

本文引用: 卢小叶, 吕倩忆, 李棋龙, 田浩梅, 张泓. Zea-longa 评分与改良 Garcia 评分应用于针刺治疗 CIRI 大鼠神经功能缺损评估的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(9): 1356-1360.

Zea-longa 评分与改良 Garcia 评分应用于针刺治疗 CIRI 大鼠神经功能缺损评估的研究

卢小叶, 吕倩忆, 李棋龙, 田浩梅*, 张泓*
(湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 比较 Zea-longa 评分与改良 Garcia 评分用于针刺治疗脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)大鼠的神经功能缺损评估的稳定性、准确性。**方法** 将 60 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、针刺组, 每组 20 只。采用线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞模型, 2 h 后, 将线栓拔出 1 cm 左右, 建立 CIRI 模型。针刺组针刺“大椎”“百会”“水沟”, 每 12 h 进行 1 次, 共治疗 7 次。72 h 后, 分别采用 Zea-longa 评分与改良 Garcia 评分进行评价, 每组选取 10 只大鼠行 TTC 染色, 并测定脑梗死面积; 分别分析和比较 Zea-longa 评分和改良 Garcia 评分与脑梗死面积的相关性。**结果** CIRI 术后, 大鼠均表现有一定程度神经功能的缺损症状, 脑组织 TTC 染色可见脑梗死病灶。针刺治疗能显著减少脑梗死面积($P<0.05$), 并改善神经功能($P<0.05$, $P<0.01$)。相关性分析发现, 改良 Garcia 评分与脑梗死面积的 r 值为 $-0.647(P<0.01)$, 而 Zea-longa 评分与脑梗死面积的 r 值为 $0.575(P<0.01)$; 针刺与改良 Garcia 评分及脑梗死面积三者相关性分析 r 值为 $-0.522(P<0.05)$; 而针刺与 Zea-longa 评分及脑梗死面积 r 值为 $0.495(P<0.05)$ 。**结论** 改良 Garcia 评分与 Zea-longa 评分均可用于 CIRI 评价研究及针刺疗效评估。在对 CIRI 大鼠进行感觉功能相关研究时可优先采用改良 Garcia 评分, 偏向运动功能评估时可考虑与 Zea-longa 评分联合使用, 能够比较全面地反映模型大鼠神经功能损伤的严重程度和治疗后的神经功能的恢复程度。

[关键词] Zea-longa 评分; 改良 Garcia 评分; 脑梗死面积; 神经功能; CIRI 大鼠

[中图分类号] R245 **[文献标志码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.09.008

Evaluation Research of Zea-longa Score and Modified Garcia Score Applied to Acupuncture Treatment of Neurological Deficits in CIRI Rats

LU Xiaoye, LV Qianyi, LI Qilong, TIAN Haomei*, ZHANG Hong*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To compare the stability and accuracy of the Zea-longa score and the modified Garcia score for the assessment of neurological deficits in rats with acupuncture treatment of cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI). **Methods** 60 SPF SD rats were randomly divided into sham-operation group, model group, and acupuncture group, with 20 rats in each group. The rat middle cerebral artery occlusion model was established by suture-occluded method. After 2 hours, the suture was pulled out about 1 cm to establish the CIRI model. In the acupuncture group, “Dazhui” (DU14), “Baihui” (DU20) and “Shuigou” (DU26) were performed for 12 hours/time for a total of 7 treatments. After 72 hours, Zea-longa score and modified Garcia score were used for evaluation. 10 rats in each group were selected to perform TTC staining and measure cerebral infarction area; the correlation

[收稿日期] 2021-04-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81874508); 湖南省自然科学基金项目(2020JJ4065); 长沙市科技局自然科学基金项目(kq2014094); 湖南省教育厅创新平台开放基金项目(19K068); 教育部高等教育司大学生创新创业训练计划(201910541050); 湖南中医药大学开放性基金项目(2018YXJS01); 湖南中医药大学研究生创新课题(2020CX27)。

