

补肾活血中药激活 MMP-9 信号通路动员大鼠骨髓 EPCs 的分子机制研究

戴国华¹ 张彤² 吴波¹ 焦华琛¹ 刘元峰³ 宋宪波⁴

摘要 **目的** 探讨补肾活血中药对心肌梗死(myocardial infarction, MI)模型大鼠骨髓、外周血内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)数量及骨髓基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)信号通路的影响。**方法** 结扎法建立大鼠 MI 模型,30 只造模成功大鼠随机分为补肾活血中药高剂量组、补肾活血中药低剂量组和模型组,每组 10 只,另取 10 只正常大鼠为空白组。补肾活血中药高、低剂量组分别用补肾活血中药按 3 g/kg、1.5 g/kg 加生理盐水 4 mL 灌胃,每天 1 次。空白组及模型组每天单用生理盐水 4 mL 灌胃 1 次。4 周后骨髓、外周血 EPC 培养,7 天后收集贴壁细胞运用流式细胞仪鉴定 CD34/CD133 表型,Western blot 法检测 MMP-9 和水溶性 Kit 配体(soluble Kit ligand, sKitL),ELISA 法检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和基质细胞衍生因子-1 α (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α)。结果 补肾活血中药高、低剂量组骨髓和外周血表达 CD34/CD133 阳性率、EPC 数量均高于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$);且两组骨髓和外周血 VEGF、SDF-1 α 、MMP-9 和 sKitL 表达均高于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 补肾活血中药能够激活 MMP-9 信号通路,增加其上游和下游信号表达水平,动员骨髓 EPC 进入血液循环。

关键词 心肌梗死模型大鼠;内皮祖细胞;补肾活血中药;基质金属蛋白酶 9 信号通路

Chinese Herbs for Shen Invigorating and Blood Activating Activated MMP-9 Signaling Pathway to Mobilize Rats' Bone Marrow EPCs: a Molecular Mechanism Research DAI Guo-hua¹, ZHANG Tong², WU Bo¹, JIAO Hua-chen¹, LIU Yuan-feng³, and SONG Xian-bo⁴ 1 Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250011), China; 2 Department of Acupuncture and Moxibustion, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250011), China; 3 College of Acupuncture and Massage, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250014), China; 4 First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250014), China

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of Chinese herbs for Shen invigorating and blood activating (CHSIBA) on the number of endothelial progenitor cells (EPCs) in the bone marrow and the peripheral blood and the signaling pathway of bone marrow matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) of the myocardial infarction (MI) model rats. **Methods** The MI rat model was established by ligation. Thirty successfully modeled rats were randomly divided into the high dose CHSIBA group, the low dose CHSIBA group, and the model group, 10 in each group. Besides, another 10 normal rats were recruited as the blank group. Rats in the high dose CHSIBA group and the low dose CHSIBA group were administered with CHSIBA at 3 g/kg and 1.5 g/kg body weight by gastrogavage (by adding them in 4 mL physiological saline), once daily. Rats in the model group and the blank group were administered with 4 mL physiological saline once daily. The EPCs were collected from the bone marrow and the peripheral blood 4 weeks later. Seven days later the CD34/CD133 phenotype was identified in collected sticking wall cells using flow cytometry. The MMP-9 and water soluble Kit ligand (sKitL) were detected using Western blot. The expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) were de-

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2009CL034);国家自然科学基金面上项目(No. 81173441)

作者单位:1.山东中医药大学附属医院心内科(济南 250011);2.山东中医药大学附属医院针灸科(济南 250011);3.山东中医药大学针灸推拿学院(济南 250014) 4.山东中医药大学第一临床医学院(济南 250014)

通讯作者:戴国华, Tel:0531-68617784, E-mail:daigh2004@163.com

tected using ELISA. Results The CD34/CD133 positive rate and the EPC quantity in the bone marrow and the peripheral blood were higher in the high dose CHSIBA group and the low dose CHSIBA group than in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Besides, the expressions of VEGF, SDF-1 α , MMP-9, and sKitL in the bone marrow and the peripheral blood were also higher in the high dose CHSIBA group and the low dose CHSIBA group than in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion CHSIBA could activate MMP-9 signaling pathway, increase its upstream and downstream signal expression levels, and mobilize EPCs in the bone marrow to enter the blood circulation.

