

## 银杏总黄酮与银杏总内酯对亚急性期卒中小鼠神经功能恢复促进作用的比较研究

李志雄<sup>1,2</sup>, 肖光旭<sup>1,2</sup>, 贺爽<sup>1,2</sup>, 王焕义<sup>1,2</sup>, 朱彦<sup>1,2\*</sup>

(1. 天津中医药大学, 组分中药国家重点实验室, 天津 301617; 2. 天津国际生物医药联合研究院, 中药新药研发中心, 天津 300457)

**摘要:** 舒血宁注射液作为一种银杏叶提取物制剂, 在脑卒中急性期和亚急性期防治上表现出独特优势, 但其主要活性部位尚不明晰。本研究旨在基于前期构建的小鼠脑卒中亚急性期模型, 进一步探讨舒血宁的两个主要组分银杏总黄酮和银杏总内酯对促进脑卒中小鼠神经功能恢复的贡献度及作用机制。主要通过神经及行为学变化、脑梗死体积、血脑屏障渗透和脑水肿进行药效评价, 结合转录组和网络药理学进行通路和靶标预测, 最后在 mRNA 和蛋白水平进行机制验证。结果显示, 在药效评价和粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、巨噬细胞分化抗原 1 (macrophage-1 antigen, MAC-1) 和 E 选择素参与的粒细胞黏附与浸润的调节机制中, 银杏总内酯的作用均优于银杏总黄酮, 提示舒血宁注射液可能主要通过银杏总内酯组分下调 G-CSF 介导的粒细胞黏附与浸润通路来改善亚急性期卒中小鼠的预后。这一发现有望为优化处方和寻找靶向治疗缺血性脑卒中预后的天然药物提供参考。本研究动物实验过程遵循天津中医药大学动物伦理委员会的规定。

**关键词:** 舒血宁注射液; 银杏总黄酮; 银杏总内酯; 缺血性脑卒中; 粒细胞集落刺激因子

中图分类号: R964 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)01-0231-13

## Comparative study on the effects of total ginkgo flavonol glycosides and total ginkgolides on neurofunctional recovery in mice with subacute stroke

LI Zhi-xiong<sup>1,2</sup>, XIAO Guang-xu<sup>1,2</sup>, HE Shuang<sup>1,2</sup>, WANG Huan-yi<sup>1,2</sup>, ZHU Yan<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. Chinese Medicine New Drug Research and Development Center, Tianjin International Biomedical Research Institute, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** As a *Ginkgo biloba* extract preparation, shuxuening injection has a unique advantage in the prevention and treatment of acute and subacute stroke, but its main active ingredient is still unclear. Using a subacute model of stroke in mice constructed earlier, we further explored the contribution and mechanism of the two main components of total ginkgo flavonol glycosides and total ginkgolides in facilitating the neurofunctional recovery in stroke-induced mice. The pharmacodynamics was mainly evaluated by neurobehavioral changes, cerebral infarction volume, blood-brain barrier permeability and brain edema. The pathway and targets were predicted by transcriptome and network pharmacology. Finally, the mechanism was verified at the mRNA and protein levels. The results showed that the beneficial effect of total ginkgolides was greater than that of total ginkgo flavonol glycosides

收稿日期: 2020-07-29; 修回日期: 2020-08-13.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873037); 国家重点研发计划项目 (2018YFC1704502); 天津中医药大学研究生科研创新资助项目 (YJSC-20191035).

\*通讯作者 Tel: 15822700439; E-mail: yanzhu.harvard@icloud.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1265

in both the pharmacodynamics and the regulatory mechanism of granulocyte adhesion and diapedesis involving granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), macrophage-1 antigen (MAC-1) and E-selectin. These findings suggest that shuxuening injection may improve the prognosis for mice with subacute stroke by down-regulating G-CSF-mediated granulocyte adhesion and diapedesis pathway mainly through the total ginkgolide components. This finding is expected to provide reference for optimizing prescription and searching for natural drugs for targeting the treatment of ischemic stroke prognosis. The animal experiments in this study followed the regulations of Animal Ethics Committee of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine.

**Key words:** shuxuening injection; total ginkgo flavonol glycosides; total ginkgolides; ischemic stroke; granulocyte colony-stimulating factor

银杏叶是一种传统中草药,其提取物具有广泛的药理学作用,包括抗氧化、抗炎、抗钙超载、抗过敏和抗凋亡等<sup>[1]</sup>。近年越来越多的研究表明,银杏叶提取物可以发挥神经保护作用,这种有益作用主要表现在减少脑缺血再灌注损伤,延迟海马神经元死亡,减轻认知缺陷以及改善缺血性卒中后的运动功能等多方面<sup>[2-5]</sup>。舒血宁注射液是经国家药品监督管理局批准的一种银杏叶提取物加工制品,可以扩张血管和改善微循环,临床上用于治疗缺血性心脑血管疾病<sup>[6]</sup>,折合含银杏叶提取物为 $3.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,其中银杏总黄酮和银杏总内酯含量达 $0.84$ 和 $0.14\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,被认为是全方质量控制<sup>[7]</sup>和防治心脑血管疾病的主要成分<sup>[8,9]</sup>。

缺血性脑卒中是脑卒中的主要类型,占比高达 $87\%$ <sup>[10]</sup>,是严重危害人类身体健康的疾病之一。目前,公认最有效的抢救方法是在 $4.5\text{ h}$ 内使用重组组织纤溶酶原激活剂溶栓<sup>[11]</sup>,但如此短的治疗时间窗让大部分(约 $95\%$ )的脑卒中患者无法得到及时治疗<sup>[12]</sup>,这一数字在我国更是达到了 $99\%$ 以上<sup>[13]</sup>,这导致了死亡和残疾等不良预后<sup>[14]</sup>,给患者家庭带来了沉重的生活负担。随着我国老龄化问题的加剧,亟需开发切实可用、安全有效的卒中预后手段。

免疫/炎症反应是脑卒中等脑损伤疾病及其后恢复的重要调节途径,这与众多的免疫细胞和炎症介质相关<sup>[15]</sup>。脑卒中后,血脑屏障破坏,促炎因子如集落刺激因子、肿瘤坏死因子、白介素、趋化因子、黏附分子以及它们的受体被大量释放,粒细胞与内皮细胞发生黏附并渗透到脑实质中,该过程包括捕获、滚动、黏附、渗出和迁移等,最终导致神经炎症、动脉粥样硬化和败血性脑病等并发症<sup>[16]</sup>。

在本课题组先前针对急性( $24\text{ h}$ )缺血性脑卒中小鼠的脑保护作用的研究中发现,舒血宁注射液可以通过肿瘤坏死因子受体超家族成员 $12\text{a}$ 介导的动脉粥样硬化信号和炎症反应减低脑缺血再灌注损伤<sup>[17]</sup>,而这种保护作用主要是通过舒血宁注射液中的银杏总内酯组分发挥的<sup>[18]</sup>。但是,由于脑卒中是一个长期的过程,

包括急性期、亚急性期和恢复期等阶段,对舒血宁注射液的研究,除了在急性卒中保护层外,需要进一步探讨其能否在卒中预后阶段起到帮助神经功能恢复的作用以及可能的活性部位。在本课题组的另一项研究中,用大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)法建立了可以效仿脑卒中预后阶段的亚急性期脑卒中小鼠模型,并发现通过 $3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的舒血宁注射液治疗可以抑制粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factors, G-CSF)介导的粒细胞黏附与浸润通路,从而对亚急性脑卒中小鼠发挥显著的神经功能恢复作用<sup>[9]</sup>。为了进一步明确舒血宁注射液的这种有益作用主要是通过哪些组分发挥的,本研究沿用同样的动物模型和机制通路,对舒血宁注射液的两个组分银杏总黄酮和银杏总内酯展开研究,以探讨它们在全方中的贡献度,为阐明舒血宁注射液的物质基础和优化处方提供理论支持。

## 材料与方法

**动物** 8周龄雄性C57BL/6J小鼠从中国食品药品检定研究院(合格证号:SCXK京2017-0005)购买,体重为 $22\sim 25\text{ g}$ ,饲养在固定湿度( $40\%\pm 5\%$ )、温度( $22^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$ )和自然光照房间内,供自由饮水和进食。动物研究方案获天津中医药大学实验动物伦理委员会(许可编号:TCM-LAEC2014004)批准。

