

抑制外周神经元 PAR2-PKA/PKC ϵ 通路对痛转化模型大鼠痛阈的影响

房军帆¹, 王思思¹, 孙海樾¹, 邵晓梅¹, 梁宜¹, 方剑乔^{2*}, 杜俊英^{1*}

(1. 浙江中医药大学第三临床医学院, 杭州 310005; 2. 浙江中医药大学, 杭州 310053)

【摘要】 目的 探讨外周神经元蛋白酶激活受体 2-蛋白酶 A/蛋白酶 C ϵ (PAR2-PKA/PKC ϵ) 通路在痛转化中的作用, 寻找同时干预急性痛和慢性痛的可能方案。方法 SD 大鼠随机分为空白组、假诱发组、诱发组、抑制剂 1 组和抑制剂 2 组。除空白组和假诱发组, 所有大鼠均通过先后足部注射角叉菜胶和前列腺素 E2 (PGE2) 建立痛觉敏化诱发模型。PGE2 于角叉菜胶注射后 7 d 进行足部注射。抑制剂 1 组和抑制剂 2 组大鼠于 PGE2 注射前/后, 分别给予 PAR2 抑制剂。观察角叉菜胶/生理盐水, 注射前、注射后 5 h、3 d、6 d、7 d 0.5 h、7 d 4 h 和 7 d 24 h 大鼠机械痛阈 (PWTs) 的变化, 检测角叉菜胶注射后 7 d 24 h 造模侧背根神经节 (DRG) 中 PAR2、蛋白酶 A (PKA) 和蛋白酶 C ϵ (PKC ϵ) 表达。结果 痛觉敏化诱发模型建立成功。角叉菜胶注射后 7 d 给予 PGE2, 显著延长了 PGE2 诱发疼痛的存在时间, 角叉菜胶注射后 7 d 24 h 假诱发组大鼠 PWTs 与同期空白组相比差异无显著性 ($P > 0.05$), 而诱发组大鼠 PWTs 明显低于同期空白组和假诱发组大鼠 ($P < 0.01$)。诱发组大鼠造模侧 DRG 中 PAR2 和 PKC ϵ 表达在角叉菜胶注射后 7 d 24 h 明显提升, 高于同期假诱发组和空白组 ($P < 0.05$)。给予 PAR2 抑制, 不论时间均能显著翻转角叉菜胶注射后 7 d 24 h, 诱发组大鼠由 PGE2 诱发的疼痛 ($P < 0.05$), 并抑制 DRG 中 PKC ϵ 表达。但, 给予 PAR2 抑制剂不能影响 PGE2 诱发的急性疼痛和调制 DRG 中 PKA 含量。结论 抑制 PAR2 表达能阻断急性痛向慢性痛转化, 这可能与抑制 DRG 中 PAR2-PKC ϵ 通路激活有关。但抑制 PAR2 并不能干预急性痛, 这可能是因为 DRG 中 PAR2 相关通路未参与急性痛的产生。

【关键词】 痛转化; 慢性痛; 背根神经节; 酶激活受体 2; 蛋白酶 C ϵ ; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 01-0013-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.01.003

Effect of inhibition of PAR2-PKA/PKC ϵ signaling pathway in periphery neurons on the transition from acute to chronic pain

FANG Junfan¹, WANG Sisi¹, SUN Haiyu¹, SHAO Xiaomei¹, LIANG Yi¹

FANG Jianqiao^{2*}, DU Junying^{1*}

(1. The Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China.

2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)

Corresponding author: FANG Jianqiao. E-mail: fangjianqiao7532@163.com. DU Junying. dujunying0706@163.com

【Abstract】 Objective To detect the role of PAR2-PKA/PKC ϵ signaling pathway in periphery neurons in the transition from acute to chronic pain, and investigate the possible approach to prevent both acute and chronic pain simultane-

【基金项目】 浙江省科技厅公益性(实验动物平台)项目(No. 2016C37135); 国家自然科学基金青年项目(No. 81603692); 国家自然科学基金青年项目(No. 81603690); 浙江省医药卫生一般研究计划(No. 2016KYA154)。

Funded by Zhejiang Province Public Welfare (experimental animal platform) Project(No. 2016C37135); Youth Fund of National Natural Science Foundation Projects(No. 81603692); Youth Fund of National Natural Science Foundation Projects(No. 81603690); Zhejiang General Research Program on Medical and Health (No. 2016KYA154).

