

## 银杏酮酯速释微丸和缓释微丸对脑缺血再灌注大鼠缺氧损伤的影响

郭莹, 陈芝, 唐超园, 俞建东, 祝丽欣, 熊阳\*

(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

**摘要:** **目的** 探讨银杏酮酯 (*Ginkgo biloba* extract) 缓释微丸和速释微丸对大鼠大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 所致缺血损伤的神经保护作用及释药速度对药效的影响。**方法** 36只雄性SD大鼠分为速释微丸组、缓释微丸组、模型对照组及假手术组。除假手术组, 其他组大鼠采用插线法制备MCAO。灌胃7d后, 采用5分行为指标评分, 记录脑质量, 采用TTC染色测定脑梗死范围。取脑组织测定一氧化氮(NO)、一氧化氮合成酶(NOS)、乳酸(LD)及乳酸脱氢酶(LDH)的含有量及活性。**结果** 速释微丸组大鼠的行为指标评分、脑指数、NO含有量与模型组相比有显著性差异, LD含有量具有极显著性差异; 而缓释微丸组与模型组相比, 其NO含有量, 诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、总一氧化氮合酶(TNOS)、LDH活性具有显著性差异, 行为指标评分、脑指数和LD含有量具有极显著性差异。缓释微丸组和速释微丸比较, 脑梗死率具有显著性差异, 缓释微丸相比速释微丸组效果更好。**结论** 对于脑缺血再灌注的防治, 银杏酮酯可能制备成缓释制剂效果更理想。

**关键词:** 银杏酮酯; 缓释微丸; 速释微丸; 大脑中动脉栓塞

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)02-0250-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.02.004

## Effects of immediate-release- and sustained-release pellets of *Ginkgo biloba* extract for cerebral ischemia injury in rats with hypoxia

GUO Ying, CHEN Zhi, TANG Chao-yuan, YU Jian-dong, ZHU Li-xin, XIONG Yang\*

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To investigate the neuroprotective effects of immediate-release- and sustained-release pellets of *Ginkgo biloba* extract (GBE) against acute middle cerebral artery occlusion (MACO) in rats. **METHODS** Thirty-six male SD rats were divided into immediate-release pellets group, sustained-release pellets group, model group and sham-operated group. All groups except the sham-operated group underwent right MACO using an intraluminal thread. After intragastric gavage for seven days, the neurologic score, infarct size measured by TTC staining, brain weight, nitric oxide (NO), nitric oxide synthase (NOS), lactic acid (LD) and lactate dehydrogenase (LDH) in brain were evaluated for different groups. **RESULTS** Compared with the model group, the neurologic score, cerebral index and LD level showed statistical differences, and NO level had significant statistical differences in rats pre-treated by immediate-release pellets of GBE. While in rats pretreated by sustained-release pellets of GBE, the levels of NO and LDH, the activities of iNOS and TNOS showed the statistical differences, the neurologic score, cerebral index and LD level had significant statistical differences compared with the model group. Comparing between the two treated groups, the cerebral infarction rate in sustained-release pellets of GBE group performed better than that in the immediate-release pellets of GBE group. **CONCLUSION** GBE sustained-release pellets would be better than GBE immediate-release pellets when used for protecting and treating cerebral ischemia

收稿日期: 2016-09-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81202926, 81473434, 81503206)

作者简介: 郭莹(1978—), 女, 副教授, 博士, 从事中医药防治脑血管病研究。Tel: (0571) 86613713, Email: littlegly@163.com

\*通信作者: 熊阳(1979—), 女, 教授, 博士, 研究方向为中药新剂型及新型给药系统开发。Tel: (0571) 61768158, E-mail: xyxn@126.com

reperfusion injury.