[作者简介] 卢小叶, 女, 在读博士研究生, 研究方向: 针灸治病机理研究。

[通信作者] * 张泓, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-Mail: zh5381271@sina.com; 田浩梅, 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, E-Mail: 451358104@qq.com。

between Zea-longa score and modified Garcia score and cerebral infarction area was analyzed and compared. **Results** After CIRI, the rats all showed signs of neurological deficits to a certain degree. Cerebral infarction lesions could be seen by TTC staining of brain tissue. Acupuncture treatment can significantly reduce the area of cerebral infarction ($P<0.05$) and improve nerve function ($P<0.05$, $P<0.01$). Correlation analysis found that the r value of the modified Garcia score and cerebral infarction area was -0.647 ($P<0.01$), and the r value of Zea-longa score and cerebral infarction area was 0.575 ($P<0.01$); the r value of the correlation analysis between acupuncture and modified Garcia score and cerebral infarction area was -0.522 ($P<0.05$); while the r value of acupuncture and Zea-longa score and cerebral infarction area was 0.495 ($P<0.05$). **Conclusion** Both the modified Garcia score and Zea-longa score can be used for CIRI evaluation research and acupuncture efficacy evaluation. When conducting sensory function-related research in CIRI rats, the modified Garcia score can be used first, and the Zea-longa score can be considered when biased in motor function assessment, but the combination of the two can more fully reflect the severity of nerve function injury in model rats and the recovery degree of nerve function after treatment.

[**Keywords**] Zea-longa score; modified Garcia score; cerebral infarction size; neurological function; CIRI rats

缺血性脑血管病是对人类生命健康威胁最大且最主要的心脑血管疾病之一。据世界卫生组织统计,缺血性脑血管病占有脑血管疾病的70%~80%^[1-2]。自2014年已来,缺血性脑血管病已上升为我国人口第一大死亡原因,同时也是中国成年人日常生活活动能力下降及遗留残疾的首要原因^[3]。目前,临床上主要通过组织恢复和再通血液灌注使脑组织恢复血供而治疗。然而,有证据显示,除急性缺血性脑卒中外,组织恢复和再通血液灌注治疗不仅不能改善脑组织缺血,反而引起CIRI^[4-5],本课题组前期研究^[4]已表明针刺“大椎”“百会”“水沟”可抗脑缺血再灌注损伤。

研究^[5]表明,大脑中动脉阻塞是脑缺血病变最常见的部位。因此,多采用线栓法制作大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型进行CIRI研究。脑缺血相关指南中指出在脑缺血研究中,组织学和行为学都是评估中不可或缺的,在操作过程中应注重多个指标相结合综合评估^[6-7]。目前,大量研究CIRI模型评价方法主要包括测量梗死面积及神经功能评分,而神经功能评分较常用的有改良 Garcia 评分和 Zea-longa 评分,且前期研究者们均采用 Zea-longa 评分,近期研究者们多采用改良 Garcia 评分,两者是否在评价神经功能缺损评估方面有差异以及在针刺干预过程中于神经缺损评估的稳定性、准确性如何,尚未见相关研究报道。故本研究拟制作大鼠 CIRI 模型,针刺治疗后行改良 Garcia 评分和 Zea-longa 评分,分析两种评分与脑梗死面积、针刺干预的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取无特定病原体(specific pathogen free, SPF)

级 Sprague-Dawley(简称 SD)大鼠 60 只,雄性,体重(230±10) g。由湖南中医药大学动物实验中心代购,合格证号:SCXK(湘)2019-0004。饲养于湖南中医药大学 SPF 级动物房,室内温度约 24~26 ℃、湿度 40%~60%。每天光照 12 小时,自由进食、饮水。符合湖南中医药大学实验动物福利和伦理委员会标准(编号:LLBH-201907230015)。

1.2 主要试剂与仪器

4%多聚甲醛(武汉赛维尔有限公司,批号:G1101); 10%水合氯醛(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:B1826028); TTC 溶液(北京索莱宝科技有限公司,批号:G3004)。

水箱箱(常州金坛恒丰仪器制造有限公司,HH-W600),超低温冰箱(中科美菱公司,DW-ZW128),单丝尼龙线栓(北京西浓科技有限公司,A4-263450)。

1.3 分组及模型制备

实验大鼠适应性饲养 1 周。采用随机数字表法将 60 只大鼠随机分为假手术组(20 只)和造模组(40 只)。造模组大鼠采用 MCAO 再灌注进行 CIRI 造模。参照 Zea Longa 方法^[8]并加以改良,10%水合氯醛按 0.3 mL/100 g 剂量腹腔注射麻醉,仰卧位固定,备皮消毒后,选择右侧距前正中线 0.3 cm 处,作长约 1 cm 的纵行切口,用止血钳钝性剥离皮下筋膜、肌肉及腺体,可见颈动脉鞘,鞘内包绕有颈总动脉(common carotid artery, CCA)和分支颈内动脉(internal carotid artery, ICA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)及迷走神经,然后钝性剥离 CCA、ICA、ECA 及迷走神经,使颈部血管、神经充分暴露。分别在 CCA、ICA、ECA 上布线,靠近近心端结扎 CCA、ECA,然后用动脉夹暂时将 ICA 夹闭。用血管剪于距 CCA 分支形成 ICA、ECA 分叉部 3 mm 处剪口,将

