

基于 thermoTRP 介导冷痛敏机制对膝骨关节炎虚寒冷痛的研究

邢润麟, 王培民*, 茆军, 张农山, 赵凌睿, 李晓辰

(南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 基于膝骨关节炎大鼠冷缩足潜伏期和冷刺激敏感通道蛋白 TRPA1 和 TRPM8 在患膝滑膜组织的表达变化, 阐述膝骨关节炎虚寒冷痛的形成原理。方法 健康 4 月龄 SD 雄性大鼠 45 只, 体质量 440~470 g, 随机分成 KOA 模型组(仅造模, 无药物干预)、拮抗剂干预组(造模 2 周后应用 TRPA1、TRPM8 拮抗剂干预的大鼠); 正常组(正常健康大鼠, 无药物干预)。分别于造模前 3 d、造模后 2、4、6、8 周, 在 3 组中随机选择 5 只大鼠, 测定冷缩足潜伏期; 并于造模后第 8 周测定痛阈值结束后处死大鼠(CO₂窒息法), 取患膝滑膜、软骨组织样本, 观察软骨组织病理切片形态, 并检测滑膜组织 TRPA1、TRPM8 基因量及蛋白表达水平。结果 造模后 2 周 KOA 大鼠出现明显的冷刺激痛敏, 至造模后 4 周其冷刺激痛阈仍处于非正常低水平, 应用 TRPA1、TRPM8 抑制剂能够提高 KOA 大鼠的冷刺激痛阈。结论 TRPA1、TRPM8 表达上调参与构建膝骨关节炎冷刺激痛敏, 是膝骨关节炎虚寒冷痛形成的重要基础。

关键词:膝骨关节炎; 虚寒; 冷刺激痛敏; TRP 离子通道; 发生机制

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2016)07-0347-05

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2016.0347

Mechanism of thermoTRP Participating in Cold Hyperalgesia of Rat with Experimental Knee Osteoarthritis

XING Run-lin, WANG Pei-min*, MAO Jun, ZHANG Nong-shan, ZHAO Ling-rui, LI Xiao-chen

(The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe both TRPA1 and TRPM8 expressions in synovial tissues of rats with cold hyperalgesia induced by experimental knee osteoarthritis(KOA). **METHODS** 45 Sprague Dawley male rats, weight ranging from 440 g to 470 g were randomly divided into the model group, model-antagonist and normal group. Paw withdrawal latency (PWL) of five rats from each group was determined one week before modeling, 2, 4, 6 and 8 weeks after modeling, respectively. 8 weeks after modeling, the rats were killed and synovial and cartilage tissues from diseased knee were collected, to observe pathological morphology at cartilage tissues and to determine the protein and gene expressions of TRPA1 and TRPM8 at synovial tissues. **RESULTS** KOA rats showed obvious cold hyperalgesia from two weeks after modeling to the latest follow-up, 8 weeks after modeling. The abnormally low level of PWL could be increased by TRPA1 and TRPM8 ion channel blocker. **CONCLUSION** Up-regulating expressions of TRPA1 and TRPM8 participate in the occurrence mechanism of KOA cold hyperalgesia.

KEY WORDS: knee osteoarthritis; deficiency cold; cold hyperalgesia; TRP ion channel; occurrence mechanism

膝骨关节炎(Knee osteoarthritis, KOA)是中老年常见骨关节退变。据报道,我国 60 岁以上人群 KOA 发病率已超过 50%,75 岁以上人群中发病率高达 80%,总致残率超过 53%^[1]。且伴随着人口老年化进程加剧,危害性尚在进一步扩大^[2]。KOA 病理机制至今不明,尚无特异性治疗药物^[3-4]。美国矫形外科协会和风湿病学会 2015 年联合推出的《膝骨关节炎治疗的循证医学指南》中,达到 I 级证据级别的防治方法只有“合理功能锻炼、控制体质量指

