

• 论 著 •

触液核组蛋白去乙酰化酶 6 参与调控大鼠神经病理性疼痛 *

李 清¹ 张红星² 张励才² 周 芳^{1△}

(¹ 徐州医科大学护理学院, 徐州 221004; ² 江苏省麻醉学重点实验室, 徐州 221004)

摘 要 **目的:** 探讨触液核组蛋白去乙酰化酶 6 (histone deacetylases 6, HDAC6) 在大鼠神经病理性疼痛中的作用。**方法:** 成年雄性 SD 大鼠, 体重 240~290 g。利用慢性坐骨神经结扎 (chronic constriction injury, CCI) 建立神经病理性疼痛模型, 分别采用 von Frey 丝和热辐射仪测量大鼠机械痛与热痛。采用免疫荧光共标技术, 观察正常及神经病理性疼痛大鼠触液核中 HDAC6 的表达情况。通过侧脑室注射 Tubastatin A 观察拮抗 HDAC6 对大鼠痛阈的影响。最后通过侧脑室注射 HDAC6 过表达病毒及对照病毒, 观察触液核 HDAC6 过表达对大鼠神经病理性疼痛的影响。**结果:** 神经病理性疼痛大鼠触液核 HDAC6 表达明显减少, Tubastatin A 拮抗 HDAC6 后 1 h 大鼠痛阈明显降低 ($P < 0.05$), 24 h 后恢复至正常水平。与以上结果一致的是, 侧脑室注射了 HDAC6 过表达病毒的神经病理性疼痛大鼠, 其疼痛状况得到明显改善 ($P < 0.05$)。**结论:** 触液核 HDAC6 参与了大鼠神经病理性疼痛的调控。

关键词 触液核; HDAC6; 神经病理性疼痛

The HDAC6 in CSF-contacting nucleus is involved in regulating neuropathic pain in rats *

LI Qing¹, ZHANG Hong-Xing², ZHANG Li-Cai², ZHOU Fang^{1△}

(¹ School of Nursing, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China; ² Jiangsu Province Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou, 221004, China)

Abstract Objective: To investigate the role of histone deacetylases 6 (HDAC6) in the cerebrospinal fluid (CSF)-contacting nucleus on neuropathic pain in rats. **Methods:** Adult male SD rats, weighing 240-290 g, were used in this study. Chronic constriction injury (CCI) was used to establish a neuropathic pain model. von Frey hair and thermal radiation meter were used to measure mechanical and thermal pain threshold in rats. The immunofluorescence technique was used to observe the expression of HDAC6 in the CSF-contacting nucleus of normal and neuropathic rats. The effect of antagonizing HDAC6 on the pain threshold of rats was observed by injection of Tubastatin A. Finally, HDAC6 overexpression and control virus were injected into the lateral ventricle to observe the effect of HDAC6 overexpression on the neuropathic pain in rats. **Results:** The expression of HDAC6 in the CSF-contacting nucleus of neuropathic pain rats was significantly decreased. 1 hour after injection of Tubastatin A, pain threshold was significantly reduced in rats ($P < 0.05$) and recovered to normal 24 hours later. Consistent with the above results, the pain thresholds of rats with neuropathic pain after HDAC6 overexpression virus injection into the lateral ventricle were increased significantly, compared with the control virus injection group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The HDAC6 in the CSF-contacting nucleus is involved in the regulation of neuropathic pain in rats.

Key words CSF-contacting nucleus; Histone deacetylases 6 (HDAC6); Neuropathic pain

国际疼痛学会将神经病理性疼痛定义为由躯体感觉神经系统损伤或疾病引起的慢性疼痛, 常表现

为自发性疼痛、痛觉过敏等临床症状^[1]。研究报道神经病理性疼痛在人群中的患病率约为 7%~10%,

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81400894); 江苏省研究生创新项目 (KYCX18_2184); 江苏省麻醉学重点实验室开放课题 (KJS1801)

