

祛风清热定痛方对偏头痛大鼠镇痛效应及神经递质含量的影响

李磊 司宁宁 杨宾 李瑞杰 张效科

【摘要】 目的 通过动物实验研究祛风清热定痛方的镇痛作用,并探讨其治疗偏头痛的作用机制。**方法** 将大鼠随机分为空白组、模型组、正天丸组、祛风清热定痛方大、小剂量组,每组 8 只,连续给药 7 天,通过热板法观察祛风清热定痛方的镇痛作用。硝酸甘油制备偏头痛大鼠模型,ELISA 法检测各组大鼠脑组织中去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)、多巴胺(dopamine,DA)及 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)含量,以 $P<0.05$ 作为具有统计学意义的界限。**结果** (1)与模型组相比,祛风清热定痛方的大剂量组自 60 分钟开始显著地提高了大鼠给药后的痛阈值($P<0.01$);祛风清热定痛方小剂量组、正天丸组在 120 分钟时提高了大鼠给药后的痛阈值($P<0.05$)。(2)与模型组相比,祛风清热定痛方大剂量组、正天丸组大鼠脑组织 NE、DA、5-HT 含量均显著升高($P<0.01$);与正天丸组比较,祛风清热定痛方大剂量组有显著性差异($P<0.05$)。**结论** 祛风清热定痛方具有明显的镇痛的作用,其治疗偏头痛的作用机制可能是通过调节 NE、DA、5-HT 的释放而实现的。

【关键词】 偏头痛; 祛风清热定痛方; 多巴胺; 去甲肾上腺素; 5-羟色胺

【中图分类号】 R277.7 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.02.004

Observation of Qufeng Qingre Dingtong decoction on analgesia effects and the content of NE, DA, 5-HT in migraine rats LI lei, SI Ning-ning, YANG Bin, et al. Department of ICU, Xinle City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hebei 050700, China

Corresponding author: LI Rui-jie, E-mail: xinleliruijie@163.com

【Abstract】 Objective The analgesic effect of Qufeng Qingre Dingtong decoction was studied through the animal experiment research, and its mechanism of action was explored. **Methods** Rats were

基金项目:河北省中医药管理局中医药立项资助课题(2011141)

作者单位:050700 河北省新乐市中医医院重症医学科(李磊、李瑞杰、杨宾);河北省滦平县中医院内科(司宁宁);陕西中医药大学第一临床学院(张效科)

作者简介:李磊(1981-),本科,主治医师。研究方向:重症医学、急诊临床研究。E-mail:hebeilrj@163.com

通讯作者:李瑞杰(1979-),硕士,主治医师。研究方向:中西医结合治疗脑血管病研究。E-mail:xinleliruijie@163.com

randomly divided into blank group, model group, Zhengtian Pill group, *Qufeng Qingre Dingtong* high and small dose groups, 8 rats in each group. Analgesic effect of *Qufeng Qingre Dingtong* decoction was observed by the hot plate method after continuous drug administration for 7 days. Migraine rat model was prepared by nitroglycerin. ELISA method was used to detect NE, DA and 5-HT contents in brain tissue. It was considered to be statistically significant when the value of P was less than 0.05. **Results** (1) Compared with the model group, *Qufeng Qingre Dingtong* high-dose group could significantly improve pain threshold from 60 min after the administration of drugs ($P < 0.01$), *Qufeng Qingre Dingtong* low-dose group, Zhengtian pill group improved pain threshold from 120 min after administration ($P < 0.05$). (2) Compared with the model group, NE, DA, 5-HT contents in brain tissue were very significantly increased in *Qufeng Qingre Dingtong* high dose group and Zhengtian Pill group ($P < 0.01$). Compared with Zhengtian Pill group, *Qufeng Qingre Dingtong* high dose group had significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** *Qufeng Qingre Dingtong* decoction has obvious analgesic effect and its mechanism in the treatment of migraine might achieve by regulating NE, DA and 5-HT release.

