

·基础研究·

单核细胞趋化因子-1在等长收缩运动促进大鼠缺血心肌侧支动脉生成中的作用*

管骏涛¹ 耿灿茹¹ 陆 晓^{1,2}

摘要

目的:探讨单核细胞趋化因子-1(MCP-1)在等长收缩运动训练促进缺血心肌侧支动脉生成中的作用。

方法:将造模成功的24只雄性SD大鼠,体重(200±20)g,随机分为4组:对照组(CG)、心肌缺血组(MI)、运动训练组(ET)、MCP-1抑制剂组(LG),每组均有6只大鼠。CG组连续2周皮下注射生理盐水;MI组连续2周皮下注射异丙肾上腺素(10mg/kg/d),造成心肌缺血;ET组连续2周皮下注射异丙肾上腺素并且进行等长收缩运动训练;LG组在ET组的基础上进行MCP-1抑制剂来氟米特灌胃。训练8周结束后,麻醉大鼠,取左心室心肌,采用微球法测定缺血区心肌相对侧支循环血流量(RCBF);采用免疫组化法测定缺血区心肌小动脉密度和单核细胞数量;以Western blot和荧光定量PCR法测定缺血心肌中MCP-1的蛋白及mRNA的表达。

结果:ET组大鼠的相对侧支血流量(RCBF)、小动脉密度(AD)明显高于其余3组($P < 0.001$),LG组的RCBF和AD与MI组相比无显著性差异;ET组大鼠缺血心肌中单核细胞数量、MCP-1 mRNA以及MCP-1蛋白表达均显著高于其余各组($P < 0.001$),而LG组大鼠缺血心肌中单核细胞数量、MCP-1 mRNA以及MCP-1蛋白表达与MI组相比无显著性差异。

结论:持续8周的等长收缩运动训练可以增加大鼠缺血心肌中MCP-1的表达,从而促进缺血心肌侧支动脉的生成。

关键词 等长收缩运动;心肌缺血;单核细胞趋化因子;侧支动脉生成;动脉密度

中图分类号:R541.4,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-08-0856-07

Effects of MCP-1 in isometric exercise training promotes the collateral artery formation in mice with myocardial ischemia/GUAN Juntao, GENG Canru, LU Xiao//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(8): 856—862

Abstract

Objective: To investigate the role of monocyte chemoattractant protein-1 in the progress that isometric exercise training improves arteriogenesis.

Method: Twenty-four male Sprague-Dawley rats were used, weighing (200±20)g. The rats were randomized into control group (CG), myocardial ischemia group (MI), exercise training group (ET), MCP-1 inhibitor group (LG). There were 6 rats in each group. Rats were continuously administered 10mg/kg subcutaneously isoproterenol for successive 2 weeks to establish the myocardial ischemia model. Successfully modeled rats were in groups MI, ET and LG. Isometric exercise training were performed in group ET and LG. The rats in group LG were given MCP-1 inhibitor leflunomide by gavage. After 8 weeks of training, the left ventricular myocardium was extracted and relative collateral blood flow (RCBF) was measured by microspheres. Artery density (AD) and monocytes were measured by immunohistochemistry analysis. Western blot analysis and real-time quantitative PCR were performed to assay protein and mRNA of MCP-1.

Result: RCBF and AD increased significantly in group ET as compared to the rest groups. RCBF and AD in

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.08.001

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81472164)

1 南京医科大学第一附属医院,南京,210029; 2 通讯作者

作者简介:管骏涛,男,硕士研究生; 收稿日期:2016-12-14

group LG showed higher than that in group MI but not significant. The number of monocytes, MCP-1 mRNA and MCP-1 expression were significantly elevated in ischemic myocardium of group ET. Interestingly, the number of monocytes, MCP-1 mRNA and MCP-1 expression showed lower than that in group MI but also not significant.

Conclusion: Eight weeks of isometric exercise training can increase the expression of MCP-1 in ischemic myocardium and promote the arteriogenesis.

