

天麻皂苷对三叉神经节离体培养后降钙素基因相关肽表达影响的机制研究

罗国刚¹, 樊文静¹, 袁兴运¹, 袁博博¹, 吕社民², 曹永孝³, 徐仓宝^{4*}

(西安交通大学医学院 1. 第一附属医院神经内科; 2. 生物化学与分子生物系中心实验室;

3. 药理学系教育部环境与基因相关性疾病重点实验室, 陕西 西安 710061;

4. Division of Experimental Vascular Research, Institution of Medicine, Lund University, Lund 22184, Sweden)

摘要: 利用成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠三叉神经节 (trigeminal ganglion, TG) 离体培养模型, 深入研究天麻活性成分天麻皂苷对 TG 内降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 表达水平的影响以及相关的细胞内信号转导机制。将不同质量浓度的天麻皂苷与 TG 孵育后, 免疫组织化学染色比较 CGRP 免疫反应 (CGRP-immunoreactivity, CGRP-ir) 阳性细胞数; 实时定量 PCR (real-time RT-PCR) 对比与琥珀酸舒马普坦和盐酸氟桂利嗪作用下 CGRP-mRNA 表达变化; Western blotting 检测进一步对比与细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase1/2, ERK1/2) 通路特异性阻滞剂 PD98059、U0126 作用下, 磷酸化 ERK1/2 蛋白 (phosphorylated ERK1/2, pERK1/2) 水平变化。实验结果显示, 天麻皂苷 (5 和 10 mmol·L⁻¹) 与 1.2 mmol·L⁻¹ 琥珀酸舒马普坦程度相当地显著降低 TG 内 CGRP-ir (+) 细胞表达, 而天麻皂苷 (2.5、20 和 40 mmol·L⁻¹) 对 CGRP-ir (+) 细胞表达与培养组比较无显著差别。天麻皂苷 (5 和 10 mmol·L⁻¹) 与 1.2 mmol·L⁻¹ 琥珀酸舒马普坦和 10 μmol·L⁻¹ 盐酸氟桂利嗪分别显著降低 CGRP-mRNA 表达水平 ($P < 0.01$)。Western blotting 检测结果显示, 天麻皂苷 (5 和 10 mmol·L⁻¹) 降低 TG 内 pERK1/2 蛋白表达水平的能力接近于 PD98059 和 U0126 (10 μmol·L⁻¹)。研究结果表明, 天麻皂苷 (5 和 10 mmol·L⁻¹) 能显著抑制大鼠 TG 内 CGRP-ir (+) 细胞表达, 抑制 CGRP mRNA 表达的强度相当于琥珀酸舒马普坦和盐酸氟桂利嗪; 降低 TG 内 pERK1/2 蛋白表达的能力接近于 ERK1/2 信号通路特异性阻滞剂的作用, 提示天麻皂苷可能通过细胞内 ERK1/2 信号转导通路抑制 CGRP 上调表达。

关键词: 天麻皂苷; 降钙素基因相关肽; 细胞外信号调节激酶 1/2; 三叉神经节; 信号转导

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 12-1451-06

The pharmacological mechanism of gastrodin on calcitonin gene-related peptide of cultured rat trigeminal ganglion

LUO Guo-gang¹, FAN Wen-jing¹, YUAN Xing-yun¹, YUAN Bo-bo¹, LÜ She-min²,
CAO Yong-xiao³, XU Cang-bao^{4*}

(1. Department of Neurology, First Affiliated Hospital, 2. Faculty of Biochemical and Molecular Biology Department,
3. Department of Pharmacology, Key Laboratory of Environment and Genes Related Disease, Ministry of Education,
Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;

4. Division of Experimental Vascular Research, Institution of Medicine, Lund University, Lund 22184, Sweden)

Abstract: The Chinese herbal medicine Tianma (*Gastrodia elata*) has been used for treating and preventing primary headache over thousands of years, but the exact pharmacological mechanism of the main bioactive

收稿日期: 2011-06-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30570631); 西安交通大学国际交流与合作重点项目 (0702-07).

