

中图分类号: R965; R285 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)10-0059-07  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.10.012



# 银杏叶提取物联合多奈哌齐对阿尔茨海默病模型大鼠的协同作用及其机制\*

薛艳云<sup>1</sup>, 李媛媛<sup>1</sup>, 王亚敏<sup>1</sup>, 王树锋<sup>2</sup>

(1. 河北省张家口市沙岭子医院, 河北 张家口 075000; 2. 河北北方学院附属第一医院, 河北 张家口 075000)

**摘要:**目的 探讨银杏叶提取物(EGb 761)联合多奈哌齐对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠的协同作用及其机制。方法 取雄性SD大鼠72只,随机分为正常组(等体积生理盐水)、假手术组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)、多奈哌齐组(25 mg/kg)、EGb 761组(50 mg/kg)和联合组(多奈哌齐 25 mg/kg + EGb 761 50 mg/kg),各12只。腹腔内注射水合氯醛 300 mg/kg 麻醉,将聚集的A $\beta$ 25-35 (10  $\mu$ L)以 1  $\mu$ L/min 的速率注入大鼠双侧海马,以复制AD大鼠模型。建模成功后,各组大鼠均灌胃相应药物或生理盐水,每天1次,共2个疗程(每个疗程10 d,间隔3 d)。采用Morris水迷宫实验评估大鼠的认知和记忆能力;采用TUNEL染色法,观察大鼠海马神经细胞凋亡情况,并计算凋亡指数;采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清乙酰胆碱酯酶(AChE)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平;采用Western blot法检测大鼠海马组织中核因子(NF)- $\kappa$ B通路相关蛋白 p-IKK $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$ , p-NF- $\kappa$ B表达水平。结果 与模型组比较,各给药组大鼠Morris水迷宫实验第6天逃避潜伏期均大幅缩短,第7天各给药组大鼠在象限I中穿越平台的次数及耗时百分比均显著增加;各给药组大鼠海马神经细胞阳性数量均显著减少,凋亡指数均显著降低( $P < 0.05$ );各给药组大鼠AChE和MDA水平均显著降低,SOD水平显著升高( $P < 0.05$ );各给药组大鼠NF- $\kappa$ B通路相关蛋白 p-IKK $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$ , p-NF- $\kappa$ B的表达水平均显著升高( $P < 0.05$ );且联合组上述指标变化均更显著( $P < 0.05$ )。结论 EGb 761联合多奈哌齐可协同改善AD模型大鼠的记忆能力,其机制可能与减少海马神经细胞NF- $\kappa$ B通路激活后的细胞凋亡有关。

**关键词:**银杏叶提取物;多奈哌齐;EGb 761;阿尔茨海默病;核因子- $\kappa$ B通路;认知功能;细胞凋亡

## Synergistic Effect of Extract of *Ginkgo Biloba* Leaves Combined with Donepezil on Alzheimer's Disease Model Rats and Its Mechanism

XUE Yanyun<sup>1</sup>, LI Yuanyuan<sup>1</sup>, WANG Yamin<sup>1</sup>, WANG Shufeng<sup>2</sup>

(1. Shalingzi Hospital, Zhangjiakou, Hebei, China 075000; 2. The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, China 075000)

**Abstract: Objective** To investigate the synergistic effect of extract of *Ginkgo biloba* leaves (EGb 761) combined with donepezil on the Alzheimer's disease (AD) model rats and its mechanism. **Methods** A total of 72 male SD rats were selected and randomly divided into the normal group (equal volume of normal saline), the sham operation group (equal volume of normal saline), the model group (equal volume of normal saline), the donepezil group (25 mg/kg), the EGb 761 group (50 mg/kg), and the combination group (25 mg/kg donepezil + 50 mg/kg EGb 761), with 12 rats in each group. After intraperitoneal injection of 300 mg/kg chloral hydrate for anesthesia, the rats' bilateral hippocampi were injected into the aggregated A $\beta$  25-35 (10  $\mu$ L) at a rate of 1  $\mu$ L/min to replicate the AD rat models. After successful modeling, the rats in each group were given corresponding drug or normal saline by gavage once a day for two treatment courses (10 d for each course, with an interval of 3 d). The Morris water maze test was used to assess the cognitive and memory abilities of rats. The TUNEL staining method was used to observe the apoptosis of hippocampal neurons in rats, and the apoptotic index was calculated. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum acetylcholinesterase (AChE), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) levels in rats. The Western blot was used to detect the expression levels of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B pathway-related proteins including p-IKK $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$  and p-NF- $\kappa$ B in hippocampal tissue of rats. **Results** Compared with those in the model group, the escape latency in each drug group significantly shortened on the 6th day of Morris water maze test, the frequency of crossing the platform and time-consuming percentage in quadrant I significantly increased on the 7th day; the positive cell count and the apoptotic index of hippocampal neurons in each drug group significantly decreased ( $P < 0.05$ ); the AChE and MDA levels in each drug group significantly decreased, while the SOD level significantly increased ( $P < 0.05$ ); the expression levels of NF- $\kappa$ B pathway-related proteins including p-IKK $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$  and p-NF- $\kappa$ B in each drug group significantly increased ( $P < 0.05$ ). The above indexes in the combination group were significantly better ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** EGb 761 combined with donepezil can synergistically improve the memory ability of AD model rats, and its mechanism may be related to the

