

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.002

川芎定痛胶囊对偏头痛大鼠模型行为学的影响及作用机制研究

刘红淼¹, 李艳玲^{2△}, 杨继章¹, 李梅芹³, 张林彦²

(1. 河北医科大学第一医院, 河北 石家庄 050031; 2. 石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司, 河北 石家庄 050051; 3. 石药控股集团有限公司, 河北 石家庄 050051)

摘要:目的 探讨川芎定痛胶囊对偏头痛大鼠模型行为学的影响及其作用机制。方法 将SD大鼠分为空白对照组(A组),模型组(B组),阳性对照组(C组)及川芎定痛胶囊低、中、高剂量组(D₁, D₂, D₃组)。C组大鼠给予正天丸3.0 g/kg, D₁, D₂, D₃组大鼠分别给予川芎定痛胶囊0.5, 1.0, 2.0 g/kg, 每天灌胃给药1次; A组和B组大鼠皮下注射生理盐水, 连续给药5 d。各组大鼠在末次给药30 min后, 皮下注射硝酸甘油注射液10 mg/kg, 建立偏头痛动物模型, 2 h内每隔30 min记录大鼠的前肢挠头次数并观察大鼠行为学变化; 采用酶联免疫吸附试验检测各组大鼠血清中降钙素(CGRP)、内皮素(ET)、一氧化氮(NO), 以及脑组织中5-羟色胺(5-HT)、β-内啡肽(β-EP)水平。结果 与A组相比, B组大鼠各时间段的挠头次数均显著增加($P < 0.01$), 血清中CGRP, ET, NO含量均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 脑组织中的5-HT和β-EP水平均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与B组相比, C组(30~120 min)和D₃组(30~120 min)、D₂组(60~90 min)的挠头次数显著减少($P < 0.05$, $P < 0.01$), C组和D₃组、D₂组大鼠血清中CGRP, ET, NO含量均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 脑组织中5-HT和β-EP水平均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 川芎定痛胶囊对偏头痛大鼠模型的行为学具有改善作用, 其作用机制与降低血清中CGRP, ET, NO含量, 以及升高脑组织中5-HT和β-EP水平有关。

关键词: 川芎定痛胶囊; 偏头痛; 行为学; 大鼠; 作用机制

中图分类号: R932; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)11-0005-03

Chuanxiong Dingtong Capsules on the Behavior of Rat Model with Migraine and Its Mechanism

LIU Hongmiao¹, LI Yanling², YANG Jizhang¹, LI Meiqin³, ZHANG Linyan²

(1. The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China 050031; 2. Pharmacological Center, Zhongqi Pharmaceutical Technology < Shijiazhuang > Co., Ltd., China Shijiazhuang Pharmaceutical Group, Shijiazhuang, Hebei, China 050051; 3. China Shijiazhuang Pharmaceutical Holding Group Co., Ltd., Shijiazhuang, Hebei, China 050051)

Abstract: Objective To study the effect of Chuanxiong Dingtong Capsules on the behavior of rat model with migraine and its mechanism. **Methods** SD rats were divided into the blank control group (group A), model control group (group B), positive control group (group C) and Chuanxiong Dingtong Capsules low, medium, high dose groups (groups D₁, D₂, D₃). Group C was given Zhengtian Pills 3.0 g/kg; groups D₁, D₂, D₃ were given Chuanxiong Dingtong Capsules 0.5, 1.0 and 2.0 g/kg intragastrically once a day; groups A and B received 0.9% sodium chloride injection; they were continued for a successive 5 d. Each group was given injection of nitroglycerin injection 10 mg/kg subcutaneously to induce migraine model 30 min after the last medication. The behavior changes of rats were observed using the times of rat forelimb scratching head as indexes within 2 h and every 30 min; enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of calcitonin gene-related peptide (CGRP), endothelin (ET), nitric oxide (NO) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) and β-endorphin (β-EP) in the serum of rats in each group. **Results** Compared with group A, the number of scratching times of group B increased significantly at each time period ($P < 0.01$); the levels of CGRP, ET, and NO in serum increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the 5-HT and β-EP levels in brain tissue were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with group B, group C (30~120 min) and group D₃ (30~120 min), group D₂ (60~90 min) significantly reduced the number of scratching heads ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the contents of CGRP, ET, NO in group C and D₃, group D₂ were significantly reduced ($P < 0.05$,

第一作者: 刘红淼, 男, 硕士研究生, 副主任中药师, 研究方向为中药研发, (电子信箱)liu8720285@126.com。

△通信作者: 李艳玲, 女, 硕士研究生, 高级工程师, 研究方向为药理学, (电子信箱)756661559@qq.com。

在风险分析[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(4): 404-407.
[13] EMA. Guideline on the sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container [EB/OL]. (2019-03-06) [2020-01-15]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-sterilisation-medicinal-product-active-substance-excipient-primary-container_en.pdf.

