

改良 CCI 大鼠痛行为学检测与损伤区自发放电活动再观察

巨文锋¹ 薛莹¹ 路美玲¹ 张萌斌¹ 李建宁^{1,2△}

(1 陕西师范大学生命科学学院 陕西 西安 710062 2 宁夏医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系 宁夏 银川 750004)

摘要 目的:应用改良 CCI 模型研究外周神经损伤后痛觉过敏和自发放电各自特征及相互关系。方法:雄性 SD 大鼠,随机分为 CCI 组和 Sham 组,分别于术前 1 天和术后 1、4、7、9、11、14 天测定机械刺激缩足反射阈值和热缩腿反射潜伏期,同时选取术侧机械刺激缩腿反射阈值低于 4g 或者术侧和健侧热缩腿反射潜伏期差异大于 2s 的 CCI 模型大鼠观察术后 4-14 天损伤区自发放电活动。结果:神经纤维损伤后,机械痛敏和热痛敏随时间表现为逐渐增强,同时在损伤区观察到三类放电模式:整数倍放电、阵发放电和周期放电。结论:术后大鼠机械痛阈和热痛阈逐渐降低,机械痛敏的产生和损伤区自发放电活动关系密切,不同的放电模式可能代表不同的传入信息。

关键词 改良 CCI 模型 机械痛敏 热痛敏 自发放电

中图分类号:Q95-3 R745 R745.42 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)14-2632-03

Pain Behaviour and Ectopic Spontaneous Discharge in Modified Chronic Constriction Injury Rats

JU Wen-feng¹, XUE-ying¹, LU Mei-ling¹, ZHANG Meng-bin¹, LI Jian-ning^{1,2△}

(1 College of Life Science, Shaanxi Normal University, 710062, Xi'an, China;

2 Department of Biochemistry, Basic College of Ningxia Medical University, 750004, Yinchuan, China)

ABSTRACT Objective: To investigate characteristic and the relationship of the hyperalgesia and spontaneous discharges in modified CCI rat. **Methods:** Male adult SD rats were randomly divided into experiment group(CCI) and control group(Sham).The mechanical withdrawal threshold(MWT) and thermal withdrawal latency(TWL)were detected before operation and on 1d,4d,7d,9d,11d,14d after operation. The rats with MWT less than 4 g or with a TWL the difference of which was higher than 2 s between ipsilateral and contralateral hind paws were selected and used in the subsequent electrophysiological studies. **Results:** Mechanical sensitivity and thermal sensitivity increased significantly in the experiment group compared with that in control group. There were three different Firing patterns: Integer multiple bursting, Intermittent period spiking and Periodic spiking. **Conclusion:** Threshold of mechanical and thermal pain decreased gradually after surgery and the abnormal discharge and the mechanical sensitivity were very close to each other. Different firing patterns may indicate different afferent information.

Key words: Modified Chronic constriction injury model; Mechanical sensitivity; Thermal sensitivity; Spontaneous discharges;

Chinese Library Classification: Q95-3, R745, R745.42 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)14-2632-03

前言

外周神经损伤包括由物理创伤、化学物质中毒、感染、系统或遗传性疾病以及老化、营养代谢障碍引起的神经退行性病。神经损伤后可诱发痛觉过敏和痛觉异常等一系列病理现象,在临床上统称为神经病理性痛,其产生机理和治疗一直是神经生理学家和神经药理学家感兴趣的研究课题^[1-8]。研究显示,外周神经损伤后,动物表现为痛觉过敏,同时在损伤区产生自发放电活动,并对痛觉过敏及自发放电的产生提出了多种可能的解释^[4-10]。然而痛觉过敏的产生和异位放电活动是否密切相关,痛觉过敏及自发放电活动各自特点又如何,到目前并不完全清晰。基于上述认识,本研究选取改良后的 CCI 模型,通过观察术后不同时间点痛阈的变化过程和术后损伤区神经纤维

的自发放电情况,为深入理解神经损伤后痛觉过敏产生机制以及对术后治疗时机的选择都具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物及仪器试剂

健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体重(220±20)g,由西安交通大学医学院实验动物中心提供。动物单笼饲养,置于(23±1)℃和 12 h 昼夜循环的环境中,能够自由地获取水和食物,所有动物均适应环境 7d 后进行实验。Von Frey 细丝购自美国 North Coast Medical 公司;热痛刺激仪 TC-1 购于西安博邦化工技术有限公司。

1.2 动物模型建立

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,随机暴露一

* 基金项目 国家自然科学基金项目(10772101,30770701,30900443) 以及国家高新技术研究和发展项目(863)(2007AA02Z310)

