

三虫半夏白术天麻汤对偏头痛大鼠脑组织5-HT_{1B/1D}受体表达影响的实验研究*

陈少玫^{1△} 韦启志¹ 奚胜艳² 李世勇¹

(1.福建中医药大学附属厦门市中医院,福建 厦门 361009;2.厦门大学,福建 厦门 361000)

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1004-745X(2016)10-1874-04

doi:10.3969/j.issn.1004-745X.2016.10.012

【摘要】目的 探索三虫半夏白术天麻汤治疗偏头痛的作用机制。方法 建立硝酸甘油致大鼠偏头痛模型,给予半夏白术天麻汤高、中、低剂量灌胃干预7 d,以苯甲酸利扎曲普坦为西药阳性对照药物,并予空白组、模型组进行对照。运用RT-PCR检测5羟色胺1B、1D(5-HT_{1B/1D})受体的基因表达。结果 1)对5-HT_{1B}受体表达的影响:与空白组相比,模型组显著低于空白组($P < 0.01$);中药低剂量组与空白组无显著差异($P > 0.05$),中药中剂量组、中药高剂量组、西药组及联合用药组显著低于空白组($P < 0.01$);中药低、中、高剂量组、西药组及联合用药组较模型组升高,但不具有显著差异($P > 0.05$)。2)对5-HT_{1D}受体表达的影响:与空白组相比,中药中剂量组显著降低($P < 0.05$),其余各组,与空白组相比较无显著差异($P > 0.05$);与模型组相比,各组无显著差异($P > 0.05$);与中药中剂量组相比,空白组、中药低剂量组、西药组、联合用药组较中药中剂量组显著升高($P < 0.05$),中药高剂量组与中药中剂量组相比无明显差异($P > 0.05$)。结论 5-HT_{1B/1D}受体调节异常为偏头痛的发病环节之一。三虫半夏白术天麻汤可以提高偏头痛大鼠脑组织5-HT_{1B}受体的基因表达,对5-HT_{1D}受体的基因表达具有双向调节作用,临床运用,剂量不宜过大。

【关键词】5-HT_{1B/1D}受体激动剂 利扎曲普坦 偏头痛 中医药 三虫半夏白术天麻汤

Experimental Study on the Effect of Sanchong Banxia Baizhu Tianma Decoction on the Expression of 5-HT_{1B/1D} Receptor in the Brain of Rats with Migraine CHEN Shaomei, WEI Qizhi, XI Shengyan, et al. Xiamen Hospital Affiliated to Fujian University of TCM, Fujian, Xiamen 361009, China.

【Abstract】 Objective: To explore the mechanism of Sanchong Banxia Baizhu Tianma Decoction in the treatment of migraine. **Methods:** Migraine model of SD rats were set up with nitroglycerin, given Banxiabaizhutanma decoction of high, medium and low-dose intervention respectively for 7 days, taking Rizatriptan Monobenzoate as a positive control drug medicine, compared with the blank control group and the model group. RT-PCR was used to test the genetic expression of the 5-HT_{1B} receptor and the 5-HT_{1D} receptor. **Results:** The influence on the expression of the 5-HT_{1B} receptor: compared with the blank control group, the model group was significantly lower than the control group ($P < 0.01$); there was no significant difference between traditional Chinese medicine low-dose group and the blank group ($P > 0.05$); traditional Chinese medicine medium dose group, high dose group, western medicine group and the combination group were significantly lower than the blank control group ($P < 0.01$); after creating the model and finishing the administration, the expression rose high in low, medium and high dose groups of traditional Chinese medicine, western medicine group and the combination group, compared with the model group, without significant difference ($P > 0.05$). The influence on the expression of 5-HT_{1D} receptor: compared with the blank control group, traditional Chinese medicine medium dose group decreased significantly ($P < 0.05$); other groups had no significant differences, compared with the control blank group ($P > 0.05$); compared with the model group, there was no significant difference among them ($P > 0.05$); compared with the traditional Chinese medicine medium dose group, the blank control group, traditional Chinese medicine low dose group, western medicine group and combination group were significantly higher ($P < 0.05$); there was no difference between traditional Chinese medicine high-dose group and the traditional Chinese medium-dose group ($P > 0.05$). **Conclusion:** 5-HT_{1B/1D} receptor dysregulation is one cause of the pathogenesis of migraine. Sanchong banxia baizhu

