

# 银杏叶提取物促进脑缺血半暗带神经元自噬 提高神经保护作用

郭涛 吴致远 赵晓明 陈学梅 刘裕源 黄志文 何红云\* 邓仪昊\*

(昆明理工大学医学院解剖学教研室, 脑卒中病理机制研究实验室, 昆明 650500)

**摘要** 银杏叶提取物(ginkgo biloba extract-761, EGb-761)注射液在中国常作为辅助药物被用于治疗脑卒中, 但是, 其潜在的细胞和药理机制尚未完全了解。该研究旨在探讨EGb-761是否通过调节缺血性脑卒中半暗带神经元的自噬从而发挥保护作用。采用雄性SD大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型, 将MCAO大鼠随机分为5组, 分别为Sham组、MCAO+saline组、MCAO+EGb组、MCAO+EGb+3-MA组和MCAO+3-MA组。脑缺血大鼠用EGb-761药物腹腔注射7天后, 并使用自噬抑制剂3-MA侧脑室注射进行干预, 分别通过蛋白免疫印迹法(WB)、实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)和免疫荧光检测缺血半暗带的脑组织, 以检测自噬的表达。另外, 根据脑梗死体积、神经功能缺损和TUNEL检测神经元凋亡水平, 以评估治疗效果。结果表明, 与MCAO+saline相比, MCAO+EGb组的EGb-761显著提高了神经元自噬水平, 同时, 明显减轻了神经功能缺损、脑梗死面积和神经元凋亡。此外, 相对于MCAO+EGb组, MCAO+EGb+3-MA组中的3-MA抵消了EGb增强神经元自噬的功效, 并且仅使用3-MA继续加重了神经损伤。因此, EGB-761通过特异性促进脑缺血半暗带神经元自噬发挥神经保护作用。

**关键词** 缺血性脑卒中; EGb-761; 自噬; 凋亡; 神经保护

## Ginkgo Biloba Extract Promotes Neuronal Autophagy and Improves Neuroprotection in Penumbra of Cerebral Ischemia

GUO Tao, WU Zhiyuan, ZHAO Xiaoming, CHEN Xuemei, LIU Yuyuan,

HUANG Zhiwen, HE Hongyun\*, DENG Yihao\*

(Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Kunming University of Science and Technology, Stroke Pathological Mechanism Research Laboratory, Kunming 650500, China)

**Abstract** EGb-761 (ginkgo biloba extract-761) injection has been widely used as an adjuvantive therapy for cerebral stroke in China, but its underlying cellular and pharmacological mechanisms have not been fully understood. This study aims to investigate whether EGb-761 has a therapeutic effect by regulating the autophagy of neurons in the penumbra of ischemic stroke. Using the MCAO (middle cerebral artery occlusion) reperfusion model of male SD rats, the MCAO rats were randomly divided into 5 groups, namely Sham group, MCAO+saline group,

收稿日期: 2020-11-20 接受日期: 2021-01-13

国家自然科学基金(批准号: 81960418、81860411)、云南省万人计划青年拔尖人才专项(批准号: YNWR-QNBJ-2018-034)、云南省应用基础研究计划(批准号: 2019FB098、202001AT070049)、云南省教育厅科研基金(批准号: 2020J0066、2018JS016)和省级人培项目(批准号: KKS201960010)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18487158200, E-mail: 511869324@qq.com; Tel: 18487174860, E-mail: deng13032871868@163.com

Received: November 20, 2020 Accepted: January 13, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81960418, 81860411), Yunnan Province Ten Thousand Talents Plan Young Talents Project (Grant No.YNWR-QNBJ-2018-034), Applied Basic Research Planned Projects of Yunnan Province (Grant No.2019FB098, 202001AT070049), Science Research Fund Project of Yunnan Provincial Department of Education (Grant No.2020J0066, 2018JS016) and Yunnan Provincial Talent Training Project (Grant No.KKS201960010)

\*Corresponding authors. Tel: +86-18487158200, E-mail: 511869324@qq.com; Tel: +86-18487174860, E-mail: deng13032871868@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5484>

MCAO+EGb group, MCAO+EGb+3-MA group and MCAO+3-MA group. Cerebral ischemic rats were injected intraperitoneally with EGb-761 for 7 days, and were injected with autophagy inhibitor 3-MA into the lateral ventricle. The brain tissue of the ischemic penumbra was used to detect the expression of autophagy by WB, qRT-PCR (quantitative real-time PCR) and immunofluorescence. In addition, the evaluation of therapeutic efficacy was based on cerebral infarction volume, neurological deficit, and TUNEL detection of neuronal apoptosis levels. The results showed that compared with MCAO+saline, the EGb-761 drug in the MCAO+EGb group significantly increased the expression of neuronal autophagy. At the same time, EGb-761 treatment significantly reduced the neurological deficit, cerebral infarction area and neuronal apoptosis. In addition, 3-MA in the MCAO+EGb+3-MA group counteracted the effect of EGb to enhance neuronal autophagy, and only the use of 3-MA continued to aggravate the nerve damage, compared with the MCAO+EGb group. Therefore, EGB-761 exerts a neuroprotective effect by specifically promoting neuronal autophagy in the penumbra of cerebral ischemia.

