

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.18.003

探讨鞘内注射 siRNA-P300 通过 cAMP-PKA-CREB 通路对神经病理性痛大鼠镇痛效果的影响^{*}

刘志军,姜云峰,胡兵伟
(浙江省立同德医院麻醉科,杭州 310012)

[摘要] **目的** 基于环磷酸腺苷(cAMP)-蛋白激酶 A(PKA)-反应元件结合蛋白(CREB)通路探讨 P300 小干扰 RNA(siRNA-P300)鞘内注射对神经病理性痛大鼠镇痛效果的影响。**方法** 60 只 SD 大鼠分成 3 组:对照组、模型组、siRNA-P300 组,每组 20 只,雌雄各半。模型组、siRNA-P300 组大鼠通过结扎三叉神经建立坐骨神经慢性压迫性损伤(CCI)模型,对照组仅暴露坐骨神经,不予结扎。siRNA-P300 组于造模成功第 1 天开始给予 siRNA-P300 鞘内注射(注射剂量 1.0 mL/100 g),持续给予 3 周,对照组和模型组鞘内注射等体积生理盐水。实验结束后,测定大鼠机械痛阈值、热痛阈、疼痛加权评分(PIS),以及 cAMP、PKA、CREB mRNA 和蛋白在脊髓组织中的表达水平。**结果** 与对照组比较,模型组、siRNA-P300 组机械痛阈值、热痛阈降低,PIS 升高($P<0.05$);与模型组比较,siRNA-P300 组机械痛阈值、热痛阈升高,PIS 降低($P<0.05$);与对照组比较,模型组、siRNA-P300 组脊髓 CAMP、PKA、CREB mRNA 和蛋白表达水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,siRNA-P300 组脊髓 CAMP、PKA、CREB mRNA 和表达水平明显降低($P<0.05$);与对照组比较,模型组、siRNA-P300 组脊髓白细胞介素(IL)-2、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,siRNA-P300 组 IL-2、IL-6、TNF- α 表达水平明显降低($P<0.05$)。**结论** siRNA-P300 鞘内注射对脊髓区神经元具有保护作用,对大鼠神经病理性痛具有镇痛效果;其机制与 siRNA-P300 抑制 cAMP-PKA-CREB 通路的激活进而抑制炎症因子 IL-2、IL-6、TNF- α 的表达有关。

[关键词] cAMP-PKA-CREB 通路;P300;RNA,小分子干扰;注射,脊髓;神经病理性痛
[中图法分类号] R741 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)18-3071-06

Effect of intrathecal injection of siRNA-P300 on analgesia effect in rats with neuropathic pain through cAMP-PKA-CREB pathway^{*}

LIU Zhijun, JIANG Yunfeng, HU Bingwei
(Department of Anesthesiology, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310012, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of intrathecal injection of siRNA-P300 on analgesia effect in rats with neuropathic pain based on cAMP-PKA-CREB pathway. **Methods** Sixty SD rats were divided into three groups: the control group, the model group and the siRNA-P300 group, with 20 rats in each group, half male and half female. Rats in the model group and the siRNA-P300 group were established neuropathic pain model by ligating trigeminal nerve, while rats in the control group were only exposed sciatic nerve without ligation. The siRNA-P300 group was given intrathecal injection of siRNA-P300 (1.0 mL/100 g) for 3 weeks on the first day of successful modeling. The control group and the model group were intrathecally injected with the same volume of normal saline. At the end of the experiment, the mechanical pain threshold, thermal pain threshold, pain weighted score (PIS) and the expression levels of cAMP, PKA, CREB mRNA and protein in spinal cord tissue were measured. **Results** Compared with the control group, the mechanical pain threshold and thermal pain threshold in the model group and the siRNA-P300 group decreased and PIS increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the mechanical pain threshold and thermal pain threshold in the siRNA-P300 group increased and PIS decreased ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression levels of CAMP, PKA, CREB mRNA and protein of spinal cord in the model group and the siRNA-P300 group were significantly increased ($P<0.05$). The expression levels of CAMP, PKA and CREB mRNA and protein of spinal cord in the siRNA-P300 group were significantly lower than those of the model group ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression levels of interleukin (IL)-2, IL-6 and TNF- α of

^{*} **基金项目:**浙江省医药卫生科技计划项目(2014KYB049)。**作者简介:**刘志军(1976—),副主任医师,本科,主要从事术后急性疼痛管理研究。

spinal cord in the model group and the siRNA-P300 group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression levels of IL-2, IL-6 and TNF- α in the siRNA-P300 group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Intrathecal injection of siRNA-P300 has protective effect on neuronal cells in spinal cord and has analgesic effect on neuropathic pain in rats. The mechanism is related to siRNA-P300 inhibiting the activation of cAMP-PKA-CREB pathway and the expression of IL-2, IL-6 and TNF- α .

