

基于 EphB2/ephrinB2 信号通路探讨丁苯酞改善阿尔茨海默病模型大鼠认知功能的机制研究

杜星宇^{1,2,4}, 刘海军^{2,3*}

1. 遵义医科大学 研究生院, 贵州 遵义 563000
2. 贵州省脑功能与脑疾病防治全省重点实验室, 贵州 遵义 563000
3. 遵义医科大学附属医院 神经内科, 贵州 遵义 563000
4. 贵州医科大学附属医院 神经内科, 贵州 贵阳 550001

摘要:目的 探究丁苯酞(NBP)是否通过 EphB2/ephrinB2 信号通路调节突触相关蛋白的表达,改善 β 淀粉样蛋白($A\beta_{1-42}$)诱导的阿尔茨海默病(AD)模型大鼠认知功能障碍。方法 将 SD 雄性大鼠随机分为 7 组:对照组、假手术组、模型组、空载组、溶媒组、NBP ($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、NBP ($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) + shEphB2 (EphB2 敲低)组,每组 8 只。所有大鼠适应性喂养 1 周后,空载组、NBP + shEphB2 组大鼠分别双侧海马立体定位注射空病毒和 EphB2 敲低病毒。等待 4 周病毒起效后,除对照组、假手术组以外,在大鼠双侧海马立体定位注射 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体 ($6.67\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $3.5\text{ }\mu\text{L}$;假手术组注射同等体积 0.9%氯化钠溶液 $3.5\text{ }\mu\text{L}$ 。NBP 组、NBP + shEphB2 组大鼠于注射 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体前 2 周开始 ig NBP,每天 1 次,共计 28 d。各组大鼠在注射 $A\beta_{1-42}$ 后第 7 天开始进行水迷宫实验;苏木精-伊红染色观察海马区神经元的病理变化;透射电镜下观察海马神经元及突触结构的变化;Western blotting 检测海马组织中 EphB2、突触后致密区蛋白 95 (PSD95)、突触素 (Syn)、ephrinB2、淀粉样前体蛋白 (APP) 蛋白表达水平;ELISA 法检测海马组织中 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 蛋白的水平;免疫荧光观察大鼠海马组织中 EphB2 蛋白的表达。结果 与模型组相比,NBP 组水迷宫逃避潜伏期有所缩短 ($P<0.05$),穿过平台的次数增加 ($P<0.05$);NBP + shEphB2 组逃避潜伏期较 NBP 组延长 ($P<0.05$),穿越平台的次数较减少 ($P<0.05$)。在苏木精-伊红染色实验中,对照组和假手术组大鼠海马 CA1/CA3 区神经元排列整齐,细胞结构完整,核仁清晰,胞核与胞质界限分明;模型组、空载组、溶媒组及 NBP + shEphB2 组大鼠海马区神经元排列紊乱,细胞结构异常;NBP 组大鼠海马组织病理损伤程度较上述各组有所减轻,但仍可见部分神经元坏死。透射电镜观察到,模型组、空病毒组、溶媒组及 NBP + shEphB2 组海马神经元呈现典型凋亡特征,突触结构模糊,三层结构不清晰;NBP 组神经元及突触病理改变较 AD 模型组减轻;细胞核形态基本正常,少数突触结构模糊。与对照组相比,AD 模型组大鼠海马组织中 EphB2、PSD95、Syn、ephrinB2 蛋白的表达量下降 ($P<0.05$ 、 0.001),APP 蛋白表达量升高 ($P<0.001$),模型组与空载组、溶媒组和 NBP + shEphB2 组之间无明显差异;与模型组相比,NBP 组大鼠海马组织中 EphB2、PSD95、Syn、ephrinB2 蛋白的表达量有所升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),APP 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)。通过 ELISA 实验发现,与对照组相比,模型组、空载组及溶媒组 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 含量显著升高 ($P<0.001$);NBP 组 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 含量较模型组显著降低 ($P<0.001$),而 NBP + shEphB2 组 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 含量水平较 NBP 组明显升高 ($P<0.001$)。在免疫荧光实验中,EphB2 在海马组织中均有分布,主要表达在各组大鼠海马神经细胞的胞质中,并与 PSD95 存在共定位;模型组 EphB2 水平较对照组下降;NBP 组 EphB2 水平较模型组升高;NBP + shEphB2 组 EphB2 水平较 NBP 组下降。结论 NBP 对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 AD 模型大鼠的学习记忆障碍具有改善作用,其作用机制可能与调控 EphB2/ephrinB2 信号通路有关,通过该通路调节突触相关蛋白的表达,进而改善 AD 模型大鼠的认知功能障碍。

关键词: 阿尔茨海默病; 丁苯酞; ephrinB2; EphB2; 突触可塑性; 认知障碍

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)12-3505-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.12.009

Exploring mechanism of butylphthalide to improve cognitive function in Alzheimer disease model rats based on EphB2/ephrinB2 signaling pathway

收稿日期: 2025-06-25

基金项目: 贵州省科技厅科技支撑计划项目(黔科合支撑[2020]4Y144 号);贵州省卫生和计划生育委员会科学技术资助项目(gzwmkj2018-1-001);遵义医科大学“12345”未来人才培养计划“未来临床名医”项目(20211004)

