

## 葛根素对慢性偏头痛小鼠三叉神经节细胞钠离子电流及动作电位的影响

申小年<sup>1</sup>, 彭俊宇<sup>2</sup>, 杨光<sup>3</sup>, 王星禹<sup>3</sup>, 徐颖<sup>3</sup>, 郑超<sup>4\*</sup>

1. 安徽中医药高等专科学校 中医学系, 安徽 芜湖 241000

2. 安徽中医药高等专科学校附属芜湖市中医医院 骨伤科, 安徽 芜湖 241000

3. 上海中医药大学基础研究院, 上海 201203

4. 皖南医学院生理科学研究所 神经生物学研究室, 安徽, 芜湖 241002

**摘要:** **目的** 通过观察葛根素对硝酸甘油诱导的慢性偏头痛模型小鼠行为学、三叉神经节细胞钠离子电流抑制率和动作电位的影响, 探讨其治疗慢性偏头痛的作用机制。 **方法** 随机取 6 只雄性 C57BL/6 小鼠, 处死后分离三叉神经节细胞, 检测不同浓度的葛根素对电压依赖性钠离子通道电流的抑制率。建立硝酸甘油诱导的慢性偏头痛小鼠模型, 给予药物干预后, qRT-PCR 检测三叉神经节细胞神经元电压门控钠通道基因 (voltage-gated sodium channel  $\alpha 1$ -subunit gene, *SCN1A*) mRNA 表达; 用膜片钳记录各组小鼠三叉神经节细胞的动作电位参数。 **结果** 葛根素对正常小鼠三叉神经节细胞的电压门控性钠离子通道抑制率的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ) 为  $29.96 \mu\text{mol/L}$ 。与对照组比较, 模型组小鼠 0~30、30~60、60~90、90~120 min 各时间段抓头次数及 2 h 内抓头次数总和显著增加 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ), 三叉神经节细胞中 *SCN1A* mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.001$ ), 动作电位发放频率和静息膜电位显著升高 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较, 葛根素 (50、100、200 mg/kg) 组 30~60 min 抓头次数和 2 h 内抓头次数总和显著减少 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 葛根素 (200 mg/kg) 组 90~120 min 抓头次数显著减少 ( $P < 0.001$ ); 葛根素 (100、200 mg/kg) 组小鼠三叉神经节细胞中 *SCN1A* mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.001$ ); 葛根素 (50、100、200 mg/kg) 组小鼠三叉神经节细胞动作电位发放频率和静息膜电位显著下降 ( $P < 0.001$ )。 **结论** 葛根素通过阻断三叉神经节细胞钠离子电流和 *SCN1A* mRNA 表达, 降低动作电位静息膜电位和发放频率, 减少慢性偏头痛发作, 有望成为临床治疗慢性偏头痛的辅助治疗药物。

**关键词:** 葛根素; 慢性偏头痛; 三叉神经节细胞; 钠离子通道; 动作电位; SCN1A

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)13-4445-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.016

## Effect of puerarin on sodium ion current and action potential in trigeminal ganglion cells of mice with chronic migraine

SHEN Xiaonian<sup>1</sup>, PENG Junyu<sup>2</sup>, YANG Guang<sup>3</sup>, WANG Xingyu<sup>3</sup>, XU Ying<sup>3</sup>, ZHENG Chao<sup>4</sup>

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Wuhu 241000, China

2. Department of Orthopaedics, Wuhu Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Wuhu 241000, China

3. Institute of Basic Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

4. Laboratory of Neurobiology, Institute of Physiological Sciences, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of puerarin on chronic migraine by observing the effects of puerarin on the behavior, sodium ion current inhibition rate, and action potential of trigeminal ganglion cells in nitroglycerin-induced chronic migraine model mice. **Methods** Six male C57BL/6 mice were randomly selected, and trigeminal ganglion cells were isolated after euthanasia. The inhibitory rate of different concentrations of puerarin on voltage dependent sodium ion channel currents were measured. A chronic migraine mouse model induced by nitroglycerin was established, and after drug intervention, qRT-PCR was used to detect the mRNA

收稿日期: 2024-04-07

基金项目: 安徽省教育厅重点项目 (KJ2020A0878); 安徽省高校学科 (专业) 拔尖人才学术资助项目 (gxbjZD2022102); 芜湖市科技局计划项目 (2022jc44)

作者简介: 申小年 (1976—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为中药止痛机制。Tel: 18130380223 E-mail: igszxd@163.com

\*通信作者: 郑超 (1978—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为神经细胞电生理学与药理学。E-mail: chaozheng10@fudan.edu.cn

expression of voltage-gated sodium channel  $\alpha 1$ -subunit gene (*SCN1A*) in trigeminal ganglion cells; The action potential parameters of trigeminal ganglion cells in each group of mice was recorded using patch clamps. **Results** The half inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of puerarin on voltage-gated sodium channel inhibition in normal mouse trigeminal ganglion cells was 29.96  $\mu\text{mol/L}$ . Compared with control group, mice in model group showed a significant increase in the number of head grabbing times at each time period of 0—30, 30—60, 60—90, 90—120 min and the total number of head grabbing times within 2 h ( $P < 0.05, 0.001$ ). The expression of *SCN1A* mRNA in trigeminal ganglion cells in model group was significantly increased ( $P < 0.001$ ), and the frequency of action potential firing and resting membrane potential were significantly increased ( $P < 0.001$ ). Compared with model group, puerarin (50, 100, 200 mg/kg) groups showed a significant decrease in the number of head grabbing times at 30—60 min and the total number of head grabbing times within 2 h ( $P < 0.05, 0.01$ ), while puerarin (200 mg/kg) group showed a significant decrease in the number of head grabbing times at 90—120 min ( $P < 0.001$ ); The expression of *SCN1A* mRNA in trigeminal ganglion cells of mice in puerarin (100, 200 mg/kg) groups was significantly reduced ( $P < 0.001$ ); The action potential firing frequency and resting membrane potential of trigeminal ganglion cells in mice treated with puerarin (50, 100, 200 mg/kg) were significantly decreased ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** Puerarin could block the sodium ion current and *SCN1A* mRNA expression in trigeminal ganglion cells, reduce the resting membrane potential and firing frequency of action potentials, and reduce the onset of chronic migraine. It is expected to become an adjunctive therapeutic drug for clinical treatment of chronic migraine.

