

• 论 著 •

岛叶通过 GluA1 受体和腺苷酸环化酶 1 参与调控大鼠头痛及相关焦虑行为^{*}李 扬^{1,2} 李晨浩^{1,2} 毛静瑞^{1,2} 张雯雯^{1,3} 马真捷^{1,2} 韩 珣¹ 唐闻晶¹刘若卓¹ 于生元^{1△} 刘颖璐^{1△}(¹ 解放军总医院第一医学中心神经内科医学部, 北京 100853; ² 解放军医学院, 北京 100853; ³ 南开大学医学院, 天津 300071)

摘 要 目的: 通过大鼠模型明确岛叶是否参与偏头痛发病并探索其机制。**方法:** 连续硬膜外注射炎症汤建立慢性偏头痛 (chronic migraine, CM) 大鼠模型。*von Frey* 纤维丝评估眶周机械阈值。通过旷场和高架十字迷宫实验观察动物焦虑行为。使用免疫印迹实验检测岛叶 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, AMPA) 受体亚基 1-GluA1 受体及腺苷酸环化酶 1 (adenylate cyclase 1, AC1) 的表达。通过双侧岛叶注射 AC1 抑制剂探索可能的机制。**结果:** 连续炎症汤刺激硬脑膜可诱导大鼠产生偏头痛样头痛及焦虑行为。与对照组相比, CM 组岛叶的 c-Fos、GluA1 及其磷酸化 (p-GluA1-S845) 和 AC1 的表达显著增加。岛叶注射 AC1 抑制剂可缓解大鼠的痛觉过敏和焦虑行为, 降低岛叶 AC1 和 GluA1 表达量及 p-GluA1-S845 水平。**结论:** 岛叶可能通过 GluA1 及 AC1 参与调控大鼠偏头痛样头痛及焦虑行为。

关键词 岛叶; 偏头痛; 焦虑; 腺苷酸环化酶 1

Insula is involved in the regulation of headache and related anxiety behaviors rats through GluA1 receptor and adenylate cyclase 1^{*}LI Yang^{1,2}, LI Chen-hao^{1,2}, MAO Jing-rui^{1,2}, ZHANG Wen-wen^{1,3}, MA Zhen-jie^{1,2}, HAN Xun¹, TANG Wen-jing¹, LIU Ruo-zhuo¹, YU Sheng-yuan^{1△}, LIU Ying-lu^{1△}(¹ Department of Neurology, The First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ² Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China; ³ School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Objective: This study aims to determine the role of the insula in the pathogenesis of migraine and explore its underlying mechanisms through a rat model. **Methods:** A chronic migraine (CM) rat model was established by continuous dural infusion of inflammatory soup. The periorbital mechanical threshold was assessed using *von Frey* filaments. Anxiety behaviors in animals were observed through open field test and elevated plus maze test. The expression of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor subunit 1-GluA1 receptor and adenylate cyclase 1 (AC1) in the insula was detected by western blot test. A potential mechanism was explored by injecting an AC1 inhibitor bilaterally into the insula. **Results:** Continuous inflammatory soup stimulation of the dura mater could induce migraine-like headache and anxiety behaviors in rats. Compared with the control group, the expression of c-Fos, GluA1, the phosphorylate of GluA1 (p-GluA1-S845), and AC1 in the insula of the CM group significantly increased. Injection of the AC1 inhibitor into the insula could alleviate hyperalgesia and anxiety behaviors in rats, and reduce the expression level of AC1, GluA1 and p-GluA1-S845 in the insula. **Conclusion:** The insula may regulate migraine-like headache and anxiety behaviors in rats through GluA1 and AC1.

Keywords insula; migraine; anxiety; adenylate cyclase 1

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金 (82101288)

[△] 通信作者 于生元 yusy1963@126.com; 刘颖璐 ly1.jane@163.com



偏头痛是全球最常见的神经系统疾病之一。根据最近的全球疾病负担分析,偏头痛是第二大致失能性疾病,在50岁以下的女性中则位居第一^[1]。本团队的一项入户调查显示,中国人群偏头痛的年患病率为9.3%,预计年损失高达3317亿元人民币^[2]。其中,慢性偏头痛(chronic migraine, CM)能导致更严重的失能表现,且多与焦虑、抑郁等精神疾病共患,部分病人治疗效果欠佳,严重影响生活质量,为家庭及社会带来了严重的医疗和经济负担^[3,4]。

有研究显示偏头痛是一种脑功能障碍性疾病,涉及前扣带回(anterior cingulate cortex, ACC)、岛叶、三叉神经脊束核等多个脑区^[5]。其中岛叶在大脑功能中具有重要地位,参与包括神经病理性疼痛和炎性痛在内的多种类型疼痛的调控^[6,7],但岛叶与偏头痛发病机制的关联研究却很少报道。在一项脑功能成像研究中显示,CM病人的病程长短与前岛叶和背内侧丘脑,前岛叶和中脑导水管周围灰质之间的功能连接强度显著相关^[8]。另一项研究表明,在患有偏头痛的女性病人中,其岛叶皮质厚度较同龄健康女性增厚^[9]。但偏头痛发病机制中具体通过什么途径影响岛叶结构和(或)功能变化尚未可知。此外,岛叶是参与认知与情绪调节的重要脑区^[6]。一项临床研究显示,选择性5-羟色胺再摄取抑制剂和行为认知疗法可减少病人岛叶和杏仁核在焦虑和抑郁发病期间的活动,且岛叶和杏仁核活动的减少程度与焦虑症状的减少情况呈正相关^[10]。然而,岛叶在偏头痛病理情况下是否仍能调节相关焦虑等情绪行为尚不清楚。

既往研究表明,谷氨酸受体及其相关信号分子积极参与疼痛及焦虑抑郁等情绪障碍的发生与调节^[10,11]。其中,在小鼠神经结扎的慢性疼痛模型中发现, α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid, AMPA)受体亚基1-GluA1上调和磷酸化改变可导致岛叶神经元的兴奋性增强^[12]。Mcginnis等^[13]研究表明,小鼠酒精戒断引起的焦虑情绪与AMPA受体介导的岛叶-杏仁核通路相关。基于此,我们推测岛叶可能通过谷氨酸受体,尤其是AMPA受体参与调控偏头痛及相关焦虑行为。

环腺苷酸(cyclic AMP, cAMP)作为细胞内关键的第二信使,在学习和记忆、慢性疼痛、情绪恐惧和药物滥用等生理功能中起重要作用^[14]。腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)具有多个分类亚型,可在细胞内将ATP催化生成cAMP。其中,AC1主要在神经系统中表达,且与AMPA受体存在相互调节作用^[14-16]。在慢性疼痛模型动物中发现,

