

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2025.11.004

• 论 著 •

CD39 在慢性偏头痛大鼠三叉神经脊束尾核中的表达及作用 *

孙雪纯 张 芸 刘 铃 周冀英[△]

(重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆市神经病学重点实验室, 重庆400016)

摘 要 目的: 观察 CD39 (外核苷三磷酸二磷酸水解酶 1, 亦称 ENTPD1) 在慢性偏头痛 (chronic migraine, CM) 大鼠三叉神经脊束尾核 (trigeminal nucleus caudalis, TNC) 中的表达变化, 并探讨其在 CM 中的作用。**方法:** 通过腹腔隔日重复注射硝酸甘油 (nitroglycerin, NTG) 建立 CM 大鼠模型。使用 von Frey 测定大鼠眶周和后足机械痛阈值。Western blotting 检测 CM 模型大鼠中 CD39 及中枢敏化关键指标降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 蛋白的表达变化, 免疫荧光检测 CD39 在 TNC 的表达及定位情况。通过侧脑室注射 CD39 类似物 Apyrase 增加外源性 CD39 表达来探究其对 CM 中枢敏化的影响。**结果:** CM 造模后, 大鼠眶周和后足机械痛阈值显著降低; Western Blot 结果显示 TNC 中 CGRP 蛋白表达显著增加; CD39 的表达明显减少。荧光染色显示 CD39 与神经元共定位; 使用 CD39 类似物 Apyrase 后 CGRP 表达明显降低。**结论:** CD39 在 CM 中发挥保护作用, 可能通过抑制中枢敏化改善 CM 的进程。

关键词 CD39; 慢性偏头痛; 三叉神经脊束尾核

The expression and role of CD39 in trigeminal nucleus caudalis of rats with chronic migraine *SUN Xue-chun, ZHANG Yun, LIU ling, ZHOU Ji-ying[△]

(Chongqing Key Laboratory of Neurology, Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Objective: To investigate the expression changes and role of CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, ENTPD1) within trigeminal nucleus caudalis (TNC) in the pathophysiological process of chronic migraine (CM) rats. **Methods:** Nitroglycerin (NTG) was repeatedly intraperitoneally injected (i.p.) in awake rats to establish CM model. Mechanical pain thresholds of periorbital region and hind paw were detected by von Frey. Western blotting was performed to detect the expression of CD39 and calcitonin gene-related peptide (CGRP) protein in TNC. Localization of CD39 in TNC was detected by immunofluorescence methods. The effect of CD39 analog Apyrase on CM was explored through intracerebroventricular injection (icv). **Results:** Repeated injection of NTG decreased pain thresholds in periorbital region and the hind paw, and the protein expression of CGRP in TNC was significantly increased, while the expression of CD39 was markedly decreased. Immunofluorescence staining revealed that CD39 was expressed in neurons in TNC. Furthermore, the use of CD39 analog Apyrase significantly reduced the expression of CGRP. **Conclusion:** CD39 exerts a protective effect in CM, potentially through the inhibition of central sensitization to alleviate disease progression. The decreased expression of CD39 in TNC may regulate the pathophysiological processes of CM by affecting central sensitization.

Keywords CD39; chronic migraine; trigeminal nucleus caudalis

* 基金项目: 重庆市科卫联合医学科研攻关项目 (2024GGXM002)

[△] 通信作者 周冀英 zheadache@163.com

慢性偏头痛 (chronic migraine, CM) 是一种常见的致残性神经系统疾病, 根据国际头痛疾病分类第 3 版 (International Classification of Headache Disorders, 3rd edition, ICHD-3) 将其定义为连续 3 个月以上, 每月头痛至少 15 天, 其中偏头痛样发作 $\geq$ 每月 8 天。每年约 2.5% 发作性偏头痛 (episodic migraine, EM) 病人会进展为 CM, CM 导致严重的个人和社会经济负担, 据调查研究显示 CM 病人中重度失能者高达 25%^[1]。然而, 由于该病发病机制复杂且治疗效果不佳, 目前可用的治疗手段有限, 因此进一步研究 CM 的病理生理机制, 对于预防和治疗其发生发展具有极为重要的意义。

偏头痛发病机制尚未完全阐明, 三叉神经脊束尾核 (trigeminal nucleus caudalis, TNC) 神经元的中枢敏化机制是关键机制之一, 其主要特征为伤害性神经元的激活阈值降低, 因此通常非伤害性刺激会诱导伤害性神经元反应。这种现象与偏头痛病人中常见的皮肤异常性疼痛 (即触诱发痛) 存在病理生理学的关联^[2]。研究表明胞外三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 作为脊髓痛觉传导通路的重要信号介质^[3], 其通过神经元与胶质细胞释放, 经配体门控阳离子通道 (purinergic ligand-gated cation channel P2X receptors, P2X) 与代谢型受体 (purinergic G-protein coupled P2Y receptors, P2Y) 发挥作用^[4]。既往研究已证明 TNC 部位小胶质细胞上的 P2X4^[5] 以及 P2Y14^[6] 受体活化有助于 CM 的中枢敏化发展。而 ATP 在胞外代谢具有动态性, 首先经胞外核苷酸酶 (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ENTPD) 催化生成单磷酸腺苷 (adenosine monophosphate, AMP), 随后由 CD73 转化为腺苷^[7], 腺苷能够激活其脑内亲和力最高的 A1 受体 (属于 G 蛋白偶联受体) 发挥抗伤害性作用。哺乳动物脑组织主要表达 ENTPD1-3 亚型^[8], 其中 CD39 (外核苷三磷酸二磷酸水解酶 1, 亦称 ENTPD1) 作为关键限速酶, 主导胞外 ATP/三磷酸腺苷的水解过程^[9]。最近一项研究表明, CD39 代谢轴通过逐级水解神经元释放的 ATP 生成腺苷, 再通过腺苷 A1 受体介导对神经元过度兴奋的抑制作用^[10]。此外, 近期一项关于偏头痛的研究中采集偏头痛病人和健康对照者的外周血, 通过基于特异性膜标志物的流式细胞术, 鉴定 T 细胞的嘌呤能特征。值得注意的是, 偏头痛病人调节性 T 细胞 (Tregs) 呈现 CD39 低表达特征, 提示 ATP-腺苷代谢轴功能受损^[11], 这可能导致对偏头痛中疼痛信号传导的抑制机制出现潜在的“去抑制”现象。CD39 已被证实参与影响多

