

网络出版时间: 2022-09-15 07:55 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220913.1745.008.html>

# 吡仑帕奈调控 MAPK 信号通路抗偏头痛作用及其机制

翟庆龄<sup>1,2</sup>, 谢丹娜<sup>1,2</sup>, 王凯新<sup>1,2</sup>, 王雪贞<sup>1</sup>, 陈金波<sup>1</sup>, 董晓梦<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨吡仑帕奈调控丝裂原活化蛋白激酶通路 (MAPK) 信号通路对偏头痛大鼠的影响。方法 40 只雄性 SD 大鼠随机分 4 组, 每组 10 只: 空白 (生理盐水) 组、硝酸甘油 (NTG) 组、吡仑帕奈 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组、吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组。观察大鼠挠头时间、爬笼次数、纤维丝测定大鼠眶周痛阈值, 明暗箱实验观察大鼠畏光情况。免疫荧光法检测大鼠三叉神经节 (TG) 垂体腺苷酸环化酶激活肽 (PACAP) 表达水平, Western blot 法检测大鼠 TG 中 PACAP、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p-p38MAPK)、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (p-JNK)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (p-ERK) 蛋白的表达水平, 实时荧光定量聚合酶链反应法 (RT-qPCR) 测定 PACAP mRNA 的表达水平, 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测大鼠血液中 PACAP 的浓度。结果 与空白组相比, NTG 组大鼠眶周痛阈降低, 爬笼行为与梳理面部行为时间长, 进入明室时间缩短, PACAP mRNA 及蛋白相对表达量升高 ( $P < 0.05$ ); 与 NTG 组相比, 吡仑帕奈 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组、吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组眶周痛阈提高, 爬笼行为与梳理面部行为时间短, 进入明室时间延长, PACAP mRNA 及蛋白相对表达量降低 ( $P < 0.05$ )。与空白组相比, NTG 组的 p-p38MAPK、p-ERK、p-JNK 相对表达量升高 ( $P < 0.05$ ); 与 NTG 组相比, 吡仑帕奈预防组的 p-p38MAPK、p-ERK、p-JNK 相对表达量降低 ( $P < 0.05$ )。结论

吡仑帕奈可能通过抑制 MAPK 信号传导通路缓解偏头痛症状。

**关键词** 偏头痛; 信号传导通路; 吡仑帕奈; 垂体腺苷酸环化酶激活肽; 丝裂原活化蛋白激酶通路

中图分类号 R 741.02

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)11-1725-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.008

偏头痛是世界上最常见的神经系统疾病之一, 许多信号传导通路参与偏头痛发病机制, 如丝裂原

活化蛋白激酶通路 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 通路、一氧化氮 (nitric oxide, NO) / 可溶性鸟苷酸环化酶 (soluble guanylate cyclase, sGC) / 环磷酸鸟苷 (cyclic guanosinemonophosphate, cGMP) 通路等。垂体腺苷酸环化酶激活肽 (pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide, PACAP) 已经被证明是脑循环中作用强大的舒张因子, 是偏头痛关键生物学标志物<sup>[1]</sup>。吡仑帕奈是一种高度选择性、非竞争性的  $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑-丙酸 (amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionatereceptor, AMPA) 受体拮抗剂, 最开始被用作治疗癫痫<sup>[2]</sup>, 基于癫痫与偏头痛共同的病理生理特征, 可能具有治疗偏头痛的作用。该研究应用腹腔注射硝酸甘油建立大鼠偏头痛模型, 研究吡仑帕奈对偏头痛大鼠的影响, 同时检测三叉神经节 (trigeminal ganglion, TG) 中 PACAP 及 MAPK 信号通路相关蛋白的表达, 以探讨吡仑帕奈的抗偏头痛作用及其机制, 为抗偏头痛药物的研发提供理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 清洁级 6 周龄成年雄性 SD 大鼠 40 只, 体质量 180 ~ 220 g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 许可证号: SCXK (鲁) 2019-0003。饲养环境温度控制在 21 ~ 22  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 12 h/12 h 明暗间隔的人工昼夜节律, 自由摄食和饮水。对实验动物进行的所有研究行为均严格遵照国际疼痛学会 (International Association for the Study of Pain, IASP) 的相关动物保护及使用规定。大鼠采用随机数字表法分为: 空白组、硝酸甘油 (nitroglycerin, NTG) 组、吡仑帕奈 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组、吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组, 每组 10 只。

## 1.2 方法

**1.2.1 偏头痛大鼠模型建立** 采用 Pradhan 改良的方法进行造模, 即每隔 1 d 给予 NTG 组、吡仑帕奈 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组、吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组腹腔注射稀释后的硝酸甘油注射液 (NTG 10 mg/kg), 空白组腹腔注射等量生理盐水; 共注射 5 次, 即在第 1、3、5、7、9 天时完成各组注射。

2022-08-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81400903); 山东省自然科学基金 (编号: ZR2017LH032); 山东省医药卫生科技发展计划项目 (编号: 2019WS322)

