银杏二萜内酯葡胺注射液对缺血性脑卒中小鼠黑质脑区的调控机制研究

刘子宇[1]，徐欣玉[2]，吕文欣[2]，郭志宏[1]，张新庄[2]，曹　亮[2]，王振中[1,2]，田金洲[2]，王团结[2]，潘　贤[2]，武子寅[2*]，肖　伟[1,2*]

1. 南京中医药大学，中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室，江苏 南京　210023
2. 江苏康缘药业股份有限公司，江苏 连云港　222001

摘　要：目的　研究银杏二萜内酯葡胺注射液（Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection，DGMI）在 C57BL/6J 小鼠大脑中动脉闭塞（middle cerebral artery occlusion，MCAO）模型黑质脑区中抗脑缺血再灌注损伤的潜在作用通路。**方法**　C57BL/6J 小鼠按随机数字表分为假手术组、模型组、DGMI（25 mg/kg）组及银杏叶提取物 761（*Ginkgo biloba* extract-761，EGb-761，100 mg/kg）组，构建 MCAO 模型，通过测定各组小鼠术后 24 h 的改良版神经功能缺损评分和脑梗死率，评价 DGMI 相较于 EGb-761 治疗缺血性脑卒中的疗效。进一步利用 Illumina 二代测序平台对各组小鼠脑组织黑质样本进行高通量转录组测序，并结合基因集富集分析（gene set enrichment analysis，GSEA）、差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs）的基因本体（gene ontology，GO）功能和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析等生物信息学分析方法，评价 DGMI 抗脑缺血再灌注损伤作用及潜在作用机制。采用 qRT-PCR 验证转录组测序中关键基因表达。**结果**　与假手术组比较，模型组改良版神经功能缺损评分和脑梗死率显著升高（$P<0.001$）；与模型组比较，DGMI 组治疗效果与 EGb-761 接近，可显著改善改良版神经功能缺损评分和脑梗死率（$P<0.01$、0.001）。转录组的数据降维分析显示，模型组与假手术组样本显著分离。GSEA 结果显示，模型组与假手术组对比显著富集 35 条通路，DGMI 组相较于模型组可有效逆转 7 条通路。与假手术组相比，模型组共筛选出 88 个 DEGs，将其与他人发现的大小鼠 MCAO 模型组共同差异基因比较（15 个），有 10 个基因相同。模型组 GO 功能分析主要富集在炎症和细胞趋化等过程，KEGG 通路分析主要富集在细胞因子互作、肿瘤坏死因子等信号通路。与模型组相比，DGMI 组 DEGs 的 GO 功能分析主要富集在神经信号传导过程，KEGG 通路分析主要富集在多巴胺能信号通路、神经活性受体配体作用等。qRT-PCR 验证与转录组结果基本一致。**结论**　DGMI 可有效抵抗脑缺血再灌注损伤，发挥作用的关键基因及信号通路主要集中于抗炎、调节神经突触等生物学过程，可能通过改善多巴胺能通路治疗损伤。

关键词：银杏二萜内酯葡胺注射液；缺血性脑卒中；黑质；大脑中动脉闭塞模型；转录组测序

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2024)11 - 3735 - 14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.11.016

Regulatory mechanism of Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection on substantia nigra brain region in ischemic stroke mice

LIU Ziyu[1], XU Xinyu[2], LYU Wenxin[2], GUO Zhihong[1], ZHANG Xinzhuang[2], CAO Liang[2], WANG Zhenzhong[1, 2], TIAN Jinzhou[2], WANG Tuanjie[2], PAN Xian[2], WU Ziyin[2], XIAO Wei[1, 2]

1. State Key Laboratory on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective　To study the effect of Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection (DGMI) on middle cerebral artery occlusion (MCAO) in C57BL/6J mice and investigate the potential pathways of anti-cerebral ischemia-reperfusion injury in substantial nigra

收稿日期：2024-02-09

基金项目：江苏省院士工作站（BM2023118）；连云港市 2023 年度第六期“521 工程”科研资助项目（LYG06521202302）；连云港市自然科学基金资助项目（JCYJ2323）；江苏省自然科学青年基金资助项目（BK20210139）

作者简介：刘子宇（1999—），女，硕士研究生，研究方向为中药新药研发及过程质量控制研究。E-mail: kannyliu2023@163.com

***通信作者：**肖　伟（1959—），男，中国工程院院士，研究员，博士生导师，研究方向为中药新药研发及过程质量控制研究。E-mail: kanionlunwen@163.com

武子寅（1986—），男，博士，主管药师，研究方向为中药新药研发及过程质量控制研究。E-mail: cs416@qq.com

(SN) brain region of MCAO model. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into sham group, model group, DGMI (25 mg/kg) group and *Ginkgo biloba* extract-761 (EGb-761, 100 mg/kg) group, MCAO model was established. The efficacy of DGMI compared with EGb-761 in the treatment of ischemic stroke was evaluated by measuring modified neurological severity score and cerebral infarction rate at 24 h after MCAO. The Illumina next-generation sequencing platform was further used to perform high-throughput transcriptome sequencing of substantia nigra samples of the brain tissue of each group. The effect and potential mechanism of DGMI against cerebral ischemia-reperfusion injury was explored by bioinformatics analysis methods such as gene set enrichment analysis (GSEA), gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs). qRT-PCR was used to verify the expressions of key genes in transcriptome sequencing. **Results** Compared with sham group, modified neurological severity score and cerebral infarction rate in model group were significantly increased ($P < 0.001$); Compared with model group, the treatment effect of DGMI group was similar to that of EGb-761, which significantly improved the modified neurological severity score and cerebral infarction rate ($P < 0.01$, 0.001). Data dimensionality reduction analysis of transcriptome showed that model group was significantly separated from control group. GSEA results showed that 35 pathways were significantly enriched in model group compared with sham group, and seven pathways were effectively reversed in DGMI group compared with model group. Compared with sham group, a total of 88 DEGs were screened out in model group. There were 10 same genes compared with 15 common DEGs in rat and mouse MCAO model group found by others. GO function analysis in model group was mainly enriched in inflammation and cell chemotaxis, KEGG pathway analysis was mainly enriched in cytokine interaction, tumor necrosis factor and other signaling pathways. Compared with model group, GO function analysis of DEGs in DGMI group was mainly enriched in neural signal transduction process, KEGG pathway analysis was mainly enriched in dopaminergic signaling pathway and neural active receptor ligand interaction. qRT-PCR results basically consistent with the transcriptome results. **Conclusion** DGMI can effectively resist cerebral ischemia-reperfusion injury. The key genes and signaling pathways of DGMI are mainly focused on anti-inflammation and regulation of biological processes such as nerve synapses. It may treat the injury through dopaminergic pathway.

Key words: Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection; ischemic stroke; substantia nigra; middle cerebral artery occlusion model; transcriptome sequencing

脑卒中是全球致伤致残致死 3 大原因之一，据全球疾病负担统计 2019 年全世界有 1 220 万人发病[1]，我国有 394 万人首发[2]；另一统计称 2020 年我国有 340 万人首发并有约 220 万人留下残疾[3-4]。缺血性脑卒中（ischemic stroke，IS）约占卒中类型的 85%[4-5]。IS 预后结局差，复发率高而且极有可能造成后遗症如偏瘫、后肢痉挛、震颤等。其病理机制也十分复杂，涉及细胞过度自噬、离子失衡与谷氨酸过度释放、氧化应激与自由基、炎症爆发和神经细胞凋亡[5-7]等。

目前治疗 IS 的主要方法为重组组织型纤溶酶原激活剂（recombinant tissue-type plasminogen activator，rt-PA）静脉溶栓、手术取栓和神经保护。手术风险高，rt-PA 治疗时间窗短，且有出血风险，符合治疗条件的病人不到 10%[8]，而神经保护的药物在临床上的效果不如动物实验那么有效，目前急需开发更安全可靠的治疗 IS 的用药。在长期的医学实践中，银杏叶提取物在治疗脑卒中和心肌梗死方面疗效显著[9]。其中，银杏内酯作为天然的血小板活化因子（platelet activating factor，PAF）受体拮抗剂，因其具有抗炎、抗氧化、抗凋亡和神经保护的作用[10-12]而越来越受到关注。

