

银杏叶提取物对雌性小鼠刻板、焦虑及记忆行为的影响

李 晋,毛建航,黄 丽,刘德金

(周口师范学院生命科学与农学院,河南 周口,466001)

[摘要] 目的:探讨银杏叶提取物(GBE)对老龄雌性小鼠刻板、焦虑及记忆行为能力的影响。方法:选取7月龄的C57BL/6J雌性小鼠13只,将其随机分为实验组与对照组,实验组以银杏叶提取物灌胃,对照组以蒸馏水灌胃,2组均干预10d。给药期间每天测量体质量,给药结束后进行自我梳理、明暗箱和旷场电刺激等行为学测试。结果:与对照组相比,实验组小鼠体质量无显著变化,自我梳理次数显著降低,焦虑行为无显著变化,电击后静止时间显著延长。结论:GBE可降低老龄雌性小鼠的刻板行为,且对其学习记忆有一定改善作用,提示银杏叶有效成分对神经精神疾病可能有一定的治疗作用。

[关键词] 银杏叶提取物;老龄雌性小鼠;认知行为;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.08.061

Effect of ginkgo biloba extract on stereotyped, anxiety-like, and memory behaviors in female mice

LI Jin, MAO Jianhang, HUANG Li, LIU Dejin

(Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, Henan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of ginkgo biloba extract (GBE) on stereotyped, anxiety-like, and memory behaviors in elderly female mice. Methods: A total of 13 C57BL/6J mice aged 7 months were randomly divided into experimental group and control group. The mice in the experimental group were given GBE by gavage, and those in the control group were given distilled water by gavage. The course of treatment was 10 days for both groups. Body weight was measured every day during administration, and related behavioral tests were performed, including self-grooming, light/dark box, and open field test with electrical stimulation. Results: Compared with the control group, the experimental group had a significant reduction in the number of times of self-grooming and a significantly longer latency after electrical stimulation, with no significant changes in body weight or anxiety-like behavior. Conclusion: GBE can reduce stereotyped behavior and improve learning and memory in elderly female mice, suggesting that the effective constituents of ginkgo leaf may exert a certain therapeutic effect on neuropsychiatric diseases.

[Key words] ginkgo biloba extract; elderly female mouse; cognitive behavior; experimental study

传统中药材白果银杏,俗称活化石^[1]。它的起源地被认为是中国东部浙江省偏远山区的山谷,如今被广泛栽培。对银杏叶不同成分的生物活性研究大约开始于20世纪,随着现代科学方法的问世,其真正的制药价值直到近年才得以实现^[2]。银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, GBE)主要由黄酮、萜内酯、酚酸、聚异戊烯醇等化学构成,其中主要有效化学成分是黄酮类化合物和萜类内酯^[3],具有很强的药理活性,对心脑血管和末梢循环有良好的改善,用于治疗动脉硬化、高血压病、脑卒中等心脑血管疾病^[4]。此外,该药物在减少神经细胞损伤、增加神经递质含量、促进脑功能恢复、提高学习记忆能力和抗衰老方面的研究也备受关注^[5]。GBE普遍应用于药物、保健药品、食物添加剂、功能性饮料、化妆品等领域,是现代科学技术开发出的植物药(属中药)比较成功的案例之一^[6]。临床发现,GBE可明显改善老年痴呆等疾病引起的老年人记忆力下降、反应迟钝、情绪抑郁等

症状^[7]。

本实验以老龄雌性小鼠为研究对象,采用自我梳理、明暗箱和旷场电刺激等行为学测试实验,观察GBE对小鼠刻板、学习记忆等行为作用的效果,为银杏叶提取物药理作用的进一步研究提供依据。

1 实验材料

1.1 动物 选取健康7月龄雌性C57BL/6J小鼠13只(由周口师范学院神经生物学与转化医学研究所提供),体质量18~27g。小鼠饲养条件为昼夜12/12h节律光照,自由进食饮水,室温控制在(22±3)℃,湿度控制在60%~70%。

1.2 药物及试剂 银杏叶片(太原市振兴制药有限责任公司,批准文号:国药准字H14021631),吐温80,无水乙醇等。电子天平称取银杏叶片剂重量,置入研钵后加吐温80研磨,稀释液为蒸馏水,使终溶液中吐温80浓度小于1%,银杏叶溶液浓度为4mg/ml,对照组蒸馏水中加入同比例吐温80。

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(编号:18A180036);河南省科技开放合作项目(编号:182106000047)