**Key words:** puerarin; chronic migraine; trigeminal ganglion cells; sodium channels; action potential; *SCN1A*

偏头痛是临床最常见的原发性头痛类型，具有中、重度搏动样头痛，多为单侧等特征，偏头痛全球患病率约为 11.6%，严重影响患者的身心健康<sup>[1]</sup>。抗降钙素基因相关肽单克隆抗体以及曲坦类药物对偏头痛临床治疗效果显著，但由于这些药物价格昂贵和严重的不良反应，使其临床应用受到限制。中药及其复方制剂具有多成分、多靶点、不良反应小等特点，在临床上得以广泛应用。

葛根为豆科植物野葛 *Puerariae lobatae* (Willd.) Ohwi 的干燥根<sup>[2]</sup>，在临床上经常用来治疗头痛性疾病。如《伤寒论》中桂枝加葛根汤用来治疗颈项头痛。葛根素为葛根的主要成分，是一种异黄酮类化合物，也称为大豆苷元-8-C-葡萄糖苷（7,4'-二羟基-8-C-糖基异黄酮），具有独特的理化性质<sup>[3]</sup>。越来越多的证据表明，葛根素具有降血糖、调血脂、保护血管、抗氧化应激、抗感染等药理作用，并表现出治疗各种神经疾病的潜力<sup>[4]</sup>。

1979 年，Moskowitz 提出了偏头痛的三叉神经血管假说，三叉神经及其含有血管活性神经肽的轴突前物质，在脑膜及其血管中起关键作用，三叉神经节与偏头痛的发作传导存在相关性<sup>[5-6]</sup>。Dichgans 等<sup>[7]</sup>研究发现 3 个家族性偏瘫性偏头痛患者的染色体 2q24 上 1 个家族性偏瘫性偏头痛的新位点，是神经元电压门控钠通道基因（voltage-gated sodium channel  $\alpha 1$ -subunit gene, *SCN1A*）中杂合错义突变（Gln1489Lys），该突变导致蛋白质的铰链结构域中的电荷改变和氨基酸交换，对钠离子通道的快速失

活至关重要。*SCN1A* 与家族性偏瘫性偏头痛 3 型变异有关<sup>[8]</sup>。以上研究表明，三叉神经节细胞上的钠离子通道基因 *SCN1A* 与偏头痛发作密切相关。动作电位是在可兴奋细胞膜上观察到的再生电现象，其信号沿轴突传播而不衰减，是神经生理学的基石<sup>[9]</sup>，同时膜片钳最适合记录细胞静息膜电位和动作电位<sup>[10]</sup>。布洛芬为芳基丙酸类非甾体抗炎药，可以抑制前列腺素合成，具有解热镇痛及抗炎作用，用于缓解中度头痛、偏头痛和牙痛等，常作为阳性对照药<sup>[11]</sup>。因此，本研究采用 qRT-PCR 检测慢性偏头痛模型小鼠 *SCN1A* 的 mRNA 表达，膜片钳技术检测小鼠钠离子通道的半数抑制浓度（half inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ）和模型小鼠的动作电位，探讨葛根素预防和治疗偏头痛的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 60 只，体质量 18~20 g，购自上海中医药大学实验动物中心，许可证号 SYXY（沪）2020-0009。大鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房，光照周期 12 h 光照/12 h 黑暗，饲养室温度（22±2）℃，相对湿度 45%~65%，自由进食饮水。实验动物操作均符合动物伦理学规定，经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准（伦理编号 PZSHUTCM2312190002）。

### 1.2 药品与试剂

硝酸甘油注射液（5 mg/mL，批号 2201181）购自河南润弘制药有限公司；葛根素（质量分数≥

99.8%, 批号 1601262) 购自上海同田生物有限公司; 布洛芬片 (0.1 g/片, 批号 211206) 购自上海华源安徽仁济制药有限公司; KCl (批号 P1969071)、NaCl (批号 P2416853)、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (批号 P1877166)、D-葡萄糖 (批号 SLCH2444)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 D2650) 购自上海泰坦科技股份有限公司; HEPES (批号 P1344851) 购自上海阿达玛斯试剂有限公司;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (批号 SLCK7949)、 $\text{Na}_3\text{GTP}$  (批号 V900868-100 MG)、 $\text{Na}_2\text{ATP}$  (批号 P1853456)、EGTA (批号 SLBN5349V)、CsF (批号 0000066330)、CsOH (批号 1003549587) 购自美国 Sigma 公司; TRIzol (批号 15596018) 购自美国赛默飞世尔科技公司; 牛血清白蛋白 (BSA, 批号 6531010160) 购自美国 Genview 公司; 二甲苯 (批号 10023418) 购自上海国药集团化学试剂有限公司; II 型胶原酶 (批号 40N20708) 购自美国 Worthington 公司; 曲拉通 X-100 (批号 30188983) 购自上海国药集团化学试剂有限公司; 0.25% Trypsin-EDTA (批号 202047) 购自美国 Gibco 公司; PCR 逆转录试剂盒 (批号 AJ60795A)、TB green (批号 RR420B) 购自日本 Takara 公司。

### 1.3 仪器

Light Cycler 96 型荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司); Tissuelyser-192L 型全自动研磨仪 (上海净信实业发展有限公司); Synergy2 型酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); CF1624R 型高速低温离心机 (美国赛洛捷克公司); MultiClamp700B 型放大器、Digidata1500B 型数据采集系统 (美国 AXON 公司); P-1000 型微电极拉制仪、BF150-86-10 型玻璃微电极 (美国 Sutter 公司); MF-830 型抛光仪 (日本 Narishige 公司); Axovert40CET 型荧光倒置显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司)。

## 2 方法

### 2.1 正常小鼠三叉神经节细胞分离

随机取 6 只 C57BL/6 小鼠, ip 1% 戊巴比妥钠深度麻醉后, 急性处死, 取出三叉神经节细胞置于细胞外液 ( $\text{NaCl}$  150 mmol/L、 $\text{KCl}$  5 mmol/L、 $\text{CaCl}_2$  2.5 mmol/L、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L、HEPES 10 mmol/L, 用 NaOH 调至 pH 7.3~7.4, 渗透压 300~310 mOsm/kg) 中, 保持 0~4 °C, 以降低细胞的代谢率。剪去三叉神经节细胞两端的神经干, 保留其膨大部分, 移到配好的消化液 (II 型

