

张子龙,刘思含,姚继红,等. 帕金森病小鼠 CatWalk 行为学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1): 7-11.

Zhang ZL, Liu SH, Yao JH, et al. Behavior of CatWalk in mice with Parkinson's disease [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(1): 7-11.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.01.002

帕金森病小鼠 CatWalk 行为学研究

张子龙[#], 刘思含[#], 姚继红, 周俊俊^{*}

(大连医科大学药学院, 辽宁 大连 116044)

【摘要】 **目的** 通过 CatWalk 步态分析系统,对帕金森小鼠模型的步态变化进行分析评估。**方法** 用 MPTP 诱导建立帕金森小鼠模型,在建立模型成功后,利用 CatWalk 步态分析仪进行相关步态参数的测定,并对测定结果进行统计分析。**结果** 与空白对照组相比,模型组小鼠脚步模式混乱;小鼠通过某特定距离的时间(run duration)、最大速率变化(maximum variation)、支撑相时间(stance)、脚步周期(step cycle)显著增加;而平均速度(average speed)、单位时间脚步数(cadence)、摆动速度(swing speed)、步幅(stride length)显著降低。**结论** CatWalk 可以作为评估帕金森小鼠模型行为学变化的一种更直观、精确、有效的新方法。

【关键词】 帕金森病;CatWalk;步态;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 01-0007-05

Behavior of CatWalk in mice with Parkinson's disease

ZHANG Zilong[#], LIU Sihan[#], YAO Jihong, ZHOU Junjun^{*}

(School of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

【Abstract】 **Objective** To analyze and evaluate the gait changes of Parkinson's disease in mice using the CatWalk gait analysis system. **Methods** A Parkinson's disease mouse model was established by the intraperitoneal injection of MPTP. After the model had been successfully established, the CatWalk gait analyzer was used to measure the relevant gait parameters, and the result were statistically analyzed. **Results** Compared with the control group, the pace of the mice in the model group was disordered. The run duration, maximum variation, stance, and step cycle were increased significantly in the MPTP group. However, the average speed, cadence, swing speed, and stride length were significantly reduced in the model group. **Conclusions** CatWalk can be used as an intuitive, precise, and effective new method to evaluate Parkinson's mouse models.

【Keywords】 Parkinson's disease; CatWalk; gait; mouse

帕金森病(Parkinson's Disease, PD)是继阿尔茨海默病后第二常见的中枢神经系统退行性疾病,是由中脑黑质纹状体区域的多巴胺能神经元变性导致的多巴胺(Dopamin, DA)神经递质缺失

引起的一种普遍性运动障碍^[1]。随着PD的进展,PD患者的步态变异性和姿势不稳定性显著呈现^[2],节律性行走时会受到短步长和低速度的阻碍,这些都与多巴胺水平的降低密切相关^[3]。常

【基金项目】 国家自然科学基金(81801377);大连医科大学第九届“挑战杯”大学生课外学术科技作品竞赛立项项目(183)。

【作者简介】 张子龙(1997—),男,大连医科大学2015级临床药学专业在读本科生。E-mail: 505588170@qq.com

刘思含(1997—),女,大连医科大学2015级临床药学专业在读本科生。E-mail: 1159668039@qq.com [#]共同第一作者

【通信作者】 周俊俊(1982—),女,博士,副教授,研究方向:神经退行性疾病动物模型。E-mail: zhoujun_2005@163.com

见的帕金森病症状包括静置性震颤,运动迟缓、僵硬,失去姿势反射等^[4],其中步态紊乱是帕金森病最常见的运动问题之一。患有 PD 的患者通常表现出弯腰姿势和步态改变、步幅长度和总体速度减少、双臂支撑增加、在摆动阶段足部间隙减小,以及节奏变快导致跌倒的可能性增大^[5]。渐进性步态障碍与姿势不稳定最终往往剥夺了患者的运动能力和日常生活能力^[6]。

