

下丘脑室旁核缩宫素神经元至三叉神经脊束尾核 γ -氨基丁酸能神经元通路可调控慢性偏头痛痛觉敏化

陈厚达¹, 邹宛芸¹, 徐许峰², 边 疆^{2,3}

1. 重庆两江新区人民医院麻醉科, 重庆 401121

2. 青岛大学青岛医学院脑科学与疾病研究院, 山东 青岛 266075

3. 攀枝花市中心医院麻醉科, 四川 攀枝花 617067

[摘 要] **目的:**探究下丘脑室旁核(PVN)缩宫素(OXT)神经元至三叉神经脊束尾核(TNC) γ -氨基丁酸(GABA)能神经元的神经通路对慢性偏头痛小鼠痛觉敏化的调控作用及潜在机制。**方法:**通过第1、3、5、7、9天重复5次腹腔注射1 mg/mL硝酸甘油(NTG, 10 mg/kg)构建慢性偏头痛小鼠模型。实验分为四部分。第一部分:取24只雄性野生型C57BL/6J小鼠随机分为单次注射对照组、单次注射NTG组、重复注射对照组、重复注射NTG组,每组6只,免疫荧光染色检测PVN的OXT及Fos原癌基因(c-Fos)表达。第二部分:取6只雄性OXT-Cre转基因C57BL/6J小鼠,采用Cre重组酶依赖的顺行跨单突触神经示踪病毒和RNAscope联合免疫荧光染色检测PVN OXT神经元至TNC GABA能神经元的神经通路。第三部分:取30只OXT-Cre转基因C57BL/6J小鼠双侧PVN注射依赖于Cre重组酶表达的化学遗传学激活病毒,随机分为五组,每组6只。氯氮平N-氧化物(CNO)组和对照组分别腹腔注射0.1 mg/mL CNO溶液(1 mg/kg)和等体积等渗氯化钠溶液,3 h后取材,免疫荧光染色检测c-Fos蛋白以验证化学遗传学激活效率。模型对照组和CNO激活模型组建立慢性偏头痛模型,第10天双侧TNC分别注射等渗氯化钠溶液和CNO;阴性对照组双侧TNC注射等渗氯化钠溶液;30 min后采用Von-Frey纤毛机械刺激针和丙酮检测这三组小鼠眶周机械痛敏阈值和眶周冷痛反应时间。第四部分:取24只雄性OXT-Cre转基因C57BL/6J小鼠双侧PVN注射依赖于Cre重组酶表达的化学遗传学激活病毒,随机分为4组,每组6只,其中模型对照组、CNO激活模型组和阿托西班组构建慢性偏头痛模型。第10天,阴性对照组和模型对照组腹腔注



收稿日期(Received):2025-03-18 修改返回日期(Revised):2025-07-16 接受日期(Accepted):2025-08-30 网络预发表日期(Online):2025-09-05

基金项目(Funding):四川省卫生健康委员会科技项目(24QNMP019);攀枝花市省级定向财力转移支付科技项目(22ZYF-S-02)

第一作者(First author):陈厚达,主治医师,主要从事慢性疼痛中枢机制研究;E-mail: chd4593949500825@163.com; ORCID: 0009-0007-9468-0578

通信作者(Corresponding author):边 疆,主治医师,主要从事慢性疼痛中枢机制研究;E-mail: 1105593984@qq.com; ORCID: 0000-0001-9642-6054

射等渗氯化钠溶液,CNO激活模型组和阿托西班组腹腔注射CNO,15 min后阿托西班组双侧TNC注射阿托西班,其余三组均注射含1%二甲基亚砷的等渗氯化钠溶液。15 min后,四组小鼠检测眶周机械痛敏阈值和眶周冷痛反应时间,高效液相色谱分析双侧TNC中GABA含量。**结果:**慢性偏头痛模型小鼠眶周机械痛敏阈值减小,眶周冷痛反应时间增加,且PVN区c-Fos⁺神经元数及c-Fos⁺OXT神经元百分比增加(均 $P<0.05$)。逆行跨单突触神经示踪病毒策略结果显示,PVN OXT神经元与TNC GABA能神经元存在神经突触联系。免疫荧光染色结果显示,与对照组比较,CNO组PVN c-Fos⁺OXT神经元百分比增加($P<0.05$)。双侧TNC注射药物实验结果显示,与模型对照组比较,CNO激活模型组眶周机械痛敏阈值增加、眶周冷痛反应时间缩短(均 $P<0.05$)。腹腔注射药物实验结果显示,与CNO激活模型组比较,阿托西班组的眶周机械痛敏阈值减小、眶周冷痛反应时间延长(均 $P<0.05$)。高效液相色谱分析结果显示,与阴性对照组、模型对照组及阿托西班组比较,CNO激活模型组TNC的GABA含量增加(均 $P<0.05$)。**结论:**PVN OXT神经元通过其末梢释放的OXT对TNC的突触后GABA能神经元产生下行兴奋作用,从而改善慢性偏头痛的痛觉敏化。

[关键词] 慢性偏头痛;缩宫素神经元;下丘脑室旁核; γ -氨基丁酸能神经元;三叉神经脊束尾核;小鼠

[中图分类号] R747.2 [文献标志码] A

A neural circuit from paraventricular hypothalamic nucleus oxytocin neurons to trigeminal nucleus caudalis GABAergic neurons modulates pain sensitization in a mouse model of chronic migraine

CHEN Houda¹, ZOU Wanyun¹, XU Xufeng², BIAN Jiang^{2,3} (1. Department of Anesthesiology, People's Hospital of Chongqing Liangjiang New Area, Chongqing 401121, China; 2. Institute of Brain Science and Disease Research, Qingdao Medical College of Qingdao University, Qingdao 266075, Shandong Province, China; 3. Department of Anesthesiology, Panzhihua Central Hospital, Panzhihua 617067, Sichuan Province, China)

Corresponding author: BIAN Jiang, E-mail: 1105593984@qq.com, ORCID: 0000-0001-9642-6054

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of a neural pathway from oxytocin (OXT) neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) to γ -aminobutyric acid (GABA) neurons (GABAergic neurons) in the trigeminal nucleus caudalis (TNC) in regulating pain sensitization in a mouse model of chronic migraine and to explore the underlying mechanisms. **Methods:** A chronic migraine mouse model was established by intraperitoneal injection of nitroglycerin (NTG, 1 mg/mL, 10 mg/kg) on days 1, 3, 5, 7, and 9. The study consisted of four parts: Part I: 24 male wild-type C57BL/6J mice were divided into four groups ($n=6$ in each), receiving single or repeated injection of NTG or saline, respectively. Immunofluorescence was used to detect c-Fos and OXT expression in the PVN. Part II: 6 male OXT-Cre transgenic C57BL/6J mice were used for anterograde monosynaptic tracing combined with RNAscope and immunofluorescence to identify neural projections

