

• 论 著 •

大鼠咬合干扰致口颌面痛敏的自我赏罚实验行为学特点

白珊珊^{1,2},莫思怡^{1,2},徐啸翔^{1,2},刘 云^{1,2},谢秋菲^{1,2△},曹 烨^{1,2△}

(北京大学口腔医学院·口腔医院, 1. 修复科, 2. 颌功能诊疗研究中心 国家口腔疾病临床医学研究中心 口腔数字化医疗技术和材料国家工程实验室 口腔数字医学北京市重点实验室, 北京 100081)

摘 要 目的: 测定咬合干扰模型(experimental occlusal interference, EOI)与部分眶下神经切断模型(partial infraorbital nerve transection, pIONX)两种口颌面疼痛模型大鼠的自我赏罚实验行为学表现及机械诱发反应痛敏, 比较两种测痛方法所反映的不同疼痛模型的疼痛特点。方法: Sprague-Dawley 大鼠随机分为 8 组, 每组 6 只, 分别为机械刺激诱发反应组(sham-EOI、EOI、sham-pIONX 与 pIONX 组, sham 为假手术组)与自我赏罚实验组(sham-EOI、EOI、sham-pIONX 与 pIONX 组, sham 为假手术组)。于建模前及建模后 1、3、7、10、14、21 d 测定各组大鼠机械刺激反应阈值与自我赏罚行为学表现。结果: 机械刺激诱发反应组大鼠 pIONX 组 von Frey 纤维的机械刺激反应阈值于 1~21 d 出现显著下降($P < 0.05$), 7~10 d 达到最低; 自我赏罚实验组大鼠 pIONX 组的总摄食时间于 10~21 d 出现显著下降($P < 0.05$), 10~14 d 达到最低。机械刺激诱发反应组大鼠 EOI 组 von Frey 纤维的机械刺激反应阈值于 3~21 d 出现显著下降($P < 0.05$), 7 d 达到最低; 自我赏罚实验组大鼠 EOI 组的总摄食时间于 1~21 d 出现显著下降($P < 0.05$), 7~10 d 达到最低。结论: 自我赏罚实验可以作为口颌面疼痛的行为学测定新方法, 而且在神经病理性疼痛和咬合干扰所致口颌面疼痛的模型中均可稳定应用。两种模型中, 自我赏罚实验与机械刺激诱发反应均表现出了不同的痛敏时程, 两种方法互为补充可以更全面地揭示不同模型的疼痛行为学特点。

关键词 动物行为; 面部疼痛; 痛觉过敏; 动物疾病模型; 大鼠

中图分类号 R782 **文献标志码** A **文章编号** 1671-467X(2020)01-0051-07

doi: 10.19723/j.issn.1671-467X.2020.01.008

Characteristics of orofacial operant test for orofacial pain sensitivity caused by occlusal interference in rats

BAI Shan-shan^{1,2}, MO Si-yi^{1,2}, XU Xiao-xiang^{1,2}, LIU Yun^{1,2}, XIE Qiu-fei^{1,2△}, CAO Ye^{1,2△}

(1. Department of Prosthodontics, 2. Center for Oral and Jaw Functional Diagnosis, Peking University School and Hospital of Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & National Engineering Laboratory for Digital and Material Technology of Stomatology & Beijing Key Laboratory of Digital Stomatology, Beijing 100081, China)

ABSTRACT Objective: To compare the orofacial pain sensitivity with operant test and mechanical hyperalgesia with von Frey filaments of two orofacial pain models (EOI: experimental occlusal interference; pIONX: partial infraorbital nerve transection). To investigate the operant and evoked characteristics of EOI-rats. **Methods:** The orofacial operant behaviors were tested by Ugo Basile Orofacial Stimulation Test System. The mechanical thresholds of vibrissal pads were tested by von Frey filaments. Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into eight groups: von Frey group: sham-EOI, EOI, sham-pIONX, pIONX (sham: sham-operated group); operant test group: sham-EOI, EOI, sham-pIONX, pIONX (sham: sham-operated group). The mechanical thresholds and orofacial operant behaviors were tested on pre-operation and post-operation days 1, 3, 7, 10, 14 and 21. **Results:** In pIONX of von Frey group, the mechanical withdrawal threshold decreased from days 1 to 21 ($P < 0.05$), peaking from days 7 to 10, and lasted until the end of the experiment. There was no significant difference between the bilateral sides. In pIONX of operant test group, the total contact time decreased from days 10 to 21 ($P < 0.05$), peaking from days 10 to 14, and lasted until the end of the experiment. In EOI of von Frey group, the mechanical withdrawal threshold decreased from days 3 to 21 ($P < 0.05$), peaking on day 7, and lasted until the end of the experiment. There was no significant difference between the bilateral sides. In EOI of operant test group, the total contact time decreased from days 1 to 21 ($P < 0.05$), peaking from days 7 to 10, and lasting until the end of experiment. **Conclusion:** Orofacial operant test is a stable method to evaluate orofacial pain behaviors, which could discriminate the feature of neuropathic and EOI orofacial

基金项目: 北京市自然科学基金(7192231) Supported by the Beijing Natural Science Foundation (7192231)

△ Corresponding author's e-mail, xieqiuf@163.com, ye.cao@bjmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-12-24 10:09:50 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20191223.1649.008.html>

pain. In these two animal models, both of the operant behaviors and the mechanical hyperalgesia exhibited different time courses. Orofacial operant test provides a novel method for evaluating the orofacial pain sensitivity and studying the orofacial pain mechanism thoroughly.

