

清脑止痛胶囊对偏头痛模型大鼠热敏通道 TRPV1/TRPA1 通路的影响

周莹雪, 包雪鸮, 金海燕*

中国人民解放军九六四医院 神经内科, 吉林 长春 130051

摘要: 目的 基于热敏通道瞬时受体电位通道香草醛亚型1 (TRPV1)/瞬时受体电位销蛋白1 (TRPA1) 通路探究清脑止痛胶囊治疗偏头疼的作用机制。方法 取 Wistar 大鼠 60 只随机分为对照组、模型组、正天丸组(阳性对照, $1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)和清脑止痛胶囊低、中、高剂量(0.35 、 0.70 、 $1.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组。除对照组外, 其余各组均用利血平 $0.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ sc 注射法建立偏头痛大鼠模型。各组均于造模成功后 ig 给予相应剂量药物, 每天1次, 连续7d。末次给药结束12h后, 观察各组大鼠挠头次数及行为学变化; 采用 vonFrey 法测试大鼠眶周疼痛阈值; 酶联免疫法检测脑组织中白细胞介素-1 (IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、5-羟色胺 (5-HT) 水平变化; 试剂盒法检测脑组织中一氧化氮 (NO)、钙离子 (Ca^{2+}) 水平; 免疫荧光法检测 TRPV1、TRPA1 与神经元微管相关蛋白2 (MAP2) 在脑组织中共表达水平; 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法检测脑组织中 TRPV1/TRPA1 通路蛋白、降钙素基因相关肽 (CGRP)、环氧酶2 (COX-2) 表达水平。结果 与模型组比较, 清脑止痛胶囊低、中、高剂量组及正天丸组大鼠挠头次数, 脑干组织 NO、 Ca^{2+} 、IL-1 及 TNF- α 水平, TRPV1、TRPA1 分别与 MAP2 阳性神经元共表达水平, TRPV1、TRPA1、CGRP、COX-2 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), 眶周疼痛阈值、5-HT 表达显著升高 ($P < 0.05$), 且上述指标变化均呈剂量相关性, 高剂量组与正天丸组相比差异无统计学意义。结论 清脑止痛胶囊可能通过降低 TRPV1/TRPA1 通路介导的疼痛信号传导, 改善偏头痛大鼠疼痛症状。

关键词: 清脑止痛胶囊; 瞬时受体电位通道香草醛亚型1; 瞬时受体电位销蛋白1; 偏头痛; 神经病理性疼痛

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 03-0481-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.03.011

Effect of Qingnao Zhitong Jiaonang on TRPV1/TRPA1 pathway in migraine model rats

ZHOU Yingxue, BAO Xueying, JIN Haiyan

Department of Neurology, 964 Hospital of Chinese people's Liberation Army, Jilin 130051, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Qingnao Zhitong Jiaonang (QNZTJN) in the treatment of migraine based on transient receptor potential Vanilloid-1 (TRPV1)/transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1) pathway. **Methods** A total of 60 Wistar rats were randomly divided into control group, model group, positive control group (Zhengtian Pill, $1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), QNZTJN low, middle, and high dose (0.35 , 0.70 , $1.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups. Except the control group, the other groups were injected with reserpine $0.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ subcutaneously to establish migraine rat models. After successful modeling, the rats in each group were given corresponding doses of drugs by gavage for seven days, once a day. At 12 hours after the end of the last administration, the number of head scratching and behavioral changes of rats in each group were observed; the threshold of periorbital pain was measured by vonFrey method; the levels of interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in brain tissue were detected by enzyme linked immunosorbent assay; the levels of nitric oxide (NO) and calcium ion (Ca^{2+}) in brain tissue were detected by kit method; the co expression levels of TRPV1, TRPA1 with neuronal microtubule associated protein 2 (MAP2) were detected by immunofluorescence; the expression levels of TRPV1/TRPA1 pathway protein, calcitonin gene related peptide (CGRP) and cyclooxygenase 2 (COX-2) were detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, the number of head scratching, the levels of NO, Ca^{2+} , IL-1 and TNF- α , the co-expression levels of TRPV1 and TRPA1 with MAP2 positive neurons, and the protein expression of TRPV1, TRPA1, CGRP and COX-2 decreased in the QNZTJN low, medium, high dose groups and

收稿日期: 2021-06-16

基金项目: 吉林省科技发展规划项目、清脑止痛胶囊大品种二次开发(20140310001YY)

第一作者: 周莹雪(1980—),女,吉林白城,硕士研究生,主治医师,研究方向为头痛及脑血管病。Tel: (0431)86988942 E-mail:etn817@163.com

*通信作者: 金海燕(1977—),女,吉林榆树,硕士研究生,副主任医师,研究方向为头痛及脑血管病。E-mail:1240272860@qq.com

positive control group ($P < 0.05$), the periorbital pain threshold and expression of 5-HT increased ($P < 0.05$), and the changes of above indexes in QNZTJN groups were dose-dependent. There was no significant difference between QNZTJN high-dose group and positive control group. **Conclusion** QNZTJN may improve the pain symptoms of migraine rats by reducing the pain signal transduction mediated by TRPV1/TRPA1 pathway.

