

角叉菜胶致急性痛雄性大鼠机械痛阈与 局部血流量的相关性

孙 晶,邵晓梅,方 芳,沈 醉,方剑乔

(浙江中医药大学第三临床医学院针灸神经生物学实验室,杭州 310053)

【摘要】 目的 初步探讨角叉菜胶致急性炎性痛大鼠机械痛阈(Mechanical Withdrawal Threshold, MWTs)与局部皮肤血流灌注量(Blood Perfusion, BP)的相关性。**方法** 20 只雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠随机分为正常对照组和模型组。采用足底注射角叉菜胶建立大鼠急性炎性痛模型,观察两组大鼠在造模前、造模后 4 h、24 h、48 h、72 h 患侧的 MWTs 和 BP,并比较分析两种行为学的相关性。**结果** 与正常对照组相比,模型组大鼠造模后足跖 MWTs 明显下降($P < 0.01$),BP 明显增加($P < 0.01$)。两者做相关性分析发现,大鼠患侧足跖 MWTs 和 BP 呈负相关,在造模后 4 h 和造模后 72 h 有显著差异($P < 0.01$)。**结论** 角叉菜胶致急性炎性痛大鼠有显著的机械痛阈和局部皮肤血流灌注量改变,这两种变化在发生发展中呈负相关。

【关键词】 角叉菜胶;急性炎性痛;局部血流灌注量;相关性;SD 大鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 10-0067-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.010.013

Correlation between mechanical pain threshold and local blood perfusion in male rat models of acute inflammation induced by carrageenan

SUN Jing, SHAO Xiao-mei, FANG Fang, SHEN Zui, FANG Jian-qiao

(Department of Neurobiology and Acupuncture Research, Third College of Clinical Medicine,
Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To explore the relationship between mechanical withdrawal threshold (MWTs) and local cutaneous blood perfusion (BP) in rats with acute inflammation induced by carrageenan. **Methods** Twenty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control and model groups. The acute inflammatory rat model was established by subcutaneously injecting with carrageenan into the left hindpaw. MWTs were measured by Dynamic Plantar Aesthesiometer 37450 before injection (as base) of carrageenan and at 4 h, 24 h, 48 h, 72 h after carrageenan injection. The local cutaneous BP was detected by Pericam Perfusion Speckle Imager (Pericam PSI) at the time after measuring of MWTs. The above two behaviors were compared and the relationship between them was analyzed. **Results** MWTs of the model group rats were decreased while BP significantly increased than that in the control group ($P < 0.01$). The MWTs and BP in the model rats showed a negative correlation, especially the correlation index showed significant differences at 4 h and 72 h after carrageenan injection ($P < 0.01$). **Conclusions** Carrageenan-induced acute inflammation in rats causes

【基金项目】国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81102645);浙江省本科院校中青年学科带头人学术攀登项目(编号:pd2013203);浙江省大学生新苗人才计划项目(编号:2013R410056)。

【作者简介】孙晶(1987-),女,研究方向:针灸镇痛与免疫调节相关性研究。E-mail:sunjing0268@163.com;邵晓梅(1977-),女,研究方向:针刺镇痛与免疫调节相关性研究,E-mail:13185097375@163.com。

【通讯作者】方剑乔(1961-),男,研究方向:针灸镇痛与免疫调节相关性研究。E-mail:fangjianqiao7532@163.com。

significant changes in mechanical pain threshold, which has a negative correlation with local cutaneous blood perfusion.

