

小鼠坐骨神经低温等离子消融后的可逆性损伤与自主修复 *

王宏岩 卢洁 何亮亮 窦智 杨嵩 杨立强[△]

(首都医科大学宣武医院疼痛科, 北京 100053)

摘要 目的: 低温等离子消融术 (low temperature plasma ablation, LTPA) 是治疗神经病理性疼痛的常用微创介入手术, 通过消融神经纤维来中断疼痛传导通路。本研究旨在通过建立小鼠坐骨神经 LTPA 模型并观察神经可逆性损伤和自主修复情况, 初步探索 LTPA 的神经损伤作用和相关不良反应的转归机制。**方法:** 将 54 只 C57BL/6 雌性小鼠按随机数字表法分为 3 组: LTPA 组使用等离子刀头消融坐骨神经、慢性压迫性损伤模型组 (chronic constrictive injury, CCI) 使用肠铬线结扎、假手术组 (Sham) 仅暴露和分离, 每组 18 只。在造模前以及造模后 3、7、14、21、28 天进行行为学测试 (von Frey 测试、热板实验和转棒疲劳实验), 观察机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT)、热痛阈值 (thermal withdrawal latency, TWL)、转棒掉落潜伏期 (rotarod fall latency, RFL) 评估感觉和运动功能恢复情况, 选取 L₄~L₆ 背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 进行免疫荧光染色, 检测转录因子-3 (activating transcription factor 3, ATF3) 的平均染色强度。**结果:** LTPA 组在术后 3~21 天 MWT 和 TWL 均显著高于术前以及 Sham 组, 并且在术后 21~28 天明显恢复到术前和 Sham 组水平; RFL 在术后各时间点显著低于术前和 Sham 组, 并到第 28 天仍未完全恢复。而 CCI 组的 MWT、TWL、RFL 在术后 3~28 天维持痛觉超敏和运动平衡能力下降状态。LTPA 组和 CCI 组 DRG 中 ATF3 平均染色强度在术后 3 天后迅速上调, CCI 组在术后 3~28 天维持高水平, LTPA 组在术后 21~28 天下调至 Sham 组水平。**结论:** LTPA 可以造成小鼠坐骨神经的可逆性损伤, 并在短时间内实现自主修复, 且不会产生痛觉超敏现象。这为其临床应用和神经损伤相关不良反应的转归现象提供了理论支撑。

关键词 小鼠; 低温等离子消融; 神经可逆性损伤修复; 转录因子-3; 动物模型

Reversible injury and spontaneous repair after sciatic nerve low temperature plasma ablation in mice *

WANG Hong-yan, LU Jie, HE Liang-liang, DOU Zhi, YANG Song, YANG Li-qiang[△]

(Department of Pain Management, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China)

Abstract Objective: Low temperature plasma ablation (LTPA) is a commonly used minimally invasive interventional procedure for the treatment of neuropathic pain. A sciatic nerve LTPA model in mice was established to evaluate nerve injury and spontaneous repair status to primitively explore the mechanisms of nerve injury and associated adverse events induced by LTPA. **Methods:** Fifty-four C57BL/6 female mice were randomly divided into three groups: LTPA group used a plasma knife head to ablate the sciatic nerve, chronic constrictive injury (CCI) model group used chromic gut ligation, and Sham group was exposed and isolated only, with 18 mice in each group. Behavioral tests (von Frey test, hot plate test, and rotarod fatigue test) were conducted before modeling and on 3 d, 7 d, 14 d, 21 d, and 28 d after modeling to observe mechanical withdrawal threshold (MWT), thermal withdrawal latency (TWL), and rotarod fall latency (RFL) to assess the recovery of sensory and motor function. The average staining intensity of ATF3 was detected by immunofluorescence staining of the L₄-L₆ dorsal root ganglion (DRG). **Results:** In the LTPA group, MWT and TWL were significantly higher than the preoperative level and Sham group from 3 to 21 days postoperatively. It recovered significantly to the preoperative

* 基金项目: 首都临床诊疗技术研究及示范应用 (Z191100006619044); 首都卫生发展科研专项 (首发 2024-2-20111)

[△] 通信作者 杨立强 yangliqiangxwpain@outlook.com



and Sham levels from 21 to 28 days after surgery. And RFL was significantly lower than that in the preoperative and Sham groups at all time points from 3 to 28 days postoperatively, but still not fully recovered on day 28. The MWT, TWL, and RFL of the CCI group remained hyperalgesia and motor balance reduction states from 3 to 28 days postoperatively. The average staining intensity of ATF3 in the DRG of the LTPA and CCI groups was rapidly upregulated after 3 days postoperatively, while the CCI group maintained a high level from 3 to 28 days, and the LTPA group decreased to the level of Sham group from 21 to 28 days postoperatively. **Conclusion:** LTPA can induce reversible injury to the sciatic nerve in mice, which repair spontaneously over a short period without inducing pain hypersensitivity. This provides theoretical support for its clinical application and functional recovery from nerve injury related adverse events.

