

大川芎方效应组分对偏头痛大鼠降钙素基因相关肽及其受体表达的影响

王清清¹, 沈 岚^{1,2*}, 张 俊³, 林 晓^{1,2}, 冯 怡²

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 上海中医药大学中药现代制剂技术教育部工程研究中心, 上海 201203; 3. 上海中医药大学教学实验中心, 上海 201203)

摘要: **目的** 研究大川芎方(川芎、天麻)效应组分对偏头痛大鼠下丘脑、中脑导水管周围灰质(periaqueductal gray, PAG)中降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)及其受体表达的影响。**方法** 将 72 只大鼠随机均分为正常组, 模型组, 阳性药组, 大川芎方高、中、低剂量组, 随机均分为 A、B 2 个亚组。皮下注射硝酸甘油注射液建立大鼠偏头痛模型。采用免疫组化染色法观察 B 组大鼠下丘脑、中脑导水管周围灰质中 CGRP 的表达; 酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定 A 组大鼠血清、下丘脑及 PAG 中 CGRP 的水平; 实时荧光定量 PCR(real-time PCR, RT-PCR)检测 A 组大鼠下丘脑、PAG 中 CGRP 及其受体 *CRLR*、*RCP*、*RAMP1* 的基因表达。**结果** 与正常组相比, 模型组血清、下丘脑、PAG 中 CGRP 水平明显升高($P < 0.01$), 下丘脑中 *CGRP*、*RCP* 表达上调($P < 0.05$), PAG 中 *CGRP*、*CRLR* 表达上调, *RCP* 表达下调($P < 0.05$)。给予低、中、高剂量效应组分后均可降低偏头痛大鼠血清、下丘脑、PAG 中 CGRP 的水平, 中剂量可下调下丘脑中 *CGRP*、*RCP* 表达($P < 0.05$, $P < 0.01$), 下调 PAG 中 *CGRP*、*CRLR* 表达($P < 0.05$), 上调 PAG 中 *RCP* 表达($P < 0.05$)。**结论** 大川芎方效应组分可能通过下调 *CGRP* 在下丘脑、PAG 的表达, 减少 CGRP 合成, 抑制神经源性炎症来达到治疗偏头痛的作用。

关键词: 大川芎方效应组分; CGRP; 下丘脑; PAG

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)01-0014-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.01.003

Effects of active components extracted from Dachuanxiong Decoction on the expressions of CGRP and its receptors in rats with migraine

WANG Qing-qing¹, SHEN Lan^{1,2*}, ZHANG Jun³, LIN Xiao^{1,2}, FENG Yi²

(1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Ministry of Education Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Teaching-Experiment Center, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the effects of active components extracted from Dachuanxiong Decoction (DCXD, *Chuanxiong Rhizoma*, *Gastrodiae Rhizoma*) on the expressions of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its receptors in hypothalamus and periaqueductal gray (PAG) of rats with migraine. **METHODS** Seventy-two rats were evenly assigned to six groups at random, normal group, model group, positive drug group, groups of high-dose, middle-dose and low-dose DCXD. Each group was then divided into Subgroup A and Subgroup B. The migraine rat model was established by subcutaneous nitroglycerin injection. The expressions of CGRP in Subgroup B's rat hypothalamus and PAG were observed by immunohistochemical staining, while the levels of CGRP in rat plasma, hypothalamus and PAG in Subgroup A were detected by ELISA. All the gene expressions of *CGRP* and its re-

收稿日期: 2017-04-13
基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会项目资助(ZY3-CCCX-3-5001); 上海市科学技术委员会平台资助(15DZ2292000); 浦东新区科技发展基金资助(PKF-2003-003)

作者简介: 王清清(1993—), 女, 硕士生, 研究方向为中药体内过程分析。Tel: 13916010373, E-mail: 13916010373@163.com
***通信作者:** 沈 岚(1975—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂关键技术及体内过程研究。Tel: (021) 51322211, E-mail: alansusu@sina.com

ceptors (*CRLR*, *RCP*, *RAMP1*) in Subgroup A's rat hypothalamus and PAG were assessed by real-time PCR.

RESULTS There was a more significant CGRP level increase in plasma, hypothalamus and PAG in the model group than that in the normal group ($P < 0.01$). The modelled rats found their up-regulated expressions of *CGRP* and *RCP* in hypothalamus ($P < 0.05$), up-regulated expressions of *CGRP* and *CRLR* in PAG, and down-regulated expression of *RCP* ($P < 0.05$). All low-dose, middle-dose, high-dose active components worked in decreasing the CGRP levels in plasma, hypothalamus and PAG. The middle-dose led to down-regulation of *CGRP*, *RCP* expressions in hypothalamus ($P < 0.05$, $P < 0.01$), down-regulation of *CGRP*, *CRLR* expressions in PAG ($P < 0.05$), and up-regulation of *RCP* expression in PAG ($P < 0.05$).