【作者简介】 房军帆(1985-), 男, 助理研究员, 博士。研究方向: 针灸镇痛与免疫调节相关研究。E-mail: fangjunfan0223@163.com

【通信作者】 方剑乔(1961-), 男, 教授, 研究方向: 针灸镇痛与免疫调节相关研究。E-mail: fangjianqiao7532@163.com; 杜俊英(1984-), 女, 助理研究员, 研究方向: 针灸调节痛感觉与痛情绪。E-mail: dujunying0706@163.com

ously. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, sham model group, model group, iPAR2-1 group and iPAR2-2 group. The hyperalgesia priming model was established by injection of carrageenan and PGE2 into the left hind-paw except control and sham model group. PGE2 was administrated at 7 days after carrageenan injection. The PAR2 inhibitor was administrated before and after PGE2 injection separately in the iPAR2-1 group and iPAR2-2 group. The paw withdrawal thresholds (PWTs) of rats in each group was detected before and at 5 h, 3 d, 6 d, 7 d 0.5 h, 7 d 4 h, 7 d 24 h after carrageenan injection. The expression level of PAR2, PKA and PKC ϵ proteins in the dorsal root ganglion (DRG) were detected at 24 h after carrageenan injection. **Results** The hyperalgesia priming model was successfully generated. When PGE2 was administrated at 7 days after carrageenan injection, the hyperalgesia induced by PGE2 was significantly prolonged. The PWTs of rats in the model group were significantly lower than that of the control and sham model groups ($P < 0.01$), though the PWTs of sham model group had no significant difference with the control on 7 d 24 h after carrageenan injection ($P > 0.05$). The expression level of PAR2 and PKC ϵ in the ipsilateral DRG neurons were significantly increased on 7 d 24 h after carrageenan injection, when compared with the control and sham model groups ($P < 0.05$). PAR2 inhibitor prevented the prolonged hyperalgesia induced by PGE2 ($P < 0.05$) and decreased the PKC ϵ expression in DRG neurons whenever it was given ($P < 0.05$). However, PAR2 inhibitor did not regulate the acute inflammatory pain of PGE2 and the expression of PKA in DRG neurons ($P > 0.05$). **Conclusions** Inhibition of the expression of PAR2 can prevent the transition from acute to chronic pain. This effect may be related with the inhibitory effect on the activation of PAR2-PKC ϵ signaling pathway in DRG neurons. However, inhibition of PAR2 can not regulate the acute pain. These may because of that the PAR2-PKA signaling pathway does not play a role in acute pain.

【Key words】 transition from acute to chronic pain; chronic pain; dorsal root ganglion; PAR2; PKC ϵ ; rats

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

慢性疼痛是长期以来困扰医学界的主要难题之一。导致该问题的主要原因之一,是慢性痛的产生机制至今尚不明确。部分疼痛研究者提出,慢性痛、急性痛和持续性疼痛三者可能具有完全不一样的机制^[1-3]。但是现有的大量疼痛动物模型,或为持续性疼痛动物模型,或急/慢性疼痛同时存在,难以精确确定慢性痛产生或转化的时间点,限制了慢性疼痛产生机制的深入研究^[4-5]。

动物敏化诱发(hyperalgesia priming)模型是一种较为特殊的疼痛动物模型^[6-7]。该模型通过两次药物干预制造慢性疼痛动物模型。该模型的特点在于,慢性疼痛的产生被人为控制,从而使慢性疼痛与急性疼痛分离,为研究急性痛如何向慢性转化(痛转化)和慢性痛的产生机制提供了良好的动物模型。

基于该模型,有部分研究指出,外周神经元中蛋白酶激活受体 2 (proteinase-activated receptors 2, PAR2)通路的活化与痛转化密切相关^[8],其下游物质蛋白激酶 C ϵ (PKC ϵ)和蛋白激酶 A(PKA)均部分参与了痛转化的产生^[9-10]。其中 PKA 可能主要参与急性痛阶段,而 PKC ϵ 可能主要参与慢性痛阶段。本研究拟建立动物敏化诱发模型,探索抑制 PAR2 活化是否能同时抑制痛转化过程中的急性痛和慢性痛,并为疼痛研究介绍新的动物模型和研究思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄、清洁级雄性健康 SD 大鼠 30 只,体重 200 ~ 220 g,购自上海斯莱克实验动物责任有限公司【SCXK(沪)2013 - 0016】,由浙江中医药大学实验动物中心饲养【SYXK(浙)2013 - 184】。饲养期间给予啮齿类动物标准颗粒饲料和饮水,恒温 20 ~ 24℃,恒湿 50% ~ 70%。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 试剂与仪器

