论著·神经科学

淫羊藿苷通过调控骨钙素改善AD模型小鼠认知损害及降低相关亢进内分泌激素水平

崔 曼[1],朱其凤[2],方 兴[2],古 联[2],闫 雨[3],方俪霖[4],张明达[5],陈星宇[1] [1]广西中医药大学研究生院,广西南宁;[2]广西中医药大学附属瑞康医院神经内科,广西南宁;[3]合江县中医医院心脑病科,四川泸州;[4]平南县中医院脑病科,广西贵港;[5]广西中医药大学附属瑞康医院空港院区神经内科,广西崇左

[摘要] **目的** 探索淫羊藿苷(icariin,ICA)通过调节骨钙素(osteocalcin,OCN)分泌改善阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)模型小鼠认知损害及影响相关内分泌激素变化情况。**方法** 通过侧脑室注射冈田酸(okadaic acid,OA)制备AD小鼠模型。使用分层设计方法将4周龄,体质量18~22 g的雄性SPF级小鼠分为8组(n=6):野生对照(wild type,WT)组:小鼠60 mg/kg生理盐水灌胃;野生模型(WT-AD)组:WT小鼠+左侧脑室注射1 μL OA;野生加药(WT+ICA)组:每日60 mg/kg ICA;野生模型加药(WT-AD+ICA)组:WT-AD小鼠+每日60 mg/kg ICA。敲除对照($OCN^{-/-}$)组:$OCN^{-/-}$小鼠60 mg/kg生理盐水灌胃;敲除模型($OCN^{-/-}$-AD)组:$OCN^{-/-}$小鼠+左侧脑室注射1 μL OA。敲除加药($OCN^{-/-}$+ICA)组:$OCN^{-/-}$小鼠+每日60 mg/kg ICA;敲除模型加药($OCN^{-/-}$-AD+ICA)组:$OCN^{-/-}$-AD小鼠+每日60 mg/kg ICA。Morris水迷宫实验检测小鼠学习记忆能力,旷场实验评估其焦虑水平;HE染色、镀银染色观察各组小鼠海马组织病理学变化,尼氏染色检测小鼠海马神经元尼氏小体表达情况;免疫组化检测β-淀粉样蛋白(amyloid β-protein,Aβ)、OCN阳性表达,Western blot检测Aβ、OCN的表达水平。ELISA检测促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone,CRH)、葡萄糖(glucose,GLU)、糖皮质激素(glucocorticoid,GC)、皮质醇(cortisol,COR)表达水平。**结果** Morris水迷宫实验结果显示,WT-AD+ICA组与WT-AD组相比,$OCN^{-/-}$-AD+ICA组与$OCN^{-/-}$-AD组相比,小鼠潜伏期缩短和目标象限停留时间延长,穿越平台次数增加(均P<0.05);旷场实验结果显示,WT-AD+ICA与WT-AD组相比,$OCN^{-/-}$-AD+ICA组与$OCN^{-/-}$-AD组相比,小鼠的运动总距离、中央场运动距离及停留时间显著增加,活动意愿增强,周边区域停留时间和运动距离显著降低(均P<0.05);染色结果显示,经ICA干预后的海马病理减轻,海马形态结构趋于正常、神经纤维缠结(neurofibrillary tangles,NFTs)减少、尼氏小体呈逐渐恢复状态,但$OCN^{-/-}$组小鼠仍未恢复到正常水平;免疫组化结果显示,WT-AD+ICA组与WT-AD组相比,$OCN^{-/-}$-AD+ICA组与$OCN^{-/-}$-AD组相比,Aβ水平下降,OCN水平上升(均P<0.05)。Western blot结果显示,WT-AD+ICA组与WT-AD组相比,$OCN^{-/-}$-AD+ICA组与$OCN^{-/-}$-AD组相比,Aβ水平下降,OCN水平上升(均P<0.05)。ELISA结果显示,WT-AD+ICA组与WT-AD组相比,$OCN^{-/-}$-AD+ICA组与$OCN^{-/-}$-AD相比,CRH、GLU、GC、COR水平明显降低(均P<0.05)。**结论** ICA可通过调节OCN分泌改善AD模型小鼠认知损害并降低相关亢进内分泌激素水平。

[关键词] 阿尔茨海默病;淫羊藿苷;骨钙素;神经内分泌

[中图法分类号] R285.5;R335;R745.7 [文献标志码] A

[基金项目] 广西自然科学基金一般项目(2023GXNSFAA026458);国家自然科学基金地区科学基金项目(82260944)

[通信作者] 朱其凤,E-mail:591520062@qq.com

2097-0927/Copyright © 2026,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:崔曼,朱其凤,方兴,等. 淫羊藿苷通过调控骨钙素改善AD模型小鼠认知损害及降低相关亢进内分泌激素水平[J]. 陆军军医大学学报,2026,48(05):551-562. DOI:10.16016/j.2097-0927.202512065.

Citation:CUI M,ZHU Q F,FANG X,*et al*. Icariin ameliorates cognitive impairment and decreases hyperactive endocrine hormone levels in Alzheimer's disease mice by regulating osteocalcin secretion[J]. J Army Med Univ,2026,48(05):551-562. DOI:10.16016/j.2097-0927.202512065.

Icariin ameliorates cognitive impairment and decreases hyperactive endocrine hormone levels in Alzheimer's disease mice by regulating osteocalcin secretion

CUI Man[1], ZHU Qifeng[2], FANG Xing[2], GU Lian[2], YAN Yu[3], FANG Lilin[4], ZHANG Mingda[5], CHEN Xingyu[1]
[1]Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi; [2]Department of Neurology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi; [3]Department of Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases, Hejiang County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Luzhou, Sichuan; [4]Department of Encephalopathy, Pingnan County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guigang, Guangxi; [5]Department of Neurology, Ruikang Hospital Airport Branch, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China

[**Abstract**] Objective To investigate whether icariin (ICA) ameliorates cognitive impairment and modulates relevant endocrine hormone alterations in Alzheimer's disease (AD) model mice by regulating osteocalcin (OCN) secretion. Methods An AD mouse model was established by intraventricular injection of okadaic acid (OA). Using a stratified design, 4-week-old male SPF mice (weighing 18 to 22 g) were randomly divided into 8 groups (n=6): wild-type (WT) control group (intragastric administration of 60 mg/kg normal saline); WT-AD group (WT mice with left intracerebroventricular injection of 1 μL OA); WT+ICA group (60 mg/kg ICA daily); WT-AD+ICA group (WT-AD mice with daily 60 mg/kg ICA); $OCN^{-/-}$ control group ($OCN^{-/-}$ mice with 60 mg/kg normal saline); $OCN^{-/-}$-AD group ($OCN^{-/-}$ mice with left intracerebroventricular injection of 1 μL OA); $OCN^{-/-}$+ICA group ($OCN^{-/-}$ mice with 60 mg/kg ICA daily); and $OCN^{-/-}$-AD+ICA group ($OCN^{-/-}$-AD mice with 60 mg/kg ICA daily). The Morris water maze test was conducted to assess learning and memory abilities, while open field test was performed to evaluate anxiety levels. Hippocampal histopathological changes were observed with HE staining and silver impregnation staining; Nissl bodies in hippocampal neurons were detected with Nissl staining. Immunohistochemistry assay was employed to determine the expression of amyloid β-protein (Aβ) and OCN, and Western blotting was used to measure the protein levels of Aβ and OCN. ELISA was applied to detect the expression levels of corticotropin-releasing hormone (CRH), glucose (GLU), glucocorticoid (GC), and cortisol (COR). Results Morris water maze test demonstrated that compared with the WT-AD group, the WT-AD+ICA group exhibited significantly shortened escape latency, prolonged time spent in the target quadrant, and increased platform crossing frequency (all P<0.05); similarly, the $OCN^{-/-}$-AD+ICA group showed improvements than the $OCN^{-/-}$-AD group (all P<0.05). Open field test results indicated that compared with the WT-AD group, the WT-AD+ICA group displayed significantly increased total exploration distance, distance in the center, and time in the center, enhanced activity willingness, and reduced time in peripheral zone and distance in peripheral zone (all P<0.05); similar improvements were observed in the $OCN^{-/-}$-AD+ICA group compared with the $OCN^{-/-}$-AD group (all P<0.05). Staining results revealed that ICA intervention attenuated hippocampal pathology, restored hippocampal morphological architecture, reduced neurofibrillary tangles (NFTs), and promoted gradual recovery of Nissl bodies; however, the $OCN^{-/-}$ mice failed to achieve complete normalization. Immunohistochemistry assay showed that compared with the WT-AD group, the WT-AD+ICA group exhibited decreased Aβ levels and increased OCN levels (all P<0.05); similar trends were observed in the $OCN^{-/-}$-AD+ICA group relative to the $OCN^{-/-}$-AD group (all P<0.05). Western blotting demonstrated that compared with the WT-AD group, the WT-AD+ICA group showed reduced Aβ expression and elevated OCN expression (both P<0.05); comparable changes were found in the $OCN^{-/-}$-AD+ICA group compared with the $OCN^{-/-}$-AD group (both P<0.05). ELISA indicated that compared with the WT-AD group, the WT-AD+ICA group exhibited significantly decreased levels of CRH, GLU, GC, and COR (all P<0.05); similar reductions were observed in the $OCN^{-/-}$-AD+ICA group compared with the $OCN^{-/-}$-AD group (all P<0.05). Conclusion ICA ameliorates cognitive impairment and reduces levels of related hyperactive endocrine hormones in AD model mice through regulating OCN secretion.

