

· 实验研究 ·

银杏叶提取物对点燃模型幼鼠学习记忆 及海马 NMDAR1 表达的影响

段方荣,袁宝强

(徐州医学院附属医院儿科,江苏 徐州 221002)

[摘要] 目的 探讨银杏叶提取物(EGb)对癫痫点燃模型幼鼠学习记忆等认知功能的影响及其可能机制,为临床应用EGb治疗癫痫儿童认知功能障碍提供实验依据。方法 21,35日龄Sprague-Dawley幼鼠各40只,经初筛后随机分为生理盐水对照组(NS)、点燃对照组(PTZ)、EGb大(PTZ+EGb1)、中(PTZ+EGb2)、小(PTZ+EGb3)剂量治疗组,采用戊四氮(PTZ)致幼鼠点燃模型,以Y型电迷宫学习记忆行为训练及免疫组化检测方法,观察用药前后大鼠学习记忆功能和海马NMDAR1表达的变化。结果 ①治疗前后大鼠电迷宫试验达标所需电击次数:治疗前不同日龄的各个点燃组与各自NS组相比,达到学会标准所需的电击次数明显增多($P < 0.01$)。EGb治疗后不同剂量的各治疗组大鼠达到学会标准的次数均明显少于同龄PTZ组($P < 0.01$),而同龄EGb大、中、小剂量治疗组相互比较,达到学会标准所需的电击次数随治疗剂量的减少逐渐递增($P < 0.01$)。EGb各剂量治疗组与治疗前比较,达标次数明显减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),而NS组、PTZ组较治疗前没有明显差异($P > 0.05$)。②NMDAR1免疫组织化学染色:各日龄PTZ组NMDAR1免疫反应产物COD值较各自NS组明显增强($P < 0.01$);不同日龄各治疗组与各自PTZ组比较,随治疗剂量的增加,NMDAR1免疫反应产物COD值逐渐降低,差异均有显著性($P < 0.01$)。结论 EGb可以明显改善发育期不同日龄点燃模型大鼠的学习记忆功能,而且剂量越大,改善作用越明显。这一作用与EGb下调反复癫痫发作后NMDAR1的过度表达有密切关系。 [中国当代儿科杂志,2008,10(3):367-370]

[关键词] 银杏叶提取物;点燃模型;学习记忆;N-甲基-D-天冬氨酸受体1;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)03-0376-04

Effect of extracts of Ginkgo biloba leaf on learning-memory ability and NMDA receptor 1 expression in the hippocampus in rats with kindling-induced epilepsy

DUAN Fang-Rong, YUAN Bao-Qiang. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China (Yuan B-Q, Email: yuanbqiang@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the effect of extracts of Ginkgo biloba leaf (EGb), a catalyzer of central nervous system, on learning-memory ability and possible mechanism in rats with kindling-induced epilepsy. **Methods** Forty postnatal day 21 (P21) and 40 postnatal day 35 (P35) Sprague-Dawley (SD) rats were randomly respectively assigned to five groups: normal sodium (NS) control, kindling epilepsy model, high, middle and low dosage of EGb-treated kindling epilepsy. The kindling epilepsy model was established by an intraperitoneal injection of pentetrazole (PTZ). The learning-memory ability and NMDA receptor 1 (NMDAR1) expression in the hippocampus were measured by Y-maze test and immunohistochemistry assay respectively. **Results** The stimulation times for reaching to academic standard in the Y-maze test in the two ages PTZ kindling groups was significantly more than that in the corresponding NS control groups ($P < 0.01$). After EGb treatment the achievement of the Y-maze test in the three treatment groups was significantly improved in a dose-dependent manner, the higher the dosage, the better the achievement ($P < 0.01$). Immunohistochemistry assay showed that the expression of NMDAR1 in the two ages PTZ kindling groups was significantly higher than that in the corresponding NS control groups ($P < 0.01$). Compared with the corresponding untreated kindling model groups, the expression of NMDAR1 in the two ages EGb treatment groups was significantly reduced in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). **Conclusions** EGb can improve learning-memory ability in epileptic rats at different developmental phases in a dose-dependent manner, possibly through a reduction of NMDAR1 expression in the hippocampus.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (3):367-370]

Key words: Extracts of Ginkgo biloba leaf; Kindling model; Learning-memory; NMDA receptor 1; Rats