作者简介: 杜星宇,研究方向为认知障碍。E-mail: duxingyu0304@163.com

*通信作者: 刘海军,研究方向为认知障碍。E-mail: 63258787@qq.com

DU Xingyu^{1, 2, 4}, LIU Haijun^{2, 3}

1. Graduate School of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

2. Key Laboratory of Brain Function and Brain Disease Prevention and Treatment of Guizhou Province, Zunyi 563000, China

3. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

4. Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550001, China

Abstract: Objective To investigate whether butylphthalide regulates the expression of synaptic-related proteins through the EphB2/ephrinB2 signaling pathway and thereby improves cognitive dysfunction in a rat model of Alzheimer's disease (AD) induced by A β ₁₋₄₂. **Methods** Male SD rats were randomly divided into seven groups: control group, sham operation group, model group, empty vector group, solvent group, NBP (100 mg·kg⁻¹) group, and NBP (100 mg·kg⁻¹) + shEphB2 (EphB2 knockdown) group, with 8 rats in each group. After one week of adaptive feeding, rats in the empty vector group and NBP + shEphB2 group were bilaterally injected with empty virus and EphB2 knockdown virus into the hippocampus, respectively. After waiting for four weeks for the virus to take effect, except for the control group and sham operation group, A β ₁₋₄₂ oligomers (6.67 μ g· μ L⁻¹) 3.5 μ L were bilaterally injected into the hippocampus of rats in the model group, empty vector group, solvent group, and NBP + shEphB2 group; the sham operation group was injected with the same volume of 0.9% sodium chloride solution 3.5 μ L. Rats in the NBP group and NBP + shEphB2 group began to receive ig administration of NBP for two weeks before the injection of A β ₁₋₄₂ oligomers, once a day for a total of 28 days. Water maze experiments were conducted on the 7th day after the injection of A β ₁₋₄₂ in all groups; hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological changes of neurons in the hippocampus; transmission electron microscopy was used to observe the changes in the structure of hippocampal neurons and synapses; Western blotting was used to detect the expression levels of EphB2, PSD95, Syn, ephrinB2, and APP proteins in the hippocampus; ELISA was used to detect the levels of A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ proteins in the hippocampus; immunofluorescence was used to observe the expression of EphB2 protein in the hippocampus of rats. **Results** Compared with the model group, the escape latency in the water maze was shortened in the NBP group ($P < 0.05$), and the number of times crossing the platform increased ($P < 0.05$); the escape latency in the NBP + shEphB2 group was longer than that in the NBP group ($P < 0.05$), and the number of times crossing the platform was reduced ($P < 0.05$). In the hematoxylin-eosin staining experiment, the neurons in the CA1/CA3 regions of the hippocampus in the control group and sham operation group were neatly arranged, with complete cell structures, clear nucleoli, and distinct boundaries between the nucleus and cytoplasm; in the model group, empty vector group, solvent group, and NBP + shEphB2 group, the neurons in the hippocampus were disordered and the cell structures were abnormal; the pathological damage of the hippocampus in the NBP group was less severe than that in the above groups, but some neurons were still necrotic. Transmission electron microscopy showed that the neurons in the hippocampus of the model group, empty vector group, solvent group, and NBP + shEphB2 group presented typical apoptotic features, with blurred synaptic structures and unclear three-layer structures; the pathological changes of neurons and synapses in the NBP group were less severe than those in the AD model group: the nuclear morphology was basically normal, and a few synaptic structures were blurred. Compared with the control group, the expression levels of EphB2, PSD95, Syn, and ephrinB2 proteins in the hippocampus of the AD model group decreased ($P < 0.05$, 0.001), and the expression level of APP protein increased ($P < 0.001$); there was no significant difference between the model group and the empty vector group, solvent group, and NBP + shEphB2 group. Compared with the model group, the expression levels of EphB2, PSD95, Syn, and ephrinB2 proteins in the hippocampus of the NBP group increased ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), and the expression of APP protein significantly decreased ($P < 0.01$). Through the ELISA experiment, it was found that the contents of A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ in the model group, empty vector group, and solvent group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.001$); The content of A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ in the NBP group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.001$), while the content of A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ in the NBP + shEphB2 group was significantly higher than that in the NBP group ($P < 0.001$). In the immunofluorescence experiment, EphB2 was distributed in the hippocampal tissue of all groups of rats, mainly expressed in the cytoplasm of hippocampal neurons, and co-localized with PSD95. The level of EphB2 in the model group was lower than that in the control group; the level of EphB2 in the NBP group was higher than that in the model group; the level of EphB2 in the NBP + shEphB2 group was lower than that in the NBP group. **Conclusion** NBP has an improvement effect on learning and memory impairment in AD model rats induced by A β ₁₋₄₂, and its mechanism may be related to the regulation of the EphB2/ephrinB2 signaling pathway, which regulates the expression of synaptic-related proteins and thereby improves cognitive dysfunction in AD model rats.

Key words: Alzheimer's disease; butylphthalide; ephrinB2; EphB2; synaptic plasticity; cognitive impairment

阿尔茨海默病(AD)是老年痴呆的主要类型,以进行性认知能力减退、神经元丢失及神经炎症等为特征,全球患者数量已近 5 000 万,且仍在上升^[1-2]。其核心病理表现为 β 淀粉样蛋白($A\beta$)沉积和 tau 蛋白过度磷酸化导致的神经纤维缠结,同时伴随突触功能障碍,而后者与认知功能减退有着十分紧密的关联^[3-5]。突触可塑性是 AD 病理机制研究的重要方向之一,其中长时程增强(LTP)和长时程抑制(LTD)依赖于突触素(Syn)和突触后致密区蛋白 95(PSD95)等关键分子的生物学作用。Syn 可以调控突触囊泡的释放影响突触可塑性,在 AD 动物模型中观察到其表达量有所下降^[6]; PSD95 则通过锚定 N-甲基天冬氨酸(NMDA)受体来维持突触功能,其上调可部分抵消 $A\beta$ 的突触毒性作用^[7-9]。

Eph 受体及其配体 ephrin 在突触发育和可塑性中起核心作用。Eph 家族分为 EphA 和 EphB 亚类,通过复杂配体-受体互作调控轴突导向、树突形态及突触形成^[10-11]。其中, EphB2-ephrinB2 信号通路介导树突丝状伪足的运动,敲除 EphB2 可导致突触数量减少 40%,而恢复其表达则可改善突触缺陷^[12-14]。该通路依赖 p21 活化激酶 1(PAK1)活化及 ephrinB2 的特异性结合,表明其双向信号传导对突触形成的必要性。在成熟突触中, EphB2 与 NMDA 受体直接结合^[15],调控其亚基(如 GluN2B)的分布和功能。AD 模型中, EphB2 表达下调早于认知障碍出现,而过表达 EphB2 可恢复突触功能,提示其作为早期干预靶点的潜力^[15-16]。

丁苯酞(NBP)是一种已获批用于脑卒中的小分子化合物,近年研究发现其可通过抑制 $A\beta$ 沉积、调节 tau 磷酸化、增强突触可塑性等机制改善 AD 动物模型的认知障碍^[17-19]。实验表明, NBP 能上调 PSD95 和 SYN 表达,增加树突棘密度,并改善 $A\beta$ 诱导的动物模型的突触损伤^[5, 20-21]。然而, NBP 是否通过 EphB2/ephrinB2 通路发挥作用尚不十分明确。

基于此,本研究提出 NBP 可能通过调控 EphB2/ephrinB2 信号通路调节突触相关蛋白的表达,从而缓解 $A\beta$ 诱导的 AD 动物模型的认知障碍的推测,以期 AD 的治疗提供新的作用靶点。

1 材料

1.1 动物

SPF 级健康成年 SD 雄性大鼠,均购自长沙市天勤生物技术有限公司,实验动物生产许可证

号 SCXK(湘)2019-0013,体质量 180~200 g。实验开始前,将大鼠置于符合自然昼夜节律的标准化动物饲养室中适应性饲养 7 d,环境温度控制在 $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。本研究基于贵州省科技计划项目(项目编号:黔科合支撑[2020]4Y144 号),实验操作均严格遵守实验动物伦理规范,伦理审批由遵义医科大学实验动物伦理委员会批准(审批号 ZMU21-2203-163)。

1.2 主要仪器

K3230102-001 脑立体定位仪(深圳沃瑞德科技有限公司); Morris 水迷宫系统(上海宝派环保科技有限公司); THUNDER Imager 3D Tissue 组织微环境分析系统、Bio Cut 石蜡切片机(Lieca 公司); Multiskan skyHigh 全波长酶标仪、Multifuge X1R 高速低温离心机、PR505750R-CN(566L)恒温箱(Thermo Fisher 公司); PowerPac Basic+Mini-Sub Cell+Wide-Mini Sub-Cell 垂直电泳转印系统、全自动凝胶曝光仪(美国 BIO-RAD 公司); DK-98-IIA 双列恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); Scientz-48 高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司); JEM-1400FLASH 透射电子显微镜(日本电子株式会社)。

1.3 主要试剂

$A\beta_{1-42}$ (美国 MedChemExpress 公司,批号 HY-P1388); 六氟异丙醇(HFIP)(上海 Macklin 公司,批号 H811027); EphB2 抗体(美国 Abcam,批号 ab252935; 美国 Santa Cruz Biotechnology,批号 sc-130068); 淀粉样前体蛋白(APP)抗体(批号 25524-1-AP)、PSD95 抗体(批号 20665-1-AP)、二抗羊抗鼠抗体(批号 RGAM001)、二抗羊抗兔抗体(批号 RGAR001)、荧光二抗(批号 RGAM002、批号 RGAR003、批号 RGAM004)购于武汉三鹰生物技术有限公司; Syn 抗体(批号 ET1606-56)、ephrinB2 抗体(批号 ET1705-33)、微管蛋白(Tubulin)抗体(批号 ET1602-4)、GAPDH 抗体(批号 ET1601-4)、神经氨酸酶(Neu)抗体(批号 ET1602-12)购于杭州华安生物技术有限公司; 丁苯酞软胶囊(规格每粒 0.1 g,批号 H2005050299)购于石药集团恩必普药业有限公司; 二甲基亚砜(DMSO,批号 D8370)、磷酸盐缓冲液(PBS,批号 P1010)购于北京索莱宝科技有限公司; EphB2 基因的 RNAi-Easy(三保一)-腺相关病毒(KO 序列号 130386-1、130387-1、130388-1,编号分别为 V1、V2、V3)、阴性对照病毒

