·基础研究·

电针对神经病理性疼痛大鼠痛觉过敏及脊髓背角钾-氯离子协同转运体2表达的影响*

李思思[1] 屠文展[1] 姜 霞[1] 陈温慈[1] 胡奇妙[1] 谷鹏鹏[1] 蒋松鹤[1,2]

摘要

目的：观察患侧电针和健侧电针足三里穴、阳陵泉穴对神经病理性疼痛大鼠行为学表现以及脊髓背角钾-氯离子协同转运体2（KCC2）表达的影响，探讨患侧选穴和健侧选穴两种针刺方案的镇痛效应，以及KCC2在电针镇痛效应中的作用。

方法：将40只雄性SD大鼠随机分为4组：假模组、模型组、患侧电针组、健侧电针组，每组10只。建立大鼠坐骨神经慢性压迫性损伤（CCI）模型，治疗组于术后1周开始电针治疗，每天1次，连续7天。各组于术前（0天）及术后3、5、7、10、12、14天分别测量大鼠患侧足机械足反射阈值（MWT）和热缩足反射潜伏期（TWL）。术后14天处死大鼠，取脊髓组织行HE染色观察组织病理学改变，并采用免疫组化方法检测脊髓背角KCC2蛋白的表达。

结果：与术前比较，CCI各组大鼠痛阈明显降低，出现痛觉过敏（$P<0.001$），电针治疗后大鼠MWT和TWL均有不同程度的持续升高，且患侧与健侧电针相比无明显差异。HE染色结果提示，患侧电针组与健侧电针组脊髓背角组织及神经元病变程度较模型组减轻。术后14天患侧与健侧电针组较模型组脊髓背角患侧KCC2表达显著增加（$P<0.05$），并且患侧电针组与健侧电针组无明显差异。

结论：患侧电针和健侧电针能产生类似的镇痛效果，均可减轻外周神经损伤后引起的痛觉过敏。患侧电针与健侧电针治疗均可抑制KCC2蛋白的表达下调，电针的镇痛作用可能是通过增加脊髓背角中KCC2的表达实现的。

关键词 针刺；神经病理性疼痛；脊髓背角；钾-氯离子协同转运体2

中图分类号：R441.1,R493 **文献标识码**：A **文章编号**：1001-1242（2017）-03-0258-06

Effect of electro-acupuncture on the hyperalgesia and the expression of KCC2 in spinal cord dorsal horn of rats with neuropathic pain/LI Sisi, TU Wenzhan, JIANG Xia, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(3): 258—263

Abstract

Objective: To investigate the effect of electro-acupuncture (EA) on the behaviors and the expression of KCC2 in spinal cord dorsal horn by applying Zusanli acupoint (ST-36) and Yanglingquan acupoint (GB-34) in chronic constriction injury (CCI) rats.

Method: Forty male SD rats were randomly divided into 4 groups: sham CCI group, CCI group, ipsilateral EA group and contralateral EA group, with 10 cases in each group. EA groups received EA treatment for 7 days. The mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) were tested on the day before operation and at 3,5,7,10,12,14 days after CCI operation. In addition, the pathological changes of spinal cord dorsal horn were observed by HE stain and the expression of KCC2 was detected by immunohistochemistry.

Result: The MWT and TWL values were decreased after CCI operation when compared with pre-operation($P<$

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.03.003

*基金项目：国家自然科学基金面上项目（81574074）；浙江省自然科学基金资助项目（LY16H270016）；温州市科技局资助项目（Y20140221）

1 温州医科大学附属第二医院康复医学科，325027；2 通讯作者

作者简介：李思思，女，硕士研究生； 收稿日期：2016-08-30

0.001). After EA treatment for 7 days, the MWT and TWL values for two EA groups were markedly increased (P<0.05). EA treatment significantly attenuated pathological changes of spinal cord dorsal horn. Furthermore, compared with the CCI group, the KCC2 expression was upregulated in the ipsilateral EA group and contralateral EA group after EA treatment(P<0.05), and there was no significant difference between the ipsilateral EA group and contralateral EA group.

