

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.27.005

## 都梁软胶囊对偏头痛模型大鼠中脑 CGRP 及 CCK 表达的影响

韩喜梅<sup>1</sup>,姚刚<sup>2</sup>,满玉红<sup>2</sup>,于挺敏<sup>2△</sup>

(1. 内蒙古自治区赤峰市医院神经内科 024000; 2. 吉林大学第二医院神经内科, 长春 130041)

**[摘要]** **目的** 研究都梁软胶囊对偏头痛模型大鼠中脑降钙素基因相关肽(CGRP)和缩胆囊肽(CCK)基因转录水平的影响,探讨其预防治疗偏头痛的作用机制。**方法** 健康 Wistar 大鼠随机分 4 组, A 为对照组, B 为偏头痛组, C 为都梁软胶囊对照组, D 为都梁软胶囊治疗组。C、D 组给予都梁软胶囊  $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃, A、B 组大鼠灌胃给予等量容积的 Tween-80。灌胃 7 d 后, 将 B、D 两组大鼠造硝酸甘油型偏头痛模型, 造模 2 h, 保存中脑标本。实时荧光定量 PCR 检测 CGRP 和 CCK 的转录水平。**结果** D 组大鼠中脑 CGRP 转录水平明显低于 B 组 ( $0.64 \pm 0.35$  和  $1.61 \pm 0.51$ ,  $P < 0.05$ )。C 组大鼠中脑 CCK 转录水平明显低于 A 组 ( $0.32 \pm 0.31$  和  $1.21 \pm 0.38$ ,  $P < 0.05$ )。**结论** 都梁软胶囊可以干预中脑 CGRP 和 CCK 的表达, 从而影响内源性痛觉调制系统的功能。

**[关键词]** 偏头痛; 中脑; 降钙素基因相关肽; 都梁软胶囊; 缩胆囊肽**[中图分类号]** R747.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)27-3760-03

## Effects of Duliang capsule on the expression of calcitonin gene-related peptide and cholecystokinin in the midbrain of a rat migraine model

Han Ximei<sup>1</sup>, Yao Gang<sup>2</sup>, Man Yuhong<sup>2</sup>, Yu Tingmin<sup>2△</sup>

(1. Department of Neurology, Chifeng Municipal Hospital, Chifeng, Inner Mongolia Autonomous Region 024000, China;

2. Department of Neurology, the Second Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130041, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of Duliang capsule on the expression of calcitonin gene-related peptide(CGRP) and cholecystokinin(CCK) in the midbrain of a rat migraine model, and explored treatment effects and mechanisms of Duliang capsule on rats with migraine. **Methods** A total of 24 rats were randomly divided into four groups: normal control groups(A), migraine model groups(B), Duliang capsule control groups(C) and Duliang capsule treatment groups(D). C and D were intragastrically perfused with Duliang capsule ( $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). After 7 days, nitroglycerin was subcutaneously injected into the buttocks of the B and D to induce migraine. Two hours after nitroglycerin injection, the midbrain were isolated CGRP and CCK expression in midbrain were determined using SYBR Green I real-time quantitative PCR. **Results** CGRP mRNA expression was significantly lower in midbrains of rats in the Duliang capsule treatment groups compared with migraine model groups ( $P < 0.05$ ). CCK mRNA expression was significantly lower in midbrains of rats in the Duliang capsule control groups compared with normal control groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Duliang capsule can exhibit the expression of CGRP and CCK in the midbrain of the migraine rats, weaken the CGRP and CCK-induced inhibition of the analgesic effects of opioid peptides.

**[Key words]** migraine disorders; mesencephalon; calcitonin gene-related peptide; duliang capsule; cholecystokinin

偏头痛是临床常见疾病,严重影响患者的生活质量,目前临床上采用的预防性治疗药物并不完全有效,并且容易产生耐受或发生不良反应<sup>[1]</sup>。偏头痛患者头痛发作若不能得到有效控制,容易发生药物滥用,同时还可能与情感障碍共病,给患者带来更严重的危害。近期一项关于都梁软胶囊治疗偏头痛的荟萃分析显示:临床上都梁软胶囊治疗偏头痛的有效率优于偏头痛一线预防性治疗药物“氟桂利嗪”<sup>[2]</sup>。目前,关于都梁软胶囊治疗偏头痛的基础研究较为薄弱,其具体机制有待于深入探讨。内源性痛觉调制系统功能异常是参与偏头痛发作的重要因素,调节内源性痛觉调制系统的功能对偏头痛的防治有重要价值<sup>[3]</sup>。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)和缩胆囊肽(cholecystokinin, CCK)是内源性痛觉调制系统中两种重要的神经肽,它们可以减弱阿片肽在中脑的镇痛效应,从而参与痛觉调节<sup>[4]</sup>。本实验以偏头痛大鼠为模型,研究了预防性给予都梁软胶囊对偏头痛发作时模型大鼠中脑 CGRP 和 CCK 基因转录水平的影响,探讨都梁软胶囊预防性治疗偏头痛的机制。