**Keywords** ischaemic cerebral stroke; EGb-761; autophagy; apoptosis; neuroprotection

缺血性脑卒中即脑中风,是导致永久性残疾的主要原因,也是世界第二大常见的死亡病因<sup>[1]</sup>。每年大约有1 500万人患有脑缺血,其中大多数幸存者都患有严重的神经系统疾病,给社会带来了巨大的经济负担<sup>[2]</sup>。脑缺血后引发了多种病理机制,包括炎症反应、细胞凋亡、钙超载、氧化应激和兴奋性毒性损伤,最终导致脑细胞死亡<sup>[3-5]</sup>。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的用于治疗缺血性脑卒中的唯一药物为纤维组织酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA),但4.5 h内的狭窄治疗时间窗极大地限制了其应用<sup>[6]</sup>,导致仅有约5%的患者可以受益于这种治疗。此外,一些神经保护性成分已被鉴定出可用于脑缺血治疗,例如抗血小板药、纤维蛋白溶解剂和抗凝药<sup>[7]</sup>,但其有益作用仍然非常有限。因此,患有缺血性脑卒中的患者迫切需要新药。

银杏叶是一种传统中草药,被广泛用于治疗脑部疾病已有数千年的历史<sup>[8]</sup>。由于草药成分的复杂多样性,从草药中鉴定和分离有效成分是不可避免的<sup>[9]</sup>。因此,选择已确定EGb-761注射液金纳多®的标准配方,其中含有约24%的银杏黄酮苷、6%的萜烯内酯及少部分白果内酯<sup>[10]</sup>。类黄酮和萜烯三内酯通常被认为是EGb-761中的生物活性成分<sup>[11]</sup>。EGb-761已被用于治疗各种疾病,包括阿尔茨海默病、痴呆、脑血管功能不全和脑梗死等<sup>[8]</sup>。血流量不足、局部缺血和神经变性是导致缺血性脑卒中后神经损伤恶化的三个主要病理因素。动物研究表明,EGb-761不仅能够增加脑缺血后的血液流量<sup>[12]</sup>,而且可以通过增强自由基清除作用减轻血流恢复后的再灌注损伤<sup>[13]</sup>。已证明EGb-761可通过抑制局部缺血引起

的谷氨酸释放来减轻兴奋性毒性<sup>[14]</sup>,可以减少梗死体积,抑制细胞凋亡并改善神经功能<sup>[15]</sup>。此外,临床试验结果还报道了EGb-761对缺血性脑中风的神经保护作用<sup>[16]</sup>。但是,这些动物和临床研究仅显示了其治疗效果,却很少阐明EGb-761是如何通过细胞自噬机制发挥脑缺血后的神经保护功能的。

自噬最初是一种细胞保护机制,通过该机制清除衰老的细胞器,多余的细胞质成分、非功能性蛋白质和某些病原体被递送至溶酶体并进行消化降解<sup>[17]</sup>。其通过在生理条件下回收营养物质为自己供能而在细胞存活中发挥神经保护作用<sup>[18]</sup>。脑缺血后自噬可以显著被激活<sup>[19]</sup>,但是自噬在脑缺血的病理过程中所起的作用一直存在争议<sup>[20]</sup>。证据表明,自噬对脑缺血的神经功能具有保护作用<sup>[21]</sup>。然而,研究也显示了自噬在脑缺血中的有害作用<sup>[22]</sup>。无论如何,这些研究表明自噬与脑缺血的病理发展密切相关。

已显示在脑缺血后EGb-761可以引发针对脑损伤的神经保护作用,同时自噬已被证实广泛参与了脑卒中的病理过程。我们讨论了EGb-761诱导的神经保护作用可能与缺血性脑卒中后自噬活性的调节有关。因此,本研究首先要验证EGb-761是否能减轻缺血性脑卒中后的神经系统损伤,然后进一步揭示EGb-761是否通过靶向神经元自噬途径达到治疗效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

雄性 Sprague-Dawley大鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。大鼠为8~9周龄,质量为250~280 g,在(21±1) °C温度和(60±5)%相对湿度条

件下自由接触淡水和食物。用10%水合氯醛麻醉后进行手术,以最大程度地减少痛苦。所有动物实验均经昆明理工大学动物实验委员会批准。总共募集102只大鼠,手术期间或之后死亡12只大鼠(死亡率约为11.76%)。该研究包括90只动物:30只大鼠用于评估神经功能缺损和梗死体积,30只用于免疫荧光,其余30只采用qRT-PCR和WB技术检测自噬表达情况。

## 1.2 试剂和仪器

1.2.1 主要试剂 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)试剂、BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液、SDS-PAGE凝胶试剂盒、ECL发光试剂购自上海碧云天生物技术有限公司;微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、Beclin-1、 $\beta$ -actin、NeuN一抗,山羊抗兔二抗, TUNEL, DAPI购自Cell Signaling Technology公司; Trizol试剂、总RNA提取试剂盒购自美国Invitrogen公司; qRT-PCR引物由北京梓熙生物股份有限公司合成;水合氯醛、电泳液、转膜液、Triton X-100购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2.2 主要仪器 电泳仪及转膜仪购自上海天能科技有限公司;冰冻切片机购自德国莱卡(Leica)公司;荧光显微镜购自日本尼康(Nikon)公司;MCAO模型建立显微器械包购自上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂;MCAO栓线购自北京西浓科技有限公司;微量注射泵和脑立体定位仪购自深圳瑞沃德生命科技有限公司。

## 1.3 方法

1.3.1 动物模型制备 在麻醉(10%水合氯醛)状态下(400 mg/kg)制备大鼠短暂性MCAO模型。左侧颈外动脉(external carotid artery, ECA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈总动脉(common carotid artery, CCA)分别与相邻的神经和肌肉分离。首先通过在ECA上的小切口将栓线插入ECA,然后从CCA返回ICA,最后向内推进(20±1) mm至大脑中动脉完全闭塞,停留90 min后将栓线取出以进行血液再灌注。Sham除不插入栓线外其余与模型操作步骤相同。

1.3.2 给药方法 将脑缺血大鼠随机分为5组(每组18只)。MCAO+EGb组:MCAO模型建立成功后立刻用EGb-761注射剂腹腔给药治疗(中豪国际有限公司, 10 mg/kg),每天一次,持续7天。MCAO+3-MA组:为避免血脑屏障对药物吸收的影响,通过侧脑室埋管

