

NGF、ASIC3 与实验性大鼠Ⅲ型前列腺炎骨盆疼痛的相关性研究*

郑明星, 刘孝东[△], 范世成, 余新龙, 朱 波, 沈 洁

昆明医科大学第一附属医院 泌尿外一科 (昆明 650032)

【摘要】 目的 探讨神经生长因子(NGF)、三型酸敏感离子通道(ASIC3)在实验性大鼠Ⅲ型前列腺炎的前列腺组织中表达的意义。**方法** 选取性成熟雄性 SD 大鼠 30 只,分为对照组(0.9% NaCl 于盆腔区域皮下、双侧肩胛皮下多点注射)、Ⅲ型前列腺炎模型组[实验性自发免疫性前列腺炎(EAP)组,完全弗氏佐剂与前列腺组织混悬液于盆腔区域皮下、双侧肩胛皮下多点注射],每组 15 只。建立 EAP 模型过程中,于建模第 0、5、10、20、30、40 天予 Von-Frey 测痛纤维进行骨盆区域痛觉测试。建模成功后取大鼠的前列腺组织,进行 HE 染色观察病理学改变;通过免疫组化和 Western blot 方法检测 NGF 及 ASIC3 的蛋白表达。**结果** Von-Frey 测痛结果显示:EAP 组大鼠骨盆疼痛表现较对照组明显。HE 染色结果显示:EAP 组大鼠前列腺间质内淋巴细胞和中性粒细胞浸润,腺体周围充血;对照组未见明显炎症细胞浸润。免疫组化染色和 Western blot 结果显示:EAP 组大鼠的前列腺组织中,NGF 及 ASIC3 蛋白表达(主要表达于细胞核与细胞浆中)较对照组增加($P<0.01$)。**结论** EAP 大鼠前列腺组织中 NGF 及 ASIC3 表达增加,NGF 及 ASIC3 可能是导致Ⅲ型前列腺炎骨盆区域疼痛的重要介质,有望作为干预及治疗Ⅲ型前列腺炎的靶向指标。

【关键词】 Ⅲ型前列腺炎/慢性前列腺炎 慢性骨盆疼痛 神经生长因子 三型酸敏感离子通道 Von-Frey

Expression of Nerve Growth Factor and Type 3 of Acid Sensitive Ion Channels in Rat Model of Type Ⅲ Prostatitis

ZHENG Ming-xing, LIU Xiao-dong[△], FAN Shi-cheng, YU Xin-long, ZHU Bo, SHEN Jie. First Department of Urology, First Affiliated of Kunming Medical University, Kunming 650032, China

[△] Corresponding author, E-mail: 1503401823@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the expressions of nerve growth factor(NGF) and acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) in prostatic tissue of experimental rats with type Ⅲ prostatitis. **Methods** Thirty SD rats were randomly allocated into control group and experimental group. The rats in control group were subjected to pelvic and bilateral scapular subcutaneous injections of 0.9% sodium chloride, while the rats in experimental group were given pelvic and bilateral scapular subcutaneous injections of mixed suspension of complete Freund's adjuvant and prostatic tissue to induce autoimmune prostatitis (EAP). Tactile allodynia was quantified using Von-Frey as a measure of pelvic pain behavior. This measurement was performed on 0th, 5th, 10th, 20th, 30th and 40th day in the two groups. After that, the prostate samples were collected and processed for HE staining, while the expressions of NGF and ASIC3 were measured by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Von-Frey filaments measurement showed that pelvis pain in EAP group was significantly more obvious than that in control group. HE staining found lymphocytes and neutrophils infiltrated in the prostate of EAP rats, but no inflammatory cells in the prostate of control group rats. The expressions of NGF and ASIC3 were significantly increased in EAP group when compared with control group ($P<0.01$). **Conclusion** The expressions of NGF and ASIC3 in the prostate with EAP were significantly increased, which may be the important mediators of chronic pelvic pain.

