

芎麻汤有效部位防治肝阳上亢兼瘀血型偏头痛的作用机制[△]

刘顶鼎^{1*}, 刘冬^{1,2}, 常露露¹, 王静茹¹, 吴雪梅¹, 郭建生², 曾贵荣^{3#}(1. 贵州中医药大学药学院/药效物质基础及作用机理研究中心, 贵阳 550025; 2. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 3. 湖南省药物安全评价研究中心/新药药效与安全性评价湖南省重点实验室, 长沙 410331)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)16-1950-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.16.06



摘要 目的 探究芎麻汤有效部位防治肝阳上亢兼瘀血型偏头痛的作用机制。方法 70只雄性SD大鼠按体质量随机分为正常组、模型组、阳性对照组(盐酸氟桂利嗪胶囊0.9 mg/kg)及芎麻汤有效部位低、高剂量组(乙酸乙酯提取物0.87、3.46 g/kg, 正丁醇提取物1.80、7.20 g/kg)。除正常组外,其余各组大鼠灌胃附子汤(2 g/kg),每天1次,连续4周,复制肝阳上亢证模型;造模第15天,各给药组同时灌胃相应药物,每天1次,连续2周;造模第29天,电刺激大鼠三叉神经节复制肝阳上亢兼瘀血型偏头痛模型后,按前述方法再维持给药1次。观察大鼠宏观体征及行为表现;取大鼠三叉神经颈髓复合体(TCC),分别采用免疫组织化学法、RT-qPCR法、Western blot法检测瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)、降钙素基因相关肽(CGRP)、降钙素受体样受体(CRLR)、活性修饰蛋白受体1(RAMP1)的阳性表达、mRNA及蛋白相对表达量。结果 模型组大鼠出现肝阳上亢兼瘀血型偏头痛相关的宏观体征及行为表现。末次给药30 min后,芎麻汤有效部位各组大鼠以上情况均明显改善。与正常组相比,模型组大鼠TCC内TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1阳性表达、mRNA及蛋白相对表达量均显著升高($P<0.05$)。与模型组相比,芎麻汤有效部位各组大鼠TCC内上述指标大部分显著降低($P<0.05$)。结论 芎麻汤防治肝阳上亢兼瘀血型偏头痛的作用机制可能与抑制TCC内TRPV1-CGRP/CGRP受体信号通路的活性有关。

关键词 芎麻汤;有效部位;肝阳上亢证;瘀血型偏头痛;瞬时受体电位香草酸亚型1;降钙素基因相关肽

The mechanism of effective fractions from Xiongma decoction in the treatment of migraine model rats with hyperactivity of liver-yang and blood stasis

LIU Dingding¹, LIU Dong^{1,2}, CHANG Lulu¹, WANG Jingru¹, WU Xuemei¹, GUO Jiansheng², ZENG Guirong³
(1. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine & Research Center for Pharmacodynamic Material Basis and Mechanism of Action, Guiyang 550025, China; 2. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3. Hunan Provincial Research Center for Safety Evaluation of Drugs & Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the mechanism of effective fractions from Xiongma decoction in the treatment of migraine with hyperactivity of liver-yang and blood stasis. **METHODS** Totally 70 male SD rats were randomly divided into normal group, model group, positive control group (Flunarizine hydrochloride capsules 0.9 mg/kg), low-dose and high-dose groups of Xiongma decoction effective fractions (ethyl acetate extract 0.87, 3.46 g/kg, n-butanol extract 1.80, 7.20 g/kg). Except for normal group, rats in other groups were given aconite decoction (2 g/kg), once a day, for 4 consecutive weeks to establish the hyperactivity model of liver-yang. On the 15th day of modeling, all administration groups were given corresponding drugs intragastrically at the same time, once a day, for 2 consecutive weeks. On the 29th day of modeling, rats trigeminal ganglion was stimulated to establish the migraine model with hyperactivity of liver-yang and blood stasis, then the medication was maintained for another time according to the above method. The macroscopic signs and behavior of the rats were observed; positive expression, mRNA and protein expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), calcitonin gene-related peptide (CGRP), calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor-associated membrane proteins 1 (RAMP1) in trigeminal cervical spinal complex (TCC) were detected by immunohistochemistry, RT-qPCR and Western blot assay. **RESULTS** Rats in model group showed macrophysical signs and behavioral manifestations related to migraine with hyperactivity of liver-yang and blood stasis. Thirty

[△] 基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.81860844, No.82160894);贵州省科技计划项目(No.黔科合基础[2019]1038号);贵州中医药大学博士启动基金项目(No.贵中医博士启动[2022]07号)

* 第一作者 副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药、民族药及复方防治神经精神系统疾病。E-mail:249000559@qq.com

通信作者 副研究员,博士。研究方向:神经精神药理。E-mail:zengguirong@hnsc.org

minutes after last administration, the above conditions of rats in Xiongma decoction effective fraction groups were improved significantly. Compared with normal group, positive expression, mRNA and protein expression of TRPV1, CGRP, CRLR and RAMP1 in TCC of rats in the model group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with model group, most of above indicators in Xiongma decoction

effective fraction groups were significantly decreased ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** The mechanism of Xiongma decoction in preventing and treating migraine with hyperactivity of liver-yang and blood stasis may be related to inhibit the activity of TRPV1-CGRP/CGRP receptor signaling pathway in TCC.

