

# 银杏叶提取物对阿尔茨海默病患者认知功能的效果及其对相关因子的影响

黄建申 沈英生 黄金武

(南京军区福州总医院第一附属医院,莆田,351100)

**摘要** 目的:观察银杏叶提取物对阿尔茨海默病患者认知功能的改善效果以及探讨其部分作用机制。方法:将本院2013年1月至2014年1月收治的80例阿尔茨海默病患者随机分为对照组和观察组各40例。2组患者均口服盐酸多奈哌齐,1次/d,10 mg/次。在此基础上观察组患者加用银杏叶提取物注射液,2组均连续治疗3个月,分别比较2组患者治疗前、治疗1个月及治疗3个月后简易精神状态量表(MMSE)、画钟试验积分(CDT)、日常生活能力积分(ADL)的变化,以及检测2组患者治疗前后外周血清cAMP-PKA-CREB信号通路上标志性蛋白cAMP、PKA及CREB浓度的变化。结果:1)2组患者治疗前MMSE、CDT及ADL的积分差异无统计学意义( $P>0.05$ ),治疗1个月后2组患者MMSE、CDT及ADL积分较治疗前有所提升( $P<0.05$ ),组间差异无统计学意义( $P>0.05$ );治疗3个月后2组患者MMSE、CDT及ADL积分进一步改善,其中观察组改善的幅度明显高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。2)使用Elisa法检测cAMP、PKA浓度,用Western blotting检测CREB浓度,治疗前2组患者cAMP、PKA、CREB蛋白水平差异无统计学意义( $P>0.05$ ),治疗3个月后观察组患者外周血清cAMP、PKA、CREB蛋白浓度均明显高于对照组( $P<0.05$ )。结论:银杏叶提取物可改善阿尔茨海默病患者认知能力,其作用机制可能通过介导cAMP-PKA-CREB信号通路有关。

**关键词** 阿尔茨海默病;认知功能;银杏叶提取物;cAMP-PKA-CREB信号通路

## Effect of Ginkgo biloba extract on Cognitive Function of Senile Dementia Patients and Its Effect on Related Factors

Huang Jianshen, Shen Yingwu, Huang Jinwu

(Fuzhou General Hospital First Affiliated Hospital of Nanjing Military Region, Putian 351100, China)

**Abstract Objective:** To observe the improvement effect of the ginkgo biloba extract on the cognitive function in the patients with senile dementia, and discuss its mechanism. **Methods:** A total of 80 senile dementia patients in our hospital during in January 2013-January 2014 were randomly divided into control group and observation group, 40 cases in each group. Both of the two groups orally took Donepezil HCL, once a day, 10 mg/time. The observation group additionally had ginkgo biloba extract injection on these basis, both two group had continuous treatment for 3 months and then compare the two groups' mini-mental state examination (MMSE), clock drawing task (CDT), activity of daily living (ADL) before treatment, and 1 month and 3 months after treatment, as well as detect two groups' concentration changes of iconic proteins cAMP, PKA and CREB in patients with peripheral serum cAMP-PKA-CREB signaling pathways before and after treatment. **Results:** 1) Integral differences of MMSE, CDT and ADL were showed no statistical significance in the two groups after the treatment ( $P>0.05$ ), the MMSE, CDT and ADL integral rose after 1 month's treatment in the two groups ( $P<0.05$ ), but there was no statistically significant differences between the two groups ( $P>0.05$ ); and 3 months after treatment, MMSE, CDT, ADL integral of the two groups further improved, which the improvement extent of observation group was significantly higher than the control group, the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). 2) The cAMP, PKA concentration detected by Elisa method, and CREB concentration by Western blotting test showed no statistically significant differences between the two groups ( $P>0.05$ ), but 3 months after treatment, cAMP, PKA, and CREB protein concentrations in peripheral blood in the treatment group were significantly higher than that of control group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Ginkgo biloba extract can improve the cognitive ability in patients with senile dementia, the mechanism may be related to cAMP-PKA-CREB signaling pathways.