KEY WORDS Animal behavior; Facial pain; Hyperalgesia; Animal disease models; Rats

口颌面疼痛可由多种疾病引起,其机制尚未完全明确,也缺乏有效的治疗手段^[1-2]。临床有部分患者因咬合干扰出现口颌面疼痛,甚至表现为广泛的颌面部疼痛,影响患者身心健康,其机制研究具有重要意义。

评估各种动物模型的疼痛程度是疼痛研究的重要方法,啮齿类动物的疼痛可分为刺激诱发性疼痛(stimulus-evoked pain)与非刺激诱发性疼痛(non stimulus-evoked pain)^[3-4],分别对应动物行为的诱发反应与非诱发反应,如 von Frey 法、热板测试等都是经典的刺激诱发反应实验。动物疼痛表情测量量表、操纵行为实验(operant behavior)、跑轮实验等均为非刺激诱发反应实验^[5-6]。诱发反应包括机械刺激及热刺激诱发反应,其中使用 von Frey 纤维是经典的机械刺激诱发反应测试方法^[5-6],当所使用的 von Frey 纤维刺激超过疼痛阈值后,动物会出现抓脸、理毛、回避等行为,研究者通过这些行为判定疼痛,该方法操作简单,可重复测量。但是,有研究指出这些行为均属于受脑干支配的反射行为^[7],另外,该方法对疼痛的评估主要依赖于研究者的操作与判断,较易出现实验者偏倚^[7-9]。动物的非刺激诱发疼痛与人类的自发性疼痛和背景疼痛(background pain)相似,非刺激诱发疼痛均可归于此类。人类的疼痛行为多为非刺激诱发反应,行为复杂,因此使用多种行为学方法研究这些行为学表现具有重要意义^[5-6]。近年来,Neubert 等^[8]创建了行为学方法——口颌面自我赏罚实验(orofacial operant test),此方法基于操纵行为测试(operant behavior test),旨在通过奖赏-惩罚模式评价动物的疼痛表现^[8-10]。自我赏罚实验允许动物在接受奖赏或逃避伤害性刺激间做出选择,与诱发反应测试方法相比更为客观,更能反映动物高级中枢对伤害性刺激加工后的表现^[8-11]。

三叉神经病理性疼痛模型与咬合干扰模型(experimental occlusal interference, EOI)均是口颌面疼痛研究中的重要动物模型,三叉神经病理性疼痛模型的大鼠表现出明显的口颌面诱发疼痛反应(如机械刺激反应阈值下降)和自发性反应(如术后实验动物出现特定的疼痛表情及异常的面部梳理行为)^[12-13]。相关模型包括眶下神经慢性缩窄模型(chronic constriction injury of the infraorbital nerve,

ION-CCI)、部分眶下神经结扎模型(partial infraorbital nerve ligation, pIONL)、部分眶下神经切断模型(partial infraorbital nerve transection, pIONX)等,既往已有关于 ION-CCI 模型与 pIONL 模型自我赏罚实验研究^[8,14]。EOI 模型包括在实验动物牙齿上加冠、咬合板等方式施加咬合干扰形成口颌面疼痛模型^[12-13],既往研究中未见此动物模型自我赏罚实验相关研究。

本课题组的前期研究建立了成熟稳定的 EOI 模型和神经病理性疼痛模型,并对诱发痛敏行为学有较深入的研究。本实验旨在将自我赏罚实验引入 EOI 模型,探索新的颌面部行为学研究方法,同时测定神经病理性疼痛模型自我赏罚实验行为学结果,比较不同疼痛模型的痛敏特点异同,并将两种模型自我赏罚实验结果与诱发反应结果相对比,以期能全面反映不同疼痛模型的疼痛特点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 Sprague-Dawley SPF 级大鼠 60 只,初始体质量 180 ~ 200 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[实验动物生产许可证号: SCXK(京) 2016-0011],饲养于北京大学口腔医院[实验动物使用许可证号: SYXK(京) 2016-0007]。24 h 昼夜交替,室温 25 °C,诱发反应实验大鼠自由饮食饮水,自我赏罚实验大鼠测试日预先禁食不禁水,其余时间自由饮食饮水。实验动物伦理审查批准号: LA2017091。

1.2 大鼠疼痛模型的建立

1.2.1 大鼠 EOI 模型的建立 参考 Cao 等^[17]的实验方法,实验组大鼠经乙醚轻度麻醉后,取上颌藻酸盐印模,灌制模型,制作右上第一磨牙镍铬合金牙冠,确定殆面厚度为 0.4 mm。大鼠于 1% (体积分数) 戊巴比妥钠(40 mg/kg, Sigma, USA) 全身麻醉下使用树脂粘接剂(Panavia F, Kuraray, Japan) 将牙冠粘固于大鼠右上第一磨牙。sham 组大鼠为假手术组,操作步骤同手术组但不粘固牙冠。

