

發明專利說明書

※申請案號：096129950

※IPC分類：

一、發明名稱：

治療腦血管疾病的組成物以及促進紅血球生成素表現的方法

COMPOSITION FOR TREATING A CEREBROVASCULAR DISEASE AND A METHOD FOR INCREASING EXPRESSION OF ERYTHROPOIETIN

二、中文發明摘要：

本發明係提供一種利用紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子治療腦血管疾病的方法，包括篩選一需要治療之個體，並給予一有效量之紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子。此外，本發明另提供一種利用顆粒性細胞生長因子來增加紅血球生成素表現的方法。

三、英文發明摘要：

A method for treating a cerebrovascular disease with erythropoietin (EPO) and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) jointly by first identifying a subject in need of the treatment and then administering to the subject an effective combined amount of EPO and G-CSF. Also disclosed is a method for increasing in a subject expression of EPO with G-CSF.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第()圖

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

[_0001] 本發明係有關於一種治療腦血管疾病之組成物，且特別有關於利用紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子來治療腦血管疾病，以及利用顆粒性細胞生長因子來增加紅血球生成素表現的方法。

【先前技術】

[_0002] 紅血球生成素(EPO)為一種30.4 kDa的醣蛋白，可控制紅血球的生成。EPO可藉由與紅血球前期細胞上的EPO受體結合而促進紅血球前期細胞的增生及分化。其相關資訊可參照Krantz, Blood 77(3): 419-434(1991) and Jelkmann, Physiol Rev. 72(2): 449-489(1992)。EPO常用來作為治療慢性貧血或因化療性貧血的藥劑。

[_0003] 顆粒性細胞生長因子(G-CSF)為一種19.6 kDa的醣蛋白，可促使骨髓產生顆粒球(granulocytes)。此外，其也可促進嗜中性白血球前驅物及其成熟細胞的存活率、增生、分化及功能。G-CSF可用來治療嗜中性白血球過低症(neutropenia)。請參照Burgess et al., Int. J. Cancer 26(5): 647-654(1980), and Frampton, et al., Drugs 48(5): 731-760(1994)。

【發明內容】

[_0004] 本發明係提供一種治療腦血管疾病之組成物，包括一有效量之紅血球生成素(erythropoietin)及/或顆粒性細胞生長因子(Granulocyte colony-stimulating factor)。

[_0005] 本發明另提供一種增加紅血球生成素表現的方法，包括：篩選一需要增加紅血球生成素表現的個體，以及給予一有效量之顆粒性細胞生長因子至該個體中。

[_0006] 為了讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例，並配合所附圖示，作詳細說明如下：