PGE2 (Sigma-Aldrich 公司, P5640); FSLRLRY-NH2 (Toeris 公司, 245329 - 02 - 6); 兔抗大鼠 PAR2 一抗 (Proteintech 公司, 12160 - 1-AP); 兔抗大鼠 PKC ϵ 一抗 (Proteintech 公司, 20877 - 1-AP); 兔抗大鼠 PKA 一抗 (Santa Cruz 公司, sc-365615); 兔抗大鼠 GAPDH 一抗 (Cell Signaling Technology 公司, 3683); 生物素标记山羊抗兔二抗 (Abcam 公司, ab6721); PVDF 膜 (Milipore 公司, IPVH00010); 其余试剂均为市售分析纯级。

Von-Fery 丝套装 (美国 Stoelting 公司); 多功能全波长酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); 垂直电泳槽、快速半干转印仪器 (美国 Bio-Red 公司); Image4000 凝胶成像系统 (美国 GE 公司)。

1.3 分组及处理

采用随机数字法将实验大鼠随机分为空白组 (control 组)、假诱发组 (sham model 组)、诱发组 (model 组)、抑制剂 1 组 (iPAR2-1 组) 和抑制剂 2 组 (iPAR2-2 组), 每组 6 只。

诱发组、抑制剂 1 组、抑制剂 2 组大鼠于左侧后足足底皮下注射 1% 角叉菜胶 0.1 mL, 7 d 后于相同足足背注射 100 ng /25 μ L PGE2^[11]。

假诱发组大鼠于左侧后足足底皮下注射生理盐水 0.1 mL, 7 d 后与相同足足背注射 100 ng /25 μ L PGE2。空白组大鼠于左侧后足足底皮下注射生理盐水 0.1 mL, 7 d 后与相同组足足背注射生理盐水 25 μ L。抑制剂 1 组大鼠在 PGE2 注射前 5 min, 于造模足足背注射 PAR2 抑制剂 FSLRY-NH2 10 μ g/25 μ L。抑制剂 2 组大鼠在 PGE2 注射后 5 min, 于造模足足背注射 PAR2 抑制剂 FSLRY-NH2 10 μ g/25 μ L。

1.4 痛阈观察

采用 Von Frey 进行痛阈测量^[12]。选取 0.4、0.6、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、15.0 g 和 26.0 g 总计 9 种强度的 Von Frey 丝。将大鼠置于不锈钢丝网上的有机玻璃罩内。待大鼠安静后, 从 4.0 g 强度 Von Frey 丝开始测量。将 Von Frey 丝对准大鼠左后足足底 (劈开足垫), 缓慢上抬 Von Frey 丝, 至丝弯曲成 S 形, 连续刺激 8 s。如大鼠产生逃避则记录为 X, 并降低 Von Frey 丝强度继续测量。如大鼠未产生逃避则记录为 O, 并提升 Von Frey 丝强度继续测量。连续进行 6 次测量, 每次测量最小间隔 2 min, 获得一组 XO 组合序列。按如下公式进行痛阈计算: $MWT(g) = (10[Xf + \kappa\delta]) / 10000$ 。Xf 代表最后一次测量的 Von Frey 丝强度, κ 值由“X”、“O”组合序列查表后获得, δ 约等于 0.231 (各强度 Von Frey 丝力度取对数后差值的平均值)。如最后计算结果超过 Von Frey 丝所含强度 (>26.0 g 或 <0.4 g), 则取 26.0 g 或 0.4 g 作为最后结果。行为学测量时间固定在 9:00 - 16:00, 环境温度: (23 \pm 2) $^{\circ}$ C。

1.5 免疫印迹检测大鼠 L4-L6 背根神经节 (DRG) PAR2、PKA 和 PKC ϵ 的表达

注射角叉菜胶 (生理盐水) 后 7 d 24 h, 完成痛阈测量后, 腹腔麻醉大鼠。经升主动脉灌注预冷 0.9% NaCl 溶液。快速取出左侧 L4-L6 背根神经节, 置于 -80 $^{\circ}$ C 待用。DRG 放入 RIPA 裂解液中超

声粉碎, 离心取上清液, BCA 蛋白定量。取 20 μ g 蛋白上样, 5% SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜, 10% 脱脂奶粉封闭, 分别用兔抗大鼠的 PAR2、PKA、PKC ϵ 和小鼠抗大鼠 GAPDH 抗体孵育, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗或山羊抗小鼠二抗孵育, ECL 试剂盒显色后拍照, 计算条带的平均光密度值, GAPDH 为内部对照。

