

# 基于网络药理学及大鼠体内实验的方法探讨麻黄细辛附子汤 干预偏头痛的作用机制

葛飞<sup>1</sup>, 张瑶<sup>1</sup>, 侯鉴宸<sup>1</sup>, 罗亚敏<sup>1</sup>, 董瑞娟<sup>2</sup>, 葛东宇<sup>2</sup>, 孟凤仙<sup>3</sup>, 陶晓华<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029;

2. 北京中医药大学生命科学学院, 北京 102488;

3. 北京中医药大学东方医院, 北京 100087)

**[摘要]** 目的:研究麻黄细辛附子汤(MXFT)干预偏头痛的作用机制。方法:通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、SiwssTargetPrediction等数据库筛选MXFT活性成分及活性成分、偏头痛的相关靶点;运用STRING 11.5平台对药物和疾病的交集靶点建立潜在蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图;采用Metascape数据库对潜在交集靶点进行基因本体(GO)分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析;利用Cytoscape 3.7.1做MXFT成分-靶点-通路网络图,筛选度值较高的核心靶点;最后通过分子对接方法验证核心靶点与其映射成分的结合强度,将对接结果较好的核心靶点进行动物体内实验验证。选用SD大鼠48只,除空白组外,其余大鼠皮下注射硝酸甘油制备偏头痛大鼠模型,成模大鼠随机分为模型组、西药组、MXFT高、中、低剂量组。西药组给予佐米曲普坦片,治疗组给予MXFT高、中、低剂量干预。成模后隔日1次观测各组大鼠行为学及疼痛阈值变化。酶联免疫吸附测定试验(ELISA)检测血浆中降钙素基因相关肽(CGRP)、大鼠细胞外信号调节激酶2(ERK2)、c-fos原癌基因蛋白(FOS)水平。免疫组化技术、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测SD大鼠三叉神经细胞外信号调节蛋白激酶1/2(ERK1/2,又称MAPK1/3)、蛋白激酶B1(Akt1)、蛋白激酶Cα(PRKCA)水平。结果:网络药理学分析显示,MXFT治疗偏头痛的核心靶点为MAPK1、MAPK3、Akt1、PRKCA等;主要通路为神经活性配体/受体相互作用信号通路、钙离子信号通路、MAPK信号通路等;分子对接结果表明,MAPK1、MAPK3、Akt1、PRKCA、PRKCB、PRKCG与其映射成分具有较好的结合能力。动物实验结果显示,与空白组比较,模型组大鼠挠头次数显著增加( $P<0.01$ ),疼痛阈值显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠挠头次数显著减少( $P<0.01$ ),疼痛阈值显著提高( $P<0.01$ )。与空白组比较,模型组大鼠血浆中CGRP、ERK2、FOS蛋白水平明显增高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),三叉神经节中Akt1、ERK1/2、PRKCA蛋白水平明显增高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组血浆中CGRP、ERK2、FOS蛋白水平,三叉神经节中Akt1、ERK1/2、PRKCA蛋白水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:MXFT抗偏头痛具有多成分-多靶点-多通路的特点,其作用机制可能与抑制血管扩张、减少炎症因子释放、抑制神经元过度活跃等多途径发挥作用。

**[关键词]** 麻黄细辛附子汤; 偏头痛; 网络药理学; 分子对接

**[中图分类号]** R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)22-0106-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220917 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220610.1041.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-06-10 16:11

## Mechanism of Mahuang Xixin Fuzitang Against Migraine Based on Network Pharmacology and Experimental Validation

GE Fei<sup>1</sup>, ZHANG Yao<sup>1</sup>, HOU Jianchen<sup>1</sup>, LUO Yamin<sup>1</sup>, DONG Ruijuan<sup>2</sup>, GE Dongyu<sup>2</sup>,  
MENG Fengxian<sup>3</sup>, TAO Xiaohua<sup>1\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029,

**[收稿日期]** 2022-01-02

**[基金项目]** 北京中医药大学校级科研纵向发展基金项目(2021-ZXFZJJ-019);北京中医药大学校级科研横向发展基金课题(2021-HXFZJJ-008);国家自然科学基金面上项目(81974542)

**[第一作者]** 葛飞,在读硕士,从事经方治疗神经性疾病研究,E-mail:agefei@126.com

**[通信作者]** \*陶晓华,教授,博士研究生导师,从事经方治疗神经性疾病研究,E-mail:xhtao1963@126.com

China; 2. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;  
3. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the mechanism of Mahuang Xixin Fuzitang (MXFT) against migraine. **Method:** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), SiwssTargetPrediction and other databases were used to screen the active components and action targets of MXFT as well as migraine-related targets. The potential protein-protein interaction (PPI) network diagram was plotted for the intersection targets of MXFT and migraine using STRING 11.5. Metascape was used for Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis of potential intersection targets. The component-target-pathway network of MXFT was constructed by Cytoscape 3.7.1 to screen core targets with high degree value. Finally, the binding strength between core target and its mapping components was verified by molecular docking, and the core targets with desirable docking results were verified by animal experiments *in vivo*. Forty eight SD rats were selected, and except the blank group, the other rats were subcutaneously injected with nitroglycerin to prepare the migraine rat model. The modeled rats were randomly divided into model group, positive drug group and MXFT high-, medium- and low-dose groups. The positive drug group was given zolmitriptan tablets, and the MXFT high-, medium- and low-dose groups were given high, medium and low doses of MXFT, respectively. The changes of behavior and pain threshold of rats in each group were observed every other day after modeling. The levels of calcitonin gene-related peptide (CGRP), extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) and c-fos proto-oncogene (FOS) protein in plasma were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunohistochemical technique and Western blot were employed to determine the levels of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2, also known as MAPK1/3) and protein kinase B 1 (Akt1), protein kinase C  $\alpha$  (PRKCA) in trigeminal nerve of SD rats. **Result:** The network pharmacology showed that the core targets of MXFT in the treatment of migraine were MAPK1, MAPK3, Akt1, PRKCA, etc., mainly involving neuroactive ligand-receptor interaction signaling pathway, calcium signaling pathway, MAPK signaling pathway, etc. The molecular docking demonstrated that MAPK1, MAPK3, Akt1, PRKCA, PRKCB and PRKCG had good binding ability with their mapping components. The animal experiments indicated that compared with the conditions in the blank group, the number of head scratching in the model group was increased ( $P < 0.01$ ), and the pain threshold was decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with the conditions in the model group, the number of head scratching in each administration group was reduced ( $P < 0.01$ ), and the pain threshold was increased ( $P < 0.01$ ). In addition, the levels of CGRP, ERK2 and FOS proteins in plasma, and Akt1, ERK1/2 and PRKCA proteins in trigeminal ganglion of the model group were higher than those of the blank group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The levels of CGRP, ERK2 and FOS proteins in plasma and Akt1, ERK1/2 and PRKCA proteins in trigeminal ganglion of each administration group were lower than those of the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** MXFT had multi-component, multi-target and multi-pathway characteristics in the treatment of migraine, and the mechanism might be related to inhibiting vasodilation, reducing the release of inflammatory factors and inhibiting neuronal hyperactivity.

