

·论著·

恒河猴脊髓半切损伤后下肢节段功能表现的研究

魏瑞晗^{1a}, 饶家声^{1a,1b}, 赵璨^{1b,1a}, 赵文², 杨朝阳^{1b,2}, 李晓光^{1a,1b,2}

作者单位

1. 北京航空航天大学
a. 生物与医学工程学院生物材料与神经再生北京市重点实验室, b. 生物医学工程高精尖创新中心/生物材料与神经再生北京市国际科技合作基地
北京 100083
2. 首都医科大学基础医学院神经生物学系
北京 100083
基金项目

国家重点研发计划 (No. 2017YFC1104001, 2017YFC1104002); 国家自然科学基金 (No. 31730030, 31650001, 31670988, 31320103903, 31771053, 31970970, 31900980); 北京市科技计划 (No. Z181100001818007); 北京市自然科学基金青年项目 (No. 7194286); 北京市教育委员会科技计划重点项目 (No. KZ201810025030); 中国博士后科学基金面上资助 (No. 2018M640046); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (No. YWF-19-BJ-J-282)

收稿日期

2019-04-19

通讯作者

饶家声
raojchina@126.com
杨朝阳
wack_lily@163.com
李晓光
lxgchina@sina.com

摘要 目的: 研究脊髓半切损伤后恒河猴下肢各节段运动功能的变化。**方法:** 成年雌性恒河猴3只, 行胸髓T_{7,9}节段半切手术; 于术前、术后6及12周分别记录猴的下肢节段仰角变化; 计算并分析不同时间点猴下肢节段仰角幅值及节段间仰角相关性。**结果:** 术后6及12周, 大腿节段仰角幅值均低于术前 ($P < 0.001$), 且术后6周与12周差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 术后小腿和足部仰角幅值均低于术前 ($P < 0.01$), 但术后12周高于术后6周 (均 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。术后6及12周, 大腿仰角与小腿仰角间相关系数均值均低于术前; 术后6周, 小腿仰角与足仰角间相关系数均值低于术前 ($P < 0.001$), 术后12周, 小腿仰角与足仰角间相关系数均值增加, 但仍低于术前 ($P < 0.01$); 术后6及12周, 大腿仰角与小腿仰角间相关系数和小腿仰角与足仰角间相关系数均值的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论:** SCI后, 下肢各节段均有严重运动障碍, 经自发恢复, 小腿足部节段活动范围及协调性有部分改善, 这可能揭示了受损脊髓神经传导的可塑性恢复。

关键词 脊髓损伤; 恒河猴; 肢体节段; 仰角

中图分类号 R741; R741.02; R744 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2019.12.003

魏瑞晗, 饶家声, 赵璨, 等. 恒河猴脊髓半切损伤后下肢节段功能表现的研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(12): 608-610, 625.