[**Key words**] Alzheimer's disease; icariin; osteocalcin; neuroendocrine

Supported by the General Project of Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2023GXNSFAA026458) and the Regional Science Fund Program of National Natural Science Foundation of China (82260944). Corresponding author: ZHU Qifeng, E-mail: 591520062@qq.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是一种起病隐匿且进行性发展的慢性神经系统退行性疾病,主要表现为记忆、思维、行为和情绪等多方面的异常[1-3]。而AD发病机制复杂,针对其病因的新药研发进展缓慢。研究发现,骨钙素(osteocalcin,OCN)不仅作用于骨骼系统,还可通过骨外内分泌作用对多器官组织发挥调节作用,其中包括对认知功能的调节[4-5],非羧化OCN(undercarboxylated osteocalcin,ucOCN)经生物信号刺激后可由骨分泌入血后通过血脑屏障(blood brain barrier,BBB)参与对中枢神经系统的调控,建立在骨、脑之间的介导应答系统,被称为骨-脑轴[6-8]。

近年文献报道,神经内分泌应激系统的过度激活是AD发病的危险因素之一,下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal,HPA)轴作为维持内环境稳态和应激反应的重要内分泌轴,这种功能紊乱可能会导致大多数动物或人出现行为缺陷和情绪障碍[9]。AD模型小鼠中出现HPA轴的过度激活,这种持续的高水平应激状态,被认为可通过损害海马神经元的代谢、突触可塑性与生存能力等方式直接加剧AD的病理进程[10-11]。

尽管OCN的神经调控作用及其与AD发病相关性的研究取得一定进展,但骨-脑轴的具体调控机制,以及如何通过靶向该通路实现AD防治,尚未得到系统阐明。同时有研究表明骨源性因子作为关键的信号分子,可通过内分泌途径直接或间接调控神经系统的发育、代谢和病理进程[12-14]。近年来中药活性成分如淫羊藿苷(icariin, ICA)[15-16]被发现除了预防骨质疏松症、调节免疫系统外[17],还具有多重神经保护和抗炎作用,并可改善认知障碍,在神经退行性疾病防治领域表现出广阔前景[18]。课题组前期研究也发现ICA能够促进成骨细胞分泌OCN,且与AD的神经递质和神经炎症密切相关[19]。然而,ICA是否通过调节OCN分泌及其相关内分泌通路实现对AD的干预,其作用机制尚缺乏系统的实验验证与探究。

本研究以建立AD动物模型为基础,聚焦ICA对OCN的分泌调控及其神经保护作用机制。深入探讨ICA的神经保护作用及对AD动物模型行为学和病理等改善效果是否依赖于OCN的存在及其神经内分泌激素调节功能,进一步拓展骨源性激素在AD中的作用,并提供骨-脑轴之间的介导应答的新思路,为中药现代化和多靶点药物治疗AD等神经退行性疾病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及伦理审查 实验采用4周龄,体质量18~22 g的雄性SPF级小鼠:野生型C57BL/6J小鼠[购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2024-0001]和OCN基因敲除(*OCN*$^{-/-}$)小鼠[定制于广州赛业百沐生物科技有限公司,许可证号:SCXK(苏)2022-0016]。所有小鼠饲养于广西中医药大学SPF级动物房,在(22±2) ℃恒温、12 h光暗循环条件下适应性喂养1周后开始实验。实验方案经广西中医药大学动物福利伦理委员会批准(DW20240919-206),符合3R原则和伦理要求。

1.1.2 主要实验药物和试剂 冈田酸(okadaic acid, OA)、ICA(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为S30686、A10029);RIPA裂解液、BCA蛋白定量检测试剂盒(武汉赛维尔生物技术有限公司,批号分别为G2002、G2026);异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,批号R510-22);β-淀粉样蛋白(amyloid β-protein, Aβ)(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:25524-1-AP);人工脑脊液(上海源叶生物科技有限公司);ELISA试剂盒(上海凡科维生物公司)。

1.1.3 主要实验器材 Spectramax i3x型酶标仪(美国Molecular Devices公司);Western blot成像系统、电泳仪(美国Bio-Rad公司);Morris水迷宫、旷场实验装置(上海软隆科技发展有限公司,型号分别为:BW-MWM101、ZS-KC);全自动石蜡切片机(德国MICROM公司,型号:HM355S);研究级显微镜(日本OLYMPUS公司,型号:BX-60);多样本组织研磨机(上海净信实业发展有限公司);微量高速离心机(深圳市瑞沃德生命技术有限公司,型号:M1324R);脑立体定位仪(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司,型号:71000-r),麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 脑立体定位仪AD造模 小鼠经过1周的适应性喂养后,参照CHOU等[20]的实验,采用侧脑室注射OA的方法制备AD小鼠模型。麻醉与固定:使用4.5%异氟烷(氧气流速0.8 L/min)诱导麻醉小鼠2 min,随后以1.0%~1.5%异氟烷(氧气流速0.3~0.5 L/min)维持。将小鼠固定于脑立体定位仪上,以耳杆稳定头部。术前准备:剃除颅顶毛发,消毒术野。沿矢状缝切开头皮,暴露并清洁前囟,以此为原点设定三维坐标零点。定位与钻孔:输入侧脑室坐标(AP:0 mm,ML:−0.9 mm,DV:−2.5 mm)。于目标点进行颅骨钻

孔,其间以PBS冷却,避免损伤硬脑膜。药物注射:使用微量注射器,以0.2 μL/min的速率向侧脑室注射OA(200 ng/μL),总注射体积1 μL。注射完毕留针10 min,随后以阶梯式速度缓慢退针。术后处理:缝合切口并消毒。将小鼠置于37 ℃保温垫上复苏,并连续3 d给予青霉素(2.5 U/只/d)肌注抗感染,局部涂抹莫匹罗星软膏。

1.2.2 小鼠分组情况 实验药物剂量60 mg/kg参照WANG等[21-22];使用分层随机方法将小鼠分为8组(n=6):野生对照(wild type,WT)组:小鼠60 mg/kg生理盐水灌胃;野生模型(WT-AD)组:WT小鼠+左侧脑室注射1 μL OA;野生加药(WT+ICA)组:小鼠每日60 mg/kg ICA;野生模型加药(WT-AD+ICA)组:WT-AD小鼠+每日60 mg/kg ICA;敲除对照($OCN^{-/-}$)组:$OCN^{-/-}$小鼠60 mg/kg生理盐水灌胃;敲除模型($OCN^{-/-}$-AD)组:$OCN^{-/-}$小鼠+左侧脑室注射1 μL OA;敲除加药($OCN^{-/-}$+ICA)组:$OCN^{-/-}$小鼠+每日60 mg/kg ICA;敲除模型加药($OCN^{-/-}$-AD+ICA)组:$OCN^{-/-}$-AD小鼠+每日60 mg/kg ICA。手术后第3天开始,每天在相同时间对小鼠进行灌胃操作,持续30 d。每天观察并记录小鼠的相关情况。

1.2.3 行为学测试评估小鼠空间学习记忆能力及焦虑状态 Morris水迷宫评估小鼠空间学习记忆能力:水池恒温(25±1)℃,第Ⅳ象限设隐蔽平台。经过1 d的适应性训练后,进行连续5 d的导航测试(记录逃避潜伏期),在第6天进行空间探索测试(记录原平台穿越次数、目标象限停留时间)。

旷场实验评估自发活动与焦虑状态:于暗光环境下将小鼠置于120 cm×120 cm×60 cm箱体中央,在测试者未知晓分组的情况下记录小鼠5 min内的自由探索行为与运动轨迹。