* 基金项目:2012福建省中医药科研课题(wst201211)

△通信作者(电子邮箱:csmxm79@126.com)

tianma decoction can improve the genetic expression of 5-HT_{1B} receptors in migraine rats' brains, and has a dual-direction regulation on genetic expression of the 5-HT_{1D} receptors. In the field of clinical application, the dose should not be too large.

【Key words】 5-HT_{1B/1D} receptor agonist; Rizatriptan Monobenzoate; Migraine; Traditional Chinese medicine; *Sanzhong Banxia Baizhu Tianma Decoction*

偏头痛是一种常见的神经血管功能紊乱性疾病,临床以反复发作的一侧或双侧搏动性头痛为特征。发作时伴有自主神经功能紊乱,面色苍白、心率加快、恶心、呕吐、畏光等;间歇期一切如常人。本病反复发作,发病机制尚不完全清楚,可能与遗传、内分泌、血管、神经递质、免疫等因素相关。2010年中国原发性头痛流行病学调查显示,偏头痛发病率为9.3%,治疗费用高达873.6亿元/年^[1-2]。三虫半夏白术天麻汤^[3-5]为陈少玫教授所创制的临床验方,运用此方治疗原发性头痛可获得较好效果^[6-7]。本实验拟通过硝酸甘油致大鼠偏头痛模型,探讨该方对大鼠脑组织5羟色胺1B(5-HT_{1B})、5羟色胺1D(5-HT_{1D})受体表达的影响,为本方的临床运用提供科学依据。现报告如下。

1 材料与方

1.1 实验动物 清洁雄性SD大鼠,6~8周龄,体质量(180~220)g,由上海新莱克实验动物有限责任公司生产,生产许可证号:SCXK(沪)2012-0002。实验动物质量合格证:2015000505392。使用许可证号:SYXK(闽)2013-0006。

1.2 实验药物 三虫半夏白术天麻汤(由全蝎3g,蜈蚣10g,僵蚕10g,法半夏10g,天麻10g,钩藤15g,川芎15g,生蒲黄10g,炒白术10g,茯苓20g,白芍30g,甘草6g组成),所用药材为全成分颗粒,由厦门市中医院全成分颗粒药房提供,由北京康仁堂药业生产。苯甲酸利扎曲普坦片(欧立停),规格:5mg/片,欧立制药有限公司,批号:150702。

1.3 试剂与仪器 硝酸甘油注射液,规格5mg/mL,批号1401232,北京益民药业有限公司;TaqDNA聚合酶、10×PCR Buffer [without Mg²⁺:100mmol/L Tris-HCl pH 8.8 at 25°C;500mmol/L KCl,0.8%(v/v)Nonidet],MgCl₂(25mmol/L),dNTP(10mmol/L),Marker,6×DNA Loading Dye(sangon);10×TAE(400mmol/L Tris-acetate and 10mM EDTA,pH8.0)(sangon);pMD 18-T Vector(宝生物);引物(sangon);Trizol提取试剂盒;第一链cDNA合成试剂盒(AMV First Strand cDNA Synthesis Kit)(SK2445);溴化乙锭;琼脂糖.柱式DNA胶回收试剂盒(sangon SK8131);一步法快速感受态细胞制备试剂盒(SK9307 sangon);SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒(SK8191 sangon)。PCR反应扩增仪(美国ABI公司);DYY-8型稳压稳流电泳仪(上海琪特分析仪器有限公司);YXJ-2离心机(湘仪离心机仪器有限公司);

