

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.07.011

川芎-天麻药对对偏头痛模型大鼠眶周机械痛阈及三叉神经节 AMPK/TRPA1 通路的影响

左笑¹, 梁丽琦¹, 唐岚琦¹, 蒙睿娜¹, 房冰莹¹, 王海芳¹, 崔海燕², 刘晓华¹✉

1. 陕西中医药大学, 陕西省咸阳市秦都区世纪大道中段1号, 712046; 2. 西藏民族大学

[摘要] **目的** 基于腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) /瞬时受体电位 A1 通道 (TRPA1) 通路探究川芎-天麻药对治疗偏头痛的可能作用机制。**方法** 48 只健康雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、川芎-天麻药对组, 每组 16 只。对照组和模型组给予 10 ml/kg 生理盐水灌胃, 川芎-天麻药对组给予 0.675 g/kg 川芎-天麻灌胃, 均每天 1 次, 连续 8 天。末次给药前造模, 对照组皮下注射生理盐水 10 ml/kg, 模型组和川芎-天麻药对组皮下注射硝酸甘油 10 ml/kg 制备偏头痛模型大鼠。运用 Von Frey 纤毛测定大鼠眶周机械痛阈值; 采用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测定大鼠血清、脑脊液中降钙素基因相关肽 (CGRP) 水平; 一氧化氮 (NO) 试剂盒测定血清、脑脊液中 NO 水平; RT-PCR 法检测大鼠三叉神经节中即刻早期基因 (c-Fos)、CGRP、瞬时受体电位 V1 通道 (TRPV1)、腺苷酸活化蛋白激酶 A (PRKAA) 及 TRPA1 mRNA 表达水平; 免疫荧光法检测三叉神经颈复合体 (TCC) 中 c-Fos 阳性细胞数和三叉神经节磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 (pAMPK)、TRPA1 蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠机械刺激阈值、pAMPK 蛋白表达降低, 血清中 CGRP、NO 水平, 三叉神经节 c-Fos、CGRP、TRPV1、TRPA1 mRNA 表达水平, TRPA1 蛋白表达和 TCC 中 c-Fos 阳性细胞数均显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 川芎-天麻药对组大鼠机械刺激阈值、pAMPK 蛋白表达显著上升, 血清中 CGRP、NO 水平, 三叉神经节中 c-Fos、CGRP、TRPV1、TRPA1 mRNA 表达水平, TRPA1 蛋白表达和 TCC 中 c-Fos 阳性细胞数明显下降 ($P < 0.05$)。**结论** 川芎-天麻药对可能通过调控三叉神经节中 AMPK/TRPA1 通路, 升高机械痛阈, 从而改善偏头痛症状。

[关键词] 偏头痛; 川芎; 天麻; 三叉神经节; 痛阈; 腺苷酸活化蛋白激酶; 瞬时受体电位 A1 通道

偏头痛是一组反复发作的、单侧搏动性头痛。我国偏头痛患病率为 9.3%^[1], 全球人群发病率高达 14%^[2]。偏头痛发病机制尚不完全清楚, 现代医学认为多种因素相互作用引起三叉神经血管通路反复激活并敏化, 导致中枢神经系统兴奋/抑制平衡功能失调, 从而出现偏头痛及其他伴随症状^[3-4]。中医学将偏头痛归属于少阳经病证, 认为头痛产生的病因是肝阴不足导致肝阳上亢、肝风内动^[5]。

川芎-天麻药对源于《圣济总录》, 由川芎、

天麻两味药材按 4:1 比例组成, 主治头痛、眩晕。Meta 分析结果显示, 川芎-天麻药对对偏头痛防治效果明显^[6]。药理学研究亦证明, 川芎-天麻药对中的有效成分川芎嗪、阿魏酸、天麻素、天麻苷元等能够通过调节神经递质、炎症因子的含量从而达到缓解偏头痛的作用^[7], 但其改善偏头痛疼痛症状的分子生物学机制尚不完全清楚。

瞬时受体单位 A1 通道 (TRPA1) 是一种广泛分布于三叉神经系统的非选择性阳离子通道型伤害性感受受体, 偏头痛的多种诱发因素均可激活 TRPA1 受体^[8]。研究^[9]发现, 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 激活可迅速下调初级感觉神经元细胞膜上 TRPA1 的表达, 并影响 TRPA1 介导的 Ca^{2+} 内流。本研究从 AMPK/TRPA1 通路角度探讨川芎-天麻药对治疗偏