[Key words] cAMP-PKA-CREB pathway; P300; RNA, small interfering; injections, spinal; neuropathic pain

脊髓损伤是一种在医疗实践中观察到的极其严重的身体创伤,影响着全世界 200 多万人的生活。脊髓损伤患者最常见的症状是慢性神经性疼痛。因此,开发有效的治疗药物对于脊髓损伤患者具有临床重要性^[1-3]。研究发现脊髓损伤通过环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)-蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)-反应元件结合蛋白(cAMP response element-binding protein, CREB)通路导致背角神经元和损伤部位的突触电路发生明显变化,进而导致神经细胞受体的表达异常,局部炎性细胞因子和活性氧物质的释放,小胶质细胞和其他免疫细胞中免疫应答激活^[4-5]。PKA 是 G 蛋白偶联受体的家族成员,研究表明脊柱 L₄~L₆ 水平约 60% 的背根神经节神经元含有 PKA。通过外周或中枢施用非炎性剂量的 PKA 激动剂刺激 PKA 可引起大鼠的机械痛觉和热痛觉过敏。研究进一步表明, P 物质和降钙素基因相关肽(CGRP)的释放通过激活 PKA 促成急性和慢性疼痛^[6-7]。在具有神经性疼痛的实验动物模型中, PKA 的表达在诱导疼痛后的脊髓背角中上调,并且阻断脊髓背角 PKA 消除了动物中观察到的机械痛觉和热痛觉过敏。P300 是高等真核生物中作用广泛的辅助激活因子,也是一类组蛋白乙酰转移酶,近期研究发现, P300 能够抑制疼痛相关基因及其上下游转录因子的表达,其可能是神经病理性痛的关键治疗点^[8-9]。本研究拟基于 cAMP-PKA-CREB 通路探讨 P300 小干扰 RNA (siRNA-P300) 鞘内注射对神经病理性痛大鼠镇痛效果的影响,为脊髓损伤引起的神经病理性痛的治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物分组及染毒 成年 Sprague-Dawley 大鼠(体质量 180~200 g) 60 只由南京医科大学实验动物中心提供[合格证号: SCXK(苏)2014-0002]。在无特定病原体(SPF)、温度(22±2)℃、湿度 40%~70%、2 h 光照/黑暗循环(上午 8:00 光照)的软垫层条件下饲养,每笼 5 只,大鼠自由摄取饲料、自由饮水。实验进行前,动物适应喂养 2 h。将大鼠分成 3 组:对照组、模型组、siRNA-P300 组,每组 20 只,雌雄各半。实验严格按照《中华人民共和国实验动物管理条例》和《实验动物质量管理方法》进行,动物实验获得本院动物研究委员会的批准。

1.2 各实验组的制备 模型组、siRNA-P300 组大鼠

制备坐骨神经慢性压迫性损伤(CCI)模型。具体操作如下:大鼠禁食、禁水 12 h,水合氯醛(300 mg/kg,腹腔内)诱导麻醉。将每只大鼠左侧大腿中部的坐骨神经暴露,在坐骨神经三叉神经的近端,将大约 7 mm 的神经与黏附的组织分离,用 4 根结扎线松散地系在它周围,结扎之间距离约 1 mm。手术后,缝合皮肤层和肌肉,手术区域用碘消毒。对照组仅暴露坐骨神经,不予结扎,并缝合皮肤层和肌肉。siRNA-P300 组于造模成功后第 1 天开始给予 siRNA-P300 鞘内注射(注射剂量 1.0 mL/100 g),具体操作流程为:在麻醉下,在 L₅ 和 L₆ 椎骨之间插入 26 G 规格的针头,注射约 10 μ L 含有 siRNA-P300 混合物(0.2 μ g/ μ L,美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)的工作溶液,持续给药 3 周,对照组和模型组鞘内注射等体积生理盐水。实验结束后,每 5 分钟观察大鼠疼痛行为学 1 次,并计算疼痛加权评分(PIS):大鼠舔咬注射足或抽动为 IV 级;足抬起,不接触玻璃缸面为 III 级;足掌轻微接触玻璃缸面,活动时时有跛行为 II 级;PIS=(T II + 2×T III + 3×T IV)/300,其中 T II、T III、T IV 分别为 5 min 内出现 II、III、IV 级行为的时间(s)。

