

芎芷地龙汤对偏头痛模型大鼠脑组织痛觉传导通路 c-fos和 5-HT蛋白表达的影响

赵永烈* 王玉来¹ 高颖² 姚卓婷³

(1. 北京中医药大学东方医院, 北京市丰台区方庄芳星园一区 6号, 100078;

2. 北京中医药大学东直门医院; 3. 人民卫生出版社)

基金项目: 教育部博士点新教师基金项目(200800261023)

* 通讯作者: yongy3@126.com, (010)67689764

摘要 目的 研究芎芷地龙汤对偏头痛模型大鼠的镇痛作用机制。方法 将48只健康雄性SD大鼠随机为生理盐水组、模型组、舒马普坦组、中药组, 每组12只。皮下注射硝酸甘油制备偏头痛动物模型, 经药物干预后在4h、6h取材, 测定三叉神经脊束核(SPN5)和中脑导水管周围灰质(PAG)中细胞癌基因 fos(c-fos)和 5-羟色胺(5-HT)的阳性细胞数。结果 SPN5中蛋白表达: 中药组 c-fos 阳性细胞数减少, 4h多于6h, 与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$); 5-HT阳性细胞数增多, 4h稍多于6h, 与模型组比较有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。PAG中蛋白表达: 中药组 c-fos 阳性细胞数减少, 4h多于6h, 与模型组比较有统计学差异($P < 0.01$); 中药组 5-HT 阳性细胞数增加更多, 6h多于4h, 与模型组比较有统计学差异($P < 0.01$)。结论 芎芷地龙汤可以减少由硝酸甘油诱导的 c-fos 的表达, 增加 5-HT 的表达, 进一步减少 SPN5神经元的兴奋性, 激动 5-HT 下行镇痛系统, 且可持续较长时间, 增高痛阈, 阻止痛觉信息的传递, 起到镇痛作用。

关键词 偏头痛; 芎芷地龙汤; 三叉神经脊束核; 导水管周围灰质; 细胞癌基因 fos; 5-羟色胺

Effect of Xiong zhi Dilong Decoction on the Expression of c-fos and 5-HT in the Brain Tissues Pain Pathway of Migraine Model Rats

ZHAO Yonglie¹, WANG Yulai¹, GAO Ying², YAO Zhuoting³

(1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078; 2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine; 3. The People's Medical Publishing House)

ABSTRACT Objective To study the mechanism of analgesic effect of Xiong zhi Dilong Decoction [Decoction of Chuanxiong (*Rhizoma Ligustici Chuangxiong*), Baizhi (*Radix Angelicae Dahuricae*), Dilong (*Lumbricus*)] on the migraine model rats.

Methods The 48 healthy male SD rats were randomized into 4 groups: normal saline group, model group, Sumatriptan group, and Chinese medicine group, with 12 in each. The migraine models were made by subcutaneous injection of nitroglycerin, and the brain tissue samples were collected 4h and 6h after medication intervention. The immunohistochemical staining technique was then conducted to determine the expression of cellular oncogene fos (c-fos) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in SPN 5 and PAG. **Results** Expression in SPN 5 A reduction of c-fos expression in the Chinese medicine group was observed, with a decrease in expression from 4h to 6h. There was statistical difference in comparing with that of the model group ($P < 0.01$). An increase of 5-HT expression in the Chinese medicine group was noticed, with a slight decrease in expression from 4h to 6h. There was statistical difference in comparing with that of the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Expression in PAG c-fos expression in the Chinese medicine group was reduced, with decrease in expression from 4h to 6h. There was statistical difference in comparing with that of the model group ($P < 0.01$). The increase of 5-HT expression in the Chinese medicine group was more significant, and the positive cell was more at 6h than at 4h. There was statistical difference in comparing with that of the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Xiong zhi Dilong Decoction is able to reduce the c-fos expression induced by nitroglycerin, increase the 5-HT expression, hence depressing excitability in neurons of SPN 5 by stimulating the descending 5-HT analgesic pathway. This effect can last for a long period of time, to make the pain threshold increased and the transmission of nociceptive information inhibited.

