

## 肢体缺血后代偿性血管新生及相关基因表达的动态变化和意义

李大勇<sup>1</sup>, 谷峰<sup>2</sup>, 陈文娜<sup>2</sup>, 郑巧楠<sup>1</sup>, 马贤德<sup>2</sup>, 袁明殿<sup>1</sup>, 吕延伟<sup>1</sup>

(1. 辽宁中医药大学附属医院血管外科; 2. 辽宁中医药大学, 辽宁省沈阳市 110032)

[关键词] 肢体缺血; 动脉; 血管新生因子; 基因表达

[摘要] 目的 探讨肢体缺血后代偿性血管新生及相关基因表达的动态变化和意义。方法 股动脉结扎法建立裸鼠肢体缺血模型, 分别于术后 3 天及术后 1、2、3、4 周观察裸鼠肢体缺血的变化, 应用苏木素-伊红染色和 CD34 免疫组织化学染色观察缺血肌肉组织形态学的改变, 应用 Western Blotting 和逆转录聚合酶链反应检测低氧诱导因子 1 $\alpha$ 、肝细胞生长因子和血管内皮生长因子蛋白和基因在缺血肌肉中表达的动态变化。结果 裸鼠肢体坏疽于术后 1~2 周最为严重, 至术后 3~4 周时有所改善。缺血后的肌肉纤维萎缩、变形, 3~4 周时逐渐好转。微血管数于缺血后 2 周时最多。低氧诱导因子 1 $\alpha$  和肝细胞生长因子的基因表达于缺血后 3 天时最为强烈, 血管内皮生长因子的基因表达于缺血后 1 周时达高峰, 至缺血后 3~4 周时, 各基因的表达均接近正常对照。结论 肢体缺血发生后, 低氧诱导因子 1 $\alpha$ 、肝细胞生长因子和血管内皮生长因子基因表达的变化介导了短暂的血管新生过程, 但微血管的生成数量有限, 尚不足以代偿肢体缺血的状态。

[中图分类号] R6

[文献标识码] A

### The Dynamic Changes and Significance of the Compensatory Angiogenesis and Related Gene Expression in Muscle After Limb Ischemia

LI Da-Yong<sup>1</sup>, GU Feng<sup>2</sup>, CHEN Wen-Na<sup>2</sup>, ZHENG Qiao-Nan<sup>1</sup>, MA Xian-De<sup>2</sup>, YUAN Ming-Dian<sup>1</sup>, and LV Yan-Wei<sup>1</sup>  
(1. Department of Vascular Surgery, First Affiliated Hospital of Liaoning Traditional Chinese Medical University; 2. Liaoning Traditional Chinese Medical University, Shenyang 110032, China)

[KEY WORDS] Limb Ischemia; Arteries; Angiogenesis Factor; Gene Expression

[ABSTRACT] **Aim** To discuss the dynamic changes and significance of the compensatory angiogenesis and related gene expression in muscle after limb ischemia. **Methods** Femoral artery ligation method was used to establish nude mice limb ischemia model. 3 days, 1, 2, 3 and 4 weeks after limb ischemia, nude mice limb ischemic changes were observed respectively. Hematoxylin-Eosine staining and CD34 immunohistochemical staining were used to observe ischemic morphological changes in muscle tissue. The application of Western Blotting and reverse transcription polymerase chain reaction detection of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), hepatocyte growth factor (HGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) was used to observe the dynamic changes of gene expression in ischemic muscle. **Results** Nude mice limb gangrene was the most serious in 1~2 weeks after ischemia and improved 3~4 weeks after. After the limb ischemia, muscle fibers shrink and deformation in 3~4 weeks were getting better. The microvascular count was the highest in 2 weeks after limb ischemia. The gene expression of HIF-1 $\alpha$  and HGF was the strongest in 3 days after limb ischemia. VEGF gene expression reached a peak at 1 week end. In 3~4 weeks after limb ischemia, all the gene expression were close to normal. **Conclusion** The short-term process of angiogenesis was mediated by HIF-1 $\alpha$ , HGF and VEGF gene expression after the limb ischemia, but a limited number of capillary formation was not enough to compensate the state of limb ischemia.