KEYWORDS myocardial infarction model rat; endothelial progenitor cell; Chinese herbs for Shen invigorating and blood activating; MMP-9 signaling pathway

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 是一种能定向分化为血管内皮细胞的前体细胞, 主要来源于骨髓, 经过血液循环到达受损内皮, 参与血管内皮损伤的修复^[1]。基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 又称明胶酶 B, 在细胞外基质胶原重构过程中具有重要作用, 与多种心血管疾病的发生、发展有关。研究证实, MMP-9 介导的细胞外基质的重建是动员 EPC 的关键环节^[2]。前期研究发现, 补肾活血中药能够增加外周血 EPC 并归巢到心肌, 增加缺血心肌组织 EPC 数量, 促进侧支循环的建立和毛细血管的新生^[3]。因此, 本实验基于 MMP-9 信号通路, 探讨了补肾活血中药动员骨髓 EPC 进入血液循环的分子机制, 报告如下。

材料与方法

1 实验动物 健康 6 周龄 SD 雄性大鼠 60 只, SPF 级, 体重 (180 $\pm$ 20) g, 由山东中医药大学实验动物中心提供, 生产许可证号: SCXK (鲁) 2005-0015。

2 试剂和仪器 试剂: 胎牛血清 (FCS, 浙江天杭生物有限公司); DMEM 高糖诱导培养基、DMEM 低糖诱导培养基、M199 诱导培养基 (美国 Gibco 公司); 兔抗大鼠 CD34 多克隆抗体、兔抗 FITC-CD133 抗体、羊抗兔 IgG (H + L), unconjugated (美国 Santa Cruz 公司); ELISA 检测试剂盒 (上海雅吉生物科技有限公司); NO 检测试剂盒 (南京建成科技有限公司)。仪器: DW-3000 动物呼吸机 (北京众实迪创科技发展有限公司); 120106EZ Langendorff 灌流系统 (美国 Radnoti 公司); Axiovert 40C Olympus 倒置相差显微镜 (德国 Zeiss 公司); FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Bio-Rad680 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

3 实验药物 补肾活血中药由山东中医药大学附属医院制剂室优选工艺制成, 由女贞子、沙苑子、肉桂、黄芪、川芎、三七粉组成, 批号: 0303349, 规格: 3 g/包, 每包含生药量 30 g。

4 方法

4.1 MI 动物模型制作 随机选取 50 只大鼠制作 MI 模型, 采用结扎法, 参照 Drexler H 等方法^[4,5]。用 10% 水合氯醛 0.3 mL/100 g 腹腔注射, 麻醉固定后记录心电图。颈部分离气管, 待打开胸腔时连接小动物呼吸机, 放置开胸器暴露心脏, 剪开心包, 在肺动脉圆锥与左心耳交界稍下 2 mm 处用无创性缝线结扎左侧冠状动脉前降支 (LAD), 记录心电图出现 Q 波、ST 段抬高、T 波高耸或倒置^[6], 证实结扎成功后逐层缝合胸壁。待大鼠出现自主呼吸后, 撤掉呼吸机, 关闭气管。术后 24 h 存活者即为模型制作成功。最终 30 只大鼠造模成功。

4.2 分组及给药方法 将造模成功的 30 只 SD 大鼠随机分为补肾活血中药高剂量组、补肾活血中药低剂量组及模型组, 每组 10 只, 未经造模的正常 SD 大鼠 10 只作为空白组。补肾活血中药高、低剂量组分别用补肾活血中药按 3 g/kg、1.5 g/kg (分别按成人用量的 10 倍、5 倍计算) 加生理盐水 4 mL 灌胃^[7], 每天 1 次。空白组及模型组每天单用生理盐水 4 mL 灌胃 1 次。灌胃 4 周后采集标本。