Impairment of Motor Performance of Hindlimb Segments after Spinal Cord Hemi-Section in Rhesus Monkeys WEI Rui-Han^{1a}, RAO Jia-Sheng^{1a,1b}, ZHAO Can^{1b,1a}, ZHAO Wen², YANG Zhao-Yang^{1b,2}, LI Xiao-Guang^{1a,1b,2}. 1.a. Beijing Key Laboratory for Biomaterials and Neural Regeneration, Department of Biomedical Engineering, School of Biological Science and Medical Engineering; b. Beijing International Cooperation Bases for Science and Technology on Biomaterials and Neural Regeneration, Beijing Advanced Innovation Center for Biomedical Engineering; Beihang University, Beijing 100083, China; 2. Department of Neurobiology, School of Basic Medical Science, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract Objective: To study the changes in motor function of hindlimb segments after spinal cord hemi-section in rhesus monkeys. **Methods:** Three adult female rhesus monkeys received a hemi-section in the thoracic spinal cord at T₇-T₉. Hindlimb kinematic recordings were made prior to and at 6 and 12 weeks after the procedure. The amplitude of elevation angles of hindlimb segments and the correlation between elevation angles in different time points was calculated and analyzed. **Results:** At both 6 and 12 weeks after surgery, the thigh segment elevation angle was smaller than that before surgery ($P < 0.001$), and there was no significant difference between elevation angles at 6 and 12 weeks after surgery ($P > 0.05$). After surgery, shank and foot elevation angles were both smaller than those before surgery ($P < 0.01$), but elevation angles at 12 weeks were greater than those at 6 weeks ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). At 6 weeks and 12 weeks after surgery, the correlation coefficient between thigh and shank elevation angles was lower than that before surgery. At 6 weeks after surgery, the correlation coefficient between shank and foot elevation angles was lower than that before surgery ($P < 0.001$); 12 weeks after surgery, there was an increase in the correlation coefficient between shank and foot elevation angles, but this value remained lower than that before surgery ($P < 0.01$). At 6 weeks and 12 weeks after surgery, there was no significant difference between the correlation coefficient between thigh and shank elevation angles and that between shank and foot elevation angles ($P > 0.05$). **Conclusion:** All hindlimb segments showed severe motor dysfunction after spinal cord injury and recovered spontaneously after a period of time; this may shed light on the plasticity of recovery of nerve conduction in the injured spinal cord.

Key words spinal cord injury; rhesus monkey; hindlimb segment; elevation angle

脊髓损伤 (Spinal Cord Injury, SCI) 是指由于外界直接或间接因素导致的脊髓神经损伤, 引起损伤节段以下出现各种运

动、感觉和括约肌功能障碍等^[1]。目前尚无有效的方法可以完全治愈 SCI。

目前可用于 SCI 研究的动物很多, 如

大鼠、猫、猴等^[2-4]。研究者通常选用行为学测试的方式来评价模型动物在SCI后的运动功能。最常用的有：开放场评价,如BBB评分、开放场活动测试等^[5-7]。这类评价操作简易,硬件要求低,通常为半定量评价,精度较低。近年来,量化步态分析技术逐渐兴起。步态分析技术是对个体行走时的肢体关节活动进行的量化观察,可提供一系列的时间、空间及力学等参数值,从而对个体运动功能进行客观、定量的评价。在神经功能损伤如脑瘫^[8]、帕金森综合征^[9]及SCI^[10]等导致的运动障碍的研究中已广泛应用并取得良好的效果。肢体节段仰角是指身体节段与重力垂线的夹角^[11]。近年来很多研究采用肢体节段仰角来进行步态分析研究^[11,12]。Ogihara等^[13]通过研究猕猴双足运动时的下肢节段仰角的平面共变来阐明人类行走时平面法则的进化与起源。Leurs等^[14]记录了截肢患者在穿戴假肢时下肢节段仰角变化,探索假肢对于运动控制及步态表现的影响。Ivanenko等^[15]通过比较不同行走姿势下肢节段仰角变化,展示了下肢运动的模块化控制。这些研究均揭示了肢体节段仰角在反映步态控制及步态表现中的重要性。

为探究SCI后神经系统对运动功能的影响,本研究采用三维运动捕捉系统对脊髓半切损伤的恒河猴下肢行走进行运动数据采集,选取肢体节段仰角作为主要参数来进行分析,比较SCI后不同时间段恒河猴下肢各节段仰角幅值及相关性的表现以揭示其变化进程。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

