

文章编号: 0465-7942(2024)06-0039-07

姜黄素调节cAMP/PKA/CREB信号通路对慢性偏头痛大鼠的治疗作用

安宁^{1,2,3,4}, 林晶^{1,2,3,4}, 李晓萍^{1,2,3,4}, 牛莹莹⁵, 杨印东^{1,2,3,4}, 李秋岩^{1,2,3,4},
王泽亮^{1,2,3,4}, 王亚婷^{1,2,3,4}, 李晶超^{1,2,3,4}

(1. 牡丹江医科大学附属红旗医院 神经内科, 黑龙江 牡丹江 157000; 2. 牡丹江医科大学 第一临床医学院, 黑龙江 牡丹江 157000; 3. 国家高级卒中中心, 黑龙江 牡丹江 157000; 4. 黑龙江省缺血性脑卒中防治重点实验室, 黑龙江 牡丹江 157000; 5. 牡丹江医科大学 公共卫生学院, 黑龙江 牡丹江 157000)

摘要: 为探究姜黄素(CUR)对慢性偏头痛(CM)大鼠的治疗作用,并研究其作用机制.随机将SD大鼠分为6组:对照组、模型组、CUR低、中、高剂量组、H-89组.采用硝酸甘油(NTG)腹腔注射构建CM大鼠模型,在造模第1、3、5、7、9天对大鼠进行疼痛阈值检测、行为学测试.分离大鼠神经元细胞,筛选CUR最佳浓度,将细胞分为NC组、NTG组、CUR低剂量组、CUR中剂量组、CUR高剂量组、H-89组,CKK-8法检测细胞活力,流式细胞术检测细胞凋亡;ELISA检测三叉神经脊束尾侧核(TNC)组织和神经元细胞环磷酸腺苷(cAMP)、白细胞介素 1β (IL- 1β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量,Western Blot检测TNC组织和神经元细胞中蛋白激酶A(PKA)、p-PKA、cAMP反应元件结合蛋白(CREB)、p-CREB蛋白表达.结果显示,与对照组相比,模型组大鼠眶周机械痛阈、足底机械痛阈、热缩足潜伏期、cAMP含量、p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白表达显著降低,IL- 1β 、TNF- α 、挠头次数、爬笼次数显著升高($P<0.05$);与模型组相比,CUR低、中、高剂量组大鼠眶周机械痛阈、足底机械痛阈、热缩足潜伏期、cAMP含量、p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白表达显著升高,IL- 1β 、TNF- α 、挠头次数、爬笼次数显著降低($P<0.05$);在NTG诱导神经元细胞中,与 $0\ \mu\text{mol/L}$ CUR比较,5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ CUR显著提高细胞活力($P<0.05$),选用5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度CUR做后续实验;与NC组相比,NTG组细胞活力、cAMP含量、p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白表达水平明显降低,IL- 1β 、TNF- α 、凋亡率(%)明显增加($P<0.05$);相比于NTG组,CUR低、中、高剂量组IL- 1β 、TNF- α 、凋亡率明显降低($P<0.05$),细胞活力、cAMP含量、p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白表达水平明显增加.PKA抑制剂H-89能逆转CUR对CM大鼠的治疗作用($P<0.05$).表明CUR能缓解CM大鼠症状,降低炎症反应,减少神经元细胞凋亡,其作用机制可能与cAMP/PKA/CREB信号通路的激活有关.

关键词: 慢性偏头痛; 姜黄素; 神经元细胞; cAMP/PKA/CREB信号通路

中图分类号: R747.2

文献标志码: A

0 引言

偏头痛是一种复杂、严重的神经系统疾病,其特征为反复发作头痛并伴有原发病的症状和体征,如恶心、畏光、恐声和呕吐等症状,对患者的生活质量产生严重的影响^[1].慢性偏头痛(CM)是指头痛频繁发作每月超过15 d,至少持续3个月,偏头痛天数超过8 d/月,其致残率更高^[2].根据流行病学研究和临床观察,约2%~3%的偏头痛患者进展为CM,同时偏头痛患者中良性阵发性位置性眩晕的发生率明显增高,给个人和社会带来巨大的经济负担.然而,由于CM的发病机制复杂,尚未找到有效的治疗方法.姜黄素(CUR)是姜科姜黄根茎中的一种天然多酚化合物,具有包括抗炎、抗氧化、抗血栓形成和抗癌等多种药理特性.研究发现,CUR能改善偏头痛患者的临床特征和炎症反应^[3].因此,猜测CUR可能参与CM的发生发展.环磷酸腺苷(cAMP)参与调节各种细胞生物活性和平衡反应,cAMP/蛋白激酶A(PKA)/cAMP反应元件结合蛋白(CREB)信号通路在调节中枢神经系统以及神经元细胞中具有重要作用.已有研究发现,PKA/pCREB信号通路在CM小鼠模型