【Key words】 Carrageenan; Acute inflammatory pain; Local blood perfusion; Correlation; SD Rats

临床上常见由于组织损伤引起的炎性疼痛,是严重影响患者生存质量的临床症状。因此,近年来对炎性痛的基础研究日益增多,常用的炎性痛模型有足底部注射角叉菜胶、弗氏佐剂、甲醛等。大鼠足跖底部注射角叉菜胶是经典急性炎性痛模型^[1-3],可诱发大鼠足跖底部组织红肿及持续性炎性痛。多数研究将机械痛阈和足跖肿胀度作为炎性痛程度的评价指标^[4,5],但足跖肿胀度的测量因其影响因素较多,很难准确评估病情变化,目前使用上已有减少趋势,仅凭机械痛阈这一单一指标无法完全客观地评估炎性痛程度。因此,在基础研究中再寻找出客观、有效、接受度高的评估方法势在必行。有研究表明,角叉菜胶诱导的急性炎症模型会导致局部微循环障碍、毛细血管扩张、局部血流流量增多^[6]。这说明急性炎症发生后,除了疼痛以外,局部皮肤血流灌注量亦会发生改变。而急性炎性痛与局部血流灌注量的变化是否存在相关性,目前未见报道。本课题采用角叉菜胶诱导的急性炎性痛模型初步探讨机械痛阈与局部皮肤血流灌注量的动态变化,分析这两者是否具有相关性,以此为炎性痛的基础研究评价指标提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及材料

1.1.1 实验动物:选取清洁级 Sprague-Dawley 大鼠 20 只,雄性,体重(200 ± 20)g,由浙江中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产合格证号:中国科学院上海实验动物中心[SCXK(沪)2008-0016,使用许可证号:SYXK(浙)2013-0184。按照实验动物合理管理利用等方法^[7,8]常规饲养大鼠,12 h 明暗交替,自主饮食,行为学检测时间控制在 9:00 至 15:00。

1.1.2 主要药品:角叉菜胶(λ -carrageenan),美国 Sigma 公司生产,批号:1408463V。使用时,用 0.9% 生理盐水配制成 2% 浓度。

1.1.3 主要仪器:动态足底测痛仪 UGO37450,意大利 UGO 公司生产;激光多普勒血流仪 Pericam PSI,美国 Thermo 公司生产。以上仪器由浙江中医药大学第三临床医学院针灸神经生物学实验室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及造模:采用 SPSS 随机方法将 20 只雄性 SD 大鼠分为正常对照组和模型组,每组 10 只。模型组大鼠在左后足足跖掌面诱导急性炎性痛模型。具体操作为新鲜配置 2% 角叉菜胶后,在足跖底部由掌腱膜向踝关节方向皮下注射 0.1 mL。正常对照组不做处理。造模后 4 h 检测大鼠的机械痛阈和血流灌注量以确定造模是否成功。

1.2.2 机械痛阈(mechanical withdrawal threshold, MWTs)检测:采用动态足底测痛仪引起大鼠压力痛缩腿反射的阈值作为痛阈指标。大鼠于测定基础痛阈前两天进行适应性痛阈检测,保证测试环境安静,室温 25℃,分别于造模前、造模后 4 h、24 h、48 h 和 72 h 检测大鼠患侧足跖机械痛阈。检测时,将大鼠置于塑料板隔开的单独空间内,底部是铁制网格结构。安静 30 min 后,用针尖对准位置自动发力,以 2.5 g/s 递增,当大鼠自觉疼痛产生缩腿反射时自动弹开。最大刺激量为 50 g,以保证大鼠不受到伤害^[9,10]。引起大鼠压力痛缩腿反射的力量记为该次痛阈。每 5 min 测 1 次,各测 5 次,取平均值为机械痛阈。

1.2.3 血流灌注量(blood perfusion, BP)检测:采用激光多普勒血流仪检测各组大鼠患侧足跖皮肤的血流灌注量^[11]。每次在 MWTs 检测完毕后测定。PSI 参数设置:波长:781 nm,图像操作距离监测值 9.8 cm,监测面积 1.6 cm × 1.6 cm(以掌腱膜中点为中心),分辨率 0.06 mm,3 图片/s。PSI 系统采用 PIMSoft 软件进行记录保存、读取分析。PSI 可以动态及时地反映监测部位的血流灌注量并同时以图像呈现。PU(perfusion unit)是记录血流灌注量的单位,PU 值越高,血流灌注量越多。大鼠固定后检测足跖掌面皮肤血流量,血流稳定后记录血流灌注量数据。