**药品与试剂** 舒血宁注射液(国药准字:Z13020795;批号:181108C1)、银杏总黄酮注射液( $0.84\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )和银杏总内酯注射液( $0.14\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )由河北神威药业集团有限公司提供,金纳多注射液(注册证号:HC20181022;批号:M7059)购自台湾济生医药生技股份有限公司。 $2\%$  2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride, TTC)溶液(G3005)、小鼠G-CSF酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(SEKM-0040)和RIPA组织/细胞裂解液(R0010)购自北京索莱宝科技有限公司。伊文思蓝(MB4680)购自大连美

仑生物技术有限公司。SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (P0015L) 购自上海碧云天生物技术有限公司。EasyPure®RNA 试剂盒 (ER101)、EasySee®Western blot 试剂盒 (DW101-02) 和 BCA 蛋白检测试剂盒 (PC0020) 购自北京全式金生物技术有限公司。反转录试剂盒 (04897030001) 购于德国 Roche 公司。Bestar™ qPCR MasterMix (DBI-2043) 购自上海星汉生物科技有限公司。E 选择素抗体 (bs-1273R) 和 CD11B/MAC1 抗体 (bs-1014R) 购自北京博奥森生物技术有限公司, 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (14C10) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。辣根酶标记山羊抗兔 IgG (ZB-2301) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**脑缺血再灌注损伤模型的建立及分组给药** 用充满 2% 异氟烷的小动物麻醉机 (Matrx VIP 3000, 美国 Midmark 公司) 将小鼠麻醉, 剪开小鼠头部皮肤, 用激光多普勒血流仪 (moor FLPI-2, 英国 Moor Instruments 公司) 监测脑血流量基值。分离小鼠左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉和翼腭动脉, 用 6-0 医用缝线结扎颈外动脉远端, 近端剪口并插入 MCAO 线栓 (L1800, 广州佳灵公司) 以阻断大脑中动脉血流, 30 min 后将线栓抽出以实现再灌注, 检测脑血流量直至恢复到基值 80% 左右的小鼠被认为实现缺血再灌注目的, 造模成功, 最后用 4-0 医用缝线缝合皮肤。假手术组 (sham) 除未插入线栓之外, 其余步骤与造模鼠相同。本研究用鼠 132 只, 其中 12 只未实现血流再灌注被舍弃, 120 只按以下 6 组均分用于正式实验: sham、模型组 (model)、3 mL·kg<sup>-1</sup> 金纳多组 (ginaton)、3 mL·kg<sup>-1</sup> 舒血宁组 (SXNI)、3 mL·kg<sup>-1</sup> 银杏总黄酮组 (YZZHT) 和 3 mL·kg<sup>-1</sup> 银杏总内酯组 (YZZNZ)。对于 4 个给药组, 造模后马上尾静脉注射相应药物 1 次, 此后每天早晚尾静脉给药 1 次直至第 7 天, 假手术组和模型组给予等量生理盐水。

**神经功能缺损评分** 如之前研究所述<sup>[19]</sup>, 在脑缺血再灌注后的第 1、4 和 7 天, 根据改良的神经系统严重程度评分表 (modified neurologic severity scores, mNSS) 对小鼠的神经功能缺损进行记录, 包括悬尾、行走、平衡木测试和反应缺失 4 项。评分范围 0~14, 与缺血再灌注损伤严重程度呈正相关。

**旷场实验** 缺血再灌注后第 5 天, 将小鼠置于 40 cm×40 cm 的旷场箱中, 上方悬挂高速相机。为了消除气味影响, 在对每只动物进行测试之前, 用 75% 酒精擦拭旷场底部。记录时间设置为 30 min, 使用 ANY-maze 行为跟踪软件 (美国 Stoelting 公司) 记录总距离和平均速度<sup>[20]</sup>。

**自动步态分析** 如前所述<sup>[21]</sup>, 在缺血再灌注之前,

小鼠在 Catwalk 系统 (荷兰 Noldus 信息技术公司) 跑道上训练 2 天, 以熟悉跑道, 在缺血再灌注后的第 7 天, 通过 Catwalk 系统对小鼠进行自动定量步态记录, 使用 Catwalk XT Version 9.1 软件分析小鼠的支撑距离、最大接触面积、爪印总面积、步幅长度和摆动速度。

**测量脑梗死体积** 小鼠安乐死后将大脑取出, 在脑模具中切成 5 个 2 mm 厚的冠状切片, 37 °C 培养箱中 TTC 染色 15 min<sup>[22]</sup>。使用 Image J 软件 (美国国立卫生研究院) 确定对侧半球 (Ci)、同侧半球 (Ii) 和同侧非缺血区域 (Ni) 的面积, 并用以下公式计算梗死体积 (%)<sup>[23]</sup>:

$$\text{Infarct volume} = \left( \frac{\sum_i \left( \left( \frac{I_i - N_i}{I_i} \right) C_i \right)}{2 \sum_i C_i} \right) \times 100\%$$

**血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 渗漏评价** 卒中后第 6 天按 300 mL·kg<sup>-1</sup> 尾静脉注射 0.6% 伊文思蓝溶液, 24 h 后取脑并切成 5 个 2 mm 厚的冠状切片, 使用 IVIS®LuminaK Series III 小动物活体光学成像系统 (美国 PerkinElmer 公司) 按以下荧光成像参数摄取总发光效率 (total radiant efficiency)<sup>[24]</sup>: 曝光时间自动, 激发光 700 nm, 发射光 790 nm。

**脑水肿分析** 在用 2% 异氟烷吸入麻醉小鼠后, 按 15 mL·kg<sup>-1</sup> 尾静脉注射造影剂碘海醇注射液。使用 Quantum FX 小动物活体三维断层扫描系统 (Micro-CT, 美国 PerkinElmer 公司) 在以下参数下对大脑进行扫描: 电压 90 kV, 电流 180 μA, 视野 2 cm, 扫描时长 4.5 min。

**生物反应信号网络分析** 在以前的研究中<sup>[5]</sup>, 本课题组已经通过转录组测序得到了缺血再灌注损伤后 7 天小鼠的模型组和舒血宁注射液给药组的差异表达基因, 其中有 963 个显著差异表达基因 (495 个上调, 468 个下调) 的变化倍数 ≥ 1.5, P 值 ≤ 0.01。将这些基因导入 Ingenuity® Pathway Analysis (IPA) 平台进行核心分析, 得到其关键通路和靶标, 以进行实验验证。

**RNA 提取和逆转录-聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)** 根据说明书用 EasyPure®RNA 试剂盒从脑组织中提取总 RNA, 然后使用反转录试剂盒反转录成 cDNA。将 cDNA 与 Bestar™ qPCR MasterMix 和引物混合, 最后经实时 PCR 系统 (LightCycler®480, 德国 Roche 公司) 检测 mRNA 表达水平。本实验中使用的引物包括 *G-csf*、E 选择素 (E-selectin, *Sele*)、整合素 αM (integrin alpha M, *Itgam*)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, *Tnf*)、白介素 1β (interleukin-1β, *Il1b*)、白介素 6 (interleukin-6, *Il6*)。以 *Gapdh* 为标准量化其相对 mRNA 水平。以上

**Table 1** Primer sequences. Csf3: Colony stimulating factor 3; Sele: E-selectin; Itgam: Integrin alpha M; Tnf: Tumor necrosis factor; Il1b: Interleukin-1 $\beta$ ; Il6: Interleukin-6; Gapdh: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Csf3</i>	ATGGCTCAACTTTCTGCCAG	CTGACAGTGACCAGGGGAAC
<i>Sele</i>	ATGCCTCGCGCTTTCTCTC	GTAGTCCCCTGACAGTATGC
<i>Itgam</i>	ATGGACGCTGATGGCAATACC	TCCCCATTCACGTCTCCA
<i>Tnf</i>	CCCTCAGCTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>Il1b</i>	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTGGGGTCCGTCAACT
<i>Il6</i>	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>Gapdh</i>	TGGTGAAGCAGGCATCTGAG	TGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

所有引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成, 序列信息如表 1 所示。

**ELISA** 用超声粉碎机 (SCIENTZ-II D, 宁波新芝生物科技股份有限公司) 捣碎新鲜的脑组织, 并加入 RIPA 裂解液, 4 °C、13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 获得上清液。根据 G-CSF ELISA 试剂盒说明书进行实验, 并在 SPARK 酶标仪 (奥地利 Tecan 公司) 中测定波长 450 nm 下的光密度值, 绘制标准曲线并计算出样品中 G-CSF 蛋白含量。

