

PKC-ERK1/2 通路在臭氧预处理减轻大鼠肝缺血再灌注损伤的作用

陶振云¹, 江祖泰², 李丽珍³, 王兰兰⁴, 钟炜昕⁵, 李粮辉⁶, 刘俊乐⁷, 陈文华^{7*}(1.义乌市中心医院, 浙江 义乌 322000; 2.福州市第二医院, 福州 350007; 3.福建省人民医院, 福州 350001; 4.福建省肿瘤医院, 福州 350001; 5.福建医科大学附属孟超医院, 福州 350025; 6.福建省立医院南院, 福州 350028; 7.福建医科大学附属协和医院, 福州 350001)

摘要: 目的 探讨 PKC 介导的 ERK1/2 信号通路在臭氧(ozone, O₃)预处理大鼠肝缺血再灌注中的作用。方法 60 只大鼠随机分成 6 组: 对照组、缺血再灌注组、O₃ 预处理组、O₃ 预处理+ERK 抑制剂组(O₃+PD98059 组)、O₃ 预处理+PKC 抑制剂组(O₃+CHE 组)、缺血再灌注+PKC 激活剂组(IR+PMA 组)。除对照组外, 其余各组均进行肝缺血再灌注手术。O₃ 相关组予 O₃ 预处理, 调节剂组予相应的调节剂。分别检测各组的血清中丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶水平, 进行病理学观察, Western blotting 检测肝组织中的热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)、蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)和细胞外调节蛋白激酶 1/2(extracellular regulated protein kinases, ERK1/2)的表达水平。结果 与对照组相比, 缺血再灌注组肝组织细胞损伤明显加重($P<0.05$), 肝组织中 PKC、ERK1/2 的磷酸化和 HSP70 的表达水平明显升高($P<0.05$)。与缺血再灌注组相比, O₃ 相关组肝组织细胞损伤明显减轻($P<0.05$), 肝组织中 PKC、ERK1/2 的磷酸化和 HSP70 的表达水平明显升高($P<0.05$)。与 O₃ 预处理组相比, 当使用 PKC 和 ERK1/2 抑制剂后, 肝组织细胞损伤明显加重($P<0.05$), 肝组织中 PKC、ERK1/2 的磷酸化和 HSP70 的表达水平明显降低($P<0.05$)。结论 O₃ 氧化预处理可通过激活 PKC 介导的 ERK1/2 信号通路, 使 HSP70 的表达水平明显增加, 使大鼠肝脏缺血再灌注损伤明显减轻。

关键词: 细胞外调节蛋白激酶 1/2; 热休克蛋白 70; 蛋白激酶 C; 臭氧; 缺血再灌注

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2021)12-1436-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.12.005

引用本文: 陶振云, 江祖泰, 李丽珍, 等. PKC-ERK1/2 通路在臭氧预处理减轻大鼠肝缺血再灌注损伤的作用[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(12): 1436-1440.

Effects of PKC-ERK1/2 Pathway on O₃ Oxidative Pretreatment to Reduce Hepatic Ischemia Reperfusion Injury in Rats

