

P2X3 在偏头痛大鼠中脑的表达及正天丸作用机制研究^{*}

白方会¹, 李 慧², 徐 茜³, 贾东佩¹, 郭力硕¹, 郭 跃¹, 陈宝田⁴, 张保朝^{1△}

(1. 南阳市中心医院, 河南 南阳 473000; 2. 广州市红十字会医院, 广东 广州 510220;

3. 南阳师范学院, 河南 南阳 473000; 4. 南方医科大学, 广东 广州 510515)

摘要: **目的** 探究正天丸对偏头痛大鼠中脑 P2X3 受体表达的影响。 **方法** 24 只 SD 雄性大鼠随机分为空白组、偏头痛组、正天丸组, 每组 8 只。连续给药 7 d 后硝酸甘油皮下注射造模。观察各组大鼠行为学及痛觉阈值变化, 免疫荧光和免疫蛋白印迹技术测各组大鼠中脑内 P2X3 受体的表达。 **结果** 正天丸组耳红和挠头持续时间均较偏头痛组缩短($P<0.001$)。造模后偏头痛组疼痛阈值较造模前及同期空白组均明显下降($P<0.05$); 正天丸组造模后 1.5 h 与空白组相比差异无统计学意义。偏头痛组 P2X3 受体在中脑内多数神经核团均呈明显高表达状态, 正天丸组表达强度较偏头痛组降低。偏头痛组和正天丸组 P2X3 蛋白表达较空白组升高($P<0.001$); 正天丸组 P2X3 蛋白表达较偏头痛组降低($P<0.001$)。 **结论** 中脑内 P2X3 受体的活化介导了偏头痛的痛觉信息传递, 正天丸的抗偏头痛作用与其抑制中脑内 P2X3 受体过表达有关。

关键词: 偏头痛; 中脑; P2X3; 正天丸

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2019)04-0021-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.04.004

Effect of Zhengtian Pills on P2X3 Receptor Expression in Midbrain of Migraine Rat Model

BAI Fanghui¹, LI Hui², XU Qian³, JIA Dongpei¹, GUO Lishuo¹, GUO Yue¹, CHEN Baotian⁴, ZHANG Baochao¹

(1. Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China;

2. Guangzhou Red Cross Hospital, Guangzhou 510220, China;

3. Nanyang Normal University, Nanyang, 473000, China; 4. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effect of Zhengtian pills on P2X3 receptor expression in midbrain of rat model of migraine. **Methods** The Sprague-Dawley (SD) male rats were randomly divided into control group, migraine group and Zhengtian pills group, with 8 rats in each group. Rats of Zhengtian pills (ZTP) group were given 1.62 g/kg Zhengtian pills by gavage. Rats of control group and model group were given 1 mL 0.9% sodium chloride solution by gavage. The drug administration lasted for 7 days. In migraine group and ZTP group, migraine rat models were established by subcutaneous injection of nitroglycerin (NTG) (10 mg/kg) after 30 min of the last drug administration. Rats of control group were given 0.5 mL 0.9% sodium chloride solution by subcutaneous injection. Behavioural performances of the rats were observed, including the duration of ears pink and scratching head. Von-Frey hair was used to monitor the pain threshold of allodynia around whisker pad. Immunofluorescence and western blot were used to detect the expression of P2X3 receptors in midbrain of rats. **Results** Rats of migraine group and ZTP group were not significantly different in the appearing time of red ear and the beginning time of scratching head. ZTP group had earlier disappearing time of red ear and earlier ending time of scratching head than migraine group ($P<0.001$). After modeling, the pain threshold at each time point in the migraine group was significantly lower than that before modeling and the control group at the same time ($P<0.05$). The pain threshold of ZTP group

收稿日期: 2019-08-02

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81774239); 河南省科技攻关项目(192102310436); 河南省中医药科研专项课题(2018ZY3052); 南阳市科技攻关项目(2017JCQY008); 北京医卫健康公益基金项目(YWJKJHHKYJJ-B17814)

第一作者简介: 白方会(1986-), 女, 主治医师, 研究方向: 脑病的中西医结合治疗。

△通信作者: 张保朝, E-mail: 74726005@qq.com

decreased at 0.5 h after modeling ($P<0.05$), then it continued to rise. There was no statistical difference between ZTP group and control group at 1.5 h after modeling. Immunofluorescence results showed that the expression of P2X3 receptors in midbrain was positive in the rats of each group, mainly distributed in the nerve nuclei of periaqueductal gray (PAG), and the expression intensity of P2X3 receptors in migraine group was higher than control group and ZTP group. The protein positive levels of P2X3 receptors of migraine group and ZTP group were higher than control group ($P<0.001$), while the expression level of P2X3 receptor of ZTP group was lower than migraine group ($P<0.001$). **Conclusion** The effect of Zhengtian pills on the treatment of migraine may be related to its inhibition on the expression of P2X3 receptors in midbrain.

