

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810116042.6

[51] Int. Cl.

A61K 36/734 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01)

A61K 47/46 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

[43] 公开日 2010年1月6日

[11] 公开号 CN 101618092A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 47/12 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

[22] 申请日 2008.7.2

[21] 申请号 200810116042.6

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路 15 号

[72] 发明人 赵保路

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 王 旭

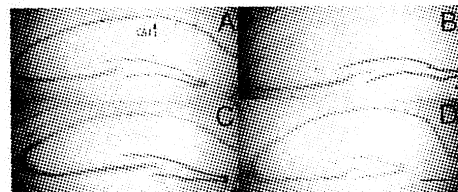
权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 6 页

[54] 发明名称

预防和治疗脑卒中的药物复合制剂及其制备方法

[57] 摘要

本发明的目的在于提供用于临床预防和治疗脑卒中的药物复合制剂，所述药物复合制剂包含由山楂黄酮、银杏黄酮和知母宁的药物组合物作为有效成分和药用辅料，并且提供用于制备所述药物复合制剂的方法。本发明的药物复合制剂可有效用于临床预防和治疗脑卒中。



1. 用于临床预防和治疗脑卒中的药物复合制剂，其中所述药物复合制剂包含由山楂黄酮、银杏黄酮和知母宁组成的药物组合物作为有效成分，和药用辅料。

2. 权利要求 1 所述的药物复合制剂，其中，在 10 重量份的所述药物组合物中，山楂黄酮的含量为 0~9 重量份，银杏黄酮的含量为 1~7 重量份，并且知母宁的含量为 0~3 重量份。

3. 权利要求 1 或 2 任何一项的药物复合制剂，其中，在 10 重量份的所述药物组合物中，山楂黄酮的含量为 4 重量份，银杏黄酮的含量为 3 重量份，并且知母宁的含量为 3 重量份。

4. 权利要求 1 或 2 任何一项的药物复合制剂，其中，在 10 重量份的所述药物组合物中，山楂黄酮的含量为 5 重量份，银杏黄酮的含量为 3 重量份，并且知母宁的含量为 2 重量份。

5. 权利要求 1 或 2 任何一项的药物复合制剂，其中，在 10 重量份的所述药物组合物中，山楂黄酮的含量为 8 重量份，银杏黄酮的含量为 1 重量份，并且知母宁的含量为 1 重量份。

6. 权利要求 1 或 2 任何一项的药物复合制剂，其中，在 10 重量份的所述药物组合物中，山楂黄酮的含量为 9 重量份，并且银杏黄酮的含量为 1 重量份。

7. 权利要求 1 的药物复合制剂，其中所述药物复合制剂为胶囊、片剂或口服液。

8. 权利要求 7 的药物复合制剂，其中，当所述药物复合制剂为胶囊时，其中药用辅料是葛根粉；当所述药物复合制剂为片剂时，其中药用辅料是淀粉；当所述药物复合制剂为口服液时，其中药用辅料是柠檬酸水溶液。

9. 权利要求 1 的药物复合制剂的制备方法，所述方法包含将有效量的所述药物组合物与所述药用辅料混合。

10. 权利要求 1-8 任何一项的药物复合制剂在制备用于临床预防和治疗脑卒中的药物中的应用。

预防和治疗脑卒中的药物复合制剂及其制备方法

技术领域

本发明涉及用于脑卒中的预防和治疗的药物复合制剂，特别涉及包含由山楂黄酮、银杏黄酮和知母宁组成的药物组合物作为有效成分和药用辅料的药物复合制剂，及其制备方法。

背景技术

脑血管疾病是一大类严重危害人类健康的疾病，其中的急性缺血性脑卒中（Ischemic Stroke）最为常见，具有高发病率、高患病率和高致残率的特点。脑卒中是全球第二位致死原因，每年共554万人死于脑卒中，而其中三分之二来自发展中国家。我国脑卒中的患病率为620/10万，其中绝大部分为缺血性卒中。此外，作为首位致残原因，脑卒中每年造成的疾病伤残在2003年约4900万。预计到2015年，全球因卒中损失的健康生命年将逾5000万，其中90%来自中低收入国家。在我国，血管性疾病致死病处首位，比肿瘤及慢性呼吸系统疾病还高。值得注意的是，有别于发达国家心血管疾病高于脑卒中的趋势，我国死于脑血管病的人数远远超过心血管疾病，是后者的三倍。我国目前用脑卒中发病率和死亡率来估算该数目亦相当惊人，给家庭和社会带来沉重的负担。这势必影响中国的和谐社会和经济的可持续性发展，已经并将进一步成为中国乃至世界人口与健康领域中的重大问题。发达国家在近二十年内，花了巨大的投资，对缺血性脑卒中的研究提供了帮助。然而，许多实验室的阳性结果在临床试验时却大多失败了。迄今为止，虽有一些治疗手段，但仅在缺血后3小时内有效，且有毒性等问题。

至今为止，在现有技术中还未发现由山楂黄酮、银杏黄酮和知母宁组成的药物组合物用于预防和治疗脑卒中的报道。

发明内容

鉴于上述原因和现有技术中存在的主要问题，当前迫切需要寻求一种新的药物或药物组合物用于预防和治疗脑卒中。为此，本发明要解决的技术问题是提供用于临床预防和治疗脑卒中的药物复合制剂。本发明进一步要解决的技术问题是提供制备上述药物复合制剂的方法。

本发明的技术方案概述如下。

本发明提供用于临床预防和治疗脑卒中的药物复合制剂，其中，所述药物复合制剂包含由山楂黄酮、银杏黄酮和知母宁(主要成分是黄酮类)组成的药物组合物作为有效成分，和药用辅料。

本发明的药物复合制剂的特征在于，在 10 重量份的所述药物组合物中，山楂黄酮的含量为 0~9 重量份，银杏黄酮的含量为 1~7 重量份，并且知母宁的含量为 0~3 重量份。

按照本发明的一个优选的实施方案，本发明的药物复合制剂的特征在于，在 10 重量份的所述药物组合物中，优选山楂黄酮的含量为 4 重量份，银杏黄酮的含量为 3 重量份，并且知母宁的含量为 3 重量份。

按照本发明的另一个优选的实施方案，本发明的药物复合制剂的特征在于，在 10 重量份的所述药物组合物中，也优选山楂黄酮的含量为 5 重量份，银杏黄酮的含量为 3 重量份，并且知母宁的含量为 2 重量份。

按照本发明的另一个优选的实施方案，本发明的药物复合制剂的特征在于，在 10 重量份的所述药物组合物中，也优选山楂黄酮的含量为 8 重量份，银杏黄酮的含量为 1 重量份，并且知母宁的含量为 1 重量份。

按照本发明的另一个优选的实施方案，本发明的药物复合制剂的特征在于，在 10 重量份的所述药物组合物中，也优选山楂黄酮的含量为 9 重量份，并且银杏黄酮的含量为 1 重量份，可以不含知母宁。

在本发明的药物复合制剂中，所述药用辅料是葛根粉、淀粉、或水溶液。

在本发明的药物复合制剂中，所述药物复合制剂为胶囊、片剂或口服液。当本发明的药物复合制剂为胶囊时，其中药用辅料优选是葛根粉。当本发明的药物复合制剂为片剂时，其中药用辅料优选是淀粉。当本发明的药物复合制剂为口服液时，其中药用辅料优选是 10%的柠檬酸水溶液。

