

银杏叶提取物对去卵巢大鼠 学习记忆功能的影响^{*}

何玉龙, 范光丽, 吴月红, 张永德, 田光明, 阿依木古丽

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 利用水迷宫法研究了银杏叶提取物(EGb)对去卵巢大鼠学习记忆功能的影响, 同时利用免疫组织化学SP法检测了大鼠海马中乙酰胆碱转移酶(ChAT)和神经元型一氧化氮合酶(NOS1)的表达情况。结果表明, 去卵巢后大鼠学习记忆功能明显下降, 海马中ChAT阳性神经元的表达明显减弱($P < 0.05$), NOS1阳性神经元(除CA2区)的表达明显增强($P < 0.01$); EGb对雌激素缺乏所致学习记忆功能下降具有明显的改善作用, 其作用是通过增强海马中ChAT阳性神经元的表达和抑制NOS1阳性神经元的表达而实现的。

[关键词] 银杏叶提取物; 学习记忆; 卵巢摘除; 海马

[中图分类号] Q492.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)01-0049-05

The effect of Ginkgo biloba extract on the learning and memory abilities of ovariectomied rats

HE Yu-long, FAN Guang-li, WU Yue-hong, ZHANG Yong-de, TIAN Guang-ming, A yimuguli

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To investigate the effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb) on the learning and memory abilities of ovariectomied rats. The expression of ChAT- and NOS1-positive neuron in the hippocampus of rats and the function of learning and memory of rats were observed by the means of immunohistochemistry and Morris water maze respectively. As a result, the learning and memory abilities of ovariectomied rats were significantly decreased, the expression of ChAT-positive neuron of ovariectomied rats was alleviated remarkably ($P < 0.05$), the expression of NOS1-positive neuron (except of CA2 district) was increased significantly ($P < 0.01$). All the results illustrated that EGb can effectively improve the learning and memory of impairment by the defect of estrogen, and this may be implemented through increasing the expression of ChAT and inhibiting the expression of NOS1-positive neuron in the hippocampus of rats.

Key words: *Ginkgo biloba* extract; learning and memory; ovariectomy; hippocampus

雌激素对人类及动物学习、记忆和认知功能具有重要的作用^[1-4], 手术切除卵巢的患者和自然绝经后的妇女会出现学习和记忆能力减退、情感异常、焦虑等变化, 甚至出现认知功能障碍、人格改变和短期记忆丧失, 严重者可发展为老年性痴呆(Alzheimer's Disease, AD)等^[5]。目前, 对雌激素缺乏的治疗方法

主要是雌激素替代疗法(Estrogen replacement therapy, ERT), 但其可产生严重的副作用, 如可引发多种癌症。有研究表明, 银杏叶提取物(*Ginkgo biloba* extract, EGb)对老年性痴呆、老年性记忆减退、衰老等疾病有显著的预防和治疗效果^[6]。近年来, 美国将银杏叶用作保健食品, 欧洲一些国家将其

* [收稿日期] 2005-12-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39670550)

[作者简介] 何玉龙(1979-), 男, 内蒙古集宁人, 在读博士, 主要从事发育生物学的研究。E-mail: heyulong2003@163.com

[通讯作者] 范光丽(1943-), 女, 山西太原人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物解剖及神经生物学的研究。E-mail: guanglifan@yahoo.com.cn

作为植物药,广泛用于防治记忆力下降、痴呆及心脑血管疾病^[7]。但EGb对去卵巢雌激素缺乏引起的学习记忆功能障碍的治疗效果至今未见研究报道。为此,本试验研究了EGb对去卵巢大鼠学习记忆功能的影响,并对其可能的作用机制进行了初步探讨,以期临床合理应用EGb提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物及其分组 3月龄健康SD雌性大鼠,购自第四军医大学实验动物中心,共24只,质量210~230 g。24只SD大鼠分为A、B、C3组,每组8只,各组大鼠采用100 g/L水合氯醛腹腔注射麻醉后,A组做假手术,只剖开腹腔不摘除卵巢;B和C组摘除双侧卵巢,C组卵巢摘除1周后,隔天腹腔注射20 mg/kg的银杏叶提取物(EGb),A和B组隔天腹腔注射相同量的生理盐水,连续注射4周。

1.1.2 试剂及药物 免疫组化超敏SP试剂盒(福州迈新公司产品);兔抗ChAT、NOS1多克隆抗体(武汉博士德公司生产);银杏叶提取物金纳多(德国威玛舒培博士药厂产品,进口药品注册证号BX20010117);四盐酸3,3'-二氨基联苯胺(DAB, Sigma公司生产)及牛血清白蛋白(BSA)、葡萄糖氧化酶等。

