

电针对偏头痛大鼠内源性大麻素及其分解酶活性的调控作用研究

朱玉璞¹ 刘璐² 徐晓白² 曲正阳² 李志娟^{1,2} 李彬² 王麟鹏²

(1 北京中医药大学, 北京, 100029; 2 首都医科大学附属北京中医医院, 北京, 100010)

摘要 目的:研究电针对电刺激硬脑膜大鼠偏头痛内源性大麻素及其分解酶活性的调节作用。方法:成年雄性 SD 大鼠随机分为 4 组,对照组、模型组、单穴组和假穴组。实验第 9 天取大鼠颈静脉血清,用酶联免疫吸附测定测定 AEA、2-AG、MAGL、FAAH,结果:与模型组比较,单穴组 AEA 含量提高,差异有统计学意义($P < 0.05$),MAGL 含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与对照组比较,模型组 AEA 含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),MAGL 含量提高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与假穴组比较,单穴组 AEA 含量提高,差异有统计学意义($P < 0.05$),MAGL 含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);各组大鼠血清 FAAH 和 2-AG 含量无显著变化。结论:提示电针对偏头痛大鼠模型的内源性大麻素及其分解酶具有调节作用。

关键词 针刺;偏头痛;大鼠;炎症汤;内源性大麻素;分解酶

Regulation Effects of Electroacupuncture on Endogenous Cannabinoid and Its Catabolic Enzyme Activity in Migraine Rats

Zhu Yupu¹, Liu Lu², Xu Xiaobai², Qu Zhengyang², Li Zhijuan^{1,2}, Li Bin², Wang Linpeng²

(1 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010, China)

Abstract Objective: To study the regulation effects of electroacupuncture on endogenous cannabinoid and its catabolic enzyme activity in migraine rats. **Methods:** Adult male SD rats were randomly divided into 4 groups: control group, model group, single acupoint group and false acupoint group. Rat jugular vein serum was taken on the 9th day of the experiment, and AEA, 2-AG, MAGL, FAAH were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** Compared with the model group, the content of AEA in the single acupoint group was increased ($P < 0.05$) and the content of MAGL was decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the content of AEA in the model group decreased ($P < 0.05$), and the content of MAGL in the model group increased ($P < 0.05$). Compared with the sham acupoints group, the content of AEA in the single acupoint group was increased ($P < 0.05$) and the content of MAGL was decreased in the single acupoint group ($P < 0.05$). The content of FAAH and 2-AG in serum of rats in each group had no significant changes. **Conclusion:** It suggests that the endogenous cannabinoids and their degrading enzymes have a regulatory effect on the migraine rat model.

Key Words Electroacupuncture; Migraine; Rats; Endogenous cannabinoid; Enzyme

中图分类号: R245 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.07.040

偏头痛是一种病因不明、反复发作、致残性的神经功能紊乱疾病,发病时头部单侧搏动样中重度剧烈疼痛,同时伴有畏光畏声、恶心呕吐等症状^[1]。据 2017 年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)全球疾病负担调查^[2]显示,偏头痛的全球健康寿命损失年在所有疾病当中排名第 3,在神经系统疾病失能调整生命年中占比 13.1%,仅次于中

风。随着研究的进展,人们对偏头痛的认识正逐步加深,但是偏头痛的发病机制仍不明确,目前最为公认的学说是三叉神经血管学说。

大麻是广为人知的天然镇痛物质,18 世纪人们就已经将大麻作为治疗偏头痛的药物^[3]。现代研究表明内源性大麻素(Endocannabinoids, eCBs)系统具有显著的镇痛抗炎作用,可以介导多种疾病

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2014CB543203);国家自然科学基金(81603683);北京市科技计划课题首都临床特色应用研究与成果转化(Z171100001017033)

作者简介:朱玉璞(1992.06—),男,北京中医药大学 2015 级在读硕士研究生,研究方向:电针治疗偏头痛的临床及机理研究,E-mail: zyp1992@bucm.edu.cn

通信作者:王麟鹏(1955.05—),男,大学本科,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向:中风及痛症的临床与机理研究,E-mail: wlp5558@sina.com;李彬(1974.03—),女,博士,主任医师,研究方向:针刺防治偏头痛的临床及基础研究,E-mail: libin0314@sina.com

