

· 经典名方 ·

基于 EphA4/ephrinA3 信号通路探讨安寐丹改善老年睡眠剥夺模型神经元突触结构功能损伤的作用

张军路¹, 谢光璟^{1,2*}, 王平^{1,2}

(1. 湖北中医药大学 教育部工程中心, 武汉 430065;

2. 湖北时珍实验室, 武汉 430065)

[摘要] 目的:探讨安寐丹(AMD)对老年睡眠剥夺模型肝配蛋白A型受体4(EphA4)/肝配蛋白A3(ephrinA3)信号通路蛋白表达及突触结构功能的影响。方法:72只18月龄老年小鼠随机分为空白组,模型组,安寐丹高、中、低剂量组(26.26、13.13、6.565 g·kg⁻¹·d⁻¹)和褪黑素组(1.3 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组12只。以新物体实验检测小鼠的认知水平,苏木素-伊红(HE)染色观察海马组织的细胞数量和形态,尼氏染色观察海马组织的细胞结构、计算尼氏小体数量;透射电镜观察突触微观结构,重点观察突触形态结构变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织中EphA4、ephrinA3及脑源性神经营养因子(BDNF)、谷氨酸-天冬氨酸转运体(GLAST)、谷氨酸转运体1(GLT-1)、生长相关蛋白43(GAP43)、突触后致密蛋白95(PSD95)、突触素(SYN)等蛋白的表达水平;免疫荧光双标分别将EphA4、ephrinA3与胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、神经元核抗原(NeuN)进行共染,观察目标蛋白与神经元及星形胶质细胞的共定位情况。结果:与空白组比较,模型组小鼠旧物体探索时间增加($P<0.01$),而新物体探索时间和识别指数均降低($P<0.01$),小鼠海马组织CA1区、CA3区和DG区神经元细胞数量减少,尼氏小体减少,突触结构损伤;海马组织BDNF、GLAST、GLT-1、GAP43、PSD95、SYN蛋白表达均减少;EphA4、ephrinA3和GFAP蛋白表达升高;与模型组比较,安寐丹低、中、高剂量组和褪黑素组小鼠探索新物体时间和新物体识别指数均升高($P<0.01$),旧物体探索时间均显著降低($P<0.01$),改善了CA1区和DG区神经元细胞损伤,提高CA1区尼氏小体数量;缓解细胞器和突触结构损伤;提高BDNF、GLAST、GLT-1、GAP43、PSD95、SYN的蛋白表达,降低EphA4、ephrinA3和GFAP的蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:安寐丹可调节老年睡眠剥夺模型EphA4/ephrinA3信号通路蛋白表达,增强突触蛋白表达并改善神经元突触损伤。

[关键词] 安寐丹; 睡眠剥夺; 肝配蛋白A型受体4(EphA4)/肝配蛋白A3(ephrinA3)信号通路; 突触; 星形胶质细胞

[中图分类号] R289;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)06-0036-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20252105

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251030.1934.007>

[网络出版日期] 2025-10-31 11:35:41



Effect of Anmeidan in Ameliorating Neuronal Synaptic Structural and Functional Impairment in Aged Sleep Deprivation Model via EphA4/ephrinA3 Signaling Pathway

ZHANG Junlu¹, XIE Guangjing^{1,2*}, WANG Ping^{1,2}

(1. Engineering Center of the Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Anmeidan (AMD) on protein expression of the ephrin type-A receptor 4 (EphA4)/ephrinA3 signaling pathway and synaptic structural function in an aged sleep deprivation model. **Methods:** Seventy-two 18-month-old aged mice were randomly divided into a blank group, a model group, AMD high-, medium-, and low-dose groups (26.26, 13.13, 6.565 g·kg⁻¹·d⁻¹, respectively), and a melatonin group (1.3 mg·kg⁻¹·d⁻¹), with 12 mice in each group. Cognitive function was assessed using the novel object recognition test. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe cell

[收稿日期] 2025-06-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82305354)

[第一作者] 张军路,在读硕士,从事中医延缓衰老理论及应用研究,E-mail:414137538@qq.com

[通信作者] * 谢光璟,博士,副教授,硕士生导师,从事中医药防治老年病研究,E-mail:397525306@qq.com

number and morphology in hippocampal tissues, and Nissl staining was performed to examine cellular structure and quantify Nissl bodies. Transmission electron microscopy was used to observe synaptic ultrastructure, with emphasis on changes in synaptic morphology and structure. Western blot was employed to detect the expression levels of EphA4, ephrinA3, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glutamate aspartate transporter (GLAST), glutamate transporter-1 (GLT-1), growth-associated protein 43 (GAP43), postsynaptic density protein 95 (PSD95), and synaptophysin (SYN) in hippocampal tissues. Immunofluorescence double labeling was performed to co-stain EphA4 and ephrinA3 with glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neuronal nuclei antigen (NeuN), respectively, to observe the colocalization of target proteins with neurons and astrocytes.

Results: Compared with the blank group, the model group exhibited increased exploration time of familiar objects ($P<0.01$), while exploration time of novel objects and the recognition index were decreased ($P<0.01$). The number of neurons in the CA1, CA3, and dentate gyrus (DG) regions of the hippocampus was reduced, Nissl bodies were decreased, and synaptic structures were damaged. Protein expression levels of BDNF, GLAST, GLT-1, GAP43, PSD95, and SYN in hippocampal tissues were decreased, whereas the expression levels of EphA4, ephrinA3, and GFAP were increased. Compared with the model group, the AMD low-, medium-, and high-dose groups and the melatonin group showed increased exploration time of novel objects and higher novel object recognition indices ($P<0.01$), along with significantly reduced exploration time of familiar objects ($P<0.01$). Neuronal damage in the CA1 and DG regions was ameliorated, the number of Nissl bodies in the CA1 region was increased, and organelle and synaptic structural damage was alleviated. Protein expression levels of BDNF, GLAST, GLT-1, GAP43, PSD95, and SYN were increased, and protein expression levels of EphA4, ephrinA3, and GFAP were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$).

Conclusion: AMD can regulate protein expression of the EphA4/ephrinA3 signaling pathway in an aged sleep deprivation model, enhance synaptic protein expression, and improve neuronal synaptic damage.