1.1.1 实验动物 3只成年雌性恒河猴,猴龄约6岁,体质量5~6 kg。本研究涉及的所有动物实验流程均通过首都医科大学动物伦理委员会审批。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 动物模型的制备在无菌环境中进行。恒河猴术前肌肉注射氯胺酮盐酸溶液诱导麻醉(10 mg/kg),然后肌肉注射盐酸塞拉嗪(5 mg/kg)以维持麻醉,同时术中保持氯化钠葡萄糖溶液(40滴/min)静脉点滴。手术区域备皮并消毒,肌注利多卡因进行局部麻醉,切开肩胛骨下角对应胸椎T₆位置的皮肤肌肉,分离骨膜,去除T₈节段棘突,采用手术显微镜对T₇~T₉施行椎板切除术,部分暴露T₁₀~T₁₂节段硬脊膜,切开硬脊膜暴露脊髓,以脊髓中央后静脉作为脊髓中线的解剖学标志,偏右0.5 mm处半切1 cm长的脊髓组织,随后缝合硬脊膜。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。术后给予抗生素预防感染5 d。所有恒河猴均被单独饲养在温度、湿度恒定的猴笼中,确保充足食物及新鲜水果。

1.2.2 数据采集 在术前对恒河猴进行运动训练,跑带速度设置为1.1 km/h,30 min/次,3次/周。训练1个月,进行正式运动学测试。采用自制猴固定架固定猴的位置^[16]。在猴双侧下肢的骨性标记位置(髌前上棘、髌后上嵴、大腿中点、膝关节、小腿中点、踝关节、足趾)上贴7个荧光标记点。采用8个摄像头的VICON运动采集系统(Ltd., Oxford, UK;采样频率:100 Hz)记录猴在跑步机上以1.1 km/h的速度进行的双下肢运动。系统对所有荧光标记点位置进行实时采集。经Plug-in-Gait软件(Oxford Metrics Ltd.)预处理,得出各荧光标记点的实时三维坐标位置^[17]。

1.2.3 数据处理 本研究选取下肢各节段仰角及仰角间的协调性进行数据分析。步态周期定义为从单侧下肢足趾触地到下一次足趾触地的过程^[17]。首先通过足趾在垂直方向的位移手动划分出每个步态周期。每只恒河猴选取连续10步完整步态周期数据(3只猴共30步)进行后续处理。摆动期定义为从单侧下肢足趾离地到足趾触地的过程。将下肢划分为大腿、小腿和足3个节段,各节段仰角定义为各节段与重力线的夹角^[11],见图1。根据荧光标记点三维坐标计算各节段仰角,采用下肢各节段间仰角间相关系数表示下肢各节段间的协调性。实验时间点分别为:健康时、SCI后6周及12周。

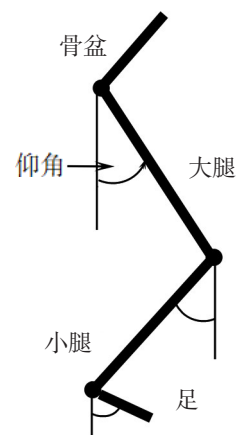


图1 下肢节段仰角示意图

1.3 统计学处理

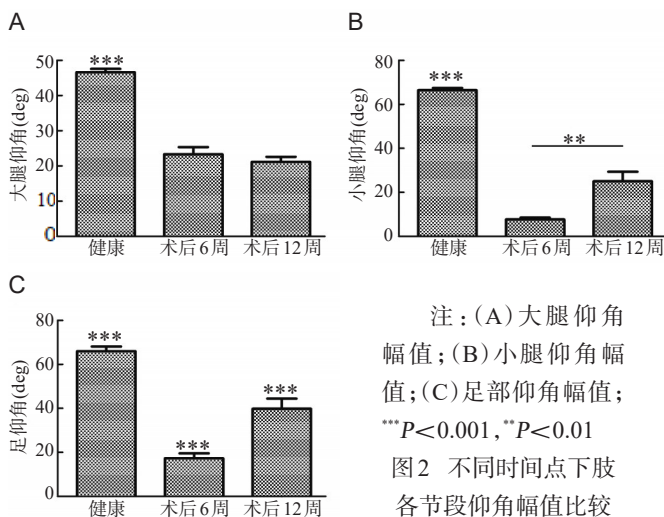
采用SPSS Statistics V.19 (SPSS Inc., IBM company, Chicago, IL, USA)软件处理数据。符合正态分布以及方差齐性的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,单因素方差分析来检验手术前后3个时间点之间参数的变化,Bonferroni和Dunnett's T3做多重比较修正;使用

