

川芎、白芷提取物对大鼠偏头痛模型脑膜肥大细胞和血浆组胺的影响

徐武 曹月洲 史兆春 韦俊超 万琪

【摘要】 目的 探讨川芎、白芷提取物对大鼠偏头痛模型硬脑膜组织中肥大细胞及血浆组胺的影响,为都梁软胶囊治疗偏头痛提供实验依据。方法 实验分为三组:假手术组、偏头痛模型无干预组、偏头痛模型药物(川芎、白芷提取物)治疗组。电刺激三叉神经节建立偏头痛大鼠模型,镜下观察硬脑膜肥大细胞数量及脱颗粒现象。用酶联免疫吸附分析法(ELISA)测定大鼠血浆组胺含量。结果 偏头痛模型无干预组大鼠刺激侧硬脑膜高倍视野肥大细胞数、脱颗粒百分率及血浆组胺含量分别为(11.63±1.67), (29.10±9.39)%, (11.59±1.20)ng/ml,与假手术组(15.46±2.40), (14.09±4.53)%, (9.87±0.88)ng/ml相比,肥大细胞数下降,脱颗粒百分率及血浆组胺含量升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。药物治疗组大鼠刺激侧硬脑膜高倍视野肥大细胞数、脱颗粒百分率及血浆组胺含量分别为(15.14±2.01), (17.22±4.10)%, (10.00±0.81)ng/ml,与偏头痛模型无干预组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 川芎、白芷提取物能有效地抑制肥大细胞脱颗粒、释放组胺,减轻偏头痛大鼠硬脑膜炎症反应,从而有效地控制疼痛。

【关键词】 偏头痛; 肥大细胞; 组胺; 川芎; 白芷

doi:10.3969/j.issn.1009-6574.2010.03.003

Effects of ligustici chuanxiong and angelica dahurica extract on mast cells in dura mater and histamine in plasma in rat models of migraine XU Wu, CAO Yue-zhou, SHI Zhao-chun, et al. Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

【Abstract】 Objective To explore the effects of ligustici chuanxiong and angelica dahurica extract on mast cells in dura mater and histamine in plasma in rat models of migraine and to provide experimental basis for the treatment of migraine by using Du Liang Capsule (DLC). **Methods** 3 groups were included in this study, sham group, migraine model group without any treatment and migraine model group with ligustici chuanxiong and angelica dahurica extract treatment, and 8 rats were involved in each group. The rat models of migraine were constructed by unilateral electrical trigeminal ganglion stimulation (UETGS). Mast cells in dura mater were observed under a microscope and histamine levels in plasma were measured by ELISA. **Results** In migraine model group without any treatment, the number of mast cells was 11.63±1.67 per high magnification field, the percentage of degranulation of mast cells was (29.10±9.39)% in the dura mater on the stimulated side and the plasma level of histamine was 11.59±1.20 ng/ml. They were significantly different from those of sham group [(15.46±2.40)%, (14.09±4.53)%, (9.87±0.88) ng/ml] ($P < 0.05$). In migraine model group with ligustici chuanxiong and angelica dahurica extract treatment, the above indices were [(15.14±2.01)%, (17.22±4.10)%, 10.00±0.81 ng/ml] and were significantly different from those of migraine model group without any treatment ($P < 0.05$). **Conclusions** Ligustici chuanxiong and angelica dahurica extract can efficiently decrease the percentage of degranulation of mast cells in the dura mater and the plasma levels of histamine in rat models of migraine, and it has anti-inflammatory effects so that it can effectively treat migraine.

【Key words】 Migraine; Mast cell; Histamine; Ligustici chuanxiong; Angelica dahurica

偏头痛是一种常见发作性神经血管紊乱疾病,发病率高,病程长,严重影响人们的身心健康。目前普遍认为皮层扩散抑制是引起偏头痛先兆的主要病理生理机制,三叉神经血管系统的激活是偏头痛患者疼痛产生的关键环节,由三叉神经激活所致的脑

膜的神经源性炎症在偏头痛的疼痛产生和维持中起着重要的作用。近年研究还发现肥大细胞(mast cell)作为在脑膜上分布广泛的一种炎性细胞,其形态和功能改变影响着疼痛的发生与程度。