KEYWORDS Xiongma decoction; effective fraction; hyperactivity of liver-yang; migraine of blood stasis; transient receptor potential vanilloid 1; calcitonin gene-related peptide

芎麻汤源于《圣济总录》的大芎丸,由川芎(一斤)、天麻(四两)组成。方中川芎主入肝胆经,行气开郁,活血、祛风、止痛,善治头痛,自古有“头痛不离川芎”之说;天麻专入肝经,平肝息风,通络止痛,主治头风头痛,为治头痛要药。芎麻汤可平肝息风、活血止痛、祛风通络,主治“偏正头痛、头风眩晕、目系眩急、身体拘倦”,为临床治肝阳上亢头痛证、瘀血头痛证或瘀血挟肝阳上亢头痛证之基础方^[1-2]。本课题组前期研究已发现,芎麻汤有效部位(乙酸乙酯及正丁醇提取部位)能降低偏头痛模型大鼠三叉神经颈髓复合体(trigeminal cervical spinal complex, TCC)内降钙素基因相关肽-降钙素受体样受体/活性修饰蛋白受体1(calcitonin gene-related peptide-calcitonin receptor-like receptor/receptor-associated membrane proteins 1, CGRP-CRLR/RAMP1)信号通路的活性,减少CGRP的释放,缓解偏头痛;芎麻汤不同提取物能下调新生大鼠三叉神经节神经元瞬时受体电位香草酸亚型1(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)的表达^[3-4]。同时有研究发现,在偏头痛三叉神经系统中,TRPV1激活会导致C纤维释放CGRP;随后,CGRP作用于A δ 纤维表面的CRLR和RAMP1[二者统称为CGRP受体(CGRP receptor, CGRP-R)],导致三叉神经系统敏化引起头痛^[5]。基于此,本研究团队推测芎麻汤可能通过干预TRPV1-CGRP/CGRP-R信号通路防治偏头痛。本实验采用附子汤灌胃联合电刺激三叉神经节复制肝阳上亢兼瘀血型偏头痛模型,以探讨芎麻汤有效部位对该模型大鼠TCC内TRPV1-CGRP/CGRP-R信号通路的影响,为芎麻汤治疗偏头痛的临床及作用机制研究提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有ALC-H型脑立体定位仪(江苏赛昂斯生物科技有限公司),YD-315型轮转式切片机(金华市益迪医疗设备有限公司),BA410-T型生物显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司),DYY-6C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司),PIKOREAL96型荧光定量PCR仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),YLS-9A型生理、药理电子刺激仪(北京冀诺泰科技发展有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

制附子、川芎、天麻饮片(批号分别为1912068、20061、200301)均购自长沙老百姓大药房;盐酸氟桂利嗪胶囊[国药准字H10930003,批号KFJ3S2S,规格5 mg

(以C₂₆H₂₆F₂N₂计)]购自西安杨森制药有限公司;二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(货号ZLI-9018)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;超敏化学发光(ECL)液(货号K-12045-D50)购自美国Advansta公司;兔TRPV1抗体、山羊CGRP抗体(货号分别为ab6166、ab36001)均购自英国Abcam公司;兔CRLR抗体(货号A11979)购自美国Abclonal公司;兔RAMP1抗体、小鼠 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(R)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG二抗(M)(货号分别为10327-1-AP、66009-1-Ig、SA00001-1、SA00001-2)均购自美国Proteintech公司;TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1的PCR引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(见表1);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格。

表1 PCR引物序列

基因	上游(5'→3')	下游(5'→3')	引物长度/bp
TRPV1	AACITTTGCCCTGGTCCCCTT	CAAAGACCCCGCATTGATCCCT	187
CGRP	ATAGCCCAGAAAGAAGGTTACACA	ACAACACGATGACAATAGCCAAC	199
CRLR	ACTGCCCACTGAACACT	CATTTGAGGGCTTTCTTCATGGTA	200
RAMP1	CCTCTGCCCTTTTCATTGTGCTC	GGACACCTACACGATGCCCTC	100
β -actin	ACATCCGTAAGACCTCTATGCC	TACTCTGCTTGCTGATCCAC	223

