

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.17.011

Orexin-A 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 *

杨克¹ 李龙¹ 乔中原¹ 樊荣¹ 杨林^{2Δ}

(1 西安市第一医院麻醉科 陕西 西安 710002; 2 资阳市第一人民医院放射科 四川 资阳 641300)

摘要 目的:研究 orexin-A 对缺血再灌注大鼠脑损伤的保护作用。**方法:**取成年雄性大鼠 6 只,观察 MCAO 前和 MCAO 后 2 h、24 h 的生理学参数,界定后续指标参考时间。另取 20 只大鼠随机分为 MCAO 组、vehicle 组、orexin-A 50 μg/kg 组和 orexin-A 100 μg/kg 组(n=5),于缺血再灌注 24 h 后评估大鼠神经功能学评分和脑梗死容积。再取 60 只大鼠同样分成 4 组,(各组 n=15),每组在术前、术后 6 h、24 h(各时间点 n=5)取脑组织匀浆离心,检测上清液中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和丙二醛(MDA)的含量。**结果:**① 大鼠 MCAO 术前、术后 2 h、24 h 生理参数比较无统计学意义(P>0.05),提示脑保护参考指标在 MCAO 后 24 h 内不受影响。② 与 MCAO 组、vehicle 组相比,orexin-A 50 和 100 μg/kg 降低神经功能评分(P<0.05)且梗死容积缩小(P<0.05);术前、术后 6 h 和术后 24 h,脑匀浆中 GSH-PX 活性升高,MDA 含量降低(P<0.05)。**结论:**Orexin-A 可能通过降低脑内自由基水平,控制脂质过氧化物酶从而对脑缺血再灌注损伤起保护作用。

关键词:Orexin-A;脑缺血再灌注损伤;神经保护

中图分类号:R-33;R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)17-3246-04

Protective Effect of Orexin-A on the Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats*

YANG Ke¹, LI Long¹, QIAO Zhong-yuan¹, FAN Rong¹, YANG Lin^{2Δ}

(1 Department of Anesthesiology, the First Hospital of Xi'an, Xi'an, Shaanxi, 710002, China;

2 Department of Anesthesiology, the First Hospital of Ziyang, Ziyang, Sichuan, 641300, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the protective effect of orexin-A on the cerebral ischemia reperfusion injury in rats. **Methods:** The physiological parameters were observed to define time rang by six rats before MCAO and after MCAO 2 h, 24 h. Twenty rats were randomly divided into middle cerebral artery occlusion (MCAO) group, vehicle group, orexin-A 50 μg/kg and orexin-A 100 μg/kg group (n=5). Neurological dysfunction scores (NDS) and infarct volume were measured at 24h after ischemia-reperfusion. The other sixty rats were also divided into 4 groups (n=15 each group), the level of glutathione peroxidase (GSH-PX) and maleic diadehyde (MDA) in brain plasm were detected pre-operation and at 6 h, 24 h after ischemia-reperfusion (n=5 each time point). **Results:** ① No significant difference was found in the pyhsiological parameters of rats before MCAO and at 2 h, 24 h after MCAO (P>0.05), suggesting that the follow indexes of cerebral protection hadn't been influenced within 24 h after MCAO. ② Compared with the MCAO group and vehicle group, the NDS (P<0.05) and the percentage of brain infarct were better in the orexin-A 50 and 100 μg/kg group (P<0.05); the concentration of GSH-PX was increased and MDA was decreased in orexin-A 50 and 100 μg/kg group (P<0.05). **Conclusion:** Orexin-A might play a protective role in the cerebral ischemia reperfusion injury in rats by increasing the concentration of antiperoxidase and decreasing the level of oxygen free radicals.

Key words: Orexin-A; Cerebral ischemia reperfusion injury; Neuroprotection

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)17-3246-04

前言

食欲素(Orexin, hypocretin)是下丘脑产生的一种具有多种神经生理功能的神经肽,由前 orexin(hypocretin)原蛋白水解为 orexin-A (hypocretin-1, orexin-1) 和 orexin-B (hypocretin-2, orexin-2)两种亚型。研究表明 orexin-A 是参与各种神经生理功能如促进摄食^[1]、调节能量代谢^[2]、睡眠-觉醒^[3]、神经内分泌过程^[4]的