AMPA受体介导钙离子与钙调蛋白结合,使AC1通过激活cAMP增加蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)的表达,激活的PKA可进一步影响AMPA受体及其磷酸化的表达变化,因此,AC1在AMPA受体相关的信号通路中具有重要作用^[15-17]。据报道,同时敲除小鼠的AC1和AC8基因可表现出明显的镇痛作用,缓解其炎性痛、深部肌肉疼痛和神经病理性疼痛,而仅敲除小鼠的AC1基因,除镇痛作用外,其运动功能、记忆及情绪表现与正常小鼠相比无明显变化。实验证实,AC1的抑制剂NB001(5-[[2-(6-Amino-9H-purin-9-yl)ethyl]amino]-1-ol)亦可在动物模型中缓解多种疼痛表现^[18]。基于此,本研究首次应用CM动物模型,通过行为学和组织学等方法探究岛叶在偏头痛及相关焦虑行为中的作用机制,旨在为理解偏头痛发病机制及未来新型治疗方案提供科学依据。

方 法

1. 实验材料

实验动物:SPF级成年雄性Sprague Dawley (SD)大鼠44只,8~9周龄,购自北京斯贝福生物技术有限公司[许可证号SCXZ(京2019-0010)],饲养在温度22~24℃、湿度40%~60%和光照(12 h光/暗循环)控制的环境中,允许自由获取食物和水。饲养1周后用于实验。本研究通过中国人民解放军总医院医学伦理委员会审核,严格遵守动物实验伦理相关规定。

主要仪器及耗材:旷场设备(上海欣软);von Frey 纤毛机械刺激针套件(Anesthesio);微量注射器(25 μ l; 10 μ l; 上海高鸽,平头);药物注射套管套装(瑞沃德,62001、62002、62101、62102、62201、62202、62513);聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(麦克林,IPFL00010)。

主要试剂:5-羟色胺(Sigma-Aldrich, H9523);前列腺素E2(麦克林, P860711);组胺(Sigma-Aldrich);缓激肽(麦克林, B860429);磷酸盐缓冲液(PBS, Solarbio, P1010)。用PBS溶液溶解配制成含有2 mM 5-羟色胺、0.2 mM 前列腺素E2、2 mM 组胺、2 mM 缓激肽的炎症汤(inflammatory soup, IS)溶液。NB001(HTS 09836; 卓敏教授实验室馈赠)。免疫印迹实验:一抗:c-Fos(1:1000, cell signaling technology, #2250)、GluA1(1:50000, Proteintech, 67642-1-Ig)、p-GluA1-S845(1:2000, cell signaling technology, #8084)、AC1(1:1000, abcam,

ab69597) 和 β -actin (1:3000, Proteintech, HRP-66009)。抗鼠/兔二抗 (1:3000, Proteintech, SA00001-1, SA00001-2)。蛋白酶抑制剂混合物 (碧云天, P1049-1); 磷酸酶抑制剂混合物 (碧云天, P1049-2); RIPA 裂解液 (碧云天, P0013B); BCA 蛋白含量检测试剂盒 (碧云天, AQ526); SDS-PAGE 预制胶 (碧云天, AQ128-01); 1 min 快速封闭液 (C220701, 阳光英锐)。

2. 实验方法

(1) CM 大鼠模型建立: 造模方式与既往实验相同^[19]。首先将 SD 雄性大鼠用戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔麻醉, 然后将大鼠固定在立体定位仪上, 切开背侧皮肤, 露出颅骨。在矢状缝右侧 1.5 mm、前囟后方 1.5 mm 处钻直径 1 mm 的小孔用于置入给药套管 (直径 1 mm, 长 1 mm), 手术保证硬脑膜完整。随后用螺丝和牙科水泥固定给药套管, 缝合头皮, 仅在皮外露出给药套管帽。所有大鼠恢复 2 天后用 PBS 溶液检查给药套管是否通畅。手术成功的大鼠单笼饲养恢复 7 天后进行实验。在大鼠清醒时, 通过给药套管向硬膜输注 10 μ l IS 以刺激大鼠上矢状窦旁硬脑膜 (共 14 次, 每日 1 次) 构建 CM 大鼠模型 (CM 组)。对照组 (Con 组) 在相同条件下向硬膜输注等体积 PBS。每日在 IS 或 PBS 输注前 5 min, 通过 von Frey 纤维丝随机测定大鼠一侧眶周的机械阈值以验证造模效果。每组 12 只大鼠, 7 只用于行为学实验, 5 只用于免疫印迹实验。实验流程见图 1。

(2) 岛叶微量注射 NB001: 在固定 IS 给药套管的同时, 在双侧岛叶放置直径 0.56 mm 的套管 (左侧和右侧各 5.7 mm、距前囟 0 mm、长 7.7 mm)。图 2 箭头所示为双侧岛叶立体定位注射位置示意图。在第 14 天, 即停止 IS 刺激 1 天后开始进行岛叶立体定位注射, 用微量注射器向双侧岛叶分别缓慢注射 1 μ l 选择性 AC1 抑制剂 NB001 (10 mg/ml) 或生理盐水 (normal saline, NS), 每日 1 次, 连续注射 3 天, 即 NB001 组和 NS 组, 每组 10 只大鼠, 5 只用于行为学实验 (其中 1 只在行为学实验结束后行免疫荧光染色查看岛叶注射位置), 5 只用于免疫印迹实验。

NB001 使用剂量及注射方法参考既往实验^[16]。

(3) 眶周机械阈值测定: 每天 (第 0 至第 17 天) 在药物 (IS/PBS/NB001/NS) 输注前 5 min, 用 von Frey 纤维丝 (1.0~26 g) 测量眶周机械阈值。测量前将每只大鼠置于塑料盒中适应 30 min。测量时, 将 von Frey 纤维丝垂直施加于眶周皮肤, 直至纤维丝弯曲, 并保持 5 秒或直到大鼠表现出阳性反应。阳性反应包括头退缩、发声和前爪拨开纤维丝。选择 3 个不同的眶周位置 (外眦、眶上和前额) 刺激^[20]。当 2 个或 3 个刺激点出现阳性反应时, 将纤维丝的重量作为其眶周机械阈值。重复上述过程 3 次。纤维丝由低刻度 (1.0 g) 开始向高刻度递增, 同一刻度的纤维丝每个刺激位点测量 1 次。对于 26 g 的纤维丝无阳性反应的大鼠, 将 26 g 记录为其眶周机械阈值。

(4) 旷场实验: 实验全程在黑暗条件下进行。实验开始前将大鼠在黑暗的行为学分析室适应 3~4 h。每只大鼠测试前用 75% 酒精溶液擦拭仪器消除嗅觉线索。旷场实验装置由一个圆形的黑色底座 (直径 120 cm) 和周围的黑色墙壁 (高 40 cm) 组成。内腔为直径 90 cm 的圆, 外空间为环形。将大鼠背向实验人员置于旷场中央, 然后采用动物行为轨迹分析系统记录其活动, 包括总路程、中央路程、进入中央区时间及次数, 共记录 5 min。在 IS 给药第 0 天和第 14 天对 IS 组及 PBS 组进行旷场行为观察。NB001 组及 NS 组的旷场行为观察时间是 IS 刺激第 14 天及 NB001 给药 3 天后, 即实验第 17 天。