银杏二萜内酯葡胺注射液（Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection，DGMI）以银杏叶提取物为原料，主要组成为银杏内酯 A（ginkgolide A，GA，35%）、银杏内酯 B（GB，60%）、银杏内酯 C（GC，2%）、银杏内酯 K（GK，2%），含总银杏内酯 5 mg/mL[13]，银杏二萜内酯成分达 98%以上[14]。临床显示，DGMI 可有效改善 IS 发病 90 d 时患者的神经缺损评分，同时改善患者认知和行动能力，并且在中老年患者中疗效优于银杏叶提取物注射液（金纳多）[15-18]，Zhao 等[15]认为 DGMI 与 rt-PA 联用治疗急性卒中效果更佳。最新一项临床研究发现，单独使用 DGMI 对急性缺血性脑卒中治疗有效[19]。也有多项体内外实验证明 DGMI 具有改善脑缺血再灌注损伤（cerebral ischemia reperfusion injury，CIRI）的作用，主要与 PAF 受体[20]、磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）-蛋白激酶 B（protein kinase B，PKB）、核因子-红细胞 2 相关因子 2（nuclear factor-erythroid 2 related

factor 2，Nrf2）[13]等通路有关。

黑质为重要的运动和感知调节中枢，是脑内合成多巴胺的主要核团，与背侧基底核、底丘脑构成基底运动环路[21]，可能通过多巴胺能神经与 IS 引发的震颤等运动障碍相关。为明确 DGMI 在黑质脑区抗 CIRI 的作用通路，本研究通过建立小鼠大脑中动脉闭塞（middle cerebral artery occlusion，MCAO）模型，模拟急性 IS 时脑内局灶性缺血缺氧的状态，利用转录组测序对小鼠脑样本进行测序，并结合生信分析鉴定 DGMI 在黑质脑区抗脑缺血损伤的作用通路及功能效应，为深入探索其作用机制提供思路。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠，6～8 周龄，体质量 18～22 g，购自南京市江宁区青龙山动物养殖场公司，生产质量合格证 SCXK（浙）2019-0002。动物于江苏康缘药业有限公司动物房普通清洁级环境中适应性饲养 1 周，温度（24±2）℃、12 h 光昼交替，自由进食饮水。动物实验经江苏康缘药业有限公司动物委员会批准（批号 2023110101）。

1.2 药品与试剂

DGMI（商品名为尤赛金，国药准字 z20120024，批号 220703）由江苏康缘药业有限公司提供；银杏叶提取物 761（*Ginkgo biloba* extract-761，EGb-761，商品名为金纳多，3.5 mg/mL，国药准字 HC20181022，批号 P6001）由台湾济生医药生技股份有限公司提供；1800AA 型小鼠硅胶线栓购自广州佳灵生物有限公司；舒泰 50（货号 BN8G4VA）购自法国维克公司；2,3,5-氯化三苯基四氮唑（2,3,5-triphenyltetrazolium chloride，TTC，批号 BCCJ6488）购自美国 Sigma 公司；RNA 提取试剂盒（批号 AM90890A）购自日本 Takara 公司；Qubit RNA BR Assay kit（批号 2506001）、Qubit 1X dsDNA HS assay kit（批号 2483579）购自美国 Invitrogen 公司；Illumina Poly(A) Capture（批号 20733163）、Illumina RNA Prep Ligation（批号 20723247）、IDT for Illumina RNA Index Anchors（批号 20717954）、IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes（批号 20739487）、NextSeq™ 2000 P3 300 循环试剂盒（批号 20751014）购自美国 Illumina 公司；RNA Screen Tape（批号 02020849-192）、RNA Screen Tape 缓冲液（批号 0006698095）、D1000 Screen Tape（批号 0202853-39）、D1000 试剂（批号 0006739609）购自美国 Agilent 公司。

1.3 仪器

DOM-1001 型显微镜、RFLSI ZW 型激光散斑血流成像系统（深圳市瑞沃德生命科技有限公司）；PY-SM5（LCD）型 LCD 高精度智能温控器（余姚市品益电器有限公司）；NanoDrop 分光光度计（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；4150 型 TapeStation 自动化电泳系统（美国 Agilent 公司）；Qubit 4.0 型核酸定量仪（美国 Invitrogen 公司）；NextSeq™ 2000 型测序仪（美国 Illumina 公司）。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

小鼠适应性饲养 5 d 后，随机分为假手术组、模型组、DGMI（25 mg/kg）组及 EGb-761（100 mg/kg）组，为确保各组术后存活 10 只小鼠，假手术组设置 10 只，模型组设置 16 只，EGb-761 组和 DGMI 组设置 14 只。

小鼠 ip 舒泰 50 麻醉后，参照 LONGA 法[22]复制 MCAO 模型。用线栓阻塞小鼠大脑中动脉血流，缺血 1 h 时，拔出线栓恢复血流，进行再灌注，并结扎颈外动脉剪口。假手术组小鼠进行颈动脉暴露处理，但不插入栓线。手术过程室温控制在（26±1）℃，术后使用加热垫等设备维持小鼠体温保持 37 ℃。线栓进入后，将小鼠俯卧位固定，纵向剪开头皮，充分暴露颅骨，置于激光散斑血流成像系统下进行血流检测，确保造模成功。采用 RFLSI Analysis v2.0.29.26606 软件分析数据，在缺血侧及对侧一致位置添加相同的区域，得到脑血流量统计结果。对造模小鼠进行筛选，排除造模不成功、大出血、蛛网膜出血及过早死亡的小鼠，最终纳入统计的共有 40 只小鼠，每组分别 10 只。

基于本课题组预实验结果，DGMI 对小鼠 MCAO 模型术后 24 h 脑梗死面积改善程度的最佳剂量为 25 mg/kg。因此，本研究采用 25 mg/kg 剂量开展 DGMI 的药效评价。DGMI 组术后 30 min ip 药物（DGMI 以生理盐水将稀释成 2.5 mg/mL 的溶液），EGb-761 组术前 1 h ip 药物，假手术组和模型组 ip 等体积生理盐水。

2.2 神经功能评分与脑组织 TTC 染色

小鼠再灌注 24 h 后进行改良版神经功能缺损评分（modified neurological severity score，mNSS）[23]。评分后取血，迅速取脑组织，−20 ℃冰箱中冷冻 15 min，随后将冷冻后的脑组织切成厚度为 2 mm 的冠

状切片共 6 片，使用 2% TTC 染液于 37 ℃恒温水浴锅中避光染色 10 min，用 4%多聚甲醛溶液对脑片进行固定，24 h 后拍照。使用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算脑梗死面积。

脑梗死面积＝白色缺血面积/总面积

2.3 脑黑质 RNA 提取和转录组测序

取小鼠脑黑质，每组 4 个样本，经高速冷冻研磨机粉碎成匀浆后，按照 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA。经过 RNA 质量控制后，筛选 3 个符合条件的样品，按照 Illumina 文库制备体系，完成文库的构建稀释与上机测序。

2.4 转录组数据分析

2.4.1 转录组数据处理与质量分析 利用 Trimmomatic[24]软件对测序数据进行滤过，获取高质量的数据信息，直接从基因组网站下载参考基因组和基因模型注释文件，使用 HISAT2[25]和 String Tie[26]软件将 clean reads 与参照基因组进行比对和拼接。

2.4.2 降维分析与模型评价 将各组数据进行降维分析，主要分为主成分分析和 tSNE 降维分析，比较各组离散程度。

2.4.3 差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs）筛选 采用 DESeq[27]软件包对各组细胞的基因表达量进行差异分析，模型组 DEGs 以模型组 *vs* 假手术组筛选，给药组 DEGs 以给药组 *vs* 模型组筛选，筛选标准为|$\log_2$ 差异倍数（fold change，FC）|≥2 且 P_{adjust}≤0.05。

2.4.4 基因集富集分析（gene set enrichment analysis，GSEA） GSEA 通路富集分析不局限于某些目标基因集，而是从所有基因的表达丰度出发，分析在不同的通路中的基因的整体表达影响，理论上更容易囊括细微但协调性的变化对生物通路的影响。参照徐小波等[28]研究，计算药物干预后表达趋势逆转的通路数与模型组特征通路总数的比值（响应值），并评价药物抗脑缺血再损伤的能力。

2.4.5 基因本体（gene ontology，GO）功能及京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析 运用 R 语言 limma[29]软件包对差异基因进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析，并用 R 语言将相关信息可视化。GO 功能包括生物学过程（biological process，BP）、细胞组分（cellular component，CC）和分子功能（molecular function，MF）。使用超几何检验进行富集分析。FDR 校正的 P≤0.05 被认为显著富集。

2.5 qRT-PCR 验证关键基因表达

按照试剂盒说明书提取脑黑质中总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相关关键基因表达。溶质载体家族 6 成员 A3（solute carrier family 18 member A3，*Slc6a3*）、钙调蛋白样 4（calmodulin like 4，*Calml4*）、G 蛋白亚基 γ14（G protein subunit gamma 14，*Gng14*）、C-C 基序趋化因子 2（C-C motif chemokine ligand 2，*Ccl2*）、色氨酸羟化酶 2（tryptophan hydroxylase 2，*Tph2*）、C-X-C 趋化因子 1（C-X-C motif chemokine ligand 1，*Cxcl1*）、*β-actin* 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
Slc6a3	F: AAATGCTCCGTGGGACCAATG
	R: GTCTCCCGCTCTTGAACCTC
Calml4	F: ACTCATGAAACTGGGAGAGAAG
	R: GTCATATTTCACTTGGCCGTTT
Gng14	F: TGGAGCAACTGCGGATGGAAG
	R: GGGTCGCTCTTGGCCTGTTC
Ccl2	F: TTTTTGTCACCAAGCTCAAGAG
	R:TTCTGATCTCATTTGGTTCCGA
Tph2	F: AGCAGCAAGACAGCGGTAGTG
	R: TCGTCGGGACCTCCTGGATTC
Cxcl1	F: ATGGCTGGGATTCACCTCAAGAAC
	R: AGTGTGGCTATGACTTCGGTTTGG
β-actin	F: CCCCTGAACCCTAAGGCCA
	R: CGGACTCATCGTACTCCTGC

