doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2013.01.005

对 SNI 和 CCI 两种大鼠神经病理性疼痛模型的实验观察*

梁 啸[1] 刘洪美[2] 李庆伟[3] 陈国武[3] 孟纯阳[3△]

([1] 新乡医学院研究生处,河南 新乡 453000;[2] 济宁医学院基础学院,山东 济宁 272067;[3] 济宁医学院附属医院,济宁 272029)

摘 要 目的 观察并比较大鼠坐骨神经分支选择性损伤(SNI)和慢性坐骨神经压迫损伤(CCI)两种神经病理性模型引起疼痛的效果。**方法** Wistar 大鼠 30 只,随机分为 3 组:Sham 组(n=10)、SNI 组(n=10)和 CCI 组(n=10)。Sham 组仅暴露坐骨神经后缝合皮肤,分别制作 SNI 模型和 CCI 模型,于术前及术后 28d 内测定大鼠术侧机械疼痛阈值,并于术后第 14 天和第 28 天行 Western Blotting 检测大鼠背根神经节(DRG)内疼痛相关基因三磷酸环化水解酶 1(GCH1)的表达变化。**结果** Sham 组大鼠术后未见疼痛敏感症状,SNI 组和 CCI 组大鼠疼痛阈值于术后第 1 天较 Sham 组显著降低($P<0.05$),SNI 组疼痛阈值直至术后第 28 天都维持在较低水平,而 CCI 组痛阈值于术后第 3 天起才趋于稳定,术后 21d 开始痛敏症状有所缓解。Western Blotting 检测显示,术后第 14 天 SNI 组和 CCI 组 GCH1 表达均高于 Sham 组($P<0.05$),术后第 28 天 CCI 组 GCH1 表达有所降低,与 SNI 组出现显著性差异($P<0.05$)。**结论** 相比传统 CCI 模型,SNI 模型是一种更敏感、更稳定的神经病理性疼痛模型。

关键词 神经病理性疼痛;大鼠;动物模型;GCH1

中图分类号:R965.1 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-9760(2013)02-022-04

Experimental observation of SNI and CCI two kinds of rat neuropathic pain models

LIANG Xiao, LIU Hong-Mei, LI Qing-Wei, et al

(Postgraduate Office of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453000, China)

Abstract: ***Objective*** To observe and compare the efficacy of 2 neuropathic pain models: spared nerve injury model (SNI) and chronic constriction injury of sciatic nerve model (CCI). ***Methods*** 30 Wistar rats were divided randomly into 3 groups: sham group (n=10), SNI group (n=10), and CCI group (n=10). In the sham group, the sciatic nerves of rats were just surgically exposed, and the SNI model and CCI model were operated on the right posterior limb. The mechanical withdrawal threshold (MWT) were tested from the 1th day preoperative to the 28th day postoperative, and GTP cyclohydrolase 1 (GCH1), which is a kind of pain-related gene, in dorsal root ganglion was measured by Western blotting on the 14th and 28th days postoperative. ***Results*** The rats in sham group did not appear hyperalgia. MWT in both SNI group and CCI group were obviously declined on the 1th day postoperative compared with Sham group ($P<0.05$). MWT of SNI rats keeped a low level to the 28th day postoperative, but MWT in CCI group rose again from the 21th day postoperative. The results of Western blotting showed that, on the 14th day after the operation, the expression of GCH1 in both SNI and CCI group increased compared with sham group ($P<0.05$), but on the 28th day it decreased in CCI group, and there were statistical differences compared with SNI group ($P<0.05$). ***Conclusion*** Compared with CCI model, SNI model is a more sensitive and stable neuropathic pain model.