1.3 动物

SPF级雄性SD大鼠70只,体质量220~250 g,购自湖南斯莱克实验动物有限公司,实验动物使用许可证号为SYXK(湘)2015-0016,生产许可证号为SCXK(湘)2019-0004。本动物实验研究符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

2 方法

2.1 药物提取

附子汤(批号20191110)制备方法:取制附子饮片20 g,加2倍量水(mL/g)浸泡30 min,煎煮2次,过滤,合并药液后蒸发浓缩至质量浓度为2 mg/mL的药液(以生药计)。

芎麻汤有效部位(批号20191220)制备方法:取川芎饮片2 kg、天麻饮片0.5 kg,依次以8倍量(mL/g)、6倍量(mL/g)水煎煮2次,合并滤液并浓缩至10 L后,依次采用等体积乙酸乙酯、正丁醇萃取(每种溶剂重复萃取3次),分别得到乙酸乙酯、正丁醇提取物,经旋转蒸发仪回收有机溶剂、水浴挥干、烘箱烘干后,得乙酸乙酯提取物26.46 g、正丁醇提取物55.19 g。

2.2 动物分组及给药剂量

70只大鼠按体质量随机分为7组:正常组,模型组,阳性对照组(盐酸氟桂利嗪胶囊0.9 mg/kg,根据成人临床剂量换算而得的等效剂量),芎麻汤乙酸乙酯提取物

低、高剂量组(0.87、3.46 g/kg),芎麻汤正丁醇提取物低、高剂量组(1.80、7.20 g/kg)。芎麻汤有效部位各剂量均根据成人临床剂量换算而得,为1.4倍等效剂量。SD大鼠正常组8只,模型组12只,其余给药组每组10只。

2.3 模型建立及药物干预

肝阳上亢兼瘀血型偏头痛大鼠模型评价标准^[6-8]:遵循中医药理论,参照《中药新药临床指导原则(试行)》中有关偏头痛中医证候诊断标准,以大鼠双眼结膜颜色加深变红,易激惹,频繁打斗,提尾时尖叫、惊跳甚至咬人等宏观体征,作为肝阳上亢证模型复制成功标准;以大鼠电刺激时出现咀嚼肌收缩、口鼻分泌物增多,清醒后出现节律性抖动头部、过度理毛、甩头、扭头等行为表现,以及被毛蓬松无泽,舌质紫暗或伴瘀斑、瘀点等宏观体征,作为瘀血型偏头痛模型复制成功的观察标准。按此评价标准,最终模型组、阳性组及芎麻汤有效部位各剂量组均保留8只大鼠。

除正常组(以10 mL/kg灌胃0.9%氯化钠溶液)大鼠外,其余各组大鼠均以2 g/kg灌胃等体积附子汤,每天1次,连续4周,复制肝阳上亢证模型^[6];各给药组大鼠从灌胃附子汤第15天起,同时灌胃等体积的相应药物,每天1次,连续2周,正常组、模型组则灌胃0.9%氯化钠溶液。第29天,除正常组外,其余各组大鼠均参照课题组前期造模方法电刺激大鼠三叉神经节复制肝阳上亢兼瘀血型偏头痛模型^[6-7]。待大鼠清醒后,各组大鼠按前述方法再维持灌胃给药1次。

2.4 大鼠宏观体征及行为表现观察

电刺激时,观察大鼠是否存在咀嚼肌收缩、口鼻分泌物增多的症状;电刺激结束待大鼠清醒后、末次灌胃30 min后观察其毛发、舌象、神情、性情等宏观体征及行为表现,以判定造模是否成功。

2.5 取材及指标检测

2.5.1 取材 观察大鼠宏观体征及行为表现后,深度麻醉大鼠,结扎腹主动脉,先用预冷的0.9%氯化钠溶液进行心脏灌注,当流出液体清亮时,再用预冷的现配4%多聚甲醛固定。大鼠灌注固定后取全脑组织,随即分离出TCC,分为3份:第1份置于4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液(PBS)中,于-20℃冰箱保存,用于免疫组织化学法检测;第2份置于加有RNA裂解液的冻存管中,于-80℃冰箱冻存,用于RT-qPCR法检测;第3份直接置于冻存管中,于-80℃冰箱保存,用于Western blot法检测。

2.5.2 大鼠TCC内TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1阳性表达的检测 采用免疫组织化学法进行检测,每个样本检测3次。取“2.5.1”项下第1份标本进行冰冻切片(5~7 μm),经烤片、脱蜡、热修复抗原、灭活内源性酶后,滴加稀释的一抗(TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1抗体稀释比例均为1:400),于4℃过夜,再用PBS冲洗3次;滴加稀释的二抗(稀释比例均为1:1000)于37℃孵育30 min, PBS冲洗3次;用新配的DAB显色,室温孵育5 min;最后,用蒸馏水洗涤,苏木素复染。贴片,晾干,脱水,二甲

