

[药 理]

微波炮制白果对 APP/PS1 转基因老年痴呆小鼠学习记忆能力的影响

余圆圆， 陈 钧*
(江苏大学药学院，江苏 镇江 212013)

摘要：目的 研究微波炮制白果对 APP/PS1 转基因老年痴呆小鼠学习记忆能力的影响。**方法** 比较炒制法、煮制法、微波法 3 种炮制方式对白果中化学成分的影响。小鼠从 4 月龄开始分别给予含有生白果及微波炮制熟白果的特殊饲料 8 个月，采用开场实验、新物体识别实验、Morris 水迷宫实验等行为学实验评价小鼠学习记忆能力。行为学实验结束后，测定小鼠血清及脑组织中超氧化物歧化酶（T-SOD）、丙二醛（MDA）、过氧化氢酶（CAT）水平，以及小鼠脑组织中 Na^+/K^+ ATPase 水平，并观察海马组织病理形态。**结果** 微波炮制是较好的白果炮制工艺。与模型组相比，微波炮制白果组 T-SOD、CAT 活力上调，MDA 含量下调， Na^+/K^+ ATPase 活力增加；生白果组无显著性差异。**结论** 与生白果不同，微波炮制白果能显著改善老年痴呆小鼠受损的学习记忆能力，其机制可能与其提高机体抗氧化能力和激活细胞能量代谢有关。

关键词：白果；老年痴呆；学习记忆；氧化应激；能量代谢；4'-O-甲基吡哆醇

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2018)01-0001-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.01.001

Effects of microwave-heated *Ginkgo Semen* on learning and memory abilities of APP/PS1 transgenic mice with Alzheimer's disease

YU Yuan-yuan， CHEN Jun*
(Department of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate microwave-heated *Ginkgo Semen*'s effects on learning and memory abilities of APP/PS1 transgenic mice with Alzheimer's disease (AD). **METHODS** Firstly, the effects on chemical compositions of *Ginkgo Semen* due to variation in processing methods (baking, boiling and microwave-heating) were compared. Then, four-month mice were given eight months' special feed containing either raw *Ginkgo Semen* powders or microwave cooked *Ginkgo Semen* powders. At the end of the experiment, the memory and learning abilities of mice were assayed by open field test, novel object recognition test and morris water maze test, sequentially. And the levels of superoxide dismutase (T-SOD), catalase (CAT), Na^+/K^+ ATPase and malondialdehyde (MDA) in the serum and brain tissue of mice were measured, and a further histopathology examination on hippocampus tissues was performed as well. **RESULTS** Microwave-heating method was determined to be the optimum processing technology for *Ginkgo Semen*. Compared with the model group, the groups treated with microwave cooked *Ginkgo Semen* had increased T-SOD, CAT, Na^+/K^+ ATPase and decreased MDA content, but the groups treated with raw *Ginkgo Semen* displayed no significant differences. **CONCLUSION** Unlike raw *Ginkgo Semen*, *Ginkgo Semen* processed by microwave heating may possess an antioxidative activity and an energy metabolism enhancement ability contributing to significant amelioration of AD mice's impaired learning and memory abilities.

KEY WORDS: *Ginkgo Semen*; Alzheimer's disease (AD); learning and memory; oxidative stress; energy metabolism; 4'-O-methylpyridoxine

收稿日期：2017-04-24

作者简介：余圆圆（1991—），女，硕士生，研究方向为天然产物活性成分筛选及应用。Tel: 18252586860, E-mail: yyy1415014@163.com

* 通信作者：陈 钧（1947—），男，教授，博士生导师，研究方向为生物资源活性成分和新药开发。Tel: 13812461762, E-mail: shchen@uj.s.edu.cn

白果为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥成熟子, 又名鸭脚子、灵眼、佛指柑、银杏。《中国药典》中记载白果具有敛肺定喘、止带缩尿、涩精固元、延年益寿之功效; 现代研究也表明, 白果具有抗氧化、抗炎、提高免疫力、抗肿瘤、治疗心血管疾病等作用^[1-3]。白果中除含有淀粉、蛋白质、多糖等营养成分, 还含有黄酮、萜类、氨基酸、生物碱、微量元素等特定生物活性物质^[4-5]。1992 年, 白果被列为药食两用的功能性果品。