数”,其它包括非甾体类抗炎药物、局部注射用玻璃酸钠等,均被认为疗效不明确^[5]。硫酸软骨素一度被认为能够抑制软骨破坏和促软骨再生修复,但各方证据并不一致。

因此,目前针对 KOA 的治疗仍然集中在如何缓解临床症状,尤其是疼痛。超过 65%的 KOA 患者以疼痛为最主要表现^[6]。疼痛贯穿 KOA 全程,是其最主要和顽固的症状。疼痛得不到有效控制,是 KOA 患者最终放弃保守治疗、选择手术的最主

收稿日期:2016-05-10;修稿日期:2016-06-20

基金项目:国家自然科学基金(81573993);江苏省自然科学基金(BK20151598);江苏省中医院院级课题(Y14022)

作者简介:邢润麟(1988—),男,江苏南京人,南京中医药大学 2014 级博士研究生。* 通信作者:drwpm@163.com

要原因。而术后根据报道仍然有高达 60%~75% 的患者残留顽固性疼痛,所以疼痛也是制约手术疗效的最主要因素^[7]。另外,“合理功能锻炼、控制体重指数”也要以有效控制疼痛为前提。国内外指南的药物推荐首选非甾体类消炎药(NSAIDs),无效者可选用曲马多、阿片类药物。但阿片类药物存在药物依赖,NSAIDs 长期应用所导致消化道溃疡、出血等不良反应,严重困扰临床。

近年来随着神经生物学慢性疼痛领域研究的深入,人们开始关注 KOA 病理机制中痛敏状态的角色^[8-9]。KOA 具有显著“遇寒则痛、得温则舒”的冷刺激痛敏特点,冷刺激敏感特异性通道蛋白(TRPA1 和 TRPM8)在其中作用非常关键。目前国内外 KOA 领域这方面的研究非常少。我们构建了 SD 大鼠 KOA 模型,在此基础上观察大鼠冷缩足潜伏期和冷刺激敏感通道蛋白 TRPA1 和 TRPM8 在患膝滑膜组织的表达变化,试图阐明 KOA 虚寒冷痛的形成原理。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

选取 4 月龄 SD 雄性大鼠 45 只,体质量 440~470 g(北京维通利华实验动物技术有限公司);冷板痛阈测量仪;热板痛阈测量仪;TRPA1 一抗(ab58844,美国 Abcam 公司);TRPM8 一抗(ab3243,美国 Abcam 公司);选择性 TRPA1 通道阻滞剂(TCS 5861528,美国 Alpha Applied Bioscience 公司);选择性 TRPM8 通道阻滞剂(Icilin,美国 Abcam 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 由 SPSS 软件生成随机数,将 45 只 SD 雄性大鼠随机分成 3 组,KOA 模型组(仅造模,无药物干预)、拮抗剂干预组(造模 2 周后应用 TRPM8、TRPA1 拮抗剂干预的大鼠);正常组(正常健康大鼠,无药物干预)。

1.2.2 模型制备 采用改良 Hulth 法手术造模^[10],术前 12 h 禁食,腹腔注射 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉。膝前正中切口直视下切断前交叉韧带,前抽屉试验检验手术结果,逐层缝合。术后丁胺卡纳霉素连续注射 4 d 预防感染(南京赛博生物科技公司,批号:CA0015,药品规格:1×10⁵ U/mL/支,注射剂量:10 mg/kg)。术后大鼠分笼饲养,自由饮水和进食,关节不固定。动物房室温(25±2)℃,相对湿度(60±5)%,每日照明 12 h。术后第 15 天开

始,模型-拮抗剂组隔天给予 TCS 5861528+Icilin 8 nmol,模型组和空白组继续标准饮食,无药物干预。

1.3 测量指标

①冷缩足潜伏期:将冷板痛觉测试仪温度设定为 0℃,将大鼠放置入玻璃方盒内,记录从接触冷板至大鼠首次出现快速缩足、舔足、跺足或跳跃时间,而身体活动引起的缩足反应不记做阳性反应。自动切断时间为 60 s(防止皮肤冻伤),每侧足测量 3 次,每次间隔 10 min,取其均值,作为该侧足的冷缩足潜伏期。测量间期清除冷板上积冰,保持冷板的清洁。

