

银杏叶提取物调控 TLR4/NF- κ B 通路减轻急性脑缺血小鼠脑皮质缺血研究

刘磊¹, 卫昊², 陈丹丹², 贾瑞¹, 张巍岚¹

1. 陕西中医药大学基础医学院, 陕西 咸阳 712046

2. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

摘要:目的 观察银杏叶提取物对急性脑缺血小鼠脑皮质缺血的影响,并探讨其对 Toll 样受体 4(TLR4)/核因子- κ B(NF- κ B) 通路的影响。方法 选取 60 只成年健康雄性 CD1 小鼠,随机分为假手术组、模型组、阳性对照 (3×10^4 IU/kg 乌司他丁) 组及银杏叶提取物低、中、高剂量 (10、20、40 mg/kg) 组,除假手术组外其余 5 组均建立急性脑缺血小鼠模型。建模成功后,各组小鼠分别尾 iv 给予相应药物,假手术组和模型组均给予等量生理盐水。观察小鼠脑皮质病理变化和组织学分级;对比各组存活神经元密度;比色法检测脑皮质组织丙二醛 (MDA) 水平,黄嘌呤氧化法检测小鼠脑皮质组织超氧化物歧化酶 (SOD) 水平;实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测小鼠脑皮质组织 Toll 样受体 4 (TLR4)、核转录因子 NF- κ B p65 (NF- κ B p65) mRNA 表达;Western blotting 法检测脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达。结果 假手术组小鼠脑皮质组织结构正常,细胞饱满且排列紧密、有序;模型组小鼠脑皮质组织结构严重受损,细胞严重皱缩,排列紊乱;乌司他丁组和银杏叶提取物各剂量组小鼠病理变化均减轻,且呈剂量依赖;与假手术组比较,其余 5 组小鼠组织学分级、脑皮质组织 MDA 水平均升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,乌司他丁组和银杏叶提取物各剂量组小鼠组织学分级、脑皮质组织 MDA 水平均下降 ($P < 0.05$);与乌司他丁组比较,银杏叶提取物高剂量组小鼠组织学分级、脑皮质组织 MDA 水平均下降 ($P < 0.05$)。与假手术组比较,其余 5 组小鼠脑皮质存活神经元密度、脑皮质组织 SOD 水平均下降 ($P < 0.05$);与模型组比较,乌司他丁组和银杏叶提取物各剂量组小鼠存活神经元密度、脑皮质组织 SOD 水平均升高 ($P < 0.05$);与乌司他丁组比较,银杏叶提取物高剂量组小鼠存活神经元密度、脑皮质组织 SOD 水平升高 ($P < 0.05$)。与假手术组比较,其余 5 组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达均升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,乌司他丁组和银杏叶提取物各剂量组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达均下降 ($P < 0.05$);与乌司他丁组对比,银杏叶提取物高剂量组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$)。结论 银杏叶提取物可减轻急性脑缺血小鼠脑皮质缺血所致的病理改变,减轻神经功能受损,改善脑皮质组织氧化应激指标,推测其可能是通过调控 TLR4/NF- κ B p65 信号通路,抑制 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达实现的。

关键词: 银杏叶提取物; 急性脑缺血; 脑皮质缺血; Toll 样受体 4; 核转录因子- κ B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)21-5282-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.21.022

Effect of *Ginkgo biloba* extract on TLR4/NF- κ B pathway in alleviating cerebral ischemia in mice with acute cerebral ischemia

LIU Lei¹, WEI Hao², CHEN Dan-dan², JIA Rui¹, ZHANG Wei-lan¹

1. School of Basic Medicine, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. School of Pharmacy, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To observe the effect of *Ginkgo biloba* extract on cerebral cortical ischemia in mice with acute cerebral ischemia and explore its effect on Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway. **Methods** Sixty adult healthy male CD1 mice were randomly divided into sham operated group, model group, positive control group (3×10^4 IU/kg ulinastatin) and *Ginkgo biloba* extract low, medium and high doses (10, 20, 40 mg/kg) groups. The acute cerebral ischemia model in other five groups were all established except sham operated group. After successful modeling, mice in each group were given corresponding drugs iv tail, sham operation group and model group were given the same amount of saline. The pathological changes and histological grades of the cerebral cortex were observed. The survival neuron density of each group was compared. Malondialdehyde (MDA) and superoxide

