

文章编号: 1004-0374(2010)05-0426-05

神经元型一氧化氮合酶(nNOS)与疼痛

陈丽钦, 洪炎国*

(福建师范大学生命科学院, 福州 350108)

摘要: 一氧化氮(NO)是神经元细胞内一种新型的神经递质,它由一氧化氮合酶(NOS)催化而成。在神经系统中神经元型一氧化氮合酶(nNOS)是NO合成的关键酶。大量研究表明, nNOS可调节多种生理和病理过程诸如炎症痛和神经病理性疼痛。该文通过介绍nNOS的结构、分布和影响nNOS活性的因素,阐述了nNOS在病理性疼痛中的重要作用,为此可通过调节nNOS表达来达到调节生理和病理过程。

关键词: 神经元型一氧化氮合酶; 一氧化氮; 炎症痛; 神经病理性疼痛

中图分类号: R338.3; R965

文献标识码: A

Neuronal nitric oxide synthase(nNOS) and pain

CHEN Li-qin, HONG Yan-guo*

(College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

Abstract: Nitric oxide (NO) acts as a new neurotransmitter in neuron cells. It is catalyzed by nitric oxide synthase (NOS). Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) is a key enzyme for NO production. Accumulating evidence shows that nNOS is involved in modulating physiological and pathological process such as inflammatory pain and neuropathic pain. This review concentrates on nNOS structural features, subcellular localization and factors regulating nNOS function, expounds the of importance of nNOS in pathological pain. So, we can modulate physiological and pathological process through regulating nNOS expression.

Key words: neuronal nitric oxide synthase; nitric oxide; inflammatory pain; neuropathic pain

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种生物活性极强的无机小分子。近年来研究发现,它还是一种新型的神经递质。NO加强神经系统的信息传递介导多种神经生理和病理过程,包括参与突触功能和突触可塑性的调节、神经元的存活与再生、介导神经损伤和神经变性过程及调节各个阶段的神经发育分化等。在体内,当细胞内Ca²⁺浓度增高时,NO可由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化L-精氨酸(L-Arg)与氧分子生成,同时也生成L-瓜氨酸,该反应需要还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)和黄素单核昔酸(FMN)作为辅助因子。

NOS有三种亚型,分别是诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)和内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide

synthase, eNOS)。其中eNOS和nNOS也称为固有型一氧化氮合酶,它们是Ca²⁺依赖型,主要存在于脊髓和大脑中。iNOS主要分布在巨噬细胞、白细胞等炎症细胞中,它的功能不被胞内Ca²⁺所调节只能由细胞因子或内毒素所激活^[1]。大量研究表明, nNOS是NO在神经系统中生成的关键酶。

1 nNOS的结构、分布和分类

nNOS由1434个氨基酸残基组成,相对分子质量为160.8 k^[2]。nNOS包含两个催化结构域,分别是C末端的还原结构域和N末端的氧化结构域。两个结构域之间被钙调蛋白(calmodulin, CaM)结合结

收稿日期: 2009-12-12; 修回日期: 2010-01-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970985); 福建省科技厅重点项目(2006F6001)

*通讯作者 E-mail: yhong@fjnu.edu.cn

构域分开, 还原结构域具有FAD、FMN和NADPH的结合位点, 而氧化结构域则包含L-Arg、亚铁血红素和四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH4)的结合位点。nNOS的活性形式是形成nNOS二聚体, nNOS二聚体的形成需要BH4、亚铁血红素和L-Arg的结合^[3]。近年来研究指出BH4为合成NO的必需辅助因子, 抑制BH4的合成可缓解炎症痛和神经病理性疼痛^[4]。在nNOS结构N末端具有一个PDZ结构域, 可与含有PDZ结构域的蛋白相互作用。

nNOS在成熟和不成熟细胞中均有表达^[5,6], 主要集中于神经元细胞、中性粒细胞和星形胶质细胞中^[7-9]。同时nNOS也可存在于骨骼肌、心肌和平滑肌中, 其产生的NO可控制血流和肌肉收缩。nNOS可由不同的接头蛋白运输至不同的位置, 这也可能导致其在不同部位具有不同的作用。nNOS主要定位于质膜, 近来有学者指出在一些神经元和神经胶质细胞中, 未能发现nNOS定位于细胞质的情况下却发现nNOS定位于细胞核^[10]。