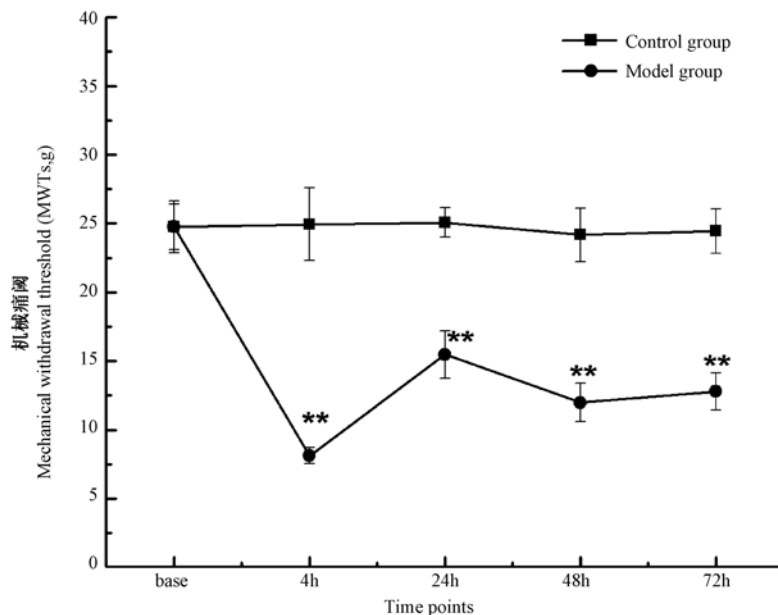
1.2.4 统计学方法:本实验数据以均数 ± 标准误($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 统计软件分析。用单因素方差分析(ANOVA)来评估两组大鼠 MWTs、BP 在不同时间点的变化,LSD 检验比较组间差异。以模型组大鼠 MWTs 和 BP 在不同时间点的同期数据作为双变量相关性分析中的变量,做 Pearson 相关系数双尾检验,并用散点图评价聚集效应。

2 结果

2.1 大鼠机械痛阈变化趋势

如图 1 所示,造模前,两组大鼠左后足跖 MWTs 差异均无显著性;造模后 4 h,模型组大鼠 MWTs 明

显下降,与正常对照组相比差异显著,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),提示造模成功;造模后 24 h 至 72 h,模型组大鼠 MWTs 较造模后 4 h 略有上升,但与正常对照组相比仍有统计学差异 ($P < 0.01$)。

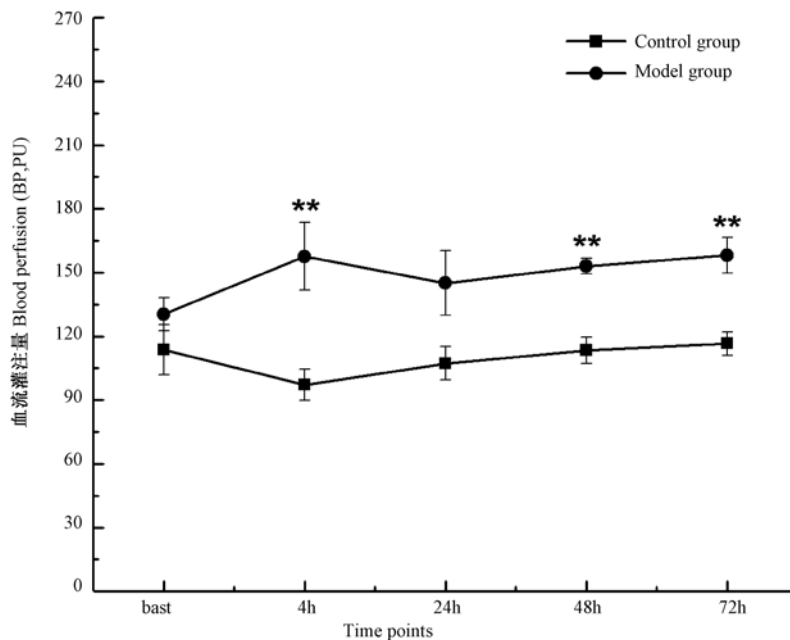


注:与正常对照组相比, ** $P < 0.01$

图 1 不同时间点大鼠患侧足跖机械痛阈

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$

Fig. 1 Mechanical withdrawal threshold of the rat ipsilateral hindpaws at different time points