[14] 胡昌勤. 对抗生素注射剂仿制药一致性评价/再评价的思考[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(3): 281-287.
[15] 国家药品监督管理局. 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[Z]. 2014.
[16] 王海学, 王庆利, 孙涛. 化学药品注射剂临床前安全性评价的基本技术要求[J]. 中国执业药师, 2009, 6(5): 31-33.
(收稿日期: 2019-12-02; 修回日期: 2020-01-20)

$P < 0.01$), and the levels of 5-HT and β -EP in brain tissue were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Chuanxiong Dingtong Capsules can improve the behavior of migraine rat model, and its mechanism is related to the decrease of CGRP, ET, NO content in serum and the increase of 5-HT and β -EP levels in brain tissue.

Key words: Chuanxiong Dingtong Capsules; migraine; behavior; rats; mechanism

偏头痛是一种神经内科常见原发性头痛,临床主要症状为单侧或双侧出现较重的搏动样头痛,且长期反复发作,发生部位以偏侧头部为主,常伴有恶心、呕吐等自主症状。偏头痛会严重影响到患者的生活和工作,降低生活质量,还可导致脑梗死、脑白质病变及产生认知功能方面的障碍^[1]。三叉神经血管学说认为,偏头痛的病理机制与神经源性炎症反应相关,其中血管活性物质内皮素(ET)、一氧化氮(NO)、5-羟色胺(5-HT)的含量异常变化,以及神经递质 β -内啡肽(β -EP)、降钙素(CGRP)的分泌异常对神经源性炎症反应的发生起到了重要作用^[2]。目前,临床尚无成熟的中药成方制剂可治疗偏头痛。偏头痛属中医“脑风”“头风”范畴,为肝风上扰、气血逆乱、瘀血阻络所致^[3]。川芎定痛胶囊是由川芎、白芷、延胡索、绞股蓝等药组方,具有调和气血、平肝熄风、活络安神止痛之功效,作为医院特色制剂(批准文号为冀药制字 Z05000005)在临床应用 10 余年,对偏头痛有良好疗效。为进一步探讨和验证其药理作用,本研究中考察了川芎定痛胶囊对偏头痛大鼠模型的行为学影响及其作用机制,以进一步完善对川芎定痛胶囊的研究。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:R320 型低速冷冻离心机(北京白洋离心机有限责任公司);YP30000 型电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司,精度为 0.01 g);Varioskan Flash 酶标仪(Thermo Scientific 公司)。

试剂:川芎定痛胶囊(河北医科大学第一医院自制,批号为 20190301);正天丸(华润三九医药股份有限公司,批号为 1905102);硝酸甘油注射液(北京益民药业有限公司,批号为 20190806);氯化钠注射液(石家庄四药有限公司,批号为 19051906);CGRP 检测试剂盒(批号为 201900512),ET 检测试剂盒(批号为 20190905),NO 检测试剂盒(批号为 20190102),5-HT 检测试剂盒(批号为 20190511), β -EP 试剂盒(批号为 20190305),均购自南京建成生物工程研究所。

动物:SD 大鼠,清洁级,雌雄各半,体质量(200 ± 20)g,合格证号为 NO. 1100111911004367,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[实验动物使用许可证号为 SYXK(冀)2016-006],于 SPF 屏障系统中自由饮水、标准饲料适应性饲养 1 周,保持室内温度 20~25℃、相对

湿度 40%~70%、12 h/12 h 明暗交替照明。

1.2 方法

动物分组与建模:60 只 SD 大鼠,适应性饲养 7 d,按体质量随机分为空白对照组(A 组)、模型组(B 组)、阳性对照组(C 组)和川芎定痛胶囊低、中、高剂量组(D₁, D₂, D₃ 组),各 10 只,雌雄各半。C 组大鼠给予正天丸 3.0 g/kg, D₁, D₂, D₃ 组大鼠分别给予川芎定痛胶囊 0.5, 1.0, 2.0 g/kg,每天灌胃给药 1 次;A 组和 B 组大鼠均给予等体积生理盐水,连续给药 5 d。各组末次给药 30 min 后,皮下注射硝酸甘油注射液 10 mg/kg^[3],建立偏头痛动物模型,造模成功的标准为,造模 30 min 后大鼠出现挠头、耳红及爬笼等烦躁表现。