*通讯作者 Tel: 46-46-2220825, E-mail: cangbaoxu@yahoo.com

ingredient gastrodin remains unclear. In present study, the effects of gastrodin on calcitonin gene-related peptide (CGRP) and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase1/2 (pERK1/2) expression were observed in rat trigeminal ganglion (TG) after *in vitro* organ culture to explore the underlying intracellular mechanism of gastrodin on primary vascular-associated headache. CGRP-immunoreactivity (CGRP-ir) positive neurons count, positive area, mean optical density and integrated optical density by means of immunohistochemistry stain were compared at different concentrations of gastrodin, which was separately co-incubated with DMEM in SD rat TG for 24 hours. Only at 5 or 10 mmol·L⁻¹ concentration, gastrodin demonstrated significantly concentration-dependent reduction of CGRP-ir (+) expression and its action closed to 1.2 mmol·L⁻¹ sumatriptan succinate. While at 2.5, 20, and 40 mmol·L⁻¹ concentration, gastrodin did not show remarkable effects on CGRP-ir (+) expression. The optimal concentration of gastrodin (5 and 10 mmol·L⁻¹) similarly inhibited CGRP-mRNA expression level separately compared with 1.2 mmol·L⁻¹ sumatriptan succinate and 10 μmol·L⁻¹ flunarizine hydrochloride, which was quantitatively analyzed by real-time PCR (RT-PCR). pERK1/2 level was examined by Western blotting after co-cultured with optimal concentration of gastrodin and effective specific ERK1/2 pathway inhibitors PD98059, U0126. The result indicated that gastrodin significantly reduced pERK1/2 protein actions similarly to ERK1/2 pathway specific blockade. It suggests ERK1/2 signaling transduction pathway may be involved in gastrodin intracellular mechanism. This study indicates gastrodin (5 and 10 mmol·L⁻¹) can remarkably reduce CGRP-ir (+) neuron, CGRP-mRNA and pERK1/2 expression level in cultured rat TG, with its actions similar to the effective concentration of sumatriptan succinate, flunarizine hydrochloride and specific ERK1/2 pathway blocker. The intracellular signaling transduction ERK1/2 pathway may be involved in the gastrodin reducing CGRP up-regulation in rat TG after organ culture.

Key words: gastrodin; calcitonin gene-related peptide; ERK1/2; trigeminal ganglion; signal transduction

中药天麻防治头痛在中国已有上千年历史^[1, 2], 现代药物分析提纯出天麻最主要的生物活性成分是天麻皂苷 (4-羟甲基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷, 图 1) 或称天麻素 (gastrodin), 易溶于水并易通过血脑屏障^[3, 4]、无依赖性或成瘾性, 安全低毒而广泛用于偏头痛、慢性反复发作性头痛、三叉神经自主性头痛等血管相关性头痛治疗^[5]。但是, 天麻皂苷防治血管性头痛确切的药理作用机制目前并不清楚, 本研究以三叉神经-血管系统激活学说为基础^[6, 7], 利用大鼠三叉神经节 (trigeminal ganglion, TG) 离体培养模型^[8, 9], 选取欧洲神经病学联盟 (EFNS) 推荐的偏头痛防治一线药物琥珀酸舒马普坦和盐酸氟桂利嗪作为对照^[10], 比较天麻皂苷对 TG 内降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 表达和磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase1/2, pERK1/2) 水平影响, 从而探讨天麻皂苷预防和治疗血管性头痛的药理作用机制。