基金项目: 国家自然科学基金 (8200422); 陕西省教育厅重点科学研究计划项目 (23JS005); 陕西中医药大学大学生创新创业训练计划项目 (S202210716057); 西藏自治区自然科学基金 (ZRKX2020000075); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2022JQ-870)

✉ 通讯作者: xiaohualiu@sntcm.edu.cn

头痛的可能作用机制,为其临床应用提供依据。本研究经陕西中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号:SUCMDL202211007005)。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 SD 雄性大鼠 48 只,7~8 周龄,体质量(200±30) g,由陕西中医药大学动物实验中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(陕)2021-001,实验动物使用许可证号:SYXK(陕)2021-001。所有大鼠自由摄食及饮水,在室温(22±2)℃、湿度(50±5)%、12 h 明暗交替环境中饲养。

1.2 药物

川芎 100 g,天麻 25 g,1000 ml 水浸泡 30 min,煎煮 2 次,合并滤液,浓缩至 75 g 浸膏,浸膏得率 60%,1 g 浸膏相当于 1.67 g 生药,其中川芎、天麻均购自康美药业股份有限公司。硝酸甘油注射液(批号:H11020289),北京益民药业有限公司。

1.3 主要试剂及仪器

10% 水合氯醛(上海山浦化工有限公司,批号:20208258);降钙素基因相关肽(CGRP)ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:NM0444D21270);一氧化氮(NO)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,批号:20230415);Trizol(批号:7E791I3)、反转录试剂盒(批号:7E731I3)、通用荧光定量 PCR 试剂盒(批号:7E722I3),均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;兔抗 TRPA1(Alomone labs 公司,批号:ACC037AN205);4% 多聚甲醛(博士德生物有限公司,批号:17K05A68);兔抗磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(pAMPK,美国 Cell Signaling Technology 公司,货号:#2535);抗即刻早期基因(c-Fos)抗体、抗神经元核抗原(NeuN)抗体、山羊抗鸡 IgY H&L 预吸附二抗、山羊抗兔 IgG H&L 预吸附二抗(均购自美国 Abcam 公司,货号分别为:ab208942、ab134014、ab150176、ab150077)。

电子天平(永康军胜辉益有限公司,型号:D3000555);实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司,型号:7500fast);冷冻切片机(德国 Leica 公司,型号:VT1200S);酶标仪(美国 BioTek 公司,型号:800TS);紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司,型号:ND-2000C);Von Frey 纤毛机械刺激测痛仪(美国 IITC 公司,型号:2390);免疫荧光显微镜(日本 Olympus 公司,型号:CKX53)。

1.4 动物分组及给药

SD 大鼠适应性饲养 1 周后,按随机数字表法将大鼠分为对照组、模型组、川芎-天麻药对组,每组 16 只。对照组和模型组大鼠给予生理盐水 10 ml/(kg·d)灌胃,川芎-天麻药对组大鼠给予人临床等效剂量^[10] 0.675 g/(kg·d)川芎-天麻灌胃。各组均每日灌胃 1 次,连续 8 天。末次灌胃前 1 h,对照组皮下注射生理盐水 10 ml/kg,模型组和川芎-天麻药对组皮下注射硝酸甘油 10 mg/kg 制备偏头痛模型。大鼠出现倦怠、活动减少、双耳变红、前爪频繁挠头等症状提示偏头痛模型制备成功^[11]。

1.5 观察指标及方法

造模组大鼠均造模成功,干预完成后当日各组采用抽签法抽取其中 10 只大鼠用于检测机械刺激阈值。机械痛阈值测定结束后所有大鼠进行取材,以 10% 水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,经颈静脉取血 4 ml,静置 15 min,4℃离心,收集上清液得到血清。经小脑延髓池吸取脑脊液约 150 μl 后,心脏灌注生理盐水,解剖分离三叉神经颈复合体(TCC)和三叉神经节,保存备用。上述 10 只大鼠检测血清、脑脊液中 CGRP、NO 水平,三叉神经节 c-Fos、CGRP、瞬时受体电位 V1 通道(TRPV1)、腺苷酸活化蛋白激酶 A (PRKAA)、TRPA1 mRNA 表达,剩余 6 只用于检测 TCC 中 c-Fos 和三叉神经节 TRPA1、pAMPK 蛋白表达。