②HE 染色:造模后第 8 周,末次痛阈测定结束后,处死大鼠(CO₂窒息法安乐死)提取软骨组织,10%中性甲醛固定,石蜡包埋,切片,常规 HE 染色。参考 OARSI 推荐的滑膜 H/E 染色评分标准对各组滑膜染色切片进行评分^[11],并记录各组分值。

③组织免疫荧光:处死大鼠提取滑膜组织,10%中性甲醛固定;EDTA 浸泡、自来水充分冲洗、切片、石蜡包埋;常规脱蜡到水化;用 0.5%的过氧化氢溶液孵育切片 10 min,自来水冲洗切片;将抗原修复液放入不锈钢高压锅中,让切片完全浸没在修复液中。当高压锅温度达到喷气温度和压力时开始计时,大约 1~2 min。打开锅盖,取出切片,立即放入 PBS 中;用最佳稀释浓度的一抗孵育切片,4℃过夜,PBS 冲洗;加入二抗孵育,约 20 min,PBS 冲洗;DAB 显色;自来水充分冲洗;苏木素复染,透明和封片。

④Western blot 检测 TRPA1、TRPM8 蛋白表达:组织总蛋白提取:滑膜组织称质量,按说明书要求比例加入 RIPA 裂解液研磨 10~15 min,冰上静置 30 min 后离心取上清,按 BCA 蛋白测定试剂盒说明测定蛋白浓度,将配平的蛋白置 98℃变性 5 min。

Western blot 具体步骤:取样,制胶,电泳后转膜至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗,4℃孵育过夜,次日 1×TBST 洗涤 3 次,10 min/次,二抗室温孵育 2 h,ECL 显色曝光。以 β-actin 作为内参,分析灰度值,计算灰度系数=(目标蛋白的面积×灰度值)/(β-actin 的面积×灰度值)。

⑤Real-time PCR 检测 TRPA1、TRPM8 基因量:总 RNA 的提取:严格按 TRIzol 法提取滑膜组织总 RNA,应用分光光度计测定 RNA 吸光度,即 A260/A280 比值,在 1.8~2.0 之间即可用于逆转

录。

逆转录反应:将提取的总 RNA 加入 Prime Script RT reagent Kit 10 μ L 反转录反应体系,按 37 $^{\circ}$ C (15 min)、85 $^{\circ}$ C (5 s) 的反应条件在 PCR 仪上行逆转录反应后,4 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 基因 GAPDH 序列

基因	上游引物	下游引物
TRPA1	5-GCAGCATTTTCAGGTGCCAA-3'	5-CGCTGTCCAGGCACATCTTA-3'
TRPM8	5-CCCTTGAGAGCCGTACCTTG-3'	5-AGGCTGGGATTGAGCAAACA-3'
GAPDH	5-ACAGCAACAGGGTGGGTGGTGGAC-3'	5-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3'

荧光定量 PCR:取 2 μ L cDNA,加入无 RNA 酶水 8 μ L,2.5RealMasterMix 8 μ L,20sybgreen 1 μ L,引物对 0.5/0.5 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,1 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;60 $^{\circ}$ C 退火 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,40 个循环,上述 PCR 产物进行 95 $^{\circ}$ C 1 min,降至 55 $^{\circ}$ C,在 55~95 $^{\circ}$ C 之间梯度升温,0.2 $^{\circ}$ C/s,绘制溶解曲线。PCR 结果以 GAPDH 为内参进行半定量计算,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 算法(ΔCT =样本 CT 值-内参 CT 值)对目的基因的相对表达量进行数据分析。

