

骨髓间充质干细胞联合血管内皮生长因子移植 治疗糖尿病兔下肢缺血的实验研究

杨亚冬 张文元 赵佳骏 张科技 房国坚

摘 要 **目的** 用包裹血管内皮生长因子(VEGF)的纳米球与骨髓间充质干细胞(BMSCs)共同多点肌内注射到糖尿病兔下肢缺血部位,以期使糖尿病兔下肢缺血症状改善,缺血部位形成新的血管。**方法** 通过密度梯度离心法及贴壁培养法分离纯化 BMSCs。采用超声乳化-溶剂挥发法制备包载 VEGF 的 PLGA 纳米球,并检测其各指标。按 100mg/kg 耳缘静脉注射四氧嘧啶制备糖尿病兔模型,14 天后空腹血糖 $>16\text{mmol/L}$ 确定为糖尿病模型。成模的糖尿病兔双侧下肢股动脉结扎制作下肢缺血模型,并分 4 组在股动脉结扎离断区进行多点注射治疗。PBS 组、BMSCs 组、VEGF 组和 BMSCs + VEGF 组,同时设正常对照组。主要观察指标:治疗后各组兔子活动情况、大体解剖情况及下肢缺血区血管形成情况。**结果** 制备的 PLGA 纳米粒基本呈球形,分散较好,平均粒径为 $438.97 \pm 15.60\text{nm}$ 。载 VEGF 的 PLGA 纳米粒包封率为 87.4%,载药量为 $43.7\mu\text{g/g}$ 。24h 释放率 55.48%。共选用 28 只雌兔制作糖尿病模型,死亡 14 只,成模 12 只,2 只血糖没达到糖尿病模型标准。死亡率为 50%,模型成功率为 42.86%,不敏感率 7.14%。移植后 1 个月发现注射 PBS 组的 1 只兔子胫骨有一 $1.0\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ 的溃疡,行走时呈拖行,另 2 只呈跛行。注射 VEGF 组 3 只兔子均呈跛行。注射 MSC 组有 2 只跛行,1 只行走正常。注射 BMSCs + VEGF 组 2 只行走正常,活动自如,仅 1 只略呈跛行。从大体解剖结果及切片结果都可以看出移植 BMSCs 组、VEGF 组及 BMSCs + VEGF 组在结扎股动脉后,可形成侧支循环,使股动脉远端保持充盈,血供良好,尤其是移植 BMSCs + VEGF 组形成的侧支较多。而 PBS 治疗组股动脉远端未见充盈,只有回流的股静脉增粗。**结论** 用包裹 VEGF 的 PLGA 纳米球与 BMSCs 共同多点肌内注射到糖尿病兔下肢缺血部位,对糖尿病兔下肢缺血区血管有促进生成作用,能改善动物模型下肢缺血的症状。

关键词 骨髓间充质干细胞 血管内皮生长因子(VEGF) 糖尿病 下肢缺血

中图分类号 R329

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.06.014

Experimental Study on the Treatment of Lower Limb Ischemia of Diabetic Rabbits by Injecting Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Vascular Endothelial Growth Factor-loaded Nanoparticles. Yang Yadong, Zhang Wenyuan, Zhao Jiajun, et al. Institute of Bioengineering, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang 310013, China