由于mRNA剪接的不同, 目前已知的nNOS剪接体有超过10种。主要有nNOS- α (即nNOS-1, 160 k)、nNOS- β (136 k)、nNOS- γ (125 k)、nNOS- μ (165 k)、nNOS-2 (144 k)、nNOS-4 (相对分子质量未知)、nNOS-5 (61.75 k)和TnNOS (125 k)等^[11] (表1)。其中nNOS- α 即nNOS的全长基因, 在脑中具有最大的催化活性, 主要位于质膜。在大鼠的胚胎干细胞中由于外显子2的缺失会导致nNOS的催化活性下降95%^[12], 同时也能产生2个不同的剪接体即nNOS- β 和nNOS- γ ^[13], nNOS- β 和nNOS- γ 缺乏外显子2中的PDZ结构域, 致使其失去膜连接, 所以它们定位于胞质。nNOS- β 和nNOS- γ 在脑中以可溶性形式存在, 体外研究表明, nNOS- γ 缺乏催化活性, 而nNOS- β 在体内外均是活性状态。研究发现nNOS- μ 选择性的在大鼠心脏和骨骼肌中表达, 后又发现它在大鼠阴茎和尿道中也有表达。nNOS- μ

具有PDZ结构域, 主要定位于胞膜。在人成神经细胞瘤细胞株中发现有nNOS-2存在, nNOS-2由于L-Arg结合区域的缺失, 导致其不具有催化活性。

2 影响nNOS活性的因素

2.1 磷酸化

nNOS不同位点的磷酸化可在不同程度上影响其活性^[14]。钙调蛋白依赖激酶II (CaMKII) 可对nNOS的Ser847位点磷酸化, 从而抑制Ca²⁺-CaM的结合而达到降低nNOS活性的目的, nNOS的另外一个磷酸化位点是Ser1412, 它是Akt的磷酸化位点。在此位点磷酸化可增加nNOS活性, 而去磷酸化却能降低其活性。此外, 在不同胞内外信号调节下, 一些激酶和磷酸酯酶如蛋白激酶A (PKA)、蛋白激酶C (PKC)和钙调蛋白依赖激酶 (CaMK) 也可调节nNOS磷酸化。

2.2 CaM

CaM可作为nNOS的变构激活剂, 当CaM与Ca²⁺同时存在, 电流从FAD到FMN的速度会减弱, CaM与nNOS结合会促进电子流从NADPH转移到还原酶结构域, 再从还原酶结构域到血红素中心^[15,16]。在胞内Ca²⁺浓度处于基础值时, nNOS处于非活性状态, 当刺激因子使胞内Ca²⁺浓度升高时, CaM与nNOS结合, 从而激活nNOS。若Ca²⁺浓度下降, 则CaM与nNOS分开, nNOS变为无活性状态。从上可以更加确定nNOS的活性与胞内Ca²⁺浓度有关。

2.3 nNOS的PDZ结构域

nNOS的N末端包含一个PDZ结构域, 这个结构域参与形成活性nNOS二聚体, 可与细胞特定区域的许多蛋白质相互作用。通过PDZ-PDZ结构域或C末端PDZ反应可将nNOS锚定于质膜或细胞溶质蛋白。PSD95能将nNOS与N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体相连, 通过NMDA受体的激活从而有效的活化nNOS^[17]。在

