

• 论 著 •

三叉神经痛琼脂压迫模型优化及相关解剖结构学研究 *

邓 浩 罗 星 石采灵 曾 晨 杨汉丰[△]

(川北医学院附属医院放射科, 南充 637000)

摘 要 **目的:** 通过 3D 定位建立琼脂压迫动物模型模拟三叉神经痛 (trigeminal neuralgia, TN), 利用影像学扫描进行模型验证, 并通过采集不同模型的行为学、影像学及病理学等相关数据, 对模型进行分析, 以便于进一步探索 TN 的发病机制。**方法:** 用 von Frey 测痛纤维丝筛选出痛阈值在 8~15 g 的雄性 SD (Sprague Dawley, SD) 大鼠 32 只, 采用随机数字法分为实验组 (16 只) 和对照组 (16 只), 建立三叉神经根部琼脂压迫模型, 术后 1~7 周通过 von Frey 测痛纤维丝测定大鼠机械疼痛阈值, 术后 4 周、8 周、12 周进行灰质体积的基于体素形态学分析 (voxel based management, VBM), 采集术后 8 周和 12 周的三叉神经颅内段 (intracranial segment, ICS) 和眶下段神经 (infraorbital nerve, ION) 利用透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 进行超微结构分析。**结果:** 机械疼痛阈值测定结果显示琼脂实验组术后机械刺激阈值出现降低, 可持续至术后 42 天, 对照组在术后 14 天内有轻度机械刺激阈值降低。TEM 结果显示实验组于术后 8 周和 12 周三叉神经 ICS 和 ION 的电镜结果均观察到明显脱髓鞘改变, 且术后 12 周较术后 8 周更严重。灰质体积 VBM 分析显示实验组大鼠术后 4 周脑灰质体积未出现明显变化; 8 周时左侧旁下托、左侧齿状回、左侧胼胝体压部、右侧顶叶联合皮质、下丘脑、右侧基底前脑、右侧纹状体及双侧初级躯体感觉皮质灰质体积显著变小; 12 周时上述变化范围明显扩大, 甚至蔓延到双侧脑区; 另外新观察到导水管周围灰质、左侧内嗅皮质、双侧扣带回及双侧海马的灰质体积显著变小; 全脑分析显示各脑区无灰质体积增加。**结论:** 琼脂压迫模型能产生稳定且较长持续时间疼痛, 可作为继发性 TN 的可靠模型用于对 TN 发病机制、治疗等的进一步研究。ICS 段神经损伤可经神经扩散或通过神经周围传导从而累及三叉神经 ION 段。短期内 (8~12 周) 随时间延长, TN 神经脱髓鞘损伤呈加重趋势。琼脂压迫模型的头颅 VBM 分析与 TN 病人较为符合。

关键词 三叉神经痛; 动物模型; 超微结构分析

Optimization of agar compression model for trigeminal neuralgia and related anatomical structural studies *

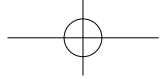
DENG Hao, LUO Xing, SHI Cailing, ZENG Chen, YANG Hanfeng[△]

(Radiology Department of Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

Abstract **Objective:** To further explore the pathogenesis of TN by establishing an agar compressed animal model through 3D localization to simulate trigeminal neuralgia (TN), validating the model with imaging scans, and analyzing the model by collecting behavioral, imaging, and pathological data from different models. **Methods:** Thirty-two male Sprague Dawley (SD) rats with pain thresholds ranging from 8 to 15 g were selected using von Frey pain filament measurement. They were randomly divided into the experimental group (16 rats) or control group (16 rats) to establish a trigeminal nerve root agar compression model. The mechanical pain threshold of the rats was measured using von Frey pain filaments at 1 to 7 weeks after surgery. Voxel based management (VBM) was performed on gray matter volume at 4, 8, and 12 weeks after surgery. Intracranial segments (ICS) and infraorbital nerves (ION) of the trigeminal nerve were collected at 8 and 12 weeks postop-

* 基金项目: 教育部产学研合作协同育人项目 (22097112074016); 南充市市校合作项目 (22SXQT0029)

[△] 通信作者 杨汉丰 yhf5@qq.com



eratively for ultrastructural analysis with transmission electron microscopy (TEM). **Results:** Mechanical pain threshold results: the mechanical stimulation threshold of the agar experimental group decreased after surgery, lasting 42 days after surgery, while the agar control group showed a slight decrease in mechanical stimulation threshold within 14 days after surgery. TEM results: the experimental group had significantly demyelinating changes in the trigeminal nerve ICS and ION electron microscopy at 8 and 12 weeks after surgery, and at the 12 weeks after surgery more severe than that at 8 weeks after surgery. VBM analysis of gray matter volume: there was no significant change in the brain gray matter volume of the agar group rats at 4 weeks after surgery. At 8 weeks, the volume decreased significantly in the gray matter of the left lateral lower bracket, left dentate gyrus, left corpus callosum pressure, right parietal lobe combined cortex, hypothalamus, right basal forebrain, right striatum and bilateral primary somatosensory cortex. At 12 weeks, these changes significantly expanded and even spread to bilateral brain regions. In addition, significant reductions in gray matter volume were observed in the periaqueductal gray matter, left inner olfactory cortex, bilateral cingulate gyrus, and bilateral hippocampus. Whole brain analysis showed no increase in gray matter volume in each brain region. **Conclusion:** The agar compression model can generate stable and long-lasting pain, and can be used as a reliable model for further research on the pathogenesis and treatment of secondary TN. The ICS segment nerve injury can spread through the nerve or involve the trigeminal ION segment through peripheral nerve conduction. In the short term (8 to 12 weeks), with the prolongation of time, the demyelinating injury of the TN nerve tends to worsen. The head VBM analysis of the agar compression model is more consistent with TN patients.

