

经穴注射 BMSCs 联合中药对下肢缺血大鼠促血管生成相关因子的影响

黄 凤¹ 叶永生² 董 雨¹ 董建勋¹ 王伏声¹ 丁 毅¹ 荣培晶³ 徐旭英¹

(1 首都医科大学附属北京中医医院疮疡血管外科, 北京, 100010; 2 北京中医药大学, 北京, 100029;

3 中国中医科学院针灸研究所, 北京, 100700)

摘要 目的: 观察经穴注射骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)联合益气活血中药对糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)大鼠缺血后肢骨骼肌中促血管生成因子的表达情况。方法: 80 只 SD 大鼠 1:7 随机分为 2 组: 正常假手术组 10 只, 其余 70 只一次性腹腔注射链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ, 50.0 mg/kg)制成 DM 大鼠模型, 再按比例随机分为 7 组, 即 DM 假手术组、DM 缺血组、益气活血中药组、局部注射 BMSCs 组、局部注射 BMSCs + 中药组、穴位注射 BMSCs 组、穴位注射 BMSCs + 中药组, 每组 10 只。应用 RT-PCR 法检测大鼠后肢骨骼肌中 VEGF、bFGF mRNA 的表达。结果: 穴位注射 BMSCs + 中药组术侧 VEGF mRNA 表达量较 DM 假手术组升高($P < 0.05$); DM 假手术组、局部注射组、穴位注射组术侧 bFGF mRNA 表达量较健侧升高($P < 0.05$); 局部注射 + 中药组、穴位注射 + 中药组术侧 bFGF mRNA 表达量较正常血糖假手术组、DM 假手术组、DM 缺血组升高($P < 0.05$); 穴位注射 + 中药组健侧 bFGF mRNA 表达量较正常血糖假手术组、DM 假手术组、DM 缺血组、中药组、局部注射组升高($P < 0.05$)。结论: 穴位注射 BMSCs 结合益气活血中药可明显促进血管生成因子 VEGF、bFGF 的表达, 益气活血中药可能促进穴位注射 BMSCs 的成活率从而提高促血管生成因子 VEGF、bFGF 的表达。

关键词 糖尿病下肢缺血; 血管内皮生长因子 VEGF; 碱性成纤维细胞生长因子 bFGF; 穴位注射; 骨髓间充质干细胞

The Effect of Acupoint Injection of BMSCs Combined with Chinese Medicine on VEGF/bFGF of Diabetic Rats with Lower Limbs Ischemic

Huang Feng¹, Ye Yongsheng², Dong Yu¹, Dong Jianxun¹, Wang Fusheng¹, Ding Yi¹, Rong Peijing³, Xu Xuying¹

(1 Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital University of Medicine Sciences, Beijing 100010, China;

2 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3 Institute of Acu-Mox, China

Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract Objective: To observe the expression of angiogenesis factor in skeletal muscle of diabetic rats with lower limbs ischemia during acupoint injection of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) with Qi-tonifying and Blood-activating Chinese medicine. **Methods:** Eighty Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into 2 groups, 10 rats in the normal blood sugar control (NMC) group. The other 70 rats were intraperitoneally injected Streptozotocin (50.0 mg/kg) to make DM model, then were randomly divided into 7 groups equally, namely diabetes control (DMC) group, diabetes ischemic (DMI) group, Qi-tonifying and Blood-activating (QB) group, local injection BMSCs (L-BMSCs) group, L-BMSCs + QB group, acupoint injection BMSCs (Acu-BMSCs) group, and Acu-BMSCs + QB group. Using RT-PCR method to detect the expression of VEGF and bFGF mRNA in muscular tissue. **Results:** The expression of VEGF mRNA on the operation side in Acu-BMSCs + QB group was higher than DMC group ($P < 0.05$). The expression of bFGF mRNA on the operation side in DMC, L-BMSCs, Acu-BMSCs groups were higher than the uninjured side ($P < 0.05$), and those in L-BMSCs, Acu-BMSCs + QB groups were higher than NMC, DMC, DMI groups ($P < 0.05$). The expression of bFGF mRNA on the uninjured side in Acu-BMSCs + QB group was higher than NMC, DMC, DMI, QB, L-BMSCs groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of VEGF, bFGF were positively affected by acupoint injection of BMSCs combined with QB, which means QB Chinese herb could improve the expression of angiogenesis factor by increasing the survival rate of BMSCs injected in acupoint.

