

经眶下孔注射相关炎症因子 制造大鼠三叉神经痛模型的实验研究

马腾飞¹, 王霁蕾¹, 黄姗姗¹, 秦 健², 韩 良¹, 赵 利¹, 肖芳莉¹, 汪 聪¹, 王元银¹

摘要 目的 经 SD 大鼠眶下孔注射炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 以制造一种新型的大鼠三叉神经痛 (TGN) 模型。方法 将大鼠随机分为 4 组, 即生理盐水组 (NS 组)、TNF- α 组、IL-1 β 组、TNF- α + IL-1 β 组; 各组分别于大鼠眶下孔注射等量的生理盐水和 TNF- α 或 IL-1 β 。观察并比较注射后不同时段各组大鼠注射侧触须垫机械痛阈、自发行学改变以及电镜观察组织改变。结果 从注射后 3 d 至注射后 8 周, 各炎症因子注射组大鼠均出现注射侧触须垫痛觉过敏及搔抓面部次数增多, 同 NS 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各炎症因子注射组间差异无统计学意义。各炎症因子注射组大鼠眶下神经及三叉神经节均出现不同程度的脱髓鞘改变, 而 NS 组大鼠则无脱髓鞘现象。结论 利用炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 经大鼠眶下孔注射, 可使大鼠产生类似 TGN 症状和病理学变化, 该 TGN 模型更接近于临床且造模方法简便。

关键词 三叉神经痛; 动物模型; 炎症因子; 脱髓鞘; 眶下孔注射

中图分类号 R 392.114; R 745.11; R 965.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0753-04

疼痛是一种复杂的生理心理活动, 是大多数疾病具有的共同症状, 是临床上最常见的症状之一。三叉神经痛 (trigeminal neuralgia, TGN) 是神经病理性疼痛的一种, 指的是在三叉神经分布区域内出现的反复发作性短暂、剧烈疼痛。在面部或口腔具有“扳机点”, 刺激可致其发作, 时间持续数秒至数分钟不等, 发作间歇期可无明显症状。TGN 作为临床上的疑难杂症, 一直以来都是研究的热点和难点; 为探讨其发病机制, 建立一种简单、稳定、与临床接近

的模型很有必要。目前研究 TGN 的动物模型有多种, 如光化学损伤诱导 TGN 大鼠模型^[1]、慢性缩窄环术 TGN 动物模型^[2]等, 这些模型与 TGN 患者的致病原因和病理学改变并不十分类似。该研究经大鼠眶下孔注射炎症因子制造 TGN 模型, 经检测该模型更接近于临床患者致病原因和病理学改变, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 成年雄性 SD 大鼠, 普通级, 购自安徽医科大学实验动物中心, 180 ~ 200 g, 常规饲养、自由饮水, 温度控制在 18 ~ 25 °C, 湿度控制在 40% ~ 50%, 12 h 交替照明。实验开始前 1 周用 VonFrey hairs 疼痛测试棒适应性刺激大鼠待注射侧眶下神经 (infraorbital nerve, ION) 支配的颜面部触须垫^[3], 每日连续刺激 5 次, 选用对以上刺激反应平静的大鼠用于造模。

1.2 实验分组及造模方法 将符合实验标准的大鼠随机分为 4 组, 即生理盐水组 (NS 组)、TNF- α 组、IL-1 β 组和 TNF- α + IL-1 β 组, 每组 10 只。各组注射方法一致, 即将实验大鼠以 10% 水合氯醛 (0.35 ml/100 g) 行腹腔注射麻醉, 待麻醉显效后, 对注射侧触须垫常规消毒后; 一只手固定大鼠头部, 另一手持微量注射器自注射侧鼻翼旁约 1 cm 处刺入皮肤, 使注射针与皮肤呈 45°, 向上、后进针约 1.5 cm, 刺入眶下孔; 分别注入 5 μ l 生理盐水或炎症因子 (用 0.1% 牛血清白蛋白配制的 TNF- α 、IL-1 β , 浓度为 0.01 ng/ μ l)。其中 TNF- α + IL-1 β 组注入 TNF- α 、IL-1 β 各 2.5 μ l。操作均在无菌条件下进行。

