



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380101384.6

[43] 公开日 2005 年 12 月 7 日

[11] 公开号 CN 1705453A

[22] 申请日 2003. 10. 13

[21] 申请号 200380101384.6

[30] 优先权

[32] 2002. 10. 15 [33] EP [31] PCT/EP02/11772

[32] 2003. 5. 7 [33] EP [31] PCT/EP03/04851

[86] 国际申请 PCT/EP2003/011329 2003. 10. 13

[87] 国际公布 WO2004/034901 英 2004. 4. 29

[85] 进入国家阶段日期 2005. 4. 14

[71] 申请人 詹森药业有限公司

地址 比利时比尔斯

[72] 发明人 M·J·M·A·尼森

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

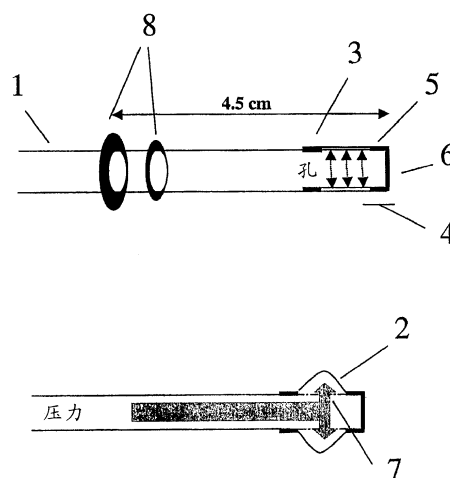
代理人 郭文洁 刘 玥

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 14 页

[54] 发明名称 用于评价内脏痛知觉的动物模型

[57] 摘要

测量内脏痛的动物模型包括球囊导管和具有经皮遥测能力的可植入传感器模块。安装可植入传感器模块接受试验动物内脏运动和拟情感应答。具体地,球囊导管是可植入的球囊导管,优选在试验动物的十二指肠内植入,并且安装可植入传感器接受来自至少一个双极性电极对和至少一个血液导管的输入信号。也描述了一种制备所述动物的方法以及在制备所述动物的方法中使用的包括有球囊导管和可植入传感器模块的试剂盒。



ISSN 1008-4274

1. 一种测量内脏痛的动物模型，其包括球囊导管和具有经皮遥测能力的可植入传感器模块。

5 2. 根据权利要求1的动物模型，其中球囊导管是可植入的球囊导管。

3. 根据权利要求2的动物，其中可植入球囊导管包含优选由用于固定导管的两个结节构成的固定装置。

4. 根据权利要求2的动物，其中将球囊导管植入到十二指肠中。

10 5. 根据前面权利要求中的任何一项的动物，其中可植入传感器模块能够接受大量输入信号。

6. 根据权利要求5的动物，其中安装可植入传感器模块接受试验动物的内脏运动和拟情感应答。

7. 根据权利要求5的动物，其中可植入传感器包括至少两个输入端口。

15 8. 根据权利要求5的动物，其中将可植入传感器与双极电极对和血管导管相连。

9. 一种由用弹性材料(2)在一端封闭的生物相容的管(1)构成的球囊导管，其特点是弹性材料在接近管末端(4)的位置(3)处附着到生物相容的管上。

20 10. 根据权利要求9的球囊导管，其中弹性材料也附着在生物相容的管的末端(5)，所述的管末端严格密闭(6)，进一步包括远离附着点(3)处的许多孔(7)。

11. 根据权利要求9或10的球囊导管，进一步包括位于邻近管末端的固定装置。

25 12. 一种测量内脏痛的系统，包括：根据权利要求9-11中任意一项的球囊导管；具有经皮遥测能力的可植入传感器模块；以及能监控和加工遥控信号的外部模块。

30 13. 根据权利要求12的系统，其中在试验动物的十二指肠内植入球囊导管；其中安装可植入传感器模块接受试验动物的内脏运动和拟情感应答。

14. 根据权利要求12或13的系统，进一步包括通过球囊导管的近端引入测定量膨胀介质的装置。

15. 根据权利要求 14 的系统，其中引入测定量膨胀介质的装置包括注射器。

16. 产生根据权利要求 1 动物的试剂盒，包括球囊导管；具有经皮遥测能力的可植入传感器模块；双极性电极对；以及血液导管。

用于评价内脏痛知觉的动物模型

本发明涉及通过球囊导管和具有经皮遥测能力的可植入传感器模块的方法测量内脏痛的动物模型。安装根据本发明的可植入传感器模块接受试验动物内脏运动和拟情感(pseudoaffective)应答。具体地, 本发明提供一种非人动物模型, 其中球囊导管是可植入的球囊导管, 优选在试验动物的十二指肠内植入, 安装可植入传感器接受来自至少一个双极性电极对和至少一个血液导管的输入信号。具体说来, 安装这种双极性电极接受内脏运动应答, 特别是腹部肌肉的肌电图, 安装血液导管记录腹主动脉的平均动脉压和心率。

因此, 本发明的另一个目的是提供一种制备所述动物的方法以及在制备所述动物的方法中使用的包括球囊导管和可植入传感器模块的试剂盒。

15 发明背景

国际疼痛研究协会以下列方式定义疼痛: “疼痛是一种与急性或潜在的组织损伤联系的, 或者以这样的损伤来描述的不愉快的感觉和情绪体验(Mertz 1979)”。然而, 问题是不能在动物上直接测量疼痛, 只能通过检查它们对有疼痛反映的刺激의 应答来估计。绝大多数的痛觉模型是基于对疼痛的行为应答, 范围从最基本的运动神经元反射到更综合性的行为(逃避、回避)。腹部疼痛的另一个问题是这种疼痛的特点是定位模糊, 腹部痉挛(内脏运动应答)和自主(拟情感)应答, 包括在很难以可计量和可复现方式评分的呼吸、心率(HR)以及平均动脉压(MAP)方面的改变。

25 一直最常使用疼痛扭动模型来研究动物的内脏痛(Reichert, Daughters 等, 2001)。在这个模型中, 将疼痛溶液腹膜内注射到清醒的动物体内, 对扭动的数量(躯干的伸展、后肢向背部凹形拱起的伸展过度以及腹部收缩)进行评分。由于伦理道德的约束, 不能在单个动物上进行反复评估, 因此使评估对止痛剂产生耐受性的困难更加严重了。此外, 这种模型缺乏可逃避性(escapability)和特异性, 而且不与人类病理学相关。机械诱导的内脏刺激(中空内脏的膨胀)重现天然的内脏刺激, 其更接近模拟人的内脏痛, 并且发现在动物中

是讨厌的（回避/扭动行为）（Gebhart 和 Ness 1991；Ness, Randich 等. 1991；Ozaki, Bielefeldt 等. 2002）。这些内脏痛模型产生可以计量的拟情感反射,其包括清醒动物中 MAP 和 HR 的增加（Danzebrink 和 Gebhart 1990；Danzebrink 和 Gebhart 1991），尽管这些可通过
5 某些麻醉剂被减弱或者甚至是被逆转（Ness 和 Gebhart 1988；Diop, Riviere 等. 1994；Ness 1999）。

Colburn 和他的同事（1989）通过对疼痛的行为应答如发抖（shaking）、探查（exploring）、梳理腹部（grooming abdominal region），伸展或不动进行评分，以及通过对腹部收缩的发生进行评
10 分，研究了在清醒状态下自由活动的大鼠对固定体积的十二指肠膨胀的内脏运动应答。他们证明了膨胀体积和腹部痉挛频率之间的分级关系。此外，它们证明通过以剂量依赖方式给予吗啡，可抑制对十二指肠膨胀的内脏运动应答。

为了获得更可计量和可再现的模型来研究对机械膨胀的内脏运动
15 应答，几个研究小组正在记录腹部肌电图（EMG）。通常，将电极丝插入到腹部或颈部肌肉内以及将电极丝置于动物的背部，使其能与记录器或计算机相连记录 EMG。这些研究是在清醒受约束的大鼠（Friedrich 和 Gebhart 2000；Ozaki, Bielefeldt, Sengupta, 和 Gebhart 2002；Bradesi, Eutamene 等. 2002）或轻度麻醉的大鼠
20 （Ness, Lewis-Sides 等. 2001）中进行的，防止由于大鼠的撕咬导致球囊导管的外置部分和电极导线的损害，和/或将由于额外的身体动作（如探查（exploration）、理毛（exploration））引起的背景 EMG 噪声减少到最小。然而，在这些研究中对内脏痛的内脏运动和拟情感应答都受到存在的麻醉（Ness 和 Gebhart 1988；Ness 1999）和/
25 或（约束/处理）胁迫（Coutinho, Plotsky 等. 2002）的影响。

因此，令人感兴趣的是使用腹部痛觉动物模型来分析新的药物化
合物的止痛性能，其中通过下列标准测定这种内脏痛模型的有效性
（Ness 和 Gebhart 1990；Gebhart 和 Sengupta 1996）：（1）刺激
应当尽可能多的再现天然刺激并且必须产生人类的疼痛，（2）刺激必
30 须诱导动物的厌恶行为（逃避、离开、回避），（3）刺激必须引起与人类对内脏痛的那些应答一致的拟情感应答，（4）对刺激的应答必须可
被防感受伤害的处理控制，（5）应答应当是可以计量的和可再现的，

以及(6)模型应当尽可能是非侵害性的,并且能够在麻醉的动物身上使用。

上面所描述所有模型仅仅部分满足这些要求。因此本发明的目的是提供一种研究内脏痛的新的动物模型,特别是它能用于止痛性能的急性和慢性分析并且允许在清醒,自由活动的动物身上同时和连续测量内脏运动(腹部 EMGs)和拟情感应答(MAP 和 HR)。

本发明解决了这个问题,通过使用在十二指肠中长期植入的球囊导管传送十二指肠的膨胀,通过长期植入的与双极性电极对和血液导管连接的发送器,同时和连续分别遥测内脏运动(腹部 EMGs)和拟情感应答(MAP 和 HR)。

发明概述

本发明涉及通过球囊导管和具有经皮遥测能力的可植入传感器模块的方法测量内脏痛的动物模型。可植入传感器能够将与内脏痛相关的数据传送到在体外的仪器中,该仪器能连续监控受试者的状态,并且能够同时或循序地接受大量输入信号,优选来自双极性电极对和血液导管的输入信号。这样,这种模型为在非人动物上连续和同时测量对内脏痛的内脏运动和拟情感应答提供了适当的工具。