Abstract **Objective** To explore the treatment effects of transplantation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on the lower limb ischemia in diabetic rabbits. **Methods** Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were isolated and purified by a combination of density gradient centrifugation and adhesive culture in vitro. PLGA nanoparticles loaded with VEGF were prepared by ultrasonic emulsification-solvent evaporation method. Alloxan was intravenously injected 100mg/kg body weight to make rabbit model with diabetes mellitus. The standard of diabetic model was fasting glucose $>16\text{mmol/L}$ on the 14th day. Then both sides of the diabetic rabbits' femoral arteries of lower limbs were ligated and cut to built hind limb ischemia model. Rabbits were randomly allocated into four groups for transplantation therapy, PBS group, VEGF group, BMSCs group, and VEGF + BMSCs group. Main outcome measures were, each rabbit's activity, gross anatomy and angiogenesis in lower limb ischemic regions. **Results** The VEGF-loaded PLGA nanoparticles were spherical in shape. The mean diameter was $438.97 \pm 15.60\text{nm}$. The entrapment efficiency was 87.4% and medicine loading was $43.7\mu\text{g/g}$. Accumulative release quantity in 24 hour was 55.48%. In total of 28 rabbits, the mortality was 50%, the model-forming rate was 42.86%, the insensitive rate was 7.14%. In PBS group, there was a $1.0\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ ulcer on one rabbit's tibia 1 month after transplantation. Their hind limbs were weakness and only could drag their legs for walking or limp. In VEGF group and BMSCs group, all rabbits had a significant limp except that one could walk unrestricted which injected with BMSCs. In BMSCs + VEGF group, two rabbits walked normally, the other one walked a little limp. The gross anatomy and pathological sections ex-

基金项目:浙江省医药卫生科学研究计划项目(2013KYA045);浙江省医学重点学科群项目(XKQ-010-001)生物医药重点学科群

作者单位:310013 杭州,浙江省医学科学院生物工程研究所

通讯作者:张文元,研究员,电子信箱:zhangwy61@163.com

hibited that collateral vessels were significantly increased and distal femoral artery kept filling in BMSCs group, VEGF group, and BMSCs + VEGF group compared with PBS group, especially in BMSCs + VEGF group. While in PBS group, there was low vessel filling intensity, poor distal tissue blood filling, and regurgitant vein enlargement. **Conclusion** Transplantation of BMSCs and VEGF by local injection can improve blood supply and contribute to angiogenesis in lower limb ischemia of diabetic rabbits.

Key words Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs); Vascular endothelial growth factor (VEGF); Diabetes; Lower limb ischemia

糖尿病患者并发末梢血管病变和(或)神经病变时,血管形成能力受限,导致下肢持续反复感染、难愈性溃疡等以糖尿病足为代表的下肢缺血性疾病,常规药物治疗收效甚微,部分患者经介入治疗或血管搭桥手术治疗后远期疗效不够理想,尤其是下肢动脉流出道闭塞而且缺乏代偿性侧支形成,采取任何手段均很难使血管再通^[1,2]。如何在糖尿病患者中建立有效的血管新生和侧支循环是治疗糖尿病缺血性疾病的关键。目前应用骨髓干细胞治疗下肢缺血性疾病已经在动物模型体内证明有效,但坏死区域局部微环境恶劣,缺血、缺氧、强烈的炎性反应、氧化应激压力等不利于移植的干细胞存活。调节植入干细胞的存活和功能,是进一步研究的热点。本研究尝试用包裹血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的纳米球与骨髓间充质干细胞(BMSCs)共同多点肌内注射到糖尿病兔下肢缺血部位,以期使缺血部位形成新的血管或者产生代偿性的侧支循环,使股动脉远端血管充盈,为糖尿病下肢缺血的治疗提供实验依据。

材料与方法

1. 材料:实验动物为31只雌性健康新西兰大白兔,4~5个月龄,体重2.0~2.5kg,由浙江省实验动物中心提供[实验动物许可证号:SCXK(浙)2009-0039号]。主要试剂:四氧嘧啶(ALX,购自美国Sigma公司),血管内皮细胞生长因子(VEGF,购自美国PerproTech公司),VEGF ELISA检测试剂盒(购自美国PerproTech公司),聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA 50:50,山东岱罡生物制品公司),聚乙烯醇(PVA,购自国药集团化学试剂有限公司),二氯甲烷(购自杭州双林化工试剂厂)。主要仪器:冷冻干燥仪(DENMARK);酶标仪(Thermo公司);超声波声振仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);激光粒度检测仪(Nano-ZS90, Malvern公司);扫描电镜(TM1000, HITACHI公司);血糖仪(Freestyle,雅培公司)。

2. 兔骨髓间充质干细胞(BMSCs)的分离纯化培养:取1只健康的新西兰大白兔,无菌条件下从髂后上棘穿刺抽取骨髓,通过密度梯度离心法及贴壁培养法分离纯化BMSCs,详见参考文献[3]。