1.2.4 病理样本采集 采用异氟烷吸入麻醉法对小鼠进行深度麻醉。通过麻醉箱持续通入异氟烷(氧气流速2~3 L/min,异氟烷浓度3%~5%,进行眼球采血0.3~0.6 mL,采血完成后实验动物安乐死,在冰盒内快速剪开小鼠颅骨,取出完整脑组织。在冰盒内保持低温环境,参照小鼠脑图谱,使用无菌解剖工具精准分离右半脑组织的前额叶皮层与海马体,剔除周围无关脑组织(如小脑、脑干等)。

1.2.5 HE染色观察小鼠海马结构变化 取小鼠海马组织,固定后,常规石蜡包埋,脑组织石蜡块沿冠状面进行6 μm切片,切片放入二甲苯中脱蜡,系列乙醇复水,蒸馏水浸泡。苏木素染液染色10 min。分化液分化后用超纯水浸洗,滴加伊红染液后倾去多余染色液后快速脱水、二甲苯透明、中性树胶封固。镜下观察。

1.2.6 尼氏染色评估神经元损伤 取小鼠海马组织,固定于4%多聚甲醛固定液中,常规脱水包埋,切片厚度6 μm,石蜡切片常规脱蜡至水,将切片置于尼氏染色液(甲苯胺蓝法)中,于50 ℃温箱浸染30 min,蒸馏水微微冲洗,95%乙醇迅速分化,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。封片后使用显微镜拍摄图像。

1.2.7 镀银染色检测小鼠神经元 取小鼠海马组织,用4%多聚甲醛固定后,常规石蜡包埋,切成10 μm石蜡切片,将切片转移至预热的甘氨酸银染液B(37 ℃)中,浸染3~5 min。迅速甩去B液,立即将切片置入预热的甘氨酸银染液A(45 ℃)中。密切观察至组织呈棕黄色时,迅速取出。甩去残液,立即转入新鲜的甘氨酸银染液A(45 ℃)中,再次还原数秒。迅速取出切片,用蒸馏水充分洗涤以终止反应。切片依次经无水乙醇脱水(3次,每次5 min)、二甲苯透明(2次,每次5 min)。用中性树胶封固,显微镜下观察。

1.2.8 免疫组化检测小鼠Aβ、OCN表达 取小鼠海马组织,以4 %多聚甲醛溶液于4 ℃下固定过夜。随后按说明书依次进行脱水、透明、石蜡包埋及切片。切片经脱蜡至水进行封闭后,分别滴加特异性一抗(Aβ、OCN)于切片上,于湿盒内4 ℃孵育过夜。PBS充分漂洗后,滴加相应荧光二抗,室温避光孵育。再次漂洗后,使用含DAPI的封片剂进行封片,并于荧光显微镜下观察、采集图像。

1.2.9 Western blot检测小鼠Aβ、OCN蛋白表达 取小鼠海马组织,使用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液提取蛋白,BCA法测定蛋白浓度。制备SDS-PAGE凝胶(分离胶与5%浓缩胶),150 V电泳30 min。转膜采用400 mA恒流22 min将蛋白转移至PVDF膜。快速封闭液封闭后,分别与一抗(4 ℃过夜)及标记二抗(室温摇床2 h)孵育。ECL显色后,Image J软件分析条带灰度值,以GAPDH为内参计算目的蛋白相对表达量。

1.2.10 ELISA测定激素表达水平 取小鼠外周血的血清按ELISA试剂盒说明书进行实验操作,检测各组小鼠促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone,CRH)、葡萄糖(glucose,GLU)、糖皮质激素(glucocorticoid,GC)、皮质醇(cortisol,COR)表达水平。

1.3 统计学分析

数据经由GraphPad prism 9.5.0版进行处理,结果以$\bar{x}\pm s$的形式呈现。对于组间差异的比较,采用单因素方差分析。当P<0.05时,差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　ICA通过调控OCN改善AD小鼠空间学习和记忆能力

Morris水迷宫实验和空间探索结果显示,随着训练时间增加,各组的逃避潜伏期均逐渐缩短。与WT组相比,WT-AD组和$OCN^{-/-}$组的小鼠逃避潜伏期延长、穿越平台次数显著减少(P<0.05),WT+ICA组的小鼠逃避潜伏期显著缩短,穿越平台次数显著增加(P<0.05)。与$OCN^{-/-}$组相比,$OCN^{-/-}$-AD组的小鼠逃避潜伏期延长、穿越平台次数显著减少(P<0.05),$OCN^{-/-}$+ICA组的小鼠逃避潜伏期缩短、穿越平台次数显著增加(P<0.05)。见表1、图1。

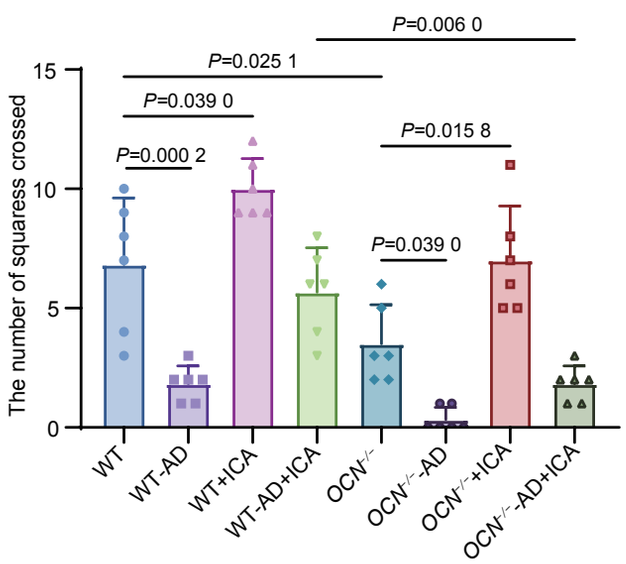


图1　各组小鼠穿越平台次数比较(n=6)

Figure 1　Comparison of platform crossing frequency among mouse groups (n=6)

2.2　ICA通过调控OCN缓解AD小鼠焦虑状态

旷场实验结果显示,与WT组相比,WT-AD组和$OCN^{-/-}$组小鼠的运动总距离、中央区运动距离及停留时间显著缩短,周边区域停留时间和运动距离则显著增加(P<0.05),WT+ICA组小鼠的运动总距离、中央区运动距离及停留时间显著增加,周边区域停留时间和运动距离显著降低(P<0.05)。与$OCN^{-/-}$组相比,$OCN^{-/-}$-AD组小鼠的运动总距离、中央区运动距离及停留时间进一步缩短,周边区域停留时间和运动距离显著增加(P<0.05),$OCN^{-/-}$+ICA组小鼠的运动总距离、中央区运动距离及停留时间显著增加,周边区域停留时间和运动距离显著降低显著降低(P<0.05)。与$OCN^{-/-}$-AD组相比,$OCN^{-/-}$-AD+ICA组小鼠的运动总距离、中央区运动距离及停留时间显著增加,周边区域停留时间和运动距离显著降低(P<0.05)。见表2。

2.3　ICA通过调控OCN改善AD小鼠海马病理结构

HE染色结果显示,WT组小鼠海马CA1与CA3区结构完整,细胞层次清晰、排列紧密,胞核形态正常。与WT组相比,WT-AD组和$OCN^{-/-}$组海马组织呈现典型病理改变,包括海马体积缩小、CA1与CA3区厚度变薄、结构排列紊乱,并伴有显著神经元丢失现象。$OCN^{-/-}$-AD组较$OCN^{-/-}$组亦呈现相似病理加重趋势,表明AD造模成功诱导了海马结构损伤。WT-AD+ICA组与WT-AD组相比、$OCN^{-/-}$-AD+ICA组与$OCN^{-/-}$-AD组相比,海马病理表现均显著改善,具体表现为正常的神经细胞排列有所恢复,细胞存活率提高。见图2。

2.4　ICA通过调控OCN减少AD小鼠神经纤维缠结

镀银染色结果显示,WT组小鼠CA1、CA3区及齿状回结构完整,神经元排列紧密、整齐、形态正常。与WT组相比,WT-AD组神经元排列散乱,可见大量神经纤维缠结(neurofibrillary tangles,NFTs)。$OCN^{-/-}$组本身

表1　各组小鼠逃避潜伏期比较(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Table 1　Comparison of escape latency across the groups of mice (n=6,$\bar{x}\pm s$)