(5) 高架十字迷宫 (elevated plus maze, EPM) 实验: EPM 实验环境及动物适应时间与旷场实验相同。EPM 装置由两个对立开放臂 (50 cm $\times$ 10 cm) 和两个对立闭合臂 (50 cm $\times$ 10 cm $\times$ 40 cm) 组成。迷宫中心是一个 10 cm $\times$ 10 cm 的开放区域, 迷宫高出地面 60 cm。在测试开始时, 将大鼠背向实验人员置于 EPM 的中央平台, 使其面对其中一只开放臂。采用动物行为轨迹分析系统记录大鼠的总路程和开臂路程。各组大鼠进行高架十字迷宫实验的时间同旷场实验。

(6) 免疫印迹实验: 蛋白制备和蛋白印迹分析按照之前的方法进行^[21]。简单来讲, 在最后 1 次药

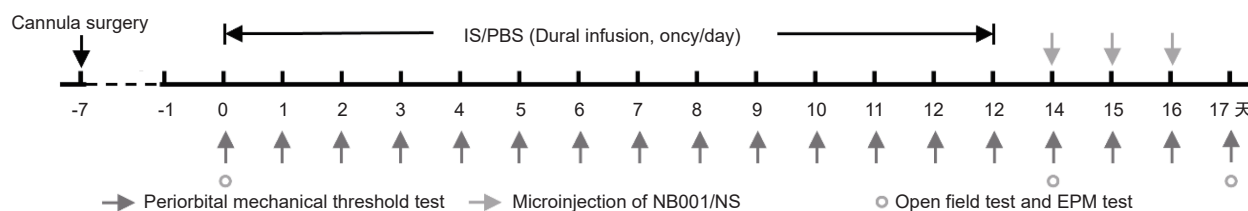


图 1 实验流程图

Fig. 1 Flow chart of the experimental outline

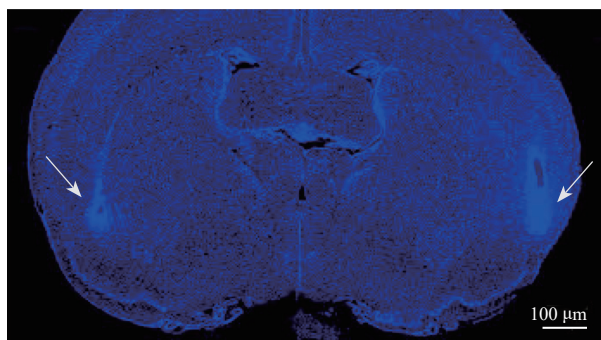


图2 岛叶注射位置图

脑组织冰冻切片免疫荧光染色。蓝色为DAPI染色的细胞核；白色箭头标记为岛叶立体定位注射位置

Fig. 2 Layout diagram of insula injection

Immunofluorescence staining was performed on frozen sections of brain tissue. DAPI stained nuclei are shown in blue; The white arrow indicates the sites of the insular stereotaxic injection.

物 (IS/PBS/NB001/NS) 输注 24~28 h 后 (第 14/17 天), 将双侧岛叶脑组织收集并放在 -80°C 保存直至使用。将大鼠脑组织用组织研磨仪低温 (0°C) 研磨后, 用加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制的 RIPA 裂解液在冰上充分裂解后, 在 4°C 条件下离心获取上清。用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度后, 将其稀释至 $3\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。30 μg 蛋白质通过 SDS-PAGE 凝胶进行分离并电转移至 PVDF 膜。用快速封闭液将 PVDF 膜封闭 1 min 后, 使其与相应一抗及二抗相结合。使用 HRP ECL 系统对蛋白条带进行可视化, 然后 ImageJ 1.53t 软件分析灰度值。

3. 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件 (IBM Corp., 美国) 进行统计分析, Prism 8.3 软件进行画图。采用 Shapiro-Wilk 检验分析数据分布情况, 采用 Levene 法检验方差齐性。两组间比较采用双尾独立样本 t 检验或双尾独立样本秩和检验。眶周机械阈值采用两因素重复测量方差分析, 当数据不符合球形假设时, 用 Greenhouse-Geisser 进行校正。数据以均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. CM 大鼠眶周痛觉过敏

CM 组和 Con 组分析结果显示, 药物 IS 和硬膜给药次数存在交互作用 [$F(14, 168) = 12.86, P < 0.001$], IS [$F(1, 12) = 71.29, P < 0.001$] 和硬膜给药次数 [$F(4.46, 53.52) = 12.86, P < 0.001$] 也分别对眶周机械阈值有影响。如图 3A 所示, 在硬膜给药前,

即 CM 组与 Con 组 (每组 7 只) 基线眶周机械阈值无显著差异 ($t = 0.066, P > 0.999$)。在 4 次 IS 注射后, CM 组的眶周机械阈值明显比 Con 组下降 (第 4 天: $t = 4.594, P = 0.011$)。从第 4 天至第 14 天, IS 组的眶周机械阈值始终比 Con 组低 (第 14 天: $t = 9.141, P < 0.001$), 且 CM 造模完成时, CM 组大鼠眶周机械阈值已经稳定在低值, 表示痛觉过敏。

2. CM 大鼠焦虑样行为增加

Con 组和 CM 组大鼠 (每组 7 只) 的旷场行为学记录显示, 在给药前, 总路程 ($t = 0.564, P = 0.583$)、中央路程 ($t = 0.509, P = 0.620$)、中央区时间 ($Z = -0.575, P = 0.565$) 及进入中央区次数 ($t = 0.632, P = 0.539$) 均无显著差异。但在给药第 14 天时, CM 组大鼠在旷场的总路程 ($t = 6.610, P < 0.001$)、中央路程 ($t = 8.630, P < 0.001$)、中央区时间 ($t = 5.147, P < 0.001$) 及进入中央区次数 ($t = 7.625, P < 0.001$) 均明显比 Con 组减少。此外, 第 14 天时 CM 组大鼠在旷场的总路程 ($t = 5.867, P < 0.001$)、中央路程 ($t = 9.043, P < 0.001$)、中央区时间 ($Z = -3.130, P = 0.002$) 及进入中央区次数 ($t = 6.411, P < 0.001$) 均明显比基线减少 (见图 3B-3F)。

Con 组和 CM 组大鼠 (每组 7 只) 的 EPM 实验结果显示, 在给药前, 总路程 ($t = 0.825, P = 0.425$) 和开臂路程 ($t = -0.542, P = 0.597$) 均无显著差异。在 IS 刺激 14 次后, CM 组和 Con 组大鼠在高架十字迷宫中的总路程 ($t = 1.146, P = 0.274$) 无显著差异, 但 CM 组大鼠的开臂路程 ($Z = -3.130, P = 0.002$) 明显比 Con 组减少。此外, 第 14 天时 CM 组大鼠在高架十字迷宫的开臂路程 ($Z = -3.130, P = 0.002$) 明显较基线减少 (见图 3G-3I)。

