

王甜,羊璞,张熙,等. 不同剂量完全弗氏佐剂建立慢性炎性疼痛抑郁共病大鼠模型的实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 633-643.

WANG T, YANG P, ZHANG X, et al. Establishment of a rat model of comorbid chronic inflammatory pain and depression using different doses of complete Freund's adjuvant [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 633-643.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.002

不同剂量完全弗氏佐剂建立慢性炎性疼痛抑郁 共病大鼠模型的实验研究

王甜¹, 羊璞², 张熙³, 李欣¹, 黄文静¹, 郑广玫¹, 黄心雨¹, 许智迤¹,
黄颖¹, 尹丽莉¹, 栗胜勇^{3*}

(1. 广西中医药大学第一临床医学院, 南宁 530023; 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院,
成都 610072; 3. 广西中医药大学第一附属医院针灸科, 南宁 530023)

【摘要】 目的 比较不同剂量的完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)足底注射诱导的慢性疼痛抑郁共病大鼠模型的成功率和稳定性。**方法** 将60只SD大鼠随机分为空白组、CFA低剂量(CFA-L)组、CFA高剂量(CFA-H)组,每组20只。CFA-L组及CFA-H组大鼠分别以左后足足底注射50、100 μ L CFA,空白组左后足足底注射0.9%氯化钠溶液。造模后第0、7、14、21、28天分别观察各组大鼠一般状态、体质量变化,机械缩足阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)、热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL)评价大鼠的疼痛反应,旷场实验(open field test, OFT)、强迫游泳实验(forced swim test, FST)、悬尾实验(tail suspension test, TST)评价大鼠的抑郁行为,酶联免疫吸附实验检测大鼠前扣带回皮层的谷氨酸(glutamate, Glu)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的含量,免疫组化法检测大鼠前扣带回皮层脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的改变,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠前扣带回皮层的病理变化。**结果** (1)一般情况:造模后第7天,CFA-L组和CFA-H组大鼠左后足踝关节和足趾均红肿明显,CFA-H组肿胀更甚;造模后第14、21、28天,CFA-L组大鼠左后足踝关节和足趾红肿渐恢复,CFA-H组大鼠仍红肿明显,且饮水进食量减少;(2)体质量:造模后第14、21、28天,CFA-H组大鼠体质量显著低于空白组、CFA-L组($P < 0.05$, $P < 0.05$);(3)疼痛相关行为学:造模后第7、14天,与空白组比较,CFA-L组、CFA-H组的MWT、TWL明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$);造模后第21天,CFA-H组的MWT显著低于空白组和CFA-L组($P < 0.05$, $P < 0.05$),CFA-L组、CFA-H组的TWL显著低于空白组($P < 0.05$, $P < 0.05$);造模后第28天,CFA-H组的MWT、TWL显著低于空白组和CFA-L组($P < 0.05$, $P < 0.05$);(4)抑郁相关行为学:造模后第7天,CFA-H组的OFT运动总距离较空白组、CFA-L组明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$);造模第14、21、28天,与空白组、CFA-L组比较,CFA-H组OFT运动总距离及中央停留时间明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$),FST、TST明显升高($P < 0.05$, $P < 0.05$);(5)Glu、GABA、BDNF表达:CFA-H组Glu含量较空白组、CFA-L组明显升高($P < 0.05$, $P < 0.05$),GABA含量、Glu/GABA和BDNF表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$);(6)前扣带回皮层病理:CFA-L组前扣带回皮层区有较少损伤,锥体细胞数量较多,细胞排列较整齐,核仁清晰,少量细胞表现出核固缩和深染色;与CFA-L组比较,CFA-H组前扣带回皮层损伤区细胞排列紊乱,大量神经元细

【基金项目】国家自然科学基金(82160934),广西自然科学基金重点项目(2023GXNSFDA026052),广西研究生教育创新计划项目(YCBZ2025181)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82160934), Guangxi Natural Science Foundation Key Project (2023GXNSFDA026052), Innovation Project of Guangxi Graduate Education(YCBZ2025181).

【作者简介】王甜,女,在读博士研究生,研究方向:针灸治疗痛症及脑病。Email:932266904@qq.com

【通信作者】栗胜勇,男,博士,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:针灸治疗痛症及脑病。Email:1037097555@qq.com

胞固缩、深染,锥体细胞数量明显减少、甚至消失,组织间隙有空泡、红细胞和神经纤维缠结出现。**结论** 足底注射 100 μ L CFA 可成功建立慢性炎性疼痛抑郁共病大鼠动物模型,引起大鼠痛觉过敏、抑郁样行为改变及前扣带回皮层 Glu、GABA、BDNF 改变,诱导前扣带回皮层病理形态变化,符合慢性疼痛抑郁共病的生理病理学特点。

【关键词】 完全弗氏佐剂;不同剂量;慢性疼痛抑郁共病;谷氨酸; γ -氨基丁酸;脑源性神经营养因子;模型研究

【中图分类号】Q95-33 【文献标志码】A 【文章编号】1005-4847 (2025) 05-0633-11

Establishment of a rat model of comorbid chronic inflammatory pain and depression using different doses of complete Freund's adjuvant

WANG Tian¹, YANG Pu², ZHANG Xi³, LI Xin¹, HUANG Wenjing¹, ZHENG Guangmei¹,
HUANG Xinyu¹, XU Zhiyi¹, HUANG Ying¹, YIN Lili¹, SU Shengyong^{3*}

(1. the First School of Clinical Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China;

