

川芎、白芷萃取物下调大鼠硬脑膜 COX-2 及 PGE2 的表达

史兆春 徐武 万琪[△]

(南京医科大学附属第一医院神经内科 江苏南京 210029)

摘要 目的:观察川芎、白芷萃取物对实验性偏头痛大鼠模型 COX-2 及 PGE2 表达的影响,为都梁软胶囊治疗偏头痛提供实验依据。**方法:**48 只健康成年 Sprague-Dawley 大鼠随机平均分为 3 组(每组 16 只):阳性对照组(M 组)、空白对照组(CO 组)(生理盐水加 10%DMSO,1ml/100g 灌胃三天);实验组(CBM 组)(川芎白芷提取物,15mg/kg 灌胃三天)。除空白对照组外,各组电刺激三叉神经节 30min。刺激完毕取硬脑膜测定待测物质。免疫组化、蛋白质印迹(WB)法观察大鼠脑膜 COX-2 的表达,酶联免疫吸附法(Elisa)观察脑膜中 PGE2 含量的变化。**结果:**与 CO 组相比, M 组、CBM 组的脑膜 COX-2 蛋白表达、阳性颗粒数和 PGE2 含量显著增加($p < 0.05$)。与 M 组相比, CBM 组 COX-2 蛋白表达、阳性颗粒数及 PGE2 的含量显著降低($p < 0.05$)。**结论:**川芎、白芷萃取物可以抑制脑膜中 COX-2、PGE2 表达,推测这可能是川芎白芷控制偏头痛急性发作的重要机制之一。

关键词:实验性偏头痛动物模型; 脑膜无菌性炎症; 环氧合酶 2; 前列腺素 E2

中图分类号:Q95-3, R747.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2010)12-2215-05

Effect of Extract of Angelica and Chuanxiong on Expression of Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 in Cerebral Meninges of Rats

SHI Zhao-chun, XU Wu, WAN Qi[△]

(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract Objective:To study the regulation of COX-2 protein expression and PGE2 concentrations by extract from chuanxiong and baizhi in an animal model of migraine and to provide experimental basis for the treatment of migraine by using Du Liang Capsule(DLC). **Methods:**48 healthy adult Sprague-Dawley rats were randomly allocated equally to 3 groups (n = 16 each group): positive control group (group M) and normal control group (group CO) (they were received the intragastric administration of 1 ml/100g NS and DMSO for three days); experimental group (group CBM) (they was respectively received the intragastric administration of chuanxiong and baizhi extract 15 mg/kg for three days). Except group CO, all rats were received electrical stimulation on the trigeminal ganglion for 30 min. After sacrificed, COX-2 was evaluated by western blot and immunohistochemistry, PGE2 was observed by ELISA. **Results:**Compared to group CO, the expression of COX-2, and release of PGE2 from the dura mater were extremely enhanced ($P < 0.05$) in group M and CBM. In contrast to group M, the expression of COX-2 and PGE2 was significantly down-regulated in group CBM ($P < 0.05$). **Conclusion:** Regulation of COX-2 and PGE2 in the meningeal blood vessels was assumed to be related with analgesic effect of chuanxiong and baizhi.

Keywords: Neurogenic Inflammation; Meninges; Cyclooxygenase-2; Prostaglandin E2

Chinese Library Classification(CLC):Q95-3, 747.2 **Migraine Document code:**A

Article ID:1673-6273(2010)12-2215-05

前言

偏头痛是反复发作的一种搏动性头痛,患病率高,发作前常有闪光、视物模糊、肢体麻木等先兆,同时可伴有神经、精神功能障碍。偏头痛具有如下特点:(1)患病率高,流行病学调查显示:美国偏头痛患病率为 12%^[1]。2010 年初中国原发性头痛流行病学调查数据显示:在 18-65 岁人都中,原发性偏头痛发病率为 23.8%,其中偏头痛发生率为 9.3%,偏头痛患者人均治疗费

