

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.12.004

人參皂甙 Rd 通过调节 SNI 大鼠背根神经节钠、钾电流抑制痛敏*

杨 菲^{1#} 张统一^{2#} 白录军² 徐春华² 方相春^{3△}

(1 第四军医大学唐都医院疼痛生物医学研究所 陕西 西安 710038 ;2 兰州军区临潼疗养院第二疗养区 陕西 西安 710600;

3 第四军医大学人体解剖与组织胚胎学教研室暨梁詠琨脑研究中心 陕西 西安 710032)

摘要 目的:观察人參皂甙 Rd(ginsenoside Rd)对大鼠坐骨神经分支选择性损伤(spared sciatic nerve injury, SNI)引起的痛敏的影响及其作用机制。**方法:**坐骨神经分支选择性损伤术后 7 天,观察腹腔注射不同浓度人參皂甙 Rd 后大鼠后足的机械性缩足反应阈值(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT)的变化;在术后 7 天,急性分离并取出大鼠腰 4 和腰 5 段背根节,对整节 DRG 上的中小型神经元运用全细胞膜片钳技术进行记录。**结果:**坐骨神经分支选择性损伤术后 7 天,大鼠出现明显的机械性痛敏,腹腔注射 5 mg/ml 和 10 mg/ml 的人參皂甙 Rd 能剂量依赖性的翻转大鼠机械性痛敏;坐骨神经分支选择性损伤能明显地增大 SNI 大鼠 DRG 中小型神经元上的钠电流以及减小电压依赖性钾电流,而 100 μ M 人參皂甙 Rd 能有效翻转该钠、钾电流的变化。**结论:**人參皂甙 Rd 能有效地改善坐骨神经分支选择性损伤引起的机械性痛敏,其机制可能与入參皂甙 Rd 明显地调节 SNI 大鼠 DRG 中小型神经元上的电压依赖性钠、钾电流有关。

关键词:人參皂甙 Rd;机械性痛敏;钠电流;钾电流

中图分类号:Q95-3, Q424, R285.5, R338 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)12-2214-05

Ginsenoside Rd Inhibits Mechanical Pain Hypersensitivity Through Modulating the Voltage-gated Sodium and Potassium Current in DRG Neurons in Rats of Spared Sciatic Nerve Injury*

YANG Fei[#], ZHANG Tong-yi[#], BAI Lu-jun², XU Chun-hua², FANG Xiang-chun^{3△}

(1 Institute for Biomedical Sciences of Pain, Tangdu Hospital; The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Second sanitarial district limiting sanatorium of Lanzhou military region, Xi'an, Shaanxi, 710600, China;

3 Department of Human Anatomy and K. K. Leung Brain Research Center, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the effect of ginsenoside Rd on the mechanical pain hypersensitivity in rats with spared sciatic nerve injury and probe the potential underlying mechanism. **Methods:** 7 day post SNI, the paw withdrawal mechanical threshold was measured before and after intraperitoneal administration of ginsenoside Rd in rats with mechanical pain hypersensitivity; the L4 and L5 DRG were isolated acutely, and whole-cell recording patch clamp were performed on small- and medium-sized DRG neurons. **Results:** Ginsenoside Rd could dose-dependently reduce mechanical pain hypersensitivity induced by spared sciatic nerve injury; electrophysiological recordings showed that ginsenoside Rd could decrease the voltage-gated sodium current and increase the voltage-gated potassium current in small- and medium-sized DRG neurons in rats with SNI. **Conclusions:** Ginsenoside Rd could reversed the mechanical pain hypersensitivity in rats with SNI, and the potential mechanism might relate to the modulating effect of ginsenoside Rd on the voltage-gated sodium current and the voltage-gated potassium current.

Key words: Ginsenoside Rd; Mechanical pain hypersensitivity; Sodium current; Potassium current

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q424, R285.5, R338 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)12-2214-05

前言

外周神经损伤后常常导致难以治疗的慢性神经病理性痛,主要表现为阵发性或持续性自发痛(spontaneous pain)、机械性痛敏(mechanical hyperalgesia)、热痛敏(thermal hyperalgesia)以

及异常痛敏(allodynia),严重影响病人的日常生活质量^[1-3]。背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)神经元作为躯体感觉传入的第一级神经元,在外周神经病理性痛的发生和维持中起着重要的作用。根据细胞直径的大小,背根神经节神经元可分为小型(<30 μ m)、中型(30-40 μ m)、和大型(>40 μ m)神经元,通常情

