· 实验研究 ·

基于 EphA4/ephrinA3 信号通路研究安寐丹对星形胶质细胞和神经元氧糖剥夺/复氧损伤的保护作用及机制

吴艺璇[1]，李娅琪[1]，黎柱江[1]，姜杰程[1]，张卓[1]，王平[1]，谢光璟[1,2*]，黄攀攀[1,2]
1. 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，湖北 武汉 430065；
2. 湖北时珍实验室，湖北 武汉 430065

摘要 目的：探究安寐丹通过调控酪氨酸激酶肾上腺素受体 4（EphA4）/酪氨酸蛋白激酶 A3 受体（ephrinA3）信号通路对星形胶质细胞和神经元氧糖剥夺/复氧（OGD/R）的保护作用及机制。方法：体外建立小鼠星形胶质细胞（C8－D1A 细胞）/海马神经元（HT22 细胞）氧糖剥夺/复氧（OGD/R）模型，同时制备对照血清及安寐丹含药血清（AMD）。设立对照组、OGD/R 组、OGD/R＋AMD 组及 OGD/R＋褪黑素组。通过细胞增殖与活性检测（CCK－8）法观察细胞的增殖和存活情况，筛选安寐丹含药血清最佳干预浓度；利用流式细胞术检测 HT22/C8－D1A 细胞凋亡率，免疫荧光染色检测神经元标志物 NeuN 及星形胶质细胞标志物 GFAP、神经发生标志物 5′－溴脱氧尿嘧啶核苷（Brdu）的荧光强度，蛋白免疫印迹技术（Western blot）检测 EAAT1、EAAT2、ephrinA3、EphrA4 及 SYN 蛋白的表达，透射电镜观察细胞超微结构。结果：与对照组相比，OGD/R 组 HT22/C8－D1A 细胞标志物荧光强度减弱（$P<0.01$），神经元形态异常，EphA4/ephrinA3 蛋白表达水平上调（$P<0.01$），EAAT1、EAAT2 蛋白表达量下降（$P<0.05$，$P<0.01$）。与 OGD/R 组相比，OGD/R＋AMD 组 GFAP 和 NeuN 平均荧光强度增强，神经元形态有所改善，星形胶质细胞 EphA4/ephrinA3 水平降低（$P<0.01$），EAAT1、EAAT2、SYN 蛋白表达量上调（$P<0.05$），细胞凋亡率显著下降（$P<0.01$）。结论：安寐丹可能通过下调 EphA4/ephrinA3 信号通路，介导谷氨酸转运，缓解 OGD/R 诱导的 HT22/C8－D1A 细胞损伤，这可能是其改善睡眠剥夺相关神经损伤的作用机制。

关键词 睡眠剥夺；氧糖剥夺/复氧；安寐丹；星形胶质细胞；酪氨酸激酶肾上腺素受体 4/酪氨酸蛋白激酶 A3 受体信号通路

中图分类号：R285.5 **文献标识码**：A **文章编号**：1002－2392（2026）10－0013－08

DOI：10.19664/j.cnki.1002－2392.260196

睡眠剥夺（Sleep deprivation）作为持续性睡眠缺乏或睡眠结构紊乱引发的病理状态，可导致焦虑抑郁等情绪障碍[1]及记忆编码、巩固功能受损[2]，且常可诱发和加剧帕金森病、阿尔茨海默病等中枢神经系统疾病进展[3]。其病理机制涉及神经发生抑制、氧化应激损伤及炎症因子（CRP、IL－6、IL－10）异常激活[4]，临床数据显示，通过优化睡眠周期可有效提升谷胱甘肽过氧化物酶等内源性抗氧化酶活性，进而改善机体的氧化还原稳态[5]。

睡眠剥夺通常与大脑神经可塑性受损、神经炎症反应以及能量代谢功能紊乱紧密相关[6]，而氧糖剥夺/复氧（OGD/R）能够从微观层面模拟这种病理状态。在缺氧和复氧过程中，神经细胞受损，导致神经递质分布失衡，并触发一系列炎症反应[7]，进而直接干扰睡眠调节稳态。星形胶质细胞与神经元等构成了中枢神经系统关键细胞群，有助于维持睡眠与记忆稳态[8]，且兴奋性神经递质神经传导是引发认知功能障碍的重要机制之一，并且可能通过调控记忆整合等其他途径，促进认知功能障碍发展[9]。

近年来，中药复方在治疗失眠及神经保护方面展

收稿日期：2025－07－10 **修回日期**：2026－05－11
基金项目：国家自然科学基金项目（82305354，82374310，82174247）
作者简介：吴艺璇（2000－），女，硕士研究生，从事中医延缓衰老理论及应用研究。
＊**通信作者**：谢光璟（1991－），男，博士，副教授，硕士生导师，从事中医药防治老年病研究。

现出独特优势,其中,安寐丹作为培元安神代表方,源自清代医家陈士铎所著《石室秘录》,具有滋阴养血、补心安神之效,前期研究发现,安寐丹能显著上调失眠大鼠肝脏组织中 γ - 氨基丁酸(γ - aminobutyric acid, GABA)等神经递质的表达,并下调谷氨酸表达[10],从而改善睡眠质量。此外,该方可通过调控 Bcl - 2/Bax 蛋白表达比值及抑制半胱氨酸蛋白酶 3 活性,有效阻断活性氧簇介导的 PARP - 1/AIF 凋亡通路激活[11],减少神经元凋亡,然其神经保护具体作用机制亟待深入揭示。

