



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110025393 A

(43)申请公布日 2019. 07. 19

(21)申请号 201810031740.X

(22)申请日 2018.01.12

(71)申请人 昆明科灵生物科技有限公司

地址 650000 云南省昆明市呈贡区博大路
中段

(72)发明人 杨立川

(74)专利代理机构 常州佰业腾飞专利代理事务
所(普通合伙) 32231

代理人 张福敏

(51)Int.Cl.

A61D 1/00(2006.01)

A61D 7/00(2006.01)

A61B 5/00(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

权利要求书3页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种建立脊髓损伤模型方法

(57)摘要

本发明涉及临床科学研究技术领域,且公开了准备实验材料:1).全套脊髓暴露操作的手术器械;2).大动物脊髓撞击器(该设备申报实用新型专利);A2.准备动物:1).建模阶段:选用6只成年食蟹猴,雄性,4-6岁,体重4-6kg;2).有效性探究阶段;A3.动物术前健康及基数检查:1).实验安全测试:肝肾功能;2).行动基数评估;3).脊髓MRI扫描基数。该建立脊髓损伤模型方法,具备以下有益效果:1、建立模型:包括手术操作,动物安全保障及护理,脊髓损伤评估和验证,如症状进程打分,MRI扫描和组织学评价;2、探究有效性:包括治疗测试物制备,给药方式,给药频率,资料解析,如特殊生物标记物免疫组织学染色和数据解析。

Monkey hindlimb score.

	Score	
	Left	Right
<i>Corridor walking assay (walking ability as measured by hip, knee, and ankle movements)</i>		
No voluntary movement in large joints (hip, knee or ankle)	0	0
Perceptible movement of 1-2 joints in the hindlimb	1	1
Perceptible movement of 3 joints	2	2
Vigorous movement of 3 joints without weight bearing	3	3
Occasional standing without sustainable weight bearing	4	4
Consistent weight support and able to walk with significant deficits	5	5
Standing and walking (3 m in >3 s)	6	6
Standing and walking (3 m in <3 s)	7	7
Coordinated walking forwards and backwards with intact body turning, jumping, and hopping.	8	8
<i>Hindlimb digital function</i>		
No bar grasp due to flaccid or spastic digits	0	0
Attempts digital movement	1	1
Delay in grasping the bar using digits (palm slips from the bar)	2	2
Delay in grasping the bar with a slow release. Digits of the foot are clumsy while standing.	3	3
Effective movement using digits with rapid shift to a relaxed position as balance is attained. Digits open rapidly to perform the next activity.	4	4

1. 一种建立脊髓损伤模型方法, 其特征在于, 包括以下步骤:
 - A1. 准备材料:
 - 1). 全套脊髓暴露操作的手术器械;
 - 2). 大动物脊髓撞击器 (该设备申报实用新型专利);
 - A2. 准备动物:
 - 1). 建模阶段: 选用6只成年食蟹猴, 雄性, 4-6岁, 体重4-6kg;
 - 2). 有效性探究阶段;
 - A3. 动物术前健康及基数检查:
 - 1). 实验安全测试: 肝肾功能;
 - 2). 行动基数评估;
 - 3). 脊髓MRI扫描基数;
 - A3. 麻醉和检测:
 - 1). 动物实验前12小时禁食, 肌肉注射氯胺酮 (10mg/kg) 和甲苯噻嗪 (0.5-1.0mg/kg) 进行麻醉;
 - 2). 将猴子俯卧放置在操作台上;
 - 3). 剃除胸椎正中区域的毛发, 并在皮肤上擦拭碘酒和酒精;
 - 4). 插入气管;
 - 5). 通过吸入异氟烷和氧气使动物麻醉;
 - 6). 持续检测包括血压, 呼吸频率, 血氧饱和度, 心电图和直肠体温;
 - 7). 用电热毯保持体温在 $37.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$;
 - 8). 术前通过肌肉注射阿托品 (计量0.06mg/kg);
 - 9). 持续静脉注射已保证动物体液补给;
 - A4. 手术操作
 - 1). 在皮肤上切开一个9-10cm开口, 露出T8-11节椎骨, 将椎旁肌从骨膜下剥离;
 - 2). 将动物固定在脊柱固定装置上, 保持脊椎固定以避免撞击时脊柱位置发生移动, 如用一对T形尺在动物周围固定;
 - 3). 用不锈钢钳臂固定住T9节椎骨双侧;
 - 4). 动物用脊椎固定装置固定后, 保持胸部悬空保证动物呼吸不受限制;
 - 5). 进行T9节椎板切除术, 暴露T10-11节椎骨, 用高速钻头 (直径3mm的圆形凹槽钻头) 去除黄韧带;
 - 6). 保持硬膜完整;
 - 7). 将猴子转移到脊柱撞击装置上, 用三维游标尺精确定位到T9节脊椎骨处;
 - 8). 撞击锤中50g, 从距离12cm的高度顺导管自由落体撞到暴露脊椎上方一个10mm²的撞击板上, 造成T9节椎骨的脊髓损伤, 冲击力度约1.0-1.5m/s, T9节椎骨上的创伤面约1.0mm到1.5mm, 脊髓20-30%的横截面积变形, 相当于一次轻微或中度脊髓损伤;
 - 9). 损伤形成后, 将脊柱从固定装置上取下, 分层缝合肌肉, 皮肤;
 - 10). 将动物放置在电热毯或有加热功能的手术台上至动物苏醒, 输液, 麻醉恢复一小时后进食;
 - 11). 术后需检测体温, 血压, 心率, 动物的呼吸道要保持畅通知道完全苏醒;

