

·实验研究·

本文引用: 邵笑笑, 张 慧, 申莉铎, 蒋若琛, 简芋鑫. 解郁止痛方对偏头痛-抑郁共病模型大鼠行为学及 NLRP3 和 Caspase-1 基因表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(1): 1-8.

解郁止痛方对偏头痛-抑郁共病模型大鼠行为学及 NLRP3 和 Caspase-1 基因表达的影响

邵笑笑¹, 张 慧^{2*}, 申莉铎¹, 蒋若琛¹, 简芋鑫¹

1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000

【摘要】目的 探究解郁止痛方(JYZT)对偏头痛-抑郁共病模型大鼠行为学及脑组织中 Nod 样受体蛋白 3(Nod-like receptor protein 3, NLRP3)/胱天蛋白酶-1(Caspase-1)蛋白表达水平的影响。**方法** 48 只大鼠随机分为正常组、模型组、阳性药物组、JYZT 低剂量组、JYZT 中剂量组、JYZT 高剂量组, 每组 8 只, 除正常组外, 其余各组均采用间歇性颈部皮下注射硝酸甘油注射液及 7 种不同的慢性不可预知性温和刺激方法诱导偏头痛-抑郁共病大鼠模型。造模开始同时予以药物干预治疗。诱导偏头痛模型前进行热痛阈值测定, 造模前、造模治疗中(第 10 天)、造模治疗后对各组大鼠进行行为学测试。Western blot 检测大鼠杏仁核组织中 NLRP3 及 Caspase-1 蛋白的表达。**结果** 第 7、第 14、第 21 天, 与正常组相比, 模型组热痛阈值显著降低($P<0.01$); 与模型组相比, 阳性药物组及解郁止痛方各剂量组热痛阈值显著升高($P<0.05, P<0.01$)。造模治疗第 10 天、第 21 天, 与正常组相比, 模型组旷场实验水平和垂直运动得分、糖水偏好率均显著降低($P<0.01$), 新奇抑制摄食-潜伏时间及强迫游泳不动时间均显著延长($P<0.01$); 与模型组比较, 阳性药物组及 JYZT 各剂量组旷场实验水平和垂直运动得分、糖水偏好率均显著升高($P<0.05, P<0.01$), 新奇抑制摄食-潜伏时间及强迫游泳不动时间显著缩短($P<0.05, P<0.01$)。造模治疗结束后, 与正常组比较, 模型组 NLRP3 及 Caspase-1 蛋白表达显著升高($P<0.01$); 与模型组比较, 阳性药物组及 JYZT 中剂量组、JYZT 高剂量组 NLRP3 及 Caspase-1 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。**结论** 解郁止痛方可以改善偏头痛-抑郁共病大鼠的行为学得分, 降低大鼠脑组织杏仁核中 NLRP3 及 Caspase-1 蛋白表达, 从而抑制炎症反应的发生。

【关键词】 偏头痛; 抑郁症; 解郁止痛方; NLRP3; Caspase-1; 大鼠

【中图分类号】R259

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.01.001

Effects of Jieyu Zhitong Formula on behaviors and expressions of NLRP3 and Caspase-1 genes in migraine-depression model rats

SHAO Xiaoxiao¹, ZHANG Hui^{2*}, SHEN Liduo¹, JIANG Ruochen¹, JIAN Yuxin¹

1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China; 2. The Hospital of Shaanxi

University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712000, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of Jieyu Zhitong (JYZT) Formula, on the behavioral and expression levels of nod-like receptor protein 3 and Caspase-1 in brain tissues of migraine-depression rat model. **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into normal, model, positive drug and JYZT low-, medium- and high-dose groups, with 8 in each group. All groups except the normal group were induced with intermittent subcutaneous neck nitroglycerin injection and 7 different chronic

【收稿日期】2022-10-08

【基金项目】中国中医科学院中医药循证能力建设项目(2019XZZX-NB010); 陕西省教育厅重点科研项目(21JS006); 陕西省创新能力支撑计划项目(2017KCT-26); 陕西中医药大学附属医院科研课题(2020XZ002)。

【第一作者】邵笑笑, 女, 医师, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合脑血管疾病的基础与临床研究。

【通信作者】* 张 慧, 女, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: 13991057086@163.com。

unpredictable mild stimulation methods for migraine–depression rat models. Pharmacological interventions were administered at the beginning of modeling. Thermal pain thresholds were measured before the induction of the migraine model, and behavioral tests were performed in each group before, during (10 d), and after the modeling. After the experiments, the expressions of NLRP3 and Caspase-1 protein in the amygdala tissue of rats was detected by Western blot. **Results** On the 7th, 14th and 21st days, the thermal pain thresholds in the model group decreased significantly compared with the normal group ($P<0.01$), and the thermal pain thresholds in positive drug group and each dose group of antidepressant formula increased in comparison to the model group ($P<0.05$, $P<0.01$); on the 10th and 21st days of the modeling, compared with the normal group, the model group showed decrease in the horizontal and vertical movement scores of the model group in the open field test, and sugar water preference rates ($P<0.01$), and a prolongation of the novel food suppression–latency time and forced swimming immobility time ($P<0.01$). The positive drug group and JYZT dose groups showed an increase in the level and vertical locomotion scores and sugar–water preference rates ($P<0.05$, $P<0.01$) and a shortening of the novel food suppression–latency time and forced swimming immobility time ($P<0.05$, $P<0.01$). After modeling, the expressions of NLRP3 and Caspase-1 protein in the model group was significantly higher compared with those of the normal group ($P<0.01$); the expressions of NLRP3 and Caspase-1 protein in the positive drug group and JYZT medium- and high- dose groups were significantly reduced ($P<0.01$). **Conclusion** JYZT Formula, can improve the behavioral scores of migraine–depressed rats, reduce the expression of NLRP3 and Caspase-1 protein in the amygdala of rat brain tissues, and thus inhibit the inflammatory response.