4.3 大鼠骨髓、外周血 EPC 培养

4.3.1 骨髓 EPC 培养 无菌条件下剪取大鼠双侧股骨和胫骨, 75% 乙醇中浸泡 15 min, 剪除一侧骨端暴露骨髓腔, 用 5 mL 注射器抽吸骨髓注入培养瓶, 以 $1 \sim 3 \times 10^5$ 的密度悬浮于 5 mL DMEM (低糖) 诱导培养基 (含 20% 胎牛血清、青霉素 10^5 IU/L、链霉素 100 mg/L) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养。每 3 天换液 1 次。

4.3.2 外周血 EPC 培养 无菌条件下心脏采血 3 mL。用 PBS 等体积 (1:1) 稀释血液, 吸取淋巴细胞分层液 5 mL 加入 15 mL 离心管中, 稀释血液沿管壁徐徐加入分层液上, 保持二者界面清晰。离心 15 min (2 000 r/min) 后吸取乳白色混浊的单核细胞 (MNC) 层, PBS 洗涤 2 次后以 $1 \sim 3 \times 10^5$ 的密度悬浮于 5 mL M199 诱导培养基 (含 20% 胎牛血清、EGF

10 $\mu\text{g/L}$ 、青霉素 10⁵ IU/L、链霉素 100 mg/L) 中, 均匀铺在 FN 包被的培养瓶内。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养, 48 h 后以 M199 诱导培养基轻轻洗去未贴壁细胞, 继续上述完全培养基培养, 每 3 天换液 1 次。

4.4 骨髓、外周血 EPC 表型鉴定 参考文献 [8]: 细胞培养至第 7 天, 0.25% 的胰酶消化细胞后用 PBS 重悬细胞, 光镜下计数。分别设立同型对照管 A、单标管 B、单标管 C 和双标管 D, 每管加入 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞。对照管 A 加入同型抗体 2 μL IgG₁, 单标管 B 加入 2 μL FITC-抗 CD133 (1:200), 单标管 C 加入 2 μL 抗 CD34 (1:200), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后加入 2 μL PE-IgG₁; 双标管 D 中加入 2 μL 抗 CD34, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后加入 2 μL PE-IgG₁ 和 2 μL FITC-抗 CD133。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次。流式细胞仪检测, 鉴定 CD34/CD133 细胞数。

4.5 ELISA 法检测血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和基质细胞衍生因子-1 α (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α) 表达 细胞培养至第 7 天, 分别收集各培养液 2 mL, 离心 10 min (3 000 r/min), 设置标准孔、样品孔和空白孔, 严格按照说明书进行操作, 酶标仪 450 nm 波长处测定各孔 OD 值。

4.6 Western blot 检测 MMP-9、水溶性 Kit 配体 (soluble Kit ligand, sKitL) 蛋白表达 细胞培养至第 7 天, 弃去培养液, 用 PBS 3 mL 洗涤 1 次, 加入裂解液, 放置 1 ~ 2 min, 收集液体离心 4 min (12 000 r/min) 后收集蛋白液。设立补肾活血中药

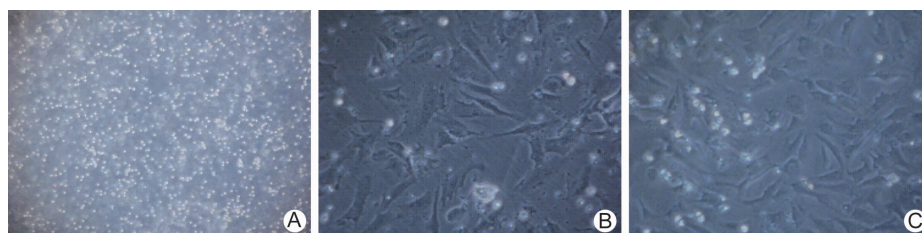
高、低剂量组, 模型组和空白组, 各加 80 μL 蛋白质样品和 20 μL 5 $\times$ SDS 样品处理液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 7 min 后冰浴冷却。凝胶加样孔加样, 左侧第 1 孔加入 10 μL 蛋白预染 Marker, 其他孔分别加入 10 μL 不同样品, 进行电泳操作, 转印完毕, 封闭液封闭, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 1 h。然后各加入一抗兔抗 MMP-9 抗体 15 μL 和一抗兔 Anti-sKitL 15 μL , 并加入内参抗 β -actin 兔多克隆抗体 3 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。取出膜 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入二抗羊抗兔 IgG (H + L), unconjugated 3 μL , 室温温育 1 h。取出膜 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。配制 DAB 染色剂加在膜上, 密切观察显色过程。10 min 后以流水漂洗终止显色反应, 凝胶成像系统观察显影结果。

