

基于BDNF/TrkB/CREB信号通路探讨有氧运动联合安寐丹对睡眠剥夺大鼠学习记忆及突触可塑性的影响

郭蕴源^{1,2}, 邵玉萍^{3,4*}, 曾秋婵¹, 林利霞^{3,4}, 谢光璟^{2,3,4}

(1. 湖北中医药大学基础医学院, 武汉 430065;

2. 湖北中医药大学老年脑健康中医药防护技术与新产品研发教育部工程研究中心, 武汉 430065;

3. 湖北中医药大学体育健康学院, 武汉 430065; 4. 湖北时珍实验室, 武汉 430065)

[摘要] 目的:研究4周的有氧运动联合安寐丹对睡眠剥夺模型大鼠海马体突触可塑性标志蛋白、突触超微结构的影响,探究其改善睡眠剥夺大鼠学习记忆的可能作用机制。方法:将50只SD大鼠随机分为空白组、模型组、有氧运动+模型组、安寐丹+模型组($18.18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)及有氧运动+安寐丹+模型组($18.18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)。安寐丹+模型组安寐丹灌胃4周、有氧运动+模型组进行4周的有氧运动、有氧运动+安寐丹+模型组安寐丹灌胃联合有氧运动4周之后采用多平台水环境法进行连续72 h睡眠剥夺。睡眠剥夺结束后采用Morris水迷宫评估各组大鼠学习记忆能力,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠海马体神经元形态改变,透射电镜观察大鼠海马体突触超微结构,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马体脑源性神经营养因子(BDNF)、酪氨酸激酶受体B(TrkB)、cAMP反应元件结合蛋白(CREB)、突触后密度蛋白-95(PSD-95)、突触素(SYN)表达水平,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠海马体BDNF、TrkB、CREB mRNA相对表达量。结果:与空白组比较,模型组大鼠上平台潜伏期和游泳总路程显著延长($P<0.01$),穿越平台次数和目标象限停留时间显著减少($P<0.01$),部分海马体神经元损伤、数量减少且排列紊乱,突触间隙模糊,突触后致密物变薄,突触小泡密度不均,BDNF、TrkB、CREB蛋白表达水平及mRNA相对表达量显著下降($P<0.01$),PSD-95、SYN蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,安寐丹+模型组、有氧运动+模型组、有氧运动+安寐丹+模型组大鼠上平台潜伏期和游泳总路程有所降低、穿越平台次数和目标象限停留时间明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),海马体神经元损伤减轻,排列较整齐,突触结构较完整、突触后致密物增厚、突触小泡密度均匀,BDNF、TrkB、CREB蛋白表达水平及mRNA表达量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),PSD-95、SYN蛋白表达明显上升($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:有氧运动联合安寐丹可以改善睡眠剥夺大鼠学习记忆,其作用机制可能与调控BDNF/TrkB/CREB信号通路、上调PSD-95、SYN的表达,改善突触结构损伤有关,且联合干预优于单一运动或药物。

[关键词] 安寐丹; 有氧运动; 睡眠剥夺; 学习记忆; 突触可塑性; 脑源性神经营养因子(BDNF)/酪氨酸激酶受体B(TrkB)/环磷酸苷效应元件结合蛋白(CERB)

[中图分类号] R651;R285;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)17-0117-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20250618

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250530.1117.001>

[网络出版日期] 2025-05-30 15:22:50 [增强出版附件] 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Effect of Aerobic Exercise Combined with Anmeidan on Learning Memory and Synaptic Plasticity in Rats with Sleep Deprivation Based on BDNF/TrkB/CREB Signaling Pathway

GUO Yunyuan^{1,2}, SHAO Yuping^{3,4*}, ZENG Qiuchan¹, LIN Lixia^{3,4}, XIE Guangjing^{2,3,4}

(1. School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine Protection Technology and New Product Development for the Elderly Brain Health, Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 3. School of Physical and Health Education, Hubei University of

[收稿日期] 2025-02-24

[基金项目] 湖北省科技厅技术创新计划-重点研发专项-自主创新类项目(合作研发)(2023BCB029)