from PVN OXT neurons to TNC GABAergic neurons. Part III: 30 male OXT-Cre transgenic C57BL/6J mice were bilaterally injected Cre-dependent chemogenetic activation virus into the PVN. These mice were randomly divided into five groups, with six mice in each group. Mice in the clozapine *N*-oxide (CNO) group and the control group were intraperitoneally injected with 0.1 mg/mL of CNO solution (1 mg/kg) and the same volume of isotonic normal saline, respectively. 3 hours after the injection, the brain tissues were harvest and c-Fos immunofluorescence staining was performed to verify the efficiency of chemogenetic activation virus. Mice in the model control group and the CNO activated model group were subjected to chronic migraine modeling, with bilateral TNC injection of isotonic normal saline and CNO, respectively, on day 10. The mice in the negative control group were bilaterally intra-TNC injected with isotonic normal saline. After 30 minutes, the Von-Frey filament and acetone tests were used to assess the mechanical pain threshold and cold pain response time in the periorbital region of the mice in these three groups. Part IV : 24 male OXT-Cre transgenic C57BL/6J mice were bilaterally injected with the Cre-dependent chemogenetic activation virus into the PVN. These mice were randomly divided into four groups, with six mice in each group. Mice in the model control group, the CNO activated model group and the atosiban group were subjected to chronic migraine modeling. On day 10, mice in the negative control group and the model control group were intraperitoneally injected with isotonic normal saline, while mice in the CNO activated model group and the atosiban group were intraperitoneally injected with CNO. After 15 minutes, mice in the atosiban group were bilaterally intra-TNC injected with atosiban, while mice in other three groups were bilaterally intra-TNC injected with isotonic normal saline containing 1% dimethyl sulfoxide. After 15 minutes, the Von-Frey filament and acetone tests were used to assess the mechanical pain threshold and cold pain response time in the periorbital region of the mice. The GABA content in the bilateral TNC was detected by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Results:** Mice with chronic migraine models exhibited reduced periorbital mechanical pain thresholds and increased periorbital cold pain reaction time, accompanied by an increase in both the number of c-Fos⁺ neurons and the percentage of c-Fos⁺ OXT neurons in the PVN (all $P<0.05$). The anterograde tracing virus and RNAscope combined with immunofluorescence staining showed that PVN OXT neurons projected to TNC GABAergic neurons. Immunofluorescence staining demonstrated that compared with the control group, the percentage of c-Fos⁺ OXT neurons in the PVN of CNO group increased ($P<0.05$). In bilateral intra-TNC drug administration experiments, compared with the model control group, the periorbital mechanical pain threshold increased, and the periorbital cold pain reaction time decreased in the CNO activated model group (both $P<0.05$). In intraperitoneal drug administration experiments, compared with the CNO activate model group, the periorbital mechanical pain threshold decreased, and the periorbital cold pain reaction time increased in the atosiban group (both $P<0.05$). HPLC analysis showed that, compared with the negative control group, the model control group and the atosiban group, GABA level of TNC in the CNO activated model group increased (all $P<0.05$). **Conclusion:** PVN OXT neurons exert a descending facilitatory effect on GABAergic neurons in the TNC via OXT release, thereby ameliorating pain sensitization in chronic migraine.

[**Key words**] Chronic migraine; Oxytocin neuron; Paraventricular hypothalamic nucleus; GABAergic neuron; Trigeminal nucleus caudalis; Mice

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2025, 54(5): 641-652.]

[**缩略语**] 下丘脑室旁核(paraventricular hypothalamic nucleus, PVN); 三叉神经脊束尾核(trigeminal nucleus caudalis, TNC); 缩宫素(oxytocin, OXT); OXT受体(OXT receptor, OXTR); γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA); 环化重组酶(cyclization recombination enzyme, Cre); Fos原癌基因(Fos proto-oncogene, c-Fos); 免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG); 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6 diamidino-2-phenylindole, DAPI); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS); 硝酸甘油(nitroglycerin, NTG); 氯氮平*N*-氧化物(clozapine *N*-oxide, CNO); 溶质载体(solute carrier, SLC); 酪胺信号放大(tyramide signal amplification, TSA); 信使RNA(messenger RNA, mRNA); 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)

根据国际头痛分类第3版标准,当偏头痛发作每月超过15 d且持续3个月以上可诊断为慢性偏头痛^[1]。慢性偏头痛的发病率为1%~2%,且每年超3%的偏头痛患者由发作性转变为慢性^[2]。与发作性偏头痛患者比较,慢性偏头痛患者会发生疼痛的中枢敏化,这是其临床治疗缺乏针对性及有效性的关键原因^[3]。

PVN是整合神经内分泌功能的高级中枢,以其为核心的神经递质互作网络对维持机体的内环境稳态至关重要^[4]。功能解剖学研究表明,PVN神经元向TNC I/II层的神经输入影响血管源性头痛在脊髓水平的处理过程^[5]。PVN中分布有中枢神经系统最为密集的OXT神经元,这类神经元通过释放OXT发挥强大的中枢镇痛作用^[6]。研究表明,偏头痛发作时PVN OXT神经元活动显著增强以促进内源性OXT释放,而拮抗OXTR会加剧痛觉敏化程度,说明PVN OXT神经元的反应性激活是机体对抗偏头痛发作的重要防御机制^[7]。在脊髓水平,TNC I/II层的GABA能神经元作为核心抑制性调控枢纽,通过GABA_A/GABA_B受体介导的突触前/后抑制机制,有效限制三叉神经血管系统中外周伤害性信号向中枢的传递^[8-9]。尽管缺乏确切的行为学实验验证,但电生理研究发现电刺激PVN能显著提高TNC I/II层GABA能神经元的兴奋性,而此效应可被OXTR抑制剂有效逆转,说明PVN OXT神经元与TNC I/II层GABA能神经元功能联系紧密^[10]。结合现有证据,推测PVN OXT神经元可能通过增强TNC I/II层GABA能神经元的兴奋性以维持局部的兴奋-

抑制稳态平衡,从而阻止偏头痛中枢敏化及慢性化。基于此,本研究拟通过动物模型观察PVN OXT神经元在慢性偏头痛时的活动变化,采用神经示踪策略解析PVN OXT神经元和TNC GABA能神经元的神经环路机制,进一步通过化学遗传学操控、药理学手段揭示PVN OXT神经元至TNC GABA能神经元通路在慢性偏头痛痛觉敏化中的调控作用及潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

36只雄性成年野生型C57BL/6J小鼠(8~10周龄,20~25 g)购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006];60只雄性成年OXT-Cre转基因C57BL/6J小鼠(8~10周龄,20~25 g)由青岛大学脑科学与疾病研究院张遐教授实验室提供。实验动物饲养于青岛大学脑科学与疾病研究院动物行为学研究平台,按2~4只分笼饲养于标准条件:室温22~26℃、湿度40%~60%、自由进食水、12 h明暗循环交替。

1.2 试剂及仪器

抗c-Fos抗体[2H2](ab208942)、重组抗Oxytocin-neurophysin 1抗体[EPR20973](ab212193)、重组抗mCherry抗体[EPR20579](ab213511)、驴抗小鼠IgG H&L抗体(Alexa Fluor® 488)(ab150105)、驴抗兔IgG H&L抗体(Alexa Fluor® 568)(ab175470)为英国Abcam公司产品;含DAPI的抗荧光淬灭剂(P0131)为中国上海碧云天生物科技公司产品;PBS(P1020)、人工脑脊液(H7700)为中国北