1.2 大鼠学习记忆功能的测定

1.2.1 水迷宫试验装置设计 迷宫设计参照宿宝贵^[8]的方法,长宽各100 cm,高35 cm,泳路宽12 cm,泳路长220 cm,水深25 cm,水温(23±1)℃。每次训练结束后清洗泳路侧壁以消除嗅觉提示。

1.2.2 学习记忆功能的测定 最后一次注射24 h后,进行水迷宫试验。让大鼠在水中自由游泳2

min,让其熟悉环境。第2天开始测定,每只大鼠每天上午、下午各连续进行4次测定,中间休息2 min,连测7 d。以大鼠自水迷宫起点游至终点所需时间和途中进入盲端的错误次数作为衡量学习获得及记忆巩固能力的指标。

1.3 大鼠海马中ChAT和NOS1表达的检测

水迷宫测试后各组大鼠用100 g/L水合氯醛腹腔注射麻醉,主动脉灌注固定,取脑,于40 g/L多聚甲醛(pH 7.4)中固定,-4℃保存。再转至200 g/L蔗糖PB液(pH 7.4)保存至沉底。用恒温冰冻切片机(美国AO公司生产)连续冠状切片,片厚35 μm,取切片两套分别做ChAT和NOS1免疫组化染色。

免疫组化染色参考试剂盒说明书,第一抗体ChAT和NOS1多克隆抗体稀释比例分别为1:150和1:200(体积比),同时设阴性对照组,用硫酸镍增强的DAB进行呈色,明胶裱片,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜观察。阳性产物呈蓝黑色或蓝色,阴性对照组无阳性产物。

1.4 分析处理

每组ChAT和NOS1免疫组化染色切片随机选取海马各区中5个相同部位,用Motic数码显微镜拍照,用江苏捷达801形态分析软件对阳性细胞进行分析,测量阳性细胞的灰度值(阳性产物表达越强其灰度值越小)。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示,用t检验进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 EGb对去卵巢大鼠学习记忆能力的影响

EGb对去卵巢大鼠学习记忆能力的影响测定结果见表1。

表1 大鼠游完水迷宫全程所需时间和错误次数

Table 1 Time needed for once swimming of rats and error reaction that the rats swam in the Morris water maze

组别 Group	所需时间/s Time						
	第1天 First day	第2天 Second day	第3天 Third day	第4天 Fourth day	第5天 Fifth day	第6天 Sixth day	第7天 Seventh day
A	34.71±10.45	31.88±10.56*	29.57±4.45*	27.16±7.18	25.20±4.32*	21.09±7.27*	13.59±2.06**
B	39.15±14.11	50.93±10.21	43.13±8.91	30.97±14.85	36.15±4.90	33.14±5.76	24.65±4.55
C	39.63±13.94	36.89±14.24	35.78±7.59	29.73±16.96	26.22±4.33*	22.90±6.40*	13.80±6.44*
组别 Group	错误次数 Default frequency						
	第1天 First day	第2天 Second day	第3天 Third day	第4天 Fourth day	第5天 Fifth day	第6天 Sixth day	第7天 Seventh day
A	3.75±1.28	3.25±2.79*	3.13±0.99*	2.88±1.25	2.50±1.20*	1.88±0.99*	0.88±0.64**
B	4.63±2.80	5.34±3.70	4.88±1.89	3.25±1.04	4.00±1.31	3.50±1.41	2.63±0.74
C	4.75±1.67	4.50±1.43	3.88±0.83	3.13±0.83	2.75±1.04*	2.00±1.31*	1.34±0.92**

注: *表示与B组相比,差异显著($P < 0.05$); **表示与B组相比,差异极显著($P < 0.01$)。下表同。

Note: * Stand $P < 0.05$; ** stand $P < 0.01$ controlled with B group. The same to the next

由表 1 可知, 与 A 组(假手术组)相比,B 组(去卵巢组)大鼠游完水迷宫全程所需时间和错误反应(除第 1, 4 天外)均显著或极显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 B 组(去卵巢组)相比,C 组(EGb 治疗组)大鼠游完水迷宫全程所需时间和错误反应次数从第 5 天起均显著或极显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。以上结果说明, 去卵巢大鼠的学习记忆功能明显降低, 而注射 EGb 后学习记忆功能有所改善。