胶原酶和 0.25% 胰酶) 中, 在 37 °C 的恒温下, 通 95%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$  的混合气体, 孵育 40~70 min。轻轻吸走消化管中的消化液, 加入适量的 37 °C 细胞外液, 轻轻吹打 (不要出现泡沫), 将神经节分离成单个细胞,  $300 \times g$  离心 2 min, 弃去上清, 用通气体的细胞外液重悬, 铺在 8 mm 圆形细胞爬片上, 静置 30 min 后使细胞贴壁后用于膜片钳记录。采用 sutter 电极, 外径 1.5 mm, 内径 0.86 mm。使用 P-1000 型微电极拉制仪拉制成尖端 1~2  $\mu\text{m}$  的微电极<sup>[12]</sup>。灌注电极内液的电极电阻为 3~5 M $\Omega$ 。实验在 20~25 °C 干燥室温下进行, 常规使用高阻抗封接的全细胞记录方式。

### 2.2 正常小鼠三叉神经节细胞电压依赖性钠离子电流检测

用电压钳检测葛根素对三叉神经节细胞电压依赖性钠离子电流的抑制率, 计算  $\text{IC}_{50}$  值。钠离子通道细胞外液<sup>[11,13]</sup>由  $\text{NaCl}$  107 mmol/L、 $\text{KCl}$  10 mmol/L、HEPES 2 mmol/L、 $\text{CaCl}_2$  1 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L 组成, 用 NaOH 调至 pH 7.3~7.4, 蔗糖调渗透压到 300~310 mOsm/kg。电极内液由 CsF 107 mmol/L、 $\text{NaCl}$  10 mmol/L、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2 mmol/L、 $\text{CaCl}_2$  1 mmol/L、HEPES 10 mmol/L、EGTA 10 mmol/L、TEACl 10 mmol/L 组成, 用 CsOH 将 pH 值调整为 7.2, 渗透压 300 mOsm/kg。电压钳制电位 -70 mV, 选择电压钳, 给予一系列跃阶电压 (-120~35 mV, step=5 mV, 时长 280 ms) 刺激。检测电压依赖性钠离子电流, 当诱导正常稳定钠电流后记录, 再分别给予 1、10、30、50、80、100  $\mu\text{mol/L}$  的葛根素, 记录不同浓度的葛根素对钠离子电流抑制率, 计算  $\text{IC}_{50}$  值。

### 2.3 动物分组、造模与给药

54 只 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组及葛根素低、中、高剂量 (50、100、200 mg/kg)<sup>[14]</sup> 组和布洛芬 (20 mg/kg) 组, 每组 9 只, 每笼 4~5 只, 小鼠适应性喂养 1 周后进行实验。葛根素溶于 DMSO 配制成 1 mg/ $\mu\text{L}$  的母液<sup>[15]</sup>, 用生理盐水稀释成相应给药浓度。各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 20 d。在给药的 8、11、14、17、20 天<sup>[16]</sup>, 对照组小鼠颈部 sc 生理盐水 0.02 mL<sup>[17]</sup>, 其余各组小鼠颈部 sc 等体积的硝酸甘油 (14.4 mg/kg) 建立慢性偏头痛模型<sup>[18]</sup>, 注射硝酸甘油后 2 min 左右, 小鼠开始出现前肢频繁搔头、爬笼次数增多、烦躁

不安等类似临床偏头痛症状,表明慢性偏头痛模型制备成功<sup>[16,19]</sup>。

## 2.4 抓头行为学检测

在给药的第 8、11、14、17、20 天,于注射硝酸甘油或生理盐水后开始计时,在安静环境下,拍摄视频记录小鼠抓头行为学 2 h<sup>[14]</sup>。将拍摄的视频分成 0~30、30~60、60~90 和 90~120 min 4 个时间段,分别对各时间段小鼠抓头次数以及 2 h 内小鼠抓头次数总和进行统计,通过分析各组小鼠抓头次数变化<sup>[19-20]</sup>,评估给药后小鼠的偏头痛症状缓解情况。

## 2.5 qRT-PCR 检测慢性偏头痛小鼠三叉神经节细胞中 *SCN1A* 基因表达<sup>[21]</sup>

给药结束后,取各组小鼠三叉神经节细胞,提取总 RNA,检测总 RNA 浓度和纯度。应用逆转录试剂盒进行逆转录制备 cDNA。进行荧光定量 PCR 扩增,以检测小鼠三叉神经节细胞中 *SCN1A* mRNA 表达水平,使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算 *SCN1A* 相对表达量。引物序列:  $\beta$ -actin 上游引物 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3',下游引物 5'-TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG-3'; *SCN1A* 上游引物 5'-CTCTGATGCAGGCCAATGTC-3',下游引物 5'-AGCACGCAATGTCAGTTGGT-3'。

## 2.6 慢性偏头痛小鼠三叉神经节细胞动作电位发放频率及波形检测

各组随机取 3 只小鼠,采用电流钳对小鼠三叉神经节细胞进行动作电位发放频率及波形检测。电极内液由 KCl 140 mmol/L、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 mmol/L、EGTA 5 mmol/L、Na<sub>2</sub>ATP 3 mmol/L、Na<sub>3</sub>GTP 0.2 mmol/L、HEPES 10 mmol/L 组成,用 CsOH 调至 pH 7.3~7.4,渗透压 300 mOsm/kg。三叉神经节细胞动作电位钳制电压 (-70 mV),跃阶电流 (-100~300 pA, step=20 pA, 时长 1.5 s),在 40 倍显微镜下筛选 20  $\mu$ m 以下的动作电位细胞,以静息膜电位大于 -55 mV、串联电阻为 10~25 M $\Omega$ 、电容小于 200 pF 为动作电位发放频率三叉神经节细胞筛选标准<sup>[22]</sup>,记录三叉神经节细胞动作电位的发放频率,观察各组小鼠动作电位变化,以动作电位跃阶频率反映神经元兴奋性;以阈电位到动作电位峰值幅度为电位幅值;用 1/2 峰值振幅的时程为动作电位时程,动作电位复极后最大电位为复极后电位<sup>[22]</sup>。评价葛根素对慢性偏头痛小鼠三叉神经节细胞动作电位发放频率及波形的影响<sup>[23]</sup>。