近年来,为了弥补药物诱导的行为学测试方法存在的种种缺陷,满足日益增长的基础研究需求,诸多非药物诱导的行为学测试方法相继被应用于 PD 模型的测试与评价^[7]。其中步态分析方法已然成为研究 PD 严重程度的重要方法^[8]。常用的步态分析方法包括:评估步行速度、摆动和站立时间的跑步机运动测试^[9];评估前肢使用不对称性的气瓶测试和评估运动起始状态的前肢运动不能测试^[10-11];此外,还有旷场测试^[12-13]、旋转测试^[14-15]、游泳测试^[16]和筑巢测试^[17]等。然而,这些测试只能单一测量步态的动态或静态变化,可观察到的变化通常较弱。而且这些测试的指标大多应用于单侧损伤的动物,因此不足以证明双侧受伤动物模型的功能缺陷。而 CatWalk 计算机辅助步态分析系统提供了一种评估步态功能的自动方法,它可以同时测量大量的动态和静态步态参数^[18],并且可以检测出对于啮齿动物研究特别有价值的肢间协调的空间指标与时间指标。本研究中我们应用 CatWalk 步态分析仪来验证和评估 MPTP 诱导的双侧病变 PD 小鼠模型的步态变异性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6~8 周龄雄性 C57BL/6 J 小鼠,20 只,SPF 级,体重 22~25 g,由大连医科大学 SPF 实验动物中心提供[生产许可证:SCXK(辽)2013-0003;使用许可证:SYXK(辽)2013-0006]。动物实验经大连医科大学伦理委员会同意,并在实验动物饲养和使用中严格遵守“减少、替代和优化”3R 原则给予人道关怀。饲养条件:温度 21℃~23℃,相对湿度 30%~60%,12 h 照明/黑暗交替的环境。

1.2 主要试剂与仪器

MPTP,购自美国 sigma 公司;CatWalk 小动物步态分析仪;CatWalk XT,Noldus,荷兰。

1.3 实验方法

1.3.1 MPTP 诱导小鼠 PD 模型建立

PD 造模方法:将雄性 C57BL/6 小鼠随机分为:空白对照组、MPTP 模型组。动物适应性喂养 7 d 后,每只腹腔注射给予 MPTP 30 mg/kg,连续 5 d。空白组给予相应体积的生理盐水。

1.3.2 动物一般情况监测

实验期间,每天观察动物一般情况:包括进食、体重等变化。

1.3.3 步态分析实验

本实验用来评价小鼠的自然运动行为及运动协调性。采用小动物步态分析仪(CatWalk XT,Noldus,荷兰)检测,实验前训练 3 d。检测时使小鼠自由穿过设定长度的检测通道,利用内光源脚印折射技术对摄像头拍摄视频中的足印进行高效的计算机处理,在自然行走情况下评估小鼠运动情况。此过程全部在暗室内完成,每只小鼠至少接受三次检测。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 17.0 软件(SPSS Inc.,Chicago,USA)分析数据。所有数据均表示为平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)。两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

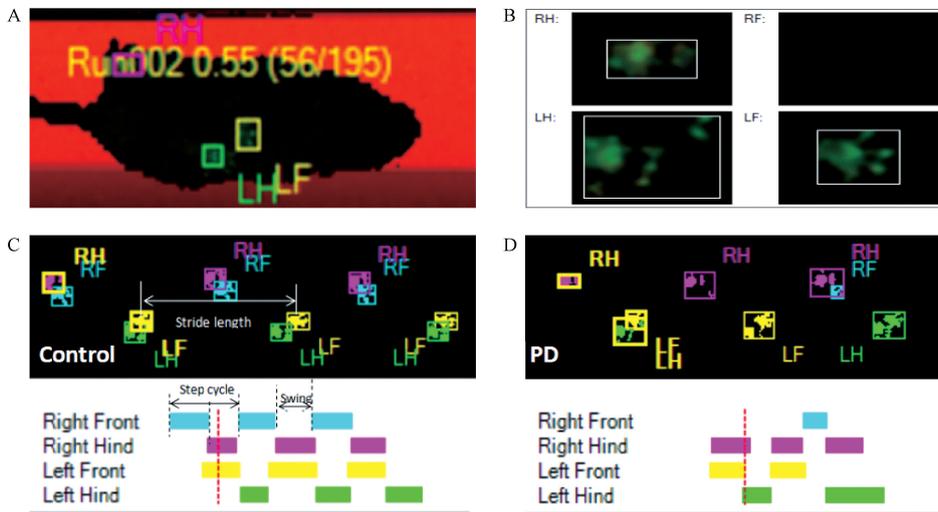
2 结果

2.1 CatWalk 采集小鼠步态图形变化

为了评价 MPTP 诱导 PD 模型损伤后小鼠运动协调性变化,我们应用 CatWalk 系统检测了小鼠步态变化,捕获大量代表性动态视频和图片(图 1)。从图中我们可以看出,空白对照组小鼠脚步以交替型为主,且步幅大小均一、步数稳定;MPTP 模型组小鼠脚步模式混乱、步态紊乱异常、步幅大小不一,三点支撑的增加明显。

