

[文章编号] 1671-587X(2024)05-1189-07

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240501

冷暴露对大鼠痛觉和感觉神经元中瞬时受体电位离子通道的影响

蒋鼎¹, 曹月龙¹, 徐勤光¹, 申安平¹, 王楠², 邱凤喜², 薛艳³

(1. 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心, 上海 201203; 2. 同济大学附属养志康复医院中医科, 上海 201619; 3. 同济大学附属养志康复医院智能康复临床研究中心, 上海 201619)

[摘要] **目的:** 探讨冷暴露对大鼠痛觉的影响及其对感觉神经元中瞬时受体电位 (TRP) 离子通道的调控机制, 为阐明冷敏感性疼痛的生物学机制提供依据。**方法:** 16只雌性SD大鼠分为对照组 ($n=8$) 和寒冷组 ($n=8$)。对照组大鼠置于 (24 ± 2) °C环境中, 寒冷组大鼠每日置于人工智能气候室内进行低温 (4 ± 1 °C) 刺激4 h, 连续1周。采用Von Frey纤维丝检测2组大鼠机械缩足反射阈值 (MWT), 采用组织免疫荧光染色法观察2组大鼠背根神经节 (DRG) 组织中TRPA1、TRPM8、TRPV1和TRPV4表达水平, 大鼠DRG组织中降钙素基因相关肽 (CGRP) 和P物质 (SP) 表达水平以及大鼠滑膜组织中TRPA1、TRPM8、TRPV1和TRPV4表达水平。**结果:** 与对照组比较, 寒冷组大鼠MWT明显降低 ($P<0.05$), DRG组织中TRPA1和TRPM8表达水平明显升高 ($P<0.05$), TRPV1表达水平明显降低 ($P<0.05$), TRPV4表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$), CGRP和SP表达水平明显升高 ($P<0.05$)。与对照组比较, 寒冷组大鼠滑膜组织中TRPA1表达水平明显升高 ($P<0.05$), TRPM8、TRPV1和TRPV4表达水平明显降低 ($P<0.05$)。**结论:** 短期冷暴露可引起大鼠痛觉过敏, 其机制可能与DRG和滑膜组织中TRP离子通道表达变化有关联。TRPA1感觉神经元在关节局部冷痛中起重要作用。

[关键词] 冷暴露; 背根神经节; 滑膜组织; 瞬时受体电位离子通道; 痛觉过敏

[中图分类号] R36 **[文献标志码]** A

Effect of cold exposure on nociception and transient receptor potential ion channels in sensory neurons in rats

JIANG Ding¹, CAO Yuelong¹, XU Qinguang¹, SHEN Anping¹, WANG Nan², QIU Fengxi², XUE Yan³

(1. Shi's Trauma Medicine Center, Affiliated Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Yangzhi Rehabilitation Hospital, Tongji University, Shanghai 201619, China; 3. Intelligent Rehabilitation Clinical Research Center, Affiliated Yangzhi Rehabilitation Hospital, Tongji University, Shanghai 201619, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of cold exposure on nociception in the rats and its regulatory mechanism on transient receptor potential (TRP) ion channels in the sensory neurons, and to provide the basis for clarifying the biological mechanism of cold-sensitive pain. **Methods:** Sixteen female SD rats were

[收稿日期] 2023-11-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82305269); 卫健委国家临床重点专科建设项目 (215508000004); 科技部国家重点研发计划项目 (2020YFC2008703); 上海市科学技术委员会扬帆计划项目 (21YF1443400); 上海市卫健委临床研究专项 (20224Y0209); 上海市康复医学重中之重研究中心科研项目 (2023ZZ02027)