注射(intra-cerebroventricular injection, ICV)进行自噬抑制剂3-MA干预(400  $\mu$ g/kg, 5  $\mu$ L/5 min, 留针5 min),每天一次,持续7天,1%的二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)作为3-MA的对照溶剂,排除对大鼠脑神经及自噬造成的影响。MCAO+EGb+3-MA组:EGb-761腹腔给药和侧脑室3-MA同时给药,进行特异性检测。MCAO+saline组:作为脑缺血模型的对照组给予相同体积的生理盐水。

1.3.3 蛋白质提取和WB技术 在冰上快速分离半暗带的脑组织,加入RIPA缓冲液研磨混匀后裂解45 min。在4  $^{\circ}$ C下12 000 r/min离心15 min后,获得组织的上清液。SDS-PAGE凝胶电泳用于分离上清液中的蛋白质,然后将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。之后,将PVDF膜在室温下用10%脱脂牛奶封闭2 h,然后用PBST洗涤。兔抗大鼠LC3、Beclin-1和 $\beta$ -actin一抗(1:1 000)分别于4  $^{\circ}$ C孵育过夜。洗涤后,将辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)-缀合的山羊抗兔二抗在室温下标记。振荡洗涤1 h后,滴加ECL发光液用凝胶成像仪曝光,条带的光密度值通过Image J软件测定。

1.3.4 实时定量PCR 用Trizol试剂提取半暗带中的脑组织总RNA,紫外分光光度法检测总RNA的纯度和浓度。使用1  $\mu$ g的总RNA合成互补DNA(cDNA)。用于扩增的引物设计如下,LC3上游引物:5'-ACT GCC GCC CTA AAG GTT AC-3',下游引物:5'-CGA GGT CCA ACC CAC AAA GA-3'; Beclin-1上游引物:5'-CGG CTC CTA TTC CAT CAC ATC AAA A-3',下游引物:5'-AAC TGT GAG GAC ACC CAA GC-3';  $\beta$ -actin上游引物:5'-TAA TGT CAC GCA CGA TTT CC-3',下游引物:5'-CAT CCT GCG TCT GGA CCT GG-3'。PCR扩增使用了20  $\mu$ L反应体系(包含2  $\mu$ L Taq polymerase、2  $\mu$ L cDNA、0.2 mmol/L引物和蒸馏水),反应条件为:95  $^{\circ}$ C变性30 s, 60  $^{\circ}$ C退火/延伸20 s,通过ABI 7000序列系统检测。LC3和Beclin-1的转录水平通过循环阈值(Ct)方法定量,并通过与 $\beta$ -actin的比值将结果归一化。

1.3.5 免疫荧光染色 快速取出大脑,浸泡于蔗糖溶液中进行梯度脱水,然后用冷冻切片将其冠状切成20  $\mu$ m厚度的切片,置于原位杂交保护液-20  $^{\circ}$ C保存备用。PBS洗涤后,0.2% Triton X-100透化15 min,牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)处理1 h,以阻断非特异性反应。然后进行双重免疫荧光,对兔

抗大鼠LC3(1:200)和小鼠抗大鼠NeuN(1:400)的一抗一同在室温下与脑片孵育4 h。洗涤后用Alexa Fluor-594的抗兔IgG(1:800)和Alexa Fluor-488的抗小鼠IgG(1:800)共同避光标记2 h。再次洗涤后,加入DAPI(1:1 000)在黑暗中复染5 min,或添加凋亡检测标记物TUNEL,以实现免疫共标。贴片于载玻片上滴加抗荧光淬灭剂,用荧光显微镜在高倍镜下(400×)检测,每个切片的半影区随机选择6个区域分别对阳性细胞数和细胞总数进行计数。

**1.3.6 评估神经缺陷** 采用改良大鼠神经功能缺损评分(modified neurological severity scores, mNSS)评估神经系统严重程度<sup>[23]</sup>。mNSS测试分为四个部分:运动功能,包括异常运动和肌肉状态;感觉功能,包括本体感受、触觉和视觉缺陷;平衡木实验;反射缺失或异常运动。总分为18分制,没有神经功能缺损得分为0。因此,得分越高表示神经功能缺损越严重。

**1.3.7 脑梗死体积的测量** 在冰上迅速取出完整大鼠大脑后,立即在-20℃冷冻20 min,用脑槽将其冠状切成2 mm厚的切片。然后在37℃条件下将切片在2% TTC溶液中染色30 min,正常脑组织显示为红色,梗死组织为苍白色。使用成像软件(Adobe Photoshop CS6)计算梗死体积。结果表示为梗死率(%)= $A'/A \times 100\%$ ,

