

慢性压迫性损伤模型制备因素及模型评价方法的研究进展

马 艳 张方博 刘 欣 许海玉 杨洪军

摘 要 慢性压迫性损伤模型(Chronic constriction injury model, CCI)是一种常用的神经病理性疼痛动物模型,制备相对简单,即结扎坐骨神经主干而造成轻微压迫损伤,但其损伤程度较难控制,制备所得的模型成功率不高(50%)。本文就慢性压迫性损伤模型的制备、评价方法以及痛敏感区域等方面进行总结,比较使用不同材料制备模型对疼痛敏感度的影响,论述模型制备过程中的注意事项,及当前模型存在的若干问题,为此模型的改进和研究应用提供参考和依据。

关键词 慢性压迫性损伤模型 模型制备 模型评价

[中图分类号] R74

[文献标识码] A

神经病理性疼痛是指由于外周或中枢神经系统损伤、病变、功能紊乱所引起的疼痛,为慢性疼痛疾病的一种。在普通人群中的发生率约为7%,中国约有1600万例神经病理性疼痛患者^[1]。其临床表现为自发性疼痛(如刺痛、灼烧样或触电样疼痛)、感觉迟钝、痛觉异常(即对正常的无害刺激也产生疼痛的反应)、痛觉过敏(即对伤害性刺激的反应性明显增强)^[2]。

目前神经病理性疼痛模型较多,如神经瘤自残模型,复制临床幻肢的症状,造成含神经瘤的神经细束特别是C类纤维大量自发放电;脊神经选择性结扎模型(SNL),在背根神经节附近损伤部分脊神经,其疼痛位点明确;坐骨神经分支选择性结扎模型(SNI),结扎并截断腓总神经和胫骨神经,游离腓肠神经^[3~5]。与这些神经性疼痛模型相比较,另一种广泛应用的模型——慢性压迫损伤性模型(CCI)是神经病理性疼痛与炎症性疼痛的复合模型,轻微结扎坐骨神经主干,使粗的有髓鞘纤维选择性损伤但仍保留大部分传递疼痛的C类纤维,能较好地模拟临床上由于外周神经的选择性A-纤维损伤而诱发的慢性疼痛。因而,本文选择CCI模型为研究对象,对该模型制备的相关因素进行综述,以期对模型的改进和深入研究提供依据。

一、CCI模型的特点

CCI模型的特点是轻度结扎坐骨神经诱发神经内水肿膨胀,从而使神经自缢,损伤区远端的有髓鞘纤维几乎完全损伤,但仍保留大部分无髓鞘纤维(图1)^[6]。模型为神经病理性疼痛和炎症性疼痛的复合模型,疼痛是由于轴突损伤引起的异位放电和结扎线处炎症细胞释放的炎症介质分子刺激产生异位敏感度提高所致。造模成功后,动物出现自发痛的行为表现(如出现术侧足趾头蜷缩、足底不负重、爪外翻,反复地抖动、保护或舔舐受伤侧后爪等),并产生明确的热痛敏、机械性异常痛敏、冷痛敏、触诱发痛以及其他感觉倒错等症状,且可保留2~3个月^[7]。

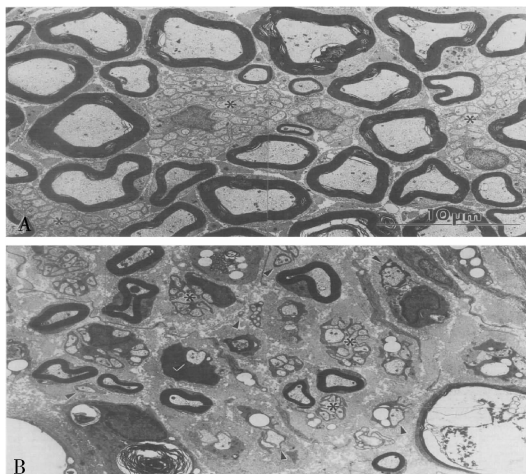


图1 坐骨神经损伤神经纤维存在情况

A. 近端中有髓鞘纤维完整存在, B. 远端中大直径或中等直径的有髓鞘纤维几乎都被损伤(黑箭头标示),而无髓鞘纤维仍保留大部分(*标示)^[6]

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81202793); 中国中医科学院自主选题项目(Z02063)