作者单位: <sup>1</sup> 滨州医学院附属医院神经内科, 滨州 256600

<sup>2</sup> 滨州医学院, 烟台 264000

作者简介: 翟庆龄, 女, 硕士研究生;

董晓梦, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: dongxiaomengbest@163.com

**1.2.2 预防组给药** 造模前 30 min 吡仑帕奈 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组、吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组分别给予腹腔注射吡仑帕奈 50、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，吡仑帕奈浓度设置参考 Hara et al<sup>[3]</sup> 的研究。实验流程设计示意图见图 1。

**1.2.3 眶周痛觉阈值测定** 实验在药物注射后 1 h 进行。研究人员用手约束每只老鼠，防止它们逃离。用 von Frey 纤维丝悬于大鼠一侧眶周皮肤上，相互垂直，从最小强度 0.08 g 开始刺激眶周皮肤，逐步增加至最大强度 300 g。以纤维丝弯曲 90° 为标准，并在刺激部位停留 2 s，刺激 5 次为 1 循环，每次刺激之前间隔 3 s。若在 5 次刺激中有 3 次及以上出现大鼠用前爪拨开纤维丝、发动攻击或缩头缩爪等行为表现，则判定该大鼠出现痛觉超敏，并记录此时刺激强度 (g) 为疼痛阈值。若刺激强度达到 300 g，但仍未出现上述痛觉超敏表现，则将 300 g 记为其痛阈值。实验表明，出现痛觉超敏的大鼠，其疼痛阈值多在 20 g 以下。

**1.2.4 爬笼及梳理面部行为测试** 头部梳理行为为大鼠用前爪或后爪清洁双侧头部或面部。爬笼次数与梳头时间的增加被认为是自发性面部疼痛的一个指标。用摄像机记录并计算各组大鼠梳理面部的时间及爬笼子的次数。在腹腔注射 NTG 后 30 min，将动物置于树脂玻璃箱中，首先适应 15 min，然后在箱前 30 cm 处放置摄像机，记录 20 min。

**1.2.5 畏光行为测试** 偏头痛的另一个特征是畏光，并且暴露在光线下会增加偏头痛的严重程度。实验第 9 天给药后 1 h 进行畏光行为测试。明暗箱是一个 80 cm × 40 cm × 35 cm 的树脂玻璃箱，被隔间分隔成两个区域。在明暗箱里，隔间用白纸包裹，没有盖子，使用 800 流明 LED 灯照明。而另一个隔间用黑纸包裹，并盖上盖子。箱子中间有一个 12 cm × 12 cm 的通道，大鼠可以自由穿梭。通过摄像装置观察并记录 10 min 内首次进入明室的潜伏时

间、在明箱的活动时间及穿梭次数。实验过程中保持外界环境安静，每次放入大鼠前要清理粪便并喷洒酒精去除异味，以便进行下一组测试，确保每次检测结果的准确性。

**1.2.6 净体质量增长量和净食物消耗量测量** 在每次注射药物之前称量大鼠的体质量和食物，计算出体质量和净食物消耗量。

**1.2.7 免疫荧光染色** 在第 9 天完成行为测定后用 10% 的水合氯醛深麻醉大鼠，用 0.1 mol/L PBS 溶液心脏灌流，再用 4% 多聚甲醛固定，取空白组及 NTG 组大鼠 TG 经 30% 蔗糖水脱水后行冰冻切片，切片厚度为 40  $\mu\text{m}$ 。经封闭液室温封闭 1 h 后，一抗 PACAP (美国 Santa 公司提供，货号：sc-166180)、二抗 Alexa fluor488 驴抗鼠 (1:400) 室温孵育 4 h，封片剂封片并用共聚焦显微镜观察 TG 染色效果并拍照。

**1.2.8 Western blot 实验** 同 1.2.7 项深麻醉大鼠，置于冰上取各组 TG 放入灭菌 EP 管中加入裂解液及相应的磷酸酶抑制剂，使用匀浆器将组织磨成匀浆状态，4  $^{\circ}\text{C}$ 、1500 r/min 离心 10 min。采用 BCA 法检测上清液中的蛋白浓度。加入上样缓冲液和裂解液将蛋白样品的浓度配平，100  $^{\circ}\text{C}$  加热 5 min 使蛋白变性，分装后保存于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。配置 SDS-PAGE 胶，加入蛋白质样本电泳后转移到 PVDF 膜。将膜浸泡在封闭缓冲液置于摇床轻柔摇晃 2 h；在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下，分别用一抗如下：PACAP 抗体 (购自英国 Abcam 公司，批号：ab181205)；phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 抗体 (批号：#4370)、ERK1/2 抗体 (批号：#9102)、phospho-JNK 抗体 (批号：#9251)、JNK 抗体 (批号：#9252)、phospho-p38MAPK 抗体 (批号：#9215)、p38MAPK 抗体 (批号：#8690) 和内参 GAPDH 抗体 (批号：#51332) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。将一抗置于摇床孵育过夜；TBST 清洗 3 次，每次 10 min；二抗孵育，按说明书稀

