

p-CREB 在切割疼痛大鼠脊髓背角的变化

崔宇龙¹, 徐军美¹, 戴茹萍¹, 李昌琪², 刘丹², 杨隆秋¹, 王娟¹

(中南大学 1. 湘雅二医院麻醉科, 长沙 410011; 2. 湘雅医学院

人体解剖学与神经生物学系, 长沙 410013)

[摘要] 目的:探讨环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, p-CREB)在切割痛敏形成中的作用。方法:异氟烷麻醉大鼠后切割后足。免疫组织化学染色,荧光双标对 p-CREB 进行定位。腹腔注射吗啡和加巴喷丁,进行行为学测定和免疫组织化学染色。结果:大鼠后足切割痛可以使同侧腰段脊髓背角内 p-CREB 增加,切割后 0.5~3 h 内比较明显($P < 0.05$)。p-CREB 增加主要定位于背角神经元。腹腔注射吗啡产生镇痛作用的同时,与未切割组相比,p-CREB 没有出现增加($P > 0.05$)。加巴喷丁产生部分镇痛作用时,与未切割组相比,p-CREB 增加($P < 0.05$)。结论:切割疼痛所致的同侧脊髓背角内 p-CREB 增加与切割疼痛和痛觉过敏密切相关。吗啡对切割疼痛的镇痛作用机制与抑制脊髓背角内 CREB 的磷酸化增加有关。加巴喷丁对切割疼痛的镇痛作用机制与抑制脊髓背角内 CREB 磷酸化关系不密切。

[关键词] cAMP 反应元件结合蛋白; 术后疼痛; 痛觉过敏; 脊髓; 吗啡; 加巴喷丁

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2010.08.010

Change of p-CREB after surgical incisional pain in rat spinal cord

CUI Yulong¹, XU Junmei¹, DAI Ruping¹, LI Changqi², LIU Dan², YANG Longqiu¹, WANG Juan¹

(1. Department of Anesthesiology, Second Xiangya Hospital, Central South University,

Changsha 410011; 2. Department of Human Anatomy and Neurobiology, Xiangya

School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To explore the role of phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) in the incision-induced pain hypersensitivity. **Methods** A longitudinal incision was made in one plantar hind paw of isoflurane-anesthetized rats. Spinal cords were removed at various postoperative time after behavior test. Phosphorylation of CREB was determined by immunohistochemistry and double-labeling immunofluorescence. Morphine and gabapentin were intraperitoneally injected before the behavior test and were used to determine the interaction between phosphorylation of CREB and morphine and gabapentin. **Results** After the hind-paw incision, phosphorylation of CREB was enhanced in the ipsilateral lumbar spinal cord ($P < 0.05$). The enhancement of p-CREB was mainly in the neurons in the dorsal horn of the spinal cord. All these were shown by double-labeling technique and p-CREB was mainly in the neurons. Intraperitoneal injection of morphine prevented the increased phosphorylation of CREB in the spinal cord and inhibited the mechanical allodynia.

收稿日期 (Date of reception) 2009-12-20

作者简介 (Biography) 崔宇龙, 博士研究生, 医师, 主要从事麻醉学及疼痛基础的研究。

通信作者 (Corresponding author) 徐军美, E-mail: xujunmei@hotmail.com

基金项目 (Foundation item) 国家自然科学基金(30700790)。 This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (30700790).

ia induced by the incision ($P > 0.05$). Gabapentin didn't inhibit the phosphorylation of CREB ($P < 0.05$) but partly inhibited the mechanical allodynia. **Conclusion** Incision induces the phosphorylation of CREB in the spinal cord, and the increase of p-CREB is mainly in the neurons. Phosphorylation of CREB in the spinal cord contributes to the pain hypersensitivity induced by surgical incision.