Keywords mice; low temperature plasma ablation; nerve reversible injury repair; activating transcription factor 3 (ATF3); animal model

神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 是由躯体感觉神经系统损伤或疾病引起的慢性疼痛, 15%~25% 的慢性疼痛都是 NP, 临床上周围神经损伤引起 NP 较常见, 表现为不同程度的痛觉过敏、痛觉超敏以及自发痛, 显著降低病人的生活质量并造成巨大的社会经济负担^[1,2]。

临床上常用射频热凝术 (radiofrequency thermo-coagulation, RFT) 等微创介入手术治疗 NP, 通过射频电极针靶向向高温 (一般在 75℃) 热损伤责任神经来阻断疼痛信号传导, 但因神经纤维和组织温度超过 55℃ 会产生蛋白变性, 其热穿透范围随温度升高而增加, 易产生不必要的周围组织热损伤, 所致术后神经支配区的长期麻木等不良反应较为严重^[3,4]。随着影像技术和工程科学的进步, 低温等离子消融术 (low temperature plasma ablation, LTPA) 作为一种较新的神经消融技术, 通过双极射频等离子刀头电场形成 100~200 μm 的等离子能量层, 气化消融责任神经或椎间盘组织, 因其工作温度较低 (一般在 40℃ 左右) 实现对神经组织的“冷消融”, 明显降低了周围组织热损伤的风险, 已经呈现出替代传统射频消融术的趋势, 病人舒适度和满意度更高, 在临床上已广泛应用于椎间盘源性疼痛、带状疱疹后神经痛、三叉神经痛、颈源性头痛等疾病^[5-7]。Bian 等^[8]研究发现, 带状疱疹后神经痛病人行 LTPA 术后疼痛显著减轻且仅有轻微麻木, 在术后 2 年的 NRS 评分显著低于 RFT, 疼痛缓解 50% 以上的 2 年有效率达到 76.3%, 高于 RFT 的 57.6%。

当周围神经受到创伤时易产生 NP, 伴随神经元病变和轴突中断, 既往研究已经开发了大、小鼠坐骨神经慢性压迫性损伤 (chronic constrictive injury, CCI) 模型用于创伤性神经损伤后持续疼痛的机制研究, 可以反映临床上人类部分类型的 NP 特征。然而 LTPA 和 RFT 等微创手术通过物理切割或高

温热损伤的方式来消融神经以中断疼痛传导通路, 本质上也是一种神经损伤, 因此这种损伤和修复过程是否产生新的 NP 一直困扰着医患双方。近期研究发现, RFT 可能与热损伤后 NP 的发生相关, 提出大鼠坐骨神经 65℃ 射频热凝术构建周围 NP 的新型动物模型^[9]。而 LTPA 已经在动物椎间盘实验研究中证明其消融影响仅局限于等离子刀头 3~4 mm 处, 该区域外的组织未见任何热损伤和坏死情况, 在临床上神经损伤相关并发症较轻, 但其应用于周围 NP 时间较短, 现有研究尚未阐明其消融神经和相关不良反应的转归机制。转录因子-3 (activating transcription factor 3, ATF3) 是一种应激性/适应性反应基因, 与周围神经系统的损伤和再生密切相关, 响应创伤或应激反应而在背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 内迅速诱导上调, 参与轴突再生和神经元变性过程, 是损伤神经元的标志物^[10]。因此, 本研究创新了一种小鼠坐骨神经 LTPA 模型, 模拟实际临床场景和手术参数, 通过观察动物行为学变化和 DRG 中 ATF3 的表达变化, 探索 LTPA 的神经损伤自主修复的情况, 旨在为 LTPA 的临床应用和术后神经损伤相关不良反应的转归现象提供基础医学依据, 并为进一步研究 NP 微创治疗技术提供参考。

方 法

1. 实验动物

健康 9~10 周龄 C57BL/6 雌性小鼠, 体重 25~30 g, 订购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证: SCXK (京) 2021-0006; 饲养于首都医科大学宣武医院实验动物中心 (SPF 级), 动物许可证: SYXK (京) 2021-0008。饲养于温度 22~24℃、相对湿度 45%~65% 的动物屏障环

境内，每日保持光暗交替 12/12 h 的昼/夜循环，每笼 5 只，自由摄取水和食物。所有小鼠进入实验动物房内饲养 1 周以上，使小鼠适应新环境以减少应激反应对实验的干扰，在实验开始前检查小鼠的神经功能和痛阈反应正常。本研究通过首都医科大学宣武医院动物实验伦理委员会审核（伦理审批号 XW-20220829-3），研究过程遵守科技部 2006 年《关于善待实验动物的指导性意见》及首都医科大学宣武医院实验动物管理条例。

2. 主要设备及试剂

低温等离子体多功能手术系统（型号：SM-D 380C，西安外科医学科技有限公司），等离子刀头（型号：A185，西安外科医学科技有限公司），6-0 可吸收铬制肠线（中国淮安紫元医疗器械公司），显微手术器械（中国上海金钟手术器械公司），Aesthesio Semmes-Weinstein 纤维丝（型号：37450-275，美国 Danmic Global 公司），智能热板仪（型号：KW-RB，中国南京卡尔文生物公司），转棒疲劳仪（型号：KW-6C，中国南京卡尔文生物公司），免疫染色 PAP 笔（型号：ab2601，美国 Abcam 公司），冰冻切片机（型号：CM1860UV，德国 Leica 公司），正置荧光显微镜（型号：Y-TV55，日本 Nikon 公司），移液器（德国 Eppendorf 公司），三溴乙醇即用型麻醉剂（型号：M2920，中国南京爱贝生物科技公

司），OCT 包埋剂（日本 SAKURA 公司），ATF3 Antibody 兔源性多克隆抗体（型号：NBP1-85816，美国 Novus Biologicals 公司），山羊抗兔 IgG (H + L) Alexa Fluor™ 488 二抗（型号：A-11008，美国 Invitrogen 公司），10% 中性福尔马林固定液（中国北京索莱宝科技公司），磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)、10% 蔗糖-多聚甲醛溶液、30% 蔗糖-PBS 溶液、Triton X-100 通透液、免疫荧光封闭液、含 DAPI 抗荧光淬灭封片剂（中国上海碧云天生物技术公司）。