主要亚型,还参与了偏头痛和脑缺血的病理生理的过程。在脑缺血再灌注损伤过程中,神经细胞除了产生大量自由基、活性氧等物质最终导致线粒体 DNA 损伤,触发并诱导神经细胞凋亡外,同时会引起糖原代谢紊乱、睡眠节律改变以及心血管调节变化。中风患者多伴有睡眠、能量代谢、自主神经调节以及神经内分泌紊乱^[5]。由此可见,由中风所致的脑缺血再灌注损伤可能与 orexin 神经能体系损伤有关。因此,本研究采用大鼠大脑

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81401138)

作者简介:杨克(1981-),男,本科,主治医师,电话 15991385166, E-mail: 44240263@qq.com

Δ 通讯作者:杨林,女,本科,主治医师, E-mail: 44942332@qq.com

(收稿日期:2017-01-05 接受日期:2017-02-07)

中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型造成局灶性脑缺血再灌注损伤, 外源性给予不同剂量的 orexin-A, 旨在研究 orexin-A 对脑缺血再灌注损伤的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

成年雄性 SD 大鼠, 体重 230~250 g, 月龄 3~4 月, 由第四军医大学实验动物中心提供。神经行为评分和脑梗死容积大鼠共 20 只, 随机分为 4 组(每组 $n=5$)。MCAO 组、vehicle 组(缺血再灌注后腹腔注射 0.9%生理盐水)、orexin-A 50 $\mu\text{g/kg}$ 组和 orexin-A 100 $\mu\text{g/kg}$ 组(缺血再灌注后腹腔注射 orexin-A)。检测脑匀浆标志物的大鼠也分为 4 组, 每组 15 只, 按照手术前、手术后 6 h、24 h 三个时间点, 每个时间点 5 只大鼠。

1.2 实验药品与试剂

Orexin-A 由(无锡迈默拓普生物科技有限公司)提供, 溶剂对照组(vehicle 组)为生理盐水(0.9%生理盐水)。谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)和丙二醛(maleic dihydride, MDA)试剂盒(泛柯生物科技有限公司)。

1.3 MCAO 模型的建立

戊巴比妥(40~60 mg/kg)麻醉大鼠, 线栓法制作大鼠大脑右侧 MCAO 模型。剪开大鼠右侧颈部皮肤, 钝性分离颈总动脉且在分叉处用眼科剪剪一小切口。准备 3 号尼龙线, 一端用火烧成圆形, 从小切口放入颈总动脉, 有阻力出现时停止置入, 造成右侧大脑缺血。待 2 h 后, 抽出线栓, 此时右侧大脑血流恢复, 完成缺血再灌注模型。

1.4 生理参数和脑血流监测

另取 6 只大鼠, 采用体温探头持续监测大鼠体温, 间断抽取大鼠股动脉血进行血气分析, 确定大鼠在所需要的实验时间内生理参数是否发生改变。4 组实验组动物, 采用激光多普勒血流仪(PeriFlux system 5000; Perimed AB, 瑞典)对大鼠区域脑血流量进行监控, 将光纤探头固定放置在大鼠缺血再灌注同侧颅骨上(bregma 点后 1 mm, 侧方 5 mm), 观察再灌注后同侧脑血流量降低不到基础值 20%和再灌注后不能马上监测到脑血流量的大鼠在后续实验中淘汰。

1.5 神经行为学评分

大鼠缺血再灌注 24 h 后, 参照 Longa 评分法对 MCAO 组、vehicle 组、orexin-A 50 $\mu\text{g/kg}$ 组和 orexin-A 100 $\mu\text{g/kg}$ 组大鼠进行神经行为学评分(neurological dysfunction scores, NDS^[6])。根据大鼠体态对称性、自主运动能力、前肢伸展功能、身体双侧触觉等评定, 认为 0 级表示无功能障碍; 1 级不能伸展左侧前肢; 2 级为向左侧旋转; 3 级为向左侧倾斜; 4 级无自主活动伴意识

障碍; 5 级死亡。级别越高, 代表大鼠在脑缺血再灌注模型中损伤越大。

1.6 TTC 染色计算脑梗死容积

1%的 2,3,5- 氯化三苯四唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride TTC)溶液是常用的计算脑梗死容积的着色剂。在大鼠完成神经行为学评分后, 各组大鼠麻醉后断头取脑, 浸入冰生理盐水 10 min, 随后将大脑放入钢质脑槽, 切为 2 mm 左右的脑片, 用 TTC 着色 10 min 后 4%多聚甲醛后固定(约 24 h)。取出固定好的脑片, 标本按组排列拍照, 脑片中白色部分为梗死脑组织。用图形处理软件计算白色梗死脑组织占整个标本的百分比。