收稿日期: 2019-07-02

作者简介: 刘磊 (1983—), 男, 陕西汉中, 硕士研究生, 讲师, 主要研究方向为心脑血管疾病损伤及防治机制研究。

Tel: 18691018969 E-mail: liulei8308@163.com

dismutase (SOD) were measured by colorimetry and xanthine oxidation respectively. The expressions of Toll like receptor 4 (TLR4) and nuclear transcription factor NF- κ B p65 (NF- κ B p65) mRNA were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). Western blotting was used to detect TLR4 and NF- κ B p65 protein expression. **Results** In sham-operated group, the structure of cerebral cortex was normal, and the cells were full and arranged tightly and orderly. In the blank control group, the structure of cerebral cortex was severely damaged, and the cells were severely shrunk and disordered. Pathological changes in the Ulinastatin group and *Ginkgo biloba* extract groups were alleviated and dose-dependent. Compared with the sham operation group, the other five groups showed higher histological grade and MDA level in cerebral cortex ($P < 0.05$). Compared with the model group, the histological grade and MDA level of cerebral cortex decreased in ulinastatin group and *Ginkgo biloba* extract groups ($P < 0.05$). Compared with ulinastatin group, the histological grade and MDA content of brain cortex decreased in high dose group ($P < 0.05$). Compared with the sham operated group, the density of surviving neurons and the level of SOD in the other five groups decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the density of survival neurons and the level of SOD in cortex increased in ulinastatin group and *Ginkgo biloba* extract group ($P < 0.05$). Compared with ulinastatin group, the density of survival neurons and the level of SOD in cortex increased in high dose group ($P < 0.05$). Compared with the sham operated group, the expression of TLR4, NF- κ B p65 mRNA and protein in the other five groups increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of TLR4, NF- κ B p65 mRNA and protein in cortex of mice in ulinastatin group and *Ginkgo biloba* extract group decreased ($P < 0.05$). Compared with ulinastatin group, the expression of TLR4, NF- κ B p65 mRNA and protein in the brain cortex of mice decreased in the high dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Ginkgo biloba* extract can alleviate the pathological changes caused by cerebral ischemia in mice with acute cerebral ischemia, alleviate neurological impairment, and improve oxidative stress indexes of cerebral cortex tissues. It is presumed that it may be achieved by regulating TLR4/NF- κ B p65 signaling pathway and inhibiting the expressions of TLR4 and NF- κ B p65 proteins.

Key words: *Ginkgo biloba* extract; acute cerebral ischemia; cerebral cortical ischemia; Toll-like receptor 4; nuclear factor- κ B

急性脑缺血是临床常见的一类神经内科疾病,可分为血栓形成性和栓塞性 2 类,均可影响局部脑组织的正常血液供应,损伤神经功能。据统计^[1],我国老年人群中短暂性脑缺血发作和急性缺血性脑卒中的发病率分别为 12%~15%和 200 万人/年,且发病率仍逐年增长。另有报道显示^[2],目前我国脑卒中的发病率正以每年 8.7%的速率增长,且致残率和死亡率均较高,需引起高度重视。对于此类患者,临床多主张采用介入手术治疗,配合给予神经营养、溶栓和降低颅内压等药物,但综合疗效和预后均不甚理想^[3-4]。银杏叶提取物是从银杏叶中提取的有效成分,主要作用于脑部,可减轻周围血流循环障碍。有研究显示^[5],银杏叶提取物可减轻急性脑缺血动物模型的神经功能损伤。Toll 样受体 4/核转录因子- κ B (TLR4/NF- κ B) p65 信号通路是脑缺血发生后局部组织氧化应激和炎症反应损伤病变的重要调控机制^[6]。而银杏叶提取物是否能够通过调控 TLR4/NF- κ B p65 通路减轻急性脑缺血发生后脑皮质组织的缺血状态仍需深入探讨。鉴于此,本研究研究银杏叶提取物对小鼠急性脑缺血发生后脑皮质组织缺血状态的影响及其作用机制,以期为其临床应用提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级成年健康雄性 CD1 小鼠 60 只,7~9 周,

体质量 22~26 g,购自上海焯翎生物科技有限公司,货号 M1200,实验动物许可证号 SCXK(沪)2018-0002,分笼饲养,自由饮食和进水。

1.2 药品与试剂

银杏叶提取物(批号 N111212,质量分数 $\geq 98\%$),江苏邳州市金龙生化制品有限公司;乌司他丁(批号 18012502A,质量分数 $\geq 98\%$),广东天普生化医药股份有限公司;HE 染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒购自上海继锦化学科技有限公司;Trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;BCA 试剂盒购自北京中杉金桥公司;兔抗鼠 TLR4、NF- κ B p65 单克隆抗体与山羊抗兔多克隆抗体均购自上海基康生物技术公司。