作者单位: 100700 中国中医科学院中药研究所

通讯作者: 杨洪军, 研究员, 电子邮箱: hongjun0420@vip.sina.com

二、CCI 模型的制备

1988 年 Bennett 等^[8]首次报道 CCI 模型,具体操作如下:雄性 SD 大鼠,戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射麻醉,大鼠俯卧位固定,从大鼠左后肢大腿中后部切开皮肤,用止血钳经股二头肌间隙钝性分离、暴露坐骨神经,在大鼠坐骨神经三根分叉上游主干部位游离一段 7mm 左右神经,以 4-0 铬制羊肠线轻度结扎,双结固定,共结扎 4 处,间距 1mm 左右,受影响神经约 4~5mm 长,结扎强度以坐骨神经表面血管轻度受压,在显微镜($\times 40$)放大下观察神经表面,可见神经外膜血流受压迫但未中断,有时能看到周围暴露的肌肉微小抽搐,术后分层缝合伤口。

1. 结扎材料对模型制备的影响:(1)铬制羊肠线:羊肠线是一种异体蛋白,在被组织吸收的过程中,会使机体发生非特异性炎症反应,用铬酸处理过的铬制羊肠线,不但能减慢组织吸收的速度,延长维持应力的时间,同时能释放出潜在化学物质或毒性物质促进神经的水肿自缢^[9]。制备模型时,事先将铬制羊肠线截成约 5cm 的小段,并用灭菌生理盐水浸泡 30min,按 Bennett 和谢益宽模型制备的方法,用铬制羊肠线轻度结扎坐骨神经主干,至肠线结贴近神经干两侧(长径),形成微小压迫,间隔约 1mm,结扎 4 道。用肠线材料制备此模型时,一定需用生理盐水浸泡,使其伸直、变软,可避免打结时因线卷曲在线上形成小疙瘩而妨碍打结,也可以增强手感而掌握松紧度。结扎第 2 个扣结时只需轻轻靠在第 1 个结上,过紧会压迫第 1 个结,过松易滑脱,均会导致模型失败。为了防止大鼠苏醒活动导致肠线松动,每个单结可用 7-0 的普通丝线紧密绑扎^[10]。此外,羊肠线头两端各留 0.5mm 左右,太短易使线结松动,太长易卷入下一个扎扣内^[11]。(2)普通丝线:丝线材料容易获得,其柔韧性较羊肠线较好且细,结扎神经时较肠线更有手感,Ankesh 等^[12]就用此材料结扎造模,其结扎基本同肠线,先用生理盐水浸泡 4-0 的丝线,在坐骨神经干中部间隔 1mm 均匀结扎 4 道。松紧程度也同肠线结,即对神经干的两侧形成微小的压迫。在结扎时要轻柔缓慢,否则容易结扎过紧导致神经坏死、萎缩而影响造模。(3)PE 管:PE 管为聚乙烯材质,其内径是固定的,可规避由于外力引起的松紧问题。神经的粗细可通过套管的弹性,撑开开口来得到缓冲。Coderre 等^[13]和 Ikeda 等^[14]将 PE 管截成 2mm 长的小段,从坐骨神经长径的一侧套入管内固定,转动管使其开口朝上。但 PE 管易出现脱落或半脱位而

造成模型失败。

有研究人员用不同内径的 PE 管束缚坐骨神经,发现管的内径大小导致的神经轴突改变与疼痛相关行为不存在太大的关系,并认为损伤部位局部内神经微环境的改变(如生化环境、伤害性感受器敏感度、传输脉冲的改变或内神经压力的增加)可能是导致外周疼痛的关键因素^[15]。

不同材料均能制备出较理想的模型,但各有利弊。就造模后手术侧后爪表现出异常姿态的时间来讲,铬制羊肠线的时间较长,平制羊肠线次之,聚乙烯管最短^[16]。同时,肠线制备的 CCI 模型异常性机械痛敏和热痛敏较其他两种材料制备的模型明显,但肠线的吸水膨胀系数较其他两种材料大,易引起神经干的过度压迫而造成模型失败;丝线结扎虽较肠线手感好,但异常性机械痛敏和热痛敏远没有肠线典型;PE-90 管对神经的压迫较一致,操作也较简单,但套管易脱落,且异常性机械痛敏和热痛敏也不如于肠线^[17]。

