

本文引用:吴 辉,陈晓光,魏 丹,苏曼莉,姚汉云,刘 慧,王 森.白芷、吴茱萸、川芎对偏头痛大鼠血清 ENK、 β -EP 含量及脑干组织 C-FOS 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(6):717-720.

白芷、吴茱萸、川芎对偏头痛大鼠血清 ENK、 β -EP 含量及脑干组织 C-FOS 表达的影响

吴 辉,陈晓光,魏 丹,苏曼莉,姚汉云,刘 慧,王 森

(武汉市第一医院,湖北 武汉 430022)

[摘要] 目的 观察单味中药白芷、吴茱萸、川芎对偏头痛模型大鼠神经递质及脑干 C-FOS 表达的影响。方法 将 48 只 Wistar 大鼠随机分为 6 组(每组 8 只):空白组、模型组、白芷治疗组、吴茱萸治疗组、川芎治疗组、西比灵治疗组(药物对照)。各治疗组分别按 0.79 g/kg、0.40 g/kg、0.79 g/kg、0.43 mg/kg 干预,模型及空白组灌胃相同体积生理盐水,连续 7 d。除空白组外,均于末次灌胃 1 h 后,硝酸甘油 10 mg/kg 皮下注射方法制备大鼠偏头痛模型。4 h 时采血,ELISA 法检测血清脑啡肽(Enkephalin, ENK)、 β 内啡肽(β -Endorphin, β -EP)含量;免疫组化方法检测脑干组织 C-FOS 表达;并观察各组大鼠行为学表现。结果 与空白组比较,模型组动物血清 ENK 含量显著增高($P < 0.05$),血清 β -EP 含量显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,各治疗组 ENK 含量及 C-FOS 表达降低($P < 0.05$), β -EP 含量显著增高($P < 0.05$);川芎组 ENK 含量低于白芷组($P < 0.05$),川芎组 C-FOS 表达低于吴茱萸组($P < 0.05$)。结论 3 种中药均能改善偏头痛动物双耳变红、挠头、爬笼、竖耳、皮肤发绀等行为学表现,减少 ENK 分泌,增加 β -EP 含量,降低 C-FOS 表达。

[关键词] 偏头痛;川芎;白芷;吴茱萸;C-FOS;脑干

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.06.009

Effects of Radix Angelicae Dahuricae, Fructus Evodiae and Rhizoma Chuanxiong on the Content of ENK and β -EP in Serum and the Expression of C-FOS in Brainstem of Migraine Rats

WU Hui, CHEN Xiaoguang, WEI Dan, SU Manli, YAO Hanyun, LIU Hui, WANG Miao

(WuHan No. 1 Hospital, Wuhan, Hubei 430022, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of single traditional Chinese medicine (TCM)-Radix Angelicae Dahuricae, Fructus Evodiae and Rhizoma Chuanxiong on neurotransmitters and the expression of C-FOS in the brainstem of migraine model rats. **Methods** A total of 48 Wistar rats were randomly divided into 6 groups (each group of 8 rats): a blank group, a model group, a Radix Angelicae Dahuricae group (BZ group, 0.79 g/kg), a Fructus Evodiae group (WZY group, 0.40 g/kg), a Rhizoma Chuanxiong group (CX group, 0.79 g/kg) and a drug control group (XBL group, 0.43 mg/kg). Each treatment group was given its respective medicine, while the blank group and the model group were given the same volume of normal saline by gavage, for 7 d. Except for the blank group, the rat model of migraine was prepared by subcutaneous injection of nitroglycerin 10 mg/kg at 1 h after the last gavage. At the end of 4 h, blood was collected. The content of enkephalin (ENK) and β -endorphin (β -EP) in serum was tested by ELISA, and the expression of C-FOS in brainstem was detected by immunohistochemistry (IHC). And the behavior of each group of rats was observed. **Results** Compared with the blank group, the content of ENK in serum in the model group was significantly increased ($P < 0.05$), and the content of β -EP in serum was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the content of ENK and the expression of C-FOS in each treatment group were decreased obviously ($P < 0.05$), and the content of β -EP was increased significantly ($P < 0.05$). The ENK content of the CX group was lower than that in the BZ group ($P < 0.05$), and the C-FOS expression of the CX group was lower than that in the WZY group ($P < 0.05$). **Conclusion** The 3 kinds of TCM can improve the behavioral performance of migraine animals such as red ears, head scratching, climbing cage, erect ears and cyanosis, reduce the secretion of ENK, increase the content of β -EP and decrease the expression of C-FOS.

