

diseases[J]. *EMBO J*, 2011, 30(18): 3667-3683.

[22] Cohen P A, Jhingran A, Oaknin A, *et al.* Cervical cancer[J]. *Lancet*, 2019, 393(10167): 169-182.

[23] Schiffman M, Castle P E, Jeronimo J, *et al.* Human papillomavirus and cervical cancer [J]. *Lancet*, 2007, 370 (9590): 890-907.

[24] 蓝家富. 防城港市 2292 例女性宫颈 HPV 感染与基因分型分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3): 204-208.

[25] 刚小青, 吴衡慧, 周文磊. 白桦脂醇通过抑制 PI3K/AKT 途径抑制宫颈癌小鼠移植瘤增殖[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(10): 1227-1231.

[26] Honegger A, Schilling D, Sltmann H, *et al.* Identification of E6/E7-dependent microRNAs in HPV-positive cancer cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1699: 119-134.

银杏二萜内酯葡胺对阿尔茨海默病大鼠学习记忆障碍的改善作用

王 颖¹, 王 强¹, 蒋珍秀¹, 陈 军¹, 雒 或^{2*}
(1. 兰州大学第一医院神经内科, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州大学基础医学院病理生理学研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘要: **目的** 探讨银杏二萜内酯葡胺对阿尔茨海默病 (AD) 大鼠学习记忆障碍的改善作用及对突触相关蛋白表达的影响。**方法** 40 只大鼠随机分为假手术组、模型组和银杏二萜内酯葡胺低、中、高剂量组 (1.5、3.0、6.0 mg/kg)。通过侧脑室定位注射 A β ₁₋₄₂ 建立 AD 大鼠模型, 尾静脉注射给药 4 周后, 通过 Morris 水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力, 蛋白免疫印迹法检测大鼠脑组织海马中突触蛋白 NR2B、PSD95、BDNF 表达, 以及下游信号通路蛋白 ERK1/2、CaMK II、CREB、TrkB 表达。**结果** 与模型组比较, 银杏二萜内酯葡胺中、高剂量组大鼠逃避潜伏期缩短 ($P<0.01$), 穿越平台次数、目标象限停留时间和游程增加 ($P<0.01$), 海马 p-NR2B、p-CaMK II、p-ERK、p-CREB、PSD95、BDNF、p-TrkB 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。**结论** 银杏二萜内酯葡胺能改善 AD 大鼠学习记忆能力, 其机制可能与激活 NR2B 相关的 CaMK II/ERK/CREB 信号通路, 增强 PSD95、BDNF 表达, 激活 TrkB 信号通路相关。**关键词:** 银杏二萜内酯葡胺; 阿尔茨海默病; 学习记忆; 突触相关蛋白; CaMK II/ERK/CREB 信号通路; TrkB 信号通路
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)10-3438-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.10.048

阿尔茨海默病 (Alzheimer’s disease, AD) 又称老年痴呆, 是一种最常见的老年慢性神经退行性疾病, 65 岁以上人群发病率约 11%, 85 岁则达到了 32%^[1], 患者晚期丧失生活自理能力, 给其亲属和家庭带来严重的经济负担, 影响社会发展^[2]。目前, 仍然没有合适的临床药物能防治 AD, 现有的也只能延缓发病。作为多病因神经退行性疾病, AD 的治疗具有多靶点性^[3-4]。

银杏叶为银杏科植物银杏的叶, 有敛肺气、平喘咳功效, 用于治疗心悸怔忡、肺虚咳喘。现代药理研究证明, 银杏提取物具有神经保护作用, 对学习记忆障碍和老年痴呆症具有一定的防治作用。银杏内酯是银杏叶提取物的主要活性成分, 银杏二萜内酯葡胺注射液主要成分为银杏内酯, 由银杏内酯 A (35%)、B (60%)、C (2%)、K (2%) 等二萜内酯组成^[5]。已有研究表明, 银杏二萜内酯葡胺能改善缺血再灌注大鼠脑缺血引起的行为缺陷, 降低谷氨酸、天冬氨酸等兴奋性氨基酸水平, 增加 γ -氨基丁酸