1.6 统计学分析

所有数据均以均数 \pm 标准误表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

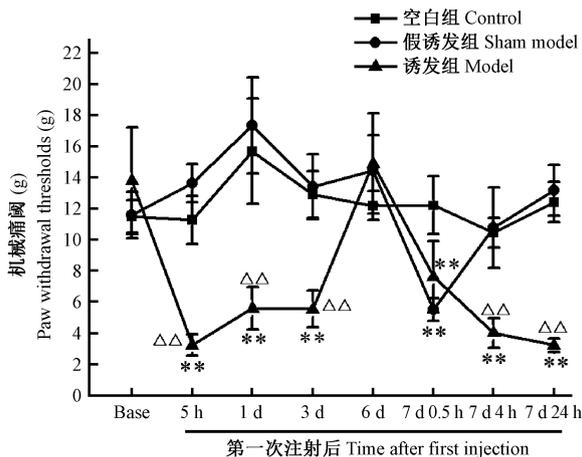
2.1 痛觉敏化诱发大鼠 PWTs 改变

角叉菜胶注射后 5 h, model 组大鼠 PWTs 明显减低, 低于同期 control 组 ($P < 0.01$), 该效应一直持续到角叉菜胶注射后 3 d ($P < 0.01$)。至注射后 6 d, 角叉菜胶的致痛效应彻底消退, 与同期 control 组差异无显著性 ($P > 0.05$)。注射生理盐水无致痛效应, sham model 组在注射后 6 d 内, 大鼠 PWTs 与 control 组比差异无显著性 ($P > 0.05$)。注射后 7 d, 给予 model 组和 sham model 组大鼠 PGE2 足背注射处理。

给予 PGE2 后 0.5 h, model 组和 sham model 组大鼠 PWTs 均快速下降, 明显低于同期 control 组 ($P < 0.01$)。至 PGE2 注射后 24 h, model 组大鼠 PWTs 一直维持在低水平, 显著低于同期 control 组 ($P < 0.01$)。而 sham model 组大鼠 PWTs 快速恢复正常, 在 PGE2 注射后 4 h 即与 control 组大鼠处于同一水平, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。以上结果提示, 先后给予角叉菜胶和 PGE2 能诱导大鼠产生痛觉敏化 (图 1)。

2.2 痛觉敏化诱发大鼠 DRG 中 PAR2、PKA、PKC ϵ 表达改变

PGE2 注射后 24 h, model 大鼠左侧 L4-6DRG 中 PAR2 和 PKC ϵ 表达均显著增高 (图 2 A, C), 明显多于同期 control 组大鼠 ($P < 0.01$)。而 sham model 组大鼠 PAR2 和 PKC ϵ 表达均无明显改变 (图 2 A, C), 与 control 组相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。PGE2 注射后 24 h, 三组大鼠左侧 L4-6DRG 中 PKA 表达处于同一水平 (图 2 B), 三组间比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。以上提示, DRG 中 PAR2 和 PKC ϵ 表达增多可能与大鼠痛觉敏化发生相关。



注:与同期空白组比较:** $P < 0.01$;与同期假诱发组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 1 大鼠机械痛阈改变

Note. ** $P < 0.01$, versus the control group. $\Delta\Delta P < 0.01$, versus the sham model group.

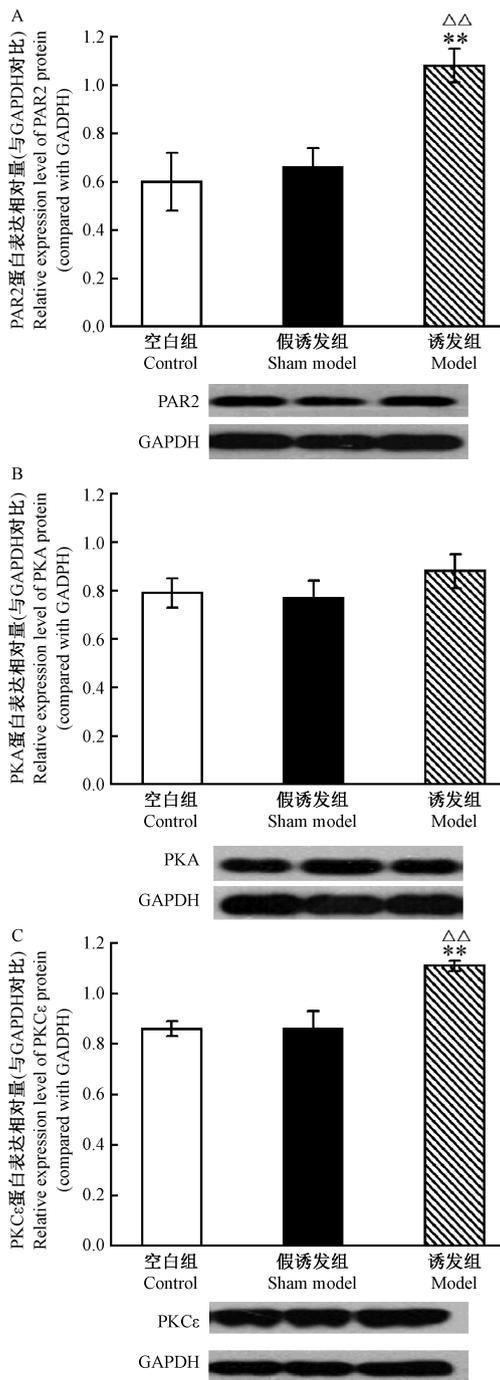
Fig. 1 Changes of paw withdrawal thresholds in the rats