**Key Words** Senile dementia; Cognitive function; Ginkgo biloba extract; cAMP-PKA-CREB signaling pathways

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.12.028

阿尔茨海默病是一种原因不明的进行性神经退行性疾病,其导致患者对外界的感知能力迟钝甚至

错乱,严重影响患者日常生活能力,所产生的伤害远大于器质性损伤<sup>[1-2]</sup>。根据最新流行病学调查研究

显示,全球约有1 000万阿尔茨海默病患者,年龄每增加5岁,患病率将增加2倍。因此改善阿尔茨海默病患者认知能力是目前临床刻不容缓的任务。

阿尔茨海默病属于中医学“呆病”“善忘”等范畴,近年来我们对国内外大量文献进行查阅,发现瘀血阻络是阿尔茨海默病患者的主要病机类型,因此我们认为活血化瘀是阿尔茨海默病患者的主要治则。银杏叶提取物注射液具有明显活血化瘀功能,可改善各类认知功能障碍,这一结果被诸多文献所证实,但其改善认知功能的作用机制尚未明了。近年来研究显示cAMP-PKA-CREB信号通路其通过参与管理神经元细胞的增殖凋亡,从而与神经系统的学习和记忆能力关系密切,因此我们设想:银杏叶提取物改善阿尔茨海默病患者认知功能是否通过cAMP-PKA-CREB信号通路进行桥接?因此本团队进行一系列临床观察研究,为目前热门的临床诊疗提供切实可行的依据。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 将本院2014年1月至2015年1月收治的80例阿尔茨海默病患者纳入研究,所有入组患者均符合2001年中华医学精神科分会颁布的《中国精神障碍分类和诊断标准》中关于阿尔茨海默病的相关诊断标准<sup>[3]</sup>。80例患者随机分为对照组和观察组各40例,2组患者在年龄、性别、病程等一般情况方面比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。见表1。

1.2 纳入标准 1)年龄 $\geq 60$ 岁;2)患者有记忆力减退、注意力不集中、行为紊乱、睡眠障碍等症状;3)近30d未服用改善认知药物;4)患者或家属签署知情同意书。

1.3 排除标准 1)年龄 $< 60$ 岁;2)有肝肾等重大脏器病变或合并肿瘤;3)全身性疾病等其他引发痴呆;4)患者或家属不予前述知情同意书者。

1.4 治疗方法 2组患者均口服盐酸多奈哌齐(安理申,卫材(中国)药业有限公司,国药准字H20050978),1次/d,10 mg/次,观察组在此基础上加用银杏叶提取物注射液(金纳多,台湾济生化学制药厂股份有限公司,国药准字HC20140019,5 mL/支),5 mL银杏叶提取物注射液+250 mL 0.9%氯化钠溶液,静脉滴注,1次/d。

## 1.5 观察指标及检测方法

### 1.5.1 简易精神状态量表(MMSE)量表评分<sup>[11]</sup>

该量表包括时间、空间定向力、迟记忆力、注意力及计算力,语言表达力等,总分为30分, $< 23$ 分为认

知功能缺陷。

1.5.2 画钟试验 要求患者在白纸上独立画出一个钟,并标出指定的8:25或9:10的位置,并且要求患者在10 min内完成。画钟试验积分(CDT)规定如下:画出闭锁圆圈得1分;将数字安放在表盘上正确位置得1分;表盘数字顺序正确得1分;指针位置安放正确得1分。

1.5.3 日常生活能力评分 日常生活能力积分(ADL)共有14项,包括2部分内容:1)躯体生活自理量表,共6项:如侧、进食、穿衣、梳洗、行走和洗澡;2)工具性日常生活能力量表,共8项:打电话、购物、备餐、做家务、洗衣、使用交通工具、服药和自理经济。

1.5.4 ELISA检测cAMP、PKA表达水平 1)采取患者肘静脉血4 mL,制备血清标本,充分分解,然后加样、稀释标本置于反应孔、加入待测样品,再加入IL-8抗体;2)温育洗涤后加入亲和链酶素-HRP,混匀温育30 min;3)洗涤4次后每孔加入底物A、B各50  $\mu$ L混匀,37  $^{\circ}$ C温育10 min,避免光照;4)取出酶标板,立即加入50  $\mu$ L终止液测定结果。