\*基金项目:河北省张家口市科技计划项目[2221145D]。

第一作者:薛艳云,女,大学本科,主治医师,研究方向为精神医学,(电子信箱)mccicee04@21cn.com。

decreased apoptosis after activation of the NF -  $\kappa$ B pathway in hippocampal neurons.

**Key words:** extract of *Ginkgo biloba* leaves; donepezil; EGb 761; Alzheimer's disease; nuclear factor -  $\kappa$ B pathway; cognitive function; apoptosis

有研究表明,阿尔茨海默病(AD)进展的早期伴随着 $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )的过量产生,这可能是AD发病机制中的一个关键步骤<sup>[1]</sup>。核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)与AD等神经退行性疾病关系密切<sup>[2]</sup>。在人类早期AD的神经元和星形胶质细胞中可观察到NF- $\kappa$ B通路的激活和淀粉样蛋白的沉积<sup>[3]</sup>。但其中NF- $\kappa$ B激活的确切功能尚未明晰。银杏叶提取物(EGb 761)可用于防止各种神经和血管损伤<sup>[4-5]</sup>。其主要含萜类、黄酮类、烷基酚类、聚丙醇、有机酸等成分<sup>[6]</sup>,具有神经保护作用,包括减少缺血性脑损伤,延缓缺血性脑卒中后海马神经元细胞死亡和凋亡,改善认知缺陷和情绪障碍,促进运动功能恢复<sup>[7-9]</sup>。但前述作用均发现于EGb 761治疗前或治疗后(缺血后4 h内)。EGb 761是否能在更长的治疗时间内发挥保护作用尚不清楚。多奈哌齐为乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制剂,是轻度至中重度AD所致痴呆对症治疗的一线药物。据报道,EGb 761和多奈哌齐对AD患者有类似的抗痴呆作用,常联合使用<sup>[10-15]</sup>。A $\beta$ 25-35为毒性A $\beta$ (A $\beta$ 1-40, A $\beta$ 1-42)的活性片段<sup>[16]</sup>,本研究中分析了前者对神经细胞的生物学效应,并研究了EGb 761联合多奈哌齐对AD模型大鼠认知和记忆损伤的潜在保护作用。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与动物

仪器: Alphamager<sup>TM</sup> 2000型凝胶图像扫描仪, PRO1406型低温高速离心机(美国Alpha innotech公司); RD1101-MVWM-R型Morris水迷宫(上海玉研科学仪器有限公司); DP74型图像分析系统, CKX53型显微镜(日本Olympus公司)。

试剂: 水合氯醛(张家口市沙岭子医院药剂科,批号为230112); A $\beta$ 25-35(美国Sigma-Aldrich公司,批号为A4559); 银杏叶注射液(EGb 761,德国Dr Willmar Schwabe Group制药公司,批号为20230304); 多奈哌齐原料药(美国MCE公司,批号为20221214); 青霉素(上海源培生物科技股份有限公司,批号为S110JV); p-IKK $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$ , p-NF- $\kappa$ B,  $\beta$ -actin一抗,辣根酶标记山羊抗小鼠IgG二抗; 磷酸盐缓冲液(PBS,武汉普诺赛生命科技有限公司, pH 7.4,批号为WH0221A241); ECL检测试剂盒(美国Fennetas公司,批号为ZY61003); RIPA裂解液试剂盒、SDS/PAGE凝胶配置试剂盒(烟台塞尔斯生物技术有限公司,批号分别为230105, 230418); TUNEL试剂盒(南京基科生物科技有

限公司,批号为230509); BCA试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号为230907); 乙酰胆碱酯酶、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒(上海科培瑞生物科技有限公司,批号分别为221208, 230103, 230402)。

动物: 雄性SD大鼠72只, 5~6月龄, 体质量250~350 g, 购自上海懿尚生物科技有限公司, 实验动物生产许可证号SCXK(沪)2023-0007。在温度23℃、相对湿度55%、12 h明暗交替、自由摄食饮水条件下适应性喂养7 d。动物实验经张家口市沙岭子医院动物与伦理审查委员会批准。