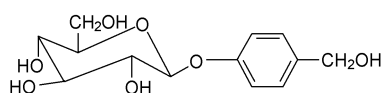


Figure 1 Chemical structure of gastrodin

材料与方法

主要试剂及配制 天麻皂苷 (图 1)^[11] 的相对分子质量为 295.38, 购自南京泽朗医药科技有限公司。天麻皂苷原药 1.475 g 溶于 0.9% 盐水 5 mL, 超声振荡至完全溶解, 配成 1 mol·L⁻¹ (295 g·L⁻¹) 母液。琥珀酸舒马普坦 (sumatriptan succinate) 的相对分子质量为 413.49, 取 10 mg 溶于灭菌双蒸水 0.5 mL, 配成 48 mmol·L⁻¹ 母液。细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2) 信号转导通路关键激酶 Raf-1 特异性阻滞剂 PD98059 和 U0126 溶于二甲基亚砷 (dimethyl sulphoxide, DMSO), 配制成 10 mmol·L⁻¹ 母液, -20 °C 保存备用。琥珀酸舒马普坦、兔抗鼠 CGRP 单克隆抗体、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培养液、丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠 (SDS)、牛血清白蛋白、四甲基乙二胺 (TEMED) 及 Tween 20 均购自 Sigma 公司 (USA)。盐酸氟桂利嗪 (flunarizine hydrochloride) 购自武汉生物科技发展有限公司; pERK1/2 和 ERK1/2 羊单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; β-actin 单克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology; 生物素酰化的羊抗兔和羊抗鼠 IgG 以及 RIPA 蛋白裂解液均购自 Pioneer Biotechnology 公司; SuperSignal 化

学发光试剂盒购自 Pierce Biotechnology; Tris-base 碱和过硫酸铵购自 Solarbio Technology 公司; 酸性定影粉及显影粉购自天津亨达感光材料厂。

实验动物分组及 TG 离体培养 成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, SPF 级, 体重 250~300 g, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供。按体重均衡原则随机分组, 每组均 3~5 只大鼠。本研究利用已经较为成熟的大鼠三叉神经节离体培养模型^[6, 9, 12-14], 具体制作过程如下: 大鼠腹腔注射 (ip) 戊巴比妥钠 ($40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 必要时追加剂量) 麻醉后断头处死, 用止血钳沿枕骨大孔处逐层剖开颅骨, 刮掉大脑、小脑后暴露三叉神经, 剪断 3 个神经根后轻轻取出左右两个 TG, 4°C 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS, pH 7.4) 中剔除神经节周围的血管、脂肪、神经鞘膜等结缔组织呈乳白色为止。24 孔培养板内每孔盛 3 mL 的改良 DMEM 培养液 (加青霉素 $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和链霉素 $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以及两性霉素 B $25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 将母液浓度的天麻皂苷、琥珀酸舒马普坦、盐酸氟桂利嗪、U0126、PD98059 等试剂分别加入 DMEM 培养液中配成不同终浓度后, 将同一只大鼠左右两个 TG 分别置入每个培养孔中孵育, 37°C 恒温培养箱中离体培养 24 h, 持续通以含 5% CO_2 的 O_2 使 pH 值保持在 7.40 左右。

免疫组织化学检测 将 TG 浸入含 4% 多聚甲醛的 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 中过夜, 振动切片机冠状位上均匀切成 $30 \text{ }\mu\text{m}$ 厚度的切片。收集组织切片在含 0.3% Triton X-100 (PBST) 和 0.3% 过氧化氢 PBS 液中, 用 0.1% 牛血清白蛋白封闭抗体 1 h, 然后与兔多克隆 CGRP 抗体 4°C 下孵育 72 h, PBST 再次冲洗, 含生物素的羊抗兔 IgG 抗体 4°C 下搅拌孵育过夜, 2 次漂洗后组织切片置于 1:1000 亲和-生物素复合物 (Vector Laboratories) 稀释液中 2 h。免疫组化反应产物在含 0.05% 3, 3-二氨基联苯胺 (DAB)、0.5% 镍和 0.005% 过氧化氢的 Tris 盐酸缓冲液 (pH 7.6) 中显色, Tris 盐酸缓冲液漂洗组织切片后置于凝胶载玻片上, 加盖玻片前中性红复染。普通光镜观察后 Olympus 荧光显微镜观察, 染色明显的组织切片胞质内出现淡黄色至棕褐色定位明确的颗粒物质为阳性细胞表达。由另一研究者应用 SCIONIMAGE 图像分析软件盲法检测每个视野范围内 CGRP 免疫反应 (CGRP immunoresponse, CGRP-ir) 阳性细胞数百分比 (positive cell percentage, PCP)、阳性表达面积 (area of interest, AOI)、积分光密度 (integrated optical density,