KEY WORDS: Zhengtian Pills; P2X3 receptors; migraine; midbrain

偏头痛以单侧头部反复发作的搏动性疼痛为特点。研究显示我国偏头痛女性年患病率较高(3.3%~32.6%)^[1]。最新全球疾病负担调查显示偏头痛患病率攀升至全球第 6 位,为第 2 位全球高致残性疾病^[2]。该病发病率高、治愈率低,目前缺乏安全有效的治疗措施。P2X3 受体作为偏头痛的重要调节受体,本课题组前期就正天丸对 P2X3 受体在三叉神经血管系统表达的影响进行了研究^[3-4]。中脑作为痛觉传导通路的关键部位,P2X3 受体在此亦有表达。有研究报道在神经病理痛模型中 P2X3 受体在中脑内高表达起镇痛作用,与其在外周神经系统作用相反^[5]。然而在中脑内 P2X3 受体活化是否介导偏头痛的发生尚不明确。本研究旨在探讨 P2X3 受体在偏头痛大鼠中脑内表达变化及正天丸的抗偏头痛作用是否影响了中脑 P2X3 受体的表达。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 24 只,平均周龄(10.1±1.3)周。由郑州大学实验动物中心提供,饲养条件:室内温度 23~26℃,光暗周期 12 h,相对湿度 40%~60%,自由摄取食物和水,干预前适应性喂养 7 d。动物实验遵循国家科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的要求^[6]。正天丸(华润三九,批号:1710005H),硝酸甘油注射液(益民药业,批号:H11020289),荧光二抗-Cy3(凯基生物),P2X3 兔多克隆抗体(Santa Cruz), β -actin(中杉金桥),PVDF 膜(Millipore),ECL 发光液和 BCA 试剂盒(碧云天),IS 2000 MM 图像工作站(Kodak)。

1.2 偏头痛模型的建立 利用随机数字表法将大鼠随机分为空白组、偏头痛组、正天丸组,每组 8 只。正天丸组给予 1.62 g/kg 正天丸灌胃(药量依成人每日口服剂量进行换算);其余两组给予生理盐水 1 mL 灌胃,连续给药 7 d,末次灌胃 30 min 后大鼠颈背部

皮下注射硝酸甘油(10 mg/kg),制造偏头痛模型^[7],空白组皮下注射 0.5 mL 生理盐水。

1.3 行为学观察 以大鼠出现前肢频繁挠头、耳红、烦躁不安等视为造模成功^[8]。观察指标:①大鼠造模后耳红出现和消失时间;②大鼠造模后挠头开始和结束时间,以大鼠出现连续 5 次以上挠头为挠头开始时间,以 30 min 内大鼠挠头次数不足 5 次且表现蜷缩不动状态为挠头结束时间。

1.4 机械痛阈值的测定 用 Von Frey 纤维丝评定大鼠疼痛阈值。正式实验前 7 d,所有大鼠均行 Von Frey 纤维丝的适应性检测。进行实验时,先将大鼠置于测试装置内适应 20 min,根据 Dixon 介绍的 Up and Down 法,用 Von Frey 纤维丝从 2.0 g 力度开始刺激大鼠须垫,以纤维丝弯曲成 C 型,刺激 1~2 s,阳性反应为大鼠缩头、用爪拨开纤维丝和发声等逃离反应行为。当该力度的刺激不能引起阳性反应,则给予相邻大一级力度的刺激;如出现阳性反应,则给予相邻小一级力度的刺激,当出现第一次阳性和阴性反应的骑跨,再连续测定 5 次,取其阳性数值的平均值即为疼痛阈值。检测时间点为造模前 0.5 h、造模后 0.5 h、造模后 1.5 h、造模后 2.5 h。