A'是同侧半球的体积,A°代表梗死体积。

**1.3.8 统计分析** 使用GraphPad Prism 5软件对实验数据进行统计学分析,所有数据均以平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

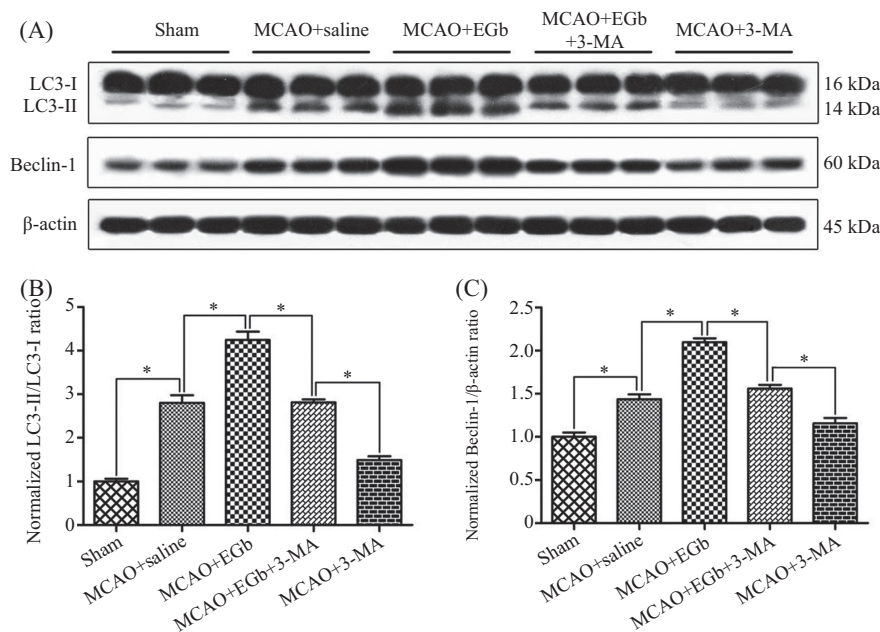
## 2 结果

### 2.1 EGb-761促进MCAO半暗带的自噬表达

将脑缺血大鼠用EGb-761治疗或自噬抑制剂3-MA干预7天后,获得半暗带的脑组织通过WB检测自噬的表达。结果显示,脑缺血后自噬显著提高,MCAO+EGb组与MCAO+saline组相比,EGb-761治疗后LC3-II/LC3-I的比值增高(图1A和图1B),并且明显提高了Beclin-1的表达水平(图1A和图1C)。然而,MCAO+EGb+3-MA组的自噬抑制剂3-MA可以降低EGb-761治疗引起的自噬升高。与MCAO+saline组相比,MCAO+3-MA组的自噬表达量降低。

### 2.2 EGb-761提高MCAO半暗带自噬基因的转录水平

干预治疗7天后,分离大鼠半暗带脑组织,通过实时荧光定量PCR检测自噬基因的mRNA水平。结果表明,与MCAO+saline组相比,MCAO+EGb组的EGb-761处理显著提高了*Beclin-1*(图2A)和*LC3*(图2B)的转录水

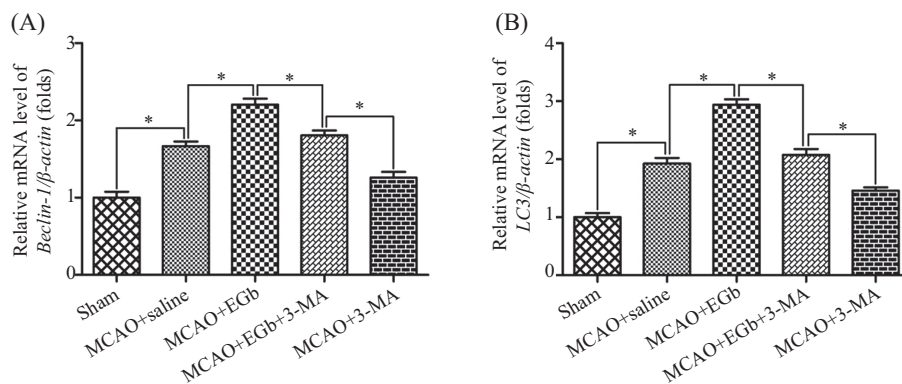


A: WB检测脑缺血半暗带自噬相关蛋白Beclin-1和LC3的表达水平; B、C: WB灰度值统计结果。\* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ 。

A: WB detects the expression levels of autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3 in the penumbra of cerebral ischemia; B,C: statistical analysis of WB. \* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ .

图1 EGb-761对MCAO半暗带自噬表达的影响

Fig.1 The effect of EGb-761 on autophagy expression in MCAO penumbra



A: qRT-PCR检测脑缺血半暗带*Beclin-1* mRNA表达量的结果; B: qRT-PCR检测脑缺血半暗带*LC3* mRNA表达量的结果。\* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ 。

A: qRT-PCR detection of *Beclin-1* mRNA expression in cerebral ischemic penumbra; B: qRT-PCR detection of *LC3* mRNA expression in ischemic penumbra. \* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ 。

图2 qRT-PCR检测MCAO半暗带*Beclin-1*和*LC3* mRNA的表达

Fig.2 qRT-PCR to detect the expression of *Beclin-1* and *LC3* mRNA in the penumbra of MCAO

平。然而, MCAO+EGb+3-MA组自噬抑制剂3-MA抵消了EGb-761增加自噬基因mRNA水平的功能。自噬抑制剂3-MA在MCAO+3-MA组中*Beclin-1*和*LC3*的转录水平明显降低, 并且显著低于MCAO+saline组。

### 2.3 EGb-761在MCAO半暗带神经元中自噬的表达变化

为了研究EGb-761治疗对MCAO半暗带神经元自噬的疗效, 我们进行了双重免疫荧光检测(图3A)。结果(图3B)表明, 脑缺血后神经元中的自噬显著升高, 与MCAO+saline组相比, MCAO+EGb组的EGb-761治疗显著促进了自噬神经元的百分比。MCAO+EGb+3-MA组自噬抑制剂3-MA又降低了EGb-761促进的神经元自噬。双重免疫荧光染色的结果(图3)表明, EGb-761治疗改变的自噬表达主要发生在神经元中。

### 2.4 EGb-761减轻MCAO引起的神经功能缺损

我们评估了mNSS测试以研究EGb-761治疗对MCAO后神经功能缺损的影响。如图4所示, 与MCAO+saline组相比, MCAO+EGb组的神经功能缺损得到明显缓解。然而, MCAO+EGb+3-MA组的自噬抑制剂3-MA可以抵消EGb-761减轻神经功能缺损的作用。与MCAO+saline组相比, MCAO+3-MA组的自噬抑制剂3-MA进一步加剧了神经损伤。Sham组未见神经功能缺损。

