

· 基础研究 ·

银杏叶提取物 EGb761 预处理对小鼠
大脑微梗死干预效应的影响史涛涛^{1△} 何小飞² 罗世坚¹ 陈晓锋¹ 冯玉琨¹ 黄如训² 裴 中² 李振东¹

摘要 目的 观察银杏叶提取物 EGb761 预处理对小鼠大脑微梗死(CMI)模型的影响。方法 28 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为假手术组[$n=6$, PBS 100 mg/(kg·d)]、磷酸缓冲液(PBS)组[$n=11$, PBS 100 mg/(kg·d)]和实验组[$n=11$, EGb761 100 mg/(kg·d)]。PBS 组和实验组小鼠均被双光子激光照射诱导建立 CMI 模型。HE 染色计算微梗死体积、免疫荧光染色观察小鼠 CMI 区域神经元凋亡、小胶质细胞激活、星形胶质细胞过度活化及 3-硝基酪氨酸(3-NT)沉积。结果 假手术组未发现 CMI 病灶, 大脑皮层组织的星形胶质细胞和小胶质细胞均呈现正常状态。与 PBS 组比较, 实验组梗死体积、活化小胶质细胞、过度活化星形胶质细胞计数及 3-NT 沉积量减小($P<0.01$)。结论 EGb761 预处理具有减少小鼠 CMI 区域神经元死亡, 减小梗死体积的作用, 机制可能与抑制小胶质细胞和星形胶质细胞活化, 并降低硝化应激水平有关。

关键词 大脑微梗死; 银杏叶提取物; 炎症反应; 双光子显微镜

Effect of Pretreatment of *Ginkgo Biloba* Extract EGb761 for Cerebral Microinfarct in Mice SHI Tao-tao¹, HE Xiao-fei², LUO Shi-jian¹, CHEN Xiao-feng¹, FENG Yu-kun¹, HUANG Ru-xun², PEI Zhong², and LI Zhen-dong¹ 1 Department of Neurology, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong(519000); 2 Laboratory of Neurology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou(510080)

ABSTRACT Objective To explore the effect of *Ginkgo Biloba* extract EGb761 pretreatment for cerebral microinfarct(CMI) in mice. **Methods** Totally 28 male C57BL/6J mice were randomly divided into sham group($n=6$, PBS 100 mg/kg per day), phosphate buffered saline(PBS) group($n=11$, PBS 100 mg/kg per day), and experimental group($n=11$, EGb761 100 mg/kg per day). CMI model was established by two-photon laser irradiation in experimental group and PBS group. The microinfarct size was calculated by HE staining. Apoptosis of neuron, activate microglia, overactive astrocyte, and deposition of 3-nitrotyrosine were observed by immunofluorescent staining. **Results** No CMI lesion was found in sham group. Astrocyte and microglia in cerebral cortex was normal. Compared with PBS group, infarct volume, counts of active microglia and overactive astrocyte, deposition of 3-nitrotyrosine decreased in experimental group($P<0.01$). **Conclusion** EGb761 pretreatment can decrease neuron death and infarct volume in CMI area of mice, the mechanism may related with inhibiting over activation of microglia and astrocyte, and reducing nitration stress level.

KEYWORDS cerebral microinfarct, *Ginkgo Biloba* extract, inflammation, two-photon microscopy

大脑微梗死(cerebral microinfarct, CMI)被定义为肉眼无法看到仅组织病理可见的小梗死灶,直径大小在 50 μm ~5 mm 之间,通常伴有胶质细胞增生和神经元死亡^[1,2]。CMI 一般无明显的临床症状,但发

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81671102); 珠海市科技计划项目(No. 20171009E030049)

作者单位: 1. 中山大学附属第五医院神经内科(珠海 519000); 2. 中山大学附属第一医院神经科实验室(广州 510000)

通讯作者: 李振东, Tel: 0756-2528725, E-mail: lizhd@mail.sysu.edu.cn

[△]现在广东三九脑科医院工作(广东 510510)

