

银杏内酯K通过PI3K/Akt/mTOR通路促进血管生成改善缺血性卒中

赵茜 米克拉依·阿不来提

830011 乌鲁木齐, 新疆维吾尔自治区心脑血管病医院康复科(赵茜), 神经内科(米克拉依·阿不来提)

通信作者: 米克拉依·阿不来提, Email: 1332412615@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2020.03.004

【摘要】目的 探究银杏内酯K(Ginkgolide K, GK)通过磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路对缺血性卒中小鼠血管内皮生长因子(VEGF)表达和脑血管生成的作用。**方法** 将40只C57BL/6小鼠随机分为对照组、大脑中动脉闭塞(MCAO)组、低剂量GK(GK-L)组(3.5 mg/kg)、中剂量GK(GK-M)组(7 mg/kg)和高剂量(GK-H)组(14 mg/kg), 每组各8只。建立MCAO模型和氧葡萄糖剥夺发(OGD)体外模型;采用改良后的神经系统严重程度评分(mNSS)评估法检测小鼠神经功能缺损;2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色检测小鼠脑缺血面积;免疫荧光染色检测小鼠梗死灶周围皮质血管生成和星形胶质细胞覆盖。培养hCMEC/D3细胞,分为对照组, OGD组、OGD+CK组、OGD+LY组(LY为PI3K信号通路抑制剂)和OGD+GK+LY组,采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测内皮细胞活性;Western blot检测内皮细胞缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、VEGF和PI3K/Akt/mTOR通路相关基因蛋白表达;细胞划痕实验检测内皮细胞迁移能力;血管形成实验检测内皮细胞管腔形成能力。**结果** 与MCAO组[(5.37 \pm 1.25)分、(11.99 \pm 1.72)%]比较, GK-M组和GK-H组小鼠mNSS评分[分别为(3.37 \pm 1.32)、(2.23 \pm 0.38)分]和脑缺血面积[(4.75 \pm 0.89)%、(2.42 \pm 0.42)%]均显著降低($P < 0.05$)。与MCAO组EdU⁺/CD31⁺细胞数、EdU⁺/GFAP⁺细胞数和星形胶质细胞覆盖率[分别为(3.33 \pm 0.58)个、(4.33 \pm 1.53)个、(69.20 \pm 5.60)%]比较, GK组小鼠EdU⁺/CD31⁺细胞数[(13.67 \pm 2.08)个, $t=3.576$]、EdU⁺/GFAP⁺细胞数[(8.33 \pm 1.53)个, $t=6.008$]和星形胶质细胞覆盖率[(82.26 \pm 7.77)%]显著升高(均 $P < 0.05$)。与对照组细胞活力、HIF-1 α 、VEGF蛋白表达、Akt和mTOR磷酸化水平[分别为(100.31 \pm 3.01)%、(0.09 \pm 0.03)、(0.13 \pm 0.03)、(0.20 \pm 0.04)、(0.18 \pm 0.03)]比较, OGD组细胞活力[(52.37 \pm 9.06)%]、HIF-1 α (0.17 \pm 0.02)和VEGF蛋白表达(0.18 \pm 0.03)、Akt和mTOR磷酸化水平[(0.28 \pm 0.06)、(0.38 \pm 0.05)]均显著升高(均 $P < 0.05$);与OGD组比较, OGD+GK组细胞HIF-1 α (0.22 \pm 0.03)和VEGF蛋白表达(0.23 \pm 0.03)、Akt和mTOR磷酸化水平[(0.48 \pm 0.09)、(0.52 \pm 0.05)]、细胞活力[(61.07 \pm 3.48)%]、迁移率[(85.26 \pm 11.03)%]和管状结构数量[(81.97 \pm 5.79)%]均显著升高(均 $P < 0.05$), OGD+LY组则表现出相反变化;PI3K信号通路抑制剂LY294002可逆转GK对OGD细胞的影响。**结论** GK通过PI3K/Akt/mTOR信号通路上调VEGF表达促进脑血管生成,改善小鼠缺血性卒中。

【关键词】 银杏内酯K; 脑缺血; 血管生成; 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路; 血管内皮生长因子

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2019D01C032)

Ginkgolide K promotes angiogenesis and improves ischemic stroke through PI3K/Akt/mTOR pathway Zhao Xi, Mikelayi Abulaiti

Department of Rehabilitation, Xinjiang Cardio-Cerebrovascular Hospital, Urumqi 830011, China (Zhao X);

Department of Neurology, Xinjiang Cardio-Cerebrovascular Hospital, Urumqi 830011, China (Abulaiti M)

