

• 论 著 •

腹外侧眶额叶激活对药物过度使用性头痛小鼠的镇痛作用 *

翟德琦¹ 龚子骅² 刘颖元¹ 杨春晓³ 袁慧娟⁴ 那伟楠⁴ 于生元¹ 董 钊^{1△}(¹解放军总医院第一医学中心神经内科, 北京 100853; ²中国人民解放军白求恩国际和平医院神经内科, 河北 050082; ³解放军总医院第二医学中心神经内科, 北京 100853; ⁴南开大学医学院, 天津 300071)

摘 要 目的: 探究腹外侧眶额叶皮质 (ventrolateral orbitofrontal cortex, vIOFC) 在利扎曲坦 (rizatriptan, RIZ) 诱导的药物过度使用性头痛 (medication-overuse headache, MOH) 小鼠模型中的镇痛作用。**方法:** 将 22 只 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠按随机数字表法分为生理盐水 (Saline, SAL) 组和利扎曲坦 (RIZ) 组, 每组 11 只, 分别使用 SAL 和 RIZ 灌胃。神经元激活或抑制调控实验则分别使用 36 只小鼠分为对照组、激活或抑制组、假激活或抑制组、对照病毒组, 注射不同调控病毒。重复 RIZ 灌胃建立 MOH 模型, 评估其基础痛阈, 包括机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和眶周机械痛阈 (head withdrawal threshold, HWT)。应用免疫荧光技术检测 c-Fos 表达, 分析眶额叶皮质 (orbitofrontal cortex, OFC) 及相关脑区神经元激活水平; 通过化学遗传技术调控神经元活性, 评估其对 MOH 小鼠痛阈的影响。**结果:** RIZ 组小鼠 MWT 和 HWT 显著低于 SAL 组。免疫荧光结果显示, RIZ 组小鼠 vIOFC 的 c-Fos 表达显著增加 ($t = 3.821, P = 0.012$), 而腹内侧丘脑 (ventromedial thalamus, Vm)、前扣带回皮质 (anterior cingulate cortex, ACC)、导水管周围灰质 (periaqueductal gray, PAG) c-Fos 表达与 SAL 组差异无统计学意义。进一步统计发现 OFC 被激活的区域集中在腹外侧 ($t = 2.723, P = 0.042$), 而内侧差异无统计学意义 ($t = 0.251, P = 0.812$)。使用化学遗传学技术激活 vIOFC 脑区神经元, 可以显著提高 RIZ 组小鼠 MWT 和 HWT, 抑制 vIOFC 效果不显著。**结论:** MOH 小鼠 vIOFC 神经元活动增加, 激活该脑区可缓解 MOH 引起的皮肤痛敏。

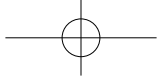
关键词 药物过度使用性头痛; 化学遗传学; 疼痛; 眶额叶皮质

The analgesic effect of ventrolateral orbitofrontal cortex activation on medication overuse headache in mice *ZHAI De-qi¹, GONG Zi-hua², LIU Ying-yuan¹, YANG Chun-xiao³, YUAN Hui-juan⁴, NA Wei-nan⁴, YU Sheng-yuan¹, DONG Zhao^{1△}(¹ Department of Neurology, First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China;² Department of Neurology, Bethune International Peace Hospital of the People's Liberation Army of China, Hebei 050082, China; ³ Department of Neurology, Second Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ⁴ School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Objective: To investigate the analgesic role of the ventrolateral orbitofrontal cortex (vIOFC) in a rizatriptan (RIZ)-induced medication-overuse headache (MOH) mouse model. **Methods:** Twenty-two 8-week-old male C57BL/6J mice were randomly assigned using a random number table to the saline (SAL) and RIZ groups ($n = 11$ per group), receiving intragastric administration of saline or RIZ, respectively. For neuronal activation or inhibition modulation experiments, 36 mice were allocated into control, activation/inhibition, sham activation/inhibition, and control virus groups through stereotaxic injection of different viral vectors. An MOH model

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82171208)

△ 通信作者 董钊 dong_zhaozhao@126.com



was established through repeated RIZ administration, with baseline pain thresholds assessed by mechanical withdrawal threshold (MWT) and periorbital head withdrawal threshold (HWT). Immunofluorescence staining was performed to detect c-Fos expression and analyze neuronal activation in orbitofrontal cortex (OFC) and related brain regions. Chemogenetic approaches were employed to modulate neuronal activity for evaluating its impact on pain thresholds in MOH mice. **Results:** The RIZ group exhibited significantly lower MWT and HWT compared with the SAL group. Immunofluorescence revealed significantly increased c-Fos expression in vOFC of RIZ-treated mice ($t = 3.821, P = 0.012$), while no significant differences were observed in the ventromedial thalamus (Vm), anterior cingulate cortex (ACC), or periaqueductal gray (PAG). Subsequent analysis identified predominant activation in the ventrolateral OFC ($t = 2.723, P = 0.042$) rather than medial OFC ($t = 0.251, P = 0.812$). Chemogenetic activation of vOFC neurons significantly increased MWT and HWT in RIZ-treated mice, whereas inhibition showed no significant effects. **Conclusion:** Enhanced neuronal activity in vOFC of MOH mice may contribute to cutaneous allodynia, and selective activation of this region could alleviate RIZ-induced pain hypersensitivity.

Keywords medication overuse headache; chemogenetics; pain; orbitofrontal cortex

药物过度使用性头痛 (medication overuse headache, MOH) 是一种继发性慢性头痛疾病, 慢性每日头痛病人中有 60% 是 MOH^[1], 已成为全球公共卫生负担的重要来源^[2]。该疾病源于镇痛药物的长期使用, 尽管现行戒断疗法具有一定疗效, 但仍有部分病人效果欠佳, 且存在一定复发率。因此, 目前仍需探讨其发病机制并探究更多治疗方法^[3]。

神经影像学研究发现, MOH 病人在导水管周围灰质 (periaqueductal gray, PAG)、扣带回皮质、丘脑、眶额叶皮质 (orbitofrontal cortex, OFC) 等脑区存在结构、功能和代谢方面的差异^[4]。其中 OFC 在疼痛、情绪调控、决策和奖赏功能中发挥重要作用^[5], 且既往研究发现, MOH 病人 OFC 脑区存在代谢异常^[6], 提示其可能参与 MOH 的发病过程。