Group	Day 1/s	Day 2/s	Day 3/s	Day 4/s	Day 5/s
WT	27.59±10.62	18.92±1.84	13.16±5.24	12.54±3.22	8.95±2.11
WT-AD	43.09±3.07^{a}	32.75±3.43^{a}	26.30±5.62^{a}	26.28±6.23^{a}	16.41±1.95^{a}
WT+ICA	10.35±1.98^{a}	6.94±1.64^{a}	5.90±1.15^{a}	3.74±1.12^{a}	3.11±0.86^{a}
WT-AD+ICA	31.62±9.39^{b}	22.90±5.15^{b}	18.98±5.54^{b}	13.21±3.92^{b}	9.30±1.00^{b}
$OCN^{-/-}$	46.08±1.46^{a}	34.55±5.64^{a}	27.35±3.11^{a}	23.30±3.90^{a}	15.07±5.67^{a}
$OCN^{-/-}$-AD	57.98±7.81^{c}	49.57±1.15^{c}	40.84±3.20^{c}	33.46±8.22^{c}	20.98±4.70^{c}
$OCN^{-/-}$+ICA	33.73±2.94^{c}	26.09±4.15^{c}	18.25±2.46^{c}	14.58±2.37^{c}	8.89±3.07^{c}
$OCN^{-/-}$-AD+ICA	53.53±1.51^{de}	38.24±6.08^{de}	37.98±1.70^{de}	24.20±2.68^{de}	15.59±1.59^{de}

a: P<0.05, compared to the WT group; b: P<0.05, compared to the WT-AD group; c: P<0.05, compared to the $OCN^{-/-}$group; d: P<0.05, compared to the $OCN^{-/-}$-AD group; e: P<0.05, compared to the WT-AD+ICA group

表2 各组小鼠旷场实验结果比较(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Table 2 Intergroup differences in behavioral performance in the open field test(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Group	Total exploration distance/m	Distance in center/m	Time in center/s	Proportion of time in center/%	Time in peripheral zone/s	Distance in perpheral zone/m
WT	20.70±5.16	13.43±0.96	67.81±1.57	22.60±1.57	108.90±17.44	8.50±1.29
WT-AD	6.28±2.58[a]	1.65±0.48[a]	13.12±1.56[a]	4.30±1.56[a]	207.30±43.74[a]	13.99±4.22[a]
WT+ICA	27.80±7.12[a]	16.88±0.47[a]	83.88±3.50[a]	27.60±3.50[a]	59.93±14.32[a]	2.54±0.91[a]
WT-AD+ICA	18.96±2.13[b]	7.88±0.58[b]	54.93±4.29[b]	18.30±4.28[b]	137.57±16.91[b]	4.29±1.35[b]
OCN$^{-/-}$	10.90±3.39[a]	2.51±0.49[a]	22.57±2.96[a]	7.50±2.96[a]	206.18±23.87[a]	15.08±3.48[a]
OCN$^{-/-}$-AD	3.20±0.74[c]	0.80±1.90[c]	4.25±0.81[c]	1.41±0.81[c]	268.12±20.21[c]	20.86±2.69[c]
OCN$^{-/-}$+ICA	18.60±1.87[c]	4.03±0.63[c]	35.33±1.60[c]	11.80±1.60[c]	153.45±32.16[c]	6.45±2.14[c]
OCN$^{-/-}$-AD+ICA	11.58±3.25[de]	2.56±0.63[de]	15.83±0.63[de]	5.30±0.63[de]	187.78±28.56[de]	11.16±4.48[de]

a:P<0.05, compared to the WT group; b:P<0.05, compared to the WT-AD group; c: P<0.05, compared to the *OCN*$^{-/-}$ group; d:P<0.05, compared to the *OCN*$^{-/-}$-AD group; e:P<0.05, compared to the WT-AD+ICA group

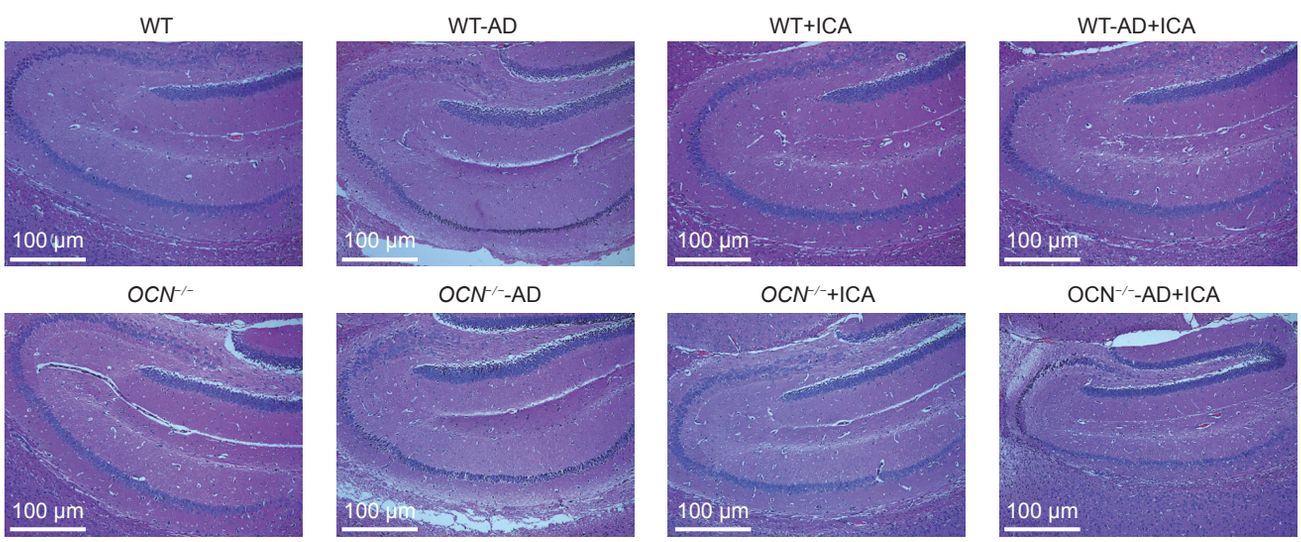


图2 小鼠海马HE染色结果

Figure 2 HE staining results of mouse hippocampus

即存在结构异常,表现为神经元内NFTs异常。*OCN*$^{-/-}$-AD组小鼠的上述病理改变进一步加剧,NFTs数量增加,提示OCN缺少可加重AD相关神经纤维缠结。WT-AD+ICA组中表现出显著修复作用,海马内小鼠NFTs数量减少、神经纤维趋于排列整齐,但在*OCN*$^{-/-}$-AD+ICA组中,NFTs的数量仍高于WT-AD+ICA组。见图3、表3。

2.5 ICA通过调控OCN降低AD小鼠神经元损伤

尼氏染色结果显示,WT组小鼠海马神经元结构正常,尼氏小体丰富、分布均匀。WT-AD组与WT组相比,出现神经元损伤,尼氏小体减少,伴溶解、排列紊乱及细胞核明显固缩。*OCN*$^{-/-}$组神经元出现尼氏小体分布紊乱与轻微结构异常。*OCN*$^{-/-}$-AD组损伤最为严重,呈现广泛尼氏小体缺失、神经元严重破坏。WT-AD+ICA组与WT-AD组相比,尼式小体数量、结构均有所恢复。*OCN*$^{-/-}$-AD+ICA组与*OCN*$^{-/-}$-AD组相比,损伤减轻,表现为神经元排列缓解、尼氏小体数量部分恢复。*OCN*$^{-/-}$-AD组较*OCN*$^{-/-}$组虽有所改善,仍未能恢复至正常水平。见图4、表3。

2.6 ICA通过调控OCN增加AD小鼠OCN阳性表达

免疫组化结果显示,WT组海马各区可见清晰的OCN蛋白阳性。与WT组相比,WT-AD组OCN蛋白表达显著降低。*OCN*$^{-/-}$组OCN蛋白表达极低,仅见零星背景染色,符合基因敲除表型。WT-AD+ICA组与WT-AD组相比,OCN蛋白表达较明显回升。*OCN*$^{-/-}$-AD+ICA组与*OCN*$^{-/-}$-AD组相比,OCN蛋白表达亦有所恢