A5. 术后护理:

- 1). 止痛:按照需要注射盐酸叔丁啡0.01-0.03mg/ml;
- 2). 使用抗生素:鉴于该手术操作是伤口长期暴露,所以兽医在术前和术后都会开具抗生素处方,所选抗生素需能够对抗和此类伤口相关的常见病菌,例如:术前半小时内和术后5-7天内使用头孢菌素,在本手术中,给头孢哌酮钠100mg/kg;
- 3). 体液补给:手术中及在恢复室的术后恢复中,都应按照兽医要求持续进行静脉滴注补充体液,如果动物出现脱水,每次静脉注射100ml甘油盐酸溶液补充体液;
- 4). 每天进行三次人工排尿,直到动物可以自行排尿;
- 5). 瘫痪的动物需要每天喂食足量的水和食物,直到他们恢复到可以自行进食进水;

A6. 术后随访

1). 行为学评价

在手术操作和治疗操作前后,需要至少两名测试人员对每只动物进行独立的行为学评估,行为学分析期限进行4个月或按需进行,前期需每天进行分析,后期分析则按每周进行;

1. 自发运动测量

大多数猴子的活动是三维的跳跃和爬笼;因此,测量自发运动活动十分困难,我们选择Tarlov神经功能评分标准和尾部活动来评价自发活动;

Tarlov神经功能评分标准

每个动物的神经病学功能可以按照改进的Tarlov神经功能评分标准进行以下评分:0分(没有自发活动功能);1分(可察觉到的关节活动);2分(主动关键活动,但动物不能站立);3分(动物可以站立,但不能跳跃);4分(动物完全恢复,没有神经功能缺陷);

尾部活动

动物的尾部活动可以分成4级:0分(没有活动);1分(轻微活动);2分(有力的动作);3分(自发反应);

2. 应激活动的测量

运用尾夹和腿夹测试来测定应激活动,相应的,腿夹的力度也要进行评估,

腿夹测试

腿夹测试是用钳子夹住下肢脚趾,钳夹引起的反应分为4个等级:0分(无反应);1分(轻微反应);2分(明显反应);3分(自发反应);

尾夹测试

尾巴顶部用钳子夹住,动物的反应可分为4级:0分(无反应);1分(轻微反应);2分(明显反应);3分(自发反应);

3. 另一种功能评估方法-猴子下肢活动评分法(MHS)

测定猴子下身功能运用一个12分的猴子下身活动评分体系,包括表格中显示的下肢运动机能分数(0-8分)和手指功能评分(0-4分);