**[Keywords]** Mahuang Xixin Fuzitang; migraine; network pharmacology; molecular docking

偏头痛是临床常见的脑神经血管功能障碍性疾病,临床表现为单侧或双侧搏动性中重度疼痛,常伴有饮食障碍、恶心、呕吐、畏声、畏光等症状<sup>[1]</sup>。2016年全球疾病负担研究系统分析结果表明<sup>[2]</sup>,偏头痛是第六大流行疾病,也是全世界致残的主要疾病之一。全球有10.4亿人口罹患偏头痛,偏头痛患

者工作效率低,工作时长受限,给社会和家庭造成巨大经济负担。国内流行病学调查显示<sup>[3]</sup>,我国人群的偏头痛患病率为9.3%,每年损失高达3 317亿元人民币,占我国国民生产总值(GDP)总量的1.12%。偏头痛常与心血管疾病、代谢性疾病、过敏性疾病、精神疾病等共病,属于高风险致残神经系

统疾病<sup>[4]</sup>。大量临床实践表明,抗偏头痛药物虽能暂时改善症状,但存在胃肠道症状、过敏反应、肝肾功能损伤等不良反应,给偏头痛患者带来极大困扰<sup>[5]</sup>。因此,开展抗偏头痛药物作用机制研究,提高其临床疗效具有重要意义。

麻黄细辛附子汤(MXFT)原载于《伤寒论·辨少阴病脉证并治》“少阴病,始得之,反发热,脉沉者,麻黄细辛附子汤主之”,主治少阴病兼表证。《东垣试效方》首次将其运用于头痛的治疗“少阴经头痛,三阴三阳经不流行,而足寒气逆为寒厥,其脉沉细,麻黄、附子、细辛为主”。现代药理研究表明MXFT具有明显的镇痛、抗炎作用<sup>[6]</sup>,临床报道MXFT能明显改善偏头痛症状,减少头痛发作次数和持续时间,提高临床疗效,且不良反应少<sup>[7]</sup>。基础研究报道MXFT与他药配伍干预偏头痛大鼠,可以改善偏头痛大鼠行为学症状、偏头痛的发作程度、持续时间等<sup>[8]</sup>。但目前缺乏对该方活性成分及作用机制的系统研究。因此,本研究基于采用网络药理学方法及动物体内实验方法系统探讨MXFT治疗偏头痛的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 网络药理学分析方法

**1.1.1 MXFT活性成分及潜在靶点预测** 基于中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)(<http://lsp.nwu.edu.cn/>)数据库筛选MXFT活性成分,以口服利用度(OB)≥30%和药物相似性(DL)≥0.18作为筛选阈值进行搜集。同时利用PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载其活性成分的2D结构图(sdf格式),置于SiwssTargetPrediction(<http://www.swisstarg-eprediction.ch>)进行活性成分靶点预测。

**1.1.2 偏头痛相关靶点收集** 利用CTD(<http://ctdbase.org>)、DisGeNET(<https://www.disgenet.org>)、GeneCards(<https://www.genecards.org>)及在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://omim.org>),“Migraine”“Migraine Headache”为关键词筛选偏头痛的潜在靶点,合并去重后获取偏头痛疾病靶点,并通过UniProt数据库(<https://www.uniprot.org>)规范药物活性成分及疾病靶点名称。

**1.1.3 MXFT抗偏头痛交集靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建** 利用DrawVennDiagram(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)数据库获取药物活性成分及疾病靶点的交集靶点并绘制韦恩图。采用STRING(<https://string-db.org>)

在线数据库对交集靶点进行分析,蛋白种类为“homo sapiens”,最低相互作用阈值为“highest confidence”(0.9)。导出TSV格式,采用Cytoscape 3.7.1软件构建PPI网络。

**1.1.4 MXFT抗偏头痛基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析** 构建成分-靶点-通路网络图,将交集靶点置入Metascape(<http://metascape.org/gp/index.html>)数据库中进行GO功能及KEGG通路富集分析,可视化富集结果。采用Cytoscape 3.7.1软件构建成分-靶点-通路网络图,并通过节点度(Degree)、中心度、紧密度等网络拓扑数据筛选核心靶点。

**1.1.5 MXFT重要成分与抗偏头痛核心靶点的分子对接验证** 采用AutoDock Tools 1.5.6软件对潜在核心靶点和其映射的活性成分进行分子对接。利用PDB(<https://www.rcsb.org>)平台下载候选蛋白的晶体结构,并从ZINC(<http://zinc.docking.org/substances/home/>)数据库获得活性成分结构文件,将结构文件载入AutoDock Tools 1.5.6程序,采用AutoDock进行分子对接,可视化所有对接结果,并使用PyMOL软件对关键靶点进行3D模式图构建。将对接结果较好的靶点在水环境存在的情况下进行动力学模拟验证。