2.6 统计学分析

实验结果使用 Graghpad prism 9.0 软件进行统计分析。两组间比较采用独立样本 t 检验，组间多重比较采用单因素方差分析（One way ANOVA）和 Dunnett-t 检验，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 脑血流成像结果

通过脑血流仪监测小鼠脑皮质血流量变化，如图 1 和表 2 所示，发现插入线栓缺血时，与假手术组比较，各组小鼠手术缺血侧脑皮质血流量均显著降低（P＜0.001），表明缺血造模成功，建立的小鼠 MCAO 脑缺血再灌注模型稳定可靠。

3.2 DGMI 对 MCAO 模型小鼠的药效评价

3.2.1 DGMI 对 MCAO 模型小鼠 mNSS 的影响 脑缺血再灌注后 24 h，各组小鼠 mNSS 结果见图 2，假手术组为 0 分，无神经功能损伤；与假手术组比

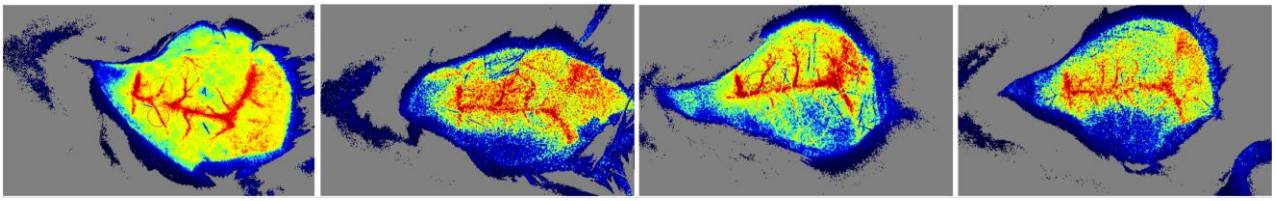


图 1　脑血流成像伪彩图

Fig. 1　False color cerebral blood flow imaging

表 2　造模时各组小鼠脑血流量（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Table 2　Brain blood flow of mice in each group during modeling（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

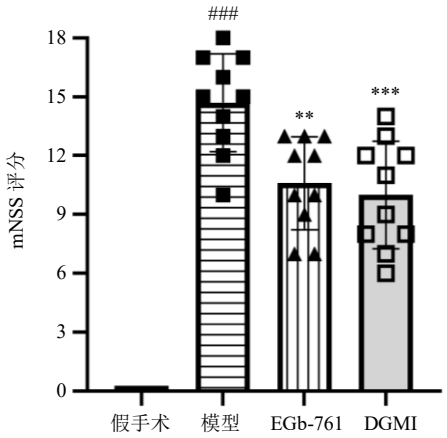
组别	剂量/(mg·kg^{-1})	脑血流量/%
假手术	—	96.58±0.67
模型	—	68.25±3.66$^{###}$
EGb-761	100	67.87±2.48$^{###}$
DGMI	25	70.42±4.23$^{###}$

与假手术组比较：$^{###}P$<0.001。

$^{###}P < 0.001$ *vs* sham group.

较，模型组小鼠 mNSS 显著升高（P<0.001），神经功能损伤严重；与模型组比较，各给药组 mNSS 显著降低（P<0.01、0.001）。表明 MCAO 造模可导致小鼠神经功能受到损伤，引起小鼠行为学发生变化；EGb-761 和 DGMI 可显著改善小鼠缺血再灌注造成的神经功能损伤。

3.2.2　DGMI 对 MCAO 模型小鼠脑梗死面积的影响　如图 3 所示，TTC 染色后，假手术组脑切片呈均匀的红色，模型组脑切片缺血侧有明显的白色梗死部位；与模型组比较，各给药组小鼠脑梗死面积

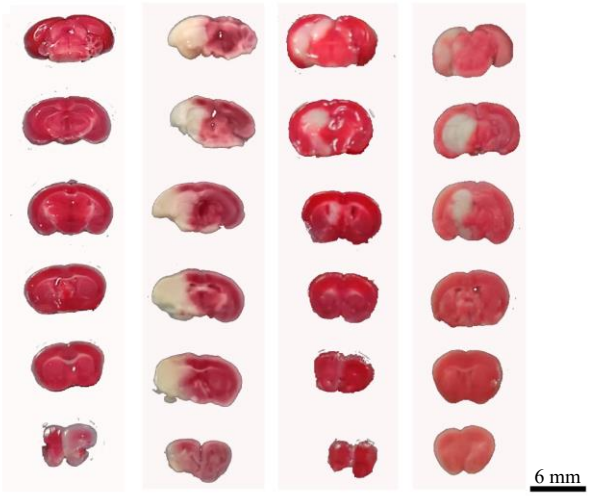


与假手术组比较：$^{#}P$<0.05　$^{##}P$<0.01　$^{###}P$<0.001；与模型组比较：$^{*}P$<0.05　$^{**}P$<0.01　$^{***}P$<0.001，图 3、10 同。

$^{#}P < 0.05$　$^{##}P < 0.01$　$^{###}P < 0.001$ *vs* sham group; $^{*}P < 0.05$　$^{**}P < 0.01$　$^{***}P < 0.001$ *vs* model group, same as Figs. 3, 10.

图 2　DGMI 对 MCAO 模型小鼠 mNSS 的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Fig. 2　Effect of DGMI on mNSS in MCAO mice model（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）



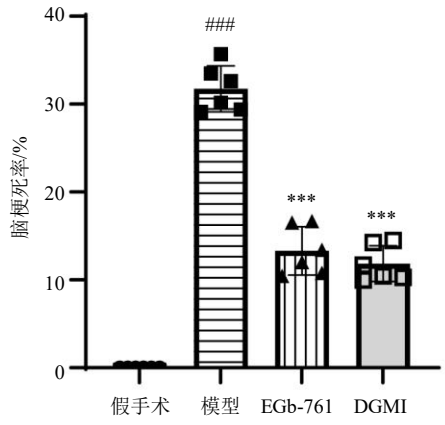


图 3　DGMI 对 MCAO 模型小鼠脑梗死面积的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Fig. 3　Effect of DGMI on cerebral infarction area in MCAO mice model（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

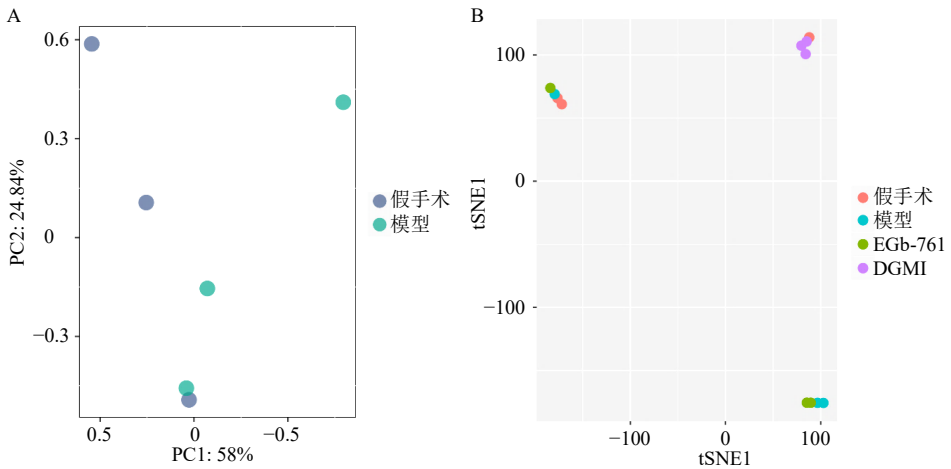
显著减小（$P<0.001$）。表明 DGMI 和 EGb-761 可显著改善小鼠脑梗死面积，对小鼠脑梗死有一定治疗作用。

3.3　转录组测序分析

3.3.1　转录组测序数据质量分析　在建立的测序文库中，超过 $Q30$ 的比例在 94%以上，对测序数据中 reads 进行滤过后，数据质量控制结果显示，与参考基因组的序列比对率在 70%以上，表明测序结果较好。

3.3.2　降维分析与模型评价　经主成分分析发现，假手术组和模型组明显分离（图 4-A）。对各组进行 tSNE 降维分析，发现 DGMI 组与模型组明显分离（图 4-B）。

3.3.3　DEGs 分析　如图 5-A～C 所示，与假手术组



A-模型组与假手术组主成分分析；B-各组 tSNE 降维分析。

A-principal component analysis of model group and sham group; B-analysis of tSNE dimensionality reduction in each group.