种中枢神经系统疾病, 如在重度抑郁症中 CD39 过表达引起 ATP 过度水解从而导致神经发生受损^[12], 在癫痫中通过抑制神经元过度兴奋调控其发生^[13]。一项关于针灸治疗关节炎模型大鼠镇痛机制的研究表明, CD39 参与调控疼痛的发展过程^[14]。既往研究已经证实由 ATP 等核苷酸激活的嘌呤能受体 (如 P2X 和 P2Y 家族) 与偏头痛的中枢敏化密切相关, 但尚无研究证明水解 ATP 等核苷酸的胞外核苷酸酶 (如 CD39) 与偏头痛慢性化的关系。此外, 既往对 CD39 的研究主要聚焦在免疫调节、缺血缺氧及肿瘤领域的作用, 但其在 CM 中的作用尚未见报道。

因此, 本研究按照既往报道的方法建立大鼠慢性偏头痛模型^[15], 观察 CD39 在中枢疼痛关键脑区 TNC 部位的表达及变化, 并观察 CD39 干预后, 对 CM 中枢敏化关键指标降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 的影响^[16], 探讨其在 CM 中的作用, 旨在为 CM 的治疗策略提供一种新思路, 为探索 CD39 在中枢神经系统疾病中的作用提供新视角。

方 法

1. 实验材料

(1) 实验动物及分组: SPF 级成年雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 36 只, 体重 250~300 g, 由重庆医科大学实验动物中心 (实验动物生产许可证号: SYXK(渝)2022-0010) 提供, 在重庆医科大学附属第一医院动物实验室 (使用许可证号: SYXK(渝)2022-0016) 分笼饲养。实验室内温度 22~24℃, 相对湿度 45%~55%, 通过自动光控装置实现 12 小时昼夜节律调节。所有大鼠自由获取辐照灭菌饲料及纯净水饮用。大鼠运输至实验室后实施 7 天环境适应。本研究通过重庆医科大学附属第一医院医学伦理委员会审核 (伦理审批号: IACUC-CQMU-2025-0234), 严格遵守动物实验伦理相关规定。

实验大鼠采用随机数字表法随机分组。实验一: Saline 对照组 ($n=9$)、NTG 模型组 ($n=9$), 用于测量机械痛阈值; 实验二: Saline 对照组 ($n=9$)、NTG 模型组 ($n=9$), 用于免疫印迹实验及免疫荧光实验测量 CD39 和 CGRP 水平; 实验三: Saline 对照组 ($n=9$)、NTG 模型组 ($n=9$)、NTG + 载体组 ($n=9$)、NTG + CD39 类似物 pyrase 组 ($n=9$), 用于免疫印迹实验测量给药后 CGRP 水平。

(2) 主要试剂：药物：注射用硝酸甘油 (nitroglycerin, NTG) 购于重庆医科大学附属第一医院 (批号：国药准字 H11020289)；Apyrase (Sigma-Aldrich, A6535)。免疫印迹实验：一抗：CD39 (1:1000, Abcam, ab108248)；CGRP (1:1000, Abcam, ab139264)；GAPDH (1:8000, ZEN BIO, 200306-7E4)；HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:5000, ZEN BIO, 511203)，羊抗鼠 IgG (1:5000, ZEN BIO, 511103)。免疫荧光实验：一抗：CD39 (1:500, Proteintech, 14211-1-AP)；Iba1 (1:500, ZEN BIO, 382207)；GFAP (1:200, Santa Cruz, sc-65343)；Neun (1:500, Abcam, ab104224)；Cy3 标记的山羊抗兔 (1,500, Beyotime, A0516)；AF488 标记的山羊抗鼠 (1:500, Beyotime, A0428)；DAPI (Beyotime, C1005)。BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (Beyotime, P0399M)，ECL 化学发光显影液 (Beyotime, P0018M)，蛋白酶抑制剂混合物 (Beyotime, P1006)；磷酸酶抑制剂混合物 (Beyotime, P1046)；RIPA 裂解液 (Beyotime, P0038)；SDS-PAGE 预制胶 (雅酶, PG112)。

(3) 主要材料及仪器：大鼠立体定位仪 (美国 Stoelting 公司, 型号 ST-51,603)，激光共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 公司, 型号 LSM800)，凝胶成像分析系统 (法国 Fusion 公司, 型号 Fusion FX7)，微量注射器 (20 μ l, 上海高鸽尖头, A124915)，von Frey 纤维丝 (上海软隆科技, BW806)。

