

胡哲,赵军,宋晷,等. 银杏叶提取物对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的脑保护作用[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 55-61.

Hu Z, Zhao J, Song W, et al. Protective effect of ginkgo biloba extract on the brain in a cerebral ischemia-reperfusion injury rat model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 55-61.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.008

银杏叶提取物对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的 脑保护作用

胡 哲¹, 赵 军², 宋 晷³, 闫旭升³, 杨占君^{3*}, 贾建新^{3*}

(1. 包头医学院卫生健康学院解剖学教研室, 内蒙古 包头 014050; 2. 包头医学院第三临床医学院神经外科, 内蒙古 包头 014050; 3. 包头医学院人体解剖学教研室, 内蒙古 包头 014040)

【摘要】 目的 脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)严重影响神经功能, 本实验计划探讨银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, GBE)对 CIRI 模型大鼠神经功能是否具有改善作用及其相关机制。**方法** 闭塞大鼠大脑中动脉 2 h, 随后再灌注 22 h 制备 CIRI 大鼠模型, 给予不同剂量(25、50、100 mg/(kg·d))的 GBE 腹腔注射 15 d, 全程给药结束后对各组动物进行神经功能评分, 评价 GBE 对 CIRI 模型大鼠运动功能的影响; 采用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色评价 GBE 对脑梗死的影响; 蛋白免疫印迹法检测自噬标志性蛋白和凋亡相关蛋白的表达量; ELISA 法检测血清中谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-px)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性以及丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量。**结果** GBE 可明显提高 CIRI 模型大鼠的神经功能评分, 明显减小脑梗死体积; 显著上调血清 SOD 与 GSH-px 的活性, 以及降低 MDA 的含量; GBE 可明显提高 Beclin-1 的蛋白表达量、LC3-II/LC3-I 和 Bcl-2/Bax 的蛋白表达量比值, 相反降低了 Caspase-3 的蛋白表达量。**结论** GBE 改善 CIRI 模型大鼠的运动功能障碍可能是通过抑制氧化应激与凋亡进而激活自噬系统, 实现对脑细胞的保护作用。

【关键词】 脑缺血再灌注损伤; 银杏叶提取物; 自噬; 凋亡; 氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0055-07

Protective effect of ginkgo biloba extract on the brain in a cerebral ischemia-reperfusion injury rat model

HU Zhe¹, ZHAO Jun², SONG Wei³, YAN Xusheng³, YANG Zhanjun^{3*}, JIA Jianxin^{3*}

(1. Health School of Baotou Medical College, Baotou 014050, China. 2. Department of Neurosurgery, Third Clinical Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014050. 3. Department of Human Anatomy of Baotou Medical College, Baotou 014040)

【Abstract】 Objective The exact pathogenesis of cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) remains unclear. This study explored whether ginkgo biloba extract (GBE) can improve neurological function in a CIRI rat model and the related mechanisms. **Methods** The CIRI rat model was induced by middle cerebral artery occlusion for 2 h, followed by reperfusion

【基金项目】 内蒙古自治区卫生计生委科研计划项目(201701080)。

【作者简介】 胡哲(1975—), 男, 副教授, 医学硕士, 研究方向: 中蒙药对中枢神经系统退行性疾病的防治。E-mail: 1197832792@qq.com

【通信作者】 贾建新(1981—), 男, 教授, 医学博士, 研究方向: 中枢神经系统退行性疾病的防治。E-mail: jiajianxindx@163.com

杨占君(1968—), 男, 教授, 医学博士, 研究方向: 中枢神经系统退行性疾病的防治。E-mail: yzj8330@163.com

* 共同通信作者

for 22 h. Varying dosages of GBE were administered intraperitoneally for 15 days. Subsequently, CIRI model rats were scored for neurological function to evaluate the effect of GBE on their motor function. In addition, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining was used to detect the volume of infarcted brain, Western blot was used to detect expression of autophagy marker proteins and apoptosis-related proteins, the serum activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH-px) and serum level of malonaldehyde was detected by ELISA. **Results** GBE significantly improved the neurological function scores of CIRI model rats, markedly reduced cerebral infarction volumes, and significantly upregulated the activities of serum SOD and GSH-px, while decreasing the level of MDA. In addition, GBE significantly increased protein expression of Beclin-1 and protein expression ratios of LC3-II/LC3-I and Bcl-2/Bax, while remarkably reducing protein expression of Caspase-3. **Conclusions** GBE improved the motor dysfunction of CIRI model rats by inhibiting oxidative stress and apoptosis, as well as activating the autophagy system to achieve a protective effect on brain cells.