DOI: 10.7661/j.cjim.20200216.114

生率较高,流行病学研究发现 CMI 在老年人中的发生率超过 30%,在有轻度认知障碍的患者中超过 55%,在血管性痴呆的患者中甚至达到 60%~70%^[3,4]。研究显示 CMI 和认知障碍之间存在强烈的相关性,而认知功能的损害严重影响人的生活质量,给家庭和社会带来极大的困扰^[5,6]。因此,对 CMI 的研究,尤其是治疗方法的研究至关重要。双光子显微镜诱导闭塞大脑皮层穿支动脉建立的 CMI 动物模型可以模拟人类 CMI 的病理改变,能够用来研究 CMI 的防治^[7]。

银杏叶提取物(EGb761)是从银杏叶中提取的天然成分,既往研究显示其对缺血性卒中具有神经保护作用,能够缩小脑梗死体积,抑制神经细胞凋亡,改善神经功能等^[8,9]。然而这些研究通常是针对大血管闭塞所致的脑梗死,对 CMI 的作用尚未见报道。为此,本实验利用双光子显微镜建立小鼠 CMI 模型,观察 EGb761 预处理对 CMI 的影响。

材料与方法

1 动物 28 只健康雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 20~25 g,6~8 周龄,购买并饲养于中山大学北校区动物实验中心[许可证号:SYXK(粤)2017-0081],环境为 SPF 级。所有动物试验操作符合中山大学实验动物伦理委员会要求(No. [2017]060)。

2 试剂与仪器 EGb761(货号:H20140770,德国威玛舒培博士药厂)、神经元特异性核蛋白(neuron-specific nuclear-binding protein, NeuN)抗体(货号:MAB377;美国 Millipore 公司)、兔神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(货号:ab7206;美国 ABCam 公司)、兔离子钙接头蛋白(Ionized calcium-binding adapter molecule-1, Iba-1)抗体(货号:SAQ1935;日本和光纯药工业株式会社)、小鼠 3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, 3-NT)抗体(货号:ab61392;美国 Abcam 公司)、抗小鼠 IgG 488(货号:A21202;美国 Life Technologies 公司)和抗兔 IgG 555(货号:A31572;美国 Life Technologies 公司)。双光子显微镜(DM6000 CFS)、测量软件(LAS AF 2.5)、成像系统(DFC 365 FX CCD)、图像摄取系统(TCS SP5 MP)均购买自德国 Leica 公司,体温维持仪(型号:69002;深圳瑞沃德生命科技公司),钛宝石激光器(Chameleon Ultra II, 美国 Coherent 公司),冰冻切片机(CM 1950, 德国 Leica 公司),体视显微镜(SMZ800, 日本 Nikon 公司),荧光显微镜(BX51, 日本 Olympus 公司),OCT 冰冻切片包埋剂(美国樱花 SAKURA 公司)。

3 动物分组及预处理 小鼠随机数字表法分为假手术组(6 只)、磷酸缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)组(11 只)和实验组(11 只)。实验组小鼠于建立模型前 7 天给予浓度 10 mg/mL 的 EGb761 100 mg/kg 灌胃处理,每天 1 次至造模当天;对照组小鼠建立模型前用等量的 PBS 做相同处理。假手术组小鼠治疗同 PBS 对照组。

4 造模方法 参考文献[10-14]。

4.1 磨颅骨窗 小鼠麻醉状态下,利用立体定位仪以大脑前囟后 1 mm,外侧 3 mm 为中心,使用颅骨钻磨薄直径约 5 mm 的圆形颅骨区域,至光镜下能清晰看到颅骨下小血管时完成磨颅。

4.2 选择穿支动脉 经小鼠内眦静脉注射 FITC 荧光染料(150 mg/kg)以使脑血管在镜下显示并便于被激光激发,在双光子显微镜下固定并看到颅骨窗下的血管图像,此时可以直接观察到血管的形态以及血流方向,找到直径约 20 μ m、流速约 10 μ m/ms 的目标穿支动脉。

4.3 闭塞目标动脉 激光波长调至 800 nm,在该穿支动脉壁上左右对称各定位 6 个漂白点(双光子激光损伤内皮细胞的过程称之为漂白)进行照射,强度(最大能量为 3.5 W)从 30% 开始,以 10% 的强度缓慢递增直到断端血液凝固并在镜下看到红细胞停止流动。持续观察 1 h,确定下游血流被阻断且没有再通,模型即制作成功。假手术组除了不经过双光子激光照射,其余操作同上。