4.7 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用两组间独立样本 t 检验, 两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

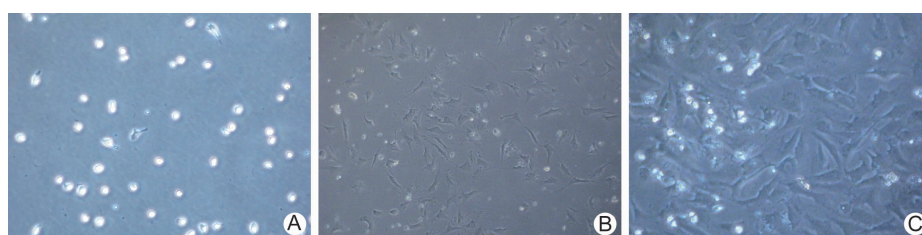
1 骨髓、外周血 EPC 培养鉴定情况

1.1 骨髓、外周血 EPC 形态学特征 (图 1、2) 骨髓细胞接种 5 h 后即开始贴壁 (图 1-A); 3 天后贴壁细胞渐伸长变形, 呈纺锤形、梭形和多角形 (图 1-B); 培养 7 天后贴壁细胞数量明显增加, 10 天后细胞基本长满培养瓶底 (图 1-C)。外周血培养 2 天贴壁细胞开始伸展 (图 2-A); 3 天细胞开始融合 (图 2-B); 培养 7 天即出现梭形样内皮细胞 (图 2-C)。



注: A 为部分细胞贴壁; B 为细胞伸长变形; C 为细胞融合

图 1 骨髓 EPC 形态特征 ($\times 200$)



注: A 为贴壁细胞伸展; B 为细胞开始融合; C 为细胞成梭形或线样

图 2 外周血 EPC 形态学特征 ($\times 200$)

1.2 各组大鼠骨髓、外周血 EPC CD34/CD133 表面抗原表达比较(表 1) 用抗 CD34、FITC-抗 CD133 标记细胞,结果模型组外周血表达 CD34/CD133 阳性率较空白组升高($P < 0.05$);补肾活血中药高、低剂量组骨髓和外周血表达 CD34/CD133 阳性率较模型组均有明显升高($P < 0.05, P < 0.01$);且以补肾活血中药高剂量组升高更为显著。

表 1 各组大鼠骨髓、外周血 EPC 表面抗原表达比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	骨髓	外周血
空白	10	18.7 ± 4.5	10.6 ± 1.5
模型	10	20.1 ± 3.4	18.1 ± 5.4 *
补肾活血中药低剂量	10	60.4 ± 5.6 Δ	46.8 ± 3.5 Δ
补肾活血中药高剂量	10	78.1 ± 2.5 $\Delta\Delta$	65.9 ± 2.2 $\Delta\Delta$

注:与空白组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

2 各组大鼠骨髓、外周血 EPC 数量比较(表 2) 200 倍镜下选取一个视野观察,发现模型组骨髓 EPC 数量较空白组有显著增高($P < 0.05$);补肾活血中药高、低剂量组骨髓及外周血 EPC 数量较模型组均有显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠骨髓、外周血 EPC 数量比较 (cells, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	骨髓	外周血
空白	10	40.5 ± 3.1	27.6 ± 4.9
模型	10	75.7 ± 6.5 *	32.6 ± 4.5
补肾活血中药低剂量	10	112.5 ± 4.3 Δ	54.7 ± 6.3 Δ
补肾活血中药高剂量	10	177.2 ± 5.8 $\Delta\Delta$	69.2 ± 3.2 $\Delta\Delta$

注:与空白组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

3 各组大鼠骨髓、外周血 VEGF、SDF-1 α 表达比较(表 3) 模型组外周血 VEGF 表达高于空白组($P < 0.05$);补肾活血中药高、低剂量组骨髓、外周血 VEGF 及 SDF-1 α 表达均高于模型组($P < 0.05, P < 0.01$)。