作者简介:巨文锋(1983-)男,神经生物学专业硕士研究生

△通讯作者:李建宁(1976-)男,电话:029-85310269 E-mail:ljn1976@gmail.com

(收稿日期:2011-02-18 接受日期:2011-03-13)

侧坐骨神经, Sham 组只暴露坐骨神经不结扎, CCI 组按照 Bennett 法^[10]分离出一段神经干, 从坐骨神经中枢端到外周端用鼠尾胶原纤维(约 4# 羊肠线直径)依次轻度结扎打三个结, 结间距约 1mm 对坐骨神经形成区段性的慢性压迫。

1.3 机械痛阈值测定(Mechanical withdrawal threshold, MWT)

按 Chaplan 等^[11]的方法, 将大鼠放入底为铁丝网(1cm×1cm)的透明有机玻璃箱(22cm×11cm×19.5cm)内, 让大鼠在此环境适应 15-30min, 待大鼠的梳理和探究活动基本消失后, 用一系列标准化的 Von Frey hairs 刺激大鼠后肢足底中部, 使之形成 S 形, 持续 8~10s, 观察是否出现缩足反应。大鼠在刺激时间内或在移开 Von Frey hair 时立即出现快速的缩足反应, 记为阳性反应, 而身体活动所引起的缩足反应不记作阳性反应。同一足, 同一克数在 5 次测试中, 3 次以上阳性反应, 则认为该克数是痛阈值。每次刺激对侧间隔 15s, 同侧间隔 30s。

1.4 热缩腿反射潜伏期测定(thermal withdrawal latency, TWL)

按 Hargreaves 等^[12]的方法, 将大鼠置于底为 3mm 厚玻璃板的透明有机玻璃箱 (22cm×11cm×19.5cm) 中, 使其适应 15-30 min, 待大鼠的梳理和探究活动基本消失后, 用热辐射刺激仪(150W, 24V)照射大鼠足底中部(落在足底的光斑直径约为 5mm), 记录从照射开始至大鼠出现抬腿回避时间即为 TWL, 照射时间不超过 30s, 以防大鼠足底灼伤。每只大鼠测量 5 次, 同侧间隔 10min, 对侧间隔 5min, 去掉最大和最小值, 计算 3 次 TWL 的平均值。

1.5 单根神经纤维放电记录

术后 4~14d, 选取术侧机械刺激缩腿反射阈值低于 4g 或者术侧和健侧热缩腿反射潜伏期差异大于 2s 的 CCI 模型, 再次暴露损伤区坐骨神经, 并以 34~35℃ 的正常灌流液灌流损伤区。在距损伤区约 20mm 的中枢端处暴露坐骨神经, 分离神经细束, 使之仅与损伤区相连, 用 Powerlab 系统(Australia)记录单

根 Aδ 纤维放电, 采样频率为 10.0kHz。并统计术后进行大鼠有效神经单纤维自发放电类型及数量(有效标准以直接搭上电极后即有自发放电, 搭上后利用 5Mm EGTA 对损伤区进行灌流后出现放电即为无效单纤维)。

1.6 统计学方法

数据采用 Origin7.0 进行分析, 组间比较采用 Independent-t 检验, 数据以均数±标准误表示(Mean±SEM)。以 P<0.05 作为差异显著性标准。

2 结果

2.1 动物模型行为表现

术后所有大鼠均保持良好状态, 无明显伤口感染现象, Sham 组大鼠活动正常。CCI 组大鼠术侧均出现爪内收, 足趾并拢并呈轻度外翻, 成防御姿势, 不负重。运动时明显跛行, 膝关节着地, 手术侧足掌拖行。

2.2 两组大鼠术后 MWT 变化

手术前(d0)CCI 组和 Sham 组大鼠的 MWT 组间比较无统计学差异(N=10, P>0.05)。术后 1d, Sham 组大鼠术侧机械痛阈值明显下降, 和 CCI 组比较, 二者有极显著性差异(N=10, P<0.01)。术后 4d, CCI 组开始表现出明显的机械痛敏, 随后 MWT 逐渐变小, 而 Sham 组则逐渐恢复到正常基础值状态。术后 11d 二者比较有显著性差异(N=10, P<0.05), 术后 14d 二者比较有极显著差异(N=10, P<0.01)(图 1A)。

2.3 两组大鼠术后 TWL 变化

手术前(d0)CCI 组和 Sham 组大鼠的 TWL 组间比较无统计学差异(N=10, P>0.05)。CCI 组大鼠术后随时间, TWL 逐渐变小, Sham 组则术后 1d 和 4d 的 TWL 有所下降, 随后逐渐恢复到正常的基础值。两组组间比较术后均有极显著差异(N=10, P<0.01)(图 1B)。