### 1.2 实验验证

**1.2.1 动物** SPF级雄性SD大鼠48只,体质量(200±10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0011。动物饲养于北京中医药大学屏障环境动物室,温度(22±1)℃、湿度(65±5)%、12 h昼夜循环光环境,普通饲料喂食、自由进食饮水。动物实验方案已通过北京中医药大学伦理委员会审核。

**1.2.2 药物** 麻黄经北京中医药大学中药学院杨瑶珺教授鉴定,为麻黄科植物草麻黄*Ephedra sinica*的干燥草质茎。细辛经北京中医药大学中药学院杨瑶珺教授鉴定,为马兜铃科植物北细辛*Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum*的干燥根及根茎。附子经北京中医药大学中药学院杨瑶珺教授鉴定,为毛茛科植物乌头*Aconitum carmichaeli*的子根的加工品。麻黄、细辛、附子饮片均购于北京同仁堂药店。麻黄6 g、细辛3 g、附子9 g,采用临床常用煎煮方法(附子先煎法)制备药液;佐米曲普坦片(生产批号H20061077,规格2.5 mg);硝酸甘油(aTG)注射液(生产批号H11020289,规格1 mL:5 mg)。

**1.2.3 试剂与仪器** 大鼠降钙素基因相关肽

(CGRP)、大鼠细胞外信号调节激酶2(ERK2)、大鼠c-fos原癌基因蛋白(FOS)酶联免疫吸附测定试验(ELISA)酶联免疫试剂盒(上海酶联,批号分别为ml003082、ml0795485、ml856255),A11107 PKC alpha Rabbit mAb、A17909 Akt1 Rabbit mAb、A4782 ERK1/2 Rabbit mAb(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为4000000197、4000000238、4000400028)。Multiskan MK3型标准规格酶标仪(美国Thermo Scientific公司),DEM-3型自动洗板机(北京拓普分析仪器有限公司),SKP-02.60型电热恒温培养箱(黄石市恒丰医疗器械有限公司)。

**1.2.4 模型制备** 将48只大鼠按体质量随机均分为空白组8只,模型组40只,参照文献[9]建立NTG慢性偏头痛模型,除正常对照组外,其余40只大鼠隔天连续5次(第1、3、5、7、9天)皮下注射NTG  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。模型成功标准为大鼠持续约30 min出现双耳发红、烦躁不安、爬笼次数增多、四肢频繁挠头等现象,然后活动减少、蜷卧,表明造模成功。

**1.2.5 分组及给药** 成模后大鼠按体质量随机分为模型组、佐米曲普坦(西药)组、MXFT高、中、低剂量组,每组8只。空白组及模型组每天予等体积蒸馏水  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。大鼠给药剂量依据大鼠体表面积换算,西药组灌胃佐米曲普坦  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,MXFT高、中、低剂量组按临床成人用药量的2、1、0.5倍剂量给药<sup>[10]</sup>,分别为  $3.6$ 、 $1.8$ 、 $0.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。给药体积均为  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,连续给药7 d。

**1.2.6 偏头痛行为学与机械痛阈值** 从造模第1天开始,隔天交替进行行为学观察、机械疼痛阈值检测。

行为学观察:给药后2 h内观察并记录每组大鼠烦躁情况,录像记录大鼠挠头次数(包括单爪挠、双爪挠的总次数)。

机械痛阈检测:用Von-Frey纤维丝测试大鼠眶周痛阈的方法观察大鼠痛觉超敏行为。各组在给药后的3 h进行测定。阳性反应标准为大鼠缩头,用前爪拨开纤维丝及发声。

**1.2.7 标本采集** 各组大鼠禁食不禁水12 h后腹腔注射1%戊巴比妥( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )麻醉,腹主动脉取血,置于抗凝真空采血管中,轻轻摇匀,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心(离心半径7.5 cm)10 min,分离血浆,  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。采用ELISA检测大鼠血浆CGRP、ERK2、FOS的含量。采血后,仰卧固定开胸,灌注  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  4%多聚甲醛液100~200 mL,断头快速剥离出脑组织,置于4%多聚甲醛液浸泡固定24 h,

常规脱水、石蜡包埋、切片。免疫组织化学法、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠三叉神经ERK1/2、蛋白激酶B1(Akt1)、蛋白激酶C $\alpha$ (PRKCA)的含量。

**1.3 统计分析** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用SPSS 22.0软件和GraphPad Prism 8.0软件进行分析。当每组数据符合正态分布时,组间比较采用One-way ANOVA法。若方差齐,组间差异比较采用最小显著性差异法(LSD);若方差不齐,组间差异比较采用Tamhane法。两组间的比较采用独立样本t检验。当每组数据不符合正态分布时,组间比较采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 网络药理学分析

**2.1.1 MXFT与偏头痛相关靶点的获取** 基于TCMSP数据库搜集MXFT化合物37种,见表1,从Pubchem数据库中收集37种化合物SDF结构,将其置入SiwssTargetPrediction平台获得活性成分靶点,经Probability值筛选出相关靶点661个。基于CTD、DisGeNET、GeneCards及OMIM等数据库共得到3 981个与偏头痛有关的疾病靶点。

**2.1.2 MXFT抗偏头痛PPI网络分析** 运用DrawVennDiagram对MXFT活性成分靶点和偏头痛疾病靶点进行交集并绘制韦恩图,见增强出版附加材料,MXFT抗偏头痛潜在靶点359个。将获取的交集靶点置入STRING平台,用Cytoscape 3.7.1软件构建PPI网络,见增强出版附加材料,包括节点270个,节点边1 146个。节点大小与颜色透明度代表度值的高低,靶点的重要性与度值呈正相关,MXFT与偏头痛相关度最高的靶点为非受体酪氨酸蛋白激酶(SRC)、热休克蛋白90AA1(HSP90AA1)、信号传导及转录激活蛋白3(STAT3)、丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)3、MAPK1、Akt1等。