收稿日期: 2024-01-23

基金项目: 黑龙江省卫生健康委科研课题(20210303070284);牡丹江医学院附属红旗医院“红旗科研基金”科技项目(2021HQ-12);牡丹江医学院研究生导师科研专项计划课题(YJSZX2022070)

作者简介: 安宁(1983-),女,河北清苑人,副教授,研究方向:BPPV、偏头痛及前庭性偏头痛发病机制.

通讯作者: 李晶超(1978-),女,黑龙江宾县人,副教授,研究方向:神经系统疾病. E-mail: lijingchao1978@126.com

中发挥重要作用^[4].此外,CUR还能通过激活cAMP-PKA-CREB信号通路减轻二氯乙酸诱导的神经毒性^[5].而CUR对CM大鼠的治疗作用机制是否与调控cAMP-PKA-CREB信号通路有关,仍然未知.本研究对此进行探讨.

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级SD大鼠72只,购自广东莱迪生物医药研究院有限公司,生产许可证号:SCXK(粤)2022-0064,适应性喂养1周,饲养环境温度(22±2)℃,12 h光暗循环,不禁水食.本研究经牡丹江医科大学附属红旗医院伦理委员会批准(伦理编号:20230182).

1.2 试剂与仪器

CUR(C1386,纯度:HPLC≥98%)购买于美国Sigma公司;硝酸甘油(NTG)注射液(2205122)购买于河南润弘制药股份有限公司;PKA抑制剂H-89(HY-15979)购买于美国Med Chem Express公司;TNF- α (BY-ER331063)、IL-1 β (BY-ER330206)、cAMP酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(BY-JZF0169)购买于南京博研生物科技有限公司;胎牛血清(FBS)(A5670701)、胰蛋白酶(27250018)、B27(17504044)、DMEM培养基(11965118)、Neurobasal培养基(21103049)购买于赛默飞世尔科技(中国)有限公司;AnnexinV-FITC/PI检测试剂盒(S0185)、细胞计数(CCK-8)检测试剂盒(C00378)购买于上海雅吉生物科技有限公司;抗体神经核抗原(NeuN)(ZM-0352)、PKA(TA501104)购买于北京中杉金桥生物技术有限公司;p-PKA(4781)、CREB(9197)、p-CREB(9198)和GAPDH(2118)购买于美国CST公司;山羊抗兔二抗IgG(GAR007)购买于杭州联科生物技术股份有限公司.

FACSAriaTM Fusion型流式细胞仪购买于美国BD公司;PL-200型足底热痛仪购买于成都泰盟科技有限公司;PowerPac Universal型蛋白电泳仪购买于美国Bio-rad公司;Synergy HTX型酶标仪购买于上海天能生命科学有限公司.

1.3 偏头痛模型建立、分组与干预

随机将SD大鼠分为6组:对照组、模型组、CUR低、中、高剂量组、H-89组,每组12只.除对照组外,其余5组大鼠构建CM模型^[6],将NTG以10 mg/kg剂量腹腔注射,隔一天注射一次(第1、3、5、7、9天),共注射5次.对照组同时注射相同剂量的生理盐水.造模大鼠出现双耳发红、挠头、爬笼、躁动不安、倦怠等症状,且持续30 min表明造模成功,造模成功率为100%.

在各组大鼠第1天造模成功后1 h进行药物干预,其中CUR低、中、高剂量组分别腹腔注射CUR 20、40、60 mg/kg^[5],H-89组在CUR高剂量组60 mg/kg的基础上再注射5 mg/kg H-89^[7],对照组和模型组注射相同剂量的生理盐水,每天1次,连续11 d.

1.4 大鼠疼痛阈值检测

在造模第1、3、5、7、9天,用von Frey纤维丝刺激大鼠眶周和后爪足底表面.眶周机械痛阈:固定大鼠于安静环境,只允许头部和前爪运动,用von Frey纤维丝刺激大鼠眼眶周围区域,当大鼠缩头、发声或同侧前爪抓挠面部为阳性反应,记录此时疼痛阈值;足底机械痛阈:固定大鼠于安静环境,用von Frey纤维丝刺激大鼠后爪足底表面的中心部位,当大鼠撤足、舔足、抬爪时为阳性反应,记录此时疼痛阈值.每个测试重复3次,间隔至少1 min.