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目(编号: 7122084); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划(编号: 2013-3-080); 北京市科委首都临床特色应用研究(编号: Z131107002213117); 北京市中医药科技年度规划项目(编号: WZF2012-02); 国家中医药管理局中医外科重点学科

第一作者简介: 黄凤(1984—), 女, 内蒙古乌海, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 中医药治疗周围血管疾病的临床与基础研究, Tel: (010) 52176642, E-mail: hf2061043@163.com

共同第一作者: 叶永生(1982—), 男, 中国香港, 博士研究生, 医师, 研究方向: 中医基础理论研究, E-mail: drneil@live.hk

通信作者: 徐旭英, Tel: (010) 52176058, E-mail: xxying7341@126.com; 荣培晶, Tel: (010) 64089302, E-mail: drrongpj@163.com

Key Words Diabetic; Lower limb ischemia; VEGF; bFGF; Acupoint injection; BMSCs
中图分类号:R587.2 **文献标识码:**A **doi:**10.3969/j.issn.1673-7202.2016.02.030

糖尿病下肢缺血是一种发病率高、发病较重的缺血性病变。2007 年流行病学调查显示,我国 7 个大中城市 50 岁以上伴有一个以上危险因素糖尿病患者 19.47% 患有 PAD,其中男性占到 18.3%,女占到 20.4%,70 岁以上 PAD 患病率更高,达 31.9%^[1]。目前,外科血管重建术可在一定时间内改善缺血肢体灌注量,但却存在手术并发症和死亡率的风险,且重建的血管再度狭窄率也较高。药物治疗虽可改善症状,但并不能彻底改善局部灌注。寻求最终改善缺血组织的灌注,提高患者的生活质量,降低致残率的有效治疗方法仍是临床工作亟待解决的问题。近年来,干细胞疗法应用于临床与实验促进血管生成的研究^[2]为这一疾病的治疗提供了新的思路,并具有广阔的临床应用前景,因此,研究干细胞疗法在治疗 DM 下肢缺血中的意义、机制和具体应用有着十分重要的临床意义和研究价值。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级雄性大鼠 80 只,体重为 200 ~

220 g 雄性 SD 大鼠,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 药品与试剂 提纯试剂盒 Z3100,GoScript 试剂盒(A5000),GoTaq qPCR Master Mix(A6001),Promega(北京)生物技术有限公司;PCR 引物合成,北京诺赛基因组研究中心有限公司;Mx3000P 荧光定量 PCR 仪,Agilent StratageneInc. USA;链脲佐菌素(S0130),Sigma;益气活血方由首都医科大学附属北京中医医院中药制剂室制备。

1.3 仪器 紫外分光光度计(Pharmacia Biotech),GeneQuant;PCR 扩增仪(GeneAmp9700),Applied Biosystems;Rea-Time PCR(Mx3000P),Agilent Technologies Stratagene。