**免疫印迹 (Western blot, WB)** 同上述方法得到脑组织上清液后, 用 BCA 试剂盒测量总蛋白质浓度。加入 SDS-PAGE 蛋白质上样缓冲液并在 95 °C 的金属浴中加热变性。电泳分离蛋白质样品后转印到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶封闭, 滴加一抗 (E-selectin, 1:2 000; CD11B/MAC-1, 1:2 000; GAPDH, 1:4 000) 后在 4 °C 冰箱孵育过夜。三羟甲基氨基甲烷吐温缓冲液 (tris-buffered saline-tween 20, TBS-T) 洗净一抗后滴加二抗山羊抗兔 IgG (1:4 000), 室温孵育 2 h, 再次用 TBS-T 洗涤。最后, 使用 EasySee Western blot Kit 避光与 PVDF 膜反应 1 min, 并通过 C-DiGit® 印迹扫描仪 (美国 LI-COR Biosciences 公司) 获得条带。通过 Image J 软件分析 E

选择素和 MAC-1 的蛋白表达量, 并用 GAPDH 标准化。

**统计学方法** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 22.0 进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),  $P < 0.05$  被认为差异有统计学意义。用 Graphpad Prism 6.0 软件对实验数据作图。

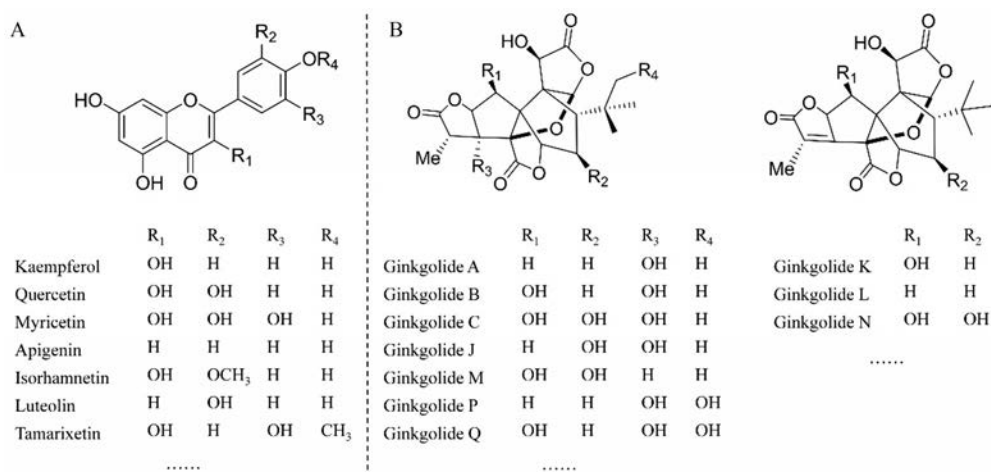
## 结果

### 1 常见银杏黄酮和银杏内酯

银杏叶提取物所含成分复杂, 其已知的黄酮类成分包括槲皮素、山奈酚、杨梅素、芹菜素、异鼠李素、木犀草素和槲柳黄素等, 而已知的内酯类成分包括银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C、银杏内酯 J、银杏内酯 M、银杏内酯 K、银杏内酯 L、银杏内酯 P、银杏内酯 Q 和银杏内酯 N 等<sup>[25-27]</sup> (图 1)。

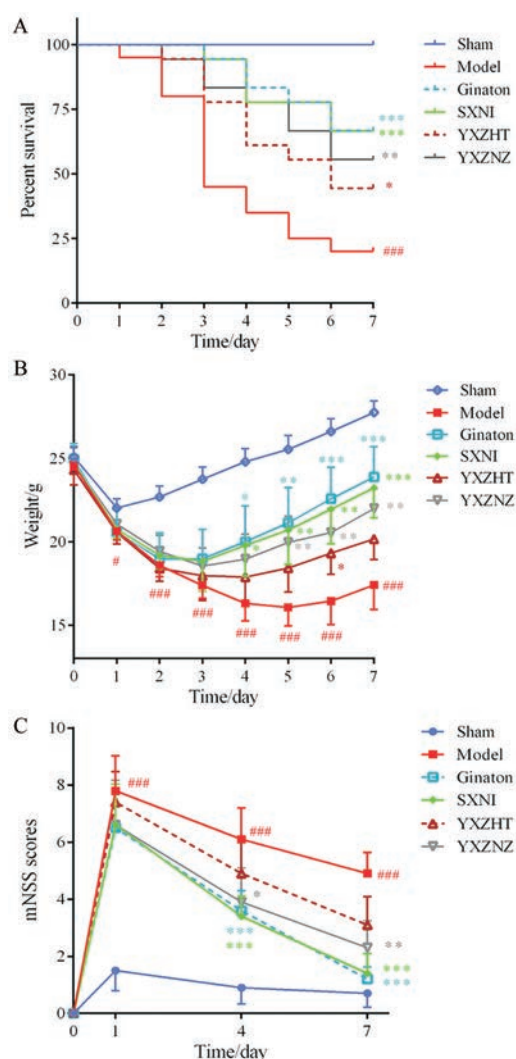
### 2 各给药组对卒中后小鼠生存率、体重和 mNSS 的影响

由图 2A 可知, 与假手术组相比, 模型组小鼠的死亡率更高 ( $P < 0.001$ )。与模型组相比, 用舒血宁全方、银杏总黄酮和银杏总内酯治疗后, 可以改善其生存率, 其中舒血宁全方 ( $P < 0.001$ ) 和银杏总内酯 ( $P < 0.01$ ) 组能将生存率提高到 50% 以上, 银杏总黄酮组效果稍弱



**Figure 1** A: The common ginkgo flavonoid glycosides include quercetin, kaempferol, myricetin, apigenin, isorhamnetin, luteolin, tamarixetin, et al.; B: The common ginkgolides include ginkgolide A, ginkgolide B, ginkgolide C, ginkgolide J, ginkgolide M, ginkgolide P, ginkgolide Q, ginkgolide K, ginkgolide L and ginkgolide N

( $P<0.05$ )。从图2B可知,模型组体重下降明显,与模型组相比,舒血宁全方从第4天开始表现出明显药效( $P<0.05$ 或 $P<0.001$ ),银杏总内酯从第5天起有效果( $P<0.01$ ),而银杏总黄酮仅第6天表现出差异( $P<0.05$ )。在mNSS评分上(图2C),模型组小鼠表现出严重的神经行为缺损( $P<0.001$ ),在手术后第4天时,舒血宁全方( $P<0.001$ )和银杏总内酯( $P<0.05$ )显著改善神经系统异常,这种有益作用持续到第7天( $P<0.001$ 或 $P<0.01$ )。然而银杏总黄酮组在这一指标上始终未体现出优势( $P>0.05$ )。舒血宁全方和阳性药金纳多在这3



**Figure 2** Survival rate, weight change and neurological deficit scores. A: Survival curve of mice in each group within 7 days after ischemic stroke.  $n = 18-20$ ,  $\bar{x} \pm s$ ; B: Diagram of changes in body weight of mice within 7 days after ischemic stroke.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ ; C: Modified neurologic severity scores (mNSS) on post-stroke days 1, 4 and 7.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P<0.05$ , ### $P<0.001$  vs sham; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs model. SXNI: Shuxuening injection; YXZHT: Total ginkgo flavonol glycosides; YXZNZ: Total ginkgolides

个指标上无明显差别。

### 3 各给药组对卒中后小鼠运动功能的影响

脑卒中后第5天的旷场实验(图3A、B)发现,模型组小鼠在30 min内的运动距离和平均速度明显下降( $P<0.01$ )。但是,与模型组相比,舒血宁全方( $P<0.001$ )和银杏总内酯( $P<0.01$ )组小鼠的运动距离和平均速度显著提升。而银杏总黄酮组和舒血宁全方相比差距明显( $P<0.01$ )。在第7天对小鼠的步态分析显示,舒血宁全方可以显著改善因脑卒中引起的肢体支撑距离(base of support, BOS)降低( $P<0.05$ ),虽然银杏总黄酮和银杏总内酯组都无表现出有益作用,但二者在对后肢支撑距离方面的作用有差异( $P<0.05$ ,图3C)。此外,舒血宁全方给药能改善异常的最大接触面积( $P<0.05$ )和后肢的爪印总面积( $P<0.01$ ),银杏总内酯在对后肢的最大接触面积和爪印总面积上的恢复作用明显优于银杏总黄酮( $P<0.05$ ,图3D、E)。在以上运动学评价指标中,舒血宁全方和阳性药金纳多效果相当。