Key words: CREB; pain, postoperative; hyperalgesia; spinal cord; morphine; gabapentin

环腺苷酸反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)是一种转录因子。它可以与cAMP反应元件(cAMP response elements, CRE)的特异性DNA序列结合,调节某些基因的转录和表达。CREB广泛分布于人体的细胞中,与DNA的结合受到磷酸化调节。p-CREB参与调节多种基因的表达,许多基因的启动序列中都有与p-CREB结合的CRE序列,如:8个碱基对的回文序列(TGACGTCA)^[1],或者CGTCA序列^[2]。其中许多基因的产物与疼痛和中枢敏感化的形成密切相关,如c-fos, bcl-2, 脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF), 降钙素基因相关肽(CGRP), 血管活性肠肽(VIP), 脑啡肽, 突触蛋白I, 神经激肽1受体, 环氧酶-2等^[3], 这些由CREB介导的基因表达在各种伤害性刺激引起的脊髓神经元长时程可塑性变化中发挥重要作用^[4]。

磷酸化CREB(phosphorylated-CREB, p-CREB)在神经病理性疼痛^[5]和炎性疼痛^[6]的病理过程中起着重要的作用。而切割痛是一种独特而常见的急性疼痛,包括静息疼痛和机械诱发疼痛^[7]。非-N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体与切割导致的疼痛以及痛觉过敏有关^[8]。切割痛可能与其他病理性疼痛有着不完全相同的机制,本研究旨在探讨p-CREB是否参与了切割痛的形成。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

健康清洁级、成年、雌性SD大鼠(体质量150~250g)由湖南农业大学实验动物中心提供。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自中国武汉博士德公司;兔抗鼠p-CREB、单克隆鼠抗

OX-42, GFAP, NeuN抗体购自美国Chemicon公司;生物素化羊抗兔IgG、免疫组织化学检测试剂盒购自美国Vector公司;羊抗鼠FITC荧光二抗、羊抗兔Cy3荧光二抗购自美国Santa Cruz公司。

1.2 免疫组织化学方法观察切割痛后p-CREB的变化

63只大鼠分为7组,每组9只,分别为未切割,切割后0.5, 1, 3, 6, 24, 72 h组大鼠。用含1.5%异氟醚的氧气麻醉后,右后足碘伏消毒,按照Brennan等^[7]的方法使用10号手术刀片从足底近端0.5 cm处向趾部行长约1 cm的纵向切口,切开皮肤至骨膜,保持肌肉肌腱及其附着点完好。压迫止血,用4-0缝线缝合皮肤2针。手术时间控制在5 min内,术毕涂红霉素眼膏。未切割组行麻醉后不手术,待其自行苏醒。于相应时间点用10%水合氯醛(8 mL/kg)腹腔注射麻醉,迅速剪开胸腔,左心室插管至升主动脉内,剪开右房。生理盐水灌注至右心室流出液基本无色,以含4%多聚甲醛的0.1 mol/L磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)300 mL灌注固定,约经30 min,待大鼠四肢变硬后,取出腰段脊髓置于上述的固定液中室温后固定4 h。然后置于含30%蔗糖的0.01 mol/L PBS(pH值7.4)中4℃至沉底。沉底标本行连续恒冷冰冻切片,脊髓片厚30 μm,每隔5张切片收集1张置于0.01 mol/L PBS中4℃保存。使用亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法(avidin-biotin-peroxidase complex method, ABC法)进行反应。选片后置于3% H₂O₂室温孵育约15 min,灭活内源性过氧化物酶,PBS洗片。用含5% BSA, 0.3% Triton X-100 1:1封闭液封闭非特异性抗原位点,2 h后直接将脊髓片从封闭液中转移到多克隆兔抗p-CREB一抗液(1:1 500)中,4℃冰箱中孵育过

夜。洗片,加入生物素化羊抗兔 IgG (1:200),室温孵育 2 h。PBS 洗片,加入生物素-卵白素-辣根过氧化物酶复合物,室温孵育 2 h。洗片,含 3% H₂O₂ 的 0.05% 的 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色液室温避光显色 3 min,适时用 PBS 终止反应,裱片。自然晾干,脱水,透明,封片。

