

復旦大學

本科畢業論文



論文題目：皮膚外用薄荷醇影響機體溫度覺感受的機制初探

姓 名：李哲楷 學 號：19307110210

院 系：生命科學學院

專 業：生物科學

指導教師：薛 磊 職 稱：教 授

單 位：復旦大學生命科學學院

完成日期： 2023 年 05 月 17 日

皮肤外用薄荷醇影响机体
温觉感受的机制初探

完成人

李哲楷

指导小组成员

薛磊 教授

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
一、 前 言.....	3
1.1 温觉感受.....	3
1.2 温度敏感型 TRP 通道.....	4
1.3 薄荷醇与温觉感受.....	7
1.4 主要研究内容.....	8
二、 材料和方法.....	9
2.1 实验材料.....	9
2.2 实验试剂.....	9
2.2.1 行为学实验试剂.....	9
2.2.2 小鼠 DRG 急性分离取材试剂.....	9
2.2.3 Western Blot 实验试剂与抗体.....	9
2.2.3.1 试剂.....	9
2.2.3.2 抗体.....	10
2.2.4 常规 PCR 和 qPCR 实验试剂和引物.....	11
2.2.4.1 试剂.....	11
2.2.4.2 引物.....	11
2.2.5 组织免疫荧光实验试剂和抗体.....	12

2.2.5.1	试剂	12
2.2.5.2	抗体	12
2.3	实验仪器	12
2.4	实验软件	13
2.5	实验方法	13
2.5.1	小鼠长期皮肤外用薄荷醇模型造模.....	13
2.5.2	行为学实验.....	14
2.5.3	小鼠 DRG 的急性分离	14
2.5.3.1	小鼠麻醉	14
2.5.3.2	小鼠心脏灌流	14
2.5.3.3	小鼠 DRG 分离	15
2.5.4	qPCR 实验	16
2.5.4.1	小鼠 DRG 总 RNA 的提取.....	16
2.5.4.2	总 RNA 的逆转录与 PCR 质检	16
2.5.4.3	cDNA 的 qPCR	17
2.5.5	Western Blot 实验.....	17
2.5.5.1	小鼠 DRG 全蛋白的提取.....	17
2.5.5.2	SDS-PAGE 电泳与转膜.....	18
2.5.5.3	封闭、抗体孵育与成像.....	18
2.5.6	组织免疫荧光实验.....	18
2.5.6.1	小鼠 DRG 的分离、固定和脱水.....	18
2.5.6.2	DRG 的冷冻切片	18

2.5.6.3 组织免疫荧光实验	19
2.5.7 数据处理.....	19
三、 研究结果.....	20
3.1 长期皮肤外用薄荷醇小鼠的行为学实验	20
3.2 长期皮肤外用薄荷醇小鼠 DRG 中 TRPM8 和 TRPV1 的表达量检测 .	21
3.3 长期皮肤外用薄荷醇小鼠 DRG 中 TRPM8 和 TRPV1 的共定位检测 .	23
四、 讨论.....	24
五、 参考文献.....	25
致 谢.....	27

摘要

薄荷醇是一种能够提供机体清凉感觉的化学物质，常喷洒在衣物上用于缓解热感。然而，皮肤不慎直接接触薄荷醇可能导致异常灼烧痛，其中的分子机制仍不清楚。本课题构建了皮肤外用薄荷醇小鼠模型，以小鼠背根神经节（dorsal root ganglion, DRG）为实验标本，通过行为学和分子细胞生物学等手段，探究长期皮肤外用薄荷醇导致疼痛的分子机制。我们发现，小鼠连续 7 天及以上皮肤外用薄荷醇会导致小鼠足部疼痛反应的提升，且在连续 7 天皮肤外用薄荷醇后，小鼠 DRG 中 TRPM8 和 TRPV1 的表达量与皮肤外用薄荷醇仅 1 天相比显著升高，而 DRG 中 TRPM8 和 TRPV1 的共表达情况定性无显著差异。本课题为探究薄荷醇导致异常疼痛的分子机制探明了可能靶点 TRPM8 和 TRPV1，将为薄荷醇的进一步应用提供实验基础。

关键词：薄荷醇，背根神经节，TRPM8，TRPV1

Abstract

Menthol is a chemical that gives body cool feelings and is often sprayed on clothes to relieve heat. However, accidental exposure to menthol may cause abnormal burning pain on skin, the molecular mechanism of which is still unclear. In this study, a mouse model of topical menthol application was established, and the mouse dorsal root ganglion (DRG) was used to explore the molecular mechanism of pain caused by long-term topical menthol by means of behavior and molecular cell biology. We found that topical application of menthol for more than 7 days led to an increase in foot pain response in mice, and after 7 days of topical application of menthol, the expression of TRPM8 and TRPV1 in mouse DRG was significantly higher than that of topical menthol in skin for 1 day, but there was no significant difference in the co-expression of TRPM8 and TRPV1 in DRG. This study identified the possible targets TRPM8 and TRPV1 for exploring the molecular mechanism of menthol-induced abnormal pain, and will provide an experimental basis for further application of menthol.

Key words: Menthol, dorsal root ganglion, TRPM8, TRPV1

一、前言

1.1 温觉感受

温觉是机体的皮肤受到不同温度刺激后产生的感觉，包括冷觉和热觉。皮肤上的冷觉和热觉从外周传入中枢的过程由初级传入感觉神经元进行传导。初级传入感觉神经元是一种假单极神经元，其胞体位于背根神经节（dorsal root ganglion, DRG）中。初级传入感觉神经元的皮肤端是游离的神经末梢，表达有感受不同温度的刺激的温觉感受器。这些温觉感受器将温觉刺激换能并编码为电信号，通过传入神经元经过 DRG 将温觉感受信号传导至脊髓背角，进入中枢神经系统。到达中枢后，温觉信号随后沿脊髓经丘脑传导至大脑皮层，进而产生热和冷的感觉（图 1-1）^[1,2]。温觉感受是生物体响应外界温度变化，进而调整机体行为、生理活动和生化反应强度过程中的重要组成部分^[1]。因此，机体正确地感受温觉对维持机体正常生命活动至关重要。

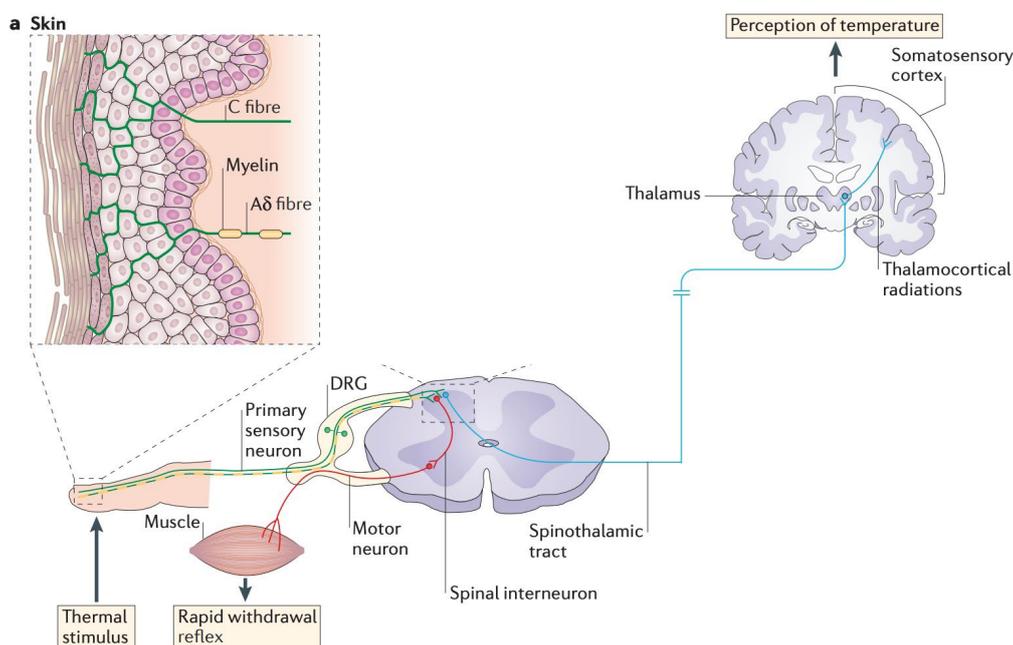


图 1-1 哺乳动物温觉感受的传导通路^[1]

DRG 作为温觉传入通路中第一级感觉神经元胞体所在的区域，含有 A α 、A β 、A δ 和 C 类等不同类型的温觉感觉神经元，其中 A δ 类感觉神经元和 C 类感觉神经元与温觉和痛觉的传导密切相关^[1,3]（图 1-1、1-2）。不同感觉神经元传递的信息和传递速度均不同，如中等粗细的薄髓鞘 A δ 纤维可快速调制、传导有

准确定位的由极端温度导致的热痛或冷痛；较细的无髓鞘的 C 纤维则较慢地传导无害范围内的冷热温度或无准确定位的慢性疼痛^[1,3,4]。

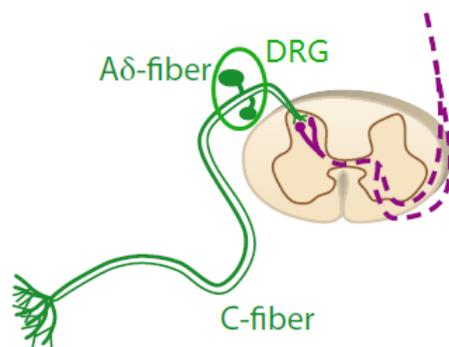


图 1-2 哺乳动物温觉感受的初级传入通路^[5]

