

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00813

· 论 著 ·

## 蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 对大鼠背根神经节神经元 P2X<sub>3</sub> 受体介导的内向电流的调节作用

李娜<sup>1,2△</sup>, 陆一<sup>1△</sup>, 樊娟<sup>1△</sup>, 邓小明<sup>2\*</sup>, 马蓓<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学基础部生理学教研室, 上海 200433
2. 第二军医大学长海医院麻醉科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 探讨蛋白激酶 A(PKA)和蛋白激酶 C(PKC)对分离培养的背根神经节(DRG)神经元 ATP 受体 P2X<sub>3</sub> 功能的调节作用。**方法** 分离培养大鼠 DRG 神经元, 给予外源性 ATP 诱导出瞬时型内向电流, 通过全细胞膜片钳记录的方法观察 P2X<sub>3</sub> 和 P2X<sub>2/3</sub> 受体特异性阻断剂 TNP-ATP 对这一电流的影响, 在此基础上观察 PKA 和 PKC 激动剂对 ATP 诱导的瞬时型内向电流的调节作用。**结果** 在分离培养的 DRG 神经元上, ATP 诱导的瞬时型电流可以被 TNP-ATP 抑制, 其抑制效应呈剂量依赖性, 半数有效剂量(IC<sub>50</sub>)为(21.7±7.6) nmol/L。PKA 激动剂 forskolin(1 μmol/L)和 PKC 激动剂 PMA(1 μmol/L)均可以快速、可逆地抑制 ATP 诱导的瞬时型电流。**结论** 在大鼠分离培养的 DRG 神经元, PKA 和 PKC 可能通过磷酸化调节抑制 P2X<sub>3</sub> 受体的功能, 从而抑制 ATP 诱导的瞬时型内向电流, 提示蛋白激酶对 P2X<sub>3</sub> 受体的调节作用可能参与痛觉的形成。

**[关键词]** 背根神经节; P2X<sub>3</sub> 受体; 蛋白激酶 A; 蛋白激酶 C; 腺苷三磷酸

**[中图分类号]** R 338.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)08-0813-05

### Regulatory effect of protein kinase A and protein kinase C on P2X<sub>3</sub>-mediated inward current in rat dorsal root ganglion neurons

LI Na<sup>1,2△</sup>, LU Yi<sup>1△</sup>, FAN Juan<sup>1△</sup>, DENG Xiao-ming<sup>2\*</sup>, MA Bei<sup>1\*</sup>

1. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Anesthesiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the regulatory effect of protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) on the function of ATP receptor P2X<sub>3</sub> in cultured dorsal root ganglion (DRG) neurons. **Methods** Rat DRG neurons were collected, cultured and subjected to exogenous ATP treatment to induce transient inward current. Whole-cell patch clamp recording was employed to observe the effect of TNP-ATP (P2X<sub>3</sub> and P2X<sub>2/3</sub> receptor antagonist) on the induced current. Meanwhile, the regulatory effects of PKA and PKC agonist on ATP-induced transient inward current were also observed. **Results** TNP-ATP inhibited ATP-induced transient current in cultured DRG neurons in a dose-dependent manner, with the IC<sub>50</sub> value being (21.7±7.6) nmol/L. PKA agonist forskolin (1 μmol/L) and PKC agonist PMA (1 μmol/L) inhibited ATP-induced transient current rapidly and reversibly. **Conclusion** PKA and PKC can inhibit ATP-induced transient inward current in cultured DRG neurons, probably through inhibiting the function of P2X<sub>3</sub> receptors. It indicates that P2X<sub>3</sub> receptor regulation by protein kinases may participate in the development of pain.