CONCLUSION The mechanism of active components extracted from DCXD in migraine management may associate with its capability in down-regulating CGRP expressions in hypothalamus and PAG, reducing CGRP synthesis and inhibiting neurogenic inflammation.

KEY WORDS: active components extracted from Dachuanxiong Decoction; CGRP; hypothalamus; PAG

偏头痛是一种常见的、多因素的神经性疾病,具有发病率高、反复发作、难以治愈等特点。偏头痛发作时多为单侧搏动性,常伴随恶心、呕吐、畏声、畏光等特征,严重影响患者的生命质量,对社会造成了极大的医疗负担。在偏头痛发作期间,三叉神经血管系统被激活,脑膜血管异常扩张,血管周围的痛觉感受器受到伤害性刺激,一方面促使周围的神经末梢释放出 CGRP、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、一氧化氮(nitric oxide, NO)等多种神经肽或神经递质;另一方面可将伤害信息传至三叉神经脊束核、下丘脑、PAG 等区域,引起恶心、呕吐、畏光、头痛等相关症状。

CGRP 是血管周围神经释放的最主要的血管活性肽类物质,作为已知的体内作用最强的内源性舒张血管活性肽,其水平的变化能在一定程度上影响偏头痛的病理进程^[1]。同时, CGRP 及其受体在中枢神经系统内广泛表达,在下丘脑、中脑、脑桥等区域均发现有 CGRP 特异性结合位点,参与神经源性炎症的发生和痛觉传递。CGRP 受体由 3 部分组成,分别是降钙素受体样受体(calcitonin receptor-like receptor, CRLR)、活性修饰蛋白受体 1 (receptor-associated membrane proteins 1, RAMP1)、受体组分蛋白(receptor component protein, RCP)^[2]。受体活性修饰蛋白(receptor-associated membrane proteins, RAMPs)是受体调节的限速蛋白,分为 RAMP1、RAMP2、RAMP3 三类,决定了配体的受体表型及作用强弱, CRLR 本身不具有生物活性,只有与 RAMP1 结合才能介导 CGRP 的生物学功能。RCP 的作用是与 CRLR/RAMP1 复合物偶联,进一步进行信号传递^[3]。

偏头痛作为一种脑部疾病,不同脑分区中神经递质的变化对于其发病机制及病理进程均有一定的

影响。PAG 作为上行痛觉传导及下行痛觉调节的重要组成部分,下丘脑作为主要的内分泌区域,释放多种神经肽,两者在偏头痛的发作中起到关键作用,因此,研究偏头痛发作时这 2 个分区中 CGRP 的变化行为将有助于揭示偏头痛发病机理。已有文献研究了硝酸甘油致偏头痛大鼠模型下丘脑和 PAG 中 *c-fos*、*c-jun* 基因的表达变化^[4],也有研究药物对偏头痛模型大鼠血浆及脑中 CGRP 水平的影响^[5],但对于与偏头痛关联最为直接的脑分区 CGRP 表达尚缺乏研究。

大川芎方源于金代刘完素的《宣明论方》,由川芎和天麻组成,是治疗偏头痛的经典复方。经课题组前期研究,采用现代工艺技术获取了川芎效应组分和天麻效应组分,按照 4:3 比例配比,能明显升高脑组织内 5-HT 的水平,获得了抗偏头痛良好药效^[6]。本研究采用经典的硝酸甘油致偏头痛大鼠模型,以大川芎方效应组分为研究对象,ELISA 检测大鼠血清、下丘脑、PAG 中 CGRP 水平,RT-PCR 分析下丘脑、PAG 内 *CGRP* 及其各部分受体的基因表达情况,免疫组织化学法检测大鼠下丘脑、PAG 中 CGRP 的表达,探讨大川芎方治疗偏头痛的机制及其在不同脑分区中的作用特点,为相关应用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 酶标仪(型号 VT05404-0998, Bio-Tek, 美国);实时荧光定量 PCR 仪(型号 Applied biosystems ViiA™ 7 Real-Time PCR System, Life Technologies, 美国);多样品组织研磨机(型号 TL-48E, 上海净信实业发展有限公司);病理切片机(型号 RM2016, 上海徕卡仪器有限公司);正置荧光显微镜(型号 Nikon Eclipse TI-SR, 尼康, 日本);台式离心机(型号 JX0130-F000, Kubota

