(2)实验方法

实验前,实验猴应禁食一餐或给予平时食量的三分之一。开始实验前,先将实验猴放入评价装置中适应,并将食物放入第一层阶梯上,训练实验猴能通过树脂玻璃面板上的狭窄通道迅速从阶梯上取走食物。

在山阶梯任务中,将食物放在单侧山阶梯上,让实验猴单手拿取食物,计时 3 min,计时结束后,查看每层食物拿取情况,记录相应分数,每天左右侧分别进行 3 次测试,并将 3 次得分相加得到当天测试的分数,连续测定 10 d。

在谷阶梯任务中,将食物放在单侧谷阶梯上,让实验猴单手拿取食物,计时 3 min,计时结束后,查看每层拿取食物情况,记录相应分数,每天左右侧分别进行 3 次测试,并将 3 次得分相加得到当天测试的分数,连续测定 10 d。

山阶梯和谷阶梯任务从低到高每层阶梯对应的分数为 1、2、3、4、5 分,实验猴通过相应侧的手拿到食物才能计分,如没有通过相应的手则不计分。每天测试总分为 45 分,最终根据 10 d 测定的平均分数评价实验猴单侧上肢的运动功能。

1.3 统计学分析

实验数据以平均数±标准误($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。实验数据采用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著的标准。

2 结果

2.1 正常食蟹猴山和谷测试结果

用于山和谷测试的 3 只正常实验猴(编号:1312203,11040305,11021311)左右手抓取食物能力基本一致。经过山阶梯任务试验测试,左手抓取左侧和右手抓取右侧阶梯上的食物得分都为 45 分。经过谷阶梯任务试验测试,左手抓取右侧和右手抓取左侧阶梯上的食物得分都为 45 分(图 3)。结合山和谷阶梯任务试验结果,说明 3 只正常实验猴空

间识别和运动功能未出现异常。

2.2 单侧颈内动脉注射 MPTP 诱导食蟹猴帕金森模型测试结果

实验猴右侧颈内动脉注射 MPTP 所致右侧大脑损伤(编号:00231,00235,00238)引起左手的抓取食物异常。山和谷测试前,通过 PET-CT 分子影像检测显示 3 只待测实验猴右侧黑质区多巴胺能神经元损伤(图 4,黑色箭头所示)。山阶梯任务试验测试结果显示,3 只猴左手抓取左侧阶梯上的食物得分分别为 0 分,2 分,1.1 分;右手抓取右侧阶梯上的食物得分分别为 2.7 分,27.6 分,27.2 分。谷阶梯任务试验测试结果显示,3 只猴左手抓取右侧阶梯上的得分分别为 0 分,10.1 分,0 分;右手抓取左侧阶梯上的食物得分分别为 4.1 分,32.6 分,30 分(图 5)。结合山和谷阶梯任务试验结果,表明编号为 00235,00238 的实验猴造模后出现左手运动功能损伤,空间识别能力基本正常,而编号为 00231 的实验猴造模后不仅出现左手运动能力损伤,可能也存在空间识别能力异常或右手运动能力损伤。

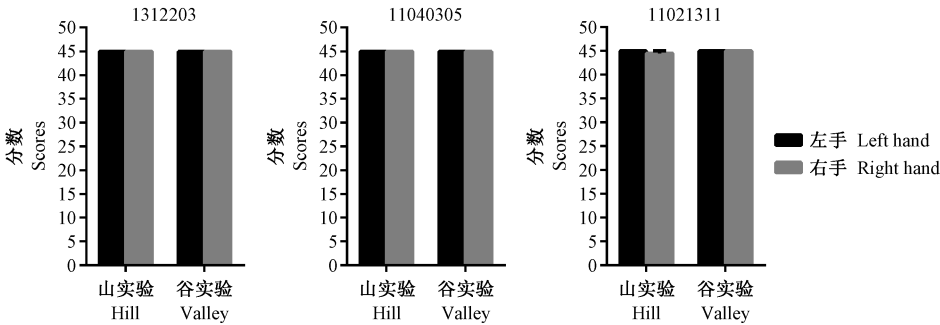


图 3 正常实验猴山和谷阶梯任务试验评价结果

Figure 3 Evaluation results for normal experimental monkeys in hill and valley staircase tasks

2.3 电凝法制备单侧大脑中动脉闭塞食蟹猴模型测试结果

实验猴左侧大脑中动脉闭塞所致的左侧大脑损伤引起右手抓取食物异常。山和谷测试前,通过 MRI 检测显示编号为 1931 的实验猴手术后左侧大脑出现典型的缺血梗死灶(图 6,白色箭头所示)。山阶梯任务试验测试结果显示,1931 实验猴左手抓取左侧阶梯上的食物得分为 43.5 分,右手抓取右侧阶梯上的食物得分为 0 分;谷阶梯任务试验测试结果显示,1931 实验猴左手抓取右侧阶梯上的食物得分为 45 分,右手抓取左侧阶梯上的食物得分为 0 分(图 7)。结合山和谷试验结果,说明该猴的实验干预导致右手运动功能损伤,空间识别能力基本正常。