Conclusion: EA could reduce CCI-induced hyperalgesia. The analgesic effect of EA may be achieved by inhibiting the expression of KCC2 in spinal cord dorsal horn.

Author's address The Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, 325027

Key word acupuncture;neuropathic pain;spinal cord dorsal horn;KCC2

钾-氯离子协同转运体 2(K^+-Cl^- co-transporter,KCC2)是阳离子和氯离子共转运体(cation-chloride cotransporters,CCCs)家族中的一员,广泛分布于中枢神经系统(CNS)[1]。Coull 等[2]首次提出KCC2可能在疼痛的产生和维持中具有重要作用。后又有研究发现[3—5]KCC2下调与一些神经系统疾病和疼痛的发生发展密切相关。电针(electro-acupuncture,EA)源于传统针灸,具有很好的镇痛作用,常用于治疗神经病理性疼痛(neuropathic pain,NP)[6],但其镇痛机制尚不明确。本实验采用坐骨神经慢性压迫性损伤(chronic constrictive injury,CCI)疼痛模型,通过患侧电针和健侧电针足三里穴、阳陵泉穴,观察大鼠造模侧行为学的变化及KCC2蛋白在L4-6脊髓背角上的表达变化,旨在探讨患侧选穴和健侧选穴两种针刺方案的镇痛效应,KCC2与神经病理性疼痛形成的关系及是否参与了电针镇痛,为深入理解针刺镇痛的机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用健康成年雄性SD大鼠40只,体重200—250 g,由温州医科大学实验动物中心提供,随机分为4组,每组10只。①假模组:仅暴露坐骨神经2—3min,不打结;②模型组:右后肢造模不电针;③患侧电针组:右后肢造模后电针右侧足三里穴,阳陵泉穴;④健侧电针组:右后肢造模后电针左侧足三里穴、阳陵泉穴。本实验已通过温州医科大学动物保护和使用委员会同意,并且操作符合实验动物伦理学要求。在保证完成实验的前提下,尽量减少动物使用数量。动物均饲养于动物房清洁笼内,自由饮食、饮水,动物房室温(22±2)℃,相对湿度为50%—70%,动物房保持昼夜12h规律变化。

1.2 主要实验试剂及仪器

KCC2小鼠单克隆抗体:英国Abcam公司,ab134300;小鼠二步法检测试剂盒:北京中杉金桥生物技术有限公司;2450型爪痛觉测试仪:美国IITC LifeScience公司;37370型爪热觉测试仪:意大利UGO公司;显微镜:日本Olympus公司。

1.3 模型制作

CCI组根据参考文献7提供的方法进行手术。5%水合氯醛(0.6ml/100g)腹腔注射麻醉,大鼠右后肢大腿去毛、备皮,常规消毒,沿右股骨下缘正中横向切开皮肤1cm,钝性分离肌肉,暴露右侧坐骨神经,用4—0可吸收铬制羊肠线在坐骨神经分叉前打4个间隔1mm的松结,松紧度以右大腿肌肉或足指微微抽动为度,后逐层缝合肌肉筋膜和皮肤,表面消毒。

1.4 痛阈测定

大鼠于术前及术后3、5、7、10、12、14天进行痛阈值的测定,测试时间为15:00—18:00。足机械足反射阈值(mechanical withdrawal threshold,MWT):采用2450型(IITC Life Science,California,USA)爪痛觉测试仪测定右后肢触诱发痛阈。将大鼠置于笼中适应20min后,待大鼠安静时逐渐用力加压于右后肢足底至有抬足、躲避或舔足等动作视为阳性反应,后记录抬腿时施加于足底的最大力度(g),重复6次,每次间隔5min,去掉最大值和最小值后取平均值。将手术前后机械性痛阈无变化即造模失败的大鼠剔除实验。

热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency,TWL):采用37370型(Ugo-Basile, Milan,Italy)