第一作者:李晋,女,硕士,助教,研究方向:孤独症的动物机制的临床应用研究

吐温 80 为助溶剂,终溶液为透明澄清液体,肉眼无难溶颗粒,现配现用。

1.3 主要仪器 电子天平(上海佑科,JA5003N);灌胃针(上海玉研科学仪器有限公司,12号小鼠灌胃针);旷场试验明暗实验箱(Truscan photobeam sensor-E63-12,Coulbourn Instruments);震惊反射系统(SR-LAB SR-LABTM Startle Response System,Coulbourn Instruments);红外移动探测器(TruscanTM Photobeam Linc,Coulbourn Instruments)。

2 实验方法

2.1 动物分组 将 13 只小鼠随机分为 2 组,对照组 7 只,实验组 6 只,2 组小鼠基础体质量差异无统计学意义。

2.2 模型制备与给药方法 实验组以 400mg/kg 体质量的剂量灌胃 GBE,对照组以 400mg/kg 体质量的剂量灌胃蒸馏水。2 组均于上午 10 时进行干预,连续 10d。给药方法:左手拇指和食指捏住小鼠颈部皮肤,其余三指固定背部及尾巴,动作轻柔,使其头、颈和身体呈一直线。固定后,右手持灌胃针的注射器(事先吸好药液),将针头沿口腔上腭壁轻轻进入,转动针头刺激动物吞咽,沿咽后壁缓慢插入食道。有落空感时表明灌胃针可能进入胃内,向外抽动注射器活塞,感觉有负压说明灌胃针未插入气管,此时可将药液灌入。

2.3 观察指标 给药期间,记录小鼠体质量有无异常变化。给药结束后进行行为学测试。行为学实验开始前,先将小鼠进行 1h 左右实验环境适应,减少动物紧张,并确认实验箱清洁无味道。实验进行过程中,保持实验场地的安静状态。每只动物实验结束后及时清除小鼠粪便及尿液,用 70% 乙醇溶液喷洒行为学仪器并用洁净纱布抹干,避免前一只动物的残留气味造成对下一只动物实验结果产生影响。

2.3.1 体质量测试 连续给药期间,每天固定时间测小鼠体质量,记录数据并观察小鼠有无异常。

2.3.2 自我梳理测试 将小鼠从笼内取出,放入一长方形空箱(34cm×40cm×24cm)中央,计时 10min,观察小鼠自我梳理次数及累计时长,并记录数据。小鼠刻板重复行为的具体表现为反复梳理毛发,有成套梳洗动作。10min 内小鼠累计梳理时长越长,梳理次数越多则表明小鼠的刻板行为越强。

2.3.3 明暗箱测试 明暗箱装置(45cm×27cm×27cm)由一明(箱内有光)一暗(箱内无光)两个箱子组成。明暗箱之间的通道(7cm×7cm)由可提插的闸门控制开或闭。每次测试进行 10min,明箱为被试鼠的起始位置,被试鼠在暗箱停留时间记为小鼠的焦虑倾向。

2.3.4 旷场电刺激测试 将小鼠从笼内取出放入旷场中央,开始进行预刺激。小鼠在箱内自由活动 1min 后给予 3s 放电刺激,之后再自由活动 2min 后将小鼠放回笼内。预刺激 24h 后,再将小鼠放入旷场中央。小鼠被电刺激后对电击环境存在记忆,经过预刺激后再次放入旷场环境,记忆力好的小鼠会提取被电击记忆而静止不动,恐惧被再次电击。即小鼠静止时间越长或移动时间越短则提示小鼠的记忆力越强。电脑软件自动记录小鼠 1min 内的移动距离和静止时

间。实验时,将 2 组小鼠交替进行。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用非配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 GBE 对小鼠体质量的影响 记录 2 组小鼠在给药期间的体质量变化,可在一定范围内观察 GBE 对小鼠的健康状态是否有影响。经过统计学分析,给药期间 2 组小鼠体质量差异无统计学意义。(见图 1)