### 4 各给药组对卒中后小鼠脑损伤的影响

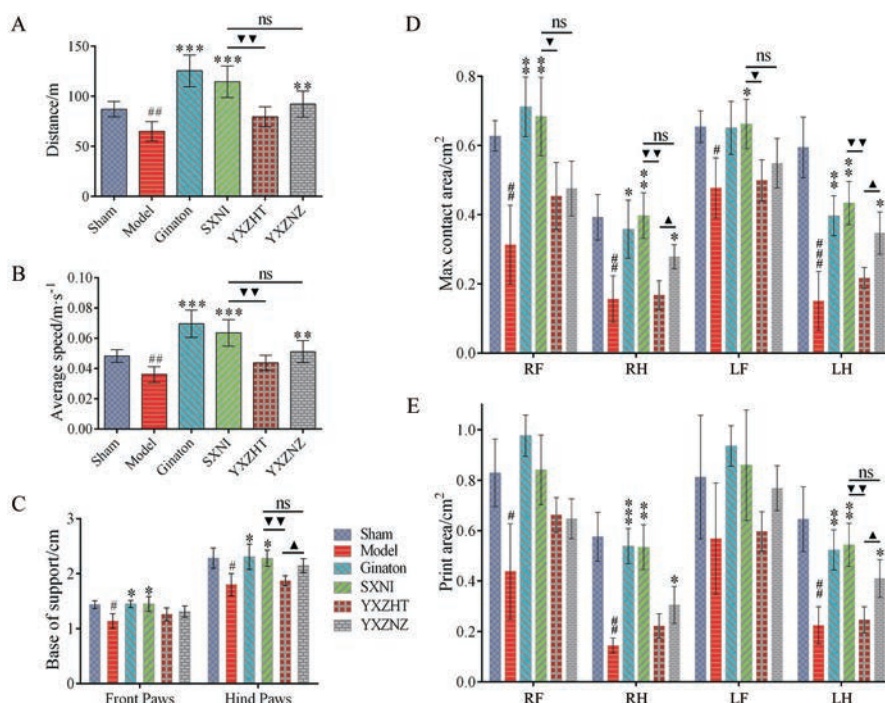
通过TTC染色和检测BBB渗漏情况来评价小鼠的脑损伤严重程度。与假手术组相比,模型组小鼠的脑梗死体积(图4A、B)和BBB渗漏(图4C、D)明显增加( $P<0.001$ )。舒血宁全方给药可以逆转这种脑损伤( $P<0.001$ 和 $P<0.01$ )。有趣的是,银杏总黄酮( $P<0.01$ )和银杏总内酯( $P<0.001$ )也可以减少脑梗死体积,但二者相比,银杏总内酯的作用更好( $P<0.05$ ,图4B)。在BBB渗漏方面,银杏总内酯表现出有益作用( $P<0.05$ ),而银杏总黄酮未发挥明显功效(图4D)。此外,舒血宁注射液和金纳多注射液在逆转脑梗死体积和BBB渗漏方面的效果相同。

### 5 各给药组对卒中后小鼠脑水肿的影响

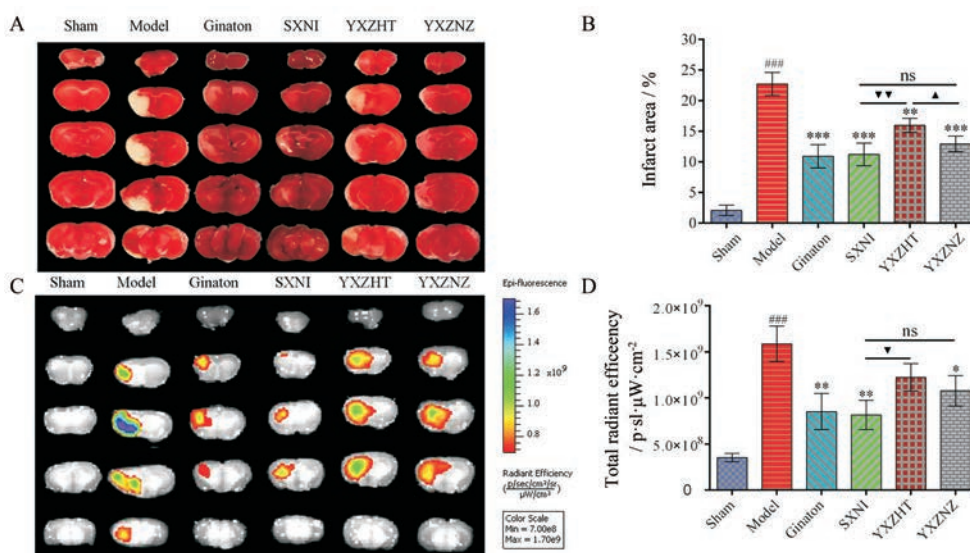
通过计算机断层扫描得到小鼠仰卧横切面,如图5A所示,左右半脑距离差的1/2即为中线偏移量,中线偏移量可以间接反映脑水肿的严重程度<sup>[28]</sup>。与假手术组相比,模型组小鼠的脑中线偏移明显增加;通过舒血宁全方( $P<0.01$ )和银杏总内酯( $P<0.05$ )给药减轻了水肿程度(图5),而银杏总黄酮组与模型组相比无统计学意义,但却与舒血宁全方组有显著差异( $P<0.05$ )。

### 6 基于差异基因的IPA关键通路和靶标分析

通过IPA平台核心分析得到排名第一的经典通路是粒细胞黏附与浸润通路(granulocyte adhesion and diapedesis pathway),该通路与32个差异基因相关(图6A),筛选既在核心分析结果中又在差异基因中的排名前100的上游调节因子(图6B),对以上32个和100个基因取交集得到15个基因,定义它们为关键靶基因,其详细信息如表2所示。由表2可知,Csf3(G-CSF)的



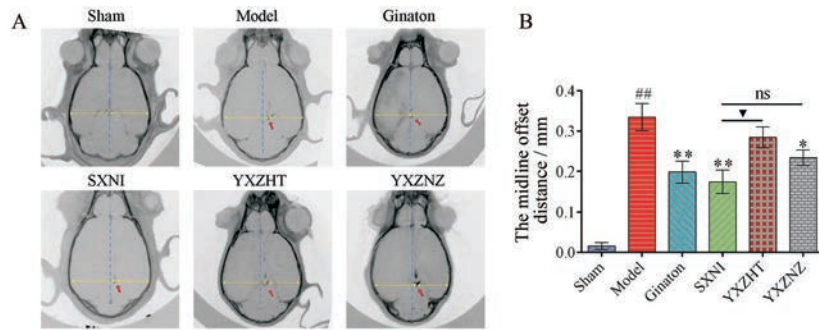
**Figure 3** Locomotor function and motor gait in post-stroke mice. The motor distance (A) and average speed of mice (B) were calculated via using open field locomotion chambers.  $n = 8, \bar{x} \pm s$ ; C: Quantification of base of support (BOS) in front and hind paws of four paws in mice.  $n = 6, \bar{x} \pm s$ ; D: Quantification of maximum contact area of four paws in mice.  $n = 6, \bar{x} \pm s$ ; E: Quantification of print area of four paws in mice.  $n = 6, \bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs sham; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model; ▽ $P < 0.05$ , ▽▽ $P < 0.01$  vs SXNI; ▲ $P < 0.05$  vs YXZLNZ. ns: No significance; RF: Right front; RH: Right hind; LF: Left front; LH: Left hind



**Figure 4** Cerebral infarct size and brain edema in post-stroke mice. A: Representative images of 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC) staining in different groups. White area indicates ischemic infarction area; B: Quantification of infarct volume after different treatment.  $n = 6, \bar{x} \pm s$ ; C: Representative IVIS images in each group; D: Quantitation of the total radiant efficiency after different treatment.  $n = 5-6, \bar{x} \pm s$ . ### $P < 0.001$  vs sham; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model; ▽ $P < 0.05$ , ▽▽ $P < 0.01$  vs SXNI; ▲ $P < 0.05$  vs YXZLNZ

变化倍数最大, 可能是受舒血宁调控最关键的基因。经查阅文献发现, 该基因对粒细胞黏附与浸润通路的抑制作用很有可能是通过下调蛋白E选择素、MAC-1 (ITGAM) 以及它们的受体实现的<sup>[29-34]</sup>, 巧合的是, E选

择素和 MAC-1 对应的差异基因 *Sele* 和 *Itgam-1* 也在本研究结果的差异基因列表里。对上述 15 个靶基因进行蛋白-蛋白相互作用如图 6C 示。粒细胞黏附与浸润通路及靶基因在该通路中的定位如图 7 所示。