初级传入感觉神经元上有大量不同种类的温觉敏感型离子通道，如与冷觉有关的瞬时受体电位 M 亚型 8（transient receptor potential melastatin 8, TRPM8）、瞬时受体电位 A 亚型 1（transient receptor potential ankyrin, TRPA1）、钠离子通道 Nav1.8、钾离子通道 TRAAK 与 TREK-1 等^[6]（图 1-3），与热觉有关的瞬时受体电位 V 亚型 1（transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1）和非 TRPV1 热敏离子通道^[6]（图 1-3）。它们都是温觉初级传入神经元皮肤端游离末梢上广泛分布的温度感受器，其中 TRPM8 和 TRPV1 是两种关键的与温觉感受相关的瞬时受体电位通道。

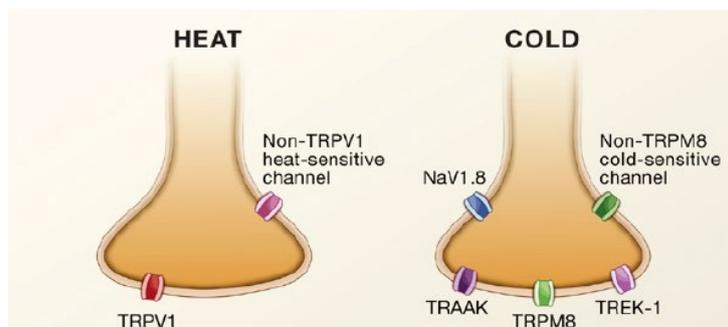


图 1-3 哺乳动物温觉感觉神经元上的离子通道^[6]

1.2 温度敏感型 TRP 通道

哺乳动物体内的 TRPM8 通道是温度敏感、电压敏感和化学敏感型的非选择性阳离子通道，可被低于 25°C 的低温^[7]、膜电位变化^[8]以及薄荷醇（menthol）^[9]、AG-3-5（icilin）^[10]等化学物质激活（图 1-4），并在二磷酸磷脂酰肌醇（phosphatidylinositol biphosphate, PIP₂）的调控下开放^[11,12]，引起以钙离子为主的阳离子内流^[9,10]。

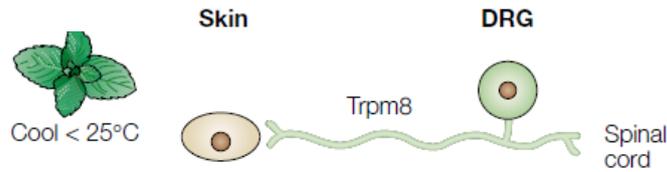


图 1-4 哺乳动物 TRPM8 的机制和传导通路^[3]

TRPM8 广泛分布于 DRG、三叉神经节 (trigeminal ganglia, TG) 等神经组织中^[13]。在 DRG 中, TRPM8 在一部分 C 类和 A δ 类感觉神经元中表达, 占 DRG 总神经元数的 5-10% (图 1-5)^[14]。因为这些神经元通常不表达 TRPV1、CGRP 和 IB4 等常见的伤害感受器标记, 传递非伤害性信号^[10,15,16]。因此, 一般认为 TRPM8 主要传导无害冷觉^[15,17]。

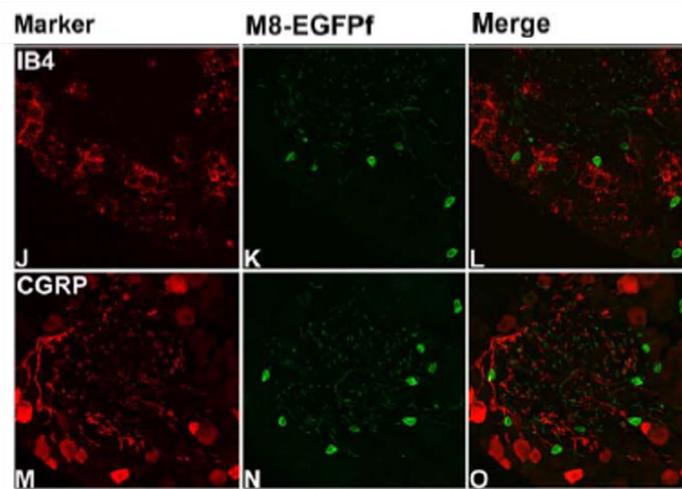


图 1-5 TRPM8 不在 IB4 和 CGRP 标志物阳性的伤害性 DRG 神经元上分布^[14]

哺乳动物体内的 TRPV1 通道是温度敏感、电压敏感和化学敏感型的非选择性阳离子通道, 可被高于 42°C 的高温^[18]、膜电位变化^[8]以及辣椒素^[18]等化学物质激活 (图 1-6), 并在蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 和蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的磷酸化作用下开放, 引起以钙离子为主的阳离子内流。

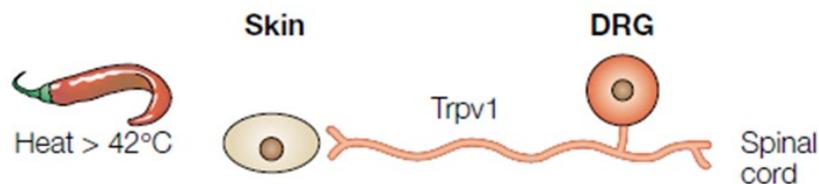


图 1-6 哺乳动物 TRPV1 的机制和传导通路^[3]

TRPV1 广泛分布于 DRG、TG 等神经组织中。在 DRG 中, 大约有 35-50% 的神经元为 TRPV1 阳性^[19]。这些神经元一般是 CGRP 和 IB4 等伤害感受器标志

物阳性的 C 类感觉神经元和 A δ 类感觉神经元，传递伤害性信号（图 1-7）^[19,20]。因此，一般认为 TRPV1 主要传导有害热痛^[3,5]。

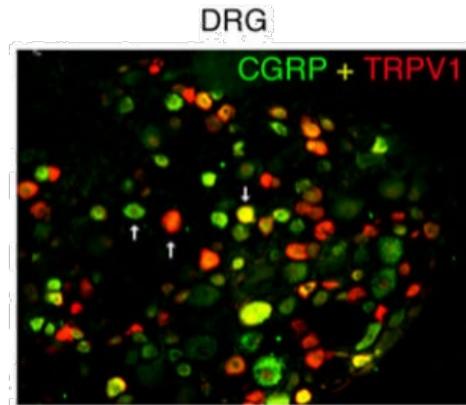


图 1-7 TRPV1 在 CGRP 阳性的伤害性 DRG 神经元上分布^[21]

此外，在 DRG 中还观测到与低温冷觉有关的非薄荷醇敏感的非薄荷醇敏感的 TRPA1 与 TRPV1 在伤害感受器标记阳性的 C 类感觉神经元和 A δ 类感觉神经元上共定位^[22,23]，约占 DRG 总神经元数的 33%^[22]。因此，该类共表达 TRPV1 和 TRPA1 的伤害感受器标记阳性的感觉神经元可传导有害的热痛和冷痛（图 1-8）。

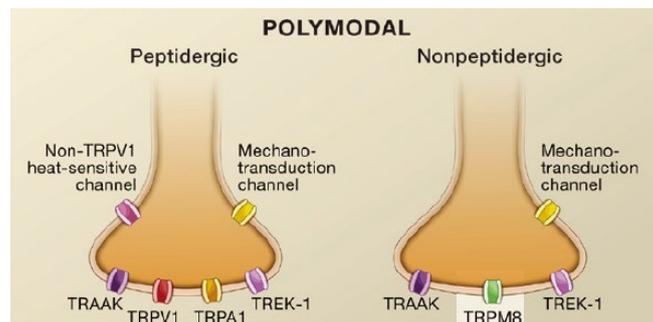


图 1-8 哺乳动物 TRPV1 和 TRPM8 的共定位^[6]

对于 TRPM8 和 TRPV1，大多数研究显示，并未观测到哺乳动物体内 TRPM8 和 TRPV1 的共定位现象^[9,10,22]（图 1-8）。然而有研究报道，体外培养的表达 TRPM8 的 DRG 神经元中，有 50% 的神经元对薄荷醇和辣椒素都有反应（图 1-9）^[7,24]，提示表达 TRPM8 的 DRG 神经元能在体外培养条件下因培养基中高水平的神经营养因子而上调 TRPV1 的表达量^[23]。

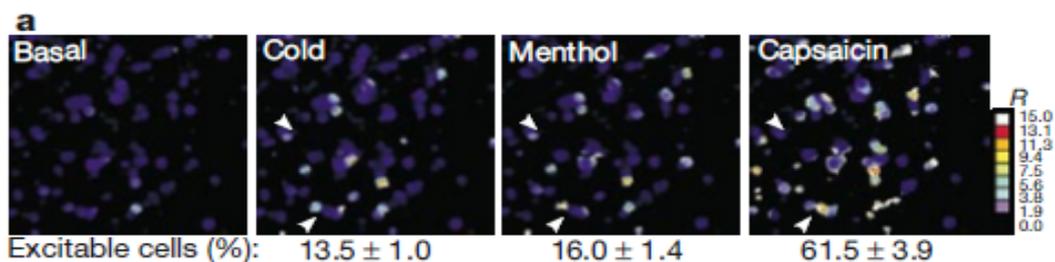


图 1-9 体外条件下 TRPM8 和 TRPV1 在 DRG 上共表达^[7]

