银杏二萜内酯通过 PERK/ATF4/CHOP 通路抑制血小板活化因子介导的神经元损伤

郭家欣[1]，王　艳[1]，梁淳杰[1,2]，杨颖博[1,2]，吴　伟[1]，王团结[1]，王　欣[4]，肖保国[3*]，肖　伟[1*]

1. 中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室（江苏康缘药业股份有限公司/南京中医药大学），江苏 南京 211112
2. 上海中医药大学中药研究所，上海　200120
3. 复旦大学神经病学研究所，上海　200040
4. 江苏康缘药业股份有限公司，江苏 连云港　222047

摘　要：目的　探讨银杏二萜内酯（ginkgo diterpene lactone，GDL）对血小板活化因子（platelet-activating factor，PAF）诱导神经元损伤的保护作用及相关机制。**方法**　构建 PAF 诱导神经元损伤的细胞模型与动物模型，给予 GDL 或 PERK 激动剂 CCT020312 进行处理。分别使用 CCK-8 和 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒测定小鼠海马神经元细胞系 HT22 细胞活力和凋亡；使用乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）检测试剂盒检测 HT22 细胞培养上清液中 LDH 活性；采用 Fluo-4 钙离子检测试剂盒测定 HT22 细胞钙离子水平；采用分子对接探究相关分子机制；使用 Western blotting 检测 HT22 细胞与小鼠脑组织的细胞凋亡相关蛋白[半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cystein-asparate protease-3，Caspase-3）、cleaved Caspase-3、B 细胞淋巴瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）]和内质网应激相关蛋白[蛋白激酶 R 样内质网激酶（protein kinase R-like ER kinase，PERK）、p-PERK、真核翻译起始因子-2α（eukaryotic initiation factor-2α，eIF-2α）、p-eIF2α、转录激活因子 4（activating transcription factor 4，ATF4）、C/EBP 同源蛋白（C/EBP-homologous protein，CHOP）]的表达。**结果**　体外细胞实验结果显示，与对照组比较，模型组细胞活性显著降低（$P<0.001$），LDH 释放率升高（$P<0.001$），钙离子水平升高（$P<0.001$），凋亡细胞显著增加（$P<0.001$），cleaved Caspase-3、Bax 蛋白表达水平显著升高（$P<0.001$），Bcl-2 蛋白表达水平显著下降（$P<0.001$），内质网应激相关蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$、0.001）；与模型组比较，GDL 显著升高了细胞活力（$P<0.05$、0.001），显著上调 Bcl-2 的表达（$P<0.05$、0.001），显著下调 cleaved Caspase-3、Bax、p-PERK、p-eIF2α、ATF4、CHOP 的表达（$P<0.05$、0.01、0.001）；CCT020312 处理后 GDL 的效果均被逆转（$P<0.001$）。体内动物实验结果显示，与对照组比较，模型组小鼠脑组织 Bax 蛋白表达水平显著升高（$P<0.001$），Bcl-2 蛋白表达水平显著下降（$P<0.001$），内质网应激相关蛋白表达水平显著升高（$P<0.001$）；与模型组比较，GDL 显著上调 Bcl-2 的表达（$P<0.01$、0.001），显著下调 p-PERK、p-eIF2α、ATF4、CHOP、Bax 的表达（$P<0.001$）；CCT020312 处理后 GDL 的效果均被逆转（$P<0.001$）。**结论**　PAF 可以激活神经元内质网应激的 PERK/ATF4/CHOP 通路来诱导钙超载，从而使神经元凋亡；而 GDL 可以通过抑制 PERK/ATF4/CHOP 通路来抑制内质网应激、钙超载和凋亡，以减轻 PAF 诱导的神经元损伤。

关键词：银杏二萜内酯；银杏内酯 A；银杏内酯 B；银杏内酯 K；血小板活化因子；PERK/ATF4/CHOP 信号通路；内质网应激；凋亡

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2025)09 - 3152 - 13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.09.013

Ginkgo diterpene lactone inhibits platelet-activating factor-mediated neuronal injury via PERK/ATF4/CHOP pathway

GUO Jiaxin[1], WANG Yan[1], LIANG Chunjie[1, 2], YANG Yingbo[1, 2], WU Wei[1], WANG Tuanjie[1], WANG Xin[4], XIAO Baoguo[3], XIAO Wei[1]

收稿日期：2025-01-14

基金项目：江苏省基础研究计划自然科学基金—前沿引领技术基础研究专项（BK20232014）；连云港市“521”人才工程支持项目（LYG06521202221）

作者简介：郭家欣（1998—），硕士研究生，研究方向为药理学。E-mail: guojiaxin202210@163.com

***通信作者：**肖　伟，教授，博士生导师，研究方向为中药新药研发及过程质量控制。E-mail: kanionlunwen@163.com

肖保国，教授，研究方向为神经保护和髓鞘再生。E-mail: bgxiao@shmu.edu.cn

1. State Key Laboratory on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutica Process Control and Intelligent Manufacture (Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd. & Nanjing University of Chinese Medicine), Nanjing 211112, China
2. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200120, China
3. Institute of Neurology, Fudan University, Shanghai 200040, China
4. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222047, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and related mechanism of ginkgo diterpene lactone (GDL) on platelet-activating factor (PAF)-induced neuronal injury. **Methods** A cellular model and an animal model of PAF-induced neuronal injury were constructed, GDL or PERK agonist CCT020312 were administered. The cell viability and apoptosis of HT22 cells were determined using CCK-8 and Annexin V-FITC apoptosis assay kits, respectively; Activity of lactate dehydrogenase (LDH) in HT22 cell culture supernatant was measured using a LDH assay kit, and calcium level in HT22 cells was determined using a Fluo-4 calcium assay kit; Molecular docking was used to explore the relevant molecular mechanisms; Western blotting was used to detect the expressions of apoptosis-related proteins [cystein-asparate protease-3 (Caspase-3), cleaved Caspase-3, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax)] and endoplasmic reticulum stress-related proteins [protein kinase R-like ER kinase (PERK), p-PERK, eukaryotic initiation factor-2α (eIF-2α), p-eIF2α, activating transcription factor 4 (ATF4), C/EBP-homologous protein (CHOP)] in HT22 cells and brain tissues of mice. **Results** The results of *in vitro* cell experiments showed that, compared with control group, cell activity was significantly reduced in model group ($P < 0.001$), release rate of LDH was increased ($P < 0.001$), level of calcium ions was increased ($P < 0.001$), number of apoptotic cells was significantly increased ($P < 0.001$), the expression levels of cleaved Caspase-3 and Bax proteins were significantly increased ($P < 0.001$), the expression level of Bcl-2 protein was significantly decreased ($P < 0.001$), and the expression levels of endoplasmic reticulum stress-related proteins were significantly increased ($P < 0.05$, 0.001). Compared with model group, GDL significantly increased cell viability ($P < 0.05$, 0.001), significantly up-regulated Bcl-2 expression ($P < 0.05$, 0.001), and significantly down-regulated the expression of cleaved Caspase-3, Bax, p-PERK, p-eIF2 α, ATF4 and CHOP ($P < 0.05$, 0.01, 0.001); The effect of GDL after CCT020312 treatment was reversed ($P < 0.001$). The results of *in vivo* animal experiments showed that compared with control group, the expression level of Bax protein in brain tissue of mice in model group was significantly increased ($P < 0.001$), the expression level of Bcl-2 protein was significantly decreased ($P < 0.001$), and the expression levels of endoplasmic reticulum stress-related proteins were significantly increased ($P < 0.001$); Compared with model group, GDL significantly up-regulated the expression of Bcl-2 ($P < 0.01$, 0.001), and significantly down-regulated the expressions of p-PERK, p-eIF2α, ATF4, CHOP and Bax ($P < 0.001$); The effect of GDL after CCT020312 treatment was reversed ($P < 0.001$). **Conclusion** PAF can active PERK/ATF4/CHOP pathway of neuronal endoplasmic reticulum stress to induce calcium overload and thus neuronal apoptosis, whereas GDL can inhibit endoplasmic reticulum stress, calcium overload and apoptosis by inhibiting PERK/ATF4/CHOP pathway to attenuate PAF-induced neuronal injury.