2. 结扎强度对模型制备的影响:不论用哪种材质结扎坐骨神经,均不能影响动物的正常生理活动,且不出自噬现象。结扎强度的控制是此模型制备的关键。坐骨神经为带状扁椭圆,当线结已轻度压迫神经干两侧(长径),上下侧仅刚接触神经,即打开结神经干两侧有较明显的缢痕,而上下侧不明显。一般以手术侧暴露的肌肉微微颤动为宜,若出现整条腿的收缩则说明结扎过紧。此外,也可从神经伴行血管辨别松紧的程度,伴行坐骨神经各有一条动、静脉,肉眼隐约可见的是静脉,而动脉需在体视显微镜下才能观察到,可打好结放置几分钟,若静脉由隐约可见到较清晰则打结合适,若有充血出现,则表明结扎太紧^[17]。结扎过紧,动物会出现自噬现象,甚至出现至少一个趾头被咬噬至第二趾骨,而啃示指甲预示自残包括组织损伤^[8],导致痛觉缺失或不敏感,影响后续的行为学指标的观察;反之,结扎过松,未造成对坐骨神经的压迫,动物神经病理性疼痛不明显,行为学指标观察无显著性差异,两种均为不成功模型,在制备和后续观察时应及时剔除。

3. 其他因素对模型制备的影响:沈立姿等^[18]比较丝线和羊肠线两种不同材料及不同结扎道数对大鼠 CCI 疼痛模型的影响,发现羊肠线 2 道、3 道、4 道组,以及丝线 3 道、4 道组均能产生稳定的神经病理性疼痛,综合模型评价是否出现自噬现象,发现以羊肠线结扎 2 道组最好,操作简便又节省时间。另外,

有研究发现实验动物性别、年龄、饮食对 CCI 模型的制备有一定的影响^[19,20]。同时, Yamato 等^[21]和 Paula - Freire 等^[22]成功制备了小鼠 CCI 模型。

三、CCI 模型的评价方法

1. 机械触摸痛:将测定的大鼠置于干净透明的观察笼内,使其至少适应 15min,直至笼勘探和主要梳理工作停止。选用 0.4 ~ 15.0g 的 Von Frey 纤维丝,垂直足底面刺激直至纤维丝尖端弯曲并持续 6 ~ 8s,测定区域固定在足底中央,避开不敏感的足垫部位。根据 Dixon 的 up and down 方法推算 50% 缩足阈值,若大鼠在测试时间内或在移开 Von Frey 纤维丝时立即出现快速的缩足或舔足反应,则记为阳性反应“×”;若无反应,则为阴性反应“0”,测定首先从中等力度 2.0g 的 Von Frey 纤维丝开始,当该力度不能引起阳性反应时,给予相邻大一级的力度刺激;若出现阳性反应,则给予相邻小一级的力度刺激,如此连续进行,以出现“×”的前一次“0”作为起点,再向下连续测定 4 次,不同刺激间间隔 5min,以消除前一刺激的影响,则可得到一串以“0”或“×”组合的序列。若测试至最大力度(15.0g)仍未有阳性反应,则大鼠的 50% MWT 人为记为 15.00g;若测试至最小力度(0.4g)仍未有阴性反应,则大鼠的 50% MWT 记为 0.40g,其余根据公式计算 50% MWT: 50% 阈值 = $(10^{[X_f + K\delta]})/10000$ ^[23]。X_f = 最后用的纤维丝的对数值;K = 积极/消极反应模式的表列值,详见表 1。其中,δ = 各个纤维丝刺激间的均差,由此公式推算 50% MWT 值可能会大于 15.00g,或小于 0.40g,但仍以 15.00g、0.40g 分别作为最大或最小的机械痛阈值。此外,也可采用电子 Von Frey 或 Von Frey 从低力度到高力度分别刺激手术侧和正常侧足底,记录引起缩足反应的最大压力(g)作为机械缩足反射潜伏期,以 50g 为上限力度^[24,25]。