图 4　小鼠 MCAO 模型降维分析

Fig. 4　Dimension reduction analysis of MCAO mice model

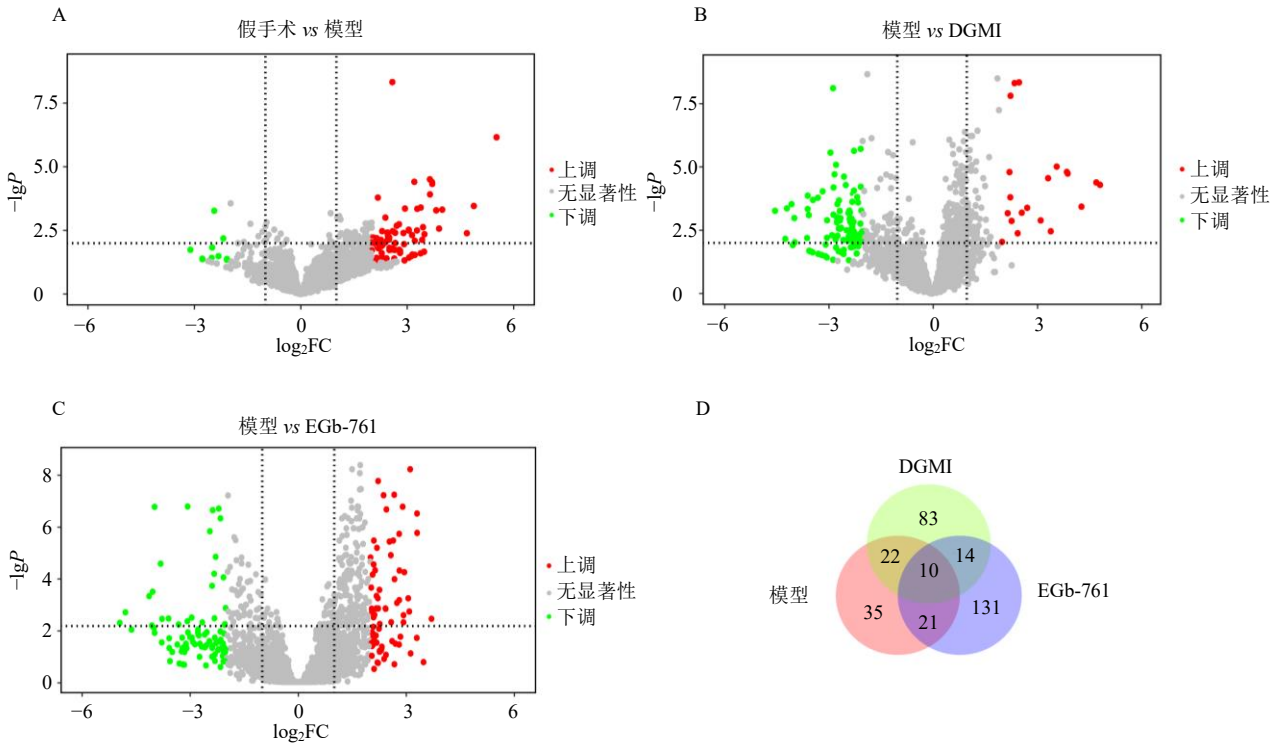


图 5　各组 DEGs 火山图（A～C）和交集韦恩图（D）

Fig. 5　Volcano plots (A—C) of DEGs and Venn plot (D) of intersection in each group

比较，模型组共筛选得到 88 个差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs），其中 78 个基因上调，10 个基因下调。与模型组比较，DGMI 组有 21 个基因上调，108 个基因下调；EGb-761 组有 92 个基因上调，84 个基因下调。分别对模型组和 DGMI、EGb-761 组的 DEGs 取交集，如图 5-D 所示，DGMI 组与模型组共有 32 个差异基因重合，EGb-761 组与模型组共有 31 个差异基因重合，三者共有 10 个 DEGs 重合。

图 6 中展示了 EGb-761 组、DGMI 组和模型组 DEGs 重叠部分的热图，共 53 个 DEGs。可以发现，这部分 DEGs 在给药后有不同程度的逆转。此外，在 Lv 等[30]通过 131 个小鼠和 39 个大鼠样本 MCAO 模型筛选出的 15 个共同 DEGs 中，模型组 DEGs 中有活化转录因子 3（activating transcription factor 3，*Atf3*）、组织基质金属蛋白酶抑制剂 1（tissue inhibitor of metalloproteinases 1，*Timp1*）、分化抗原 14（cluster of differentiation 14，*Cd14*）、半乳糖结合凝集素 3（lectin, galactoside-binding, soluble 3，*Lgals3*）、血红素加氧酶（heme oxygenase 1，*Hmox1*）、*Ccl2*、上皮膜蛋白 1（epithelial membrane protein 1，*Emp1*）、热休克蛋白家族 B 成员 1（heat shock protein family B member 1，*Hspb1*）、血小板反应蛋白基序 1 型去整合素和金属蛋白酶（a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1，*Adamts1*）、波形蛋白（vimentin protein，*Vim*）共 10 个基因重合（66.7%）。Lv 等[30]发现的与人类卒中易感基因联系最强的基因 *Adamts1*、锌指蛋白（zinc finger protein 36，*Zfp36*）、核因子 κB 抑制剂 zeta（nuclear factor kappa B inhibitor zeta，*Nfkbiz*）、*Ccl2* 和 *Hmox1* 中，本研究模型组中也有 3 个重合。

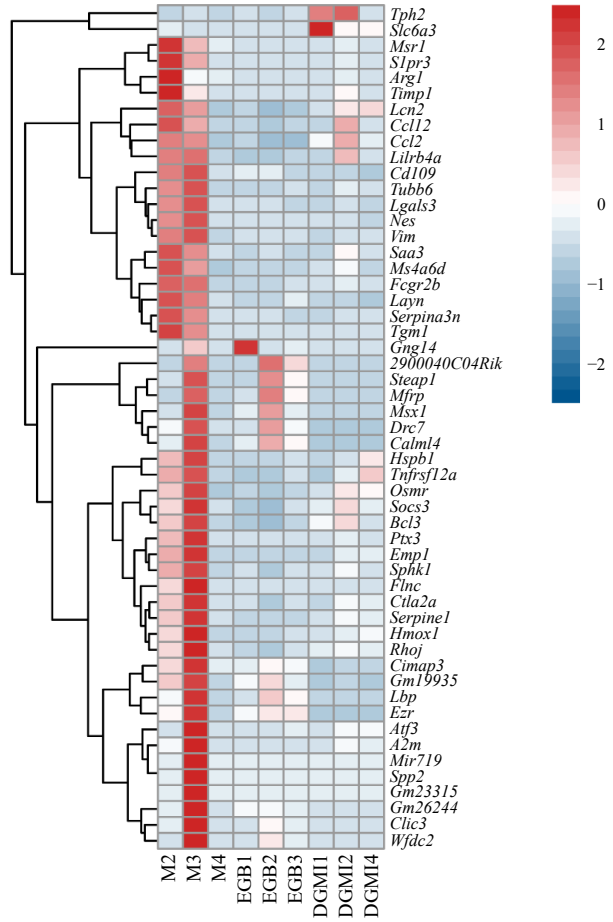


图 6　模型组与 DGMI 组 DEGs 热图

Fig. 6　Heatmap of DEGs between model and DGMI groups

3.3.4　GSEA 结果　如图 7 所示，GSEA 结果显示，与假手术组比较，模型组表达相反的通路有 35 条，定义这些通路为模型组的特征通路；DGMI 与模型组趋势相反的通路有 7 条，如帕金森症、色氨酸代谢、嘧啶代谢等通路，响应值为 20%左右。

3.3.5　DEGs 的 GO 功能富集分析　为明确小鼠 MCAO 造模及药物干预后所涉及的生物学功能变化，对模型组和 DGMI 组小鼠脑组织 DEGs 进行 GO 功能富集分析，见图 8。结果显示，模型组主要富集在细胞对白细胞介素-1 和 γ 干扰素的反应、趋化因子互作和免疫细胞的浸润等 BP，细胞外空间、细胞外区域等 CC，趋化因子受体结合等 MF。DGMI 干预后，主要富集在分泌颗粒、神经肽激素信号通路等 BP，细胞外空间与区域，多巴胺能神经突触等 CC，S100 蛋白结合、激素与神经肽激素等 MF。

3.3.6　DEGs 的 KEGG 通路富集分析　为明确 DGMI 对 MCAO 模型小鼠 KEGG 通路的影响，基于获得的 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析，见图 9。结果显示，模型组前 15 条 KEGG 通路主要与炎症、凋亡和免疫反应相关，富集在细胞因子-细胞因子受体相互作用、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）信号通路、白细胞介素-17（interleukin-17，IL-17）信号通路、趋化因子信号通路、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）通路等。DGMI 组 KEGG 通路主要富集在神经活性配体-受体作用、多巴胺能神经突触等。

进一步分析发现，模型组 KEGG 通路中出现频率较高（≥3）的关键差异基因为 *Ccl12*、*Ccl2*、*Cxcl1* 等，见表 3。DGMI 组 KEGG 通路中出现频率较高（≥3）的关键差异基因是 *Gng14*、*Slc6a3*、*Calml4*