Corresponding author: Mikelayi Abulaiti, Email: 1332412615@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of ginkgolide K on vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and cerebral angiogenesis in mice with cerebral ischemia via the PI3K/Akt/mTOR

signaling pathway. **Methods** A total of 40 C57BL/6 mice were randomly divided into five groups with 8 mice in each group: control group, MCAO group, GK-L group (3.5 mg/kg), GK-M group (7 mg/kg) and GK-H group (14 mg/kg), with 8 cases in each. MCAO rat models and oxygen glucose deprivation (OGD) in vitro models were established. The modified Neurological Severity Score (mNSS) was utilized to detect neurological deficits in mice. TTC staining was utilized to detect cerebral ischemic area of mice; immunofluorescence staining was utilized to detect cortical angiogenesis and astrocyte coverage in the peri-infarct cortex of ischemic mice. HcmeC / D3 cells were cultured and divided into control group, OGD group, OGD + CK group, OGD + LY group (LY as PI3K Signal pathway inhibitor) and OGD + GK + LY group. Endothelial cell activity was detected by CCK-8. Western blot was used to detect the protein expression of HIF-1 α , VEGF and PI3K/Akt/mTOR pathway-related gene in endothelial cell; cell scratch test was used to detect the migration ability of endothelial cell; angiogenesis test was used to detect tube formation ability of endothelial cell. **Results** Compared with MCAO group [(5.37 \pm 1.25), (11.99 \pm 1.72)%], the mNSS scores [respectively (3.37 \pm 1.32), (2.23 \pm 0.38)] and the area of cerebral ischemia [(4.75 \pm 0.89)%, (2.42 \pm 0.42)%] of mice in GK-M group and GK-H group were significantly reduced (all $P < 0.05$). Compared with the number of EdU+/CD31+cells, the number of EdU +/GFAP+cells and the astrocyte coverage of MCAO group [(3.33 \pm 0.58), (4.33 \pm 1.53), (69.20 \pm 5.60)%], GK Mouse EdU+/CD31+cell count [(13.67 \pm 2.08), $t=3.576$], EdU+/GFAP+cell count [(8.33 \pm 1.53), $t=6.008$], and astrocyte coverage [(82.26 \pm 7.77)%] increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the control group (100.31 \pm 3.01)%, the cell viability (52.37 \pm 9.06)% of the OGD group was significantly reduced ($F=19.914$, $P < 0.05$), HIF-1 α (0.17 \pm 0.02) and VEGF protein expression (0.18 \pm 0.03), Akt and mTOR phosphorylation levels [(0.28 \pm 0.06), (0.38 \pm 0.05)] were significantly increased ($P < 0.05$); Compared with OGD group (0.28 \pm 0.06), OGD+GK group cells HIF-1 α (0.22 \pm 0.03) and VEGF protein expression (0.23 \pm 0.03), Akt and mTOR phosphorylation levels [(0.48 \pm 0.09), (0.52 \pm 0.05)], cell viability [(61.07 \pm 3.48)%], mobility [(85.26 \pm 11.03)%] and the number of tubular structures [(81.97 \pm 5.79)%] were significantly increased ($P < 0.05$). The OGD+LY group showed the opposite change; PI3K signaling pathway inhibitor LY294002 could reverse the effect of GK on OGD cells. **Conclusions** Ginkgolide K up-regulates the expression of VEGF through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway to promote cerebral angiogenesis and improve ischemic stroke in mice.

【Key words】 Ginkgolide K; Cerebral ischemia; Angiogenesis; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; Vascular endothelial growth factor

Fund Program: Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2019D01C032)

卒中是世界范围内导致死亡和残疾的主要原因之一,缺血性卒中约占全部卒中病例的80%。脑缺血会导致细胞死亡、脑萎缩和功能缺陷^[1]。目前,重组组织型纤溶酶原激活剂(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)是目前唯一获得美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的用于治疗缺血性卒中的药物。然而,由于rt-PA的治疗时间窗和安全问题,其临床应用仍然受限^[2-3]。因此,开发新的卒中治疗策略十分必要。血管生成可以恢复缺血性脑组织的氧气和营养供应^[4]。卒中后,机体通过激活血管生成机制来保护大脑免受进一步损害,并促进功能恢复和神经再生,同时伴随着血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管壁的病理生理学变化^[5]。因此,促进血管生成可能是缺血性卒中的潜在治疗策略。

银杏内酯K(ginkgolide K, GK)是一种从银杏叶中提取出来的新型化合物,因其对脑缺血的神经保护作用而备受关注。GK预处理可减少大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型