3. CM 大鼠岛叶 c-Fos、GluA1 及 AC1 表达增加

在 CM 造模完成后, 取岛叶组织 (见图 4A) 做免疫印迹检测。CM 组岛叶 c-Fos 的蛋白表达量明显高于 Con 组 (每组 5 只, $t = 3.548, P = 0.008$, 见图 4B, 4C)。同时, CM 组 AC1 的表达也多于 Con 组 (每组 5 只, $t = 3.066, P = 0.015$; 见图 4B, 4D)。最后, GluA1 (每组 5 只, $t = 2.953, P = 0.018$) 及其磷酸化 p-GluA1-S845 (每组 5 只, $Z = -2.611, P = 0.009$) 在 CM 组岛叶明显多于 Con 组 (见图 4E-4G)。

4. NB001 岛叶注射可改善 CM 大鼠眶周痛觉过敏及焦虑样行为

NB001 组和 NS 组分析结果显示, 药物 NB001 和 NB001 给药次数存在交互作用 [$F(3, 24) = 21.76, P < 0.001$], 药物 NB001 [$F(1, 8) = 36.49, P < 0.001$] 和 NB001 给药次数 [$F(1.14, 9.12) = 24.67, P < 0.001$]

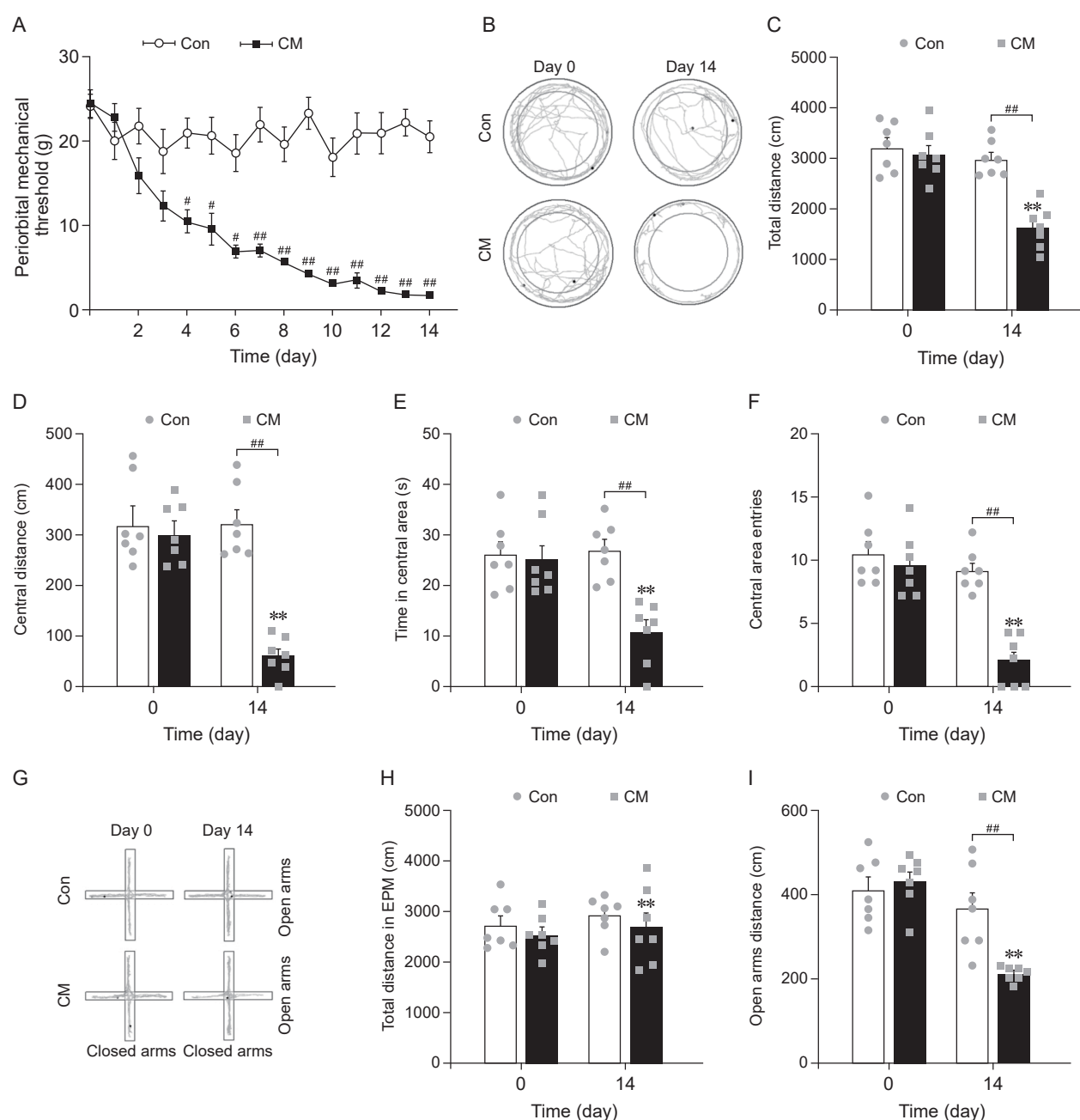


图3 反复IS刺激硬脑膜对大鼠眶周机械阈值及焦虑行为的影响 ($n = 7$ 只/组, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) 反复IS刺激硬脑膜对大鼠眶周机械阈值的影响; (B) 各组大鼠的旷场活动轨迹代表图; (C) 各组大鼠旷场总路程对比; (D) 各组大鼠旷场中央路程对比; (E) 各组大鼠旷场中央时间对比; (F) 各组大鼠进入旷场中央区次数对比; (G) 各组大鼠高架十字迷宫活动轨迹代表图; (H) 各组大鼠在高架十字迷宫的总路程对比; (I) 各组大鼠在高架十字迷宫的开臂路程对比。

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与Con组相比; ** $P < 0.01$, 与第0天相比

Fig. 3 Effects of dural repeated IS stimulation on periorbital mechanical threshold and anxiety behaviors in rats ($n = 7$ rats/group, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Effect of dural repeated IS stimulation on periorbital mechanical threshold in rats; (B) Representative open field activity tracks for each group of rats; (C) Comparison of total open field distance traveled by each group of rats; (D) Comparison of central open field distance traveled by each group of rats; (E) Comparison of time spent in the central open field by each group of rats; (F) Comparison of the number of entries into the central open field area by each group of rats; (G) Representative EPM activity tracks for each group of rats; (H) Comparison of total distance traveled by each group of rats in the EPM; (I) Comparison of the open-arm distance traveled by each group of rats in the EPM.

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with the group Con; ** $P < 0.01$, compared with day 0.