对大鼠进行热痛阈值检测,使用足底热痛阈测试仪对大鼠抬爪时间进行记录,即为热缩足潜伏期,每只大鼠测试重复3次,间隔至少1 min.

1.5 大鼠行为学测试

末次给药24 h后,将大鼠置于安静环境,记录大鼠30 min内挠头和爬笼次数,选取3个不同时间段,取平均值.

1.6 大鼠神经元细胞的分离、鉴定及培养

麻醉处死大鼠,取脑组织中三叉神经节,剪碎、清洗后加入胰蛋白酶消化,加入含有10% FBS的DMEM-

F12培养基培养.后将细胞接种在多聚赖氨酸包被的24孔板中6 h,用神经元培养液Neurobasal-A培养基(含2% B27和1% L-谷氨酰胺)培养7 d,用于后续实验.

将培养7 d的神经元细胞用4%多聚甲醛固定,PBS洗涤、Triton-X100室温通透、封闭去上清,加入一抗NeuN(1:200),在4℃过夜,洗涤后与荧光二抗在37℃下孵育1 h,并用DAPI进行核染,在显微镜下观察拍照,观察阳性细胞数计算神经元细胞的纯度.

1.7 细胞毒性测定

将细胞以 3×10^4 个/孔的密度接种于96孔板,然后用不同浓度的姜黄素(0、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)预处理24 h后,在0.55 mmol/L NTG中培养24 h.每组均3个重复,处理完成后,每孔加入10 μL 10% CCK-8溶液于室温下孵育2 h,然后使用酶标仪测量450 nm处的吸光度(A),计算细胞活力.

1.8 细胞分组实验

将细胞分为NC组、NTG组、CUR低剂量组、CUR中剂量组、CUR高剂量组、H-89组,其中NC组为细胞正常培养组;NTG组细胞在0.55 mmol/L NTG中培养24 h;CUR低、中、高剂量组细胞参照1.7中筛选出的最佳浓度5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 预处理24 h后,在0.55 mmol/L NTG中培养24 h;H-89组用10 $\mu\text{mol/L}$ H-89^[7]和20 $\mu\text{mol/L}$ CUR预处理24 h后,在0.55 mmol/L NTG中培养24 h.

细胞活力测定:在96孔板中接种各组细胞,每孔加入 1×10^4 个细胞,培养24 h,每组3个重复,向每孔加入10 μL CCK-8溶液(10%)放入37℃的培养箱中孵育2 h,酶标仪测定450 nm处的吸光度(A),计算细胞活力.

细胞凋亡率检测:各组细胞每孔 1×10^7 个细胞加入6孔板中,培育12 h,严格依照AnnexinV-FITC/PI细胞凋亡双染试剂盒说明书逐步进行操作,使用流式细胞仪检测细胞凋亡率.

1.9 ELISA检测三叉神经脊束尾侧核(TNC)组织和细胞cAMP、IL-1 β 、TNF- α 含量

麻醉处死大鼠,立即在冰上分离脑组织中TNC,每组取6只大鼠TNC组织用于ELISA检测,剩余6只大鼠TNC组织-80℃保存,用于Western Blot检测.取大鼠TNC组织和细胞,按照试剂盒说明书,检测cAMP、IL-1 β 、TNF- α 含量.

1.10 Western Blot检测TNC组织和细胞中蛋白水平

收集破碎后的各组大鼠TNC组织和细胞提取总蛋白,采用BCA试剂盒测定蛋白质浓度,根据步骤将蛋白行SDS-PAGE电泳,转移至PVDF膜,10%脱脂奶粉封闭2 h,加入一抗PKA、p-PKA、CREB、p-CREB(1:1 000)和 β -actin在4℃下过夜孵育,清洗,加入二抗山羊抗兔IgG(1:1 000),在4℃下孵育2 h.加入ECL试剂发光显影,观察拍照,用Image J软件对各条带灰度值进行处理分析.