等抑制性神经递质的释放, 并通过 calpain 通路抑制神经细胞凋亡^[5-8]。银杏二萜内酯葡胺能激活 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路, 发挥抗氧化和保护神经细胞的作用^[9-10]。课题组前期研究表明, 银杏二萜内酯葡胺能减轻老年小鼠脑内的炎症反应, 增强自然衰老小鼠学习记忆功能^[11]。但银杏二萜内酯葡胺对 AD 影响的研究较少, 本研究通过建立 AD 大鼠模型, 探讨银杏二萜内酯葡胺对 AD 大鼠认知功能障碍的影响, 并对其相关分子机制作进一步研究。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠, 3 月龄, 雌雄各半, 体质量 230~270 g, 由兰州大学实验动物中心提供 [实验动物生产许可证号 SCXK (甘) 2018-0002], 饲养于温度 20~24 $^{\circ}\text{C}$ 、自然光照的实验环境, 自由进食、饮水。本研究涉及的动物实验操作均遵守兰州大学实验动物饲养和使用规范。

1.2 试剂与药物 银杏二萜内酯葡胺注射液 [批号 181005, 5 mL (25 mg) /支, 江苏康缘药业股份有限公

收稿日期: 2022-01-24
基金项目: 甘肃省自然科学基金项目资助项目 (1506RJZA235); 兰州大学中央高校基本科研业务费专项基金资助项目 (lzujbky-2016-70)
作者简介: 王 颖 (1978—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为阿尔茨海默病的发病机制、治疗。E-mail: ldyy_wangy@lzu.edu.cn
* 通信作者: 雒 或 (1978—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为神经病理生理学。E-mail: luoy@lzu.edu.cn

司]。Aβ₁₋₄₂ (批号 171596, 美国 Sigma 公司); 兔单克隆抗体 NMDA 受体 2B (NR2B)、兔单克隆抗体 NMDA 受体 2B-phospho S1248 (p-NR2B)、鼠单克隆抗体 p44/p42 MAPK (ERK1/2)、兔多克隆抗体 p44/p42 MAPK- Thr202/Tyr204 (p-ERK1/2) (货号 145445、5355S、4696S、9101S, 美国 Cell Signaling Technology 公司); 鼠单克隆抗体钙调蛋白依赖蛋白激酶 (calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II)、兔多克隆抗体 CaMK II-phospho T286 (p-CaMK II)、兔多克隆抗体 cAMP 反应结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB)、兔单克隆抗体 CREB-phospho S133 (p-CREB)、兔多克隆抗体 PSD95、兔单克隆抗体脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)、兔多克隆抗体 TrkB、兔单克隆抗体 TrkB-phospho Y705 (p-TrkB)、鼠单克隆抗体 β-actin (货号 ab22609、ab32678、ab31387、ab32096、ab18258、ab108319、ab18987、ab229908、ab8226, 英国 Abcam 公司); IRDye™ (800CW) 染料标记的羊抗鼠/兔二抗 (美国 LI-COR 公司)。

1.3 仪器 Odyssey 近红外双色激光成像系统 (美国 LI-COR 公司); WM-100 型水迷宫视频分析系统 (成都泰盟软件有限公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 将大鼠 (雌雄各半) 随机分为假手术组、模型组和银杏二萜内酯葡胺低、中、高剂量组, 每组 8 只。假手术组行脑立体定位注射手术, 但不注射任何药物, 其余各组大鼠侧脑室注射 Aβ₁₋₄₂ (5 nmol/L) 建立 AD 模型。造模后第 2 天, 银杏二萜内酯葡胺低、中、高剂量组大鼠分别尾静脉注射 1.5、3.0、6.0 mg/kg 银杏二萜内酯葡胺, 假手术组和模型组大鼠尾静脉注射等量生理盐水, 连续 4 周。给药结束后进行 Morris 水迷宫实验, 第 1~6 天为学习能力检测, 第 7 天为记忆能力检测。实验结束后处死大鼠, 分离脑组织海马体。