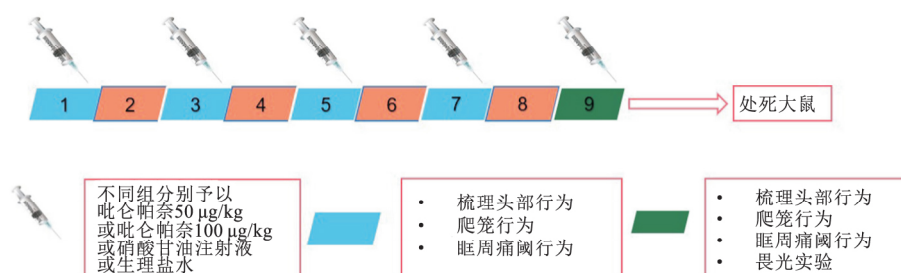


图 1 研究的实验设计

释相应二抗,室温孵育置于摇床轻柔摇晃 2 h; TBST 清洗 3 次,每次 15 min; Western blot 条带经 Photo-shopcs6.0 软件进行灰度扫描分析。

**1.2.9 RT-PCR 实验** 用 RNA 提取试剂盒将组织裂解稀释提取总 RNA,反转录为 cDNA,于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。设计 PACAP 引物,用 GAPDH 作为内参。PACAP 上游引物: 5'-ACTCACCTTTGGTCAATCCC-3',下游引物: 5'-TGATCCCAGGGAAGCTGAGT-3'; GAPDH 上游引物: 5'-CATGTGTAGCGGAGCAAG-GTT-3',下游引物: 5'-TGATCCCAGGGAAGCTGAGT-3'。PCR 扩增,反应体系 20  $\mu\text{l}$ , 2  $\times$  AceQ qPCR Green Master Mix (High ROX Premixed) 10  $\mu\text{l}$ , Primer 10.4  $\mu\text{l}$ , Primer 20.4  $\mu\text{l}$ , Template DNA 1  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu\text{l}$ 。反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,  $95^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s, 循环 40 次。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算基因相对表达量。

**1.2.10 ELISA 实验** 同 1.2.7 项麻醉大鼠,各组大鼠经颈静脉取血 1.5 ml,血液静置后放入离心机中  $4^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 5 min 后取血清,使用 ELISA 试剂盒检测 PACAP 浓度,严格按照说明书进行。

**1.3 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件,实验数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示计量资料,多组比较用单因素或双因素方差分析,当数据方差不齐时,选择 Welch's ANOVA 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 吡仑帕奈对 NTG 诱导的畏光、偏头痛样疼痛、眶周痛觉阈值减低的影响** 与空白组相比,NTG 组在明室中的时间缩短且重新进入明室的潜伏期更长,在明暗箱间穿梭次数也更少 ( $P < 0.0001$ ); 吡仑帕奈预处理组不仅增加了大鼠在明室停留时间 (图 2A) ( $F = 62.62$ ,  $P < 0.0001$ ),而且还缩短了重新进入明室的潜伏期 (图 2B) ( $F = 147.10$ ,  $P < 0.0001$ ),增加了穿梭次数 (图 2C) ( $F = 15.03$ ,  $P < 0.0001$ )。在观察大鼠头部梳理和爬笼行为时,如图 2D 所示,第 1 次和第 2 次给药后,NTG 组的头部梳理时间长于空白组 ( $P < 0.05$ ),而吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组的大鼠头部梳理时间比 NTG 组短 ( $P < 0.05$ ); 随着注射次数增多,与 NTG 组相比,吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组头部梳理时间有差异 (给药因素,  $F = 36.51$ ,  $P < 0.0001$ ; 时间因素,  $F = 0.09$ ,  $P = 0.96$ ; 双因素,  $F = 0.36$ ,  $P = 0.97$ )。

如图 2E 所示,NTG 增加了爬笼时间,吡仑帕奈 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组和吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组减弱了 NTG 诱导的爬笼次数增加 (给药因素,  $F = 29.37$ ,  $P < 0.0001$ ; 时间因素,  $F = 1.40$ ,  $P = 0.24$ ; 双因素,  $F = 0.67$ ,  $P = 0.78$ )。第 1 天四组之间的眶周疼痛阈值没有显著差异 (图 2F)。从第 2 次给药开始,NTG 组与空白组之间存在差异,NTG 组阈值降低 ( $P < 0.05$ )。NTG 组的阈值从第 3 次到第 4 次给药呈现出进一步降低的趋势 ( $P < 0.01$ )。第 2 次给药后,吡仑帕奈 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组和 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组的眶周疼痛阈值高于 NTG 组 ( $P < 0.05$ )。给药 3 次后,NTG 组的阈值低于 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  吡仑帕奈 + NTG 组 (图 2F) (给药因素  $F = 23.28$ ,  $P < 0.0001$ ; 时间因素,  $F = 4.40$ ,  $P < 0.001$ ; 双因素,  $F = 0.96$ ,  $P = 0.49$ )。注射 5 次给药后,各组大鼠代谢情况并没有显著差异,大鼠体质量差异、食物消耗差异无统计学意义。体质量测量 (图 2G): (给药因素,  $F = 3.20$ ,  $P = 0.04$ ; 时间因素,  $F = 34.27$ ,  $P < 0.0001$ ; 双因素,  $F = 0.64$ ,  $P = 0.81$ ); 净食物消耗量 (图 2H): (给药因素,  $F = 4.79$ ,  $P = 0.01$ ; 时间因素,  $F = 6.31$ ,  $P < 0.001$ ; 双因素,  $F = 1.40$ ,  $P = 0.17$ )。各组行为学数据见表 1、2。

