

瞬时感受器电位离子通道香草素受体4下游信号分子的确定及其对大鼠背根神经节慢性压迫后痛觉过敏的作用*

丁欣利^{1,2} 张 杨¹ 王永慧¹ 宁丽萍¹ 岳寿伟^{1,3}

摘要

目的:探讨大鼠背根神经节慢性压迫 CCD 后瞬时感受器电位离子通道香草素受体 4(TRPV4)下游信号分子及其在痛觉过敏中的机制。

方法:鞘内分别注射 TRPV4 拮抗剂钌红(RR)、TRPV4 反义寡脱氧核苷酸(AS ODN)和一氧化氮合成酶(NOS)抑制剂 L-NAME,检测 CCD 大鼠背根神经节 DRG 内一氧化氮(NO)代谢产物亚硝酸盐(nitrite)含量变化,并观测热刺激缩爪反应潜伏期(PWL)的变化。

结果:鞘内分别注射 RR、TRPV4 AS ODN 和 L-NAME 后,均能够显著降低 CCD 大鼠 DRG 内亚硝酸盐含量($P<0.05$), CCD 大鼠的热痛敏行为也能够显著改善($P<0.05$)。

结论:TRPV4 及其下游信号分子 NO 参与介导 CCD 大鼠的热痛觉过敏。

关键词: 瞬时感受器电位离子通道香草素受体 4;一氧化氮;神经痛;热痛觉过敏

中图分类号: R493, R681.5 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2011)-01-0039-06

Identification of transient receptor potential vanilloid 4 downstream signaling molecule and its effect in behavioural hyperalgesia following chronic compression of the dorsal root ganglion in rats/ DING Xinli, ZHANG Yang, WANG Yonghui, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(1): 39-44

Abstract

Objective: To investigate transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) downstream signaling molecule and its effect in behavioural hyperalgesia following chronic compression of dorsal root ganglion (DRG) (CCD) in rats.

Method: Intrathecal administration of ruthenium red (RR, TRPV4 antagonist), TRPV4 antisense oligodeoxynucleotide (ODN)(TRPV4 AS ODN) or L-NAME (inhibitor of NO synthase) were adopted to study the thermal stimuli paw withdraw latency (PWL) and the nitrite (an index of nitric oxide formation) production in the DRG of CCD rats.

Result: Intrathecal administration of RR TRPV4 AS ODN or L-NAME induced significant increase of PWL($P<0.05$) and significant decrease of nitrite in DRG($P<0.05$), compared with control rats, respectively.

Conclusion: TRPV4-NO pathway is involved in thermal hyperalgesia in CCD rats.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine; Provincial Hospital Affiliated to Shandong University; Jinan 250021

Key word transient receptor potential vanilloid 4; nitric oxide; neuropathic pain; thermal hyperalgesia

动物背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG)的慢性压迫(chronic compression of DRG, CCD)能够模拟临床上的椎间盘突出和椎管狭窄症状,是一种

典型的神经性疼痛模型。CCD 大鼠能够产生自发性疼痛、机械性的异常疼痛和热痛觉过敏,伴随着受压迫神经元的动作电位和电流阈值降低、自发性放电

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.01.009

* 基金项目:国家自然科学基金资助课题(30872732,81071597);山东省自然科学基金资助课题(Z2007C04)

1 山东大学齐鲁医院康复医学与理疗科,济南,250012; 2 山东大学附属省立医院康复科; 3 通讯作者
作者简介:丁欣利,女,博士,住院医师; 收稿日期:2010-08-02

增加^[1]。瞬时感受器电位离子通道香草素受体4 (transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)是一种多觉型感受器,可被低渗、机械刺激、热、佛波醇酯、低pH值等激活,在多种疼痛模型中发挥致痛敏作用^[2]。我们早期研究发现 CCD 大鼠 DRG TRPV4 的基因、蛋白表达均明显升高,且高表达的 TRPV4 参与介导 CCD 大鼠的痛觉过敏,有利于低渗溶液或佛波醇(4 α -PDD)引起 DRG 神经元 Ca²⁺内流。一氧化氮合成酶(NOS)具有 Ca²⁺依赖性,促进 L-精氨酸合成一氧化氮(NO)。多个疼痛模型均证实 NO 是伤害性疼痛信号中的重要介质^[3]。研究发现 TRPV4 能够调控豚鼠耳蜗外毛细胞内的 NO 合成^[4],表明 CCD 后 TRPV4 可能进一步调控下游信号分子 NO 而发挥致痛敏作用。本实验主要研究抑制 TRPV4 作用对 CCD 大鼠 DRG 内 NO 含量变化的影响,进一步确定 TRPV4 下游信号分子 NO 及其在 CCD 大鼠热痛觉过敏中的作用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及分组:健康雄性 Wistar 大鼠(体重 150—180g),由山东大学实验动物中心提供。

