

## 紫杉醇联合三尖杉宁碱诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡

刘同祥<sup>1\*</sup>, 张艳平<sup>2</sup>, 徐羽<sup>1</sup>, 黄火强<sup>1</sup>, 徐斯凡<sup>1</sup>

(1. 中央民族大学 中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081;

2. 河南中医学院 药学院, 河南, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 以 HepG2 细胞作为体外模型, 研究紫杉醇与三尖杉宁碱联合作用抑制肿瘤细胞增殖及凋亡双重作用。方法: MTT 法检测不同浓度紫杉醇、三尖杉宁碱单药及不同联合给药方案对 HepG2 细胞的生长抑制作用; 以 PI 染色法流式细胞仪分析不同给药方案对 HepG2 细胞周期分布的影响, Annexin V-FITC/PI 双染色法分析不同联合给药方案对 HepG2 细胞凋亡的影响。结果: MTT 法证实不同给药方案对 HepG2 细胞抑制强度不同, 紫杉醇和三尖杉宁碱同时给药无明显协同作用; 先给予三尖杉宁碱 24 h 再给予紫杉醇和先给予紫杉醇 24 h 再给予三尖杉宁碱可见明显协同作用, 先给予紫杉醇 24 h 再给予三尖杉宁碱协同作用更加明显, 流式细胞仪检测结果显示, 紫杉醇与三尖杉宁碱联合用药较二者单独用药可诱导更多 HepG2 细胞凋亡。结论: 紫杉醇与三尖杉宁碱联合应用可协同抑制 HepG2 细胞增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡。

[关键词] 紫杉醇; 三尖杉宁碱; HepG2 细胞

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0115-05

## Effect of Taxol Combining with Cephalomannine on Apoptosis of Liver Cancer Cell HepG2

LIU Tong-xiang<sup>1\*</sup>, ZHANG Yang-ping<sup>2</sup>, XU Yu<sup>1</sup>, HUANG Huo-qiang<sup>1</sup>, XU Si-fan<sup>1</sup>

(1. Chinese Minority Traditional Medical Center, Minzu University of China, Beijing, 100081, China;

2. School of Chinese Materia Media, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the function of taxol combining with cephalomannine on apoptosis of liver cancer cell HepG2. **Method:** The inhibitory rates of taxol and cephalomannine alone or different combinations of taxol and cephalomannine on HepG2 cells were examined by MTT assay. The HepG2 cells of control group, cephalomannine group, taxol group and the combination group were stained by PI and Annexin V-FITC/PI, the cell cycle distribution and the apoptosis rates were detected by flow cytometry. **Result:** MTT assay showed different combination schemes had different inhibitory effects. The synergistic effects was seen in Scheme2 (HepG2 cells were treated with cephalomannin firstly and successively treated with taxol) and Scheme3 (HepG2 cells were treated with taxol firstly and successively treated with cephalomannin). **Conclusion:** Taxol combining with cephalomannine can definitely inhibit the growth of liver cancer cell HepG2 *in vitro*, and induce apoptosis for the cancer cell.

**[Key words]** taxol; cephalomannine; HepG2 cell

[收稿日期] 20100322(003)

[基金项目] 国家科技部科技人员服务企业项目 (2009GJD00019); 中央民族大学青年教师科研基金 (200928)

[通讯作者] \* 刘同祥, Tel: 010-68933254-801, E-mail: liutongxiangbj@126.com

紫杉醇是二萜类生物碱化合物, 是有效的植物抗癌药, 并且对于多种临床恶性肿瘤疗效显著。它主要作用于细胞微管, 诱导和稳定微管蛋白聚合, 抑制其解聚, 这样便抑制了细胞质微管的解聚, 使微管束不能与微管组织中心相互连接, 从而抑制肿瘤细胞纺锤体的形成, 使肿瘤细胞停止在 G<sub>2</sub> 期和 M 期, 导致有丝