【Keywords】 cerebral ischemia-reperfusion injury; ginkgo biloba extract; autophagy; apoptosis; oxidative stress

脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI) 是指脑组织在缺血后恢复血流灌注时, 反而加重组织损伤及功能障碍的现象^[1]。CIRI 是一个非常复杂的病理生理学过程, 涵盖多个环节, 在脑组织缺血过程中, 血管阻塞使下游脑组织血流中断, 脑细胞失去能量及氧的供应, 引起脑细胞的功能障碍或死亡^[2]。现阶段, CIRI 的发病机制仍未完全阐明, 涉及兴奋性氨基酸的释放增加、能量代谢障碍、细胞发生酸中毒、自由基的堆积、细胞内 Ca^{2+} 浓度的失稳、凋亡基因的大量激活等^[3-5]。

银杏叶提取物 (ginkgo biloba extract, GBE) 是从银杏叶中获得的醇提物, 主要有效成分包括黄酮类和萜内酯类, 具有多种生物效应, 诸如抗炎、抑制神经细胞凋亡和兴奋性氨基酸的释放、抗氧化和氧自由基损伤等。既往研究显示, GBE 对 CIRI 的神经功能具有显著的改善作用, 但其确切的分子机制仍未知^[6]。本研究计划探讨 GBE 是否对 CIRI 模型大鼠具有治疗作用及可能机制, 旨在为临床 CIRI 提供新治疗靶点及中草药的研发提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 60 只, 7~8 周龄, 体重 260~280 g, 实验大鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2019-0010] 提供。饲养于包头医学院实验动物中心 [SYXK (蒙) 2018-0001], 自主进食水、维持饲料。包头医学院实验动物伦理委员会已批准相关研究工作 (包院字 20201102), 所有实验动物在饲养和实验过程中均按照 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

银杏叶提取物 (北京中检院); 2,3,5-氯化三苯

基四氮唑 (TTC, Sigma 公司, 美国); 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-px)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) (武汉新启迪生物科技有限公司); Beclin-1、LC3-II、LC3-I、Bcl-2、Bax、Caspase-3、 β -actin 抗体 (Proteintech 公司, 美国)。低温高速离心机 (Thermo 公司, 美国); -80°C 超低温冰箱 (Thermo 公司, 美国); 垂直板电泳槽 (北京六一生物科技有限公司); 酶标仪 (Thermo 公司, 美国); 蛋白凝胶成像分析系统 (上海 Tanon 科技有限公司); 移液枪 (Eppendorf 公司, 德国); 脱色摇床 (北京六一生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 CIRI 动物模型的制备以及神经功能评分

本实验所用动物模型的制备方法参照改良的 Zea-longa 线栓法^[5], 闭塞大鼠左侧大脑中动脉 (middle cerebral artery, MCA) 2 h, 随后再灌注 22 h, 术前 12 h 禁食不禁水。大鼠用 2% (100 mg/kg) 戊巴比妥钠 (0.3 mL/100 g) 腹腔注射麻醉, 仰卧颈部备皮消毒, 暴露左侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA), 并将迷走神经与之分离。向远心端将颈内动脉 (internal carotid artery, ICA) 和颈外动脉 (external carotid artery, ECA) 的起始部进行钝性分离, 在 CCA 远心端和近心端及 ECA 处挂线备用。用微动脉夹暂时夹闭 ICA, 然后近心端结扎 CCA、ECA。在 CCA 分叉部约 4 mm 处剪一小口, 将栓线插入到 ICA, 用绕在 CCA 远心端的细线轻轻系牢栓线。线栓经 CCA、ICA 置入 MCA, 出现阻力时停止前进并轻轻系牢 CCA 远心端的细线, 缺血 2 h 后拔出栓线实现再灌注 22 h, 局部放置凝胶海绵止血, 待止血完全后缝合切口, 常规消毒。