为了测量 CCD 对 NO 代谢产物亚硝酸盐(nitrite)的影响,72 只大鼠被随机分成假手术组(sham)和 CCD 手术组(CCD),每组均 36 只大鼠。每个组又分成术前处理组(pre-surgery, n=18)和术后 7 天处理组(7 days post-surgery, n=18)2 个亚组。

为了测量钌红(ruthenium red, RR)对 CCD 大鼠热刺激行为的影响和亚硝酸盐的影响,207 只大鼠被分成假手术组(sham, n=9)和 CCD 手术组(CCD, n=198),其中 CCD 手术组又分为钌红 1nmol 组(n=90)、钌红 0.1nmol 组(n=9)、钌红 0.01nmol 组(n=9)和生理盐水组(n=90) 4 个亚组,其中钌红 1nmol 组和生理盐水组(saline)又分为术后第 7 天鞘内注射后 1h、2h、4h、8h 和 24h 5 个次亚组进行亚硝酸盐含量的测定,每组 18 只。

为了测量 TRPV4 反义寡脱氧核苷酸对(ODN) TRPV4 蛋白的干扰效应及干扰对热痛阈值、亚硝酸盐的影响,81 只大鼠被随机分为 CCD 手术组(CCD 组),CCD 术后反义 ODN 干扰组(antisense ODN

group, AS 组)和错配 ODN 干扰组(mismatch ODN group, MM 组)3 个组,每组 n=27。

为了测量 NOS 抑制剂 L-NAME 对 CCD 大鼠热刺激行为的影响和亚硝酸盐的影响,189 只大鼠被随机分成 L-NAME 300nmol 组(n=90)、L-NAME 30nmol 组(n=9)和 D-NAME 300nmol 组(n=90),其中 L-NAME 300nmol 组和 D-NAME 300nmol 组又分为 1h、2h、4h、8h 和 24h 5 个亚组,每组 18 只。

1.1.2 主要仪器和试剂:热痛刺激仪(BME-410A 型,中国医学科学院生物医学工程研究所);酶标仪(DV800 型,美国)。

TRPV4 反义 ODN 序列:

5'-CATCACCAGGATCTGCCATACTG-3'

错配 ODN 序列:

5'-CAACAGGAGGTTTCAGGCAAAGT-3'(Invitrogen 公司合成,使用去核酸酶的 0.9% NaCl 配制,浓度为 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ^[14,18]);

TRPV4 拮抗剂:钌红(美国 Sigma);NOS 抑制剂:NG-L-硝酸精氨酸甲酯(NG-L-nitro-arginine methyl ester, L-NAME)和 L-NAME 异构体:NG-D-nitro-arginine methyl ester(D-NAME)(美国 Cayman 公司)。以上试剂的配置和使用遵循早期报道。

1.2 实验方法

1.2.1 CCD 模型建立:手术组大鼠用戊巴比妥钠(50mg/kg)行腹腔注射麻醉,腰骶部剃毛,常规消毒,铺无菌巾。沿 L4—S1 棘突做后正中偏右切口,依次切开皮肤、腰背筋膜、背最长肌、多裂肌及背半棘肌,钝性分离至横突,暴露横突的根部,此骨性标志的后方即为椎间外孔的前壁。暴露右侧 L4 及 L5 椎间外孔后,然后用弯成直角的 4 号针头以与正中线成 30°,与脊柱水平线成 10°向头端插入孔内。当针头触及 DRG 或神经根可引起同侧后肢肌肉轻微抽动,退出针头,将一根长 4mm,直径 0.63mm 的“L”形不锈钢棒沿针道插入椎间孔,以对 DRG 及邻近神经根形成恒定的压迫^[1]。术后用生理盐水冲洗切口,依次用 4-0 丝线缝合肌肉、腰背筋膜和皮肤,腹腔注射青霉素 40 万单位预防感染,术后密切观察大鼠生命体征变化,待其生命体征平稳,送回动物室饲养。假手术组除不插钢棒压迫神经节外,其余操作同手术组。分别于术后第 7 天或最后一次 ODN 注射 12h 后处死

