

·基础研究·

# 蛋白激酶C $\epsilon$ 对大鼠背根神经节持续受压后背角星型胶质细胞激活和机械痛敏的影响\*

张 杨<sup>1</sup> 杜占慧<sup>2</sup> 魏 慧<sup>1</sup> 高文双<sup>1</sup> 岳寿伟<sup>1,3</sup>

## 摘要

**目的:**探讨大鼠背根神经节持续受压(chronic compression of the dorsal root ganglion, CCD)后,脊髓背角星型胶质细胞的激活情况,以及PKC $\epsilon$ 是否可以通过调节星型胶质细胞的活性而参与CCD后神经病理性疼痛。

**方法:**将大鼠随机分为6组,每组大鼠8只:假手术组、CCD7天组、CCD14天组、CCD7天+BIM I组、CCD+DMSO组、CCD+PDBu组,分别通过鞘内注射不同药物,或对正常大鼠鞘注DMSO/PDBu后,测量大鼠机械刺激缩爪阈值(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT)的变化,利用Western Blot技术检测脊髓背角PKC $\epsilon$ 和GFAP蛋白表达的变化,利用免疫荧光技术检测脊髓背角星型胶质细胞激活情况。

**结果:**CCD术后第4天,鞘内注射PKC $\epsilon$ 的激动剂PDBu 1—4h,明显降低CCD大鼠PWMT( $P<0.05$ ),而给予BIM I 1—4h,可升高CCD大鼠PWMT( $P<0.05$ )。从CCD术后第4天起,连续3天鞘注BIM I,可明显缓解大鼠的机械痛敏(4天, $P<0.05$ ),但从停止注射后镇痛作用消失( $P>0.05$ )。与假手术组比较,CCD后7天和14天,手术侧背角PKC $\epsilon$ 和GFAP表达升高,差异有显著性意义( $P<0.05$ ),星型胶质细胞激活增加,而注射BIM I可明显抑制PKC $\epsilon$ 和GFAP表达( $P<0.05$ )和星型胶质细胞激活。PDBu可导致正常大鼠PWMT明显降低( $P<0.05$ ),GFAP蛋白质表达量增加( $P<0.05$ ),促进星型胶质细胞激活。

**结论:**大鼠背根神经节持续受压后,机械痛阈下降的同时,手术侧脊髓背角内PKC $\epsilon$ 和GFAP蛋白表达上调,星型胶质细胞激活增加。PKC $\epsilon$ 可能通过调节星型胶质细胞激活参与CCD后病理性神经痛的中枢敏化机制。

**关键词** 脊髓背角;蛋白激酶C;星型胶质细胞;背根神经节持续受压

**中图分类号:**R493,R6185 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2019)-11-1278-07

Effects of protein kinase C $\epsilon$  on pain behavior and spinal astrocytes activation after chronic compression of the dorsal root ganglion in rats/ZHANG Yang, DU Zhanhui, WEI Hui, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(11): 1278—1284

## Abstract

**Objective:** To investigate the effect of protein kinase C $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) on pain behavior and spinal astrocytes activation after chronic compression of the dorsal root ganglion (CCD) of rats.

**Method:** Wistar rats weighting 200—220g were randomly divided into six groups( $n=8$ ): sham operation group, CCD 7 days group, CCD 14 days group, CCD 7 days+Bisindolylmaleimide I (BIM I) group, CCD+DMSO group, CCD+Phorbol 12, 13-dibutyrate (PDBu) group. Drugs were given by intrathecal injection after CCD model established. At 1, 4, 7, and 14 days after CCD operation, the paw withdrawal mechanical threshold (PWMT) was tested. Then the protein expression of PKC $\epsilon$  and GFAP in ipsilateral spinal dorsal horn was tested by Western Blot and the activation of astrocytes was detected by immunofluorescence technique.

**Result:** The mechanical allodynia in CCD rats was attenuated by intrathecal administration of the PKC inhibi-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.11.003

\*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81101453, 81472159)

1 山东大学齐鲁医院康复科,济南,250012; 2 青岛市妇女儿童医院心脏中心; 3 通讯作者  
作者简介:张杨,女,博士,副主任医师; 收稿日期:2019-07-02

tor BIM I and aggravated by its activator PMA at 4th day after CCD. The protein expression of PKC $\epsilon$  and GFAP in the spinal dorsal horn and the activation of astrocytes were increased 7 days and 14 days after CCD ( $P<0.05$ ), which was suppressed by BIM I. Pretreated with PDBu could also significantly increase PMWT and the protein expression of GFAP ( $P<0.05$ ), as well as the activation of astrocytes in spinal dorsal horn in normal rats.