此次研究拟在前期研究基础上,构建 HT22(神经元细胞系)与 C8 - D1A(星形胶质细胞)共培养体系,聚焦安寐丹对氧糖剥夺/复氧(OGD/R)诱导的神经细胞损伤的保护效应,着重解析 EphA4/ephrinA3 双向信号轴在调控兴奋性神经递质稳态中的作用机制,系统解析神经元 - 胶质细胞互作网络,旨在为失眠相关的神经保护策略提供新的视角和实验依据。

1 材料

1.1 细胞株

HT22/C8 - D1A 细胞均购于武汉普诺赛生命科技有限公司,货号分别为 CL - 0506、CL - 0697。

1.2 药物制备

Melatonin 用 DMSO 配制成 200 mmol/L 母液,-20 ℃保存备用。参考课题组前期研究[12]确定安寐丹配伍及剂量。按照生酸枣仁 19 g,熟酸枣仁 19 g,人参 11 g,麦冬 11 g,茯神 11 g,当归 11 g,五味子 4 g,丹参 7 g,石菖蒲 4 g,甘草 4 g 的剂量配置成含生药质量 15 $mg \cdot mL^{-1}$ 的水煎剂。

1.3 药物与试剂

CCK - 8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(HYCEZMBIO);双染细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物);Melatonin(MCE);磷酸酶抑制剂(Meilunbio);RIPA 裂解液(Meilunbio);胞浆胞核蛋白提取试剂盒(南京凯基生物);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(GBCBIO);Trise - Base(Meilunbio);二硫苏糖醇(Biofroxx);Genscript4% ~20% 梯度预制胶(Genscript);蛋白 marker(20 ~120 KD)(Genscript);HRP 标记羊抗小鼠二抗(武汉博士德生物工程有限公司);HRP 标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司);X 光胶片(柯达)显影定影试剂盒(天津市汉中摄影材料厂);β - actin 抗体、ephrinA3 抗体、EphA4 抗体、EAAT1 抗体、EAAT2 抗体及 SYN 抗体均购于武汉 ABclonal 公司。

1.4 主要仪器

311 型 CO_2 恒温培养箱(ThermoFisherScientificLLC);ECLIPSETs2 型倒置显微镜(Nikon);L2 - 5K 型低速离心机(湖南可成仪器设备有限公司);Multiskan FC 型酶标仪(ThermoScientific);cytoFLEX 型流式细胞仪(Beckmancoulter);HT7800/HT7700 型透射电镜(HITACHI);DYY - 6C 型电泳仪(北京六一仪器厂);neofuge 15R 型冷冻高速离心机(Heal force)。

2 方法

2.1 安寐丹含药血清的制备

雄性 SD 大鼠 20 只,18 月龄,随机分为对照组(10 只)和 OGD/R + AMD 组(10 只)。根据动物总体表面积换算公式计算出大鼠给药剂量为 18.18 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,对照组给予等体积生理盐水,每天 2 次,连续 1 周,末次给药 2 h 后以 3% 戊巴比妥钠(30 $mg \cdot kg^{-1}$)腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉采血。静置 2 h,2 500 r/min 离心 15 min,取上层血清,用 0.45 μm 滤膜过滤除菌,-20 ℃冰箱保存备用。

2.2 细胞培养

HT22/C8 - D1A 细胞复苏后,用含胎牛血清的完全培养基重悬细胞,37 ℃、5% CO_2 饱和湿度条件下培养。当细胞密度达到 80% 时,加 1 ~2 mL 0.25% 胰蛋白酶消化 1 ~2 min,制成单细胞悬液,按 1∶3 的比例传代,37 ℃、5% CO_2 饱和湿度条件下扩大培养。选取第 3 ~30 代处于对数生长期,生长状态良好的 HT22/C8 - D1A 细胞进行后续实验。

2.3 神经元与星形胶质细胞共培养及 OGD/R 模型的建立

将 HT22/C8 - D1A 细胞分别培养于 transwell 小室上下层的孔板中,添加适量 DMEM/F12 培养基(含 10% FBS),以 5×10^5/mL 的细胞密度接种于 24 孔细胞培养板中,在 5% CO_2,37 ℃细胞培养箱中共培养 7 d,用于后续缺糖缺氧造模。选择目前国内公认的氧糖剥夺法对共培养体系细胞进行处理[13]。除对照组外其余组均进行氧糖剥夺,原培养基替换为 DMEM 无糖培养基,置于低氧(O_2 体积分数 2%)培养箱中进行氧糖剥夺 6 h。在缺氧处理前,于细胞培养液中添加安寐丹含药血清培养液培养,24 h 后更换为高糖完全培养基于 5% CO_2、37 ℃环境中复氧 24 h,对照组细胞常规培养至其他组复氧结束。

2.4 CCK - 8 检测细胞活力

取处于对数生长期,生长状态良好的 HT22/C8 - D1A 细胞,以 3×10^3 个/孔接种于 96 孔细胞培养板,按照分组分别加入不同浓度的含药血清(2.5%、5%、7.5%、10%),每组 3 个复孔,孵育 48 h。在 96 孔板中每孔加入 10 μL CCK - 8 试剂,37 ℃、5% CO_2 条件下

孵育 1 ~ 4 h，用酶标仪在 450 nm 处获得吸光度（A）值。计算公式：细胞存活率（%）=［（实验孔吸光度 - 对照孔吸光度）/（对照孔吸光度 - 对照孔吸光度）］× 100%。

