

研究论文

TRPV1受体基因敲除雌性小鼠背根神经节P2X3受体表达升高

方潇^{1,**}, 时霄寒^{1,**}, 黄丽斌^{1,**}, 戎伟芳², 马蓓^{1,*}

¹中国人民解放军第二军医大学生理学教研室, 上海 200433; ²上海交通大学医学院生理学教研室, 上海 200025

摘要: 本文旨在考察瞬时受体电位香草酸亚型1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1受体)基因敲除后小鼠慢性炎症条件下机械痛阈的改变。通过足底注射给予完全弗氏佐剂(20 μ L)介导雌性小鼠慢性炎症痛的形成, 利用弗莱毛测痛法测量TRPV1受体基因敲除型及野生型雌性小鼠在给药前1天和给药后8天内的机械痛阈。给药后第9天处死小鼠, 利用蛋白质免疫印迹技术研究两组小鼠脊髓背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)和脊髓背角中c-Fos蛋白和P2X3受体表达的差别。结果显示, 与野生型小鼠相比, TRPV1受体基因敲除型小鼠基础机械痛阈明显增高($P < 0.05$); 足底注射CFA后第3天起, TRPV1受体基因敲除型小鼠机械痛阈高于野生型小鼠($P < 0.05$); 蛋白质免疫印迹结果表明TRPV1受体基因敲除型小鼠DRG和脊髓背角中c-Fos蛋白的表达明显低于野生型小鼠($P < 0.01$, $P < 0.05$), TRPV1受体基因敲除型小鼠DRG中P2X3受体的表达明显高于野生型小鼠($P < 0.05$)。以上结果证明TRPV1受体可能通过调节DRG和背角中的c-Fos蛋白的表达以及影响P2X3受体在DRG中的表达从而影响外周机械痛阈。

关键词: TRPV1阳离子通道; P2X3受体; 基因敲除小鼠; 背根神经节; c-Fos蛋白; 痛阈

中图分类号: R338.3

Upregulation of P2X3 receptors in dorsal root ganglion of TRPV1 knockout female mice

FANG Xiao^{1,**}, SHI Xiao-Han^{1,**}, HUANG Li-Bin^{1,**}, RONG Wei-Fang², MA Bei^{1,*}

¹Department of Physiology, Secondary Military Medical University, Shanghai 200433, China; ²Department of Physiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Abstract: The study was aimed to investigate the changes in mechanical pain threshold in the condition of chronic inflammatory pain after transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) gene was knockout. Hind-paw intraplantar injection of complete freund's adjuvant (CFA, 20 μ L) produced peripheral inflammation in wild-type and TRPV1 knockout female mice. The mechanical pain thresholds were measured during the 8 days after injection and pre-injection by using Von-Frey hair. Nine days after injection, mice were killed and the differences of expression of c-Fos and P2X3 receptor in the dorsal root ganglia (DRG) and spinal cord dorsal horn were examined by Western blotting between the two groups. Compared with that in wild-type mice, the mechanical pain threshold was increased significantly in TRPV1 knockout mice ($P < 0.05$); 3 days after CFA injection, the baseline mechanical pain threshold in the TRPV1 knockout mice group was significantly higher than that in the wild-type mice group ($P < 0.05$); The result of Western blotting showed that the expression of c-Fos protein both in DRG and spinal cord dorsal horn of TRPV1 knockout mice group was decreased significantly compared with that in wild-type mice group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), while the expression of P2X3 receptor in DRG of TRPV1 knockout mice group was increased significantly compared with that in wild-type mice group ($P < 0.05$). Our findings indicate that TRPV1 may influence the peripheral mechanical pain threshold by mediating the expression of c-Fos protein both in DRG and spinal cord dorsal horn and changing the expression of P2X3 receptor in DRG.

Key words: TRPV1 cation channels; P2X3 receptor; knockout mice; spinal ganglia; c-Fos protein; pain threshold

Received 2013-11-30 Accepted 2014-05-04

This work was supported by the Project of Undergraduate Students Creative Fund of the Secondary Military Medical University, China (No. ZD2012030).

