

本文引用: 郭兰青, 海广泛, 闫建伟, 等. 溪黄草化学成分及细胞毒活性研究[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(2): 96-99.

【基础研究】

溪黄草化学成分及细胞毒活性研究

郭兰青¹, 海广泛², 闫建伟², 刘 巍², 杨丽娟², 黄明光³, 王 雷³

(1. 新乡医学院护理学院, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院药学院, 河南 新乡 453003; 3. 河南省博济光明医药有限公司, 河南 新乡 453000)

摘要: 目的 研究溪黄草的化学成分及二萜成分的细胞毒活性。方法 采用柱层析对溪黄草植物中的提取物进行分离提纯, 并利用现代波谱方法分析鉴定, 确定化合物的结构, 采用磺酰罗丹明 B 染色法对提取的单体化合物进行体外细胞毒试验。结果 从该植物中分离出 8 个二萜化合物, 其中 4 个化合物有较好的细胞毒活性。结论 Enmein、Nodosin、Isodocarpin 和 Efusanin A 4 种化合物具有较好的细胞毒活性, 为进一步研发二萜类抗癌药物奠定了实验基础。

关键词: 唇形科; 溪黄草; 二萜; 细胞毒活性**中图分类号:** R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2014)02-0096-04Chemical constituents of *Isodon serra* and their cytotoxicityGUO Lan-qing¹, HAI Guang-fan², YAN Jian-wei², LIU Wei², YANG Li-juan², HUANG Ming-guang³, WANG Lei³

(1. School of Nursing Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. School of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 3. Boji Guangming Pharmaceutical Company, Limited of Henan Province, Xinxiang 453000, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents of *Isodon serra* and cytotoxicity of diterpenoid. **Methods** The compounds were isolated and purified by means of silica gel column chromatography and the structures of compounds were identified by modern spectrum methods. Cytotoxicity test was assayed by sulforhodamine B. **Results** Eight diterpenoids were obtained and four compounds have better cytotoxic activity. **Conclusion** Compounds Enmein, Nodosin, Isodocarpin and Efusanin A have good cytotoxic activity, which provide experimental basis for study of anti-cancer drugs of diterpenoids.

Key words: Labiatae; *Isodon serra*; chemical constituents; cytotoxic activity

溪黄草 [*Rabdosia Serra* (Maxim.) Hara] 系唇形科 (Labiatae) 香茶菜属 (*Isodon*) 植物, 多年生草本, 全株可入药, 性味苦凉, 用于治疗湿热泻痢、跌打瘀肿、急性黄疸型肝炎、急性胆囊炎等^[1]。溪黄草富含二萜成分, 多数有较好的生物活性。作者对采自湖北省神农架的溪黄草进行了化学成分研究, 从其丙酮水 (V/V 7:3) 提取物中经硅胶柱层析分离得到 8 个贝壳杉烷型二萜化合物, 利用磁共振、质谱等现代分析方法对化合物进行了结构鉴定, 并对部分化合物进行了细胞毒活性测试, 结果表明 4 个化合物有较好的细胞毒活性。

1 材料与方法

1.1 材料 溪黄草于 2010 年 6 月采自湖北省神农架, 植物标本由河南农业大学朱长山教授鉴定。人白血病细胞 (human leukaemia cell, HL60), 人肝癌细胞 (human hepatoma cell, SMMC-7721) 和人宫颈癌细胞 (human cervical carcinoma cell, HeLa) 购于中国科学院细胞研究中心。

1.2 仪器与试剂 X-4 数字显示显微熔点仪 (北京光电设备厂), Nicolet 170 SX FT-IR (美国 Nicolet 公司生产), Bruker AM-400 型超导核磁共振仪 (德国 Bruker 公司), HP-5988A GC/MS 质谱仪 (electron ionization mass spectrum, EI-MS) (美国 HP 公司); 对照品丝裂霉素 (武汉鑫佳灵医药化学有限公司), 柱层析用硅胶 (200~300 目) 及薄层析 (thin layer chromatography, TLC) 用硅胶 GF₂₅₄ (10~40 μm) 均由青岛海洋化工厂生产; 所用试剂均为分析纯。