爪热觉测试仪测定各组大鼠TWL值。将大鼠置入观察笼内，待其安静后用仪器发射红外光照射实验大鼠右后肢足底，安静大鼠逃避性抬腿时，仪器自动切断热源，记录开始照射至出现缩足逃避反射时间(s)，每次照射时间不超过40s，以防大鼠足底灼伤。同一部位重复5次，间隔10min，去掉最大值和最小值后取平均值，

1.5 电针治疗

电针组于手术7天后开始给予电针治疗，连续治疗7d，每日治疗1次。穴位选择："足三里"(ST-36)与"阳陵泉"(GB-34)穴，足三里穴位于膝关节后外侧，在腓骨小头下方约5mm处；阳陵泉穴位于足三里上外侧5mm处[8]。电针治疗：环境安静，将大鼠固定于大鼠固定器上，头部与四肢可自由活动，用华佗牌一次性无菌针(0.18mm×13mm)施针，垂直进针3mm。本实验采用韩氏穴位神经刺激仪LH402型给予2/100Hz"疏密波"刺激，强度为1.5mA(以腿部肌肉轻微抽动为度)，留针30min后拔针。

1.6 取材、灌注固定和组织切片

所有实验大鼠于术后14天处死取材。处死方法：腹腔注射10%水合氯醛(0.4ml/100g)行深度麻醉，经主动脉先快速灌注生理盐水200ml，后用4%的多聚甲醛磷酸缓冲液灌注，取脊髓L4-6，置于4%多聚甲醛内后固定，标本经梯度乙醇脱水、石蜡包埋后连续冠状面切片，厚为5μm。

1.7 HE染色

标本切片60℃烤1h，脱腊，苏木精染色8min，流水冲洗后伊红染色2min，经梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，放置显微镜下观察。

1.8 免疫组化

标本切片60℃烤1h，脱腊，热修复抗原，3%H_2O_2孵育10min后滴加10%山羊血清封闭液37℃孵育1h。按免疫组化常规步骤进行染色，滴加稀释的KCC2一抗(1∶200)覆盖标本，4℃过夜。次日复温30min，滴加组化二抗，DAB显色、苏木精复染、中性树脂封片后置于显微镜下观察。KCC2阳性区域染成棕褐色，采用Image-Pro Plus 6.0软件分析脊髓背角总面积和KCC2免疫反应阳性面积，计算KCC2免疫反应阳性面积占脊髓背角总面积的百分比，以此来反映脊髓背角KCC2表达。

1.9 统计学分析

所得数据均以均数±标准差表示，用SPSS 16.0软件处理，行为学数据采用重复测量方差分析，组间比较采用单因素方差分析，后进行LSD检验，$P<0.05$认为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 模型成功的鉴定

本研究选用CCI模型与人类神经病理性疼痛的某些特征十分相似，CCI术后第1天大鼠便出现行走时患肢拖动、跛行，足呈轻度外翻状，且有时出现舔舐、悬空等后肢保护现象，表明CCI模型制备成功。

2.2 行为学观察

2.2.1 大鼠患侧足MWT：与假模组比较，CCI各组大鼠MWT值术后第3天降低，直到第14天，与术前相比差异均有显著性意义($P<0.001$)；电针治疗后，患侧电针组与健侧电针组大鼠术后第10天MWT值开始提高，术后第14天的MWT值明显高于模型组而明显低于假模组，差异均有显著性意义($P<0.05$)。患侧电针组大鼠电针治疗后MWT值升高幅度虽大于健侧电针组，但差异无显著性意义($P>0.05$)。见表1。

2.2.2 大鼠患侧足TWL：与假模组比较，CCI各组大鼠TWL值术后第3天降低，直到第14天，与术前相比差异均有显著性意义($P<0.001$)；电针治疗后，患侧电针组与健侧电针组大鼠术后第10天TWL值开始提高，术后第14天的TWL值明显高于模型组而明显低于假模组，差异均有显著性意义($P<0.05$)。患侧电针组大鼠电针治

表1 各组大鼠患侧机械足反射阈值比较 ($\bar{x}\pm s$，g)