的病理过程^[4]。在 20 世纪末,人们找到了第一种“类大麻素样物质”N-花生四烯酸乙醇胺 (Anandamide, AEA),具有与 Δ^9 -四氢大麻酚(Δ^9 -tetrahydrocannabinol, THC)相似的生物学效应,此后人们又发现了 2-花生四烯酸甘油(2-arachidonic acid, 2-AG),从此人们对 eCBs 系统有了新的认识。

针灸作为传统中医疗法正逐渐被国内外所接受,在疼痛疾病方面具有优势^[5]。有临床研究表明针刺治疗可以提高偏头痛发作天数减半率^[6]。同时,美国神经协会认可了针灸在偏头痛治疗中的作用^[7]。WHO 也已经将“偏头痛”列入针灸治疗疾病的推荐疾病谱^[8]。现代研究当中,多数学者关注针刺对内源性大麻素受体(Cannabinoid Receptor, CBR)的调节,对 eCBs 及其分解酶的关注不多。因此本文试图探讨针刺在对 eCBs 的释放和分解的干预在镇痛机制当中的作用,从而发现针刺治疗偏头痛的新机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 成年雄性 SD 大鼠 24 只,体重 200 ~ 220 g,由军科院提供。适应性喂养 1 周,单笼喂养,12:12 h 明暗交替模拟昼夜。大鼠随机分为 4 组,即:对照组(C,只进行手术,不进行炎症汤注射)、模型组(M,炎症汤注射造模不给予电针)、单穴组(EA,造模并给予电针风池)和假穴组(NA,造模并给予电针假穴),每组 6 只。

1.2 方法 手术操作:用 10% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,大鼠备皮后置于脑立体定位仪上,并固定住头部。消毒后大鼠头顶沿正中中线,逐层剪开组织彻底暴露颅骨。以大鼠颅骨前囟为原点,向左向前各 1 mm 处打穿颅骨。将套管放入钻孔中,用螺丝和牙科水泥进行固定。最后向套管内注射肝素钠封管。在大鼠下肢肌肉注射 1 mL 庆大霉素,待大鼠清醒后放回笼舍,手术后大鼠正常饲养恢复 1 周。

清醒状态下反复注射炎症汤:大鼠术后恢复后,将大鼠固定于特制的大鼠固定装置上,用微量注射泵以 2 μ L/min 泵入 20 μ L 炎症汤后封管。在实验第 1、3、5、7、9 d 注射炎症汤,对照组大鼠等速等量注射人工脑脊液。

配制炎症汤:组胺、5-羟色胺和缓激肽,均为 2 mM,和前列腺素 E₂(PGE₂),分别为 0.2 mmol,溶于 pH5.0 的 10 mmol HEPES 缓冲液中。

1.2.1 电针治疗 电针穴位选取参照《实验针灸学》^[9],单穴组取大鼠双侧“风池”穴(GB20),双穴组取大鼠双侧“阳陵泉”穴(GB34)。假穴取风池穴旁开 1 mm。在实验第 1、3、5、7、9 d 进行电针治疗。电针(直径 0.16 mm)进针约 2 ~ 3 mm,连接华佗牌电针仪,电针参数:疏密波 2 Hz,1 ~ 2 mA,强度以大鼠耳郭轻度抖动或局部肌肉收缩为度,电针治疗 10 min。

1.2.2 取材与 ELISA 检测 取材在实验第 9 天进行,实验结束后用 10% 水合氯醛 0.3 mL/100 g 腹腔注射麻醉大鼠并以仰卧位固定。暴露大鼠双侧颈静脉,抽取 1 ~ 2 mL 大鼠颈静脉血并加入 50 μ L 抑肽酶。离心机 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 15 min 后取上清备用。利用 ELISA 法检测大鼠血清 AEA、2-AG、MAGL、FAAH 含量,ELISA 检测严格遵照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计软件进行数据分析,所得实验数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用单因素方差分析法对实验数据进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

实验结果显示,大鼠血清中 AEA 的含量 M 组(8.62 ± 0.92)显著低于 C 组(13.35 ± 1.43),且差异有统计学意义($P < 0.001$),EA(11.73 ± 0.58)组高于 NA(10.10 ± 0.90)组,差异有统计学意义($P < 0.01$),EA(11.73 ± 0.58)组高于 M(8.62 ± 0.92)组,差异有统计学意义($P < 0.001$),NA 组和 M 组比较差异无统计学意义。