1.3 腰椎脊髓病理切片制作 腰椎脊髓组织常规脱水、包埋、切片,于二甲苯(I) 15 min、二甲苯(II) 15 min、二甲苯:无水乙醇=1:1 2 min、100%乙醇(I) 5 min、100%乙醇(II) 5 min、80%乙醇 5 min、蒸馏水 5 min、苏木精液染色 5 min、水洗 10 min 或流水冲洗 5 min、1%盐酸乙醇 30 s、水洗 30 s、蒸馏水过洗 5 s、0.5%伊红液染色 1~3 min、蒸馏水稍洗 30 s、80%乙醇稍洗 30 s、95%乙醇(I) 1 min、95%乙醇(II) 1 min、无水乙醇(I) 3 min、无水乙醇(II) 3 min、二甲苯(I) 3 min 二甲苯(II) 3 min、中性树胶封固。

1.4 机械痛阈值、热痛阈的测定 各组大鼠处死前,根据文献[9]方法测定机械痛阈值、热痛阈。具体操作:美国 II TC 公司生产的 2390 series 电子 von Frey 压力测痛仪触压大鼠左足第 3、4 趾间的皮肤,当大鼠出现后足抬起、迅速回缩反应时读取数值作为热痛阈;热辐射刺激仪照射大鼠右侧足底紧贴玻璃板部位,记录抬足时间为机械痛阈值,截止时间为 25 s。

1.5 cAMP、PKA、CREB mRNA 在脊髓组织中表达的测定 通过使用 TRIzol 试剂(美国 Life Technologies 公司)从同侧脊髓分离总 RNA,并使用 Oligo

(dT)18 引物将其反转录成 cDNA。使用 Applied Biosystems7300 实时 PCR 系统(美国 Applied Biosystems 公司)进行实时定量 PCR(qPCR)。qPCR 引物如下,cAMP:正向 5'-TCT TTC CTA CAA CAG CCT CCG-3',反向 5'-TAA ATG CTC GCT TCA AAC TCA G-3';PKA:正向 5'-TCG AAG GCG ACC TCA AGT G-3',反向 5'-TTC GGT GTA GCT TTG GAT CCA-3';CREB:正向 5'-ACC GTC GCC CAT CAT CAA-3',反向 5'-TTG CAC TGC CAA CTC TTT GTC T-3';GAPDH:正向 5'-ATG ACT CTA CCC ACG GCA AG-3',反向 5'-CTG GAA GAT GGT GAT GGG TT-3';其中 GAPDH 用作内参。qPCR 反应条件:94 ℃ 预变性 10 min;94 ℃ 10 s,55 ℃ 10 s,72 ℃ 10 s,40 个循环。使用阈值循环(Ct)方法分析数据,并将结果表示为倍数差异。实验重复 3 次。

1.6 cAMP、PKA、CREB 在脊髓组织中表达的测定 通过腹腔注射水合氯醛(300 mg/kg)深度麻醉后,用生理盐水经心脏灌注动物,然后用 0.1%磷酸盐缓冲液(PBS)配制的 pH 为 7.4 的 4%多聚甲醛灌注 20 min。于 L₄ 和腰椎将脊髓片段解剖出来并在 4%多聚甲醛中固定,然后切成 25 μm 厚。将每组的切片与山羊抗体鼠 cAMP(1:200)、PKA(1:100)、CREB(1:100)一抗一起孵育。然后,用 PBS 洗涤切片并与二抗孵育。用 PBS 洗涤 3 次后,在免疫荧光显微镜(Zeiss AX10,德国)下研究样品的免疫荧光染色的形态学细节。双盲进行检查。随机编码图像,并通过 Image Pro Plus 6.0 软件(美国 Media Cybernetics Inc. Rockville 公司)分析。染色评分标准:0 表示小于 5%阳性染色细胞(阴性染色);1+表示 5%~20%阳性染色细胞(弱表达),2+表示 21%~50%阳性染色细胞(中表达),3+表示大于 50%阳性染色细胞(强表达)。染色强度评分为 0~3(0,阴性;1,弱;2,中等;3,强)。然后将数量和染色强度评分的值相乘,得到范