京索莱宝生物科技有限公司产品;4%多聚甲醛溶液(G1101)为中国武汉赛维尔生物科技有限公司产品;丙酮由青岛大学化学化工学院可持续能源和资源研究院提供;等渗氯化钠溶液(国药准字H37020766)为中国淄博齐都制药有限公司产品;戊巴比妥钠(P3761)为美国Sigma-Aldrich公司产品;NTG注射液(国药准字H44020569)为中国广州白云山明兴制药有限公司产品;CNO,依赖于Cre重组酶表达的化学遗传学激活病毒rAAV-EF1 α -DIO-hM3D(Gq)-mCherry(BC-0146),依赖于Cre重组酶表达的顺行跨单突触病毒组合rAAV-UL26.5-DIO-cmgD(BC-1356)、rAAV-hSyn-DIO-EGFP-T2A-Her2CT9(BC-1245)、H129-dgD-ubc-mCherry-p2A-scher2::gd(BC-HSV-Hs06)为中国深圳布林凯斯生物技术有限公司产品;二甲基亚砜(HY-Y0320C)和阿托西班(HY-17572)为美国MedChemExpress公司产品;RNAscope®多重荧光试剂盒(323100)、RNAscope™ Probe-Mm-Slc17a6-C3(319171-C3)和RNAscope™ Probe-Mm-Slc32a1-C2(319191-C2)为美国Advanced Cell Diagnostics公司产品;TSA 520 荧光染料(abs50076)为中国上海爱必信生物科技有限公司产品。

共聚焦荧光显微镜(FV3000)为日本Olympus公司产品;KOPF®单臂数显脑立体定位仪为中国千奥星科南京生物科技有限公司产品;小鼠微量给药套管(外径0.41 mm,内径0.25 mm)为中国深圳瑞沃德生物科技有限公司产品;Von-Frey 纤毛机械刺激针(NC12775)为中国上海玉研科学仪器有限公司产品;振动式切片机(VT 1200S)和冰冻切片机(CM1860 UV)为德国Leica公司产品;高效液相色谱仪(DECADE Elite)为荷兰Antec Leyden公司产品;Diamondsil C18(5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm)色谱柱(99903)为中国迪马科技公司产品;显微注射泵(Legato 130)为美国KD Scientific公司产品。

1.3 造模方法

12只野生型C57BL/6J小鼠随机分为对照组和模型组,每组6只。参考文献[11],模型组于第1、3、5、7、9天重复5次腹腔注射1 mg/mL NTG溶液(10 mg/kg)构建慢性偏头痛模型,对照组同时注射相同体积的等渗氯化钠溶液。以小鼠发生持续性眶周痛觉敏化为造模成功的判定标准。实验流程见附图1A。

1.4 实验设计及处理

第一部分:24只野生型C57BL/6J小鼠随机分为单次注射对照组、单次注射NTG组、重复注射对照组、重复注射NTG组,每组6只。重复注射对照组和重复注射NTG组于第1、3、5、7、9天重复5次分别腹腔注射等渗氯化钠溶液和1 mg/mL NTG溶液(10 mg/kg),末次注射3 h后,心脏灌注后取脑组织,固定脱水后行脑组织冰冻切片,根据脑图谱定位RVN并留取相应脑片。免疫荧光染色检测注射NTG后小鼠PVN区OXT及c-Fos表达。

第二部分:取6只OXT-Cre转基因C57BL/6J小鼠单侧PVN注射rAAV-UL26.5-DIO-cmgD与rAAV-hSyn-DIO-EGFP-T2A-Her2CT9按1:3混合的辅助病毒,恢复14 d后,同侧PVN注射rAAV-hSyn-DIO-EGFP-T2A-Her2CT9顺行跨单突触神经示踪病毒,恢复7 d后灌注取脑,观察TNC中病毒标记的PVN OXT神经元的下游神经元^[12]。结合RNAscope联合免疫荧光染色鉴定TNC中病毒标记神经元的类型。实验流程见附图1B。

第三部分:取30只OXT-Cre转基因C57BL/6J小鼠双侧PVN注射依赖于Cre重组酶表达的化学遗传学激活病毒,病毒表达28 d后随机分为五组,每组6只。CNO组腹腔注射0.1 mg/mL CNO溶液(1 mg/kg),对照组腹腔注射等体积等渗氯化钠溶液,3 h后取材(同第一部分取材),免疫荧光染色检测c-Fos蛋白以验证化学遗传学激活效率。另三组小鼠双侧TNC埋植微量给药套管。模型对照组和CNO激活模型组采用重复注射NTG法建立慢性偏头痛模型,阴性对照组则重复注射等体积等渗氯化钠溶液。第10天,CNO激活模型组通过微量给药套管向双侧TNC局部注射0.5 μ mol/L CNO溶液(300 nL/侧)^[13],模型对照组和阴性对照组则向双侧TNC局部注射等体积等渗氯化钠溶液,30 min后实施痛觉敏化行为学检测,观察激活PVN OXT神经元中TNC投射末梢对慢性偏头痛的影响。实验流程见附图1C。

第四部分:取24只OXT-Cre转基因C57BL/6J小鼠双侧PVN注射依赖于Cre重组酶表达的化学遗传学激活病毒,病毒表达28 d后随机分为四组,每组6只。各组小鼠双侧TNC埋植微量给药套管。模型对照组、CNO激活模型组及阿托西班组采用重复注射NTG法建立慢性偏头痛模

型,阴性对照组则重复注射等体积等渗氯化钠溶液。第10天,CNO激活模型组和阿托西班组腹腔注射CNO溶液(1 mg/kg),阴性对照组和模型对照组腹腔注射等体积等渗氯化钠溶液。15 min后,阿托西班组通过微量给药套管向双侧TNC局部注射1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 阿托西班(300 nL/侧)^[14],阴性对照组、模型对照组、CNO激活模型组则向双侧TNC注射等体积含1%二甲基亚砜的等渗氯化钠溶液,再15 min后实施痛觉敏化行为学检测,观察在激活的PVN OXT神经元中TNC局部注射OXR抑制剂对慢性偏头痛的影响。实验流程见附图1D。

1.5 脑立体定位病毒注射及埋植微量给药套管

小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后,固定于脑立体定位仪。参照小鼠脑图谱^[15]确定PVN和TNC的脑区坐标,PVN位于前囟后0.75 mm,正中线上旁开0.20 mm,颅骨平面下4.85 mm;TNC位于前囟后6.25 mm,正中线上旁开1.65 mm,颅骨平面下4.00 mm。在显微注射泵的控制下,通过玻璃微电极将病毒匀速(40 nL/min)注入PVN(80 nL/侧),注射完毕留针10 min。将定制的微量给药套管安装于套管夹持器,并按照脑图谱确定的坐标埋植于双侧TNC,随后用牙托粉将微量给药套管固定于颅骨表面。病毒注射及套管埋植结束后,将小鼠置于加温毯复苏,常规饲养28 d后开始实验。

1.6 痛觉敏化行为学检测

1.6.1 Von-Frey 纤毛机械刺激针检测眶周机械痛敏阈值 采用up-down方法^[16],将Von-Frey纤毛机械刺激针刺向眶周皮肤表面至稍弯曲,持续3 s。小鼠出现搔抓、震颤动作视为机械痛反应,将对应的强度值记为眶周机械痛敏阈值。间隔5 min重复测量三次,取平均值。为避免小鼠因恐惧出现假阳性结果,正式实验前需进行7 d适应性训练。