在另一个实施方案中,本发明提供在制备测量内脏痛动物模型的方法中使用的试剂盒,包括有球囊导管、可植入的遥测传感器模块、双极性电极对和血液导管。本发明的另一个目的是提供在上述动物模型中使用的球囊导管。

本发明的另一个目的是提供制备用于测量内脏痛的动物模型的方法,包括:在所述动物的十二指肠内植入球囊导管;以及在所述动物的腹腔内植入遥测传感器模块,其中安装所述的遥测传感器模块接受至少一个双极性电极对和至少一个血液导管的输入信号。

附图的简要说明

图 1. 非膨胀和膨胀状态下硅氧烷球囊导管的胃十二指肠内部分的示意图。

图 2. 由膨胀体积(ml)阶梯性增加诱导的总活动(计数/分钟)的变化。显示每个膨胀期间观察到的行为。bas = 基线, post = 膨胀期后。数据以均数 $\pm$ SEM 表示。

图 3. 诱导不舒适行为、疼痛行为、基线 EMG 信号增加和降低的膨

胀的阈体积 (ml)。数据以均数 $\pm$ SEM 表示。

图 4. 阶梯膨胀 (0.1 到 0.6ml) 之前、之间和之后原始的、过滤后的以及矫正后的单个 EMG 波形的记录。

图 5. 由膨胀体积(ml)阶梯性增加所诱导的 EMG 的最大幅度 (MAX) 和曲线下面积 (AUC) 对基线 (= 100%) 的百分率的变化。数据以均数 $\pm$ SEM 表示。

图 6. 由膨胀体积 (ml) 阶梯性增加所诱导的平均动脉压 (MAP, 以 mm Hg 表示) 和心率 (HR, 以心跳/分表示) 的变化。显示每个膨胀期间观察到的行为。bas = 基线, post = 膨胀期后。数据以均数 $\pm$ SEM 表示。

图 7. 阶梯膨胀模型期间, 平均动脉压 (MAP, 以 mm Hg 表示) 和 MAX (mV) 或 AUC (mV x 秒) 之间的相关性。

图 8. 由膨胀体积 (ml) 阶段性增加所诱导的总活动 (计数/分) 的变化。显示在每个膨胀期间观察到的行为。bas = 基线, int = 未膨胀间期。数据以均数 $\pm$ SEM 表示。

图 9. 阶段性膨胀 (0.1、0.3 和 0.5ml) 之前、之间和之后原始的、过滤后的以及矫正后的单个 EMG 波形的记录。

图 10. 由膨胀体积(ml)阶段性增加所诱导的 EMG 的最大幅度 (MAX) 和曲线下面积 (AUC) 对基线 (= 100%) 的百分率的变化。数据以均数 $\pm$ SEM 表示。

图 11. 由膨胀体积 (ml) 阶段性增加所诱导的平均动脉压 (MAP, 以 mm Hg 表示) 和心率 (HR, 以心跳/分表示) 的变化。显示在每个膨胀期间观察到的行为。bas = 基线, int = 未膨胀间期。数据以均数 $\pm$ SEM 表示。

图 12. 阶段性膨胀模型期间, 平均动脉压 (MAP, 以 mm Hg 表示) 和 MAX (mV) 或 AUC (mV x 秒) 之间的相关性。

图 13. 用吗啡 (0.3, 1.5 和 3 mg/kg) 预处理后, 由膨胀体积 (ml) 阶段性增加所诱导的 EMG 的最大幅度 (MAX) 和曲线下面积 (AUC) 对基线 (= 100%) 的百分率的变化。数据以均数 $\pm$ SEM 表示。

图 14. 置于开放场地中小平台上的膨胀 (0.6 ml) 和未膨胀的大鼠 9 次试验中下台 (step-down) 的潜伏期 (秒)。数据以均数 $\pm$ SEM 表示。

详细描述

本发明涉及通过球囊导管和具有经皮遥测能力的可植入传感器模块的方法测量内脏痛的动物模型。可植入传感器能够将与内脏痛相关的数据传送到在体外的仪器，该仪器能连续监控受试者的状态，并且能够同时或循序地接受大量输入信号，优选来自双极性电极对和血液导管的输入信号。这样，这种模型为在非人动物上连续和同时测量对内脏痛的内脏运动和拟情感应答提供了适当的工具。具体地，本发明涉及用于测量内脏痛的非人动物模型，其包括球囊导管和具有经皮遥测能力的可植入传感器模块。优选地，非人动物，其中在所述动物中长期植入球囊导管和传感器模块。优选地，在十二指肠内植入球囊导管，将传感器模块连于双极性电极对和血液导管上。

在本模型中使用的球囊导管是可植入的球囊导管，特点是该球囊导管由生物相容性材料如聚对亚二甲苯基的无免疫原性聚合材料、聚乙烯、天然的或合成橡胶、硅氧烷或其它芳族为基础的部分构成，其具有有效阻滞免疫原性试剂通过的多孔的膜部分。本发明的球囊导管由在一端用弹性材料（2）封闭的生物相容的管（1）构成。为了改善将球囊导管引入到根据本发明方法的动物中，将弹性材料在邻近管末端（4）的位置（3）处附着到生物相容的管上。在提高弹性材料的径向扩展的进一步改进中，也将弹性材料附着在生物相容的管的末端（5），所述的管末端是严格密闭的（6）。为了使球囊能在这最后的构型中膨胀，从许多孔（7）可预知管末端远离附着点（3）。根据本发明，球囊导管的另一个特点是其包括防止由于肠道的蠕动导致导管活动的固定装置。所述的固定装置位于邻近管末端的部位，使管固定到动物的胃壁上。在一个优选的实施方案中，固定装置由两个结节（8）构成。

通过使用的试验动物决定管的直径和长度。由于在根据本发明的方法中，在试验动物的十二指肠内引入可植入的球囊导管，因此，管的长度应当允许从所述动物的十二指肠，经过胃壁到达易于固定的头颅。例如，在大鼠中，管的长度应当在15和50厘米之间，优选在20和30厘米之间，外径从2到2.5毫米。

本发明的另一个目的是提供由在一端用弹性材料（2）封闭的生物相容的管（1）构成的球囊导管，其特点是弹性材料在邻近管末端（4）的位置（3）处附着到生物相容的管上。在另一个实施方案中，弹性材

料也附着到生物相容的管的末端(5),所述的管末端是严格密闭(6)的,进一步包括远离附着点(3)的许多孔(7)。在具体的实施方案中,球囊导管进一步包括位于邻近管末端以使管固定到动物胃壁上的固定装置。在优选的实施方案中,固定装置由两个结节(8)构成。

5 可在根据本发明的动物模型中使用的具有经皮遥测能力的可植入感受器模块在现有技术中是已知的。例如,有可获得的起搏器,当被植入并与心脏连接时,其能通过附着到起搏器上的电极监控心电(electrocardial)活动。电极的功能是作为电位传感器,起搏器包括界面电路,其缓冲传感器信号,使信号格式化,然后通过连于外部
10 通讯模块的双向射频(RF)通讯的途径传送格式化的信号。通过外部模块监控并加工遥测的信号。

此外,现有技术中已知能提供允许循序或同时测量至多8个单个参数的植入遥测装置实现两个或多个功能。在根据本发明的动物模型中,可植入的传感器模块能循序或同时接受大量输入信号。在优选的
15 实施方案中传感器模块包括至少两个输入端口并且与至少一个双极性电极对和至少一个血液导管相连。在更优选的实施方案中,传感器模块是一种无线电遥测装置,其与用于测量腹部肌肉肌电图的双极性电极对相连,并且与通过股动脉安装的用于记录腹主动脉的平均动脉压和心率的血液导管相连。本领域技术人员将很容易地意识到,这里使
20 用的可植入的传感器模块需要外部模块来探测和将传感器模块的输出信号解调成适合驱动输出描计装置的输出信号。例如,用于记录电流幅度对时间变化的记录仪。

因此,本发明的目的是提供一种测量内脏痛的系统,包括:球囊导管、通过球囊导管的近端引入测定量膨胀介质的装置、具有经皮遥
25 测能力的可植入传感器、以及能监控和加工遥测信号的外部模块。一种将球囊导管植入试验动物的十二指肠内以及安装接受试验动物的内脏运动(EMG)和拟情感(MAP、HR)应答的可植入传感器的系统。在具体的实施方案中,该系统包括一种无线电遥测装置,其与测量腹部肌肉肌电图的双极性电极对相连,并且与通过股动脉安装的用于记录
30 腹主动脉平均动脉压和心率的血液导管相连。在前述系统中使用的球囊导管典型地由在一端用弹性材料(2)封闭的生物相容的管(1)构成,导管的特点是弹性材料在邻近管末端(4)的位置(3)处附着到

生物相容的管上。在另一个实施方案中，弹性材料也附着在生物相容的管末端（5），并且所述的管末端是严格密闭（6）的，进一步包括远离附着点（3）的许多孔（7）。在具体的实施方案中，球囊导管进一步包括位于邻近管末端使管固定到动物胃壁上的固定装置。在优选的实施方案中，固定装置由两个结节（8）构成。引入测定量膨胀介质的装置典型地包括包含液体注入泵的注射器，其在伺服系统或 stepper 马达的控制下驱动，其中膨胀介质典型地是无菌、相对无泡和实际上不能压缩的液体，如生理盐水。在本发明中将通过使用的试验动物决定膨胀介质的体积。例如，在大鼠中膨胀介质的体积是在 0.05 - 1.00 ml 的范围内，优选在 0.1 - 0.6 ml 的范围内。

在另一个实施方案中，本发明提供在制备测量内脏痛动物模型的方法中使用的试剂盒，包括球囊导管、可植入遥测传感器模块、双极性电极对和血液导管。可任选地，进一步包括能监控和加工遥测信号的外部模块和/或引入测定量膨胀介质的装置。在具体的实施方案中，试剂盒包括根据本发明的球囊导管和能循序或同时接受大量输入信号并且具有经皮遥测能力的可植入遥测传感器模块。在优选的实施方案中，传感器模块包括至少两个输入端口。