1.5 标本采集与指标检测

1.5.1 免疫荧光检测 造模 4 h 后,10%水合氯醛麻醉后,4%多聚甲醛灌注固定,开颅取大脑,4%多聚甲醛固定 24 h,脱水、石蜡包埋切片,片厚约 10 μ m。切片依次进行脱蜡、水化、热抗原修复和灭活内源性过氧化物酶后,BSA 封闭后加入 P2X3 一抗(1:500),4℃过夜,滴加 Cy3 荧光二抗(1:500),避光孵育 1 h,倒置显微镜下观察结果,显现红色为 P2X3 受体阳性,对照组以 PBS 作一抗。

1.5.2 Western blot 检测 造模 4 h 后各组取 4 只大鼠,麻醉后迅速冰上取材,裂解组织,BCA 法测定蛋

白浓度,SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭 1 h,TBST 冲洗 3 次,加入一抗(1:1 000),4 ℃孵育过夜,羊抗兔二抗(1:3 000)室温孵育 1 h,采用 ECL 化学发光法进行曝光拍照,Molecular Imaging Software Version 4.0 (Kodak)软件分析条带灰度值,每组重复检测 3 次,以 β -actin 为内参。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 t 检验或单因素方差分析,方差不齐时用 Welch 近似方差分析,组间多重比较,方差不齐时用 SNK- q 检验,不齐时用 Dunnett's

T3 法,组内比较用配对 t 检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

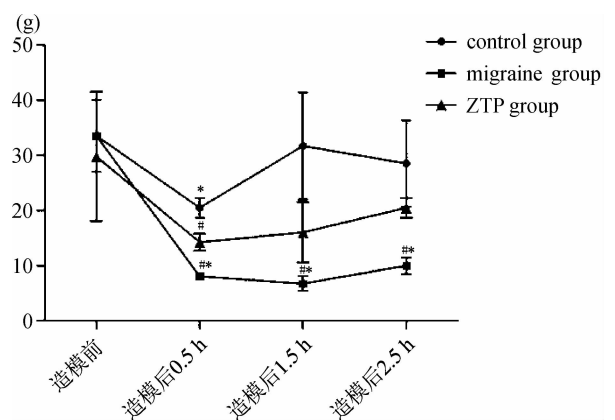
2.1 各组大鼠行为学表现 偏头痛组和正天丸组大鼠造模后均出现耳红、频繁挠头及爬笼等表现,空白组大鼠表现不明显,提示造模成功。2 组大鼠耳红出现时间和挠头开始时间比较均无差异,均在造模后 4 min 左右开始;正天丸组耳红持续时间和挠头持续时间均较偏头痛组缩短 30 min 左右 ($P<0.001$),见表 1。

表 1 各组大鼠耳红及挠头时间比较($\bar{x} \pm s$, $n=5$, min)

组别	只数	耳红出现时间	耳红消失时间	挠头开始时间	挠头结束时间
偏头痛组	5	4.08±0.79	134.92±7.25	4.42±1.08	136.50±5.96
正天丸组	5	3.92±0.90	100.58±7.37*	4.17±0.83	101.17±5.41*
t 值		0.48	11.50	0.63	15.21
P 值		0.64	0.000	0.53	0.000

注:与偏头痛组相比,* $P<0.001$

2.2 各组大鼠疼痛阈值的变化 结果显示,造模前各组大鼠基础疼痛阈值无明显差异,空白组除造模后 0.5 h 较造模前稍降低外($P=0.046$),其余各时间点较造模前均无显著差异;偏头痛组各时间点疼痛阈值较造模前及同期空白组均明显下降,再次证实已经成功复制了偏头痛模型;正天丸组造模后 0.5 h 疼痛阈值明显下降,但随后呈持续回升趋势,造模后 1.5 h 疼痛阈值(16.05±5.45)与空白组(31.72±9.72)相比差异无统计学意义。各组大鼠疼痛阈值比较见图 1。



注:与同期空白组比较,* $P<0.05$;与同组内造模前比较,* $P<0.05$

图 1 各组大鼠疼痛阈值变化

2.3 P2X3 受体在中脑内的定位表达情况 免疫荧光结果显示,P2X3 受体在中脑内多数神经核团均有阳性表达,本文选取了具有典型定位意义的中脑导水管周围的神经核团。从图 2 中可知,偏头痛组呈明显高表达状态(图中高亮的红色荧光颗粒),正天丸组表达强度较偏头痛组降低,空白组可见少量阳性表达。