**Figure 5** Analysis of cerebral edema. A: Schematic diagram of brain line offset; B: Quantitation of the midline offset distance.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . ## $P < 0.01$  vs sham; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs model;  $\nabla P < 0.05$  vs SXNI

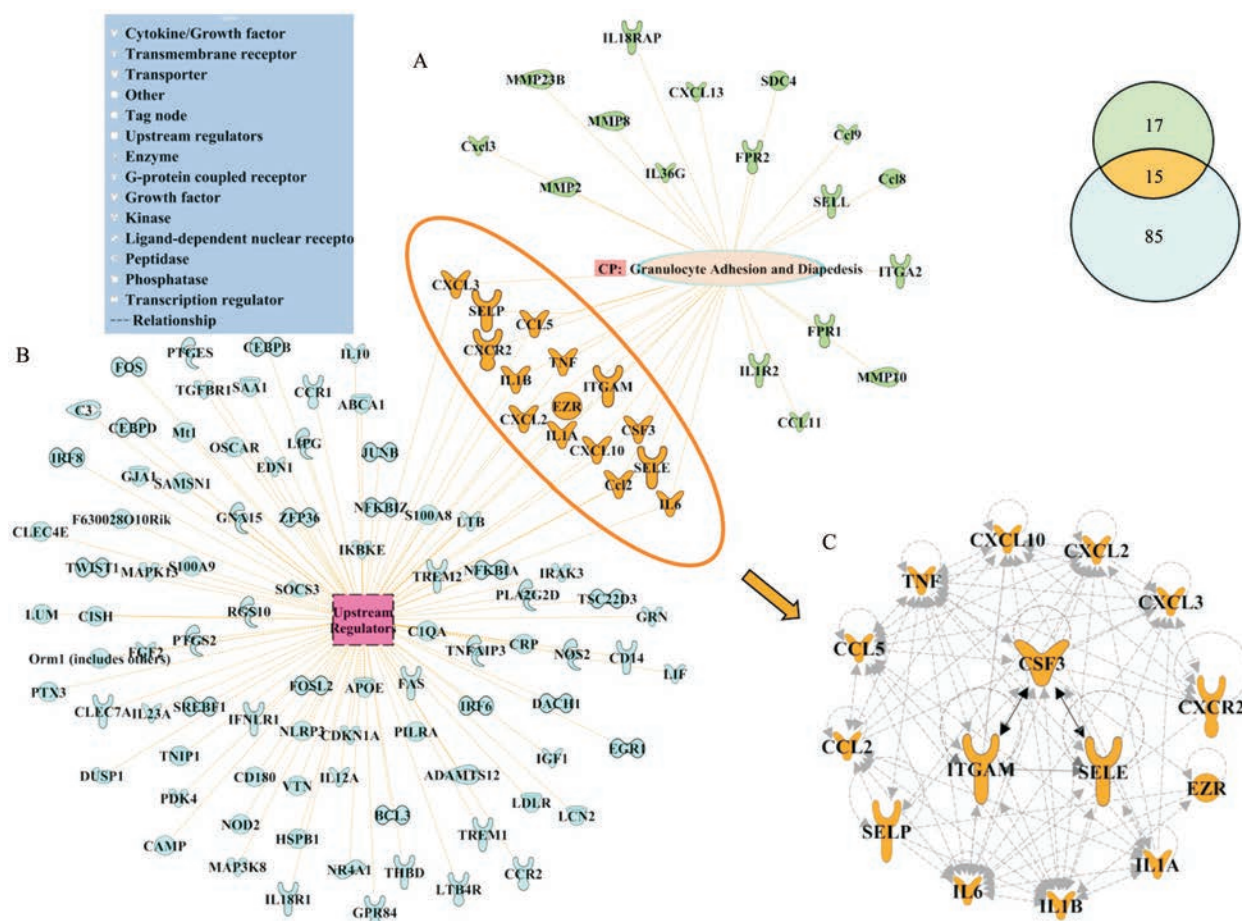
**Table 2** Key target genes regulated by shuxuening injection. Selp: P-selectin; Il1a: Interleukin-1 $\alpha$ ; Ccl2: C-C motif chemokine ligand 2; Ccl5: C-C motif chemokine ligand 5; Cxcl2: C-X-C motif chemokine ligand 2; Cxcl3: C-X-C motif chemokine ligand 3; Cxcl10: C-X-C motif chemokine ligand 10; Cxcr2: C-X-C motif chemokine receptor 2; Ezr: Ezrin

Gene	log <sub>2</sub> Fold change	P	Gene description
<i>Csf3</i>	-10.934 211 06	3.70E-09	Colony stimulating factor 3 (granulocyte) [Acc:MGI:1339751]
<i>Itgam</i>	-1.908 524 056	0.001 725 159	Integrin alpha M [Acc:MGI:96607]
<i>Sele</i>	-7.485 348 354	2.26E-06	Selectin, endothelial cell [Acc:MGI:98278]
<i>Tnf</i>	-3.106 793 322	0.001 041 127	Dipeptidase 3 [Acc:MGI:1919104]
<i>Il1b</i>	-6.691 510 323	3.03E-15	Interleukin 1 beta [Acc:MGI:96543]
<i>Selp</i>	-5.493 604 907	0.000 246 497	Selectin, platelet [Acc:MGI:98280]
<i>Il1a</i>	-2.868 498 611	0.001 291 925	Interleukin 1 alpha [Acc:MGI:96542]
<i>Il6</i>	-6.680 580 448	8.69E-10	Interleukin 6 [Acc:MGI:96559]
<i>Ccl2</i>	-3.595 195 39	0.000 166 186	Chemokine (C-C motif) ligand 2 [Acc:MGI:98259]
<i>Ccl5</i>	-2.732 516 098	7.97E-05	Chemokine (C-C motif) ligand 5 [Acc:MGI:98262]
<i>Cxcl2</i>	-8.941 144 426	1.19E-08	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 [Acc:MGI:1340094]
<i>Cxcl3</i>	-6.872 811 628	0.001 562 207	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3 [Acc:MGI:3037818]
<i>Cxcl10</i>	-2.615 559 957	0.001 420 705	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 [Acc:MGI:1352450]
<i>Cxcr2</i>	-6.664 211 205	1.74E-14	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2 [Acc:MGI:105303]
<i>Ezr</i>	-1.031 002 504	0.002 131 919	Ezrin [Acc:MGI:98931]

## 7 关键靶标的 mRNA 水平表达验证

对 *G-csf*、*Itgam*、*Sele*、*Tnf*、*Il1b* 和 *Il6* 这 6 个关键靶基因进行 RT-PCR 实验。结果表明,舒血宁全方和银杏总内酯可以下调 *G-csf*、*Tnf* 和 *Il1b* ( $P < 0.05$ , 图 8A、D、E)。对于 *Itgam* (图 8B), 虽然 3 个给药组与模型组之间都无统计学差异, 但是舒血宁全方和银杏总内酯对 *Itgam* 的下降趋势优于银杏总黄酮 ( $P < 0.05$ )。在 *Sele* 上 (图

8C), 舒血宁全方、银杏总黄酮和银杏总内酯都表现出下调效应 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 但是舒血宁和银杏总内酯作用显著优于银杏总黄酮 ( $P < 0.05$ )。在 *Il6* 上 (图 8F), 虽然舒血宁全方、银杏总黄酮和银杏总内酯均未表现出显著性 ( $P > 0.05$ ), 但有下降趋势。RT-PCR 结果与转录组结果基本一致, 说明转录组数据具有较高的可信度和生物学重复性。



**Figure 6** Shuxuening injection-regulated vital targets of stroke prognosis in mice. A: The core analysis of differentially expressed genes shows that the No. 1 pathway—the granulocyte adhesion and diapedesis and its closely related 32 genes (light green + orange); B: The top 100 upstream regulators (light blue + orange) in differentially expressed genes; C: Protein-protein interactions of differentially expressed genes present in both granulocyte adhesion and diapedesis pathway and upstream regulators