2. Sichuan Academy of Medical Sciences · Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China;

3. Department of Acupuncture and Moxibustion, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

Corresponding author: SU Shengyong. E-mail: 1037097555@qq.com

【Abstract】 **Objective** To compare the success rate and stability of rat models of comorbid chronic pain and depression induced by different doses of complete Freund's adjuvant (CFA). **Methods** Sixty SD rats were divided randomly into a control group, low-dose CFA group (CFA-L), and high-dose CFA group (CFA-H) ($n = 20$ rats per group). Rats in the CFA-L and CFA-H groups were injected with 50 and 100 μ L CFA, respectively, and rats in the control group were injected with 0.9% sodium chloride solution. The general state, body weight, mechanical withdrawal threshold (MWT), and thermal withdrawal latency (TWL) were observed at 0, 7, 14, 21, and 28 days after modeling. Depressive behavior was evaluated using the open field test (OFT), forced swim test (FST), and tail suspension test (TST). Glutamate (Glu) and γ -aminobutyric acid (GABA) levels in the anterior cingulate cortex were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the anterior cingulate cortex was detected by immunohistochemistry, and pathological changes in the anterior cingulate cortex were observed by HE staining. **Results** (1) Regarding the general condition of the rats, the left ankle joint and toes were obviously red and swollen in the CFA-L and CFA-H groups on the 7th day after modeling, and the swelling was more severe in the CFA-H group. The redness and swelling of the left hind foot and ankle joint and toes gradually recovered in the CFA-L group on days 14, 21, and 28 after modeling, but were still obvious in the CFA-H group, and the water and food intake decreased. (2) The body mass was significantly lower in rats in the CFA-H group compared with those in the blank and CFA-L groups on days 14, 21, and 28 after modeling ($P < 0.05$, $P < 0.05$). (3) Regarding pain-related behavior, the MWT and TWL were significantly decreased in the CFA-L and CFA-H groups on the 7th and 14th days after modeling, compared with the control group ($P < 0.05$, $P < 0.05$). On day 21 after modeling, MWT was significantly lower in the CFA-H group than in the blank and CFA-L groups ($P < 0.05$, $P < 0.05$), and TWL was significantly lower in the CFA-L and CFA-H groups than in the blank group ($P < 0.05$, $P < 0.05$). On day 28 after modeling, MWT and TWL were significantly lower in the CFA-H group than in the blank and CFA-L groups ($P < 0.05$, $P < 0.05$). (4) In terms of depression-related behaviors, the total OFT movement distance was significantly lower in the CFA-H group than in the blank and CFA-L groups on day 7 after modeling ($P < 0.05$, $P < 0.05$). The total OFT distance and central dwell time were significantly lower in the CFA-H group than in the blank and CFA-L groups on days 14, 21, and 28 after modeling ($P < 0.05$, $P < 0.05$), and the result in the FST and TST were significantly higher than in the blank and CFA-L groups ($P < 0.05$, $P < 0.05$). (5) Glu, GABA, and BDNF expression levels were significantly higher in the CFA-H group than in the blank and CFA-L groups

($P < 0.05$, $P < 0.05$), while GABA, Glu/GABA, and BDNF levels were significantly lower in the CFA-H group than in the blank and CFA-L groups ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$). (6) The CFA-L group showed less damage in the anterior cingulate cortex, more pyramidal cells, more arranged cells, clear nucleoli, and a small number of cells with karyokinesis and deep staining. Compared with the CFA-L group, rats in the CFA-H group showed a disordered cell arrangement in the injured area of the anterior cingulate cortex, a large number of pyknotic and hyperchromatic neurons, significantly fewer or absent pyramidal cells, and vacuoles, red blood cells, and neurofibrillary tangles in the interstitial space. **Conclusions** Injection of CFA 100 μL can be used to establish a rat model of chronic inflammatory pain and depression, showing hyperalgesia, depression-like behavioral changes, changes in levels of Glu, GABA, and BDNF in the anterior cingulate cortex, and pathological changes in the anterior cingulate cortex, consistent with the pathophysiological characteristics of chronic pain and depression.

【Keywords】 complete Freund's adjuvant; different doses; comorbid chronic pain and depression; glutamate; γ -aminobutyric acid; brain-derived neurotrophic factor; model study

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

国际疼痛研究协会将持续 3 个月及以上的疼痛称为慢性疼痛^[1]。流行病学调查显示,慢性疼痛作为一种长期的应激源,可引起 30% ~ 60% 的慢性疼痛患者出现抑郁状态^[2]。临床上慢性疼痛和抑郁一旦共病,易发展成难治性疾病,造成患者躯体功能下降,影响预后^[3]。但目前其共病的病因及发病机制尚不明确,患者对慢性疼痛抑郁共病治疗方式的开发需求日益迫切,因此,建立合理、可靠、切合临床的动物模型是该病研究的基础,对慢性疼痛抑郁共病的发病机制研究有着重大意义。

目前,慢性疼痛抑郁共病动物造模方式众多,常用的造模方法为使用一定剂量的完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)对实验动物进行干预^[4]。但在实验过程中 CFA 足底注射所致的慢性炎性动物模型存在自限性,即在造模完成后的一定时间内,在不对造模动物进行任何干预的情况下,其慢性炎性病理学改变会逐渐减轻,抑郁障碍也会逐渐恢复,只能通过缩短实验周期或在实验期间增加造模次数解决上述问题。如王雅娟等^[5]对 CFA 诱导的慢性疼痛抑郁共病模型仅进行了 7 d 内的实验观察。羊璞^[6]采用足底注射 2 次 CFA 复制慢性疼痛抑郁共病大鼠模型。上述方法虽都能成功建立慢性疼痛抑郁共病模型,但是无法观察远期疗效,或是操作频次过多,造模时对实验动物造成损害,导致实验结果的不确定性因素增多。并且既往相关研究中, CFA 造模剂量未完全统一,引起诸多研究者无法成功模拟文献报道中的模型。然而不同剂量

CFA 建立慢性疼痛抑郁共病大鼠模型有何差异未见报道,且尚未有研究对慢性炎性抑郁共病大鼠模型进行长期观察,明确其病变消退的规律。故探索最符合慢性疼痛抑郁共病的发病机制及进程的 CFA 有效造模剂量,减少足底注射的次数成功建立慢性疼痛抑郁共病模型是目前亟待解决的基础研究问题。

Cell 曾提出大脑皮层的重要组成部分——前扣带回皮层是缓解慢性疼痛的中枢核团之一,亦有研究发现,前扣带回皮层参与了疼痛及抑郁间的信息传导^[7]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及谷氨酸(glutamate, Glu)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是疼痛抑郁共病的关键机制^[8-9]。基于此,本研究采用 50、100 μL CFA 足底注射诱导慢性疼痛抑郁共病大鼠模型,进行为期 28 d 的追踪观察,验证不同剂量 CFA 慢性疼痛抑郁共病大鼠模型的稳定性及可靠性,并通过观察大鼠疼痛和抑郁相关行为学改变,及监测大鼠前扣带回皮层中 BDNF、Glu、GABA 的变化,并结合前扣带回皮层病理学检测,旨在减少造模次数的基础上,确定 CFA 制备慢性疼痛抑郁共病大鼠模型的最佳造模剂量,为寻求有效疗法并探讨机制提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 200

~ 240 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】。大鼠饲养及观察均在广西中医药大学动物实验中心进行【SYXK(桂)2019-0001】。保持饲养温度 23 ~ 25 ℃, 湿度 50% ~ 60%, 12 h 昼夜对半循环照明节律, 大鼠自由饮水摄食。本实验经过广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审批(DW 20240919-204)。