Keywords trigeminal neuralgia; animal models; ultrastructural analysis

三叉神经痛 (trigeminal neuralgia, TN) 是临床最常见的脑神经疾病, TN 的终生患病率为 0.16%~0.3%, 年发病率为 4~29/10 万人^[1]。2018 年,《国际头痛障碍分类》第 3 版 (ICHD-3)^[2] 将其分为经典 TN、继发性 TN 和特发性 TN。继发性 TN 的病因包括脱髓鞘疾病 (即多发性硬化症)、桥小脑角占位、外伤、卒中等^[3]。约 15% 的桥小脑角占位病人出现 TN 症状, 肿瘤压迫三叉神经会引起局部神经脱髓鞘, 导致神经的电位活动异常而形成异常的神经冲动^[4]。

为了进一步研究 TN 的发病机制及治疗手段, 已建立多种符合 TN 发病机制的动物模型, 但仅有少数模型比较符合 TN 发病机制^[5]。Ahn 等^[6] 首先报道了利用琼脂对三叉神经节进行压迫的模型, 证实三叉神经节受压后大鼠会出现机械性痛觉异常和痛觉过敏; Wu 等^[7] 对该模型进行完善, 证实琼脂压迫建立 TN 大鼠模型相对稳定, 可用于 TN 的病理生理学研究。该模型能较好地模拟桥小脑角处良性肿瘤对三叉神经的压迫症状, 符合继发性 TN 的发病机制。然而该实验的过程仍存在部分瑕疵, 首先, 采用的实验动物未进行术前筛选来控制大鼠的个体差异; 其次, 在注射琼脂后, 未采取合适方法对琼脂压迫的情况进行评估。

本研究通过术前疼痛阈值测定, 筛选出一批痛阈值较为稳定的大鼠; 在造模术后进行大鼠头颅磁

共振扫描, 对琼脂的位置及压迫程度进行评估, 对琼脂压迫模型的实验过程进行完善。在术后对大鼠头颅进行基于体素形态学分析 (voxel based management, VBM), 评价该模型的灰质体积变化。通过对模型的疼痛阈值变化、头颅 VBM 变化、眶下段神经 (infraorbital nerve, ION) 及三叉神经颅内段 (intracranial segment, ICS) 神经超微结构变化的研究, 评价该模型的可靠性。

方 法

1. 实验对象

本研究所用实验动物为雄性 SD 大鼠, 由川北医学院动物实验中心提供, 其使用规程已通过川北医学院动物实验中心审查, 获得川北医学院科技部批准 (NSMC 伦理动物审 [2022] 043 号), 并根据国际疼痛学会《关于在有意识的动物中调查实验性疼痛的伦理指南》进行实验。实验纳入 32 只雄性 SD 大鼠, 体重范围在 240~280 g, 常规饲料喂养, 自由饮水, 温度为 22℃~25℃, 12 h 交替照明。主要仪器及试剂见表 1。

2. 研究方法

(1) 实验动物筛选: 选择清洁级雄性 SD 大鼠, 术前 7 天, 通过 von Frey 测痛纤维丝 (1.4 g、2.0 g、4.0 g、6.0 g、8.0 g、10.0 g、15.0 g) 刺激大鼠双侧

表 1 主要仪器及试剂
Table 1 Main instruments and reagents

实验仪器及试剂 Experimental instruments and reagents	公司 Company	产地 Producer
联影 uMR790 3.0T 磁共振	联影	中国
大鼠线圈	联影	中国
动物脑立体定位仪	上海玉研科学仪器有限公司	中国
骨钻	上海玉研科学仪器有限公司	中国
von Frey 测痛纤维丝	North Coast	美国
台式高速微量离心机	大龙兴创实验仪器	中国
超薄切片机	LEICA	瑞士
组织脱水机	LEICA	瑞士
透射电子显微镜	JEOL	日本
戊二醛固定液	实验室提供	中国
琼脂粉	康倍斯生物	中国
25 μ l 微量注射器	高鸽有限公司	中国

颜面部触须垫，使纤维丝弯曲（持续刺激 5 s，前后 2 次不同刺激间隔 30 s）；从有反应细丝开始，使用 Dixon^[8] 所描述的 up-and-down 法，测定大鼠痛阈。阳性结果判断标准：①大鼠迅速抓咬刺激物；②大鼠迅速摇头并搔抓刺激区域；③大鼠迅速后退靠近笼壁，躲避刺激物，或将头面部藏于身体下，避免进一步刺激；当出现上述 1 项或 1 项以上反应时，即认为刺激实验阳性。选择痛阈结果稳定在 8~15 g 的大鼠共 32 只。实验开始前 1 周，用棉棒适应性刺激大鼠 ION 支配的颜面部触须垫，双侧交替进行，每日连续刺激 5 次，每 2 次刺激间隔时间不小于 30 s。

（2）模型建立与分组：32 只 SD 大鼠采用随机数字表法均分为琼脂实验组 16 只和 0.9% 氯化钠注射液对照组 16 只。实验组大鼠在称量体重后，1% 戊巴比妥钠 (0.4 ml/100 g) 通过腹腔注射麻醉，麻醉生效后，将大鼠头部固定于动物脑立体定位仪上，微量注射器固定于引导杆上。于大鼠头皮中线切开皮肤剥离骨膜暴露前囟点，将微量注射器针头定位于前囟点，针头 3D 定位于左侧三叉神经根处（前囟后 7.5 mm、中线左 3.2 mm），定位后利用骨钻去除骨质，有落空感后停止去骨，针头刺入 9 mm，随后注入 5 μ l 5% 琼脂溶液，注射器固定 5 min 后缓慢取出，缝合切口（见图 1）。对照组手术同前，3D 定位后经微量注射器给予 5 μ l 0.9% 氯化钠注射液。手术过程中遵循无菌操作观念，术前与术后无需使用抗生素^[9]。