【實施方式】

- [_0007] 請參照Semenza, *Trend Mol Med.* 7(8): 345-350, 2001, EPO的表現量可藉由轉錄因子HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α)與EPO啟動子上的hypoxia-response片段結合來提升。
- [_0008] 本發明發現G-CSF可藉由活化HIF-1 α 來促進EPO的表現量,同時也發現EPO與G-CSF結合時可對皮質神經細胞(primary cortical cells)產生強大的神經保護作用。例如,結合EPO與G-CSF時可藉由增加Bcl-2(抗細胞凋亡蛋白)表現量及去活化caspase-3(細胞凋亡因子)來抑制細胞凋亡。且同時使EPO與G-CSF所產生的抑制效果大於單獨使用EPO或G-CSF。此外,同時使用EPO與G-CSF可大量地減少缺血性傷害。EPO與G-CSF可減少栓塞性腦中風及中大腦動脈阻塞(Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO)的神經失調。EPO與G-CSF可促使幹細胞移動至缺血的部位,且EPO與G-CSF可促進血管新生及生成新的腦血管。簡而言之,EPO與G-CSF可用來治療腦血管疾病。
- [_0009] 首先篩選一個體是否需要此治療,再給予此個體一有效量之EPO與G-CSF。
- [_0010] 腦血管疾病包括所有腦部因缺血或失血所造成暫時或永久的損傷,以及一或複數個腦血管病變。
- [_0011] “有效量之組合”係指可對患者個體產生治療效果的EPO與G-CSF的含量。此技藝人士可依照疾病的種類、給予方式、載體及來改變有效劑量。
- [_0012] EPO與G-CSF可為一般商品,例如,Johnson & Johnson及Kirin Pharmaceutical Co. Ltd。也可利用DNA重組技術產生。
- [_0013] EPO與G-CSF可配製成二個藥物組成物或合併成一種藥物組成物。此組合物包括藥學上可接受之載體。“可接受”係指此載體可與組成物之成份相容(較佳可穩定活性成份)且不會對治療的個體產生毒害。一或多個可溶性物質可作為藥學載體,例如,膠態氧化矽、硬脂酸鎂、纖維素、烷基硫酸鹽及D&C Yellow#10。
- [_0014] EPO與G-CSF可藉由各種不同的途徑給予,例如,非腸胃的途徑。“非腸胃”係指皮下、皮內、靜脈、肌肉、關節、動脈、滑囊、胸腔、髓膜、病灶或顱內注射等適合的方式。當EPO與G-CSF為二種藥劑時,可同時或分別給予。
- [_0015] 在一實施例中,EPO與G-CSF共同配製成一血管注射組成物。此血管注射組成物可為一溶液或懸浮於適當的溶劑或釋液,例如,1,3-丁二醇。適合的溶劑可為甘露醇、水、Ringer溶液及生理食鹽水。此外,不揮發油也可作為溶劑或懸浮培養液(如單或雙甘油酯)。脂肪酸,如油酸及其甘油酯衍生物常用於血管注射劑的製備,也可作為藥學上可接受的油類,例如,橄欖油、蓖麻油,尤其是其聚氧乙烯衍生物。上述油脂溶液或懸浮液也可包含一長鏈的醇類稀釋劑或分散劑,如羧甲基纖維素或其類似物。其他界面活性劑,如Tweens或Spans等類似乳化劑或生物促進劑也可使用於製備藥學上可接受之藥劑。
- [_0016] 本發明也包括使用同時包含EPO與G-CSF的藥劑治療腦血管疾病。
- [_0017] 在本發明另一形態中包括篩選一需增加EPO表現量的個體,接著給予該個體一有效量之G-CSF。此需治療的個體可為許多情況,例如貧血。G-CSF可以上述的方法進行配製及給予。本發明包括利用G-CSF來增加一個體EPO的表現量。
- [_0018] **1. G-CSF增加健康者血清中的EPO含量**首先,以皮下注射的方式給予健康受試者10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的G-CSF,連續注射5天。分別在注射G-CSF後第1、3、7、14天採取受試者的血液樣本。利用EPO的專一性抗體(R&D System, Minneapolis, MN)以ELISA分析血液樣本中EPO的含量。
- [_0019] 由分析結果可知,在G-CSF注射後3天,G-CSF可大量地增加EPO的含量。
- [_0020] **2. 以G-CSF活化之HIF-1 α 可提升EPO在初代皮質神經細胞的含量**由Sprague-Dawley大鼠受孕17天之胚胎的大腦皮層取得初代皮質神經細胞。相關步驟可參考Goldberg et al., *J. Neurosci.* 13(8): 3510-3524。在採取初代皮質神經細胞後4天,將初代皮質神經細胞置於含0.5 g/L的BSA、2%的B27補充劑、0.5 mM的丙酮酸及抗生素(例如,10⁵ $\mu\text{g}/\text{L}$ 盤尼西林及100 mg/L鏈黴素)之MEM培養基(GI0CO-BRL)中。在第7天時,將培養基換成無血清之神經培養基,其中含有1 mM的丙酮酸,1 mM的麩胺酸,0.5 g/L的BSA,2%的B27補充劑及抗生素(例如,10⁵ $\mu\text{g}/\text{L}$ 盤尼西林及100 mg/L鏈黴素)。
- [_0021] 接著以G-CSF處理此初代皮質神經細胞,處理時間分別為0.5、1、4、10及24小時,處理劑量分別為0.01、0.1、1及10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。處理後,將細胞溶解於含有320 mM蔗糖,5 mM HEPES,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin的緩衝液中,並以13000 g離心15分鐘。將沉澱物懸浮於含62.5 mM Tris-HCl,10%甘油,2% SDS,0.1 bromophenol blue及50 mM DTT的樣本緩衝液中,並利用4%-12%的十二烷基磺酸鈉-聚丙烯醯胺膠電泳