用为 728 元/年。(2)偏头痛给患者带来极大痛苦,导致工作效率降低、生活质量下降、药物滥用、消耗大量医疗资源等,不仅如此,严重频繁偏头痛还同卒中、焦虑抑郁等疾病相关,已成为一个严重的公共卫生问题。目前,偏头痛缺乏有效的预防和治疗措施,对人类健康的威胁将日趋严重。因此,预防和治疗偏头痛已成为刻不容缓的重大研究课题。偏头痛发病机制尚未完全阐明,以三叉神经血管学说得到更多的公认,该学说中以硬脑膜上感觉神经元释放的神经肽及其所介导的神经源性炎症为偏

作者简介 史兆春(1985-),女,硕士研究生,主要从事偏头痛的基础及临床研究。

E-mail:290694748@qq.com

[△]通讯作者 万琪,E-mail:qi_wan@126.com

(收稿日期:2010-04-05 接受日期:2010-04-30)

头痛的病理生理基础。PG,尤其是 PGE2 是偏头痛发作时重要的炎性介质,COX-2 是合成 PGE2 重要限速酶之一。越来越多的研究证实 PGE2 在炎症痛中枢敏化过程中发挥重要作用,临床上 COX-2 抑制剂也已试用于偏头痛的治疗^[2]。近年来,国内外偏头痛硬脑膜神经炎症的研究日趋丰富,但对 COX-2 及 PGE2 在硬脑膜上表达的研究较少,尤其缺乏对硬脑膜上 COX-2 的研究。

川芎、白芷均为祛风止痛之药。通过现代技术萃取到的挥发油具有镇痛消炎作用,两药配伍合剂——都梁软胶囊能有效降低偏头痛的发作次数、疼痛持续时间及疼痛程度,而不良反应轻微,安全性高^[3]。但是其作用机制并不清楚,尤其对硬脑膜上神经源性炎症的研究目前国内尚是空白。因此,本研究拟通过电刺激三叉神经节制备偏头痛大鼠模型,观察硬脑膜炎性介质 COX-2、PGE2 的表达变化,探讨川芎白芷提取物对 COX-2、PGE2 表达的影响,为中药有效成分的进一步研究和开发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药物 白芷(四川产,干燥根)、川芎(四川产,干燥根茎)两药 4:1 混合,以超临界流体(SFE2CO2)法萃取两药挥发油,将挥发油(主要含萜类、内酯类醇类、饱和烃类、不饱和烃类和酯等)与浸膏(剩下的药渣水煎)混合而得提取液(重庆华森制药有限公司提供),浓度为 6.14g/ml(每毫升提取液中所含生药克数)。

1.1.2 动物 健康 SD 雄性大鼠,体重 270± 20g,清洁级,南京医科大学实验动物中心提供。

1.1.3 试剂 兔抗 COX-2 多抗(美国 Santa Cruz 公司);单克隆抗 β-actin(北京博奥森生物科技公司);大鼠前列腺素 E2 酶联免疫试剂盒(美国 R&D 公司);其余化学试剂均为国产分析纯。

1.1.4 仪器 LZ26 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(山东医药科学院设备站);荧光显微镜(江苏捷达 OLYMPUS BX51)

1.2 方法

1.2.1 分组、造模、给药 48 只健康成年 Sprague-Dawley 大鼠随机平均分为 3 组(每组 16 只):模型组、空白对照组(生理盐水加 10%DMSO,1ml/100g 灌胃);模型给药组(川芎白芷提取物 15g/kg 灌胃(有效镇痛剂量^[4])).除空白对照组外,各组电刺激三叉神经节 30min(详见表 1)。

表 1 实验操作流程

Table1 The operated procedure of experiments

Groups for experimental rats (n=16)	administration	Migraniemodels	Western Blot	immunohistochemistry	ELISA
Group M	×	▲	▲	▲	▲
Group Co	×	×	▲	▲	▲
Group CBM	▲	▲	▲	▲	▲

NOTE:15g (active compound)/kg/day in CBM group, prepared into well-distributed suspension for intragastric administration with 10%DMSO; 10% DMSO+sterile physiological saline with equivalence for intragastric administration; 10:00 in the morning for three days. Animals were sacrificed three days later for western blot, immunohistochemistry on COX-2.

