



银杏叶提取物对 MPTP 诱导帕金森小鼠保护作用的研究

李金凤¹, 徐桂梅², 张辰子¹, 费帆¹, 杨林¹, 代路路¹, 孙侠¹, 邝少松¹

(1. 广东省医学实验动物中心, 广东 佛山 528248; 2. 增城市妇幼保健院, 广东 增城 511300)

【摘要】目的 观察银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, GBE)对1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导不同年龄段的帕金森(parkinson's disease, PD)小鼠的防治作用。**方法** 将8周龄及32周龄各60只C57BL/6小鼠随机分为阴性组,模型组,GBE给药高、中、低剂量组及阳性组,采用腹腔注射MPTP法制备PD动物模型,采用银杏叶提取物进行灌胃治疗。运用爬杆、悬挂和游泳实验检测小鼠肢体运动功能,采用分光光度法测定小鼠脑组织超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)含量,采用免疫组化法观察小鼠大脑黑质酪氨酸羟化酶(TH)及纹状体多巴胺转运蛋白(DAT)阳性细胞数目的变化。**结果** (1)与阴性对照组比较,8周龄模型组小鼠运动功能得分、大脑GSH-Px活性、黑质TH阳性细胞及纹状体DAT阳性细胞平均光密度值均显著下降,脑组织MDA含量显著升高,说明PD模型复制成功。与模型组比较,银杏叶提取物给药组8周龄小鼠运动功能得分、SOD与GSH-Px活性、黑质TH阳性细胞平均光密度值均显著提高,MDA含量显著下降。(2)与阴性对照组比较,32周龄模型组小鼠运动功能得分、黑质TH阳性细胞以及纹状体DAT阳性细胞平均光密度值均显著下降,SOD与GSH-Px活性降低,脑组织MDA含量升高,说明模型复制成功。与模型组比较,银杏叶提取物给药组32周龄小鼠运动功能得分、SOD活性、黑质TH及纹状体DAT阳性细胞平均光密度值均显著提高,脑组织MDA含量显著下降。**结论** 银杏叶提取物对MPTP诱导的不同年龄段PD小鼠有一定的防治作用。

【关键词】 银杏叶提取物;帕金森病;MPTP;氧化应激;神经元

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 01-0046-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2016.001.009

Protective effect of ginkgo biloba extract on mouse with parkinson's disease induced by MPTP

LI Jin-feng¹, XU Gui-mei², ZHANG Chen-zi¹, FEI Fan¹, YANG Lin¹, DAI Lu-lu¹, SUN Xia¹, KUANG Shao-song¹

(1. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Guangdong Foshan 528248, China;

2. Zengcheng maternal and Child Health Hospital, Guangdong Zengcheng 511300, China)

【Abstract】 Objective To investigate the therapeutical effect of Ginkgo Biloba extract (GBE) on different ages of parkinsono Biloba e (PD) mice that induced by MPTP. **Methods** Sixty adult mice (8 weeks) and sixty older mice (32 weeks) were randomly divided into 6 groups: negative group, model group, positive group, high, medium and low dose GBE group. PD animal model were built through injecting with MPTP and then treated with different drugs accordingly. The limb motor function of mice were tested by using pole-climbing, hanging and swimming test. The activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and the content of malondialdehyde (MDA) in the brain tissue were measure using spectro photography. The number of positive neurons expressing tyrosine hydroxylase (TH) in substantial nigra pars compacta and dopamine transporters (DAT) in striatum were detected by using the method of

[基金项目] 广东省中医药局课题项目(20122199);广东省科技计划项目(2013B060300033)。

[作者简介] 李金凤(1986-)女,硕士,实习研究员,研究方向:实验动物与动物实验模型。

[通讯作者] 邝少松(1973-)女,硕士,高级兽医师,研究方向:实验动物药理、毒理学研究。E-mail: kuangss@126.com。

immunohistochemistry. **Results** 1. The motor function score, the activity of GSH-Px, and the mean optical density of TH and DAT in brain tissues of model group of 8 weeks significantly decreased compared with negative group, while the content of MDA was significantly raised, showing the model of PD was successfully established. The function score, the activities of SOD and GSH-Px, the mean optical density of TH and DAT in brain tissues of the GBE treatment group significantly raised compared with the model group, while the content of MDA was significantly decreased. 2. The motor function score, the activity of GSH-Px, and the mean optical density of TH and DAT in brain tissues of model group of 32 weeks significantly decreased compared with negative group, while the content of MDA was significantly raised, showing the model of PD was successfully established. The function score, the activities of SOD and GSH-Px, the mean optical density of TH and DAT in brain tissues of the GBE treatment group significantly raised compared with the model group, while the content of MDA was significantly decreased. **Conclusions** The preventive medication of GBE shows a protective effect on mice of different ages with PD induced by MPTP.