都梁软胶囊为纯中药制剂,主要由川芎、白芷组成,在长期的临床实践中,用于治疗偏头痛,有一定的疗效,但其作用机制尚不完全清楚。本实验对偏头痛大鼠模型给予川芎、白芷提取物,观察其脑膜肥大细胞的形态学变化,对大鼠血浆组胺(肥大细胞重

作者单位:210029 南京医科大学第一附属医院神经内科(徐武、曹月洲、史兆春、韦俊超、万琪);扬州大学医学院附属泰兴人民医院(徐武)

通讯作者:万琪 Email:qi_wan@126.com

要的炎性介质)含量进行检测,进而探讨都梁软胶囊治疗偏头痛的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 清洁级SD雄性大鼠24只,体重250~300g,随机分成3组:假手术组;偏头痛模型无干预组;偏头痛模型川芎、白芷提取物治疗组。每组8只。均由南京医科大学实验动物中心提供。

1.2 试剂与仪器 川芎、白芷提取物(重庆华森制药有限公司);甲苯胺蓝(上海试剂三厂);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);组胺酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(美国R&D公司);Nikon 50i光学显微镜;LZ-6台钻车(上海老港新兴医疗器械厂);单臂脑立体定位仪(STOELTING);YLS-9A生理药理电子刺激仪(山东省医学科学院设备站)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠偏头痛模型的建立 参考沈飞飞等^[1]的方法,将大鼠以10%水合氯醛(0.3~0.35 ml/100 g)腹腔注射进行麻醉后,将大鼠固定在立体定位仪上,门齿固定插设在正中处,头正中中部去毛,皮肤消毒,头顶正中切口,逐层切开皮肤、肌肉,于脑矢状缝中部开口暴露颅盖骨。在前囟后移3.2~3.4 mm(根据动物大小可变动),旁开2.8~3.2 mm处,用0.8 mm牙科钻插孔,然后将电极插入三叉神经节(以硬脑膜算起深度为9.3 mm左右),术中持续麻醉。所有操作均在无菌条件下进行。调试好刺激电极,电刺激参数为周期200 ms,幅度10 V,波宽5 ms,刺激30 min,电流强度为0.5~1.0 mA。

1.3.2 药物干预 川芎、白芷提取物用茶油配成药液备用。大鼠禁食17 h后称重,按体重灌胃给药。(1)假手术组:连续用等体积生理盐水灌胃3 d,每天1次,末次给药60 min后,插入电极不给电刺激;(2)偏头痛模型无干预组:连续用等体积生理盐水灌胃3天,每天1次,末次给药60 min后,造模;(3)偏头痛模型药物治疗组:川芎、白芷提取物(原药6 g/kg)灌胃3 d,每天1次,末次给药60 min后,造模。

1.3.3 血浆组胺测定 假手术组插入电极30 min后、偏头痛模型无干预组和药物治疗组造模结束后即刻从颈静脉直接抽血0.5 ml,立刻置入含肝素的抗凝管中混匀,静置30 min后以3 000 r/min,离心10 min,留取血浆冻存于-20℃待测。大鼠血浆组胺含量用酶联免疫吸附法(ELISA)测定。

1.3.4 脑膜甲苯胺蓝染色 假手术组插入电极30 min后、偏头痛模型无干预组和药物治疗组造模结束后立即放血处死动物,取附着有硬脑膜的额颞顶部颅骨置于4%的多聚甲醛中固定2 h,小心剥离双侧硬脑膜,平铺于载玻片上,晾干,行甲苯胺蓝染色,

脱水、透明封固后于光镜下观察,摄片。染色后于高倍镜(400倍)下选择刺激侧脑膜动脉附近区域5个和疏松结缔组织区域5个,计数10个高倍视野中的肥大细胞总数和脱颗粒肥大细胞数,计算每个高倍视野中的平均细胞数和肥大细胞脱颗粒百分率。

1.4 统计学处理 所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示。将原始数据输入SPSS 11.0统计软件包,组间比较运用*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型动物大体表现 模型制备成功标志为:大鼠在电刺激过程中出现刺激侧咀嚼肌收缩,口鼻分泌物增多。

