

## 经皮穿刺纤维环建立大鼠椎间盘源性疼痛模型

吴志强<sup>1</sup>, 周利君<sup>2</sup>, 陈江波<sup>1</sup>, 庄文权<sup>1</sup>(<sup>1</sup>中山大学附属第一医院介入放射科, 广东省广州市 510080; <sup>2</sup>中山大学疼痛研究中心, 广东省广州市 510080)

### 文章亮点:

1 目前研究的大鼠盘源性疼痛模型大都需要复杂的外科手术干预, 造模创伤大, 手术时间较长, 增加了感染的机会, 术后动物致残率和死亡率高。目前未见有经皮穿刺纤维环建立 SD 大鼠椎间盘源性疼痛模型报道。  
2 作者通过运用 X 射线透视引导穿刺, 定位准确; 采用背侧路径, 避免了对腹腔脏器及脊髓的损伤, 建立了一种操作简单、定位准确、稳定性好的 SD 大鼠椎间盘源性疼痛模型。

### 关键词:

实验动物; 骨及关节损伤模型; 疼痛; X 射线; 经皮穿刺; 椎间盘; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 降钙素基因相关肽; 国家自然科学基金

### 主题词:

刺术; 椎间盘; 疼痛; 疾病模型; 动物

### 基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81272041); 广东省科技计划项目(2012B031800028)

### 摘要

**背景:** 用于研究椎间盘源性疼痛的模型众多, 采用经皮穿刺纤维环建立 SD 大鼠盘源性疼痛模型鲜见报道, 利用微创方法建立的盘源性疼痛模型能减少开放性手术建模中组织创伤大的干扰因素。

**目的:** 建立一种操作简单、稳定性高且利于大样本量制作的 SD 大鼠盘源性疼痛模型, 从行为学、影像学和分子生物学方面研究其时程变化。

**方法:** SPF 级 SD 雄性大鼠 88 只采用随机数表法分为对照组( $n=10$ )、假手术组( $n=34$ )和模型组( $n=44$ )。模型组大鼠于 X 射线透视引导下经皮穿刺靶椎间盘纤维环; 假手术组大鼠经皮穿刺椎旁组织, 不穿刺纤维环。

**结果与结论:** 与对照组及假手术组相比, 模型组大鼠双后足 50%机械撤足阈值下降。模型组大鼠 L<sub>5/6</sub> 椎间盘退变较相邻椎间盘明显, 其退变程度随时间延长有加重趋势。模型组大鼠背根神经节的降钙素基因相关肽从建模后第 3 天开始升高并在建模后第 21 天达到峰值, 维持较高水平至第 35 天。模型组大鼠背根神经节的肿瘤坏死因子  $\alpha$  也从建模后第 3 天开始升高并在建模后第 14 天达到峰值, 维持较高水平至建模后第 35 天。表明 X 射线透视引导下穿刺 SD 大鼠纤维环建立的盘源性疼痛模型具有创伤小、稳定性好、干扰因素少等优点, 可用于盘源性致痛的相关实验研究。

吴志强, 周利君, 陈江波, 庄文权. 经皮穿刺纤维环建立大鼠椎间盘源性疼痛模型[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(18):2831-2837.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.18.008

## A discogenic pain rat model induced by percutaneous puncture annulus

Wu Zhi-qiang<sup>1</sup>, Zhou Li-jun<sup>2</sup>, Chen Jiang-bo<sup>1</sup>, Zhuang Wen-quan<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Interventional Radiology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Pain Research Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** There are many animal models used for studying discogenic pain, but percutaneous puncture annulus is rarely reported. Minimally invasive approach to establish a discogenic pain model in Sprague-Dawley rats could reduce the interference factors of surgical trauma.

**OBJECTIVE:** To establish a Sprague-Dawley rat model of discogenic pain by percutaneous puncture annulus, with easy operations, high stability and obtaining large-scale productions, and to confirm the model by the results of behavior, MRI and molecular biology.

**METHODS:** Eighty-eight male Sprague-Dawley rats, of specific pathogen free level, were randomly divided into three groups, model group ( $n=44$ ), control group ( $n=10$ ) and sham group ( $n=34$ ). In the model group, the annulus was percutaneously punctured under X-ray guidance; while rats in the sham group were punctured at the paravertebral tissue, rather than the annulus.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The 50% mechanical withdrawal threshold of both hind paws in model group were reduced compared with control group and sham group. In the model group, the L<sub>5/6</sub> intervertebral disc degeneration was apparently visible, and the degree of degeneration was aggravated along the time. In the model group, the expression of calcitonin gene-related peptide in dorsal root ganglion of rats began to increase at

吴志强, 男, 1989 年生, 江西省南昌市人, 汉族; 中山大学在读硕士, 主要从事介入放射学研究。

通讯作者: 庄文权, 教授, 硕士生导师, 中山大学附属第一医院介入放射科, 广东省广州市 510080

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2015)18-02831-07

稿件接受: 2015-02-25

http://www.crter.org

Wu Zhi-qiang, Studying for master's degree, Department of Interventional Radiology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zhuang Wen-quan, Professor, Master's supervisor, Department of Interventional Radiology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Accepted: 2015-02-25

3 days post-operation and reached the peak at 21 days post-operation, then remained at high levels until the 35<sup>th</sup> day post-operation. The expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in dorsal root ganglion of rats increased at 3 days post-operation and reached the peak at 14 days post-operation, then remained at a higher level until the 35<sup>th</sup> day post-operation. The experiment result verifies that the discogenic pain model of Sprague-Dawley rats induced by percutaneous puncture annulus has the advantages of good stability and less trauma. The model can be used to study discogenic pain.