[**Keywords**] migraine; depression; Antidepressant and Pain Relief Formula; NLRP3; Caspase-1; rat

偏头痛是一种发作性神经血管性头痛,发作时以头两侧剧烈搏动性疼痛、恶心、呕吐等为主症^[1]。我国流行病学调研发现,偏头痛发病率为 9.3%^[2],且有逐年升高趋势。偏头痛还可提高一些神经精神类疾病的发病率,如焦虑、抑郁等,疾病相互影响给患者带来多重打击,使其工作及生活质量明显下降。抑郁症是持久性绝望的情绪紊乱性疾病,是一种严重致残性疾病^[3]。研究表明,偏头痛、抑郁有多种共同的发病机制,临床常见二者共病,较单一疾患对机体损害更为严重,且二者共病后其发病机制、证候类型更加复杂难辨,预后更差^[4],延长患者遭受疾病痛苦的时间。因此,尽早发现偏头痛–抑郁共病并加以治疗,对疾病进程的控制及最终治愈有重要作用。临床对二者共病无明确认识、鉴别及诊断,二者共病时常会忽略抑郁状态,致临床疗效不佳。现有关偏头痛–抑郁共病的发病机制研究相对较少,临床治疗多以口服止痛药为主,但止痛药多具有不同程度成瘾性,对人体产生多种不良反应,不利于慢性继发性偏头痛患者恢复健康^[5]。中医辨证论治对患者有个性化治疗方案,可多靶点治疗,且可发挥多种中药综合治疗的优势,不良反应少。有研究发现,疼痛常伴随着不愉快的情绪体验,并会诱发强烈的负面情绪及疼痛刺激回避行为,偏头痛–抑郁患者存在共同的传导通路,杏仁核可能是此通路的重要中枢核团之一,

其参与疼痛情绪加工,维持慢性疼痛^[6]。解郁止痛方是闫咏梅教授的多年临床经验方,治疗偏头痛抑郁共病效果显著,但其药物作用分子机制尚不明确。包括 Nod 样受体蛋白 3(Nod-like receptor protein 3, NLRP3)、胱天蛋白酶 1(Caspase-1)在内的多种炎症小体相关蛋白已被证明在偏头痛–抑郁发病中呈上调趋势^[7-8]。本实验主要探究解郁止痛方对偏头痛–抑郁共病模型大鼠行为学及脑组织杏仁核中 NLRP3/Caspase-1 蛋白表达水平的作用,以期为临床使用解郁止痛方治疗偏头痛–抑郁共病患者提供证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 48 只,体质量(200±10)g,由成都达硕实验动物有限公司提供,合格证书号:SCXK(川)2022-006。伦理审批号:SUCMDL20221121003。实验前于陕西中医药大学动物实验中心适应性喂养 1 周,实验中心动物房于 8:00–20:00 光照、20:00–8:00 黑暗,噪声<60 dB,实验室温度(24±1)℃,湿度 50%±5%,期间大鼠自由摄食(标准大鼠用颗粒饲料)、饮水(自来水)。所有操作均符合动物处置伦理。

1.2 药物和试剂

解郁止痛方(川芎 12 g,柴胡 10 g,合欢皮 10 g,

全蝎 6 g, 黄芪 10 g), 由陕西中医药大学附属医院中草药药剂中心浓缩至每剂 192、96、48 mL, 含生药浓度为 0.25、0.50、1.00 g/mL; 总生药剂量为 0.8 g/kg, 以换算系数 6.25 计算成大鼠剂量为 5.0 g/kg, 则中剂量组灌胃 5.0 g/kg, 低剂量组灌胃 2.5 g/kg, 高剂量组灌胃 10.0 g/kg; 硝酸甘油注射液(郑州羚锐制药有限公司, 批号: 20210309); 尼莫地平片(广东华南药业集团有限公司, 批号: 210302)。

兔多抗 NLRP3(美国 Affinity 公司, 批号: DF15549); Caspase-1(美国 Abclonal 公司, 批号: A0964); GAPDH(杭州贤至生物有限公司, 批号: AB-P-R 001); 蛋白标记(南京金斯瑞生物科技股份有限公司, 批号: 10-180KD); 羊抗兔二抗(批号: A0208 HRP)、RIPA 裂解液(批号: P0013B)均购自上海碧云天生物技术有限公司; 甘氨酸电转液(德国 Biofroxx 公司, 批号: 1275GR500); PBS 磷酸盐缓冲液(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 10019318)。