**[Key words]** dorsal root ganglion; P2X<sub>3</sub> receptor; protein kinase A; protein kinase C; adenosine triphosphate

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(8): 813-817]

痛觉的产生牵涉到刺激信号在感觉神经末梢部位的换能(信号转导)、在初级传入神经元纤维上的传导、向脊髓背角神经元的传递, 以及感觉信号在中枢神经系统内的上行传递与大脑皮质对感觉信号的

处理等过程。在外周组织, 伤害性刺激可直接激活感觉神经末梢上的离子通道, 从而诱发感受器电位; 也可以通过引起上皮及免疫内分泌细胞释放介质而间接地激活传入神经末梢。三磷酸腺苷(ATP)即是

**[收稿日期]** 2012-04-28 **[接受日期]** 2012-06-11

**[基金项目]** 上海市科委基础重点项目(08JC1405400). Supported by the Key Program of Shanghai Science and Technology Committee (08JC1405400).

**[作者简介]** 李娜, 博士生. E-mail: lina8346@gmail.com; 陆一, 硕士生. E-mail: lluyi@126.com; 樊娟, 硕士生. E-mail: fanjuan@126.com

△共同第一作者(Co-first authors).

\* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81873484, E-mail: xmdeng@anesthesia.org.cn; Tel: 021-81870979, E-mail: mabei08@yahoo.com.cn

这类细胞释放的炎性介质之一,通过激活 P2X(配基门控性非选择性阳离子通道)受体而引起痛觉<sup>[1-4]</sup>。ATP 受体家族包括配基门控的 P2X 受体和 G 蛋白偶联的 P2Y 受体两大类<sup>[5-6]</sup>,特别是 P2X<sub>3</sub> 受体特异性高表达于与伤害性感受相关的小直径背根神经节(DRG)神经元上<sup>[7]</sup>。在急性分离和培养的 DRG 细胞上,ATP 可诱发出 3 种电流(I<sub>ATP</sub>):瞬时型、缓慢型以及双相型(包含快速和缓慢两种成分)<sup>[8]</sup>。有研究者采用 P2X<sub>2</sub> 和 P2X<sub>3</sub> 基因敲除小鼠及药理学方法,证明 P2X<sub>2</sub> 或 P2X<sub>2/3</sub> 受体介导缓慢型 I<sub>ATP</sub>,P2X<sub>3</sub> 受体介导瞬时型 I<sub>ATP</sub>,双相型 I<sub>ATP</sub> 与 P2X<sub>3</sub> 和 P2X<sub>2/3</sub> 受体同时存在有关<sup>[9]</sup>。其中,瞬时型 I<sub>ATP</sub> 主要存在于 DRG 的中小细胞中,免疫组化研究也显示 P2X<sub>3</sub> 亚型选择性地表达于辣椒素敏感的 DRG 中小细胞中<sup>[7]</sup>,这些都表明 P2X<sub>3</sub> 受体特异性地参与痛觉的信号转导,在机体的痛觉形成和调节中起到重要作用。

已有研究证实 P2X 受体上有蛋白激酶 A(protein kinase A,PKA)和蛋白激酶 C(protein kinase C,PKC)结合位点<sup>[10-14]</sup>,并有实验表明离子通道型 ATP 受体的功能可以被细胞内磷酸化调节<sup>[14]</sup>,但是 PKA 和 PKC 是否可以调节分离培养的 DRG 神经元 P2X<sub>3</sub> 受体的功能尚不清楚。本研究拟通过全细胞膜片钳方法记录电流,在大鼠分离培养的 DRG 神经元上,观察外源性 ATP 诱导出的瞬时型内向电流,并确认这一电流为 P2X<sub>3</sub> 受体介导,在此基础上观察 PKA 和 PKC 对 P2X<sub>3</sub> 受体介导的内向电流的调节作用,从而为痛觉调节的外周机制研究提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 DRG 神经元分离和培养

