



Antithrombotic Effect of *Ginkgo biloba* Extract: a Study Based on Network Pharmacological Analysis and *In Vivo* Experiments

Hong-wei YANG¹, Han-lei YANG¹, Wang-wen MA²,
Ke YANG³, Jun-hua LIAO⁴ & Yan-ping ZHAO^{2*}

¹ Clinical Laboratory, Suzhou Kowloon hospital.
Suzhou, Jiangsu 215127, China;

² Health Management Center, Suzhou Kowloon hospital.
Suzhou, Jiangsu 215127, China;

³ SysCan BioTech (SuZhou) CO., LTD.
Suzhou, Jiangsu 215163, China;

⁴ Guangzhou Yujia Biotechnology Co., Ltd,
Guangzhou 510300, Guangdong, China.

SUMMARY. *Ginkgo biloba*, a deciduous tree native to China, has been revered for centuries in traditional medicine for its therapeutic properties. Among its many purported benefits, GBE has garnered significant attention for its potential antithrombotic effects. We aimed to explore the effect and mechanism of *Ginkgo biloba* extract (GbE) against thrombosis. The active components of GbE, the target genes corresponding to the active components of GbE and thrombosis-related targets were obtained through online database. Next, the functional enrichment analyses of gene ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes were performed. Protein-protein interaction network and drug-active component-target gene-signaling pathway network were constructed, and the core target genes and pathways were analyzed. Subsequently, a rat model of deep vein thrombosis (DVT) was established by ligating the inferior vena cava. After that, H&E staining was used to evaluate the vascular endothelial structure. Later, antithrombotic factors nitric oxide (NO), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), and prostaglandin I₂ (PGI₂) in the plasma, the level of fibrinogen (FIB), and the activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and thrombin time (TT) were measured. Besides, western blot was used to detect the expression of the PI3K/AKT signaling pathway-related proteins. GbE mainly consisted of 27 active components, including 4727 target genes. In addition, 2462 targets related to thrombosis were obtained, after intersection, 974 common targets of GbE and thrombosis were acquired. According to interaction networks, the core targets such as AKT1, ALB, GAPDH, TNF and IL6 were mainly enriched in the PI3K-AKT signaling pathway and AGE-RAGE signaling pathway. Molecular docking results showed good binding activity of the main active components of GbE to core targets. Additionally, *in vivo* experiments proved that GbE treatment significantly relieved the vascular lesions of DVT rats, reduced the thrombotic wet weight ($p < 0.01$), increased the expression of NO, cGMP and PGI₂ in the plasma ($p < 0.01$), decreased the content of FIB, and prolonged the APTT, PT and TT ($p < 0.05$). Additionally, western blot showed that GbE significantly inhibited the ratio of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT in venous tissues of DVT rats. GbE treatment can inhibit thrombosis by increasing the level of antithrombotic factors and reducing coagulation function, which may be achieved by reducing the PI3K/AKT signaling pathway activity.

RESUMEN. *Ginkgo biloba*, un árbol de hoja caduca originario de China, ha sido venerado durante siglos en la medicina tradicional por sus propiedades terapéuticas. Entre sus muchos supuestos beneficios, el GBE ha atraído una atención significativa por sus posibles efectos antitrombóticos. Nuestro objetivo era explorar el efecto y el mecanismo del extracto de *Ginkgo biloba* (GbE) contra la trombosis. Los componentes activos de GbE, los genes diana correspondientes a los componentes activos de GbE y las dianas relacionadas con la trombosis se obtuvieron a través de una base de datos en línea. A continuación, se realizaron los análisis de enriquecimiento funcional de la ontología genética y la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. Se construyeron una red de interacción proteína-proteína y una red de vías de señalización del gen objetivo-componente activo del fármaco, y se analizaron los genes y vías objetivo principales. Posteriormente, se estableció un modelo de trombosis venosa profunda (TVP) en ratas median-

KEY WORDS: *Ginkgo biloba* extract (GbE), network pharmacology, PI3K/AKT signaling pathway, thrombosis.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: Yanpingz967@outlook.com

te la ligadura de la vena cava inferior. Después de eso, se utilizó tinción H&E para evaluar la estructura endotelial vascular. Posteriormente, los factores antitrombóticos óxido nítrico (NO), monofosfato de guanosín cíclico (cGMP) y prostaglandina I₂ (PGI₂) en el plasma, el nivel de fibrinógeno (FIB) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), tiempo de protrombina (PT) y se midieron el tiempo de trombina (TT). Además, se utilizó Western blot para detectar la expresión de las proteínas relacionadas con la vía de señalización PI3K/AKT. GbE constaba principalmente de 27 componentes activos, incluidos 4727 genes diana. Además, se obtuvieron 2462 objetivos relacionados con la trombosis, tras la intersección se adquirieron 974 objetivos comunes de GbE y trombosis. Según las redes de interacción, los objetivos principales como AKT1, ALB, GAPDH, TNF e IL6 se enriquecieron principalmente en la vía de señalización PI3K-AKT y la vía de señalización AGE-RAGE. Los resultados del acoplamiento molecular mostraron una buena actividad de unión de los principales componentes activos de GbE a los objetivos centrales. Además, los experimentos in vivo demostraron que el tratamiento con GbE alivió significativamente las lesiones vasculares de las ratas con TVP, redujo el peso húmedo trombótico ($p < 0,01$), aumentó la expresión de NO, cGMP y PGI₂ en el plasma ($p < 0,01$), disminuyó el contenido de FIB, y prolongaron el APTT, PT y TT ($p < 0,05$). Además, la transferencia Western mostró que GbE inhibía significativamente la proporción de p-PI3K/PI3K y p-AKT/AKT en tejidos venosos de ratas con TVP. El tratamiento con GbE puede inhibir la trombosis aumentando el nivel de factores antitrombóticos y reduciendo la función de la coagulación, lo que puede lograrse reduciendo la actividad de la vía de señalización PI3K/AKT.