组别	例数	0	3	5	7	10	12	14
假模组	10	31.2±2.59	31.2±1.13	30.4±2.99	30.4±1.23	30.0±2.1	31.1±2.34	32.4±2.32
模型组	10	31.4±1.11	14.3±0.98①	11.8±0.96①	10.4±1.07①	9.8±1.3①	10.6±1.32①	11.2±0.85①
患侧电针组	10	31.2±1.44	14.2±0.62①	11.9±0.79①	10.4±0.60①	13.3±0.94①②	16.8±1.80①②	19.2±1.07①②
健侧电针组	10	29.6±0.75	13.9±0.46①	12.0±0.41①	10.5±0.35①	11.3±0.35①②	14.1±0.41①②	17.3±0.71①②

注：①与假模组相比$P<0.001$；②与模型组相比$P<0.05$

疗后TWL值升高幅度虽大于健侧电针组,但差异无显著性意义(P>0.05)。见表2。

2.3 HE染色观察脊髓组织和神经元

假模组神经元形态完整、规则,排列整齐,胞体内核仁清晰,可见分布均匀的尼氏体。模型组可见神经元受损,可发生变性或坏死,主要表现为胞体肿胀,胞质伴有空泡变性,细胞核出现固缩、碎裂和溶解,并可见周围组织疏松,形成水肿带,说明CCI模型制备成功。电针组可见神经元排列存在轻度不规则,胞体轻度肿胀,部分神经元出现核固缩,周围组织相对模型组致密,总体情况优于模型组。见图1。

2.4 电针对L4-6脊髓背角KCC2蛋白表达的影响

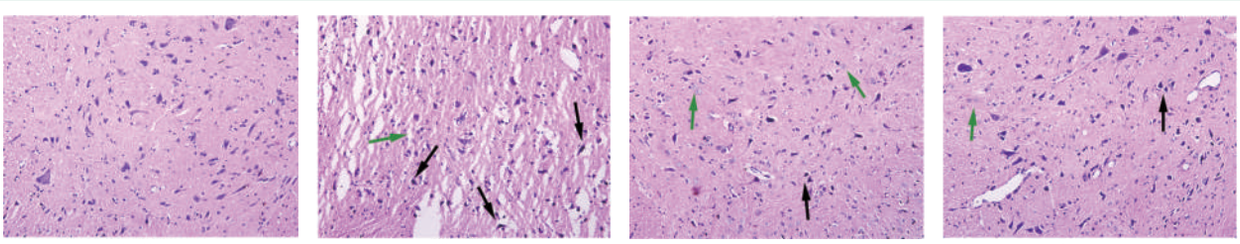
与假模组相比,其余各组大鼠KCC2蛋白表达下调(P<0.001);与模型组相比,患侧电针组与健侧电针组能够明显上调KCC2蛋白的表达(P<0.05),但仍低于假模组(P<0.001)。健侧电针组与患侧电针组相比,并无显著性差异(P>0.05)。见图2,表3。

表2 各组大鼠患侧机械足反射阈值比较 ($\bar{x}\pm s$,g)

组别	例数	0	3	5	7	10	12	14
假模组	10	21.2±2.98	20.4±0.74	19.8±0.73	19.9±0.74	20.6±1.36	18.6±1.17	20.2±1.47
模型组	10	21.7±1.99	13.9±0.91①	12.1±0.66①	10.5±0.34①	8.3±0.50①	8.09±0.87①	8.1±0.34①
患侧电针组	10	20.9±1.60	13.8±0.40①	12.2±0.42①	10.5±0.53①	11.8±0.75①②	13.8±0.28①②	16.3±0.66①②
健侧电针组	10	20.9±2.91	12.7±0.50①	11.8±0.48①	10.1±0.44①	11.2±0.69①②	12.0±0.51①②	15.3±0.55①②