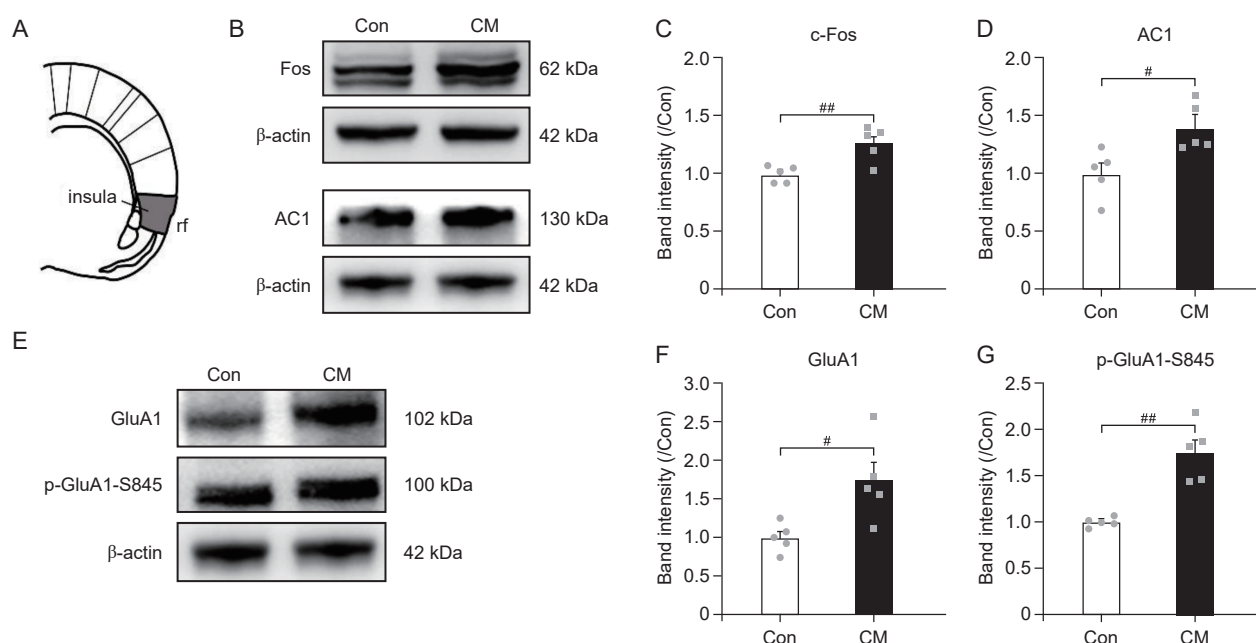


图 4 反复 IS 硬膜刺激对岛叶的 c-Fos、AC1、GluA1 及其磷酸化的影响 ($n = 5$ 只/组, $\bar{x} \pm SEM$)
(A) 岛叶解剖位置图; (B) 免疫印迹法检测各组大鼠岛叶 c-Fos 和 AC1 蛋白表达的代表图; (C) CM 大鼠岛叶 c-Fos 蛋白表达变化经对照组归一化后的统计图; (D) CM 大鼠岛叶 AC1 蛋白表达变化经对照组归一化后的统计图; (E) 免疫印迹法检测各组大鼠岛叶 GluA1 和 p-GluA1-S845 蛋白表达的代表图; (F) CM 大鼠岛叶 GluA1 蛋白表达变化经对照组归一化后的统计图; (G) CM 大鼠岛叶 p-GluA1-S845 水平变化经对照组归一化后的统计图。
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与 Con 组相比

Fig. 4 Effects of dural repeated IS stimulation on c-Fos, AC1, GluA1 and its phosphorylation in insula ($n = 5$ rats/group, $\bar{x} \pm SEM$)
(A) Schematic diagram showed the location of insula. rhinal fissure (rf); (B) Representative images of c-Fos and AC1 protein expression in the insula of each group, detected by western blot test; (C) Graph showing normalized changes in c-Fos protein expression in the insula of CM rats; (D) Graph showing normalized changes in AC1 protein expression in the insula of CM rats; (E) Representative images of GluA1 and p-GluA1-S845 expression in the insula of each group, detected by western blot test; (F) Graph showing normalized changes in GluA1 protein expression in the insula of CM rats; (G) Graph showing normalized changes in the level of p-GluA1-S845 in the insula of CM rats.
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with the group Con.

也分别对眶周机械阈值有影响。向 CM 大鼠双侧岛叶注射 1 次 NB001 后, NB001 组大鼠的眶周机械阈值就较 NS 组明显升高 (每组 5 只, 第 15 天: $t = 5.585$, $P = 0.014$)。NB001 连续治疗 3 次后, 其眶周机械阈值上升的更加明显 (每组 5 只, 第 17 天: $t = 5.337$, $P = 0.018$), 而 NS 组的阈值仍稳定在低值 (见图 5A)。

NB001 组及 NS 组大鼠在完成 CM 造模时 (第 14 天, 每组 5 只), 在旷场的总路程 ($t = -0.189$, $P = 0.854$)、中央路程 ($t = 0.561$, $P = 0.590$)、中央区时间 ($t = 0.049$, $P = 0.962$) 及进入中央区次数 ($t = 0.290$, $P = 0.779$) 差异无统计学意义。接受连续 3 次 NB001 岛叶注射后 (第 17 天), NB001 组的总路程 ($Z = -2.611$, $P = 0.009$)、中央路程 ($t = -7.265$, $P < 0.001$)、中央区时间 ($t = -7.100$, $P < 0.001$) 及进入中央区次数 ($t = -5.409$, $P = 0.001$) 均较 NS 组明显增加。且第 17

天时 NB001 组的总路程 ($t = -3.864$, $P = 0.005$)、中央路程 ($t = -6.699$, $P < 0.001$)、中央区时间 ($t = -6.157$, $P < 0.001$) 和进入中央区次数 ($t = -5.092$, $P = 0.001$) 均较基线明显增加 (见图 5B-5F)。

实验第 14 天时, NB001 组和 NS 组大鼠 (每组 5 只) 在高架十字迷宫的总路程 ($t = -0.363$, $P = 0.726$) 及开臂路程 ($t = 0.231$, $P = 0.823$) 差异无统计学意义。经过 3 次连续 NB001 岛叶注射治疗后, NB001 组大鼠在高架十字迷宫的总路程 ($t = -1.846$, $P = 0.102$) 和 NS 组差异无统计学意义, 但开臂路程 ($Z = -2.611$, $P = 0.009$) 明显较 NS 组增加。且此时 NB001 组的开臂路程 ($t = 0.486$, $P = 0.640$) 也较治疗前明显增加 (见图 5G-5I)。