5 取材及切片 造模后第 7 天,用戊巴比妥钠将小鼠深度麻醉后取仰卧位固定,剪开胸腔暴露心脏,经心尖处进入左心室,先推注 100 mL 左右 0.9% 生理盐水溶液,再以 100 mL 4% PFA 继续推注直到小鼠躯体、四肢及肝脏变硬后停止。小心撬开颅骨,取出整个大脑,用镊子分离颅骨窗位置的皮层组织并夹于两张载玻片中使其平展,而后连同载玻片一起放入含有 4% PFA 的试管中,4 $^{\circ}$ C 冰箱中固定过夜;之后用 20% 和 30% 蔗糖溶液梯度脱水。脱水的皮层组织用 OCT 包埋后置于液氮中速冻,再使用冰冻切片机制作 10 μ m 的矢状位切片。切片在 37 $^{\circ}$ C 烘箱烘干后于 -40 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

6 HE 染色计算梗死体积 对各组小鼠大脑皮层切片在 100、200、300、400、500、600、700、800 μ m 层面处进行 HE 染色。染色后的脑切片用体视显微镜采集照片,采用 ImageJ 软件分析照片并计算梗死体积(各个层面的梗死面积的平均值 $\times$ 皮层的厚度)。

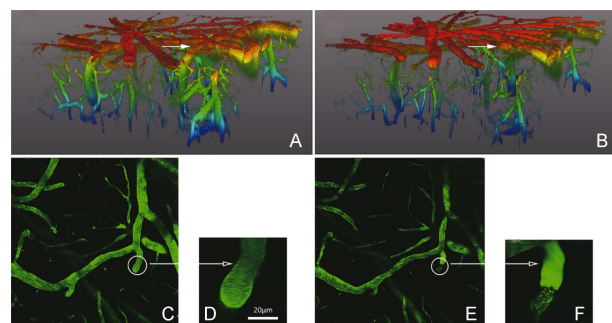
7 免疫荧光染色细胞计数及 3-NT 沉积检测

大脑切片在 37 ℃ 烘箱烘烤 30 min, 浸入 0.01 mol/L PBS 中水化 10 min, 之后浸入枸橼酸溶液置于微波炉内抗原修复 5 min。冷却后每个脑片滴加免疫荧光封闭液于室温封闭 1 h; 倒掉封闭液后滴加经抗体稀释液稀释后的一抗于 4 ℃ 冰箱孵育过夜。一抗按比例稀释: 小鼠 NeuN 抗体 (1:400)、兔 GFAP 抗体 (1:400)、兔 Iba-1 抗体 (1:400) 和小鼠 3-NT 抗体 (1:100), 其中 NeuN 和 Iba-1 两者双标。过夜后取出玻片室温下复温 1 h, 之后再以 PBS 溶液洗 3 次 (每次 5 min) 后滴加荧光二抗于室温避光孵育 1 h。二抗稀释浓度为: 抗小鼠 IgG 488 (1:400) 和抗兔 IgG 555 (1:400), 之后再以 PBS 洗 3 次 (每次 5 min), 最后用抗荧光淬灭剂封片。用荧光显微镜拍摄照片, 使用 Image J 软件进行小胶质细胞、星形胶质细胞活化以及 3-NT 沉积检测。

8 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验方法选用两独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

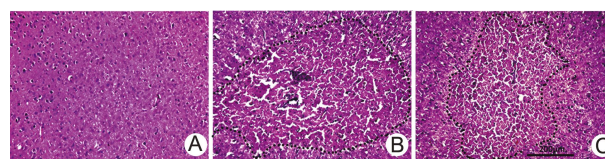
1 造模结果 (图 1) 图 1A 和 1 图 B 分别是穿支动脉闭塞之前和之后的 3D 立体图像; 图 1C 和图 1D 所示, 在激光诱发前, 穿支动脉是完整的; 激光诱发后, 图 1E 和图 1F 显示穿支动脉血管内的红细胞流动停止, 表明该穿支动脉被成功阻断。最终假手术组未发现微梗死病灶, 实验组有 81.82% (9/11) 只小鼠产生微梗死病灶, PBS 组有 72.73% (8/11) 产生微梗死灶, 两组造模成功率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: 箭头所指为穿支动脉