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.02.005

收稿日期: 2013-11-11

基金项目: 河南省科技攻关资助项目 (编号: 102102310011)

作者简介: 郭兰青 (1962-), 女, 河南辉县人, 硕士, 教授, 研究方向: 肿瘤预防。

1.3 提取与分离 溪黄草叶 13 kg 阴干后粉碎,用丙酮:水(7:3 V/V)室温浸泡提取4次,每次6 d,提取液减压浓缩至无丙酮味,水液用乙酸乙酯萃取5次,将乙酸乙酯层减压浓缩后共得浸膏440 g。以氯仿/甲醇(V/V)(1:0.30:1.20:1.10:1.5:1.3:1.1:1.0:1)为洗脱剂梯度洗脱,进行硅胶柱层析。根据TLC检测,将柱层析收集到的浸膏分为若干部分。然后再次用硅胶柱层析,分别用石油醚/丙酮、氯仿/丙酮、氯仿/异丙醇、氯仿/甲醇等系统重复梯度洗脱,分别得到化合物1~8。

1.4 化学成分结构鉴定方法 通过磁共振(^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 DEPT)、质谱(mass spectrum, MS)、红外光谱(infrared spectrum, IR)等现代波谱方法分析鉴定,并与标准品对照熔点及TLC比移值(R_f)确定了化合物1~8的结构。

1.5 细胞毒活性测试 将 $4 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞加入96孔板中,每孔100 μL ,培养24 h后,加入不同浓度的二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)助溶,DMSO在培养体系的终浓度小于0.05%,阳性对照孔每孔加入不同浓度的丝裂霉素,每个浓度各设5个。继续培养48 h后,每孔内分别加入体积分数50%的三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)液25 μL (TCA终浓度为10%)固定,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置1 h。倒掉固定液,小孔用去离子水洗5遍,空气干燥。每孔加100 μL 磺酰罗丹明B(sulforhodamine B, SRB)液,室温放置10 min。未与蛋白结合的SRB用体积分数1%醋酸液洗5遍,空气干燥。结合的SRB用150 μL 10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 非缓冲Tris(三羟甲基氨基甲烷, pH 10.5)液溶解,在酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)酶标仪上测出 A_{515} 。细胞存活率用下式计算:

细胞存活率(%) = (实验组 A_{515} - 加药前 A_{515}) / (对照组 A_{515} - 加药前 A_{515}) $\times 100\%$ 。

采用SRB法^[2]测试植物中分离得到的化合物对HL60、SMMC-7721和HeLa的抑制活性。

2 结果

2.1 结构测定数据 Longirabdolide C(化合物1): 无色粉末(MeOH); ^1H -NMR(400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ , ppm): 8.64(1H, d, 2.2, OH-6), 6.74(1H, d, 5.6, OH-3), 6.15(1H, d, 3.4, OH-11), 6.20(1H, dd, 12.5, 6.6, H-1 β), 5.97和5.34(2 \times 1H, br s, H2-17), 5.93(1H, d, 2.2, H-6 β), 5.12(1H, m, H-11 α), 4.66和4.44(2 \times 1H, ABd, 9.2, H2-20), 3.81(1H, m, H-3 α), 3.64(1H, d, 12.0, H-14 β), 3.11(1H, d,

3.7, H-9 α), 3.10(1H, m, H-13 β), 2.90(1H, s, H-5 β), 1.30(3H, s, Me-18), 1.06(3H, s, Me-19); ^{13}C -NMR(100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ , ppm): 75.4(C-1), 30.4(C-2), 75.8(C-3), 35.9(C-4), 52.5(C-5), 102.5(C-6), 172.0(C-7), 56.8(C-8), 48.9(C-9), 49.3(C-10), 66.7(C-11), 40.3(C-12), 35.4(C-13), 34.1(C-14), 200.8(C-15), 151.0(C-16), 117.7(C-17), 28.4(C-18), 23.2(C-19), 74.7(C-20)。