1.5.5 Western blotting检测CREB浓度 将外周血加入淋巴细胞分离液提取外周血单核细胞,利用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基将提取的细胞置于置于37  $^{\circ}$ C,5%  $\text{CO}_2$ 环境中培养4~6 h,随后以3 000 r/min,4  $^{\circ}$ C离心10 min,收集细胞,然后加入细胞裂解液,充分裂解后置于4  $^{\circ}$ C,12 000 r/min离心机离心10 min。取上清液获取总蛋白,再根据DAB方法对所提蛋白液进行浓度测定,之后以100  $\mu$ L蛋白液中加入25  $\mu$ L的上样缓冲液于100  $^{\circ}$ C金属浴中变性,接着可按照每泳道上样量为50  $\mu$ g蛋白,计算上样量,电泳(4%浓缩胶,12%分离胶,120 V,50 mA,1.5 h)结束后将凝胶取出,用PVDF膜转印,遵循胶在负极,膜在正极的原则,50 V,100 mA,2 h,5%脱脂奶粉液的封闭2 h,TBS洗3次,每次5 min,分别加入5%脱脂奶粉按1:1 000稀释的抗CREB和 $\beta$ -actin抗体(1:1 000),4  $^{\circ}$ C孵育过夜,TBS洗3次,每次5 min,加入碱性磷酸酶标记山羊抗兔IgG(1:2 000)室温2 h,TBS洗3次,每次5 min。将滤膜放入配好的显色液中显色15~30 min,计算机扫描图像,并由生物图像分析系统Bio-Rad公司,Model Gel Doc 2000,美国),分析处理。

1.6 统计学方法 所有结果均选择3个或3个以上数据,各实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应

用 SPSS 22.0 软件进行统计处理, 计量资料比较采用  $t$  检验和单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 银杏叶提取物注射液可提高患者的认知能力及日常生活能力 2 组患者治疗前 MMSE、CDT 及 ADL 的积分差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 治疗 1 个月后 2 组患者 MMSE、CDT 及 ADL 积分较治疗前有所提升 ( $P < 0.05$ ), 但组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 治疗 3 个月后 2 组患者 MMSE、CDT 及 ADL 积分进一步改善, 其中观察组改善的幅度明显高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 2 组患者一般资料比较

组别	例数	性别		年龄(岁)	病程(年)
		男	女		
观察组	40	21	19	66.9 ± 4.1	3.95 ± 3.2
对照组	40	20	20	66.1 ± 3.9	4.01 ± 3.6
$P$		0.42		0.36	0.27
$\chi^2$		4.11		5.09	3.64

表 2 2 组 MMSE 评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 分)

组别	MMSE 评分		
	治疗前	治疗后 1 个月	治疗后 3 个月
观察组	15.3 ± 2.1	18.1 ± 2.2*	24.3 ± 1.7*
对照组	14.1 ± 2.9	19.2 ± 1.1* <sup>△</sup>	20.6 ± 2.3* <sup>△▲</sup>

注: \*表示与治疗前比较  $P < 0.05$ ; <sup>△</sup>表示与同时期对照组比较  $P < 0.05$ ; <sup>▲</sup>表示与同组治疗后 1 个月比较  $P < 0.05$ 。

表 3 2 组 CDT 评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 分)

组别	CDT 评分		
	治疗前	治疗后 1 个月	治疗后 3 个月
观察组	1.12 ± 0.23	2.06 ± 0.8*	3.12 ± 1.17*
对照组	1.09 ± 0.49	2.11 ± 0.5* <sup>△</sup>	2.36 ± 1.28* <sup>△▲</sup>

注: \*表示与治疗前比较  $P < 0.05$ ; <sup>△</sup>表示与同时期对照组比较  $P < 0.05$ ; <sup>▲</sup>表示与同组治疗后 1 个月比较  $P < 0.05$ 。

表 4 2 组 ADL 评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 分)

组别	ADL 评分		
	治疗前	治疗后 1 个月	治疗后 3 个月
观察组	36.66 ± 6.25	42.06 ± 7.86*	63.12 ± 11.67*
对照组	35.38 ± 7.28	42.11 ± 8.52* <sup>△</sup>	52.36 ± 7.84* <sup>△▲</sup>

注: \*表示与治疗前比较  $P < 0.05$ ; <sup>△</sup>表示与同时期对照组比较  $P < 0.05$ ; <sup>▲</sup>表示与同组治疗后 1 个月比较  $P < 0.05$ 。

2.2 银杏叶提取物注射液可提高阿尔茨海默病患者外周血 cAMP、PKA、CREB 的浓度 使用 Elisa 法检测 cAMP、PKA 浓度, 用 Western blotting 检测 CREB 浓度, 治疗前 2 组患者 cAMP、PKA、CREB 蛋白水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 治疗 3 个月

后观察组患者外周血清 cAMP、PKA、CREB 蛋白浓度均明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。见表 5、图 1。

表 5 2 组治疗前后 cAMP 及 PKA 浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu\text{g/mL}$ )

