

α -葎草烯调控 NRG1/ErbB4 信号通路改善精神分裂症研究

陈 杰, 陈 策, 刘立滢, 戴伯坚, 金晓庄, 汤锦磊, 邓江南

温州市第七人民医院, 浙江 温州 325000

摘 要: **目的** 探讨 α -葎草烯对小鼠精神分裂症的作用机制。**方法** 采用地卓西平马来酸盐 (MK801) 建立精神分裂症小鼠模型, 用不同浓度 α -葎草烯进行 ig 给药。对各组小鼠进行旷场试验和前脉冲抑制 (PPI) 测试, 评估小鼠自发活动量和感觉运动门控功能; 检测小鼠额前脑组织 NO 活性、MDA 含量; Western blotting 法检测小鼠海马组织 NRG1、ErbB4 蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠的活动量明显增加, PPI 受损 ($P < 0.01$); 脑内 NO 活性、MDA 含量、NRG1、ErbB4 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 不同浓度 α -葎草烯组中小鼠活动量明显降低, PPI 异常明显改善, NO 和 MDA 含量、NRG1 和 ErbB4 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** α -葎草烯通过下调 NRG1/ErbB4 信号通路, 改善精神分裂症小鼠异常行为, 从而达到治疗精神分裂症的目的。

关键词: α -葎草烯; 地卓西平马来酸盐 (MK801); 精神分裂症; NRG1/ErbB4 信号通路; NO

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)23-5790-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.021

α -humulene improves schizophrenia via NRG1/ErbB4 signaling pathway

CHEN Jie, CHEN Ce, LIU Li-ying, DAI Bo-jian, JIN Xiao-zhuang, TANG Jin-lei, DENG Jiang-nan

Wenzhou Municipal 7th People's Hospital, Wenzhou 325000, China

Abstract: **Objective** To study the treating mechanism of α -humulene on the schizophrenic mice. **Methods** The schizophrenic models were established by dizocilpine maleate (MK801), then different concentrations of α -humulene were used to treat the mice by intragastric administration. Open-field experiment and PPI test were carried out to evaluate the spontaneous activity and sensorimotor gating function of mice. Moreover, the frontal cortex MDA, NO levels and hippocampal NRG1, ErbB4 protein expression was detected. **Results** The spontaneous activity, sensorimotor gating function, MDA, NO, NRG1 and ErbB4 levels were significantly changed in model mice when compared with normal mice ($P < 0.01$). Compared with model group, different concentrations of α -humulene notably inhibited spontaneous activity, improved PPI value, increased NO and MDA content, down-regulated ErbB4 and NRG1 protein expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** The schizophrenia abnormal behavior of mice was improved by α -humulene via down-regulating NRG1/ErbB4 signaling pathway, so as to achieve the purpose of treating schizophrenia.

Key words: α -humulene; dizocilpine maleate (MK801); schizophrenia; NRG1/ErbB4 signaling pathway; NO

精神分裂症是临床上较为常见的、严重的精神疾病, 其终身患病率占总人口的 1%, 不仅严重影响患者生活质量, 而且给家庭与社会造成沉重负担^[1]。精神分裂症常以思维、情感及行为障碍为主要表现, 以精神活动与社会现实严重脱离为主要特征, 通常是由生物、心理和社会环境及其相互作用而导致的大脑功能损害^[2-3]。对于精神分裂症的发病机制尚未完全清晰, 目前大多认为谷氨酸-多巴胺 (Glu-DA) 神经递质系统功能障碍在其发病过程中占据重要作用^[4]。临床常用多巴胺 D2 受体阻断剂进行治疗, 但

可引起锥体外症候群或代谢症候群等不良反应^[5]。

中医认为精神分裂症属“癫狂”“痴呆”“郁症”等范畴, 多表现于沉默痴呆、忧郁寡欢、喜静勿动、语无伦次等, 其病机为气滞痰凝。而中药石菖蒲始载于《神农本草经》, 是天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott. 的干燥根茎, 具有开窍豁痰、醒神益智、化湿开胃等功效, 临床常用于神昏癫痫、健忘失眠及噤口下痢等的治疗^[6], 是治疗精神分裂症方剂中的最常用药物^[7]。现代药理研究揭示, α -葎草烯为石菖蒲挥发油中重要成分^[8], 具有抗菌、