（3）模型验证：术后 3 天对实验组大鼠进行头颅 MR 扫描，评估琼脂的位置、大小，排除未看到琼脂及琼脂未对三叉神经造成明显压迫的大鼠，并重新造模补充数据。

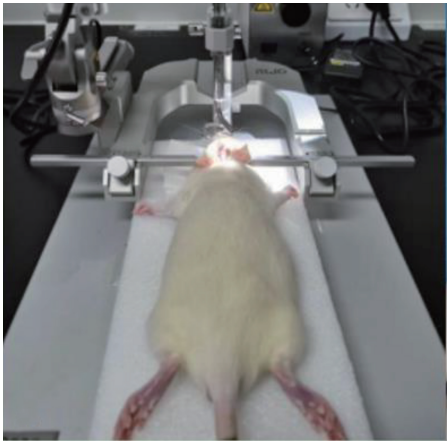


图 1 立体定位仪下建立三叉神经根琼脂压迫模型
Fig. 1 Establishment of an agar compression model of the trigeminal nerve root using a stereotaxic apparatus

（4）痛阈测定：两组大鼠中各随机选取 12 只分别于术前 7 天、5 天、3 天、1 天及术后 1 天、3 天、5 天、7 天、10 天、14 天、21 天、28 天、35 天、42 天、49 天采用 up-and-down 法行机械刺激反应阈值测试。记录大鼠出现阳性反应时的疼痛阈值。

（5）灰质体积 VBM 分析：将两组大鼠于造模术后 4 周、8 周、12 周时，利用联影 3.0T 磁共振对大鼠进行头颅 MRI 扫描，扫描参数：TR/TE 为 1300/227 ms，FOV 60 mm×60 mm，矩阵 384×384，翻转角 110°，层厚 0.55 mm，层数 44，采集时间 18.5 min。

将大鼠头部数据导入到 PC 机，数据处理和分析使用下列软件包：矩阵实验室 MATLAB2013 软件包，基于统计学参数图 SPM12 软件的 VBM8 (<http://dbm.neuro.uni-jena.de/vbm>) 对采集的三维数据进行预处理。主要步骤包括：①图像转化；②获

取大脑 mask；③空间标准化；④灰白质分割；⑤平滑。计算两组全脑灰质 (gray matter, GM)、白质和脑脊液体积并取平均值，最后计算每组疼痛相关区域的平均 GM 体积。

(6) 超微结构分析：两组大鼠于造模术后 8 周、12 周随机各选取 2 只，麻醉显效后，大鼠取仰卧位固定于操作台，剪开胸腔暴露心脏，将 26G 留置针经心尖插入，剪开右心耳，用 0.9% 氯化钠注射液 200 ml 快速灌注置换血液，待肝脏明显由红变白且右心耳流出液变清后，用 3% 多聚甲醛-4% 戊二醛混合固定液 (4℃) 50 ml 低速灌注，灌注时间约 30 min。灌注过程中大鼠出现四肢抽搐，表明灌注良好。灌注结束后，迅速取 3~4 mm 眶下孔段与颅内段三叉神经，置于混合固定液中，在 4℃ 的冰箱中保存 24 h。

标本依次进行固定-脱水-渗透-包埋-超薄切片-染色-电镜观察，获得所需要的神经超微结构透射电镜图像。所有超微结构图像由专业病理技师采集，图像经电子显微镜放大 6000 倍。根据髓鞘损伤程度将有髓轴突超微结构分为 0 级、1 级、2 级、3 级、4 级（见表 2）^[10]。由 2 名研究者依据髓鞘损伤分级标准将 TEM 图像中的髓鞘进行分级统计，并记录实验结果，对存在异议的髓鞘由 2 人讨论后共同评估决定。

3. 统计学分析

使用 SPSS 23.0 对数据进行统计分析。对符合正态分布的数据，采用单因素方差 (ANOVA) 分析进行比较，事后两两比较采用 LSD 法；对于非正态分布的数据使采用非参数检验进行统计分析，

表 2 髓鞘损伤分级

Table 2 Classification of myelin sheath injury

分级 Grade	损伤特征性表现 Characteristic manifestation of injury
0 级	髓鞘正常
1 级	髓鞘结构轻度肿胀、松散
2 级	髓鞘结构分层、分裂
3 级	髓鞘呈蜂窝状外观
4 级	髓鞘塌陷、中断伴髓鞘卵形体形成

使用 Kruskal-Wallis test 对多个独立样本进行比较，Mann-Whitney U test 对组间差异进行分析，Bonferroni 检验对报告的 P 值进行多重比较校正。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

VBM 图像结果通过双样本 t 检验进行比较，结果由 $P < 0.005$ 未校正产生，多重比较校正采用了 Cluster-level 设置为 $P < 0.05$ 的 FDR 进行校正。使用 xjview 读取各脑区体积存在的体素差异，在体素高于 100 的集合被认为差异具有统计学意义。

结 果

1. 模型的评估

实验组造模时间约每只 40 min，实验组大鼠造模共计 21 只，符合造模要求的 16 只（见图 2A, 2B），造模成功率为 76.1%。部分失败的实验组内未看到琼脂，部分琼脂不在三叉神经脑池段（见图 2C, 2D），虽然对三叉神经也存在一定压迫作用，