【Key words】 Ginkgo biloba extract; Parkinson's disease; MPTP; Oxidative stress; Neuron

帕金森病 (parkinson's disease, PD) 是一种慢性神经系统退行性疾病,以中脑黑质多巴胺能神经元选择性丢失为特征,进而导致纹状体多巴胺水平降低,引发一系列典型症状如震颤、肌肉强直和运动障碍等^[1]。银杏叶提取物 (ginkgo biloba extract, GBE) 主要有效成分为黄酮类和萜类内酯化合物,药理研究表明它具有很好的神经保护作用^[2-3]。本实验以 MPTP 制备不同年龄段的 PD 小鼠模型,观察银杏叶提取物对模型小鼠学习记忆能力、抗氧化作用、黑质 TH 阳性神经元和纹状体 DAT 阳性神经纤维变化的影响,探讨银杏叶提取物对 MPTP 诱导的不同年龄段的帕金森模型小鼠神经元保护的作用机制,为开发具有抗 PD 作用的天然药物提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,8 周龄 60 只,体重 18~22 g,32~36 周龄 60 只,体重 27~33g,由广东省医学实验动物中心提供【SCXK(粤)2013-0002】,饲养在广东省医学实验动物中心 SPF 级动物实验室【SYXK(粤)2013-0002】。实验开始时,把 8 周龄及 32 周龄各 60 只小鼠随机分为阴性组,模型组,银杏叶提取物给药高、中、低剂量组,阳性对照组 6 个组,每个年龄每组各 10 只。每日观察动物一般状态表现并记录动物行为变化,每周记录小鼠的体重。

1.2 仪器与试剂

生物组织自动染色机(孝感宏业医用仪器有限公司);石蜡切片机(德国 Leica 公司);荧光病理图像分析系统(日本 Olympus 公司);全波长酶标仪(美国 Thermfisher 公司);台式高速离心机(德国 Eppendorf 股份有限公司);银杏叶提取物滴剂(德国

威玛舒培博士药厂);美多芭(多巴丝肼片)(上海罗氏制药有限公司);1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 MPTP(广州春岚生物制品有限公司);多聚甲醛(天津市福晨化学试剂厂);超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程技术有限公司);其余试剂均为国产市售分析纯。

1.3 预处理及治疗给药方法

银杏叶给药组给予 GBE 灌胃治疗,给药浓度分别为高剂量组 60 mg/kg、中剂量组 40 mg/kg、低剂量组 20 mg/kg^[3-4]。阳性药物对照组小鼠灌胃给予美多芭,给药浓度为 75 mg/kg^[5],模型组与阴性对照组小鼠灌胃生理盐水。各组均按照 0.1 mL/10g 体重给药,1 次/d,连续 12 d。从灌胃治疗第 8 天起进行造模给药,各组均于 MPTP 造模给药后 30 min 内完成灌胃治疗。

1.4 造模给药方法

采用腹腔注射 MPTP 的方法制备动物模型。GBE 给药组、阳性药物对照组及模型组给予 MPTP (30 mg/kg)^[6] 腹腔注射,注射量为 0.1 mL/10g,1 次/d 连续 7 d,制备 PD 小鼠模型,阴性组给予生理盐水腹腔注射。

1.5 行为学检查

1.5.1 爬杆试验

将一直径为 25 cm 的软木小球固定于一根长 50 cm 粗 1 cm 的木杆顶端,木杆上缠上纱布以防打滑,然后将被测小鼠放到小球上,并记录小鼠从小球上下来、小鼠爬完杆子上半部分、小鼠爬完杆子下半部分各段所用时间,然后按以下标准记分:3 s 内完成上述某一动作的记 3 分;6 s 内完成的记 2 分;超过 6 s 的记 1 分。每只小鼠测 5 次,每次检测间隔 3 min,记录每只小鼠总得分情况,并作统计学分析。

1.5.2 悬挂实验

将小鼠悬挂于一水平电线上,如小鼠用两后爪抓住电线则记 3 分,如用一后爪抓住电线则记 2 分,如果小鼠两后爪均抓不住电线则记 1 分,每只小鼠测 5 次,每次检测间隔 3 min,最后记录每只小鼠总得分情况,并作统计学分析。

1.5.3 游泳试验

将受试小鼠放入一个 20 × 30 × 20 cm 规格的水箱中,水温为 32 ~ 35℃,评分标准如下:在受试时间 2 min 内能连续不断游泳者记 3 分,大部分时间游泳仅偶尔漂浮者记 2.5 分,漂浮时间占整个受试时间 50% 以上者记 2 分,偶尔游泳者记 1.5 分,偶尔用后肢游动并漂浮在一边者记 1 分。每只小鼠测 3 次,每次检测间隔 3 min,最后计算总得分情况,并作统计学分析。

1.6 氧化应激指标检测

行为检测后,采用脱颈法迅速断头取脑,玻璃匀浆器制成 10% 脑组织匀浆, -80℃ 保存备用。实验时用 Bradford 法定量蛋白,按试剂盒说明检测脑组织中 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量。

