

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.23.003

## 经穴注射 BMSCs 联合中药对大鼠血清 VEGF、G-CSF、SDF-1 浓度的影响 \*

黄 凤<sup>1,2</sup> 段行武<sup>1</sup> 董建勋<sup>2</sup> 李 健<sup>4</sup> 赵明镜<sup>1</sup> 荣培晶<sup>3△</sup> 徐旭英<sup>2△</sup>

(1 北京中医药大学东直门医院 北京 100029; 2 首都医科大学附属北京中医医院 北京 100010;

3 中国中医科学院针灸研究所 北京 100700; 4 北京中医药大学基础医学院 北京 100029)

**摘要 目的:** 前期基础实验发现经穴注射骨髓间充质干细胞联合益气活血中药对大鼠缺血后肢骨骼肌血管密度以及后肢血流恢复具有明显促进作用,为进一步明确其机制,本研究着重经穴注射骨髓间充质干细胞(BMSCs)联合益气活血方对大鼠血清中血管内皮细胞生长因子(VEGF),粒细胞集落刺激因子(G-CSF),基质细胞衍生因子-1(SDF-1)浓度的影响,从而为临床中医血管外科防治后肢动脉缺血性疾病提供新的思路和方法。**方法:** 25 只大鼠随机分为空白对照组(CG)、下肢缺血模型组(IG)、益气活血方缺血组(HG)、经穴注射 BMSCs 缺血组(BG),经穴注射 BMSCs+ 益气活血方缺血组(BHG),每组 5 只,在给予相应干预措施后,于 7 天后取血清,用酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠血清中 VEGF、G-CSF、SDF-1 质量浓度。**结果:** ①与 CG 比较,IG、HG、BG、BHG 大鼠血清中 VEGF、SDF-1、G-CSF 浓度显著升高( $P < 0.01$ );②与 IG 比较,HG、BG、BHG 组大鼠血清中 VEGF、G-CSF 浓度显著升高( $P < 0.01$ ),BG、BHG 大鼠血清中 SDF-1 浓度显著升高( $P < 0.01$ );③与 HG 比较,BG、BHG 大鼠血清中 VEGF、SDF-1、G-CSF 浓度显著升高( $P < 0.01$ );④与 BG 比较,BHG 大鼠血清中 VEGF、SDF-1、G-CSF 浓度显著升高( $P < 0.01$ ),以上差异均有统计学意义。**结论:** 经穴注射 BMSCs 联合益气活血中药可大幅提升下肢缺血模型大鼠血清中 VEGF、G-CSF、SDF-1 质量浓度,为临床中医血管外科防治后肢动脉缺血性疾病提供了新的思路和方法。

**关键词:** 血管内皮细胞生长因子;粒细胞集落刺激因子;基质细胞衍生因子-1

**中图分类号:** R392.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)23-4409-04

## Effect of Concentration on VEGF, G-CSF, SDF-1 Stimulated by Acupoint Injection BMSCs Combined Chinese Herb in Rat Serum\*

HUANG Feng<sup>1,2</sup>, DUAN Xing-wu<sup>1</sup>, DONG Jian-xun<sup>2</sup>, LI Jian<sup>4</sup>, ZHAO Ming-jing<sup>1</sup>, RONG Pei-jing<sup>3△</sup>, XU Xu-ying<sup>2△</sup>

(1 Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China; 2 Beijing Hospital of T.C.M Affiliated to Capital University of Medicine Sciences, Beijing, 100010, China; 3 Institute of Acu-Mox, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700, China; 4 Basic Medical School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China)