Key words: ginkgo diterpene lactone; ginkgolide A; ginkgolide B; ginkgolide K; platelet-activating factor; PERK/ATF4/CHOP signaling pathway; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

缺血性脑卒中发病率高，恢复期长，暂无有效的治疗手段及预防性措施[1-2]。缺血性脑卒中的后继反应是临床上导致神经功能障碍和脑损伤的重要原因，其发病机制复杂多样，涉及氧化应激、炎症反应、钙稳态失衡、线粒体功能障碍以及内质网应激（endoplasmic reticulum stress，ERS）等多种病理过程[3-6]。近年来，血小板活化因子（platelet-activating factor，PAF）作为一种重要的炎性介质，在缺血损伤中的作用受到了广泛关注。研究发现，PAF 水平在缺血后短时间内迅速升高，可达正常水平的 2 倍以上，且与脑损伤的程度密切相关[7]。PAF 可以介导神经毒性[8]，并可加剧神经元死亡[9]。PAF 与 PAF 受体（platelet-activating factor receptor，PAFR）结合后，能够激活促炎和促血栓形成途径[10]。但是也有文献证明，PAF 诱导 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3（NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3，NLRP3）炎性小体的激活并不依赖于 PAFR[11]。并且研究发现 PAF 诱导的神经元凋亡独立于其 G 蛋白偶联的 PAFR 启动[12]，但是并未明确阐述 PAF 诱导神经元凋亡的具体机制。提示 PAF 介导的凋亡有可能存在其他通路，但是其具体的分子机制尚不完全清楚，尤其是并无研究表明 PAF 在诱导 ERS 方面的作用。

银杏二萜内酯（ginkgo diterpene lactone，GDL）

是从银杏叶 *Ginkgo Folium* 中提取纯化而得的活性成分，包括银杏内酯 A（ginkgolide A，GA）、银杏内酯 B（ginkgolide B，GB）、银杏内酯 K（ginkgolide K，GK）。GDL 作为一种来源于传统中药的活性成分，具有显著的抗炎、抗氧化及神经保护等多种生物活性[13-17]。研究发现，GA 可以抑制一氧化氮诱导的细胞凋亡，降低一氧化氮的神经毒性[18]；GB 对线粒体依赖性凋亡具有调控作用，可以保护神经元免于凋亡[19]；GB 可提高氧糖剥夺/复氧（oxygen and glucose deprivation/reperfusion，OGD/R）损伤后神经元细胞活力，改善细胞损伤[20]；GK 靶向激活核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor-E2-related factor 2，Nrf2）来抑制少突胶质细胞的细胞凋亡[21]。因此，GDL 及其单体成分具有明确的抗凋亡作用，但 GDL 是否可以抑制 PAF 介导的神经元损伤尚不清楚。

ERS 是细胞在受到氧化、缺氧或炎症等刺激时常见的应激反应，过度或持续的 ERS 会激活凋亡通路，最终导致细胞死亡[22]。当脑缺血发生后，缺血区内质网稳态被破坏，大量未折叠、错误折叠的蛋白积累，发生内质网过度应激，最终通过多种途径促使神经细胞凋亡[23]。Ca^{2+}在内质网腔中储存起来，以维持细胞内低浓度的游离 Ca^{2+}。研究表明，PAF 的过度生成造成 Ca^{2+},Mg^{2+}-三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）酶活性降低，发生钙超载，促进发生一系列病理反应如自由基反应，使神经元产生不可逆的损伤[24-25]。PAF 会诱发钙超载，Ca^{2+}与 ERS 密不可分，PAF 是否通过诱导 ERS 造成钙超载，进而加剧神经元损伤，这一过程的分子机制尚不清晰。

综上，PAF 作为一种强效炎性介质，其对神经毒性可能与 ERS 诱导的钙超载有关，而 GDL 可能通过对 ERS 的调控来实现对神经元的保护作用。基于以上背景，本研究深入探讨 PAF 在诱导 ERS 及神经元损伤中的作用，进一步验证 GDL 在这一过程中的干预效果及潜在机制。通过体内外实验与分子机制研究，揭示 PAF 诱导 ERS 对神经元损伤的关键作用，并证实 GDL 在干预这一过程中的潜在治疗价值。本研究为缺血性脑卒中的治疗提供了新思路，也为 GDL 在神经保护领域的应用奠定了一定理论基础。

1 材料

1.1 动物与细胞

36 只 SPF 级雌性 C57 小鼠，6 周龄，购自上海必凯科翼实验动物饲养有限公司，动物生产许可证号 SCXK（沪）2023-0009。动物饲养于温度（22±2）℃、相对湿度（55±5）%、12 h 光/暗循环的 SPF 级环境中，自由进食饮水。动物实验经上海中医药大学伦理委员会批准（批准号 PZSHUTCM2501060004）。

小鼠海马神经元细胞系 HT22 细胞由江苏康缘药业股份有限公司赠送。

1.2 药品与试剂

GDL（质量分数为 98%，批号 240112）由江苏康缘药业股份有限公司中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室制备；PAF（质量分数为 98%，批号 P4904）购自美国 Sigma 公司；二甲亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO，批号 O1028A）、PBS（批号 MA0020）、DMEM（批号 MA0212）、优级胎牛血清（批号 PWL001）、青霉素和链霉素溶液（批号 MA0110）、胰酶（批号 PWL215）、细胞增殖及毒性检测试剂盒（CCK-8，批号 MA0218）购自大连美仑生物技术有限公司；乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）细胞毒性检测试剂盒（批号 C0016）、钙离子荧光探针 Fluo-4 AM（2 mmol/L，批号 S1060）、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（批号 P0010）、RIPA 裂解液（批号 P0038）、PMSF（批号 ST505）、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物（批号 P1045）、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液（批号 P0015L）、ECL 化学发光液（批号 P0018FM）、抗体稀释液（批号 AZ050）、脱脂奶粉（批号 P0216）购自上海碧云天生物技术公司；NC 膜（批号 57444203）购自美国 Pall Corporation 公司；B 细胞淋巴瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）抗体（1∶1 000，批号 WL01556）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）抗体（1∶1 000，批号 WL01637）、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cystein-asparate protease-3，Caspase-3）抗体（1∶1 000，批号 WL04004）、cleaved Caspase-3 抗体（1∶1 000，批号 WL01992）购自沈阳万类生物科技有限公司；蛋白激酶 R 样内质网激酶（protein kinase R-like ER kinase，PERK）抗体（1∶1 000，批号 bs-2469R）购自博奥森生物技术有限公司；p-PERK 抗体（1∶1 000，批号 3179T）购自美国 CST 公司；真核翻译起始因子-2α（eukaryotic initiation factor-2α，eIF-2α）抗体（1∶1 000，批号 RM8047）、p-eIF-2α 抗体（1∶1 000，批号 AF5803）、转录激活因子 4（activating transcription factor 4，ATF4）抗体（1∶1 000，批号 T55873）、C/EBP 同源蛋白（C/EBP-homologous protein，CHOP）抗体（1∶1 000，批号 T56694）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体（1∶4 000，批号 AF1186）、β-actin 抗体（1∶10 000，批号 81115）购自武汉三鹰生物技术有限公司；HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体（1∶20 000，批号 P9132）、PERK 激动剂 CCT020312（批号 Y4071115B）购自上海泰坦科技股份公司。

1.3 仪器

Flex Station3 型酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；DM6B 型荧光显微镜（德国 Leica 公司）；PowerPac HC 蛋白印迹转印系统、Chemi Doc XRS System 凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司）；Multifuge X1R 型高速冷冻离心机（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

小鼠适应性饲养 1 周后，随机分为对照组、GDL 对照组、模型组、GDL 低剂量组（GDL-L）、GDL 高剂量组（GDL-H）和 GDL＋CCT020312 组，每组 6 只。根据预实验结果，确定了 PAF、GDL 和 CCT020312 的给药剂量。对照组双侧滴鼻给予 20 μL 生理盐水；GDL 对照组双侧滴鼻给予 20 μL 生理盐水，ip GDL（25 mg/kg）；其他组小鼠连续 7 d 双侧经鼻滴入 20 μL PAF（20 μmol/L），造模同时 GDL-L 组 ip GDL（5 mg/kg），GDL-H 组 ip GDL（25 mg/kg），GDL＋CCT020312 组 ip GDL（25 mg/kg）和 CCT020312（5 mg/kg）。末次给药结束后，将处于深度麻醉状态下的小鼠断头而死，随后取出大脑于−80℃保存。