2.2 CatWalk 步态参数测定结果

经分析发现:模型组与空白对照组相比,通过某特定距离的时间(run duration)、最大速率变化(maximum variation)、支撑相时间(stance)、脚步周期(step cycle)显著增加,平均速度(average speed)、单位时间脚步数(cadence)、摆动速度(swing speed)、步幅(stride length)显著降低(图 2、图 3)。上述 8 项指标变化差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

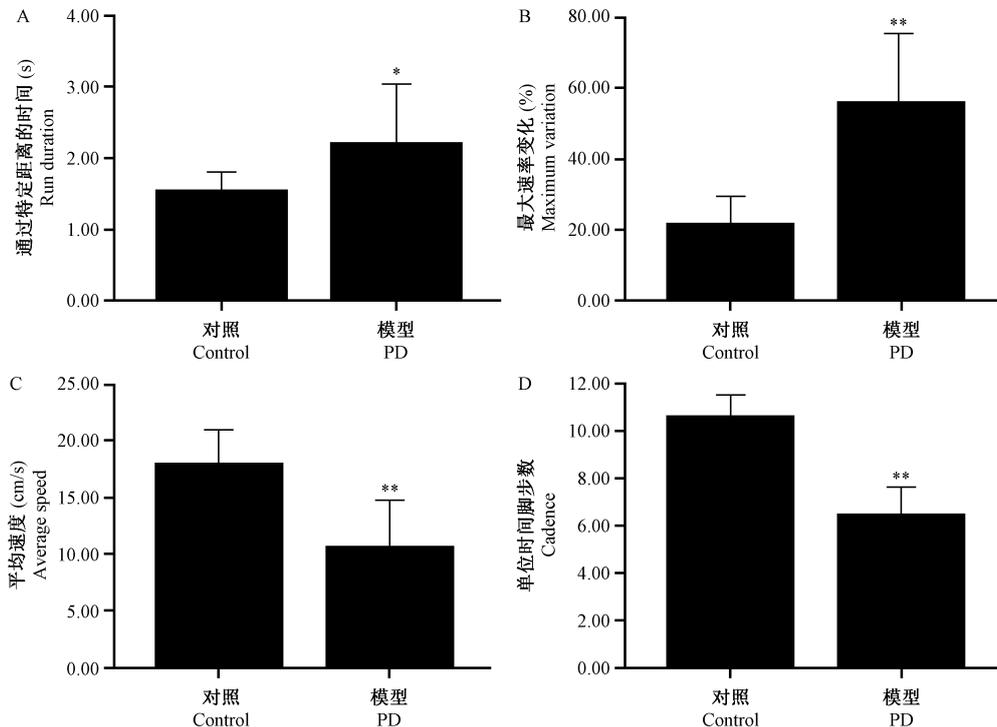


注:A:小鼠于跑道进行测试;B:小鼠脚印的放大显示;C:空白组小鼠的步态模式以及步幅;D:模型组小鼠的步态模式及步幅。Control:空白对照组;PD:模型组。

图 1 小鼠步态变化对比结果

Note: A: Mice were tested on a runway; B: enlarged display of mouse footprints; C: gait pattern and stride of mice in the control group; D: gait pattern and stride of mice in the model group. Control: control group; PD: model group.