SD 大鼠(8 周,购自中国科学院上海实验动物中心),体质量 200 g 左右,快速断头处死,取出 L<sub>4-5</sub> DRG,置于 L-15 培养液中(Life Technologies, Paisley, UK),将神经节置于 4 ml 含有 1.5 mg/ml 胶原酶(class II, Sigma)和 6 mg/ml 牛血清白蛋白(BSA; Sigma, Poole, UK)的无钙无镁 Hank 平衡盐溶液(Life Technologies)中。在 37℃ 的恒温下孵育 45 min,然后将神经节置于 4 ml 含 1 mg/ml 的胰酶(Sigma)中,在 37℃ 下孵育 15 min。用 1 ml 培养液[由含有 10% 胎牛血清(Gibco)、50 ng/ml 神经生长因子(Sigma)、2 mg/ml NaHCO<sub>3</sub>、5.5 mg/ml 葡萄糖、200 μg/ml penicillin 和 200 μg/ml streptomycin 的 L-15 培养液组成]轻轻吹打直至将神经节分离成单个细胞。将这些细胞铺在用 10 μg/ml 层黏蛋白(laminin; Sigma)预先涂过的 35 mm 的平皿上。在含有 5% CO<sub>2</sub>(体积分数) 37℃ 恒温箱中孵育,6~30 h 内选择直径在 25 μm 以

下的细胞用于实验。

### 1.2 全细胞膜片钳记录

采用常规高阻抗封接的全细胞记录方式。在电极进入液面前,通过 1 ml 注射器向记录电极施加一轻的正压(约 10 cmH<sub>2</sub>O, 1 cmH<sub>2</sub>O=0.098 kPa),防止气液界面上积聚的灰尘或溶液中的粒子附着在电极尖端而妨碍紧密封接的形成。当记录电极接触细胞表面时,迅速通过记录电极内部用注射器施加一负压(约 20~30 cmH<sub>2</sub>O),使电极和细胞膜表面形成紧密封接,封接阻抗于几秒内升至 GΩ 级。此时向电极施加较大负压(约 100 cmH<sub>2</sub>O)则可吸破电极腔正下方的膜片,形成全细胞记录模式,即可观察全细胞电流。全细胞电流记录通常可维持约 40 min,实验温度为 22~24℃。所记录的信号输入 Axopatch 200B 膜片钳放大器(Axon Instruments, Foster City, CA, USA),放大器所采集的信号以并联方式同时输向和模数转换器相连的计算机,记录信号的监测、存储与分析处理以及通过记录电极给予细胞的指令电压由 Axon 公司 pClamp 9.2 软件完成。

### 1.3 给药方法及途径

P2X<sub>1</sub>、P2X<sub>3</sub> 和 P2X<sub>2/3</sub> 受体特异性阻断剂 TNP-ATP<sup>[7]</sup>、PKA 激动剂 forskolin 和 PKC 激动剂佛波酯(PMA)均购自 Sigma Aldrich 公司。实验中采用细胞外给药,通过记录程序控制八道灌流系统(DAD-12 Superfusion System)的不同通道,从而选择所给的药物,给药系统出口的尖端为石英毛细微孔,内径为 100 μm,距离细胞 250 μm。其中有一管中充入细胞外液(Kreb 液)用于药物终止和冲洗。使用恒流泵(HL-2 型)进行细胞外灌流,换药时间<4 s,给药时间为 4 s,给药间隔至少 4 min,使细胞对药物的反应恢复。本实验室以 N<sub>2</sub> 提供正压,压力选择为 200 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),开启电磁阀的电压选择 5 mV。

### 1.4 统计学处理

本实验所有数据均以  $\bar{x} \pm s_x$  表示。由 pClamp 9.2 软件采样系统获得的图形,直接进入 Clamfit 9.2 软件数据处理系统进行测量、分析、作图。剂量-效应曲线按照下列公式由 Origin 41 软件非线性回归拟合绘制: $Y=A/[1+(K/X)^{nH}]$ ,式中 A 为标准活化后的激活电流最大值,K 为产生最大效应的半效浓度,nH 为 Hill 系数(由 Hill 图求出)。全细胞膜片钳实验采用配对 t 检验,检验水平(α)为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 ATP 诱发的瞬时型电流主要由 P2X<sub>3</sub> 受体介导