## 2.7 统计学分析

IC<sub>50</sub> 实验数据使用平均值表示,其余数据使用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 22 软件进行分析<sup>[22]</sup>。单因素方差分析用于多组间比较后两两组间比较,方差分析重复测量资料用于多组间比较且同一个体不同时间点比较,采用 LSD 事后检验进行两两之间的多重比较。

## 3 结果

### 3.1 葛根素对三叉神经节细胞钠离子电流的 IC<sub>50</sub>

从 6 只 C57BL/6 小鼠中共分离出 8 个直径小于 20  $\mu$ m 的离体三叉神经节细胞(图 1-A)。记录稳定钠电流值后,分别施加 1、10、30、50、80、100  $\mu$ mol/L 的葛根素抑制钠离子电流(图 1-B)。分别对同一细胞不同浓度钠电流的 I-V 曲线进行 Origin 作图(图 1-C)。以稳定的钠电流值峰值电流为对照,对所有峰值电流进行归一化处理<sup>[24]</sup>后得到葛根素浓度-响应曲线,计算得到葛根素在三叉神经节细胞中的 IC<sub>50</sub> 为 29.96  $\mu$ mol/L<sup>[25]</sup>(图 1-D)。

### 3.2 葛根素抑制慢性偏头痛小鼠的抓头行为

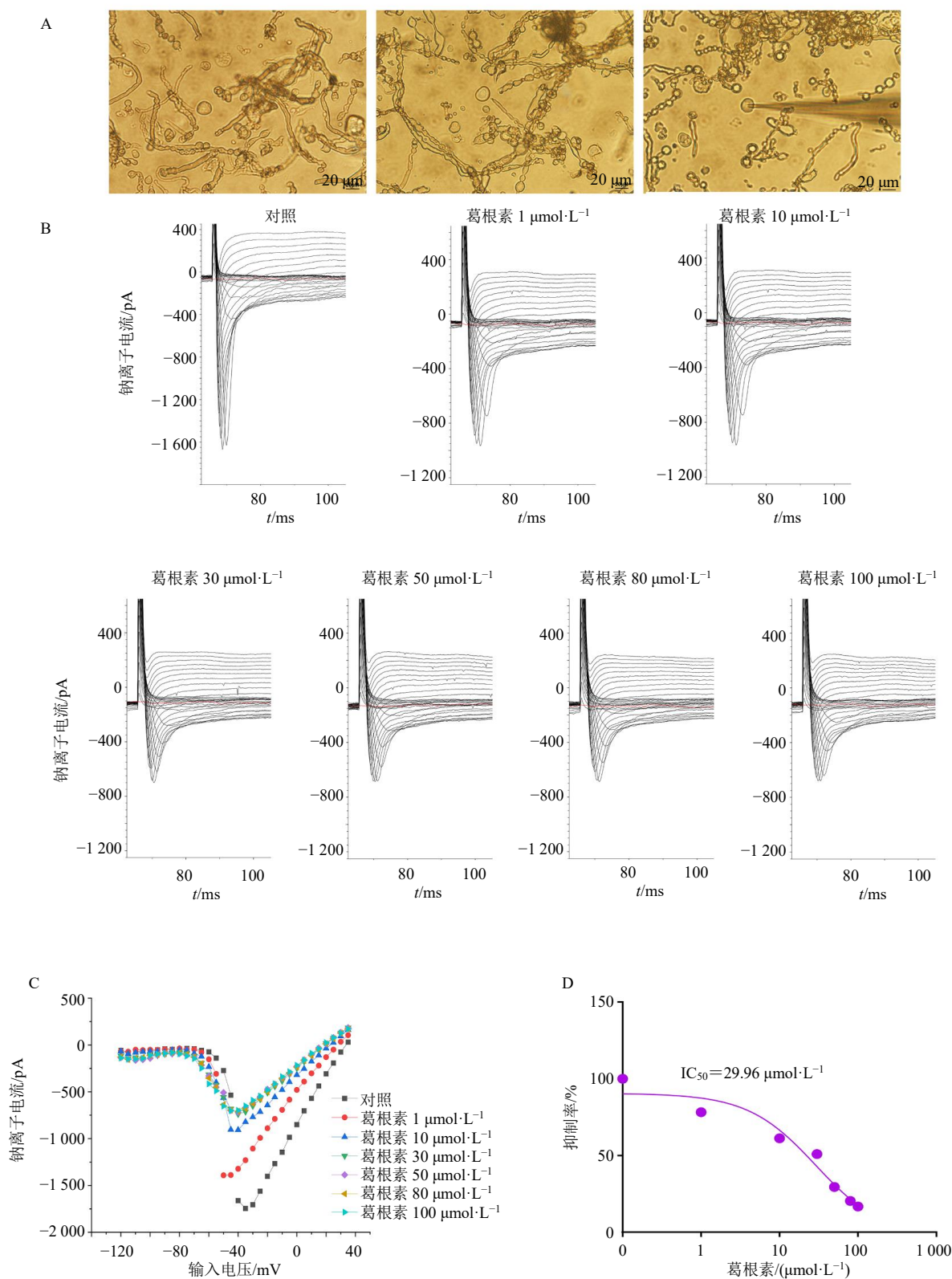
如图 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠毛发枯槁,较为瘦弱,0~30、30~60、60~90、90~120 min 各时间段抓头次数以及 2 h 内抓头次数总和显著增加 ( $P<0.05$ 、 $0.001$ );与模型组比较,布洛芬组 0~30、30~60、60~90、90~120 min 各时间段抓头次数及 2 h 内抓头次数总和显著减少 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ ),葛根素各剂量组 30~60 min 抓头次数和 2 h 内抓头次数总和显著减少 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ),葛根素高剂量组 90~120 min 抓头次数显著减少 ( $P<0.001$ )。

### 3.3 葛根素抑制慢性偏头痛小鼠三叉神经节细胞中 *SCN1A* mRNA 表达

如图 3 所示,与对照组比较,模型组三叉神经节细胞中 *SCN1A* mRNA 表达水平显著升高 ( $P<0.001$ );与模型组比较,葛根素中、高剂量组和布洛芬组三叉神经节细胞中 *SCN1A* mRNA 表达水平均显著降低 ( $P<0.001$ )。表明葛根素能够有效抑制慢性偏头痛小鼠三叉神经节细胞中 *SCN1A* 基因表达。

### 3.4 葛根素抑制慢性偏头痛小鼠三叉神经节细胞动作电位发放频率

按动作电位发放频率三叉神经节细胞筛选标准,从对照组、葛根素中剂量组每组各获得 8 个有效三叉神经节细胞,葛根素低、高剂量组和布洛芬组每组各获得 9 个有效三叉神经节细胞,各组小鼠



A-三叉神经节细胞 ( $\times 40$ ); B-不同浓度葛根素对三叉神经节细胞钠电流的抑制作用; C-钠电流 I-V 曲线图; D-抑制率曲线图。

A-trigeminal ganglion cells ( $\times 40$ ); B-inhibitory effect of different concentrations of puerarin on sodium currents in trigeminal ganglion cells; C-I-V curve of sodium current; D-inhibition rate curve.