3. 采用超声乳化-溶剂挥发法制备包载血管内皮生长因子(VEGF)的纳米球:在4ml 2% PLGA的二氯甲烷溶液中

加入5μg VEGF,冰浴,超声30s,形成初级乳液;将初级乳液缓慢倒入30ml 2%聚乙烯醇水溶液(含2%吐温80)中,边加边搅拌,冰浴,超声2min,形成复乳液;在室温下磁力搅拌12h,用双蒸水洗涤3次,39200×g离心15min,洗去残余的聚乙烯醇,用双蒸水重悬;冻干机内冻干24h,-20℃保存。用扫描电镜观察其形态,用粒径测试仪测试其粒径大小。通过收集载药纳米粒制备过程中所有洗脱溶液,利用VEGF ELISA检测试剂盒检测溶液中VEGF含量,根据标准曲线计算载VEGF的PLGA纳米粒的载药量、包封率。具体步骤按说明书操作。包封率(%)=(VEGF总量-洗脱液中VEGF浓度×洗脱液总量)/投入VEGF总量×100%;载药量=(VEGF总量-洗脱液中VEGF浓度×洗脱液总量)/所得纳米粒质量。

4. 糖尿病兔下肢缺血动物模型制作:(1)糖尿病兔模型的建立^[4-6]:用无菌生理盐水配制4%的四氧嘧啶(ALX)溶液,用微量过滤器过滤后,按100mg/kg经兔耳缘静脉快速注射四氧嘧啶,给药前禁食4h,给药后密切观察进食水、排尿等情况,并在给药后5h给予静脉注射25%葡萄糖4ml/只,再用50%葡萄糖液代替进食水以防低血糖,12h后换成正常水。72h后测空腹血糖,血糖<16mmol/L的兔子继续追加80mg/kg四氧嘧啶,14天后测空腹血糖,以空腹血糖>16mmol/L确定为糖尿病。正常对照组的兔子饮食与造模组兔子相同,未给予其他任何处理。(2)糖尿病兔下肢缺血模型的建立:取成模的糖尿病兔用3%戊巴比妥钠30mg/kg耳缘静脉麻醉,双后肢自腹股沟韧带至膝关节做一纵行切口,行股动脉及其分支分离术,分别结扎并离断股动脉及分支。正常对照组的兔子做假手术,仅切开皮肤,然后缝合。术后3天内均用青霉素预防感染。

5. 动物模型移植治疗及分组处理:于糖尿病兔下肢缺血动物模型制作同时,在后肢缺血部位的内侧肌群多点肌注1ml VEGF纳米球和(或)BMSCs,无菌PBS(pH 7.0)配制的0.1% VEGF纳米球,BMSCs浓度调整为 1×10^6 cells/ml。移植后1个月全身麻醉,再次测血糖,观察血糖是否已自行恢复正常。以股内侧正中部位为中心等距离取局部肌组织,甲醛固定、包埋、切片,HE染色,观察肌肉组织中微血管形成情况。移植实验分成4组,第1组移植VEGF纳米球+BMSCs;第2组移植VEGF纳米球;第3组移植BMSCs;第4组仅注射PBS为空白组。每组均为3只兔子。另设一组做完假手术后未予治疗的正常对照组。

结 果

1. 纳米粒形态特征及VEGF包封率和体外缓释

情况:制备的 PLGA 纳米粒呈白色粉末状。扫描电镜下纳米粒基本呈球形,大小不均,分散较好(图 1A)。粒径测试仪测试其平均粒径为 $438.97 \pm 15.60\text{nm}$ (图 1B)。VEGF ELISA 检测试剂盒检测溶液中 VEGF 含量,利用 ELISAcacalc 软件绘制标准曲线,得出曲线方程为 $y = 0.9296 + 1.632x - 0.8894x^2$,计算出载 VEGF 的 PLGA 纳米粒包封率为 87.4%,载药量为 $43.7\mu\text{g/g}$ 。PLGA 纳米粒中 VEGF 的体外药物释放情况见图 1C。在前 7 h 内药物释放速度较快,然后逐渐呈平缓持续释放。24h 释放率即突释率 55.48%。