1.3 仪器

XSZ-H 型光学显微镜(购自重庆光学仪器厂);ICP-AES 型离心机购自天美(中国)科学仪器有限公司;9600 型 PCR 仪购自美国 ABI 公司;164-5050 型电泳仪购自上海希言科学仪器有限公司。

2 方法

2.1 造模及给药

将 60 只成年健康雄性 CD1 小鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照(3×10^4 IU/kg 乌司他丁)组及银杏叶提取物低、中、高剂量(10、20、40 mg/kg)

组, 每组 10 只。除假手术组外其余 5 组均制备急性脑缺血小鼠模型。方法为常规腹腔麻醉, 选取仰卧位, 沿颈部正中切开, 长度约为 1 cm, 轻柔分离左侧颈总动脉、颈内外动脉和迷走神经, 其中颈外动脉需夹闭处理, 颈总动脉近心端需结扎处理, 并在其分叉部位备线, 夹闭。在夹闭位置上方 1 mm 剪口, 将烧圆的 5~0 号尼龙线插入前端, 去除动脉夹后将其插入颈总动脉, 深度约为 10 mm, 将切口与线栓同时结扎, 制备模型, 其中假手术组分离颈总动脉的操作与上述方法完全相同, 但无需用尼龙线插入结扎, 所有小鼠均需缝合伤口。乌司他丁组小鼠尾 iv 给予 3×10^4 IU/kg 乌司他丁, 银杏叶提取物低、中、高剂量组小鼠分别尾 iv 给予相应剂量药物, 假手术组和模型组均给予等量生理盐水。

2.2 脑皮质病理变化、组织学分级、存活神经元密度检测

所有小鼠均于干预 48 h 后以 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 将其固定后采用 4% 多聚甲醛经左心室灌注固定, 断头并于冰上迅速取脑, 用小镊子从矢状缝将皮质向两侧分开, 从里向外翻, 显露海马和纹状体后将整个大脑皮质迅速分离, 并将其放置于含有生理盐水湿润的定性滤纸的培养皿中备用。取脑皮质组织固定、包埋切片后采用 HE 染色试剂盒染色并于光镜下观察脑皮质缺血后病理学变化。对脑皮质组织进行分级, 其中将无神经元死亡者记为 0 级; 将有散在的神经元死亡者记为 2 级; 将有部分或成片神经元死亡者记为 3 级; 将几乎所有神经元均死亡者记为 4 级^[7]。在光镜下统计存活神经元个数并计算密度, 具体操作为选取 3 个不重复视野, 查找存活神经元个数, 其中将神经元结构与形态基本正常、核仁清晰且无核固缩记为神经元存活, 将其累加并求取平均值。

2.3 脑皮质组织 MDA、SOD 含量检测

将小鼠脑皮质组织匀浆, 采用免疫比色法检测, 以四乙氧基丙烷为基准计算每克脑皮质组织 MDA 的生成量, 比色波长为 532 nm, 另采用黄嘌呤氧化法测定 SOD 活力, 按照试剂盒说明书操作。

2.4 脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达水平检测

采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测。常规方法取小鼠脑皮质组织, 研磨后匀浆, 采用试剂盒提取总 RNA, 反转录后对互补的 DNA 链定量测定。进行 qRT-PCR 扩增, 反应体系包括 8 μ L

ddH₂O、12.5 μ L 2 $\times$ qRT-PCR Mix、2 μ L 7.5 μ mol/L 引物、2.5 μ L 互补的 DNA, 其中 TLR4 上游引物: 5'-CTAGAGATCGATAGCTATTAGCTAG-3', 下游引物: 5'-TCGATAGCTAGTTTAGATCGATAGT-3'; NF- κ B p65 上游引物: 5'-TAGCTAGATCGATATTAGCTAGACA-3', 下游引物: 5'-CTAGTAGATCGATATTAGATGCTAG-3'; β -actin 上游引物: 5'-TCGC-TAGATAGCTAGTAGCTAGAT-3', 下游引物: 5'-CTGAATAGCTAGATAGCTAGATAT-3'。扩增反应条件为 92 $^{\circ}$ C、30 s, 95 $^{\circ}$ C、60 s, 60 $^{\circ}$ C、40 s, 55 $^{\circ}$ C、120 s, 共进行 45 个循环后 50 $^{\circ}$ C、10 min。将扩增反应产物电泳, 绘制熔解曲线, 求取 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 作为目的基因的表达量。