CON305 (9 型) (AAV9CON305) 由吉凯基因定制。

2 方法

2.1 A β ₁₋₄₂、NBP 溶液的制备

在 1 mg 的 A β ₁₋₄₂ 中加入预冷的 HFIP 222 μ L, 混合均匀后离心, 超声溶解 3 次, 每次 5 s, 室温静置 1 h 后转至冰上溶解 10 min, 通风橱室温过夜, 使其形成肽膜。次日在肽膜中加入 13 μ L DMSO, 充分混匀, 再加入 137 μ L PBS, 超声溶解 10 min, 制成 6.67 μ g $\cdot\mu$ L⁻¹ 的 A β ₁₋₄₂ 溶液, 存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

用无菌注射器抽取 0.3 g NBP, 用玉米油定容至 10 mL, 混合均匀, 制成 30 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的 NBP 溶液。

2.2 分组、造模及干预

将 SD 雄性大鼠随机分为 7 组: 对照组、假手术组、模型组、空载组、溶媒组、NBP (100 mg $\cdot$ kg⁻¹) 组、NBP (100 mg $\cdot$ kg⁻¹) + EphB2 病毒敲低 (shEphB2) 组, 每组 8 只。课题组前期预试验中设置 NBP 30、100 mg $\cdot$ kg⁻¹, 探究其对 AD 模型大鼠学习、记忆的改善作用, 结果发现 100 mg $\cdot$ kg⁻¹ 作用更为显著。

所有大鼠适应性喂养 1 周后, 对空载组、NBP + shEphB2 组进行病毒注射, 在大鼠双侧海马分别立体定位注射阴性对照病毒 CON305 及 EphB2 基因的 RNAi-Easy-腺相关病毒, 待病毒起效。实验动物经 1.5% 戊巴比妥钠 (2 mL $\cdot$ kg⁻¹) ip 麻醉后, 固定于脑立体定位仪上。参照《大鼠脑立体定位图谱》确定海马 CA1 区坐标: 前囟后 3.6 mm, 矢状缝旁开 2.0 mm, 硬脑膜下 3.86 mm。使用电动微型颅骨钻在定位点钻孔, 采用微量注射器以 0.5 μ L $\cdot$ min⁻¹ 的速度缓慢注射病毒, 注射完成后留针 10 min 以确保病毒充分扩散, 随后缓慢撤针。同法进行对侧海马 CA1 区注射。注射完成后, 检查钻孔处无出血, 依次进行消毒、缝合皮肤及术后消毒等处理。

待病毒转染 4 周时, 对模型组、空载组、溶媒组、NBP 组、NBP + shEphB2 组大鼠双侧海马立体定位注射 A β ₁₋₄₂ 寡聚体 3.5 μ L, 以 0.5 μ L $\cdot$ min⁻¹ 的速度持续注射 7 min, 注射后留针 10 min, 再缓慢撤针, 以确保溶液充分弥散, 具体操作步骤同前; 假手术组以同样方法双侧海马 CA1 区注射 0.9% 氯化钠溶液 3.5 μ L, 对照组不注射。

NBP 组和 NBP + shEphB2 组大鼠在 A β ₁₋₄₂ 注

射前 2 周开始进行 NBP ig 处理, 每天 1 次, 持续至实验结束, 共计 28 d; 溶媒组大鼠每天 ig 给予等体积玉米油。在 A β ₁₋₄₂ 注射后第 7 天开始 Morris 水迷宫实验, 所有行为学测试均在每天 ig 后 1 h 进行。

为筛选最佳干扰序列, 设置对照组、空载组和 V1、V2、V3 (分别立体定位注射 V1、V2、V3) 组, 4 周后取海马组织, 采用 Western blotting 法检测 EphB2 蛋白表达。

2.3 Morris 水迷宫行为学检测大鼠认知功能

进行 Morris 水迷宫行为学检测时, 将水池划分为 4 个象限, 在其中 1 个象限固定设置逃生平台。正式测试前 24 h 进行适应性训练, 将逃生平台固定于第 3 象限, 平台顶端露出水面, 依次将大鼠放入 4 个象限, 观察其在 120 s 内是否能够自主找到平台, 若大鼠未能在规定时间内找到平台, 则引导其游向平台并停留至少 10 s。在实验第 1~5 天进行定位航行测试。保持水迷宫设置不变, 将逃生平台置于水面下 2 cm 处。每次测试时, 将大鼠面向池壁放入水中。图像采集系统记录每只大鼠的运动轨迹及找到隐藏平台所需时间 (潜伏期)。所有大鼠依次完成 4 个象限的测试。在实验第 6 天进行空间探索测试。撤除水池中的逃生平台, 其余条件保持不变。图像采集系统记录每只大鼠在 120 s 内的运动轨迹, 并统计其穿越原平台所在区域的次数。

2.4 组织标本的采集与处理

行为学实验结束后, 立即进行脑组织的分离及后续处理。首先, 将全脑置于中性缓冲福尔马林固定液中, 用于后续苏木素-伊红 (HE) 染色、免疫荧光实验。同时, 迅速分离海马组织并分割成适当体积置于预冷的电镜专用固定液, 在避光条件下固定后转移至 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 以备透射电子显微镜观察。剩余海马组织经液氮速冻后, 置于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中长期保存, 供 Western blotting、ELISA 检测使用。

2.5 HE 染色检测海马区神经元的病理变化

全脑进行石蜡包埋后制备 4 μ m 连续切片, 经二甲苯脱蜡及梯度乙醇脱水。切片苏木素染色 5 min, 1% 盐酸酒精分化后 LiCO₃ 反蓝, 伊红染色 3 min, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明, 中性树脂封片, 将切片置于显微镜下观察。

2.6 透射电镜下观察海马神经元及突触结构变化

组织块经戊二醛和锇酸双重固定后, 采用梯度丙酮脱水。随后依次用丙酮/Epon-812 混合液梯度渗

透, 纯树脂过夜渗透后, 60 °C 聚合 48 h。半薄切片甲苯胺蓝染色定位后, 制备 60~90 nm 超薄切片, 经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, 双蒸水冲洗后干燥待检。

2.7 Western blotting 检测海马组织中 EphB2、PSD95、Syn、ephrinB2、APP 蛋白表达水平

海马组织经含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液匀浆后离心取上清, BCA 法定量蛋白浓度。样品经 SDS 变性后, 进行 SDS-PAGE 电泳 (7.5%~10% 分离胶, 80~120 V) 并转至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 经 TBST 洗涤后依次孵育一抗 (EphB2 1:5 000、PSD95 1:10 000、Syn 1:5 000、ephrinB2 1:2 000、APP 1:1 000、Tubulin 1:10 000、GAPDH 1:10 000) 4 °C 过夜, 一抗孵育结束后取出并用 TBST 洗涤后室温孵育相应二抗 1 h。ECL 显影后, 采用 Image J 分析条带灰度值, GraphPad Prism 10 进行统计。