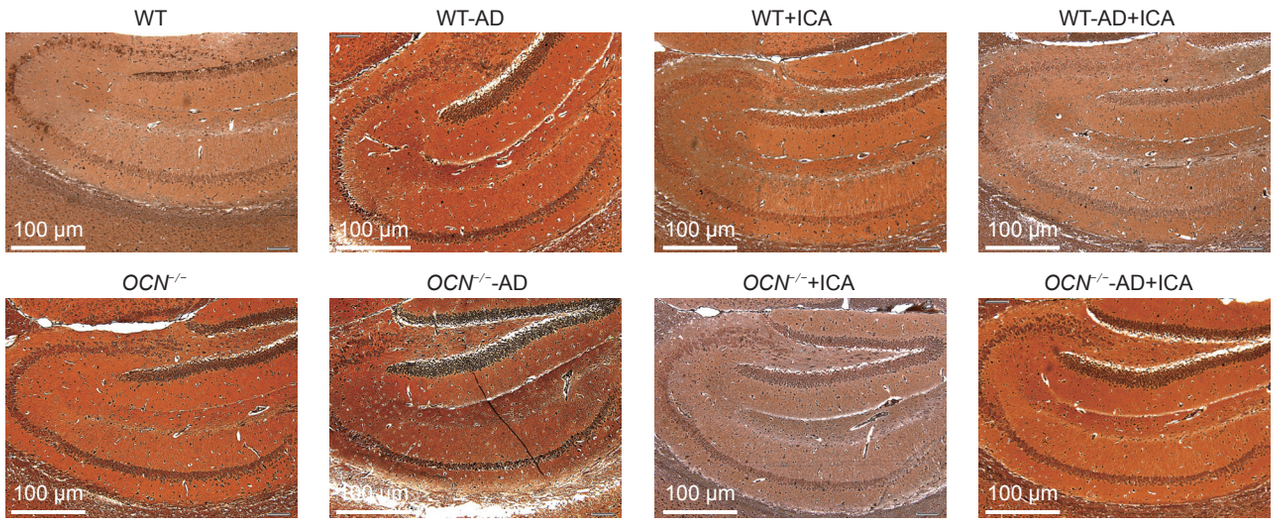


图3　小鼠海马镀银染色结果

Figure 3　Silver impregnation staining of the mouse hippocampus

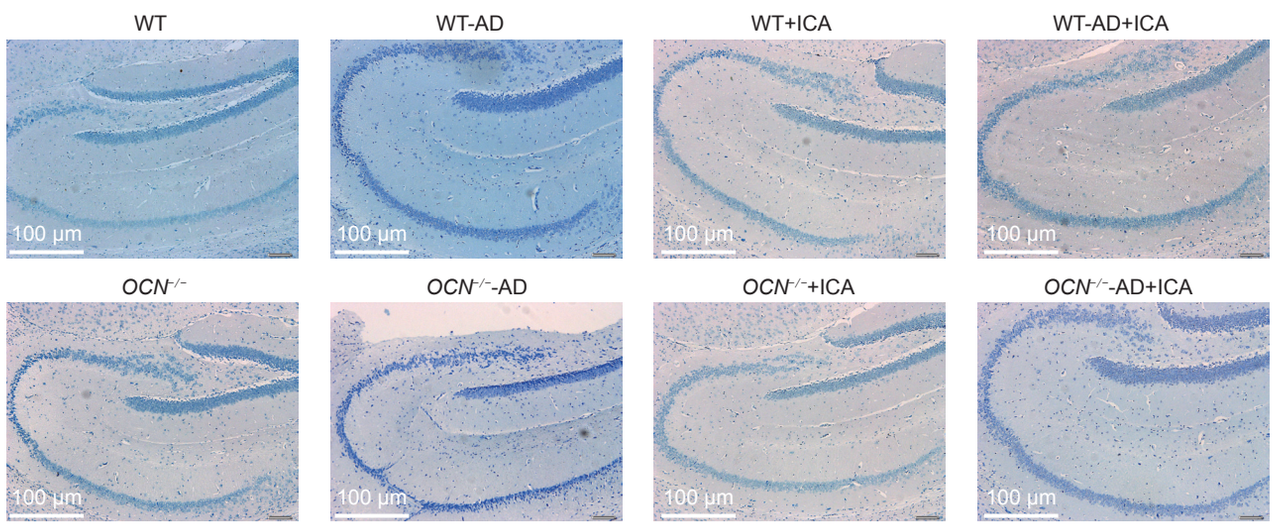


图4　小鼠海马尼氏染色结果

Figure 4　Nissl staining showing Nissl bodies in the mouse hippocampal neurons

复,说明ICA对OCN基因敲除小鼠的OCN蛋白表达有一定的提升作用,但效果有限,提示ICA可上调OCN表达并部分逆转AD模型中OCN的表达下降。见图5、表3。

2.7　ICA通过调控OCN减少AD小鼠Aβ阳性表达

免疫组化结果显示,WT组海马各区仅见微弱背景染色,几乎无Aβ阳性信号。与WT组相比,WT-AD组和*OCN*$^{-/-}$组Aβ蛋白阳性细胞明显增多,染色增强(P<0.05)。与*OCN*$^{-/-}$组相比,*OCN*$^{-/-}$-AD组进一步恶化,Aβ蛋白阳性细胞明显增多,染色增强(P<0.05)。WT-AD+ICA组与WT-AD组相比,*OCN*$^{-/-}$-AD+ICA组与*OCN*$^{-/-}$-AD组相比,Aβ蛋白阳性细胞数量均降低,染色均减弱(P<0.05)。见图6,表3。

2.8　ICA通过调控OCN减少Aβ、增加OCN蛋白表达水平

Western blot结果显示,与WT组相比,WT-AD组和*OCN*$^{-/-}$组的Aβ蛋白上升,OCN蛋白下降(P<0.05)。WT-AD+ICA组与WT-AD相比,*OCN*$^{-/-}$-AD+ICA组与*OCN*$^{-/-}$-AD相比,Aβ蛋白水平均下降,OCN蛋白水平均上升(P<0.05)。见图7。