注:与空白组相比, ** $P < 0.01$

图 2 不同时间点大鼠患侧足跖皮肤血流灌注量

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$

Fig. 2 Blood perfusion of the rat ipsilateral hindpaws at different time points

表 1 大鼠患侧机械痛阈与局部血流灌注量的关系

Tab. 1 The relationship between mechanical withdrawal threshold(MWTs) and blood perfusion(BP) in the rats

		基础 MWTs	造模后 4 h MWTs	造模后 24 h MWTs	造模后 48 h MWTs	造模后 72 h MWTs
		Baseline MWTs	MWTs at 4 h after Carr-injected	MWTs at 24 h after Carr-injected	MWTs at 48 h after Carr-injected	MWTs at 72 h after Carr-injected
基础 BP	r 值	-0.074	-0.146	-0.433	0.027	-0.220
Baseline BP	P 值	0.770	0.562	0.073	0.916	0.381
造模后 4 h BP	r 值	0.102	-0.615(**)	-0.565	-0.407	-0.418
BP at 4 h	P 值	0.687	0.007	0.015	0.094	0.085
after carr-injection	r 值	0.351	-0.535	-0.363	-0.213	-0.448
造模后 24 h BP	P 值	0.153	0.022	0.138	0.395	0.063
BP at 24 h after carr-injection	r 值	0.040	-0.479	-0.443	-0.379	-0.564
造模后 48 h BP	P 值	0.876	0.045	0.066	0.121	0.015
BP at 48 h after Carr-injection	r 值	0.020	-0.628	-0.614	-0.453	-0.699(**)
造模后 72 h BP	P 值	0.938	0.005	0.007	0.059	0.001
BP of 72 h after carr-injection						

注：MWTs 和 BP 的 Pearson 相关系数双尾检验，** P<0.01

Note. Double-end test to determine the Pearson correlation coefficient of MWTs and BP, ** P<0.01

2.2 大鼠局部血流灌注量变化趋势

如图 2 所示,造模前,两组大鼠左后足跖皮肤 BP 无明显差异;造模后 4 h,模型组大鼠 BP 明显上升,与正常对照组相比差异显著,差异有统计学意义($P<0.01$);造模后 24 h,模型组大鼠 BP 下降,与正常对照组相比无统计学差异;造模后 48 h 至 72 h,模型组大鼠 BP 又上升,与正常对照组相比差异显著,差异有统计学意义($P<0.01$)。

图 3 中,蓝色至红色分别代表了 BP 由少至多的变化(图 3 见文后彩插 2)。本研究结果显示:两组大鼠患侧足跖 BP 在不同时间点呈现动态变化过程。正常对照组大鼠 BP 在不同时间点均呈蓝绿色;造模后 4 h 至 72 h,模型组大鼠 BP 在造模区域明显变成红色,提示炎症模型后,局部 BP 显著增加。

2.3 大鼠机械痛阈与血流灌注量的相关性分析

对大鼠患侧足跖 MWTs 和 BP 进行相关性分析。结果显示:大鼠患侧足跖 MWTs 和 BP 呈负相关(表 1),其中造模后 4 h($r = -0.615, P = 0.007$,图 4A)和造模后 72 h($r = -0.699, P = 0.001$,图 4B)明显有统计学差异($P<0.01$)。

如图 5 所示:分析模型组大鼠患侧足跖 MWTs 和 BP,角又菜胶造模前,大鼠患侧足跖 MWTs 和 BP 无相关性。造模后,两者总体呈负相关趋势,在造模后 4 h 和 72 h 呈现显著负相关性($P<0.01$)。