分裂异常或停止,使癌细胞无法继续分裂,细胞最终以凋亡方式而死亡<sup>[1]</sup>。三尖杉宁碱与紫杉醇结构十分相似,为紫杉烷类二萜化合物,是紫杉醇次生代谢的前体物质<sup>[2]</sup>,在红豆杉属植物中的含量仅次于紫杉醇<sup>[3]</sup>,药理实验表明三尖杉宁碱具有较强的抗肿瘤活性,但尚无文献报道说明紫杉烷类二萜化合物单体成分或多个紫杉烷类二萜化合物协同的抑癌作用。本研究观察紫杉醇、三尖杉宁碱单独及联合用药对人肝癌 HepG2 细胞体外生长情况的影响,探讨不同给药方式有效性的差异并初步探索其作用机制。

## 1 材料与方

**1.1 试剂与细胞株** DMEM 培养液 (Invitrogen Corporation),胎牛血清(Sigma 公司),紫杉醇(中国药品生物制品检定所,批号 100382-200301),三尖杉宁碱(中国药品生物制品检定所,批号 100926-2007010),FITC-Annexin V/PI 凋亡试剂盒(Biovision 公司),肝癌细胞系 HepG2(首都医科大学肝病研究实验室提供)

**1.2 人肝癌 HepG2 细胞的培养** 人肝癌 HepG2 细

胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。

## 1.3 MTT 法检测细胞毒性

**1.3.1 确定最佳给药浓度** 紫杉醇和三尖杉宁碱分别配制成 0, 2.5, 12.5, 25, 62.5, 125, 250 μmol·L<sup>-1</sup>。单独作用于 HepG2 细胞 24 h 后测 A, 计算细胞生长抑制率,比较不同浓度紫杉醇和三尖杉宁碱抑制 HepG2 细胞生长作用,确定适宜的用药浓度。

**1.3.2 紫杉醇、三尖杉宁碱联合用药 HepG2 生长的协同作用** 试验分为紫杉醇作用组(24, 48 h);三尖杉宁碱作用组(24, 48 h);紫杉醇与三尖杉宁碱不同方式的联合给药组(联合给药组 1, 2, 3),另设空白对照组和本底组。联合给药组 1: 细胞培养 48 h 后同时给予紫杉醇和三尖杉宁碱。联合给药组 2: 细胞培养 24 h 后先给予三尖杉宁碱再给予紫杉醇;联合给药组 3: 细胞培养 24 h 后先给予紫杉醇再给予三尖杉宁碱;空白对照组: 加细胞, 含普通培养液;本底组: 不加细胞, 只含普通培养液。见表 1。

表 1 紫杉醇、三尖杉宁碱联合用药分组

组别	24 h		48 h	
	紫杉醇	三尖杉宁碱	紫杉醇	三尖杉宁碱
空白对照	-	-	-	-
本底	-	-	-	-
紫杉醇	24 h	最佳浓度	-	-
	48 h	-	最佳浓度	-
三尖杉宁碱	24 h	-	最佳浓度	-
	48 h	-	-	最佳浓度
联合给药	1	-	最佳浓度	最佳浓度
	2	最佳浓度	-	最佳浓度
	3	-	最佳浓度	最佳浓度

**1.4 流式细胞仪检测细胞周期** 试验分空白组、紫杉醇组、三尖杉宁碱组、联合给药组(细胞培养 24 h 后给予紫杉醇,继续培 24 h 后再给予三尖杉宁碱)共 4 组。取对数生长的细胞,0.25% 胰酶消化离心,制备成单细胞悬液。取细胞密度为 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL 放入 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 24 h,待细胞贴壁后加入相应的干预因素,按上述分组方法处理细胞后,继续培养 24 h 后收集,胰酶消化以上各处理组的细胞,收集至离心管,离心(1 000 r·min<sup>-1</sup> × 5 min),收集细胞;加入 70% 乙醇 1 mL 吹打成单细胞悬液,4

过夜,离心弃上清后收集细胞,PBS 洗 1 次;加入 200 μL 20 μg·mL<sup>-1</sup> 的 RNA 酶(PBS 稀释),37℃ 水浴 30 min;加入 300 μL 50 μg·mL<sup>-1</sup> PI,冰浴 30 min,流式细胞仪检测并对 DNA 进行定量分析,利用 CellFit 软件进行细胞周期分布的测定。