2.8 ELISA 法检测海马组织中 A β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₂ 蛋白的水平

海马组织经 PBS 匀浆后离心取上清备用。实验前将试剂盒平衡至室温, 按 5 倍稀释比例加样, 37 °C 孵育 30 min。采用 20 倍稀释洗涤液洗板 5 次后, 加入 50 μ L 酶标二抗 37 °C 反应 60 min。重复洗涤后依次加入显色剂 A/B 各 50 μ L, 37 °C 避光显

色 10 min。终止反应后立即在 450 nm 波长下测定吸光度值, 15 min 内完成检测。

2.9 免疫荧光观察大鼠海马组织中目的蛋白神经细胞定位

脑组织切片经 EDTA 抗原修复液高压修复 8 min 后, 0.1% Triton X-100 37 °C 通透 30 min。10% 山羊血清封闭 1 h 后, 加入一抗 (EphB2 1:30, Neun 1:200, PSD95 1:50) 4 °C 过夜。次日 37 °C 复温 1 h 后, 荧光二抗 (1:500) 37 °C 避光孵育 1 h。DAPI 染核 10 min, 抗淬灭剂封片后 4 °C 保存, 将切片置于显微镜下观察。

2.10 统计学处理

采用使用 IBM SPSS Statistics 29.0 软件进行统计分析, 实验数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。检验数据正态性时使用 Shapiro-Wilk 检验法, 方差齐性检验使用 Brown-Forsythe 检验法, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 EphB2 敲减病毒的转染及敲减效果的验证

为筛选最佳干扰序列, 采用 Western blotting 法检测 3 个不同 shRNA 序列的敲减效率。结果显示 (图 1), 与对照组比较, V1 的敲减效果最为显著, EphB2 蛋白表达降低 65.6% ($P<0.05$), 故后续实验选用该序列进行 EphB2 敲减。

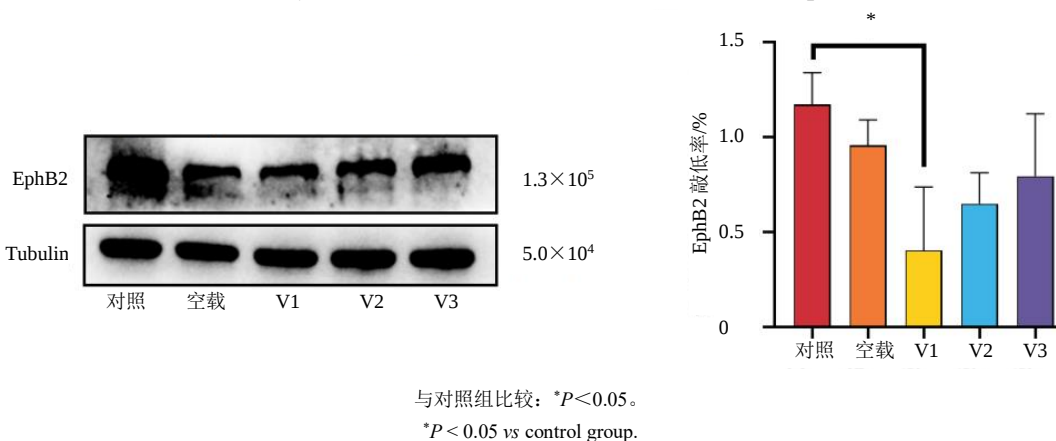


图 1 EphB2 敲减病毒转染情况及敲减率的筛选 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Screening of EphB2 knockdown virus transfection status and knockdown rate ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.2 NBP 对 AD 模型大鼠认知功能的影响

3.2.1 水迷宫定位航线实验 在第 1~5 天的定位航行实验中, 各组大鼠的逃避潜伏期逐渐缩短。AD 模型组比对照组逃避潜伏期延长 ($P<0.05$); 与模型组相比, 第 3~5 天 NBP 组逃避潜伏期有所缩短 ($P<0.05$); 第 3、5 天 NBP+shEphB2 组逃避潜伏

期较 NBP 组延长 ($P<0.05$), 结果见表 1。

3.2.2 水迷宫空间探索实验 在同一 120 s 内计数各组大鼠穿过平台的次数, AD 模型组穿过平台的次数较对照组明显减少 ($P<0.05$); 空载组、溶媒组穿过平台的次数与 AD 模型组无明显差异 ($P>0.05$); 与 AD 模型组相比较, NBP 组穿过平台的次

表 1 各组大鼠逃避潜伏期的情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Escape from latency in groups of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	逃避潜伏期/s				
		第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
对照	—	41.44±5.39	30.99±3.32	21.02±2.84	17.88±2.51	12.37±2.99
假手术	—	45.04±5.95	33.81±3.01	22.69±3.03	15.54±3.70	15.26±3.60
模型	—	54.59±8.32*	43.38±4.94*	40.29±2.99*	39.90±3.15	39.03±4.33*
空载	—	56.83±7.50*	40.68±4.50*	41.44±3.09*	37.13±5.31*	36.51±2.27*
溶媒	—	51.91±2.54*	44.28±3.69*	41.35±6.17*	35.77±6.08*	33.31±5.06*
NBP	100	49.27±4.26*	36.72±6.51	28.80±7.01 [#]	21.64±3.71 [#]	19.06±4.50 [#]
NBP+shEphB2	100	52.97±5.19*	41.79±2.19*	37.59±5.16* ^{&}	32.71±6.92*	30.25±6.08* ^{&}

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与 NBP 组比较: [&] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [&] $P<0.05$ vs NBP group.

表 2 各组大鼠穿越平台次数 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Number of times rats in each group crossed the platform ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	穿越平台次数
对照	—	6.25±0.94
假手术	—	5.94±0.99
模型	—	3.19±0.85*
空载	—	2.41±1.32*
溶媒	—	3.06±0.54*
NBP	100	4.91±0.62 [#]
NBP+shEphB2	100	3.09±1.18* ^{&}

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与 NBP 组比较: [&] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [&] $P<0.05$ vs NBP group.

数增加 ($P<0.05$); 与 NBP 组相比, NBP+shEphB2 组穿过平台的次数显著减少 ($P<0.05$); 假手术组穿过平台的次数与对照组比较无明显差异 ($P>0.05$), 结果见表 2。

3.3 HE 染色观察各组大鼠海马组织病理学改变

如图 2 所示, HE 染色后观察海马组织 CA1 或 CA3 区结构。对照组和假手术组大鼠海马 CA1/CA3 区神经元排列整齐, 细胞结构完整, 核仁清晰, 胞核与胞质界限分明。相比之下, 模型组、空载组、溶媒组及 NBP+shEphB2 组大鼠海马区神经元排列紊乱, 细胞结构异常, 表现为胞质嗜伊红染色加深, 并出现核固缩、核碎裂、核溶解等病理改变, 部分

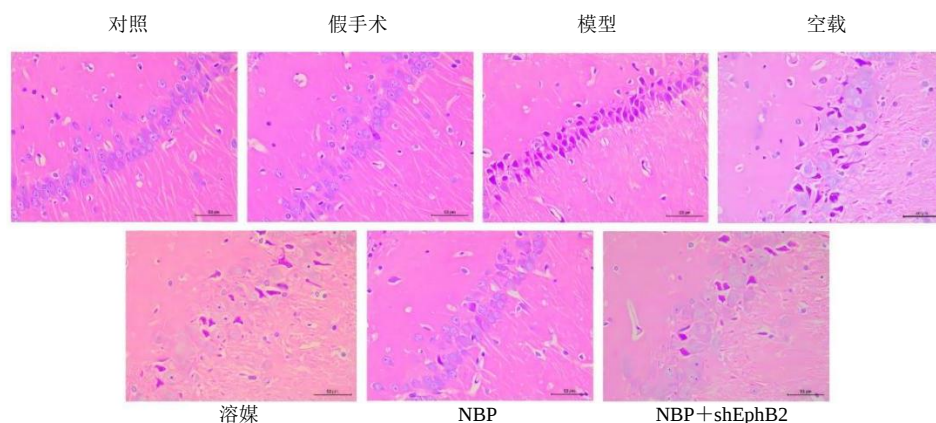


图 2 各组大鼠海马区组织的病理学变化 (×40)