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81070899)

作者简介:杨菲(1988-),男,硕士研究生,主要研究方向:神经电生理学, E-mail: yangfei514718@hotmail.com

为共同第一作者,张统一,男,本科,主要研究方向:疼痛的诊疗

△ 通讯作者:方相春, E-mail: fangxc523@163.com

(收稿日期:2013-11-30 接受日期:2013-12-23)

况下绝大多数的中小型神经元处于“静息”状态,但在伤害性刺激下他们可被激活并产生痛信号,因此被认为是一类伤害性感受神经元(nociceptive neuron)^[4]。越来越多的研究表明在外周神经损伤后这类神经元的兴奋性异常改变并且可产生异位自发放电;而作为动作电位的重要组成部分,电压依赖性钠、钾电流的变化可能起着关键性的作用。人参皂甙 Rd(ginsenoside Rd)是人参的主要药理活性成分,新近研究表明人参皂甙 Rd 具有较好的镇痛效应,然而其具体作用机制仍然不清。本研究拟在坐骨神经分支选择性损伤大鼠慢性神经病理性痛模型上,评价不同浓度人参皂甙 Rd 的镇痛作用,并应用全细胞膜片钳技术观察其对背根神经节中小型神经元上电压依赖性钠、钾电流的影响,探讨人参皂甙 Rd 的镇痛机理,为临床用药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

健康的成年雄性 SD 大鼠(第四军医大学实验动物中心提供),体重 180-200 g 左右,动物分笼饲养,自由饮水取食。饲养间温度维持在 22~26 °C,光照时间为 12 h/d。实验过程中尽可能地减少动物遭受的痛苦及所用动物的数量。

人参皂甙 Rd 注射液规格为每支 1 mL(10 mg / 支),广东泰禾生物药业有限公司提供;人参皂甙 Rd 注射液专用稀释液(丙二醇):规格为每支 9 mL,广东泰禾生物药业有限公司提供。行为学实验中大鼠接受等体积不同浓度的人参皂甙 Rd 注射液(分别为 1, 5, 10 mg/1 mL)腹腔注射,对照组采用等体积 1 mL 生理盐水注射;电生理实验中人参皂甙 Rd 浓度为 100 μ M,采用灌流给药。

1.2 动物模型

用 2.5% 戊巴比妥钠对大鼠进行腹腔注射(50mg/kg)麻醉后将大鼠右侧卧位固定,经备皮、消毒后,按照 Woolf 等^[5]描述的方法进行坐骨神经分支选择损伤手术。将大鼠左侧坐骨神经干的胫神经和腓总神经分支切断结扎,保留腓肠神经分支完整。用医用缝合线分层缝合肌肉及皮肤。整个手术过程严格遵守无菌操作原则。

1.3 行为学检测

用 Von Frey 纤维丝测定大鼠左侧后足的机械性缩足反应阈值(paw withdrawl mechanical threshold, PWMT):将大鼠放置在悬空的分隔好的金属笼中,笼底为金属网,使动物足部良好暴露。并将大鼠适应 30 分钟左右,消除大鼠的紧张感,使其保持安静状态。之后用不同刻度的 Von Frey 纤维丝从小刻度开始进行测试,依次递增。用纤维丝垂直地刺激大鼠的后足底,并用力使纤维丝呈 90 度角,但始终保持其顶端以点的形式接触足底。每次刺激约 6 秒,多次刺激时,同侧足时间间隔大于 30 秒,对侧足间隔大于 15 秒。若大鼠产生对刺激的逃避反应,如快速缩足,舔足等,则认为是阳性反应。每个刻度重复刺激大鼠后足 10 次,若阳性反应出现 5 次(50%)以上,则认为该刻度即是此动物的 PWMT。选择机械性痛阈在 20-30 g 的大鼠进行造模,术后第 7 天当大鼠 PWMT 低于 8 g 时,认为造模成功,并纳入后续实验。接受人参皂甙 Rd 注射的 SNI 大鼠分别于注射前 30 min 和注射后 30, 60, 90, 120 min 分别测定大鼠