2.2 甲苯胺蓝染色肥大细胞的形态学观察 静止型肥大细胞在血管周围呈圆形或卵圆形(图1),在远离血管的疏松结缔组织呈长条形(图2),胞质中布满紫色圆形颗粒,着色较均匀,细胞边缘光滑完整,细胞表面无颗粒脱出;脱颗粒肥大细胞(图3)形状不规则,胞体增大,颗粒有脱出,着色较淡且不均匀,胞质中有空泡出现,细胞膜不完整。

2.3 三叉神经刺激侧硬脑膜肥大细胞及血浆组胺含量比较 偏头痛模型无干预组(图4)与假手术组(图5)相比较,其脑膜组织高倍视野肥大细胞数减少,脱颗粒百分率升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);偏头痛模型药物治疗组(图6)与无干预组相比其脑膜组织高倍视野肥大细胞数增多,脱颗粒百分率降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),与假手术组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

偏头痛模型无干预组与假手术组相比较,血浆组胺含量升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。偏头痛模型药物治疗组血浆组胺含量较无干预组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),与假手术组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

3 讨论

偏头痛的发病机制尚未完全阐明,但三叉神经血管反射学说是目前广为接受的一种学说。该学说认为偏头痛的发生是由于某种原因激活了脑血管周围的三叉神经末梢,三叉神经血管周围纤维释放血管活性肽如降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)、P物质(SP)、神经激肽A(NKA)等引起神经源性无菌性炎症,以脑膜血管扩张、血浆蛋白外渗、血小板活化及肥大细胞脱颗粒为特征。三叉神经的刺激逆行、顺行传导,逆行性传导加强神经源性炎症,而顺行性传导在脑干进入三叉神经脊束核尾部,冲动达到延脑化学感受器,引起恶心、呕吐,经丘脑传至大脑皮层,表现出疼痛^[2-4]。我们建立的电刺激大鼠三叉神经节的偏头痛模型,为