2.5 脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达检测

Western blotting 法检测相关蛋白表达水平。将待检测的脑皮质组织匀浆后研磨, 加入裂解液, 按照 12 000 r/min 转速离心, 10 min 后对总蛋白定量。取 50 μ g 样品与上样缓冲液均匀混合, 100 $^{\circ}$ C 条件进行水浴, 共 5 min。同样条件下离心, 取上清, 电泳并进行转膜, 按照室温条件封闭, 孵育 2 h, 向其中加入 TLR4、NF- κ B p65 一抗, 摇床孵育, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 向其中加入二抗, 孵育, 室温 2 h。电泳, 分析目的蛋白的相对表达量。

2.6 统计学分析

以 SPSS 26.0 软件为统计学工具, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本计量资料以单因素方差分析, 每 2 样本计量资料对比以 SNK- q 检验。

3 结果

3.1 各组小鼠脑皮质病理变化观察和组织学分级

假手术组小鼠脑皮质组织结构正常, 细胞饱满且排列紧密、有序。模型组小鼠脑皮质组织结构严重受损, 细胞严重皱缩, 排列紊乱。乌司他丁组和银杏叶提取物各剂量组小鼠脑皮质病理变化明显轻于模型组, 且银杏叶提取物高剂量组明显轻于低、中剂量组和乌司他丁组。见图 1。

假手术组、模型组、乌司他丁组及银杏叶提取物低、中、高剂量组干预期间分别有 0、2、4、3、4、3 只死亡。与假手术组比较, 其余 5 组小鼠组织学分级均升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 乌司他丁组和银杏叶提取物低、中、高剂量组小鼠组织学分级均下降 ($P < 0.05$)。与乌司他丁组比较, 银杏叶提取物低剂量组小鼠组织学分级升高 ($P < 0.05$), 中剂量组无明显变化, 高剂量组下降 ($P < 0.05$)。见表 1。

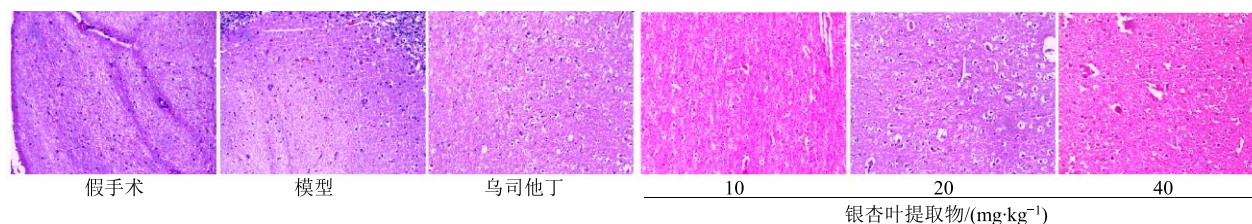


图 1 各组脑皮质组织病理学观察 (HE 染色, ×200)

Fig. 1 Histopathological observation of cerebral cortex in each group (HE staining, ×200)

表 1 各组小鼠组织学分级 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Histological grades of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	n	组织学分级
假手术	—	10	0
模型	—	8	$3.8 \pm 0.4^*$
乌司他丁	$3 \times 10^4 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$	6	$2.7 \pm 0.4^{*\#}$
银杏叶提取物	$10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	7	$3.1 \pm 0.5^{*\#\&}$
	$20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	6	$2.8 \pm 0.4^{*\#\Delta}$
	$40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	7	$1.9 \pm 0.3^{*\#\&\Delta\blacktriangle}$

与假手术组比较: $^*P < 0.05$; 与模型组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与乌司他丁组比较: $^{\&}P < 0.05$; 与银杏叶提取物低剂量组比较: $^{\Delta}P < 0.05$; 与银杏叶提取物中剂量组比较: $^{\blacktriangle}P < 0.05$, 下表同

$^*P < 0.05$ vs sham group; $^{\#}P < 0.05$ vs model group; $^{\&}P < 0.05$ vs ulinastatin group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs low dose group of *Ginkgo biloba* extract; $^{\blacktriangle}P < 0.05$ vs middle dose group of *Ginkgo biloba* extract, same as below tables