**2.1.3 通过GO和KEGG分析筛选MXFT抗偏头痛的关键通路和核心靶点** 利用Metascape数据库对359个交集靶点进行GO及KEGG分析,获得MXFT治疗偏头痛相关生物学注释以及相关通路。GO分析取TOP20进行可视化分析见增强出版附加材料,生物学过程(BP)涉及细胞对氮化合物的反应、血管直径的维护、血管收缩等。细胞组分(CC)包括神经元细胞体及其突触后膜、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物、谷氨酸能突触等。分子功能(MF)涉及神经递质受体的活性、蛋白质结构域特异性结合、蛋白丝

表1 MXFT活性成分信息

Table 1 Information of effective constituents of MXFT

简称	来源	编号(Mol ID)	活性成分	OB/%	DL
MH1	麻黄	MOL000006	luteolin	36.16	0.25
MH2	麻黄	MOL000098	quercetin	46.43	0.28
MH3	麻黄	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
MH4	麻黄	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
MH5	麻黄	MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76
MH6	麻黄	MOL001494	mandenol	42.00	0.19
MH7	麻黄	MOL001506	supraene	33.55	0.42
MH8	麻黄	MOL001755	24-ethylcholest-4-en-3-one	36.08	0.76
MH9	麻黄	MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75
MH10	麻黄	MOL002823	herbacetin	36.07	0.27
MH11	麻黄	MOL002881	diosmetin	31.14	0.27
MH12	麻黄	MOL004328	naringenin	59.29	0.21
MH13	麻黄	MOL005043	campest-5-en-3beta-ol	37.58	0.71
MH14	麻黄	MOL005190	eriodictyol	71.79	0.24
MH15	麻黄	MOL005573	genkwanin	37.13	0.24
MH16	麻黄	MOL005842	pectolarigenin	41.17	0.30
MH17	麻黄	MOL011319	truflex OBP	43.74	0.24
XX1	细辛	MOL001460	cryptopin	78.74	0.72
XX2	细辛	MOL001558	sesamin	56.55	0.83
XX3	细辛	MOL002501	[(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl](1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate	62.52	0.31
XX4	细辛	MOL002962	(3S)-7-hydroxy-3-(2,3,4-trimethoxyphenyl)chroman-4-one	48.23	0.33
XX5	细辛	MOL009849	ZINC05223929	31.57	0.83
XX6	细辛	MOL012140	4,9-dimethoxy-1-vinyl-5b-carboline	65.30	0.19
XX7	细辛	MOL012141	caribine	37.06	0.83
FZ1	附子	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
FZ2	附子	MOL000538	hyaconitine	31.39	0.26
FZ3	附子	MOL002211	11,14-eicosadienoic acid	39.99	0.2
FZ4	附子	MOL002392	deltoin	46.69	0.37
FZ5	附子	MOL002395	deoxyandrographolide	56.30	0.31
FZ6	附子	MOL002397	karakoline	51.73	0.73
FZ7	附子	MOL002398	Karanjin	69.56	0.34
FZ8	附子	MOL002410	benzoynapelline	34.06	0.53
FZ9	附子	MOL002416	deoxyaconitine	30.96	0.24
FZ10	附子	MOL002419	(R)-norcoclaurine	82.54	0.21
FZ11	附子	MOL002421	ignavine	84.08	0.25
FZ12	附子	MOL002423	jesaconitine	33.41	0.19
FZ13	附子	MOL002433	(3R,8S,9R,10R,13R,14S,17R)-3-hydroxy-4,4,9,13,14-pentamethyl-17-[(E,2R)-6-methyl-7-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxyhept-5-en-2-yl]-1,2,3,7,8,10,12,15,16,17-decahydr	41.52	0.22

氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性等。KEGG 通路取相关前 20 条进行可视化分析见增强出版附加材料,涉及 MAPK 信号通路、神经活性配体-受体相互作用、钙离子信号通路等。

利用 Cytoscape 3.7.1 软件构建成分-靶点-通路网络见增强出版附加材料,并利用 NetworkAnalyzer 进行网络拓扑分析。网络拓扑学分析显示,见表 2, Akt1、MAPK1、MAPK3、PRKCA、PRKCB、RKCG 等靶点具有较高的度值,神经活性配体/受体相互作用信号通路、钙离子信号通路、MAPK 信号通路等具有较高的度值,表明 MXFT 改善模型大鼠可能与以上靶点及通路相关。将上述靶点映射于成分,可得 PRKCB 与 caribine、Akt1 与 luteolin、MAPK1 与 deltoin、MAPK3 与 24-ethylcholest-4-en-3-one、PRKCA 与 Truflex OBP、PRKCG 与 deltoin 相关联。

从结果可以看出,各结合值均  $< -6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 分别为  $-8.31$ 、 $-7.88$ 、 $-6.47$ 、 $-8.14$ 、 $-8.12$ 、 $-7.19 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  ( $1 \text{ cal} \approx 4.186 \text{ J}$ ), 见增强出版附加材料。选取 MAPK1 进行水环境下的动力学模拟,模拟结果见增强出版附加材料,Caribine 与 MAPK1 活性位点 Thr41、Ala309、Gln306 及 Hsd310 均可以形成较强的氢键相互作用,是促使其结合到活性位点的主要作用力。

使用 PyMOL 软件分析化合物与靶点进行 3D 模式图构建,其中化合物 caribine 与 Akt1 中氨基酸残基 ALA-50、LEU-52 形成氢键,与靶点 MAPK1 中氨基酸残基 GLU-305、SER-43 形成氢键,与靶点 PRKCA 中氨基酸残基 ASP-481、VAL-420 形成氢

表 2 MXFT 活性成分-偏头痛靶点-通路图靶点网络节点特征参数  
Table 2 MXFT main effective target network node characteristic parameter

名称	度值	中心度	亲密度
PRKCA	26	0.425 287 36	0.039 713 81
MAPK1	24	0.399 280 58	0.023 234 22
MAPK3	24	0.399 280 58	0.027 277 58
PRKCB	22	0.390 845 07	0.027 624 62
MAP2K1	22	0.392 226 15	0.019 895 76
PRKCG	22	0.392 226 15	0.023 440 86
Akt1	22	0.373 737 37	0.015 666 16
RAF1	20	0.386 759 58	0.019 776 87
MAPK9	20	0.370 000 00	0.015 123 81
PIK3CB	20	0.366 336 63	0.010 371 26