2.2 脑立体定位注射 Aβ₁₋₄₂ 大鼠腹腔注射 6% 水合氯醛 (30 mg/kg) 进行麻醉, 仰卧位固定在脑立体定位仪上, 剃去头部毛发并进行消毒, 纵向切开皮肤暴露前囟颅骨, 根据大鼠立体定位图谱的侧脑室坐标点 (前囟后 1.4 mm、矢状线旁左侧 1.5 mm、深 4 mm) 进行注射, 注射速度 0.2 μL/min, 注射完毕后留针 5 min, 再缓慢移出注射器, 缝合头皮并消毒, 将大鼠从脑立体定位仪上取下, 放回饲养笼中待苏醒。

2.3 Morris 水迷宫实验 参考 Morris 等^[12]报道方法设置水迷宫圆柱形水箱直径 1.6 m, 水温 23~25 ℃, 测试平台固

定于第三象限内水面下 2.0 cm。第 1~6 天进行定位航行实验, 每天在固定时间训练 4 次, 在每个象限的固定点将大鼠面向水池壁放入水箱中, 60 s 内让其自由游动并寻找隐藏的平台, 记录找到平台时间 (逃避潜伏期), 并让其在平台上停留休息 20 s; 如果 60 s 内找不到平台 (逃避潜伏期记为 60 s), 则由实验人员将其引导到平台上并停留休息 20 s。第 7 天进行空间探索实验, 撤除平台, 将大鼠于第一象限放入水池中, 在 60 s 内使用视频跟踪系统软件描记其游动路径轨迹图, 记录穿越平台次数、在目标象限停留时间、游程比例。

2.4 蛋白免疫印迹法检测蛋白表达 将大鼠海马体于冰浴条件下使用电动匀浆机进行匀浆, 加入组织裂解液提取总蛋白, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, BCA 法测定样品蛋白浓度, 于-80 ℃保存备用。取部分蛋白样本, 加入上样缓冲液煮沸 10 min 变性。蛋白样本经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转至 NC 膜, 加 4% 脱脂牛奶-TBS 溶液室温封闭 1 h, 加一抗 4 ℃孵育过夜, 洗膜后加入兔或鼠 IgG 荧光二抗室温孵育 1 h, 加入 ECL 发光试剂, 使用奥德赛扫描成像系统扫描免疫印迹条带, 检测并记录条带的相对灰度值。

2.5 统计学分析 通过 SPSS 16.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 银杏二萜内酯葡胺对大鼠学习记忆能力的影响 由表 1 可知, 水迷宫定位航行实验第 2 天起, 与假手术组比较, 模型组大鼠逃避潜伏期延长 ($P < 0.01$), 学习能力下降; 与模型组比较, 银杏二萜内酯葡胺中、高剂量组逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$), 学习能力增强。由表 2 可知, 与假手术组比较, 模型组大鼠穿越平台次数、目标象限停留时间和游程比例均降低 ($P < 0.01$), 记忆能力下降; 与模型组比较, 银杏二萜内酯葡胺中、高剂量组大鼠穿越平台次数、目标象限停留时间和游程比例增加 ($P < 0.01$), 记忆能力增强。

3.2 银杏二萜内酯葡胺对大鼠海马组织 NR2B、ERK1/2、CaMK II、CREB 蛋白表达的影响 由图 1、表 3 可知, 与假手术组比较, 模型组大鼠海马组织 p-NR2B、p-ERK1/2、p-CaMK II、p-CREB 蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 银杏二萜内酯葡胺中、高剂量组大鼠海马组织 p-NR2B、p-ERK1/2、p-CaMK II 和 p-CREB 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。

表 1 银杏二萜内酯葡胺对大鼠逃避潜伏期的影响 (s, $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