1.11 统计学分析

所有实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,本研究采用SPSS 22.0软件进行统计分析,用单因素方差分析进行多组间比较,采用SNK-q检验进一步两两比较,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

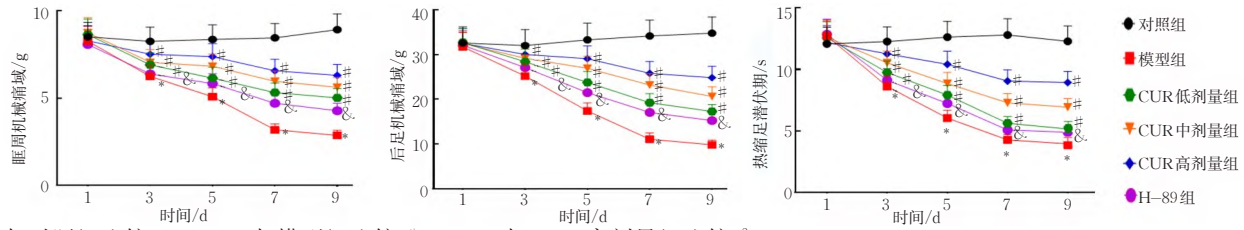
2 结 果

2.1 CUR对不同时间点大鼠疼痛阈值的影响

造模第1天各组大鼠眶周机械痛阈、足底机械痛阈、热缩足潜伏期,无显著差异($P > 0.05$);与对照组相比,模型组大鼠在第3、5、7、9天眶周机械痛阈、足底机械痛阈、热缩足潜伏期均显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,CUR低、中、高剂量组大鼠第3、5、7、9天眶周机械痛阈、足底机械痛阈、热缩足潜伏期均显著升高($P < 0.05$);与CUR高剂量组相比,H-89组在第3、5、7、9天眶周机械痛阈、足底机械痛阈、热缩足潜伏期均显著降低($P < 0.05$)(见图1).

2.2 CUR对大鼠行为学的影响

模型组与对照组相比,大鼠挠头和爬笼次数显著增多($P < 0.05$);CUR低、中、高剂量组与模型组相比,大鼠挠头和爬笼次数显著减少($P < 0.05$);与CUR高剂量组相比,H-89组大鼠挠头次数、爬笼次数显著升高($P < 0.05$)(见图2).



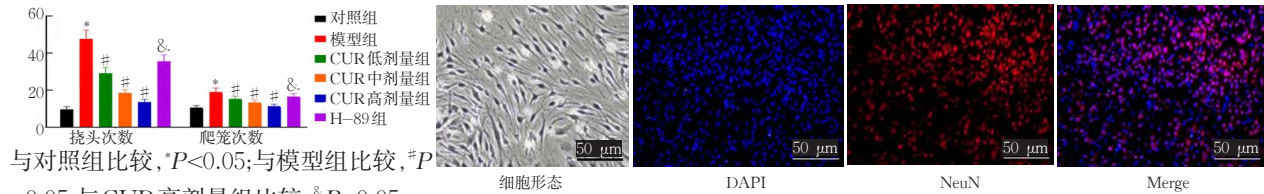
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 与CUR高剂量组比较, & $P < 0.05$

图1 各组大鼠眶周机械痛阈、足底机械痛阈、热缩足潜伏期比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

Fig.1 Comparison of periorbital mechanical pain threshold, plantar mechanical pain threshold, and thermal shrinkage foot latency of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

2.3 神经元细胞形态与纯度鉴定

培养7 d后神经元细胞成熟饱满,光晕清晰,突触增多.免疫荧光实验显示,NeuN在神经元中表达,呈红色荧光,计算神经元细胞的纯度为(93.61±1.08)% (见图3).



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 与CUR高剂量组比较, & $P < 0.05$

图3 神经元细胞形态及纯度鉴定($\times 200$)

Fig.3 Morphology and purity identification of neuron cells ($\times 200$)