中脑梗死面积和脑水肿量,并改善神经功能缺损评分^[6]。氧葡萄糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)后, GK通过磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian rapamycin target protein, mTOR)/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine-protein kinase, ULK1)信号通路诱导保护性自噬,促进星形胶质细胞增殖和迁移,这表明GK可能是脑缺血再灌注损伤的潜在药物^[7]。磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)/mTOR信号通路在促进细胞周期、增殖和血管生成中起重要作用^[8]。激活PI3K/Akt/mTOR途径可上调VEGF和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达,改善缺血性卒中后血管生成和神经发生^[9]。本研究旨在探究GK通过PI3K/Akt/mTOR信号通路调控VEGF表达和脑血管生成对缺血性卒中小鼠的作用,以期研发缺血性卒中的新的治疗策略提供参考。

材料与方法

一、材料

1. 动物与细胞: 40只C57BL/6小鼠购自新疆医科大学实验动物中心; 人脑微血管内皮细胞系 (immortalized human microvascular endothelial cells, hCMEC/D3) 购自上海继和生物科技有限公司。

2. 试剂: 2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑(2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 购自美国Sigma公司; GK购自江苏康缘药业; 缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、VEGF、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) 和胶质纤维酸性蛋白(GFAP) 抗体购自英国Abcam; mTOR、p-mTOR、Akt和p-Akt抗体购自美国Cell Signaling Technology; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记二抗; 白细胞分化抗原31(the cluster of differentiation 31, CD31) 抗体和基质胶购自美国BD Biosciences; 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU; 批号: E6032) 购自中国苏州宇恒生物科技有限公司。

3. 仪器: Click-iT™ EdU Imaging Kit with Alexa Fluor™ 488和647 Azides, 以及冷冻切片机均购自美国Thermo Scientific公司; 荧光显微镜购自日本Nikon。

二、方法

1. 动物饲养及分组: 40只C57BL/6雄性小鼠于安静、湿度55%~65%、温度19~25℃环境中饲养, 提供充足的饮水和饲料。待小鼠适应环境1周后, 将小鼠随机分为对照组、MCAO组、GK-L(低剂量GK组)、GK-M(中剂量GK组)和GK-H组(高剂量GK组), 每组各8只。

2. 脑缺血小鼠模型制备及给药处理: MCAO组和GK-L、GK-M、GK-H组参照Longa等^[10]建立的栓线法制备MCAO模型, 由右颈总动脉插入, 闭合动脉的起点。1.5 h后将栓线拔出。对照组小鼠进行相同的外科手术操作, 但不插入栓线。造模后24 h按照分组进行给药: GK-H组腹腔注射GK(14 mg/kg)和EdU(5 mg/kg), GK-L组腹腔注射GK(3.5 mg/kg)和等量生理盐水, GK-M组腹腔注射GK(7 mg/kg)和等量生理盐水, 对照组和MCAO组腹腔注射等量生理盐水和EdU(5 mg/kg), 连续给药14 d后, 进行后续实验操作。EdU表现为绿色荧光。

3. 改良的神经系统严重程度评分(modified neurological severity score, mNSS): 各组小鼠给药14 d

后, 参考文献[11], 进行mNSS测试。mNSS测试包括运动、感觉、平衡和反射方面的检测, 最高分值为18分, 分数越高表示神经系统损伤越大。

4. 脑缺血面积测定^[12]: 各组小鼠给药14 d后, 断头法处死大鼠后迅速取脑, -20℃条件下冷冻30 min。脑组织切成3个冠状面脑片, 2% TTC染液37℃避光孵育30 min, 磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤脑片, 4%多聚甲醛固定脑片24 h。Image J软件分析梗死面积。

5. 免疫荧光染色: 10%水合氯醛麻醉小鼠, 心脏灌注预冷生理盐水和4%多聚甲醛, 取小鼠梗死灶周围皮质。冷冻切片机制备组织切片。将切片用0.3% Triton X-100透化, 10%脱脂奶粉37℃下封闭1 h, CD31(1:40)和胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)(1:200)抗体4℃过夜孵育。磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffer saline Tween-20, PBST)清洗后, 加入相应Alexa Fluor 488或594二抗(1:200)室温孵育1 h, Hoechst 33342染核。应用EdU专用试剂盒进行Click反应, 检测EdU发光情况。PBST清洗后, 荧光显微镜下观察, GFAP表现为绿光, CD31表现为红光, Hoechst表现为蓝光, EdU表现为绿光或红光。

6. 细胞培养及处理: hCMEC/D3细胞用含10%胎牛血清(FBS)、1%青霉素-链霉素的改良伊格尔培养基(DMEM)培养基, 于37℃、5%CO₂条件下培养。细胞进行OGD时, 将细胞培养于无葡萄糖培养基中, 于37℃、1% O₂、5%CO₂、94%N₂条件下培养6 h, 随后恢复正常培养。将细胞按照分组进行给药处理: 对照组(等量生理盐水)、OGD组(等量生理盐水)、OGD+GK组(GK 30 μ g/L)、OGD+LY组(PI3K信号通路抑制剂LY294002, 简称为LY, 终浓度10 μ mol/L^[13])和OGD+GK+LY组(GK 30 μ g/L, LY 20 μ mol/L)。细胞于37℃、5% CO₂条件下培养24 h后, 进行后续实验。