1.7 脑匀浆的制备

MCAO 组、vehicle 组、orexin-A 50 $\mu\text{g/kg}$ 组和 orexin-A 100 $\mu\text{g/kg}$ 组各组 ($n=15$) 大鼠按照缺血再灌注时间分为 3 个时间点: 手术前、术后 6 h、术后 24 h, 每个时间点 5 只大鼠。在相应的时间点大鼠立即断头取脑, 分离右侧大脑入匀浆器, 用 1:9 比例加入生理盐水研磨匀浆。随后将匀浆液放入离心机(4℃, 3000 r/min, 15 min) 离心, 取上清液检测 GSH-PX 和 MDA 含量, 实验步骤按照公司提供的试剂盒说明书操作。

1.8 统计学分析

所有资料采用统计软件 SPSS13.0 进行分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两组间比较采用 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MCAO 大鼠生理学参数和区域脑血流的变化

MCAO 前, 6 只大鼠基础体温 $37.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$, 动脉血气分析 PaO_2 为 89.4 ± 6.3 mmHg, PaCO_2 为 38.1 ± 3.1 mmHg, pH 值 7.36 ± 0.01 ; MCAO 2 h 后, 大鼠体温 $37.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 动脉血气分析 PaO_2 为 88.9 ± 6.6 mmHg, PaCO_2 为 39.2 ± 4.2 mmHg, pH 值 7.39 ± 0.02 ; MCAO 24 h 后, 大鼠体温 $37.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 动脉血气分析 PaO_2 为 88.7 ± 5.5 mmHg, PaCO_2 为 39.2 ± 3.8 mmHg, pH 值 7.38 ± 0.02 。大鼠在三个时间点的基础生理参数值比较差异均无统计学意义($P > 0.05$), 提示至少在 MCAO 发生 24 h 内, 大鼠神经行为学评分、脑梗死容积和脑内血浆标志物的检测在正常生理功能下进行。区域脑血流监测显示: 4 组实验组大鼠在 MCAO 后均达到入组标准。

2.2 orexin 对大鼠神经行为学评分的影响

与 MCAO 组、vehicle 组相比, 脑缺血再灌注 2 h 后, 腹腔给予 orexin-A 50 或 100 $\mu\text{g/kg}$, 可明显降低 MCAO 后 24 h 脑缺血再灌注引起的神经功能评分, 降低评估等级, 且 4 组比较差异具有统计学意义(* $P < 0.05$, 如表 1)。

表 1 各组大鼠脑缺血再灌注损伤 24h 后 NDS 评分($n=5$)

Table 1 Neurological dysfunction scores at 48h after ischemia reperfusion injury in each group

Groups	NDS Score (number)						Average Score
	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5	
MCAO group	0	0	0	2	2	1	3.8 ± 0.8
Vehicle group	0	0	0	2	3	0	3.6 ± 0.5
Orexin-A 50 $\mu\text{g/kg}$ group	1	1	2	1	0	0	$1.6 \pm 1.1^*$
Orexin-A 100 $\mu\text{g/kg}$ group	1	1	3	0	0	0	$1.4 \pm 0.9^*$

注: * $P < 0.05$ vs MCAO and vehicle group.

2.3 orexin 对大鼠脑梗死容积的影响

脑缺血再灌注后 24 h, MCAO 组脑梗死容积百分比为 $50\% \pm 4.6\%$, vehicle 组脑梗死容积百分比为 $49\% \pm 4\%$, 脑缺血再灌注后腹腔给予 orexin-A 50 或 100 $\mu\text{g/kg}$ 的大鼠脑梗死容积百分比分别为 $38\% \pm 1.7\%$ 、 $33\% \pm 1.7\%$, 与 MCAO 和 vehicle 组相比显著下降, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。这些结果提示 Orexin-A 对大鼠脑缺血再灌注损伤 24 h 后的发生脑梗死具有保护作用。