[Keywords] Anmeidan (AMD); Sleep deprivation; ephrin type-A receptor 4 (EphA4)/ephrinA3 signaling pathway; synapse; astrocyte

睡眠是人类不可或缺的一种生理现象,良好充足的睡眠是保证人体的正常生命活动的基础。而目前睡眠障碍发病率逐年升高,其中老年群体因衰老等因素的影响,其发病率较其他年龄段人群更为显著,其中睡眠剥夺是主要表现,并成为老年性失眠的重要诱因之一。老年性失眠主要以入睡困难、早醒或醒后难以入睡为临床表现的疾病^[1],属中医“不寐”“不得卧”等范畴,且常伴随认识功能损伤。调查显示,老年性失眠的发生率已经达到到30%~40%,其中女性高于男性,并成为老年性痴呆、心脏病、抑郁症等慢性疾病的重要危险因素^[2-3]。长期的睡眠缺失通过破坏昼夜节律、加剧神经炎症及突触可塑性损伤,诱发并加重老年失眠的发生^[4]。研究表明,慢性失眠可使老年人认知功能下降风险增加^[5],其中肝配蛋白A型受体4(EphA4)/肝配蛋白A3(ephrinA3)信号通路的异常表达通过影响突触结构功能进一步加重认知损伤的恶性循环。

安寐丹是治疗失眠的代表方剂之一,出自《石室秘录》卷一,前期临床报道此方对于慢性失眠患者睡眠质量具有较好疗效,并缓解患者认知功能损害,治疗后总有效率显著高于对照组^[6]。为进一步揭示安寐丹对睡眠障碍的现代分子机制,课题组通过动物实验证实安寐丹可改善睡眠剥夺模型的认知损害,减轻神经元损伤^[7-8],但安寐丹是否对老年睡眠剥夺模型有作用尚待进一步研究。故本次研究在前期基础上,选用18月龄雄性C57BL/6

小鼠为研究对象,从行为学、形态学、分子生物学等层面,围绕EphA4/ephrinA3通路介导胶质细胞兴奋性氨基酸转运体(EAATs)转运和神经因子表达,挖掘安寐丹治疗老年睡眠剥夺模型的作用机制,研究结果将为中医药防治老年脑病提供新思路。

1 材料

1.1 动物 72只18月龄雄性小鼠,体质量(35±2)g,由江苏华创信诺医药科技有限公司提供,合格证号SCXK(苏)2020-0009,喂养于SPF级动物房,室温(24±1)℃,湿度(55±5)%、所有动物自由摄食饮水。

1.2 伦理 本实验已获得湖北中医药大学动物伦理委员会批准(批注号HUCMS33540852)。

1.3 药材及试剂 安寐丹组成及剂量:人参11g、麦冬11g、茯神11g、丹参7g、甘草4g、石菖蒲4g(江阴天江药业有限公司,批号分别为B23071401-01、B23120601-01、B23050801-01、B23062502-01、B23010201-01、B23041801-01),生酸枣仁19g(重庆医药集团杭州医药有限公司,批号240201),熟酸枣仁19g(河北康美制药股份有限公司,批号230501),当归11g(亳州广源堂中药饮片有限公司,批号231001),五味子4g(安徽毫泰中药科技有限公司,批号23102603);所有药材经湖北中医药大学药学院游秋云教授鉴定为正品。药物装入煎药机中煎煮30min后过滤,煎煮2次后合并浓缩成26.26g·mL⁻¹药液;褪黑素(上海麦克林生化科技有

限公司,批号C14896562);聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G-辣根过氧化物酶(HRP)、山羊抗兔IgG-HRP、RIPA裂解液、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、尼氏染色液(北京兰杰柯科技有限公司,批号分别为BL521S、BL001A、BL003A、BL504A、G1076、G1086);兔源抗体促红细胞生成素产生肝细胞受体A4(EphA4)、Eph受体反应蛋白A3(ephraA3)、谷氨酸-天冬氨酸转运体(GLAST)、谷氨酸转运体-1(GLT-1)、脑源性神经营养因子(BDNF)、线粒体神经元核抗原(NeuN)、生长相关蛋白43(GAP43)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、突触后致密物(PSD95)、突触素(SYN)鼠源抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为A8346、12480-1-AP、20785-1-AP、2515-1-AP、A1307、A0951、A19055、A0237、A0131、A19122、AC033)。

1.4 仪器 GelDoc XR+型自制睡眠剥夺箱、Mini-PROTEAN型电泳仪、转膜仪、Universal Hood III型凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司);Ethovision XT 16.0型动物行为学视频跟踪系统(荷兰Noldus公司);Spectra Max M5型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);AVANTI J-15R型高速冷冻离心机(美国Beckman Coulter有限公司);DVM6型透射电镜仪(德国Leica公司);IX71型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 模型制备 采用多平台水环境制备睡眠剥夺模型^[9]。自制睡眠剥夺箱尺寸为75 cm×50 cm×36 cm,在其中放入小圆台直径3 cm;箱内注入水低于平台1 cm,小鼠仅在不同圆台间活动造成持续性睡眠剥夺。空白组在实验组基础上增加圆台直径保证动物能够正常睡眠,剥夺时间为当日中午12:00至次日早上8:00,造模持续4周。除造模时间外小鼠正常饲养。

2.2 分组及给药 将72只18月龄雄性小鼠采用随机数字法分为空白组,模型组,安寐丹低、中、高剂量组和褪黑素组,每组12只,空白组和模型组给予等容生理盐水灌胃,每日1次。根据中药药理研究方法学(第2版)^[10]小鼠与人剂量折算,安寐丹低剂量为6.565 g·kg⁻¹·d⁻¹,安寐丹中剂量组给药剂量为13.13 g·kg⁻¹·d⁻¹,安寐丹高剂量组为26.26 g·kg⁻¹·d⁻¹,褪黑素组给药量为1.3 mg·kg⁻¹·d⁻¹,持续性睡眠剥夺14 d后,开始灌胃给药并连续给药28 d。

2.3 指标检测

2.3.1 新物体识别实验 于治疗结束后每组12只小鼠在边长25 cm的去盖正方体中进行检测,实验分为3 d完成,分别为熟悉期、适应期和测试期,第1天箱体内不放任何物体,小鼠自由活动熟悉环境5 min。第2天将2个相同的物体放在实验箱内,以箱子的正中中线为轴对称放在左右两边,将小鼠放入箱内5 min对两相同物体进行探索。第3天将箱中的1个物体换为其他颜色形状均不相同的物体,小鼠进行新物体识别。视频分析软件自动识别并记录小鼠在5 min内对2个不同物体的学习探索的时间,每次实验结束后喷洒75%乙醇消除气味,记录 T_n 为探测新物体的时间, T_r 为探索旧物体的时间,用新物体识别指数表示小鼠的学习记忆能力,新物体识别指数= $T_n/(T_n+T_r) \times 100\%$ 。

2.3.2 样本采集 行为学实验结束后,每组随机选取3只小鼠安乐死处理后冰盘上剥离全脑4%多聚甲醛溶液固定用于后续检测,取海马组织分置于电镜固定液作为电镜标本,其余动物迅速剥离海马和皮质等组织放入无菌冷冻管,置于-80℃冰箱备用。

2.3.3 HE染色观察小鼠海马病理形态 脑组织在4%多聚甲醛中固定后,经梯度乙醇脱水,透明包埋处理后,用切片机切为5 μm薄片并贴于载玻片。依次进行脱蜡,组织水化,染色,水洗,返蓝,梯度乙醇脱水,伊红染色,脱水与透明,封片,最后光学显微镜下观察。

2.3.4 尼氏染色检测小鼠海马CA1区、CA3区和DG区神经元细胞 对全脑组织进行取材固定,包埋,切片等制备相应的组织切片,石蜡切片脱蜡至水,冰冻切片复温固定,尼氏染色,透明封片,最后显微镜观察,分析图像。