1.3 模型的验证

1.3.1 眶下神经支配区机械痛阈测定 参照 Christensen^[4]、Vos^[5]等的标准, 将大鼠置于鼠笼中, 安静放置 10 min 适应周围环境后, 持 VonFrey hairs 疼痛测试棒缓慢接近大鼠, 刺激大鼠注射侧触须垫, 刺激过程中测试棒强度缓慢增加, 每个刺激强度刺激 10 次, 2 次刺激应至少间隔 30 s。大鼠的阳性反

2015-03-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81271162); 安徽省自然科学基金 (编号: 11040606M204); 高等学校省级优秀青年人才基金 (编号: 2012SQRL070)

作者单位: ¹ 安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院、安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

² 合肥新民医院三叉神经科, 合肥 230041

作者简介: 马腾飞, 男, 硕士研究生;

王元银, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wyy1970548@sohu.com

应包括:①大鼠快速抓咬刺激物,表现出攻击行为;②受到刺激后快速后退,为避免面部进一步受到刺激,蜷缩身体向笼壁靠拢,或将头面部藏在身体下;③连续搔抓面部受刺激区域,通常合并后退动作。出现以上3种反应中任意1项或1项以上即认为是刺激实验阳性。使大鼠产生阳性反应的细丝强度最小值即为注射侧触须垫机械痛阈值。

1.3.2 自发行为学视频检测 将大鼠放置在一个透明的有机玻璃格子里面,在其上方1 m处放置摄像机,记录各组大鼠搔抓面部次数。搔抓面部动作包括用前肢或后肢搔抓面部或头部,实验时,先将大鼠置于玻璃格子内10 min,等大鼠平静后,间断用摄像机录像6 h,记录各组大鼠的抓脸次数并加以比较。

1.3.3 电镜观察 于注射后2周,每组取5只大鼠断头处死,急性分离出注射ION及三叉神经节(trigeminal ganglion, TG),用尖刀片制成1 mm×1 mm×1 mm大小,置于2.5%戊二醛中固定6~12 h,1%锇酸后固定1~2 h,后经过30%、50%、80%至100%乙醇溶液梯度脱水、环氧树脂包埋、行超薄切片(片厚70 nm),电子染色(铅、铀染色)等处理后,用日产JEM-4230型透射电镜观察,用数码相机记录图像。

1.4 统计学处理 使用SPSS 16.0软件进行统计分析,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 注射侧触须垫机械痛阈的变化 与注射前相比较,NS组大鼠的机械痛阈无明显改变。不同炎症因子注射组的大鼠从注射炎症因子后第3天开始均出现不同程度的痛觉过敏,轻微刺激其注射侧触须垫,大鼠即出现抓咬刺激物、躲避或快速搔抓面部受刺激区域;在于注射后2~3周最为明显,即各炎症因子注射组大鼠眶下神经分布区触须垫机械痛阈达最低点。该痛觉过敏症状持续至注射后8周,在注射后第10周检测时基本恢复至注射前水平。见图1。将注射后第2周和第3周的机械阈值采用单因素方差分析,进行组间统计学分析;结果显示,第2、3周时,同NS组相比,各炎症因子注射组机械痛阈明显降低($F=149.872, 121.268, P<0.05$);各炎症因子注射组间机械痛阈差异无统计学意义。

2.2 自主行为学视频检测 采用单因素方差分析,

NS组、TNF- α 组、IL-1 β 组和TNF- α +IL-1 β 组注射前的抓脸次数差异无统计学意义。与注射前相比较,NS组大鼠注射生理盐水后各时间段的抓脸次数差异无统计学意义。与NS组以及本组注射前相比较,TNF- α 组、IL-1 β 组以及TNF- α +IL-1 β 组的大鼠抓脸次数于注射后1~6周均出现明显增多,其中注射后第2周大鼠的抓脸次数最多,注射后第6周抓脸次数有所下降,在注射后第8周,各炎症注射组大鼠的抓脸次数恢复至正常。见表1。