**Subject headings:** Punctures; Intervertebral Disk; Pain; Disease Models, Animal

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81272041; Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, No. 2012B031800028

Wu ZQ, Zhou LJ, Chen JB, Zhuang WQ. A discogenic pain rat model induced by percutaneous puncture annulus. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(18):2831-2837.

## 0 引言 Introduction

腰椎间盘突出疾病所导致的疼痛给患者的生活带来极大的不便,目前主要通过动物实验研究其疼痛机制和治疗手段。相对新西兰兔和其他大动物而言,SD大鼠具有体格小,价格低廉,生长周期短等优点,且其局部解剖与人类十分相似,如Mackinno等<sup>[1]</sup>使用电子显微镜观察到大鼠神经组织结构与人类很相似;O'Connell等<sup>[2]</sup>发现大鼠椎间盘在几何形状方面与人类很接近;Elliott等<sup>[3]</sup>对大鼠进行几何力学标准化后,发现大鼠与人类椎间盘在压缩和扭转的机械性能上极为相似。大鼠体质量与椎间盘性能的相关性研究也支持四足动物机械性模型可用于研究人类椎间盘,因此大鼠被认为是一种较好的椎间盘疾病的模型动物。目前大鼠的椎间盘疾病动物模型种类较多,早在1957年,Goff等<sup>[4]</sup>通过捆绑双前肢,截断尾巴获得双足大鼠,建立椎间盘退变模型。Gruber等<sup>[5]</sup>应用沙鼠建立了自发性腰椎间盘突出模型。国内学者Hu等<sup>[6]</sup>将针头放置在SD大鼠L<sub>5/6</sub>神经根出口处建立慢性压榨性疼痛模型。Toshinori等<sup>[7]</sup>将SD大鼠尾椎髓核组织植入背根神经节旁引发自身免疫反应建立疼痛模型。Olmaker等<sup>[8]</sup>通过手术暴露椎间盘,直视下穿刺纤维环建立SD大鼠疼痛模型。以往的模型存在需要复杂的器械和建模手术创伤大等不足,目前未见有经皮穿刺纤维环建立SD大鼠椎间盘源性疼痛模型报道。实验拟利用X射线透视定位精确的特点,采用腰背部入路方式,经皮穿刺纤维环,拟建立了一种操作简单、定位准确、稳定性好的SD大鼠椎间盘源性疼痛模型。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2013年11月至2014年9月在中山大学北校区疼痛研究中心和中山大学附属第一医院完成。

**材料:**

**实验动物:** 选取鼠龄SPF级SD雄性大鼠88只,鼠龄约9周,体质量220~250 g,由中山大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(粤)2008-0002。动物饲养室温度维持在(23±2)℃,湿度维持在(50±5)%,噪声控制在85 dB以下,提供12 h/12 h黑夜/白昼循环照明,本实验严格按照中山大

学动物保护和使用规定进行饲养和实验。大鼠入组条件:①双后肢50%机械撤足阈值均高于10 g。②MR-T2WI成像各腰椎间盘Pfirrmann分级均为1级<sup>[9]</sup>,无先天性椎骨融合,无脊髓和坐骨神经受压表现。

大鼠椎间盘源性疼痛模型实验用主要试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
VonFrey纤毛仪	美国Stoelting公司
数字减影血管造影机(Allura Xper FD20), 磁共振扫描仪(Achieva 1.5T A-Series Nova Dual)	荷兰PHILIPS公司
肿瘤坏死因子 $\alpha$ 一抗(ab8348), 降钙素基因相关肽一抗(ab47027), $\beta$ -actin一抗(ab8226)	英国abcam公司
羊抗小鼠二抗, 小鼠抗兔二抗	中国武汉博士得公司
超敏ECL化学发光试剂盒(P0018)	中国碧云天公司
Tanon曝光系统	上海天能科技有限公司

**方法:**

**动物分组:** 入选动物88只采用随机数表法分为对照组( $n=10$ )、假手术组( $n=34$ )和模型组( $n=44$ )。

**椎间盘源性疼痛模型的建立:** 将模型组大鼠用10%水合氯醛(35  $\mu$ L/g)腹腔注射麻醉,术野皮肤备皮后俯卧在硬纸板上并固定其四肢、消毒术野皮肤。在数字减影血管造影机透视引导下定位L<sub>5/6</sub>椎间盘,使用23 G针头从脊柱左侧旁处入路穿刺L<sub>5/6</sub>椎间盘,针与水平面夹角约45°。穿刺过程中注意大鼠左下肢是否颤动(若穿刺针刺到坐骨神经,大鼠则会出现左下肢不自主颤动)。正侧位观察穿刺针位置和方向,确保针尖穿破纤维环全层进入L<sub>5/6</sub>椎间盘内,负压拔针(图1)。假手术组只穿刺皮下组织至椎旁,不损伤纤维环。对照组不做任何处理。

