

# 头痛宁胶囊对偏头痛模型大鼠三叉神经节 P2X3mRNA 表达的影响

刘斌\*, 王彩霞, 符艳松

(河北联合大学附属医院神经内一科, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** 目的:观察头痛宁胶囊对偏头痛模型大鼠三叉神经节 P2X3mRNA 表达的影响。方法:健康 SD 大鼠随机分为:正常对照组(生理盐水组)、模型组(偏头痛模型组)、西比灵组  $1.04 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、头痛宁高、中、低剂量组 ( $760, 380, 190 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。预防给药 7 d。第 7 天 ig 30 min 后 sc 硝酸甘油(NTG,  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )制备偏头痛大鼠模型,造模后 3, 6 h 2 个时间点取材,用 RT-PCR 方法检测各组大鼠三叉神经节 P2X3mRNA 的表达情况。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠三叉神经节 P2X3mRNA 表达数增多 ( $P < 0.01$ ), 3 h 多于 6 h。与模型组比较,头痛宁高、中、低剂量治疗组和西比灵治疗组大鼠三叉神经节 P2X3mRNA 表达数均减少 (均  $P < 0.01$ )。结论:头痛宁胶囊可能通过抑制由硝酸甘油诱导的 P2X3mRNA 过度表达,发挥治疗偏头痛的作用。

**[关键词]** 偏头痛; 头痛宁胶囊; 三叉神经节; P2X3mRNA; 大鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0188-03

## Effect of Toutongning Capsule on P2X3mRNA Expression in Trigeminal Ganglion of Migraine Rats

LIU Bin\*, WANG Cai-xia, FU Yan-song

(First Department of Neurology, Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of Toutongning capsule on P2X3mRNA expression in trigeminal ganglion of migraine rats. **Method:** The healthy SD rats were evenly divided into: normal group, model group, three dose groups of Toutongning ( $760, 380, 190 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) capsule group and Xibiling group. Migrated rats model was established by NTG subcutaneous injection. Samples were harvested and measured in 3 hours and 6 hours after NTG subcutaneous injection. The P2X3mRNA expression in trigeminal ganglion was determined by RT-PCR. **Result:** P2X3mRNA expression in trigeminal ganglion increased in the model group compared with that in the normal group ( $P < 0.01$ ). P2X3mRNA expression was elevated at hour 3 then decreased at hour 6. P2X3mRNA expression in trigeminal ganglion and thalamencephalon were downregulated in the three dose groups of Toutongning capsule and Xibiling group compared with those in the model group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Toutongning capsule could treat migraine by reducing P2X3mRNA expression in trigeminal ganglion.

**[Key words]** migraine; Toutongning capsule; trigeminal ganglion; P2X3mRNA; rat

偏头痛(migraine)是反复发作的一侧或两侧搏动性头痛,是神经内科常见的疾病,目前还没有特效的防治方法。头痛宁胶囊由天麻、防风、制何首乌等精致而成,临床用于治疗偏头痛,有一定疗效<sup>[1]</sup>,但

其作用机制尚不十分明确。P2X3受体基因是从感觉神经元 DNA 文库中克隆出来的,定位于感觉神经节的中小径神经元如三叉神经节(trigeminal ganglion, TG)、背根神经节及节状神经节。研究表明 P2X3受体在多种疼痛的产生和维持中起重要作用<sup>[2]</sup>。本实验应用头痛宁胶囊对大鼠进行预防性给药后复制偏头痛模型,观察头痛宁胶囊对偏头痛模

**[收稿日期]** 20110227(007)

**[通讯作者]** \*刘斌,主任医师,从事脑血管病及偏头痛基础与临床研究, E-mail: liubin919tsh@sina.com

型大鼠三叉神经节 P2X3mRNA 表达的影响,探讨头痛宁胶囊治疗偏头痛的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级健康 SD 大鼠 72 只,雌雄各半,体质量 200 ~ 250 g,由中国医学科学院实验动物研究所供给,合格证号 SCXK(京)2010-0013。在河北联合大学屏障环境动物实验室自由进食喂养,室温控制在  $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,自然光照,在实验前适应喂养 2 周。