PWMT。

1.4 DRG 细胞的制备

坐骨神经分支选择损伤手术后 7 天,出现机械性痛敏的大鼠经 2.5% 戊巴比妥钠充分麻醉后,脱颈处死,并迅速沿其背部正中线做一长 3-4 厘米的切口。切开脊柱两侧的筋膜及肌肉组织,用剪刀横断脊柱,取出腰 4、5 节段并放入氧饱和的冰冻人工脑脊液(ACSF)(mmol/L, 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.0 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, 25 NaHCO₃ 和 10 Glucose)中。在低温条件下,沿棘突将所取的脊柱矢状剪开,去除脊髓组织,取出手术侧腰 4、5 背根节(正常大鼠腰 4、5 背根节为对照组),将其放入氧饱和的常温 ACSF 液体中,随后在体式显微镜下,撕去背根节表面的结缔组织膜。将处理好的背根节放入 2 ml 消化酶(0.4 mg/ml 胰蛋白酶和 1 mg/ml 胶原酶)中在 37 °C 水浴锅中消化 40 min。消化结束后,将背根节取出放入氧饱和的常温 ACSF 中孵育 1-2 h 后待用^[6]。

1.5 DRG 细胞的电生理记录

取待测背根节置于循环灌流的浴槽中,用“U”型白金锚固定。在 40 倍镜(Olympus, BX51)下观察细胞,并选择状态良好,外表光滑,直径为 25-40 μ m 的中小型细胞进行封接。玻璃电极由 P-97 水平拉制仪拉制,电阻一般在 4-7 M 欧左右。采用 EPC-10 膜片钳放大器(HEKA 公司)和 Pluse10.0 软件进行刺激及数据采集。细胞破膜后进行电容及串联电阻补偿,电阻补偿率为 80%~90%。电流钳下记录细胞静息膜电位,选择膜电位大于 -50 mV 的中小细胞进行钠、钾电流的记录。

1.5.1 DRG 细胞钠电流的记录 采用全细胞膜片钳电压钳模式。电极内液包括 (mmol/L): 100 CsCl, 30 tetraethylammonium-Cl, 5 NaCl, 2 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 3 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg-ATP; pH 由 CsOH 调整为 7.4, 渗透压由蔗糖调整为 300 mOsm。循环灌流细胞外液包括 (mmol/L): 65 NaCl, 30 tetraethylammonium-Cl, 45 Choline-Cl, 0.1 CaCl₂, 5 MgCl₂, 0.1 Cd-Cl₂, 10 HEPES, 11 glucose; pH 由 NaOH 调整为 7.4, 渗透压由蔗糖调整为 290-300 mOsm^[6]。

1.5.2 DRG 细胞钾电流的记录 采用全细胞膜片钳电压钳模式。电极内液包括 (mmol/L): 140 KCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 2 Mg-ATP; 循环灌流细胞外液包括 (mmol/L): 140 Choline-Cl, 5 KCl, 2.0 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 10 HEPES, 1 CdCl₂, 10 glucose, 1 mM tetrodotoxin (TTX)。液体 pH 均由 KOH 调整为 7.2-7.4, 渗透压均由蔗糖调整为 290-300 mOsm^[7]。

1.6 统计学分析

结果以均数 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)表示,采用 SPSS 软件进行统计学分析,进行单因素方差分析,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂甙 Rd 对 SNI 大鼠机械性痛敏的影响

与对照组相比,腹腔注射低剂量人参皂甙 Rd(1 mg/ml)对坐骨神经分支选择性损伤引起的机械性痛敏无明显影响,而高剂量人参皂甙 Rd(5 和 10 mg/ml)能剂量依赖性的翻转 SNI 引起的机械性痛敏。该镇痛作用于注射后 30 min 开始出现,60 min 时达到最大,并能维持 120 min。结果见图 1。

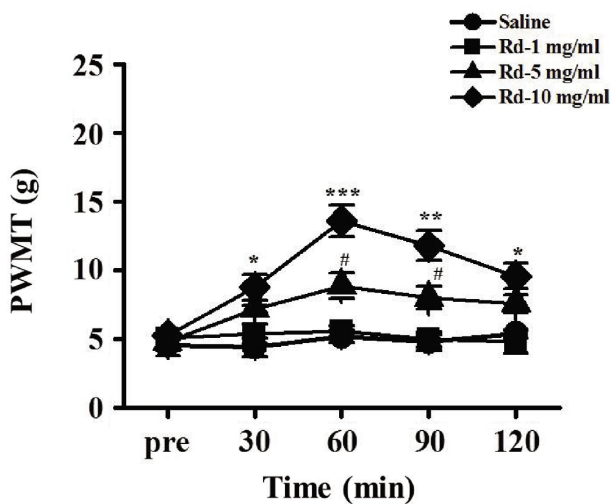


图1 人参皂甙 Rd 对 SNI 大鼠机械性痛敏的影响

Fig.2 Effect of ginsenoside Rd on the mechanical pain hypersensitivity in rats with SNI

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ Rd-10 mg/ml VS Saline; # $P < 0.05$ Rd-5 mg/ml VS Saline.