[作者简介] 蒋鼎 (1994—), 男, 四川省成都市人, 在读博士研究生, 主要从事中医药防治慢性筋骨疾病方面的研究。

[通信作者] 薛艳, 讲师, 助理研究员, 硕士研究生导师 (E-mail: joycexy1103@163.com)

divided into control group ($n=8$) and cold group ($n=8$). The rats in control group were exposed to the environment of $(24\pm 2)^\circ\text{C}$, and the rats in cold group were exposed to low temperature $(4^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C})$ in an artificial intelligence climate chamber for 4 h daily, for one week. Von Frey filaments were used to detect the mechanical withdrawal threshold (MWT) of the rats in two groups; immunofluorescence staining was used to observe the expression levels of TRPA1, TRPM8, TRPV1, and TRPV4 in dorsal root ganglion (DRG) tissue of the rats in two groups, the expression levels of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP) in DRG tissue of the rats in two groups, and the expression levels of TRPA1, TRPM8, TRPV1, and TRPV4 in synovial tissue of the rats in two groups. **Results:** Compared with control group, the MWT of the rats in cold group was significantly decreased ($P<0.05$), the expression levels of TRPA1 and TRPM8 in DRG tissue were significantly increased ($P<0.05$), the expression level of TRPV1 was significantly decreased ($P<0.05$), there was no significant difference in the expression level of TRPV4 ($P>0.05$), and the expression levels of CGRP and SP were significantly increased ($P<0.05$). Compared with control group, the expression level of TRPA1 in synovial tissue of the rats in cold group was significantly increased ($P<0.05$), while the expression levels of TRPM8, TRPV1, and TRPV4 were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Short-term cold exposure can induce the hyperalgesia of the rats, and its mechanism may be associated with the changes in the expression of TRP ion channels in DRG and synovial tissues. TRPA1 sensory neurons play an important role in local joint cold pain.

KEYWORDS Cold exposure; Dorsal root ganglion; Synovial tissue; Transient receptor potential ion channel; Hyperalgesia

在寒冷环境中, 人体可能承受寒冷应激, 从而触发一系列病理变化, 包括关节疼痛^[1]。研究^[2-3]显示: 暴露于寒冷环境与关节炎、滑膜炎和关节软骨病变等疾病的发生发展有密切关联。其中, 膝关节作为一个神经支配密集的结构, 其内部的外周感觉神经元自由神经末梢对温度变化尤为敏感。背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)位于脊椎侧面, 作为四肢的初级感觉神经元, 是外周神经系统与中枢神经系统之间的关键连接点。DRG含有大量感觉神经元, 负责传递来自身体各部位的感觉信息, 如痛觉、触觉和温度觉等^[4]。近年来, 研究者^[5]日益关注关节痛觉过敏与DRG之间的联系。关节病变患者的疼痛加剧可能与DRG的生理和生化反应有密切关联。当神经元的动作电位和电流阈值降低时, 自发性放电相应增加, 可能导致痛觉感受器对刺激更为敏感, 进而加剧关节疼痛^[6]。

在冷暴露引发和加剧关节疼痛的过程中, 位于DRG上的瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)离子通道家族起关键作用。TRP离子通道是一类对温度变化高度敏感的蛋白, 该家族包括50多名成员。TRP家族编码神经元对于一系列温度变化的敏感性, 覆盖了从有害冷感到有害热感的广阔范围。TRP离子通道在人体多种器官

和组织中广泛分布, 其在低温环境中发挥关键的温度感应器作用, 能感知低温刺激和寒冷环境中的化学物质。多数TRP通道具有钙离子通透性^[7], 在寒冷环境下激活的TRP离子通道可以促使DRG神经元释放促炎肽, 进而影响关节疼痛的发生发展^[8]。

既往研究^[5-6, 9-10]已经揭示了TRP离子通道在特定疾病模型中的作用, 如TRPM8通道参与神经性疼痛大鼠痛觉过敏的发病机制, TRPM8或TRPA1的基因敲除会影响小鼠整体冷感知能力。但对于在非病理性条件下, 冷暴露如何影响疼痛感知以及关节局部TRP通道表达尚未明确。本研究探讨在非病理性条件下, 冷暴露对大鼠痛觉、DRG和膝关节滑膜中TRP离子通道表达的影响, 为探讨TRP离子通道在关节局部疼痛条件下的调控作用提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 动物、主要试剂和仪器

健康雌性SD大鼠16只, 体质量180~220 g, 购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 饲养于同济大学实验动物中心(动物伦理审批号: TJBII00423201; 动物合格证编号: 20180006043685), 饲养笼光/暗周期为12 h。