行为学观察:于大鼠注射硝酸甘油 5 min 后,记录 2 h 内每 30 min 大鼠的前肢挠头次数^[4]。

血管活性物质及神经递质水平检测:大鼠造模 4 h 后,腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(2 mL/kg)进行麻醉。腹主动脉取适量血,置无抗凝剂的真空采血管中,以 3 000 r/min 离心 15 min,分离血浆,液氮中冷冻保存,备用。按相关试剂盒说明进行操作,分别测定血清中 CGRP, ET, NO 的含量。采血后,断头处死,立即在冰上剖取脑组织,剥离后于液氮中冷冻保存。称取脑组织 0.5 g,加入预冷磷酸盐缓冲液 1.5 mL,在冰浴下充分匀浆,以 3 000 r/min 离心 25 min,分离血浆,冷冻保存备用。按相关试剂盒说明书标明的方法进行操作,分别测定脑组织中 5-HT 和 β -EP 的含量^[5-6]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠行为学观察

与 A 组比较,B 组大鼠在各时间段挠头次数均显著增加($P < 0.01$)。与 B 组比较,C 组(30~120 min)和 D₃ 组(30~120 min)、D₂ 组(60~90 min)的挠头次数均显著减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。详见表 1。

2.2 大鼠检测指标

与 A 组比较,B 组血清中 CGRP, ET, NO 含量均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),脑组织中的 5-HT 和 β -EP 水平均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 B 组比较,C 组和 D₃, D₂ 组大鼠血清中 CGRP, ET, NO 含量

表1 各组大鼠挠头次数比较($\bar{X} \pm s$, 次, $n = 10$)

组别	0 ~ 30 min	30 ~ 60 min	60 ~ 90 min	90 ~ 120 min
A 组	5.30 ± 1.82	6.20 ± 2.35	5.30 ± 1.66	4.50 ± 2.01
B 组	49.15 ± 10.23**	39.86 ± 5.75**	29.03 ± 6.77**	14.87 ± 5.28**
C 组	48.52 ± 6.93	30.31 ± 9.47 [#]	20.59 ± 4.53 [#]	9.27 ± 2.50 [#]
D ₁ 组	47.03 ± 8.93	39.22 ± 11.93	22.99 ± 9.14	13.23 ± 3.20
D ₂ 组	48.34 ± 8.01	36.06 ± 9.78	21.76 ± 4.92 [#]	10.55 ± 2.42
D ₃ 组	46.03 ± 5.75	30.43 ± 8.39 [#]	19.80 ± 6.73 [#]	9.06 ± 2.10 [#]

注:与 A 组比较,** $P < 0.01$;与 B 组比较,[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$ 。下表同。

表2 各组大鼠血清中 CGRP,ET,NO 和脑组织中 5-HT 和 β -EP 水平比较($\bar{X} \pm s$, $n = 10$)

组别	CGRP(ng/L)	ET(ng/L)	NO(μ mol/L)	5-HT(ng/mL)	β -EP(pg/g)
A 组	39.25 ± 10.05	75.65 ± 6.11	42.15 ± 8.24	3.01 ± 0.39	355.10 ± 25.77
B 组	81.38 ± 14.10**	85.50 ± 10.02*	73.84 ± 12.04**	1.22 ± 0.35**	300.15 ± 22.03*
C 组	67.22 ± 11.81 [#]	74.3 ± 7.42 [#]	49.98 ± 10.09 [#]	2.77 ± 1.59 [#]	361.35 ± 25.07 [#]
D ₁ 组	72.03 ± 12.19	80.22 ± 8.15	55.75 ± 9.03 [#]	1.59 ± 0.92	345.65 ± 21.37 [#]
D ₂ 组	65.43 ± 14.99 [#]	74.98 ± 5.35 [#]	53.03 ± 6.02 [#]	1.85 ± 0.89 [#]	357.56 ± 30.05 [#]
D ₃ 组	60.61 ± 10.56 [#]	74.31 ± 6.55 [#]	45.62 ± 8.44 [#]	2.02 ± 0.76 [#]	360.72 ± 28.47 [#]

均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),脑组织中 5-HT 和 β -EP 水平均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。详见表 2。