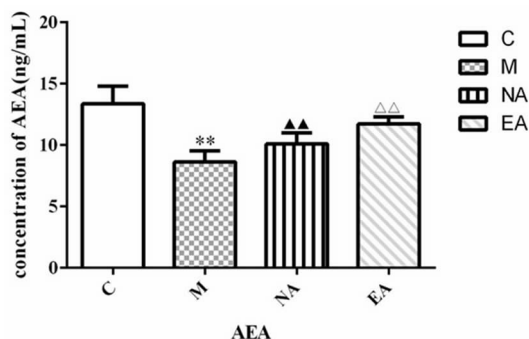


图1 各组大鼠血清中 AEA 含量

注:5 组间大鼠血清中 AEA 含量的比较,* M 组 V. S. C 组(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$), $^{\Delta}$ EA 组 V. S. M 组($^{\Delta}$ $P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}$ $P < 0.01$), $^{\Delta}$ NA 组 V. S. EA 组($^{\Delta}$ $P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}$ $P < 0.01$)

实验结果显示,大鼠血清中 MAGL 的含量 M 组($1 026.58 \pm 14.91$) ng/mL 显著高于 C 组(823.72 ± 61.22) ng/mL,差异有统计学意义($P < 0.01$),EA(711.15 ± 109.07) ng/mL 组低于 NA($985.86 \pm$

6.98) ng/mL 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), EA (711.15 ± 109.07) ng/mL 组低于 M (1 026.58 ± 14.91) ng/mL 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), NA 组和 M 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

此外, 实验各组大鼠血清中 2-AG 和 FAAH 含量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

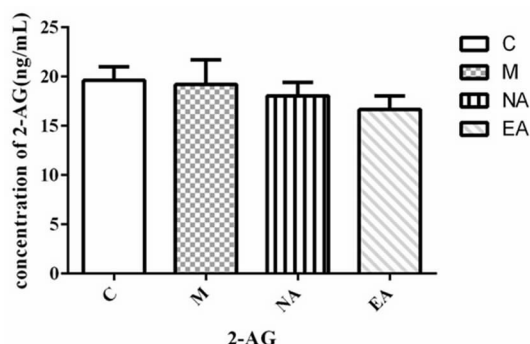


图2 各组大鼠血清中 2-AG 含量

注: 5 组间大鼠血清中 2-AG 含量的比较

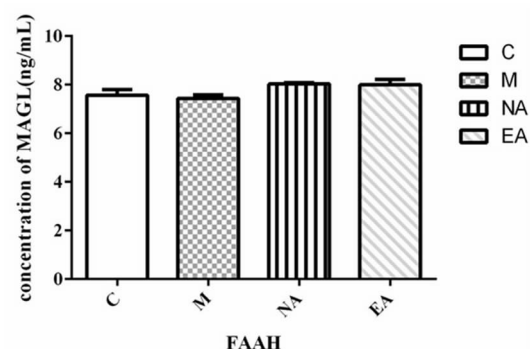


图3 各组大鼠血清中 FAAH 含量

注: 5 组间大鼠血清中 FAAH 含量的比较

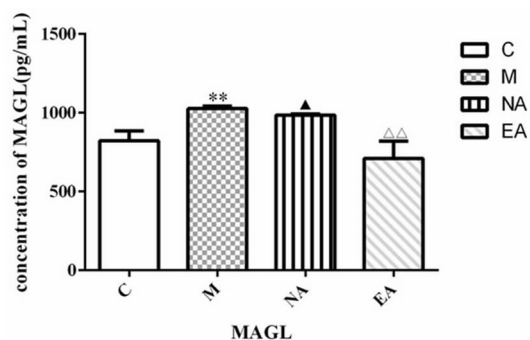


图4 各组大鼠血清中 MAGL 含量

注: 5 组间大鼠血清中 MAGL 含量的比较, * M 组 V. S. C 组 ($* P < 0.05$), ** $P < 0.01$), △ EA 组 V. S. M 组 ($\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$), ▲ NA 组 V. S. EA 组 ($\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$)