图 1 葛根素对三叉神经节细胞钠离子电流的  $IC_{50}$

Fig. 1  $IC_{50}$  of puerarin on sodium ion currents in trigeminal ganglion cells

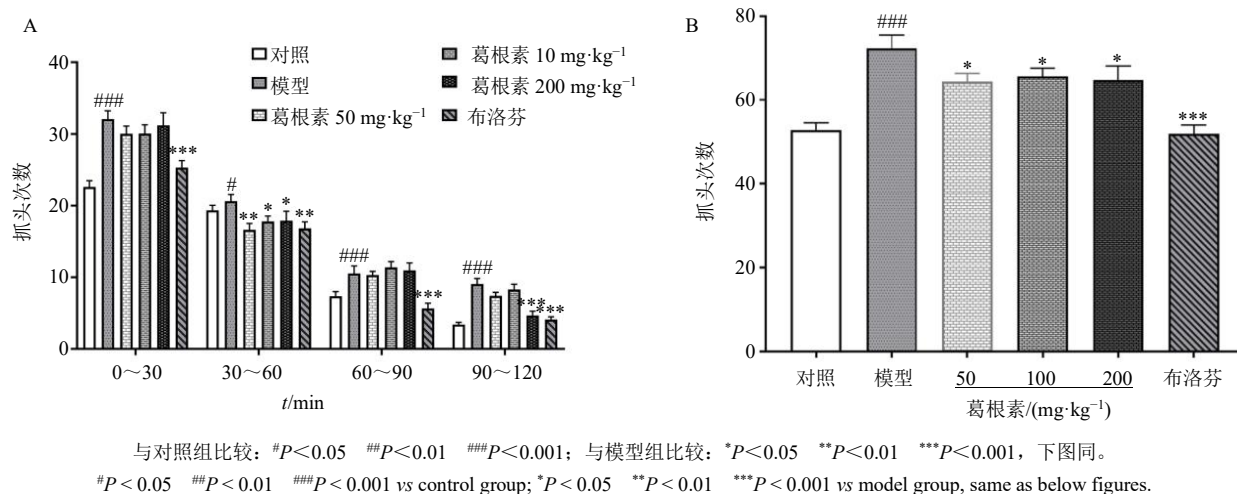


图 2 各组小鼠分时间段抓头次数 (A) 和 2 h 内抓头次数总和 (B) ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Fig. 2 Total number of head grabbing times in different time periods (A) and number of head grabbing times within 2 h (B) of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

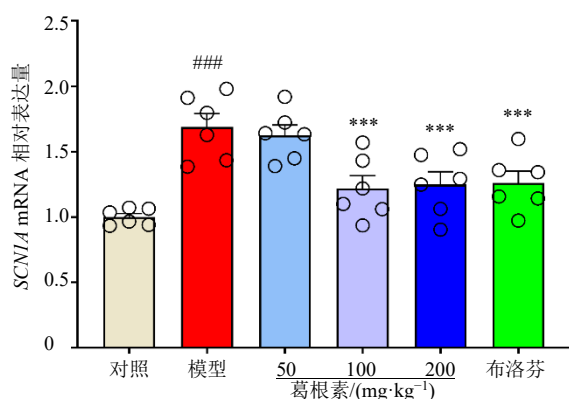


图 3 各组小鼠三叉神经节细胞中 SCN1A mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 SCN1A mRNA expression in trigeminal ganglion cells of mice of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

三叉神经节细胞动作电位变化见图 4-A, 动作电位跃阶输入电压越大, 三叉神经节细胞感觉神经元越兴奋 (图 4-B)。各组小鼠三叉神经节细胞动作电位发放频率如图 4-C 所示, 与对照组比较, 模型组三叉神经节细胞动作电位发放频率显著上升 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 各给药组三叉神经节细胞动作电位发放频率显著下降 ( $P < 0.001$ )。表明葛根素能够有效抑制慢性偏头痛小鼠三叉神经节细胞动作电位发放频率。

### 3.5 葛根素对慢性偏头痛小鼠三叉神经节细胞动作电位波形的影响

按动作电位波形图筛选标准, 从对照组获得 7 个有效三叉神经节细胞波形, 葛根素各剂量组和布

洛芬组每组各获得 8 个有效三叉神经节细胞波形, 动作电位波形图, 见图 5-A。如图 5-B~E 所示, 与对照组比较, 模型组静息膜电位显著上升 ( $P < 0.001$ ), 电位幅值、时程和复极后电位未见显著统计学差异; 与模型组比较, 葛根素各剂量组和布洛芬组静息膜电位显著下降 ( $P < 0.001$ ), 电位幅值、时程和复极后点位未见显著统计学差异。

## 4 讨论

偏头痛是一种常见的致残性神经系统疾病, 其显著的特征是搏动性的剧烈单侧头痛。研究证明这种疼痛与 SCN1A 基因相关, 家族性偏瘫型偏头痛 3 型由 SCN1A 突变引起, 编码主要在抑制性中间神经元中表达的电压门控钠离子通道 NaV1.1<sup>[26]</sup>。同时研究发现偏头痛的病理机制之一是皮层扩散性抑制<sup>[27]</sup>, 是一种去极化波, 随后是皮质活动的抑制, 是一种与先兆偏头痛和各种其他脑部病变 (如缺血性卒中和创伤性脑损伤) 有关的病理生理过程。据报道, 硬脑膜刺激会导致颅内机械超敏反应, 形成偏头痛的搏动性疼痛。以上研究表明, 硬脑膜激活痛觉过敏后, 形成伤害性信号传递到中枢使其敏感, 这是诱发反复偏头痛发作的关键因素<sup>[28]</sup>。