1.7 免疫组织化学检测

行为学检测后各组小鼠断头处死,迅速取出大脑,一半迅速放入 4% 多聚甲醛中固定,常规制备石蜡切片,用于免疫组织化学染色;一半仔细分离皮层和海马, -80℃ 保存,用于免疫组织化学检测黑质 TH 阳性神经元和纹状体 DAT 阳性神经纤维的变化。用低倍和高倍镜观察切片,阳性细胞为镜下组织细胞结构清晰、细胞内有棕黄色沉着、染色明显高于背景的细胞,用 OLYMPUS BX41 显微镜拍照。用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统分析 TH、DAT 的平均光密度值。

1.8 统计方法

应用 SPSS 20.0,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,行为学与氧化应激结果组间比较采用单因素方差分析,病理学检测结果组间采用方差分析 Tamhane 比较。

2 结果

2.1 小鼠行为学表现

小鼠注射 MPTP 后立刻出现全身震颤、竖毛、尾僵直、步态不稳、活动能力减弱等症状,8 周龄小鼠持续 20 ~ 30 min 后逐渐减轻,32 周龄小鼠持续 50 ~ 60

min 后逐渐减轻,两组年龄段的小鼠 24 h 后基本恢复正常。随着给药次数的增加,上述各种急性反应表现基本无太大变化,但 24 h 后 32 周龄小鼠活动能力减弱、四肢僵硬、反应迟缓的表现越来越明显。

2.2 小鼠肢体运动功能测定结果

如表 2 所示,与阴性对照组比较,两个年龄段的模型组小鼠爬杆、悬挂和游泳实验得分均显著降低 ($P < 0.05$),提示造模成功。在爬杆实验中,8 周龄 GBE 给药组与阳性对照组、32 周龄 GBE 低剂量组与阳性对照组小鼠的肢体协调能力均明显提高 ($P < 0.05, P < 0.01$);在悬挂实验中,两个年龄段的 GBE 高剂组小鼠的悬挂能力均明显增强 ($P < 0.05, P < 0.01$);在游泳实验中,8 周龄 GBE 低剂量组与阳性对照组小鼠游泳得分显著提高 ($P < 0.01$),32 周龄 GBE 低剂量组、GBE 中剂量组及阳性对照小鼠游泳得分显著提高 ($P < 0.05$)。

2.3 小鼠脑组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量测定结果

如表 3 所示,与阴性对照组比较,8 周龄模型组小鼠的 GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.01$),MDA 含量明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,8 周龄 GBE 低剂量组小鼠 GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.05$),MDA 含量降低,但没有统计学意义;8 周龄 GBE 中剂量组、阳性对照组小鼠 SOD、GSH-Px 活性均显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$),而 MDA 含量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。32 周龄 GBE 中剂量组小鼠 SOD、GSH-Px 活性有不同程度的提升,MDA 含量明显降低 ($P < 0.01$);32 周龄 GBE 高剂量组小鼠 SOD 活性显著提高 ($P < 0.05$),MDA 含量明显降低 ($P < 0.01$)。

2.4 小鼠大脑黑质 TH、纹状体 DAT 的表达,

2.4.1 黑质 TH 的表达结果

如表 4 所示,与阴性对照组比较,两个年龄段模型组小鼠大脑黑质 TH 平均光密度值均显著降低 ($P < 0.01$),TH 阳性细胞数显著减少(图 1B、图 1H)。与模型组比较,8 周龄 GBE 给药组、阳性对照组小鼠大脑黑质 TH 平均光密度值均显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$),TH 阳性细胞数目显著增加(图 1C-1F);32 周龄 GBE 高剂量组小鼠大脑黑质 TH 平均光密度值显著升高 ($P < 0.01$),TH 阳性细胞数显著增加(图 1I),32 周龄 GBE 低剂量组、GBE 中剂量组及阳性对照组 TH 光密度值有所增加,但无统计学意义,TH 阳性细胞数较模型组多(图 1J-1K)。

表 1 小鼠运动功能测定结果比较($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Motor function test results of mice($\bar{x} \pm s$)