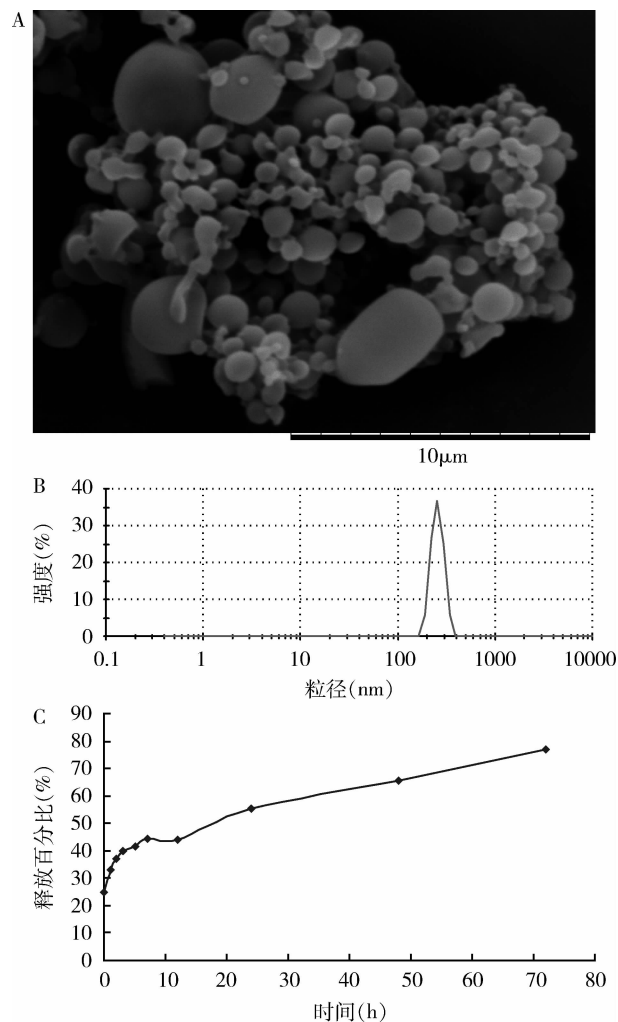


图 1 载 VEGF 的 PLGA 纳米粒检测结果

A. PLGA 纳米粒扫描电镜图 ($\times 10000$); B. PLGA 纳米粒粒径检测图; C. 载 VEGF 的 PLGA 纳米粒体外释放图

2. 糖尿病兔动物模型成模结果:兔子注射四氧嘧啶后皮毛杂乱,精神疲软,注射后 12 ~ 24h 死亡率较高,死亡时呈现惊厥、尖叫、角弓反张等症状,原因是注射四氧嘧啶后,兔子在经过短暂的高血糖后进入了

较持续的低血糖期。给予静脉注射葡萄糖后,可改善低血糖反应的症状。本实验共选用了 28 只体重约 2.5kg 的雌兔,第 1 次注射后,死亡 10 只,7 只兔子在 72h 测空腹血糖 $> 16\text{mmol/L}$,另外 11 只在追加注射后,死亡 4 只,5 只 72h 测空腹血糖 $> 16\text{mmol/L}$,2 只 72h 测空腹血糖仍 $< 16\text{mmol/L}$,不适用于实验,淘汰。采用四氧嘧啶制作糖尿病兔模型死亡率为 50%,模型成功率为 42.86%,不敏感率 7.14%。