1.2.2 偏头痛大鼠模型建立 参考 Knyihar-Csillik 等^[5]电刺激三叉神经节法成功建立偏头痛大鼠模型。将大鼠以 10%水合氯醛(0.3ml/100g)腹腔注射进行麻醉,麻醉成功后将大鼠固定在立体定位仪上,门齿固定插在正中处,头正中部去毛后皮肤消毒,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 3mm,右旁开 3mm 处,用 0.8mm 牙科钻钻孔,将电极从钻孔处垂直插入三叉神经节(以硬脑膜算起深度为 9.5mm)。行为学表现为刺激侧大鼠咀嚼肌收缩,口鼻分泌物增多。电极刺激参数为周期 200ms,幅度 10v,波宽 5ms。刺激时间为 30 分钟。

1.2.3 大鼠脑膜 COX-2 免疫荧光染色 每组随机取 8 只 4%多聚甲醛灌注固定,取刺激侧硬脑膜,置于 24 孔板中,用含 0.1% Triton-x-100 的 PBS(PBST)洗三次,加封闭血清封闭 1h(室温),加一抗(封闭稀释),-4℃ 过夜,PBST 洗三次,加二抗,室温 2h,铺片,用 PBST 洗三次,风干,封片,荧光显微镜下观察硬脑膜中 COX-2 样免疫反应阳性细胞数的变化。以大鼠硬脑膜中动脉作为主要观察部位,在形态学分析软件上计数免疫阳性细胞数。

1.2.4 大鼠脑膜组织处理 造模完成,每组随机取 8 只,暴露心

脏,经左心室插管至主动脉,夹住降主动脉弓,分离右心耳,0.9%生理盐水冲洗(压力为 100mmH2O),至流出水无色后,断头并从颅骨上分离大鼠脑膜,迅速置入液氮中保存备用。

1.2.5 Western 印迹法(Western blot) 取出备用的硬脑膜,自液氮中取出脑膜组织,用冰生理盐水洗净,滤纸吸干水分,称重等分,每等分加裂解液,置于冰上,匀浆(800 rpm, 30 stroke, 7 次),未溶解物质后置离心机(13 000rpm 20min 4℃)。取 1/2 上清测每等分样品的蛋白浓度,取 10ug 蛋白与上样缓冲液混合,煮沸 5min,置于 SDS 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移到 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 1h,加用 PBS+0.1%吐温 -20 稀释的一抗和单克隆抗 β-actin,洗膜,加二抗孵育 1h(抗兔 IgG 抗体),再次洗膜,显影,Gelpro 软件分析可视带的密度。

1.2.6 酶联免疫吸附实验(ELISA) 另一半匀浆液在 4℃ 用于 PGE2 的检测。实验步骤按照 ELISA 试剂盒说明严格操作,其敏感度为 20-400pg / ml。严格按照试剂盒中说明书上的操作步骤进行测定。

1.2.7 数据分析 所有数据采用均数± 标准差($\bar{X} \pm S$)表示。采用 SPSS 11.0 统计学软件进行分析。采用重复测量方差分析对数据进行统计学处理。以 P<0.05 作为判断差异显著性的标准。

2 结果

2.1 电刺激对 COX-2 蛋白表达的影响

结果显示,空白对照组大鼠硬脑膜中有一定的 COX-2 蛋白表达。造模后,模型组中大鼠硬脑膜中 COX-2 蛋白含量显

著增多,从 19.5 ± 9.2 升至 359.2 ± 21.9 ($P < 0.05$ vs 空白对照组);而在模型给药组,大鼠硬脑膜 COX-2 蛋白含量表达显著减少从 359.2 ± 21.9 降至 96 ± 15.5 ($P < 0.05$ vs 模型组);但在模型给药组,大鼠硬脑膜 COX-2 蛋白表达仍然高于空白对照组,由 19.5 ± 9.2 升至 96 ± 15.5 ($P < 0.05$ vs 空白对照组)(图 2)。