苯透明,中性树胶封片,用显微镜观察并用Motic B5显微摄像系统采像。用Image-Pro-Plus图像分析软件分析各组大鼠TCC内TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1的阳性表达情况(镜下棕色或深棕色现象可以判断为阳性表达)。

2.5.3 大鼠TCC内TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1 mRNA相对表达量的检测 采用RT-qPCR法进行检测,每个样本检测3次。取“2.5.1”项下第2份标本0.02 g,依次加入TRIZOL试剂、三氯甲烷、异丙醇、75%乙醇提取总RNA,用无菌无酶水复溶后得RNA溶液。吸取RNA溶液2 μL,用紫外分光光度计在260、280 nm波长处测定其吸光度值,并计算浓度及纯度;另取RNA溶液3 μL按试剂盒说明书操作,以组织中总mRNA为模板,逆转录cDNA(逆转录条件为50℃孵育50 min、85℃孵育5 min),以cDNA为模板进行RT-qPCR实验扩增。PCR反应体系(每个样本每个指标3个孔,每孔10 μL,共30 μL)包括:反转录产物2 μL,上、下游引物各1 μL, ddH₂O 11 μL, SYB GREEN PCR Master Mix(2×)15 μL。PCR反应条件:95℃预变性10 min;95℃变性15 s,60℃退火/延伸30 s,40个循环。以正常组样品为对照样品,采用2^{-ΔΔCt}法计算各目的mRNA的相对表达量。

2.5.4 大鼠TCC内TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1蛋白相对表达量的检测 采用Western blot法进行检测,每个样本检测3次。取“2.5.1”项下第3份标本0.03 g,用预冷的PBS冲洗后加入RIPA裂解液400 μL提取蛋白,测定蛋白上清液的浓度后,进行蛋白变性。将已变性蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶电压80 V,分离胶电压120 V,电泳时间150 min)分离后,转膜(恒定电流300 mA, CGRP、RAMP1 30 min, CRLR 70 min, TRPV1、β-actin 60 min);用5%脱脂奶粉室温封闭2 h,加入一抗(TRPV1、RAMP1、CRLR抗体稀释比例均为1:1000, CGRP抗体稀释比例为1:1500, β-actin稀释比例为1:5000)室温孵育90 min,于4℃孵育过夜;加入二抗(R、M稀释比例分别为1:6000、1:5000)孵育1 h;置于ECL显色液中孵育3 min,暗盒中曝光20 min后,显影冲洗底片并扫描。采用Quantity one软件进行定量分析。目的蛋白相对表达量=目的蛋白条带灰度值/内参β-actin条带灰度值。

2.6 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 芎麻汤有效部位对大鼠宏观体征及行为表现的影响

电刺激时,大鼠均出现了咀嚼肌收缩、口鼻分泌物增多的症状。电刺激结束待大鼠清醒后,与正常组相比,模型组大鼠均出现了双眼结膜颜色加深变红,易激惹,频繁打斗,提尾时尖叫、惊跳甚至咬人等宏观体征,以及节律性抖动头部、过度理毛、甩头、扭头等行为表现;同时被毛明显蓬松无泽,大部分大鼠的舌质出现紫暗,小部分甚

至有明显瘀斑或瘀点,提示肝阳上亢兼瘀血型偏头痛模型复制成功。末次灌胃 30 min 后,各给药组大鼠以上情况均明显改善,个别大鼠以上情况甚至完全消失。

3.2 芎麻汤有效部位对大鼠 TCC 内 TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1 阳性表达的影响

与正常组相比,模型组大鼠 TRPV1、CGRP、CRLR、

RAMP1 阳性表达均显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比,阳性组和芎麻汤有效部位各组大鼠 TCC 内 TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1 阳性表达均不同程度降低,除阳性对照组、芎麻汤乙酸乙酯提取物低剂量组的 CGRP 以及芎麻汤正丁醇提取物低剂量组的 TRPV1 外,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图 1、表 2。