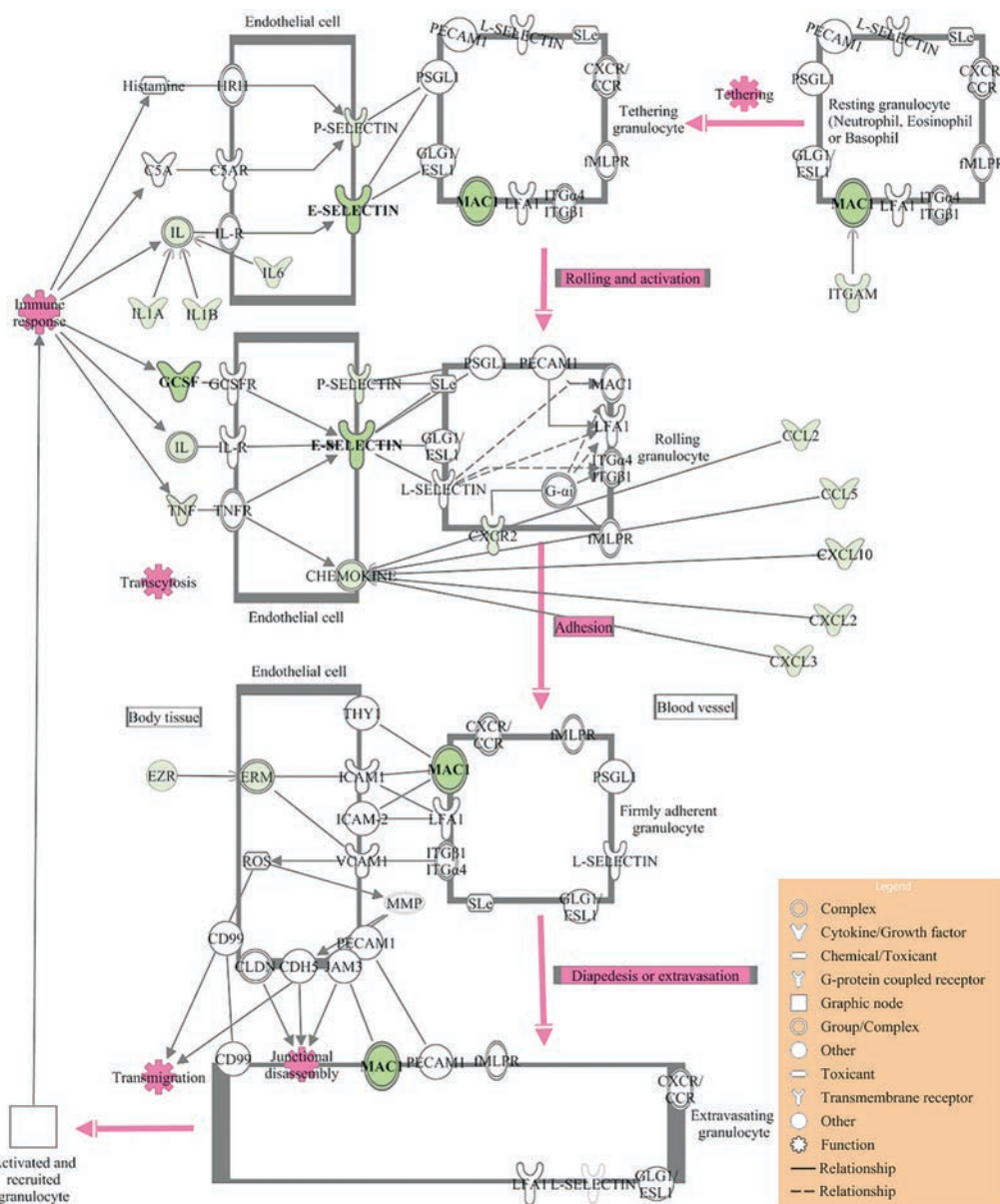
### 8 关键靶标的蛋白水平表达验证

在蛋白水平上用 ELISA 验证了 G-CSF 在脑组织中的表达, 结果表明, 与假手术组相比, 模型组小鼠脑组织中 G-CSF 蛋白水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), 而通过舒血宁全方和银杏总内酯给药可以降低 G-CSF ( $P < 0.01$ ), 银杏总黄酮虽然也能降低 G-CSF 的表达 ( $P < 0.05$ ), 但是其效果明显低于全方组 ( $P < 0.05$ , 图 9A)。WB 结果显示 (图 9B~D), 舒血宁全方和银杏总内酯能显著降低 MAC-1 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ), 并且它们的作用都显著优于银杏总黄酮 ( $P < 0.05$ )。此外, 舒血宁全方和银杏总内酯还能下调 E 选择素蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ), 而银杏总黄酮未表现出显著差异 ( $P > 0.05$ )。在验证以上 3 个蛋白的表达时, 加入了金纳多组, 结果显示与舒血宁组无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

### 讨论

银杏叶提取物作为改善认知功能药物使用由来已

久<sup>[35, 36]</sup>, 金纳多是业内使用较广、效果公认的银杏叶提取物制剂之一<sup>[37]</sup>, 众多研究表明其对心脑血管疾病发挥有益作用<sup>[38-41]</sup>, 而舒血宁注射液与金纳多注射液主成分都为银杏总黄酮和银杏总内酯, 折合含总银杏叶提取物都为  $3.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 所以本研究以金纳多作为阳性药。有研究表明, 摄入富含类黄酮的食物能有效改善老年学习和记忆功能障碍<sup>[42]</sup>, 这可能与控制突触可塑性、减少神经炎症和诱导血管新生等潜在机制有关<sup>[43]</sup>。同样, 银杏内酯也可以保护脑缺血损伤, 发挥神经保护作用, 表现在降低血脑屏障渗透性、逆转脑水肿、改善脑代谢紊乱、调节内质网应激、促进良性自噬、减少氧化应激、抗炎和抑制神经元凋亡等方面<sup>[44]</sup>。银杏叶提取物给药后, 关于黄酮和内酯类成分的脑暴露及相关药代动力学研究也越来越引起重视<sup>[8, 45]</sup>。然而, 关于二者在脑缺血再灌注损伤预后阶段的药理学功能差异尚未有相关对比研究。基于以上问题, 本研究主要探讨银杏总黄酮和银杏总内酯这两大组分在舒血宁

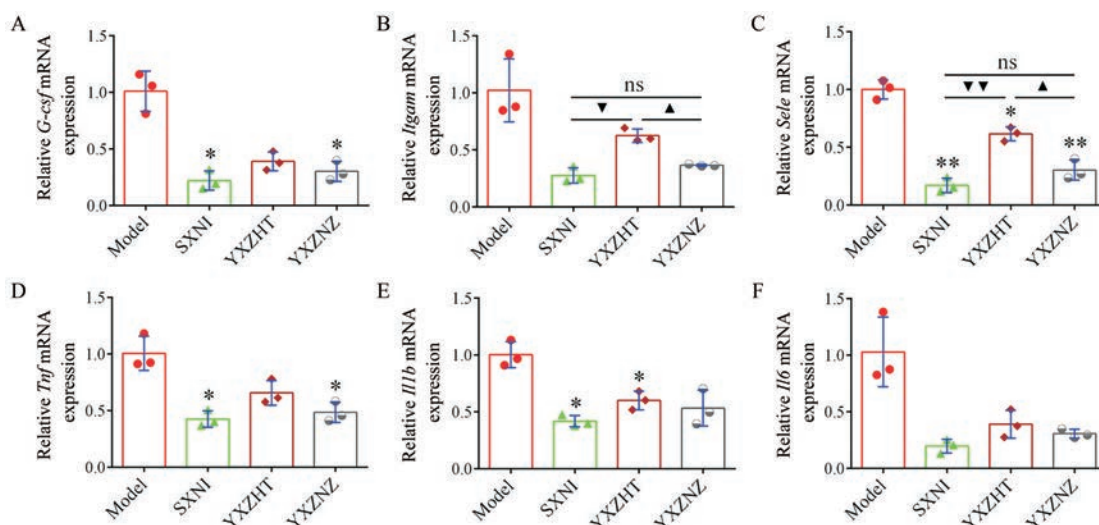


**Figure 7** The display diagram of the granulocyte adhesion and diapedesis pathway. The process mainly includes tethering, rolling and activation, adhesion, diapedesis or extravasation, and transmigration (in pink). The 15 key genes were shown in light green, and G-CSF, MAC-1, and E-selectin were enlarged