(SDS-PAGE)進行分析。接著將蛋白質轉漬到Hybond-P耐龍膜上，並利用抗HIF-1 α 抗體及抗EPO抗體(R&D System, Minneapolis, MN)以西方墨點法分析HIF-1 α 及EPO的含量。

- [_0022] 結果發現，在以G-CSF處理初代皮質神經細胞1及4小時後，HIF-1 α 及EPO的含量明顯增加，且其具有劑量依隨效應(dose-dependent)。當G-CSF的劑量為0.1 μ g/ml時，HIF-1 α 的含量最高。當G-CSF的劑量為0.1 μ g/ml時，EPO的含量增加，而當G-CSF的劑量為1 μ g/ml時，EPO的含量最高。
- [_0023] **3. G-CSF與EPO在初代皮質細胞中在抗凋亡作用上具有協同效果**採取及培養大鼠初代皮質細胞。採取及培養方法與上述相同。將這些細胞分別以G-CSF(2 mg/ml)、EPO(20 U/ml)或G-CSF(1 mg/ml)+EPO(10 U/ml)處理12小時，並給予缺糖及缺氧處理(OGD)以誘發細胞凋亡。簡而言之，將細胞培養於無葡萄糖的Earle's鹽類溶液及缺氧箱中(Bug Box, Ruskin Technology, UK)4小時，同時灌流37°C的95%N₂及5%O₂，使氧的壓力小於1 mmHg。接著將OGD處理過後的細胞以氧處理24小時，並培養於正常的條件下。正常的培養條件已揭示於前文。對照組的細胞培養於無葡萄糖的Earle's鹽類溶液並置於正常氧含量的環境中。
- [_0024] 在經過OGD處理後，以螢光分析套組(Bio-Rad)分析皮質細胞的caspase-3活性。並利用西方墨點法分析與凋亡相關蛋白質，如Bcl-2、Bcl-xL、Bax及Bad的表現量。
- [_0025] 結果發現，不論以G-CSF(2 mg/ml)或EPO(20 U/ml)處理初代皮質細胞皆可以有效地減少OGD所引發的caspase-3活性。且細胞在以G-CSF(1 mg/ml)+EPO(10 U/ml)處理後，更能有效地抑制caspase-3活性。換句話說，與單獨G-CSF或EPO相比，G-CSF與EPO對抑制初代皮質細胞因OGD所引發的caspase-3活性具有協同效果。
- [_0026] 同樣地，EPO(20 U/ml)或G-CSF(2 mg/ml)可增加皮質細胞在OGD處理下的Bcl-2表現量，且細胞在以G-CSF(1 mg/ml)+EPO(10 U/ml)處理後，更能有效地增加Bcl-2的表現量。
- [_0027] **4. EPO與G-CSF可促進皮質缺血後的神經行為**利用肢體搖擺(body swing)及活動力測定(locomotor activity)分析EPO、G-CSF及EPO+G-CSF對回復缺血損害的能力。
- [_0028] 對40隻Sprague-Dawley大鼠(6-7週大，重約250-300 g)進行*in vivo*的腦部缺血/充血實驗。首先以水化氯醛(chloral hydrate)(0.4 g/kg, ip)麻醉並結紮右中腦動脈(right middle cerebral artery, MCA)，並以及鉗夾側總頸動脈(common carotid artery, CCA)，相關的步驟可參考Chen et al., A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke*, 17(4): 738-743(1986)。在缺血90分鐘後，移除右中腦動脈(MCA)的10-0縫合及側總頸動脈(CCA)的動脈鉗，使血液重新流通。當大鼠由缺血狀態回復過來後，以燈光照射使體溫維持於37°C。在缺血處理後1天，將大鼠分為4組(每組10隻)，分別以皮下注射的方式注射G-CSF(100 mg/kg)、EPO(10000 U/kg)、G-CSF(50 mg/kg)+EPO(5000 U/kg)或載體。
- [_0029] 分別在缺血處理前3天，及缺血後第3、7、14及28天測定大鼠的行為模式。測定方法包括：(a)肢體搖擺測式，相關步驟請參照Borlongan et al., *Neuroreport* 9(12): 2837-2842，(b)活動力測式，相關步驟請參照Shyu et al., *Circulation* 110(13): 1847-1854(2004)以及(c)利用鼠拉力機測試抓握肌力，相關步驟請參照Dunnett et al., *Neurosci Lett*. 246(1): 1-4(1998)。簡而言之，在缺血處理前後分別偵測每隻大鼠前肢的抓握肌力，計算其平均值(超過20次)，並分別比較同側及不同側的抓握肌力平均值。
- [_0030] 在缺血處理後7天，載體控制組的大鼠表現出嚴重的不對稱，但在G-CSF(100 mg/kg)、EPO(10000 U/kg)、G-CSF(50 mg/kg)+EPO(5000 U/kg)處理下則可大幅的減少這種情況。此外，同時處理G-CSF及EPO的回復效果較單獨處理G-CSF或EPO好。
- [_0031] 缺血鼠活動力的恢復可藉由偵測大鼠的垂直活性(vertical activity)、垂直移動數(number of vertical movement)及每次移動的最短時間來判定。實驗發現，大鼠的活動力在G-CSF(100 mg/kg)、EPO(10000 U/kg)、G-CSF(50 mg/kg)+EPO(5000 U/kg)處理下可大幅的恢復。例如，在缺血後第28天，對照組大鼠的垂直移動數僅150，而EPO組或G-CSF組大鼠的垂直移動數可增加至225，且同時處理G-CSF及EPO的垂直移動數可增加至280。
- [_0032] 此外，以EPO及G-CSF共同處理下，大鼠的抓握肌力也大於單獨以EPO、G-CSF處理或對照組。
- [_0033] **5. EPO與G-CSF可減少腦部梗塞的梗塞體積**將4組缺血大鼠(每組10隻)分別以皮下注射G-CSF(100 μ g/kg)、EPO(10000 U/kg)、G-CSF(50 μ g/kg)+EPO(5000 U/kg)或載