7. CCK-8细胞活性检测: 将对数期生长的hCMEC/D3细胞接种于96孔板中(5 \times 10³个/孔), 37℃、5%CO₂条件下继续培养24 h。在细胞OGD处理0、6、9、12和24 h后, 每孔加入10 μ l CCK-8, 37℃、5%CO₂条件下孵育3 h。酶标仪测定各孔在450 nm处的吸光度(A)值。hCMEC/D3细胞接种96孔板中, 培养24 h后, 将细胞分为对照组、OGD组和OGD+GK组(GK 2、10、30和50 μ g/L), 继续培养24 h后, 每孔加

入 10 μl CCK-8、37 °C、5%CO₂条件下孵育 3 h。酶标仪测定各孔在 450 nm 处的 A 值。

8. Western blot: 收集 hCMEC/D3 细胞, 双辛酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度后, 取 20 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白, 并将其转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。10% 脱脂奶粉室温封闭 3 h, 加入 HIF-1α (1 : 2 000)、VEGF (1 : 3 000)、p-mTOR (1 : 2 500)、mTOR (1 : 2 000)、p-AKT (1 : 2 000)、AKT (1 : 1 000) 和 GAPDH (1 : 2 000), 4 °C 过夜孵育。HRP 标记二抗 (1 : 2 500 稀释) 室温孵育 1 h 后, 电化学发光 (ECL) 法发光、曝光。Image J 分析条带灰度值, 以目的条带与 GAPDH 比值表示目的蛋白相对表达量。

9. 细胞划痕实验: hCMEC/D3 细胞以 4 × 10⁵ 个/孔密度接种于 6 孔板, 37 °C、5%CO₂ 条件下培养 24 h 后, 100 μl 移液器吸头垂直 6 孔板划痕, PBS 清洗细胞后, 加入无血清 DMEM 培养基, 37 °C、5%CO₂ 条件下培养 12 h 后, 显微镜拍照。Image J 分析细胞迁移率。

10. 血管形成实验: 将基质胶 4 °C 过夜溶解, 向 96 孔板中加入基质胶 (50 μl/孔), 37 °C 下聚合 1 h。hCMEC/D3 细胞 (2 × 10⁵ 个/ml) 接种于 96 孔板中。OGD 条件下孵育 9 h 后, 显微镜拍摄内皮细胞管腔形成的图片。Image J 软件通过分支数计算管腔的形成。

11. 统计学方法: 用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD-t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

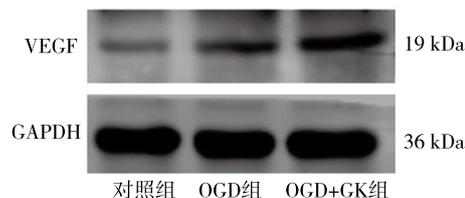
结 果

1. GK 改善缺血性脑卒中小鼠的神经功能评分并减少缺血面积: 由 mNSS 实验结果可知, MCAO 组、GK-L 组、GK-M 组和 GK-H 组小鼠第 14 天 mNSS 评分分别为 (5.37 ± 1.25)、(4.67 ± 0.45)、(3.37 ± 1.32)、(2.23 ± 0.38) 分, 4 组比较差异有统计学意义 ($F = 6.351, P < 0.05$), GK-M 组和 GK-H 组小鼠 mNSS 评分明显低于 MCAO 组 (均 $P < 0.05$)。连续给药 7 d 后, 4 组小鼠脑缺血面积分别为 (11.99 ± 1.72)%、(12.90 ± 2.66)%、(4.75 ± 0.89)%、(2.42 ± 0.42)%, 4 组比较差异有统计学意义 ($F = 45.417, P < 0.01$), GK-M 组和 GK-H 组小鼠脑缺血面积明显小于 MCAO 组 (均 $P < 0.05$), 见图 1 (见本期封二)。

2. GK 促进缺血性卒中小鼠血管生成: 见图 2 (见本期封二)。免疫荧光检测小鼠梗死灶周围皮质中 CD31 和 EdU 阳性细胞数, 结果显示, 与 MCAO 组 [(3.33 ± 0.58) 个] 比较, GK 组小鼠 EdU⁺/CD31⁺ 细胞数 [(13.67 ± 2.08) 个] 明显升高 ($t = 3.576, P < 0.05$)。