1.2.2 大鼠 pIONX 模型的建立 参考 Cao 等^[18]的实验方法,大鼠在 1% 戊巴比妥钠全身麻醉下,于右上第一磨牙前龈颊沟处行纵行切口,钝性分离周围组织,暴露眶下神经分支。使用显微外科剪剪断约

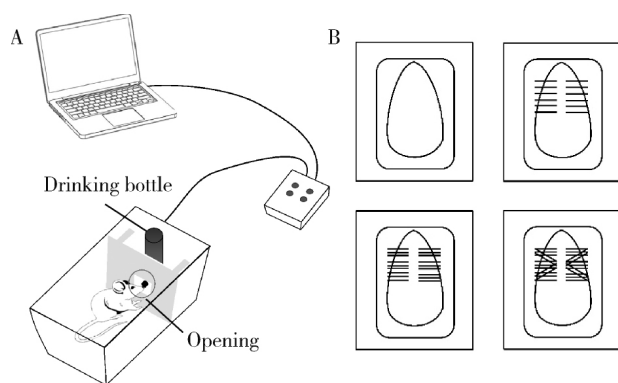
外侧 1/2 的眶下神经分支,术后缝合线缝合伤口。sham 组大鼠为假手术组,操作步骤同手术组,但不进行神经切断。

1.3 大鼠机械刺激诱发反应阈值的测定

实验大鼠在建模前 4~6 d 熟悉环境,实验者每日安抚大鼠 30 min,之后使用 von Frey 纤维测定建模前与建模后固定时间点 EOI 组与 pIONX 组大鼠双侧触须垫机械刺激反应阈值。

1.4 大鼠自我赏罚行为学测定

实验使用 Ugo Basile 面部疼痛测试仪 (Ugo Basile Orofacial Stimulation Test System, ComerioVA, Italy), 该仪器由标准动物笼与测试单元连接而成,测试单元主要包括刺激装置、食物奖励、红外线探头等部分,刺激装置包括机械刺激模块与温度刺激模块,提供颌面部机械与热伤害性刺激。机械刺激装置包括三种不同的密度模块,模块上分别设有不同数量的 NiTi 刺激丝,分别为(左侧+右侧) 6+6、9+9 与 13+13(图 1)。实验过程中,动物将头探出窗口获得食物奖励时会触动刺激装置产生颌面部伤害性刺激,通过分析动物忍受伤害性刺激时的摄食情况(摄食总时间与摄食总次数)评估其疼痛程度。



A, diagram of the orofacial operant test system; B, the blank mask and three mechanical modules with different number of wires.

图 1 Ugo Basile 面部疼痛测试仪

Figure 1 Ugo Basile Orofacial Stimulation Test System

具体测试方法参考 Cha 等^[8]的研究,非测试期大鼠自由饮食饮水,测试日预先禁食,将大鼠置于标准动物笼中,放置机械刺激模块,提供食物奖励,大鼠经过窗口获得食物奖励时红外装置可自动检测该行为并将结果传入计算机,大鼠经过适应期训练后,能够忍受机械刺激间断性获取食物奖励。大鼠每次测试时均先熟悉环境,随后打开摄食窗口,测试大鼠固定时间段内的摄食水平。本实验参考相关研究的参数^[8-10]进行设计,结合 EOI 模型特点,最终将禁食时间确定为(20±1) h,食物奖励为 30%(体积分

数) 炼奶(Nestle Carnation), 饮水瓶口与机械刺激间距离为 14 mm,大鼠在摄食期间机械刺激位于触须垫后方至咬肌前缘,机械刺激选择中等密度模块(9+9 NiTi 刺激丝)。大鼠在进入测试笼后先熟悉环境 10 min,随后打开窗口,测试 10 min 摄食水平(摄食总时间与摄食总次数)。

1.5 大鼠体质量测量实验设计

既往研究已证实 EOI 与 pIONX 模型的建立对实验大鼠体质量无影响^[17-18]。选择与后续行为学实验动物起始体质量接近的大鼠 12 只(自由饮食饮水大鼠 6 只与间断性禁食大鼠 6 只),按照后续行为学实验时间点测定实验动物体质量并进行比较。

1.6 行为学实验设计

实验采用盲法,大鼠随机分为 8 组(每组 6 只),4 组为机械刺激诱发反应组,以 von Frey 纤维测定机械刺激反应阈值(分别为 sham-EOI、EOI、sham-pIONX、pIONX 组,sham 为假手术组);4 组为自我赏罚实验组,以 Ugo Basile 口颌面疼痛测试仪测定自我赏罚实验行为学表现(分别为 sham-EOI、EOI、sham-pIONX、pIONX,sham 为假手术组)。

机械刺激诱发反应组中的 4 组大鼠分别于建模前 1~3 d 及建模后 1、3、7、10、14、21 d 每天固定时间点测试,每侧重复测试 5 次,每次间隔 1 min,取平均值作为该侧机械刺激反应阈值。自我赏罚实验组大鼠进行 2 周适应训练,熟悉自我赏罚行为学实验仪器及人员,适应训练成功的大鼠在测试期间可忍受颌面部伤害性刺激,间断性获得食物,且摄食水平稳定。训练成功的大鼠在适应训练期结束后,连续测定 3 次基线摄食水平,取平均值为基线摄食水平,测定基线后,分别于建模后 1、3、7、10、14、21 d 每天固定时间点进行大鼠自我赏罚实验行为学测定。