1.5.1 Von Frey 纤毛测定机械刺激阈值 大鼠皮下硝酸甘油注射后 1 h,采用 Von Frey 纤毛机械刺激测痛仪刺激大鼠注射侧眼眶周皮肤,从 0.04 g 开始,每次刺激持续 1 s,当大鼠不出现回避反应时调大一级,直至大鼠出现回避反应,此时所用刺激量(g)即为机械性刺激痛阈值,重复测量 3 次,每次间隔 10 min,取平均值计算。最大刺激阈值为 6 g,如大鼠对该刺激无反应,则取该值为机械刺激阈值进行分析。

1.5.2 血清、脑脊液中 CGRP、NO 水平检测 取-80℃保存的血清及脑脊液,按照 ELISA 试剂盒说明书检测标本中 CGRP 含量,按 NO 测定试剂盒说明书方法检测 NO 含量。

1.5.3 免疫荧光法检测 TCC 中 c-Fos 和三叉神经节 TRPA1、pAMPK 蛋白表达水平 将分离出的新鲜 TCC 和三叉神经节组织置于 4% 多聚甲醛,4℃固定 48 h,后将组织转移至 30% 蔗糖溶液中脱水,72 h 后 OCT 包埋,冰冻切片机切片,厚度 16 μm。洗片后抗体稀释液室温封闭 1 h,一抗 4℃过夜(c-Fos

1 : 200, TRPA1 1 : 200, pAMPK 1 : 400, NeuN 1 : 500), 洗片后二抗 (1 : 500) 室温避光孵 1 h, 洗片后 DAPI 避光孵育 5 min 后再洗片, 封片, 荧光显微镜下观察、拍照。每个样本随机选取 3 张切片, 每张切片随机选取 6 个视野并用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析。c-Fos 表达结果以阳性细胞数计数, TRPA1 及 pAMPK 蛋白表达结果用其平均荧光强度与神经元特异性抗体 NeuN 的平均荧光强度比值表示, 以评价阳性表达的变化。

1.5.4 RT-PCR 法检测大鼠三叉神经节 c-Fos、CGRP、TRPV1、PRKAA、TRPA1 mRNA 表达 使用 Trizol 法提取组织中总 RNA, 检测 RNA 浓度后, 反转录为 cDNA。设计 c-Fos、CGRP、TRPV1、PRKAA、TRPA1 引物, 用 β -Actin 作为内参。进行 PCR 扩增, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。引物由上海生物工程股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列
Table 1 RT-PCR primer sequences

基因	正向引物序列	反向引物序列	产物长度 /bp
c-Fos	5'-GGTTTCAACGC- GGACTACGA-3'	5'-CGGACAGATCTGCGC- AAAAG-3'	151
CGRP	5'-AGAGATCCTG- CAACACTGCC-3'	5'-GAAGGCTTCAGAGCC- CACAT-3'	116
TRPV1	5'-TTCACCGAAT- GGGCCTATGG-3'	5'-TGACGGTTAGGGGTC- TCACT-3'	125
PRKAA	5'-TTCGGCAAAGT- GAAGATTGGA-3'	5'-TTGGAGTGCTGATCA- CTTGGT-3'	181
TRPA1	5'-AAGTAACCCCC- ACCCAGGAT-3'	5'-AGCTCTGAAGCCATA- GGCAC-3'	143

注: c-Fos, 即刻早期基因; CGRP, 降钙素基因相关肽; TRPV1, 瞬时受体电位 V1 通道; PRKAA, 腺苷酸活化蛋白激酶 A; TRPA1, 瞬时受体电位 A1 通道。

1.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件、SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计学处理。所有数据均符合正态

分布且方差齐, 采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey's 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠机械刺激阈值及血清、脑脊液中 CGRP、NO 水平比较