DRG 神经元分离培养后 6~30 h 内用于实验,当给予 ATP (10~100 μmol/L, 4 s)时,46.4% (65/140)的 DRG 细胞出现一个快速激活和失活的

瞬时型内向电流(transient inward current),幅值为(0.48±0.21) nA;8.6% (12/140)的 DRG 细胞出现一个快速激活和缓慢失活的缓慢型内向电流(sustained inward current),幅值为(0.37±0.13) nA;34.3% (48/140)的 DRG 细胞出现一个双相的内向电流(biphasic inward current),即分别有一部分缓慢成分和一部分快速成分,幅值为(0.53±0.18) nA。另外在 15 个(10.7%) DRG 神经元上,ATP 不能引起明显的反应。上述结果提示 ATP 诱发的瞬时型电流主要由 P2X<sub>3</sub> 受体介导。

为了进一步证实 ATP 诱发的瞬时型电流是由 P2X<sub>3</sub> 受体介导的,本研究用 TNP-ATP 来阻断这一效应。由图 1 可见,当细胞外分别给予不同浓度的 TNP-ATP (1~100 nmol/L) 4 min, TNP-ATP 对 ATP (100 μmol/L) 诱发的瞬时型电流均具有抑制作用。当细胞外持续给予 TNP-ATP (10 nmol/L) 4 min, ATP (100 μmol/L) 诱发的瞬时型电流降低至对照的(66.5±9.7)%,洗去 TNP-ATP 后,ATP 诱发的瞬时型电流可恢复;当细胞外持续给予 TNP-ATP (100 nmol/L) 4 min, ATP (100 μmol/L) 诱发的瞬时型电流可降低至对照的(22.7±4.2)%。TNP-ATP 的作用呈剂量依赖性, IC<sub>50</sub> 为(21.7±7.6) nmol/L。

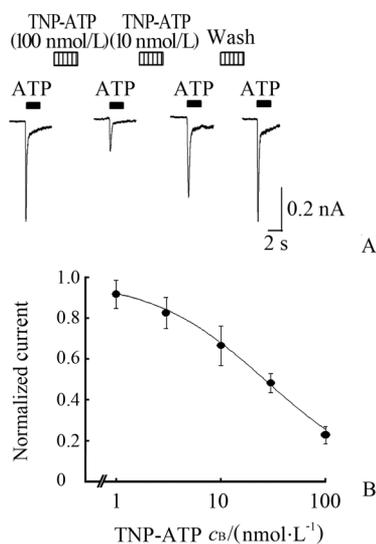


图 1 不同浓度 TNP-ATP 对 ATP (100 μmol/L) 诱发的瞬时型电流的抑制作用

Fig 1 Inhibitory effect of different concentrations of TNP-ATP on ATP (100 μmol/L)-induced transient current

A: The inhibitory effect of different concentrations of TNP-ATP on ATP-induced transient current in one DRG (dorsal root ganglion) neuron; B: The concentration-response curve for the inhibitory effect of different concentrations of TNP-ATP on ATP-induced transient current. Normalized by the amplitude of 100 μmol/L ATP-induced current, each point represents the mean and standard error of 5-7 cells, and the IC<sub>50</sub> is (21.7±7.6) nmol/L

2.2 激动 PKA 和 PKC 可抑制 ATP 诱导的瞬时型电流 为研究 PKC 对瞬时型电流的调节作用,本研究观察了 PKC 激动剂 PMA 的作用。在钳制电压为-60 mV 时,细胞外预给 PMA (1 μmol/L, 4 min),在结束前 5 s 给予 ATP (100 μmol/L),其诱导的瞬时型电流被 PMA 明显抑制,为对照的(71.2%±10.4)%(P<0.01);洗去 PMA 后,ATP (100 μmol/L) 诱发的瞬时型电流可恢复(图 2)。