**Conclusion:** After CCD operation, the PMWT and the protein expression of PKC $\epsilon$  and GFAP ( $P<0.05$ ) were significantly increased, as well as the activation of astrocytes in spinal dorsal horn. PKC $\epsilon$  may take part in the central sensitization mechanism of neuropathic pain of CCD rats via regulating the activation of astrocytes.

**Author's address** Rehabilitation Department of Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, 250012

**Key word** spinal cord horn; protein kinase C $\epsilon$ ; astrocytes; chronic compression of the dorsal root ganglion

临床报道显示,60%以上的神经病理性疼痛患者伴有脊柱异常,如椎间盘突出、椎管狭窄、椎间孔狭窄等脊柱结构改变。脊柱结构改变引起的脊髓神经压迫可导致根性疼痛或腰痛,这种痛起源于下背部,并向下辐射到腿和脚的后部<sup>[1]</sup>。背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)及周围神经根的持续受压(chronic compression of DRG, CCD)可以产生痛觉过敏和异常疼痛<sup>[2]</sup>,从损伤的DRG神经元到脊髓的大量神经冲动,能够改变脊髓突触可塑性或导致中枢敏化。但是疼痛的维持以及疼痛耐受和调节,单纯从DRG神经元或者背角神经元角度并不能完全解释,神经系统内的胶质细胞在疼痛产生机制中的作用越来越受到关注。有研究报道,髓核压迫神经根可诱导脊髓中胶质细胞被激活,而这些激活的胶质细胞在背角疼痛信号的传递中起着至关重要的作用<sup>[3]</sup>。

PKC是一类重要的蛋白质磷酸化激酶,通过对多种底物蛋白的丝氨酸/苏氨酸磷酸化发挥作用,调节细胞的生长、分化、增生、凋亡、神经传导等过程。脊髓背角上,PKC $\epsilon$ 表达在多种与伤害性感受器相关的神经元和神经纤维末梢,被确认是导致机械痛觉过敏的一种重要的胞内信使<sup>[4]</sup>。在慢性坐骨神经压迫(chronic constriction injury, CCI)模型<sup>[5]</sup>和炎性疼痛模型中<sup>[6]</sup>,PKC的抑制剂可降低脊髓中星型胶质细胞的激活程度,缓解大鼠机械痛敏。但目前关于CCD后脊髓内星型胶质细胞的激活情况,以及PKC在CCD后机械痛敏中的作用并不明确。

本研究目的为观察DRG持续受压后,脊髓背角星型胶质细胞的激活情况,以及PKC是否可以通过调节星型胶质细胞的活性而参与CCD后神经病理

性疼痛。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

清洁级、健康雄性Wistar大鼠,2—3月龄,体重200—220g,由山东大学动物实验中心提供。为观察PKC对CCD后胶质细胞激活中的作用,将大鼠随机分为6组,每组8只:假手术组(sham组);制作CCD模型,脊髓鞘内注射生理盐水,7天取材组(CCD7天);制作CCD模型,鞘注生理盐水,14天取材组(CCD14天);制作CCD模型,鞘注双咪唑马来酰亚胺(Bisindolylmaleimide I, BIM I),7天取材组(CCD7天+BIM I);制作CCD模型,鞘注DMSO组(CCD+DMSO);制作CCD模型,鞘注佛波醇二酯(phorbol 12, 13-dibutyrate, PDBu)组(CCD+PDBu)。为观察PKC对正常大鼠痛敏的影响,将大鼠随机分为2组,每组5只:正常大鼠,鞘注DMSO组(control);正常大鼠,鞘注佛波醇二酯(Phorbol 12, 13-dibutyrate, PDBu)组(PDBu)。实验试剂及仪器,总蛋白提取试剂盒(贝博,中国),兔抗PKC $\epsilon$ 单克隆抗体(1:1000, Abcam, Cambridge, UK),兔抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)单克隆抗体(1:1000, Abcam, Cambridge, UK),兔抗 $\beta$ -actin抗体(1:1000, Abcam, Cambridge, UK),山羊抗兔二抗(1:2000, 中杉金桥,中国),DyLight 594荧光二抗(Abbkine, USA),一抗稀释液(碧云天,中国),HRP化学发光试剂盒(1:1, USA),二甲基亚砜(DMSO, 中杉金桥,中国),PDBu, (Sigma, USA), BIM I, (Cayman, USA),电子机械测痛仪(BME-404型,天津伯尔尼科技有限公司,中国)。