因此，本发明的另一个目的是提供制备测量内脏痛动物模型的方法，包括：在所述动物的十二指肠内植入球囊导管；和在所述动物的腹腔内植入遥测传感器模块，其中安装所述的遥测传感器模块接受至少一个双极性电极对和至少一个血液导管的输入信号。一种制备根据本发明动物模型的方法，其中使用可植入球囊导管的固定装置（8）将球囊导管固定到试验动物的胃壁上。一种制备根据本发明动物模型的方法，其中将可植入球囊导管的生物相容的管（1）引导到易于固定的试验动物的头颅，优选皮下进行。在优选的实施方案中，将管末端固定到注射器连接器上，优选可买到的 90° 环连接器。将注射器连接器固定到试验动物的头颅上，例如使用牙科水泥。一种制备根据本发明动物模型的方法，其中将双极性电极对的电极缝合到腹部肌肉内测量 EMG。一种制备根据本发明动物模型的方法，其中将血液导管穿到腹主动脉内，优选通过股动脉。

通过参考下列实施例的详细描述将更好地理解本发明，但是本领域技术人员将很容易地意识到这些实施例仅仅是本发明其后权利要求

中更充分地描述的说明。另外，在整个本申请中引用了各种出版物。这里将这些出版物公开的内容并入本申请中作为参考，更充分地描述本发明所涉及技术的状态。

实施例

5 材料和方法

动物

在实验开始时，使用体重 280-300 克重的雄性纯白化病 Wistar 大鼠 (WU; Harlan, 荷兰)。在周围恒温 ($21 \pm 1^\circ\text{C}$)、恒定湿度 ($60 \pm 15\%$) 以及恒定昼夜节律 (光照从早 7 点到晚 7 点) 条件下，将大鼠
10 分别圈养在含有一层木屑的 Macrolon 单个通风笼中 (25 x 40 x 22 厘米)。手术后，将动物在手术前的条件下单独圈养。整个实验中以易于获得的方式提供食物 (完全的实验室食物) 和水。

手术

在大鼠十二指肠内安置诱导十二指肠膨胀的球囊导管以及遥测发
15 送器，研究腹部肌电图 (EMGs)、平均动脉压 (MAP)、心率 (HR) 和身体活动。手术在芬太尼/氟丁酰胺 (fluanisone) (Hypnorm®, Janssen Pharmaceutica, Beerse, 比利时; 0.1 ml/100 g 体重 (BW), 肌肉内注射) 麻醉和盐酸咪达唑仑 (Dormicum®, Hoffman-LaRoche, Mijdrecht, 荷兰; 0.05 ml, 腹膜内注射 (ip)) 作为肌肉松弛药的情
20 况下进行。在注射肌肉松弛药前，通过检查大鼠足反射和角膜反射是否丧失检验芬太尼麻醉的止痛效果。正常似乎 10 分钟后痛觉反应全部丧失，然后注射肌肉松弛药。手术在无菌层流橱内进行以将感染的风险减少到最低。在腹前白线处作一个小的纵向切口。根据 Colburn 等.
(1989) 描述的方法，将自制的有一些改动的硅氧烷球囊导管 (i. d.
25 1.02 mm/ o. d. 2 mm) (见图 1) 长期植入十二指肠内。在胃壁上作一个插入导管的小切口 (3 mm)，引导导管进入十二指肠内，直到球囊导管上的小结节恰好穿过胃壁。然后在两个结节之间紧密缝合胃壁以固定导管。将球囊导管的另一端穿过皮下进入头颅，固定到 90° 环连接器
(Bilaney, Dusseldorf, 德国) 上。用牙科水泥将连接器固定到头
30 颅上 (Dentimex BV, Zeist, 荷兰)。将由双极性电极对和血液导管构成的遥测发送器 (TL11M2-C50-PXT, Data Sciences International, St. Paul, 美国) 长期植入大鼠的腹腔内。将电极的非绝缘端 (不锈

钢金属丝螺旋; Ø 0.45 mm、8 mm) 平行 (5mm 极间空间) 缝合到腹部肌肉内测量 EMG, 而将血液导管穿过股动脉进入腹主动脉内记录 MAP 和 HR。手术后动物接受 0.1 mg/kg 长效阿片制剂止痛剂盐酸丁丙诺啡 (Buprenorfine hydrochloride) (Temgesic®, Reckitt & Colman, Kingston-upon-Hull; 英国; 0.1 ml, 皮下注射)。

实验设计

给大鼠 (n=14) 手术安装十二指肠球囊导管和遥测传送器, 并允许大鼠手术后恢复 12 天。在恢复期间对动物每天进行称重和适应实验目的。使大鼠习惯于实验过程 (实验前两次)。在实验期间, 同时和连续记录十二指肠膨胀之前 (基线)、之间和之后的 EMG、身体活动、MAP 和 HR。记录 30 秒钟基线值。随后, 大鼠接受 300 (阶梯性模型 n=7) 或者 690 (阶段性模型 n=7) 秒 (见下文) 的固定体积的十二指肠膨胀方案。然后, 进行另一个 120 (阶梯性模型) 或 300 (阶段性模型) 秒的膨胀后记录。

为了验证我们的模型, 用一组新动物进行另外的实验。在阶段性十二指肠膨胀前 30 分钟, 给予大鼠腹膜内注射吗啡 (0.3 (n=8), 1.5 (n=7) 或 3 (n=8) mg/kg 体重) 或者盐水 (n=8)。

在验证我们模型的最后的实验中, 以下称作消极回避实验, 给 12 只大鼠手术安装十二指肠球囊导管, 并允许手术后恢复 12 天。每天对这些动物进行称重和适应实验目的。在消极回避试验中, 对下台的潜伏期进行评分。

所有实验都是在昼夜节律周期的光照期间早 8 点和晚 12 点之间在笼中进行。实验后, 通过过量 (0.5 ml) 注射戊巴比妥 (Nembutal®, Sanofi, 比利时; 60mg/ml, 腹膜内注射) 处死所有的大鼠, 解剖并肉眼检查感染。没有在任何动物中发现任何感染的迹象。

十二指肠膨胀

在基线记录前 45 分钟, 将球囊导管的头颅骨连接器用注射器附着到装满液体的长线上 (1 m; 聚乙烯管, Becton Dickinson, 英国), 使得可从笼外给予各种固定体积的膨胀, 而用不限制大鼠的活动。在这个适应期间, 大鼠保持睡眠, 以便开始无胁迫的基线记录。使用两种方案: 1) 阶梯性膨胀: 将球囊从 0.1 到 0.6ml 开始, 每次增加 0.1ml 体积 (每次 30 秒) 膨胀; 2) 阶段性膨胀: 用 0.1、0.3 和 0.5ml 膨胀

30 秒，其间休息不膨胀 5 分钟。

行为测量

在实验期间，通过实验者对笼中动物对十二指肠膨胀的行为反应进行评分。使用下列行为评分：睡眠、醒着、觉醒、发抖、探查、梳理腹区 (groom abdominal region)、腹部收缩、伸展行为 (躯干的伸展、以及后肢向背部凹拱的伸展过度) 和不动。在阶梯性模型中，测定诱导不舒适 (发抖、探查) 和/或疼痛 (梳理腹区)、伸展和不动) 行为的阈值 (膨胀体积 (ml))。

消极回避实验

10 为了验证是否感觉到十二指肠膨胀是讨厌的，对大鼠 (n=12) 进行消极回避实验。第一天，将大鼠置于位于大的开放区域 (Ø 80 cm) 的小平台上。当大鼠走下平台时，将其从开放的区域移走。为了适应实验的目的，在每间隔 10 分钟的 9 次学习试验中对每只大鼠重复这个过程。当大鼠不走下平台时，150 秒后将其移走。第二天，对同样的大鼠进行同样的过程 (不膨胀，对照组; n=6) 或者走下平台后立即接受 15 5 秒钟 0.6ml 的十二指肠膨胀 (n=6)。在每间隔 10 分钟的 9 次学习试验中对每只大鼠重复这个过程。下台的潜伏期的增加可用作疼痛感觉增加的指示。

遥控测量

20 通过检测动物在其笼中四处走动时传送器信号强度的变化遥控测量身体的活动。通过数据获得程序 ART 2.2 (Data Sciences International, St. Paul, 美国) 记录 EMGs、身体活动、MAP 和 HR。连续收集原始 EMG 活动形成一种波形 (在 1000 Hz 频率)，在 50Hz 处向下削减过滤除去运动干扰，并通过 Spike2, version 4.11 25 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, 英国) 充分矫正。从矫正的 EMG 中，分析曲线下的面积 (AUC; mV x 秒) 和最大值 (EMG_{max}; mV)。在阶梯性模型中，测定诱导基线 EMG 幅度增加或降低的阈值 (膨胀体积 (ml))。

统计

30 以均值 ± SEM 表示膨胀阈值 (ml)、EMG 数据 (对基线的百分率)、总活动 (计数/分)、MAP (mmHg) 和 HR (心跳/分)。在用单因素方差分析 (ANOVA) 和 post-hoc Student's t 检验进行统计学分析前，将

每只单个大鼠的心血管数据平均到每一基线和膨胀期的 1 点上。对于吗啡实验, 使用重复测量的两因素复合 ANOVA (MANOVA)。P 值 < 0.05 认为是有统计学意义。

在阶段性膨胀方案中, 对心血管数据的统计学分析上排除一只由于不良信号传导的大鼠。

结果和讨论

阶梯性模型

行为反应和内脏运动反应

从 0.2 毫升体积开始, 十二指肠的阶梯性膨胀产生“不舒适”行为 (发抖 (shaking)、探查 (exploring))。在较高的体积 (0.4 到 0.6 毫升) 时, 大鼠另外显示“疼痛”行为 (梳理腹区、伸展、不动) (图 2 和 3)。在发生痛觉相关行为前, 显示腹部收缩。图 4 显示阶梯性膨胀前 (基线)、膨胀期间 (0.1 到 0.6 毫升) 和膨胀后 (post) 的原始、过滤后以及矫正的 EMG 信号的单个记录实例。“积极”行为 (发抖、探查、梳理、腹部痉挛) 伴随着 EMG 幅度的显著增加, 而在较高膨胀体积期间 (0.4 到 0.6 毫升) 的伸展行为则反映在基线 EMG 信号的降低 (图 3 和 4)。