本发明提供所述药物复合制剂的制备方法，该方法包含将有效量的所

述药物组合物与所述药用辅料以适当比例混合,优选将 80 重量%的药物组合物与 20 重量%的药用辅料混合,以制备临床中所需的剂型。

本发明还提供所述药物复合制剂在制备用于临床预防和治疗脑卒中的药物中的应用。

本领域技术人员应当理解,上述重量比例组成是本发明的各组分之间优选的比例,本领域技术人员通过常规方法适当调整和改变所述药物组合物各组分之间的比例也可以达到本发明的目的,而不背离本发明的范围和精神,因此意欲将此调整和改变也包括在本发明的内容之内。上述涉及的药物复合制剂的各组分是市场上可以采购到的药用级产品。

本发明所提供的上述的预防和治疗脑卒中药物复合制剂,在具体实施方式中经过细胞和动物实验(缺血再灌手术模拟脑卒中),探明了作用机理,所述药物复合制剂具有以下功能特征和有益效果:本发明的药物复合制剂对羟基、超氧阴离子自由基有明显清除作用,对过氧亚硝基和脂类自由基有明显清除作用,对沙鼠脑卒中脑组织中产生一氧化氮有明显调节作用,对沙鼠脑卒中脑组织中产生活性氧有清除作用,对沙鼠脑卒中海马 CA1 区成活大锥体神经元的数量有明显保护作用,对沙鼠脑卒中海马 CA1 区神经元 DNA 损伤有明显保护作用,对沙鼠脑卒中海马组织中 iNOS 的 mRNA 水平及 NF κ B p65 和 TNF- α 的蛋白质水平有明显抑制作用。

附图说明

从下面结合附图的详细描述中,本发明的上述特征和优点将更明显,其中:

图 1 是表明本发明的药物复合制剂对羟基和超氧阴离子自由基的清除作用的图。

图 2 是表明本发明的药物复合制剂对过氧亚硝基和脂类自由基的清除作用的图。

图 3 是表明本发明的药物复合制剂对沙鼠脑卒中脑组织中产生一氧化氮的调节作用的图。图 3A 显示用 ESR 法检测了缺血再灌注过程中在脑中产生的一氧化氮自由基的量。图 3B 显示缺血再灌过程中在脑中产生的亚硝酸盐产量。1: 对照; 2: 缺血再灌注; 3: 低剂量; 4: 高剂量。

图 4 是表明本发明的药物复合制剂对沙鼠脑卒中脑组织中产生活性氧的清除作用的图。1: 对照; 2: 缺血再灌注; 3: 低剂量; 4: 高剂量。

图 5 是表明本发明的药物复合制剂对沙鼠脑卒中脑组织中产生的脂质过氧化的抑制作用的图。

图 6 是表明本发明的药物复合制剂对沙鼠脑卒中海马 CA1 区成活大锥体神经元的数量的保护作用的图。A: 对照; B: 缺血再灌注; C: 低剂量; D: 高剂量。

图 7 是表明本发明的药物复合制剂对沙鼠脑卒中海马 CA1 区神经元 DNA 损伤的保护作用的图。A: 对照; B: 缺血再灌注; C: 低剂量; D: 高剂量。

图 8 是表明本发明的药物复合制剂对沙鼠脑卒中引起的海马 CA1 区神经元凋亡的防护作用的图。A: 对照; B: 缺血再灌注; C: 低剂量; D: 高剂量。

图 9 是表明本发明的药物复合制剂对沙鼠脑卒中海马组织中 iNOS 的 mRNA 水平的抑制作用的图。

图 10 是表明本发明的药物复合制剂对沙鼠脑卒中海马组织中 NF κ B p65 的蛋白质水平的抑制作用的图, 其中 1: 对照; 2: 缺血再灌注; 3: 低剂量; 4: 高剂量。

图 11 是表明本发明的药物复合制剂对沙鼠脑卒中海马组织中 TNF- α 的蛋白质水平的抑制作用的图, 其中 1: 对照; 2: 缺血再灌注; 3: 低剂量; 4: 高剂量。

在图 1 至 11 中, “*”表示与正常对照相比有显著差异 ($P<0.05$), “#”表示与损伤对照相比有显著差异 ($P<0.05$)。

具体实施方式

以下通过实施例来进一步阐明本发明的药物复合制剂的制备方法。但是应该理解, 所述实施例只是举例说明的目的, 并不意欲限制本发明的范围和精神。

实施例 1. 本发明的药物复合制剂的制备——胶囊的制备

每粒 300 毫克，有效成分为 80 重量%，其它添加葛根粉（级别：食物级；购自四川富贵人生物工程有限公司）。山楂黄酮（购自山西金甲药物有限公司）；银杏黄酮（购自江苏健佳药业有限公司）；知母宁（购自山东富而美生物科技有限公司）的重量比例和各自的重量分别见表 1。表 1. 在胶囊剂型的药物复合制剂中，各成分的比例及重量。

编号	山楂黄酮:银杏黄酮: 知母宁(重量比)	山楂黄 酮(mg)	银杏黄酮(mg)	知母宁(mg)	葛根粉 (mg)
1	6:1:3	144	24	72	60
2	7:1:2	168	24	48	60
3	8:1:1	192	24	24	60
4	9:1:0	216	24	0	60
5	5:2:3	120	48	72	60
6	6:2:2	144	48	48	60
7	7:2:1	268	48	24	60
8	8:2:0	192	48	0	60
9	4:3:3	96	72	72	60
10	5:3:2	120	72	48	60
11	6:3:1	144	72	24	60
12	7:3:0	168	72	0	60
13	3:4:3	72	96	72	60
14	4:4:2	96	96	48	60
15	5:4:1	120	96	24	60
16	6:4:0	144	96	0	60
17	2:5:3	48	120	72	60
18	3:5:2	72	120	48	60
19	4:5:1	96	120	24	60
20	5:5:0	120	120	0	60
21	1:6:3	24	144	72	60
22	2:6:2	48	144	48	60
23	3:6:1	72	144	24	60
24	4:6:0	96	144	0	60
25	0:7:3	0	168	72	60
26	1:7:2	24	168	48	60
27	2:7:1	48	168	24	60
28	3:7:0	72	168	0	60

在 GMP 车间，将山楂黄酮、银杏黄酮和知母宁及添加剂葛根粉按要求的比例在搅拌器(CH-10 小型混合机，中南制药机械厂)中充分搅拌混合 1 小时，在胶囊机(半自动胶囊充填机，山东省青州市精诚机械制造有限公司)上装胶囊（A 型肠溶胶囊，潮州市强基制药厂），采用好乐股份公司的紫外技术 bluepoint 4 经济型紫外消毒器消毒，包装（YLE-500+YLH-500L 包装机，裕隆包装设备有限公司）。

实施例 2. 本发明的药物复合制剂的制备——口服液的制备

每瓶 10 毫升，药物复合制剂共 300mg，有效成分为 80 重量%，将组合药物溶解在蒸馏水中，其它添加柠檬酸（食用级，购自山东济南云翔化工有限责任公司），其中山楂黄酮（购自山西金甲药物有限公司）：银杏黄酮（购自江苏健佳药业有限公司）：知母宁（购自山东富而美生物科技有限公司）的重量比例和各自的重量分别见表 2。