注:①与假模组相比P<0.001;②与模型组相比P<0.05

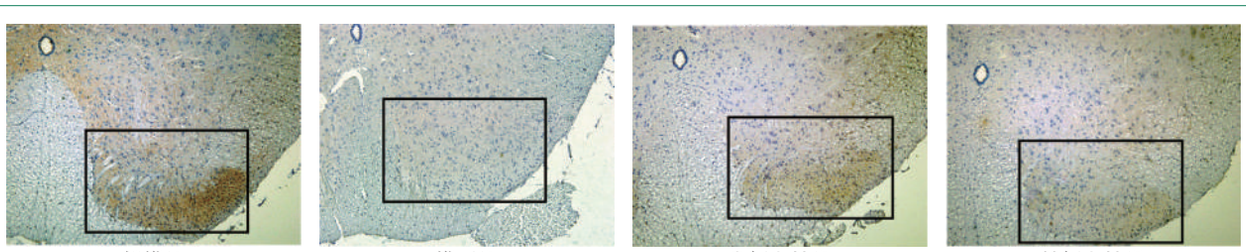
图1 各组大鼠患侧脊髓组织和神经元形态 (HE染色,×200)



假模组 模型组 患侧电针组 健侧电针组

黑色箭头所指为变性坏死的神经元,绿色箭头所指为核固缩。

图2 各组大鼠患侧脊髓背角KCC2蛋白表达 (免疫组化,×100)



假模组 模型组 患侧电针组 健侧电针组

表3 各组大鼠患侧脊髓背角KCC2蛋白表达结果 ($\bar{x}\pm s$,×100)

组别	例数	KCC2
假模组	10	0.12±0.00
模型组	10	0.04±0.01①
患侧电针组	10	0.08±0.02①②
健侧电针组	10	0.07±0.01①②

注:①与假模组比较P<0.001;②与模型组比较P<0.05

3 讨论

长久以来,电针一直被广泛应用于临床各类疼痛的治疗,其疗效得到国内外认可[6,9]。电针起源于传统针灸,遵循中医基础理论和传统经穴理论指导,与药物、手术等治疗相比具有操作简单、副作用轻、损伤小、费用合理、容易推广、易于被患者所接受等优点。它通过刺激人体某些特定经络腧穴,达到通行经络、调畅气血、调整脏腑功能,从而起到较好的

镇痛作用。

神经病理性疼痛是由于躯体感觉系统的损伤或疾病所引起的疼痛，是一种较难治愈的慢性疼痛。临床上其发病率较高，严重影响患者的工作和生活[10]。坐骨神经慢性压迫性损伤是慢性周围神经性疼痛的特征性例子，属于中医痹症范围，发病多因感受风寒湿邪或跌仆闪挫，以致经络受损，气血阻滞，不通则痛。

CCI模型疼痛特征与临床上神经病理性疼痛表现相似，根据针灸治疗神经病理性疼痛的选穴规律，治疗选择“足三里”（ST-36）与“阳陵泉”（GB-34）穴，二者均作用于坐骨神经的神经干及其分支[8]。电针频率是电针刺激的重要参数之一，本实验电针组应用2/100Hz疏密波。2Hz电刺激能促进脑啡肽、内啡肽的释放，产生缓慢而持久的镇痛效应；100Hz电刺激可以促进强啡肽释放，产生快速而短暂的镇痛效果。2/100 Hz结合交替运用能引起脑啡肽、内啡肽和强啡肽同时释放，达到最好的镇痛效果[11]。

本实验通过电针刺激患侧或健侧“足三里”、“阳陵泉”穴，发现两种取穴方法均可缓解CCI损伤后大鼠的痛觉过敏，电针7天后大鼠MWT和TWL均有不同程度的持续升高，且患侧与健侧电针相比无明显差异。这一结果提示电针可以提高神经病理性痛大鼠的痛阈，而且健侧电针效果与患侧电针类似。双侧效果类似的原因可能是由于针灸学认为从经络生理上看，经络系统对称分布于人体，且“上下相连，左右贯通”。从现代医学角度来看，人体感觉神经纤维、运动神经纤维在中枢内均与对侧交叉，这也进一步说明左右两侧经络是相互沟通的。健侧针刺，即缪刺法，也是传统针刺方法之一，是一种左病治右，右病治左的取穴方法，施治时不仅可避免由于患处局部过多的针刺刺激而增加患者不必要的针刺痛苦，而且可以在针灸治疗同时，配合患处的主动或被动运动，从而增强疗效[12]。