临床上有多种可引起肢体动脉狭窄或闭塞的疾病, 如动脉硬化闭塞症、血栓闭塞性脉管炎、多发性大动脉炎和糖尿病性周围动脉闭塞症等, 均可导致不同程度的肢体缺血, 具有比较高的肢体病残率,

还可使患者出现心血管事件的风险大为增加<sup>[1]</sup>, 目前仍属难治性疾病。研究表明, 肢体缺血发生后机体自身存在着血管新生的现象<sup>[2,3]</sup>, 在一定程度上代偿了缺血的病理状况。为进一步明确肢体缺血后血管新生的主要机制, 我们建立了裸鼠肢体缺血模型, 动态观察了缺血的肢体肌肉中代偿性血管新生及与之密切相关的低氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor HGF) 和血管内皮生长因子 (vascular

[收稿日期] 2009-10-14 [修回日期] 2009-12-16

[基金项目] 国家自然科学基金 (30600843) 和辽宁省科技厅博士启动基金 (20061030)

[作者简介] 李大勇, 博士, 副主任医师, 主要从事肢体缺血性疾病的发病机制及中西医结合治疗的研究, E-mail 为 sylidy@yahoo.com.cn.

endothelial growth factor; VEGF)的基因表达状况。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物分组及模型的建立

4周龄 BALB/c裸鼠 48只, 体重  $20 \pm 5$  g 雌雄各半, 购自大连医科大学实验动物中心, 随机分为 5 个实验组和 1 个正常对照组, 每组 8 只。清洁环境中, 无菌专用饲料及高压灭菌饮用水适应性喂养 1 周后, 将实验组裸鼠制成右后肢缺血模型, 主要过程如下: 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉, 手术显微镜下 ( $2.5 \times$ ) 于右股部沿股动脉走行剪开皮肤, 近腹股沟处游离出右股动脉约 1 cm (注意保护好伴行的静脉和神经), 8-0 无损伤缝合线分别于两端结扎后, 将右股动脉剪断, 无损伤缝合线连续缝合皮肤切口。术中注意无菌操作, 未应用抗生素治疗。5 个实验组根据标本采集时间分别为术后 3 天及术后 1、2、3、4 周。

### 1.2 标本制作

于预定的观察期末颈椎脱位分别处死各组裸鼠, 快速剪下右后肢内收肌群, 分成三块, 其中两块置于液氮中冷却 20 min,  $-80$  °C 冰箱保存, 分别用于提取蛋白质和 RNA; 另一块于中性甲醛溶液中固定 24 h 后, 常规方法制成蜡块备用。

### 1.3 肌肉组织形态学检测

通过 HE 染色观察肌肉组织一般形态的变化。用 CD34 免疫组织化学染色的阳性表达来标记血管内皮, CD34 一抗和二抗分别为武汉博士德公司和北京中杉公司的产品, 一抗工作浓度为 1: 100, 免疫组织化学染色采用链霉素抗生物素-过氧化物酶 (S-P) 法, 凡染成棕黄色的内皮细胞簇作为一个微血管计数, 每张切片随机计数 3 个视野 ( $200 \times$ ), 计算内皮细胞簇的平均数, 作为该片的微血管数。

### 1.4 Western Blotting 检测低氧诱导因子 1 $\alpha$ 、肝细胞生长因子和血管内皮生长因子表达

参照《分子克隆实验指南》<sup>[4]</sup> 配制细胞裂解液, 剪碎肌肉组织后机械和超声匀浆, 12 000 r/min 4 °C 离心 1 h, 考马斯亮蓝染色法测定总蛋白质浓度, 并将各组蛋白质浓度调到同一水平。样品中加入样品缓冲液, 沸水煮 5 min, 置于 12% SDS-PAGE 电泳。然后转印 (40 V, 100 mA, 2 h) 至硝酸纤维素膜。5% 脱脂奶粉 TTBS 缓冲液室温封闭 1 h, 用含 1% 脱脂奶粉的 TTBS 稀释兔抗鼠 HIF-1 $\alpha$ 、HGF 和 VEGF 多克隆抗体 (武汉博士德公司, 内参照  $\beta$ -actin 为美国 Sigma 公司产品) 成 1: 400 4 °C 过夜, TTBS 洗