## 1.5 Annexin V-FITC 荧光染色检测细胞凋亡<sup>[4]</sup>

试验分组及给药同 1.4 取细胞(1 × 10<sup>5</sup> 个/mL)放入 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 24 h,待细胞贴壁后加入相应的干预因素,按上述分组方法处理细胞后,继续培养 24 h 后收集,收集细胞,4℃ 预冷的 PBS 液洗 2 次,

1 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min, 250 μL 的结合缓冲液悬浮细胞, 取 100 μL 细胞悬液于 5mL 流式管中(将其平均分入 2 个流式管内, 每管 100 μL; 一组为对照组, 一组为试验组), 加 5 μL 的 Annexin-V/FITC 和 10 μL 20 ng·mL<sup>-1</sup> PI 溶液, 混匀后室温避光孵育 5 ~15 min, 在反应管中加入 400 μL PBS 洗去多余的染料, 上流式细胞仪检测分析。

**1.6 数据分析** 实验数据采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。P < 0.05 有显著性差异, P < 0.01 有极显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 紫杉醇、三尖杉宁碱对 HepG2 细胞生长的影响

**2.1.1 紫杉醇对 HepG2 细胞生长的影响** 紫杉醇浓度小于 12.5 μmol·L<sup>-1</sup>时, 给药组与空白对照组 A 间比较差异无统计学意义; 浓度大于 12.5 μmol·L<sup>-1</sup>时紫杉醇对 HepG2 给药组与空白组 A 间比较差异有统计学意义 (P < 0.05); 紫杉醇可呈剂量依赖性的抑制 HepG2 细胞生长, 半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 为 18.5 μmol·L<sup>-1</sup>, 最佳给药浓度为 12.5 μmol·L<sup>-1</sup> (表 2)。

表 2 不同浓度紫杉醇对 HepG2 细胞系的抑制作用

组别	终浓度 / μmol·L <sup>-1</sup>	A	抑制率 / %
本底	-	0.097 ±0.009	-
空白对照	-	0.370 ±0.003	-
紫杉醇	2.5	0.252 ±0.012	43.02
	12.5	0.233 ±0.012 <sup>1)</sup>	51.90
	25.0	0.176 ±0.005 <sup>1)</sup>	74.10
	62.5	0.158 ±0.004 <sup>1)</sup>	77.50
	125.0	0.160 ±0.005 <sup>1)</sup>	76.99
	250.0	0.115 ±0.001 <sup>2)</sup>	93.60

注: 与空白对照组比<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01 (表 3 ~4 同)。

**2.1.2 三尖杉宁碱对 HepG2 细胞生长的影响** 三尖杉宁碱浓度小于 12.5 μmol·L<sup>-1</sup>时, 给药组与空白对照组吸光度值间比较差异无统计学意义; 浓度大于 12.5 μmol·L<sup>-1</sup>, 三尖杉宁碱对 HepG2 加药组与空白组吸光度值间比较差异有统计学意义 (P < 0.05)。三尖杉宁碱可呈剂量依赖性的抑制 HepG2 细胞生长, 半数药物抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 为 22.5 μmol·L<sup>-1</sup>, 最佳给药浓度为 12.5 μmol·L<sup>-1</sup> (表 3)。

表 3 不同浓度三尖杉宁碱对 HepG2 细胞系的抑制作用

组别	终浓度 / μmol·L <sup>-1</sup>	A	抑制率 / %
本底	-	0.102 ±0.014	-
空白对照	-	0.317 ±0.013	-
三尖杉宁碱	2.5	0.233 ±0.012	29.10
	12.5	0.173 ±0.015 <sup>1)</sup>	66.70
	25.0	0.163 ±0.006 <sup>1)</sup>	71.60
	62.5	0.161 ±0.012 <sup>1)</sup>	72.50
	125.0	0.158 ±0.015 <sup>1)</sup>	73.90
	250.0	0.144 ±0.008 <sup>2)</sup>	80.50