Key words: Neuropathic pain; Rat; Animal model; GCH1

神经病理性疼痛是由中枢或外周神经系统原发性损害或功能障碍引起的痛觉异常和痛觉过敏,以往研究此类疼痛的动物模型种类众多,其中应用最为广泛的模型包括以下两种:坐骨神经分支选择性损伤(SNI)模型[1]和慢性坐骨神经压迫损伤(CCI)模型[2]。这两种模型在制作方法和引起疼痛效果方面均存在一定的差异。另一方面,越来越多的证据显示,疼痛的产生过程受多种神经递质的影响,其中三磷酸环化水解酶 1(GCH1)可以影响这些神经递质的合成,与疼痛的发生有着较为密切

* [基金项目]山东省教育厅高校科技计划资助课题(J11LF19)

△ [通信作者]孟纯阳,E-mail:chunyangmeng16@163.com

的关系[3-5]，它可以作为检验神经病理性疼痛发生的重要指标。本实验旨在通过观察大鼠疼痛行为学变化，并辅以对大鼠背根神经节（DRG）中GCH1 表达的检测，比较 SNI 和 CCI 两种疼痛模型的效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年 Wistar 大鼠 30 只，雌雄不限，体重 280～ 320 g，由山东鲁抗医药有限公司提供。

1.2 仪器及试剂

Von-Frey 纤维丝测痛仪（Stoelting 公司，美国）；GCH-1 抗体（GCH1 Antibody Rabbit Polyclonal，0.1mg，Abbiotec 公司，批号 250680）；山羊抗兔 IgG（Goat Anti-Rabbit IgG-HRP，200 μg/0.5 ml，Santa Cruz Biotechnology 公司，批号 CS-2004）；蛋白印迹检测试剂盒（Western Boltting Luminol Reagent，Santa Cruz Biotechnology 公司，批号 sc-2048）。

1.3 动物分组及模型建立

30 只 Wistar 大鼠随机分为 3 组，分别为 Sham 组（n＝10）、SNI 组（n＝10）和 CCI 组（n＝10）。用 1%的戊巴比妥钠(40mg/ kg)对大鼠行腹腔注射麻醉，取俯卧位捆绑。Sham 组制作，切开右后肢皮肤，分离肌肉，暴露坐骨神经后立即缝合皮肤。SNI 模型制作，切开大鼠右后肢皮肤，分离肌肉，充分暴露坐骨神经主干及其远端分支，结扎并剪断胫神经和腓总神经，保留腓肠神经，注意避免损伤，随后逐层缝合。CCI 模型制作，切开大鼠右后肢皮肤，分离肌肉，暴露坐骨神经干，用 4-0 铬制羊肠线松扎坐骨神经干 4 道，每两道之间间隔 1mm，结扎强度以引起小腿肌肉轻度颤动为宜，最后逐层缝合。

1.4 机械缩足反射阈值（mechanical withdrawal threshold，MWT）测定

依照 Chaplan[6] 的 up-and-down 法，分别于术前 1d 及术后 1d、3d、7d、14d、21d、28d，测定大鼠术侧后肢机械缩足反射阈值。将大鼠置于金属笼中，用 Von-Frey 纤维丝按其力度从小到大的顺序依次垂直刺激大鼠术侧爪跖面，每次持续时间 3～4s，两次测量间隔 30s，将大鼠抬足或舔足行为视作阳性反应，得到第一次阳性结果后，再用此力度和未引起阳性反应的最大力度分别测量 5 次，并记录各自的阳性率，最后运用 up-and-down 法计算大鼠 50%缩爪阈值。

1.5 Western blotting 检测

各组大鼠分别于术后第 14 天和第 28 天取材，每个时间点取 5 只。用 1%的戊巴比妥钠将大鼠过量麻醉后，取大鼠术侧 L4-6 DRG，将组织与含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液按 1∶10 混合，于冰上充分匀浆。12000r/min、4℃离心 20min，静置后取上清液，并用 Bradford 法测定蛋白浓度。浓度调整后加上样缓冲液，于干浴器内 98℃变性 8min，分别取等量样品加入 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白，转膜至硝酸纤维膜，5%脱脂奶粉室温封闭 2h，分别加 GCH1 抗体（1∶1000）、β-actin 抗体（1∶1000），4℃孵育过夜，再加二抗（1∶500）室温孵育 1h，洗膜后 ECL 荧光显色、曝光。利用 Tanon Gis 灰度分析系统测定胶片上 GCH1 和 β-actin 蛋白条带的灰度值，以二者灰度值的半比值定量分析 GCH1 的表达。