1.3 主要仪器

大小鼠足底热刺痛仪(上海欣软信息科技有限公司, 型号: XR-YLS-22A); 垂直电泳槽(型号: DY-CZ-24DN)、电泳仪(型号: DYCZ-40)均购自北京六一仪器厂; 凝胶成像仪(上海天能科技有限公司, 型号: 5200); 多功能酶标仪(美国 ThermoFisher 仪器有限公司, 型号: MK3); 离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, 型号: HI650); 水浴锅(德国 Leica 公司, 型号: HI1210)。

1.4 实验方法

健康 SD 雄性实验大鼠 48 只适应性喂养 1 周, 随机分为 6 组(正常组、模型组、阳性药物组、JYZT 低剂量组、JYZT 中剂量组、JYZT 高剂量组), 每组 8 只。实验造模开始第 1 天, 除正常组外, 其余 5 组诱导偏头痛模型, 参照偏头痛间断性发作的特点, 于实验造模开始第 1、第 7、第 14、第 21 天分别在大鼠颈部皮下注射硝酸甘油注射液(5 mg 的硝酸甘油注射液用生理盐水稀释为 10 mg/kg), 注射完成 20 min 后至 1 h 内, 可观察到造模后大鼠耳朵发红, 前肢搔头动作和攀笼次数明显较正常组增加, 此为偏头痛造模成功的标志^[9], 注射硝酸甘油后大鼠会出现痛

觉过敏现象, 因此, 同时测量大鼠后足热痛阈值^[10]。诱导偏头痛模型当天至实验开始第 7 天, 每天对除正常组外的其余 5 组大鼠进行一种随机不可重复的慢性不可预知性刺激, 以诱发偏头痛-抑郁共病模型, 通过多种行为学检测得分判断是否造模成功^[11]。(1)晃笼: 220 Hz, 持续 10 min。(2)湿笼: 于鼠笼内倒 130 mL 水, 至垫料充分浸湿, 持续 24 h。(3)夹尾: 将每组大鼠单只分笼放置, 使用夹取力度相同且适中的鼠尾夹, 在距大鼠尾巴根处 1.5 cm 部位夹紧, 持续 4 min, 每只大鼠夹 1 次。(4)冰水游泳: 准备一长、宽各 50 cm, 高 30 cm 的水箱, 放 4 °C 的冷水至水箱高 25 cm 处, 依次放入各组实验大鼠, 8 min 后捞出, 游泳期间保证大鼠的足尖可碰到水箱底部但无法越出水箱。(5)斜笼: 分别将各组鼠笼以 50° 倾斜放置, 持续 24 h。(6)电击足底: 以 40 V 直流电电击大鼠足底刺激 2 s, 间歇 1 s, 持续 2 min。(7)24 h 内禁止大鼠饮食、饮水。实验开始造模同时予以药物灌胃干预, 正常组以纯净水灌胃, 模型组以生理盐水灌胃, 西药组以尼莫地平混悬液 6 mg/kg 灌胃, JYZT 低、中、高剂量组分别予以解郁止痛方(2.5、5.0、10.0 g/kg)^[9]灌胃, 1 天 1 次, 共 21 d。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 热痛阈的测定 于实验开始第 1、第 7、第 14、第 21 天诱导偏头痛模型前测量各组实验大鼠的热痛阈。热痛阈的测定: 将大鼠依次放置于有机玻璃框中, 待大鼠趋于安静后用热辐射照射其左后肢足底中部, 观察并记录其反应及缩足时间, 每组测 3 次, 每次间隔 5 min, 取其平均值。测量时应保持大鼠足底干燥以减少误差^[12]。

1.5.2 行为学评分 分别于实验造模前(第 0 天)、造模治疗中(第 10 天)、造模治疗后(第 21 天)对实验各组大鼠评估以下行为学。

(1)旷场实验。准备长、宽各 105 cm, 高 55 cm 的敞口纸箱, 将其内壁四面均匀涂黑, 内底部等分为 25 个正方形格子。将每只大鼠沿同一侧内壁放置于此纸箱内, 适应 3 min 后观察 4 min 内每只大鼠爬过的方格数量(四肢同时经过, 记为水平运动得分)及直立次数(双侧前肢离开地面或竖起爬于侧壁, 记

为垂直运动得分)^[13]。各组大鼠依次检测,每次检测敞箱中保证不多于1只大鼠,检测过程中尽量保持安静以确保实验结果准确性,并用视频记录检测结果,每次检测前保证纸箱干净无排泄物。分析其得分差异。

(2)糖水偏好实验。实验前准备两只500 mL水瓶,一只于瓶身标记糖水,另一只相同位置标记纯净水。每次评估前24 h对大鼠进行糖水摄入适应性训练,即每笼同时放2个瓶内均装有1%蔗糖水500 mL的水瓶。24 h后,一只瓶内仍装1%蔗糖水500 mL,另一只瓶内装纯净水500 mL。持续24 h后,记录每只大鼠的糖水、纯净水及总液体摄入量^[13]。计算其百分比(糖水偏好率=糖水摄入量/总液体摄入量×100%),比较其差异。