^{**}These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Tel: +86-21-81870979; Fax: +86-21-81870979; E-mail: mabei08@aliyun.com

疼痛与人们的生活息息相关,它无时无刻不在影响着人们日常生活的质量。然而对病人疼痛的治疗仍是临床上难以解决的问题。目前对于疼痛传递机制研究的不断深入,许多参与痛觉传导的特异性受体被相继发现,其中瞬时受体电位香草酸亚型 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1 受体) 和 P2X3 受体在痛觉传导中发挥着重要作用^[1]。

TRPV1 受体是 TRP 超家族的成员之一,是一种非选择性的阳离子通道。TRPV1 受体广泛分布于伤害性感受器上,譬如,其可高表达于背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 的小、中神经元以及背根神经节的感觉神经细胞中,在伤害性感受的转导中起重要作用。TRPV1 受体可被热、酸和辣椒素激活,在热和炎性痛的信号转导和传递中发挥重要作用^[2,3]。此外,TRPV1 受体在内脏痛、偏头痛和癌症疼痛形成中也发挥重要的作用^[4-6]。由于 TRPV1 受体在伤害性感受中有重要作用,对于其生理和病理研究具有十分重要的意义。

P2X3 受体克隆自感觉神经细胞的 cDNA,并被发现主要表达在小、中感觉神经细胞上,可被 ATP 所激活,是一种配体门控离子型受体。目前的动物实验表明,P2X3 受体基因敲除之后,小鼠的痛觉发生明显的改变^[7],这说明 P2X3 在痛觉信号的产生和传导过程中起到重要作用。

原癌基因 *c-fos* 被刺激后能够快速在脊髓背角部分神经元兴奋表达,产生 c-Fos 蛋白,故 c-Fos 蛋白的表达常被认为是中枢神经细胞兴奋的标志物^[8],近年来被广泛用于研究痛觉的产生或调节机制,尤其是脊髓水平的伤害性信息在中枢的传递以及调控等方面的研究。采用免疫印迹法观察脊髓背角 c-Fos 蛋白的表达,可以了解 TRPV1 受体基因敲除型小鼠在慢性炎症条件下行为学改变的可能机制和中枢神经系统对伤害性刺激的反应方式。

因此,我们通过建立小鼠慢性炎症痛模型,观察 TRPV1 受体基因敲除型小鼠和野生型小鼠足底皮肤痛阈的差别;并进一步分离提取 DRG 和脊髓背角进行蛋白免疫印迹实验检测 c-Fos 蛋白的表达,观察探讨 TRPV1 受体对小鼠疼痛的外周调节情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物 雌性小鼠(8~12周,C57/BL6来源,购于 GlaxoSmithKline, Harlow, UK^[9])由英国谢菲尔德大学的 David Grundy 教授赠送,分别为 TRPV1

受体基因敲除型和野生型小鼠,各 6 只。

1.2 慢性炎症痛小鼠模型的建立 对每组小鼠左后肢足底注射 20 μ L 完全弗氏佐剂来引发炎症痛觉增敏,并发展为持续性的慢性痛觉增敏,其致炎的典型标记包括注射后 1~3 d 局部出现激烈的发红、水肿、发热现象,并且持续 4 周以上。注射 24 h 后,对其进行行为学实验。给药后 8 d 内每天观察并记录两组小鼠足底肿胀厚度,以此作为炎症反应的量化指标。

1.3 行为学实验

1.3.1 热板测痛仪测痛 小鼠在室内适应 30 min 后放置于恒温热板上,热板周围有上方开放的透明有机玻璃,热板温度设定保持在 55.0 $^{\circ}$ C。以小鼠舔后足、原地跳跃、明显缩腿为反应阳性,记录反应潜伏期 (latency)。每只小鼠测试时间间隔至少 5 min,共测 5 次。

1.3.2 机械痛阈的测定 采用弗莱毛 (Von Frey Hair, 英国伦敦大学自主神经科学研究所) 测痛法。即将测试的小鼠置于特制笼中,熟悉环境 30 min 后,用弗莱毛刺激小鼠后足部,以小鼠抬起后肢为反应阳性。弗莱毛的强度分别为 1 (0.09 g)、2 (0.18 g)、3 (0.27 g)、4 (0.51 g)、5 (1.08 g)、6 (3.85 g)、7 (5.50 g)、8 (7.05 g)。由细到粗,逐个进行左足部刺激,每一强度的弗莱毛刺激左脚 10 次,记录反应率 (10 次刺激中发生缩腿反应的次数,用百分数表示),根据公式拟合出强度 - 反应率曲线,并且计算反应率为 50% 时弗莱毛的强度为 50% 机械缩足阈值 (50% paw withdrawal threshold, PWT₅₀)。拟合公式为: $Y = A/[1 + (K/X)^n]$, A 是最大反应值, K 是 PWT₅₀, nH 为拟合系数。