Corporation, 日本); 电子天平 (型号 MS105, 梅特勒-托利多中国公司)。

1.2 试药 川芎 (批号 121005, 产地四川, 购自上海康桥中药饮片有限公司, 经上海中医药大学生药教研室赵志礼教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎); 天麻 (批号 120817, 产地安徽, 购自上海康桥中药饮片有限公司, 经上海中医药大学生药教研室赵志礼教授鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎)。硝酸甘油注射液 (批号 20160122, 北京益民药业有限公司); 西比灵胶囊 (批号 160302365, 西安杨森制药有限公司)。大鼠降钙素基因相关肽 ELISA 检测试剂盒 (货号 CEA876Ra, 武汉优尔生物科技股份有限公司); CGRP 抗体 (货号 PC205 L-100UL, Millipore, 美国); HRP-山羊抗兔/鼠通用二抗 (货号 K5007, Dako, 丹麦); PrimeScript[®] RT Master Mix (货号 4368814, Applied biosystems 公司, 美国); Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (货号 4367659, Applied biosystems 公司, 美国); Trizol 试剂 (货号 139501, Life Technology 公司, 美国)。实时 PCR 特异性引物序列见表 1, 均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

表 1 实时 PCR 引物序列

Tab. 1 Sequences of primers used for real-time PCR

引物名称	引物序列(5'→3')
CGRP 正向	AAGTTCTCCCTTTCTGCT
CGRP 反向	GGTGGGCACAAAGTTGTCCT
RCP 正向	ATCTTTGTGCCTTGGGTT
RCP 反向	GTGCCTGACATTGCCTAC
CRLR 正向	ATTGTGGTGGCTGTGTTT
CRLR 反向	TGATGTAGAGGAGATGAGTGTG
RAMP1 正向	GCTCCTCTCATCTCATCATTT
RAMP1 反向	CCCACCACTTCCTCTCTTT
Gapdh 正向	TGATTCTACCCACGGCAAGTT
Gapdh 反向	TGATGGGTTTCCCATTGATGA

川芎效应组分制备方法^[7]: 取一定量川芎粗粉, 加 12 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 滤过, 合并滤液, 减压回收乙醇, 浓缩至相当于生药 0.5 g/mL, 5 000 r/min 离心 15 min, 取上清液上 HPD-100 大孔树脂, 吸附体积流量为 1 BV/h, 水洗至近无色后, 用 50% 乙醇洗脱 4 BV, 收集醇洗脱液后减压回收乙醇, 真空干燥, 即得, 其中阿魏酸质量分数为 3.86%。

天麻效应组分制备方法^[8]: 取一定量天麻粗粉, 10 倍量加 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 减压回收乙醇, 浓缩至相当于生

药 0.5 g/mL, 5 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 减压浓缩至相当于生药 4 g/mL, 加乙醇至醇含量 70%, 静置 24 h, 滤过, 加 40% NaOH 溶液调 pH 值为 8.0, 静置 24 h 滤过, 减压回收乙醇, 真空干燥, 即得, 其中天麻素质量分数为 5.30%。

1.3 实验动物 SPF 级健康 SD 大鼠, 雄性, 体重 170 ~ 210 g, 合格证号 SCXK (沪) 2013-0016, 饲养于上海中医药大学实验动物中心, 适应性饲养 1 周后使用。室温 (22 ± 0.8)℃, 相对湿度 50% ~ 60%, 12 h 光暗循环, 实验严格按照国家和上海中医药大学动物中心动物使用管理条例进行。

2 药液配制及动物分组

2.1 药液的配制 称取川芎效应组分 2.62 g、天麻效应组分 3.80 g, 置于 50 mL 量瓶中, 加生理盐水稀释至刻度, 振摇使其均匀分散, 配制成含阿魏酸 2.02 mg/mL 和天麻素 4.03 mg/mL 的药液, 作为供大川芎方效应组分低剂量组大鼠灌胃用的药物溶液。另称取川芎效应组分 5.24 g 和天麻效应组分 7.60 g、川芎效应组分 10.48 g 和天麻效应组分 15.20 g, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加生理盐水稀释至刻度, 振摇使其均匀分散, 配制供大川芎方效应组分中、高剂量组大鼠灌胃用的药物溶液。

取 1 粒西比灵胶囊内容物 (5 g) 至 50 mL 烧杯中, 精密移取 40 mL 生理盐水将其溶解, 制成含盐酸氟桂利嗪 0.125 mg/mL 的阳性药溶液, 作为供西比灵阳性药组大鼠灌胃用的药物溶液, 临用前充分摇匀。