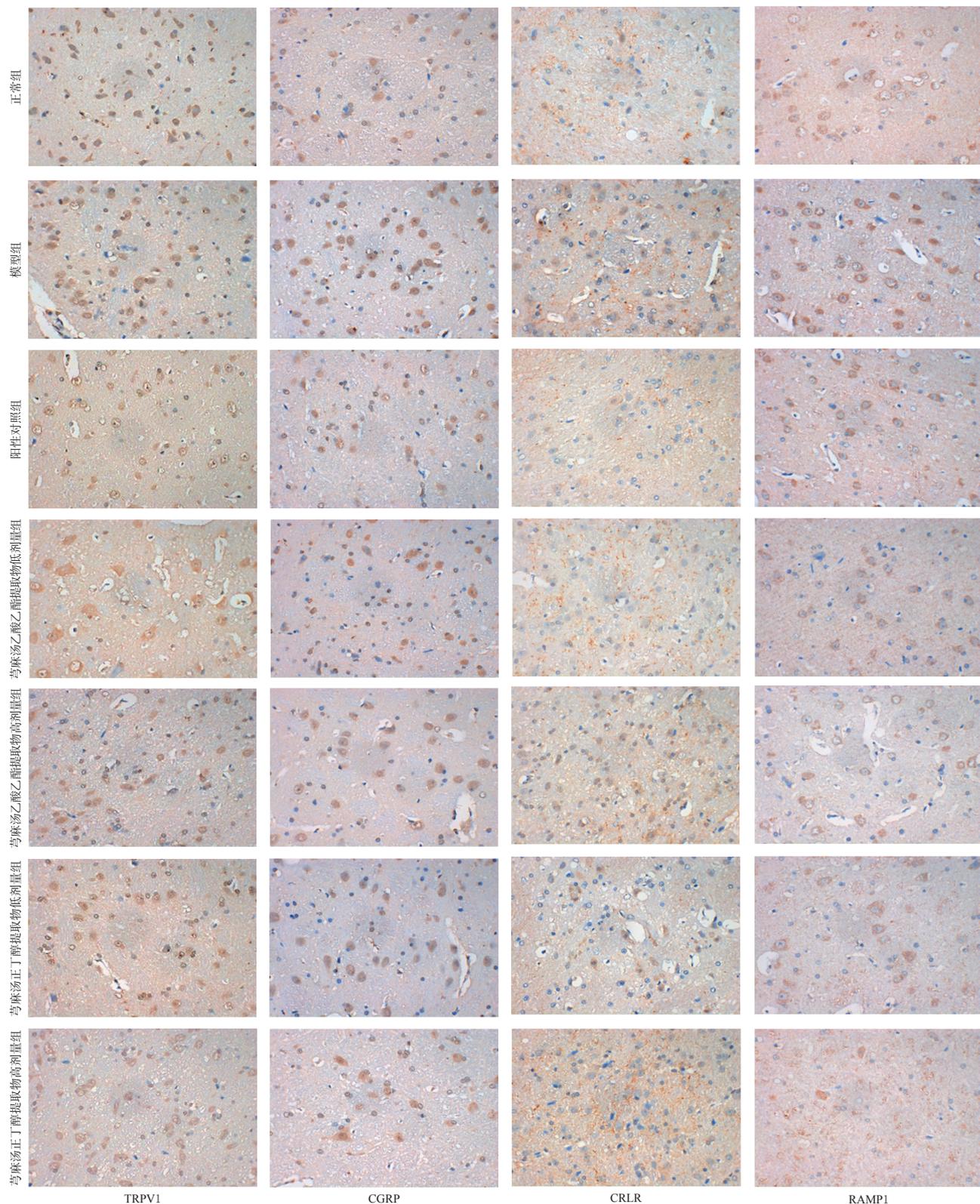


图 1 各组大鼠 TCC 内 TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1 的免疫组织化学染色图($\times 400$)

表2 各组大鼠TCC内TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1阳性面积百分比($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	TRPV1	CGRP	CRLR	RAMP1
正常组	4.314 ± 0.166	4.210 ± 1.149	3.591 ± 0.711	3.852 ± 0.318
模型组	5.991 ± 0.815 ^a	5.851 ± 0.791 ^a	5.224 ± 0.461 ^a	5.331 ± 0.298 ^a
阳性对照组	4.699 ± 0.468 ^b	4.933 ± 0.478	3.049 ± 1.066 ^b	3.769 ± 0.052 ^b
芎麻汤乙酸酯提取物低剂量组	4.067 ± 0.098 ^b	5.367 ± 0.663	3.088 ± 0.472 ^b	3.354 ± 0.147 ^b
芎麻汤乙酸酯提取物高剂量组	4.711 ± 0.615 ^b	4.140 ± 0.530 ^b	3.393 ± 0.682 ^b	2.972 ± 0.878 ^b
芎麻汤正丁醇提取物低剂量组	5.077 ± 0.383	4.584 ± 0.863 ^b	4.227 ± 0.236 ^b	3.643 ± 0.497 ^b
芎麻汤正丁醇提取物高剂量组	4.501 ± 0.357 ^b	4.182 ± 0.701 ^b	3.890 ± 0.574 ^b	3.371 ± 0.389 ^b

a: 与正常组相比, $P < 0.05$; b: 与模型组相比, $P < 0.05$

3.3 芎麻汤有效部位对大鼠TCC内TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1 mRNA相对表达量的影响