1.6.2 丙酮冷刺激检测眶周冷痛反应时间 小鼠预先眶周去毛,并置于9 cm×5 cm×5 cm的透明玻璃箱中适应30 min。将20 μL 丙酮滴至眶周,以搔抓、震颤动作视为冷痛反应,记录1 min内小鼠眶周冷痛反应时间,间隔5 min重复测试三次,取平均值。

1.7 免疫荧光染色检测PVN区c-Fos和OXT蛋白表达

小鼠经1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后,用

PBS行心脏灌注,肝脏变白时更换为4%多聚甲醛继续灌注。灌注完毕后分离脑组织,依次采用4%多聚甲醛固定、30%蔗糖脱水预处理,然后使用冰冻切片机制备含PVN区域的冠状脑片(厚度30 μm)。用PBS漂洗三遍,以去除脑片上的包埋剂,随后用0.5%曲拉通X-100溶液通透20 min、10%驴血清封闭1 h。将脑片置于含抗c-Fos抗体(1:500)、重组抗Oxytocin-neurophysin 1抗体(1:500)稀释液中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10~14 h。用PBS漂洗三次,脑片置于包含驴抗小鼠IgG H&L(1:1000)、驴抗兔IgG H&L(1:1000)的抗体稀释液室温避光孵育2 h。用PBS漂洗三次,将脑片贴于载玻片,用含DAPI的抗荧光淬灭剂封片。每只小鼠选取间隔为200 μm 的连续四张脑片在共聚焦显微镜下拍摄PVN区c-Fos和(或)OXT蛋白表达荧光图像。采用ImageJ软件计算PVN区c-Fos⁺神经元数和c-Fos⁺OXT神经元百分比(c-Fos⁺OXT神经元/OXT神经元×100%)。

1.8 RNAscope原位杂交联合免疫荧光检测TNC中荧光病毒标记神经元的Slc17a6 mRNA和Slc32a1 mRNA表达

OXT-Cre转基因C57BL/6J小鼠在顺行跨单突触病毒表达后,心脏灌注获取TNC所在的脑干组织,组织取材、预处理与上述免疫荧光染色取材方法相同。采用冰冻切片机切取TNC所在区域的冠状脑干切片(厚度20 μm),将脑干切片贴于载玻片。按照RNAscope[®]多重荧光试剂盒说明书操作:过氧化氢溶液孵育10 min去除内源性过氧化物酶,100 $^{\circ}\text{C}$ 1×靶标修复液中靶标修复5 min,与Slc17a6-C3(囊泡型谷氨酸转运体2基因,对应蛋白为TNC中谷氨酸能神经元的标志物)或Slc32a1-C2(囊泡型GABA转运体基因,对应蛋白为所有GABA能神经元的标志物)探针在40 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育2 h,与信号放大剂1、2、3在40 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30、30、15 min(探针信号放大),与HRP-C2或HRP-C3在40 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30 min,与TSA 520荧光染料在40 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30 min,并使用HRP阻断剂孵育15 min以终止反应。RNAscope染色结束后,免疫荧光染色标记组织中mCherry蛋白的表达。组织经10%驴血清封闭1 h后,与重组抗mCherry抗体(1:200)4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育10~14 h,用PBS漂洗三次,与驴抗兔IgG H&L(1:1000)室温孵育2 h。最后用含DAPI的抗荧光淬灭剂封片。每只小鼠取间隔为100 μm 的

连续四张脑干切片在共聚焦显微镜下拍摄TNC中 *Slc17a6* mRNA、*Slc32a1* mRNA 和 mCherry 蛋白的表达荧光图像。采用 ImageJ 软件分析 *Slc17a6* mRNA 和 *Slc32a1* mRNA 分别在 mCherry 标记的下游神经元表达情况(*Slc17a6*⁺mCherry⁺神经元/mCherry⁺神经元×100%、*Slc32a1*⁺mCherry⁺神经元/mCherry⁺神经元×100%)。

1.9 高效液相色谱分析TNC中GABA含量

为保证组织的活性,采用1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠后,用预冷、预充氧的人工脑脊液对其进行心脏灌注,并迅速取出脑干组织。组织立即转入振动式切片机进行冠状切片,设置切片厚度为200 μm,留取含有TNC区域的切片4片,分离出双侧TNC组织,放入含1 mL高氯酸溶液(0.4 mmol/L)的1.5 mL EP管。冰浴下超声匀浆促进组织溶解,转入低温高速离心机离心(1500×g,4℃)10 min取上清液用于衍生化反应。色谱柱为Diamonsil C18(5 μm,250 mm×4.6 mm)。配制流动相:流动相A为乙酸钠溶液/去离子水/四氢呋喃(体积比82:17:1),流动相B为100%乙腈,调节流动相A与流动相B的体积比至3:7。配制衍生剂:向1.5 mL EP管依次加入水(90 μL)、硼酸-硼砂缓冲液(80 μL)、乙腈(120 μL)、4 mmol/L 苄甲基氯甲酸酯溶液(80 μL)。将40 μL标准品或样品与衍生剂涡旋混合,进行高效液相色谱分析,使用LC Solution软件分析数据。

1.10 统计学方法

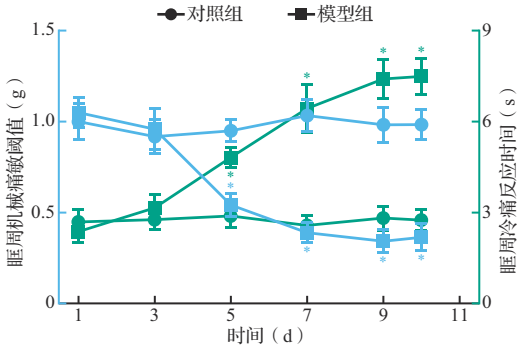
采用SPSS 19.0软件完成数据分析。正态分布的计量资料以均数±标准误($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)表示,采用独立样本t检验进行两组间数据比较,采用单因素方差分析及Bonferroni事后检验进行多组间数据比较。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢性偏头痛建模成功及小鼠注射NTG后PVN区神经元激活情况

与对照组比较,模型组第5、7、9、10天的眶周机械痛敏阈值减小、眶周冷痛反应时间增加(均 $P<0.05$),见图1,提示重复注射NTG可诱导小鼠发生持续性眶周痛觉敏化,即成功构建慢性偏头痛小鼠模型。与单次注射对照组和重复注射对照组比较,单次注射NTG组和重复注射NTG组小鼠PVN区c-Fos⁺神经元数及c-Fos⁺OXT神经元百

分比均增加(均 $P<0.05$);与单次注射NTG组比较,重复注射NTG组小鼠PVN的c-Fos⁺神经元数及c-Fos⁺OXT神经元百分比减少(均 $P<0.05$)。见图2及表1。结果提示,PVN OXT神经元活动随着偏头痛慢性化而减弱。



与对照组比较,* $P<0.05$ 。

图1 两组小鼠眶周痛觉敏化行为学比较($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$, $n=12$)

Figure 1 Comparison of periorbital hyperalgesia like behaviors of mice in two groups ($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$, $n=12$)