阶梯性膨胀产生 EMG_{max} 和 AUC 体积依赖性增加 (图 5)。 EMG_{max} ($F(6, 48) = 2.9, p < 0.05$) 和 AUC ($F(6, 48) = 3.1, p < 0.05$) 的单因素方差显示有显著意义, post-hoc 分析显示与基线相比, 在 0.2 ($p < 0.05$)、0.3 ($p < 0.05$)、0.4 ($p < 0.05$)、0.5 ($p < 0.005$) 和 0.6 ($p < 0.005$) 毫升膨胀体积处 AUC 和 EMG_{max} 显著增加。

心血管反应

十二指肠的阶梯性膨胀产生 MAP 的体积依赖性增加 (图 6A)。对 MAP 的单因素方差分析显示有显著意义 ($F(6, 48) = 22.6, p < 0.0001$), post-hoc 分析显示与基线相比, 膨胀体积在 0.3 ($p < 0.005$)、0.4 ($p < 0.0001$)、0.5 ($p < 0.0001$) 和 0.6 ($p < 0.0001$) 毫升时 MAP 显著增加。

十二指肠的阶梯性膨胀产生 HR 的体积依赖性增加 (图 6B)。HR 的单因素方差分析有统计学意义 ($F(6, 48) = 3.9, p < 0.005$), post-hoc 分析显示与基线相比, 膨胀体积在 0.3 ($p < 0.05$)、0.4 ($p < 0.01$)、0.5 ($p < 0.005$) 和 0.6 ($p < 0.01$) 毫升时 HR 显著增加。

内脏运动 - 拟情感应答的关系

图 7 显示在阶梯性膨胀期间, 平均 MAP 和 EMG_{max} ($MAP=63 EMG_{max} + 109, r = 0.9$) 或者 AUC ($MAP=143 AUC + 87, r = 0.8$) 之间正相关。平均 MAP 也显示和 HR 正相关 ($HR=1.2 MAP + 242, r = 0.9$), 平均 HR 显示和 EMG_{max} ($HR=75EMG_{max} + 375, r = 0.8$) 以及和 AUC ($HR=185 AUC + 343, r = 0.8$) 正相关; 没有显示数据。

阶段性模型

行为反应和内脏运动反应

十二指肠的阶段性膨胀在 0.3 和 0.5 毫升体积时产生“不舒适”和“疼痛”行为 (图 8)。如在阶梯性方案中显示的那样, 伸展行为很少反应在基线 EMG 幅度的降低 (见图 9)。阶段性膨胀产生 EMG_{max} 和 AUC 体积依赖性增加 (图 10)。 EMG_{max} ($F(3, 27) = 4.4, p < 0.05$) 和 AUC ($F(3, 27) = 3.8, p < 0.05$) 的单因素方差显示有统计学意义, post-hoc 分析显示与基线相比, 膨胀体积在 0.3 ($p < 0.05$) 和 0.5 ($p < 0.01$) 毫升时 AUC 和 EMG_{max} 显著增加。

心血管反应

十二指肠的阶段性膨胀产生 MAP 体积依赖性增加 (图 11A)。MAP 的单因素分析显示有统计学意义 ($F(3, 23) = 11.8, p < 0.0001$), post-hoc 分析显示与基线相比, 膨胀体积在 0.5 ($p < 0.005$) 毫升时 MAP 显著增加。

阶段性膨胀产生 HR 体积依赖性增加 (图 11B)。HR 的单因素方差分析显示有统计学意义 ($F(3, 23) = 5.8, p < 0.005$), post-hoc 分析显示与基线相比, 膨胀体积在 0.3 ($p < 0.005$) 和 0.5 ($p < 0.05$) 毫升时 HR 显著增加。

内脏运动 - 拟情感应答的关系

图 12 显示在阶段性膨胀期间, 平均 MAP 和 EMG_{max} ($MAP=26EMG_{max} + 101, r = 0.8$) 或者 AUC ($MAP=64 AUC + 90, r = 0.8$) 之间正相关。平均 MAP 也显示与 HR 正相关 ($HR=1.5 MAP + 204, r = 0.7$), 平均 HR 显示与 EMG_{max} ($HR=67 EMG_{max} + 347, r = 0.98$) 以及和 AUC ($HR=152 AUC + 321, r = 0.95$) 正相关; 数据没有显示。

吗啡实验

用吗啡的预处理抑制膨胀诱导的疼痛行为 (伸展行为、梳理腹区、

不动; $p < 0.0001$, 数据没有显示)。吗啡剂量依赖性减少的处理减少膨胀诱导的 EMG_{max} 增加, 抑制膨胀诱导的 AUC 增加 (图 13)。MANOVA 显示对 EMG_{max} ($F(3, 27) = 4.8$, $p < 0.01$) 和 AUC ($F(3, 27) = 4.3$, $p < 0.05$) 有显著治疗效果, 对 EMG_{max} ($F(2, 26) = 14.9$, $p < 0.0001$) 和 AUC ($F(2, 26) = 10.8$, $p < 0.0005$) 有显著膨胀效果, 对 EMG_{max} ($F(6, 52) = 3.0$, $p < 0.05$) 和 AUC ($F(6, 52) = 2.8$, $p < 0.05$) 有显著的膨胀 $\times$ 治疗相互作用。Post-hoc MANOVA 显示通过给予 0.3、1.5 和 3 mg/kg 剂量的吗啡处理, EMG_{max} 显著降低 ($p < 0.05$)。Post-hoc MANOVA 显示通过给予 1.5 和 3 mg/kg 剂量的吗啡处理, AUC 显著降低 ($p < 0.05$) 以及给予 0.3 mg/kg 剂量的吗啡处理, AUC 有减少的趋势 ($p = 0.07$)。

消极回避实验

为了评价传送急性十二指肠痛觉的传入途径和皮层痛觉, 可研究动物对疼痛的行为反应。在这个研究中我们使用消极回避实验评价有害相关的行为。同意以前的研究, 我们的研究显示十二指肠膨胀增加了下台的潜伏期 (图 14 显示在消极回避实验的第二天, 大鼠下台的潜伏期。与未膨胀大鼠下相比, 0.6 毫升体积的十二指肠膨胀导致走下平台 (step-down) 的潜伏期显著增加 ($F(1, 10) = 7.3$, $p < 0.05$))。与上述行为数据一起考虑, 本发明的研究显示在我们的动物模型中十二指肠膨胀被感觉是有害、讨厌的刺激。

结论

本发明数据显示无线电遥测技术是一种在清醒和自由运动大鼠中连续和同时测量对内脏痛的内脏运动和心血管反应的适当工具, 不需要额外的相关处理或约束胁迫。十二指肠膨胀在大鼠中诱导“不舒适的”和“疼痛”行为以及体积依赖性的内脏运动和心血管反应。阶梯性膨胀模型适合研究对十二指肠膨胀的讨厌行为 (梳理腹区、伸展)、内脏运动 (腹部收缩、EMG 幅度和 AUC 的增加) 以及拟情感 (MAP 和 HR) 反应的阈值。对十二指肠膨胀的心血管和内脏运动的反应都可用于测量内脏痛, 以及由药物引起的这些反应的消失, 预测药物的止痛功效。阶梯性和阶段性膨胀模型都适于研究新的药物化合物对回动的内脏痛的效力。