5. NB001 岛叶注射可减少 CM 大鼠岛叶 AC1 表达, GluA1 表达及磷酸化

AC1 抑制剂 NB001 连续 3 次岛叶注射后 (第

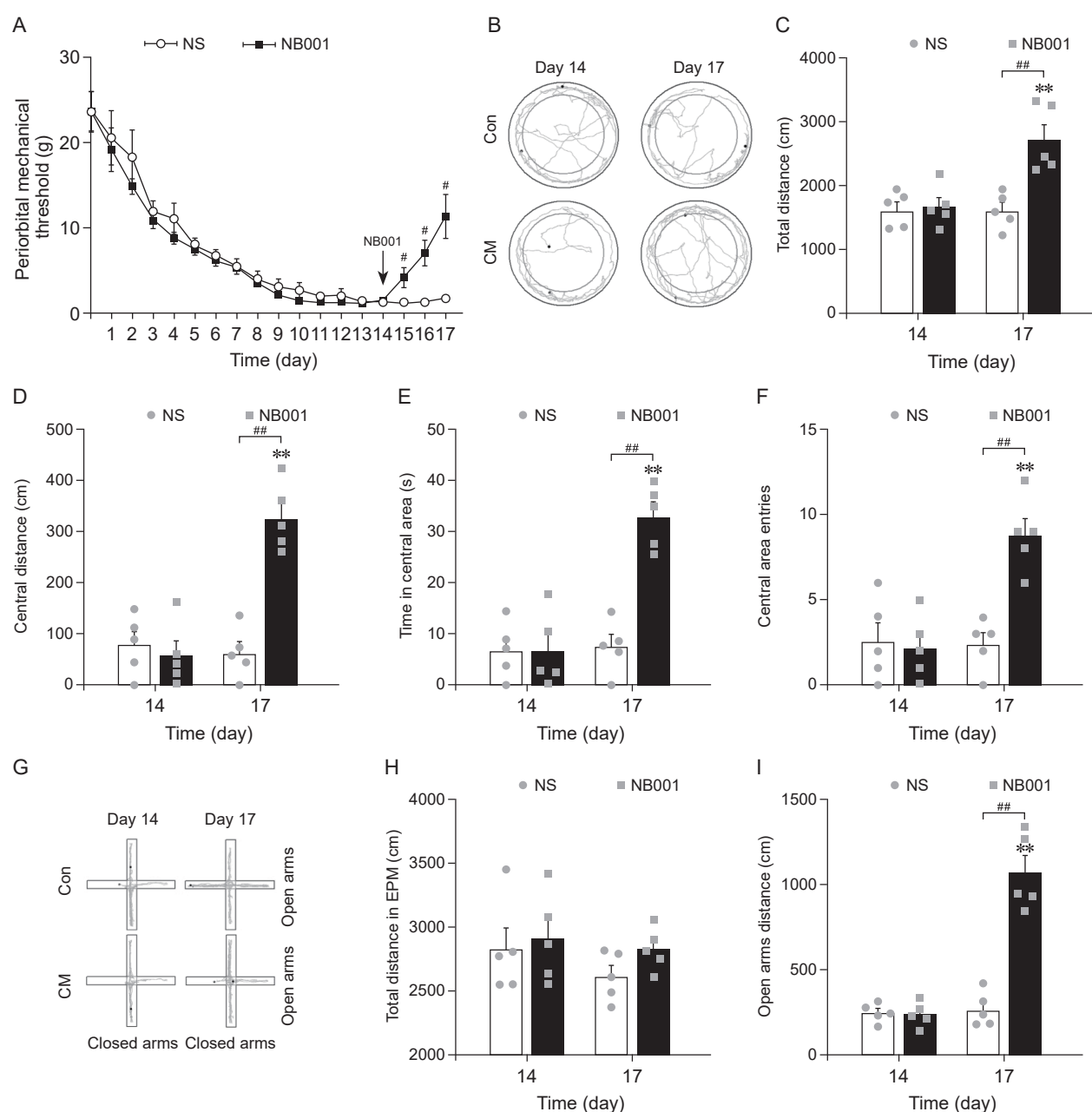


图 5 双侧岛叶输注 NB001 对 CM 大鼠眶周机械阈值及焦虑行为的影响 ($n = 5$ 只/组, $\bar{x} \pm SEM$) (A) 双侧岛叶输注 NB001 对 CM 大鼠眶周机械阈值的影响 (黑色箭头指示第 1 次注射 NB001, 阴影部分表示统计比较时间); (B) 各组大鼠的旷场活动轨迹代表图; (C) 各组大鼠旷场总路程对比; (D) 各组大鼠旷场中央路程对比; (E) 各组大鼠旷场中央时间对比; (F) 各组大鼠进入旷场中央区次数对比; (G) 各组大鼠的高架十字迷宫活动轨迹代表图; (H) 各组大鼠在高架十字迷宫的总路程对比; (I) 各组大鼠在高架十字迷宫的开臂路程对比。
$P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与 Con 组相比; ** $P < 0.01$, 与第 14 天相比

Fig. 5 Effect of bilateral insular infusion of NB001 on periorbital mechanical threshold and anxiety behaviors in CM rats ($n = 5$ rats/group, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Effect of bilateral insular infusion of NB001 on periorbital mechanical threshold in CM rats (The black arrow indicates the first intraperitoneal injection of NB001. The shaded area indicates statistical comparison times); (B) Representative open field activity tracks for each group of rats; (C) Comparison of total open field distance traveled by each group of rats; (D) Comparison of central open field distance traveled by each group of rats; (E) Comparison of time spent in the central open field by each group of rats; (F) Comparison of the number of entries into the central open field area by each group of rats; (G) Representative EPM activity tracks for each group of rats; (H) Comparison of total distance traveled by each group of rats in the EPM; (I) Comparison of the open-arm distance traveled by each group of rats in the EPM.

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with the group Con; ** $P < 0.01$, compared with day 14.

17天), 其岛叶的 AC1 表达明显较 NS 组减少 (每组 5 只, $t = 8.579, P < 0.001$)。同时, NB001 组的 GluA1 表达 (每组 5 只, $t = 3.404, P = 0.009$) 及 p-GluA1-S845, 即 GluA1 磷酸化水平 (每组 5 只, $t = 4.245, P = 0.003$) 明显较 NS 组减少 (见图 6)。

讨 论

在本研究中, 发现大鼠硬脑膜重复 IS 刺激可诱发偏头痛样症状和焦虑情绪行为。免疫印迹实验结果显示 CM 组岛叶 c-Fos 蛋白表达增加, 同时 GluA1 受体及其磷酸化 p-GluA1-S845, 以及 AC1 的表达均上调。CM 大鼠岛叶微注射 AC1 抑制剂 NB001 能显著缓解大鼠的眶周痛觉过敏和焦虑行为, 并降低岛叶 AC1, GluA1 受体及其磷酸化 p-GluA1-S845 的表达量。

本研究采用反复 IS 刺激硬膜以激活三叉神经血管系统并产生偏头痛样疼痛^[22]。结果表明反复 IS 硬脑膜刺激 4 次后, 大鼠眶周机械阈值出现显著降低, 并在第 14 天时已经维持在低值。与既往的研究相比, 本研究发现 14 天的 IS 硬膜刺激足以诱导成年大鼠出现稳定头部疼痛状态^[19,23]。本研究检测了岛叶的 c-Fos 蛋白表达, 这是一种可反映刺激后神经元激活的蛋白标志物^[24], 结果发现 CM 模型大鼠的岛叶 c-Fos 蛋白表达量明显高于 Con 组。该结果与既往报道的颅脑核磁研究结果显示偏头痛病人及偏头痛模型动物的岛叶较对照组显著激活相一致^[8,25], 可共同证