组别 group	n	爬杆实验得分 pole-climbing test score	悬挂实验得分 hanging test score	游泳实验得分 swimming test score
8 周龄阴性对照组 8 weeks negative group	10	27.20 ± 6.88	7.20 ± 6.37	7.95 ± 0.80
8 周龄模型组 8 weeks model group	10	21.30 ± 4.95 [▲]	1.70 ± 1.89 [▲]	7.10 ± 1.58 [▲]
8 周龄 GBE 低剂量组 8 weeks low dose GBE group	10	26.60 ± 6.15 [#]	4.44 ± 4.33	8.17 ± 0.75 ^{##}
8 周龄 GBE 中剂量组 8 weeks medium dose GBE group	10	30.30 ± 7.92 ^{##}	5.11 ± 6.97	7.72 ± 1.23
8 周龄 GBE 高剂量组 8 weeks high dose GBE group	9	29.33 ± 8.60 ^{##}	9.00 ± 8.93 ^{##}	7.85 ± 0.58
8 周龄阳性对照组 8 weeks positive group	8	35.63 ± 8.42 ^{##}	5.33 ± 3.67	8.39 ± 0.49 ^{##}
32 周龄阴性对照组 32 weeks negative group	10	30.10 ± 6.79	6.50 ± 3.81	8.10 ± 0.70
32 周龄模型组 32 weeks model group	9	23.56 ± 2.19 [▲]	1.44 ± 1.01 [▲]	7.39 ± 0.82 [▲]
32 周龄 GBE 低剂量组 32 weeks low dose GBE group	5	34.80 ± 5.31 ^{##}	3.20 ± 1.64	8.40 ± 0.42 [#]
32 周龄 GBE 中剂量组 32 weeks medium dose GBE group	8	27.88 ± 6.98	4.38 ± 2.62	8.38 ± 0.52 [#]
32 周龄 GBE 高剂量组 32 weeks high dose GBE group	6	27.67 ± 2.25	6.43 ± 2.51 [#]	8.21 ± 0.49
32 周龄阳性对照组 32 weeks positive group	6	31.83 ± 5.64 [#]	5.57 ± 2.64	8.50 ± 0.50 [#]

注:模型对照组与阴性对照组比较, [▲] $P < 0.05$; GBE 给药组或阳性对照组与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ 。

Note: MPTP group vs the control group, [▲] $P < 0.05$; GBE group or positive control group vs MPTP group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

表 2 小鼠脑组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量测定结果比较($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 SOD、GSH-Px activity and MDA content in brain tissue of mice ($\bar{x} \pm s$)

组别 group	n	1% 脑匀浆 SOD 含量 SOD content of 1% brain homogenate (U/mL)	10% 脑匀浆 GSH-Px 含量 GSH-Px content of 10% brain homogenate (U/mg prot)	1% 脑匀浆 MDA 含量 MDA content of 1% brain homogenate (nmol/mg prot)
8 周龄阴性对照组 8 weeks negative group	9	124.07 ± 8.25	61.42 ± 6.17	1.58 ± 0.10
8 周龄模型组 8 weeks model group	10	113.49 ± 15.04	51.23 ± 7.22 ^{▲▲}	1.86 ± 0.38 [▲]
8 周龄 GBE 低剂量组 8 weeks low dose GBE group	9	118.69 ± 12.07	59.79 ± 7.65 [#]	1.74 ± 0.41
8 周龄 GBE 中剂量组 8 weeks medium dose GBE group	8	126.67 ± 10.44 [#]	59.15 ± 11.99 [#]	1.37 ± 0.14 ^{##}
8 周龄 GBE 高剂量组 8 weeks high dose GBE group	10	125.07 ± 11.24	58.34 ± 6.92	1.74 ± 0.35
8 周龄阳性对照组 8 weeks positive group	8	127.13 ± 20.65 [#]	63.34 ± 10.74 ^{##}	1.53 ± 0.33 [#]
32 周龄阴性对照组 32 weeks negative group	10	125.03 ± 13.53	56.77 ± 5.97	2.03 ± 0.39
32 周龄模型组 32 weeks model group	9	116.60 ± 18.99	53.60 ± 10.08	1.78 ± 0.26
32 周龄 GBE 低剂量组 32 weeks low dose GBE group	5	108.24 ± 13.57	58.57 ± 6.07	1.49 ± 0.13
32 周龄 GBE 中剂量组 32 weeks medium dose GBE group	8	127.07 ± 10.29	59.56 ± 4.38	1.32 ± 0.12 ^{##}
32 周龄 GBE 高剂量组 32 weeks high dose GBE group	8	130.89 ± 17.27 [#]	59.05 ± 11.27	1.33 ± 0.17 ^{##}
32 周龄阳性对照组 32 weeks positive group	5	120.32 ± 3.70	53.03 ± 6.03	1.86 ± 0.36

注:模型对照组与阴性对照组比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$; GBE 给药组或阳性对照组与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ 。

Note: MPTP group vs the control group, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$; GBE group or positive control group vs MPTP group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

2.4.2 纹状体 DAT 的表达结果

如表 4 所示,与阴性对照组比较,两个年龄段模型组小鼠大脑纹状体尾壳核 DAT 平均光密度值均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),DAT 阳性细胞显著减少(图 2B、图 2H)。与模型组比较,8 周龄 GBE 给药组与阳性对照组小鼠大脑纹状体尾壳核 DAT 平均光密度值没有统计学意义,DAT 阳性细胞数增加不明显(图 2C-2F);32 周龄 GBE 高剂量组小鼠大脑纹状体尾壳核 DAT 平均光密度值显著升高($P < 0.05$),DAT 阳性细胞数显著增加(图 2L),DAT 阳性细胞数增加不明显(图 2I-2K)。