[Keywords] migraine; Rhizoma Chuanxiong; Radix Angelicae Dahuricae; Fructus Evodiae; C-FOS; brainstem

[收稿日期] 2018-06-27

[基金项目] 武汉市卫生计生委科研项目(WZ09D13)。

[作者简介] 吴 辉,男,副主任医师,副教授,硕士研究生导师,研究方向:脑血管病、失眠、头痛、神经重症,E-mail:269272582@qq.com。

偏头痛(Migraine)是一种反复发作的血管性头痛,呈一侧或两侧疼痛,常伴恶心、呕吐、畏光等症状。少数典型者发作前有视觉、感觉和运动等先兆,可有家族史。2010年我国原发性头痛流行病学调查显示,偏头痛发病率为9.3%。日本偏头痛患病率为6.0%~8.4%,美国与欧洲约为12%^[1]。30岁以下年龄组发病率有逐年增多的趋势^[2]。

偏头痛属于中医学“头痛”范畴。中医药治疗本病经验丰富,教材《中医内科学》《中药学》在论及头痛、偏头痛的治疗时均用到川芎、白芷、吴茱萸,但没有说明三者功效的差别,仅有“头痛不离川芎”之说,似乎川芎治疗头痛效果最好,但无明确说明。本实验利用硝酸甘油(Glyceryltrinitrate, GTN)制备大鼠Migraine模型,观察三种中药对脑啡肽(Enkephalin, ENK)、 β 内啡肽(β -Endorphin, β -EP)含量及脑干组织C-FOS表达的影响,了解三者之间的疗效差异,指导临床用药。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar大鼠48只,雌雄各半(200 \pm 10)g,购于湖北省动物中心,动物合格证编号:42000600012121。动物实验在武汉市第一医院屏障动物室内进行,动物设施使用证编号:00137527。动物室内12h昼夜交替,实验动物饲喂维持饲料(北京华阜康公司),自由饮去离子水。

1.2 实验药物

白芷、吴茱萸、川芎购于武汉市第一医院中药房,由湖北天济中药饮片有限公司炮制、包装,批号分别为20150912、20150921、201510022。单味中药浸泡30min后,大火煎开,改小火30min,双层纱布过滤;再加水煎煮一次,合并2次滤液,分别浓缩至0.67g/mL、0.50g/mL、0.67g/mL,4℃冰箱保存备用;硝酸甘油由河南润弘制药股份有限公司生产,批号1503302,5mg/mL;盐酸氟桂利嗪胶囊(西比灵)由西安杨森生产,批号150424975,5mg/粒。

1.3 仪器及试剂

1.3.1 仪器 MK3型酶标仪(美国热电);动物室监控系统(SONY-GEDVR-WTO);千屏显微图像采集系统(武汉千屏)。

1.3.2 试剂 ENK、 β -EP等指标ELISA检测试剂盒购于上海酶联生物科技有限公司(批号分别为10-61-499,10-61-497),组化用兔抗大鼠一抗C-fos(Bioworld, BS6433),组化检测试剂盒(Servicebio, G1210, 含二抗),水合氯醛(上海山浦化工有限公司, AR, 批号20150312)。

1.4 分组及干预

48只大鼠随机分为6组,每组8只(雌雄各半),分别为:模型组与空白组分别灌胃2mL生理盐水,白芷组按0.79g/kg质量灌胃白芷煎煮液(按人与大鼠体表面积换算)2mL、吴茱萸组按0.40g/kg质量灌胃吴茱萸煎煮液2mL、川芎组按0.79g/kg质量灌胃川芎2mL、西比灵组按0.43mg/kg质量灌胃西比灵混悬液2mL,连续7d;在第7天灌胃1h后,空白组皮下注射生理盐水,其他各组均按10mg/kg剂量皮下注射硝酸甘油^[3]。