Key words: Qingnao Zhitong Jiaonang; transient receptor potential Vanilloid-1; transient receptor potential ankyrin-1; migraine; neuropathic pain

偏头痛是一种慢性、反复发作的神经系统疾病^[1]。偏头痛发病率、复发率及致残率较高,严重影响患者生活质量^[2]。偏头痛发病机制复杂、不明确,且目前尚无特效药物治疗^[3]。清脑止痛胶囊由天麻、川芎、蒺藜、枸杞子、香附、牛膝、丹参、藁本、熟地黄、细辛等中药组成,具有祛风清脑、化瘀止痛功效,近来研究报道,清脑止痛胶囊对偏头疼有一定的治疗作用^[4]。但清脑止痛胶囊改善偏头痛疼痛症状的分子生物学机制还不明确,这不利于其开发应用。瞬时受体电位通道香草醛亚型-1(transient receptor potential vanilloid-1, TRPV1)和瞬时受体电位销蛋白1(transient receptor potential ankyrin-1, TRPA1)能感受痛觉刺激信号传递,参与机械性、热和化学性刺激信号的识别和传递过程,进而参与多种神经病理性疼痛疾病发生过程^[5]。但 TRPV1/TRPA1 通路是否介导偏头痛病理性疼痛过程报道较少。本研究建立大鼠偏头痛模型,探究清脑止痛胶囊干预治疗过程中 TRPV1/TRPA1 通路蛋白的变化,以期阐明偏头痛发病过程中的可能机制,并为清脑止痛胶囊的开发应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Wistar 大鼠 60 只,体质量 180~200 g, 6~7 周龄,购自吉林大学实验动物中心,实验动物生产许可证号为 SCXK(吉)2020-0003。本实验由吉林大学基础医院机构动物护理和使用委员会(IACUC)批准(编号 105061),并遵循《实验动物使用指南》且符合 3R 原则。

1.2 药物及主要试剂

清脑止痛胶囊(吉林敖东洮南药业股份有限公司,批号 Z20200035,规格为每粒 0.45 g);正天丸(华润三九医药股份有限公司,批号 Z20200025);利血平(上海宝曼生物科技有限公司,货号 D0792);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海爱必信生物科技有限公司,货号 abs9217);白细胞介素-1(IL-1)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海研生实业有限公司,货号 YS-E8809);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA 试剂

盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号 E-EL-R0019);5-羟色胺(5-HT)ELISA 试剂盒(武汉益普生物科技有限公司,货号 CK-E30326);一氧化氮(NO)ELISA 试剂盒(武汉益普生物科技有限公司,货号 CK-E40008);钙离子(Ca^{2+})检测试剂盒(上海将来实业股份有限公司,货号 JL13527);小鼠抗 TRPV1、兔抗 TRPA1、鸡抗微管相关蛋白 2(MAP2)、降钙素基因相关肽(CGRP)、环氧化酶 2(COX-2)等抗体(均购自美国 abcam 公司,货号分别为 ab203103、ab58844、ab5392、ab231722、ab179800)。

1.3 主要仪器

自动凝胶成像分析系统(美国 Tanon 公司,货号 Taton-4200);视频摄像机(深圳市瑞安科技有限公司,型号 Panasonic WV-CP300);荧光显微镜(南京贝登医疗股份有限公司,型号 CX43);电子 Von Frey 测痛仪(上海阮隆科技发展有限公司,型号 BW-EVF2393)。

2 方法

2.1 大鼠偏头痛模型建立及分组给药

参照文献报道^[6-7]方法,取 Wistar 大鼠于右肩 sc 利血平溶液 $0.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天 1 次,连续 14 d,建立大鼠偏头痛模型。将视频摄像机放在大鼠笼 1 m 处,观察大鼠 180 min 挠头次数,若挠头次数大于正常大鼠挠头次数 2 倍,视为造模成功。共造模成功 50 只,随机分为模型组、正天丸组(阳性对照, $1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)和清脑止痛胶囊低、中、高剂量($0.35, 0.70, 1.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[8]组,每组 10 只。另取 10 只大鼠,右肩 sc 等量生理盐水,作为对照组。各组均于造模成功后开始给药,按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 给药,对照组及模型组 ig 给予等量生理盐水,每天 1 次,连续 7 d。

