

## 基于 TRPV1 通道探究正天丸治疗偏头痛的作用机制

白方会<sup>1</sup>, 张保朝<sup>1</sup>, 徐茜<sup>2</sup>, 贾东佩<sup>1</sup>, 胡科<sup>1</sup>, 陈宝田<sup>3</sup>, 李慧<sup>4</sup>

(1. 河南省南阳市中心医院, 河南 南阳 473000;

2. 南阳师范学院, 河南 南阳 473000;

3. 南方医科大学, 广东 广州 510515;

4. 广东省广州市红十字会医院, 广东 广州 510220)

**摘要:**目的 探究正天丸的抗偏头痛作用是否与三叉神经颈髓复合体(TCC)中 TRPV1 受体的表达有关。方法 随机将 24 只雄性 SD 大鼠分为空白组、偏头痛组、正天丸组。除正天丸组给以每天正天丸(1.62 g/kg)灌胃,其余两组灌胃 1 ml 0.9% NaCl,连续给药 7 d。末次给药 30 min 后予偏头痛组和正天丸组大鼠皮下注射 10 mg/kg 硝酸甘油制造大鼠偏头痛模型。观察各组造模后行为学表现,检测各组大鼠 TCC 内 TRPV1 蛋白和基因的表达。结果 正天丸组大鼠偏头痛样行为持续约 1.5 h,偏头痛组大鼠偏头痛样行为持续约 2.5 h。免疫荧光结果可见偏头痛组大鼠 TCC 中 TRPV1 表达强度明显较空白组高,正天丸组表达强度明显低于偏头痛组。偏头痛组大鼠 TRPV1 蛋白和基因表达水平平均较显著高于空白组,正天丸组大鼠 TRPV1 蛋白和基因表达水平平均明显低于偏头痛组( $P < 0.05$ )。结论 抑制 TCC 中 TRPV1 的过表达可能是正天丸治疗偏头痛的作用机制之一。

**关键词:**正天丸;偏头痛;TRPV1;三叉神经颈髓复合体

中图分类号:R747.2

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2020)03-0299-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.03.008

### The mechanism of Zhengtian Pills in treatment of migraine based on TRPV1 channel

Bai Fanghui<sup>1</sup>, Zhang Baochao<sup>1</sup>, Xu Qian<sup>2</sup>, Jia Dongpei<sup>1</sup>, Hu Ke<sup>1</sup>, Chen Baotian<sup>3</sup>, Li Hui<sup>4</sup>

(1. Nanyang Central Hospital, Nanyang, 473000, Henan, China;

2. Nanyang Normal University, Nanyang 473000, Henan, China;

3. Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China;

4. Guangzhou Red Cross Hospital, Guangzhou 510220, Guangdong, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate whether the anti-migraine function of Zhengtian Pills is related to the TRPV1 receptor expression in trigeminal nerve cervical spinal complex (TCC). **Methods** Twenty-four Sprague-Dawle (SD) male rats were randomly divided into three groups: a blank group, a migraine group and a Zhengtian Pills (ZTP) group. Rats of ZTP group were given 1.62 g/kg Zhengtian Pills by oral administration daily, rats of the other two group were given 1 ml 0.9% NaCl by oral administration daily. The drug administration lasted for 7 days continuously. Rats models of migraine were established by subcutaneously injection of nitroglycerin (10 mg/kg) for rats of the ZTP group and the migraine group 30 minutes after the end of drug administration. Behavioral manifestations of the rats were observed after the models were developed. The expressions of TRPV1 protein and gene in rat TCC of each group were detected. **Results** The migraine-like behavior of rats in the ZTP group lasted about 1.5 hours and the migraine-like behavior of rats in the migraine group

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81774239);河南省科技攻关项目(192102310436);河南省中医药科研专项课题(2018ZY3052);南阳市科技攻关项目(2017JCQY008)

**第一作者简介:**白方会(1986-),女,博士,主治医师,研究方向:偏头痛的基础与临床研究, E-mail:bfh1986@163.com

**通讯作者简介:**李慧(1982-),女,博士,副主任医师,研究方向:脑病的中西医结合治疗, E-mail:747260051@qq.com

lasted about 2.5 hours. Immunofluorescence results showed that the expression intensity of TRPV1 receptors in rat TCC of migraine group was obviously higher than that of the blank group. The expression intensity of ZTP group was significantly higher than that of migraine group. The expressions of TRPV1 protein and gene in migraine group were significantly lower than those in blank group. The expressions of TRPV1 protein and gene of ZTP group were significantly lower than those of migraine group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** One of the mechanisms of Zhengtian pills in the treatment of migraine may be its inhibition on the overexpression of TRPV1 receptors in TCC.