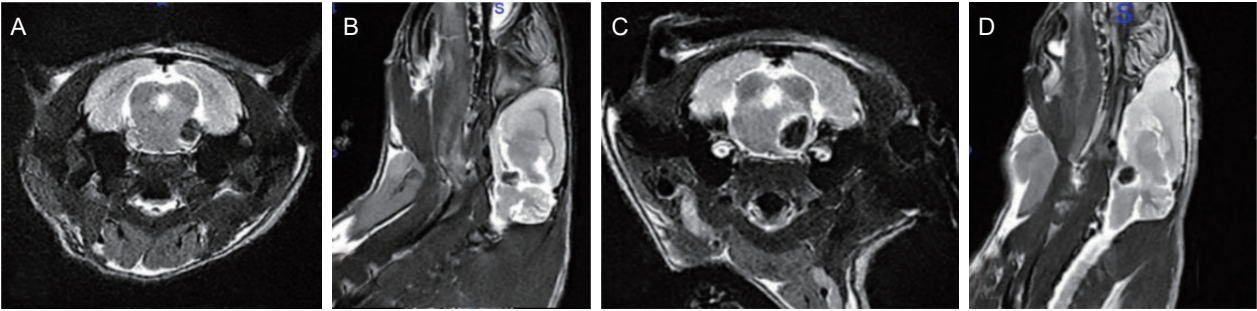


图 2 通过头颅 MRI 对琼脂压迫模型进行验证 (A, B) 分别为琼脂压迫模型的轴位和矢状位图像，可以清晰的看到琼脂位于三叉神经入脑桥区，与对侧三叉神经对比，可以看到三叉神经根部受到明显压迫；(C, D) 分别为造模失败的轴位和矢状位图像，图示琼脂注入脑桥内，虽然也对三叉神经形成一定的压迫，但可能对脑桥组织造成影响，故排除。

Fig. 2 Verification of the agar compression model using cranial MRI (A, B) Show the axial and sagittal positions of the agar compression model, respectively. It can be clearly seen that the agar is located in the pontine area of the trigeminal nerve. Compared with the contralateral trigeminal nerve, it can be seen that the trigeminal nerve root is significantly compressed; (C, D) Show the axial and sagittal images of failed modeling. Although agar injection into the pons may cause some compression to the trigeminal nerve, it may have an impact on the pons tissue, so it is excluded.

但是不能除外其他因素，故纳入排除标准。

2. 痛阈分析

实验组与对照组术前 1~7 天痛阈较为稳定无显著性差异。术后两组痛阈均出现下降，实验组痛阈到术后 7 天痛阈达到最低值，术侧痛阈 (2.08±0.45) g，这种较低痛阈值持续到术后 21 天，随后出现缓慢的回升，于术后 42 天基本恢复正常；术后 42 天实验组痛阈为 (10.81±1.33) g。结果显示实验组术侧痛阈于术后 3 天至术后 35 天与对照组差异有显著统计学意义 ($P < 0.001$)。对照组术侧痛阈于术后 3 天达到最低值为 (7.84±1.34) g，到术后 14 天恢复到基线水平（见图 3）。

3. VBM 分析结果

实验组大鼠术后 4 周大脑灰质体积未出现明显变化。8 周时左侧旁下托、左侧齿状回、左侧胼胝体压部、右侧顶叶联合皮质、下丘脑、右侧基底前脑区域、右侧纹状体及双侧初级躯体感觉皮质灰质体积显著变小（见图 4A）。12 周时这些变化范围明显扩大，甚至蔓延到双侧脑区（见表 3）；另外新观察到导水管周围灰质、左侧内嗅皮质、双侧扣带回及双侧海马的灰质体积显著变小（见图 4B）。全脑分析没有显示灰质体积增加的脑区。

4. 透射电镜结果分析

电子显微镜下，对照组髓鞘致密完整，微管、微丝排列规则，线粒体结构清晰，超微结构较完好，仅出现部分轻度损伤；实验组于术后 8 周和 12 周 ICS 和 ION 的电镜结果均观察到明显脱髓鞘改变，在轻度损伤的有髓轴突中，髓鞘轻度分层，有髓轴突胞质结构正常。在严重损伤的有髓轴突中，髓鞘有严重的分层和解体，轴突细胞质内线粒体肿胀，嵴消失，微管和微丝结构紊乱，部分轴突变暗，内含髓鞘卵圆形小体（见图 5）。按照超微结构损伤

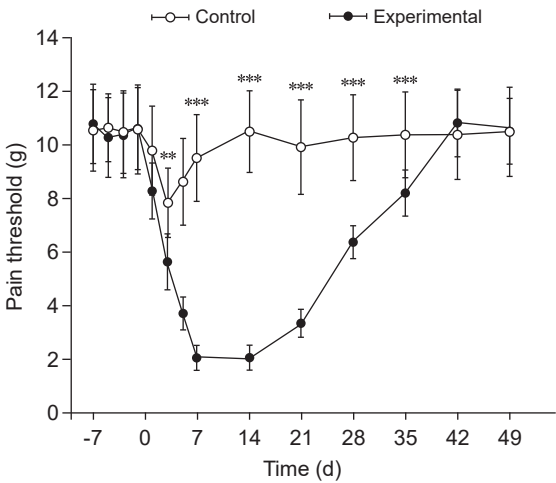


图 3 实验组模型痛阈变化
 $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, 与对照组相比
Fig. 3 Changes in pain threshold of experimental group model
 $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, compared with group control.

分级标准，将各个髓鞘划分为不同等级（见表 4）。术后 8 周和 12 周实验组神经节段与对照组对应神经节段存在显著性差异 ($P < 0.05$)；实验组术后 8 周和术后 12 周的 ION 和 ICS 分别存在差异。

讨 论

本研究建立了三叉神经根部琼脂压迫模型，通过对模型的疼痛阈值变化、头颅 VBM 变化、ION 及 ICS 段神经超微结构变化的研究，表明琼脂压迫三叉神经根模型为可靠的 TN 动物模型。
琼脂是一种线性多糖，具有高黏度、低水溶性和低生物利用率等特点，在温度低于 40℃ 便会凝固^[11]。基于这些特点，琼脂可作为压迫材料来制备三叉神经根压迫模型，用以较好地模拟占位性病变压迫三叉神经根的发病机制。

表 3 实验组术后 12 周头颅 VBM 分析聚类水平下的 FDR 校正后结果
Table 3 Head VBM analysis results of the experimental group 12 weeks after surgery