腹内侧眶额叶皮质 (medial orbitofrontal cortex, mOFC) 与腹外侧眶额叶皮质 (ventrolateral orbitofrontal cortex, vOFC) 呈现显著的功能分化。在神经连接方面, mOFC 主要与伏隔核、腹侧被盖区等奖赏相关脑区形成较强功能连接^[7], 而 vOFC 则与下丘脑、杏仁核等疼痛情绪调节相关的边缘系统及感觉运动皮质联系密切^[8,9]。在疼痛调控中, mOFC 通过奖赏-疼痛交互作用影响痛觉感知 (如金钱奖励可增强其活动并降低痛感)^[7], vOFC 则调控疼痛伴随的焦虑等负性情绪, 动物实验表明其激活可缓解神经痛相关焦虑行为^[10]。然而, OFC 的哪个亚区参与了 MOH 的发病过程, 目前尚未有研究证实。

根据既往研究, OFC 脑区与前扣带回皮质 (anterior cingulate cortex, ACC)、腹内侧丘脑 (ventromedial thalamus, Vm) 及导水管周围灰质 (periaqueductal gray, PAG) 形成功能环路, 调控后可以缓解大鼠热辐射引起的甩尾反射、神经病理性疼痛等症状^[11], 但其在

MOH 中的参与情况和具体作用仍缺乏研究。因此, 阐明 OFC 及相关脑区是否参与 MOH 发病, 以及调控 OFC 是否影响 MOH 相关痛敏症状, 对揭示 MOH 机制和开发精准干预策略具有重要意义。

基于上述问题, 本研究通过构建 MOH 小鼠模型, 采用行为学、免疫荧光染色及化学遗传调控等实验技术探索 OFC 参与 MOH 发病的相关机制。以期解决 OFC 及相关脑区在 MOH 中的参与情况、OFC 的哪个亚区参与 MOH 的发生发展、调控 OFC 神经元能否逆转 MOH 痛敏等问题, 这些结果将为 MOH 机制研究和靶向治疗提供理论依据和实践指导。

方 法

1. 实验动物及分组

本研究使用 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠, 购自北京 SPF 生物技术有限公司 (许可证号 SCXK (京) 2024-0001), 实验经解放军总医院医学伦理委员会批准。小鼠体重 22~26 g, 繁殖批次及饲养环境一致, 适应 3 天后随机分组。

选取 22 只小鼠, 按随机数字表法分为生理盐水 (Saline, SAL) 组和利扎曲坦 (rizatriptan, RIZ) 组, 每组 11 只, 分别进行 SAL 或 RIZ 灌胃。

神经元激活调控实验: 选取 36 只小鼠, 按随机数字表法分为四组 ($n = 9$): 对照组 (SAL + 3Dq + CNO 组, SAL 造模并注射 3Dq 病毒, 注射 CNO)、激活组 (RIZ + 3Dq + CNO 组, RIZ 造模并注射 3Dq 病毒, 注射 CNO)、假激活组 (RIZ + 3Dq + VEH 组, RIZ 造模并注射 3Dq 病毒, 注射 CNO 溶剂)、对照病毒组 (RIZ + empty + CNO 组, RIZ 造模并注



射空载病毒, 注射 CNO)。

神经元抑制调控实验: 另取 36 只小鼠, 分为四组 ($n = 9$): 对照组 (SAL + 4Di + CNO 组, SAL 造模并注射 4Di 病毒, 注射 CNO)、抑制组 (RIZ + 4Di + CNO 组, RIZ 造模并注射 4Di 病毒, 注射 CNO)、假抑制组 (RIZ + 4Di + VEH 组, RIZ 造模并注射 4Di 病毒, 注射 CNO 溶剂)、对照病毒组 (RIZ + empty + CNO 组, RIZ 造模并注射空载病毒, 注射 CNO)。其中, 3Dq 和 4Di 分别为化学遗传激活与抑制病毒, CNO 为配体, VEH 为溶剂对照, empty 为空载病毒。

2. 主要仪器与试剂

von Frey 纤维丝 (上海玉研, NC12775), 小动物麻醉机 (瑞沃德, R500), 冰冻切片机 (Leica, CM1950), 脑立体定位注射仪 (瑞沃德, 69100), 全景扫描仪 (斯瑞缔, DX12), 利扎曲普坦 (YangGuangBio, H222277), 异氟烷 (瑞沃德, R510-22), 三溴乙醇 (Sigma-Aldrich, T48402), 叔戊醇 (Sigma-Aldrich, 152463), 磷酸盐缓冲液 (Solarbio, P1010), 多聚甲醛溶液 (YangGuangBio, C200101), 蔗糖 (Sigma-Aldrich, V900116), O.C.T. (Sakura Finetek, 4583), 快速封闭液 (YangGuangBio, C220702), rabbit anti-c-fos (Abcam, ab222699), Goat Anti-Rabbit 488 (Jackson, 111-545-003), DAPI (Abcam, ab104139), 快速抗原修复液 (上海爱必信, abs9027), rAAV-EF1 α -hM3D (Gq)-EGFP (BrainVTA, PT-1839), rAAV-EF1 α -hM4D (Gi)-EGFP (BrainVTA, PT-1840), rAAV-Ef1-EGFP (BrainVTA, PT-0291), 氯氮平 (BrainVTA, CNO-02)。

3. 药物过度使用性头痛模型建立及实验分组

使用 RIZ 溶液建立 MOH 模型, 每只小鼠给药量为 4 mg/kg, 剂量基于本团队既往的研究^[12]。从第 0 天开始, 隔日给药 1 次, 共 6 次, 通过这种重复给药的方式, 模拟 MOH 病人药物过度使用的过程^[13], 将其命名为“药物过度使用周期”。造模示意图 1A。

4. 小鼠足底机械痛阈及眶周机械痛阈的测量

采用上下法 (Up-Down) 测定小鼠机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 及眶周机械痛阈 (head withdrawal threshold, HWT), 在每日给药前评估 MWT 和 HWT。持 von Frey 纤维丝, 轻扎小鼠足底或小鼠头面部区域, 使纤维丝弯折并维持 3~5 秒。若小鼠出现缩爪、舔爪或头面部后撤的行为, 记录为阳性 (X), 反之记录为阴性 (O)。根据“XO/OX”反应模式动态调整刺激力度, 首次阳性反应后继续完成 4 次刺激序列^[14]。最终通过在