**2.1.3 紫杉醇与三尖杉宁碱联合用药对 HepG2 细胞生长的抑制作用** 紫杉醇 12.5 μmol·L<sup>-1</sup>与三尖杉宁碱 12.5 μmol·L<sup>-1</sup>以不同的给药方式联合给药, 观察对 HepG2 细胞生长的影响。结果: 同时给予紫杉醇和三尖杉宁碱与紫杉醇和三尖杉宁碱与单独给药比较无协同作用 (CDI = 1.59); 先给予三尖杉宁碱再给予紫杉醇与紫杉醇单独给药、三尖杉宁碱单独给药比较亦无协同作用 (CDI = 2.54); 先给予紫杉醇再给予三尖杉宁碱与紫杉醇单独给药组、三尖杉宁碱单独给药组比较有协同作用 (CDI = 0.35, < 0.7)。先给予紫杉醇作用 24 h 后再加入三尖杉宁碱继续作用 24 h 对细胞生长抑制作用最强。见表 4。

表 4 不同给药方式对 HepG2 细胞系的抑制作用

组别	A	抑制率 / %	两药相互作用指数
空白对照	0.24 ±0.009	-	
紫杉醇 24 h	0.06 ±0.005	75.0	
三尖杉宁碱 24 h	0.1506 ±0.012	45.58	1.59
联合给药组 1	0.06 ±0.015	75.0	
紫杉醇 24 h	0.06 ±0.011	75.0	
三尖杉宁碱 48 h	0.0401 ±0.012	83.29	2.54
联合给药组 2	0.0255 ±0.009	89.38	
紫杉醇 48 h	0.0978 ±0.008	89.58	
三尖杉宁碱 24 h	0.1506 ±0.011	45.58	0.35
联合给药组 3	0.0213 ±0.007	91.13	

### 2.2 紫杉醇、三尖杉宁碱对 HepG2 细胞周期影响

流式细胞仪检测细胞周期, 与空白对照组比较, 紫杉醇和三尖杉宁碱作用 24 h 后 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞明显减少, G<sub>2</sub>/M 期细胞明显增多; 作用 48 h 后 S 期细胞明显增多; 不同给药方式给药组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期亦见明

显减少, G<sub>2</sub>/M 期明显增多, S 期细胞数无明显改变, 结果见表 5。

**2.3 紫杉醇、三尖杉宁碱对 HepG2 细胞凋亡的影响** HepG2 细胞按不同给药方式进行处理, 细胞处理完毕 Annexin V-FITC/PI 双染法标记细胞, 流式细胞检测细胞凋亡率。结果, 紫杉醇和三尖杉宁碱都能诱导细胞凋亡, 二者联合给药, 细胞凋亡数目明显多于二者单独给药, 结果见表 5。

表 5 紫杉醇、三尖杉宁碱不同给药方式对 HepG2 细胞周期的影响 %

组别	细胞周期分布			细胞 凋亡率
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> /M	S	
空白对照	52.71	7.34	39.95	17.11
紫杉醇(24 h)	5.48	61.67	32.84	47.58
紫杉醇(48 h)	18.76	31.02	50.23	68.19
三尖杉宁碱(24 h)	23.54	38.98	37.48	30.72
三尖杉宁碱(48 h)	23.52	15.75	60.74	42.95
联合给药组 1	2.33	74.12	23.55	27.94
联合给药组 2	21.44	44.29	34.26	43.26
联合给药组 3	22.67	33.10	44.23	65.04

### 3 讨论

紫杉醇(paclitaxel, 商品名 Taxol) 是红豆杉属植物中含有的一种具有五甲基十五碳烯骨架的二萜类化合物, 最初是由 Wani 等从短叶红豆杉(Taxus brevifolia) 中得到<sup>[5]</sup>, 具有独特的抗癌作用, 对卵巢癌、子宫癌、乳腺癌等十几种癌症具有很好的疗效。研究证实紫杉醇诱导胃癌、前列腺癌等细胞凋亡有浓度依赖性, 随着浓度的增高细胞毒性增强。目前已作为乳腺癌、卵巢癌和非小细胞肺癌的临床一线药品。本研究发现紫杉醇浓度小于 12.5 μmol·L<sup>-1</sup> 时, 加药组与空白组比较无明显抑制作用, 而浓度大于或等于 12.5 μmol·L<sup>-1</sup> 时, 对 HepG2 细胞生长有显著的抑制作用, 并且紫杉醇对 HepG2 细胞的抑制作用呈剂量依赖性, 随浓度的增高细胞毒性增强, 与文献<sup>[6-7]</sup> 报道一致。说明本实验所采用三尖杉宁碱(cephalomannine, ) 是紫杉烷二萜类化合物, 是紫杉醇的紫杉烷类同系物, 与紫杉醇结构、性质比较接近, 母环部分是一个复杂的四环体系, 与紫杉醇完全相同, 只是在侧链部分略有不同, 有许多功能基团和立体化学特征, 可以经过结构修饰转变为紫杉醇, 是紫杉醇半合成的前体, 也是红豆杉属植物中含有的抗癌活性成分, 含量仅次于紫杉醇。紫杉烷二萜类