TAO Zhenyun¹, JIANG Zutai², LI Lizhen³, WANG Lanlan⁴, ZHONG Weixin⁵, LI Lianghui⁶, LIU Junle⁷, CHEN Wenhua^{7*}(1.Yiwu Central Hospital, Yiwu 322000, China; 2.Fuzhou Second Hospital, Fuzhou 350007, China; 3.Fujian Provincial People's Hospital, Fuzhou 350001, China; 4.Fujian Cancer Hospital, Fuzhou 350001, China; 5.Fujian Medical University Mengchao Hospital, Fuzhou 350025, China; 6.South Hospital of Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350028, China; 7.Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the role of PKC-mediated ERK1/2 signaling pathway in ozone(O₃)preconditioning rat liver ischemia-reperfusion. **METHODS** Sixty rats were randomly divided into 6 groups: control group, ischemia reperfusion group, O₃ pretreatment group, O₃ pretreatment+ERK inhibitor group(O₃+PD98059 group), O₃ pretreatment+PKC inhibitor group(O₃+CHE group), ischemia reperfusion+PKC activator group(IR+PMA group). Except for control group, all other groups underwent liver ischemia reperfusion surgery. The O₃-related group was pretreated with O₃, and the regulator group was given the corresponding regulator. The levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in serum of each group were detected respectively, and pathological observation was performed. Western blotting was used to detect heat shock protein 70(HSP70), protein kinase C(PKC) and extracellular regulated protein kinase 1/2(ERK1/2) expression levels in liver tissue. **RESULTS** Compared with the control group, ischemia reperfusion group had significantly increased liver tissue cell damage($P<0.05$), and the PKC and ERK1/2 phosphorylation and HSP70 expression levels in the liver tissue were significantly increased($P<0.05$). Compared with the ischemia reperfusion group, the liver tissue cells of the O₃-related group were significantly reduced($P<0.05$), the phosphorylation of PKC and ERK1/2 and the expression level of HSP70 in the liver tissue were significantly increased($P<0.05$). Compared with the O₃ pretreatment group, when PKC and ERK1/2 inhibitors were used, liver tissue cell damage was significantly increased($P<0.05$), PKC and ERK1/2 phosphorylation and HSP70 expression levels in liver tissue were significantly reduced($P<0.05$). **CONCLUSION** O₃ oxidative pretreatment can significantly increase the

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2016J01543)

作者简介: 陶振云, 女, 硕士, 医师 Tel: 18314966595 E-mail: 466324674@qq.com *通信作者: 陈文华, 男, 硕士, 主任医师, 教授 Tel: 13365910975 E-mail: whc6202@163.com

expression level of HSP70 by activating the PKC-mediated ERK1/2 signaling pathway, and significantly reduce the liver ischemia-reperfusion injury in rats.

KEYWORDS: extracellular regulated protein kinases(ERK1/2); heat shock protein 70(HSP70); protein kinase C(PKC); ozone(O₃); ischemia-reperfusion

肝缺血再灌注损伤(hepatic ischemia-reperfusion injury, HIRI)指的是缺血的肝组织细胞在再一次获得血供和氧供后,原来已经破坏的组织结构及细胞功能不能及时有效地修复,反而较缺血时明显加重,进而引起相应组织、器官功能逐步受损的综合征^[1]。到目前为止,其保护措施仍非常有限。因此,如何避免和减轻肝缺血再灌注损伤是外科亟待解决的问题。

高毅等^[2]发现缺血预处理可激活 PKC 介导的 P44/42 MAPKs 信号通路,引起热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)的高表达。本课题组前期实验表明臭氧(ozone, O₃)预处理可通过 HSP70 高表达明显减轻肝脏缺血再灌注损伤^[3]。但 O₃ 氧化预处理能否激活蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)介导的细胞外调节蛋白激酶 1/2(extracellular regulated protein kinases, ERK1/2)(即 P44/42 MAPKs)信号通路国内外尚未报道。本研究通过建立肝脏缺血再灌注损伤模型,探讨 O₃ 预处理对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂和仪器

60 只健康清洁级 SD 大鼠,♂,8 周龄,体重 250~300 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005。大鼠饲养在安静、清洁、温度 22~26 °C、湿度(60±10)% 的动物房内,动物使用许可证号:SYXK(闽)016-006。

PD98059(货号:P215)、丙二醇甲醚醋酸酯(phorbol12-myristate13-acetate, PMA, 货号:P1583)均购自 Sigma 公司;胆碱酯酶(chelerythrine chloride, CHE, MERCK 公司,货号:220285);磷酸化 ERK1/ERK2MAPK 兔单克隆抗体(CST 公司,批号:15);抗 Hsp70 抗体(批号:GR177617)、抗 PKCβ1 抗体(批号:GR235758-11)均购自 Abcam 公司;β-actin 一抗(美国 Santa Cruz 公司,批号:b14100101);HRP 标注的山羊抗小鼠 IgG 二抗(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号:b03p00106)。

