

# 心肌缺血周负荷对兔心肌血管内皮生长因子表达的影响\*

顾劲扬<sup>1</sup> 励建安<sup>1,2</sup> 王元会<sup>1</sup> 王 骏<sup>1</sup> 金挺剑<sup>1</sup>

**摘要** 目的:研究不同心肌缺血周负荷对兔心肌血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法:健康成年新西兰兔35只,体重2.2—2.5kg。根据不同的周缺血天数随机分为对照组、假手术组、3天/周组、5天/周组和7天/周组。将气囊梗阻器安装在冠状动脉左室支处,建立可控性心肌缺血模型。日缺血负荷为2min/h,2次/天,持续缺血刺激4周。取缺血区心肌观察形态学改变,并采用Western Blot方法检测缺血区和非缺血区心肌VEGF的表达水平。结果:①气囊充气后可以安全、有效地诱发心肌缺血。②与对照组和假手术组相比,缺血组左室支配区心肌VEGF表达显著增高( $P<0.05$ );各缺血亚组间VEGF表达差异无显著性意义( $P>0.05$ )。③假手术组心肌VEGF表达与对照组相比无明显变化( $P>0.05$ )。④左室支配区心肌VEGF表达和冠状动脉侧支血流量(CCBF)呈正相关( $r=0.775, P<0.01$ )。结论:持续4周间断性心肌缺血可显著提高缺血区心肌VEGF表达,不同周缺血负荷对其表达无明显影响;缺血区心肌VEGF表达水平和CCBF相关。

**关键词** 心肌缺血负荷;血管内皮生长因子;侧支循环

中图分类号:R493,R542.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-02-0099-05

**The effects of weekly myocardial ischemic burden on expression of VEGF in myocardium of rabbits/GU Jinyang, LI Jian'an, WANG Yuanhui, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(2):99—103**

**Abstract Objective:**To investigate the effects of weekly myocardial ischemic burden on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in hearts of rabbits. **Method:**Thirty-five adult New Zealand rabbits (2.2—2.5kg) were randomly divided into the control group, sham-operated group and ischemic groups which were subdivided into 3, 5 and 7-days subgroups in terms of the weekly frequencies of ischemic stimulation. Controlled myocardial ischemia model was established by installing a balloon occluder on the left ventricular branch (LVB). Upon a seven-day post-operative recovery, 2-min occlusions per hour on LVB with different weekly ischemic burdens by inflating the balloon occluder were performed twice a day and lasted for 4 weeks, meanwhile ECG was observed. The ischemic myocardium was sampled for histological examination. The expression levels of VEGF in ischemic and non-ischemic myocardium were quantified by Western Blot. **Result:** ①The inflation of the balloon occluder momentarily induced elevation of ST segment, which indicated safe and effective onset of myocardial ischemia. ②Compared with control and sham-operated group, the expression of VEGF obviously increased in the ischemic groups ( $P<0.05$ ) while no significant differences among these subgroups were observed ( $P>0.05$ ). ③VEGF levels remained similar in myocardium of both control and sham-operated groups ( $P>0.05$ ). ④VEGF levels in ischemic myocardium were positively correlated with coronary collateral blood flow ( $r=0.775, P<0.01$ ). **Conclusion:** Intermittent myocardial ischemia for four weeks may increase the expression of VEGF in ischemic myocardium while increment of weekly ischemic burden does not enhance expression of VEGF further. There is a certain correlation with regard to VEGF levels of ischemic myocardium and coronary collateral blood flow.

**Author's address** Dept. of Rehabilitation Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029

**Key words** myocardial ischemic burden; vascular endothelial growth factor; collateral circulation

冠心病、心绞痛等血管闭塞性疾病是现代社会常见的心血管疾病。长期以来,缺血性心脏病的临床与康复治疗策略均致力于抑制或避免心肌缺血的发作。然而近年来有研究发现猪慢性冠状动脉左回旋支狭窄后心肌缺血可促进侧支循环生成<sup>[1]</sup>;同时临床研究提示发生前驱心绞痛的急性心肌梗死患者较无

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370687)

1 南京医科大学第一附属医院康复医学科,江苏省省级机关医院内(省人民医院集团康复医学科),南京市珞珈路30号,210024

2 通讯作者:励建安(南京医科大学第一附属医院康复医学科,210029)