【Key words】 Migraine; *Qufeng Qingre Dingtong* decoction; Dopamine; Norepinephrine; 5-hydroxytryptamine

偏头痛是一种具有遗传性及复发性的头痛综合征,其发病机制至今未有统一的理论解释,目前多认为其发作与神经血管痛觉传导通路的活化及神经递质表达密切相关。偏头痛发作过程中始终存在单胺类神经递质如 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺(dopamine, DA)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)及血管活性物质如内皮素(endothelin, ET)、降钙素相关基因肽(calcitonin related gene peptide, CRRP)等含量异常^[1]。祛风清热定痛方治疗偏头痛临床疗效确切^[2-3]。为进一步明确其作用机制,本研究观察了祛风清热定痛方的镇痛效应及对硝酸甘油致偏头痛大鼠脑组织中 DA、NE、5-HT 含量的影响,探讨其治疗偏头痛作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠 60 只, SPF 级,雌雄各半,体质量(280 ± 20) g,由第四军医大学动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK(军)2009-005,饲养于陕西中医药大学中药药理学实验室。

1.2 药品及试剂

祛风清热定痛方(药物组成:川芎 20 g、白芍 10 g、柴胡 10 g、香附 10 g、白芷 12 g、地龙 10 g、藁本 9 g、薄荷 6 g、黄芩 10 g、羌活 8 g、甘草 6 g)水煎液,由陕西中医药大学中药药理研究室制备;正天丸(三九医药股份公司生产,国药准字:Z44020711,规格:6 g/袋);硝酸甘油注射液(四环药业股份有限公司生产,国药准字:H20057880,规格:5 mg/mL);

DA、NE、5-HT 酶联免疫试剂盒,由北京科美东雅生物技术有限公司提供。

1.3 仪器设备

冷热板痛觉测痛仪(上海玉研科学仪器有限公司生产);酶标仪(美国宝特公司生产);电子天平、美的中型机械微波炉、海尔超低温储存箱、温度计、秒表、手术器械、低温离心机、移液枪等实验器械,由陕西中医药大学中药药理实验室提供。

1.4 分组

按体质量随机分为空白组、模型组、正天丸组、祛风清热定痛方大、小剂量组,每组 8 只。各组互相隔离饲养,实验室温度维持在 $17 \sim 24^{\circ}\text{C}$,12 小时为一个光照周期,喂养颗粒型普通大鼠饲料,自来水为大鼠饮用水。

1.5 给药方法及剂量

正天丸按临床用药剂量用蒸馏水配制成 1.24 g/kg 的悬浊液;祛风清热定痛方按人体等效量用蒸馏水配制成大剂量(0.3 g/kg)、小剂量(0.15 g/kg)的悬浊液置冰箱冷藏备用。试验药物组均灌胃给药($1 \text{ mL}/100 \text{ g}$),空白组、模型组灌胃等体积的生理盐水,每天 1 次,连续给药 7 天。

1.6 观察指标及方法

(1)各组大鼠首先行基础痛阈值测定,考虑空白组与模型组均灌胃等体积氯化钠注射液,故除空白组外,其余各组首先进行基础痛阈值(0 分钟)测定,末次灌胃后于 30 分钟、60 分钟、120 分钟和 180 分钟检测大鼠的痛阈值。将大鼠放在(55 ± 5) $^{\circ}\text{C}$ 热板上,观察大鼠自足底接触热板出现舔足的潜伏期,大鼠出现添足后停止计时,这段时间视为大鼠

的痛阈值。60 秒定为痛阈的最高值,超过 60 秒,痛阈值则被记为 60 秒;如有跳跃、快速走动等逃避反应视为淘汰。

(2)痛阈值实验结束后,空白组腹部皮下等容积注射生理盐水,其余各组分别进行腹部皮下注射硝酸甘油注射剂 10 mg/kg,复制偏头痛动物模型,大鼠出现烦躁、挠头、拍脸、爬笼次数增多,提示造模成功。模型制备成功 4 小时后,各组大鼠用 10% 乌拉坦(1 mL/100 g)腹腔麻醉,断头处死,快速取脑,脑组织去除血迹,滤纸拭干,称重后将脑组织按每 100 mg 脑组织加入 1 mL 的生理盐水进行混合,用超声波细胞粉碎仪制成 10% (W/V) 的组织匀浆液,离心取上清液,并用 ELISA 法测定大鼠脑组织中 NE、DA、5-HT 的含量,其操作过程严格按照试剂盒说明书进行。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,统计数据经正态性检验,服从正态分布。组间比较行单因素方差分析,用最小显著法(LSD 法)进行两两比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 祛风清热定痛方对偏头痛模型大鼠痛阈值的影响

由表 1 可见,各组大鼠的基础痛阈值无明显差异($P>0.05$),经过 7 天药物灌胃治疗后,各组大鼠

的痛阈值出现了一定的差异。与模型组相比,祛风清热定痛方的大剂量组自 60 分钟开始显著地提高了大鼠给药后的痛阈值。祛风清热定痛方小剂量组、正天丸组只在 120 分钟时的痛阈值与模型组有统计学差异($P<0.05$)。