2.2 分组 将 72 只大鼠随机均分为正常组、模型组、阳性药西比灵胶囊组及大川芎方高、中、低剂量组, 每组 12 只, 各组随机均分为 A、B 2 个亚组, 每个亚组 6 只。大鼠适应性饲养 1 周后, 实验前禁食 12 h (自由饮水), 除正常组外的其余 5 组 (共 60 只) 采用皮下注射硝酸甘油注射液 (10 mg/kg) 复制急性偏头痛大鼠模型。造模 30 min 后, 模型组灌胃给予生理盐水, 阳性药西比灵组及大川芎方高、中、低剂量组给予相应药物, 药物给药容量为 10 mL/kg。造模或给药 30 min 后, 腹腔注射 10% 水合氯醛溶液 (3 mL/kg) 麻醉, 腹主动脉取血, 断头取脑, 用于后续实验。

3 实验方法

3.1 ELISA 法检测血清、下丘脑及 PAG 中 CGRP 水平 A 组大鼠麻醉后腹主动脉取血约 5 mL, 全血 4℃ 以 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 于 -80℃ 保存样品。取血后开胸暴露心脏, 先用预

冷的 PBS 溶液进行心脏灌注快速冲去血液，断头剥离全脑组织，分离下丘脑及 PAG，并平均分为 2 部分，取其中一份采用 ELISA 法测定 A 组大鼠血清、下丘脑、PAG 中 CGRP 水平，严格按照说明书或实验流程进行操作。

3.2 Real-Time PCR 检测下丘脑、PAG 内 CGRP 及其受体的 mRNA 表达 运用 Trizol 试剂提取 A 组大鼠下丘脑和 PAG 组织中的总 mRNA，并按照 PrimeScript® RT Master Mix 说明书将各样本总 mRNA 的逆转录合成 cDNA，条件是 25 ℃ 10 min，37 ℃ 120 min，85 ℃ 5 min。实时 PCR 扩增按照试剂盒方法，以 *Gapdh* 为内参照，采用相对定量法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 分析 CGRP、*CRLR*、*RCP*、*RAMP1* 的基因表达。

3.3 免疫组化 B 组大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛溶液 (3 mL/kg)，开胸暴露心脏，使用预冷的 PBS 溶液进行心脏灌注快速冲去血液，再用预冷的 4% 多聚甲醛先后慢灌注至大鼠肢体僵直、肝脏变硬，即完成固定。断头剥离全脑组织，分离下丘脑及 PAG，石蜡包埋。组织切片后脱蜡至水，CGRP (1:400) 抗体 4 ℃ 孵育过夜，HRP 标记的二抗 (1:1) 室温孵育 50 min，洗涤，DAB 显色，苏木精复染细胞核，脱水封片后显微镜镜检，采集图像。

3.4 统计学方法 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。若资料符合正态性和方差齐性，多组间均数比较采用单因素方差分析；若不符合，采用秩和检验。应用 SPSS 21.0 软件，以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准， $P < 0.05$ 可认为差异具有统计学意义。

4 实验结果

4.1 大川芎方效应组分对偏头痛大鼠下丘脑及 PAG 中 CGRP 表达的影响 图 1~2 显示，CGRP 阳性细胞呈现棕色，多为椭圆形或近圆形，中心部分染色浅，细胞边缘染色深。模型组下丘脑及 PAG 内 CGRP 阳性细胞表达比正常组增加；与模型组相比，低、中、高剂量大川芎方组和阳性药西比灵组，CGRP 阳性细胞表达下降。

4.2 大川芎方效应组分对偏头痛大鼠血清、下丘脑及 PAG 中 CGRP 水平的影响 采用 ELISA 测定各组大鼠血清、下丘脑、PAG 中 CGRP 的水平。皮下注射硝酸甘油注射液后，与正常组相比，模型组大鼠血清、下丘脑、PAG 中 CGRP 水平明显升高 (均 $P < 0.01$)；给药后，与模型组相比，大川芎方低、中、高剂量组和阳性药西比灵组血清中

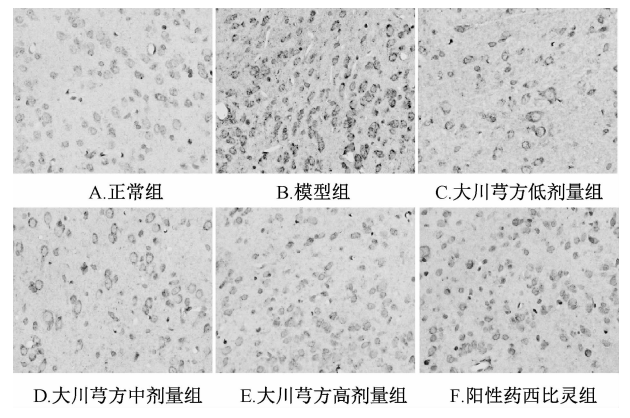


图 1 大鼠下丘脑内 CGRP 表达免疫组化染色 (×400)
Fig.1 Expression of CGRP in hypothalamus of rats by immunohistochemical staining (×400)