[收稿日期]2007-07-19; [修回日期]2007-09-09

[作者简介]段方荣,女,硕士。主攻方向:小儿神经系统疾病。

[通讯作者]袁宝强,男,主任医师,硕士生导师,徐州医学院附属医院儿科,邮编:221002。

儿童癫痫病是小儿神经系统一种常见且严重的疾病,常常导致患儿认知功能的损害,严重影响了生活质量。但到目前为止对其发病机制尚不完全清楚,也缺乏较好的处理措施。随着人们对生存质量要求的不断提高,如何降低或消除认知功能障碍对癫痫患儿生活质量的影响已成为患儿、家长和儿科医生非常关心的一个社会问题。目前药物防治是我国乃至世界其他国家所能采取的一条主要途径,因此积极寻求有效的药物已成为临床亟待解决的问题。银杏叶提取物(extracts of ginkgo biloba, EGb)是从银杏叶中利用醇溶液提取出的混合成分,主要含有银杏总黄酮苷、银杏内酯和有机酸等,具有多价性药理作用^[1]。作为一种中枢神经赋活剂目前国内外已将EGb广泛应用于治疗动脉硬化、脑梗塞后遗症和老年神经精神症状如注意力不集中、记忆力减退、意识模糊等,在临床上明显地改善了脑功能不全病人的学习记忆能力,因而被认为是一种“认知增强剂”^[2~4]。而关于EGb对癫痫病人尤其是癫痫儿童学习记忆等认知功能障碍影响的实验研究或临床研究尚未见报道。为此,本研究制备了戊四氮(pentylentetrazol, PTZ)诱导发育期 Sprague-Dawley 大鼠癫痫点燃模型,在此模型的基础上应用不同剂量EGb进行治疗,治疗前后以Y型电迷宫方法进行学习记忆等认知功能的评价,同时观察与学习记忆功能关系极为密切的海马N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methy-D-aspartate receptor, NMDAR)表达的改变,以此探讨EGb对点燃模型大鼠学习记忆等认知功能障碍的改善作用及其作用机制,为临床应用EGb治疗癫痫儿童认知功能障碍提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 21,35日龄 Sprague Dawley 幼鼠,体重55~95g,雌雄不拘,由徐州医学院实验动物中心提供。

1.1.2 药物及试剂 EGb(银杏总黄酮苷>24%,银杏内酯>6%,峰比0.8~1.0,银杏酸<1PPM),由徐州富伟生化制品有限公司惠赠;戊四氮购于Sigma公司;一抗(兔抗NMDAR1)及SABC试剂盒均由博士德生物工程有限公司提供。DAB显色试剂盒购于北京中山公司。

1.1.3 仪器 Y型电迷宫(张家港生物医学仪器厂);石蜡切片机(德国);Nikon E600纤维摄像系统(日本);LEICA Qwin图像处理与分析系统(德国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 采用文献^[5]的方法。用PTZ亚惊厥剂量32mg/kg,腹腔注射,每天1次,连续注射28d。停药1周后,再用相同剂量的PTZ测试。癫痫发作行为按Racine标准分为6级^[6],即0级:未发作;I级:头面部抽搐;II级:肌阵挛、跳起,但无直立;III级:肌阵挛,双前肢抬起伴有直立;IV级:强直2阵挛性惊厥;V级:全身强直-阵挛性惊厥伴有翻滚、跌倒。凡显示连续5次2级以上惊厥的大鼠,被认为达到点燃标准。未达到点燃标准与死亡者均被剔除。

1.2.2 动物分组及药物处理 先用Y型电迷宫初步筛选21,35日龄 Sprague-Dawley 大鼠各40只,然后进行点燃模型的制备,造模成功后随机分为5组($n=8$):生理盐水组(NS组)、点燃对照组(PTZ组)、EGb大剂量300mg/kg治疗组(PTZ+EGb1组)、EGb中剂量200mg/kg治疗组(PTZ+EGb2组)、EGb小剂量100mg/kg治疗组(PTZ+EGb3组)。EGb以5%的乙醇为溶剂制备成10%的混悬液,采用灌胃给药,NS组和PTZ组给以相同体积的生理盐水,每日1次,连续给药7d。所有大鼠均在同一实验室和动物中心操作和喂养,以保持喂养、光照、噪音等条件相同,减少外界造成的差异。