TRPM8 (NBP1-97311, 美国 Novus 公司), TRPV4 (货号 ab259361, 英国 Abcam 公司), TRPA1、TRPV1 原癌基因 c-Fos 和降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP) (货号分别为 AF8241、AF8250、AF6489 和 AF6495, 广州碧云天生物技术有限公司), P 物质 (substance P, SP) (货号 MAB4375-SP, 美国 R&D Systems 公司), 羊抗兔二抗 IgG (武汉赛维尔生物科技有限公司)。光学显微镜 (日本 Nikon 公司), Von Frey 纤维丝 (美国 Ugo basile 公司)。

1.2 动物分组和干预方式

适应性饲养 1 周后, 将 16 只大鼠随机分为对照组和寒冷组, 每组各 8 只。对照组大鼠环境温度为 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$, 湿度 40%, 光照昼夜 12 h 交替。寒冷组大鼠在人工智能气候室内, 刺激温度为 $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$, 湿度 40%, 每日冷暴露 4 h, 连续刺激 1 周。

1.3 各组大鼠行为学表现

行为学测试环境温度维持在 $22^\circ\text{C} \sim 24^\circ\text{C}$, 湿度 50%~60%, 测量时间为上午 9:00~11:00。采用 Von Frey 纤维丝在大鼠后足底表面检测机械缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT)。将大鼠置于离桌面高 50 cm 的铁丝网上, 罩上玻璃观察框, 测试前让大鼠适应环境 30 min。以不同折力 (依次为 0.4、0.6、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、15.0、26.0 和 60.0 g) 的 Von Frey 纤维丝缓慢压迫大鼠后足底中部, 每次持续时间 ≤ 5 s, 若大鼠出现快速反应, 如抓、举或舔脚, 则视为阳性, 30 s 后施加低一级力度的刺激, 若为阴性则 30 s 后施加高一级力度的刺激。如此连续进行, 出现第 1 次阳性反应后继续记录 4 次力度^[11]。MWT 可反映引起大鼠撤回反应所需的力度。

1.4 标本采集和处理

大鼠深麻醉, 经心脏灌注 4% 多聚甲醛固定, 取 L5 水平 DRG 和膝关节滑膜组织。标本采用 4% 多聚甲醛固定, 经梯度乙醇脱水, 二甲苯透明化处理, 石蜡浸蜡与包埋制作成连续切片。

1.5 免疫荧光染色

1.5.1 免疫荧光染色检测各组大鼠 DRG 组织中 TRP 离子通道表达水平 将石蜡切片进行脱蜡, 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 抗原修复缓冲液 (pH 8.0) 微波修复 15 min, 冷却至室温, 加入 3% 血清工作液封闭 30 min 后, 弃去封闭液, 直接加入一抗, 4°C 孵育过

夜, 滴加羊抗兔二抗 IgG 覆盖组织, 避光室温孵育, 磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次, 滴加 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染核 10 min。抗荧光淬灭封片剂封片, 光学显微镜下拍照。采用 Image J 软件检测各组大鼠 DRG 组织中 TRPA1、TRPM8、TRPV1 和 TRPV4 的荧光强度, 以荧光强度代表 DRG 组织中 TRPA1、TRPM8、TRPV1 和 TRPV4 表达水平。

1.5.2 免疫荧光染色检测各组大鼠 DRG 组织中 CGRP 和 SP 表达 将石蜡切片进行脱蜡, 采用 EDTA 抗原修复缓冲液 (pH 8.0) 微波修复 15 min, 冷却至室温。加入 3% 血清工作液封闭 30 min 后, 弃去封闭液, 直接加入一抗, 4°C 孵育过夜。然后滴加羊抗兔二抗 IgG 覆盖组织, 避光室温孵育。磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次, 滴加 DAPI 染核 10 min。采用抗荧光淬灭封片剂封片, 并在光学显微镜下拍照。采用 Image J 软件检测各组大鼠 DRG 组织中 CGRP 和 SP 荧光强度, 以 CGRP 和 SP 荧光强度与内参荧光强度的比值代表 DRG 组织中 CGRP 和 SP 表达水平。