Pearson相关分析计算下肢各节段仰角之间的相关性;
 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 下肢节段仰角

术后6及12周,大腿节段仰角幅值持续降低,均低于术前(均 $P < 0.001$),且术后6周与12周差异无统计学意义($P = 0.766$),见图2A,提示大腿节段无显著恢复。术后6及12周,小腿和足部仰角幅值均低于术前(均 $P < 0.01$),但术后12周高于术后6周(均 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),提示出现一定的恢复,见图2B-C。



2.2 下肢节段间协调性

大腿仰角与小腿仰角间相关系数均值比较,展示了大小腿间协调性。术后6及12周,大腿仰角与小腿仰角间相关系数均值均低于术前,提示其协调性显著降低(均 $P < 0.001$);术后6周,小腿仰角与足仰角间相关系数均值低于术前($P < 0.001$),术后12周,小腿仰角与足仰角间相关系数均值增加,但仍低于术前($P < 0.01$);术后6及12周,大腿仰角与小腿仰角间相关系数和小腿仰角与足仰角间相关系数均值的差异无统计学意义($P > 0.05$),见图3。

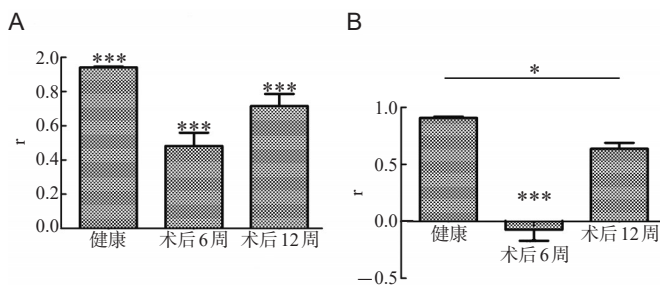


图3 不同时间点下肢各节段间协调性的变化

3 讨论

脊髓半切损伤后,损伤侧下行运动传导束被切断,导致恒河猴运动控制能力减弱,进而引发肢体节段运动功能障碍。有研究显示,相较于关节,感觉和运动神经系统会优先调节肢体相对于重力方向的位移^[19],故研究下肢节段仰角能够更直接地反映SCI后神经系统的变化。本研究结果显示,SCI后恒河猴下肢各节段仰角活动范围均显著减小。SCI后12周,小腿及足部节段活动范围均有一定程度地增加,但大腿节段仰角活动范围无显著变化。肢体远端肌肉活动主要是由具有良好步态控制能力的皮质脊髓束控制^[20]。在不完全SCI后,皮质脊髓束所在的运动系统回路可以在皮质和脊髓内产生可塑性变化^[21]。结合本研究结果,我们推测肢体远端节段较好的运动恢复是由皮质脊髓束为主的运动回路的可塑性重建引起的。值得注意的是,Donati等^[22]在有关SCI患者的康复训练的研究中发现,相较于肢体远端而言,截瘫患者肢体近端肌肉的肌力先恢复,这意味着患者大腿节段的运动功能可能会最先改善。而本研究中不论是腿大腿仰角幅值还是大腿与小腿间的协调性,在脊髓半切损伤后的改变程度均相对较小,推测因本研究所采用的损伤模型并不完全破坏肢体近端功能,可能在一定程度上造成了本研究与前述研究结果之间的差异。