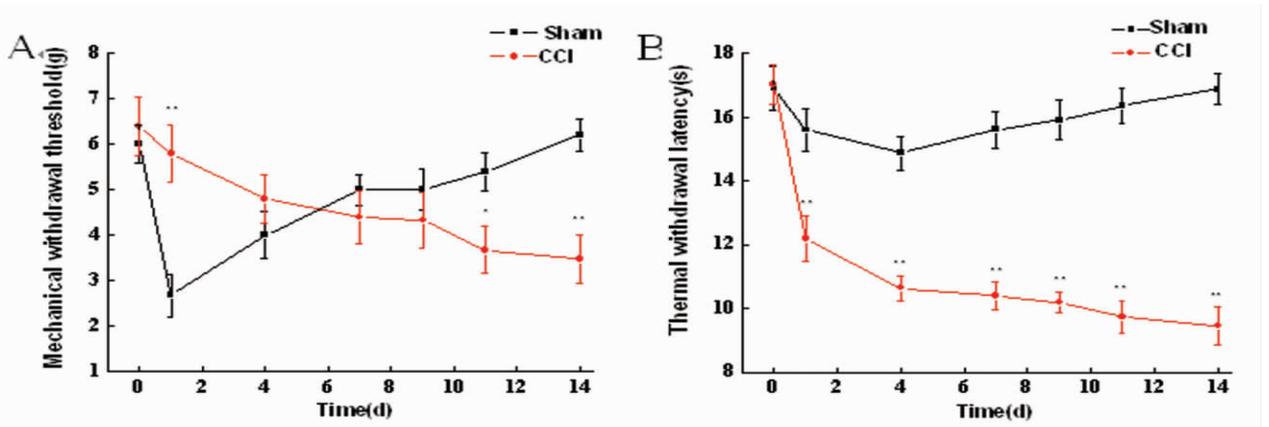


图 1 两组大鼠 MWT(g)及 TWL(s)测量结果 (A)两组大鼠 MWT (g)随时间变化测量结果。(B)两组大鼠 TWL (s)随时间变化测量结果。

Fig.1 Pain behavior of CCI model rats and Sham model rats. (A). Mechanical withdrawal threshold of CCI model rats and Sham model rats. (B). Thermal withdrawal latency of CCI model rats and Sham model rats.

2.4 电生理观察结果

在术后 4d~14d 内, 记录到大量自发放电活动, 统计搭上电极有效单纤维 80 例后发现, 共有三类放电模式: (1) 整数倍放电 3 例(图 2A), 放电与休止期随机交替出现, 休止期是连续放电间期的整数倍。(2) 阵发放电 31 例(图 2B), 表现为连续快

速的放电和较长的休止期状态交替出现的一种放电形式, 其放电持续时间以及休止期的出现均无明显的周期性, 变异较大。(3) 周期放电 44 例(图 2C), 放电节律规律的重复着原有放电模式。另外无放电 2 例, 搭上电极后无放电, 滴加 5Mm EGTA 后出现放电。

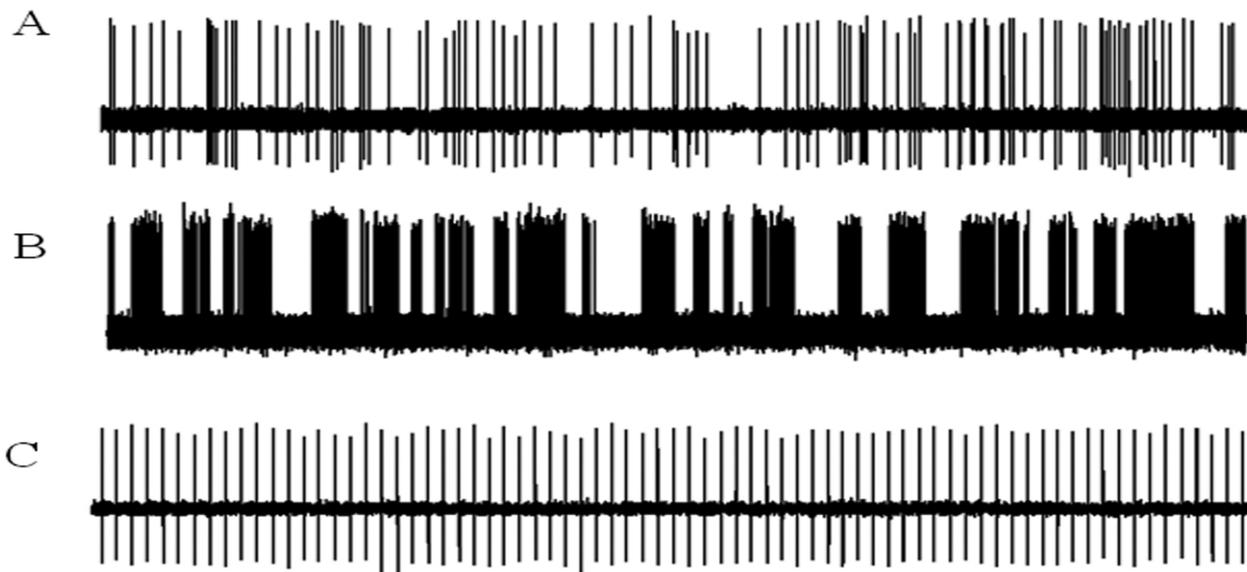


图2 神经损伤后自发放电模式 (A)整数倍放电.(B)阵发放电.(C)周期放电.