**大体行为学观察:** 造模前1 d,建模后第1, 3, 7, 14, 21, 28和35天,将各组大鼠放置于有机玻璃箱内,观察大鼠有无易激惹、撕咬肢体、运动功能障碍以及有无尿便失禁等情况。

**50%机械撤足阈值的测定:** 造模前1 d,建模后第1, 3, 7, 14, 21, 28和35天,对照组、假手术组和模型组分别取10, 10, 20只大鼠进行50%机械撤足阈值的测定。参考

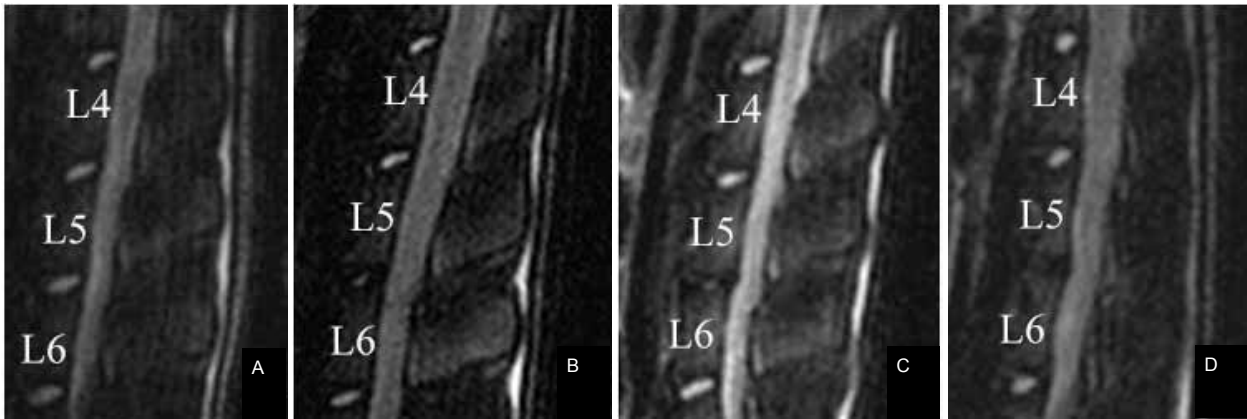


图4 建模前后大鼠腰椎间盘磁共振 T2WI 成像信号变化

Figure 4 Sagittal MR T2 weighted images of rat intervertebral disk before and after modeling

图注: 图中 A 为造模前磁共振显示 L<sub>4-5</sub> 和 L<sub>5-6</sub> 椎间盘均为高信号; B 为造模后 2 周, L<sub>4-5</sub> 椎间盘仍表现为高信号, 而 L<sub>5-6</sub> 椎间盘信号开始减低; C 为造模后 3 周, L<sub>4-5</sub> 椎间盘无明显改变, 而 L<sub>5-6</sub> 椎间盘信号明显下降, 且椎间隙开始变窄; D 为造模后 5 周, L<sub>4-5</sub> 椎间盘无明显改变, 而 L<sub>5-6</sub> 椎间盘已无髓核与椎间盘分界, 呈现更低信号。

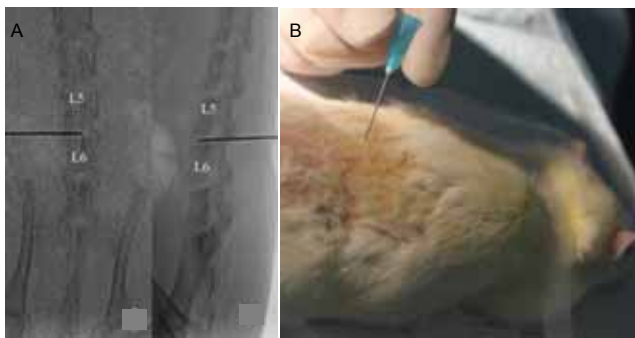


图1 大鼠 L<sub>5/6</sub> 椎间盘纤维环穿刺定位 X 射线正侧位及操作模式图

Figure 1 Anteroposterior and lateral radiography of percutaneous puncture at the annulus of L<sub>5/6</sub> intervertebral disc and the operations  
图注: 图中 A 为正侧位片显示针尖位于大鼠椎间盘的中央; B 为大鼠 L<sub>5/6</sub> 椎间盘纤维环穿刺操作模式图。

表 1 椎间盘退变 Pfirrmann 分级标准

Table 1 Pfirrmann classification criteria of intervertebral disk degeneration

级别	髓核结构	髓核与纤维环分界	信号强度	椎间隙高度
I	结构完整, 均匀一致, 白亮	清楚	接近脑脊液	正常
II	结构完整, 欠均匀, 灰色带	清楚	高, 接近脑脊液	正常
III	欠完整, 灰色, 亮度下降	欠清楚	中等	正常或稍窄
IV	不完整, 灰黑色信号	消失	中等到低信号	稍窄
V	不完整, 黑色信号	消失	低信号	狭窄明显

Chaplan 等<sup>[10]</sup>的“Up-Down”方法, 测定 50% 机械撤足阈值以判定大鼠是否产生病理性疼痛, 该阈值越低表明疼痛越明显。为消除心理因素对测试结果的影响, 每天将大鼠放置于测试装置内 1 h 使其适应环境, 每次在大鼠安静状态时开始测试。测试时 von Frey hairs 垂直、微弯, 在大鼠足底停留 5 s, 期间出现快速撤足反应为阳性。若撤足反应为阴性则选用刺激强度递增的 von Frey hair 继续刺激, 若撤足反应为阳性, 则选择刺激强度递减的 von Frey hair 刺激。

表 3 造模前后模型组大鼠 L<sub>4-5</sub> 和 L<sub>5-6</sub> 椎间盘磁共振 Pfirrmann 分级  
Table 3 Pfirrmann grade of L<sub>4-5</sub> and L<sub>5-6</sub> intervertebral disk before and after modeling