2.3.5 电镜观察突触超微结构 取海马脑组织置于电镜固定液中4℃保存;1%锇酸固定2 h,0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液洗3次,然后室温对组织进行乙醇脱水,100%丙酮,包埋,切片机切片,染色,最后观察并分析图像,重点观察突触形态结构变化。

2.3.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织EphA4、ephraA3、BDNF、GLAST、GLT-1、GAP43、PSD95、SYN蛋白的表达 从海马组织中提取组织蛋白,BCA试剂盒测定蛋白配平后,依据检测蛋白分子量选取合适十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶,经过上样,电泳,转膜,封闭,清洗,孵育一抗工作液(1:1 000),孵育二抗(1:10 000)工作液,最后TBST清洗后,滴加显影

工作液,显影,拍照分析目标条带。

2.3.7 免疫荧光(IF)双标检测 EphA4、ephrinA3与GFAP、NeuN共染表达 海马组织进行切片固定,清洗,抗原修复,封闭,孵育一抗(1:1 000)、二抗(1:1 000),组织复染与淬灭组织自发荧光,抗荧光淬灭封片,根据图像分析数据。

2.4 统计学处理 采用Image J 1.8.0对实验图像数据处理,GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组间比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表1 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠新物体识别检测结果比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 1 Comparison of new object recognition detection results of Anmeidan (AMD) in aged sleep deprivation model mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	旧物体探索时间/s	新物体探索时间/s	相对识别指数/%
空白组		32.87±0.59	44.49±2.24	57.50±1.35
模型组		43.39±0.72 ¹⁾	21.15±0.49 ¹⁾	32.70±1.35 ¹⁾
安寐丹低剂量组	6.565	41.67±1.10 ³⁾	31.88±0.63 ³⁾	43.50±0.71 ³⁾
安寐丹中剂量组	13.13	37.88±0.90 ³⁾	36.15±0.85 ³⁾	48.80±0.92 ³⁾
安寐丹高剂量组	26.26	33.51±0.73 ³⁾	44.81±1.60 ³⁾	57.30±1.06 ³⁾
褪黑素组	0.001 3	33.10±0.67 ³⁾	44.07±2.81 ³⁾	57.10±1.66 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表2-表5同)

3.2 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠神经元形态结构的影响 空白组海马组织神经元细胞排列整齐有序,结构完整规则,细胞轮廓清晰,数量较多,无明显炎症浸润和细胞水肿;与空白组比较,模型组小鼠海马CA1区、CA3区和DG区神经元细胞数量减少,神经元显著水肿,有炎性细胞浸润,形态排列无规则。与模型组比较,褪黑素组和安寐丹低、中、高剂量组小鼠海马组织CA1区和DG区神经元细胞结构相对完整,细胞损伤得到改善,炎性浸润细胞得到不同程度缓解,其中安寐丹高剂量组和褪黑素组改善效果最佳;但治疗各组CA3区神经元细胞数量差异无统计学意义。见图1。

3.3 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠海马组织尼氏体的影响 空白组可见海马组织有较多神经元细胞,排列紧密,细胞胞浆内有较多尼氏体,呈现为“斑点状”;与空白组比较,模型组海马CA1区、CA3区和DG区锥体细胞数量显著丢失($P < 0.01$),尼氏体小体数量大幅减少,颜色变淡;与模型组比较,安寐丹高、中、低剂量组及褪黑素组小鼠海马组织CA1区神经元细胞数量依次增多($P < 0.01$),细胞内尼氏小体数量增多;与模型组比较,治疗各组海马CA3区与DG区尼氏小体数量差异无统计学意义,褪黑素组CA3区细胞数差异具有统计学意义($P <$

3 结果

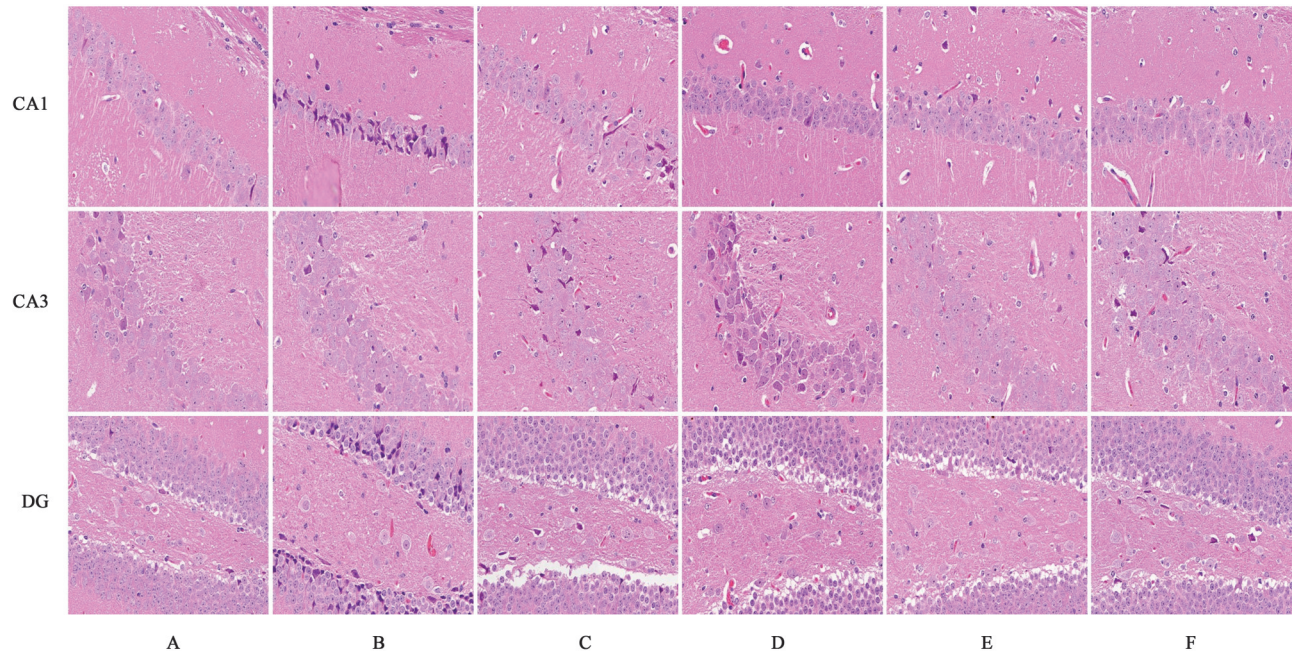
3.1 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠新物体识别实验的影响 与空白组比较,模型组小鼠旧物体探索时间显著增加($P < 0.01$),而新物体探索时间和识别指数均显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,安寐丹低、中、高剂量组和褪黑素组小鼠探索新物体时间和新物体识别指数均显著升高($P < 0.01$),尤以安寐丹高剂量组和褪黑素组治疗效果最佳;与模型组比较,安寐丹低、中、高剂量组和褪黑素组旧物体探索时间均显著降低($P < 0.01$)。见表1。