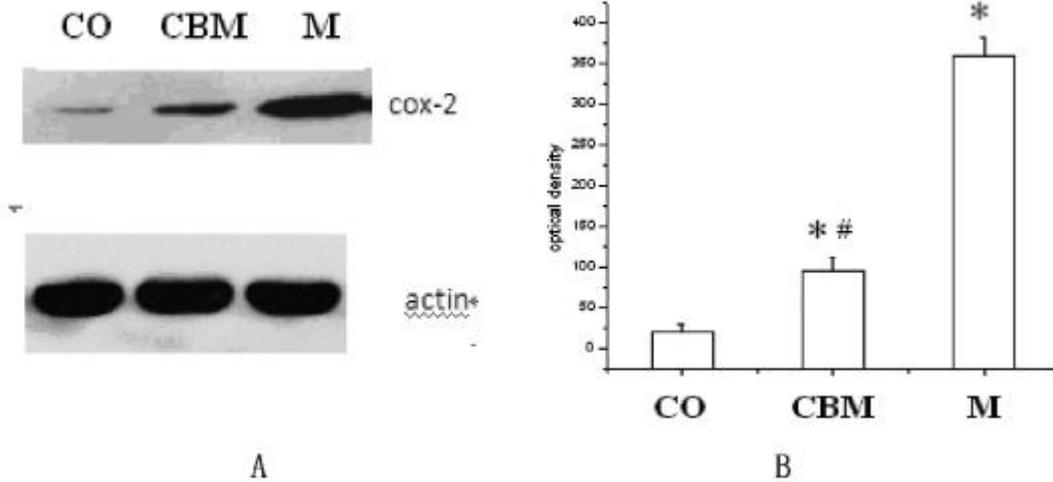


图 1 电刺激三叉神经节后三组大鼠硬脑膜 COX-2 蛋白含量的变化

Fig 1 The change of COX-2 protein expression in the the dura mater after electrical stimulation.

Note: * $p < 0.05$ CBM,M group compared to control group, # $p < 0.05$ CBM Group compared to M group.

2.2 电刺激后大鼠硬脑膜 COX-2 蛋白免疫阳性细胞的变化

结果显示,空白对照组大鼠硬脑膜中有 COX-2 免疫阳性细胞的表达,且表达水平相对稳定。造模后,模型组中大鼠硬脑膜中 COX-2 免疫组化阳性细胞数显著增多,由空白对照组的 42 ± 18.4 升至 139 ± 20.5 ($P < 0.05$ vs 空白对照组);而在模型给

药组,大鼠硬脑膜 COX-2 免疫阳性细胞数显著减少,由模型组 139 ± 20.5 降至 75.33 ± 10.5 ($P < 0.05$ vs 模型组);但在模型给药组,大鼠硬脑膜 COX-2 免疫阳性细胞数(75.33 ± 10.5)仍然高于空白对照组 (42 ± 18.4) ($P < 0.05$ vs 空白对照组)。结果与 Western Blot 结果一致。

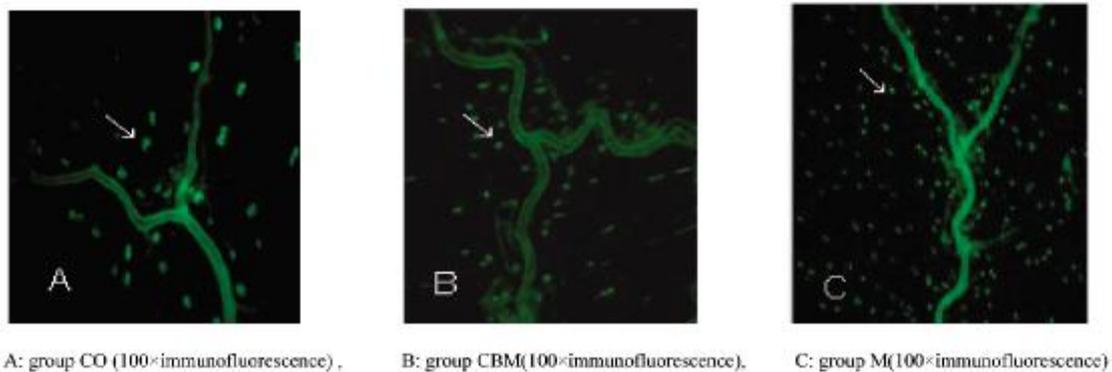


图 2 大鼠脑膜 COX-2 免疫组化(100×)