2.2 人参皂甙 Rd 对 SNI 大鼠 DRG 中小型神经元钠电流的影响

本实验对 19 个正常和 27 个 SNI 大鼠的 DRG 中小型神经元进行了全细胞电压依赖性钠电流记录,钳位电压从 -80 mV 到 +50 mV,步阶为 10 mV,持续 300 ms。坐骨神经分支选择性损伤后,DRG 中小型神经元的钠电流峰值明显增加,而 100 μ M 人参皂甙 Rd 能翻转该电压依赖性钠电流幅度的增加。结果见图 2。

2.3 人参皂甙 Rd 对 SNI 大鼠 DRG 中小型神经元钾电流的影响

我们观察了 15 个正常和 24 个 SNI 大鼠的 DRG 中小型神经元的电压依赖性钾电流,采用两步电压钳法进行记录,测试电压从 -80 mV 到 +50 mV,步阶为 10 mV,持续 700 ms。测试电压前将细胞钳制到 -120 mV 持续 1 s 来激活全钾电流(Total K current);测试电压前将细胞钳制到 -40 mV 持续 1 s 来激活延迟整流性钾电流(IK current)。与对照组相比,坐骨神经分支选择性损伤能明显减小中小型神经元的全钾电流和延迟整流性钾电流,而 100 μ M 人参皂甙 Rd 能有效地增大 SNI 大鼠 DRG 中小型神经元上的全钾电流和延迟整流钾电流。结果见图 3。

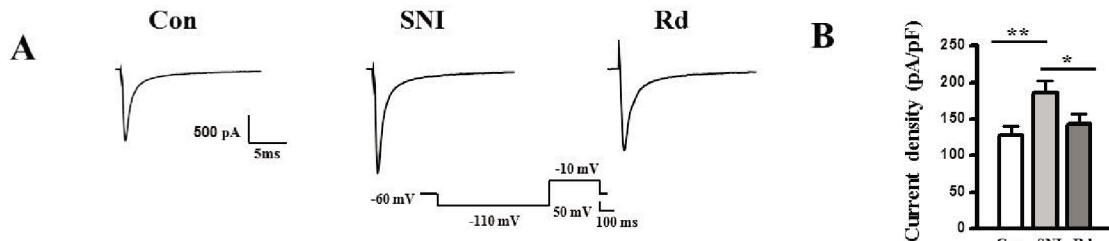


图2 人参皂甙 Rd 对 SNI 大鼠 DRG 中小型神经元钠电流的影响:A 对照组,SNI 组和人参皂甙 Rd 组钠电流幅度代表图;B 人参皂甙 Rd 减小 SNI 大鼠 DRG 神经元钠电流幅度

Fig.2 Effect of ginsenoside Rd on the voltage-gated sodium current in small- and medium-sized DRG neurons in rats with SNI