3 讨论

在机体运动过程中,大脑根据外界刺激产生运动意向,明确运动的方向或行为方式,但是,大脑不对运动的程序、指令进行分析,而是由纹状体、小脑参与完成。当大脑联络区产生运动意向后,纹状体、小脑根据运动意向分析产出运动样本,调动纹状体、小脑控制、指挥运动。已有文献报道,山和谷阶梯任务试验已报道应用于单侧损伤的帕金森和脑梗等猴疾病模型的运动功能和药效评价^[5-8]。为此,我们依据文献报道,设计改造了山和谷阶梯任务试验评价装置,其中,山阶梯任务试验装置评价空间感知和运动的脑区均位于大脑同侧,谷阶梯任务试验装置评价空间感知和运动的脑区分别大脑

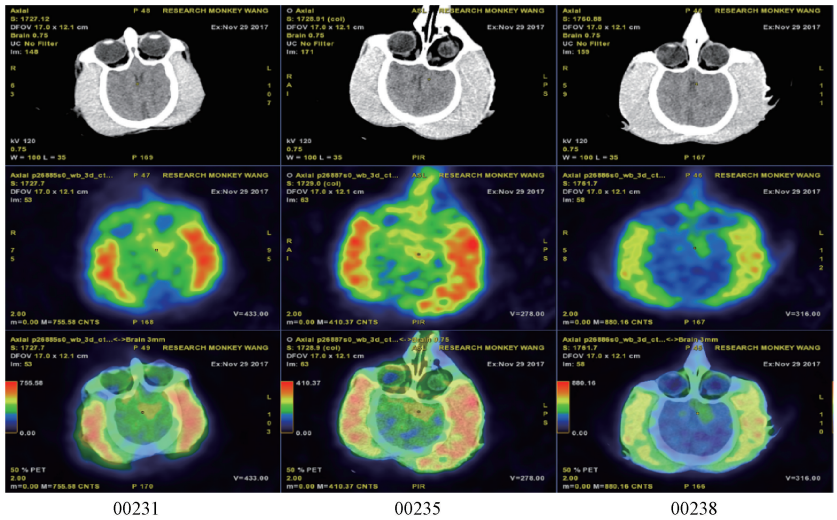
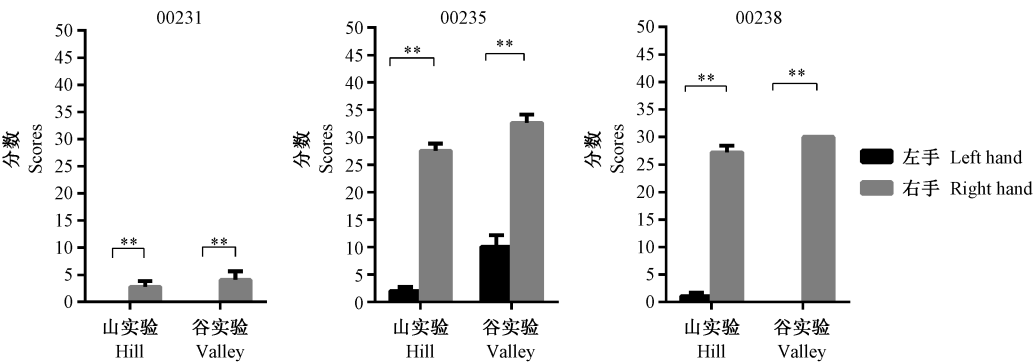


图 4 利用¹⁸F-L-DOPA 进行 PET-CT 显像表明 3 只帕金森猴右侧黑质区多巴胺神经元损伤(黑色箭头)
Figure 4 ¹⁸F-fluoro-L-DOPA PET-CT images showing the impairment of dopaminergic neurons in right substantia nigra of three PD monkeys (Black arrow)