△ 通讯作者 meadow_zh@hotmail.com

其发病机制复杂, 目前的治疗手段包括药物及神经阻滞等治疗效果有限, 为病人及社会带来较大的负担^[2], 因此探索新的、更有效的分子及药物治疗靶点具有临床意义。

组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 是一类蛋白酶, 基于序列同源性被分为 4 类, 其中组蛋白去乙酰化酶 6 (histone deacetylase 6, HDAC6) 是 II 类中的一员。与 HDACs 中其他成员不同, HDAC6 主要存在于细胞质中, 在结构和功能上均具有独特性, 其具有两个催化脱乙酰酶结构域, 以及一个锌指泛素结合结构域^[3], 且在细胞质中与多种非组蛋白底物结合, 如 α -微管蛋白、泛素、热休克蛋白 90 (HSP90) 等, 从而对其进行调控^[4]。HDAC6 的结构特点决定了其能参与调节许多重要的生物学过程, 包括细胞生长、代谢、迁移、氧化缓冲能力, 错误折叠蛋白质的降解以及免疫突触形成等^[5]。所以 HDAC6 成为神经保护和神经变性之间维持平衡的关键调节因子, 后又发现 HDAC6 参与神经病理性疼痛的调控^[6,7]。这为本研究神经病理性疼痛提供了分子基础。触液核 (cerebrospinal fluid-contacting nucleus, CSF-contacting nucleus) 是张励才等^[8]以霍乱毒素亚单位 B 结合辣根过氧化酶复合物 (horseradish peroxidase-conjugated toxin subunit B, CB-HRP) 作为示踪剂, 通过侧脑室引入, 在国际上首次发现并命名的脑内特殊神经核团。既往研究表明触液核有多种神经活性物质表达, 且参与神经病理性疼痛等生命活动的调控^[9-12]。但 HDAC6 是否在触液核这一新的核团中表达, 以及是否参与触液核介导的神经病理性疼痛还未见研究报道。因此, 本研究将采用免疫荧光技术结合行为药理学方法探讨 HDAC6 在触液核中的表达以及触液核 HDAC6 在大鼠神经病理性疼痛中的作用。

方 法

1. 实验动物及分组

SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只, 体重 240~290 g, 由山东济南朋悦实验动物繁育有限公司提供, 许可证号: SCXK (鲁) 20140007。将大鼠置于 12 h/12 h 光照/黑暗交替、22~24℃ 的安静环境中饲养, 自由进食和饮水。

分组: ①为了观察正常及神经病理性疼痛大鼠触液核中 HDAC6 的表达情况, 将大鼠分为: Normal 组、Sham 组和 CCI 组 ($n = 6$); ②关于 Tubastatin A 拮抗 HDAC6 对大鼠痛阈影响的研究, 将大鼠分为: Vehicle 组和 Tubastatin A 组 ($n = 6$); ③为了观察触

液核 HDAC6 过表达对大鼠神经病理性疼痛的影响, 将大鼠分为: Sham + CMV-MCS 组、CCI + CMV-MCS 组以及 CCI + CMV-HDAC6 组 ($n = 6$)。

2. 实验试剂

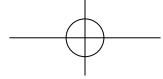
CB-HRP (Sigma, 美国); 羊抗 CB 一抗 (Abcam, 英国); HDAC6 小鼠多克隆抗体一抗 (Thermo, 美国); 驴抗羊 AlexaFluor546 二抗 (Life Technologies, 美国); 驴抗小鼠 AlexaFluor488 二抗 (Life Technologies, 美国); Tubastatin A (Selleck, 中国); 对照病毒 pAAV-CMV-MCS-3FLAG-CW3SL (和元生物, 中国); HDAC6 过表达病毒 pAAV-CMV-HDAC6-3FLAG-CW3SL (和元生物, 中国)。

3. 实验方法

(1) 慢性坐骨神经结扎 (chronic constriction injury, CCI) 模型建立: 参考 Bennett 等^[13]的方法, 雄性 SD 大鼠称重, 腹腔内注射 10% 水合氯醛 (300 mg/kg), 选取大鼠左后肢, 于后外侧切口, 在股骨后游离坐骨神经主干, 用 4-0 丝线做 4 道环形结扎, 各丝线间相距约 1 mm, 结扎强度以大腿肌肉或足趾产生轻微收缩为宜, 随后消毒, 缝合伤口。假手术组仅对大鼠进行坐骨神经分离, 不进行结扎, 其余步骤均相同。