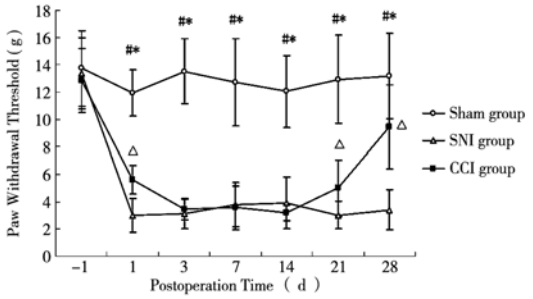
1.6 统计学分析

本实验采用 SPSS13.0 软件进行统计分析，数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用方差分析，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MWT 测定

MWT 结果显示，Sham 组大鼠术后较术前无明显变化。SNI 组大鼠术后第 1 天 MWT 即下降至 3.03±1.24，显著低于 Sham 组和 CCI 组（$P<0.05$），此后其 MWT 一直保持在这一水平。CCI 组大鼠术后第 3 天开始与 SNI 组无显著性差异（$P>0.05$），第 21 天开始 MWT 值逐渐升高，疼痛敏感症状有所缓解，第 21 天和第 28 天 MWT 值分别为 4.99±2.05 和 9.42±3.06，显著高于 SNI 组（$P<0.05$）。（图 1）`



#：$P<0.05$，SNI 组与 Sham 组相比

*：$P<0.05$，CCI 组与 Sham 组相比

△：$P<0.05$，SNI 组与 CCI 组相比

图 1 3 组大鼠不同时间点 MWT 值检测结果（$\bar{x}\pm s$）

2.2 Western Blotting 检测

术后第 14 天，SNI 组和 CCI 组大鼠术侧 DRG 内 GCH1 表达均显著高于 Sham 组（$P<0.05$）。术后第 28 天 SNI 组 GCH1 含量仍较高，CCI 组 GCH1 表达明显下降，与 SNI 组相比差异有统计学意义（$P<0.05$）。（图 2，表 1）

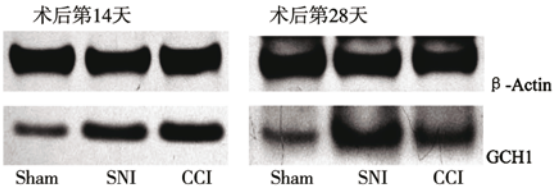


图 2 Western Blotting 检测结果

表 1 Western Blotting 检测结果（GCH1/β-Actin）（$\bar{x}\pm s$）

组别	术后第 14 天	术后第 28 天
Sham 组	0.44±0.12#*	0.39±0.10#*
SNI 组	0.68±0.09	0.70±0.11△
CCI 组	0.72±0.13	0.49±0.14
F 值	6.493	5.571
P 值	0.012	0.019

#：$P<0.05$，SNI 组与 Sham 组相比

*：$P<0.05$，CCI 组与 Sham 组相比

△：$P<0.05$，SNI 组与 CCI 组相比

3 讨论

SNI 模型和 CCI 模型都是较为常用的神经病理性疼痛模型。本研究中，SNI 模型大鼠术后出现疼痛敏感症状较早，并在 4 周内一直处于稳定状态，Decosterd 等[1]研究显示此模型引起的动物疼痛过敏症状可持续长达 6 个月之久。而 CCI 组大鼠术后第 3 天疼痛阈值才降低到和 SNI 组同一水平，并从第 3 周开始逐渐回升，说明该模型引起大鼠痛觉过敏时间较 SNI 组短，敏感性也稍差，出现这种差异的原因可能与不同模型引起神经损伤的特点有关。SNI 模型是将坐骨神经 3 个分支分离，保留腓肠神经，结扎并切断胫神经和腓总神经，选择性地损伤周围神经，可使后肢爪跖面外侧的特定区域产生疼痛症状[1]。研究显示[7]，神经纤维损伤后，发生脱髓鞘改变，进而导致神经生长因子（NGF）、脑源性神经营养因子（BDNF）等神经营养因子运输障碍。NGF、BDNF 等神经因子可直接调节神经元上的多种离子通道，其运输障碍可引起离子通道功能异常，降低神经细胞的动作电位阈值，提高细胞兴奋性，最终使疼痛敏感性增强[8-9]。CCI 模型则是用铬制羊肠线环扎坐骨神经干制作而成，羊肠线遇水膨胀，对神经形成慢性束缚性损伤，导致部分神经纤维变性坏死[10]；另一方面，CCI 模型引起的疼痛还与此种可吸收线分解产物引起的炎性刺激有关[11]，因此 CCI 模型引起的疼痛受两方面因素的影响，作用机制更为复杂。