IOD) 和平均光密度 (mean optical density, MOD); 平均光密度 = 积分光密度 / 阳性表达面积 (MOD = IOD/AOI)。图像分析时每个切片取 5 个视野, 剔除染色不均、皱褶或泪滴样图像。

实时定量 RT-PCR RNA proTM 液 (FastPrepA 试剂盒) 1 mL 匀浆处理 TG 后, 按程序提取总 RNA, 1% 普通琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA。cDNA 逆转录采用 GeneAmp RT 试剂盒 (PE Applied Biosystems), Perkin-Elmer 2400 PCR 扩增仪扩增。RT-PCR 采用 GeneAmp SYBR Green PCR 试剂盒和 Perkin-Elmer PCR 仪 (PE, GeneAmp 5700)。根据基因数据库引物表达-2 软件设计引物序列, CGRP (M34090) 上游引物: 5'-GAGGCAGCTACAAGGTTTCAGG-3', 下游引物: 5'-AGGTGTTGGTGCTGGACACA-3'。管家基因 (house keeping gene) β -actin 作为内对照, 上游引物: 5'-CTATCGGCAATGAGCGGTTCC-3', 下游引物: 5'-TGTGTTGGCATAGAGGTCTTTACG-3'。PCR 反应体系为 $50 \text{ }\mu\text{L}$, 开始 50°C 2 min, 95°C 10 min, 然后在 95°C 15 s 和 60°C 1 min 循环 40 次, 反应结束后分离曲线分析法确定反应产物特异性。以 β -actin 为内对照, PCR 循环阈值 (cycle threshold, C_T) 定量分析法比较 CGRP mRNA 相对表达量。标准曲线根据 $C_T = \lg [\text{浓度}/(1+E)]$ 方程绘制, E 代表扩增效率 (根据标准曲线的斜率计算而得), 理想斜率为 3.3, 理想扩增效率为 100%。标准曲线验证 CGRP 和 β -actin 的 cDNA 在 PCR 反应体系中扩增效率相同。

Western blotting 进行蛋白半定量分析 低温下将 TG 剪碎、加入 RIPA 蛋白裂解液 (含 RIPA 蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂) 快速匀浆、裂解、离心提取组织块中总蛋白, Bradford 法测定蛋白质浓度。清洗玻璃板、灌胶、上样、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜。免疫反应: 脱色摇床上摇动封闭 1 h, 室温下与一抗生物素酰化的羊抗兔 IgG 抗体 (biotinylated goat anti-rabbit IgG) 孵育 1~2 h, 室温下脱色摇床上洗膜 3 次, 将硝酸纤维素膜浸入塑料膜中的二抗反应液中缓慢振荡, 室温下与二抗生物素酰化的羊抗鼠 IgG 抗体反应 1 h 后洗膜, 化学发光、显影、定影、拍照。以 β -actin 作内标参考, Bandscan 5.0 凝胶成像系统分析目标条带的最大灰度对数和光密度 (IOD), 测定各样品 IOD 值作为蛋白相对表达量。

统计学处理 应用 SPSS Statistics 17.0 统计软件和 GraphPad Prism 4.0 作图软件。免疫组化分析时 CGRP-ir (+) 细胞数百分比 PCP、AOI、MOD、IOD

以均数 ± 标准误 (mean ± SE) 表示, 两组间比较采用独立样本间 *t* 检验。CGRP-mRNA、pERK1/2 相对表达量先做正态性检验和方差齐性检验, 符合正态分布且方差相齐时采用单因素 ANOVA 方差分析。