(2) 侧脑室给药: SD 大鼠称重, 腹腔注射 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) 进行麻醉。待麻醉后将大鼠固定于脑立体定位仪上, 头顶部备皮、消毒, 于头顶部皮肤做正中切口, 暴露前凶点, 参照 Paxinos 脑图谱^[14]确定侧脑室位置: Bregma: 1.2 ± 0.4 mm, Right to median sagittal plane: 1.4 ± 0.2 mm, Depth: 3.2 ± 0.4 mm。用微量注射器抽取药液进行缓慢注射, 注射完毕留针 5 min, 随后消毒, 缝合伤口, 放回笼中待清醒。HDAC6 拮抗剂 Tubastatin A 的注射, 按 1 mg/ml 的标准称取相应剂量的 Tubastatin A 粉末, 先用 4% 的 DMSO 对其进行溶解, 然后加入 30% 的 PEG 300, 最后加入 67% 的双蒸水, 混匀。在注射 Tubastatin A 的前 1 天按上述方法在侧脑室位置钻一小孔, 伤口不予缝合, 并用红霉素软膏覆盖伤口, 第 2 天注射时用七氟烷维持大鼠麻醉, 进行药物注射。待 1 h 后进行行为学测量。

(3) 组织制备及免疫荧光: 大鼠于侧脑室注射 30% CB-HRP 后 48 h, 进行腹腔注射 10% 水合氯醛进行麻醉, 经升主动脉灌注行组织固定。首先使用 300 ml 生理盐水进行快速灌注, 以快速冲净动物体内血液。接着灌注 4% 多聚甲醛 300 ml 进行组织的前固定, 前 100 ml 快速灌注, 后 200 ml 慢滴。灌注结束后取触液核所在节段脑组织, 于 4% 多聚甲醛 4℃ 冰箱内后固定 4~6 h, 后换入 30% 蔗糖溶液脱水。待组织沉底, 取组织进行冰冻切片, 片厚



30 μm , 组织切片用 0.01 M PBS 溶液漂洗 3 遍, 每遍 5 min。加入 10% 驴血清室温封闭 3.5 h, 接着混合加入小鼠源 HDAC6 一抗 (1:400) 和羊源 CB 一抗 (1:600), 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境孵育过夜。第 2 天用 0.01 M PBS 溶液将组织切片漂洗 3 遍后, 加入驴抗小鼠 Alexa Fluor 488 (1:800) 和驴抗羊 Alexa Fluor 546 二抗 (1:500), 避光室温下敷育 1.5 h。然后 0.01 M PBS 溶液充分漂洗, 贴片, 封片。用激光共聚焦显微镜观察并拍片。

(4) 机械缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 测定: 参照 Up-down 法^[15] 进行测量。将大鼠放置于金属测试架上, 并用透明隔板将大鼠隔开。测试前大鼠需适应环境 30 min, 待大鼠探查等其他活动基本消失后, 开始测量。采用 von Frey 细丝刺激大鼠足底, 逐渐加压使细丝弯曲呈 90 度, 维持刺激时间 5 s, 若大鼠出现抬足或舔舐足底行为, 则记为阳性反应。连续刺激时, 测量间隔为 5 min。

(5) 热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) 测定: 按 Hargreaves 等^[16] 的方法进行测量。将待测大鼠放置于测试架上, 使其适应环境 30 min, 待充分适应环境后开始测量。将已开启的热辐射刺激仪对准大鼠左后足, 当大鼠突然抬足或舔舐足底时, 计时停止。每只大鼠的左后足均进行 5 次测量, 两次测量间隔为 10 min, 将测量的数值进行平均值计算。设置热辐射刺激仪测定 TWL 的上限时间为 25 s, 防止烫伤大鼠足底。

4. 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 7.0 作图并进行统计学分析。所有数据均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。行为数据的比较采用双因素方差分析 (two-way repeated measures ANOVA), 神经元双标率的比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 正常及神经病理性疼痛大鼠触液核 HDAC6 的表达情况

如图 1 所示, 红色为 CB-HRP 标记的触液核、绿色荧光标记的为 HDAC6 阳性神经元、黄色为 CB-HRP/HDAC6 双标神经元。与正常组和 Sham 组相比, CCI 组大鼠触液核 CB-HRP/HDAC6 双标神经元数量明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2. Tubastatin A 拮抗 HDAC6 对正常大鼠痛阈的影响