Epinodosinol(化合物2): 无色块状结晶(Me_2CO), mp. 236 ~ 237 $^{\circ}\text{C}$; ^1H -NMR(400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ , ppm): 5.74(1H, s, H-6 α), 5.60和5.20(2 \times 1H, br s, H2-17), 5.54(1H, s, H-15 β), 4.81(1H, dd, H-1 β), 4.51和4.20(2 \times 1H, ABd, 8.5, H2-20), 4.45(1H, m, H-11 β), 3.60(1H, d, 10.0, H-9 α), 3.17(1H, s, H-5 β), 0.97(3H, s, Me-18), 0.94(3H, s, Me-19); ^{13}C -NMR(100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ , ppm): 77.5(C-1), 24.3(C-2), 37.3(C-3), 31.8(C-4), 54.4(C-5), 102.4(C-6), 175.5(C-7), 53.6(C-8), 46.4(C-9), 51.0(C-10), 63.2(C-11), 45.4(C-12), 37.2(C-13), 34.3(C-14), 76.1(C-15), 158.0(C-16), 108.6(C-17), 33.0(C-18), 23.2(C-19), 73.5(C-20)。

Enmein(化合物3): 无色块状结晶(Me_2CO), mp. 297 ~ 298 $^{\circ}\text{C}$; ^1H -NMR(400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ , ppm): 5.97和5.32(2 \times 1H, d, H2-17), 5.90(1H, s, H-6 α), 5.44(1H, dd, H-1 β), 4.45(2H, ABd, H2-20), 3.84(1H, br q, H-3 α), 1.34(3H, s, Me-18), 1.03(3H, s, Me-19); ^{13}C -NMR(100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ , ppm): 75.1(C-1), 30.9(C-2), 74.0(C-3), 35.9(C-4), 51.1(C-5), 102.3(C-6), 172.2(C-7), 57.1(C-8), 46.6(C-9), 50.1(C-10), 19.9(C-11), 32.8(C-12), 35.3(C-13), 29.5(C-14), 200.6(C-15), 151.4(C-16), 117.4(C-17), 28.3(C-18), 23.2(C-19), 74.5(C-20)。

Nodosin(化合物4): 无色块状晶体(MeOH), mp. 278 ~ 279 $^{\circ}\text{C}$; ^1H -NMR(400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ , ppm): 8.23(1H, br s, OH-6), 6.05和5.34(2 \times 1H, s, H2-17), 5.78(1H, s, H-6 α), 5.70(1H, t, 9.0, H-1 β), 5.04(1H, m, H-11 α), 4.53和4.21(2 \times 1H, s, H2-20), 3.77(1H, d, 11.5, H-14 β), 3.20(1H, m, H-13 β), 3.06(1H, s, H-5 β), 1.01(6H, s, 2 \times Me); ^{13}C -NMR(100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ , ppm): 78.8(C-1), 24.2(C-2), 37.5(C-3), 31.6(C-4), 55.7(C-5), 102.1(C-6), 171.6(C-7), 56.3(C-8), 48.7(C-9), 50.0(C-10), 66.5(C-11), 41.5(C-12), 35.6(C-13),

34.2(C-14) 201.0(C-15) ,151.3(C-16) ,117.2(C-17) ,33.4(C-18) 23.5(C-19) ,74.1(C-20) 。

Isodocarpin (化合物 5): 无色针状结晶 (Me₂CO) ,mp. 271 ~ 273 °C; ¹H-NMR (400 MHz , CDCl₃ δ ,ppm): 6.06 和 5.50 (2 × 1H ,s ,H₂-17) , 5.32 (1H ,s ,H-6α) 4.38 (1H ,dd ,11.6 5.9 ,H-1β) , 4.04 和 3.97 (2 × 1H ,ABd ,9.4 ,H₂-20) 2.52 (1H ,dd ,13.0 5.4 ,H-9α) 1.92 (1H ,s ,H-5β) 1.02 (3H ,s ,Me-18) 0.95 (3H ,s ,Me-19) ; ¹³C-NMR (100 MHz , C₅D₅N δ ,ppm): 76.5 (C-1) ,23.4 (C-2) ,37.2 (C-3) ,33.0 (C-4) ,53.8 (C-5) ,101.4 (C-6) ,171.8 (C-7) ,56.1 (C-8) ,45.4 (C-9) ,49.7 (C-10) ,19.7 (C-11) ,35.4 (C-12) ,35.0 (C-13) ,29.3 (C-14) ,199.9 (C-15) ,150.1 (C-16) ,118.0 (C-17) ,33.1 (C-18) , 23.4 (C-19) ,74.0 (C-20) 。