2.5 免疫荧光检测星形胶质细胞和神经元标志物

细胞处理同 2.2 项下，将细胞爬片接种到 12 孔板中，每孔加入细胞悬液 1 mL，继续培养 72 h，1 × PBS 清洗 3 次，加入 4% 多聚甲醛固定 10 min。加入破膜剂（0.1% TritonX - 100）室温通透 5 min，再加封闭液（1% BSA + 20% triton - X）室温封闭 1 h。C8 - D1A 细胞组加入 1% BSA 稀释后的一抗（兔抗 GFAP，兔抗 Brdu，1∶200），神经元细胞加入 1% BSA 稀释的一抗（兔抗 NeuN，兔抗 Brdu 1∶200），4 ℃孵育过夜。加入 1% BSA 稀释后的荧光二抗，山羊抗兔 IgG（1∶500）、山羊抗鼠 IgG（1∶500，室温避光孵育 2 h。用 4′，6 - 二脒基 - 2 - 苯基吲哚（DAPI）进行核染色 10 min（避光）。另取载玻片加入抗荧光淬灭封片剂封片，于荧光显微镜下选取视野观察采集图像。

2.6 透射电镜下观察细胞形态结构

收集各组细胞沉淀，0.1 mol/L 磷酸缓冲液 PBS 漂洗 3 次，室温固定 2 h。加入梯度酒精上行脱水，经置换、纯树脂包埋、修块、切片、染色等操作后，透射电子显微镜下观察，采集图像分析。

2.7 流式细胞术检测细胞凋亡

取转染成功的细胞，用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞，1 500 r/min 离心 5 min，去上清，加 PBS 重悬，用 PBS 将细胞润洗 2 次，1 500 r/min 离心 5 min，使用 DHE 进行检测：去掉 PBS，加入 1 mL 无血清培养基稀释好的 DHE（1∶1 000 稀释），37 ℃培养箱孵育 20 min，其间每隔 3 min 混匀 1 次，用无血清培养基洗涤细胞 3 次，用 500 μL PBS 重悬后，使用流式细胞仪上机检测，荧光显微镜下观察并拍照，用 ImageJ 软件分析荧光强度。

2.8 蛋白免疫印迹（Western - blot）检测相关蛋白表达

使用细胞裂解缓冲液提取各组细胞样本总蛋白，取等量蛋白在 100 g·L^{-1}的 SDS - PAGE 中电泳，转膜，5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后 TBST 洗 3 次，加入一抗（β - actin、ephrinA3、EphA4、EAAT1、EAAT2 及 SYN），4 ℃孵育过夜。一抗孵育结束后，经 TBST 洗涤 3 次，加入按 1∶1 000 稀释的二抗，室温孵育 1 h。孵育抗体后的硝酸纤维素膜经 TBST 洗涤后，加入 ECL 显影液显色，并在凝胶成像系统中拍照。保存条带并利用 ImageJ 软件对灰度值进行分析。

2.9 统计学分析

实验结果均以（$\bar{x} \pm s$）表示，使用 SPSS25.0 软件分析数据，组间差异均用单因素方差分析，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度安寐丹含药血清和褪黑素对正常 HT22/C8 - D1A 细胞活力的影响

如表 1 所示，与对照组相比，安寐丹含药血清干预组细胞活性均未降低，说明安寐丹不同浓度含药血清对细胞未产生增殖抑制作用，且 10% 浓度处理组细胞增殖率显著提升（$P < 0.01$），说明安寐丹含药血清优势剂量浓度为 10%。

表 1 不同浓度安寐丹对正常 HT22/C8 - D1A 细胞增殖率的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$，%）

组别	体积分数	C8 - D1A	HT22
对照组		100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
安寐丹组	2.5	101.38 ± 0.81	102.62 ± 0.85
	5.0	102.84 ± 1.43 *	104.19 ± 1.42 **
	7.5	104.96 ± 0.84 **	105.23 ± 1.01 **
	10	107.53 ± 0.94 **	109.38 ± 0.79 **

注：与对照组比较，* $P < 0.05$，** $P < 0.01$。

3.2 安寐丹对 OGD/R 损伤的 HT22/C8 - D1A 细胞活性影响

如表 2 所示，与对照组相比，OGD/R 组细胞增殖率显著降低（$P < 0.01$），与 OGD/R 组比，OGD/R + AMD 组、OGD/R 褪黑素组细胞增殖率显著升高（$P < 0.01$）。

表 2 安寐丹对 OGD/R 损伤的 HT22/C8 - D1A 细胞增殖率的调控作用（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$，%）

组别	C8 - D1A	HT22
对照组	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
OGD/R 组	60.92 ± 1.85 **	67.96 ± 2.25 **
OGD/R + AMD 组	78.92 ± 3.70 ##	82.64 ± 2.71 ##
OGD/R + 褪黑素组	86.66 ± 1.90 ##	86.99 ± 1.48 ##