侧脑室注射 Tubastatin A 的大鼠, 在 1 h 后对其进行痛阈的测量, 发现与 Vehicle 组相比, 注射

Tubastatin A 的大鼠 MWT 和 TWL 值明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与同组大鼠基础痛阈 (baseline, BL) 相比, 差异也具有统计学意义 ($P < 0.05$)。24 h 后再次对大鼠进行痛阈测量, 发现降低的痛阈基本恢复至正常水平 (见图 2)。

3. 触液核 HDAC6 过表达对大鼠神经病理性疼痛的影响

将大鼠随机分为 Sham + CMV-MCS 组、CCI + CMV-MCS 组以及 CCI + CMV-HDAC6 组。3 组大鼠分别对应于侧脑室注射 HDAC6 过表达病毒及对照病毒。并在病毒表达 2 周后对 CCI + CMV-MCS 组和 CCI + CMV-HDAC6 组大鼠进行 CCI 造模, 于病毒表达 3 周, 即 CCI 术后 1 周痛阈最低时, 对大鼠进行痛阈测量。结果发现与 Sham + CMV-MCS 组大鼠相比, CCI + CMV-MCS 组大鼠痛阈明显降低 ($P < 0.05$), 而触液核 HDAC6 过表达的神经病理性疼痛大鼠疼痛状况得到明显改善 (见图 3)。

讨 论

本研究利用 CCI 模型模拟神经病理性疼痛, 通过免疫荧光技术观察到正常大鼠即有 HDAC6 的表达, 且在神经病理性疼痛状态下, 触液核 HDAC6 表达明显减少。与此一致的是, 拮抗触液核 HDAC6, CCI 大鼠的痛阈明显降低。以往关于触液核参与神经病理性疼痛的研究中, CCI 模型引起的神经病理性疼痛在术后 1 周痛阈达到最低^[9,10,12], 因此在触液核过表达 HDAC6 的情况下, 选择 CCI 术后 1 周对大鼠进行行为学检测, 结果发现触液核过表达 HDAC6 能够改善神经病理性疼痛。

既往关于 HDAC6 的研究多集中于其在肿瘤发生发展中的作用, 只有少量 HDAC6 与神经病理性疼痛相关的研究。Krukowski 和 Van 等^[6,7] 发现通过拮抗 HDAC6 能够改善化疗药物诱导的神经病理性疼痛。在 Krukowski 和 Van 等的实验中, 肿瘤化疗药物会破坏神经元的轴突运输和微管动力学, 从而导致化疗药物的神经毒性, 出现神经病理性疼痛。而 α -微管蛋白的乙酰化修饰是调节神经元轴突运输和微管动力学的关键机制之一。与其他 HDACs 相比, HDAC6 对包括 α -微管蛋白在内的非组蛋白具有特异性, 是调节 α -微管蛋白乙酰化水平的重要酶^[17]。因此通过抑制 HDAC6, 能够增加外周神经中的 α -微管蛋白乙酰化水平^[18], 从而增加神经元轴突的运输能力, 提高微管稳定性, 改善化疗药物诱导的神经病理性疼痛。而这与 Zerong 等的实验结果相矛盾, Zerong 等^[19]