Ememogin (化合物 6): 无色粉末 (MeOH) ,¹H-NMR (400 MHz ,C₅D₅N δ ,ppm): 7.34 (1H ,s ,OH) , 7.01 (1H ,d ,4.0 ,OH) 6.11 (1H ,s ,H-6α) 5.64 和 5.52 (2 × 1H ,br s ,H₂-17) 5.53 (1H ,dd ,12.0 6.0 ,H-1β) 5.14 (1H ,m ,H-15β) 3.80 (2H ,m ,H-3α 和 H-9α) 3.04 (1H ,s ,H-5β) 1.35 和 1.00 (2 × 3H ,s , 2 × Me) ; ¹³C-NMR (100 MHz ,C₅D₅N δ ,ppm): 70.6 (C-1) ,34.2 (C-2) ,74.5 (C-3) ,36.3 (C-4) ,48.7 (C-5) ,98.6 (C-6) ,175.2 (C-7) ,52.2 (C-8) ,37.1 (C-9) ,46.9 (C-10) ,17.8 (C-11) ,32.5 (C-12) ,37.4 (C-13) ,32.5 (C-14) ,77.9 (C-15) ,159.2 (C-16) ,108.8 (C-17) ,26.5 (C-18) ,22.6 (C-19) ,176.5 (C-20) 。

Sculponeatin F (化合物 7): 无色晶体 (MeOH) , mp. 278 ~ 280 °C; ¹H-NMR (400 MHz ,C₅D₅N δ , ppm): 8.10 (1H ,br s ,OH-6β) ,7.90 (1H ,d ,5.9 , OH-15α) 6.77 (1H ,d ,4.2 ,OH-3β) 5.90 (1H ,s ,H-6α) 5.57 (1H ,d ,5.9 ,H-15β) 5.50 (1H ,dd ,11.7 , 5.9 ,H-1β) 5.44 (1H ,s ,H-17a) 5.10 (1H ,s ,H-17b) 4.78 (1H ,ABd ,8.3 ,H-20a) 4.32 (1H ,ABd , 8.3 ,H-20b) 3.80 (1H ,m ,H-3α) 3.71 (1H ,dd , 12.9 5.5 ,H-9α) 2.84 (1H ,s ,H-5β) 2.63-2.59 (1H ,m ,H-13β) 2.35 (1H ,H-2β) 2.31 (1H ,H-11α) 2.23 (1H ,t ,11.7 ,H-2α) 2.04 (1H ,H-12β) , 1.96 (1H ,d ,11.5 ,H-14β) 1.89 ~ 1.84 (1H ,m ,H-11β) 1.65 (1H ,dd ,11.5 4.7 ,H-14α) 1.62 (1H , H-12α) 1.34 (3H ,s ,Me-18) 1.05 (3H ,s ,Me-19) ; ¹³C-NMR (100 MHz ,C₅D₅N δ ,ppm): 73.4 (C-1) ,31.2 (C-2) ,75.3 (C-3) ,36.0 (C-4) ,51.2 (C-5) , 102.5 (C-6) ,176.7 (C-7) ,53.2 (C-8) ,39.2 (C-9) , 50.0 (C-10) ,19.1 (C-11) ,32.7 (C-12) ,37.3 (C-