【Key words】 Type Ⅲ prostatitis /chronic prostatitis Chronic pelvic pain NGF ASIC3 Von-Frey

Ⅲ型前列腺炎,又称为慢性前列腺炎(CP)/慢性盆腔疼痛综合征(CPPS),是泌尿外科常见的疾病,其病因复杂,引发疼痛的机制不明确。中国患有

CP/CPPS 的患者约占男性人群的 12%^[1],主要表现为骨盆区域的慢性疼痛及不适,疼痛常伴有下尿路症状、性功能障碍及精神神经症状,严重影响患者的生活质量。

正常生理情况下,神经生长因子(NGF)属于交感神经元、感觉神经元和中枢部分胆碱能神经元的

* 云南省应用基础研究基金(No. 2014FB042)资助

[△] 通信作者, E-mail: 1503401823@qq.com

营养因子,参与神经营养功能。炎症性反应中,NGF 水平升高可致疼痛加剧。近年来,NGF 致中枢神经细胞痛觉过敏的作用引起了更多重视,它被认为是联系炎症和痛觉过敏的重要纽带,是疼痛持续状态的重要炎症介质^[2]。人体内环境的 pH 受到精密的调节而达到稳定,细胞可以通过直接门控的离子通道,如酸敏感的离子通道(ASICs)去感受 pH 值变化。机体处于如炎症、缺血或肿瘤组织等病理环境下,组织酸化可使 pH 值降低。三型酸敏感离子通道(ASIC3)是对 pH 值改变最敏感的酸受体,与痛觉过敏及深部组织炎症的关系密切^[3]。

目前 CP/CPPS 发病机制的研究,大多从原来研究炎症反应中的细胞功能过渡到研究炎症反应应答的调节,这些调节机制中最重要的是细胞因子。目前尚无公认的 CP/CPPS 动物模型,本研究通过建立大鼠实验性自发免疫性前列腺炎(EAP)模型,检测大鼠前列腺组织中 NGF、ASIC3 表达的变化,分析 NGF、ASIC3 与Ⅲ型前列腺炎慢性骨盆疼痛之间的关系,为Ⅲ型前列腺炎治疗提供新的思路与方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 2 月龄雄性性成熟 SD 大鼠 50 只(其中 30 只用于实验分组,20 只用于制备大鼠前列腺蛋白提纯液),体质量(200 ± 20) g,由昆明医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂及仪器

弗氏完全佐剂、TritonX-100、戊巴比妥钠(Sigma 公司),百白破疫苗(昆明市五华区卫生防疫站),兔抗 NGF 一抗、兔抗 ASIC3 一抗、FITC 标记羊抗兔二抗、Anti- β -actin(Abcam 公司),Von-Frey 痛觉测试纤维(UGO 公司),相关手术器械、HE 染色、免疫组化及 Western blot 相关仪器由中国科学院昆明动物研究所提供。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及建立 EAP 模型 30 只大鼠随机分成 2 组,分别为对照组、EAP 组,每组 15 只。EAP 组按文献^[4-5]并予改进建立大鼠 CP/CPPS 模型;另取 20 只 SD 大鼠予 4%戊巴比妥钠麻醉后,脱颈处死,取出前列腺组织,加入与前列腺等重的生理盐水溶液(含 0.5% TritonX-100),冰浴下研磨成悬液,15 000 r/min、4℃离心 30 min,离心后取上清液予 PBS 溶液稀释,制成质量浓度为 60 mg/mL 的大

鼠前列腺蛋白提纯液。以 1:1 体积比与弗氏完全佐剂充分混合研磨,形成油包水状态,取 1.0 mL 于 EAP 组大鼠盆腔区域皮下、双侧肩胛皮下多点注射,同时腹腔注射百白破疫苗 0.5 mL,对照组大鼠于相同区域注射等量 0.9%生理盐水。每组均分别于建模第 0、7、14、28 天注射。