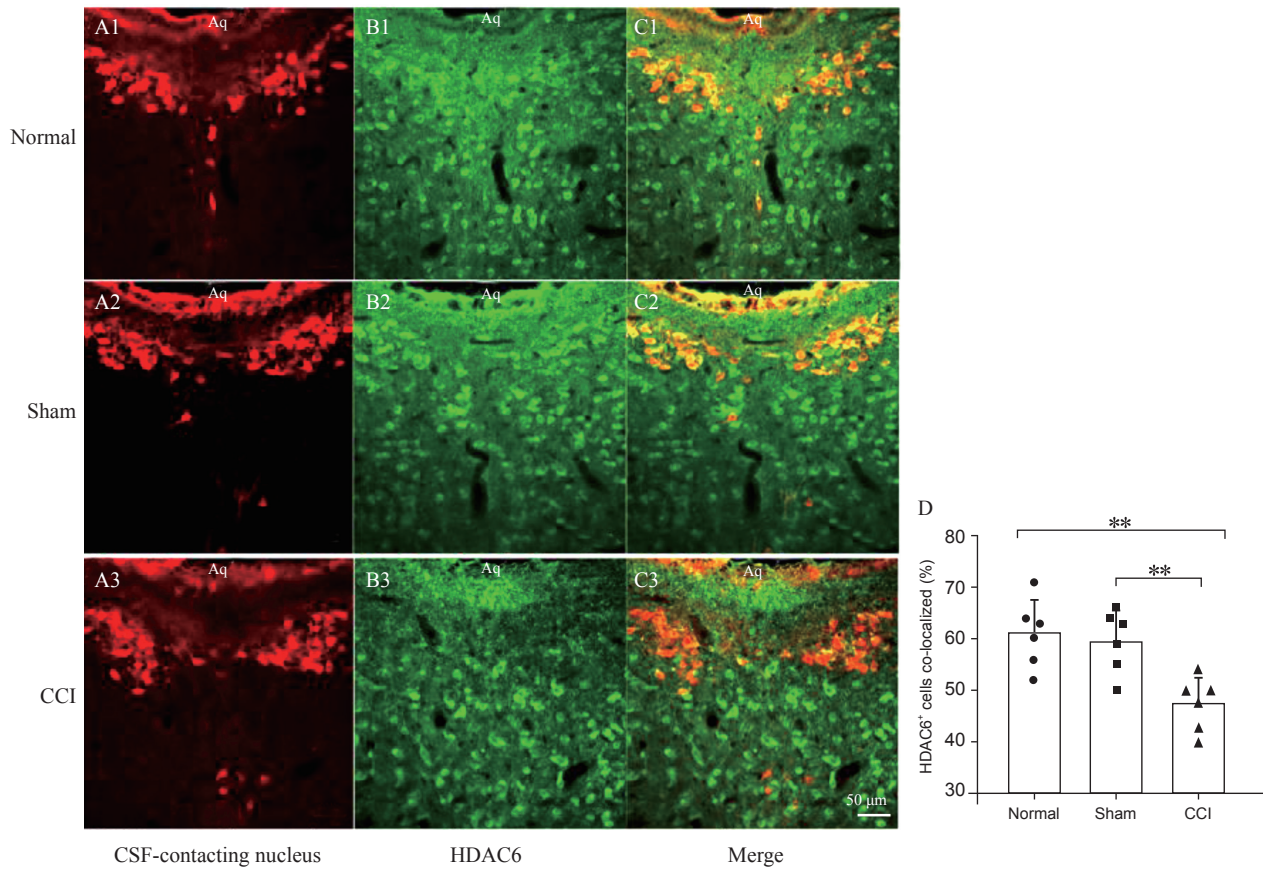


图 1 正常大鼠及神经病理性疼痛大鼠触液核 HDAC6 的表达 ($n = 6, \bar{x} \pm SD$) (A1, A2, A3) CB-HRP 标记的触液核 (红色); (B1, B2, B3) HDAC6 阳性神经元 (绿色); (C1, C2, C3) 两者双标神经元 (黄色) 标尺 = 50 μm ; (D) 三组大鼠触液核 HDAC6 双标阳性率比较 $**P < 0.01$, 与 CCI 组相比

Fig. 1 The expression of HDAC6 in the CSF-contacting nucleus of normal and neuropathic pain rats ($n = 6, \bar{x} \pm SD$) (A1, A2, A3) The CSF-contacting nucleus (red); (B1, B2, B3) HDAC6⁺ cells (green); (C1, C2, C3) double-labeling (yellow). Scale bar = 50 μm ; (D) Comparison on the rates of co-staining positive neurons in the CSF-contacting nucleus of three groups of rats. $**P < 0.01$, compared with the group CCI.