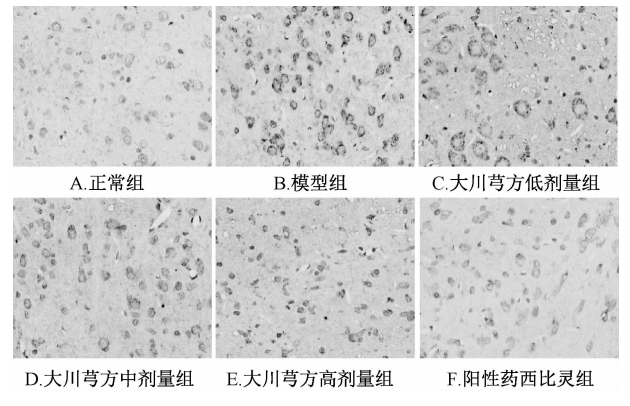


图 2 大鼠 PAG 内 CGRP 表达免疫组化染色 (×400)
Fig.2 Expression of CGRP in PAG of rats by immunohistochemical staining (×400)

CGRP 水平显著下降 ($P < 0.01$)；大川芎方低、中、高剂量组和阳性药西比灵组下丘脑中 CGRP 水平显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；PAG 中 CGRP 水平同样呈现下降趋势，大川芎方中、高剂量组和阳性药西比灵组明显下降 ($P < 0.01$)。大川芎方中、高剂量组可将 CGRP 调节至接近正常组水平 ($P > 0.05$)，与阳性药相当。见表 2。

4.3 大川芎方效应组分对偏头痛模型大鼠下丘脑及 PAG 中 CGRP、*CRLR*、*RCP*、*RAMP1* 基因表达的影响 将正常组、模型组、阳性药组与大川芎方中剂量组进一步进行 RT-PCR 分析 CGRP 及其受体组成部分 *CRLR*、*RCP*、*RAMP1* 的基因表达。与正常组相比，模型组大鼠下丘脑、PAG 内 CGRP 表达显著上调 (均为 $P < 0.05$)。而给予中剂量大川芎方后，与模型组相比，给药组大鼠下丘脑、PAG 中 CGRP 表达显著下降 (分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。与正常组相比，模型组大鼠下丘脑中 *RCP* 表达上调 ($P < 0.05$)，PAG 内 *CRLR* 上调 ($P < 0.05$)，*RCP*

表 2 大鼠血清、下丘脑及 PAG 中 CGRP 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab.2 Levels of CGRP in plasma, hypothalamus and PAG of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

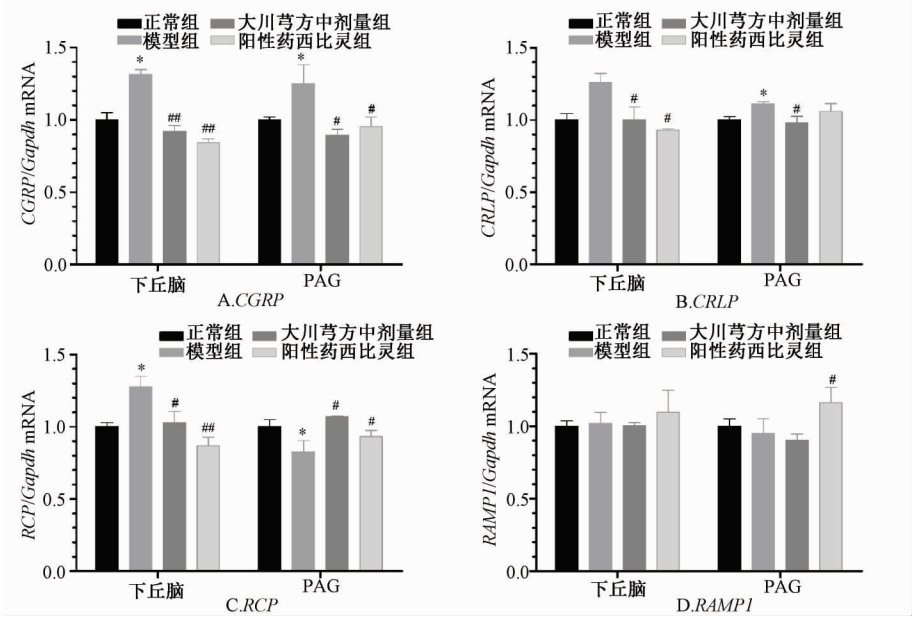
组别	CGRP/(pg·mL ⁻¹)		
	血清	下丘脑	PAG
正常组	9.00 ± 1.39	30.07 ± 2.18	25.44 ± 3.14
模型组	21.94 ± 2.43 **	37.78 ± 3.75 **	35.16 ± 3.45 **
大川芎方低剂量组	13.85 ± 2.76 ##	34.70 ± 0.85 #	31.59 ± 2.95
大川芎方中剂量组	9.53 ± 1.97 ##	31.24 ± 0.87 ##	27.96 ± 3.25 ##
大川芎方高剂量组	9.87 ± 1.81 ##	32.44 ± 0.79 ##	27.06 ± 3.01 ##
阳性药西比灵组	9.51 ± 1.35 ##	30.62 ± 0.69 ##	26.49 ± 2.18 ##