1.7 统计学分析

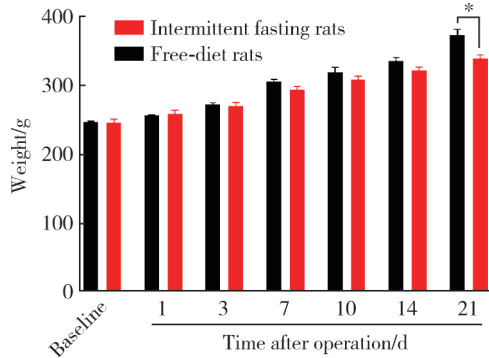
使用 SPSS 20.0 软件,计量资料以均数±标准误差表示,对自由饮食饮水大鼠与间断性禁食大鼠的每次平均体质量采用独立样本 *t* 检验分析两组间差异,对各组不同时间点的机械刺激反应阈值与自我赏罚行为学结果分别采用重复测量方差分析、Bonferroni 后检验,对各组相同时间点的机械刺激反应阈值与自我赏罚行为学结果进行多因素方差分析、Bonferroni 后检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠基本情况

自由饮食饮水大鼠与间断性禁食大鼠在测试期

间体质量均出现缓慢增加,7 d 开始间断性禁食大鼠的体质量略低于自由饮食饮水大鼠,21 d 两组差异有统计学意义($P < 0.05$),其余时间点差异无统计学意义(图2)。



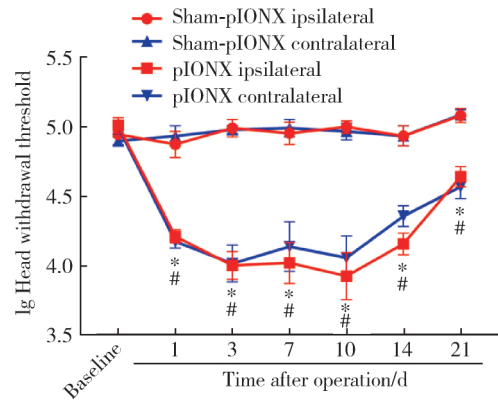
* $P < 0.05$.

图2 间断性禁食大鼠与自由饮食饮水大鼠的体质量变化($n = 6$)

Figure 2 Weight change of the intermittent fasting rats and free-diet rats ($n = 6$)

2.2 pIONX 大鼠机械诱发反应实验结果

机械刺激诱发反应组中,sham-pIONX 与 pIONX 组大鼠双侧机械刺激反应阈值变化见图3。pIONX 组大鼠手术侧与非手术侧机械刺激反应阈值均下降,1~21 d 与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$),7~10 d 达到最低点,之后出现升高,但机械刺激反应阈值持续至观察终点仍未恢复至基线水平($P < 0.05$),双侧机械反应阈值差异无统计学意义($P > 0.05$)。



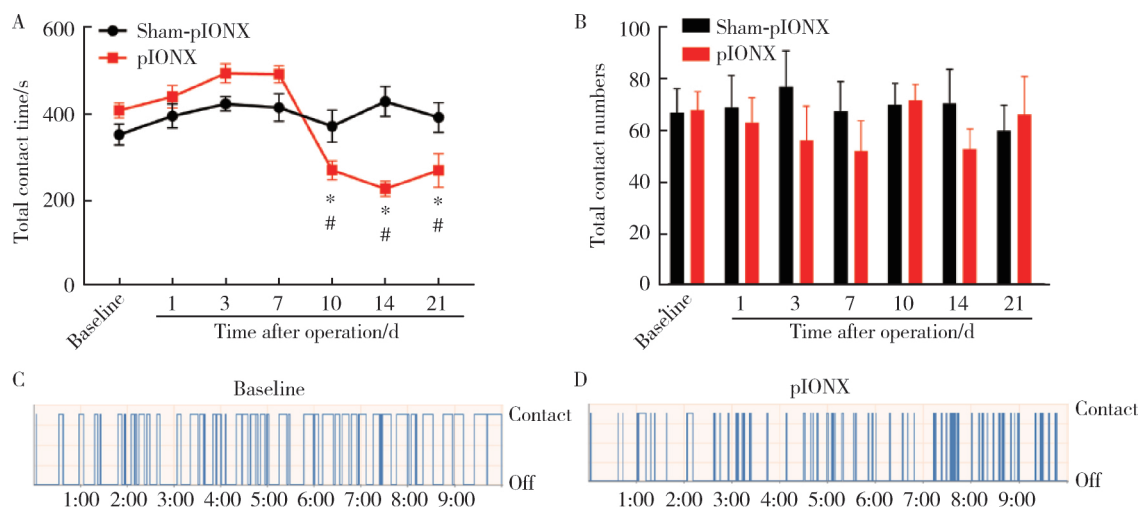
* $P < 0.05$, significant difference between the sham-pIONX ipsilateral and pIONX ipsilateral; # $P < 0.05$, significant difference between the sham-pIONX contralateral and pIONX contralateral.