群集级别 Cluster-level			峰值坐标 Peak coordinates	
P (FWE-corr)	P (FDR-corr)	k	P (unc)	x, y, z (mm)
0	0	9941	0	-12, 45, 22
				8, 39, 15
				0, 47, 7
	0	2181	0	54, 5, -17
				51, 8, -6
				38, -4, 18

高度阈值: $T = 1.86$, $P = 0.005$ (1.000) Height threshold: $T = 1.86$, $P = 0.005$ (1.000)
范围阈值: $k = 9941$ 体素, $P = 0.001$ Extent threshold: $k = 9941$ voxels, $P = 0.001$

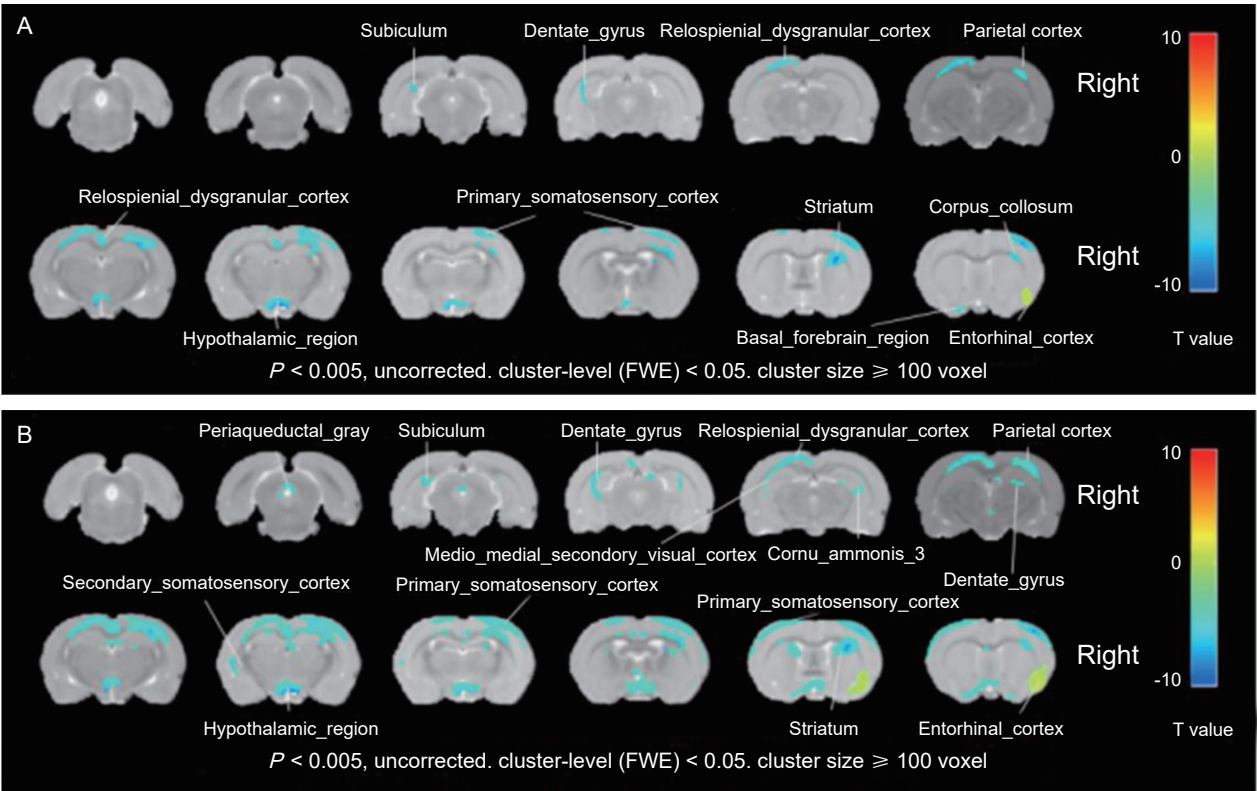


图 4 实验组术后 8 周及 12 周脑区结构变化
(A, B) 分别为实验组术后 8、12 周脑区灰质变化。图上有颜色的位置为具有显著差异的脑区，颜色的值对应 colorbar 上的值，蓝色表示此处脑区的指标值为实验组小于对照组，红色为实验组大于对照组。

Fig. 4 Structural changes in brain regions at 8 and 12 weeks after surgery in experimental group
(A, B) Show the changes of gray matter in the brain area of the experimental group at 8 and 12 weeks after surgery. The positions with colors on the graph are brain regions with significant differences, and the color values correspond to the values on the colorbar. Blue indicates that the index values of the brain regions here are smaller in the experimental group than in the control group, and red indicates that the experimental group is larger than in the control group.

表 4 实验组髓鞘损伤分级
Table 4 Grade of myelin sheath injury in experimental group

	髓鞘损伤分级 Classification of myelin sheath injury				
	0 级 (n) Level 0	1 级 (n) Level 1	2 级 (n) Level 2	3 级 (n) Level 3	4 级 (n) Level 4
SY_8 W_ICS	9	13	15	22	5
SY_8 W_ION	13	14	26	15	6
DZ_8 W_ICS	42	19	1	0	0
DZ_8 W_ION	38	18	3	0	0
SY_12 W_ICS	5	9	12	10	25
SY_12 W_ION	6	6	12	12	27
DZ_12 W_ICS	34	20	3	0	0
DZ_12 W_ION	35	17	2	0	0

SY: 实验组; DZ: 对照组; 8 W: 造模术后 8 周; 12 W: 造模术后 12 周; ICS: 颅内段; ION: 眶下孔段
SY: Experimental group; DZ: Control group; 8 W: 8 weeks after modeling surgery; 12 W: 12 weeks after modeling surgery; ICS: Intracranial segment; ION: Infraorbital nerve.