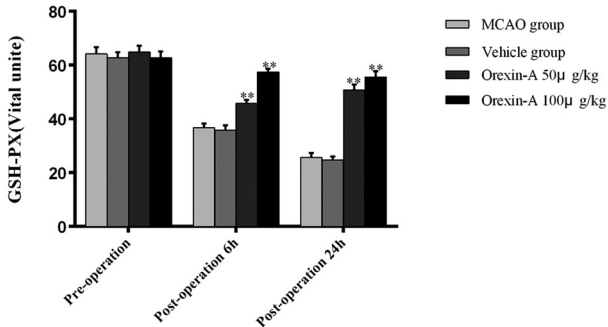


图 1 GSH-PX 在脑组织匀浆中的活力 (** $P < 0.01$, vs MCAO 组和 vehicle 组)

Fig.1 The activity of GSH-PX in brain plasma (** $P < 0.01$, vs MCAO and vehicle group)

3 讨论

Orexin 是一种新型神经肽, orexin 神经元纤维可投射于整个中枢神经系统, 其两个亚型 orexin-A 和 orexin-B 通过 orexin-1 和 orexin-2 两个受体完成其生物学作用。这两种受体均为 G 蛋白偶联受体, 神经信号传至特异的神经元, 通过激活 G 蛋白引起细胞内信号通路激活从而发挥神经调节功能。由于 orexin-A 同时作用于 orexin-1 和 -2 两种受体, 而 orexin-B 只作用于 orexin-2 一种受体, 所以一般认为 orexin-A 是发挥主要生物学效应的亚型。研究表明, orexin 等睡眠通路可能参与中风患者的神经保护过程^[7,8]。而中风病人急性脑缺血, 可导致血浆和脑脊液中 orexin-A 含量显著下降, 并且观察到 orexin 在脑损伤的发展中也发挥作用^[9]。在动物实验中, 全脑或局灶性脑缺血均能引起脑脊液 orexin-A 含量降低, 而缺血侧下丘脑 orexin-A 细胞表达高于非缺血侧, 同时伴有 orexin 受体 -1 表达增高^[10,11]。基于以上研究结果, orexin-A 可能在脑缺血再灌注损伤后发挥重要的神经保护作用。由于 orexin-A 可以通过自由扩散通过血脑屏障, 因此本实验腹腔给予全身剂量的 orexin-A 完全可以到达脑组织, 观察其对脑缺血再灌注损伤病灶的保护作用。

本实验结果显示: orexin-A 50 和 100 $\mu\text{g/kg}$ 腹腔注射后, 脑梗死容积百分比与 MCAO 和 vehicle 组相比显著下降, Kitamura E 等人的研究也显示脑室注射 0.3 nmoL 的 orexin-A 可使总体的脑梗死容积显著下降, 但对纹状体为中心的核心梗死区的容积无明显改变, 这意味着 orexin-A 的神经保护作用可能只在缺血再灌注损伤的周围区域(半影区)发挥作用; 同时, 脑室注射内微注射 orexin-A 可增加脑血流, 这可能是 orexin-A 降低脑梗死容积的一个个重要原因^[11]。Hirota 等人的研究显示脑室注射 orexin-A 可以增加大鼠血压、心率和血浆中儿茶酚胺的含量^[12]; 另一研究也显示 orexin-A 可通过激活交感神经帮助失血性

2.4 orexin 对大鼠脑组织 GSH-PX 活性和 MDA 含量的比较

与 MCAO 组和 vehicle 组相比, 术前、术后 6 h 和术后 24 h, 脑匀浆中 GSH-PX 活性降低, MDA 含量增高。在 orexin-A 50 和 100 $\mu\text{g/kg}$ 组, 虽然 GSH-PX 活性与术前相比有所下降, 但其在术后 6 h 和术后 24 h, 其 GSH-PX 均比 MCAO 组和 vehicle 组升高 (** $P < 0.01$, 如图 2); 而 MDA 含量在术后 6 h 和术后 24 h 均比 MCAO 组和 vehicle 组降低 (** $P < 0.01$, 如图 1)。