1.2.3 学习记忆功能的训练与评定 参照王跃春^[7]Y型电迷宫的方法,电流强度0.7mA,选用电压50V,电击延时5s。①筛选:将大鼠放入Y型迷宫箱中适应3min后,给予适当电击,至其对3臂均探索进入为止,选择活跃、对点击反应较敏感、逃避反应迅速者供测试用。淘汰反应过于迟钝或特别敏感的大鼠。②训练及评定:采用随机休息不固定训练次数法,以大鼠在足底通电后15s内一次性进入安全区的反应为正确,直至大鼠在连续10次电击中有9次或以上正确(9/10标准)为达到学会标准,以每只大鼠达学会标准所需电击次数表示大鼠的学习记忆成绩,所有训练在一个实验日内完成。各组在造模后次日及治疗后7d进行认知功能的评定。

1.2.4 灌注与取材 观察完成后,大鼠用4%多聚甲醛常规方法灌注固定,快速取脑入10%的甲醛继续固定36~48h(4℃)后,常规石蜡包埋,海马连续冠状切片,片厚5μm,每例标本(双侧海马结构)取切片不少于5张。

1.2.5 免疫组织化学染色 切片依次按以下步骤处理:二甲苯梯度乙醇脱蜡至水;微波抗原修复;新配制的0.3% H₂O₂溶液中室温下孵育10min以灭活内源性过氧化物酶;滴加5%BSA封闭液,室

温 20 min 甩去多余液体、不洗;滴加兔抗 NMDAR1 (一抗,稀释度 1:100),4℃ 过夜;生物素标记的羊抗兔 IgG 室温下孵育 20 min;加试剂 SABC 室温下 20 min。以上各步骤之间皆用 0.01 mol/L PBS 充分洗涤。DAB 显色 5~10 min,常规脱水、透明、封片。对照实验:用 PBS 缓冲液代替第一抗体孵育切片,结果为阴性。

1.2.6 图像分析 采用 LEICA QWIN 图像分析与处理系统对图片进行图像分析。每例动物测 2 张切片,每组共 16 张切片。每张切片海马 CA3 区随机选取 2 个 ×100 视野进行平均光密度(OD)测量。以上数据由分析系统自动计算。

1.2.7 统计学处理 所有计量资料数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,多组间的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),治疗前后的比较采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 点燃模型的建立

一般 PTZ 腹腔注射 1 周左右大鼠陆续出现程度不等的反复痫性发作,为 I~III 级,以后发作程度逐渐加剧,在连续注射 28 d 后所有大鼠均达到 III 级以上发作,并且均达到连续 5 次 2 级以上惊厥的点燃标准。停药期间,每天上午 8:00~10:00 对大鼠进行观察发现,大鼠有自发性、复发性的惊厥发作过

程。停药 1 周再次用 PTZ 诱导,所有大鼠均可出现 III 级以上发作。大鼠的痫性发作基本上每次腹腔注射 PTZ 后 4~6 min 出现,一般在 10 min 左右达到高峰,高峰过后时而表现安静,时而阵发性阵挛,一般 30 min 后很少再有抽搐发作。

2.2 行为学测试

治疗前,不管是 21 日龄还是 35 日龄的大鼠,PTZ 点燃各组与其同龄 NS 组相比,达到学会标准所需的电击次数明显增多($P < 0.01$),而点燃各组之间没有明显差异($P > 0.05$)。治疗后,两个日龄段 EGb 各治疗组大鼠达到学会标准的次数均明显少于同龄 PTZ 组($P < 0.01$);同龄 EGb 大、中、小剂量治疗组相互比较,达到学会标准的次数随 EGb 治疗剂量的减少逐渐增多,呈现剂量依赖性递增($P < 0.01$)。21 日龄段、35 日龄段各组治疗前后相互比较,亦发现 EGb 各剂量治疗组治疗后达标次数均明显少于治疗前($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),而 NS 组、PTZ 组治疗前后差异无显著性(表 1)。

