

## 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

刘斌\*, 符艳松, 王彩霞

(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中脑导水管周围灰质(PAG)和下丘脑 c-fos, c-jun 表达的影响,探讨头痛宁胶囊治疗偏头痛的作用机制。方法:健康 SD 大鼠随机分为:生理盐水组、偏头痛模型组、西比灵( $1.04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )治疗组、头痛宁高、中、低剂量( $760, 380, 190 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )治疗组。sc 硝酸甘油(NTG)制备偏头痛大鼠模型,给药后 4, 6 h 2 个时间点取材,用免疫组化方法检测中脑导水管周围灰质(PAG)和下丘脑 c-fos, c-jun 表达水平。结果:与生理盐水组比较,模型组大鼠中脑导水管周围灰质(PAG)和下丘脑 c-fos, c-jun 阳性细胞数增多( $P < 0.01, P < 0.01$ ), 4 h 多于 6 h。与模型组比较,头痛宁高、中剂量治疗组和西比灵治疗组大鼠中脑导水管周围灰质(PAG)和下丘脑 c-fos, c-jun 阳性细胞数减少(均  $P < 0.01$ )。头痛宁低剂量治疗组无明显变化。结论:头痛宁胶囊可以减少由硝酸甘油诱导的致痛物质 c-fos, c-jun 的表达,从而抑制中脑导水管周围灰质(PAG)和下丘脑痛觉信息的传递,发挥治疗偏头痛的作用。其中,以头痛宁高、中剂量治疗组作用明显。

**[关键词]** 偏头痛; c-fos; c-jun; 头痛宁胶囊; 大鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0195-04

## Effects of Toutongning Capsule on Expression of c-fos and c-jun in Mesencephalon and Thalamencephalon in Rats with Migraine

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

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

**[Abstract]** **Objective:** By observing the effects of Toutongning capsule on the expression of c-fos and c-jun

**[收稿日期]** 20101227(015)

**[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, E-mail: liubin919tsh@sina.com

关于丁香镇痛机制的文献很少, 仅陈天丽等报道, 丁香对牙痛有麻痹和镇静、镇痉作用<sup>[5]</sup>。“经络闭塞气血凝”, 气血运行郁滞, 不通则痛, 丁香气芳香入血分而活血止痛。本实验表明, 丁香外用大、中剂量组可明显提高小鼠机械性压痛痛阈值, 具有一定的镇痛作用。

通过本次实验, 初步表明黄连外用具有显著的抗炎作用, 丁香外用可以镇痛, 黄连、丁香均可治疗口腔溃疡。对黄连外用抗炎、丁香外用镇痛的机制, 以及从中药药性理论出发, 研究寒凉药物黄连及温热药物丁香, 对相同模型的口腔溃疡的作用机制, 还有待于进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 王家骅, 赵波, 范华. 浅谈近代中药外用剂型的发展[J]. 山东医药工业, 1998, 17(5): 24.
- [2] 杨安民, 姚尧, 冀为, 等. 云南白药防治口腔溃疡作用的实验研究[J]. 中草药, 2007, 29(9): 1367.
- [3] 吕霞, 王晶, 蒋文强. 黄连的研究进展[J]. 山东医药工业, 2003, 12(6): 35.
- [4] 肖百全, 朱少璇, 杨威. 角叉菜胶致大鼠足肿胀模型探讨及其机制研究[J]. 中国实用医药, 2008, 3(23): 63.
- [6] 俞珊, 秦志丰, 陈天丽. 中药镇痛机理的研究概述[J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(5): 667.

[责任编辑 聂淑琴]

in periaqueductal grey (PAG) and thalamencephalon in rats with migraine to discuss the therapeutic mechanism of Toutongning capsule. **Method:** The SD rats were evenly divided into 6 groups; normal group, model group, Flunarizine ( $1.04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) intervention group, high-dose, mid-dose and low-dose Toutongning capsule groups ( $760, 380, 190 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Migraine model in rats was established by NTG subcutaneous injection. After NTG subcutaneous injection the specimen at 4 hours and 6 hours was obtained. The expression of c-fos and c-jun were detected by immunohistochemistry. **Result:** The expression of c-fos and c-jun in PAG and thalamencephalon were increased in the model group compared with that in the normal group (all  $P < 0.01$ ). At 4 hours after NTG subcutaneous injection, there was much more expression of c-fos and c-jun compared with those at 6 hours after NTG subcutaneous injection. The expressions of c-fos and c-jun in PAG and thalamencephalon were decreased in the high-dose Toutongning capsule intervention group, mid-dose Toutongning capsule intervention group and Flunarizine intervention group compared with those in low-dose Toutongning capsule group and in the model group (all  $P < 0.01$ ). There was no significant difference between model group and low dose intervention group. **Conclusion:** By reducing the expression of c-fos and c-jun and restraining the transmission of pain information in PAG and thalamencephalon, Toutongning capsule could treat migraine. And the effect of high-dose Toutongning capsule and mid-dose Toutongning capsule were much better.