2.2 细胞培养

HT22 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素的高糖 DMEM 培养。培养 2～4 d 后，细胞融合度达到 70%时，传代再次培养。实验发现血清的存在会干扰 PAF 的正常诱导效果，因此本实验中细胞培养均用含 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素的 DMEM 培养基，细胞给药时均用含 1%青霉素/链霉素的无血清 DMEM 培养基。

2.3 细胞活力与毒性检测

2.3.1 CCK-8 检测 GDL 对 HT22 细胞活力的影响 HT22 细胞以 1×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中，培养 24 h。加入不同质量浓度（6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μg/mL）的 GDL 处理 24 h，另设置不含药物的对照组。每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，培养 2 h，用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度（A）值，计算细胞存活率。

细胞存活率＝$A_{给药}/A_{对照}$

2.3.2 CCK-8 和 LDH 试剂盒检测 PAF 对 HT22 细胞活力与毒性的影响 HT22 细胞以 1×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中，培养 24 h。加入不同浓度（61、2、4、8、16 μmol/L）的 PAF 处理不同时间（3、6、12 h），另设置不含药物的对照组。按照 CCK-8 试剂盒测定 A 值，计算细胞存活率。

HT22 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 24 孔板中，培养 24 h。加入不同浓度（1、2、4、8、16 μmol/L）的 PAF 处理 3 h，另设置不含药物的对照组。收集上清液，用酶标仪检测 490 nm 处的 A 值，计算 LDH 释放率。

2.3.3 CCK-8 和 LDH 试剂盒检测 GDL 对 PAF 诱导的 HT22 细胞活力与毒性的影响 设置对照组（不含药物的培养基）、模型组和 GDL（6.25、12.50、25.00 μg/mL）组，模型组和 GDL 组加入 8 μmol/L PAF，GDL 组加入不同质量浓度的 GDL，共同刺激 3 h。按照 CCK-8 和 LDH 试剂盒测定 A 值，计算细胞存活率和 LDH 释放率。

2.4 Annexin V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡

HT22 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 24 孔板中，培养 24 h。按“2.3.3”项下方法进行分组和处理，弃去培养液，PBS 洗涤 1 次。加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液、5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 染色液，混匀后，室温（20～25 ℃）避光孵育 20 min，随后置于冰浴中，使用铝箔进行避光。在荧光显微镜下观察并拍照，Annexin V-FITC 为绿色荧光，PI 为红色荧光。

2.5 钙离子荧光探针检测细胞内钙离子水平

按“2.3.3”项下方法进行分组和处理，弃去培养液，PBS 洗涤 3 次，加入 Fluo-4 AM 工作液（5 μmol/L）覆盖细胞，37 ℃孵育 30 min 进行荧光探针装载。PBS 洗涤 3 次，用荧光显微镜检测 Fluo-4 的荧光，以确定细胞内钙离子水平的变化。

2.6 Western blotting 检测小鼠大脑组织和 HT22 细胞 Bax、Bcl-2、Caspase-3、cleaved Caspase-3、p-PERK、PERK、p-eIF-2α、eIF-2α、ATF4、CHOP 蛋白表达

按“2.3.3”项下方法进行分组和处理，收集 HT22 细胞。取“2.1”项下各组小鼠大脑组织和 HT22 细胞，加入含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解，提取蛋白，使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定

蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入 5%脱脂奶粉，室温封闭 2 h，TBST 洗涤，加入一抗，4 ℃摇床孵育过夜；加入山羊抗小鼠 IgG 二抗，室温孵育 2 h。加入 ECL 发光试剂显影，在化学发光成像系统下拍照，并使用 Image J 软件进行分析。

2.7　分子对接分析

从 PubChem 数据库中获取 PAF、GA、GB 和 GK 的分子构型，利用 AutoDock 工具 1.5.6 转换为 QDBQT 格式。与目标相对应的基本蛋白质结构来源于 PDB 数据库，并使用 PyMOL 2.3.0 进行处理，其中水和配体分子被消除。随后，使用 AutoDock 工具 1.5.6 添加任何缺失的氢原子，并对受体分子的原子类型进行分类，然后以 PDBQT 格式保存。对接研究使用 AutoDock Vina 1.2.0 进行，并通过 PyMOL 实现了结果的可视化。配体和受体之间的结合能值较低，表明更稳定的构象和更大的相互作用机会。结合能小于−5.0 kcal/mol（1 kcal/mol＝4.182 kJ/mol）反映了配体和受体之间良好的亲和力。

2.8　PERK 激动剂对 GDL 作用于 HT22 细胞的影响

设置对照组、GDL 对照组、模型组、GDL 组和 CCT020312 组，对照组加入不含药物的培养基；GDL 对照组加入 GDL（25 μg/mL）处理 3 h；模型组加入 PAF（8 μmol/L）刺激 3 h；GDL 组加入 PAF（8 μmol/L）和 GDL（25 μg/mL），共同刺激 3 h；CCT020312 组加入 PAF（8 μmol/L）、GDL（25 μg/mL）和 CCT020312（5 μmol/L），共同刺激 3 h。按“2.5”项下方法检测细胞内钙离子水平，按“2.6”项下方法检测凋亡和 ERS 相关蛋白表达。

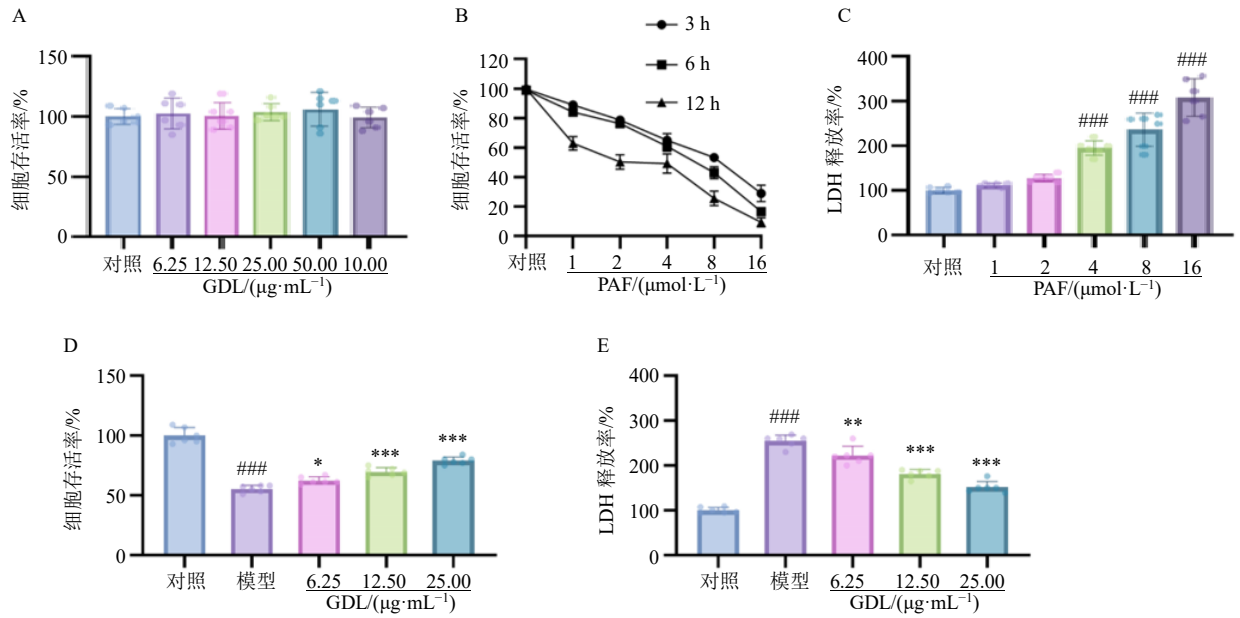
2.9　统计学分析

数据处理使用 GraphPad 9.5 软件进行统计分析，所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用双样本独立 Students’*t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）。

3　结果

3.1　GDL 减轻 PAF 诱导的 HT22 细胞毒性

如图 1-A 所示，用不同质量浓度（6.25～100.00 μg/mL）的 GDL 处理 HT22 细胞 24 h 后，进行 CCK-



A-不同质量浓度的 GDL 对 HT22 细胞活力的影响；B-不同浓度的 PAF 作用于 HT22 细胞不同时间，对细胞活力的影响；C-不同浓度的 PAF 对 HT22 细胞 LDH 释放率的影响；D-GDL 对 PAF 诱导的 HT22 细胞活力的影响；E-GDL 对 PAF 诱导的 HT22 细胞 LDH 释放率的影响；与对照组比较：$^{\#\#}P<0.01$　$^{\#\#\#}P<0.001$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$，下图同。

A-effect of GDL with different concentrations on viability of HT22 cells; B-effect of different concentrations of PAF on viability of H22 cells at different time; C-effect of different concentrations of PAF on LDH release rate in HT22 cells; D-effect of GDL on PAF-induced HT22 cell viability; E-effect of GDL on PAF-induced LDH release rate in HT22 cells; $^{\#\#}P < 0.01$　$^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$　$^{**}P < 0.01$　$^{***}P < 0.001$ *vs* model group, same as below figures.