### 2.5 EGb-761减轻MCAO引起的脑组织梗死

通过TTC染色测量梗死体积(图5A)。结果(图5B)说明, MCAO+EGb组中的EGb-761治疗显著减轻了脑梗死灶。而MCAO+EGb+3-MA组的自噬抑制剂3-MA减弱了EGb-761的这种功效。MCAO+3-MA

组用自噬抑制剂3-MA治疗后, 与MCAO+saline组相比, 梗死体积进一步扩大。

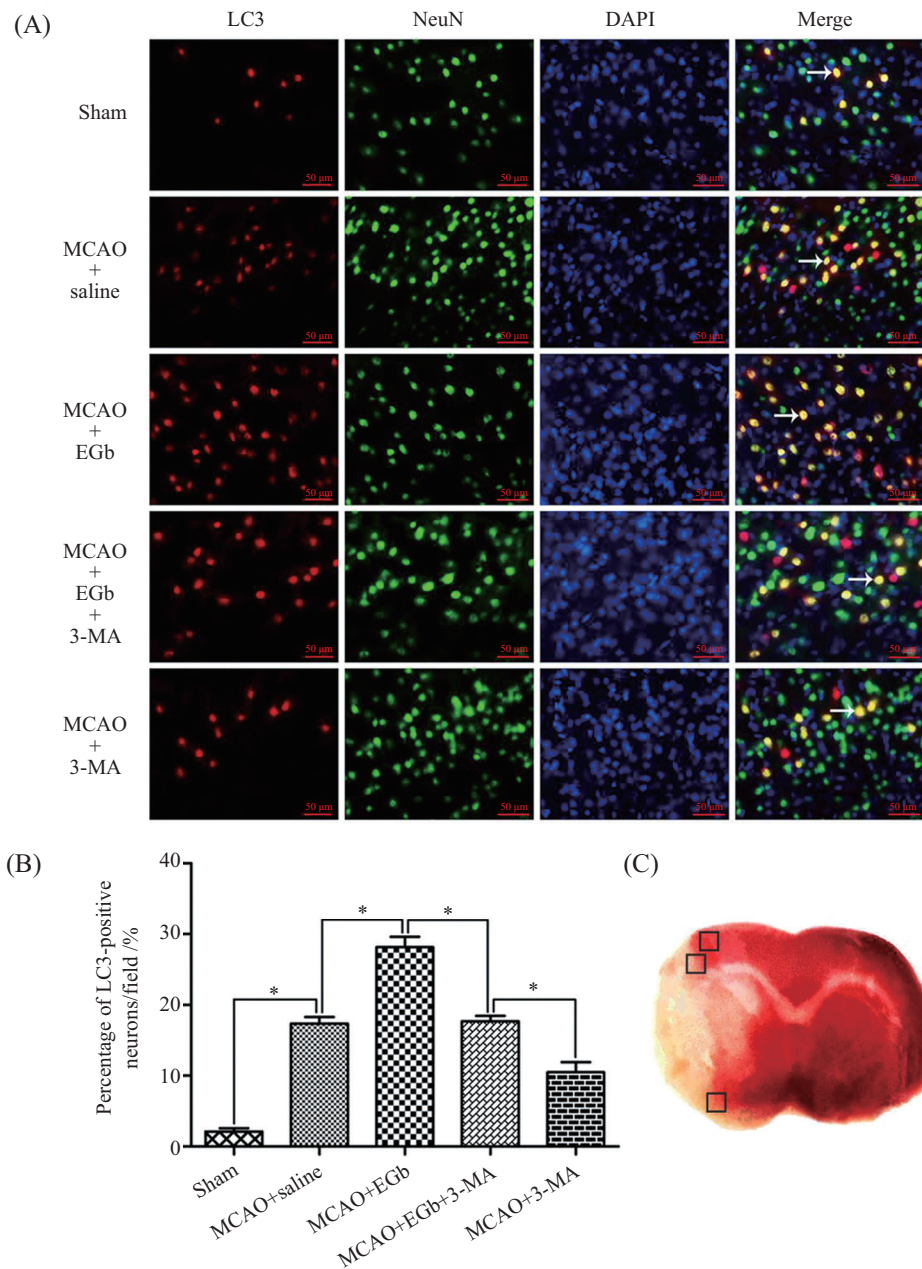
### 2.6 EGb-761减少MCAO半暗带的神经元凋亡

在MCAO用EGb-761治疗7天后, 通过TUNEL染色与免疫荧光复合检测半暗带的神经元凋亡(图6A)。结果(图6B)表明, 在MCAO+EGb组中, EGB-761治疗显著降低了TUNEL阳性神经元的百分比。在EGb-761治疗同时给予自噬抑制剂3-MA, MCAO+EGb+3-MA组减弱了EGb-761减少神经元凋亡的作用。然而, 与MCAO+saline组相比, MCAO+3-MA组自噬抑制剂3-MA进一步增加了神经元的凋亡。

## 3 讨论

银杏叶提取物是从中国本土的银杏叶中提取的复合药物, 它在中医药中可用于治疗多种疾病, 如心脑血管病、神经退行性疾病、糖尿病等<sup>[24]</sup>。动物研究和临床试验均证实, EGb针对缺血性脑损伤具有明显的神经保护作用<sup>[25-26]</sup>。基于其生物学特性, 标准化的银杏叶提取物(EGb-761)注射液在中国常作为辅助药物治疗卒中<sup>[27]</sup>。先前的研究显示, EGb-761减轻脑缺血后损伤的功效是通过减少梗死面积、抑制细胞凋亡、改善神经功能、增强抗氧化酶以及减轻兴奋性中毒性损伤等来发挥保护作用的<sup>[8]</sup>。但对脑缺血治疗中EGb-761详细治疗的细胞机制尚未完全了解。