表 2. 在口服液剂型的药物复合制剂中，各成分的比例及重量。

编号	山楂黄酮:银杏黄酮: 知母宁(重量比)	山楂黄 酮(mg)	银杏黄酮(mg)	知母宁(mg)	柠檬酸 (mg)
1	6:1:3	144	24	72	60
2	7:1:2	168	24	48	60
3	8:1:1	192	24	24	60
4	9:1:0	216	24	0	60
5	5:2:3	120	48	72	60
6	6:2:2	144	48	48	60
7	7:2:1	268	48	24	60
8	8:2:0	192	48	0	60
9	4:3:3	96	72	72	60
10	5:3:2	120	72	48	60
11	6:3:1	144	72	24	60
12	7:3:0	168	72	0	60
13	3:4:3	72	96	72	60
14	4:4:2	96	96	48	60
15	5:4:1	120	96	24	60
16	6:4:0	144	96	0	60
17	2:5:3	48	120	72	60
18	3:5:2	72	120	48	60
19	4:5:1	96	120	24	60
20	5:5:0	120	120	0	60
21	1:6:3	24	144	72	60
22	2:6:2	48	144	48	60
23	3:6:1	72	144	24	60
24	4:6:0	96	144	0	60
25	0:7:3	0	168	72	60
26	1:7:2	24	168	48	60
27	2:7:1	48	168	24	60
28	3:7:0	72	168	0	60

在 GMP 车间，将山楂黄酮、银杏黄酮和知母宁及添加剂柠檬酸按要求的比例在搅拌器(RW 20 DZM.n 顶置式机械搅拌器，上海丽度电子科技

发展有限公司)中充分搅拌混合,在罐装机(DGDG 系列台式液体灌装机,中南制药机械厂)上装瓶,采用好乐股份公司的紫外技术 bluepoint 4 经济型紫外消毒器消毒,包装(YLE-500+YLH-500L 包装机,裕隆包装设备有限公司)。

实施例 3. 本发明的药物复合制剂的制备——片剂的制备

每片 300 毫克,有效成分为 80 重量%,其它添加剂为淀粉(级别:食物级;天津森众商贸公司)。山楂黄酮:银杏黄酮:知母宁的重量比例和各自的重量分别见表 3。

表 3. 在片剂剂型的药物复合制剂中,各成分的比例及重量。

编号	山楂黄酮:银杏黄酮: 知母宁(重量比)	山楂黄 酮(mg)	银杏黄酮(mg)	知母宁(mg)	淀粉 (mg)
1	6:1:3	144	24	72	60
2	7:1:2	168	24	48	60
3	8:1:1	192	24	24	60
4	9:1:0	216	24	0	60
5	5:2:3	120	48	72	60
6	6:2:2	144	48	48	60
7	7:2:1	268	48	24	60
8	8:2:0	192	48	0	60
9	4:3:3	96	72	72	60
10	5:3:2	120	72	48	60
11	6:3:1	144	72	24	60
12	7:3:0	168	72	0	60
13	3:4:3	72	96	72	60
14	4:4:2	96	96	48	60
15	5:4:1	120	96	24	60
16	6:4:0	144	96	0	60
17	2:5:3	48	120	72	60
18	3:5:2	72	120	48	60
19	4:5:1	96	120	24	60
20	5:5:0	120	120	0	60
21	1:6:3	24	144	72	60
22	2:6:2	48	144	48	60
23	3:6:1	72	144	24	60
24	4:6:0	96	144	0	60
25	0:7:3	0	168	72	60
26	1:7:2	24	168	48	60
27	2:7:1	48	168	24	60
28	3:7:0	72	168	0	60

在 GMP 车间，将山楂黄酮、银杏黄酮和知母宁及添加剂淀粉按要求的比例在搅拌器(RW 20 DZM.n 顶置式机械搅拌器，上海丽度电子科技发展有限公司)中充分搅拌混合，在制片机(TDP-1.5 单冲压片机，中南制药机械厂)上装制片，采用好乐股份公司的紫外技术 bluepoint 4 经济型紫外消毒器消毒，包装(YLE-500+YLH-500L 包装机，裕隆包装设备有限公司)。

试验例

以下通过具体的试验例进一步阐明本发明组合药物复合制剂的有益效果。但是本领域的技术人员应该理解，所述实验例只是举例说明的目的，并不意欲限制本发明的范围和精神。脑卒中动物模型用缺血再灌注手术的沙鼠（来自北京动物中心）模拟。

试验例 1. 药物复合制剂对自由基的清除作用

本试验例采用胶囊剂型的药物复合制剂，表 1 中的 9 号产品，其中活性成分重量比例为：楂黄酮：银杏黄酮：知母宁=4：3：3。进行体外试验检测所述药物复合物制剂对自由基的清除作用。

自由基，特别是活性氧自由基，如羟基、超氧阴离子自由基，是引起脑卒中损伤的重要因素。采用电子自旋共振技术(ESR)测试，条件如下：在 Bruker ER200 D-SRC 型 ESR 波谱仪(德国 Bruker 公司)上进行测定时，X 波段，微波功率 10mW，调制频率 100kHz，调幅 1G，中心磁场 3385G，扫宽 200G，室温下检测(参见，Zhao, B-L, Li, X-J, He, R-G, Cheng, S-J, Xin, W-J: Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. Cell Biophys.14:175.1989)。测试结果表明本发明的药物复合制剂对羟基、超氧阴离子自由基有明显清除作用。

由图 1 可以看出，本发明的药物复合制剂对羟基和超氧阴离子自由基的清除作用的 IC₅₀ 分别大约为 IC₅₀ (羟基自由基)=0.05mg/ml 和 IC₅₀ (超氧阴离子自由基)=0.10mg/ml。复合制剂对羟基的清除作用比对超氧阴离子自由基的清除作用略强(参见图 1)。

NO 和超氧阴离子自由基具有非常高的反应速率常数(6.4X10⁹mol/L⁻¹s⁻¹)，反应形成过氧亚硝基(ONOO⁻)。这是一种氧化性极强

的物质，可氧化细胞膜脂和蛋白质的硫氢基，导致脑卒中细胞损伤，因而对过氧亚硝基的研究非常引人关注。复合制剂对过氧亚硝基的清除作用的 $IC_{50}=40\mu\text{g/ml}$ （参见图 2）。

试验例 2. 药物复合制剂对缺血再灌注过程中一氧化氮的调节作用

本试验例采用口服液剂型的药物复合制剂，为表 2 中的 10 号，其中活性成分重量比例为：山楂黄酮：银杏黄酮：知母宁=5：3：2。采用缺血再灌注沙鼠模型进行体内试验。