1.4 动物分组与造模方法

1.4.1 动物分组 80 只 SD 大鼠,先后随机分为 8 组,分组情况及干预方法如表 1。

表 1 分组情况及干预方法

分组简称	分组	干预方法
正常假手术组(NMC)	正常血糖假手术组	局部注射 1×PBS+蒸馏水灌胃
DM 假手术组(DMC)	糖尿病大鼠假手术组	局部注射 1×PBS+蒸馏水灌胃
DM 缺血组(DMI)	糖尿病大鼠缺血组	缺血局部注射 1×PBS+蒸馏水灌胃
中药组(QB)	益气活血中药治疗组	缺血局部注射 1×PBS+益气活血中药灌胃
局部注射组(L-BMSCs)	局部注射 BMSCs 组	缺血局部注射 BMSCs+蒸馏水灌胃
局部+中药组(L-BMSCs+QB)	局部注射 BMSCs+益气活血方治疗组	缺血局部注射 BMSCs+益气活血方灌胃
穴位注射组(Acu-BMSCs)	穴位注射 BMSCs 组	穴位注射 BMSCs+蒸馏水灌胃
穴位+中药组(Acu-BMSCs+QB)	穴位注射 BMSCs+益气活血方治疗组	穴位注射 BMSCs+益气活血方灌胃

1.4.2 造模方法 经普食普水适应喂养 1 周后,以 1:7 随机分为 2 组,正常假手术组 10 只,其他 70 只大鼠在禁食 6 h 后左下腹腔注射 STZ 50.0 mg/kg(溶于 0.1 mmol/L、pH 值=4.2 的柠檬酸钠-柠檬酸缓冲溶液)以制备糖尿病模型^[3]。于造模后 3、7、14、28 d 尾静脉采血针取血检测随机血糖浓度,以血糖值>16.0 mmol/L 作为糖尿病模型制备成功标准。

糖尿病模型造模 1 个月后,将糖尿病造模成功血糖值>16.0 mmol/L 的大鼠,等比例随机分组后按要求行以下方法制备左后肢缺血模型。

术前大鼠用浓度为 350 mg/kg 水合氯醛麻醉(麻醉剂量:10 mL/kg),经常规备皮、消毒、铺巾,经

左侧腹股沟韧带中点(摸到股动脉搏动后)做一个 1~1.5 cm 的纵行皮肤切口暴露股动脉。

正常血糖假手术组与糖尿病大鼠假手术组:游离股动脉,不行结扎、也不切除动脉术,直接缝合切口。

糖尿病大鼠后肢缺血模型:大鼠左侧后肢缺血模型。游离股动脉后,用 1 号线结扎近端股动脉,切除股动脉、远端隐动脉和所有侧支血管。术毕,5-0 缝合线缝合皮肤,建立糖尿病大鼠左侧后肢缺血模型。

1.4.3 穴位注射 取穴:凡局部注射取缺血组织与正常假手术组织交界处等距离选取 5 个点为注射部位,注射标记的 BMSCs,每只共注射 100 μL 1×10⁶

个细胞^[4],每处注射 20 μL;假手术组、模型对照组注射等量 1 × PBS + 蒸馏水灌胃;中药治疗各组分别选用相应中药灌胃。

穴位如表 2^[5]。

表 2 注射穴位及定位

经络及穴位	定位
足太阴脾经 三阴交	后肢内踝尖直上 10 mm 处
足少阴肾经照海	后肢内踝下 1 cm
足少阳胆经环跳	后肢髋关节后上缘
足少阳胆经阳陵泉	后三里上外侧 5 mm 处
足阳明胃经后三里	膝关节后外侧,在腓骨小头下约 5 mm 处

1.5 RT-PCR 法测 VEGF、bFGF 在大鼠下肢缺血骨骼肌中的表达 大鼠麻醉后,取每组大鼠术侧后肢骨骼肌 50 ~ 100 mg,将取得的新鲜组织迅速放入已标记无 RNA 酶冻存管,立即放入液氮储存,后转入 -80 ℃ 冰箱保存。Trizol 一步法提取总 RNA。反转录体系:总 RNA 2 μg, Oligo(dT) 1 μg, 引物 1 μg, 加入 Nuclease-Free Water 至 10 μL, 反应条件:70 ℃、5 min 终止反应后,立即行 PCR 反应。引物序列: GAPDH 上游 5'-TCCATCAAGGGAGTGTGTGC-3', 下游 5'-TCCGTGACCGGTAAGTGTG-3'; VEGF 上游 5'-GT-CACCGTCGACAGAACAGT-3', 下游 5'-GACCCAAAGT-GCTCCTCGAA3'; bFGF 上游 5'-TCCATCAAGGGAGT-GTGTG-3', 下游 5'-TCCGTGACCGGTAAGTGTG-3'; PCR 反应体系: cDNA 2 μL, 引物 0.8 μL, GoTaq qPCR Master Mix 10 μL, 加 Nuclease-Free Water 至 20 μL, 反应条件:95 ℃ 预变性 10 min; 95 ℃ 引物退火 15 s, 60 ℃ 1 min; 溶解曲线 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 15 s, 95 ℃ 15 s, 共 40 个循环。