键,与靶点 PRKCB 中氨基酸残基 LEU-403、PRO-400 形成氢键,与靶点 MAPK3 中氨基酸残基 LYS-71、GLN-122、MET-125 形成氢键,与靶点 PRKCG 中氨基酸残基 HIS-78 形成氢键,见增强出版附加材料。根据 PPI、MXFT 活性成分-偏头痛靶点-通路图中贡献度排名与及分子对接结果,对重要靶点 Akt1、MAPK1、MAPK3、PRKCA 进行动物体内实验验证。

## 2.2 动物实验

2.2.1 行为学与痛阈值 与空白组比较,模型组挠头次数显著增多 ( $P < 0.01$ ),痛阈值显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,各用药组挠头次数显著减少 ( $P < 0.01$ );各用药组痛阈值显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 3、表 4。

表 3 各组大鼠挠头次数比较 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 3 Comparison of behavioral and pain threshold changes of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
空白组	4.00±1.87	6.33±2.31	6.00±2.16	8.33±1.53
模型组	59.67±24.68 <sup>1)</sup>	79.00±16.99 <sup>1)</sup>	60.50±17.21 <sup>1)</sup>	57.20±10.24 <sup>1)</sup>
西药组	27.25±13.96 <sup>2)</sup>	35.00±14.42 <sup>2)</sup>	37.67±11.55 <sup>2)</sup>	29.25±12.5 <sup>2)</sup>
MXFT 低剂量组	27.2±9.00 <sup>2)</sup>	29.25±12.50 <sup>2)</sup>	28.00±5.66 <sup>2)</sup>	24.50±9.61 <sup>2)</sup>
MXFT 中剂量组	6.00±4.58 <sup>2)</sup>	3.25±1.71 <sup>2)</sup>	5.67±1.41 <sup>2)</sup>	9.50±2.52 <sup>2)</sup>
MXFT 高剂量组	4.33±3.51 <sup>2)</sup>	4.83±1.82 <sup>2)</sup>	3.60±1.89 <sup>2)</sup>	4.20±1.79 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 4 同)

2.2.2 MXFT 对偏头痛大鼠血浆 CGRP、FOS、ERK2 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠血浆中 CGRP、FOS、ERK2 含量显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,西药组与 MXFT 中、低剂量组血浆中 CGRP、FOS、ERK2 水平显著下降 ( $P <$

0.01)。西药组与 MXFT 中、低剂量组 CGRP、FOS、ERK2 水平差异无统计学意义。见表 5。

2.2.3 MXFT 对偏头痛大鼠三叉神经节 ERK1/2、Akt1、PRKCA 蛋白表达的影响 免疫组化结果表明,与空白组比较,模型组大鼠三叉神经节中

表4 各组大鼠痛阈变化比较 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 4 Comparison of behavioral and pain threshold changes of rats in each group ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	第2天	第4天	第6天
空白组	7.33±1.03	6.57±0.98	6.33±2.34
模型组	0.47±0.48 <sup>1)</sup>	0.49±0.46 <sup>1)</sup>	0.35±0.20 <sup>1)</sup>
西药组	6.00±2.83 <sup>2)</sup>	6.67±1.03 <sup>2)</sup>	6.00±1.41 <sup>2)</sup>
MXFT低剂量组	6.00±1.63 <sup>2)</sup>	5.14±1.07 <sup>2)</sup>	4.67±1.03 <sup>2)</sup>
MXFT中剂量组	9.00±1.10 <sup>2)</sup>	6.67±2.07 <sup>2)</sup>	6.57±1.90 <sup>2)</sup>
MXFT高剂量组	6.29±1.80 <sup>2)</sup>	6.57±1.51 <sup>2)</sup>	6.57±1.51 <sup>2)</sup>

表5 MXFT对偏头痛大鼠血浆CGRP、FOS、ERK2水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 5 Effects of MXFT on levels of CGRP, FOS and ERK2 in plasma of migraine rats ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	CGRP	ERK2	FOS
空白组	30.14±1.72	3 172.55±347.73	3 172.55±347.73
模型组	36.90±2.86 <sup>1)</sup>	4 281.37±337.90 <sup>1)</sup>	4 281.37±337.90 <sup>1)</sup>
西药组	31.10±2.79 <sup>3)</sup>	3 475.33±117.83 <sup>3)</sup>	3 475.33±117.83 <sup>3)</sup>
MXFT低剂量组	31.94±1.88 <sup>3)</sup>	3 582.14±266.13 <sup>3)</sup>	3 582.14±266.13 <sup>3)</sup>
MXFT中剂量组	32.56±1.95 <sup>3)</sup>	3 493.74±497.50 <sup>3)</sup>	3 493.74±497.50 <sup>3)</sup>
MXFT高剂量组	35.58±0.93	3 761.90±335.59 <sup>2)</sup>	3 761.90±335.59 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$

ERK1/2、Akt1、PRKCA含量显著升高( $P<0.01$ 、 $P<0.05$ )。与模型组比较,西药组与MXFT低、中剂量组三叉神经节中ERK1/2、Akt1、PRKCA水平显著下降( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ )。见图1、表6。

Western blot结果表明,与空白组比较,模型组大鼠三叉神经节中ERK1/2、Akt1、PRKCA含量明显

表6 免MXFT对偏头痛大鼠三叉神经节ERK1/2、Akt1、PRKCA蛋白表达水平 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 6 Expression level of MXFT on levels of ERK1/2, Akt1, PRKCA protein of migraine rats ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