1.3 薄荷醇与温觉感受

薄荷醇也称为薄荷樟脑，是薄荷植物精油中的主要成分，赋予植物凉爽的气味^[25]。现有研究表明，薄荷醇能化学激活皮肤表面冷觉感受器之一的 TRPM8，产生无害的冷觉^[9,10]，因此在吸入、食用或皮肤外用时能产生清凉的感觉^[25]，所以也常用于为高温条件下的工作者或长时间运动的运动员缓解热感^[26-28]。同时，薄荷醇还作为潜在的镇痛剂，可作用于三叉神经节上的 TRPM8，降低颅脑表面的温度，大幅缓解偏头痛^[29]。综上，薄荷醇在清凉和镇痛方面存在潜力，可为新产品或药品的研发提供思路。

然而，有研究报道，人体皮肤长期直接涂抹外用 30%-40%浓度的薄荷醇-乙醇溶液可能会使涂抹有薄荷醇的皮肤产生灼烧痛感而非无害冷觉，影响机体的温觉感受^[30-32]，干扰机体对环境温度的判断，然而其详细分子机制尚未明确。

有研究表明，在炎症模型小鼠的 TG 中，共表达 TRPM8 和 TRPV1 的神经元数量显著增加^[29]，从而改变一段时间内小鼠面部对温度和疼痛的感觉，而 DRG 中则缺乏相关的研究（图 1-10）。因此，在 DRG 中是否会有类似的共表达水平变化的机制，使长期皮肤涂抹外用薄荷醇导致灼烧痛感而非清凉感，仍有待研究。

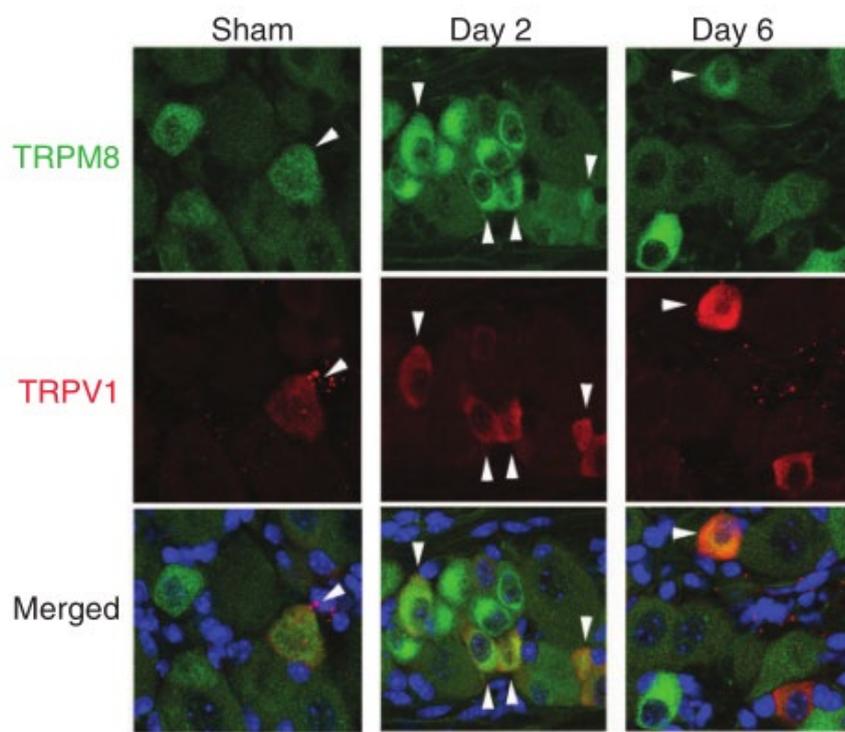


图 1-10 TRPM8 和 TRPV1 在 TG 中的共定位^[29]

1.4 主要研究内容

本文将通过小鼠后足背部连续给药的方式构建长期皮肤外用薄荷醇小鼠模型，通过行为学实验表征小鼠的疼痛感受，并以小鼠的 DRG 作为实验材料，通过 qPCR、Western Blot 和免疫荧光等实验探究长期皮肤外用薄荷醇后小鼠 DRG 中 TRPM8 和 TRPV1 表达量的变化和共定位情况。

二、 材料和方法

2.1 实验材料

本课题使用 6-8 周龄的 C57BL/6 雄鼠作为实验动物。本课题中的全部动物实验均已通过复旦大学动物伦理委员会的审核和批准。

2.2 实验试剂

2.2.1 行为学实验试剂

表 2-1 行为学实验试剂

名称	公司
(-)-薄荷醇	Sigma
二甲亚砜 (DMSO)	Sigma
磷酸缓冲生理盐水 (PBS) (固体)	Solarbio

PBS 配制：一包 PBS 固体加至 2 l 双蒸水 (ddH₂O) 中，配制 PBS 溶液。

750 mM 薄荷醇溶液配制：使用 90%DMSO-10%PBS 的混合溶液作为溶剂，称取薄荷醇配制 750 mM 薄荷醇溶液。

对照组溶液配制：使用 90%DMSO-10%PBS 的混合溶液作为对照组溶液。

2.2.2 小鼠 DRG 急性分离取材试剂

表 2-2 小鼠 DRG 急性分离取材试剂

名称	公司
水合氯醛	BBI
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	碧云天

7% (w/v) 水合氯醛溶液配制：使用双蒸水 (ddH₂O) 作为溶剂，称取水合氯醛配制 7% (w/v) 水合氯醛溶液。

2.2.3 Western Blot 实验试剂与抗体

2.2.3.1 试剂

表 2-3 Western Blot 实验试剂

名称	公司
RIPA 裂解液 (强)	碧云天
100× Protease Inhibitor Cocktail	Bimake
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	碧云天

10× TG-SDS Buffer	生工
Acryl/Bis 30% Solution (29:1) (30%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液)	生工
1.5 M Tris-HCl, pH8.8	碧云天
1 M Tris-HCl, pH6.8	碧云天
十二烷基硫酸钠 (SDS)	生工
过硫酸铵 (APS)	Sigma
TEMED	生工
乙醇	国药
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5X)	碧云天
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#26619)	Thermofisher
10× TG Buffer Solution	生工
甲醇	国药
Tween-20	生工
脱脂奶粉	生工
QuickBlock™ Western 一抗稀释液	碧云天
Western 一抗二抗去除液 (弱碱性)	碧云天
BeyoECL Moon (极超敏 ECL 化学发光试剂盒)	碧云天

表 2-4 Western Blot 溶液配制

溶液	溶质或浓缩液	溶剂
含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液	100× Protease Inhibitor Cocktail	RIPA 裂解液(强)
10% (w/v) SDS 溶液	SDS	ddH ₂ O
10% (w/v) APS 溶液	APS	ddH ₂ O
PBST	Tween-20 (终浓度 0.5% (v/v))	PBS
5%脱脂奶粉	脱脂奶粉	PBST
1× 电泳缓冲液	10× TG-SDS Buffer	ddH ₂ O
1× 转膜缓冲液	10× TG Buffer Solution、 甲醇 (终浓度 20% (v/v))	ddH ₂ O

Western Blot 显色液配制: BeyoECL Moon 试剂盒中, 将 A 液与 B 液按 1:1 体积比混合。

2.2.3.2 抗体

表 2-5 Western Blot 实验抗体

抗体名称	公司
TRPM8 Rabbit PolyAb	Proteintech
TRPV1 Mouse McAb	Proteintech
GAPDH Mouse McAb	Proteintech

Peroxidase-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)	Proteintech
Peroxidase-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)	Proteintech

TRPM8、TRPV1、GAPDH：使用 QuickBlock™ Western 一抗稀释液，分别按 1:1000、1:1000 和 1:5000 的体积比稀释。孵育后回收，最多使用 3 次。

Anti-Rabbit、Anti-Mouse：使用 PBST，按 1:5000 体积比稀释。孵育后弃去。

2.2.4 常规 PCR 和 qPCR 实验试剂和引物

2.2.4.1 试剂

表 2-6 常规 PCR 和 qPCR 实验试剂

名称	公司
TRIzol	Invitrogen
三氯甲烷（氯仿）	国药
异丙醇	国药
BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	碧云天
2× Phanta Max Master Mix (Dye Plus)	Vazyme
Regular Agarose G-10	BIOWEST
50× TAE 缓冲液	Solarbio
核酸染料	Tanon
DL2000 DNA Marker	Genesand
FastKing cDNA 第一链合成试剂盒（去基因组）	Tiangen
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad

1× TAE 缓冲液：使用 ddH₂O 作为溶剂，量取 50× TAE 缓冲液稀释至 1× TAE 缓冲液。

含核酸染料的 2%琼脂糖凝胶：使用 1× TAE 缓冲液作为溶剂，称取 Regular Agarose G-10 后加入至溶剂中，微波炉加热至完全溶解。溶解后滴加 1-2 μl 核酸染料，倒入模具中凝固。