膜, 1: 2 000 羊抗兔 IgG-AP (武汉博士德公司) 孵育 15 min, TTBS 洗膜, 加入显色液 15~30 min 后终止, 凝胶自动成像系统 (Chem Imager 550Q 美国) 上分析, 测量光密度值, 与相应的内对照  $\beta$ -actin 蛋白印迹灰度值的比值作为每一个目的蛋白表达的半定量指标。

### 1.5 逆转录聚合酶链反应检测低氧诱导因子 1 $\alpha$ 、肝细胞生长因子和血管内皮生长因子的基因表达

采用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司, 美国) 一步法提取组织总 RNA, 紫外分光光度计 (UV-300Q 英国) 测定纯度并定量。根据 GenBank 提供的 HIF-1 $\alpha$ 、HGF、VEGF 和内参照 GAPDH 的 mRNA 序列, 应用软件 Premier 5.0 自行设计引物, 引物序列为 HIF-1 $\alpha$  上游 5'-CCT GGC AAT GTC TCC-3', 下游 5'-CCT TAG CAG TGG TCG T-3', 扩增片长 662 bp; HGF 上游 5'-TGC CAA CAG GTG TAT CAG-3', 下游 5'-CAC AGA CTT CGT AGC GTA-3', 扩增片长 395 bp; VEGF 上游 5'-CAC CAC CAC GCC ATC A-3', 下游 5'-GCC TTT CAT CCC ATT GTC-3', 扩增片长 452 bp; GAPDH 上游 5'-TCA ACG GCA CAG TCA AGG-3', 下游 5'-ACC AGT GGA TGC AGG GAT-3', 扩增片长 452 bp。所有引物由大连宝生物公司合成。反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 再延伸 5 min 后结束扩增反应。取 5  $\mu$ L PCR 产物与 2  $\mu$ L Loading Buffer 混合, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 100 V 1.5 h, 电泳结束后, 凝胶自动成像系统分析。记录每条 DNA 扩增带的灰度值, 将每一个目的 DNA 扩增片段的灰度值与相应的内对照 GAPDH 扩增片段灰度值的比值作为每一个目的基因 mRNA 的半定量指标。

### 1.6 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SAS 6.12 统计软件进行统计分析, 组间差异性比较采用 *t* 检验或方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 裸鼠肢体缺血状态的观察

所有裸鼠均存活至观察期末, 无意外死亡发生。实验组裸鼠的右后肢术后即出现明显缺血改变, 颜色苍白, 行动时呈拖拉步态。术后 3 天时, 有多只裸鼠的右后肢出现了不同程度的肢体坏疽。术后 1 周末时, 部分裸鼠肢体的坏疽程度进一步加重, 同时伴有切口的缺血、感染及部分哆开。术后 2 周末时, 肢

体的缺血状态未见继续加重,坏疽平面已局限。3周时,肢体的缺血状况有所改善,坏疽的肢节已脱落。至术后4周末时,残肢及切口逐渐自愈,但裸鼠行动时,肢体仍呈拖拉步态。实验组裸鼠左后肢及对照组裸鼠肢体未见有缺血发生(图1和表1)。

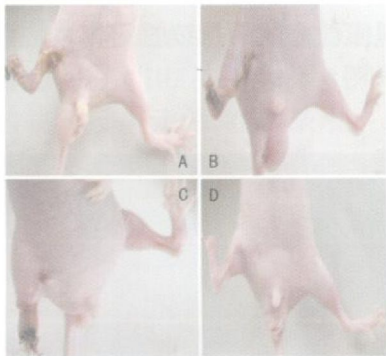


图1 裸鼠肢体缺血状态的观察 A为缺血后1周, B为缺血后2周, C为缺血后3周, D为缺血后4周。

## 2.2 缺血肌肉组织形态学观察

HE染色显示,正常对照组裸鼠肢体的肌纤维排列整齐,形态饱满,未见有异常细胞出现;模型裸鼠缺血肢体的肌纤维萎缩变形且排列紊乱,有大量的炎性细胞浸润于肌肉组织中,术后2周时最为严