## 1.2 制作 CCD 模型

腹腔注射 10%水合氯醛(0.3ml/100g)麻醉后常规消毒,沿 L4—S1 棘突正中偏右做一纵形切口,钝性分离椎旁肌,充分暴露乳突及横突根部。将 U 型棒沿椎间外孔前壁的上方插入椎管内,使其长端沿椎管内壁下滑,紧密压迫 DRG。生理盐水局部冲洗后,依次缝合肌肉、筋膜及皮肤<sup>[7]</sup>。术后大鼠未发生自残现象及运动神经元受损的表现。

## 1.3 施加药物

异氟烷吸入麻醉大鼠,L4/L5 椎间隙位于双侧棘连线与脊柱的交点处,将微量注射器针头刺入下一椎间隙及 L5/L6 椎间隙,至有突破感。如大鼠出现侧向快速甩尾,表明进入蛛网膜下腔。回抽无血液回流,以 1 $\mu$ l/s 的速度缓慢推注药物,注射完毕后按压约 1min。停止吸入麻醉 1min 内,大鼠可恢复翻身反射。PDBu 浓度为 0.1nmol, BMI 为 5nmol,共 10 $\mu$ l<sup>[8]</sup>。

## 1.4 行为学观察

于术前、术后不同时间点使用电子机械测痛仪测量大鼠机械缩爪阈值(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT),试验设计见图 1A。以针刺端垂直刺激大鼠足底第三、四趾间皮肤,直至出现缩爪或舔足现象,记录数值(g),每次刺激间隔 5min,连续测 5 次,计算平均值作为统计变量<sup>[7]</sup>。

## 1.5 检测蛋白质表达量

Western Blot 免疫印迹法同 Kim 等<sup>[9]</sup>。处死大鼠后,用预冷生理盐水快速灌注,冰上快速取出受压侧 L4 及 L5 节段脊髓,提取蛋白样品,10%SDS-PAGE 胶上电泳分离,再转至 PVDF 膜上。牛奶封闭后先后进行一抗(GFAP 1:1000; PKC $\epsilon$  1:1000)和二抗孵育,冲洗后加入 HRP 化学发光试剂,FcluroChem 9900 成像系统显影,Quantity one 软件光密度分析。

## 1.6 免疫荧光检测星型胶质细胞激活

麻醉大鼠后,先后用 PBS 和 4%多聚甲醛灌注,取出 L4 及 L5 节段脊髓,脱水浸蜡后制作石蜡切片,抗原修复。PBS 清洗后,一抗(GFAP 1:200)孵育过夜。再次清洗后加荧光二抗,DAPI 染核。采用 DMRXA 全自动明场度光显微镜和 Q550A 图像分析系统采集图像。

## 1.7 统计学分析

所有实验数据均以均数 $\pm$ 标准差表示,统计学

检验使用 SPSS 19.0 统计软件,PWMT 采用双因素方差分析,Western Blot 光密度分析结果组间比较采用单因素方差分析或配对 *t* 检验进行比较, $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 干预 PKC 对神经病理性疼痛的影响

CCD 术后第 4 天,鞘内注射 PKC 的激动剂 PDBu 10 $\mu$ l 和抑制剂 BIM I 10 $\mu$ l,注射后 1h, 2h, 4h 和 8h 测量 PWMT 的改变。结果显示,CCD 大鼠 PWMT 较 sham 组明显降低( $P < 0.05$ ),CCD+PDBu 组给药 1h 后,PWMT 较 CCD+DMSO 组明显降低( $P < 0.05$ ),给药后 4h 达到峰值( $P < 0.05$ )。CCD+BIMI 组给药 1h 后,PWMT 较 CCD+DMSO 组有升高趋势,给药后 4h 达到峰值,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),至 8h 已无明显差异(图 1B,  $P > 0.05$ )。

CCD 术后第 4 天,连续 3 天经鞘内注射生理盐水或 BIM I 10 $\mu$ l,分别于术前及 CCD 后 1 天、4 天(注射后 4h)、7 天、10 天、14 天测量大鼠 PWMT<sup>[10]</sup>。与 sham 组相比,CCD 术后 4 天、7 天、10 天及 14 天时机械痛阈值明显下降,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); sham 组不同时间点 PWMT 无明显差异( $P > 0.05$ )。与 CCD 组相比,注射 BIM I 可明显缓解大鼠的机械痛敏(4 天,  $P < 0.05$ ),但从停止注射的 7 天起,该镇痛作用消失(图 1C)。