2.9　ICA通过调控OCN降低AD小鼠CRH、GLU、GC、COR表达水平

ELISA结果显示,WT-AD组与WT组相比,*OCN*$^{-/-}$-AD组与*OCN*$^{-/-}$组相比,CRH、GLU、GC、COR表达水平

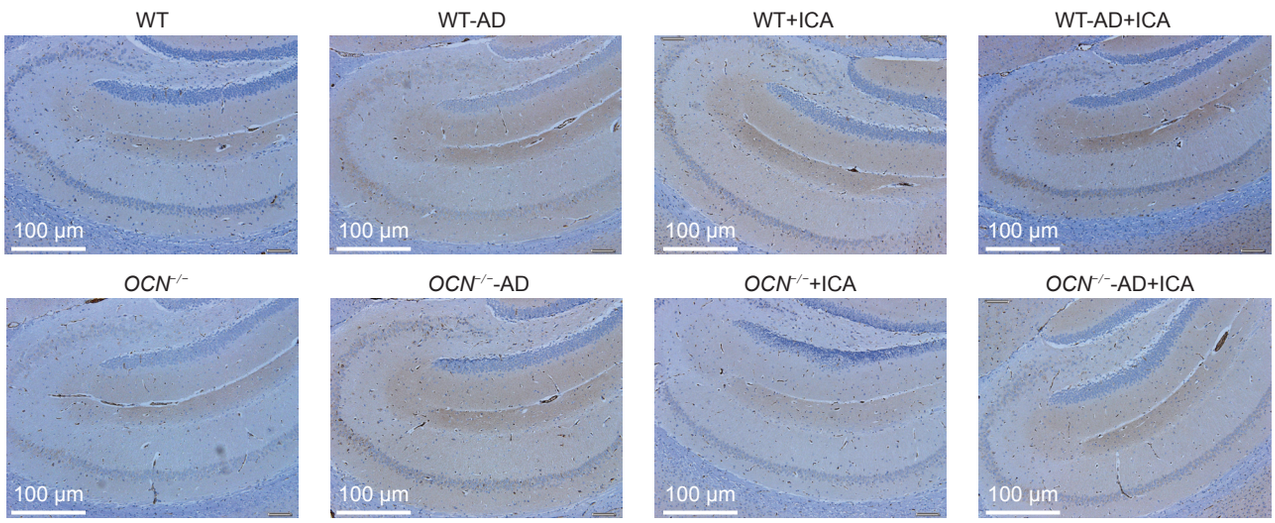


图5 小鼠海马OCN免疫组化结果

Figure 5 Immunohistochemical staining of OCN in the mouse hippocampus

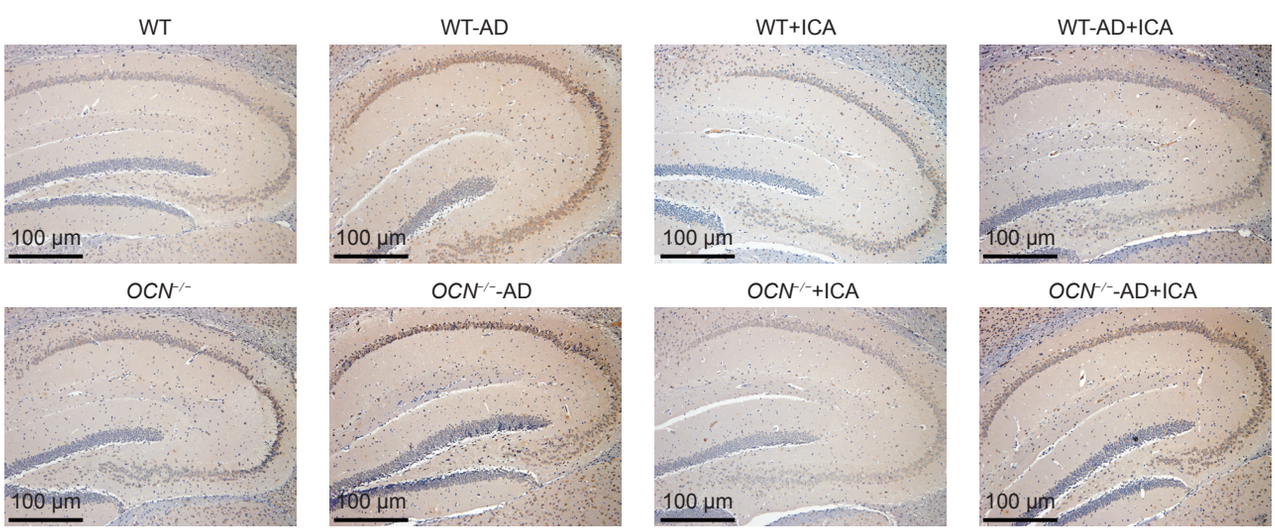


图6 小鼠海马Aβ免疫组化结果

Figure 6 Immunohistochemical staining of Aβ in the mouse hippocampus

均显著上升($P<0.05$)。WT-AD+ICA组与WT-AD组相比,$OCN^{-/-}$-AD+ICA组与$OCN^{-/-}$-AD组相比,CRH、GLU、GC、COR表达水平均显著下降($P<0.05$),提示ICA可调节神经内分泌激素从而达到影响AD进程的效果,但$OCN^{-/-}$-AD+ICA组的激素水平仍高于WT-AD+ICA组,无法降低至正常水平。见图8。

3 讨论

3.1 OCN缺失直接加剧AD核心病理与行为缺陷

AD给患者家庭与社会带来了沉重负担,尽管研究已揭示Aβ积累等关键机制,但现有治疗手段在延缓疾病进程方面效果有限。越来越多的证据支持OCN不仅参与骨代谢,还可能通过调控神经元功能和认知能力,在AD的发病与进展中发挥重要作用。已有研究揭示OCN可穿越血脑屏障,调控脑内多巴胺、去甲肾上腺素及5-羟色胺等神经递质的合成,从而影响认知与情绪行为,同时OCN与其受体GPR37、GPR158在大脑多个核心区高度表达,通过调节该区的神经网络活动,参与情绪和认知调控[23]。

本实验发现$OCN^{-/-}$小鼠表现出海马神经元丢失与NFTs加重,提示OCN缺失会直接影响神经元存活;同时$OCN^{-/-}$小鼠中Aβ水平显著升高,这一现象与前人关于OCN调控AD核心病理的发现形成呼应。OCN不仅参与神经元保护,还可能通过多条信号通路抑制Aβ

表3　各组小鼠海马镀银面积比、尼氏平均灰度值及OCN、Aβ平均光密度比较(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Table 3　Comparison of silver-stained area ratios, Nissl-stained mean gray values, and mean optical densities of OCN, and Aβ among mouse groups(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Group	silver area ratio/%	Neyman mean gray value	OCN AO	Aβ AO
WT	47.26±2.16	189.11±2.46	0.280±0.016	0.105±0.006
WT-AD	35.32±2.17[a]	197.92±2.56[a]	0.170±0.006[a]	0.133±0.003[a]
WT+ICA	64.20±2.76[a]	173.36±2.93[a]	0.415±0.051[a]	0.075±0.003[a]
WT-AD+ICA	45.39±2.48[b]	177.41±3.40[b]	0.277±0.028[b]	0.093±0.007[b]
$OCN^{-/-}$	13.30±0.91[a]	198.98±3.22[a]	0.166±0.009[a]	0.126±0.016[a]
$OCN^{-/-}$-AD	4.10±2.03[c]	204.75±1.08[c]	0.088±0.011[c]	0.143±0.013[c]
$OCN^{-/-}$-ICA	33.69±2.16[c]	196.93±4.08[c]	0.282±0.181[c]	0.095±0.007[c]
$OCN^{-/-}$-AD+ICA	19.13±1.31[de]	199.08±1.78[de]	0.161±0.004[de]	0.110±0.005[de]

a:P<0.05, compared to the WT group; b:P<0.05, compared to the WT-AD group; c:P<0.05, compared to the $OCN^{-/-}$ group; d:P<0.05, compared to the $OCN^{-/-}$-AD group; e:P<0.05, compared to the WT-AD+ICA group

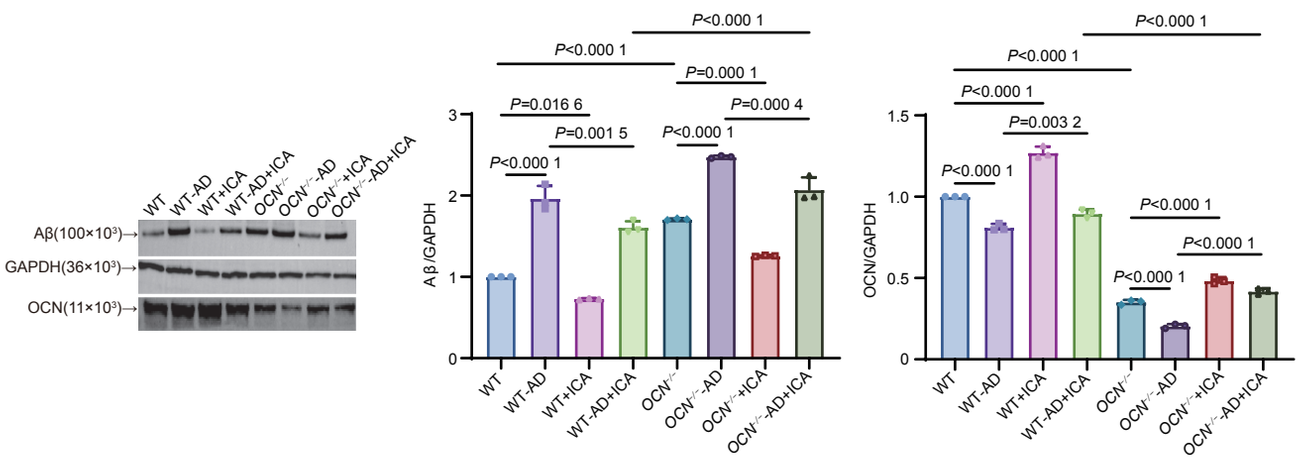


图7　各组小鼠海马Aβ、OCN蛋白表达水平比较

Figure 7　Comparison of protein expression levels of Aβ and OCN in the mouse hippocampus

生成[23],通过PI3K/Akt及MAPK等信号传导,能维持神经元内环境稳定,防范凋亡和异常蛋白聚集[24]。

本实验中发现ICA可通过调控OCN改善AD小鼠病理状况,由此推测OCN通过多靶点、多通路综合调控神经元稳态,缺失时则导致AD病理表型显著恶化,而ICA可以修复小鼠海马神经结构并维持神经元稳态,但此效应在一定程度上受限于OCN的表达水平。

有文献报道ICA可促进成骨细胞修复与重建[25],通过调节PI3K/Akt、MAPK和mTOR等信号通路,抑制神经元凋亡、缓解神经炎症并促进自噬清除异常蛋白,上调血清OCN含量[26],与课题组前期研究结论一致[19],此次体内实验再次得到验证,提示其神经保护作用可能部分依赖于骨源性因子的上调。在OCN缺失背景下其疗效受限,提示OCN功能完整性对药物干预效果具有决定性作用,这与ICA药理效应需依赖内源性信号整合的观点相符[27]。此外,ICA与其他中药活性成分如黄酮类、皂苷类在防治AD中的药理作用有所交叉,但ICA特有的促进骨-脑轴信号互作的能力为其神经保护机制提供了独特性,其通过促进OCN分泌,进而下调Aβ表达,抑制NFTs形成,呈现出与骨-脑互作机制密切相关的神经保护效应。