雄性蒙古沙鼠（来自北京动物中心），体重 50~70 克，每笼一只，在标准条件（ $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，每日 8:00-20:00 光照）下饲养，自由饮食，随机分为四组：缺血再灌注组（IR）（在附图中简称“缺血再灌注”），自来水喂养 15 天后，实行缺血再灌注手术：动物手术前 12 小时禁食，但可以自由饮水，腹腔注射 1300mg/Kg.wt 氨基甲酸乙酯（Ethyl Carbamate）麻醉动物。仰位固定于手术台上，用手术刀在颈部划开一个 1~1.5cm 小口，钝性分离肌肉，暴露与迷走神经伴行的颈总动脉，用动脉夹闭塞双侧颈总动脉 5 分钟，夹闭后或打开后检查血管，以保证血管闭塞或畅通按实验安排进行，该操作可以可重复性造成沙鼠大脑海马 CA1 区大锥体神经元的死亡（Kirino, Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res. 239, 57-69, 1982），在手术过程中和手术后 5 小时内，动物的体温用肛温计和红外灯控制于 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ；阴性对照组（在附图中简称“对照”），处理与 IR 组相同但是不结扎颈总动脉；低剂量处理组（在附图中简称“低剂量”），用含有 0.5mg/ml 复合制剂的自来水喂养，其余处理与 IR 组相同；高剂量保护组（在附图中简称“高剂量”），用含有 2.5mg/ml 复合制剂的自来水喂养，其余处理与 IR 组相同。动物在手术之后处死前，继续用相应的自来水或自来水配制的复合制剂喂养。每天记录动物的饮水量，计算动物实际的服药量。

用 ESR 法检测了缺血再灌注过程中产生的一氧化氮自由基。与缺血再灌注过程中 ROS 升高相比，一氧化氮的产量在缺血再灌注组与阴性对照组相比降低了约 19%，复合制剂预处理 15 天显著升高了缺血再灌注后脑中的一氧化氮的产量，低剂量和高剂量组一氧化氮的产量与缺血再灌注组相比分

别升高了约 44% 和 77% (见图 3A)。而亚硝酸盐的产量在缺血再灌组与阴性对照组相比升高了约 150%，复合制剂预处理 15 天显著降低了缺血再灌后脑中的亚硝酸盐的产量，低剂量和高剂量组亚硝酸盐的产量与缺血再灌组相比分别降低了约 30% 和 40%，试验结果见图 3B。

试验例 3. 药物复合制剂对缺血再灌注脑组织中活性氧 (ROS) 升高的抑制作用

本试验例采用口服液剂型的药物复合制剂，表 2 中的 3 号产品，其中活性成分重量比例为：槲黄酮：银杏黄酮：知母宁=8：1：1。

雄性蒙古沙鼠（北京动物中心），体重 50~70 克，每笼一只，在标准条件（见试验例 2）下饲养，自由饮食，随机分为四组：缺血再灌注组（IR），自来水喂养 15 天后，实行缺血再灌注手术；阴性对照组，处理与 IR 组相同但是不结扎颈总动脉；低剂量处理组，用含有 0.5mg/ml 复合制剂的自来水喂养，其余处理与 IR 组相同；高剂量保护组，用含有 2.5mg/ml 复合制剂的自来水喂养，其余处理与 IR 组相同。动物在手术之后处死前，继续用相应的自来水或自来水配制的抗氧化剂喂养。每天记录动物的饮水量，计算动物实际的服药量。

缺血再灌注脑损伤手术一小时后，部分动物麻醉后杀死，快速分离脑组织，冰浴生理盐水冲洗，沿中线分离两侧大脑。左侧大脑半球用于检测缺血再灌注过程中产生的活性氧 (Capani F., Loidl C. F., Aguirre F., Piehl L., Facorro G., Hager A., Paoli T. D., Farach H. and Pecci-Saavedra J. Changes in reactive oxygen species (ROS) production in rat brain during global perinatal asphyxia: an ESR study. Brain Res. 914, 204–207, 2001.)。组织称重后加入 1ml 冰浴的自旋捕集剂溶液（在冰冷的磷酸缓冲盐水 (PBS) 中的 100 mM N-叔丁基- α -苯基硝酸灵 (PBN)，2 mM 二亚乙基三胺五乙酸 (DETAPAC)），匀浆。然后加入 500 μ l 乙酸乙酯，涡旋振荡 1 分钟，10000g 离心 5 分钟。小心分离上层的乙酸乙酯，避光 4 $^{\circ}$ C 保存，24 小时内室温 ESR 检测。

缺血再灌后，按上述检测方法分别测量缺血再灌过程中产生的 ROS，脑匀浆的脂质过氧化水平，脑匀浆的抗氧化能力（或脑匀浆中的抗氧化剂

水平), 以评价缺血再灌手术中活性氧对脑组织的损伤效果。缺血再灌注手术 1 小时后, ESR 试验表明, 与阴性对照组相比, 缺血再灌组中的 ROS 升高了约 62%。与缺血再灌组相比, 复合制剂预处理 15 天, 低剂量组和高剂量组中, ROS 分别显著降低了约 23%和约 50%。高剂量组中 ROS 的产量甚至低于阴性对照组, 但是差异性不显著(见图 4)。

缺血再灌后脂质过氧化水平用 TBARS (硫代巴比妥酸反应的物质 (thiobarbituric acid reacted substance)) 的含量表示, 脑匀浆中的脂质过氧化水平以 TBARS 浓度表示。100 μ l 脑匀浆加入 1.9ml 反应体系中 (100 μ l 8.1% SDS, 750 μ l 20% 冰乙酸, 调 pH 至 3.5, 750 μ l 0.8% 硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid), 300 μ l 双蒸水), 混匀后沸水浴 1 小时, 然后加入 0.5ml 双蒸水, 2.5ml 正丁醇, 涡旋混匀后 4000g 离心 10 分钟。上清于 532nm 分光光度计检测。脂质过氧化水平 TBARS 含量以 nmol/g/ml 组织蛋白表示。结果表明, 缺血再灌注损伤使脑匀浆中的 TBARS 水平与阴性对照组相比升高了约 73%, 口服复合制剂 15 天, 剂量依赖性降低了 TBARS 水平。与单纯缺血再灌组 (IR) 相比, 在低剂量和高剂量处理组, TBARS 水平分别降低了约 26%和约 48%。试验结果见图 5。

试验例 4. 药物复合制剂对沙鼠脑中海马 CA1 区成活大锥体神经元的数量的保护作用

本试验例采用口服液剂型的药物复合制剂, 表 2 中的 4 号产品, 其中活性成分重量比例为: 槲黄酮: 银杏黄酮: 知母宁=9: 1: 0。

雄性蒙古沙鼠 (来自北京动物中心), 体重 50~70 克, 每笼一只, 在标准条件下 (见试验例 2) 饲养, 自由饮食, 随机分为四组: 缺血再灌注组 (IR), 自来水喂养 15 天后, 实行缺血再灌注手术; 阴性对照组, 处理与 IR 组相同但是不结扎颈总动脉; 低剂量处理组, 用含有 0.5mg/ml 复合制剂的自来水喂养, 其余处理与 IR 组相同; 高剂量保护组, 用含有 2.5mg/ml 复合制剂的自来水喂养, 其余处理与 IR 组相同。动物在手术之后处死前, 继续用相应的自来水或自来水配制的抗氧化剂喂养。每天记录动物的饮水量, 计算动物实际的服药量。缺血再灌注手术六天后, 部分动物用硫代巴比妥钠 (50mg/kg i.p.) 深度麻醉, 用预冷的 pH 7.4 磷酸盐配制的 4%多聚