[第一作者] 郭蕴源,在读硕士,从事中医药防治老年病研究,E-mail:264443605@qq.com

[通信作者] *邵玉萍,教授,从事老年病防治与传统运动养生研究,E-mail:1146042812@qq.com

Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 4. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** This paper aims to study the effects of four weeks of aerobic exercise combined with Anmeidan on the synaptic plasticity marker protein and synaptic ultrastructure of the hippocampus in the model rats with sleep deprivation, thereby investigating the possible mechanism of its action to improve the learning memory of rats with sleep deprivation. **Methods:** 50 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into blank control group (group C), sleep deprivation group (group M), aerobic exercise + sleep deprivation group (group MEX), Anmeidan + sleep deprivation group (group MA, $18.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and aerobic exercise + Anmeidan + sleep deprivation group (group MEXA, $18.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Anmeidan was administered by gavage in the MA group for four weeks. Aerobic exercise was performed in the MEX group for four weeks. Anmeidan was administered by gavage in the MEXA group in combination with aerobic exercise for four weeks, and sleep deprivation was performed for 72 h by using the multi-platform water environment method. At the end of sleep deprivation, Morris water maze was used to assess the learning and memory ability of rats in each group, and hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes of rats' hippocampal neurons. A transmission electron microscope was used to observe the synaptic ultrastructure of rats' hippocampus. The expression levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), tyrosine kinase receptor B (TrkB), cAMP-response element binding protein (CREB), postsynaptic density-95 (PSD-95), and synaptophysin (SYN) were detected by Western blot, and the real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the relative mRNA expression levels of BDNF, TrkB, and CREB in the rats' hippocampus. **Results:** Compared with those in group C, rats in group M had significantly longer latency and total swimming distance on the platform ($P < 0.01$) and a significantly reduced number of traversals across the platform as well as the residence time in the target quadrant ($P < 0.01$). Part of the hippocampal neurons damaged, with a reduced number, disorganized arrangement, fuzzy synaptic gaps, thinning of post-synaptic dense material, and uneven density of synaptic vesicles. The protein expression levels and relative mRNA expression levels of BDNF, TrkB, and CREB were significantly reduced ($P < 0.01$), and the protein expression levels of PSD-95 and SYN were significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with those in group M, rats in MA, MEX, and MEXA groups showed a decrease in latency to platform and total distance swum, an increase in the number of traversals across the platform and residence time in the target quadrant ($P < 0.05$, $P < 0.01$), a reduction in hippocampal neuronal damage, a better arrangement, a more intact synaptic structure, a thickening of post-synaptic dense material, a uniform density of synaptic vesicles, and an increase in the protein expression levels and mRNA expression levels of BDNF, TrkB, and CREB ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The protein expressions of PSD-95 and SYN rose ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Aerobic exercise combined with Anmeidan can improve learning memory in rats with sleep deprivation, and its mechanism of action may be related to the modulation of the BDNF/TrkB/CREB signalling pathway, up-regulation of the expression of PSD-95 and SYN, and improvement of synaptic structural damage. The combination of interventions is superior to single exercise or drugs.

[Keywords] Anmeidan; aerobic exercise; sleep deprivation; learning memory; synaptic plasticity; brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/tyrosine kinase receptor B (TrkB)/cAMP-response element binding protein (CREB)

睡眠是人们保持身心健康的基本需要。充足的睡眠有助于清除大脑的代谢废物、促进神经修复、巩固记忆,改善认知功能^[1]。睡眠剥夺是临床常见的睡眠障碍之一,中医将其归于“不寐”“不得卧”范畴^[2],不仅会引起海马体依赖的学习记忆等认知功能的损伤,还会成为阿尔茨海默病(AD)等神经退行性疾病的慢性应激源^[3]。有氧运动作为一种非药物疗法,具有神经保护作用,对于神经细胞和大脑功能活动有积极的影响,可以改善睡眠剥夺引起的记忆障碍和情绪紊乱^[4-5]。安寐丹是中医经典方剂,出自清代医书《石室秘录》,具有培元益智、养心安神的功效。由人参、酸枣仁、炒酸枣仁、茯神、石菖蒲、五味子等10种中药组成^[6]。

人类学习记忆等高级功能的实现与海马体突触功效及突触可塑性水平密切相关,突触可塑性是学习记忆形成的神经基础^[7]。脑源性神经营养因子

(BDNF)对神经元生长、发育和维持至关重要,与其特异性受体酪氨酸激酶受体B(TrkB)结合,可激活cAMP反应元件结合蛋白(CREB)在海马体突触可塑性调节中起关键作用^[8]。

课题组前期基础实验研究发现,安寐丹可以改善睡眠剥夺大鼠海马体神经元损伤,保护海马体突触微环境^[9-10];临床研究表明,安寐丹治疗慢性失眠安全有效^[11]。然而,安寐丹联合有氧运动对睡眠剥夺大鼠学习记忆影响的相关研究少见报道。因此,本研究基于BDNF/TrkB/CREB信号通路调控海马体突触可塑性途径探讨有氧运动联合安寐丹预防性干预对睡眠剥夺大鼠学习记忆的影响和可能作用机制,为中医药改善睡眠剥夺提供新方案,为临床防治睡眠障碍提供新思路。

1 材料

1.1 动物 50只SPF级雄性SD大鼠(2月龄),体质

量190~230 g,购买于辽宁长生生物技术股份有限公司,合格证号SCXK(辽)2020-0001。饲养于湖北中医药大学动物房中,保持房内温度20~24℃,相对湿度50%~70%。动物自由进食和饮水,定期进行清洁。适应性饲养1周后,采用随机数字表法分为5组,每组10只。

1.2 伦理 本研究通过武汉华联科生物技术有限公司伦理委员会审查(编号HLK20230524001),实验遵循伦理要求。

1.3 药物及试剂 安寐丹组成为生酸枣仁19 g、熟酸枣仁19 g、人参11 g、麦冬11 g、茯神11 g、当归11 g、丹参7 g、石菖蒲4 g、五味子4 g、甘草4 g,购于湖北中医药大学黄家湖校医院,经湖北中医药大学游秋云教授鉴定均为正品。药物用15倍水浸泡30 min后武火煮沸,文火煎煮30 min后过滤药液。第2次10倍水后煎煮,合并2次药液最终浓缩为含生药 $1.82\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液,灌胃给药体积为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(武汉四维加生物科技公司,货号S10010);电镜固定液、RNA提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为P1126、R1100);蛋白定量法(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(美国Thermo公司,货号A53225);辣根过氧化物酶(HRP)-山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)、HRP-山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)(美国Jackson公司,货号分别为JAC-111-035-003、JAC-115-035-003);放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,货号P0013D);兔源抗体一抗BDNF、TrkB、CREB、突触素(SYN)、鼠源抗体一抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(英国Abcam公司,货号分别为ab108319、ab187041、ab178322、ab32127、ab8245);兔源抗体一抗突触后密度蛋白95(PSD-95)(武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号A7889)。