Key Words migraine; Xiong zhi Dilong Decoction [Decoction of Chuanxiong (*Rhizoma Ligustici Chuangxiong*), Baizhi (*Radix Angelicae Dahuricae*) and Dilong (*Lumbricus*)]; spinal trigeminal nucleus; periaqueductal gray matter; cellular oncogene fos; 5-hydroxytryptamine

在偏头痛发生过程中, 三叉神经脊束核(SPN 5)作用, 中脑导水管周围灰质(PAG)在痛觉的传导过程中处在承上启下的重要地位, 是中枢内源性镇痛神经细胞的激活在痛觉信息的传导过程中发挥重要作用。

系统的关键结构 前期我们观察了芎芷地龙汤对偏头痛模型有镇痛、镇静作用^[1-2],为进一步探讨其对偏头痛的作用机理,本研究从偏头痛发病过程中痛觉传导通路中神经元激活状态方面,观察芎芷地龙汤对 SPN5和 PAG细胞癌基因 fos(c-fos)和 5-羟色胺(5-HT)蛋白共存表达情况,探讨芎芷地龙汤对偏头痛的作用机制

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

芎芷地龙汤制剂(由川芎、白芷、生石膏、地龙、延胡索按 3∶2∶6∶3∶2的比例配伍组成)由北京中医药大学东方医院制剂室提取(每毫升含生药 1.8g);硝酸甘油(nitroglycerin,NTG)注射液,5mg/ml,北京益民药业有限公司生产;戊巴比妥钠、多聚甲醛,均购自北京化学试剂公司;PBS磷酸缓冲液(0.01M,pH7.2~7.4),DAB显色剂,AEC显色剂,双染增强剂,抗体稀释液,CLEARMOUNT(tm)封片剂,TritonX-100即用型 SP-9001免疫组化检测试剂盒,兔抗大鼠 c-fos 抗体,以上试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗大鼠 5-HT 抗体,购自武汉博士德生物工程有限公司

1.2 动物

健康雄性 SD 大鼠,清洁级,48只,体重 250~270g,由北京维通利华实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK(京)2006-0009

1.3 实验仪器

Leica CM1850 恒温冷冻切片机,德国生产;BX51M 显微镜,日本 Olympus 公司生产。

1.4 实验分组

动物在同一条件下适应性喂养,按照随机数字表法分为生理盐水组、模型组、舒马普坦组、中药组,每组 12只

1.5 造模及给药

参照文献[3-4]制作偏头痛动物模型。动物适应性喂养 1周后,各组处理如下:生理盐水组连续灌胃生理盐水 3天,第 3天灌胃 30min 后皮下注射生理盐水 2ml/kg;模型组连续灌胃生理盐水 3天,第 3天灌胃 30min 后皮下注射 NTG 注射剂 10mg/kg;舒马普坦组连续灌胃琥珀酸舒马普坦(6mg/kg)3天,第 3天灌胃 30min 后皮下注射 NTG 注射剂 10mg/kg;中药组连续灌胃给芎芷地龙汤(10.8g/kg)3天,第 3天灌胃 30min 后皮下注射 NTG 注射剂 10mg/kg 动物皮下注射 NTG 注射剂或生理盐水后,分两个时间点即 4h、6h 采集标本

1.6 切片制作及染色

按照《大鼠脑立体定位图谱》^[5],在 6.6~7.6mm 之间及 12.8~13.8mm 连续冠状切片,层厚 20μm,隔 5 张取 1张 切片收集于 0.01mol/L 的 PBS(pH7.4)中待染 按照试剂盒说明书进行免疫双标染色