与正常组相比, 模型组大鼠TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1 mRNA相对表达量均显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比, 阳性对照组和芎麻汤有效部位各组大鼠TCC内TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1 mRNA相对表达量均不同程度降低, 除阳性对照组的CRLR外, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表3。

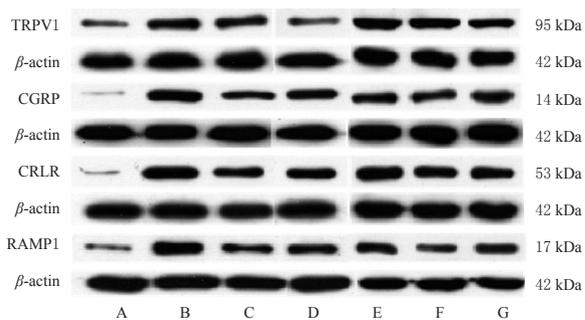
表3 各组大鼠TCC内TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1 mRNA相对表达量($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	TRPV1	CGRP	CRLR	RAMP1
正常组	1.006 ± 0.106	1.000 ± 0.073	1.004 ± 0.088	1.000 ± 0.071
模型组	5.860 ± 1.213 ^a	9.051 ± 0.344 ^a	4.921 ± 0.899 ^a	10.644 ± 0.645 ^a
阳性对照组	2.473 ± 0.512 ^b	6.473 ± 0.409 ^b	4.196 ± 0.908	5.632 ± 0.586 ^b
芎麻汤乙酸酯提取物低剂量组	2.860 ± 0.343 ^b	6.121 ± 0.494 ^b	2.725 ± 0.348 ^b	4.804 ± 0.666 ^b
芎麻汤乙酸酯提取物高剂量组	1.652 ± 0.226 ^b	5.151 ± 0.763 ^b	2.352 ± 0.978 ^b	3.187 ± 0.428 ^b
芎麻汤正丁醇提取物低剂量组	3.806 ± 0.786 ^b	5.379 ± 0.455 ^b	3.016 ± 2.624 ^b	5.220 ± 0.375 ^b
芎麻汤正丁醇提取物高剂量组	3.212 ± 1.980 ^b	5.750 ± 0.695 ^b	1.636 ± 0.275 ^b	3.906 ± 0.378 ^b

a: 与正常组相比, $P < 0.05$; b: 与模型组相比, $P < 0.05$

3.4 芎麻汤有效部位对大鼠TCC内TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1蛋白相对表达量的影响

与正常组相比, 模型组大鼠TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1蛋白相对表达量均显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比, 阳性对照组和芎麻汤有效部位各组大鼠TCC内TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1蛋白相对表达量均不同程度降低, 除芎麻汤正丁醇提取物低、高剂量组及乙酸酯提取物低剂量组的CRLR, 以及正丁醇提取物低剂量组的TRPV1、RAMP1外, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图2、表4。



A: 正常组; B: 模型组; C: 阳性对照组; D, E: 芎麻汤乙酸酯提取物低、高剂量组; F, G: 芎麻汤正丁醇提取物低、高剂量组

图2 各组大鼠TCC内TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1的蛋白表达电泳图

表4 各组大鼠TCC内TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	TRPV1	CGRP	CRLR	RAMP1
正常组	0.113 ± 0.039	0.177 ± 0.021	0.190 ± 0.046	0.170 ± 0.070
模型组	0.284 ± 0.035 ^a	0.538 ± 0.045 ^a	0.423 ± 0.083 ^a	0.578 ± 0.043 ^a
阳性对照组	0.181 ± 0.051 ^b	0.324 ± 0.059 ^b	0.185 ± 0.053 ^b	0.255 ± 0.031 ^b
芎麻汤乙酸酯提取物低剂量组	0.185 ± 0.035 ^b	0.260 ± 0.170 ^b	0.225 ± 0.205	0.325 ± 0.361 ^b
芎麻汤乙酸酯提取物高剂量组	0.120 ± 0.028 ^b	0.280 ± 0.028 ^b	0.170 ± 0.042 ^b	0.295 ± 0.050 ^b
芎麻汤正丁醇提取物低剂量组	0.250 ± 0.071	0.220 ± 0.028 ^b	0.250 ± 0.170	0.505 ± 0.120
芎麻汤正丁醇提取物高剂量组	0.210 ± 0.028 ^b	0.235 ± 0.064 ^b	0.340 ± 0.113	0.200 ± 0.156 ^b