图3 sham-pIONX 组与 pIONX 组大鼠双侧面部机械刺激反应阈值

Figure 3 Mechanical withdrawal threshold of the sham-pIONX group and pIONX group

2.3 pIONX 大鼠自我赏罚实验结果

自我赏罚实验组中,sham-pIONX 与 pIONX 组大鼠在建模后一周内总摄食时长均呈现上升趋势,但各时间点间差异无统计学意义($P > 0.05$)。建模7 d 后,大鼠总摄食时长下降,10~14 d 最低,之后出现回升,但在测试末仍未回到基线水平,pIONX 组大鼠建模后10、14、21 d 总摄食时长与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),与自身基线相比差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。实验期间两组总摄食次数的各时间点差异无统计学意义($P > 0.05$),见图4。



A, total contact time of orofacial operant tests between two groups; B, total contact numbers of the two groups; C, a sample trace shows the automatic recordings of operant behavior in a duration of 10 min of a pre-operation pIONX rat; D, a sample trace of a post-operation pIONX rat. * $P < 0.05$, significant difference between the two groups; # $P < 0.05$, significant difference between the baseline and days after operation.

图4 sham-pIONX 组与 pIONX 组大鼠自我赏罚行为学表现

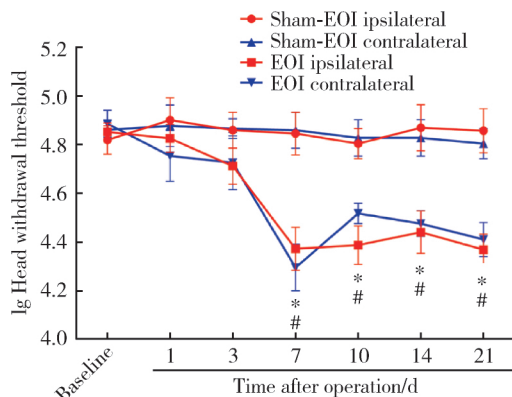
Figure 4 The operant behavior of the sham-pIONX group and pIONX group

2.4 EOI 大鼠机械诱发反应实验结果

机械刺激诱发反应组中,sham-EOI 与 EOI 组大

鼠双侧机械刺激反应阈值变化见图5。EOI 组在施加0.4 mm 咬合干扰后,机械刺激反应阈值呈下降

趋势,但建模后 1~3 d 与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$),之后机械刺激反应阈值显著下降,7~21 d 与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$),7 d 达到最低点,之后有所回升,但持续至观察终点差异仍有统计学意义。EOI 组大鼠干扰侧与非干扰侧机械刺激反应阈值间的差异无统计学意义($P>0.05$)。



* $P<0.05$, significant difference in the ipsilateral sides between the sham-EOI and EOI groups; # $P<0.05$, significant difference in the contralateral sides between the sham-EOI and EOI groups.

图5 sham-EOI 组与 EOI 组大鼠双侧面部机械刺激反应阈值

Figure 5 Mechanical withdrawal threshold of the sham-EOI group and EOI group

2.5 EOI 大鼠自我赏罚实验结果

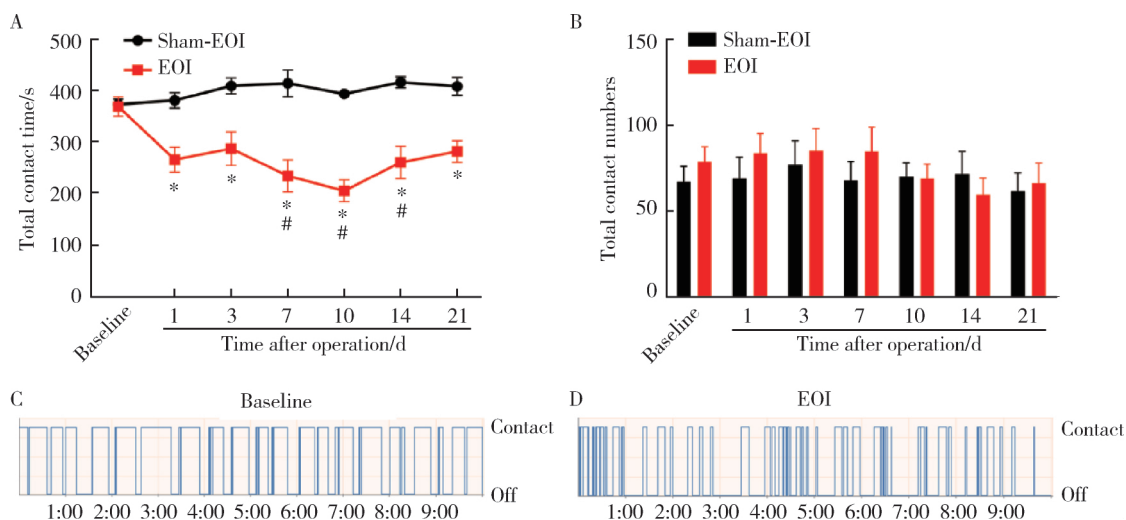
自我赏罚实验组中,sham-EOI 组大鼠摄食水平稳定,总摄食时长与总摄食次数各时间点间差异无统计学意义($P>0.05$)。EOI 组大鼠在建模后,总