2.2 大鼠行为学观察及挠头次数计算

于给药期间观察各组大鼠行为学变化,末次给药 12 h 后,大鼠单笼饲养,并将视频摄像机放在大鼠笼 1 m 处,观察 180 min 内大鼠挠头次数。

2.3 vonFrey 法测试大鼠眶周疼痛阈值^[9]

各组大鼠于末次给药 12 h 后,用电子 von Frey 测痛仪的硬头端垂直轻触大鼠面部眼眶周皮肤,大

鼠头部快速缩回,仪器自动记录痛阈,每只大鼠测试3次,取平均值进行计算。

2.4 大鼠脑组织标本采集

各组大鼠断头处死,取脑干组织,分成2部分,一部分置于-80℃冰箱保存备用,一部分置于液氮中保存备用。

2.5 试剂盒法检测脑干组织 NO、Ca²⁺水平

取部分脑干组织,匀浆、离心后取上清液,按 NO、Ca²⁺试剂盒说明书检测脑干组织中 NO、Ca²⁺水平。

2.6 ELISA 法检测脑干组织 IL-1、TNF-α、5-HT 水平

取部分脑干组织,用组织匀浆器匀浆,离心后取上清液,按 IL-1、TNF-α、5-HT ELISA 试剂盒说明书检测脑干组织中 IL-1、TNF-α、5-HT 水平。

2.7 免疫荧光共定位法检测 TRPV1、TRPA1 分别与 MAP2 阳性共表达水平

取“2.4”项下液氮中保存的脑干组织,进行常规透明、浸蜡、包埋后切成 20 μm 切片,经室温风干、0.5% 曲拉通 (Triton X-100) 透化、10% 山羊血清封闭后,加入一抗抗体 (小鼠抗 TRPV1/兔抗 TRPA1、鸡抗 MAP2,稀释倍数均为 1:500) 于 4℃ 孵育过夜后,加入二抗 (TRITC 标记的山羊抗兔 IgG、TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG、FITC 标记的山羊抗鸡 IgG,稀释倍数为 1:200) 进行孵育显色后,用荧光显微镜观察、拍照。用 Image Pro Plus 6.0 图像处理系统计算荧光面积,计算 TRPV1、TRPA1 分别与 MAP2 阳性共表达率 (荧光染色面积/总面积)。

2.8 Western blotting 法检测各组大鼠脑干组织 TRPV1、TRPA1、CGRP、COX-2 蛋白相对表达水平

取“2.4”项中-80℃冰箱保存的脑干组织 200 mg,在 4℃ 解冻后,加入裂解液匀浆,离心后取上清液,BCA 试剂盒测定蛋白浓度后,取 100 μg 蛋白进行电泳、转膜,加入一抗 [TRPV1、TRPA1、CGRP、COX-2 (稀释倍数 1:3 000)、β-actin (稀释倍数 1:2 000)] 4℃ 孵育过夜后,加入羊抗兔二抗 (稀释倍数 1:2 000) 37℃ 孵育 4 h 后,用增强化学发光法显色,以化学发光仪观察条带并拍照,并以 Image J 软件分析各组蛋白相对表达水平。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件行数据统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较进行单因素方差分析,进一步两组间比较行 SNK-*q* 检验。

3 结果

3.1 清脑止痛胶囊对大鼠行为变化的影响

对照组大鼠饮食、活动及精神状态正常。模型组大鼠毛发竖立、饮食活动减少,精神较萎靡。清脑止痛胶囊低、中、高剂量组及正天丸组大鼠饮食及活动量较模型组增加。

3.2 清脑止痛胶囊对大鼠挠头次数及眼眶周疼痛阈值的影响

与对照组比较,模型组大鼠挠头次数显著增加 ($P < 0.05$),眼眶周疼痛阈值显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,清脑止痛胶囊低、中、高剂量组及正天丸组大鼠挠头次数显著减少 ($P < 0.05$),眼眶周疼痛阈值显著升高 ($P < 0.05$),且清脑止痛胶囊作用呈剂量相关性,高剂量组与正天丸组相比差异无统计学意义。见表 1。

表 1 各组大鼠挠头次数及眼眶周疼痛阈值比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Comparison of head scratching times and periorbital pain threshold of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	挠头次数	疼痛阈值/g
对照	—	50.38±5.00	8.98±0.40
模型	—	155.19±15.44*	3.09±0.22*
清脑止痛	0.35	136.71±13.49* [#]	4.53±0.39* [#]
胶囊	0.70	94.11±9.32* [#] △	6.06±0.52* [#] △
	1.40	69.12±6.43* [#] △	7.06±0.62* [#] △▲
正天丸	1.80	69.16±6.50* [#] △▲	7.07±0.60* [#] △▲