1. 模型痛阈值变化
实验结果表明，三叉神经根入脑桥段的压迫能造成大鼠颜面部机械性异常疼痛，并较稳定地持续一段时间。对照组术后痛阈值出现轻度下降，于术

后 3 天达到最低值，随后出现缓慢恢复，并于术后 14 天基本恢复正常，这可能是由穿刺损伤所致。
实验组与相应对照组术后短期内均出现痛阈值下降的现象，故既往仅通过测量痛阈值来判断

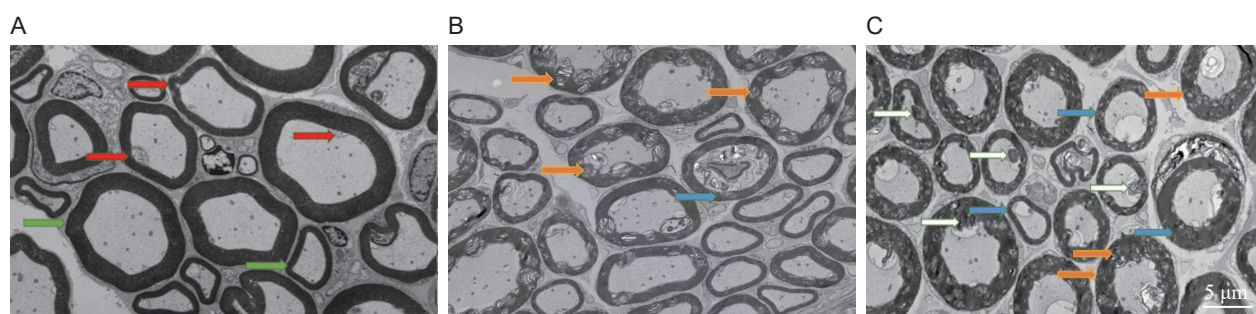


图 5 有髓轴突细胞质的透射电子显微镜照片 (图像放大倍数 $\times 6000$, 标尺 = $5 \mu\text{m}$) (A) 对照组术后 8 周 ICS 段 TEM 图。可看到基本正常的髓鞘 (绿色箭头) 超微结构及正常的线粒体、微管和微丝, 部分层面可看到髓鞘轻度肿胀 (红色箭头); (B) 实验组术后 8 周 ICS 段 TEM 图片; (C) 实验组术后 12 周 ICS 段 TEM 图片。可看到髓鞘出现分离中断 (蓝色箭头)、蜂窝状改变 (橙色箭头), 部分髓鞘可见髓球体形成 (白色箭头); 部分轴突可见线粒体肿胀及白色包涵体形成、膨胀的空泡及扭曲的嵴膜和大面积微管和微丝碎裂, 紊乱, 轴突膜不完整。

Fig. 5 Transmission electron micrograph of medullated axonal cytoplasm (Image magnification: $\times 6000$, Scale bar = $5 \mu\text{m}$)

(A) Shows the TEM image of ICS segment in the agar control group 8 weeks after surgery. Basically normal ultrastructure of the myelin sheath (green arrow) and normal mitochondria, microtubules, and microfilaments can be seen, and slight swelling of the myelin sheath can be seen on some layers (red arrow); (B) Is a TEM image of the ICS segment in the agar experimental group 8 weeks after surgery; (C) Is a TEM image of the ICS segment in the agar experimental group 12 weeks after surgery. Separation and interruption of the myelin sheath can be seen (blue arrow), honeycomb like changes (yellow arrow), and formation of medullary spheres can be seen in some myelin sheaths (white arrow); In some axons, mitochondrial swelling and the formation of white inclusion bodies, swollen vacuoles, twisted cristae, and large areas of microtubules and microfilaments can be seen, with disorder and incomplete axonal membranes.

造模结果的实验方法^[6]存在一定的瑕疵。本研究于造模术后 3 天通过大鼠头部磁共振扫描, 确保琼脂成功注射到三叉神经根部并对三叉神经根产生压迫, 早期证实模型是否成功, 便于进一步实验研究。

实验过程中, 实验组大鼠均表现出痛阈值降低的现象, 并未出现阴性结果。在对 TN 病人的研究中发现, 部分存在血管神经冲突现象的健康受试者并没有出现 TN 症状。Lamani 等^[12]根据血管对神经压迫的严重程度, 将其分为 3 级: I 级: 血管与神经接触, 而没有任何可见的神经移位或扭曲; II 级: 血管导致神经移位和/或扭曲, 而神经上没有压痕; III 级表示血管在神经上造成明显的压痕。Ruiz-Juretschke 等^[13]发现在无症状个体中, 桥小脑角 (cerebellopontine angle, CPA) 处与三叉神经的轻度压迫、远端或以静脉为主的血管接触的比率较高。实验组模型在进行模型验证时, 通过 MRI 头颅扫描, 剔除了未对三叉神经造成明显压迫的大鼠, 故我们推测, 临床上伴血管神经冲突现象的健康受试者神经受压迫等级仅为 I 级的可能性较大, 导致受压处神经未出现模型脱髓鞘改变和电位冲突。

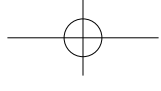
部分学者支持“动脉接触”假说, 即三叉神经上的脉冲式机械压力会带来神经纤维的脱髓鞘、异位神经冲动和邻近纤维的异常非突触性传导, 最终

可能导致皮肤刺激引起的阵发性疼痛^[14]。然而, 通过 MRI 扫描和术中发现证实 9.2%~38% 的 TN 由“静脉冲突”所导致^[15]。Lutz 等^[16]利用 DTI 技术发现 TN 的微结构改变与血管的类型无关。本研究使用琼脂对三叉神经产生压迫, 模拟桥小脑角处良性肿瘤对三叉神经压迫反应, 可引发大鼠疼痛阈值的改变。因此, 我们推测血管搏动可能不是 TN 发病的必要因素。