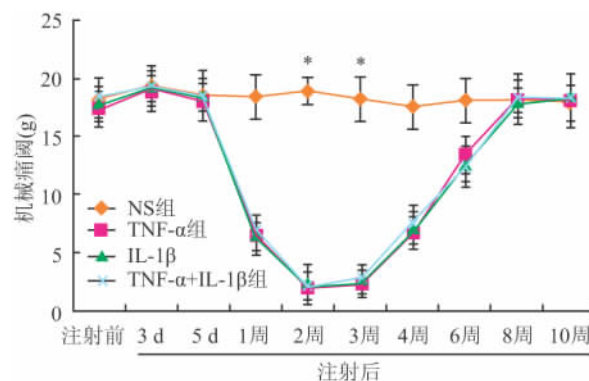


图1 4组大鼠触须垫机械痛阈的变化

与其余3组比较: * $P<0.05$

表1 4组大鼠注射前和注射后抓脸次数的统计结果($\bar{x} \pm s$)

项目	NS组	TNF- α 组	IL-1 β 组	TNF- α +IL-1 β 组	F值
注射前	2.2±0.98	2.2±0.40	2.6±0.49	2.2±0.75	-
注射后3天	2.8±0.75	2.6±0.49	3.0±0.63	2.0±0.63	-
注射后5天	2.4±1.02	3.2±0.75	2.6±0.80	2.6±0.8	-
注射后1周	2.8±0.74	7.0±1.41 ^{###}	6.8±0.74 ^{###}	6.0±1.79 ^{###}	9.612
注射后2周	2.4±0.80	9.2±1.16 ^{###}	8.8±1.47 ^{###}	9.2±1.17 ^{###}	32.309
注射后3周	2.2±0.40	7.6±1.02 ^{###}	7.4±0.49 ^{###}	7.2±1.17 ^{###}	38.781
注射后4周	2.0±0.63	6.2±0.75 ^{###}	5.8±1.17 ^{###}	6.0±1.41 ^{###}	14.914
注射后6周	2.6±1.01	5.4±1.02 ^{**}	4.6±1.02 ^{**}	4.2±1.17 ^{**}	4.952
注射后8周	2.4±0.80	3.2±1.17	3.2±1.17	3.0±0.63	-

与NS组比较: [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$;与注射前比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

2.3 电镜观察 在NS组生理盐水注射后第2周,大鼠ION及TG神经纤维髓鞘板层致密,呈圆形或卵圆形,雪旺氏细胞结构清晰,细胞胞浆均匀,内见圆形的线粒体,无髓神经纤维呈簇状由雪旺氏细胞包裹间杂分布于其间。在炎症因子注射后第2周,大鼠ION及TG神经纤维的髓鞘板层松解增厚,呈卷发样变,呈虫噬样、空泡样改变,无髓神经纤维减少甚至消失。见图2。

3 讨论

近年来,关于疼痛和炎症因子之间联系的研究

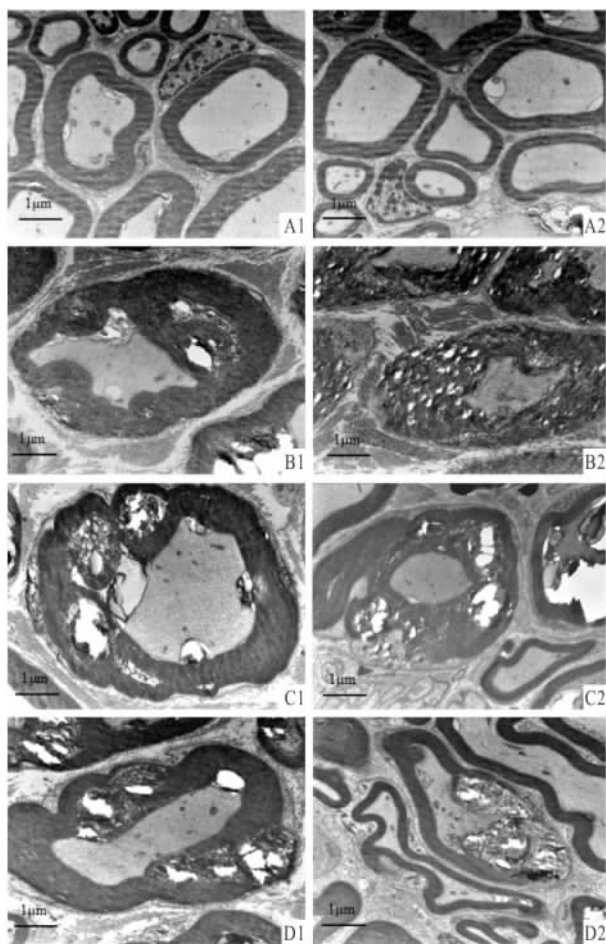


图2 4组大鼠 ION 及 TG 电镜检测典型结果 铅、铀染色 $\times 5\,000$
A: NS 组; B: TNF- α 组; C: IL-1 β 组; D: TNF- α + IL-1 β 组; 1: ION;
2: TG