**1 材料与方****1.1 实验动物、主要试剂和仪器** 24 只健康 SPF 级 Wistar

大鼠(雌雄各半),体质量 200~220 g,购于吉林大学基础医学院动物中心,动物合格证号:SCXK(吉)2003-001。都梁软胶囊(重庆华森制药有限公司,批准文号:Z20055185)。总 RNA 提取试剂盒(RNAiso Reagent)、反转录试剂盒 RNA [PCR Kit (AMV) Ver. 3.0]、E. coli DH5 $\alpha$  菌株、pEASY-T1 载体、限制性内切酶 BamH I 和 EcoR V、荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>,购自大连 TaKaRa 公司。胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒(Axygen Biosciences)。定量 PCR 仪(ABI PRISM 7500)。

**1.2 大鼠分组、药物干预及模型制备** 按随机区组法分为 4 组,每组 6 只大鼠:对照组(A组)、偏头痛组(B组)、都梁软胶囊对照组(C组)和都梁软胶囊治疗组(D组)。都梁软胶囊对照组和都梁软胶囊治疗组大鼠灌胃给予都梁软胶囊,剂量为  $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (药物用 Tween-80 稀释为  $0.1 \text{ g/mL}$ ,剂量根据成人常规每日剂量进行换算),A 组和 B 组大鼠灌胃给予等容积的 Tween-80。给药 7 d 后, B、D 组皮下给予硝酸甘油注射剂(剂量为:10 mg/kg)制备实验性偏头痛模型,以出现双耳发红、前肢频繁搔头、爬笼次数增多、咬尾、往返运动等提示模型动物头部不适的症状为造模成功的指标<sup>[5]</sup>。

**1.3 标本采集** 造模 2.0 h, 麻醉并处死各组大鼠(腹腔注射 10% 水合氯醛每 100 克 0.3 mL/100 g), 分离中脑, 存于 -70 °C 冰箱中备用。

**1.4 实时定量 PCR cDNA 合成:** 根据试剂盒说明书提取各组大鼠中脑总 RNA, 每一标本取总 RNA 200 ng, MgCl<sub>2</sub> 4 μL, 10×RT Buffer 2 μL, dNTP Mixture(各 10 mmol/L) 2 μL, RNase Inhibitor 0.5 μL, AMV Reverse Transcriptase 1 μL, Random 9 mers 1 μL, 加 RNase Free ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。30 °C 10 min, 42 °C 30 min, 99 °C 5 min, 5 °C 5 min 进行反转录。定量标准品制备: CGRP 引物上游 5'-AAG TTC TCC CCT TTC CTG GT-3', 下游 5'-GGT GGG CAC AAA GTT GTC CT-3', 扩增片段长度为 318 bp。CCK 引物上游 5'-CCC GAT ACA TCC AGC AGG TC-3', 下游 5'-AAA TCC ATC CAG CCC ATG-TAG TC-3', 扩增片段长度为 121 bp。PCR 反应参数: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, CGRP 53 °C (CCK 57 °C) 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环。PCR 产物胶回收纯化后与 pEASY-T1 载体连接, 转化克隆宿主 E. coli DH5α 进行亚克隆, 筛选获得目标转化子后提取质粒, 经酶切和测序验证, 证实克隆到的 CGRP cDNA 和 CCK cDNA 全长序列完全正确。根据所提质粒的 A260 计算其浓度, 梯度稀释后用于绘制标准曲线。SYBR Green I 实时定量 PCR: 20 μL 反应体系中包括: SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL, 上下游引物各 0.4 μL (10 μmol/L), ROX Reference Dye 0.4 μL, cDNA 标本 2.0 μL, dH<sub>2</sub>O 6.8 μL。将 CGRP(CCK) 质粒标准品进行 10 倍系列稀释, 得到不同浓度的标准品, 同时进行 PCR。以上各标本均做 3 个复孔。反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, CGRP 53 °C (CCK 57 °C) 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环, 根据荧光信号记录 Ct 值 (threshold cycle, Ct), 代入标准曲线计算绝对含量。同时设置 95 °C 15 s, 60 °C 20 s, 95 °C 15 s 进行溶解曲线分析以确定定量准确性。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS1 7.0 统计软件进行分析处理, 数据以均数±标准差表示, 组间差别采用单因素方差分析和 Tukey 比较, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 CGRP、CCK 基因标准品实时定量 PCR 标准曲线** 10 倍系列稀释的 CGRP 和 CCK 质粒标准品制作 PCR 标准曲线, 检测的线性范围达 7 个数量级。CGRP 检测上限为 2.7×10<sup>9</sup> copy/μL, 下限为 2.7×10<sup>3</sup> copy/μL, 回归方程 Ct = -2.69Log(x) + 38.875, r = 0.993, 见图 1。CCK 检测上限为 2.8×10<sup>9</sup> 拷贝/μL, 下限为 2.8×10<sup>3</sup> copy/μL, 回归方程 Ct = -1.907 Log(x) + 35.224, r = 0.953, 见图 2。