3.2　OCN是ICA调节HPA轴稳态的关键介质

关于内分泌及免疫调控机制,AD模型及$OCN^{-/-}$小鼠表现出HPA轴相关激素(如ACTH、CRH、GC、COR)水平升高,提示神经-内分泌网络的过度激活。研究发现,AD的HPA轴功能障碍反映在患者的COR基础水平升高和小鼠模型的COR水平升高[28],GC通过海马中糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR)、下丘脑和垂体前叶负反馈的异常调节HPA轴,并在AD患者和小鼠模型中观察到GC负反馈的异常调节以及皮

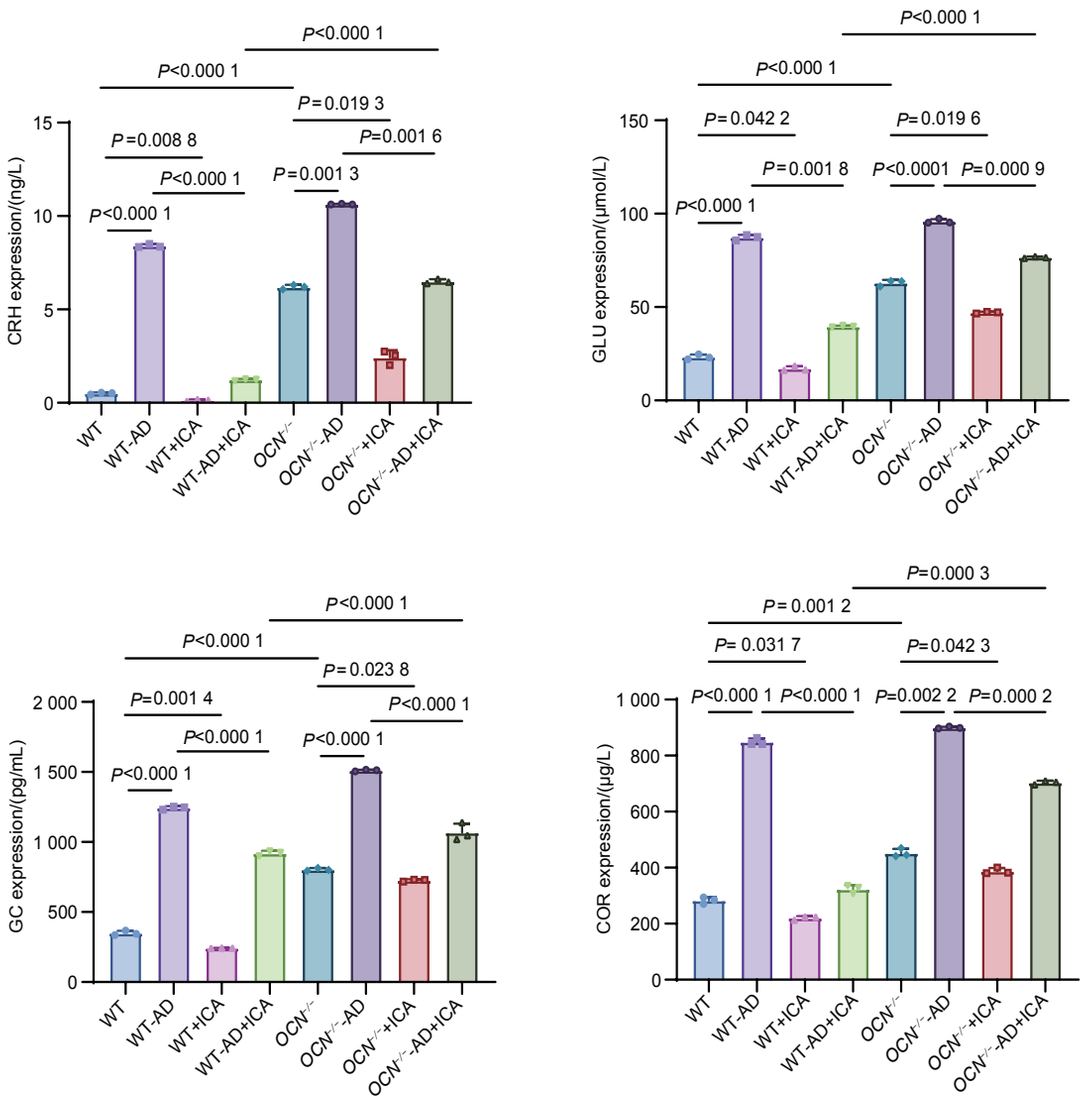


图8 各组小鼠血清中CRH、GLU、GC、COR表达水平比较

Figure 8 Comparison of serum CRH, GLU, GC and COR expression levels in mice from each group

质激素水平升高,CRH系统失调与压力相关疾病如抑郁、焦虑和成瘾等和神经内分泌学改变密切相关,并影响神经退行性过程的发生发展[29]。OCN不仅调节能量代谢,还影响应激反应及糖皮质激素释放,对抗慢性应激导致的神经损伤。骨源激素调控HPA轴可能是骨-脑轴调节应激反应与认知功能的关键环节,OCN缺失时HPA轴过度活跃会加重神经元损伤和AD病理进展[30]。OCN对应激反应的调节能力能够影响糖皮质激素轴活性,过度应激易诱发认知功能障碍与AD相关病理变化,而OCN缺失可能放大这一风险。

本实验结果显示,ICA干预可有效抑制WT-AD模型小鼠的内分泌激素亢进,证实其具备缓解AD相关神经内分泌与代谢应激的药理作用,这与已知的抗炎、抗氧化及调节神经-内分泌-免疫网络的作用机制存在一致性[31]。但ICA对*OCN*$^{-/-}$基因敲除后的小鼠的治疗效果具有选择性,虽能降低*OCN*$^{-/-}$基因敲除状态下的CRH、GLU、GC及COR水平,但无法恢复到WT组小鼠正常水平,由此可见,ICA虽可有效改善HPA轴激活与代谢失调,但其部分治疗效应依赖OCN的存在,提示ICA可能通过调控OCN分泌来维持HPA轴功能与代谢稳态从而影响AD的进程。

3.3 局限与展望

本研究尚存在一定的局限性:①ICA调控OCN在中枢神经系统中的机制尚不明确;②仅观察了30 d干预后的效果,未评估长期效应或剂量依赖性;③将动物实验结果转化为有效的人体疗法需大量临床研究。靶向OCN通路无疑已成为对抗AD的一个新的探索领域,同时OCN是ICA调控骨-脑轴的核心因子,不

排除其他骨源性因子的协同作用,未来需深入研究ICA调节OCN对AD作用的上下游通路,进一步阐明ICA的神经保护作用机制。

综上,本研究揭示了ICA通过骨-脑轴调控OCN对AD的保护作用机制,发现ICA通过调控OCN,改善对AD模型小鼠认知损害及影响神经内分泌激素变化。在本实验中,ICA不仅能够显著改善AD模型动物的认知功能障碍,还能有效减轻海马区神经元损伤,同时进一步阐述了OCN作为一种骨源性激素,能够穿过血脑屏障并负反馈调控HPA轴活性,抑制CRH神经元过度兴奋,减少GC的神经毒性作用,进而维持神经元稳态;ICA则通过促进OCN的表达与分泌来进一步强化这一保护性机制,而在OCN缺失模型中,ICA的调控作用部分受限,提示OCN是ICA发挥神经保护效应的核心介质之一,为靶向神经内分泌应激系统的AD干预策略提供了科学依据。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] LANE C A, HARDY J, SCHOTT J M. Alzheimer's disease [J]. Euro J Neurol, 2018, 25(1): 59-70. DOI: 10.1111/ene.13439.

[2] QIU C X, KIVIPELTO M, VON STRAUSS E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention [J]. Dialogues Clin Neurosci, 2009, 11(2): 111-128. DOI:10.31887/DCNS.2009.11.2/cqiu.

[3] FANG J, ZHANG Y J. Icariin, an anti-atherosclerotic drug from Chinese medicinal herb horny goat weed [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 734. DOI:10.3389/fphar.2017.00734..