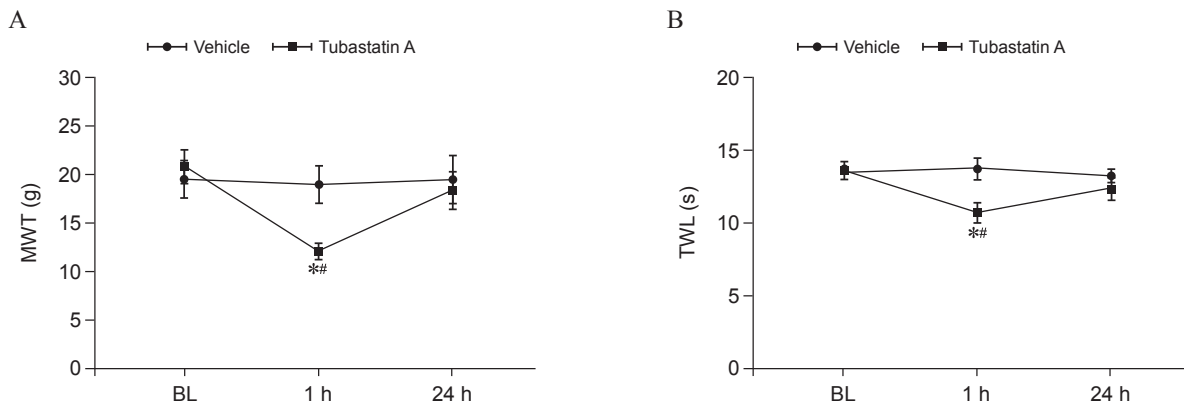


图 2 HDAC6 拮抗剂 Tubastatin A 对正常大鼠痛阈的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm SD$) (A) Tubastatin A 对大鼠 MWT 的影响; (B) Tubastatin A 对大鼠 TWL 的影响 $*P < 0.05$, 与 Vehicle 组相比; $^{\#}P < 0.05$, 与 Tubastatin A 组 BL 时间点相比

Fig. 2 Effects of HDAC6 antagonist Tubastatin A on pain threshold in rats ($n = 6, \bar{x} \pm SD$) (A) Effect of Tubastatin A on MWT in rats; (B) Effect of Tubastatin A on TWL in rats. $*P < 0.05$, compared to the group Vehicle; $^{\#}P < 0.05$, compared to the BL time point of Tubastatin group A.

