

脑心痛胶囊对体外模拟脑缺血再灌注损伤大鼠脑微血管内皮细胞的保护作用

刘振权^{1,2a},徐秋萍^{2b},张文生¹,郭建友³,杜树山¹,王树强¹,陈超杰¹,顾彬¹(1. 北京师范大学资源学院资源药物与中药资源研究所,教育部资源药物工程研究中心,北京 100875; 2. 北京中医药大学, a. 基础医学院; b. 中药学院中药药理系,北京 100102; 3. 中国科学院心理研究所,北京 100101)

摘要:目的 观察脑心痛胶囊对体外模拟脑缺血再灌注损伤大鼠脑微血管内皮细胞的保护作用。方法 建立体外培养大鼠脑微血管内皮细胞模拟脑缺血再灌注损伤模型,模拟脑缺血 3 h,再灌注 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 h 后损伤内皮细胞的活性、死亡率变化以及脑心痛胶囊的影响,测定体外培养大鼠脑微血管内皮细胞模拟脑缺血 3 h,再灌注 24 h 时脑心痛胶囊含药血清对细胞裂解液 SOD 活性、MDA 及 NO 含量的影响。结果 体外培养的大鼠脑微血管内皮细胞在模拟缺血再灌注损伤后,细胞内线粒体活力下降,死亡率升高,脑心痛胶囊 0.24, 0.48 g · kg⁻¹ 能不同程度改善细胞损伤 (P < 0.05, P < 0.01),明显提高裂解液中 SOD 活性 (P < 0.05, P < 0.01),降低裂解液中 MDA 和 NO 含量 (P < 0.05, P < 0.01),对大鼠脑微血管内皮细胞模拟脑缺血再灌注损伤有明显的保护作用。结论 脑心痛胶囊对体外培养大鼠脑微血管内皮细胞模拟脑缺血损伤有保护作用,其机制可能与抗脂质过氧化作用有关。

关键词:脑心痛胶囊;脑缺血再灌注损伤;脑微血管内皮细胞;超氧化物歧化酶;丙二醛;一氧化氮

中图分类号: R965 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-2494(2007)10-0733-04

Protective Effect of Naoxintong Capsules on Cultivated Rat Cerebral Microvascular Endothelial Cells Subjected to Simulated Cerebral Ischemia and Reperfusion *in Vitro*

LIU Zhen-quan^{1,2a}, XU Qiu-ping^{2b}, ZHANG Wen-sheng¹, GUO Jian-you³, DU Shu-shan¹, WANG Shu-qiang¹, CHEN Chao-jie¹, GU Bin¹(1. Institute of Natural Medicine and Chinese Medicine Resources, Center for Natural Medicine Engineering Ministry of Education, College of Resource Science & Technology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 2a. School of Basic Medical Sciences; 2b. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 3. Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the protective effects of Naoxintong capsule (NXTJN) on the cultivated rat cerebral microvascular endothelial cells (rCMEC) subjected to simulated cerebral ischemia and reperfusion *in vitro*. **METHODS** rCMEC activity, motility rate and the effects of NXTJN were observed after simulated cerebral ischemia for 3 h and reperfusion for 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 and 72 h, respectively. The change of SOD activity, MDA content and NO content of cell lysate and the effects of NXTJN were observed after simulated cerebral ischemia of 3 h and reperfusion for 24 h. **RESULTS** The rCMEC viability was decreased and the motility rate was increased significantly in various ischemia reperfusion durations and NXTJN could affect the changes in these criteria. NXTJN at the dose of 0.24 and 0.48 g · kg⁻¹ increased the activity of SOD and reduced the content of MDA and NO in lysate of rCMEC subjected to simulated cerebral ischemia for 3 h and reperfusion for 24 h (P < 0.05, P < 0.01). **CONCLUSION** NXTJN protects cerebral ischemia reperfusion injury in rCMEC *in vitro*. And the mechanism is probably related to the suppression of the generation of NO and reduction of lipid peroxide action.