历代本草均有记载, 白果性味甘苦涩平, 有毒; 近年来也有文献报道, 白果生食有毒, 可产生精神亢奋、抽搐、惊厥、呕吐等毒性反应^[6]。研究显示, 4'-O-甲基吡哆醇 (MPN) 具有神经毒性, 是白果中主要毒性物质^[7]。白果经炮制后可降低毒性, 所以白果入药大多以炮制品为主, 历代炮制方式有炒制、煮制、蒸制等。

阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD), 又称老年性痴呆, 是一种常见的老年神经退行性疾病, 主要表现为全面认知障碍^[8]。西医虽对老年痴呆症提出多种学说, 但对其发病机制仍未阐明。中医则认为, 老年痴呆症病因是五脏虚衰, 本虚标实, 本虚指肾精不足、髓海空虚、五神失用; 标实指痰浊血淤、闭阻脑络^[9]。对于该病的治疗目前没有特效药物, 但众多中药能提高患者认知功能。由于白果具有多种药理活性, 其很可能成为防治老年痴呆症的有效中药。

与各类 AD 动物模型相比较, 转基因动物模型以遗传基因学说为基础, 具备认知功能障碍, 有神经斑块及神经纤维缠结的组织病理学改变, 能全面模拟 AD 的一些重要病症。APP/PS1 转基因小鼠指嵌入淀粉样肽蛋白前体 (APP) 基因与早老素-1 (PS1) 基因的双转基因小鼠, 是研究老年痴呆症较好的模型。

因此, 本研究利用 APP/PS1 转基因老年痴呆小鼠模型, 观察微波炮制的白果及普通生白果对痴呆小鼠认知学习能力的影响, 考察白果对老年痴呆的防治作用。另外, 本研究从氧化应激及能量代谢方面探讨了其可能的防治机制。

1 实验材料

1.1 药品与试剂 白果品种为大佛指 (江苏泰兴市场); 4'-O-甲基吡哆醇为实验室自制, 纯度 99.5%; 总银杏酚酸对照品 (上海同田生物技术有限公司, 纯度 99.0%); 银杏萜内酯对照品 (美

国 Sigma 公司, 纯度 98.0%); γ -氨基丁酸对照品 (华中海威基因科技有限公司, 纯度 98.0%); 腺苷 (成都普思生物有限公司, 纯度 99.0%); T-SOD 试剂盒 (批号 20161211)、MDA 试剂盒 (批号 20161126)、CAT 试剂盒 (批号 20161218)、 Na^+/K^+ ATPase 试剂盒 (批号 20161207) 均购自南京建成生物工程研究所。其他试剂均为分析纯。

1.2 实验动物 APP/PS1 转基因种鼠购自南京模式动物研究所, 许可证编号 SCXK (苏) 2015-0001; 野生型 C57/B6 雌鼠购自江苏大学动物实验中心, 许可证编号 SCXK (苏) 2013-0011。雄性 APP/PS1 转基因鼠与野生型 C57/B6 雌鼠交配繁殖, 子代鼠经基因鉴定后, 阳性基因型鼠为 APP/PS1 转基因小鼠, 同窝阴性基因型鼠为对照组小鼠, 供后续试验。

1.3 主要仪器 JE-502 电子天平 (上海浦春计量仪器有限公司); HH-S 数显恒温水浴锅 (江苏省金坛市医疗仪器厂); 多功能酶标仪 (Molecular Devices Spectra Max M5); 冷冻离心机 (Eppendorf Centrifuge 5424); JNOEC XS-212-202 型显微镜 (南京江南光电股份有限公司); 行为学实验装置 (北京硕林苑科技有限公司); Ethovision Basic 软件采集分析小鼠行为 (荷兰 Noldus 公司)。

2 实验方法

2.1 白果样品制备

2.1.1 炮制品的制备 砂炒法: 将生白果置于铁锅中, 加砂炒至微炸裂、有香气。水煮法: 将生白果剥壳后置于沸水中, 煮制 2 h 后取出。微波法: 将生白果置于微波炉中, 功率 700 W, 加热 2 min。将上述炮制品以及生白果剥除硬壳, 经冷冻干燥得干品, 研磨, 过筛后得白果粉末。

2.1.2 炮制后白果中毒性成分含有量的测定 参照 Yoshimura 等人的方法^[10], 利用 HPLC 法测定 MPN 的含有量变化; 参照李转梅等人的方法^[11], 利用 HPLC 法测定总银杏酸的含有量变化。

2.1.3 炮制后白果中活性成分含有量的测定 参照卢定强等人的方法^[12], 利用 HPLC 法测定银杏萜内酯的含有量变化。采用 NaNO_2 -Al (NO_3)₃ 比色法测定总黄酮的含有量^[13]。采用 Berthelot 比色法测定 γ -GABA 的含有量变化^[14]。采用 HPLC 法测定腺苷的含有量变化^[15]。