1.4 仪器 ZH-PT/5S型多通道动物实验跑台、ZH0065型Morris水迷宫(安徽正华生物仪器设备有限公司);Microfuge 26型高速离心机(美国Beckman Coulter公司);DYY-6C型电泳仪和转膜仪(北京六一生物技术有限公司);QuickChem5100型化学发光成像仪、Q225型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪[莫纳(苏州)生物技术有限公司];ChemidocXRS+型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);JEM-1400Flash型透射电子显微镜(日本电子公司);JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司)。

2 方法

2.1 模型制备 根据课题组前期研究,采用多平台水环境法制备睡眠剥夺模型^[12]。睡眠剥夺箱体长宽高分别为70 cm、50 cm、40 cm,内置直径6.5 cm、高9 cm的圆型金属连体站台,实验过程中保持水面低于站台1 cm,每个剥夺箱中放置5只大鼠,大鼠在站台上活动,当其进入睡眠阶段时会因接触水面而惊醒,从而达到睡眠剥夺的目的。空白组的设置和实验组相同,但在站台上放置金属网来保证其正常睡眠。预防性干预后,进行72 h连续睡眠剥夺,造模后模型组大鼠反应迟钝,学习记忆能力下降提示造模成功。正式睡眠剥夺前,让大鼠进行3 d适应性训练($1\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$)。在此期间,保证箱内的清洁和大鼠正常摄食。

2.2 分组和给药 将大鼠随机分为空白组、模型组、有氧运动+模型组、安寐丹+模型组、有氧运动+安寐丹+模型组,每组10只。根据课题组前期总结的安寐丹最佳有效剂量和中药药理研究方法学(第2版)对大鼠与人的药物剂量进行折算^[13-14],安寐丹+模型组和有氧运动+安寐丹+模型组的给药量为 $18.18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。空白组和模型组等体积生理盐水灌胃,适应性饲养1周后开始给药,连续给药28 d。

2.3 运动方案 参考文献^[15]方法,有氧运动+模型组和有氧运动+安寐丹+模型组置于多通道动物跑台进行4周的有氧运动训练。将跑台的速度设置为 $15\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$,坡度为 0° 。每15 min为1个运动小节,第1周和第2周每天进行2个小节的运动,第3周进行3个小节的运动,第4周进行4个小节的运动。每个运动小节结束后休息5 min。

2.4 指标检测

2.4.1 Morris水迷宫检测 4周的跑台运动和安寐丹灌胃结束后的第1天,进行Morris水迷宫检测。水迷宫系统由影像采集分析设备、圆形水池、站台等组成。将圆形水池划分为4个象限,本实验将站台放置在第1象限并将其设定为目标象限。水迷宫检测分为定位巡航试验和空间探索试验两部分,在定位巡航实验中,将大鼠贴壁背对站台放入水中,记录每只大鼠找寻站台的时间,记为逃避潜伏期,若大鼠未在90 s内找到站台,则将其引导至站台上停留15 s。每天训练1次,持续训练5 d。在第6天,进行定位巡航实验,统计大鼠试验中寻找目标站台的时间和游泳总距离。到第7天,撤去站台,进行空间探索试验,统计大鼠穿越站台次数和目标象限停留时间。

2.4.2 大鼠海马体组织取材 行为学检测结束后,用小动物麻醉机将大鼠麻醉,麻醉成功后于冰上剥

离全脑,将HE染色所需样本放置于4%多聚甲醛中固定,取1 mm×1 mm×1 mm海马体组织置于电镜固定液中固定,将剩余海马体样本装入无菌冻存管并放入-80℃冰箱保存备用。

2.4.3 大鼠全脑组织HE染色 将固定在4%多聚甲醛中的全脑组织取出,梯度乙醇进行脱水、石蜡包埋后置于切片机经典海马体处切片(片厚4 μm),再用二甲苯和乙醇脱蜡处理,然后用苏木素染细胞核、伊红染细胞质,最后经脱水后中性树胶封片,在显微镜下观察海马体神经元形态结构、排列情况。

2.4.4 海马体组织透射电镜观察 将置于电镜固定液中的海马体组织取出,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗3次,1%锇酸固定2 h,随后使用丙酮和乙醇脱水,丙酮和包埋剂按比例包埋后渗透聚合,之后切片、铀-铅双染色,最后在透射电镜下观察海马体突触超微结构。

2.4.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马体组织蛋白 将冻存的海马体组织剪成小碎块,加入去污剂和裂解液后置于匀浆器中匀浆,匀浆完成后冰浴30 min使匀浆液完全裂解,4℃、12 000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径7.5 cm),收集上清液。采用BCA法测定蛋白浓度,将提取的上清液与5×蛋白上样缓冲液混合后,在沸水中加热10 min,让蛋白溶液完全变性。配制10%分离胶和5%浓缩胶,将已备好的蛋白样本进行电泳、转膜,然后将转好的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜放入5%脱脂奶粉中,在摇床上振荡封闭1 h,加入稀释一抗BDNF(1:5 000)、TrkB(1:5 000)、CREB(1:500)、PSD-95(1:1 000)、SYN(1:20 000),4℃孵化过夜后,洗去多余的一抗,稀释二抗(1:10 000)并摇床孵育1 h,用TBST清洗,滴加新鲜配置的增强化学发光法(ECL)混合溶液到膜的蛋白面侧,发光检测。根据不同光强度调整曝光条件显影,采用Image J软件分析目标条带的灰度值。