图 1 大脑穿支动脉的阻断

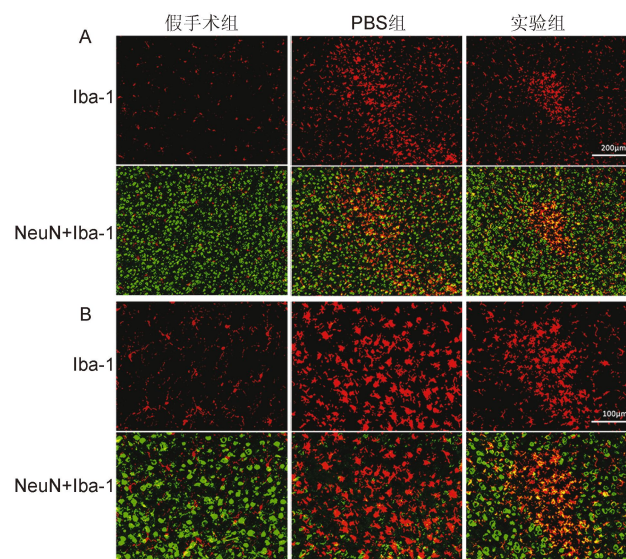
2 各组脑梗死体积比较 (图 2) 假手术组未发现梗死灶。实验组梗死体积为 $(222.39 \pm 20.26) \mu\text{m}^3$, PBS 组梗死体积比平均为 $(317.23 \pm 20.29) \mu\text{m}^3$ 。与 PBS 组比较, 实验组小鼠大脑皮层梗死体积减少 ($t = 9.356, P < 0.01$)。



注: A 为假手术组; B 为 PBS 组; C 为实验组; 图中用黑色虚线所画的区域内即为梗死病变区, 此处以增生的胶质细胞及核固缩的神经元为特征

图 2 各组小鼠大脑皮层梗死情况比较 (HE, $\times 200$)

3 各组小胶质细胞活化和神经元丢失比较 (图 3) 假手术组无神经元的丢失, 小胶质细胞呈现无活化的正常形态; PBS 组出现大量神经元丢失; 实验组神经元丢失较 PBS 组减少。实验组浸润的小胶质细胞数量为 (43.63 ± 7.67) , PBS 组的为 (101.63 ± 9.16) 。与 PBS 组比较, 实验组活化小胶质细胞数量减少 ($t = 13.727, P < 0.01$)。

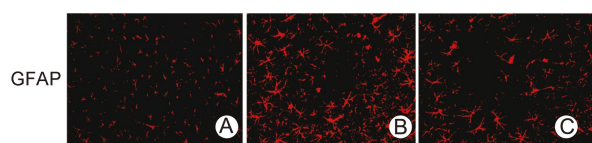


注: 使用 Iba-1 和 NeuN 免疫荧光染色观察, 可见微梗死区出现大量活化的小胶质细胞 (红色的) 的浸润和神经元 (绿色的) 的丢失; A 放大倍数为 $\times 100$, B 放大倍数为 $\times 200$

图 3 各组神经元丢失以及小胶质细胞活化比较 (免疫荧光)

4 各组星形胶质细胞计数比较 (图 4) 免疫荧光染色观察显示, 假手术组可见星形胶质细胞呈现未激活的正常形态, PBS 组和实验组有过度活化的星形胶质细胞环绕。实验组过度活化星形胶质细胞数量为 (226.13 ± 23.36) , PBS 组为 (454.50 ± 32.43) 。与 PBS 组比较, 实验组过度活化星形胶质细胞减少 ($t = 16.162, P < 0.01$)。

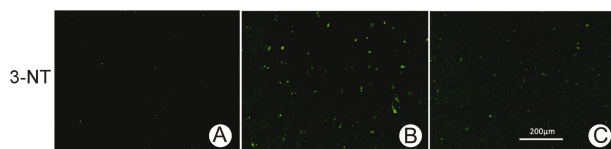
5 各组 3-NT 沉积比较 (图 5) 3 组小鼠大脑皮层组织均见有 3-NT 的沉积。假手术、PBS、实验组 3-NT