表1 nNOS不同剪接体结构和分布

类型	改变的区域	改变的结构域	相对分子质量(k)	细胞内定位	催化活性	组织定位(主要)
nNOS- α	无	无	160.00	主要在胞膜	有	脑
nNOS- β	缺失外显子2	PDZ结构域	136.00	胞质	有	脑
nNOS- γ	缺失外显子2	PDZ结构域	125.00	胞质	无	脑
nNOS- μ	插入外显子16/17	未知	165.00	胞膜	有	骨骼肌
nNOS-2	缺失外显子9/10	血红素, L-Arg的结合位点	144.00	胞质	无	脑
nNOS-4	缺失外显子3/4	还原酶结构域	未知	未知	无	睾丸、骨骼肌
nNOS-5	缺失外显子5	还原酶结构域	61.75	未知	未知	脑、骨骼肌
TnNOS	缺失外显子3/4	PDZ/GLGF结构域	125.00	胞膜	有	骨骼肌

NOS的三个亚型中, nNOS与NMDA在突触后关系最密切^[18]。将nNOS连接于PSD95蛋白上, 对于nNOS锚定于突触后来说是重要的。

2.4 nNOS的蛋白抑制剂

nNOS的N端与PIN蛋白相结合从而抑制nNOS活性, 因为PIN与nNOS能够发生免疫共沉淀, 而与eNOS、iNOS则不会^[19]。结合PIN后使二聚体结构不稳定, 所以能够抑制nNOS活性。

2.5 Hsp90和小窝蛋白-3

由于nNOS-Hsp90复合物的产生会导致NO含量的增加, Hsp90能够促进CaM与nNOS结合, 导致nNOS的活化。然而, 小窝蛋白-3却能抑制Ca²⁺-CaM的结合进而抑制骨骼肌中NO的产生, 这个抑制作用又可被Ca²⁺-CaM所反转。

3 nNOS参与病理性疼痛过程

病理性疼痛, 由损伤、炎症和肿瘤等各种疾病引起。主要表现为痛阈下降和自发性疼痛, 有时甚至在损伤的组织修复后, 疼痛依然存在。病理性疼痛包括神经病理性痛和炎症痛。机体在受到伤害性刺激后, 受损伤的组织细胞释放氯化钾、组织胺、缓激肽、5-羟色胺和P物质等致痛物质, 刺激伤害感受器, 产生神经冲动, 传递到脊髓; 传入神经纤维终末释放神经递质, 使脊髓背角中的伤害性感受神经元发生兴奋, 伤害性刺激信号继而向中枢神经系统高级部位上传, 到达大脑皮层, 形成痛觉。此过程在神经病理性疼痛和炎症性痛时被大大地易化。而nNOS在这一易化机制中有重要作用。

3.1 nNOS与神经病理性疼痛

神经病理性疼痛是由于神经系统, 如传入神经、脊髓或中枢神经系统等部分功能异常或结构损伤所导致的疼痛。神经病理性疼痛经常伴随着感觉缺失和诸如痛觉过敏、痛觉失常等感觉异常, 它与炎症痛的病理机制大不相同, 持续时间比较长, 可以延续几周, 甚至几个月。

许多证据证明, 在外周和中枢神经系统中, nNOS在神经病理性疼痛中发挥了重要作用。外周神经损伤可导致脊髓背角神经元nNOS的过度表达, 同时伴有痛觉过敏和痛觉失常^[20-22]。全身或鞘内注射非特异性NOS抑制剂或选择性nNOS抑制剂, 会导致坐骨神经慢性压迫(chronic constriction injury, CCI)或脊神经结扎(spinal nerve ligation, SNL)模型中神经病理性疼痛的热痛反应减轻^[23,24]; 而nNOS敲除鼠不能显示出神经损伤所诱导的机械痛敏^[25]。