Fig2 COX-2 Immunohistochemistry in the dura mater of rat(100×)

2.3 电刺激对硬脑膜中 PGE2 的影响

结果显示,空白对照组大鼠硬脑膜中有一定的 PGE2。造模后,模型组中大鼠硬脑膜中 PGE2 含量显著增多,从 80.7 ± 10.6 升至 382.3 ± 20.9 ($P < 0.05$ vs 空白对照组);而在模型给药

组,大鼠硬脑膜 PGE2 含量显著减少. 从 382.3 ± 20.9 降至 149.3 ± 16.71 ($P < 0.05$ vs 模型组);但在模型给药组,大鼠硬脑膜 PGE2 含量仍然高于空白对照组由 80.7 ± 10.6 升至 149.3 ± 16.71 ($P < 0.05$ vs 空白对照组)。

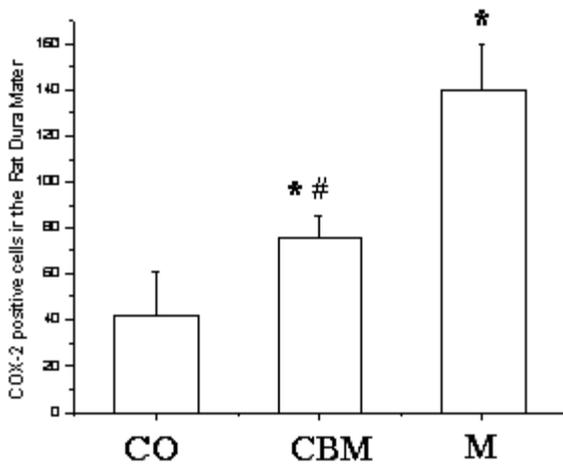


图3 各组硬脑膜中 cox-2 阳性细胞数

Fig3 OX-2 positive cells in the Rat Dura Mater

Note: *p<0.05 CBM,M group compared to control group, # p<0.05 CBM Group compared to M group.

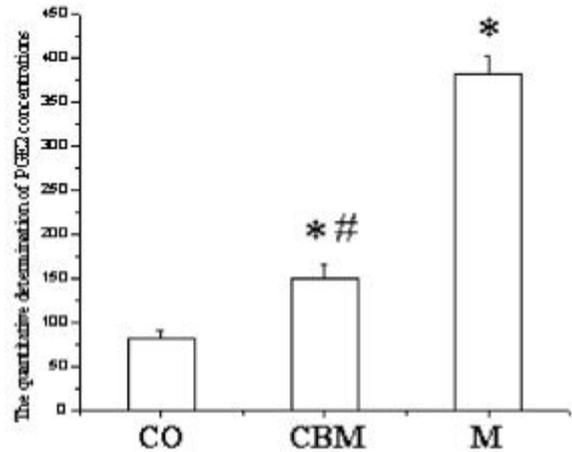


图4 PGE2 在脑膜中的含量

Fig4 The quantitative determination of PGE2 concentrations in dura mater

Note: *p<0.05 CBM,M group compared to control group, # p<0.05 CBM Group compared to M group.

3 讨论

本研究结果显示电刺激成年雄性大鼠三叉神经节,能导致脑膜炎性物质 COX-2 释放,PGE2 表达增高,产生脑膜神经源性炎症。CBM 能减少 COX-2、PGE2 的表达,减轻脑膜神经源性炎症。这提供了一个在体动物实验证据,CBM 通过减少脑膜炎症介质,减轻脑膜神经源性炎症,进而改善偏头痛症状。

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:模型组与空白对照组相比,脑膜组织炎症介质 COX-2 表达明显增高。这说明电刺激大鼠三叉神经节激活了炎症物质,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,引起肥大细胞脱颗粒,释放出大量炎性介质。我们的实验结果与 Schwengerl^[6]观察结果一致。