1.1.2 主要试剂与仪器

完全弗氏佐剂(7009, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 异氟醚(R510-22, 深圳瑞沃德生命科技有限公司), 伊红染液(BA-4024, 珠海贝索生物技术有限公司), 75% 乙醇(1001-0038, 天津市永大化学试剂有限公司), 95% 乙醇(1001-0044, 天津市永大化学试剂有限公司), 苏木素染色液(BA-4041, 珠海贝索生物技术有限公司), 分化液(C0163M, 上海碧云天生物技术有限公司), 无水乙醇(1001-0254, 天津市永大化学试剂有限公司), 二甲苯(1001-0220, 天津市永大化学试剂有限公司), 中性树胶(ZLI-9555, 北京中杉金桥生物技术有限公司), DAB 显色剂(ZLI-9018, 北京中杉金桥生物技术有限公司), 一抗(DF6387, Affinity)、二抗(PV-6000, 北京中杉金桥生物技术有限公司), 5% BSA(AR0004, 武汉博士德), Glu 比色法测试盒(E-BC-K903-M, 武汉伊莱瑞特), GABA 比色法测试盒(E-BC-K852-M, 武汉伊莱瑞特)。

Von Frey 纤维丝(NC12775-79, 上海玉研科学仪器有限公司), 小动物专用麻醉机(CDS9000, 美国 Harvard), 热板痛觉测试仪(II TC39, 美国 Life Science), 旷场实验系统(XR-XZ301, 上海欣软信息科技有限公司), 智能热板测痛仪(KW-RB, 南京卡尔文生物科技有限公司), 强迫游泳实验系统(XR-XQ202, 上海欣软信息科技有限公司), 生物安全柜(SW. TFG-15, 广州瑞智净化设备有限公司), 低温冰箱(MDF-382E 型, 日本三洋), 涡旋振荡仪(QL-902, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司), 离心机(Centrifuge 5417R, Eppendorf), 电热恒温水箱(HH. W21. 600, 余姚市东方电工仪器厂), 酶标仪(Elx800, BIO-TEK), 干燥箱(MIR-153 型, 日本三洋), 石蜡切片机(RM2135, 德国 LEICA), 电子天平(AE100 型, 瑞士 METTER), 电磁炉(JYC-21ES55C 型, 九阳), 电脑生物组织摊烤片机(KD-T, 浙江省金华市科

迪仪器设备有限公司), 光学显微镜(BX43, 日本 OLYMPUS), 成像系统(UC90, 日本 OLYMPUS)。

1.2 方法

1.2.1 分组与造模

所有大鼠适应性喂养 1 周后, 用随机数字表法将 60 只大鼠分为空白组、CFA 低剂量(CFA-L)组、CFA 高剂量(CFA-H)组, 每组各 20 只。

大鼠予 2% 异氟醚吸入麻醉后俯卧位固定, CFA-L 组和 CFA-H 组大鼠分别接受 50、100 μ L CFA 于左后爪足底注射, 空白组于左后爪足底注射 0.9% 氯化钠溶液。

1.2.2 大鼠一般情况观察

观察并记录各组大鼠造模后第 7、14、21、28 天的精神状态、饮水进食情况及左后足肿胀等情况。

1.2.3 大鼠体质量变化

分别于造模后第 0、7、14、21、28 天称量大鼠体质量。

1.2.4 大鼠行为学检测

分别于造模后第 0、7、14、21、28 天进行行为学检测。

(1) 机械缩足阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT): 使用 Von Frey 纤维丝的 Up-down 法依次对每只大鼠进行评估^[10]。放置大鼠于测试笼中适应 3 min, 将 Von Frey 纤维丝于左后肢足底中部垂直施加压力, 直至纤维丝轻微弯曲, 每次刺激时间 ≤ 5 s, 刺激间隔时间 > 120 s。刺激时观察大鼠的反应, 当大鼠出现缩足或舔足行为时, 为阳性反应, 标记为“X”, 下一次刺激以较低强度纤维丝替代; 反之, 如果出现阴性反应(无缩足或舔足行为), 则记为“O”, 下一次刺激以较高强度纤维丝替代。在出现“OX”或“XO”组合的情况下, 再进行另外 4 次测量。机械痛阈的计算和分析采用公式: $MPT(g) = (10^{[Xf + k\delta]}) / 10\ 000$, Xf : 最后测试纤维丝编号; δ : 所取各根纤维丝取对数后的平均差值(约为 0.224); k : 测试所得序列根据查表后获得的系数值。

(2) 热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL): 将每只大鼠依次置入热板测痛仪测试箱中适应环境 3 min, 待大鼠无探索等行为时, 记录从开始照射至大鼠出现抬腿舔足行为的时间。每只大鼠共测定 3 次, 每次间隔 5 min, 取

3 次测量的平均值。

(3) 旷场实验(open field test, OFT): 将每只大鼠单独放置在黑色敞箱的中心区域内适应环境 3 min 后开始实验, 通过旷场视频分析软件分析每只大鼠 5 min 内的运动轨迹, 依次记录每只大鼠的运动总距离和中央停留时间。

(4) 强迫游泳实验(forced swim test, FST): 将大鼠放入有机玻璃测试圆桶中, 圆桶中的水深约 30 cm, 水温 18 ~ 22 °C, 待大鼠适应环境后, 用视频分析软件记录 5 min 内大鼠累计不动时间。

(5) 悬尾实验(tail suspension test, TST): 予绳子固定大鼠尾部距末端约 1/3 处, 并将其倒挂于悬尾仪顶部适应 3 min, 开始实验时使用行为学软件观察并记录大鼠在 5 min 内的不动时间。

1.2.5 大鼠前扣带回皮层 Glu 及 GABA 测定

造模后第 28 天, 待所有行为学实验完成后, 大鼠予 2% 异氟醚吸入麻醉后开胸, 暴露心脏。每组随机选取 3 只大鼠使用 0.9% 氯化钠溶液灌注, 随后剥离出大脑组织后置于无菌培养皿中, 并于冰上快速分离大脑, 取前扣带回皮层组织, 于 -80 °C 冰箱保存备用。检测时, 取大鼠前扣带回皮层组织, 加入 9 倍体积的生理盐水, 4 °C, 以 2500 r/min 离心 10 min, 取 10% 匀浆上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书检测 Glu 及 GABA 含量。