(3)新奇抑制摄食实验。实验前各组大鼠禁食12 h,不禁水,准备一50 cm×40 cm的敞口箱子,在箱子中央放置数枚大小相似的标准大鼠用颗粒饲料,每次从箱子的同一位置放入大鼠,记录大鼠第一次寻找食物并咬食的时间,每次实验保证箱内不超过1只大鼠,以确保实验结果准确无误^[14]。比较各组大鼠新奇抑制摄食-潜伏时间之间的差异。

(4)强迫游泳实验。检测前准备一长方形塑料箱(长100 cm,宽50 cm,高50 cm),箱内放置高40 cm,20~22 ℃的水。将实验大鼠按分组依次放入水中,每次放置1组大鼠,大鼠被动漂浮在水中,后足可触及箱底,但无法跃出水面,强迫其游泳8 min,将其在水中停止挣扎5 s以上规定为不动状态,记录大鼠游泳时不动时间^[13],分析各组间的差异。

1.5.3 Western blot 检测各组大鼠脑内杏仁核中

NLRP3 及 Caspase-1 蛋白的水平 实验造模治疗结束后(第21天),各组大鼠均采取腹腔注射的方式麻醉,大鼠麻醉成功后用生理盐水心脏灌注以置换出大鼠全身血液,随后进行断头取脑,取出的大鼠全脑置于-20 ℃冰箱内加以凝固,数分钟后依据大鼠脑解剖图谱将杏仁核组织取出后称重,放入冻存管中液氮速冻后于-80 ℃冰箱内保存。操作时将样本取出放入2 mL EP管中,向每管加入清洗干净的钢珠及裂解液充分裂解30 min,后移至1.5 mL离心管中,4 ℃ 12 000 g离心5 min,取上清分装稀释后,分别计算其蛋白样本光密度值,进行蛋白变性,随即上样、电泳、转膜、封闭、一抗、二抗、显色曝光等检测大鼠脑内杏仁核组织中 NLRP3 及 Caspase-1 蛋白的水平。

1.6 统计学方法

数据均采用 SPSS 22.0 软件分析。计量数据均符合正态分布,以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较采用单因素方差(One-Way ANOVA)分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同阶段各组大鼠热痛阈值比较

造模治疗前(第1天)各组热痛阈值比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。造模治疗中(第7、第14、第21天),与正常组相比,模型组热痛阈值均明显降低($P<0.01$);与模型组相比,阳性药物组及 JYZT 各剂量组热痛阈值均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。详见图1。

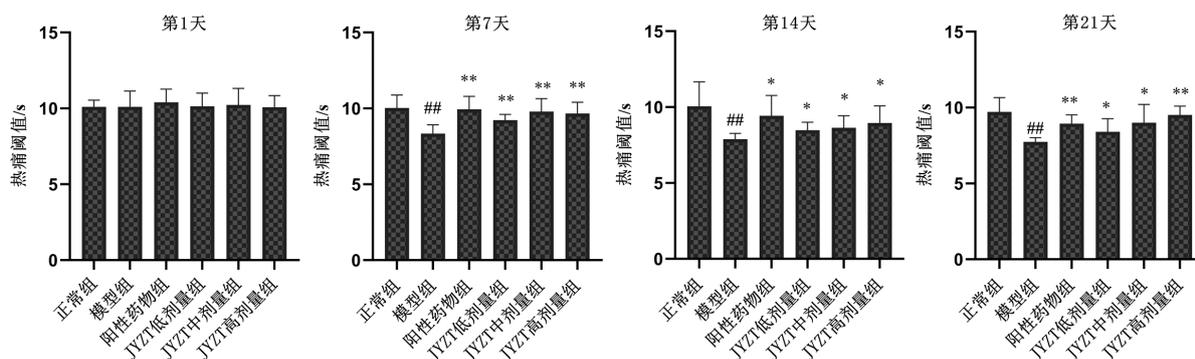


图1 不同阶段各组大鼠热痛阈值比较

注:与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

2.2 不同阶段各组大鼠糖水偏好率比较

造模治疗前(第0天)各组糖水偏好率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。造模治疗中(第10、第21天),与正常组相比,模型组糖水偏好率均明显降低($P<0.01$);与模型组相比,阳性药物组及JYZT各剂量组糖水偏好率均明显升高($P<0.05, P<0.01$)。详见图2。

2.3 不同阶段各组大鼠旷场实验得分比较

造模治疗前(第0天)各组旷场实验水平及垂直活动得分比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。造模治疗中(第10、第21天),与正常组相比,模型组旷场实验水平及垂直活动得分均明显降低($P<0.01$);与模型组相比,阳性药物组及JYZT各剂量组旷场实验水平及垂直活动得分均明显升高($P<0.05, P<0.01$)。详见图3~4。

2.4 不同阶段各组大鼠新奇抑制摄食-潜伏时间比较

造模治疗前(第0天)各组新奇抑制摄食-潜伏时间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。造模治疗中(第10、第21天),与正常组相比,模型

组新奇抑制摄食-潜伏时间均明显延长($P<0.01$);与模型组相比,阳性药物组及JYZT各剂量组新奇抑制摄食-潜伏时间均明显缩短($P<0.05, P<0.01$)。详见图5。