### 1.2 方法

溶液制备: 取A $\beta$ 25-35适量, 加37℃的无菌生理盐水, 溶解7 d, 以制备聚集的A $\beta$ 25-35(质量浓度为1 g/L)。取EGb 761、多奈哌齐各适量, 分别溶解于蒸馏水中, 制得质量浓度为20, 0.5 mg/mL的溶液。

建模、分组与给药: 将72只大鼠随机分为正常组(等体积生理盐水)、假手术组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)、多奈哌齐组(25 mg/kg)、EGb 761组(50 mg/kg)和联合组(多奈哌齐25 mg/kg + EGb 761 50 mg/kg), 各12只。腹腔内注射水合氯醛(300 mg/kg)麻醉大鼠, 将A $\beta$ 25-35(10  $\mu$ L)以1  $\mu$ L/min的速率注入大鼠双侧海马, 以复制AD大鼠模型。建模成功后, 各组大鼠均灌胃相应药物或生理盐水, 每天1次, 共2个疗程(每个疗程10 d, 间隔3 d)。

Morris水迷宫实验: 各组均取6只大鼠, 先将平台置象限I内, 进行隐藏平台试验6 d: 将大鼠置起始位置(象限II和象限III)的水中, 如其在90 s内成功逃到平台上, 则实验成功。所有大鼠均被允许在平台上停留20 s。记录每只大鼠的逃避潜伏期(如90 s内仍未能逃脱, 则逃避潜伏期记为90 s)、游泳速率和轨迹, 每天2次。第7天起移除平台, 并进行探针试验, 起点位于象限III, 记录90 s内大鼠在象限I中穿越耗费的时间。

细胞凋亡检测: 采用TUNEL染色法。各组取6只大鼠麻醉, 灌注0.01 mol/L PBS, 然后左心室灌注4℃ 4%多聚甲醛。处死大鼠, 取出大脑, 用石蜡包埋, 切片, 使用TUNEL试剂盒进行TdT介导的dUTP缺口末端标记测试。检查各组大鼠TUNEL染色阳性细胞情况, 并计算海马CA1区细胞的凋亡指数(AI), AI(%) = 凋亡细胞数 / (凋亡细胞数 + 正常细胞数)  $\times$  100%。

生化指标测定: 水迷宫实验结束后, 腹腔注射戊巴

比妥钠 40 mg/kg 处死大鼠,心脏采血,置EP管中室温静置至少 1 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离, 得血清, 采用检测试剂盒分别检测 AChE, MDA, SOD 的水平。

蛋白表达检测: 采用 Western blot 法。使用组织分离试剂盒提取大鼠海马组织的蛋白质, 并使用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。取蛋白质样品 15 mg, 进行 SDS-PAGE, 并转移至聚偏二氟乙烯膜上, 4 °C 下封闭 2 h, 并与 (p-IKK $\alpha$ , p-IkB $\alpha$ , p-NF- $\kappa$ B,  $\beta$ -actin) 一抗、二抗孵育。使用 ECL 检测试剂盒对蛋白条带进行化学发光检测。

### 1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析。计量资料以  $\bar{X} \pm s$  表示, 两组间比较行 *t* 检验, 多组间比较行方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