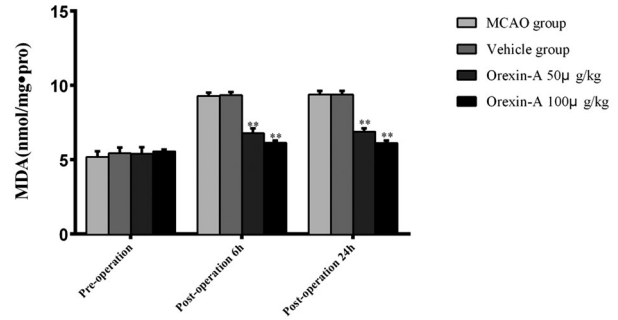


图 2 MDA 在脑组织匀浆中的含量 (** $P < 0.01$, vs MCAO 组和 vehicle 组)

Fig.2 The concentration of MDA in brain plasma (** $P < 0.01$, vs MCAO and vehicle group)

休克的大鼠复苏^[13]。而在心脏骤停大鼠全身缺血再灌注模型中, 大鼠心跳骤停 5 min 后, 24 h 脑脊液中 orexin-A 含量和 orexin-1 受体均有短暂升高, orexin-A 的神经保护作用可能还与抗氧化应激有关^[14]。

由于 orexin 前体位于 17 号染色体, 而 17 号染色体上的基因大多与神经退行性病变有关^[15], 因此, orexin 神经能系统可能参与神经再生和大脑完整性。近来很多研究开始关注 orexin 与老年性痴呆 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森 (Parkinson's disease, PD) 等疾病之间的关系, 如 orexin 受体介导的 AD 的神经保护作用, 通过另一种神经肽受体 GPR10 发挥作用^[16]; 而 orexin-A 对 PD 的神经保护作用可能通过低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α), 这种参与缺血和低氧的转录因子发挥作用^[17]。另一些相似研究指出 orexin-A 对缺血再灌注损伤引起的神经保护作用可直接或通过增加 HIF-1 α 表达发挥作用^[18,19]。本研究与之均关注了在缺血再灌注后保护性因子的变化, 如 GSH-PX 是脑缺血再灌注损伤后具有保护作用的酶, 其主要分解 H_2O_2 , 并能使脂质过氧化物还原为 H_2O 和无害的羟基化合物^[20], orexin-A 50 和 100 $\mu\text{g/kg}$ 腹腔注射后, 均可在术后 6 h 起增加 GSH-PX 活性, 使其检测水平增高。与之不同的是, 本实验还检测了与损伤相关的有害因子 MDA, 一种反应氧自由基引起的脂质过氧化程度, 可间接反应氧自由基含量的因子的变化^[21], 实验结果显示 orexin-A 可并降低 MDA 含量, 且作用效果至少持续到 24 h。相对而言, 本实验更加全面的反映了 orexin-A 可通过抗氧化、清除自由基起到神经保护作用。那么, 继续加大 orexin-A 的腹腔给药剂量, 神经保护作用是否更加明显, 或者神经保护的作用时间会延长, orexin-A 的神经保护作用是否还可能通过其它作用机制实现? 这些都需要进一步研究证明。

综上所述, orexin-A 对脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 可能与其降低脑内自由基水平, 控制脂质过氧化物酶有关。本实验从抗氧化应激方面为 orexin-A 的神经保护作用提供了新的证据, 为脑缺血再灌注损伤的治疗提供了新思路。

参考文献(References)