KEY WORDS: naoxintong capsule; cerebral ischemia reperfusion injury; cerebral microvascular endothelial cells; SOD; MDA; NO

缺血性中风具有发病率高、致残率高、死亡率高和复发率高等特点,是威胁人类健康的重大疾病之一,其发病是由于血管阻塞引起脑缺血损伤而致局灶或全脑的功能障碍。治疗时既保证尽早

恢复缺血脑组织的血流,又减轻或防止再灌注损伤的发生,是研究缺血性中风的治疗中亟待解决的重要课题。脑微血管内皮细胞是构成血脑屏障的重要成分,其独特的结构和功能使血脑屏障形

基金项目:北京市教委新医药学科群项目(227105803)

作者简介:刘振权,男,博士 Tel/Fax: (010) 81418532 E-mail: lzbzy@hotmail.com

中国药学杂志 2007年 5月第 42卷第 10期

Chin Pharm J, 2007 May, Vol. 42 No. 10 · 733 ·

成一个限制大多数极性分子和蛋白质运转的选择性低渗透性的屏障,具有维持管壁通透性、防止凝血和血栓形成等重要的生理功能。脑缺血损伤活化的内皮细胞主动参与炎症和免疫反应,进一步加重神经元损伤^[1]。脑心通胶囊由黄芪、丹参、地龙、全蝎等中药组成的复方,近年来临床上应用脑心通胶囊治疗气虚血瘀、脉络闭阻所致中风获得肯定疗效^[2]。前期研究表明,脑心通胶囊能改善局灶性脑缺血再灌注损伤模型大鼠的神经症状,减小脑梗死范围,减少脑组织 L-1、L-6、TNF- α 的含量^[3]。本实验采用原代培养大鼠脑微血管内皮细胞,建立脑微血管内皮细胞模拟脑缺血再灌注损伤模型,研究脑心通胶囊对脑微血管内皮细胞损伤的保护作用及相关机制。

1 材料与试剂

1.1 动物

SD大鼠,雄性,体重 70~80 g[北京维通利华实验动物中心,合格证号:SCXK(京):2002-0003]。

1.2 受试药

脑心通胶囊(陕西咸阳步长制药有限公司。批号:050525)。

1.3 试剂

胎牛血清,胰蛋白酶,M199培养基(Gibco公司);噻唑蓝(MTT),台盼蓝(Sigma公司);青霉素、链霉素(华北制药股份有限公司);肝素钠(鼎国生物技术发展中心);Collagenase(科海生物技术有限公司);胰酶、明胶(欣经科生物技术有限公司);内皮细胞生长因子(Roche公司);普通牛血清,标准胎牛血清(Hyclone公司);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所);其他试剂均为国产分析纯。

1.4 仪器

CJT型超净工作台(北京昌平长城空气净化工程公司);DM LHC倒置显微镜(德国 Leica公司);CO₂培养箱(美国 N.C公司);722型分光光度计(上海第三分析仪器厂);MK3型自动酶标仪(芬兰雷勃公司)。

2 实验方法

2.1 含药血清的制备

正常 SD大鼠,随机分为 3组。正常对照组、脑心通胶囊 0.24 g·kg⁻¹组和脑心通胶囊 0.48 g·kg⁻¹组。药物按剂量,每日分上、下午两次全量灌胃给药,正常组灌服 0.5% cmc,10 mL·kg⁻¹体重,第 5次给药后 2 h颈总动脉取血,4 保存 4 h后离心,

3 000 r·min⁻¹离心 20 min,取上清,混匀,56 灭活 30 min,过滤除菌,分装,-20 贮存。

2.2 大鼠脑微血管内皮细胞(iCMEC)的培养

培养方法参考 Gordon等^[4]的方法,并略加改进。具体操作如下:取 70~80 g雄性 SD大鼠。10%水合氯醛(3.5 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,断头,体积分数为 75%酒精浸泡 3 min,无菌条件下分离鼠脑,在 PBS中清洗一遍后,立刻放入含 8%牛血清冲洗液内,去除大血管、软脑膜、小脑和大脑髓质,收集大脑皮质。在烧杯中剪碎后,经玻璃匀浆器匀浆,经 75 μ m尼龙滤网过滤,收集滤液,再经孔径 145 μ m尼龙滤网过滤,收集网上之血管段。1 500 r·min⁻¹离心 8 min,弃上清,将沉淀悬浮于 0.1%胶原酶液中,吹打后,置 37 水浴中孵育 20 min,再次 1 500 r·min⁻¹离心 5 min,去上清,沉淀用完全培养液悬浮接种于明胶预覆盖的培养瓶中,放入 CO₂培养箱中静置 3 d,然后每 3 d换液 1次。当细胞长成致密单层,出现“铺路石”征象后可进行传代培养。