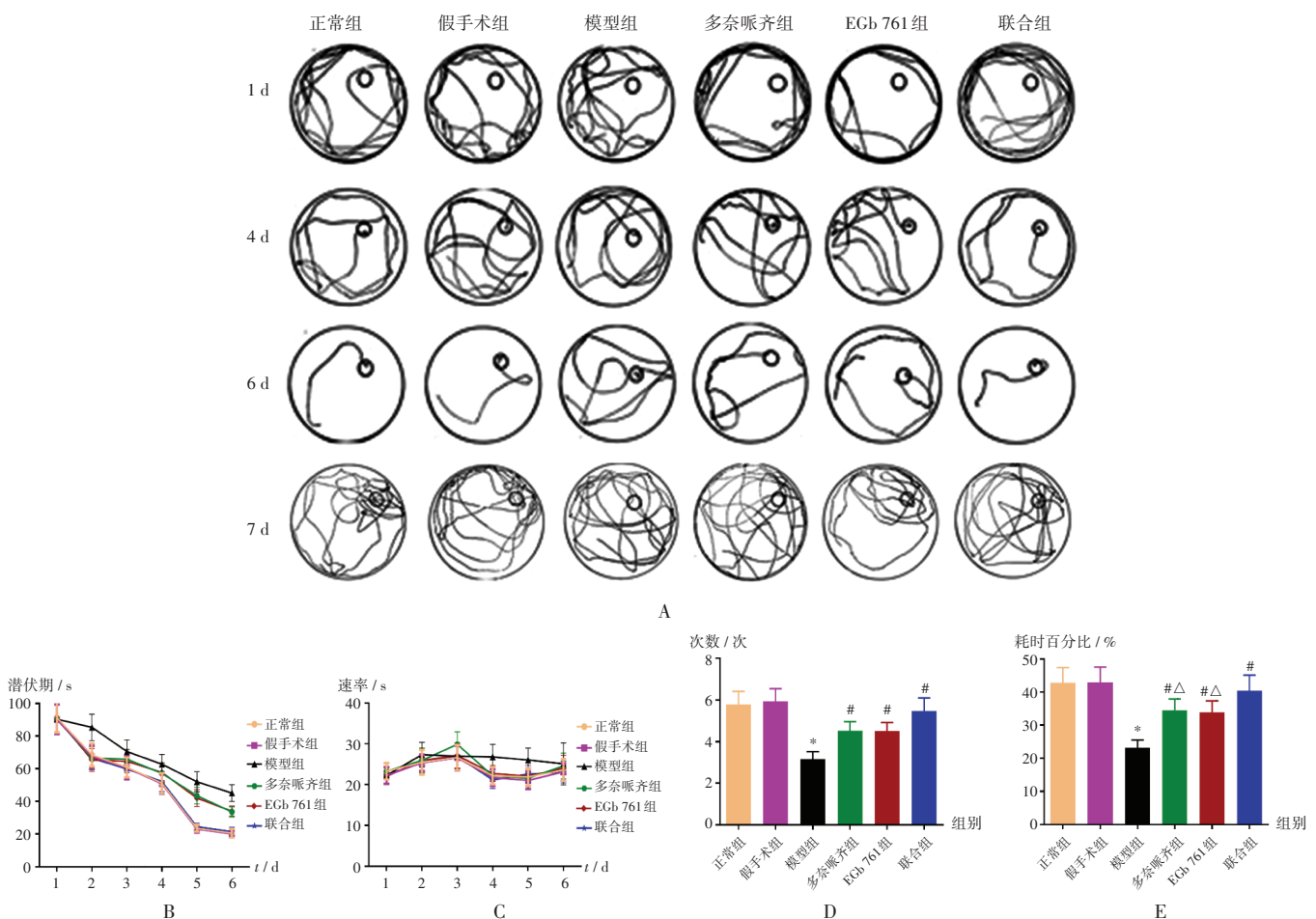
### 2.1 Morris 水迷宫实验

各组大鼠第 1 天沿池壁游泳, 第 4 天搜索行为完成

了认知任务, 第 6 天几乎均有明确目标, 表现为游泳轨迹类型单一。与模型组比较, 联合组大鼠第 5 天的逃避潜伏期大幅缩短, 多奈哌齐组、EGb 761 组和联合组大鼠第 6 天的逃避潜伏期大幅缩短。前 6 d 各组大鼠的游泳速率无明显差异。第 7 天, 大鼠的游泳轨迹均在象限 I 位置附近。与模型组比较, 多奈哌齐组、EGb 761 组和联合组大鼠在象限 I 中穿越平台次数更多, 耗时百分比显著增加, 且联合组增加更显著。详见图 1。

### 2.2 细胞凋亡

正常组和假手术组中均未见阳性染色细胞, 模型组中见大量阳性染色细胞, 多奈哌齐组、EGb 761 组、联合组大鼠海马神经细胞阳性数量显著减少, 且联合组减少更显著 (P < 0.05)。与模型组比较, 多奈哌齐组、EGb 761 组、联合组大鼠正常海马神经细胞凋亡指数均显著降低, 且联合组降低更显著 (P < 0.05)。详见图 2。



注: 与假手术组比较, \*P < 0.05; 与模型组比较, #P < 0.05; 与联合组比较,  $\Delta$ P < 0.05。图 2 至图 4 同。

A. 游泳轨迹 B. 逃避潜伏期 C. 游泳速率 D. 穿越平台次数 E. 象限 I 中耗时百分比

图 1 Morris 水迷宫实验结果

Note: Compared with those in the sham operation group, \*P < 0.05. Compared with those in the model group, #P < 0.05. Compared with those in the combination group,  $\Delta$ P < 0.05 (for Fig. 1 - 4).