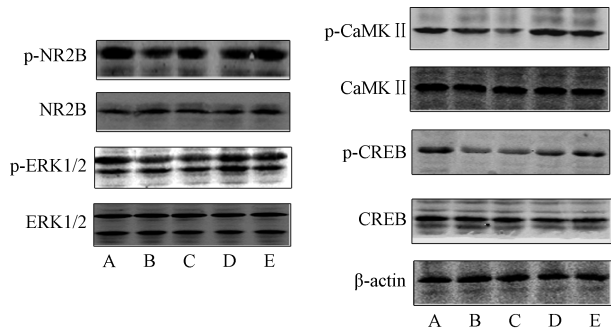
组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
假手术组	56.352±3.543	42.045±2.481	35.534±3.053	31.376±3.535	23.621±4.375	16.036±2.682
模型组	58.542±2.054	56.654±2.241**	48.854±1.614**	44.582±3.402**	36.853±3.225**	33.278±5.105**
银杏二萜内酯葡胺低剂量组	56.358±2.058	55.542±2.821	45.357±4.681	42.258±2.312	36.571±2.357	30.365±2.482
银杏二萜内酯葡胺中剂量组	55.245±1.652	48.351±1.852 ^{##}	40.243±2.256 ^{##}	34.365±2.351 ^{##}	26.358±1.251 ^{##}	21.874±1.632 ^{##}
银杏二萜内酯葡胺高剂量组	56.851±2.026	46.778±2.225 ^{##}	41.527±3.324 ^{##}	35.667±2.629 ^{##}	26.278±3.244 ^{##}	22.823±3.624 ^{##}

注: 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

表 2 银杏二萜内酯葡胺对大鼠穿越平台次数、目标象限停留时间、游程比例的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	穿越平台次数/次	目标象限游程比例/%	目标象限停留时间比例/%
假手术组	5.254±0.214	56.654±1.514	57.084±3.811
模型组	3.674±0.651**	39.028±2.743**	40.110±2.892**
银杏二萜内酯葡胺低剂量组	3.852±0.254	40.521±1.954	41.645±1.657
银杏二萜内酯葡胺中剂量组	4.580±0.361 ^{##}	47.368±2.036 ^{##}	49.921±2.641 ^{##}
银杏二萜内酯葡胺高剂量组	4.636±0.547 ^{##}	48.625±3.012 ^{##}	50.541±3.325 ^{##}

注：与假手术组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，^{##} $P<0.01$ 。



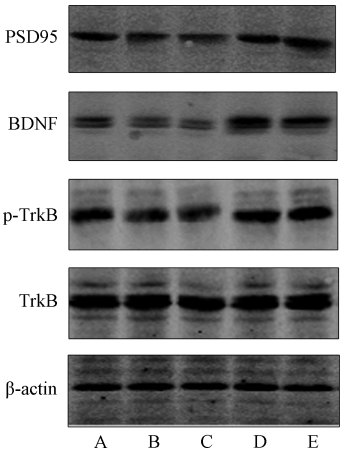
注：A 为假手术组，B 为模型组，C~E 为银杏二萜内酯葡胺低、中、高剂量组。

图 1 各组大鼠海马组织 NR2B、ERK1/2、CaMK II、CREB 蛋白条带

表 3 银杏二萜内酯葡胺对大鼠海马组织 NR2B、ERK1/2、CaMK II、CREB 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	p-NR2B/NR2B	p-ERK1/2/ERK1/2	p-CaMK II /CaMK II	p-CREB/CREB
假手术组	1.067±0.146	1.004±0.083	0.992±0.133	1.013±0.087
模型组	0.618±0.029**	0.624±0.022**	0.665±0.026**	0.651±0.015**
银杏二萜内酯葡胺低剂量组	0.652±0.030**	0.629±0.013**	0.710±0.036**	0.661±0.042**
银杏二萜内酯葡胺中剂量组	0.815±0.053 ^{##}	0.796±0.045 ^{##}	0.902±0.030 ^{##}	0.857±0.081 ^{##}
银杏二萜内酯葡胺高剂量组	0.876±0.034 ^{##}	0.883±0.064 ^{##}	0.827±0.071 ^{##}	0.832±0.047 ^{##}

注：与假手术组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，^{##} $P<0.01$ 。



注：A 为假手术组，B 为模型组，C~E 为银杏二萜内酯葡胺低、中、高剂量组。

图 2 各组大鼠海马组织 PSD95、BDNF、TrkB 蛋白条带

的大脑高级功能具有高度的相关性。NMDAR 家族蛋白 NR2B 与谷氨酸相互作用，能激活 CaMK II 和细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2) 信号通路并诱发长时程增强效应 (long-term potentiation, LTP)。CaMK II 和 ERK1/2 下游最重要的分子是 CREB，