图2 各组大鼠行为学指标比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

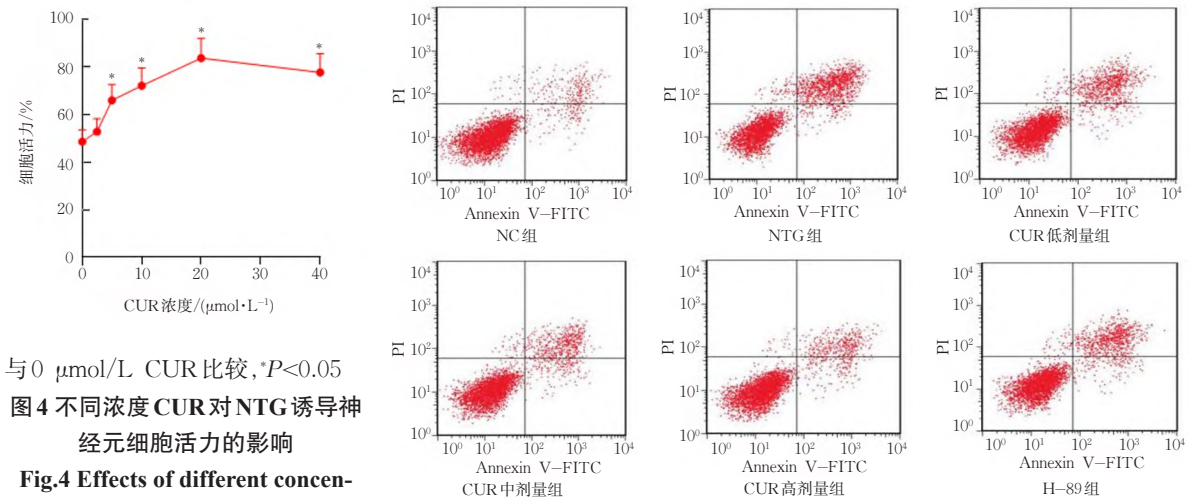
Fig.2 Comparison of behavioral indexes of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

2.4 不同浓度CUR对NTG诱导神经元细胞活力的影响

在NTG诱导神经元细胞中,与0 $\mu\text{mol/L}$ CUR比较,2.5 $\mu\text{mol/L}$ CUR能够提高细胞活力,但无显著差异;5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ CUR显著提高细胞活力($P < 0.05$),其中20 $\mu\text{mol/L}$ CUR细胞活力最高,选用5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度CUR做后续实验(见图4).

2.5 CUR对各组神经元细胞活力和凋亡情况的影响

NTG组相比于NC组,大鼠细胞活力明显降低,凋亡率明显上升($P < 0.05$);CUR低、中、高剂量组相比于NTG组,细胞活力明显上升,凋亡率明显降低($P < 0.05$);H-89组相比于CUR高剂量组,大鼠细胞活力明显降低,凋亡率明显上升($P < 0.05$)(见图5-6).



与0 $\mu\text{mol/L}$ CUR比较, * $P < 0.05$
图4 不同浓度CUR对NTG诱导神经元细胞活力的影响

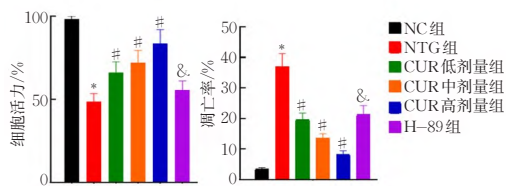
Fig.4 Effects of different concentrations of CUR on NTG induced neuron cell activity

图5 流式细胞术检测各组大鼠神经元细胞凋亡情况

Fig.5 Flow cytometry was used to detect the apoptosis of neurons in each group

2.6 CUR对各组大鼠和细胞IL-1 β 、TNF- α 含量的影响

与对照组、NC组相比,模型组和NTG组大鼠TNC组织和神经元细胞中IL-1 β 、TNF- α 含量明显增加($P<0.05$);CUR低、中、高剂量组与模型组和NTG组相比,大鼠TNC组织和神经元细胞中IL-1 β 、TNF- α 含量明显减少($P<0.05$);H-89组与CUR高剂量组相比,大鼠TNC组织和神经元细胞中IL-1 β 、TNF- α 含量明显增加($P<0.05$)(见图7)。

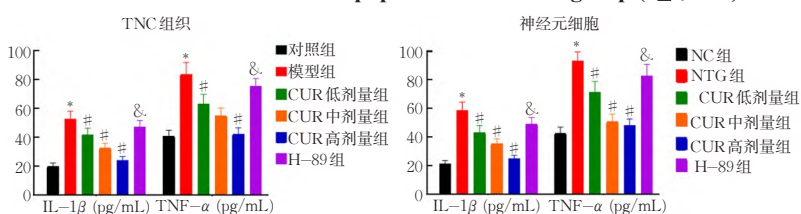


与NC组比较, * $P<0.05$;与NTG组比较, # $P<0.05$;与CUR高剂量组比较, & $P<0.05$

图6 各组神经元细胞活力和凋亡率比较($\bar{x}\pm s, n=6$)
Fig.6 Comparison of neuronal cell activity and apoptosis rate in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