1.6 统计学方法 采用 MxPro Mx3005P 4.0 软件分析曲线,根据标准曲线将各样品测得的 Ct 值换算

成拷贝数,分析各组检测样本中目的基因拷贝数相对于阳性定量参考样品的基因拷贝数,分析方法利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,比较组间基因拷贝数。实验数据用 SPSS 19.0 统计软件分析比较,计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示,多样本均数间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 检测大鼠后肢术侧、健侧骨骼肌中 VEGF mRNA 和 bFGF mRNA 的表达水平。

2.1 各组大鼠后肢骨骼肌中 VEGF mRNA 表达量的比较 经 t 检验,术侧与健侧 VEGF mRNA 表达量无统计学意义 ($P > 0.05$), 无统计学意义。

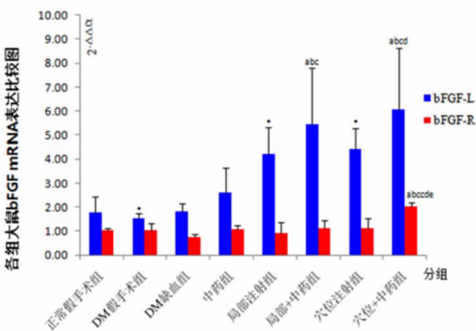
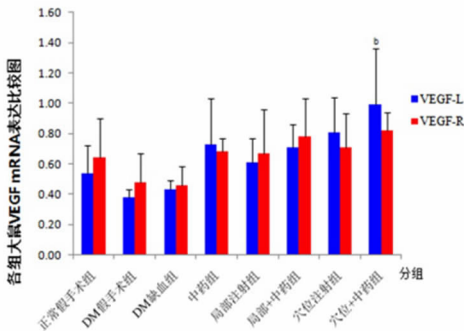
经 ANOVA 检验,与 DM 假手术组比较,穴位注射 BMSCs + 中药组术侧 VEGF mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05$), 差异有统计意义(见表 3, 图 1)。

表 3 各组大鼠后肢骨骼肌中 VEGF mRNA 表达量分析 ($\bar{x} \pm s$)

分组	患侧(L 侧)	健侧(R 侧)
正常假手术组	0.54 ± 0.18	0.64 ± 0.26
DM 假手术组	0.38 ± 0.05	0.48 ± 0.19
DM 缺血组	0.43 ± 0.06	0.46 ± 0.12
中药组	0.73 ± 0.30	0.68 ± 0.09
局部注射组	0.61 ± 0.16	0.67 ± 0.29
局部 + 中药组	0.71 ± 0.15	0.78 ± 0.25
穴位注射组	0.81 ± 0.23	0.71 ± 0.22
穴位 + 中药组	0.99 ± 0.37 *	0.82 ± 0.12

注:经 ANOVA 检验:与 DM 假手术组比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠后肢骨骼肌中 bFGF mRNA 表达量的比较 经 t 检验,与健侧比较,DM 假手术组、局部注射组、穴位注射组术侧 bFGF mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。



注:经 t 检验:与健侧比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
经 ANOVA 检验:与正常假手术组比较, a $P < 0.05$; 与 DM 假手术组比较, b $P < 0.05$;
与 DM 缺血组比较, cc $P < 0.01$; 与中药组比较, d $P < 0.05$; 与局部注射组比较, e $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠后肢骨骼肌中 VEGF、bFGF mRNA 表达量组内与组间比较图