1.3.2 痛觉测试 予 Von-Frey 测痛纤维分别于建模第 0、5、10、20、30、40 天对两组大鼠进行痛觉测试。具体方法为:将大鼠分别置于透明塑料箱中(15 cm×15 cm×15 cm),其底板为不锈钢丝格栅,让其适应半小时后,予 Von-Frey 纤维丝 1 g、2 g、4 g、8 g、15 g、26 g 依次垂直刺激其骨盆区域,每次刺激时间持续 2 s,间隔 5 s 后相同力度重复刺激,每种力度均刺激 100 次。Von-Frey 纤维丝刺激阳性反应^[6]:腹部急剧收缩;立即舔或刮擦细丝刺激的区域;跳跃。计数在相同时间点及相同刺激力度下,每组大鼠 100 次刺激中呈阳性反应的次数,所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $(\bar{x} \pm s)/100 \times 100\%$ 为疼痛反应频率。

1.3.3 HE 染色 于建模第 40 天痛觉测试完成后,将两组大鼠麻醉下脱颈处死,取出前列腺组织,洗涤干净后,分别装入无菌容器中,体积分数为 4%的中性甲醛固定,常规石蜡包埋、切片、HE 染色、脱水、透明、中性树胶封片。显微镜下观察前列腺组织及细胞变化。

1.3.4 免疫组化检测大鼠前列腺组织 NGF、ASIC3 蛋白的表达 常规取出前列腺组织,予体积分数为 4%的中性甲醛固定、石蜡包埋,切片、脱蜡、入水、抗原修复,切片上滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min。滴加一抗(anti-NGF 抗体浓度 1:250,anti-ASIC3 抗体浓度 1:200),4℃过夜。滴加生物素化二抗(IgG),37℃维持 20 min。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP),37℃维持 20 min。最后予 DAB 显色,苏木素复染,封片,显微镜下观察。每张切片在 400 倍光镜下拍 10 个视野,经 Image-Pro plus 6.0 软件转化为灰度值后进行分析,取 10 个视野灰度值的平均值。

1.3.5 Western blot 检测大鼠前列腺组织 NGF、ASIC3 蛋白的表达 常规提取前列腺组织,于冰浴中 10 min,室温平衡。经 100 g/L SDS-PAGE 膜转印 2 h,以 5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入一抗(anti-NGF 抗体浓度 1:1 000,anti-ASIC3 抗体浓度 1:400)、anti- β -actin(1:4 000) 4℃反应过夜。加入 HRP 羊抗兔二抗(1:6 000)室温孵育 2 h,ECL 化

学发光法显色,曝光,显影,定影。扫描仪扫描实验结果,GEL-Pro4 图像分析软件分析灰度值,以目的条带与内参 β -actin 灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析和 LSD 检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