线分析平台 (https://bioapps.shinyapps.io/von_frey_app/) 输入纤维丝参数及反应序列, 计算 50% MWT。基础痛阈反映小鼠日常机械敏感状态, 测量时间自实验第 0 天起至第 12 天结束。

5. 小鼠脑取材及荧光染色样本的制备

使用 1.25% 阿佛丁麻醉剂以 0.02 ml/g 腹腔注射麻醉小鼠。开胸暴露心尖, 使用钝头头皮针刺透小鼠心尖, 将 37℃ 预热的 20 ml 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 缓慢注入小鼠血液循环, 清除循环血液。随后顺次将 4℃ PBS、4℃ 4% 多聚甲醛溶液 (paraformaldehyde, PFA) 进行心脏灌注。灌注后剪下头部, 完整剥离小鼠脑组织。

将脑组织置于 4% 的 PFA 固定 24 小时。经梯度蔗糖溶液 (15%~30%) 脱水处理, 每阶段待组织沉底后方可进入下一浓度梯度。脱水完成后, 将脑组织表面蔗糖溶液吸净, 包埋入 O.C.T., 并置于 -20℃ 预冻 4 小时至固态, 转入 -80℃ 超低温冰箱中保存。

6. 小鼠脑组织免疫荧光染色及成像

使用冰冻切片机以 30 μ m 厚度进行组织切片并浸没于常温 PBS 中。染色前, 使用快速封闭液于常温下预处理组织 15 分钟, 随后孵育 c-Fos (兔抗, Abcam, ab222699, 稀释浓度 1:1000) 一抗, 4℃ 下 18 小时。二抗孵育阶段, 选择 Alexa Fluor 488 孵育 2 小时。使用含 DAPI 封片剂封片, 并尽快于显微镜下拍摄成像^[15]。

使用全景扫描仪 z-stack 模式拍摄高清组织切片, 每层间隔 2 μ m, 拍摄 7~10 层。针对各脑区荧光切片, 选择 6 张间隔层数相同的脑组织切片进行定量分析。设置阴性对照 (跳过孵育一抗步骤, 仅孵育二抗) 以排除自发荧光干扰。使用 Image J 软件进行荧光共定位分析并进行细胞计数, 将图像转换为 8 位灰度图, 将对比度的 Minimum 设置为“2”, Maximum 设置为“39”; 并使用 Plugins 中的 Cell Counter 插件统一进行手动计数, 压线的细胞右侧和下侧纳入计数, 左侧和上侧不纳入计数。

7. 化学遗传学实验 (病毒立体定位注射和化学遗传病毒配体注射)

病毒立体定位注射实验于 MOH 建模前 9 天 (-9 天) 进行 (见图 4B)。小鼠麻醉固定后暴露颅骨, 参照 Paxinos 脑图谱定位 vOFC (坐标 AP + 2.58 mm, ML $\pm$ 1.12 mm, DV -2.40 mm), 使用微量注射泵以 30 nl/min 速率与双侧 OFC 注射 200 nl 病毒。在激活调控实验中, 实验组注射 rAAV-EF1 α -hM3D(Gq)-EGFP 激活病毒, 对照组注射 rAAV-EF1 α -EGFP 空载病毒; 病毒表达后, 激活组腹腔注射 CNO (0.02 ml/g),

假激活组注射等量 SAL，空载病毒对照组注射 CNO。抑制实验采用相同逻辑，实验组注射 rAAV-EF1 α -hM4D (Gi)-EGFP 抑制病毒，抑制组注射 CNO，假抑制组注射 SAL，空载病毒对照组注射 CNO。病毒注射 9 天后（第 0 天）启动 MOH 建模，并于第 12 天开始神经元调控及行为学检测，所有 CNO 干预均在调控当日按标准剂量同步实施。注射前及注射后 30 分钟测量小鼠 MWT 和 HWT。

8. 统计学分析

本实验中动物的样本量基于既往研究^[12]，使用 G*Power 软件估算，确保足够的统计效力。所有实验均包含生物学重复。当异常值超过均值的 2 个标准差时进行排除。对于病毒注射的小鼠，若后续组织学验证发现病毒注射部位不准确，则会排除其行为学数据。数据分析使用 GraphPad Prism 10.3 软件（GraphPad Software，美国拉霍亚）完成。痛阈随

时间的变化通过重复测量双因素方差分析 (repeated measures two-way ANOVA) 进行统计，多重比较采用 Bonferroni 事后检验。配对 *t* 检验用于评估 CNO 化学遗传调控前后 (pre-and post-CNO) 行为学数据的影响。组织学数据通过 Image J 软件 (FIJI，美国国立卫生研究院) 手动测量，并采用双尾独立样本 *t* 检验分析。结果以均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. RIZ 组小鼠基础痛阈下降

如图 1A 所示，通过 MWT 和 HWT 评估第 0 天至第 12 天的皮肤异痛。结果显示，重复 RIZ 灌胃显著降低了基础 MWT 和 HWT；随剂量增加，二者持续降低（见图 1B, 1C）。从 MWT 的第 2 天