3 讨论

神经递质和血管活性物质在偏头痛发病过程中有重要作用,这一过程主要涉及 CGRP,ET,NO,5-HT, β -EP 等活性物质。目前,CGRP 被认为是体内作用最强的扩血管活性物质,可通过调控不同血管床的通透性,在调节组胺诱导的血管扩张反应、神经性炎症及疼痛中起着重要作用^[6]。偏头痛发作过程中,CGRP 大量释放,其作用于血管壁产生一系列反应,导致血浆蛋白外渗、神经源性炎症,使得肥大细胞脱颗粒、血小板活化及脑膜血管扩张,最终传至丘脑和皮质,产生疼痛^[7-8]。ET 可通过收缩血管起到调节脑血管紧张度的作用,使脑部微血管的通透性增加,促进蛋白外渗,从而引起炎症反应^[9]。NO 是偏头痛发病机制中起关键作用的物质,其扩张血管作用可引发神经源性炎症,导致受损的感觉神经元的敏感性增加,通过介导身体疼痛信号的传递,放大生物学作用,导致疼痛发生^[10-11]。5-HT 水平在偏头痛发作前就开始增加,可直接收缩血管引起先兆期血管痉挛收缩,其通过快速代谢使得发作期血液中 5-HT 浓度降低,引发偏头痛血管扩张性疼痛^[12-13]。 β -EP 是一种 α -内源性阿片肽,具有强镇痛作用,其通过抑制 P 物质的释放,使三叉神经管和脊髓的神经感觉的疼痛抑制。

本研究结果表明,造模后大鼠血清中的 CGRP,ET,NO 和脑内 5-HT, β -EP 等活性物质含量都产生了较明显变化,川芎定痛胶囊可降低 CGRP,ET,NO 含量,增

加 5-HT 和 β -EP 水平,使其接近正常生理水平。这种多靶点的综合效应可达到抑制偏头痛发病过程中的一系列疼痛反应,产生较强的缓解偏头痛的作用,表明川芎定痛胶囊可通过调节血管活性物质水平、促进脑神经递质释放,达到调节血管收缩与舒张作用,抑制不良信息的传导,发挥治疗偏头痛的作用。

综上所述,川芎定痛胶囊对偏头痛大鼠模型的行为学具有改善作用,其作用机制与降低血清中 CGRP,ET,NO 含量及升高脑组织中 5-HT 和 β -EP 水平有关。

参考文献:

- [1] SILBERSTEIN SD. Topiramate in migraine prevention: 2016 perspective[J]. Headache, 2017, 57(1): 165 - 178.
- [2] ROSHNI R. Neurogenic inflammation and its role in migraine[J]. Semin Immunopathol, 2018, 3(40): 301 - 314.
- [3] 张 慧,李冬霞,栗志勇,等. 川芎石膏汤对硝酸甘油致偏头痛大鼠血浆 NO、NOS、CGRP 及脑中 5-HT、5-HIAA 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(17): 175 - 180.
- [4] SUN YY, ZHANG WJ, DONG CL, et al. Baicalin alleviates nitroglycerin-induced migraine in rats via the trigeminovascular system[J]. Phytother Res, 2017, 31(6): 899 - 905.
- [5] DOODS H, HALLERMAYER G, WU D, et al. Pharmacological profile of BIBN4096BS, the first selective small molecule CGRP antagonist[J]. Br J Pharmacol, 2000, 129(3): 420 - 423.
- [6] DURHAM PL, RUSEO AF. New insights into the molecular actions of serotonergic antimigraine drugs[J]. Pharmacol Therapeutics, 2002, 94(1-2): 77 - 92.
- [7] ARULMANI U, MAASSEN-VANDENBRINK A, VILLALON CM, et al. Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology[J]. European Journal of Pharmacology, 2004, 500(1-3): 315 - 330.
- [8] EDINSSON L. Calcitonin gene-related peptide(CGRP) and the pathophysiology of headache: therapeutic implications[J]. CNS Drugs, 2001, 15(10): 745 - 753.
- [9] PURKISS JR, WEST D, WILKES LC, et al. Stimulation of phospholipase C in cultured micro-vascular endothelial cells from human frontal lobe by histamin, endothelin and purinoceptor agonists[J]. Br J Pharmacol, 1994, 111(4): 1041.
- [10] 杨德功,付秋菊,黄厚才,等. 痛宁胶囊对硝酸甘油型偏头痛大鼠下丘脑、脑干 NOS 和 5-HT 表达的影响[J]. 中成药, 2012, 34(2): 345 - 348.
- [11] 罗国标,刘晓丽,杨 丽,等. 青藤碱对偏头痛模型大鼠蛛网膜下腔炎症细胞的影响[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2014, 40(4): 198 - 201.
- [12] 孙志华,班 艳. 黛力新联用熄风通络头痛片治疗女性偏头痛的疗效观察[J]. 中外医学研究, 2011, 11(34): 52 - 53.
- [13] 郭宇博. 不同配伍中药方剂对偏头痛大鼠血清和脑组织中 5-HT 含量的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(3): 206 - 208.

(收稿日期:2020-01-19)