SNI 和 CCI 模型均有各自的优缺点，并不能完全相互替代。SNI 模型的制作较为简单，可重复性强，个体差异小，是一种较为理想的神经病理性疼痛模型，但既往有报道[12]称 SNI 模型大鼠对热刺激敏感性差。CCI 模型引起的疼痛受术者手法的影响较大，因为制作过程缺乏量化标准，肠线结扎的松紧程度无法测量，因此不同实验室制作同一 CCI 模型得到的实验结果也较难保持一致，不易达到标准化。但由于 CCI 模型存在炎性疼痛的特点，在模拟腰椎间盘突出症的发病过程中有着独特的优势。

本实验选取 GCH1 作为检测指标，是由于它和疼痛的产生有着密切的联系。GCH1 是 BH4 合成的主要限速酶，而 BH4 又为儿茶酚胺、5-羟色胺、一氧化氮等神经递质的合成所必需[13]。Tegeder 等[3]研究证实周围神经损伤引起 GCH1 表达增加，是神经病理性疼痛产生的重要原因。本研究中，SNI 组大鼠术后 14d 和 28d，DRG 内 GCH1 表达均高于 Sham 组，CCI 组则表现为先升高后降低的趋势，此规律与疼痛行为学检测结果相符，同样也印证了 GCH1 在神经病理性疼痛中的作用。不同于 CCI 模型，SNI 模型大鼠术后 4 周内 GCH1 的表达均维持在较高水平，从分子层面说明了 SNI 模型较 CCI 模型在引起神经源性痛的稳定性上存在一定优势。

总之，相比 CCI 模型，SNI 模型对机械刺激更为敏感，稳定性也更高，是一种较为理想的神经病理性疼痛模型。

参考文献：

[1] Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain[J]. Pain, 2000, 87(2): 149-158.

[2] 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.

[3] Tegeder I, Costigan M, Griffin RS, et al. GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence[J]. Nat Med, 2006, 12(11): 1269-1277.

（下转第 27 页）

0.05)，说明槐白皮与卡托普利联合用药是有意义的。硝苯地平、缬沙坦血压值和联合用药血压值虽然均与复制高血压血压值之间比较有显著性差异（$P<0.01$），但无联合用药意义，因联合用药和单给硝苯地平或缬沙坦无明显差异。我们发现槐白皮与 3 种西药联用效果不一，槐白皮与卡托普利联用效果明显，而槐白皮与硝苯地平或缬沙坦联用则无意义。

卡托普利为血管紧张素转化酶抑制药，使血管紧张素Ⅱ合成酶减少，血管扩张，外周阻力减弱，血压降低。还可抑制激肽酶 II，使缓激肽水解减少，血管部位缓激肽浓度升高，促进血管内皮细胞上的 β_2 受体被激动，产生 NO，血管扩张，血压下降[4-5]。槐白皮有增加动物血管、肾组织等器官中的 PGI2 含量，促进血管扩张，致血压下降，推测是协同降压的主要原因。缬沙坦为非肽类特异性 AT_1 受体拮抗剂，竞争性的阻断 AT_1 受体，使血管紧张素Ⅱ不能与之相结合，而发挥降压作用[6-7]。缬沙坦与槐白皮的作用机理相似，都是增加 PGI_2 含量，减少 TXA_2 但其降压结果相同，故二者无协同作用。硝苯地平为 Ca^{2+} 通道阻滞剂，抑制细胞 Ca^{2+} 内流，使血管平滑肌松弛，血压下降[8-9]。本药以扩张外周动脉血管为主，产生降压作用。槐白皮对家兔外周血管也有较强的扩张作用。硝苯地平和槐白皮均有增加 PGI_2 和减少 TXA_2 的作用。两药作用叠加可解释二者无协同作用的机制，因此也可推测槐白皮的扩血管作用可能与阻滞 Ca^{2+} 通道有关，具体机制有待进一步探讨。