注：与对照组比较，** $P < 0.01$；与 OGD/R 组比较，## $P < 0.01$。

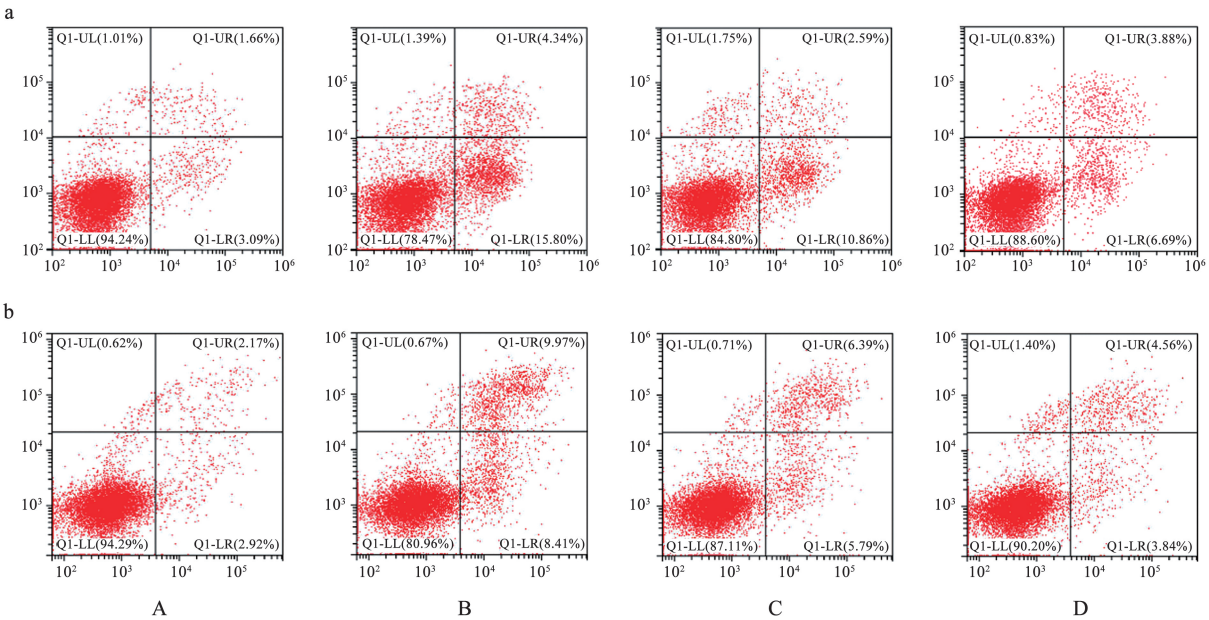
3.3 HT22/C8 - D1A 细胞凋亡水平

结果显示，与对照组相比，OGD/R 组细胞活性降低，凋亡细胞数量上升（$P < 0.01$）；与 OGD/R 组比较，OGD/R + AMD 组、OGD/R + 褪黑素组细胞凋亡率显著下调（$P < 0.01$），见表 3、图 1。

表 3 安寐丹对 OGD/R 损伤 HT22/C8 - D1A 细胞凋亡率的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$，%）

组别	C8 - D1A	HT22
对照组	5.31 ± 0.73	5.22 ± 0.65
OGD/R 组	18.68 ± 1.39 **	19.62 ± 1.22 **
OGD/R + AMD 组	12.72 ± 0.65 ##	13.86 ± 1.47 ##
OGD/R + 褪黑素组	8.71 ± 1.66 ##	9.57 ± 1.10 ##