动物会被放置在开放的场地上进行现场评估和录像以便后续进一步评估,录像评估由两个不同的人员分别观看录像打分,手指功能评分是通过猴子是否能抓住金属笼竿超过30分钟来确定,MHS要综合下肢活动评分和手指功能评分,该测试要在脊髓损伤手术前进行,并在术后1,2,3,4,5天每天进行,到术后第4周每周进行一次,术后第4个月每月进行一次;

2). MRI检测

损伤的脊髓核磁共振影像检测需要在术前和术后不同时间点(2天,1个月和4个月)进行,传统的序列包括矢状T1加权和T2加权快速自旋回声影像(SE)序列,以揭示脊髓损伤后脊髓结构变化进程;

对于更多的特定检测,弥散张量成像(DTI)是一种检测急性脊髓损伤后病理变化的有效方法,MRI使用3-T扫描,磁共振示踪成像可以利用弥散成像(DTI)收集的数据将神经术可视化,DTI运用矢状面单拍回波平面广义自动校准部分并行采集(GRAPPA)序列和2倍加速因子,图像分析使用商业软件进行,脊髓白质纤维束成像使用主扩散法,图像以病灶中心为核心区域,在矢状面和冠状面上观察到的脊髓纵切面显示受伤后移位、分离或断开;

3).组织学分析

在研究末期,将动物安乐死并取出脊髓组织以进行组织学研究;

制备脊髓损伤区域和其上下位置的蜡块,用马松三色和Verhoeff染色法或H&E染色法对胶原、网状纤维和弹性纤维进行染色,总之,病变区域通常有或大或小的囊腔,残余或受损/坏死组织,有时密集的疤痕组织,病变的中心就是横截面上最大病变区域;

损伤量评估

为约2cm的中心病变脊髓节段将用到连续切片技术,给连续的切片拍照,在每一组病变区域的切片图片中都能看见在边界清晰,形态完整的原组织内有退化组织和/或腔体,病变的延喙尾区域是包含病变区域的最喙到尾部的最长距离,损伤量记为:损伤区域(μm) $\times$ 截面距离(μm) $\times$ 区域个数;

免疫组织化学

免疫组织化学用来检测研究所需的特殊神经元生物标记物或组织细胞因子。

一种建立脊髓损伤模型方法

技术领域

[0001] 本发明涉及脊髓损伤模型方法研究技术领域,具体为一种建立脊髓损伤模型方法。

背景技术

[0002] 鉴于啮齿类动物和人类在解剖学和功能上的差异,建立可靠的脊髓损伤大动物模型(例如非人灵长类动物脊髓损伤模型)对从理论研究转换到临床运用是十分关键的。

[0003] 脊髓损伤模型的研究经常会涉及脊髓暴露的外科手术,因此,通常有两种方式造成脊髓损伤:一是横向切致中线,不损伤对侧的另一半脊髓的半切术模型,另一种是在日常脊髓损伤事故中更常见的撞击模型,撞击模型及它的变形首先是由Allen(1911年)提出的,是将设定重量的撞击物从设定高度落下撞击暴露的脊髓上,这样可以制造一个更为精确量化和标准化的损伤模型,这项技术能造成脊髓可估计的创伤,能对脊髓造成“瞬间打击”,我们要开发的正是这种撞击法建立脊髓损伤模型。

发明内容

[0004] (一)解决的技术问题

[0005] 针对现有技术的不足,本发明提供了一种建立脊髓损伤模型方法,解决了理论研究不能准确的转换到临床运用的问题。

[0006] (二)技术方案

[0007] 为实现以上目的,本发明通过以下技术方案予以实现:一种建立脊髓损伤模型方法,包括以下步骤:

[0008] A1.准备材料:

[0009] 1).全套脊髓暴露操作的手术器械。

[0010] 2).大动物脊髓撞击器(该设备申报实用新型专利)。

[0011] A2.准备动物:

[0012] 1).建模阶段:选用6只成年食蟹猴,雄性,4-6岁,体重4-6kg。

[0013] 2).有效性探究阶段。

[0014] A3.动物术前健康及基数检查。

[0015] 1).实验安全测试:肝肾功能。

[0016] 2).行动基数评估。

[0017] 3).脊髓MRI扫描基数。

[0018] A3.麻醉和检测:

[0019] 1).动物实验前12小时禁食,肌肉注射氯胺酮(10mg/kg)和甲苯噻嗪(0.5-1.0mg/kg)进行麻醉。

[0020] 2).将猴子俯卧放置在操作台上。

[0021] 3).剃除胸椎正中区域的毛发,并在皮肤上擦拭碘酒和酒精。

- [0022] 4). 插入气管。
- [0023] 5). 通过吸入异氟烷和氧气使动物麻醉。
- [0024] 6). 持续检测包括血压, 呼吸频率, 血氧饱和度, 心电图和直肠体温。
- [0025] 7). 用电热毯保持体温在 $37.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。
- [0026] 8). 术前通过肌肉注射阿托品 (计量 0.06mg/kg)。
- [0027] 9). 持续静脉注射已保证动物体液补给。
- [0028] A4. 手术操作
- [0029] 1). 在皮肤上切开一个9-10cm开口, 露出T8-11节椎骨, 将椎旁肌从骨膜下剥离。
- [0030] 2). 将动物固定在脊柱固定装置上, 保持脊椎固定以避免撞击时脊柱位置发生移动, 如用一对T形尺在动物周围固定。
- [0031] 3). 用不锈钢钳臂固定住T9节椎骨双侧。
- [0032] 4). 动物用脊椎固定装置固定后, 保持胸部悬空保证动物呼吸不受限制。
- [0033] 5). 进行T9节椎板切除术, 暴露T10-11节椎骨, 用高速钻头 (直径3mm的圆形凹槽钻头) 去除黄韧带。
- [0034] 6). 保持硬膜完整。
- [0035] 7). 将猴子转移到脊柱撞击装置上, 用三维游标尺精确定位到T9节脊椎骨处。
- [0036] 8). 撞击锤中50g, 从距离12cm的高度顺导管自由落体撞到暴露脊椎上方一个10mm²的撞击板上, 造成T9节椎骨的脊髓损伤, 冲击力度约1.0-1.5m/s, T9节椎骨上的创伤面约1.0mm到1.5mm, 脊髓20-30%的横截面积变形, 相当于一次轻微或中度脊髓损伤。
- [0037] 9). 损伤形成后, 将脊柱从固定装置上取下, 分层缝合肌肉, 皮肤。
- [0038] 10). 将动物放置在电热毯或有加热功能的手术台上至动物苏醒, 输液, 麻醉恢复一小时后进食。
- [0039] 11). 术后需检测体温, 血压, 心率, 动物的呼吸道要保持畅通知道完全苏醒。
- [0040] A6. 术后护理。
- [0041] 1). 止痛: 按照需要注射盐酸叔丁啡 $0.01-0.03\text{mg/ml}$ 。
- [0042] 2). 使用抗生素: 鉴于该手术操作是伤口长期暴露, 所以兽医在术前和术后都会开具抗生素处方, 所选抗生素需能够对抗和此类伤口相关的常见病菌, 例如: 术前半小时内和术后5-7天内使用头孢菌素, 在本手术中, 给头孢哌酮钠 100mg/kg 。
- [0043] 3). 体液补给: 手术中及在恢复室的术后恢复中, 都应按照兽医要求持续进行静脉滴注补充体液, 如果动物出现脱水, 每次静脉注射100ml甘油盐酸溶液补充体液。
- [0044] 4). 每天进行三次人工排尿, 直到动物可以自行排尿。
- [0045] 5). 瘫痪的动物需要每天喂食足量的水和食物, 直到他们恢复到可以自行进食进水。
- [0046] A6. 术后随访
- [0047] 1). 行为学评价
- [0048] 在手术操作和治疗操作前后, 需要至少两名测试人员对每只动物进行独立的行为学评估, 行为学分析期限进行4个月或按需进行, 前期需每天进行分析, 后期分析则按每周进行。
- [0049] 1. 自发运动测量

[0050] 大多数猴子的活动是三维的跳跃和爬笼;因此,测量自发运动活动十分困难,我们选择Tarlov神经功能评分标准和尾部活动来评价自发活动。

[0051] Tarlov神经功能评分标准

[0052] 每个动物的神经病学功能可以按照改进的Tarlov神经功能评分标准进行以下评分:0分(没有自发活动功能);1分(可察觉到的关节活动);2分(主动关键活动,但动物不能站立);3分(动物可以站立,但不能跳跃);4分(动物完全恢复,没有神经功能缺陷),