2. 实验方法

(1) 建立 CM 大鼠模型：参照 Pradhan 等^[15]的报道，大鼠充分适应环境并随机分组后，首先用 0.9% 氯化钠溶液配制 1 mg/ml 的 NTG 溶液，按照 10 mg/kg NTG 对大鼠进行腹腔注射，隔日 1 次，持续 9 天，共 5 次，即在造模第 1、3、5、7、9 天进行给药。使用与 NTG 相同剂量的 0.9% 氯化钠溶液作为对照，给药时间和方法与模型组一致。

(2) 立体定位术和侧脑室注射：参考既往相关文献报道^[11,12]，CD39 类似物 Apyrase 以侧脑室给药的方式作用于中枢。麻醉及手术方式如前所述^[17]。大鼠通过腹腔注射 10% 水合氯醛 (4 ml/kg) 联合镇痛药物丁丙诺啡 (0.01 mg/kg) 进行麻醉。待足底反射消失后，将其固定于立体定位仪上，并辅以恒温加热垫。沿矢状面切开皮肤暴露前囟，于左侧硬脑膜上方行直径 1 mm 的颅骨钻孔，坐标定位如下：前囟后移 1.0 mm，向左旁开 1.5 mm，靶向左侧侧脑室。将无菌带螺帽套管植入上述坐标位置，并用牙科水泥固定。术后大鼠恢复至少 7 天，直至其机械痛阈恢复至术前基线水平。侧脑室注射在麻醉状态下的大鼠上进行，使用 20 μ l 微量进样器通过套管注射，立体定位坐标如下：前囟后移 1.0 mm，向左旁开 1.5 mm，颅骨平面下探 4.0 mm。每次注射前后均检查导引套管的通畅性。药物以每分钟 2 μ l 的速率缓慢输注，注射完成后留针观察 10 分钟，随后在 1 分钟内缓慢拔针。操作完成后，将大鼠重新置于恒温加热垫上恢复，随后进行 NTG 注射。给药部位示意及实验流程见图 1。

(3) 机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 测定：参照本课题组既往的方法^[17]，将大鼠个体转移至不锈钢网格 (孔径 5 mm $\times$ 5 mm) 构成的透明聚碳酸酯行为观察箱 (30 cm $\times$ 30 cm $\times$ 40 cm)，进行 30 分钟环境适应期，通过校准的 von Frey 纤维丝测量机械痛。眶周痛阈测试时，将纤维丝垂直于眶周皮肤施加刺激，若大鼠出现快速缩头或前爪抓挠面部动作，则判定为阳性反应。后足底机械痛阈测试时，将纤维丝垂直按压于后足底，若出现缩足或抖动肢体动作，则视为阳性反应。当大鼠出现阳性反应时，降低细丝强度；若未出现，则增强纤维丝强度直至引发阳性反应。阈值记录以 3 次重复测试中能引发阳性反应的最小

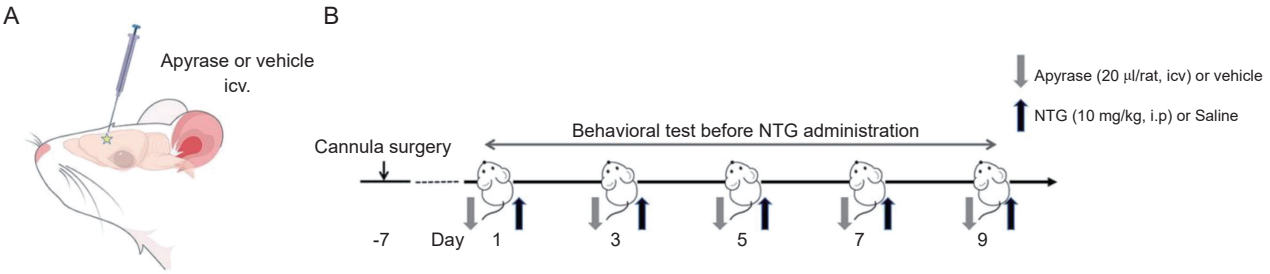


图 1 实验设计图
(A) 侧脑室给药部位示意；(B) 实验流程表

Fig. 1 Experimental design chart
(A) Schematic diagrams of injection sites; (B) Experimental timeline

作用力为准，每次测试间隔 5 分钟，每只大鼠至少接受 3 次测评。

(4) 蛋白提取与免疫印迹实验：取 Saline 对照组 ($n = 9$)、NTG 模型组 ($n = 9$)、NTG + 载体组 ($n = 9$)、NTG + CD39 类似物 Apyrase 组 ($n = 9$) 四组大鼠。末次药物干预后以及行为学测定完成后，10% 水合氯醛麻醉大鼠，迅速断头处死取脑干 TNC 组织，组织裂解采用 PMSF 和蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量后，通过快速凝胶制备试剂盒进行凝胶电泳分离，并将蛋白转移至 PVDF 膜。PVDF 膜在室温下用无蛋白快速封闭缓冲液封闭 30 分钟，随后与一抗 4℃ 孵育过夜。次日用 1×TBST 缓冲液洗膜 3 次后，加入 HRP 标记的二抗，室温孵育 1 小时。采用增强型化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 底物和凝胶成像系统检测免疫印迹条带，并通过 ImageJ 软件进行灰度分析。