1.7 阳性细胞计数及图像分析

在 10倍物镜下观察每张切片的 c-fos 阳性细胞和 5-HT 阳性细胞,c-fos 染色暗红色沉淀位于细胞核内认为是阳性,5-HT 染色棕褐色沉淀位于细胞浆内认为是阳性,并只记录有明显染色的神经元,以 Image-pro Plus 5.0 图像分析系统采集图像和分析,记录各组图像阳性细胞数

1.8 统计学方法

运用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,先进行正态分布和方差齐性检验,各组间进行单因素方差分析,并作 LSD 检验

2 结果

2.1 各组 SPN5 中蛋白表达比较

表 1 示,模型组大鼠 4h、6h 时 c-fos、5-HT 阳性细胞数增多,4h 多于 6h,与生理盐水组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);中药组和舒马普坦组大鼠 4h、6h 时 c-fos 阳性细胞数减少,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),与生理盐水组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);中药组和舒马普坦组大鼠 4h、6h 时 5-HT 阳性细胞数增多,与模型组、生理盐水组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)

表 1 各组大鼠不同时间点 SPN5 中 c-fos、5-HT 蛋白表达比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	4h		6h	
		c-fos	5-HT	c-fos	5-HT
模型组	12	103±21	110±22	92±21	92±18
生理盐水组	12	30±14*	67±15*	3±10*	65±12*
中药组	12	43±20*	146±28△	36±18*	145±25*△
舒马普坦组	12	38±15*	184±49*△	4±8*	179±34*△

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与生理盐水组比较,△ $P < 0.01$

2.2 各组大鼠 PAG 中蛋白表达比较

表 2 示,模型组大鼠 4h、6h 时 c-fos 阳性细胞数增多,4h 多于 6h,与生理盐水组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);5-HT 阳性细胞数增多,4h 多于 6h,但两个时间点的阳性细胞数与生理盐水组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。中药组和舒马普坦组大鼠 4h、6h 时 c-fos 阳性细胞数减少,4h 多于 6h,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),与

生理盐水组比较无差异 ($P>0.05$);中药组和舒马普坦组大鼠 4h、6h 时 5-HT 阳性细胞数增加更多,两个时间点的阳性细胞数与模型组、生理盐水组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$)

表2 各组大鼠不同时间点 PAG 中 c-fos 和 5-HT 蛋白表达比较 (个, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	4h		6h	
		c-fos	5-HT	c-fos	5-HT
模型组	12	85±14	123±27	79±11	108±22
生理盐水组	12	3±1 ^a	9±3	33±19	97±20
中药组	12	46±20 [*]	160±31 [△]	42±14	163±29 [△]
舒马普坦组	12	44±17 [*]	179±30 [△]	40±12	197±36 [△]

注:与模型组比较,* $P<0.01$;与生理盐水组比较,△ $P<0.01$

3 讨论

研究证明,三叉神经系统是偏头痛患者头痛及其他症状出现的解剖学基础,其中 SPN5 神经细胞的激活在痛觉信息的传导过程中发挥重要作用^[6]。

PAG 参与疼痛的调控过程,是中枢内源性镇痛系统的关键结构,处在承上启下的重要地位^[7]。近年来组织形态学、影像学研究等均提示 PAG 在偏头痛发病中的具有重要作用^[8-9]。c-fos 调节细胞内信息的传递,已被广泛用于作为神经元激活的标记物,中枢部 c-fos 的表达为偏头痛发生的客观指标^[10]。5-HT 在痛觉的调控中以及在偏头痛发病中的重要作用已经得到公认,最近发现 5-HT_{1B/1D} 受体激动剂对大部分偏头痛发作患者有效,开创了治疗偏头痛的新途径。本研究以硝酸甘油型偏头痛模型为对象,观察偏头痛模型 SPN5 及 PAG 中 c-fos 和 5-HT 阳性细胞表达情况,从组织学上说明动物受到伤害性刺激后痛觉传导通路上神经元的功能状态,从而揭示芎芷地龙汤干预偏头痛的作用机制。