作者简介:顾劲扬,男,硕士研究生

收稿日期:2005-10-25

前驱心绞痛发生者预后良好<sup>[2-3]</sup>。因此, 心肌缺血促进冠状动脉侧支循环生成可能是心肌保护因素之一。

心肌缺血促进侧支循环生成的机制目前尚不清楚, 现在比较公认的观点是缺血可以诱导局部心肌合成多种促血管生长因子, 促进内皮细胞和支持细胞的增殖和成熟, 从而通过血管新生的方式实现侧支血管的生成。目前已经发现的促血管生长因子众多, 其中研究最为深入的是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)<sup>[4]</sup>。VEGF是内皮细胞特异性的有丝分裂原<sup>[5]</sup>, 它可以诱导内皮细胞迁移、增殖, 并抑制其凋亡, 在调节血管和淋巴管新生中起重要作用。为此, 有学者引入治疗性血管新生的概念, 即人为地通过蛋白重组、基因转染和细胞移植等方法提高病变部位血管新生诱导因子的浓度, 促进局部血管新生, 提高心肌代偿能力, 最终达到治疗缺血性心血管疾病的目<sup>[6]</sup>。

长期以来, 外周效应一直被认为是冠心病和各类心血管疾病的康复治疗机制。本课题组对运动、心肌缺血和冠脉侧支循环生成之间的关系进行了系列研究, 旨在通过适当的有氧运动训练安全诱导慢性冠状动脉狭窄猪心肌缺血, 体内合成内源性 VEGF 蛋白<sup>[7]</sup>, 有效地促进冠状动脉侧支循环生成<sup>[8]</sup>, 从而实现动脉自身“生物搭桥”, 以揭示运动训练促进心肌侧支循环形成的中心效应, 并为缺血性心血管疾病的血管新生疗法提供全新的治疗理念。前期研究表明, 兔固有侧支循环最大程度开放的最短缺血时域为 2min, 且病理切片中未见心肌细胞坏死, 提示单次缺血刺激以 2min 为宜<sup>[9]</sup>。金挺剑等<sup>[10]</sup>对不同心肌日缺血负荷(单次缺血程度与缺血频率的乘积)对兔冠状动脉侧支血流量(coronary collateral blood flow, CCBF)的影响进行研究, 发现在同等缺血程度的情况下, 2次/天的日缺血频率即可显著促进心肌侧支血管的生成, 更高的日缺血负荷并不能进一步增加 CCBF。同期对心肌局部 VEGF 的表达进行观察亦得到类似结果<sup>[11]</sup>。但是有关周缺血负荷(日缺血负荷×周缺血频率)与侧支循环生成之间的规律尚未见报道。因此, 在额定日缺血负荷的前提下, 确定适量的周缺血频率是确定周缺血负荷的前提, 也是目前亟待解决的问题。

本实验旨在探索不同周缺血负荷对兔心肌 VEGF 表达的影响, 为同期进行的周缺血负荷与 CCBF 之间关系的研究提供分子生物学层面的支持, 并为后续进一步研究运动诱发可控性心肌缺血与侧支循环生成的规律奠定必要的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康成年普通级新西兰兔 35 只, 雌雄不拘, 体重 2.2—2.5kg, 由南京金陵实验动物繁殖调剂中心提供。

### 1.2 气囊梗阻器制作

参照王骏等<sup>[12]</sup>研究方法自制气囊梗阻器。将医用静脉输液器导管一端的针头剪去, 并打结封闭。导管另一端连接注射器, 然后将打结端伸入沸水中约 1—2cm, 同时向管腔内充气使伸入沸水中的管腔段膨大成大小适度的气囊。之后再用胶水将两对宽约 1mm、直径约 2mm 的塑料环分别固定在气囊两侧。使用前向其中充气致使气囊部膨胀撑大, 1 天后如仍能维持者视为制作成功。

### 1.3 动物模型复制

参照王骏等<sup>[10-12]</sup>实验研究方法复制兔可控性心肌缺血模型。用 3% 戊巴比妥钠自兔耳缘静脉缓慢推注麻醉(30mg/kg)。取俯卧位, 分别在四肢前臂近肘关节处备皮、酒精消毒。然后取 1cm 长切口, 钝性分离皮肤和皮下筋膜, 借助导丝经切口处皮下将电极引至项背部两肩胛骨间。后将电极一端与肢体皮下筋膜缝合, 另一端穿出皮下固定。将心电图各肢体导联与相应电极连接后记录各导联心电图(I、II、III、aVR、aVL、aVF), 检测电极安装效果。