许多研究发现, 脑缺血再灌注后导致自噬被显著激活, 并且自噬水平对缺血性脑卒中的病理发展具有较大影响<sup>[28]</sup>。但自噬在缺血性脑卒中研究中的作



A: 双重免疫荧光检测自噬蛋白LC3(红色)和神经元标记物NeuN(绿色)在MCAO半暗带的表达, 箭头所指黄色细胞为LC3和NeuN融合后的代表性阳性细胞; B: LC3在神经元上阳性细胞的百分比; C: 黑色方框中为免疫荧光选取的脑缺血半暗带检测区域。\* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ 。

A: double immunofluorescence to detect the expression of autophagy protein LC3 (red) and neuron marker NeuN (green) in the penumbra of MCAO. The yellow cells indicated by the arrow are representative positive cells after the fusion of LC3 and NeuN; B: the percentage of LC3 positive cells in neurons; C: the black box is the cerebral ischemia selected by immunofluorescence penumbra detection area. \* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ 。

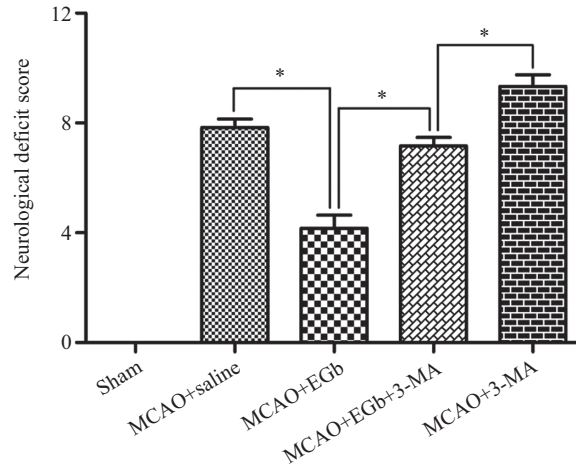
图3 免疫荧光检测LC3在神经元中的表达情况

Fig.3 Immunofluorescence to detect the expression of LC3 in neurons

用存在争议, 其缺血程度、研究设计、检测方法和实验模型可能是确定自噬在脑卒中后是有益还是有害的重要因素<sup>[29]</sup>。研究表明, 急性中风或严重的局部缺血可能导致过度自噬, 从而加剧神经系统损伤<sup>[30]</sup>。但是, 慢性或轻度局部缺血可能会引起适度自噬, 从而通过清除受损的组织碎片来保护细胞。对脑缺血再灌注动物模型的多项研究表明, 雷帕霉素诱导的自

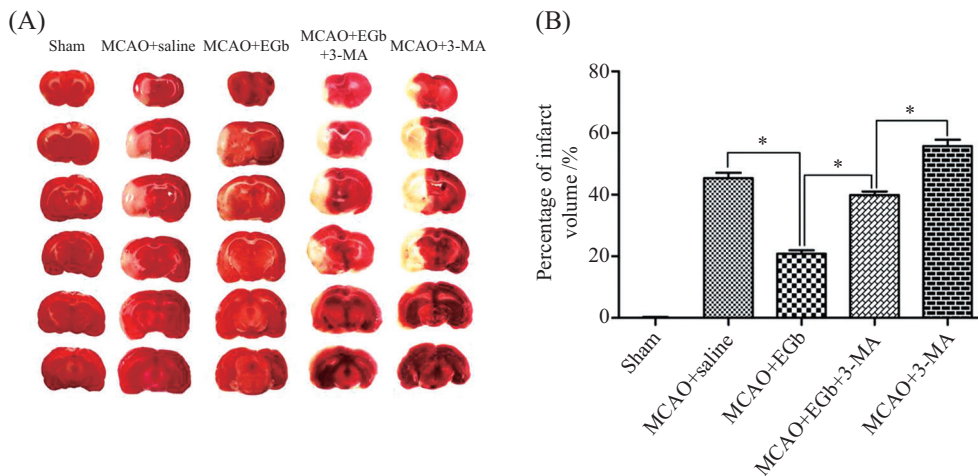
噬具有神经保护作用<sup>[31]</sup>, 但自噬抑制作用反而加重了由缺血引起的神经系统损伤<sup>[32]</sup>。这些研究表明, 自噬功能不足可能是缺血性中风的重要病理机制。因此, 增强自噬活性可能是减轻脑卒中后神经损伤的可行策略。本研究旨在探讨EGb-761是否通过促进缺血性脑卒中后自噬的强度从而发挥神经保护作用。

我们的研究表明, 与假手术组相比, MCAO导致



\* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ .

图4 采用mNSS测试以评估MCAO后EGb-761的疗效  
Fig.4 Using mNSS test to evaluate the efficacy of EGb-761 after MCAO



A: TTC染色检测脑梗死体积; B: 对脑梗死体积的定量分析。\* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ 。