Figure 1 Comparison of gait changes in mice

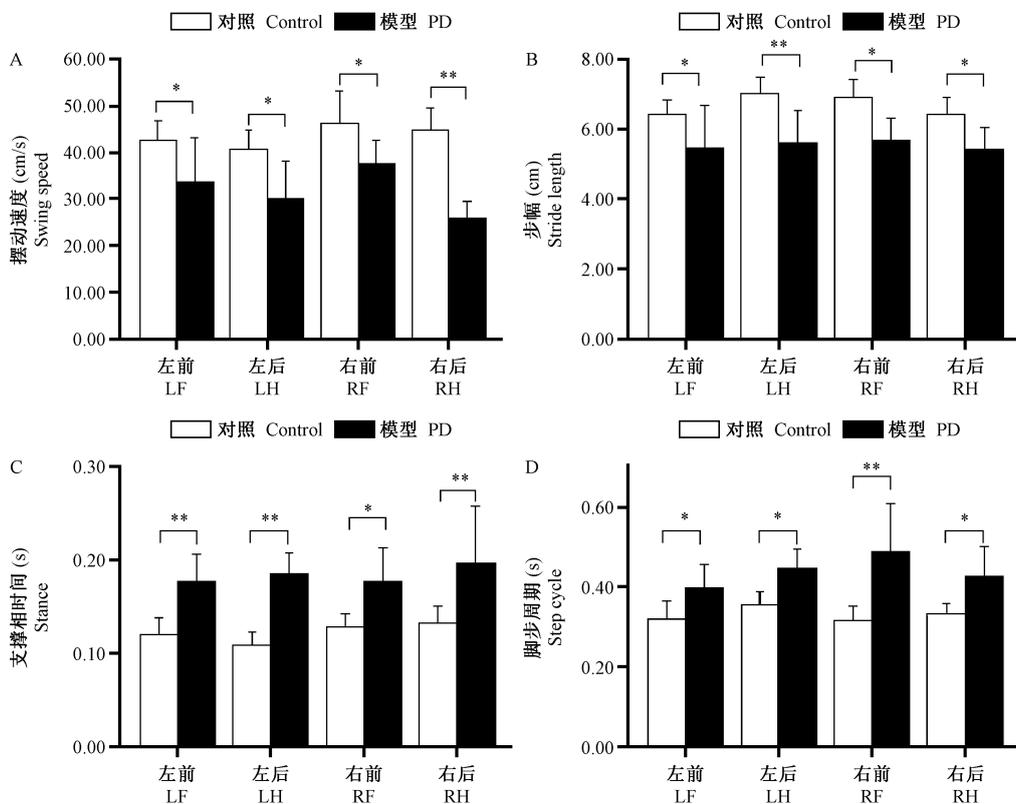


注:A:通过某特定距离的时间(duration);B:最大速率变化(maximum variation);C:平均速度(average speed);D:单位时间脚步数(cadence);与空白对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ (结果表示为 $\bar{x} \pm s, n = 10$)。Control:空白对照组;PD:模型组。

图 2 PD 小鼠定量性速度相关指标变化

Note: A: Time through a certain distance (duration); B: Maximum variation; C: Average speed; D: Number of steps per step (cadence). Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (results expressed as $\bar{x} \pm s, n = 10$). Control: control group; PD: model group.

Figure 2 Changes in quantitative speed-related indicators of PD mice



注:A:摆动速度 (swing speed); B:步幅 (stride length); C:支撑相时间 (stance); D:脚步周期 (step cycle)。与空白对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (结果表示为 $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)。Control:空白对照组; PD:模型组。LF:左前; LH:左后; RF:右前; RH:右后。

图3 PD小鼠定量性爪印指标变化

Note: A: Swing speed; B: Stride length; C: Stance; D: Step cycle. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (results expressed as $\bar{x} \pm s$, $n = 10$). Control: control group; PD: model group. LF: Left Front; LH: Left Hind; RF: Right Front; RH: Right Hind.

Figure 3 Changes in quantitative paw print indicators of PD mice

3 讨论

为了对 MPTP 诱导的 PD 小鼠进行更为直观且无创的行为学评估, 在本实验过程中引入了 CatWalk 动物步态分析技术。实验结果显示, 和空白对照组相比, MPTP 诱导的模型组小鼠运动迟缓、运动协调能力显著下降, 表现为通过某特定距离的时间 (run duration)、最大速率变化 (maximum variation)、支撑相时间 (stance)、脚步周期 (step cycle) 显著增加, 平均速度 (average speed)、单位时间脚步数 (cadence)、摆动速度 (swing speed)、步幅 (stride length) 显著降低。以上结果表明, CatWalk 动物步态分析技术能够敏锐地捕捉到 PD 小鼠的步态平衡障碍和肢内协调缺陷。

行动迟缓是 PD 的主要行为学标志之一, 摆动速度、步幅、脚步周期等都是与移动性分析相关的

参数。PD 小鼠模型的步幅和摆动速度明显降低, 可能是由于 MPTP 作用诱导小鼠肌肉僵硬和运动功能减退所导致的结果, 这与 PD 患者的症状基本一致^[19], 小鼠脚步周期的增大主要是由于爪和玻璃板之间的接触较长, 该参数的变化也同样与双侧 6-OHDA 大鼠模型的步态评估结果相吻合^[20]。而 PD 模型小鼠在单位时间脚步数明显减少, 则是由于小鼠步幅的减少并不能抵消步行周期的增大所致。同时, MPTP 诱导损伤后, 还表现出摆动速度降低和支撑相时间的延长。这些指标变化进一步说明了 Catwalk 步态分析参数可反映 PD 小鼠出现步态紊乱和步态平衡障碍。