2.4 中脑内 P2X3 受体蛋白表达情况 Western blot 结果显示,P2X3/ β -actin 比值整体组间比较有显著差异($F=178.51$, $P=0.000$),组间两两比较显示,3 组之间均存在显著差异 ($P=0.000$),偏头痛组(0.87±0.04),P2X3 蛋白表达显著高于其它 2 组,正天丸组(0.63±0.06)高于空白组(0.25±0.01),见图 3。

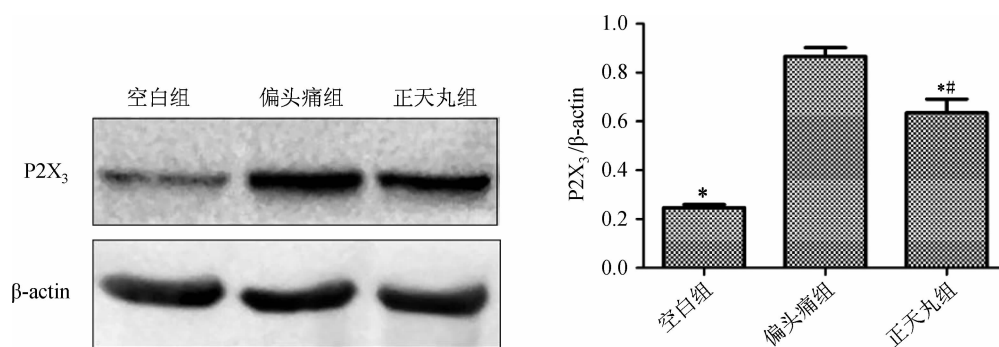
3 讨论

偏头痛属于中医学“头风”“头痛”“首风”“脑风”“偏头风”等范畴。偏头痛多为本虚标实之证,病位在脑髓经络,与肝、脾、肾三脏密切相关^[9]。风、瘀、湿、虚为偏头痛的主要致病因素^[10-12]。正天丸是全国名老中医陈宝田教授创制的中成药复合组方,由头痛四大古方:川芎茶调散、麻黄附子细辛汤、桃红四物汤、四藤消震饮化裁而来。正天丸综合各方之精华,具有疏风活血、通络止痛、养血平肝等功效,为临床治疗偏头痛的国家基本药物,以其显著的疗效受到患者及医务工



注:A. 空白组;B. 偏头痛组;C. 正天丸组

图 2 各组大鼠中脑内 P2X3 的表达($\times 100$)



注:与偏头痛组相比,* $P < 0.001$;与空白组相比,** $P < 0.001$

图 3 各组大鼠中脑 P2X3 受体蛋白的表达

作者的好评,并远销海外。本研究中通过对大鼠行为学观察可知,成功复制了偏头痛动物模型,而正天丸可以明显缩短大鼠偏头痛样行为的持续时间,通过对大鼠面部疼痛阈值的测定双重验证了正天丸有明显镇痛作用。

P2X₃ 受体属于嘌呤能受体,介导痛觉过敏的形成与维持,参与了炎性痛、神经病理性痛、癌痛、偏头痛等多种慢性疼痛的形成过程,目前已成为疼痛治疗领域的新靶点^[13-15]。

用于镇痛的 P2X₃ 受体第二代拮抗剂已进入临床前研究阶段^[16]。P2X₃ 受体选择性高表达于处理痛觉信息的感觉神经元上^[17-18]。

中脑作为中枢内源性疼痛调节系统的关键部位,P2X₃ 受体也参与了中脑的疼痛调节过程,P2X₃ 受体在正常大鼠中脑内有少量分布^[19]。有学者报道,在慢性坐骨神经结扎所致神经病理痛模型中 P2X₃ 受体在中脑内高表达起到镇痛作用,不同于其在外周神经系统的致痛作用^[5]。神经病理痛是由于神经系统(传入神经、脊髓或中枢神经系统等)功能异常或结构损伤所致的疼痛^[20-21],其发病机制与偏头痛有所不同。那么在偏头痛大鼠中脑内 P2X₃ 受体起何作用,与本

课题组前期研究结果,其在偏头痛大鼠三叉神经血管系统高表达介导偏头痛发生的作用是否一致?