2.2 祛风清热定痛方对偏头痛模型大鼠神经递质的影响

由表可见,与空白组相比较,模型组 NE、DA、5-HT 含量明显降低($P<0.05$),提示造模成功。与模型组相比,祛风清热定痛方大剂量组、正天丸组 NE、DA、5-HT 的含量有显著性差异($P<0.01$),小剂量组有统计学差异($P<0.05$);与正天丸组比较,祛风清热定痛方大剂量组 NE、DA、5-HT 的含量有统计学差异($P<0.05$),小剂量组无统计学差异($P>0.05$)。

3 讨论

疼痛可由多种原因导致,对于药物镇痛研究分物理刺激法和化学刺激法,热板反应为高级中枢参与的物理刺激反应,可反应中枢镇痛作用,故选用了热板法研究祛风清热定痛方的镇痛作用。根据偏头痛发病的几种学说,本实验在考虑硝酸甘油诱发偏头痛动物模型造模简单、易成功、动物易于获得等因素且硝酸甘油能导致明显的中枢和周围血管扩张,从而在产生搏动性头痛的相似性基础上,选取了皮下注射硝酸甘油制备偏头痛大鼠模型。

表 1 祛风清热定痛方对大鼠痛阈值的影响($\bar{x}\pm s, s$)

组别	例数	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min
模型组	8	19.31±5.38	19.41±5.48	19.51±5.11	19.61±6.29	19.21±5.44
正天丸组	8	19.31±5.41	22.3±5.01	25.01±7.12	27.01±5.95 ^b	24.75±6.52 ^a
大剂量组	8	21.44±4.54	23.01±4.61	25.11±5.73 ^a	28.31±6.91 ^b	25.32±5.05 ^a
小剂量组	8	19.51±6.60	21.42±7.06	23.62±7.56	27.01±5.31 ^b	24.32±8.24

注:与模型组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$ 。

表 2 祛风清热定痛方对血浆 DA、NE、5-HT 含量的影响($\bar{x}\pm s, \text{ng/mL}$)

组别	例数	剂量(g/kg)	DA	NE	5-HT
空白组	8	—	530.32±99.32	50.08±9.22	259.51±98.10
模型组	8	—	370.42±128.38 ^a	28.10±11.35 ^a	107.28±55.70 ^a
正天丸组	8	1.24	437.59±129.04 ^b	42.14±11.26 ^b	179.75±89.8 ^b
大剂量组	8	0.6	510.12±118.26 ^{bd}	45.11±8.95 ^{bd}	190.90±75.41 ^{bd}
小剂量组	8	0.15	461.16±85.28 ^c	39.18±8.08 ^{ce}	144.95±66.34 ^{ce}

注:与空白组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.01$,^c $P<0.05$;与正天丸组相比,^d $P<0.05$,^e $P>0.05$ 。

目前研究认为 5-HT 代谢紊乱是偏头痛发病的核心^[4],循环血液中 5-HT 的异常与偏头痛的发病相关^[5]。多巴胺受体存在于三叉神经节及三叉神经脊束核,多巴胺通过刺激多巴胺受体抑制三叉颈复合体神经元的活化^[6],抑制三叉颈复合体上传至丘脑的疼痛信号传递,减轻疼痛感^[7]。研究还发现 DA 受体和 5-HT 受体共存于三叉颈复合体,这两种单胺类神经递质在一定条件下可相互作用,减少神经元放电。既往研究证实由于偏头痛患者血小板、淋巴细胞表面的多巴胺受体升高,导致 DA 生成 NE,引起颅内动脉收缩,造成脑血管痉挛缺血,引发偏头痛,脑血流减少,NE、DA 含量减少,又可使脑血管扩张,产生偏头痛^[8],而应用去甲肾上腺素可抑制灰质的皮层扩散抑制信号的播散,减轻头痛症状^[9]。单胺类神经递质耗竭能够诱发偏头痛发生,5-HT、DA、NE 降低,进而致血管过度扩张诱发头痛,NE、DA、5-HT 减少导致中枢性痛调制机制发生障碍,致使机体对痛觉更为敏感^[10]。因此,DA、NE、5-HT 是观察药物的治疗偏头痛的重要治疗靶标。