大鼠。

1.2.2 TRPV4 反义 ODN 干扰: 微量注射器吸取 40 μ g ODN, 使用 0.9% NaCl 配制为总体积 20 μ l。2.5% 乙醚吸入麻醉大鼠后, 30 号针头从正中中线插入 L4 和 L5 之间的蛛网膜下腔, 换用微量注射器, 以 1 μ l/s 的速度注入 ODN^[9]。每天 1 次, 共 7d。CCD 组于手术 12h 后进行第 1 次注射。

1.2.3 热辐射刺激缩爪反应潜伏期 (paw withdrawl latency, PWL) 测定: 室温保持在(26 \pm 0.5) $^{\circ}$ C。将动物放在 6mm 厚有机玻璃板上, 当大鼠安静后, 损伤侧后爪接触玻璃板时, 将热痛刺激仪放在有机玻璃板下方, 使光源聚焦照射动物后肢足底掌心, 电子秒表记录从照射开始到引起后肢回缩反应时的 PWL 作为热痛觉观测指标。读数精确到 0.01s。取每只大鼠 5 次测量结果的均值为统计数据, 测量间隔时间为 5min。事先调节光照强度, 使平均潜伏期约 10s。上限为 20s, 以免造成组织损伤。分别于手术前连续测量 2d, 手术后第 7 天鞘内注射化学药物前 2h 及注射药物后 1h、2h、4h、8h、24h 时测量或最后一次 ODN 注射 12h 后、取材前进行。所有的测量均使用单盲法。

1.2.4 Western 印迹: 断头处死大鼠后, 取出受压 DRG, 提取组织总蛋白, 使用 BCA 法测蛋白浓度后, 以 30 μ g/泳道上样, 经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转至硝酸纤维素膜。加入 TRPV4 一抗(英国 abcam 公司, 1:500)孵育过夜, 冲洗后再加入 HRP-conjugated 二抗 2.5h, 化学发光显色, 显影、定影处理, 使用 AlphaEaseFC Imaging software 4.0 系统分析条带光密度, 目的条带与内参 β -actin 的强度的比值作为结果, 每个组 3 个样本, 每个样本重复 3 次。

1.2.5 NO 检测: 依照碧云天生产的试剂盒说明书进行, 每组 9 个样本, 每个样本重复 3 次。

1.3 统计学分析

所得数据用均数 \pm 标准差表示。根据需要需要使用两因素或者单因素方差分析, 选择 Bonferroni t-test, Student-Newman-Keuls Method (SNK) 或 Tukey 检验作为 post hoc 检验。

2 结果

2.1 TRPV4 拮抗剂 钆红对 CCD 大鼠热痛敏及

DRG NO 衍生产物亚硝酸盐浓度的影响

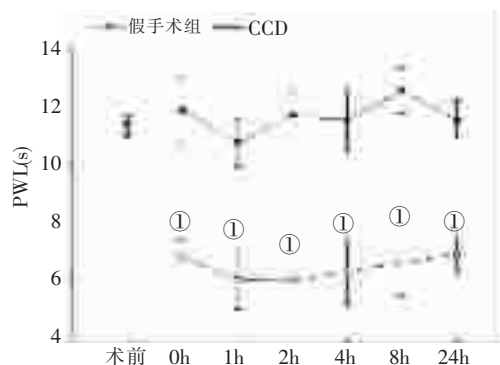
与假手术组相比, CCD 明显降低热辐射刺激缩爪反应潜伏期(F(1,112)=175.858, $P<0.001$), CCD 术后第 7 天大鼠 DRG 亚硝酸盐的浓度也显著增高($P<0.001$)。见表 1, 图 1。

表 1 CCD 术后第 7 天大鼠 DRG NO 衍生产物亚硝酸盐浓度的变化 (nm/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	术前	术后第 7 天
假手术组	9	3.63 \pm 0.21	3.80 \pm 0.16
CCD 组	9	4.00 \pm 0.19	19.14 \pm 0.45 ^{①②}