明岛叶参与了偏头痛的疾病过程。

既往研究显示, AMPA 受体可以通过调节 AC1 参与内脏痛及癌痛等疼痛调控^[26,27]。最新研究发现, 大鼠 ACC 通过抑制 AC1 表达进而降低 GluA1 磷酸化水平能有效缓解大鼠偏头痛样疼痛^[16], 作为和 ACC 同样在痛觉调控中发挥重要作用的岛叶, 其 AC1 表达是否可以调控偏头痛相关表现尚无报道。因此, 本研究检测了岛叶 AMPA 的 GluA1、p-GluA1-S845 及 AC1 的表达量, 发现 GluA1、p-GluA1-S845 及 AC1 均明显较对照组多。而双侧岛叶立体定位注射 AC1 抑制剂 (NB001) 后, 发现大鼠的偏头痛样疼痛显著缓解。同时显示, CM 组大鼠岛叶的 GluA1 表达及磷酸化均明显升高, 在应用 NB001 岛叶立体定位注射后该变化有所缓解。由此, 我们推测岛叶可通过 GluA1 及 AC1 调控偏头痛的病理生理机制。

除头部疼痛外, 与焦虑等情绪共病也是非常值得关注的问题。在临床工作中, 偏头痛病人常常合并焦虑抑郁等负性情绪^[28], 因此, 本研究观察了大鼠连续 IS 硬膜刺激后是否也能产生焦虑样行为。结果表明, 在连续硬膜刺激 14 天后, 大鼠在旷场及高架十字迷宫的焦虑样行为明显增加, 这更加证实了偏头痛与焦虑疾病发病存在交叉或相互影响的机制。基于此, 本研究发现在 CM 大鼠中岛叶立体定位注射 NB001 后, 除了眶周机械阈值有所回升外, 其焦虑情绪行为也得到了缓解, 进一步证明岛叶可能通过调节 GluA1 和 AC1 影响 CM 大鼠的痛阈和

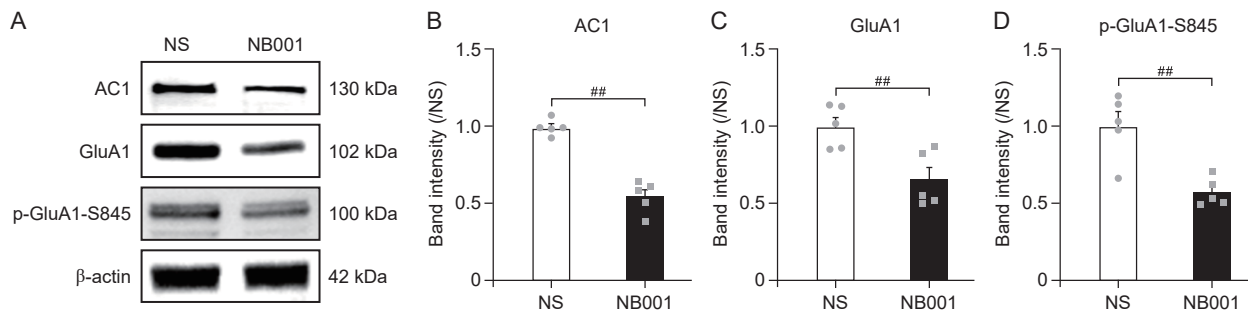
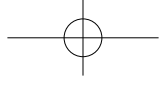


图 6 双侧岛叶输注 NB001 对 CM 大鼠岛叶 AC1、GluA1 及其磷酸化的影响 ($n = 5$ 只/组, $\bar{x} \pm SEM$) (A) 免疫印迹法检测各组大鼠岛叶 GluA1 和 p-GluA1-S845 蛋白表达的代表图; (B) NB001 组大鼠岛叶 AC1 表达量经对照组归一化后的统计图; (C) NB001 组大鼠岛叶 GluA1 蛋白表达变化经对照组归一化后的统计图; (D) NB001 组大鼠岛叶 p-GluA1-S845 水平变化经对照组归一化后的统计图。

^{##} $P < 0.01$, 与 Con 组相比

Fig. 6 Effect of bilateral insular infusion of NB001 on AC1, GluA1 and its phosphorylation in CM rats ($n = 5$ rats/group, $\bar{x} \pm SEM$) (A) Representative images of GluA1 and p-GluA1-S845 protein expression in the insula of each group, detected by western blot test; (B) Graph showing normalized changes in AC1 protein expression in the insula of rats from NB001 group; (C) Graph showing normalized changes in GluA1 protein expression in the insula of rats from NB001 group; (D) Graph showing normalized changes in the level of p-GluA1-S845 in the insula of rats from NB001 group.

^{##} $P < 0.01$, compared with the group Con.



焦虑样行为。既往研究表明,小鼠急性偏头痛样疼痛发作不导致焦虑样行为,但偏头痛样疼痛持续发作导致中枢痛觉敏化,同时表现出焦虑行为^[16]。根据先疼痛后焦虑的症状产生顺序,考虑NB001可能通过缓解疼痛,进一步缓解焦虑行为。此外,有多项研究证明NB001对生理性疼痛感知、认知和运动功能无明显影响,且无明显成瘾性^[29]。其临床I期研究的结果在健康成人中亦证实具有良好的安全性和耐受性^[30]。因此,NB001在治疗偏头痛及其相关焦虑行为方面具有潜在应用前景。

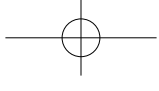
本研究首次在动物模型中发现了岛叶参与偏头痛及其相关焦虑情绪行为调控,且这一调控作用可能是通过影响岛叶GluA1及AC1实现的。但本研究仍存在以下不足之处:①岛叶立体定位给药方式存在较大创伤及风险,后续应完善腹腔注射、灌胃等更加安全的给药方式。②本实验所用模型虽为经典偏头痛动物模型,但在硝酸甘油诱发模型、左克洛卡林诱发模型等其他偏头痛模型共同验证下更具说服力。