2.7 CUR对各组大鼠和细胞cAMP含量及p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白的影响

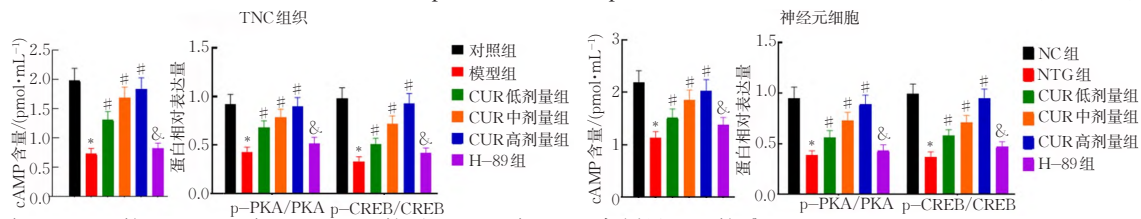
与对照组、NC组相比,模型组和NTG组大鼠TNC组织和神经元细胞中cAMP含量及p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$);CUR低、中、高剂量组与模型组和NTG组相比,大鼠TNC组织和神经元细胞中cAMP含量及p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白相对表达量明显增加($P<0.05$);与CUR高剂量组相比,H-89组大鼠TNC组织和神经元细胞中cAMP含量及p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白表达显著下降($P<0.05$)(图8)。



与NC组比较, * $P<0.05$;与NTG组比较, # $P<0.05$;与CUR高剂量组比较, & $P<0.05$

图7 各组大鼠TNC组织和神经元细胞中IL-1 β 、TNF- α 水平比较($\bar{x}\pm s, n=12$)
Fig.7 Comparison of IL-1 β and TNF- α levels in TNC tissues and neurons of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=12$)

TNC组织和神经元细胞中cAMP含量及p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白表达显著下降($P<0.05$)(图8)。



与NC组比较, * $P<0.05$;与NTG组比较, # $P<0.05$;与CUR高剂量组比较, & $P<0.05$

图8 各组大鼠TNC组织和神经元细胞中cAMP含量及p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白比较($\bar{x}\pm s, n=6$)
Fig.8 Comparison of cAMP content and p-PKA/PKA and p-CREB/CREB proteins in TNC tissues and neuron cells of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

3 讨 论

偏头痛是最易致残的疾病之一,由皮质扩散抑制(CSD)和三叉神经血管功能障碍的共同作用引起的原发性头痛.CSD发生后,来自脑膜、血管和三叉神经支配的伤害性刺激通过三叉神经节传递到三叉神经颈复合体,然后上升到脑干、丘脑、下丘脑和基底神经节,最后投射到多个皮层区域,引起头痛及相关症状.重复腹腔注射NTG是目前建立CM大鼠模型的常用方法,通过在动物体内分解为一氧化氮,刺激三叉神经血管激活,引起触觉异常性疼痛,痛觉过敏以及畏光和脑膜血流改变等症状,与CM患者的临床特征相似.已有研究表明,重复注射NTG可导致基础机械痛阈值逐渐降低,引发眶周区域和后爪的超敏机械性痛觉过敏以及热超敏反应,且伴随耳红、挠头、爬笼、躁动不安等症状^[8].本研究通过重复腹腔注射NTG建立CM大鼠模型,发现大鼠眶周机械痛阈、足底机械痛阈、热缩足潜伏期均显著降低,挠头次数、爬笼次数显著升高,表明大鼠痛觉敏感度提高,出现偏头痛症状。

TNC是三叉神经血管系统的重要中心区域,可调节颅面疼痛.NTG会促进TNC中神经胶质细胞的活化,导致促炎细胞因子的产生.此外,NTG条件下炎症反应的发生会导致神经元细胞损伤,引发细胞凋亡^[9].本研究发现,模型组大鼠TNC组织和神经元细胞中TNF- α 、IL-1 β 水平显著升高,神经元细胞活力下降,

凋亡率升高,表明NTG可能导致胶质细胞活化,引发神经炎症和神经元细胞凋亡,导致偏头痛.CUR具有神经保护和抗神经炎症作用,使其在偏头痛中发挥重要作用.已有研究发现,脂质体CUR通过发挥抗炎、抗氧化作用对偏头痛大鼠起到保护作用^[10].本研究中,CUR治疗后,大鼠眶周机械痛阈、足底机械痛阈、热缩足潜伏期明显升高,挠头次数、爬笼次数降低,且炎症因子TNF- α 、IL-1 β 水平下降,神经元细胞活力升高,凋亡率降低,表明CUR可能通过减少神经炎症的发生,减少神经元细胞凋亡,降低痛觉敏感度,对CM大鼠起到治疗作用.