本实验将两组小鼠置于笼中适应 30 min 后测基础机械痛阈,完成后向小鼠左足皮下注射完全弗氏佐剂,测出给药后 8 d 内每天两组小鼠的 PWT₅₀。

1.4 蛋白免疫印迹实验检测 DRG 和脊髓背角上 c-Fos 蛋白和 P2X3 受体的表达

两组小鼠左足皮下给药后第 9 天,经断头处死后迅速取出 DRG 和脊髓背角组织,将组织块剪碎并立即放入 4 $^{\circ}$ C 裂解缓冲液中,经匀浆器匀浆后,10 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。取上清液,用紫外分光光度计确定蛋白质纯度;按所测浓度稀释样品。取适量稀释后样品加入电泳槽进行电泳,转膜,5% 脱脂奶粉封闭后,分别加入一抗 (兔抗, 1:800, Santa Cruz, CA) 4 $^{\circ}$ C 过夜;TBST 缓冲液洗脱后加入辣根过氧化物酶

标记的羊抗兔 IgG 抗体 (1:1 000, Proteintech, USA) 孵育 1 h, TBST 缓冲液室温下洗脱 3 次, 每次 10 min; ECL 发光显色。采用 β -actin 作为内参, 扫描电泳条带, 采用 UVP 软件测定蛋白目的条带的灰度值。待测蛋白含量=目的条带灰度/内参条带灰度。

1.5 统计学处理 实验数据为计量资料结果, 均为 $\text{mean} \pm \text{SEM}$, 数据分析使用 SPSS 13.0 软件, 作图采用 Origin 8。TRPV1 受体基因敲除型和野生型小鼠的基础机械痛阈和慢性炎症条件下机械痛阈值的比较中, 采用非配对 t 检验方法统计分析。在蛋白免疫印迹实验结果统计中采用非配对 t 检验方法进行统计学处理。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 TRPV1基因敲除鼠足底机械痛阈和热痛阈的变化

弗莱毛测试结果显示, TRPV1 受体基因敲除型小鼠 PWT_{50} 值为 (3.68 ± 1.86) g, 野生型小鼠 PWT_{50} 为 (1.77 ± 1.11) g, 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1A); 热板测痛法结果显示, TRPV1 受体基因敲除型小鼠足底热痛反应潜伏期为 (9.79 ± 0.60) s, 野生型小鼠足底热痛反应潜伏期为 (5.54 ± 0.27) s, 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1B)。表明 TRPV1 受体基因敲除后小鼠的基础机械痛阈和热痛阈都有明显提高。

2.2 TRPV1敲除鼠慢性炎症时足底厚度和机械痛阈的变化

慢性炎症条件下足底厚度变化结果见图 2A, TRPV1 受体基因敲除型小鼠组给药前左足厚度为

(2.44 ± 0.40) μm , 给药后第 2 天左足厚度为 (3.00 ± 0.68) μm , 左足厚度明显增加 ($P < 0.05$), 之后保持稳定。野生型小鼠组给药前左足厚度为 (2.13 ± 0.51) μm , 给药后第 2 天左足底厚度为 (3.24 ± 0.34) μm , 左足厚度明显增加 ($P < 0.01$), 之后保持稳定。但两组小鼠左足厚度间差异无显著性差异 ($P > 0.05$)。慢性炎症条件下小鼠基础机械痛阈变化结果见图 2B, 给药后第 3 天, TRPV1 受体基因敲除型小鼠组 PWT_{50} 为 (0.70 ± 0.20) g, 野生型小鼠组 PWT_{50} 为 (0.30 ± 0.10) g, 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并在之后保持稳定。可以看出, 相比野生型小鼠, TRPV1 受体基因敲除型小鼠在慢性炎症条件下机械痛阈明显较高。

2.3 TRPV1敲除鼠慢性炎症时DRG和脊髓背角中c-Fos蛋白表达降低

蛋白免疫印迹实验表明, TRPV1 受体基因敲除型小鼠组 DRG 上 c-Fos 蛋白的表达显著低于野生型小鼠组, 两组间差异具有统计学意义 (图 3A, $P < 0.01$)。TRPV1 受体基因敲除型小鼠组在脊髓背角上 c-Fos 蛋白的表达也明显低于野生型小鼠组, 两组间差异具有统计学意义 (图 3B, $P < 0.05$)。