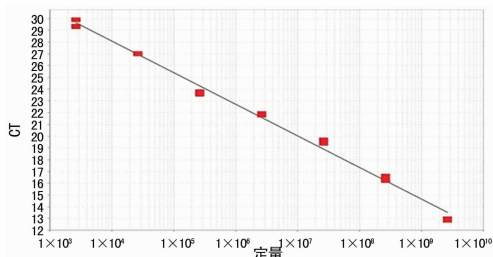


图 1 CGRP mRNA 荧光定量 PCR 标准曲线

**2.2 各组大鼠中脑 CGRP mRNA 的表达** 各组大鼠中脑总 RNA(每 200 纳克)中 CGRP mRNA 拷贝数(×10<sup>4</sup> copy)分别为: A 组 1.13±0.68; B 组 1.61±0.51; C 组 0.53±0.43; D 组 0.64±0.35。B 组大鼠中脑 CGRP 转录水平明显高于 C 组 (q=5.242, P<0.05); D 组大鼠中脑 CGRP 转录水平明显低于 B 组 (q=4.671, P<0.05), 见图 3。

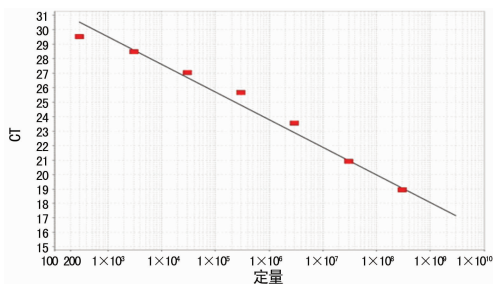
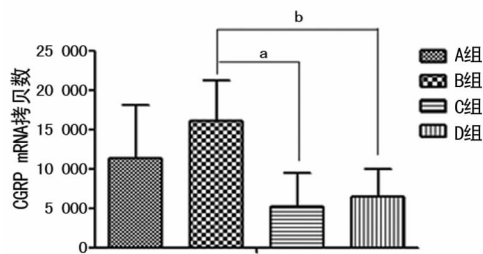


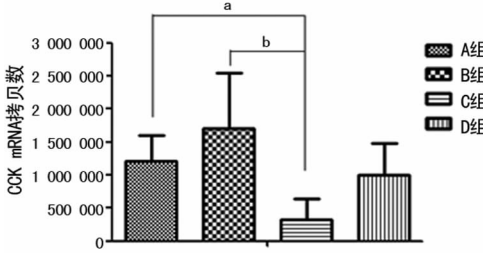
图 2 CCK mRNA 荧光定量 PCR 标准曲线



a: q=5.242, P<0.05; b: q=4.671, P<0.05; CGRP: 降钙素基因相关肽。

图 3 各组大鼠中脑 CGRP mRNA 表达比较

**2.3 各组大鼠中脑 CCK mRNA 的表达** 各组大鼠中脑总 RNA(每 200 纳克)中 CCK mRNA 拷贝数(×10<sup>6</sup> copy)分别为: 对照组 1.21±0.38; B 组 1.71±0.83; C 组 0.32±0.31; D 组 1.00±0.48。B 组大鼠中脑 CCK 转录水平明显高于 C 组 (q=6.301, P<0.05); C 组大鼠中脑 CCK 转录水平明显低于 A 组 (q=4.035, P<0.05), 见图 4。