3 讨论

临床发现,各种损伤因素导致的组织损伤或坏死常伴随着急性炎症的发生,产生急性炎症痛或病

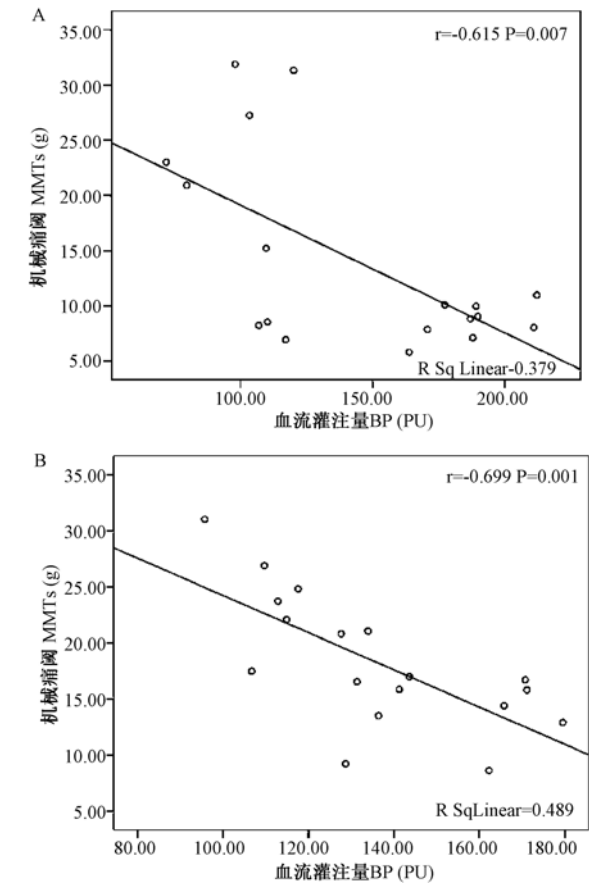
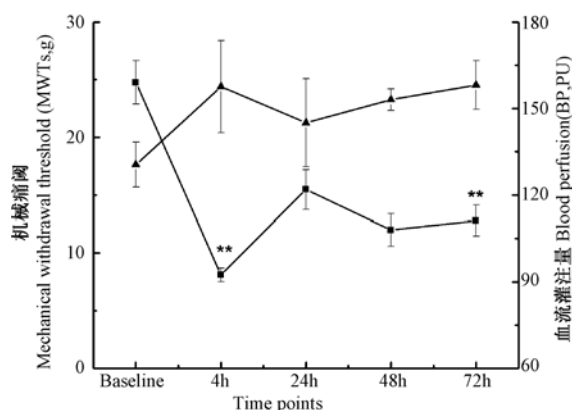


图 4 大鼠患侧足跖 MWTs 和 BP 的相关性散点图 (A:造模后 4 h;B:造模后 72 h)

Fig. 4 Correlation scatterplot of MWTs and BP in the rat ipsilateral hindpaws (A: 4 h after carrageenan-injection; B: 72 h after carrageenan-injection)

情迁延成慢性炎症痛,严重影响患者的身心健康。因此,对于炎症痛的研究有重要的临床意义,用动



注: MWTs 和 BP 的 Pearson 相关系数双尾检验, $** P < 0.01$

图 5 模型组大鼠患侧足跖 MWTs 和 BP 负相关图

Note. Double end test to determine the Pearson

correlation coefficient of MWTs and BP, $** P < 0.01$

Fig.5 Negative correlation of MWTs and BP in the rat ipsilateral hindpaws of the model group