2.4 TRPV1敲除鼠慢性炎症时DRG中P2X3受体表达升高

蛋白免疫印迹实验表明, TRPV1 受体基因敲除型小鼠组 DRG 上 P2X3 受体的表达显著高于野生型小鼠组, 两组间差异具有统计学意义 (图 4A, $P < 0.05$)。而 TRPV1 受体敲除小鼠组脊髓背角中 P2X3 受体的表达与野生型小鼠相比无明显差别 (图 4B, $P > 0.05$)。

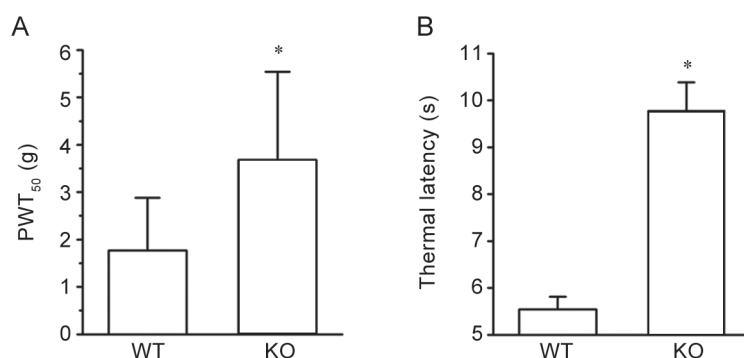


图 1. 生理条件下小鼠足底机械痛阈和热痛阈的比较

Fig. 1. Comparison of paw withdrawal threshold (PWT) and thermal latency between wild-type (WT) and TRPV1 knockout (KO) female mice. A: Von-Frey hair force-response comparison between WT and KO female mice. PWT_{50} , 50% paw withdrawal threshold. B: Thermal latency comparison between WT and KO female mice. Mean $\pm$ SEM, $n = 6$ for each group, * $P < 0.05$ vs WT.

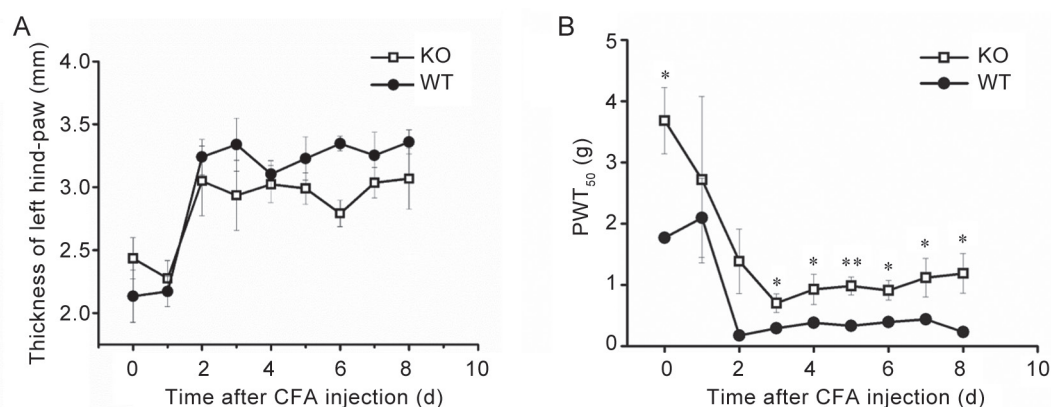


图 2. 左后足注射完全弗氏佐剂后小鼠左后足厚度和左后足机械痛阈改变的比较

Fig. 2. Changes in the thickness of left hind-paw and paw withdrawal threshold (PWT) in wild-type (WT) and TRPV1 knockout (KO) female mice after injection of complete Freund's adjuvant (CFA) in the left hind-paw. *A*: Two days after injection of CFA, the thickness of the left hind-paw in both the WT and KO groups was increased significantly compared with that of pre-injection (Mean $\pm$ SEM, $n = 6$ for each group, $P < 0.01$, $P < 0.05$), while there was no difference between the two groups. *B*: PWT of both the WT and KO groups were significantly decreased compared with that of pre-injection (Mean $\pm$ SEM, $n = 6$ for each group, $P < 0.05$, $P < 0.05$). And 3 days after CFA injection, the PWT in the KO group was significantly higher than that in the WT group (Mean $\pm$ SEM, $n = 6$ for each group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs WT), which was maintained during at least the next 5 days. PWT₅₀, 50% paw withdrawal threshold.