2.3 免疫组化

2.3.1 NMDAR1 阳性细胞的分布 光镜下观察,NMDAR1 阳性细胞在各组大脑皮质各层内弥散分布,在海马主要分布于 CA1、CA3 区锥体细胞层及齿状回颗粒细胞层。阳性细胞表现为圆或椭圆形,大小不一,胞膜及胞浆内见棕黄色免疫反应产物,以胞膜着色为主。阴性对照试验切片无特征性免疫反应产物(图 1)。

表 1 各组大鼠电迷宫试验达标所需电击次数的比较

($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	21 d		35 d	
	治疗前	EGb 治疗后	治疗前	EGb 治疗后
NS 组	36.25 ± 7.44 ^a	38.05 ± 6.42	26.25 ± 9.16 ^a	26.43 ± 7.44
PTZ 组	140.00 ± 38.17	126.25 ± 50.12 ^b	91.25 ± 25.31	92.50 ± 17.52 ^b
PTZ + EGb1 组	135.00 ± 34.22	23.75 ± 15.05 ^d	90.00 ± 25.63	25.00 ± 9.25 ^d
PTZ + EGb2 组	108.75 ± 29.97	58.75 ± 14.57 ^{c,d}	93.75 ± 55.27	45.00 ± 13.09 ^{c,d}
PTZ + EGb3 组	113.75 ± 39.97	90.00 ± 23.90 ^d	81.25 ± 21.67	63.75 ± 20.65 ^d

a: 治疗前 NS 组与其他 4 组比较 $P < 0.01$; b: 治疗后 PTZ 组与 PTZ + EGb 各组比较均 $P < 0.01$; c: 治疗后 PTZ + EGb2 与 PTZ + EGb1、PTZ + EGb3 比较 $P < 0.01$; d: PTZ + EGb 治疗后与治疗前比较均 $P < 0.05$



图 1 21 d 大鼠海马 CA3 区 NMDAR1 免疫组化染色反应产物(×400)

A: NS 组海马 CA3 区; B: PTZ 组海马 CA3 区, NMDAR1 的表达较 NS 组明显增多; C: PTZ + EGb1 组海马 CA3 区; D: PTZ + EGb2 组海马 CA3 区; E: PTZ + EGb3 组海马 CA3 区。C、D、E 组,随治疗剂量的增加,NMDAR1 的表达逐渐减少。

2.3.2 各组大鼠海马 NMDAR1 免疫反应的比较

各日龄 PTZ 组 NMDAR1 免疫反应产物 COD 值较各自 NS 组明显增强 ($P < 0.01$); 治疗后, 不同日龄各治疗组与各自 PTZ 组比较, 随治疗剂量的增加, NMDAR1 免疫反应产物 COD 值逐渐降低, 差异均有显著性 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 各组大鼠海马 CA3 区 NMDAR1 平均光密度值 (COD) 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	21 日龄	35 日龄
NS 组	8	15.66 ± 0.81	16.21 ± 0.87
PTZ 组	8	29.29 ± 0.76 ^a	21.51 ± 0.42 ^a
PTZ + EGb1 组	8	11.05 ± 0.50	10.89 ± 1.11
PTZ + EGb2 组	8	15.28 ± 0.83 ^b	15.12 ± 0.38 ^b
PTZ + EGb3 组	8	20.38 ± 0.45	18.62 ± 0.09

a: PTZ 组与同龄各组比较均 $P < 0.01$; b: 与 PTZ + EGb1 组, PTZ + EGb3 组比较, 均 $P < 0.01$

3 讨论

近年研究表明, 谷氨酸 (glutamic acid, Glu) 受体及其亚型在调节学习记忆的过程中起着重要作用, 各型受体均不同程度地介入了学习记忆的形成和维持过程, 其中 NMDAR 被认为是学习记忆中的关键物质^[8]。NMDAR 是海马、皮层长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 形成和维持的关键, 通过 Glu 作用于 NMDAR, 引起由 G 蛋白介导的一系列反应, 包括 Ca^{2+} 内流、激活钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 (Ca^{2+} -CaMK)、PKC 和酪氨酸激酶 (PTK) 通路等, 共同作用产生 LTP, 而 LTP 是中枢神经系统可塑性的一种模式, 是记忆形成和巩固过程中神经元活动的客观过程和指标^[4,9], NMDAR 通过诱导 LTP 的形成, 实现对学习记忆过程进行调节。已知 NMDAR 包含 NMDAR1 与 NMDAR2 两个亚基, 其中 NMDAR1 是必需功能亚基, 而 NMDAR2 对整个受体通道的功能起修饰作用^[10]。由于 NMDAR1 的分布可以代表整个 NMDAR 的分布情况, 本实验仅对 NMDAR1 的表达进行检测。