2.2 对去卵巢大鼠海马中 ChAT 和 NOS1 表达的影响

2.2.1 对 ChAT 表达的影响 由图 1 可以看出, ChAT 阳性神经元分布于海马各层。由表 2 可知, 与 A 组(假手术组)相比,B 组(去卵巢组)大鼠 ChAT 在海马 CA1 和 CA2 区中的表达显著减弱($P <$

0.05), 在 CA3 区和齿状回中的表达极显著减弱($P < 0.01$); 与 B 组(去卵巢组)相比,C 组(EGb 治疗组)大鼠海马 CA1, CA2, CA3 区和齿状回中 ChAT 的表达显著增强($P < 0.05$)。

2.2.2 对 NOS1 表达的影响 由图 2 可以看出, 各组大鼠海马中 NOS1 阳性神经元分布于海马各层, 以放射层和锥体层最多。由表 2 可知, 与 A 组(假手术组)相比,B 组(去卵巢组)大鼠海马中 CA1, CA3 区和齿状回中 NOS1 表达显著增强($P < 0.01$), CA2 区变化不明显; 与 B 组(去卵巢组)相比,C 组(EGb 治疗组)大鼠海马 CA1 区和齿状回中 NOS1 表达显著减弱($P < 0.05$), CA3 区极显著减弱($P < 0.01$), 但 CA2 区变化不明显。

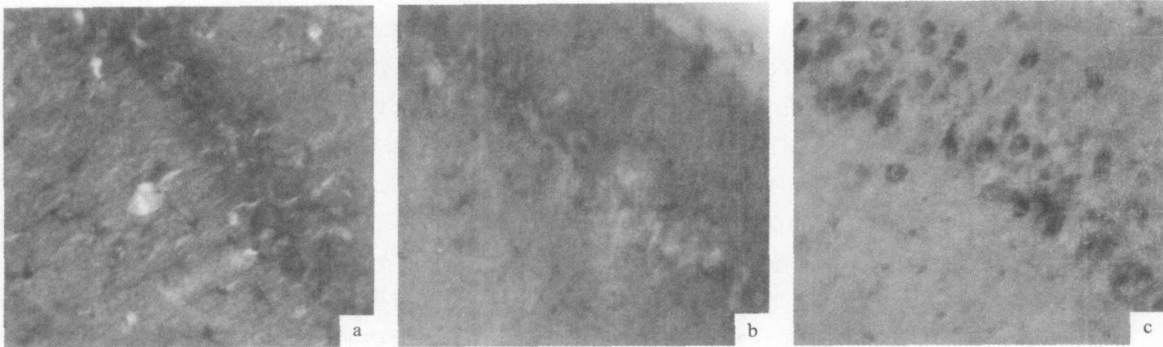


图 1 大鼠海马 CA1 区 ChAT 免疫阳性产物 ($\times 100$)
a 假手术组(A 组); b 去卵巢组(B 组); c EGb 治疗组(C 组)
Fig 1 Expression of ChAT in the CA1 of hippocampus ($\times 100$)
a Intact control group (A); b ovariectomied group (B); c group treated with EGb (C)

表 2 EGB 对大鼠海马中 ChAT 和 NOS1 表达的影响
Table 2 Effect of the expression of ChAT and NOS1 on the hippocampus of rats

组别 Group	ChAT 阴性产物灰度值 ChAT gray level			
	CA1	CA2	CA3	齿状回 Gyrus dentatus
A	87.2459 $\pm$ 5.0732 [*]	90.9161 $\pm$ 5.3421 [*]	88.4251 $\pm$ 5.7052 ^{**}	97.4218 $\pm$ 7.2328 ^{**}
B	104.4433 $\pm$ 12.6764	99.8057 $\pm$ 6.4429	105.2925 $\pm$ 5.7644	109.5626 $\pm$ 6.6037
C	91.1162 $\pm$ 6.7136 [*]	92.5876 $\pm$ 1.8693 [*]	91.6869 $\pm$ 7.4606 [*]	101.3723 $\pm$ 4.4279 [*]

组别 Group	NOS1 阴性产物灰度值 NOS1 gray level			
	CA1	CA2	CA3	齿状回 Gyrus dentatus
A	105.6942 $\pm$ 3.0072 ^{**}	97.5864 $\pm$ 6.3920	105.2069 $\pm$ 4.8069 ^{**}	107.1580 $\pm$ 7.1597 ^{**}
B	85.4483 $\pm$ 3.7591	88.1993 $\pm$ 6.4866	90.0784 $\pm$ 7.9517	82.1217 $\pm$ 6.6414
C	103.1346 $\pm$ 12.1536 [*]	93.8431 $\pm$ 4.3309	103.0967 $\pm$ 9.7886 ^{**}	98.8728 $\pm$ 10.0365 [*]