2.3 不同时间点注射 PAR2 抑制剂对大鼠 PWTs 的影响

不论是在 PGE2 注射前给予 PAR2 抑制剂(图 3 A),还是在 PGE2 注射后给予 PAR2 抑制剂(图 3B),均未能干预 PGE2 注射后 4 h 内,大鼠 PWTs 的降低。给予 PGE2 后 4 h,即角叉菜胶/生理盐水注射后 7 d 4 h, iPAR2-1 和 iPAR2-2 组大鼠 PTWs 与 sham model 组相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。但是,在 PGE2 注射后 24 h,给予 PAR2 抑制剂的大鼠,其 PWTs 均出现了明显的回升, iPAR2-1 和 iPAR2-2 组大鼠 PTWs 显著高于同期 sham model 组 ($P < 0.01$)。其中,在 PGE2 注射前给予 PAR2 抑制剂,大鼠 PWTs 能完全恢复至正常水平,与同期 sham model 组相比差异无显著性 ($P > 0.05$) (图 3 A)。而在 PGE2 注射后给予 PAR2 抑制剂,仅能部分恢复 7 d 24 h 大鼠 PWTs,仍低于同期 sham model 组 ($P < 0.01$) (图 3B)。

2.4 不同时间点注射 PAR2 抑制剂对 DRG 中 PKC ϵ 和 PKA 表达的影响

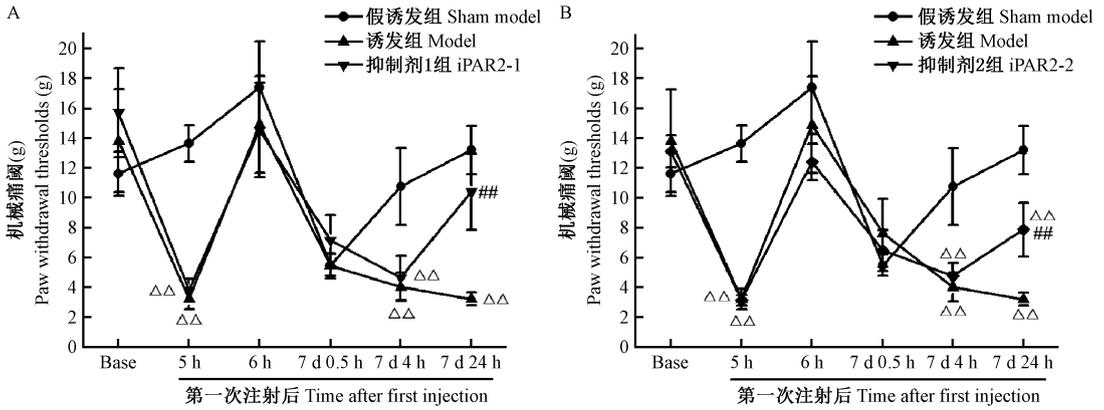
给予 PAR2 抑制剂,无论是在 PGE2 注射前还是 PGE2 注射后,均能明显抑制大鼠 L4-6DRG 中 PKC ϵ 的高表达(图 4C, D), PGE2 注射后 24 h, iPAR2-1 和 iPAR2-2 组大鼠腰段 DRG 中 PKC ϵ 表达显著低于同期 model 组大鼠 ($P < 0.05$),与同期 sham model 组相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。但是,给予 PAR2 并未对 PKA 表达产生任何作用(图 4



注: A. 大鼠腰段 DRG 神经元 PAR2 蛋白表达统计图和 western blot 代表图; B. 大鼠腰段 DRG 神经元 PKA 蛋白表达统计和 western blot 代表图; C. 大鼠腰段 DRG 神经元 PKC ϵ 蛋白表达统计和 western blot 代表图;空白组比较:** $P < 0.01$;与假模型组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 2 大鼠腰段 DRG 神经元 PAR2、PKA 和 PKC ϵ 蛋白表达。A. The expression levels of PAR2 in the rat lumbar DRG neurons and a representative image of western blot. B. The expression levels of PKA in the rat lumbar DRG neurons and a representative image of western blot. C. The expression levels of PKC ϵ in the rat lumbar DRG neurons and the representative image of western blot. ** $P < 0.01$, versus the control group; $\Delta\Delta P < 0.01$, versus the sham model group.