部位	时间	Pfirrmann 分级				
		1	2	3	4	5
L <sub>5-6</sub>	造模前 1 d	20	0	0	0	0
	造模后 2 周	3	16	1	0	0
	造模后 3 周	0	2	14	4	0
	造模后 5 周	0	0	4	14	2
L <sub>4-5</sub>	造模前 1 d	20	0	0	0	0
	造模后 2 周	20	0	0	0	0
	造模后 3 周	20	0	0	0	0
	造模后 5 周	19	1	0	0	0

如此反复, 以第一个转折点的前一点为起点, 连续 6 次的刺激结果为最终的撤足反应模式。如测试至最小强度 (0.41 g) von Frey hair 均出现阳性反应, 或最大强度 (15.14 g) 均出现阴性反应则结束。再通过特定的程序将撤足反应模式转换为相应的撤足阈值。

**磁共振检查建模前后大鼠腰椎间盘退变情况:** 模型组大鼠 20 只在建模前 1 d、建模后第 14, 21, 35 天分别行腰椎间盘磁共振 T2WI 序列检查。观察大鼠 L<sub>4-5</sub>, L<sub>5-6</sub>, L<sub>6-7</sub> 椎间盘退变情况。由磁共振室 2 名教授盲法采用 Pfirrmann 分级法<sup>[9]</sup>进行分级(表 1)。

**Western bolt 方法检测大鼠 L<sub>4-6</sub> 背根神经节中肿瘤坏死因子 α、降钙素基因相关肽的表达:** 造模前 1 d, 造模后第 1, 3, 7, 14, 21, 28 和 35 天, 模型组和假手术组各取 3 只大鼠, 麻醉, 在冰面上取材, 取左侧 L<sub>4-6</sub> 背根神经节, 标本取出后立即放液氮中极速冷冻。将标本称质量后加入 RIPA 裂解液 (10 mL/g)、蛋白酶抑制剂 (1 mL/g) 和磷酸酶抑制剂 (1 mL/g)。剪碎、超声、高速离心后取上清。电泳前做蛋白定量。以 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜后用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后, 在 4 °C 条件下与肿瘤坏死因子 α-抗 (1 : 200)、降

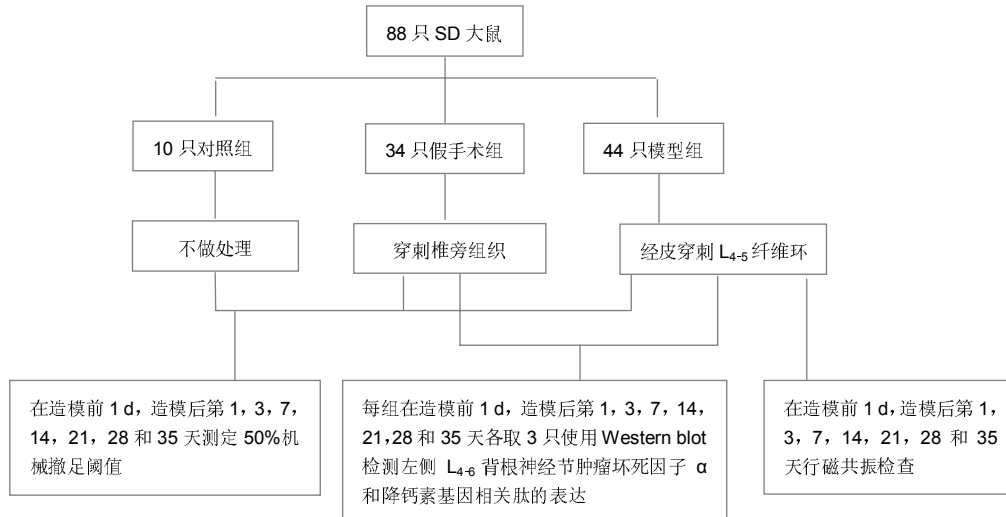


图2 椎间盘源性疼痛大鼠模型的实验流程图

Figure 2 Flow chart of establishing rat models of discogenic pain

表2 经皮穿刺纤维环建立椎间盘源性疼痛大鼠模型的双后足50%机械撤足阈值

( $\bar{x} \pm s$ , g)

Table 2 Comparison of 50% mechanical withdrawal threshold of both hind paws in three groups at each time point

组别	造模前	造模后(d)						
		1	3	7	14	21	28	35
对照组(n=10)								
左后足	19.72±6.09	17.92±6.65	16.00±6.47	18.67±7.06	16.00±6.47	16.00±6.47	18.67±7.06	17.33±6.91
右后足	17.68±6.69	17.68±6.69	19.02±6.77	17.68±6.69	17.68±6.69	19.02±6.77	19.02±6.77	19.02±6.77
假手术组(n=10)								
左后足	19.37±6.45	10.95±2.73 <sup>abc</sup>	13.37±1.79	19.02±6.77	17.68±6.70	17.68±6.7	19.02±6.77	17.68±6.70
右后足	17.04±7.22	17.92±6.65	18.67±7.05	17.33±6.91	15.99±6.46	15.99±6.46	18.67±7.05	15.99±6.46
模型组(n=20)								
左后足	20.57±6.33	4.24±1.96 <sup>abc</sup>	1.31±0.52 <sup>abc</sup>	1.53±0.65 <sup>abc</sup>	1.44±0.59 <sup>abc</sup>	1.31±0.53 <sup>abc</sup>	1.34±0.49 <sup>abc</sup>	1.20±0.37 <sup>abc</sup>
右后足	20.25±6.59	5.01±2.62 <sup>abc</sup>	1.83±0.76 <sup>abc</sup>	1.62±0.73 <sup>abc</sup>	1.49±0.58 <sup>abc</sup>	1.39±0.57 <sup>abc</sup>	1.71±0.62 <sup>abc</sup>	1.58±0.71 <sup>abc</sup>