摄食时间显著下降,与对照组相比,1~21 d 差异均有统计学意义($P<0.05$),7~10 d 最低,之后出现回升,但持续至观察终点差异仍有统计学意义。建模后 7、10、14 d 总摄食时间与自身基线的对比结果差异亦有统计学意义($P<0.05$),实验期间两组的总摄食次数差异无统计学意义($P>0.05$),见图 6。

3 讨论

3.1 疼痛评估的方法

目前认为疼痛是一种多维的复合感觉,一个简单的痛觉过程至少包含三个维度:感觉维度、情绪维度和认知维度^[19]。动物模型与疼痛行为评估均是疼痛研究的重要组成,一直以来,该领域的研究者们不断创新、发展实验方法,以期能客观评价实验动物疼痛行为。动物疼痛行为评估通常包括“反射行为”(reflexive behaviors)与“自愿行为”(voluntary reactions),其中又包括非习得与习得行为^[20]。不同评估方法可获得不同信息,如动物的屈肌反射中枢为脊髓,更复杂的非习得行为(如舔爪、发声、理毛等)的中枢可能由脑干介导^[20-23],这些非习得行为在去大脑的动物中也可观察到^[24],较之更复杂的习得行为则需要经过大脑加工处理,如实验动物通过操纵实验学会自我选择食物或逃避伤害性刺激。因此,客观评价习得行为更能反映高级中枢对伤害性刺激的整合,对研究疼痛的中枢机制具有重要意义。



A, total contact time of orofacial operant tests between two groups; B, total contact numbers of the two groups; C, a sample trace shows the automatic recordings of operant behavior in a duration of 10 min of a pre-operation EOI-rat; D, a sample trace of a post-operation EOI-rat. * $P<0.05$, significant difference between the two groups; # $P<0.05$, significant difference between the baseline and days after operation.

图6 sham-EOI 组与 EOI 组大鼠自我赏罚行为学表现

Figure 6 The operant behavior of the sham-EOI group and EOI group

3.2 咬合干扰致口颌面痛敏大鼠的自我赏罚实验

Ugo Basile 口颌面疼痛测试仪是一种能够评估

反应高级中枢对疼痛整合行为的仪器,曾用于研究三叉神经病理性疼痛(眶下神经慢性缩窄模型与眶

下神经部分结扎模型)、口颌面炎性痛模型,探索行为学特点及其相关机制^[8-11,24],在三叉神经病理性疼痛研究中,多个实验均使用该方法评价了动物模型的行为学特点,探索该模型实验动物机械痛觉过敏与冷刺激痛觉过敏的自我赏罚实验行为学表现^[8-10]。

临床上可观察到咬合干扰相关口颌面疼痛患者的焦虑、抑郁等评分较高,更容易出现不稳定情绪。动物研究也提示,咬合问题与情绪、精神心理等因素相关,如一项关于猕猴的研究显示,功能失调的咬合关系可能导致与情绪压力相关的磨牙症^[23]。颞下颌关节紊乱病(temporomandibular disorders, TMD)相关口颌面疼痛研究显示,咬合因素可能为TMD的危险因素,而TMD患者多伴有心理问题^[26-27]。本课题组的前期研究发现,海马、前扣带回等均参与了咬合干扰致口颌面痛敏的中枢机制^[28-29],提示该模型痛觉的产生与情绪认知等相关。因此,使用自我赏罚实验方法可能更全面地反映该模型的行为学特点。

自我赏罚实验在既往的研究应用中,测试前禁食时间多为12~15 h,机械刺激多选择密度最低的机械刺激模块(6+6 NiTi 刺激丝),食物奖励包括30% 炼奶与20% 蔗糖^[8-11,30-31]。本研究的预实验发现,设置三种不同密度NiTi 刺激丝时,实验大鼠总摄食时间随密度增加而降低,训练失败的大鼠增多,但大鼠疼痛时总摄食时间的变化量增加,另一方面,随禁食时长增加,实验动物总摄食时长增加,EOI 组大鼠使用最低密度NiTi 刺激丝时,施加干扰后总摄食时间降低较少,综上,我们最终选择中等密度NiTi 刺激丝与更长的禁食时间,以达到建模后实验动物总摄食时间变化量明显,且适应期后总摄食时间与大部分相关研究相似(≥ 200 s/10 min)。EOI 模型与既往研究中神经病理性疼痛与急性炎性痛模型相比,可能具有疼痛症状较轻、动物自发性行为更少的特点,因此更长的禁食时长与较强的机械刺激更适用。

自我赏罚实验能够反映高级中枢对疼痛的整合,实验过程操作方便,实验大鼠在适应期训练结束后,实验人员每次测试仅需安装操作仪器,并不需对实验大鼠反复操作,能够减少实验动物恐惧、紧张等心理,且实验结果稳定,不同模型对照组及假手术组大鼠的摄食水平稳定。但是,自我赏罚实验也存在一些缺点,如实验周期长,适应期训练需要2~3周,实验动物存在训练失败的可能,实验前需对大鼠禁食。