1.3 免疫荧光双标定位

18 只大鼠分为 2 组,每组 9 只。分别为未切割、切割后 1 h 组大鼠。按 1.2 中的方法建模、取材、切片后选片、裱片,自然晾干过夜。用含 5% BSA 的 0.3% 的 Triton X-100 1:1 封闭液室温封闭 2 h,弃去封闭液,切片分为 3 组,(1)切片加入兔抗 p-CREB (1:200)与鼠抗 OX-42 (1:200) 1:1 混合液;(2)切片加入兔抗 p-CREB (1:200)与鼠抗 GFAP (1:500) 1:1 混合液;(3)切片加入兔抗 p-CREB (1:200)与鼠抗 NeuN (1:200) 1:1 混合液各 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜。

避光条件下进行以下操作:分别加入 Cy3 标记的羊抗兔 IgG (1:200)与 FITC 标记的羊抗鼠 IgG (1:200)室温孵育 2 h。洗片,晾干。用甘油与 0.01 mol/L PBS (1:1)液封片,-20 $^{\circ}$ C 暂存。荧光显微镜下观察,照片。阴性对照用正常羊血清代替兔抗 p-CREB,阳性对照为 p-CREB 阳性脊髓片。

1.4 痛觉过敏检测

36 只大鼠分为 4 组,每组 9 只。分为未切割组、切割组、吗啡腹腔注射 + 切割组、加巴喷丁腹腔注射 + 切割组。处理组腹腔注射吗啡 (10 mg/kg)或加巴喷丁 (300 mg/kg)后立即按 1.2 中的方法复制切割痛模型。分别于切割前(注射药物前)、切割后 0.5,1,3,6,24,72 h,根据 Chaplan 等^[9]描述的尼龙 von-Frey 纤维法进行行为学检测。大鼠置于金属纤维编织平台上,上罩透明塑料罩。安静适应后开始测试,用不同粗细的 von-Frey 纤维触顶大鼠切口中部边缘约 1 mm 处,保持纤维呈“S”型,持续 6 s 以上仍不出现缩足反应记为阴性。6 s 内或纤维离开时出现缩足反应记为阳性。若为阳性反应就依次递减刺激强度,若为阴性就依次增大刺激强度。记录 6 次回缩反应以及记录最后一次刺激所对应的刺激

强度。5 min 后重复 1 次。

1.5 药物对切割痛所致 p-CREB 变化的影响

36 只大鼠分为 4 组,每组 9 只。分组同痛觉过敏检测分组。按上述方法腹腔注射吗啡和加巴喷丁 1 h 后处死、灌注、取材、切片、行免疫组织化学 ABC 法染色并观察。

1.6 图像获取与分析

使用 Nikon H600L 显微镜采集图像,Motic 3.2 图像分析进行图像分析,在每个图像中,随机抽取背角内的 5 个部分用于图像分析,获得 p-CREB 阳性产物的光密度值。

1.7 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件包进行数据分析,数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;计量资料的组间比较采用方差分析和 LSD-*t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 切割疼痛时脊髓背角内 p-CREB 变化

p-CREB 阳性产物中等强度染色,呈棕色,主要分布于胞核内。p-CREB 阳性细胞主要分布在脊髓背角灰质区域。切割 0.5 h 后,切割侧脊髓背角 p-CREB 阳性产物明显增加;切割 1 h 后,增加最为明显,而后逐渐下降,24 h 后基本恢复到正常水平(图 1)。切割后 0.5 h 组、1 h 组、3 h 组,切割侧脊髓背角 p-CREB 阳性细胞光密度值明显高于未切割侧 ($P < 0.05$);切割 1 h 组、3 h 组,切割侧脊髓背角 p-CREB 阳性细胞光密度值明显高于假手术组 ($P < 0.05$,表 1)。

2.2 切割疼痛模型 p-CREB 表达定位

图 2 显示切割 1 h 后的脊髓免疫荧光双标染色。图 2A 中,红色示 p-CREB 阳性产物,绿色示神经元,黄色示 p-CREB 阳性神经元,可见多数神经元内出现了 p-CREB。而图 2B 中,红色示 p-CREB 阳性产物,绿色示星型胶质细胞,无黄色的阳性星型胶质细胞,星型胶质细胞内无 p-CREB 阳性产物。图 2C 红色示 p-CREB 阳性产物,绿色示小胶质细胞,黄色示 p-CREB 阳性小胶质细胞,可见有极少量的小胶质细胞内有 p-CREB 阳性产物。