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

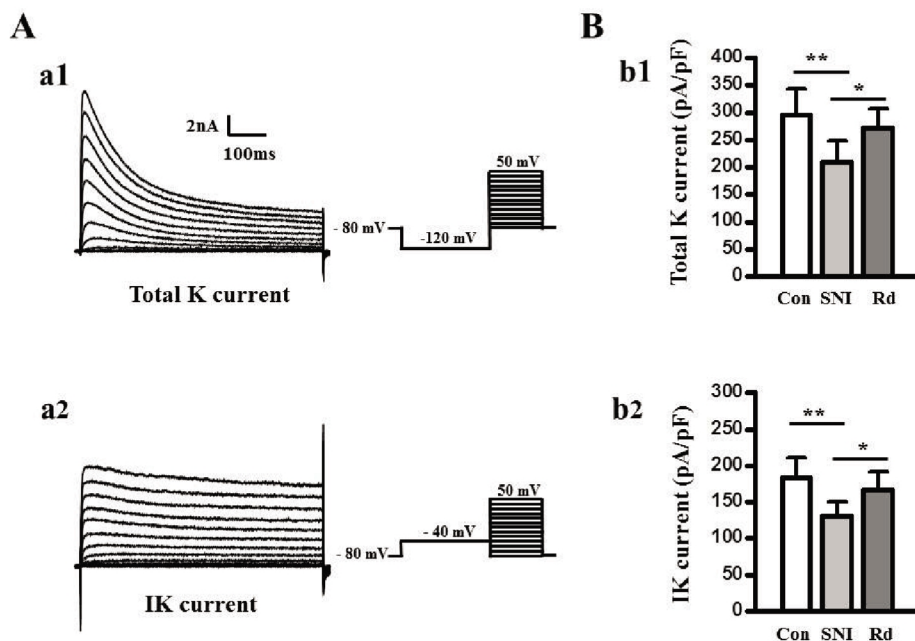


图3 人参皂甙 Rd 对 SNI 大鼠 DRG 中小型神经元钾电流的影响:A 全细胞钾电流(a1)和延迟整流性钾电流(a2)代表图;B 人参皂甙 Rd 增大 SNI 大鼠 DRG 神经元全细胞钾电流(b1)和延迟整流性钾电流(b2)

Fig.3 Effect of ginsenoside Rd on the voltage-gated potassium current in small- and medium-sized DRG neurons in rats with SNI

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

本研究于坐骨神经分支选择性损伤后用 Von Frey 纤维丝进行机械性痛阈值检测,将术后出现明显痛敏(PWMT<8 g)的大鼠纳入实验进行研究,确保了在神经病理性痛模型成功建立的基础上观察药理作用。

坐骨神经分支选择性损伤模型(SNI 模型)具有手术操作简单,模型成功率较高,术后痛敏行为明显,痛敏出现较早并能长时间稳定存在等优点,可以很好地模拟临床神经病理性痛的部分症状,因此被广泛用于外周神经病理性痛的机制研究和临床镇痛药物的筛选。虽然近年来大量的研究结果表明电压依赖性钠、钾离子通道与神经病理性痛的发生关系密切,如 Zhang 等^[8]报道 NaV1.8 的特异性阻断剂 A-887826 能有效缓解脊神经结扎引起的异常痛敏,而 Cao 等^[9]则发现在糖尿病神经病理性痛的条件下大鼠 DRG 神经元的电压依赖性钾电流明显减小;然而在 SNI 模型上,关于伤害性神经元上瞬时性钠电流和电压依赖性钾电流的研究却未见报道。本实验发现,与对照组相比,SNI 术后 7 天,出现痛敏行为的大鼠的中小型 DRG 神经元上的电压依赖性钠电流的幅度显著增大,而全细胞钾电流和延迟整流性钾电流的幅度则明显减小,Berta 等^[10]也证实 SNI 模型上 TTX-R 钠电流的幅度明显减小且电压依赖性钠离子通道转录水平也明显下调,以上结果均表明电压依赖性钠、钾电流的异常改变可能是坐骨神经分支选择性损伤导致外周痛敏行为的潜在机制。

人参皂甙 Rd 是人参的有效成分之一,已有研究证实其具有良好的免疫调节^[11]和抗肿瘤^[12]的作用,在神经系统相关性疾病中人参皂甙 Rd 也具有较好的保护作用,如缺血性脑卒中^[13]、癫痫^[14]和阿尔茨海默病^[15]等。然而其在疼痛领域的研究直到近几年才受到关注,以往 Shin 等^[16]研究发现人参皂甙 Rd 能够有效改善醋酸扭体实验和福尔马林实验中的痛相关行为。本实验观察到腹腔注射人参皂甙 Rd 能剂量依赖性地翻转坐骨神经分支选择性损伤引起的外周机械性痛敏,该镇痛作用于急性给药后 1 小时达到最大,并能维持 2 个多小时,再一次证实了人参皂甙 Rd 的良好镇痛作用,这与曹荣等^[17]的报道相一致,但人参皂甙 Rd 在外周神经病理性痛模型上的具体镇痛机制目前尚不清楚。在本研究中,我们首次发现人参皂甙 Rd 能明显减小 SNI 大鼠中小型 DRG 神经元上增大的瞬时性钠电流,同时人参皂甙 Rd 还能有效翻转 SNI 大鼠中小型 DRG 神经元上减小的全细胞钾电流和延迟整流性钾电流。类似地, Lee 等^[18]也报道了人参皂甙能有效抑制体外培养的大鼠脑神经元的钠电流, Bai 等^[19]也发现人参皂甙能通过一氧化氮信号通路明显增大延迟整流性钾电流。电压依赖性钠电流和电压依赖性钾电流分别介导了动作电位(包括外周伤害性信息)的去极化和复极化过程。人参皂甙 Rd 能明显减小伤害性感受神经元上的钠电流,从而减小细胞膜的去极化,增大膜电位与阈电位差值,减小伤害性感受神经元的兴奋性,从而抑制痛信号的产生。此外,减少细胞内 Na⁺浓度的剧增,可以减少神经递质的大量释放^[20,21],从而抑制痛信号向中枢的传递;而电压依赖性钾电流的增大,亦可抑制伤害性感受神经元对兴奋的反应^[22],同样能起到镇痛作用。