《本经逢原》言“葛根乃阳明经之专药, 治头额痛, 眉棱骨痛”, 葛根治头痛与解肌、止痛、生津液、舒筋脉功效密切相关, 《本草纲目》谓其可“疗伤寒中风头痛, 解肌发表出汗”; 《名医别录》载葛根“疗伤寒中风头痛, 解肌止痛, 胁风痛”<sup>[29]</sup>。研究表明, 葛根素可改善局灶性脑缺血大鼠神经功能损伤和前

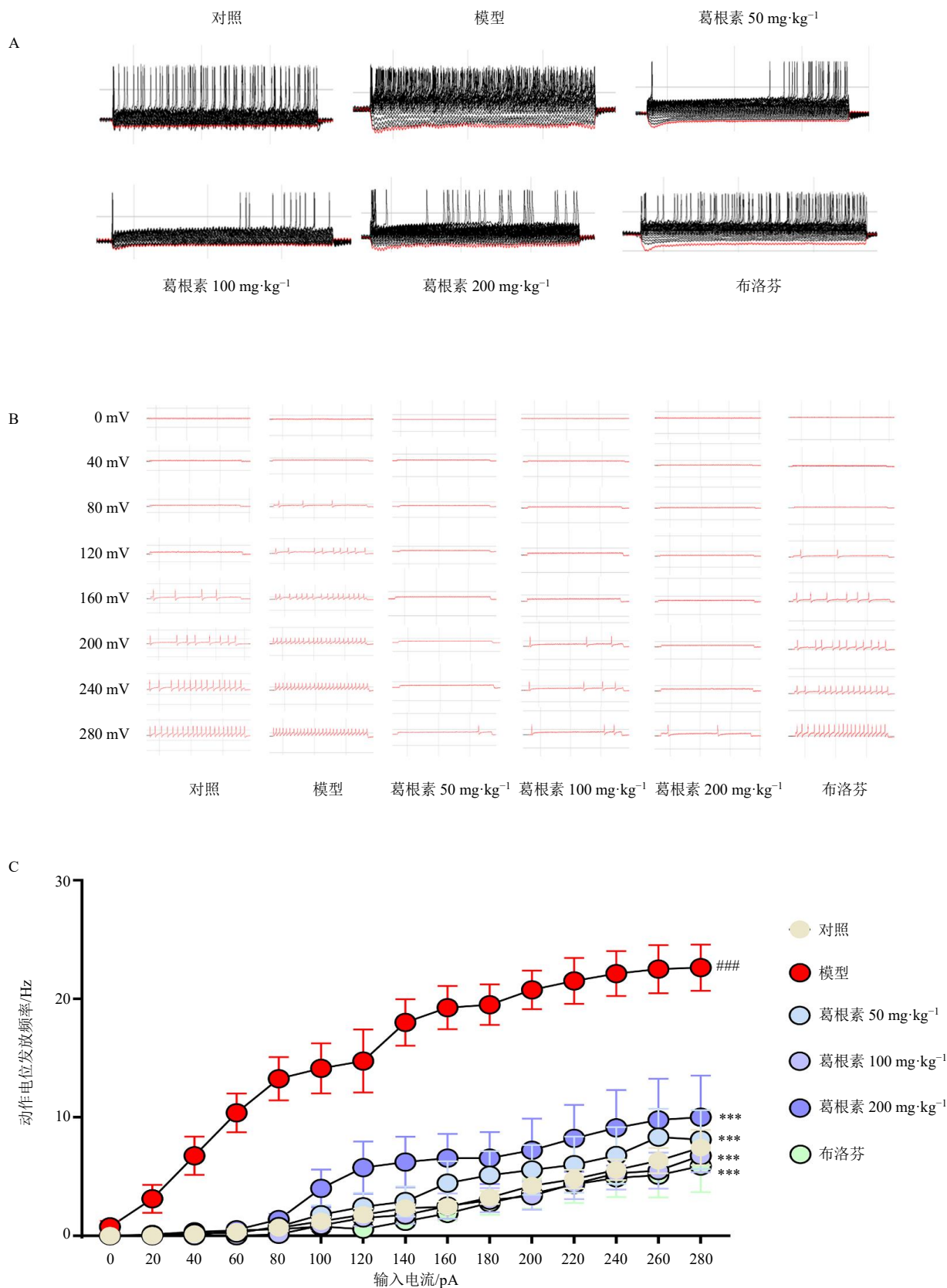


图 4 各组小鼠三叉神经节细胞动作电位变化 (A)、跃阶刺激峰 (B) 和发放频率 (C) ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8 \sim 9$ )

Fig. 4 Action potential change (A), step-shift stimulation peak (B) and firing frequency (C) of trigeminal ganglion cells in mice of each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8 \sim 9$ )