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与假手术组相比, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与造模前相比, <sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

钙素基因相关肽(1 : 200)或 $\beta$ -actin(1 : 500)共孵育48 h, TBS洗30 min后, 再与二抗(1 : 5 000)室温下孵育2 h。使用Tanon曝光系统(上海天能科技有限公司)进行曝光。用Image J 6.0软件采集胶片条带灰度值, 实验重复3次, 将每次实验中各样品目的蛋白与 $\beta$ -actin的灰度比值为目的蛋白相对表达水平。

**主要观察指标:** 大鼠双后足敏感度、腰椎间盘突出情况及背根神经节中肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和降钙素基因相关肽的表达水平。

**统计学分析:** 50%机械撤足阈值结果采用重复测量方差分析, 方差不齐时, 使用Greenhouse-Geisser方法进行校正。若存在交互效应, 进一步采用多元方差分析方法检验组别和时间的单独效应。

同一只大鼠L<sub>4-5</sub>与L<sub>5-6</sub>椎间盘进行配对, 采用Wilcoxon符号秩和检验分析两组椎间盘退变趋势有无差异。采用CMH卡方检验分析L<sub>5-6</sub>椎间盘Pfirrmann分级的时间趋势。Western bolt结果采用单因素方差分析。差异有统计学意义时均采用Bonferroni法进行两两比较。

采用SPSS 18.0软件(美国IBM公司)进行统计学分析, 定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $P < 0.01$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 共使用9周鼠龄的SPF级SD雄性大鼠101只, 其中5只因磁共振显示L<sub>4-5</sub>椎体融合或退变被剔除, 3只因磁共振检查前麻醉意外死亡被剔除, 5只在饲养过程中死亡被剔除; 造模成功率100%。实验流程图见图2。

**2.2 经皮穿刺纤维环建立椎间盘源性疼痛大鼠模型的行为学表现** 对照组大鼠双后足及假手术组大鼠右后足50%机械撤足阈值各时间点均无明显改变( $P > 0.01$ )。假手术组大鼠左后足在造模后第1天50%机械撤足阈值有下降, 造模后第3天逐渐回升, 7 d后维持稳定水平至造模后35 d, 与造模前相比差异无显著性意义( $P > 0.01$ )。造模后所有大鼠均未出现易激惹、撕咬肢体、运动功能障碍以及尿便失禁等情况。实验大鼠双后肢50%机械撤足阈值结果见表2和图3。模型组大鼠双后足50%机械撤足阈值从造模后第1

天开始下降, 至第3天降至最低, 并保持低水平至造模后35 d, 与造模前相比, 造模后大鼠50%机械撤足阈值明显下降( $P < 0.01$ )。造模后模型组大鼠50%机械撤足阈值与对照组和假手术组差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。

**2.3 经皮穿刺纤维环建立椎间盘源性疼痛大鼠模型的磁共振检测结果** 模型组大鼠建模后各时间点L<sub>5/6</sub>椎间盘与L<sub>4/5</sub>椎间盘相比, Pfirrmann分级更高( $P < 0.01$ )。L<sub>5/6</sub>椎间盘Pfirrmann分级随建模时间延长, 有升高趋势( $P < 0.01$ ; 图4, 表3)。

**2.4 经皮穿刺纤维环建立椎间盘源性疼痛大鼠模型的损伤根神经节中肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和降钙素基因相关肽的表达**造模后各时间点假手术组大鼠模型侧背根神经节中降钙素基因相关肽和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的表达水平无明显变化( $P > 0.01$ )。模型组大鼠模型侧背根神经节中降钙素基因相关肽和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的表达水平从造模后第3天开始升高, 分别在造模后第14, 21天达到峰值, 并维持较高水平至造模后35 d, 且与造模前相比, 差异有显著性意义( $P < 0.01$ ; 图5)。

### 3 讨论 Discussion

腰椎间盘突出症已成为严重影响人类生活质量的常见病、多发病, 然而目前对其致痛机制尚不完全清楚。目前用于研究其疼痛相关机制和治疗方法的模型较多。以往的模型大都需要复杂的外科手术干预, 造模创伤大, 手术时间较长, 增加了感染的机会, 造模后动物致残率和死亡率高。Lotz等<sup>[11]</sup>使用外部加压设备建立的小鼠椎间盘压榨性模型, 该建模方法需要较长的时间, 并且需要精密外部设备而限制了动物的样本量。最近, Li等<sup>[12]</sup>报道了一种大鼠腰椎间盘突出症模型, 从磁共振、苏木精-伊红染色及胶原蛋白等方面得到验证。该模型建立方法与本研究的相似, 但其主要从椎间盘退变角度进行研究, 未涉及到有关疼痛及相关生化方面的研究。在本实验中, 作者通过运用X射线透视引导穿刺, 定位准确; 采用背侧路径, 避免了对腹腔脏器及脊髓的损伤; 建模所需要的时间较短, 在本实验操作过程, 每只SD大鼠建模耗时不到10 min。

腰椎间盘退变性疾病的治疗中缓解或消除疼痛症状的处理是十分重要的, 盘源性疼痛的动物模型有助于研究和评估一种新药物或者治疗技术的疗效。作者运用成熟的测量方法<sup>[8, 10]</sup>, 研究大鼠建模前后50%机械撤足阈值时辰变化以验证成模与否。本实验中, 假手术组左后足50%机械撤足阈值在造模后第1天下降, 之后回升, 而右后足无下降趋势, 考虑为手术创伤所致暂时行痛觉过敏所致。然后模型组大鼠双后足50%机械撤足阈值均在造模后第1天明显下降, 造模后第3天疼痛达到最低, 并维持至造模后35 d。由此可以推断手术创伤对50%机械撤足阈值下降的影响较小。本实验中模型组大鼠造模测(左)和对侧(右)均