1.2.6 大鼠前扣带回皮层 BDNF 测定

造模后第 28 天, 所有行为学实验完成后, 大鼠予 2% 异氟醚吸入麻醉后开胸, 暴露心脏。每组随机选取 3 只大鼠使用 4% 多聚甲醛于左心室进行灌注, 取大脑前扣带回皮层组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 脱水, 切片, 抗原修复, 冷却, 使用 PBS 缓冲液清洗, 滴加 5% BSA, 室温孵育 30 min, 滴加一抗(BDNF 1:80), 4 °C 孵育 12 h, PBS 冲洗 3 次, 滴加二抗, 37 °C 孵育 20 min, PBS 冲洗 3 次, 加入 DAB 显色液, 苏木素复染、分化、反蓝, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明、树胶封片。光学显微镜下进行观察, 以棕黄色为阳性标准判定染色结果, 细胞核呈蓝色, 对阳性细胞进行定量分析。在阳性区域中选取 1 个间断高倍视野($\times 400$), 分析免疫阳性区域比例, 并计算其平均光密度值。

1.2.7 大鼠前扣带回皮层病理变化

前扣带回皮层取材方法同上, 流水冲洗组织样本, 依次梯度乙醇进行脱水, 常规石蜡包埋后

切片, 65 °C 烤片 4.5 h, 进行脱蜡、水洗、返蓝、染色、封片, 采用光学显微镜观察, 选取目标区域进行拍照, 分析前扣带回皮层组织形态变化。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计分析处理。计量以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 符合正态分布且方差齐采用 LSD 法检验, 方差不齐采用 Dunnett's T_3 检验。以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况观察

空白组大鼠在观察期间均活动自如, 精神状态佳, 饮水进食正常, 毛发柔顺光亮。造模后第 7 天, CFA-L 组和 CFA-H 组大鼠出现活动不利, 两组大鼠均左后足踝关节和足趾红肿明显, CFA-H 组肿胀更甚; 造模后第 14、21、28 天, CFA-L 组大鼠左后足踝关节和足趾红肿渐恢复, CFA-H 组大鼠仍红肿明显, 活动不利, 懒动, 精神萎靡不振, 饮水进食量减少, 毛发无光泽。见图 1。

2.2 各组大鼠体质量变化

实验期间各组大鼠体质量整体呈上升趋势。造模后第 0 和 7 天, 与空白组比较, CFA-L 组和 CFA-H 组大鼠体质量, 无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$); 造模后第 14、21、28 天, 与空白组比较, CFA-L 组体质量, 无统计学意义($P > 0.05$), 而 CFA-H 组体质量增长缓慢, 显著低于空白组和 CFA-L 组($P < 0.05$, $P < 0.05$)。见图 2。

2.3 各组大鼠行为学比较

2.3.1 各组大鼠疼痛相关行为学比较

(1) MWT: 造模第 0 天, CFA-L 组和 CFA-H 组与空白组相比, 无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$); 造模后第 7、14 天, CFA-L 组及 CFA-H 组的 MWT 明显低于空白组($P < 0.05$, $P < 0.05$), CFA-H 组比 CFA-L 组降低更为显著($P < 0.05$); 造模后第 21、28 天, 与空白组比较, CFA-L 组无统计学意义($P > 0.05$), 而与空白组和 CFA-L 组比较, CFA-H 组显著降低($P < 0.05$, $P < 0.05$)。见图 3A。

(2) TWL: 造模第 0 天, 与空白组 TWL 比较, CFA-L 组和 CFA-H 组, 无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$); 造模后第 7、14、21 天, CFA-L 组和

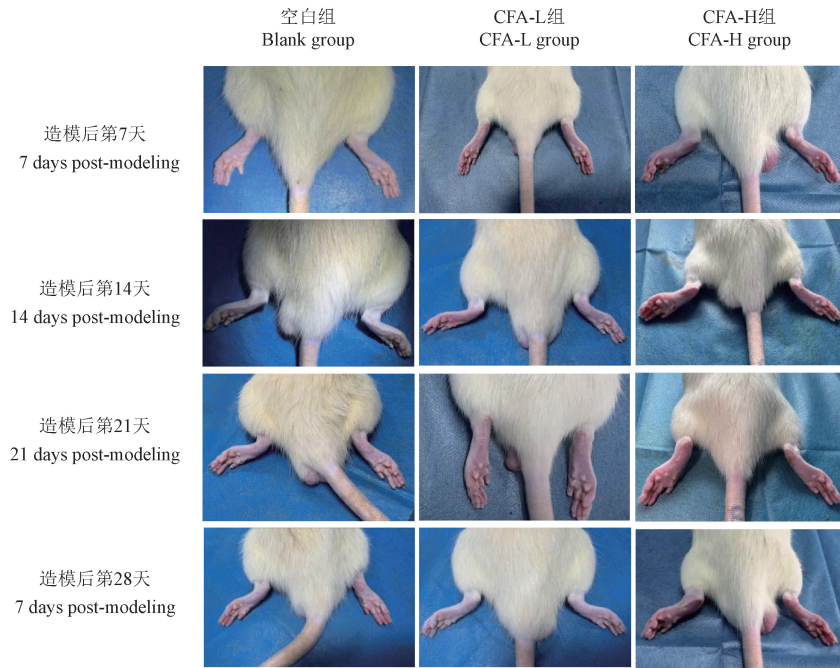
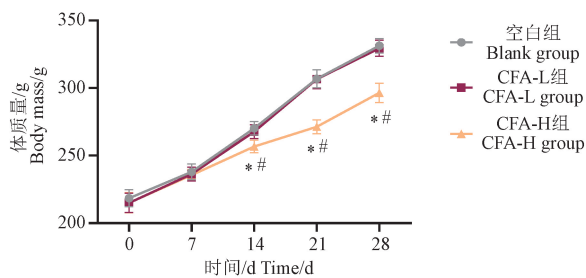


图 1 各组大鼠造模后左后足脚踝及足趾变化情况比较

Figure 1 Comparison of ankle and toe changes of left hind foot of rats in each group after modeling



注:与空白组相比, * $P < 0.05$; 与 CFA-L 组相比, # $P < 0.05$ 。(下图同)

图 2 各组大鼠体质量变化

Note. Compared with blank group, * $P < 0.05$. Compared with CFA-L group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 2 Changes in body mass of rats in each group