1.5 指标检测

1.5.1 行为学观察 从造模时起,利用动物室监控系统,于注射硝酸甘油后连续摄录3h内各动物的行为(包括耳朵变红、挠头、甩头、爬笼、竖耳、竖毛、皮肤发绀等现象)。每30分钟为1个时间段,观察摄录资料中各组动物双耳红出现时间及观察时间段内动物挠头次数。挠头开始时间以大鼠挠头次数>5次以上次为标志,消失时间以挠头次数<5次并出现倦怠表现为标志^[4]。

1.5.2 血清ENK、 β -EP含量检测 注射硝酸甘油后4h以10%水合氯醛腹腔注射麻醉动物,腹主动脉采血(分离胶管盛装),分离胶管于室温放置2h,3000r/min离心10min,分离血清,-80℃冰箱保存。采用酶联免疫吸附法(ELISA)按试剂盒说明书操作方法检测各组动物血清ENK、 β -EP含量。

1.5.3 脑干组织免疫组化检测 4%多聚甲醛固定脑干组织经常规方法包埋,将所切白片置于58℃烤片1h;恢复室温后将样本脱蜡至水;微波加热进行抗原修复;滴加3%双氧水于玻片上孵育10min消除内源性过氧化物酶活性,再以双蒸水清洗3次,每次3min;滴加正常山羊血清室温下孵育12min;滴加1:80稀释一抗(C-FOS),于湿盒中4℃孵育过夜;取出湿盒室温放置20min, PBS浸洗3次,每次3min;滴加生物素标记二抗,室温孵育30min; PBS浸洗3次,每次3min,滴加辣根酶标记链霉卵白素,室温孵育30min; PBS冲洗3次,每次5min;新鲜配制DAB染色30min,流水冲洗2min;苏木素复染,盐酸酒精返蓝;自来水冲洗后脱水,中性树脂封片,显微镜下观察,胞浆棕褐色为阳性表达。用IPP 6.0软件计算各组阳性表达OD值,并与空白组比较计算各组相对表达量。

1.6 统计分析

用SPSS 19.0统计软件进行数据处理。数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,实验数据用单因素方差分析进行统计。如果方差齐性,即用最小显著差数法(LSD)完成组间比较,如果方差不齐,则用Dunnett's T3进行比

较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组动物行为学改变

模型组动物在 3 min 左右出现双耳发红、上肢摇头频繁、烦躁、爬笼次数增加等现象,1~3 h 后,现倦怠、活动减少等症状。空白组未见双耳发红,仅偶尔出现摇头、爬笼现象。如表 1 所示,各组动物耳红出现时间差异无统计学意义($P=0.831$)。

2.2 各组动物不同时间段摇头次数比较

如表 1 所见,与空白组比较,模型组各时间段摇头次数均显著增高($P=0.000$);与模型组比较,各个时间段 3 组中药组摇头次数均显著降低($P=0.000$),西比灵组 31~60 min 段、61~90 min 段、91~120 min 段、121~150 min 时间段摇头次数显著降低 (P 值分别为 0.000,0.000,0.000,0.000,0.029);与川芎组比较,0~30 min 时间段白芷组和吴茱萸组摇头次数均显著增高 (P 值分别为 0.001,0.000),91~120 min 时间段吴茱萸组摇头次数显著降低($P=0.004$),在 31~60 min、61~90 min 及 151~180 min 时间段白芷组摇头次数均显著增高($P=0.000,0.007,0.020$)。

2.3 各组动物血清 ENK、 β -EP 含量比较

与空白组比较,模型组血清 ENK 含量显著增高($P=0.004$), β -EP 含量显著降低($P=0.002$);与模型组比较白芷组、吴茱萸、西比灵组 ENK 含量降低(P 值分别为 0.000,0.001,0.026),白芷组 β -EP 含量显著增高($P=0.001$);与西比灵组比较,白芷组 ENK 含量显著降低($P=0.036$),白芷组、吴茱萸组、川芎组 β -EP 含量均显著增高(P 值分别为 0.000,0.004,0.003);与川芎组比较,白芷组 ENK 含量显著降低($P=0.011$),白芷组 β -EP 含量显著增高($P=0.026$),见表 2。

