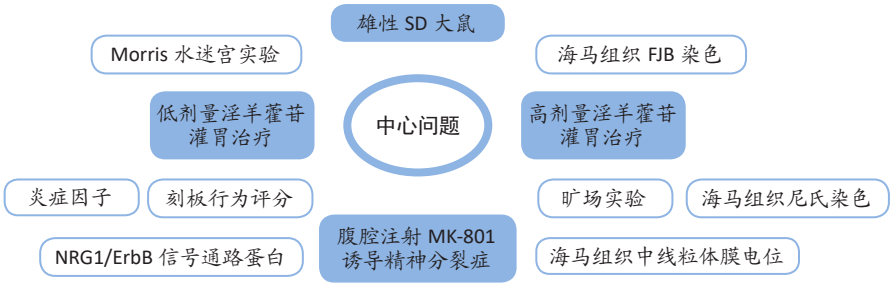
# 淫羊藿苷对精神分裂症模型大鼠认知及海马组织 NRG1/ErbB 信号通路的影响

刘运琴[1]，林 丽[2]，肖文昊[1]，戢秋明[1]，刘燕芹[3]

https://doi.org/10.12307/2023.433
投稿日期：2022-04-24
采用日期：2022-06-15
修回日期：2022-08-04
在线日期：2022-09-15
中图分类号：
R459.9；[R395.4]；R965
文章编号：
2095-4344(2023)20-03236-06
文献标识码：B

**文章快速阅读：**淫羊藿苷对精神分裂症模型大鼠认知功能的影响




文题释义：

**精神分裂症：**是一种严重的慢性精神疾患，主要致病原因有大脑结构异常、遗传因素、妊娠分娩、环境因素等，患者主要表现为感知觉、情感和行为的异常，一般多并发精神衰退、精神残疾等疾病。大部分患者患病年龄为15−25岁，男女患病率大致相等，且男性患病的高峰年龄是在10−25岁，而女性患病的高峰年龄是25−35岁。

**NRG1/ErbB4信号通路：**在精神分裂症、双相情感障碍等多种精神疾病中存在异常表达，NRG1可激活其酪氨酸激酶ErbB4受体，参与神经元的发育和迁移、突触的形成及功能等过程。因此，NRG1/ErbB4信号通路可能是改善精神分裂症脑损伤的潜在靶点。

摘要

**背景：**淫羊藿苷是补肾助阳中药淫羊藿的有效活性成分之一，除了可促进生殖系统功能外，还能明显改善精神分裂症，但其具体作用机制仍处于研究与探索阶段。

**目的：**探究淫羊藿苷对精神分裂症大鼠认知功能的影响及机制。

**方法：**采用随机数字表法将48只SD大鼠分4组，每组12只：正常组不造模；模型组、淫羊藿苷低、高剂量组通过腹腔注射N−甲基−D−天冬氨酸受体拮抗剂MK-801(1次/d)诱导精神分裂症模型，连续注射14 d。确认造模成功后，淫羊藿苷低、高剂量组分别灌胃给予25，50 mg/(kg·d)的淫羊藿苷，对照组、模型组灌胃生理盐水，连续给药28 d。给药结束后，进行行为学检测及海马组织尼氏染色和FJB染色、氧化应激水平、炎症因子水平、NRG1/ErbB4信号通路蛋白表达。

**结果与结论：**①与模型组比较，给药两组刻板行为评分、自发活动总路程和逃避潜伏期明显减少($P < 0.05$)，穿台次数明显增加($P < 0.05$)；淫羊藿苷高剂量组刻板行为评分、逃避潜伏期(第3−5天)明显低于淫羊藿苷低剂量组($P < 0.05$)；②与模型组比较，给药两组海马组织线粒体膜电位、超氧化物歧化酶活性升高($P < 0.05$)，丙二醛、白细胞介素6、白细胞介素1β及肿瘤坏死因子α水平减少($P < 0.05$)；与淫羊藿苷低剂量组比较，淫羊藿苷高剂量组超氧化物歧化酶活性升高($P < 0.05$)，丙二醛、白细胞介素6、白细胞介素1β及肿瘤坏死因子α水平减少($P < 0.05$)；③与模型组比较，淫羊藿苷低、高剂量组NRG1和ErbB4蛋白表达降低($P < 0.05$)；与淫羊藿苷低剂量组比较，淫羊藿苷高剂量组ErbB4蛋白表达降低($P < 0.05$)；④海马组织尼氏染色和FJB染色显示，模型组海马组织中尼氏小体数量明显减少，CA1区和CA3区FJB阳性细胞明显增多；与模型组比较，淫羊藿苷低、高剂量组海马组织中尼氏小体数量明显增加，CA1区和CA3区FJB阳性细胞明显减少；⑤结果表明，淫羊藿苷可改善精神分裂症大鼠的认知功能，其机制可能与调节NRG1/ErbB4信号通路蛋白、减轻氧化应激和炎症反应损伤有关。

**关键词：**精神分裂症；淫羊藿苷；NRG1/ErbB4信号通路；氧化应激；炎症反应；认知；大鼠

## Effects of icariin on NRG1-ErbB signaling pathways in hippocampus of schizophrenia rats

**Liu Yunqin[1], Lin Li[2], Xiao Wenhao[1], Ji Qiuming[1], Liu Yanqin[3]**
[1]Department of Psychiatry, [3]Operating Room, Wuhan Wudong Hospital, Wuhan 430084, Hubei Province, China; [2]Laboratory of Molecular Cell Biology, School of Basic Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei Province, China
Liu Yunqin, Associate chief physician, Department of Psychiatry, Wuhan Wudong Hospital, Wuhan 430084, Hubei Province, China
**Corresponding author:** Liu Yanqin, Associate chief nurse, Operating Room, Wuhan Wudong Hospital, Wuhan 430084, Hubei Province, China