2.2 动物分组及给药 4 月龄 APP/PS1 转基因小鼠雌雄并用, 随机分为模型组、生白果低剂量组

(生低组)、生白果高剂量组(生高组)、微波熟白果低剂量组(熟低组)、微波熟白果高剂量组(熟高组),同窝阴性小鼠作为对照组,每组 6 只。将“2.1”项下制备的生白果粉以及微波炮制的熟白果粉委托江苏协同生物有限公司制备成含白果粉 5% 的订制动物饲料。对照组、模型组小鼠给予普通动物饲料,生低组与生高组每只小鼠每天分别给予含生白果粉动物饲料 2.5 g 和 5 g [相当于白果粉量分别为 4.16、8.32 mg/(g·d)],熟低组与熟高组每只小鼠每天分别给予含熟白果粉动物饲料为 2.5 g 和 5 g [相当于白果粉量分别为 4.16、8.32 mg/(g·d)],连续给药 8 个月至行为学实验结束。设计上述动物试验给药剂量时,参考 2015 版《中国药典》中规定白果每天最大摄取量 10 g/人,本实验中小鼠给药低剂量按照每人每天最大摄取量的 5 倍折算,并按照《药理实验方法学》(徐淑云著)中人与小鼠之间等效剂量折算公式: $D_{\text{小鼠}}(\text{mg/只}) = K \cdot D_{\text{人}}(\text{mg/人})$, K 值为 0.002 5,小鼠体质量按 30 g 计算,得小鼠等效低剂量为 4.16 mg/(g·d)。

2.3 行为学实验 行为学实验开始前,将实验小鼠转移至行为学实验室适应性饲养 1 周后用于试验。

2.3.1 开场实验 将小鼠放入 45 cm × 45 cm × 30 cm 的敞箱,并将底部中心 35 cm × 35 cm 区域划分为中心区域,由敞箱上方的摄像头监测小鼠在敞箱内自由活动 30 min 的活动轨迹,由专业软件记录与分析小鼠在中心区域的时间。

2.3.2 新物体识别 新物体识别实验仍在上述敞箱中进行,实验分为 3 个阶段。适应阶段:箱中不放置任何物体,将小鼠放入活动箱中自由活动 1 min 后取出。熟悉阶段:间隔 5 min 后,箱中放入绿色圆柱体和白色立方体,重新将小鼠放入箱中活动 1 min 后取出。测试阶段:间隔 5 min 后,将箱中绿色圆柱体更换为红色三棱柱,再次将小鼠放入箱中活动 1 min,由敞箱上方的摄像头监测小鼠在测试阶段中探视新物体(红色三棱柱)和熟悉物体(白色立方体)的时间。按下式计算识别指数:识别指数 = (接触新物体时间/接触物体总时间) × 100%。

2.3.3 Morris 水迷宫 定位航行实验:将直径 1.5 m 的圆形水池人工划分为 4 个象限,直径 12 cm 的圆形平台置于水下 1 cm 任一象限的 1/2 弧度处,

选取第 2 象限作为初始入水点,训练时将小鼠面朝池壁放入水中。录像系统记录小鼠入水到找到平台的时间,即潜伏期。如果小鼠在 60 s 内没有找到平台,由实验者将小鼠牵引至平台,潜伏期记为 60 s。每天在 4 个象限各训练 1 次,4 次潜伏期的算术平均值作为该只小鼠该天的成绩,连续测定 6 d。

空间探索实验:定位航行试验结束 24 h 后,撤除平台。选取第 4 象限作为入水点,将小鼠面朝池壁放入水中,记录小鼠在 60 s 内的游泳路径,对小鼠在原平台象限的停留时间及穿越平台次数等进行统计分析。

2.4 小鼠脏器指数、血清/脑组织氧化应激与脑能量代谢生化指标测定 行为学实验结束后,小鼠眼眶取血,静置 6 h 后,3 000 r/min 离心 10 min,分离上清。取血后,将小鼠置于冰上快速处死,取肾、脾称重,计算脏器指数。取脑后 4 ℃ 预冷生理盐水冲洗,冠状切割后称重,制备 10% 脑组织匀浆,备用。按照试剂盒说明书测定血清以及脑组织中 T-SOD 活力、MDA 含量、CAT 活力,以及脑组织中 Na^+/K^+ ATPase 的活力。