围为 0~9 的结果。

1.7 ELISA 测定大鼠脊髓组织中 cAMP、PKA、CREB、白细胞介素(IL)-2、IL-6、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)水平 无菌条件下,称取 0.1 g 脊髓组织,加入少量液氮,在研钵中迅速将海马组织碾碎至粉末状;将组织粉末转入 2 mL Eppendorf 管中,加入 1.2 mL PBS(pH 为 7.4),充分振荡混匀,2 000×g、4 ℃离心 20 min,收集上清液。大鼠 cAMP、PKA、CREB、IL-2、IL-6、TNF-α ELISA 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司。使用酶标仪(Model 550,美国 Bio-Rad 公司)在 450、512、539、429、529、487 nm 波长下读取吸光度(A)值。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

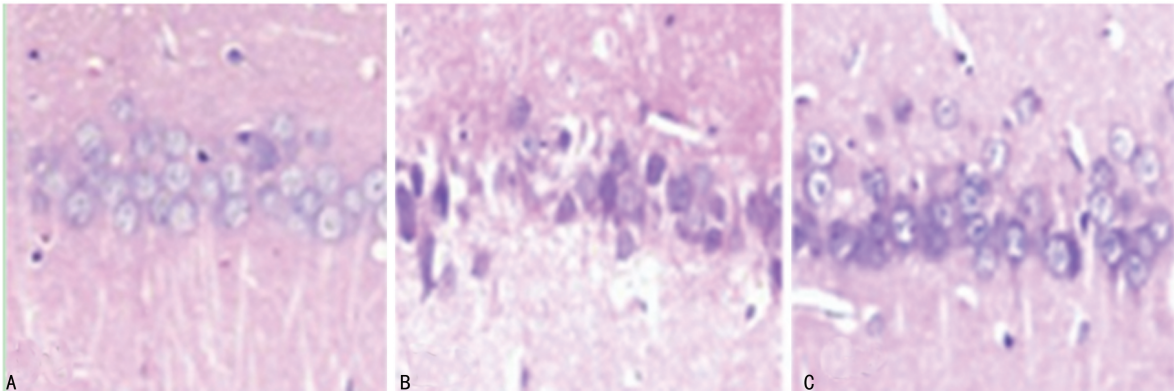
2 结 果

2.1 各组大鼠机械痛阈值、热痛阈、PIS 的比较 与对照组比较,模型组、siRNA-P300 组机械痛阈值、热痛阈降低,PIS 升高($P < 0.05$);与模型组比较,siRNA-P300 机械痛阈值、热痛阈升高,PIS 降低($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠脊髓组织病理形态学比较 对照组脊髓区神经元细胞完整,结构正常,染色清晰,细胞核呈卵圆形位于中央;模型组脊髓区可见大量坏死神经元,且细胞脱失现象明显,细胞核固缩,可见中性细胞及少量嗜酸性细胞浸润;siRNA-P300 组脊髓区见少量坏死神经元,且神经元细胞结构较为完整,神经元细胞核呈卵圆形位于中央,分布均匀。见图 1。

表 1 各组大鼠机械痛阈值、热痛阈、PIS 的比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	机械痛阈值(s)	热痛阈(g)	PIS(分)
对照组	20	21.92±2.32	12.20±2.21	0.00±0.00
模型组	20	8.04±2.49 ^a	6.75±1.37 ^a	8.65±2.15 ^a
siRNA-P300 组	20	13.32±3.36 ^{ab}	9.35±1.31 ^{ab}	3.26±0.24 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较



A:对照组 B:模型组 C:siRNA-P300 组

图 1 各组大鼠脊髓组织病理形态学观察(苏木素-伊红×400)

2.3 各组大鼠脊髓 cAMP、PKA、CREB mRNA 表达水平比较 与对照组比较,模型组、siRNA-P300 组脊

髓 cAMP、PKA、CREB mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, siRNA-P300 组脊髓 cAMP、PKA、CREB mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠脊髓 cAMP、PKA、CREB mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	cAMP	PKA	CREB
对照组	20	0.94±0.29	1.01±0.51	1.54±0.61
模型组	20	5.32±0.51 ^a	4.91±0.39 ^a	4.54±0.43 ^a
siRNA-P300 组	20	2.12±0.51 ^{ab}	2.31±0.41 ^{ab}	2.56±0.86 ^{ab}