1.3.2 实验动物分组、给药

动物给予充足饮水和饮食, 12 h 明暗交替。将

60 只动物分为两组,10 只动物作为空白对照组,其余 50 只动物用于 CIRI 模型制备。模型制备完成后,神经功能评分评价动物造模效果,神经功能评分法采用国际通用的 Zea-Longa 评分法^[7],神经功能评分为 0~4 分 5 级:0 分,功能表现无缺陷;1 分,瘫痪侧前爪不能彻底伸展;2 分,行走时向瘫痪侧偏移甚至转圈;3 分,行走时向瘫痪侧倾倒;4 分:无法自主活动、意识丧失或死亡。实验剔除 0 分和 4 分的动物,动物神经功能评分 ≥ 2 分确定为模型制备成功,剔除造模失败的动物,成模的动物随机分为以下 4 组:模型组、GBE 低、中、高剂量组(25、50、100 mg/(kg·d))。GBE 用无菌蒸馏水溶解,调整 GBE 各剂量组药物浓度,保证各剂量组给药体积等量(0.5 mL)。模型组给予同等体积的无菌生理盐水,连续给药 15 d。

1.3.3 蛋白标本、组织切片的存取和制备

全程实验结束后,所有动物常规麻醉,主动脉采血 1 mL 置于 EP 管备用。每组半数动物取脑,冻存于超低温冰箱以备后用。半数动物用于 TTC 染色计算脑梗死面积。

1.3.4 TTC 染色以及脑梗死体积的计算

实验结束后将用于 TTC 染色的大鼠断头取脑,生理盐水灌注脑组织,-20℃ 放置数分钟,冠状位将大脑用脑膜均分为 5 片。将切好的脑片放入 2% TTC 染液中,37℃ 避光染色 20 min,4% 多聚甲醛固定,将染好的脑片排列于平板上拍照。脑底有血凝块、动脉环血栓形成的动物予以排除。脑梗死体积通过梗死体积比率表示(梗死体积比率=各切面梗死面积之和/各切面面积之和 $\times 100\%$),用 IPP (Image Pro-Plus) 图像分析软件进行计算。

1.3.5 蛋白免疫印迹(Western blot)

脑组织称重后进行蛋白裂解,蛋白在冰浴环境下超声破碎数次。4℃ 离心 12000 r/min 离心 15 min,提取并测定浓度,每 100 μ L 样品蛋白加入 4 $\times$ Buffer 33.3 μ L 后振荡混匀,沸水煮沸 10 min 使蛋白变性。蛋白上样,恒压 80 V 浓缩胶电泳,恒压 120 V 分离胶电泳,300 mA 湿转膜约 60 min;室温下 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后漂洗;一抗孵育 4℃ 摇床过夜,次日 T-TBS 液漂洗数次;室温下二抗避光孵育 1 h 后漂洗数次;成像分析系统对条带进行统计分析。

1.3.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)

实验全部结束后,各组动物经腹腔注射麻

醉。抽取大鼠尾静脉血 0.3~0.5 mL 置于预冷的 EP 管,随后 4℃ 离心 15 min(5000 r/min),留取 100 μ L 血清备用。检测血清 SOD 和 GSH-px 活性、MDA 的含量,具体操作步骤根据试剂盒说明书进行。

1.4 统计学方法

实验数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。实验数据多样本均数的两两比较采用 SNK-*q* 检验分析,多样本率的两两比较采用 χ^2 分割法分析,以 $P<0.05$ 表示存在显著性差异。

2 结果

2.1 GBE 对脑缺血再灌注损伤模型大鼠神经功能评分和运动状态的影响

本实验用于模型制备的大鼠 50 只,最终造模成功 48 只,死亡 1 只(麻醉致死),造模失败 1 只,模型成功率为 96.00%。CIRI 造模手术后 24 h 对大鼠进行第 1 次 Longa 神经功能评分,神经行为学评分为(2.80 $\pm$ 0.39)分,与空白对照组比较存在显著性差异($P<0.05$)。成模动物运动障碍主要表现为左侧眼裂变小,右侧前肢瘫痪,行走时向右侧转圈或向右侧倾倒,部分动物出现四肢直立性战栗或全瘫痪等。周期给药结束后,对各组动物进行第 2 次神经功能评分,与空白对照组比较,其余 4 组动物神经功能评分均存在显著性差异($P<0.05$);与模型组相比,各剂量组神经行为学评分均明显的降低($P<0.05$),运动障碍症状显著改善,但中剂量组(1.51 $\pm$ 0.22)分与高剂量组(1.60 $\pm$ 0.26)分动物神经行为学评分之间无显著性差异($P>0.05$)。与第 1 次神经功能评分比较,模型组动物神经行为学评分有所减小,但无显著性差异($P>0.05$),运动障碍症状未见显著改善;而 GBE 各剂量组动物运动障碍症状均出现明显改善,神经功能评分均明显降低($P<0.05$),尤其以中、高剂量组改变更为显著,详见表 1。