[**Key words**] migraine; c-fos; c-jun; Toutongning capsule; rat

头痛宁胶囊是由天麻、防风、制何首乌等组成,具有养血益气、化痰通络等功效,临床用于治疗偏头痛,有较好的治疗效果<sup>[1]</sup>,但其作用机制尚不明确。c-fos 与 c-jun 是一对关系密切的原癌基因,称为即刻早期基因(immediate early genes, IEG)。研究表明,c-fos 与 c-jun 基因在中枢神经系统(CNS)内的表达与痛觉调控密切相关<sup>[2]</sup>,它的表达已被广泛用作神经元激活标记物来研究神经功能通路<sup>[3]</sup>。本实验通过观察头痛宁胶囊对偏头痛模型大鼠中脑导水管周围灰质(periaqueductal grey, PAG)和下丘脑 c-fos, c-jun 表达的影响,以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,体重  $300 \sim 350 \text{ g}$ ,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  $(23 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ ,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,规格  $0.40 \text{ g/粒}$ 。西比灵胶囊,西安杨森制药有限公司生产,批号 20090720,规格  $5 \text{ mg/粒}$ 。硝酸甘油(NTG)注射液,北京益民药业有限公司生产,批号 20090822。兔抗大鼠 c-fos 抗体和 c-jun 抗体购自北京中杉生物有限公司,SP-

0023 免疫组化试剂盒购自北京博奥森生物工程有限公司,DAB 显色液购自北京中杉生物有限公司。低温离心机购自美国 Sigma 公司。

## 2 方法

**2.1 动物分组及给药** 健康 SD 大鼠随机分为:生理盐水组(对照组)、模型组(偏头痛模型组)、西比灵治疗组、头痛宁高、中、低剂量治疗组。每组各 6 只大鼠。生理盐水组:连续 ig 给生理盐水 7 d,第 7 天 ig 30 min 后 sc 注射生理盐水  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。模型组:连续 ig 给生理盐水 7 d,第 7 天 ig 30 min 后 sc 注射硝酸甘油注射液  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。西比灵组:连续 ig 西比灵悬液  $1.04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} 7 \text{ d}$ ,第 7 天 ig 30 min 后 sc 注射硝酸甘油注射液  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。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 注射硝酸甘油注射液  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。各组大鼠 sc 硝酸甘油注射液或生理盐水后,分两个时间点,即 4, 6 h 取材。

**2.2 动物模型制备** 参照 Cristina Tassorelli 等<sup>[4]</sup>报道的方法,sc 注射硝酸甘油(NTG)制备实验性偏头痛大鼠模型。具体操作方法:模型组和治疗组大鼠称重后以  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  计算硝酸甘油注射液用量。捏起大鼠颈部皮肤,用  $5 \text{ mL}$  注射器 sc 注射硝酸甘油注射液,注射区定位于右肩部皮下。生理盐水组 sc 生理盐水。

**2.3 症状行为学观察** 观察各组大鼠造模后双耳

发红等症状出现、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** 用 10% 水合氯醛(4 mL·kg<sup>-1</sup>)腹腔麻醉动物,将动物后仰卧固定,然后开胸,左心室穿刺,剪开右心耳,快速灌注生理盐水 100~200 mL(4℃)至肝脏完全变白,右心耳流出澄清液体后,继之灌入含 4% 多聚甲醛 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的 PBS(pH 7.4, 4℃)200~400 mL,先快后慢灌注,至大鼠肝脏变硬,肢体僵直,即固定完成,大约 1~2 h。然后完整取出鼠脑后投入 4% 多聚甲醛 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的 PBS(pH 7.4, 4℃)过夜固定保存。然后依据大鼠脑解剖图谱在大鼠中脑及下丘脑取材,进行常规脱水、石蜡包埋。做 4 μm 连续切片,捞片后置 60℃ 的烤箱中烘干备用。

**2.5 c-fos,c-jun 表达检测** 用免疫组化方法检测。具体操作步骤严格按试剂说明书操作要求进行。c-fos,c-jun 免疫组化阳性标准:光镜下观察,细胞核染色呈棕黄色颗粒,位于胞浆内。高倍镜下随机分别观察各组大鼠中脑导水管周围灰质(PAG)和下丘脑区不重叠的 6 视野,进行 c-fos,c-jun 阳性细胞计数。