0.05)。见图2、表2。

3.4 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠神经元突触超微结构的影响 空白组线粒体形态结构清晰完整,粗面内质网丰富,前膜突触囊泡分布均匀。与空白组比较,模型组线粒体肿胀,有空泡样变,胞内细胞器部分溶解,有明显的神经元突触损伤改变,树突棘和树突断裂、变短、分支缩短,突触后致密物质明显变薄,突触囊泡密度显著降低;与模型组比较,褪黑素组和安寐丹高、中、低组的线粒体损伤得到不同的缓解,海马组织突触超微结构损伤改善,缓解突触致密物质减少;胞内细胞器结构基本恢复正常,分布较为均匀。见图3。

3.5 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠 EphA4/ephrinA3信号通路蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组海马组织EphA4、ephrinA3蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,安寐丹低、中、高剂量组和褪黑素组显著降低EphA4蛋白的表达水平($P < 0.01$);安寐丹低、中剂量组ephrinA3蛋白表达水平差异无统计学意义,安寐丹高剂量组和褪黑素组明显降低ephrinA3蛋白表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图4、表3。

3.6 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠突触功能相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组海马



注: A.空白组; B.模型组; C.安寐丹低剂量组; D.安寐丹中剂量组; E.安寐丹高剂量组; F.褪黑素组(图2-图7同)

图1 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠海马的病理的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of AMD on hippocampal region in mouse model of elderly sleep deprivation (HE, ×400)

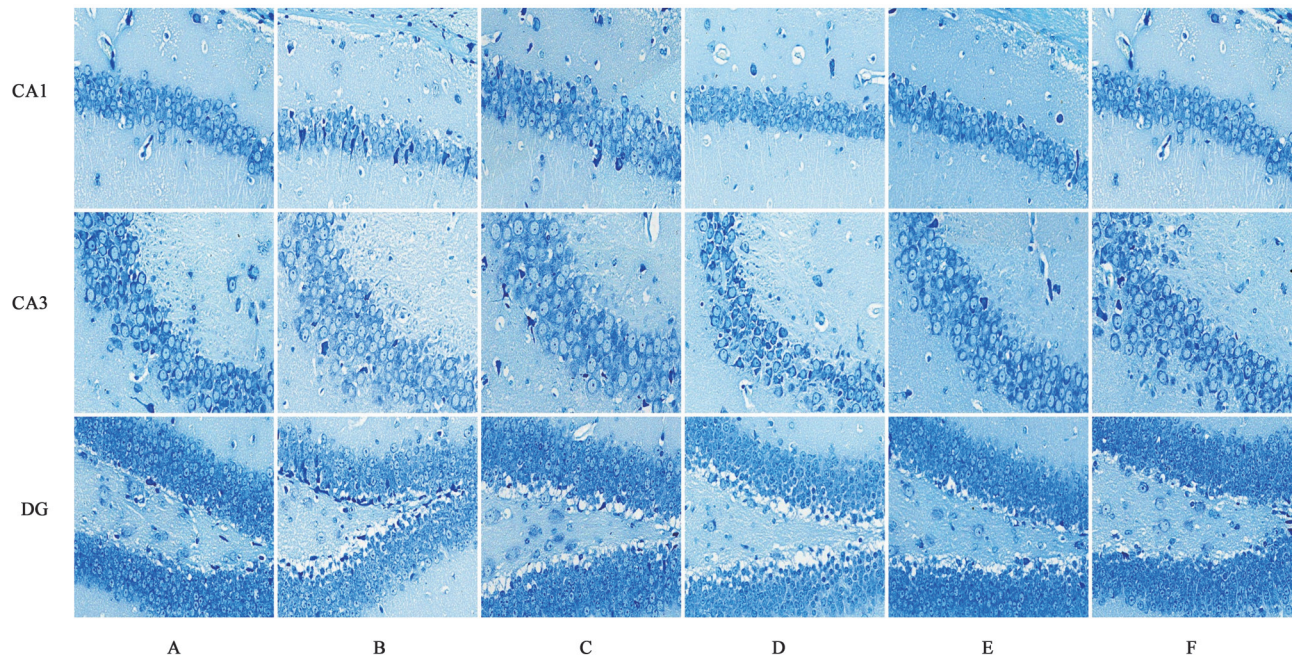


图2 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠海马尼氏染色结果的影响(尼氏, ×400)

Fig. 2 Effect of AMD on results of Nysted staining in hippocampal region of mice in elderly sleep deprivation model (Nissl, ×400)

BDNF、GLAST、GLT-1、GAP43、PSD95、SYN蛋白表达水平显著下降($P<0.01$);与模型组比较,安寐丹低、中、高剂量组和褪黑素组明显升高GLAST、GLT-1、GAP43、PSD95蛋白的表达($P<0.05$, $P<0.01$);其中安寐丹高剂量组和褪黑素组明显升高BDNF蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$),安寐丹低剂量组和安寐丹中剂量组差异无统计学意义;安寐丹低、

中剂量组和褪黑素剂量组均能够显著提高SYN蛋白表达($P<0.01$),安寐丹高剂量组SYN蛋白表达水平无统计学意义。见图5、表4。

3.7 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠海马组织合成蛋白表达的影响 EphA4、ephrinA3用红色标记,GFAP、NeuN用绿色标记,并用DAPI标记细胞核,免疫荧光共染用黄色标记。与空白组比较,模型组海马

表2 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠海马神经元细胞数目的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CA1区神经元细胞数	CA3区神经元细胞数	DG区神经元细胞数
空白组		70.67±3.98	92.67±3.51	163.00±10.82
模型组		29.00±4.38 ¹⁾	33.33±1.53 ¹⁾	92.00±4.36 ¹⁾
安寐丹低剂量组	6.565	40.96±3.02 ³⁾	34.33±2.08	93.67±4.51
安寐丹中剂量组	13.13	51.13±4.36 ³⁾	38.00±1.00	93.33±9.87
安寐丹高剂量组	26.26	64.53±2.83 ³⁾	37.33±1.53	99.70±7.37
褪黑素组	0.001 3	67.80±3.54 ³⁾	40.00±2.65 ²⁾	97.70±6.66

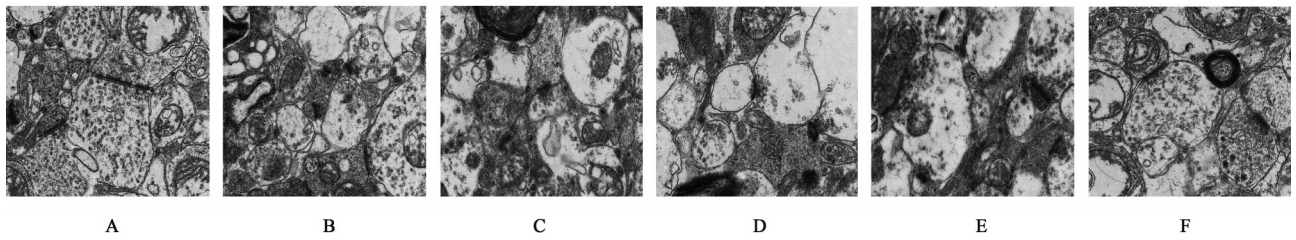


图3 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠海马神经元突触微观结构的影响 (透射电镜, ×10 000)