化合物在紫杉属植物化学研究中占有重要的地位, 其结构与紫杉醇类似, 又是紫杉醇半合成的前体物质, 从构效关系而言, 其抑制肿瘤细胞增殖活性也应较强<sup>[8-9]</sup>。本研究证实, 三尖杉宁碱浓度小于 12.5 μmol·L<sup>-1</sup> 时, 加药组无明显抑制作用, 而浓度大于或等于 12.5 μmol·L<sup>-1</sup> 时, 对 HepG2 细胞生长有显著的抑制作用。三尖杉宁碱作用 HepG<sub>2</sub> 细胞后, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞明显减少, G<sub>2</sub>/M 期细胞增多, 这与紫杉醇能使肿瘤细胞停止在 G<sub>2</sub> 期和 M 期, 导致有丝分裂异常或停止, 使癌细胞无法继续分裂, 可诱导细胞最终以凋亡方式而死亡的作用机制相一致。

研究表明人肝癌 HepG2 细胞对紫杉醇与三尖杉宁碱联合应用的敏感性高, 明显较单药组凋亡细胞数目多, 具有抑制其增殖、促进凋亡的协同作用。同时本研究发现紫杉醇与三尖杉宁碱以不同顺序联合给药对 HepG2 细胞的生长抑制率不同, 只有先给予紫杉醇再给予三尖杉宁碱可以起到较好的协同作用。诱导凋亡是实现其对 HepG2 细胞抑制作用的重要途径, 紫杉醇作用 48 h, 肝癌 HepG2 细胞发现凋亡, 仅见少许坏死细胞, 紫杉醇与三尖杉宁碱联合作用 48 h, 肝癌 HepG2 细胞大量凋亡, 可见肿瘤细胞大量坏死。细胞凋亡的早期改变之一是磷脂酰丝氨酸(ps) 从细胞膜内转移至细胞外, 异硫氰荧光素(FITC) 标记的 Annexin V 结合 PI 双染检测细胞凋亡。结果显示: HepG2 细胞凋亡通常是在紫杉醇与三尖杉宁碱联合作用的一定浓度和作用时间内发生的, 超出最高界线则表现为细胞坏死, 提示如何更安全更有效地发挥其治疗作用, 应进一步研究。

此外, 我国紫杉醇工业生产中, 提取完紫杉醇目标产物后很少再次利用红豆杉原料, 其中三尖杉宁碱同样具有较高的药用价值, 将紫杉醇和三尖杉宁碱联合用于临床抗肿瘤治疗, 能有效综合利用红豆杉属植物, 解决植物资源匮乏, 从而保护濒临灭绝的红豆杉资源。

### [参考文献]

[1] 张传涛, 史业辉, 佟仲生. 紫杉醇联合肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体诱导 MCF-7 乳腺癌细胞系凋亡机制的研究[J], 中华乳腺病杂志, 2008, 2(6): 27.

[2] 李瑞, 郭利伟, 郭伟云, 等. 抗肿瘤药用植物及其内生菌活性代谢产物的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(16): 7508, 7515.