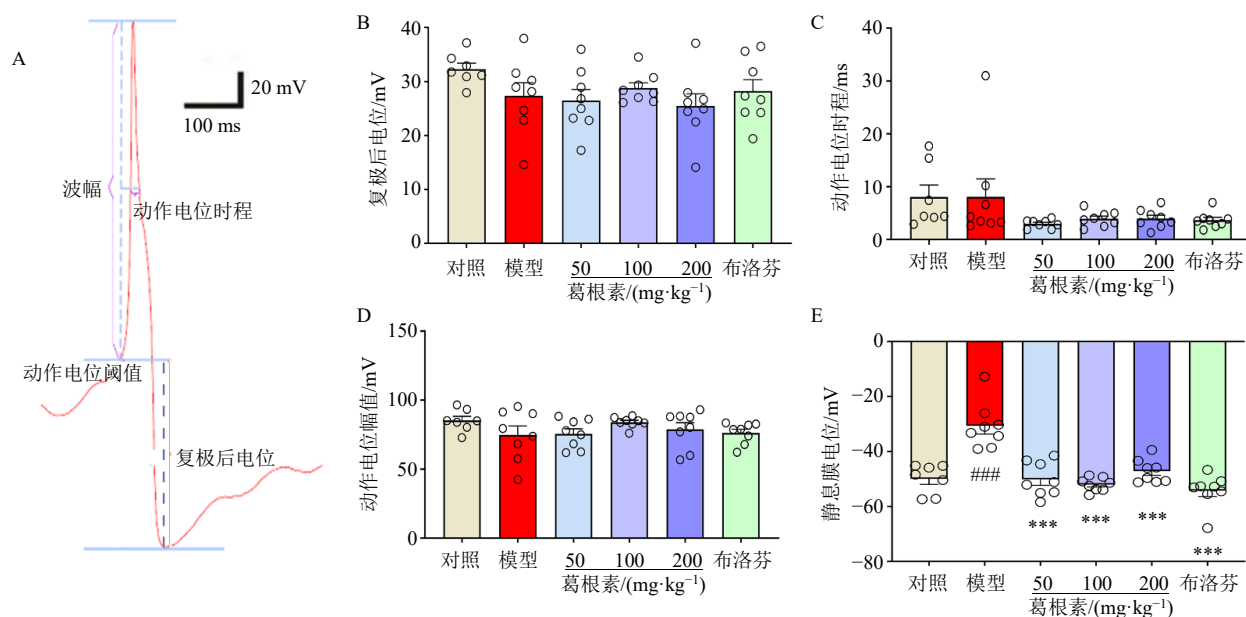


图 5 动作电位波形图 (A) 及各组小鼠复极后电位 (B)、时程 (C)、电位幅值 (D)、静息膜电位 (E) ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7 \sim 8$ )

Fig. 5 Action potential waveform (A) and post repolarization potential (B), duration (C), potential amplitude (D), resting membrane potential (E) of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7 \sim 8$ )

肢运动功能障碍,减轻炎症反应,抑制脑水肿,调节突触可塑性和恢复突触界面曲率<sup>[30]</sup>。葛根为药食同源植物,是葛根汤、川芎葛根汤、天麻葛根汤、葛根通络颗粒、葛根素片、葛根素注射液等常用治疗偏头痛制剂的主要药味,对偏头痛的预防和治疗具有重要作用。小鼠神经解剖学和神经生理学与人类相似,常用于偏头痛病理生理相关研究,本研究在小鼠 ig 葛根素 1 周后,进行硝酸甘油颈部注射建立慢性偏头痛模型,进一步探讨葛根素预防和治疗偏头痛的作用机制。

慢性偏头痛小鼠抓头行为学表明,葛根素组和布洛芬组均能够显著减少模型小鼠抓头次数。葛根素低、中剂量组抑制偏头痛作用时间主要在用药后 30~60 min,说明葛根素低、中剂量半衰期短。与 Nacem 等<sup>[31]</sup>研究相吻合,由于葛根素较差的药动学特征(低口服生物利用度、快速全身清除、半衰期短)和理化性质(如低水溶性和较差的稳定性),其治疗效果有限。在 90~120 min,葛根素高剂量组与模型组比较有显著统计学差异,且与布洛芬组效果接近,葛根素高剂量组能够显著抑制抓头行为,说明葛根素在高剂量才能维持较长时间的抑制偏头痛发作的效果,这种现象与伤寒论原著中葛根桂枝汤用 4 两葛根的用药剂量相吻合。

葛根素对三叉神经节细胞钠离子电流抑制率  $IC_{50}$  为 29.96  $\mu\text{mol/L}$ ,表明葛根素能够直接阻断三

叉神经节细胞的钠离子电流。研究表明丙戊酸钠、美托洛尔、双丙戊酸钠、替马洛尔心得安、托吡酯等钠离子通道阻断剂对偏头痛预防有效<sup>[32]</sup>;弗罗曲普坦对预防经期偏头痛有效;拉莫三嗪对偏头痛无效<sup>[32]</sup>。临床有报道,应用钠离子阻断剂治疗偏头痛也获得了一定效果。葛根素抑制钠离子电流的作用可能是抑制偏头痛发作的重要作用靶点之一。

qRT-PCR 结果显示,模型组小鼠三叉神经节细胞中 *SCN1A* mRNA 表达水平显著升高,说明造模是成功的。葛根素低剂量组与模型组比较没有统计学差异,说明低剂量葛根素抑制 *SCN1A* mRNA 表达效果不明显,只能抑制疼痛信号( $I_{Na}$ )传导,尚不能有效抑制三叉神经节细胞 *SCN1A* mRNA 表达,从而达到治疗效果。葛根素中、高剂量组与模型组比较有显著差异,且与布洛芬组效果相同,表明在中等剂量(100 mg/kg)下,葛根素既能阻断疼痛传导,抑制偏头痛的发作,还能够抑制三叉神经节细胞 *SCN1A* 的 mRNA 表达,从而治疗偏头痛。葛根素呈剂量相关性抑制三叉神经节细胞 *SCN1A* 的 mRNA 表达,对于慢性偏头痛小鼠的最佳治疗剂量  $\geq 100 \text{ mg/kg}$ 。

钠离子通道电流是动作电位的关键性因素,是疼痛信号传导的主要离子。与模型组比较,葛根素显著抑制三叉神经节细胞动作电位发放频率,且与布洛芬组效果一致。说明葛根素能够抑制动作电位

发放频率阻断疼痛信号传导,抑制偏头痛的发作。葛根素主要通过降低模型组三叉神经节细胞动作电位的静息膜电位,使三叉神经节细胞静息膜电位趋向稳定,减少动作电位的发放,抑制了模型组的偏头痛发作次数。