改换仰卧位, 常规备皮、消毒左侧胸廓后, 在胸骨左缘第 5 肋间处取长约 5cm 的切口进胸。沿心脏长轴于心包上作长约 1cm 的弧形切口, 暴露心脏。再用 2% 的利多卡因喷注心脏表面少许, 适当减慢心率。肉眼确定冠状动脉左室支(left ventricular branch, LVB), 在左心耳下缘 5—10mm 处用 5—0 单股聚丙烯无创缝合线经 LVB 下方的心肌内穿过, 再通过塑料环将气囊梗阻器捆绑固定。阻断程度标准: 充气时阻断部位以下 LVB 支配区心肌发绀、心电图 II 导联示 ST 段抬高或压低; 抽气后发绀区心肌恢复红润, 2min 内 ST 段恢复正常。将气囊导管固定于胸廓壁上, 生理盐水反复冲洗胸腔, 并用青霉素钠稀释液再次冲洗, 胸腔内留置引流管, 抽吸液体。逐层缝合胸廓, 关闭胸腔, 经引流管抽取胸膜腔内气体, 帮助左肺复张。最后将气囊梗阻器导管经皮下从项背部引出并固定。术后肌注苄星青霉素 40 万 U/次, 1 次/2 周。

### 1.4 实验动物剔除标准

出现下列情况之一者将退出实验: ①术中气囊安装完成后充气既无心电图改变, 又无心肌发绀表现; ②术后给予缺血刺激时无心电图改变; ③缺血刺

激结束 30min 后心电图改变仍不能恢复正常; ④术中或术后非心脏原因意外死亡。

### 1.5 实验分组

造模成功后随机分为缺血刺激组和假手术组, 根据每周缺血负荷再将缺血刺激组分为 3 天组、5 天组和 7 天组。假手术组除了不进行缺血刺激外, 其余操作均同缺血刺激组。另外随机选择 6 只兔进入对照组。

### 1.6 缺血刺激方案

自术后第 8 天开始, 各缺血亚组按照不同周缺血负荷开始接受持续 4 周间断性心肌缺血刺激 (日缺血负荷为 2min/h, 2 次/天)。缺血刺激前将心电图各肢体导联与对应电极连接, 在气囊充气过程中监测 II 导联心电图变化。如 ST 段抬高或压低即为缺血成功, ST 段恢复正常为再灌注标志。每周监测心电图 1—2 次。

### 1.7 标本采集

缺血刺激开始后第 29 天清晨, 在麻醉状态下再次开胸。监测心电图正常后于耳缘静脉注射空气处死动物。立即取出心脏, 分离粘连组织, 肉眼大体观察 LVB 支配区有无心肌坏死灶。迅速于缺血刺激组气囊固定部位远端 2mm 以下的 LVB 支配区和右心室各取心肌组织约 100mg; 对照组和假手术组亦取左、右心室相应部位心肌组织。随即将标本暂存于液氮中, 后转移至 -80℃ 低温冰箱保存供 Western Blot 检测。另取对照组和缺血刺激组 LVB 支配区 2—3mm 厚心肌置 10% 中性甲醛溶液中固定备镜检。

### 1.8 蛋白提取及 VEGF 含量检测

**1.8.1 蛋白提取:** 称重待测心肌组织约 100mg, 用冰预冷 PBS 洗涤至缓冲液清澈; 吸净 PBS, 加入冰预冷的组织裂解液 1ml, 冰水浴下 12000r/min 机械匀浆 3 次; 冰上孵育 1h; 4℃ 12000r/min 离心 30min; 吸取上清, 分装后 -25℃ 保存。

**1.8.2 总蛋白浓度测定:** 采用 Bradford 法用紫外分光光度计 (Ultmspec2000 分光光度计, 美国 Pharmacia 公司) 测定蛋白浓度。

**1.8.3 VEGF 蛋白含量检测:** 采用 Western Blot 法测定。取 30μg 组织蛋白溶液, 加入同体积的 2× 上样缓冲液, 100℃ 变性 4min, 经 10% SDS 凝胶电泳分离 (20mA/胶恒流) 后, 在 Bio-Rad Mini 湿式转移电泳槽中以 100V 恒压转移蛋白至 PVDF 印迹膜 (美国 Millipore 公司) 上, 持续 1h。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭非特异性免疫反应结合位点 (室温下 1h)。一抗 (兔抗 VEGF 多克隆抗体, 美国 Santa Cruz 公司, 1:7500) 4℃ 孵育过夜, TBST 漂洗 5min×3 次后加二抗