**1.2 试剂与仪器** 头痛宁胶囊,陕西步长制药有限公司生产,批号 20090806;西比灵胶囊,西安杨森制药有限公司生产,批号 20090720;硝酸甘油(NTG)注射液,北京益民药业有限公司生产,批号 20090822。Realtime RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司,Trizol 购自美国 Sigma 公司,引物由上海生工生物工程技术公司合成。

## 2 方法

**2.1 动物分组及给药** 大鼠随机分为正常对照组、模型组、西比灵治疗组、头痛宁高、中、低剂量治疗组。每组各 6 只大鼠。正常对照组:连续 ig 给生理盐水 7 d,第 7 天 ig 30 min 后 sc 生理盐水  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。模型组:连续 ig 给生理盐水 7 d,第 7 天 ig 30 min 后 sc 硝酸甘油注射液  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。西比灵组:连续 ig 西比灵悬液  $1.04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  7 d,第 7 天 ig 30 min 后 sc 硝酸甘油注射液  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。头痛宁高、中、低剂量组:分别连续 ig 头痛宁胶囊悬液(760,380,190  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 7 d,第 7 天 ig 30 min 后 sc 硝酸甘油注射液  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。各组大鼠 sc 硝酸甘油注射液或生理盐水后,分 2 个时间点,即 3,6 h 取材。

**2.2 动物模型制备** 参照 Cristina Tassorelli 等<sup>[3]</sup>报道的方法,sc 硝酸甘油(NTG)制备实验性偏头痛大鼠模型。具体操作方法:大鼠称重后以  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  sc 硝酸甘油注射液,注射区定位于右肩部皮下。正常对照组 sc 生理盐水。

**2.3 造模后症状行为学观察** 观察各组大鼠造模后症状出现、消失的时间和单位时间段内前肢挠头、爬笼的次数。

**2.4 标本制备** 动物 sc NTG 注射液或生理盐水后,分别于造模后 3,6 h 将动物用 10% 水合氯醛( $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip)进行全身麻醉后,75% 乙醇消毒,于超净台中用无 Rnaese 器械迅速断头取脑,分离出三叉神经节置于液氮中,后保存于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中待用。

**2.5 Real Time RT-PCR 法测定三叉神经节 P2X3**

mRNA 表达

**2.5.1 采用 Trizol 试剂一步法提取组织总 RNA** 取 50 mg 组织,加入 1 mL Trizol 试剂,于冰上用匀浆器打匀。将匀浆室温放置 5 min。加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿,剧烈震荡混匀 30 s,冰上放置 5 min,12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ , $4^\circ\text{C}$ ,离心 15 min。将上清液小心转移到新的 1.5 mL 无 Rnaese 离心管中(取 400  $\mu\text{L}$ ),加入等量体积的异丙醇,上下颠倒混匀,室温下放置 15 min,12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ , $4^\circ\text{C}$ ,离心 10 min。小心移去上清液,加 75% 乙醇(DEPC 处理水配制) 1 mL,将 RNA 沉淀弹起,漂洗。7 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,室温离心 5 min,室温下干燥 5 min,沉淀用 20  $\mu\text{L}$  DEPC 处理水溶解。