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与清脑止痛胶囊低剂量组比较: △ $P < 0.05$; 与清脑止痛胶囊中剂量组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs QNZTJN low dose group; ▲ $P < 0.05$ vs QNZTJN middle dose group

3.3 清脑止痛胶囊对大鼠脑组织 NO、Ca²⁺水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠脑组织 NO、Ca²⁺水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,清脑止痛胶囊低、中、高剂量组及正天丸组大鼠脑组织 NO、Ca²⁺水平显著降低 ($P < 0.05$),且清脑止痛胶囊作用呈剂量相关性,高剂量组与正天丸组相比差异无统计学意义。见表 2。

3.4 清脑止痛胶囊对大鼠脑组织 IL-1、TNF-α、5-HT 表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠脑组织 IL-1、TNF-α 水平显著升高 ($P < 0.05$),5-HT 表达显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,清脑止痛胶囊低、中、高剂量组及正天丸组大鼠脑组织 IL-1、TNF-α 显著降

低($P<0.05$), 5-HT 表达显著升高($P<0.05$), 且清脑止痛胶囊作用呈剂量相关性, 高剂量组与正天丸组相比差异无统计学意义, 见表3。

3.5 清脑止痛胶囊对大鼠脑组织 TRPV1、TRPA1 分别与 MAP2 共阳性表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠脑组织 TRPV1、TRPA1 与 MAP2 阳性神经元共表达水平显著增高($P<0.05$)。与模型组比较, 清脑止痛胶囊低、中、高剂量组及正天丸组大鼠脑组织 TRPV1、TRPA1 与 MAP2 阳性神经元共表达水平显著降低($P<0.05$), 且清脑止痛胶囊作用呈剂量相关性, 高剂量组与正天丸组相比差异无统计学意义。见图1、2和表4。

表2 各组脑组织大鼠 NO、Ca²⁺ 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 2 Comparison of NO and Ca²⁺ levels in brain tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	NO/ (μmol·g ⁻¹)	Ca ²⁺ / (mmol·L ⁻¹)
对照	—	1.05±0.27	0.31±0.01
模型	—	4.16±0.23*	0.84±0.06*
清脑止痛 胶囊	0.35	3.54±0.26*#	0.70±0.05*#
	0.70	2.29±0.22*#△	0.59±0.05*#△
	1.40	1.79±0.24*#△▲	0.41±0.04*#△▲
正天丸	1.80	1.82±0.25*#△▲	0.42±0.05*#△▲

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与清脑止痛胶囊低剂量组比较: △ $P<0.05$; 与清脑止痛胶囊中剂量组比较: ▲ $P<0.05$

* $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group; △ $P<0.05$ vs QNZTJN low dose group; ▲ $P<0.05$ vs QNZTJN middle dose group

表3 各组大鼠脑组织 IL-1、TNF-α、5-HT 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 3 Comparison of expression levels of IL-1, TNF-α and 5-HT in brain tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	IL-1/ (ng·g ⁻¹)	TNF-α/ (pg·mg ⁻¹)	5-HT/ (ng·mg ⁻¹)
对照	—	206.89±17.24	2.15±0.17	6.95±0.57
模型	—	405.16±32.21*	6.74±0.56*	3.14±0.36*
清脑止	0.35	394.36±30.14*#	6.01±0.44*#	3.96±0.34*#
痛胶囊	0.70	346.08±18.54*#△	4.59±0.25*#△	4.79±0.39*#△
	1.40	270.47±19.72*#△▲	3.02±0.26*#△▲	5.52±0.46*#△▲
正天丸	1.80	266.97±15.65*#△▲	3.12±0.35*#△▲	5.77±0.35*#△▲

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与清脑止痛胶囊低剂量组比较: △ $P<0.05$; 与清脑止痛胶囊中剂量组比较: ▲ $P<0.05$

* $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group; △ $P<0.05$ vs QNZTJN low dose group; ▲ $P<0.05$ vs QNZTJN middle dose group