(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG, 美国 Santa Cruz 公司, 1:10000) 室温孵育 1h。再用 TBST 洗膜 5min×3 次。在 ECL 发光反应系统 (美国 Cell Signaling 公司) 中反应 5min, 暗室压片 1min, 胶片显影。分别以鼠抗 GAPDH 抗体 (1:3000) 和山羊抗鼠 IgG 抗体 (1:5000) 为一抗和二抗, 重复上述步骤以作内参照。采用图象分析系统 (Labwork 图象分析系统, 美国 UVP 公司) 扫描, 并对条带进行灰度分析。

### 1.9 组织学检查

首先在大体标本上观察气囊阻断部位以下 LVB 管壁完整性及有无肉眼可见的心肌坏死灶。然后取 LVB 支配区心肌作常规石蜡包埋切片, 苏木素-伊红染色, 高倍镜视野下观察有无心肌坏死和血管栓塞。

### 1.10 统计学分析

所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 经 SPSS11.5 软件检验呈正态性分布且方差齐性。各组间采用单因素方差分析。Pearson 相关分析 LVB 支配区心肌 VEGF 表达量和 CCBF 之间的关系。P<0.05 为差异有显著性意义。

## 2 结果

本实验共用健康新西兰成年兔 35 只, 随机选择 6 只入对照组。其余 29 只接受手术, 模型制作成功 25 只, 剔除 4 只, 包括术中麻醉意外和气胸死亡各 1 只, 另有 2 只因气囊充气未能产生缺血效果亦被剔除。根据周缺血负荷不同随机分为假手术组 (6 只)、3 天/周组 (7 只)、5 天/周组 (6 只) 和 7 天/周组 (6 只)。

### 2.1 心电图表现

缺血刺激前后各肢体导联心电图表现对比显示: 缺血刺激 2min 时 II 导联上 ST 段较缺血刺激前抬高或压低, 缺血刺激结束后 2min 心电图恢复正常。

### 2.2 各组缺血区、非缺血区 VEGF 蛋白表达含量的比较

与对照组和假手术组相比, 缺血组 LVB 支配区心肌 VEGF 表达的灰度值显著增高 (P<0.05), 而各缺血亚组间 VEGF 表达量之差异无显著性意义 (P>0.05); 假手术组心肌 VEGF 表达水平与对照组相比无明显变化 (P>0.05)。图 1 和表 1 比较各组缺血区、非缺血区心肌组织中 VEGF 表达含量。

### 2.3 LVB 支配区心肌 VEGF 蛋白表达水平与 CCBF 之间的关系

与同期对不同周缺血负荷兔心肌 CCBF 研究的初步结果相比较, 采用 Pearson 相关分析发现两者

存在正相关性 ( $r=0.775, P<0.01$ )。图 2 示各组 LVB 支配区 VEGF 表达水平与 CCBF 之间关系。

#### 2.4 组织学检查

标本大体肉眼观:LVB 支配区心肌未见坏死灶,与正常心肌无明显差别。组织切片经 H-E 染色高倍镜下观察各组均未见明显心肌变性坏死,亦未见血栓形成(图 3)。

表 1 各组缺血区、非缺血区 VEGF 相对含量 ( $\bar{x}\pm s$ )

	对照组	假手术组	3 天组	5 天组	7 天组
缺血区	2.44±0.19 <sup>②</sup>	2.46±0.24 <sup>②</sup>	3.54±0.37 <sup>①</sup>	3.51±0.40 <sup>①</sup>	3.79±0.32 <sup>①</sup>
非缺血区	2.18±0.18 <sup>②</sup>	2.29±0.22 <sup>②</sup>	2.75±0.25 <sup>①②</sup>	2.70±0.10 <sup>②</sup>	2.78±0.22 <sup>①②</sup>

①与对照组 LVB 支配区比较  $P<0.05$ ;②与 3 天组缺血区比较  $P<0.01$

图 1 Western Blot 法比较各组缺血区、非缺血区 VEGF 表达含量

1、3、5、7、9 分别代表对照组、假手术组、3 天组、5 天组和 7 天组缺血区心肌 VEGF 表达结果;2、4、6、8、10 分别代表相应组非缺血区心肌 VEGF 表达结果

图 2 各组 LVB 支配区 VEGF 相对表达含量与 CCBF 之间关系

图 3 对照组和缺血组 LVB 支配区心肌组织切片 HE 染色( $\times 400$ )