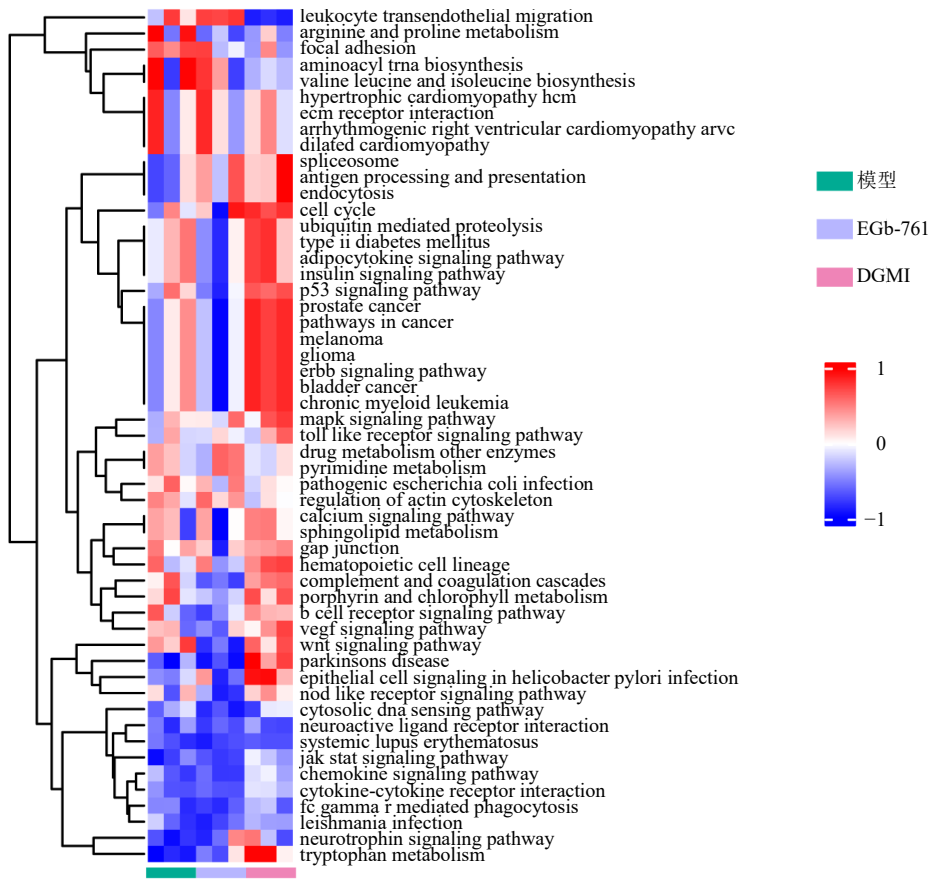


图 7　模型组和给药组 GSEA 热图

Fig. 7　Heatmap of GSEA between model and treatment groups

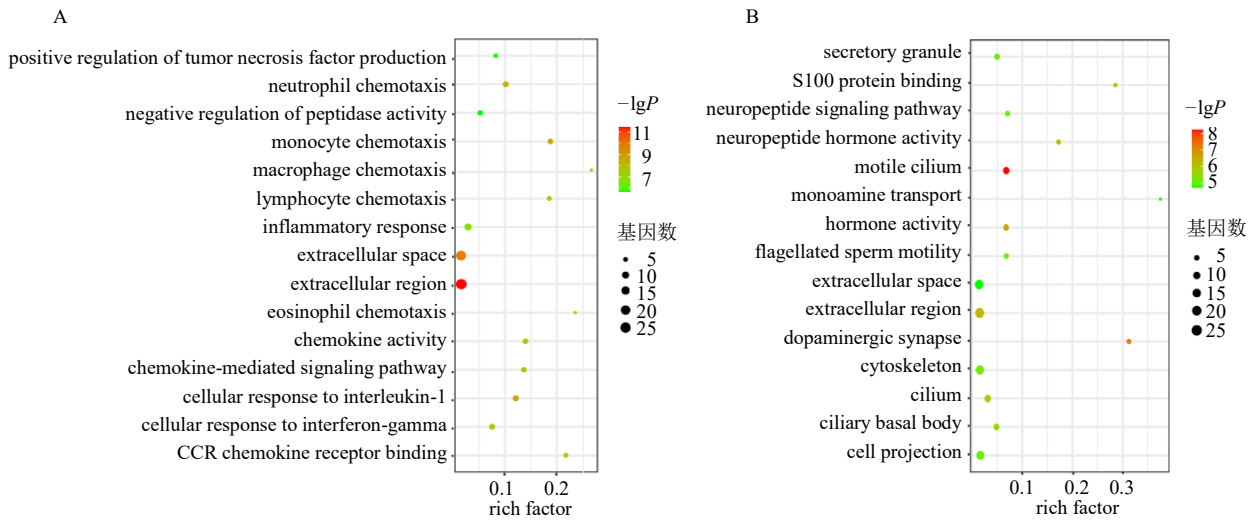


图 8　模型组 (A) 和 DGMI 组 (B) DEGs 的 GO 分析气泡图

Fig. 8　Bubble plots of GO analysis for DEGs in model (A) and DGMI (B) group

等，见表 4。

Ccl12、*Ccl2* 与免疫细胞趋化浸润脑区有关，*Gng14* 编码的蛋白质参与 G 蛋白偶联受体通路，而 *Slc6a3*、*Calml4* 与多巴胺在脑内的转运分泌密切相关，提示 DGMI 治疗 IS 可能与多巴胺能信号通路密切相关。

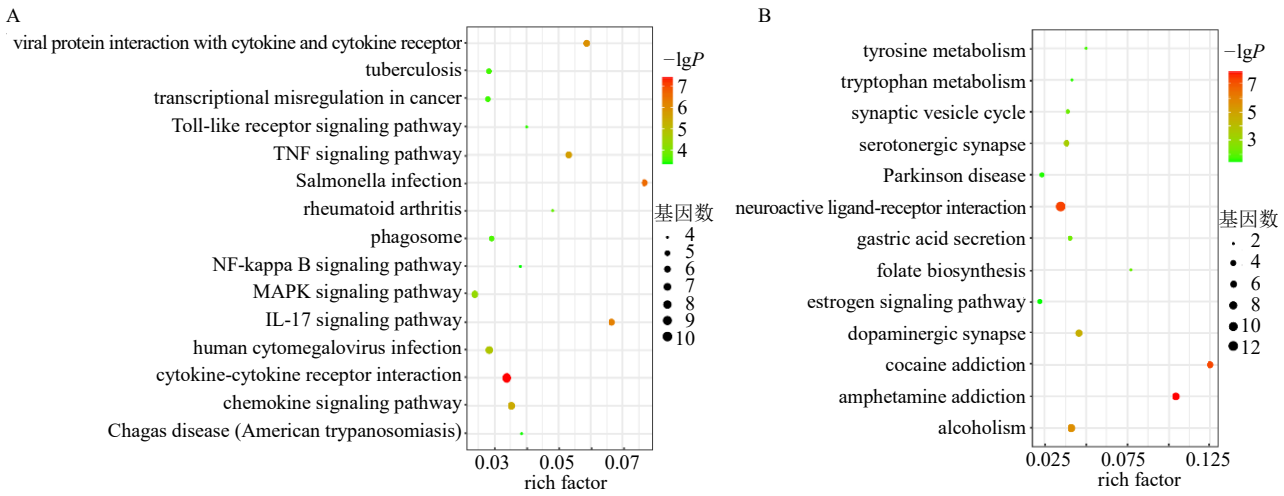


图 9　模型组 (A) 和 DGMI 组 (B) DEGs 的 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 9　Bubble plots of KEGG pathway analysis for DEGs in model (A) and DGMI (B) group

表 3　模型组 KEGG 通路关键基因

Table 3　Key genes of KEGG pathways in model group

KEGG ID	KEGG 条目	*P* 值	基因
mmu04060	cytokine-cytokine receptor interaction	4.03×10^{-8}	*Ccl12*、*Ccl2*、*Ccl3*、*Ccl4*、*Ccl9*、*Cxcl1*、*Gh*、*Ngfr*、*Osmr*、*Tnfrsf12a*
mmu04657	IL-17 signaling pathway	5.71×10^{-7}	*Ccl12*、*Ccl2*、*Cxcl1*、*Fosl1*、*Mmp3*、*Lcn2*
mmu04668	TNF signaling pathway	2.02×10^{-6}	*Ccl12*、*Ccl2*、*Cxcl1*、*Mmp3*、*Bcl3*、*Socs3*
mmu04062	chemokine signaling pathway	3.69×10^{-6}	*Ccl12*、*Ccl2*、*Ccl3*、*Ccl4*、*Ccl9*、*Cxcl1*、*Gng14*
mmu05163	human cytomegalovirus infection	1.49×10^{-5}	*Ccl12*、*Ccl2*、*Ccl3*、*Ccl4*、*Gng14*、*Calml4*、*Cdkn1a*
mmu04010	MAPK signaling pathway	4.42×10^{-5}	*Cd14*、*Gng14*、*Flnc*、*Gadd45b*、*Hspb1*、*Hspa1b*、*Ngfr*