^a: $P<0.05$, 与对照组比较; ^b: $P<0.05$, 与模型组比较

2.4 各组大鼠脊髓 cAMP、PKA、CREB 表达评分比较 免疫组织化学法下, cAMP、PKA、CREB 主要定位于细胞核, 其阳性表达为棕褐色; 与对照组比较, 模型组、siRNA-P300 组脊髓 cAMP、PKA、CREB 表达评分明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, siRNA-P300 组脊髓 cAMP、PKA、CREB 表达评分明显降低 ($P<0.05$)。见表 3、图 2。

2.5 各组大鼠脊髓 IL-2、IL-6、TNF-α 表达水平比

较 与对照组比较, 模型组、siRNA-P300 组脊髓 IL-2、IL-6、TNF-α 表达水平明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, siRNA-P300 组 IL-2、IL-6、TNF-α 表达水平明显降低 ($P<0.05$)。见表 4。

表 3 各组大鼠脊髓 cAMP、PKA、CREB 表达评分比较($\bar{x}\pm s$, 分)

组别	<i>n</i>	cAMP	PKA	CREB
对照组	20	1.21±0.32	1.14±0.49	1.64±0.43
模型组	20	6.21±0.54 ^a	5.53±0.41 ^a	6.54±0.52 ^a
siRNA-P300 组	20	2.45±0.49 ^{ab}	2.63±0.48 ^{ab}	2.86±0.46 ^{ab}

^a: $P<0.05$, 与对照组比较; ^b: $P<0.05$, 与模型组比较

表 4 各组大鼠脊髓 IL-2、IL-6、TNF-α 表达水平比较($\bar{x}\pm s$, ng/g)

组别	<i>n</i>	IL-2	IL-6	TNF-α
对照组	20	78.98±16.32	123.65±23.21	99.36±18.63
模型组	20	326.21±19.69 ^a	413.65±13.69 ^a	589.36±18.34 ^a
siRNA-P300 组	20	201.36±15.32 ^{ab}	302.67±19.32 ^{ab}	432.39±15.39 ^{ab}