**2.2 吡仑帕奈对 NTG 诱导的 PACAP 水平升高的影响** 免疫荧光实验显示,与空白组相比,NTG 组大鼠 TG 中 PACAP 水平表达升高 (图 3A、B); Western blot 结果显示,与空白组相比,NTG 组中的 PACAP 蛋白表达升高,吡仑帕奈 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组、吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组 PACAP 蛋白的表达降低 ( $F = 25.06$ ,  $P < 0.0001$ )。RT-qPCR 分析显示,与空白组相比,NTG 组中 PACAP mRNA 的表达升高 ( $F = 25.06$ ,  $P < 0.0001$ )。吡仑帕奈 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组和吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组降低 PACAP 的表达。ELISA 结果与 Western blot 和 RT-qPCR 的结果相似,与 NTG 组相比,吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 下调 PACAP 的水平但结果无统计学差异 ( $W = 4.218$ ,  $P = 0.88$ )。见图 3D。

**2.3 吡仑帕奈调控 MAPK 信号通路对偏头痛大鼠的影响** Western blot 实验结果如图 4 所示,与空白组相比,NTG 组 p-JNK、p-ERK 和 p-p38MAPK 蛋白表达升高; 而吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组 p-JNK ( $F = 22.76$ ,  $P < 0.0001$ )、p-ERK ( $F = 11.06$ ,  $P < 0.001$ ) 和 p-p38MAPK ( $F = 10.49$ ,  $P < 0.001$ ) 蛋白表达降低 (图 4B),差异有统计学意义; 而注射

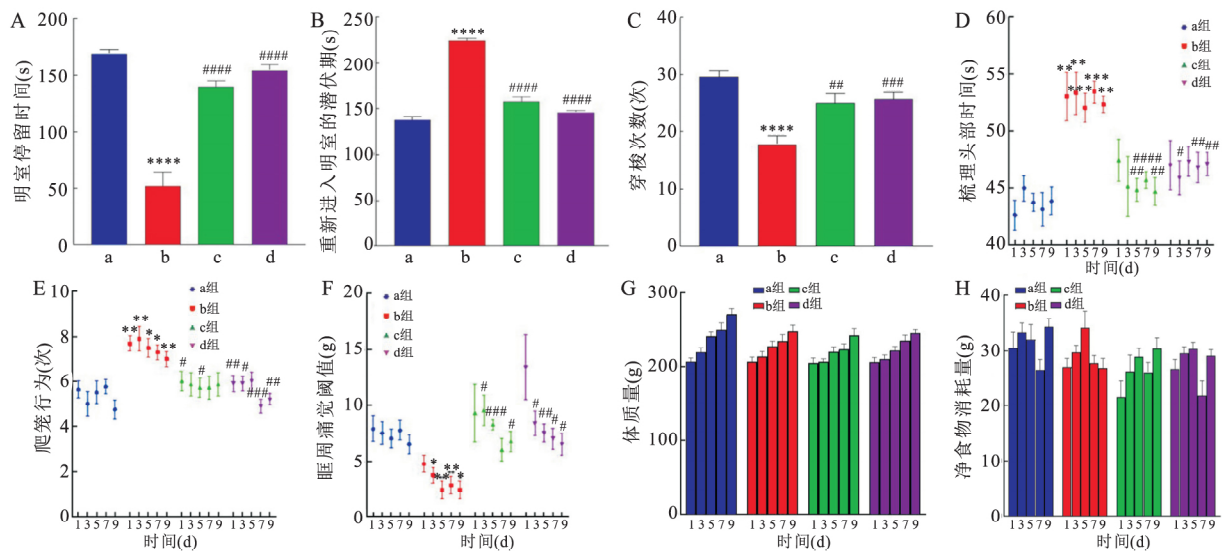


图2 吡仑帕奈对 NTG 诱导的畏光、偏头痛样疼痛、眶周痛觉阈值减低的影响低

A: 明室停留时间; B: 重新进入明室的潜伏时间; C: 穿梭次数; D: 梳理头部行为; E: 爬笼行为; F: 眶周痛觉阈值; G: 体质量; H: 净食物消耗量; a: 空白组 ( $n=8$ ); b: NTG 组 ( $n=10$ ); c: 吡仑帕奈  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组 ( $n=7$ ); d: 吡仑帕奈  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组 ( $n=10$ ); 与空白组比较: \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ , \*\*\*\*  $P<0.0001$ ; 与 NTG 组比较: #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ , ###  $P<0.001$ , ####  $P<0.0001$