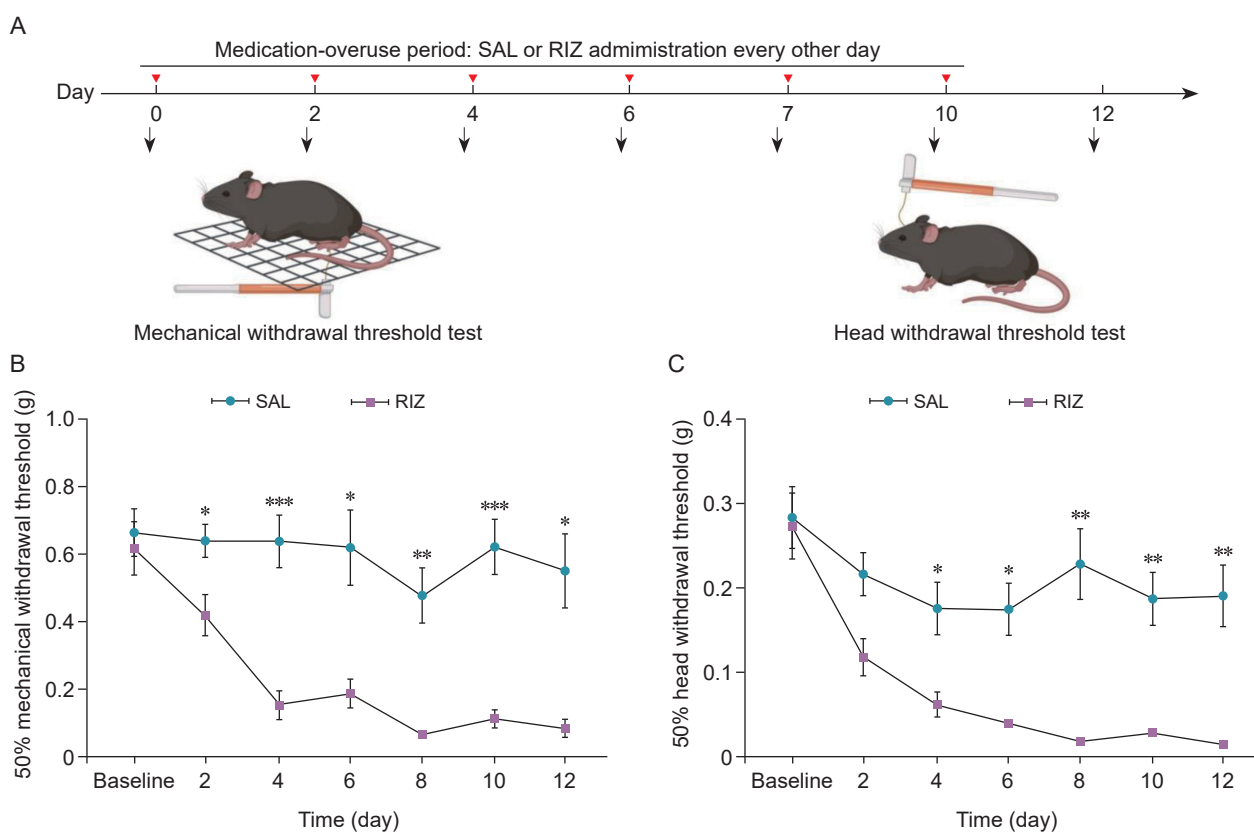


图 1 RIZ 组小鼠基础痛阈下降 ($n = 10-11$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) MOH 及其对照组建模过程示意图。药物过度周期：每隔 1 天给予利扎曲坦 (4 mg/kg) 或生理盐水灌胃。每次给药前测量小鼠 MWT 和 HWT；(B) 第 0~12 天小鼠足底机械痛阈；(C) 第 0~12 天小鼠眶周机械痛阈。

Mann-Whitney 非参数检验，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，与 RIZ 组相比

Fig. 1 Reduced baseline thresholds in RIZ-treated mice ($n = 10-11$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Schematic of the MOH modeling procedure and its control group. Medication overuse period: Rizatriptan (4 mg/kg) or saline was administered via intragastric gavage every other day. MWT and HWT were measured prior to each administration; (B) MWT of mice from Day 0 to Day 12; (C) HWT of mice from Day 0 to Day 12.

Mann-Whitney nonparametric test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with RIZ group.

和 HWT 的第 4 天开始, RIZ 组的基础痛阈显著低于 SAL 组, 且在第 12 天达到最低水平。以上结果表明, 重复 RIZ 灌胃有效建立了 MOH 小鼠模型, 成功诱导小鼠出现皮肤痛敏。

2. RIZ 组小鼠 OFC 脑区明显激活

在小鼠痛阈达最低值 (第 12 天) 时, 取材并对小鼠的痛觉相关脑区, 包括 ACC、Vm、OFC、PAG 进行 c-Fos 免疫荧光染色, 以评估小鼠的各脑

区神经元活动水平 (见图 2A)。结果显示, MOH 小鼠 OFC 脑区与对照组小鼠相比, 神经元激活显著增加 ($t = 3.821$, $P = 0.012$, 见图 2B); ACC、PAG 脑区神经元激活水平与对照组小鼠相比激活略有增加, 但差异无统计学意义 (ACC: $t = 0.974$, $P = 0.475$; PAG: $t = 1.321$, $P = 0.235$); Vm 脑区神经元激活水平两组差异无统计学意义 ($t < 0.001$, $P > 0.999$, 见图 2B)。