在本项研究中, CatWalk 提供了对 MPTP 模型小鼠在运动方面实时、精密且全面的分析, 揭示了 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型的步态变化。相比于其他常用 PD 模型检测方法, 如自主活动仪、滚筒法

等, CatWalk 的使用更为便捷、检测数据更为可靠、对小鼠的训练更为简单、且不会对模型小鼠造成任何损伤。更重要的一点在于 CatWalk 系统可以同时、全面地测量步态的动态和静态相关参数, 并且参数与 PD 行为学变化有较强的对应关系。在以 PD 为代表的神经系统退行性疾病动物模型的相关研究实验中, CatWalk 检测系统以其独特优势, 应用将会越来越广。

参考文献:

[1] Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2015, 386 (9996): 896-912.

[2] Lewis GN, Byblow WD, Walt SE. Stride length regulation in Parkinson's disease: the use of extrinsic, visual cues [J]. *Brain*, 2000, 123: 2077-2090.

[3] Hill KK, Campbell MC, McNeely ME, et al. Cerebral blood flow responses to dorsal and ventral STN DBS correlate with gait and balance responses in Parkinson's disease [J]. *Exp Neurol*, 2013, 241:105-112.

[4] Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2008, 79(4): 368-376.

[5] Sidaway B, Anderson J, Danielson G, et al. Effects of long-term gait training using visual cues in an individual with Parkinson disease [J]. *Phys Ther*, 2006, 86(2):186-194.

[6] Hanakawa T, Katsumi Y, Fukuyama H, et al. Mechanisms underlying gait disturbance in Parkinson's disease: a single photon emission computed tomography study [J]. *Brain*, 1999, 122 (Pt 7): 1271-1282.

[7] 魏翔, 刘晓莉. 帕金森病大鼠模型运动行为测评方法的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(2): 209-215.

[8] Goldberg NR, Hampton T, McCue S, et al. Profiling changes in gait dynamics resulting from progressive 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced nigrostriatal lesioning [J]. *J Neurosci Res*, 2011, 89(10): 1698-1706.

[9] Chang JY, Shi LH, Luo F, et al. High frequency stimulation of the subthalamic nucleus improves treadmill locomotion in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats [J]. *Brain Res*, 2003, 983(1-2): 174-184.

[10] Shi LH, Woodward DJ, Luo F, et al. High-frequency stimulation

of the subthalamic nucleus reverses limb-use asymmetry in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions [J]. *Brain Res*, 2004, 1013(1): 98-106.

[11] Tillerson JL, Cohen AD, Philhower J, et al. Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(12): 4427-4435.

[12] Biju K, Zhou Q, Li G, et al. Macrophage-mediated GDNF delivery protects against dopaminergic neurodegeneration: a therapeutic strategy for Parkinson's disease [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(8): 1536-1544.

[13] Pothakos K, Kurz MJ, Lau YS. Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration [J]. *BMC Neurosci*, 2009, 10: 6.

[14] Vijitruth R, Liu M, Choi DY, et al. Cyclooxygenase-2 mediates microglial activation and secondary dopaminergic cell death in the mouse MPTP model of Parkinson's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2006, 3: 6.

[15] Gorton LM, Vuckovic MG, Vertelkina N, et al. Exercise effects on motor and affective behavior and catecholamine neurochemistry in the MPTP-lesioned mouse [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 213 (2): 253-262.

[16] Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, et al. Comparison of bilaterally 6-OHDA-and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations [J]. *J Neurosci Methods*, 2005, 148(1): 78-87.

[17] Deacon RM. Assessing nest building in mice [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(3): 1117-1119.

[18] Zhou M, Zhang W, Chang J, et al. Gait analysis in three different 6-hydroxydopamine rat models of Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 584: 184-189.

[19] Kim ST, Son HJ, Choi JH, et al. Vertical grid test and modified horizontal grid test are sensitive methods for evaluating motor dysfunctions in the MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. *Brain Res*, 2010, 1306: 176-183.

[20] Westin JE, Janssen ML, Sager TN, et al. Automated gait analysis in bilateral Parkinsonian rats and the role of L-DOPA therapy [J]. *Behav Brain Res*, 2012, 226(2): 519-528.

[收稿日期] 2019-08-28