表1 各组不同时间行为学测定 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间(d)	挠头时间(s)	爬笼次数(次)	眶周痛阈(g)	体质量增长(g)	食物消耗(g)
空白( $n=8$ )	1	42.63 ± 1.32	5.63 ± 0.38	7.88 ± 1.14	206.70 ± 4.93	30.53 ± 2.81
	3	45.00 ± 1.10	5.00 ± 0.53	7.50 ± 0.98	219.80 ± 6.32	33.33 ± 1.69
	5	43.75 ± 0.82	5.50 ± 0.50	7.00 ± 0.85	241.40 ± 5.88	32.03 ± 2.74
	7	43.13 ± 1.48	5.75 ± 0.31	7.75 ± 0.88	249.60 ± 9.44	26.41 ± 1.98
	9	43.88 ± 1.22	4.75 ± 0.41	6.50 ± 0.82	270.90 ± 7.55	34.31 ± 1.54
NTG( $n=10$ )	1	53.00 ± 2.14	7.70 ± 0.34	4.75 ± 0.75	206.70 ± 6.11	24.12 ± 3.01
	3	53.30 ± 1.88	7.90 ± 0.55	3.75 ± 0.70	213.70 ± 7.05	27.24 ± 2.99
	5	52.00 ± 1.25	7.50 ± 0.43	2.45 ± 0.80	227.50 ± 7.01	31.87 ± 4.18
	7	53.40 ± 0.98	7.30 ± 0.34	2.85 ± 0.79	235.10 ± 8.81	26.02 ± 2.48
	9	52.30 ± 0.70	7.00 ± 0.33	2.45 ± 0.81	248.10 ± 7.89	25.07 ± 2.49
吡仑帕奈 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ + NTG 预防( $n=7$ )	1	47.43 ± 1.82	6.00 ± 0.44	9.25 ± 2.56	204.70 ± 6.82	21.57 ± 2.88
	3	45.14 ± 2.59	5.86 ± 0.51	9.50 ± 1.34	206.60 ± 3.59	26.14 ± 3.03
	5	44.86 ± 0.96	5.71 ± 0.42	8.25 ± 0.45	220.00 ± 6.83	28.91 ± 1.59
	7	45.71 ± 0.75	5.71 ± 0.52	6.00 ± 1.00	223.70 ± 7.46	26.04 ± 1.80
	9	44.71 ± 1.21	5.86 ± 0.51	6.75 ± 0.92	242.60 ± 8.58	30.44 ± 1.92
吡仑帕奈 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ + NTG 预防( $n=10$ )	1	47.00 ± 2.14	5.90 ± 0.35	13.38 ± 2.93	206.10 ± 6.05	26.67 ± 1.72
	3	45.90 ± 1.49	5.90 ± 0.31	8.38 ± 1.07	210.00 ± 5.58	29.56 ± 1.18
	5	47.30 ± 1.28	6.00 ± 0.42	7.50 ± 0.82	221.90 ± 5.69	30.33 ± 1.22
	7	46.80 ± 1.32	4.90 ± 0.31	7.00 ± 0.93	235.60 ± 7.33	21.80 ± 2.57
	9	47.10 ± 0.99	5.20 ± 0.25	6.50 ± 0.98	245.40 ± 4.44	29.09 ± 1.10

表2 各组明暗箱实验测定 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	明室停留时间(s)	首次进入明室潜伏时间(s)	穿梭次数(次)
空白( $n=8$ )	179.50 ± 4.15	137.10 ± 3.93	29.63 ± 1.03
NTG( $n=10$ )	60.20 ± 10.64	224.20 ± 2.79	17.80 ± 1.41
吡仑帕奈 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ + NTG 预防( $n=7$ )	147.00 ± 5.75	157.60 ± 5.17	25.00 ± 1.59
吡仑帕奈 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ + NTG 预防( $n=10$ )	163.90 ± 3.10	145.90 ± 2.26	25.60 ± 1.13