^a: $P<0.05$, 与对照组比较; ^b: $P<0.05$, 与模型组比较

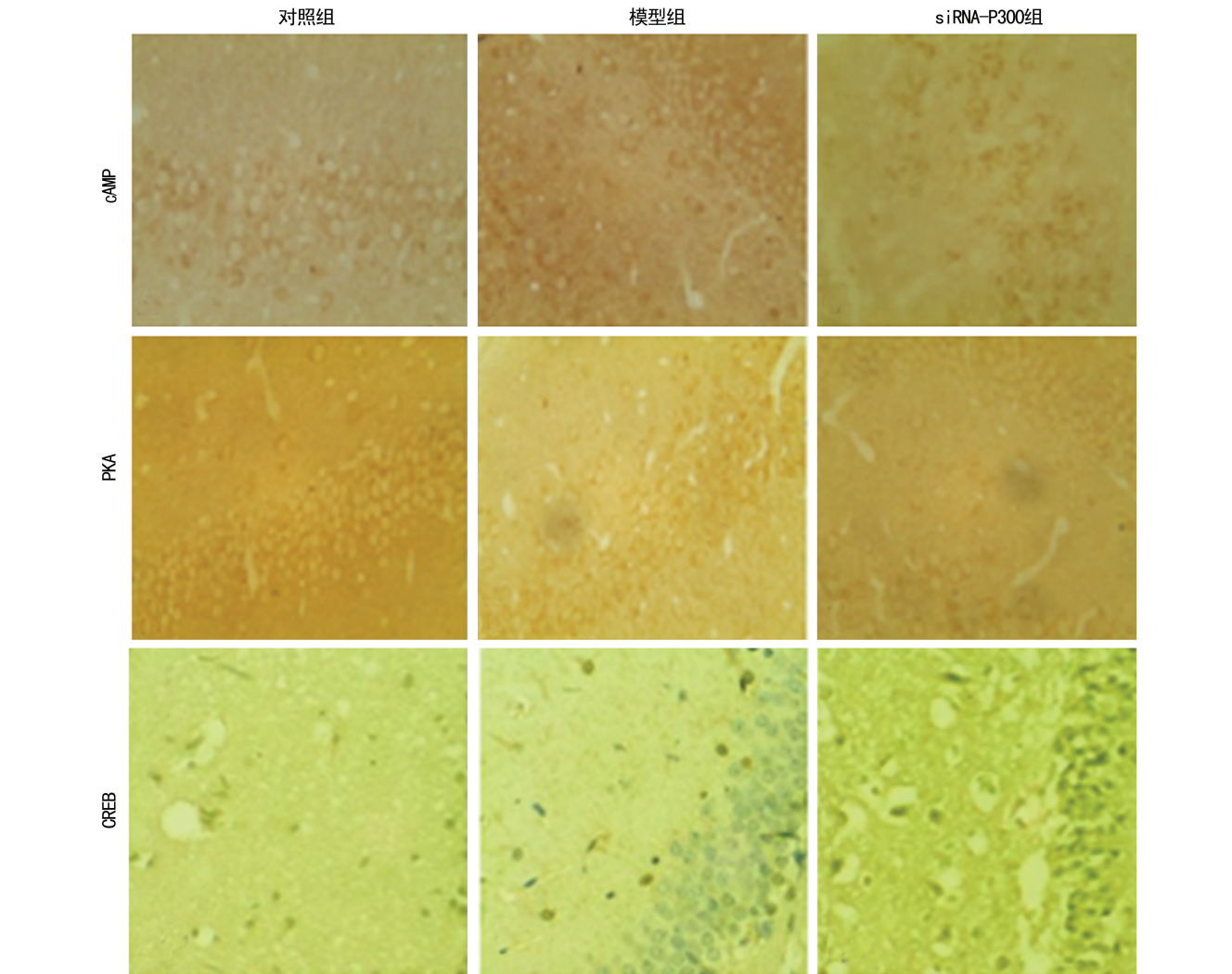


图 2 各组大鼠脊髓部 cAMP、PKA、CREB 表达情况观察 (免疫组织化学×400)

3 讨 论

脊髓损伤引起的神经性疼痛与感觉异常及改变的刺激-反应功能有关,例如异常性疼痛,痛觉过敏和某些区域的感觉丧失。国际疼痛研究协会将神经性病理痛定义为“由躯体感觉神经系统的病变或疾病引起的疼痛”。神经性疼痛对患者的生活质量造成沉重负担,而目前可用的治疗方法效果通常存在局限。神经性病理痛的潜在分子机制仍然很难阐明,越来越多的证据表明,P300 基因可能与神经性病理痛发病机制密切相关。P300 基因在组织内广泛表达,其在各生物过程中发挥重要作用。P300 通过桥接、支架或组蛋白乙酰转移酶(HAT)活性调节各种基因的表达,其在表观遗传学上导致炎症、肿瘤、神经退行性疾病。siRNA 可通过基因组中载体靶向沉默基因表达。鞘内应用 siRNA 已成为研究药物、受体或其他基因、蛋白质等小分子功能的有效方法^[10-12]。研究已证实 siRNA-P300 能专一性抑制脊髓的 P300 mRNA 表达,导致 P300 介导的组蛋白乙酰化作用减弱,进而抑制各类疼痛相关转录因子的转录,最终缓解疼痛。本研究结果表明,与对照组比较,模型组、siRNA-P300 组机械痛阈值、热痛阈降低,PIS 升高;与模型组比较,siRNA-P300 组机械痛阈值、热痛阈升高,PIS 降低。结合病理学结果说明,siRNA-P300 鞘内注射对脊髓区神经元细胞具有保护作用,对大鼠神经病理性痛具有镇痛效果。

PKA 是 G 蛋白偶联受体的家族成员,同时也是一种非选择性阳离子通道。近期研究表明 PKA 可被多种内源性物理和化学刺激物激活,如高温,低 pH(酸性条件),内源性大麻素和酰胺,N-油酰多巴胺和 N-花生四烯酰-多巴胺等。PKA 的激活导致痛苦的灼烧感^[13-14]。PKA 受体主要存在于外周神经系统的感受神经元中,但其也存在于包括脑和脊髓在内的中枢神经系统中。PKA 参与疼痛的传递和调节,以及多种疼痛刺激的整合。有证据表明 PKA 具有调节外周和中枢神经系统神经性病理痛的作用^[15-16]。近期研究表明,脊髓损伤大鼠浅表背角中 PKA 表达上调,PKA 拮抗剂 FSLRY-NH₂ 能减弱脊髓损伤诱发的机械痛觉和热痛觉过敏。cAMP、CREB 分别是 PKA 的上、下游调控因子,研究表明 cAMP、CREB 也是参与神经性病理痛的两种重要神经递质物质,其表达水平在脊髓损伤大鼠的浅表背角中显著增加,在鞘内注射各自相应的抑制剂(SB366791、HC030031)后,大鼠机械痛阈值、热痛阈升高^[17-18]。本次研究结果显示,与对照组比较,模型组、siRNA-P300 组脊髓 cAMP、PKA、CREB mRNA 和蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,siRNA-P300 组脊髓 cAMP、