2.2.4.2 引物

表 2-7 PCR 引物

引物名称	序列
<i>Trpm8</i> -F	5'-AGGTCATTTGGGAGCAGACC-3'
<i>Trpm8</i> -R	5'-CGGTGAACAACCTCCACTGCT-3'
<i>Trpv1</i> -F	5'-TTCTCGTGGAGCCCTTGAAC-3'
<i>Trpv1</i> -R	5'-CGATAGTAAGCAGCCGTGGT-3'
<i>Gapdh</i> -F	5'-TGGAAAGCTGTGGCGTGATG-3'
<i>Gapdh</i> -R	5'-ATCCACGACGGACACATTGG-3'

引物由生工公司合成，按要求对固体进行溶解，得到 100 μM 引物母液。

将引物母液稀释至 10 μM 作为工作液进行常规 PCR 和 qPCR 反应。

2.2.5 组织免疫荧光实验试剂和抗体

2.2.5.1 试剂

表 2-8 组织免疫荧光实验试剂

名称	公司
多聚甲醛固定液 (4%PFA, PB)	Servicebio
蔗糖	生工
OCT 包埋剂	Tissue-Tek®
浓缩型正常山羊血清	BOSTER
TritonX-100	生工
QuickBlock™ 免疫染色一抗稀释液	碧云天
DAPI Fluoromount-G®	SouthernBiotech

30%蔗糖溶液：使用 ddH₂O 作为溶剂，称取蔗糖配制 30%蔗糖溶液。

含 10%山羊血清和 0.5% TritonX-100 的封闭液：使用 PBS 作为溶剂，使用微量移液器量取山羊血清和 TritonX-100 配制含 10%山羊血清和 0.5% TritonX-100 的封闭液。

2.2.5.2 抗体

表 2-9 组织免疫荧光抗体

抗体名称	公司
TRPM8 Rabbit PolyAb	Proteintech
TRPV1 Mouse McAb	Proteintech
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	Abcam
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 594)	Abcam

TRPM8、TRPV1：使用 QuickBlock™ 免疫染色一抗稀释液，均按 1:100 体积比共同稀释。孵育后回收。

Anti-Rabbit、Anti-Mouse：避光，使用 PBS 稀释，均按 1:100 体积比共同稀释，避光孵育后弃去。

2.3 实验仪器

表 2-10 实验仪器

仪器名称	型号
体视显微镜	Zeiss Stemi 508
离心机	eppendorf Centrifuge 5424R
恒温水浴锅	科析
酶标仪	TECAN Spark®
金属浴	Tiagen
电泳仪	Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra System

摇床	Orbital Shaker TS-100
化学发光成像仪	eBlot Touch Imager
微量分光光度计	Thermofisher NanoDrop™ One/OneC
PCR 仪	eppendorf Mastercycler
蓝光切胶仪	Kylin-Bell GL-1000
qPCR 仪	Agilent Technologies Stratagene Mx3000P
冷冻切片机	Leica CM1950
数字病理切片扫描仪（荧光）	KFBIO KF-FL-020

2.4 实验软件

表 2-11 实验软件

软件名称	公司
Microsoft Office	Microsoft
Image J	National Institutes of Health
K-Viewer	KFBIO
GraphPad Prism 9	GraphPad Software

2.5 实验方法

2.5.1 小鼠长期皮肤外用薄荷醇模型造模

将 6-8 周龄的 C57BL/6 雄鼠放在斜口鼠笼盖上，左手捏住小鼠尾巴，调整小鼠头部朝向，使小鼠头部沿鼠笼盖朝下，此时小鼠前爪会抓住鼠笼盖。左手通过移动小鼠尾巴和控制力度，使小鼠后爪能够正常放在鼠笼盖上并暴露（图 2-1）。右手夹取已蘸取实验组薄荷醇溶液或对照组溶液的脱脂棉球，将棉球轻轻敷在小鼠一侧的后爪上 5 s，随后夹取洁净的脱脂棉球，将棉球轻轻敷在小鼠后爪上 5 s，吸去处理液。重复上述操作处理另一侧后爪即完成造模。每次处理小鼠后爪前均会重新蘸取溶液。

对小鼠进行造模操作 1 天、连续 7 天和连续 14 天，即可完成小鼠连续皮肤外用薄荷醇不同天数模型的构建。



图 2-1 小鼠皮肤外用薄荷醇模型造模操作

2.5.2 行为学实验

行为学实验在一个光照强度正常、温度适宜、噪音小的房间中进行。行为实验系统中使用长 15 cm、宽 15 cm、高 20 cm 的全透明有盖亚克力盒作为行为学实验平台，平板电脑作为录像设备，秒表作为同步计时设备（图 2-2）。行为学实验前，所有小鼠均会在搭建好的行为实验系统中熟悉环境 2 天，每天 10 min，并记录行为基线 2 天，再对小鼠进行造模后的行为实验。造模操作后，迅速将小鼠放入的亚克力盒中并盖上盖子（留有通气口），立刻开始录像记录小鼠 5 min 内的行为，同时使用秒表进行同步计时。当小鼠出现舔舐足背的行为时（图 2-3），立刻记录此时秒表的时间，便于在后续进行视频统计时直接定位到小鼠发生舔舐行为的时间而无需观看完整录像。每只小鼠的行为观察结束后会对亚克力盒子进行全面清洗并使用 75%乙醇擦拭，避免前一只小鼠的气味影响后一只小鼠的行为结果。



图 2-2 小鼠行为学实验系统

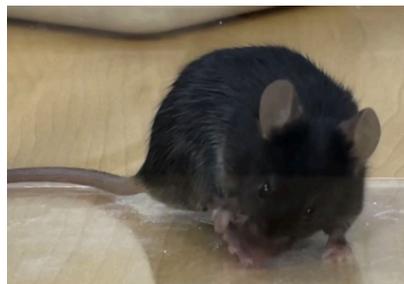


图 2-3 小鼠舔舐足背行为

2.5.3 小鼠 DRG 的急性分离

2.5.3.1 小鼠麻醉

抓取小鼠，以 0.1 ml/10 g 的剂量腹腔注射 7%水合氯醛麻醉小鼠。

2.5.3.2 小鼠心脏灌流

将小鼠固定于鼠板上，剪开小鼠腹部皮肤和肌肉，暴露小鼠的肝脏和龙骨突。用镊子提起龙骨突，剪开小鼠胸腔并使用止血钳固定剪下的胸骨。取已剪

去尖头的输液针，用镊子轻轻夹住心脏，将输液针扎进小鼠心尖后固定输液针。剪开右心耳，将输液针连接至准备好的吸有 PBS 溶液的无针注射器上，缓慢推动注射器活塞，进行小鼠心脏灌流。

2.5.3.3 小鼠 DRG 分离

小鼠足背的感觉经腰段 L4（第 4 腰椎）至 L6（第 6 腰椎）的 DRG 传入至脊髓背角进入中枢神经系统^[33]（图 2-4），因此造模后的 DRG 取材选择双侧 L4 至 L6 的 DRG。

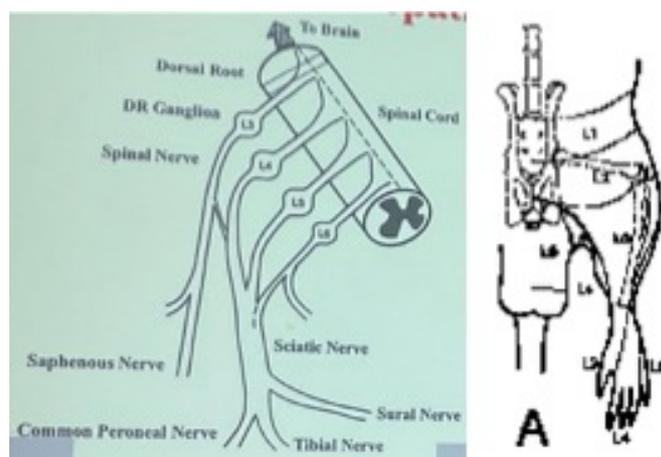


图 2-4 小鼠足背部感觉投射体节图^[33]

小鼠心脏灌流后，剪开小鼠背部皮肤和肌肉，取带肋骨的脊椎于冰上的无钙镁 HBSS 中。在体视显微镜下定位最后一节肋骨的位置，此为 T12（第 12 胸椎），之后脊椎以 T13、L1（第 1 腰椎）、L2、L3、L4、L5、L6 排列（图 2-5）。剪开椎骨，在 L4、L5 和 L6 椎骨的背侧靠近脊髓的小窝里取出连有神经纤维的锥形神经节体，并减去连接的神经纤维，只保留神经节部分，即得到急性分离的 DRG。经以上步骤得到的 DRG 可用于全蛋白和总 RNA 提取。