收稿日期: 2019-08-14

作者简介: 陈 杰, 男, 重症精神科副主任医师, 主要研究方向为精神病学。Tel: 13626585001 E-mail: 506639057@qq.com

抗炎^[9-10]等关键活性,但其是否为石菖蒲治疗精神分裂症的起效成分尚不清楚。因此本研究以地卓西平马来酸盐(MK801)诱导的精神分裂症小鼠为模型,观察 α -葎草烯在干预过程中的作用及机制,为精神分裂症的临床治疗寻找新策略,并为石菖蒲的临床疗效提供科学数据。

1 材料

1.1 实验动物

雄性昆明小鼠(SPF级)50只,体质量18~22g,购于上海斯莱克实验动物有限公司,动物许可证号SCXK(沪)2012-0002。所有小鼠均在动物房适应性喂养3d,自由饮水、进食,保持温度20~25℃、湿度50%~60%及12h昼夜节律。

1.2 试剂与仪器

MK801(批号022M4616V),购自美国Sigma公司;利培酮片(生产批号20160517),购自江苏恩华药业股份有限公司; α -葎草烯(质量分数 $\geq 98\%$,批号B29274)购自上海源叶生物科技有限公司;一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)试剂盒,购自南京建成生物工程研究所;BCA试剂盒、RIPA裂解液、TBS及10%十二烷基硫酸钠(SDS),购自康为世纪生物科技有限公司;NRG1、ErbB4及 β -Tubulin抗体,购自美国abcam公司;ECL试剂盒,购自上海碧云天生物技术有限公司;SDS-PAGE电泳系统(PowerPac TMHC),购自美国Bio-Rad公司;全自动化学发光成像系统(5200 Multi),购自上海天能科技有限公司;旷场红外追踪系统(Tru Scan 2.0),美国Coulbourn Instruments公司;震惊反射系统(SR-LAB),美国San Diego公司。

2 方法

2.1 分组、给药及模型制备^[11]

取健康小鼠,每日ip MK801(0.36 mg/kg),连续14d,造模。取造模成功小鼠随机分为模型组、利培酮(阳性对照,1.21 mg/kg)组及 α -葎草烯低、高剂量(25、50 mg/kg)组,另取健康小鼠为对照组,每组10只。各组小鼠每天ig给予相应剂量药物,对照组与模型组小鼠ig等量生理盐水,连续28d。

2.2 小鼠旷场实验和前脉冲抑制(PPI)测试

将各组小鼠逐只放入旷场测试箱(42 cm×42 cm×30 cm),记录210 min内自发活动,并分析小鼠活动总路程与中央区活动总路程。随后将小鼠置入PPI测试箱,每隔15s随机给予5种不同脉冲刺激

条件(70 dB、120 dB、74 dB+120 dB、78 dB+120 dB、84 dB+120 dB),各脉冲刺激重复累计8次。

$PPI = (\text{惊吓脉冲刺激的反应幅度} - \text{前脉冲联合惊吓脉冲刺激的反应幅度}) / \text{惊吓脉冲刺激的反应幅度}$

2.3 额前脑组织 NO 及 MDA 水平测定

取小鼠额前脑组织,加入PBS溶液进行研磨、反复冻融及离心(12 000 r/min),取上清液并于-20℃保存。实验进行时根据试剂盒说明书进行操作。

2.4 Western blotting 法检测海马组织 NRG1 及 ErbB4 蛋白表达

将下丘脑组织进行低温裂解,经离心(12 000 r/min)后取其上清液,根据BCA试剂盒检测其蛋白质量浓度。将蛋白样本处理后采用SDS-PAGE进行电泳,随后转膜、封闭、孵育一抗及二抗,滴加ECL底物发光,采用凝胶图像处理系统进行灰度值扫描与分析,实验重复3次。

2.5 数据统计

采用SPSS 19.0软件统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数采用单因素方差分析,组间两两比较用LSD检验。

3 结果

3.1 α -葎草烯对精神分裂症小鼠旷场运动量的影响

旷场实验发现,与对照组比较,模型组小鼠的运动总距离、中央区运动总距离均显著升高($P < 0.01$);而与模型组比较, α -葎草烯低剂量(25 mg/kg)组、 α -葎草烯高剂量(50 mg/kg)组及利培酮组小鼠的运动总距离、中央区运动总距离均明显减少($P < 0.05$ 、0.01)。其中以高剂量 α -葎草烯及利培酮的改善作用较为明显。结果见表1。