PKA、CREB mRNA 和蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。这与前述研究结果一致,同时也说明 siRNA-P300 可通过抑制 cAMP-PKA-CREB 通路的激活进而抑制神经病理性痛。近期研究发现,PKA 在疼痛和神经源性炎症中具有功能性作用,PKA 通过 CREB 通道活化各种化合物,包括刺激性物质、活性氧和炎症因子(IL-2、IL-6、TNF- α)等。本研究结果显示,与对照组比较,模型组、siRNA-P300 组脊髓 IL-2、IL-6、TNF- α 表达水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,siRNA-P300 组 IL-2、IL-6、TNF- α 表达水平明显降低($P < 0.05$),这说明 siRNA-P300 抑制神经病理性痛与抑制 cAMP-PKA-CREB 通路的激活进而抑制炎症因子 IL-2、IL-6、TNF- α 的表达有关。

综上所述,siRNA-P300 鞘内注射对脊髓区神经元具有保护作用,对大鼠神经病理性痛具有镇痛效果;其机制与 siRNA-P300 抑制 cAMP-PKA-CREB 通路的激活进而抑制炎症因子 IL-2、IL-6、TNF- α 的表达有关。

参考文献

- [1] ASSINCK P, DUNCAN G J, HILTON B J, et al. Cell transplantation therapy for spinal cord injury[J]. *Neuroscience*, 2017, 20(5): 637-647.
- [2] AHUJA C S, NORI S, TETREAULT L, et al. Traumatic spinal cord injury-repair and regeneration[J]. *Neurosurgery*, 2017, 80(3 Suppl): S9-22.
- [3] AZEVEDO COSTE C, BERGERON V, BERKELMANS R, et al. Comparison of strategies and performance of functional electrical stimulation cycling in spinal cord injury pilots for competition in the first ever CYBATHLON[J]. *Eur J Transl Myol*, 2017, 27(4): 568-572.
- [4] WANG X, GAO J, WANG X, et al. Treatment with Shuyu capsule increases 5-HT_{1A}R level and activation of cAMP-PKA-CREB pathway in hippocampal neurons treated with serum from a rat model of depression[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 3575-3582.
- [5] WU H Y, TANG X Q, LIU H, et al. Both classic Gs-cAMP/PKA/CREB and alternative Gs-cAMP/PKA/p38 β /CREB signal pathways mediate exenatide-stimulated expression of M2 microglial markers[J]. *J Neuroimmunol*, 2018, 316(16): 17-22.
- [6] HWAN P K, YOORIM C, SUK Y D, et al. Zinc promotes osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells via activation of the cAMP-PKA-CREB signaling pathway[J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(16): 1125-1135.
- [7] WANG B, CHEN T, WANG J, et al. Methamphetamine modulates the production of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α , via, the cAMP/PKA/CREB signaling pathway in lipopolysaccharide-activated microglia[J]. *Int*

Immunopharmacol,2018,56:168-178.