本研究评价了禁食对实验动物的影响,以往关于EOI 模型与pIONX 模型的研究显示建模并不会影响实验大鼠的体质量增长^[17-18],因此,本研究仅探索自我赏罚实验方法对实验大鼠的体质量影响。实验中发现,随实验时间延长,自我赏罚实验大鼠与空白对照大鼠相比,体质量增长较慢,测试第21天两组体质量差异有统计学意义,提示实验中长期间断性禁食影响大鼠生长。后续研究中,随实验时间延长,测试时间点间隔应延长,尤其在长期慢性痛研究中,需要注意禁食时间与禁食时长的选择。

3.3 两种行为学方法评估pIONX 与EOI 两种模型的疼痛特点

本实验结果显示,pIONX 模型与EOI 模型大鼠在建模后von Frey 纤维机械诱发反应实验结果与自我赏罚实验结果中表现出不同的时程特点。

pIONX 模型建模后,机械刺激诱发疼痛在建模后1 d 开始出现,持续到测试末,而自我赏罚行为学表现则在建模1周后下降。自我赏罚实验疼痛行为的出现晚于机械刺激诱发的疼痛行为,原因可能为手术导致的急性神经损伤后,损伤神经周围会出现异位神经断端的异常兴奋,并对内源性细胞因子等反应增强,引起实验动物对机械刺激的躲避行为^[32-33],但并不影响自我赏罚实验行为表现,随时间延长,疼痛逐渐转变为慢性,出现了中枢敏化,神经病理性疼痛表现出神经损伤后持续的异常输入引发的脊髓背角神经元兴奋性增强、腹后丘脑脊髓背角广动力范围神经元兴奋性增强、前扣带回星形胶质细胞标记物表达上调等^[18,33-34],此时,自我赏罚实验的行为学表现即总的摄食时长开始减少。

EOI 模型建模后,机械刺激诱发的疼痛在建模后7 d 差异有统计学意义,持续到测试末,而自我赏罚实验的疼痛出现早于机械刺激诱发的疼痛,提示0.4 mm 咬合干扰会直接刺激大鼠口腔内多种感受器,给实验大鼠带来的不适感更强,自我赏罚实验的阳性结果出现得更早。既往研究也显示,长期EOI 模型存在外周与中枢敏化机制,随咬合干扰时间延长,实验大鼠出现中枢敏化,表现为长期咬合干扰后三叉神经脊束核尾侧亚核神经元反应高度活跃、胶质细胞活化、前扣带回突触传导增强等,另外海马的记忆功能也参与相关机制^[28-29,35]。中枢敏化也表现为痛敏感野扩大,出现触须垫机械反应阈值降低,因此,自我赏罚实验的疼痛感受出现早于触须垫局部机械刺激诱发反应的疼痛。

上述结果也提示,对于机械刺激诱发的疼痛出现晚于自我赏罚实验阳性结果的模型(如EOI 模

型),自我赏罚实验可应用于观察建模后早期的疼痛表现,对研究这一阶段的口颌面疼痛机制有重要意义。实验中,两种模型总摄食次数与对照组相比差异均无统计学意义,组内差异大,这与既往大部分研究相同,反映出不同实验大鼠个体间的摄食习惯差异^[8-10]。

综上,自我赏罚实验可以作为咬合干扰致口颌面疼痛的行为学测定新方法,在神经病理性疼痛和咬合干扰所致口颌面疼痛的模型中均可稳定应用。在本实验两种模型中,自我赏罚实验与机械刺激诱发反应均表现出了不同的痛敏时程,两种方法互为补充可以更全面地揭示不同模型的疼痛行为学特点,在未来研究中应根据不同实验研究的需要选择合适的行为学方法,以更好地探索口颌面疼痛的相关机制。