3. 实验分组与流程

将 54 只小鼠按随机数字表法分为低温等离子消融术组 (LTPA)、坐骨神经慢性压迫性损伤模型组 (CCI)、假手术组 (Sham)，每组 18 只，其中 6 只接受行为学测试和第 28 天免疫荧光染色，12 只仅接受免疫荧光染色。首先，每组 6 只小鼠在造模术前和术后 3、7、14、21、28 天进行行为学测试，并在第 28 天行为学实验后取材每组 3 只小鼠的 L₄~L₆ 左侧 DRG。此外，每组各时间点 3 只小鼠分别在造模术后第 3、7、14、21 天取材 DRG 和免疫荧光染色。主要研究流程见图 1 所示。

4. 建立各组小鼠模型

应用三溴乙醇即用型溶液（1.25% 三溴乙醇、叔戊醇、0.9% 氯化钠注射液配制为终浓度 20 mg/ml 的

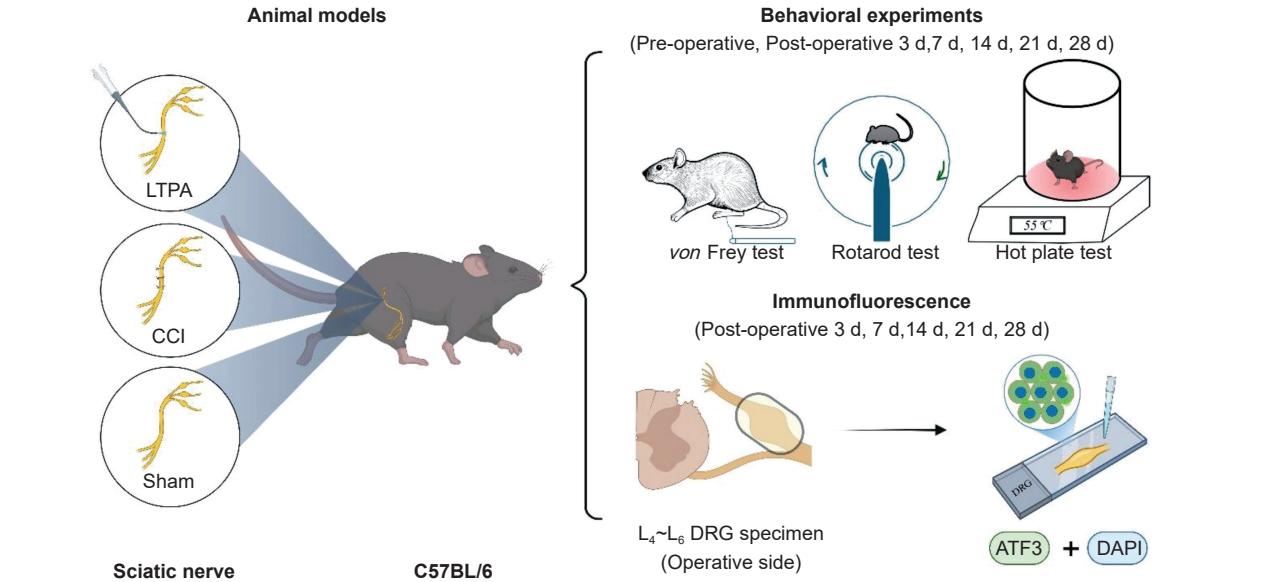


图 1 研究流程图
左侧为 3 组小鼠模型的造模方法，右侧为行为学实验（von Frey、转棒、热板）和 DRG 免疫荧光染色（ATF3 和 DAPI）。

Fig. 1 Study flowchart
The left side of the figure shows animal models in mice of three groups, and the right side shows behavior experiments (von Frey, rotarod and hot plate) and DRG immunofluorescence (ATF3 and DAPI).



即用型溶液)腹腔注射麻醉小鼠,剂量为 0.2 ml/10 g,用镊子挤压下肢或尾部刺激无反应来评估麻醉深度。将小鼠放置于动物手术台上右侧卧位,在眼部涂抹眼膏保护眼睛,保持左下肢朝上、膝盖屈曲的姿势,并用胶带固定,剃除左下肢大腿和膝盖周围的毛发,消毒局部皮肤(造模前后均不使用局部麻醉药和/或非甾体抗炎药,以免影响术后疼痛表现)。

LTPA 组:在完成麻醉和术前准备后,用精细剪从横穿膝盖的水平线前 1/3 处向上与垂直线约 30°角,沿大腿中部向上剪开长 1~1.5 cm 的皮肤切口,打开皮肤后,可见股二头肌下有两白色线条,内侧(头侧)粗线为股骨,外侧(尾侧)细线为坐骨神经。沿外侧白线处钝性分离股二头肌,暴露坐骨神经干,在坐骨神经分叉处上方 1~2 mm 处向上将坐骨神经干与周围组织钝性分离 4~5 mm。将等离子刀头尖端置于坐骨神经干下方(约为坐骨神经分叉处上方 3 mm 处),确认位置无误且紧贴神经后,设定低温等离子体多功能手术系统为消融模式,手术参数为工作档位 1 级(功率约 30 W),轻点黄色脚踏开关 0.5 s,测试有无神经刺激现象(如观察到下肢肌肉轻微颤动即可),调至工作强度 2 级(功率约 50 W),踩下黄色脚踏消融坐骨神经 5 s。将坐骨神经归位,并用 4-0 可吸收 PGA 线逐层缝合肌肉和皮肤,术后继续常规饲养。