出现痛阈下降, 这类似于临床和动物实验研究中常见的镜像痛现象, 其具体机制尚不明确。Arguis等<sup>[13]</sup>观察到在L<sub>5</sub>和L<sub>6</sub>脊神经结扎大鼠模型上可以观察到双后足都可出现机械性和热温度性的痛阈下降。Schreiber等<sup>[14]</sup>发现小胶质细胞的活化在对侧敏化的过程中起到了重要的作用, 从免疫学角度对镜像痛的机制作出解释。另外, 由于神经系统具有解剖对称性, 所以外周和中枢神经通路都可能参与了镜像痛的过程<sup>[15]</sup>。

本实验在疼痛相关的分子生物学方面做了初步研究。肿瘤坏死因子 $\alpha$ 是一种重要的促炎性因子, 在椎间盘突出致疼痛中的作用已经有大量的研究资料。大量研究证实患者在手术取出的退变纤维环中存在高表达的肿瘤坏死因子 $\alpha$ <sup>[16]</sup>。Igarashi等<sup>[17]</sup>发现注射肿瘤坏死因子 $\alpha$ 可引起大鼠神经病理性疼痛。Zanella等<sup>[18-19]</sup>证明肿瘤坏死因子 $\alpha$ 拮抗剂(依那西普)可以使缩窄模型和髓核置入致疼痛模型中大鼠的疼痛得到缓解。椎间盘破裂后髓核溢出可引起自身免疫反应导致肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素 $\beta$ 等前炎性因子升高, 后者可直接作用于相应受体, 激活后可活化p38MAPK、核因子 $\kappa$ B等通路引起疼痛<sup>[20]</sup>。Cuellar等<sup>[21]</sup>发现肿瘤坏死因子 $\alpha$ 能在数小时内使大鼠热痛敏和机械撤足阈值升高。本实验研究发现, 大鼠纤维环穿刺致痛模型的背根神经节肿瘤坏死因子 $\alpha$ 在建模后第1天开始升高, 持续升高并维持至造模后35 d, 与行为学结果趋势一致。

研究表明, 大鼠L<sub>5/6</sub>纤维环表层存在有多节段背根神经节支配的感觉神经<sup>[22]</sup>, 其中近半数降钙素基因相关肽敏感的, 这些神经元大多为神经生长因子依赖性神经元<sup>[23-25]</sup>。降钙素基因相关肽被认为是神经生长因子依赖性神经元的标志物。神经生长因子在炎症性疼痛中起着重要作用, 它可通过神经生长因子-TrkA和神经生长因子-p75<sup>NTR</sup>路径介导产生炎症反应。退变的纤维环和髓核可引起神经末梢的异常生长和降钙素基因相关肽的高表达, 从而产生疼痛和痛敏。另有学者研究表明, 降钙素基因相关肽可能参与慢性疼痛导致的中枢敏化机制<sup>[26]</sup>。本实验中, 大鼠纤维环穿刺致痛模型的背根神经节降钙素基因相关肽在建模后第3天开始明显升高, 至造模后21 d达到最高, 维持较高水平至造模后35 d, 与Orita等<sup>[27]</sup>的研究结果一致。

综合本实验结果, 使用X射线引导经皮穿刺大鼠纤维环, 成功建立了一种大鼠盘源性疼痛模型。该模型操作时间短, 模型干扰因素少, 成模周期短, 可重复性好, 利于大样本量研究。本研究建立的模型可用于盘源性致痛的相关实验研究。

实验也存在一些不足: ①本实验未系统地探索穿刺针直径大小对建模的影响, 是否使用更小的穿刺针, 可以获得行为学、影像学和生物化学变化更为缓慢的模型尚不明确。②本实验未对大鼠热痛敏进行评估, 关于该模型是否会引起大鼠热痛敏的变化尚待研究。③本实验研究没有与以往的盘源性疼痛模型进行比较研究。