2.2 PVN OXT神经元单突触控制的TNC I/II层下游神经元类型

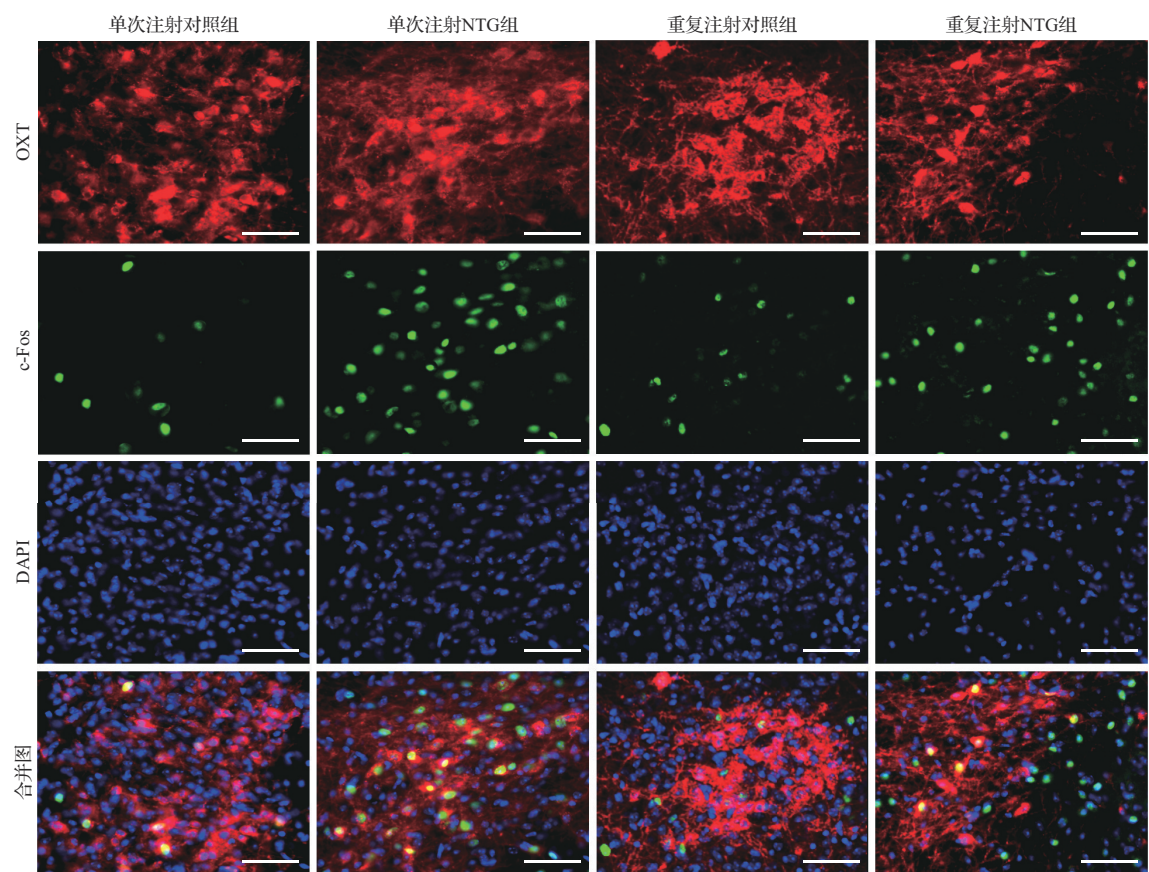
顺行跨单突触神经示踪病毒策略结果显示,TNC I/II层中分布有PVN OXT神经元单突触控制的下游神经元(mCherry标记神经元),见图3A。RNAscope联合免疫荧光染色结果显示,与*Slc17a6*⁺下游神经元百分比[(15.0±2.6)%]比较,*Slc32a1*⁺下游神经元百分比增加[(78.0±2.7)%, $P<0.05$],见图3B。结果提示,PVN OXT神经元单突触控制的TNC下游神经元以GABA能神经元为主。

2.3 化学遗传学策略对PVN OXT神经元的激活效率

免疫荧光染色结果显示,与对照组[(12.7±2.1)%]比较,CNO组PVN区c-Fos⁺OXT神经元百分比增加[(84.8±3.0)%, $P<0.05$],见图4,提示化学遗传学策略成功激活PVN的OXT神经元。

2.4 激活PVN OXT神经元中TNC投射末梢对慢性偏头痛小鼠痛觉敏化的影响

与阴性对照组[眶周机械痛敏阈值为(1.00±0.11)g、眶周冷痛反应时间为(2.72±0.40)s]比较,模型对照组和CNO激活模型组的眶周机械痛敏阈值分别减小至(0.28±0.05)g和(0.60±0.05)g(均 $P<0.05$),眶周冷痛反应时间分别延长至(7.50±0.35)s和(5.35±0.31)s(均 $P<0.05$);CNO激活模型



单次注射对照组和重复注射对照组 PVN OXT 神经元极少表达 c-Fos; 单次注射 NTG 组和重复注射 NTG 组 PVN OXT 神经元 c-Fos 表达明显增加; 重复注射 NTG 组 PVN OXT 神经元 c-Fos 表达明显少于单次注射 NTG 组。标尺=50 μm 。NTG: 硝酸甘油; PVN: 下丘脑室旁核; OXT: 缩宫素; c-Fos: Fos 原癌基因; DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶。

图2 四组小鼠 PVN 区 OXT 及 c-Fos 表达情况(免疫荧光染色)

Figure 2 Expression of OXT and c-Fos in the PVN of mice among four groups (Immunofluorescence staining)