综上,葛根素主要通过抑制三叉神经节细胞钠离子电流、抑制 *SCN1A* mRNA 表达和降低动作电位的静息膜电位,阻断动作电位发放频率,抑制硝酸甘油诱导的小鼠慢性偏头痛的发作。但本研究尚存在一定的不足,如未对小鼠抓头次数随着时间变化进行统计分析,外向钾离子电流变化以及过表达 *SCN1A* 对葛根素治疗效果影响,后续将增加实验动物样本数量,进一步对小鼠抓头次数随着时间变化、钾电流变化以及过表达 *SCN1A* 对葛根素治疗效果影响开展相关研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Ali M D, Gayasuddin Qur F, Alam M S, *et al.* Global epidemiology, clinical features, diagnosis and current therapeutic novelties in migraine therapy and their prevention: A narrative review [J]. *Curr Pharm Des*, 2023, 29(41): 3295-3311.
- [2] 叶彬, 闫小巧, 雷婷, 等. 葛根药材 HPLC 指纹图谱与 6 种成分含量测定研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(24): 8222-8227.
- [3] Raghavan M, Fee D, Barkhaus P E. Generation and propagation of the action potential [J]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 160: 3-22.
- [4] Li X, Lou Y, Shang J J, *et al.* Traditional Chinese medicine injections with activating blood circulation, equivalent effect of anticoagulation or antiplatelet, for acute myocardial infarction: A protocol for the systematic review and Meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Medicine*, 2022, 101(24): e29089.
- [5] Moskowitz M A, Reinhard J F Jr, Romero J, *et al.* Neurotransmitters and the fifth cranial nerve: Is there a relation to the headache phase of migraine? [J]. *Lancet*, 1979, 2(8148): 883-885.
- [6] Cropper H C, Pradhan A A. Seq-ing the mechanisms of migraine [J]. *Neuron*, 2022, 110(11): 1745-1746.
- [7] Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, *et al.* Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel *SCN1A* in familial hemiplegic migraine [J]. *Lancet*, 2005, 366(9483): 371-377.
- [8] Brunklaus A, Brünger T, Feng T, *et al.* The gain of function *SCN1A* disorder spectrum: Novel epilepsy phenotypes and therapeutic implications [J]. *Brain*, 2022, 145(11): 3816-3831.
- [9] Bezanilla F. The action potential: From voltage-gated conductances to molecular structures [J]. *Biol Res*, 2006, 39(3): 425-435.
- [10] Perkins K L. Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices [J]. *J Neurosci Methods*, 2006, 154(1/2): 1-18.
- [11] Cho J H, Jang I S. Ibuprofen modulates tetrodotoxin-resistant persistent  $\text{Na}^+$  currents at acidic pH in rat trigeminal ganglion neurons [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 961: 176218.
- [12] 刘艺, 李清亚, 刘晓, 等. 烯啶虫胺对棉铃虫神经细胞钠、钙通道的影响 [J]. *南开大学学报: 自然科学版*, 2021, 54(1): 23-29.
- [13] 申小年, 周爱民, 赵忠. 中药常用止疼药蜈蚣、三七和川芎的  $\text{NaV}_{1.7}$  离子通道抑制作用比较 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2021, 42(18): 1565-1569.
- [14] 王雨, 陈传奇, 王文晟, 等. 葛根素对臂丛神经根性撕脱伤脊髓前角 iNOS、CGRP 蛋白表达及 PI3K/Akt 信号通路的影响 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2019, 37(5): 517-522.
- [15] 巴宗韬, 高外毛, 热爱拉·阿合力江, 等. 葛根素治疗阿尔茨海默病作用机制的网络药理学及分子对接研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2023, 57(9): 33-41.
- [16] 邓海燕, 赵杨, 李坤, 等. 复方藜苈片对硝酸甘油致慢性偏头痛大鼠血中促炎因子的影响 [J]. *上海中医药杂志*, 2019, 53(4): 71-76.
- [17] 陈鸿, 阮红日, 马天文, 等. 葛根素干预软骨氧化应激和 Nrf2/HO-1 通路改善 PTOA 大鼠软骨退变的机制 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(9): 3951-3963.
- [18] 耿永芝, 李国伟, 刘晓豆, 等. 葛根素调节 PINK1/Parkin 信号通路对横纹肌溶解致大鼠急性肾损伤的影响 [J]. *西部医学*, 2023, 35(11): 1602-1609.
- [19] Bian N N, Yuan Y, Li X L. Effects of transcranial ultrasound stimulation on blood oxygen metabolism and brain rhythms in nitroglycerin-induced migraine mice [J]. *Neuromodulation*, 2024, doi: 10.1016/j.neurom.2023.12.007.
- [20] Huang D Y, Ren L, Qiu C S, *et al.* Characterization of a mouse model of headache [J]. *Pain*, 2016, 157(8): 1744-1760.
- [21] Vongseenin S, Ha-Ji-A-Sa N, Thanprasertsuk S, *et al.* Deciphering migraine pain mechanisms through electrophysiological insights of trigeminal ganglion neurons [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 14449.
- [22] 赵杨. 异甘草素对 Presenilin 1/2 条件性双基因敲除小鼠青壮年期焦虑样行为的影响及机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.

- [23] Guo Z H, Qiu C S, Jiang X H, *et al.* TRESK  $K^+$  channel activity regulates trigeminal nociception and headache [J]. *eNeuro*, 2019, 6(4): ENEURO.0236-19.2019.
- [24] Jin N, Zhu S Y, Yang X Y, *et al.* Orexin-a potentiates glycine currents by activating  $OX_1R$  and  $IP_3/Ca^{2+}/PKC$  signaling pathways in spinal cord ventral horn neurons [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 169: 196-204.
- [25] Chang W T, Wu S N. Effectiveness of columbianadin, a bioactive coumarin derivative, in perturbing transient and persistent  $I_{Na}$  [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 621.
- [26] Auffenberg E, Hedrich U B, Barbieri R, *et al.* Hyperexcitable interneurons trigger cortical spreading depression in an *Scn1a* migraine model [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(21): e142202.
- [27] Chever O, Zerimech S, Scalmani P, *et al.* Initiation of migraine-related cortical spreading depolarization by hyperactivity of GABAergic neurons and  $NaV_{1.1}$  channels [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(21): e142203.
- [28] Burstein R, Jakubowski M, Garcia-Nicas E, *et al.* Thalamic sensitization transforms localized pain into widespread allodynia [J]. *Ann Neurol*, 2010, 68(1): 81-91.
- [29] 杨倩, 付英杰, 任佳丹, 等. 葛根在躯体疾病共病抑郁治疗中的应用及其作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(14): 4701-4712.
- [30] Zhang Y, Yang X, Ge X H, *et al.* Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved Caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 726-733.
- [31] Naeem A, Yu C Q, Zhu W F, *et al.* Study of hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin and puerarin inclusion complexes encapsulated in sodium alginate-grafted 2-acrylamido-2-methyl-1-propane sulfonic acid hydrogels for oral controlled drug delivery [J]. *Gels*, 2023, 9(3): 246.
- [32] Silberstein S D, Holland S, Freitag F, *et al.* Evidence-based guideline update: Pharmacologic treatment for episodic migraine prevention in adults: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Headache Society [J]. *Neurology*, 2012, 78(17): 1337-1345.

[责任编辑 李亚楠]