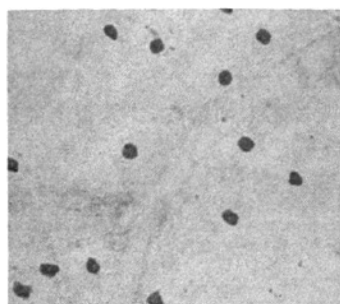


图1 静止型肥大细胞在血管周围呈圆形或卵圆形 光镜×400

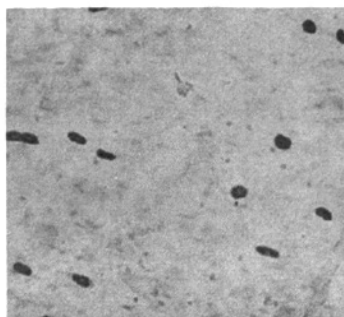


图2 静止型肥大细胞在远离血管的疏松结缔组织呈长条形 光镜×400

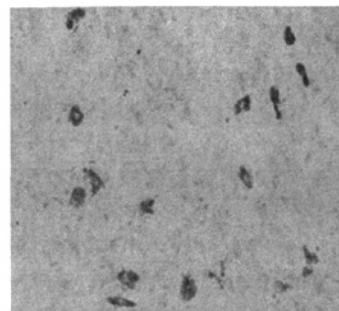


图3 脱颗粒肥大细胞形状不规则,胞体增大,颗粒有脱出,着色较淡且不均匀,胞质中有空泡出现,细胞膜不完整 光镜×400

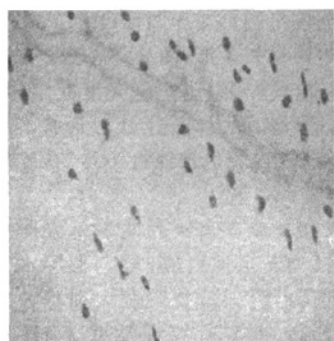


图4 偏头痛模型无干预组大鼠刺激侧硬脑膜,肥大细胞数减少,可见较多脱颗粒肥大细胞 光镜×200

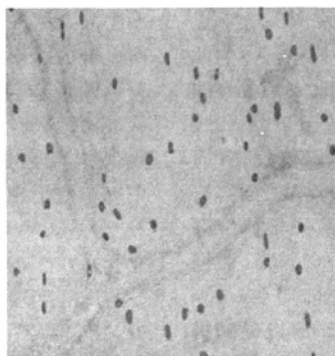


图5 假手术组大鼠插入电极侧硬脑膜,可见脱颗粒肥大细胞较少 光镜×200

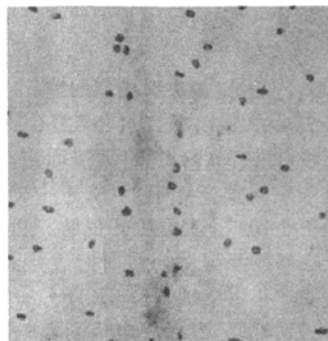


图6 偏头痛模型药物治疗组大鼠刺激侧硬脑膜,可见脱颗粒肥大细胞较少 光镜×200

表1 各组大鼠手术侧硬脑膜肥大细胞数、脱颗粒百分率及血浆组胺含量比较

组别	高倍视野肥大细胞数(n)	脱颗粒百分率(%)	血浆组胺含量(ng/ml)
假手术组	15.46±2.40	14.09±4.53	9.87±0.88
无干预组	11.63±1.67 ^a	29.10±9.39 ^a	11.59±1.20 ^a
治疗组	15.14±2.01 ^b	17.22±4.10 ^b	10.00±0.81 ^b

注:a:与假手术组比较, $P < 0.05$; b:与偏头痛模型无干预组比较, $P < 0.05$

研究脑膜的无菌性炎症提供了可能。肥大细胞作为在脑膜上分布广泛的一类炎性细胞,在偏头痛疼痛发生和维持过程中的作用逐渐引起人们的关注。

本实验证实在大鼠脑膜上存在大量的肥大细胞,主要分布在血管周围,其他部位也有散在分布。肥大细胞是一种重要的免疫炎性细胞,内含有大量颗粒,颗粒内含组胺、5-羟色胺、肝素、炎性细胞因子(如嗜酸性粒细胞趋化因子、肿瘤坏死因子、白细胞介素和集落刺激因子等)和各种蛋白酶,如类胰蛋白酶(tryptase)和类糜蛋白酶(chymase)。肥大细胞

可以通过免疫机制和多种非免疫机制被激活,然后发生脱颗粒,释放出颗粒内的介质。免疫机制主要是外来抗原结合其表面受体耦联的免疫球蛋白 IgE,引起胞内介质的级联释放,导致过敏反应;非免疫机制则包括各种神经肽(如 CGRP、SP)、神经生长因子、促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)和偏头痛促发剂硝酸甘油等^[5]。Ottosson 等^[6]和 Schwenger 等^[7]的实验证实感觉神经末梢释放的神经肽 CGRP 和 SP 能够直接促进硬脑膜 MC 释放组胺,而且这种作用能够被 CGRP 和 SP 的受体阻滞剂阻断。

偏头痛的最常见诱因急性应激会使肥大细胞激活,血浆组胺水平升高 3~4 倍^[8]。它的机制可能是急性应激机体促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)作用于三叉神经末梢的受体引起神经肽释放,间接作用于肥大细胞,或 CRF 直接作用于肥大细胞引起其激活脱颗粒,导致硬脑膜局部炎性反应的发生。越来越多的研究证实,肥大细胞释放的炎性介质如组胺、5-羟色胺、类胰蛋白酶等可引起硬脑膜的血管扩张,通透性增加,硬脑膜机械性感受器敏感性增

加,激活疼痛通路^[9-11]。

本实验通过电刺激大鼠三叉神经节建立偏头痛模型,观察到:偏头痛模型无干预组与假手术组相比,其脑膜组织肥大细胞数减少,脱颗粒百分率升高。这说明电刺激大鼠三叉神经节激活了肥大细胞,它可能是通过三叉神经末梢释放的 CGRP、P 物质等神经肽以非免疫机制作用于肥大细胞引起的,也可能是偏头痛的常见诱发因素应激使机体释放 CRF 引起的,导致肥大细胞脱颗粒,释放出大量炎性介质。我们的实验结果与 Dimitriadou 等^[12]的观察结果一致。偏头痛模型无干预组与假手术组相比较,血浆组胺含量升高,也间接说明了肥大细胞的激活,因为组胺是肥大细胞的重要炎性介质,血中组胺含量的变化可以反映肥大细胞激活与否^[13]。而且组胺可以引起血管扩张,血管通透性增高,是引起炎症反应的一种活性物质。早前的研究已经发现偏头痛病人的血浆组胺水平增高,静脉使用组胺在易感人群可以引起偏头痛样头痛发作,抗组胺药物可用作偏头痛的预防治疗^[14]。这些均说明肥大细胞和组胺在偏头痛的发生机制中具有一定的作用。