综上所述,岛叶可能通过GluA1及AC1参与偏头痛及其相关焦虑的病理机制调控,AC1抑制剂可缓解大鼠眶周痛觉敏化及焦虑样行为表现,具有临床转化及应用价值。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Steiner TJ, Stovner LJ, Jensen R, *et al.* Migraine remains second among the world's causes of disability, and first among young women: findings from GBD2019[J]. *J Headache Pain*, 2020, 21(1):1-4.
- [2] Yu SY, Liu RZ, Zhao G, *et al.* The prevalence and burden of primary headaches in China: a population-based door-to-door survey[J]. *Headache*, 2012, 52(4):582-591.
- [3] Buse DC, Fanning KM, Reed ML, *et al.* Life with migraine: effects on relationships, career, and finances from the chronic migraine epidemiology and outcomes (CaMEO) study[J]. *Headache*, 2019, 59(8):1286-1299.
- [4] Khalil M, Moreno-Ajona D, Villar-Martínez MD, *et al.* Erenumab in chronic migraine: experience from a UK tertiary centre and comparison with other real-world evidence[J]. *Eur J Neurol*, 2022, 29(8):2473-2480.
- [5] Dodick DW. Migraine[J]. *Lancet*, 2018, 391(10127):1315-1330.
- [6] Labrakakis C. The role of the insular cortex in pain[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6):5736.
- [7] Tan LL. 陆颖(译). 中扣带回-后岛叶通路调控痛觉超敏反应[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2018, 24(9):653-655.
- [8] Schwedt TJ, Schlaggar BL, Mar S, *et al.* Atypical resting-state functional connectivity of affective pain regions in chronic migraine[J]. *Headache*, 2013, 53(5):737-751.
- [9] Maleki N, Barmettler G, Moulton EA, *et al.* Female migraineurs show lack of insular thinning with age[J]. *Pain*, 2015, 156(7):1232-1239.
- [10] Gorka SM, Young CB, Klumpp H, *et al.* Emotion-based brain mechanisms and predictors for SSRI and CBT treatment of anxiety and depression: a randomized trial[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2019, 44(9):1639-1648.
- [11] Gogolla N. The insular cortex[J]. *Curr Biol*, 2017, 27(12):R580-R586.
- [12] Qiu S, Zhang M, Liu Y, *et al.* GluA1 phosphorylation contributes to postsynaptic amplification of neuropathic pain in the insular cortex[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(40):13505-13515.
- [13] McGinnis MM, Parrish BC, McCool BA. Withdrawal from chronic ethanol exposure increases postsynaptic glutamate function of insular cortex projections to the rat basolateral amygdala[J]. *Neuropharmacology*, 2020, 172:108129.
- [14] Zhuo M. Targeting neuronal adenylyl cyclase for the treatment of chronic pain[J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17(11-12):573-582.
- [15] Bliss TV, Collingridge GL, Kaang BK, *et al.* Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17(8):485-496.
- [16] Liu RH, Zhang M, Xue M, *et al.* Inhibiting neuronal AC1 for treating anxiety and headache in the animal model of migraine[J]. *iScience*, 2023, 26(6):1-23.
- [17] Xu H, Wu LJ, Wang H, *et al.* Presynaptic and postsynaptic amplifications of neuropathic pain in the anterior cingulate cortex[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(29):7445-7453.
- [18] Wei F, Qiu CS, Muglia L, *et al.* Genetic elimination of behavioral sensitization in mice lacking calmodulin-stimulated adenylyl cyclases[J]. *Neuron*, 2002, 36:731-726.
- [19] 毛静瑞, 李扬, 刘颖璐, 等. 枕神经电刺激对慢性偏头痛模型大鼠疼痛相关行为的影响[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2023, 29(12):897-907.
- [20] Zhang Q, Han X, Wu H, *et al.* Dynamic changes in CGRP, PACAP, and PACAP receptors in the trigemino-vascular system of a novel repetitive electrical stimulation rat model: relevant to migraine[J]. *Mol Pain*, 2019, 15:1-15.
- [21] Han X, Ran Y, Su M, *et al.* Chronic changes in pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and related receptors in response to repeated chemical dural stimulation in rats[J]. *Mol Pain*, 2017, 13:1-10.



- [22] Oshinsky ML, Gomomchareonsiri S. Episodic dural stimulation in awake rats: a model for recurrent headache[J]. Headache, 2007, 47(7):1026-1036.
- [23] Wu H, Dong Z, Liu Y, *et al.* Temporal alterations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptors in a rat model induced by recurrent chemical stimulations: Relevant to chronic migraine[J]. Mol Pain, 2023, 19:1-19.
- [24] Joo JY, Schaukowitz K, Farbiak L, *et al.* Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-fos enhancers[J]. Nat Neurosci, 2015, 19(1):75-83.
- [25] Jia Z, Yu S, Tang W, *et al.* Altered functional connectivity of the insula in a rat model of recurrent headache[J]. Mol Pain, 2020, 16:1-8.
- [26] Liu SB, Wang XS, Yue J, *et al.* Cyclic AMP-dependent positive feedback signaling pathways in the cortex contributes to visceral pain[J]. J Neurochem, 2020, 153(2):252-263.
- [27] Kang WB, Yang Q, Guo YY, *et al.* Analgesic effects of adenylyl cyclase inhibitor NB001 on bone cancer pain in a mouse model[J]. Mol Pain, 2016, 12:1-9.
- [28] 陈倩, 蓝晓芳, 李陈渝. 103 例原发性头痛病人睡眠障碍及焦虑抑郁相关性分析 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2017, 23(12):935-938.
- [29] Wang H, Xu H, Wu LJ, *et al.* Identification of an adenylyl cyclase inhibitor for treating neuropathic and inflammatory pain[J]. Sci Transl Med, 2011, 3(65): 65ra3.
- [30] Wang W, Chen QY, Zhao P, *et al.* Human safety study of a selective neuronal adenylate cyclase 1 inhibitor NB001 which relieves the neuropathic pain and blocks ACC in adult mice[J]. Mol Pain, 2022, 18:1-15.

· 消 息 ·

中国中西医结合学会疼痛学专业委员会第九次学术年会会议通知

为促进中西医结合疼痛新理念、新技术的临床应用,由中国中西医结合学会主办,中国中西医结合学会疼痛学专业委员会承办,苏州市中西医结合医院协办的“中国中西医结合学会疼痛学专业委员会第九次学术年会”定于2024年4月26~28日在江苏省苏州市召开。

会议内容:

1. 中西医结合疼痛诊疗发展现状分析。
2. 中西医结合疼痛领域新技术新理念推广交流。

会议征文内容: ①慢性骨骼肌肉疼痛、神经病理性疼痛、风湿性疼痛、癌痛等的诊疗经验与诊疗技术规范研究; ②脊柱内镜的临床应用新进展及相关并发症的总结与研究; ③疼痛微创介入技术的临床应用及相关基础研究; ④中医、西医、中西医结合疼痛疾病的临床和相关基础研究; ⑤中医整脊、中医微创(手法整脊、小针刀、银质针、内热针等)的临床及基础研究; ⑥疼痛疾患的中西医护理新进展; ⑦与疼痛科相关的国内外临床论著与基础研究; ⑧运动康复与疼痛; ⑨疼痛与心理的临床与基础研究; ⑩红外热成像及心率变异在疼痛诊断中的应用新进展。

征文要求: ①论文内容真实、可靠,具备科学性、先进性、实用性,未在国内外公开发表; ②摘要500~800字,结构为目的、方法、结果、结论。论文请勿涉及保密内容,文责自负; ③文末请注明作者姓名、单位、邮编、电话及E-mail。

投稿方式: ①本次会议不接受邮寄和Email投稿,凡经审核录用的论文,将录入大会汇编; ②所有投稿请自留副本,投稿无论是否采用,恕不退稿。截稿时间:2024年3月25日。

联系方式: 李 顺 13967103070 任莉梅 13910566182
黄佳彬 13302480392 刘 磊 18801393293

联系邮箱: zgzyjhtt@126.com