2.5 病理学观察 将冠状切割后剩余部分脑组织浸于 10% 中性福尔马林固定液中,石蜡包埋、切片,HE 染色,在光镜下观察小鼠海马 CA1 区神经细胞结构形态。

2.6 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 11.5 统计软件单因素方差分析(one way-AVONA),对数据进行组间差异的比较。 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

3 结果

3.1 不同炮制方法对白果化学成分的影响 从表 1 中看出,3 种炮制方式均能有效脱除白果中的毒性成分 MPN 与银杏酚酸,但微波法使银杏萜内酯、总黄酮、 γ -GABA、腺苷这些白果活性成分保留最多,故选择微波炮制熟白果。

3.2 白果对 APP/PS1 转基因小鼠行为学的影响 开场实验结果如图 1A 所示,与对照组比较,模型组小鼠在中心区域停留时间显著减少($P < 0.01$);与模型组相比,生白果组无显著差异($P > 0.05$),给予低、高剂量熟白果均能显著增加在中心区域的停留时间($P < 0.05$)。实验表明,熟白果可以增加 APP/PS1 小鼠的自发活动和探究行为。

表 1 不同炮制方法对白果中化学成分的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

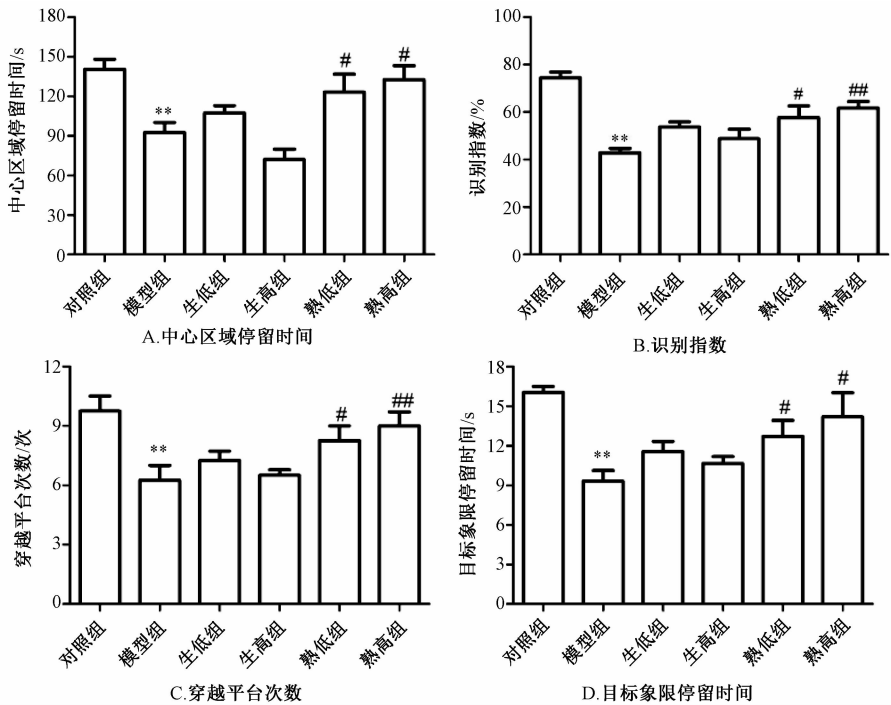
Tab. 1 Effects of different processing methods on chemical compositions in *Ginkgo Semen* ($\bar{x} \pm s, n=4$)

样品	MPN/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	银杏酚酸/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	银杏萜内酯/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	总黄酮/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	γ -GABA/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	腺苷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
生白果	133.63 $\pm$ 18.40	120.34 $\pm$ 17.30	1.530 $\pm$ 0.230	3.62 $\pm$ 0.40	1.57 $\pm$ 0.24	457.19 $\pm$ 32.50
砂炒法	4.27 $\pm$ 0.30	38.26 $\pm$ 5.20	0.527 $\pm$ 0.069	2.07 $\pm$ 0.30	1.48 $\pm$ 0.31	448.13 $\pm$ 45.30
水煮法	5.06 $\pm$ 0.40	41.38 $\pm$ 5.30	0.535 $\pm$ 0.085	1.53 $\pm$ 0.30	0.52 $\pm$ 0.05	22.12 $\pm$ 2.50
微波法	4.37 $\pm$ 0.40	37.61 $\pm$ 4.70	1.410 $\pm$ 0.260	2.42 $\pm$ 0.20	1.53 $\pm$ 0.19	449.09 $\pm$ 37.90