在健康状态下,下肢节段间具有良好的协调性(图3)。Lacquanita等^[23]的研究阐释了人在行走时,下肢节段间的摆动并不彼此独立,而是具有节间协调性。在步进运动中,神经系统为了更为有效地进行运动控制,下肢节段间的协调可以很好地限制能量消耗,从而以一种平稳轻松的方式行走。本研究结果显示了损伤后下肢节段间协调性被破坏。节间协调性的破坏会导致运动时耗能增加,肢体稳定性降低,步态模式异常。经过一段时间恢复,在SCI后12周时下肢节段间协调性有一定程度的改善。有研究表明皮质脊髓束可通过皮质投射的多节段分叉来调节不同关节处屈肌活动的时间模式,从而完成节间的协调^[20,24]。SCI后皮质脊髓束通路被破坏,导致不同关节屈肌活动模式被改变,进而破坏协调性。后续节间协调性的变化可能部分依赖于皮质脊髓通路的重塑。但SCI的自发恢复是一个复杂的过程,对损伤后肢体节间协调性变化的影响仍有待进一步的深入研究。

综上所述,本研究展示了SCI后下肢各节段运动功能和节段间协调性的变化进程,分析了下肢各节段自发恢复的情况,深入理解下肢不同节段的运动恢复

比上肢长,导致神经反射弧比较长,使得下肢反射需要更长的时间。

综上所述,病程长、HDL-C低或MAGE大的糖尿病患者更容易出现DPN,而且应针对年龄>45岁、病程>10年或MAGE>4 mmol/L的糖尿病患者,常规筛查神经传导速度,从而为临床预防DPN的发生、发展提供必要帮助。

参考文献

- [1] Reynoso-Noverón N, Mehta R, Almeda-Valdes P, et al. Estimated incidence of cardiovascular complications related to type 2 diabetes in Mexico using the UKPDS outcome model and a population-based survey [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2011, 10: 11-15.
- [2] 张大红,刘淑娣,李涛.糖尿病周围神经病变的临床特点及药物治疗

- [J]. *中国医药导报*, 2009, 4: 220-224.
- [3] 陆祖谦,丁维.糖尿病周围神经病变诊治进展[J]. *药品评价*, 2013, 10: 35-36.
- [4] Lu B, Yang Z, Wang M, et al. High prevalence of diabetic neuropathy in population based patients diagnosed with type 2 diabetes in the Shanghai downtown[J]. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010, 88: 289-294.
- [5] 吴敏,黄淑玉,晏益民,等. α -硫辛酸治疗糖尿病周围神经病变的疗效[J]. *神经损伤与功能重建*, 2015, 10: 40-42.
- [6] Shun CT, Chang YC, Wu HP, et al. Skin denervation in type 2 diabetes: correlations with diabetic duration and functional impairments [J]. *Brain*, 2004, 127: 1593-1605.
- [7] 陈晓倩,毕艳,胡云,等.糖尿病周围神经病变患病率及危险因素分析[J]. *医学研究生学报*, 2011, 24: 1035-1038.
- [8] El Boghdady NA, Badr GA. Evaluation of oxidative stress markers and vascular risk factors in patients with diabetic peripheral neuropathy[J]. *Cell Biochem Funct*, 2012, 30: 328-340.
- [9] Gabbay KH. Aldose reductase inhibition in the treatment of diabetic neuropathy: where are we in 2004[J]. *Curr Diab Rep*, 2004, 4: 405-408.

(本文编辑:唐颖馨)

(上接第610页)