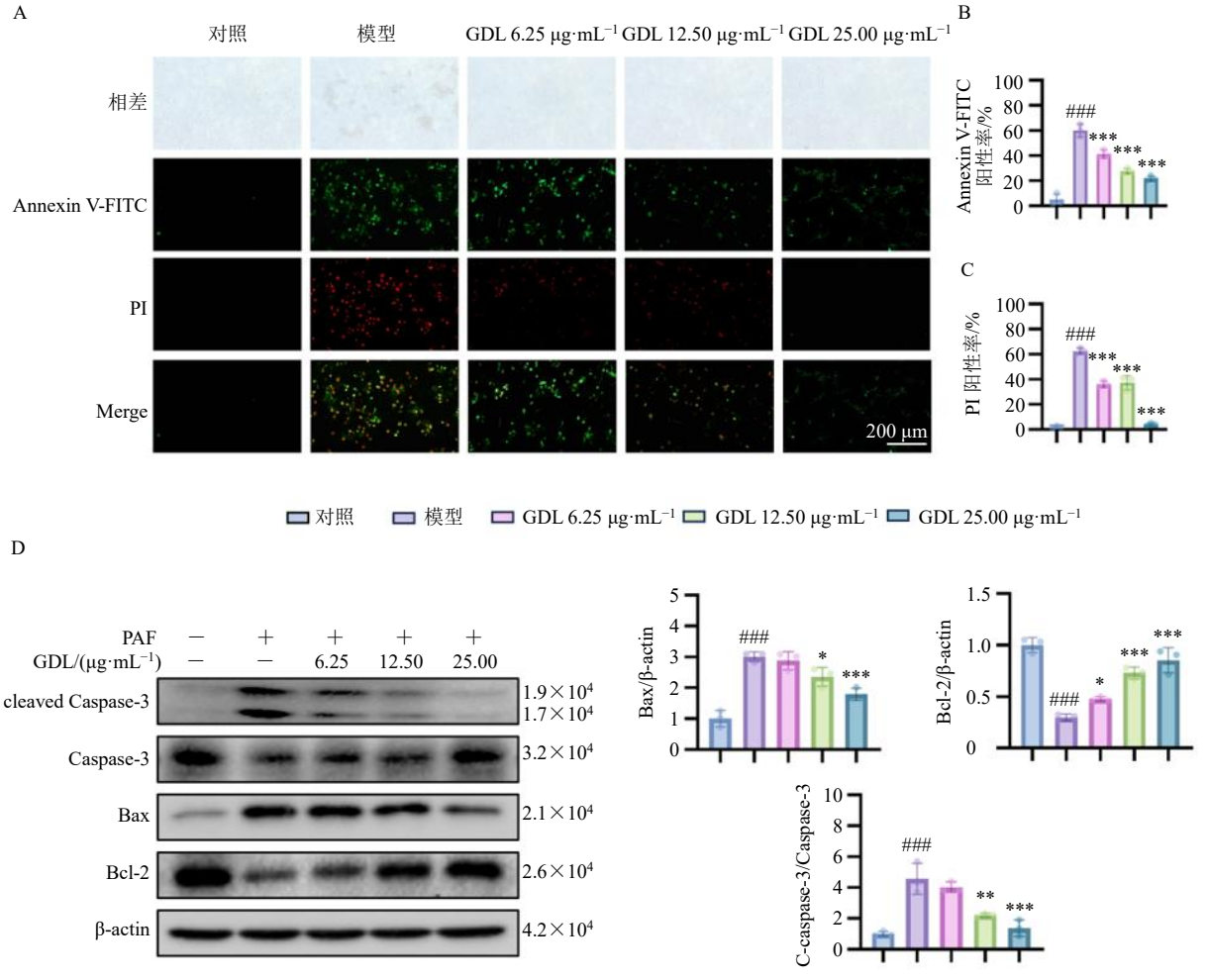
图 1　GDL 减轻 PAF 诱导的 HT22 细胞毒性（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Fig. 1　GDL attenuates PAF-induced cytotoxicity of HT22 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

8 测定，结果显示，单独使用 GDL 对 HT22 细胞活力没有明显影响。如图 1-B 所示，不同浓度（1～16 μmol/L）的 PAF 作用于 HT22 细胞不同时间（3、6、12 h），细胞存活率存在明显差异，8 μmol/L PAF 作用细胞 3 h 时，细胞存活率接近 50%；如图 1-C 所示，4～16 μmol/L PAF 诱导的 HT22 细胞 LDH 释放率较对照组有明显上升（P＜0.001），因此后续实验选择 8 μmol/L PAF 诱导 HT22 细胞 3 h。如图 1-D 所示，8 μmol/L PAF 刺激的 HT22 细胞活力明显下降（P＜0.001）；给予不同质量浓度（6.25、12.50、25.00 μg/mL）的 GDL 处理后，细胞活力明显升高（P＜0.05、0.001）。如图 1-E 所示，8 μmol/L PAF 刺激的 HT22 细胞 LDH 释放率显著升高（P＜0.001）；给予不同质量浓度（6.25、12.50、25.00 μg/mL）的 GDL 处理后，LDH 释放率明显降低（P＜0.01、0.001）。上述结果表明 PAF 对神经元有细胞毒性，并能够被 GDL 所逆转。

3.2 GDL 抑制 PAF 诱导的 HT22 细胞凋亡

如图 2-A 所示，8 μmol/L PAF 可诱导 HT22 细胞凋亡，GDL 呈剂量相关性地抑制 PAF 诱导的 HT22 细胞的凋亡。图 2-B、C 为图 2-A 中 Annexin V-FITC/PI 染色阳性率的统计图，与对照组比较，模型组 AnnexinV-FITC/PI 阳性率显著升高（P＜0.001）；与模型组比较，GDL（6.25、12.50、25.00 μg/mL）组 Annexin V-FITC/PI 阳性率显著下降（P＜0.001）。如图 2-D 所示，在 PAF 刺激的 HT22 细胞



A-GDL 抑制 PAF 诱导的 HT22 细胞凋亡（×40）；B-Annexin V-FITC 阳性率的统计图；C-PI 阳性率的统计图；D-GDL 抑制 PAF 诱导的 HT22 细胞凋亡相关蛋白表达。

A-GDL inhibits PAF-induced apoptosis in HT22 cells (× 40); B-statistical graph of Annexin V-FITC positivity rate; C-statistical chart of PI positivity rate; D-GDL inhibits PAF-induced apoptosis-related protein expressions in HT22 cells.