注：与对照组比较，** $P < 0.01$；与 OGD/R 组比较，## $P < 0.01$。

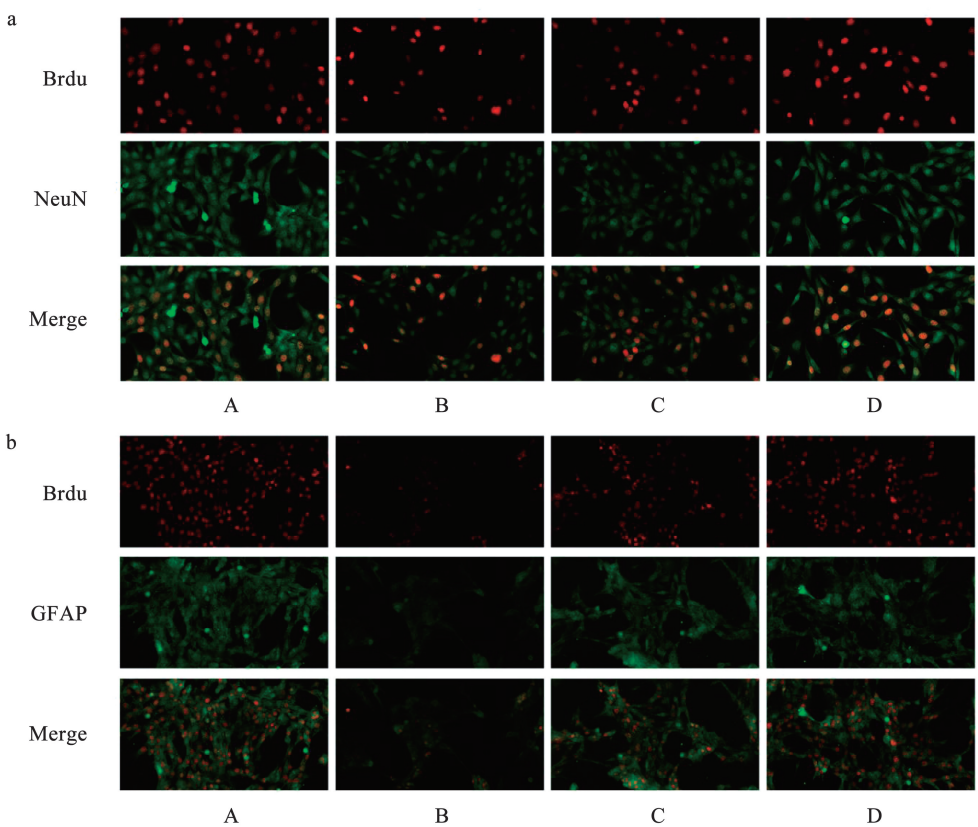


注：a. 星型胶质细胞；b. 神经元细胞；A. 对照组；B. OGD/R 组；C. OGD/R + AMD 组；D. OGD/R + 褪黑素组。

图 1　安寐丹对 OGD/R 神经细胞凋亡率的影响

3.4　各组 GFAP、NeuN、Brdu 表达水平比较

与对照组相比，OGD/R 组星形胶质细胞 GFAP 表达下降（$P<0.01$），神经元细胞 NeuN、Brdu 表达降低（$P<0.01$）；与 OGD/R 组对比，安寐丹和褪黑素干预后星形胶质细胞 GFAP 平均荧光表达强度明显增强（$P<0.01$），神经元细胞 NeuN、Brdu 平均荧光强度均显著升高（$P<0.01$），见表 4、图 2。



注：a. 星型胶质细胞；b. 神经元细胞；A. 对照组；B. OGD/R 组；C. OGD/R + AMD 组；D. OGD/R + 褪黑素组。

图 2　各组 HT22/C8 - D1A 细胞 Brdu、NeuN 和 GFAP 表达水平（免疫荧光染色，×40）

表 4 各组 HT22/C8 – D1A 细胞 Brdu、NeuN 和 GFAP 平均荧光强度变化($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	GFAP 荧光强度	Brdu 荧光强度	NeuN 荧光强度	Brdu 荧光强度
对照组	24.75 ± 0.25	28.04 ± 0.89	26.32 ± 1.90	33.32 ± 1.74
OGD/R 组	9.97 ± 0.78**	14.33 ± 0.92**	15.90 ± 1.73**	23.97 ± 2.17**
OGD/R + AMD 组	20.69 ± 0.52##	23.44 ± 1.56##	23.81 ± 1.98##	33.14 ± 0.75##
OGD/R + 褪黑素组	22.08 ± 0.35##	23.51 ± 0.14##	25.06 ± 1.37##	32.20 ± 1.34##

注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与 OGD/R 组比较,## $P < 0.01$。

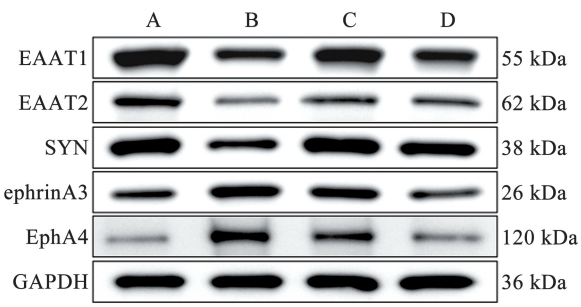
3.5 安寐丹对 OGD/R 模型 HT22/C8 – D1A 细胞 EphA4、ephrinA3、EAAT1、EAAT2 及 SYN 蛋白表达的影响

与对照组相比,OGD/R 组 EphA4/ephrinA3 的表达水平升高($P < 0.01$),EAAT1、EAAT2、SYN 蛋白的表达水平降低($P < 0.05$,$P < 0.01$)。与 OGD/R 组比较,OGD/R + AMD 组及褪黑素组 EphA4/ephrinA3 蛋白表达显著下降($P < 0.01$),EAAT1、EAAT2、SYN 蛋白的表达水平升高($P < 0.05$),见表 5、图 3。

表 5 各组细胞 ephrinA3、EphA4、EAAT1、EAAT2 及 SYN 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	EphA4	ephrinA3	EAAT1	EAAT2	SYN
对照组	0.78 ± 0.18	0.30 ± 0.20	0.97 ± 0.01	0.78 ± 0.06	1.11 ± 0.25
OGD/R 组	1.12 ± 0.07**	0.78 ± 0.10**	0.70 ± 0.06**	0.44 ± 0.09*	0.27 ± 0.12**
OGD/R + AMD 组	0.83 ± 0.06##	0.24 ± 0.09##	0.97 ± 0.05#	0.72 ± 0.22#	0.57 ± 0.04#
OGD/R + 褪黑素组	0.87 ± 0.09##	0.19 ± 0.06##	0.94 ± 0.11#	0.64 ± 0.10	0.77 ± 0.02#

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 OGD/R 组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$。