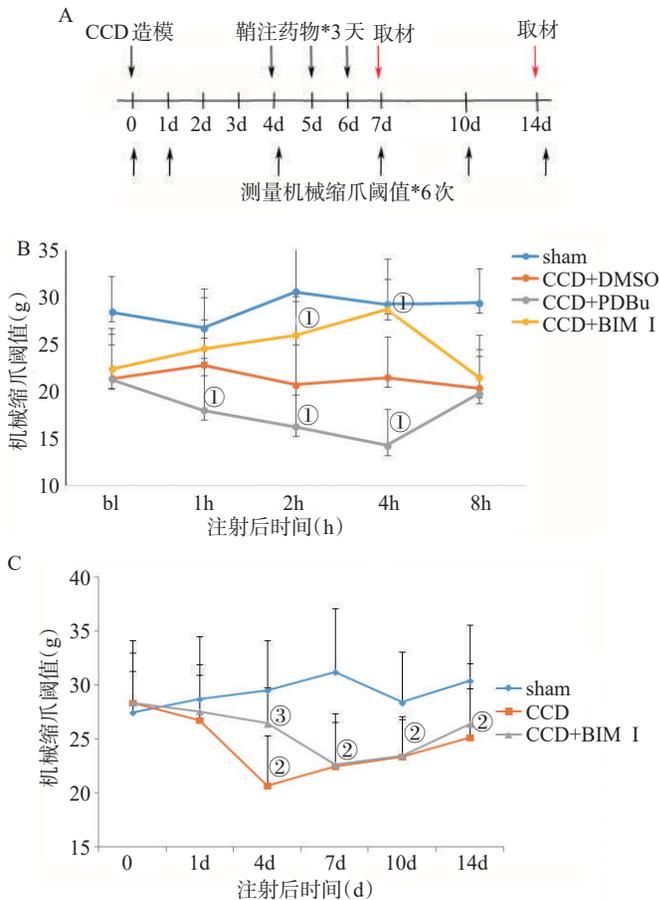
### 2.2 CCD 后脊髓背角 PKC $\epsilon$ 和 GFAP 蛋白表达变化

于术后 7 天和 14 天测试完 PWMT 后取材,检测蛋白质表达量。与 sham 组比较,CCD 后 7 天和 14 天,手术侧脊髓背角 PKC $\epsilon$  和 GFAP 表达升高,差异有显著性意义( $P < 0.05$ );与 CCD7 天组相比,注射 BIM I 可明显抑制 PKC $\epsilon$  和 GFAP 表达(图 2,均  $P < 0.05$ )。证明 CCD 后 PKC $\epsilon$  表达增加,星型胶质细胞激活增加,抑制 PKC $\epsilon$  可抑制脊髓背角星型胶质细胞的激活。

### 2.3 正常大鼠注射 PKC 激动剂后行为学和 GFAP 蛋白质表达的改变

对正常大鼠,连续 3 天向脊髓蛛网膜下腔注射 DMSO(control 组)或 PDBu(PDBu 组),注射后 4h 测量 PWMT,第 4 天取出 L4 及 L5 节段脊髓,采用 Western Blot 免疫印迹检测蛋白质表达量。结果显示,PDBu 组 PWMT 明显低于 control 组(图 3A,  $P <$

图1 试验设计和机械缩爪阈值时间变化曲线



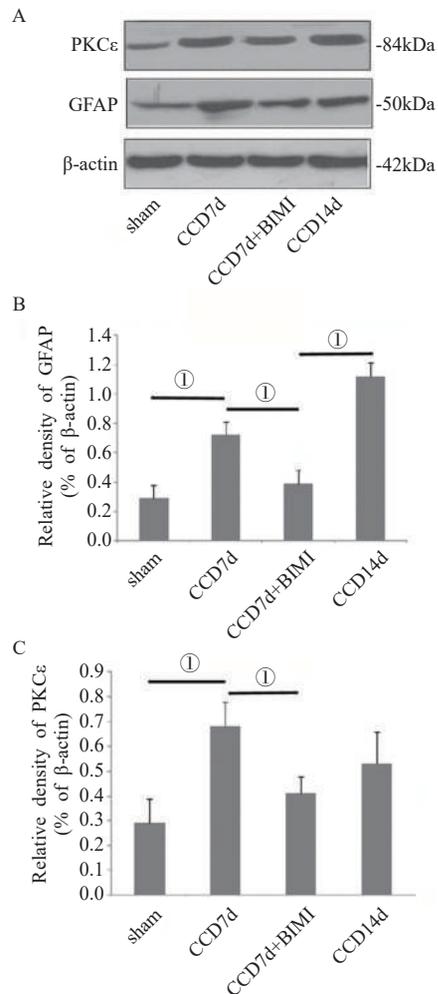
A: 试验设计说明。B: CCD术后第4天,鞘内注射PKC的激动剂PDBu和抑制剂BIM I,注射后1h,2h,4h和8h机械缩爪阈值时间变化曲线。C: CCD术后第4天,连续3天经鞘内注射生理盐水或BIM I,注射后1天、4天(注射后4h)、7天、10天和14天机械缩爪阈值时间变化曲线。①与CCD+DMSO相比,  $P < 0.05$ 。②与sham组相比,  $P < 0.05$ 。③与CCD组相比,  $P < 0.05$ 。