表2 有氧运动联合安寐丹对睡眠剥夺大鼠学习记忆的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of aerobic exercise combined with Anmeidan on learning memory in sleep deprived rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	逃避潜伏期/s	游泳总路程/cm	穿越平台次数/次	目标象限停留时间/s
空白组		17.56±4.36	210.71±45.24	4.40±1.26	35.59±5.90
模型组		31.79±5.55 ²⁾	397.74±50.56 ²⁾	1.60±0.84 ²⁾	21.83±5.41 ²⁾
有氧运动+模型组		26.60±4.34 ³⁾	295.02±48.33 ⁴⁾	2.80±1.03 ³⁾	28.68±4.35 ³⁾
安寐丹+模型组	18.18	26.22±6.11 ³⁾	284.26±47.71 ⁴⁾	2.60±1.07 ³⁾	27.67±5.78 ³⁾
有氧运动+安寐丹+模型组	18.18	24.78±3.50 ⁴⁾	247.31±32.84 ⁴⁾	3.60±0.97 ⁴⁾	30.31±6.74 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3、表4同)

3.2 有氧运动联合安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马体神经元形态结构的影响 空白组大鼠海马体区细

2.4.6 Real-time PCR检测海马体组织mRNA表达

取冻存的部分海马体组织样本,用TRIzol提取海马体组织总RNA,用逆转录试剂盒逆转录成cDNA,再以cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系为加入SYBR Green混合液,上下游引物,DNA template,ddH₂O等。反应条件:95℃、5 min;95℃、10 s,60℃、30 s,40个循环。以GAPDH为内参,使用2^{-ΔΔC_t}计算目标mRNA表达量。引物由四维加生物科技公司合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 ATCTTCTTGTCAGTGCC	237
	下游 CAGCTTCCCATTCTCAGC	
BDNF	上游 AGGGGCATAGACAAAA	100
	下游 CCAGCCAATTCTCTT	
CREB	上游 TTGCCCTGGAGTTGTTAT	113
	下游 CTTGCTGCTTCCCTGTTCTT	
TrkB	上游 TCGCCAGCAGTAGCAGAG	174
	下游 ACTGCGGTAGCAGGACAG	

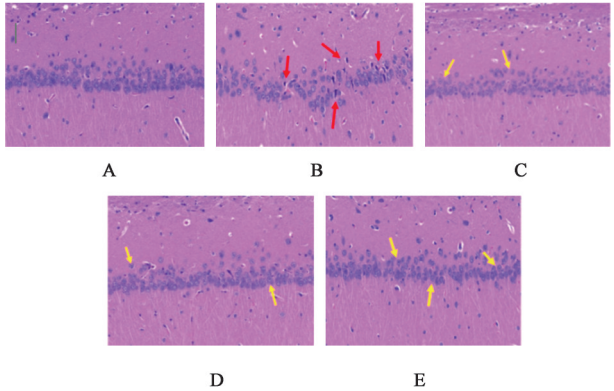
2.4.7 统计学方法 采用SPSS 26.0软件进行数据分析和处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对睡眠剥夺大鼠学习记忆能力的影响 定位巡航实验结果显示,与空白组比较,模型组大鼠逃避潜伏期和游泳总路程显著延长($P<0.01$),穿越平台次数显著减少、目标象限停留时间明显缩短($P<0.01$);与模型组比较,有氧运动+模型组、安寐丹+模型组、有氧运动+安寐丹+模型组大鼠逃避潜伏期、游泳总路程明显缩短($P<0.05, P<0.01$),穿越平台次数明显增多、目标象限停留时间明显延长($P<0.05, P<0.01$)。见表2、增强出版附加材料。

胞数量多,排列整齐紧密,形态结构完整;与空白组比较,模型组大鼠海马体神经细胞数量减少,排列

松散无规则,部分细胞出现核固缩,染色加深;与模型组比较,有氧运动+模型组、安寐丹+模型组、有氧运动+安寐丹+模型组大鼠海马体神经细胞数量较多,细胞形态较完整,排列较整齐,部分细胞核饱满、核仁清晰、胞浆丰富。见图1。



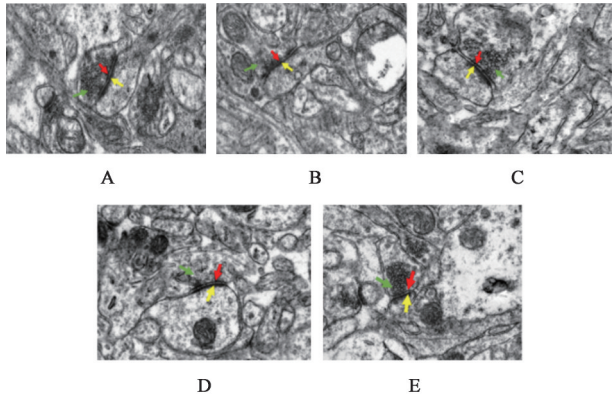
注:A.空白组;B.模型组;C.安寐丹+模型组;D.有氧运动+模型组;E.有氧运动+安寐丹+模型组(图2-图3同);红色箭头标注细胞结构损伤;黄色箭头标注细胞形态结构完整

图1 有氧运动联合安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马体神经病理形态的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of aerobic exercise combined with Anmeidan on pathological morphology of hippocampal neurons in sleep-deprived rats (HE,×400)