4 各组大鼠骨髓 MMP-9 和 sKitL 表达比较(图 3,表 4) 与空白组比较,模型组 MMP-9 和 sKitL 表达均升高($P < 0.05$);与模型组比较,补肾活血中药高、低剂量组 MMP-9 和 sKitL 表达均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 4 各组大鼠骨髓 MMP-9 和 sKitL 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP-9	sKitL
空白	10	7.29 ± 1.14	9.73 ± 1.05
模型	10	13.16 ± 1.82 *	17.15 ± 4.21 *
补肾活血中药低剂量	10	16.87 ± 1.45 Δ	28.41 ± 2.12 $\Delta\Delta$
补肾活血中药高剂量	10	21.34 ± 2.63 $\Delta\Delta$	24.68 ± 0.74 Δ

注:与空白组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

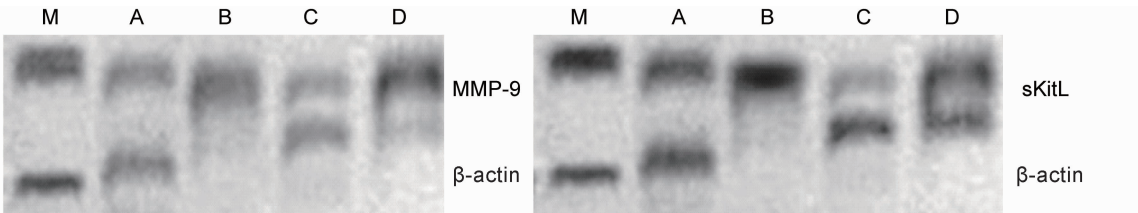
讨 论

研究证实,缺血组织可以释放缺氧诱导因子-1 α (hypoxia induced factor-1 α , HIF-1 α)^[9], 促进 VEGF 和 SDF-1 α 的表达增加, VEGF、SDF-1 α 与 EPC 表面的特异受体结合,促使骨髓 MMP-9 的释放和激活。在 MMP-9 的作用下,EPC 膜上的膜结合性 Kit 配体(mKitL)转化为 sKitL,EPC 与基质细胞的结合减弱,同时 sKitL 可以促进 EPC 的运动,从而使 EPC 从骨髓动员到外周血。因此,由 MMP-9 介导的细胞外基质的重建是动员 EPC 的关键环节^[2]。本研究在前期工作的基础上,基于上述 MMP-9 信号通路,探讨了补肾活血中药动员缺血心肌大鼠骨髓 EPC 进入血液循环的分子机制。

表 3 各组大鼠骨髓、外周血 VEGF、SDF-1 α 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF (pg/mL)		SDF-1 α (ng/mL)	
		骨髓	外周血	骨髓	外周血
空白	10	45.22 ± 8.64	39.26 ± 2.19	5.65 ± 0.14	5.53 ± 0.13
模型	10	53.55 ± 1.03	48.30 ± 6.62 *	5.89 ± 0.12	5.80 ± 0.25
补肾活血中药低剂量	10	68.26 ± 5.47 Δ	61.20 ± 2.32 Δ	7.03 ± 0.36 $\Delta\Delta$	7.04 ± 0.92 $\Delta\Delta$
补肾活血中药高剂量	10	79.38 ± 7.05 Δ	75.69 ± 5.78 Δ	8.21 ± 0.23 $\Delta\Delta$	7.40 ± 0.61 $\Delta\Delta$

注:与空白组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$



注:M 为 Marker;A 为模型组;B 为补肾活血中药低剂量组;C 为空白组;D 为补肾活血中药高剂量组

图 3 各组大鼠骨髓 EPC MMP-9 和 sKitL 表达比较

研究表明,补肾活血中药高、低剂量组骨髓 MMP-9 释放增多;模型组外周血 VEGF 较空白组增加,但骨髓 VEGF、骨髓和外周血 SDF-1 α 表达均较空白组有所增加,差异无统计学意义,表明缺血组织释放的 HIF-1 α 虽然可以促进 VEGF 和 SDF-1 α 表达增加,但自身作用有限;补肾活血中药高、低剂量组骨髓、外周血 VEGF、SDF-1 α 及 sKitL 表达的结果证实 MMP-9 上游和下游信号的表达水平增加。模型组骨髓、外周血 EPC 数量、EPC 表面抗原表达表明 MI 后骨髓 EPC 应激性动员,数量增加,但 EPC 绝对数量较低,自身应激动员作用不明显;而补肾活血中药高、低剂量组骨髓及外周血 EPC 数量明显增加,表明补肾活血中药能够动员骨髓 EPC 到外周血液循环,其作用机制与激活骨髓 MMP-9 信号通路相关。