3. GK 促进缺血性卒中小鼠微血管周围的星形胶质细胞覆盖: 见图 3 (见本期封三)。由免疫荧光实验结果可知, 对照组 [(23.49 ± 5.00)%]、MCAO 组 [(69.20 ± 5.60)%] 和 GK 组 [(82.26 ± 7.77)%] 小鼠梗死灶周围区域中星形胶质细胞包裹微血管的比例差异具有统计学意义 (图 3A, $F = 73.453, P < 0.05$); MCAO 组 [(4.33 ± 1.53) 个] 和 GK 组 [(8.33 ± 1.53) 个] 小鼠 EdU⁺/GFAP⁺ 阳性细胞数差异具有统计学意义 (图 3B, $t = 6.008, P < 0.01$)。由图 3C 观察可知, 星形胶质细胞通过其足突包裹微血管。

4. GK 增强 OGD 后内皮细胞中 VEGF 的表达: 见图 4。由 CCK-8 和 Western blot 实验结果可知, 0 h 组、6 h 组、9 h 组、12 h 组和 24 h 组细胞活力分别为 (102.36 ± 9.42)%、(82.51 ± 9.15)%、(70.60 ± 9.39)%、(52.49 ± 7.61)%、(23.83 ± 6.94)%, 5 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 36.568, P < 0.001$)。对照组、OGD 组和 OGD+GK 组细胞活力分别为 (100.31 ± 3.01)%、(52.37 ± 9.06)%、(54.55 ± 5.87)%、(58.55 ± 7.80)%、(68.24 ± 7.51)%、(77.14 ± 7.33)%, 6 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 19.914, P < 0.001$)。对照组、OGD 组和 OGD+GK 组 VEGF 蛋白表达分别为 (0.18 ± 0.02)、(0.24 ± 0.05)、(0.39 ± 0.09), 3 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 9.114, P < 0.05$)。

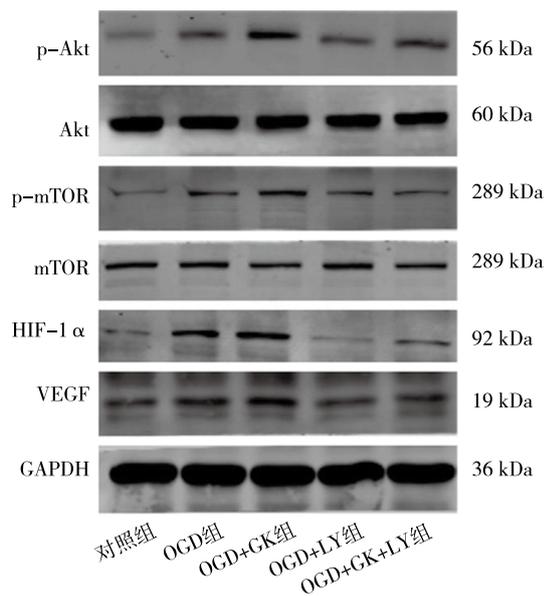


注: hCMEC/D3 人脑微血管内皮细胞系; VEGF 血管内皮生长因子; OGD 氧葡萄糖剥夺; GK 银杏内酯 K; GAPDH 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图 4 Western blot 检测 hCMEC/D3 细胞 VEGF 表达

5. GK 通过激活 OGD 后内皮细胞中的 PI3K/Akt/mTOR 信号传导途径增加 VEGF 表达: 见图 5。由 Western blot 实验结果可知, 对照组、OGD 组、OGD+GK 组、OGD+LY 组和 OGD+GK+LY 组细胞中 p-Akt/Akt 表达分别为 (0.20 ± 0.04)、(0.28 ± 0.06)、

(0.48 ± 0.09)、(0.22 ± 0.03)、(0.32 ± 0.06)，p-mTOR/mTOR 表达分别为(0.18 ± 0.03)、(0.38 ± 0.05)、(0.52 ± 0.05)、(0.19 ± 0.02)、(0.32 ± 0.08)，5组比较，差异有统计学意义($F=9.956$, $P < 0.01$; $F=24.584$, $P < 0.01$; 图5); HIF-1 α 表达分别为(0.09 ± 0.03)、(0.17 ± 0.02)、(0.22 ± 0.03)、(0.10 ± 0.02)、(0.13 ± 0.03)，VEGF 表达分别为(0.13 ± 0.03)、(0.18 ± 0.03)、(0.23 ± 0.03)、(0.15 ± 0.03)、(0.18 ± 0.03)，5组比较，差异均有统计学意义($F=12.486$, $P < 0.01$; $F=5.346$, $P < 0.05$)。