cAMP是参与细胞生物学功能的重要物质,可通过调节基因表达、细胞分化、增殖、凋亡介导多种激素、神经递质和生长因子的作用,是信息传递的“第二信使”.cAMP受到外界刺激后,磷酸化激活PKA,进一步激活CREB,而CREB磷酸化形式可调节与神经元细胞生长和存活密切相关的细胞因子,如BDNF、NGF转录水平.此外,CREB作为一种转录增强因子,在促使轴突和树突的细胞增殖、代谢、存活和重塑中也发挥重要作用.研究发现,cAMP/PKA/CREB信号通路是神经系统的重要调控机制之一,调节神经元存活和轴突生长,抑制cAMP/PKA通路会导致能量缺乏和神经元凋亡^[11].Jin等^[12]发现通过激活cAMP/PKA/CREB信号轴,可减弱脓毒症大鼠神经炎症并预防认知障碍.本研究中,NTG调控的大鼠神经元细胞和TNC组织中cAMP含量以及p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白表达水平明显下调,表明NTG刺激抑制cAMP/PKA/CREB信号通路,抑制其神经保护作用.CUR已被证明对偏头痛的治疗发挥作用,本研究中CUR治疗后模型大鼠及NTG组神经元细胞中cAMP含量及p-PKA/PKA、p-CREB/CREB蛋白表达显著升高,表明CUR可能通过激活cAMP/PKA/CREB信号通路发挥神经保护作用,减少CM的发生.为进一步验证CUR对cAMP/PKA/CREB信号通路的干预作用,本研究在CUR高剂量组的基础上加上PKA抑制剂H-89,H-89逆转CUR对CM大鼠的治疗作用.

综上所述,CUR可能通过激活cAMP/PKA/CREB信号通路降低炎症反应,减少神经元细胞凋亡,提高CM大鼠疼痛阈值,对CM大鼠起到治疗作用.

参 考 文 献

- 1 Ashina M, Terwindt G M, Al-Karagholi M A, et al. Migraine: Disease characterisation, biomarkers, and precision medicine[J]. *Lancet*, 2021, 397(10 283): 1 496–1 504.
- 2 Kung D, Rodriguez G, Evans R. Chronic migraine: diagnosis and management[J]. *Neurol Clin*, 2023, 41(1): 141–159.
- 3 Rezaie S, Askari G, Khorvash F, et al. Effects of curcumin supplementation on Clinical features and inflammation, in migraine patients: A double-blind controlled, placebo randomized clinical trial[J]. *Int J Prev Med*, 2021, 12: 161–167.
- 4 Wang Y, Pan Q, Tian R, et al. Repeated oxytocin prevents central sensitization by regulating synaptic plasticity via oxytocin receptor in a chronic migraine mouse model[J]. *J Headache Pain*, 2021, 22(1): 84–99.
- 5 Wei W, Dong Q, Jiang W, et al. Dichloroacetic acid-induced dysfunction in rat hippocampus and the protective effect of curcumin[J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36(4): 545–556.
- 6 Jing F, Zou Q, Wang Y, et al. Activation of microglial GLP-1R in the trigeminal nucleus caudalis suppresses central sensitization of chronic migraine after recurrent nitroglycerin stimulation[J]. *J Headache Pain*, 2021, 22(1): 86–103.
- 7 Machado G D B, de Freitas B S, Florian L Z, et al. G protein-coupled oestrogen receptor stimulation ameliorates iron- and ovariectomy-induced memory impairments through the cAMP/PKA/CREB signalling pathway[J]. *J Neuroendocrinol*, 2019, 31(10): e12780.
- 8 Harriott A M, Chung D Y, Uner A, et al. Optogenetic spreading depression elicits trigeminal pain and anxiety behavior[J]. *Ann Neurol*, 2021, 89(1): 99–110.
- 9 Filippone A, Scuderi S A, Basilotta R, et al. BAY-117082-driven NLRP3 inflammasome inhibition resolves nitro-glycerine (NTG) neuronal damage in in vivo model of migraine[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 156: 113851.
- 10 Bulboacă A E, Bolboacă S D, Bulboacă A C, et al. Liposomal curcumin enhances the effect of naproxen in a rat model of migraine[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 5 087–5 097.
- 11 Bao Z, Bao L, Han N, et al. rTMS alleviates AD-induced cognitive impairment by inhibiting apoptosis in SAMP8

mouse[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(24): 26 034–2 6045.