3.3 有氧运动联合安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马体突触超微结构的影响 与空白组比较,模型组大鼠海马体突触结构模糊,突触前后膜界限不清,突触间隙部分融合、突触后致密物厚度变薄,突触小泡密度不一;与模型组比较,有氧运动+模型组、安寐丹+模型

组、有氧运动+安寐丹+模型组大鼠突触结构较完整,突触后致密物增厚,突触小泡密度均匀,突触前后膜界限清晰,突触间隙宽度适中。见图2。



注:红色箭头标注突触前膜;黄色箭头标注突触后膜;绿色箭头标注突触小泡

图2 有氧运动联合安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马体突触超微结构的影响(透射电镜,×15 000)

Fig. 2 Effect of aerobic exercise combined with Anmeidan on ultrastructure of hippocampal synapses in sleep-deprived rats (TEM,×15 000)

3.4 有氧运动联合安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马体BDNF/TrkB/CREB信号通路蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组海马体BDNF、TrkB、CREB蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,有氧运动+模型组、安寐丹+模型组、有氧运动+安寐丹+模型组海马体TrkB、CREB、BDNF蛋白表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。见表3、图3。

表3 有氧运动联合安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马体BDNF、TrkB、CREB、PSD-95、SYN蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect aerobic exercise combined with Anmeidan on hippocampal BDNF, TrkB, CREB, PSD-95, SYN protein expression in sleep deprived rats ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BDNF/GAPDH	TrkB/GAPDH	CREB/GAPDH	PSD-95/GAPDH	SYN/GAPDH
空白组		0.94±0.12	0.91±0.16	0.92±0.14	0.94±0.11	0.89±0.19
模型组		0.22±0.04 ²⁾	0.20±0.04 ²⁾	0.30±0.10 ²⁾	0.33±0.18 ²⁾	0.28±0.02 ²⁾
有氧运动+模型组		0.42±0.05 ⁴⁾	0.52±0.22 ³⁾	0.55±0.13 ³⁾	0.58±0.09 ³⁾	0.50±0.09 ³⁾
安寐丹+模型组	18.18	0.52±0.01 ⁴⁾	0.51±0.07 ³⁾	0.59±0.18 ³⁾	0.67±0.08 ⁴⁾	0.57±0.05 ³⁾
有氧运动+安寐丹+模型组	18.18	0.70±0.04 ⁴⁾	0.62±0.08 ⁴⁾	0.79±0.10 ⁴⁾	0.76±0.09 ⁴⁾	0.72±0.14 ⁴⁾

3.5 对睡眠剥夺大鼠海马体突触标志蛋白PSD-95、SYN蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠海马体PSD-95、SYN蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,有氧运动+模型组、安寐丹+模型组、有氧运动+安寐丹+模型组海马体PSD-95、SYN蛋白表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。见表3和图3。

3.6 对睡眠剥夺大鼠海马体BDNF、TrkB、CREB mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组海马体

BDNF、TRKB、CREB mRNA表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,有氧运动+模型组、安寐丹+模型组、有氧运动+安寐丹+模型组海马体BDNF、TrkB、CREB mRNA表达水平显著升高($P<0.01$)。见表4。

4 讨论

睡眠剥夺的危害是多方面的,涉及生理、心理、社交行为等。研究显示,学习和记忆的巩固有赖于良好的睡眠,而睡眠剥夺会导致学习记忆等认知能

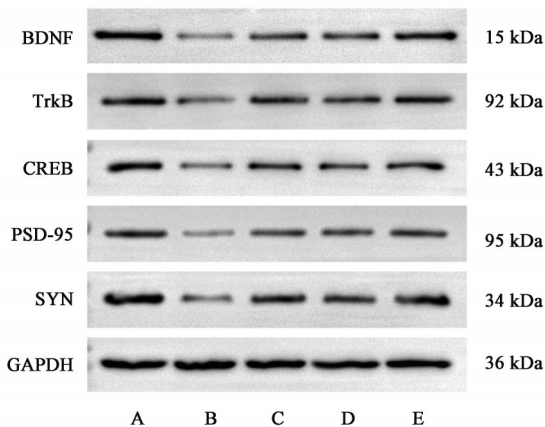


图 3 睡眠剥夺大鼠海马体 BDNF、TRKB、CREB、PSD-95、SYN 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of BDNF, TrkB, CREB, PSD-95 and SYN protein expression in hippocampus of sleep-deprived rats

表 4 有氧运动联合安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马体 BDNF、TrkB、CREB mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect aerobic exercise combined with Anmeidan on hippocampal BDNF, TrkB, CREB mRNA expression in sleep deprived rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	BDNF	TrkB	CREB
空白组		1.05±0.08	1.04±0.06	1.02±0.03
模型组		0.21±0.02 ²⁾	0.19±0.02 ²⁾	0.22±0.01 ²⁾
有氧运动+模型组		0.48±0.10 ⁴⁾	0.45±0.12 ⁴⁾	0.52±0.02 ⁴⁾
安寐丹+模型组	18.18	0.57±0.06 ⁴⁾	0.61±0.07 ⁴⁾	0.62±0.03 ⁴⁾
有氧运动+安寐丹+模型组	18.18	0.77±0.06 ⁴⁾	0.77±0.08 ⁴⁾	0.79±0.06 ⁴⁾