甲醛穿心脏灌流 (perfused transcardially) 15 分钟, 等动物颈部僵硬后分离脑组织, 在 4% 多聚甲醛 PBS 溶液中后固定 24 小时, 然后在 30% 蔗糖 PBS 溶液中浸泡 72 小时, 保证所有的脑样本沉入蔗糖的底部, 充分防冻保护 (cryoprotection), 在海马区切 12 μ m 厚的冰冻切片, 甲酚紫 (Cresyl Violet) 染色。在光学显微镜下观察海马 CA1 区神经元, 有清楚的细胞核, 胞体着色良好的计为成活神经元, 由对试验分组不了解者计数 CA1 区 1mm 长度内成活大锥体神经元的数量。每只动物的脑片, 光镜下计数 4 片, 成活神经元按每毫米的成活细胞数表示。

按上述方法测量复合制剂对沙鼠脑卒中海马 CA1 区成活大锥体神经元的数量的保护作用, 脑中各部分对缺血再灌注损伤的敏感性不同, 海马 CA1 区大锥体神经元对缺血尤其敏感, 5 分钟缺血就可造成 CA1 区细胞的不可逆性损伤。本试验用本领域公知的尼氏染色方法检测了 CA1 区神经元的数量。图 6 所示为缺血再灌损伤 6 天后海马 CA1 区的冰冻切片图像。在缺血再灌注组, CA1 区神经元几乎全部消失了, 活体神经元仅为 11 \pm 7 cell/mm, 与之相比阴性对照组 CA1 区活体细胞数为 280 \pm 30 cell/mm。与缺血再灌注组相比, 用本发明的复合药物制剂预处理显著增加了 CA1 区成活神经元数量, 在低剂量组和高剂量组 CA1 区神经元数量分别为 130 \pm 60 cell/mm 和 255 \pm 35 cell/mm。在高剂量组和阴性对照组之间无显著性差异。试验结果见图 6。

试验例 5. 药物复合制剂对沙鼠脑卒中海马 CA1 区神经元 DNA 损伤的保护作用

本试验例采用口服液剂型的药物复合制剂, 表 2 中的 5 号产品, 其中活性成分重量比例为: 槲黄酮: 银杏黄酮: 知母宁=5: 2: 3。

雄性蒙古沙鼠 (来自北京动物中心), 体重 50~70 克, 每笼一只, 在标准条件下 (见试验例 2) 饲养, 自由饮食, 随机分为四组: 缺血再灌注组 (IR), 自来水喂养 15 天后, 实行缺血再灌注手术; 阴性对照组, 处理与 IR 组相同但是不结扎颈总动脉; 低剂量处理组, 用含有 0.5mg/ml 复合制剂的自来水喂养, 其余处理与 IR 组相同; 高剂量保护组, 用含有 2.5mg/ml 复合制剂的自来水喂养, 其余处理与 IR 组相同。动物在手术之后处死前,

继续用相应的自来水或自来水配制的抗氧化剂喂养。每天记录动物的饮水量，计算动物实际的服药量。

测量方法如下：每只动物尼氏染色试验相邻的切片用于TUNEL试验，检测缺血再灌注损伤后海马区细胞的凋亡情况。TUNEL用改进的Gavrieli等建立的原位DNA碎片终端标记的方法（Gavrieli Y., Sherman Y. and Ben-Sasson S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493–501, 1992），可以特异检测断裂的DNA碎片，反映细胞的凋亡情况。该试验用试剂盒（In situ cell apoptosis detection kit, 武汉Boster 生物技术公司）检测，步骤如下：切片在TBS（Tris-buffer Solution）缓冲液中浸泡2次每次5分钟，在0.5% H₂O₂甲醇溶液中室温浸泡10分钟淬灭内源性的过氧化物酶，在双蒸水中冲洗2次，每次2分钟。切片用蛋白酶K（2mg/ml）室温通透60秒，TBS缓冲液中冲洗3次，每次2分钟。加入20μl标记缓冲液后，与含有地高辛标记的dUTP(digoxigenin-dUTP)在湿盒（Humidified chamber）中37°C孵育2小时。在TBS中冲洗3次，每次2分钟，然后用含有牛血清白蛋白的封闭液在湿盒中室温封闭30分钟。切片用生物素标记的抗地高辛抗体（Anti-DIG-Biotin）在湿盒中37°C孵育30分钟，TBS冲洗3次，每次2分钟，然后切片用过氧化物酶标记的链霉素湿盒中37°C孵育30分钟，TBS冲洗4次，每次5分钟，DAB显色。在试验中，DNAseI处理的切片和反应中不含中端转移酶的切片分别作为阳性对照和阴性对照。

复合制剂对沙鼠脑卒中细胞凋亡过程的作用包括，激活细胞内 DNA 内切酶，降解基因组 DNA，断裂 DNA。结果显示，阴性对照组海马区神经元没有特异性染色，缺血再灌后，几乎所有 CA1 区细胞都被特异性的着色，显示缺血再灌注引起 CA1 区大锥体神经元大量断裂的 DNA。在缺血再灌注损伤脑片中，与 CA1 区相比，CA2 区神经元部分断裂的 DNA，CA3 区凋亡神经元只有少部分断裂的 DNA，CA4 区和海马回几乎没有细胞断裂的 DNA。复合制剂预处理剂量依赖性减少了切片中断裂 DNA 神经元的数目，试验结果见图 7。

试验例 6. 药物复合制剂对沙鼠脑卒中引起的海马 CA1 区神经元凋亡的防

护作用

本试验例采用口服液剂型的药物复合制剂，表 2 中的 6 号产品，其中活性成分重量比例为：槲黄酮：银杏黄酮：知母宁=6：2：2。

雄性蒙古沙鼠（来自北京动物中心），体重 50~70 克，每笼一只，在标准条件下（见试验例 2）饲养，自由饮食，随机分为四组：缺血再灌注组（IR），自来水喂养 15 天后，实行缺血再灌注手术；阴性对照组，处理与 IR 组相同但是不结扎颈总动脉；低剂量处理组，用含有 0.5mg/ml 复合制剂的自来水喂养，其余处理与 IR 组相同；高剂量保护组，用含有 2.5mg/ml 复合制剂的自来水喂养，其余处理与 IR 组相同。动物在手术之后处死前，继续用相应的自来水或自来水配制的抗氧化剂喂养。每天记录动物的饮水量，计算动物实际的服药量。

电子显微镜检测了缺血再灌手术三天后，海马 CA1 区神经元的状态。阴性对照组海马 CA1 区神经元的细胞核，细胞核膜完整，DNA 均匀的分布于核中。与阴性对照组相比，多数缺血再灌注组海马 CA1 区神经元细胞核，表现出典型的凋亡细胞的特征，细胞核皱缩，DNA 凝聚在核膜附近。低剂量处理组的 CA1 区细胞核部分表现出凋亡细胞特征，部分细胞核 DNA 均匀的分布与细胞核内，细胞核膜基本完整但是与核膜相连的内质网膨胀。高剂量处理组 CA1 区神经元大部分形态完好，DNA 均匀的分布于细胞核内，表现出正常细胞特征，极少数神经元表现出凋亡细胞特征。电子显微镜结果进一步表明，复合制剂预处理可以保护海马 CA1 区神经元免受缺血再灌注损伤引起的神经元凋亡。试验结果见图 8。