CCI 组:与 LTPA 组进行相同的手术操作来暴露并分离坐骨神经干,在坐骨神经分叉处上方 3 mm 处,将 3 根 6-0 可吸收铬制肠线以约 1 mm 的间距较为宽松地向上逐个结扎 3 处于坐骨神经干,总计结扎范围长 3~4 mm,观察下肢的收缩情况来控制结扎力度(以不影响神经血运为界限,即以引起小鼠左下肢肌肉短暂的轻度颤动反应为宜)。归位坐骨神经位后缝合创口,术后常规饲养。

Sham 组:仅暴露并分离坐骨神经干,不进行其他手术干预,术后缝合创口,常规饲养。

5. 行为学实验

von Frey 测试:将小鼠放入底部为 0.6 cm×0.6 cm 网格的测试平台适应 15~30 min 后,用 von Frey 纤维丝通过较为精准的“Up-Down”法进行测试:选用不同规格的纤维丝对小鼠足底垂直施压,至纤维丝弯曲成“C”或“S”型并维持 1~1.5 s,观察小鼠因刺激突然缩爪、退缩或舔爪,记为阳性反应标记为 X,否则标记为 O,设置纤维丝级别单位为 g,从中间值 0.4 g 规格开始测量,有反应时减少到前一级纤维(更细的),无反应时则增加到后一级(更

粗的),在出现阳性反应后重复上述操作 4 次,并记录最后使用的纤维丝压力值^[11]。重复测试 3 次,每次间隔 15 min,取 3 次结果平均值,以评估机械刺激缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)变化。

热板实验:在小鼠适应智能热板仪后,设定工作温度为 55℃。待预热完成后,将小鼠放在热板上,使其后爪足底正中部位接触热板。观察其出现缩爪、跳跃、舔爪等热痛刺激反应时,记录从开始刺激到缩足反应的时间,设定上限为 30 s^[12]。重复测试 3 次,每次间隔 15 min,取 3 次结果平均值,以评估热痛阈值(thermal withdrawal latency, TWL)变化。

转棒疲劳实验:预先将小鼠放入转棒疲劳仪的通道上,背对杆旋转方向,设定旋转速度为 4 rpm,让其向前走 5 s 不掉落。设定模式以 20 rpm 的加速度内从 4 rpm 加速到 40 rpm,自动记录小鼠从杆上掉下来的潜伏期时间,小鼠在转棒仪上的停留时间越长说明运动协调能力越好,反之则越差,设定潜伏期时间上限为 180 s^[13]。重复测试 3 次,每次间隔 30 min,取 3 次结果平均值,通过转棒掉落潜伏期(rotarod fall latency, RFL)来评估运动协调能力的变化。

6. 免疫荧光染色

在造模术后第 3、7、14、21、28 天取小鼠术侧 L₄~L₆ 节段的 DRG。腹腔注射麻醉后,先后注射 1×PBS 20 ml 和 10% 中性福尔马林固定液 40 ml 进行心内灌注,沿术侧坐骨神经向上暴露脊椎并咬除椎板,小心分离 L₄~L₆ 节段的 DRG 标本。放入 4℃ 冰箱内过夜,通过 10% 蔗糖-多聚甲醛溶液和 30% 蔗糖-PBS 溶液完成梯度蔗糖脱水。取出 DRG 用 OCT 包埋后,以 10 μm 厚度在冰冻切片机中切片贴于载玻片上,并于-25℃ 冰箱内储存。使用免疫染色 PAP 笔在载玻片上围绕 DRG 画圈,滴加适量 Triton X-100 免疫染色通透液在室温下通透 30 min。滴加 10×PBS 清洗 10 min×3 次,滴加免疫染色封闭液室温下封闭 30 min。然后滴加稀释好的 ATF3 兔抗(1:500),放入 4℃ 冰箱在湿盒内孵育过夜。次日取出复温后,用 10×PBS 清洗 10 min×3 次,滴加稀释好的 IgG 488 荧光二抗(1:500)室温孵育 1 h。再次用 10×PBS 清洗 10 min×3 次,吸干多余液体后用含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片。使用正置荧光显微镜(型号:Y-TV55,日本 Nikon 公司)观察并拍照,检测平均染色强度。

7. 统计学分析

使用 SPSS 26.0(美国 IBM 公司)、GraphPad

Prism 9.5 (美国 GraphPad 公司)、ImageJ 1.54 (美国国立卫生研究院) 软件对实验数据进行统计分析。符合正态分布的数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 使用单因素或多因素方差分析, 并进一步多重比较 (Bonferroni 校正)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. von Frey 机械痛阈

三组小鼠术前 MWT 基线差异无统计学意义 (见图 2)。LTPA 组在造模术后 3~14 天 MWT 较术前基线和 Sham 组显著增高 ($P < 0.001$), 在术后第 21~28 天 MWT 恢复到术前基线水平, 且与 Sham 组相比差异无统计学意义。而 CCI 组术后 3~28 天 MWT 较术前基线显著下降 ($P < 0.01, P < 0.001$), 并明显低于 Sham 组 ($P < 0.001$)。而 Sham 组 MWT 在造模前后均未发生明显变化。