1.5.3 免疫荧光染色检测各组大鼠滑膜组织中 TRP 离子通道表达水平 将石蜡切片进行脱蜡, 采用 EDTA 抗原修复缓冲液 (pH 8.0) 微波修复 15 min, 冷却至室温。加入 3% 血清工作液封闭 30 min 后, 弃去封闭液, 直接加入一抗, 4°C 孵育过夜。滴加羊抗兔二抗 IgG 覆盖组织, 避光室温孵育。磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次, 滴加 DAPI 染核 10 min。采用抗荧光淬灭封片剂封片, 并在光学显微镜下拍照。采用 Image J 软件检测各组大鼠滑膜组织中 TRPA1、TRPM8、TRPV1 和 TRPV4 荧光强度, 以荧光强度代表滑膜组织中 TRPA1、TRPM8、TRPV1 和 TRPV4 表达水平。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行统计学分析。采用 Graphpad Prism 9.0 软件绘图。采用 Shapiro-Wilk 法进行正态性检验, Levene's 法确认方差齐性。2 组数据均呈正态分布且方差齐性, 各组大鼠 MWT, 大鼠 DRG 组织中 TRPA1、TRPM8、TRPV1 和 TRPV4 表达水平, 大鼠 DRG 组织中 CGRP 和 SP 表达水平, 大鼠滑膜组织中 TRPA1、TRPM8、TRPV1 和 TRPV4 表达水平均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用两独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

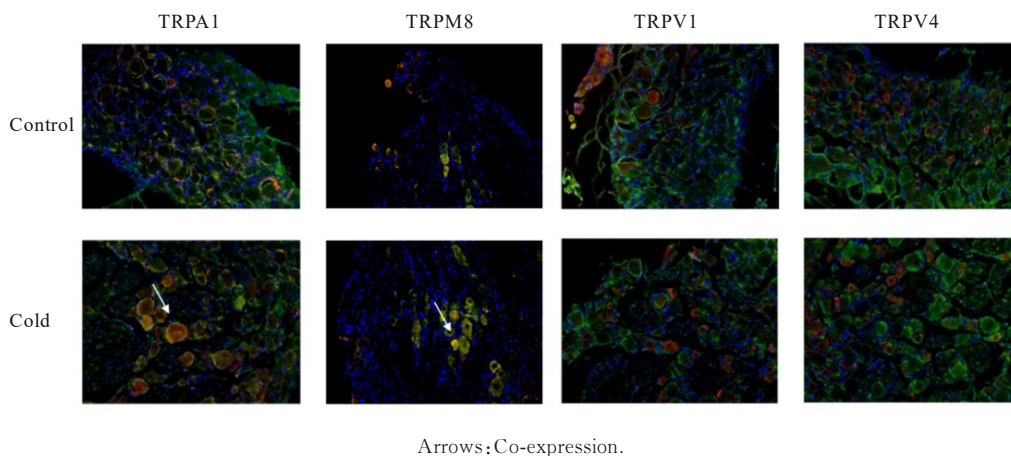
2.1 2组大鼠MWT

与对照组 ($7.7 \text{ g} \pm 2.1 \text{ g}$) 比较, 寒冷组大鼠基线MWT ($7.9 \text{ g} \pm 1.8 \text{ g}$) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 冷暴露1周后, 与对照组 ($7.6 \text{ g} \pm 2.0 \text{ g}$) 比较, 寒冷组大鼠MWT ($4.0 \text{ g} \pm 0.9 \text{ g}$) 明显降