研究发现,模型动物皮下注射硝酸甘油 5min 后,出现双耳发红、竖耳、甩头、前肢频繁搔头、皮肤发绀、竖毛、活动次数增加等外在表现(持续约 1h),继而蜷卧,活动减少,整个动物行为变化过程持续约 3~5h,这与文献报道的相一致^[11],而 SPN5 和 PAG 中 c-fos 和 5-HT 免疫阳性细胞在 4h 表达高峰,6h 表达减少,表明由 NO 诱导的伤害性信息的传递产生在 4h 达高峰,同时发现模型动物 5-HT 免疫阳性细胞表达较生理盐水组表达增加,但在 PAG 中 5-HT 表达与生理盐水组比较差异无统计学意义,反映出机体在病理状态下的一种应激抗痛机制,但这种抗痛机制是有限的。有研究提示,机体受到疼痛刺激后, PAG 区的 5-HT 阳性神经元增加,合成的 5-HT 通过 PAG 内复杂的上下行纤维积极地参与内源性

镇痛过程^[12]。经过药物的干预后, c-fos 免疫阳性细胞显著减少,近乎达到生理状态下的水平,表明芎芷地龙汤可抑制伤害性刺激对 SPN5 及 PAG 神经元的激活,从而阻止痛觉信息的进一步传递;药物干预后 5-HT 免疫阳性细胞大量表达,且在 6h 时 PAG 中表达仍比 4h 高,表明芎芷地龙汤可激动 5-HT 镇痛系统,且可持续较长时间。

本研究结果表明,芎芷地龙汤可抑制伤害性刺激对 SPN5 和 PAG 神经元的激活,可激动 5-HT 镇痛系统,从而阻止痛觉信息的进一步传递,可有效减轻偏头痛痛觉的发生。在此研究中, 5-HT 在 PAG 中 6h 时表达更多,这种表达或持续更长时间,还有待进一步研究。

参考文献

[1] 赵永烈,王玉来,高颖. TL-1号方镇痛作用的实验研究[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(1): 37- 38.

[2] 赵永烈,王玉来,高颖. TL-1号方镇静作用的实验研究[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(4): 332- 333.

[3] Pardutz A, Krizbai I, Multon S, et al. Systemic nitroglycerin increases nNOS levels in rat trigeminal nucleus caudalis[J]. Neuroreport, 2000, 11(14): 3071- 3075.

[4] 赵永烈,王爱成,陈锦锋,等. 硝酸甘油型偏头痛模型评述[J]. 中国康复理论与实践, 2005, 11(6): 455- 456.

[5] 包新民,舒思云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 70- 100.

[6] 王玉洁,付峻,蔺慕慧,等. 偏头痛[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2004, 12(1): 19- 30.

[7] Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathway and endorphin circuitry[J]. Annu Rev Neurosci, 1984, 7: 309- 338.

[8] Hoskin KL, Bulmer DC, Lasalandra M, et al. Fos expression in the midbrain periaqueductal grey after trigeminovascular stimulation[J]. J Anat, 2001, 198(Pt 1): 29- 35.

[9] Welch KM, Nagesh V, Aurora SK, et al. Periaqueductal gray matter dysfunction in migraine: cause or the burden of illness? [J]. Headache, 2001, 41(7): 629- 637.

[10] 冯加海,徐礼鲜. c-fos原癌基因与痛觉调控[J]. 国外医学麻醉学与复苏分册, 2000, 21(3): 141- 143.

[11] 许争平,杨丽白,解龙昌,等. 硝酸甘油诱导偏头痛大鼠三叉神经尾核核因子 κ B 表达增加[J]. 国际脑血管病杂志, 2007, 15(7): 505- 508.

[12] 高艳,吴爱群,张静,等. 刺激大鼠海马后 PAG NRM 和脊髓背角 5-HT 的变化[J]. 解剖学杂志, 2002, 25(6): 558- 562.

(收稿日期: 2010- 07- 28;修回日期: 2011- 02- 14)

【编辑: 行之】