试验例 7. 药物复合制剂对沙鼠脑卒中大脑海马组织中 iNOS 的 mRNA 水平

本试验例采用口服液剂型的药物复合制剂，表 2 中的 7 号产品，其中活性成分重量比例为：槲黄酮：银杏黄酮：知母宁=7：2：1。

雄性蒙古沙鼠（来自北京动物中心），体重 50~70 克，每笼一只，在标准条件（见试验例 2）下饲养，自由饮食，随机分为四组：缺血再灌注组（IR），自来水喂养 15 天后，实行缺血再灌注手术；阴性对照组，处理与 IR 组相同但是不结扎颈总动脉；低剂量处理组，用含有 0.5mg/ml 复合制剂的自来水喂养，其余处理与 IR 组相同；高剂量保护组，用含有 2.5mg/ml

复合制剂的自来水喂养，其余处理与 IR 组相同。动物在手术之后处死前，继续用相应的自来水或自来水配制的抗氧化剂喂养。每天记录动物的饮水量，计算动物实际的服药量。

用 RT-PCR 试验检测沙鼠大脑海马组织中 iNOS 的 mRNA 水平，如图 9 所示。在缺血再灌注组 iNOS 的 mRNA 大量表达，复合制剂处理剂量依赖性降低了 iNOS 的 mRNA 表达水平。

试验例 8. 药物复合制剂对沙鼠脑卒中海马组织中 NF κ B p65 和 TNF- α 的蛋白质水平作用

本试验例采用口服液剂型的药物复合制剂，表 2 中的 7 号产品，其中活性成分重量比例为：槲黄酮：银杏黄酮：知母宁=7：2：1。

雄性蒙古沙鼠（来自北京动物中心），体重 50~70 克，每笼一只，在标准条件（见试验例 2）下饲养，自由饮食，随机分为四组：缺血再灌注组（IR），自来水喂养 15 天后，实行缺血再灌注手术；阴性对照组，处理与 IR 组相同但是不结扎颈总动脉；低剂量处理组，用含有 0.5mg/ml 复合制剂的自来水喂养，其余处理与 IR 组相同；高剂量保护组，用含有 2.5mg/ml 复合制剂的自来水喂养，其余处理与 IR 组相同。动物在手术之后处死前，继续用相应的自来水或自来水配制的抗氧化剂喂养。每天记录动物的饮水量，计算动物实际的服药量。

缺血再灌注损伤 48 小时后海马区 NF κ B 和 TNF- α 的蛋白质水平如图 10 和 11 中所示（所述蛋白质水平以考马斯亮蓝 G-250 测定并调整所有的样品至统一的蛋白浓度）。在阴性对照组中 NF κ B 显示构成型表达，缺血再灌注损伤显著性增加了 75%左右的 NF κ B 表达水平。复合制剂处理剂量依赖性降低了 NF κ B 的表达水平，其中高剂量组的表达水平与缺血再灌注组相比有显著性差异，与阴性对照组相比差异不显著（如图 10 所示）。TNF- α 的蛋白质水平也表现出相似的趋势。TNF- α 在阴性对照组中也有表达，但表达量比较低，可能是由于缺血再灌手术引起的。在缺血再灌注损伤组中，TNF- α 的蛋白质水平显著性升高一倍以上。复合制剂处理剂量依赖性降低了 TNF- α 的蛋白质水平，其中高剂量组与缺血再灌注组相比有显著性差异（如图 11 所示）。

应该理解，尽管参考其示例性的实施方案，已经对本发明进行具体地显示和描述，但是本领域的普通技术人员应该理解，可以在其中进行各种形式和细节的变化，而不背离由后附的权利要求所定义的本发明的精神和范围。

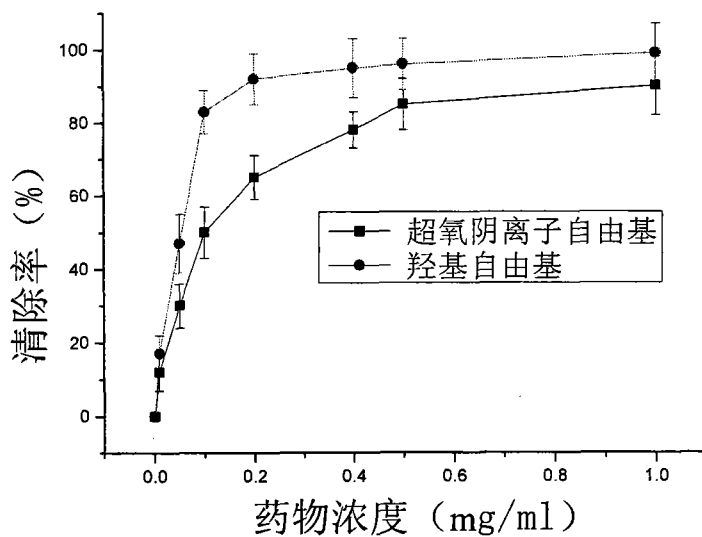


图 1

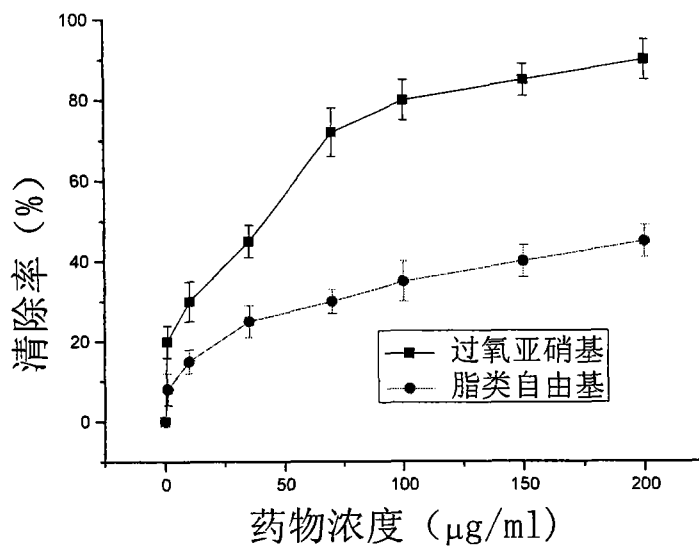
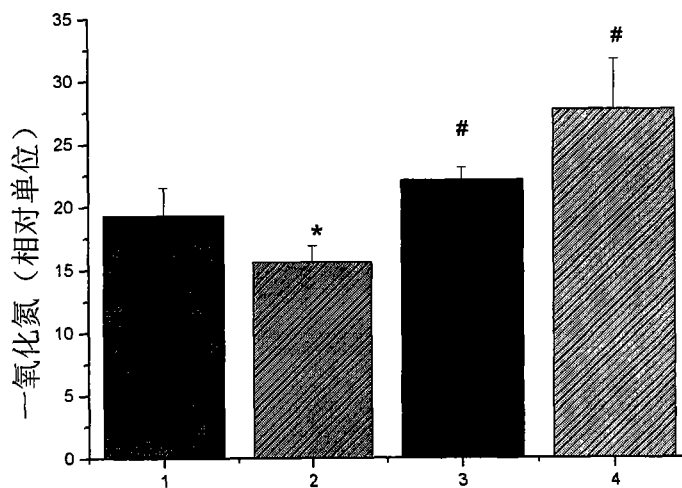
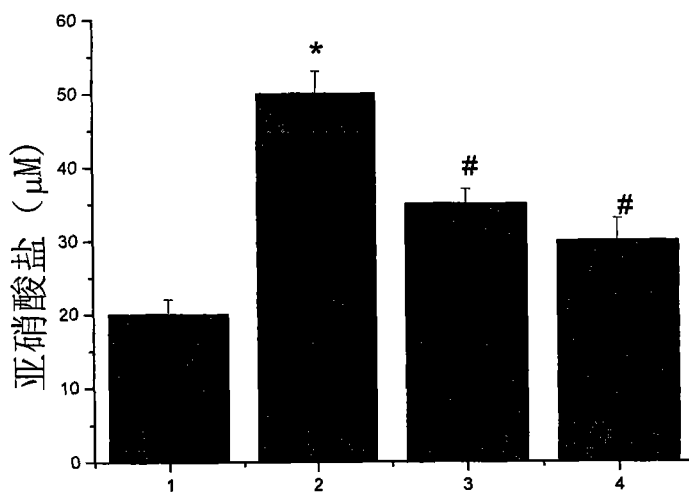