3 讨论

PD 是发病率仅次于阿尔茨海默病(alzheimer's

disease, AD)的好发于中老年人第二大神经退行性疾病,临床常见症状有运动迟缓、静止性震颤、肌强直和姿势步态障碍。MPTP 是人工合成毒品的副产物,MPP⁺是其活性代谢产物,其可以选择性抑制线粒体复合物 I,诱导氧化应激,导致细胞死亡^[7]。MPTP 诱导的 C57BL/6 小鼠是目前学术界广泛运用并得到公认的研究 PD 的经典模型^[8]。由于不同周龄的 C57BL/6 小鼠对于 MPTP 的敏感程度有明显的差异^[9],为使实验结果更具参考价值,本实验选用了不同年龄段的小鼠作为研究对象。通过爬杆、悬挂和游泳实验分别检测 8 周龄和 32 周龄 PD 小鼠的运动协调功能,研究发现银杏叶提取物(GBE)能够显著增强不同年龄段 PD 小鼠的肢体协调能力,推测其对 PD 的症状具有改善作用。

表 3 小鼠大脑黑质 TH 与纹状体 DAT 表达的平均光密度值比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 The mean optical density of TH and DAT expression in brain tissues of mice($\bar{x} \pm s$)

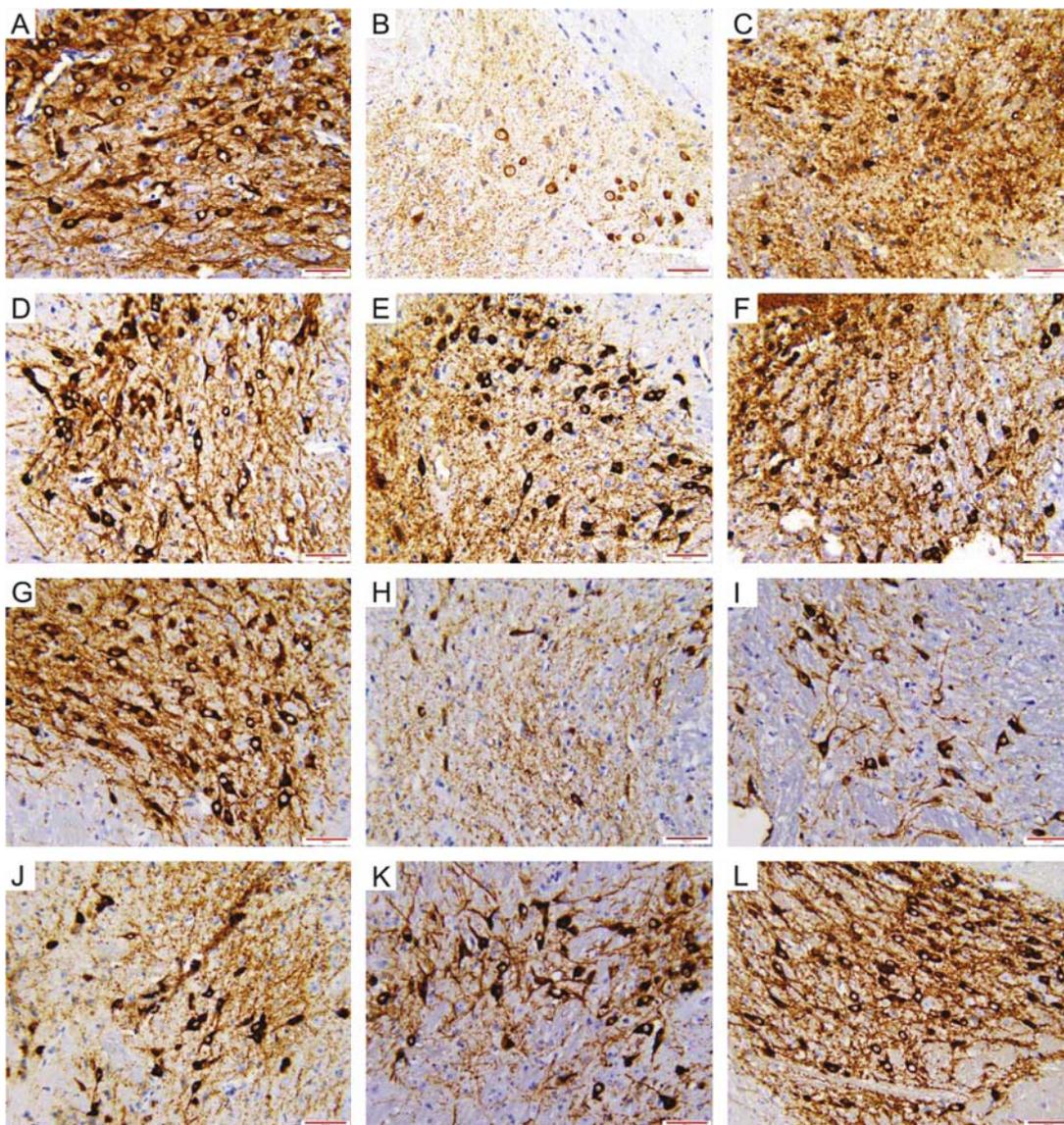
组别 group	n	黑质 TH 平均光密度值 TH mean optical density in substantia nigra pars compacta	纹状体尾壳核 DAT 平均光密度值 DAT mean optical density in striatum
8 周龄阴性对照组 8 weeks negative group	10	0.588 ± 0.054	0.199 ± 0.068
8 周龄模型组 8 weeks model group	10	0.372 ± 0.024 ^{▲▲}	0.081 ± 0.007 [▲]
8 周龄 GBE 低剂量组 8 weeks low dose GBE group	9	0.517 ± 0.056 ^{##}	0.081 ± 0.004
8 周龄 GBE 中剂量组 8 weeks medium dose GBE group	8	0.527 ± 0.068 [#]	0.084 ± 0.016
8 周龄 GBE 高剂量组 8 weeks high dose GBE group	9	0.528 ± 0.069 ^{##}	0.087 ± 0.017
8 周龄阳性对照组 8 weeks positive group	9	0.526 ± 0.066 ^{##}	0.086 ± 0.019
32 周龄阴性对照组 32 weeks negative group	10	0.559 ± 0.043	0.195 ± 0.042
32 周龄模型组 32 weeks model group	9	0.379 ± 0.026 ^{▲▲}	0.082 ± 0.015 ^{▲▲}
32 周龄 GBE 低剂量组 32 weeks low dose GBE group	5	0.493 ± 0.039	0.081 ± 0.019
32 周龄 GBE 中剂量组 32 weeks medium dose GBE group	8	0.495 ± 0.064	0.113 ± 0.030
32 周龄 GBE 高剂量组 32 weeks high dose GBE group	8	0.535 ± 0.053 ^{##}	0.158 ± 0.037 [#]
32 周龄阳性对照组 32 weeks positive group	6	0.468 ± 0.087	0.109 ± 0.033