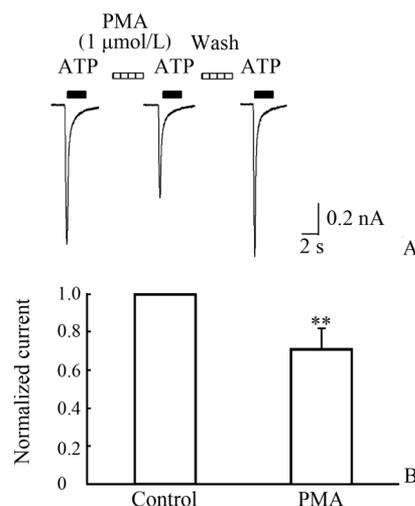


图 2 PKC 激动剂 PMA 对 ATP (100 μmol/L) 诱导的瞬时型电流的快速抑制作用

Fig 2 Rapid inhibition of the PKC agonist

#### PMA against ATP (100 μmol/L)-induced transient current

A: In a DRG (dorsal root ganglion) neuron, the PKC agonist PMA (1 μmol/L) exert rapid inhibition against P2X<sub>3</sub> receptor-induced transient current; B: Diagram showing the rapid inhibition of PKC agonist PMA (1 μmol/L) on P2X<sub>3</sub> receptor-induced transient current. \*\* P<0.01 vs control; n=6,  $\bar{x} \pm s_x$

由于 forskolin 是 AC 酶的激动剂,其通过激动 AC 酶使 ATP 生成 cAMP,继而激活 PKA,所以,为了研究 PKA 对瞬时型电流的调节作用,本研究观察了 forskolin 的作用。在钳制电压为-60 mV 时,细胞外预给 forskolin (1 μmol/L, 4 min),在结束前 5 s 给予 ATP (100 μmol/L),其诱导的瞬时型电流被 forskolin 明显抑制,为对照的(63±19)%(P<0.01),洗去 forskolin 后,ATP (100 μmol/L) 诱发的瞬时型电流可恢复(图 3)。

### 3 讨论

本实验表明,在分离培养的 DRG 神经元上,ATP 诱导的瞬时型电流主要为 P2X<sub>3</sub> 受体介导,PKC 激动剂 PMA 和 forskolin 均可逆地抑制 ATP 诱导的瞬时型电流,说明在分离培养的 DRG 神经元,PKA 和 PKC 均可以快速抑制 P2X<sub>3</sub> 受体的功

能,提示蛋白激酶对 P2X<sub>3</sub> 受体的调节作用可能参与了痛觉的形成。

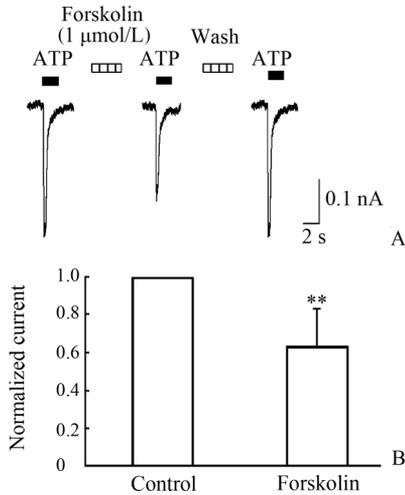


图3 Forskolin对ATP(100 μmol/L)诱导的瞬时型电流的快速抑制作用

Fig 3 Rapid inhibition of forskolin on ATP (100 μmol/L)-induced transient current

A: In a DRG (dorsal root ganglion) neuron, forskolin (1 μmol/L) exert rapid inhibition on P2X<sub>3</sub> receptor-induced transient current; B: Diagram showing the rapid inhibition of forskolin (1 μmol/L) on the transient current induced by ATP (100 μmol/L). \*\* P < 0.01 vs control; n = 5, x̄ ± s<sub>x</sub>