Fig. 3 Effect of AMD on synaptic microstructure of neurons in hippocampal tissue of mice with aged sleep deprivation model (TEM, ×10 000)

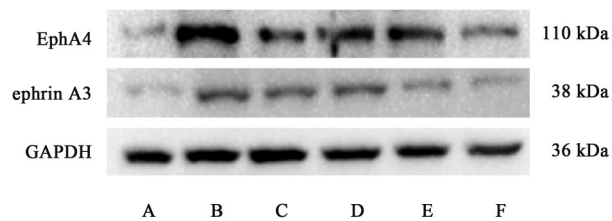


图4 各组小鼠 EphA4 和 ephrinA3 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of EphA4 and ephrinA3 protein expressions in each group of mice

表3 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠 EphA4 和 ephrinA3 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of AMD on protein expression levels of EphA4 and ephrinA3 in aged sleep deprivation model mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	EphA4/GAPDH	ephrinA3/GAPDH
空白组		0.73±0.27	0.72±0.15
模型组		1.80±0.09 ¹⁾	1.09±0.07 ¹⁾
安寐丹低剂量组	6.565	1.09±0.05 ³⁾	0.99±0.05
安寐丹中剂量组	13.13	1.28±0.13 ³⁾	1.00±0.04
安寐丹高剂量组	26.26	1.21±0.04 ³⁾	0.80±0.05 ²⁾
褪黑素组	0.001 3	0.98±0.03 ³⁾	0.75±0.02 ³⁾

组织 EphA4、ephrinA3 和 GFAP 蛋白表达显著升高, NeuN 蛋白表达显著减少, EphA4/NeuN 蛋白共染表达显著增加 ($P<0.01$), 但 ephrinA3/GFAP 蛋白共染表达差异无统计学意义; 与模型组比较, 安寐丹组 EphA4、ephrinA3 和 GFAP 蛋白表达量显著降低, NeuN 蛋白表达显著增强, EphA4/NeuN 蛋白共染表达显著减少 ($P<0.01$), ephrinA3/GFAP 蛋白共染表达差异无统计学意

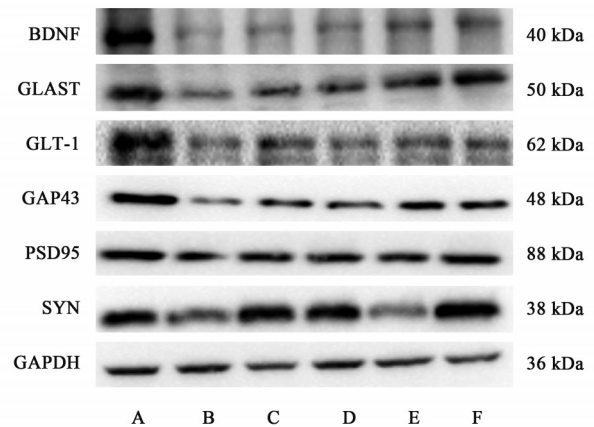


图5 各组小鼠突触功能相关蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of expression of synaptic function-related proteins in each group of mice

义。见表5、图6、图7。

4 讨论

安寐丹出自清代医家陈士铎《石室秘录》:“心经之病,怔忡不寐等症,乃心血少也……水煎服。”常用于治疗元气亏虚,心血失养所致的睡眠不安,心悸等病症^[11-12]。方中人参大补元气,配合麦冬、五味子益气养阴;生枣仁、熟枣仁同用养血以益气,配以茯神、甘草增强益气宁心安神之功;当归、丹参补血行血,助力气血调和;石菖蒲醒脑益智。中医学认为人体衰老是脏腑气血阴阳等的整体衰老,彼此之间相互影响,若出现元气亏虚、阴阳失衡等则人体出现一系列的病理变化,如早衰,失眠等。全方补中有泻,以补为主,合用可以培元固本,养心安

表 4 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠 BDNF、GLAST、GLT-1、GAP43、PSD95、SYN 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of AMD on expression levels of BDNF, GLAST, GLT-1, GAP43, PSD95, and SYN protein expression in aged sleep deprivation model mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BDNF/GAPDH	GLAST/GAPDH	GLT-1/GAPDH	GAP43/GAPDH	PSD95/GAPDH	SYN/GAPDH
空白组		0.95±0.04	1.05±0.12	1.08±0.02	1.31±0.05	1.30±0.08	1.05±0.01
模型组		0.27±0.08 ¹⁾	0.42±0.03 ¹⁾	0.35±0.06 ¹⁾	0.28±0.06 ¹⁾	0.65±0.03 ¹⁾	0.52±0.03 ¹⁾
安寐丹低剂量组	6.565	0.33±0.02	0.56±0.08 ²⁾	0.54±0.01 ³⁾	0.66±0.01 ³⁾	1.01±0.02 ³⁾	1.12±0.08 ³⁾
安寐丹中剂量组	13.13	0.34±0.03	0.60±0.04 ³⁾	0.50±0.07 ³⁾	0.67±0.07 ³⁾	1.08±0.06 ³⁾	1.14±0.05 ³⁾
安寐丹高剂量组	26.26	0.47±0.07 ²⁾	0.88±0.03 ³⁾	0.60±0.05 ³⁾	0.84±0.07 ³⁾	1.21±0.03 ³⁾	0.48±0.03
褪黑素组	0.001 3	0.56±0.01 ³⁾	1.01±0.05 ³⁾	0.62±0.06 ³⁾	0.85±0.06 ³⁾	1.30±0.04 ³⁾	1.42±0.02 ³⁾

表 5 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠 NeuN、EphA4、GFAP、ephrinA3 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of AMD on expression of NeuN, EphA4, GFAP, and ephrinA3 proteins in aged sleep-deprived model mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NeuN	EphA4	GFAP	ephrinA3	EphA4/NeuN	ephrinA3/GFAP
空白组		49.64±2.82	6.11±0.65	3.40±0.12	6.23±0.16	1.26±0.02	0.02±0.01
模型组		13.52±0.51 ¹⁾	48.89±0.72 ¹⁾	27.23±0.23 ¹⁾	25.98±0.21 ¹⁾	21.23±0.23 ¹⁾	0.03±0.02
安寐丹低剂量组	6.565	23.01±0.44 ³⁾	39.37±0.61 ³⁾	14.78±0.83 ³⁾	18.27±0.33 ³⁾	12.03±0.16 ³⁾	0.01±0.01
安寐丹中剂量组	13.13	25.56±1.26 ³⁾	29.80±0.82 ³⁾	10.63±0.26 ³⁾	13.09±0.72 ³⁾	11.42±0.18 ³⁾	0.02±0.01
安寐丹高剂量组	26.26	28.84±0.94 ³⁾	20.38±0.11 ³⁾	8.92±0.58 ³⁾	9.82±0.39 ³⁾	9.84±0.20 ³⁾	0.03±0.01
褪黑素组	0.001 3	28.10±0.70 ³⁾	21.73±0.53 ³⁾	6.23±0.92 ³⁾	8.22±0.67 ³⁾	9.89±0.67 ³⁾	0.04±0.01