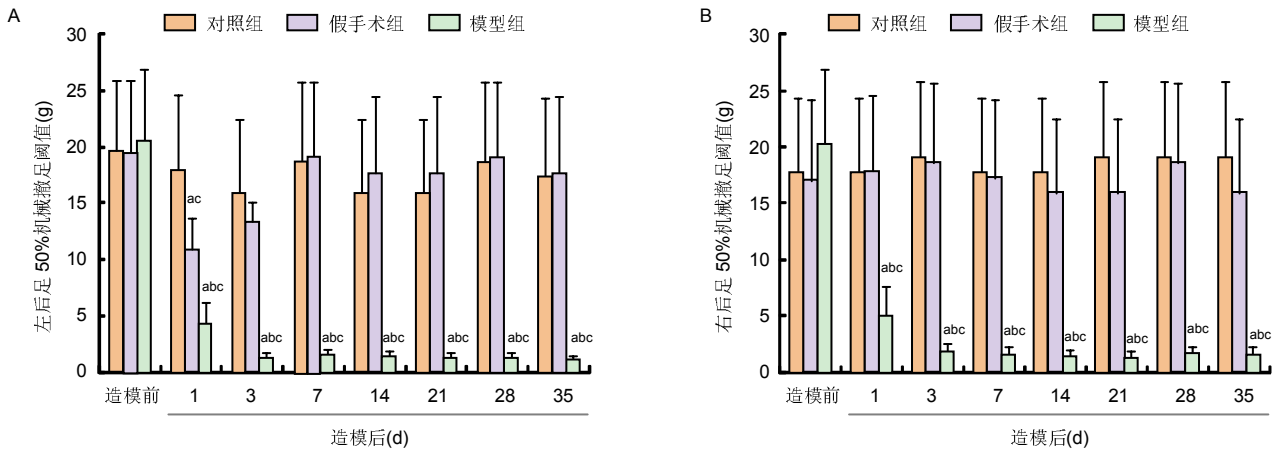


图3 经皮穿刺纤维环建立椎间盘源性疼痛大鼠模型的双后足50%机械撤足阈值的变化曲线

Figure 3 Curve of 50% mechanical withdrawal threshold of both hind paws in three groups

图注: 图中A为左后足, B为右后足。与对照组相比, <sup>a</sup>P < 0.01; 与假手术组相比, <sup>b</sup>P < 0.01; 与造模前相比, <sup>c</sup>P < 0.01。

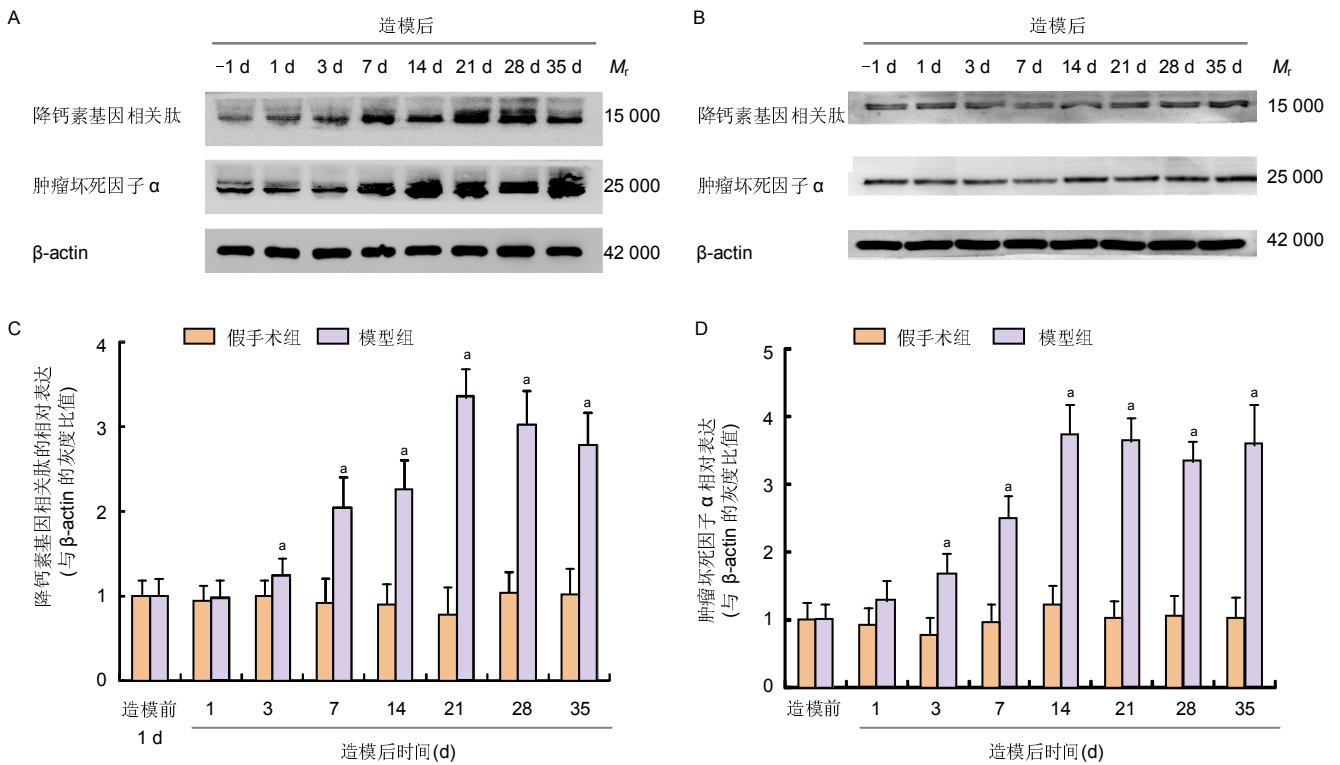


图5 不同时间点模型组和假手术组大鼠背根神经节的肿瘤坏死因子α和降钙素基因相关肽表达

Figure 5 Expression of calcitonin gene-related peptide and tumor necrosis factor-α in dorsal root ganglion in the model and sham groups at each time point

图注: 图中A为模型组大鼠损伤侧背根神经节中肿瘤坏死因子α和降钙素基因相关肽表达的Western blot结果; B为假手术组大鼠损伤侧背根神经节中肿瘤坏死因子α和降钙素基因相关肽表达的Western blot结果; C为模型组和假手术组大鼠损伤侧背根神经节中降钙素基因相关肽的表达水平; D为模型组和假手术组大鼠损伤侧背根神经节中肿瘤坏死因子α的表达水平。以造模前1d为标准(作为1)。与造模前相比, <sup>a</sup>P < 0.01。