a: 与正常组相比, $P < 0.05$; b: 与模型组相比, $P < 0.05$

4 讨论

偏头痛是最常见的致残性原发性头痛^[9], 严重影响患者的生活质量。2017年全球疾病负担研究显示, 按伤残损失健康生命年(years lived with disability, YLDs)计算, 头痛疾患是我国第8位致残性疾病, 而偏头痛所致YLDs占头痛疾患所致YLDs的82.5%^[10]。偏头痛在我国具有发病率高、致残率高的特点, 许多偏头痛患者对西医药物治疗依从性差、疗效欠佳或不能耐受不良反应, 导致急性镇痛药的滥用和头痛的慢性化^[9]。在偏头痛防治方面, 中医具有一定优势, 已有多部指南推荐可采用针灸或服用中药等进行干预^[11-12]。

证候是中医治疗的核心, 是中药复方干预的对象, 运用病证结合的研究模式, 有利于突出中医药优势^[13]。电刺激三叉神经节诱导引发的偏头痛动物模型是目前偏头痛研究较常用的模型, 与中西医临床诊断标准的吻合度约60%^[14]。附子属辛、甘, 大热之品, 久用, 灼伤肝肾之阴而发生肝阳上亢^[6]。又依据中医“若有所堕坠, 恶血在内而不去, ……则气血凝结……”^[15]及“世谓血块为瘀, ……然即是离经之血, 虽清血鲜血, 亦是瘀血”^[16]的理论, 以附子汤长期灌胃(即恶血), 加上电刺激三叉神经节的开颅手术导致的出血(即瘀血)等因素, 可诱导大鼠出现血液黏滞度增高、血液流变学异常的瘀血症^[17]。故对大鼠灌胃附子汤(4周)联合电刺激三叉神经节的方法, 可从病和证两方面综合模拟肝阳上亢兼瘀血型偏头痛模型。与单纯偏头痛模型和单纯肝阳上亢证或瘀血症模型相比, 该模型在研究芎麻汤治疗偏头痛的药效评价及机制研究方面更具有优势。本研究结果显示, 肝阳上亢证模型大鼠更易被激惹, 结膜充血、打斗及提尾时尖叫、惊跳、咬人的发生情况也明显增多。经电刺激诱导后, 肝阳上亢兼瘀血型偏头痛模型大鼠可出现咀嚼肌收缩、口鼻分泌物增多; 清醒后出现节律性抖动头部、过度理毛、甩头、扭头等行为变化, 同时被毛蓬松无泽, 大部分大鼠舌质紫暗或有瘀斑、瘀点等, 但正常组大鼠均未出现以上变化, 说明肝阳上亢兼瘀血型偏头痛模型复制成功。

TRPV1是一种高钙渗透性的非选择性阳离子通道, 主要分布于伤害性感觉神经元。TRPV1又称辣椒素受体, 可被辣椒素等化学成分、酸($\text{pH} < 6$)、热刺激(温度 $> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$)等激活, 使阳离子(如 Ca^{2+})内流, 触发神经末梢释

放神经肽类和兴奋性氨基酸,最终引起大脑皮层痛觉形成^[18]。目前,偏头痛的发病机制尚无定论。有研究发现,一氧化氮、伞形酮、丙烯醛等能引起偏头痛发作,其通过激活 TRPV1 通道,引起颅脑感觉神经元的血管周围末端释放 CGRP,引起神经源性炎性反应;同时 CGRP-R 拮抗剂、CGRP 单克隆抗体可阻断此反应,即通过阻断 CGRP/CGRP-R 信号通路能取得理想的镇痛作用^[19]。因此,本研究团队推测,在偏头痛三叉神经血管系统内抑制 TRPV1-CGRP/CGRP-R 信号通路中 CGRP 的释放,阻断神经源性炎性反应,将是治疗偏头痛的一种新策略。本研究结果表明,附子汤灌胃联合电刺激三叉神经节显著增加了大鼠 TCC 内 TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1 阳性表达、mRNA 及蛋白相对表达量,导致 TRPV1-CGRP/CGRP-R 通路活化,说明附子汤灌胃联合电刺激三叉神经节引起了三叉神经血管系统激活,TRPV1-CGRP/CGRP-R 通路的活化在肝阳上亢兼瘀血型偏头痛发病过程中发挥了重要作用。芎麻汤有效部位均能不同程度下调肝阳上亢兼瘀血型偏头痛模型大鼠 TCC 内 TRPV1、CGRP、CRLR、RAMP1 的阳性表达、mRNA 及蛋白相对表达量,即能够一定程度抑制附子汤灌胃联合电刺激三叉神经节所致的 TRPV1-CGRP/CGRP-R 通路的活化。