3.2 各组小鼠脑皮质存活神经元密度

与假手术组比较, 其余 5 组小鼠脑皮质存活神经元密度均下降 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 乌司他丁组和银杏叶提取物各剂量组小鼠脑皮质存活神经元密度均升高 ($P < 0.05$)。与乌司他丁组比较, 银杏叶提取物低剂量组小鼠脑皮质存活神经元密度下降 ($P < 0.05$), 中剂量组无明显变化, 高剂量组显著升高 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 2。

3.3 各组小鼠脑皮质组织 MDA、SOD 水平

与假手术组比较, 其余 5 组小鼠脑皮质组织 MDA 水平均升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 乌司他丁组和银杏叶提取物各剂量组小鼠脑皮质组织 MDA 水平均下降 ($P < 0.05$)。与乌司他丁组比较, 银杏叶提取物低剂量组小鼠脑皮质组织 MDA 水平升高 ($P < 0.05$), 中剂量组无明显变化, 高剂量组下降 ($P < 0.05$)。与假手术组比较, 其余 5 组小鼠脑皮质组织 SOD 水平均下降 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 乌司他丁组和银杏叶提取物各剂量组小鼠脑皮质组织 SOD 水平均升高 ($P < 0.05$)。与乌司他丁

表 2 各组小鼠脑皮质存活神经元密度 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Density of surviving neurons in cerebral cortex of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	n	存活神经元密度/mm ²
假手术	—	10	125.4 ± 15.9
模型	—	8	$52.5 \pm 7.1^*$
乌司他丁	$3 \times 10^4 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$	6	$80.3 \pm 11.4^{*\#}$
银杏叶提取物	$10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	7	$64.7 \pm 9.2^{*\#\&}$
	$20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	6	$79.8 \pm 11.2^{*\#\Delta}$
	$40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	7	$105.7 \pm 13.5^{*\#\&\Delta\blacktriangle}$

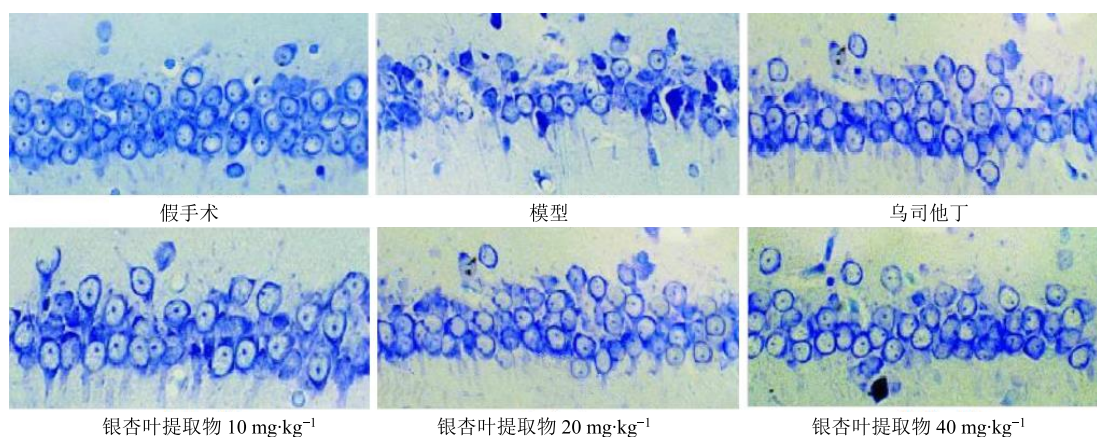


图 2 各组小鼠脑皮质存活神经元密度 (×400)

Fig. 2 Density of surviving neurons in cerebral cortex of mice in each group (×400)

组比较, 银杏叶提取物低剂量组小鼠脑皮质组织 SOD 水平下降 ($P<0.05$), 中剂量组无明显变化, 高剂量组显著升高 ($P<0.05$)。见表 3。

3.4 各组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达水平

与假手术组比较, 其余 5 组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达水平均升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 乌司他丁组和银杏叶提取物各剂量组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达水平均下降 ($P<0.05$)。与乌司他丁组比较, 银杏叶提取物低剂量组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达均升高 ($P<0.05$),