注:模型对照组与阴性对照组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;GBE 给药组或阳性对照组与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

Note: MPTP group vs the control group,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$; GBE group or positive control group vs MPTP group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

已有研究表明,氧自由基与 PD 发病密切相关^[10],SOD 及 GSH-Px 在清除自由基方面具有重要作用,其活性的降低会加剧自由基对神经的毒性作用^[11]。MDA 含量是反应氧自由基水平的重要指

标,可间接反映细胞损伤的程度。本研究中显示,银杏叶提取物(GBE)给药组小鼠的 SOD、GSH-Px 活性较模型组小鼠有不同程度的提高,MDA 水平下降,提示 GBE 可能通过增加脑组织抗氧化酶的含量



注:A:8 周龄阴性对照组;B:8 周龄模型组;C:8 周龄阳性对照组;D:8 周龄 GBE 低剂量组;E:8 周龄 GBE 中剂量组;F:8 周龄 GBE 高剂量组;G:32 周龄阴性对照组;H:32 周龄模型组;I:32 周龄阳性对照组;J:32 周龄 GBE 低剂量组;K:32 周龄 GBE 中剂量组;L:32 周龄 GBE 高剂量组。

图 1 PD 小鼠大脑黑质 TH 表达水平(标尺 = 50 μm)

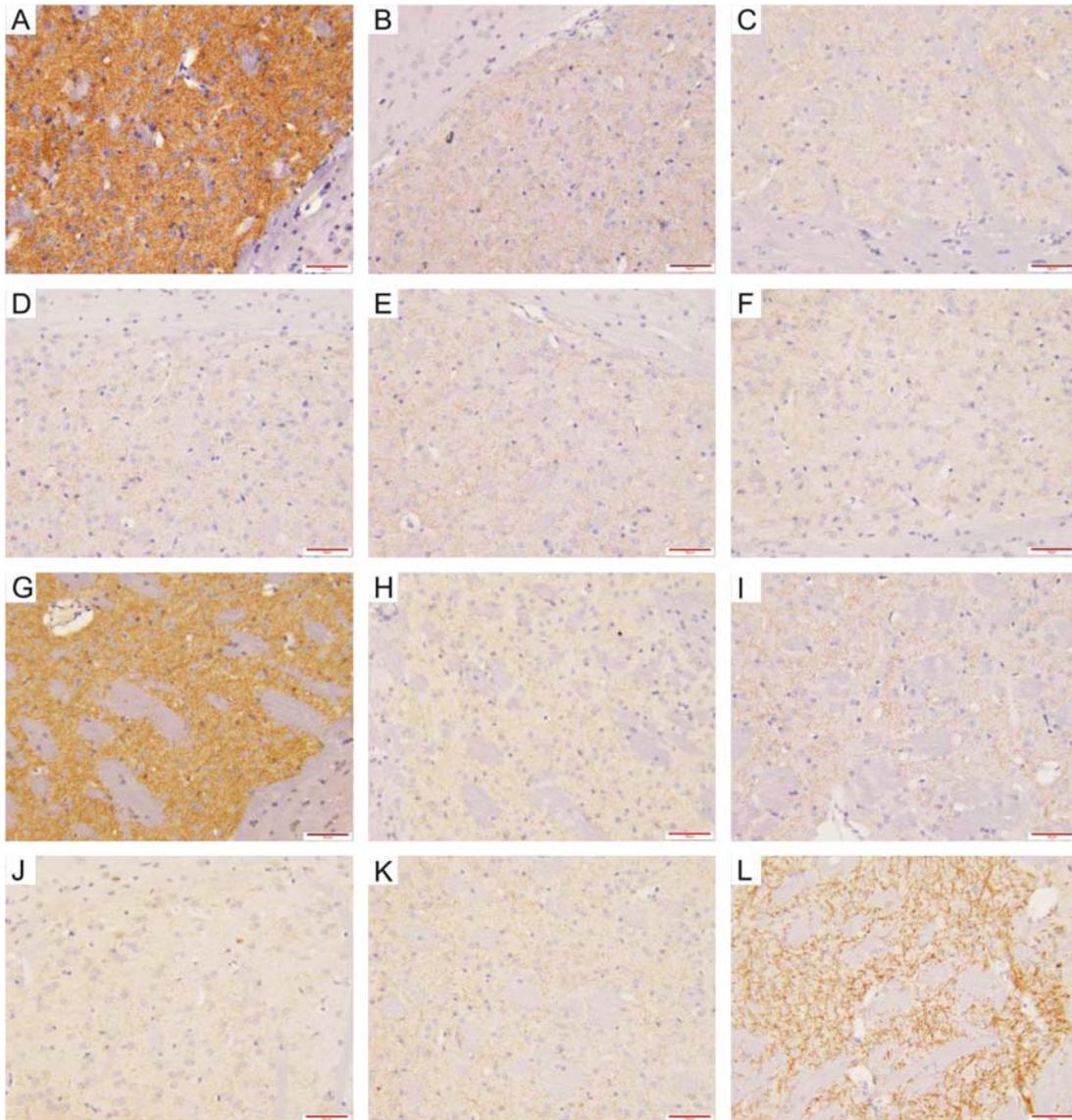
Note:A:8 weeks negative group;B:8 weeks model group;C:8 weeks positive group;D:8 weeks low dose GBE group; E:8 weeks medium dose GBE group;F:8 weeks high dose GBE group; G:32 weeks negative group;H:32 weeks model group;I:32 weeks positive group;J:32 weeks low dose GBE group;K:32 weeks medium dose GBE group; L:32 weeks high dose GBE group.