2. 超微结构结果分析

实验组术后 8 周和 12 周均能观察到明显脱髓鞘损伤, 由于病因未去除, 且随时间延长 (8~12 周), 神经脱髓鞘损伤呈加重趋势。实验组术后 8 周和 12 周 ION 段和 ICS 段 TN 均出现显著的髓鞘损伤, 说明 ICS 段损伤可经神经扩散或通过神经周围传导从而累及三叉神经 ION 段。这与 Marinković 等^[17]的实验结果一致。

Lutz 等^[16]利用弥散张量成像 (diffusion tensor imaging, DTI) 技术发现 TN 的微结构改变与症状持续时间无关, 与本研究结果不一致。本研究大鼠超微结构分析标本采集时间为 8 周和 12 周, 相较于大多数临床 TN 病人, 病程持续时间较短, 由此推测在短期内三叉神经脱髓鞘的程度与疼痛持续时间具有相关性, 对长期疼痛的持续时间和脱髓鞘程度的关系还有待进一步研究。



3. VBM 结果分析

在 TN 病人的大脑 VBM 分析中,可观察到初级躯体感觉皮质、眶前叶皮质、次级躯体感觉皮质、丘脑、脑岛、前扣带回 (anterior cingulate cortex, ACC)、小脑和背外侧前额叶皮质的灰质体积变小^[18,19]; Zhang 等^[20]通过 TN 病人和健康受试者对比,发现 TN 病人双侧杏仁核、中脑导水管周围灰质和右侧脑岛的 GM 体积变小。琼脂压迫模型的实验结果与 TN 病人的 VBM 分析结果较为符合,证明该模型可在一定程度上可靠地模拟 TN 的发生。

将外周伤害性刺激转化为痛觉需要多层次的整合。首先,疼痛信号沿着脊髓丘脑束传导到丘脑后部的多个核团,然后投射到顶叶内侧岛(包括体感皮质 S1)、扣带回和岛叶后部^[21]。岛叶后部是与疼痛关系最密切的区域之一,刺激岛叶皮质可以直接产生疼痛^[22]。岛叶吻腹侧无颗粒区参与情绪调节,传出联系包括杏仁核的基底复合体区、伏核、下丘脑外侧区、中缝背核、导水管周围灰质 (periaqueduct gray matter, PAG) 等区域^[23]。丘脑室旁核-岛叶-杏仁核-PAG 通路激活下行疼痛调控通路。扣带回是边缘系统重要组成部分之一,扣带回的前部又称为情感部分,主要负责情绪的产生,自主反应及认知等方面,一项动物研究发现,ACC 及其对伏隔核的投射选择性地参与了疼痛和镇痛的社会转移^[24]。疼痛刺激会引起扣带回 GM 体积减低,健康志愿者反复疼痛刺激 11 天后,扣带回前部 GM 体积明显降低^[25]。初级感觉皮质 (S1 区) 位于中央后回,是躯体感觉系统的一部分,它还可以减少伤害感受。

痛觉的形成还需要第二层次的伤害性感觉整合。参与二次整合的脑区包括前脑岛、前额叶、顶后叶、纹状体、海马体、海马旁回、小脑和颞顶交界区。这些脑区不是脊丘脑束的直接投射区域,因此,直接刺激这些区域不会引起疼痛,选择性损毁这些区域也无明显的镇痛作用。

TN 病人大脑结构变化与病情程度及持续时间相关^[26],本研究证实了这一观点。此外,本研究发现,实验组大鼠的灰质体积变小涉及感觉辨别的皮质 (S1、V1)、情感-动机维度的边缘区域(海马区及海马旁皮质、下丘脑、纹状体)和情绪-认知调节的皮质(岛叶皮质、基底前脑),这与既往的研究结果相似^[27]。影像学结果表明,编码疼痛情绪、动机、记忆和持续性疼痛的脑区涉及皮质-边缘系统^[28]。

术后 8 周实验组出现 PAG 体积变小,且 12 周时受累范围增大。持续性疼痛状态在一定程度上反映了下行抑制系统的功能障碍^[29]。延髓头端腹内侧

部 (rostral ventromedial medulla, RVM) 包括中缝大核及其周围网状区,是痛觉下行调制的主要输出节点。研究表明, PAG-RVM 环路激活,可以增强痛觉下行抑制和减轻痛觉过敏^[30]。因此, PAG 灰质体积减小,反应了这一区域功能在一定程度上受损,进一步证实了该区域的解剖损伤可能是 TN 发病的基础。

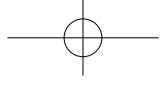
为避免雌性激素影响实验结果,本研究仅纳入了雄性大鼠,这难免会造成性别偏倚,且临床 TN 病人以女性居多,模型与临床 TN 存在一定差异。既往曾晨^[31]针对大鼠 DTI 研究发现由于大鼠中枢神经系统体积较小,DTI 图像质量较差,部分层面形变严重,因此 3.0T MRI 的 DTI 序列不适宜用于对大鼠中枢神经系统进行研究;未来可通过更高场强的 MR 进一步探索大鼠脑功能等变化。

综上所述,三叉神经根部琼脂压迫模型从发病机制上符合占位性病变所致 TN 的发病机制,经痛阈值测定、神经超微结构分析及灰质体积 VBM 分析,证实其作为占位性病变所致继发性 TN 动物模型的可靠性。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 杨吉垒,温晓霞,王文丽,等. 三叉神经痛的诊疗研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2023, 29(3):201-206.
- [2] Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition[J]. Cephalalgia, 2018, 38(1):1-211.
- [3] Martínez JL, Domingo RA, Rowland NC, *et al.* Trigeminal neuralgia secondary to Meckel's cave meningoencephaloceles: a systematic review and illustrative case[J]. Neurol India, 2022, 70(3):857-863.
- [4] Cruccu G, Finnerup NB, Jensen TS, *et al.* Trigeminal neuralgia: new classification and diagnostic grading for practice and research[J]. Neurology, 2016, 87(2):220-228.
- [5] 江翠华,张达颖,张学学. 三叉神经痛动物模型制作研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2014, 20(6):430-433.
- [6] Ahn DK, Lim EJ, Kim BC, *et al.* Compression of the trigeminal ganglion produces prolonged nociceptive behavior in rats[J]. Eur J Pain, 2009, 13(6):568-575.
- [7] Wu CB, Guo YF, Zhou Q. Preparation of trigeminal neuralgia animal model through stereotactic trigeminal nerve compression technology[J]. Int J Clin Exp Med, 2017, 10(2):3204-3210.
- [8] Dixon WJ. Staircase bioassay: the up-and-down method[J]. Neurosci Biobehav Rev, 1991, 15(1):47-50.