0.05), PDBu组GFAP蛋白质表达明显高于control组(图3B,  $P < 0.05$ )。证明PKC激动剂可使正常大鼠出现痛敏,激活星型胶质细胞。

#### 2.4 脊髓背角星型胶质细胞激活的改变

sham组脊髓背角GFAP染色较浅,未发现明显星形胶质细胞(图4A和E); CCD7天组,可见手术侧脊髓背角内GFAP阳性细胞数目增多,染色增强,主要分布在脊髓I—II层,星型胶质细胞胞体增大,突起变粗变长(图4B和F)。较CCD7天组, CCD7天+BIM I组,脊髓背角内GFAP阳性细胞数目减少(图4C和G)。正常大鼠在脊髓蛛网膜下腔注射PDBu 3天后,脊髓背角内可见少量GFAP阳性细胞(图4D和H)。

图2 受压侧脊髓背角PKCε和GFAP蛋白表达改变



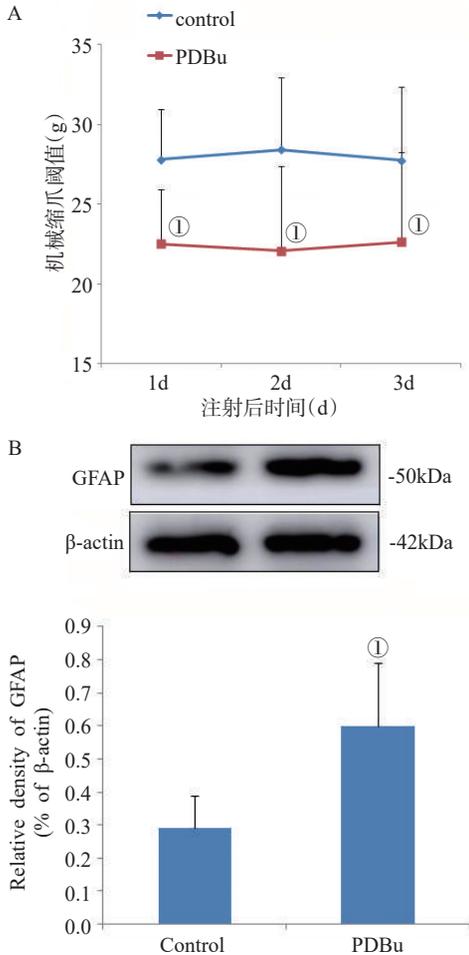
A: PKCε和GFAP蛋白表达条带。B: GFAP蛋白表达量光密度分析。C: PKCε蛋白表达量光密度分析。①  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

CCD是一种典型的神经性疼痛模型,能够模拟人类腰痛和坐骨神经痛。这种疼痛可能伴随着孔内狭窄、外侧椎间盘突出和其他影响背根神经节、脊神经根功能特性的疾病<sup>[1]</sup>。CCD后,除了受压侧神经节,脊髓背角内也产生多种病理改变,如背角神经元兴奋性升高<sup>[2]</sup>,神经元上各种蛋白受体表达增加等<sup>[3]</sup>。机械信号被转化为电信号,通过DRG神经元、脊髓背角神经元等传递到大脑皮质,产生痛觉过敏和异常疼痛<sup>[4]</sup>。在这一过程中,中枢敏化的作用似乎更为重要<sup>[5]</sup>。