图 2 GDL 抑制 PAF 诱导的 HT22 细胞凋亡（$\bar{x} \pm s$，n = 3）

Fig. 2 GDL inhibits PAF-induced apoptosis in HT22 cells ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

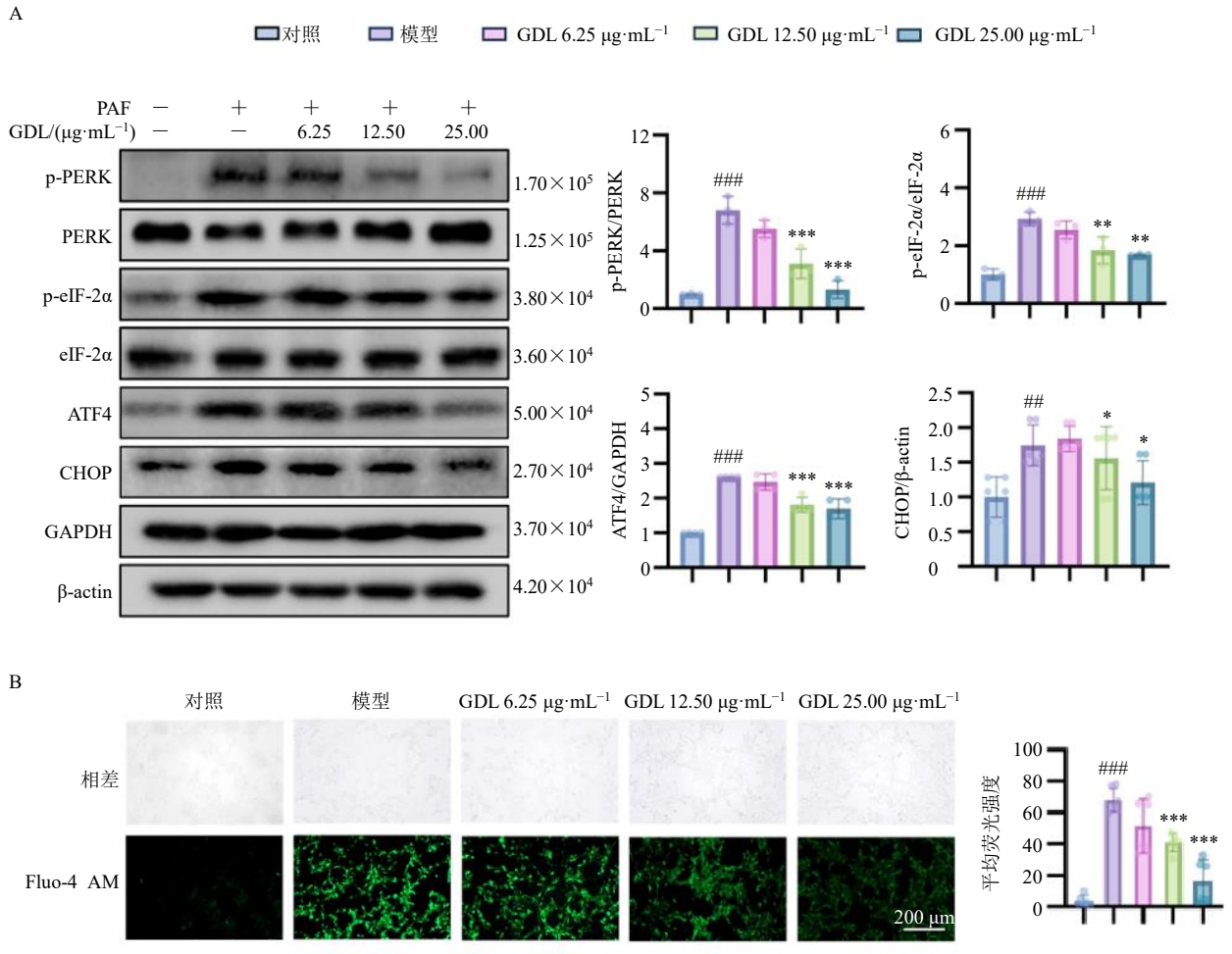
中，cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著升高（$P<0.001$），Bcl-2 蛋白表达水平显著降低（$P<0.001$）；与模型组比较，GDL（12.50、25.00 μg/mL）组 cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$、0.01、0.001），各给药组 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$、0.001）。上述结果表明 PAF 可以诱导 HT22 细胞凋亡，而 GDL 可以抑制 PAF 诱导的凋亡。

3.3　GDL 抑制 PAF 诱导的 HT22 细胞中 PERK/ATF4/CHOP 通路

ERS 时首先启动生存途径，但长时间的 ERS 将诱导细胞凋亡。如图 3-A 所示，PAF 刺激的 HT22 细胞中 p-PERK、p-eIF2α、ATF4、CHOP 蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$、0.001），而 GDL（12.50、25.00 μg/mL）显著抑制 PAF 诱导的 HT22 细胞 PERK/ATF4/CHOP 信号通路相关蛋白表达的上调（$P<0.05$、0.01、0.001）。内质网是细胞中重要的钙库，ERS 会导致 Ca^{2+}失衡，进而诱发凋亡。钙离子荧光探针染色结果见图 3-B，8 μmol/L PAF 刺激的 HT22 细胞中 Ca^{2+}水平显著升高（$P<0.001$），而 GDL（12.50、25.00 μg/mL）显著抑制 PAF 诱导的 HT22 细胞中 Ca^{2+}水平（$P<0.001$）。上述结果表明 PAF 可以激活过度的 PERK/ATF4/CHOP 信号通路，导致 Ca^{2+}超载，诱发神经元损伤。

3.4　分子对接分析

PERK 是 3 大 ERS 通路之一的最上游蛋白分子。如图 4-A 所示，PAF 对 PERK 表现出较强的亲和力，对接评分为−6.0 kcal/mol（1 kcal/mol＝4.182 kJ/mol），氨基酸结合位点为 ASP-898、VAL-652、LEU-643，提示 PAF 作为脂质小分子可能与内质网

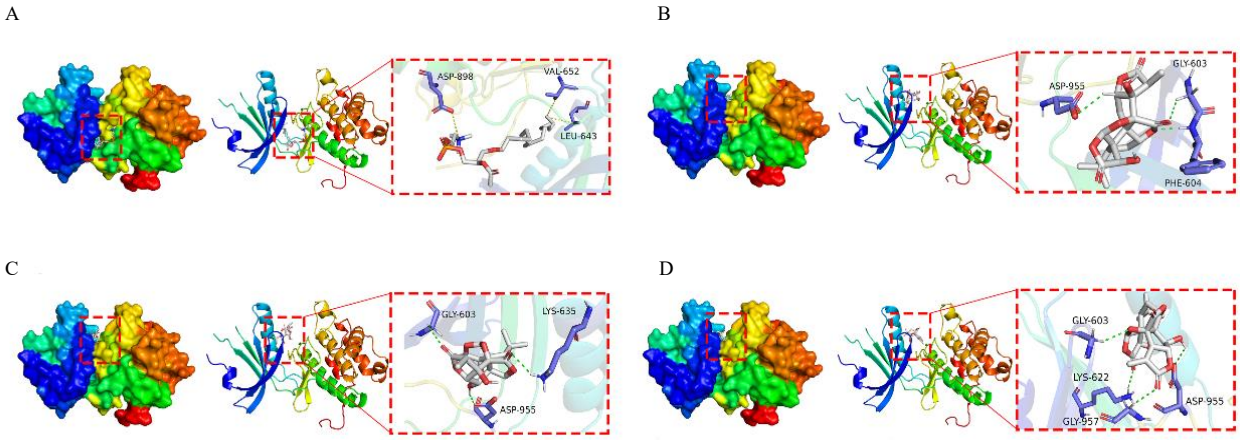


A-GDL 抑制 PAF 诱导的 PERK/ATF4/CHOP 信号通路；B-GDL 抑制 PAF 诱导的钙离子超载（×40）。

A-GDL inhibits PAF-induced PERK/ATF4/CHOP signaling pathway; B-GDL inhibits PAF-induced calcium overloading (× 40).

图 3　GDL 抑制 PAF 诱导的 HT22 细胞中 PERK/ATF4/CHOP 通路（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 3　GDL inhibits PAF-induced PERK/ATF4/CHOP pathway in HT22 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A-PAF 与 PERK 的分子对接可视化结果；B-GA 与 PERK 的分子对接可视化结果；C-GB 与 PERK 的分子对接可视化结果；D-GK 与 PERK 的分子对接可视化结果。

A-results of molecular docking visualization of PAF with PERK; B-results of molecular docking visualization of GA with PERK; C-results of molecular docking visualization of GB with PERK; D-results of molecular docking visualization of GK with PERK.