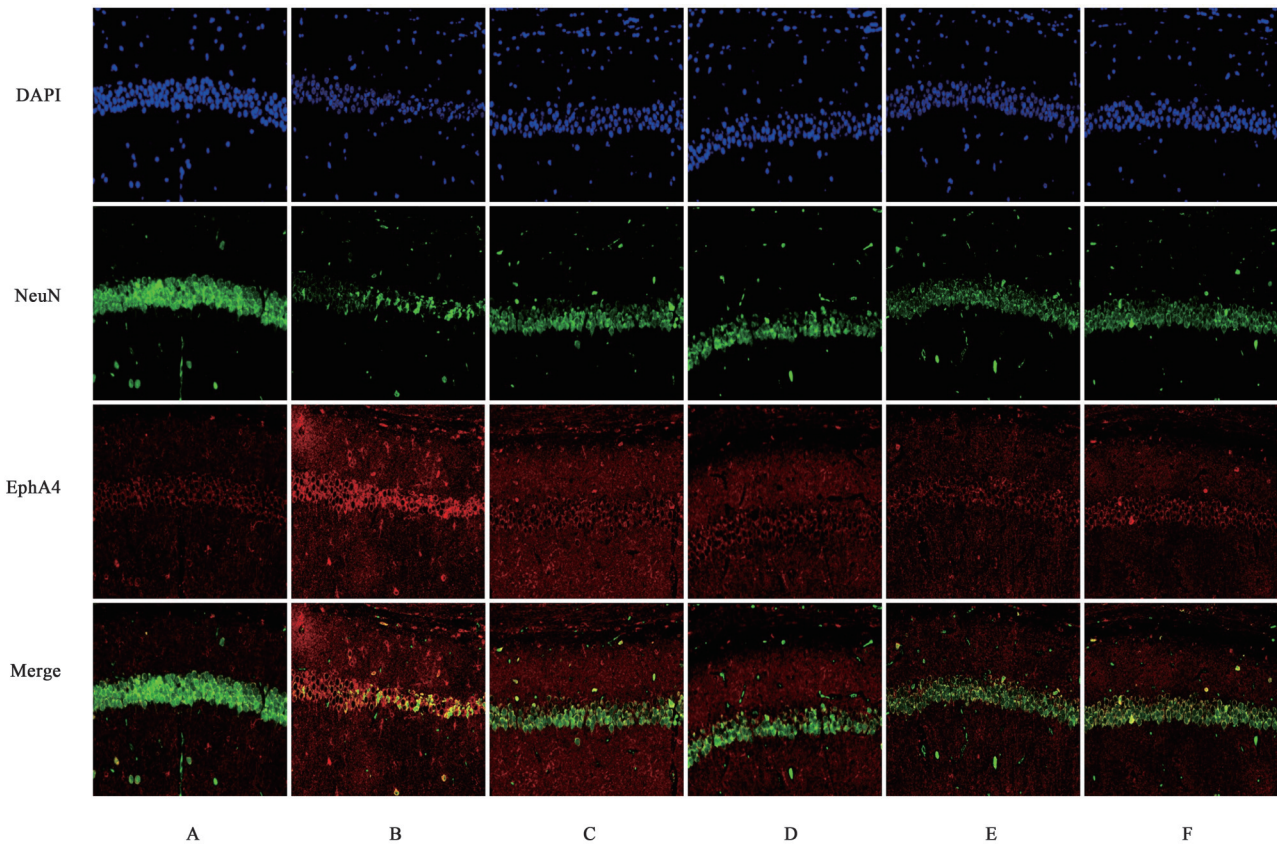


图 6 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠 EphA4 与 NeuN 蛋白表达的影响(免疫荧光, ×500)

Fig. 6 Effect of AMD on expression of EphA4 and NeuN protein in aged sleep deprivation model mice (IF, ×500)

神^[13]。本实验结果证明安寐丹可改善老年睡眠剥夺模型认知损伤,并减轻神经元突触损伤,为进一

步研究提供基础。

突触是信息传递的敏感部位,是神经元之间的

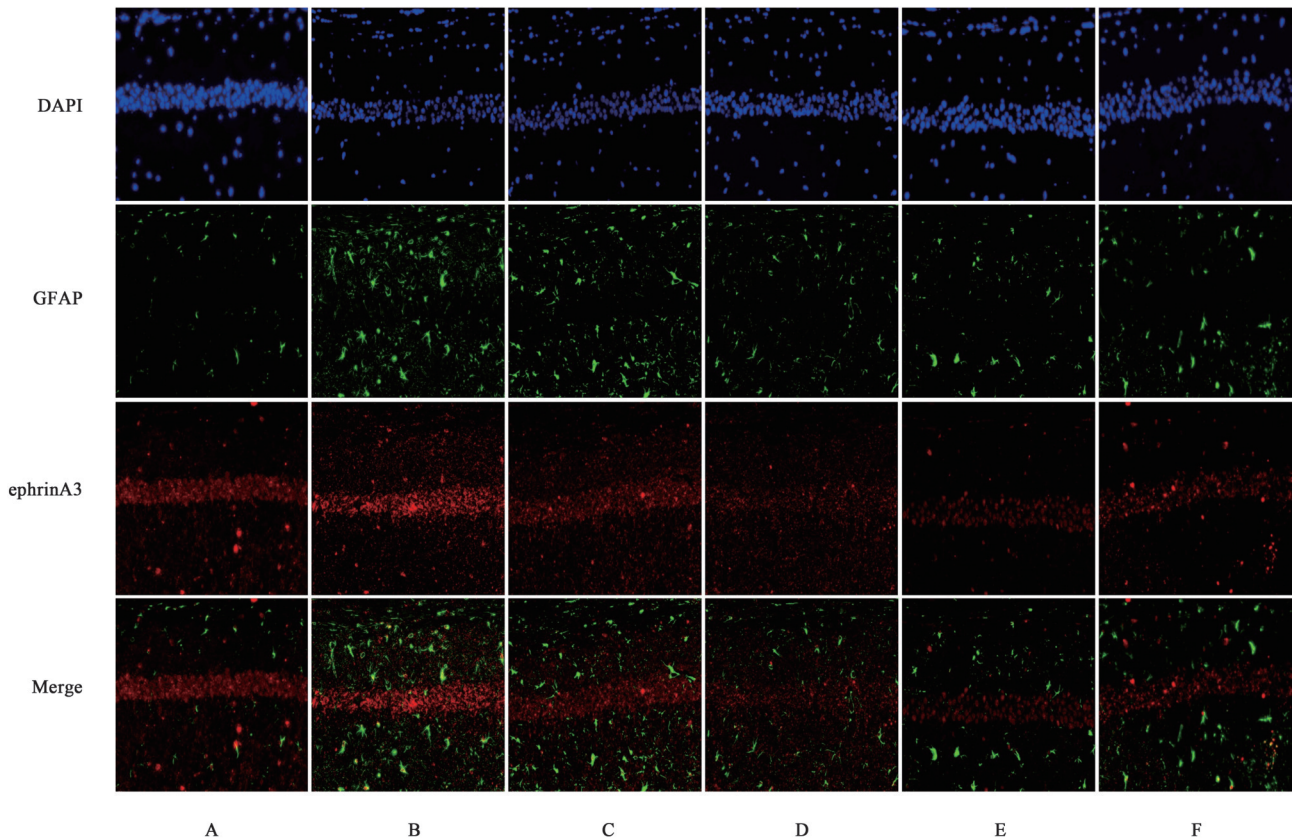


图7 安寐丹对老年睡眠剥夺模型小鼠 ephrinA3与 GFAP 蛋白表达的影响(免疫荧光,×500)