由此可见,本实验证实了腹腔注射人参皂甙 Rd 可能通过

改变外周伤害性神经元上的电压依赖性钠、钾电流的大小,调节伤害性神经元的兴奋性,阻断伤害性信息的产生和传递,从而减轻外周神经病理性痛。当然,由于人参皂甙 Rd 脂溶性较高,能够通过血脑屏障等一系列药理特性,人参皂甙 Rd 的镇痛作用除了外周直接作用以外可能还存在其他机制,有待于进一步的研究,以期临床上使用人参皂甙 Rd 治疗慢性神经病理性痛提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] Kerstman E, Ahn S, Tariq S, et al. Neuropathic pain [J]. Handb Clin Neurol, 2013, 110: 175-187
- [2] Fornasari D. Pain mechanisms in patients with chronic pain [J]. Clin Drug Investig, 2012, 32 Suppl 1: 45-52
- [3] Suter MR, Sprenger T, Taub E, et al. New concepts in the pathophysiology, diagnosis and treatment of neuropathic pain[J]. Rev Med Suisse, 2013, 9(392): 1346, 1348-1350
- [4] Dennis C Turk, S McMahon and M Koltzenburg, et al. Wall and Melzack's Textbook of Pain [M]. Elsevier Science Health Science Division, 2006, 5rd ed
- [5] Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain[J]. Pain, 2000, 87(2): 149-158
- [6] Sun W, Miao B, Wang XC, et al. Gastrodin inhibits allodynia and hyperalgesia in painful diabetic neuropathy rats by decreasing excitability of nociceptive primary sensory neurons [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39647
- [7] Nie A, Wei C, Meng Z. Sodium metabisulfite modulation of potassium channels in pain-sensing dorsal root ganglion neurons[J]. Neurochem Res, 2009, 34(12): 2233-2242
- [8] Zhang XF, Shieh CC, Chapman ML, et al. A-887826 is a structurally novel, potent and voltage-dependent Na^v 1.8 sodium channel blocker that attenuates neuropathic tactile allodynia in rats [J]. Neuropharmacology, 2010, 59(3): 201-207
- [9] Cao X H, Byun H S, Chen S R, et al. Reduction in voltage gated K⁺ channel activity in primary sensory neurons in painful diabetic neuropathy: role of brain derived neurotrophic factor [J]. Journal of neurochemistry, 2010, 114(5): 1460-1475
- [10] Berta T, Poirot O, Pertin M, et al. Transcriptional and functional profiles of voltage-gated Na⁺ channels in injured and non-injured DRG neurons in the SNI model of neuropathic pain[J]. Molecular and Cellular Neuroscience, 2008, 37(2): 196-208
- [11] Han Y, Rhew K Y. Ginsenoside Rd induces protective anti- Candida albicans antibody through immunological adjuvant activity [J]. International immunopharmacology, 2013, 17(3): 651-657
- [12] Yoon J H, Choi Y J, Cha S W, et al. Anti-metastatic effects of ginsenoside Rd via inactivation of MAPK signaling and induction of focal adhesion formation[J]. Phytomedicine, 2012, 19(3): 284-292
- [13] Ye R, Kong X, Yang Q, et al. Ginsenoside Rd attenuates redox imbalance and improves stroke outcome after focal cerebral ischemia in aged mice[J]. Neuropharmacology, 2011, 61(4): 815-824
- [14] Lian X Y, Zhang Z, Stringer J L. Anticonvulsant and neuroprotective effects of ginsenosides in rats [J]. Epilepsy research, 2006, 70(2): 244-256
- [15] Li L, Liu Z, Liu J, et al. Ginsenoside Rd attenuates beta-