这些都表明nNOS参与了神经病理性疼痛。

然而, nNOS- α 和nNOS- β 由于结构不同、定位不同、酶活性不同, 可能导致它们在神经病理性疼痛中发挥不同的作用。有研究报道, 在PC12细胞中转染nNOS- α 对NF- κ B的活性没有影响, 但是转染nNOS- β 却能明显降低其活性。nNOS- α 与NMDA受体相偶联, 导致NMDA受体激活。相反, 神经损伤之后nNOS- β 含量下调, 说明nNOS- β 的存在可能导致NO所产生病理性疼痛的抑制^[26]。因此, 脊髓NO在神经病理性疼痛中实际上起着双相作用。

3.2 nNOS与炎症性疼痛

炎症性疼痛是指由创伤、感染等引起的外周组织损伤导致炎症时所发生的疼痛, 主要表现为痛觉过敏。在动物模型中, 通常是由注射福尔马林、角叉菜胶、酵母多糖或者CFA等引起炎症, 炎症痛所持续的时间为几个小时到几周。在炎症等病理条件下, 大脑和脊髓的nNOS表达都会上调^[27], 鞘内注射NOS非特异性抑制剂和nNOS特异性抑制剂都能抑制炎症痛的发生和维持, 这些都说明了nNOS参与炎症痛的发展和维持^[28]。

研究表明, nNOS在角叉菜胶诱导的炎症痛的两个阶段发挥不同的作用, nNOS对于角叉菜胶所诱导的炎症热痛敏的后期阶段是必要的, 且其在痛敏的早期阶段可被其他NOS亚型所代替^[29]。同时还发现在nNOS基因敲除鼠中, 注射完全弗氏佐剂(CFA)后大鼠机械痛觉过敏均有不同程度的缓解, 对热痛敏则结果不一^[28,30]。从这一点我们也可以知道慢性炎症痛的维持过程中, 其机械痛敏和热痛敏的机制可能有所不同, 有假说指出机械痛敏大部分是依赖于中枢, 而外周机制则会导致热痛敏^[28]。

有研究指出nNOS-1和nNOS-2在吗啡止痛和吗啡耐受方面具有相反作用。用反义探针选择性针对nNOS-2可使吗啡止痛水平下降, nNOS-1表达的下调可阻断吗啡耐受。因此, nNOS的两种剪接体在脊髓和脊上水平的吗啡止痛具有不同作用, nNOS-1可使吗啡止痛效应降低, 而nNOS-2却能加强吗啡的止痛效应^[31]。后又发现在福尔马林炎症痛模型中, 利用nNOS- β 反义探针可明显降低福尔马林诱导的炎症痛反应的第二阶段, 说明nNOS- β 在脊髓水平上能够致痛, 同时在该实验中nNOS-2可降低福尔马林诱导的痛反应^[32]。由上述可知nNOS在痛觉调制方面的两面性。

4 nNOS在疼痛发生中所激活的细胞内信号通路

机体受到伤害性刺激后, 导致神经冲动从外周传到脊髓, 在脊髓背角产生过量兴奋性氨基酸如谷氨酸, 从而可激活 NMDA 受体, 打开离子通道, 促进 Ca^{2+} 内流, CaM 与 Ca^{2+} 结合激活 nNOS, 经 nNOS 催化产生的 NO 可激活可溶鸟苷酸环化酶 (soluble guanylate cyclase, sGC), 从而刺激第二信使 cGMP 的产生, NO 与 cGMP 之间的联系是 NO-cGMP 信号通路的核心。cGMP 能导致蛋白激酶 G (PKG) 活化, 并可调节 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 和甘氨酸 (Gly) 对脊髓后角神经元的抑制作用。cGMP 的升高也可导致蛋白质磷酸化和离子通道电导的改变。PKG 可直接作用于 Ca^{2+} 离子通道和 Ca^{2+} 激活的 K^+ 离子通道, 产生的 NO 也可作用于 Ca^{2+} 依赖的 K^+ 离子通道和 Na^+ 离子通道。PKG 可以对多种离子通道进行功能调节。例如 cGMP 可通过 PKG 的激活而导致 ATP 敏感的 K^+ 离子通道的活性增加。