DW-3000A/B 小动物人工呼吸机(福建领江生物科技有限公司);Ozomed Basic 型臭氧治疗仪(德国 Kastner-Praxisbedarf 公司)。

1.2 分组与给药

60 只大鼠按随机数字表法分成 6 组($n=10$),对照组:大鼠麻醉、气管插管后,经阴茎背静脉泵注 20%DMSO 生理盐水溶液,速度为 30 mL·h⁻¹,持续泵注 10 min 后,开腹、分离左中叶的肝蒂,但不夹闭,45 min 后关闭腹腔,再过 3 h 后采集标本检测。缺血再灌注组:夹闭左中叶的肝蒂,缺血 45 min 后松开动脉夹,然后关闭腹腔,再灌注 3 h,其余同对照组。O₃ 预处理组:术前连续 5 d 同一时间给大鼠腹腔内注射 O₃ 与氧气混合气体,其余同缺血再灌注组。O₃ 预处理+ERK 抑制剂组(O₃+PD98059 组):缺血再灌注前静脉泵注 PD98059 5 mg·kg⁻¹,其余同 O₃ 预处理组;O₃ 预处理+PKC 抑制剂组(O₃+CHE 组):缺血再灌注前静脉泵注 CHE 5 mg·kg⁻¹,其余同 O₃ 预处理组;缺血再灌注+PKC 激活剂组(IR+PMA 组):肝缺血再灌注前静脉泵注 PMA 4 μg·kg⁻¹,其余同缺血再灌注组。

1.3 O₃ 预处理模型的制备

连续 5 d 同一时间采用臭氧治疗仪腹腔注射 O₃ 与氧气混合气体(O₃ 浓度为 50 μg·mL⁻¹,剂量为 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。对照组、缺血再灌注组和 IR+PMA 组则连续 5 d 注射相同容积的氧气处理。

1.4 肝缺血再灌注模型的制备

大鼠术前禁食 12 h,自由饮水。大鼠采用 3% 戊巴比妥钠(35 mg·kg⁻¹)腹腔内注射麻醉,气管插管后开腹,钝性分离腹膜和肝脏周围韧带,充分暴露肝左中叶的肝动脉、门静脉及胆管分支,而后使用无创血管夹夹闭,左中叶的肝叶瞬间由鲜红色变为暗红色则建模成功。缺血过程中关腹,用纱布覆盖腹部,持续加温,维持大鼠体温在 37 °C 左右。45 min 后松开血管夹,原来缺血的肝叶瞬间由暗红色变为鲜红色则建模成功。再灌注 3 h 期间仍要维持大鼠体温 37 °C 左右,并适时地追加麻醉以维持适当的麻醉深度。

1.5 相关指标检测和观察

1.5.1 检测血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)水平 从腹主动脉采取 2~3 mL 血液, 然后立即将血液标本装入促凝管中。在室温中静置 30 min 后, 离心 15 min 后取上清液分装于 0.5 mL 的离心管中, 密封, 标记, 全自动生化仪检测血清中 ALT 和 AST 水平。

1.5.2 肝组织病理学观察 新鲜肝组织放入 4% 甲醛溶液固定液中固定 24 h, 脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色, 显微镜下观察肝小叶结果及肝索排列、肝细胞结构等。

1.5.3 Western blotting 检测新鲜肝脏组织中 PKC、ERK1/2 MAPKs 活性变化和 HSP70 表达水平 采血后, 立即用线将腹主动脉结扎; 然后用剪刀剪取大鼠肝脏中叶的肝组织, 放入提前标记好的冻存管中, 密封后迅速将标本放入液氮中, 最后移出转存入-80℃冰箱中备用。取肝组织标本裂解提取蛋白, SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 加入 5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 1 h。将膜随机分成 4 组, 每组分别予相应的 HSP70 的鼠单克隆抗体(稀释度 1:500)、磷酸化的 ERK1/ERK2 MAPK 兔单克隆抗体(稀释度 1:500)、PKC 的抗体(稀释度 1:500)、 β -actin 一抗(稀释度 1:5000), 室温下摇床孵育 2 h, TBST 洗膜, 加入 HRP 标注的山羊抗小鼠 IgG 二抗(稀释度 1:5000), 室温下摇床孵育 2 h。用 TBST 洗膜, ECL 显色成像。Image J 图像分析软件分析目的条带的灰度值, 以目的蛋白条带灰度值与 β -actin 灰度值的比值反映目的蛋白的表达水平。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计分析软件进行分析, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较用 SNK-q 法检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中 ALT、AST 水平