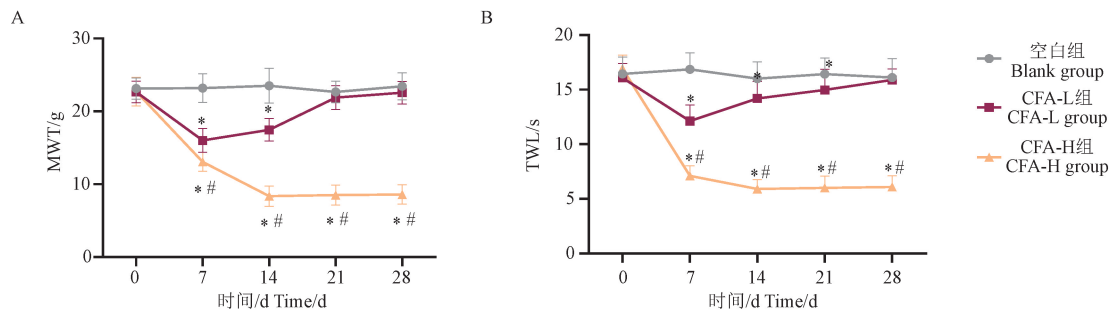


图 3 各观察时点各组大鼠 MWT 和 TWL 变化比较

Figure 3 Comparison of MWT and TWL changes of rats in each group at each observation time point

CFA-H 组明显低于空白组 ($P < 0.05$, $P < 0.05$), CFA-H 组显著低于 CFA-L 组 ($P < 0.05$); 造模后第 28 天, CFA-L 组与空白组比较, 无统计学意义 ($P > 0.05$), CFA-H 组比空白组、CFA-L 组明显降低, 具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.05$)。见图 3B。

结果表明 CFA-L 组、CFA-H 组均出现大鼠 MWT 和 TWL 的敏感性增加, 并引起大鼠疼痛反应。但在造模后第 14、21、28 天, CFA-L 组 MWT 和 TWL 的敏感性降低, 而 CFA-H 组仍存在大鼠持续性疼痛。

2.3.2 各组大鼠抑郁相关行为学比较

(1) OFT: 造模后第 0 天, 与空白组比较,

CFA-L 组和 CFA-H 组 OFT 运动总距离、中央停留时间,均无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$)。造模后第 7 天,与空白组比较,CFA-L 组运动总距离、中央停留时间,无统计学意义;与空白组、CFA-L 组比较,CFA-H 组运动总距离明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$),而中央停留时间,无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$)。造模后第 14、21、28 天,空白组与 CFA-L 组比较运动总距离、中央停留时间无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$),而与空白组、CFA-L 组比较,CFA-H 组运动总距离、中央停留时间均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$)。见图 4A ~ 图 4B。

(2) FST: 造模后第 0、7 天, CFA-L 组和 CFA-H 组与空白组 FST 比较,无统计学意义($P >$

0.05 , $P > 0.05$);造模后第 14、21、28 天,与空白组比较,CFA-L 组无统计学意义($P > 0.05$),与空白组及 CFA-L 组比较,CFA-H 组明显升高($P < 0.05$, $P < 0.05$)。见图 4C。

(3) TST: 造模后第 0、7 天,与空白组比较, CFA-L 组和 CFA-H 组 TST 比较,无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$);造模后第 14、21、28 天,与空白组比较,CFA-L 组无统计学意义($P > 0.05$),而 CFA-H 组与空白组及 CFA-L 组比较明显升高($P < 0.05$, $P < 0.05$)。见图 4D。

表明仅有 CFA-H 组可引起 OFT、FST、TST 改变,诱导大鼠出现持续性抑郁样行为,且该类抑郁样行为在造模后第 14 天开始逐渐显著,至造模后第 28 天仍明显存在。

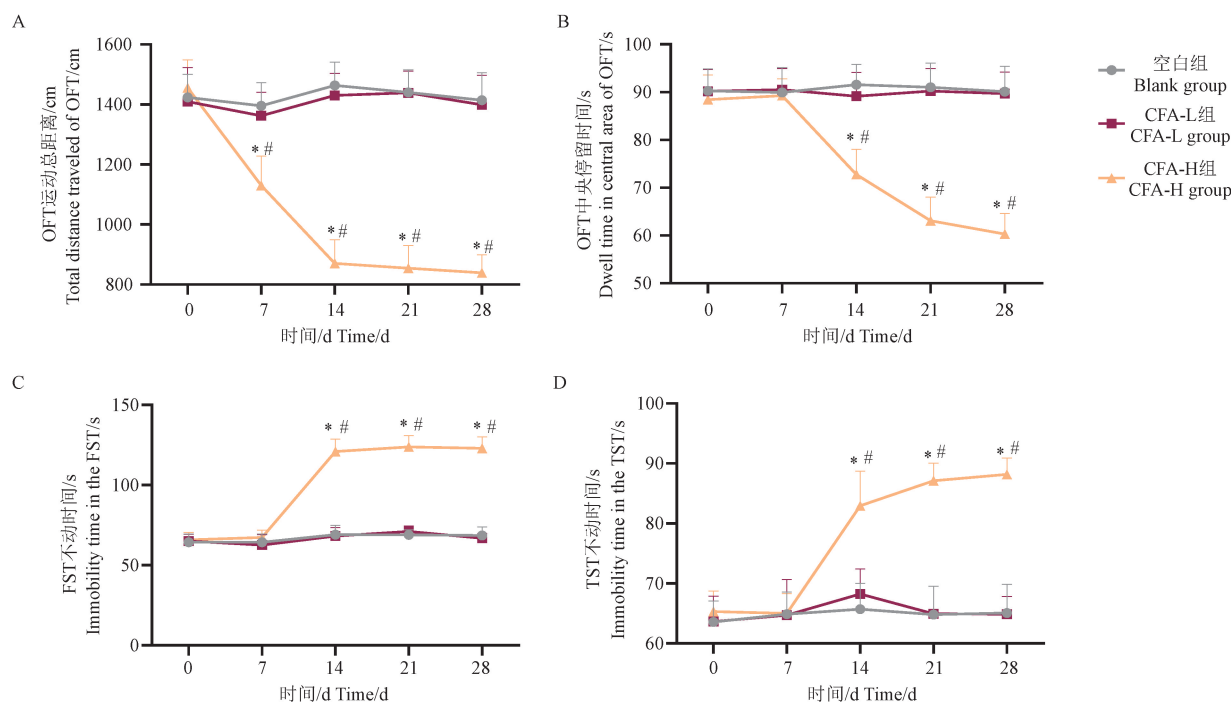


图 4 各观察时点各组大鼠 OFT、FST 及 TST 变化比较

Figure 4 Comparison of OFT, FST and TST changes of rats in each group at each observation time point