- 12 Jin P, Deng S, Tian M, et al. INT-777 prevents cognitive impairment by activating Takeda G protein-coupled receptor 5 (TGR5) and attenuating neuroinflammation via cAMP/ PKA/ CREB signaling axis in a rat model of sepsis[J]. Exp Neurol, 2021, 335: 113504.

The Therapeutic Effect of Curcumin on Chronic Migraine Rats by Regulating cAMP/PKA/CREB Signaling Pathway

An Ning^{1,2,3,4}, Lin Jing^{1,2,3,4}, Li Xiaoping^{1,2,3,4}, Niu Yingying⁵, Yang Yindong^{1,2,3,4},
Li Qiuyan^{1,2,3,4}, Wang Zeliang^{1,2,3,4}, Wang Yating^{1,2,3,4}, Li Jingchao^{1,2,3,4}

- (1. Department of Neurological Internal Medicine, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157000, China; 2. First Clinical Medical College, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157000, China; 3. National Advanced Stroke Center, Mudanjiang 157000, China; 4. Key Laboratory of Ischemic Stroke Prevention and Control in Heilongjiang Provincial, Mudanjiang 157000, China; 5. School of Public Health, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157000, China)

Abstract: In order to explore the therapeutic effect of curcumin (CUR) on chronic migraine (CM) rats and its mechanism. In animal experiments, SD rats were randomly grouped into 6 groups: control group, model group, CUR low dose group, CUR medium dose group, CUR high dose group, and H-89 group. CM rat models were constructed by intraperitoneal injection of nitroglycerin (NTG), and pain threshold and behavioral tests were performed on the 1st, 3rd, 5th, 7th, and 9th days of modeling. Rat neuronal cells were isolated, the optimal concentration of CUR was screened, and the cells were divided into NC group, NTG group, CUR low dose group, CUR medium dose group, CUR high dose group, and H-89 group, CCK-8 method was applied to detect cell viability, flow cytometry was applied to detect cell apoptosis; ELISA was applied to detect the contents of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the tissue and neuron cells of the caudal nucleus of the trigeminal neural crest tract (TNC), Western Blot was applied to detect protein kinase A (PKA), p-PKA, cAMP responsive element binding protein (CREB), and p-CREB protein expression in TNC tissue and neuronal cells. The results showed that compared with the control group, the periorbital mechanical pain threshold, plantar mechanical pain threshold, thermal contraction latency, cAMP content, p-PKA/PKA, and p-CREB/CREB protein expression in rats in the model group obviously reduced, the IL-1 β , TNF- α , head bending frequency, and cage climbing frequency obviously increased ($P < 0.05$); compared with the model group, the periorbital mechanical pain threshold, plantar mechanical pain threshold, thermal contraction latency, cAMP content, p-PKA/PKA, and p-CREB/CREB protein expression in rats in the CUR low, medium, and high dose groups obviously increased, the IL-1 β , TNF- α , head bending frequency, and cage climbing frequency obviously reduced ($P < 0.05$); in NTG induced neuronal cells, compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ CUR, 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$ CUR obviously increased cell viability ($P < 0.05$), 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$ CUR concentrations were selected for subsequent experiments; compared with the NC group, the cell viability, cAMP content, p-PKA/PKA, and p-CREB/CREB protein expression levels in the NTG group obviously decreased, IL-1 β , TNF- α , and apoptosis rate obviously increased ($P < 0.05$); compared with the NTG group, IL-1 β , TNF- α , and apoptosis rate in the CUR low, medium, and high dose groups obviously decreased ($P < 0.05$), the cell viability, cAMP content, p-PKA/PKA, and p-CREB/CREB protein expression levels obviously increased. PKA inhibitor H-89 was able to reverse the therapeutic effect of CUR on CM rats ($P < 0.05$). The results demonstrated CUR can alleviate symptoms, reduce inflammatory response, and reduce neuronal apoptosis in CM rats, and its mechanism of action may be related to the activation of the cAMP/PKA/CREB signaling pathway.

Keywords: chronic migraine; curcumin; neuron cells; CAMP/PKA/CREB signaling pathway

[责任编辑: 孙丹]