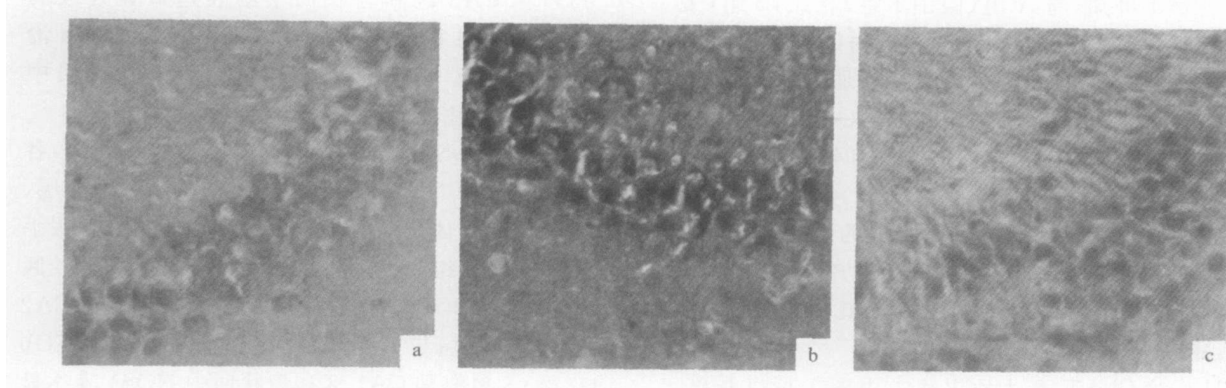


图 2 大鼠海马 CA 3 区 NOS1 免疫阳性产物 ($\times 100$)

a 假手术组(A 组); b 去卵巢组(B 组); c EGb 治疗组(C 组)

Fig 2 Expression of CA 3 in the hippocampus ($\times 100$)

a Intact control group (A); b ovariectomized group (B); c group treated with EGb (C)

3 讨 论

银杏(*Ginkgo biloba*)为银杏科银杏属植物,别名白果树、公孙树,其药用部位主要是叶和果。研究证实,EGb 具有广泛的药理作用,如拮抗血小板活化、清除自由基、抗炎、抗过敏^[9]。去卵巢后,机体内雌激素水平下降,直接影响神经元的活性和修复。中枢胆碱能神经系统的海马胆碱能细胞的功能障碍,是导致各种类型痴呆和记忆功能下降的重要原因^[10]。并且人衰老过程及血管性痴呆病程中伴有的记忆力减退,也主要是由于胆碱能神经系统的全面衰退引起的^[11]。ChA T 是胆碱能神经的标志酶,其活性代表乙酰胆碱(acetylcholine, A ch)合成的水平。一氧化氮(nitric oxide, NO)性质活跃,它的生物学效应很大程度上取决于催化其生成的一氧化氮合酶(NOS)的活性。NOS 的活性可间接反映 NO 的生成量。研究发现,NO 在中枢神经系统内具有双重作用,正常情况下作为一种神经递质参与学习记忆的过程^[12],是中枢神经系统中不可缺少的信使分子,但一氧化氮在细胞内积累过多会导致神经元坏死或凋亡,使学习记忆功能受到损害^[13]。

本试验中大鼠双侧卵巢切除后,体内雌激素缺乏,导致大鼠学习记忆功能下降,表现为游完水迷宫全程所需时间和出错次数均明显增加,海马中与学习记忆密切相关的 ChA T 表达明显减弱,而 NOS1 在 CA 1, CA 3 及 DG 区的表达增强,在 CA 2 区差异不显著,这与李慧^[14]的研究结果一致。目前,关于去卵巢后大鼠海马中 NOS1 阳性神经元表达的研究主要集中在阳性神经元数量的变化上^[15-16],而对 NOS1 表达的强弱很少有报道。注射 EGb 后大鼠的

学习记忆功能显著提高(表现为大鼠游完水迷宫全程所需时间和错误反应次数均明显降低),海马各区 ChA T 的表达增强,同时 NOS1 在 CA 1, CA 3 区和齿状回中表达减弱,但在 CA 2 区的表达变化不明显,可能与 CA 2 区的功能有关。颜艳等^[16]研究认为,CA 1, CA 3 区和 DG 区与学习记忆有密切的关系,而 CA 2 区与学习记忆的关系目前还无报道。