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

下调 ($P < 0.05$),下丘脑及 PAG 中 *RAMP1* 无明显改变。给予中剂量大川芎方后,与模型组相比,下丘脑内 *RCP*、PAG 内 *CRLR* 均显著下调 ($P < 0.05$),PAG 内 *RCP* 显著上调 ($P < 0.05$),下丘脑及 PAG 中 *RAMP1* 无明显改变 ($P > 0.05$)。见图 3。

5 讨论

偏头痛与癫痫、抑郁症属于共病^[9],反复发作的偏头痛增加了另外 2 种疾病的发病风险,同时会造成患者精神紧张,严重影响工作与学习,对社会经济发展与医疗保障造成了严重负担。临床上用于偏头痛的药物主要为阿片类止痛药、非甾体类抗



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

图 3 中剂量大川芎方对大鼠下丘脑、PAG 中 CGRP、CRLR、RCP 和 RAMP1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Fig.3 Effects of middle-dose DCXD on mRNA expressions of CGRP, CRLR, RCP, RAMP1 in hypothalamus and PAG of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

炎药、麻醉镇痛药等,但是这些药物存在不耐受或者禁忌症等问题,且药物滥用会加剧偏头痛的发作,导致急性偏头痛发展为长期偏头痛。因此,在临床上仍然需要新型药物的出现。

偏头痛发病机制尚不明确,三叉神经-血管系统介导的神经源性炎症和疼痛中枢敏化在偏头痛发作中起到重要作用。偏头痛发作时,三叉神经-血管系统被激活,多种与疼痛传导密切相关的神经肽释放增加,且互相促进,发挥协同作用,如 CGRP、P 物质、缩胆囊肽等。CGRP 主要由三叉神经节神经元和三叉神经脊束核释放,参与疼痛传导、神经源性炎症的发生与痛觉敏化过程,在下丘

脑、中脑、脑桥等均存在 CGRP 特异性结合位点。相关研究表明,在偏头痛发作的前驱阶段,脑桥背外侧、中脑导水管周围灰质以及丘脑区域都是活跃的^[10]。CGRP 诱导血管扩张和肥大细胞脱颗粒,进一步引起神经源性炎症;激活卫星胶质细胞,触发炎症级联反应^[11]; CGRP 释放增加,会导致 NO^[12]、脑源性神经营养因子 (BDNF)^[13]、三磷酸腺苷受体 (P2X3) 等释放增加,加剧疼痛。以 CGRP 为靶向,阻断 CGRP 与受体结合从而达到预防或治疗偏头痛的方法已经成为新的药物研发方向,目前已有多种 CGRP 受体拮抗剂或单克隆抗体进入临床试验阶段,如 olcegepant、telcagepant^[14]、

LY2951742^[15]、rimegepant^[16]等。

大川芎方源于金代刘完素《宣明论方》，由川芎、天麻组成，川芎行气止痛，天麻活血化瘀，为治疗偏头痛的经典中药复方。本课题组多年研究结果表明^[17-19]，天麻醇提取部位+川芎醇提取部位抗血小板释放 5-HT 作用和阻滞血管内皮细胞钙通道的作用均最强，说明天麻乙醇提取部位和川芎乙醇提取部位是大川芎方治疗偏头痛的物质基础。在此基础上，对大川芎方治疗偏头痛的物质基础进行了提取、纯化研究，使效应组分得到较高度富集，得到了大川芎方效应组分。药效学研究表明，相当于川芎生药和天麻生药 4：1 配伍得到的大川芎方效应组分药效最佳，可通过镇痛作用及对头痛发作期颅外扩张的血管起收缩作用从而缓解头痛症状。进一步的研究结果显示，皮下注射硝酸甘油造模后，大鼠脑内神经末梢大量释放 CGRP，血清、下丘脑及中脑导水管灰质中 CGRP 水平上升，CGRP 作用于血管壁引起血管扩张和神经源性炎症，刺激三叉神经颈髓复合体，最终将上述信息传递到丘脑和皮质产生疼痛感觉，促进偏头痛的发作。而低、中、高剂量的大川芎方效应组分能够降低造模后大鼠血清、下丘脑、中脑导水管周围灰质中的 CGRP 水平，影响其表达。