2. 热痛阈值

三组小鼠术前 TWL 基线差异无统计学意义 (见图 3)。LTPA 组在造模术后 3~14 天 TWL 较术前基线和 Sham 组显著增高 ($P < 0.001$), 在术后第 21~28 天 TWL 逐渐恢复到术前基线水平, 第 28 天与 Sham 组相比差异无统计学意义。而 CCI 组术后 3~28 天 TWL 较术前基线明显下降, 并明显低

于 Sham 组 ($P < 0.01, P < 0.001$)。而 Sham 组 TWL 在造模前后均未发生明显变化。

3. 运动协调能力

三组小鼠术前 RFL 基线差异无统计学意义 (见图 4)。LTPA 组和 CCI 组在造模术后 3~28 天 RFL 显著下降且低于 Sham 组, LTPA 虽呈上升趋势但未恢复到术前基线水平 ($P < 0.001$), 而 CCI 组恢复不明显。此外, 因假手术造模所致肌肉损伤, Sham

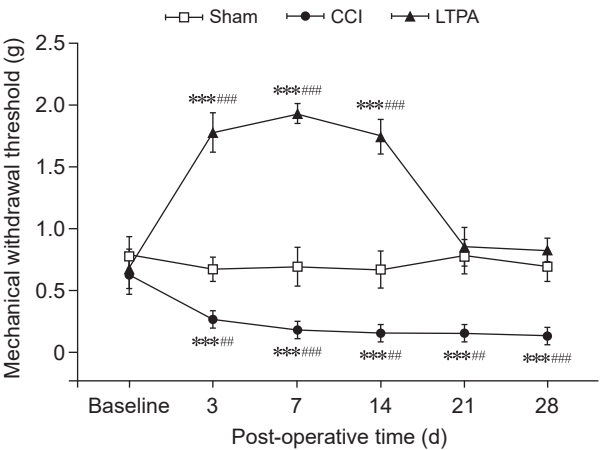


图 2 各组各时间点小鼠机械痛阈变化 ($n = 6, \bar{x} \pm SD$)
*** $P < 0.001$, 与 Sham 组相比; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$, 与术前基线相比
Fig. 2 Comparison of mechanical withdrawal threshold in mice between different groups at various time points ($n = 6, \bar{x} \pm SD$)
*** $P < 0.001$, compared with Sham group; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$, compared with pre-operative baseline.

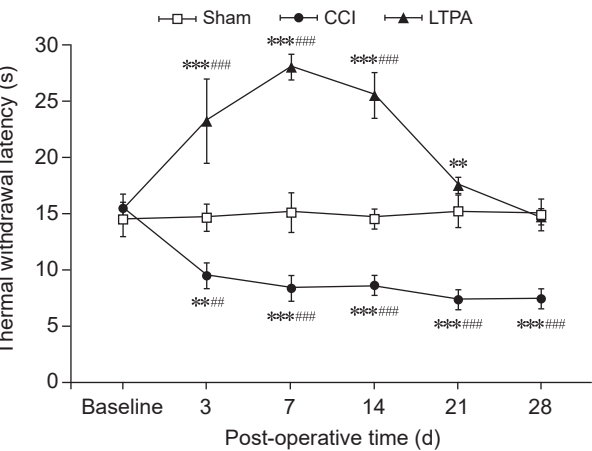


图 3 各组各时间点小鼠热痛阈值变化 ($n = 6, \bar{x} \pm SD$)
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 Sham 组相比; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$, 与术前基线相比
Fig. 3 Comparison of thermal withdrawal latency in mice between different groups at various time points ($n = 6, \bar{x} \pm SD$)
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with Sham group; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$, compared with pre-operative baseline.

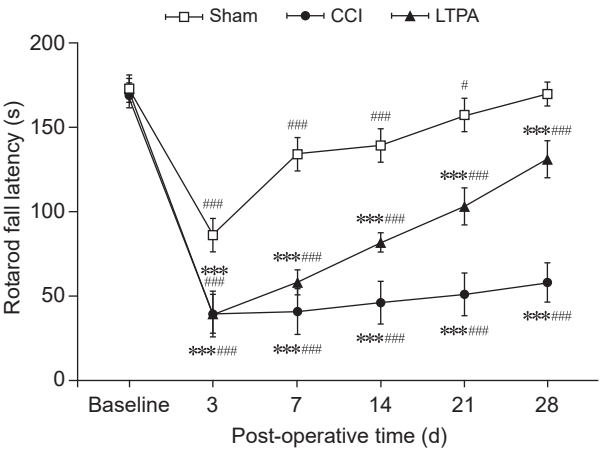


图 4 各组各时间点小鼠转棒掉落潜伏期变化 ($n = 6, \bar{x} \pm SD$)
*** $P < 0.001$, 与 Sham 组相比; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, 与术前基线相比
Fig. 4 Comparison of rotarod fall latency in mice between different groups at various time points ($n = 6, \bar{x} \pm SD$)
*** $P < 0.001$, compared with Sham group; # $P < 0.05$, #### $P < 0.001$, compared with pre-operative baseline.