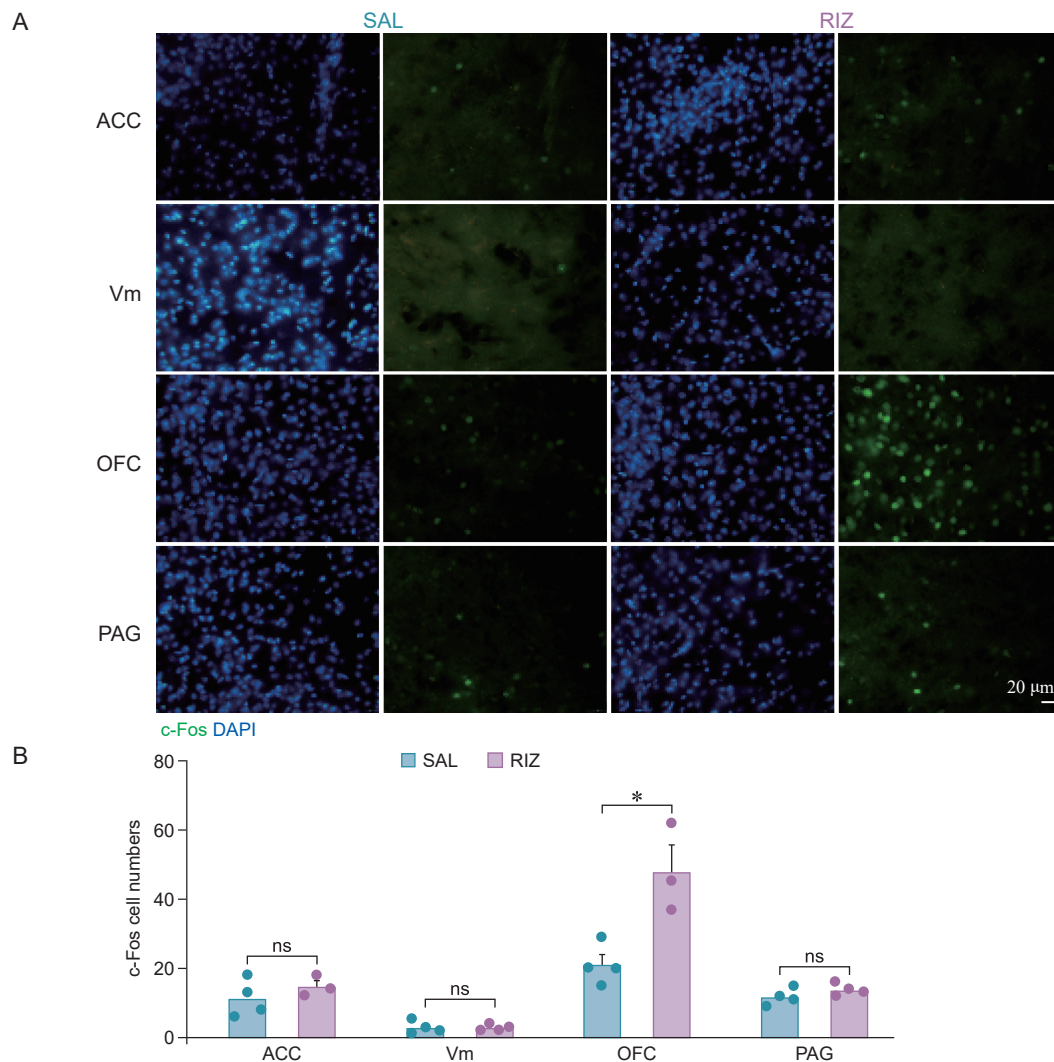


图 2 RIZ 小鼠各脑区 c-Fos 表达情况 ($n = 3-4$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) SAL 和 RIZ 小鼠的前扣带皮质 (ACC)、Vm、OFC 及 PAG 脑区 c-Fos (绿色) 和 DAPI (蓝色) 的代表性免疫荧光图像, 比例尺 = 20 μm; (B) SAL 和 RIZ 小鼠的各脑区 c-Fos 阳性细胞数统计图 (每组 3~4 只小鼠, 每只小鼠每个脑区 6 张切片, 每张切片取 3 个 0.09 mm² 视野平均值)。

采用双尾非配对 t 检验评估显著性, $*P < 0.05$, 与 SAL 组相比

Fig. 2 c-Fos expression in brain regions of RIZ-treated mice ($n = 3-4$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Representative immunofluorescence images of c-Fos (green) and DAPI (blue) in the anterior cingulate cortex (ACC), Vm, OFC, and PAG of SAL- and RIZ-treated mice. Scale bar = 20 μm; (B) Quantification of c-Fos-positive cells in brain regions of SAL- and RIZ-treated mice ($n = 3-4$ mice per group; 6 sections per mouse per region; 3 fields of 0.09 mm² per section averaged).

Significance was assessed using two-tailed unpaired t -tests. $*P < 0.05$, compared with SAL group.

3. MOH 小鼠 vIOFC 脑区的神经元被激活

造模后第 12 天（即 RIZ 组小鼠基础痛阈达最低值时），再次对 vIOFC 脑区行 c-Fos 免疫荧光染色。如图 3 所示，在 MOH 小鼠中，OFC 被激活的亚区主要是 vIOFC，两组存在显著统计学差异 ($t = 2.723$, $P = 0.042$)。而 mOFC 脑区，MOH 小鼠与对照组差异无统计学意义 ($t = 0.251$, $P = 0.812$)。

4. 化学遗传学激活 RIZ 组小鼠 vIOFC 脑区神经元发挥镇痛作用

为探究 vIOFC 脑区在 MOH 中的作用，本研究通过双侧 vIOFC 注射化学遗传病毒构建干预模型。实验采用 rAAV-EF1 α -hM3D(Gq)-EGFP 激活病毒、rAAV-EF1 α -hM4D(Gi)-EGFP 抑制病毒及空载病毒（见图 4A），结合 RIZ 重复注射建立 MOH 模型（见图 4B）。病毒定位通过组织学验证（见图 4C）。结果显示，在痛觉超敏高峰期（第 12 天）腹腔注射 CNO 激活 vIOFC 神经元后，实验组小鼠 MWT 和 HWT 较基线显著升高（见图 4D, 4E），而对照组、假激活组、对照病毒组未见显著变化。抑制 vIOFC 神经元时（见图 4F, 4G），与基线 (Baseline) 相比，各组小鼠 MWT 和 HWT 差异均无统计学意义，表明 vIOFC 的激活特异性逆转了药物过量周期诱导的痛觉超敏现象。该结果提示 vIOFC 神经元兴奋性调控在 MOH 病理进程中具有重要作用。

讨 论

本研究通过重复 RIZ 灌胃成功构建了 MOH 小鼠模型，其 MWT 和 HWT 随给药次数呈时间依赖性下降。c-Fos 免疫荧光染色结果显示，MOH 小鼠 vIOFC 神经元激活显著增强，而 ACC、Vm、PAG 无显著激活。化学遗传学调控实验进一步证实，特异性激活 vIOFC 神经元可逆转 MOH 小鼠痛觉过敏，这表明激活 vIOFC 神经元对 MOH 痛敏具有显著改善作用。

vIOFC 的镇痛作用机制研究取得系列进展。1997 年 Zhang 团队首次通过实验证实 vIOFC 可抑制小鼠痛觉反射，并发现其镇痛效果依赖于完整的 PAG 功能^[11]。2021 年 Huang 等^[8]揭示了 vIOFC 通过 vIOFC-PAG 神经环路缓解神经损伤模型痛敏，且该过程受上游 Vm 调控。且 ACC 作为 OFC 上游脑区被发现与疼痛相关^[16,17]。但本研究显示，MOH 小鼠仅出现 vIOFC 活动增强，而 PAG、Vm 和 ACC 未见显著变化。这种现象可能是由于 vIOFC 神经元的激活表现为“低频振荡”，其同步性和节律性较弱^[18]，不能像高频 gamma 振荡那样有效地驱动下游脑区活动^[19]。