表1 四组小鼠 PVN 区神经元激活情况比较

Table 1 Comparison of neuronal activation in the PVN of mice among four groups

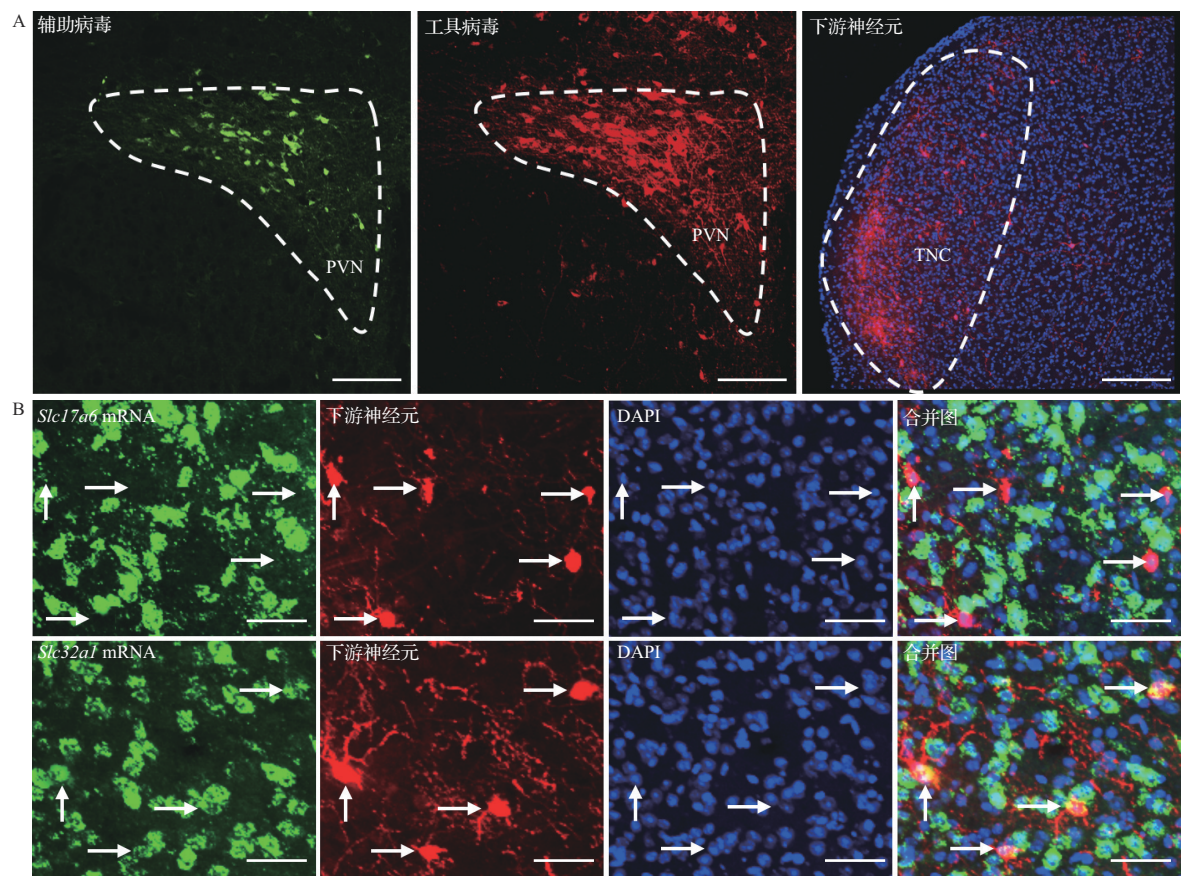
组 别	n	$(\bar{x} \pm s_x)$	
		c-Fos ⁺ 神经元数 (/mm ²)	c-Fos ⁺ OXT 神经元 百分比(%)
单次注射对照组	6	54.3 $\pm$ 5.5	12.3 $\pm$ 1.3
单次注射 NTG 组	6	370.8 $\pm$ 30.9*	78.8 $\pm$ 2.6*
重复注射对照组	6	65.5 $\pm$ 5.6	15.4 $\pm$ 2.2
重复注射 NTG 组	6	152.8 $\pm$ 15.7 ^{#Δ}	24.6 $\pm$ 3.9 ^{#Δ}

与单次注射对照组比较, * $P<0.05$; 与重复注射对照组比较, $^{\#}P<0.05$; 与单次注射 NTG 组比较, $^{\Delta}P<0.05$ 。PVN: 下丘脑室旁核; c-Fos: Fos 原癌基因; OXT: 缩宫素; NTG: 硝酸甘油。

组的眶周机械痛敏阈值大于模型对照组, 而眶周冷痛反应时间较模型对照组缩短(均 $P<0.05$)。结果提示, 特异性激活 PVN OXT 神经元中 TNC 投射末梢能够显著改善慢性偏头痛小鼠的痛觉敏化。

2.5 激活的 PVN OXT 神经元中抑制 TNC OXTR 对慢性偏头痛小鼠痛觉敏化及 TNC GABA 含量的影响

与阴性对照组比较, 模型对照组、CNO 激活模型组和阿托西班组的眶周机械痛敏阈值均减小、眶周冷痛反应时间均延长(均 $P<0.05$)。与模型对照组比较, CNO 激活模型组的眶周机械痛敏阈值增加、眶周冷痛反应时间均缩短(均 $P<0.05$)。与 CNO 激活模型组比较, 阿托西班组的眶周机械痛敏阈值减小、眶周冷痛反应时间均延长(均 $P<0.05$)。见表 2。高效液相色谱分析结果显示, 与阴性对照组和模型对照组比较, CNO 激活模型组的 GABA 含量增加(均 $P<0.05$); 与 CNO 激活模型组比较, 阿托西班组 GABA 含量减少($P<0.05$)。见表 2。结果提示, 激活 PVN OXT 神经元能促进慢性偏头痛小鼠 TNC 中 GABA 释放并改善其痛觉敏化, 而这些效应依赖于 TNC 局部 OXTR。



A:脑立体定位注射病毒表达图(辅助病毒、工具病毒,标尺=100 μm;下游神经元,标尺=200 μm);B:下游神经元与*Slc17a6*、*Slc32a1*表达图(标尺=50 μm). 箭头所指为受PVN OXT神经元调控的TNC下游神经元. PVN:下丘脑室旁核;TNC:三叉神经脊束尾核;SLC:溶质载体;mRNA:信使RNA;DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吡啶.

图3 PVN OXT神经元的TNC下游神经元鉴定(免疫荧光染色)

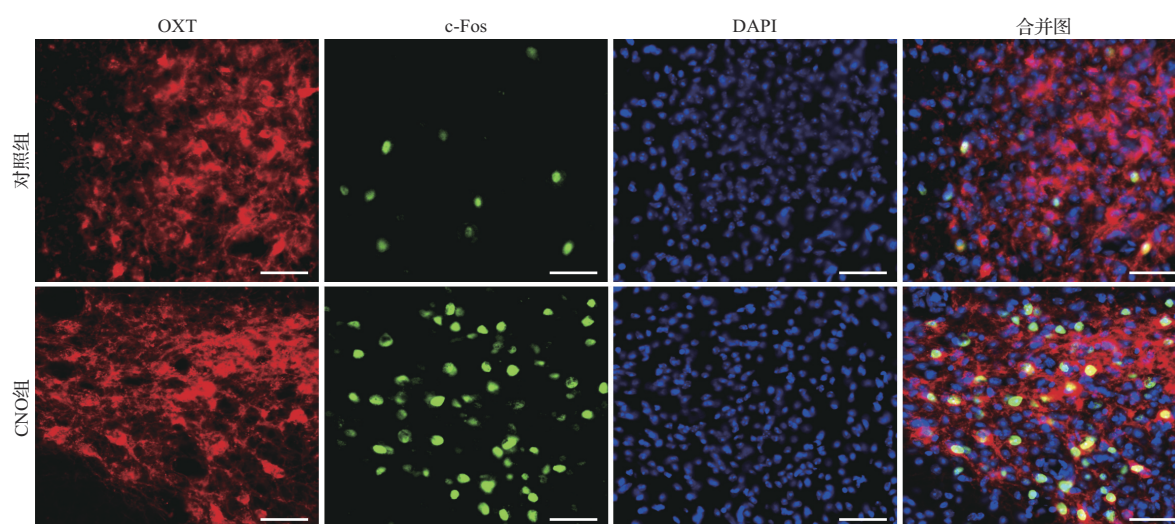
Figure 3 Identification of the TNC downstream neurons innervated by PVN OXT neurons (Immunofluorescence staining)