新物体识别实验结果如图 1B 所示，与对照组比较，模型组小鼠的识别指数显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组相比，生白果组的识别指数没有显著差异 ($P > 0.05$)，熟白果给药组与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$)。实验表明，熟白果可以提高老年痴呆小鼠对新事物的识别能力，改善 APP/PS1 小鼠的短期记忆力。

Morris 水迷宫实验结果如图 1C ~ 1D、图 2 所示。6 d 的定位航行实验中 (图 2)，各组小鼠找到水下平台的潜伏期都在逐渐缩短，表明经训练学习

后小鼠空间记忆力加强。但与对照组相比较，模型组的潜伏期较长；与模型组比较，熟白果低、高剂量组的潜伏期缩短。空间探索实验中 (图 1C ~ 1D)，与模型组相比，对照组小鼠穿越平台的次数以及在目标象限停留的时间都较长 ($P < 0.01$)；与模型组相比较，熟低、高组均能使小鼠穿越平台次数以及在目标象限停留时间增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。实验表明，熟白果低、高剂量能改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆能力。



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

图 1 白果对 APP/PS1 小鼠学习记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Effects of *Ginkgo Semen* on learning and memory abilities of APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.3 白果对 APP/PS1 转基因小鼠脏器指数的影响
脏器指数结果如图 3 所示，与对照组比较，模型组的脾脏指数与肾脏指数均显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，熟低组与熟高组的脾脏指数和肾脏指数均升高，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，提示熟白果对 APP/PS1 转基因小鼠具有补益作用。

3.4 白果对 APP/PS1 转基因小鼠血清/脑组织氧化应激水平的影响
实验结果如表 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠的 T-SOD、CAT 活力显著下降，MDA 含有量升高，差异均具有统计学差异 ($P < 0.01$)；与模型组比较，给药组均能使小鼠血清及脑组织 T-SOD、CAT 活力升高，MDA 含有量

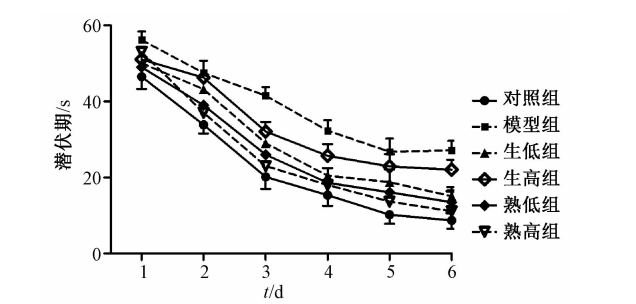


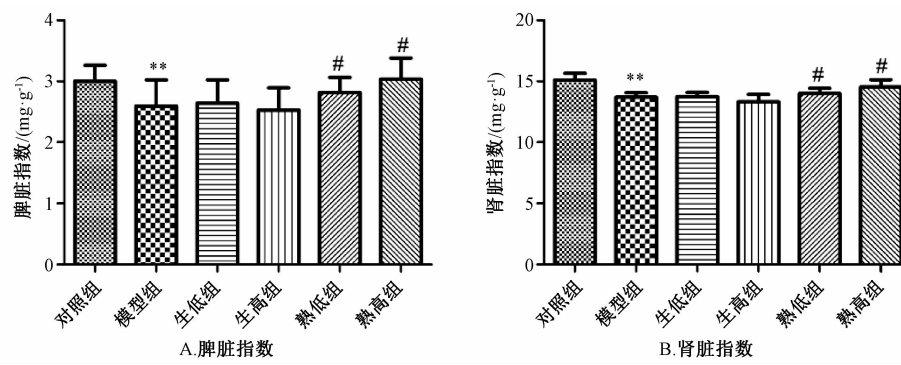
图 2 定位航行实验中 APP/PS1 小鼠的潜伏期变化

Fig. 2 Latency variations of APP/PS1 mice in orientation navigation test

降低，但只有熟低组与熟高组具有统计学差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，表明熟白果可提高小鼠抗氧化能力。

3.5 白果对 APP/PS1 转基因小鼠脑组织能量代谢系统的影响 实验结果如图 4 所示。与对照组比较，模型组 Na^+/K^+ ATPase 活力显著下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较，熟低组及熟高组均能使该酶活力显著升高 ($P < 0.01$)。

3.6 白果对 APP/PS1 转基因小鼠脑海马组织病理形态的影响 实验结果如图 5 所示。对照组神经细胞排列紧凑，结构层次清晰，细胞完整，大小均



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

图 3 白果对 APP/PS1 小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 3 Effects of Ginkgo Semen on viscera indices of APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