H6-1微型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂);凝胶成像系统(上海复日科技有限公司);TU-1901紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);移液器(范围100~1000μL,20~200μL,0.5~10μL)(加拿大BBI公司);3730XL测序仪(美国ABI);LightCycler480 Software Setup(Roche 罗氏)。

1.4 分组及造模 清洁级雄性SD大鼠适应环境3d后,10只皮下注射0.9%氯化钠注射液2mL/kg,每日1次,连续7d,作为空白组;120只雄性SD大鼠分别皮下注射硝酸甘油注射剂10mg/kg,每日1次,连续7d,后随机分为6组,即中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组、西药组、联合用药组、模型组。每组20只。

1.5 给药方法 空白组每日给予蒸馏水10mL/kg灌胃,其余6组造模成功后每日将相应药物用蒸馏水稀释至10mL/kg灌胃,连续7d。中药低、中、高剂量组分别按15、22.5、30g/kg(相当于60kg成人日用量的6倍、9倍、12倍)予三虫半夏白术天麻汤;西药组按0.498mg/kg(相当于60kg成人日用量的6倍)予苯甲酸利扎曲普坦片;联合用药组予三虫半夏白术天麻汤22.5g/kg+苯甲酸利扎曲普坦片0.498mg/kg。模型组予蒸馏水10mL/kg。

1.6 标本采集与检测 末次给药结束后,用1.5%戊巴比妥钠溶液(45mg/kg)将存活大鼠采用腹腔注射法麻醉,断头处死,迅速取出脑组织,用滤纸吸尽脑组织表面的血液,在冰盘上快速去除脑膜和血管,在解剖显微镜下迅速分离包含有基底节区、纹状体及三叉神经尾核相应的低位脑干区域的脑组织,用0.9%氯化钠注射液冲洗血迹,称质量,置液氮速冻后-80℃冻存,送生工生物有限责任公司(上海)运用RT-PCR检测5-HT_{1B}受体、5-HT_{1D}受体基因含量。

1.7 统计学处理 应用SPSS13.0统计软件处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示。各组间进行单因素方差分析下的多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠脑组织5-HT_{1B}受体表达比较 见表1。大鼠经腹腔注射硝酸甘油致偏头痛模型后,模型组5-HT_{1B}受体表达显著低于空白组($P < 0.01$)。造模并干预后,给药各组5-HT_{1B}受体表达水平仍低于空白组,其中中药低剂量组与空白组差异无统计学意义($P > 0.05$),中药中剂量组、中药高剂量组、西药组及联合用药组5-HT_{1B}受体表达显著低于空白组($P < 0.01$)。造

模并给药后,中药低、中、高剂量组、西药组及联合用药组 5-HT1B 受体表达较模型组升高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠脑组织 5-HT1B、5-HT1D 受体平均拷贝数($\bar{x}\pm s$)

组别	n	5-HT1B 受体拷贝数	5-HT1D 受体拷贝数	β -actin
空白组	10	6121.99±1061.57	2100.06±350.35 [*]	2780260±298895.22
中药低剂量组	20	5458.47±1225.55	2244.02±766.87 [*]	2758834±294363.52
中药中剂量组	20	4707.14±675.55 ^{△△}	1316.50±195.29 [△]	2600477±256208.42
中药高剂量组	20	4746.46±785.82 ^{△△}	1787.67±559.70	2776595±165308.14
西药组	20	4980.25±910.72 ^{△△}	2049.12±376.43 [*]	2582900±307774.15
联合用药组	20	4841.22±978.94 ^{△△}	2047.90±737.88 [*]	2674082±250260.05
模型组	20	4664.85±897.62 ^{△△}	1824.98±1060.88	2769097±244673.62

与中药中剂量组比较,^{*} $P<0.05$;与空白组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