表 2 示, 与对照组比较, 模型组大鼠机械刺激阈值明显下降, 血清和脑脊液中 CGRP 水平显著升高, 血清 NO 水平亦升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 川芎-天麻药对组大鼠机械刺激阈值上升, 血清和脑脊液中 CGRP 水平显著降低, 血清 NO 水平亦降低 ($P<0.05$)。各组大鼠脑脊液中 NO 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠 TCC 中 c-Fos 表达及三叉神经节中 TRPA1、pAMPK、NeuN 蛋白表达比较

表 3 示, 与对照组比较, 模型组大鼠 TCC 中 c-Fos 阳性细胞数及三叉神经节中 pAMPK/NeuN 值明显下降, TRPA1/NeuN 值明显上升 ($P<0.05$); 与模型组比较, 川芎-天麻药对组大鼠 TCC 中 c-Fos 阳性细胞数及三叉神经节中 pAMPK/NeuN 值明显上升, TRPA1/NeuN 值明显下降 ($P<0.05$)。

表 3 各组大鼠 TCC 中 c-Fos 阳性细胞数和三叉神经节中 pAMPK、TRPA1 阳性表达比较

Table 3 Comparison of the number of c-Fos positive cells in the trigeminal cervical complex and the positive expression of pAMPK and TRPA1 in the trigeminal ganglion among groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	c-Fos 阳性细胞数/个	TRPA1/NeuN/%	pAMPK/NeuN/%
对照组	6	5.12 $\pm$ 0.53	47 $\pm$ 20	50 $\pm$ 30
模型组	6	1.51 $\pm$ 0.53 ^{a)}	77 $\pm$ 25 ^{a)}	32 $\pm$ 20 ^{a)}
川芎-天麻药对组	6	3.04 $\pm$ 1.04 ^{b)}	44 $\pm$ 30 ^{b)}	64 $\pm$ 27 ^{b)}

注: TCC, 三叉神经颈复合体; c-Fos, 即刻早期基因; pAMPK, 磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶; TRPA1, 瞬时受体电位 A1 通道; NeuN, 神经元核抗原。

a) 与对照组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠机械刺激阈值及血清和脑脊液中 CGRP、NO 水平比较

Table 2 Comparison of mechanical stimulation thresholds and levels of CGRP and NO in serum and cerebrospinal fluid among groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	机械刺激阈值/g	CGRP/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
			血清	脑脊液	血清	脑脊液
对照组	10	5.12 $\pm$ 0.53	62.04 $\pm$ 0.89	62.04 $\pm$ 0.89	37.12 $\pm$ 7.92	89.41 $\pm$ 54.87
模型组	10	1.51 $\pm$ 0.53 ^{a)}	112.30 $\pm$ 26.29 ^{a)}	87.76 $\pm$ 18.49 ^{a)}	180.30 $\pm$ 54.72 ^{a)}	47.66 $\pm$ 35.02
川芎-天麻药对组	10	3.04 $\pm$ 1.04 ^{b)}	70.08 $\pm$ 4.49 ^{b)}	77.75 $\pm$ 16.64 ^{b)}	27.38 $\pm$ 6.16 ^{b)}	52.02 $\pm$ 10.50

注: CGRP, 降钙素基因相关肽; NO, 一氧化氮。

a) 与对照组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠三叉神经节中 c-Fos、CGRP、TRPV1、PRKAA、TRPA1 mRNA 表达水平比较

表 4 示, 与对照组比较, 模型组大鼠三叉神经节中 c-Fos、CGRP、TRPV1、TRPA1 mRNA 表达水平明显上升, PRKAA mRNA 表达水平明显下降 ($P<0.05$); 与模型组比较, 川芎-天麻药对组大鼠三叉神经节中 c-Fos、CGRP、TRPV1、TRPA1 mRNA 表达水平明显下降, PRKAA mRNA 表达水平明显上升 ($P<0.05$)。

3 讨论

偏头痛属于临床常见的慢性神经血管性疾病, 其临床特征为发作性、多为偏侧、搏动性头痛, 伴有不同的自主神经症状。川芎-天麻药对由川芎、天麻两味药材按 4 : 1 比例^[7]组成。川芎辛温走窜, 可上行头目、驱风散寒、行气活血止痛, 川芎的主要活性成分川芎嗪、阿魏酸等可通过抑制神经炎性、调节神经营养因子等途径对心脑血管、呼吸系统、神经系统等多个系统产生药理作用, 可通过调节神经递质的含量从而达到治疗偏头痛的效果^[12]。天麻辛平柔润, 可潜阳熄风、祛风柔肝, 其主要有效成分天麻素、天麻多糖等可通过调节血管舒缩物质、降低炎症介质水平等途径发挥镇痛、镇静、抗炎等多种作用^[13]。川芎-天麻药对作为经典治疗偏头痛的中药组合之一, 对缓解偏头痛症状具有确切疗效。