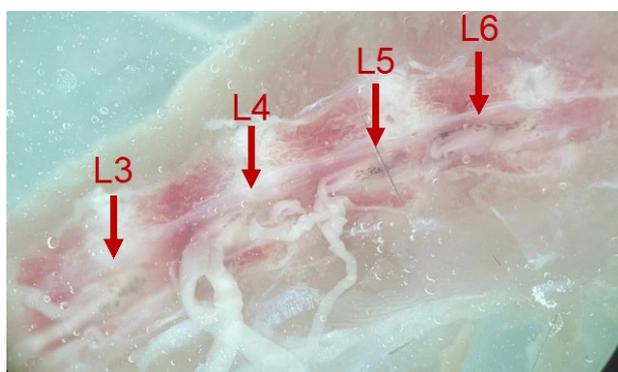


图 2-5 小鼠 L3-L6 DRG 示意图

若需急性分离 DRG 后用于组织免疫荧光实验，则在“小鼠心脏灌流”过程的 PBS 灌流后继续进行多聚甲醛固定液的灌流。

2.5.4 qPCR 实验

2.5.4.1 小鼠 DRG 总 RNA 的提取

取急性分离的 DRG 组织，按每 15-18 个 DRG 使用 1 ml TRIzol 裂解液的剂量使用玻璃匀浆器在冰上研磨。将匀浆液转移至离心管中，室温静置 5 min。向离心管中加入氯仿并剧烈振荡 15 s 后静置 3 min，4°C，12000 rpm 离心 10 min。小心取上层水相，加入等体积异丙醇上下颠倒混匀并静置 10 min，4°C，12000 rpm 离心 10 min。离心后去上清，加入 70%乙醇轻柔洗涤后 4°C，7500 rpm 离心 5 min。弃去乙醇并彻底干燥。加入 RNase-free H₂O，55-60°C 金属浴溶解 RNA，即得小鼠 DRG 总 RNA。

取少量小鼠 DRG 总 RNA，使用微量分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。

2.5.4.2 总 RNA 的逆转录与 PCR 质检

使用 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒（去基因组），进行总 RNA 的逆转录。

按表 2-12 配置 20 μl 常规 PCR 体系、表 2-13 设定常规 PCR 程序。

使用含核酸染料的 2%琼脂糖凝胶，上样 2 - 4μl DL2000 DNA Marker 和 10 μl 常规 PCR 产物，100 V 电泳至条带基本分离后使用蓝光切胶仪检测 PCR 结果。

表 2-12 常规 PCR 体系

PCR 组分	体积
2× Phanta Max Master Mix (Dye Plus)	10 μl
10 μM 引物工作液-F	2 μl
10 μM 引物工作液-R	2 μl
模板	2 μl
ddH ₂ O	4 μl

表 2-13 常规 PCR 程序

步骤序号	温度	时间	备注
1	95.0°C	3 min	
2	95.0°C	10 s	
3	60.0°C	15 s	循环 30 次
4	72.0°C	30 s	
5	72.0°C	5 min	
6	10.0°C	End	

2.5.4.3 cDNA 的 qPCR

按表 2-14 配制 20 μl qPCR 体系、表 2-15 设定 qPCR 程序。

以引物为单位，按 n+4 至 n+6 的比例配制除模板外的总体系。例如，需 24 个 *Gapdh* qPCR 体系时，将 300 μl Supermix、30 μl 引物-F、30 μl 引物-R 和 180 μl ddH₂O 混合制成含 30 个体系的总体系。将总体系分装至 96 孔 PCR 板后再向孔中加入模板。

表 2-14 qPCR 体系

PCR 组分	体积
iTaq™ Universal SYBR®	10 μl
Green Supermix	
10 μM 引物工作液-F	1 μl
10 μM 引物工作液-R	1 μl
模板	2 μl
ddH ₂ O	6 μl

表 2-15 qPCR 程序

步骤序号	温度	时间	备注
1	95.0°C	30 s	
2	95.0°C	10 s	
3	60.0°C	10 s	循环 40 次
4	60.0°C	20 s	
5	95.0°C	15 s	
6	60.0°C	30 s	连续升温
7	95.0°C	15 s	测定熔解曲线
8	10.0°C	End	

2.5.5 Western Blot 实验

2.5.5.1 小鼠 DRG 全蛋白的提取

取急性分离的 DRG 组织，按每 15-18 个 DRG 使用 200 μl 含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液的剂量使用玻璃匀浆器在冰上研磨。冰上静置 5 min 后将匀浆液转移至离心管中，4°C，12000 rpm 离心 15 min。取上清至新离心管中，即为提取到的小鼠 DRG 的全蛋白，以每管 20 μl 进行分装。

取少量小鼠 DRG 全蛋白并稀释 20 倍，使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定提取的全蛋白的浓度。

2.5.5.2 SDS-PAGE 电泳与转膜

按表 2-16 配方配制 4%-10%不连续 SDS-PAGE 变性胶。向 20 μ l 蛋白中加入 5 μ l SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5X)并在 95°C金属浴上变性 5 min。上样 3 - 6 μ l Ladder 和 20 μ l 已变性的蛋白后，分别在 80 V 电压条件下浓缩 30 min 和在 100 V 分离 60 min，随后在冰上以 250 mA 电流湿法转膜 90 min 至 PVDF 膜上。

表 2-16 4%-10%不连续 SDS-PAGE 变性胶配方

组分	4%浓缩胶体积 (ml)	10%分离胶体积 (ml)
ddH ₂ O	3.4	6.0
30% Acryl/Bis	1.0	5.0
Tris-HCl	1.5(1 M, pH6.8)	3.8 (1.5 M, pH8.8)
10%SDS	0.06	0.15
10%APS	0.06	0.15
TEMED	0.006	0.012

2.5.5.3 封闭、抗体孵育与成像

使用 5%脱脂牛奶溶液封闭膜 1 h 后使用抗 TRPM8 一抗 4°C孵育过夜。以 PBST 洗膜 5 min 共 3 次后在室温孵育对应属源的二抗 45 min。以 PBST 洗膜 5 min 共 3 次后即可使用 Western Blot 显色液在化学发光成像仪上成像。成像后使用 Western 一抗二抗去除液洗膜 10 min 再用 PBST 洗膜 5 min 共 3 次后，即可进行抗 TRPV1 或抗 GAPDH 一抗的孵育和成像。

2.5.6 组织免疫荧光实验

2.5.6.1 小鼠 DRG 的分离、固定和脱水

急性分离 DRG 用于组织免疫荧光实验。将分离的 DRG 浸泡于多聚甲醛固定液中 2 h，随后转移至 30%蔗糖溶液中脱水。待 DRG 在蔗糖溶液中沉底，即完成脱水。

2.5.6.2 DRG 的冷冻切片

将已脱水的 DRG 从蔗糖溶液中取出，用吸水纸吸去 DRG 上残留的液体。向模具中加入约占模具一半体积的 OCT 包埋剂，随后将 DRG 以面积最大的截面平行于模具底面的方式放入模具中，使其几乎沉底。随后继续加入 OCT 包埋剂直至充满模具。将模具放入-80°C冰箱中速冻约 30 min，得到 OCT 包埋的冷冻 DRG 标本。

将 DRG 标本通过 OCT 包埋剂底面朝上地固定在冷冻切片机的底座上。安装好底座、刀片和防卷板，调整底座和刀片位置使标本切面平行于刀片。通过 100 μm 粗切定位后使用 10 μm 细切，用吸附性载玻片收集切片。

2.5.6.3 组织免疫荧光实验

将玻片晾干，随后放在湿盒中用 PBS 洗片 5 min，共 3 次。使用组化笔在切片周围画圈，使用含 10%山羊血清和 0.5% TritonX-100 的封闭液破膜并封闭组织 1 h。将片子上的血清弃去，使用封口膜对玻片于 4°C 过夜孵育抗 TRPM8 和抗 TRPV1 一抗。回收一抗，于 37°C 烘箱中复温 30 min，再用 PBS 洗片 5 min，共 3 次。将片子弃去 PBS，使用封口膜对玻片于 37°C 避光孵育荧光二抗 1 h。使用 PBS 洗片 5 min，共 3 次后对样品滴加封片剂，封片。使用仪器进行荧光成像并分析。

2.5.7 数据处理

图像分析使用 K-Viewer 和 ImageJ，数据分析使用 Microsoft Excel 和 GraphPad Prism 9，制图使用 Microsoft Powerpoint。数据以平均值 \pm 标准误 (Mean \pm S.E.M.) 表示，多组间差异性检验采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 后进行 Bonferroni's t test 校正。p < 0.05 表示具有统计学差异，其中 ns 表示无显著性差异；* 表示 p < 0.05；** 表示 p < 0.01；*** 表示 p < 0.001。

三、 研究结果

3.1 长期皮肤外用薄荷醇小鼠的行为学实验

首先，我们建立了长期皮肤外用薄荷醇小鼠模型，统计了小鼠在每天上药造模后的 5 min 内舔舐足背的总时长，检测其疼痛感受随长期皮肤外用薄荷醇的变化。行为学实验受个体差异影响较大。我们发现，小鼠从第 2 天开始（D2 Vehicle: 9.8 ± 2.0 , $n = 3$; D2 Menthol: 1.8 ± 1.6 , $n = 3$ ），第 5 天（D5 Vehicle: 7.2 ± 5.6 , $n = 3$; D5 Menthol: 0.6 ± 0.3 , $n = 3$ ）、第 7 天（D7 Vehicle: 9.1 ± 6.4 , $n = 3$; D7 Menthol: 0.6 ± 0.3 , $n = 3$ ）、第 11 天（D11 Vehicle: 8.7 ± 1.4 , $n = 3$; D11 Menthol: 2.2 ± 1.4 , $n = 3$ ）和第 14 天（D14 Vehicle: 7.2 ± 1.7 , $n = 3$; D14 Menthol: 0.4 ± 0.4 , $n = 3$ ）上药薄荷醇溶液后小鼠的舔舐时长与上药对照组溶液后小鼠的舔舐时长存在差异（图 3-1）。小鼠的舔舐时长差异与小鼠疼痛感觉有关，在一定疼痛强度之上，疼痛强度越高，小鼠的舔舐行为越少。因此，小鼠长期皮肤外用薄荷醇会导致小鼠疼痛反应的提升。