武汉市武东医院，[1]精神科，[3]手术室，湖北省武汉市 430084；[2]湖北中医药大学基础医学院分子细胞生物学实验室，湖北省武汉市 430065
**第一作者：**刘运琴，女，1971 年生，湖北省武汉市人，汉族，副主任医师，主要从事精神病的病因及功能障碍研究。
**通讯作者：**刘燕芹，副主任护师，武汉市武东医院手术室，湖北省武汉市 430084
https://orcid.org/0000-0001-5245-3675( 刘运琴 )

**基金资助：**中国博士后科学基金第 59 批面上资助项目 (2016M592319)，项目负责人：林丽；武汉市卫计委医疗卫生科研项目 (wx14c70)，项目负责人：肖文昊
**引用本文：**刘运琴，林丽，肖文昊，戢秋明，刘燕芹. 淫羊藿苷对精神分裂症模型大鼠认知及海马组织 NRG1/ErbB 信号通路的影响 [J]. 中国组织工程研究，2023，27(20):3236-3241.

**Abstract**

**BACKGROUND:** Icariin is one of the effective active components of Epimedium, which is important for reinforcing kidney and strengthening yang. It can not only promote the function of the reproductive system, but also significantly improve schizophrenia. However, its specific mechanisms of action are still in study and exploration phase.

**OBJECTIVE:** To explore the effects and mechanisms of icariin on cognitive function of schizophrenia rats.

**METHODS:** A total of 48 Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, model group, low-dose and high-dose icariin groups with 12 rats in each group. Except for the control group, schizophrenia models were established in the other groups by intraperitoneal injection of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, MK-801, once a day for continuous 14 days. After modelging, the rats in the low- and high-dose icariin groups were intragastrically given icariin, 25 and 50 mg/kg per day for 28 days, respectively, while those in the control and model groups were given the same amount of normal saline. After administration, behavioral detection, Nissl staining and FJB staining of the hippocampus were performed. Oxidative stress level, inflammatory factor level, and NRG1/ErbB4 signaling pathway protein expression were detected.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the model group, stereotyped behavior score, total distance of spontaneous activities and escape latency were significantly decreased, while times of crossing the platform were significantly increased in the two administration groups ($P < 0.05$). The stereotyped behavior score and escape latency (days 3−5) in the high-dose icariin group were significantly lower than those in the low-dose icariin group ($P < 0.05$). Compared with the model group, mitochondrial membrane potential and superoxide dismutase activity in the hippocampus were significantly increased, while the levels of malondialdehyde, interleukin-6, interleukin-1β, and tumor necrosis factor-α were significantly decreased in the two administration groups ($P < 0.05$). Compared with the low-dose icariin group, superoxide dismutase activity was significantly increased and the levels of malondialdehyde, interleukin-6, interleukin-1β, and tumor necrosis factor-α were significantly decreased in the high-dose icariin group ($P < 0.05$). Compared with the model group, expressions of NRG1 and ErbB4 proteins in the hippocampus were significantly decreased in the two administration groups ($P < 0.05$). Compared with the low-dose icariin group, the expression of ErbB4 protein was significantly decreased in the high-dose icariin group ($P < 0.05$). Nissl staining and FJB staining of the hippocampus showed that the number of Nissl bodies in the hippocampus was significantly reduced in the model group, while the number of FJB-positive cells in the CA1 and CA3 regions was significantly increased; compared with the model group, the number of Nissl bodies in the hippocampal was significantly increased in the low-dose and high-dose icariin groups, while the number of FJB positive cells in CA1 and CA3 regions was significantly decreased. To conclude, icariin can improve cognitive function in rats with schizophrenia. And its mechanisms may be related to regulating expressions of NRG1/ErbB4 signaling pathway proteins and reducing oxidative stress and inflammatory responses.

**Key words:** schizophrenia; icariin; NRG1/ErbB4 signaling pathway; oxidative stress; inflammatory response; cognition; rat

**Funding:** *The 59th-Batch General Project of China Postdoctoral Science Foundation, No. 2016M592319 (to LL); Medical and Health Research Project of Wuhan Municipal Health and Family Planning Commission, No. wx14c70 (to XWH)*

***How to cite this article:*** *LIU YQ, LIN L, XIAO WH, JI QM, LIU YQ. Effects of icariin on NRG1-ErbB signaling pathways in hippocampus of schizophrenia rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2023;27(20):3236-3241.*

## 0 引言 Introduction

精神分裂症是一种大脑神经发育障碍性疾病，患者主要表现为感知觉、情感和行为的异常，一般多并发精神衰退、精神残疾等疾病 [1-3]，该病病因和发病机制至今尚未明确，考虑是基因与环境因素共同影响的结果 [4-5]。近年来机制研究显示，神经调节蛋白 1 可激活其酪氨酸激酶 ErbB4 受体，参与神经元的发育和迁移、突触的形成及功能等过程 [6]，在精神分裂症 [7]、双相情感障碍等多种精神疾病中存在异常表达 [8]。因此，NRG1/ErbB4 信号通路可能是改善精神分裂症脑损伤的潜在靶点。淫羊藿苷是补肾助阳中药淫羊藿的有效活性成分之一 [9]，除了能够促进生殖系统功能 [10]，其对精神分裂症大鼠模型有明显的改善效果，但其具体作用机制仍处于研究与探索阶段 [11-12]。淫羊藿苷在精神分裂症大鼠中是否可调控 NRG1/ErbB4 信号通路发挥保护作用尚不清楚。此次实验拟用 N− 甲基 −D− 天冬氨酸受体拮抗剂 MK-801 诱导精神分裂症大鼠模型，研究淫羊藿苷对模型大鼠认知功能及 NRG1/ErbB4 信号通路的影响，为抗精神分裂症新药的研发提供理论指导。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组动物实验，多组数据的比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2021−04−14/11−24 在湖北中医药大学基础医学院分子细胞生物学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 48 只，6−8 周龄，体质量 180−240 g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，许可证号 SCXK( 京 )2020-0001。饲养环境为 SPF 级别，温度 20−24 ℃，相对湿度 40%−60%，每 12 h 进行昼夜交替。动物实验获得湖北中医药大学基础医学院机构伦理委员会批准。