2. 热痛觉过敏:1988 年, Hargreaves 等^[26]首次提出热缩足反射潜伏期测定方法将测定的大鼠置于干净透明的观察笼内,使其至少适应 30min,直至笼勘探和主要梳理工作停止。将热辐射仪垂直于后爪并使红外光束透过玻璃板正好辐射到足底表面,每次测试 3 次以上,每隔 5min 连续测试 1 次,用秒表记录后爪撤离板面的时间,几次延迟时间取平均值即得热缩足反射潜伏期^[27]。在测试后的几个小时有时会出现轻微的红斑,但在接下来的观察里会逐渐消失并无水泡产生,不影响实验。研究发现恒定的红外辐射强度与末端伤害感受器所属皮肤的温度呈线性增加关

系,因而需调节合适的红外辐射强度和自动切断时间,避免对动物造成不可逆转的伤害。

3. 热冷诱发痛:冷热浴测试,即将大鼠的下肢浸没在热水浴(47.5℃)或冰水浴(7℃)中,用秒表记录产生缩足或挣扎反应的延迟时间。每只大鼠至少测定 2 次,每次间隔至少 10min。如果发现在浸没 15s 后未缩足,可人为将其移出水浴以免可能发生组织损害。记录术后延迟时间 - 术前延迟时间的值,作为感觉过敏的评价值。冷板测试,即将大鼠后爪放置于冷金属板上,并保持温度(4 ± 1)℃,测试时间为 2min,记录动物急性撤足的次数,每次间隔 15 ~ 20min。

此外,大鼠对无伤害冷刺激的行为测试还可采用丙酮测试,测试前适应至少 30min。将丙酮或薄荷醇喷洒至大鼠后爪足底表面。若在喷洒丙酮后(一般为 20s)出现急性的撤足行为,即为阳性反应。具体的行为打分可分成 4 个等级:0 为无反应;1 为急性撤足或舔足;2 为反复地舔足;3 反复地舔足和抖足。

4. 模型的痛敏感区域:研究发现测定机械缩足反射潜伏期、热缩足反射潜伏期、冷热板缩足反射期时,测试的部位对结果影响较大。坐骨神经的终端分支反射在足底区域的痛敏感区域为主要的测试部位,即足垫后的中央足底表面,同时应避开脚后跟和脚垫等不敏感区域。

四、存在的问题及展望

笔者在制备模型过程中发现,由于铬制羊肠线有一定的直径且相比于普通丝线较硬,结扎时易松动,在打第 2 个扣结时不容易轻靠在第 1 个扣结上,会出现扣结压迫神经的情况;暴露和游离坐骨神经时,动作应轻柔,小心剥离包被在神经周围的膜,避免在穿线结扎时神经上的膜自绞而压迫神经,影响造模。此模型评价时,热痛敏不如机械痛敏稳定、明显,且受测定时环境温度影响较大,因而测定时最好保证环境温度的恒定;大鼠有较规律的活动期和非活动期,应尽量将所有的测定安排在 8:00 ~ 18:00 时,否则会出现测定值偏差较大的状况。

目前 CCI 模型已成为广泛应用的外周神经损伤模型,其操作相对简单,并在手术后至少 1 个月内出现显著稳定的痛觉过敏和痛觉异常。但结扎的松紧度由操作者控制,差异较大。除了改变结扎材料,如 PE 套管,但由于存在易滑脱的缺点,需对此材料的构造进一步改进,同时开发其他材料或对结扎强度提出一个标准化的参考。除了感觉功能紊乱,研究者还发现 CCI 模型可出现行为障碍,例如扰乱睡眠和社会交

往,产生抑郁或焦虑行为,考虑可作为研究疼痛与睡眠、记忆力、焦虑、抑郁等情志活动的动物模型。另外,坐骨神经中不是单纯的感觉神经,也含有明显的运动成分,并且坐骨神经损伤产生的行为影响还涉及隐神经,因而使此方法有一定的局限性,需进一步研究改进,也可以根据不同的需要而考虑选用其他的动物模型,取长补短。