Fig. 7 Effect of AMD on expression of ephrinA3 and GFAP protein in aged sleep deprivation model mice (IF,×500)

连结关键部位,是生物体学习记忆存储的重要基础^[14]。神经元必须保持长期的突触连接以存储信息,通过维持可塑性以创造新的记忆^[15]。突触可塑性包括传递效率功能可塑性和信息贮存结构可塑性,结构可塑性是功能可塑性的基础,主要与神经系统的发育、修复和信息传递过程,以及情绪应激、学习记忆等重要的脑功能密切相关^[16-17]。因此,棘突密度和突触的形成、重塑是神经元连接活动依赖性变化的重要部分^[18-19]。长期的睡眠缺失不仅直接影响海马捕获外界刺激,削弱大脑保留信息的能力,同时加速脑衰老进程,引起海马神经元出现不同程度的损伤,表现在相关突触蛋白异常,导致突触可塑性降低,损害记忆的形成与巩固^[20-21]。以 EphA4 为代表的酪氨酸激酶肾上腺素受体(Eph)家族可调节神经的发育过程如神经网络的形成、轴突导向等,且在突触的发育和成熟中扮演关键角色,重点参与轴突生长与树突棘密度发育^[22]。Eph 受体家族还参与调节学习与记忆功能^[23]。EphA4 已成为常见神经系统疾病如睡眠障碍、阿尔茨海默病、抑郁症等从突触功能障碍开展研究的重要靶点^[24],遗传方式减少或药物阻断 EphA4 的表达可以挽救

树突棘丢失和长时程增强(LTP)缺陷,改善认知能力^[25]。但 EphA4 与配体 ephrinA3 调控区域并不相同。EphA4 主要存在于海马成熟神经元,而 ephrinA3 位于星形胶质细胞。在 EphA4 激酶调控棘突形态的研究中 MURAI 等^[26]通过实验证明了 EphA4 和 ephrin 的正向传递信号是保持树突棘长度重要因素。BOURGIN 等^[27]进一步阐述了 EphA 受体对树突棘形态可塑性同样起着重要作用。因此检测 EphA4/ephrinA3 信号通路蛋白表达发现安寐丹可以下调其表达,这可能是其改善突触微环境缓解认知损伤的潜在机制。

为了进一步证实,对其下游蛋白即星形胶质细胞膜上大量的 EAATs 尤其是 EAAT1 (GLAST) 和 EAAT2 (GLT-1) 进行了研究。EAATs 通过摄取谷氨酸(Glu)的方式消除海马中多余的兴奋性突触连接,防止过量堆积造成神经元兴奋性毒性^[28-29]。另外,星形胶质细胞可以通过调节 BDNF/激活原肌球蛋白受体激酶 B (TrkB) 通路,促进神经元生长、生存和修复,参与突触可塑性规则的维持,改善学习记忆水平^[30]。在生理条件下, EphA4 介导的星形胶质细胞 ephrinA3 信号是控制胶质细胞 EAATs 浓度所

必需的。星形胶质细胞 ephrinA3 调控 EAATs 转运促进 Glu 再摄取,维持突触传递效率与可塑性^[31]。当星形胶质细胞摄取能力减弱,EAATs 转运能力下降时,Glu 清除效率降低,将造成不可逆突触损伤而损害认知功能^[32-33]。本研究发现安寐丹可改善海马组织突触超微结构损伤,提高神经营养因子,兴奋性氨基酸转运体 GLAST、GLT-1 的蛋白表达。

睡眠剥夺损伤海马神经元已经得到广泛证实,并通过降低相关突触蛋白表达,诱导认知功能障碍^[34]。BDNF 是突触可塑性的重要神经因子,调控着神经元的生长与分化^[35],发挥神经保护作用,成熟星形胶质细胞中,GFAP 是主要的中间丝蛋白,其水平的变化能够体现出星形胶质细胞的活力状态与功能状况;SYN 是突触前膜发育和活性的标志性蛋白,调控突触的延长,促使突触囊泡前移^[36];GAP43 在其轴突导向作用中发挥着重要作用^[37],PSD-95 维持突触结构稳定、促进突触传递效能发挥着关键作用^[38]。进一步通过免疫荧光双标法进行共定位标记及蛋白半定量分析,结果发现安寐丹可以改善缓解突触致密物质减少,提高神经营养因子,突触功能相关蛋白 GAP43、PSD95、SYN 的表达,降低 EphA4、ephrinA3 蛋白和 GFAP 蛋白表达,降低 EphA4/NeuN 蛋白共染表达;提示安寐丹维持老年睡眠剥夺模型小鼠突触可塑性,并改善星形胶质细胞活性。

综上所述,安寐丹通过调节 EphA4/ephrinA3 信号来控制胶质细胞 EAATs 转运并调整突触传递,增强海马神经元与星形胶质细胞对话,减轻海马神经损伤和认知障碍。后期的研究考虑结合细胞实验及临床进行持续性研究及验证。

[利益冲突] 谢光璟为本刊青年编委,未参与本文的任何审校环节,不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] RIEMANN D, NISSEN C, PALAGINI L, et al. The neurobiology, investigation, and treatment of chronic insomnia [J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(5): 547-558.

[2] BUYSSE D J. Insomnia [J]. *JAMA*, 2013, 309(7): 706-716.

[3] CUNNINGTON D, JUNGE M F, FERNANDO A T. Insomnia: Prevalence, consequences and effective treatment [J]. *Med J Aust*, 2013, 199(8): S36-S40.

[4] XU L J, WANG H N, ZHOU H, et al. EphA4/ephrinA3 reverse signaling induced Müller cell gliosis and production of pro-inflammatory cytokines in experimental glaucoma [J]. *Brain Res*, 2023, 1801: 148204.

[5] CHEN J C, ESPELAND M A, BRUNNER R L, et al. Sleep

duration, cognitive decline, and dementia risk in older women [J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(1): 21-33.

[6] 杨杰,谭云霞,王平,等.安寐丹对慢性失眠患者血清 BDNF、GFAP 和 Irisin 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(16): 170-177.

YANG J, TAN Y X, WANG P, et al. Effects of Anmei Dan on serum BDNF, GFAP and irisin in patients with chronic insomnia [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2023, 29(16): 170-177.