表1 α -葎草烯对精神分裂症小鼠旷场活动量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of α -humulene on open field behavior of schizophrenic mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	运动总距离/cm	中央区总距离/cm
对照	—	23 634.1±3 607.0	3 523.3±572.2
模型	—	59 150.7±7 747.5 ^{###}	6 855.8±417.1 ^{###}
α -葎草烯	25	43 748.2±5 412.6*	5 602.4±954.3*
	50	32 756.8±4 529.9**	4 505.3±653.4**
利培酮	1.21	32 320.7±3 798.3**	4 602.4±661.0**

与对照组比较: ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下表同

^{###} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as following tables

3.2 α -葎草烯对精神分裂症小鼠 PPI 的影响

PPI 实验发现, 74 dB 前脉冲刺激、120 dB 惊吓脉冲刺激对各组小鼠 PPI 值无明显影响。78 dB、84 dB 的前脉冲刺激测试后, 与对照组比较, 模型组小鼠的 PPI 值均显著降低 ($P < 0.01$); 而与模型组比较, α -葎草烯低剂量 (25 mg/kg) 组、 α -葎草烯高剂量 (50 mg/kg) 组及利培酮组小鼠的 PPI 值均明显增加 ($P < 0.05$ 、0.01)。其中以 α -葎草烯高剂量及利培酮的改善作用较为明显。结果见表 2。

表 2 α -葎草烯对精神分裂症小鼠 PPI 值的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effects of α -humulene on PPI of schizophrenic mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PPI/%			
		74 dB	78 dB	84 dB	120 dB
对照	—	18.3±2.1	35.4±3.5	42.9±6.3	93.2±10.5
模型	—	19.5±3.2	14.5±2.1 ^{##}	15.4±2.8 ^{##}	101.6±8.6
α -葎草烯	25	18.7±2.5	18.9±1.3 [*]	24.0±4.5 [*]	96.7±8.4
	50	20.1±2.1	32.3±3.5 ^{**}	31.9±4.1 ^{**}	89.5±10.6
利培酮	1.21	19.0±1.3	28.3±1.3 ^{**}	29.3±3.2 ^{**}	95.8±9.7

表 3 α -葎草烯对小鼠额前脑组织中 MDA 及 NO 分泌水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effects of α -humulene on frontal cortex MDA and NO levels of schizophrenic mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	NO/(μ mol·mg ⁻¹)
对照	—	1.05±0.11	2.24±0.38
模型	—	2.67±0.26 ^{##}	4.52±0.45 ^{##}
α -葎草烯	25	2.13±0.09 [*]	3.04±0.44 [*]
	50	1.30±0.09 ^{**}	2.76±0.47 ^{**}
利培酮	1.21	1.41±0.07 ^{**}	2.97±0.54 [*]

3.4 α -葎草烯对精神分裂症小鼠下丘脑中 NRG1 及 ErbB4 蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, 模型组小鼠下丘脑中 NRG1 及 ErbB4 蛋白的表达水平增高, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。给予 α -葎草烯低剂量 (25 mg/kg)、 α -葎草烯高剂量 (50 mg/kg) 及利培酮后, 小鼠下丘脑中 NRG1 及 ErbB4 蛋白表达水平下降, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。在抑制 NRG1 及 ErbB4 蛋白表达方面, 均以 α -葎草烯高剂量及利培酮的作用较强。结果见图 1。

4 讨论

精神分裂症发病机制主要包括多巴胺、神经发

3.3 α -葎草烯对精神分裂症小鼠额前脑组织中 MDA 及 NO 水平的影响

模型组小鼠额前脑组织中 MDA 及 NO 水平增加, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。而 α -葎草烯低剂量 (25 mg/kg)、 α -葎草烯高剂量 (50 mg/kg) 及利培酮给药后, 小鼠额前脑组织中 MDA 及 NO 的分泌减少, 与模型组比较差异明显 ($P < 0.05$ 、0.01)。在降低 MDA 方面, 以 α -葎草烯高剂量及利培酮的作用较佳; 在降低 NO 方面, 则以 α -葎草烯高剂量的作用较强, 结果见表 3。