Fig. 1 TH expression in substantia nigra pars compacta of PD mice(Bar = 50 μm)

来提高机体的抗氧化能力,保护脂质免受病理性过氧化损伤,显著改善 MPTP 诱导的帕金森病的氧化应激状态。MDA 测定结果显示,相对于 8 周龄小鼠,GBE 对 32 周龄小鼠的抗氧化能力改善更为显著。

酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是儿茶酚胺类神经递质及多巴胺、去甲肾上腺素、肾上腺

素生物合成过程所需的限速酶。大脑多巴胺能神经元可以从细胞外摄取酪氨酸,在胞浆内经 TH 催化形成左旋多巴,再经芳香族氨基酸脱羧酶催化形成多巴胺(dopamine, DA)。DA 是一种儿茶酚胺类神经传导物质,是用来帮助细胞传送脉冲的化学物质,主要负责大脑的愉悦和奖赏,将兴奋及开心的信息传递,在处理身体的学习、记忆、注意力、运动、



注:A:8 周龄阴性对照组;B:8 周龄模型组;C:8 周龄阳性对照组;D:8 周龄 GBE 低剂量组;E:8 周龄 GBE 中剂量组;F:8 周龄 GBE 高剂量组;G:32 周龄阴性对照组;H:32 周龄模型组;I:32 周龄阳性对照组;J:32 周龄 GBE 低剂量组;K:32 周龄 GBE 中剂量组;L:32 周龄 GBE 高剂量组。

图 2 PD 小鼠大脑纹状体 DAT 表达水平(标尺 = 50 μm)

Note:A:8 weeks negative group;B:8 weeks model group;C:8 weeks positive group;D:8 weeks low dose GBE group;E:8 weeks medium dose GBE group;F:8 weeks high dose GBE group;G:32 weeks negative group;H:32 weeks model group;I:32 weeks positive group;J:32 weeks low dose GBE group;K:32 weeks medium dose GBE group;L:32 weeks high dose GBE group.

