

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.04.003  
文章编号: 1005-8982 (2019) 04-0014-04

## 经眶下神经注射 ET-1 复制三叉神经痛大鼠模型 \*

曹启旺, 徐慧巧

(湖南省人民医院 疼痛科, 湖南 长沙 410005)

**摘要:** **目的** 经眶下神经注射内皮素-1 (ET-1) 复制三叉神经痛大鼠模型。 **方法** 实验1, 将24只SD大鼠随机分为A、B、C3组, A、B组分别经眶下神经注射不同剂量的ET-1溶液, C组注射10  $\mu$ l生理盐水, 观察各组大鼠给药后60 min眶下神经支配区域机械痛阈值和抓脸行为的变化。实验2, 将16只SD大鼠随机分为两组, 分别连续喂给卡马西平(D组)、生理盐水(E组)3 d, 然后按实验1的方法复制三叉神经痛模型, 观察注射ET-1溶液后60 min大鼠眶下神经支配区域机械痛阈值的变化。 **结果** 实验1中与C组比较, A、B组术后60 min大鼠眶下神经支配区域机械痛阈值降低, 抓脸行为次数增多, 且B组变化更显著 ( $P < 0.05$ )。实验2中D组大鼠术后对机械刺激的痛敏反应敏感性较E组降低 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 经眶下神经注射ET-1能复制理想的三叉神经痛大鼠模型。

**关键词:** 三叉神经痛; 内皮素-1/受体, 内皮素A; 大鼠; 模型, 动物

**中图分类号:** R745.11

**文献标识码:** A

## Study of trigeminal neuralgia in an animal model produced by administration of endothelin-1 to the infraorbital nerve\*

Qi-wang Cao, Hui-qiao Xu

(Department of Pain Medicine, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China)

**Abstract: Objective** To establish a rat model of trigeminal neuralgia produced by administration of endothelin-1 (ET-1) to the infraorbital nerve. **Methods** Experiment 1: Twenty-four healthy Sprague-Dawley rats randomly divided into 3 groups: ET-1 8 nmol injection group (group A,  $n = 8$ ), ET-1 16 nmol injection group (group B,  $n = 8$ ), and saline 10  $\mu$ l injection group (group C,  $n = 8$ ). The changes of mechanical pain threshold and the facial scratching behavior in infraorbital nerve innervation area had been observed during 60 minutes after surgery. Experiment 2: Sixteen healthy Sprague-Dawley rats randomly divided into carbamazepine fed group (group D,  $n = 8$ ) and saline fed group (group E,  $n = 8$ ). To establish model of trigeminal neuralgia according to the method of experiment 1 after continuous feeding for 3 days. The changes of mechanical pain threshold and the facial scratching behavior in infraorbital nerve innervation area had been observed during 60 minutes after surgery. **Results** Experiment 1: Compared with group C, the mechanical pain threshold of infraorbital nerve innervation area decreased and the number of facial scratching behavior increased in group A and B ( $P < 0.05$ ), and the changes in group B were more significant ( $P < 0.05$ ). Experiment 2: Compared with group E, the mechanical pain threshold of infraorbital nerve innervation area increased and the number of facial scratching behavior decreased in group D ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Rat model of trigeminal neuralgia can be successfully established by injecting ET-1 into infraorbital nerve.

**Keywords:** trigeminal neuralgia; endothelin-1/receptor; endothelin a; rats; models, animal

收稿日期: 2018-08-15

\* 基金项目: 湖南省卫生计生委项目 (No: C2016014)

三叉神经痛是一种临床较常见的神经病理性疼痛,主要特点是患侧三叉神经支配区域出现可触诱发性或自发性的剧烈疼痛。有研究表明,外源性内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)可以诱发动物形成短暂且剧烈的痛觉过敏、自发痛等疼痛反应<sup>[1-6]</sup>。本实验经大鼠眶下神经干注射 ET-1,力求复制一种与人类三叉神经痛相接近的动物模型。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 实验动物** 采用健康清洁级成年雄性 SD 大鼠,体重 250 ~ 300 g,购自长沙天勤生物公司[动物许可证号:SCXK(湘)2014-0011],饲养于湖南省人民医院老年医学研究所动物实验中心。