A. Swimming trajectory B. Escape latency C. Swimming rate D. Frequency of crossing the platform E. Time-consuming percentage in quadrant I

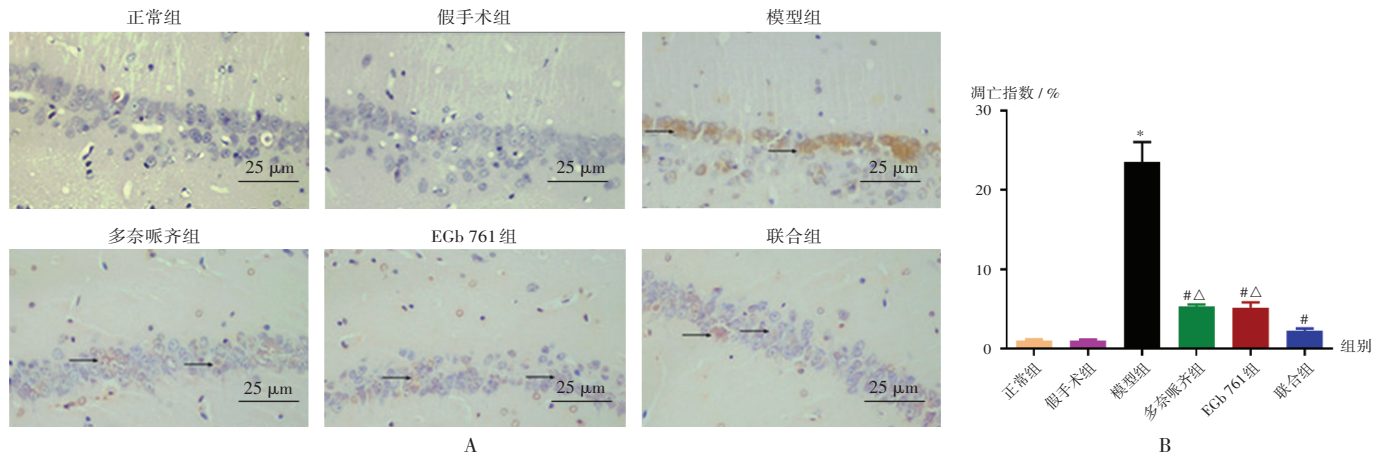
Fig. 1 Results of the Morris water maze test

### 2.3 AChE, MDA, SOD 水平

与假手术组比较,模型组大鼠 AChE 和 MDA 水平均显著升高, SOD 水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,多奈哌齐组、EGb 761 组、联合组大鼠 AChE 和 MDA 水平均显著降低, SOD 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ),且联合组变化更显著 ( $P < 0.05$ )。详见图 3。

### 2.4 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达水平

与假手术组比较,模型组大鼠 p-IKK $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$ , p-NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,多奈哌齐组、EGb 761 组、联合组大鼠前述蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ),且联合组升高更显著 ( $P < 0.05$ )。详见图 4。