ATP 可以存在于各种细胞,由细胞外吐或细胞溶解后释放<sup>[3,15]</sup>。伤害性刺激可以使组织细胞释放 ATP,通过激活 ATP 受体而引起痛觉,因此,ATP 在外周伤害性感受的转导中起重要作用<sup>[16]</sup>。TNP-ATP 是 P2X<sub>1</sub>、P2X<sub>3</sub> 和 P2X<sub>2/3</sub> 受体特异性的阻断剂<sup>[7]</sup>,其中对 P2X<sub>3</sub> 和 P2X<sub>1</sub> 受体最为敏感。本研究发现,在 DRG 神经元上,ATP 诱导的瞬时型电流可以被 TNP-ATP 所拮抗,半数有效剂量为 (21.7 ± 7.6) nmol/L。已有文献报道,TNP-ATP 对重组 P2X<sub>3</sub> 受体的拮抗的半数有效剂量为 1~10 nmol/L<sup>[7]</sup>,与本实验结果接近。此外,由于 DRG 神经元中 P2X<sub>1</sub> 受体的表达量非常少<sup>[7]</sup>,可以认为分离培养的 DRG 神经元上 ATP 介导的瞬时型电流主要由 P2X<sub>3</sub> 受体介导。

有实验表明 PKA 可以调节 P2X 受体的功能。在转染 P2X<sub>2</sub> 受体的 HEK 293 细胞上,磷酸化 P2X<sub>2</sub> 受体 C 端的 Ser431 可以抑制 P2X<sub>2</sub> 诱导的电流<sup>[13]</sup>。在转染 P2X<sub>4</sub> 受体的 HEK 293 细胞上,腺苷酸环化酶和 forskolin 可以增大 ATP 电流<sup>[17]</sup>。此外,有报道认为 DRG 神经元上 cAMP/PKA 通路激活可以显著增强 P2X<sub>3</sub> 介导的 ATP 反应<sup>[18]</sup>。这些实验提示 P2X 受体上可能存在 PKA 结合位点,一旦被

PKA 结合后通过某些途径可以抑制 P2X 受体的功能。我们前期的研究发现,孕酮可以通过激活 PKA 从而对 P2X<sub>3</sub> 受体的功能起到抑制作用<sup>[19]</sup>。本实验中还发现, forskolin 可以显著抑制 P2X<sub>3</sub> 受体介导的瞬时型电流,这一作用可逆,提示 PKA 对 P2X<sub>3</sub> 受体也存在着抑制作用。PKA 对 P2X 受体的调节主要通过磷酸化来实现,但具体机制不清楚,有研究表明,PKA 对 P2X<sub>4</sub> 受体的调节可能通过某种辅助蛋白对其 C 端磷酸化来实现<sup>[20]</sup>。