力的下降^[16-17]。海马体是大脑的重要组成部分,对于学习和空间记忆的巩固至关重要^[18]。研究发现,睡眠剥夺会导致海马体神经元损伤,影响海马体的功能^[19-20]。本研究采用 Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆能力并对海马体组织进行 HE 染色观察,结果显示模型组学习记忆水平显著下降且海马体部分神经元固缩损伤,神经细胞数量有所减少,排列较松散。与模型组比较,有氧运动+模型组、安寐丹+模型组、有氧运动+安寐丹+模型组学习记忆水平均有不同程度地提高,海马体区神经元损伤有所恢复,其中有氧运动+安寐丹+模型组改善效果最佳。说明有氧运动干预和安寐丹给药均能改善大鼠学习记忆能力,并且有氧运动联合安寐丹干预比单一的干预方法效果更佳。

突触是神经元之间实现彼此联系和信息传递的基础,记忆的获取、储存和巩固与神经元的突触可塑性有着密切的联系^[21]。突触可塑性包括结构可塑性和功能可塑性,功能可塑性与突触传递相关^[22];结构可塑性主要是突触形态结构的改变,包括突触界

面曲率、突触后致密物厚度、突触间隙宽度等的变化^[23]。研究发现,睡眠剥夺会使突触形态结构损伤,导致突触功能障碍,影响突触信息传递的效率^[24]。本研究使用透射电镜观察大鼠海马体突触超微结构发现,模型组大鼠海马体突触后致密物变薄,突触小泡密度不均,突触间隙模糊,与文献基本一致^[25-26]。而经过有氧运动、安寐丹、有氧运动联合安寐丹预防性干预后大鼠海马体突触超微结构损伤有所改善,突触后致密物增厚,突触间隙清晰宽度适中。

BDNF 是海马体中突触传递和长时程增强(LTP)的重要调节因子,在记忆的形成中发挥重要作用^[27]。TrkB 是 BDNF 的高亲和力受体。BDNF 与 TrkB 特异性结合后,诱导 TrkB 受体二聚化,使其酪氨酸残基发生磷酸化,激活下游磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/细胞外信号调节激酶(ERK)等多条信号通路,这些信号最终会导致 CREB^{Ser133} 位点的磷酸化,活化的 CREB 可以增强 BDNF 的转录,进而在神经元存活,分化和突触可塑性中起关键作用^[28]。有研究发现,激活 BDNF/TrkB 信号通路可以改善睡眠剥夺小鼠海马体神经损伤和突触可塑性^[29]。SYN 和 PSD-95 与突触结构和功能状态密切相关,参与突触成熟、信息传递和记忆形成,被认为是突触可塑性的标志^[30]。有研究显示,睡眠剥夺大鼠学习记忆能力的下降可能与 SYN、PSD-95 等突触相关蛋白含量降低有关^[31]。本次研究通过 Western blot 和 Real-time PCR 检测 BDNF/TrkB/CREB 信号通路蛋白和 mRNA 的表达,同时还检测了 PSD-95、SYN 蛋白,发现模型组大鼠海马体 BDNF、TrkB、CREB、PSD-95、SYN 表达水平均显著下降,而有氧运动+模型组、安寐丹+模型组、有氧运动+安寐丹+模型组以上指标均有不同程度的提高,其中有氧运动+安寐丹+模型组上升水平更为明显,提示有氧运动联合安寐丹预防性干预可能通过调控 BDNF/TrkB/CREB 信号通路、上调 PSD-95、SYN 的表达来改善突触可塑性进而提高学习记忆水平。

安寐丹是防治失眠健忘的经典方,方中以人参为君大补元气;生、熟酸枣仁同用,一阴一阳、补肝宁心,为臣药;当归补血行血、丹参清心除烦、麦冬清心养阴、石菖蒲醒脑益智、茯神宁心安神、五味子益心敛气,6 种药物清补结合、开敛共济,共奏清心宁心之功,为佐药;甘草益气健脾、调和诸药,为使药;诸药合用,共奏培元固本、养心安神之功。课题组前期已从昼夜节律、神经递质等角度探讨安寐丹防治失眠健忘的作用机制^[32-33]。运动疗法是一种低成本、高收

益的非药物治疗,中医提出了“动以养形、静以养神、动静结合、形神兼养”的运动防治疾病的理念。近些年,运动疗法对于学习记忆等认知功能的改善备受认可。研究发现,跑步机运动预处理阻止了AD小鼠学习记忆水平的下降,AD小鼠突触数量、突触结构参数、树突棘数量增加,海马体突触结构可塑性恢复^[34]。另有研究显示,中等强度跑台运动增强了慢性睡眠剥夺大鼠学习记忆能力,提高了海马体DG区BDNF及其TrkB受体的表达^[35]。本实验从海马体突触结构可塑性的角度,检测与之密切相关的BDNF、TrkB、CREB、PSD-95、SYN表达水平,并结合行为学和病理形态学结果,揭示有氧运动联合安寐丹对睡眠剥夺大鼠学习记忆的保护作用可能与BDNF/TrkB/CREB信号通路介导的突触结构可塑性相关。但对于突触功能可塑性的影响及其指标未进行深入探究,后期将持续深入研究。