组别	cAMP		PKA	
	治疗前	治疗后 3 个月	治疗前	治疗后 3 个月
观察组	14.20 ± 8.89	77.59 ± 4.79*	24.14 ± 6.15	104.26 ± 4.73*
对照组	13.99 ± 7.39	48.59 ± 4.82* <sup>△</sup>	23.57 ± 7.39	73.54 ± 5.18* <sup>△</sup>

注: \*表示与治疗前比较  $P < 0.05$ ; <sup>△</sup>表示与同时期对照组比较  $P < 0.05$ 。

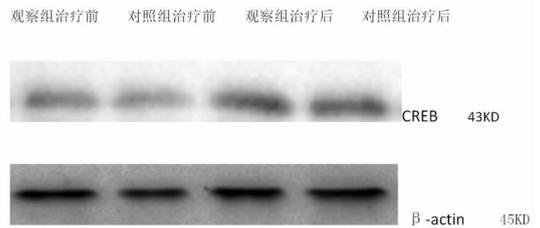


图 1 2 组治疗前后 CREB 蛋白结果比较

## 3 讨论

在我国经济水平不断发展的同时人口老龄化亦日趋严重, 年龄的不断增长致使机体自身功能水平不断下降, 增加了患病的风险。现代医学认为阿尔茨海默病的发生与脑组织弥漫性萎缩性改变从而导致老年患者出现智能障碍<sup>[4-6]</sup>。目前医学仍将阿尔茨海默病界定为无法痊愈的疾病, 患者虽然接受改善脑循环、营养脑神经等治疗, 但临床效果抑制差强人意<sup>[7-9]</sup>。近年来中草药以疗效显著、安全性高等特点被诸多临床工作者所认可。在多年的临床工作中我们发现银杏叶提取物注射液对改善认知功能障碍患者的认知能力方面有明显的效果, 随着阿尔茨海默病患者发病率的逐年增加, 我们对银杏叶提取物注射液治疗阿尔茨海默病患者的疗效进行了观察总结, 结果显示银杏叶提取物注射液可明显提高阿尔茨海默病患者的 MMSE、CDT 及 ADL 评分, 这说明该药物可改善认知能力, 从而提高患者的日常生活能力, 在研究中我们发现, 治疗 1 个月时 2 组患者组间认知能力及日常生活能力相仿, 直至治疗 3 个月后组间上述指标差异才具有统计学意义, 因此我们认为银杏叶提取物注射液的确可明显改善阿尔茨海默病患者的认知能力, 但其具有一定的时间和剂量依赖性。

阿尔茨海默病属于中医学“呆病”“善忘”等范畴, 《医学震中参西录》中提到: “脑髓纯者灵, 杂者钝”, 故本病病位在脑。唐容川在《中西汇通医书种》一书中写到: “血在上, 则浊蔽而不明矣, 凡有瘀者, 亦令健忘”。且在查阅大量临床文献及随访大量临床患者, 我们亦认为瘀血阻滞是阿尔茨海默病的

主要证型,机体十二经脉,三百余络,其血皆上于面而走空窍,此空窍即脑髓,故气血通顺濡养脑窍是发挥理想技能的基础。老年患者气血亏虚致瘀,清代王清任在《医林改错》一书中写到“气血凝滞,脑气与脏腑不通,如梦,如呆”,因此,气虚血滞,气血无法上注于清窍,脑髓失养,病程日久者出现善忘、痴呆等智能减退症状,因此,活血化瘀是调和血脉,清窍得养的关键<sup>[10-13]</sup>。银杏叶是传统的活血化瘀药,传统药理学认为银杏叶提取物注射液可选择性扩张脑血管,从而增加脑组织血氧含量,改善患者血液流变学,从而改善循环,最终实现改善脑功能的目的,但是随着临床研究的不断深入,我们在临床上发现,有部分阿尔茨海默病患者使用银杏叶提取物注射液治疗后认知功能有明显的提升,但其血液流变学与治疗前相比并无明显变化,因此,我们认为银杏叶提取物注射液介导阿尔茨海默病患者的功能改善机制可能存在多靶点。