①与假手术组相比 $P<0.001$; ②与相应的术前组相比 $P<0.001$

图 1 CCD 术后第七天大鼠的热痛敏



n=9, ①与假手术组相比 $P<0.001$ 。

为了检测 TRPV4 非选择性抑制剂钆红(RR)对 CCD 大鼠热痛敏及 DRG NO 衍生产物亚硝酸盐浓度的影响, 鞘内注射不同浓度的钆红(0.01nmol、0.1nmol、1nmol)各 20 μ l, 分别检测注射后 0h、1h、2h、4h、8h 和 24h 的热刺激缩爪时间和亚硝酸盐浓度, 结果显示 0.1—1nmol 的钆红对 CCD 后大鼠的热痛敏产生抑制作用($P<0.001$), 此抑制作用注射后 1h 可测得, 4h 作用达到最大, 大约能够持续到 8h, 而 0.01nmol 钆红无抑制作用($P>0.05$)。与鞘内注射生理盐水组相比, 1nmol 钆红组明显降低 DRG 亚硝酸盐浓度($P<0.001$), 4h 作用最大, 其浓度的变化与热痛觉反应呈正相关($r=0.997$, $P<0.05$)。见表 2, 图 2。

2.2 TRPV4 AS ODN 对 CCD 大鼠热痛敏及 DRG NO 衍生产物亚硝酸盐浓度的影响

鉴于钆红非 TRPV4 特异性阻断剂, 因此本研究加用 TRPV4 AS ODN 来特异性抑制 TRPV4 的表达。CCD 术后第 7 天 AS ODN 组 TRPV4 的表达显著抑制($P<0.001$), 而错配组(MM ODN)则无影响。

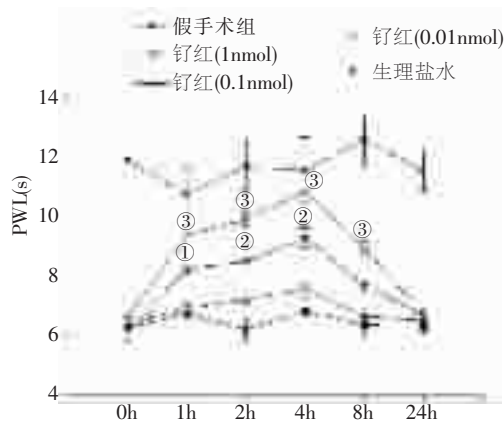
CCD、MM、AS 组术前热刺激 PWL 差异无显著性意义 ($P>0.05$), 鞘内连续注射第 7 天后, CCD 和 MM 组 PWL 较术前显著降低 ($P<0.001$), AS 组缩爪时间虽有所降低, 但较术前无明显变化 ($P=0.059$)。与 MM 组相比, AS 组能明显降低 CCD 引起的亚硝酸盐浓度增高 ($P<0.001$)。见表 3, 图 3。

表 2 钆红对 CCD 大鼠亚硝酸盐浓度的抑制作用 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	生理盐水(n=9)	钆红(n=9)
第 1 小时组	93.02±3.14	46.70±3.51 ^①
第 2 小时组	94.26±3.60	40.23±2.08 ^①
第 4 小时组	95.92±4.56	18.19±3.44 ^①
第 8 小时组	91.78±2.64	59.16±2.71 ^①
第 24 小时组	89.65±2.40	81.89±3.51

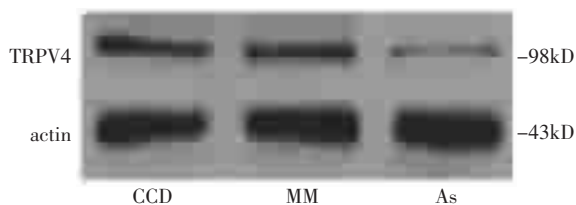
①与生理盐组相比 $P<0.001$

图 2 钆红对 CCD 大鼠热痛敏的作用



n=9, 与生理盐水组相比: ① $P<0.05$; ② $P<0.01$; ③ $P<0.001$

图 3 TRPV4 Western blotting 条带, 内参为 β -Actin



2.3 非选择性 NO 合成酶抑制剂 L-NAME 对 CCD 大鼠热痛敏及 DRG NO 衍生产物亚硝酸盐浓度的影响

鞘内注射 L-NAME 30-300nmol 能够明显降低 CCD 后大鼠的热痛敏 ($P<0.001$), 抑制作用大约维持 8h, 4h 时效应最大。L-NAME 300nmol 明显抑制 CCD 引起的亚硝酸盐浓度增高 ($F(2, 120)=201.725$,