与对照组比较, 缺血再灌注组血清中 ALT 和 AST 水平明显升高($P < 0.05$)。与缺血再灌注组比较, 各 O_3 相关组和 IR+PMA 组血清中 ALT 和 AST 水平明显降低($P < 0.001$)。与 O_3 预处理组比较, O_3 +PD98059 组、 O_3 +CHE 组和 IR+PMA 组血清中 ALT 和 AST 水平明显升高($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组血清中 ALT、AST 水平($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 1 Serum ALT and AST levels in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
对照组	60.67±6.50	313.50±36.07
缺血再灌注组	1 445.68±154.41 ¹⁾	2 523.02±204.24 ¹⁾
O_3 预处理组	251.33±36.87 ¹⁾²⁾	646.50±95.92 ¹⁾²⁾
O_3 +PD98059 组	481.00±147.12 ¹⁾²⁾³⁾	965.00±116.29 ¹⁾²⁾³⁾
O_3 +CHE 组	770.00±50.17 ¹⁾²⁾³⁾	2 118.99±122.86 ¹⁾²⁾³⁾
IR+PMA 组	897.17±83.47 ¹⁾²⁾³⁾	1 442.83±105.90 ¹⁾²⁾³⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与缺血再灌注组相比, ²⁾ $P < 0.001$; 与 O_3 预处理组相比, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with ischemia reperfusion group, ²⁾ $P < 0.001$; compared with O_3 pretreatment group, ³⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 HE 染色结果

对照组可见完整的肝小叶, 整齐排列的肝索; O_3 预处理组、 O_3 +PD98059 组和 O_3 +CHE 组可见结构尚完整的肝小叶和排列尚整齐的肝索, 以及轻度充血的肝组织。缺血再灌注组、IR+PMA 组的肝小叶结构不完整, 肝索排列紊乱, 肝细胞明显肿胀。结果见图 1。

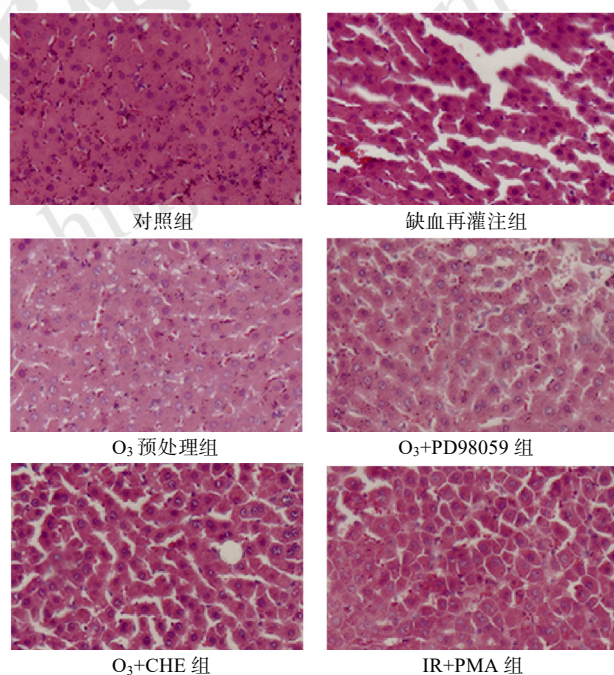


图 1 大鼠肝脏组织病理形态学的变化(HE, 400×)

Fig. 1 Histopathological changes of rat liver(HE, 400×)