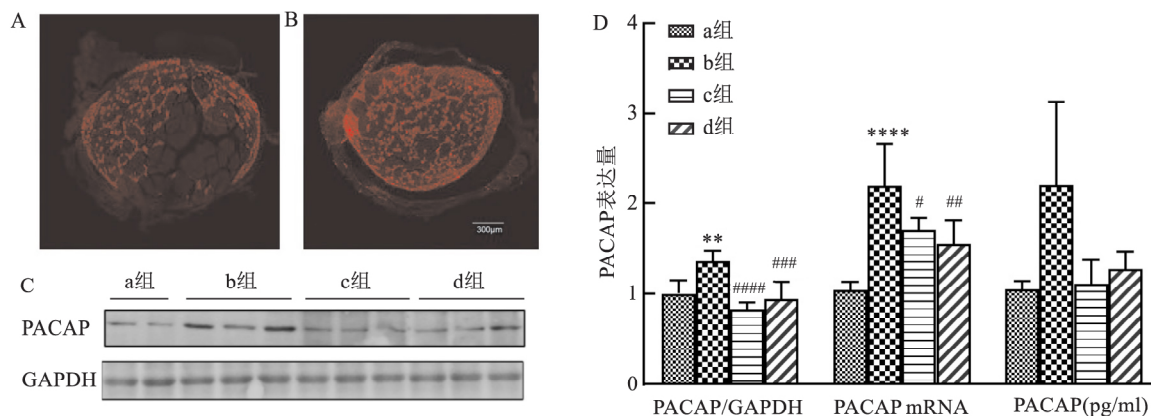


图3 吡仑帕奈对 NTG 诱导的 PACAP 水平升高的影响

A: 空白组 TG PACAP 免疫荧光图  $\times 40$ ; B: NTG 组 TG PACAP 免疫荧光图  $\times 40$ ; C: PACAP 蛋白检测 Western blot 图; D: PACAP 表达水平统计图; a: 空白组 ( $n=4$ ); b: NTG 组 ( $n=6$ ); c: 吡仑帕奈 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组 ( $n=6$ ); d: 吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组 ( $n=6$ ); 与空白组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ; 与 NTG 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ , ####  $P < 0.0001$

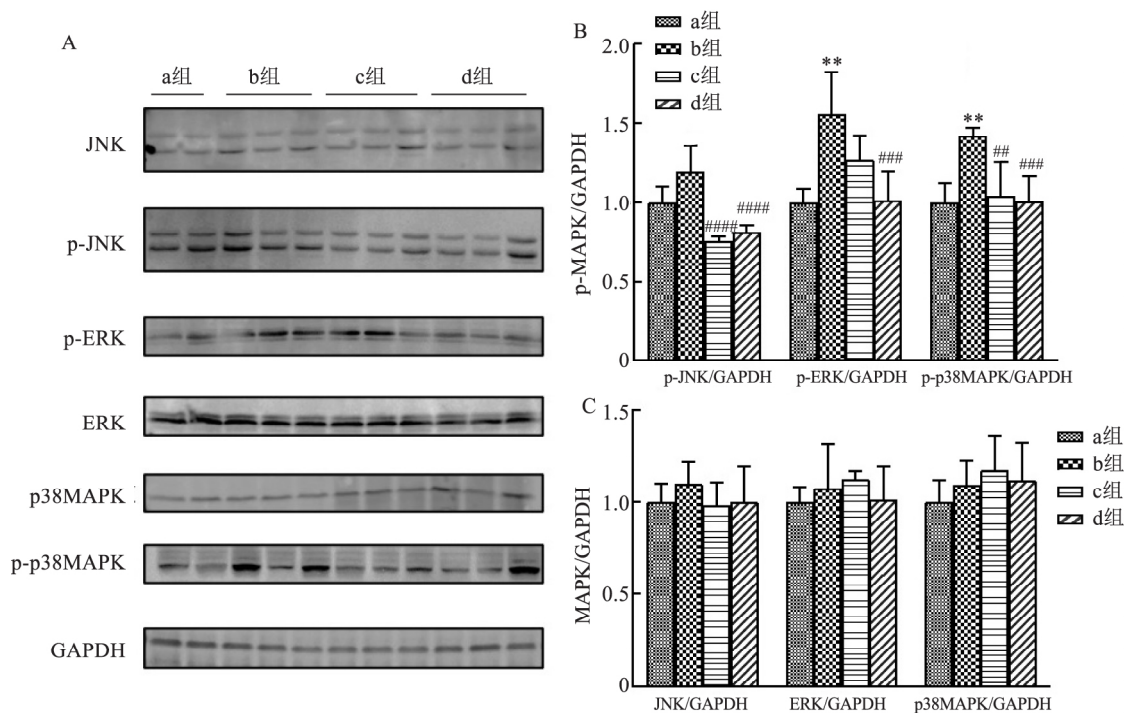


图4 吡仑帕奈调控 MAPK 信号通路对偏头痛大鼠的影响

A: MAPK、p-MAPK 蛋白检测的 Western blot 图; B: p-MAPK 蛋白水平统计图; C: MAPK 蛋白水平统计图; a: 空白组 ( $n=4$ ); b: NTG 组 ( $n=6$ ); c: 吡仑帕奈 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组 ( $n=6$ ); d: 吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + NTG 预防组 ( $n=6$ ); 与空白组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 NTG 组相比较: ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ , ####  $P < 0.0001$

NTG 后各组 JNK、ERK 和 p38MAPK 蛋白表达差异无统计学意义(图 4C)。这些结果表明,NTG 可以促进 MAPK 通路信号传导以促进偏头痛的病理生理过程,但吡仑帕奈 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  可以抑制 MAPK 通路缓解偏头痛。