Fig. 2 Expression levels of PAR2, PKA and PKC ϵ in the rat lumbar DRG neurons



注: A. PGE2 注射前给予 PAR2 抑制剂对大鼠机械痛阈的影响; B. PGE2 注射后给予 PAR2 抑制剂对大鼠机械痛阈的影响 PGE2 注射前给予 PAR2 抑制剂对大鼠机械痛阈的影响; 与同期假诱发组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与同期诱发组相比: $## P < 0.01$ 。

图 3 PAR2 抑制剂对大鼠机械痛阈改变的影响

Note. A. Effect of PAR2 inhibitor on the paw withdrawal thresholds in the rats when it was administered before PGE2 injection. B. Effect of PAR2 inhibitor on the paw withdrawal thresholds in the rats when it was administered after PGE2 injection. $\Delta\Delta P < 0.01$, versus the sham model group; $## P < 0.01$, versus the model group.

Fig. 3 Effect of PAR2 inhibitor on the changes of paw withdrawal thresholds in the rats

A, B), iPAR2-1 组和 iPAR2-2 组大鼠腰段 PKA 表达与 model 组相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

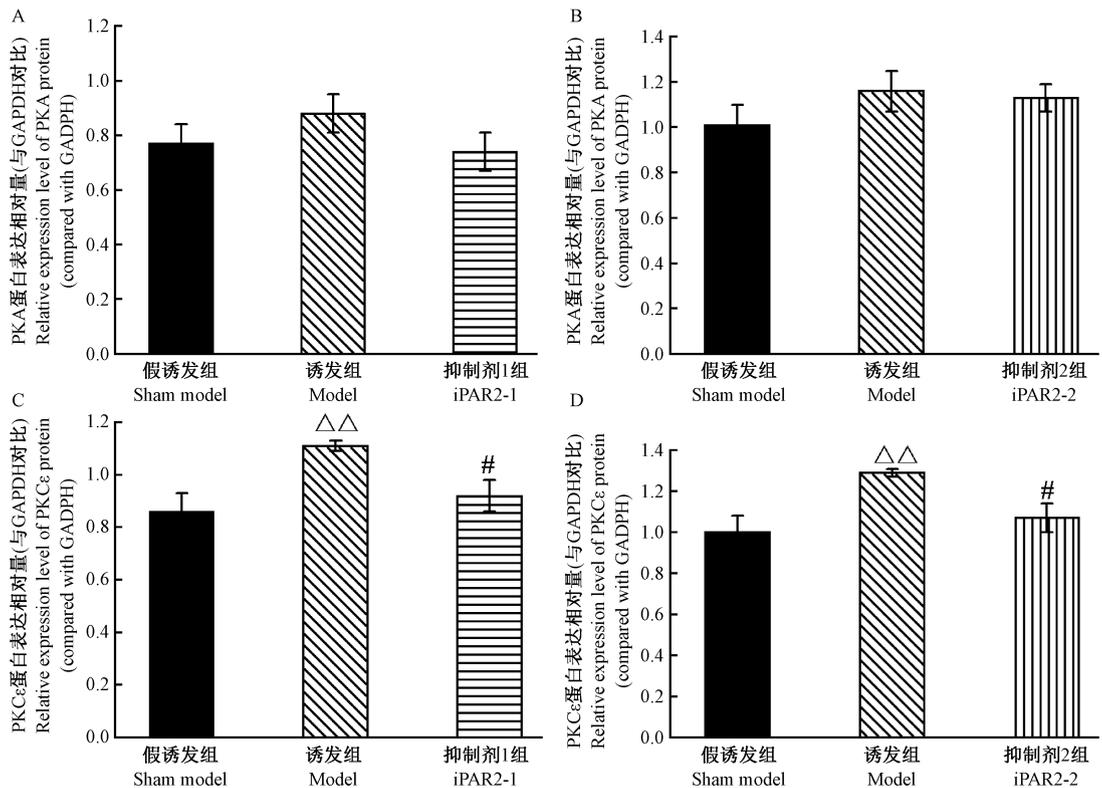
慢性疼痛的治疗一直是医学界的难题。受限于动物模型,疼痛研究者一直难以将慢性疼痛与持续性疼痛进行分离。比如,经典的慢性炎性痛动物模型,弗氏完全佐剂诱导大鼠足趾局部炎性疼痛。在该模型中,大鼠足趾局部炎症能持续存在 14 d 以上,导致急性痛(炎症自身诱导)和慢性痛(炎症导致神经可塑性改变产生)相互混杂。又比如传统的神经病理性痛动物模型,人为造成的神经损伤会持续存在,导致神经损伤疼痛(急性痛)和神经可塑性改变疼痛(慢性痛)混杂。这些急/慢性疼痛的混杂,必然导致机制的混杂。如不论在神经病理性疼痛还是炎性疼痛中,外周神经元 PKA 和 PKC ϵ 的高表达,均被认为是维持慢性疼痛存在的重要机制^[13-14]。但基于痛觉敏化诱发模型的研究发现,慢性疼痛的机制并不一定如此。