日益增多,如在脊髓周围施用外源性 IL-1^[6-7]引起机械痛觉超敏和热痛觉过敏;硬脑膜外注射 IL-1 受体拮抗剂可以改善大鼠腰神经根性疼痛相关性行为^[8]。同样在大鼠坐骨神经注射 TNF 观察到了轴突和髓鞘的破坏^[9]。Shi et al^[10]在大鼠糖尿病模型中,检测到 TNF- α 表达增高和坐骨神经脱髓鞘改变,而用 TNF- α 抑制剂则能明显改善上述症状。

TGN 的病因有多种学说,病灶感染学说是其中之一。由于局部的炎症反应,局部炎症因子表达增高,三叉神经髓鞘被破坏,脱髓鞘的轴突与邻近的无髓纤维发生“短路”。近来有研究^[11]指出,神经的兴奋可通过脱髓鞘轴突并列形成的伪突触传递和交叉后释放形成正反馈放大,所以刺激颌面部及口内“扳机点”可诱发整群纤维兴奋而导致一阵疼痛发作。本实验基于该学说来进行造模。各炎症因子注射组大鼠从注射后第 3 天开始,触须垫处出现痛觉过敏,于注射后 2 周最为明显,此时,各组大鼠 ION

分布区触须垫机械痛阈达最低点,极低的刺激都可以引起大鼠出现攻击、躲避等行为。各组与同期的 NS 组相比,差异有统计学意义。各炎症因子组进行两两组间比较,差异无统计学意义。痛觉过敏症状能够持续炎症因子注射后 8 周,第 10 周时基本恢复至正常。

当动物受到各种慢性伤害性刺激时,会做出一系列的保护性动作,比如搔抓面部^[12]。本研究观察到的搔抓面部动作包括用前肢或后肢搔挠面部或头部,此动作在既往的疼痛学研究中多次提及,如在大鼠面部注射福尔马林建立的面痛模型^[13]等。在本实验中,各炎症因子注射组大鼠同注射前以及同期 NS 组相比,出现明显增多的抓脸行为,于注射后 2 周达到最高峰。这与 TGN 患者疼痛发作时为了减轻疼痛而用手紧按患侧面部或用力揉搓痛处的临床表现类似。

本研究电镜结果显示,NS 组 ION 及 TG 神经纤维髓鞘板层致密,呈圆形或卵圆形;雪旺氏细胞结构清晰,细胞胞浆均匀,内见圆形的线粒体;无髓神经纤维呈簇状由雪旺氏细胞包裹间杂分布于其间。而各炎症因子注射组的 ION 及 TG 均观察到不同程度的脱髓鞘病变,部分神经纤维的髓鞘板层松解增厚,呈卷发样变,呈虫噬样、空泡样改变,无髓神经纤维减少甚至消失。不过,在被检测的标本中,有部分同时也观察到了髓鞘再生的出现,说明在这模型上这种病理改变是可逆的。可能原因是由于本研究仅注射 1 次炎症因子,这些炎症因子足以造成神经纤维脱髓鞘和致痛作用;当这些炎症因子在体内下降后,机体会通过一系列未知的调节机制修复髓鞘。这也与临床上 TGN 患者间断发作相一致。提示若能揭示髓鞘修复机制,将对 TGN 的治疗提供很好的理论依据。

本实验在注射炎症因子后,通过检测大鼠触须垫机械痛阈、自主行为学视频观察以及组织电镜改变,成功地观察到了大鼠类似 TGN 的症状,证明了经大鼠眶下孔注射炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 制造 TGN 模型是可行的。相对于其他模型,该造模方法简单,对大鼠的创伤最小;采用多种方法进行验证,模型与临床上 TGN 相接近,可用于对 TGN 发病机制和治疗等方面的研究。