表 2 白果对 APP/PS1 小鼠血清/脑组织氧化应激水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab. 2 Effects of Ginkgo Semen on oxidative stress levels in the serum and brain tissue of APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	血清			脑组织		
	T-SOD/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MDA/ ($\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CAT/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	T-SOD/ ($\text{U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)	MDA/ ($\text{nmol} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)	CAT/ ($\text{U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$)
对照组	99.24 $\pm$ 9.67	6.63 $\pm$ 0.80	6.71 $\pm$ 0.31	125.33 $\pm$ 11.45	9.53 $\pm$ 0.76	2.16 $\pm$ 0.35
模型组	77.56 $\pm$ 5.71 **	8.57 $\pm$ 1.11 **	4.50 $\pm$ 0.19 **	103.21 $\pm$ 5.91 **	16.33 $\pm$ 1.55 **	1.30 $\pm$ 0.30 **
生低组	85.23 $\pm$ 12.32	8.50 $\pm$ 1.25	5.15 $\pm$ 0.27	108.57 $\pm$ 6.93	16.57 $\pm$ 1.56	1.46 $\pm$ 0.15
生高组	81.82 $\pm$ 6.83	9.07 $\pm$ 0.90	4.68 $\pm$ 0.19	102.07 $\pm$ 8.95	17.34 $\pm$ 1.90	1.36 $\pm$ 0.17
熟低组	92.01 $\pm$ 3.62 #	7.67 $\pm$ 0.75	5.57 $\pm$ 0.23 #	113.78 $\pm$ 7.44 #	12.61 $\pm$ 0.96 #	1.67 $\pm$ 0.25 #
熟高组	96.92 $\pm$ 7.63 ##	7.13 $\pm$ 0.69 ##	5.95 $\pm$ 0.28 ##	121.69 $\pm$ 8.94 ##	11.01 $\pm$ 0.75 ##	1.93 $\pm$ 0.29 ##

注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

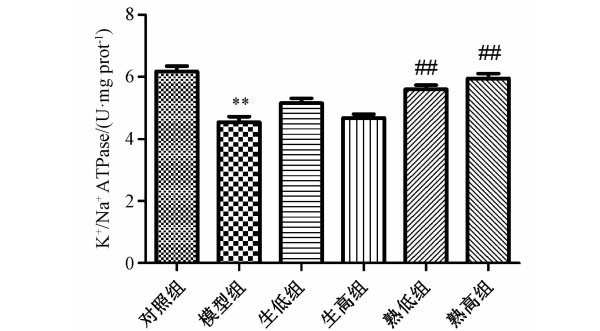
一，胞浆丰富，胞核圆形无固缩；模型组神经细胞排列散乱，层次混乱，神经细胞明显脱失，大小不一，胞核固缩。与模型组比较，生低、高剂量组神经细胞改变不明显，熟高组神经细胞结构基本正常，排列紧凑，细胞少量脱失，神经细胞数量增多。

4 讨论

文献报道^[16]，APP/PS1 转基因老年痴呆模型小鼠在 4 月龄脑内开始出现老年斑，10 ~ 12 月龄出现认知功能障碍，是研究老年痴呆症的理想模型。所以，本实验以 4 月龄 APP/PS1 基因型老年

痴呆模型鼠为实验组，在 12 月龄检测其学习记忆能力。

学习记忆能力下降是老年痴呆症的典型症状，所以衡量一个药物对老年痴呆症是否有治疗效果，检测其能否提高学习记忆能力是一个重要指标。开场实验通过测定小鼠在中心区域的活动时间来量化其空间分析认知能力及环境适应能力；新物体识别实验利用小鼠对新物体有天生的探知欲，认知功能若无障碍则对新物体的探知时间会更长；Morris 水迷宫系列实验可以反映动物的空间定位、空间记忆以及记忆保持能力，以上方法已广泛应用于检测动



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$

图 4 白果对 APP/PS1 小鼠脑组织 Na^+/K^+ ATPase 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 Effect of *Ginkgo Semen* on Na^+/K^+ ATPase activity in the brain tissue of APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