Fig. 2 Pathological changes in the tissues of the hippocampal region of rats in various groups (×40)

神经元发生裂解坏死, 细胞间隙明显增宽。NBP 组大鼠海马组织病理损伤程度较上述各组有所减轻, 神经元排列相对整齐, 但仍可见部分神经元坏死, 其病理改变程度介于对照组与其他造模组之间。

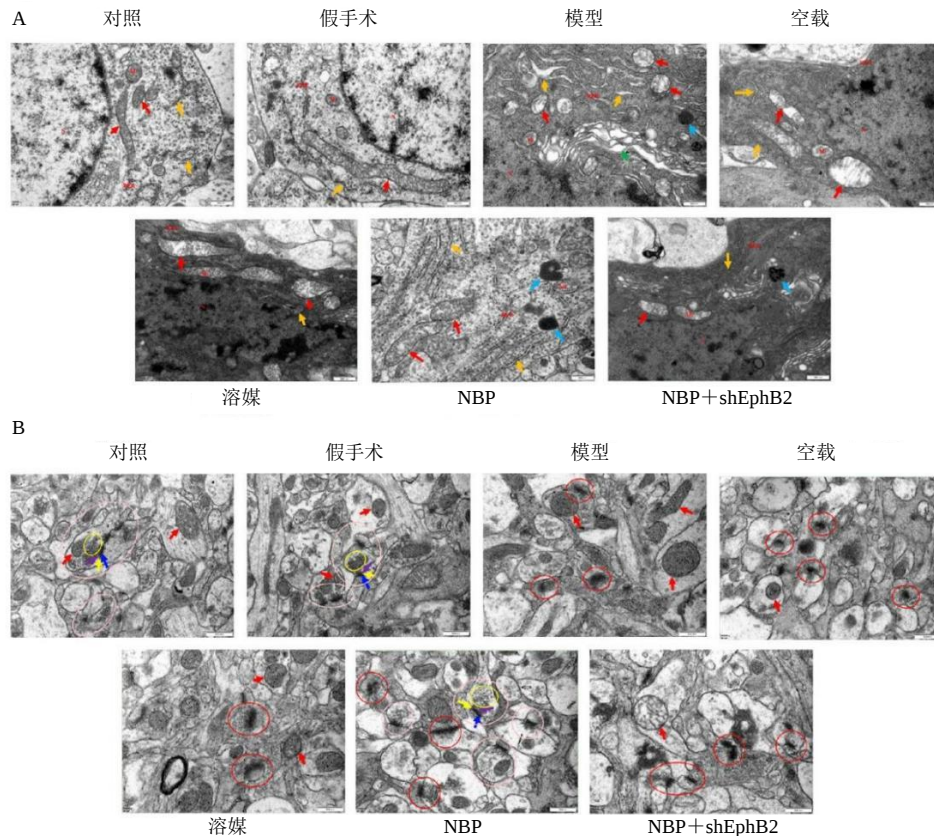
3.4 透射电镜观察大鼠海马组织中神经元细胞及突触结构的变化

在透射电镜下观察到, 对照组和假手术组海马神经元结构完整: 细胞核其位置居中, 形态规则, 核膜界限分明, 染色质均匀分布, 核仁结构清晰可

见：胞质富含结构完整的细胞器，线粒体形态正常，粗面内质网分布均匀，细胞膜结构完整。相比之下，AD 模型组、空载组、溶媒组及 NBP+shEphB2 组海马神经元呈现典型凋亡特征：胞浆浓缩，细胞核皱缩，线粒体肿胀，粗面内质网部分扩张，高尔基体明显扩张，胞质中可见少量溶酶体；尽管细胞膜保持完整，但突触结构模糊，三层结构不清晰，部分线粒体呈现轻度肿胀。值得注意的是，NBP 组神经元病理改变较其他模型组明显减轻：细胞核形态基本正常，线粒体仅轻度肿胀，粗面内质网形态正常，高尔基体轻度扩张，细胞膜完整，突触数量较多且

多数结构清晰，仅少数突触结构模糊，线粒体形态正常。

在透射电镜下，对照组和假手术组海马组织突触结构完整，突触数量丰富，突触前膜、突触间隙和突触后膜三层结构清晰可见，突触小泡数量较多且分布均匀。相比之下，AD 模型组、空载组、溶媒组及 NBP+shEphB2 组海马组织虽然突触数量较多，但结构模糊，突触三层结构界限不清。NBP 组海马组织突触数量与正常组相当，多数突触结构清晰，但仍可见部分突触结构模糊，提示其突触结构部分受损。



A 图：红色箭头-线粒体，橙色箭头-粗面内质网，绿色箭头-高尔基体，蓝色箭头-溶酶体；B 图：粉色圈-突触结构完整，紫色箭头-突触前膜，黄色箭头-突触间隙，深蓝色箭头-突触后膜，黄色圈-突触小泡。

Figure A: Red arrow-mitochondria, orange arrow-rough endoplasmic reticulum, green arrow-Golgi apparatus, blue arrow-lysosome; Figure B: Pink circle-intact synaptic structure, purple arrow-presynaptic membrane, yellow arrow-synaptic cleft, dark blue arrow-postsynaptic membrane, yellow circle-synaptic vesicles.

图 3 透射电镜下各组大鼠海马区神经元细胞 (A) 及突触结构 (B)

Fig. 3 Neuronal cells (A) and synaptic structures (B) in hippocampus of rats under transmission electron microscopy

3.5 Western blotting 检测各组大鼠海马组织中 EphB2、PSD95、APP、Syn、ephrinB2 的表达水平

与对照组相比，模型组 EphB2、PSD95、Syn 和 ephrinB2 表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)；对照组与假手术组间上述蛋白的表达无统计学差异 ($P > 0.05$)；

模型组、空载组及溶媒组间上述蛋白的表达水平相当 ($P > 0.05$)；值得注意的是，NBP 组各蛋白的表达较模型组显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，而 NBP+shEphB2 组各蛋白的表达较 NBP 组明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与对照组相比，模型

组 APP 表达显著升高 ($P<0.001$); 对照组与假手术组间 APP 表达无统计学差异 ($P>0.05$); 模型组、空载组及溶媒组间 APP 表达水平相当 ($P>$

0.05), NBP 组 APP 表达较模型组显著降低 ($P<0.01$), 而 NBP+shEphB2 组 APP 表达较 NBP 组明显升高 ($P<0.05$)。结果见图 4。