两组大鼠在建模期间一般情况良好(进食饮水正常,精神活跃,活动度好,体毛颜色光亮),实验期间大鼠未出现死亡现象。

2.1 各组大鼠痛觉测试

附表 Von-Frey 测试两组大鼠骨盆区域疼痛表现/%, n=15

Table The frequency of pelvic pain behavior in rats detected by Von-Frey filaments/%, n=15							
Group	Stimulus	0 d (baseline)	5 d	10 d	20 d	30 d	40 d
Control	1 g	2.67±1.95	4.53±3.20	4.00±1.81	4.13±1.68	4.33±1.63	4.60±1.64
	2 g	5.73±3.03	7.47±3.31	6.67±2.29	7.33±2.09	8.40±2.69	8.53±2.80
	4 g	8.60±3.18	10.73±3.67	9.13±2.75	10.93±2.40	11.93±2.71	12.07±3.08
	8 g	12.00±3.61	15.60±2.50	13.73±2.52	14.00±2.07	15.93±1.67	16.47±1.30
	16 g	14.47±3.98	17.60±2.82	16.40±2.35	17.13±1.46	17.13±1.36	18.67±1.68
	25 g	17.33±4.03	19.93±2.71	19.40±2.13	19.93±2.34	21.07±1.87	21.80±2.18
EAP	1 g	3.33±2.58	17.60±5.34*	21.47±4.44*	24.93±4.28*	27.47±6.47*	29.33±5.42*
	2 g	5.40±2.80	23.93±4.30*	27.47±5.73*	29.47±4.31*	33.60±6.33*	34.00±6.34*
	4 g	8.13±2.39	33.93±3.86*	37.33±5.33*	37.73±4.76*	39.67±5.54*	40.13±6.76*
	8 g	11.60±3.07	43.40±7.76*	45.20±6.26*	48.60±7.60*	48.07±6.34*	50.33±7.52*
	16 g	13.60±3.87	50.80±9.00*	52.00±8.35*	54.53±7.90*	58.00±6.85*	59.07±9.28*
	25 g	16.93±4.85	56.40±11.09*	57.27±10.75*	61.87±11.55*	65.13±9.12*	65.33±11.17*

* $P<0.01$, vs. control group with the same stimulate intensity at the same time

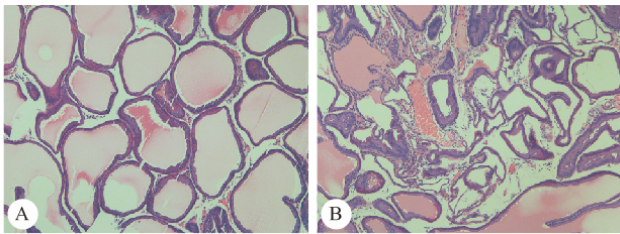


图 1 对照组(A)和 EAP 组(B)大鼠前列腺 HE 染色。×100
Fig 1 HE staining of prostate in rats of control (A) and EAP (B) groups. ×100

常大鼠前列腺组织有少量 NGF、ASIC3 蛋白表达, EAP 组大鼠前列腺组织 NGF(374.60 ± 45.60)、ASIC3(300.10 ± 4.93)蛋白表达较对照组(NGF: 226.80 ± 28.71 , ASIC: 110.20 ± 5.76)升高($P<0.01$),主要表达于细胞核及细胞浆。Western blot 结果与免疫组化结果一致(NGF, 对照组 vs. EAP 组: 0.35 ± 0.02 vs. 0.73 ± 0.02 ; ASIC3, 对照组 vs. EAP 组: 0.26 ± 0.01 vs. 0.53 ± 0.01 ; P 均 <0.01)。

大鼠骨盆区域痛觉测试显示:建模第 5、10、20、30、40 天,所有力度下 EAP 组骨盆疼痛表现较对照组升高($P<0.01$),提示大鼠 EAP 模型建模成功。见附表。

2.2 病理学检查结果

结果见图 1。前列腺组织 HE 染色发现 EAP 组大鼠前列腺出现局部炎症,表现为间质内淋巴细胞和中性粒细胞浸润,腺体周围充血明显,未见明显组织损伤。对照组大鼠前列腺间质未见明显炎症细胞浸润。

2.3 大鼠前列腺组织中 NGF 和 ASIC3 蛋白的表达

结果见图 2、图 3。免疫组化染色结果显示,正

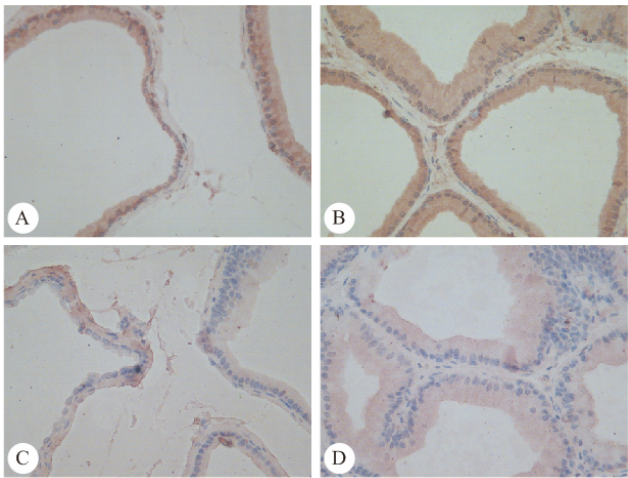


图 2 大鼠前列腺组织 NGF 和 ASIC3 免疫组化染色。SP ×400
Fig 2 Immunohistochemical staining of prostate in rats. SP ×400
A: Control group (NGF); B: EAP group (NGF); C: Control group (ASIC3); D: EAP group (ASIC3)