图 4　分子对接结果

Fig. 4　Results of molecular docking

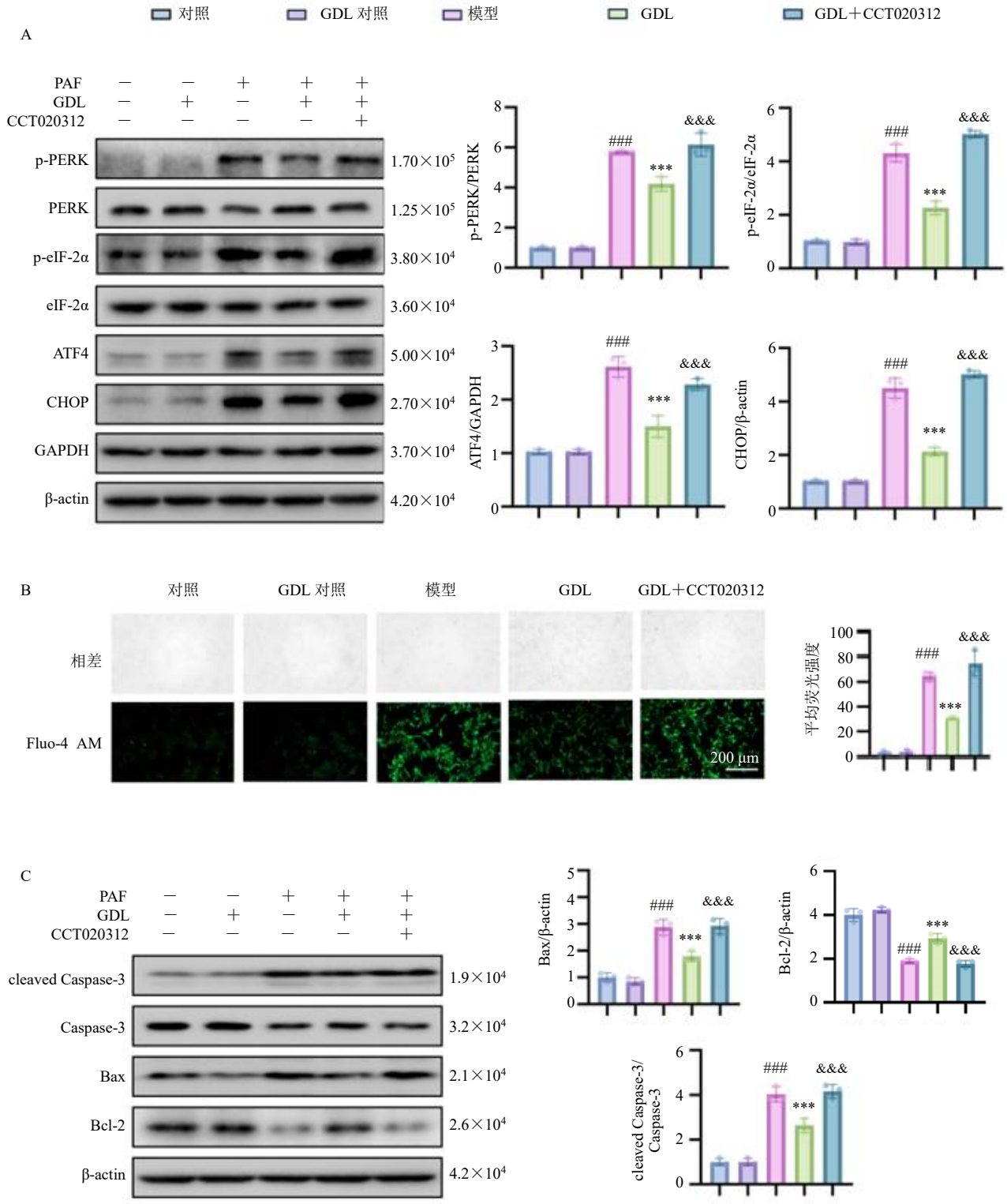
上的 PERK 靶点直接结合。如图 4-B 所示，GA 对 PERK 表现出很强的亲和力，对接评分为−6.5 kcal/mol，氨基酸结合位点为 ASP-955、GLY-603、PHE-604。如图 4-C 所示，GB 对 PERK 表现出很强的亲和力，对接评分为−6.4 kcal/mol，氨基酸结合位点为 ASP-955、GLY-603、LYS-635。如图 4-D 所示，GK 对 PERK 也表现出很强的亲和力，对接评分为−6.6 kcal/mol，氨基酸结合位点为 ASP-955、GLY-603、GLY-957、LYS-622。GDL 是 GA、GB、GK 药效最好的配比，分子对接结果显示 GDL 中的 3 种单体具有相同的作用靶点，产生协同效应，提示 ASP-955、GLY-603 位点可能是 GA、GB、GK 与 PERK 的关键结合位点。

3.5　PERK 激动剂逆转 GDL 的保护效果

在已经确定 PAF 可以激活 PERK/ATF4/CHOP 信号通路的情况下，且 GDL 与 PERK 有非常好的结合能，假设 PERK 是关键的治疗靶点，应用 PERK 激动剂 CCT020312 来持续激活 PERK/ATF4/CHOP 信号通路。如图 5-A 所示，与对照组比较，模型组 p-PERK、p-eIF2α、ATF4、CHOP 蛋白表达水平显著升高（$P<0.001$）；与模型组比较，GDL 组 p-PERK、p-eIF2α、ATF4、CHOP 蛋白表达水平显著下降（$P<0.001$），给予 CCT02031 干预后能够减弱 GDL 对 PERK/ATF4/CHOP 通路的抑制作用（$P<0.001$）。如图 5-B 所示，与对照组比较，模型组钙超载显著升高（$P<0.001$）；与模型组比较，GDL 组钙超载显著下降（$P<0.001$），给予 CCT020312 干预后能够减弱 GDL 对钙超载的抑制作用（$P<0.001$）。如图 5-C 所示，与对照组比较，模型组 cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著升高（$P<0.001$），Bcl-2 蛋白表达水平显著降低（$P<0.001$）；与模型组比较，GDL 组 cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著降低（$P<0.001$），Bcl-2 蛋白表达水平显著升高（$P<0.001$），给予 CCT020312 干预后能够逆转 GDL 对凋亡相关蛋白的调控作用（$P<0.001$）。上述结果表明，PERK 是 PAF 诱导 ERS 的关键靶点，GDL 抑制 PAF 介导的 ERS 也有可能通过抑制 PERK 的磷酸化发挥作用。

3.6　体内实验验证 GDL 抑制 PAF 介导的 PERK/ATF4/CHOP 通路

经鼻给药可通过嗅觉和三叉神经等通路绕过血脑屏障直接到达脑部，PAF 作为磷脂小分子，在预实验中已经证明了 PAF 经鼻滴入可以诱导 C57 小鼠脑内的神经元凋亡。有研究表明 ip CCT020312 可以激活脑内 PERK 磷酸化[26]。如图 6 所示，与对照组比较，模型组小鼠脑组织 p-PERK、p-eIF2α、ATF4、CHOP、Bax 蛋白表达水平显著升高（$P<0.001$），Bcl-2 蛋白表达水平显著降低（$P<0.001$）；与模型组比较，GDL 低、高剂量组 p-PERK、p-eIF2α、CHOP、Bax 蛋白表达水平显著下降（$P<0.001$），