**2.5.2 测定样品在 260 nm 和 280 nm 的吸光度(A)** 按  $A_{260}/A_{280}$  在 1.8 ~ 2.0,调节 RNA 至  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.5.3 逆转录过程** RT 反应体系共 10  $\mu\text{L}$ (反应液配制在冰上进行): 5  $\times$  PrimeScript<sup>®</sup> Buffer, 2.0  $\mu\text{L}$ ; PrimeScript<sup>®</sup> RT Enzyme Mix I, 0.5  $\mu\text{L}$ ; Oligo dT Primer, 0.5  $\mu\text{L}$ ; Random 6 mers, 0.5  $\mu\text{L}$ ; Total RNA, 4.0  $\mu\text{L}$ ; RNase Free dH<sub>2</sub>O, 2.5 RNase Free dH<sub>2</sub>O。反应在 TEChne TC-512 逆转录仪上进行,逆转录反应条件:  $37^\circ\text{C}$ , 40 min。cDNA 保存在  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中。

**2.5.4 Real Time PCR 法检测 P2X3 mRNA 的表达** 反应在 Rotor-Gene3000 定量 PCR 仪上进行。取三叉神经节组织 cDNA 进行 10 倍梯度稀释,取 5 个梯度分别对 P2X3 和 GAPDH 基因作标准曲线。通过标准曲线确定两组基因的扩增效率是否一致或接近;将扩增效率优化为一致。同一样品分别进行看家基因和目的基因的扩增。

①引物序列: P2X3 F: 5' -CACGGGTGGCGTTCTGGGTATT-3'; P2X3 R: 5' -ACTCGCTGCCGTTCTCATCT-3'; GAPDH F: 5' -ACAGCAACAGGCTGCTGAC-3'; GAPDH R: 5' -TTTGAGGGTGCAGCGAAGTT-3'。

②Real Time PCR 反应体系: SYBR Premix Ex Taq<sup>™</sup>, 12.5  $\mu\text{L}$ ; PCR Forward Primer, 1.0  $\mu\text{L}$ ; PCR Reverse Primer, 1.0  $\mu\text{L}$ ; RT 反应液(cDNA 溶液), 2.0  $\mu\text{L}$ ; dH<sub>2</sub>O(灭菌蒸馏水) 8.5  $\mu\text{L}$ , 共 25  $\mu\text{L}$ 。

③扩增条件:  $95^\circ\text{C}$  30 s 预变性后,  $95^\circ\text{C}$  5 s,  $60^\circ\text{C}$  30 s, 40 个循环。

**2.5.5 分析方法** 以 GAPDH 作为内参照,由于目的基因与内参的扩增效率一致,采用 Comparative Delta-delta Ct 法进行相对定量分析。最终结果表明偏头痛模型各组 P2X3 基因的表达式相对于正常对照组的基因表达量的倍数。

$$F = 2^{-\{[\text{目的基因 A 平均 Ct 值} - \text{看家基因 A 平均 Ct 值}] - [\text{目的基因 B 平均 Ct 值} - \text{看家基因 B 平均 Ct 值}]\}}$$

(注:A = 正常对照组;B = 偏头痛模型各组样品;

F = 偏头痛模型各组目的基因 P2X3 相对于生理盐水对照组的基因表达的倍数)

**2.6 统计学分析** 所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,以 Excel 数据库整理后用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,两组之间均数比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 各组大鼠的症状行为学表现** 本实验除正常对照组(生理盐水组)外,其余组动物造模后 10 min 左右,大鼠均出现双耳发红、前肢频繁挠头、爬笼次数增多、烦躁不安的现象,约 40 ~ 90 min 达高峰,之后逐渐下降。此现象持续约 1 ~ 3 h,继之大鼠呈现蜷卧、活动减少状态。

**3.2 各组大鼠三叉神经节 P2X3 mRNA 表达的情况** 与正常对照组比较,模型组大鼠三叉神经节 P2X3mRNA 表达数增多( $P < 0.01$ ),3 h 多于 6 h。与模型组比较,头痛宁高、中、低剂量治疗组和西比灵治疗组大鼠三叉神经节 P2X3mRNA 表达数均减少(均  $P < 0.01$ )。