经 ANOVA 检验,与正常血糖假手术组、DM 假手术组、DM 缺血组比较,局部注射 + 中药组、穴位注射 + 中药组术侧 bFGF mRNA 表达量明显升高($P < 0.05$);且穴位注射 + 中药组较中药组明显升高($P < 0.01$),差异均有统计意义(见表 4,图 1)。

穴位注射 + 中药组健侧 bFGF mRNA 表达量明显较正常血糖假手术组、DM 假手术组、DM 缺血组、中药组、局部注射组升高($P < 0.05$),差异有统计学意义(见表 4,图 1)。

表 4 各组大鼠后肢骨骼肌中 bFGF mRNA 表达量分析($\bar{x} \pm Se$)

分组	患侧(L 侧)	健侧(R 侧)
正常假手术组	1.79 ± 0.63	1.03 ± 0.10
DM 假手术组	1.53 ± 0.19 *	1.05 ± 0.29
DM 缺血组	1.81 ± 0.33	0.75 ± 0.14
中药组	2.62 ± 1.03	1.08 ± 0.18
局部注射组	4.23 ± 1.09 *	0.90 ± 0.48
局部 + 中药组	5.43 ± 2.38 $\Delta \blacktriangle \square$	1.12 ± 0.32
穴位注射组	4.40 ± 0.88 *	1.13 ± 0.42
穴位 + 中药组	6.05 ± 2.56 $\Delta \blacktriangle \square \blacksquare$	2.03 ± 0.15 $\Delta \blacktriangle \square \blacksquare \circ$

注:经 t 检验:与健侧比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。经 ANOVA 检验:与正常假手术组比较, Δ $P < 0.05$;与 DM 假手术组比较, $\blacktriangle$ $P < 0.05$;与 DM 缺血组比较, $\square$ $P < 0.01$;与中药组比较, $\blacksquare$ $P < 0.05$;与局部注射组比较, $\circ$ $P < 0.05$ 。

3 讨论

缺血组织血管新生过程复杂,需要各种因子之间相互协同或制约作用从而形成新的血管。VEGF 是目前最重要的、促血管生成作用最强的血管生长因子之一。VEGF 是血管内皮细胞特异性的有丝分裂原,可促进内皮细胞增殖,改变细胞外基质的成分,促进血管的新生^[6]。VEGF 主要分布在血管内皮细胞,属于胞浆内表达抗原,可产生血管基底膜分解所需要的蛋白酶及特定的整合素,从而促进内皮细胞的增殖和迁移^[7];促进骨髓源性的 EPCs 聚集和活化,提高小血管通透性,使血浆蛋白外渗并形成细胞外基质,引起内皮细胞和基质细胞的转移^[8],抑制内皮细胞的凋亡^[9],其两种旁分泌因子具有维持血管内皮的完整性和修复内皮损伤的作用。局部应用 VEGF 可产生全身效应。

研究证明,体内许多组织都分布和表达 bFGF,尤其是血管内皮细胞、血管平滑肌和高度血管化的器官^[10-11]。bFGF 亦是体内发现的最为有效的促血管形成因子之一^[12-13],可促进血管内皮细胞和平滑肌细胞有丝分裂,促进 VEGF 的产生和诱导细胞内的 VEGFR-2 的表达增强 VEGF 的促血管生成作用。

本实验发现,术侧与健侧比较,VEGF mRNA、

bFGF mRNA 表达量均不同程度升高趋势,说明在结扎离断大鼠后肢股动脉造成骨骼肌缺血缺氧时,便会刺激内皮细胞分泌 VEGF、bFGF 等因子,使促血管生成因子表达升高。穴位注射 BMSCs + 中药组术侧 VEGF mRNA、bFGF mRNA 表达量较 DM 缺血模型组明显升高,说明经穴注射 BMSCs 联合中药比单纯穴位注射 BMSCs、局部注射 BMSCs 或单用中药更能刺激 VEGF、bFGF 的分泌,说明穴位注射 BMSCs 联合中药对促进 DM 缺血后肢骨骼肌中 VEGF、bFGF 等促血管因子的表达量,以此推测对促进毛细血管新生、改善 DM 后肢缺血有积极作用。