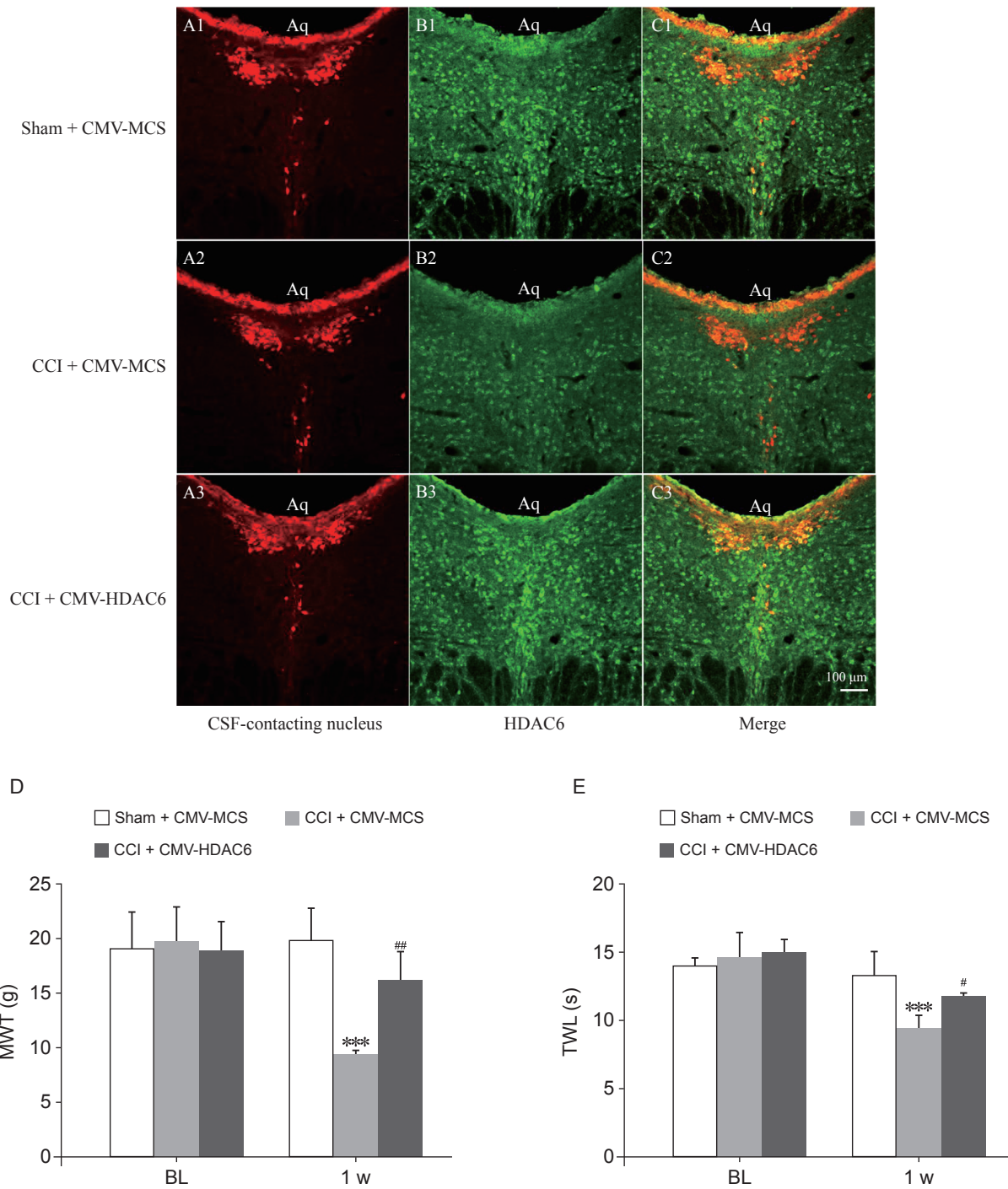


图 3 触液核 HDAC6 过表达对大鼠神经病理性疼痛的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm SD$) (A1, A2, A3) CB-HRP 标记的触液核 (红色); (B1, B2, B3) HDAC6 阳性神经元 (绿色); (C1, C2, C3) 两者双标神经元 (黄色) 标尺 = 100 μm ; (D) 各组大鼠术前及 CCI 术后 1 周 MWT 比较; (E) 各组大鼠术前及 CCI 术后 1 周 TWL 比较
*** $P < 0.001$, 与 Sham + CMV-MCS 组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与 CCI + CMV-MCS 组相比

Fig. 3 The effect of HDAC6 overexpression in the CSF-contacting nucleus on the neuropathic pain rats ($n = 6, \bar{x} \pm SD$) (A1, A2, A3) The CSF-contacting nucleus (red); (B1, B2, B3) HDAC6⁺ cells (green); (C1, C2, C3) double-labeling (yellow). Scale bar = 100 μm ; (D) Comparison of the MWT of rats in each group before surgery and one week after CCI; (E) Comparison of the TWL of rats in each group before surgery and one week after CCI.
*** $P < 0.001$, compared with the group Sham + CMV-MCS; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with the group CCI + CMV-MCS.

发现在 HDAC6 表达明显减少、 α -微管蛋白高度乙酰化、微管稳定性得到提高的情况下,神经病理性疼痛大鼠疼痛阈值明显降低。这可能是由于两者所涉及神经病理性疼痛模型不同,不同的动物模型其疼痛特点及所涉及的机制侧重点有所不同^[20],Krukowski 和 Van 等研究的是化疗药物诱发的神经病理性疼痛,而 Zerong 等使用的是坐骨神经分支选择性损伤模型。

触液核是一类胞体位于脑实质,而突起跨过室管膜屏障伸向脑脊液中的特殊核团。它不仅与脑脊液有联系,而且与其他非触液神经元、胶质细胞、血管等之间也存在联系。因此,触液核可能在神经、体液两大调节功能中发挥重要作用。通过 CB-HRP 逆行示踪结合免疫荧光技术,目前已经发现多种神经活性物质在触液核均有表达,且部分参与神经病理性疼痛的调控^[9-12,21-23]。本研究通过侧脑室注射 CB-HRP 并采用免疫荧光技术观察大鼠触液核中 HDAC6 的表达情况,结果发现正常大鼠触液核即有 HDAC6 的表达,且在神经病理性疼痛状态下,大鼠触液核中 HDAC6 的表达明显减少。这提示触液核 HDAC6 可能在神经病理性疼痛中发挥作用,为研究神经病理性疼痛提供了新的分子基础。