研究^[14]证明, 三叉神经节初级感觉神经元释放的 CGRP 与卫星细胞膜上的 CGRP 受体结合后可激活诱导型一氧化氮合酶促进 NO 的合成与释放。NO 是神经系统中一种重要的气体信号分子, 与偏头痛的发生关系密切, 硝酸甘油通过增加皮质内 NO 含量扩张内皮源性血管、促进神经源性炎症、诱导三叉神经脊束核尾侧亚核的 c-Fos 表达等作用引起三叉神经纤维致敏, 从而引发头痛^[15]。NO 供体硝酸甘油被广泛用于偏头痛模型的建立^[11]。

CGRP 是一种由 37 个氨基酸构成的多肽类神经递质, 是临床偏头痛发生的标志性分子, 偏头痛患者头痛发作时, 血浆 CGRP 浓度明显上升^[16]。本研究经硝酸甘油建立偏头痛大鼠模型后发现大鼠机械刺激阈值明显低于对照组, 血清中 NO 及 CGRP 水平高于对照组, 而川芎-天麻药对可明显升高大鼠机械刺激阈值, 降低血清中 NO 及 CGRP 水平, 证明川芎-天麻药对对偏头痛模型有镇痛作用。各组大鼠脑脊液中 NO 的含量没有明显差异, 提示川芎-天麻药对可能主要影响外周血管系统中的 NO 水平, 而对中枢神经系统的影响较小。同时免疫荧光结果表明, 川芎-天麻药对可以抑制位于 TCC 中的头痛信息传导二级神经元 c-Fos 的表达, 提示川芎-天麻药对可以抑制痛觉信息的传导, 且其作用部位可能主要是位于三叉神经节的初级感觉神经元。

既往研究证明, TRPA1 是偏头痛发生的关键伤害性感受受体, 偏头痛的多种诱发因素均可激活 TRPA1 受体^[17]。本研究发现, 川芎-天麻药对可抑制三叉神经节中 TRPA1 mRNA 及蛋白的表达, 提示川芎-天麻药对对偏头痛的作用可能是通过抑制 TRPA1 的表达, 从而使痛觉初级感觉神经元的兴奋性降低, 产生镇痛作用。AMPK 是一细胞能量代谢的检测器, 参与痛觉调控^[18], AMPK 激活后可迅速下调初级感觉神经元细胞膜上 TRPA1 的表达^[9]。为了进一步明确川芎-天麻药对对 TRPA1 的调控是不是通过激活 AMPK, 我们利用实时荧光定量 PCR 检测了三叉神经节中 PRKAA 的表达, PRKAA 为编码 AMPK 的 α 亚基基因, 其水平可间接反映 AMPK 的表达, 并进一步用免疫荧光双标方法检测了 pAMPK, 以反映 AMPK 的激活水平。结果显示, 川芎-天麻药对组大鼠三叉神经节中 PRKAA mRNA 表达水平上调, pAMPK 阳性水平上升, 提示川芎-天麻药对可能通过使 AMPK 生成及磷酸化水平上升调控三叉神经节初级感觉神经元 TRPA1 的表达, 抑制

表 4 各组大鼠三叉神经节中 c-Fos、CGRP、TRPV1、PRKAA、TRPA1 mRNA 表达水平比较

Table 4 Comparison of the relative expression mRNA levels of c-Fos, CGRP, TRPV1, PRKAA, and TRPA1 in the trigeminal ganglion among groups (2^{- $\Delta\Delta C_t$} , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	c-Fos	CGRP	TRPV1	TRPA1	PRKAA
对照组	10	0.77±0.20	1.05±0.15	1.05±0.15	0.90±0.09	0.98±0.38
模型组	10	4.31±0.97 ^{a)}	1.95±0.36 ^{a)}	1.95±0.36 ^{a)}	2.64±0.49 ^{a)}	0.63±0.08 ^{a)}
川芎-天麻药对组	10	2.05±0.37 ^{b)}	1.10±0.23 ^{b)}	1.10±0.23 ^{b)}	0.78±0.30 ^{b)}	1.82±0.33 ^{b)}