近几年来,除了神经元,神经系统内的胶质细胞

图3 注射PKC激动剂后机械缩爪阈值时间变化曲线和GFAP蛋白质表达的改变



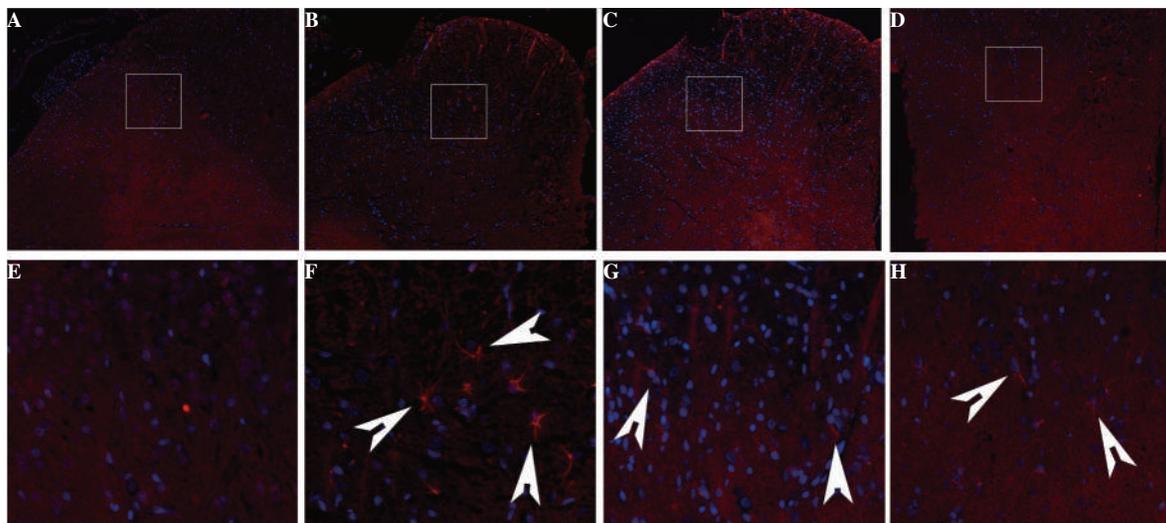
A: 正常大鼠连续3天向鞘注DMSO或PDBu,注射后4h机械缩爪阈值时间变化曲线。B: GFAP蛋白质表达的改变。①与control相比  $P < 0.05$ 。

在疼痛中枢敏感化机制中的作用越来越受到关注,其中星形胶质细胞和小胶质细胞占主导地位。DRG中的卫星细胞(satellite glial cells, SGCs)与中枢神经中的星形胶质细胞存在很多共同点,都以GFAP为标志物,甚至被认为是处于两种位置的同一种细胞。研究证明,L5神经根结扎后,受损侧SGCs被激活,参与早期神经性疼痛的产生和保持<sup>[16]</sup>。在CCD发病后12h,受压侧DRG中GFAP表达增加,但在相邻或对侧DRG中表达较少<sup>[17]</sup>。Tanga等<sup>[18]</sup>证实,L5神经根切断可同时激活脊髓背角中星形胶质细胞和小胶质细胞,但星形胶质细胞的活化呈明显增强趋势,GFAP表达增加,在疼痛作用中占据主导地位。在大鼠坐骨神经慢性结扎(sciatic

nerve ligation, SNL)的疼痛模型上,与非结扎侧相比较,结扎侧脊髓灰质GFAP免疫组化染色明显增强,增加的幅度与痛觉过敏的程度呈正相关<sup>[19]</sup>,而且GFAP的增殖增加,活性加强<sup>[20]</sup>。髓核压迫神经节模型中,14天后大鼠脊髓背角GFAP表达量明显升高<sup>[21]</sup>。与其他神经病理性疼痛模型相同,我们的结果显示,CCD后脊髓背角GFAP蛋白表达增加,与大鼠机械痛敏的时程相一致,GFAP表达被抑制后机械痛敏被缓解,证明CCD后脊髓背角的星形胶质细胞被激活,参与CCD后神经病理性疼痛的产生。同时,有研究报道,CCD后3—12天,脊髓背角和腹角的小胶质细胞激活均增强,更加证实了CCD后胶质细胞被广泛激活。胶质细胞能表达许多离子通道和神经递质受体,通过升高胞内钙浓度影响突触活动。另一方面,细胞内的 $Ca^{2+}$ 水平升高使星形胶质细胞释放谷氨酸,促进突触前神经元的活动,促进突触前末端释放P物质和EAAs。此外,胶质细胞可以动态调节突触传递信息,激活后释放多种神经递质、神经调节剂、促炎细胞因子和趋化因子<sup>[22]</sup>。激活的胶质细胞释放促炎细胞因子,如IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 等,成为二级刺激因子,进一步激活胶质细胞,在背角疼痛信号的传递中起着至关重要的作用<sup>[23]</sup>。