低 ($P < 0.05$)。

2.2 2组大鼠DRG组织中TRPA1、TRPM8、TRPV1和TRPV4表达水平

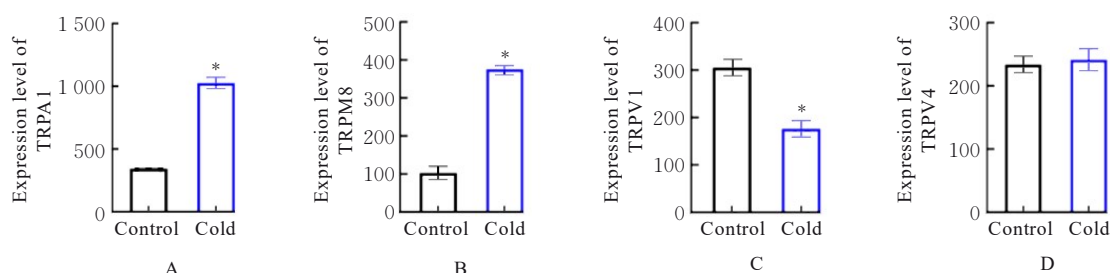
与对照组比较, 寒冷组大鼠DRG组织中TRPA1和TRPM8表达水平明显升高 ($P < 0.05$), TRPV1表达水平明显降低 ($P < 0.05$), TRPV4表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图1和2。



Arrows: Co-expression.

图1 免疫荧光法检测2组大鼠DRG组织中TRPA1、TRPM8、TRPV1和TRPV4表达情况($\times 200$)

Fig. 1 Expressions of TRPA1, TRPM8, TRPV1, and TRPV4 in DRG tissue of rats in two groups detected by immunofluorescence assay ($\times 200$)



* $P < 0.05$ vs control group.

图2 2组大鼠DRG组织中TRPA1(A)、TRPM8(B)、TRPV1(C)和TRPV4(D)表达水平

Fig. 2 Expression levels of TRPA1(A), TRPM8(B), TRPV1(C), and TRPV4(D) in DRG tissue of rats in two groups

2.3 2组大鼠DRG组织中CGRP和SP表达水平

与对照组比较, 寒冷组大鼠DRG组织中CGRP和SP表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见图3和4。

2.4 2组大鼠滑膜组织中TRPA1、TRPM8、TRPV1和TRPV4表达水平

与对照组比较, 寒冷组大鼠滑膜组织中TRPA1表达水平明显升高 ($P < 0.05$), TRPM8、TRPV1和TRPV4表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图5和6。

3 讨论

寒冷刺激对生物体构成危害, 引发痛觉和一系列保护性生理反应。为应对和避免低温的影响, 生物在进化过程中发展了一系列防护机制。冷感受器在非伤害性的低温刺激下通常不活跃, 但长时间低温刺激可能导致这些感受器进入持续、低频且延迟的激活模式, 使本应无害的刺激被感知为疼痛, 导致痛觉过敏^[12]。正常的SD大鼠在 $5^{\circ}\text{C} \sim 9^{\circ}\text{C}$ 环境中会出现冷痛性撤退反应, 在完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)模型中, 温

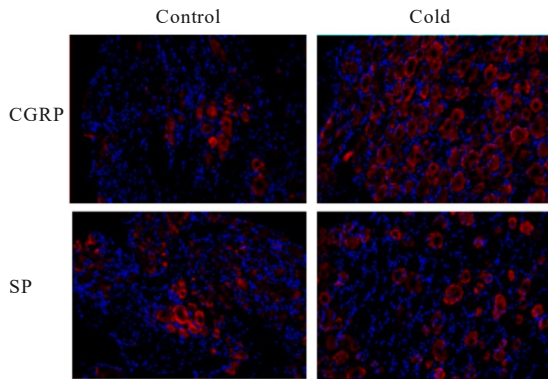
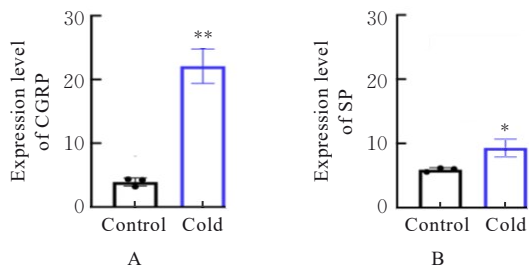


图3 免疫荧光法检测2组大鼠DRG组织中CGRP和SP表达情况($\times 200$)