尼龙线栓头端由 CCA 插入至 ICA, 然后松开 ICA 处动脉夹, 再继续将线栓向内轻轻推送, 当插入深度为 19 mm 时(线栓上黑色标记穿过血管分叉口), 将 ICA 远心端细线系紧, 以固定线栓防止其从 CCA 脱落。缝合伤口, 缝合时将线栓尾端用缝合线固定于皮肤。注射青霉素抗炎, 单笼饲养观察。2 h 后, 将线栓拔出 1 cm 左右^[9], 从而实现 CIRI 模型。生命体征平稳后, 参照 Zea Longa 5 分制评分法^[7], 无神经损伤为 0 分; 提尾时对侧前肢内收屈曲为 1 分; 爬行时向对侧旋转为 2 分; 站立或爬行时, 向对侧倾倒是 3 分; 无自主活动伴意识障碍为 4 分。评分在 1~3 分者入组。将造模成功的大鼠随机分为模型组(20 只)和针刺组(20 只)。

假手术组按步骤只分离 CCA、ECA 及 ICA, 不阻断大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA), 注射青霉素(0.2 ml/100 g)抗炎, 单笼饲养观察。

1.4 干预方法

造模大鼠于麻醉清醒后(造模后 120 min)进行干预。假手术组和模型组只捆绑 30 min, 不针刺, 每 12 h 进行 1 次, 共 7 次; 针刺组根据《实验针灸学》^[10]、大鼠实验图谱^[11]及拟人比照法定位, 相关选穴如下: (1)“大椎”: 第 7 颈椎与第 1 胸椎间, 背部正中, 直刺 5 mm; (2)“百会”: 顶骨正中, 平刺 2 mm; (3)“水沟”:

唇裂鼻尖下 1 mm 正中处, 向鼻中隔方向斜刺 2 mm。行捻转手法 1 min, 频率 90 次/min, 15 min 后捻转 1 次, 留针 30 min, 每 12 h 进行 1 次, 共 7 次^[12]。

1.5 评价方法

72 h 后分别采用 Zea-longa 评分法与改良 Garcia 评分法评价其神经功能。

1.5.1 Zea-longa 评分法 包含 0~4 分, 得分越高则表明神经功能缺损越严重。通常 1~3 分者视为造模成功, 纳入实验, 0 分及 4 分分别视为造模失败、症状过重, 予以剔除。见表 1。

表 1 Zea-longa 评分法

表现	评分/分
无神经损伤	0
提尾时对侧前肢内收屈曲(轻度神经损伤)	1
爬行时向对侧旋转(中度神经损伤)	2
站立或爬行时, 向对侧倾倒(重度神经损伤)	3
无自主活动伴意识障碍	4

1.5.2 改良 Garcia 评分 主要从 6 个表现进行判断: 动物的自主运动、体态对称性、前肢伸展运动、抓持和攀爬铁笼能力、两侧身体触觉反射及两侧胡须碰触反应。总分 18 分, 得分区间 3~18 分, 得分越高, 神经功能损伤程度越轻, 18 分表明无神经功能缺损。见表 2。

表 2 改良 Garcia 评分

项目	表现	评分/分
自主运动 (观察 5 min 大鼠在鼠笼内的活动)	活动正常	3
	轻度影响	2
	重度影响	1
	无自主运动	0
体态对称性	体态对称	3
	体态不对称	2
	偏瘫	1
前肢伸展运动 (提住鼠尾, 将前肢移向桌面边缘, 观察前爪伸展运动)	对称	3
	轻度不对称	2
	显著不对称	1
	偏瘫	0
抓持和攀爬铁笼能力	攀爬能力、抓持有力量	3
	一侧损害表现	2
	不能攀爬或转圈	1
两侧身体触觉反射	双侧对称	3
	一侧反应迟钝	2
	一侧无反应	1
两侧胡须碰触反应	对称	3
	不对称	2
	一侧无反应	1

1.6 TTC 法测定脑梗死面积

假手术组、模型组、针刺组每组随机选择 10 只大鼠行 TTC 染色法。麻醉后断头取脑, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 15 min, 切除小脑、嗅球, 以冠状位均匀 5 等分切取脑片, 厚度约 2 mm。立即将脑片置于 0.4% TTC 染液中, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中避光水浴, 过程中每 5 min 需翻面一次, 确保脑片均匀染色。非梗死部位为红色, 梗死灶范围染为灰白色。染色完毕后, 将 TTC 染色液倒出, 脑组织用 4% 多聚甲醛浸泡固定。6 h 后, 将每一脑片的尾侧面用 Image-Pro Plus 6.0 系统进行分析, 测量每一脑片的梗死面积和总面积, 并计算梗死区域占全脑面积百分比。