3 讨论

偏头痛是一种常见的神经内科疾病, 迁延难愈且具有致残性和遗传倾向。本病至今发病机制并不明确, 目前关于偏头痛的发病机制有神经学说、遗传学说及离子学说等多种学说, 其中三叉神经血管学

说是目前较为公认的学说。偏正头痛中医理论中均属于头风病, 偏头痛是头风病的一种, 其病属少阳经, 本实验选穴风池是足少阳胆经要穴, 可祛风散寒, 治疗头痛、眩晕等头部诸疾。

目前常用的大鼠炎症汤偏头痛模型主要有完全弗氏佐剂和配方炎症汤 2 类。本实验模型采用硬脑膜上反复配方注射炎症汤模型来模拟大鼠偏头痛发作。有文献报道称, 反复向大鼠硬脑膜注射炎症汤可以诱发大鼠的偏头痛发作^[10]。在硬脑膜上注射炎症汤后 15 min 可明显观察到硬脑膜血管扩张^[11]。同时, 注射炎症汤可以引发大鼠的中枢敏化和外周敏化, 降低大鼠痛域。以上均说明硬脑膜上注射炎症汤是一种可靠的偏头痛动物造模方法。

在 eCBs 以及“类内源性大麻素样物质”中, AEA 和 2-AG 是目前研究最为深入的 2 种 eCBs。AEA 和 2-AG 是 2 种“即时分泌”的逆行神经递质^[12], AEA 和 2-AG 在突触后膜分泌, 作用于突触前膜的 CBR, 产生效应后立即被重新摄入到神经细胞内被 eCBs 分解酶分解。eCBs 分解酶主要有 2 种, 分别为脂肪酰胺水解酶 (Fatty Acid Amide Hydrolase, FAAH) 和单酰基甘油酯酶 (Monoacylglycerol Lipase, MAGL), 这 2 种分解酶分别对应分解 AEA 和 2-AG。随着研究的进展, 人们试图通过开发分解酶抑制来降低 eCBs 的分解, 从而研发新的镇痛药物。目前有学者针对 eCBs 分解酶开发新的抗偏头痛药物, 发现当给 MAGL 基因敲除小鼠注射硝酸甘油时会引发小鼠的偏头痛样疼痛^[13]。

本实验发现电针治疗可以有效干预偏头痛大鼠体内 eCBs 及其分解酶的含量。实验数据表明, 大鼠血清中 AEA 含量 M 组比 C 组明显降低, MAGL 含量 M 组比 C 组明显升高, 说明偏头痛造模成功, 同时说明偏头痛发作期间可以观察到大鼠 eCBs 系统有相应的变化。有研究表明, AEA 可抑制偏头痛大鼠的痛觉过敏^[14]。另外, MAGL 基因敲除偏头痛小鼠出现了痛域下降^[13], 这揭示当偏头痛发作时有 eCBs 及其分解酶的变化。本实验中大鼠血清中 AEA 含量 EA 组比 M 组明显升高, MAGL 含量 EA 组比 M 组明显降低, 可以说明针刺可以干预偏头痛大鼠源性大麻素分解酶, 从而预防偏头痛发作。此外, 大鼠血清中 AEA 含量 NA 组比 EA 组有降低, 且 MAGL 升高, 可以说明经穴和非经假穴在预防偏头痛发作方面具有疗效差异。另外, 各组大鼠比较, FAAH 和 2-AG 2 个指标并差异无统计学意义, 说明电针预防偏头痛发作并非依靠该 2 者起作用。出现该结果可

能是电针增加 AEA 的分泌反射性的引起 FAAH 的升高,同时,电针激活了分解酶 MAGL,所以 2-AG 的含量有所下降。

本实验在技术选择上只选用了 ELISA 一种技术进行验证,同时也未观察大鼠具体脑核团的 eCBs 及其分解酶的含量,以上是该实验存在的不足之处,我们将在未来的实验中进一步深入探讨。