**ABSTRACT Objective:** It was found in our early basic experiment that acupoint injection of bone marrow mesenchymal stem cells combined Qi-tonifying and Blood-activating Chinese herb have obvious effect of promoting the vascular density and restoring the blood flow to skeletal muscle of SD rat with hind limbs ischemic. In order to clarify the further mechanism, this study was designed to investigate the concentration of vascular endothelial cell growth factor (VEGF), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), stromal cell derived factor 1 (SDF-1) stimulated by acupoint injection of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation combined Chinese Herb in rat serum, so as to provide new methods for prevention and cure arterial ischemic disease in vascular surgery of traditional Chinese medicine. **Methods:** 25 rats were randomly divided into control group (CG), lower limb ischemia model group(IG), Herb group(HG), Acupoint injection of BMSCs ischemia group(BG), Acupoint injection of BMSCs +Herb ischemia group(BHG), and given 7 days corresponding intervention measures. Then we measured the concentration of VEGF, G-CSF, SDF-1 in rat serum by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Results:** ① Compared with CG, concentration of VEGF, G-CSF, and SDF-1 increased significantly ( $P < 0.01$ ) in IG, HG, BG, BHG; ② Compared with IG, concentration of VEGF and G-CSF increased significantly ( $P < 0.01$ ) in HG, BG, BHG, while SDF-1 increased ( $P < 0.01$ ) in BG, BHG; ③ Compared with HG, concentration of VEGF, G-CSF, and SDF-1 increased significantly ( $P < 0.01$ ) in BG, BHG; ④ Compared with BG, concentration of VEGF, G-CSF, and SDF-1 increased significantly ( $P < 0.01$ ) in BHG. The above all differences were statistically significant. **Conclusion:** Acupoint injection of BMSCs combined Qi-tonifying and Blood-activating Chinese herb can be sharply raised the concentration of VEGF, G-CSF and SDF-1 in the lower limb ischemia rat model, which provide new methods for prevention and cure arterial ischemic disease in vascular surgery of

\* 基金项目: 北京市自然科学基金面上项目(7122084);北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划(2013-3-080);

北京市科委首都临床特色应用研究(Z131107002213117);北京市中医药科技年度规划项目(WZF2012-02)

作者简介:黄凤,博士研究生,主要研究方向:中医药治疗周围血管疾病临床与基础研究,

电话:13436992951, E-mail: hf2061043@163.com

△通讯作者:徐旭英,电话:+86-10-52176642;荣培晶,电话:+86-10-64014411-2718, E-mail: drongpj@163.com

(收稿日期:2014-03-14 接受日期:2014-04-11)

traditional Chinese medicine.

**Key words:** VEGF; G-CSF; SDF-1

**Chinese Library Classification (CLC):** R392.7 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2014)23-4409-04

## 前言

1996 年以来,大量通过动脉、静脉、肌肉注射血管生成因子或基因促进血管新生的临床实验治疗周围血管疾病并没有取得与动物实验一样的良好结果。效果欠佳的原因可能是临床周围动脉疾病患者因受体信号或拮抗表达改变而改变了相关配体的浓度,甚至因血管生成因子缺乏所致<sup>[1,2]</sup>;另外,可能是因为局部缺血组织促血管新生的药代动力学较差所致<sup>[3]</sup>。因此,寻找一种能更促进血管生成因子分泌,提高血管生成因子浓度的方法对于解决基因疗法治疗各类缺血性疾病有重要的临床意义。本研究所选方药是基于前期临床用药经验,临床诊疗过程中发现益气活血中药对下肢缺血患者血流灌注量有一定的影响,为了明确其作用机制,本研究在临床选方用药原则基础之上,应用经穴注射骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)联合益气活血中药应用于下肢缺血模型大鼠,观察大鼠血清中 VEGF、G-CSF、SDF-1 的质量浓度,以探讨经穴注射 BMSCs 联合益气活血中药对下肢缺血性疾病的作用机制,为临床应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

大鼠 VEGF、SDF-1、G-CSF 酶连免疫吸附(ELISA)试剂盒均购自上海联硕生物科技有限公司;标准酶标仪型号为美国 Synergy™4;精密移液器为德国生产 Eppendorf 牌;去离子水生成器为美国 Millipore 制造;37℃ 孵育箱为上海福玛实验设备厂生产。

### 1.2 实验动物与分组

25 只体重 240-280 g 雄性 SD 大鼠,实验用动物均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,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》。

25 只大鼠随机分为 5 组,即:

正常假手术组:(Control Group, CG, 5 只)

缺血模型组:(Ischemia Group, IG, 5 只)

益气活血中药+缺血模型组(Herb Group, HG, 5 只)

经穴注射 BMSCs+缺血模型组(BMSCs Group, BG, 5 只)

经穴注射 BMSCs+益气活血中药+缺血模型组(BMSCs+Herb Group, BHG, 5 只)。

### 1.3 方法

**1.3.1 造模方法** 25 只雄性 SD 大鼠,经普食普水适应喂养 1 周后,随机分为 5 组,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。

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,大鼠左侧后肢缺血模型。

**1.3.2 实验用药** 益气活血方:生黄芪 120 克、党参 120 克、炙甘草 48 克、当归 120 克、鸡血藤 120 克、川牛膝 48 克等。(饮片由首都医科大学附属北京中医医院中药房提供,符合 1995 年版《中华人民共和国药典》相关规定,并由北京中医医院制剂室煎制)。

以上复方以大火煎开,文火水煎 2 次过滤去渣,合并水煎液后在中药液体包装机中浓缩成含生药 1.5 kg/L 溶液作为灌胃剂量(相当于病人临床正常用药剂量的 18 倍)。4℃ 冰箱保存备用。

**1.3.3 采集大鼠血清** 正常对照组、缺血组、经穴注射 BMSCs 组大鼠每天上午行蒸馏水灌胃,剂量为 10 ml/Kg,益气活血中药灌胃大鼠每天上午行浓度为 1.5 g/ml 益气活血中药灌胃,药物剂量为 10 ml/Kg,经穴注射 BMSCs 组大鼠每只共注射 100  $\mu$ L  $1 \times 10^6$  个细胞,5 组大鼠连续灌胃 7 天,取穴如下。

注射穴位如下<sup>[4]</sup>:足太阴脾经三阴交:后肢内踝尖直上 10 mm 处;足少阴经照海: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。

7 天后,从各组大鼠腹主动脉取动脉血 8-10 mL,室温静置 0.5-1 小时,待血液自然凝固 10-20 min 后,2000-3000× g 离心,仔细收集血清,避免收集到沉淀,如保存过程中有沉淀形成,应再次离心,置于 -70℃ 保存。

**1.3.4 大鼠含药血清中 VEGF 的检测**(按试剂盒使用说明书进行) 本实验采用的是生物素双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测定样品中大鼠血管内皮生长因子(VEGF、G-CSF、SDF-1)质量浓度,具体步骤如下:

(1)稀释标准品:设第 1 孔为空白孔,加 100  $\mu$ L 蒸馏水;标准孔 5 孔,每一浓度设 2 个复孔,每孔中各加入样品稀释液 100  $\mu$ L,第一孔加标准品 100  $\mu$ L,混匀后用加样器吸出 100  $\mu$ L,移至第二孔。如此反复作对倍稀释至第 5 孔,最后,从第 5 孔中吸出 100  $\mu$ L 弃去,使之体积均为 100  $\mu$ L。

(2)加样:

空白孔:只加显色剂 A&B 和终止液,其他操作步骤相同;  
样品孔:每组大鼠随机抽三只大鼠血清做检测,每个样品做 3 个复孔,每孔各加入待测样品 40  $\mu$ L,然后各孔加入抗 VEGF 抗体 10  $\mu$ L,链霉亲和素-HRP 50  $\mu$ L,密封板条,37℃ 保温箱培育 120 min;

(3)配洗涤液:将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用。

(4)洗涤:小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 秒后弃去,如此重复洗板 5 次,用滤纸印干;

(5)显色:每孔先加入显色剂 A 50  $\mu$ L,再加入显色剂 B 50

μL,轻轻震荡混匀,置 37℃ 培育 15 min;

(6)终止:每孔各加终止液 50 μL,终止反应(此时蓝色立即转为黄色);

(7)测定:以空白孔调零,492 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值),测定应在加终止液后 10 min 内进行;(8)根据标准品的浓度及对应的 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程,再根据样品的 OD 值在回归方程上计算出 VEGF、G-CSF、SDF-1 的质量浓度。