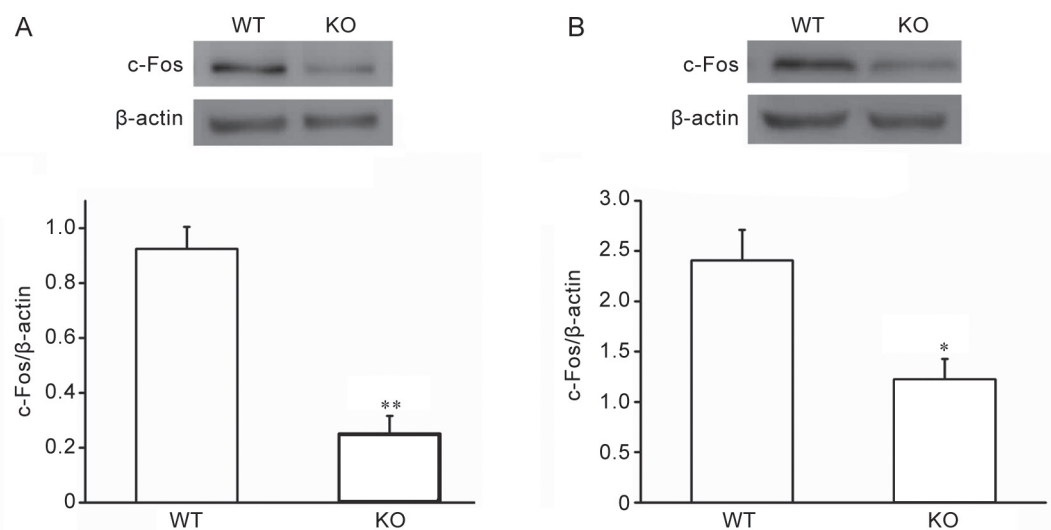


图 3. 免疫印迹半定量分析慢性炎症条件下DRG和脊髓背角中c-Fos蛋白表达的水平

Fig. 3. Western blotting analysis showing the c-Fos protein changed in the DRG and the spinal cord dorsal horn from CFA mice. *A*: In CFA-induced chronic inflammatory pain models, the expression of c-Fos protein in the DRG of TRPV1 knockout mice (KO) group was decreased significantly compared with that in wild-type mice (WT) group (Mean $\pm$ SEM, $n = 6$ for each group, $^{**}P < 0.01$ vs WT). *B*: The expression of c-Fos protein in the spinal cord dorsal horn of KO group was decreased significantly compared with that in WT group (Mean $\pm$ SEM, $n = 6$ for each group, $^*P < 0.05$ vs WT).

3 讨论

辣椒素敏感型受体 TRPV1 受体在慢性痛治疗的研究中发挥着越来越重要的作用, 其广泛表达于神经系统, 特别是 DRG 伤害性感受神经元和脊髓背角初级传入末梢上^[10]。利用辣椒素刺激皮肤可产

生温感、烧灼感、及疼痛感, TRPV1 受体在此发挥着重要作用^[11]。TRPV1 受体作为非选择性阳离子通道, 受各种刺激激活后引起 Ca^{2+} 内流, 有助于引发动作电位, 传导疼痛。这是伤害性感受信息形成和传递的第一步^[12]。既往实验表明, 敲除小鼠的