2.5 不同阶段各组大鼠强迫游泳不动时间比较

造模治疗前(第0天)各组强迫游泳不动时间比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。造模治疗中(第10、第21天),与正常组相比,模型组强迫游泳不动时间均明显延长($P<0.01$);与模型组相比,阳性药物组及JYZT各剂量组强迫游泳不动时间均明显缩短($P<0.05, P<0.01$)。详见图6。

2.6 各组大鼠杏仁核组织中 NLRP3 及 Caspase-1 蛋白表达比较

与正常组相比,模型组 NLRP3 及 Caspase-1 蛋白表达均明显升高($P<0.01$)。与模型组相比,阳性药物组、JYZT 中剂量组、JYZT 高剂量组 NLRP3 及 Caspase-1 蛋白表达均明显降低($P<0.05, P<0.01$)。JYZT 低剂量组 NLRP3 及 Caspase-1 蛋白表达与模型组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。详见图7、表1。

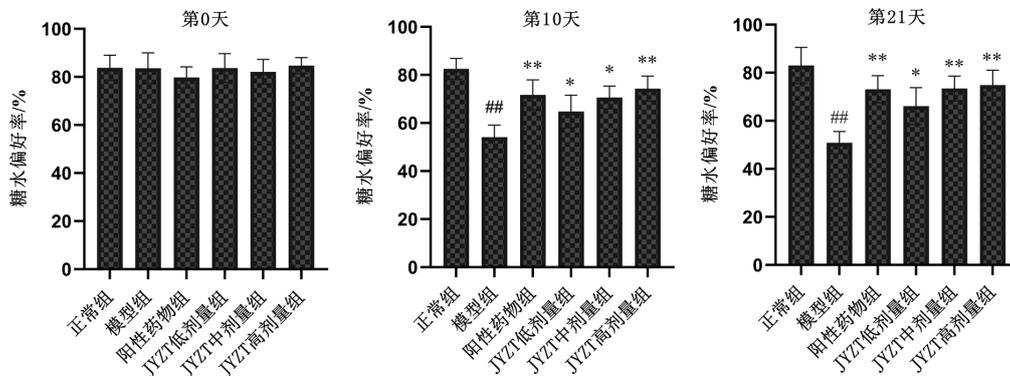


图2 不同阶段各组大鼠糖水偏好率比较

注:与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

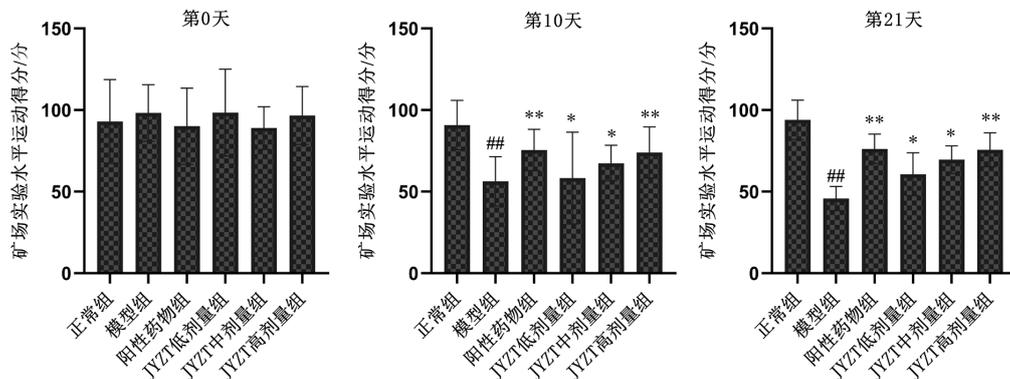


图3 不同阶段各组大鼠旷场实验水平运动得分比较

注:与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

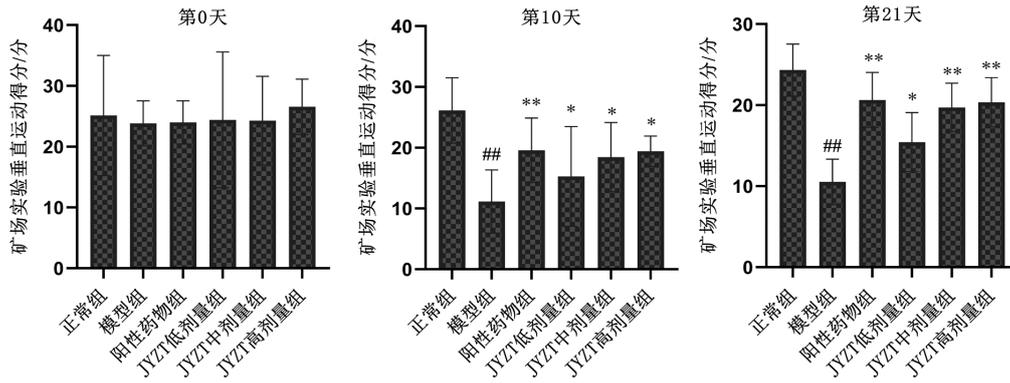


图4 不同阶段各组大鼠旷场实验垂直运动得分比较