重,至术后4周时,肌纤维营养状况有所改善,炎性细胞浸润减轻(图2)。

CD34免疫组织化学染色显示,正常对照组裸鼠后肢肌肉中可见微血管呈散在分布。模型裸鼠右后肢肌肉中术后3天时可见有极少的微血管存在,术后1周时,微血管数量开始增多,术后2周末时可见微血管数量较前明显增加,达到相对的峰值,与对照组相比,差异有显著性( $P < 0.01$ ),此后,肌肉中微血管数量逐渐下降,至4周末时,已接近正常对照的水平(图3和表1)。

## 2.3 低氧诱导因子1 $\alpha$ 、肝细胞生长因子和血管内皮生长因子的蛋白表达

正常对照组裸鼠后肢肌肉中均未见明显的HIF-1 $\alpha$ 、HGF和VEGF的蛋白表达。术后3天,模型裸鼠右后肢肌肉中HIF-1 $\alpha$ 和HGF的蛋白表达达峰值,与正常对照组相比,差异有显著性意义( $P < 0.01$ ),VEGF的表达稍有增加。术后1周末时,VEGF的蛋白表达达峰值,与正常对照组相比,差异有显著性意义( $P < 0.01$ ),HIF-1 $\alpha$ 和HGF的蛋白表达开始减弱。此后,各因子的蛋白表达均明显下降,至术后3~4周时,仅有微弱的表达甚至未见表达(图4和表2)。