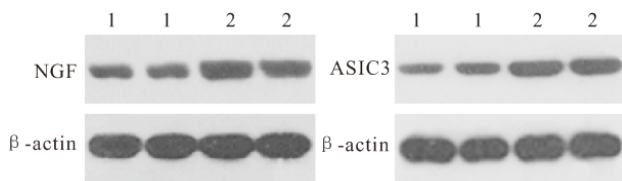


图 3 Western blot 检测大鼠前列腺组织 NGF 和 ASIC3 蛋白的表达
Fig 3 The expressions of NGF and ASIC3 proteins of prostate in rats
(Western blot)

1: Control group; 2: EAP group

3 讨论

美国国立卫生研究所(NIH)将 CP/CPSS 的特征定义为慢性骨盆疼痛表现和没有尿路感染或可证明的细菌感染情况下出现尿频、尿急等排尿症状,可影响所有成年的男性^[7]。持续性、药物难以控制的顽固性骨盆疼痛是影响 CP/CPSS 患者生活质量最主要的症状及就诊的主要原因。CP/CPSS 病因十分复杂,存在广泛争议,中国泌尿外科疾病诊断治疗指南明确把缓解疼痛作为 CP/CPSS 治疗的首要目标^[8]。

EAP 的特征在于前列腺炎症与外周前列腺特异性自身免疫应答相关,用前列腺抗原(PAg)加弗氏佐剂在啮齿动物中免疫诱导后形成的 EAP,与人类 CP/CPSS 相比具有相似的临床和免疫学特征^[9]。目前,CP/CPSS 动物模型制作尚无公认的标准方法,本实验按照文献^[4-5]方法并稍予改进,选取 SD 大鼠作为实验动物,取大鼠前列腺蛋白提纯液与弗氏完全佐剂混悬液于大鼠盆腔、肩胛皮下等区域注射,注射时间为 EAP 模型建立第 0 天、7 天、14 天、28 天,而国内外多采用第 0 天、30 天 2 次或第 0 天、15 天、30 天 3 次注射,大鼠前列腺蛋白提纯液质量浓度由 15 mg/mL 至 60 mg/mL 不等。本实验选用 60 mg/mL 的大鼠前列腺蛋白提纯液与弗氏完全佐剂混合,通过选配较高质量浓度的大鼠前列腺蛋白提纯液及增加注射次数以增强大鼠的自身免疫反应,建模期间未出现大鼠死亡现象。

本研究在建模 40 d 过程中,分别于第 0、5、10、20、30、40 天对大鼠骨盆区域进行 Von-Frey 痛觉测试,建模后第 5 天,EAP 组大鼠骨盆疼痛表现迅速增加,且维持至第 40 天。对照组大鼠骨盆区域 Von-Frey 痛觉测试并未见明显变化,维持于基线水平。提示使用 SD 大鼠自身 PAg 免疫的方法建立的 SD 大鼠 CP/CPSS 模型可模仿 CP/CPSS 慢性骨盆疼痛表现及维持状态。40 d 后将 EAP 组及对照

组大鼠处死,进行 HE 染色观察大鼠前列腺组织病理学改变:EAP 组大鼠前列腺间质内淋巴细胞和中性粒细胞浸润,腺体周围充血水肿,腺腔呈不规则改变。对照组未见明显炎症细胞浸润,腺体及间质无充血水肿,腺腔排列规律。两组大鼠病理学的改变,更加证实了此方法可成功建立 CP/CPSS 大鼠模型。为今后的 CP/CPSS 动物模型研究奠定了良好的基础。