图 2



3A



3B

图 3

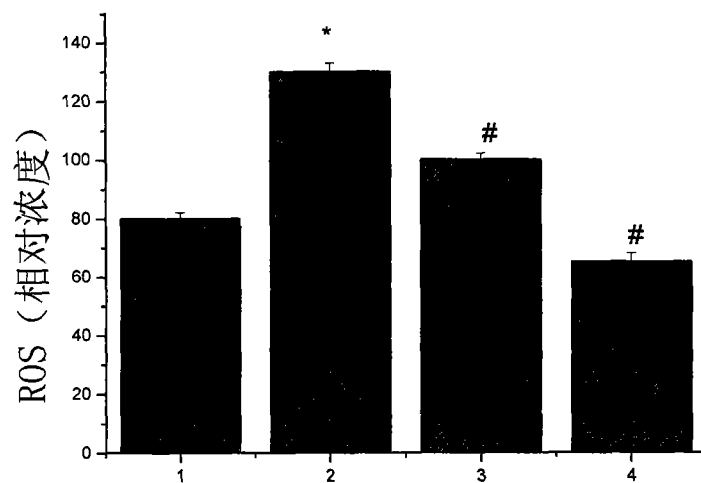


图 4

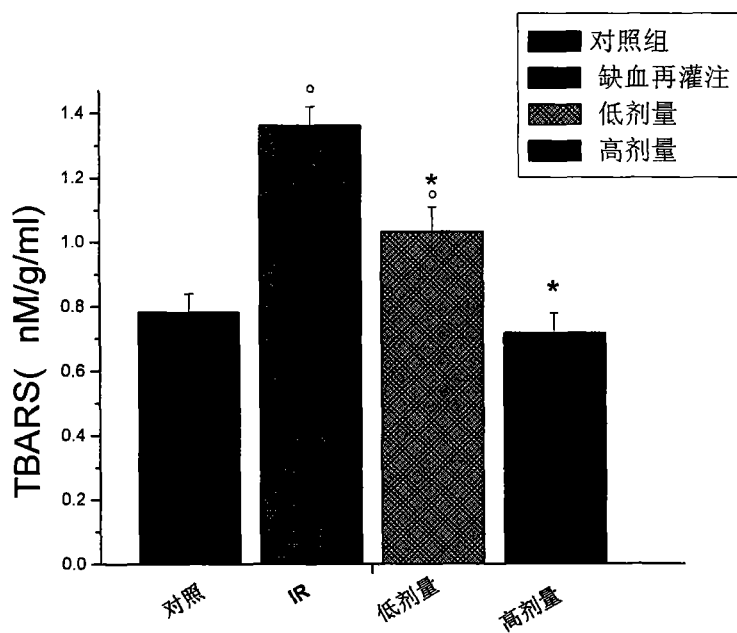


图 5

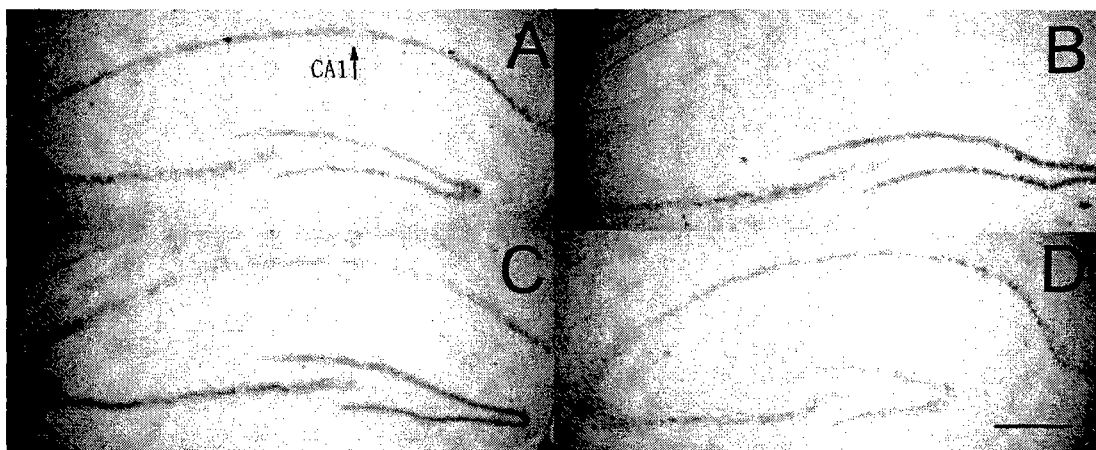


图 6

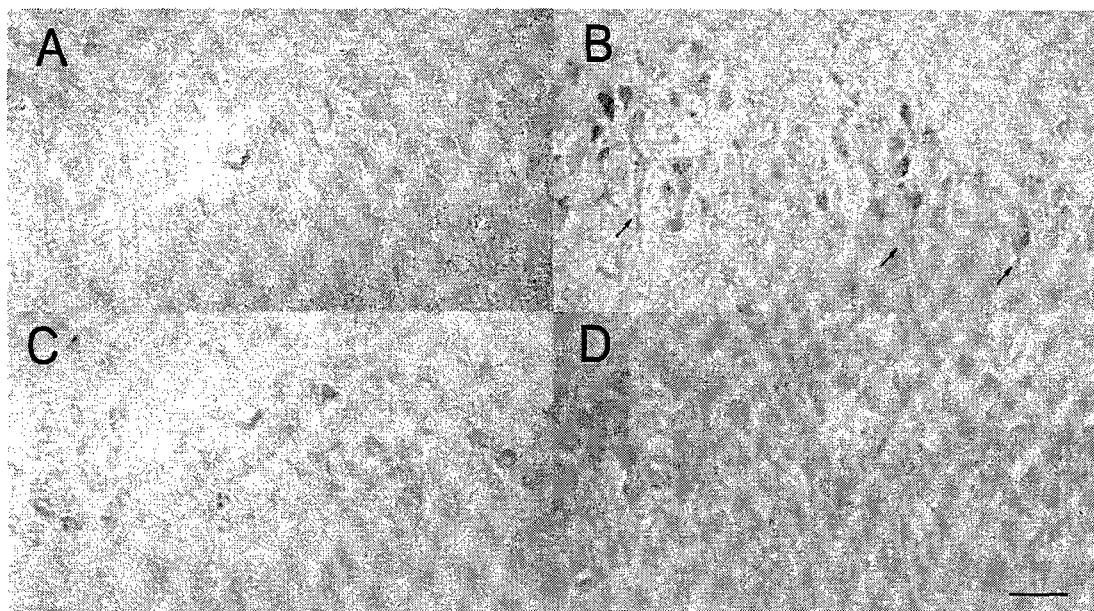