中剂量组均无明显变化, 高剂量组均下降 ($P<0.05$)。见图 3。

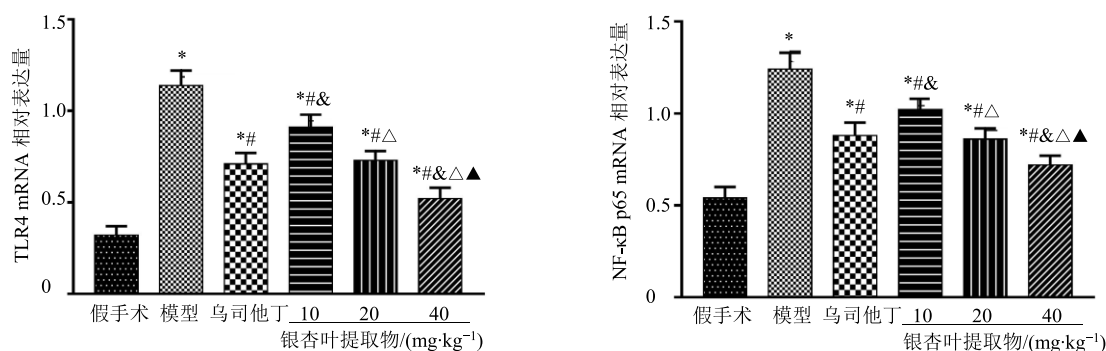
3.5 各组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达水平

与假手术组比较, 其余 5 组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达水平均升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 乌司他丁组和银杏叶提取物各剂量组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达水平均下降 ($P<0.05$)。与乌司他丁组比较, 银杏叶提取物低剂量组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达水平均升高 ($P<0.05$), 中剂量组均无明显变化, 高剂量组均下降 ($P<0.05$)。见表 4 和图 4。

表 3 各组小鼠脑皮质组织 MDA、SOD 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Levels of MDA and SOD in cerebral cortex of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	n	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)
假手术	—	10	2.95±0.74	688.75±42.59
模型	—	8	5.38±1.01*	281.83±21.20*
乌司他丁	3×10 ⁴ IU·kg ⁻¹	6	3.89±0.82*#	413.86±34.20*#
银杏叶提取物	10 mg·kg ⁻¹	7	4.68±0.83*#&	336.75±30.07*#&
	20 mg·kg ⁻¹	6	3.92±0.80*#△	412.39±33.14*#△
	40 mg·kg ⁻¹	7	3.32±0.66*#&△▲	506.57±35.41*#&△▲



与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与乌司他丁组比较: & $P<0.05$; 与银杏叶提取物低剂量组比较: △ $P<0.05$; 与银杏叶提取物中剂量组比较: ▲ $P<0.05$, 下图同

* $P<0.05$ vs sham group; # $P<0.05$ vs model group; & $P<0.05$ vs ulinastatin group; △ $P<0.05$ vs low dose group of *Ginkgo biloba* extract; ▲ $P<0.05$ vs middle dose group of *Ginkgo biloba* extract, same as below figure

图 3 各组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Expressions of TLR4 and NF- κ B p65 mRNA in cerebral cortex of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

4 讨论

急性脑缺血发作是由多种原因引起的, 可由于动脉粥样硬化、血栓形成等因素致病, 常出现运动、肢体、语言等方面障碍, 还可出现头晕、视力减弱等症状, 危害严重, 需加强重视力度^[8]。近年来国内外学者已经意识到急性脑缺血发作的危害^[9-11], 且对其发病机制的认识也逐渐深入, 但是常规用药难以有效减轻脑皮质组织缺血状态, 且大多患者的

预后并不理想, 需积极采取有效的方案以解决上述问题。银杏叶提取物在急性脑缺血发作治疗中的良好表现已在既往报道中得到证实^[12], 但其作用机制仍有待深入挖掘, 以为其在临床中的推广应用奠定理论基础。

本研究中, 假手术组小鼠脑皮质组织正常, 模型组小鼠脑皮质组织出现严重的缺血病理改变, 乌司他丁组和银杏叶提取物各剂量组小鼠脑皮质组织

表 4 各组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF-κB p65 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Expressions of TLR4 and NF-κB p65 protein expressions in cerebral cortex of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	n	蛋白相对表达量	
			TLR4	NF-κB p65
假手术	—	10	0.15 ± 0.03	0.12 ± 0.03
模型	—	8	1.69 ± 0.21*	1.24 ± 0.19*
乌司他丁	3 × 10 ⁴ IU·kg ⁻¹	6	0.32 ± 0.08*#	0.31 ± 0.05*#
银杏叶提取物	10 mg·kg ⁻¹	7	0.97 ± 0.12*#&	0.91 ± 0.10*#&
	20 mg·kg ⁻¹	6	0.34 ± 0.06*#△	0.33 ± 0.05*#△
	40 mg·kg ⁻¹	7	0.26 ± 0.05*#&△▲	0.25 ± 0.04*#&△▲