同时，我们观察到从第 7 天开始上药薄荷醇溶液后小鼠的舔舐时长与上药对照组溶液后小鼠的舔舐时长差异相似（图 3-1），因此之后不再进行 14 天连续上药处理造模，以 7 天连续上药为限。

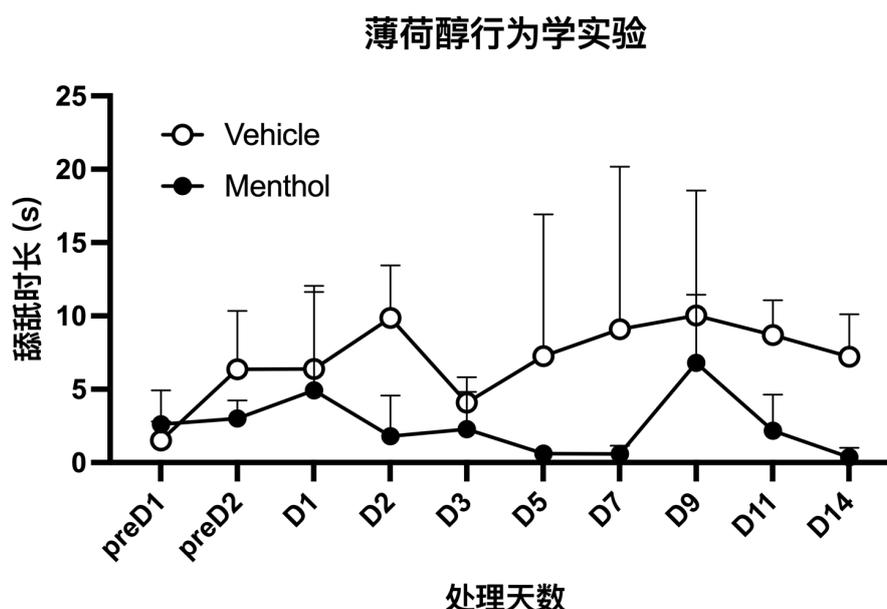


图 3-1 小鼠皮肤外用薄荷醇造模的行为学实验

3.2 长期皮肤外用薄荷醇小鼠 DRG 中 TRPM8 和 TRPV1 的表达量检测

为探究长期皮肤外用薄荷醇导致小鼠疼痛的原因，我们检测了使用对照组溶液或薄荷醇溶液造模 1 天和 7 天的小鼠 DRG 中薄荷醇受体 TRPM8 和疼痛受体 TRPV1 的表达量。我们首先检测了造模 1 天和 7 天小鼠 DRG 总 RNA 中 *Trpm8* 和 *Trpv1* 转录本的表达量。结果表明，使用薄荷醇溶液造模 7 天的小鼠的 DRG 总 RNA 与薄荷醇溶液造模 1 天的小鼠相比，*Trpm8* 和 *Trpv1* 转录本含量显著升高（D1 Menthol *Trpm8*: $101 \pm 11\%$, $n = 4$; D7 Menthol *Trpm8*: $179 \pm 12\%$, $n = 4$; $p < 0.001$; 图 3-2A; D1 Menthol *Trpv1*: $112 \pm 4\%$, $n=3$; D7 Menthol *Trpv1*: $142 \pm 19\%$, $n = 4$; $p = 0.11$; 图 3-2B)。同时，薄荷醇溶液造模 7 天的小鼠 DRG 中 *Trpm8* 和 *Trpv1* 转录本含量与对照组溶液造模 7 天的小鼠相比也显著升高（D7 Vehicle *Trpm8*: $104 \pm 8\%$, $n = 4$; $p < 0.001$; 图 3-2A; D7 Vehicle *Trpv1*: $104 \pm 8\%$, $n = 4$; $p = 0.056$; 图 3-2B)，而在造模 1 天的小鼠中无显著差异（D1 Vehicle *Trpm8*: $100 \pm 5\%$, $n = 4$; D1 Menthol *Trpm8*: $101 \pm 11\%$, $n = 4$; 图 3-2A; D1 Vehicle *Trpv1*: $100 \pm 3\%$, $n = 4$; D1 Menthol *Trpv1*: $112 \pm 4\%$, $n = 4$; 图 3-2B)。因此，连续 7 天皮肤外用薄荷醇与仅外用 1 天相比和连续 7 天外用对照组溶液相比均会导致小鼠 DRG 中 *Trpm8* 和 *Trpv1* 转录本表达量升高。同时，仅皮肤外用薄荷醇 1 天与对照组相比并不显著影响转录本表达量。

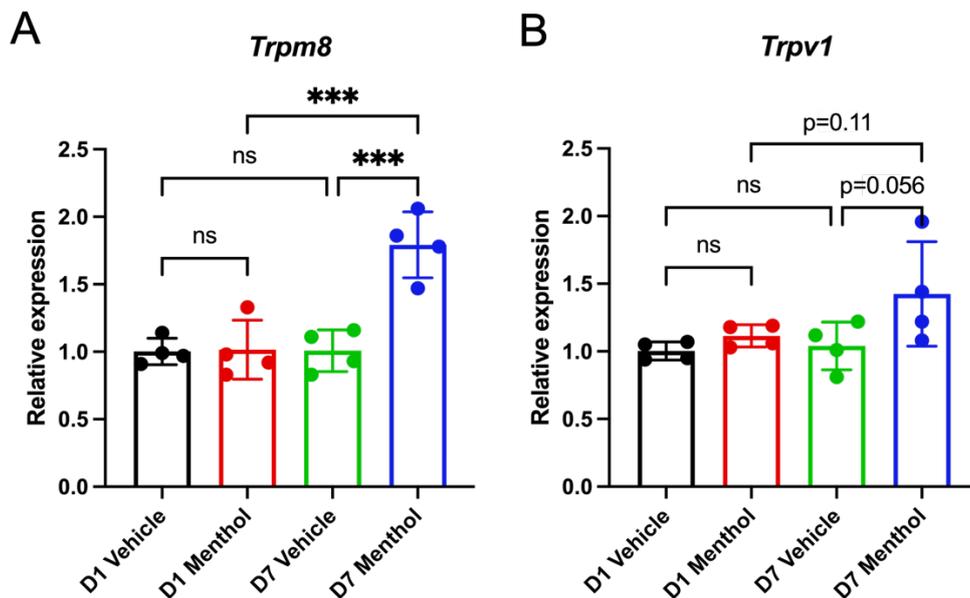


图 3-2 皮肤外用薄荷醇造模 1 天和 7 天后小鼠 DRG 中 *Trpm8* 和 *Trpv1* 转录本含量
A: 皮肤外用薄荷醇造模 1 天和 7 天后小鼠 DRG 中 *Trpm8* 转录本含量 (ns: 无显著性差异; ***: $p < 0.001$); B: 皮肤外用薄荷醇造模 1 天和 7 天后小鼠 DRG 中 *Trpv1* 转录本含量 (ns: 无显著性差异)

我们随后检测了造模 1 天和 7 天小鼠 DRG 全蛋白中 TRPM8 和 TRPV1 蛋白的表达情况。结果表明，使用薄荷醇溶液造模 7 天的小鼠的 DRG 全蛋白与薄荷醇溶液造模 1 天的小鼠相比，TRPM8 和 TRPV1 的表达量显著升高（D1 Menthol TRPM8: $73 \pm 14\%$, $n = 2$; D7 Menthol TRPM8: $200 \pm 31\%$, $n = 2$; $p < 0.01$; 图 3-3A、B; D1 Menthol TRPV1: $49 \pm 11\%$, $n = 2$; D7 Menthol TRPV1: $95.5 \pm 0.4\%$, $n = 2$; $p < 0.01$; 图 3-3A、C)。同时，薄荷醇溶液造模 7 天的小鼠 DRG 全蛋白与对照组溶液造模 7 天的小鼠相比，TRPM8 表达量显著降低（D7 Vehicle TRPM8: $348 \pm 17\%$, $n = 2$; $p < 0.01$; 图 3-3A、B)，而 TRPV1 表达量显著升高（D7 Vehicle TRPV1: $47.5 \pm 0.8\%$, $n = 2$; $p < 0.01$; 图 3-3A、C)。而在造模 1 天的小鼠中观察到 TRPM8 表达量无显著差异（D1 Vehicle TRPM8: $100 \pm 2\%$, $n = 2$; $p < 0.01$; 图 3-3A、B)，TRPV1 表达量显著降低（D1 Vehicle TRPV1: $101 \pm 11\%$, $n = 2$; 图 3-3A、C)。因此，连续 7 天皮肤外用薄荷醇与仅外用 1 天相比会导致小鼠 DRG 中 TRPM8 和 TRPV1 蛋白表达量升高，但与对照组相比会导致 TRPM8 表达量降低、TRPV1 表达量升高。同时，仅皮肤外用薄荷醇 1 天与对照组相比对 TRPM8 表达量无显著影响，但会降低 TRPV1 的表达量。