本研究在正常大鼠中脑发现少数 P2X₃ 免疫阳性神经元细胞,主要位于 PAG 外侧区,与文献报道一致,说明在生理状态下中脑内有少量 P2X₃ 受体表达。通过免疫荧光和 western blot 的双重验证,结果显示偏头痛组大鼠中脑内 P2X₃ 受体表达明显升高,正天丸组 P2X₃ 受体表达较偏头痛组明显降低,证明中脑内 P2X₃ 受体的活化介导了偏头痛的痛觉信息传递,与其在三叉神经节、脊神经节等周围神经系统所起作用一致。正天丸的抗偏头痛作用与其可以抑制外周及中枢(中脑)神经系统内 P2X₃ 受体过表达有关,为其临床疗效奠定了有力的客观依据。

参考文献:

- [1] 李舜伟,李焰生,刘若卓,等.中国偏头痛诊断治疗指南[J].中国疼痛医学杂志,2011,17(2):65-86.
- [2] LICHTE N E M. Menstrual migraine and treatment options: review[J]. Headache, 2018,58(1):145-146.
- [3] 白方会,李慧,姜婷婷,等.正天丸对偏头痛模型大鼠三叉神经二级神经元 P2X₃ 受体表达的影响研究[J].中国全科医学,2016,19(15):1828-1832.

- [4] 白方会, 李慧, 任志军, 等. 正天丸对偏头痛大鼠三叉神经节 P2X3 受体表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(5): 923-927.
- [5] XIAO Z, OU S, HE W J, et al. Role of midbrain periaqueductal gray P2X3 receptors in electroacupuncture-mediated endogenous pain modulatory systems [J]. Brain Res, 2010, 1330: 31-44.
- [6] 宗阿南, 郑志红, 史晓萍, 等. 探讨《关于善待实验动物的指导性意见》饲养、应用、运输及相关方面的措施[J]. 实验动物科学, 2008, 25(2): 63-64.
- [7] 刘燕, 赵永烈, 刘金民. 散偏汤对偏头痛模型大鼠中脑、三叉神经节 CGRP、PENK 基因、蛋白表达的影响[J]. 中国中医急症, 2018, 27(8): 1325-1328.
- [8] 章正祥, 曹克刚, 高永红. 从临床到基础: 硝酸甘油实验性偏头痛大鼠模型信度和效度评价 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(4): 312-314.
- [9] 王文慧, 沈燕. 针刺预防性治疗偏头痛的机制研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1): 229-232.
- [10] 袁梦果, 刘云芳, 田婷, 等. 活血祛风法治疗偏头痛的 Meta 分析[J]. 中医药导报, 2017, 23(1): 73-75.
- [11] 李慧, 伍志勇, 聂玲辉, 等. 辛温止痛法对瘀血型偏头痛的疗效及对 5-HT、CGRP 的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(3): 570-572.
- [12] 姜婷婷, 李慧, 白方会, 等. 头痛新 1 号治疗慢性偏头痛的临床研究[J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(6): 36-38.
- [13] 曹欣娅, 秦榜勇. P2X3 受体在病理性疼痛中的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(7): 1182-1184.
- [14] 赵浩, 余庆, 刘曾旭. P2X 受体介导的神经病理痛的研究进展[J]. 南昌大学学报(医学版), 2013, 53(4): 90-91.
- [15] XIANG X, WANG S, SHAO F, et al. Electroacupuncture stimulation alleviates CFA-Induced inflammatory pain via suppressing P2X3 expression[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13): E3248.
- [16] GINETTI A T, PAONE D V, STAUFFER S R, et al. Identification of second-generation P2X3 antagonists for treatment of pain[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2018, 28(8): 1392-1396.
- [17] QI D, YANG Y, JI P, et al. Upregulation of the purinergic receptor subtype P2X3 in the trigeminal ganglion is involved in orofacial pain induced by occlusal interference in rats[J]. J Oral Facial Pain Headache, 2016, 30(1): 51-60.
- [18] KIM Y S, PAIK S K, CHO Y S, et al. Expression of P2X3 receptor in the trigeminal sensory nuclei of the rat [J]. J Comp Neurol, 2008, 506(4): 627-639.
- [19] 费雪瑜, 郇昭霞, 王涵芝, 等. P2X 受体介导慢性疼痛的研究进展[J]. 世界中医药, 2019, 14(6): 1363-1367.
- [20] WOOLF C J, MANNION R J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management[J]. Lancet, 1999, 353(9168): 1959-1964.
- [21] 朱远航, 金华. 神经胶质细胞对神经病理性疼痛的调控作用研究进展[J]. 中华神经医学杂志, 2018, 17(8): 842-846.