2.4 各组大鼠前扣带回皮层 Glu 和 GABA 比较

ELISA 测定 Glu 及 GABA 含量结果显示,与空白组比较,CFA-L 组无统计学意义($P > 0.05$), CFA-H 组 Glu 较空白组和 CFA-L 组明显升高($P < 0.05$, $P < 0.05$), GABA、Glu/GABA 明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$)。结果提示,CFA-H 组可诱导慢性疼痛抑郁共病大鼠出现 Glu 升高、GABA 含量显著降低,Glu/GABA 稳态失衡。见图 5。

2.5 各组大鼠前扣带回皮层 BDNF 比较

免疫组化测定 BDNF 含量结果显示,空白组与 CFA-L 组棕黄色区域均较少,呈弱阳性表达;与空白组、CFA-L 组比较,CFA-H 组棕黄色染色区域增多,表现为强阳性表达。此外,与空白组比较,CFA-L 组 BDNF 的平均光密度值差异无统计学意义($P > 0.05$),而 CFA-H 组与空白组、CFA-L 组比较明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$)。

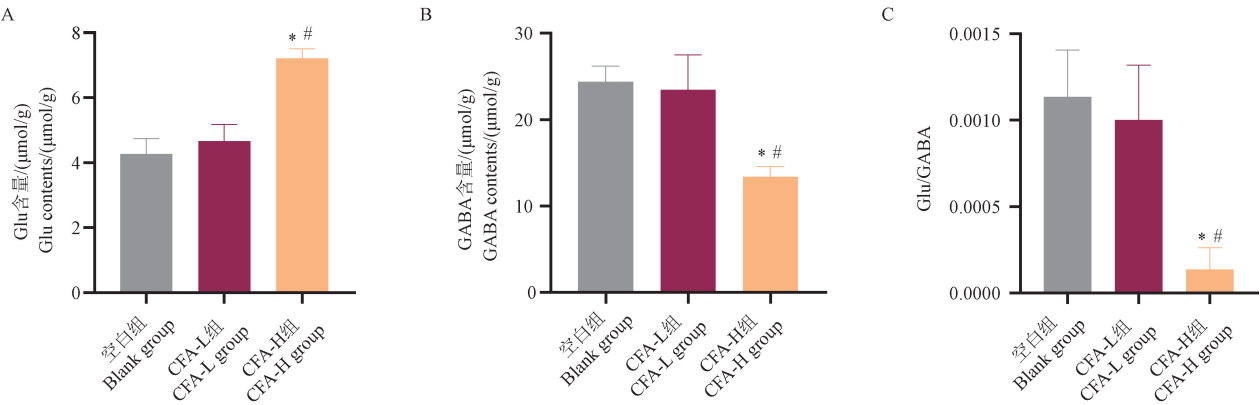


图 5 各组大鼠 Glu 和 GABA 含量比较

Figure 5 Comparison of Glu and GABA contents of rats in each group

结果提示,CFA-H 组可引起慢性疼痛抑郁共病大鼠 BDNF 降低。见图 6。

2.6 各组大鼠前扣带回皮层组织病理形态变化

空白组大鼠前扣带回皮层区形态正常,有大量锥体细胞,细胞排列整齐,未见固缩神经元出现;与空白组比较,CFA-L 组有较少损伤,锥体细

胞数量较多,细胞排列较整齐,核仁清晰,少量细胞表现出核固缩和深染色;与 CFA-L 组比较,CFA-H 组前扣带回皮层损伤区细胞排列紊乱,大量神经元细胞固缩、深染,锥体细胞数量明显减少、甚至消失,组织间隙有空泡、红细胞和神经纤维缠结出现。见图 7。

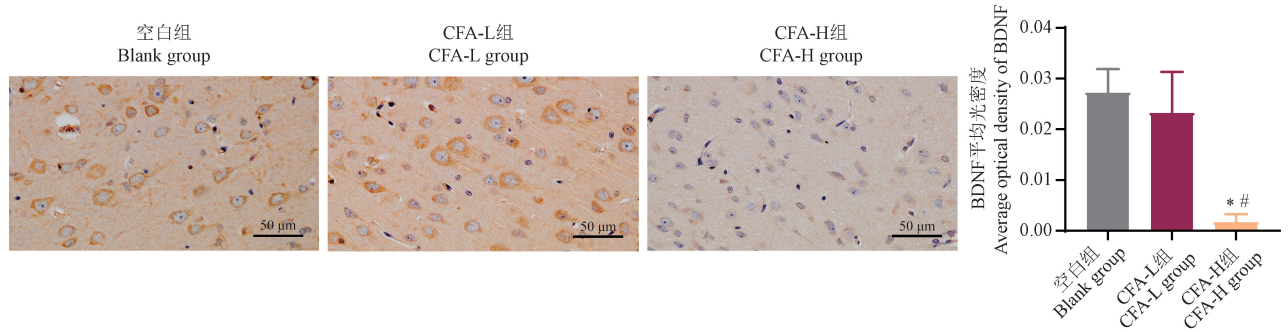
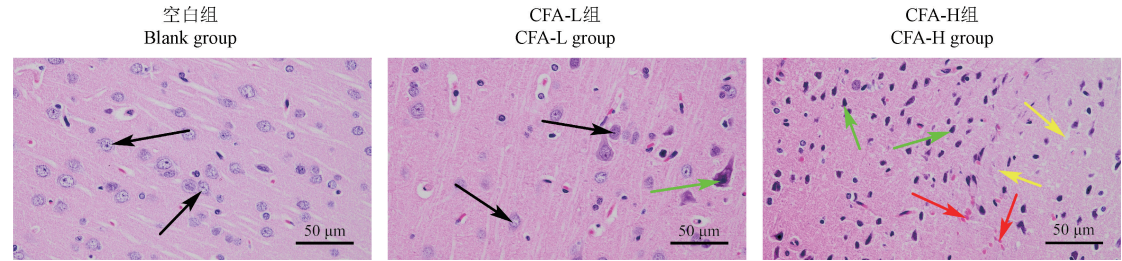


图 6 各组大鼠 BDNF 平均光密度值比较

Figure 6 Comparison of average optical density values of BDNF of rats in each group



注:黑色箭头:锥体细胞;绿色箭头:固缩神经元;红色箭头:红细胞;黄色箭头:组织间隙空泡和神经纤维缠结。

图 7 各组大鼠前扣带回皮层结构

Note. Black arrows. Pyramidal cells. Green arrows. Pyknotic neurons. Red arrows. Erythrocytes. Yellow arrows. Interstitial vacuoles and neurofibrillary tangles.