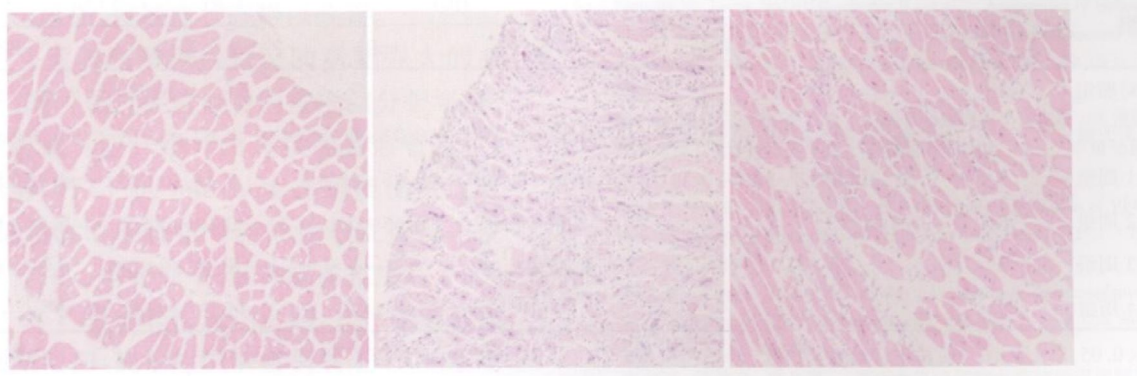


图2 肌肉组织形态学观察(HE染色, 200 $\times$ ) 左为正常对照组,中为缺血后2周,右为缺血后4周。

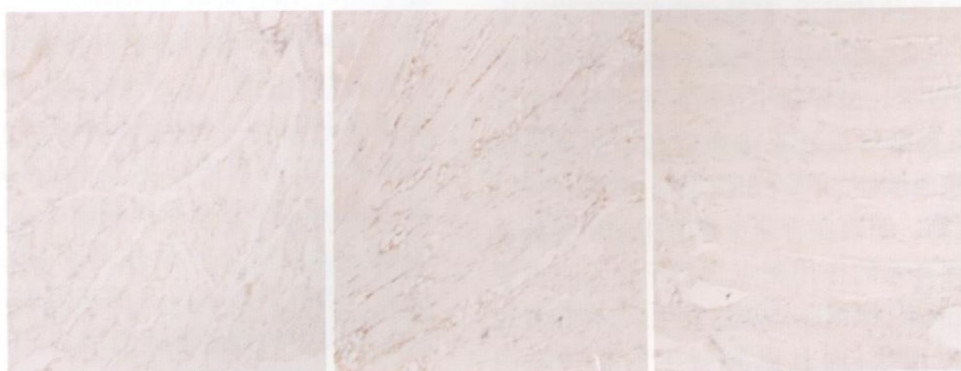


图3 CD34免疫组织化学染色观察肌肉组织内微血管情况(200 $\times$ ) 左为正常对照组,中为缺血后2周,右为缺血后4周。

表 1 各组裸鼠肢体坏疽数量及微血管数量比较

分 组	例数	肢体坏疽 数量 (条)	微血管数量 (条)
正常对照组	8	0	4.3 ± 0.7
术后 3 天组	8	5	2.4 ± 0.3
术后 1 周组	8	6	10.5 ± 2.3 <sup>a</sup>
术后 2 周组	8	5	15.2 ± 3.8 <sup>b</sup>
术后 3 周组	8	4	8.7 ± 2.1
术后 4 周组	8	5	5.4 ± 1.2

a为  $P < 0.05$ , b为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较。

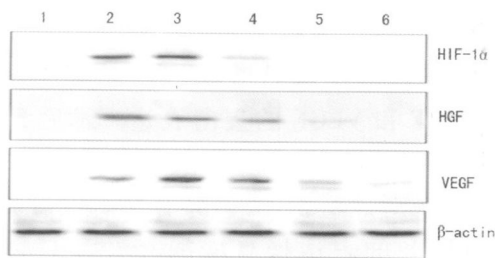


图 4 Western Blotting 检测肌肉组织内低氧诱导因子 1 $\alpha$ 、肝细胞生长因子和血管内皮生长因子的蛋白表达 1 为正常对照组, 2~ 6 分别为缺血后 3 天、1 周、2 周、3 周和 4 周。

### 2.4 低氧诱导因子 1 $\alpha$ 、肝细胞生长因子和血管内皮生长因子的 mRNA 表达

正常对照组裸鼠后肢肌肉中均未见明显的 HIF-1 $\alpha$ 、HGF 和 VEGF 的 mRNA 表达。模型裸鼠右后肢肌肉中各因子的 mRNA 表达状况与蛋白表达基本一致, 但阳性表达的持续时间较短, 达到峰值后均迅速下降 (图 5 和表 2)。

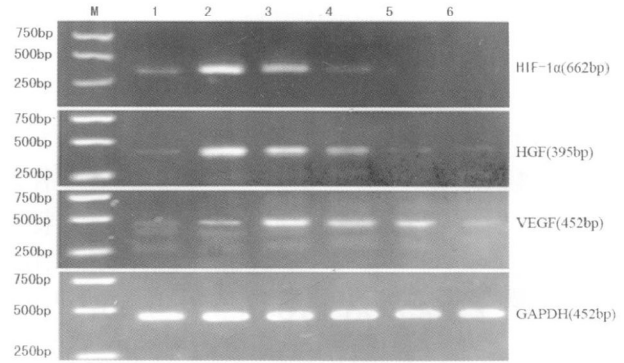


图 5 RT-PCR 检测肌肉组织内低氧诱导因子 1 $\alpha$ 、肝细胞生长因子和血管内皮生长因子的 mRNA 表达 M 为 Marker 1 为正常对照组, 2~ 6 分别为缺血后 3 天、1 周、2 周、3 周和 4 周。

表 2 裸鼠缺血肢体中低氧诱导因子 1 $\alpha$ 、肝细胞生长因子和血管内皮生长因子的蛋白和 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	例数	HIF-1 $\alpha$		HGF		VEGF	
		蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA
正常对照组	8	-	-	-	-	0.21 ± 0.06	-
术后 3 天组	8	0.73 ± 0.21 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.25 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.25 <sup>b</sup>	0.91 ± 0.28 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.05
术后 1 周组	8	0.62 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.18 <sup>b</sup>	0.75 ± 0.24 <sup>b</sup>	1.11 ± 0.34 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.23 <sup>b</sup>
术后 2 周组	8	0.30 ± 0.08	-	0.23 ± 0.07	0.65 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.94 ± 0.27 <sup>b</sup>	0.54 ± 0.17 <sup>b</sup>
术后 3 周组	8	-	-	0.33 ± 0.16 <sup>a</sup>	-	0.46 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.13 <sup>a</sup>
术后 4 周组	8	-	-	-	-	0.37 ± 0.09	-