痛觉敏化诱发模型的引入,为研究者分别研究急性痛、慢性痛和痛转化提供了可能。该模型的最大特点在于通过 2 次注射,精确的控制慢性疼痛的产生。炎症刺激后,足底注射前列腺素 2 (PGE2) 诱发的疼痛时间被显著延长,被认为是痛觉过敏的产生。如文中图 1 所示,正常情况下,PGE2 仅能诱导不足 4 h 的急性疼痛。但当大鼠的神经元发生可塑性改变后,PGE2 能诱导出超过 24 h 的疼痛。这种

疼痛没有明确的诱因(如炎症或神经损伤),能持续存在超过 14 d,被认为是相对纯净的慢性疼痛^[11]。该模型的另一特点为,在诱发慢性痛前,大鼠的痛阈处于正常状态。即大鼠处于一种外在无明显疼痛表现,而神经元可能已存有某些改变的状态下^[15]。为研究者进一步探索慢性痛发病的病理基础提供了可能。

目前,通过对该模型的研究已有部分不同于过往认识的结果。研究者发现,PKA 和 PKC ϵ 在疼痛中扮演的角色并不一样^[16]。在疼痛由急性痛向慢性痛转化的过程中,外周神经元中 PKA 的高表达参与了急性期疼痛,即 PGE2 刺激导致的疼痛。而 PKC ϵ 则参与了慢性痛的产生,即痛觉敏化。进一步使用两者的特异性证明,抑制外周 PKA 表达能有效防止 PGE2 诱导的急性疼痛($< 4 h$),但不能缓解慢性疼痛。抑制外周 PKC ϵ 表达能有效缓解慢性疼痛的产生($> 24 h$),但对于急性疼痛无效。与前人研究一致,本研究中我们观察到造模后 24 h,敏化外周神经元中 PKC ϵ 的高表达,但 PKA 的表达没有明确改变。以上结果提示,敏化诱发模型复制成功。

PAR2 是 PKA 和 PKC ϵ 共同的上游物质之一,抑制 PAR2 能抑制 PKA 和 PKC ϵ 的活化^[17]。过往的研究表明,PAR2-PKA 和 PAR2-PKC ϵ 通路均参与了疼痛的产生和维持^[18-19]。因此,注射 PAR2 可能同时改善 PGE2 诱发的急性痛和慢性痛。本研究中,我们在 PGE2 注射前后分别进行注射 PAR2 的特异性抑制剂 FSLRY-NH2,并观察其对敏化诱发



注: A. PGE2 注射前给予 iPAR2 对大鼠腰段 DRG 神经元 PKA 蛋白表达的影响; B. PGE2 注射后给予 iPAR2 对大鼠腰段 DRG 神经元 PKA 蛋白表达的影响; C. PGE2 注射前给予 iPAR2 对大鼠腰段 DRG 神经元 PKCε 蛋白表达的影响; D. PGE2 注射后给予 iPAR2 对大鼠腰段 DRG 神经元 PKCε 蛋白表达的影响; 与同期假模型组相比: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与同期模型组相比: $\# P < 0.05$ 。

图 4 大鼠腰段 DRG 神经元 PKA 和 PKCε 蛋白表达

Note. A. The effect of iPAR2 on the expression levels of PKA in lumbar DRG neurons of the rats when it was given before PGE2 injection. B. The effect of iPAR2 on the expression levels of PKA in lumbar DRG neurons of the rats when it was given after PGE2 injection. C. The effect of iPAR2 on the expression levels of PKCε in lumbar DRG neurons of the rats when it was given before PGE2 injection. D. The effect of iPAR2 on the expression levels of PKCε in lumbar DRG neurons of the rats when it was given after PGE2 injection. $\Delta\Delta P < 0.01$, versus the sham model group; $\# P < 0.05$, versus the model group.