#### 1.4 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数±标准误( $\bar{X} \pm S$ )表示,用 SPSS19.0 软件处理数据,组间均数比较用 One-way ANOVA 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ ,  $p<0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠血清中 VEGF、SDF-1、G-CSF 浓度的检测

表 1 大鼠血清中 VEGF、SDF-1、G-CSF 的浓度(ng/L;  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Concentration of VEGF, SDF-1, G-CSF in rat serum (ng/L;  $\bar{x} \pm s$ )

| Group            | VEGF                         | SDF-1                        | G-CSF                        |
|------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Control Group    | 154.92± 3.84                 | 206.48± 5.83                 | 168.02± 5.45                 |
| Ischemia Group   | 183.69± 6.01 <sup>a</sup>    | 255.27± 5.07 <sup>a</sup>    | 195.52± 5.06 <sup>a</sup>    |
| Herb Group       | 214.77± 2.4 <sup>3b</sup>    | 269.21± 5.51 <sup>a</sup>    | 219.01± 2.52 <sup>ab</sup>   |
| BMSCs Group      | 235.11± 4.26 <sup>abc</sup>  | 296.20± 4.73 <sup>abc</sup>  | 241.71± 3.99 <sup>abc</sup>  |
| BMSCs+Herb Group | 286.03± 2.49 <sup>abcd</sup> | 388.14± 4.08 <sup>abcd</sup> | 299.29± 3.53 <sup>abcd</sup> |

注:经 ANOVA 检验:与正常组比,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与缺血组比,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与中药缺血组比,<sup>c</sup> $P<0.01$ ;与 BMSCs 缺血组比,<sup>d</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, <sup>a</sup> $P<0.01$ ; Compared with ischemia group, <sup>b</sup> $P<0.01$ ; Compared with herb group, <sup>c</sup> $P<0.01$ ;

Compared with BMSCs group, <sup>d</sup> $P<0.01$ .

## 3 讨论

生长因子 VEGF 是由 BMSCs 分泌的,除促进血管生成外,也可通过旁分泌作用直接作用于肌细胞,防止其凋亡<sup>[56]</sup>,是目前发现的最重要的血管生长因子之一。有研究发现,经穴注射 BMSCs 后,能产生更多的 VEGF 等生长因子<sup>[7]</sup>。G-CSF 是 BMSCs 动员剂,可通过旁分泌作用促进缺血组织血管新生<sup>[8]</sup>。Kuethe<sup>[9]</sup>、华平<sup>[10]</sup>等人通过基础与临床实验发现,G-CSF 确实能促进患者血管新生,可增加毛细血管数量与血液灌注量。内皮祖细胞修复血管时,SDF-1 是介导内皮祖细胞黏附的主要调控因子<sup>[11]</sup>。目前已证实其作用机制与血管内皮生长因子相似,均会聚于磷脂酰肌醇-3-激酶(P13K)/蛋白激酶 B(Akt)(PI3K/Akt)通路<sup>[12,13]</sup>。SDF-1 $\alpha$  结合于细胞表面的 CXCR4,活化 PI3K 并进一步激活 Akt,受活化的 Akt 通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白 Bad、Caspase-9、NF- $\kappa$ B、GSK-3、FKHR、p21Cip1 和 p27 Kip1 等,进而调节细胞的增殖、分化、凋亡以及迁移。G-CSF、VEGF、SDF-1<sup>[14]</sup>等已证实有促进骨髓干细胞迁移的作用。SDF-1 是骨髓基质细胞产生的 CXCR 类趋化蛋白,是已知唯一能与受体 CXCR4 结合<sup>[15]</sup>、并能激活它的天然趋化因子。随着研究的深入 SDF-1/CXCR4 轴已成为探索干细胞迁移及归巢行为的重要环节<sup>[16]</sup>。

灌胃 7 天后,用酶连免疫吸附(ELISA)法比较各组大鼠血清中 VEGF、SDF-1、G-CSF 因子的质量浓度,比较结果如下:

与对照组比较,缺血组、中药缺血组、BMSCs 缺血组、BMSCs+ 中药缺血组大鼠血清中 VEGF、SDF-1、G-CSF 浓度显著升高( $P<0.01$ );

与缺血组比较,中药缺血组、BMSCs 缺血组、BMSCs+ 中药缺血组大鼠血清中 VEGF、G-CSF 浓度显著升高( $P<0.01$ );与缺血组比较,BMSCs 缺血组、BMSCs+ 中药缺血组大鼠血清中 SDF-1 浓度显著升高( $P<0.01$ );

与中药缺血组比较,BMSCs 缺血组、BMSCs+ 中药缺血组大鼠血清中 VEGF、SDF-1、G-CSF 浓度显著升高( $P<0.01$ );

与 BMSCs 缺血组比较,BMSCs+ 中药缺血组大鼠血清中 VEGF、SDF-1、G-CSF 浓度显著升高( $P<0.01$ ),以上差异均有统计学意义,(见表 1)。

根据中医基础理论,气与血的关系还可以概括为"气为血之帅","血为气之母"。"气为血之帅"体现在气能生血、行血、摄血三个方面;《血证论·阴阳水火血气论》说:"守气者,即是血",气所以能行血,因血能载气。气与血既相互对立又相互依存,共同维持人体生理活动。导师董建勋教授认为骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BMNC)来源于骨髓血,属于人体"阴中之阳",具有生发、温煦、推动等作用。前期实验发现,经穴注射 BMSCs 可促进大鼠后肢血流灌注恢复速度<sup>[7]</sup>,另外,有学者发现,辨证循经注射 BMNC,可以更好地发挥促进血管再生,提高 BMSCs 存活率<sup>[8]</sup>,以濡养经脉,从而起到使缺血肢体气血调和、脉络通畅的作用。

以上研究理论说明,VEGF、G-CSF、SDF-1 除可促进血管新生外,在血管形成过程中,G-CSF 还起到 BMSCs 动员剂作用,SDF-1 促进 BMSCs 迁移、分化、凋亡的作用。在给予不同干预措施后,VEGF、G-CSF、SDF-1 等因子分泌呈不同程度的增加,众多研究表明,与健康人群相比,动脉缺血患者血浆中 VEGF 浓度大幅升高<sup>[19,20]</sup>。这点与本实验结果一致,与对照组比较,缺血模型组大鼠血清中 VEGF、SDF-1、G-CSF 因子的质量浓度明显升高,说明缺血、缺氧环境可能会刺激内皮细胞分泌 VEGF、SDF-1、G-CSF 等因子的分泌。在通过经穴注射 BMSCs 联合益气活血中药条件作用下,后肢缺血大鼠血清中这些因子

分泌影响最多,说明 BMSCs 亦可动员此类生长因子分泌,而益气活血中药则可刺激生长因子分泌增多,提示经穴注射 BMSCs 联合益气活血中药可促进 VEGF、G-CSF、SDF-1 的分泌,从而推测其可促进后肢血管的形成,这一结果尚需进一步实验来验证。

综上所述,辨证循经注射骨髓间充质干细胞联合益气活血中药具有显著促进细胞生长因子分泌的特点,对临床应用辨证循经注射干细胞发挥治疗性血管生成的作用具有指导意义,但具体疗效尚待进一步研究。