(5) 免疫荧光实验：取 Saline 对照组 ($n = 9$)、NTG 模型组 ($n = 9$) 两组大鼠。麻醉大鼠后，先行心脏灌注 250 ml 0.1 M 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)，随后灌注 250 ml 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA)，组织样本在 4℃ 条件下经 4% PFA 后固定 24 小时，依次转入 20% 和 30% 蔗糖溶液脱水至沉底。使用冰冻切片机切取处理好的脑组织，切取 15 μm 厚的冠状冰冻切片，切片放入 -80℃ 冰箱保存。实验时取出切片自然风干，切片经 37℃ 0.3% Triton X-100 破膜 10 分钟，用 10% 山

羊血清 37℃ 封闭 30 分钟。随后与一抗 4℃ 孵育过夜，PBS 清洗 3 次 (每次 15 分钟)，再与种属特异性荧光二抗 37℃ 孵育 90 分钟。核染色采用 DAPI 染料。封片后使用激光共聚焦显微镜采集图像。

3. 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析及图表绘制。所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。 n 代表实验动物数量。根据前期研究及“3R 原则”，通过 G*Power 软件计算 $\alpha = 0.05$ 显著性水平和 0.8 统计效力所需的样本量。统计分析前，使用 Shapiro-Wilk (S-W) 正态性检验和 Bartlett's test 验证数据正态性及方差齐性。行为学数据采用双因素方差分析 (Two-way ANOVA) 结合 Bonferroni 事后检验进行分析；两组比较采用 Two-tailed Student's t -test；多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 结合 Dunnett's 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CM 大鼠模型的成功建立

在给药前即第 1 天 Saline 对照组与 NTG 模型组机械痛阈值无显著差异 (眶周: $t = 0.05957$, $P > 0.9999$; 足底: $t = 1.612$, $P = 0.5280$)；与 Saline 对照组相比，NTG 模型组大鼠自第 5 日 (即第 3 次 NTG 给药后) 起眶周 ($t = 4.933$, $P = 0.0075$) 及后足底机械痛阈值 ($t = 5.986$, $P = 0.0011$) 呈显著下降；从第 5 日至第 9 日，NTG 模型组的机械痛阈值始终

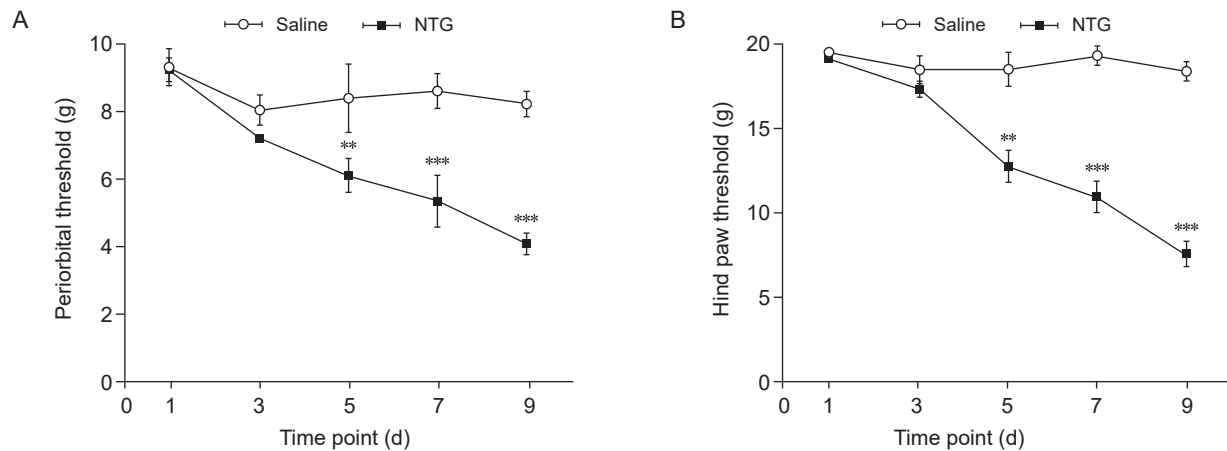


图 2 反复 NTG 注射诱导大鼠眶周及后足底机械痛阈下降 ($n = 9$, $\bar{x} \pm SD$)
Saline 对照组和 NTG 模型组 5 次给予生理盐水/硝酸甘油前的眶周 (A) 和后足底 (B) 机械痛阈值
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 Saline 对照组相比

Fig. 2 Repeated NTG injections decreased pain thresholds of periorbital and hindpaw ($n = 9$, $\bar{x} \pm SD$)
The changes of MWT in periorbital (A) and hind paw (B) before each time saline/NTG infusion in both control (saline) group and CM (NTG) group.
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with saline group.

明显低于 Saline 对照组（第 9 日眶周： $t = 19.18, P < 0.001$ ；足底： $t = 26.08, P < 0.001$ ），见图 2。Western blot 结果显示：NTG 模型组大鼠 TNC 部位 CGRP 的蛋白表达较 Saline 对照组显著增高（ $t = 14.95, P < 0.001$ ），见图 3。以上结果表明 CM 大鼠模型建立成功。

2. CD39 在 CM 大鼠 TNC 部位表达下调，主要表达于神经元上

使用 Western blot 对 Saline 对照组和 NTG 模型组大鼠的 TNC 区域中 CD39 的蛋白表达进行检测，实验结果表明，与 Saline 对照组相比，CM 中 CD39 的蛋白表达（见 4A, 4B）出现了显著下降（ $t = 5.786, P < 0.001$ ）；同时免疫荧光图像显示 CD39 的阳性细胞数（见图 4C, 4D）也明显减少（ $t = 9.852, P < 0.001$ ）；以上发现揭示了 CD39 在 CM 病理过程中的潜在作用。此外，利用双重免疫荧光染色技术进一步分析了 CD39 在 TNC 中的具体定位。结果显示，CD39 主要存在于神经元中（见图 5），这一发现为理解 CD39 在 CM 发病机制中的角色提供了新的线索。