1.4 数据处理与统计学分析

采用 SPSS 11.0 软件进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,相关阈值测定的数据用 Two-way ANOVA 及 Dunnett-t 后检验进行统计分析。组间差异比较采用单因素方差分析,方差齐者组间比较用 LSD 检验,方差不齐者用 Tamhane's T2 检验, $P < 0.05$ 为统计学上具有显著性差异。

2 结果

2.1 冷、热刺激疼痛敏感阈值

膝骨关节炎大鼠的冷缩足潜伏期显著短于空白对照组大鼠,并且这种情况一直持续到造模后第 8 周的末次观察。造模后 2 周应用选择性 TRPA1、TRPM8 拮抗剂能够显著延长 KOA 大鼠的冷缩足潜伏期,但对比空白对照组仍有降低趋势。而膝骨关节炎大鼠的热刺激缩足阈值对比空白组大鼠并无显著差异,且其波动趋势也未受到拮抗剂应用的影响。提示经改良 Hulth 法造模后的经典 KOA 大鼠模型,其疼痛阈值改变具有冷刺激疼痛敏感的趋势。



图 1 各组冷、热刺激缩足反应时间阈值

引物设计:采用 Oligo v6.6 软件,根据 GenBank 中的基因序列设计引物并交由上海生物工程技术服务有限公司合成;目的基因 TRPA1、TRPM8 及内参照基因 GAPDH 序列见表 1。

2.2 HE 染色结果

KOA 模型组:软骨表面缺损,部分区域软骨全层缺损,较多裂隙形成,向下延伸达辐射层,分层不清晰,结构不规则,潮线破坏,钙化层明显增厚。空白对照组:软骨表面平滑整齐,无裂隙或缺损,软骨细胞整齐排列,4 层结构分层规则,染色分布均匀、潮线清晰完整,如图 2。Mankin's 评分结果如表 2。

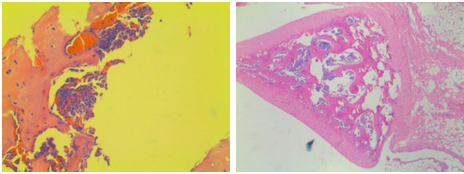


图 2 2 组大鼠膝关节软骨光镜图(HE, $\times 400$)

表 2 软骨 Mankin 评分($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Mankin's 评分
正常组	15	4.7 $\pm$ 0.95
KOA 模型组	15	0.5 $\pm$ 0.71 *

注:与正常组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 组织免疫荧光实验

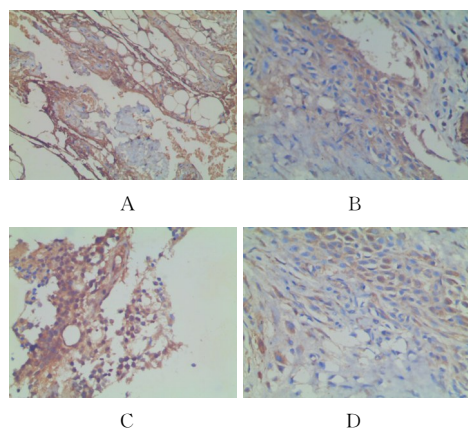
KOA 模型组大鼠的滑膜组织存在明显炎性浸润。TRPA1 和 TRPM8 免疫反应阳性着色细胞在所有活检标本中均可见到,其中 KOA 模型组大鼠滑膜组织的 TRPA1 和 TRPM8 表达较空白对照组明显丰富。见图 3。