2.3 原代培养 iCMEC缺氧缺糖再灌注损伤模型的建立和脑心通胶囊的影响

培养的第 4代 iCMEC吸出原培养液,用 PBS液洗涤 2次,加入 6 mL 0.1%胰蛋白酶室温消化,在倒置显微镜下观察,当发现细胞回缩或细胞间隙增大,且有少量细胞因消化而悬浮时,弃胰蛋白酶液,加入完全培养液,轻轻吹打细胞使成细胞悬液,以(3~4) $\times 10^5$ 个细胞·mL⁻¹密度铺到 96孔板中,每孔 150 μ L,细胞培养 1 d后,先用预温的 PBS洗涤培养板两次,然后用 Earle氏液(含糖或不含糖)置换原培养液,将培养板随机分为 4组:正常组:换有糖 Earle氏液(NaCl 116.4 mmol·L⁻¹, KCl 5.4 mmol·L⁻¹, CaCl₂ 1.8 mmol·L⁻¹, MgSO₄ 0.8 mmol·L⁻¹, NaH₂PO₄ 2.6 mmol·L⁻¹, NaHCO₃ 26.2 mmol·L⁻¹, Hepes 20.1 mmol·L⁻¹, Glucose 5.5 mmol·L⁻¹),并始终在正常气体条件下培养;模型组:造模按文献方法稍加改进^[5],换无糖 Earle氏液(NaCl 116.4 mmol·L⁻¹, KCl 5.4 mmol·L⁻¹, CaCl₂ 1.8 mmol·L⁻¹, MgSO₄ 0.8 mmol·L⁻¹, NaH₂PO₄ 2.6 mmol·L⁻¹, NaHCO₃ 26.2 mmol·L⁻¹, Hepes 20.1 mmol·L⁻¹),将培养板放入缺氧罐内,通入 5% CO₂和 95% N₂的混合气体,通气 30 min后,夹闭缺氧罐的进、出口,放入培养箱内 3 h(缺氧缺糖模拟脑缺血状态);脑心通胶囊 0.24 g·kg⁻¹组:造模同模型组;在

换 Earle氏液时加脑心通胶囊 0.24 g · kg⁻¹含药血清 1次; 脑心通胶囊 0.48 g · kg⁻¹组:造模同模型组;在换 Earle氏液时加脑心通胶囊 0.48 g · kg⁻¹含药血清 1次。体外模拟脑缺血 3 h后各组换完全培养液模拟再灌注,其中脑心通胶囊 0.24 g · kg⁻¹组和 0.48 g · kg⁻¹组再加含药血清 1次,然后将培养板放入 37 ℃、5%的 CO₂的培养箱内继续培养 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 h,分别用 MTT法测定各时间点细胞线粒体活力^[6],台盼蓝染色法测定细胞死亡率^[7]。

2.4 脑心通胶囊含药血清对缺氧缺糖再灌注损伤 iCMEC裂解液 SOD活性、MDA及 NO含量的影响

测定体外培养大鼠脑微血管内皮细胞缺氧缺糖(Is) 3 h,再灌注(Rp) 24 h时脑心通胶囊含药血清对细胞裂解液 SOD活性、MDA及 NO含量的影响。测定方法按南京建成生物工程研究所 SOD、MDA及 NO试剂盒说明书操作。

2.5 统计方法

实验数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 软件做统计分析,组间差异比较用单因素方差分析 Student-Newman-Keuls test统计。

3 实验结果

3.1 MTT法测定 iCMEC的活性

模型组培养的 iCMEC活性明显降低,尤其以 Rp-1、Rp-3、Rp-24和 Rp-36 h时 iCMEC活性较低,脑心通胶囊 0.24 g · kg⁻¹组在 Rp-24、Rp-48、Rp-36和 Rp-72 h时对细胞损伤有明显的保护作用,脑心通胶囊 0.48 g · kg⁻¹组在 Is-3、Rp-6、Rp-12、Rp-24、Rp-36、Rp-48和 Rp-72 h与模型组相比较具有显著性差异,对细胞损伤有明显的保护作用。结果见表 1。