文献报道注射干细胞通常分为以下几种:肌肉注射^[14]、动、静脉管腔内灌注^[15]等方式,但管腔注射容易因为远端血管闭塞性病变而降低药物到达局部的效果,且血流容易将细胞冲到其他非治疗部位而引起不必要的血管增生性损伤,另外其操作难度亦较大。本课题组在原有干细胞移植的方法(局部肌肉注射、静脉注射与动脉注射)基础之上不断探索、创新,提出辨证循经注射 BMSCs 联合中药以提高 BMSCs 存活率、分化能力以及疗效的观点。

对于经穴注射 BMSCs 联合益气活血中药促进 VEGF、bFGF 表达增加的原因,大致归纳为以下几点:一是刺激经穴亦可起到调节脏腑功能的作用,从而起到一定的调节血糖的作用,对后肢缺血情况的改善起到一定的作用,从而也提高了注射后 BMSCs 的存活率;二是穴位注射有产生药理作用速度快、作用强,与同药等剂量下静脉注射者相当或超过,治疗优于皮下或肌肉注射^[16],经穴给药除选择足三阴、三阳经,取“宁失其穴,勿失其经”的理论外,亦选择缺血局部穴位进行注射,除起到经穴效应外,亦取其局部效应,即经络理论之“局部取穴”,加快了药物的吸收过程,提高了细胞的存活率,亦使细胞直达病所,发挥疗效;另外,联合益气活血中药,对促进血液循环、调畅经络气血、增强细胞活性、滋养血管神经组织、提高大鼠整体功能亦有促进作用。

参考文献

- [1]管街,刘志明,李光伟,等.50 岁以上糖尿病人群周围动脉闭塞性疾病相关因素分析[J].中华医学杂志,2007,87(1):23-27.
- [2]MorishitaR,AokiM,HashiyaN,etal. Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat Peripheral arterial disease[J]. Hypertension,2004,44(2):203-209.
- [3]Takako G,Naoto F,Akira AKI,et al. Search for appropriate experimental methods to create stable hind-limb ischemia in mouse[J]. Tokai J ExpClin Med,2006,3(31):128-132.

(下接第 300 页)

细胞增殖等方面效果更佳,为石斛合剂临床有效防治老年糖尿病、延缓其并发症的发生、发展进一步提供理论依据。

为深入明确石斛合剂防治老年糖尿病的作用机制,尚需在其他信号途径及上述指标的基因水平做进一步研究。

参考文献

- [1] Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. JAMA, 2013, 310(9): 948-959.
- [2] Daniel Porte, Robert S. Ellenberg & Rifkin's diabetes mellitus[M]. ed5. McGraw Hill, 2000: 565-568.
- [3] 刘明, 董超仁, 苏静怡, 等. 一种简便实用的大鼠高脂血症模型[J]. 中国药理学通报, 1989, 5(2): 119.
- [4] Song X, Bao M, Li D, et al. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model[J]. Mech ageing Dev, 1999, 108(3): 239.
- [5] 刘晓秋, 李卫东. D-半乳糖衰老模型大鼠的羰基毒化机理初步探讨[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(3): 141.
- [6] 施红, 金国琴, 余文珍. 诱导构建最佳类似人类 2 型糖尿病大鼠的造模方式[J]. 中国临床康复, 2005, 9(39): 69-71.
- [7] 施红, 王晓宁, 余文珍, 等. 化学药物诱导构建衰老糖尿病大鼠模型[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(24): 2416-2418.
- [8] 王晓宁, 江敏, 郑燕芳, 等. 降糖中药方对糖尿病模型大鼠糖脂代谢的影响[J]. 福建中医学院报, 2009, 19(3): 54-56.
- [9] Jin Guo-qin, Dai Wei-wei, Zhang Xue-li, et al. Effect of tonifying kid-

ney recipe on retarding aging change of the brain limbic system-HYP axis and thymus-dependent immune function in senile rats[J]. ABBS, 2003, 35(11): 1052.