COX-2 的调节在偏头痛的病理生理过程及急性治疗中,起到很重要的作用,非选择性 COX 抑制剂,如乙酰水杨酸类^[7],罗非考昔(rofecoxib)对于控制有 / 无先兆的偏有疗效的^[8]。另外,帕瑞考昔(parcoxib)可以显著减少实验性偏头痛大鼠硬脑膜的血浆蛋白外渗,减弱电刺激大鼠三叉神经节模型中三叉神经尾核 I、II 层的 c-fos 表达^[9]。目前越来越多的研究者将视线聚焦在抑制 COX-2 对偏头痛的治疗作用上,我们的实验也显示川芎白芷提取物可以有效的降低脑膜中 COX-2 的蛋白表达。

模型组与空白对照组相比较,脑膜中 PGE-2 含量也明显升高。大鼠硬脑膜上,PGE2 完全是由神经纤维周围组织(如 Schwann 细胞、成纤维细胞、肥大细胞、平滑肌细胞)合成释放的。外周神经元几乎不释放 PG,电刺激三叉神经节后,CGRP 释放,聚集到一定浓度后,促使 PGE2 释放,阻滞神经肽的释放同样可以降低 PGE2 的释放^[10]。经典抗偏头痛药物阿司匹林就是通过抑制 PGE2 的生成发挥作用的。我们的实验结果显示川芎白芷提取物可以降低这种升高,这也可能是该药物治疗偏头痛

的机制之一。

总之,COX-2 和 PGE2 在脑膜神经源性炎症中发挥重要作用。

COX-2 是合成 PGE2 的限速酶之一。前列腺素类物质是 20 碳不饱和脂肪酸如花生四烯酸等的环氧产物,包括前列腺素和血栓素。当机体受多种因素刺激时,体内的多种细胞可以合成这些物质并迅速释放,以旁分泌或自分泌的方式作用于临近组织或外周组织来维持内环境的稳态。在所有的前列腺素类物质中,E 型前列腺素,特别是来自于花生四烯酸的 PGE2,广泛分布于大多数哺乳动物体内,通过其受体 EP(E-series of Prostaglandin Receptors)作用于外周循环系统引发充血和肿胀,在急性炎症中发挥着重要的生物学功能。

本实验中使用的刺激参数,主要引起 Aδ 和 C 类纤维产生动作电位(不兴奋 Aβ 类纤维,亦未见有报道证明脑膜上有此类纤维分布),产生血浆蛋白渗出、血管舒张、血管周围肥大细胞脱颗粒、内皮细胞粘附、血小板聚集等反应^[11]。偏头痛发病机制至今尚未完全阐明,而三叉神经系统的激活、中枢疼痛调节系统的功能异常在头痛的发生发展过程中起到重要作用。1940, Ray 和 Wolff 的实验显示,头痛的敏感化是由传入刺激引起的,电、化学、机械刺激都可以激活脑膜上的传入纤维和神经元,激活后这些在硬脑膜上密集分布的肽类感觉神经元(主要是 Aδ 和 C 类纤维),释放神经肽。1984 年 Moskowitz 提出“脑膜神经源性炎症”,伤害性刺激激活无髓鞘感觉神经元,外周神经末梢释放神经肽如 P 物质和降钙素基因相关肽(CGRP),发生神经源性炎症^[12]。电刺激三叉神经节,可以导致实验性的脑膜炎反应,它以水肿,高灌注,血小板、内皮细胞、肥大细胞的激活为特征^[13]。临床上发现,偏头痛患者急性发作的前几个小时里颈静脉血中的致炎因子 IL-1b, IL-6 和 TNF-a 升高,同时可溶性细胞粘附分子-1 也是升高的,这些都会诱导

COX-2 的生成。COX 在大鼠脑膜上存在两种亚型[14],COX-1 主要在中小血管周围表达,也和内皮细胞标记物弹性蛋白(vimentin)、一氧化氮合酶内皮亚型一起表达,大部分脑膜肥大细胞中也见到 COX-1;硬脑膜 COX-2 主要在单核巨噬细胞抗原-2(ED-2)阳性的驻留型巨噬细胞表达,也在一些轴突表达,如释放神经肽 CGRP 的纤维末梢。