注:红色为星形胶质细胞;A 为假手术组;B 为 PBS 组;C 为实验组

图 4 各组梗死区域过度激活星形胶质细胞数量比较 (免疫荧光, $\times 200$)

的沉积数量分别为 (8.00 ± 1.48) 、 (98.38 ± 9.10) 、 (29.75 ± 4.03) 。与假手术组比较, PBS 组 3-NT 沉积增多 ($t=23.96, P<0.01$); 与 PBS 组比较, 实验组 3-NT 沉积减少 ($t=19.475, P<0.01$)。



注:绿色为 3-NT 的沉积;A 为假手术组;B 为 PBS 组;C 为实验组

图 5 各组 3-NT 沉积比较 (免疫荧光, $\times 200$)

讨 论

适合的 CMI 动物模型对研究药物的作用非常重要,既往动物模型是通过向颈内动脉注射胆固醇晶体,使之堵塞小血管后行成多发微梗死灶,但此法缺乏模型一致化的控制^[6]。利用双光子显微镜建立的 CMI 模型精准度高,稳定性强,目前已经研究使用本模型进行微梗死与认知功能缺损机制方面的研究^[14]。笔者利用双光子显微镜成功建立了小鼠大脑皮层微梗死模型,并进行了 CMI 治疗方面的研究^[11,15]。该模型病理特点为神经元死亡,并伴随着胶质细胞过度活化的炎症反应,与 CMI 病理表现一致^[16]。小胶质细胞在正常脑组织中处于一种静息状态,但在脑缺血后可被激活,释放炎症因子引起炎症反应,导致神经细胞凋亡^[17]。正常来讲,星形胶质细胞对神经元具有保护和支持作用,但过度活化后不但会失去这种保护作用,而且对神经元有害^[18]。氧化应激反应中的自由基如一氧化氮 (nitric oxide, NO)、过氧化物等,可能在缺血性脑损伤的发病机制中起关键作用^[19]。3-NT 由 NO、过氧化物和蛋白质相互作用生成,能够反应体内氧化应激和硝化应激的反应程度^[20]。研究表明,抑制炎症和氧化应激能够减少神经元的死亡,减小微梗死体积^[15]。

既往研究表明, EGb761 具有抗神经元凋亡、抗氧化和抗炎的特性^[21,22]。EGb761 也已被证明可以减少局灶性脑缺血引起的神经元死亡^[23,24]。在小鼠大

鼠中动脉阻塞模型上, EGb761 预处理使脑梗死体积减小了 48.2%^[9]。

本研究利用双光子显微镜成功诱导小鼠 CMI 模型,发现 EGb761 预处理后较 PBS 组 CMI 体积减少。PBS 组 CMI 区可观察到神经元丢失, EGb761 预处理后神经元丢失减少。此外,活化的小胶质细胞浸润及梗死周围区域环绕着大量活化的星形胶质细胞,提示炎症参与微梗死的病理生理,而 EGb761 能够改善相关病理变化。另外,研究还发现 EGb761 预处理减少了微梗死区 3-NT 的沉积,这可能是 EGb761 减轻 CMI 的另一机制。

本实验证实 EGb761 预处理可以减轻 CMI 梗死体积,同时抑制了梗死及周边区域的小胶质细胞活化浸润、星形胶质细胞的过度激活以及 3-NT 沉积。本实验的不足之处在于未涉及小鼠 CMI 的认知功能改变以及对 EGb761 预处理的效应。由于 CMI 与痴呆之间有如此密切的相关性,如果 EGb761 可通过减轻 CMI 来改善认知功能,那将对痴呆患者大有裨益,课题组将针对此方面进一步研究。