a为  $P < 0.05$ , b为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较。

### 3 讨论

在缺血、缺氧的状态下, 肢体的血管系统将发生重塑以增加供血, 改善缺氧<sup>[5, 6]</sup>, 血管新生是其中的一个重要病理过程。血管新生是由原有小毛细血管组织“发芽”后逐渐形成新毛细血管和小的非肌性血管, 这是使缺血肢体的侧支血流增加、微循环得以改善的主要机制。明确血管新生过程中的主要分子机制, 对于找到有效的作用靶点进行干预具有重要意义。本研究发现, 裸鼠肢体缺血发生后, 存在着短暂的血管新生现象, 而且血管新生的相关基因 VEGF、HIF-1 $\alpha$  和 HGF 的表达发生了明显变化。

VEGF 是血管新生的主要调控因子, 具有促血

管内皮细胞增殖、迁移, 诱导内皮细胞上相应配体和受体表达, 促进血管形成的作用。有学者移植转染 VEGF 基因的骨髓间充质干细胞, 兔心肌梗死后的功能明显改善<sup>[7]</sup>。本研究中, 裸鼠肢体缺血后 3 天, VEGF 的 mRNA 及蛋白表达开始增强, 正常对照组裸鼠后肢肌肉中均未见 VEGF 的 mRNA 及蛋白表达, 提示肢体缺血缺氧刺激了 VEGF 的基因表达, 并进一步促进血管新生和对缺血组织的保护作用<sup>[8]</sup>。术后 1 周, VEGF 的基因表达达到高峰, 此时缺血肌肉中的微血管逐渐增多, 于术后 2 周时方达到峰值, 而肢体的缺血程度从术后 2 周开始逐渐减轻, 提示缺血引起的内源性 VEGF 表达的绝对量不

足,需通过“旁分泌效应”,促进新生血管网络的形成,但微血管的生成仍不足以代偿肢体缺血性坏疽的发生。因此,在肢体缺血发生的早期,如能适当补充外源性 VEGF 基因,将会迅速改善肢体的缺血状态。

目前已经证实, HIF-1 $\alpha$  是缺血缺氧发生与 VEGF 基因表达增强之间的一种重要的核转录调节因子<sup>[9]</sup>。缺氧促使 HIF-1 $\alpha$  过表达,并直接调控 VEGF 中的缺氧反应元件,在转录水平调控 VEGF 基因的表达。本研究发现,肢体缺血发生后 3 天, HIF-1 $\alpha$  的 mRNA 及蛋白表达明显增强,而且早于 VEGF 的 mRNA 表达和血管新生;有学者更深入的研究表明,在缺血缺氧后数小时内局部组织中即可出现 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达上调,明显先于 VEGF 的 mRNA 表达<sup>[10]</sup>;当局部应用反义 HIF-1 $\alpha$  寡核苷酸时,VEGF 的表达亦被阻断<sup>[11]</sup>;移植携带腺病毒-HIF-1 $\alpha$  的内皮祖细胞可促进缺血下肢的局部血管新生<sup>[12]</sup>,均提示组织缺血缺氧诱导 HIF-1 $\alpha$  在缺血组织中过表达,是血管新生的始动因素之一。但本研究还发现,由于 HIF-1 $\alpha$  的过表达持续时间较短,新生血管尚不足以代偿缺血缺氧的病理状况,肢体出现了一定程度的坏疽。因此,当内源性基因表达不足时,适当补充外源性 HIF-1 $\alpha$  基因,将会通过刺激 VEGF 表达增强,使缺血状态得以改善。