表 1 各组大鼠三叉神经节 P2X3 mRNA 表达相对量( $\bar{x} \pm s, n = 6$ ) 倍

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	3 h	6 h
正常对照	-	1.0	1.0
模型	-	12.02 ± 2.05 <sup>1)</sup>	7.53 ± 1.70 <sup>1)</sup>
头痛宁	760	6.36 ± 1.47 <sup>2)</sup>	3.97 ± 1.09 <sup>2)</sup>
	380	6.23 ± 1.56 <sup>2)</sup>	3.51 ± 0.87 <sup>2)</sup>
	190	8.73 ± 1.16 <sup>2)</sup>	5.78 ± 1.61 <sup>2)</sup>
西比灵	1.04	6.20 ± 1.60 <sup>2)</sup>	3.63 ± 0.98 <sup>2)</sup>

注:与正常对照组比较 <sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较 <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 4 讨论

三叉神经节伤害可能是偏头痛产生的神经基础。该学说主要与三叉神经的激活以及中枢内源性镇痛系统功能失调有关,认为三叉神经对颅内外血管的舒缩调节以及疼痛刺激传导途径的激活是关键性机制,局部血管活性物质在偏头痛的发病过程中起着重要作用<sup>[4]</sup>。

P2X3 受体基因是从感觉神经元 DNA 文库中克

隆出来的,P2X3 受体选择性地表达于初级传入感觉神经元,在疼痛信息处理中存在重要作用。研究表明 P2X3 受体参与并调制多种疼痛信号的传递,当 P2X3 受体表达上调或者活性增强时疼痛加重,当其表达下降或者脱敏时疼痛会相应减轻<sup>[2]</sup>。P2X3 受体参与了偏头痛的发病机制,其可能机制是:在偏头痛的发生过程中,P2X3 受体可以通过其介导的 ATP 引起头部头痛,而且 CGRP 可以持续且有选择性的上调 P2X3 受体的活性,增加 P2X3 受体的转变<sup>[5]</sup>。P2X3 受体在偏头痛发作过程中的作用为偏头痛的发病机制和治疗,提供一个新思路。

Eriksson<sup>[6]</sup>,Novakovic<sup>[7]</sup>等的研究表明在三叉神经的分支受损伤但神经元保持完整的情况下,P2X3 受体的表达是呈现瞬时的上调及持续增加的。本实验研究结果显示,与正常对照组比较,皮下注射 NTG 3 h 后模型组大鼠三叉神经节 P2X3mRNA 表达数增多,随着时间的推移,有逐渐下降的趋势(6 h 低于 3 h)。说明皮下注射 NTG 三叉神经节 P2X3mRNA 的表达是时限性增强。与模型组比较,头痛宁治疗组和西比灵治疗组大鼠三叉神经节 P2X3mRNA 的表达数均减少。说明头痛宁胶囊可能通过抑制由硝酸甘油诱导的 P2X3mRNA 过度表达,发挥其预防、治疗偏头痛的作用,但其确切机制还有待于进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 孙迎男. 步长头痛宁治疗偏头痛 127 例临床分析[J]. 中国实用医药,2010,5(23):194.
- [2] 王英,鄢建勤. P2X3 受体在疼痛机制中的作用[J]. 中国疼痛医学杂志,2009,15(3):177.
- [3] Ravishankar N, Demakis G J. The neuropsychology of migraine[J]. Dis Mon,2007,53(3):156.
- [4] 贾建平. 神经病学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2008:160.
- [5] 杨飒飒,牛争平. P2X3 受体在硝酸甘油诱导的偏头痛大鼠三叉神经节的表达变化[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2009,7(4):438.
- [6] Eriksson J, Bongehiell U, Kidd E, et al. Distribution of P2X3 receptors in the rat trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve injury[J]. Neurosci Lett,1998,254(1):37.
- [7] Novakovic S D, Kassotakis L C, Oglesby I B, et al. Immunocytochemical localization of P2X3 purinoceptors in sensory neurons in naive rats and following neuropathic injury[J]. Paty,1999,80(1/2):273.

[责任编辑 聂淑琴]