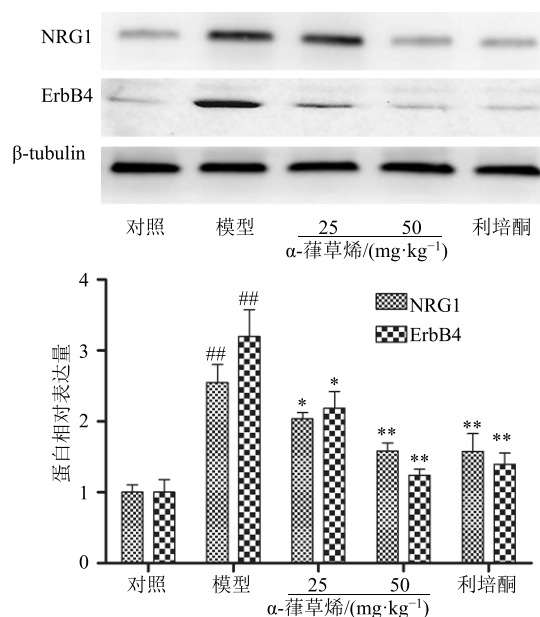


图 1 α -葎草烯对小鼠下丘脑中 NRG1 及 ErbB4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effects of α -humulene on hypothalamus NRG1 and ErbB4 levels of schizophrenic mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

育及谷氨酸三大假说, 其中谷氨酸假说在其中占据重要角色, 谷氨酸受体功能障碍是重要的发病机制^[5,12]。NMDA 受体非竞争性拮抗剂 (MK801) 通过下调谷

氨酸受体功能,继而诱发一系列精神分裂症症状,因此常用于精神分裂症动物模型的建立^[13-14]。研究表明,MK801 可致小鼠在旷场实验中出现活动总路程增加的精神分裂症阳性症状,亦可出现中央区(潜在危险区)活动总路程增加的阴性症状,上述症状与精神分裂症患者的行为与环境不协调的特征极其相似^[15],因此采用旷场实验可有效考察药物对精神分裂症状的改善作用。而 PPI 测试代表了前脑神经环路对中脑信息过滤中前脉冲刺激的调控,而 PPI 缺失是精神分裂症患者的常见症状,是感觉运动门控障碍的指标^[16-17],因此采用 PPI 测试亦可反映药物对精神分裂症的改善作用。实验结果表明, α -萆草烯有效减少 MK801 诱导小鼠增加的活动总路程与中央区活动总路程,同时恢复其 PPI 受损。因此, α -萆草烯通过减轻精神分裂症小鼠的阳性症状与阴性症状,消除感觉运动门控功能障碍,发挥其改善精神分裂症的作用。

研究认为,精神分裂症患者额前脑组织中谷氨酸功能障碍,通过纹状体-丘脑-皮质反馈性刺激额前脑,促进谷氨酸释放^[18-19]。而过量的谷氨酸可激活 NO 信号通路及氧化应激,促进 NO 及 MDA 释放,进一步加重谷氨酸神经毒性,谷氨酸神经毒性又可使 NMDA 受体激活增多加剧精神分裂症症状^[20-21]。研究结果发现, α -萆草烯可明显降低额前脑组织中 NO 及 MDA 含量,发挥抗谷氨酸神经毒性作用,防止精神分裂症的加剧。NRG1 作为目前神经科学的研究热点,广泛分布在谷氨酸能神经元的突出囊泡中,通过与其特异性受体 ErbB4 结合从而发挥作用^[22]。研究发现,NGR1-ErbB4 信号通路激活后可干扰谷氨酸神经递质系统,影响轴突髓鞘化,抑制 NMDA 受体功能,最终加剧精神分裂症的发病进程^[23],因此通过调控 NGR1-ErbB4 信号通路可有效改善精神分裂症。实验结果提示, α -萆草烯可有效下调精神分裂症小鼠下丘脑组织中 NGR1、ErbB4 蛋白表达,抑制信号传导,有效发挥其保护作用。

综上所述, α -萆草烯减少模型小鼠额前脑组织中 NO 及 MDA 含量,防止谷氨酸神经毒性,继而发挥抗精神分裂症的作用;同时 α -萆草烯可抑制小鼠下丘脑组织中 NGR1 及 ErbB4 的蛋白表达,亦可发挥抗精神分裂症的作用。旷场测试及 PPI 测试证实 α -萆草烯可改善精神分裂症小鼠的阳性症状与阴性症状,保护感觉运动门控功能。因此推断 α -萆草烯可能是通过下调 NGR1-ErbB4 信号传导继而发挥