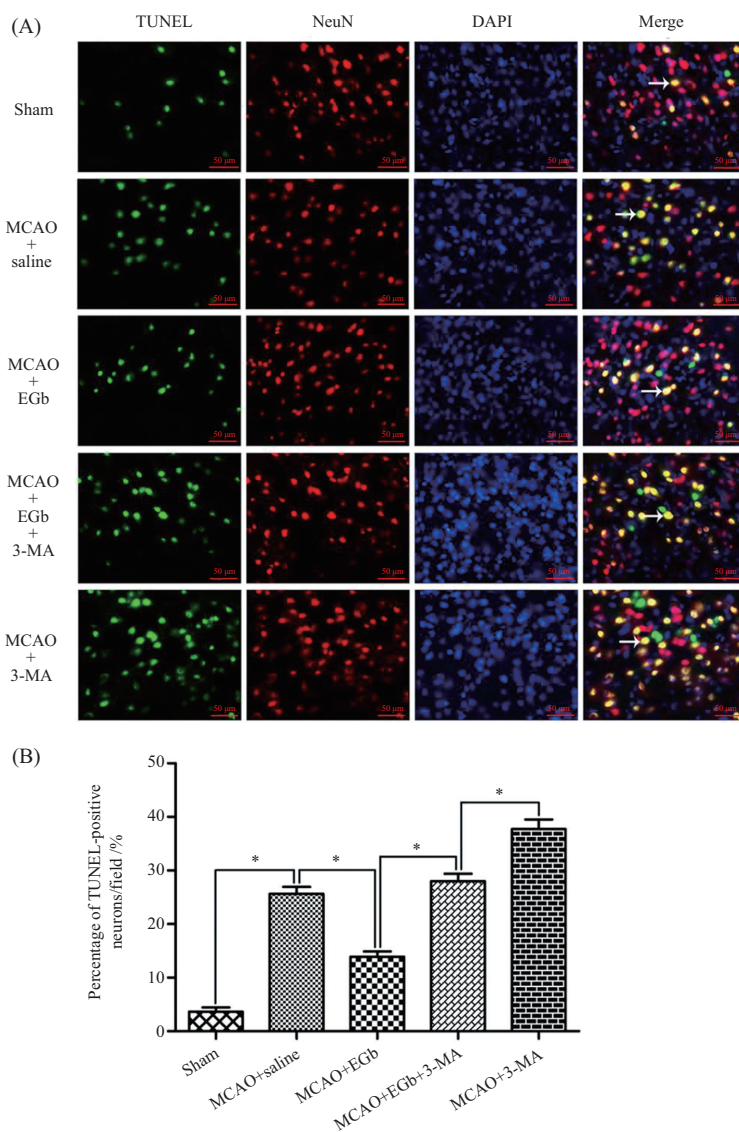
A: TTC staining to detect cerebral infarct volume; B: quantitative analysis of cerebral infarct volume. \* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ .

图5 EGb-761对脑梗死体积的影响  
Fig.5 The influence of EGb-761 on cerebral infarction volume

神经功能缺损、脑梗死体积和神经元凋亡均增加。另外, MCAO局部缺血使自噬表达升高,但这种升高的自噬不足以减轻局部缺血引起的脑损伤。自噬抑制剂3-MA治疗后,与MCAO模型组相比, MCAO+3-MA组神经损伤进一步加重。该结果进一步证实,自噬不足是缺血性脑卒中的病理因素,这一结果也表明诱导自噬可能是减轻脑缺血后损伤的一种可行方法。然而用EGb-761注射液干预后,缺血性脑卒中引起的神经损伤功能明显减轻,这种针对缺血性脑损伤的保护作用与先前的研究一致<sup>[33-34]</sup>。为了研究这种神经保护作用是否是通过靶向自噬途径引起的,我们进一步探索了EGb-761对自噬表达的影响。WB和qRT-PCR均表明,EGb-761治疗7天显著提

高了自噬水平,同时双重免疫荧光表明,EGb-761治疗促进的细胞自噬主要发生在神经元中。因此,我们推测EGb-761的药理作用可能是通过神经元自噬的升高来实现的。为了证实这种推断,在EGb-761治疗期间另外使用了自噬抑制剂3-MA,结果表明,与MCAO+EGb组相比, MCAO+EGb+3-MA组可以抵消EGb-761增强神经元自噬的药理作用,同时也减弱了EGb-761的神经改善功能。由此得出结论,EGb-761减轻MCAO再灌注损伤的治疗作用是通过特异性促进神经元自噬提高引起的。

总而言之,EGb-761可显著提高脑缺血半暗带的神经元自噬,这种自噬的促进伴随着神经功能缺损的减轻、梗死体积的减少和神经元凋亡的减弱,



A: 通过TUNEL染色检测缺血半暗带的神经元凋亡, 箭头所指黄色细胞为TUNEL(绿色)和NeuN(红色)融合后的代表性阳性细胞; B: 对TUNEL染色结果的统计学分析。\* $P < 0.01$ ,  $n = 6$ 。

A: TUNEL staining was used to detect neuronal apoptosis in ischemic penumbra. The yellow cells indicated by the arrow are representative positive cells after the fusion of TUNEL (green) and NeuN (red); B: statistical analysis of TUNEL staining results. \* $P < 0.01$ ,  $n = 6$ 。

图6 EGb-761对MCAO半暗带神经元凋亡的影响

Fig.6 The effect of EGb-761 on neuronal apoptosis in the penumbra of MCAO

并且通过反向施用自噬抑制剂3-MA特异性地检验了EGb-761具有增强自噬的治疗作用。因此, 神经元中的自噬细胞靶向诱导可能是EGb-761在缺血性脑卒中治疗中的神经保护机制, 为银杏叶在脑缺血细胞生物学方面的治疗提供了进一步研究的基础。

### 参考文献 (References)

- [1] FEIGIN V L, NICHOLS E, ALAM T, et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(5): 459-80.
- [2] SUN H, ZOU X, LIU L. Epidemiological factors of stroke: a survey of the current status in China [J]. *J Stroke*, 2013, 15(2): 109-14.
- [3] BANO D, ANKARCORONA M. Beyond the critical point: an overview of excitotoxicity, calcium overload and the downstream consequences [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 663: 79-85.
- [4] RADAK D, KATSIKI N, RESANOVIC I, et al. Apoptosis and acute brain ischemia in ischemic stroke [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, 15(2): 115-22.
- [5] KHOSHNAM S E, WINLOW W, FARZANEH M, et al. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke [J]. *Neurol Sci*, 2017, 38(7): 1167-86.
- [6] LENG T, XIONG Z G. Treatment for ischemic stroke: from thrombolysis to thrombectomy and remaining challenges [J].