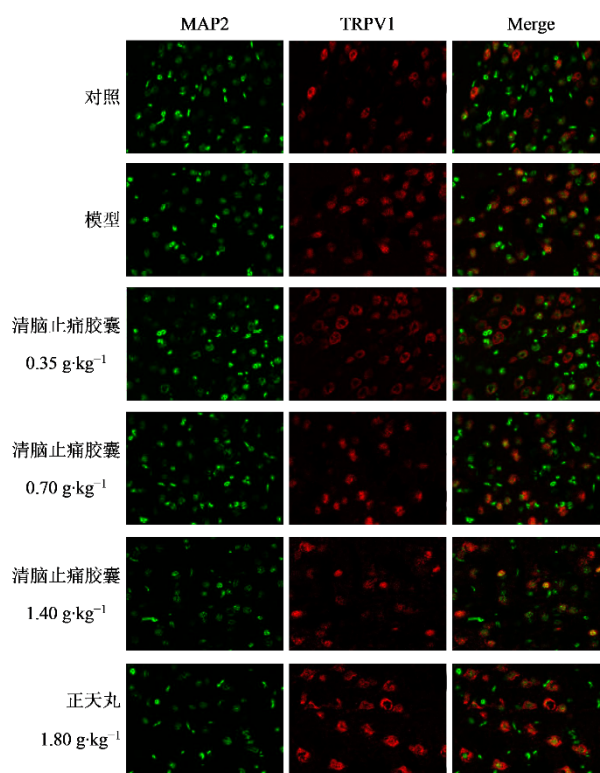


图1 大鼠脑组织 TRPV1 与 MAP2 阳性共表达免疫荧光染色图(×200)

Fig. 1 Immunofluorescence staining of positive co-expression of TRPV1 and MAP2 in rat brain tissue (×200)

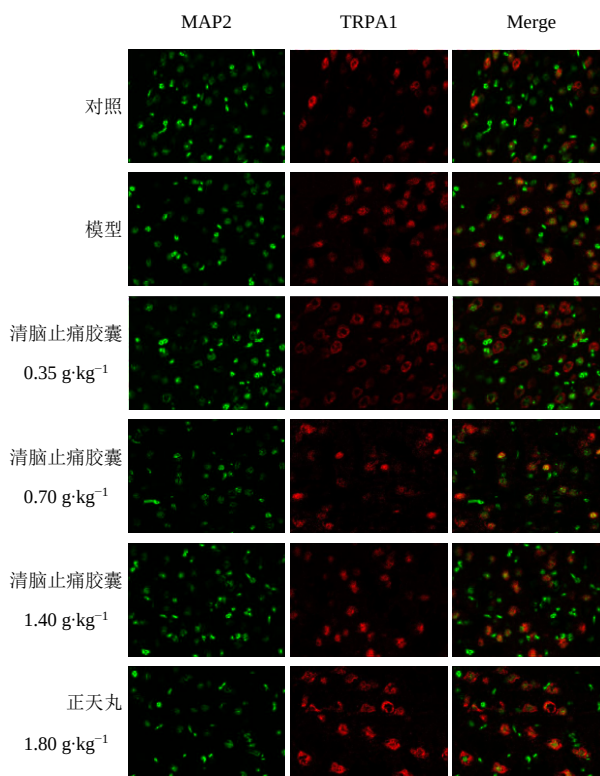


图2 大鼠脑组织 TRPA1 与 MAP2 阳性共表达免疫荧光染色图(×200)

Fig. 2 Immunofluorescence staining of positive co-expression of TRPA1 and MAP2 in rat brain tissue (×200)

3.6 清脑止痛胶囊对大鼠脑组织 TRPV1、TRPA1、CGRP、COX-2 蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠脑组织 TRPV1、

表4 各组大鼠脑组织 TRPV1、TRPA1 与 MAP2 阳性共表达率比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	TRPV1 ⁺ MAP2 ⁺ /%	TRPA1 ⁺ MAP2 ⁺ /%
对照	—	31.01±3.24	32.05±3.13
模型	—	58.91±5.29*	59.74±5.56*
清脑止痛	0.35	51.36±5.14*#	52.03±5.04*#
胶囊	0.70	46.38±4.21*#△	46.59±4.25*#△
	1.40	38.47±3.75*#△▲	37.32±3.21*#△▲
正天丸	1.80	39.97±3.65*#△▲	38.92±3.35*#△▲

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与清脑止痛胶囊低剂量组比较: △ $P<0.05$; 与清脑止痛胶囊中剂量组比较: ▲ $P<0.05$

* $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group; △ $P<0.05$ vs QNZTJN low dose group; ▲ $P<0.05$ vs QNZTJN middle dose group

表5 各组大鼠脑组织 TRPV1、TRPA1、CGRP、COX-2 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TRPV1/ β -actin	TRPA1/ β -actin	CGRP/ β -actin	COX-2/ β -actin
对照	—	1.09±0.11	1.16±0.13	1.19±0.12	1.06±0.13
模型	—	2.74±0.28*	2.83±0.18*	2.73±0.17*	2.98±0.19*
清脑止痛胶囊	0.35	2.01±0.23*#	2.42±0.14*#	2.32±0.16*#	2.43±0.16*#
	0.70	1.72±0.17*#△	2.11±0.20*#△	2.01±0.18*#△	1.98±0.19*#△
	1.40	1.42±0.14*#△▲	1.82±0.18*#△▲	1.75±0.17*#△▲	1.55±0.16*#△▲
正天丸	1.80	1.46±0.14*#△▲	1.84±0.18*#△▲	1.71±0.18*#△▲	1.48±0.17*#△▲