综上,有氧运动联合安寐丹可以改善睡眠剥夺大鼠学习记忆能力,其机制可能与调控BDNF/TrkB/CREB信号通路,增加突触可塑性标志蛋白的表达、修复突触结构损伤、增强突触可塑性有关,且二者联合使用优于单一药物或运动。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] BARANWAL N, YU P K, SIEGEL N S. Sleep physiology, pathophysiology, and sleep hygiene[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2023, 77: 59-69.
- [2] 谢光璟,徐子绚,张军路,等. 基于海马神经炎症探讨安寐丹对睡眠剥夺大鼠模型神经元损伤的保护作用及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(10): 65-71.
XIE G J, XU Z X, ZHANG J L, et al. Protective effect and mechanism of anmeidan against neuronal damage in rat model of sleep deprivation based on hippocampal neuroinflammation[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(10): 65-71.
- [3] SHIH N C, BARISANO G, LINCOLN K D, et al. Effects of sleep on brain perivascular space in a cognitively healthy population[J]. *Sleep Med*, 2023, 111: 170-179.
- [4] MAHALAKSHMI B, MAURYA N, LEE S D, et al. Possible neuroprotective mechanisms of physical exercise in neurodegeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5895.
- [5] ZHAO Y, HUANG B, YU Y, et al. Exercise to prevent the negative effects of sleep deprivation: A systematic review and Meta-analysis[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2023, 155: 105433.
- [6] 徐波,王平. 安寐丹源流组方探溯与研究评析[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(8): 4330-4333.
XU B, WANG P. Exploration and research evaluation of the source and flow formula of Anmei Dan[J]. *Chin J Trad Chin Med Pharm*, 2022, 37(8): 4330-4333.

- [7] CHEN P, BAN W, WANG W, et al. The devastating effects of sleep deprivation on memory: Lessons from rodent models[J]. *Clocks Sleep*, 2023, 5(2): 276-294.
- [8] ZHAO X, KONG D, ZHOU Q, et al. Baicalein alleviates depression-like behavior in rotenone-induced Parkinson's disease model in mice through activating the BDNF/TrkB/CREB pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 140: 111556.
- [9] 谢光璟,徐波,夏婧,等. 安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马CA1区细胞结构及神经元损伤的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(7): 26-32.
XIE G J, XU B, XIA J, et al. Protective effects of anmeidan on cell structure against neuronal damage in hippocampal CA1 region of sleep-deprived rats[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(7): 26-32.
- [10] 谢光璟,徐波,夏婧,等. 基于NRG1/ErbB4信号通路研究安寐丹对睡眠剥夺大鼠海马神经元损伤及突触微环境的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(18): 4957-4966.
XIE G J, XU B, XIA J, et al. Protective effect of Anmeidan on hippocampal neuronal damage and synaptic microenvironment in sleep-deprived rats based on NRG1/ErbB4 signaling pathway[J]. *China J Chin Mater Med*, 2024, 49(18): 4957-4966.
- [11] 纪可,王平,谭云霞,等. 安寐丹治疗成人慢性失眠的多中心随机对照临床试验[J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(12): 6890-6893.
JI K, WANG P, TAN Y X, et al. Anmeidan in treating chronic insomnia in adults: A multicenter randomized controlled clinical trial[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2024, 39(12): 6890-6893.
- [12] 李童,谢光璟,邵玉萍,等. 运动结合生慧汤对睡眠剥夺大鼠海马神经元树突棘发育异常和认知损害的影响[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2023, 25(1): 203-211.
LI T, XIE G J, SHAO Y P, et al. Effects of exercise combined with Shenghui decoction on abnormal development of hippocampal neuronal dendritic spines and cognitive impairment in sleep deprived rats[J]. *World Sci Tec-Mod Tradit Chin Med*, 2023, 25(1): 203-211.
- [13] 陈奇,孙康宁,林志彬,等. *中药药理研究方法学*[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2006.
CHEN Q, SUN K N, LIN Z B, et al. *Pharmacological Research Methodology of Traditional Chinese Medicine* [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006.
- [14] 李非洲,谢光璟,徐波,等. 安寐丹调控ROS/PARP-1/AIF通路改善睡眠剥夺模型神经元损伤[J]. *中国中西医结合杂志*, 2024, 44(8): 952-958.
LI F Z, XIE G J, XU B, et al. Anmeidan regulates ROS/PARP-1/AIF pathway to alleviate neuronal damage in sleep deprivation model[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2024, 44(8): 952-958.
- [15] 叶南,邵玉萍,王平. 基于SIRT1/NF- κ B信号通路探讨有氧运动结合生慧汤对睡眠剥夺大鼠学习记忆的影响[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2021, 23(9): 2994-3002.
YE N, SHAO Y P, WANG P. Study on the effect of aerobic exercise combined with Shenghui decoction on learning memory in sleep deprived rats based on SIRT1/NF- κ B signaling pathway[J]. *World Sci Tec-Mod Tradit Chin Med*, 2021, 23(9): 2994-3002.