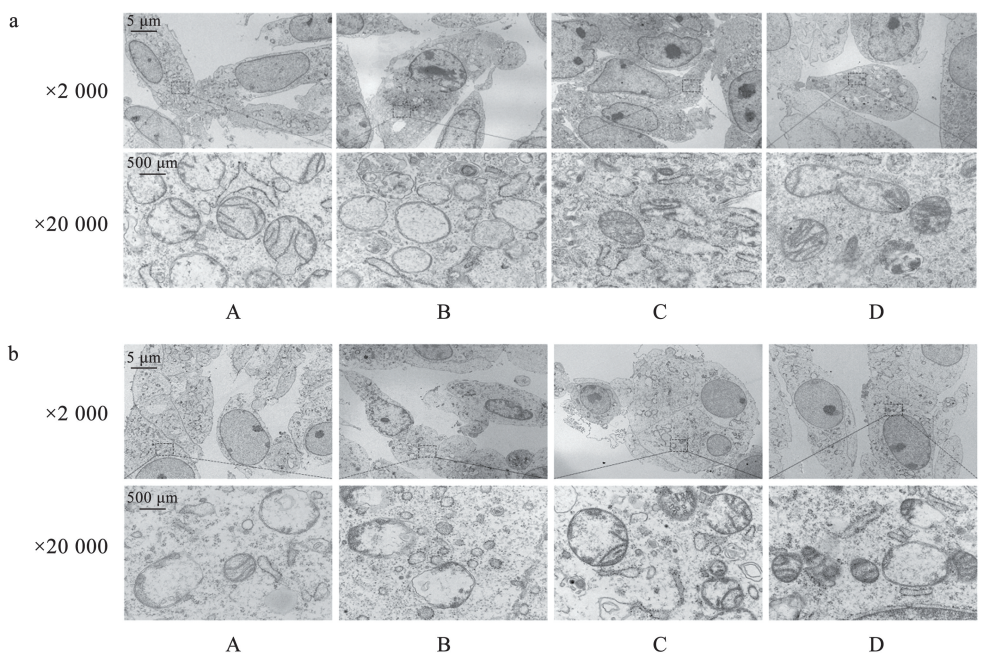


注:A. 对照组;B. OGD/R 组;C. OGD/R + AMD 组;D. OGD/R + 褪黑素组。

图 3 安寐丹对 HT22/C8 – D1A 细胞 EAAT1、EAAT2、ephrinA3、EphA4 及 SYN 蛋白表达的影响

3.6 超微电镜观察 HT22/C8 – D1A 细胞结构

对照组细胞胞膜完整,细胞核圆,线粒体边界及结构清晰,基质均匀,嵴排列整齐,未见明显肿胀变化。OGD/R 组细胞结构破坏,胞膜不完整,部分线粒体嵴断裂、减少,高尔基体囊泡肿胀,溶酶体及自噬体数量异常。与 OGD/R 组比较,OGD/R + AMD 组及 OGD/R + 褪黑素组细胞结构改善,线粒体肿胀程度变轻,受损自噬体数量较 OGD/R 组减少,见图 4。



注:a. 星型胶质细胞;b. 神经元细胞;A. 对照组;B. OGD/R 组;C. OGD/R + AMD 组;D. OGD/R + 褪黑素组。

图 4 各组 HT22/C8 – D1A 细胞超微结构变化

4 讨论

睡眠剥夺是常见的睡眠障碍,可导致失眠和认知功能障碍。其机制可能与脑血流量减少引发的慢性缺氧,以及葡萄糖代谢紊乱加重的线粒体功能障碍有关[14]。课题组前期动物实验发现,安寐丹可改善睡眠剥夺诱导的认知损伤,并减轻氧化应激、炎症反应及细胞凋亡[15]。本次研究摆脱既往单以神经元保护为切入点的研究思路,通过构建星形胶质细胞 - 神经元共培养体系,设立氧糖剥夺/复氧(OGD/R)模型,模拟睡眠剥夺引发的神经炎症损伤[16],探讨 EphA4 介导 ephrinA3 信号影响氨基酸转运体和神经因子表达机制。

本次实验结果显示,经 OGD/R 处理后,星形胶质细胞活力显著降低,神经元标志物 NeuN 表达减少,反映神经元凋亡或丢失,表明 OGD/R 模型构建成功,这与临床研究中睡眠障碍患者海马体积缩小、胶质细胞激活受抑制的影像学特征高度吻合[17]。在 OGD/R 模型中,电镜观察到线粒体嵴断裂等超微结构改变,与以往研究中睡眠剥夺动物模型中观察到的线粒体动力学失衡现象高度吻合,提示 OGD/R 不仅造成细胞能量代谢障碍,更通过激活线粒体凋亡途径诱导程序性死亡[18]。安寐丹通过促进星形胶质细胞与神经元增殖分化、抑制线粒体凋亡通路,显著减轻 OGD/R 诱导的细胞损伤,其促神经再生作用为中药多靶点治疗提供了新的依据。

安寐丹作为培元健脑、安神益智的经典古方,为历代医家所推崇,其以人参为君,取其大补元气、宁心安神之效;酸枣仁与炒酸枣仁相须为用,清胆热、养心神,麦冬养阴清心、除虚烦,防人参温燥。茯神入心安神,当归补心血、养肝肾并为臣药;佐以丹参养血活血化瘀,兼能清解心经郁热;五味子酸收敛气而固护心阴;石菖蒲芳香透窍以祛痰浊蒙蔽醒神,诸药协同共奏元气培补、开敛共济之功。既往研究证实,方中人参主要成分人参皂苷 Rg1 可增强抗氧化能力;臣药酸枣仁具有双向调节作用,其黄酮成分在 OGD/R 早期抑制谷氨酸过度释放,皂苷成分在复氧期促进 GABA 能中间神经元活化[19]。丹参中丹参酮ⅡA 具有抗炎,抗氧化,抗凋亡等作用[20],石菖蒲有效成分 β - 细辛醚可阻断炎症因子扩散[21],五味子中五味子素可减轻海马神经炎症[22]。而本次研究主要侧重于安寐丹对于神经 - 胶质界面 EphA4/ephrinA3 双向信号传导的影响。