结果

1 不同浓度天麻皂苷作用下 SD 大鼠 TG 内 CGRP-ir (+) 物质表达

将不同体积天麻皂苷母液加入 DMEM 培养液中, 分别配成 2.5、5、10、20 和 40 mmol·L⁻¹ (终浓度) 与 1.2 mmol·L⁻¹ 琥珀酸舒马普坦 (终浓度)。将离体 TG 孵育 24 h 后与新鲜组和单纯培养组相比, 免疫组化染色显示 CGRP-ir (+) 物质在新鲜 TG 内神经元细胞几乎不表达, 离体培养后中、小型神经元细胞胞体内出现大量棕褐色菊花样、周围胞浆点状着色的 CGRP-ir (+) 物质, 部分细胞浆内染色致密均匀且中心部位略淡 (图 2)。SCIONIMAGE 图像分析显示, 天麻皂苷 5 和 10 mmol·L⁻¹ 浓度组 CGRP-ir(+) 的 PCP (%)、AOI (μm²)、MOD 和 IOD 值低于单纯培养组 (均为 *P* < 0.01), 与 1.2 mmol·L⁻¹ 琥珀酸舒马普坦组接近; 而 2.5、20 和 40 mmol·L⁻¹ 浓度组与培养组无显著差异 (表 1)。

2 有效浓度天麻皂苷对 TG 内 CGRP-mRNA 表达水平影响

RT-PCR 分析显示: 天麻皂苷 (5 和 10 mmol·L⁻¹)、琥珀酸舒马普坦 (1.2 mmol·L⁻¹)、盐酸氟桂利嗪 (10 μmol·L⁻¹) 分别与 TG 孵育 24 h 后, CGRP-mRNA 表达水平较培养组显著降低 (*P* < 0.01, 图 3)。

3 有效浓度天麻皂苷对 TG 内 pERK1/2 蛋白表达的影响

天麻皂苷 (5 和 10 mmol·L⁻¹)、U0126、PD98059

阻滞剂 (10 μmol·L⁻¹) 分别与 TG 离体孵育 24 h 后, β-actin 蛋白表达量作内参照, Western blotting 蛋白半

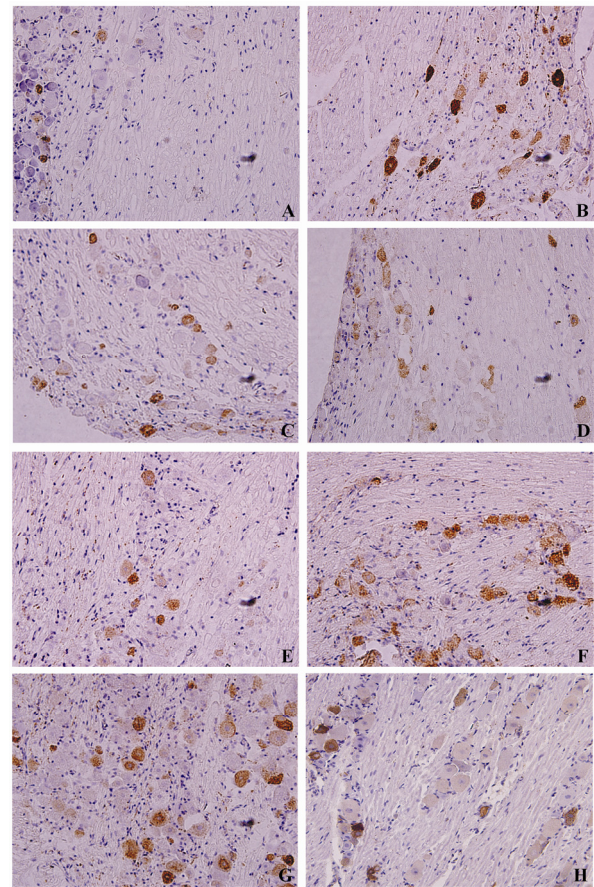


Figure 2 Immunohistochemistry stain indicates CGRP-ir (+) neuron expression alteration after co-incubation with different concentrations of gastrodin, sumatriptan succinate by comparing with control and fresh group of rat TG under light microscope (immunohistochemistry, paraffin section, ×400). A: Fresh group; B: Control group; C: Gastrodin (2.5 mmol·L⁻¹); D: Gastrodin (5 mmol·L⁻¹); E: Gastrodin (10 mmol·L⁻¹); F: Gastrodin (20 mmol·L⁻¹); G: Gastrodin (40 mmol·L⁻¹); H: Sumatriptan succinate (1.2 mmol·L⁻¹)