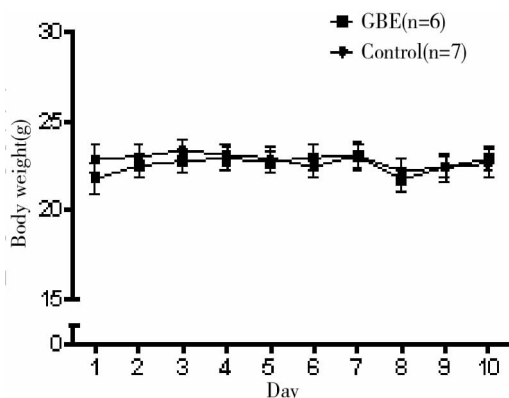


图 1 给药期间小鼠体质量的变化

3.2 GBE 对小鼠自我梳理行为的影响 与对照组比较,实验组小鼠自我梳理时长差异无统计学意义($P > 0.05$),梳理次数显著降低($P < 0.05$),提示 GBE 有一定的降低刻板行为作用。(见图 2~3)

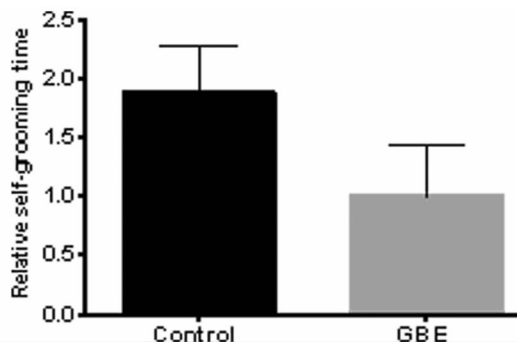


图 2 2 组小鼠累计自我梳理时长比较

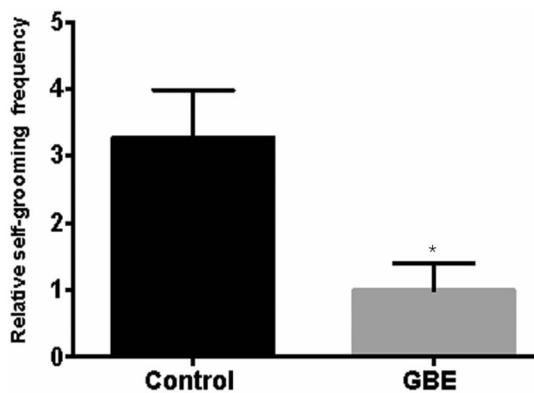


图 3 2 组小鼠自我梳理次数比较

3.3 GBE 对小鼠焦虑行为的影响 2 组大鼠在暗箱所待时间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图 4)

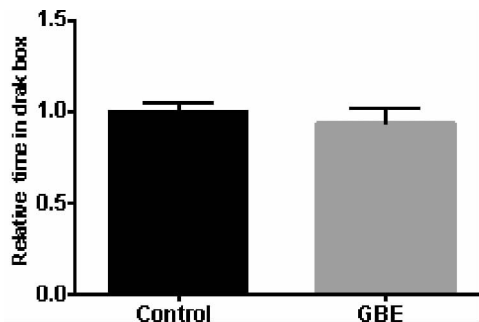


图 4 小鼠在暗箱中所待时间的比较

3.4 GBE 对小鼠学习记忆行为的影响 2 组小鼠电击刺激 24h 后再次放入同一环境,1min 内 2 组小鼠移动距离无差别($P>0.05$),实验组小鼠静止时间显著延长($P<0.05$),提示 GBE 可能存在提高小鼠学习记忆力的功能。(见图 5~6)