1.3.2 主要试剂和仪器 淫羊藿苷购自程度瑞芬思生物技术有限公司，纯度 > 98%；MK-801 购自美国 Sigma；焦油紫染色剂购自北京索莱宝生物科技有限公司；FJB 染色剂购自美国 AAT Bioquest；线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 购自上海碧云天生物技术有限公司；超氧化物歧化酶试剂盒、丙二醛试剂盒购自南京建成生物工程研究所；白细胞介素和肿瘤坏死因子 α 酶联免疫吸附法试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司；兔抗 NRG1、ErbB4 多克隆抗体、鼠抗 β-actin 多克隆抗体购自美国 Proteinech Group；小动物自发活动箱购自上海软隆科技发展有限公司；MT-200 型 Morris 水迷宫分析仪购自成都泰盟科技有限公司；FV3000 型激光共聚焦显微镜购自日本 OLYMPUS；VersaFlour 型荧光分光光度计、iMark 型酶标仪购自美国 Bio-Rad。

1.4 实验方法

1.4.1 实验造模与分组处理 采用随机数字表法将 48 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、淫羊藿苷低剂量组、淫羊藿苷高剂量组，每组 12 只。除正常组外，其他 3 组大鼠腹腔注射 0.2 mg/kg MK-801，1 次 /d，连续注射 14 d，建立精神分裂症大鼠模型。期间无大鼠死亡，第 15 天时进行行为学观察，建模大鼠 Morris 水迷宫实验平均逃避潜伏期与正常组的差值占该大鼠平均逃避潜伏期的比例 > 20%，即可认定为成功复制精神分裂症大鼠模型 [13]。确认造模成功后，淫羊藿苷低、

高剂量组分别灌胃给予 25，50 mg/(kg·d) 的淫羊藿苷，正常组和模型组灌胃等量生理盐水，连续给药 28 d。

| 组织工程实验动物造模过程中的相关问题 | |
|---|---|
| 造模目的 | 构建精神分裂症大鼠模型，研究淫羊藿苷药理作用机制 |
| 选择动物的条件 | 雄性，6–8 周龄，SPF 级 |
| 模型与所研究疾病的关系 | 腹腔注射 N– 甲基 –D– 天冬氨酸受体拮抗剂 MK-801，MK-801 可阻断神经元中 N– 甲基 –D– 天冬氨酸受体，是复制精神分裂症的经典方法 |
| 动物来源及品系 | SD 大鼠，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 |
| 造模技术描述 | 腹腔注射 0.2 mg/kg 的 MK-801，1 次 /d，连续注射 14 d |
| 动物数量及分组方法 | 采用随机数字表法将 48 只 SD 大鼠分为正常组、模型组、淫羊藿苷低剂量组、淫羊藿苷高剂量组，每组 12 只 |
| 造模成功评价指标 | 注射 MK-801 第 15 天时进行行为学观察，建模大鼠 Morris 水迷宫实验平均逃避潜伏期与正常组的差值占该大鼠平均逃避潜伏期的比例 > 20%，即可认定为成功复制精神分裂症大鼠模型 |
| 造模后观察指标 | 行为学观察、海马组织病理染色观察、线粒体膜电位的检测、生化指标检测及海马组织中相关蛋白表达 |
| 造模后动物处理 | 行为学检测结束后麻醉处死 |
| 伦理委员会批准 | 动物实验获得湖北中医药大学基础医学院机构伦理委员会批准 |

1.4.2 行为学检测 大鼠行为学测试采用单盲法评估。采用 Sams Dodd 刻板行为标准评估大鼠行为 [14]，0 分为几乎静止不动，1 分为正常生理活动，2 分为活动并伴有反复向前闻嗅探索行为，3 分为连续向前闻嗅探索行为，4 分为重复地摇头、抬头或旋转，5 分为快速地摇头、转圈或头的背腹运动。

采用旷场实验检测大鼠自发活动行为，测试前将大鼠置于昏暗的房间中适应 30 min，实验开始后将大鼠从旷场实验箱的一角放入，记录大鼠自由探索 10 min 内的总路程。

采用 Morris 水迷宫评估大鼠学习和空间记忆能力，分为定位航行实验和空间探索实验。定位航行实验共 5 d，每天将大鼠放入目标象限的圆形平台上适应 30 s，再随机从任一象限放入，记录大鼠登上圆形平台的时间 ( 逃避潜伏期 )，120 s 内仍未登上圆形平台则逃避潜伏期记为 120 s；第 6 天进行空间探索实验，撤去目标象限的圆形平台，将大鼠放入水池中，记录大鼠穿越原圆形平台位置的次数。

1.4.3 海马组织病理染色观察 行为学检测结束 24 h 后，戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉后处死大鼠，快速取脑，分离海马组织，浸泡于体积分数 10% 甲醛固定液，石蜡包埋制备切片，厚度为 5 μm，二甲苯脱蜡 10 min，梯度浓度乙醇复水，分别进行尼氏染色 ( 焦油紫染色剂 ) 和 FJB 染色，依次梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树脂封固，光镜下观察大鼠海马组织尼氏小体病理结构损伤情况，激光共聚焦显微镜下观察并计数 FJB 阳性细胞数 ( 绿色荧光 )。

1.4.4 线粒体膜电位检测 取大鼠海马组织剪碎，放入离心管，添加 0.25% 胰酶 37 ℃下消化 20–30 min，经 200 目细胞筛过滤后，吸取细胞悬液，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，冲洗一两次后即为单个脑细胞悬液。取 $5\times10^5$ 个细胞，加入 JC-A 染色工作液，37 ℃下孵育 20 min，离心沉淀细胞，荧光分光光度计检测红色荧光值和绿色荧光值，以红色荧光值 / 绿色荧光值表示线粒体膜电位水平，并将正常组结果设置为 1。