电针参与神经病理性疼痛的内在机制一直是困扰我们的难题，目前国内外对电针治疗神经病理性疼痛的分子及神经化学机制进行大量研究。脊髓背角作为中枢神经系统痛觉信息整合加工的重要部位，是接受和调控伤害性信息由外周向中枢传递的关键部位。脊髓上行传导束包括脊柱突触后纤维、脊丘束、脊网束、脊-中脑束和脊颈丘束，其中起于脊髓背角浅层并投射到臂旁核连接到脑区的脊丘束主要参与痛觉的形成起主要作用，研究表明针刺信号和疼痛信号是交织在一起的[13—15]。大量针刺机理研究结果表明针刺通过中枢神经系统调控神经、内分泌、免疫网络是针刺疗效信号传递的中心环节[16]。目前，已有很多证据表明KCC2在中枢神经系统中发挥着重要作用[17—18]。

本研究通过免疫组化技术观察到CCI模型组大鼠L4-6脊髓背角KCC2蛋白表达明显减少，患侧电针与健侧电针治疗均可抑制KCC2蛋白的表达下调，两组比较无显著差异。结果提示KCC2可能参与了神经病理性疼痛的过程，电针的镇痛作用可能是通过抑制脊髓背角KCC2的表达下调。KCC2作为CCCs家族的一员，在脊髓神经元、海马CA1—CA4区的锥形神经元、颗粒层以及小脑浦肯野纤维和脑干的神经元等中枢神经系统部位均可观察到，并且在脊髓全层都有表达[19]。正常情况下，KCC2主要功能是将Cl^-转运出细胞，维持神经元内的低氯状态，抑制神经元兴奋性[20]。

有研究者在慢性炎性痛[21]和神经病理性痛[22]模型中均发现脊髓背角KCC2表达下调，而且KCC2表达减少在炎性痛后很快出现并长时间持续存在，所以KCC2的表达或功能降低可能参与一些神经系统疾病和疼痛的产生和维持。在神经病理性痛模型中，脊髓小胶质细胞活化后释放脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor，BDNF)，BDNF与酪氨酸蛋白激酶B(tyrosine protein kinase B, TrkB)受体结合后引起KCC2的下调，脊髓背角KCC2表达减少或活性下降，神经元细胞内Cl^-浓度增高，γ-氨基丁酸A受体（gamma-aminobutyric acid A receptor, ，GABA A receptor）Cl^-通道开放后，Cl^-内流减少、消失甚至转变为外流，致使GABA介导的抑制作用减弱，缺失甚至转变为兴奋性作用，改变脊髓背角第I板层神经元的兴奋性，这种反应通过大脑特定神经网络的处理产生痛觉过敏[23]。

4 结论

本实验结果显示，电针可以提高神经病理性疼痛大鼠的痛阈，患侧电针与健侧电针治疗能产生类

似的镇痛效果。患侧电针与健侧电针治疗均可抑制KCC2蛋白的表达下调,电针的镇痛作用可能是通过抑制脊髓背角KCC2的表达下调实现的。本研究一定程度上为临床针刺治疗慢性神经病理性疼痛提供实验依据并为配穴提供了指导。但是有关KCC2的上下游调质以及各信号分子在疼痛传递过程中的具体机制仍不十分清楚,今后可用鞘内注射抑制剂或者基因敲除手段等进一步研究KCC2及其参与的信号通路与电针镇痛的关系。

参考文献

[1] Rivera C,Voipio J,Payne JA,et al. The K^+/Cl^- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation[J]. Nature, 1999, 397(6716): 251—255.