3. 糖尿病兔下肢缺血模型移植治疗结果观察:
(1) 大体观察:12 只糖尿病兔在双侧后肢股动脉离断术后无死亡现象,建模后 24h 内精神均较差,后肢活动受限。移植后 1 个月发现注射 PBS 组的 1 只兔子胫骨有一 $1.0 \times 1.5\text{cm}^2$ 的溃疡,行走时后肢无力,呈拖行。有 8 只兔子呈跛行,后蹬腿无力,其中 2 只为注射 PBS 组,2 只为注射 BMSCs 组,3 只为注射 VEGF 组,1 只为注射 BMSCs + VEGF 组。另外 3 只行走正常,活动自如。血糖检测发现有 1 只移植 MSC 的糖尿病兔血糖仅 7.5mmol/L ,其余 11 只兔子血糖均 $> 16\text{mmol/L}$,提示糖尿病模型可能发生自愈。解剖发现见图 2,注射 PBS 组股动脉结扎后只有股静脉的远端代偿性增粗,与正常对照肌肉相比呈苍白色,血供明显不足,其他 3 组都可见股动脉远端仍有血供,且动脉周边均有旁支生成,尤以 BMSCs + VEGF 组侧支动脉增生最多。
(2) 组织切片观察:注射 PBS 组切片未见任何血管增生,仅见有轻微炎症,移植 BMSCs 组可见有细胞团及血管增生,移植 VEGF 和 BMSCs + VEGF 组均可见有血管增生(图 3)。

讨 论

已有研究证实应用骨髓干细胞治疗动物模型下肢缺血性疾病有很好的疗效,能促进血管形成^[7,8]。而 Tateno 等^[9]研究发现移植干细胞后单靠干细胞分泌的细胞因子还较难以使血管新生,细胞因子及干细胞联合移植更利于血管新生。故本研究尝试用骨髓间充质干细胞与含 VEGF 的纳米球共移植治疗糖尿病兔下肢缺血。

VEGF 是一种特异作用于血管内皮细胞的细胞因子,能强烈而特异地促使内皮细胞分裂、增生和转移,提高干细胞的成血管潜能^[10]。可刺激缺血区小血管生长和侧支循环形成,达到改善缺血的目的^[11]。但是 VEGF 稳定性差、易于失活,因而设计合理有效的缓释体系极为重要。PLGA 微球及纳米球用于制备生物降解型缓释或定向给药体系研究已有数十年,

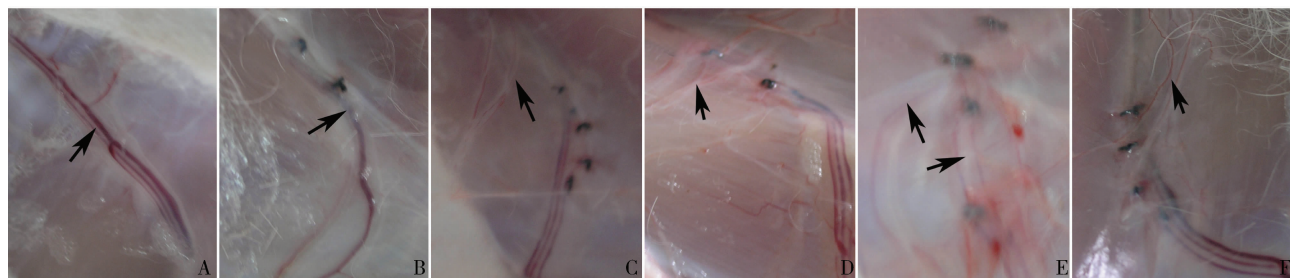


图2 糖尿病兔下肢缺血模型移植治疗1个月后各组动物下肢股动脉结扎处大体解剖与正常动物下肢股动脉比较

A. 正常兔股动脉; B. 股动脉结扎后, 内侧的股静脉增粗, 周边肌肉发白; C. 股动脉结扎后注射1ml BMSCs 治疗后, 股动脉远端仍有血液充盈, 箭头所示为增生的小血管; D. 股动脉结扎后注射1ml VEGF 纳米球治疗后, 股动脉远端仍有血液充盈, 箭头所示为增生的小血管; E、F. 股动脉结扎后注射1ml BMSCs + VEGF 治疗后, 股动脉远端仍有血液充盈, 箭头所示为增生的小血管