1.4.5 生化指标检测 取大鼠海马组织，按质量体积比 1 ∶ 9 添加预冷生理盐水，制备海马组织匀浆液，离心取上清，根据试剂盒说明书操作，采用羟胺法检测海马组织中超氧化物歧化酶活力，采用硫代巴比妥酸法检测丙二醛水平，采用酶联免疫吸附法检测白细胞介素 6、白细胞介素 1β 及肿瘤坏死因子 α 水平。

1.4.6 蛋白印迹检测 采用免疫印迹法检测 NRG1、ErbB4 蛋白表达。取适量大鼠海马组织，添加 RIPA 裂解液匀浆，冰上裂解 40 min；12 000×*g* 离心 10 min，取上清，通过 BCA 试剂盒测定蛋白浓度；定量取灭活蛋白 50 μg，经聚丙烯酰胺凝胶电泳，再恒流转膜至 PVDF 膜，浸泡于 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h，分别加入 1 ∶ 1 000 稀释后的兔抗 NRG1、ErbB4 多克隆抗体、鼠抗 β-actin 多克隆抗体，4 ℃下摇床过夜；次日经 TBST 清洗 3 次，再加入 1 ∶ 5 000 稀释后的二抗工作液，室温下孵育 40 min；最后采用化学发光法显影，扫描各蛋白条带的灰度值，以目的蛋白条带灰度值与内参 β-actin 条带灰度值表示目的蛋白的相对表达量。

1.5 主要观察指标 各组大鼠行为学及海马组织尼氏染色和 FJB 染色、线粒体膜电位、氧化应激指标与炎症因子水平、NRG1 与 ErbB4 蛋白表达。

1.6 统计学分析 采用统计学软件 SPSS 17.0 分析处理，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组数据的比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验；重复测量资料采用重复测量资料方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该文统计学方法已经湖北中医药大学生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 48 只大鼠全部进入结果分析。

2.2 各组大鼠行为学表现 逃避潜伏期采用重复测量资料方差分析，组间和时间效应显著 ($F$=97.991，378.088，$P < 0.001$)，进一步采用多重分析。与正常组比较，模型组大鼠刻板行为评分、自发活动总路程和逃避潜伏期明显增加 ($P < 0.05$)，穿台次数明显减少 ($P < 0.05$)。与模型组比较，淫羊藿苷低剂量组大鼠刻板行为评分和逃避潜伏期明显减少 ($P < 0.05$)，穿台次数明显增加 ($P < 0.05$)；淫羊藿苷高剂量组刻板行为评分、自发活动总路程和逃避潜伏期明显减少 ($P < 0.05$)，穿台次数明显增加 ($P < 0.05$)。淫羊藿苷高剂量组大鼠刻板行为评分、逃避潜伏期 ( 第 3–5 天 ) 明显低于淫羊藿苷低剂量组 ($P < 0.05$)，见**表 1**，**2**。

2.3 各组大鼠海马组织病理变化 各组大鼠海马组织尼氏染色见**图 1**。正常组海马组织中尼氏小体数量丰富，神经元细胞结构完整、清晰；与正常组比较，模型组海马组织中尼氏小体数量明显减少，神经元细胞体积缩小，形态不规则，排列紊乱；与模型组比较，淫羊藿苷低、高剂量组海马组织中

表 1 | 各组大鼠刻板行为评分和自发活动总路程的比较 ($\bar{x}\pm s$，$n$=12)
Table 1 | Comparison of stereotyped behavior score and total distance of spontaneous activities in rats

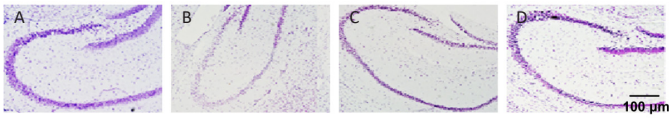
| 组别 | 刻板行为评分 ( 分 ) | 自发活动总路程 (×10$^3$ cm) |
|---|---|---|
| 正常组 | 0.31±0.09 | 1.25±0.16 |
| 模型组 | 2.68±0.42$^a$ | 1.78±0.32$^a$ |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 1.86±0.25$^b$ | 1.61±0.31 |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 1.45±0.27$^{bc}$ | 0.46±0.28$^b$ |
| $F$ 值 | 146.971 | 7.876 |
| $P$ 值 | < 0.001 | < 0.001 |

表注：与正常组比较，$^aP < 0.05$；与模型组比较，$^bP < 0.05$；与淫羊藿苷低剂量组比较，$^cP < 0.05$

表 2 | 各组大鼠逃避潜伏期和穿台次数的比较 ($\bar{x}\pm s$，$n$=12)
Table 2 | Comparison of escape latency and times of crossing the platform in rats

| 组别 | 逃避潜伏期 (s) | | | | | 穿台次数 ( 次 ) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 第 1 天 | 第 2 天 | 第 3 天 | 第 4 天 | 第 5 天 | |
| 正常组 | 78.62±9.54 | 64.21±7.86 | 44.39±8.14 | 25.57±4.46 | 18.89±3.37 | 4.47±0.98 |
| 模型组 | 101.67±13.26$^a$ | 90.37±11.25$^a$ | 68.67±9.55$^a$ | 54.32±8.23$^a$ | 45.56±8.12$^a$ | 2.15±0.62$^a$ |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 91.21±11.43$^b$ | 78.40±10.64$^b$ | 59.32±7.38$^b$ | 46.38±6.52$^b$ | 32.41±5.86$^b$ | 2.94±0.75$^b$ |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 84.46±12.51$^b$ | 72.21±8.63$^b$ | 50.21±6.72$^{bc}$ | 35.49±6.31$^{bc}$ | 25.63±5.29$^{bc}$ | 3.42±0.81$^b$ |
| $F$ 值 | 8.485 | 15.542 | 21.128 | 44.583 | 44.568 | 17.622 |
| $P$ 值 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |

表注：与正常组比较，$^aP < 0.05$；与模型组比较，$^bP < 0.05$；与淫羊藿苷低剂量组比较，$^cP < 0.05$




图注：A 为正常组，海马组织中尼氏小体数量丰富，神经元细胞结构完整、清晰；B 为模型组，海马组织中尼氏小体数量明显减少，神经元细胞体积缩小，形态不规则，排列紊乱；C、D 分别为淫羊藿苷低剂量组、淫羊藿苷高剂量组，海马组织中尼氏小体数量较模型组明显增加，神经元细胞损伤减轻，排列趋于整齐

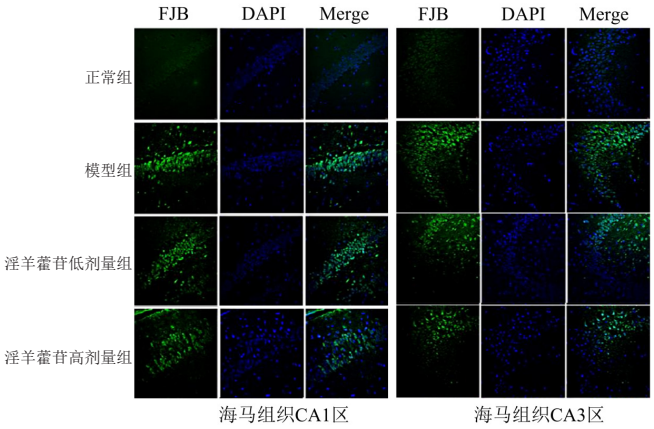
图 1 | 各组大鼠海马组织尼氏染色 (×100)
Figure 1 | Nissl staining of the hippocampus (×100)

尼氏小体数量明显增加，神经元细胞损伤减轻，排列趋于整齐。

各组大鼠海马组织 FJB 染色见**图 2**。正常组几乎无 FJB 阳性细胞；与正常组比较，模型组海马组织 CA1 区和 CA3 区 FJB 阳性细胞明显增多；与模型组比较，淫羊藿苷低、高剂量组海马组织 CA1 区和 CA3 区 FJB 阳性细胞明显减少。

2.4 各组大鼠海马组织内氧化应激水平 与正常行组比较，模型组大鼠海马组织线粒体膜电位、超氧化物歧化酶活性降低 ($P < 0.05$)，丙二醛水平升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，淫羊藿苷低、高剂量组海马组织线粒体膜电位和超氧化物歧化酶活性升高 ($P < 0.05$)，丙二醛水平降低 ($P < 0.05$)；淫羊藿苷高剂量组海马组织超氧化物歧化酶活性高于淫羊藿苷低剂量组，丙二醛水平低于淫羊藿苷低剂量组 ($P < 0.05$)，见**表 3**。

2.5 各组大鼠海马组织内炎症反应水平 与正常组比较，模型组大鼠海马组织中白细胞介素 6、白细胞介素 1β 及肿瘤坏死因子 α 水平明显增加 ($P < 0.05$)；与模型组比较，淫羊藿苷低、高剂量组海马组织中白细胞介素 6、白细胞介素 1β 及肿瘤坏死因子 α 水平明显减少 ($P < 0.05$)，且淫羊藿苷高剂量组海马组织中白细胞介素 6、白细胞介素 1β 及肿瘤坏死因子 α 水平低于淫羊藿苷低剂量组 ($P < 0.05$)，见**表 4**。




图注：正常组几乎无 FJB 阳性细胞；与正常组比较，模型组海马组织 CA1 区和 CA3 区 FJB 阳性细胞明显增多；与模型组比较，淫羊藿苷低、高剂量组海马组织 CA1 区和 CA3 区 FJB 阳性细胞明显减少

图 2 | 各组大鼠海马组织 FJB 染色 (×200)
Figure 2 | FJB staining of the rat hippocampus (×200)

表 3 | 各组大鼠海马组织中氧化应激指标的比较 ($\bar{x}\pm s$，$n$=5)
Table 3 | Comparison of oxidative stress indexes in the rat hippocampus

| 组别 | 线粒体膜电位 ( 红色荧光值 / 绿色荧光值 ) | 超氧化物歧化酶 (U/mL) | 丙二醛 (mol/L) |
|---|---|---|---|
| 正常组 | 1.00±0.16 | 132.56±6.52 | 3.27±0.86 |
| 模型组 | 0.38±0.11$^a$ | 86.27±7.81$^a$ | 9.15±1.24$^a$ |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 0.57±0.10$^b$ | 98.34±8.24$^b$ | 7.56±1.13$^b$ |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 0.76±0.15$^b$ | 113.60±9.54$^{bc}$ | 5.84±1.35$^{bc}$ |
| $F$ 值 | 20.026 | 30.478 | 23.567 |
| $P$ 值 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |

表注：与正常组比较，$^aP < 0.05$；与模型组比较，$^bP < 0.05$；与淫羊藿苷低剂量组比较，$^cP < 0.05$

表 4 | 各组大鼠海马组织中炎症反应指标的比较 ($\bar{x}\pm s$，$n$=5，ng/L)
Table 4 | Comparison of inflammatory response indexes in the rat hippocampus

| 组别 | 白细胞介素 6 | 白细胞介素 1β | 肿瘤坏死因子 α |
|---|---|---|---|
| 正常组 | 86.53±8.26 | 9.65±1.24 | 18.24±3.07 |
| 模型组 | 156.94±13.57$^a$ | 37.82±4.27$^a$ | 62.91±6.45$^a$ |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 123.40±11.84$^b$ | 28.39±5.31$^b$ | 43.38±8.24$^b$ |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 103.27±9.13$^{bc}$ | 17.74±3.63$^{bc}$ | 29.76±7.83$^{bc}$ |
| $F$ 值 | 38.550 | 49.494 | 40.928 |
| $P$ 值 | < 0.001 | < 0.001 | < 0.001 |