3.2 台盼蓝染色测定 iCMEC的死亡率

体外模拟脑缺血再灌注损伤使培养 iCMEC的死亡率明显升高,以 Is-3、Rp-1、Rp-3和 Rp-24 h时 iCMEC的死亡率较高,和正常组比较有显著性差异;用药组可使细胞死亡率降低,NXTJN 0.24 g · kg⁻¹组在 Rp-3、Rp-24、Rp-48、Rp-36和 Rp-72 h时死亡率降低,脑心通胶囊 0.48 g · kg⁻¹组在 Is-3、Rp-1、Rp-3、Rp-12、Rp-24、Rp-36、Rp-48和 Rp-72 h时死亡率降低,和模型组比较均有显著性差异,对 iCMEC模拟脑缺血再灌注损伤有明显的保护作用。结果见表 2。

3.3 脑心通胶囊含药血清对缺氧缺糖再灌注损伤 iCMEC裂解液 SOD活性、MDA及 NO含量的影响

表 1 脑心通胶囊对外模拟脑缺血再灌注损伤大鼠脑微血管内皮细胞活性的影响 . n = 6, $\bar{x} \pm s$

Table 1 Effect of Naoxintong capsules on activity of cerebral microvascular endothelial cell of cerebral ischemia and reperfusion rats *in vitro*. n = 6, $\bar{x} \pm s$

Time points	Control	Vehicle	Naoxintong capsules/g · kg ⁻¹	
			0.24	0.48
Is-3 h	0.639 ± 0.023	0.424 ± 0.034 ¹⁾	0.445 ± 0.031	0.484 ± 0.028 ²⁾
Rp-1 h	0.631 ± 0.021	0.392 ± 0.014 ¹⁾	0.414 ± 0.028	0.429 ± 0.038
Rp-3 h	0.635 ± 0.024	0.373 ± 0.036 ¹⁾	0.383 ± 0.024	0.424 ± 0.036 ²⁾
Rp-6 h	0.626 ± 0.020	0.440 ± 0.026 ¹⁾	0.445 ± 0.032	0.511 ± 0.031 ²⁾
Rp-12 h	0.655 ± 0.021	0.442 ± 0.030 ¹⁾	0.467 ± 0.030	0.499 ± 0.043 ²⁾
Rp-24 h	0.646 ± 0.025	0.395 ± 0.021 ¹⁾	0.463 ± 0.031 ³⁾	0.522 ± 0.029 ³⁾
Rp-36 h	0.608 ± 0.014	0.405 ± 0.021 ¹⁾	0.461 ± 0.033 ³⁾	0.449 ± 0.043 ²⁾
Rp-48 h	0.617 ± 0.018	0.395 ± 0.038 ¹⁾	0.459 ± 0.030 ³⁾	0.502 ± 0.033 ³⁾
Rp-72 h	0.636 ± 0.016	0.467 ± 0.037 ¹⁾	0.513 ± 0.025 ²⁾	0.566 ± 0.027 ³⁾

注:与对照组比较,¹⁾ P < 0.01;与模型组比较,²⁾ P < 0.05,³⁾ P < 0.01

Note: ¹⁾ P < 0.01 vs control group; ²⁾ P < 0.05, ³⁾ P < 0.01 vs vehicle group

表 2 脑心通胶囊对外模拟脑缺血再灌注损伤大鼠脑微血管内皮细胞死亡率的影响 . n = 6, $\bar{x} \pm s$

Table 2 Effect of Naoxintong capsules on mortality of cerebral microvascular endothelial cell of cerebral ischemia and reperfusion rats *in vitro*. n = 6, $\bar{x} \pm s$

Time points	Control	Vehicle	Naoxintong capsules/g · kg ⁻¹	
			0.24	0.48
Is-3 h	11.3 ± 3.0	51.0 ± 6.9 ¹⁾	44.9 ± 8.4	41.8 ± 6.2 ²⁾
Rp-1 h	10.3 ± 3.8	54.6 ± 9.2 ¹⁾	51.6 ± 9.5	42.5 ± 8.7 ²⁾
Rp-3 h	9.2 ± 2.1	56.1 ± 7.6 ¹⁾	45.9 ± 5.3 ²⁾	43.1 ± 8.5 ²⁾
Rp-6 h	10.7 ± 4.4	48.7 ± 5.4 ¹⁾	44.6 ± 4.8	42.3 ± 5.2
Rp-12 h	9.8 ± 4.2	49.7 ± 5.2 ¹⁾	43.2 ± 6.4	41.8 ± 5.2 ²⁾
Rp-24 h	11.2 ± 4.2	52.1 ± 8.9 ¹⁾	40.6 ± 4.8 ³⁾	37.8 ± 6.2 ³⁾
Rp-36 h	9.3 ± 3.6	46.3 ± 7.8 ¹⁾	36.8 ± 4.8 ²⁾	35.3 ± 6.9 ²⁾
Rp-48 h	8.8 ± 2.2	41.1 ± 4.3 ¹⁾	34.0 ± 6.1 ²⁾	31.0 ± 5.1 ³⁾
Rp-72 h	10.1 ± 3.0	43.7 ± 4.0 ¹⁾	34.8 ± 4.7 ³⁾	29.8 ± 6.5 ³⁾