2.4 Western blot 实验

KOA 模型组大鼠患膝滑膜组织 TRPA1 和 TRPM8 蛋白表达量均高于空白对照组($P < 0.05$)。见图 4。

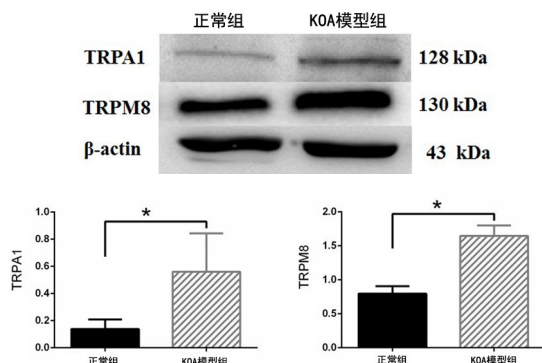
2.5 Real-time PCR 实验

KOA 模型组大鼠滑膜组织中 TRPA1 和 TRPM8 的 mRNA 表达量均显著高于空白对照组($P < 0.05$)。见图 5。



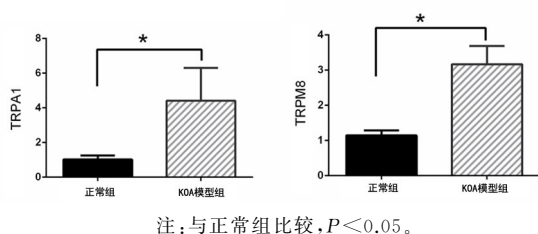
注:A.正常组大鼠膝关节滑膜组织 TRPA1 免疫荧光检测;
B.KOA 组大鼠患侧膝关节滑膜组织 TRPA1 免疫荧光检测;
C.正常组大鼠膝关节滑膜组织 TRPM8 免疫荧光检测;
D.KOA 组大鼠患侧膝关节滑膜组织 TRPM8 免疫荧光检测。

图 3 各组大鼠免疫荧光检测



注:与正常组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 各组大鼠膝关节滑膜组织 TRPA1、TRPM8 的蛋白表达量对比



注:与正常组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 各组大鼠膝关节滑膜组织 TRPA1、TRPM8 mRNA 表达量对比

3 讨论

既往 KOA 疼痛的研究主要集中在滑膜炎症、骨质破坏性疼痛、骨髓内血管神经暴露导致疼痛等方面,对痛敏状态的关注相对较少^[12-13]。KOA 存在痛阈下降在临床已经获得部分证实,但机制不清楚。根据外周伤害性感受器的不同激活条件,可分为温度痛敏(冷痛敏、热痛敏)、机械痛敏等。KOA 疼痛“遇寒则剧、得温则舒”,具有典型的冷刺激痛敏特点。这也被认为是中医学对 KOA 证属“虚寒痹

痛”的认识基础。

瞬时感受器电位通道(Transient receptor potential, TRP)是位于细胞膜上的非选择性阳离子通道,对 Ca^{2+} 具有高通透性。TRP 离子通道既是兴奋性(神经和肌肉)细胞的电压门控或依赖性 Ca^{2+} 通道,又是非兴奋性(上皮、内皮、黏膜、骨与软骨和滑膜等)细胞的非电压门控或依赖性 Ca^{2+} 通道,可将温度、机械、化学等多种刺激转化、整合,形成信号传导,响应细胞和机体周围环境中温度、触压、渗透压等多种刺激,是感觉系统的前沿哨兵^[14-15]。介导温度痛敏的 TRP 离子通道被称作 thermoTRP,生理状态下的主要功能是参与机体温度感知和体温调节,病理状态下则可介导温度刺激所致痛敏,其中 TRPA1 和 TRPM8 是主要感受冷刺激痛敏的成员^[16]。