近年来,对川芎、白芷有效成分的研究受到关注,通过超临界流体法萃取到的挥发油是川芎两药的主要成分之一,它具有镇痛消炎的作用。川芎白芷萃取物可以保护血管内皮细胞,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缓解由平滑肌痉挛引起的疼痛等作用。现代药理研究也表明,川芎的活性成分有以藁本内酯、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。二药伍用其药理作用更加广泛。本实验旨在探讨在有效抗炎镇痛剂量(15g/kg 灌胃)下,川芎白芷提取物治疗偏头痛的病理生理机制。研究结果表明,川芎白芷提取物可下调硬脑膜炎性介质的 COX-2、PGE2 的增加。故可以认为川芎白芷提取物控制偏头痛急性发作的病理生理机制,至少有部分是通过抑制硬脑膜上神经元或非神经元的 COX 活性、下调硬脑膜中 PGE2 的含量发挥作用的。但该提取物控制偏头痛急性发作的时间/剂量效应究竟如何,抑制 CGRP 的释放是否会影响提取物对 PGE2 的调节作用,有待于今后进一步探讨。

参考文献(Refereces)

- [1] Lipton R, Stewart W, Diamond S, et al. Prevalence and burden of migraine in the United States :data from the American Migraine Study[J].*Headache*,2001,41 (7) :646-57.
- [2] Sigrid S, Mandana T, Reuter U, et al. Effects of parecoxib on plasma protein extravasations and c-fos expression in the rat [J]. *Headache*, 2006; 46(2):276-85.
- [3] 汪健,罗兰,时文远,等。都梁软胶囊治疗偏头痛临床疗效及安全性观察[J].*中国中医急诊*,2009,18(9):1402
Wang Jian, Luo Lan, Shi Wen-yuan, et al. The observation of therapeutic effect and security on the therapy of Duliang capsule[J]. *Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine*,2009,18(9):1402-04. (In Chinese)
- [4] 邓虹珠,陈育尧,陈江华,等。都梁软胶囊的药效及毒性试验[J].*第一军医大学学报*,2002,22(6):561
Deng Hong-zhu, Chen Yu-yao, Chen Jiang-hua, et al. Tests of the pharmacodynamics and toxicity of Duliang capsule [J]. *J First Mil Med Univ*,2002,22(6):561-3. (In Chinese)
- [5] Knyiha E, Tajti J, Chadaide Z, et al. Functional immunohistochemistry of neuropeptides and nitric oxide synthase in the nerve fibers of the supratentorial dura mater in an experimental migraine model [J]. *Microsc Res Tech*,2001,53(3):193-211.
- [6] Schwenger N, Dux M, Coll 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): 481-91.
- [7] Vanessa K, Moshe J, Rami B, et al. Localization of COX-1 and COX-2 in the intracranial dura mater of the rat[J]. *Neuroscience Letters*,2009, 452(1):33-6.
- [8] Silberstein S, Goldstein J, Winner P, et al. Randomized, placebo-controlled trial of rofecoxin the acute treatment of migraine [J]. *Neurology*, 2004, 62:155(9):1552-7.
- [9] Zimmermann K, Reeh P, Averbeck B. S(+)-flurbiprofen but not 5-HT1 agonists suppress basal and stimulated CGRP and PGE2 release from isolated rat dura mater[J]. *Pain*, 2003,103(3):313-20.
- [10] Shimizu T, Toriumi H, Sato H, et al. Distribution and origin of TRPV1 receptor-containing nerve fibers in the dura mater of rat[J]. *Brain Res*, 2007, 1173:84-91.
- [11] D'Andrea G, Leon A. Pathogenesis of migraine: from neurotransmitters to neuromodulators and beyond [J]. *Neurol Sci*. 2010, 31 Suppl 1:S1-7.
- [12] Bolay H, Reuter U, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model [J]. *Nat Med*, 2002; 8(2):136-42.
- [13] Goadsby P, Charbit A, Andreou A. Neurobiology of migraine [J]. *Neuroscience*, 2009,161(2):327-41.
- [14] Sarchielli P, Alberti A, Baldi A, et al. Proinflammatory cytokines, adhesion molecules, and lymphocyte integrin expression in the internal jugular blood of migraine patients without aura assessed ictally[J]. *Headache*,2006, 46(2):200-7.