#### 参考文献(References)

- [1] Collinson DJ, Donnelly R. Therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease: can biotechnology produce an effective collateral circulation?[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2004, 28(1): 9-23
- [2] Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, et al. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(10): 1015-1026
- [3] Moulton KS. Plaque angiogenesis and atherosclerosis[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2001, 3(1): 225-233
- [4] 李辞荣, 华兴邦, 周浩良, 等. 豚鼠针灸穴位图谱的研制[J]. *上海针灸杂志*, 1992, (2): 28-30  
Li Ci-rong, Hua Xing-bang, Zhou Hao-liang, et al. Development of guinea pig acupoint map [J]. *Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion*, 1992, (2): 28-30
- [5] Kinnard T, Stabile E, Burnett MS, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral Perfusion through paracrine mechanisms[J]. *Circulation*, 2004, 109(12): 1543-1549
- [6] Kinnard T, stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms [J]. *Circ Res*, 2004, 94(5): 678-685
- [7] 董建勋, 朱朝军, 路广林, 等. 经穴注射骨髓间充质干细胞对缺血大鼠促血管生长相关因子的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(8): 728-730  
Dong Jian-xun, Zhu Chao-jun, Lu Guang-lin, et al. Effect of acupoint injection with bone marrow mesenchymal stem cells on the factors of proangiogenesis in rats with hind limb ischemia[J]. *Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine*, 2010, 16(8): 728-730
- [8] Capoccia BJ, Shepherd RM, Link DC. G-CSF and AMD3100 mobilize monocytes into the blood that stimulate angiogenesis in vivo through a paracrine mechanism[J]. *Blood*, 2006, 108(7): 2438-2445
- [9] Kuethe F, Figulla HR, Voth M, et al. Mobilization of stem cells by granulocyte colony stimulating factor for the regeneration of myocardial tissue after myocardial infarction[J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2004, 129(9): 424-428
- [10] Huang PP, Li SZ, Han MZ, et al. Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterans of lower extremities [J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2004, 91(3): 606-609
- [11] Lataillade JJ, Domenech J, Le-Bousse-Kerdiles MC. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 couple plays multiple roles on haematopoietic progenitors at the border between the old cytokine and new chemokine worlds: survival, cell cycling and trafficking[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2004, 15(3): 177-188
- [12] Zheng H, Fu GS, Dai T, et al. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 alpha /CXCR4 via PI3K/Akt /eNOS signal transduction pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50(3): 274-280
- [13] Dimmeler S, Zeiher AM. Akt takes center stage in angiogenesis signaling[J]. *Circ Res*, 2000, 86(1): 4-5
- [4] Carr AN, Howard BW, Yang HT, et al. Efficacy of systemic administration of SDF-1 in a model of vascular insufficiency: support for an endothelium- dependent mechanism[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69(4): 925-935
- [5] R. Mohle, M.A. Moore, R.L. Nachman, et al. Transendothelial migration of CD34+ and mature hematopoietic cells: an in vitro study using a human bone marrow endothelial cell line [J]. *Blood*, 1997, 89(1): 72-80
- [6] R.J. Miller, G. Banisadr, B.J. Bhattacharyya. CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development[J]. *Neuroimmunol*, 2008, 198(1-2): 31-38
- [7] Zhu CJ, Dong JX, Zhang MJ, et al. Effect of acupoint injection with bone marrow mesenchymal stem cells on the blood flow in rats with hind limb ischemia[J]. *Chinese Acup & Moxi*, 2009, 29(12): 987-992
- [18] 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  
Zhu Yihui, Chen Yuhua. Theory of effect on acupoint and medicine by acupoint injection[J]. *Chinese acupuncture and moxibustion*, 2005, 25(1): 46-48
- [19] Belgore FM, Blann AD, Lip GY. Measurement of free and complexed soluble vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1, in fluid samples: development and application of two new immunoassays[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2001, 100(5): 567-575
- [20] Blann AD, Belgore FM, McCollum CN, et al. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1, in the plasma of patients with coronary or peripheral atherosclerosis, or Type II diabetes[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2002, 102(2): 187-194
- [16] Dweck MR, Khaw HJ, Sng GK, et al. Aortic stenosis, atherosclerosis, and skeletal bone: is there a common link with calcification and inflammation?[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(21): 1567-1574
- [17] Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, et al. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(3): 142-147

(上接第 4549 页)

- [14] Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies [J]. *Circulation*, 2005, 111(24): 3316-3326
- [15] Arjunon S, Rathan S, Jo H, et al. Aortic valve: mechanical environment and mechanobiology[J]. *Ann Biomed Eng*, 2013, 41(7): 1331-1346