既往对 TRPA1 和 TRPM8 的研究揭示,①TRPA1 除对冷刺激敏感外,同时参与炎症反应,是炎症中的“增效剂”,是炎症疼痛发生的重要参与者^[17-18]。②冷刺激激活 TRPM8 是一种从去极化电位到生理负电位阶梯分明的电压敏感性的渐进性改变,通道开放比关闭具有更低的温度依赖性,且冷刺激引起通道开放的过程迅速且具类似瀑布样效应^[19-20]。③炎症环境能对 TRP 离子通道的敏感性产生影响;如低渗透压导致细胞肿胀产生 5',6'-EET (Eicosanoid 5',6'-epoxyeicosatrienoic acid)直接激活 TRPV1、TRPM8、TRPV4 等 TRP 蛋白超家族成员,前列腺素 E_2 (PGE_2)能显著增强这一过程,这可以部分解释 NSAIDs 类药物也能一定程度拮抗 KOA 冷痛敏^[21]。④近年来在骨科慢性疼痛的研究中,TRP 离子通道的作用也逐步受到关注。首先是 TRPV1 被发现在 KOA 关节滑膜的成纤维细胞中呈高表达状态,随后又证实 TRPV1、TRPA1、TRPM8、TRPV4 等通道蛋白的表达及开放水平与 KOA 疼痛存在关联^[22-23]。

本研究在既往研究的基础上,观察到模型组大鼠在 KOA 造模后 2 周,出现冷刺激痛敏。主要表现为冷缩足潜伏期缩短,并持续 4 周以上。改良 Hult 法的大鼠 KOA 模型存在典型的疼痛敏感现象在既往研究中也见诸报道。我们也在研究中确认了其存在冷刺激疼痛阈值的降低,契合中医学对虚寒性疼痛的症状特征描述^[24-26]。应用 TRPA1 和 TRPM8 抑制剂能显著改善大鼠的冷刺激痛敏症状。研究中所观察到 KOA 大鼠的冷缩足潜伏期均

低于造模前和空白对照组,而经应用 TRPA1 和 TRPM8 抑制剂的 KOA 大鼠冷缩足潜伏期能够相应获得提高。进一步应用免疫组织化学的方法,观察到 KOA 大鼠患膝滑膜组织 TRPA1、TRPM8 蛋白表达增加。以免疫荧光法检测滑膜组织 TRPA1 和 TRPM8 表达水平的研究也得出类似结论。Realtime-PCR 检测 TRPA1、TRPM8 基因量,与前述结果也是相符合的。

我们的研究表明:TRPA1、TRPM8 离子通道表达的上调,参与构建了 KOA 冷刺激痛觉敏感。下一步研究将根据大鼠行为学检测设立样本取材时间点,以检测 TRPA1、TRPM8 水平,进一步明确 TRPA1、TRPM8 量与变化趋势之间的联系。

参考文献:

- [1] JOHNSON VL, HUNTER DJ. The epidemiology of osteoarthritis[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2014, 28(1): 5-15.
- [2] 顾明士, 张申岳, 王萍, 等. 中老年人膝关节炎患病趋势十年前后对照分析[J]. 上海医药, 2013, 34(4): 57-59.
GU MS, ZHANG SY, WANG P, et al. Comparative analysis of the trend of the knee osteoarthritis prevalence of the community middle-aged people before and after ten years[J]. Shanghai Med Pharm J, 2013, 34(4): 57-59.
- [3] BROWN GA. AAOS clinical practice guideline: treatment of osteoarthritis of the knee: evidence-based guideline, 2nd edition [J]. J Am Acad Orthop Surg, 2013, 21(9): 577-579.
- [4] 中华医学会骨科学分会. 骨关节炎诊治指南(2007年版)[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2007, 1(4): 281-285.
Chinese Orthopaedic Association. Guide of diagnosis and treatment of osteoarthritis(2007 edition)[J]. Chin J Joint Surg(Electr Ver), 2007, 1(4): 281-285.
- [5] HAUKE L. Treatment of knee osteoarthritis: a clinical practice guideline from the AAOS[J]. Am Fam Physician, 2014, 89(11): 918-920.
- [6] NEOGI T. The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(9): 1145-1153.
- [7] PASSMORE P, CUNNINGHAM E. Managing osteoarthritis pain in the older population[J]. J Pain Palliat Care Pharmacother, 2013, 27(3): 292-295.
- [8] FILATOVA ES, TUROVSKAIA EF, ALEKSEEVA LI, et al. Neurogenic mechanisms of chronic joint pain[J]. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova, 2013, 113(12): 45-49.
- [9] RAKEL B, VANCE C, ZIMMERMAN MB, et al. Mechanical hyperalgesia and reduced quality of life occur in people with mild knee osteoarthritis pain[J]. Clin J Pain, 2015, 31(4): 315-322.
- [10] ROGART JN, BARRACH HJ, CHICHESTER CO. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 1999, 7(6): 539-547.
- [11] VAN DER SLUIJS JA, GEESINK RG, VAN DER LINDEN AJ, et al. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis [J]. J Orthop Res, 1992, 10(1): 58-61.
- [12] KUNI B, WANG H, RICKERT M, et al. Pain threshold correlates with functional scores in osteoarthritis patients[J]. Acta Orthop, 2015, 86(2): 215-219.
- [13] FILARDO G, KON E, LONGO UG, et al. Non-surgical treatments for the management of early osteoarthritis[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2016, 24(6): 1775-1785.
- [14] JULIUS D. TRP channels and pain[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2013, 29: 355-384.
- [15] BREDERSON JD, KYM PR, SZALLASI A. Targeting TRP channels for pain relief[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 716(1-3): 61-76.
- [16] NOZADZE I, TSIKLARI N, GURTSKAIA G, et al. Role of thermo TRPA1 and TRPV1 channels in heat, cold, and mechanical nociception of rats[J]. Behav Pharmacol, 2016, 27(1): 29-36.
- [17] YAMAMOTO K, CHIBA N, CHIBA T, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 that is induced in dorsal root ganglion neurons contributes to acute cold hypersensitivity after oxaliplatin administration[J]. Mol Pain, 2015, 11(1): 69.
- [18] HORVATH A, TEKUS V, BOROS M et al. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: in vivo study using TRPA1-deficient mice[J]. Arthritis Res Ther, 2016, 18: 6.
- [19] PROUDFOOT CJ, GARRY EM, COTTRELL DF, et al. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain[J]. Curr Biol, 2006, 16(16): 1591-1605.
- [20] PATEL R, GONCALVES L, NEWMAN R, et al. Novel TRPM8 antagonist attenuates cold hypersensitivity after peripheral nerve injury in rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2014, 349(1): 47-55.
- [21] FERNANDEZ JA, SKRYMA R, BIDAUX G, et al. Voltage- and cold-dependent gating of single TRPM8 ion channels[J]. J Gen Physiol, 2011, 137(2): 173-195.
- [22] CLARK AL, VOTTA BJ, KUMAR S, et al. Chondroprotective role of the osmotically sensitive ion channel transient receptor potential vanilloid 4: age- and sex-dependent progression of osteoarthritis in Trpv4-deficient mice[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(10): 2973-2983.
- [23] ENGLER A, AESCHLIMANN A, SIMMEN BR, et al. Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 359(4): 884-888.
- [24] 隋峰, 戴丽, 李倩, 等. TRPV1 通道介导的热生成是辛热(温)中药药性表征的重要模式[J]. 药理学报, 2015, 50(7): 836-841.
SUI F, DAI L, LI Q, et al. TRPV1 channel-mediated thermogenesis is a common mode for the Chinese pungent-hot or pungent-warm herbs to demonstrate their natures[J]. Acta Pharm Sin, 2015, 50(7): 836-841.
- [25] MEENTS JE, HOFFMANN J, CHAPLAN SR, et al. Two TRPV1 receptor antagonists are effective in two different experimental models of migraine[J]. J Headache Pain, 2015, 16(1): 57.
- [26] NOZADZE I, TSIKLARI N, GURTSKAIA G, et al. NSAIDs attenuate hyperalgesia induced by TRP channel activation[J]. Data Brief, 2016, 6: 668-673.

(编辑:杨巍敏)