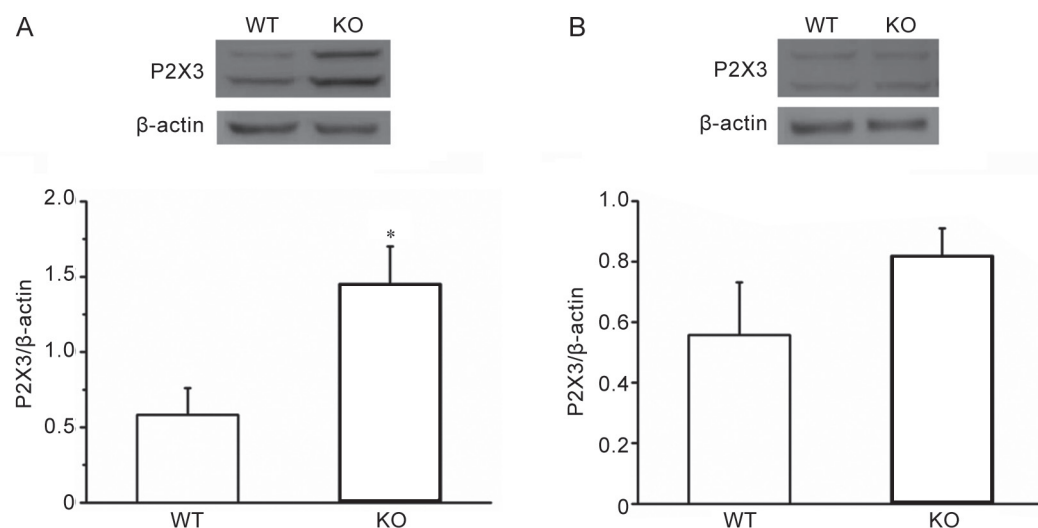


图 4. 免疫印迹半定量分析慢性炎症条件下DRG和脊髓背角中P2X3受体表达的水平

Fig. 4. Western blotting analysis showing the P2X3 receptor changed in the DRG and the spinal cord dorsal horn from CFA mice. A: In CFA-induced chronic inflammatory pain models, the expression of P2X3 receptor in the DRG of TRPV1 knockout mice (KO) group was increased significantly compared with that in wild-type mice (WT) group (Mean $\pm$ SEM, $n = 6$ for each group, $^*P < 0.05$ vs WT). B: The expression of P2X3 receptor in the spinal cord dorsal horn of KO and WT groups. There was no significant difference between two groups (Mean $\pm$ SEM, $n = 6$ for each group, $P > 0.05$).

TRPV1 受体, 会减少疼痛信号的传导, 动物在行为学上可表现为从接受刺激到出现疼痛反应的潜伏期延长 (与野生型相比)^[13]。之前的动物实验显示, TRPV1 受体基因敲除型动物对伤害性或非伤害性机械刺激在行为学上表现与野生型动物的应答无明显差异^[10]。但我们实验中利用弗莱毛测痛法和热板测痛仪进行行为学检测, 结果显示 TRPV1 敲除鼠足底机械痛阈和热痛阈较野生型均显著增高, 提示该小鼠痛觉敏感性下降。

近年研究表明, TRPV1 通道不仅在痛觉的产生, 而且在痛觉敏感性增强的病理发生过程中也扮演着重要角色。在临床上观察到人皮肤受热损伤后对热和机械刺激产生痛觉增敏。Bölcskei 等将蛋白激酶 C (PKC) 的激活剂——佛波醇-肉豆蔻酸酯-13-醋酸盐 (PMA) 注入小鼠脚掌内致炎后, 小鼠产生的痛觉防御行为明显增强; 而 TRPV1 基因敲除后, 小鼠的痛觉防御行为消失^[14]。本实验研究结果表明, 相比野生型小鼠, 在 TRPV1 受体基因敲除型小鼠足底皮下注射完全弗氏佐剂建立慢性炎症痛模型后, 该小鼠的足底机械痛阈依然高于野生型小鼠。这些结果进一步证实, TRPV1 受体也参与了炎症条件下痛觉信号的传导过程。

有研究表明, 缺失 TRPV1 受体的小鼠在局部

致炎 (后足注射芥子油) 后, 后足底机械痛阈相比野生型小鼠明显提高^[15]; 在神经源性疼痛的模型大鼠, 发现 TRPV1 拮抗剂可减弱其机械痛觉过敏^[13]; 另外, 反复多次对大鼠结肠给予扩张膨胀引起的机械性结肠痛觉过敏, 可被 TRPV1 受体拮抗剂抑制^[16]。这些结果提示, TRPV1 受体对机械刺激的介导可能需要通过炎症介质等物质的参与, 或者说, 在炎症等病理条件情况下, TRPV1 受体介导机械刺激的信号被放大了, 故在 TRPV1 基因敲除后可观察到显著差异。

c-Fos 蛋白是原癌基因 *c-fos* 基因的表达产物, 可作为神经功能活动的代谢性指标^[17], 神经干损伤早期 c-Fos 表达增加参与冲动在轴突传导即对伤害性刺激的反应^[18]。生理情况下, c-Fos 在中枢和外周神经系统中可有基础水平的表达, 例如在 DRG 和脊髓背根神经节中, 但表达水平很低, 难以检测^[19]。但在许多伤害性刺激下都可以造成脊髓背角中 *c-fos* 基因表达的增强和 c-Fos 神经元的增多^[20-22], 其表达的强度与神经损伤程度明显相关^[22]。以往的研究表明, 伤害性刺激 (例如对小鼠用完全弗氏佐剂进行足底皮下注射所形成的慢性炎症痛) 可以诱发 *c-fos* 在中枢神经系统内表达^[17]。给予 TRPV1 激动剂辣椒素, 可伴随中枢脑干^[24,25]和脊髓背角^[26]

c-Fos 蛋白表达阳性的神经元增多。在本实验中, 蛋白免疫印迹结果表明在慢性炎症持续 8 天后, TRPV1 基因敲除鼠无论是在 DRG 还是脊髓背角中 c-Fos 蛋白的表达都有明显的降低 (相比野生型), 提示 c-Fos 蛋白参与 TRPV1 受体介导的痛觉信号传导通路, 可能是痛觉信号传入途径中的重要信号分子。