2.3 HSP70 蛋白表达水平

与对照组比较, HSP70 的表达水平在缺血再灌注组明显升高($P < 0.05$)。与缺血再灌注组比较, HSP70 的表达水平在 O_3 +PD98059 组、 O_3 +CHE 组、 O_3 预处理组和 IR+PMA 组明显升高($P < 0.05$)。与

O₃ 预处理组比较, HSP70 的表达水平在 O₃+PD98059 组($P<0.05$)和 O₃+CHE 组($P<0.05$)明显升高。与 O₃+PD98059 组相比, HSP70 在 O₃+CHE 组的表达水平降低更显著($P<0.05$)。结果见图 2。

2.4 PKC 蛋白表达水平

与对照组比较, 缺血再灌注组 PKC 的磷酸化水平明显升高($P<0.05$); 与缺血再灌注组比较, O₃ 预处理组、O₃+PD98059 组、O₃+CHE 组和 IR+PMA 组 PKC 磷酸化水平明显升高($P<0.05$); 与 O₃ 预处理组相比较, O₃+PD98059 组和 O₃+CHE 组 PKC 磷酸化水平明显降低($P<0.05$); 与 O₃+PD98059 组相比, O₃+CHE 组的 PKC 磷酸化水平更低($P<0.05$)。结果见图 2。

2.5 ERK1/2 蛋白表达水平

与对照组相比, 缺血再灌注组的 P44/42 MAPKs 活性显著增加($P<0.05$)。与缺血再灌注组比较, O₃ 预处理组、O₃+PD98059 组、O₃+CHE 组、IR+PMA 组 ERK1/2 活性显著升高($P<0.05$)。与 O₃

预处理组相比, O₃+PD98059 组和 O₃+CHE 组 ERK1/2 活性显著降低($P<0.05$)。与 O₃+PD98059 组相比, O₃+CHE 组 ERK1/2 活性显著降低($P<0.05$)。结果见图 2。

3 讨论

参考文献[4]建立肝脏缺血模型。肝缺血再灌注分为缺血期和再灌注期, 根据再灌注时间的长短, 再灌注期又分为再灌注早期和再灌注晚期(再灌注时间分别在 2~4 h 和再灌注时间 ≥ 6 h)。研究表明肝缺血再灌注 2 h 血清中 ALT、AST 就开始升高, 4 h 升到最高值^[5]。因此, 选择缺血 45 min, 再灌注 3 h 作为研究 O₃ 预处理对肝脏缺血再灌注早期肝损伤的观察时间点。从实验结果可以看出缺血再灌注组的 ALT 和 AST 水平明显高于对照组和 O₃ 预处理组, 表明缺血再灌注可以引起大鼠早期急性肝损伤, 而 O₃ 预处理可明显减轻。与之前的研究 O₃ 预处理可限制或下调肝脏缺血再灌注损伤相吻合^[3]。