关于 PKC 与 P2X<sub>3</sub> 受体之间的关系已有不少报道,但结果并不一致。P2X 受体(P2X<sub>1-7</sub>)为二次跨膜结构,包括胞内的 N 端、C 端和胞外环<sup>[21]</sup>,胞内 N 端通过改变膜内孔隙直接参与调节 P2X 受体离子转导,所有 P2X 受体亚型 N 端都有 PKC 磷酸化位点<sup>[17]</sup>,但有研究发现胞内 C 端也有 PKC 磷酸化位点<sup>[14]</sup>,同时,P2X<sub>3</sub> 受体胞外环结构也存在 PKC 磷酸化位点<sup>[21]</sup>,从而提示,P2X 受体胞内外结构域都参与受体磷酸化。此外,有研究发现 PMA 处理后基因重组的 P2X<sub>3</sub> 受体功能明显增强,从而提示 PKC 诱导的磷酸化增强了 P2X<sub>3</sub> 受体的活性<sup>[22]</sup>。并且在炎症形成时,cAMP 还可通过激活 Epac(鸟嘌呤核苷酸交换因子)继而激活 PKC,从而增强 PGE2 对 P2X<sub>3</sub> 受体的促进作用<sup>[23]</sup>。然而,也有研究显示,PKC 的激活可以抑制大鼠 DRG 神经元中 P2X 受体介导的电流<sup>[24]</sup>。本实验也发现,PKC 激动剂 PMA 可以对 P2X<sub>3</sub> 受体介导的瞬时型电流起抑制作用,提示 PKC 激活也可以抑制 P2X<sub>3</sub> 受体的功能,从而参与痛觉调节。由于 PMA 可激活 PKC 所有亚型<sup>[23,25-26]</sup>,因此我们尚不知 PKC 的哪一种亚型参与了对 P2X<sub>3</sub> 受体的调节作用,需要进一步的研究。对于以上不一致的情况,我们认为,可能与不同的细胞、细胞的不同状态以及胞内可能存在多种 PKC 亚型影响 P2X<sub>3</sub> 受体功能的机制有关。以上证据表明,PKC 的激活对 P2X<sub>3</sub> 受体的功能有重要的调节作用,但具体的分子机制还不是很清楚。有研究发现,P2X 受体的胞内 N 端 PKC 磷酸化位点 TXR/K 在 P2X 受体功能中发挥重要作用,且 PKC 激动剂 PMA 能调节一些 P2X 受体的亚型,但其中的机制可能不是直接磷酸化 P2X 受体,而是通过某种辅助蛋白对其磷酸化,从而影响其功能<sup>[27]</sup>。也有研究发现,PKC 激活能显著增强不同细胞系中 Ca<sup>2+</sup> 信号以及通过 P2X<sub>3</sub> 受体的阳离子电流,且这种作用不是通过直接磷酸化 P2X<sub>3</sub> 受体来实现的<sup>[14]</sup>。