2.4 各组动物脑干 C-FOS 表达比较

各组之间 C-FOS 表达有显著差异(方差分别为 6.327, $P=0.021$),进一步两两比较结果显示,与空白组比较,模型组 C-FOS 表达显著增高($P=0.033$);与模型组比较,各个治疗组 C-FOS 表达均显著降低(P

值分别为 0.002,0.025,0.005,0.039);与西比灵组比较,白芷组 C-FOS 表达显著降低($P=0.042$);川芎组 C-FOS 表达显著低于吴茱萸组($P=0.041$),见表 2、图 1。

3 讨论

偏头痛是临床常见的一种慢性神经血管病,具有无法根治、反复发作并容易伴有精神障碍等特点,对患者生活质量影响巨大。大多数患者发病时会影响学习或工作。世界卫生组织(WTO)发布的常见疾病按健康寿命损失年(years lived with disability, YLD)排列中,偏头痛位列第 20 位,且将严重偏头痛定为最严重致残的慢性疾病,等同于痴呆、瘫痪和严重精神病^[6]。因此防治偏头痛是亟待解决的公共健康课题。

阿片肽系统是参与高级中枢对伤害性刺激内源性调节的相关递质之一,是控制痛觉的主要递质,其中 ENK 和 β -EP 在脑内和脊髓内均有镇痛作用, β -EP 在脑内含量远远大于脊髓,ENK 在脊髓发挥镇痛作用,而在脑内反而有对抗吗啡镇痛作用。 β -内啡肽由 31 个氨基酸组成,主要在垂体合成,是 β 脂肪酸释放激素的第 36~91 氨基酸序列,存在于丘脑、垂体、肾上腺及其他外周组织中。有研究认为偏头痛是由于伤害感受系统的神经递质功能失调引起的, β -内啡肽是其中最重要的神经递质^[6], β -EP 释放减少时,其抑制去甲肾上腺素神经元胞体活性的能力下降导致颈部血管收缩舒张失调,造成同侧颈内动脉收缩和颈外动脉舒张,与偏头痛的前驱期和头痛期血管变化一致^[7],因此认为 β -EP 具有缓解偏头痛的作用。

C-FOS 基因属于即刻早期基因,对神经递质、激素、神经冲动及外界刺激引起的传入信息在数分钟内即可做出反应并进行表达,作为神经元激活的标志物,是细胞外刺激、激活神经元的敏感指标,并广泛用于多种疼痛研究。正常情况下,C-FOS 很少表达,各种如疼痛、创伤等伤害性刺激均可诱导中枢神经系统 C-FOS 表达,其表达水平与痛觉调控密切相