综上所述,本研究发现芎麻汤防治偏头痛的作用机制可能与抑制三叉神经节血管系统中 TRPV1-CGRP/CGRP-R 信号通路活性有关。由于偏头痛的发病机制和 TRPV1 通路非常复杂,且近期研究发现,肠道微生物也可能通过 TRPV1、CGRP 等参与偏头痛的发生发展^[20-21],因此,芎麻汤防治偏头痛的作用机制还需进一步研究和探讨。

参考文献

- [1] 张月清,周利民,赖智君.平肝通络推拿结合芎麻汤治疗偏头痛的临床研究[J].辽宁中医杂志,2019,46(1):141-144.
- [2] 金玉华,官俏兵,陆旭东,等.芎麻汤加减对偏头痛患者疼痛缓解及血管内皮功能的影响[J].中药材,2019,42(2):439-441.
- [3] 刘顶鼎,刘冬,郭建生,等.芎麻汤药效部位对硝酸甘油诱导偏头痛大鼠三叉神经颈髓复合体内 CGRP-CRLR/RAMP1 信号通路的影响[J].西安交通大学学报(医学版),2017,38(4):596-601.
- [4] 刘顶鼎,刘冬,周英,等.芎麻汤不同提取物对新生大鼠三叉神经节神经元 TRPV1 表达的影响[J].中华中医药杂志,2020,35(9):4380-4385.
- [5] SHIBATA M, TANG C H. Implications of transient receptor potential cation channels in migraine pathophysiology[J]. Neurosci Bull, 2021, 37(1):103-116.
- [6] 刘顶鼎,常露露,杨菁,等.肝阳上亢兼瘀血型偏头痛病证结合大鼠模型建立的研究[J].时珍国医国药,2021,32(5):1253-1256.
- [7] 刘顶鼎,杨菁,刘冬,等.芎麻汤提取物对肝阳上亢兼瘀血型偏头痛模型大鼠脑组织中 5-HT、CGRP 的影响[J].中国药房,2020,31(1):24-29.
- [8] 黄志云,苏洁贞,刘明平,等.川芎-天麻治疗偏头痛肝阳上亢证大鼠的作用机制研究[J].中药新药与临床药理,2015,26(5):609-613.
- [9] 于生元,万琪,王伟,等.偏头痛非药物防治中国专家共识[J].神经损伤与功能重建,2021,16(1):1-5.
- [10] YAO C Y, WANG Y, WANG L J, et al. Burden of headache disorders in China, 1990-2017: findings from the Global Burden of Disease Study 2017[J]. J Headache Pain, 2019, 20(1):102.
- [11] 徐榛敏,贾敏,梁晓,等.偏头痛中医临床实践指南:征求意见稿[J].中国中药杂志,2020,45(21):5057-5067.
- [12] STEINER T J, JENSEN R, KATSARAVA Z, et al. Aids to management of headache disorders in primary care: 2nd edition: on behalf of the European Headache Federation and Lifting the Burden: the Global Campaign against Headache[J]. J Headache Pain, 2019, 20(1):57.
- [13] 王新陆,朱明军,王建茹,等.基于病证结合的中医经典名方上市后评价要点[J].中国中药杂志,2021,46(8):2004-2009.
- [14] 雷会霞,白明,苗明三.基于中西医临床病证特点的偏头痛动物模型分析[J].中华中医药杂志,2021,36(4):1892-1894.
- [15] 田代华,刘更生.灵枢经[M].北京:人民卫生出版社,2017:129.
- [16] 唐宗海.血证论[M].欧阳兵,李文华,韩涛,点校.天津:天津科学技术出版社,2003:83.
- [17] 顾静,李海龙,吴国泰,等.头痛安的镇痛作用及对大鼠血液流变学的影响[J].中药药理与临床,2019,35(3):117-122.
- [18] ZHANG K H, JULIUS D, CHENG Y F. Structural snapshots of TRPV1 reveal mechanism of polymodal functionality[J]. Cell, 2021, 184(20):5138-5150.e12.
- [19] GEPPETTI P, BENEMEI S, DE CESARIS F. CGRP receptors and TRP channels in migraine[J]. J Headache Pain, 2015, 16(Suppl 1):A21.
- [20] 刘洁琼,于生元.肠道菌群与偏头痛的关系探讨[J].中国疼痛医学杂志,2019,25(1):6-10.
- [21] LAI N Y, MUSSER M A, PINHO-RIBEIRO F A, et al. Gut-innervating nociceptor neurons regulate peyer's patch microfold cells and SFB levels to mediate *Salmonella* host defense[J]. Cell, 2020, 180(1):33-49.e22.

(收稿日期:2022-02-17 修回日期:2022-06-15)

(编辑:曾海蓉)