利益冲突: 本文章无任何利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Brundel M, de Bresser J, van Dillen JJ, et al. Cerebral microinfarcts: a systematic review of neuropathological studies [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32(3): 425-436.
- [2] van Veluw SJ, Shih AY, Smith EE, et al. Detection, risk factors, and functional consequences of cerebral microinfarcts [J]. Lancet Neurol, 2017, 16(9): 730-740.
- [3] Corrada MM, Sonnen JA, Kim RC, et al. Microinfarcts are common and strongly related to dementia in the oldest-old: The 90+ study [J]. Alzheimers Dement, 2016, 12(8): 900-908.
- [4] Xiong L, van Veluw SJ, Bounemina N, et al. Cerebral cortical microinfarcts on magnetic resonance imaging and their association with cognition in cerebral amyloid angiopathy [J]. Stroke, 2018, 49(10): 2330-2336.
- [5] O'Brien JT, Thomas A. Vascular dementia [J]. Lancet, 2015, 386(10004): 1698-1706.
- [6] Wang M, Iliff JJ, Liao Y, et al. Cognitive deficits and delayed neuronal loss in a mouse model of multiple microinfarcts [J]. J Neurosci, 2012, 32(50): 17948-17960.

- [7] Taylor ZJ, Hui ES, Watson AN, et al. Microvascular basis for growth of small infarcts following occlusion of single penetrating arterioles in mouse cortex[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2016, 36(8): 1357–1373.
- [8] Zhang Y, Liu J, Yang B, et al. *Ginkgo Biloba* extract inhibits astrocytic lipocalin-2 expression and alleviates neuroinflammatory injury via the JAK2/STAT3 pathway after ischemic brain stroke[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 518.
- [9] Li MZ, Zhang Y, Zou HY, et al. Investigation of *Ginkgo Biloba* extract (EGb 761) promotes neurovascular restoration and axonal remodeling after embolic stroke in rat using magnetic resonance imaging and histopathological analysis[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 989–1001.
- [10] Yang G, Pan F, Parkhurst CN, et al. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice[J]. Nat Protoc, 2010, 5(2): 201–208.
- [11] 史涛涛, 罗世坚, 唐超刚, 等. 双光子显微镜飞秒激光照射建立小鼠大脑皮质微梗死模型[J]. 国际脑血管病杂志, 2017, 25(5): 425–430.
- [12] Summers PM, Hartmann DA, Hui ES, et al. Functional deficits induced by cortical microinfarcts[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37(11): 3599–3614.
- [13] Shih AY, Nishimura N, Nguyen J, et al. Optically induced occlusion of single blood vessels in rodent neocortex[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2013, (12): 1153–1160.
- [14] Shih AY, Blinder P, Tsai PS, et al. The smallest stroke: occlusion of one penetrating vessel leads to infarction and a cognitive deficit[J]. Nat Neurosci, 2013, 16(1): 55–63.
- [15] Zhang Q, Lan Y, He XF, et al. Allopurinol protects against ischemic insults in a mouse model of cortical microinfarction[J]. Brain Res, 2015, 1622: 361–367.
- [16] Arvanitakis Z, Leurgans SE, Barnes LL, et al. Microinfarct pathology, dementia, and cognitive systems[J]. Stroke, 2011, 42(3): 722–727.
- [17] Kuboyama K, Harada H, Tozaki-Saitoh H, et al. Astrocytic P2Y(1) receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2011, 31(9): 1930–1941.
- [18] Ding S. Dynamic reactive astrocytes after focal ischemia[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(23): 2048–2052.
- [19] Chen SD, Yang DI, Lin TK, et al. Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1alpha and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia[J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(10): 7199–7215.
- [20] Teixeira D, Fernandes R, Prudencio C, et al. 3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges[J]. Biochimie, 2016, 125: 1–11.
- [21] Mdzinarishvili A, Sumbria R, Lang D, et al. *Ginkgo* extract EGb761 confers neuroprotection by reduction of glutamate release in ischemic brain[J]. J Pharm Pharm Sci, 2012, 15(1): 94–102.
- [22] Sung JH, Shah FA, Cho EH, et al. *Ginkgo Biloba* extract (EGb 761) prevents the ischemic brain injury-induced decrease in parvalbumin expression[J]. Lab Anim Res, 2012, 28(2): 77–82.
- [23] Zhou X, Qi Y, Chen T. Long-term pre-treatment of antioxidant *Ginkgo Biloba* extract EGb-761 attenuates cerebral-ischemia-induced neuronal damage in aged mice[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 85: 256–263.
- [24] 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.

(收稿: 2018-09-12 在线: 2020-03-02)

责任编辑: 邱禹