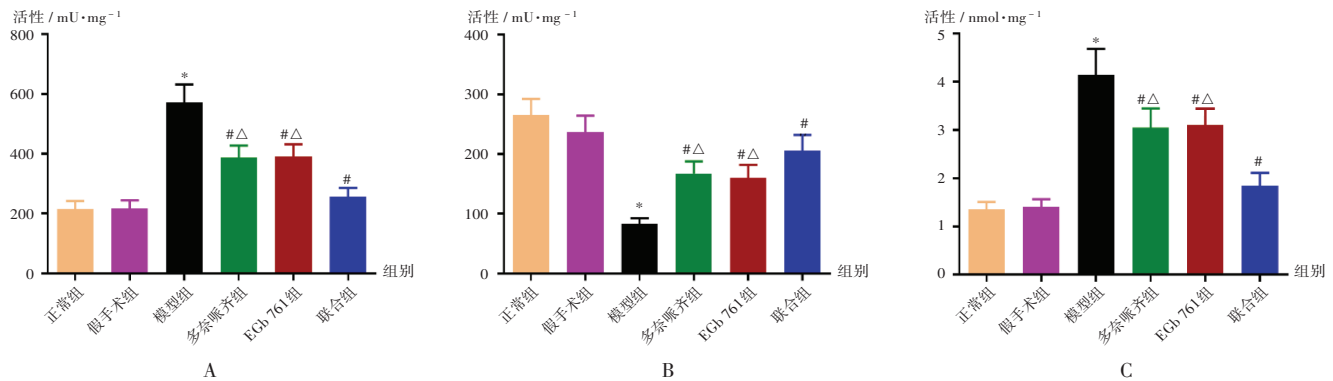


A. 显微图( $\times 200$ ) B. 数据统计

图 2 细胞凋亡

A. Microscopic photos ( $\times 200$ ) B. Data statistics

Fig. 2 Apoptosis

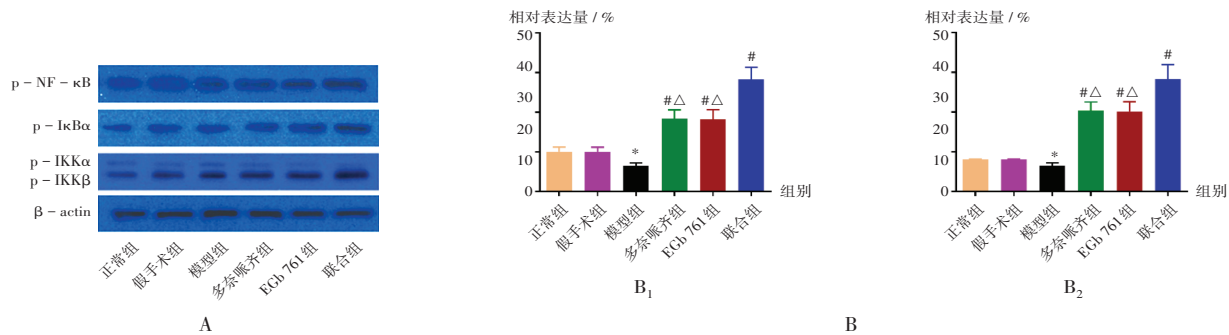


A. AChE B. SOD C. MDA

图 3 AChE, MDA, SOD 水平

A. AChE B. SOD C. MDA

Fig. 3 AChE, MDA and SOD levels



A. 蛋白条带 B. 相对表达量 (B<sub>1</sub>. p-I $\kappa$ B $\alpha$  B<sub>2</sub>. p-NF- $\kappa$ B)

图 4 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达水平

A. Protein electropherograms B. Relative expression levels (B<sub>1</sub>. p-I $\kappa$ B $\alpha$  B<sub>2</sub>. p-NF- $\kappa$ B)

Fig. 4 Expression levels of NF- $\kappa$ B pathway-related proteins

### 3 讨论

AD的发病机制被认为与胆碱能传递减少、氧化应激水平升高、A $\beta$ 异常形成和聚集及tau蛋白过度磷酸化有关<sup>[17]</sup>,但目前临床可用的抗痴呆治疗仅以AChE抑制剂来改善轻中度痴呆患者的认知功能,故具有抗氧化活性的中草药如EGb 761<sup>[18]</sup>迅速获得关注。鉴于EGb 761对现有AChE抑制剂治疗额外获益的机制尚不明确<sup>[12]</sup>,且对此类联合治疗机制的研究有限,故本研究中选择一线AChE抑制剂多奈哌齐,全面评估其与EGb 761在AD模型大鼠中的协同作用及其调控机制。

神经系统的衰老是以功能神经细胞慢性凋亡为特征的生理过程。人们普遍认为,A $\beta$ 在老年斑块中的细胞外积聚是AD发病机制中的一个重要步骤<sup>[19]</sup>。聚集的A $\beta$ 在体外和体内对神经细胞均有毒性<sup>[20]</sup>,且在AD的转基因小鼠模型中观察到人类淀粉样蛋白前体蛋白(APP)的过表达<sup>[6]</sup>,其导致异鼠李素类似于在具有学习和记忆缺陷的AD患者中看到的神经炎斑块<sup>[21]</sup>。APP转基因小鼠表现出认知能力下降,被公认为是成功的AD模型<sup>[22-23]</sup>。同时,可溶性A $\beta$ 低聚物可在体外和体内抑制认知功能和长时程增强作用<sup>[24]</sup>。此外,脑内注射聚集的A $\beta$ 寡聚物诱导认知障碍和神经病理学体征的动物模型是AD早期的有用模型<sup>[25]</sup>,被用于许多研究<sup>[7-9]</sup>。

本研究中的Morris水迷宫实验发现,EGb 761与多奈哌齐联合给药可进一步减弱A $\beta$ 25-35导致的学习和记忆障碍。这种抗遗忘作用可能与二者联合抗AChE和抗氧化作用有关。有报道指出,EGb 761中的槲皮素<sup>[26-27]</sup>、山柰酚和异鼠李素<sup>[28]</sup>具有抗AChE活性,而银杏内酯B和银杏内酯C对AChE活性无抑制作用<sup>[29-30]</sup>。此外,本研究中也发现对黄酮类苷元和银杏内酯A均无抑制AChE活性的作用。由此推测EGb 761中槲皮素、山柰酚和异鼠李素是EGb 761抗AChE活性的主要原因。此外,EGb 761的抗氧化活性首次在A $\beta$ 25-35诱导的大鼠中得到证实,此前的3项研究证实了EGb 761在AD患者<sup>[24]</sup>、API/PS1小鼠、SAMP8小鼠<sup>[31-32]</sup>中的抗氧化作用。此外,由于槲皮素<sup>[33]</sup>、山柰酚<sup>[34]</sup>、异鼠李素<sup>[35]</sup>、白叶碱、银杏内酯A和银杏内酯B<sup>[36]</sup>的抗氧化活性已被证实,可知EGb 761中的类黄酮苷元和萜烯内酯均可促使其发挥抗氧化作用。