3. 侧脑室注入 CD39 类似物 Apyrase 后 CGRP 表达减少

为探究 CD39 在 CM 中枢敏化机制中的潜在作用，本研究进一步分析了 CD39 类似物 Apyrase 对 CGRP 表达模式的调控效应。图 6 免疫印迹实验结果显示，与 Saline 对照组相比，NTG 模型组 CGRP 表达呈现显著上调（Saline vs. NTG, $q = 10.50, P < 0.001$ ；Saline vs. NTG + VEH, $q = 11.29, P < 0.001$ ），而 Apyrase 干预可显著抑制 NTG 重复给药诱导的 CGRP 过表达（NTG + VEH vs. NTG + Apyrase, $q = 10.41, P < 0.001$ ）。

讨 论

参考前期研究^[17]，本研究通过重复腹腔注射 NTG 成功建立了经过验证的大鼠 CM 模型。重复注射 NTG 可产生显著的时间和剂量依赖性慢性基础机械痛觉过敏，这是 CM 大鼠模型构建成功的标志性特征，这些结果与临床观察一致，CM 病人的痛觉异常既可发生于偏头痛发作间期，也可在发作期间出现^[15]。

中枢敏化是伤害性系统反应性异常增强的病理状态，由伤害性通路中神经元及神经环路的兴奋性增强所致^[18]。其表现为对无害刺激产生自发性疼痛超敏（即痛觉异常），以及对伤害性刺激产生夸张且延长的疼痛反应（即痛觉过敏）^[18]。大量研究表明，中枢敏化是 CM 最核心、最重要的病理生理学机制^[19]。CGRP 是参与 CM 发病的重要神经肽，已被临床广泛作为 CM 的治疗靶点^[20]。因此，本研究延续了前期工作基础^[17]，选择通过检测 CGRP 的表达水平来评估中枢敏化状态。此外前期研究已表明 NTG 诱导 CM 模型中的动物超敏行为学反应与 CGRP 的释放水平相对应^[21]，因此预计给予 CD39 类似物后，在逆转 CGRP 水平的同时，也能类似地逆转疼痛阈值，这需要接下来进一步地深入研究。此外，偏头痛在女性高发，并且偏头痛病理生理学中的性二态性已有报道。然而，CD39 的表达水平受雌激素影响^[22]，为避免 CD39 在雌性大鼠发情周期中的波动，本研究仅使用雄性大鼠。但鉴于偏头痛患病率的显著性别差异，CD39 的性别二态性参与调节 CM 的发病机制需要进一步探索。

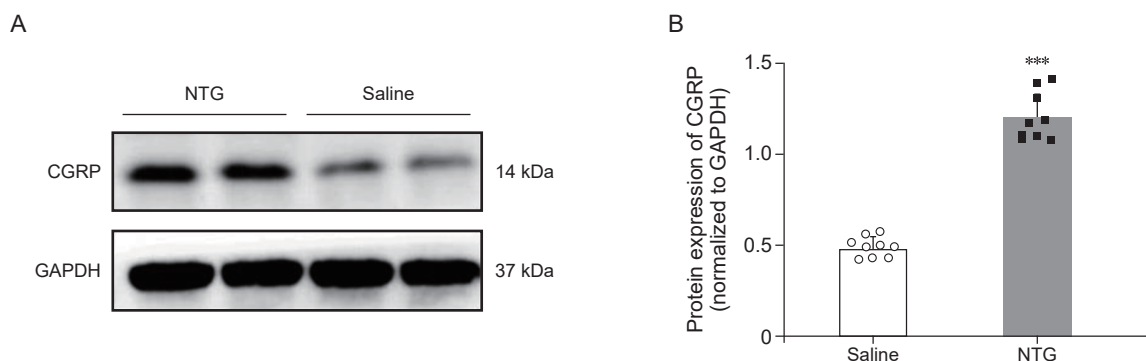


图 3 反复 NTG 注射后 CGRP 蛋白水平表达上调（ $n = 9, \bar{x} \pm SD$ ）
Saline 对照组和 NTG 模型组 TNC 部位中 CGRP 的代表性免疫印迹图 (A) 和定量统计图 (B)
*** $P < 0.001$ ，与 Saline 对照组相比

Fig. 3 Upregulation of CGRP expression at protein levels after NTG injection ($n = 9, \bar{x} \pm SD$)
Representative Western blot bands (A) and densitometric quantification (B) of CGRP in TNC between groups of control (saline) and CM (NTG).
*** $P < 0.001$, compared with saline group.