[0053] 尾部活动

[0054] 动物的尾部活动可以分成4级:0分(没有活动);1分(轻微活动);2分(有力的动作);3分(自发反应)。

[0055] 2. 应激活动的测量

[0056] 运用尾夹和腿夹测试来测定应激活动,相应的,腿夹的力度也要进行评估。

[0057] 腿夹测试

[0058] 腿夹测试是用钳子夹住下肢脚趾,钳夹引起的反应分为4个等级:0分(无反应);1分(轻微反应);2分(明显反应);3分(自发反应)。

[0059] 尾夹测试

[0060] 尾巴顶部用钳子夹住,动物的反应可分为4级:0分(无反应);1分(轻微反应);2分(明显反应);3分(自发反应)。

[0061] 3. 另一种功能评估方法-猴子下肢活动评分法(MHS)

[0062] 测定猴子下身功能运用一个12分的猴子下身活动评分体系,包括表格中显示的下肢运动机能分数(0-8分)和手指功能评分(0-4分)。

[0063] 动物会被放置在开放的场地上进行现场评估和录像以便后续进一步评估,录像评估由两个不同的人员分别观看录像打分,手指功能评分是通过猴子是否能抓住金属笼竿超过30分钟来确定,MHS要综合下肢活动评分和手指功能评分,该测试要在脊髓损伤手术前进行,并在术后1,2,3,4,5天每天进行,到术后第4周每周进行一次,术后第4个月每月进行一次。

[0064] 2).MRI检测

[0065] 损伤的脊髓核磁共振影像检测需要在术前和术后不同时间点(2天,1个月和4个月)进行,传统的序列包括矢状T1加权和T2加权快速自旋回声影像(SE)序列,以揭示脊髓损伤后脊髓结构变化进程。

[0066] 对于更多的特定检测,弥散张量成像(DTI)是一种检测急性脊髓损伤后病理变化的有效方法,MRI使用3-T扫描,磁共振示踪成像可以利用弥散成像(DTI)收集的数据将神经术可视化,DTI运用矢状面单拍回波平面广义自动校准部分并行采集(GRAPPA)序列和2倍加速因子,图像分析使用商业软件进行,脊髓白质纤维束成像使用主扩散法,图像以病灶中心为核心区域,在矢状面和冠状面上观察到的脊髓纵切面显示受伤后移位、分离或断开。

[0067] 3).组织学分析

[0068] 在研究末期,将动物安乐死并取出脊髓组织以进行组织学研究,

[0069] 制备脊髓损伤区域和其上下位置的蜡块,用马松三色和Verhoeff染色法或H&E染色法对胶原、网状纤维和弹性纤维进行染色,总之,病变区域通常有或大或小的囊腔,残余或受损/坏死组织,有时密集的疤痕组织,病变的中心就是横截面上最大病变区域。

[0070] 损伤量评估

[0071] 为约2cm的中心病变脊髓节段将用到连续切片技术,给连续的切片拍照,在每一组病变区域的切片图片中都能看见在边界清晰,形态完整的原组织内有退化组织和/或腔体,病变的延喙尾区域是包含病变区域的最喙到尾部的最长距离,损伤量记为:损伤区域(μm) $\times$ 截面距离(μm) $\times$ 区域个数。

[0072] 免疫组织化学

[0073] 免疫组织化学用来检测研究所需的特殊神经元生物标记物或组织细胞因。

[0074] (三)有益效果

[0075] 与现有技术相比,本发明提供了一种建立脊髓损伤模型方法,具备以下有益效果:

[0076] 1、建立模型:包括手术操作,动物安全保障及护理,脊髓损伤评估和验证,如症状进程打分,MRI扫描和组织学评价。

[0077] 2、探究有效性:包括治疗测试物制备,给药方式,给药频率,资料解析,如特殊生物标记物免疫组织学染色和数据分析。

附图说明

[0078] 图1为本发明实验对象的下身活动评分图。

具体实施方式

[0079] 下面将结合本发明的实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0080] 一种建立脊髓损伤模型方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0081] A1.准备材料:

[0082] 1).全套脊髓暴露操作的手术器械。

[0083] 2).大动物脊髓撞击器(该设备申报实用新型专利)。

[0084] A2.准备动物:

[0085] 1).建模阶段:选用6只成年食蟹猴,雄性,4-6岁,体重4-6kg。

[0086] 2).有效性探究阶段。

[0087] A3.动物术前健康及基数检查。

[0088] 1).实验安全测试:肝肾功能。

[0089] 2).行动基数评估。

[0090] 3).脊髓MRI扫描基数。

[0091] A3.麻醉和检测:

[0092] 1).动物实验前12小时禁食,肌肉注射氯胺酮(10mg/kg)和甲苯噻嗪($0.5-1.0\text{mg/kg}$)进行麻醉。

[0093] 2).将猴子俯卧放置在操作台上。

[0094] 3).剃除胸椎正中区域的毛发,并在皮肤上擦拭碘酒和酒精。

[0095] 4).插入气管。

- [0096] 5).通过吸入异氟烷和氧气使动物麻醉。
- [0097] 6).持续检测包括血压,呼吸频率,血氧饱和度,心电图和直肠体温。
- [0098] 7).用电热毯保持体温在 $37.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。
- [0099] 8).术前通过肌肉注射阿托品(计量 0.06mg/kg)。
- [0100] 9).持续静脉注射已保证动物体液补给。
- [0101] A4.手术操作
- [0102] 在皮肤上切开一个9-10cm开口,露出T8-11节椎骨,将椎旁肌从骨膜下剥离。
- [0103] 1).将动物固定在脊柱固定装置上,保持脊椎固定以避免撞击时脊柱位置发生移动,如用一对T形尺在动物周围固定。
- [0104] 2).用不锈钢钳臂固定住T9节椎骨双侧。
- [0105] 3).动物用脊椎固定装置固定后,保持胸部悬空保证动物呼吸不受限制。
- [0106] 4).进行T9节椎板切除术,暴露T10-11节椎骨,用高速钻头(直径3mm的圆形凹槽钻头)去除黄韧带。
- [0107] 5).保持硬膜完整。
- [0108] 6).将猴子转移到脊柱撞击装置上,用三维游标尺精确定位到T9节脊椎骨处。
- [0109] 7).撞击锤中50g,从距离12cm的高度顺导管自由落体撞到暴露脊椎上方一个 10mm^2 的撞击板上,造成T9节椎骨的脊髓损伤,冲击力度约 $1.0\text{--}1.5\text{m/s}$,T9节椎骨上的创伤面约 1.0mm 到 1.5mm ,脊髓20-30%的横截面积变形,相当于一次轻微或中度脊髓损伤。
- [0110] 8).损伤形成后,将脊柱从固定装置上取下,分层缝合肌肉,皮肤。
- [0111] 9).将动物放置在电热毯或有加热功能的手术台上至动物苏醒,输液,麻醉恢复一小时后进食。
- [0112] 10).术后需检测体温,血压,心率,动物的呼吸道要保持畅通知道完全苏醒。
- [0113] A6.术后护理。
- [0114] 1).止痛:按照需要注射盐酸叔丁啡 $0.01\text{--}0.03\text{mg/ml}$ 。
- [0115] 2).使用抗生素:鉴于该手术操作是伤口长期暴露,所以兽医在术前和术后都会开具抗生素处方,所选抗生素需能够对抗和此类伤口相关的常见病菌,例如:术前半小时内和术后5-7天内使用头孢菌素,在本手术中,给头孢哌酮钠 100mg/kg 。
- [0116] 3).体液补给:手术中及在恢复室的术后恢复中,都应按照兽医要求持续进行静脉滴注补充体液,如果动物出现脱水,每次静脉注射 100ml 甘油盐酸溶液补充体液。
- [0117] 4).每天进行三次人工排尿,直到动物可以自行排尿。
- [0118] 5).瘫痪的动物需要每天喂食足量的水和食物,直到他们恢复到可以自行进食进水。
- [0119] A6.术后随访
- [0120] 1).行为学评价
- [0121] 在手术操作和治疗操作前后,需要至少两名测试人员对每只动物进行独立的行为学评估,行为学分析期限进行4个月或按需进行,前期需每天进行分析,后期分析则按每周进行。
- [0122] 1.自发运动测量
- [0123] 大多数猴子的活动是三维的跳跃和爬笼;因此,测量自发运动活动十分困难,我们