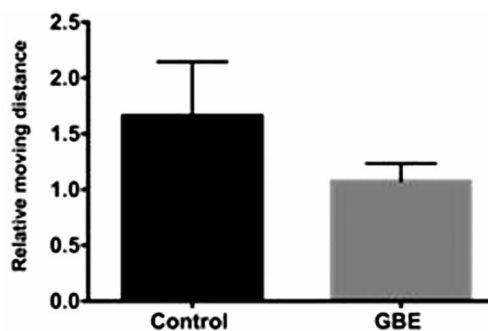


图 5 小鼠移动距离比较

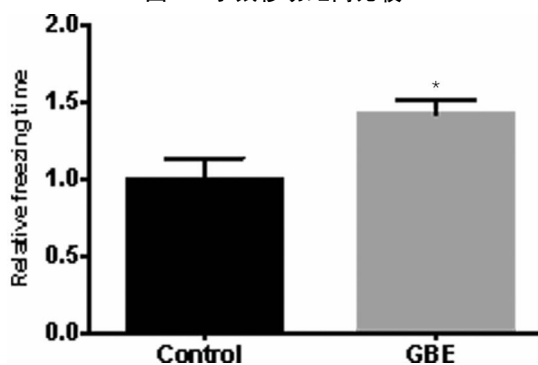


图 6 小鼠静止时间比较

4 讨 论

在诸多研究领域中,GBE 应用于老年痴呆的研究尤其受到广泛关注,既往研究显示,相对于安慰剂,GBE 对老年痴呆患者日常生活中的认知活动可产生有益影响^[8]。本研究表明,连续 10d 喂服 GBE 可明显增加受到电刺激惊吓后老龄雌性小鼠的静止时间,即显著改善了老龄雌性小鼠的记忆行为。该结果为 GBE 应用于临床研究提供了动物学实验依据。连续 10d 给药 GBE 对小鼠自我梳理时长的改变无显著性差异,而显著减少了自我梳理次数。自我梳理是小鼠模拟人类刻板行为的典型表现,也是孤独症的核心症状之一。本实验结果显示 GBE 可以部分改善孤独症的刻

板行为,提示 GBE 应用于孤独症研究的潜质。近期研究表明,GBE 在抑制 GABA 增强方面比白果内酯更有效,银杏叶的活性成分已被证明负调节 GABA 对 $\alpha 1 \beta 2 \gamma 2$ LGABAA 受体的作用^[9]。在本次实验中,GBE 的抗焦虑作用未得出显著性差异,可能与研究存在一定局限性有关,如研究对象样本量较少,且性别仅为雌性。此外,GBE 的给药方式、最佳喂食剂量等仍需优化。

本实验以 GBE 对小鼠自主活动及学习记忆改善进行初步研究,观察到 GBE 对降低老龄雌性小鼠刻板行为,改善记忆等方面表现出一定正性作用。提示银杏有效成分治疗神经精神疾病的潜质,也为市场上银杏老年保健药物功效的进一步研发提供了参考依据。

参考文献

- [1] Kaur S, Chhabra R, Nehru B. Ginkgo biloba extract attenuates hippocampal neuronal loss and cognitive dysfunction resulting from trimethyltin in mice[J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(2): 178-86.
- [2] Stoll S, Scheuer K, Pohl O, et al. Ginkgo biloba extract (EGb 761) independently improves changes in passive avoidance learning and brain membrane fluidity in the aging mouse[J]. *Pharmacopsychiatry*, 1996, 29(4): 144-149.
- [3] 陈红辉,孙圣刚,刘安求,等. 银杏液提取物改善学习记忆障碍的实验研究[J]. *华中科技大学学报*, 2002, 31(5): 518-521.
- [4] 高国全,姚志彬,张静,等. 老年大鼠空间记忆减退与 eNOS 基因表达变化[J]. *中国病理生理杂志*, 1999, 15(9): 789.
- [5] 陈长勋,金若敏,李义奎,等. 银杏液提取物改善小鼠记忆作用的研究[J]. *中国中药杂志*, 1991, 16(11): 68.
- [6] 尹宗宁. 中医药防治老年痴呆症的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2005, 25(3): 354-356.
- [7] 夏祥河. 老年痴呆症的发病机制及中医药治疗方面的研究进展[J]. *职业技术*, 2009(7): 84-85.
- [8] Weinmann S, Roll S, Schwarzbach C, et al. Effects of Ginkgo biloba in dementia: systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Geriatrics*, 2010, 10(1): 14.
- [9] Ng CC, Duke RK, Hinton T, et al. Effects of bilobalide, ginkgolide B and picrotoxinin on GABAA receptor modulation by structurally diverse positive modulators[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017(806): 83-90.

(收稿日期:2019-01-09)

山茱萸熟地治阳痿

方药:山茱萸 40g,熟地黄 40g,枸杞子 40g,石燕 40g,白术 40g,巴戟天 30g,当归 25g,五味子 25g,茯神 25g,山药 25g,鹿茸 10g,炙海马 10g,炙蛤蚧 1 对,炙蜂房 25g,炙蜗牛 50 个,阳起石 50g,淫羊藿 30g,全蝎 25g,蛇床子 25g,地龙 25g。将上药共研细末,过 120 目筛后,分成 60 包,或炼蜜为丸。每次服 1 包或 1 丸,每天服 2 次,饭前服用。1 个月为 1 个疗程。

主治:阳痿。

宜忌:忌生、冷、烟酒。

病例验证:用此方治疗阳痿患者 297 例,治愈 274 例,无效 23 例,总有效率为 92.25%。(http://paper.cntcm.com.cn/html/content/2019-07/26/content_617523.htm)