**2.6 统计学分析** 所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示用 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 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 大鼠症状行为学表现** 除生理盐水组外,其余各组动物造模后 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、烦躁不安等现象,约 40~60 min 达高峰。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 大鼠中脑导水管周围灰质 c-fos,c-jun 表达** 生理盐水组大鼠中脑导水管周围灰质区,可见有一定量的 c-fos,c-jun 免疫反应阳性细胞表达,4 h 多于 6 h。模型组大鼠中脑导水管周围灰质区 c-fos,c-jun 免疫反应阳性细胞表达数高于生理盐水组,头痛宁胶囊和西比灵治疗组大鼠中脑导水管周围灰质区 c-fos,c-jun 免疫反应阳性细胞表达数低于模型组。表 1 显示,模型组大鼠中脑导水管周围灰质 c-fos,c-jun 蛋白阳性细胞数增多,4 h 多于 6 h,2 个时间点的阳性细胞数与生理盐水组比较有显著性差异(均 *P* < 0.01)。头痛宁高、中剂量组和西比灵组 4 h 和 6 h 2 时间点大鼠中脑导水管周围灰质(PAG) c-fos,c-jun 蛋白阳性细胞数减少,与模型组比较均有显著性差异(均 *P* < 0.01),头痛宁低剂量组 4 h 和 6 h 2 个时间点大鼠中脑导水管周围灰质区 c-fos,c-jun 蛋白阳性细胞数减少,但与模型组比较无显著性差异。

**3.3 大鼠下丘脑 c-fos,c-jun 蛋白表达** 生理盐水组大鼠下丘脑区,可见有一定量的 c-fos,c-jun 免疫反应阳性细胞表达,4 h 多于 6 h。模型组大鼠下丘脑区 c-fos,c-jun 免疫反应阳性细胞表达数高于生理盐水组,头痛宁胶囊和西比灵治疗组大鼠下丘脑区 c-fos,c-jun 免疫反应阳性细胞表达数低于模型组。表 2 显示,模型组大鼠下丘脑区 c-fos,c-jun 蛋白阳性细胞数增多,4 h 多于 6 h,2 个时间点的阳性细胞数与生理盐水组比较有显著性差异(均 *P* < 0.01)。头痛宁高、中剂量组和西比灵组 4 h 和 6 h 2 个时间点大鼠下丘脑区 c-fos,c-jun 蛋白阳性细胞数减少,与模型组比较均有显著性差异(均 *P* < 0.01),头痛宁低剂量组 4 h 和 6 h 2 个时间点大鼠下丘脑区 c-fos,c-jun 蛋白阳性细胞数减少,但与模型组比较无显著性差异。

表 1 各组大鼠中脑 PAG 区 c-fos,c-jun 阳性细胞数( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	c-fos/(个/视野)		c-jun/(个/视野)	
		4 h	6 h	4 h	6 h
生理盐水	-	11.16 ± 1.60	10.50 ± 1.51	18.0 ± 4.09	16.66 ± 3.44
模型	-	22.00 ± 3.46 <sup>1)</sup>	18.33 ± 1.86 <sup>1)</sup>	26.50 ± 3.50 <sup>1)</sup>	23.16 ± 4.66 <sup>1)</sup>
西比灵	1.04	11.90 ± 3.09 <sup>2)</sup>	11.02 ± 2.52 <sup>2)</sup>	14.16 ± 3.06 <sup>2)</sup>	13.83 ± 5.84 <sup>2)</sup>
头痛宁	760	13.23 ± 2.73 <sup>2)</sup>	11.20 ± 1.99 <sup>2)</sup>	14.5 ± 1.37 <sup>2)</sup>	13.04 ± 1.90 <sup>2)</sup>
	380	15.13 ± 2.99 <sup>2)</sup>	13.54 ± 1.72 <sup>2)</sup>	21.33 ± 3.77 <sup>2)</sup>	17.47 ± 4.02 <sup>2)</sup>
	190	20.24 ± 4.08	15.73 ± 2.52	25.66 ± 4.50	21.50 ± 2.16

注:与生理盐水比<sup>1)</sup>*P* < 0.01;与模型组比<sup>2)</sup>*P* < 0.01(表 2 同)。

表 2 各组大鼠下丘脑 c-fos, c-jun 阳性细胞数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	c-fos/(个/视野)		c-jun/(个/视野)	
		4 h	6 h	4 h	6 h
生理盐水	-	16.22 ± 3.94	14.11 ± 2.25	22.66 ± 6.05	22.00 ± 5.01
模型	-	31.30 ± 4.66 <sup>1)</sup>	29.05 ± 4.29 <sup>1)</sup>	33.46 ± 5.58 <sup>1)</sup>	29.33 ± 4.41 <sup>1)</sup>
西比灵	1.04	18.80 ± 3.23 <sup>2)</sup>	16.98 ± 1.57 <sup>2)</sup>	23.06 ± 6.32 <sup>2)</sup>	21.61 ± 2.21 <sup>2)</sup>
头痛宁	760	19.56 ± 2.35 <sup>2)</sup>	17.40 ± 4.71 <sup>2)</sup>	25.40 ± 3.87 <sup>2)</sup>	20.23 ± 3.96 <sup>2)</sup>
	380	23.46 ± 1.61 <sup>2)</sup>	22.30 ± 1.49 <sup>2)</sup>	25.30 ± 1.90 <sup>2)</sup>	22.83 ± 5.14 <sup>2)</sup>
	190	27.85 ± 4.05	25.4 ± 2.67	30.52 ± 3.90	27.66 ± 2.94