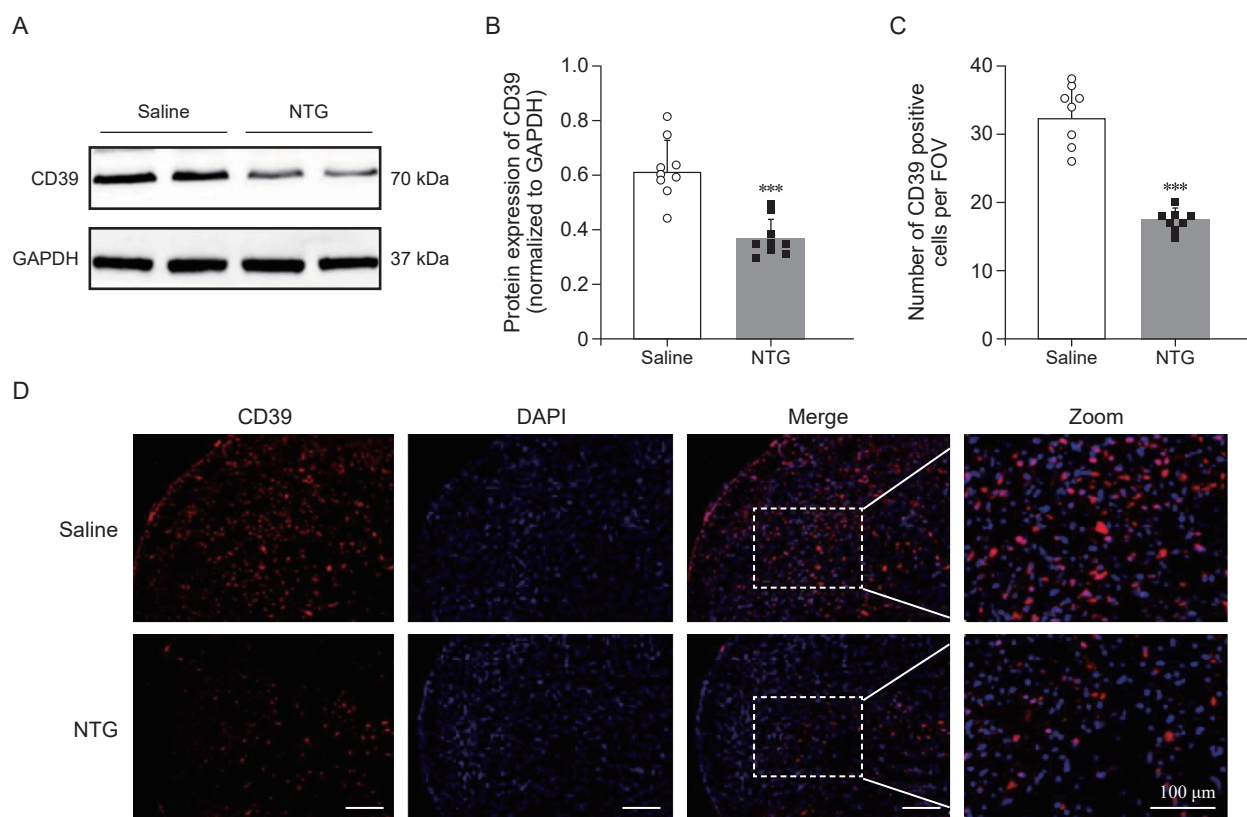


图4 反复 NTG 注射后 TNC 部位 CD39 的表达下降 ($n = 9$, $\bar{x} \pm SD$)

Saline 对照组和 NTG 模型组 TNC 部位中 CD39 的代表性免疫印迹图 (A) 和定量统计图 (B); 免疫荧光显示 CD39 的阳性细胞 (红色) 代表性图像 (D) 和定量分析 (C)。比例尺 = 100 μm

*** $P < 0.001$, 与 Saline 对照组相比

Fig. 4 The expression of CD39 in the TNC decreases after repeated NTG injections ($n = 9$, $\bar{x} \pm SD$)

Representative Western blot bands (A) and densitometric quantification (B) of CGRP in TNC between groups of control (saline) and CM (NTG); Representative images (D) and quantitative analysis (C) of CD39-positive cells (red). Scale bar = 100 μm

*** $P < 0.001$, compared with saline group.

既往嘌呤能信号传导参与偏头痛中枢敏化的研究聚焦于小胶质细胞上嘌呤能受体的激活, 根据本课题组前期工作 (如 P2X4R、P2X7R 以及 P2Y12R) 被证实有助于 CM 的发病机制^[23]。研究表明在中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中, 胞外 ATP 通过激活广泛分布于神经元、各类胶质细胞及内皮细胞的 P2X 配体门控离子型受体与 P2Y G 蛋白偶联受体传递信号^[4]。而 CD39 是一种能将胞外 ATP 迅速水解的酶。目前关于 CD39 通过嘌呤能信号介导抑制过度兴奋的神经元已在癫痫疾病中得到充分研究, 表明癫痫神经元过度兴奋可激活环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (cAMP response element-binding protein, CREB) 调控的转录共激活因子 1 (CREB-regulated transcription coactivator 1, CRTC1) 从细胞质募集至细胞核, 与 CREB 结合, 进而驱动 ATP/ADP 水解外切酶即 CD39 (由 Entpd1 基因编码) 的表达,