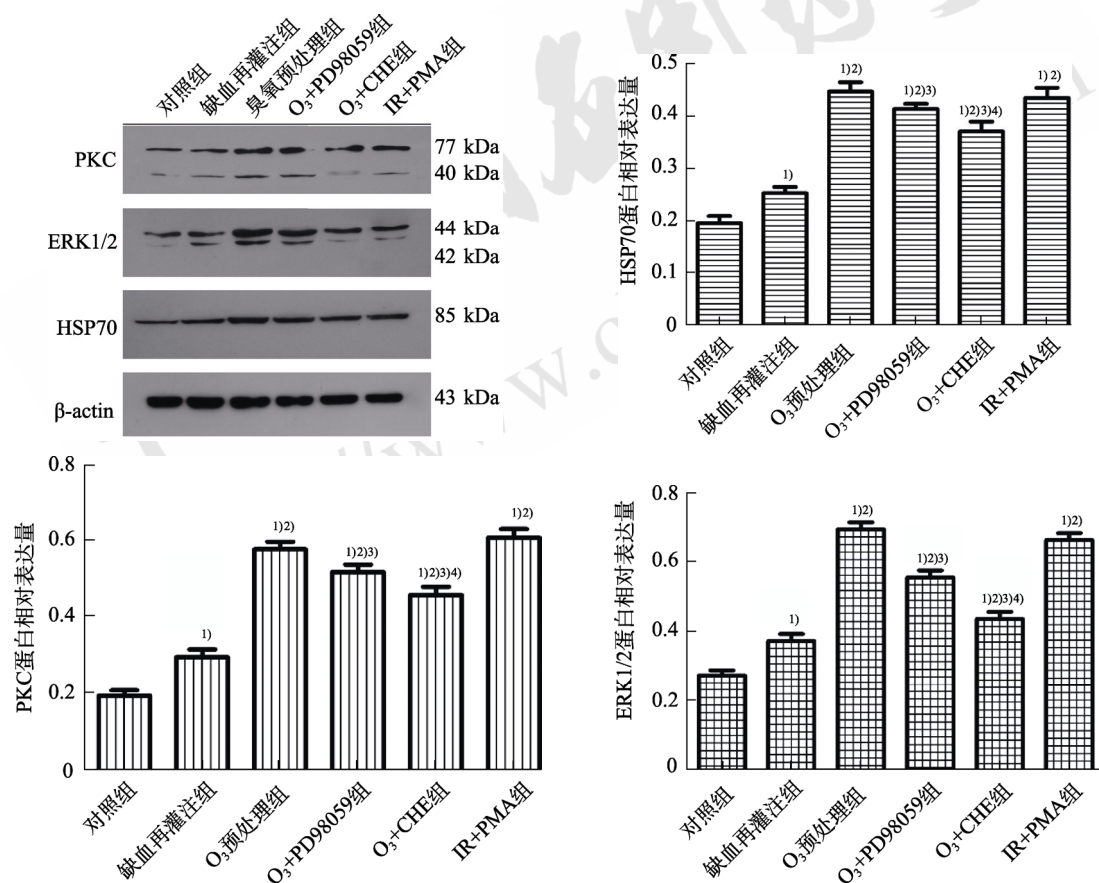


图 2 HSP70、ERK1/2、PKC 蛋白表达水平

与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与缺血再灌注组相比, ²⁾ $P<0.05$; 与 O₃ 预处理组相比, ³⁾ $P<0.05$; 与 O₃+PD98059 组相比, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 Protein expression level of HSP70, ERK1/2, PKC

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with ischemia reperfusion group, ²⁾ $P<0.05$; compared with O₃ pretreatment group, ³⁾ $P<0.05$; compared with O₃+PD98059 group, ⁴⁾ $P<0.05$.

HSP70 在正常细胞中水平较低,在应激状态下可明显升高。在应激的不利条件下,提高细胞的抵抗力,起到应激保护作用。研究表明 HSP70 可通过抑制细胞凋亡、氧化应激和促炎信号通路来减轻七氟醚的神经毒性^[6]。为更好地观察分析 HSP70 的表达以及 PKC、ERK1/2 信号通路与大鼠 O₃ 预处理肝缺血再灌注损伤的关系,选择用 Western blotting 定量检测各组中相关蛋白的表达水平。通过实验,可以看出:①缺血再灌注的应激刺激不仅可以激活 PKC 和 ERK1/2 信号通路,还可以提高 HSP70 的表达水平,与之前高毅等^[2]的研究结果相吻合。②O₃ 预处理后 PKC、ERK1/2 磷酸化水平和 HSP70 的表达水平比单纯的缺血再灌注应激刺激增加更加明显。③PKC 和 ERK1/2 的磷酸化水平与 HSP70 的表达水平呈正相关,说明 PKC 或者 ERK1/2 信号通路参与正向调控效应蛋白 HSP70 的表达。