Fig. 2 DAT expression in striatum of PD mice(Bar = 50 μm)

新陈代谢中发挥重要作用。TH 是 DA 能神经元的特有酶,染色阳性标志细胞存活,其 TH 阳性神经元数可直观反映脑内 DA 含量^[12]。本实验两个年龄段 PD 小鼠的 TH 免疫阳性染色结果均显示,阴性对照组小鼠 TH 阳性细胞丰富,细胞胞体着色均匀,突起丰富,PD 模型组小鼠 TH 阳性细胞数量呈明显的丢失,银杏叶提取物给药组多巴胺能神经细胞没有

明显的丢失,随着给药浓度的升高,阳性细胞数呈递增趋势,提示银杏叶提取物减轻了 MPTP 对多巴胺能神经元的毒性作用,TH 阳性细胞平均光密度值结果显示,银杏叶提取物对 8 周龄小鼠的治疗效果更明显。

DAT 是位于 DA 能神经元突触前膜的一种膜蛋白分子,属于 Na^+/Cl^- 依赖性转运蛋白,PD 患者

脑内 DAT 水平的降低与 DA 能神经元减少呈正相关^[13]。DAT 能够通过重摄取机制把 DA 重吸收进细胞,以确保 DA 不会不受限制的过多产生,DAT 的水平是 DA 能神经元最为特异的标记物,已成为诊断早期 PD 的敏感指标^[11]。本实验结果显示,模型组小鼠脑组织纹状体内 DAT 平均光密度值显著降低,DAT 阳性细胞数明显减少,而给予不同浓度的银杏叶提取物治疗后,其减少得到不同程度的抑制,并呈剂量依赖性,说明银杏叶提取物能在一定程度上减轻 MPTP 对小鼠脑组织的病理损伤,DAT 阳性细胞平均光密度值结果显示,银杏叶提取物对 32 周龄小鼠的治疗效果更明显。

本实验中,银杏叶提取物(GBE)显著改善了 PD 小鼠的行为协调能力,显著增强了 PD 小鼠抗氧化应激能力,明显抑制了 MPTP 诱导的 TH 阳性细胞和 DAT 阳性细胞的减少,对 PD 有一定的神经保护作用。

参考文献:

- [1] Liu SM, Li XZ, Huo Y, *et al.* Protective effect of extract of *Acanthopanax senticosus* harms on dopaminergic neurons in Parkinson s disease mice[J]. *Phytomedicine*,2012,19(7):631 - 638.
- [2] 巴晓红,刘英. 银杏叶提取物及银杏总内酯对帕金森病大鼠黑质神经元损伤的保护作用[J]. *中国临床康复*,2006,10(11):39 - 41.
- [3] 杨赣军,张建平,李庆耀. 银杏叶提取物对帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元保护作用研究[J]. *四川解剖学杂志*,2009,17(1):36 - 37.
- [4] 孙红梅,张琳,关涛,等. 银杏叶提取物促进帕金森病模型小鼠室管膜下区神经干细胞增殖作用的研究[J]. *世界中西医结合杂志*,2008,3(9):518 - 520.
- [5] 余凌虹,魏怀玲,鲍秀琦,等. 番荔枝酰胺衍生物 FLZ 对 LPS 联合 MPTP 诱发小鼠慢性帕金森病的治疗作用[J]. *药学报*. 2013,48(10):1557 - 1562.
- [6] 刘树民,张琳,于海龙. MPTP 对小鼠帕金森病造模条件探讨[J]. *中国实验动物学报*. 2007, 15(2):146 - 149.
- [7] Przedborski S, Tieu K, Perier C, *et al.* MPTP as a Mitochondrial Neurotoxic Model of Parkinson 's Disease [J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*,2004,36:375 - 379.
- [8] Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, *et al.* . Classic and new animal models of Parkinson 's disease [J]. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*,2012,2012:845618.
- [9] 舒丹,何金彩,陈江帆. 不同周龄组的 C57BL 小鼠多巴胺神经元对 MPTP 敏感性的对比及其机制探讨[J]. *实用医学杂志*, 2007,23(6):807 - 809.
- [10] 冯卫红,刘耕陶. 帕金森病与氧自由基[J]. *中国药理学通报*, 2000,16(5):481 - 484.
- [11] 陈生弟,乐卫东,陈先文,周海燕. 帕金森病[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:59 - 73.
- [12] YUAN H, SARRE S, EBINGER G, *et al.* Histological, behavioural and neurochemical evaluation fo medil forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson 's diseases[J]. *J Neurosci Methods*,2005,144(1):35 - 45.
- [13] Gonzalo E. The dopamine transporter proteome[J]. *Journal of Neurochem*,2006,97:3 - 10.

[修回日期] 2015-10-21