**KEY WORDS:** *Ginkgo biloba*; sustained-release pellets; immediate-release pellets; middle cerebral artery occlusion

脑缺血再灌注是一种临床常见疾病,其机制较为复杂,主要是与自由基过度形成、兴奋性氨基酸毒性作用、细胞内钙超载、炎症反应等多种机制有关<sup>[1]</sup>。其中神经细胞凋亡是脑缺血/再灌注损伤后出现的最重要的形式,神经元的损伤、坏死、凋亡等与活性氧引发的脂质过氧化密切相关,而抗氧化剂可以通过提高抗氧化酶、清除自由基等途径有效地阻断或防止这一过程<sup>[2-3]</sup>。

银杏叶提取物(*Ginkgo biloba* extract, GBE)是治疗心脑血管疾病的常用原料药<sup>[4-5]</sup>,其主要有效成分为黄酮类和萜内酯<sup>[6]</sup>。GBE能有效清除氧自由基和过多的NO,防止脑缺血造成的细胞膜离子转运紊乱,阻止细胞内钙超载,保护脑细胞<sup>[7]</sup>,增加脑血流,改善脑血管循环等功能。尽管GBE治疗脑血管疾病疗效确切,但是目前市场上GBE的相关已上市制剂或其研究报道很多,有速释制剂,如银杏酮酯分散片<sup>[8-9]</sup>和缓释制剂<sup>[10-11]</sup>,但是很少有报道对于脑缺血再灌注的防治,到底缓释制剂还是速释制剂的效果更理想。

因此本研究采用插线法阻塞大鼠大脑中动脉(MCAO)制备局灶性脑缺血模型,考察了速释和缓释2种不同释药速度的银杏酮酯微丸抗局灶性脑缺血的效果,初步探讨GBE微丸释药速度与药效之间的关系。

## 1 材料与方 法

1.1 动物 SD大鼠,雄性,体质量为220~250g,浙江中医药大学动物实验研究中心提供。

1.2 药物与试剂 银杏酮酯(上海得恩德医药科技有限公司,批号20130228);银杏酮酯速释和缓释微丸(自制,批号20140312);一氧化氮(NO)检测试剂盒、一氧化氮合成酶(NOS)检测试剂盒、乳酸(LD)检测试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒、TTC染色检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所);羧甲基淀粉钠(烟台金昱变性淀粉有限公司);微晶纤维素(美国FMC公司惠赠);尤特奇RL30D、尤特奇RS30D(德国罗姆公司);柠檬酸三乙酯(昌乐屹立化工有限公司);吐温-80、硬脂酸甘油酯(上海强顺化学试剂有限公司);甲基硅油(杭州树脂总厂);其余试剂均

为市售分析纯。

1.3 仪器 80-2离心沉淀机(上海手术器械厂);UV759s紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);550酶标测定仪(日本Bio-red公司);DK-S24电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);DGG-9070B电热鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司);KQ5200DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);JHQ-100流化沸腾颗粒包衣机(辽宁医联新药技术研究所);Mini-250低温挤出滚圆微丸机(深圳市信宜特制药设备有限公司);JA203H电子分析天平(常州市幸运电子设备有限公司)。

### 1.4 银杏酮酯缓释微丸的制备

1.4.1 速释微丸的制备<sup>[12]</sup> 采用挤出滚圆法,称取适量GBE与辅料混匀,加适量润湿剂制成软材,经过筛选和优化,确定速释丸芯的基本处方为GBE 40%,微晶纤维素(MCC)58%,羧甲基淀粉钠2%;挤出速度50 Hz、滚圆速度为40 Hz,滚圆时间为5 min,该法制备的微丸粉体学性质、收率和溶出结果的平行性较好,微丸中黄酮类成分和内酯类成分均在2 h内快速释放并且体外累积释放率达到80%上。

1.4.2 缓释微丸的制备<sup>[12]</sup> 采用尤特奇RS/RL30 D作为包衣材料,流化床包衣法对“1.4.1”中速释丸芯进行包衣,通过筛选和优化后的处方工艺为Eudragit RS 30 D 4.5 g、Eudragit RL 30 D 0.5 g、柠檬酸三乙酯(TEC)0.3 g、硬脂酸甘油酯(GMS)0.075 g、聚山梨酯800.06 g;蒸馏水10 mL。包衣工艺为鼓风机频率为35 Hz,喷气压力为20 kPa,蠕动泵转速为0.4~1.5 r/min,熟化时间24 h。结果微丸中黄酮类成分和内酯类成分均在12 h内达到缓慢释放并且体外累积释放率达到80%以上。