a: q=4.035, P<0.05; b: q=6.301, P<0.05; CCK: 缩胆囊肽。

图 4 各组大鼠中脑 CCK mRNA 表达比较

**3 讨 论**

流行病学调查显示: 全球患偏头痛的人口约占 14.7%<sup>[6]</sup>。由 Yu 等<sup>[7]</sup>牵头进行的流行病学调查显示我国偏头痛患病率约为 9.3%。目前临床上常用的偏头痛预防性治疗药物主要包括如下几类: 钙离子拮抗剂(氟桂利嗪)、β 受体阻滞剂(普萘洛尔)、抗癫痫药(丙戊酸、托吡酯)、抗抑郁药物(阿米替林)等<sup>[8]</sup>。然而, 上述药物长期应用可能出现的副作用及不良反应常常限制了这些药物的临床应用。

都梁软胶囊由白芷和川芎两味中药组成, 具有祛风散寒, 活血通络的功效, 临床用于偏头痛的治疗, 取得了较为满意的效果<sup>[9]</sup>。李伟仕等<sup>[10]</sup>应用都梁软胶囊对偏头痛进行预防性治疗, 发现都梁软胶囊疗效明显, 并且远期疗效仍可达到 64.71%。内源性痛觉调制系统对痛觉感受起着关键的调控作用, 都梁软胶囊对偏头痛的治疗是否影响到内源性痛觉调制系统的功能还不清楚。本研究在制备硝酸甘油型偏头痛大鼠模型之前, 连续给予都梁软胶囊 7 d, 观察都梁软胶囊对内源性痛觉调制系统的核心结构——中脑疼痛相关神经肽的影响, 进而探讨都梁软胶囊预防性治疗偏头痛的机制。

CGRP 是目前公认的与偏头痛关系最为密切的神经肽之

一。研究发现,偏头痛发作时颈外静脉血中 CGRP 的含量增加,但同一时刻肘静脉血中 CGRP 的含量并无明显变化,此现象提示偏头痛发作时颅内释放 CGRP 增加<sup>[11]</sup>。CGRP 在神经系统中具有增强突触传递的作用。动物实验发现,脊髓背角突触后神经元 AMPA 型谷氨酸受体与 CGRP 受体共表达,外源性给予 CGRP 预处理可以明显增加这些神经元对 AMPA 的放电频率,同时也发现 CGRP 拮抗剂 CGRP8-37 可以阻断这种反应<sup>[12]</sup>。当 CGRP 水平升高时,感觉传入信号可能被异常放大而超过疼痛的阈值,CGRP 起到传递和扩大痛觉信号的作用<sup>[13]</sup>。另外,CGRP 在中脑还可以减弱内源性阿片肽的镇痛效应<sup>[4]</sup>。本研究发现,都梁软胶囊预防性治疗的偏头痛大鼠中脑 CGRP mRNA 表达明显低于偏头痛组大鼠,说明都梁软胶囊预防性治疗可以抑制偏头痛发作时模型大鼠中脑 CGRP 的基因表达,这样一方面可以减弱 CGRP 对痛觉信息的传递作用;另一方面可以抵抗 CGRP 对阿片肽镇痛作用的抑制效应。

脑中与痛觉调制相关的脑区均有 CCK 存在,动物实验发现在神经损伤后及摄入阿片后 CCK 水平都会上升,提示 CCK 是阿片拮抗剂,当 CCK 水平升高时,阿片所诱发的镇痛作用便大大减弱了,但若同时使用 CCK 拮抗剂,则阿片的镇痛作用增强<sup>[4]</sup>。因此,目前认为 CCK 在内源性痛觉调制系统中的作用主要是拮抗阿片镇痛<sup>[4,14]</sup>。本研究显示都梁软胶囊对对照组大鼠中脑 CCK mRNA 拷贝数明显低于对照组和偏头痛组,说明都梁软胶囊可以抑制大鼠中脑 CCK 的基因表达,都梁软胶囊下调 CCK 的表达会减弱 CCK 对阿片镇痛的拮抗作用,从而,一定程度上增强了内源性阿片肽的镇痛效应。但研究结果并未发现都梁软胶囊治疗组大鼠中脑 CCK 基因表达与对照组及偏头痛组有显著性差异,说明大鼠偏头痛发作时中脑 CCK 基因表达并未发生明显的下调,考虑与偏头痛病理生理过程复杂有关,同时也提示都梁软胶囊镇痛机制可能与其调节 CCK 的表达无直接关系。