综上所述,触液核表达 HDAC6,且参与神经病理性疼痛的调控。这为研究神经病理性疼痛机制提供了新的分子基础,为临床治疗神经病理性疼痛提供了新的药物靶点。但考虑到神经病理性疼痛机制的复杂性以及触液核的结构特殊性,因此还需要更进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Williams AC, Craig KD. Updating the definition of pain[J]. *Pain*, 2016, 157(11):2420-2423.
- [2] 王焕玲,赵美一,刘金锋. 抗抑郁药在治疗神经病理性疼痛的研究进展[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2019, 25(7):537-540.
- [3] 马宇,洪谦谦,陈亚东,等. 组蛋白去乙酰化酶 6 选择性抑制剂的研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2018, 45(11):824-833.
- [4] Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, *et al.* HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin[J]. *Mol Cell*, 2007, 27(2): 197-213.
- [5] 郁泽宇,杨肖肖,森孟,等. HDAC6 对人肝癌 HepG2 细胞迁移和侵袭的影响及其机制[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(24): 4334-4340.
- [6] Krukowski K, Ma J, Golonzhka O, *et al.* HDAC6 inhibition effectively reverses chemotherapy-induced peripheral neuropathy[J]. *Pain*, 2017, 158(6):1126-1137.
- [7] Van Helleputte L, Kater M, Cook DP, *et al.* Inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) protects against vincristine-induced peripheral neuropathies and inhibits tumor growth[J]. *Neurobiol Dis*, 2018, 111:59-69.
- [8] Lu XF, Geng XJ, Zhang LC, *et al.* The methodology for labeling the distal cerebrospinal fluid-contacting neurons in rats[J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 168(1):98-103.
- [9] 倪林花,张励才. 神经病理性疼痛大鼠触液核 BKCa- α 表达降低[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2013, 19(11):664-669.
- [10] Li GL, Lu XF, Zhang SM, *et al.* mTOR and Erk1/2 signaling in the cerebrospinal fluid-contacting nucleus is involved in neuropathic pain[J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(5):1053-1062.
- [11] Wang CG, Song SY, Ding YL, *et al.* Extracellular signal-regulated kinase 5 in the cerebrospinal fluid-contacting nucleus contributes to neuropathic pain in rats[J]. *Pain Physician*, 2015, 18: E1073-E1082.
- [12] Wang JF, Zhang SM, Li L, *et al.* Involvement of Wnt5a within the cerebrospinal fluid-contacting nucleus in nerve injury-induced neuropathic pain[J]. *Int J Neurosci*, 2015, 125(2): 147-153.
- [13] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. *Pain*, 1988, 33:87-107.
- [14] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th edn[M]. Amsterdam: Elsevier press, 2007:115-116.
- [15] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. *J Neurosci Meth*, 1994, 53:55-63.
- [16] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, *et al.* A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia[J]. *Pain*, 1988, 32:77-88.
- [17] Zeb A, Park C, Rampogu S, *et al.* Structure-based drug designing recommends HDAC6 inhibitors to attenuate microtubule-associated tau-pathogenesis[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(3):1326-1335.
- [18] Benoy V, Van Helleputte L, Prior R, *et al.* HDAC6 is a therapeutic target in mutant GARS-induced Charcot-Marie-Tooth disease[J]. *Brain*, 2018, 141(3):673-687.
- [19] Zerong Y, Zhang SZ, Shen SQ, *et al.* Cognitive impairment in a rat model of neuropathic pain: Role of hippocampal microtubule stability[J]. *Pain*, 2018, 159(8):1518-1528.
- [20] 武亚茹,常可欣,贾庆忠. 神经病理性疼痛动物模型的制备与评价方法[J]. *神经药理学报*, 2017, 7(5):15-20.
- [21] Wang XY, Yan WW, Zhang XL, *et al.* ASIC3 in the cerebrospinal fluid-contacting nucleus of brain parenchyma contributes to inflammatory pain in rats[J]. *Neurol Res*, 2014, 36(3):270-275.
- [22] Zhang C, Li Y, Wang X, *et al.* Involvement of neurokinin 1 receptor within the cerebrospinal fluid contacting nucleus in visceral pain[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15:4300-4304.
- [23] 周芳,王家友,田恩琪,等. 触液核神经元蛋白激酶 C 磷酸化水平调制炎性痛大鼠的痛觉[J]. *生理学报*, 2015, 67(6): 323-331.