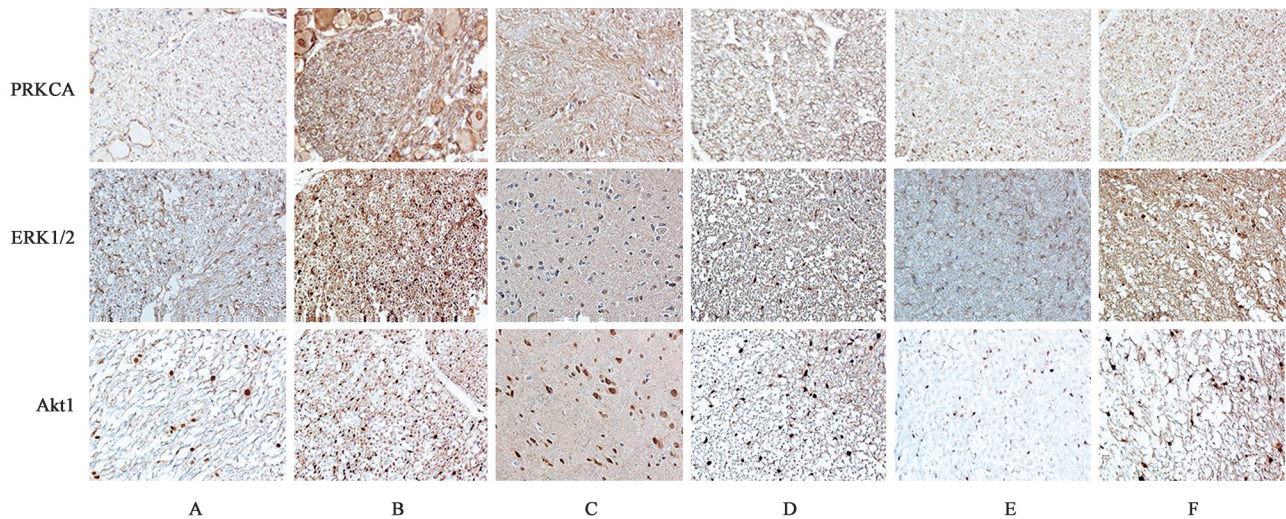
组别	PRKCA	Akt1	ERK1/2
空白组	25.41±3.81	25.41±18.12	24.04±6.64
模型组	118.18±38.9 <sup>2)</sup>	142.96±30.62 <sup>2)</sup>	67.96±6.42 <sup>2)</sup>
西药组	37.57±21.1 <sup>4)</sup>	32.5±12.74 <sup>4)</sup>	31.81±13.55 <sup>3)</sup>
MXFT低剂量组	54.58±10.29 <sup>3)</sup>	16.96±5.87 <sup>4)</sup>	47.85±7.41 <sup>3)</sup>
MXFT中剂量组	22.18±9.91 <sup>4)</sup>	25.77±11.35 <sup>4)</sup>	28.18±15.04 <sup>4)</sup>
MXFT高剂量组	59.52±27.62	94.57±33.06	56.25±20.08

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表7同)

升高( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ )。与模型组比较,西药组与MXFT低、中、高剂量组三叉神经节中ERK1/2、Akt1、PRKCA水平明显下降( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ )。见图2、表7。

### 3 讨论

偏头痛属于中医头痛范畴,偏头痛病名最早见于《针灸甲乙经》:“偏头痛,引外毗而急,颌厌主之。”后世医籍记载与偏头痛相关的病名还有“头痛”“首风”“脑风”“头项痛”“厥头痛”“真头痛”“头半痛”等。《症因脉治》指出“伤风头痛或半边偏痛,皆因风冷所吹,遇风冷则发。贼风外袭,上犯巅顶,邪气稽留,风邪入脑,清阳被扰,气血不畅,阻遏络道。”明确指出了偏头痛的病因病机与风寒邪气入脑有关。MXFT方中麻黄辛散发表以解太阳表寒,附子辛热内助少阴阳气,细辛沟通表里,助麻黄散寒于外,佐附子固少阴之阳。临床应用于阳虚有



注:A.空白组;B.模型组;C.西药组;D.MXFT低剂量组;E.MXFT中剂量组;F.MXFT高剂量组(图2同)

图1 MXFT对偏头痛大鼠三叉神经节ERK1/2、Akt1、PRKCA蛋白的表达(免疫组化,×200)

Fig. 1 Expression of MXFT on levels of ERK1/2, Akt1, PRKCA protein of migraine rats (IHC, ×200)

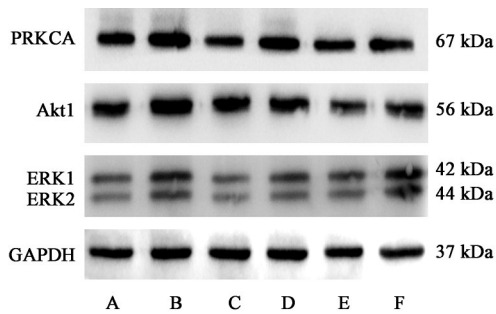


图2 MXFT对ERK1/2、Akt1、PRKCA蛋白表达电泳

Fig. 2 Expressions of ERK1/2, Akt1 and PRKCA proteins were electrophoretic by MXFT

表7 MXFT对ERK1/2、Akt1、PRKCA蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 7 Effect of ERK1/2, Akt1 and PRKCA proteins by MXFT ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	PRKCA/ GAPDH	Akt1 /GAPDH	ERK1/2
空白组	0.99±0.13	0.89±0.07	0.86±0.15
模型组	1.38±0.09 <sup>2)</sup>	1.37±0.11 <sup>2)</sup>	1.39±0.16 <sup>2)</sup>
西药组	0.93±0.18 <sup>4)</sup>	0.97±0.19 <sup>3)</sup>	0.83±0.20 <sup>4)</sup>
MXFT低剂量组	0.92±0.05 <sup>4)</sup>	0.89±0.03 <sup>4)</sup>	0.96±0.08 <sup>3)</sup>
MXFT中剂量组	0.87±0.08 <sup>4)</sup>	0.98±0.02 <sup>4)</sup>	0.94±0.02 <sup>3)</sup>
MXFT高剂量组	0.90±0.04 <sup>4)</sup>	0.91±0.15 <sup>4)</sup>	1.02±0.09 <sup>3)</sup>