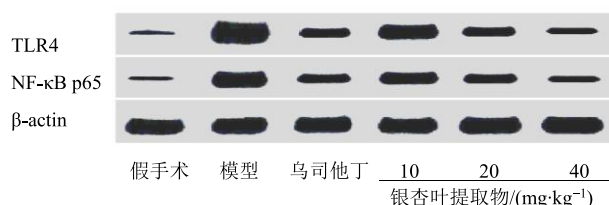


图 4 各组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF-κB p65 蛋白表达水平
Fig. 4 Expressions of TLR4 and NF-κB p65 protein expressions in cerebral cortex of mice in each group

缺血病理改变均明显减轻, 其中高剂量组病理观察结果与假手术组最为接近, 可知银杏叶提取物可减轻急性脑缺血小鼠脑皮质组织缺血病理改变, 且呈剂量依赖性。此外, 乌司他丁组和银杏叶提取物各剂量组大鼠脑组织学分级、存活神经元密度、脑皮质组织 SOD、MDA 水平均明显优于假手术组, 且银杏叶提取物高剂量组明显优于乌司他丁组和银杏叶提取物中、低剂量组, 可知银杏叶提取物在急性脑缺血小鼠中应用可提高组织学分级、存活神经元密度, 减轻脑皮质组织氧化应激和炎症反应。银杏叶提取物是从银杏叶中提取的银杏内酯和黄酮类化合物, 可促纤溶、扩张血管, 在脑缺血、心肌缺血中的作用尚未阐明。有研究表明^[13], 银杏叶提取物对急性脑缺血再灌注大鼠海马 CA1 区神经元有良好的保护作用, 可减小神经细胞凋亡, 减轻脑组织损伤。此外, 银杏叶提取物还具有抗氧化、抗炎、免疫调节等作用, 脑缺血损伤属于非感染性炎症损伤, 在脑缺血发生的过程中, 氧自由基产生、炎症介质释放均是导致神经元凋亡的重要原因, 且脑皮质缺血也是导致认知功能障碍的机制之一^[14-15]。因而利用银杏叶提取物的抗氧化和抗炎作用可减轻脑皮质缺血, 控制此病理改变所致的氧化应激损伤, 从而发挥减轻脑皮质组织缺血和脑组织损伤的重要作用。

此外, 本研究还发现, 与假手术组比较, 其余各组小鼠脑皮质组织 TLR4、NF-κB p65 mRNA 及蛋白表达水平均升高, 其中模型组最高。与模型组比较, 银杏叶提取物各剂量可降低小鼠脑皮质组织 TLR4、NF-κB p65 mRNA 及蛋白表达水平, 且高剂量的银杏叶提取物作用明显优于乌司他丁。TLR4 主要参与非生物性炎症损伤, 其结构可促进免疫细胞成熟分化, 还可调节免疫应答, 不仅能够识别外源性微生物, 还可识别内源性有害物质, 包括参与调节机体对细胞外基质降解产物、热休克蛋白等的应答。近年来研究发现^[16], TLR4 可诱导中枢神经损伤, 小胶质细胞是损伤介入的主要来源之一, 而作为炎性跨膜受体的 TLR4 可调控小胶质细胞的生物学作用, 据此调控中枢神经损伤。NF-κB p65 属于一种核转录激活因子, 在正常生理情况下处于无活性状态, 但当上游激酶降解 NF-κB 抑制蛋白 (IκB) 后可激活其表达及生物学作用, 进入细胞核内从而促使肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 等促炎因子分泌, 在脑缺血损伤过程中 NF-κB p65 可过度表达, 使得进入细胞核内的 NF-κB p65 蛋白量显著增多, 增加促炎因子的合成和分泌, 诱导并逐渐加重炎症损伤^[17]。有研究^[18]指出, 急性脑缺血的发生是多种信号传导通路机制共同作用的结果, TLR4/NF-κB 信号传导通路被激活, TLR4、NF-κB p65 表达增高, 进而可诱发氧化应激及炎症反应, 导致颅脑损伤。本研究对急性脑缺血小鼠给予银杏叶提取物干预, TLR4、NF-κB p65 mRNA 及蛋白表达水平均得到控制, 脑皮质组织缺血状态有所改善, 且脑皮质组织氧化应激和炎症指标均得到缓解, 推测银杏叶提取物很可能是通过调控 TLR4/NF-κB 信号通路发挥减轻脑皮质组织缺血的作用的。