PKC $\epsilon$ 是PKC的一种亚型,分布广泛,在90%以上的DRG小直径神经元中表达,在多种疼痛过程中起重要作用。在福尔马林导致的神经病理性疼痛模型中,大鼠脊髓背角PKC $\epsilon$ 表达水平上调,抑制PKC $\epsilon$ 激活可通过降低脊髓背角NMDA受体的表达减轻疼痛,证明PKC $\epsilon$ 与痛觉过敏相关,能够促进脊髓中枢敏化<sup>[24]</sup>。在腓肠肌注射酸导致的肌肉痛模型中,鞘内注射PKC的激动剂可引起痛觉过敏启动,而拮抗剂可抑制痛敏,导致脊髓背角突触可塑性<sup>[8]</sup>。在角叉菜胶导致的炎性痛模型中,皮下注射PKC $\epsilon$ 抑制剂可降低PGE2诱发的持续痛敏<sup>[25]</sup>。在骨癌疼痛模型,PKC抑制剂可抑制大鼠的机械痛敏,而其激活剂则使其加重<sup>[26]</sup>。我们先前的实验发现,CCD后,受压侧DRG中PKC $\epsilon$ 的表达明显升高<sup>[27]</sup>。本研究结果显示,CCD后手术侧脊髓背角PKC $\epsilon$ 蛋白的表达量增高,鞘内注射PKC $\epsilon$ 的激动剂可加强CCD大鼠的机械痛敏,而PKC $\epsilon$ 抑制剂可明显缓解大鼠的机械痛敏。单独鞘注PKC $\epsilon$ 的激动剂,也可

图4 脊髓背角星型胶质细胞激活情况的变化 (免疫荧光染色,A-D:×20;E-H:×100)



A: sham组; B: CCD7天组; C: CCD7天+BIM 1组; D: 正常大鼠注射PDBu后。E-H分别为上图白框区域放大。白色箭头: 激活的星型胶质细胞。

引起大鼠的机械痛敏,证明在CCD后神经病理性疼痛过程中,PKC $\epsilon$ 参与了外周和中枢敏化的产生。

PKC是重要的胞内信使,在不同的病理状态下,参与疼痛的途径较多,如影响背根神经节上Nav1.8离子道的表达<sup>[28]</sup>,调节背角NMDA受体<sup>[24]</sup>和谷氨酸/PKC/ERK/AMPA依赖通路<sup>[8]</sup>等。PKC也参与调节胶质细胞激活。研究者发现,褪黑素可通过抑制PKC活性和上调cAMP,从而预防吗啡戒断引起的痛觉过敏和脊髓胶质细胞激活<sup>[6]</sup>。PKC $\alpha$ 抑制剂(白屈菜红碱)灌胃,可缓解CCI模型大鼠机械和热痛敏,降低脊髓背角GFAP表达<sup>[5]</sup>。我们发现,PKC $\epsilon$ 激动剂可激活正常大鼠脊髓内星型胶质细胞,而PKC $\epsilon$ 抑制剂可降低CCD后脊髓内星型胶质细胞激活程度,证明在CCD病理过程中,PKC $\epsilon$ 调节脊髓星型胶质细胞激活是产生镇痛作用的途径之一。

#### 4 结论

本研究初步观察了CCD后脊髓背角内PKC $\epsilon$ 表达和星型胶质细胞的激活情况,发现CCD后PKC $\epsilon$ 表达增加,星型胶质细胞被激活,而干扰PKC $\epsilon$ 可改变星型胶质细胞的激活程度,缓解大鼠机械痛敏。本研究的结果更加深入探讨了PKC $\epsilon$ 和星型胶质细胞在CCD后中枢敏化产生的作用和相互关系,为治疗CCD后痛敏提供更多靶点,但相关的调节通路仍

待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Berger A, Dukes EM, Oster G. Clinical characteristics and economic costs of patients with painful neuropathic disorders [J]. *J Pain*, 2004, 5(3):143—149.
- [2] Ma C, LaMotte RH. Enhanced excitability of dissociated primary sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion in the rat [J]. *Pain*, 2005, 113(1—2): 106—112.
- [3] Norimoto M, Sakuma Y, Suzuki M, et al. Up-regulation of pain behavior and glial activity in the spinal cord after compression and application of nucleus pulposus onto the sciatic nerve in rats [J]. *Asian Spine J*, 2014, 8: 549—556.
- [4] Schuster DJ, Kitto KF, Overland AC. Protein kinase C $\epsilon$  is required for spinal analgesic synergy between delta opioid and alpha-2A adrenergic receptor agonist pairs [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(33):13538—13546.
- [5] 陈勇,梁应平,郭莲. 白屈菜红碱预先给药对神经病理性疼痛大鼠疼痛行为和脊髓星形胶质细胞活化的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2014, 30(1):77—80.
- [6] Xin W, Chun W, Ling L, et al. Role of melatonin in the prevention of morphine-induced hyperalgesia and spinal glial activation in rats: protein kinase C pathway involved [J]. *Int J Neurosci*, 2012, 122(3):154—163.
- [7] 曲玉娟, 张晓, 魏慧, 等. 大鼠背根神经节持续受压后脊髓背角TRPV4蛋白表达及分布的变化 [J]. *中国康复医学杂志*, 2017, 32 (2):151—155.