PMA 广泛用于信号通路研究,因为它可以模拟甘油二酯激活常规的和新型的 PKC^[7]。PKC 抑制剂 CHE 可通过减少细胞增殖和上调细胞凋亡来行使其生物学效应^[8]。在转基因小鼠中可观察到,低水平 PKC β 过表达可改善缺血再灌注的恢复;有条件地过表达 PKC β 表现为心脏收缩性增加^[9]。本实验中,大鼠 O₃ 预处理后的肝组织中的 PKC、ERK1/2 活性、HSP70 表达水平明显增加,血清学及病理学提示肝缺血再灌注损伤明显减轻。相反,当静脉使用抑制剂 CHE 或 PD98059 时,O₃ 预处理所诱导的保护作用被显著削弱,具有保护作用的 HSP70 的表达水平也明显降低,反证了 PKC 和 ERK1/2 在 O₃ 预处理过程中的细胞内信号通路中关键的保护作用。同时,还发现 CHE 不仅降低 PKC 的磷酸化水平,而且还降低 ERK1/2 磷酸化水平,提示 PKC 和 ERK1/2 参与相同的信号转导途径^[10]。最后,在单纯缺血再灌注的基础上使用 PKC 激动剂 PMA 后,PKC 信号通路激活后,则出现明显的保护作用,肝组织细胞中不仅 PKC 活性明显增加,而且 ERK1/2 活性、HSP70 表达水平明显增加,说明 PKC 在 ERK1/2 的上游,调控着 ERK1/2 的活性和 HSP70 的表达。因此,结果表明 O₃ 氧化预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护机制是通过 PKC 介导的 ERK1/2 信号通路来实现的,这个信

号通路可能成为未来肝脏缺血再灌注损伤的预防 and 治疗的靶点。

O₃ 预处理可明显减轻大鼠肝缺血再灌注损伤,其机制可能与激活 PKC 介导的 ERK1/2 信号通路诱导 HSP70 过表达有关。

REFERENCES

- [1] OLTHOF P B, VAN GOLEN R F, MEIJER B, et al. Warm ischemia time-dependent variation in liver damage, inflammation, and function in hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. *Biochim et Biophys Acta BBA-Mol Basis Dis*, 2017, 1863(2): 375-385.
- [2] GAO Y, SHAN Y Q, PAN M X, et al. Protein kinase C-dependent activation of P44/42 mitogen-activated protein kinase and heat shock protein 70 in signal transduction during hepatocyte ischemic preconditioning[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(7): 1019-1027.
- [3] ZHONG W X, LI L H, WANG L L, et al. Role of HSP70 in ozone preconditioning-induced reduction of hepatic ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Chin J Anesthesiol(中华麻醉学杂志)*, 2018, 38(4): 493-496.
- [4] ASAKAWA H, JEPSSON B, MACK P, et al. Acute ischemic liver failure in the rat: A reproducible model not requiring portal decompression[J]. *Eur Surg Res Eur Chir Forschung Recherches Chir Eur*, 1989, 21(1): 42-48.
- [5] SUN P P, CHEN J, YUAN F, et al. Rat model of hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *J Trop Med(热带医学杂志)*, 2013, 13(4): 390-392, 525.
- [6] LIU M, LI M Y, ZHOU Y, et al. HSP90 inhibitor 17AAG attenuates sevoflurane-induced neurotoxicity in rats and human neuroglioma cells via induction of HSP70[J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 166. Doi: 10.1186/s12967-020-02332-w.
- [7] SANTO-DOMINGO J, CHAREYRON I, DAYON L, et al. Coordinated activation of mitochondrial respiration and exocytosis mediated by PKC signaling in pancreatic β cells[J]. *FASEB J*, 2017, 31(3): 1028-1045.
- [8] LIU L, HUANG Y X, ZHANG K L, et al. Hepatitis B core antigen regulates dendritic cell proliferation and apoptosis through regulation of PKC/NF- κ B signaling pathway[J]. *Mol Med Report*, 2018. Doi: 10.3892/mmr.2018.9604.
- [9] BOWMAN J C, STEINBERG S F, JIANG T, et al. Expression of protein kinase C β in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates[J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(9): 2189-2195.
- [10] ZHANG Y B, GUO Z D, LI M Y, et al. Gabapentin effects on PKC-ERK1/2 signaling in the spinal cord of rats with formalin-induced visceral inflammatory pain[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0141142. Doi: 10.1371/journal.pone.0141142.

收稿日期: 2020-04-20

(本文责编: 沈倩)