寒、邪气郁闭之证。本研究基于上述理论,通过网络药理学分析药物与疾病相关性,针对偏头痛阳虚寒凝的核心病机,探讨MXFT干预偏头痛的作用机制。

本研究通过TCMSP数据库搜集MXFT化合物37种,包括柚皮素、槲皮素、圣草酚、柳穿鱼黄素等。偏头痛发作过程中单胺氧化酶(MAO)耗竭5-羟色胺(5-HT)使脑血管过度扩张,进而引起头痛症状。柚皮素是MAO抑制剂,具有抗氧化、抗炎和神经保护的性质<sup>[11-12]</sup>。FOS是在神经元细胞核中发现的即刻早期基因的蛋白质产物,参与偏头痛的痛觉调控过程,是研究偏头痛三叉神经血管理论的重要指标<sup>[13]</sup>。槲皮素因其抗氧化、镇痛和抗炎作用而被描述为细胞保护剂<sup>[14]</sup>,能明显改善奥沙利铂引起的小鼠疼痛性周围神经病变,抑制脊髓背角神经元中一氧化氮合酶、FOS表达发挥抗炎镇痛作用。瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)属于瞬时受体通道家族,在颅内主要分布于痛觉感觉神经元,当通道开放激活后,钙离子流入胞内,激活血管活性物质,如CGRP和P物质(SP),促进血管扩张以及炎症介质的释放,导致偏头痛产生。圣草酚<sup>[15]</sup>属于TRPV1

受体拮抗剂,能够防止辣椒素引起的伤害感受,且不会引起体温或运动活动的变化。柳穿鱼黄素<sup>[16]</sup>具有抗炎作用,研究表明其能缓解星形胶质细胞炎症,而星形胶质细胞在痛觉超敏的启动和维持中发挥着重要作用。由此可见,MXFT中活性成分具有良好的抗炎镇痛作用,可有效缓解偏头痛的发生发展。

研究结果显示,MXFT抗偏头痛的核心靶点为Akt1、MAPK1、MAPK3、PRKCA、PRKCB、RKCG等。涉及的主要通路包括MAPK信号通路、神经活性配体-受体相互作用、钙离子信号通路、环腺苷酸(cAMP)信号通路等。Akt1是一种丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶,是蛋白激酶B家族的成员,是PI3K/Akt信号通路的关键蛋白<sup>[17]</sup>。Akt1是血管生成和代谢的关键介质,广泛存在于血管内皮、平滑肌细胞中。血管活性物质的释放使内皮一氧化氮合酶的Akt1依赖性磷酸化,促进NO释放,导致偏头痛的产生<sup>[18]</sup>。MAPK信号级联是调节细胞存活、增殖和代谢的细胞内激酶,参与反馈调节和信号放大,是参与神经性疼痛的重要通路之一<sup>[19-20]</sup>。神经细胞损伤后,周围神经胶质雪旺氏细胞和巨噬细胞等炎症细胞被募集到病变部位,促进神经生长因子的分泌,神经生长因子与其受体结合,激活MAPK信号通路在内的多个下游信号通路,进而增加和敏化各种神经递质、受体和离子通道,包括SP、CGRP、脑源性神经营养因子、缓激肽受体、TRPV1和酸感应离子通道,促使神经性疼痛包括偏头痛的产生。PRKCA、PRKCB、PRKCG是丝氨酸-苏氨酸特异性蛋白,是蛋白激酶C家族的成员,参与调节细胞增殖、凋亡、分化、迁移和炎症<sup>[21]</sup>,在神经元兴奋性的调制、信号转导、神经递质的释放以及突触可塑性等过程中扮演重要角色。有研究表明,炎性疼痛发生的主要机制可能是通过激活中枢神经系统内的蛋白激酶C增强神经元的兴奋性,使其对外周传入信号的反应增强,从而导致痛觉异常发生<sup>[22]</sup>。蛋白激酶C能够增强谷氨酸能传递,谷氨酸在疼痛传递、中枢敏化和皮质扩散抑制中起着关键作用,偏头痛患者脑内及外周循环中谷氨酸水平较高<sup>[23-24]</sup>。偏头痛发作期间,血管活性物质大量释放激活cAMP信号通路,上调蛋白激酶A,导致神经保护细胞外信号调节激酶ERK和Akt途径等多个下游信号级联的激活,促进痛觉敏化,炎症介质释放,导致偏头痛症状持续发展<sup>[25]</sup>。

CGRP为偏头痛的特异性指标,是强大的血管

扩张剂,能促进肥大细胞脱颗粒释放炎症介质激活并敏化伤害感受器,进一步激活三叉神经血管系统促进神经炎症导致偏头痛<sup>[26]</sup>。ERK2是MAPK信号通路、疼痛产生的关键蛋白。有研究表明,MAPK通路中的ERK1/2可以促进CGRP mRNA及蛋白表达。通过介导各种炎症介质和关键转导分子,包括肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 和白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 的转录和合成,促进神经炎症和超敏反应的发生,产生偏头痛症状<sup>[28]</sup>。FOS是ERK1/2的下游蛋白,ERK通路是调节FOS表达和功能的关键调节因子之一。在中枢神经系统出现明显的痛觉敏化时表达FOS蛋白,有研究表明,偏头痛大鼠脑干细胞核中表达FOS的神经元数量明显增加,因此FOS在神经元中表达的数量可能与偏头痛程度相关<sup>[29]</sup>。

本次大鼠体内实验结果显示,模型组大鼠血浆中CGRP、ERK2、FOS蛋白表达均增加,各给药组蛋白表达均有所下降;大鼠三叉神经节Akt1、ERK1/2、PRKCA蛋白表达均增加,各给药组蛋白表达均有所下降,提示MXFT可能通过抑制Akt1、ERK、PRKCA蛋白表达,减少炎症因子释放,抑制神经元过度活跃,缓解痛觉敏化,进而减少CGRP、FOS表达,阻断伤害感受器的激活治疗偏头痛。