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与清脑止痛胶囊低剂量组比较: △ $P<0.05$; 与清脑止痛胶囊中剂量组比较: ▲ $P<0.05$

* $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group; △ $P<0.05$ vs QNZTJN low dose group; ▲ $P<0.05$ vs QNZTJN middle dose group

4 讨论

偏头痛为世界第6大流行性和第2大致残性疾病^[10]。偏头痛常呈一侧或两侧性疼痛,常伴有恶心、严重的抑郁和焦虑等精神疾病及自主神经系统功能障碍性疾病^[11]。偏头痛病理机制复杂,常涉及分子和离子通道、炎症途径、代谢变化和生物学过程^[12]。利血平可降低并耗竭机体内5-HT水平而诱发偏头痛,Huang等^[13]研究证实偏头痛疼痛发作期5-HT浓度降低,可引起内源性血管扩张递质NO水平升高而导致血管扩张、血管周围神经纤维有害神经递质自外周向丘脑和皮层的传递,加重偏头痛疼痛症状。本研究经sc利血平建立大鼠偏头痛模型

TRPA1、CGRP、COX-2 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,清脑止痛胶囊低、中、高剂量组及正天丸组大鼠 TRPV1、TRPA1、CGRP、COX-2 蛋白表达显著降低($P<0.05$),且清脑止痛胶囊作用呈剂量相关性,高剂量组与正天丸组相比差异无统计学意义。结果见图3、表5。

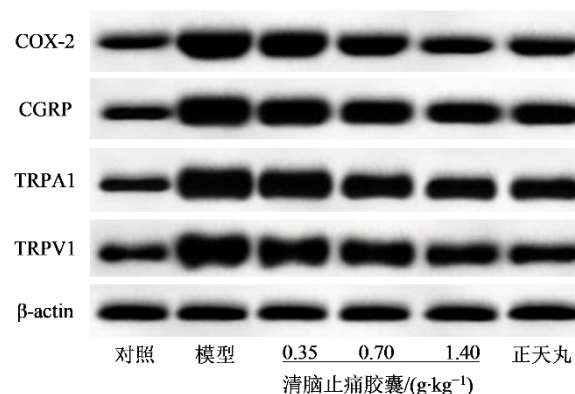


图3 各组大鼠脑组织 TRPV1、TRPA1、CGRP、COX-2 蛋白表达

Fig. 3 TRPV1, TRPA1, CGRP, COX-2 protein expression in rat brain tissue in each group

后发现,随着5-HT水平降低,大鼠运动、行走行为减少,精神出现萎靡,眶周疼痛阈值降低,且挠头次数、脑组织NO水平均显著高于对照组,出现与文献^[6]偏头痛动物模型相似症状,提示偏头痛动物模型造模成功。另外,近来研究发现CGRP及COX-2在偏头痛中起关键作用。Wattiez等^[14]及Dubowchik等^[15]发现CGRP参与外周神经源性血管舒张,与痛觉的中枢、外周敏化和偏头痛畏光现象关系密切,而用CGRP受体拮抗剂MK-825和olcegepant可显著降低偏头痛患者头疼症状,并认为CGRP可能是偏头痛潜在病因。Li等^[16]及Dong等^[17]发现偏头痛患者血浆中COX-2及促炎介

质 IL-1、TNF- α 等表达升高, COX-2 抑制剂可降低偏头痛模型动物中 IL-1、TNF- α 表达并预防或降低偏头痛的严重程度, 提示 CGRP 及 COX-2 与偏头痛关系密切。本研究也在偏头痛大鼠脑组织中检测到 CGRP、COX-2 蛋白表达及促炎介质 IL-1、TNF- α 表达的升高, 进一步证实偏头痛模型造模成功。