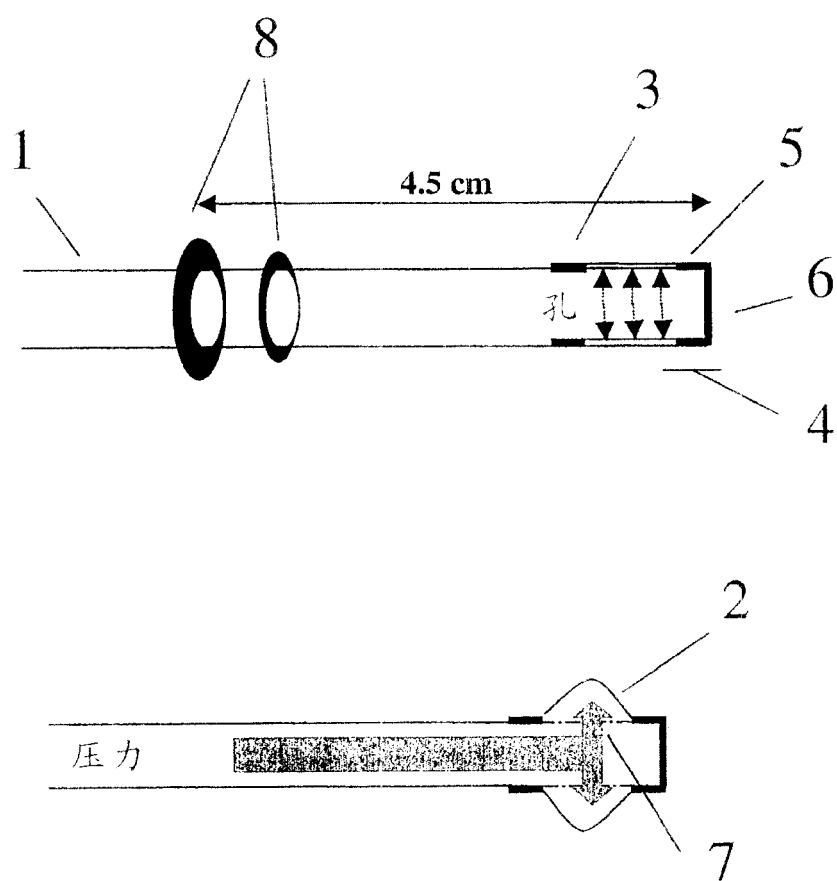


图 1

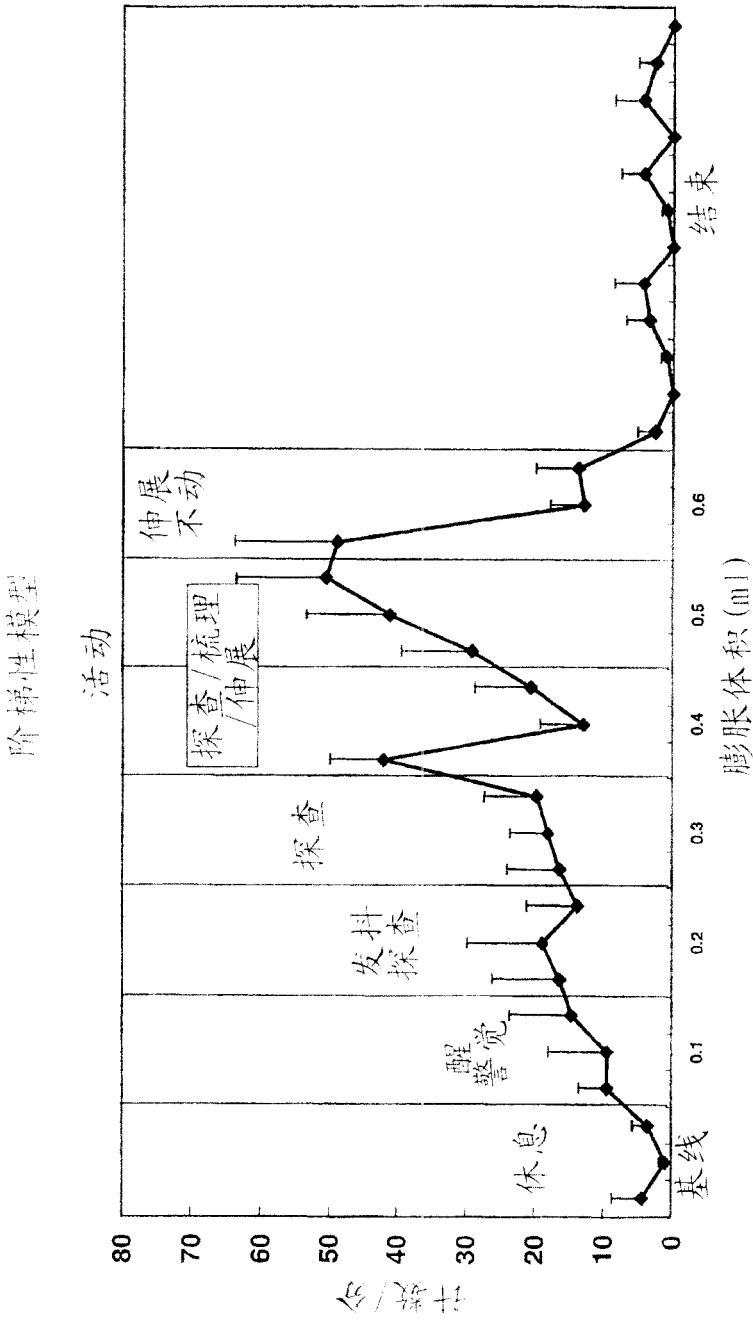


图 2

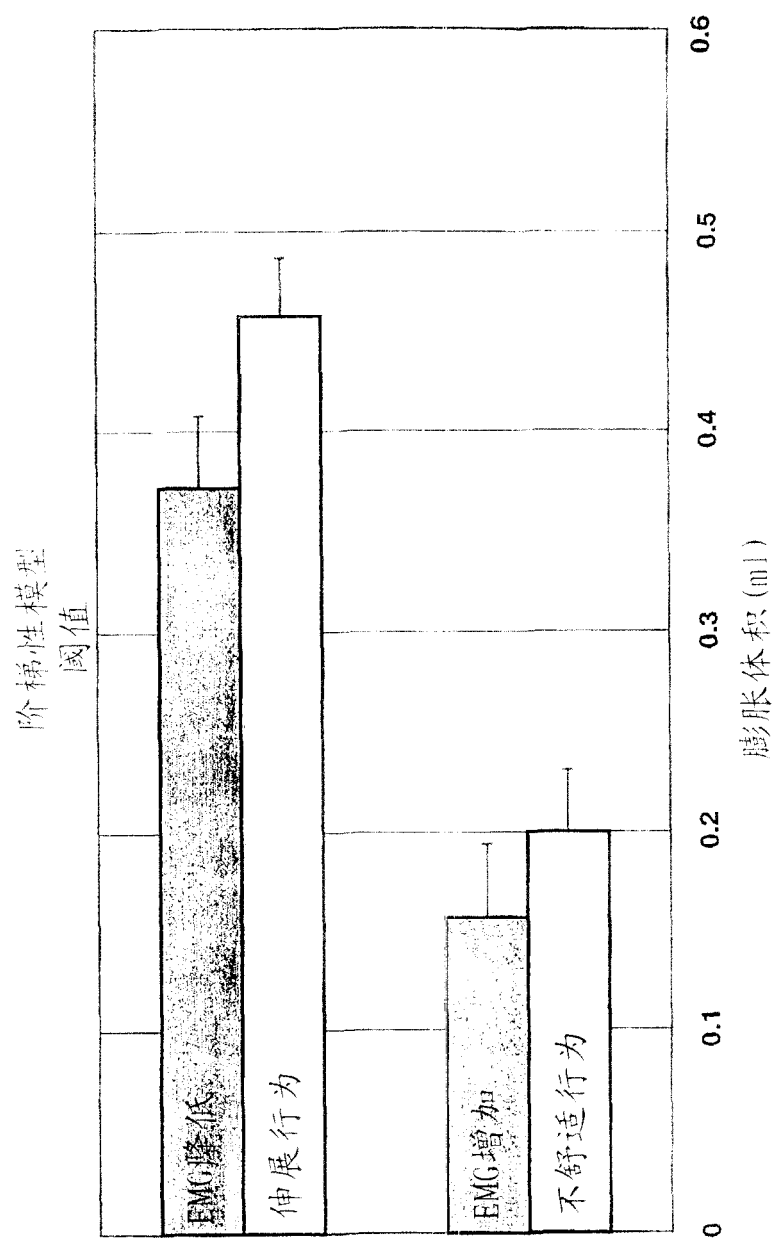


图 3

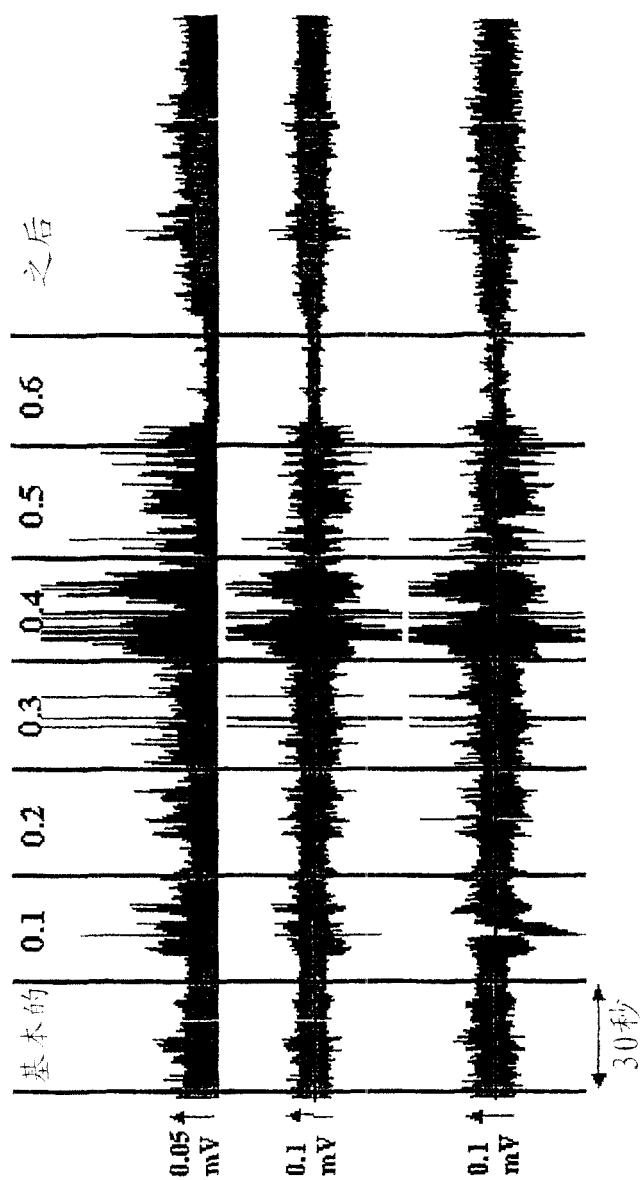


图 4

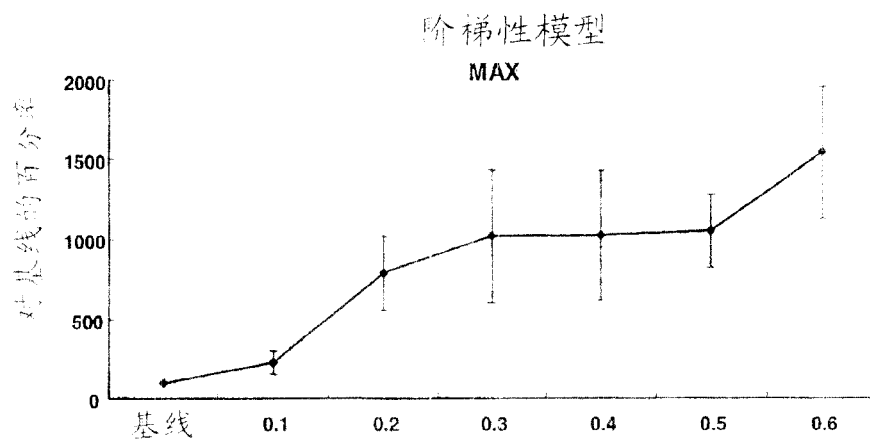


图 5A