Fig. 3 Expressions of CGRP and SP in DRG tissue of rats in two groups detected by immunofluorescence assay($\times 200$)



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图4 2组大鼠DRG组织中CGRP(A)和SP(B)表达水平

Fig. 4 Expression levels of CGRP(A) and SP(B) in DRG tissue of rats in two groups

度低于 5°C 则会导致痛觉过敏^[13]。本研究采用冷暴露($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)刺激大鼠,结果显示:冷暴露前,对照组和寒冷组大鼠MWT比较差异无统计学意

义,冷暴露1周后,寒冷组大鼠MWT明显降低,提示冷暴露可能引起痛觉过敏。

DRG负责将内外环境的变化转化为神经活动,传导至中枢神经系统,从而产生感觉^[14]。在该系统中,温度觉是一个关键的生理机制。与温度觉有关的TRP家族离子通道包括TRPV1、TRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPM8和TRPA1,其对温度刺激的激活阈值各不相同,其中TRPA1和TRPM8被鉴定为冷敏感离子通道^[10, 15]。TRPM8在 $25^{\circ}\text{C} \sim 28^{\circ}\text{C}$ 时被激活,TRPA1在约 17°C 时被激活,这是人类能感知到的寒冷温度范围^[16-17]。本研究结果显示:当大鼠暴露在 4°C 低温环境中时,TRPA1和TRPM8感觉神经元被激活,与其冷激活特性相符。TRPV1感觉神经元受到抑制,而TRPV4感觉神经元无明显改变,可能与TRPV4作为高阈值温度敏感通道,其激活受到多种因素影响有关。

TRP离子通道不仅感知多种刺激信号,还参与各类生理过程,尤其在慢性疼痛中发挥关键作用,近年来已成为新型镇痛药物的潜在靶标^[18-19]。TRP离子通道不仅在神经元中感知有害刺激,也是外周神经末梢释放多种神经递质的主要位点,如CGRP和SP^[20-21]。上述神经递质的释放会触发神经源性炎症生化级联反应,在各种慢性疼痛疾病的发病中起关键作用^[22]。本研究观察低温条件下大鼠DRG组织中CGRP和SP表达水平,结果显示:低温环境中大鼠DRG组织中CGRP和SP表达水平升高,提示低温可能透过TRPs的温度感知诱导神经肽的释放,进一步影响痛觉和炎症环境。早期对于TRP在疼痛领域的研究主要集中于牙痛、偏头

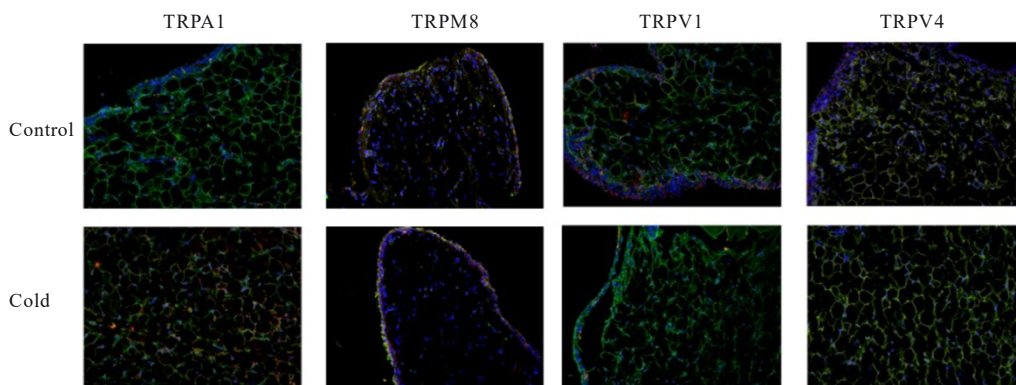


图5 免疫荧光法检测2组大鼠滑膜组织中TRPA1、TRPM8、TRPV1和TRPV4表达情况($\times 200$)

Fig. 5 Expressions of TRPA1, TRPM8, TRPV1, and TRPV4 in synovial tissue of rats in two groups detected by immunofluorescence assay($\times 200$)