我们的实验结果显示: PTZ 点燃组 NMDAR1 的表达较 NS 组明显增多, 提示癫痫发作后 NMDAR 活性增高。因为 NMDAR 参与学习记忆、突触发育的可塑性过程, 其活性增高后必然对其介导的反应产生增强作用, 除使癫痫发作的易感性增加, 并能增强兴奋性突触传递, 干扰 LTP 的形成并导致神经网络突触重建, 还可通过 c-fos 等基因的表达上调 caspase-3、NF- κ B 等活性物质诱导神经元凋亡、脱

失^[11], 最终引起学习记忆功能障碍。在应用 EGb 治疗后, EGb 在显著下调 NMDAR1 表达的同时, 还显著改善癫痫鼠的学习记忆功能, 并随剂量增加, 作用明显增强。提示 EGb 在一定程度上可能通过抑制 NMDAR1 的过度表达来改善癫痫幼鼠的学习记忆功能障碍^[12]。另有研究表明, EGb 成分中的有机酸, 特别是其中的喹啉酸, 能对癫痫发作中产生的大量 NMDAR 产生竞争性和非竞争性拮抗, 在减轻 Glu 兴奋毒的同时, 还具有一定的抗癫痫作用^[13]。

综上所述, 我们认为 EGb 可通过调节学习记忆功能脑区 NMDAR1 的表达改善点燃模型幼鼠的学习记忆功能, 为 EGb 用于临床治疗癫痫儿童认知功能障碍提供了理论和实验依据, 并且进一步拓展了 EGb 的药用价值。

[参 考 文 献]

- [1] 危华玲. 银杏叶提取物和山楂提取物的药理作用研究进展 [J]. 海峡药学, 2006, 18(2): 5-7.
- [2] 汪建龙. 银杏叶提取物在心脑血管疾病上的临床应用概况 [J]. 时珍国医国药, 2003, 14(4): 243-244.
- [3] Gertz HJ, Kiefer M. Review about Ginkgo biloba special extract EGb 761 (Ginkgo) [J]. Curr Pharm Des, 2004, 10(3): 261-264.
- [4] Wang Y, Wang L, Wu J, Cai J. The in vivo synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial learning and memory in aged rats [J]. Br J Pharmacol, 2006, 148(2): 147-153.
- [5] 王丽. 大鼠戊四唑点燃模型的建立 [J]. 药学报, 1993, 28(7): 486-489.
- [6] Racine RJ, Steingart M, McIntyre DC. Development of kindling-prone and kindling-resistant rats: selective breeding and electrophysiological studies [J]. Epilepsy Res, 1999, 35(3): 183-195.
- [7] 王跃春. Y 型电迷宫在大鼠学习记忆功能测试中的合理应用 [J]. 中国行为医学科学, 2005, 14(1): 69-70.
- [8] Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures [J]. Neurobiol Learn Mem, 1997, 68(3): 285-316.
- [9] Collingridge GL, Singer W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity [J]. Trends Pharmacol Sci, 1990, 11(7): 290-296.
- [10] Gurden H, Takita M, Jay TM. Essential role of D1 but not D2 receptors in the NMDA receptor-dependent long-term potentiation at hippocampal-prefrontal cortex synapses in vivo [J]. J Neurosci, 2000, 20(22): RC106.
- [11] Frazier CJ, Strowbridge BW, Papke RL. Nicotinic receptors on local circuit neurons in dentate gyrus: a potential role in regulation of granule cell excitability [J]. J Neurophysiol, 2003, 89(6): 3018-3028.
- [12] 肖昭扬, 孙长凯, 肖旭武, 林永忠, 李绍, 马辉, 等. 银杏叶提取物抗 N-甲基-D-天冬氨酸受体介导兴奋毒性作用及机制研究 [J]. 中华医学杂志, 2006, 86(35): 2479-2484.
- [13] 刘建丰, 陶定波. 癫痫对认知功能的影响 [J]. 国外医学神经病学神经外科学分册, 2003, 30(5): 470-473.

(本文编辑: 吉耕中)