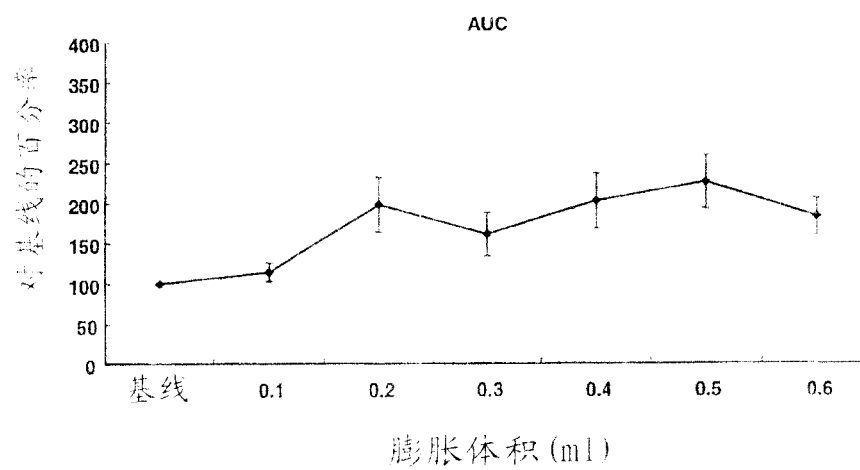


图 5B

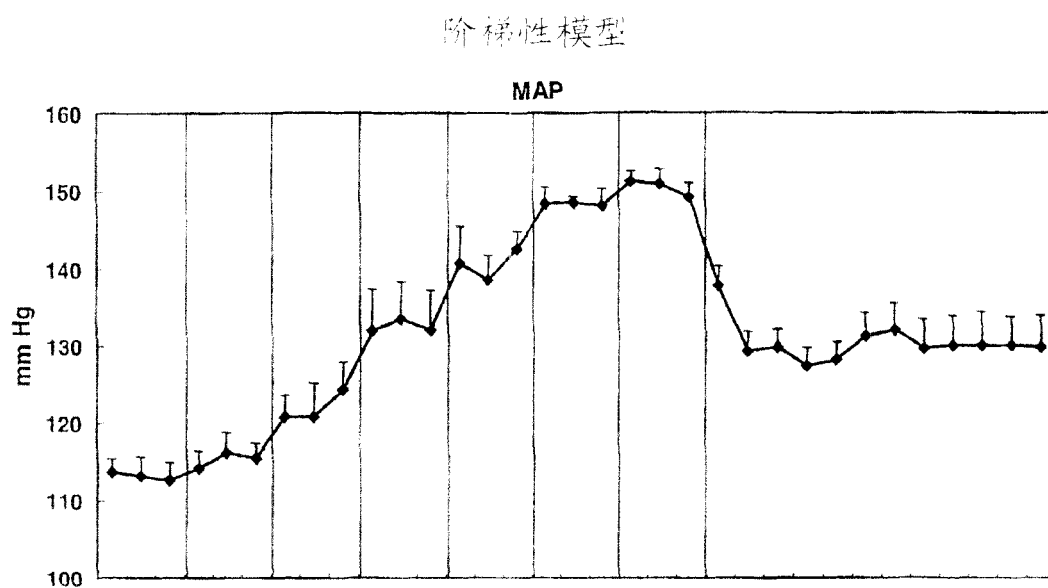


图 6A

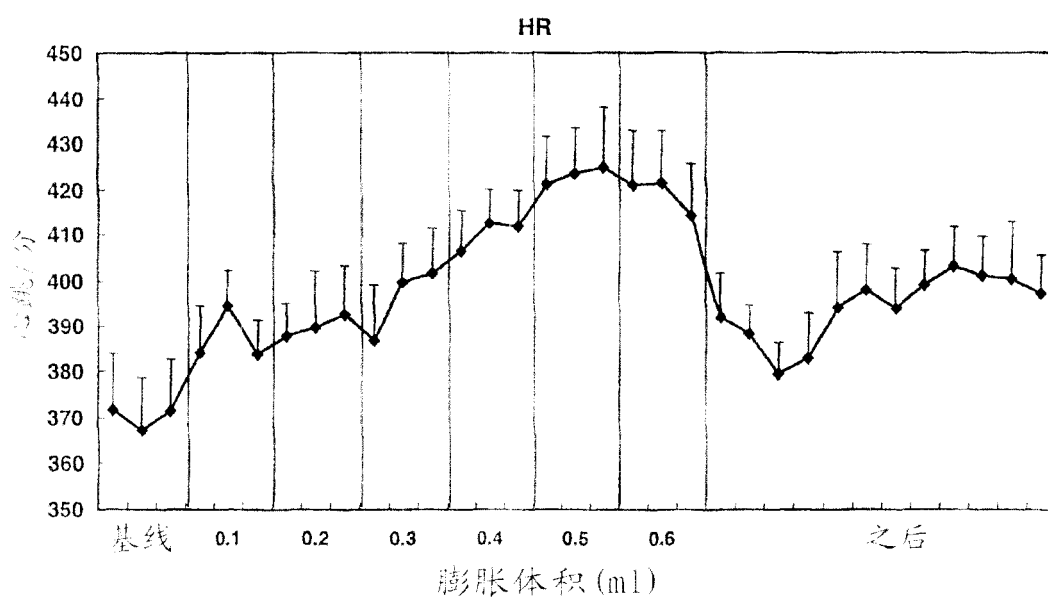


图 6B

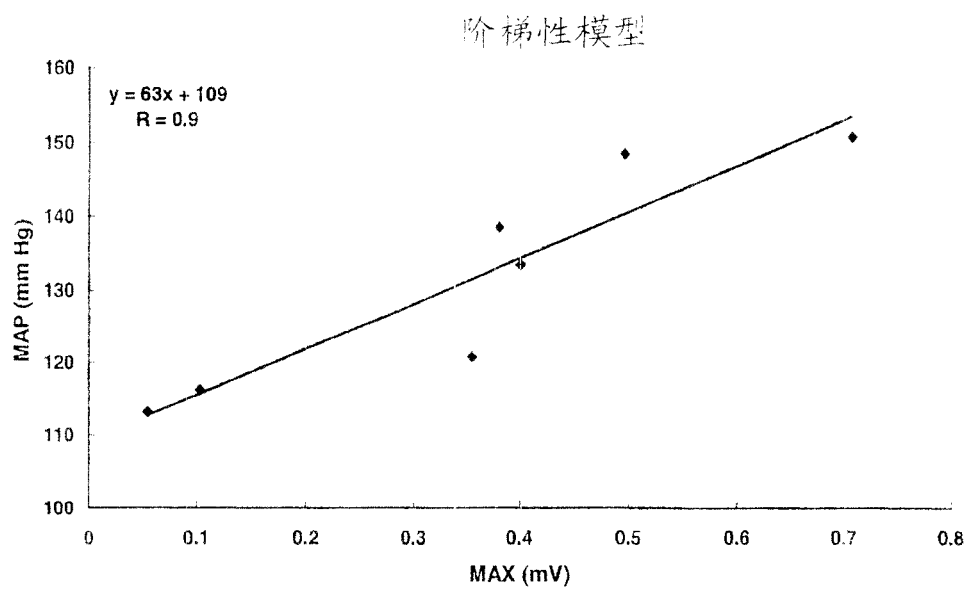


图 7A

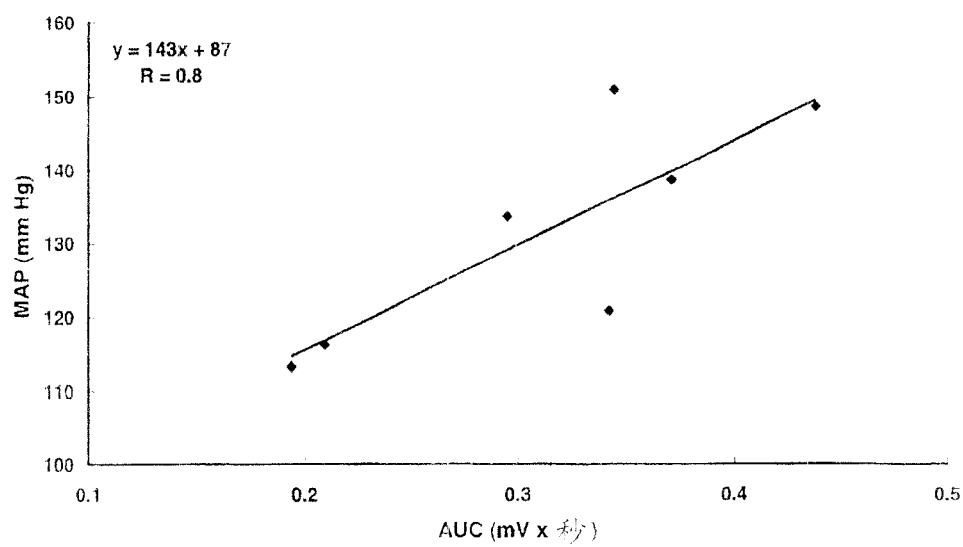


图 7B

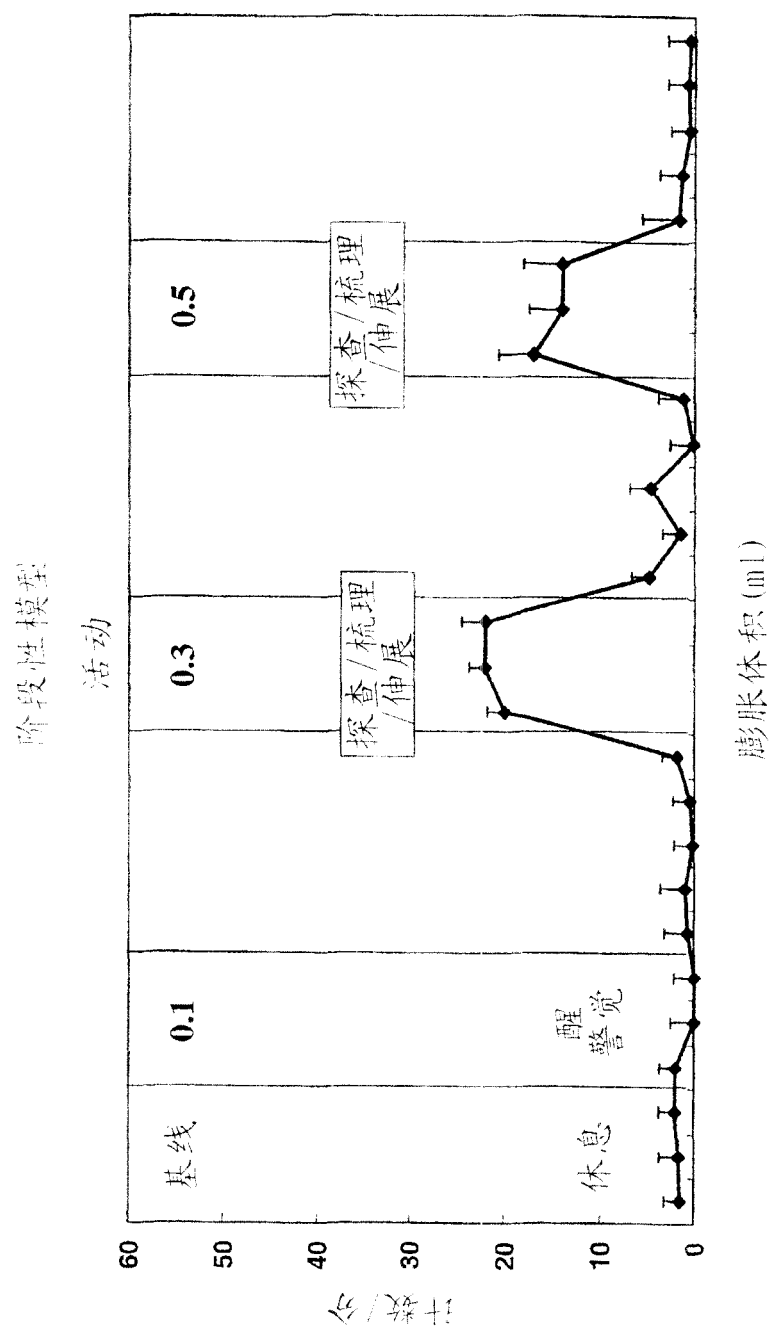