表 4　DGMI 组 KEGG 通路关键基因

Table 4　Key genes of KEGG pathways in DGMI group

KEGG ID	KEGG 条目	*P* 值	基因
mmu05031	amphetamine addiction	8.08×10^{-8}	*Fosb*、*Calml4*、*Ddc*、*Pdyn*、*Slc18a2*、*Slc6a3*、*Th*
mmu04080	neuroactive ligand-receptor interaction	2.29×10^{-7}	*Avp*、*Chrna6*、*Chrnb3*、*Gal*、*Ghrh*、*Oxt*、*Pmch*、*Pomc*、*Pdyn*、*Rln3*、*Tac2*、*Trh*
mmu05030	cocaine addiction	2.68×10^{-7}	*Fosb*、*Ddc*、*Pdyn*、*Slc18a2*、*Slc6a3*、*Th*
mmu05034	alcoholism	7.40×10^{-6}	*Fosb*、*Gng14*、*Calml4*、*Ddc*、*Pdyn*、*Slc18a2*、*Slc6a3*、*Th*
mmu04728	dopaminergic synapse	6.12×10^{-5}	*Gng14*、*Calml4*、*Ddc*、*Slc18a2*、*Slc6a3*、*Th*
mmu04726	serotonergic synapse	5.73×10^{-4}	*Gng14*、*Ddc*、*Slc18a2*、*Slc6a4*、*Tph2*

3.4　qRT-PCR 验证关键基因表达

对模型组和 DGMI 组部分关键基因表达进行 qRT-PCR 验证，如图 10 所示，与对照组比较，模型组小鼠脑组织 *Slc6a3*、*Tph2* 基因表达水平显著降低（$P<0.001$），*Calml4*、*Ccl2*、*Gng14*、*Cxcl1* 基因表达显著升高（$P<0.05$、0.01、0.001）；与模型组比较，DGMI 组小鼠脑组织 *Slc6a3*、*Tph2* 基因表达显著升高（$P<0.01$、0.001），*Calml4*、*Ccl2*、*Gng14*、*Cxcl1* 基因表达显著降低（$P<0.05$、0.01、0.001）。6 个基因表达量的 qRT-PCR 检测结果均与转录组测序结果一致；值得注意的是，*Calml4* 和 *Gng14* 2 个基因通过 qRT-PCR 和转录组测序方法获得的表达量在 3 个受试样本间差异较大，这可能是由于 2 种检测方法对基因的检测区域不同产生的，因此说明 qRT-PCR 检测对 RNA-seq 结果验证的必要性。总之，综合 qRT-PCR 与转录组测序结果，DGMI 可能通过影响炎症和多巴胺相关通路改善 IS。

4　讨论

目前，银杏叶提取物作为天然药物产物，已被证明具有抗炎、抗氧化等多种药理作用，可以有效治疗 IS。DGMI 是国内常用的银杏叶提取物制剂之一，目前虽然在临床前和临床研究上都获得一定成果，但是其治疗 IS 的作用机制尚缺乏深入的探索。在 DGMI 作用机制探索的初期首先面对 3 方面主要

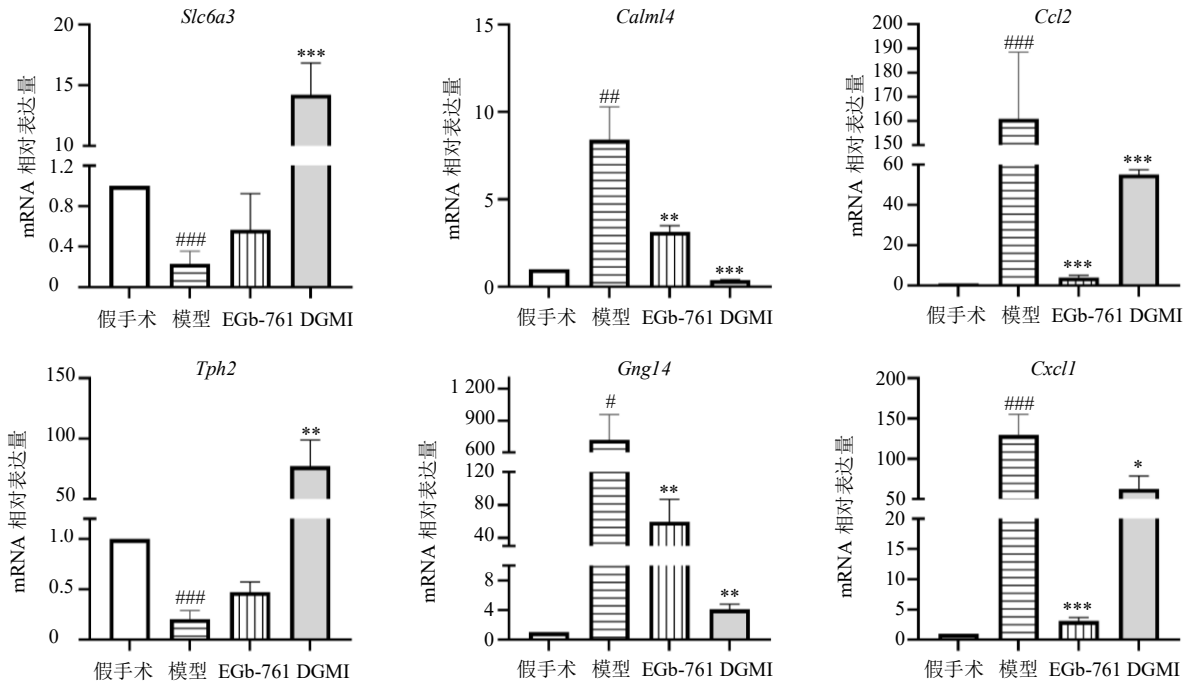


图 10　qRT-PCR 验证转录组测序关键基因表达（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Fig. 10　qRT-PCR validation of key gene expressions in transcriptome sequencing ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

的问题。第一，缺乏机制研究方向的指导。面对此问题，在组学水平，例如采用转录组测序方法，获得与疾病进程和发展相关，以及药物治疗途径相关的必要信息，将对后续针对性及更深入的研究提供方向指导。第二，对于 IS，临床实验样本的获取比较困难，使得目前相关研究集中在细胞和动物实验，目前关于 DGMI 在动物 IS 实验上的转录组测序还没有相关研究内容发表以作参考。第三，由于大脑功能的实行分区域进行，且十分复杂，采用全脑均质化样本进行检测难以对获得的结果进行解析，取特定的脑区进行研究可以更精准地反映疾病和药物对脑特定的功能结构造成的变化影响。

4.1　多巴胺能神经、黑质与卒中炎症

CCL2 基因编码的单核细胞趋化蛋白，可以吸引单核和淋巴细胞。CCL2/CCR2 趋化因子信号通路在卒中急性期中呈现促炎作用[31]，临床试验和动物实验都证明 *CCL2* 基因高表达是 IS 的危险因素，而且在临床上 *CCL2* 可作为多种卒中亚型急性期的标志物[32-33]。CCL2 因子可由小胶质细胞促炎亚型分泌，CCL2 还可能与其他趋化因子共同作用，在急性期介导 CD^{8+} T 细胞在脑中的活化和浸润[34]。不过在急性期后的慢性期，CCL2 可能有利于促进血管生成和卒中恢复[35]。卒中后活化的星型胶质细胞等分泌的 CXCL-1 是中性粒细胞趋化因子，可以募集中性粒细胞浸润脑区。中性粒细胞会通过胞外诱捕网等方式进一步加剧卒中[36-38]。

DGMI 组和模型组黑质脑区 DEGs 的 KEGG 以及 GO 结果显示，DGMI 治疗 IS 可能和多巴胺能神经相关，尤其是多巴胺的转运和代谢。溶质载体蛋白（solute carrier，Slc）是一类跨膜转运蛋白，*Slc18a2* 基因调控的囊泡单胺转运蛋白 2（Vesicular monoamine transporter 2，VMAT2）依赖于质子浓度，介导多巴胺在突触前神经元中从胞质溶胶进入囊泡储存[39-41]，囊泡经突触小泡循环将多巴胺运至突触前膜附近，释放多巴胺进入突触间隙，多巴胺结合突触后膜的受体后失活，而 *Slc6a3* 调控的多巴胺转运蛋白 1（dopamine transporter1，DAT1）位于突触前末梢周围，依赖于 Na^+/Cl^- 从突触间隙再摄取多巴胺至突触前末梢[42]。包括多巴胺、乙酰胆碱在内的多种神经递质的受体为 G 蛋白偶联受体，小鼠 *Gng14* 编码的蛋白为 G 蛋白 γ 亚基，与人类 *GNG14* 同源，*Gng14* 可能通过调节 G 蛋白亚基发挥作用，而 *Calml4* 是钙调蛋白，通过与钙离子结合作用于钙离子信号通路对下游信号产生影响。TPH2 是 5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）合成的关键酶，同时也会影响多巴胺的浓度，涉及其转运与代谢[43]。