选择Tarlov神经功能评分标准和尾部活动来评价自发活动。

[0124] Tarlov神经功能评分标准

[0125] 每个动物的神经病学功能可以按照改进的Tarlov神经功能评分标准进行以下评分:0分(没有自发活动功能);1分(可察觉到的关节活动);2分(主动关键活动,但动物不能站立);3分(动物可以站立,但不能跳跃);4分(动物完全恢复,没有神经功能缺陷),

[0126] 尾部活动

[0127] 动物的尾部活动可以分成4级:0分(没有活动);1分(轻微活动);2分(有力的动作);3分(自发反应)。

[0128] 2. 应激活动的测量

[0129] 运用尾夹和腿夹测试来测定应激活动,相应的,腿夹的力度也要进行评估。

[0130] 腿夹测试

[0131] 腿夹测试是用钳子夹住下肢脚趾,钳夹引起的反应分为4个等级:0分(无反应);1分(轻微反应);2分(明显反应);3分(自发反应)。

[0132] 尾夹测试

[0133] 尾巴顶部用钳子夹住,动物的反应可分为4级:0分(无反应);1分(轻微反应);2分(明显反应);3分(自发反应)。

[0134] 3. 另一种功能评估方法-猴子下肢活动评分法(MHS)

[0135] 测定猴子下身功能运用一个12分的猴子下身活动评分体系,包括表格中显示的下肢运动机能分数(0-8分)和手指功能评分(0-4分)。

[0136] 动物会被放置在开放的场地上进行现场评估和录像以便后续进一步评估,录像评估由两个不同的人员分别观看录像打分,手指功能评分是通过猴子是否能抓住金属笼竿超过30分钟来确定,MHS要综合下肢活动评分和手指功能评分,该测试要在脊髓损伤手术前进行,并在术后1,2,3,4,5天每天进行,到术后第4周每周进行一次,术后第4个月每月进行一次。

[0137] 2) .MRI检测

[0138] 损伤的脊髓核磁共振影像检测需要在术前和术后不同时间点(2天,1个月和4个月)进行,传统的序列包括矢状T1加权和T2加权快速自旋回声影像(SE)序列,以揭示脊髓损伤后脊髓结构变化进程。

[0139] 对于更多的特定检测,弥散张量成像(DTI)是一种检测急性脊髓损伤后病理变化的有效方法,MRI使用3-T扫描,磁共振示踪成像可以利用弥散成像(DTI)收集的数据将神经术可视化,DTI运用矢状面单拍回波平面广义自动校准部分并行采集(GRAPPA)序列和2倍加速因子,图像分析使用商业软件进行,脊髓白质纤维束成像使用主扩散法,图像以病灶中心为核心区域,在矢状面和冠状面上观察到的脊髓纵切面显示受伤后移位、分离或断开。

[0140] 3) .组织学分析

[0141] 在研究末期,将动物安乐死并取出脊髓组织以进行组织学研究,

[0142] 制备脊髓损伤区域和其上下位置的蜡块,用马松三色和Verhoeff染色法或H&E染色法对胶原、网状纤维和弹性纤维进行染色,总之,病变区域通常有或大或小的囊腔,残余或受损/坏死组织,有时密集的疤痕组织,病变的中心就是横截面上最大病变区域。

[0143] 损伤量评估

[0144] 为约2cm的中心病变脊髓节段将用到连续切片技术,给连续的切片拍照,在每一组病变区域的切片图片中都能看见在边界清晰,形态完整的原组织内有退化组织和/或腔体,病变的延喙尾区域是包含病变区域的最喙到尾部的最长距离,损伤量记为:损伤区域(μm) $\times$ 截面距离(μm) $\times$ 区域个数。

[0145] 免疫组织化学

[0146] 免疫组织化学用来检测研究所需的特殊神经元生物标记物或组织细胞因。

[0147] 本发明的有益效果是:

[0148] 1、建立模型:包括手术操作,动物安全保障及护理,脊髓损伤评估和验证,如症状进程打分,MRI扫描和组织学评价。

[0149] 2、探究有效性:包括治疗测试物制备,给药方式,给药频率,资料解析,如特殊生物标记物免疫组织学染色和数据分析。

[0150] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

Monkey hindlimb score.