抑制其过度兴奋^[13]。近期一项关于针灸治疗关节炎模型大鼠的镇痛机制研究表明^[14], CD39 在疼痛调控中的作用, 其机制呈现双模态特征: 一方面通过清除促痛觉敏化的 ATP 实现快速镇痛; 另一方面通过与 CD73 等外切 AMP 酶协同作用, 促进抗痛觉敏化腺苷的生成。然而, 目前尚未有研究探索 CD39 与偏头痛的关系。目前仅有一项研究是取样偏头痛病人和健康对照者的外周血, 通过基于特异性膜标志物的流式细胞术鉴定外周血中 T 细胞的嘌呤能特征, 值得注意的是偏头痛病人调节性 T 细胞 (Tregs) 呈现 CD39/CD73 低表达特征, 提示 ATP-腺苷代谢轴功能受损^[11], 这可能导致对偏头痛中疼痛信号传导的抑制不足。这与本课题组在 CM 大鼠中的研究一致, 蛋白印迹和免疫荧光结果均显示与 Saline 对照组相比, CD39 在 CM 大鼠的 TNC 中表达显著下降。在为 CM 大鼠侧脑室补充 CD39 类似物 Apyrase 后,

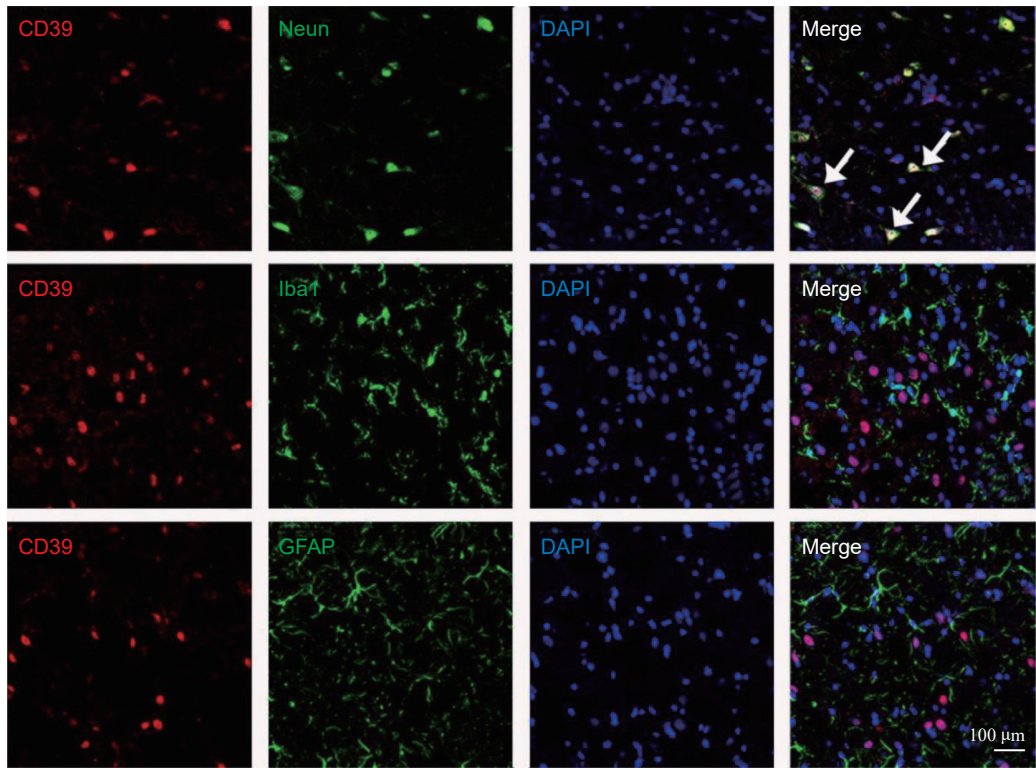
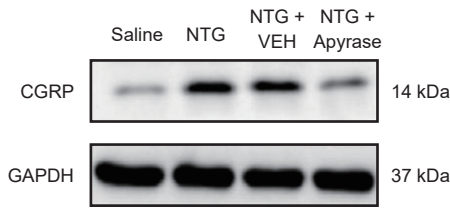


图 5 免疫荧光检测 CD39 在 TNC 部位的定位
大鼠 TNC 部位 CD39 (红色) 与神经元标志物 NeuN (绿色)、小胶质细胞标志物 Iba1 (绿色)、星形胶质细胞 GFAP (绿色) 的免疫荧光染色; 细胞核用 DAPI (蓝色) 染色; 白色箭头表示 CD39 与神经元共定位。比例尺 = 100 μ m

Fig. 5 Localization of CD39 in the TNC detected by immunofluorescence
Immunofluorescence staining of CD39 (red) with neurons (NeuN, green), microglia (Iba1, green) and astrocytes (GFAP, green) in TNC; The nuclei were stained with DAPI (blue); White arrows indicate the colocalization of CD39 with neurons. Scale bar = 100 μ m

A



B

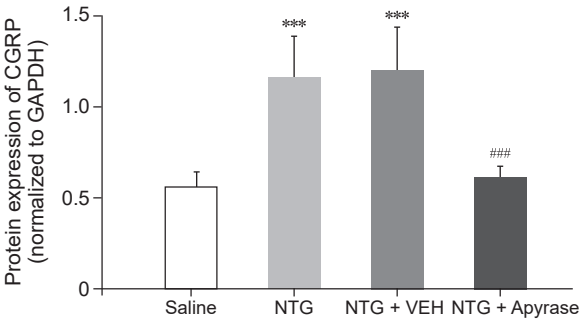


图 6 CD39 可抑制反复 NTG 诱导的 TNC 部位中 CGRP 表达 ($n = 9, \bar{x} \pm SD$)
给予 CD39 类似物 Apyrase 后各组 TNC 部位中 CGRP 的代表性免疫印迹图 (A) 和定量统计图 (B)
*** $P < 0.001$, 与 Saline 对照组相比; ### $P < 0.001$, 与 NTG + VEH 组相比

Fig. 6 CD39 inhibits the expression of CGRP in the TNC induced by NTG administration ($n = 9, \bar{x} \pm SD$)
The changes of CGRP protein expression in TNC after administration of CD39 analog Apyrase: (A) Representative Western blot bands; (B) Densitometric quantification.
*** $P < 0.001$, compared with saline group; ### $P < 0.001$, compared with NTG + VEH group.