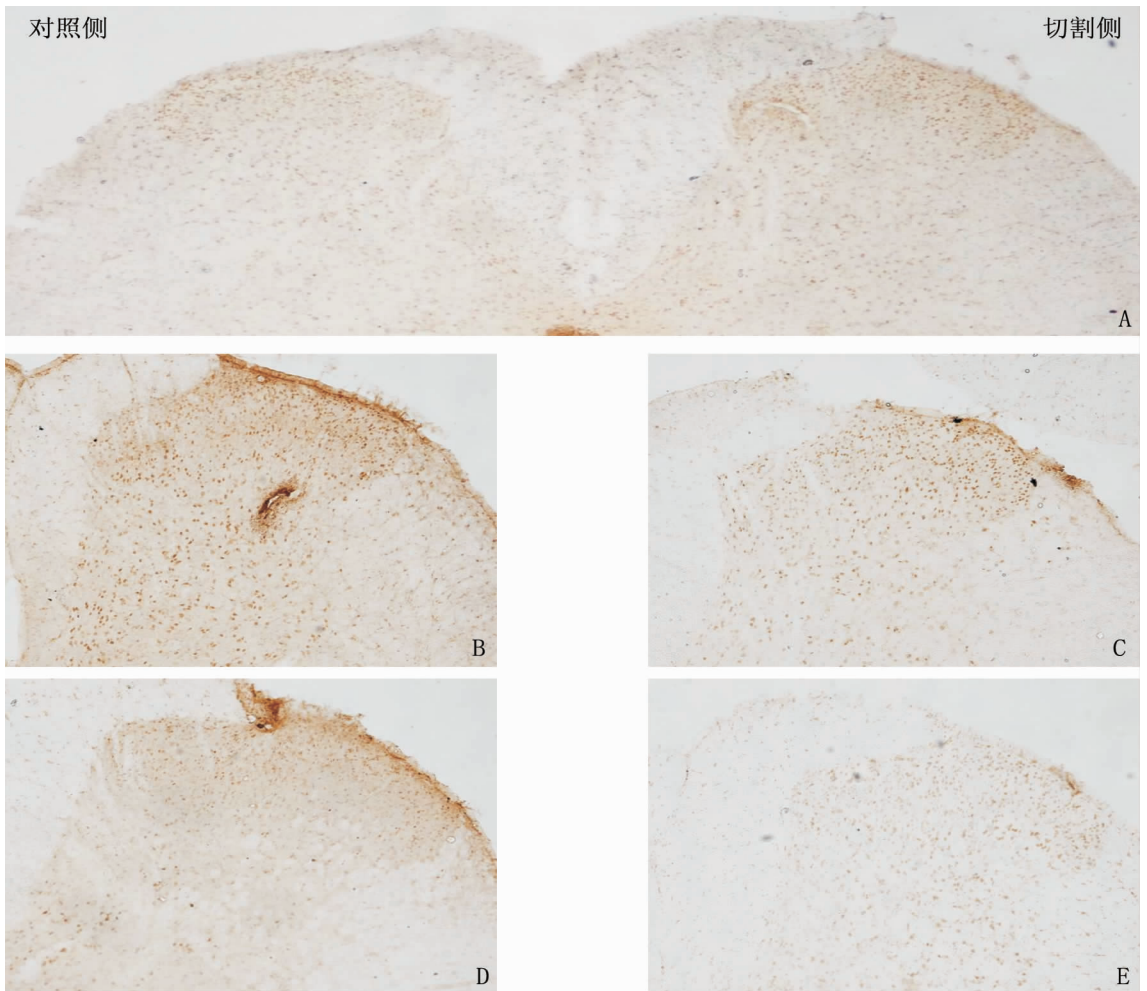


图1 后足切割后脊髓内 p-CREB 的变化。A:切割后 0.5 h; B:切割后 1 h; C:切割后 3 h; D:切割后 6 h; E:切割后 24 h。

Fig. 1 Upregulation of spinal p-CREB after hind-paw incision. A: 0.5 h after hind-paw incision; B: 1 h after hind-paw incision; C: 3 h after hind-paw incision; D: 6 h after hind-paw incision; E: 24 h after hind-paw incision.