**Key words:** Zhengtian Pills; migraine; TRPV1 receptor; trigeminal nerve cervical spinal complex

原发性头痛中以偏头痛最常见,呈反复发作性,以半侧或双侧头部跳痛为特点,恶心呕吐是其常见伴随症状,劳累和声、光刺激是其主要诱发或加重因素<sup>[1]</sup>。最新调查表明,偏头痛是人类第6个易患疾病,其致残率为全球第2位<sup>[2]</sup>,由此可知,偏头痛是威胁人类健康的最大的功能性疾病。我国偏头痛年患病率为9.3%,其中女性患病率是男性的3倍<sup>[3]</sup>。C1-C2颈髓背侧核至三叉神经脊束核尾部(trigeminal nucleus caudalis, TNC)统称为三叉神经颈髓复合体(trigeminal nerve cervical spinal complex, TCC)<sup>[4]</sup>,是三叉神经二级神经元,是偏头痛发生时信号传递的重要部位。三叉神经脊束核尾部有TRPV1通道存在,TRPV1受体的活化在偏头痛发生与痛觉过敏形成中均起重要作用<sup>[5-7]</sup>。正天丸临床应用30余年,有较好疗效与较高安全性,但其作用机制尚未明确。本研究通过检测偏头痛大鼠TCC内TRPV1受体的水平,以探讨正天丸的作用靶点。现报道如下:

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 SD雄性大鼠24只,平均周龄(10.1±1.3)周;平均体质量(270±30)g。由南方医科大学实验动物中心提供,饲养条件:室温23℃~26℃,光暗周期12h,相对湿度40%~60%,自由进食水,待大鼠适应7d后干预。实验遵从《关于善待实验动物的指导性意见》的规定<sup>[8]</sup>。

1.2 实验药物与试剂 正天丸(华润三九,批号:1308002H)、硝酸甘油注射液(益民药业,批号:131122)、荧光二抗-Cy3(凯基生物)、VR1兔多克隆抗体(Santa Cruz)、 $\beta$ -actin(中杉金桥)、PVDF膜(Millipore)、ECL发光液和BCA试剂盒(碧云天)、IS 2000 MM图像工作站(Kodak)。

1.3 偏头痛模型的建立 随机将24只大鼠分为空白组、偏头痛组、正天丸组,每组8只。正天丸组每天灌胃一次正天丸(1.62g/kg);其余两组灌胃1ml 0.9% NaCl,连续给药7d,末次给药30min后空白组皮下注射0.9% NaCl溶液0.5ml,其余两组大鼠颈背部皮下注射硝酸甘油(10mg/kg),制造偏头痛模型<sup>[9]</sup>。

1.4 行为学观察 当大鼠出现频繁用前肢挠头、耳朵

发红、转圈、爬笼等不安表现提示造模成功<sup>[5]</sup>。根据前期研究结果,观察造模后3h内行为学表现。以每30min作为一个观察时间段,头痛开始以30min内连续挠头5次以上为标志,头痛消失以30min内挠头次数低于5次为标志。

## 1.5 标本采集与指标检测

1.5.1 Western blotting 造模4h后,大鼠麻醉后迅速冰上取材,裂解组织,BCA法测定蛋白浓度,SDS-PAGE电泳,转膜,封闭1h, TBST冲洗3次,加入一抗(1:1000),4℃孵育过夜,羊抗兔二抗(1:3000)室温孵育1h,采用ECL化学发光法进行曝光拍照, Molecular Imaging Software Version 4.0(Kodak)软件分析条带灰度值,每组重复检测3次,以 $\beta$ -actin为内参。

1.5.2 免疫荧光 造模4h后灌注固定,开颅取出全脑连至颈2以下颈髓,继续固定24h,脱水、石蜡切片,片厚约10 $\mu$ m。切片顺次脱蜡、水化、热抗原修复和灭活内源性过氧化物酶后,BSA封闭后加入TRPV1一抗(1:500),4℃过夜,滴加Cy3荧光二抗(1:500),避光孵育1h,倒置显微镜下观察结果,显现红色为TRPV1表达阳性,空白组以PBS作一抗。