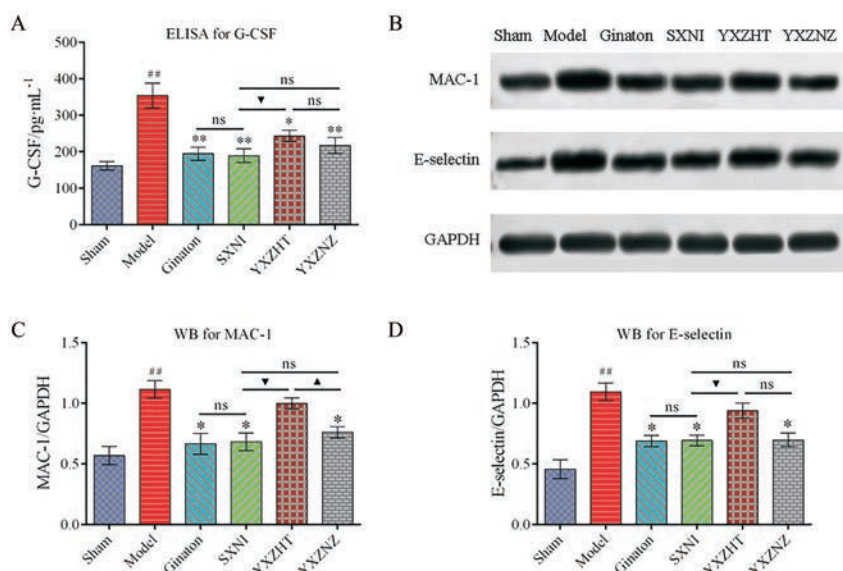
全方治疗缺血性脑卒中预后的贡献度, 辅以比较舒血宁注射液和金纳多注射液的效益异同。

正如课题组前期研究表明<sup>[5]</sup>, 舒血宁全方在亚急性性卒中小鼠模型中通过下调G-CSF介导的粒细胞黏附与浸润通路促进神经功能恢复, 所以本研究沿用该动物模型及机制通路继续对两个组分展开贡献度探究。实验结果表明, 无论在生存率、体重变化和神经功能缺损评分(图2)、运动及步态分析(图3)上, 还是脑梗死体积、BBB 渗漏(图4)、脑水肿(图5)等体内指标上, 阳性药金纳多、舒血宁全方、银杏总黄酮和银杏总内酯都不同程度地表现出有益作用。其中步态分析

(图3C~E)、TTC 染色(图4A、B)、E选择素 mRNA 表达(图8C)以及MAC-1的mRNA(图8B)和蛋白水平表达(图9C)结果显示, 银杏总内酯显著优于银杏总黄酮( $P < 0.05$ )。在旷场实验(图3A、B)、BBB 渗漏(图4C、D)、脑水肿(图5)、G-CSF 蛋白表达(图9A)以及E选择素蛋白表达(图9D)上, 虽然银杏总内酯和银杏总黄酮组相比无显著差异, 但将两者单独与舒血宁全方比较, 则发现舒血宁全方显著优于银杏总黄酮( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 而全方与银杏总内酯相比却无统计学差异, 这也能从侧面反映银杏总内酯在舒血宁全方中的贡献度比银杏总黄酮大, 有可能是全方的主要活性部



**Figure 8** Verification of mRNA level expression of key targets. The mRNA expression of *G-csf* (A), *Itgam* (B), *Sele* (C), *Tnf* (D), *Il1b* (E) and *Il6* (F) in mice brain.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs model; ▼ $P < 0.05$ , ▼▼ $P < 0.01$  vs SXNI; ▲ $P < 0.05$  vs YXZNZ



**Figure 9** Verification of protein expression level of G-CSF, MAC-1 and E-selectin. A: The protein expression of G-CSF in mice brain via ELISA.  $n = 4, \bar{x} \pm s$ ; B: Representative Western blot (WB) images of MAC-1 and E-selectin protein expression in brain tissue after different treatment; C, D: Quantification of WB results.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . ## $P < 0.01$  vs sham; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs model; ▼ $P < 0.05$  vs SXNI; ▲ $P < 0.05$  vs YXZNZ

位。有趣的是, 本研究发现与之前急性期脑卒中给药 24 h 相比, 持续给药到亚急性期时, 脑梗死体积从约 30% 下降到约 15% (图 4A、B), 脑水肿距离从约 0.5 mm 下降到约 0.25 mm (图 5)<sup>[18]</sup>, 说明舒血宁全方从急性期到亚急性期能持续发挥效益。此外, 本研究结果表明两种银杏叶提取物制剂舒血宁和金纳多无论是药效 (图 2~5) 还是机制 (图 8、9) 上效果都相当, 且都优于银杏总内酯和银杏总黄酮组, 一定程度上反映了组中药协同配伍作用的必要性, 关于不同配比的银杏总黄酮和银杏总内酯组分注射剂的卒中预后研究, 有

望进一步开展。

粒细胞黏附与浸润通路如图 7 所示, 研究表明金纳多、舒血宁全方和银杏总内酯可能是通过抑制该通路中粒细胞的捕获、滚动、黏附、渗出和迁移等过程 (图 7 中粉色箭头), 来发挥神经功能恢复作用的。具体地说, 卒中中预后阶段机体发生免疫应答, 银杏叶提取物治疗降低了 G-CSF、TNF 和 IL1B 等炎性介质的表达, 抑制粒细胞与内皮细胞表面受体结合, 进而抑制其下游蛋白 E 选择素、P 选择素、MAC-1、CXCR2、趋化因子 (包括 CCL2、CCL5、CXCL2、CXCL3、CXCL10) 的

表达, 最终阻止粒细胞与内皮细胞发生黏附作用并外渗到脑实质中。

本研究的创新点在于: 在前期舒血宁注射液及其组分银杏总黄酮和银杏总内酯对急性缺血性脑卒中小鼠的差异脑保护作用研究基础上, 建立了可效仿临床上卒中短期预后的亚急性脑卒中模型<sup>[46]</sup>, 并进一步探讨了银杏总黄酮和银杏总内酯在该模型中调控粒细胞黏附与浸润通路发挥神经功能恢复作用的贡献度情况。尽管结果表明了银杏总黄酮和银杏总内酯在舒血宁全方对缺血性脑卒中预后的贡献度方面的不同, 即银杏总内酯比银杏总黄酮发挥更好的神经功能恢复作用, 但本研究仍存在一些局限性, 例如 ① 本实验只涉及动物实验, 针对与内皮细胞相关性最强的粒细胞黏附与浸润通路未在相应的细胞水平展开研究; ② 对两个组分的研究不够深入, 仍需进一步阐明其内含单体化合物如槲皮素或银杏内酯 A 等在防治脑卒中方面的药效作用及药理学机制, 为临床上银杏叶提取物的二次开发提供化合物精准定位; ③ 该通路是否是银杏叶提取物的独特途径, 即是否其他能够抑制炎细胞浸润的药物也可通过该通路对亚急性脑卒中发挥防治作用, 仍需相关的对比研究。

综上所述, 本研究表明金纳多、舒血宁全方、银杏总黄酮和银杏总内酯可以在缺血性卒中小鼠预后阶段不同程度地下调 G-CSF、MAC-1、E 选择素等靶基因/蛋白的表达, 抑制粒细胞黏附与浸润通路, 从而减轻卒中预后阶段的脑损伤, 发挥神经功能恢复作用。作用效果大致为: 金纳多~舒血宁全方>银杏总内酯>银杏总黄酮, 提示银杏总内酯在银杏叶提取物治疗卒中预后的重要性比银杏总黄酮要强, 这与之前在急性期脑卒中的研究结果一致, 即银杏总内酯比银杏总黄酮更倾向于发挥脑保护作用<sup>[18]</sup>, 这种差异可能归因于银杏总内酯更强的血脑屏障渗透能力<sup>[47,48]</sup>。总之, 本研究在贡献度探讨上的发现有望为优化处方和寻找靶向治疗缺血性脑卒中预后的天然药物提供数据支持。

**作者贡献:** 朱彦是本文的通讯作者, 构思并督导了此项研究; 李志雄是本文的第一作者, 参与全部实验并撰写了本文; 肖光旭在实验过程和手稿撰写中给予了宝贵意见; 贺爽负责实验试剂的订购并提供了实验指导; 王焕义参与了步态分析实验并绘制了图 1。