- [1] Shimizu S, Nakamachi T, Konno N, et al. Orexin A enhances food intake in bullfrog larvae[J]. *Peptides*, 2014, 59: 79-82
- [2] Tsuneki H, Sasaoka T. Hypothalamic orexin system regulates energy and glucose metabolism [J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2013, 142(6): 316-317
- [3] Kantor S, Mochizuki T, Lops S N, et al. Orexin gene therapy restores the timing and maintenance of wakefulness in narcoleptic mice[J]. *Sleep*, 2013, 36(8): 1129-1138
- [4] Inutsuka A, Yamanaka A. The physiological role of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness and neuroendocrine functions[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4: 18
- [5] Lim A S, Yu L, Schneider J A, et al. Sleep Fragmentation, Cerebral Arteriosclerosis, and Brain Infarct Pathology in Community-Dwelling Older People[J]. *Stroke*, 2016, 47(2): 516-518
- [6] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91
- [7] Pace M, Baracchi F, Gao B, et al. Identification of Sleep-Modulated Pathways Involved in Neuroprotection from Stroke [J]. *Sleep*, 2015, 38(11): 1707-1718
- [8] Song J, Kim E, Kim C H, et al. The role of orexin in post-stroke inflammation, cognitive decline, and depression[J]. *Mol Brain*, 2015, 8 (10): 1186-1202
- [9] Kotan D, Deniz O, Aygul R, et al. Acute cerebral ischaemia: relationship between serum and cerebrospinal fluid orexin-A concentration and infarct volume[J]. *J Int Med Res*, 2013, 41(2): 404-409
- [10] Xiong X, White R E, Xu L, et al. Mitigation of murine focal cerebral ischemia by the hypocretin/orexin system is associated with reduced inflammation[J]. *Stroke*, 2013, 44(3): 764-770
- [11] Kitamura E, Hamada J, Kanazawa N, et al. The effect of orexin-A on the pathological mechanism in the rat focal cerebral ischemia[J]. *Neurosci Res*, 2010, 68(2): 154-157
- [12] Hirota K, Kushikata T, Kudo M, et al. Effects of central hypocretin-1 administration on hemodynamic responses in young-adult and middle-aged rats[J]. *Brain Res*, 2003, 9(81): 143-150
- [13] Lo Martire V, Silvani A, Bastianini S, et al. Effects of ambient temperature on sleep and cardiovascular regulation in mice: the role of hypocretin/orexin neurons[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): 470-472
- [14] Dohi K, Nishino S, Nakamachi, T, et al. CSF orexin A concentrations and expressions of the orexin-1 receptor in rat hippocampus after cardiac arrest[J]. *Neuropeptides*, 2006, 40(13): 245-250
- [15] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior[J]. *Cell*, 1998, 1(92): 573-585
- [16] Davies J, Chen J, Pink R, et al. Orexin receptors exert a neuroprotective effect in Alzheimer's disease (AD) via heterodimerization with GPR103[J]. *Sci Rep*, 2015, 30(5): 12584
- [17] Feng Y, Liu T, Li XQ, et al. Neuroprotection by Orexin-A via HIF-1 α induction in a cellular model of Parkinson's disease[J]. *Neurosci Lett*, 2014, 10(579): 35-40
- [18] Li LY, Hai LD, Hao PZ, et al. Neuroprotective Effect of Orexin-A Is Mediated by an Increase of Hypoxia-inducible Factor-1 Activity in Rat[J]. *Anesthesiology*, 2011, 2(114): 340-354
- [19] Harada S, Tokuyama S. Involvement of communication system between brain and peripheral tissues on the development of post-ischemic glucose intolerance induced by cerebral neuronal damage[J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 2016, 148(1): 34-38
- [20] Goc Z, Szaroma W, Kapusta E, et al. Protective effects of melatonin on the activity of SOD, CAT, GSH-Px and GSH content in organs of mice after administration of SNP[J]. *Chin J Physiol*, 2017, 60(1): 435
- [21] Hao L, Xie Y, Wu G, et al. Protective Effect of Hericium erinaceus on Alcohol Induced Hepatotoxicity in Mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 10(4): 1155-1159

(上接第 3233 页)

- [18] 徐杰, 左金华. 碱性成纤维细胞生长因子促进血管再生的研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2008, 24(24): 4317-4318
Xu Jie, Zuo Jin-hua. Research advance on basic fibroblast growth factor in promoting angiogenesis [J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2008, 24(24): 4317-4318
- [19] 史笑笑, 王宁夫. 肝细胞生长因子对冠心病治疗作用的研究[J]. *心血管病学进展*, 2008, 29(5): 700-703
Shi Xiao-xiao, Wang Ning-fu. Therapeutic effect of hepatocyte growth factor on coronary heart disease[J]. *Advances in Cardiovascular Diseases*, 2008, 29(5): 700-703
- [20] 杨夏茵, 徐应军, 张桂东. 冠心病基因治疗研究进展 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2012, 4(1): 73-74
Yang Xia-yin, Xu Ying-jun, Zhang Gui-dong. Research advance on gene therapy for coronary heart disease [J]. *Chinese Journal of Evidence-based Cardiovascular Medicine*, 2012, 4(1): 73-74
- [21] 魏仙, 姚于勤, 杨金亮. 新生血管生成模型及应用 [J]. *生物技术通讯*, 2015, 26(3): 421-425
Wei Xian, Yao Yu-qin, Yang Jin-liang. Angiogenesis models and the applications[J]. *Letters in Biotechnology*, 2015, 26(3): 421-425