3440

3.3 银杏二萜内酯葡胺对大鼠海马组织 PSD95、BDNF、TrkB 蛋白表达的影响 由图 2、表 4 可知，与假手术组比较，模型组大鼠海马组织 PSD95、BDNF、p-TrkB 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，银杏二萜内酯葡胺中、高剂量组大鼠海马组织 PSD95、BDNF 和 p-TrkB 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。

4 讨论

随着我国快速进入老龄化社会，包括 AD 在内的多种神经退行性疾病的发病率持续升高。海马体位于大脑颞叶内，对于记忆、空间定位、定向发挥关键作用，AD 患者海马内嗅皮层区域最先、最易出现损伤^[13]。

N-甲基-D-门冬氨酸受体 (NMDAR) 家族蛋白属于谷氨酸受体，在脑组织中普遍表达，与包括学习、认知在内

CREB 活化 (磷酸化水平增强) 也与 LTP、记忆的形成相关^[14-15]。研究发现在老龄动物模型和 AD 动物模型中，NR2B 以及 CaMK II、ERK1/2、CREB 的活性均下降^[16-18]。本研究结果显示，银杏二萜内酯葡胺上调了 AD 大鼠海马组织 p-NR2B 表达，激活了下游 CaMK II/ERK/CREB 信号通路，而该信号通路激活具有促进突触的形成，增强突触可塑性、LTP 等效应。同时水迷宫实验表明银杏二萜内酯葡胺能改善 AD 大鼠的学习记忆障碍。

PSD95 是突触后联合的主要构成组件，与学习记忆形成、神经信息传递和突触可塑性等过程具有密切联系，在老年人和阿尔茨海默病患者脑内表达减少^[19]。本研究结果显示，银杏二萜内酯葡胺能上调 AD 大鼠海马组织 PSD95 蛋白表达。BDNF 在学习和记忆的形成中发挥重要的作用^[20-21]，转 BDNF 基因小鼠的认知功能和突触可塑性有明显的提升，而敲除 BDNF 基因小鼠则表现出空间学习记忆能力的下降^[22-23]。BDNF 能和神经元表面 TrkB 结合并激活 TrkB 和 ERK/CREB 信号通路，在海马刺激突触发生和强化突触间联系、增加树突棘密度和体积大小、参与神经发生、促进突触可塑性、LTP 和记忆的形成中起关键作用。BDNF 在海马中的表达和认知功能呈现正相关性，在部分 AD 转基因动物和老龄动物的海马中表达降低，且 TrkB 的活性受

表 4 银杏二萜内酯葡胺对大鼠海马组织 PSD95、BDNF、TrkB 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	PSD95	BDNF	p-TrkB/TrkB
假手术组	1.033±0.176	1.002±0.089	0.998±0.114
模型组	0.648±0.038 **	0.636±0.041 **	0.778±0.050 **
银杏二萜内酯葡胺低剂量组	0.703±0.051 **	0.695±0.052 **	0.721±0.087 **
银杏二萜内酯葡胺中剂量组	0.961±0.053 ^{##}	0.905±0.043 ^{##}	0.896±0.038 ^{##}
银杏二萜内酯葡胺高剂量组	0.970±0.077 ^{##}	0.942±0.021 ^{##}	0.960±0.103 ^{##}

注：与假手术组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，^{##} $P<0.01$ 。
到抑制^[24]。本研究结果与上述研究结果一致，AD 大鼠海马组织 BDNF 蛋白表达降低，TrkB 信号通路受到抑制（即 TrkB 磷酸化水平降低）；而银杏二萜内酯葡胺则能升高 BDNF 蛋白表达并激活 TrkB 通路。

综上所述，银杏二萜内酯葡胺可改善 AD 大鼠的学习记忆功能，其机制可能与增加突触相关蛋白 NR2B 磷酸化水平和 PSD95、BDNF 表达，并激活下游 CaMK II/ERK/CREB 和 TrkB 信号通路相关。

参考文献：

[1] Alzheimer’s Association. 2016 Alzheimer’s disease facts and figures[J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(4): 459-509.