[4] MERA P, LAUE K, FERRON M, *et al*. Osteocalcin signaling in myofibers is necessary and sufficient for optimum adaptation to exercise [J]. Cell Metab, 2017, 25(1): 218. DOI:10.1016/j.cmet.2016.12.003.

[5] LIU D, ZHOU H D, TAO Y, *et al*. Alzheimer's disease is associated with increased risk of osteoporosis: the Chongqing aging study [J]. Curr Alzheimer Res, 2016, 13(10): 1165-1172. DOI:10.2174/1567205013109990149.

[6] 薛香莉, 刘微娜, 漆正堂, 等. 基于"脑-肠互动"理论探究脑肠肽在运动抗抑郁中的作用机制[J]. 体育科学, 2019, 39(12): 76-85. DOI:10.16469/j.css.201912008.
XUE X L, LIU W N, QI Z T, *et al*. The potential role of brain gut peptides in the antidepressant effects of exercise based on the theory of "brain-gut interaction" [J]. China Sport Sci, 2019, 39(12): 76-85. DOI:10.16469/j.css.201912008.

[7] WIPPERT P M, RECTOR M, KUHN G, *et al*. Stress and alterations in bones: an interdisciplinary perspective [J]. Front Endocrinol, 2017, 8: 96. DOI: 10.3389/fendo. 2017.00096.

[8] 于雷. 下丘脑-垂体-肾上腺轴对抑郁行为的影响概述[J]. 生物学教学, 2025, 50(10): 9-12. DOI: 10.3969/j. issn. 1004-7549.2025.10.003.
YU L. Overview of the effects of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis on depressive behaviors [J]. Biol Teach, 2025, 50(10): 9-12. DOI:10.3969/j.issn.1004-7549.2025.10.003.

[9] SWAAB D F, BAO A M, LUCASSEN P J. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration [J]. Ageing Res Rev, 2005, 4(2): 141-194. DOI: 10.1016/j.arr.2005.03.003.

[10] MRAVEC B, HORVATHOVA L, PADOVA A. Brain under stress and Alzheimer's disease [J]. Cell Mol Neurobiol, 2018, 38(1): 73-84. DOI:10.1007/s10571-017-0521-1.

[11] SZABÓ R, RÁCZ C P, DULF F V. Bioavailability improvement strategies for icariin and its derivates: a review [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(14): 7519. DOI: 10.3390/ijms23147519.

[12] SHI T S, SHEN S Y, SHI Y, *et al*. Osteocyte-derived sclerostin impairs cognitive function during ageing and Alzheimer's disease progression [J]. Nat Metab, 2024, 6(3): 531-549. DOI:10.1038/s42255-024-00989-x.

[13] SCHURMAN C A, BURTON J B, ROSE J, *et al*. Molecular and cellular crosstalk between bone and brain: accessing bidirectional neural and musculoskeletal signaling during aging and disease [J]. J Bone Metab, 2023, 30(1): 1-29. DOI:10.11005/jbm.2023.30.1.1.

[14] 李庆, 卜淑敏. 骨钙素与认知功能及其在运动改善认知功能中的作用机制[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(3): 447-451, 457. DOI:10.3969/j.issn.1006-7108.2023.03.025.
LI Q, BU S M. The role of osteocalcin in cognitive function and its promotion by exercise [J]. Chin J Osteoporos, 2023, 29(3): 447-451, 457. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-7108.2023.03.025.

[15] 范凯健, 钮艾雯, 吴辉辉. 淫羊藿苷通过PI3K/AKT信号通路促进MC3T3-E1细胞的增殖分化[J]. 中南药学, 2025, 23(2): 417-422. DOI: 10.7539/j. issn. 1672-2981.2025.02.019.
FAN K J, NIU A W, WU H H. Effect of icariin on the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells via PI3K/AKT signalling pathway [J]. Cent South Pharm, 2025, 23(2): 417-422. DOI:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.019.

[16] 廖香莲, 吴涛, 梅菊, 等. 淫羊藿苷及其代谢产物生物活性研究进展[J]. 中成药, 2025, 47(2): 504-512. DOI:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.02.022.
LIAO X L, WU T, MEI J, *et al*. Research progress on biological activities of icariin and its metabolites [J]. Chin

Tradit Pat Med, 2025, 47(2): 504-512. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.02.022.

[17] HUANG X, XIANG T, XU S, *et al*. Icariin reduces S-nitrosogultathione induced endothelial cell apoptosis through modulating AKT/P53 pathway[J]. Chin J Cardiol, 2016, 44(8): 707-713. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2016.08.013.

[18] KUMAR S, CHANDNANI A, AUNG N H, *et al*. Alzheimer's disease and its association with bone health: a case-control study[J]. Cureus, 2021, 13(3): e13772. DOI: 10.7759/cureus.13772.

[19] 方俪霖, 朱其凤, 张明达, 等. 骨钙素在阿尔茨海默病细胞模型中的神经保护作用与机制研究[J]. 陆军军医大学学报, 2025, 47(16): 1883-1893. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202504118.
FANG L L, ZHU Q F, ZHANG M D, *et al*. Neuroprotective effects and mechanisms of osteocalcin in an Alzheimer's disease cell model[J]. J Army Med Univ, 2025, 47(16): 1883-1893. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202504118.

[20] CHOU C H, YANG C R. Neuroprotective studies of evodiamine in an okadaic acid-induced neurotoxicity[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(10): 5347. DOI: 10.3390/ijms22105347.

[21] YAN F, LIU J, CHEN M X, *et al*. Icariin ameliorates memory deficits through regulating brain insulin signaling and glucose transporters in 3 ×Tg-AD mice[J]. Neural Regen Res, 2023, 18(1): 183-188. DOI: 10.4103/1673-5374.344840.

[22] WANG Y H, ZHU T R, WANG M, *et al*. Icariin attenuates M1 activation of microglia and aβ plaque accumulation in the hippocampus and prefrontal cortex by up-regulating PPARγ in restraint/isolation-stressed APP/PS1 mice[J]. Front Neurosci, 2019, 13: 291. DOI: 10.3389/fnins.2019.00291.

[23] FREUS N K, WANK I, HÄFELE M, *et al*. Pharmacological and resting state fMRI reveal Osteocalcin's effects on mouse brain regions with high Gpr37 and Gpr158 expression[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 10116. DOI: 10.1038/s41598-025-95000-2.

[24] WANG D W, ZHENG J L, SUN X S, *et al*. Study on the pharmacological mechanism of icariin for the treatment of Alzheimer's disease based on network pharmacology and molecular docking techniques[J]. Metabolites, 2023, 14(1): 1. DOI: 10.3390/metabo14010001.

[25] XIE Y L, SUN W C, YAN F F, *et al*. Icariin-loaded porous scaffolds for bone regeneration through the regulation of the coupling process of osteogenesis and osteoclastic activity[J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 6019-6033. DOI: 10.2147/IJN.S203859.

[26] 张晓星. 淫羊藿苷对去卵巢后骨质疏松大鼠骨强度、骨微结构、血清BGP及Fabp4mRNA的影响[D]. 广州: 暨南大学, 2014.
ZHANG X X. Effects of icariin on bone strength, bone microstructure, BGP in the serum and Fabp4mRNA in treating postmenopausal osteoporosis[D]. Guangzhou: Jinan University, 2014.

[27] HE C, WANG Z, SHI J. Pharmacological effects of icariin[J]. Adv Pharmacol, 2020, 87: 179-203. DOI: 10.1016/bs.apha.2019.10.004.

[28] CARUSO A, NICOLETTI F, MANGO D, *et al*. Stress as risk factor for Alzheimer's disease[J]. Pharmacol Res, 2018, 132: 130-134. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.04.017.

[29] SILBERSTEIN S, LIBERMAN A C, DOS SANTOS CLARO P A, *et al*. Stress-related brain neuroinflammation impact in depression: role of the corticotropin-releasing hormone system and P2X7 receptor[J]. Neuroimmunomodulation, 2021, 28(2): 52-60. DOI: 10.1159/000515130.

[30] KANG N, HUANG J, HAN X G, *et al*. The role of osteocalcin in regulating the acute stress response[J]. Front Pharmacol, 2025, 16: 1646558. DOI: 10.3389/fphar.2025.1646558.

[31] DONG Y K, WANG L W, YANG M G, *et al*. Effect of icariin on depressive behaviour in rat pups. Evidences for its mechanism of action by integrating network pharmacology, metabolomics and gut microbiota composition[J]. Phytomedicine, 2024, 126: 155422. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.155422.

(**收稿**:2025-12-12;**修回**:2026-01-09)

(编辑 严 涵)