**1.1.2 主要设备与试剂** Von Frey 测痛仪(天津仪数科技), ET-1(美国 Sigma 公司)溶解在去离子蒸馏水中<sup>[7]</sup>,卡马西平片(100 mg/片,上海三维制药)溶解在生理盐水中。

### 1.2 方 法

**1.2.1 动物模型的复制** 健康 SD 大鼠术前禁食 12 h,自由饮水,称重后用 10% 水合氯醛(0.3 ml/kg)腹腔注射麻醉,取右侧卧位,固定头部及四肢。右侧颊部颧骨下缘前 1/3 段脱毛、消毒、铺巾。取 1 cm 长切口,将皮下组织向触须垫方向钝性分离,在显微镜下找到眶下孔并分离出眶下神经,将针头插入眶下神经干的鞘膜内,用无菌纱条将周围组织与眶下神经隔离,然后注入不同剂量的 ET-1 溶液或生理盐水,术后缝合切口<sup>[8-9]</sup>。将术后 5 min 内苏醒的大鼠纳入本实验。

**1.2.2 实验分组** ①实验 1:将 24 只 SD 大鼠随机分为 A、B、C 3 组,每组 8 只。A、B 组分别经眶下神经注射 8 和 16 nmol ET-1 溶液, C 组注射 10  $\mu$ l 生理盐水。观察各组大鼠给药后 60 min 眶下神经支配区域机械痛阈值和抓脸行为的变化。②实验 2:将 16 只 SD 大鼠随机分为 D、E 组,每组 8 只。D、E 组分别喂卡马西平 10 mg/(kg·d)、生理盐水,连续 3 d。然后按实验 1 的方法复制三叉神经痛模型,观察注射 ET-1 后 60 min 大鼠眶下神经支配区域机械痛阈的变化。

### 1.3 大鼠行为学检测

大鼠在实验前适应环境 3 d,术前 10 min,以及术

后 10、20、30、40、50 和 60 min 分别进行行为学测定。采用 Von Frey 细丝测定大鼠右侧触须垫机械刺激阈值,刺激强度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 和 12.0 g。大鼠出现  $\geq 1$  项表现即判定为阳性反应:①将头面部藏在身下以免受刺激的退缩反应;②连续  $\geq 3$  次搔抓面部刺激区域的抓脸行为;③抓咬刺激物并有攻击动作<sup>[10]</sup>。由 4.0 g 开始刺激,如有反应,则用低一级刺激力度的细丝;如没有反应,则加大一级刺激力度的细丝。以此类推,从有反应开始再给 3 次相同强度的刺激。如用大鼠对最大力度 12.0 g 的刺激无反应,则痛觉阈值为 12.0 g。记录大鼠术后 60 min 自发性抓脸行为的次数(除外细丝刺激诱发的抓脸行为)。

### 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 A、B、C 组大鼠术后机械痛阈值和抓脸行为的变化

A、B、C 组大鼠右侧触须垫部术后 10、20、30、40、50 和 60 min 的机械痛阈值比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①术后不同时间点大鼠右侧触须垫部的机械痛阈值有差别( $F = 129.455, P = 0.000$ );②3 组大鼠术后右侧触须垫部的机械痛阈值有差别( $F = 41.630, P = 0.000$ ), B 组较 A、C 组低,相对痛觉反应敏感性高;③3 组大鼠术后右侧触须垫部的机械痛阈值变化趋势有差异( $F = 34.711, P = 0.000$ )(见表 1 和图 1)。A、B、C 组大鼠术后抓脸行为分别为( $4.875 \pm 0.835$ )、( $8.000 \pm 0.756$ )和( $2.625 \pm 1.061$ )次,经单因素方差分析,差异有统计学意义( $F = 53.127, P = 0.000$ ), B 组高于 A、C 组,相对自发性疼痛反应次数多( $P < 0.05$ )。经眶下神经注射 16 nmol ET-1 更容易引起大鼠产生三叉神经痛样痛觉过敏和自发性疼痛反应。