参考文献

- [1] Alrashdan M, Alkhader M. Psychological factors in oral mucosal and orofacial pain conditions [J]. *Eur J Dent*, 2017, 11(4): 548–552.
- [2] Haviv Y, Zini A, Etzioni Y, et al. The impact of chronic orofacial pain on daily life: the vulnerable patient and the disruptive pain [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2016, 123(1): 58–66.
- [3] Deuis JR, Dvorakova LS, Irina V. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 284.
- [4] Tappe-Theodor A, King T, Morgan MM. Pros and cons of clinically relevant methods to assess pain in rodents [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 100(5): 335–343.
- [5] Martinez-Garcia MA, Miguelanez-Medran BC, Goicoechea C. Animal models in the study and treatment of orofacial pain [J]. *J Clin Exp Dent*, 2019, 11(4): e382–e390.
- [6] Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents [J]. *Neuroscience*, 2012, 211(11): 39–50.
- [7] Woolf CJ. Long term alterations in the excitability of the flexion reflex produced by peripheral tissue injury in the chronic decerebrate rat [J]. *Pain*, 1984, 18(4): 325–343.
- [8] Cha M, Kohan KJ, Zuo X, et al. Assessment of chronic trigeminal neuropathic pain by the orofacial operant test in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2012, 234(1): 82–90.
- [9] Neubert JK, Widmer CG, Malphurs W, et al. Use of a novel thermal operant behavioral assay for characterization of orofacial pain sensitivity [J]. *Pain*, 2005, 116(3): 386–395.
- [10] Rohrs EL, Kloefkorn HE, Lakes EH, et al. A novel operant-based behavioral assay of mechanical allodynia in the orofacial region of rats [J]. *J Neurosci Methods*, 2015, 248(13): 1–6.
- [11] Ramirez HE, Queeney TJ, Dunbar ML, et al. Assessment of an orofacial operant pain assay as a preclinical tool for evaluating analgesic efficacy in rodents [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2015, 54(4): 426–432.
- [12] Araujo-Filho HG, Pereira EWM, Campos AR, et al. Chronic orofacial pain animal models-progress and challenges [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2018, 13(10): 949–964.
- [13] Kaan TK, Ohara PT, Jasmin L, et al. Orofacial pain models and behavior assessment [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 851: 159–170.
- [14] Desseure K, Hans GH. Differential drug effects on spontaneous and evoked pain behavior in a model of trigeminal neuropathic pain [J]. *J Pain Res*, 2017, 10: 279–286.
- [15] Romero-Reyes M, Akerman S, Nguyen E, et al. Spontaneous behavioral responses in the orofacial region: a model of trigeminal pain in mouse [J]. *Headache*, 2013, 53(1): 137–151.
- [16] Zhang Q, Cao DL, Zhang ZJ, et al. Chemokine CXCL13 mediates orofacial neuropathic pain via CXCR5/ERK pathway in the trigeminal ganglion of mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 183.
- [17] Cao Y, Xie QF, Li K, et al. Experimental occlusal interference induces long-term masticatory muscle hyperalgesia in rats [J]. *Pain*, 2009, 144(3): 287–293.
- [18] Cao Y, Wang H, Chiang CY, et al. Pregabalin suppresses nociceptive behavior and central sensitization in a rat trigeminal neuropathic pain model [J]. *J Pain*, 2013, 14(2): 193–204.
- [19] 韩济生. 疼痛学 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2012: 46.
- [20] Chapman CR, Casey KL, Dubner R, et al. Pain measurement: an overview [J]. *Pain*, 1985, 22(1): 1–31.
- [21] Chesler EJ, Wilson SG, Lariviere WR, et al. Identification and ranking of genetic and laboratory environment factors influencing a behavioral trait, thermal nociception, via computational analysis of a large data archive [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2002, 26(8): 907–923.
- [22] Chung JM. Animal models and experimental tests to study nociception and pain [M] // Gebhart GF, Schmidt RF. *Encyclopedia of pain*. Berlin Heidelberg: Springer, 2013: 154–157.
- [23] Kauppila T, Kontinen VK, Pertovaara A. Influence of spinalization on spinal withdrawal reflex responses varies depending on the submodality of the test stimulus and the experimental pathophysiological condition in the rat [J]. *Brain Res*, 1998, 797(2): 234–242.
- [24] Ling J, Erol F, Gu JG. Role of KCNQ2 channels in orofacial cold sensitivity: KCNQ2 upregulation in trigeminal ganglion neurons after infraorbital nerve chronic constrictive injury [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 664(3): 84–90.
- [25] Budtz-Jørgensen E. Occlusal dysfunction and stress. An experimental study in Macaque monkeys [J]. *J Oral Rehabil*, 2010, 8(1): 1–9.
- [26] Wang C, Yin X. Occlusal risk factors associated with temporomandibular disorders in young adults with normal occlusions [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2012, 114(4): 419–423.
- [27] Raphael KG, Marbach JJ. Widespread pain and the effectiveness of oral splints in myofascial face pain [J]. *J Am Dent Assoc*, 2001, 132(3): 305–316.
- [28] Ding TT, Xu XX, Cao Y, et al. Inflammatory pain memory facilitates occlusal interference-induced masticatory muscle hyperalgesia in rats [J]. *Eur J Pain*, 2016, 20(3): 353–364.
- [29] Xu XX, Cao Y, Mo SY, et al. ACC plasticity maintains masseter hyperalgesia caused by occlusal interference [J]. *J Dent Res*, 2019, 98(5): 589–596.
- [30] Nag S, Mokha SS. Activation of the trigeminal α_2 -adrenoceptor produces sex-specific, estrogen dependent thermal antinociception and antihyperalgesia using an operant pain assay in the rat [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 314(19): 152–158.
- [31] Rohrs EL, Neubert JK, Caudle RM, et al. Behavioral characteristics of capsaicin mediated cutaneous, myogenic, and arthrogenic orofacial nociception in rats [J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 92(8): 18–24.
- [32] Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 429(1–3): 23–37.
- [33] Melo LT, Panchalingam V, Cherkas P, et al. $(-)-\alpha$ -Bisabolol reduces nociception and trigeminal central sensitization in acute orofacial neuropathic pain induced by infraorbital nerve injury [J]. *Life Sci*, 2019, 227(12): 122–128.
- [34] Meacham K, Shepherd A, Mohapatra DP, et al. Neuropathic pain: central vs. peripheral mechanisms [J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2017, 21(6): 28.
- [35] Cao Y, Li K, Fu KY, et al. Central sensitization and MAPKs are involved in occlusal interference-induced facial pain in rats [J]. *J Pain*, 2013, 14(8): 793–807.

(2019-10-10 收稿)
(本文编辑: 任英慧)