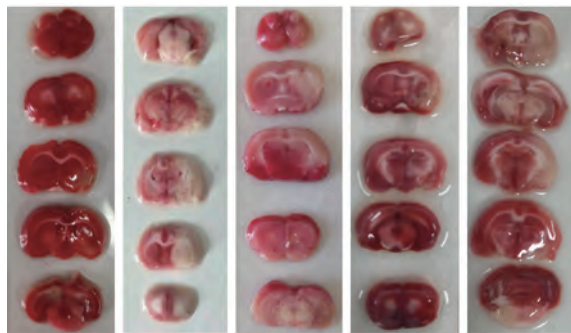
2.2 GBE 对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑梗死体积的影响

TTC 染色后的脑组织非梗死区呈鲜红色,梗死区灶呈苍白色。空白对照组大鼠脑组织呈鲜红色,模型组大鼠左侧大脑半球部分区域呈苍白色。模型组、GBE 各剂量组梗死体积比率与空白对照组比较均存在显著性差异($P<0.05$);与模型组比较,GBE 各剂量组梗死体积比率均出现显著性减小($P<$

0.05), 尤以中剂量组、高剂量组更为显著, 剂量组之间梗死体积比率无显著性差异(图 1、表 1)。

2.3 GBE 对脑缺血再灌注损伤模型大鼠血清 ELISA 氧化应激指标的影响

与空白对照组相比, 模型组 MDA 的含量出现了明显增加($P < 0.05$), 而 SOD 与 GSH-px 的活性均出现了显著性降低($P < 0.05$); GBE 低剂量组 GSH-px 的活性较空白对照组显著性降低($P < 0.05$), 而 MDA 的含量显著性升高($P < 0.05$); GBE 中、高剂量组与空白对照组比较上述氧化应激指标



注: a: 空白对照组; b: 模型组; c: GBE 低剂量组; d: GBE 中剂量组; e: GBE 高剂量组。

图 1 TTC 染色显示各组动物脑梗死体积比率

Note. a, Control group. b, Model group. c, Low GBE group. d, Intermediate GBE group. e, High GBE group.

Figure 1 TTC staining shows the volume ratio of cerebral infarction area in each group

表 1 各组动物神经功能评分、梗死体积比率的比较($n = 12$)

Table 1 Neurological function score and infarct volume ratio were compared in each group

组别 Groups	术后 24 h Post-operation 24 h	GBE 给药 15 d GBE administration 15 d
空白对照组 Control group	0	0
模型组 Model group	2.91±0.45 [*]	2.75±0.39 [*]
GBE 低剂量组 Low GBE group	2.66±0.32 [*]	1.92±0.25 ^{*##}
GBE 中剂量组 Intermediate GBE group	2.84±0.41 [*]	1.51±0.22 ^{*##}
GBE 高剂量组 High GBE group	2.78±0.38 [*]	1.60±0.26 ^{*##}

注: 与空白对照组相比, $^*P < 0.05$; 与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$; 与术后 24 h 相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, $^*P < 0.05$. Compared with model Group, $^{\#}P < 0.05$. Compared with post-operation 24 h, $^{\Delta}P < 0.05$.