综上所述, 对急性脑缺血小鼠给予银杏叶提取

物干预可减轻脑皮质组织的缺血状态,改善神经组织学分级,提高存活神经元密度,还可控制脑皮质组织氧化应激损伤,推测很可能是通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路,抑制 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达实现的,且呈明显的剂量依赖性,其中银杏叶提取物高剂量的作用明显优于常规药物乌司他丁,在急性脑缺血发作患者中的临床治疗中显示出良好的开发和应用前景。

参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组缺血性脑卒中二级预防指南撰写组. 中国缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南 (2010) [J]. 中国临床医生, 2011, 3(11): 84-93.
- [2] 贺威, 刘运海, 黄清, 等. 湖南省脑血管病监测人群短暂性脑缺血发作检出情况调查 [J]. 中华健康管理学杂志, 2017, 11(5): 415-420.
- [3] 虞德明, 白亚强, 刘文晶. 促红细胞生成素在开颅动脉瘤夹闭术后脑缺血中的应用效果 [J]. 重庆医学, 2017, 46(3): 112-114.
- [4] Yang X, Zheng T, Hong H, *et al.* Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* extract and ginkgolide B against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation and glucose injury in a new *in vitro* multicellular network model [J]. *Front Med*, 2018, 12(3): 307-318.
- [5] 杨静, 吴凤芝, 李瑜霞, 等. 银杏叶提取物缓释剂穴位埋药线对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织损伤及 Nrf2/HO-1 信号通路的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(1): 27-33.
- [6] 乔会敏, 陈林玉, 杜媛媛, 等. 木犀草素对脑梗死动物模型大脑皮质 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路的干预 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2018, 26(1): 9-13.
- [7] 徐秋琴. 小鼠局灶性脑缺血的神经行为和组织损伤的评价 [D]. 杭州: 浙江大学, 2002.
- [8] Tillman H, Johnston S C, Farrant M, *et al.* Risk for major hemorrhages in patients receiving clopidogrel and aspirin compared with aspirin alone after transient ischemic attack or minor ischemic stroke: A secondary analysis of the point randomized clinical trial [J]. *JAMA Neurol*, 2019, 76(7): 774-782.
- [9] Vaghef L, Bafandeh Gharamaleki H. Effects of physical activity and *Ginkgo biloba* on cognitive function and oxidative stress modulation in ischemic rats [J]. *Int J Angiol*, 2017, 26(3): 158-164.
- [10] Kim M S, Bang J H, Lee J, *et al.* *Ginkgo biloba* L. extract protects against chronic cerebral hypoperfusion by modulating neuroinflammation and the cholinergic system [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(12): 1356-1364.
- [11] Tulsulkar J, Glueck B, Hinds T D J, *et al.* *Ginkgo biloba* extract prevents female mice from ischemic brain damage and the mechanism is independent of the HO1/Wnt pathway [J]. *Transl Stroke Res*, 2016, 7(2): 120-131.
- [12] 鲁强, 张光奎, 郑德先, 等. 3D-ASL MRI 研究银杏叶提取物在治疗缺血性脑血管病中的作用 [J]. 医学影像学杂志, 2018, 28(12): 1978-1982.
- [13] Wu C, Zhao X, Zhang X, *et al.* Effect of *Ginkgo biloba* extract on apoptosis of brain tissues in rats with acute cerebral infarction and related gene expression [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 6387-6394.
- [14] Xu L, Hu Z, Shen J, *et al.* Effects of *Ginkgo biloba* extract on cerebral oxygen and glucose metabolism in elderly patients with pre-existing cerebral ischemia [J]. *Compl Ther Med*, 2015, 23(2): 220-225.
- [15] Guo S G, Guan S H, Wang G M, *et al.* Clinical research of persimmon leaf extract and *Ginkgo biloba* extract in the treatment of vertebrobasilar insufficiency [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2015, 29(1): 151-157.
- [16] Han B, Lu Y, Zhao H, *et al.* Electroacupuncture modulated the inflammatory reaction in MCAO rats via inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway in microglia [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 11199-11205.
- [17] Wang L, Liu X H, Chen H, *et al.* Picoside II protects rat kidney against ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and inflammation by the TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(4): 1253-1258.
- [18] 唐志贤, 钟宗仁, 刘子由, 等. TLR4/NF- κ B 信号通路在深低温停循环脑损伤发病机制中的体外实验研究 [J]. 实用医学杂志, 2017, 33(20): 3344-3347.