體。腦缺血的相關步驟可參照前文。利用MRI及造影系統(General Electric at 3.0 T)計算缺血大鼠右腦皮層的梗塞體積。簡而言之，在以水化氯醛(chloral hydrate)麻醉大鼠後，進行6個連續的3 mm冠狀斷層造影。T2-weighted造影脈衝組序可由spinecho技術(脈衝重複間隔時間：4000 ms，重覆時間：105 ms)獲得。分別在缺血處理後第1、7、14及28天對每隻大鼠進行分析。將大鼠左腦皮層的全部區域減去右腦皮層的非梗塞區域，並利用internal volume分析軟體(Voxtool, General Electric, Medical System, Fairfield, CT)計算破壞區域的體積。

- [_0034] 大鼠在經過以EPO及G-CSF共同處理後，被破壞的體積遠小於單獨處理EPO、G-CSF或緩衝液對照組。在缺血處理後第7天，對照組(緩衝液)的梗塞體積為 $159 \pm 32 \text{ mm}^3$ 。令人驚訝的是，以G-CSF(50 mg/kg)+EPO(5000 U/kg)處理之大鼠的梗塞體積為 $42 \pm 32 \text{ mm}^3$ ，其也遠小於分別以10000 U/kg EPO($77 \pm 26 \text{ mm}^3$)或100 mg/kg G-CSF($71 \pm 26 \text{ mm}^3$)處理。此外，以EPO及G-CSF共同處理缺血大鼠的梗塞區數量同樣也遠少於分別以EPO或G-CSF處理。
- [_0035] **6. EPO與G-CSF對缺血腦中幹細胞移動及分化的影響**在上述缺血處理後，利用BrdU標定來分析內神經前驅細胞(intrinsic neural progenitor cells)及骨髓衍生幹細胞(bone marrow derived stem cells)的移動。BrdU是一種胸腺嘧啶(thymidine)類似物，在細胞分裂過程中，其可在的DNA合成時嵌入DNA中。BrdU是一種常用於標定有絲分裂細胞的物質。標定的相關步驟及BrdU標定的分析條件可參考Zhang, et al., Neuroscience 105(1): 33-41(2001)。
- [_0036] 以EPO(10000 U/kg)、G-CSF(100 $\mu\text{g/kg}$)、G-CSF(50 $\mu\text{g/kg}$)+EPO(5000 U/kg)或食鹽水處理缺血大鼠後，對這些大鼠進行BrdU標定。在分別或共同以EPO(10000 U/kg)、G-CSF(100 $\mu\text{g/kg}$)處理下，以免疫組織分析後可在梗塞區域周圍的同側腦皮層及缺血腦亞室區(Subventricular region)發現少許的BrdU標定細胞。此外，也可在缺血腦周圍的病變血管中發現BrdU標定細胞。且以EPO及G-CSF共同處理的BrdU標定的細胞數量遠大於單獨以EPO、G-CSF處理。