Fig. 4 Expression levels of PKA and PKCε in lumbar DRG neurons of the rats

大鼠痛阈的影响。PGE2 注射前给予 FSLRY-NH2 其目的在于同时抑制 PKA 和 PKCε 的高表达, 而 PGE2 注射后给予 FSLRY-NH2 其目的在于抑制 PKCε 的高表达, 而不影响 PKA。结果证明, 不论在 PGE2 注射前还是注射后给予 PAR2 抑制剂, 均能显著改善由 PGE2 诱发的慢性疼痛, 并明显抑制 PKCε 在外周神经元中的表达。但两种注射方案, 均未能改善 PGE2 诱导的急性疼痛, 也未能改变造模后 24 h 敏化大鼠外周神经元 PKA 的表达。

综上所述, 痛觉敏化诱发模型是一种适用于研究慢性痛产生的疼痛动物模型。外周神经元 PAR2-PKCε 通路活化介导了急性痛向慢性痛的转化。但是, 介导急性期疼痛的 PKA 可能并非通过 PAR2 活化。

参考文献 (References)

- [1] Aley KO, Messing RO, Mochly-Rosen D, et al. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C [J]. J Neurosci, 2000, 20(12): 4680-4685.
- [2] Taylor PC. The importance of the patients' experience of RA compared with clinical measures of disease activity [J]. Clin Exp Rheumatol, 2010, 28(3 Suppl 59): S28-31.
- [3] McGreevy K, Bottros MM, Raja SN. Preventing chronic pain following acute pain: risk factors, preventive strategies, and their efficacy [J]. Eur J Pain Suppl, 2011, 5(2): 365-372.
- [4] Reichling DB, Levine JD. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain [J]. Trends Neurosci, 2009, 32(12): 611-618.
- [5] Su C, D'Amour J, Lee M, et al. Persistent pain alters AMPA receptor subunit levels in the nucleus accumbens [J]. Mol Brain, 2015, 8: 46.
- [6] Kandasamy R, Price TJ. The pharmacology of nociceptor priming

- [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 227: 15–37.
- [7] Ferrari LF, Bogen O, Reichling DB, et al. Accounting for the delay in the transition from acute to chronic pain; axonal and nuclear mechanisms [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(2): 495–507.
- [8] Tillu DV, Hassler SN, Burgos-Vega CC, et al. Protease-activated receptor 2 activation is sufficient to induce the transition to a chronic pain state [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(5): 859–867.
- [9] Parada CA, Yeh JJ, Reichling DB, et al. Transient attenuation of protein kinase Cepsilon can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat [J]. *Neuroscience*, 2003, 120(1): 219–226.
- [10] Araldi D, Ferrari LF, and Levine JD. Repeated Mu-opioid exposure induces a novel form of the hyperalgesic priming model for transition to chronic pain [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(36): 12502–12517.
- [11] Joseph EK, Bogen O, Alessandri-Haber N, et al. PLC-beta 3 signals upstream of PKC epsilon in acute and chronic inflammatory hyperalgesia [J]. *Pain*, 2007, 132(1–2): 67–73.
- [12] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55–63.
- [13] Tumati S, Roeske WR, Vanderah TW, et al. Sustained morphine treatment augments prostaglandin E2-evoked calcitonin gene-related peptide release from primary sensory neurons in a PKA-dependent manner [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 648(1–3): 95–101.
- [14] Li L, Zhao L, Wang Y, et al. PKCε mediates substance P inhibition of GABA_A receptors-mediated current in rat dorsal root ganglion [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci (English and Germany Version)*, 2015, 35(1): 1–9.
- [15] Kim JY, Megat S, Moy JK, et al. Neurologin 2 regulates spinal GABAergic plasticity in hyperalgesic priming, a model of the transition from acute to chronic pain [J]. *Pain*, 2016, 157(6): 1314–1324.
- [16] Huang WY, Dai SP, Chang YC, et al. Acidosis mediates the switching of Gs-PKA and Gi-PKCε dependence in prolonged hyperalgesia induced by inflammation [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125022.
- [17] Chen Y, Yang C, and Wang ZJ. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain [J]. *Neuroscience*, 2011, 193: 440–451.
- [18] Amadesi S, Cottrell GS, Divino L, et al. Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase Cepsilon- and A-dependent mechanisms in rats and mice [J]. *J Physiol*, 2006, 575(Pt 2): 555–571.
- [19] Huang ZJ, Li HC, Cowan AA, et al. Chronic compression or acute dissociation of dorsal root ganglion induces cAMP-dependent neuronal hyperexcitability through activation of PAR2 [J]. *Pain*, 2012, 153(7): 1426–1437.

[收稿日期] 2017–07–04