Table 1 CGRP-ir (+) neurons expression alteration in rat trigeminal ganglion which was determined by immunohistochemistry stain and compared at different concentrations of gastrodin, sumatriptan succinate, control and fresh group after 24 h organ culture. *n* = 5 - 8, mean ± SE. ***P* < 0.01 vs control group. CGRP-ir (+): Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity positive neuron; PCP: Positive cells percentage; AOI: Area of optic interest; MOD: Mean optical density; IOD: Integrated optical density

Group	C/mmol·L ⁻¹	PCP/%	AOI/μm ²	MOD	IOD
Control		80.655 ± 0.786	191.286 ± 3.126	0.743 ± 0.012	141.482 ± 3.011
Fresh		36.003 ± 0.899	99.195 ± 2.541	0.416 ± 0.011	42.798 ± 1.753
Gastrodin	2.5	76.453 ± 4.001	110.04 ± 3.332	0.697 ± 0.008	90.509 ± 1.396
	5	45.154 ± 2.043**	64.497 ± 10.902**	0.394 ± 0.068**	25.642 ± 4.296**
	10	43.672 ± 1.918**	61.343 ± 8.631**	0.364 ± 0.059**	22.668 ± 3.002**
	20	73.518 ± 3.027	110.701 ± 7.656	0.742 ± 0.054	97.219 ± 2.026
	40	80.732 ± 3.178	126.765 ± 11.058	0.742 ± 0.059	100.631 ± 11.266
Sumatriptan succinate	1.2	42.445 ± 1.216**	124.556 ± 3.636**	0.398 ± 0.009**	69.125 ± 3.411**

定量分析显示各干预组的 pERK1/2 蛋白相对表达量较培养组明显降低 (均为 $P < 0.01$, t 检验); 天麻皂苷与 ERK1/2 阻滞剂 pERK1/2 蛋白表达在 44 kD 与 42 kD 条带处的降低水平相近 (图 4)。

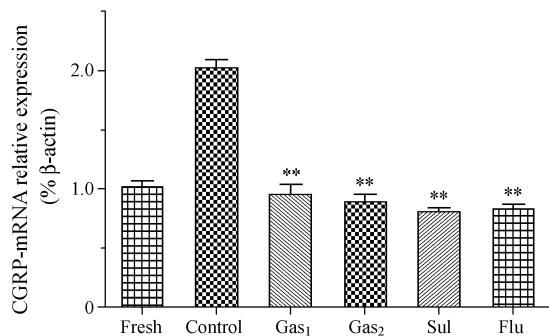


Figure 3 CGRP-mRNA relative expression compares with the optimal concentrations of gastrodin, sumatriptan succinate and flunarizine hydrochloride after 24 h organ culture determined by RT-PCR. ** $P < 0.01$ vs control group. Gas₁: Gastrodin (5 mmol·L⁻¹); Gas₂: Gastrodin (10 mmol·L⁻¹); Sul: Sumatriptan succinate (1.2 mmol·L⁻¹); Flu: Flunarizine hydrochloride (10 μmol·L⁻¹)

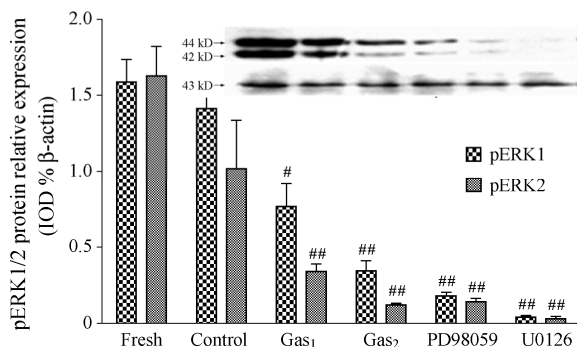


Figure 4 pERK1/2 protein relative expression alteration semi-quantified by Western blotting after co-cultured with optimal concentrations of gastrodin, specific ERK1/2 pathway inhibitors PD98059, U0126 for 24 h which was compared with control and fresh rat trigeminal ganglion. # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs control group. Gas₁: Gastrodin (5 mmol·L⁻¹); Gas₂: Gastrodin (10 mmol·L⁻¹); PD98059: 10 μmol·L⁻¹; U0126: 10 μmol·L⁻¹