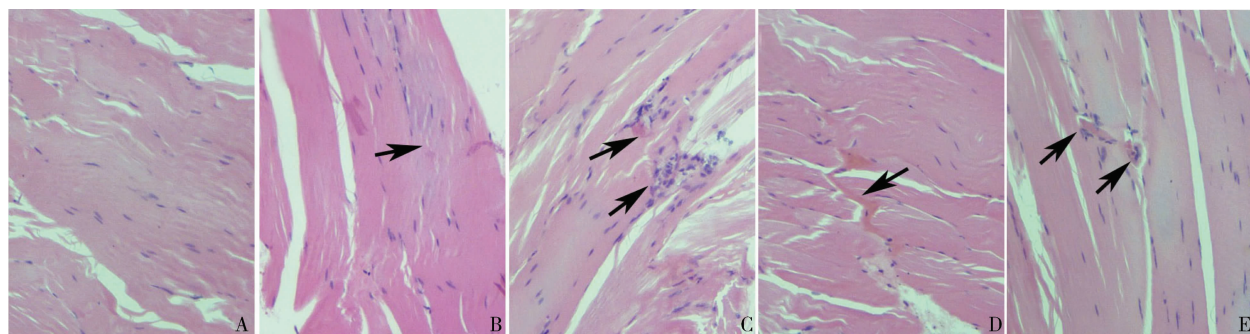


图3 糖尿病兔下肢缺血模型移植治疗1个月后各组动物组织切片显示血管形成情况(HE染色, ×100)

A. 正常兔股动脉; B. PBS 治疗组切片未见有小血管, 箭头所示可见有轻微炎症反应; C. BMSCs 治疗组可见有细胞团增生, 箭头所示为增生的小血管及细胞团; D. VEGF 纳米球治疗组可见有血管增生, 箭头所示为增生的小血管横断面; E. BMSCs + VEGF 治疗组可见有血管增生, 箭头所示为增生的小血管

用 PLGA 作为制备纳米球的载体, 具有可降解性、生物相容性好、安全无毒的优点, 而且可通过改变乳酸(LA)、羟基乙酸(GA)不同组成比, 达到所需要的药物释放速度和降解吸收周期, 使其在局部组织内缓慢释放药物, 从而维持局部长期有效药物浓度, 达到治疗血管疾病的目的。本实验选用 LA: GA 为 50: 50 的 PLGA 制备包裹 VEGF 纳米球, 直径约 500nm, 封装率为 87.4%, 载药量为 43.7 μ g/g。经比较用此组成比的 PLGA 制成的纳米球直径较小, 在 PBS 中分散后呈悬液, 可以轻松通过注射器针孔, 方便对缺血区域进行多点注射治疗。为了提高封装率, 笔者仅投入少量的 VEGF 细胞因子, 故出现载药量低的情况。PLGA 纳米粒中 VEGF 的体外药物释放在前 7h 内释放速度较快, 然后逐渐呈平缓持续释放, 24h 释放率即突释率 55.48%。突释率较高, 有待于进一步改进纳米球制备工艺, 使 VEGF 能长期稳定释放。

动物模型制作过程中, 糖尿病兔的制作是关键, 用静脉注射四氧嘧啶造模, 剂量大死亡率高, 剂量小又无法造成兔子的胰腺细胞损伤导致糖尿病, 所以摸索合适的注射剂量以及注射后 24h 内的护理是关键,

特别是注射后 5h 一定要给予葡萄糖液注射, 助兔子度过低血糖期, 降低死亡率。本实验选用耐受性较好的雌兔制作糖尿病模型^[12], 并根据孟建波等^[5]的实验结果, 连续 2 次小剂量给药法优于 1 次高剂量给药, 在首次注射造模不成功时, 追加注射, 结果证实有效, 11 只兔子有 5 只成模, 成功率 45.5%。实验结束时再次测血糖, 此时距首次注射时间为 6 周, 12 只成模的兔子, 仅 1 只血糖恢复到 <16mmol/L, 这个现象可能与自身胰岛细胞修复有关。朱昆等^[13]的研究也证实了该现象, 从 5~12 周开始, 造模成功的兔子会出现血糖下降的现象。所以在兔子造模成功后, 后续实验最好能在 1 个月内完成, 这样可以保证模型的稳定性。