注:与对照组比较,¹⁾ P < 0.01;与模型组比较,²⁾ P < 0.05,³⁾ P < 0.01

Note: ¹⁾ P < 0.01 vs control group; ²⁾ P < 0.05, ³⁾ P < 0.01 vs vehicle group

体外培养大鼠脑微血管内皮细胞模拟脑缺血(Is) 3 h,再灌注(Rp) 24 h时细胞裂解液和正常对照组相比较,裂解液中 SOD活性明显降低,MDA、NO含量明显升高(P < 0.01)。与模型组相比较,NXTJN 0.24、0.48 g · kg⁻¹组可明显提高裂解液中 SOD活性(P < 0.05, P < 0.01),显著降低裂解液中 MDA、NO的含量(P < 0.05, P < 0.01),对 iCMEC模拟脑缺血再灌注损伤有明显的保护作用。结果见表 3。

4 讨论

细胞缺氧缺氧再灌注损伤时,自由基引发的线粒体膜脂质过氧化或细胞内形成脂质过氧化物作用于线粒体膜,使膜的液态及流动性改变,从而导致线粒体功能障碍,启动细胞损伤的一系列病理生理过程^[8]。线粒体膜富含磷脂,线粒体生化功能与能量

表 3 脑心通胶囊对体外模拟脑缺血再灌注损伤大鼠脑微血管内皮细胞裂解液中 SOD 活性、MDA 和 NO 含量的影响。

$n=6, \bar{x} \pm s$

Tab 3 Effect of naxintoxg capsules on SOD activity, MDA and NO content of cerebral microvascular endothelial cell of cerebral ischemia and reperfusion rats *in vitro* $n=6, \bar{x} \pm s$

Group	Dose /g · kg ⁻¹	SOD	MDA	NO
		/kU · g(p10) ⁻¹	/μmol · g(p10) ⁻¹	/μmol · g(p10) ⁻¹
Control	-	56.21 ± 3.04	5.20 ± 0.81	61.02 ± 7.14
Vehicle	-	37.10 ± 8.13 ¹⁾	16.80 ± 0.92 ¹⁾	127.01 ± 32.86 ¹⁾
Naxintoxg capsules	0.24	52.60 ± 9.36 ²⁾	5.56 ± 0.96 ³⁾	88.58 ± 24.50 ²⁾
Naxintoxg capsules	0.48	57.42 ± 3.21 ³⁾	6.74 ± 0.52 ³⁾	70.23 ± 20.78 ³⁾

注:与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$

Note: ¹⁾ $P < 0.01$ vs control group; ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ vs vehicle group

代谢很大程度依赖于膜磷脂的完整^[9]。对培养的大鼠脑微血管内皮细胞进行 MTT 法测定可以反映培养的细胞在正常或缺血再灌注损伤时线粒体的功能状态,从而确定培养大鼠脑微血管内皮细胞的活性和存活率。

本实验中脑微血管内皮细胞经 因子抗体免疫细胞化学染色后的阳性细胞数占总细胞数 95% 以上,细胞呈短梭形或多角形,胞浆丰富,内含棕黄色颗粒。用 MTT 法和台盼蓝染色法观测体外培养大鼠脑微血管内皮细胞模拟脑缺血再灌注损伤模型,模拟脑缺血(Is) 3 h,再灌注(Rp) 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 h 后损伤内皮细胞的活性、存活率、死亡率变化。结果显示,细胞活性在缺血再灌注损伤后明显降低,说明体外模拟脑缺血再灌注损伤对培养的脑微血管内皮细胞内的线粒体造成损伤,线粒体功能障碍,能量衰竭而发生死亡。而脑心通胶囊给药组可使受损脑微血管内皮细胞活性和存活率明显提高,说明脑心通胶囊对脑微血管内皮细胞缺血再灌注损伤有保护作用。