#### 4 讨论

本实验采用硝酸甘油制备实验性偏头痛动物模型,造模后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。实验结果显示造模后 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、烦躁不安等现象,以上说明我们的造模是成功的。

c-fos 与 c-jun 是一对关系密切的 IEG, c-fos 与 c-jun 的表达是偶联的, c-fos 蛋白必须与 c-jun 蛋白结合,从而共同介导目的基因的表达。研究表明, c-fos 基因参与细胞的分化、正常生长过程,调节细胞内信息传递过程,并且其在中枢神经系统内的表达与痛觉调控密切相关<sup>[2]</sup>。正常情况下,细胞内 c-fos 很少表达。各种伤害性刺激(如疼痛、创伤等)均可诱导中枢神经系统 c-fos 的表达,其表达水平与痛觉调控密切相关。c-jun 与 c-fos 在痛觉传递上是功能相似的基因。研究发现,偏头痛模型动物下丘脑和三叉神经脊束核尾部 c-fos 基因表达增强<sup>[5-6]</sup>。彭成等<sup>[7]</sup>以 sc 注射硝酸甘油复制偏头痛动物模型,发现在模型组大鼠脑干、下丘脑中 c-fos, c-jun 阳性细胞数明显多于正常对照组, c-fos, c-jun 表达阳性细胞面积和正常对照组相比明显增大。另有文献报道,中脑导水管周围灰质(PAG)参与疼痛与阵痛的调控过程,是中枢内源性镇痛系统的关键结构,处在承上启下的重要地位<sup>[8]</sup>。因此,本研究采用 sc 硝酸甘油建立大鼠偏头痛模型,观察头痛宁胶囊对中脑导水管周围灰质和下丘脑 c-fos, c-jun 表达的影响,并选用西比灵胶囊作为对照药物。我们的研究结果显示,模型组大鼠中脑导水管周围灰质和下丘脑 c-fos, c-jun 阳性细胞数明显增多,表达情况均以 4 h 明显, 6 h 稍减少,但与生理盐水组比较差异均有显著性。

经头痛宁胶囊干预后,偏头痛模型大鼠中脑导水管周围灰质和下丘脑 c-fos, c-jun 阳性细胞数明显下降,其中以头痛宁胶囊高、中剂量组作用明显,与模型组比较差异有显著性,其作用与西比灵作用相当。表明头痛宁胶囊可以减少由硝酸甘油诱导的致痛物质 c-fos, c-jun 的表达,从而抑制中脑导水管周围灰质(PAG)和下丘脑痛觉信息的传递,发挥治疗偏头痛的作用。

#### [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] 马加海, 徐礼鲜. c-fos 原癌基因与痛觉调控[J]. 国外医学·麻醉学与复苏分册, 2000, 21(3): 141.
- [3] 郭俊唐, 于生元. 大鼠偏头痛模型中脑导水管周围灰质 c-fos 表达及与 5-羟色胺共存[J]. 中华神经科杂志, 2004, 37(6): 504.
- [4] Tassorelli C, Creco R, Wang D, et al. Nitroglycerin induces hyperalgesia in rats—a time-course study. Eur J Pharmacol, 2003, 464(2-3): 159.
- [5] 王贺波, 于生元, 王卫东, 等. 刺激猫上矢状窦区硬脑膜诱发三叉神经脊束核尾部段核上颈髓后角 c-fos 蛋白的表达[J]. 中国疼痛医学杂志, 2002, 8(1): 27.
- [6] 任永欣, 彭成, 姚干. 头风饮对实验性偏头痛动物模型 c-fos, c-jun 基因表达的影响[J]. 成都中医药大学学报, 2000, 23(3): 34.
- [7] 彭成, 任永欣, 姚干, 等. 实验性偏头痛动物模型 c-fos, c-jun 基因表达[J]. 中国实验动物学报, 2002, 8(2): 112.
- [8] 刘若卓, 方生元. 中脑导水管周围灰质在大鼠血管源性头痛模型中的作用[J]. 中华神经医学杂志, 2005, 4(7): 672.

[责任编辑 聂淑琴]