注:与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

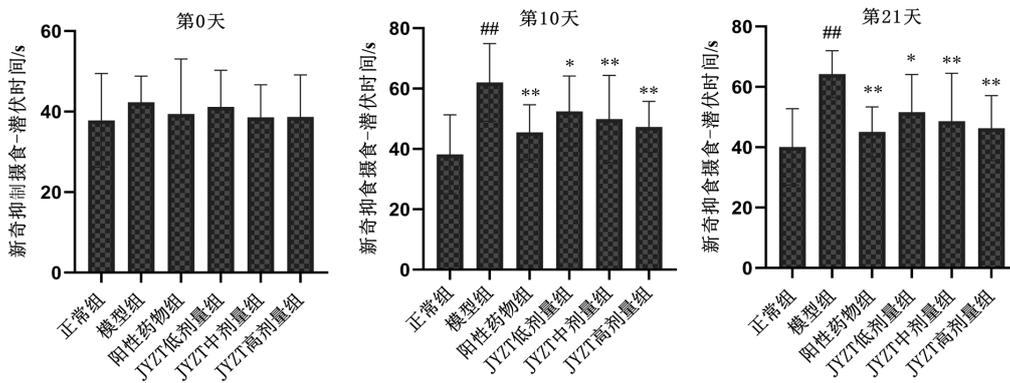


图5 不同阶段各组大鼠新奇抑制摄食-潜伏时间比较

注:与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

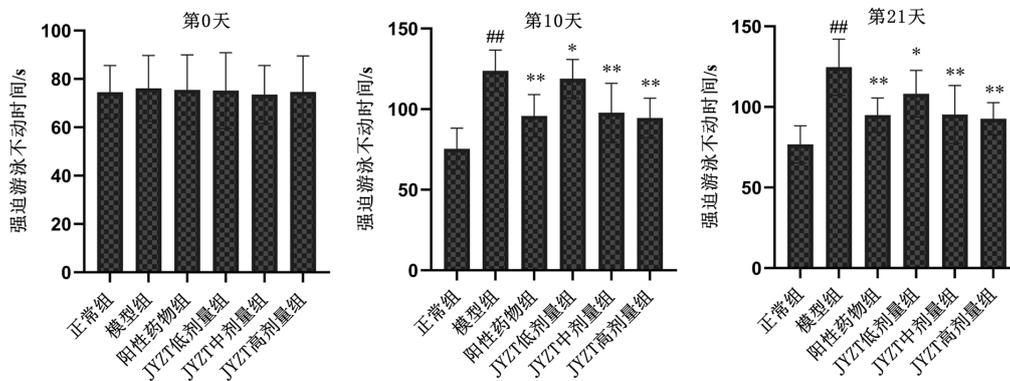


图6 不同阶段各组大鼠强迫游泳不动时间比较

注:与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

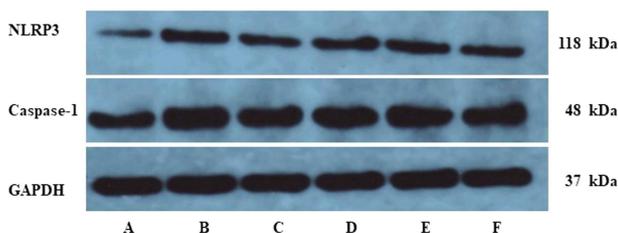


图7 各组大鼠杏仁核组织中NLRP3及Caspase-1蛋白的表达水平

注:A.正常组;B.模型组;C.阳性药物组;D. JYZT低剂量组;E. JYZT中剂量组;F. JYZT高剂量组。

表1 各组大鼠杏仁核中NLRP3及Caspase-1蛋白表达比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	NLRP3 蛋白相对表达	Caspase-1 蛋白相对表达
正常组	0.9 000±0.410	3.9 538±0.362
模型组	4.7 540±1.053##	6.9 648±0.597##
阳性药物组	2.0 850±0.305**	5.3 444±0.252**
JYZT低剂量组	3.8 172±0.305	6.4 004±0.502
JYZT中剂量组	2.5 881±0.501*	5.4 767±0.407*
JYZT高剂量组	2.1 352±0.353**	5.2 529±0.312**