[7] 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 Anmei Dan on hippocampal CA1 region cell structure and neuronal damage in sleep-deprived rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(7): 26-32.

[8] 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 Anmei Dan on neuronal damage in sleep-deprived rat model based on hippocampal neuroinflammation [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(10): 65-71.

[9] 文纯.生慧汤改善睡眠剥夺模型小鼠学习记忆的物质基础和 P2X7R/p38MAPK 炎症机制研究 [D]. 武汉:湖北中医药大学, 2023.

WEN C. Study on the material basis and P2X7R/p38MAPK inflammatory mechanism of Shenghui decoction in improving learning and memory in sleep-deprived model mice [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2023.

[10] 陈奇,孙建宁,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 J N, LIN Z B, et al. Methodology of pharmacological research on traditional Chinese medicine [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006.

[11] 谢光璟,徐波,黄攀攀,等.安寐丹对睡眠剥夺大鼠自发活动昼夜节律的调节及对生物钟蛋白的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(7): 33-39.

XIE G J, XU B, HUANG P P, et al. Regulation of Anmei Dan on circadian rhythm of spontaneous activity and its effect on clock proteins in sleep-deprived rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(7): 33-39.

[12] 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. Exploration of the mechanism of Anmei Dan in improving cognitive impairment induced by senile sleep deprivation model based on Cyt C-regulated apoptotic pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(19): 1-9.

[13] 高艺,徐波,夏婧,等.安寐丹的化学成分分析及调控 ERK1/2/MNK/eIF4E 信号通路改善失眠大鼠昼夜节律的机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(10): 44-53.

- GAO Y, XU B, XIA J, et al. Chemical composition analysis of anmei dan and its mechanism in improving circadian rhythm of insomniac rats by regulating ERK1/2/MNK/eIF4E signaling pathway[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(10):44-53.
- [14] FENG Y, SHI R, HU J, et al. Effects of neural-derived estradiol on actin polymerization and synaptic plasticity-related proteins in prefrontal and hippocampal cells of mice[J]. *Steroids*, 2022, 177:108935.
- [15] ENDO F, KASAI A, SOTO J S, et al. Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease[J]. *Science*, 2022, 378(6619):eabc9020.
- [16] 赵刚, 刘晓莉, 乔德才. 纹状体中等多棘神经元侧抑制效应与基底神经节运动功能调控[J]. *生理科学进展*, 2019, 50(1):58-62.
- ZHAO G, LIU X L, QIAO D C. Lateral inhibitory effect of striatal medium spiny neurons and regulation of basal ganglia motor function[J]. *Prog Physiol Sci*, 2019, 50(1):58-62.
- [17] PAREKH P K, JOHNSON S B, LISTON C. Synaptic Mechanisms Regulating Mood State Transitions in Depression[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2022, 45:581-601.
- [18] MAYNARD S A, RANFT J, TRILLER A. Quantifying postsynaptic receptor dynamics: Insights into synaptic function[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2023, 24(1):4-22.
- [19] 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. Study on the protective effect of anmei dan 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.
- [20] BIAN L H, YAO Z W, ZHAOC B, et al. Nardosinone alleviates Parkinson's disease symptoms in mice by regulating dopamine D2 receptor[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, doi:10.1155/2021/6686965.
- [21] AMANOLLAHI M, JAMEIE M, HEIDARI A, et al. The dialogue between neuroinflammation and adult neurogenesis: Mechanisms involved and alterations in neurological diseases[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(2):923-959.
- [22] RUGGIERO R N, ROSSIGNOLI M T, MARQUES D B, et al. Neuromodulation of hippocampal-prefrontal cortical synaptic plasticity and functional connectivity: Implications for neuropsychiatric disorders[J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15:732360.
- [23] TANASIC S, MATTUSCH C, WAGNER E M, et al. Desipramine targets astrocytes to attenuate synaptic plasticity via modulation of the ephrinA3/EphA4 signalling [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 105:154-163.
- [24] LI Y, SU P, CHEN Y, et al. The Eph receptor A4 plays a role in demyelination and depression-related behavior[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(8):e152187.
- [25] SMITH L M, KOSTYLEV M A, LEE S, et al. Systematic and standardized comparison of reported amyloid- β receptors for sufficiency, affinity, and Alzheimer's disease relevance[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(15):6042-6053.
- [26] MURAI K K, NGUYEN L N, IRIE F, et al. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling[J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6(2):153-160.
- [27] BOURGIN C, MURAI K K, RICHTER M, et al. The EphA4 receptor regulates dendritic spine remodeling by affecting beta1-integrin signaling pathways[J]. *J Cell Biol*, 2007, 178(7):1295-1307.
- [28] GROG L, CHOQUET D. Linking glutamate receptor movements and synapse function [J]. *Science*, 2020, 368(6496):4631.
- [29] PIETRANCOSTA N, DJIBO M, DAUMAS S, et al. Molecular, structural, functional, and pharmacological sites for vesicular glutamate transporter regulation [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(7):3118-3142.
- [30] LIU J H, ZHANG M, WANG Q, et al. Distinct roles of astroglia and neurons in synaptic plasticity and memory[J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(2):873-885.
- [31] BRANDEBURA A N, PAUMIER A, ONUR T S, et al. Astrocyte contribution to dysfunction, risk and progression in neurodegenerative disorders[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2023, 24(1):23-39.
- [32] UPADHYA R, ZINGG W, SHETTY S, et al. Astrocyte-derived extracellular vesicles: Neuroreparative properties and role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders[J]. *J Control Release*, 2020, 323:225-239.
- [33] TRUDLER D, SANZ-BLASCO S, EISELE Y S, et al. α -Synuclein oligomers induce glutamate release from astrocytes and excessive extrasynaptic NMDAR activity in neurons, thus contributing to synapse loss [J]. *J Neurosci*, 2021, 41(10):2264-2273.
- [34] GAO H, ZHANG Y, LUO D, et al. Activation of the hippocampal DRD2 alleviates neuroinflammation, synaptic plasticity damage and cognitive impairment after sleep deprivation[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(12):7208-7221.
- [35] KOJIMA M, MIZUI T. BDNF propeptide: A novel modulator of synaptic plasticity[J]. *Vitam Horm*, 2017, 104:19-28.
- [36] KWON S E, CHAPMAN E R. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons [J]. *Neuron*, 2011, 70(5):847-854.
- [37] 付蕊, 徐桂芝, 朱海军, 等. 经颅磁刺激对学习记忆及大脑神经突触可塑性影响的研究进展[J]. *生物医学工程学杂志*, 2021, 38(4):783-789.
- FU R, XU G Z, ZHU H J, et al. (2021). Research progress on the effect of transcranial magnetic stimulation on learning and memory and brain neural synaptic plasticity [J]. *J Biomed Eng*, 38(4):783-789.
- [38] MARDONES M D, JORQUERA P V, HERRERA-SOTO A, et al. PSD95 regulates morphological development of adult-born granule neurons in the mouse hippocampus[J]. *J Chem Neuroanat*, 2019, 98:117-123.

[责任编辑 周冰冰]