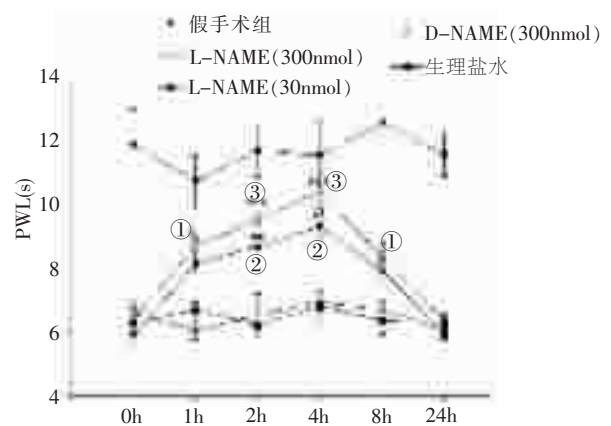
$P<0.001$), 且最大抑制作用也出现在 4h, 8h 后逐渐恢复正常, 而 D-NAME 300nmol (L-NAME 的同分异构体) 却无上述作用。见表 4, 图 4。

表 3 不同处理组 PWL、亚硝酸盐浓度的比较及 TRPV4 的相对表达量 ($\%, \bar{x} \pm s$)

	动物数	CCD	MM	AS
相对表达量 (%)	3	65.60±0.46	57.76±3.82	23.27±2.23 ^{①③}
PWL				
基数 (S_1)	9	11.52±0.71	11.24±0.37	11.59±0.50
CCD 后 (S_2)	9	6.46±0.12 ^②	6.89±0.32 ^②	10.45±0.167 ^{①③}
亚硝酸盐 (nM/ml)	9	18.35±0.31	17.87±0.46	5.45±0.19 ^{①③}

①与 MM 组相比 $P<0.001$; ②与相应的 baseline 相比 $P<0.001$, ③与 CCD 组相比 $P<0.001$ 。

图 4 L-NAME 对 CCD 大鼠热痛敏的作用



n=9, 与生理盐水组相比: ① $P<0.05$; ② $P<0.01$; ③ $P<0.001$ 。

表 4 L-NAME 对 CCD 大鼠亚硝酸盐浓度的抑制作用 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	CCD	MM	AS
第 1 小时组	93.02±3.14	96.17±3.51	47.44±1.52 ^{①②}
第 2 小时组	94.26±3.60	91.89±3.09	41.57±1.82 ^{①②}
第 4 小时组	95.92±4.56	89.69±4.20	34.59±1.11 ^{①②}
第 8 小时组	91.78±2.64	93.67±2.66	58.34±0.90 ^{①②}
第 24 小时组	89.65±2.40	92.60±4.92	94.94±6.27

①与生理盐水组相比 $P<0.001$; ②与 D-NAME 组相比 $P<0.001$

3 讨论

TRPV4 是 DRG 上一种重要的感受器^[2], 能够传导伤害性刺激, 在神经性和炎症性疼痛中发挥痛敏作用^[5-6]。有报道显示: TRPV4 激动剂 4 α -PDD 或低渗溶液, 能够诱导 NO 合成, 而 TRPV4 抑制剂钆红则抑制 NO 产生^[4]。CCD 手术后, TRPV4 的基因和蛋白表达增加; NO 产物的含量也增加; TRPV4 抑制剂钆红或反义 ODN 作用后, NO 含量降低。以上结果