1.5.3 实时荧光定量PCR 麻醉后冰上快速分离大鼠TCC,-80℃保存。TRPV1总RNA的提取和cDNA的转录均按照相应试剂盒说明书进行操作,25℃反应10min $\rightarrow$ 37℃反应1h $\rightarrow$ 95℃反应5min。以GAPDH为内参照,由上海英骏生物技术有限公司进行引物合成,建立20 $\mu$ l的PCR反应体系:其中dH<sub>2</sub>O 7 $\mu$ l,各1 $\mu$ l上下游引物,1 $\mu$ l cDNA,10 $\mu$ l的Taq酶。PCR反应条件:95℃ 10s,95℃ 10s,58℃ 5s,72℃ 10s,共45个循环。PCR仪读取TRPV1与GAPDH的循环阈值,根据相对定量法( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )计算各样本TRPV1mRNA的 $\Delta CT$ 值: $\Delta CT = \text{目的基因CT} - \text{内参基因CT}$ 。

1.6 统计学方法 采用SPSS 21.0软件进行分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 $t$ 检验或单因素方差分析进行组间比较,方差不齐时用Welch近似方差分析;组间多重比较,方差不齐时用SNK- $q$ 检验,不齐时用Dunnnett's T3法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 行为学表现 自造模后 10 min 起,偏头痛组和正天丸组大鼠纷纷出现不断爬笼、转圈等行为,耳朵开始发红,频繁快速挠头,标志造模成功。偏头痛组和正天丸组挠头表现在造模后 1 h 内最明显,正天丸组大鼠大约造模 1.5 h 以后未再出现连续挠头 5 次以上表现,耳红消失,蜷卧不动;偏头痛组大鼠造模 2.5 h 以后未再出现连续挠头 5 次以上表现,耳红消失,活动明显减少,倦怠不动。空白组大鼠仅皮下注射 0.9% NaCl 溶液,30 min 内有间断挠头表现,随后挠头不明显,一直未见耳朵发红。

### 2.2 正天丸对 TCC 中 TRPV1 受体表达的影响

2.2.1 免疫荧光结果 免疫荧光结果表明,TRPV1 在每组大鼠 TCC 内均可见阳性表达(图中箭头所示红色高亮部分)。从图 1 可见,偏头痛组大鼠 TCC 内可见 TRPV1 明显高表达,正天丸组表达强度低于偏头痛组,空白组也可见 TRPV1 轻度阳性表达(见图 1)。

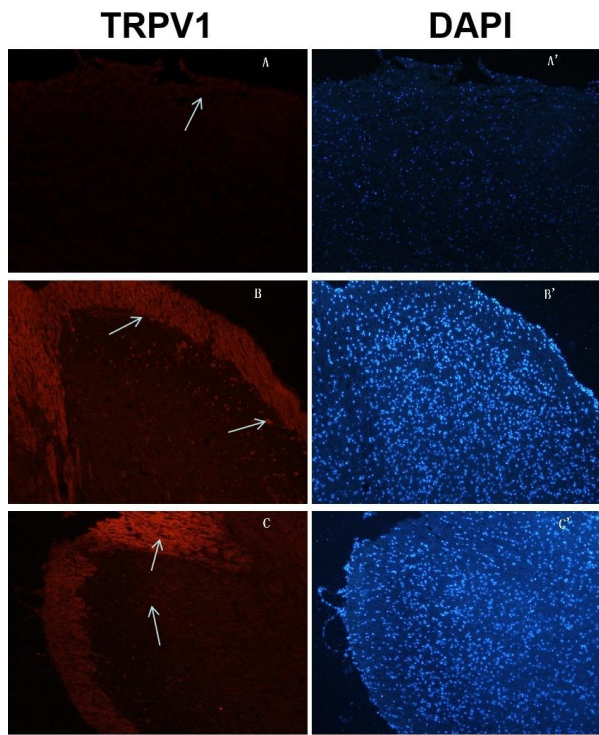


图 1 各组大鼠 TCC 中 TRPV1 的表达( $\times 100$ )

注:A:空白组,B:偏头痛组,C:正天丸组。

2.2.2 Western blotting 结果 结果显示 TRPV1/ $\beta$ -actin 的比值分别为:空白组( $0.35 \pm 0.04$ ),偏头痛组( $0.86 \pm 0.01$ ),正天丸组( $0.70 \pm 0.03$ )。偏头痛组 TRPV1 蛋白表达较空白组显著增高( $t = 37.51, P < 0.001$ );与偏头痛组相比,正天丸组 TRPV1 蛋白表达显著降低( $t = -13.907, P < 0.05$ ),见图 2。