注: GK 银杏内酯K; OGD 氧葡萄糖剥夺; PI3K 磷脂酰肌醇-3-激酶; Akt 蛋白激酶B; p-Akt 磷酸化Akt; mTOR 雷帕霉素靶蛋白; p-mTOR 磷酸化mTOR; HIF-1 α 缺氧诱导因子1 α ; VEGF 血管内皮生长因子; GAPDH 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; LY PI3K 信号通路抑制剂LY294002

图5 Western blot检测PI3K/Akt/mTOR、HIF-1 α 和VEGF的蛋白表达

6. GK通过激活OGD后内皮细胞中的PI3K/Akt/mTOR信号通路发挥血管生成作用: 由CCK-8、细胞划痕实验和显微镜图片可知, 对照组、OGD组、OGD+GK组、OGD+LY组和OGD+GK+LY组细胞活力分别为(100.43 ± 1.78)%、(47.30 ± 4.78)%、(61.07 ± 3.48)%、(40.52 ± 5.50)%、(53.62 ± 4.08)%，5组比较，差异有统计学意义($F=97.739$, $P < 0.01$)。OGD组、OGD+GK组、OGD+LY组和OGD+GK+LY组细胞迁移率和管状结构数量分别为(100.69 ± 2.76)%、(192.01 ± 17.16)%、(85.26 ± 11.03)%、(125.11 ± 11.71)%以及(100.40 ± 3.79)%、(162.90 ± 8.87)%、(81.97 ± 5.79)%、(123.18 ± 10.67)%，4组比较，差异有统计学意义($F=47.478$, $P < 0.01$, 图6A; $F=60.704$, $P < 0.01$, 图6B)。

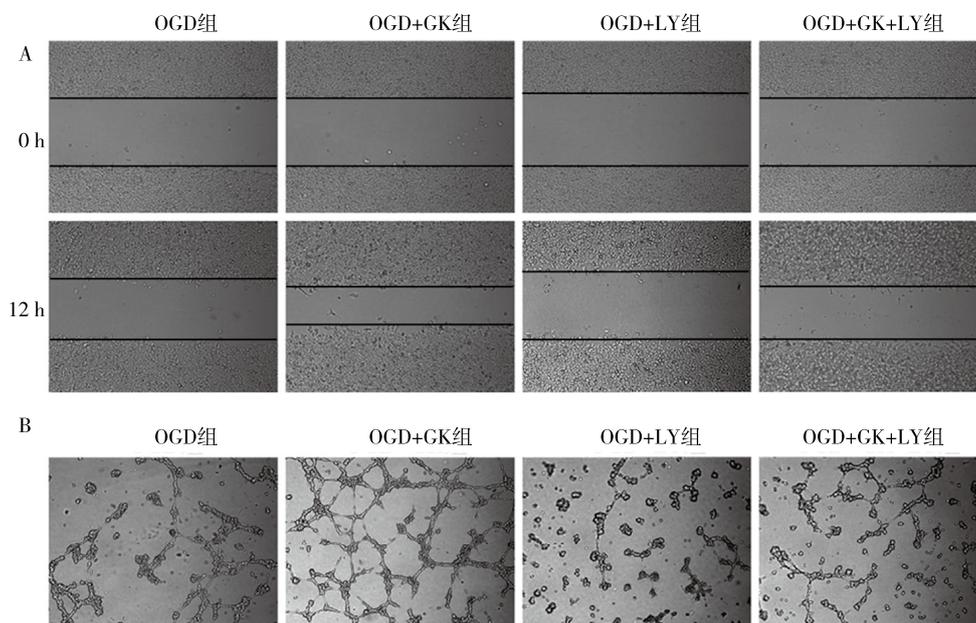
讨 论

卒中已成为世界人口的第二大死亡原因, 仅次于缺血性心脏病^[14]。血流不足和再灌注引起的细胞死亡是缺血性卒中的主要病理学特征^[15]。对于缺血性卒中的治疗, 血液恢复可能是一种潜在的治疗策略。银杏叶提取物通过不同机制改善MCAO、局灶性脑缺血、缺氧和肌萎缩性侧索硬化动物模型中神经元损伤和死亡^[16]。GK是一种从银杏中分离出来的新型天然小分子化合物。最近研究发现, GK抑制线粒体裂变和糖原合成酶激酶-3 β 依赖性线粒体膜通透性, 从而减轻脑缺血中的神经元损伤^[17]。GK通过激活Janus相关激酶2/信号转导与转录激活因子3途径促进MCAO小鼠模型中的血管生成^[6]。