表1 脊髓背角 p-CREB 阳性细胞光密度值($\bar{x} \pm s, n=9$)

Tab. 1 OD values of p-CREB positive cells in the spinal cord dorsal horn ($\bar{x} \pm s, n=9$)

部位	p-CREB 阳性细胞光密度值					
	假手术组	0.5 h	1 h	3 h	6 h	24 h
未切割侧	0.148 ± 0.006	0.144 ± 0.007	0.147 ± 0.011	0.147 ± 0.016	0.147 ± 0.008	0.146 ± 0.016
切割侧	0.149 ± 0.005	0.159 ± 0.015 *	0.192 ± 0.010 **	0.190 ± 0.021 **	0.150 ± 0.016	0.159 ± 0.011

与未切割侧比较, * $P < 0.05$; 与假手术组比较, # $P < 0.05$ 。

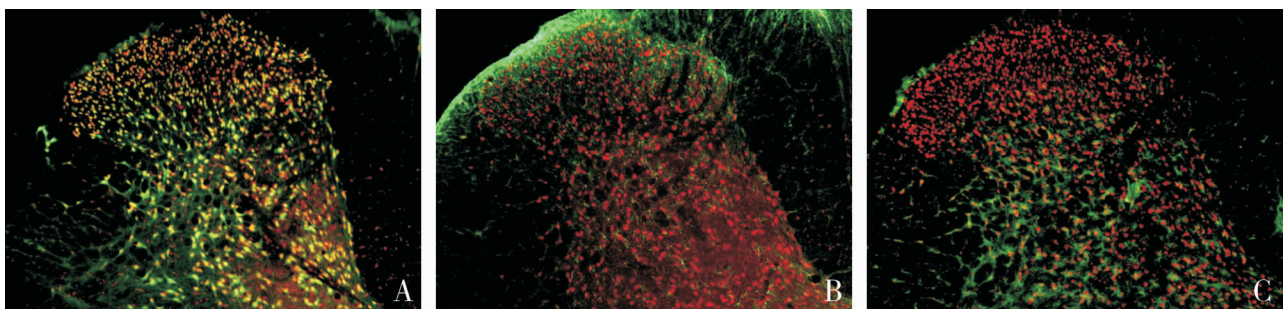


图2 脊髓内 p-CREB 免疫荧光双标定位。A:神经元; B:星型胶质细胞; C:小胶质细胞。

Fig. 2 Detection of localization of p-CREB in the spinal cord after hind-paw incision by double-labeling immunofluorescence. A: Neuron; B: Astrocyte; C: Microglia.

2.3 切割痛模型的机械性痛觉过敏

图 3 所示,腹腔注射吗啡(10 mg/kg)后 0.5~24 h,缩足阈值大于切割组($P < 0.05$);0.5,1,3 及 72 h 组缩足阈值与未切割组差异无统计学意义($P > 0.05$)。腹腔注射加巴喷丁(300 mg/kg)后 0.5~6 h,缩足阈值大于切割组($P < 0.05$),0.5~24 h 缩足阈值小于未切割组($P < 0.05$)。

2.4 吗啡与加巴喷丁对 p-CREB 的影响

吗啡可以抑制切割痛引起的脊髓背角 p-CREB 阳性产物的增加(图 4A),在其产生明显镇痛作用时,吗啡组脊髓背角内 p-CREB 阳性产物与对照侧和未切割组相比均未见增加($P > 0.05$,表 2)。加巴喷丁对切割痛引起的脊髓背角 p-CREB 阳性产物的增加基本没有影响(图 4B),与对照侧和未切割组相比,加巴喷丁组脊髓背角内 p-CREB 阳性产物可见增加($P < 0.05$,表 2)。