均强有力的说明 CCD 手术后,TRPV4 参与介导 NO 的合成,促进痛敏信号的传递。

DRG 神经元和脊髓背侧角神经元间的突触传递在疼痛的发生中起重要作用,TRPV4 则能增强两部位神经元间的突触传递^[7]。TRPV4 可能经由谷氨酸突触连接调节下游效应器^[8]。而对延髓头端腹外侧核神经元的研究显示:NO 通过 NO-cGMP-PKG 通路调节谷氨酸释放,在伤害性疼痛中发挥重要作用。NO/cGMP 信号通路调节谷氨酸释放的研究在离体蓝斑核的切片上也有报道。另外,NO 通过 PKG 通路抑制 DRG 神经元上抑制性神经递质 γ -氨基丁酸 (GABA) 电流^[9]。以上研究表明:NO 既能通过 NO-cGMP-PKG 通路促进兴奋性神经递质谷氨酸的释放,又能通过此信号通路抑制抑制性神经递质 γ -氨基丁酸电流,参与介导伤害性疼痛信号的传递。NO 也参与合成和释放降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP)^[10]。有报道称 NO 可能通过活化 cGMP-PKG 通路敏化伤害性初级传入纤维末端,增加神经肽的释放。对背根神经节和三叉神经节的研究均显示:高浓度 NO 能够上调 CGRP 的合成,并促进其释放;而 NOS 抑制剂则下调 CGRP 水平。NO 也能促进大鼠硬脑膜、离体主动脉环和脊髓切片释放 CGRP。TRPV4 与 NO 可能存在密切联系。TRPV4 促进 NO 合成^[4],NO 可能通过 cGMP-PKG 通路促进谷氨酸和 CGRP 的释放,参与介导疼痛信号的传递。大量证据显示:NO、NO-cGMP、cGMP-PKG、NO-cGMP-PKG 通路均参与病理性疼痛,在伤害性疼痛信号的传递过程中发挥促进作用。综上所述,CCD 大鼠伤害性疼痛信号的传递可能是:CCD 术后持续机械刺激能够增加 TRPV4 的表达和功能,导致细胞内钙离子内流增多,增加钙离子依赖性 NOS 表达,在一定的条件下催化 L-精氨酸合成 NO,进一步调节下游的 cGMP-PKG 级联反应,调节突触联系,促进谷氨酸等兴奋性神经递质和 CGRP 等神经肽类物质的释放,从而调节伤害性疼痛信号的传递。

值得注意的是,对神经性疼痛和炎症性疼痛的动物模型实验均显示:N-甲基-D-天门冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体激活导致大量钙离子内流,能够产生 NO,参与介导急性和慢性病理性

疼痛^[11]。另外,NMDA 受体激活能够导致花生四烯酸释放^[12],而花生四烯酸是 TRPV4 的一种内源性的化学激动剂^[2]。即 NMDA 受体可能通过释放内源性的化学物质间接调控 TRPV4 的作用。鞘内注射 NMDA 受体拮抗剂 APV 和 MK-801 均能抑制 CCD 大鼠的热痛觉过敏^[13],说明 NMDA 受体在 CCD 大鼠导致的神经性痛敏中也发挥重要作用。因此,CCD 手术后,TRPV4 的作用可能通过 NMDA 受体介导花生四烯酸的释放产生,引发 DRG 神经元内大量钙离子内流,进一步激活 NO-cGMP-PKG 信号通路,促进疼痛信号传递。

由于抑制 TRPV4-NO 信号通路只能部分逆转 CCD 大鼠的热痛觉过敏,提示该热痛敏的产生可能还有其他机制,如:电压门控性钠离子通道和钾离子通道、超极化激活性阳离子通道、蛋白激酶 A、C、D、磷脂酶 C β 、肌醇三磷脂、磷脂酶 A2、酪氨酸激酶及其他^[2,14]。

NO 除了有致痛作用外,这条通路还可以产生抑制疼痛效应^[15]。这可能与伤害性初级感觉神经元亚型不同有关^[16],也可能与此通路的上游调控信号不同有关:去甲肾上腺素能受体和毒蕈碱受体活化产生的 NO 具有镇痛效应^[17];而 NMDA 受体激活产生的 NO 则具有痛敏效应^[11]。本研究中 TRPV4 介导 NO 生成产生热痛敏可能是 NMDA 受体的作用。

NOS 有三种类型:神经元型 NOS (neuronal NOS, nNOS)、内皮型 NOS (endothelial NOS, eNOS) 和诱导型 NOS (inducible NOS, iNOS)^[18]。由于本研究中,我们使用的 L-NAME,是一种 NOS 非选择性的抑制剂,对三种类型的 NOS 均有作用,因此无从判断 TRPV4 介导的 NO 的合成究竟是哪种类型的 NOS 起作用。此问题还需进一步研究。