### 1.5 大鼠脑缺血实验与相关指标的检测和统计

1.5.1 动物分组及给药 SD大鼠随机分为速释微丸组、缓释微丸组、模型组、假手术组,每组各9只,分别给予相应的银杏酮酯微丸24 mg/(kg·d),模型组及假手术组分别给予含等量MCC的生理盐水。

1.5.2 脑缺血大鼠模型的制备 灌胃7 d后,参

考 Longa 法<sup>[13]</sup>对 GBE 速释微丸组、GBE 缓释微丸组、模型组的大鼠进行 MCAO 造模。大鼠经 20% 乌拉坦 (5 mL/kg) 腹腔注射麻醉后仰卧位固定, 在颈部正中做约 1.5 cm 长的切口, 依次暴露右侧颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA) 和颈内动脉 (ICA), 手术线结扎 CCA 的近心端及 ECA 分叉端。夹闭颈内动脉, 在颈外动脉上剪一小口, 将圆口端的栓线 (直径 0.24 mm) 插入小口向 ICA 缓慢送入, 进线约 18 mm 略感到阻力后固定栓线。缺血后 1.5 h, 轻轻拉出栓线并缝合皮肤。假手术组动物除不插入栓线外, 其余所有操作均同手术组。

1.5.3 行为指标评分 参考 Longa 等 5 分制评分法于大鼠手术后 24 h 进行行为评分。无精神损伤症状为 0 分; 不能完全伸展对侧前爪为 1 分; 向对侧转圈为 2 分; 向对侧倾倒是 3 分; 不能自发行走, 意识丧失为 4 分。

1.5.4 脑梗死率测定 缺血 24 h 后麻醉大鼠, 开胸, 穿针于心脏左心室并剪开右心耳, 用生理盐水冲洗, 然后断头取脑, 精密称取脑质量, -20 °C 速冻 20 min, 从额极向枕极作厚度为 2 mm 的冠状切片 6 片, 立即置于 TTC 染色液中, 37 °C 避光孵育 25 min。吸走染液, 洗掉切片表面多余的染液, 再用 10% 多聚甲醛固定, 采用自制软件计算全脑面积和梗死面积, 得出脑梗死率。

1.5.5 观察指标及检测方法 取缺血侧半脑分离出脑皮质组织, 冰水浴下用 9 倍体积生理盐水制成 10% 的组织匀浆, 2 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 供脑皮质中 NO、NOS、LD、LDH 及蛋白含量检测用。

1.5.6 统计学分析 实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析, 组间均数比较采用单因素方差分析 (one way ANOVA) 和 LSD 检验, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 脑梗死率测定 TTC 有氧化型和还原型 2 种状态, 氧化型呈无色, 还原型呈红色。正常脑组织内含还原型尼克酰胺腺苷二核苷酸 (NADPH), 能将无色的氧化型 TTC 还原成红色。脑缺血后, 梗塞区域的神经细胞缺血坏死, NADPH 丧失, 不能将 TTC 还原, 该区域脑组织呈灰白色, 从而可区分梗塞区与正常区<sup>[14]</sup>。TTC 染色结果表明, 模型组可见明显的白色梗死区, 说明大鼠大脑中动脉栓塞模型已造成功。经过 GBE 微丸给药 7 d 后的造模组, 白色的梗死区明显减小 (见图 1)。从脑梗死率结果来看, 与模型组相比, 缓释微丸组和速释微丸组均有显著性下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。两治疗组比较, 缓释微丸组效果更好, 统计学具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。