西医治疗偏头痛以镇静止痛为主, 但副作用较多, 中医治疗偏头痛具有疗效确切、辨证施治、安全性高等多种优势而受到临床研究者的重视^[18]。清脑止痛胶囊方中川芎及天麻是治疗偏头痛的常用药物^[7], 且本课题前期研究证实, 清脑止痛胶囊可通过升高 5-HT、 β -内啡肽(β -EP), 抑制 NO、CGRP、IL-1、TNF- α 释放及 COX-2/核转录因子- κ B(NF- κ B) 通路活化等, 来改善脑血管的功能障碍及神经源性炎症反应, 缓解偏头痛症状^[19]。本研究发现随着清脑止痛胶囊各剂量组及正天丸组大鼠脑组织 5-HT 蛋白表达升高, 大鼠精神萎靡、活动减少有所缓解, 眶周疼痛阈值升高, 且挠头次数、脑组织 NO、IL-1、TNF- α 水平、CGRP 及 COX-2 蛋白表达进一步降低, 且清脑止痛胶囊各剂量组上述指标呈剂量相关性, 进一步证实清脑止痛胶囊对偏头痛有一定的缓解作用, 但清脑止痛胶囊改善偏头痛症状的分子机制还不甚明确, 本研究对此进行深入探究。

近年来研究证实, TRPV1/TRPA1 通路可介导多种神经病理性疼痛过程, 在偏头痛的病理生理中起着至关重要的作用^[20]。Demartini 等^[21]及 Ambrosino 等^[22]等发现, TRPV1 及 TRPA1 可表达于皮肤的神经轴突、感觉神经元上, 参与疼痛信号的接收、应答和传导, TRPV1 及 TRPA1 通道激活后, 能增强感觉神经元兴奋性, 通过调控 Ca^{2+} 的水平介导疼痛发生, 并将疼痛信号及动作电位传递至脊髓和大脑中的疼痛处理中枢, 且组织损伤、感染、炎症、缓激肽等多种伤害性物质刺激, 可上调神经元中 TRPV1、TRPA1 的表达, 并增加 TRPV1、TRPA1 向肤神经末梢的轴浆运输来降低疼域。Liao 等^[20]发现 CGRP 及 COX-2、TRPV1、TRPA1 在偏头痛模型大鼠脑组织神经元中表达增高, 且耳廓电针刺激可降低 CGRP 及 COX-2、TRPV1、TRPA1 在神经元中阳性表达水平, 来缓解偏头痛大鼠神经病理性疼痛及抑郁症状, 提示 TRPV1/TRPA1 通路激活参与偏头痛病理过程。本研究也检测到偏头痛大鼠脑组织 TRPV1、TRPA1 蛋白表达水平及 Ca^{2+} 水平均显著高于对照组, 且免疫荧光共定位检测到 TRPV1、TRPA1 阳性表达于 MAP2 阳性神经元中, 提示 TRPV1/TRPA1

通路可能介导 Ca^{2+} 信号激活, 参与偏头痛神经疼痛的传导。而清脑止痛胶囊各剂量组及正天丸组大鼠脑组织中 TRPV1、TRPA1 蛋白表达水平及 Ca^{2+} 水平呈剂量相关性降低, 且 TRPV1、TRPA1 在 MAP2 阳性神经元中表达降低, 并伴随着炎症释放及疼痛症状的减缓, 提示清脑止痛胶囊改善偏头痛症状的作用, 可能与阻断 TRPV1/TRPA1 介导的疼痛信号传导有关。

清脑止痛胶囊可能通过降低 TRPV1/TRPA1 通路介导的疼痛信号传导, 来改善偏头痛疼痛症状。但 TRPV1/TRPA1 介导疼痛信号发生及传导的靶向调控机制复杂且不明确, 本研究未设置通路抑制剂进行验证, 这有待后续研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Speck R M, Collins E M, Lombard L, et al. A qualitative study to assess the content validity of the 24-hour migraine quality of life questionnaire in patients with migraine [J]. Headache, 2020, 60(9): 1982-1994.
- [2] Barra M, Dahl F A, Vetvik K G, et al. A Markov chain method for counting and modelling migraine attacks [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 3631.
- [3] 董雪佳, 江名芳. 偏头痛药物治疗新进展 [J]. 中华神经科杂志, 2020, 53(5): 385-390.
Dong X J, Jiang M F. New progress in migraine drug treatment [J]. Chin J Neurol, 2020, 53(5): 385-390.
- [4] 林伟. 清脑止痛胶囊对老年偏头痛患者脑动脉血流速度与血浆 5-羟色胺的影响 [J]. 中国民康医学, 2019, 31(9): 1-3, 6.
Lin W. Effects of Qingnaozhitong capsules on cerebral arterial blood flow velocity and plasma serotonin in elderly patients with migraine [J]. Med J Chin People's Heal, 2019, 31(9): 1-3, 6.
- [5] Fu W S, Wessel C R, Taylor B K. Neuropeptide Y tonically inhibits an NMDAR $\rightarrow$ AC1 $\rightarrow$ TRPA1/TRPV1 mechanism of the affective dimension of chronic neuropathic pain [J]. Neuropeptides, 2020, 80: 102024.
- [6] 王晶, 吴莎, 许永崧, 等. 芎附方对利血平致偏头痛模型小鼠的药效学研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(12): 2970-2973.
Wang J, Wu S, Xu Y S, et al. Pharmacodynamics research of Xiongfu Formula on migraine mice induced by reserpine [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2019, 37(12): 2970-2973.
- [7] 吴燕川, 许永崧, 贺蕊, 等. 吴茱萸汤各成分在正常和偏头痛模型大鼠肠吸收差异的研究 [J]. 中国中药杂志,