本试验结果显示,银杏叶提取物对雌激素缺乏大鼠学习记忆功能障碍有改善作用,其作用一方面是通过提高海马中 ChA T 的表达,进而增强中枢胆碱能神经系统的功能;另一方面是抑制 NOS1 阳性神经元的表达,防止细胞内一氧化氮积累过多而导致神经元坏死或凋亡。但这不排除还有其他因素作用的可能,因此银杏叶提取物的作用机理仍有待于进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Singh M, Meyer EM, Millard W J, et al Ovarian steroid deprivation results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female SD rats[J]. Brain Res, 1994, 644: 305
- [2] Bieber E J, Cohen D P. Estrogens and hormone replacement therapy: is there a role in the preservation of cognitive function[J]. Int J Fertil Womens Med, 2001, 46 (4): 206-209
- [3] 郭宗君, 金丽英, 王洪霞, 等. 外源性雌激素对 BA 和 D-gal 诱发大鼠认知障碍的干预作用[J]. 中国老年学杂志, 2003, 23 (11): 761-763
- [4] Paech K, Webb P, Kuiper G, et al Differential ligand activation of estrogen receptors ER- α and ER- β at AP1 sites[J]. Science, 1997, 277: 1508-1510
- [5] Vincent IB, Smith J D. Effect of estradiol on neuronal Swedish-

- mutated beta-amyloid precursor protein metabolism: reversal by astrocytic cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 271(1): 82-85
- [6] 游松, 姚新生, 陈英杰. 银杏的化学及药理研究进展[J]. *沈阳药学院学报*, 1998, 5(2): 142
- [7] McKenna D J, Jones K, Hughes K. Efficacy, safety, and use of *Ginkgo biloba* in clinical and preclinical applications[J]. *Altern Ther Health Med*, 2001, 7(5): 70-86
- [8] 宿宝贵, 许鹿希. 用水迷宫检测大鼠空间辨别性学习记忆的探讨[J]. *解剖学研究*, 1999, 21(1): 30-32
- [9] 陈建英, 张可伟, 徐誉泰, 等. 银杏叶提取物(EGb) 药理作用[J]. *中医药学报*, 1999(4): 36-38
- [10] Bartus R T, Dean R L, Beer B, et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction[J]. *Science*, 1982, 217: 408
- [11] 任非, 龚淑英. 银杏叶提取物治疗老年痴呆症[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(32): 166-168
- [12] Bon C L, Garthwaite J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation[J]. *J Neurosci*, 2003, 23: 1941-1948
- [13] Mollace V, Rodino P, Massoud R, et al. Age-dependent changes of NO synthase activity in rat brain[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 215: 822-827.
- [14] 李慧. 雌性大鼠去势前后海马结构内一氧化氮合酶阳性神经元的变化[D]. 山西太原: 山西医科大学, 2003
- [15] 郭开华, 徐杰, 袁群芳. 植物雌激素对去卵巢大鼠海马NOS阳性神经元及学习记忆的影响[J]. *解剖学杂志*, 2004, 27(4): 404-407.
- [16] 颜艳, 肖明, 丁炯, 等. 去势后大鼠海马结构一氧化氮合酶阳性神经元的变化[J]. *南京医科大学学报*, 2002, 22(1): 10-12

(上接第48页)

- [6] Jan Y N, Jan L Y, Kuffler S W. A peptide as a possible transmitter in sympathetic ganglia of the frog[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(3): 1501-1505
- [7] Dudas B, Mihaly A, Merchenthaler I, et al. Topography and associations of luteinizing hormone releasing hormone and neuropeptide Y immunoreactive neuronal systems in the human diencephalons[J]. *J Comp Neurol*, 2000, 427(4): 593-603
- [8] Maurer J A, Wray S L. Luteinizing hormone releasing hormone quantified in tissues and slice explant cultures of postnatal rat hypothalamus[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(2): 791-799
- [9] 谢启文. 现代神经内分泌学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 29-33
- [10] Wilson R C, Kesner J S, Kaufman J M, et al. Central electrophysiologic correlates of pulsatile in the rhesus monkey[J]. *Neuroendocrinology*, 1984, 39(3): 256-260
- [11] Wetsel W C, Valencia M M, Merchenthaler I, et al. Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(9): 4149-4153
- [12] 陈树林, 赵慧英, 孙志宏, 等. 青年奶山羊下丘脑催产素神经元分布特点[J]. *中国农学通报*, 2005, 21(1): 5-7.