NGF 最先被鉴定为对伤害性原发性神经元发育至关重要的物质,在产生疼痛、痛觉过敏及慢性疼痛的状态维持中有着重要的作用^[10]。NGF 在慢性疼痛病症例如间质性膀胱炎、前列腺炎、关节炎、胰腺炎、慢性头痛、癌症疼痛、糖尿病性神经病变和非癌性疼痛中表达增加,表明 NGF 介导的信号传导在慢性伤害性过程中持续活跃,使得神经性疼痛的状态持续^[11]。同时,机体炎症期间,细胞内容物的外排、缺氧代谢产物和乳酸生成,使得细胞外 pH 降低。细胞外 pH 降低可通过 ASICs 阳离子门控通道去极化直接激活伤害感受器,引起痛觉过敏和异常性疼痛^[12]。现已知 ASICs 包括 6 种亚型(ASIC1a、ASIC1b、ASIC2a、ASIC2b、ASIC3 和 ASIC4)。其中,ASIC3 作为一种广泛存在于痛觉传导通路上的酸敏感阳离子通道,对炎症环境中痛觉过敏的形成起着重要作用^[13]。且 NGF 与 ASIC3 有着密切相关的联系,NGF 是控制 ASIC3 在感觉神经元中表达水平的主要促炎因子,神经元细胞的研究显示 ASIC3 的表达和启动子活性由 NGF 诱导^[14]。

本研究发现 EAP 组前列腺组织中 NGF 和 ASIC3 蛋白的表达较对照组明显升高,NGF 及 ASIC3 主要表达于细胞核及细胞浆。DONE 等^[15]发现 NGF 在 CP/CPSS 患者前列腺液及 EAP 小鼠模型前列腺中表达增加,EAP 小鼠予 NGF 拮抗剂后,其骨盆疼痛症状表现可减轻。MARTÍNEZ-ROJAS 等^[16]建立由福尔马林诱导的大鼠继发性痛觉过敏模型,发现 ASIC3 参与了继发性痛觉过敏的发展和维持,ASIC3 拮抗剂可减轻大鼠慢性疼痛症状。另外,敲除 ASIC3 基因的小鼠(ASIC3^{-/-})可减弱炎症反应中对机械性疼痛感的反应^[17]。我们之前的研究也发现膀胱过度活动综合征及脊髓损伤后逼尿肌反射亢进所致的排尿刺激症状,分别与膀胱内 ASIC3 及 NGF 的异常表达相关^[18-19]。根据目前国内外研究基础及本课题组研究成果,结合 ASIC3 及 NGF 的生理特性,我们推测 CP/CPSS 骨