图 8

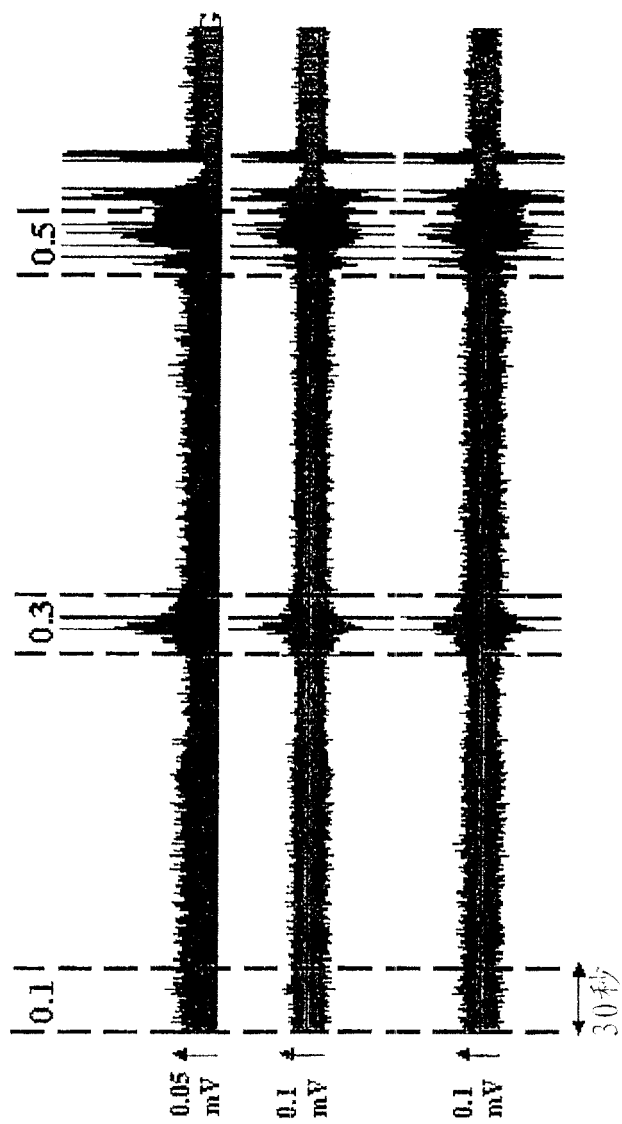


图 9

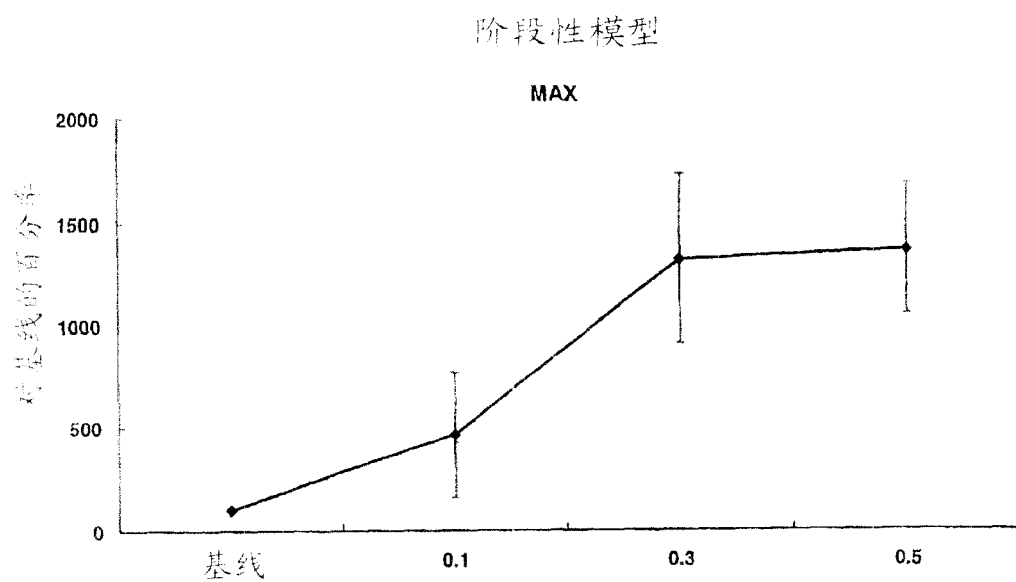


图 10A

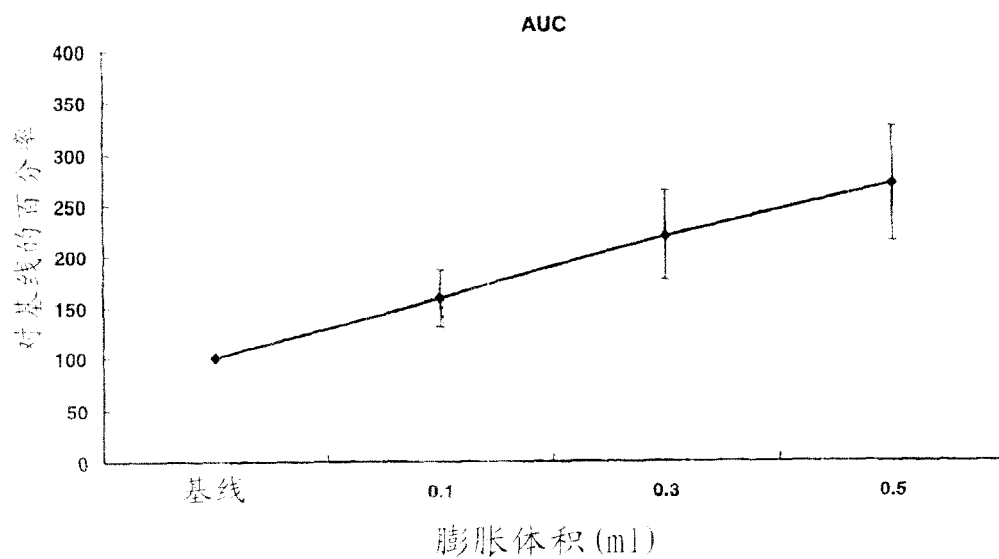


图 10B

阶段性模型

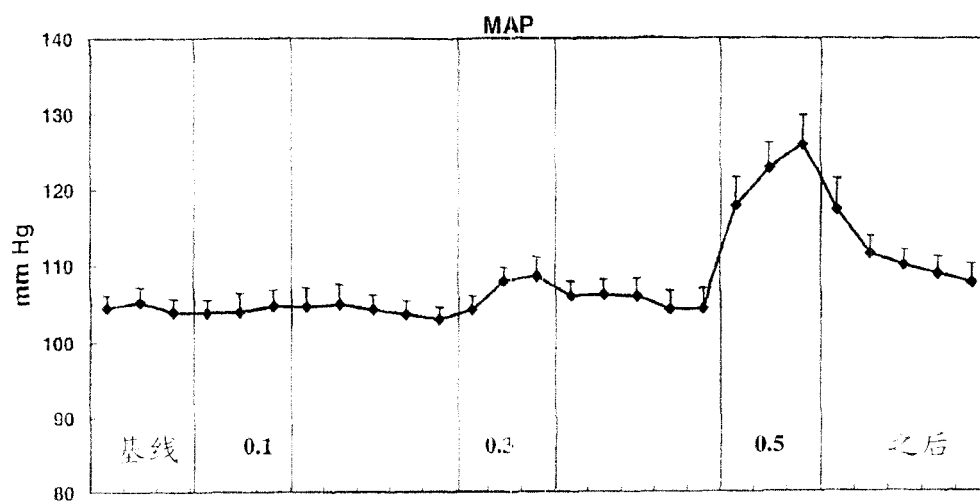
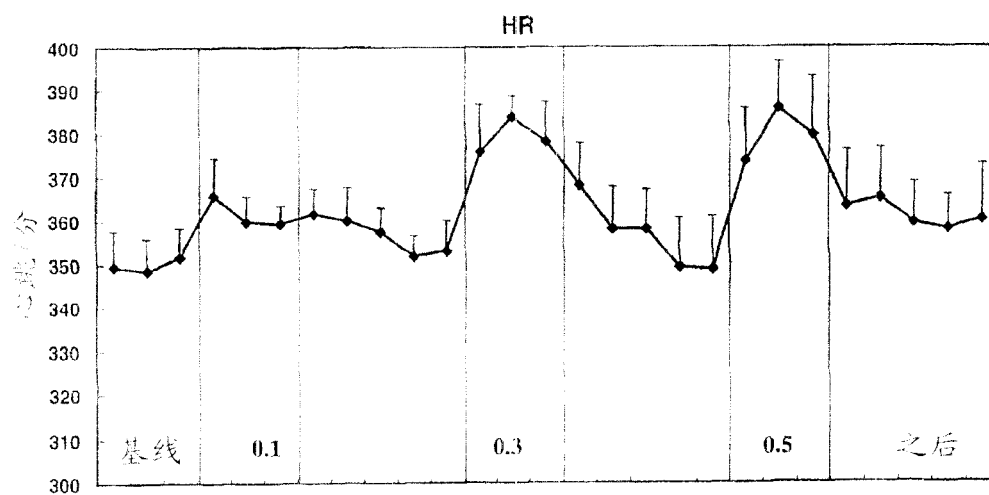