模型组的 CGRP 过度表达得到抑制。

本研究存在以下局限性。首先给予 CD39 类似物 Apyrase 后逆转了偏头痛模型大鼠分子层面的表

达变化, 但未进行痛觉相关行为学检测, 接下来将进一步对药物干预后的行为学进行检查。其次本研究仅对 CM 大鼠使用 CD39 类似物进行其功能探索,

未来将使用 CD39 抑制剂或选择性基因敲除技术, 针对 CD39 参与调控 CM 病理生理进行更为深入和可靠的机制研究。

综上所述, 本研究发现在反复腹腔注射 NTG 诱导的 CM 大鼠模型中 TNC 部位的 CD39 表达下调, 这提示 CD39 与 CM 有关, 进一步发现在三叉神经脊束尾核部位 CD39 与神经元的共表达情况; 反复注射 NTG 诱导大鼠痛觉敏化, 并伴随 TNC 部位 CGRP 激活, 在给予大鼠每日侧脑室注射 CD39 类似物 Apyrase 后可明显降低 TNC 部位中枢敏化相关蛋白表达。以上结果提示 CD39 参与调控 CM 的病理生理学机制, 然而其具体机制还需进一步研究。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Hovaguimian A, Roth J. Management of chronic migraine[J]. BMJ, 2022, 379:e067670.
- [2] 裴培, 刘璐, 赵洛鹏, 等. 偏头痛: 中枢敏化与皮肤异常性疼痛 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2016, 22(2): 128-132.
- [3] Burnstock G. Purinergic mechanisms and pain[J]. Adv Pharmacol, 2016, 75:91-137.
- [4] Burnstock G. Purine and purinergic receptors[J]. Brain Neurosci Adv, 2018, 2:2398212818817494.
- [5] 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.
- [6] 朱品欢, 燕兰云, 徐欢, 等. P2Y14 受体可能参与小胶质细胞介导的偏头痛的中枢敏化 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(11):814-820.
- [7] Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(3):201-212.
- [8] Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance[J]. Purinergic Signal, 2006, 2(2):409-430.
- [9] Kishore BK, Robson SC, Dwyer KM. CD39-adenosinergic axis in renal pathophysiology and therapeutics[J]. Purinergic Signal, 2018, 14(2):109-120.
- [10] Badimon A, Strasburger HJ, Ayata P, *et al.* Negative feedback control of neuronal activity by microglia[J]. Nature, 2020, 586(7829):417-423.
- [11] Nurkhametova D, Kudryavtsev I, Khayrutdinova O, *et al.* Purinergic profiling of regulatory T-cells in patients with episodic migraine[J]. Front Cell Neurosci, 2018, 12:326.
- [12] Cui QQ, Hu ZL, Hu YL, *et al.* Hippocampal CD39/ENTPD1 promotes mouse depression-like behavior through hydrolyzing extracellular ATP[J]. EMBO Rep, 2020, 21(4):e47857.
- [13] Hu Y, Yao Y, Qi H, *et al.* Microglia sense and suppress epileptic neuronal hyperexcitability[J]. Pharmacol Res, 2023, 195:106881.
- [14] Xu JW, Tang SQ, Lin J, *et al.* NTPDase1-ATP-P2Y2Rs axis in the sciatic nerve contributes to acupuncture at "Zusanli" (ST36)-induced analgesia in ankle arthritis rats[J]. Brain Res Bull, 2024, 209:110909.
- [15] Pradhan AA, Smith ML, McGuire B, *et al.* Characterization of a novel model of chronic migraine[J]. Pain, 2014, 155(2):269-274.
- [16] Edvinsson L. The trigeminovascular pathway: role of CGRP and CGRP receptors in migraine[J]. Headache, 2017, 57(Suppl 2):47-55.
- [17] Tian R, Zhang Y, Pan Q, *et al.* Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN4096BS regulates synaptic transmission in the vestibular nucleus and improves vestibular function via PKC/ERK/CREB pathway in an experimental chronic migraine rat model[J]. J Headache Pain, 2022, 23(1):35.
- [18] Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity[J]. J Pain, 2009, 10(9):895-926.
- [19] Su M, Yu S. Chronic migraine: a process of dysmodulation and sensitization[J]. Mol Pain, 2018, 14:1744806918767697.
- [20] Iyengar S, Johnson KW, Ossipov MH, *et al.* CGRP and the trigeminal system in migraine[J]. Headache, 2019, 59(5):659-681.
- [21] Jing F, Zhang Y, Long T, *et al.* P2Y12 receptor mediates microglial activation via RhoA/ROCK pathway in the trigeminal nucleus caudalis in a mouse model of chronic migraine[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1):217.
- [22] Cassavaugh J, Qureshi N, Csizmadia E, *et al.* Regulation of hypoxic-adenosinergic signaling by estrogen: implications for microvascular injury[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2023, 16(3):422.
- [23] Jiang L, Zhang Y, Jing F, *et al.* P2X7R-mediated autophagic impairment contributes to central sensitization in a chronic migraine model with recurrent nitroglycerin stimulation in mice[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1):5.