表 2 各组 ELLISA 检测血清 SOD、GSH-px 的活性与 MDA 含量的比较($n = 12$)

Table 2 ELLISA detects the serum activities of SOD, GSH-px and MDA content in each group

组别 Groups	超氧化物歧化酶 (U/mL) SOD	谷胱甘肽过氧化物酶 (nmol/L) GSH-px	丙二醛 (nmol/L) MDA
空白对照组 Control group	225.24±20.05	52.65±5.18	1.95±0.27
模型组 Model group	155.41±12.65 [*]	30.34±3.38 [*]	3.51±0.36 [*]
GBE 低剂量组 Low GBE group	195.53±18.27 [#]	40.09±4.77 ^{*##}	2.74±0.30 ^{*#}
GBE 中剂量组 Intermediate GBE group	214.26±17.80 [#]	45.28±4.42 [#]	2.22±0.33 [#]
GBE 高剂量组 High GBE group	207.61±12.71 [#]	44.23±3.90 [#]	2.35±0.39 [#]

注: 与空白对照组相比, $^*P < 0.05$; 与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, $^*P < 0.05$. Compared with model group, $^{\#}P < 0.05$.

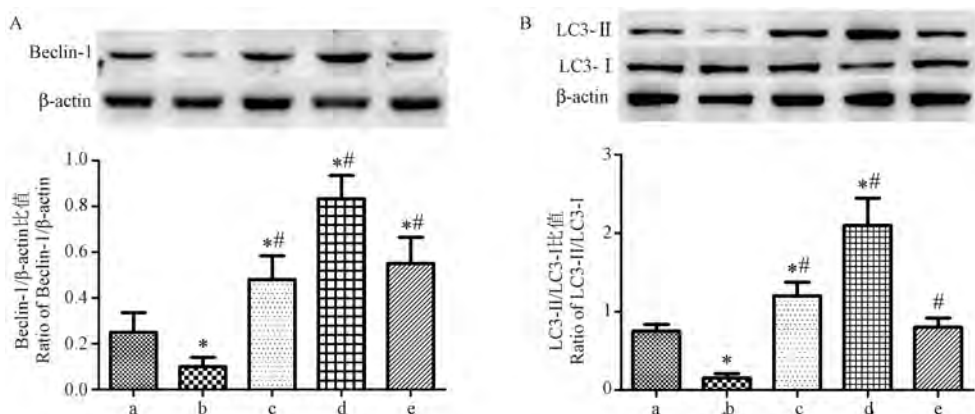
均无显著性差异($P > 0.05$)。与模型组比较, GBE 各剂量组血清 MDA 的含量均出现了显著性下降($P < 0.05$), SOD 与 GSH-px 的活性均显著升高($P < 0.05$), 其中尤以中剂量组对上述指标的影响最为显著(详见表 2)。上述实验结果表明, GBE 可以显著抑制脑缺血再灌注损伤模型大鼠的氧化应激损伤程度, GBE 具有明显的抗氧化损伤作用。

2.4 GBE 对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织自噬相关蛋白表达的影响

模型组的 Beclin-1 蛋白表达量较空白对照组明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 各 GBE 剂量组 Beclin-1 的表达量均出现了明显升高($P < 0.05$), 但以中剂量对 Beclin-1 的表达量的影响最为显著(图 2A)。与空白对照组相比, 模型组 LC3-II/LC3-I 的蛋白表达量比值明显降低($P < 0.05$), 与模型组比较, 各 GBE 剂量组 LC3-II/LC3-I 的蛋白表达量比值均出现了明显升高($P < 0.05$), 但以中剂量对 LC3-II/LC3-I 的蛋白表达量比值的影响最为显著(图 2B)。上述结果表明, GBE 可以显著上调脑缺血再灌注损伤模型大鼠的自噬水平。

2.5 GBE 对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织凋亡相关蛋白表达的影响

模型组的 Bcl-2/Bax 蛋白表达量比值较空白对照组明显降低($P < 0.05$), 而 Caspase-3 的蛋白表达量显著增加($P < 0.05$)。与模型组比较, 各 GBE 剂量组 Bcl-2/Bax 的蛋白表达量比值均出现了明显升