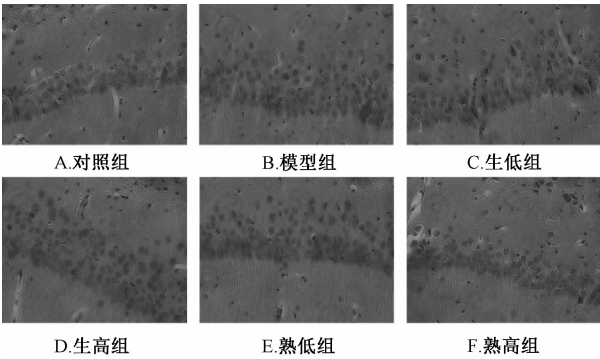


图 5 APP/PS1 小鼠海马 CA1 区神经元 (HE, $\times 400$)

Fig. 5 Neurons in hippocampal CA1 area of APP/PS1 mice (HE, $\times 400$)

物的认知功能与学习能力^[17]。

本研究运用开场实验、新物体识别、Morris 水迷宫实验考察了生白果和微波炮制后熟白果对老年痴呆小鼠行为学的影响，结果与模型组相比，熟低组、熟高组能显著提高小鼠自发行为、探究行为，改善短期记忆，缩短潜伏期，加强学习记忆能力，呈现量效关系；生白果组没有显著性差异。病理研究结果显示，熟白果组海马 CA1 区神经细胞形态明显优于模型组，而生白果组较模型组无明显改善，提示熟白果抑制神经细胞凋亡与退化，具有神经保护作用，对 APP/PS1 转基因小鼠有一定防治作用。

本实验又进一步对小鼠血清、脑组织的氧化应激水平及能量代谢能力指标进行了测定，以探讨白果对老年痴呆症的防治机制。结果，熟白果组能提高老年痴呆小鼠血清及脑组织 T-SOD、MDA 活力，下调 MDA 含量，生白果组没有显著性差异，提

示熟白果可改善脑内氧化应激水平，保护脑组织免受自由基损害。 Na^+/K^+ ATPase 在合成 ATP 以及离子交换中起重要作用，该酶活性降低可导致神经细胞内 Ca^{2+} 浓度升高，增加细胞内钙负荷，使细胞超常规运转，ATP 耗竭，谷氨酸兴奋性神经元激活，增加自由基生成，对细胞造成一定损伤^[18]。实验结果显示，熟白果组小鼠脑组织 Na^+/K^+ ATPase 活力较模型组有显著性升高，生白果组无显著性差异，提示熟白果能激活老年痴呆鼠脑能量代谢的作用。

生白果对 AD 小鼠的学习记忆能力没有改善作用，不能提高 T-SOD、CAT 活力，下调 MDA 含量，可能与白果中 MPN 的神经毒性作用有关。MPN 是一种神经毒性物质，其结构与维生素 B6 (VB6) 类似，VB6 是谷氨酸在谷氨酸脱羧酶 (GAD) 的作用下转化为 GABA 的辅助因子。有文献指出，MPN 能与 VB6 产生竞争性拮抗作用，降低大脑内 GABA 含量以及 GAD 的活性，升高谷氨酸的含量，从而产生神经毒性作用，其症状有精神亢奋、惊厥、抽搐、呕吐等^[19]。谷氨酸是一种神经兴奋性递质，GABA 是一种抑制性神经递质，近几年，有关兴奋性氨基酸和抑制性氨基酸与 AD 发病及学习记忆的密切关系已引起重视，有文献报道脑内 GABA 浓度显著降低，以及谷氨酸在脑内长期大量累积会造成神经细胞死亡，两者都是神经退行性疾病的病因^[20]，其机制可能是与钙离子浓度过高有关^[21]，兴奋性递质升高，抑制性递质降低，使 AD 鼠脑内长期处于兴奋状态，增加自由基生成，可加强大脑的氧化损伤。但生白果中银杏萜内酯、黄酮具有抗炎、抗菌、抗生物氧化性、抗衰老、降血脂等生物活性功能；GABA 对癫痫、抑郁等神经疾病均具有调节与治疗作用^[22]；腺苷能抑制缺血诱导的兴奋性氨基酸的释放，降低细胞膜钙离子通透性^[23]。所以，生白果对 AD 模型鼠没有增益作用，也未见显著损伤作用。

综上所述，与生白果比较，微波炮制白果可有效脱除毒性成分并保留其活性成分，是较好的白果炮制工艺；微波炮制熟白果能显著改善老年痴呆小鼠的学习记忆能力，其机制可能与提高机体抗氧化能力与激活细胞能量代谢有关；生白果中由于毒性物质的存在，对老年痴呆小鼠未见显著防治作用，显示白果应熟制后服用，本研究可为熟白果防治老年痴呆症提供实验数据。

致谢 江苏大学医学院行为学研究室张维宁教

授指导设计行为学试验方案，并提供试验设备与条件。

参考文献：

[1] 黄 文, 谢笔钧, 姚 平, 等. 白果活性蛋白的抗生物氧化作用研究[J]. 营养学报, 2002, 24(2): 192-194.