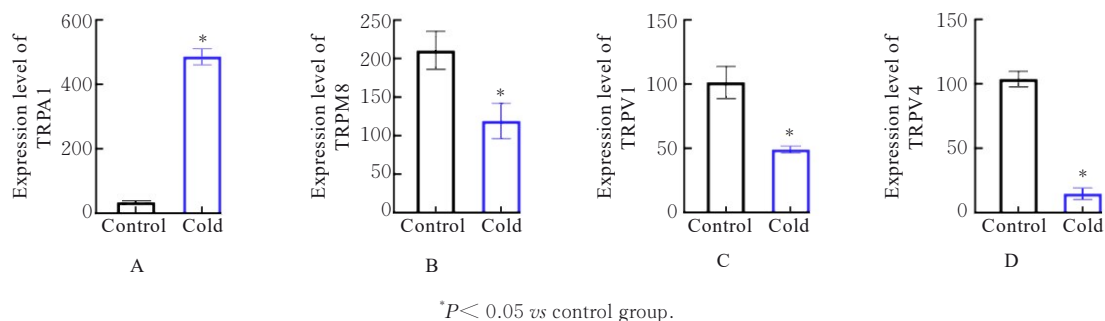


图6 2组大鼠滑膜组织组织中TRPA1(A)、TRPM8(B)、TRPV1(C)和TRPV4(D)表达水平

Fig. 6 Expression levels of TRPA1(A), TRPM8(B), TRPV1(C), and TRPV4 (D) in synovial tissue of rats in two groups

痛和癌症疼痛等方面, TRP在关节疼痛中也起重要作用。冷暴露不仅激活了DRG组织中的TRPA1感觉神经元, 滑膜组织中的感觉神经元末梢也呈现类似的模式。TRPA1感觉神经元对低温($<17^{\circ}\text{C}$)敏感, 可能在关节中充当伤害感受器。既往研究^[23]显示: 在关节炎滑膜成纤维细胞中, TRPA1通道激活可增加钙离子内流, 从而导致细胞增殖减少和坏死增加。在CFA模型小鼠中, TRPA1在关节疼痛过敏中发挥关键作用, 而阻断TRPA1受体可减轻与关节炎相关的慢性疼痛^[24]。外部环境的干预证实了冷暴露可以通过TRPA1引发原发性痛觉过敏的机制。

尽管冷暴露激活了滑膜组织中TRPA1感觉神经元, 但TRPV1和TRPV4感觉神经元却受到抑制。在本实验中, 被视为“寒冷通道”的TRPM8感觉神经元在大鼠滑膜组织中未被激活, 原因可能是冷暴露在关节组织中对TRPM8感觉神经元的刺激不够明显, 或是干预时间和强度未设置多个梯度。与TRPA1比较, TRPM8是阈值较高的寒冷通道, 未来应探索不同冷暴露条件以了解其反应。此外, 也有必要对TRP离子通道家族中其他成员的表达和作用进行深入研究, 以增进对痛觉机制的认识。

综上所述, 在冷暴露的条件下, 大鼠疼痛阈值降低, DRG组织中TRPA1和TRPM8感觉神经元活跃度增强, 神经递质CGRP和SP释放增多。此外, 冷暴露还明显激活了关节滑膜组织中TRPA1感觉神经元。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

蒋鼎和薛艳参与论文的整体设计, 徐勤光、申安平和王楠参与实验过程, 邱凤喜参与论文的统计学分析, 蒋鼎和曹月龙参与论文撰写。

[参考文献]