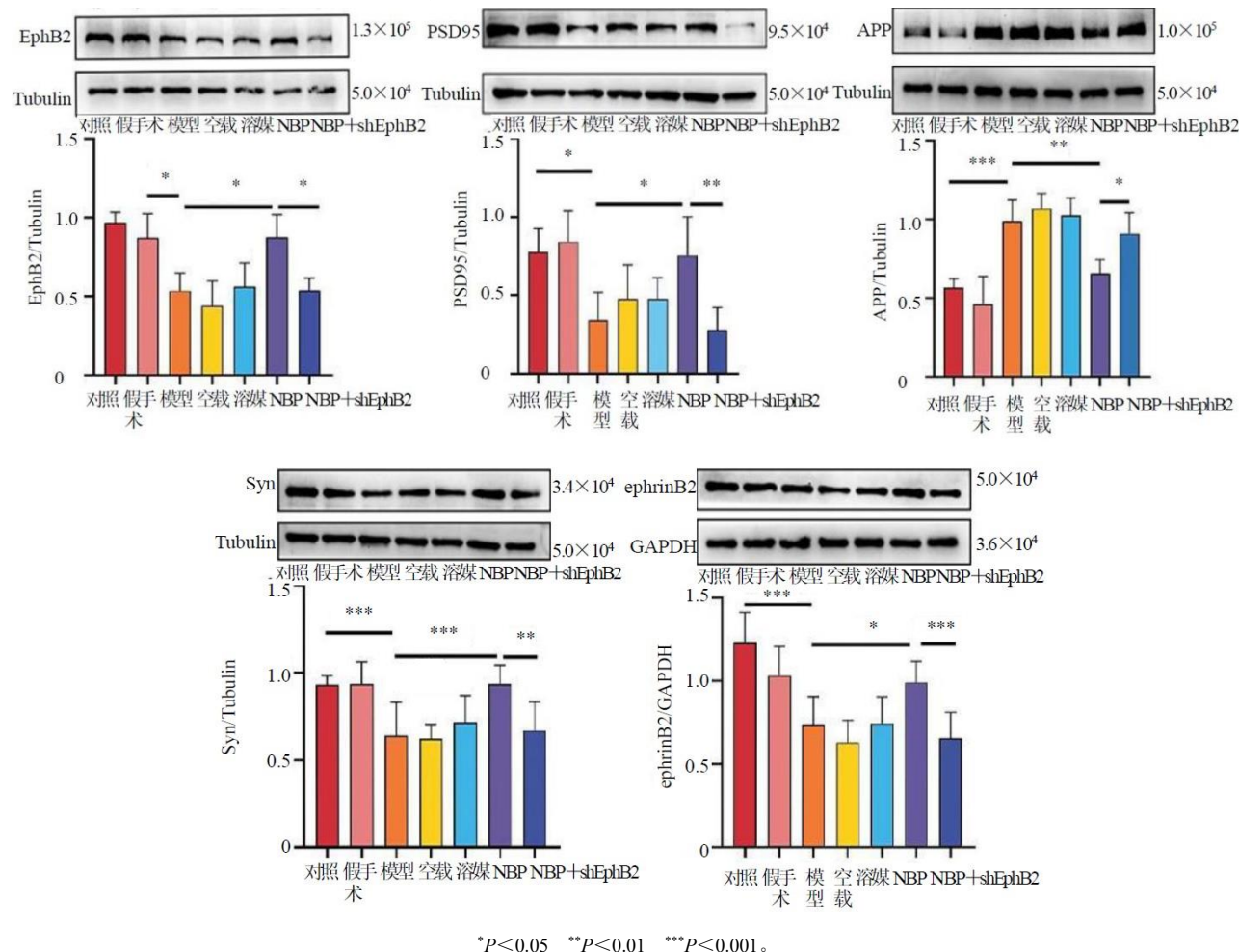


图 4 各组大鼠海马区 EphB2 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 EphB2 expression in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.6 ELISA 检测各组大鼠海马组织中 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 表达水平

与对照组相比, 模型组 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 含量显著

升高 ($P<0.001$); NBP 组 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 含量较模型组显著降低 ($P<0.001$), 而 NBP+shEphB2 组 $A\beta$ 水平较 NBP 组明显升高 ($P<0.001$)。结果见图 5。

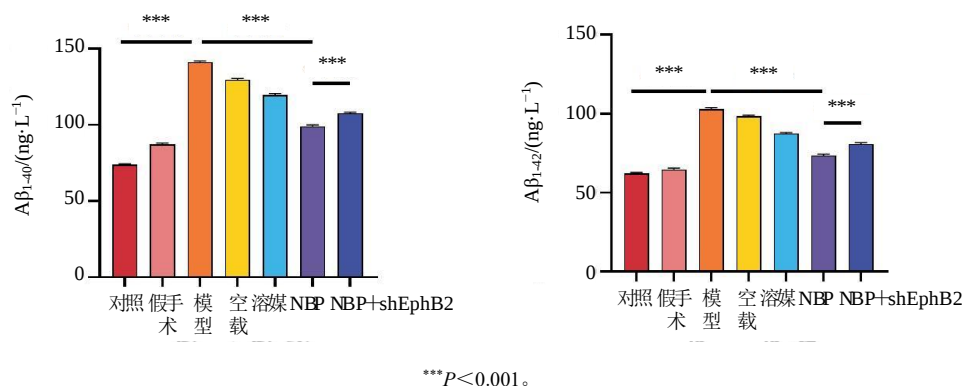


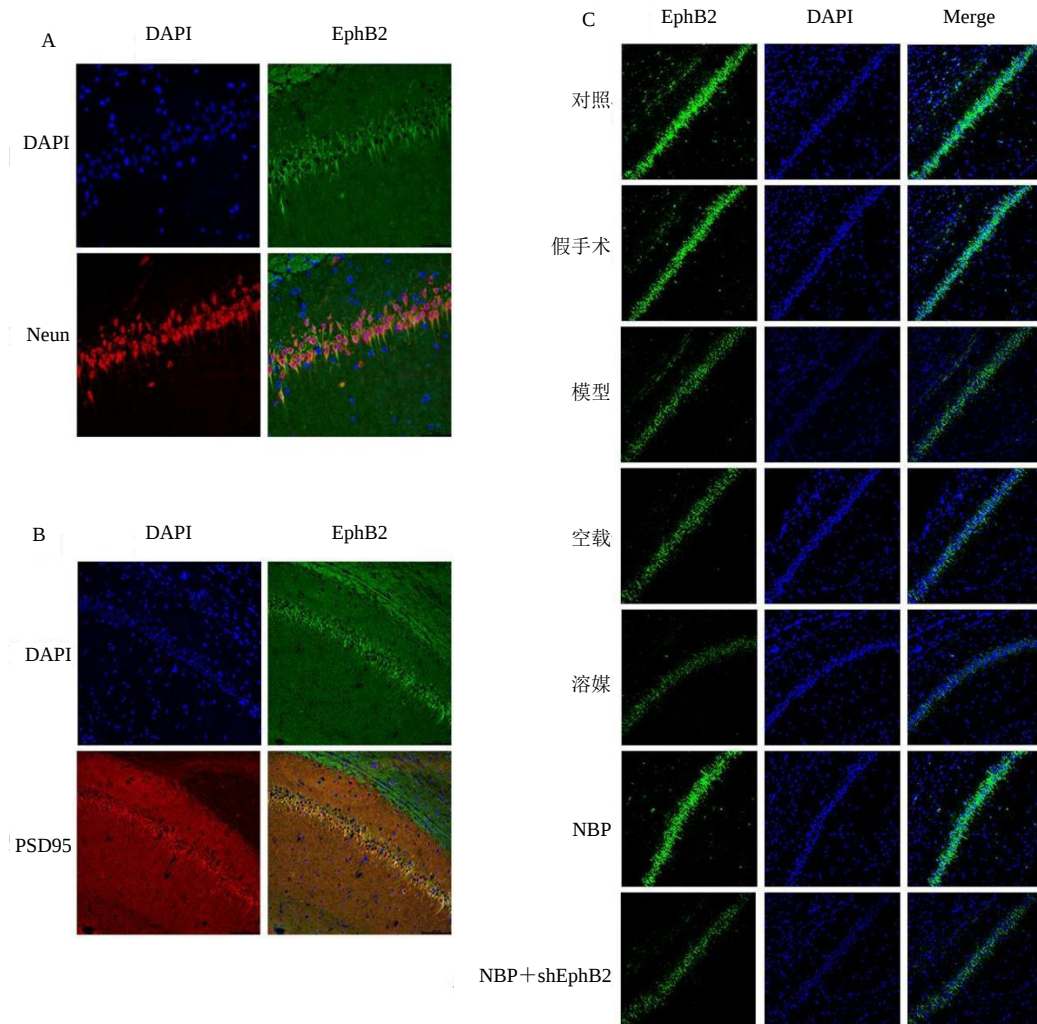
图 5 各组大鼠海马组织中 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 表达情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Expression of $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$ in hippocampal tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.7 免疫荧光观察大鼠海马组织中 EphB2 蛋白