讨论

EFNS 于 2006 年提出的偏头痛急性期治疗和预防指南中, 曲普坦类药物和非甾体类抗炎药是偏头痛急性发作治疗首选, 钙离子拮抗剂氟桂利嗪、 β -受体阻滞剂、抗癫痫药丙戊酸和托吡酯为一线预防性用药^[10], 这是目前临床上偏头痛防治的主要依据。本研究利用大鼠三叉神经节离体培养模型, 以曲普坦类代表药物琥珀酸舒马普坦和一线预防用药盐酸氟桂利嗪为参照, 对比验证天麻皂苷治疗和预防偏头痛

的药理作用及细胞内机制。免疫组化染色结果分析显示, 一定浓度范围 (5 和 10 mmol·L⁻¹) 天麻皂苷能显著降低三叉神经节内 CGRP-ir (+) 细胞表达 (抑制强度接近于舒马普坦), 抑制 CGRP-mRNA 表达水平的强度与舒马普坦和氟桂利嗪相当; 而且天麻皂苷 (5 和 10 mmol·L⁻¹) 显著降低 pERK1/2 蛋白水平的强度, 接近于特异性阻滞 ERK1/2 信号通路关键蛋白激酶 Raf-1 的效果; 但是天麻皂苷 (2.5、20 和 40 mmol·L⁻¹) 对 CGRP-ir (+) 神经元细胞表达无明显影响。这可能与中药双向调节机制以及不同剂量、不同浓度中药制剂激活细胞内不同的信号转导途径而产生不同的生物学效应有关, 具体的天麻皂苷剂量-效应调节机制有待于进一步探索。

前期研究已经证实三叉神经节离体培养后, 促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 系统中 ERK1/2 和 JNK 信号转导通路活化, 通过细胞核内转录因子上调 CGRP-mRNA 和蛋白表达水平^[12, 15]。MAPK 信号转导通路广泛存在于真核细胞, 其中 ERK1/2 通路主要接受激素、神经递质、炎症因子、血管肽类等细胞外信号分子刺激, 通过跨膜信号转导、G-蛋白偶联受体和细胞内一系列蛋白激酶级联活化反应而激活, 产生膜受体表达调变、细胞生长、分化、增殖、移动等生物学效应; JNK 通路主要与应激刺激引起的炎症反应有关^[16, 17]。ERK 蛋白至少包括 ERK1 和 ERK2 两个亚型, 分子量分别为 42 和 44 kD, 两者间有 90% 的同源性, 通过磷酸化而活化。离体三叉神经节在无血清 DMEM 液培养后, 损伤、应激、营养物质缺乏、局部炎症反应等细胞外信号刺激活化细胞膜表面 G-蛋白偶联受体, 依次活化细胞内 Ras、Raf、MEK 等关键性蛋白激酶而进一步将 ERK1/2 蛋白磷酸化, 活化的 ERK1/2 由细胞质进入细胞核, 调节即刻反应基因和迟反应基因表达^[18], 上调 CGRP-mRNA 基因转录和蛋白翻译水平, CGRP 即刻释放增加是血管性头痛急性发作的基础, CGRP 合成水平上调是头痛反复发作和慢性化的基础。最新抗偏头痛药物 CGRP 受体拮抗剂 telcagepant 在欧洲 III 期临床试验显示出良好的应用前景^[19, 20], 但还未广泛用于临床。

本研究提示, 适当浓度天麻皂苷可抑制细胞外信号引发的三叉神经节神经元内 ERK1/2 信号转导通路激活, 明显降低 pERK1/2 蛋白水平, 通过抑制细胞核内 NF- κ B 和 AP-1 等转录因子下调 CGRP-mRNA 和蛋白表达水平, 从而达到防治血管性头痛急性发作和慢性化目的。