组 RFL 在术后 3 天较术前明显下降 ($P < 0.001$), 后逐步好转并在第 28 天完全恢复。

4. DRG 免疫荧光染色

小鼠术侧 $L_4 \sim L_6$ DRG 的 ATF3 平均染色强度变化如图 5 所示, 各时间点单因素方差分析结果表明 LTPA 组和 CCI 组的 ATF3 平均染色强度均在造模术后 3 天开始升高, 但差异无统计学意义, 两组在术后第 7 天和第 14 天均明显高于 Sham 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。CCI 组在术后 7~28 天全程存在 ATF3

高表达, 但 LTPA 组仅在术后 7~14 天维持高表达量, 在第 21 天出现明显下降, 并且在第 21~28 天回落至 Sham 组平均染色强度。而 Sham 全程处于 ATF3 低表达状态。

讨 论

本研究基于 LTPA 的临床场景, 首次创建了 C57BL/6 小鼠坐骨神经 LTPA 模型, 与 CCI 模型小

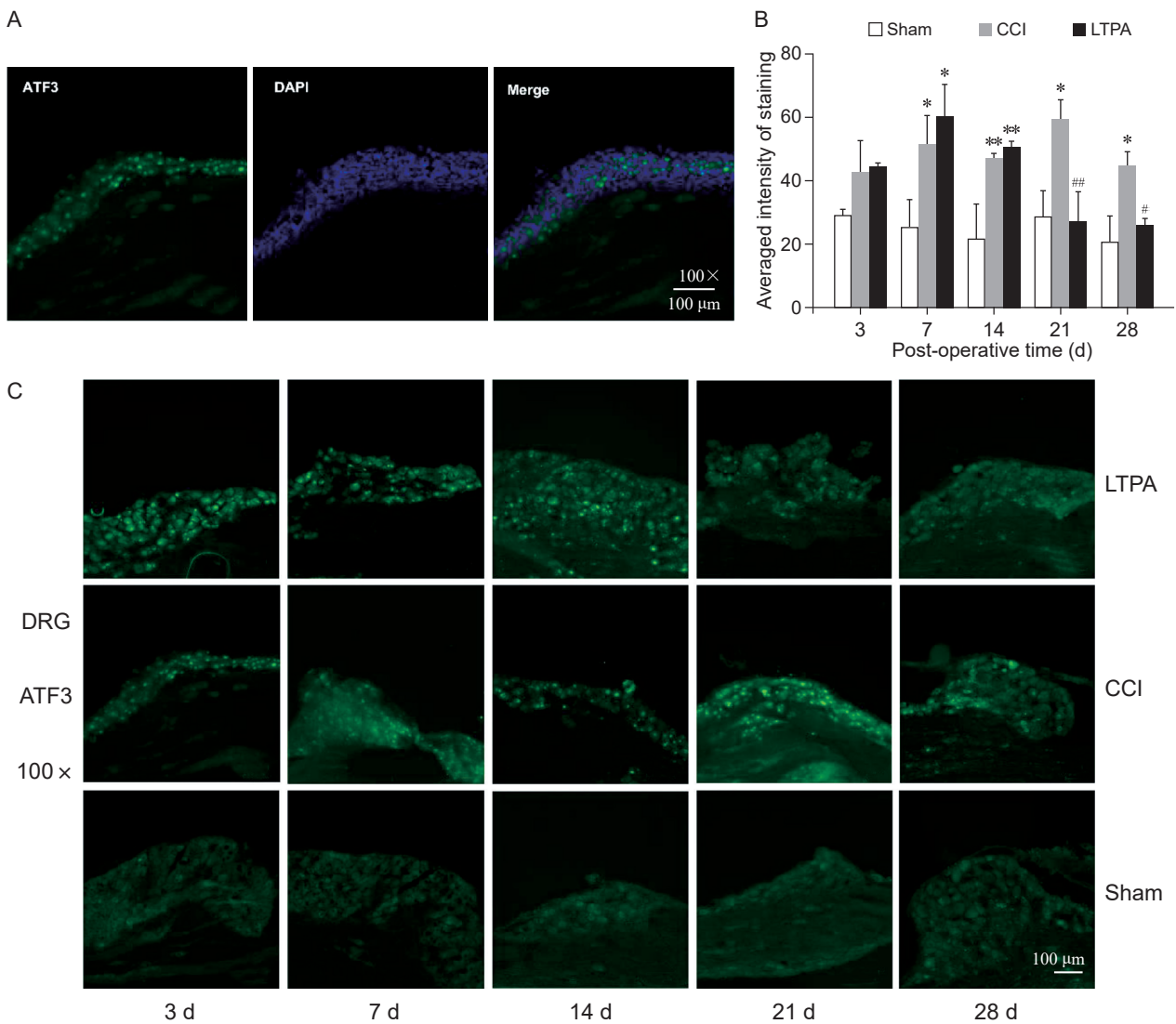
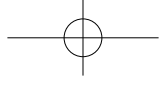


图 5 DRG 免疫荧光平均染色强度比较 ($n = 3$, $\bar{x} \pm SD$)
(A) 以 CCI 为例的 DRG 免疫荧光染色步骤图, 包括 ATF3、DAPI 和 Merge 图; (B) 各组 ATF3 的平均染色强度变化; (C) 各组在各时间点的 ATF3 染色结果的代表性照片
 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, 与 Sham 组相比; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, LTPA 组与 CCI 组相比

Fig. 5 Comparison of averaged staining intensity for DRG ATF3 immunofluorescence ($n = 3$, $\bar{x} \pm SD$)
(A) Schematic diagram of the DRG immunofluorescence staining steps, including ATF3, DAPI and Merge plots, using CCI as an example; (B) The average staining intensity change of ATF3; (C) Shows representative photos of ATF3 staining results at each time point in each group.
 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, compared with Sham group; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, LTPA group compared with CCI group.