2.2 对偏头痛大鼠脑组织 5-HT1D 受体表达的影响
见表 1。大鼠经腹腔注射硝酸甘油致偏头痛模型后,干预各组 5-HT1D 受体表达部分升高,部分降低。其中,与空白组相比,中药中剂量组 5-HT1D 受体表达显著降低($P<0.05$),其余各组与空白组相比较差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组相比,各组差异差异无统计学意义($P>0.05$);与中药中剂量组相比,空白组、中药低剂量组、西药组、联合用药组较中药中剂量组 5-HT1D 受体基因表达显著升高($P<0.05$),中药高剂量组与中药中剂量组相比差异差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

偏头痛属于严重危害人类健康的重大疾病,发病率及患病率较高。发病机制主要有血管源学说^[8]、皮层扩散性抑制、三叉神经血管学说。其中,三叉神经血管学说将神经、血管、神经递质三者相结合,统一于三叉神经血管系统(受 5-HT1B/1D 受体调节),较好地解释了偏头痛的一些临床表现及动物实验结果^[9],也为偏头痛药物的作用机制提供了合理的解释,成为目前的主流学说^[10]。该学说认为偏头痛是由于三叉神经血管系统和中枢神经系统内源性痛觉调节系统功能缺陷(与遗传有关)加之过多的内外刺激引起。

5-HT 是偏头痛发作中重要的神经递质^[11],是中枢内源性镇痛系统中重要神经活性物质之一。近年来,将 5-HT1B/1D 受体激动剂开发为治疗偏头痛的新药^[12],其代表药物为利扎曲普坦^[13]、夫罗曲坦、舒马曲坦等。现有研究者证实 5-HT1B/1D 受体激动剂不仅能够影响外周 5-HT 系统的代谢状态,提高偏头痛大鼠头痛发作期外周血中 5-HT 含量,而且还能抑制偏头痛发作时三叉神经节降钙素基因相关肽(CGRP)的表达^[14],从而减轻 CGRP 引发的神经源性炎症^[15-16]。

三虫半夏白术天麻汤治疗偏头痛的疗效已在前期

临床工作及研究中证实。本实验采用硝酸甘油制造偏头痛大鼠模型,研究发现造模成功后偏头痛大鼠脑组织内 5-HT1B/1D 受体表达下降,这是造模成功的重要标志。经三虫半夏白术天麻汤干预后,各组 5-HT1B 受体表达都有一定程度升高,以中药低剂量组升高幅度最大,但不具有显著差异,表明三虫半夏白术天麻汤具有类似 5-HT1B 受体激动剂的作用,且效果与剂量相关。

大鼠经腹腔注射硝酸甘油致偏头痛模型后,中药低剂量组 5-HT1D 受体表达升高,其余各组表达降低,其中以中药中剂量组 5-HT1D 受体表达降低幅度最明显。结果表明本方对 5-HT1D 受体的表达具有双向调节的作用,临床用于治疗偏头痛,剂量不宜偏大。