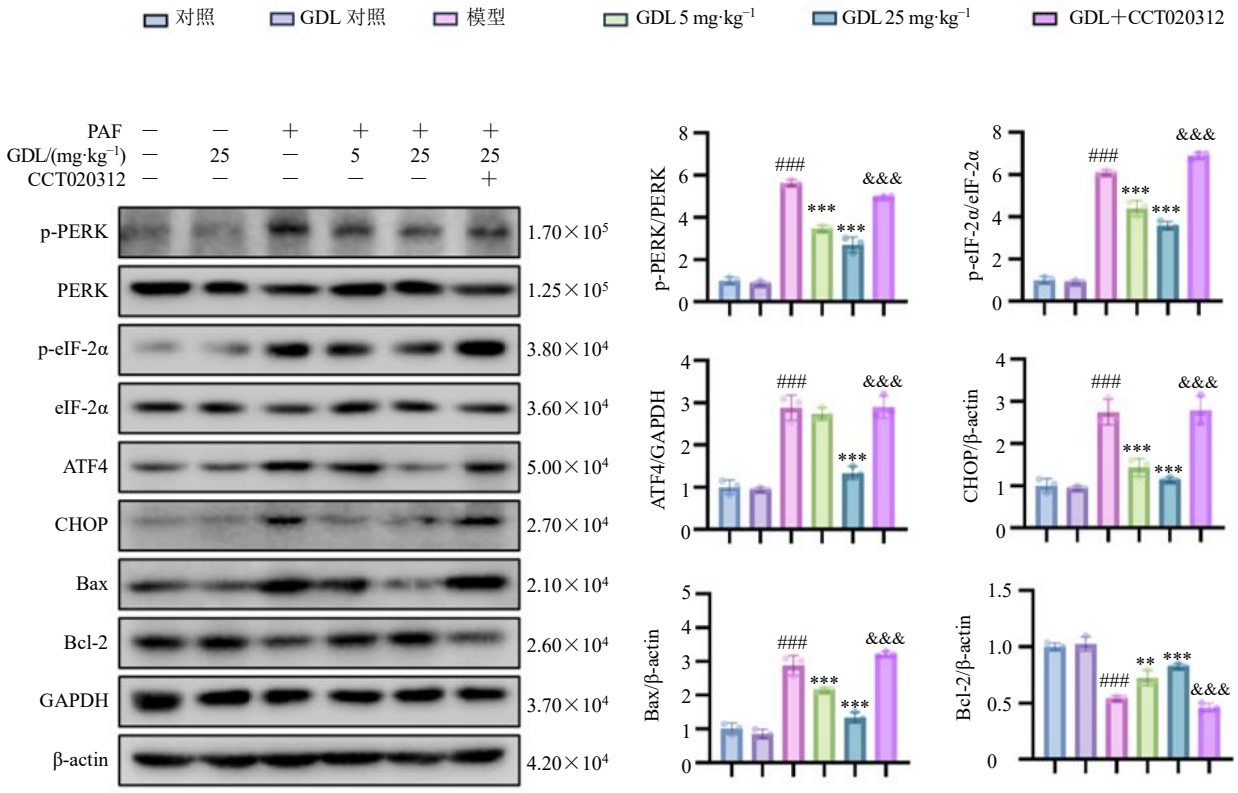


A-CCT020312 逆转了 GDL 的保护效果，并促进了 ERS；B-CCT020312 逆转了 GDL 的保护效果，并促进了钙离子超载（×40）；C-CCT020312 逆转了 GDL 的保护效果，并促进了凋亡；与 GDL 组比较：$^{\&\&\&}P<0.001$。

A-CCT020312 reversed protective effect of GDL and promoted ERS; B-CCT020312 reversed protective effect of GDL and promoted calcium overload (× 40); C-CCT020312 reversed protective effect of GDL and promoted apoptosis; $^{\&\&\&}P < 0.001$ *vs* GDL group.

图 5　CCT020312 逆转了 GDL 的保护效果并促进 HT22 细胞 ERS 来诱导凋亡（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 5　CCT020312 reversed protective effect of GDL and promoted HT22 cell ERS to induce apoptosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与 GDL 高剂量组比较：&&&P<0.001。

&&&P < 0.001 *vs* GDL high-dose group.

图 6 体内实验验证 GDL 可以抑制 PAF 介导的 PERK/ATF4/CHOP 通路（$\bar{x} \pm s$, n = 3）

Fig. 6 *In vivo* experiments verified that GDL inhibits PAF-mediated PERK/ATF4/CHOP pathway ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Bcl-2 蛋白表达水平显著升高（P<0.01、0.001），GDL 高剂量组 ATF4 蛋白表达水平显著下降（P<0.001）；给予 CCT020312 干预后能够逆转 GDL 对 ERS 和凋亡相关蛋白的调控作用（P<0.001）。上述结果表明 GDL 可抑制 PAF 诱发的凋亡与 ERS，CCT020312 可以逆转 GDL 的神经元保护作用，提示 GDL 可以通过抑制 PAF 介导的 ERS 来保护神经元。

4 讨论

脑卒中会诱发高于正常水平的 PAF 产生。研究表明，PAF 会改变血脑屏障通透性[27]。缺血和创伤性脑损伤也会导致 PAF 的大量产生[28-29]。PAF 可以介导血小板聚集的发生，Ca^{2+}内流被认为是 PAF 在血小板[30]和 U-397 细胞[31]中引发后续效应的主要机制。在牛脑微血管内皮细胞中，PAF 通过磷脂酶 C 依赖性机制促使 Ca^{2+}的增加[32]。还有早期研究表明，PAF 产生磷酸肌醇水解、肌醇磷酸合成和来自内质网储存 Ca^{2+}的释放[33]。尚未见到 PAF 介导的 ERS 与神经元凋亡相关报道，本研究首先证明了 PAF 对神经元的损伤与钙离子密不可分，内质网作为细胞内重要的钙库，与钙离子的关系也不言而喻。血液中含有大量 PAF 乙酰水解酶，与 PAF 产生动态平衡，在遇到缺血后，PAF 的大量产生会破坏血脑屏障，导致 PAF 直接刺激大脑内的神经元细胞，造成神经元细胞损伤。本研究证实了 PAF 在无血清干扰的情况下会诱发 ERS，并激活钙超载，最终导致神经元凋亡。PAF 能显著上调 PERK/ATF4/CHOP 通路相关蛋白的表达，同时伴随着钙超载和神经元凋亡的增加。提示 PAF 在缺血损伤中的重要作用不仅限于炎症和氧化应激，其通过诱发 ERS 对神经元的损害更为直接和严重。

ERS 在脑缺血的半暗带区恢复中具有举足轻重的地位，内质网位于胞质内、胞核外，内质网除了负责正确折叠蛋白质的合成转运，还参与细胞内信号肽识别和糖基化修饰、细胞钙离子的贮存和调节、分子效应信号转导等功能[34]。ERS 可以由内质网腔内错误折叠蛋白的过量积累、营养剥夺、缺氧、化学药物和炎症因子等多种刺激因素所诱发，这些刺激因素会导致内质网腔体存贮及释放钙离子功

能发生障碍或者导致蛋白质和脂类的加工及运输功能失常，继而引起后续一系列级联反应，其中主要涉及细胞的凋亡[35]。随着研究深入，许多学者认为，ERS 可能是研究脑缺血/再灌注损伤病理机制和防治方法的关键环节[36]。脑缺血会破坏神经细胞内质网稳态并最终导致梗死区域神经细胞更加严重的神经损伤。

银杏二萜内酯葡胺（ginkgo diterpene lactone meglumine，GDLM）是主要的银杏提取物制剂之一，有一项多中心、随机、双盲的临床研究表明 GDLM 可提高急性缺血性脑卒中（acute ischemic stroke，AIS）患者 90 d 获得良好临床结局效果的比例[37]。良好的临床效果证实了 GDLM 对神经元的保护作用。GDL 作为 GDLM 的原料药，其主要活性成分包括 GA、GB 和 GK，这些化合物具有显著的神经保护特性，尤其在脑缺血损伤中的应用潜力已被多项研究证实。GDL 可在一定程度上抑制脑小血管病（cerebral small-vessel disease，CSVD）认知障碍大鼠的氧化应激和炎症反应[38]。Aβ 会诱导细胞钙超载，并激活 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体，引起神经毒性，而 GA 可以抑制这种神经毒性[39]。GB 能够通过抑制内质网应激改善大鼠心肌缺血再灌注损伤[40]。GK 的神经保护作用可能通过抑制 Ca^{2+}通道的激活来发挥作用[41]。GK 在体外和体内模型中均显著降低 ER 应激诱导的细胞死亡[42]。

综上，GA、GB、GK 均可抑制细胞凋亡，其相关分子机制与钙离子超载和 ERS 有一定相关性。本研究证实了 PAF 与 GDL 共同处理后，内质网应激相关蛋白的表达显著降低，神经元凋亡显著减少。表明 GDL 能够通过调控 PERK/ATF4/CHOP 通路，抑制 PAF 诱导的 ERS。PERK 是 ERS 3 大通路之一的最上游蛋白，分子对接结果显示 PAF 与 PERK 有相当好的结合能，提示 PAF 作为脂质小分子有可能与内质网上的 PERK 靶点直接结合。GA、GB、GK 对 PERK 都表现出很强的亲和力，GDL 是 GA、GB、GK 药效最好的配比，分子对接结果显示 GDL 中的这 3 种单体具有相同的作用靶点，产生了协同效应，提示 ASP-955、GLY-603 位点有可能是 GA、GB、GK 与 PERK 的关键结合靶点。为进一步明确 GDL 的作用位点，加入 PERK 激动剂 CCT020312 干预后发现，CCT020312 可完全逆转 GDL 的保护作用，表现为 ERS 标志物和神经元凋亡的显著升高。同时在小鼠上进行了 CCT020312 的干预实验，进一步验证了体外实验的结论。结果表明，GDL 的保护作用主要通过抑制 PERK/ATF4/CHOP 通路实现，同时也提示 PERK 是 PAF 介导 ERS 的核心通路。

本研究首次明确了 PAF 通过 PERK/ATF4/CHOP 通路引发 ERS 并导致神经元损伤的机制，同时验证了 GDL 在这一过程中发挥的保护作用。本研究揭示了 PAF 介导 ERS 的分子机制，为进一步研究缺血性脑损伤的病理机制提供了新思路，同时为针对 PERK/ATF4/CHOP 通路的靶向治疗策略提供了新的方向。未来可进一步研究 GDL 在其他动物模型中的保护作用。此外，结合药物递送技术（如靶向纳米递送），可进一步提高 GDL 的治疗效果和组织靶向性，为缺血性脑损伤的临床治疗提供更多可能性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Hostettler I C, Seiffge D J, Werring D J. Intracerebral hemorrhage: An update on diagnosis and treatment [J]. *Expert Rev Neurother*, 2019, 19(7): 679-694.