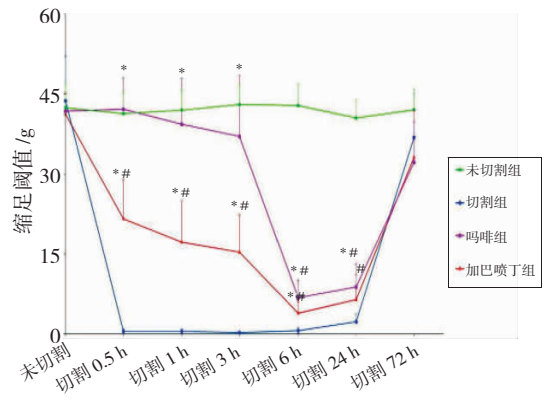


图 3 药物对切割疼痛的影响。与切割组比较, * $P < 0.05$; 与未切割组比较, # $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Medicine attenuated incisional-induced pain. Compared with the incisional group, * $P < 0.05$; compared with the sham-operated group, # $P < 0.05$.

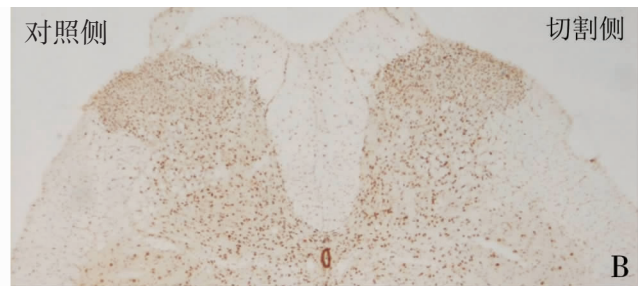
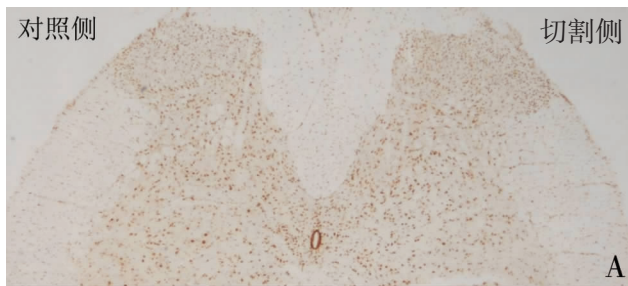


图 4 吗啡和加巴喷丁对 p-CREB 的影响(切割后 1 h)。A:吗啡组;B:加巴喷丁组。

Fig. 4 Effect of morphine and gabapentin on p-CREB (1 h after hind-paw incision). A: Morphine group; B: Gabapentin group.

表 2 切割后 1 h,脊髓背角 p-CREB 阳性细胞光密度值($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Tab. 2 OD values of p-CREB positive cells in the spinal cord dorsal horn, 1 h after hind-paw incision($\bar{x} \pm s, n = 9$)

部位	切割后 1 h 脊髓背角 p-CREB 阳性细胞光密度值			
	假手术组	生理盐水组	吗啡组	加巴喷丁组
未切割侧	0.265 ± 0.120	0.2564 ± 0.012	0.262 ± 0.005	0.2554 ± 0.011
切割侧	0.266 ± 0.014	0.296 ± 0.012 ^{*#}	0.261 ± 0.011	0.280 ± 0.003 ^{*#}

与未切割侧比较, * $P < 0.05$;与假手术组比较,# $P < 0.05$ 。

3 讨 论

目前的研究发现,p-CREB 参与介导的切割痛痛觉过敏形成中有其独特的特点。切割疼痛导致同侧腰髓背角 CREB 磷酸化增强,对侧基本没有变化。这与神经病理性疼痛^[10]和炎性疼

痛^[6]观察到的双侧 p-CREB 增加不同。

CREB 是上世纪 80 年代后期发现的一种细胞核内调控因子,是真核生物的核转录因子,有广泛的生物学功能,是细胞内多种信号通路的关键部分。它通过自身的磷酸化实现调节转录功能。其中 133 位的丝氨酸是 cAMP 依赖的蛋白激酶的磷酸化位点,可被 PKA, CAMA II, ERK 等磷酸化