细胞缺糖缺氧损伤时,细胞内 Ca^{2+} 浓度异常升高,触发一系列病理反应,可产生大量氧自由基,一方面可诱发炎症反应,另一方面可引起细胞内 DNA、RNA、氨基酸、蛋白质以及多糖高分子物质的氧化、交联、变性或降解。SOD 是自由基清除剂和催化 H_2O_2 分解的酶,它通过歧化方式清除超氧阴离子自由基,对细胞有保护作用,其活力可反映体内自由基的变化情况。MDA 作为氧自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的代谢产物,其含量变化间接反映了组织中氧自由基含量及细胞损伤的程度。NO 是迄今在体内发现的第一个气体性信息分子,在脑缺血再灌注损伤中起重要作用,能减轻 NO 毒性作用的药物有望成为缺血性脑血管病治疗

的靶点之一^[10-11]。本实验测定了体外培养大鼠脑微血管内皮细胞模拟脑缺血 3 h,再灌注 24 h 时细胞裂解液中 SOD 活性、MDA 及 NO 含量的变化以及脑心通胶囊含药血清对变化的影响。结果显示,裂解液中 SOD 活性明显降低,MDA、NO 含量明显升高。脑心通胶囊给药组可明显提高裂解液中 SOD 活性,显著降低裂解液中 MDA、NO 的含量。因此,脑心通胶囊对 rCMEC 模拟脑缺血再灌注损伤保护作用的机制可能是通过提高 SOD 活性,清除自由基从而减少缺血再灌注过程中自由基损伤,阻碍线粒体膜过强的脂质过氧化反应,防止线粒体发生氧化磷酸化脱偶联,维持细胞正常的能量代谢;通过减少受损细胞内 NO 的含量,减轻了 NO 介导的兴奋性氨基酸毒性及其衍生毒性自由基的损伤,从而达到保护脑微血管内皮细胞缺血再灌注损伤的目的。

REFERENCES

- [1] POBER J S. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium: physiology and pathology [J]. *Am Pathol*, 1988, 133: 426-433.
- [2] ZHANG W W, LI Y Z, QU L Q, et al. Neuroprotective effects of buchang naoxintong capsule on focal cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. *J Clin Neurol* (临床神经病学杂志), 2006, 19 (2): 118-120.
- [3] LU Z Q, XU Q P, GUO X F, et al. Effects of Naoxintong capsule on the levels of cerebral L-1, L-6 and TNF- in the rat experienced focal cerebral ischemia-reperfusion [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2005, 28 (1): 44-47.
- [4] GORDON E L, DANIELSSON P E, NGUYEN T S, et al. A comparison of primary cultures of rat cerebral microvascular endothelial cells to rat aortic endothelial cells [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1991, 27A (4): 312-326.
- [5] ZHANG W D, SMITH C, SHAPRO A, et al. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebral microvascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia *in vitro* [J]. *J Neuroimmunol*, 1999, 101: 148-160.
- [6] CHEN X C, ZHU Y G, CHEN L M, et al. Nitric oxide induced PC₁₂ cells apoptosis and the protective effect of ginsenoside Rg1 [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2002, 18 (5): 516-519.
- [7] LOCK R B, STRONSKIENE L. Dual modes of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival [J]. *Cancer Res*, 1996, 56 (17): 4006-4012.
- [8] NELS S. Selective impairment of respiration in mitochondria isolated from brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat [J]. *J Neurochem*, 1991, 56 (6): 1836-1844.
- [9] DANDAN S, DAV D G. Ischemia-induced changes in cerebral mitochondrial free fatty acids, phospholipids and respiration in the rat [J]. *J Neurochem*, 1994, 62 (5): 1921-1928.
- [10] WILLMOT M, GRAY L, GIBSON C, et al. A systematic review of nitric oxide donors and L-arginine in experimental stroke; effects on infarct size and cerebral blood flow [J]. *Nitric Oxide*, 2005, 12 (3): 141-149.
- [11] KHAN M, JATANA M, ELANGO C, et al. Cerebrovascular protection by various nitric oxide donors in rats after experimental stroke [J]. *Nitric Oxide*, 2006, 15 (2): 114-124.

(收稿日期: 2006-10-13)