参考文献：

[1] 刘善庭，李建美，储萍，等. 槐白皮口服液对大鼠血液生化影响的研究[J]. 中国中医药科技，2001，8(1)：25-26.

[2] Neaton JD，Grimm RJ，Prineas RJ，et al. Treatment of mild hypertension study. Final results. Treatment of mild hypertension study research group[J]. JAMA，1993，270：713-724.

[3] 邓旭光，吕娜，夏洪生，等. 中西药联用对自发性高血压大鼠血压的影响[J]. 深圳中西医结合杂志，2002，12(1)：18-20.

[4] 郭益民，黄晓颖，于建兴. 卡托普利在 L-NAME 高血压大鼠中的作用[J]. 1999，29(2)：101.

[5] Gohlke P，Lamberty V，Kuwer I，et al. Long-term low-dose angiotensin converting enzyme inhibitor treatment increases vascular cyclic guanosine 3′，5′-monophosphate[J]. Hypertension，1993，22：682.

[6] 田芳. 国产缬沙坦治疗原发性高血压[J]. 临床医学，2008，28(8)：65-66.

[7] Kang PM，Landau AJ，Eberhardt RT，et al. Angiotensin Ⅱ receptor antagonists：a new approach to blockade of the renin-angiotensin system[J]. Am Heart J，1994，127(5)：1388-1401.

[8] Derosa G，Maffioli P. Nifedipine and telmisartan for the treatment of hypertension：the TALENT study[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther，2011，9(12)：1499-1503.

[9] Lee KM，Kang HA，et al. Differential gene expression profiles in spontaneously hypertensive rats induced by administration of enalapril and nifedipine[J]. Int J Mol Med，2013，31(1)：179-187.

（收稿日期 2013-01-15）

（上接第 24 页）

[4] Zhang L，Rao F，Zhang K，et al. Discovery of common human genetic variants of GTP cyclohydrolase 1（GCH1）governing nitric oxide，autonomic activity，and cardiovascular risk[J]. J Clin Invest，2007，117(9)：2658-2671.

[5] Kealey C，Roche S，Claffey E，et al. Linkage and candidate gene analysis of 14q22-24 in bipolar disorder：support for GCHI as a novel susceptibility gene[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet，2005，136B(1)：75-80.

[6] 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.

[7] Siniscalco D，Fuccio C，Giordano C，et al. Role of reactive oxygen species and spinal cord apoptotic genes in the development of neuropathic pain[J]. Pharmacol Res，2007，55(2)：158-166.

[8] Kramar EA，Lin B，Lin CY，et al. A novel mechanism for the facilitation of theta-induced long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor[J]. J Neurosci，2004，24(22)：5151-5161.

[9] Boettger MK，Till S，Chen MX，et al. Calcium-activated potassium channel SK1-and IK1-like immunoreactivity in injured human sensory neurones and its regulation by neurotrophic factors[J]. Brain，2002，125(Pt 2)：252-263.

[10] 王红，冯泽国，徐龙河，等. 坐骨神经慢性挤压伤模型大鼠行为学及形态学变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2007，11(23)：4590-4593.

[11] Maves TJ，Pechman PS，Gebhart GF，et al. Possible chemical contribution from chromic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. Pain，1993，54(1)：57-69.

[12] 林露，陶国才，易斌. 3 种神经病理性疼痛大鼠模型的评价[J]. 重庆医学，2011，40(1)：3-6.

[13] Costigan M，Befort K，Karchewski L，et al. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury[J]. BMC Neurosci，2002，3：16.

（收稿日期 2012-11-11）