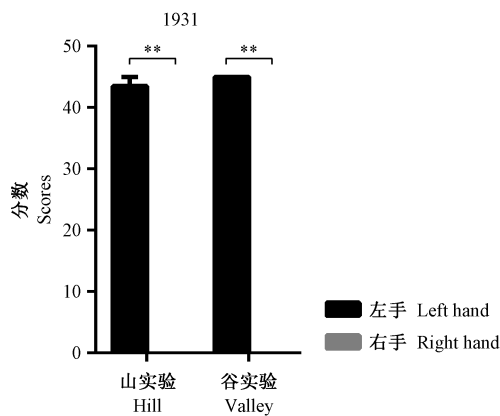
注:与对侧上肢比较, ** $P < 0.01$ 。
图 5 单侧颈内动脉注射 MPTP 诱导帕金森食蟹猴山和谷阶梯任务试验评价结果
Note. Compared with the contralateral upper limb, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Evaluation results of the hill and valley staircase tasks for PD monkeys induced by injecting MPTP into unilateral internal carotid artery



图 6 MRI 显像表明实验猴左侧大脑出现缺血梗死灶(白色箭头)
Figure 6 MRI images showing ischemic infarction in the left brain of experimental monkeys (White arrow)

对侧,通过对不同实验猴脑疾病模型的应用评价,对于正常实验猴,主管大脑意识的大脑额叶、为脑疾病研究提供合适、有效的行为评价方法。顶枕颞联络区和主管运动的纹状体和小脑没有受



注:与对侧上肢比较, ** $P<0.01$ 。

图 7 单侧大脑中动脉闭塞食蟹猴山和谷阶梯任务试验评价结果

Note. Compared with the contralateral upper limb, ** $P<0.01$.

Figure 7 Evaluation results of hill and valley staircase tasks for ischemic stroke monkey induced by unilateral middle cerebral artery occlusion

损。因此,动物在山和谷阶梯任务试验中,左右手均获得较高的分数,表明正常动物能够顺利完成上述测试,仪器功能正常。

对于 MPTP 诱导的帕金森实验猴,通过 PET-CT 检测,显示右侧纹状体区多巴胺能神经元损伤后,3 只帕金森实验猴在山阶梯任务试验都显示左手的得分较低,说明左侧脑意识和左侧脑运动功能损伤。在谷阶梯任务试验中,3 只实验猴都显示左手右侧的得分较低,说明左侧脑意识和右侧脑运动的损伤。结合损伤部位,3 只帕金森的右侧脑运动区受到了损伤。由于模型制作是通过右侧颈内动脉注射 MPTP,可能存在大脑其他区域的损伤,所以其中 1 只动物显示出左右手功能缺陷,暂时无法确定是否存在右侧意识的损伤。

对于大脑中动脉闭塞损伤猴模型,通过 MRI 影像检测,显示实验猴左侧大脑存在缺血梗死灶,所以动物在山阶梯任务试验中显示右手的得分较低,说明右侧脑意识和右侧脑运动功能损伤。在谷阶

梯任务实验中该猴右手左侧得分较低,说明右侧脑意识和左侧脑运动的损伤,手术干预损伤了左侧大脑中动脉,因此该猴的左侧脑运动区受到损伤。

通过对正常实验猴和不同的模型猴进行山和谷阶梯任务试验评价,说明该实验能有效应用于单侧脑损伤的运动功能评价。

参 考 文 献(References)

[1] Marshall JW, Ridley RM. Assessment of cognitive and motor deficits in a marmoset model of stroke [J]. ILAR J, 2003, 44 (2): 153-160.

[2] Marshall JW, Duffinb KJ, Green AR, et al. NXY-059, a free radical-trapping agent, substantially lessens the functional disability resulting from cerebral ischemia in a primate species [J]. Stroke, 2001, 32(1): 190-198.

[3] Collier TJ, Lipton J, Daley BF, et al. Aging-related changes in the nigrostriatal dopamine system and the response to MPTP in nonhuman primates: diminished compensatory mechanisms as a prelude to parkinsonism [J]. Neurobiol Dis, 2007, 26(1): 56-65.

[4] Chen X, Dang G, Dang C, et al. An ischemic stroke model of nonhuman primates for remote lesion studies: a behavioral and neuroimaging investigation [J]. Restor Neurol Neurosci, 2015, 33(2): 131-142.

[5] Marshall JW, Green AR, Ridley RM. Comparison of the neuroprotective effect of clomethiazole, AR-R15896AR and NXY-059 in a primate model of stroke using histological and behavioural measures [J]. Brain Res, 2003, 972(1-2): 119-126.

[6] Asakawa T, Fang H, Sugiyama K, et al. Animal behavioral assessments in current research of Parkinson's disease [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2016, 65: 63-94.

[7] Marshall JW, Baker HF, Ridley RM. Contralesional neglect in monkeys with small unilateral parietal cortical ablations [J]. Behav Brain Res, 2002, 136(1): 257-265.

[8] Workman KP, Healey B, Carlotto A, et al. One-year change in cognitive flexibility and fine motor function in middle-aged male and female marmosets (Callithrix jacchus) [J]. Am J Primatol, 2018; e22924.

[收稿日期] 2019-02-21