- [_0037] 另外，利用骨髓移植實驗分析以EPO、G-CSF或G-CSF+EPO對缺血大鼠幹細胞的影響。骨髓是來自於綠螢光蛋白轉殖鼠(GFP-transgenic donor mice)，其相關步驟可參考Hess et al., Stroke 33(5): 1362-1368(2002)。簡而言之，以25單位的注射器於大鼠股骨兩端採取骨髓，並浸泡於滅菌的生理食鹽水中。將股骨的骨髓稀釋至1 ml後以30 μm 的音波篩網(Spectramesh)(Fisher Scientific, Suwanee, GA)處理。
- [_0038] 在骨髓移植前，先利用Gammacell 40發射器(MDS Nordion, Ottawa, Ontario, Canada)的¹³⁷Cs伽瑪射線對接受移植的老鼠進行照射。照射的量為9 Gy，以完全破壞接受移植老鼠的骨髓。因為高劑量的放射線照射及之後的腦缺血處理會導致老鼠的死亡，因此需在放射線照射後24小時內進行骨髓移植。
- [_0039] 接著將骨髓(100 μl 包含 $1-1.5 \times 10^6$ 細胞)注射至接受移植老鼠的尾巴。移植後3至6週，以水化氯醛(0.3 g/kg, ip)麻醉移植鼠並進行腦部缺血處理，處理方式如前文所述。在缺血處理後1天，將這些老鼠分為4組，每組分別以皮下注射的方式注射EPO(10000 U/kg)、G-CSF(100 $\mu\text{g/kg}$)、G-CSF(50 $\mu\text{g/kg}$)+EPO(5000 U/kg)及載體，持續5天，每天一次。以上述方法對每隻老鼠進行BrdU標定。
- [_0040] 接著將每組大鼠的腦切片(brain slices)與可專一性辨識BrdU、神經膠質微纖維酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein)、溫韋伯氏因子(von Willebrand factor)、微管結合蛋白(microtubule-associated protein 2)、神經性細胞核(neuronal nuclei)及Musashi-1的抗體反應，並以共軛焦雷射掃描式顯微鏡觀察GFP⁺及BrdU⁺細胞。
- [_0041] 經觀察發現，GFP⁺細胞散佈於經EPO、G-CSF及G-CSF+EPO處理老鼠之對稱紋狀體(striatum)、海馬迴區及缺血陰影區(penumbra area)中，但未出現於對照組中。G-CSF+EPO共同處理之老鼠腦部切片的GFP⁺及BrdU⁺細胞遠多於單獨處理EPO或G-CSF。此外，以G-CSF及EPO處理老鼠可使老鼠的腦海馬迴、亞室區(Subventricular zone)及缺血陰影區之BrdU⁺細胞的數量增加，且其同樣發現有GFAP、Neu-N⁺及MAP-2。而GFP⁺-Musashi-1⁺-BrdU⁺細胞僅發現於海馬迴區中。
- [_0042] **7. 皮下注射EPO與G-CSF可促進缺血腦部的血管新生**利用FITC-右旋糖酐(FITC-Dextran)來研究大腦的微循環。FITC-右旋糖酐為一螢光原生質標記，可將此標記以靜脈注射的方式注射至缺血大鼠體內，且此缺血大鼠分別經過EPO(10000 U/kg)、G-CSF(100 $\mu\text{g/kg}$)、G-CSF(50 $\mu\text{g/kg}$)+EPO(5000 U/kg)及載體的處理，並利用螢光