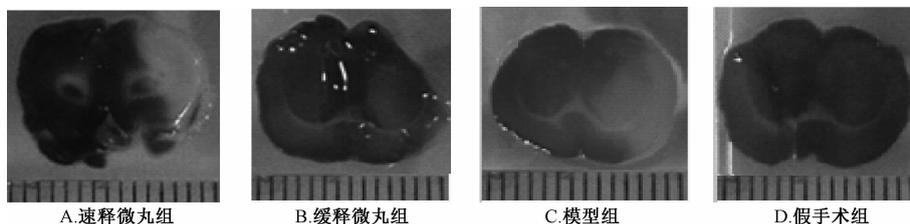


图 1 TTC 染色后各组脑片观察

Fig. 1 Observation of brain slice after TTC staining

表 1 各组大鼠脑梗死率结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Results of rat infarction rate ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	假手术组	模型组	速释微丸组	缓释微丸组
脑梗死率/%	0.00 ± 0.00	27.2 ± 0.05 **	25.4 ± 0.06 #	9.2 ± 0.03 ### △△

注: 与假手术组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.01$ ; 与速释微丸组比较, △△ $P < 0.01$

2.2 大鼠行为指标评分及脑指数结果 模型组大鼠的行为障碍、脑指数明显大于假手术组 ( $P < 0.01$ ), 说明造模成功; 预先给予 GBE 微丸的组别可改善大鼠的行为障碍, 与模型组比较, 速释微丸组行为和脑指数有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 缓释微丸组行为和脑指数均具有极显著性差异

( $P < 0.01$ ), 速释微丸和缓释微丸 2 组比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

2.3 脑皮质 NO 含量及 NOS 活性 与假手术组比较, 模型组 NO 含量、TNOS 活性、iNOS 活性显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 速释微丸组 NO 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ), 缓释微丸组

表2 各组大鼠行为指标评分及脑指数结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Results of rat behavioral index scores and brain index ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	行为指标评分/分	脑指数/( $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ )
假手术组	0.000 ± 0.000	0.743 5 ± 0.003 0
模型组	3.333 ± 1.033 **	0.865 3 ± 0.067 2 **
速释微丸组	2.500 ± 0.548 #	0.802 9 ± 0.024 0 #
缓释微丸组	2.286 ± 0.488 ##	0.783 7 ± 0.038 3 ##

注:与假手术组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$

NO 含有量、TNOS 活性、iNOS 活性与模型组相比均明显降低 ( $P < 0.05$ )。缓释微丸和速释微丸 2 组之间无显著统计学差异 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

表3 各组大鼠脑皮质 NO、NOS 检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 Results of rat NO of cerebral cortex and NOS detection ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	NO/ ( $\text{mmol} \cdot \text{g prot}^{-1}$ )	TNOS/ ( $\text{U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ )	iNOS/ ( $\text{U} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ )
假手术组	0.039 6 ± 0.002 1	1.4535 ± 0.052 6	0.255 6 ± 0.048 4
模型组	0.080 2 ± 0.011 0 **	2.932 6 ± 0.168 2 **	0.597 2 ± 0.058 3 **
速释微丸组	0.053 7 ± 0.012 3 #	2.817 2 ± 0.383 0	0.549 3 ± 0.083 9
缓释微丸组	0.053 0 ± 0.003 7 #	2.437 4 ± 0.207 4 #	0.474 3 ± 0.075 2 #

注:与假手术组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$

2.4 脑皮质 LD 含有量及 LDH 活性 与假手术组相比,模型组 LD 含有量显著增加 ( $P < 0.01$ ),LDH 活性显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,速释微丸组 LD 含有量显著降低 ( $P < 0.01$ );缓释微丸组 LD 含有量显著降低 ( $P < 0.01$ ),LDH 活性显著升高 ( $P < 0.05$ ),速释微丸组和缓释微丸组 LD 含有量没有统计学差异。见表 4。