GK被广泛用作缓解脑血管和心血管疾病症状, 可通过减轻缺血再灌注损伤后的炎症和氧化应激来保护神经元功能^[18]。本研究结果显示, GK呈剂量依赖性促进缺血性卒中小鼠的神经功能恢复, 同时减少脑缺血面积, 表明GK对缺血性卒中发挥神经保护作用, 该结果与之前的研究结果一致。血管生成对于神经血管重塑至关重要, 并且有利于脑缺血后的功能恢复^[4]。新形成的血管参与神经发生、轴突生长和突触重塑过程^[19]。证据显示, GK通过激活JAK2/STAT3途径促进MCAO小鼠模型中脑血管生成^[6]。本研究结果显示, GK可增加缺血性卒中小鼠梗死周围皮质EdU⁺/CD31⁺细胞数, 该结果表明, GK可促进缺血性卒中小鼠微血管形成, 有利于脑缺血后的功能恢复。

在血管生成的后期, 结构重塑是必不可少的, 这受紧密连接和神经血管成分的协调调节。星形胶质细胞通过与神经元和内皮细胞相互作用而成为神经血管单元的关键结构^[20]。脑卒中导致星形胶质细胞聚集, 以其胞足突包裹血管, 呈现出指向缺血核心的流状结构^[21]。研究表明, GK可促进OGD处理后星形胶质细胞增殖和迁移^[22]。本研究结果显示, GK处理可增加缺血性卒中小鼠梗死周围皮质中EdU⁺/GFAP⁺阳性细胞数, 促进星形胶质细胞对微血管的覆盖, 该结果表明GK可促进缺血性卒中小鼠星形胶质细胞活化, 进而促进星形胶质细胞对微血管的覆盖, 从而加速血管结构重塑过程。

VEGF在血管生成中起主要作用, 可调节多种内皮细胞功能^[23]。上调VEGF可促进缺血性卒中小鼠血管生成^[24]。本研究结果显示, GK促进OGD处



注: GK 银杏内酯K; OGD 氧葡萄糖剥夺; LY PI3K 信号通路抑制剂 LY294002; PI3K 磷脂酰肌醇-3-激酶; Akt 蛋白激酶 B; mTOR 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; hCMEC/D3 人脑微血管内皮细胞系; 6A 细胞划痕实验检测 hCMEC/D3 细胞迁移能力($\times 40$), 显示 GK 通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路促进细胞迁移; 6B 光学显微镜观察 hCMEC/D3 细胞管状结构数量($\times 200$), 显示 GK 通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路促进血管生成

图6 GK通过激活OGD后内皮细胞中的PI3K/Akt/mTOR信号通路发挥血管生成作用

理后内皮细胞中 VEGF 的表达。据报道, PI3K/Akt/mTOR 信号通路通过影响内皮细胞存活、迁移和管形成在血管生成中起重要作用^[8]。PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活会激活其下游因子 HIF-1 α , 并进一步调节 VEGF 的表达^[25]。激活 PI3K/Akt/mTOR 途径可上调 VEGF 和 BDNF 表达, 改善缺血性卒中后血管生成和神经发生^[9]。本研究结果显示, GK 通过激活 PI3K/Akt/mTOR 通路, 上调 HIF-1 α 和 VEGF 表达, 促进内皮细胞血管生成。

综上所述, GK 通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路上调 VEGF 表达促进脑血管生成, 改善缺血性卒中。该研究结果为 GK 在缺血性卒中中的应用和新疗法的开发提供了新的科学依据。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 试验设计、资料收集、数据整理为米克拉依·阿不来提, 研究实施、论文撰写、论文修订为赵茜

参 考 文 献

- [1] Martire A, Lambertucci C, Pepponi R, et al. Neuroprotective potential of adenosine A1 receptor partial agonists in experimental models of cerebral ischemia[J]. J Neurochem, 2019, 149(2): 211-230. DOI: 10.1111/jnc.14660.
- [2] Krueger M, Mages B, Hobusch C, et al. Endothelial edema precedes blood-brain barrier breakdown in early time points after experimental focal cerebral ischemia[J]. Acta Neuropathol Commun, 2019, 7(1): 17. DOI: 10.1186/s40478-019-0671-0.
- [3] Wang LP, Zhou PT, Mu ZH, et al. Dynamic detection of thrombolysis in embolic stroke rats by synchrotron radiation angiography[J]. Transl Stroke Res, 2019, 10(6): 695-704. DOI: 10.1007/s12975-019-0687-6.
- [4] Kanazawa M, Takahashi T, Ishikawa M, et al. Angiogenesis in the ischemic core: a potential treatment target?[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2019, 39(5): 753-769. DOI: 10.1177/0271678X19834158.
- [5] Hatakeyama M, Ninomiya I, Kanazawa M. Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke[J]. Neural Regen Res, 2020, 15(1): 16. DOI: 10.4103/1673-5374.264442.
- [6] Chen M, Zou WY, Chen MM, et al. Ginkgolide K promotes angiogenesis in a middle cerebral artery occlusion mouse model via activating JAK2/STAT3 pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 833: 221-229. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.06.012.
- [7] Zhang Y, Miao JM. Ginkgolide K promotes astrocyte proliferation and migration after oxygen-glucose deprivation via inducing protective autophagy through the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 832: 96-103. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.05.029.
- [8] Lee JH, Kim C, Um JY, et al. Casticin-induced inhibition of cell growth and survival are mediated through the dual modulation of akt/mTOR signaling cascade[J]. Cancers, 2019, 11(2): 254. DOI: 10.3390/cancers11020254.
- [9] Zhang Q, Zhao YH, Xu YH, et al. Sodium ferulate and n-butylidenephthalate combined with bone marrow stromal cells (BMSCs) improve the therapeutic effects of angiogenesis and neurogenesis after rat focal cerebral ischemia[J]. J Transl Med, 2016, 14(1): 223. DOI: 10.1186/s12967-016-0979-5.
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1986, 17(1): 15-18. DOI: 10.1161/01.str.17.1.15.