结果如图 6 所示, EphB2 在海马组织中均有分布, 主要表达在各组大鼠海马神经细胞的胞质中,

并与 PSD95 存在共定位。模型组 EphB2 水平较对照组下降; NBP 组 EphB2 水平较模型组升高; NBP+shEphB2 组 EphB2 水平较 NBP 组下降。



A-EphB2 定位于神经元胞质 ($\times 40$); B-EphB2 与 PSD95 共定位 ($\times 20$); C-各组大鼠海马区 EphB2 的表达 ($\times 20$)。

A-EphB2 is located in the cytoplasm of neurons ($\times 40$); B-EphB2 co localization with PSD95 ($\times 20$); C-Expression of EphB2 in the hippocampus of rats in each group ($\times 20$).

图 6 免疫荧光观察大鼠海马组织中 EphB2 蛋白的表达

Fig. 6 Immunofluorescence observation of EphB2 protein expression in rat hippocampus tissue

4 讨论

AD 是一种病因未明、发病机制复杂的原发性中枢神经系统退行性疾病, 已成为老年人群痴呆症的主要类型^[1]。该病以进行性认知功能障碍和神经元退行性病变为特征, 常伴有神经精神症状和行为异常, 对全球公共卫生构成重大挑战^[2]。AD 的病理特征主要包括 A β 异常沉积和 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结^[3]。此外, 神经元丢失、突触功能障碍和神经炎症反应也是其重要病理改变^[22]。然而, AD 病理机制的复杂性和当前治疗效果的局

限性提示, AD 中仍存在许多未知机制有待阐明, 深入研究 AD 的多因素发病机制, 对于改善 AD 的防治策略具有重要意义。本研究采用 A β_{1-42} 诱导建立 AD 动物模型。将 A β_{1-42} 溶液注射至大鼠双侧海马 CA1 区, 以模拟 AD 特征性病理改变——A β 沉积形成的老年斑^[23,24]。A β_{1-42} 作为淀粉样蛋白的主要形式, 其形成的核结构可启动纤维形成过程, 进而引发典型的淀粉样变性。本研究中, 与对照组相比, 模型组大鼠表现出显著的认知功能障碍。HE 染色及透射电镜结果显示模型组大鼠海马区神经元

细胞排列紊乱,出现核细胞凋亡特征,突触结构模糊。此外模型组大鼠海马组织中 APP、A β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₂ 蛋白表达量增加,符合 AD 特征。

近年来的研究进展表明,突触可塑性在认知功能中起着关键作用^[25,26],参与突触可塑性调控的关键分子包括 Syn 和 PSD95 等。PSD 作为突触后膜接受兴奋性神经递质的关键区域,其结构和成分的动态变化能够准确反映突触功能状态。Syn 作为突触前囊泡膜的特异性标志物,与 PSD95 共同构成了评估突触数量的重要指标。轴突导向分子在突触定位、生成及功能调控中发挥关键作用。其中,Eph 受体及其配体 ephrin 作为重要的轴突导向分子,在突触发育调控中扮演着不可或缺的角色,参与多种重要生理活动,包括神经元的分化与迁移、轴突导向、树突重塑以及突触的形成与成熟等。研究证实,EphB 受体中的 EphB 亚家族分子,特别是 EphB2,在前脑兴奋性突触形成过程中具有不可或缺的作用,具体而言,EphB2 的上调可以部分挽救突触损害及改善认知功能^[10,14]。该作用主要通过调控谷氨酸受体的簇集与定位发挥作用^[12,13,27,28]。研究表明,树突丝状伪足作为突触后前体结构^[10,14,29,30],其与突触前成分的特异性识别主要依赖 EphB-ephrinB 相互作用。这些高度可塑性的细胞突起在突触形成过程中大量存在^[29,31],并通过 EphB 信号通路动态调节形态变化,以促成突触形成或寻找新结合位点^[10]。在分子机制上,EphB2 的纤维连接蛋白结构域是与 A β 寡聚体相互作用的关键区域^[32];EphB2 还能与 NMDA 受体(NMDAR)相互作用,增强钙离子内流,促进谷氨酸受体 GluN2B 磷酸化并调控受体膜表达^[27,32]。通过 Western blotting 发现,与对照组相比,模型组大鼠海马组织中 EphB2、PSD95、Syn 表达量下降且具有统计学差异,与前述结论一致。免疫荧光中观察到,EphB2 在大鼠海马组织的神经元的胞质中表达,并与 PSD95 存在共定位。

NBP 是一种从芹菜籽中提取的手性小分子化合物,具有广泛的神经保护作用。近年来研究发现,NBP 不仅对脑卒中急性期症状具有显著改善作用^[33-34],还对 AD 动物模型展现出多方面的治疗潜力。其作用机制涉及抑制 A β 沉积^[17]、调节 Tau 蛋白磷酸化、缓解神经炎症、增强突触可塑性^[18]、抑制神经元凋亡以及促进神经发生^[19]等多个方面。既往实验研究表明^[5]NBP 处理可显著增加 APP/PSI 转基因小鼠海马 CA1 和 CA3 区的突触密度及突触后致密

区厚度。Western blotting 分析显示,NBP 处理显著上调 PSD95 的表达水平,体外实验也证实 Syn 蛋白表达增加。这些发现表明,NBP 通过调控突触可塑性来改善认知功能的作用机制^[20,21]。尽管研究表明 NBP 具有调节突触可塑性的作用,但其具体分子机制尚未完全阐明。本研究假设 NBP 可能通过调控 EphB2 的表达来改善突触可塑性,从而缓解 A β ₁₋₄₂ 诱导的 AD 模型大鼠认知功能障碍,采用立体定位注射技术向 AD 大鼠海马区注射 EphB2 敲低病毒,特异性降低 EphB2 表达水平。本实验中,经 NBP ig 治疗后大鼠认知功能障碍有所改善,海马组织中 EphB2、ephrinB2 蛋白表达量有所升高且具有统计学差异,神经元结构和突触结构受损程度有所减轻,突触相关蛋白 PSD95、Syn 蛋白的表达量有所上升,但经 EphB2 病毒敲低后 NBP 对前述变化无明显的改善作用。

本研究结果表明,NBP 可以改善 A β ₁₋₄₂ 诱导的 AD 模型大鼠认知功能障碍,其作用机制可能通过调控 EphB2/ephrinB2 信号通路来调节突触可塑性从而改善认知功能。本研究尚存在部分局限性,实验采用的 SD 大鼠与人类在生理和病理特征上存在种属差异;其次,样本量相对有限可能影响结果的统计学效力。后续的研究可考虑使用更接近人类 AD 病理特征的转基因动物模型,并适当增加样本量以提高实验结果的可靠性和代表性。此外,进一步研究可结合多种行为学测试和多时间点检测,以更全面地评估认知功能改变和病理进程。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu P, Li L X, He F P, et al. Identification of candidate biomarkers of Alzheimer's disease via multiplex cerebrospinal fluid and serum proteomics [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(18): 14225.
- [2] Frost B. Alzheimer's disease and related tauopathies: Disorders of disrupted neuronal identity [J]. Trends Neurosci, 2023, 46(10): 797-813.
- [3] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2021, 397(10284): 1577-1590.
- [4] Chae S, Lee H J, Lee H E, et al. The dopamine analogue CA140 alleviates AD pathology, neuroinflammation, and rescues synaptic/cognitive functions by modulating DRD1 signaling or directly binding to Abeta [J]. J Neuroinflammation, 2024, 21(1): 200.