偏头痛在中医学中归属“头痛”的范畴,病机与风、火、痰、瘀、虚相关,各因素在发病中所占地位各家有不同的认识。在临床工作中笔者观察到本病得之初起多因感受风邪,加之失治、误治致邪气稽留经脉,或遇情志不畅致肝失疏泄、胆郁阻络,郁而不宣,化热化火,侵袭阳位,则清阳不升,浊阴不降,风热上扰,脑脉痹阻,头痛发作。复因感受风邪、情志所伤,饮食不当而触发,导致头痛经年不愈,据此可以认为偏头痛的病机特点多为风热上扰、脑脉痹阻,拟祛风清热定痛方在临床中治疗偏头痛效果显著。现代药理研究证实川芎嗪通过抑制组胺、5-HT 的合成、释放起到抗炎、止痛的作用^[11];白芍具有镇痛、镇静、抗炎等作用^[12];香附具有解热、镇痛等作用^[13];白芷的镇痛疗效显著,尤其在血管神经性头痛的中医药治疗中被广泛应用^[14];地龙有解热、镇静、镇痛、降压等作用^[15]。

本实验结果显示祛风清热定痛方大、小剂量、正天丸组均有镇痛作用,以大剂量组镇痛作用最强,且优于正天丸组,提示祛风清热定痛方具有一定的中枢镇痛作用。模型组大鼠应用硝酸甘油诱导使脑组织中 NE、DA、5-HT 的含量明显减少,从而导致脑血管过度舒张而产生偏头痛症状;祛风清热定痛方能显著增加脑组织内降低的 NE、DA、5-HT 含量,通过调节单胺类神经递质的表达,抑制神经

源性炎症反应,使之趋于生理状态下的平衡水平,起到镇痛作用,且祛风清热定痛方大剂量组优于正天丸组。

综上所述,祛风清热定痛方具有明显的镇痛作用,其治疗偏头痛的作用机制可能与通过调节 NE、DA、5-HT 的释放有关。

参 考 文 献

- [1] 刘建林,彭成,潘越,等. 元胡止痛胶囊对偏头痛模型大鼠的影响[J]. 中药药理与临床,2013,29(4):11-13.
- [2] 冀绪,李炜,李瑞杰,等. 清热祛风活血止痛法治疗偏头痛 50 例临床研究[J]. 河北中医,2013,35(1):16-20.
- [3] 李瑞杰,李辉. 加味散偏汤治疗偏头痛 50 例[J]. 江西中医药,2012,43(8):28-29.
- [4] Weiller C, May A, Limmroth V, et al. Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks [J]. Nature medicine, 1995,1(7):658.
- [5] Rutkowska M, Gliniak H. The influence of ACEA - a selective cannabinoid CBI receptor agonist on whole blood and platelet-poor plasma serotonin concentrations [J]. Pharraazie, 2009,64(9):598-601.
- [6] Charbit AR, Akerman S, Goadsby PJ. Comparison of the effects of central and peripheral dopamine receptor activation on evoked firing in the trigeminocervical complex [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009,331(2):752-763.
- [7] Richter F, Mikulik O, Ebersberger A, et al. Noradrenergic agonists and antagonists influence migration of cortical spreading depression in rat-a possible mechanism of migraine prophylaxis and prevention of post ischemic neuronal damage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005,25(9):1225-1235.
- [8] Gelfand AA, Goadsby PJ. A Neurologist's Guide to Acute Migraine Therapy in the Emergency Room [J]. Neurohospitalist, 2012,2(2):51-59.
- [9] Peroutka SJ. Dopamine and migraine [J]. Neurology,1997,49:650-656.
- [10] Cristina T, Rosaria G, Wang DC, et al. Nitroglycerin induces hyperalgesia in rat-a time-course study [J]. Eur J Pharmacol, 2003,464(2-3):159-162.
- [11] 范治云,罗红,刘玉兰,等. 川芎嗪的抗炎作用与组胺、5-羟色胺的关系 [J]. 中药新药与临床药理,2004,15(2):93.
- [12] 王本祥. 现代中药药理与临床 [M]. 天津:天津科技翻译出版公司,2000:490-493.
- [13] 沈映君. 中药药理学 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1997:111-112.
- [14] 徐术,胡晋红. 白芷的活性成分研究与临床应用进展 [J]. 中国药房,2005,6(6):467-468.
- [15] 林海鸥,苏孝共. 地龙的药理研究概要 [J]. 中国药业,2007,16(1):61-62.

(收稿日期:2015-07-08)

(本文编辑:韩虹娟)