肢体缺血后, 低氧和炎症是引起血管新生的主要刺激剂。本实验中移植 BMSCs 组、VEGF 组及 BMSCs + VEGF 组大体解剖可见均有毛细血管增生, 股动脉远端可见充盈, 血供良好, 尤其是 BMSCs + VEGF 组, 切片中可见肌肉组织中有小血管形成。证实 BMSCs + VEGF 注射治疗对下肢缺血性疾病具有促进血管生成的作用。血管新生的主要过程为内皮细胞和基膜之间的连接溶解, 内皮细胞的迁移、黏附和再连

接,最后形成新的毛细血管腔。糖尿病则可能对血管新生的各个环节产生影响导致侧支血管的建立不足。BMSCs 治疗下肢缺血性疾病的机制可能是利用干细胞特性来实现的^[14]:①转分化能力:在 VEGF 和(或)碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)存在条件下 BMSCs 能被诱导具有内皮特性,并表达内皮特有的标记,移植后促进血管生成,动脉生成,从而旁支动脉增粗最终显著提高下肢血流恢复;②旁分泌作用:通过分泌可溶性的细胞因子来支持和调节缺血坏死的微环境,以及调节其他的干细胞分化和募集炎症抑制细胞,进而缓解缺血症状;③免疫抑制效应:BMSCs 具有独特的免疫学特性允许他们在异种/异体环境中持续存在。

将骨髓间充质干细胞与细胞因子移植到糖尿病患者缺血的下肢肌肉内后,在缺血、缺氧环境下诱生成血管内皮细胞、表皮细胞等,逐渐分化形成新的毛细血管,达到促进血管再生,改善和恢复糖尿病下肢缺血患者的患肢血流^[15,16]。该方法有望成为治疗下肢缺血性疾病的一种有前景的新方法。

参考文献

- 1 Shi E, Jiang X, Wang L, *et al*. Intrathecal injection of hepatocyte growth factor gene - modified marrow stromal cells attenuates neurologic injury induced by transient spinal cord ischemia in rabbits[J]. *Anesthesiology*, 2010,113(5):1109 - 1117
- 2 Pesce M, Orlandi A, Iachininoto MG, *et al*. Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood - derived stem cells in ischemic limb tissues[J]. *Circ Res*, 2003,93(5):e51 - 62
- 3 张文元,杨亚冬,房国坚,等. 兔骨髓基质干细胞的分离生长及冻存技术研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005,15(6):651 - 653
- 4 宁勇,邹欣. 自制四氧嘧啶针剂制作家兔糖尿病模型观察[J]. *微*

- 循环学杂志, 2004,14(3):33 - 35
- 5 孟建波,康胜群,康素娟,等. 四氧嘧啶诱导兔 I 型糖尿病模型的实验研究[J]. *河北医药*, 2009,31(1):19 - 20
- 6 朱昆,潘洪涛,罗萍,等. 四氧嘧啶诱发糖尿病模型的胰岛素管理及糖尿病模型建立[J]. *吉林医学*, 2006,27(9):1010 - 1011
- 7 Smadja DM, d'Audigier C, Guerin CL, *et al*. Angiogenic potential of BM MSCs derived from patients with critical leg ischemia[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2012,47(7):997 - 1000
- 8 Menasché P. Cell therapy for peripheral arterial disease[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2010,12(5):538 - 545
- 9 Tateno K, Minamino T, Toko H, *et al*. Critical roles of muscle - secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization[J]. *Circ Res*, 2006,98(9):1194 - 1202
- 10 Golub JS, Kim YT, Duvall CL, *et al*. Sustained VEGF delivery via PLGA nanoparticles promotes vascular growth[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010,298(6):H1959 - 1965
- 11 Lalani J, Raichandani Y, Mathur R, *et al*. Comparative receptor based brain delivery of tramadol - loaded poly(lactic - co - glycolic acid) nanoparticles[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2012,8(6):918 - 927
- 12 王开富,李鸣真,叶望云,等. 四氧嘧啶剂量和家兔性别对制作糖尿病模型的影响[J]. *同济医科大学学报*, 1994,23(3):223 - 226
- 13 朱昆,潘洪涛,罗萍,等. 四氧嘧啶诱发糖尿病模型的胰岛素管理及糖尿病肾病模型建立[J]. *吉林医学*, 2006,27(9):1010 - 1011
- 14 Yan J, Tie G, Xu TY, *et al*. Mesenchymal stem cells as a treatment for peripheral arterial disease: current status and potential impact of type II diabetes on their therapeutic efficacy[J]. *Stem Cell Rev*, 2013,9:360 - 372
- 15 Hastings CL, Kelly HM, Murphy MJ, *et al*. Development of a thermoresponsive chitosan gel combined with human mesenchymal stem cells and desferrioxamine as a multimodal pro - angiogenic therapeutic for the treatment of critical limb ischaemia[J]. *J Control Release*, 2012,161(1):73 - 80
- 16 Piao W, Wang H, Inoue M, *et al*. Transplantation of Sendai viral angiopoietin - 1 - modified mesenchymal stem cells for ischemic limb disease[J]. *Angiogenesis*, 2010,13(3):203 - 210