[2] Coull JA,Boudreau D,Bachand K,et al. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain[J]. Nature, 2003, 424(6951): 938—942.

[3] Aguado F,Carmona MA,Pozas E,et al. BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K^+/Cl^- co-transporter KCC2[J]. Development, 2003, 130(7): 1267—1280.

[4] Zhao B,Wong AY,Murshid A,et al. Identification of a novel di-leucine motif mediating K^+/Cl^- cotransporter KCC2 constitutive endocytosis[J]. Cell Signal, 2008, 20(10): 1769—1779.

[5] Zhang Z,Wang X,Wang W,et al. Brain-derived neurotrophic factor-mediated downregulation of brainstem K^+-Cl^- co-transporter and cell-type-specific GABA impairment for activation of descending pain facilitation[J]. Mol Pharmacol, 2013, 84(4): 511—520.

[6] Kim SK,Park JH,Bae SJ,et al. Effects of electroacupuncture on cold allodynia in a rat model of neuropathic pain: mediation by spinal adrenergic and serotonergic receptors[J]. Exp Neurol, 2005, 195(2): 430—436.

[7] Bennett GJ,Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. Pain, 1988, 33(1): 87—107.

[8] 华兴邦,周浩良. 大鼠穴位图谱的研制[J]. 实验动物与动物实验, 1991, (1): 1—5.

[9] Xing GG,Liu FY,Qu XX,et al. Long-term synaptic plasticity in the spinal dorsal horn and its modulation by electroacupuncture in rats with neuropathic pain[J]. Exp Neurol, 2007, 208(2): 323—332.

[10] Jensen TS,Baron R,Haanpaa M,et al. A new definition of neuropathic pain[J]. Pain, 2011, 152(10): 2204—2205.

[11] Silva JR,Silva ML,Prado WA. Analgesia induced by 2- or 100-Hz electroacupuncture in the rat tail-flick test depends on the activation of different descending pain inhibitory mechanisms[J]. J Pain, 2011, 12(1): 51—60.

[12] 娄必丹,龚萍,章薇,等. 针刺"对应穴"治疗痛证的理论探讨[J]. 中国针灸, 2015, 35(1): 77—79.

[13] Millan MJ. The induction of pain: an integrative review[J]. Prog Neurobiol, 1999, 57(1): 1—164.

[14] Millan MJ. Descending control of pain[J]. Prog Neurobiol, 2002, 66(6): 355—474.

[15] 阚宇. 慢性痛大鼠海马NO/cGMP/PKG信号通路在针刺累积镇痛效应中的作用分析[D]. 中国中医科学院, 2013.

[16] 陈波,李明月,丁沙沙,等. 针刺调节神经-内分泌-免疫网络研究进展(英文)[J]. World Journal of Acupuncture-moxibustion, 2014, 24(4): 49—53.

[17] Zhang W,Liu LY,Xu TL. Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats[J]. Neuroscience, 2008, 152(2): 502—510.

[18] Rivera C,Voipio J,Thomas-Crusells J,et al. Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2[J]. J Neurosci, 2004, 24(19): 4683—4691.

[19] Payne JA,Stevenson TJ,Donaldson LF. Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal- specific isoform[J]. J Biol Chem, 1996, 271(27): 16245—16252.

[20] Price TJ,Cervero F,Gold MS,et al. Chloride regulation in the pain pathway[J]. Brain Res Rev, 2009, 60(1): 149—170.

[21] Morales-Aza BM,Chillingworth NL,Payne JA,et al. Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons[J]. Neurobiol Dis, 2004, 17(1): 62—69.

[22] Modol L,Cobianchi S,Navarro X. Prevention of NKCC1 phosphorylation avoids downregulation of KCC2 in central sensory pathways and reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury[J]. Pain, 2014, 155(8): 1577—1590.

[23] Miletic G,Miletic V. Loose ligation of the sciatic nerve is associated with TrkB receptor- dependent decreases in KCC2 protein levels in the ipsilateral spinal dorsal horn[J]. Pain, 2008, 137(3): 532—539.