### 2.2 D、E 组大鼠术后机械痛阈值和抓脸行为的变化

D、E 组大鼠右侧触须垫部术后 10、20、30、

表 1 3 组大鼠术后不同时间点机械痛阈值比较 (n=8, g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
A 组	8.50 ± 1.41	7.25 ± 2.12	6.25 ± 1.28	6.50 ± 0.93	7.50 ± 1.41	8.00 ± 1.51
B 组	6.50 ± 1.77	5.25 ± 1.83	2.25 ± 1.17	3.00 ± 1.51	4.00 ± 1.51	6.50 ± 1.41
C 组	11.00 ± 1.07	10.75 ± 1.04	10.50 ± 0.93	11.00 ± 1.07	10.75 ± 1.04	11.00 ± 1.07

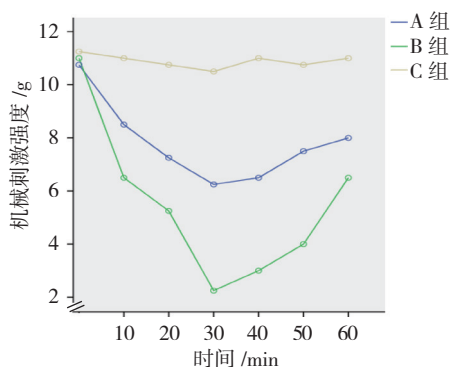


图 1 3 组大鼠术后机械痛阈值的变化趋势

表 2 D、E 组大鼠术后不同时间点机械痛阈值比较 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
D 组	9.50 ± 1.41	8.75 ± 1.49	8.25 ± 1.67	9.00 ± 1.51	9.25 ± 1.83	10.00 ± 1.51
E 组	6.50 ± 1.77	5.25 ± 1.83	2.25 ± 1.17	3.00 ± 1.51	4.00 ± 1.51	6.50 ± 1.41

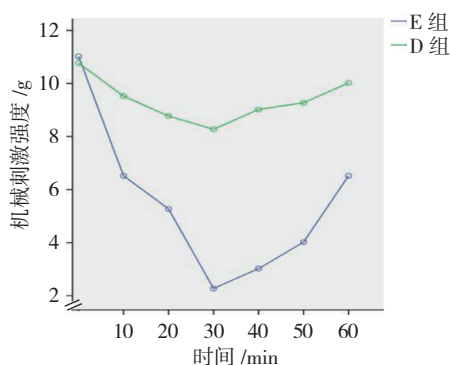


图 2 D、E 组大鼠术后机械痛阈值的变化趋势

### 3 讨论

三叉神经痛患者的患侧三叉神经支配区域可出现痛觉过敏、自发痛和触诱发痛等典型神经病理性疼痛症状，痛觉过敏和触诱发痛可因机械或化学刺激而诱发，自发痛则表现为疼痛区域可自发出现阵发性剧痛。临床上，三叉神经痛多因某种诱因作用于三叉神经感觉通路上某一部位而引起。ET-1 是一种含有 21 个氨基酸的强效血管活性肽，作用于外周伤害性感受器的内皮素 A 受体可引起神经性疼痛痛觉过敏与自发痛<sup>[11-13]</sup>。本实验经大鼠眶下神经干注射 16 nmol

40、50 和 60 min 的机械痛阈值比较，采用重复测量设计的方差分析，结果：①术后不同时间点大鼠术后右侧触须垫部的机械痛阈值有差别 ( $F = 105.367, P = 0.000$ )；②两组大鼠术后右侧触须垫部的机械痛阈值有差别 ( $F = 32.870, P = 0.000$ )，D 组较 E 组高，相对痛觉反应敏感性低；③两组大鼠术后右侧触须垫部的机械痛阈值变化趋势有差别 ( $F = 37.249, P = 0.000$ )。卡马西平可较好地抑制三叉神经痛大鼠模型最主要的疼痛行为学改变。见表 2 和图 2。

ET-1 后 60 min，大鼠眶下神经支配区域出现机械痛阈值降低（痛觉过敏）和自发性的抓脸行为次数增多（自发痛），笔者推测可能是 ET-1 使眶下神经感觉神经元内钙离子浓度升高和钠通道电流增强<sup>[14-15]</sup>，增加神经元细胞动作电位产生的频率，使神经元过度兴奋，产生痛觉过敏和自发痛等典型三叉神经痛行为学表现。