注:与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3 讨论

疼痛是一种多维度情绪体验,杏仁核、基底神经节、海马及顶叶皮质等,统称为疼痛神经网络^[15],共同参与疼痛的加工。杏仁核内含有多种生物活性因子,是此疼痛网络中调节情绪和应激的重要中枢核团,可整合来自三叉神经核及丘脑的多种感觉,产生负面情绪,因此,杏仁核极可能是偏头痛-抑郁共病的生理基础。有研究表明,神经胶质细胞中含有 NLRP3 和 IL-1 β 等,NLRP3 炎症小体主要由 NOD 样受体 3 蛋白、凋亡相关斑点样蛋白以及胱天蛋白酶 1 前体构成,被刺激的 NLRP3 炎症小体通过启动信号及产生活性氧、K⁺外流、溶酶体损伤等激活信号完成活化^[16],活化的 NLRP3 炎症小体一方面刺激神经胶质细胞释放 IL-1 β 和 c-fos 等,参与偏头痛-抑郁发生^[17-18]。另一方面会加速 Caspase-1 的激活,进一步促进神经胶质细胞内 IL-1 β 的成熟与分泌,从而作用于细胞自身白介素受体,形成正反馈环路,并且招募周围神经胶质细胞及炎性细胞,进一步扩大炎症反应,使得脑组织损伤愈加严重^[19-21]。综上所述,NLRP3 与 Caspase-1 协同作用于偏头痛-抑郁共有发病机制,加重炎症级联反应。偏头痛-抑郁模型的建立,是在偏头痛模型复制基础上同时建造抑郁模型^[14],研究表明,体外注射硝酸甘油制备偏头痛模型,操作简单且可直观观察到大鼠挠头、攀笼次数,是目前常用制备偏头痛模型的方法^[22]。慢性不可预知温和刺激制备抑郁模型是目前通用的造模方法^[11]。因此,本实验通过颈部注射硝酸甘油注射液及不可预知的温和刺激诱导偏头痛-抑郁共病大鼠模型,予以中药解郁止痛方来探究偏头痛-抑郁共病大鼠行为学及脑组织杏仁核中 NLRP3/Caspase-1 蛋白表达水平的改变。

偏头痛-抑郁患者病情复杂,不易诊断,易发展为严重的慢性、反复发作性疾病,对患者有极大的致残性,且带来巨大的经济负担^[23]。解郁止痛方为闫咏梅教授的多年临床经验,并通过临床验证治疗偏头痛-抑郁有明显疗效。该方由川芎、柴胡、合欢皮、黄芪、全蝎共同组成。其中川芎、柴胡共为本方君药,川芎是一味活血化瘀药,归肝、胆经,可行气散郁,活血,祛瘀止痛,网络药理学分析发现川芎治疗偏头痛的有效成分主要有 Myricanone、Wallichilide、Senkyunone 等,这些成分可能通过参与能量的代谢、调节相关

激素、加强信号通路的传导等几方面改善脑循环^[24], Myricanone 可催化环氧化酶的抗炎活性^[25],从而减轻偏头痛发作。柴胡可疏肝气、解郁、退热,《神农本草经》述其可去寒热邪气,推陈出新,有研究表明,柴胡内皂苷等有效成分可通过调节 NF- κ B/miR-155/FGF2 轴改善抑郁症状,发挥其抗炎作用^[26-27]。二者合用加强解郁行气止痛。合欢皮为安神药,有极强的安眠作用,同时可解郁、活血、消除疼痛,改善患者失眠症状,其含有的三萜类、木脂素等能提高小鼠脑内 GABA 含量,降低 5-HT 含量,发挥抗焦虑作用^[28],其有效成分丁香树脂酚还可有抗炎作用。久病正气虚弱,黄芪为补气药,善补脾气,升阳气,行滞通痹,黄芪总黄酮可抑制 MAPKs 通路关键蛋白 p38^[29],且黄芪甲苷能减少星形胶质细胞激活,从而从多靶点抑制炎症的产生,黄芪还可与川芎组成药对,使补而不滞,行气而不耗伤正气。久病入络,配伍全蝎可达搜风通络止痛之功,治疗偏正头痛效果极佳,现代药理学发现,全蝎可抑制钙离子通道及调控神经细胞离子通道的开放从而达到保护脑神经的作用。全方诸药合用共奏补虚泻实,舒达肝气,解郁祛瘀活血作用。

本实验研究结果显示:解郁止痛方能显著改善偏头痛抑郁共病模型大鼠旷场实验水平和垂直运动得分、糖水偏好率,缩减新奇抑制摄食-潜伏时间及强迫游泳不动时间。实验中大鼠共死亡 2 只,刺激造成的大鼠应激、疲劳等原因为其死亡的主要原因。本实验模型组大鼠脑内杏仁核组织中 NLRP3 及 Caspase-1 蛋白表达水平明显升高,同时,JYZT 中、高剂量组大鼠脑内杏仁核内中 NLRP3 及 Caspase-1 蛋白含量明显降低。因此,推测解郁止痛方可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1 信号通路的活化,减少进一步炎症级联反应,保护脑细胞。

参考文献

- [1] QUBTY W, et al. Migraine pathophysiology[J]. *Pediatric Neurology*, 2020, 107: 1-6.
- [2] KHAN J, ASOOM L I A, SUNNI A A, et al. Genetics, pathophysiology, diagnosis, treatment, management, and prevention of migraine[J]. *Biomedicine and Pharmacotherapie*, 2021, 139: 111557.
- [3] DUDEK K A, DION-ALBERT L, KAUFMANN F N, et al. Neurobiology of resilience in depression: Immune and vascular insights from human and animal studies[J]. *The European Journal of Neuroscience*, 2021, 53(1): 183-221.