图 7

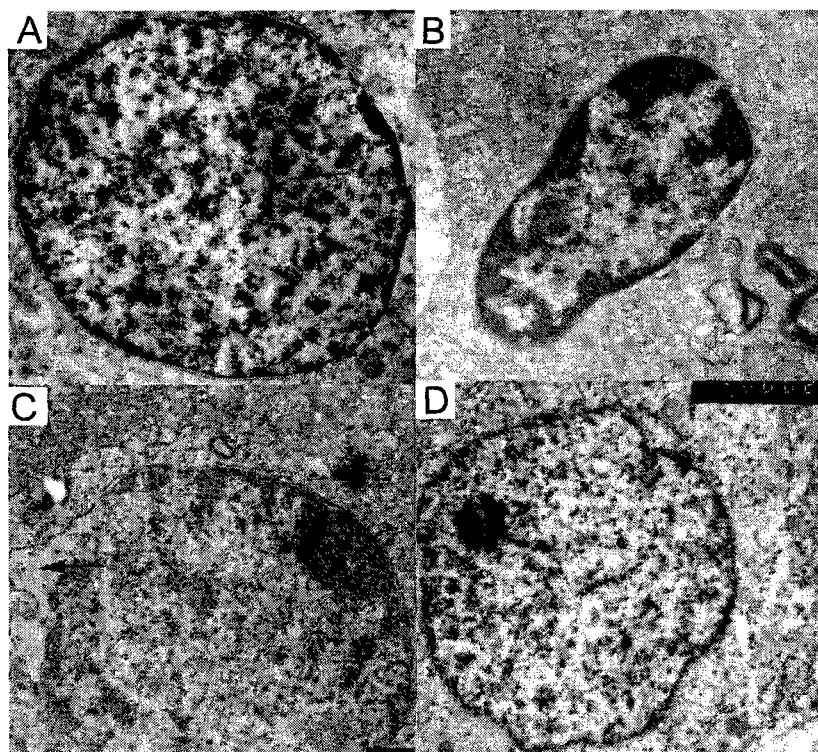


图 8

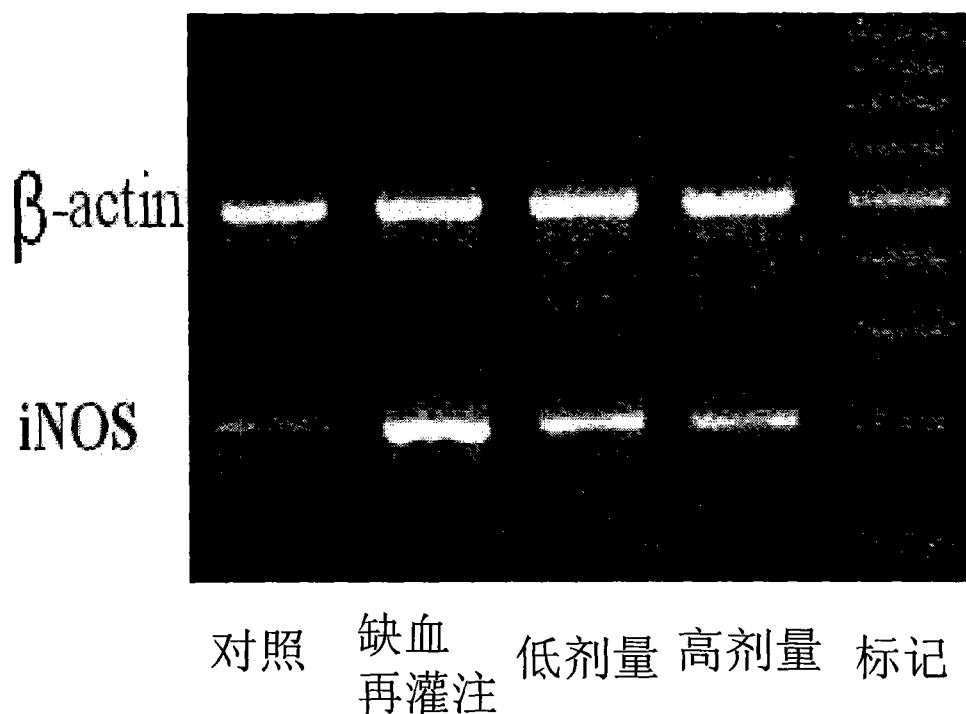


图 9

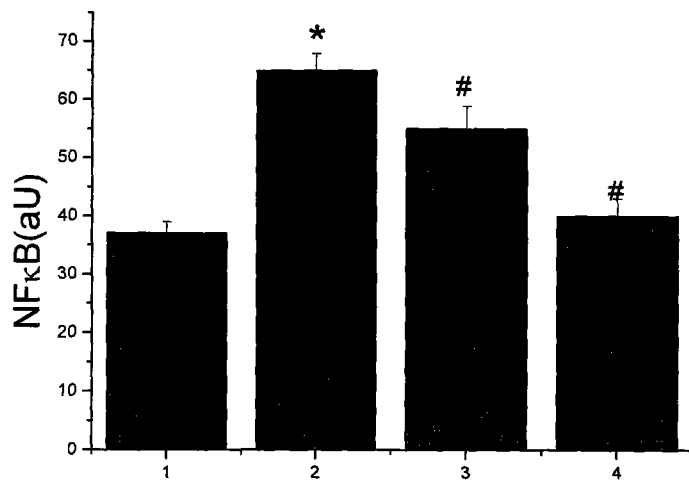


图 10

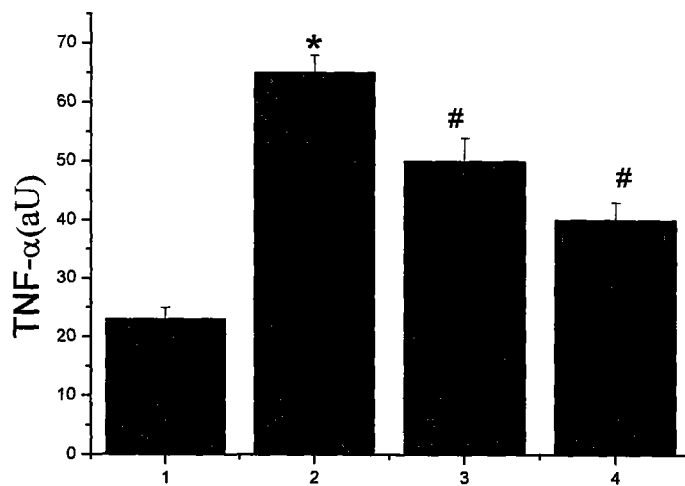


图 11