卡马西平是临床上治疗三叉神经痛的首选药物，能降低神经细胞膜对钠离子和钙离子的通透性，从而降低神经细胞的兴奋性，延长不应期，抑制神经元的过度兴奋，提高患者的痛阈，降低疼痛强度及发作频率。本实验发现，卡马西平喂药大鼠术后右侧触须垫部对机械刺激的痛敏反应敏感性较对照组降低，说明卡马西平可抑制模型大鼠的触诱发痛和自发痛等典型三叉神经疼痛行为学改变，从另一个角度证明经大鼠眶下神经注射 ET-1 复制三叉神经痛模型的可行性。

综上所述，经眶下神经注射 ET-1 复制三叉神经痛模型是与临床三叉神经痛较接近的动物模型之一，但本模型也存在一定的局限性和不足。首先，本模型更趋向于炎症刺激所引起的三叉神经痛；其次，本模型持续时间太短。相信随着医学工作者对三叉神经痛发

病机制认识的深入和实验方法的不断改进,这些缺点都可以克服。

#### 参 考 文 献:

- [1] DAVAR G, HANS G, FAREED M U, et al. Behavioral signs of acute pain produced by the application of endothelin-1 to rat sciatic nerve[J]. *Neuroreport*, 1998, 9(10): 2279-2283.
- [2] MENENDEZ L, LASTRA A, HIDALGO A, et al. Nociceptive reaction and thermal hyperalgesia induced by local ET-1 in mice: a behavioral and Fos study[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2003, 367(1): 28-34.
- [3] GOKIN A P, FAREED M U, PAN H L, et al. Local injection of endothelin-1 produces pain-like behavior and excitation of nociceptors in rats[J]. *Neurosci*, 2001, 21(14): 5358-5366.
- [4] BALONOV K, KHODOROVA A, STRICHARTZ G R. Tactile allodynia initiated by local subcutaneous endothelin-1 is prolonged by activation of TRPV-1 receptors[J]. *Exp Biol Med*, 2006, 231(6): 1165-1170.
- [5] KAWAMATA T, JI W, YAMAMOTO J, et al. Contribution of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 to endothelin-1-induced thermal hyperthermal hyperalgesia[J]. *Neuroscience*, 2008, 154(3): 1067-1076.
- [6] HAMAMOTO D T, KHASABOV S G, CAIN D M, et al. Tumor-evoked Sensitization of C nociceptors: a role for endothelin[J]. *Neurophysiology*, 2008, 100(4): 2300-2311.
- [7] TANG Y X, PENG H, HUANG D, et al. Study of breakthrough cancer pain in an animal model induced by endothelin-1[J]. *Neuroscience Letters*, 2016, 617(2016): 108-115.
- [8] 李娜, 邓小明, 马蓓等. 眶下神经结扎后三叉神经节神经元钾电流改变 [J]. *生理学报*, 2009, 61(1): 72-78.
- [9] AN J X, HE Y, QIAN X Y, et al. A new animal model of trigeminal neuralgia produced by administration of cobra venom to the infraorbital nerve in the rat[J]. *Anesth Analg*, 2011, 113(3): 652-656.
- [10] 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]. *Neuroscience*, 1994, 14(5): 2708-2723.
- [11] 曹启旺, 徐慧巧, 吴礼平, 等. 血浆内皮素-1水平与骨转移瘤爆发疼痛强度相关性的研究 [J]. *湖北民族学院学报(医学版)*, 2014, 31(1): 12-14.
- [12] DASHWOOD M R, TSUI J C. The effect of acute ischemia on ET-1 and its receptors in patients with underlying chronic ischemia of the lower limb[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006, 231(6): 802-805.
- [13] HOUCK C S, KHODOROVA A, REALE A M, et al. Sensory fibers resistant to the actions of tetrodotoxin mediate nociceptive responses to local administration of endothelin-1 in rats[J]. *Pain* 2004, 110(3): 719-726.
- [14] ZHOU Q L, STRICHARTZ G, DAVAR G. Endothelin-1 activates ET(A) receptors to increase intracellular calcium in model sensory neurons[J]. *Neuroreport*, 2001, 12(17): 3853-3857.
- [15] ZHOU Z, DAVAR G, STRICHARTZ G. Endothelin-1 (ET-1) selectively enhances the activation gating of slowly inactivating tetrodotoxin-resistant sodium currents in rat sensory neurons: a mechanism for the pain-inducing actions of ET-1[J]. *Neuroscience*, 2002, 22(2002): 6325-6330.

(童颖丹 编辑)