**利益冲突:** 本文的研究内容无任何利益冲突。

## References

- [1] Omidkhoda SF, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Protective effects of *Ginkgo biloba* L. against natural toxins, chemical toxicities, and radiation: a comprehensive review [J]. *Phytother Res*, 2019, 33: 2821-2840.
- [2] Tian J, Liu Y, Chen K. *Ginkgo biloba* extract in vascular protection: molecular mechanisms and clinical applications [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, 15: 532-548.
- [3] Tulsulkar J, Glueck B, Hinds TD, 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: 120-131.
- [4] Zeng GR, Zhou SD, Shao YJ, et al. Effect of *Ginkgo biloba* extract-761 on motor functions in permanent middle cerebral artery occlusion rats [J]. *Phytomedicine*, 2018, 48: 94-103.
- [5] Li Z, Xiao G, Lyu M, et al. Shuxuening injection facilitates neurofunctional recovery via down-regulation of G-CSF-mediated granulocyte adhesion and diapedesis pathway in a subacute stroke mouse model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110213.
- [6] Chen J, Zhang X, Liu J, et al. Progress on clinical application of shuxuening injection [J]. *Chin J Drug Eval (中国药物评价)*, 2015, 32: 297-301.
- [7] Ma H, Li J, An M, et al. A powerful on line ABTS<sup>+</sup>-CE-DAD method to screen and quantify major antioxidants for quality control of shuxuening injection [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 5441.
- [8] Chen F, Li L, Xu F, et al. Systemic and cerebral exposure to and pharmacokinetics of flavonols and terpenoid lactones after dosing standardized *Ginkgo biloba* leaf extracts to rats via different routes of administration [J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 170: 440-457.
- [9] Liebgott T, Miollan M, Berchadsky Y, et al. Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) during ischemia and reperfusion [J]. *Basic Res Cardiol*, 2000, 95: 368-377.
- [10] Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2018, 137: e67-e492.
- [11] Broussalis E, Killer M, McCoy M, et al. Current therapies in ischemic stroke. Part A. Recent developments in acute stroke treatment and in stroke prevention [J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17: 296-309.
- [12] Re-examining Acute Eligibility for Thrombolysis Task Force, Levine SR, Khatri P, et al. Review, historical context, and clarifications of the NINDS rt-PA stroke trials exclusion criteria. Part 1: rapidly improving stroke symptoms [J]. *Stroke*, 2013, 44: 2500-2505.
- [13] Wang Y, Liao X, Zhao X, et al. Using recombinant tissue plasminogen activator to treat acute ischemic stroke in China: analysis of the results from the Chinese National Stroke Registry (CNSR) [J]. *Stroke*, 2011, 42: 1658-1664.
- [14] Man S, Xian Y, Holmes DN, et al. Association between thrombolytic door-to-needle time and 1-year mortality and readmission in patients with acute ischemic stroke [J]. *JAMA*, 2020, 323: 2170-2184.
- [15] Qin X, Akter F, Qin L, et al. Adaptive immunity regulation and

- cerebral ischemia [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 689.
- [16] Rossi B, Angiari S, Zenaro E, et al. Vascular inflammation in central nervous system diseases: adhesion receptors controlling leukocyte-endothelial interactions [J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 89: 539-556.
- [17] Lyu M, Cui Y, Zhao T, et al. Tnfrsf12a-mediated atherosclerosis signaling and inflammatory response as a common protection mechanism of shuxuening injection against both myocardial and cerebral ischemia-reperfusion injuries [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 312.
- [18] Xiao G, Lyu M, Wang Y, et al. Ginkgo flavonol glycosides or ginkgolides tend to differentially protect myocardial or cerebral ischemia-reperfusion injury regulation of TWEAK-Fn14 signaling in heart and brain [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 735.
- [19] Li Y, Chopp M, Chen J, et al. Intraatrial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 1311-1319.
- [20] Sanchez HL, Silva LB, Portiansky EL, et al. Dopaminergic mesencephalic systems and behavioral performance in very old rats [J]. *Neuroscience*, 2008, 154: 1598-1606.
- [21] Caballero-Garrido E, Pena-Philippides JC, Galochkina Z, et al. Characterization of long-term gait deficits in mouse dMCAO, using the CatWalk system [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 331: 282-296.
- [22] Liu NW, Ke CC, Zhao Y, et al. Evolutional characterization of photochemically induced stroke in rats: a multimodality imaging and molecular biological study [J]. *Transl Stroke Res*, 2017, 8: 244-256.
- [23] McBride DW, Klebe D, Tang J, et al. Correcting for brain swelling's effects on infarct volume calculation after middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Transl Stroke Res*, 2015, 6: 323-338.
- [24] Orgah JO, Yu J, Zhao T, et al. Danhong injection reversed cardiac abnormality in brain-heart syndrome *via* local and remote beta-adrenergic receptor signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 692.
- [25] Liao HJ, Zheng YF, Li HY, et al. Two new ginkgolides from the leaves of *Ginkgo biloba* [J]. *Planta Med*, 2011, 77: 1818-1821.
- [26] Mohanta TK, Tamboli Y, Zubaidha PK. Phytochemical and medicinal importance of *Ginkgo biloba* L [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28: 746-752.
- [27] van Beek TA, Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 2002-2032.
- [28] Motuel J, Biette I, Srairi M, et al. Assessment of brain midline shift using sonography in neurosurgical ICU patients [J]. *Crit Care*, 2014, 18: 676.
- [29] Eyles JL, Hickey MJ, Norman MU, et al. A key role for G-CSF-induced neutrophil production and trafficking during inflammatory arthritis [J]. *Blood*, 2008, 112: 5193-5201.
- [30] Eberle M, Ebel P, Mayer CA, et al. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in ceramide synthase 6 knockout mice is associated with enhanced activation/migration of neutrophils [J]. *Immunol Cell Biol*, 2015, 93: 825-836.
- [31] Ohsaka A, Saionji K, Igari J. Granulocyte colony-stimulating factor administration increases serum concentrations of soluble selectins [J]. *Br J Haematol*, 1998, 100: 66-69.
- [32] Dagia NM, Gadhoun SZ, Knoblauch CA, et al. G-CSF induces E-selectin ligand expression on human myeloid cells [J]. *Nat Med*, 2006, 12: 1185-1190.
- [33] Silvescu CI, Sackstein R. G-CSF induces membrane expression of a myeloperoxidase glycovariant that operates as an E-selectin ligand on human myeloid cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 10696-10701.
- [34] Fusté B, Mazzara R, Escolar G, et al. Granulocyte colony-stimulating factor increases expression of adhesion receptors on endothelial cells through activation of p38 MAPK [J]. *Haematologica*, 2004, 89: 578-585.
- [35] Birks J, Grimley EV, Van Dongen M. *Ginkgo biloba* for cognitive impairment and dementia [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002, (4): CD003120.
- [36] Liu H, Ye M, Guo H. An updated review of randomized clinical trials testing the improvement of cognitive function of *Ginkgo biloba* extract in healthy people and Alzheimer's patients [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1688.
- [37] Liu Y, Ji Y, Ma M. Clinical application and mechanism of gintonin injection [J]. *Proc Clin Med (临床医药实践)*, 2005, 14: 91-92.
- [38] Chang J, Yao X, Zou H, et al. BDNF/PI3K/Akt and Nogo-A/RhoA/ROCK signaling pathways contribute to neurorestorative effect of Houshiheisan against cerebral ischemia injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194: 1032-1042.
- [39] Deng YK, Wei F, An BQ. Effects of gintonin on the markers of myocardial injury during cardiopulmonary bypass [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med (中国中西医结合杂志)*, 2006, 26: 316-318.
- [40] Li X, Zhang D, Bai Y, et al. Gintonin improves neurological function in ischemic stroke rats *via* inducing autophagy and maintaining mitochondrial homeostasis [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, 15: 1813-1822.
- [41] Miao M, Zhang X, Bai M, et al. Persimmon leaf flavonoid promotes brain ischemic tolerance [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8: 2625-2632.
- [42] Rendeiro C, Guerreiro JD, Williams CM, et al. Flavonoids as modulators of memory and learning: molecular interactions resulting in behavioural effects [J]. *Proc Nutr Soc*, 2012, 71: 246-262.
- [43] Vauzour D. Effect of flavonoids on learning, memory and neuro-

- cognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer's disease pathophysiology [J]. *J Sci Food Agric*, 2014, 94: 1042-1056.
- [44] Feng Z, 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: 57.
- [45] Wang WP, Liu N, Kang Q, et al. Simultaneous determination by UPLC-MS/MS of seven bioactive compounds in rat plasma after oral administration of *Ginkgo biloba* tablets: application to a pharmacokinetic study [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2014, 15: 929-939.
- [46] Perego C, Fumagalli S, De Simoni MG. Response by Perego et al to letter regarding article, "combined genetic deletion of IL (interleukin)-4, IL-5, IL-9, and IL-13 does not affect ischemic brain injury in mice" [J]. *Stroke*, 2019, 50: e330.
- [47] Konczol A, Rendes K, Dekany M, et al. Blood-brain barrier specific permeability assay reveals *N*-methylated tyramine derivatives in standardised leaf extracts and herbal products of *Ginkgo biloba* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 131: 167-174.
- [48] Ma S, Liu X, Xu Q, et al. Transport of ginkgolides with different lipophilicities based on an hCMEC/D3 cell monolayer as a blood-brain barrier cell model [J]. *Life Sci*, 2014, 114: 93-101.