多巴胺能神经元控制着脑内的奖赏系统、成瘾性以及运动功能[44]，还能调控疼痛和神经炎症[45-46]。

黑质-纹状体通路是主要的多巴胺能通路之一，黑质中多巴胺能神经元丰富，是脑内合成多巴胺的主要核团，与纹状体、丘脑、皮质共同构成基底神经节回路，是调节运动和感知的重要中枢[21,47]。

IS 致残率高，患者由于神经受损导致运动障碍，常见症状有偏瘫、后肢痉挛、偏侧震颤、肢体无规则地甩动摇摆或者出现急性帕金森症，这可能与黑质-纹状体通路受损有关。GSEA 结果显示模型组帕金森症通路下调，而 DGMI 能有效逆转。DGMI 可以改善运动和感知功能，其 GO 和 KEGG 富集分析结果都在提示可能与保护多巴胺能神经、调节神经活性物质配体受体有关。目前有多篇文献证明银杏提取物（包括银杏内酯）可以增加并保护多巴胺能神经，抑制其凋亡[48-49]。

另外，还有研究发现，脑卒中后痉挛与神经元过度兴奋有关，涉及黑质内谷氨酸、γ-氨基丁酸（γ-aminobutyric acid，GABA）的变化[50-52]。银杏内酯还有调节谷氨酸、GABA、5-HT 等神经活性物质的功能[53]。

4.2 差异基因与卒中潜在标志物

差异基因分析结果显示，*Gng14*、*Ccl12*、*Ccl2*、*Slc18a2*、*Slc6a3*、*Calml4*、α2-巨球蛋白（α2-macroglobulin，*A2m*），丝氨酸蛋白酶抑制剂家族 E 成员 1（serpin family E member 1，*Serpine1*）、丝氨酸蛋白酶抑制剂家族 A 成员 3（serpin family A member 3，*Serpina3n*）、鞘氨醇-1-磷酸受体 3（sphingosine-1-phosphate receptor 3，*S1pr3*）等 32 个基因是模型组和 DGMI 组重合的差异基因。其中，前几个差异基因在黑质与多巴胺能通路中已讨论，其他差异基因也有有意思的发现。

虽然 *Serpina3n* 和 *Serpine1* 基因在 IS 模型组中都显著上调，都编码 serpin 超家族，但是他们具有不同的功能。Serpina3n 是分泌型丝氨酸蛋白酶抑制剂[54]，*Serpina3n* 可作为反应性星型胶质细胞和神经炎症的潜在标志物[55-56]，其表达上调可通过抑制丝氨酸蛋白酶，减轻外周 T 细胞、中性粒细胞浸润，从而减少血脑屏障破坏[57]；而 *Serpine1* 是 Serpin 家族 E 的一员，为 rt-PA 的主要抑制剂[58]，降低其表达可以减轻中性粒细胞浸润[59]，并且 Serpine1 结合蛋白与 IS 临床风险有一定关联[60]。*S1pr3* 基因在转录组分析中被认为是卒中的核心基因，会影响血脑屏障[61]，其抑制剂可以改善 IS 并可能有助于血管生成[62]。A2m 蛋白与凝血酶原激活有关，被认为是急性 IS 潜在的标志物[63-64]，可能与白质病变有关[65]，应用于临床模型预测患者生存结局[66-67]。这些基因都可能成为潜在的卒中标志物。

4.3 DGMI 与纤毛

尽管模型组 GO 富集分析中未富集到与纤毛有关的通路，本研究 DGMI 组的 GO 富集分析结果提示 DGMI 治疗作用可能与胞外空间、纤毛有关。纤毛介导细胞间通讯[68]，如同细胞天线，接受包括生长因子、激素、气味剂等刺激并传回胞内。纤毛与脑中血管内皮细胞紧密相关[69]。并在动脉粥样硬化中起保护作用[70]。但 DGMI 与原纤毛的关系尚未有人研究，有待探索。

综上，本研究初步讨论了 DGMI 治疗 MCAO 小鼠模型在脑黑质区的转录组学结果，通过 GSEA、DEGs 的 KEGG 通路以及 GO 功能分析，发现 IS 的通路主要富集于神经炎症、趋化因子活动和免疫细胞大脑浸润等，而 DGMI 治疗作用可能体现在保护多巴胺能神经，改善神经活性物质分泌。本研究首次提供 DGMI 治疗小鼠缺血性脑卒中的转录组数据，脑分区样本使疾病特征和药物作用表现更精细，发现了 DGMI 抗脑缺血损伤可能的作用机制，为进一步探索 IS 疾病发展以及 DGMI 的治疗机制提供基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] GBD Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990—2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(10): 795-820.

[2] Wang Y J, Li Z X, Gu H Q, *et al*. China Stroke Statistics: An update on the 2019 report from the National Center for Healthcare Quality Management in Neurological Diseases, China National Clinical Research Center for Neurological Diseases, the Chinese Stroke Association, National Center for Chronic and Non-communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention and Institute for Global Neuroscience and Stroke Collaborations [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2022, 7(5): 415-450.

[3] Tu W J, Wang L D, Yan F, *et al*. China stroke surveillance report 2021 [J]. *Mil Med Res*, 2023, 10(1): 33.

[4] Tu W J, Zhao Z P, Yin P, *et al*. Estimated burden of stroke in China in 2020 [J]. *JAMA Netw Open*, 2023, 6(3): e231455.

[5] Ajoolabady A, Wang S Y, Kroemer G, *et al*. Targeting

autophagy in ischemic stroke: From molecular mechanisms to clinical therapeutics [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 225: 107848.

[6] DeLong J H, Ohashi S N, O'Connor K C, *et al*. Inflammatory responses after ischemic stroke [J]. *Semin Immunopathol*, 2022, 44(5): 625-648.

[7] Qin C, Yang S, Chu Y H, *et al*. Signaling pathways involved in ischemic stroke: Molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 215.

[8] Tao T, Liu M Z, Chen M Y, *et al*. Natural medicine in neuroprotection for ischemic stroke: Challenges and prospective [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 216: 107695.

[9] Zhang W, Song J K, Yan R, *et al*. Diterpene ginkgolides protect against cerebral ischemia/reperfusion damage in rats by activating Nrf2 and CREB through PI3K/Akt signaling [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(8): 1259-1272.

[10] Feng Z L, Sun Q, Chen W, *et al*. The neuroprotective mechanisms of ginkgolides and bilobalide in cerebral ischemic injury: A literature review [J]. *Mol Med*, 2019, 25(1): 57.

[11] 蔡琳, 杜瑜, 彭鹏. 银杏中银杏内酯提取方法及其药理作用的研究进展 [J]. 安徽化工, 2022, 48(3): 18-19.

[12] Omidkhoda S F, Razavi B M, Hosseinzadeh H. Protective effects of *Ginkgo biloba* L. against natural toxins, chemical toxicities, and radiation: A comprehensive review [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(11): 2821-2840.

[13] 杜雨芯, 操娇娇, 张倩霞, 等. 银杏二萜内酯通过拮抗 PAFR 和调节 SIRT1/STAT3 抑制氧化应激诱导的 PC12 神经元衰老研究 [J]. 中草药, 2023, 54(9): 2793-2801.

[14] Fan X X, Cao Z Y, Liu M X, *et al*. Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection inhibits apoptosis induced by optic nerve crush injury via modulating MAPKs signaling pathways in retinal ganglion cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114371.

[15] Zhao H, Guo Q, Li B L, *et al*. The efficacy and safety of *Ginkgo* terpene lactone preparations in the treatment of ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 821937.

[16] 杜晓, 韩舟, 何斌, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液对急性缺血性脑卒中再通成功患者预后的影响 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(3): 607-613.

[17] 赵宾江, 王振中, 凌娅, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液治疗动脉粥样硬化性血栓性脑梗死恢复期 (痰瘀阻络证) III 期临床试验 [J]. 中草药, 2013, 44(24): 3525-3530.

[18] Zhang D D, Wang Y, Meng Z H, *et al*. Efficacy of Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection in elderly patients with ischemic stroke: A post hoc analysis of a randomized controlled trial [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154391.

[19] Zhang Q, Wang A X, Xu Q, *et al*. Efficacy and safety of *Ginkgo* diterpene lactone meglumine in acute ischemic stroke: A randomized clinical trial [J]. *JAMA Netw Open*, 2023, 6(8): e2328828.

[20] Wang T J, Wu Z Y, Yang C H, *et al*. Multiple mechanistic models reveal the neuroprotective effects of diterpene ginkgolides against astrocyte-mediated demyelination via the PAF-PAFR pathway [J]. *Am J Chin Med*, 2022, 50(6): 1565-1597.

[21] Aoki S, Smith J B, Li H, *et al*. An open cortico-basal Ganglia loop allows limbic control over motor output via the nigrothalamic pathway [J]. *Elife*, 2019, 8: e49995.

[22] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.

[23] Bieber M, Gronewold J, Scharf A C, *et al*. Validity and reliability of neurological scores in mice exposed to middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 2019, 50(10): 2875-2882.