本研究结果表明,AD模型大鼠中A $\beta$ 的过度沉积可导致海马神经细胞凋亡,导致记忆能力受损。EGb 761联合多奈哌齐治疗相较两药单用进一步改善了AD模型大鼠的记忆和认知能力,并减少了海马神经细胞的凋亡。表明两者有协同作用。此外,本研究中还观察到EGb 761联合多奈哌齐治疗激活了海马神经细胞中的NF- $\kappa$ B通路。这与既往的研究结果<sup>[37]</sup>一致,表明NF- $\kappa$ B

通路的激活可能在AD中发挥保护作用。

据报道,神经细胞中NF- $\kappa$ B通路的激活在AD等神经退行性疾病的退行性过程中具有神经保护作用<sup>[38]</sup>。此外,NF- $\kappa$ B通路可能参与由突触信号产生的短期记忆转变为长期记忆的过程,在信号转导、记忆形成和神经建模中发挥重要作用<sup>[39]</sup>。同时,在病理条件下,NF- $\kappa$ B通路的激活促进了神经细胞的存活。如NF- $\kappa$ B通过调节细胞凋亡蛋白(1APs)、抗氧化酶和抑制线粒体去极化、膜通透性变化和细胞色素C释放来抑制细胞凋亡<sup>[40]</sup>。但也有证据表明它可能导致神经细胞死亡。在Tg2576转基因小鼠中,在相同细胞中发现NF- $\kappa$ B活化和细胞凋亡增加同时发生,表明NF- $\kappa$ B活化可能增加神经细胞凋亡<sup>[41]</sup>。

综上所述,EGb 761和多奈哌齐联用于A $\beta$ 25-35诱导的AD模型大鼠,相较两药单用可进一步增强其胆碱能和抗氧化作用,从而在不改变其全身和大脑暴露的情况下发挥更好的抗遗忘作用,这可能与海马神经细胞NF- $\kappa$ B通路激活后细胞凋亡的减少有关。

### 参考文献

- [1] CHEN Z, ZHONG C. Oxidative stress in Alzheimer's disease[J]. *Neurosci Bull*, 2014, 30(2): 271-281.
- [2] MEMET S. NF- $\kappa$ B functions in the nervous system: from development to disease[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(9): 1180-1195.
- [3] MATTSON MP. NF- $\kappa$ B in the survival and plasticity of neurons[J]. *Neurochem Res*, 2005, 30(6-7): 883-893.
- [4] 殷贺, 刘广志. 银杏叶提取物治疗阿尔茨海默病的作用机制研究进展[J]. *中国医药*, 2020, 15(1): 151-154.
- [5] 徐振伟, 刘晓蕾, 李新毅. 银杏叶提取物治疗血管性痴呆的作用机制研究进展[J]. *中国医药*, 2022, 17(4): 623-626.
- [6] PAULSON JB, RAMSDEN M, FORSTER C, et al. Amyloid plaque and neurofibrillary tangle pathology in a regulatable mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(3): 762-772.
- [7] FU AL, ZHOU CY, CHEN X. Thyroid hormone prevents cognitive deficit in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(4-5): 722-729.
- [8] ZHOU J, ZHOU L, HOU D, et al. Paeonol increases levels of cortical cytochrome oxidase and vascular actin and improves behavior in a rat model of Alzheimer's disease[J]. *Brain Res*, 2011, 1388: 141-147.
- [9] ZHONG SZ, GE QH, LI Q, et al. Peoniflorin attenuates A $\beta$ <sub>1-42</sub>-mediated neurotoxicity by regulating calcium homeostasis and ameliorating oxidative stress in hippocampus of rats[J]. *J Neurol Sci*, 2009, 280(1-2): 71-78.
- [10] JEONG DI, KIM S, KIM MH, et al. Donepezil hydrochloride-reinforced cellulose nanocrystal-aggregated gel structure for long-acting drug delivery[J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 296:

- 119887.
- [11] FANG X, ZHANG J, ZHAO J, et al. Effect of Resveratrol Combined with Donepezil Hydrochloride on Inflammatory Factor Level and Cognitive Function Level of Patients with Alzheimer's Disease[J]. *J Healthc Eng*, 2022, 2022:9148650.
- [12] CANEVELLI M, ADALI N, KELAIDITI E, et al. Effects of Ginkgo biloba supplementation in Alzheimer's disease patients receiving cholinesterase inhibitors: data from the ICTUS study[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(6):888 – 892.
- [13] ZHENG Y, XIE Y, QI M, et al. Ginkgo Biloba Extract Is Comparable With Donepezil in Improving Functional Recovery in Alzheimer's Disease: Results From a Multilevel Characterized Study Based on Clinical Features and Resting – State Functional Magnetic Resonance Imaging [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:721216.
- [14] 张峰, 袁菁, 顾曙光. 银杏酮酯分散片联合多奈哌齐对阿尔茨海默病患者认知及行为能力的影响[J]. *中医药导报*, 2015, 21(2):62 – 64.
- [15] 王霞. 多奈哌齐联合银杏叶对阿尔茨海默病 MMSE, MoCA 评分的影响[J]. *母婴世界*, 2019(24):138.
- [16] XU Y, HOU XY, LIU Y, et al. Different protection of K252a and N – acetyl – L – cysteine against amyloid – beta peptide – induced cortical neuron apoptosis involving inhibition of MLK3 – MKK7 – JNK3 signal cascades[J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(4):918 – 927.
- [17] MCKEAGE K, LYSENG – WILLIAMSON KA. *Ginkgo biloba* extract EGb 761® in the symptomatic treatment of mild – to – moderate dementia: a profile of its use [J]. *Drugs Ther Perspect*, 2018, 34(8):358 – 366.
- [18] PIETRI S, SEGUIN JR, D'ARBIGNY P, et al. Ginkgo biloba extract (EGb 761) pretreatment limits free radical – induced oxidative stress in patients undergoing coronary bypass surgery[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1997, 11(2):121 – 131.
- [19] MEYER – LUEHMANN M, SPIRES – JONES TL, PRADA C, et al. Rapid appearance and local toxicity of amyloid – beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2008, 451(7179):720 – 724.
- [20] BUTTERFIELD DA, CASTEGNA A, LAUDERBACK CM, et al. Evidence that amyloid beta – peptide – induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death[J]. *Neurobiol Aging*, 2002, 23(5):655 – 664.
- [21] SHALOVA IN, CEHALOVA K, REHAKOVA Z, et al. Decrease of dehydrogenase activity of cerebral glyceraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase in different animal models of Alzheimer's disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1770(5):826 – 832.
- [22] ZHAO L, LIU S, WANG Y, et al. Effects of Curculigoside on Memory Impairment and Bone Loss via Anti – Oxidative Character in APP/PS1 Mutated Transgenic Mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7):e0133289.
- [23] GONZALEZ – DOMINGUEZ R, GARCIA – BARRERA T, VITORICA J, et al. Metabolomic investigation of systemic manifestations associated with Alzheimer's disease in the APP/PS1 transgenic mouse model [J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(9):2429 – 2440.
- [24] CLEARY JP, WALSH DM, HOFMEISTER JJ, et al. Natural oligomers of the amyloid – beta protein specifically disrupt cognitive function[J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(1):79 – 84.
- [25] KLYUBIN I, WALSH DM, LEMERE CA, et al. Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity *in vivo* [J]. *Nat Med*, 2005, 11(5):556 – 561.
- [26] DAVIS S, LAROCHE S. What can rodent models tell us about cognitive decline in Alzheimer's disease? [J]. *Mol Neurobiol*, 2003, 27(3):249 – 276.
- [27] BALKIS A, TRAN K, LEE YZ, et al. Screening Flavonoids for Inhibition of Acetylcholinesterase Identified Baicalein as the Most Potent Inhibitor [J]. *Journal of Agricultural Science*, 2015, 7(9):26 – 35.
- [28] ZHANG L, LI D, CAO F, et al. Identification of Human Acetylcholinesterase Inhibitors from the Constituents of EGb761 by Modeling Docking and Molecular Dynamics Simulations [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2018, 21(1):41 – 49.
- [29] DING X, OUYANG MA, LIU X, et al. Acetylcholinesterase Inhibitory Activities of Flavonoids from the Leaves of Ginkgo biloba against Brown Planthopper [J]. *Journal of Chemistry*, 2013, 2013:645086.
- [30] ZHAO J, REN T, YANG M, et al. Reduced systemic exposure and brain uptake of donepezil in rats with scopolamine – induced cognitive impairment [J]. *Xenobiotica*, 2020, 50(4):389 – 400.
- [31] SHI C, XIAO S, LIU J, et al. Ginkgo biloba extract EGb761 protects against aging – associated mitochondrial dysfunction in platelets and hippocampi of SAMP8 mice [J]. *Platelets*, 2010, 21(5):373 – 379.
- [32] TIAN X, ZHANG L, WANG J, et al. The protective effect of hyperbaric oxygen and Ginkgo biloba extract on Abeta25 – 35 – induced oxidative stress and neuronal apoptosis in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 242:1 – 8.
- [33] CESARONE MR, BELCARO G, HU S, et al. Supplementary prevention and management of asthma with quercetin phytosome: a pilot registry [J]. *Minerva Med*, 2019, 110(6):524 – 529.
- [34] SAW CL, GUO Y, YANG AY, et al. The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: involvement of the Nrf2 – ARE signaling pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 72:303 – 311.