顯微鏡觀察，相關步驟可參考Morris et al., Brain Res. Brain Res. Protoc 4(2) : 185-191(1999)。

- [_0043] 結果發現FITC-右旋糖酐佈滿於經G-CSF與EPO(n=6)共同處理之大鼠，且其微循環情況也較單獨以G-CSF(n=6)、EPO(n=6)或載體(n=6)處理之大鼠好。
- [_0044] 計數大腦血管密度。以水化氯醛麻醉缺血鼠，以專一性偵測CD31的Cy-3整合抗體(PharMingen, San Diego, CA)處理組織切片(6 μm)，並計算大腦血管的數量，其計數方式可參考Taguchi, et al., J. Clin. Invest. 114(3) : 330-338(2004)。
- [_0045] CD31免疫染色顯示經EPO、G-CSF或G-CSF+EPO處理之缺血大鼠，在其缺血陰影區有顯著的血管新生，且G-CSF+EPO共同處理之血管數量也大於單獨以EPO或G-CSF處理。
- [_0046] **8. EPO與G-CSF可促進缺血腦部的大腦血管流速**以水化氯醛麻醉缺血鼠後固定於固定裝置上，並在缺血處理後以雷射杜卜勒微流儀(Laser Doppler Flowmetry)偵測大腦基礎血液流速(baseline local cortical blood flow, bCBF)，相關步驟可參考Part et al., J. Neurosci. 25(7) : 1769-1777(2005)。於EPO(10000 U/kg)、G-CSF(100 μg/kg)、G-CSF(5000 U/kg)+EPO(50 μg/kg)或載體處理後，偵測大腦血液流速(CBF)並與大腦基礎血液流速比較。
- [_0047] 在麻醉下，以雷射杜卜勒微流儀(Laser Doppler Flowmetry)偵測經EPO、G-CSF、G-CSF+EPO或載體處理之缺血大鼠。在大腦缺血處理後一週，以G-CSF與EPO(n=6)共同處理之大腦血液流速(CBF)遠大於單獨以EPO(n=6)、G-CSF(n=6)、或載體(n=6)處理。
- [_0048] **9. 皮下注射EPO與G-CSF並不會影響大鼠體內的物理參數**分別偵測大鼠的系統性物理參數，例如，血壓、心跳、血糖及血液氣體等，相關的步驟可參考Lin et al., Stroke, 30(1) : 126-133(1999)。所有的偵測方法在本實施例中不再描述。偵測結果以平均值±標準差(SEM)。並計算行為評量的常態檢定。
- [_0049] 表一顯示經EPO及G-CSF處理後大鼠的物理參數。由表一可知，在以G-CSF+EPO(n=8)、EPO(n=8)、G-CSF(n=8)、或載體(n=8)處理後，在各種系統性血壓、血液氣體、血糖或血清電解質含量中都沒有顯著的差異。