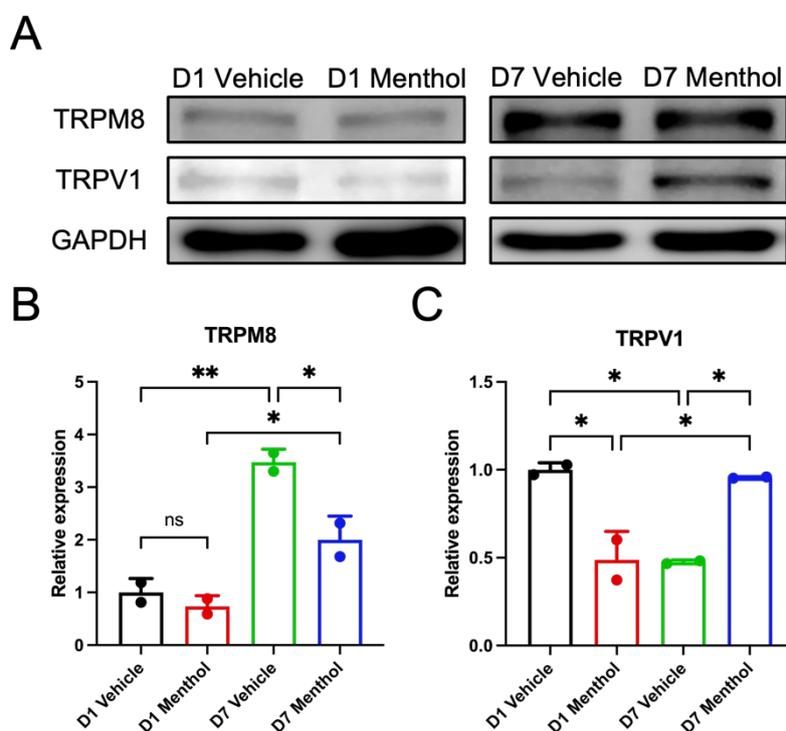


图 3-3 皮肤外用薄荷醇造模 1 天和 7 天后小鼠 DRG 中 TRPM8 和 TRPV1 蛋白表达量
A: 四条泳道分别为对照组溶液造模 1 天、薄荷醇溶液造模 1 天、对照组溶液造模 7 天、薄荷醇溶液造模 7 天小鼠 DRG 全蛋白中的 TRPM8、TRPV1 和 GAPDH 内参的免疫印迹结果;

B: 皮肤外用薄荷醇造模 1 天和 7 天后小鼠 DRG 中 TRPM8 蛋白表达量 (ns: 无显著性差异; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$); C: 皮肤外用薄荷醇造模 1 天和 7 天后小鼠 DRG 中 TRPV1 蛋白表达量 (*: $p < 0.05$)

以上实验结果表明, 小鼠连续 7 天皮肤外用薄荷醇与仅 1 天外用薄荷醇相比会导致 DRG 中 TRPM8 和 TRPV1 离子通道的转录本和蛋白含量均明显提升。这一现象说明长期皮肤外用薄荷醇导致小鼠疼痛与 TRPM8 和 TRPV1 表达量的提升有关。然而在蛋白表达水平上, 连续 7 天皮肤外用薄荷醇与对照组相比会导致 TRPM8 表达量降低、TRPV1 表达量升高。这一现象中, TRPV1 的表达量升高虽然与薄荷醇导致灼烧痛的现象相吻合, 但 TRPM8 的表达量降低可能与实验数据异常和生物学重复不足有关, 有待进一步研究。

3.3 长期皮肤外用薄荷醇小鼠 DRG 中 TRPM8 和 TRPV1 的共定位检测

为了进一步探究 TRPM8 和 TRPV1 表达量提升导致小鼠疼痛的机制, 我们通过免疫荧光成像技术检测了使用对照组溶液或薄荷醇溶液造模 1 天和 7 天的小鼠的 DRG 中 TRPM8 和 TRPV1 的共定位情况。结果表明, 连续 7 天皮肤外用薄荷醇溶液与皮肤外用薄荷醇溶液 1 天或连续 7 天皮肤外用对照组溶液相比, TRPM8 和 TRPV1 的共表达现象的定性差异不明显 (图 3-4)。

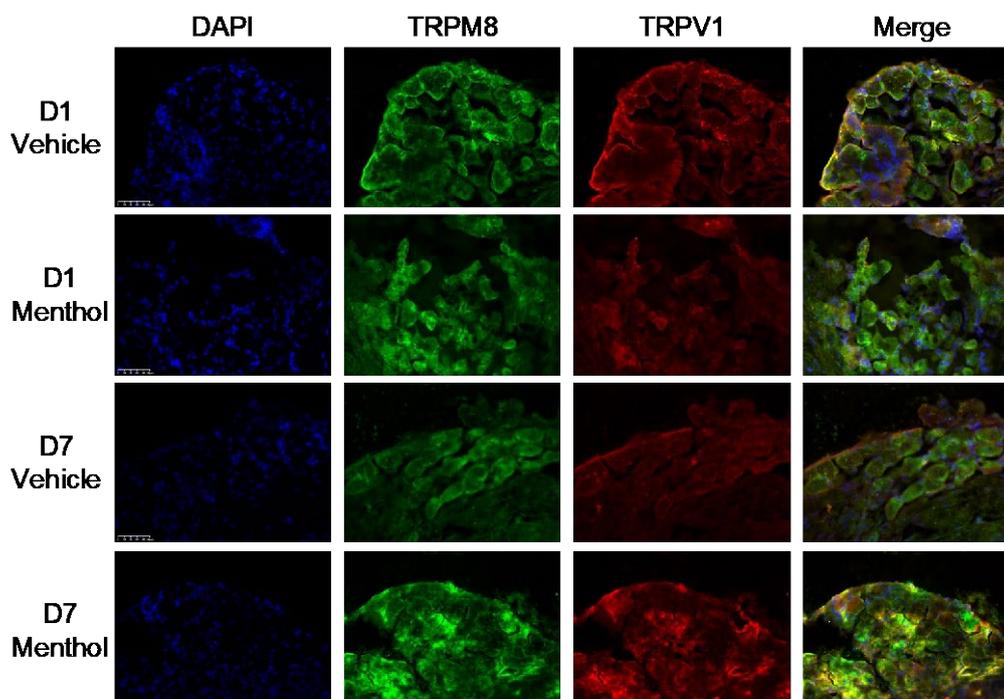


图 3-4 皮肤外用薄荷醇造模 1 天和 7 天后小鼠 DRG 中 TRPM8 和 TRPV1 的共表达情况

四、 讨 论

本课题中，我们构建了长期皮肤外用薄荷醇小鼠模型，以小鼠腰段L4至L6的DRG神经元为标本，初步探究了长期皮肤外用薄荷醇导致机体产生异常疼痛的机制。我们发现，皮肤外用薄荷醇7天及以上会导致小鼠足部疼痛感受提升，且在皮肤外用薄荷醇7天时，小鼠DRG中TRPM8和TRPV1的表达量与仅皮肤外用薄荷醇1天相比显著升高，而小鼠DRG上TRPM8和TRPV1的共表达情况定性无显著差异。上述结果表明，长期皮肤外用薄荷醇导致温觉感受异常甚至疼痛的机制与TRPM8和TRPV1在DRG中的表达量上调有关。

本课题也存在一些局限性。实验动物选择方面，本课题中只选择了雄鼠作为实验对象。然而，小鼠的痛觉调控存在一定的雌雄差异^[34]，因此同等比例的选择雄性和雌性小鼠作为实验对象进行该实验可进一步提升实验的完整性。薄荷醇模型构建方面，本课题中对双侧后爪进行了处理，进而进行行为学实验。但考虑到小鼠行为的个体差异性较大，因此可以通过对单侧后爪处理的方式，只统计小鼠对进行处理的后爪的舔舐行为，排除小鼠舔舐后爪的左右偏好性，进而降低个体差异对行为实验的影响。同时，qPCR和Western Blot的实验结果存在相互不匹配的地方，如连续7天皮肤外用薄荷醇与对照组相比会导致TRPM8表达量降低等实验结果，还需要更多生物学重复、改进实验操作和精进实验技术等方式获取更准确、重复度高的结果。

本课题的研究为阐明长期皮肤外用薄荷醇导致机体温觉感受异常的分子机制找到了潜在靶点TRPM8和TRPV1离子通道。基于该课题的发现，我们将对其中可能涉及的更为复杂细胞分子信号通路以及神经功能调控进行更深入的研究，如在体外对急性分离的DRG神经元中传递伤害性信号的神经元，模拟长期皮肤外用薄荷醇的环境，并通过电生理手段检测DRG神经元的兴奋性变化进而表征疼痛感觉，或在分子水平研究薄荷醇调节TRPM8和TRPV1表达量的细胞信号通路及其下游调控疼痛的机制，为薄荷醇的进一步应用提供实验基础。