通过本实验研究,证实了 5-HT1B/1D 受体调节异常为偏头痛的发病环节之一。三虫半夏白术天麻汤可以提高偏头痛大鼠脑组织 5-HT1B 受体的基因表达,对 5-HT1D 受体的基因表达具有双向调节作用。临床运用,本方剂量不宜过大。研究为本方的临床运用提供了确切的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Ruozhuo Liu, Shengyuan Yu, Mianwang He, et al. Health-care utilization for primary headache disorders in China: a population-based door-to-door survey[J]. Journal of Headache & Pain, 2012, 14(1): 135-142.
- [2] 张燕萍. 数字 Digital[J]. 中国卫生产业, 2010; 7(4): 18-20.
- [3] 陈少玫, 张小丽, 林安基, 等. 三虫半夏白术天麻汤治疗椎-基底动脉供血不足 67 例疗效[J]. 中国中医急症, 2010, 19(1): 24-25.
- [4] 邵侠飞. 三虫半夏白术天麻汤治疗急性缺血性脑卒中风痰瘀阻型的临床研究[D]. 福建中医药大学, 2015.
- [5] 郑晶慧. 三虫半夏白术天麻汤治疗痰瘀互阻型眩晕的临床疗效观察[D]. 福建中医药大学, 2014.
- [6] 陈少玫. 三虫半夏白术天麻汤治疗偏头痛 72 例疗效观察[J]. 中国中医急症, 2003, 12(2): 127-128.
- [7] 韦启志. 痰瘀互阻型头痛与血清同型半胱氨酸的关联性及其三虫半夏白术天麻汤干预研究[D]. 福建中医药大学, 2010.
- [8] Borsook D, Dodick DW. Taking the headache out of migraine[J]. Neurology Clinical Practice, 2015, 5(4): 317-325.
- [9] 吴江. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 315-320.
- [10] 杨腊梅. 偏头痛的病理生理及其进展[J]. 中华现代临床医学杂志, 2000(12): 547-548.
- [11] Hamel E. Serotonin and migraine: biology and clinical implications[J]. Cephalalgia, 2007, 27(11): 1293-1300.
- [12] 姚刚. 5-HT(1B/1D)受体激动剂对偏头痛的治疗机制研究[D]. 吉林大学, 2013.
- [13] 姚刚, 郝婷婷, 罗翔丹, 等. 利扎曲普坦对硝酸甘油型偏头痛模型大鼠行为和血中疼痛相关因子水平的影响[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2014(5): 981-984.
- [14] 张成林, 万琪. 三叉神经感觉神经元 5-HT1D 受体调节

(下转第 1880 页)

醋酸棉酚引起的大鼠血清谷丙转氨酶明显下降,对麻醉犬和大鼠有明显利胆作用。刘寄奴总生物碱和总黄酮均能防治醋酸棉酚肝损害引起的大鼠高谷丙转氨酶谷丙转氨酶^[13]。朱老善用豨莶草治疗黄疸型肝炎,认为此证多系湿热转于血分所致,若迁延时日,瘀热胶结难解,一般利湿退黄之剂,殊难中的,必须凉血活血,解毒护肝始为合拍,凡黄疸缠绵不退,湿热疫毒稽留,朱老每从血分取法,以豨莶草配合丹参、刘寄奴等,多能应验^[14]。柴胡皂苷能使半乳糖所致的肝功能与组织损伤恢复,对四氯化碳引起的小鼠肝损伤实验,可见过氧化脂质含量降低,肝脏中谷胱甘肽含量升高,而血清中谷丙转氨酶含量下降^[15];丹参可明显减轻肝坏死和炎症反应,经丹参治疗的肝纤维化动物,肝纤维化较对照组明显减轻。大量文献报道:赤芍、郁金、当归、茵陈、白术、茯苓等药有促进肝细胞修复,降低转氨酶,减轻肝脏胶原纤维增生的作用。

用猪血清腹腔注射法复制大鼠肝纤维化动物模型,该模型与其他模型比较,具有周期短、经济、方法简单、整体损伤轻、肝纤维化出现率高等特点^[3]。本实验中药预防组大鼠的肝脏组织结构接近正常,血液循环没有改建,纤维组织增生不明显,肝细胞变性、坏死比较轻微;中药治疗组肝细胞变性坏死与西药组相比明显减少,纤维组织增生相对比较轻,贮脂细胞、成纤维细胞比西药组明显减少。秋水仙碱治疗肝纤维化也有一定的作用,但西药治疗组大鼠肝脏组织内胶原纤维的含量与中药治疗组相比明显增多。Masson 三色胶原染色,经图像分析仪做半定量分析处理后,模型组肝组织内胶原纤维的含量是正常组的 7.59 倍,西药治疗组是正常组的 4.14 倍,中药治疗组是正常组的 1.5 倍,中药治疗组与西药治疗组相比,疗效明显,两组有非常显著性差异。肝组织内非胶原糖蛋白主要有 FN 及 LN,肝纤维化时 FN 作用于肝细胞,使之分泌胶原,并且也可以使成纤维细胞、肝窦内皮细胞增生,分泌细胞外基质,使纤维化继续发展。LN 是基底膜的主要组成成分,肝纤维化时其形成增加,其含量增加与肝窦毛细血管化,也就是与肝纤维化的不可逆性有关^[5],模型组 FN 和 LN 明显增多,中药治疗组, FN 与 LN 的增生相对比较少,中药治疗组与西药治疗组比较有显著差异。本实验结果表明:刘豨逍遥五苓汤能够保护肝细胞,减轻致