- [9] 郭永峰, 丁纯, 李明子, 等. 新型 SD 大鼠压迫性三叉神经痛动物模型建立及其作用研究 [J]. 中国实用口腔科杂志, 2016, 9(5):295-299.
- [10] Ozbay I, Ital I, Kucur C, *et al.* Effects of ozone therapy on facial nerve regeneration[J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2017, 83(2):168-175.
- [11] Rahman JMH, Shiblee MNI, Ahmed K, *et al.* Rheological and mechanical properties of edible gel materials for 3D food printing technology[J]. *Heliyon*, 2020, 6(12): e05859.
- [12] Lamani PU, Arora AJ, Kona KKR, *et al.* Correlation of trigeminopontine angle with severity of trigeminal neuralgia due to neurovascular conflict over medial aspect of nerve: can we prognosticate the reduction in pain in patients on medical management?[J]. *Indian J Radiol Imaging*, 2022, 32(3):308-313.
- [13] Ruiz-Juretschke F, González-Quarante LH, García-Leal R, *et al.* Neurovascular relations of the trigeminal nerve in asymptomatic individuals studied with high-resolution three-dimensional magnetic resonance imaging[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2019, 302(4):639-645.
- [14] Zhang F, Zhang G, Luo H, *et al.* Significance of different offending vessels and development of a potential screening tool for trigeminal neuralgia[J]. *Eur Radiol*, 2022, 32(9):6435-6443.
- [15] Wang W, Yu F, Kwok SC, *et al.* Microvascular decompression for trigeminal neuralgia caused by venous offending on the ventral side of the root entrance/exit zone: classification and management strategy[J]. *Front Neurol*, 2022, 13:864061.
- [16] Lutz J, Thon N, Stahl R, *et al.* Microstructural alterations in trigeminal neuralgia determined by diffusion tensor imaging are independent of symptom duration, severity, and type of neurovascular conflict[J]. *Neurosurg*, 2016, 124(3):823-830.
- [17] Marinković S, Gibo H, Todorović V, *et al.* Ultrastructure and immunohistochemistry of the trigeminal peripheral myelinated axons in patients with neuralgia[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2009, 111(10):795-800.
- [18] Shen S, Zheng H, Wang J, *et al.* Gray matter volume reduction with different disease duration in trigeminal neuralgia[J]. *Neuroradiology*, 2022, 64(2):301-311.
- [19] Wang Y, Yang Q, Cao D, *et al.* Correlation between nerve atrophy, brain grey matter volume and pain severity in patients with primary trigeminal neuralgia[J]. *Cephalalgia*, 2019, 39(4):515-525.
- [20] Zhang Y, Mao Z, Pan L, *et al.* Dysregulation of pain- and emotion-related networks in trigeminal neuralgia[J]. *Front Hum Neurosci*, 2018, 12:107.
- [21] Hu L, Zhang L, Chen R, *et al.* The primary somatosensory cortex and the insula contribute differently to the processing of transient and sustained nociceptive and non-nociceptive somatosensory inputs[J]. *Hum Brain Mapp*, 2015, 36(11):4346-4360.
- [22] Martins Pereira RC, Medeiros P, Coimbra NC, *et al.* Cortical neurostimulation and N-Methyl-D-aspartate glutamatergic receptor activation in the dysgranular layer of the posterior insular cortex modulate chronic neuropathic pain[J]. *Neuromodulation*, 2022. doi: 10.1016/j.neurom.2022.05.009.
- [23] 仇莉, 徐峰, 朱倩, 等. 基于体素的原发性三叉神经痛脑灰质和脑白质结构研究 [J]. 实用医学影像杂志, 2021, 22 (5):456-459.
- [24] 邱欣彤, 魏斯顿, 史英武, 等. 岛叶参与痛觉信息传递与调控的研究现状 [J]. 神经解剖学杂志, 2019, 35(5): 552-556.
- [25] Smith ML, Asada N, Malenka RC. Anterior cingulate inputs to nucleus accumbens control the social transfer of pain and analgesia[J]. *Science*, 2021, 371(6525): 153-159.
- [26] Stankewitz A, Valet M, Schulz E, *et al.* Pain sensitizers exhibit grey matter changes after repetitive pain exposure: a longitudinal voxel-based morphometry study[J]. *Pain*, 2013, 154(9):1732-1737.
- [27] Liu M, Zhong J, Xia L, *et al.* The expression of voltage-gated sodium channels in trigeminal nerve following chronic constriction injury in rats[J]. *Int J Neurosci*, 2019, 129(10):955-962.
- [28] Magalhães R, Barrière DA, Novais A, *et al.* The dynamics of stress: a longitudinal MRI study of rat brain structure and connectome[J]. *Mol Psychiatry*, 2018, 23(10):1998-2006.
- [29] 王飞雪, 毕研芝, 胡理. 慢性疼痛与皮层-边缘系统 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2021, 48(4):393-406.
- [30] Yarnitsky D. Role of endogenous pain modulation in chronic pain mechanisms and treatment[J]. *Pain*, 2015, 156 (Suppl 1):S24-S31.
- [31] 曾晨. 大鼠三叉神经痛模型建立及中枢、外周神经的影像学 [D]. 南充: 川北医学院, 2022.