丝裂酶原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 是生物体内重要的信号转导系统之一, 激活后可诱导和维持不同的痛敏反应。nNOS 可通过 NO-cGMP 通路来调节 MAPK 信号通路。研究指出, nNOS 可能通过调节脊髓小神经胶质细胞中的 p38-MAPK 的活性来达到调节吗啡止痛和耐受^[33]。有学者指出, NO-cGMP-PKG 通路包含胞外 ERK, 已证明此通路参与许多痛模型的可塑性的调节。在 cGMP-PKG-MAPK 信号通路中, NO 激活 ERK、NO-sGC 信号通路是 ERK 活化的上游, PC12 细胞中 NOS 的活化和激活对其参与 MAPK 级联反应是非常重要的。实验研究表明, NO 和 cGMP 可导致 VEGF 依赖的 ERK1/ERK2 的激活, 这个结果也第一次证明了激酶诱导的受体活化可再次引起 nNOS 或者 GC 信号通路活化 MAPK 级联反应^[34]。

5 结语

近年来, 对 nNOS 在疼痛中的作用研究发展迅速, 但对其具体的作用机制还不甚明了, 或有很大争议。但有一点是明确的, 即 nNOS 参与多种病理和生理过程, 所以调节 nNOS 的表达对于疼痛的治疗具有重要的意义。

[参 考 文 献]

- [1] Bian K, Ke Y, Kamisaki Y, et al. Proteomic modification by nitric oxide. *J Pharmacol Sci*, 2006, 101(4): 271-9
- [2] Boissel JP, Schwarz PM, Förstermann U. Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expression regulation. *Nitric Oxide*, 1998, 2(5): 337-49
- [3] Reif A, Fröhlich LG, Kotsonis P, et al. Tetrahydrobiopterin inhibits monomerization and is consumed during catalysis in neuronal NO synthase. *J Biol Chem*, 1999, 274(35): 24921-9
- [4] Schmidtko A, Tegeder I, Geisslinger G. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends Neurosci*, 2009, 32(6): 339-46
- [5] Bredt DS, Snyder SH. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron*, 1994, 13(2): 301-13
- [6] Cork RJ, Perrone ML, Bridges D, et al. A web-accessible digital atlas of the distribution of nitric oxide synthase in the mouse brain. *Prog Brain Res*, 1998, 118: 37-50
- [7] Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 1990, 347(6295): 768-70
- [8] Saini R, Patel S, Saluja R, et al. Nitric oxide synthase localization in the rat neutrophils: immunocytochemical, molecular, and biochemical studies. *J Leukocyte Biol*, 2006, 79(3): 519-28
- [9] Murphy S, Simmons ML, Agullo L, et al. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci*, 1993, 16(8): 323-8
- [10] Korzhevski DE, Otellin VA, Grigor'ev IP, et al. Immunocytochemical demonstration of neuronal NO-synthase in rat brain cells. *Morfologiya*, 2007, 132(4): 77-80
- [11] Kavva R, Saluja R, Singh S, et al. Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. *Nitric Oxide*, 2006, 15(4): 280-94
- [12] Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, et al. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*, 1993, 75(7): 1273-86
- [13] Brenman JE, Chao DS, Gee SH, et al. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α -syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*, 1996, 84(5): 757-67
- [14] El-Mlili N, Rodrigo R, Naghizadeh B, et al. Chronic hyperammonemia reduces the activity of neuronal nitric oxide synthase in cerebellum by altering its localization and increasing its phosphorylation by calcium-calmodulin kinase II. *J Neurochem*, 2008, 106(3): 1440-9
- [15] Roman LJ, Masters BS. Electron transfer by neuronal nitric oxide synthase is regulated by concerted interaction of calmodulin and two intrinsic regulatory elements. *J Biol Chem*, 2006, 281(32): 23111-8
- [16] Guan ZW, Iyanagi T. Electron transfer is activated by calmodulin in the flavin domain of human neuronal nitric oxide synthase. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 412(1): 65-76
- [17] Sattler R, Xiong Z, Lu WY, et al. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*, 1999, 284(5421): 1845-8
- [18] Xu L, Mabuchi T, Katano T, et al. Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. *Nitric Oxide*, 2007, 17(1): 18-24
- [19] Jaffrey SR, Snyder SH. PIN: an associated protein inhibitor