- [8] JIN J,ZHANG H,DALY I,et al. An improved P300 pattern in BCI to catch user's attention[J]. J Neural Eng, 2017,14(3):6001-6008.
- [9] LIAO Z W,LEI Z,CAI M Y,et al. P300 promotes migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a nasopharyngeal carcinoma cell line[J]. Oncol Lett, 2017, 13(2):763-769.
- [10] LASKO L M,JAKOB C G,EDALJI R P,et al. Discovery of a selective catalytic p300/CBP inhibitor that targets lineage-specific tumours[J]. Nature, 2017, 550 (7674): 468-472.
- [11] FRANCESCO C,LUIGI B,RITA Q L,et al. A Fuzzy Integral Ensemble Method in Visual P300 Brain-Computer Interface[J]. Comput Intell Neurosci,2016,65(3):1-9.
- [12] CAO J,PENG J,AN H,et al. Endotoxemia-mediated activation of acetyltransferase P300 impairs insulin signaling in obesity. [J]. Nat Commun,2017,8(1):131-137.
- [13] ZHOU W, YU L, FAN J, et al. Endogenous parathyroid hormone promotes fracture healing by increasing expression of BMPR2 through cAMP/PKA/CREB pathway in mice[J]. Cell Physiol Biochem,2017,89(8):551-563.
- [14] GUO H,CHENG Y,WANG C,et al. FFPM, a PDE4 inhibitor, reverses learning and memory deficits in APP/PS1 transgenic mice via cAMP/PKA/CREB signaling and anti-inflammatory effects [J]. Neuropharmacology, 2017,116(6):260-269.
- [15] WANG C, GUO J, GUO R. Effect of XingPiJieYu decoction on spatial learning and memory and cAMP-PKA-CREB-BDNF pathway in rat model of depression through chronic unpredictable stress[J]. BMC Complement Altern Med,2017,17(1):73-79.
- [16] LUO Y,KUANG S,LI H,et al. cAMP/PKA-CREB-BDNF signaling pathway in hippocampus mediates cyclooxygenase 2-induced learning/memory deficits of rats subjected to chronic unpredictable mild stress[J]. Oncotarget, 2017,8(22):35558-35572.
- [17] WEI X,YANGLIANG Y,YING F,et al. Linderane suppresses hepatic gluconeogenesis by inhibiting the cAMP/PKA/CREB pathway through indirect activation of PDE 3 via ERK/STAT3[J]. Front Pharmacol, 2018, 9 (2): 476-451.
- [18] LI Y, SONG J, TONG Y, et al. RGS19 upregulates Nm23-H1/2 metastasis suppressors by transcriptional activation via the cAMP/PKA/CREB pathway [J]. Oncotarget, 2017,8(41):69945-69960.

(收稿日期:2019-01-18 修回日期:2019-04-23)

(上接第 3070 页)

- [12] BANFI G,BERTANI T,BOERI V,et al. Renal vascular lesions as a marker of poor prognosis in patients with lupus nephritis. Gruppo Italiano per lo Studio della Nefrite Lupica (GISNEL) [J]. Am J Kidney Dis, 1991, 18 (2): 240-248.
- [13] LETCHUMANAN P,NG H J,LEE L H,et al. A comparison of thrombotic thrombocytopenic purpura in an inception cohort of patients with and without systemic lupus erythematosus[J]. Rheumatology (Oxford),2009,48 (4):399-403.
- [14] WU L H,YU F,TAN Y,et al. Inclusion of renal vascular lesions in the 2003 ISN/RPS system for classifying lupus nephritis improves renal outcome predictions[J]. Kidney Int,2013,83(4):715-723.
- [15] SONG D,WU L H,WANG F M,et al. The spectrum of renal thrombotic microangiopathy in lupus nephritis[J]. Arthritis Res Ther,2013,15(1):R12.
- [16] EL-HUSSEINI A,HANNAN S,AWAD A,et al. Thrombotic microangiopathy in systemic lupus erythematosus:efficacy of eculizumab[J]. Am J Kidney Dis,2015,65(1):127-130.
- [17] KLONIZAKIS P,TSELIOS K,SARANTOPOULOS A, et al. ADAMTS-13 metalloprotease abnormalities in systemic lupus erythematosus: is there a correlation with disease status? [J]. Lupus,2013,22(5):443-452.
- [18] MARTIN-RODRIGUEZ S,REVERTER J C,TASSIES D,et al. Reduced ADAMTS13 activity is associated with thrombotic risk in systemic lupus erythematosus[J]. Lupus,2015,24(11):1143-1149.
- [19] CLARK W F. Plasma exchange for renal disease:evidence and use 2011[J]. J Clin Apher,2012,27(3):112-116.
- [20] SCHNEIDER M. Thrombotic microangiopathy (TTP and HUS):advances in differentiation and diagnosis[J]. Clin Lab Sci,2007,20(4):216-220.
- [21] SADLER J E,MOAKE J L,MIYATA T,et al. Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program,2004:407-423.
- [22] SCULLY M,HUNT B J,BENJAMIN S,et al. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies[J]. Br J Haematol,2012,158(3):323-335.
- [23] VEYRADIER A. Von willebrand factor:a new target for TTP treatment? [J]. N Engl J Med,2016,374(6):583-585.
- [24] BROCKLEBANK V,KAVANAGH D. Complement C5-inhibiting therapy for the thrombotic microangiopathies: accumulating evidence, but not a panacea[J]. Clin Kidney J,2017,10(5):600-624.

(收稿日期:2019-02-18 修回日期:2019-06-23)