物实验探讨其产生机制及寻找有效的治疗方法亦成为研究热点。其中,如何测量炎性疼痛对炎性疼痛研究的顺利开展有重要影响。

临床研究常用的测痛方法主要是 VAS 评分法。用来作测量的标尺标有表示“无痛”到“最痛”的固定刻度,由患者根据目前的疼痛转况,在盲法下判定自我疼痛有几分,属于 VAS 的哪一等级。其他类似的还有提问法、量表法等^[9]。其操作均是患者在未知等级分布条件下,自我评价疼痛指数。而以实验动物为主的基础研究中最常用的测痛方法是机械测痛^[10-12,14]。其原理是触觉刺激引起足底压力痛缩腿反射,记录该次触觉刺激的力量为痛阈^[13]。正常情况下,当机体接收到伤害性刺激信号时,痛觉传导通路会将信号传递至中枢系统,引起本能的缩腿反射以躲避伤害。当病理状态下,如炎症发生时,痛觉传导通路会异常,产生痛觉过敏和痛觉超敏,轻触即能诱发缩腿反射以保护机体躲避伤害,产生痛阈下降^[11,14]。

由此我们认为,基础研究领域测定炎性痛方式与临床存在一定差异。由于实验动物的难沟通性,测痛方法多采用压力痛等能引起动物本能反射的直接刺激途径,这可能会对正常实验动物造成一定的伤害。对于炎性痛动物来说,由于痛觉传导通路异常,本身无伤害性轻触刺激亦会诱发疼痛,使其对痛觉更易产生过敏或超敏,从而不可能完全客观、真实地反映疼痛本身。临床测痛中采用的 VAS 评分法和量表法等,存在一定的主观因素,但是避免

了触诱发可能引起的对痛觉程度本身特征的干预,且更容易被受试者接受。因此,我们认为在基础研究和临床研究的转化环节,寻找能客观反映疼痛程度又不干预痛觉发展过程的疼痛评估方法,实现动物和人在测痛方式上的统一,将会提高基础研究的价值。

角叉菜胶模型是经典的局部急性炎症痛诱发模型^[1-3]。本实验中,造模大鼠在造模后机械痛阈明显下降,造模侧足跖至踝关节部肿大发红,局部皮肤血流灌注量增加,说明角叉菜胶足底注射诱发了大鼠疼痛和炎症的双重症状表现。从模型大鼠机械痛阈和局部血流灌注量的相关性分析中我们不难发现,在造模后 4 h,痛阈下降最明显时,血流灌注量明显升高;造模后 24 h,痛阈较造模后 4 h 略上升恢复,局部血流灌注量亦下降;造模后 48 h 及 72 h,与造模后 24 h 相比,痛阈有下降趋势,同期局部血流灌注量上升。这一动态变化过程充分说明了急性炎症大鼠中,局部血流量的变化与炎症导致的疼痛感知密切相关。现代研究表明:角叉菜胶致急性疼痛会导致痛觉传导通路异常,产生痛觉超敏和痛觉过敏,神经可塑性增强,诱导局部触诱发痛的产生^[1,2,15]。同时,角叉菜胶所致的炎症会诱发中性粒细胞聚集,炎症介质渗出,血管微循环发生血液动力学改变,血管扩张,血流加速^[16-19]。最新研究表明,伤害性刺激的传入会引发脊髓背角的背根反射,而增加皮肤的血流灌注量^[20,21]。以上研究结果提示,角叉菜胶所致的急性疼痛与炎症引起的血流灌注量增多密切相关。结合本次实验结果,我们发现,通过激光多普勒血流仪监测局部皮肤血流灌注量,这一无创伤的便捷模式有望成为测量急性炎性痛另一方法,并且是在人和实验动物为观察对象的研究中都可能被接受的有效方法,有利于炎性痛研究的顺利开展。

本研究所选角叉菜胶致急性痛大鼠具有明显的急性炎症特征,其在急性痛早期的痛阈与血流变化情况尤显重要,因此我们有必要在后续研究中对造模后 30 min、1 h、3 h、5 h、7 h、24 h 的痛阈血流关系进行系统探讨,以确定本模型急性痛早期痛阈与血流的变化特征。另本结论为动物实验结论,是否适用于临床急性炎性痛研究,还有待验证。

参考文献:

- [1] Hau VS, Huber JD, Campos CR, et al. Effect of lambda-carrageenan-induced inflammatory pain on brain uptake of