参考文献

- [1] 崔悦,赵佳,王晔,等.一种光化学损伤诱导的三叉神经

- 痛大鼠模型的建立[J]. 中国药理学通报 2014, 30(7):1026-30.
- [2] 孙 晖, 李国超, 王元银, 等. 眶下神经慢性缩窄环三叉神经痛动物模型的研究进展[J]. 医学综述 2013, 19(12):2113-6.
- [3] 张 亮. 局部施用辣椒素治疗原发性三叉神经痛的实验研究[D]. 南京:东南大学 2007.
- [4] Christensen D, Gautron M, Guilbaud G, et al. Combined systemic administration of the glycine/NMDA receptor antagonist, (+)-HA966 and morphine attenuates pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain[J]. *Pain*, 1999, 83(3):433-40.
- [5] Vos B P, Strassman A M, Maciewicz R J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve[J]. *J Neurosci*, 1994, 14(5 Pt 1):2708-23.
- [6] Falchi M, Ferrara F, Gharib C, et al. Hyperalgesic effect of intrathecally administered interleukin-1 in rats[J]. *Drugs Exp Clin Res* 2001 27(3):97-101.
- [7] Reeve A J, Patel S, Fox A, et al. Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat[J]. *Eur J Pain* 2000 4(3):247-57.
- [8] 毛吉刚, 陈根元, 萧文耀, 等. 大鼠腰神经根性疼痛相关行为变化与硬膜外注射白细胞介素-1受体拮抗剂干预的影响[J]. 中国临床康复 2005 9(18):129-31.
- [9] Wagner R, Myers R R. Endoneurial injection of TNF- α produces neuropathic pain behaviors[J]. *Neuroreport*, 1996, 7(18):2897-901.
- [10] Shi X, Chen Y, Nadeem L, et al. Beneficial effect of TNF- α inhibition on diabetic peripheral neuropathy[J]. *J Neuroinflammation*, 2013, 10:69.
- [11] 邱蔚六, 张震康. 口腔颌面外科学[M]. 人民卫生出版社, 2010:348-52.
- [12] Matsuyama Y, Sakuma Y, Suzuki M, et al. Evaluation of behavior and expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in dorsal root Ganglia after sciatic nerve compression and application of nucleus pulposus in rats[J]. *Asian Spine J* 2014 8(5):557-64.
- [13] 姚红艳. 神经妥乐平 and 丙戊酸钠对大鼠面部疼痛的影响[D]. 郑州大学 2003.

An experimental study of injecting inflammatory cytokines through infraorbital fossa to manufacture rat model of trigeminal neuralgia

Ma Tengfei, Wang Jilei, Huang Shanshan, et al

(College of Stomatology, Anhui Medical University, The Affiliated stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province Hefei 230032)

Abstract Objective To establish a rat model of trigeminal neuralgia by injecting inflammatory cytokines, TNF- α and IL-1 β through infraorbital foramen. **Methods** Rats were randomly divided into four groups: normal saline group, TNF- α group, IL-1 β group and TNF- α + IL-1 β group. Rats in each group were injected with the same equivalent of normal saline and TNF- α or IL-1 β , respectively. The mechanical withdrawal threshold of the injecting side of vibrissa pad, video detection of spontaneous behavior and the organizational change in electron microscopy were observed and compared in each group of rats. **Results** From 3 d to 8 w after injection, rats in all cytokines injecting groups appeared hyperalgesia in the vibrissa pad. And there was an increased frequency of scratching the face at the same time. Compared with the normal saline group, it was significantly different ($P < 0.05$). However, there was not significant difference among TNF- α group, IL-1 β group and TNF- α + IL-1 β group. Nerve demyelinations were observed in both infraorbital nerve and trigeminal ganglion in all cytokines injecting group, while there was no demyelination in the normal saline group. **Conclusion** Injecting cytokines, TNF- α and/or IL-1 β can make a trigeminal neuralgia model which is easy to operate and very close to the trigeminal neuralgia in clinic.

Key words trigeminal neuralgia; animal model; inflammatory cytokines; demyelination; infraorbital foramen injection