鼠对照,进行了一系列疼痛行为学实验和 DRG 中 ATF3 免疫荧光染色来观察神经可逆性损伤和自主修复表现。本研究发现,小鼠坐骨神经 LTPA 造成的神经损伤是可逆性的,并且可以在短时间内实现自主修复,期间不会产生痛觉超敏现象。其中在感觉神经功能上, LTPA 组在术后 3 天出现触痛觉和热痛觉的痛阈上升,并可在术后 21~28 天明显恢复到术前正常状态,这与临床上消融神经后中断疼痛信号传导以及浅感觉减退不良反应的恢复表现相一致。而运动协调能力虽然在术后明显好转,但仍未在 28 天内恢复正常,这也符合既往提出的感觉神经纤维再生速度可能快于运动神经的观点。既往研究发现,感觉神经纤维传导速度恢复比运动神经纤维快约 14%,这与神经原始发育的顺序相反,而且先再生的感觉神经轴突可以通过阻碍神经细胞黏附分子的表达来抑制运动轴突再生^[14,15]。此外,本研究的免疫荧光染色结果显示 LTPA 组和 CCI 组的 DRG 中 ATF3 表达水平在术后 7 天内均因神经损伤而迅速上调, LTPA 组的表达水平随神经修复而逐步下降,在第 35 天恢复到与 Sham 组相同水平,这表明其神经损伤和再生情况与神经功能的行为学变化趋势基本一致;而 CCI 造模术后出现了神经损伤所致 NP,表现为持续存在的机械触觉和热温觉的疼痛超敏和运动平衡能力的下降,并维持 DRG 中 ATF3 的高表达水平,与 LTPA 术后的神经损伤修复变化形成对比。近期研究发现,小鼠周围神经部分挤压伤后的长期触觉超敏是由于感觉神经轴突未能完全中断,相比之下,感觉轴突全部离断的完全挤压伤小鼠在神经再生过程中并未发现痛觉超敏现象^[16],这与本研究结果基本一致,解释了临床实际中未发现 LTPA 消融神经后产生 NP 的情况。

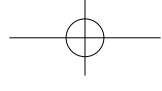
在周围神经损伤后,从神经损伤部位到 DRG 损伤的神经元与神经免疫细胞产生相互作用,诱导神经修复和轴突再生。其中 ATF3 参与调控氧化应激、炎症反应及细胞凋亡等病理过程,其表达水平在神经元中通常非常低,但会因神经损伤和病变而迅速上调^[10]。研究发现,ATF3 表达在神经系统处于稳态时几乎检测不到;而神经损伤、应激等刺激会诱导 ATF3 在受伤的 DRG 神经元中快速表达,产生相应的蛋白质产物直接促进轴突再生,而 ATF3 缺乏的小鼠在周围神经损伤后出现轴突再生减少和再生相关基因障碍,这意味着激活的 ATF3 可能是周围神经轴突再生成功的关键因素^[17-19]。本研究 LTPA 组 DRG 中 ATF3 的表达水平早期迅速上调后逐步下降,并且与神经功能的恢复同步,这反映

了 LTPA 对神经的可逆性损伤以及自主修复情况。而周围神经损伤后产生 NP 是临床上常见的现象,神经损伤后引发局部炎症级联反应,受损的神经轴突发生华勒变性,激活巨噬细胞等免疫细胞,释放 IL-1 β 、TNF- α 等促炎因子,引发疼痛信号的异常传导和放大,增加神经元兴奋性和疼痛敏感度^[2,20]。本研究采用的 CCI 模型通过结扎坐骨神经诱发神经损伤并模拟 NP 的痛觉过敏症状,其造模方法相对简单,但结扎力度难以量化,在 NP 研究领域逐渐被坐骨神经分支选择性损伤等更稳定的新型动物模型所取代^[21]。

LTPA 通过双极等离子系统产生射频电场,等离子刀头以生理盐水等液体以及人体组织为介质被激发产生等离子层,形成带电的等离子体层,可以破坏靶点组织细胞的分子键,将其分解为氧气、氮气等气体排出,从而物理切断神经纤维以阻断疼痛信号传导,感觉减退等神经损伤相关不良反应程度和发生率较低^[22]。而 RFT 是靶向连续输出射频电流,使电极针尖的靶向高温造成神经发生华勒变性,导致痛觉传导通路被中断,对神经周围组织热损伤范围较大,易导致术后麻木或肌无力等不良反应较重且难以恢复^[23,24]。近期研究还发现大鼠坐骨神经 RFT 在 65℃ 时出现痛觉超敏,这可能和感觉神经部分热损伤导致 NP 有关^[9]。在动物实验中发现 LTPA 不会造成椎间盘靶点周围组织不必要的热损伤,并在消融单根机械感觉轴突后 6 h 轴突开始发芽,并在 24 h 出现明显修复^[25,26]。在临床上治疗三叉神经痛时, LTPA 术后面部麻木、咀嚼肌功能下降程度和发生率较 RFT 更低^[27]。因此, LTPA 有潜力成为治疗 NP 的有益补充和改良技术。

本研究存在的局限性:虽然在健康小鼠上创新性地建立了 LTPA 手术模型,并与 CCI 模型小鼠进行比较,观察到 LTPA 神经可逆性损伤和自主修复情况,但并未与 RFT 进行比较,无法对二者的临床选择提供进一步建议。此外,本研究缺少对坐骨神经损伤的形态学观察和电生理实验。因此,今后将在坐骨神经分支选择性损伤等 NP 大鼠模型的基础上观察 LTPA 和 RFT 干预的影响,并补充坐骨神经感觉和运动神经纤维动作电位潜伏期和神经传导速度等神经电生理观察指标,以及坐骨神经损伤部位的电镜下形态学观察,进一步探索 LTPA 和 RFT 相关治疗机制,为临床上 NP 微创介入技术的推广应用和创新发展供理论支撑,使更多 NP 病人受益,减轻慢性疼痛所造成的巨大社会经济负担。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。