- codeine and antinociception [J]. *Brain Res*, 2004, 1018: 257 – 264.
- [2] Marzocco S, Paola DR, Serrano I, et al. Effect of methylguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in the rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 484: 341 – 350.
- [3] Fecho K, Manning EL, Maixner W, et al. Effects of carrageenan and morphine on acute inflammation and pain in Lewis and Fischer rats [J]. *Brain Behav Immun*, 2007, 21: 68 – 78.
- [4] Kima HW, Uha DK, Yoonb SY, et al. Low-frequency electroacupuncture suppresses carrageenan-induced paw inflammation in mice via sympathetic post-ganglionic neurons, while high-frequency EA suppression is mediated by the sympathoadrenal medullary axis [J]. *Brain Res Bull*, 2008, 75: 698 – 705.
- [5] Kissin I, Freitas CF, Bradley EL. Memory of pain: the effect of perineural resiniferatoxin [J]. *Anesth Analg*, 2006, 103 (3): 721 – 728.
- [6] 肖百全, 朱少璇, 杨威, 等. 角叉菜胶致大鼠足肿胀模型探讨及其机制研究 [J]. *中国实用医药*, 2008, 3(23): 63 – 65.
- [7] 徐平. 实验动物资源开发、保存和共享利用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(10): 48 – 56.
- [8] 田还成, 袁慧, 许超琪. 实验动物垫料的标准化 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(10): 72 – 75.
- [9] Liu X, Tian Y, Lu N, et al. Stat3 inhibition attenuates mechanical allodynia through transcriptional regulation of chemokine expression in spinal astrocytes [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8: e75804.
- [10] Barclay J, Patel S, Dorn G, et al. Functional downregulation of P2X3 receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain [J]. *J Neurosci*, 2002, 22: 8139 – 8147.
- [11] Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain [J]. *Pain*, 2011, 152: S2 – S15.
- [12] Zhang Z, Liu X, Lu S, et al. Increased pain in response to mechanical or thermal stimulation in a rat model of incision-induced pain with nicotine dependence and withdrawal [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5: 1063 – 1066.
- [13] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53: 55 – 63.
- [14] Ikeda H, Kiritoshi T, Murase K. Contribution of microglia and astrocytes to the central sensitization, inflammatory and neuropathic pain in the juvenile rat [J]. *Mol Pain*, 2012, 8: 1 – 10.
- [15] Holthoff JH, Wang Z, Seely KA, et al. Resveratrol improves renal microcirculation, protects the tubular epithelium, and prolongs survival in a mouse model of sepsis-induced acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2012, 81: 370 – 378.
- [16] Dufton N, Hannon R, Brancalone V, et al. Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation [J]. *J Immunol*, 2010, 184(5): 2611 – 2619.
- [17] de Melo JO, de Arruda LL, Baroni S, et al. Inhibitory effect of *Helicteres gardneriana* ethanol extract on acute inflammation [J]. *Evid based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 1 – 5.
- [18] Wei H, Saarnilehto M, Falck L, et al. Spinal transient receptor potential ankyrin 1 channel induces mechanical hypersensitivity, increases cutaneous blood flow, and mediates the pronociceptive action of dynorphin A [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2013, 64: 331 – 340.
- [19] Lin Q, Li D, Xu X, et al. Roles of TRPV1 and neuropeptidergic receptors in dorsal root reflex-mediated neurogenic inflammation induced by intradermal injection of capsaicin [J]. *Mol Pain*, 2007, 3: 1 – 14.
- [20] Hagains CE, Trevino LA, He JW, et al. Contributions of dorsal root reflex and axonal reflex to formalin-induced inflammation [J]. *Brain Res*, 2010, 1359: 90 – 97.
- [21] Lin Q, Wu J, Willis WD. Dorsal root reflexes and cutaneous neurogenic inflammation after intradermal injection of capsaicin in rats [J]. *J Neurophysiol*, 1999, 82: 2602 – 2611.

[修回日期] 2014-09-15