- [5] Huang L J, Lan J Q, Tang J S, et al. *L*-3-*n*-Butylphthalide improves synaptic and dendritic spine plasticity and ameliorates neurite pathology in Alzheimer's disease mouse model and cultured hippocampal neurons [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(3): 1260-1274.
- [6] Zhang K, Liu R, Zhang J R, et al. Electroacupuncture ameliorates depression-like behaviour in rats by enhancing synaptic plasticity via the GluN2B/CaMKII/CREB signalling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 2146001.
- [7] Prikas E, Ahel H, Stefanoska K, et al. Interaction between the guanylate kinase domain of PSD-95 and the proline-rich region and microtubule binding repeats 2 and 3 of tau [J]. *Biochem Cell Biol*, 2021, 99(5): 606-616.
- [8] Dore K, Malinow R. Elevated PSD-95 blocks ion-flux independent LTD: A potential new role for PSD-95 in synaptic plasticity [J]. *Neuroscience*, 2021, 456: 43-49.
- [9] Dore K, Carrico Z, Alfonso S, et al. PSD-95 protects synapses from β -amyloid [J]. *Cell Rep*, 2021, 35(9): 109194.
- [10] Mao Y T, Zhu J X, Hanamura K, et al. Filopodia conduct target selection in cortical neurons using differences in signal kinetics of a single kinase [J]. *Neuron*, 2018, 98(4): 767-782.e8.
- [11] Zhang H, Lei M S, Zhang Y, et al. Phosphorylation of Doc2 by EphB2 modulates Munc13-mediated SNARE complex assembly and neurotransmitter release [J]. *Sci Adv*, 2024, 10(20): eadi7024.
- [12] Henkemeyer M, Itkis O S, Ngo M, et al. Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus [J]. *J Cell Biol*, 2003, 163(6): 1313-1326.
- [13] Kayser M S, McClelland A C, Hughes E G, et al. Intracellular and trans-synaptic regulation of glutamatergic synaptogenesis by EphB receptors [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(47): 12152-12164.
- [14] Kayser M S, Nolt M J, Dalva M B. EphB receptors couple dendritic filopodia motility to synapse formation [J]. *Neuron*, 2008, 59(1): 56-69.
- [15] Washburn H R, Xia N L, Zhou W, et al. Positive surface charge of GluN1 *N*-terminus mediates the direct interaction with EphB2 and NMDAR mobility [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 570.
- [16] Shi X D, Sun K, Hu R, et al. Blocking the interaction between EphB2 and ADDLs by a small peptide rescues impaired synaptic plasticity and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(47): 11959-11973.
- [17] Peng Y, Sun J, Hon S, et al. *L*-3-*n*-butylphthalide improves cognitive impairment and reduces amyloid- in a transgenic model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(24): 8180-8189.
- [18] Lv C N, Ma Q Y, Han B, et al. Long-term DL-3-*n*-butylphthalide treatment alleviates cognitive impairment correlate with improving synaptic plasticity in SAMP8 mice [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 200.
- [19] Lei H, Zhang Y, Huang L J, et al. *L*-3-*n*-butylphthalide regulates proliferation, migration, and differentiation of neural stem cell *in vitro* and promotes neurogenesis in APP/PS1 mouse model by regulating BDNF/TrkB/CREB/Akt pathway [J]. *Neurotox Res*, 2018, 34(3): 477-488.
- [20] Che P, Zhang J, Yu M Q, et al. DL-3-*n*-butylphthalide promotes synaptic plasticity by activating the Akt/ERK signaling pathway and reduces the blood-brain barrier leakage by inhibiting the HIF-1 α /MMP signaling pathway in vascular dementia model mice [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(5): 1392-1404.
- [21] Matosin N, Fernandez-Enright F, Lum J S, et al. Molecular evidence of synaptic pathology in the CA1 region in schizophrenia [J]. *NPJ Schizophr*, 2016, 2: 16022.
- [22] Wang J, Gu B J, Masters C L, et al. A systemic view of Alzheimer disease: Insights from amyloid- β metabolism beyond the brain [J]. *Nat Rev Neurol*, 2017, 13(10): 612-623.
- [23] 吕君妍. $A\beta_{1-42}$ 或 $A\beta_{1-15}$ 改善 APP/PS1/Tau 转基因阿尔茨海默症小鼠记忆的机制 [D]. 上海: 华东师范大学, 2023.
- [23] Lü J Y. Mechanism of $A\beta_{1-42}$ or $A\beta_{1-15}$ improving memory of APP/PS1/Tau transgenic mice with Alzheimer's disease [D]. Shanghai: East China Normal University, 2023.
- [24] Puzzo D, Lee L D, Palmeri A, et al. Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: Practical considerations and guidelines [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88(4): 450-467.
- [25] Dinamarca M C, Raveh A, Schneider A, et al. Complex formation of APP with GABAB receptors links axonal trafficking to amyloidogenic processing [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1331.
- [26] Fišar Z. Linking the amyloid, tau, and mitochondrial hypotheses of Alzheimer's disease and identifying promising drug targets [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(11): 1676.
- [27] Dalva M B, Takasu M A, Lin M Z, et al. EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation [J]. *Cell*, 2000, 103(6): 945-956.

- [28] Segura I, Essmann C L, Weinges S, et al. Grb4 and GIT1 transduce ephrinB reverse signals modulating spine morphogenesis and synapse formation [J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(3): 301-310.
- [29] Ziv N E, Smith S J. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation [J]. *Neuron*, 1996, 17(1): 91-102.
- [30] Fiala J C, Feinberg M, Popov V, et al. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1 [J]. *J Neurosci*, 1998, 18(21): 8900-8911.
- [31] Dailey M E, Smith S J. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(9): 2983-2994.
- [32] Cissé M, Halabisky B, Harris J, et al. Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model [J]. *Nature*, 2011, 469(7328): 47-52.
- [33] 王沂, 易杰, 陈明, 等. 丁苯酞通过 RAS/PI3K 信号通路减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(11): 3059-3072.
- Wang Y, Yi J, Chen M, et al. Butylphthalide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via RAS/PI3K signaling pathway [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 48(11): 3059-3072.
- [34] 吴延华, 郭江涛, 赵广珍, 等. 脑安滴丸联合丁苯酞治疗急性脑梗死的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(3): 621-626.
- Wu Y H, Guo J T, Zhao G Z, et al. Clinical study of Naoan Dropping Pills combined with butylphthalide in treatment of acute cerebral infarction [J]. *Drug Clin*, 2024, 39(3): 621-626.

[责任编辑 兰新新]