[2] Martin S S, Aday A W, Almarzooq Z I, *et al*. 2024 heart disease and stroke statistics: A report of US and global data from the American heart association [J]. *Circulation*, 2024, 149(8): e347-e913.

[3] Tuo Q Z, Zhang S T, Lei P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications [J]. *Med Res Rev*, 2022, 42(1): 259-305.

[4] Shin T H, Lee D Y, Basith S, *et al*. Metabolome changes in cerebral ischemia [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1630.

[5] Wu F, Liu Z C, Zhou L H, *et al*. Systemic immune responses after ischemic stroke: From the center to the periphery [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 911661.

[6] Chi L M, Jiao D, Nan G X, *et al*. miR-9-5p attenuates ischemic stroke through targeting ERMP1-mediated endoplasmic reticulum stress [J]. *Acta Histochem*, 2019, 121(8): 151438.

[7] Umemura A, Yamada K, Mabe H, *et al*. Production of platelet-activating factor during focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 1997, 6(6): 394-397.

[8] Shi C, Wu F M, Xu J. H_2O_2 and PAF mediate Abeta1-42-induced Ca^{2+} dyshomeostasis that is blocked by EGb761 [J]. *Neurochem Int*, 2010, 56(8): 893-905.

[9] Xu Y, Tao Y X. Involvement of the NMDA receptor/nitric oxide signal pathway in platelet-activating factor-induced neurotoxicity [J]. *Neuroreport*, 2004, 15(2): 263-266.

[10] Harishkumar R, Hans S, Stanton J E, *et al*. Targeting the

platelet-activating factor receptor (PAF-R): Antithrombotic and anti-atherosclerotic nutrients [J]. *Nutrients*, 2022, 14(20): 4414.

[11] Deng M, Guo H T, Tam J W, *et al*. Platelet-activating factor (PAF) mediates NLRP3-NEK7 inflammasome induction independently of PAFR [J]. *J Exp Med*, 2019, 216(12): 2838-2853.

[12] Ryan S D, Harris C S, Mo F, *et al*. Platelet activating factor-induced neuronal apoptosis is initiated independently of its G-protein coupled PAF receptor and is inhibited by the benzoate orsellinic acid [J]. *J Neurochem*, 2007, 103(1): 88-97.

[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] 刘子宇, 徐欣玉, 吕文欣, 等. 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 [J]. 中草药, 2024, 55(11): 3735-3748.

[15] Yu W B, Cao L, Zhao Y Y, *et al*. Comparing the role of ginkgolide B and ginkgolide K on cultured astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(5): 4417-4427.

[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] Asiwe J N, Ojetola A A, Ekene N E, *et al*. Pleiotropic attenuating effect of *Ginkgo biloba* against isoprenaline induced myocardial infarction via improving Bcl-2/mTOR/ERK1/2/Na^+, K^+-ATPase activities [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(2): 282-292.

[18] Zhao H W, Li X Y. Ginkgolide A, B, and huperzine A inhibit nitric oxide-induced neurotoxicity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(11): 1551-1556.

[19] Ren D Z, Li F, Gao A, *et al*. Hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes is restricted by ginkgolide B-downregulated microRNA-29 [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(10): 1067-1076.

[20] Xu D, Li F Y, Hou K, *et al*. XQ-1H attenuates ischemic injury in PC12 cells via Wnt/β-catenin signaling though inhibition of apoptosis and promotion of proliferation [J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(11): 2363-2369.

[21] Li Q Y, Miao Q, Sui R X, *et al*. Ginkgolide K supports remyelination via induction of astrocytic IGF/PI3K/Nrf2 axis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75: 105819.

[22] Chen X Y, Shi C R, He M H, *et al*. Endoplasmic reticulum stress: Molecular mechanism and therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 352.

[23] Faitova J, Krekac D, Hrstka R, *et al*. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2006, 11(4): 488-505.

[24] Serou M J, DeCoster M A, Bazan N G. Interleukin-1 beta activates expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in primary hippocampal neuronal culture: Platelet-activating factor as a preferential mediator of cyclooxygenase-2 expression [J]. *J Neurosci Res*, 1999, 58(4): 593-598.

[25] Phillis J W, Horrocks L A, Farooqui A A. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: Their role and involvement in neurological disorders [J]. *Brain Res Rev*, 2006, 52(2): 201-243.

[26] Bruch J, Xu H, Rösler T W, *et al*. PERK activation mitigates tau pathology *in vitro* and *in vivo* [J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(3): 371-384.

[27] Brailoiu E, Barlow C L, Ramirez S H, *et al*. Effects of platelet-activating factor on brain microvascular endothelial cells [J]. *Neuroscience*, 2018, 377: 105-113.

[28] Lindsberg P J, Hallenbeck J M, Feuerstein G. Platelet-activating factor in stroke and brain injury [J]. *Ann Neurol*, 1991, 30(2): 117-129.

[29] Satoh K, Imaizumi T, Yoshida H, *et al*. Increased levels of blood platelet-activating factor (PAF) and PAF-like lipids in patients with ischemic stroke [J]. *Acta Neurol Scand*, 1992, 85(2): 122-127.

[30] Hallam T J, Sanchez A, Rink T J. Stimulus-response coupling in human platelets. Changes evoked by platelet-activating factor in cytoplasmic free calcium monitored with the fluorescent calcium indicator quin2 [J]. *Biochem J*, 1984, 218(3): 819-827.

[31] Barzaghi G, Sarau H M, Mong S. Platelet-activating factor-induced phosphoinositide metabolism in differentiated U-937 cells in culture [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989, 248(2): 559-566.

[32] Lin A Y, Rui Y C. Platelet-activating factor induced calcium mobilization and phosphoinositide metabolism in cultured bovine cerebral microvascular endothelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1224(2): 323-328.

[33] Shukla S D. Platelet-activating factor receptor and signal transduction mechanisms [J]. *FASEB J*, 1992, 6(6): 2296-2301.

[34] Krshnan L, van de Weijer M L, Carvalho P. Endoplasmic reticulum-associated protein degradation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2022, 14(12): a041247.

[35] Shore G C, Papa F R, Oakes S A. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(2): 143-149.

[36] Han Y, Yuan M, Guo Y S, *et al*. Mechanism of endoplasmic

reticulum stress in cerebral ischemia [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 704334.

[37] 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.

[38] Jiang S, Ma X J, Chen Y Y, *et al*. Effects of *Ginkgo* diterpene lactone on brain inflammation and oxidative stress in rats with cognitive impairment of cerebral small vessel disease [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(6): 6382-6390.

[39] Texidó L, Martín-Satué M, Alberdi E, *et al*. Amyloid β peptide oligomers directly activate NMDA receptors [J]. *Cell Calcium*, 2011, 49(3): 184-190.

[40] Guo C, Zhang J, Zhang P, *et al*. Ginkgolide B ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury in rats via inhibiting endoplasmic reticulum stress [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 767-774.

[41] Liu H B, Li Q Y, Zhang X D, *et al*. Effect of ginkgolide K on calcium channel activity in Alzheimer's disease [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(6): 426.

[42] Wang S B, Wang Z Z, Fan Q R, *et al*. Ginkgolide K protects the heart against endoplasmic reticulum stress injury by activating the inositol-requiring enzyme 1α/X box-binding protein-1 pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(15): 2402-2418.

[责任编辑　李亚楠]