## 参考文献

- [1] Schulte LH, May A. Headache research in 2014: advancing migraine therapy[J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(1): 6-7.
- [2] 马保成,武凯歌,谢伟彬. 都梁软胶囊治疗偏头痛的 Meta 分析[J]. *中医学报*, 2014, 29(4): 612-614.
- [3] Yao G, Man Y, Luo X, et al. Rizatriptan benzoate influ-

ences the endogenous pain modulatory system in a rat model of migraine [J]. *Neural Regeneration Research*, 2012, 7(2): 131-135.

- [4] 谢启文. 神经肽[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2004: 29-75.
- [5] Yao G, Man Y, Qi J, et al. Effects of toutongning capsule on enkephalin in a rat migraine headache model[J]. *Neural Regeneration Res*, 2011, 6(9): 661-665.
- [6] Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2163-2196.
- [7] 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.
- [8] 中华医学会疼痛学分会头痛学组. 中国偏头痛诊疗指南[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2011, 17(2): 65-86.
- [9] 郭冉冉,周廷惠,徐李,等. 都梁软胶囊治疗头痛的药理机制及临床疗效[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(2): 48-49.
- [10] 李伟仕,黄志勇,吴修信. 都梁软胶囊预防性治疗偏头痛的临床疗效观察[J]. *中国医药指南*, 2010, 8(9): 12-14.
- [11] Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache [J]. *Ann Neurol*, 1990, 28(2): 183-187.
- [12] Gu XL, Yu LC. The colocalization of CGRP receptor and AMPA receptor in the spinal dorsal Horn neuron of rat: A morphological and electrophysiological study[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 414(3): 237-241.
- [13] Raddant AC, Russo AF. Calcitonin gene-related peptide in migraine: intersection of peripheral inflammation and central modulation[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2011, 13: e36.
- [14] Yao G, Han X, Hao T, et al. Effects of rizatriptan on the expression of calcitonin gene-related peptide and cholecystokinin in the periaqueductal gray of a rat migraine model[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 587(1): 29-34.

(收稿日期: 2016-02-15 修回日期: 2016-04-06)

(上接第 3759 页)

- [9] Xu WL, Tayerjiang JL, Zhao XB, et al. Study of optimal scheme of spinal image-guided radiotherapy based on expression of caspase-3 in spinal cord neurons by orthogonal design[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 3223-3233.
- [10] 江仁兵,徐万龙,锡林宝勒日,等. 经皮椎体成形术治疗对 83 例胸腰椎转移瘤的疗效分析[J]. *重庆医学*, 2010, 39(23): 3231-3232, 3235.
- [11] Xu W, Zhao X, Wang Q, et al. Three-dimensional conformal intensity-modulated radiation therapy of left femur foci does not damage the sciatic nerve[J]. *Neural Regeneration Research*, 2014, 9(20): 1824-1829.
- [12] 徐万龙,锡林宝勒日,白靖平. 犬脊柱放疗对脊髓血管形态及血流量的影响[J]. *重庆医学*, 2010, 39(23): 3168-3169.
- [13] Paronetto MP, Bernardis I, Volpe E, et al. Regulation of

FAS exon definition and apoptosis by the Ewing sarcoma protein[J]. *Cell Rep*, 2014, 7(4): 1211-1226.

- [14] Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, et al. Valproic acid cooperates with hydralazine to augment the susceptibility of human osteosarcoma cells to Fas- and NK cell-mediated cell death[J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(1): 83-91.
- [15] Yang SJ, Lee SA, Park MG, et al. Induction of apoptosis by diphenyldifluoroketone in osteogenic sarcoma cells is associated with activation of caspases [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(5): 2286-2292.
- [16] 赵意华,陈清汉,华海婴,等. 氯化锂对人骨肉瘤细胞 U2-OS 增殖、凋亡及 Fas、Caspase-3mRNA 表达的影响[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2012, 47(4): 502-505.

(收稿日期: 2016-02-10 修回日期: 2016-04-06)