- [4] ASIF N, PATEL A, VEDANTAM D, et al. Migraine with comorbid depression: Pathogenesis, clinical implications, and treatment[J]. *Cureus*, 2022, 14(6): e25998.
- [5] BYUN Y J, LEVY D A, NGUYEN S A, et al. Treatment of vestibular migraine: A systematic review and meta-analysis[J]. *The Laryngoscope*, 2021, 131(1): 186-194.
- [6] ALLEN H N, BOBNAR H J, KOLBER B J. Left and right hemispheric lateralization of the amygdala in pain[J]. *Progress in Neurobiology*, 2021, 196: 101891.
- [7] HE W, LONG T, PAN Q, et al. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 β release and contributes to central sensitization in a recurrent nitroglycerin-induced migraine model[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 1-17.
- [8] GONG Q Y, et al. Microglia-astrocyte cross talk through IL-18/IL-18R signaling modulates migraine-like behavior in experimental models of migraine[J]. *Neuroscience*, 2020, 451: 207-215.
- [9] 刘 溪,张 慧,冯思娜,等.解郁止痛方对偏头痛-抑郁病模大鼠行为学及 c-fos、c-jun 基因表达影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2022,24(10):25-30,221.
- [10] 荆 凤.小胶质细胞 P2Y₁₂ 受体参与慢性偏头痛中枢敏化的机制研究[D].重庆:重庆医科大学,2020.
- [11] 杨一帆,王 豆,李 涛,等.慢性不可预知温和刺激抑郁模型及其评价指标的研究进展[J]. *山东医药*, 2021,61(25):96-99.
- [12] JIANG L, ZHANG Y X, JING F, et al. P2X₇R-mediated autophagic impairment contributes to central sensitization in a chronic migraine model with recurrent nitroglycerin stimulation in mice[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 1-19.
- [13] HUANG Y J, JIN Y S, YAO S, et al. LncRNA NEAT1 inhibits neuronal apoptosis and induces neuronal viability of depressed rats via microRNA-320-3p/CRHR1 axis[J]. *Neurochemical Research*, 2022: 1-12.
- [14] 冯思娜,舒星星,张 慧.解郁止痛方对偏头痛抑郁共病大鼠行为学及脑组织脑源性神经营养因子表达的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2022,31(13):1786-1791,1796.
- [15] 韩 奕,翟晓静,陈丹丹,等.疼痛感觉易感与非易感神经生物学机制的研究进展[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2022,28(8):571-581.
- [16] WANG J H, et al. Cathepsin B aggravates acute pancreatitis by activating the NLRP3 inflammasome and promoting the Caspase-1-induced pyroptosis[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 94: 107496.
- [17] 刘 一,周梦荻,孙铭声,等.小胶质细胞参与偏头痛慢性化以及针刺镇痛中的研究进展[J]. *世界中医药*, 2022,17(17):2389-2393.
- [18] 庞森一,马奕然,王培培,等.NLRP3 炎症小体与神经病理性疼痛关系的研究进展[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2022,28(10):776-782.
- [19] 覃高升,李佳乐,王婉婉,等.细胞焦亡在肿瘤中的研究进展[J]. *癌症进展*, 2020,18(4):339-342,355.
- [20] YU Z W, ZHANG J, LI X, et al. A new research hot spot: The role of NLRP3 inflammasome activation, a key step in pyroptosis, in diabetes and diabetic complications[J]. *Life Sciences*, 2020, 240: 117138.
- [21] XIA S Y, et al. Biological mechanisms and therapeutic relevance of the gasdermin family[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2020, 76: 100890.
- [22] 张泽鹏,郭 颖,李 霖,等.偏头痛药理实验模型研究进展[J]. *天津中医药大学学报*, 2022,41(2):258-264.
- [23] 张 梦,汪美霞,赵 倩,等.基于 TCD 探讨逍遥散联合帕罗西汀片治疗肝郁血虚型偏头痛与抑郁共病的临床疗效[J]. *中国实验方剂学杂志*:1-10(2022-06-20)[2022-10-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220618.0823.002.html>.
- [24] 张晓娟,张燕丽,左冬冬.川芎的化学成分和药理作用研究进展[J]. *中医药信息*, 2020,37(6):128-133.
- [25] YU Y, ZHANG G, HAN T, et al. Analysis of herbal mechanisms and Prescriptions for chronic cerebral circulatory insufficiency based on data mining and network pharmacology[J]. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 2022, 25(8): 1239-1253.
- [26] CHAO B, HUANG S J, PAN J H, et al. Saikosaponin d down-regulates microRNA-155 and upregulates FGF2 to improve depression-like behaviors in rats induced by unpredictable chronic mild stress by negatively regulating NF- κ B[J]. *Brain Research Bulletin*, 2020, 157: 69-76.
- [27] PIAO C H. Saikosaponin A ameliorates nasal inflammation by suppressing IL-6/ROR- γ /STAT3/IL-17/NF- κ B pathway in OVA-induced allergic rhinitis[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2020, 315: 108874.
- [28] 熊永豪,冯 波,牛源菲,等.合欢皮对小鼠焦虑行为影响及抗焦虑活性部位筛选[J]. *世界中医药*, 2018,13(4):790-793,798.
- [29] 周鸿缘,张 贤,王 萌,等.黄芪总黄酮体外抗炎作用及对 MAPKs 信号通路的调控[J]. *中国兽医学报*, 2020,40(12):2392-2397.

(本文编辑 黎志清)