其改善精神分裂症的作用。为进一步证实上述推断,未来需在体内、体外实验中进行深入研究。

参考文献

- [1] Weiser M, Davidson M, Noy S. Comments on risk for schizophrenia [J]. *Schizophr Res*, 2005, 79(1): 15-21.
- [2] Alexandra N, Laurent F, Iannis M C, *et al.* Development of the positive emotions program for schizophrenia: An intervention to improve pleasure and motivation in schizophrenia [J]. *Front Psych*, 2016, doi: 10.3389/fpsy.2016.00013.
- [3] Popolo R, Dimaggio G, Luther L, *et al.* Theory of mind in schizophrenia: Associations with clinical and cognitive insight controlling for levels of psychopathology [J]. *J Nerv Ment Dis*, 2016, 204(3): 240-243.
- [4] 朱德晓. MK-801 致幼鼠额叶皮层神经元兴奋性降低和成年后社会交往缺陷的机制研究及帕潘立酮的干预作用 [D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [5] Leucht S, Cipriani A, Spineli L, *et al.* Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: A multiple-treatments meta-analysis [J]. *Lancet*, 2013, 382(9896): 951-962.
- [6] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002.
- [7] 赵艳青, 滕晶. 基于中医传承辅助平台系统精神分裂症的组方用药规律分析 [J]. *中国中医急症*, 2014, 23(11): 1980-1983.
- [8] 杨晓燕, 陈发奎. 菖蒲的化学成分研究概况 [J]. *沈阳药科大学学报*, 1999, 16(1): 71-78.
- [9] Al-Taweel A M, El-Deeb K S, Al-Muhtadi F J. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Kleini odorata* [J]. *Saudi Pharm J*, 2004, 12(1): 47-50.
- [10] Rogerio A P, Andrade E L, Leite D F P, *et al.* Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene α -humulene in experimental airways allergic inflammation [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 158(4): 1074-1087.
- [11] 张燕, 杨春娟, 刘飞虎, 等. 消幻汤合并利培酮对精神分裂症模型小鼠旷场行为的影响 [J]. *中国医药导报*, 2015, 12(21): 8-10.
- [12] 周勇, 黄汉津, 唐建良. 齐拉西酮联用奥氮平对精神分裂症疗效及糖化血红蛋白的影响 [J]. *温州医科大学学报*, 2015, 45(9): 674-678.
- [13] Rung J P, Carlsson A, Katarina Rydén Markinhuhta, *et al.* (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; A model for negative symptoms of schizophrenia [J]. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psych*, 2005, 29(5): 827-832.
- [14] Zofia R, Katarzyna K. The effect of combined treatment

- with escitalopram and risperidone on the MK-801-induced changes in the object recognition test in mice [J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68(1): 116-120.
- [15] 卞士中. NMDA 受体拮抗剂与精神分裂症动物模型 [J]. 法医学杂志, 2009, 25(6): 443-446.
- [16] Geyer M A, Krebs-Thomson K, Braff D L, *et al.* Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: A decade in review [J]. *Psychopharmacology*, 2001, 156(2/3): 117-154.
- [17] Katja L, Geyer M A, Vollenweider F X. Deficits in prepulse inhibition and habituation in never-medicated, first-episode schizophrenia [J]. *Biol Psych*, 2003, 54(2): 121-128.
- [18] 刘 勇, 唐亚梅, 蒲唯丹, 等. MK-801 诱导的精神分裂症发育模型大鼠脑组织 DA, DOPAC, Glu 和 GABA 浓度的变化 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2011, 36(8): 712-719.
- [19] 武春艳, 王祖承, 江三多. 神经营养素-3 基因甘氨酸/谷氨酸多态性与精神分裂症的相互关系 [J]. 中华精神科杂志, 2000, 33(4): 207-209.
- [20] 卢 敏. 褪黑素对谷氨酸钠致病大鼠海马内 5-羟色胺及一氧化氮含量的影响 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2006.
- [21] 赵 瑾. 首发精神分裂症患者外周血氧化应激及认知功能的研究 [D]. 新乡: 新乡医学院, 2016.
- [22] 谌晓燕, 张银辉. 精神分裂症相关基因的研究进展 [J]. 临床检验杂志, 2013, 31(9): 681-682.
- [23] Yin D M, Chen Y J, Lu Y S, *et al.* Reversal of behavioral deficits and synaptic dysfunction in mice overexpressing neuregulin 1 [J]. *Neuron*, 2013, 78(4): 644-657.