表注：与正常组比较，$^aP < 0.05$；与模型组比较，$^bP < 0.05$；与淫羊藿苷低剂量组比较，$^cP < 0.05$

2.6 各组大鼠海马组织中 NRG1/ErbB4 信号通路蛋白表达 蛋白印迹法检测海马组织中相关蛋白表达，见**图 3**。与正常组比较，模型组大鼠海马组织中 NRG1 和 ErbB4 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，淫羊藿苷低、高剂量组海马组织中 NRG1 和 ErbB4 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，淫羊藿苷高剂量组海马组织中 ErbB4 蛋白表达低于淫羊藿苷低剂量组 ($P < 0.05$)，见**表 5**。

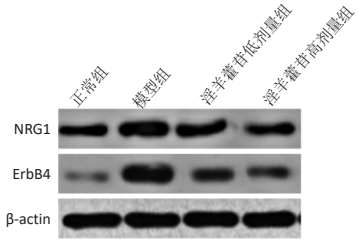



**图 3** | 各组大鼠海马组织中 NRG1/ErbB4 信号通路蛋白表达条带
**Figure 3** | **Expressions of NRG1/ErbB4 signaling pathway proteins in the rat hippocampus**

**表 5** | 各组大鼠海马组织中 NRG1/ErbB4 信号通路蛋白表达的比较 ($\bar{x}\pm s$，$n$=5)
**Table 5** | **Comparison of expressions of NRG1/ErbB4 signaling pathway proteins in the rat hippocampus**

| 组别 | NRG1 蛋白 | ErbB4 蛋白 |
|---|---|---|
| 正常组 | 0.64±0.12 | 0.12±0.03 |
| 模型组 | 1.27±0.19[a] | 0.93±0.15[a] |
| 淫羊藿苷低剂量组 | 0.95±0.14[b] | 0.39±0.08[b] |
| 淫羊藿苷高剂量组 | 0.81±0.11[b] | 0.25±0.07[bc] |
| *F* 值 | 17.346 | 72.983 |
| *P* 值 | < 0.001 | < 0.001 |

表注：与正常组比较，[a]$P < 0.05$；与模型组比较，[b]$P < 0.05$；与淫羊藿苷低剂量组比较，[c]$P < 0.05$

## 3 讨论 Discussion

认知力和情感深度分裂是精神分裂症的首要特征，严重影响患者最基本的人类行为，包括语言、思想、知觉等，给患者及家人带来极大痛苦 [15-16]。此类疾病患者的临床病症包括阳性症状、阴性症状及认知方面的障碍，其中认知能力损伤主要与处理任务的信息缺失有关 [17-18]。虽然抗精神病药物被广泛用于精神分裂症的治疗，但仍未能明显改善患者转归，积极探索疗效全面、不良反应较小的新型药物，具有重大的临床意义。现代药理学研究表明，淫羊藿苷具有免疫调节、抗炎、抗衰老、抗肿瘤活性等多种药理活性，对神经、免疫、内分泌等相关疾病均有一定的改善作用 [19]。近年来基础研究报道淫羊藿苷可改善精神分裂症症状，减轻神经损伤。陈溪等 [20] 采用腹腔注射 N− 甲基 −D− 天冬氨酸 (NMDA) 受体拮抗剂 MK-801 制备精神分裂症小鼠模型，通过测定各组小鼠 210 min 内的活动总距离和在中心区的活动距离，发现淫羊藿苷可改善模型小鼠阴性症状和阳性症状。以往研究显示，淫羊藿苷可改善精神分裂症大鼠的认知功能，可能与调节胆碱能系统、抑制神经元凋亡、促进 BDNF/ERK/CREB 信号通路的表达有关 [21]。由于目前临床缺乏疗效确切的精神分裂症治疗药物，淫羊藿苷对精神分裂症动物模型的改善作用尤其值得关注。

关于精神分裂症的动物造模方法较多，其中选用 MK-801 阻断神经元中 N− 甲基 −D− 天冬氨酸受体，是复制精神分裂症的经典方法 [22]。此次实验采用刻板行为、旷场实验和 Morris 水迷宫实验评估大鼠行为学，其中刻板行为可反映精神分裂症的阳性症状，旷场实验可检测大鼠的高活动性 ( 阳性症状 )，而 Morris 水迷宫实验可检测大鼠的学习和空间记忆能力 ( 认知功能 )，通过尼式染色和 FJB 染色观察大鼠海马组织病理损伤程度。结果显示，MK-801 注射后大鼠刻板行为评分明显升高，出现高活动性，学习和空间记忆能力明显下降，尼氏小体分裂、数目减少，且伴有海马组织中神经元的变性和坏死，表明 MK-801 诱导后大鼠出现明显的精神分裂症症状和神经损伤，提示模型建立成功。分别采用不同剂量淫羊藿苷处理后，大鼠刻板行为评分、自发活动总路程和逃避潜伏期明显减少，穿台次数明显增加，海马组织病理损伤明显减轻，提示淫羊藿苷可明显减轻模型大鼠神经元损伤，改善大鼠高活动性症状和认知记忆功能障碍，这与既往研究基本相符 [23]。

氧化应激和炎症反应被认为是精神分裂症中的重要因素，其引起的神经元损伤是导致精神分裂症症状的重要原因 [24-25]。外周炎症反应将激活小胶质细胞产生神经炎症，介导先天免疫参与精神分裂症的发生与疾病进展 [26]。还有学说认为，体内氧化与抗氧化平衡偏向于氧化作用时将产生大量的氧化因子，诱导蛋白质、脂质、DNA 等物质损伤，影响神经系统功能，从而导致精神疾病的发生 [27]。临床研究也显示，精神分裂症患者存在基础性的全身氧化应激和炎症反应 [28]。此次实验中，与正常组比较，模型组大鼠海马组织线粒体膜电位明显降低，抗氧化酶超氧化物歧化酶活性下降，脂质代谢终产物丙二醛和炎性细胞因子白细胞介素 6、白细胞介素 1β 及肿瘤坏死因子 α 水平明显增加，而淫羊藿苷干预后可显著提高海马组织线粒体膜电位和超氧化物歧化酶活力，减少丙二醛、白细胞介素 6、白细胞介素 1β 及肿瘤坏死因子 α 的生成，该结果初步表明淫羊藿苷可提高精神分裂症大鼠脑组织抗氧化和抗炎能力，这与 JING 等 [29]、WANG 等 [30] 报道的淫羊藿苷具有抗氧化、抗炎作用相符。但引起线粒体膜电位降低的原因很多，此次实验仅从氧化应激角度分析淫羊藿苷提高大鼠海马组织线粒体膜电位，减轻脑损伤，后续还可深入分析。