(收稿日期:2014 - 11 - 28)

(修回日期:2014 - 12 - 05)

(上接第 8 页)

- 3 Irving J. CTO Pathophysiology: how does this affect management? [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2014, 10(2): 99 - 107
- 4 Hoebers LP, Claessen BE, Dangas GD, *et al*. Contemporary overview and clinical perspectives of chronic total occlusions [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2014, 11(8): 458 - 469
- 5 Fefer P, Robert N, Qiang B, *et al*. Characterisation of a novel porcine coronary artery CTO model [J]. *EuroIntervention*, 2012, 7(12): 1444 - 1452
- 6 Strauss BH, Segev A, Wright GA, *et al*. Microvessels in chronic total occlusions: pathways for successful guidewire crossing? [J]. *J Interv Cardiol*, 2005, 18(6): 425 - 436
- 7 Choi JH, Song YB, Hahn JY, *et al*. Three - dimensional quantitative volumetry of chronic total occlusion plaque using coronary multidetector computed tomography [J]. *Circ J*, 2011, 75(2): 366 - 375
- 8 Munce NR, Strauss BH, Qi X, *et al*. Intravascular and extravascular microvessel formation in chronic total occlusions a micro - CT imaging study [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2010, 3(8): 797 - 805
- 9 Carlino M, Latib A, Godino C, *et al*. CTO recanalization by intraocclusion injection of contrast: the microchannel technique [J]. *Catherter Cardiovasc Interv*, 2008, 71(1): 20 - 26

- 10 Zimarino M, D'andreamatteo M, Waksman R, *et al*. The dynamics of the coronary collateral circulation [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2014, 11(4): 191 - 197
- 11 Werner GS, Ferrari M, Heinke S, *et al*. Angiographic assessment of collateral connections in comparison with invasively determined collateral function in chronic coronary occlusions [J]. *Circulation*, 2003, 107(15): 1972 - 1977
- 12 Werner GS. The role of coronary collaterals in chronic total occlusions [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2014, 10(1): 57 - 64
- 13 Sianos G, Werner GS, Galassi AR, *et al*. Recanalisation of chronic total coronary occlusions: 2012 consensus document from the EuroCTO club [J]. *Euro Intervention*, 2012, 8(1): 139 - 145
- 14 李宇林. MRI 技术检测心肌梗死后心肌活性的研究进展 [J]. *西南军医*, 2011, 13(2): 320 - 322
- 15 Li M, Zhang J, Pan J, *et al*. Obstructive coronary artery disease: reverse attenuation gradient sign at CT indicates distal retrograde flow - a useful sign for differentiating chronic total occlusion from subtotal occlusion [J]. *Radiology*, 2013, 266(3): 766 - 772
- 16 王静. 存活心肌的影像学检测与评估 [J]. *中国医学影像学杂志*, 2011, 19(4): 263 - 266

(收稿日期:2014 - 10 - 21)

(修回日期:2014 - 11 - 24)