3 讨论

偏头痛是三叉神经血管系统功能障碍而导致的一种发作性头痛。当各种原因引起脑膜、头面部皮肤及肌肉等处的血管扩张时,分布于血管的Aδ和C纤维(外周伤害性感受器)随即受到刺激,此伤害性信号由外周三叉神经通过TNC的次级感觉神经元传至大脑,从而引起头痛发作^[17]。若偏头痛反复发作,则不可避免地发展为慢性偏头痛。中枢敏化是区分慢性偏头痛与发作性偏头痛的核心病理机制,主要表现为TNC以上水平的痛觉传递神经元过度兴奋^[18]。NTG作为一氧化氮供体,因其显著的血管扩张特性成为构建偏头痛动物模型的核心药理学工具,被广泛用于模拟三叉神经血管系统激活及中枢敏化过程^[11]。本文资料显示,通过5次重复腹腔注射NTG后,小鼠出现持续性的眶周机械痛敏和冷痛敏,说明

反复发作的偏头痛导致小鼠疼痛中枢敏化形成,即成功构建慢性偏头痛模型。与既往研究一致^[19],单次注射NTG无法导致小鼠出现持续性的眶周痛觉敏化,其主要原因之一是机体内源性镇痛系统的适应性激活,通过下行抑制作用阻止痛觉信号进一步向高级中枢传递^[20]。目前临床应用的偏头痛治疗药物包括非甾体类解热镇痛抗炎药、曲坦类和麦角类缩血管药、降钙素基因相关肽抗体等,主要在发作性偏头痛治疗中发挥作用^[21]。然而,对于已形成中枢敏化的慢性偏头痛,上述药物的疗效欠佳。因此,寻找抑制慢性偏头痛中枢敏化的潜在靶点是其治疗的关键所在。

由OXT神经元末梢释放的OXT是一种具有镇痛作用的神经递质,PVN则是中枢神经系统中OXT神经元分布最密集的区域之一^[6]。既往研究发现,PVN OXT神经元在偏头痛发作时发生反应



对照组PVN OXT神经元极少表达c-Fos,而CNO组PVN OXT神经元c-Fos表达明显增加. 标尺=50 μm . OXT:缩宫素;c-Fos:Fos原癌基因;DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吡啶;CNO:氯氮平N-氧化物;PVN:下丘脑室旁核.

图4 对照组和CNO组PVN OXT神经元c-Fos表达比较(免疫荧光染色)

Figure 4 c-Fos expression in PVN OXT neurons between control group and CNO group (Immunofluorescence staining)

表2 四组小鼠的痛觉敏化行为学指标及TNC GABA含量比较

Table 2 Periorbital hyperalgesia like behaviors and TNC GABA levels of mice among four groups

($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)				
组别	n	眶周机械痛敏阈值(g)	眶周冷痛反应时间(s)	GABA含量($\mu\text{g/mL}$)
阴性对照组	6	0.96 $\pm$ 0.08	1.75 $\pm$ 0.43	0.17 $\pm$ 0.02
模型对照组	6	0.23 $\pm$ 0.05*	7.05 $\pm$ 0.35*	0.19 $\pm$ 0.02
CNO激活模型组	6	0.57 $\pm$ 0.07**	3.73 $\pm$ 0.46**	0.35 $\pm$ 0.03**
阿托西班牙组	6	0.30 $\pm$ 0.06* Δ	6.03 $\pm$ 0.60* Δ	0.15 $\pm$ 0.02 Δ

与阴性对照组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,* $P<0.05$;与CNO激活模型组比较, $\Delta P<0.05$. TNC:三叉神经脊束尾核;GABA: γ -氨基丁酸;CNO:氯氮平N-氧化物.

性活化,从而限制偏头痛进一步恶化^[7].作为神经元活化标志物,即刻早期基因c-Fos在神经元受到刺激1.5~2.0 h时处于表达高峰^[22].同时NTG诱导的小鼠痛觉敏化高峰发生于NTG注射后1~2 h时^[23].因此,本研究选择在单次及第5次NTG注射3 h时观察PVN OXT神经元中c-Fos表达情况,以评价发作性偏头痛及慢性偏头痛时PVN OXT神经元的活动情况.结果显示,单次或重复偏头痛发作后PVN OXT神经元均显著活化,但相比发作性偏头痛小鼠,慢性偏头痛小鼠的PVN OXT神经元的活化程度显著减弱.由此推测,PVN OXT神经元活化减弱可能是导致偏头痛中枢敏化及慢性化的潜在原因之一.

电生理研究发现,PVN OXT神经元通过下行疼痛调控通路抑制三叉神经血管痛觉信号向TNC传递,并且该效应依赖于TNC I/II层的GABA能神经元,说明PVN OXT神经元与TNC I/II层GABA能神经元存在功能联系^[10].本文通过特异性顺行神经示踪技术发现,TNC I/II层分布有接受PVN OXT神经元输入的突触后神经元,而RNAscope联合免疫荧光染色显示这群突触后神经元以GABA能神经元为主.进一步采用化学遗传学策略特异性激活PVN OXT神经元在TNC的投射末梢,通过观察慢性偏头痛模型小鼠眶周痛觉敏化的变化以明确这条神经投射对慢性偏头痛中枢敏化的调控作用.研究发现,腹腔注射CNO能诱导PVN OXT神经元显著表达c-Fos,验证了此化学遗传学激活策略的有效性^[24].基于此,本文采用微量给药套管向TNC局部注射CNO特异性激活PVN OXT神经元的TNC末梢,发现慢性偏头痛小鼠的眶周痛觉敏化得到显著改善,证明了PVN OXT神经元通过下行调控作用抑制慢性偏头痛小鼠中枢敏化过程.OXT属于兴奋性神经递质,可通过OXTR兴奋突触后神经元^[25].由于TNC I/II层的兴奋-抑制失衡是慢性偏头痛中枢敏化的特征性病理生理表现,因此PVN OXT神经元可能通过提高TNC I/II层GABA能神经元的兴奋性来抑制慢性偏头痛的中枢敏化.为验证该假设,研究进一步通过化学遗传学

结合药理学实验观察到TNC局部注射OXTR抑制阿托西班消除了PVN OXT神经元介导的镇痛作用及TNC GABA上调效应,表明PVN OXT神经元末梢释放的兴奋性递质OXT可能通过促进下游GABA能神经元释放GABA,从而限制三叉神经血管痛觉信号在TNC I/II层的中枢敏化。

综上,PVN OXT神经元与TNC I/II层GABA能神经元形成特定神经环路结构,故PVN OXT神经元可下行调控TNC I/II层GABA能神经元的活动;慢性偏头痛时,PVN OXT神经元活动减弱致使TNC I/II层GABA能神经元GABA释放减少,这可能是导致偏头痛发生中枢敏化及慢性化潜在机制之一。值得注意的是,PVN OXT神经元能通过垂体后叶和神经投射将OXT分别释放至外周及中枢以影响偏头痛的外周及中枢敏化过程^[26-27]。因此,PVN OXT神经元活动减弱可能也会影响外周或中枢其他区域OXT/OXTR信号通路,从而促进慢性偏头痛的发生发展。PVN OXT神经元通过其他途径调控慢性偏头痛的潜在机制尚需后续研究进行系统阐述。

本文附加文件见电子版。



致谢 本研究得到四川省卫生健康委员会科技项目(24QNMP019)和攀枝花市省级定向财力转移支付科技项目(22ZYZF-S-02)支持

Acknowledgements This study was supported by Science and Technology Project of Sichuan Provincial Health Commission (24QNMP019) and Provincial-Level Targeted Financial Transfer Science and Technology Project of Panzhihua City (22ZYZF-S-02)