- Brain Circ, 2019, 5(1): 8-11.
- [7] YUH W T, ALEXANDER M D, UEDA T, et al. Revisiting current goldens rules in managing acute ischemic stroke: evaluation of new strategies to further improve treatment selection and outcome [J]. *AJR Am Roentgenol*, 2017, 208(1): 32-41.
- [8] NASH K M, SHAH Z A. Current perspectives on the beneficial role of Ginkgo biloba in neurological and cerebrovascular disorders [J]. *Integr Med Insights*, 2015, 10: 1-9.
- [9] CHAU F T, CHAN H Y, CHEUNG C Y, et al. Recipe for uncovering the bioactive components in herbal medicine [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(17): 7217-25.
- [10] VAN BEEK T A, MONTORO P. Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2002-32.
- [11] MOHANTA T K, TAMBOLI Y, ZUBAIDHA P K. Phytochemical and medicinal importance of Ginkgo biloba L [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28(10): 746-52.
- [12] HOSSEINI-SHARIFABAD M, ANVARI M. Effects of Ginkgo biloba extract on the structure of Cornu Ammonis in aged rat: a morphometric study [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2015, 18(9): 932-7.
- [13] ZHOU X, QI Y, CHEN T. Long-term pre-treatment of antioxidant Ginkgo biloba extract EGb-761 attenuates cerebral ischemia-induced neuronal damage in aged mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 256-63.
- [14] CHANDRASEKARAN K, MEHRABIAN Z, SPINNEWYN B, et al. Neuroprotective effects of bilobalide, a component of Ginkgo biloba extract (EGb 761) in global brain ischemia and in excitotoxicity-induced neuronal death [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2003, 36: S89-94.
- [15] LIU Y, WU X, YU Z. Ginkgo leaf extract and dipyridamole injection as adjuvant treatment for acute cerebral infarction: Protocol for systemic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(8): e14643.
- [16] OSKOEI D S, RIKHTEGAR R, HASHEMILAR M, et al. The effect of Ginkgo biloba on functional outcome of patients with acute ischemic stroke: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2013, 22(8): e557-63.
- [17] DOHERTY J, BAEHRECKE E H. Life, death and autophagy [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(10): 1110-7.
- [18] GLICK D, BARTH S, MACLEOD K F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms [J]. *J Pathol*, 2010, 221(1): 3-12.
- [19] HOU K, XU D, LI F, et al. The progress of neuronal autophagy in cerebral ischemia stroke: mechanisms, roles and research methods [J]. *J Neurol Sci*, 2019, 400: 72-82.
- [20] CHEN W, SUN Y, LIU K, et al. Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(12): 1210-6.
- [21] BEARD D J, HADLEY G, THURLEY N, et al. The effect of rapamycin treatment on cerebral ischemia: A systematic review and meta-analysis of animal model studies [J]. *Int J Stroke*, 2019, 14(2): 137-45.
- [22] NI Y, GU W W, LIU Z H, et al. RIP1K contributes to neuronal and astrocytic cell death in ischemic stroke via activating autophagolysosomal pathway [J]. *Neuroscience*, 2018, 371: 60-74.
- [23] CHEN X, ZHANG X, LIAO W, et al. Effect of physical and social components of enriched environment on astrocytes proliferation in rats after cerebral ischaemia/reperfusion injury [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(5): 1308-16.
- [24] LI M Z, ZHANG Y, ZOU H Y, et al. Investigation of Ginkgo biloba extract (EGb 761) promotes neurovascular restoration and axonal remodeling after embolic stroke in rat using magnetic resonance imaging and histopathological analysis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 989-1001.
- [25] ZENG G R, ZHOU S D, SHAO Y J, et al. Effect of Ginkgo biloba extract-761 on motor functions in permanent middle cerebral artery occlusion rats [J]. *Phytomedicine*, 2018, 48: 94-103.
- [26] SAVASKAN E, MUELLER H, HOERR R, et al. Treatment effects of Ginkgo biloba extract EGb 761® on the spectrum of behavioral and psychological symptoms of dementia: meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Int Psychogeriatr*, 2018, 30(3): 285-93.
- [27] LI S, ZHANG X, FANG Q, et al. Ginkgo biloba extract improved cognitive and neurological functions of acute ischaemic stroke: a randomised controlled trial [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2017, 2(4): 189-97.
- [28] WOLF M S, BAYIR H, KOCHANEK P M, et al. The role of autophagy in acute brain injury: a state of flux [J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 122: 9-15.
- [29] SUN Y, ZHU Y, ZHONG X, et al. Crosstalk between autophagy and cerebral ischemia [J]. *Front Neurosci*, 2019, 12: 1022.
- [30] MORSELLI E, TASDEMIR E, MAIURI M C, et al. Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(19): 3056-61.
- [31] BUCKLEY K M, HESS D L, SAZONOVA I Y, et al. Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAO, and embolic MCAO, murine models of stroke [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2014, 6: 8.
- [32] ZHAO F, QU Y, ZHU J, et al. miR-30d-5p plays an important role in autophagy and apoptosis in developing rat brains after hypoxic-ischemic injury [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2017, 76(8): 709-19.
- [33] ZHANG Y, LIU J, YANG B, et al. Ginkgo biloba extract inhibits astrocytic lipocalin-2 expression and alleviates neuroinflammatory injury via the JAKS/STAT3 pathway after ischemic brain stroke [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 518.
- [34] DEMARIN V, BASIC KES V, TRKANJEC Z, et al. Efficacy and safety of Ginkgo biloba standardized extract in the treatment of vascular cognitive impairment: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2017, 13: 483-90.