已有研究显示 vIOFC 激活可产生镇痛效果^[8,11]，但本研究发现 MOH 小鼠在 vIOFC 神经元自发性活

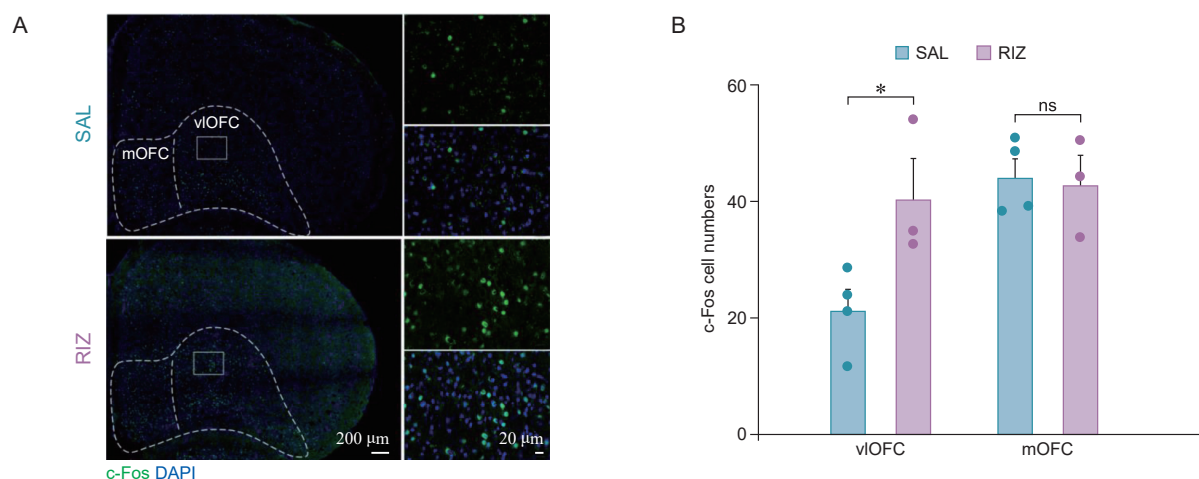


图 3 利扎曲坦重复给药诱导 vIOFC 神经元激活 ($n = 3-4$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) SAL 和 RIZ 小鼠 OFC 中 c-Fos (绿色) 和 DAPI (蓝色) 的代表性免疫荧光图像，比例尺 = 200 μm 和 20 μm (插图)；(B) 与 SAL 组相比，RIZ 组中 c-Fos 阳性细胞计数 (每组 3~4 只小鼠，每只小鼠 6 张切片，每张切片取 3 个 0.09 mm^2 视野平均值)。

采用双尾非配对 t 检验评估显著性。* $P < 0.05$ ，与 SAL 组相比

Fig. 3 Repeated rizatriptan administration induces activation of vIOFC neurons ($n = 3-4$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Representative immunofluorescence images of c-Fos (green) and DAPI (blue) in the OFC of SAL- and RIZ-treated mice. Scale bars = 200 μm and 20 μm (inset); (B) c-Fos-positive cell counts in RIZ-treated mice relative to SAL controls ($n = 3-4$ mice per group; 6 sections per mouse; 3 fields of 0.09 mm^2 per section averaged).

Two-tailed unpaired t -test. * $P < 0.05$, compared with SAL group.

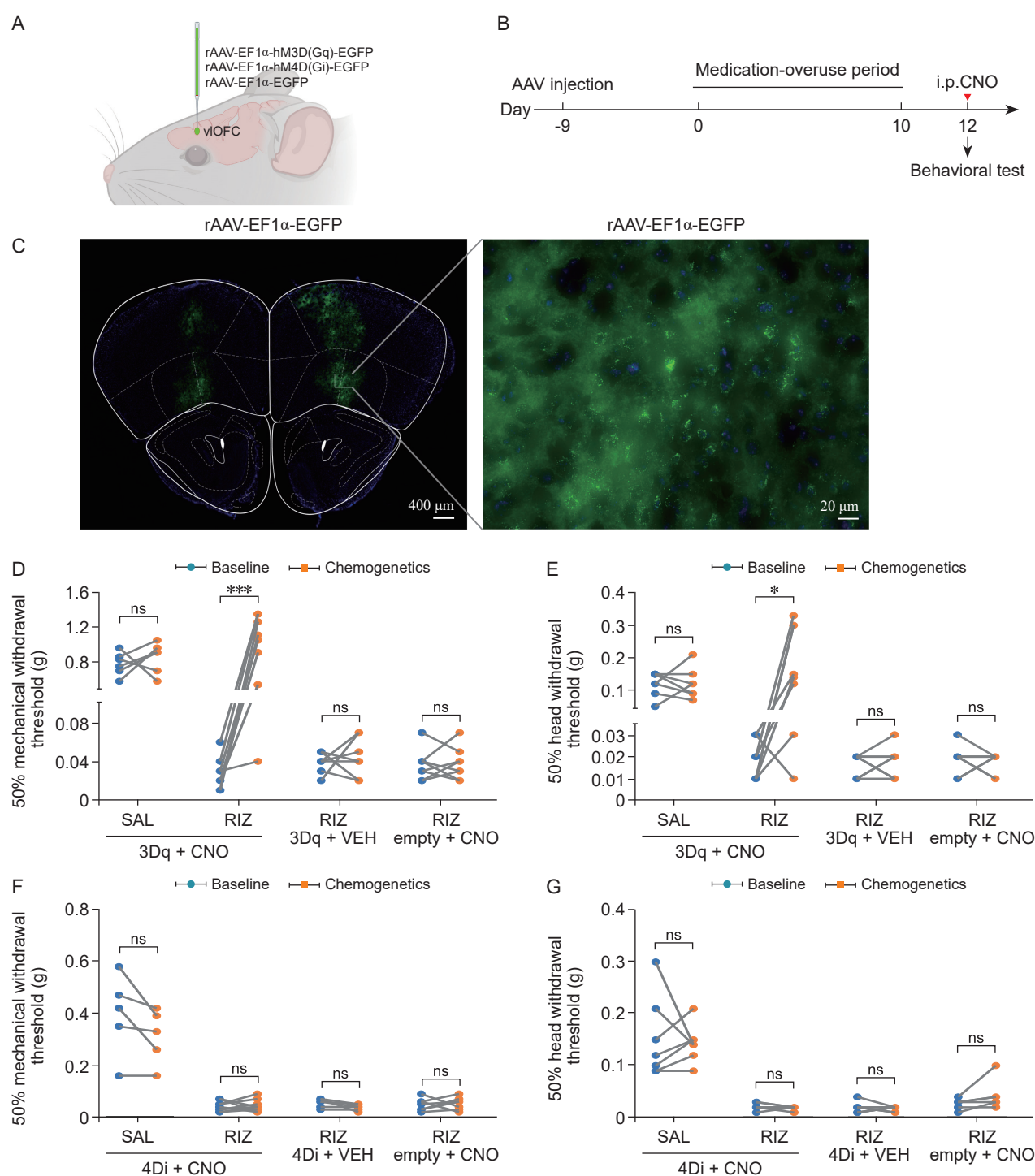


图 4 化学遗传学激活 RIZ 小鼠 vOFC 神经元可发挥镇痛效果 ($n = 7-9$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) 病毒注射示意图; (B) D-G 实验方案示意图; (C) 病毒注射部位的代表性图像。比例尺 = 400 μm (左) 和 20 μm (右); (D, E) CNO (5 mg/kg, 腹腔注射) 或生理盐水注射前和 30 min 后激活 vOFC 脑区神经元, SAL 和 RIZ 小鼠 MWT (D) 和 HWT (E), 配对 t 检验, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, 与 SAL 组相比; (F, G) CNO 或生理盐水注射前和 30 min 后抑制 vOFC 脑区神经元, SAL 和 RIZ 小鼠 MWT (F) 和 HWT (G)。