- 1989, 20(1): 84-91. DOI: 10.1161/01.STR.20.1.84.
- [11] Wen ZY, Xu XM, Xu LL, et al. Optimization of behavioural tests for the prediction of outcomes in mouse models of focal middle cerebral artery occlusion[J]. *Brain Res*, 2017, 1665: 88-94. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.04.001.
- [12] Zhou PT, Wang LP, Qu MJ, et al. DL-3-N-butylphthalide promotes angiogenesis and upregulates sonic hedgehog expression after cerebral ischemia in rats[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(6): 748-758. DOI: 10.1111/ens.13104.
- [13] Wang J, Zhang CL, Zhu JL, et al. Blood-brain barrier disruption and inflammation reaction in mice after chronic exposure to microcystin-LR[J]. *Sci Total Environ*, 2019, 689: 662-678. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.387.
- [14] Zents K, Copray S. The therapeutic potential of induced pluripotent stem cells after stroke: evidence from rodent models[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2016, 11(2): 166-174. DOI: 10.2174/1574888x10666150728121324.
- [15] Radak D, Katsiki N, Resanovic I, et al. Apoptosis and acute brain ischemia in ischemic stroke[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, 15(2): 115-122. DOI: 10.2174/1570161115666161104095522.
- [16] Rehman MU, Wali AF, Ahmad A, et al. Neuroprotective strategies for neurological disorders by natural products: an update[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2019, 17(3): 247-267. DOI: 10.2174/1570159X16666180911124605.
- [17] Zhou X, Wang HY, Wu BW, et al. Ginkgolide K attenuates neuronal injury after ischemic stroke by inhibiting mitochondrial fission and GSK-3 β -dependent increases in mitochondrial membrane permeability[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(27): 44682-44693. DOI: 10.18632/oncotarget.17967.
- [18] Wang SB, Wang ZZ, Fan QR, et al. Ginkgolide K protects the heart against endoplasmic reticulum stress injury by activating the inositol-requiring enzyme 1 α /X box-binding protein-1 pathway[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(15): 2402-2418. DOI: 10.1111/bph.13516.
- [19] Surugiu R, Glavan D, Popescu M, et al. Vasculature remodeling in a rat model of cerebral ischemia. The fate of the BrdU-labeled cells prior to stroke[J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 1014. DOI: 10.3389/fneur.2018.01014.
- [20] Segarra M, Aburto MR, Hefendehl J, et al. Neurovascular Interactions in the nervous system[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2019, 35: 615-635. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100818-125142.
- [21] Li Y, Zhang X, Cui L, et al. Salvianolic acids enhance cerebral angiogenesis and neurological recovery by activating JAK 2/STAT 3 signaling pathway after ischemic stroke in mice[J]. *J Neurochem*, 2017, 143(1): 87-99. DOI: 10.1111/jnc.14140.
- [22] Yu WB, Cao L, Zhao YY, 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. DOI: 10.3892/mmr.2018.9450.
- [23] Grossman JD, Grossman W. Angiogenesis[J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2019, 3(3): 138-144. DOI: 10.1172/JCI120352.
- [24] Shi FP, Wang XH, Zhang HX, et al. MiR-103 regulates the angiogenesis of ischemic stroke rats by targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(3): 318. DOI: 10.22038/IJBMS.2018.27267.6657.
- [25] Patra K, Jana S, Sarkar A, et al. The inhibition of hypoxia-induced angiogenesis and metastasis by cinnamaldehyde is mediated by decreasing HIF-1 α protein synthesis via PI3K/Akt pathway[J]. *Bio Factors*, 2019, 45(3): 401-415. DOI: 10.1002/biof.1499.

(收稿日期: 2019-02-07)

(本文编辑: 赵金鑫)