### 3 讨论

现有研究表明运动训练可诱发心肌缺血从而促进侧支循环生成<sup>[8]</sup>,但运动训练、缺血负荷与侧支血管生成三者之间的确切关系目前尚未明确。故而在临床上无法做到合理利用心肌缺血而不造成心肌坏死、病情恶化或其它心血管意外,限制了运动训练在冠心病康复治疗中的应用。为此,本课题组前期采用逐级设定不同缺血时间和缺血负荷的方法观察不同

缺血负荷对兔冠状动脉固有侧支循环开放程度和开放持续时间的影响。发现心肌固有侧支循环最大程度开放至少需要 2min 缺血刺激,且侧支开放的维持时间不超过 2min,而缺血负荷的进一步增加不能提高固有侧支循环开放程度和持续时间<sup>[9]</sup>。因此提示单次缺血刺激以 2min 为宜。进一步研究显示 4 周运动训练即可促进慢性冠状动脉狭窄猪心肌侧支循环生成并促进缺血区心肌 VEGF 表达的显著增高<sup>[7-8]</sup>。金挺剑等<sup>[10-11]</sup>继续对促进 CCBF 增加的心肌最适日缺血负荷展开研究,实验结果表明 2min/h,为期 4 周的三种不同日缺血频率(2 次/天、4 次/天、6 次/天)均可促进 CCBF 的增加,不同日缺血负荷对其并无明显影响,且未对心肌造成损伤。因此为本课题选择将 2min/h、2 次/天的间断性心肌缺血负荷作为日缺血负荷提供了重要依据。

关于心肌周缺血负荷与侧支循环生成之间的研究鲜有报道。Rys 等<sup>[13]</sup>制作了水囊自动控制装置对犬冠状动脉左前降支作 2min/次,间隔 1h,8 次/天,5 天/周,共 3 周的间断性缺血刺激后,检测放射性微球发现 CCBF 较对照组显著增加。另有一些动物实验亦按照 5 天/周的周缺血负荷得到类似结果<sup>[14-15]</sup>,提示并非需要每周连续 7 天的缺血刺激,5 天亦可促进侧支明显生成。但究竟何种周缺血负荷最佳尚未见报道。据此,本课题选择 3 天/周、5 天/周和 7 天/周 3 种不同缺血频率对心肌周缺血负荷与心肌 VEGF 表达之间的规律进行研究。

VEGF 是一个糖蛋白家族,其中 VEGF-A 即通常所说的 VEGF 在治疗性血管新生的动物实验及临床治疗中被广泛研究。VEGF-A 和 VEGF-C 在内皮细胞上的常见受体是 VEGFR-2 即 KDR,它被认为是转导 VEGF 信号诱发血管新生的主要受体。至于 VEGFR-1(Flt-1)在血管新生中的作用仍有争议,但是越来越多的研究认为 VEGFR-1 通过与 VEGFR-2 竞争结合 VEGF,从而对其发挥负向调节作用<sup>[16]</sup>。

缺血、低氧是诱发生理性和病理性血管新生的刺激因素。缺血缺氧时血红蛋白作为氧分压感受器上调低氧诱导因子(HIF-1)的合成<sup>[17]</sup>。HIF-1 $\alpha$  亚单位在氧分压正常的情况下被降解,而出现低氧时则降解显著减少。上调后的 HIF-1 与 VEGF 基因启动子上的缺氧反应元件结合,从而增加 VEGF 蛋白表达。此外,缺血缺氧还上调内皮细胞上 KDR 的表达,实现了对 VEGF 效应的放大。可见 VEGF 作为主要的促血管生长因子通过与其受体结合,在缺血诱发侧支血管新生过程中发挥重要作用。因此,本课题组选择将心肌内 VEGF 表达水平作为研究指标,以期

接了解缺血心肌内毛细血管内皮细胞增殖活性及侧支血管生成能力。

本实验结果表明, 气囊充气后各肢体导联心电图上均见ST段较充气前抬高或压低, 抽气后2min心电图恢复正常, 实验终点时对缺血区域组织学检查未见心肌坏死征象, 标志兔可控性心肌缺血模型复制成功。在此基础上, Western Blot法检测心肌VEGF表达含量显示, 缺血刺激组LVB支配区心肌VEGF水平较对照组和假手术组显著增高, 而3个缺血亚组间VEGF表达差异并未达到显著性, 说明3天/周、5天/周或7天/周的周缺血负荷均可有效诱导心肌组织VEGF蛋白的高效表达, 但此3种周缺血负荷之间对其表达影响并无差异, 提示2min/h、2次/天、3天/周的周缺血负荷足以诱导心肌VEGF的显著表达, 从而有利于冠状动脉侧支循环的生成。进一步增加缺血刺激负荷无益于心肌VEGF蛋白表达的相应增加。从另一侧面而言, 以较低的周缺血负荷即可达到VEGF蛋白的高效表达也有助于临床实际操作和运动处方的制定, 并减少心血管意外事件的发生。假手术组心肌内VEGF含量与对照组之间差异未达显著性意义, 提示手术操作本身对心肌VEGF蛋白表达并无明显影响, 再次证明可控性心肌缺血模型制作安全、可靠。