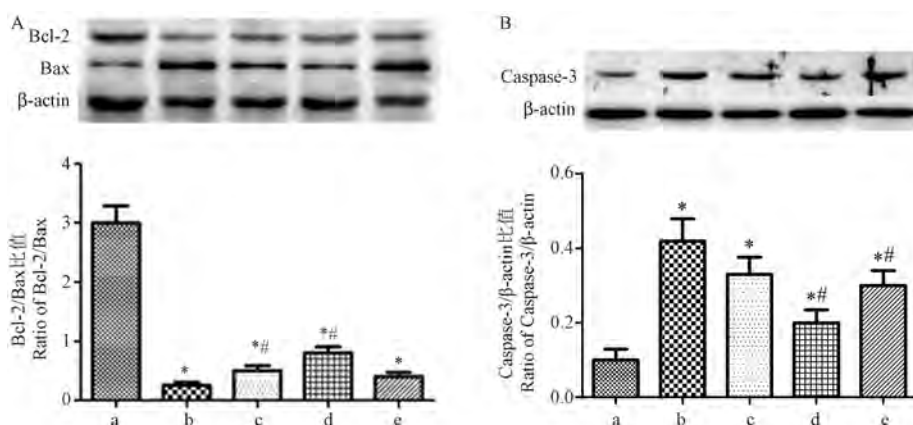


注:a;空白对照组;b;模型组;c;GBE 低剂量组;d;GBE 中剂量组;e;GBE 高剂量组。A;Beclin-1 蛋白;B;LC3-II/LC3-I 蛋白。与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图2 蛋白免疫印迹检测各组动物脑组织 Beclin-1 蛋白和 LC3-II/LC3-I 蛋白的表达

Note. a, Control group. b, Model group. c, Low GBE group. d, Intermediate GBE group. e, High GBE group. A, Beclin-1. B, LC3-II/LC3-I. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 2 Western blot detects the protein expression level of Beclin-1 and LC3-II/LC3-I in brain tissues of each group



注:a;空白对照组;b;模型组;c;GBE 低剂量组;d;GBE 中剂量组;e;GBE 高剂量组。A;Bcl-2/Bax 蛋白;B;Caspase-3 蛋白。与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图3 蛋白免疫印迹检测各组动物脑组织 Bcl-2/Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达

Note. a, Control group. b, Model group. c, Low GBE group. d, Intermediate GBE group. e, High GBE group. A, Bcl-2/Bax. B, Caspase-3. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Western blot detects the protein expression ratio of Bcl-2/Bax and Caspase-3 in brain tissues of each group

高,但以低剂量组、中剂量最为显著 ($P < 0.05$);各 GBE 剂量组 Caspase-3 的蛋白表达量均出现了明显降低 ($P < 0.05$),但以中剂量、高剂量组对 Caspase-3 的蛋白表达量的影响最为显著。上述结果表明,GBE 可以显著抑制脑缺血再灌注损伤模型大鼠细胞凋亡水平(图3)。

3 讨论

目前,GBE 广泛用于临床治疗帕金森病和阿尔茨海默病等中枢神经系统退行性疾病,并取得了较好的疗效^[8-10]。本文研究发现,GBE 可以明显减小

MCAO 模型大鼠脑梗死区域面积,并且显著提高了神经功能评分,表明 GBE 对 CIRI 脑组织具有显著的保护作用,这与既往报道相一致^[11-13]。本实验结果显示,GBE 在低中剂量 ($25 \sim 50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$) 给药区间随给药剂量的增加,药效作用呈现逐渐增加的趋势,而高剂量组 ($100 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$) 药效作用呈现下降趋势, $50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 组药效作用达到高峰,提示 GBE 改善 MCAO 模型大鼠的最佳剂量应该趋于 $50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 附近。

既往研究证明,再灌注引发的继发性脑损伤中氧化应激损伤发挥关键作用^[14]。本实验中大脑中

动脉闭塞(MCAO)引起脑组织缺血缺氧诱发梗死,进而导致神经功能障碍和神经细胞的不可逆损伤。恢复血液再灌注的过程对脑组织造成了进一步的损伤,大量自由基产生,对细胞造成了氧化应激损伤。既往研究报道,GBE 具有显著的抗氧化应激损伤的作用,GBE 通过清除自由基减轻缺血再灌注损伤,进而发挥神经保护作用^[15]。本实验结果显示,MCAO 在引起脑组织梗死的同时出现血清 SOD 与 GSH-px 的活性明显降低,MDA 的含量明显增加,表明机体发生了严重的氧化应激损伤;GBE 干预后可以明显减小梗死区的体积,同时引起 CIRI 模型大鼠血清 SOD 与 GSH-px 的活性明显增加,MDA 的含量明显减小,表明 GBE 具有显著的抗氧化应激药效作用,其可能通过减轻机体氧化应激损伤与清除自由基对 CIRI 发挥脑保护作用。