References

- [1] Zhang Q, Yang YF, Yu GY. Effects of gastrodin injection on blood pressure and vasoactive substances in treatment of old patients with refractory hypertension: a randomized controlled trial [J]. *J Chin Integ Med (中西医结合学报)*, 2008, 6: 695–699.
- [2] Luo J, Wu ZL, Wang HX. Pharmacokinetic study of gastrodin injection [J]. *Pharm J Chin PLA (解放军药学学报)*, 2006, 22: 391–393.
- [3] Wang Q, Chen GS, Zeng S. Pharmacokinetics of gastrodin in rat plasma and CSF after in and iv [J]. *Int J Pharm*, 2007, 341: 20–25.
- [4] Wang Q, Chen GS, Zeng S. Distribution and metabolism of gastrodin in rat brain [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46: 399–404.
- [5] Yang J, Zhao ZH, Zong CH, et al. Neuroprotective effect of gastrodin on rat with transient middle cerebral artery occlusion [J]. *J Fourth Mil Med Univ (第四军医大学学报)*, 2008, 29: 295–298.
- [6] Luo GG, Xu CB, Edvinsson L. Time-dependent up-regulation of mRNA for CGRP, PACAP and nociceptin in trigeminal ganglia during organ culture [C] // Symposium of the 7th European Headache Federation Congress. Rotterdam: the 7th European Headache Federation Congress, 2004: 175.
- [7] Kristiansen KA, Edvinsson L. Neurogenic inflammation: a study of rat trigeminal ganglion [J]. *J Headache Pain*, 2010, 11: 485–495.
- [8] Yuan BB, Luo GG. The current research situation of experimental animal models of migraine [J]. *Med Recapit (医学综述)*, 2011, 17: 1447–1450.
- [9] Luo GG, Lei L, Lü SM, et al. Organ culture of rat trigeminal ganglion is an ideal *in vitro* model for pathogenesis study and therapeutic target exploration of primary vascular headache [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci) (西安交通大学学报医学版)*, 2009, 30: 562–566.
- [10] Evers S, Frab JA, Fresea A, et al. EFNS guideline on the drug treatment of migraine – report of an EFNS task force [J]. *Eur J Neurol*, 2006, 13: 560–572.
- [11] Xu X, Lu YY, Bie XD. Protective effects of gastrodin on hypoxia-induced toxicity in primary cultures of rat cortical neurons [J]. *Planta Med*, 2007, 73: 650–654.
- [12] Luo GG, Lei L, Fan WJ, et al. Intracellular signaling transduction mechanism study on the modulation of calcitonin gene-related peptide after organ culture of rat trigeminal ganglion [J]. *Chin J Clin Neurosci (中国临床神经科学)*, 2010, 18: 113–118.
- [13] Kuris A, Xu CB, Zhou MF, et al. Enhanced expression of CGRP in rat trigeminal ganglion neurons during cell and organ culture [J]. *Brain Res*, 2007, 1173: 6–13.
- [14] Luo GG, Lei L, Fan WJ, et al. Intracellular mechanism on the modulation of CGRP after organ culture of rat trigeminal ganglion [J]. *Ann Neurol*, 2009, 66: S4–S61.
- [15] Tajti J, Kuris A, Vecsei L, et al. Organ culture of the trigeminal ganglion induces enhanced expression of calcitonin gene-related peptide via activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 [J]. *Cephalalgia*, 2011, 31: 3638–3649.
- [16] Luo GG, Cao YX, Xu CB, et al. ERK1/2 pathway involved in the expression of ET_B receptors of the culturing smooth muscle cells of rat mesenteric artery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 257–262.
- [17] Luo GG, Ma AQ, Xu CB, et al. Involvement of ERK1/2 pathway in endothelin ET_A and ET_B receptor mediated contraction in isolated rat mesenteric artery [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2005, 21: 343–347.
- [18] Luo GG, Jamali R, Cao YX, et al. Vascular endothelin ET (B) receptor-mediated contraction requires phosphorylation of ERK1/2 proteins [J]. *Eur J Pharm*, 2006, 538: 124–131.
- [19] Eftekhari S, Edvinsson L. Possible sites of action of the new calcitonin gene-related peptide receptor antagonists [J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2010, 3: 369–378.
- [20] Ho TW, Edvinsson L, Goadsby PJ. CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology [J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6: 573–582.