- [16] HOEDLMOSER K, PEIGNEUX P, RAUCHS G. Recent advances in memory consolidation and information processing during sleep[J]. *J Sleep Res*, 2022, 31(4): e13607.
- [17] SALARI M, ESMAEILPOUR K, MOHAMMADIPOOR-GHASEMABAD L, et al. Impact of sleep deprivation on the brain's inflammatory response triggered by lipopolysaccharide and its consequences on spatial learning and memory and long-term potentiation in male rats[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2024, 31(1): 12-24.
- [18] JEONG N, SINGER A C. Learning from inhibition: Functional roles of hippocampal CA1 inhibition in spatial learning and memory[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2022, 76: 102604.
- [19] ZHOU H, WU J, GONG Y, et al. Isoquercetin alleviates sleep deprivation dependent hippocampal neurons damage by suppressing NLRP3-induced pyroptosis[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2022, 44(5): 766-772.
- [20] 张军路, 孙康, 吴艺璇, 等. 基于Cyt C调节细胞凋亡途径探讨安寐丹改善老年睡眠剥夺模型致认知损伤的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(19): 1-9.
- ZHANG J L, SUN K, WU Y X, et al. Mechanism of anmeidan in ameliorating cognitive impairment in geriatric sleep deprivation model based on Cyt C signaling pathway on apoptosis[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(19): 1-9.
- [21] GOTO A. Synaptic plasticity during systems memory consolidation[J]. *Neurosci Res*, 2022, 183: 1-6.
- [22] 阿兰, 李双燕, 徐桂芝, 等. 睡眠剥夺对记忆功能及突触可塑性的影响[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2024, 51(12): 3224-3237.
- A L, LI S Y, XU G Z, et al. Effects of sleep deprivation on memory function and synaptic plasticity[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2024, 51(12): 3224-3237.
- [23] 袁洁, 高静, 苏凯奇, 等. 电针对脑缺血再灌注损伤诱导的学习记忆障碍大鼠BDNF/TRKB/CREB信号通路和海马突触可塑性的影响[J]. *针刺研究*, 2023, 48(9): 843-851.
- YUAN J, GAO J, SU K Q, et al. Electroacupuncture improves learning and memory impairment and enhances hippocampal synaptic plasticity through BDNF/TRKB/CREB signaling pathway in cerebral ischemiareperfusion injury rats[J]. *Acupunct Res*, 2023, 48(9): 843-851.
- [24] WANG Z, WU D, HU X, et al. WuYou decoction effectively reduces neuronal damage, synaptic dysfunction, and A β production in rats exposed to chronic sleep deprivation by modulating the A β -related enzymes and SIRT1/Nrf2/NF- κ B pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337(Pt 3): 118939.
- [25] 郭娅静, 温婧, 王孟雨, 等. 电针对睡眠剥夺大鼠突触超微结构及突触功能相关蛋白的影响[J]. *针刺研究*, 2024, 49(11): 1168-1173.
- GUO Y J, WEN J, WANG M Y, et al. Effect of electroacupuncture on synaptic ultrastructure and synaptic function related proteins PSD-95 and MeCP2 in sleep deprivation rats[J]. *Acupunct Res*, 2024, 49(11): 1168-1173.
- [26] 叶茂, 张莹, 王强, 等. 右美托咪定对睡眠剥夺小鼠记忆能力和突触可塑性的影响[J]. *临床床学杂志*, 2023, 39(5): 519-523.
- YE M, ZHANG Y, WANG Q, et al. Effects of dexmedetomidine on memory fuction and synaptic plasticity in sleep-deprived mice[J]. *J Clin Anesthesiol*, 2023, 39(5): 519-523.
- [27] COLUCCI-D'AMATO L, SPERANZA L, VOLPICELLI F. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7777.
- [28] WANG H, XU J, LAZAROVICI P, et al. cAMP response element-binding protein (CREB): A possible signaling molecule link in the pathophysiology of schizophrenia[J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 255.
- [29] 陈洪丽, 高静静, 姜忠迪, 等. 光疗对睡眠剥夺小鼠学习记忆以及BDNF-TrkB信号通路的影响[J]. *中国激光*, 2022, 49(5): 230-240.
- CHEN H L, GAO J J, JIANG Z D, et al. Effects of phototherapy on learning memory and BDNF-TrkB signaling pathway in sleep-deprived mice[J]. *Chin J Lasers*, 2022, 49(5): 230-240.
- [30] LIU Y, ZHANG Y, ZHENG X, et al. Galantamine improves cognition, hippocampal inflammation, and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide in mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 112.
- [31] 张士滨, 王璐, 王储, 等. 不同时间急性睡眠剥夺对大鼠行为学及突触生物标志物表达的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(5): 55-64.
- ZHANG S B, WANG L, WANG C, et al. Effects of acute sleep deprivation on behavior and synaptic biomarker expression in rats[J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(5): 55-64.
- [32] 徐波, 夏婧, 蔡铭, 等. 安寐丹对不同周期睡眠剥夺大鼠昼夜节律、学习记忆及食欲素的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(3): 1677-1682.
- XU B, XIA J, CAI M, et al. Effects of Anmei pill on circadian rhythm, learning and memory and orexin of sleep deprivation rats in different cycles[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(3): 1677-1682.
- [33] 纪可, 刘玲, 刘福贵, 等. 基于星形胶质细胞调控作用探讨安寐丹对睡眠剥夺大鼠脑内神经递质的影响[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2024, 26(7): 1786-1792.
- JI K, LIU L, LIU F G, et al. To Investigate the effects of anmeidan on neurotransmitters in sleep deprived rats based on the regulation of astrocytes[J]. *World Sci Tec-Mod Tradit Chin Med*, 2024, 26(7): 1786-1792.
- [34] MU L, CAI J, GU B, et al. Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in 3 $\times$ Tg-AD mice through enhancement of structural synaptic plasticity of the hippocampus and prefrontal cortex[J]. *Cells*, 2022, 11(2): 244.
- [35] 崔建梅, 郭燕兰, 李中华, 等. 跑台运动对慢性睡眠剥夺大鼠行为学改变、海马炎症因子及海马齿状回BDNF/TrkB信号通路的影响[J]. *体育科学*, 2019, 39(6): 62-72.
- CUI J M, GUO Y L, LI Z H, et al. Effects of treadmill exercise on behavior changes, hippocampal inflammation and BDNF/TrkB pathway in the hippocampus dentate gyrus of chronic sleep deprived rats[J]. *Chin Sport Sci*, 2019, 39(6): 62-72.

[责任编辑 顾雪竹]