注: c-Fos, 即刻早期基因; CGRP, 降钙素基因相关肽; TRPV1, 瞬时受体电位 V1 通道; TRPA1, 瞬时受体电位 A1 通道; PRKAA, 腺苷酸活化蛋白激酶 A。

a) 与对照组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

初级感觉神经元的兴奋性,从而产生镇痛作用。TRPV1 与 TRPA1 同属于瞬时感受器电位 (TRP) 通道家族,是一种高表达于与伤害有关的初级感觉神经元的受体,广泛分布于外周和中枢神经系统,TRPV1 的激活可引起 CGRP 等神经源性因子的释放^[19]。本实验结果显示,川芎-天麻药对组大鼠三叉神经节内 TRPV1 mRNA 表达水平下调,提示川芎-天麻药对血清中 CGRP 的影响可能是通过抑制 TRPV1 产生的作用,其对偏头痛的镇痛作用也可能与抑制 TRPV1 有关。

综上,川芎-天麻药对治疗偏头痛,一方面可通过抑制 CGRP 释放,缓解三叉神经血管通路的神源性炎症,发挥治疗偏头痛的作用;另一方面,可通过 AMPK/TRPA1 途径调控初级感觉神经的兴奋性而产生镇痛作用。然而本实验只进行了初步探讨,对于川芎-天麻药对 AMPK/TRPA1 通路调控作用的机制仍需进一步研究,在后期实验中可以进一步设立阳性对照组和相应的通路抑制剂进行观察,以更全面阐述川芎-天麻药对治疗偏头痛的作用机制,为川芎-天麻药对治疗偏头痛提供更有力的证据。

参考文献

- [1]黎运凤,樊旭,陈汐,等. 偏头痛的国内外研究进展[J]. 实用中医内科杂志,2022,36(3):76-79.
- [2]ASHINA M, KATSARAVA Z, DO TP, et al. Migraine: epidemiology and systems of care [J]. Lancet, 2021, 397 (10283):1485-1495.
- [3]王琳,殷旭华,杨挺嘉,等. 偏头痛的发病机制及其治疗新靶点[J]. 中国实用内科杂志,2023,43(7):594-598.
- [4]ASHINA M, TERWINDT GM, AL-KARAGHOLI MA, et al. 偏头痛:疾病特征、生物标志物和精准医疗[J]. 中国疼痛医学杂志,2023,29(8):561-564.
- [5]樊志丽,嵇冰. 偏头痛的中医防治研究进展[J]. 内蒙古中医药,2022,41(9):141-142.
- [6]付勇,董志威,周旭,等. 中医方案治疗偏头痛的贝叶斯网状 Meta 分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022,24(11):4325-4338.
- [7]常露露,曾贵荣,刘顶鼎,等. 川芎-天麻药对防治偏头痛的研究进展[J]. 中国现代应用药学,2021,38(10):1245-1250.
- [8]明露,陈艳芬. TRPA1 在疼痛感受的研究进展[J]. 广东药学院学报,2015,31(1):122-125.
- [9]WANG S, KOBAYASHI K, KOGURE Y, et al. Negative regulation of TRPA1 by AMPK in primary sensory neurons as a potential mechanism of painful diabetic neuropathy [J]. Diabetes, 2018, 67(1):98-109.
- [10]黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.
- [11]郭琳,洪治平. 硝酸甘油型实验性偏头痛模型原理与研究现状[J]. 中国疼痛医学杂志,2004,10(6):357-359,364.
- [12]邵笑笑,张慧,申莉铎,等. 川芎治疗偏头痛药理机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2023,25(8):129-133.
- [13]舒星星,冯思娜,张慧. 天麻治疗偏头痛药理机制及研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2023,25(6):210-214.
- [14]TASSORELLI C, GRECO R, MOROCUTTI A, et al. Nitric oxide-induced neuronal activation in the central nervous system as an animal model of migraine: mechanisms and mediators [J]. Funct Neurol, 2001, 16 (4 Suppl): 69-76.
- [15]MESSLINGER K, LENNERZ JK, EBERHARDT M, et al. CGRP and NO in the trigeminal system: mechanisms and role in headache generation [J]. Headache, 2012, 52(9):1411-1427.
- [16]杨小艳,石国霞,曾利,等. 天麻素对偏头痛患者外周血 CGRP、NO 和 ET-1 表达的影响[J]. 南京中医药大学学报,2017,33(1):23-25.
- [17]BENEMEI S, FUSI C, TREVISAN G, et al. The TRPA1 channel in migraine mechanism and treatment [J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(10):2552-2567.
- [18]董欣,万琪. AMPK 在慢性疼痛中作用的研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志,2016,22(10):774-776.
- [19]MARINA FD, MARINA Q, MARIANNA B, et al. TRPV1, CGRP and SP in scalp arteries of patients suffering from chronic migraine [J]. J Neurol, 2015, 86(4): 393-397.