表4 各组大鼠脑皮质 LD、LDH 检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 4 Results of rat LD of cerebral cortex and LDH detection ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	LD/( $\text{mmol} \cdot \text{g prot}^{-1}$ )	LDH/( $\text{U} \cdot \text{g prot}^{-1}$ )
假手术组	0.073 3 ± 0.013 6	0.027 7 ± 0.000 8
模型组	0.208 3 ± 0.012 6 **	0.021 7 ± 0.002 5 **
速释微丸组	0.142 5 ± 0.066 6 ##	0.024 6 ± 0.001 1
缓释微丸组	0.165 0 ± 0.070 7 ##	0.025 7 ± 0.001 7 #

注:与假手术组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$

### 3 讨论

在体外溶出度试验中,银杏酮酯速释微丸成分在 2 h 之内溶出度达到 80%,而缓释微丸在 12 h 之内溶出 80% 左右。但根据课题组先前的体内药物动力学实验证明,缓释微丸组药动学参数进行分析发现黄酮醇苷类(槲皮素、异鼠李素)具有较显著的缓释作用,而萜类内酯(银杏内酯 A、银杏

内酯 B、银杏内酯 C、白果内酯)缓释作用不明显。而我们在采用血脑同步微透析方法研究了大鼠口服给药银杏酮酯后黄酮类和内酯类成分在血液和脑中的药物浓度及药物分布系数。结果发现黄酮类成分无法在脑中检测到。内酯类成分除白果内酯只能在血液中检测到外,银杏内酯 A、B、C 在脑部和血液中均可以检测得到。这可能是由于黄酮类成分极性和分子量相对较大,肠渗透性和透过血脑屏障的比例都很小,加上代谢不稳定,因此无法测定得到。而内酯类成分的分子量和极性相对较小,因此吸收入肠和入脑的量相比黄酮类成分大大增加,也说明采用银杏酮酯治疗脑部疾病主要起作用的可能是内酯类成分。因此,综合以前的实验结果,在本实验中缓释微丸组和速释微丸组在大部分药效指标上无显著性差异可能与以上原因相关,而且本试验中是采用先给药 7 d 后然后造模的方式,这可能会降低 2 组之间药效的差异化。

由于脑组织完全依赖血液供给氧和葡萄糖,缺血时氧供应阻断,脑组织只能通过无氧代谢补充能量,造成无氧代谢产物的堆积<sup>[15]</sup>。研究显示,脑缺血再灌注损伤可使大脑皮质 LD 含有量急剧升高,而银杏酮酯微丸明显减少了脑皮质 LD 的含有量,提示银杏酮酯速释和缓释微丸对脑缺血再灌注损伤均有明显的缓解作用,并且均与其能够降低脑无氧代谢产物水平有关。LDH 是一种和葡萄糖代谢有关的酵素,它广泛存在于身体各器官组织,几乎身体的细胞受到伤害或死亡都会释放出 LDH,本研究观察到速释微丸组 LDH 虽有变化趋势,但与模型组相比并无统计学意义,而缓释微丸组 LDH 降低较为明显,说明缓释微丸组保护脑细胞的作用更好。

NO 是以 L-精氨酸为底物,在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化下产生的。在脑缺血/再灌注中 NO 有神经毒性和神经保护双重作用,低浓度扩张血管、改善缺血组织血供、抑制血小板聚集、减轻缺血/再灌注损伤,具有一定的神经保护作用;高浓度参与脑缺血急性脑损伤与迟发神经元死亡过程,即诱导神经细胞凋亡<sup>[16]</sup>。但由于 NO 极不稳定,且半衰期仅数秒钟,于是研究主要集中在催化作用的 iNOS 上, iNOS 只是在细胞受到刺激而被激活才发挥功效,它的激活不依赖  $\text{Ca}^{2+}$ , 受内毒素及细胞因子刺激时, iNOS 激活持续产生大量的 NO<sup>[17]</sup>, 发挥细胞毒性作用。而过量的 NO 能与超氧阴离子形成 ONOO<sup>-</sup> 和 OH<sup>-</sup>, 导致