既往研究显示,细胞凋亡可能在 CIRI 的病理过程中起着重要的作用^[16]。神经凋亡与 Bcl-2(抑制细胞凋亡)和 Bax(促进细胞凋亡)的表达相关,Bax 表达升高导致线粒体通透性增加,诱导 Cytc 释放进入胞质,激活 Caspase-3 引起细胞凋亡。既往报道,凋亡的发生与 CIRI 后所产生氧自由基、炎症因子诱发而引起^[17]。银杏叶提取物(EGb761)能够有效清除氧自由基,抑制脂质的氧化,显著提高 Bcl-2/Bax 蛋白表达量比值,提示银杏叶可抑制神经细胞的凋亡,对 CIRI 模型动物脑损伤发挥显著的保护作用^[18-19]。本研究结果显示,GBE 可显著提高 CIRI 模型大鼠脑组织 Bcl-2/Bax 的蛋白表达量比值,相反降低了 Caspase-3 的蛋白表达量,GBE 引起 CIRI 模型大鼠血清 SOD 与 GSH-px 的活性明显增加,MDA 的含量明显减小,表明 GBE 具有显著的抗氧化应激药效作用,实验结果说明 GBE 通过抗氧化应激抑制了 CIRI 的神经损伤和细胞凋亡。

自噬(autophagy)是机体通过细胞内自噬溶酶体清除降解受损细胞器及体内大分子物质的过程,在细胞体内发挥“清道夫”的作用。自噬通过平衡细胞的合成和分解代谢,维持机体内环境稳态,发挥机体自身保护和防御作用^[20]。Beclin-1 是酵母 Atg6/Vps30 的同源基因,Beclin-1 调控哺乳动物自噬体的形成和成熟,是自噬体形成的必需分子,其可以将其他的自噬蛋白定位在吞噬泡,故越来越多的学者将其作为衡量自噬发生程度的标记物之一^[21-22]。LC3-II 是自噬体形成的生物学标志,定位于自噬体膜上。在 ATG7 及 ATG3 共同作用下,胞

质中游离的 LC3-I 与磷脂酰乙醇胺结合酯化形成 LC3-II,而 LC3-I 是由哺乳动物酵母菌 ATG8 的同源基因 LC3 在自噬相关蛋白 ATG4 的作用下脱去羟基生成^[23]。

郝莉等^[24]研究表明,银杏酮酯能提高自然衰老大鼠的海马 LC3-II 蛋白表达水平,通过调控机体自噬水平改善自然衰老相关的学习认知功能障碍。当机体遭受缺血缺氧等应激刺激时,神经细胞存活率明显降低,激活自噬能显著抑制细胞死亡,故认为自噬激活对应激状态下的神经细胞具有保护作用^[25-26]。本研究结果显示,GBE 能显著抑制机体氧化应激损伤程度,同时 Beclin-1 与 LC3-II/LC3-I 的表达量均显著上调,这提示 GBE 极有可能是通过激活自噬,进而对 CIRI 模型大鼠神经细胞发挥保护作用,最终改善脑缺血再灌注损伤的神经功能表现。该实验结果为临床 CIRI 的防治开辟了新思路,也为中草药的开发与利用提供了实验依据。

综上所述,本研究结果表明 GBE 可以通过增强机体自噬水平、提高机体抗氧化应激损伤和抗凋亡,发挥对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用,进而改善 MCAO 模型大鼠的行为功能,从而达到保护缺血性脑卒中的目的,进而为脑缺血再灌注损伤的治疗提供新的靶点及治疗策略。

参考文献:

- [1] Stegner D, Klaus V, Nieswandt B. Platelets as modulators of cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2505.
- [2] Yang B, Zang LE, Cui JW, et al. Melatonin plays a protective role by regulating miR-26a-5p-NRSF and JAK2-STAT3 pathway to improve autophagy, inflammation and oxidative stress of cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 3177-3188.
- [3] 靳晓飞, 张弋宁, 周晓红, 等. 黄芪甲苷对脑缺血再灌注大鼠炎症因子及超微结构的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 1-6.
- [4] 王瑜, 王天龙, 赵磊, 等. 局部脑缺血再灌注损伤对小鼠 TMEM166 基因和神经细胞自噬的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(7): 28-32.
- [5] 曹慧, 宋玉晨, 张颖, 等. 红景天苷对脑缺血再灌注模型大鼠的治疗作用及其在脑组织中的动态含量研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(2): 180-186.
- [6] 韩望, 方伟荣, 李远曼, 等. 银杏黄酮和银杏内酯醇比大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究 [J]. *时珍国医医药*, 2019, 30(1): 89-91.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*,