The Effect of Chuanxiong (*Rhizoma Chuanxiong*) & Tianma (*Rhizoma Gastrodiae*) Herbal Pair on the Periorbital Mechanical Pain Threshold and AMPK/TRPA1 Pathway in the Trigeminal Ganglion of Migraine Model Rats

ZUO Xiao¹, LIANG Liqi¹, TANG Lanqi¹, MENG Ruina¹, FANG Bingying¹, WANG Haifang¹, CUI Haiyan², LIU Xiaohua¹

1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, 712046; 2. Xizang Minzu University

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of Chuanxiong (*Rhizoma Chuanxiong*) & Tianma (*Rhizoma Gastrodiae*) herbal pair in treating migraines based on AMP-activated protein kinase (AMPK)/transient receptor potential A1 channel (TRPA1) pathway. **Methods** Forty-eight healthy male SD rats were randomly divided into control group, model group, and Chuanxiong Tianma medication group, with 16 rats in each group. The control group and model group were given 10 ml/kg of normal saline by gavage, while the Chuanxiong Tianma medication group was given 0.675 g/kg of Chuanxiong Tianma herbal pair by gavage, once daily for 8 consecutive days in both groups. Migraine model was performed before the last administration, with subcutaneous injection of 10 ml/kg of normal saline in the control group, and subcutaneous injection of 10 ml/kg of nitroglycerin in the model group and Chuanxiong Tianma medication group. The Von Frey filament was used to measure the periorbital mechanical pain threshold of rats. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the levels of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in rat serum and cerebrospinal fluid. The nitric oxide (NO) assay kit was used to determine the NO level in serum and cerebrospinal fluid. RT-PCR was used to detect the mRNA expression levels of immediate-early genes in the trigeminal ganglion of rats (c-Fos), CGRP, transient receptor potential V1 channel (TRPV1), AMPK alpha subunit (PRKAA), and TRPA1. Immunofluorescence was used to detect the number of c-Fos-positive cells in the trigeminal cervical complex (TCC) and the protein expression levels of phosphorylated AMPK (pAMPK) and TRPA1 in the trigeminal ganglion. **Results** Compared to those in the control group, the mechanical stimulation threshold and pAMPK protein expression in the model group decreased, while the levels of CGRP and NO in serum, c-Fos, CGRP, TRPV1 and TRPA1 mRNA levels in the trigeminal ganglion, TRPA1 protein expression, and the number of c-Fos-positive cells in the TCC significantly increased ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the mechanical stimulation threshold and pAMPK protein expression in the Chuanxiong Tianma medication group significantly increased, while the levels of CGRP and NO in serum, c-Fos, CGRP, TRPV1 and TRPA1 mRNA levels in the trigeminal ganglion, TRPA1 protein expression, and the number of c-Fos-positive cells in the TCC significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Chuanxiong Tianma herbal pair may improve migraine symptoms by regulating the AMPK/TRPA1 pathway in the trigeminal ganglion and increasing the mechanical pain threshold.

Keywords migraine; Chuanxiong (*Rhizoma Chuanxiong*); Tianma (*Rhizoma Gastrodiae*); trigeminal ganglion; pain threshold; adenosine AMP-activated protein kinase; transient receptor potential A1 channel

(收稿日期: 2023-11-15; 修回日期: 2024-01-22)

[编辑: 邓媛]