Figure 7 Structure of the anterior cingulate cortex of rats in each group

3 讨论

了解慢性疼痛抑郁共病的病理机制成为目前研究的热点,稳定的动物模型是研究该病病理机制、探寻有效防治方法及机制的关键,建立符合该共病病理发展机制的动物模型有助于探索慢性疼痛与抑郁之间的联系,并有助于临床研发新的治疗方式。多种因素可诱导慢性疼痛抑郁共病动物模型,如 CFA 注射、硬脑膜致炎剂灌注、神经结扎等^[11-13],其中 CFA 诱导的慢性疼痛抑郁共病模型因其易操作、刺激性强、提供持久的抗原释放、与人类疾病典型特征相似等优点而应用广泛^[14];诱导方式有右胫骨关节内注射、足底注射,以足底注射尤为常见^[15]。而在以往研究中,CFA 的造模剂量未完全统一,导致慢性疼痛抑郁共病的病理机制研究和药物作用评价均受限制,选用最符合临床及疾病发展机制的造模剂量是制定研究方案的前提和基础。故本研究采用 50、100 μL CFA 足底注射制备不同剂量的慢性疼痛抑郁共病大鼠模型,并延长观察周期,对大鼠进行为期 28 d 的行为学观察,旨在对比不同造模剂量制备的慢性疼痛抑郁共病模型在不同时间节点的整体情况,明确其病理阶段,评价其成模特点。

慢性疼痛患者在临床上表现为触痛觉超敏和热痛觉过敏,这些现象在大鼠模型中可用 MWT 和 TWL 观察到^[16]。本研究发现,CFA-L 组和 CFA-H 组大鼠的 MWT 和 TWL 在造模后第 7 天明显降低,但 CFA-L 组的 MWT 和 TWL 在造模后第 21 及 28 天恢复,不可建立大鼠持续性疼痛,而 CFA-H 组大鼠 MWT 和 TWL 在造模后第 7 天至造模后第 28 天仍持续性降低。疼痛感觉是相关情绪和认知功能活动改变的基础,慢性疼痛可引起大鼠出现奖赏机制缺乏和快感缺失等,OFT、FST、TST 及糖水偏好实验(sucrose preference test, SPT)相关行为学测试是用于评估大鼠行为绝望的检测方法^[17]。本研究采用 CFA 诱导慢性疼痛抑郁共病模型,在此状态下,大鼠呈现持续躯体疼痛、运动功能受限及抑郁样行为。故行为学评价时,应重点关注与“疼痛-抑郁交互作用”相关指标。OFT 用于评估大鼠疼痛导致的活动抑制与抑郁行为叠加效应;FST 和 TST 可交叉验证大

鼠行为绝望表现,减少假性结果的可能,可靠区分抑郁行为与运动功能改变。然而,疼痛症状可能干扰大鼠的摄食行为,SPT 在本模型中的特异性较低,无法区分是疼痛导致摄食抑制还是抑郁相关快感缺失。因此,在本研究采用 OFT、FST、TST 对慢性疼痛抑郁共病模型大鼠进行行为学评估。本研究结果显示,造模后第 14 天,CFA-H 组出现 OFT 运动总距离和中央区停留时长减少、FST、TST 不动时间增加,提示采用 100 μL CFA 足底注射在造模后第 14 天可诱导出大鼠的抑郁样行为,并且该抑郁样行为至造模后第 28 天仍存在。实验期间观察到,在造模后第 7 天,CFA-L 组及 CFA-H 组大鼠左后足踝关节及足趾可见明显红肿,大鼠活动不利,而在造模后第 14 天,CFA-L 组大鼠左后足踝关节及足趾红肿恢复,CFA-H 组仍存在红肿,且出现饮食减少,此现象亦证实了 CFA-L 组和 CFA-H 组大鼠体质量增长率的变化。从造模后第 14 天开始,CFA-H 组大鼠体质量增长缓慢,饮水进食量减少,体质量增长率符合疼痛及抑郁相关行为学检测变化结果,提示 100 μL CFA 诱导的大鼠疼痛及抑郁样行为可抑制大鼠体质量增长。

前扣带回皮层是大脑边缘系统中的重要信息处理区域,是接受参与感觉知觉和情绪反应的重要调节枢纽^[7]。慢性疼痛可引起前扣带回皮层神经元激活,前扣带回皮层内神经元突触连接紊乱,并导致抑郁样行为的发生。人类基因研究表明,当疼痛与抑郁呈共病状态时,前扣带回皮层内不仅存在 BDNF 表达异常,还发现神经递质表达失衡。BDNF 是神经营养因子家族中的一员,在 CFA 模型致慢性疼痛模型中,BDNF 呈下降趋势^[18]。GABA 是 Glu 脱羧后的代谢产物,被认为是一种重要的抑制性递质;而 Glu 则被认为是一种兴奋性神经递质,GABA 及 Glu 作为神经递质参与中枢神经系统的兴奋与抑制的调节,Glu/GABA 稳态失衡可能导致大鼠抑郁样行为及慢性疼痛的重要机制^[19]。BDNF 及 Glu/GABA 的失衡是疼痛抑郁共病的关键机制,针对前扣带回皮层内 BDNF、Glu/GABA 探讨慢性疼痛抑郁共病的发病机制具有显著意义,因此本研究以 BDNF、Glu/GABA 表达为切入点,进一步探究三者在前扣带回皮层内表达情况。研究结果发现,CFA-H

组大鼠前扣带回皮层内 Glu 含量显著升高, GABA 含量明显降低, Glu/GABA 失衡, BDNF 表达减少, 证实了足底注射 100 μ L CFA 诱导的慢性炎性疼痛抑郁共病行为, 其机制可能与 BDNF 减少、Glu/GABA 失衡密切相关。本研究亦发现, 与空白组和 CFA-L 组比较, CFA-H 组前扣带回皮层损伤区细胞排列紊乱, 神经元细胞出现大量固缩、深染, 锥体细胞数量明显减少, 组织间隙有空泡、红细胞和神经纤维缠结出现。提示前扣带回皮层损伤情况与行为学实验及 Glu/GABA、BDNF 检测结果相一致。