[2] 贾建平, 侯婷婷. 阿尔茨海默病发病机制及治疗进展[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(29): 2351-2356.

[3] 朱 杰, 张 钊, 董一筱, 等. 阿尔茨海默病及其治疗药物研究进展[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(12): 1629-1634.

[4] Zhang P F, Xu S T, Zhu Z Y, *et al.* Multi-target design strategies for the improved treatment of Alzheimer’s disease[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 176: 228-247.

[5] 章晨峰, 曹 亮, 邓 奕, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液对脑缺血再灌注大鼠行为学和脑脊液成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(20): 118-122.

[6] 刘 秋, 许治良, 金治全, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液通过下调 calpain 信号通路抑制脑缺血神经细胞凋亡[J]. 中国药科大学学报, 2015, 46(6): 707-711.

[7] 张 雯, 宋俊科, 何国荣, 等. 银杏二萜内酯对缺血/再灌注大鼠脑组织中神经递质的影响[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(12): 1648-1656.

[8] 李 涛, 袁春桃. DGMI 对缺血再灌注大鼠脑内神经递质的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(7): 3132-3136.

[9] 金治全, 许治良, 刘 秋, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液通过激活 Akt/Nrf2 通路抑制缺糖缺氧诱导的 SH-SY5Y 细胞的氧化应激损伤[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(1): 65-72.

[10] Zhang W, Song J K, Yan R, *et al.* Diterpene ginkgolides protect against cerebral ischemia/reperfusion damage in rats by activating Nrf2 and CREB through PI3K/Akt signaling[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(8): 1259-1272.

[11] 王 颖, 蒋珍秀, 王 强, 等. 银杏二萜内酯葡胺对老年小鼠学习记忆的影响及其机制[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2019, 28(6): 510-515.

[12] Morris R G, Garrud P, Rawlins J N, *et al.* Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions[J]. *Nature*, 1982, 297(5868): 681-683.

[13] Bettio L E B, Rajendran L, Gil-Mohapel J. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, 79: 66-86.

[14] Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMK II function in synaptic and behavioural memory[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3(3): 175-190.

[15] Go J, Park T S, Han G H, *et al.* Piperlongumine decreases cognitive impairment and improves hippocampal function in aged mice[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(4): 1875-1884.

[16] Monti B, Berteotti C, Contestabile A. Dysregulation of memory-related proteins in the hippocampus of aged rats and their relation with cognitive impairment[J]. *Hippocampus*, 2005, 15(8): 1041-1049.

[17] Cowansage K K, Bush D E A, Josselyn S A, *et al.* Basal variability in CREB phosphorylation predicts trait-like differences in amygdala-dependent memory[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(41): 16645-16650.

[18] Permpoonputtana K, Tangweerasing P, Mukda S, *et al.* Long-term administration of melatonin attenuates neuroinflammation in the aged mouse brain[J]. *EXCLI J*, 2018, 17: 634-646.

[19] Zhao H F, Li Q, Pei X R, *et al.* Long-term ginsenoside administration prevents memory impairment in aged C57BL/6J mice by up-regulating the synaptic plasticity-related proteins in hippocampus[J]. *Behav Brain Res*, 2009, 201(2): 311-317.

[20] Hempstead B L. Brain-derived neurotrophic factor: Three ligands, many actions[J]. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2015, 126: 9-19.

[21] Harrisberger F, Smieskova R, Schmidt A, *et al.* BDNF Val66Met polymorphism and hippocampal volume in neuropsychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2015, 55: 107-118.

[22] Gorski J A, Balogh S A, Wehner J M, *et al.* Learning deficits in forebrain-restricted brain-derived neurotrophic factor mutant mice[J]. *Neuroscience*, 2003, 121(2): 341-354.

[23] Bae J S, Han M, Shin H S, *et al.* *Lycopersicon esculentum* extract enhances cognitive function and hippocampal neurogenesis in aged mice[J]. *Nutrients*, 2016, 8(11): 679.

[24] Buhusi M, Etheredge C, Granholm A C, *et al.* Increased hippocampal ProBDNF contributes to memory impairments in aged mice[J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9: 284.