参考文献

- [1] Burstein R, Nosedá R, Borsook D. Migraine: multiple processes, complex pathophysiology[J]. J Neurosci, 2015, 35(17):6619-6629.
- [2] Steiner TJ, Stovner LJ, Vos T. GBD 2015: migraine is the third cause of disability in under 50s[J]. J Headache Pain, 2016, 17(1):104.
- [3] Baron EP. Comprehensive Review of Medicinal Marijuana, Cannabinoids, and Therapeutic Implications in Medicine and Headache: What a Long Strange Trip It's Been [J]. Headache, 2015, 55(6):885-916.
- [4] Ryz NR, Remillard DJ, Russo EB. Cannabis Roots: A Traditional Therapy with Future Potential for Treating Inflammation and Pain[J]. Cannabis Cannabinoid Res, 2017, 2(1):210-216.
- [5] Li Z, Liu M, Lan L, et al. Altered periaqueductal gray resting state functional connectivity in migraine and the modulation effect of treatment[J]. Sci Rep, 2016, 6:20298.
- [6] Wang LP, Zhang XZ, Guo J, et al. Efficacy of acupuncture for migraine prophylaxis: a single-blinded, double-dummy, randomized controlled trial[J]. Pain, 2011, 152(8):1864-1871.
- [7] Campbell JK, Penzien DB. Evidence-Based Guidelines For Migraine Headache: Behavioral and Physical Treatments[J]. US Headache Con-

sortium 1:1-29, 2000, 1:1-29.

- [8] von Peter S, Ting W, Scrivani S, et al. Survey on the use of complementary and alternative medicine among patients with headache syndromes[J]. Cephalalgia, 2002, 22(5):395-400.
- [9] 郭义, 方剑乔. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 51-212.
- [10] Nelly Boyera B, Radhouane Dallela B C, Alain Artola B, et al. General trigeminospinal central sensitization and impaired descending pain inhibitory controls contribute to migraine progression[J]. Pain, 2014(7):1196-1205.
- [11] Lundblad C, Haanes KA, Grande G, et al. Experimental inflammation following dural application of complete Freund's adjuvant or inflammatory soup does not alter brain and trigeminal microvascular passage [J]. J Headache Pain, 2015, 16(1):1-9.
- [12] Chiurchiù V, dSM Van, Centonze D, et al. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation in multiple sclerosis: Clues for other neuroinflammatory diseases[J]. Prog Neurobiol, 2017, 160:82-100.
- [13] Nozaki C, Markert A, Zimmer A. Inhibition of FAAH reduces nitroglycerin-induced migraine-like pain and trigeminal neuronal hyperactivity in mice[J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2015, 25(8):1388-1396.
- [14] Greco R, Mangione A S, Sandrini G, et al. Effects of anandamide in migraine: data from an animal model[J]. J Headache Pain, 2011, 12(2):177-183.

(2018-04-13 收稿 责任编辑: 张文婷)

鲁南中药产业发展评估座谈会在山东临沂召开

2018年7月14日,弘扬国粹,传承创新——鲁南中药产业发展评估座谈会在山东临沂召开。本次会议由世界中医药学会联合会主办,《世界中医药杂志》、中药制药共性技术国家重点实验室和鲁南制药集团股份有限公司承办。座谈会由世界中医药学会联合会副主席兼秘书长桑滨生主持。

世界中医药学会联合会创会主席余靖,创会副主席兼秘书长李振吉,山东省中医药管理局局长孙春玲,鲁南制药集团党委书记、董事长、总经理张贵民,中国科学院院士、上海中医药大学原校长陈凯先,北京中医药大学终身教授、国医大师王琦,云南省中医药管理局局长郑进,山东省中医药管理局原局长于淑芳,世界中医药学会联合会副秘书长徐春波,广东药科大学校长郭姣,山东中医药大学校长武继彪,福

建中医药大学校长李灿东,湖北中医药大学校长吕文亮,黑龙江中医药大学原校长匡海学,浙江中医药学会会长肖鲁伟,江西中医药大学副校长杨明,中国中医科学院中药研究所所长陈士林,四川省中医药科学院院长赵军宁,解放军302医院中西医结合中心全军中药研究所所长肖小河,中国科学院上海药物研究所副所长叶阳,深圳宝安中医院(集团)院长朱美玲,世界中医药杂志社社长魏金明等领导和专家出席会议。

本次会议是在《世界中医药》杂志第三届编辑委员会召开期间举行,聚集了编辑委员会的特邀嘉宾和鲁南制药集团研发骨干,旨在通过座谈会服务中医药科技创新,达到促进中医药国际化发展的目的。