- [1] 金璐, 董维云, 边祥雨, 等. 药食同源物质组方对急性寒暴露雌性大鼠HPO轴及HPA轴功能的影响[J]. 军事医学, 2023, 47(7): 521-526.
- [2] XUE Y, CHEN Y, JIANG D, et al. Self-reported weather sensitivity is associated with clinical symptoms and structural abnormalities in patients with knee osteoarthritis: a cross-sectional study [J]. Rheumatol Ther, 2021, 8(3): 1405-1417.
- [3] ZIADÉ N, BOUZAMEL M, MRAD-NAKHLÉ M, et al. Prospective correlational time-series analysis of the influence of weather and air pollution on joint pain in chronic rheumatic diseases [J]. Clin Rheumatol, 2021, 40(10): 3929-3940.
- [4] 李丽梅, 郑宝森, 张志利, 等. 背根神经节解剖及其参与神经病理性疼痛机制的研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(7): 531-540.
- [5] CAO S, LI Q M, HOU J F, et al. Intrathecal TRPM8 blocking attenuates cold hyperalgesia via PKC and NF- κ B signaling in the dorsal root ganglion of rats with neuropathic pain [J]. J Pain Res, 2019, 12: 1287-1296.
- [6] MACDONALD D I, WOOD J N, EMERY E C. Molecular mechanisms of cold pain [J]. Neurobiol Pain, 2020, 7: 100044.
- [7] 康欣欣, 唐志鹏, 王立娟, 等. 肉桂醛对 0°C 冷应激大鼠背根神经节神经细胞胞浆内 Ca^{2+} 变化及TRPA1和TRPM8 mRNA表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 127-133.
- [8] CABAÑERO D, VILLALBA-RIQUELME E, FERNÁNDEZ-BALLESTER G, et al. ThermoTRP

- channels in pain sexual dimorphism: new insights for drug intervention [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 240: 108297.
- [9] MILENKOVIC N, ZHAO W J, WALCHER J, et al. A somatosensory circuit for cooling perception in mice[J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17(11): 1560-1566.
- [10] KARASHIMA Y, TALAVERA K, EVERAERTS W, et al. TRPA1 acts as a cold sensor *in vitro* and *in vivo*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(4): 1273-1278.
- [11] CHRISTENSEN S L, HANSEN R B, STORM M A, 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] SIMONE D A, KAJANDER K C. Excitation of rat cutaneous nociceptors by noxious cold [J]. *Neurosci Lett*, 1996, 213(1): 53-56.
- [13] ALLCHORNE A J, BROOM D C, WOOLF C J. Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats [J]. *Mol Pain*, 2005, 1: 36.
- [14] PRESCOTT S A, MA Q F, DE KONINCK Y. Normal and abnormal coding of somatosensory stimuli causing pain[J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17(2): 183-191.
- [15] MUELLER-TRIBBENSEE S M, KARNA M, KHALIL M, et al. Differential contribution of TRPA1, TRPV4 and TRPM8 to colonic nociception in mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0128242.
- [16] SHERKHELI M A, VOGT-EISELE A K, BURA D, et al. Characterization of selective TRPM8 ligands and their structure activity response (S.A.R) relationship[J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2010, 13(2): 242.
- [17] STORY G M, PEIER A M, REEVE A J, et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures [J]. *Cell*, 2003, 112(6): 819-829.
- [18] MICKLE A D, SHEPHERD A J, MOHAPATRA D P. Nociceptive TRP channels: sensory detectors and transducers in multiple pain pathologies [J]. *Pharmaceuticals*, 2016, 9(4): 72.
- [19] ZHANG M, MA Y M, YE X L, et al. TRP (transient receptor potential) ion channel family: structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 261.
- [20] ASO K, IZUMI M, SUGIMURA N, et al. Nociceptive phenotype alterations of dorsal root Ganglia neurons innervating the subchondral bone in osteoarthritic rat knee joints[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(9): 1596-1603.
- [21] SCHOU W S, ASHINA S, AMIN F M, et al. Calcitonin gene-related peptide and pain: a systematic review[J]. *J Headache Pain*, 2017, 18(1): 34.
- [22] MORAN M M, SZALLASI A. Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(12): 2185-2203.
- [23] LOWIN T, BLECK J, SCHNEIDER M, et al. Selective killing of proinflammatory synovial fibroblasts *via* activation of transient receptor potential ankyrin (TRPA1) [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 154: 293-302.
- [24] FERNANDES E S, RUSSELL F A, ALAWI K M, et al. Environmental cold exposure increases blood flow and affects pain sensitivity in the knee joints of CFA-induced arthritic mice in a TRPA1-dependent manner[J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1): 7.