进一步采用 RT-PCR 实验，分析正常组、模型组、阳性药组与大川芎方效应组分中剂量组 CGRP 及其受体组成部分 *CRLR*、*RCP*、*RAMP1* 的基因表达。实验结果显示，与模型组相比，大川芎方效应组分中剂量能显著下调下丘脑、PAG 内 *CGRP*、*CRLR* mRNA 的表达，可能是通过下调 *CGRP* 基因表达进而减少蛋白表达，达到缓解偏头痛的作用。在 CGRP 受体的组成部分中，*CRLR* 与 *RAMP1* 结合后才能介导 CGRP 的作用，*RAMP1* 的主要作用是糖基化 *CRLR* 和作为一种分子伴侣蛋白，将 *CRLR* 转运至胞膜上，当 CGRP 与受体结合后，CGRP 所携带的信息通过磷酸化 *CRLR* 传递进入细胞内，接着 *RCP* 偶联 CGRP 受体进行信号传递。研究表明，*RAMP1* 与 *CRLR* 的组成有 1：1、1：2 两种比例，可能造成了 *CRLR* 的增加对 CGRP 应答无改变，而过表达 *RAMP1* 却能增加 CGRP 的应答^[20]。与正常组比较，模型组下丘脑及 PAG 中 *RAMP1* 的基因表达没有增加，*CRLR* 单独增加并不能增强 CGRP 的应答；*RCP* 的表达增加时，可能增加 CGRP 与受体结合后信息的进一步传递，但需要作深入研究。因此，推测在大鼠下丘脑及 PAG 脑区

域中，大川芎方效应组分主要通过减少 CGRP 的生成与释放、抑制神经源性炎症、干扰疼痛信号传导来缓解硝酸甘油诱导的偏头痛发作。

PAG 是由包绕在中脑导水管周围神经细胞构成的区域，是重要的痛觉调制中枢，可将伤害性刺激上传至丘脑。PAG 内存在 CGRP 阳性神经元及 CGRP 受体，给药后下丘脑、PAG 中 *CGRP* mRNA 下调，血清、下丘脑、PAG 中 CGRP 的水平下降，表明大川芎方可能是通过减少 CGRP 的生成及释放干预疼痛信号传导来缓解偏头痛。刘斌等^[4]研究表明，偏头痛模型大鼠下丘脑中 *c-fos* 基因表达增加，在偏头痛发作时下丘脑被激活，参与痛觉调控。另外相关研究表明，大川芎方可以提高大鼠脑组织中 5-HT 的水平^[6]，使 5-HT_{1D} 受体表达增加^[21]。5-HT 受体被激活，可以使扩张的颅内动脉收缩，减少 CGRP 在血管周围间隙的释放，从而减轻神经源性炎症和干预疼痛传导，这可能是大川芎方效应组分干预偏头痛发作的作用机制之一。由此推测，大川芎方效应组分可能是通过调节脑内 CGRP、5-HT 的水平缓解偏头痛发作。

参考文献：

[1] 黄 倩. CGRP 诱导神经源性炎症偏头痛模型大鼠行为学的研究[D]. 长春：吉林大学，2015.

[2] 姜艳艳，金永华. CGRP 及其受体在偏头痛发病机制中的研究[J]. 中风与神经疾病杂志，2012，29(5)：479-480.

[3] 孙 飞. *RAMP1* 促进 *CRLR* 膜分布对 CGRP 抑制 VSMCs 增殖的研究[D]. 衡阳：南华大学，2010.

[4] 刘 斌，符艳松，王彩霞. 头痛宁胶囊对偏头痛模型大鼠中脑和下丘脑 *c-fos*、*c-jun* 基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17(11)：195-198.

[5] 赵永烈，王玉来，高 颖. 芎芷地龙汤对偏头痛模型动物血液和脑中 β -EP、CGRP 的影响[J]. 世界中西医结合杂志，2009，4(7)：473-475.

[6] Wang Q, Shen L, Ma S Y, et al. Determination of the levels of two types of neurotransmitter and the anti-migraine effects of different dose-ratios of *Ligusticum chuanxiong* and *Gastrodia elata* [J]. *J Food Drug Anal*, 2015, 24(1)：189-198.

[7] 洪燕龙，徐德生，冯 怡，等. 川芎中含阿魏酸效应组分的提取、纯化工艺研究[J]. 中国中药杂志，2007，32(17)：1740-1743.

[8] 洪燕龙，徐德生，冯 怡，等. 天麻提取物的提取、纯化工艺研究[J]. 中成药，2008，30(2)：204-207.