[_0050]

表一、在任何處理下皆不會影響各物理參數值

	G-CSF+EPO (n=7)	G-GSF (n=8)	EPO (n=8)	載體 (n=8)	P*
pH	7.34±0.033	7.36±0.04	7.31±0.031	7.35±0.039	0.711
PaCO ₂ , (mm Hg)					
PaO ₂ , (mm Hg)	91.31±4.3	92.57±3.7	92.66±3.9	93.07±3.3	0.885
HCO ₃ ⁻ (10 ⁻³ mol/L)	26.7±2.57	25.66±2.54	25.52±2.11	26.0±1.97	0.689
血球比容(%)	44.33±3.5	43.8±2.75	44.08±3.15	43.66±3.0	0.611
血紅素(10g/L)	14.9±0.62	15.39±0.12	15.11±0.32	14.79±0.24	0.455
Na ⁺ (10 ⁻³ mol/L)	138.5±3.3	140.41±2.9	139.31±3.9	141.2±3.0	0.543
K ⁺ (10 ⁻³ mol/L)	4.23±0.11	4.44±0.45	4.3±0.31	4.29±0.21	0.759
Ca ⁺ (10 ⁻² g/L)	4.11±0.41	3.94±1.13	4.02±0.22	3.98±0.11	0.684
葡萄糖(10 ⁻² g/L)	151.2±26.4	147.61±15.2	150.4±27.1	149.2±21.4	0.621
平均血壓(mm Hg)	78.4±7.51	83.2±6.89	79.5±8.12	80.4±8.8	0.672
心跳(bpm)	398±28	409±17	401±28.9	399±26.8	0.821

*:t test

- [_0051] 雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

【主要元件符號說明】

七、申請專利範圍：

1. 一種治療腦血管疾病之組成物，包括一有效量之紅血球生成素(erythropoietin)及/或顆粒性細胞生長因子(Granulocyte colony-stimulating factor)。
2. 如申請專利範圍第1項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該腦血管疾病為缺血。
3. 如申請專利範圍第2項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子為分別給予。
4. 如申請專利範圍第3項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子以皮下注射的方式給予。
5. 如申請專利範圍第2項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子為同時給予。
6. 如申請專利範圍第5項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子以皮下注射的方式給予。
7. 如申請專利範圍第1項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該腦血管疾病為中風。
8. 如申請專利範圍第7項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子為分別給予。
9. 如申請專利範圍第8項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子以皮下注射的方式給予。
10. 如申請專利範圍第7項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子為同時給予。
11. 如申請專利範圍第10項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子以皮下注射的方式給予。
12. 如申請專利範圍第1項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該腦血管疾病為栓塞性腦中風。
13. 如申請專利範圍第12項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子為分別給予。
14. 如申請專利範圍第13項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子以皮下注射的方式給予。
15. 如申請專利範圍第12項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子為同時給予。
16. 如申請專利範圍第15項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子以皮下注射的方式給予。
17. 如申請專利範圍第12項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子為分別給予。
18. 如申請專利範圍第12項所述之治療腦血管疾病之組成物，其中該紅血球生成素及顆粒性細胞生長因子同時給予。
19. 一種增加紅血球生成素表現的方法，包括：篩選一個體，其需要增加紅血球生成素的表現，以及給予一有效量之顆粒性細胞生長因子至該個體中。
20. 如申請專利範圍第19項所述之增加紅血球生成素表現的方法，其中該個體患有貧血。

八、圖式：