DNA 氧化, 抑制 DNA 修复酶的作用, 损伤线粒体膜, 使线粒体形成漏道, 开放线粒体转换孔, 使细胞能量衰竭<sup>[18]</sup>。本研究表明, 经银杏酮酯微丸干预后, 可明显抑制 iNOS 活性和 TNOS 的量, 从而降低 NO 的生成, 这说明银杏酮酯微丸对急性脑缺血神经元具有保护作用, 其机制可能与增加局部血流与抑制 iNOS 活力表达有关。

本实验中, 采取先给药 7 d 然后造模的方式, 7 d 时间略偏短, 但是由于不能破坏缓释微丸的包衣层, 只能以整体微丸灌胃, 要采取比较特殊的方式和自制的灌胃针, 相对操作比较困难, 而且对大鼠的食道有一定的损伤, 因此只采取预先灌胃 7 d 的方法, 但由于剂量较大, 因此相对于模型组效果还是比较明显。

#### 参考文献:

[ 1 ] 王立英, 杨世杰. 脑缺血-再灌注损伤机制及其药物治疗方法的研究进展[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2012, 38(6): 1227-1231.

[ 2 ] Kang C, Cho W, Park M, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-triggered bubble generating antioxidant polymeric nanoparticles as ischemia/reperfusion targeted nanotheranostics [J]. *Biomaterials*, 2016, 85: 195-203.

[ 3 ] Surapaneni S, Prakash T, Ansari M, et al. Study on cerebroprotective actions of *Clerodendron glandulosum* leaves extract against long term bilateral common carotid artery occlusion in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 80: 87-94.

[ 4 ] Xiao C, Liu F L, Zhang J, et al. EGb761 protects motoneurons against avulsion-induced oxidative stress in rats[J]. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*, 2010, 5: 12.

[ 5 ] Kotl K, Uyar R, Bilge T, et al. Investigation of the dose-dependent antivasospastic effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *J Clin*

*Neurosci*, 2008, 15(12): 1382-1386.

[ 6 ] Beek T A V, Montoro P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2002-2032.

[ 7 ] Pierr S, Jamme I, Robert K, et al. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects Na<sup>+</sup>, K-ATPase isoenzymes during cerebral ischemia[J]. *Cell Mol Biol*, 2002, 48(6): 671-679.

[ 8 ] 李霞, 张弦, 贡联兵. 银杏酮酯分散片的临床应用评价[J]. 中国医院用药评价与分析, 2014, 14(2): 116-118.

[ 9 ] 刘崇应, 梁正勤. 银杏酮酯滴丸的临床应用[J]. 内蒙古中医药, 2012, 31(6): 49.

[ 10 ] 王文平. 热熔挤出技术制备固体分散体和微型骨架缓释片的应用研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.

[ 11 ] 王建筑, 郝吉福, 郭丰广, 等. 银杏叶提取物缓释片的制备[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(16): 1351-1354.

[ 12 ] 祝丽欣, 陈芝, 郭莹, 等. f<sub>2</sub>相似因子法评价银杏酮酯缓释微丸大类成分总黄酮和各类成分的体外释放相关性研究[J]. 中草药, 2015, 46(23): 3482-3488.

[ 13 ] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.

[ 14 ] 王坚苗, 易莉莎. 银杏酮酯卵磷脂复合物对脑缺血损伤的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(5): 291-293.

[ 15 ] 魏延, 沈新南, 麦嘉仪, 等. 番茄红素对脑缺血再灌注大鼠活性氧及缺氧损伤的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2010(1): 34-38.

[ 16 ] Fassbender K, Fatar M, Ragoschke A, et al. Subacute but not acute generation of nitric oxide in focal cerebral ischemia[J]. *Stroke*, 2000, 31(9): 2208-2211.

[ 17 ] 张文杰, 刘冬岩. 灯盏花素联合三七总苷对急性脑梗死大鼠模型 tNOS、iNOS 的影响[J]. 中国中医急症, 2011(4): 603-604.

[ 18 ] 王光胜. 脑缺血/再灌注损伤机制研究进展[J]. 医学综述, 2011, 17(24): 3753-3756.