图 11A



膨胀体积 (ml)

图 11B

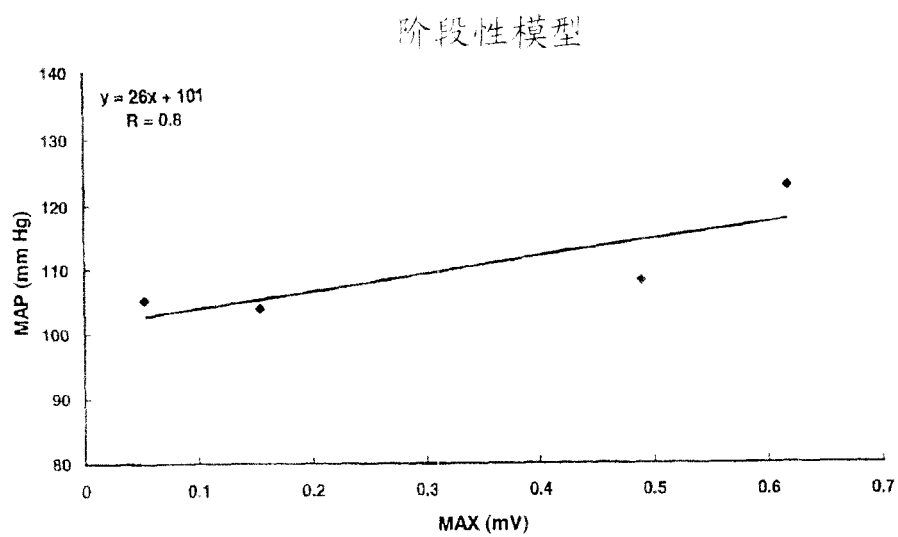


图 12A

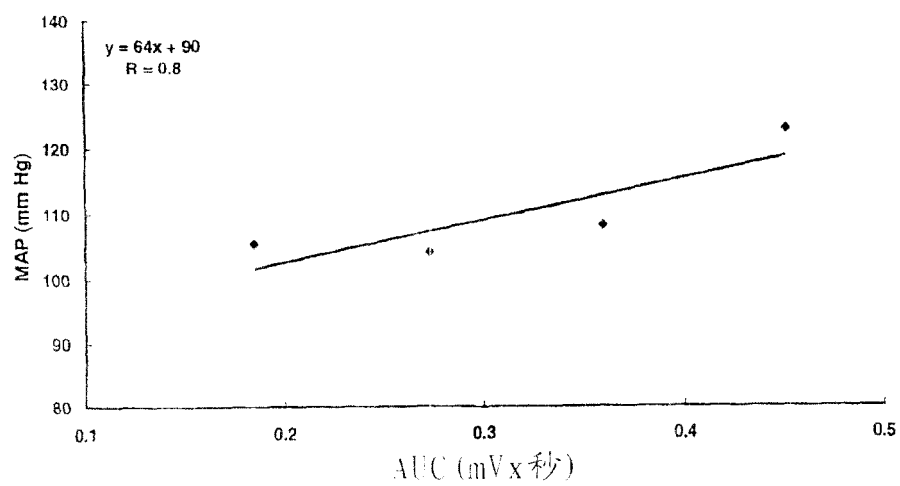


图 12B

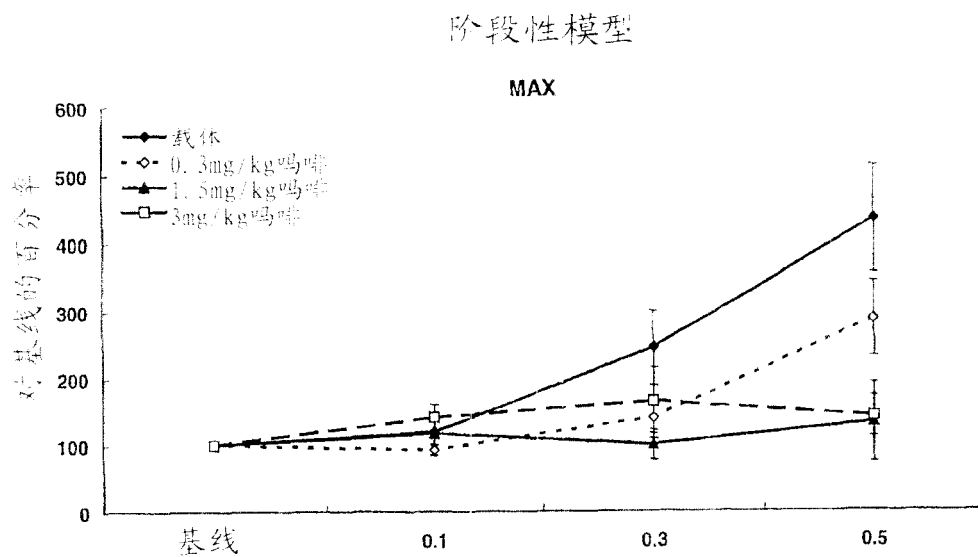


图 13A

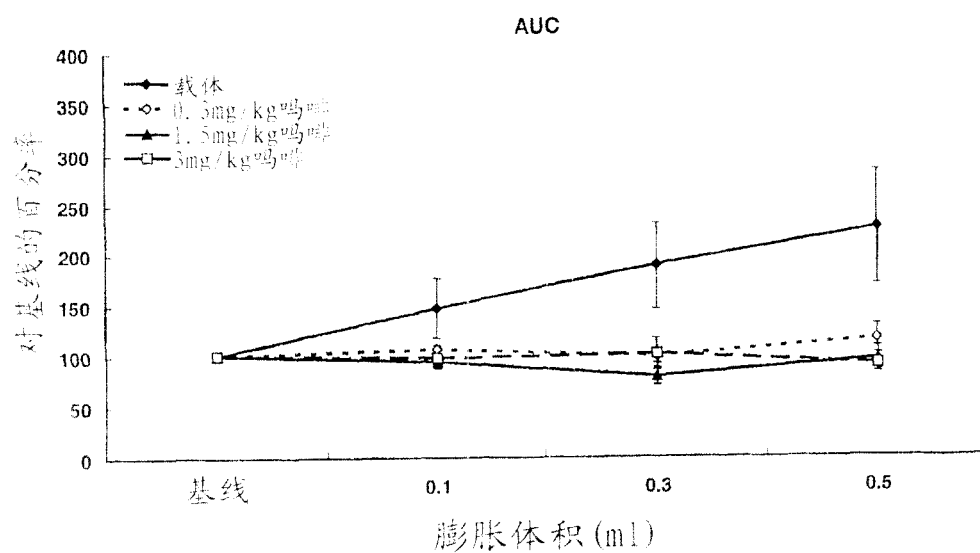


图 13B

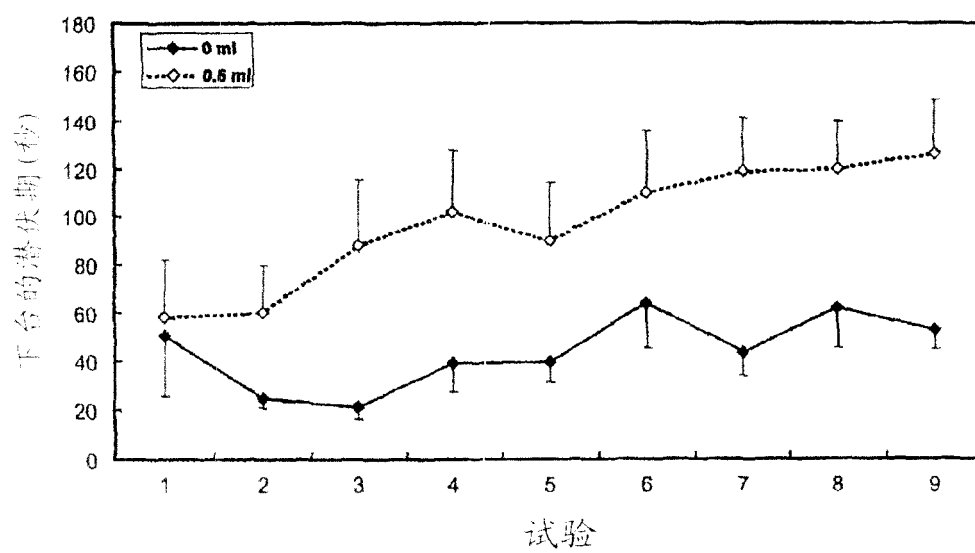


图 14

专利名称(译)	用于评价内脏痛知觉的动物模型		
公开(公告)号	CN1705453A	公开(公告)日	2005-12-07
申请号	CN200380101384.6	申请日	2003-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	詹森药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	詹森药业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	詹森药业有限公司		
[标]发明人	MJMA尼森		
发明人	M·J·M·A·尼森		
IPC分类号	A61B5/00 A61B5/03		
CPC分类号	A61B5/037 A61B5/4238 A61B5/036 A61B5/0031		
代理人(译)	郭文洁 刘玥		
优先权	PCT/EP2002/011772 2002-10-15 WO PCT/EP2003/004851 2003-05-07 WO		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

测量内脏痛的动物模型包括球囊导管和具有经皮遥测能力的可植入传感器模块。安装可植入传感器模块接受试验动物内脏运动和拟情感应答。具体地，球囊导管是可植入的球囊导管，优选在试验动物的十二指肠内植入，并且安装可植入传感器接受来自至少一个双极性电极对和至少一个血液导管的输入信号。也描述了一种制备所述动物的方法以及在制备所述动物的方法中使用的包括有球囊导管和可植入传感器模块的试剂盒。