	Score	
	Left	Right
<i>Corridor walking assay (walking ability as measured by hip, knee, and ankle movements)</i>		
No voluntary movement in large joints (hip, knee or ankle)	0	0
Perceptible movement of 1–2 joints in the hindlimb	1	1
Perceptible movement of 3 joints	2	2
Vigorous movement of 3 joints without weight bearing	3	3
Occasional standing without sustainable weight bearing	4	4
Consistent weight support and able to walk with significant deficits	5	5
Standing and walking (3 m in >3 s)	6	6
Standing and walking (3 m in <3 s)	7	7
Coordinated walking forwards and backwards with intact body turning, jumping, and hopping.	8	8
<i>Hindlimb digital function</i>		
No bar grasp due to flaccid or spastic digits	0	0
Attempts digital movement	1	1
Delay in grasping the bar using digits (palm slips from the bar)	2	2
Delay in grasping the bar with a slow release. Digits of the foot are clumsy while standing.	3	3
Effective movement using digits with rapid shift to a relaxed position as balance is attained. Digits open rapidly to perform the next activity.	4	4

图1

专利名称(译)	一种建立脊髓损伤模型方法		
公开(公告)号	CN110025393A	公开(公告)日	2019-07-19
申请号	CN201810031740.X	申请日	2018-01-12
[标]申请(专利权)人(译)	昆明科灵生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	昆明科灵生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	昆明科灵生物科技有限公司		
[标]发明人	杨立川		
发明人	杨立川		
IPC分类号	A61D1/00 A61D7/00 A61B5/00 G01N33/48		
CPC分类号	A61B5/407 A61B2503/40 A61B2503/42 A61D1/00 A61D7/00 G01N33/48		
代理人(译)	张福敏		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及临床科学研究技术领域，且公开了准备实验材料：1).全套脊髓暴露操作的手术器械；2).大动物脊髓撞击器(该设备申报实用新型专利)；A2.准备动物：1).建模阶段：选用6只成年食蟹猴，雄性，4-6岁，体重4-6kg；2).有效性探究阶段；A3.动物术前健康及基数检查：1).实验安全测试：肝肾功能；2).行动基数评估；3).脊髓MRI扫描基数。该建立脊髓损伤模型方法，具备以下有益效果：1、建立模型：包括手术操作，动物安全保障及护理，脊髓损伤评估和验证，如症状进程打分，MRI扫描和组织学评价；2、探究有效性：包括治疗测试物制备，给药方式，给药频率，资料解析，如特殊生物标记物免疫组织学染色和数据分析。

Monkey hindlimb score.

	Score	
	Left	Right
<i>Corridor walking assay (walking ability as measured by hip, knee, and ankle movements)</i>		
No voluntary movement in large joints (hip, knee or ankle)	0	0
Perceptible movement of 1-2 joints in the hindlimb	1	1
Perceptible movement of 3 joints	2	2
Vigorous movement of 3 joints without weight bearing	3	3
Occasional standing without sustainable weight bearing	4	4
Consistent weight support and able to walk with significant deficits	5	5
Standing and walking (3 m in >3 s)	6	6
Standing and walking (3 m in <3 s)	7	7
Coordinated walking forwards and backwards with intact body turning, jumping, and hopping.	8	8
<i>Hindlimb digital function</i>		
No bar grasp due to flaccid or spastic digits	0	0
Attempts digital movement	1	1
Delay in grasping the bar using digits (palm slips from the bar)	2	2
Delay in grasping the bar with a slow release. Digits of the foot are clumsy while standing.	3	3
Effective movement using digits with rapid shift to a relaxed position as balance is attained. Digits open rapidly to perform the next activity.	4	4