P2X3 受体被发现高选择性地表达于处理伤害性信息的小直径感觉神经元上, 在 DRG 中含量较高^[27]。在一些急、慢性疼痛模型中, 如慢性前列腺炎, 坐骨神经慢性压迫性损伤, 实验性大鼠正畸牙移动和皮下注射福尔马林致痛等, 多个实验结果表明这些急、慢性疼痛的产生与维持均与 P2X3 受体表达上调及活性增强有关^[28]。本实验中, 蛋白免疫印迹实验结果提示 TRPV1 受体基因敲除型小鼠 DRG 中 P2X3 受体含量明显升高, 而在脊髓背角中两组无明显差别。早期国外研究显示 P2X3 受体同时高度表达在 TRPV1 受体敏感的细胞上, 且许多 P2X3 受体阳性表达细胞同时表达 TRPV1 受体, 提示二者存在功能上的相互作用^[1]。本实验结果显示 TRPV1 受体敲除后, DRG 中 P2X3 受体表达含量上升, 说明 TRPV1 受体与 P2X3 受体介导的痛觉传导通路是相互联系的, 且更大的可能性是相互拮抗, 即当 TRPV1 受体表达量下降会促进 P2X3 受体表达增高, 其可能包括神经元 P2X3 受体表达的增加或 / 和表达 P2X3 受体阳性的神经元数目的上调。鉴于 TRPV1 基因敲除鼠 DRG 中 c-Fos 蛋白的表达明显降低, 提示 P2X3 受体表达的增高可能与 c-Fos 蛋白表达下降有关, 其具体机制尚待进一步研究明确。以往的报道中 P2X3 受体表达上调参与痛觉敏感化过程^[7], 但本实验中 TRPV1 受体基因敲除鼠背根神经节 P2X3 受体表达上调, 行为学上却表现为痛觉钝化, 说明外周 P2X3 受体表达上调未能弥补整体 TRPV1 受体缺失, 因而行为上仍表现为痛觉钝化。

综上所述, 本实验结果表明, TRPV1 受体介导机械刺激引发的痛觉信号传导通路和完全弗氏佐剂致炎条件下引发的痛觉信号传导通路; TRPV1 受体基因敲除鼠在慢性炎症条件下 DRG 和脊髓背角中 c-Fos 蛋白表达明显下降, 提示 c-Fos 参与了 TRPV1 受体介导的痛觉信号传导。此外, TRPV1 受体敲除后 DRG 中的 P2X3 受体含量相应上升, 提示 TRPV1 受体对 P2X3 受体存在功能上的抑制作用。

TRPV1 受体与 P2X3 受体均为外周初级感觉传入通路上的痛觉相关受体, 因此, 进一步研究 TRPV1 受体与 P2X3 受体之间的相互作用及其具体机制, 对研发新的药物作用靶点、开发临床新的镇痛药物具有十分重要的价值与意义。

参考文献

- 1 Doychin S, Maren B, Doreen M, Zoltan G, Patrizia R, Günther S, Klaus E, Michael S, Kerstin W, Peter I. Cross-inhibition between native and recombinant TRPV1 and P2X3 receptors. *Pain* 2009; 43: 26–36.
- 2 Chu KL, Chandran P, Joshi SK, Jarvis MF, Kym PR, McGaughy S. TRPV1-related modulation of spinal neuronal activity and behavior in a rat model of osteoarthritic pain. *Brain Res* 2011; 1369: 158–166.
- 3 Biró T, Tóth BI, Marincsák R, Dobrosi N, Géczy T, Paus R. TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772: 1004–1021.
- 4 Geppetti P, Materazzi S, Nicoletti P. The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 207–214.
- 5 Winston J, Shenoy M, Medley D, Naniwadekar A, Pasricha PJ. The vanilloid receptor initiates and maintains colonic hypersensitivity induced by neonatal colon irritation in rats. *Gastroenterology* 2007; 132(2): 615–627.
- 6 Chan CL, Facer P, Davis JB, Smith GD, Egerton J, Bountra C, Williams NS, Anand P. Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and faecal urgency. *Lancet* 2003; 361(9355): 385–391.
- 7 North RA. P2X3 receptors and peripheral pain mechanisms. *J Physiol* 2004; 554(Pt 2): 301–308.
- 8 Li JX (李景学). X-ray Diagnostics of Bone and Joint. Beijing: People's Medical Publishing House (人民卫生出版社) 2002; 169–170 (Chinese).
- 9 Rong W, Hillsley K, Davis JB, Hicks G, Winchester WJ, Grundy D. Jejunal afferent nerve sensitivity in wild-type and TRPV1 knockout mice. *J Physiol* 2004; 560: 867–881.
- 10 Immke DC, Gavva NR. The TRPV1 receptor and nociception. *Semin Cell Dev Biol* 2006; 17: 582–591.
- 11 Stfänder S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol* 2004; 13: 129–139.
- 12 Jia Y (贾岳), Hong YG. Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inflammatory pain. *Chin Bull Life Sci (生命科学)* 2010; 22: 1259–1263 (Chinese, English abstract).