而激活^[11]。其下游信号途径参与调节许多细胞内过程。CREB 家族成员作为典型的刺激诱导的转录因子已经被广泛接受。许多神经元细胞外刺激均能够激活 CREB 家族,参与中枢神经系统可塑性形成及疾病发生等复杂的生理病理过程。切割皮肤后,胞外信号激活胞内第二信使(PKA, PKC, ERK, p38 MAPK 等)^[12],后者进一步磷酸化 CREB, p-CREB 与 CRE 结合后,调节即刻早期基因和晚期基因的转录,基因转录的改变导致了蛋白质合成的相应变化,反过来又影响了痛觉信息的调制和整合。从另外一个角度来看,CREB 的磷酸化更像是用功能性磁共振观察局部血流变化一样,可以反映局部细胞功能激活状态。

CREB 是许多细胞内激酶的底物,许多信号途径都可以通过不同的激酶激活 CREB 使其磷酸化,例如 cAMP 信号通过 PKA^[13],钙离子通过钙调蛋白激酶途径^[14],神经营养因子通过 PP90 rsk 途径使 CREB 磷酸化^[15]。p-CREB 与 CRE 序列结合,调节许多产物的表达。其中很多与疼痛中枢敏感化的形成关系密切^[16]。

疼痛的药物治疗目前多为后处理,本研究采用切割前给予吗啡和加巴喷丁。因为随着疼痛分子机制的研究进展和临床经验的积累,越来越多的证据表明:在伤害刺激传入导致的中枢敏感化形成以前应用镇痛药物,可以抑制神经可塑性变化,从而达到创伤后镇痛和减少镇痛药用量的目的。吗啡通过作用于阿片受体,产生镇痛作用。阿片受体急性激活时,可以抑制腺苷酸环化酶活性,从而降低细胞内 cAMP 的浓度,显著抑制 PKA^[17]。而抑制 PKA 激活则可减少 CREB 磷酸化,从而抑制下游与疼痛相关的基因的表达,可能在基因调控水平产生镇痛作用。已经证明,这些基因的表达产物如 BDNF^[18]等与切割导致的痛觉过敏产生有关,切割疼痛引起同侧腰段脊髓中 BDNF 上升,BDNF 的启动序列中存在 CRE 序列,而 CREB 在神经病理性疼痛与炎性疼痛中又有着重要的作用,因此可以推断:p-CREB 可能在切割引起的痛觉过敏形成中起一定的作用。在尼古丁处理的切割疼痛模型中^[19],尼古丁可以抑制浅层脊髓背角 p-CREB 增加,减轻切割疼痛引起痛觉过敏,并呈剂量依赖性。因此,有充分的理由相信,CREB 磷酸化参与了切割导致的痛觉过敏的形成,并且这一机制也参与了吗啡止痛的过程。

加巴喷丁是近十几年来开始应用于疼痛治疗的,对神经病理性疼痛^[20]、偏头痛^[21]、带状疱疹后神经痛^[22]、糖尿病性神经痛^[23]有一定的疗效。加巴喷丁用于治疗神经性疼痛的确切机制还不是十分清楚,可能是通过作用于中枢神经系统内的电压门控的 N 型钙离子通道产生作用^[24]。试验发现,加巴喷丁发挥镇痛作用的同时,脊髓内的 CREB 磷酸化没有受到明显的抑制。前面提到,p-CREB 更像是局部神经元激活的一项标志,这说明加巴喷丁镇痛作用的作用机制点可能不在脊髓区域,而很可能在更高级的或者其他中枢部位。其确切机制有待进一步研究。

虽然还很难通过直接干预 CREB 的磷酸化来达到控制急性疼痛的目的,但是这一机制的发现为急性疼痛的研究提供了一项很好的神经激活的反应指标。CREB 在神经元内磷酸化增强,提示神经元在急性疼痛中枢敏感化过程中起重要作用。

参考文献:

- [1] Comb M, Birnberg N C, Seasholtz A, et al. A cyclic AMP-and phorbol ester-inducible DNA element [J]. *Nature*, 1986, 323(6086):353-356.
- [2] Craig J C, Schumacher M A, Mansoor S E, et al. Consensus and variant cAMP-regulated enhancers have distinct CREB binding properties [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(15):11719-11728.
- [3] Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(8):599-609.
- [4] White D M, Walker S, Brenneman D E, et al. CREB contributes to the increased neurite outgrowth of sensory neurons induced by vasoactive intestinal polypeptide and activity-dependent neurotrophic factor [J]. *Brain Res*, 2000, 868(1):31-38.
- [5] Liou J T, Liu F C, Hsin S T, et al. Inhibition of the cyclic adenosine monophosphate pathway attenuates neuropathic pain and reduces phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate response element-binding in the spinal cord after partial sciatic nerve ligation in rats [J]. *Anesth Analg*, 2007, 105(6):1830-1837.
- [6] Xiao C, Zhang L, Cheng Q P, et al. The activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 in spinal cord and dorsal root ganglia contributes to inflammatory pain [J]. *Brain Res*, 2008, 1215:76-86.
- [7] Brennan T J, Vandermeulen E P, Gebhart G F. Characterization of a rat model of incisional pain [J]. *Pain*, 1996,

- 64(3):493-501.
- [8] Zahn P K, Pogatzki-Zahn E M, Brennan T J. Spinal administration of MK-801 and NBQX demonstrates NMDA-independent dorsal horn sensitization in incisional pain [J]. *Pain*, 2005, 114(3):499-510.
- [9] Chaplan S R, Bach F W, Pogrel J W, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1):55-63.
- [10] Ma W, Hatzis C, Eisenach J C. Intrathecal injection of cAMP response element binding protein (CREB) antisense oligonucleotide attenuates tactile allodynia caused by partial sciatic nerve ligation [J]. *Brain Res*, 2003, 988(1/2):97-104.
- [11] Shaywitz A J, Greenberg M E. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals [J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68:821-61.
- [12] Niederberger E, Ehnert C, Gao W, et al. The impact of CREB and its phosphorylation at Ser142 on inflammatory nociception [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(1):75-80.
- [13] Gonzalez G A, Montminy M R. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133 [J]. *Cell*, 1989, 59(4):675-680.
- [14] Sun P, Enslin H, Myung P S, et al. Differential activation of CREB by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity [J]. *Genes Dev*, 1994, 8(21):2527-2539.
- [15] Xing J, Ginty D D, Greenberg M E. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase [J]. *Science*, 1996, 273(5277):959-963.
- [16] Lonze B E, Ginty D D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system [J]. *Neuron*, 2002, 35(4):605-623.
- [17] Law P Y, Wong Y H, Loh H H. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000, 40:389-430.
- [18] Li C Q, Xu J M, Liu D, et al. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) contributes to the pain hypersensitivity following surgical incision in the rats [J]. *Mol Pain*, 2008, 4:27.
- [19] Rowley T J, Payappilly J, Lu J, et al. The antinociceptive response to nicotinic agonists in a mouse model of postoperative pain [J]. *Anesth Analg*, 2008, 107(3):1052-1057.
- [20] Backonja M M, Serra J. Pharmacologic management part 1: better-studied neuropathic pain diseases [J]. *Pain Med*, 2004, Suppl 1:S28-S47.
- [21] Mathew N T, Rapoport A, Saper J, et al. Efficacy of gabapentin in migraine prophylaxis [J]. *Headache*, 2001, 41(2):119-128.
- [22] Irving G, Jensen M, Cramer M, et al. Efficacy and tolerability of gastric-retentive gabapentin for the treatment of postherpetic neuralgia: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial [J]. *Clin J Pain*, 2009, 25(3):185-192.
- [23] Rodríguez M J, Díaz S, Vera-Llonch M, et al. Cost-effectiveness analysis of pregabalin versus gabapentin in the management of neuropathic pain due to diabetic polyneuropathy or post-herpetic neuralgia [J]. *Curr Med Res Opin*, 2007, 23(10):2585-2596.
- [24] Hendrich J, Van Minh A T, Hebllich F, et al. Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2 delta ligand gabapentin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(9):3628-3633.

(本文编辑 郭征)