13) ,33.5 (C-14) ,78.5 (C-15) ,159.5 (C-16) ,108.1 (C-17) ,28.5 (C-18) 23.5 (C-19) ,74.1 (C-20) 。

Effusanin A (化合物 8): 无色针状晶体 (MeOH) ,mp. 266 ~ 268 °C; ¹H-NMR (400 MHz , C₅D₅N δ ,ppm): 5.94 和 5.21 (2 × 1H ,br s ,H₂-17) , 4.70 和 4.28 (2 × 1H ,ABd ,10.0 ,H₂-20) 4.24 (1H , dd ,H-6α) 3.61 (1H ,dd ,7.5 ,H-1β) 2.88 (1H ,m , H-13α) 1.47 (1H ,d ,6.5 ,H-5β) 1.25 和 1.10 (2 × 3H ,s ,Me-18 ,19) ; ¹³C-NMR (100 MHz ,C₅D₅N δ , ppm): 73.5 (C-1) ,30.1 (C-2) ,39.1 (C-3) ,33.8 (C-4) ,61.3 (C-5) ,75.0 (C-6) ,95.6 (C-7) ,60.5 (C-8) , 51.7 (C-9) ,41.4 (C-10) ,20.2 (C-11) ,30.0 (C-12) , 34.9 (C-13) ,26.4 (C-14) ,210.7 (C-15) ,154.3 (C-16) ,115.5 (C-17) ,33.0 (C-18) ,21.9 (C-19) ,63.5 (C-20) 。

2.2 细胞毒活性 实验结果表明 ,Enmein、Nodosin、Isodocarpin 和 Effusanin A 4 个化合物对 HL60 有较好的抑制作用 ,对 HL60 的半抑制浓度 (50% inhibiting concentration ,IC₅₀) 分别为 8.35、1.89、0.58 和 0.23 mg · L⁻¹; Isodocarpin 和 Effusanin A 对 SMMC-7721 也有较好的抑制作用 ,对 SMMC-7721 的 IC₅₀ 分别为 3.65 和 1.36 mg · L⁻¹; 同时 ,Isodocarpin 和 Effusanin A 2 个化合物也对 HeLa 有较好的抑制作用 ,对 HeLa 的 IC₅₀ 分别为 3.82 和 6.87 mg · L⁻¹。结果见表 1。

表 1 化合物的细胞毒活性

Tab.1 Cytotoxic activities of compounds ($\bar{x} \pm s$)

化合物	IC ₅₀ / (mg · L ⁻¹)		
	HL60 细胞	SMMC-7721 细胞	HeLa 细胞
丝裂霉素	0.58 ± 0.23	1.98 ± 0.44	1.23 ± 0.56
Epindosinol	25.48 ± 1.69	38.47 ± 4.14	59.60 ± 1.29
Enmein	8.35 ± 0.76	20.79 ± 0.68	42.18 ± 3.35
Nodosin	1.89 ± 0.24	22.66 ± 1.27	11.58 ± 2.34
Isodocarpin	0.58 ± 0.10	3.65 ± 0.20	3.82 ± 0.46
Effusanin A	0.23 ± 0.16	1.36 ± 0.23	6.87 ± 0.23
Ememogin	76.22 ± 3.06	98.42 ± 0.44	72.38 ± 2.13

3 讨论

溪黄草 [*Rabdosia Serra* (Maxim.) Hara] 系唇形科 (Labiatae) 香茶菜属 (*Isodon*) 植物。香茶菜属植物在我国除青海及内蒙古外分布甚是广泛 ,但在西南地区分布的种类最多。到目前为止 ,对本属植物研究品种已达 80 多种 ,发现二萜化合物 500 多个 ,多为贝壳杉烷型二萜。据文献报道 ,多种贝壳杉烷型二萜具有细胞毒活性 ,有的化合物已作为抗癌药物用于临床试验。对于溪黄草的植物化学研究虽有