- 13 Christoph T, Bahrenberg G, Vry JD, Englberger W, Erdmann VA, Frech M. Investigation of TRPV1 loss of function phenotypes in transgenic shRNA expressing and knockout mice. *Mol Cell Neurosci* 2008; 37: 579–589.
- 14 Bölcskei K, Helyes Z, Szabó A, Sándor K, Elekes K, Németh J, Almási R, Pintér E, Petho G, Szolcsányi J. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 2005; 117: 368–376.
- 15 Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000; 288: 306–313.
- 16 Ravnefjord A, Brusberg M, Kang DW, Bauer U, Larsson H, Lindström E. Involvement of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in the development of acute visceral hyperalgesia during colorectal distension in rats. *Eur J Pharmacol* 2009; 611: 85–91.
- 17 Da cosata AP, Broad KD, Kenduck KM. Olfactory memory and maternal behaviour-induced changes in c-fos and zif/268 mRNA expression in the sheep brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 46: 63–76.
- 18 Narita M, Ozaki S, Narita M, Ise Y, Yajima Y, Suzuki T. Change in the expression of c-Fos in the rat brain following sciatic nerve ligation. *Neurosci Lett* 2003; 352(3): 231–233.
- 19 Liu XJ (刘晓军), Lei MF. The research progress of immediate early genes c-fos and nervous system disease. *J Tianjin Med Univ (天津医科大学学报)* 2011; 17(1): 137–139 (Chinese).
- 20 Lao L, Zhang RX, Zhang G, Wang X, Berman BM, Ren K. A parametric study of electroacupuncture on persistent hyperalgesia and Fos protein expression in rats. *Brain Res* 2004; 1020: 18–29.
- 21 Tsai YC, So EC, Chen HH, Wang LK, Chien CH. Effect of intrathecal octreotide on thermal hyperalgesia and evoked spinal c-Fos expression in rats with sciatic constriction injury. *Pain* 2002; 99: 407–413.
- 22 Williams S, Evan GI, Hunt SP. c-Fos induction in the spinal cord after peripheral nerve lesion. *Eur J Neurosci* 1991; 3: 887–894.
- 23 Yi DK, Barr GA. The induction of fos-like immunoreactivity by noxious thermal, mechanical and chemical stimuli in the lumbar spinal cord of infant rats. *Pain* 1995; 60: 257–265.
- 24 Plevkova J, Poliacsek I, Antosiewicz J, Adamkov M, Jakus J, Svirlochova K, Tatar M. Intranasal TRPV1 agonist capsaicin challenge and its effect on c-Fos expression in the guinea pig brainstem. *Respir Physiol Neurobiol* 2010; 173 (1): 11–15.
- 25 Chang Z, Okamoto K, Tashiro A, Bereiter DA. Ultraviolet irradiation of the eye and Fos-positive neurons induced in trigeminal brainstem after intravitreal or ocular surface transient receptor potential vanilloid 1 activation. *Neuroscience* 2010; 170(2): 678–685.
- 26 Trevisan G, Rossato MF, Hoffmeister C, Oliveira S M, Silva CR, Matheus F C, Mello GC, Antunes E, Prediger RD, Ferreira J. Mechanisms involved in abdominal nociception induced by either TRPV1 or TRPA1 stimulation of rat peritoneum. *Eur J Pharmacol* 2013; 714(1–3): 332–344.
- 27 Johansen TE. Understanding chronic pelvic pain syndrome. *Curr Opin Urol* 2002; 12(1): 63–67.
- 28 Pennefather JN, Lau WA, Mitchelson F, Ventura S. The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies. *J Auton Pharmacol* 2000; 20(4): 193–206.