- of neuronal nitric oxide synthase. *Science*, 1996, 274(5288): 774-7
- [20] Cizkova D, Lukacova N, Marsala M, et al. Neuropathic pain is associated with alterations of nitric oxide synthase immunoreactivity and catalytic activity in dorsal root ganglia and spinal dorsal horn. *Brain Res Bull*, 2002, 58(2): 161-71
- [21] Gordh T, Sharma HS, Alm P, et al. Spinal nerve lesion induces upregulation of neuronal nitric oxide synthase in the spinal cord: an immunohistochemical investigation in the rat. *Amino Acids*, 1998, 14(1-3): 105-12
- [22] O'Rielly DD, Loomis CW. Increased expression of cyclooxygenase and nitric oxide isoforms, and exaggerated sensitivity to prostaglandin E₂, in the rat lumbar spinal cord 3 days after L5-L6 spinal nerve ligation. *Anesthesiology*, 2006, 104(2): 328-37
- [23] Lui PW, Lee CH. Preemptive effects of intrathecal cyclooxygenase inhibitor or nitric oxide synthase inhibitor on thermal hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Life Sci*, 2004, 75(21): 2527-38
- [24] Mabuchi T, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, et al. Attenuation of neuropathic pain by the nociceptin/orphanin FQ antagonist JTC-801 is mediated by inhibition of nitric oxide production. *Eur J Neurosci*, 2003, 17(7): 1384-92
- [25] Guan Y, Yaster M, Raja SN, et al. Genetic knockout and pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase attenuate nerve injury-induced mechanical hypersensitivity in mice. *Mol Pain*, 2007, 3: 29
- [26] Jin XG, He SQ, Yan XT, et al. Variants of neural nitric oxide synthase in the spinal cord of neuropathic rats and their effects on nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity in PC12 cells. *J Pain*, 2009, 10(1): 80-9
- [27] Guhring H, Gorig M, Ates M, et al. Suppressed injury-induced rise in spinal prostaglandin E₂ production and reduced early thermal hyperalgesia in iNOS-deficient mice. *J Neurosci*, 2000, 20(17): 6714-20
- [28] Chu YC, Guan Y, Skinner J, et al. Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant-induced persistent pain. *Pain*, 2005, 119(1-3): 113-23
- [29] Tao F, Tao YX, Zhao C, et al. Differential roles of neuronal and endothelial nitric oxide synthases during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia. *Neuroscience*, 2004, 128(2): 421-30
- [30] Boettger MK, Üceyler N, Zelenka M, et al. Differences in inflammatory pain in nNOS-, iNOS- and eNOS-deficient mice. *Eur J Pain*, 2007, 11(7): 810-8
- [31] Kolesnikov YA, Chereshnev I, Criesta M. Functionally differentiating two neuronal nitric oxide synthase isoforms through antisense mapping: evidence for opposing NO actions on morphine analgesia and tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(15): 8220-5
- [32] Kolesnikov YA, Chereshnev I, Criesta M. Opposing actions of neuronal nitric oxide synthase isoforms in formalin-induced pain in mice. *Brain Res*, 2009, 1289: 14-21
- [33] Liu W, Wang CH, Cui Y, et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase antagonizes morphine antinociceptive tolerance by decreasing activation of p38 MAPK in the spinal microglia. *Neurosci Lett*, 2006, 410(3): 174-7
- [34] Yamazaki MK, Chiba K, Mohri T, et al. Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade through nitric oxide synthesis as a mechanism of neuritogenic effect of genipin in PC12h cells. *J Neurochem*, 2001, 79(1): 45-54