### 3 讨论

偏头痛为一种常见疾病,偏头痛动物模型提示该疾病共同之处是存在关键信号通路的失调。本研究使用 NTG 诱导的偏头痛大鼠模型进一步验证偏



头痛发病机制中的 MAPK 信号传导通路,探讨吡仑帕奈调控 MAPK 信号通路对偏头痛大鼠的影响,并且首次提出吡仑帕奈可能通过调控此通路发挥缓解偏头痛作用。

吡仑帕奈是高度选择性的突触后膜神经元离子 AMPA 受体拮抗剂,通过与 AMPA 受体非竞争性结合,阻止  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  单价阳离子进出细胞,无法引起突触后膜去极化,因此兴奋性突触后电位无法诱发,从而抑制兴奋性突触传递。有研究<sup>[4]</sup>证明 NTG 诱导 AMPA 受体亚基 GluA1Ser831 位点磷酸化是偏头痛模型小鼠痛觉敏化的关键机制;通过上调钙通透型 AMPA 受体进一步促进痛觉敏化发生。因此,AMPA 受体很可能在偏头痛发生机制——痛觉敏化中起重要作用。偏头痛与癫痫同为发作性疾病,其病理生理、治疗方法有相似之处。因此,推断作为抗癫痫药物上市的 AMPA 受体抑制剂吡仑帕奈可能具有抗偏头痛的作用。

NTG 是一种 NO 供体,可以在一定条件下激活鸟苷酸环化酶模拟细胞内 NO 的效应<sup>[5]</sup>。NO 是调节脑血流量及动脉直径的重要调节因子,参与偏头痛的急性发作;NO 还可以促进皮层扩散性抑制(cortical spreading depression, CSD)的发生,而 CSD 目前被广泛认为是偏头痛先兆发作的潜在机制<sup>[6]</sup>。全身注射 NTG 还会引发健康人的即刻头痛和偏头痛易感患者的偏头痛发作<sup>[7]</sup>。本研究通过建立 NTG 偏头痛大鼠模型,观察大鼠挠头、爬笼行为、测定眶周痛觉阈值、计算畏光行为时间,模拟偏头痛发作的临床表现和特征。从行为学角度表明吡仑帕奈具有缓解偏头痛症状的作用。原发性头痛、特别是偏头痛,与饮食障碍有双向关系,有研究表明,88% 的女性偏头痛患者有节食经历,59% 会暴食、26% 会催吐<sup>[8]</sup>;饮食失调患者中 74% 患有偏头痛<sup>[9]</sup>。因此本实验初步探索了偏头痛大鼠的饮食障碍与体质量增减情况,然而本实验中 5 次注射 NTG 后 NTG 组大鼠与空白组、吡仑帕奈预防组大鼠的食欲减退程度才有显著差异,其原因可能是大鼠的饮食失调需要更长的时间来观察。

PACAP 在偏头痛中的标志性作用已被越来越多的者证实。偏头痛学早在 2009 年, Schytz et al<sup>[1]</sup>首次证明静脉输入 PACAP38 会引发偏头痛样发作,所有的健康受试者和超过 90% 的偏头痛患者在输注 PACAP 后诱发偏头痛发作。Körtési et al<sup>[10]</sup>发现口面注射弗氏完全佐剂可激活大鼠三叉神经血管系统,导致三叉神经脊束尾核大量降钙素基因相关肽

和 PACAP38 释放。Syed et al<sup>[11]</sup>的一项离体研究使用 PAC1 拮抗剂逆转了 PACAP38 诱导的大鼠脑膜中动脉管舒张。在本实验,与空白组相比,NTG 诱导的偏头痛大鼠 TG 组织和血液中的 PACAP 表达上调,而吡仑帕奈预处理可降低 NTG 诱导的大鼠 TG 组织和血液中的 PACAP 表达。这些结果表明吡仑帕奈治疗偏头痛作用可能是通过减少偏头痛标志物质 PACAP 表达实现的。

MAPK 信号在偏头痛发病机制中的作用已经在 NTG 诱导的动物模型中得到印证<sup>[12]</sup>。Lai et al<sup>[13]</sup>认为钩藤碱的抗偏头痛作用是通过抑制由 NTG 激活 MAPK/核因子- $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )完成。这些研究均表明,MAPK 通路在偏头痛的发生和维持中有着密切的关系。本实验中 NTG 诱导的偏头痛模型大鼠 TG 组织中 p-JNK、p-ERK 和 p-p38MAPK 蛋白表达升高,进一步验证了 MAPK 信号通路在偏头痛发病机制中的重要作用;吡仑帕奈预处理组大鼠 TG 组织中 p-JNK、p-ERK 和 p-p38MAPK 蛋白表达降低,提示吡仑帕奈可能通过调控 MAPK 信号通路达到缓解偏头痛的效果。

综上所述,抗癫痫药物吡仑帕奈有缓解偏头痛的潜力。基于 NTG 诱导的偏头痛大鼠模型,本实验预给药吡仑帕奈可以缓解偏头痛症状,并且进一步验证 MAPK 通路参与了偏头痛的发病机制过程,吡仑帕奈可能通过调控 MAPK 通路缓解偏头痛,并为偏头痛治疗药物的研发提供实验依据。