Fig. 4 Chemogenetic activation of vOFC neurons in RIZ-treated mice produces analgesic effects ($n = 7-9$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Schematic illustration of viral injection; (B) Diagram of D-G experimental protocol; (C) Representative images of viral injection. Scale bar = 400 μm (left) and 20 μm (right); (D, E) MWT (D) and HWT (E) in SAL and RIZ mice before and 30 min after neuronal activation in vOFC via CNO (5 mg/kg, i.p.) or saline injection. Paired t -test, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, compared with SAL group; (F, G) MWT (F) and HWT (G) in SAL and RIZ mice before and 30 min after neuronal inhibition in vOFC via CNO or saline injection.

性增强的情况下仍表现出痛阈降低。这种现象可能源于两种机制：其一，vIOFC 活性增强可能属于代偿性保护机制，但由于激活程度不足未能通过下游 PAG 发挥镇痛作用，这与 PAG 未出现 c-Fos 表达改变的结果相符；其二，vIOFC 自发性激活可能集中于 GABA 能神经元亚群。既往研究表明，选择性激活谷氨酸能神经元具有镇痛作用^[8]，而激活 GABA 能神经元则会加剧疼痛，考虑到 vIOFC 以谷氨酸能神经元为主，非选择性激活通常表现为镇痛效应，但 MOH 小鼠可能因 GABA 能神经元特异性激活导致痛觉敏化，这与本研究中 MOH 小鼠痛阈降低的表型一致。本团队计划在下一步的研究中证实上述猜想。

本研究通过化学遗传学激活 vIOFC 成功逆转 MOH 痛敏，证实该脑区神经元活性与疼痛强度呈负相关。然而，抑制 vIOFC 脑区后，小鼠痛阈却未进一步下降，可能与 von Frey 测试存在“地板效应”有关，即 MOH 模型小鼠的痛阈已经到达 von Frey 纤维丝所能测量的最低值，化学遗传学抑制 vIOFC 脑区后，小鼠的痛阈虽然进一步下降，但已低于 von Frey 纤维丝的量程，无法进一步准确测量。例如，在 SNI 小鼠模型中，Huang 等^[8]抑制 vIOFC 脑区神经元后，足底痛阈也未进一步下降。

从分子机制层面，vIOFC 的疼痛调控依赖于多递质系统协同作用。谷氨酸/GABA 能系统通过调节局部神经环路影响镇痛效果^[20]，而神经病理性疼痛模型中催产素受体信号被证实参与调控过程，表现为催产素注射可显著提高痛阈且该效应可被其受体拮抗剂逆转^[21]。此外，现有研究提示 vIOFC 中内源性大麻素 CB1 受体^[22]和 5-HT 系统^[23,24]可能通过特定受体亚型参与疼痛调节。基于 MOH 模型的研究空白，未来需重点解析 vIOFC 不同神经元亚型的功能异质性，通过 Vgat-Cre/Vglut-Cre 基因鼠结合化学遗传学技术，特异性调控 GABA 能中间神经元和谷氨酸能锥体神经元活性以明确其在痛敏中的作用机制。同时需系统验证催产素、5-HT 及内源性大麻素系统的调控必要性，可采用受体拮抗剂微量注射或 shRNA 局部干预进行靶向验证。在神经环路层面，可以利用逆行跨突触病毒示踪技术定位 vIOFC 下游脑区（如中脑导水管周围灰质、中缝核），结合 Cre-LOXP 系统阐明特定环路在 MOH 痛敏中的调控作用。

本研究存在的局限性：首先，尽管化学遗传调控已证实激活 vIOFC 可以缓解 MOH 小鼠痛敏，但操纵该脑区的长期效果仍不明确。其次，其他递质如 5-HT、多巴胺和阿片系统是否参与 MOH 模型小鼠皮肤痛敏，也有待进一步研究。

综上所述，本研究提示 vIOFC 可作为 MOH 镇痛干预的潜在靶点，其调控机制可能涉及多种神经递质系统的协同作用。未来研究需结合环路示踪与受体靶向干预技术，系统解析 vIOFC 不同神经元亚群及其下游脑区的调控作用，为开发基于 vIOFC 精准调控的慢性头痛治疗措施提供理论依据。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Yu SY, Cao XT, Zhao G, *et al.* The burden of headache in China: validation of diagnostic questionnaire for a population-based survey[J]. *J Headache Pain*, 2011, 12(2):141-146.
- [2] 中国医师协会神经内科医师分会, 中国研究型医院学会头痛与感觉障碍专业委员会. 中国药物过度使用性头痛诊治指南 (第一版) [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2024, 30(12):881-896.
- [3] Diener HC, Dodick D, Evers S, *et al.* Pathophysiology, prevention, and treatment of medication overuse headache[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(9):891-902.
- [4] Ashina S, Terwindt GM, Steiner TJ, *et al.* Medication overuse headache[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2023, 9(1):5.
- [5] Rolls ET. Emotion, motivation, decision-making, the orbitofrontal cortex, anterior cingulate cortex, and the amygdala[J]. *Brain Struct Funct*, 2023, 228(5):1201-57.
- [6] Liu H, Liu J, Sun S, *et al.* Medication overuse headache associated with decreased dopamine transporter availability in the medial but not in the lateral orbitofrontal cortex: a (11)CFT PET/MR study[J]. *Int J Neurosci*, 2024, 134(6):543-550.
- [7] Becker S, Gandhi W, Pomares F, *et al.* Orbitofrontal cortex mediates pain inhibition by monetary reward[J]. *Soc Cogn Affect Neurosci*, 2017, 12(4):651-661.
- [8] Huang J, Zhang Z, Gambeta E, *et al.* An orbitofrontal cortex to midbrain projection modulates hypersensitivity after peripheral nerve injury[J]. *Cell Rep*, 2021, 35(4):109033.
- [9] Giesecke T, Gracely RH, Clauw DJ, *et al.* [Central pain processing in chronic low back pain. Evidence for reduced pain inhibition][J]. *Schmerz*, 2006, 20(5):411-414.
- [10] Sheng HY, Lv SS, Cai YQ, *et al.* Activation of ventrolateral orbital cortex improves mouse neuropathic pain-induced anxiodepression[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(19):e133625.
- [11] Zhang YQ, Tang JS, Yuan B, *et al.* Inhibitory effects of electrically evoked activation of ventrolateral orbital cortex on the tail-flick reflex are mediated by periaqueductal gray in rats[J]. *Pain*, 1997, 72(1-2):127-135.
- [12] Gong Z, Yang C, Dai W, *et al.* Annexin A1 exerts analgesic effect in a mouse model of medication