本研究结果表明, 足底注射 100 μ L CFA 可成功制备慢性疼痛抑郁共病模型, 但 100 μ L 的 CFA 相较于低剂量组存在一定刺激性, 对大鼠的生长抑制更加明显。同时本研究也对实验设计有一些启示, 进行慢性疼痛抑郁共病相关实验时可根据实验目的选择恰当的时间点进行观察, 在进行损伤机制相关研究或进行疗程相对较长的疗效及机制研究时, 观察的时间点可选用造模后第 14 ~ 28 天观察。但本研究仍存在部分局限之处: 本实验仅检测了前扣带回皮层内 BDNF、Glu、GABA 的表达, 未对三者的关系进行进一步探索, 未来研究会以此研究为基础, 深入探究前扣带回皮层内 BDNF、Glu、GABA 在慢性疼痛抑郁共病中三者的联系。

综上, 足底注射 100 μ L CFA 建立慢性疼痛抑郁共病动物模型方法可行, 符合本病发病机制及临床治疗进程。在后续研究中运用不同治疗方式干预慢性疼痛抑郁共病大鼠的机制研究具有一定的研究价值。

参 考 文 献 (References)

- [1] BRAIN K, BURROWS T L, ROLLO M E, et al. A systematic review and meta-analysis of nutrition interventions for chronic noncancer pain [J]. *J Hum Nutr Diet*, 2019, 32 (2): 198–225.
- [2] KREMER M, BECKER L J, BARROT M, et al. How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1): 236–270.
- [3] NERURKAR L, SIEBERT S, MCINNES I B, et al. Rheumatoid arthritis and depression: an inflammatory perspective [J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6 (2): 164–173.
- [4] DURIC V, MCCARSON K E. Persistent pain produces stress-like alterations in hippocampal neurogenesis and gene expression [J]. *J Pain*, 2006, 7(8): 544–555.
- [5] 王雅娟, 杨彬, 曾学晴, 等. 右美托咪定上调海马脑源性神经营养因子-酪氨酸激酶受体 B 的表达及改善完全费氏佐剂所致小鼠焦虑样和抑郁样行为 [J]. *解剖学报*, 2023, 54(2): 181–187.
- WANG Y J, YANG B, ZENG X Q, et al. Dexmedetomidine improving complete Freund's adjuvant-induced anxiety-like and depression-like behaviour by promoting the expression of brain-derived neurotrophic factor-tyrosin kinase receptor B in mice hippocampus [J]. *Acta Anat Sin*, 2023, 54(2): 181–187.
- [6] 羊璞. 基于 BDNF/TrkB/CREB 信号通路探讨电针对疼痛抑郁共病大鼠的作用机制研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学; 2024.
- YANG P. Investigating the mechanism of electroacupuncture on comorbid chronic pain and depression in rats based on BDNF/TrkB/CREB signaling pathway [D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine; 2024.
- [7] IQBAL Z, LIU S, LEI Z, et al. Astrocyte L-lactate signaling in the ACC regulates visceral pain aversive memory in rats [J]. *Cells*, 2022, 12(1): 26.
- [8] ISHIKAWA K, YASUDA S, FUKUHARA K, et al. 4-methylcatechol prevents derangements of brain-derived neurotrophic factor and TrkB-related signaling in anterior cingulate cortex in chronic pain with depression-like behavior [J]. *Neuroreport*, 2014, 25(4): 226–232.
- [9] HUANG H Y, LIAO H Y, LIN Y W. Effects and mechanisms of electroacupuncture on chronic inflammatory pain and depression comorbidity in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 4951591.
- [10] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55–63.
- [11] ZHANG G F, WANG J, HAN J F, et al. Acute single dose of ketamine relieves mechanical allodynia and consequent depression-like behaviors in a rat model [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 631: 7–12.
- [12] ZHANG M, LIU Y, ZHAO M, et al. Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine [J]. *J Headache Pain*, 2017, 18(1): 27.
- [13] BRÜNING C A, MARTINI F, SOARES S M, et al. M-trifluoromethyl-diphenyl diselenide, a multi-target selenium compound, prevented mechanical allodynia and depressive-like behavior in a mouse comorbid pain and depression model [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2015, 63: 35–46.
- [14] KIM H, CHEN L, LIM G, et al. Brain indoleamine 2, 3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and

- depression [J]. J Clin Invest, 2012, 122(8): 2940–2954.
- [15] 国笑, 王瑜, 李少源, 等. 抑郁与慢性疼痛共病动物模型的研究进展 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(4): 689–695.
- GUO X, WANG Y, LI S Y, et al. Research progress of animal models of depression-chronic pain comorbidity [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2019, 21(4): 689–695.
- [16] 樊静杰, 袁普卫, 郑洁, 等. 基于脊髓大麻素受体 CB2 介导的 MAPK 信号通路探讨电针治疗膝骨性关节炎慢性痛的机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(13): 1582–1586.
- FAN J J, YUAN P W, ZHENG J, et al. Study on mechanism of electroacupuncture therapy for chronic pain in knee osteoarthritis based on MAPK signaling pathway mediated by spinalcannabinoid receptor CB2 [J]. Chin J Immunol, 2021, 37(13): 1582–1586.
- [17] 王小玲. 前扣带回皮层 FTO 在神经病理性疼痛致焦虑抑郁样行为中的作用及其机制 [D]. 郑州: 郑州大学; 2022.
- WANG X L. The role and mechanism of FTO in anxiety and depression-like behaviors induced by neuropathic pain in anterior cingulate cortex [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University; 2022.
- [18] 王倩, 张娟, 周一, 等. CFA 注射致炎性疼痛过程中海马内 BDNF 的表达及作用研究 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(36): 7001–7006.
- WANG Q, ZHANG J, ZHOU Y, et al. The expression and role of BDNF in the hippocampus during inflammatory pain after CFA administration [J]. Prog Mod Biomed, 2014, 14(36): 7001–7006.
- [19] 黄硕. 慢性心理和疼痛应激对大鼠神经递质及内分泌腺轴的影响 [D]. 杭州: 浙江理工大学; 2017.
- HUANG S. Effects of chronic psychological stress and chronic pain on neurotransmitters and endocrine gland axis in rats [D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University; 2017.

[收稿日期] 2024-12-04

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》2023 年版(即第 10 版)动物学/人类学类的核心期刊!

《中文核心期刊要目总览》采用定量评价和定性评价的学术水平和学术影响进行综合评价,受到学术界的广泛认同。

目前,本刊为中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

感谢编委、专家们的帮助与支持,感谢广大作者和读者朋友们的厚爱与信任。本刊编辑部将始终坚守办刊宗旨,不忘初心,严谨办刊,开拓进取,不断创新,向世界一流期刊看齐。