(下转第 122 页)

## 大黄苷元联合尿激酶动脉溶栓对血栓性 脑缺血大鼠神经细胞凋亡的影响

刘敬霞<sup>1</sup>, 李建生<sup>2\*</sup>, 王冬<sup>3</sup>, 刘轲<sup>2</sup>, 梁生旺<sup>2</sup>, 李宁<sup>2</sup>, 苏静<sup>2</sup>, 郭晓燕<sup>2</sup>, 孙捷<sup>2</sup>

(1. 宁夏医科大学, 银川 750004; 2. 河南中医学院老年医学研究所, 郑州 450003;  
3. 河南省洛阳市妇女儿童保健中心儿童医院, 河南 洛阳 471000)

[摘要] 目的: 探讨大黄苷元联合不同时间窗溶栓治疗对脑缺血大鼠神经细胞凋亡的阻抑作用及其对相关调控基因蛋白表达的影响。方法: 大鼠随机分为假手术组、模型组、尿激酶溶栓组(简称溶栓组)、大黄苷元组和联合组(大黄苷元+尿激酶组)。大鼠自体血栓结合线栓阻塞大脑中动脉制备血栓性脑缺血动物模型。大鼠分别于缺血后 3, 6, 9 h 经导管由颈内动脉用尿激酶进行溶栓。动脉给尿激酶后 24 h, 观察大鼠脑组织病理改变; 免疫组织化学法检测神经细胞凋亡和凋亡相关基因蛋白 Bax, caspase-3 和 Bcl-2 表达。结果: 各模型组大鼠病理改变明显, TUNEL 细胞增多、Bax 和 caspase-3 表达增强、Bcl-2 表达下调; 各用药组较模型组 TUNEL 细胞减少, 6 h 和 9 h 组 Bax 和 caspase-3 表达减弱、6 h 组 Bcl-2 表达上调; 各组 9 h 分别较其 3 h 的 TUNEL 细胞数增加、Bax 增强、Bcl-2 减弱; 联合组分别较单一用药各时间组 TUNEL 细胞数减少、6 h 和 9 h 组 Bax 及 caspase-3 表达减弱、Bcl-2 表达上调。结论: 脑缺血可使促凋亡基因 Bax 表达上调和抑凋亡基因 Bcl-2 下调, 引起神经细胞凋亡, 且随缺血时间延长而明显。大黄苷元及尿激酶溶栓可下调 Bax, caspase-3, 上调 Bcl-2 表达, 对脑缺血神经细胞凋亡有阻抑作用, 以二者联合用药的效果尤为理想。

[关键词] 脑缺血; 大鼠; 溶栓; 大黄苷元; 联合; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0119-04

## Influence of Rhubarb Aglycone Associated Thrombolysis on Neurocyte Apoptosis in Rats with Thrombus-occluded Cerebral Ischemia

LIU Jing-xia<sup>1</sup>, LI Jian-sheng<sup>2\*</sup>, WANG Dong<sup>3</sup>, LIU Ke<sup>2</sup>, LIANG Sheng-wang<sup>2</sup>, LI Ning<sup>2</sup>,  
SU Jing<sup>2</sup>, GUO Xiao-yan<sup>2</sup>, SUN Jie<sup>2</sup>

(1. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Geriatrics Institute of Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China; 3. China Children's Hospital of Femme and Child Care Centre of Luoyang City in Henan Province, Luoyang 471000, China)

[Abstract] **Objective:** To compare depression effects of rhubarb aglycone associated thrombolysis using at different time windows through artery on neurocyte apoptosis and its correlated controlling gene in rats with thrombus-occluded cerebral ischemia. **Method:** Rats were randomly divided into sham-operated, model, urokinase thrombolysis, rhubarb aglycone and associated groups. Rat model of thrombus-occluded cerebral ischemic was duplicated through the occlusion of middle cerebral artery by using the embolus of rat autologous blood blot and being inserted with nylon thread. At the time of 3, 6, 9 h after the operation of cerebral ischemia, rats were underwent

[收稿日期] 20100111(024)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(C03050311)

[第一作者] 刘敬霞, 博士, 副教授, 硕士生导师, 长期从事中医防治脑血管病的研究工作, Tel: 0951-6880501, E-mail: ljx199566@163.com.

[通讯作者] \* 李建生, 博士, 教授, 博士生导师, 长期从事中医防治脑血管病的研究工作, Tel: 0371-65676568, E-mail: Li\_js8@163.com.