作者贡献 陈厚达、邹宛芸、徐许峰和边疆参与论文选题和设计或参与资料获取、分析或解释,起草研究论文或修改重要智力性内容。所有作者均已阅读并认可最终稿件,并对数据的完整性和安全性负责。具体见电子版

Author Contributions CHEN Houda, ZOU Wanyun, XU Xufeng and BIAN Jiang participated in brewing and designing experiments, or acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work, or revising it critically for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript, and take responsibility for the integrity and security of the data. See the electronic version for details

数据可用性 本研究的相关数据可根据合理请求从通信作者(E-mail:1105593984@qq.com)处获得

Data Availability All relevant data supporting the findings of this study can be accessed upon reasonable request from the corresponding author at 1105593984@qq.com

医学伦理 本研究遵循国家和青岛大学青岛医学院有关实验动物管理和使用的规定,通过青岛大学青岛医学院伦理委员会审查(QDU-AEC-2025733)

Ethical Approval All applicable national guidelines and Medical College of Qingdao University regulations for the care and use of animals were followed, and the research protocol of animal experiments was approved by the Ethics Committee of Medical College of Qingdao University (QDU-AEC-2025733)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2025. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献(References)

- [1] Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The international classification of headache disorders, 3rd edition[J]. **Cephalalgia**, 2018, 38(1): 1-211.
- [2] MAY A, SCHULTE L H. Chronic migraine: risk factors, mechanisms and treatment[J]. **Nat Rev Neurol**, 2016, 12(8): 455-464.
- [3] BUSE D C, GREISMAN J D, BAIGI K, et al. Migraine progression: a systematic review[J]. **Headache**, 2019, 59(3): 306-338.
- [4] QIN C, LI J, TANG K. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: development, function, and human diseases[J]. **Endocrinology**, 2018, 159(9): 3458-3472.
- [5] ROBERT C, BOURGEOIS L, ARRETO C D, et al. Paraventricular hypothalamic regulation of trigeminovascular mechanisms involved in headaches[J]. **J Neurosci**, 2013, 33(20): 8827-8840.
- [6] KAWASAKI M, SAKAI A, UETA Y. Pain modulation by oxytocin[J]. **Peptides**, 2024, 179: 171263.
- [7] HARRIOTT A M, KAYA M, AYATA C. Oxytocin shortens spreading depolarization-induced periorbital allodynia[J]. **J Headache Pain**, 2024, 25(1): 152.
- [8] MAEGAWA H, USAMI N, KUDO C, et al. Dopaminergic modulation of orofacial mechanical hypersensitivity induced by infraorbital nerve injury[J]. **Int J Mol Sci**, 2020, 21(6): 1945.
- [9] QIAN X, ZHAO X, YU L, et al. Current status of GABA

- receptor subtypes in analgesia[J]. **Biomed Pharmacother**, 2023, 168: 115800.
- [10] CONDÉS-LARA M, MARTÍNEZ-LORENZANA G, ESPINOSA DE LOS MONTEROS-ZÚÑIGA A, et al. Hypothalamic paraventricular stimulation inhibits nociceptive wide dynamic range trigeminocervical complex cells via oxytocinergic transmission[J/OL]. **J Neurosci**, 2024, 44(17): e1501232024.
- [11] PRADHAN A A, SMITH M L, MCGUIRE B, et al. Characterization of a novel model of chronic migraine [J]. **Pain**, 2014, 155(2): 269-274.
- [12] YANG H, XIONG F, QIN H B, et al. A novel H129-based anterograde monosynaptic tracer exhibits features of strong labeling intensity, high tracing efficiency, and reduced retrograde labeling[J]. **Mol Neurodegener**, 2022, 17(1): 6.
- [13] LIANG H Y, CHEN Z J, XIAO H, et al. nNOS-expressing neurons in the vmPFC transform pPVT-derived chronic pain signals into anxiety behaviors[J]. **Nat Commun**, 2020, 11(1): 2501.
- [14] NISHIMURA H, YOSHIMURA M, SHIMIZU M, et al. Endogenous oxytocin exerts anti-nociceptive and anti-inflammatory effects in rats[J]. **Commun Biol**, 2022, 5(1): 907.
- [15] PAXINOS G, FRANKLIN K. **Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates**[M]. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2012: 87-90, 145-150.
- [16] WEN J, TANAKA M, ZHANG Y. Inhibition of 2-AG hydrolysis alleviates posttraumatic headache attributed to mild traumatic brain injury[J]. **J Headache Pain**, 2024, 25(1): 115.
- [17] DO T P, HOUGAARD A, DUSSOR G, et al. Migraine attacks are of peripheral origin: the debate goes on[J]. **J Headache Pain**, 2023, 24(1): 3.
- [18] SUZUKI K, SUZUKI S, SHIINA T, et al. Central sensitization in migraine: a narrative review[J]. **J Pain Res**, 2022, 15: 2673-2682.
- [19] ALPAY B, CIMEN B, AKAYDIN E, et al. Levromakalim provokes an acute rapid-onset migraine-like phenotype without inducing cortical spreading depolarization[J]. **J Headache Pain**, 2023, 24(1): 93.
- [20] GRECO R, DEMARTINI C, ZANABONI A M, et al. The endocannabinoid system and related lipids as potential targets for the treatment of migraine-related pain[J]. **Headache**, 2022, 62(3): 227-240.
- [21] LAMPL C, MAASSENVDENBRINK A, DELIGIANNI C I, et al. The comparative effectiveness of migraine preventive drugs: a systematic review and network meta-analysis[J]. **J Headache Pain**, 2023, 24(1): 56.
- [22] SMITH R J, ANDERSON R I, HAUN H L, et al. Dynamic c-Fos changes in mouse brain during acute and protracted withdrawal from chronic intermittent ethanol exposure and relapse drinking[J/OL]. **Addict Biol**, 2020, 25(6): e12804.
- [23] MARONE I M, DE LOGU F, NASSINI R, et al. TRPA1/NOX in the soma of trigeminal ganglion neurons mediates migraine-related pain of glyceryl trinitrate in mice[J]. **Brain**, 2018, 141(8): 2312-2328.
- [24] IKEDA N, KAWASAKI M, BABA K, et al. Chemo-genetic activation of oxytocin neurons improves pain in a reserpine-induced fibromyalgia rat model[J]. **Neuroscience**, 2023, 528: 37-53.
- [25] WANG Y, XU H, CHEN S, et al. Oxytocin protects nigrostriatal dopamine signal via activating GABAergic circuit in the MPTP-induced Parkinson's disease model [J/OL]. **Adv Sci (Weinh)**, 2024, 11(36): e2310244.
- [26] TZABAZIS A, KORI S, MECHANIC J, et al. Oxytocin and migraine headache[J]. **Headache**, 2017, 57(Suppl 2): 64-75.
- [27] KRAUSE D N, WARFVINGE K, HAANES K A, et al. Hormonal influences in migraine: interactions of oestrogen, oxytocin and CGRP[J]. **Nat Rev Neurol**, 2021, 17: 621-633.

[本文编辑 余 方 刘丽娜]