EphA4 在昼夜睡眠调控中具有关键作用,有学者[23]发现,EphA4 基因敲除小鼠在光照期间表现出快速眼动睡眠(REMS)减少、觉醒时间延长和非快速眼动睡眠(NREMS)片段化等特征。而通过 RNA 干扰技术敲低 EphrinA3 表达,可显著改善大鼠认知衰退趋势,并减轻 OGD/R 模型诱导的细胞损伤[24]。进一步研究发现,睡眠缺失导致星形胶质细胞过度激活,兴奋性神经递质释放与传递异常,加速海马神经兴奋性毒性堆积[25]。ephrinA3 蛋白特异性分布于星形胶质细胞膜,而 EphA4 受体在海马神经元膜表面丰度最高[26],因此,海马区 ephrinA3/EphA4 双向信号能够在星形胶质细胞和神经元之间传递,EphA4 活性可以被 ephrinA3 激活导致其在海马神经元上的功能活动改变[27],这种交互作用在神经稳态维持中扮演关键角色。

上述 EphA4/ehrinA3 信号轴的异常激活构成连接代谢偶联失调与兴奋性毒性损伤的分子桥梁,其核心机制可能通过靶向调控星形胶质细胞特异性谷氨酸转运体(EAATs)的表达与功能实现。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兴奋性氨基酸转运体(EAATs)浓度所必需的[28]。星形胶质细胞 ephrinA3 调控 EAATs 转运促进 Glu 再摄取,星形胶质细胞膜上富集的 EAATs 尤其是 EAAT1(GLAST)和 EAAT2(GLT - 1)[29],通过感受局部 Glu 活性动态调节 EAATs 以摄取 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[30]。当 EphA4/ephrinA3 信号过度激活时,星形胶质细胞摄取能力减弱,EAATs 转运能力下降,Glu 清除效率降低[31],引发细胞内钙超载和氧化应激,从而触发细胞凋亡途径。

本次研究发现,OGD/R 组 EphA4/ephrinA3 蛋白表达升高,而安寐丹组显著下调,提示神经细胞损伤可能导致该通路异常激活,直接或间接诱导细胞凋亡,安寐丹干预则通过下调该通路表达,减轻神经细胞凋亡损伤。此外,SYN 作为突触前终末囊泡的关键结构蛋白,不仅直接参与突触形成,还可作为评估突触密度及信息传导效能的生物标志物,其蛋白丰度变化与特定突触间联系的神经递质传导强度呈显著正相关[32]。安寐丹干预后 EAAT1、EAAT2 表达水平呈现不同程度的上调,SYN 水平回升,其神经营养作用与谷氨酸转运功能可形成正反馈调节,这进一步揭示了安寐丹通过调控 EAATs 发挥神经元保护作用的潜在机制。

综上所述,海马神经元 EphA4 激活星形胶质细胞 ephrinA3 信号降低 EAATs 转运能力和神经营养因子水平,本研究系统阐明了安寐丹通过多途径调控 EphA4/ephrinA3 信号轴、重建谷氨酸稳态、减轻神经元兴奋性毒性等协同机制,从而减轻 OGD 诱导的星形胶

质细胞和神经元损伤,为中医药治疗睡眠障碍相关神经退行性疾病提供了实验依据,但其深入机制尚未完全探明,后期将考虑补充动物实验加以佐证。

参考文献:

[1] KONAKANCHI S, RAAVI V, ML H K, et al. Effect of chronic sleep deprivation and sleep recovery on hippocampal CA3 neurons, spatial memory and anxiety – like behavior in rats[J]. Neurobiol Learn Mem, 2022, 187: 107559.

[2] CREERY J D, BRANG D J, ARNDT J D, et al. Electrophysiological markers of memory consolidation in the human brain when memories are reactivated during sleep[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(44): e2123430119.

[3] 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.

[4] IRWIN M R. Sleep and inflammation: partners in sickness and in health[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(11): 702 – 715.

[5] ATROOZ F, SALIM S. Sleep deprivation, oxidative stress and inflammation[M]//Inflammatory Disorders, Part A. Amsterdam: Elsevier, 2020: 309 – 336.

[6] MOHD SHAFIE A S, ABD AZIZ C B, LONG I, et al. Impact of rapid eye movement sleep deprivation on pain behaviour and oxidative stress in the thalamus: role of tualang honey supplementation[J]. Malays J Med Sci, 2022, 29(2): 69 – 79.

[7] YUAN Y, ZHAI Y Y, CHEN J J, et al. Kaempferol ameliorates oxygen – glucose deprivation/reoxygenation – induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis [J]. Biomolecules, 2021, 11(7): 923.

[8] XUE R, WAN Y H, SUN X Q, et al. Nicotinic mitigation of neuroinflammation and oxidative stress after chronic sleep deprivation[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2546.

[9] YANG X, GONG R, QIN L W, et al. Trafficking of NMDA receptors is essential for hippocampal synaptic plasticity and memory consolidation[J]. Cell Rep, 2022, 40(7): 111217.

[10] 徐波,王平,夏婧,等. 基于 OX1R/PLCβ – 1/PKCα/ERK1/2 信号通路探讨安寐丹对失眠模型大鼠肝脏神经递质和昼夜节律的影响及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(15): 11 – 20.

[11] 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.

[12] 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.

[13] DENG Y, DUAN R, DING W L, et al. Astrocyte – derived exosomal nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) ameliorates ischemic stroke injury by targeting AMPK/mTOR signaling to induce autophagy[J]. Cell Death Dis, 2022, 13: 1057.

[14] SUN B, OU H, REN F, et al. Propofol inhibited autophagy through Ca^{2+}/CaMKKβ/AMPK/mTOR pathway in OGD/R – induced neuron injury[J]. Mol Med, 2018, 24(1): 58.

[15] 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.