表 1 各组动物耳红出现时间及不同时间段摇头次数比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

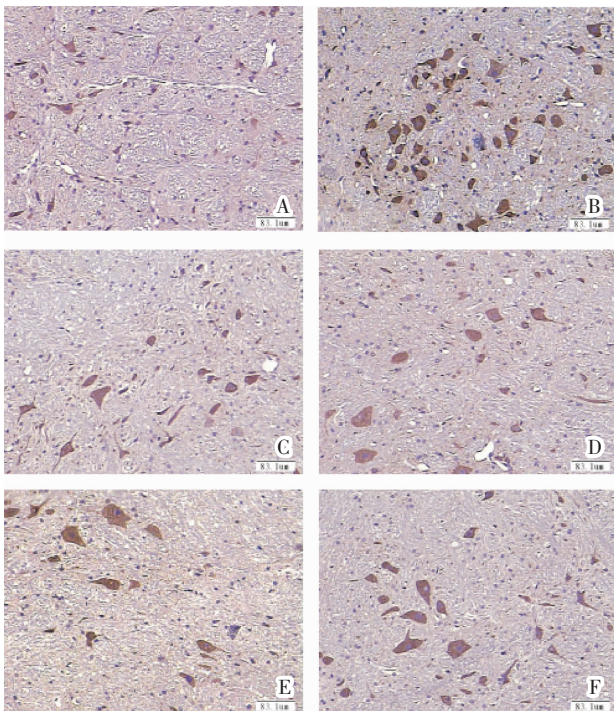
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	耳红出现 时间/min	不同时间段摇头次数/次					
			0~30 min	31~60 min	61~90 min	91~120 min	121~150 min	151~180 min
空白组			2.1±0.8	1.4±0.5	1.4±0.5	2.1±0.8	1.4±0.5	1.4±0.5
模型组		4.3±0.1	77.1±5.8**	59.1±6.9**	55.1±7.8**	42.8±5.8**	31.8±4.8**	13.4±2.8**
白芷组	0.79	4.0±0.6	35.6±4.2 ^{##} Δ	32.6±4.6 ^{##} Δ	26.3±5.0 ^{##} Δ	11.3±2.1 ^{##}	6.1±1.2 ^{##}	4.1±1.6 ^{##} $\Delta\Delta$
吴茱萸组	0.40	3.8±0.5	27.5±3.5 ^{##} Δ	20.8±4.0 ^{##}	17.6±3.1 ^{##}	7.1±1.1 ^{##} Δ	3.1±0.6 ^{##}	1.4±0.5 ^{##}
川芎组	0.79	4.1±0.5	20.3±4.7 ^{##}	21.4±4.9 ^{##}	19.1±4.8 ^{##}	13.5±5.4 ^{##}	5.1±0.8 ^{##}	2.1±0.8 ^{##}
西比灵组	0.43	3.8±0.6	73.3±6.5	70.8±7.4 ^{##}	34.0±5.9 ^{##}	32.6±6.0 ^{##}	28.1±0.6 [#]	15.5±2.2

注:与空白组比,** $P<0.01$;与模型组比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与川芎组比, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

表2 各组动物血清 ENK、 β -EP 含量及脑干 C-FOS 表达比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

分组	剂量 $/(g\cdot kg^{-1})$	ENK $/(ng\cdot L^{-1})$	β -EP $/(ng\cdot mL^{-1})$	C-FOS 表达 (OD 相对值)
空白组		465.1 \pm 80.1	2 611 \pm 227	1.008 \pm 0.148
模型组		552.6 \pm 72.2*	1 997 \pm 252**	2.220 \pm 0.066**
白芷组	0.79	505.3 \pm 35.0 ^{###} $\Delta\Delta$	2 654 \pm 282 ^{###} $\Delta\Delta\Delta$	1.429 \pm 0.173 ^{###} Δ
吴茱萸组	0.40	447.6 \pm 40.7 ^{###}	2 212 \pm 291 ^{###}	1.814 \pm 0.259 [#]
川芎组	0.79	423.9 \pm 42.8 ^{###}	2 227 \pm 517 ^{###}	1.516 \pm 0.020 ^{###}
西比灵组	0.43	488.2 \pm 51.5	1 685 \pm 304	1.704 \pm 0.115 [#] Δ

注:与空白组比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与西比灵组比,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与川芎组比,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$



注:A.空白组;B.模型组;C.白芷组;D.吴茱萸组;E.川芎组;F.西比灵组

图1 各组动物脑干组织显微镜下 C-FOS 表达图谱 (IHC, $\times 200$)

关。FOS 蛋白与 JUN 蛋白在胞核中相互连接形成二聚体复合物,并结合目的基因中的 AP-1 位点,进一步激活目的基因表达最终对疼痛刺激作出反应^[8-10]。