本课题组同期对心肌周缺血负荷与CCBF之间的关系进行了观察, 初步研究结果显示LVB支配区心肌VEGF表达和该区域CCBF呈正相关, 即冠状动脉侧支血管生成随心肌VEGF蛋白表达水平提高而增多, 从而从血流动力学方面对本实验结果予以深层次印证。同时, 本研究成果也为研究心肌不同周缺血负荷与冠脉侧支循环生成之间的关系提供分子生物学依据。

本课题对心肌缺血周负荷与心肌VEGF表达之间的关系进行了初步的探索, 但心肌缺血负荷与侧支循环生成之间的整体规律目前仍未完全揭示, 故有关运动和缺血促进心肌侧支血管生成的基础和临床研究任重道远。此外, 侧支循环的生成除受VEGF蛋白表达的影响外, 还受心肌细胞内多种因子及其受体的综合调控。仅对单一因素研究仍将难以从整体水平揭示缺血促进侧支循环生成的分子生物学机制。近年来日趋成熟的蛋白质组学技术必将为本课题组系列研究开辟新的探索方向。

## 参考文献

- [1] White FC, Carroll SM, Magnet A, et al. Coronary collateral development in swine after coronary artery occlusion [J]. *Circ Res*, 1992, 71(6):1490—1500.
- [2] Ottani F, Galvani M, Ferrini D, et al. Prodromal angina limits infarct size. A role for ischemic preconditioning [J]. *Circulation*, 1995, 91(2):291—297.
- [3] Kobayashi Y, Miyazaki S, Itoh A, et al. Previous angina reduces in-hospital death in patients with acute myocardial infarction [J]. *Am J Cardiol*, 1998, 81(2):117—122.
- [4] Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review [J]. *Br J Haematol*, 2005, 128(3):303—309.
- [5] Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis [J]. *Semin Cancer Biol*, 1999, 9(3):211—220.
- [6] Syed IS, Sanborn TA, Rosengart TK. Therapeutic angiogenesis: a biologic bypass [J]. *Cardiology*, 2004, 101(1-3):131—143.
- [7] 袁红洁, 励建安, 黄澎, 等. 有氧运动训练对慢性冠状动脉狭窄猪心肌血管内皮生长因子表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2002, 17(2):72—74.
- [8] 黄澎, 励建安, 袁红洁, 等. 有氧运动训练对冠状动脉狭窄后侧支循环生成的初步研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2001, 17(1):22—25.
- [9] 王红星, 励建安, 路鹏. 缺血负荷对家兔冠状动脉固有侧支循环开放的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2003, 18(5):274—278.
- [10] 金挺剑, 励建安, 王骏, 等. 心肌缺血日负荷对冠状动脉侧支血流量的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2005, 20(6):405—408.
- [11] 王骏, 励建安, 金挺剑, 等. 心肌缺血日负荷对新西兰兔血管内皮生长因子表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2005, 20(3):165—168.
- [12] 王骏, 金挺剑, 励建安. 兔可控性心肌缺血模型的建立 [J]. *中国康复医学杂志*, 2005, 20(5):327—328.
- [13] Rys R, LaDisa JF Jr, Tessmer JP, et al. An automated coronary artery occlusion device for stimulating collateral development in vivo [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2002, 48(2):111—118.
- [14] Fujita M, Mikuniya A, McKown DP, et al. Characterization of nonischemic segment shortening during variable extent of myocardial ischemia in conscious dogs [J]. *Heart Vessels*, 1987, 3(3):122—128.
- [15] Cohen MV, Yang XM, Liu Y, et al. A new animal model of controlled coronary artery occlusion in conscious rabbits [J]. *Cardiovasc Res*, 1994, 28(1):61—65.
- [16] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors [J]. *Nat Med*, 2003, 9(6):669—676.
- [17] Goldberg MA, Schneider TJ. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(6):4355—4359.