[16] XU S, LI Y, CHEN J P, et al. Oxygen glucose deprivation/re – oxygenation – induced neuronal cell death is associated with Lnc – D63785 m6A methylation and miR – 422a accumulation[J]. Cell Death Dis, 2020, 11: 816.

[17] RIEMANN D, KRONE L B, WULFF K, et al. Sleep, insomnia, and depression[J]. Neuropsychopharmacology, 2020, 45(1): 74 – 89.

[18] ZHANG R, LAHENS N F, BALLANCE H I, et al. A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(45): 16219 – 16224.

[19] 丁灵,王欣,上官惠子,等. 酸枣仁的化学成分及治疗失眠的作用机制研究进展[J]. 现代中医药, 2025, 45(3): 14 – 23.

[20] 许红蕾,王庭芳,张川. 丹参素及其衍生物药理作用机制和应用研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(2): 237 – 243.

[21] 冯鹏,王明露,王宇彤,等. 石菖蒲挥发油化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药药理与临床, 2025, 41(6): 100 – 109.

[22] 刘继艳,王冰,李超宇,等. 五味子非药用部位活性成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2024, 55(9): 3179 – 3189.

[23] HRISTOVSKA I, ROBERT M, COMBET K, et al. Sleep decreases neuronal activity control of microglial dynamics in mice[J]. Nat Commun, 2022, 13: 6273.

[24] ZHU Z M, TAO X, DAI T T, et al. Cognitive – exercise dual – task attenuates chronic cerebral ischemia – induced cognitive impairment by activating cAMP/PKA pathway through inhibiting EphrinA3/EphA4[J]. Exp Neurol, 2024, 372: 114617.

[25] PUENTES – MESTRIL C, DELORME J, WANG L J, et al. Sleep loss drives brain region – specific and cell type – specific alterations in ribosome – associated transcripts involved in synaptic plasticity and cellular timekeeping[J]. J Neurosci, 2021, 41(25): 5386 – 5398.

[26] LI J G, LIU N H, WANG Y, et al. Inhibition of EphA4 signaling after ischemia – reperfusion reduces apoptosis of CA1 pyramidal neurons[J]. Neurosci Lett, 2012, 518(2): 92 – 95.

[27] ZHOU Z X, XU L J, WANG H N, et al. EphA4/ephrinA3 reverse signaling mediated downregulation of glutamate transporter GLAST in Müller cells in an experimental glaucoma model[J]. Glia, 2023, 71(3): 720 – 741.

[28] 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.

[29] GROC L, CHOQUET D. Linking glutamate receptor movements and synapse function[J]. Science, 2020, 368(6496): eaay4631.

[30] 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.

[31] XU L J, GAO F, CHENG S, et al. Activated ephrinA3/EphA4 forward signaling induces retinal ganglion cell apoptosis in experimental glaucoma[J]. Neuropharmacology, 2020, 178: 108228.

[32] 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.

Study on the Protective Effect and Mechanism of Anmei Dan on Astrocyte and Neuron Oxygen – Glucose Deprivation/Reoxygenation Injury Based on the EphA4/ephrinA3 Signaling Pathway

WU Yixuan[1], LI Yaqi[1], LI Zhujiang[1], JIANG Jiecheng[1], ZHANG Zhuo[1], WANG Ping[1], XIE Guangjing[1,2], HUANG Panpan[1,2]

1. *Engineering Research Center of Ministry of Education for Traditional Chinese Medicine Prevention and Protection Technologies and New Product Development for Senile Brain Health, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan* 430065, *China*; 2. *Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan* 430065, *China*

Abstract Objective: To investigate the protective effects and underlying mechanisms of Anmeidan (AMD) against oxygen – glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) – induced injury in astrocytes and neurons by regulating the EphA4/ephrinA3 signaling pathway. Methods: An invitro OGD/R model was established using mouse astrocytes (C8 – D1A) and hippocampal neurons (HT22 cells). Control serum and AMD – containing serum were prepared. Cells were divided into control, OGD/R, OGD/R + AMD, and OGD/R + melatonin groups. Cell proliferation and viability were assessed via CCK – 8 assay to determine the optimal AMD serum concentration. Apoptosis rates were measured by flow cytometry. Immunofluorescence staining was performed to evaluate fluorescence intensity of neuronal marker NeuN, astrocytic marker GFAP, and neurogenesis marker BrdU. Protein expression of ephrinA3, EphA4, EAAT1, EAAT2, and SYN was analyzed by Western blot. Cellular ultrastructure was observed via transmission electron microscopy (TEM). Results: Compared with the control group, the OGD/R group showed reduced fluorescence intensity of NeuN and GFAP ($P < 0.01$), abnormal neuronal morphology, upregulated EphA4/ephrinA3 protein expression ($P < 0.01$), and decreased EAAT1/EAAT2 levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$). AMD treatment significantly enhanced GFAP and NeuN fluorescence intensity, improved neuronal morphology, downregulated EphA4/ephrinA3 expression ($P < 0.01$), upregulated EAAT1, EAAT2, SYN ($P < 0.05$), and reduced apoptosis rates ($P < 0.01$). Conclusion: Anmeidan alleviates OGD/R – induced astrocyte and neuronal injury by downregulating the EphA4/ephrinA3 signaling pathway and modulating glutamate transport, which may underlie its therapeutic potential in sleep deprivation – related neural damage.

Key words Sleep deprivation; Oxygen – glucose deprivation/reoxygenation; Anmei Dan; Astrocytes; Tyrosine kinase adrenergic receptor 4/tyrosine protein kinase A3 receptor signaling pathway