Fig.2 Sample of spontaneous activity of three different fibers.(A).integer multiple bursting.(B).Intermittent period spiking.(C).Periodic spiking

3 讨论

CCI 模型的典型特点是粗的有髓纤维选择性损伤,而大量的细的无髓纤维相对保持完好。研究证实,粗的有髓纤维对机械刺激比较敏感,无髓纤维则对热刺激更敏感^[13]。由于大量的对热敏感的无髓纤维相对保持完好,从术后 1d 起,大鼠就对热刺激表现敏感。手术本身,因手术而产生的炎症、免疫性反应以及损伤区的自发放电活动,增加了中枢的敏化程度,从而使得大鼠对机械刺激和热刺激随时间表现为逐渐敏感。对于 Sham 组机械痛敏和热痛敏的变化可能是手术本身所致。

实验表明,神经损伤后自发放电至少存在三种模式:整数倍放电、阵发放电及周期放电。在术后 4-14 天,三种不同节律的出现从时间角度分析,并未有明显的先后次序。但经统计,自发放电节律主要是周期放电与阵发放电,节律出现类型相对稳定(75 例/80 例, 93.75%)。相关研究表明,自发放电在外周神经损伤后 2-14 天就可以记录到^[9,14]。应用相应的离子通道阻断剂阻断外周神经损伤产生的异位放电活动,可明显提高机械痛阈^[15]。基于以上实验结果,推测大量的自发放电与痛觉过敏的产生密切相关。

本实验中选用同种大鼠鼠尾胶原纤维作为结扎用线,代替了一直以来 CCI 模型采用的羊肠线,同时动物的手术和行为学操作由同一人完成,减少了实验的干扰因素。改良后的 CCI 模型可出现稳定的痛觉过敏与自发放电,除了对以往研究印证的同时,也提示痛觉过敏的产生与自发放电存在着密切的联系。该结果可以作为对以往 CCI 模型电生理及行为学认识上新的补充,同时也提示可以通过对自发放电节律的研究来深入了解其痛行为,如痛的耐受性和习惯性等。也可利用行为学异常反过来了解其放电情况,继而了解其内在的动态变化,从而为神经病理性痛的深入研究及治疗提供参考。

参考文献(References)

[1] Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes [J]. Neurology, 2008,70(18):1630-1635
 [2] Thomas RT. Challenges with current treatment of neuropathic pain[J]. European Journal of Pain Supplements, 2010, 4(2):161-165

[3] Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain[J].pain, 2010,150(3):573-581
 [4] Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain[J]. Brain Research Review, 2006,51(2):240-264
 [5] Devor M. Neuropathic pain and injured nerve: peripheral mechanisms [J]. British Medical Bulletin, 1991, 47(3):619-630
 [6] Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain[J]. Neuron, 2006,52(1):77-92
 [7] Jensen TS, Finnerup NB. Neuropathic pain: Peripheral and central mechanisms [J].European Journal of Pain Supplements, 2009, 3(2): 33-36
 [8] Stein C, Clark JD, Oh U, et al. Peripheral mechanisms of pain and analgesia[J]. Brain Research Reviews, 2009, 60(1):90-113
 [9] Tal M, Eliav E. Abnormal discharge originates at the site of nerve injury in experimental constriction neuropathy (CCI) in the rat[J]. Pain, 1996,64(3):511-518
 [10] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. Pain, 1988,33(1):87-107
 [11] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. Neuroscience Methods,1994,53(1): 55-63
 [12] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia [J]. Pain,1988,32(1):77-78
 [13] Shir Y, Seltzer Z. A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats[J]. Neuroscience Letters, 1990,115 (1):62-67
 [14] Kajander KC, Bennett GJ. Onset of a painful peripheral neuropathy in rat: a partial and differential deafferentation and spontaneous discharge in A beta and A delta primary afferent neurons[J]. Neurophysiology, 1992, 68(3):734-744
 [15] Jiang YQ, Xing GG, Wang SL, et al. Axonal accumulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels contributes to mechanical allodynia after peripheral nerve injury in rat[J]. Pain, 2008, 137(3):495-506