报道,但不同产地不同环境下植物中的化学成分往往变化很大。作者首次对采自湖北神农架的溪黄草进行了研究,以期寻找抗癌活性好的二萜类化合物。利用现代色谱分离技术从溪黄草植物中分离得到8个贝壳杉烷型二萜化合物,通过磁共振等现代波谱方法鉴定了化合物的结构。化合物1~8的波谱数据分别与文献[3-10]中报道的化合物 Longirabdolide C、Epinodosinol、Enmein、Nodosin、Isodocarpin、Ememogin、Sculponeatin E 及 Effusanin A 一致。细胞毒活性测试结果表明,Enmein、Nodosin、Isodocarpin 和 Effusanin A 4种化合物对人白血病细胞有很好的抑制作用,而 Isodocarpin 和 Effusanin A 对 SMMC-7721 和 HeLa 也有较好的抑制作用。经过观察分析4个具有较好细胞毒活性的化合物,在结构上均有一个 α -亚甲基环戊酮的部分,与文献报道一致^[11]。本研究为中药资源的开发利用、抗癌药物的研发奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 25.
- [2] Skehan P, Storeng R, Scudiero D *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(13): 1107-1112.
- [3] Takeda Y, Matsumoto T, Otsuka H. Longirabdolide C, a new Diterpenoid from *Rabdosia longituba* [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57(5): 650-653.
- [4] 许凤鸣, 胡惠平, 兆全. 毛叶香茶菜二萜类成分研究[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(11): 678-680.
- [5] Fujita E, Fujita T, Shibuya M. Diterpenoid constituents of *Isodon trichocarpus* and *Isodon japonicus* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1966, 27(7): 3153-3162.
- [6] Chen Y Z, Bai G, Meng X J. Diterpenoids from *Rabdosia nervosa* [J]. *Acta Chim Sin Eng Edition*, 1989, 6(7): 549-553.
- [7] Han Q B, Zhang J X, Shen Y H *et al.* Diterpenoids from *Isodon japonica* [J]. *Chin J Nat Med*, 2003, 1(1): 16-20.
- [8] Takeda Y, Takeda K, Fujita T. Structures of ememogin and trichorabdolone, minor diterpenoids from *Rabdosia trichocarpa* [J]. *J Chem Soc Perkin Trans I*, 1986, 689-694.
- [9] Jiang B, Hou A J, Li M L *et al.* Cytotoxic ent-Kaurane Diterpenoids from *Isodon sculponeata* [J]. *Planta Med*, 2002, 68(10): 921-925.
- [10] Fujita T, Takeda Y, Shingu T *et al.* Structures of effusanins, antibacterial diterpenoids from *Rabdosia effusa* [J]. *Chem Lett*, 1980, 12(9): 1635-1638.
- [11] 孙汉董, 徐云龙, 姜北. 香茶菜属植物二萜化合物[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 95.

(本文编辑: 孟月 英文编辑: 孟月)

(上接第95页)

- [7] Gallai V, Sarehielli P, Floridi A *et al.* Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally [J]. *Cephalalgia*, 1995, 15(5): 384-390.
- [8] Juhasz G, Zsombok T, Jakab B *et al.* Sumatriptan causes parallel decrease in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and migraine headache during nitroglycerin induced migraine attack. [J]. *Cephalalgia*, 2005, 25(3): 179-183.
- [9] Lassen L H, Haderslev P A, Jacobsen V B *et al.* CGRP may play a causative role in migraine [J]. *Cephalalgia*, 2002, 22(1): 54-61.
- [10] Christiansen I, Jversen H K, Olesen J *et al.* Nitric oxide-induced headache may arise from extracerebral arteries as judged from tolerance to isosorbide-5-mononitrate [J]. *J Headache Pain*, 2008, 9(4): 215-220.
- [11] Luo Z D, Cizkova D. The role of nitric oxide in nociception [J]. *Curr Rev Pain*, 2000, 4(6): 459-466.
- [12] Hoskin K L, Bulmer D C, Lasalandra M *et al.* Fos expression in the midbrain periaqueductal grey after trigeminovascular stimulation [J]. *J Anat*, 2001, 198(Pt 1): 29-35.
- [13] Olesen J, Thomsen L L, Jversen H. Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1994, 15(5): 149-153.
- [14] Tassorelli C, Greco R, Morocutti A *et al.* Nitric oxide-induced neuronal activation in the central nervous system as an animal model of migraine: mechanisms and mediators [J]. *Funct Neurol*, 2001, 16(4 Suppl): 69-76.
- [15] Lassen L H, Ashina M, Christiansen I *et al.* Nitric oxide synthase inhibition in migraine [J]. *Lancet*, 1997, 349(9049): 401-402.
- [16] Stepien A, Chalimoniuk M. Level of nitric oxide-dependent cGMP in patients with migraine [J]. *Cephalalgia*, 1998, 18(9): 631-634.
- [17] Strassman A M, Raymond S A, Burstein R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches [J]. *Nature*, 1996, 384(6609): 560-564.
- [18] Reuter U, Bolay H, Jansen-Olesen I *et al.* Delayed inflammation in rat meninges: implications for migraine pathophysiology [J]. *Brain*, 2001, 124(Pt 12): 2490-2502.

(本文编辑: 孟月 英文编辑: 孟月)