现代医学<sup>[14-15]</sup>对认知能力研究逐渐发展至分子生物学水平,研究人员逐渐发现 cAMP-PKA-CREB 信号通路 with 认知功能具有密切关系,通过解剖实验大鼠发现 cAMP-PKA-CREB 信号通路的标志性蛋白在海马组织有广泛的分布,而海马是与记忆关系密切的脑组织结构。cAMP 是细胞转导的第二信使,将激素或神经递质转导致靶细胞后通过磷酸化靶酶,从而参与基因的开启表达、细胞的增殖、代谢及凋亡。PKA 是神经元细胞重塑的主要物质,具有催化活性作用的 PKA 在保持长时程记忆环节有重要作用。使细胞膜上 G 蛋白的偶联受体与细胞内的配体相结合而活化,从而使 cAMP 浓度增加,活性及浓度增强的 cAMP 与具有催化活性的 PKA 相结合,出现核移位而进入细胞核内磷酸化下游重要因子 CREB,从而开启了下游靶基因的转录。CREB 是机体多条重要信号通路的共同作用点,对记忆、学习以及各类情绪变化均具有重要的维持及调节作用。诸多动物研究显示抑制大鼠海马 cAMP-PKA-CREB 的表达,大鼠的记忆力出现明显下降。在本研究中我们对 2 组患者治疗前后外周血清的 cAMP-PKA-CREB 信号通路的标志性蛋白进行检测,结果显示 2 组患者经过治疗干预后 cAMP、PKA、CREB 蛋白的浓度均出现上调,其中观察组上调的幅度较对照组明显,这一结果提示银杏叶提取物注射液可改善阿

尔茨海默病患者认知功能的作用机制可能与提高 cAMP-PKA-CREB 信号通路的标志性蛋白表达水平有关。

总之,银杏提取物注射液治疗阿尔茨海默病患者具有明显的医疗价值,其作用机制可能与介导 cAMP-PKA-CREB 信号通路的标志性蛋白表达水平有关。

#### 参考文献

- [1] 范丽伟. 丙戊酸镁缓释片联合盐酸多奈哌齐胶囊治疗老年痴呆精神行为障碍的疗效观察[J]. 内科急危重症杂志, 2014, 20(1): 34-35.
- [2] 张玉琦, 徐文炜, 程灶火, 等. 奥氮平或喹硫平联合多奈哌齐治疗老年痴呆精神行为症状的疗效和安全性研究[J]. 中国医药导报, 2012, 9(26): 73-75.
- [3] 中华医学精神科分会. 中国精神障碍分类与诊断标准(CC—MD3)[M]. 3版. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 33-39.
- [4] 刘艳, 赵晓玲, 王蕾, 等. 多奈哌齐与尼莫地平联合治疗老年期血管性痴呆的临床观察[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2010, 12(6): 488-490.
- [5] 段晓宇, 张正春, 蔡秀英, 等. 尼莫地平对阿尔茨海默病大鼠认知功能的影响[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2012, 32(5): 645-648.
- [6] 王霞, 梁卓燕, 李慧芳, 等. 盐酸多奈哌齐联合尼莫地平治疗血管性痴呆的临床观察[J]. 临床荟萃, 2012, 27(6): 482-484.
- [7] 余庆. 记忆能力及海马神经元凋亡的影响[J]. 四川医学, 2009, 30(12): 1861-1865.
- [8] 王里. 盐酸多奈哌齐联合用药方案延缓老年痴呆患者病情进展的作用[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(20): 5849-5850.
- [9] 杨红, 朱德生. 盐酸多奈哌齐治疗老年痴呆的疗效研究[J]. 中国全科医学, 2013, 16(8): 853-856.
- [10] 邱幸凡, 袁德培, 王平, 等. 肾虚髓衰、脑络痹阻是老年性痴呆的基本病机[J]. 河南中医学院学报, 2006, 21(2): 11-13.
- [11] 时晶, 魏明清, 马福云, 等. 血管性认知损害的中医证候特征[J]. 中医杂志, 2012, 53(6): 503-506.
- [12] 健芬, 覃翠, 杨波. 肾虚血瘀论治阿尔茨海默病的探讨[J]. 光明中医, 2010, 25(1): 58-59.
- [13] 梁纪文, 黄淑芳. 老年性痴呆的中医辨证及中成药应用[J]. 中国临床医生, 2010, 38(8): 19-21.
- [14] 李晓恒, 刘能保, 张敏海, 等. 慢性复合应激性学习记忆增强大鼠海马神经细胞增殖和突触后 Fyn 表达的变化[J]. 解剖学报, 2005, 36(6): 591-596.
- [15] Jagasia R, Steib K, Englberger E, et al. GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus[J]. JNeurosci, 2009, 29(25): 7966-7977.

(2016-09-13 收稿 责任编辑: 张文婷)