- 2018, 43(8): 1682-1691.
- Wu Y C, Xu Y S, He R, et al. Difference in intestinal absorption of Wuzhuyu Decoction between normal and migraine model rats [J]. China J Chin Mater Med, 2018, 43(8): 1682-1691.
- [8] 曲极冰, 董秀华, 阎鑫, 等. 清脑止痛胶囊对硝酸甘油偏头痛模型大鼠的影响机制 [J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(4): 529-532.
- Qu J B, Dong X H, Yan X, et al. Effect of QNZTJN on migraine in rats induced by nitroglycerin [J]. Chin J Lab Diagn, 2016, 20(4): 529-532.
- [9] Long T, He W, Pan Q, et al. Microglia P2X4 receptor contributes to central sensitization following recurrent nitroglycerin stimulation [J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 245.
- [10] Korolainen M A, Tuominen S, Kurki S, et al. Burden of migraine in Finland: Multimorbidity and phenotypic disease networks in occupational healthcare [J]. J Headache Pain, 2020, 21(1): 8.
- [11] Clemow D B, Baygani S K, Hauck P M, et al. Lasmiditan in patients with common migraine comorbidities: A *post hoc* efficacy and safety analysis of two phase 3 randomized clinical trials [J]. Curr Med Res Opin, 2020, 36(11): 1791-1806.
- [12] Demartini C, Greco R, Zanaboni A M, et al. Nitroglycerin as a comparative experimental model of migraine pain: From animal to human and back [J]. Prog Neurobiol, 2019, 177: 15-32.
- [13] Huang P C, Yang F C, Chang C M, et al. Targeting the 5-HT_{1B/1D} and 5-HT_{1F} receptors for acute migraine treatment [J]. Prog Brain Res, 2020, 255: 99-121.
- [14] Wattiez A S, Sowers L P, Russo A F. Calcitonin gene-related peptide (CGRP): Role in migraine pathophysiology and therapeutic targeting [J]. Expert Opin Ther Targets, 2020, 24(2): 91-100.
- [15] Dubowchik G M, Conway C M, Xin A W. Blocking the CGRP pathway for acute and preventive treatment of migraine: The evolution of success [J]. J Med Chem, 2020, 63(13): 6600-6623.
- [16] Li C, Zhu Q S, He Q, et al. Plasma levels of cyclooxygenase-2 (COX-2) and visfatin during different stages and different subtypes of migraine headaches [J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 24-28.
- [17] Dong X M, Hu Y Z, Jing L, et al. Role of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, calcitonin gene-related peptide and cyclooxygenase-2 in experimental rat models of migraine [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 1803-1809.
- [18] 付高爽, 陈海敏, 曹克刚. 偏头痛的中西医治疗与调护 [J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48(4): 385-387.
- Fu G S, Chen H M, Cao K G. Treatment and nursing of migraine with traditional Chinese and Western Medicine [J]. Chin J Clin, 2020, 48(4): 385-387.
- [19] 薛欢, 曲圆, 朱天全, 等. 清脑止痛胶囊对硝酸甘油致偏头痛大鼠体内炎性细胞因子表达水平的影响及其意义 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2016, 42(3): 496-501.
- Xue H, Qu Y, Zhu T Q, et al. Effect of QNZTJN on expression levels of inflammatory cytokines in migraine rats induced by nitroglycerin and its significance [J]. J Jilin Univ Med Ed, 2016, 42(3): 496-501.
- [20] Liao C C, Li J M, Hsieh C L. Auricular electrical stimulation alleviates headache through CGRP/COX-2/TRPV1/TRPA1 signaling pathways in a nitroglycerin-induced migraine rat model [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 2413919.
- [21] Demartini C, Tassorelli C, Zanaboni A M, et al. The role of the transient receptor potential ankyrin type-1 (TRPA1) channel in migraine pain: Evaluation in an animal model [J]. J Headache Pain, 2017, 18(1): 94.
- [22] Ambrosino P, Soldovieri M V, di Zazzo E, et al. Activation of Kv7 potassium channels inhibits intracellular Ca²⁺ increases triggered by TRPV1-mediated pain-inducing stimuli in F11 immortalized sensory neurons [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): E4322.

[责任编辑 兰新新]