- amyloid-induced tau phosphorylation by altering the functional balance of glycogen synthase kinase 3 β and protein phosphatase 2A[J]. *Neurobiology of disease*, 2013
- [16] Shin YH, Jung OM, Nah JJ, et al. Ginsenosides that produce differential antinociception in mice [J]. *Gen Pharmacol*, 1999,32(6): 653-659
- [17] 曹荣, 屠令锋, 段丽, 等. 人参皂甙-Rd 对 SNI 大鼠痛敏异常及脊髓背角内 P 物质和 NK-1 受体表达的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2011, 27(1): 8-13
- Cao Rong, Tu Ling-feng, Duan Li, et al. Effect of Ginsenoside-Rd on allodynia and the expression of substance P and NK-1 receptor in the spinal dorsal horn of rats induced with spared nerve injury[J]. *Chinese journal of neuroanatomy*, 2011, 27(1): 8-13
- [18] Lee J H, Jeong S M, Kim J H, et al. Characteristics of ginsenoside Rg3-mediated brain Na⁺ current inhibition [J]. *Molecular pharmacology*, 2005, 68(4): 1114-1126
- [19] Bai C X, Takahashi K, Masumiya H, et al. Nitric oxide dependent modulation of the delayed rectifier K⁺ current and the L type Ca²⁺ current by ginsenoside Re, an ingredient of Panax ginseng, in guinea pig cardiomyocytes [J]. *British journal of pharmacology*, 2004, 142(3): 567-575
- [20] Verdru P, De Greef C, Mertens L, et al. Na⁺(+)-Ca²⁺ exchange in rat dorsal root ganglion neurons[J]. *J Neurophysiol*, 1997, 77(1): 484-490
- [21] Tsuzuki K, Xing H, Ling J, et al. Menthol-induced Ca²⁺ release from presynaptic Ca²⁺ stores potentiates sensory synaptic transmission[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(3): 762-771
- [22] Catacuzzeno L, Fioretti B, Pietrobon D, et al. The differential expression of low-threshold K⁺ currents generates distinct firing patterns in different subtypes of adult mouse trigeminal ganglion neurones[J]. *J Physiol*, 2008, 586(Pt 21): 5101-5118

(上接第 2213 页)

- Xiao Hang, Yun Shi-feng, Liu Nian-shuang, et al. Science and application of Laboratory animals [M]. Nanjing: Phoenix science press, 2008: 78-79
- [12] Navarro V M, Castellano J M, Fernandez-Fernandez R, et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(10): 4565-4574
- [13] Rasier G, Parent A S, Gerard A, et al. Early maturation of gonadotropin-releasing hormone secretion and sexual precocity after exposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane [J]. *Biol Reprod*, 2007, 77(4): 734-742
- [14] 丁海珍, 于宝生, 单晔, 等. 雌激素对青春前期雌性大鼠下丘脑促性腺激素释放激素表达和分泌的影响 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2010, 25(8): 552-554
- Ding Hai-zhen, Yu Bao-sheng, Shan Ye, et al. Effects of estrogen on expression and secretion of gonadotropin-releasing hormone in hypothalamus of prepubertal female rat[J]. *J Appl Clin Pediatr*, 2010, 25(8): 552-554
- [15] Hiney J K, Srivastava V K, Pine M D, et al. Insulin-like growth factor-I activates KiSS-1 gene expression in the brain of the prepubertal female rat[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(1): 376-384
- [16] Viswanathan S R, Daley G Q, Gregory R I, et al. Selective blockade of microRNA processing by Lin28[J]. *Science*, 2008, 320(5872): 97-100
- [17] Zhu H, Shah S, Shyh-Chang N, et al. Lin28a transgenic mice manifest size and puberty phenotypes identified in human genetic association studies[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(7): 626-630
- [18] 戴方伟, 陈文文, 毛栋森, 等. SD 雌性大鼠性发育早期性器官等脏器和性激素的动态变化[J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(7): 33-37
- Dai Fang-wei, Chen Wen-wen, Mao Dong-sen, et al. Dynamic development of organs and serum sex hormone levels in normal pre-pubertal female Sprague-Dawley rats [J]. *Chin Comp Med*, 2009, 19(7): 33-37
- [19] Stavrou I, Zois C, Chatzikyriakidou A, et al. Combined estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta genotypes influence the age of menarche[J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(2): 554-557
- [20] Messenger S, Chatzidaki E E, Ma D, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(5): 1761-1766