病因素引起的肝细胞变性和坏死,促进肝细胞结构及功能的恢复;能够抑制贮脂细胞向成纤维细胞的转化及增殖,减轻纤维组织及非胶原糖蛋白的合成以及分泌,促使肝纤维化进展减慢或者逆转。

参 考 文 献

[1] 姜一鸣,姜学连,刘新军,等. 中医综合治疗慢性乙型肝炎肝纤维化优化方案的研究[J]. 世界中西医结合杂志,2015,10(1):75-77.

[2] 姜学连,张国栋,孙云廷,等. 刘豨逍遥五苓汤治疗慢性重度肝内淤胆型肝炎的临床研究[J]. 中国中医急症,2008,17(9):1217-1218.

[3] 邱志济,朱建华,马璇卿,著. 朱良春杂病廉验特色发挥[M]. 北京:中医古籍出版社,2004:211-212.

[4] 于世瀛,贲长恩,杨美娟,等. 免疫性和化学性损伤肝纤维化动物模型的比较研究[J]. 实验动物科学与管理,1995,12(4):5-12.

[5] 姜学连,靳艳华,贲长恩. 中药 2 号方抗大鼠肝纤维化的组织化学及免疫组织化学实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2002,8(11):48-50.

[6] 姜学连,崔银枝,靳艳华. 慢肝合剂抗肝纤维化的形态学实验研究[J]. 滨州医学院学报,2003,26(6):434-436.

[7] 姜学连,贲长恩,于世瀛. 中药 2 号方抗肝纤维化的形态学和血清学实验研究[J]. 北京中医药大学学报,1999,22(3):36-37.

[8] 袁柱婷,单长民,姜学连,等. 三棱莪术抗大鼠免疫性肝纤维化的研究[J]. 中国中药杂志,2002,27(12):929-931.

[9] 刘新军,姜学连. 中医药治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床研究进展[J]. 滨州医学院学报,2013,36(6):437-439.

[10] 刘新军,王慧凯,姜学连. 刘豨汤抗大鼠肝纤维化作用机制的实验研究[J]. 中国中医急症,2015,24(12):2141-2143.

[11] 姜学连,孙云廷,魏铭. 加味黄精汤治疗慢性乙型肝炎的临床研究[J]. 中华中医药学刊,2009,27(8):1611-1612.

[12] 姜学连,刘新军. 《内经》有关水气病的论述对治疗肝硬化腹水的指导意义[J]. 辽宁中医药大学学报,2010,12(8):7-8.

[13] 孙文忠,潘颖宜,郭忻,等. 南北刘寄奴活血化瘀药理作用的比较研究[J]. 成都中医药大学学报,1997,20(3):51-53.

[14] 王发辉,冯起校,黄超文. 豨莶草药理研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(10):102-104.

[15] 沈霞,张岗,陈莹. 柴胡防治乙型肝炎的网络分子机理初探[J]. 陕西中医,2015,36(1):113-114.

(收稿日期 2016-05-08)

(上接第 1876 页)

CGRP 表达和释放的机制[J]. 中国疼痛医学杂志,2015(3):213-216.

[15] 罗国刚,袁兴运,袁博博,等. 肿瘤坏死因子 α 、白介素 1β 和舒马曲坦对大鼠三叉神经节离体培养后降钙素基因相关肽 mRNA 表达水平的影响[J]. 西安交通大学学报:医学

版,2012,33(3):276-280.

[16] Benemei S, Nicoletti P, Capone J G, et al. CGRP receptors in the control of pain and inflammation [J]. Current Opinion in Pharmacology, 2009, 9(1): 9-14.

(收稿日期 2016-05-06)