综上所述,MXFT可能通过柚皮素、槲皮素、圣草酚、柳穿鱼黄素等活性成分作用于Akt1、MAPK1、MAPK3、PRKCA、PRKCB、RKCG等靶点,涉及PI3K/Akt信号通路、MAPK信号通路、神经活性配体/受体相互作用、钙离子信号通路、cAMP信号通路等机制干预偏头痛的发生发展。本研究表明,复方MXFT及其活性成分通过抑制大鼠血浆中CGRP、ERK2及FOS蛋白高表达及三叉神经节Akt1、ERK1/2、PRKCA蛋白高表达,干预偏头痛发作,为研究MXFT及其活性成分作用机制提供实验依据,为经方现代化研究提供参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition[J]. Cephalalgia, 2018, 38(1): 1-211.
- [2] Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. Lancet Neurol, 2019, 18(5): 459-480.
- [3] YU S, LIU R, ZHAO G, et al. The prevalence and

burden of primary headaches in China: A population-based door-to-door survey[J]. Headache, 2012, 52(4): 582-591.

- [4] ANDREOU A P, EDVINSSON L. Mechanisms of migraine as a chronic evolutive condition [J]. J Headache Pain, 2019, 20(1): 117.
- [5] GRIMSRUD K W, HALKER SINGH R B. Emerging treatments in episodic migraine [J]. Curr Pain Headache Rep, 2018, 22(9): 61.
- [6] 肖和平,段小毛,李茯梅,等. 仲景麻黄细辛附子汤药效分析[J]. 中医药管理杂志, 2006, 14(3): 52-53.
- [7] 梁丽丽,黄颜颜,黄发根. 麻黄附子细辛汤联合盐酸氟桂利嗪胶囊治疗偏头痛的临床效果观察[J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(23): 32-33.
- [8] 陈捷,梁伟雄,秦劭晨,等. 正天丸治疗偏头痛的有效性与安全性的系统评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(19): 194-200.
- [9] PRADHAN A A, SMITH M L, MCGUIRE B, et al. Characterization of a novel model of chronic migraine [J]. Pain, 2014, 155(2): 269-274.
- [10] 邓中甲. 方剂学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2008: 312.
- [11] OLSEN H T, STAFFORD G I, VAN STADEN J, et al. Isolation of the MAO-inhibitor naringenin from *Mentha aquatica* L [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 117(3): 500-502.
- [12] ZOU L, NING M, WANG W, et al. Naringenin prevents propofol induced neurodegeneration in neonatal mice brain and long-term neurocognitive impacts on adults [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 5469-5482.
- [13] BOYER N, DALLEL R, ARTOLA A, et al. General trigeminospinal central sensitization and impaired descending pain inhibitory controls contribute to migraine progression [J]. Pain, 2014, 155(7): 1196-1205.
- [14] AZEVEDO M I, PEREIRA A F, NOGUEIRA R B, et al. The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy [J]. Mol Pain, 2013, 9: 53.
- [15] ROSSATO M F, TREVISAN G, WALKER C I, et al. Eriodictyol: A flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 81(4): 544-551.
- [16] HEIMFARTH L, NASCIMENTO L, AMAZONAS DA SILVA M J, et al. Neuroprotective and anti-inflammatory effect of pectolinarigenin, a flavonoid from Amazonian *Aegiphila integrifolia* (Jacq.),

- against lipopolysaccharide-induced inflammation in astrocytes via NF $\kappa$ B and MAPK pathways [J]. Food Chem Toxicol, 2021, 157: 112538.
- [17] YU H, LITTLEWOOD T, BENNETT M. Akt isoforms in vascular disease [J]. Vascul Pharmacol, 2015, 71: 57-64.
- [18] CHEN J, SOMANATH P R, RAZORENOVA O, et al. Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability *in vivo* [J]. Nat Med, 2005, 11(11): 1188-1196.
- [19] MORRISON D K. MAP kinase pathways [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4(11): 1-5.
- [20] RAMOS J W. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(12): 2707-2719.
- [21] DEMPSEY E C, NEWTON A C, MOCHLY-ROSEN D, et al. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(3): L429-L438.
- [22] DE SOUZA NUNES J P, DA SILVA K, DA SILVA G F, et al. The antihypersensitive and antiinflammatory activities of a benzofuranone derivative in different experimental models in mice: The importance of the protein kinase C pathway [J]. Anesth Analg, 2014, 119(4): 836-846.
- [23] TRIPATHI G M, KALITA J, MISRA U K. Role of glutamate and its receptors in migraine with reference to amitriptyline and transcranial magnetic stimulation therapy [J]. Brain Res, 2018, 1696: 31-37.
- [24] FUORTES M G, FARIA L C, MERLIN L R. Impact of protein kinase C activation on epileptiform activity in the hippocampal slice [J]. Epilepsy Res, 2008, 82(1): 38-45.
- [25] JOHNSON-FARLEY N N, KERTESY S B, DUBYAK G R, et al. Enhanced activation of Akt and extracellular-regulated kinase pathways by simultaneous occupancy of Gq-coupled 5-HT<sub>2A</sub> receptors and Gs-coupled 5-HT<sub>7A</sub> receptors in PC12 cells [J]. J Neurochem, 2005, 92(1): 72-82.
- [26] 卢姿含, 王青, 马涛, 等. 偏头痛三叉神经血管系统中降钙素基因相关肽作用机制的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(7): 889-893.
- [27] 张金璐, 陈新林, 吕海侠, 等. c-Jun 氨基末端激酶信号通路参与电刺激大鼠三叉神经节偏头痛模型降钙素基因相关肽表达调控 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2016, 37(1): 28-32.
- [28] CHENG J K, JI R R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain [J]. Neurochem Res, 2008, 33(10): 1970-1978.
- [29] BOHÁR Z, FEJES-SZABÓ A, TAR L, et al. Evaluation of c-Fos immunoreactivity in the rat brainstem nuclei relevant in migraine pathogenesis after electrical stimulation of the trigeminal ganglion [J]. Neurol Sci, 2013, 34(9): 1597-1604.

[责任编辑 顾雪竹]