- 1989, 20(1): 84-91.
- [8] Song W, Zhao J, Yan XS, et al. Mechanisms associated with protective effects of Ginkgo biloba leaf extraction in rat cerebral ischemia reperfusion injury [J]. J Toxicol Environ Health A, 2019, 82(19): 1045-1051.
- [9] 袁海虹, 周薇, 吴国忠, 等. 银杏叶提取物保护视网膜缺血-再灌注损伤与自噬的关系 [J]. 上海交通大学学报医学版, 2014, 34(5): 635-639.
- [10] 赵军, 武月娥, 张健敏, 等. 银杏叶提取物对脑缺血再灌注损伤模型大鼠氧化应激和炎症的治疗作用 [J]. 包头医学院学报, 2019, 35(1): 61-63, 92.
- [11] 饶江燕, 王倩, 王钰淳, 等. β -石竹烯通过激活自噬减轻小鼠脑缺血/再灌注损伤的研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(4): 932-936.
- [12] Yang YM, Liu PF, Chen LX, et al. Therapeutic effect of Ginkgo biloba polysaccharide in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury [J]. Carbohydr Polym, 2013, 98(2): 1383-1388.
- [13] Tang YP, Zhou GS, Yao LJ, et al. Protective effect of Ginkgo biloba leaves extract, EGb761, on myocardium injury in ischemia reperfusion rats via regulation of TLR-4/NF- κ B signaling pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(49): 86671-86680.
- [14] 刘自然, 霍东升, 贾建新, 等. 5-(4-羟基-3-甲氧基苯亚甲基) 罗丹宁对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2): 37-42.
- [15] Diamond BJ, Bailey MR. Ginkgo biloba: indications, mechanisms, and safety [J]. Psychiatr Clin North Am, 2013, 36(1): 73-83.
- [16] Nagy Z, Nardai S. Cerebral ischemia/reperfusion injury: From bench space to bedside [J]. Brain Res Bull, 2017, 134: 30-37.
- [17] Smith DL, Soria JC, Morat L, et al. Human telomerase reverse transcriptase (Hthrt) and Ki-67 are better predictors of survival than established clinical indicators in patients undergoing curative hepatic resection for colorectal metastases [J]. Ann Surg Oncol, 2004, 11(1): 45-51.
- [18] 吕建国, 孙燕玲. 大鼠全脑缺血再灌注后海马 CA1 区细胞凋亡及银杏叶提取物的保护作用 [J]. 解剖学杂志, 2018, 41(4): 395-399.
- [19] 张春军, 董琦, 董凯. 银杏叶对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞凋亡、Bcl-2 和 Bax 表达的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(23): 3714-3716.
- [20] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double edged sword [J]. Science, 2004, 306(5698): 990-995.
- [21] 李媛, 靳晓飞, 周晓红, 等. 黄芪甲苷对脑缺血/再灌注损伤大鼠细胞自噬的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(11): 2037-2042.
- [22] Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, et al. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin1 complexes [J]. Biochimie, 2008, 90(2): 313-323.
- [23] 赵安东, 李玉亮, 辛益妹, 等. 银杏叶提取物对大鼠脑缺血再灌注氧化损伤的保护作用 [J]. 空军医学杂志, 2013, 29(2): 93-95.
- [24] 郝莉, 徐玉英, 郭春霞, 等. Beclin1 在银杏酮酯改善衰老大鼠学习记忆中的作用 [J]. 上海中医药大学学报, 2018, 32(5): 45-49.
- [25] Wang P, Xu Y, Wei K, et al. ARRB1/ β -arrestin-1 mediates neuroprotection through coordination of BECN1 dependent autophagy in cerebral ischemia [J]. Autophagy, 2014, 10(9): 1535.
- [26] 丁培炎, 王冬, 赫曼, 等. 短期禁食诱导自噬对大鼠脑缺血损伤的保护作用 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2013, 12(3): 201-204.

[收稿日期] 2021-01-29