[24] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.

[25] Kim D, Paggi J M, Park C, *et al*. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(8): 907-915.

[26] Pertea M, Pertea G M, Antonescu C M, *et al*. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(3): 290-295.

[27] Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data [J]. *Genome Biol*, 2010, 11(10): R106.

[28] 徐小波, 武子寅, 张新庄, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液及其银杏二萜内酯成分抗人脐静脉内皮细胞氧糖剥夺损伤的转录组学研究 [J]. 中草药, 2023, 54(13): 4233-4244.

[29] Ritchie M E, Phipson B, Wu D, *et al*. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47.

[30] Lv W J, Jiang J Q, Xu Y, *et al*. Re-exploring the inflammation-related core genes and modules in cerebral ischemia [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(6): 3439-3451.

[31] Jayaraj R L, Azimullah S, Beiram R, *et al*. Neuroinflammation: Friend and foe for ischemic stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 142.

[32] Georgakis M K, Malik R, Björkbacka H, *et al*. Circulating monocyte chemoattractant protein-1 and risk of stroke: Meta-analysis of population-based studies involving 17 180 individuals [J]. *Circ Res*, 2019, 125(8): 773-782.

[33] Holmegaard L, Stanne T M, Andreasson U, *et al*. Proinflammatory protein signatures in cryptogenic and large artery atherosclerosis stroke [J]. *Acta Neurol Scand*, 2021, 143(3): 303-312.

[34] Shi Z S, Yu P, Lin W J, *et al*. Microglia drive transient insult-induced brain injury by chemotactic recruitment of $CD8^+$ T lymphocytes [J]. *Neuron*, 2023, 111(5): 696-710.e9.

[35] Pedragosa J, Miró-Mur F, Otxoa-de-Amezaga A, *et al*. CCR2 deficiency in monocytes impairs angiogenesis and functional recovery after ischemic stroke in mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2020, 40(1_suppl): S98-S116.

[36] Denorme F, Portier I, Rustad J L, *et al*. Neutrophil extracellular traps regulate ischemic stroke brain injury [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(10): e154225.

[37] Kang L J, Yu H L, Yang X, *et al*. Neutrophil extracellular traps released by neutrophils impair revascularization and vascular remodeling after stroke [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2488.

[38] Zhao Z Y, Pan Z R, Zhang S, *et al*. Neutrophil extracellular traps: A novel target for the treatment of stroke [J]. *Pharmacol Ther*, 2023, 241: 108328.

[39] Wang Y W, Zhang P, Chao Y L, *et al*. Transport and inhibition mechanism for VMAT2-mediated synaptic vesicle loading of monoamines [J]. *Cell Res*, 2024, 34(1): 47-57.

[40] Pidathala S, Liao S Y, Dai Y X, *et al*. Mechanisms of neurotransmitter transport and drug inhibition in human VMAT2 [J]. *Nature*, 2023, 623(7989): 1086-1092.

[41] Yaffe D, Forrest L R, Schuldiner S. The ins and outs of vesicular monoamine transporters [J]. *J Gen Physiol*, 2018, 150(5): 671-682.

[42] Wu X H, Gu H H. Cocaine affinity decreased by mutations of aromatic residue phenylalanine 105 in the transmembrane domain 2 of dopamine transporter [J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 63(3): 653-658.

[43] Kulikova E A, Kulikov A V. Tryptophan hydroxylase 2 as a therapeutic target for psychiatric disorders: Focus on animal models [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(8): 655-667.

[44] Channer B, Matt S M, Nickoloff-Bybel E A, *et al*. Dopamine, immunity, and disease [J]. *Pharmacol Rev*, 2023, 75(1): 62-158.

[45] Meng F, Guo Z G, Hu Y L, *et al*. CD73-derived adenosine controls inflammation and neurodegeneration by modulating dopamine signalling [J]. *Brain*, 2019, 142(3): 700-718.

[46] Wu Y Q, Hu Y C, Wang B W, *et al*. Dopamine uses the DRD5-ARRB2-PP2A signaling axis to block the TRAF6-mediated NF-κB pathway and suppress systemic inflammation [J]. *Mol Cell*, 2020, 78(1): 42-56.

[47] Foster N N, Barry J, Korobkova L, *et al*. The mouse cortico-basal ganglia-thalamic network [J]. *Nature*, 2021, 598(7879): 188-194.

[48] Miao Q, Chai Z, Song L J, *et al*. The neuroprotective effects and transdifferentiation of astrocytes into dopaminergic neurons of ginkgolide K on Parkinson' disease mice [J]. *J Neuroimmunol*, 2022, 364: 577806.

[49] Li L Y, Zhao X L, Fei X F, *et al*. Bilobalide inhibits 6-OHDA-induced activation of NF-kappaB and loss of dopaminergic neurons in rat substantia nigra [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(5): 539-547.

[50] 郭斌, 岳增辉, 谢志强, 等. 基于神经兴奋-抑制因子 (Glu-GABA) 受体含量及表达观察电针对于脑卒中痉挛状态大鼠黑质纹状体的影响实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(5): 1268-1270.

[51] 郭斌, 岳增辉, 谢志强, 等. 电针对脑卒中痉挛状态大鼠黑质内多巴胺受体及其亚型含量与表达的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(11): 1489-1491.

[52] 郭斌, 岳增辉, 谢志强, 等. 基于大脑黑质纹状体内多巴胺受体亚型含量与表达观察针刺对大鼠脑卒中痉挛状态的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(2): 577-579.

[53] Gachowska M, Szlasa W, Saczko J, *et al*. Neuroregulatory role of ginkgolides [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(7): 5689-5697.

[54] 万进杰, 何勇生, 冯九庚. Serpina3n 在中枢神经系统疾病中应用及研究进展 [J]. 江西医药, 2022, 57(12): 2301-2303.

[55] Zamanian J L, Xu L J, Foo L C, *et al*. Genomic analysis of reactive astrogliosis [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(18): 6391-6410.

[56] Zhang Y, Chen Q, Chen D, *et al*. SerpinA3N attenuates ischemic stroke injury by reducing apoptosis and neuroinflammation [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(4): 566-579.

[57] Li F S, Zhang Y M, Li R Q, *et al*. Neuronal Serpina3n is an endogenous protector against blood brain barrier damage following cerebral ischemic stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2023, 43(2): 241-257.

[58] He W T, Gu L, Yang J L, *et al*. Exosomal circCNOT6L regulates astrocyte apoptotic signals induced by hypoxia

exposure through miR99a-5p/SERPINE1 and alleviates ischemic stroke injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(12): 7118-7135.

[59] Pu Z J, Bao X Y, Xia S N, *et al*. Serpine1 regulates peripheral neutrophil recruitment and acts as potential target in ischemic stroke [J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 2649-2663.

[60] Shilenok I, Kobzeva K, Stetskaya T, *et al*. SERPINE1 mRNA binding protein 1 is associated with ischemic stroke risk: A comprehensive molecular-genetic and bioinformatics analysis of SERBP1 SNPs [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10): 8716.

[61] Xu D K, Gao Q, Wang F, *et al*. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 is implicated in BBB injury via the CCL2-CCR2 axis following acute intracerebral hemorrhage [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(6): 674-686.

[62] Fan X H, Chen H P, Xu C, *et al*. S1PR3, as a core protein related to ischemic stroke, is involved in the regulation of blood-brain barrier damage [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 834948.

[63] 李金懋, 陈莉芬. α2-巨球蛋白在神经系统疾病中的研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2015, 42(5): 479-482.

[64] Nezu T, Hosomi N, Aoki S, *et al*. Alpha2-macroglobulin as a promising biomarker for cerebral small vessel disease in acute ischemic stroke patients [J]. *J Neurol*, 2013, 260(10): 2642-2649.

[65] Fernandez-Cadenas I, Mendioroz M, Domingues-Montanari S, *et al*. Leukoaraiosis is associated with genes regulating blood-brain barrier homeostasis in ischaemic stroke patients [J]. *Eur J Neurol*, 2011, 18(6): 826-835.

[66] Gori A M, Giusti B, Piccardi B, *et al*. Inflammatory and metalloproteinases profiles predict three-month poor outcomes in ischemic stroke treated with thrombolysis [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(9): 3253-3261.

[67] Del Río-Espínola A, Fernández-Cadenas I, Giralt D, *et al*. A predictive clinical-genetic model of tissue plasminogen activator response in acute ischemic stroke [J]. *Ann Neurol*, 2012, 72(5): 716-729.

[68] Ma R, Kutchy N A, Chen L, *et al*. Primary cilia and ciliary signaling pathways in aging and age-related brain disorders [J]. *Neurobiol Dis*, 2022, 163: 105607.

[69] Sánchez-Duffhues G, de Vinuesa A G, Lindeman J H, *et al*. SLUG is expressed in endothelial cells lacking primary cilia to promote cellular calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(3): 616-627.

[70] Dinsmore C, Reiter J F. Endothelial primary cilia inhibit atherosclerosis [J]. *EMBO Rep*, 2016, 17(2): 156-166.

[责任编辑 李亚楠]