本实验结果说明,在分离培养的 DRG 神经元,PKA 和 PKC 均可以快速抑制 P2X<sub>3</sub> 受体的功能,提

示蛋白激酶对 P2X<sub>3</sub> 受体的调节作用可能参与了痛觉的形成。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Moore F L, Evans S J. Steroid hormones use non-genomic mechanisms to control brain functions and behaviors: a review of evidence[J]. *Brain Behav Evol*, 1999, 54:41-50.
- [2] Chaban V V, McRoberts J A, Ennes H S, Mayer E A. Nitric oxide synthase inhibitors enhance mechanosensitive Ca<sup>2+</sup> influx in cultured dorsal root ganglion neurons[J]. *Brain Res*, 2001, 903: 74-85.
- [3] Burnstock G. A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain[J]. *Lancet*, 1996, 347:1604-1605.
- [4] Hamilton S G, McMahon S B. ATP as a peripheral mediator of pain[J]. *Auton Nerv Syst*, 2000, 81:187-194.
- [5] Collo G, North R A, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, et al. Cloning of P2X<sub>5</sub> and P2X<sub>6</sub> receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels[J]. *J Neurosci*, 1996, 16:2495-2507.
- [6] Ruan H Z, Burnstock G. Localisation of P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>4</sub> receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat [J]. *Histochem Cell Biol*, 2003, 120:415-426.
- [7] Dunn P N, Zhong Y, Burnstock G. P2X receptors in peripheral neurons[J]. *Prog Neurobiol*, 2001, 65:107-134.
- [8] Burnstock G. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2001, 22:182-188.
- [9] Ma B, Ruan H Z, Cockayne D A, Ford A P, Burnstock G, Dunn P M. Identification of P2X receptors in cultured mouse and rat parasympathetic otic ganglion neurones including P2X knockout studies[J]. *Neuropharmacology*, 2004, 46:1039-1048.
- [10] Paukert M, Osteroth R, Geisler H S, Brandle U, Glowatzki E, Ruppersberg J P, et al. Inflammatory mediators potentiate ATP-gated channels through the P2X<sub>3</sub> subunit [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:21077-21082.
- [11] Ennion S J, Evans R J. P2X<sub>1</sub> receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291:611-616.
- [12] Boué-Grabot E, Archambault V, Séguéla P. A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X<sub>2</sub> ATP-gated channels [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275:10190-10195.
- [13] Chow Y W, Wang H L. Functional modulation of P2X<sub>2</sub> receptors by cyclic AMP-dependent protein kinase [J]. *J Neurochem*, 1998, 70:2606-2612.
- [14] Brown D A, Yule D I. Protein kinase C regulation of P2X<sub>3</sub> receptors is unlikely to involve direct receptor phosphorylation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773:166-175.
- [15] Hamilton S G, McMahon S B. ATP as a peripheral mediator of pain[J]. *J Auton Nerv Syst*, 2000, 81:187-194.
- [16] Cook S P, McCleskey E W. Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP[J]. *Pain*, 2002, 95:41-47.
- [17] Brown D A, Bruce J I, Straub S V, Yule D I. cAMP potentiates ATP-evoked calcium signaling in human parotid acinar cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:39485-39494.
- [18] Wang C, Li G W, Huang L Y. Prostaglandin E<sub>2</sub> potentiation of P2X<sub>3</sub> receptor mediated currents in dorsal root ganglion neurons[J]. *Mol Pain*, 2007, 3:22.
- [19] Fan J, Lu Y, Yu L H, Zhang Y, Ni X, Burnstock G, et al. Progesterone rapidly attenuates ATP-evoked transient currents in cultured rat dorsal root ganglion neurons [J]. *Pharmacology*, 2011, 87:36-44.
- [20] Brown D A, Yule D I. Protein kinase A regulation of P2X<sub>4</sub> receptors: requirement for a specific motif in the C-terminus[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803:275-287.
- [21] Wirkner K, Stanchev D, Köles L, Klebingat M, Dihazi H, Flehmig G, et al. Regulation of human recombinant P2X<sub>3</sub> receptors by ecto-protein kinase C[J]. *J Neurosci*, 2005, 25:7734-7742.
- [22] Paukert M, Osteroth R, Geisler H S, Brandle U, Glowatzki E, Ruppersberg J P, et al. Inflammatory mediators potentiate ATP-gated channels through the P2X<sub>3</sub> subunit [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:21077-21082.
- [23] Wang C, Gu Y, Li G W, Huang L Y. A critical role of the cAMP sensor Epac in switching protein kinase signalling in prostaglandin E<sub>2</sub>-induced potentiation of P2X<sub>3</sub> receptor currents in inflamed rats[J]. *J Physiol*, 2007, 584:191-203.
- [24] Bie B H, Zhang Y H, Zhao Z Q. Inhibition of P2X receptor-mediated inward current by protein kinase C in small-diameter dorsal root ganglion neurons of adult rats[J]. *Neurosci Bull*, 2009, 25:179-186.
- [25] Orimo A, Inoue S, Ikegami A, Hosoi T, Akishita M, Ouchi Y, et al. Vascular smooth muscle cells as target for estrogen [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 195:730-736.
- [26] Snetkov V A, Thomas G D, Teague B, Leach R M, Shaifita Y, Knock G A, et al. Low concentrations of sphingosylphosphorylcholine enhance pulmonary artery vasoreactivity: the role of protein kinase C delta and Ca<sup>2+</sup> entry[J]. *Hypertension*, 2008, 51:239-245.
- [27] Franklin C, Braam U, Eisele T, Schmalzing G, Hausmann R. Lack of evidence for direct phosphorylation of recombinantly expressed P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> receptors by protein kinase C[J]. *Purinergic Signal*, 2007, 3:377-388.

[本文编辑] 徐佳, 孙岩