中医学认为,“心本于肾”、“补肾生血”、“活血生肌”,肾脏阴阳的虚衰和失调是冠心病的重要病理基础,从肾论治冠心病有着丰富的临床经验,且相对安全。我们以补肾活血中药为主处方:女贞子、沙苑子、肉桂、黄芪、川芎、三七粉,优选工艺研制的现代中药(院内制剂),治疗冠心病心绞痛的研究结果显示,治疗后心肌缺血总负荷减少,与治疗前比较差异有统计学意义($P < 0.01$),减少幅度显著大于复方丹参滴丸组($P < 0.01$),表明该药具有较好的抗心肌缺血作用^[10]。而且继续研究发现,该药能够促进心肌梗死模型大鼠心脏缺血心肌侧支循环的建立和毛细血管的新生,发挥“自身血管搭桥”的作用,机制可能与缺血心肌中 VEGF 表达上调有关^[11]。药理研究表明,女贞子能改善心肌缺血的心电图,沙苑子总黄酮有扩张血管的作用,川芎嗪对麻醉兔心肌缺血再灌注所致心肌损伤有保护作用,三七总皂苷有抗心肌缺血及对缺血心肌再灌注的保护作用^[12]。因此,可以推断补肾活血中药能够激活 MMP-9 信号通路,增加 VEGF、SDF-1 α 及 sKitL 信号表达水平,从而动员骨髓 EPC 进入外周血,到达受损内皮,参与血管内皮损伤的修复,为寻找安全有效的骨髓 EPC 调动剂,防治动脉粥样硬化性疾病提供理论支持。

参 考 文 献

[1] Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al. Statin

therapy accelerate re-endothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. *Circulation*, 2002, 105(25): 3 017 - 3 024.

- [2] Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand[J]. *Cell*, 2002, 109(5): 625 - 637.
- [3] 陈晓峰,唐礼江,朱敏,等.丹参酮 II A 对外周血内皮祖细胞增殖、黏附和迁移功能的影响[J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(2): 274 - 275.
- [4] Drexler H, Depenbusch JW, Truog AG, et al. Effects of diltiazem on cardiac function and regional blood flow at rest and during exercise in a conscious rat preparation of chronic heart failure (myocardial infarction) [J]. *Circulation*, 1985, 71(6): 1 260 - 1 272.
- [5] 施新猷主编.现代医学实验动物学[M].北京:人民军医出版社, 2000:462 - 463.
- [6] 刘艳伟,刘水平,成建定,等.大鼠心肌缺血再灌注模型的改进及心电图判断指标[J]. *实用儿科临床杂志*, 2007, 22(7): 525 - 527.
- [7] 徐叔云,卞如谦,陈修.药理实验方法学[M].第3版.北京:人民卫生出版社, 2001:179.
- [8] 张军霞,李瑞,赵鹏,等. CD133 免疫磁珠分选脐血内皮祖细胞的培养及鉴定[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(2): 159 - 162.
- [9] Lee SH, Wolf PL, Escudero R, et al. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(9): 626 - 633.
- [10] 戴国华,林慧娟,张彤,等.祛风生脉颗粒治疗冠心病心绞痛心络风阻、肾虚血瘀证的临床研究[J]. *山东中医药大学学报*, 2005, 29(4): 271 - 273.
- [11] 戴国华,林慧娟,张彤,等.祛风生脉颗粒对实验性心肌缺血大鼠心脏促血管生成作用的研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2005, 3(11): 964 - 966.
- [12] 张丽君,耿志辉.三七总皂苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护研究[J]. *吉林医学*, 2007, 28(11): 1261 - 1262.

(收稿:2012-08-24 修回:2013-01-14)