多项研究结果表明，NRG1 和 ErbB4 均是神经精神疾病的潜在易感基因 [31-32]。NRG1/ErbB4 信号通路可参与神经元之间信号的精细传输和有序调节，NRG1 属于含有表皮生长因子样结构域的蛋白质，主要分布于神经系统，在髓鞘形成、细胞间信号转导、胶质细胞的分化与发育、神经递质受体表达与神经传递等过程中发挥功能 [33-35]；ErbB4 是 NRG1 自主性、特异性受体，作为酪氨酸激酶与配体相互作用并被活化，参与精神分裂症的发生发展 [36-37]。YANG 等 [38] 纳入 221 例神经分裂症患者作为研究对象，发现 NRG1 基因多态性与利培酮治疗 12 周后认知反应改变间存在药物遗传关系，NRG1 基因 rs3924999 和 rs35753505 位点的变异与利培酮治疗后患者注意力和推理能力的变化密切相关。ZHANG 等 [39] 在小鼠模型和人类样本中发现，正常的小鼠和精神分裂症患者中存在右侧感动运动皮质 − 纹状体网络灰质和白质的损伤，而 ErbB4 缺损表达小鼠及健康对照人群中没有发现。基础研究结果表明，胚胎脑发育后期的免疫激活将启动 NRG1/ErbB4 信号通

路的活化，这种干扰可能导致成年期的认知功能障碍，出现精神分裂症、自闭症等精神疾病[40]。上述研究结果表明，调控 NRG1/ErbB4 信号通路可能是精神分裂症治疗的新型药物靶点。此次实验观察淫羊藿苷对精神分裂症大鼠 NRG1/ErbB4 信号通路的影响，结果显示，淫羊藿苷干预后可显著降低 NRG1 和 ErbB4 蛋白表达，提示淫羊藿苷可抑制精神分裂症大鼠 NRG1/ErbB4 信号通路的表达，这可能是淫羊藿苷治疗精神分裂症的潜在机制。

综上所述，淫羊藿苷可改善 MK-801 诱导精神分裂症大鼠的认知功能，其机制可能与调节 NRG1/ErbB4 信号通路表达、减轻氧化应激和炎症反应损伤有关，这为淫羊藿苷治疗精神分裂症的作用机制提供了一些实验数据，但淫羊藿苷的抗精神分裂症具体机制仍有待继续研究。

**作者贡献：**刘运琴进行实验设计，实验实施为林丽和刘运琴，实验评估为戢秋明，资料收集为刘燕芹和林丽，刘运琴成文，肖文昊审校。

**利益冲突：**文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明：**这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名－非商业性使用－相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让：**文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范：**该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