中医学认为,偏头痛属于“偏头风”“头风”“脑痛”“偏头痛”等范畴,系由风邪、气郁、肝阳上扰或痰浊、淤血阻滞脑络,不通则痛,发为本病。通过对《中医方剂大辞典》中治疗头痛、偏头痛方剂的分析发现,白芷-川芎组合出现的频率最高,其机制与抗炎及能量代谢相关通路有关^[11]。川芎是治头痛要药,现代药理研究也证实川芎中挥发油成分有镇痛作用^[12],白芷能祛风止痛,善治头面部的疼痛,这二味药在 1994-2007 年中药治疗偏头痛的文献分析中属于高频率使用药物^[13];吴茱萸为治疗肝寒气滞诸痛主药,《伤寒论·辨厥阴病脉证并治》:“干呕,吐涎沫,头痛

者,吴茱萸汤主之。”

本研究显示,偏头痛模型组及各治疗组大鼠皮下注射硝酸甘油约 4 min 时双耳变红,继而出现烦躁、活动增多,前肢及后肢搔头频繁,中药治疗组及西比灵治疗组动物烦躁、挠头次数较模型组少,三种中药组在 90 min 左右时搔头减少,120 min 后逐渐开始倦卧,期间有间断活动。在皮下注射硝酸甘油后动物血清 ENK 含量增高, β -EP 含量降低,脑干组织 C-FOS 表达增高,川芎治疗组 ENK 含量显著低于白芷组($P<0.05$), β -EP 含量高于白芷组($P<0.01$),C-FOS 表达低于吴茱萸组($P<0.05$)。从各组动物行为改变看,开始阶段川芎治疗组挠头次数最低,且维持时间较长;吴茱萸组挠头次数梯次降低较快,提示川芎、吴茱萸可能联用疗效较好。

参考文献

- [1] STOVNER L J, ANDREE C. Prevalence of headache in Europe: a review for the Eurolight project[J]. The journal of headache and pain, 2010,11(4):289-299.
- [2] 袁梦果,刘云芳,田 婷,等.活血祛风法治疗偏头痛的 Meta 分析[J].中医药导报,2017,23(1):73-76.
- [3] 周 莉,蔡秀英,倪健强.偏头痛实验动物模型的行为学评价[J].中国疼痛医学杂志,2016,22(4):293-297.
- [4] 张笑娜,王新来,史文珍,等.偏头痛动物模型的研究现状[J].中华脑科疾病与康复杂志(电子版),2014,4(3):203-206.
- [5] 宋丹宁,尚 坤,李 娜,等.当归川芎颗粒对硝酸甘油致大鼠偏头痛的影响及机制[J].中国老年医学杂志,2017,37(1):269-270.
- [6] 孙 达,许保海.川芎茶调散治疗偏头痛的疗效观察及对 β 内啡肽、5 羟色胺的影响[J].中国中医急症,2016,25(11):2117-2119.
- [7] WU X, ZHANG M, HUANG H. Effect of qilongtutong granule on calcitonin gene-related peptide, beta-endorphin, serotonin, dopamine, and noradrenalin in migraine model rats and mice[J]. Journal of traditional Chinese medicine, 2014,34(2):188-193.
- [8] SETHI N K, ULLOA C M, SOLOMON G E, et al. Diagnostic utility of routine EEG study in identifying seizure as the etiology of the index event in patients referred with a diagnosis of migraine and not otherwise specified headache disorders[J]. Clinical EEG and Neuroscience, 2012,43(4):323-325.
- [9] RAMACHANDRAN R, BHATT D K, PLOUG K B, et al. A naturalistic glyceryl trinitrate infusion migraine model in the rat[J]. Cephalalgia, 2012,32(1):73-84.
- [10] 赵永烈,王玉来,岳广欣.芎芷地龙汤对偏头痛模型大鼠脑组织 C-FOS 和 CGRP 蛋白表达的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(9):957-960.
- [11] 苏 瑾,唐仕欢,郭非非,等.含白芷方剂组方规律及核心药对“白芷-川芎”分子机制的研究[J].中国中药杂志,2018,43(7):1331-1337.
- [12] 刘顶鼎,郭建生,曾贵荣,等.芎麻汤及其提取物对利血平低 5-HT 型偏头痛模型小鼠的影响[J].湖南中医药大学学报,2012,32(3):17-19.
- [13] 刘红梅.中药治疗偏头痛文献综述[J].中西医结合心脑血管病杂志,2014,12(10):1267-1269.