## 参考文献

- [1] Schytz H W, Birk S, Wienecke T, et al. PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura [J]. Brain 2009, 132(1): 16–25.
- [2] Ahn S J, Kim T J, Cha K S, et al. Effects of perampanel on cognition and quantitative electroencephalography in patients with epilepsy [J]. Epilepsy Behav 2021, 115: 107514.
- [3] Hara K, Haranishi Y, Terada T. Intrathecally administered perampanel alleviates neuropathic and inflammatory pain in rats [J]. Eur J pharmacol 2020, 872: 172949.
- [4] Tang Y, Liu S, Shu H, et al. AMPA receptor GluA1 Ser831 phosphorylation is critical for nitroglycerin-induced migraine-like pain [J]. Neuropharmacology 2018, 133: 462–9.
- [5] Divakaran S, Loscalzo J. The role of nitroglycerin and other nitro-gen oxides in cardiovascular therapeutics [J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70(19): 2393–410.
- [6] Iftikhar W, Cheema F F, Khanal S, et al. Migrainous infarction and cortical spreading depression [J]. Discoveries 2020, 8(3): e112.
- [7] Demartini C, Greco R, Zanaboni A M, et al. Nitroglycerin as a

- comparative experimental model of migraine pain: from animal to human and back [J]. *Prog Neurobiol* 2019 ,177: 15 –32.
- [8] Brewerton T D , George M S. Is migraine related to the eating disorders? [J]. *Int J Eat Disord* ,1993 ,14( 1) : 75 –9.
- [9] D Andrea G , Ostuzzi R , Bolner A , et al. Is migraine a risk factor for the occurrence of eating disorders? Prevalence and biochemical evidences [J]. *Neurol Sci* 2012 ,33 Suppl 1: S71 –6.
- [10] Körtési T , Tuka B , Nyári A , et al. The effect of orofacial complete Freund's adjuvant treatment on the expression of migraine-related molecules [J]. *J Headache Pain* 2019 ,20( 1) : 43.
- [11] Syed A U , Koide M , Braas K M , et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ( PACAP) potentially dilates middle meningeal arteries: implications for migraine [J]. *J Mol Neurosci* 2012 ,48( 3) : 574 –83.
- [12] 王 祥,袁晓阳,徐 靓,等. CP-25 调控 GRK2/p38MAPK 信号在血管紧张素Ⅱ 诱导小鼠系膜细胞增殖中的作用 [J]. *安徽医科大学学报* 2021 ,56( 11) : 1774 –9.
- [13] Lai T , Chen L , Chen X , et al. Rhynchophylline attenuates migraine in trigeminal nucleus caudalis in nitroglycerin-induced rat model by inhibiting MAPK/NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Mol Cell Biochem* 2019 ,461( 1 –2) : 205 –12.

## Effects of perampanel on MAPK signal pathway in nitroglycerin-induced migraine rats and its mechanism

Zhai Qingling<sup>1,2</sup> , Xie Danna<sup>1,2</sup> , Wang Kaixin<sup>1,2</sup> , Wang Xuezhen<sup>1</sup> , Chen Jinbo<sup>1</sup> , Dong Xiaomeng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>*Dept of Neurology , Binzhou Medical University Hospital , Binzhou 256600;*

<sup>2</sup>*Binzhou Medical University , Yantai 264000)*

**Abstract Objective** To explore the effect of perampanel regulation of mitogen activated protein kinase ( MAPK) signaling pathway after injection of nitroglycerin ( NTG) induced migraine rats. **Methods** Thirty-two male SD rats were randomly divided into four groups with eight in each group: normal saline , NTG group , perampanel 50  $\mu$ g/kg + NTG group , perampanel 100  $\mu$ g/kg + NTG group. The time of scratching the head and the number of climbing the cage were observed , the periorbital pain threshold of the rat was measured by the fiber filament , and the photophobia of the rat was observed in the light and dark box experiment. Immunofluorescence was used to detect the rat TGs PACAP expression level; RT-qPCR was used to determine the expression level of PACAP mRNA and ELISA was used to detect the concentration of PACAP in rat blood. Meanwhile , Western blot was used to detect p-p38MAPK , p-JNK , p-ERK protein expression level in rats TG. **Results** Compared with the control group , the periorbital withdrawal threshold decreased , the cage climbing behaviors and facial grooming behaviors increased , and the time spent in the light compartment in the light –aversive behaviors decreased in the NTG group , the expression levels of PACAP mRNA and protein increased (  $P < 0.05$  ) . While , the perampanel 50  $\mu$ g/kg + NTG group and the perampanel 100  $\mu$ g/kg + NTG group increased the periorbital withdrawal threshold , reduced the cage climbing behaviors and facial grooming behaviors , increased the time spent in the light compartment and decreased the expressions of PACAP mRNA and protein in comparison with the NTG group (  $P < 0.05$  ) . Compared with the control group , the expression levels of p-p38MAPK , p-ERK and p-JNK in NTG group increased (  $P < 0.05$  ) ; compared with the NTG group , the expression levels of p-p38MAPK , p-ERK and p-JNK decreased in perampanel 50  $\mu$ g/kg + NTG group and the perampanel 100  $\mu$ g/kg + NTG group (  $P < 0.05$  ) . **Conclusion** Perampanel may relieve migraine symptoms by inhibiting MAPK signaling pathway.

**Key words** migraine; signaling pathway; perampanel; PACAP; mitogen activated protein kinase