[9] Ferrari M D, Klever R R, Terwindt G M, et al. Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics [J]. *Lancet Neurol*. 2015, 14(1)：65-80.

[10] 齐丹丹，张 芹，张忠玲. 降钙素基因相关肽在偏头痛中的作用[J]. 国际神经病学神经外科学杂志，2015，42

(6): 542-544.

[11] 姚刚. 5-HT_{1B/1D}受体激动剂对偏头痛的治疗机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.

[12] 张毅民. 内皮源性降钙素基因相关肽合成与释放调节机制及其病理生理意义[D]. 长沙: 中南大学, 2010.

[13] 邓惠慧. BDNF 在硝酸甘油致偏头痛大鼠发病机制中的作用探讨[D]. 长沙: 中南大学, 2013.

[14] Yao G, Yu T, Han X, *et al.* Therapeutic effects and safety of olcegepant and telcagepant for migraine: A meta-analysis[J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(10): 938-947.

[15] Dodick DW, Goadsby PJ, Spierings EL, *et al.* Safety and efficacy of LY2951742, a monoclonal antibody to calcitonin gene-related peptide, for the prevention of migraine: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled study[J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(9): 885-892.

[16] Marcus R, Goadsby PJ, Dodick D, *et al.* BMS-927711 for the acute treatment of migraine: a double-blind, randomized, placebo-controlled, dose-ranging trial[J]. *Cephalalgia*, 2013, 34(2): 114-125.

[17] 洪燕龙, 冯怡, 徐德生, 等. 大川芎方治疗偏头痛效应组分的提取、纯化工艺研究[J]. 中药材, 2007, 30(6): 721-723.

[18] 洪燕龙. 大川芎方释药单元的处方、工艺研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2006.

[19] 魏元峰. 大川芎方复方释药系统的制备[D]. 上海: 上海中医药大学, 2009.

[20] Héroux M, Hogue M, Lemieux S, *et al.* Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(43): 31610-31620.

[21] 万莉红, 方治平, 王正荣. 大川芎方提取物对神经胶质细胞 5-HT_{1D}受体的影响[J]. 西部医学, 2003, 1(1): 1-2.

消定膏对骨折愈合过程中 COX-2/PGE₂/cAMP 信号通路表达的影响

董万涛^{1,2}, 宋敏^{2*}, 陈秉雄³, 巩彦龙², 刘涛², 张洁¹, 刘保健¹, 冯宜菡¹
(1. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃 兰州 730020; 2. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000;
3. 临洮县人民医院, 甘肃 定西 730500)

摘要: **目的** 研究消定膏(无名异、儿茶、大黄等)对兔环氧酶-2(COX-2)、前列腺素 E₂(PGE₂)、环磷酸腺苷(cAMP)不同时相表达的影响,探讨其对骨折愈合的作用机制。**方法** 将 128 只新西兰大耳白兔随机分为空白组、模型组、青鹏膏组(棘豆、亚大黄、诃子等)和消定膏组,除空白组外,其余各组均采用骨缺损法造成尺骨 3 mm 骨缺损模型,造模成功后,空白组、模型组仅做外固定。用药后第 3、7、14、28 天各组随机抽取 8 只,取骨痂组织,光镜下观察病理形态学变化,实时荧光定量-聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测骨痂组织 COX-2 mRNA 表达水平,免疫组化法检测骨痂组织 PGE₂、cAMP 蛋白的表达。**结果** 与模型组、青鹏膏组比较,消定膏组骨痂和胶原纤维的形成明显优于其他组,消定膏组 COX-2 mRNA 表达及 PGE₂、cAMP 蛋白表达在术后 7、14 d 明显增强(P<0.05),且在术后 14 d 左右出现峰值。**结论** 消定膏具有明显的促进骨折愈合作用,可能与其对 COX-2/PGE₂/cAMP 信号通路的影响有关。

关键词: 消定膏;骨缺损;环氧酶-2(COX-2);前列腺素 E₂(PGE₂);环磷酸腺苷(cAMP)

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)01-0020-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.01.004

收稿日期: 2017-05-02
基金项目: 甘肃省高校科研项目(2016B-056);吴阶平医学基金会临床科研专项基金资助项目(320.6750.11061);甘肃省青年自然科学基金计划(1208RJYA066)
作者简介: 董万涛(1980—),男,博士生,副主任医师,研究方向为骨伤科疾病的中医药防治。Tel: (0931) 8673732, E-mail: dwt130@126.com
***通信作者:** 宋敏(1964—),男,教授,博士生导师,研究方向为骨伤科疾病的中医药防治。Tel: (0931) 8765377, E-mail: sm@gszy.edu.cn
网络出版日期: 2017-06-08
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20170608.1744.002.html>