都梁软胶囊为纯中药制剂,主要由川芎、白芷组成。药理研究表明,川芎的活性成分有以藜本内酯、川芎内酯为主的苯酚类,以川芎嗪为代表的生物碱类,以阿魏酸为代表的有机酸类,具有保护血管内皮细胞,解除血管平滑肌痉挛,抑制血小板聚集及 5-HT、缓激肽等物质的释放,降低血液黏滞度,扩张脑血管,改善脑血流及神经系统功能等作用。白芷主要成分为香豆素类成分及挥发油,其中香豆素主要为小分子的欧前胡素、异欧前胡素和氧化前胡素等,具有镇痛作用,可缓解由平滑肌痉挛引起的疼痛,还有抗菌、抗炎和解热作用^[15]。

本实验中发现,偏头痛模型使用川芎、白芷提取物治疗组与无干预组相比,其脑膜组织高倍视野肥大细胞数增多,脱颗粒百分率降低,血浆组胺含量降低,说明川芎、白芷提取物能抑制偏头痛大鼠模型脑膜肥大细胞脱颗粒,减少组胺等炎性介质释放,从而减轻脑膜的无菌性炎症反应,降低脑膜机械敏感性感受器纤维的敏感性,达到预防和治疗偏头痛的效果。

致谢 本实验得到重庆华森医药有限公司科学基础基金的资助。

参 考 文 献

- [1] 沈飞飞,万琪,季燕,等. 电刺激三叉神经节诱导偏头痛大鼠脑膜非特异炎症[J]. 神经病学与神经康复学杂志,2009,6(1):47-51.
- [2] Pietrobon D, Striessnig J. Neurobiology of migraine[J]. Nature,2003,4(5):386-398.
- [3] Goadsby PJ. Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics[J]. Trends Mol Med, 2007,13(1):39-44.
- [4] Moskowitz MA. Pathophysiology of Headache: Past and Present[J]. Headache,2007,47(Sup 1):S58-S63.
- [5] Levy D. Meningeal Mast Cells, Inflammation and Migraine Pain [J]. Drug Development Research,2007,68(7):412-418.
- [6] Ottosson A, Edvinsson L. Release of histamine from dural mast cells by substance P and calcitonin gene-related peptide [J]. Cephalalgia,1997,17(3):166-174.
- [7] Schwenger N, Dux M, de Col R, et al. Interaction of calcitonin gene-related peptide, nitric oxide and histamine release in neurogenic blood flow and afferent activation in the rat cranial dura mater[J]. Cephalalgia,2007,27(6):481-491.
- [8] Theoharides TC, Donelan J, Kandere - Grzybowska K, et al. The role of mast cells in migraine pathophysiology[J]. Brain Res Brain Res Rev,2005,49(1):65-76.
- [9] Zhang X, Strassman AM, Burstein R, et al. Sensitization and activation of intracranial meningeal nociceptors by mast cell mediators [J]. J Pharmacol Exp Ther,2007,322(2):806-812.
- [10] Zhang XC, Levy D. Modulation of meningeal nociceptors mechanismsensitivity by peripheral proteinase-activated receptor-2: the role of mast cells[J]. Cephalalgia,2008,28(3):276-284.
- [11] Levy D, Burstein R, Kainz V, et al. Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache[J]. Pain, 2007,130(1):166-176.
- [12] Dimitriadou V, Buzzi MG, Moskowitz MA, et al. Trigeminal sensory fiber stimulation induces morphological changes reflecting secretion in rat dura mater mast cells[J]. Neuroscience, 1991,44(1):97-112.
- [13] 孙仁山. 肥大细胞脱颗粒的标志[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,2001,22(2):100-101.
- [14] Levy D, Burstein R, Strassman AM. Mast Cell Involvement in the Pathophysiology of Migraine Headache: A Hypothesis[J]. Headache,2006,46(Sup 1):S13-S18.
- [15] 梅学仁,许俊然,田义红,等. 都梁软胶囊治疗偏头痛药效学实验研究[J]. 中国医药导报,2006,3(36):157-159.

(收稿日期:2010-03-18)