五、 参考文献

- [1] Vriens J, Nilius B, Voets T. Peripheral thermosensation in mammals[J]. Nature Reviews. Neuroscience, 2014, 15(9): 573-589.
- [2] Lumpkin E A, Caterina M J. Mechanisms of sensory transduction in the skin[J]. Nature, 2007, 445(7130): 858-865.
- [3] Patapoutian A, Peier A M, Story G M, et al. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation[J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(7): 529-539.
- [4] Julius D, Basbaum A I. Molecular mechanisms of nociception[J]. Nature, 2001, 413(6852): 203-210.
- [5] Xiao R, Xu X Z S. Temperature Sensation: From Molecular Thermosensors to Neural Circuits and Coding Principles[J]. Annu Rev Physiol, 2021, 83: 205-230.
- [6] Basbaum A I, Bautista D M, Scherrer G, et al. Cellular and molecular mechanisms of pain[J]. Cell, 2009, 139(2): 267-284.
- [7] McKemy D D, Neuhausser W M, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation[J]. Nature, 2002, 416(6876): 52-58.
- [8] Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, et al. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels[J]. Nature, 2004, 430(7001): 748-754.
- [9] McKemy D D, Neuhausser W M, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation[J]. Nature, 2002, 416(6876): 52-58.
- [10] Peier A M, Moqrich A, Hergarden A C, et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol[J]. Cell, 2002, 108(5): 705-715.
- [11] Daniels R L, Takashima Y, McKemy D D. Activity of the neuronal cold sensor TRPM8 is regulated by phospholipase C via the phospholipid phosphoinositol 4,5-bisphosphate[J]. J Biol Chem, 2009, 284(3): 1570-1582.
- [12] Rohacs T, Lopes C M, Michailidis I, et al. PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain[J]. Nat Neurosci, 2005, 8(5): 626-634.
- [13] Kandel E R. Principles of neural science[M]. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 2013.
- [14] Dhaka A, Earley T J, Watson J, et al. Visualizing Cold Spots: TRPM8-Expressing Sensory Neurons and Their Projections[J]. Journal of Neuroscience, 2008, 28(3): 566-575.
- [15] Bautista D M, Siemens J, Glazer J M, et al. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold[J]. Nature, 2007, 448(7150): 204-208.
- [16] Nealen M L, Gold M S, Thut P D, et al. TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat[J]. J Neurophysiol, 2003, 90(1): 515-520.
- [17] Dhaka A, Murray A N, Mathur J, et al. TRPM8 is required for cold sensation in mice[J]. Neuron, 2007, 54(3): 371-378.
- [18] Caterina M J, Schumacher M A, Tominaga M, et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway[J]. Nature, 1997, 389(6653): 816-824.

- [19] Dai Y. TRPs and pain[J]. *Semin Immunopathol*, 2016, 38(3): 277-291.
- [20] Mandadi S, Roufogalis B D. ThermoTRP channels in nociceptors: taking a lead from capsaicin receptor TRPV1[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2008, 6(1): 21-38.
- [21] Ono K, Ye Y, Viet C T, et al. TRPV1 expression level in isolectin B₄-positive neurons contributes to mouse strain difference in cutaneous thermal nociceptive sensitivity[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2015, 113(9): 3345-3355.
- [22] Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, et al. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors[J]. *J Comp Neurol*, 2005, 493(4): 596-606.
- [23] 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.
- [24] Reid G, Babes A, Pluteanu F. A cold- and menthol-activated current in rat dorsal root ganglion neurones: properties and role in cold transduction[J]. *J Physiol*, 2002, 545(2): 595-614.
- [25] Kamatou G P, Vermaak I, Viljoen A M, et al. Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties[J]. *Phytochemistry*, 2013, 96: 15-25.
- [26] Best R, Crosby S, Berger N, et al. The Effect of Isolated and Combined Application of Menthol and Carbohydrate Mouth Rinses on 40 km Time Trial Performance, Physiological and Perceptual Measures in the Heat[J]. *Nutrients*, 2021, 13(12).
- [27] Flood T R. Menthol Use for Performance in Hot Environments[J]. *Curr Sports Med Rep*, 2018, 17(4): 135-139.
- [28] Jeffries O, Waldron M. The effects of menthol on exercise performance and thermal sensation: A meta-analysis[J]. *J Sci Med Sport*, 2019, 22(6): 707-715.
- [29] Kayama Y, Shibata M, Takizawa T, et al. Functional interactions between transient receptor potential M8 and transient receptor potential V1 in the trigeminal system: Relevance to migraine pathophysiology[J]. *Cephalalgia*, 2018, 38(5): 833-845.
- [30] Wasner G, Schattschneider J, Binder A, et al. Topical menthol--a human model for cold pain by activation and sensitization of C nociceptors[J]. *Brain*, 2004, 127(Pt 5): 1159-1171.
- [31] Binder A, Stengel M, Klebe O, et al. Topical high-concentration (40%) menthol-somatosensory profile of a human surrogate pain model[J]. *J Pain*, 2011, 12(7): 764-773.
- [32] Hatem S, Attal N, Willer J C, et al. Psychophysical study of the effects of topical application of menthol in healthy volunteers[J]. *Pain*, 2006, 122(1-2): 190-196.
- [33] Takahashi Y, Takahashi K, Moriya H. Mapping of dermatomes of the lower extremities based on an animal model[J]. *Journal of Neurosurgery*, 1995, 82(6): 1030-1034.
- [34] Mogil J S. Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2020, 21(7): 353-365.

致 谢

2019年8月26日，是我的18岁生日，也是复旦大学为2019级新生开放新生系统的第一天。那天匆匆忙忙，登录了系统，查看了通知，找齐了学院安排的另外三位室友，也收拾了几天后前往学校报道需要携带的行李。这一岁里，我的学习生活被高等数学和大学物理填满；课余时间也作为书院自管会的小干事为修理、更新园区吹风机做了点事；最后也做出了进入生科院学习生物科学的决定。也正是这一岁里，新冠疫情突至，口罩和网课突然成为了生活的全部。

2020年8月26日，是我的19岁生日，但不太记得这一年的生日是怎么过的了。这一岁里，我真正接触到了生物科学的专业课，学到了很多，也取得了不错的成绩，也很荣幸地获得了这一学年的国奖；我进入了薛磊老师的实验室，进行了科研实习，也在薛老师的鼓励下申请课题，报名参加了大学生生命科学竞赛，生活于是被学习和科研填满。这一岁里，新冠疫情稍微消停，口罩还在，但网课暂时退出了生活。

2021年8月26日，是我的20岁生日，也是我最难忘的生日。那天有军训开营的早起和烈日，有在休息室听薛老师指导修改ppt的大脑宕机，有改ppt改到崩溃的鼻子一酸，有乘坐末班校车碰上倾盆大雨的寒冷与无助，有冒雨走回寝室疲惫但坚定。虽然开头可能不如人意，但这一岁里，薛老师的指导帮助我斩获了竞赛全国一等奖；对生物科学专业课的进一步学习不仅让我视野更加开阔，优异的成绩也让我再次获得了国奖。虽然2022年春的生活被封楼和网课填满，但我也遇上了能够陪伴彼此、支持彼此的女朋友王子晗。

2022年8月26日，是我的21岁生日。这天一如既往的在上课在忙，但学习的充实、暂时清晰的未来和不再独自一人让我并不觉得辛苦。这一岁里，我评上了年度优秀学生标兵，和很多人畅聊了从手头的科研实验到未来的远景规划各种话题。虽然这一岁还没过完，但这一定会是我人生中很精彩一年。

走马观花回头看完了我的四年，有很多人给予了我支持和帮助。感谢薛磊老师在我三年的科研见习中对我的谆谆教诲和指导，让我从一个什么都不会的小白本科生成为了一名能做、能写、能说的有所长进的本科生。感谢 Xue Lab

范文勇师兄、胡佳琦师姐、刘庆卓师兄、王宇琦师兄、胡家玮师兄、陆炼师兄、黄盈莹师姐、高一鸣师兄、徐玥师姐以及 Hu Lab 潘成芳师姐、张雪峰师兄、李晨阳师兄、陆童创师兄在我科研见习过程中给予我的帮助。同时也感谢我未来课题组的张玉秋老师在我完成本科毕业设计时给予我的支持和理解。感谢我的女朋友王子晗的陪伴和鼓励，感谢她在我实验失败时的安慰和在实验成功时的祝贺，她的陪伴帮助我跨过了太多太多坎。感谢我的辅导员朱震宇老师，虽然经常捞我去报名这个报名那个凑上人数，但真的很感谢小朱老师在我报名评优时帮我改材料的细致耐心。感谢我的室友王若昕、谷峰和罗小勇，充满欢乐的 38 号楼 2022 很多时候成为了我充电的港湾。感谢我的同班同学和好朋友们，与你们在一起的交流非常开心也收获颇丰，希望我们都能追求得到自己希望的未来。感谢复旦大学 Echo 学生合唱团，让我有一隅小小天地能用音乐疗愈。感谢“四人组”、“咖啡书馆”和“学术吐槽群”让我能大胆分享和评价我的所见所闻。最后也是最重要的，是要感谢我的父母，感谢您们给予了我无限的支持和放心大胆去冲的勇气。

2023 年 8 月 26 日是复旦大学研究生新生开学报道的日子，也是我的 22 岁生日。而 4 年前的 8 月 26 日也是复旦大学本科生新生开学报到的日子，18 岁的我懵懂地踏进了百年复旦的星空，感恩当下，也憧憬未来。4 年前与 4 年后，同样的日期，不同的身份，但同样的星空。也许现在，也许未来，我也能成为百年复旦星空中的一颗在日月光华和卿云烂漫中闪亮的星星。

李哲楷

2023 年 5 月 17 日于复旦大学