进程差异对于促进SCI临床治疗方案的制定及康复训练措施的筛选具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 董源基,喻志源,谢敏杰,等.脊髓损伤和炎症[J]. *神经损伤与功能重建*, 2018, 13: 142-145.
- [2] 饶海军,唐向阳,周远辉,等.芝麻素通过抑制氧化应激以及抗凋亡作用保护大鼠脊髓损伤[J]. *神经损伤与功能重建*, 2018, 13: 244-246.
- [3] Musienko PE, Bogacheva IN, Gerasimenko YP. Significance of peripheral feedback in the generation of stepping movements during epidural stimulation of the spinal cord[J]. *Neurosci Behav Physiol*, 2007, 37: 181-190.
- [4] Friedli L, Rosenzweig ES, Barraud Q, et al. Pronounced species divergence in corticospinal tract reorganization and functional recovery after lateralized spinal cord injury favors primates[J]. *Sci transl med*, 2015, 7: 302ra134.
- [5] 顾兵,金建波,李华南,等.脊髓损伤动物模型的运动功能评价[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27: 893-897.
- [6] 蒋显锋,汤锋武,陈旭义,等.骨髓间充质干细胞对脊髓损伤大鼠的治疗作用[J]. *神经损伤与功能重建*, 2016, 11: 99-102.
- [7] Šedý J, Urdziková L, Jendelová P, et al. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats[J]. *Neurosci Biobehav R*, 2008, 32: 550-580.
- [8] 冉茂群,周世林,肖农,等.脑性瘫痪儿童的步态特征分析[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17: 7329-7334.
- [9] Herman T, Weiss A, Brozgol M, et al. Gait and balance in Parkinson's disease subtypes: objective measures and classification considerations[J]. *J Neurol*, 2014, 261: 2401-2410.
- [10] Rao JS, Zhao C, Zhang AF, et al. NT3-chitosan enables de novo regeneration and functional recovery in monkeys after spinal cord injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E5595-E5604.
- [11] Grasso R, Zago M, Lacquaniti F. Interactions between posture and locomotion: Motor patterns in humans walking with bent posture versus erect posture[J]. *J Neurophysiol*, 2000, 83: 288-300.
- [12] Ivanenko YP, Cappellini G, Dominici N, et al. Modular control of

- limb movements during human locomotion[J]. *J Neurosci*, 2007, 27: 11149-11161.
- [13] Ogihara N, Kikuchi T, Ishiguro Y. Planar covariation of limb elevation angles during bipedal walking in the Japanese macaque[J]. *J R Soc Interface*, 2012, 9: 2181-2190.
- [14] Leurs F, Bengoetxea A, Cebolla AM, et al. Planar covariation of elevation angles in prosthetic gait[J]. *Gait Posture*, 2012, 35: 647-652.
- [15] Ivanenko YP, Cappellini G, Dominici N, et al. Modular control of limb movements during human locomotion[J]. *J Neurosci*, 2007, 27: 11149-11161.
- [16] Wei RH, Song W, Zhao C, et al. Influence of walking speed on gait parameters of bipedal locomotion in rhesus monkeys[J]. *J Med Primatol*, 2016, 45: 304-311.
- [17] Wei RH, Zhao C, Rao JS, et al. The kinematic recovery process of rhesus monkeys after spinal cord injury[J]. *Exp Anim*, 2018, 67: 431-440.
- [18] Zhao C, Song W, Rao JS, et al. Combination of kinematic analyses and diffusion tensor tractography to evaluate the residual motor functions in spinal cord-hemisected monkeys[J]. *J Med Primatol*, 2017, 46: 239-247.
- [19] Courtine G, Roland 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.
- [20] Drew T, Jiang W, Widajewicz W. Contributions of the motor cortex to the control of the hindlimbs during locomotion in the cat[J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2002, 40: 178-191.
- [21] Raineteau O, Schwab, ME. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2: 263-273.
- [22] Donati AR, Shokur S, Morya E, et al. Long-term training with a brain-machine interface-based gait protocol induces partial neurological recovery in paraplegic patients[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30383.
- [23] Lacquaniti F, Ivanenko YP, Zago M. Kinematic control of walking[J]. *Arch Ital Biol*, 2002, 140: 263-272.
- [24] Jiang W, Drew T. Effects of bilateral lesions of the dorsolateral funiculi and dorsal columns at the level of the low thoracic spinal cord on the control of locomotion in the adult cat. I. Treadmill walking[J]. *J Neurophysiol*, 1996, 76: 849-866.

(本文编辑:唐颖馨)