盆疼痛表现与 NGF、ASIC3 的表达增加密切相关。

目前 CP/CPPS 疼痛发病机制尚未明确。本研究通过建立大鼠 CP/CPPS 模型,检测 NGF、ASIC3 在 CP/CPPS 模型前列腺组织中的表达,发现 NGF、ASIC3 表达水平的变化与 CP/CPPS 大鼠模型的骨盆疼痛程度可能有关,NGF、ASIC3 在 CP/CPPS 疼痛的发生、发展中可能起到一定作用。NGF、ASIC3 有望作为新的生物标志物来评价 CP/CPPS 的症状和治疗的效果。下一步拟使用 NGF、ASIC3 拮抗剂对大鼠 CP/CPPS 模型进行干预,以进一步证实 NGF、ASIC3 在 CP/CPPS 疼痛机制中作用。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Z, LI Z, YU Q, *et al.* The prevalence of and risk factors for prostatitis-like symptoms and its relation to erectile dysfunction in Chinese men. *Andrology*, 2015, 3(6): 1119-1124.
- [2] KELLEHER JH, TEWARI D, MCMAHON SB. Neurotrophic factors and their inhibitors in chronic pain treatment. *Neurobiol Dis*, 2017, 97(PtB): 127-138.
- [3] SCHUHMACHER LN, SMITH ES. Expression of acid-sensing ion channels and selection of reference genes in mouse and naked mole-rat. *Mol Brain*, 2016, 9(1): 97.
- [4] HU Y, NIU X, WANG G, *et al.* Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome impairs erectile function through increased endothelial dysfunction, oxidative stress, apoptosis, and corporal fibrosis in a rat model. *Andrology*, 2016, 4(6): 1209-1216.
- [5] 赵秀娟, 王 红, 徐 晨. 大鼠慢性前列腺炎模型长时程形态学研究. *重庆医科大学学报*, 2011, 36(6): 696-698.
- [6] QUICK ML, DONE JD, THUMBIKAT P. Measurement of tactile allodynia in a murine model of bacterial prostatitis. *J Vis Exp*, 2013, 71: e50158. doi:10.3791/50158.
- [7] CHOPRA S, SATKUNASIVAM R, ARON M. Feasibility of robotic radical prostatectomy for medication refractory chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: initial results. *Indian J Urol*, 2016, 32(3): 238-241.
- [8] 那彦群. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南(2014 版). 北京: 人民卫生出版社, 2013: 447-448.
- [9] BRESER ML, MOTRICH RD, SANCHEZ LR, *et al.* Chronic pelvic pain development and prostate inflammation in strains

of mice with different susceptibility to experimental autoimmune prostatitis. *Prostate*, 2017, 77(1): 94-104.

- [10] MIZUMURA K, MURASE S. Role of nerve growth factor in pain. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 227: 57-77. doi:10.1007/978-3-662-46450-2-4.
- [11] MCKELVEY L, SHORTEN GD, O'KEEFFE GW. Nerve growth factor-mediated regulation of pain signalling and proposed new intervention strategies in clinical pain management. *J Neurochem*, 2013, 124(3): 276-289.
- [12] MARRAM S, FERRU-CLEMENT R, BREUIL V, *et al.* Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *EMBO J*, 2016, 35(4): 414-428.
- [13] CORROW K, GIRARD BM, VIZZARD MA. Expression and response of acid-sensing ion channels in urinary bladder to cyclophosphamide-induced cystitis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 298(5): F1130-F1139 [2017-01-22]. <http://ajprenal.physiology.org/content/298/5/F1130.long>. doi:10.1152/ajprenal.00618.2009.
- [14] CHANG DS, HSU E, HOTTINGER DG, *et al.* Anti-nerve growth factor in pain management: current evidence. *Pain Res*, 2016, 9: 373-383 [2017-01-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4908933/>. doi: 10.2147/JPR.S89061.
- [15] DONE JD, RUDICK CN, QUICK ML, *et al.* Role of mast cells in male chronic pelvic pain. *J Urol*, 2012, 187(4): 1473-1482.
- [16] MARTÍNEZ-ROJAS VA, BARRAGÁN-IGLESIAS P, ROCHA-GONZÁLEZ HI, *et al.* Role of TRPV1 and ASIC3 in formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia. *Pharmacol Rep*, 2014, 66(6): 964-971.
- [17] SLUKA KA, RASMUSSEN LA, EDGAR MM. Acid-sensing ion channel 3 deficiency increases inflammation but decreases pain behavior in murine arthritis. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(5): 1194-1202.
- [18] 刘孝东, 陈剑珩, 李 颖, 等. 三型酸敏感离子通道在大鼠 OAB 模型膀胱组织中表达的意义. *四川大学学报(医学版)*, 2016, 47(2): 174-179.
- [19] 刘孝东, 申吉泓, 张建华, 等. 神经生长因子在脊髓高位损伤大鼠膀胱中表达量的变化与意义. *昆明医学院学报*, 2009, 30(10): 37-41.

(2017-06-30 收稿, 2017-10-20 修回)

编辑 余 琳