- overuse headache[J]. *iScience*, 2023, 26(11):108153.
- [13] Bonnet C, Hao J, Osorio N, *et al*. Maladaptive activation of Nav1.9 channels by nitric oxide causes triptan-induced medication overuse headache[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):4253.
- [14] 李扬, 李晨浩, 毛静瑞, 等. 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 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2024, 30(3):173-182.
- [15] 刘超阳, 刘清, 王莎, 等. P2X4 受体在慢性偏头痛大鼠三叉神经脊束尾核的表达及意义 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2018, 24(3):169-175.
- [16] Oane I, Barborica A, Mindruta IR. Cingulate cortex: anatomy, structural and functional connectivity[J]. *J Clin Neurophysiol*, 2023, 40(6):482-490.
- [17] Wei F, Zhuo M. Potentiation of sensory responses in the anterior cingulate cortex following digit amputation in the anaesthetised rat[J]. *J Physiol*, 2001, 532(Pt 3):823-833.
- [18] Buzsaki G, Draguhn A. Neuronal oscillations in cortical networks[J]. *Science*, 2004, 304(5679):1926-1929.
- [19] Ramanathan DS, Guo L, Gulati T, *et al*. Low-frequency cortical activity is a neuromodulatory target that tracks recovery after stroke[J]. *Nat Med*, 2018, 24(8):1257-1267.
- [20] Zhang S, Tang JS, Yuan B, *et al*. Inhibitory effects of glutamate-induced activation of thalamic nucleus submedialis are mediated by ventrolateral orbital cortex and periaqueductal gray in rats[J]. *Eur J Pain*, 1998, 2(2):153-163.
- [21] Taati M, Tamaddonfard E. Ventrolateral orbital cortex oxytocin attenuates neuropathic pain through periaqueductal gray opioid receptor[J]. *Pharmacol Rep*, 2018, 70(3):577-583.
- [22] Wu Y, Fu D, Gu Q, *et al*. Activation of CB1 receptors on GABAergic interneurons in the ventrolateral orbital cortex induces analgesia[J]. *Neurosci Lett*, 2020, 736: 135286.
- [23] Xu WJ, Zhao Y, Huo FQ, *et al*. Involvement of ventrolateral orbital cortex 5-HT_{1,7} receptors in 5-HT induced depression of spared nerve injury allodynia[J]. *Neuroscience*, 2013, 238:252-257.
- [24] Zhao YL, Yi HY, Baba SS, *et al*. Activation of 5-HT₆ receptors in the ventrolateral orbital cortex produces anti-anxiodepressive effects in a rat model of neuropathic pain [J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(1):1136-1150.

• 国际译文 •

伤害性刺激诱发高频振荡的神经元机制：小清蛋白阳性中间神经元

初级躯体感觉皮质 (primary somatosensory cortex, S1) 中 60~90 Hz 的 Gamma 振荡 (Gamma-band oscillations, GBOs) 在伤害性信息的处理中发挥重要作用。然而，伤害性刺激诱发高频振荡的神经元机制目前尚不清楚。该研究采用人类高密度脑电记录 (electroencephalography, EEG)，结合大鼠/小鼠在体电生理记录、钙成像及光遗传学操控等方法，深入解析伤害性刺激诱发 GBOs 的机制。结果：（1）研究团队通过大样本人类 EEG 数据分析发现，疼痛诱发的高频振荡信号受到刺激强度 (stimulus intensity) 与个体主观疼痛评分 (subjective rating) 的双重影响，并主要分布在中央区域，即主要来源于双侧 S1 区域。在控制刺激强度因素后，高频振荡信号与主观疼痛评分之间仍保持显著线性关系：高频振荡越强，个体对疼痛的评分越高。（2）利用硅电极记录技术，分析了大鼠 S1 区域对疼痛的编码特性。S1 区域的 GBOs 主要编码疼痛强度，并且 GBOs 由中间神经元的放电驱动。（3）采用小鼠钙离子成像技术，对比分析小清蛋白 (parvalbumin, PV) 阳性的中间神经元，以及锥体神经元对伤害性刺激的反应特性。结果显示，PV 阳性中间神经元主要受疼痛强度调控，而锥体神经元主要对疼痛位置敏感。（4）进一步通过光遗传学手段，精确操控上述两类神经元。激活或抑制 PV 阳性中间神经元分别增加或降低小鼠对激光或机械刺激的疼痛反应，而对锥体神经元的调控并未显著影响疼痛敏感度。（5）为进一步确认 PV 阳性中间神经元是否是疼痛诱发高频振荡信号的核心来源，研究者利用光电极记录技术，在调控 S1 区不同类型神经元的同时，监测高频振荡信号的变化。结果显示，激活或抑制 PV 阳性中间神经元可分别增强或减弱疼痛诱发的高频振荡幅值，而对锥体神经元的调节则并不影响该振荡信号。结论：该研究通过跨物种、跨层级的研究范式，揭示 PV 阳性中间神经元驱动疼痛高频振荡，并编码痛觉强度的机制。该研究结果不仅为疼痛的客观评估提供了潜在的脑指标，也为疼痛的神经调控治疗提供了新的干预靶点。

(Yue L, Bao C, Zhang L, *et al*. Neuronal mechanisms of nociceptive-evoked gamma-band oscillations in rodents. *Neuron*, 2025, 113(5):769-784.e6. 北京大学神经科学研究所, 刘风雨 译)