## 4 参考文献 References

[1] McCUTCHEON RA, MARQUES TR, HOWES OD. Schizophrenia-an overview. JAMA Psychiatry. 2020;77(2):201-210.
[2] SRIVASTAVA A, DADA O, QIAN J, et al. Epigenetics of schizophrenia. Psychiatry Res. 2021;305:114218.
[3] RICHETTO J, MEYER U. Epigenetic modifications in schizophrenia and related disorders: molecular scars of environmental exposures and source of phenotypic variability. Biol Psychiatry. 2021;89(3):215-226.
[4] 彭兴，马辛，任艳萍，等. 精神分裂症患者语义距离与认知功能的相关性研究 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志，2020,29(9):797-801.
[5] GAMA MARQUES J, OUAKININ S. Schizophrenia–schizoaffective–bipolar spectra: an epistemological perspective. CNS Spectr. 2021;26(3):197-201.
[6] 陈彦霖，陈诚，李泽平，等. NRG1/ErbB4 信号通路与精神疾病关联的研究进展 [J]. 中国现代医学杂志，2020,30(15):44-49.
[7] HASAN A, ROEH A, LEUCHT S, et al. Add-on spironolactone as antagonist of the NRG1-ERBB4 signaling pathway for the treatment of schizophrenia: Study design and methodology of a multicenter randomized, placebo-controlled trial. Contemp Clin Trials Commun. 2020;17:100537.
[8] LIN E, LIN CH, LANE HY. Logistic ridge regression to predict bipolar disorder using mRNA expression levels in the N-methyl-D-aspartate receptor genes. J Affect Disord. 2022;297:309-313.
[9] WANG M, GAO H, LI W, et al. Icariin and its metabolites regulate lipid metabolism: From effects to molecular mechanisms. Biomed Pharmacother. 2020;131:110675.
[10] 路宇仁，陈昳冰，崔元璐，等. 淫羊藿苷药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018,24(17):209-220.
[11] 陈静，高瑜，夏海建，等. 淫羊藿苷调节大鼠脑内 N- 甲基 -D- 天冬氨酸受体分子机制研究 [J]. 中国药业，2020,29(11):18-21.
[12] WANG S, MA J, ZENG Y, et al. Icariin, an up-and-coming bioactive compound against neurological diseases: network pharmacology-based study and literature review. Drug Des Devel Ther. 2021;15:3619-3641.
[13] ZHOU D, LV D, WANG Z, et al. GLYX-13 ameliorates schizophrenia-like phenotype induced by MK-801 in mice: role of hippocampal NR2B and DISC1. Front Mol Neurosci. 2018;11:121.
[14] 万争艳，李宁，向玲玲，等. 精神分裂症模型大鼠前额叶皮质 PKA 和内皮细胞趋化因子 -5 的表达变化 [J]. 中国比较医学杂志，2019,29(10):92-97.
[15] JAARO-PELED H, SAWA A. Neurodevelopmental factors in schizophrenia. Psychiatr Clin North Am. 2020,43(2):263-274.
[16] PARK HJ, CHOI I, LEEM KH. Decreased brain pH and pathophysiology in schizophrenia. Int J Mol Sci. 2021;22(16):8358.
[17] MATSUDA Y, MAKINODAN M, MORIMOTO T, et al. Neural changes following cognitive remediation therapy for schizophrenia. Psychiatry Clin Neurosci. 2019; 73(11):676-684.
[18] WRIGHT AC, BROWNE J, SKIEST H, et al. The relationship between conventional clinical assessments and momentary assessments of symptoms and functioning in schizophrenia spectrum disorders: A systematic review. Schizophr Res. 2021; 232(13):11-27.
[19] HE C, WANG Z, SHI J. Pharmacological effects of icariin. Adv Pharmacol. 2020;87: 179-203.
[20] 陈溪，谷洪顺，张兰，等. 淫羊藿苷对 MK-801 致精神分裂症小鼠模型的影响 [J]. 中国康复理论与实践，2016,22(4):395-398.
[21] 刘运琴，刘燕芹，戢汉斌，等. 淫羊藿苷对精神分裂症模型大鼠认知功能的改善作用及机制 [J]. 中国药房，2021,32(7):812-818.
[22] WINSHIP IR, DURSUN SM, BAKER GB, et al. An overview of animal models related to schizophrenia. Can J Psychiatry. 2020;64(1):5-17.
[23] 陈溪，马登磊，李林. 淫羊藿苷对 cuprizone 诱导精神分裂症样小鼠模型行为学变化，髓鞘脱失及神经炎性反应的影响 [J]. 首都医科大学学报，2021, 42(5):761-767.
[24] KÖŞGER F, YİĞİTASLAN S, EŞSİZOĞLU A, et al. Inflammation and oxidative stress in deficit schizophrenia. Noro Psikiyatr Ars. 2020;57(4):303-307.
[25] UPTHEGGROVE R, KHANDAKER GM. Cytokines, oxidative stress and cellular markers of inflammation in schizophrenia. Curr Top Behav Neurosci. 2020;44: 49-66.
[26] PRESTWOOD TR, ASGARIROOZBEHANI R, WU S, et al. Roles of inflammation in intrinsic pathophysiology and antipsychotic drug-induced metabolic disturbances of schizophrenia. Behav Brain Res. 2021;402:113101.
[27] CJIEN YL, HWU HG, HANG TJ, et al. Clinical implications of oxidative stress in schizophrenia: Acute relapse and chronic stable phase. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2020;99:109868.
[28] 范瑜，吴嘉，林静. 集体心理干预对精神分裂症患者氧化应激、细胞凋亡及炎症反应的影响 [J]. 海南医学院学报，2017,23(16):2299-2302.
[29] JING X, DU T, CHEN K, et al. Icariin protects against iron overload-induced bone loss via suppressing oxidative stress. J Cell Physiol. 2019;234(7):10123-10137.
[30] WANG P, MENG Q, WANG W, et al. Icariin inhibits the inflammation through down-regulating NF-κB/HIF-2α signal pathways in chondrocytes. Biosci Rep. 2020;40(11):BR20203107.
[31] RAJASEKARAN A, SHIVAKUMAR V, KALMAADY SV, et al. Impact of NRG1 HapICE gene variants on digit ratio and dermatoglyphic measures in schizophrenia. Asian J Psychiatry. 2020;54:102363.
[32] LI C, TAO H, YANG X, et al. Assessment of a combination of serum proteins as potential biomarkers to clinically predict Schizophrenia. Int J Med Sci. 2018;15(9): 900-906.
[33] ZHANG Z, LI Y, HE F, et al. Sex differences in circulating neuregulin1-beta1 and beta-secretase 1 expression in childhood-onset schizophrenia. Compr Psychiatry. 2020;100:152176.
[34] ZIEBA J, MPRRIS MJ, WEICKERT CS, et al. Behavioural effects of high fat diet in adult Nrg1 type III transgenic mice. Behav Brain Res. 2020;377:112217.
[35] JAHN K, HEESE A, KEBIR O, et al. Differential methylation pattern of schizophrenia candidate genes in tetrahydrocannabinol-consuming treatment-resistant schizophrenic patients compared to non-consumer patients and healthy controls. Neuropsychobiology. 2021;80(1):36-44.
[36] XIE R, HONG S, YE Y, et al. Ketamine affects the expression of ErbB4 in the hippocampus and prefrontal cortex of rats. J Mol Neuroscie. 2020;70(6):962-967.
[37] SKIRZEWSKI M, CRONIN ME, MURPHY R, et al. ErbB4 null mice display altered mesocorticolimbic and nigrostriatal dopamine Levels, as well as deficits in cognitive and motivational behaviors. eNeuro. 2020;7(3):ENEURO.0395-19.2020.
[38] YANG JZ, KANG CY, WU C, et al. Pharmacogenetic associations of NRG1 polymorphisms with neurocognitive performance and clinical symptom response to risperidone in the untreated schizophrenia. Schizophr Res. 2021;231(1-3):67-69.
[39] ZHANG C, NI P, LIU Y, et al. GABAergic abnormalities associated with sensorimotor corticostriatal community structural deficits in ErbB4 knockout mice and first-episode treatment-naive patients with schizophrenia. Neurosci Bull. 2020;36(2): 97-109.
[40] DABBAH-ASSADI F, ALON D, GOLANI I, et al. The influence of immune activation at early vs late gestation on fetal NRG1-ErbB4 expression and behavior in juvenile and adult mice offspring. Brain Behav Immun. 2019;79:207-215.

（责任编辑：GW，ZN，ZJP）