TRPV4-NO 参与介导 CCD 大鼠的热痛觉过敏。本实验我们对 TRPV4-NO 信号通路的研究只局限于 DRG,通过鞘内干扰 TRPV4 的作用检测 DRG 内亚硝酸盐含量的变化来证明此信号通路的存在。由于 DRG 的中枢突是脊髓水平的痛觉传导通路的突触前结构,因此突触前结构乃至脊髓水平的亚硝酸盐含量均相应的受到一定影响。所以可以认为 TRPV4-NO 信号通路在 DRG 水平和脊髓水平均发挥作用。

参考文献

- [1] Song XJ, Hu SJ, Greenquist KW, et al. Mechanical and thermal hyperalgesia and ectopic neuronal discharge after chronic compression of dorsal root ganglia [J]. *J Neurophysiol*, 1999, 82(6):3347—3358.
- [2] O'Neil RG, Heller S. The mechanosensitive nature of TRPV channels[J]. *Pflugers Arch*, 2005, 451(1):193—203.
- [3] Sasaki A, Mabuchi T, Serizawa K, et al. Different roles of nitric oxide synthase-1 and -2 between herpetic and postherpetic allodynia in mice[J]. *Neuroscience*, 2007, 150(2):459—466.
- [4] Takeda-Nakazawa H, Harada N, Shen J, et al. Hyposmotic stimulation-induced nitric oxide production in outer hair cells of the guinea pig cochlea[J]. *Hear Res*, 2007, 230(1—2):93—104.
- [5] Alessandri-Haber N, Dina OA, Yeh JJ, et al. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(18):4444—4452.
- [6] Alessandri-Haber N, Joseph E, Dina OA, et al. TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator [J]. *Pain*, 2005, 118(1—2):70—79.
- [7] Cao DS, Yu SQ, Premkumar LS. Modulation of transient receptor potential Vanilloid 4-mediated membrane currents and synaptic transmission by protein kinase C [J]. *Mol Pain*, 2009, 5:5.
- [8] Bourque CW, Ciura S, Trudel E, et al. Neurophysiological characterization of mammalian osmosensitive neurones [J]. *Exp Physiol*, 2007, 92(3):499—505.
- [9] Bie BH, Zhao ZQ. Nitric oxide inhibits GABA-evoked current in dorsal root ganglion neuron via PKG-dependent pathway[J]. *Brain Res Bull*, 2001, 55(3):335—339.
- [10] Grant AD, Cottrell GS, Amadesi S, et al. Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice [J]. *J Physiol*, 2007, 578(Pt3):715—733.
- [11] Meller ST, Pechman PS, Gebhart GF, et al. Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat[J]. *Neuroscience*, 1992, 50(1):7—10.
- [12] Windelborn JA, Lipton P. Lysosomal release of cathepsins causes ischemic damage in the rat hippocampal slice and depends on NMDA-mediated calcium influx, arachidonic acid metabolism, and free radical production[J]. *J Neurochem*, 2008, 106(1):56—69.
- [13] Song XJ, Vizcarra C, Xu DS, et al. Hyperalgesia and neural excitability following injuries to central and peripheral branches of axons and somata of dorsal root ganglion neurons [J]. *J Neurophysiol*, 2003, 89(4):2185—2193.
- [14] Tan ZY, Donnelly DF, LaMotte RH. Effects of a chronic compression of the dorsal root ganglion on voltage-gated Na⁺ and K⁺ currents in cutaneous afferent neurons [J]. *J Neurophysiol*, 2006, 95(2):1115—1123.
- [15] Wang J, Zhang LC, Lv YW, et al. Involvement of the nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channel pathway in the antihyperalgesic effects of bovine lactoferrin in a model of neuropathic pain[J]. *Brain Res*, 2008, 1209:1—7.
- [16] Vivancos GG, Parada CA, Ferreira SH. Opposite nociceptive effects of the arginine/NO/cGMP pathway stimulation in dermal and subcutaneous tissues [J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 138(7):1351—1357.
- [17] Takasu K, Honda M, Ono H, et al. Spinal alpha(2)-adrenergic and muscarinic receptors and the NO release cascade mediate supraspinally produced effectiveness of gabapentin at decreasing mechanical hypersensitivity in mice after partial nerve injury[J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 148(2):233—244.
- [18] Forstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1995, 352(4):351—364.