- [10] 施红, 林求诚, 冯亚. 石斛合剂对阴虚热盛、气阴两虚型 2 型糖尿病的疗效观察[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(3): 42-44.
- [11] 辛金钟, 王麒又, 陈丽娟, 等. 石斛合剂改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗的临床研究[J]. 中国现代医生, 2010, 48(3): 58.
- [12] 卢丹, 冯桂梅, 姜秀英, 等. 参麦注射液对 II 型糖尿病患者抗脂质过氧化损伤的临床研究[J]. 中国医药学报, 1999, 14(3): 72.
- [13] Hanke J. Apoptosis and occurrence of Bcl-2, Bak, Bax, Fas and FasL in the developing and adult rat endocrine pancreas[J]. Anat Embryol (Berl), 2000, 202(4): 303-312.
- [14] Reddy S, Bradley J, Ross JM. Immunolocalization of caspase-3 in pancreatic islets of NOD mice during cyclophosphamide-accelerated diabetes[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003(1005): 192.
- [15] Buteau J, El-Assaad W, Rhodes CJ, et al. Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipotoxicity[J]. Diabetologia, 2004, 47(5): 806-815.
- [16] 施红, 金国琴, 高亢亮, 等. 石斛合剂对衰老糖尿病大鼠胰腺组织凋亡相关基因 Bax, Bcl-2 mRNA 及蛋白表达的调控[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(1): 57.
- [17] 岳凤鸣. 糖尿病对小鼠睾丸组织中 PCNA 表达的影响[J]. 中国男科学杂志, 2001, 15(3): 154.

(2015-11-22 收稿 责任编辑: 王明)

(上接第 295 页)

- [4] Juha P. Laurilaa, Lilja Laatikainen, et al. Human embryonic stem cell derived mesenchymal stromal cell transplantation in at hind limb injury model[J]. Cytotherapy, 2009, 11(6): 726 - 737.
- [5] 华兴邦, 李辞荣, 周浩良, 等. 大鼠穴位图谱的研制[J]. 实验动物与动物实验, 1991(1): 1-5.
- [6] Werner Risau. Angiogenic growth factors[J]. Pro In growth factor Res, 1990(2): 71.
- [7] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen[J]. Science, 1989, 246(4935): 1306-1309.
- [8] Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF[J]. Science, 1989(246): 1309 - 1312.
- [9] Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signaling pathways, biological responses and therapeutic inhibition[J]. Trends Pharmacol Sci, 2001, 22(4): 201-207.
- [10] Werner Risau. Angiogenic growth factors[J]. Pro In growth fac-

tor Res, 1990(2): 71.

- [11] Montesano R, Vassalli JD, Baird A, et al. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(19): 7297-7301.
- [12] Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E, et al. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium[J]. Cardiovasc Res, 2003, 57(1): 8-19.
- [13] Pu LL, Holme KR, Symes JF. Heparinase enhances collateral vessel development in the ischemic limb[J]. Int Surg, 2002, 87(4): 260-268.
- [14] Morishita R, Aoki M, Hashiya N, et al. Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease[J]. Hypertension, 2004(44): 203-209.
- [15] Sharif F, Daly K, Crowley J, et al. Current status of catheter-and stent-based gene therapy[J]. Cardiovasc Res, 2004(64): 208-216.
- [16] 诸毅晖, 陈玉华. 论穴位注射的穴药效应[J]. 中国针灸, 2005, 25(1): 46-48.

(2015-11-12 收稿 责任编辑: 洪志强)