[2] 邓乾春, 黄 文, 谢笔钧. 白果清蛋白抑制肿瘤活性及其机制的初步研究[J]. 营养学报, 2006, 28(3): 259-262.

[3] 赵春芳, 朱立学. 白果活性成分的提取及其功效研究进展[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2009, 22(4): 67-70.

[4] 何 珩, 何照范, 张迪清. 不同干燥条件对银杏叶中活性成分含量的影响[J]. 中草药, 2004, 35(1): 46-48.

[5] 周桂生, 姚 鑫, 唐于平, 等. 白果仁化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(17): 1362-1366.

[6] Kobayashi D, Yoshimura T, Johno A, *et al.* Decrease in pyridoxal-5'-phosphate concentration and increase in pyridoxal concentration in rat plasma by 4'-O-methylpyridoxine administration [J]. *Nutr Res*, 2015, 35(7): 637-642.

[7] Kobayashi D, Yoshimura T, Johno A, *et al.* Toxicity of 4'-O-methylpyridoxine-5'-glucoside in *Ginkgo biloba* seeds[J]. *Food Chem*, 2011, 126(3): 1198-1202.

[8] 何丹丹, 张 磊, 刘 力, 等. 骆驼蓬子总生物碱改善小鼠学习记忆能力[J]. 中成药, 2015, 37(3): 478-482.

[9] 闫敬来, 陈燕清. 老年痴呆病机的中医学认识概述[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23 (7): 640-642.

[10] Yoshimura T, Udaoka N, Morita J, *et al.* High performance liquid chromatographic determination of ginkgotoxin and ginkgotoxin-5'-glucoside in *Ginkgo biloba* seeds[J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2006, 29(4): 605-616.

[11] 李转梅, 张学兰, 李慧芬, 等. 白果不同部位及不同炮制品中白果酸和总银杏酸定量比较[J]. 中成药, 2015, 37(1): 164-168.

[12] 卢定强, 欧阳平凯, 陈 钧. 反相高效液相色谱法测定银杏叶中银杏萜内酯的含量[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(1):

70-72.

[13] 李树立, 郝秋娟, 赵士豪, 等. 白果总黄酮超声波提取及抗衰老作用[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(12): 3252-3254.

[14] 赵国群, 王 维. 比色法快速测定 γ -氨基丁酸含量[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(10): 85-89.

[15] 周成惠, 李春雪, 张稼小, 等. HPLC 测定不同产地掌叶半夏中腺苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 77-79.

[16] McGowan E, Sanders S, Iwatsubo T, *et al.* Amyloid phenotype characterization of transgenic mice overexpressing both mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin 1 transgenes [J]. *Neurobiol Dis*, 1999, 6(4): 231-244.

[17] 陈罗西, 郭玲玲, 李 亮. Morris 圆形水迷宫的应用及其相关检测指标分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(8): 55-57.

[18] 王生福, 周志强, 刘 栋, 等. 补肾健脾活血中药复方对 D-半乳糖脑衰老小鼠海马皮质一氧化氮合酶 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的影响[J]. 江苏大学学报 (医学版), 2003, 13(3): 199-201.

[19] Kästner U, Hallmen C, Wiese M, *et al.* The human pyridoxal kinase, a plausible target for ginkgotoxin from *Ginkgo biloba* [J]. *FEBS J*, 2007, 274(4): 1036-1045.

[20] 赵珍东, 张雷红, 夏 黎, 等. 银杏叶内酯 N 对谷氨酸诱导 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中药材, 2015, 38(8): 1694-1698.

[21] 侯小梅, 魏晶晶, 陈志琼. 补肾益智方对老年痴呆症大鼠脑内氨基酸类神经递质含量的影响[J]. 中成药, 2016, 38(5): 1151-1154.

[22] 田发发, 谢光洁, 杨期东, 等. 实验性癫痫与 γ -氨基丁酸和谷氨酸脱羧酶的关系[J]. 中华神经科杂志, 2000, 33(4): 31-33.

[23] 孟珊珊, 张铁辉, 刘洪文, 等. 腺苷 A_1 受体激动剂对缺血损伤的兔脊髓神经元凋亡的影响[J]. 卒中与神经疾病, 2011, 18(3): 162-164.