参考文献

- 1 韩济生. 神经病理性疼痛热点谈[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(7): 1-2
- 2 Ralf B, Andreas B, Gunnar W. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment [J]. The Lancet, 2010, 9(8): 807-819
- 3 Wall PD, Gutnick M. Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma [J]. Nature, 1974, 248(5451): 740-743
- 4 Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat [J]. Pain, 1992, 50(3): 355-363
- 5 Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain [J]. Pain, 2000, 87(2): 149-158
- 6 Gauthron M, Jazat F, Ratnahirana H, et al. Alterations in myelinated fibers in the sciatic nerve of rats after constriction: possible relationships between the presence of abnormal small myelinated fibers and pain related behavior [J]. Neurosci Lett, 1990, 111(1-2): 28-33
- 7 Attal N, Jazat F, Kayser V, et al. Further evidence for pain-related behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy [J]. Pain, 1990, 41(2): 235-251
- 8 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
- 9 Maves TJ, Pechman PS, Gebhart GF, et al. Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. Pain, 1993, 54(1): 57-69
- 10 Vierck CJ, Acosta-Rua AJ, Johnson RD. Bilateral chronic constriction of the sciatic nerve: a model of long-term cold hyperalgesia [J]. The Journal of Pain, 2005, 6(8): 507-517
- 11 吴俊芳, 刘恣. 现代神经科学研究方法 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2006: 741-743
- 12 Ankesh K, Nirmal S, Amteshwar SJ. Neuropathic pain - attenuating potential of aliskiren in chronic constriction injury model in rats [J]. Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, 2013, 14(2): 116-123
- 13 Coderre TJ, Kumar N, Lefebvre CD, et al. Evidence that gabapentin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate [J]. J Neurochem, 2005, 94(4): 1131-1139
- 14 Ikeda T, Ishida Y, Naono R, et al. Effects of intrathecal administra-

- tion of newer antidepressants on mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain [J]. Neuroscience Research, 2009, 63(1): 42-46
- 15 Mosconi T, Kruger L. Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations [J]. Pain, 1996, 64(1): 37-57
- 16 Kajander KC, Pollock CH, Berg H. Evaluation of hindpaw position in rats during chronic constriction injury (CCI) produced with different suture materials [J]. Somatosensory and Motor Research, 1996, 13(2): 95-101
- 17 马骋, 李翠贤, 易建良, 等. 不同材料制备大鼠神经病理性疼痛 CCI 模型的比较 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(4): 555-557
- 18 沈立姿, 房立丛, 于津鹏, 等. 丝线、羊肠线及结扎道数对大鼠 CCI 疼痛模型的影响 [J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2013, 31(1): 45-49
- 19 Tall JM, Stuesse SL, Cruce WL, et al. Gender and the behavioral manifestations of neuropathic pain [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2001, 68(1): 99-104
- 20 Tanck EN, Kroin JS, McCarthy RJ, et al. Effects of age and size on development of allodynia in a chronic pain model produced by sciatic nerve ligation in rats [J]. Pain, 1992, 51(3): 313-316
- 21 Yamato K, Kataoka T, Nishiyama Y, et al. Preventive and curative effects of radon inhalation on chronic constriction injury-induced neuropathic pain in mice [J]. European Journal of Pain, 2013, 17(4): 480-492
- 22 Paula-Freire LI, Andersen ML, Gama VS, et al. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice [J]. Phytomedicine, 2013, 2013: 6
- 23 Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. Journal of Neuroscience Methods, 1994, 53(1): 55-63
- 24 Alba-Delgado C, Borges G, Sánchez-Blázquez P, et al. The function of alpha-2-adrenoceptors in the rat locus coeruleus is preserved in the chronic constriction injury model of neuropathic pain [J]. Psychopharmacology, 2012, 221(1): 53-65
- 25 Berrococo E, Mico JA, Vitton O, et al. Evaluation of milnacipran, in comparison with amitriptyline, on cold and mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain [J]. European Journal of Pharmacology, 2011, 655(1-3): 46-51
- 26 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): 77-88
- 27 Terada T, Hara K, Haranishi Y, et al. Antinociceptive effect of intrathecal administration of taurine in rat models of neuropathic pain [J]. Can J Anesth, 2011, 58(7): 630-637

(收稿日期: 2014-01-13)

(修回日期: 2014-02-13)