**致谢:** 感谢中山大学疼痛中心和中山大学附属第一医院的老 师和同学们对实验提供的支持和帮助。

**作者贡献:** 吴志强与庄文权共同进行实验设计, 实验由吴志 强和庄文权实施。周利君对实验进行评估。陈江波协助收集资料。 吴志强成文, 庄文权审校, 吴志强对文章负责。

**利益冲突:** 文章内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条

例。

**学术术语:** 50%机械撤足阈值-是Chaplan在1994年报道的 一种定量测量异常疼痛的评估方法。该方法利用刻度呈对数增长 的von Frey 纤毛刺激大鼠足底皮肤。通过分析大鼠撤足反应模式 计算出其疼痛阈值。该方法简单易行, 重复性好, 广泛应用于动 物模型疼痛的相关研究。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和 专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1985;75(3):384-388.
- [2] O'Connell GD, Vresilovic EJ, Elliott DM. Comparison of animals used in disc research to human lumbar disc geometry. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(3):328-333.
- [3] Elliott DM, Sarver JJ. Young investigator award winner: validation of the mouse and rat disc as mechanical models of the human lumbar disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(7):713-722.
- [4] Goff CW, Landmesser W. Bipedal rats and mice; laboratory animals for orthopaedic research. *J Bone Joint Surg Am*. 1957; 39-A(3):616-622.
- [5] Gruber HE, Johnson T, Norton HJ, et al. The sand rat model for disc degeneration: radiologic characterization of age-related changes: cross-sectional and prospective analyses. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002;27(3):230-234.
- [6] Hu SJ, Xing JL. An experimental model for chronic compression of dorsal root ganglion produced by intervertebral foramen stenosis in the rat. *Pain*. 1998;77(1):15-23.
- [7] Ito T, Ohtori S, Inoue G, et al. Glial phosphorylated p38 MAP kinase mediates pain in a rat model of lumbar disc herniation and induces motor dysfunction in a rat model of lumbar spinal canal stenosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(2):159-167.
- [8] Olmarker K. Puncture of a lumbar intervertebral disc induces changes in spontaneous pain behavior: an experimental study in rats. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008;33(8):850-855.
- [9] Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, et al. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(17):1873-1878.
- [10] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994;53(1):55-63.
- [11] Lotz JC, Colliou OK, Chin JR, et al. Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: an in vivo mouse model and finite-element study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1998; 23(23):2493-2506.
- [12] Li D, Yang H, Huang Y, et al. Lumbar intervertebral disc puncture under C-arm fluoroscopy: a new rat model of lumbar intervertebral disc degeneration. *Exp Anim*. 2014;63(2):227-234.
- [13] Arguis MJ, Perez J, Martínez G, et al. Contralateral neuropathic pain following a surgical model of unilateral nerve injury in rats. *Reg Anesth Pain Med*. 2008;33(3):211-216.
- [14] Schreiber KL, Beitz AJ, Wilcox GL. Activation of spinal microglia in a murine model of peripheral inflammation-induced, long-lasting contralateral allodynia. *Neurosci Lett*. 2008;440(1):63-67.
- [15] Koltzenburg M, Wall PD, McMahon SB. Does the right side know what the left is doing? *Trends Neurosci*. 1999; 22(3):122-127.
- [16] Séguin CA, Pilliar RM, Roughley PJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha modulates matrix production and catabolism in nucleus pulposus tissue. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(17):1940-1948.
- [17] Igarashi T, Kikuchi S, Shubayev V, et al. 2000 Volvo Award winner in basic science studies: Exogenous tumor necrosis factor-alpha mimics nucleus pulposus-induced neuropathology. Molecular, histologic, and behavioral comparisons in rats. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000;25(23):2975-2980.
- [18] Sasaki N, Kikuchi S, Konno S, et al. Anti-TNF-alpha antibody reduces pain-behavioral changes induced by epidural application of nucleus pulposus in a rat model depending on the timing of administration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007; 32(4):413-416.
- [19] Zanella JM, Burchright EN, Hildebrand K, et al. Effect of etanercept, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor, on neuropathic pain in the rat chronic constriction injury model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008;33(3):227-234.
- [20] Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*. 2004;361(1-3):184-187.
- [21] Cuellar JM, Montesano PX, Carstens E. Role of TNF-alpha in sensitization of nociceptive dorsal horn neurons induced by application of nucleus pulposus to L5 dorsal root ganglion in rats. *Pain*. 2004;110(3):578-587.
- [22] Sugiura A, Ohtori S, Yamashita M, et al. Existence of nerve growth factor receptors, tyrosine kinase a and p75 neurotrophin receptors in intervertebral discs and on dorsal root ganglion neurons innervating intervertebral discs in rats. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008;33(19):2047-2051.
- [23] Ozawa T, Aoki Y, Ohtori S, et al. The dorsal portion of the lumbar intervertebral disc is innervated primarily by small peptide-containing dorsal root ganglion neurons in rats. *Neurosci Lett*. 2003;344(1):65-67.
- [24] Ohtori S, Takahashi K, Chiba T, et al. Substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactive sensory DRG neurons innervating the lumbar intervertebral discs in rats. *Ann Anat*. 2002;184(3):235-240.
- [25] Mousa SA, Cheppudira BP, Shaqura M, et al. Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. *Brain*. 2007;130(Pt 2):502-513.
- [26] Benarroch EE. CGRP: sensory neuropeptide with multiple neurologic implications. *Neurology*. 2011;77(3):281-287.
- [27] Orita S, Ohtori S, Nagata M, et al. Inhibiting nerve growth factor or its receptors downregulates calcitonin gene-related peptide expression in rat lumbar dorsal root ganglia innervating injured intervertebral discs. *J Orthop Res*. 2010; 28(12):1614-1620.