1.7 统计学分析

计量资料采用均数“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。所有资料进行正态性检验, 符合正态分布者, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 方差齐者用 LSD 和 SNK 法, 方差不齐者用 Tamhane's T_2 或 Dunnett's T_3 法。不符合正态分布数据采用非参数检验, 用中位数与四分位间距 ($M(Q)$) 表示; 采用 Spearman 等级相关系数评估相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠脑梗死面积比较

假手术组 TTC 染色无梗死灶形成。与假手术组比较, 模型组与针刺组均可见不同程度的灰白色梗死灶, 差异有显著统计学意义 ($P<0.01$); 与模型组比较, 针刺组脑梗死面积明显减小, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 1、表 3。

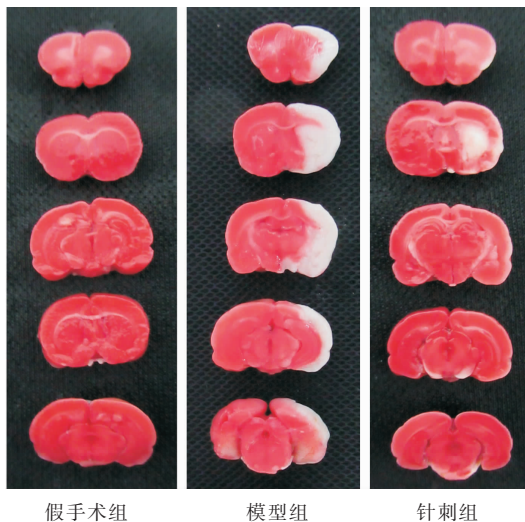


图 1 各组大鼠脑梗死面积 TTC 染色

2.2 Zea-longa、改良 Garcia 神经功能缺损评分比较
与假手术组比较, 模型组 Zea-longa 评分增加、

表 3 大鼠脑梗死面积比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	脑梗死面积比
假手术组	10	0.000±0.000
模型组	10	18.78±0.104**
针刺组	10	10.23±0.054 [▲]

注: 与假手术组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, [▲] $P<0.05$

改良 Garcia 评分降低, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 均提示 CIRI 大鼠神经功能受损; 治疗前模型组与针刺组比较, Zea-longa 评分、改良 Garcia 评分差异无统计学差异 ($P>0.05$); 与模型组比较, 针刺治疗后, 大鼠 Zea-longa 评分降低、改良 Garcia 评分增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$); 与治疗前比较, 治疗后针刺组大鼠 Zea-longa 评分降低、改良 Garcia 评分增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$)。见表 4。

表 4 大鼠神经功能缺损评分 ($\bar{x}\pm s$, 分)

组别	n	Zea-longa 评分		改良 Garcia 评分	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
假手术组	20	0.00±0.00	0.00±0.00	18.00±0.00	18.00±0.00
模型组	20	1.80±0.70**	1.95±0.89	10.35±1.95**	9.85±1.93
针刺组	20	1.85±0.94	1.20±0.90 ^{▲*}	10.15±1.93	12.35±2.46 ^{▲**}

注: 与假手术组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, [▲] $P<0.01$, ^{*} $P<0.05$; 与治疗前比较, [■] $P<0.01$, ^{*} $P<0.05$

2.3 两种神经功能评分与脑梗死面积的相关性分析

Zea-longa 评分与脑梗死面积呈正相关 ($P<0.01$)。改良 Garcia 评分与脑梗死面积呈负相关 ($P<0.01$)。见表 5。

表 5 大鼠神经功能缺损评分与脑梗死面积比的相关性分析 ($n=20$)

评分	项目	相关度 (r 值)	P 值
Zea-longa 评分	脑梗死面积比	0.575	0.008
改良 Garcia 评分	脑梗死面积比	-0.647	0.002

2.4 针刺与神经功能评分和脑梗死面积的相关性分析

针刺与改良 Garcia 评分及脑梗死面积呈负相关 ($P<0.05$)。针刺与 Zea-longa 评分及脑梗死面积呈正相关 ($P<0.05$)。见表 6。

表 6 针刺与神经功能缺损评分及脑梗死面积比的相关性分析 ($n=10$)