HGF 也是近年来被深入研究的功能强大的血管生成因子,既可通过促进血管内皮细胞分裂增殖、迁移趋化及形成管腔样结构而直接促进血管新生,又可通过诱导 VEGF 的 mRNA 表达间接促进血管生成,还可通过激活多种信号转导途径发挥抗内皮细胞凋亡的作用。本研究中,肢体缺血发生后 3 天,缺血组织中 HGF 的 mRNA 表达上调,并伴随着微血管密度的逐渐增加,提示组织缺血引发了 HGF 水平的升高及生物活性的明显增强。HGF 的特异受体 cmet 在缺血组织中是上调的,可能会加强 HGF 促进血管新生的活性。但内源性 HGF mRNA 短暂的峰值表达依然无法有效改善肢体缺血的状态。目前,携带 HGF 质粒 DNA 转移至缺血组织,促进局部新血管生成的研究已进入临床试验,并可能成为治疗周围动脉闭塞性疾病的一种新手段<sup>[13]</sup>。

综上所述,本研究阐明了肢体缺血后代偿性血管新生的一个基本过程, HIF-1 $\alpha$ 、HGF 作为血管新生的早期应答基因,介导了局部 VEGF 的表达,最终

产生了缺血组织中微血管密度增加这一令人期待的生物学效应。肢体缺血后 2~4 周,三种因子的基因表达均逐渐减弱,表明肢体缺血引发的内源性血管新生因子的表达持续时间较短,微血管的生成数量有限,不足以代偿肢体缺血缺氧的状态,难免出现肢体的缺血性坏死。此时,外源性血管生成基因的补充对于缺血缺氧的改善起到了重要作用,但应早期使用,因为基因的表达与生物学效应的产生并非同步,肢体一旦出现缺血性坏死,则属不可逆转。在血管新生的领域中,如能研究出同时对多种血管生成相关基因具有多靶点调节作用的治疗药物,无疑将具有光明的应用前景,这也是本课题组今后工作的主要内容。

#### [参考文献]

- [1] Shanoun F, Sural N, Abela G. Peripheral artery disease therapeutic advances [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2008, 6 (4): 539-553
- [2] Huang PH, Sata M, Nishimatsu H, et al. Pioglitazone ameliorates endothelial dysfunction and restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice [J]. *Biomol Pharmacother*, 2008, 62 (1): 46-52
- [3] Shireman PK. The chemokine system in arteriogenesis and hind limb ischemia [J]. *J Vasc Surg*, 2007, 45 (Suppl A): A48-56
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 金冬雁,黎孟枫译. 分子克隆实验指南·第 2 版 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 888-898
- [5] Tritsaris K, Myren M, Ditlev SR, et al. IL-20 is an arteriogenic cytokine that remodels collateral networks and improves functions of ischemic hind limbs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (39): 15364-369
- [6] Pascotto M, Leong-Poi H, Kaufmann B, et al. Assessment of ischemia-induced microvascular remodeling using contrast-enhanced ultrasound vascular anatomical mapping [J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2007, 20 (9): 1100-108
- [7] 盛小刚,宋卉,冯建章,等. 转染人血管内皮生长因子 165 基因的骨髓间充质干细胞移植改善兔心肌梗死后心功能 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (8): 669-672
- [8] Arany Z, Foo SY, Ma Y, et al. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  [J]. *Nature*, 2008, 451 (7181): 1008-012
- [9] Jiang M, Wang B, Wang C, et al. Angiogenesis by transplantation of HIF-1 $\alpha$  modified EPCs into ischemic limbs [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103 (1): 321-334
- [10] 黄越芳,庄思齐,陈东平. 新生大鼠缺血缺血性脑病模型组织新生血管形成及调控因素 [J]. 中华儿科杂志, 2004, 42 (3): 210-215
- [11] 周健,黄岚,晋军,等. 低氧诱导因子 1 $\alpha$  抑制大鼠缺血下肢血管生成及内皮祖细胞的动员 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2006, 8 (7): 474-477
- [12] 姜萌,王彬尧,王长谦,等. 静脉注射携带缺氧诱导因子的内皮祖细胞对裸鼠缺血下肢血管新生的作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (8): 580-584
- [13] 张庆林,李元敏,吴祖泽. 肝细胞生长因子基因治疗周围动脉闭塞症研究进展 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2006, 20 (11): 1147-150

(此文编辑 许雪梅)