参 考 文 献

- [1] Scholz J, Finnerup NB, Attal N, *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain[J]. *Pain*, 2019, 160(1):53-59.
- [2] Cohen SP, Vase L, Hooten WM. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances[J]. *Lancet*, 2021, 397(10289):2082-2097.
- [3] 樊碧发. 周围神经病理性疼痛诊疗中国专家共识 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2020, 26(5):321-328.
- [4] Suer M, Wahezi SE, Abd-Elsayed A, *et al.* Cervical facet joint pain and cervicogenic headache treated with radiofrequency ablation: a systematic review[J]. *Pain Physician*, 2022, 25(3):251-263.
- [5] Guo Y, Wang X, Bian J, *et al.* Low-temperature plasma radiofrequency ablation for the management of refractory cluster headache[J]. *Videosurgery Miniinv*, 2021, 16(2):362-368.
- [6] Sun M, Xu G, Zhang G. Low temperature plasma ablation device for minimally invasive surgery[J]. *Rev Sci Instrum*, 2023, 94(1):14101.
- [7] 林鹂, 苗羽, 朱谦, 等. 不同档位脊神经后支低温等离子消融术治疗慢性关节突关节源性腰痛 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2024, 30(8):585-591.
- [8] Bian J, Wang A, Li N, *et al.* A retrospective comparison of low-temperature plasma ablation and radiofrequency thermocoagulation of the thoracic nerve root for refractory postherpetic neuralgia[J]. *Pain Physician*, 2024, 27(4):243-251.
- [9] 刘彦朋, 张瑞, 孙柏, 等. 大鼠坐骨神经射频热凝神经病理性疼痛模型的建立 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2023, 29(7):495-501.
- [10] Hunt D, Raivich G, Anderson PN. Activating transcription factor 3 and the nervous system[J]. *Front Mol Neurosci*, 2012, 5:7.
- [11] Christensen SL, Hansen RB, Storm MA, *et al.* Von frey testing revisited: provision of an online algorithm for improved accuracy of 50% thresholds[J]. *Eur J Pain*, 2020, 24(4):783-790.
- [12] Menéndez L, Lastra A, Hidalgo A, *et al.* Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice[J]. *J Neurosci Methods*, 2002, 113(1):91-97.
- [13] Deacon RMJ. Measuring motor coordination in mice[J]. *J Vis Exp*, 2013(75):e2609.
- [14] Brushart T, Kebaish F, Wolinsky R, *et al.* Sensory axons inhibit motor axon regeneration in vitro[J]. *Exp Neurol*, 2020, 323:113073.
- [15] Moldovan M, Sørensen J, Krarup C. Comparison of the fastest regenerating motor and sensory myelinated axons in the same peripheral nerve[J]. *Brain*, 2006, 129(Pt 9):2471-2483.
- [16] Kim HW, Shim SW, Zhao AM, *et al.* Long-term tactile hypersensitivity after nerve crush injury in mice is characterized by the persistence of intact sensory axons[J]. *Pain*, 2023, 164(10):2327-2342.
- [17] Zhang Y, Zhao Q, Chen Q, *et al.* Transcriptional control of peripheral nerve regeneration[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(1):329-341.
- [18] Gey M, Wanner R, Schilling C, *et al.* Atf3 mutant mice show reduced axon regeneration and impaired regeneration-associated gene induction after peripheral nerve injury[J]. *Open Biol*, 2016, 6(8):160091.
- [19] Wang K, Wang S, Chen Y, *et al.* Single-cell transcriptomic analysis of somatosensory neurons uncovers temporal development of neuropathic pain[J]. *Cell Res*, 2021, 31:904-918.
- [20] Kocot-Kępska M, Zajączkowska R, Mika J, *et al.* Peripheral mechanisms of neuropathic pain-the role of neuronal and non-neuronal interactions and their implications for topical treatment of neuropathic pain[J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(2):77.
- [21] He L, Zhao W, Zhang L, *et al.* Modified spared nerve injury surgery model of neuropathic pain in mice[J]. *J Vis Exp*, 2022, 179:63362.
- [22] Xiao A, Liu D, He D, *et al.* Plasma scalpels: devices, diagnostics, and applications[J]. *Biomedicine*, 2022, 10(11):2967.
- [23] Li Y, Yang L, Ni J, *et al.* Microvascular decompression and radiofrequency for the treatment of trigeminal neuralgia: a meta-analysis[J]. *J Pain Res*, 2019, 12:1937-1945.
- [24] 杨立强, 李博, 赵丹, 等. CT 引导下半月节热凝射频术延长对老年复发三叉神经痛疗效及安全性的影响 [J]. *中国医药导报*, 2017, 14(2):85-88.
- [25] Tsai PS, Blinder P, Migliori BJ, *et al.* Plasma-mediated ablation: an optical tool for submicrometer surgery on neuronal and vascular systems[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20(1):90-99.
- [26] Hong Y, Yoon SY, Sohn S, *et al.* Evaluation of the resection efficiency and safety of an enhanced power plasma generator using cadaveric intervertebral discs[J]. *Biomed Eng Lett*, 2023, 13(1):57-64.
- [27] Li Y, Guo Y, Yang L, *et al.* Comparison of the short-term outcomes after low-temperature plasma radiofrequency ablation (coblation) in the gasserian ganglion for the treatment of idiopathic trigeminal neuralgia[J]. *J Pain Res*, 2019, 12:1235-1242.