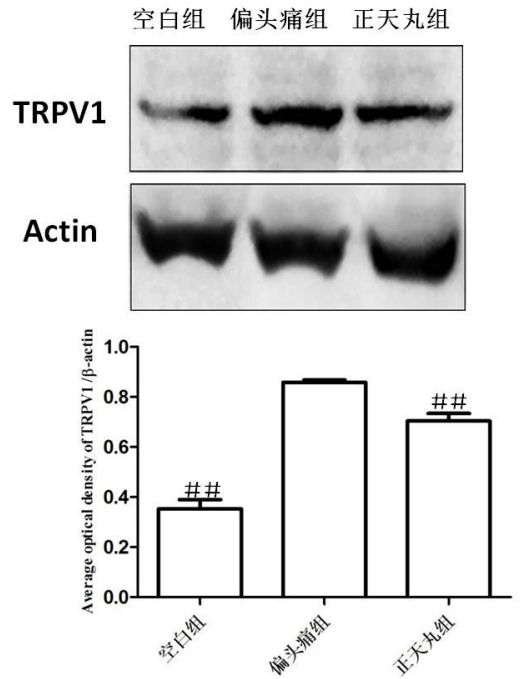


图 2 三叉神经颈髓复合体中 TRPV1 蛋白的表达

注:##与偏头痛组比, $P < 0.001$ 。

2.2.3 PCR 结果 以 GAPDH 为内参将 TRPV1 的灰度值进行标化,结果如下:空白组( $0.995 \pm 0.010$ )、偏头痛组( $2.57 \pm 0.37$ )、正天丸组( $1.71 \pm 0.25$ )。偏头痛组 TRPV1 mRNA 表达较空白组明显增加( $t = -4.009, P = 0.005$ ),正天丸组 TRPV1 mRNA 表达较偏头痛组明显降低( $F = 37.149, P < 0.001$ ),见图 3。

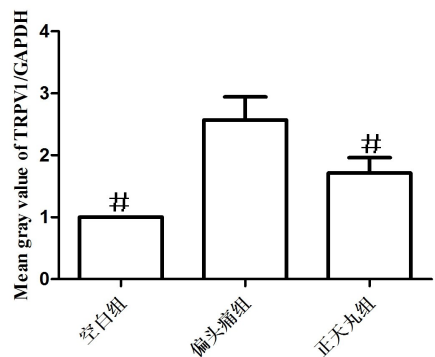


图 3 三叉神经颈髓复合体 TRPV1 受体 mRNA 的表达

注:#与偏头痛组比, $P < 0.001$

## 3 讨论

在中医古籍中偏头痛又名“边头风”“偏头风”。自《黄帝内经》以来,历代医书均有对偏头痛理法方药的记载,偏头痛多为本虚标实之证,病位在脑髓经络,与肝、脾、肾三脏关系密切<sup>[10-11]</sup>。多风、多瘀、多湿、多虚是多年来陈宝田教授对偏头痛患者病理机制特点的总

结。陈教授吸取川芎茶调散、麻黄附子细辛汤、桃红四物汤、四藤消震饮四方之精华,于1985年创制正天丸。川芎性味辛温,功善祛风止痛、活血行气,为该方之君药,自古有“头痛需用川芎”之说法。正天丸综合各方之长,具有疏风通络、活血止痛、养血平肝之功,30余年来以其卓越的疗效得到广大患者及医生的好评,并远销海外。临床随机对照试验(RCT)研究表明,正天丸能有效减轻患者的头痛强度,减少发作次数,并缩短头痛持续时间,临床疗效确切,且无明显不良反应<sup>[12]</sup>。但其具体作用机制尚未明确。

TCC是偏头痛发作时伤害性信息由颅外向颅内传导的重要二级神经元,偏头痛患者常伴的恶心呕吐表现也是由TCC发出信号刺激延髓呕吐中枢所致<sup>[13]</sup>。TRPV1受体又称香草酸受体亚型1(VR1)或辣椒素受体,是TRP亚家族中首个用于偏头痛研究的成员。研究显示背根神经节、三叉神经节、三叉神经背束核尾部(TNC)、硬脑膜、蓝斑和下丘脑均有TRPV1通道存在,在偏头痛和其它神经病理性疼痛的发病机制中起特定作用<sup>[5,14-15]</sup>。缓激肽、前列腺素、低pH值、辣椒素、炎性分泌物等炎性因子可以兴奋TRPV1,使局部脑膜CGRP释放增加,脑膜血管扩张、血流加速,TCC兴奋性增加,从而介导偏头痛的发作<sup>[16-17]</sup>。小鼠敲除TRPV1受体后,伤害性信息的传递明显减少,疼痛反应出现的时间明显推后<sup>[18]</sup>。