- [8] Chen WH, Chang YT, Chen YC, et al. Spinal protein kinase C/extracellular signal-regulated kinase signal pathway mediates hyperalgesia priming[J]. *Pain*, 2018, 159(5):907—918.
- [9] Kim B. Western Blot Techniques[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1606:133—139.
- [10] 陈勇, 杜晓红, 应俊. 鞘内注射 Staurosporine 对骨癌痛大鼠小胶质细胞活化的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2013, 29(12): 1214—1217.
- [11] Hu SJ, Xing JL. An experimental model for chronic compression of dorsal root ganglion produced by intervertebral foramen stenosis in the rat[J]. *Pain*, 1998, 77:15.
- [12] Song Y, Zhang YM, Xu J, et al. Effect of spontaneous firing of injured dorsal root ganglion neuron on excitability of wide dynamic range neuron in rat spinal dorsal horn[J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2013, 65(5):533—539.
- [13] Yu J, Fu P, Zhang Y, et al. Pregabalin alters nociceptive behavior and expression level of P2X3 receptor in the spinal dorsal horn in a rat model induced by chronic compression of the dorsal root ganglion[J]. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013, 296(12):1907—1912.
- [14] Ma C, Greenquist KW, Lamotte RH. Inflammatory mediators enhance the excitability of chronically compressed dorsal root ganglion neurons[J]. *J Neurophysiol*, 2006, 95(4): 2098—3107.
- [15] Yang L, Zhang FX, Huang F, et al. Peripheral nerve injury induces trans-synaptic modification of channels, receptors and signal pathways in rat dorsal spinal cord[J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 19:871—883.
- [16] Hanani M. Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: in search of function[J]. *Brain Res Rev*, 2010, 64: 304—327.
- [17] Zhang HJ, Mei XF, Zhang P. Altered functional properties of satellite glial cells in compressed spinal ganglia[J]. *Glia*, 2009, 57(15): 1588—1599.
- [18] Tanga FY, Raghavendra V, De Lo. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain[J]. *Neurochem Int*, 2004, 45(2—3):397—407.
- [19] Levant A, Levy E, Argaman M, et al. Kinins and neuroinflammation: dual effect on prostaglandin synthesis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 546(1—3):197—200.
- [20] Yang L, Wang SH, Hu Y. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on astrocytes proliferation and nNOS expression in neuropathic pain rats[J]. *Curr Med Sci*, 2018, 8(3):482—490.
- [21] Cho HK, Kang JH, Kim SY, et al. Changes in neuroglial activity in multiple spinal segments after caudal epidural pulsed radiofrequency in a rat model of lumbar disc herniation[J]. *Pain Physician*, 2016, 19:E1197—E1209.
- [22] Coraggio V, Guida F, Boccella S, et al. Neuroimmune-driven neuropathic pain establishment: a focus on gender differences[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1): E281.
- [23] Abbadie C, Bhargoo S, De Koninck Y, et al. Chemokines and pain mechanisms[J]. *Brain Res Rev*, 2009, 60(1): 125—134.
- [24] Sweitzer SM, Wang SM, Peters MC, et al. Protein kinase C epsilon and gamma: involvement in formalin-induced nociception in neonatal rats[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 309(2):616—625.
- [25] Melemedjian OK, Tillu DV, Asiedu MN, et al. BDNF regulates atypical PKC at spinal synapses to initiate and maintain a centralized chronic pain state[J]. *Mol Pain*, 2013, 9:12.
- [26] An K, Rong H, Ni HD, et al. Spinal PKC activation-induced neuronal HMGB1 translocation contributes to hyperalgesia in a bone cancer pain model in rats[J]. *Exp Neurol*, 2018, 303:80—94.
- [27] Zhang Y, Wang YH, Zhang XH, et al. Proteomic analysis of differential proteins related to the neuropathic pain and neuroprotection in the dorsal root ganglion following its chronic compression in rats[J]. *Exp Brain Res*, 2008, 189(2):199—209.
- [28] 杨鹏举, 袁峰, 夏莉. 蛋白激酶C在大鼠慢性炎性痛维持中的作用:与背根神经节 Nav1.8 表达的关系[J]. *中华麻醉学杂志*, 2018, 38(2):209—211.