干预方法	评分	项目	相关度 (r 值)	P 值
针刺治疗	改良 Garcia 评分	脑梗死面积比	-0.522	0.022
针刺治疗	Zea-longa 评分	脑梗死面积比	0.495	0.031

3 讨论

CIRI 因其发病症状与中医中风类似,故将其归属于中医学“中风”范畴。调查^[13]显示,70%~80%的中风患者遗留有功能障碍,肢体运动障碍是 CIRI 最常见的症状和体征之一,当前对 CIRI 的相关研究也往往偏于运动功能。但中风后感觉障碍在近年逐渐被重视,有高达 68%的中风患者出现感觉功能障碍,出现偏身感觉障碍的患者也达到了 51%^[14],可见感觉障碍在本病中发生率极高,且对运动功能及平衡功能产生极大影响。Zea-longa 评分法根据动物肢体活动及意识状态进行评分,无需特殊器械,简便且可操作性强,在动物实验中被广泛应用,但其主要以动物肢体运动功能为评分依据,忽视了对大鼠的感觉方面的评估。而改良 Garcia 评分详细评价了受试大鼠的运动功能、感觉功能及自主活动,且采用健、患侧双侧对比的方式进行评估,故目前较多研究采用改良 Garcia 评分。

本研究结果显示,CIRI 术后,动物均出现了不同程度神经功能缺损,TTC 可见脑梗死病灶,而针刺治疗可显著减少脑梗死面积($P<0.05$)及神经功能缺损评分($P<0.05$, $P<0.01$)。相关性分析发现,改良 Garcia 评分与脑梗死面积 r 值为 -0.647 , $P<0.01$;而 Zea-longa 评分与脑梗死面积 r 值为 0.575 , $P<0.01$;针刺与改良 Garcia 评分及脑梗死面积三者相关性分析 r 值为 -0.522 , $P<0.05$;而针刺与 Zea-longa 评分及脑梗死面积 r 值为 0.495 , $P<0.05$;提示两评分均可用于 CIRI 模型神经功能缺损程度及针刺治疗效果的评估。

综上,改良 Garcia 评分与 Zea-longa 评分同脑梗死面积及针刺均有较高相关度。而改良 Garcia 评分全面评估了大鼠感觉、运动、自主活动,在对 CIRI 大鼠进行感觉功能相关研究时可优先采用改良 Garcia 评分,偏向运动功能评估时可考虑与 Zea-

longa 评分相结合使用,以期更准确地评估大鼠神经功能缺损的程度及大鼠脑梗死面积。

参考文献

- [1] 郑慧娥,何灏龙,陈芯仪,等.针刺对 CIRI 大鼠缺血侧海马区 miRNA 表达及 miR-20a-5p 和 miR-22-5p 的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(10):1226-1231.
- [2] MENG Y W, GIOU T Y, WAN T L, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 46(4): 1650-1667.
- [3] 高 杰.延续性护理干预对老年缺血性卒中患者复发的影响观察[J].临床研究,2018,26(10):170-171.
- [4] 武姿含,蒋素容,陈芯仪,等.针刺大椎、百会、人中穴对大鼠脑缺血再灌注损伤后 ES 蛋白表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(4):507-510.
- [5] 闫 俊.大脑中动脉重度狭窄侧枝循环对脑梗死病因及预后的影响[D].西安:第四军医大学,2017.
- [6] FISHER M, FEUERSTEIN G, HOWELLS D W, et al. Update of the stroke therapy academic industry Round table preclinical recommendations[J]. Stroke, 2009, 40(6): 2244-2250.
- [7] ROTHER J. Neuro protection does not work[J]. Stroke, 2008, 39(2): 523-524.
- [8] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without Craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] WANG H L, LIU F L, LI R Q, et al. Electroacupuncture improves learning and memory function in a rat cerebral ischemia/reperfusion injury model through PI3K/Akt signaling pathway activation [J]. Neural Regeneration Research, 2021, 16(6): 1011-1016.
- [10] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2007:314.
- [11] 华兴邦,周浩良.大鼠穴位图谱的研制[J].中国中西医结合杂志,2012,32(2):209-213.
- [12] 武姿含,蒋素容,陈芯仪,等.针刺大椎、百会、人中穴对大鼠脑缺血再灌注损伤后 ES 蛋白表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(4):507-510.
- [13] 李 婷.物理技术辅助脑卒中康复的临床指南[J].国际生物医学工程杂志,2019,42(2):100-108.
- [14] 陈晓军,方剑乔,商 越,等.针刺配合西药治疗中风后轻度认知障碍:随机对照研究[J].中国针灸,2016,36(4):337-341.

(本文编辑 匡静之)