我们的结果显示:生理状态下大鼠TCC神经元既有TRPV1受体较低水平的表达,免疫荧光结果可以直观地显示偏头痛组大鼠TRPV1受体表达亮度较空白组明显增高。Western blotting和RT-PCR结果显示偏头痛组大鼠TCC内TRPV1受体蛋白和基因表达水平均较正常组大鼠显著增高,印证了TRPV1受体的活化参与了偏头痛发作过程中的痛觉信息传递。正天丸组行为学表现持续时间较偏头痛组明显缩短,证实了正天丸的有效性,其TRPV1受体蛋白和基因表达较偏头痛组明显降低,表明正天丸可以抑制TRPV1受体的过表达从而抑制疼痛信号在TCC中的传递起到治疗偏头痛的作用。

#### 参考文献:

- [1] 王栋,陈春富. 偏头痛诱发因素与遗传[J]. 国际神经病学神经外科学杂志,2019,46(1):113-117.
- [2] Lichten EM. Menstrual Migraine and Treatment Options: Review[J]. Headache,2018,58(1):145-146.
- [3] 许梦雪,曹文英,吴瑾. 偏头痛与过敏症的相关性研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志,2018,24(11):851-854.
- [4] 白方会,李慧,姜婷婷,等. 正天丸对偏头痛模型大鼠三叉

神经二级神经元P2X3受体表达的影响研究[J]. 中国全科医学,2016,19(15):1828-1832.

- [5] 张丽,白占涛,王志红,等. Toll样受体家族介导疼痛和痒觉信号的分子机制[J]. 中国疼痛医学杂志,2020,26(1):10-19.
- [6] Kayama Y, Shibata M, Takizawa T, et al. Functional interactions between transient receptor potential M8 and transient receptor potential V1 in the trigeminal system: Relevance to migraine pathophysiology[J]. Cephalalgia, 2018,38(5):833-845.
- [7] 刘美霞,刘群会,周龙. siRNA介导靶向下调TRPV1对偏头痛大鼠的影响及可能机制研究[J]. 川北医学院学报,2019,34(1):114-117.
- [8] 宗阿南,郑志红,史晓萍,等. 探讨《关于善待实验动物的指导性意见》饲养、应用、运输及相关方面的措施[J]. 实验动物科学,2008,25(2):63-64.
- [9] Mahmoudi J, Mohaddes G, Erfani M, et al. Cerebrolysin attenuates hyperalgesia, photophobia, and neuroinflammation in a nitroglycerin-induced migraine model in rats [J]. Brain Res Bull,2018,140:197-204.
- [10] 梁惠昌,李明海,张莹莹,等. 头痛宁胶囊联合尼莫地平治疗头痛患者临床效果分析[J]. 右江民族医学院学报,2014,36(5):725-726.
- [11] 王文慧,沈燕. 针刺预防性治疗偏头痛的机制研究进展[J]. 中华中医药杂志,2019,34(1):229-232.
- [12] 王勇,袁灿兴,商洪才,等. 正天丸治疗偏头痛随机对照双盲双模拟多中心临床研究[J]. 中成药,2012,34(5):791-794.
- [13] Anna P. Andreou, Lars Edvinsson. Mechanisms of migraine as a chronic evolutive condition[J]. J Headache Pain,2019,20(1):117.
- [14] 潘凤婷,黄征,张春莹,等. OPRM1 A118G基因多态性对阿片类药物镇痛的影响研究进展[J]. 右江民族医学院学报,2019,41(4):449-451.
- [15] 宋晓文,陈金波,吴欣彤,等. 瞬时感受电位香草酸亚家族蛋白1受体在慢性偏头痛大鼠模型中的作用研究[J]. 中风与神经疾病杂志,2017,34(5):398-405.
- [16] 沈岩金,王梦莹,蒋桂秀,等. 神经递质及其受体在针刺分娩镇痛中的作用研究进展[J]. 右江民族医学院学报,2017,39(3):226-228.
- [17] Hu F., 刘怀存. Nogo-A蛋白通过上调TRPV1的功能促进慢性炎症痛的发生[J]. 中国疼痛医学杂志,2018,24(8):585.
- [18] Christoph T, Bahrenberg G, De Vry J, et al. Investigation of TRPV1 loss-of-function phenotypes in transgenic shRNA expressing and knockout mice[J]. Mol Cell Neurosci,2008,37(3):579-589.

收稿日期:2020-02-18;修回日期:2020-03-22