Author's address Rehabilitation Department, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029

Key word isometric exercise training; myocardial ischemia; monocyte chemoattractant protein; arteriogenesis; artery density

定期的运动训练可以降低冠心病的发病率和死亡率, Taylor等^[1-2]的研究证实:参加心脏康复训练的冠心病患者与对照组相比,其死亡率降低27%。因此,运动训练是治疗冠心病的有效方法之一^[3]。

与常规动力性运动相比,冠心病患者做等长收缩运动发生心肌缺血的概率相对较低^[4]。Lin S等^[5]实验研究发现,单次等长收缩运动可增加缺血心肌侧支血流募集,从而改善缺血心肌供血;我课题组前期研究发现,让冠心病患者作3个月的等长握拳训练,发现与非运动组相比,核素心肌显像提示缺血心肌区域的血流灌注明显增加^[6]。因此推测等长收缩运动可以促进侧支生成。

冠状动脉侧支生成包括血管新生和动脉生成。由于动脉生成形成的血管管径相较于血管新生形成的毛细血管更大、功能更加完善,可以更好地促进缺血心肌血流量灌注,因此动脉生成的意义较血管新生更为重要^[2-3]。尽管有实验证实运动训练可以促进侧支生成^[7],但等长收缩运动是否能促进侧支动脉生成目前研究甚少。

单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)的上调是分子水平动脉生成的重要特征^[8]。研究表明MCP-1可以吸引单核细胞的聚集、游离出血管形成巨噬细胞,进而在局部产生各种因子,是侧支动脉生成的重要步骤^[9]。但等长收缩运动训练是否能通过促进MCP-1的增加,从而促进侧支动脉生成目前鲜有研究涉及。

因此,本实验旨在探讨等长收缩运动训练是否能刺激缺血心肌MCP-1表达的增加,从而促进侧支动脉的生成,为等长收缩运动在冠心病患者的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

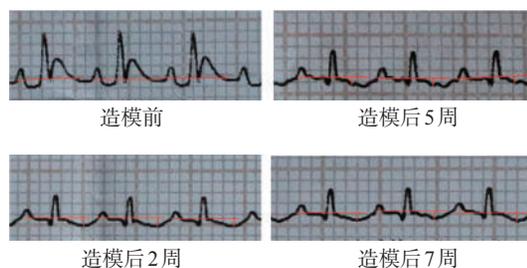
1.1 实验动物

本实验动物采用健康成年雄性SD大鼠30只, SPF级,体重(200±20)g,购自于南京医科大学实验动物中心[SCXK(苏)2014-0025]。大鼠饲养于12h昼夜循环,饮水和食物充足的不锈钢鼠笼中,温度保持在23—28℃。大鼠适应环境1周后,开始实验造模及分组。实验方案遵循美国NIH公布的实验动物使用指南,并经南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 实验设计及分组

造模:参考张清友等^[10]方法并改进复制异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)心肌缺血模型,即每日皮下注射异丙肾上腺素,10mg/kg/d,连续注射2周。每周进行心电图记录,观察心电图变化确认造模成功(ST段压低,T波倒置)。见图1。

图1 大鼠造模前后心电图



分组:选取24只成功造模的SD大鼠随机分为4组:对照组:(control group, CG, n=6),连续2周进行皮下注射生理盐水,每天进行浓度为0.1%的DMSO生理盐水灌胃(DMSO为来氟米特的助悬剂),不进行任何运动训练;心肌缺血组:(myocardial isch-

emia group, MI, n=6), 进行连续2周的皮下异丙肾上腺素注射(10mg/kg), 其他与对照组相同; 运动训练组:(exercise training group, ET, n=6), 相较于心肌缺血组, 大鼠进行为期8周的等长收缩运动训练, 其余干预均相同; 来氟米特组:(Leflunomide group, LG, n=6), 与等长收缩运动训练组相比较, 在等长收缩运动训练组的基础上, 每天对大鼠行MCP-1的抑制剂来氟米特(10mg/kg)灌胃。

等长收缩运动训练方案: 设计大鼠的可穿戴马甲, 大鼠四肢可以穿过马甲, 马甲背部设计一口袋(装负重物), 然后让大鼠四肢抓住垂直的铁丝笼进行四肢等长收缩训练。通过不断调整背负重量, 以大鼠能持续抓持1min的负重作为训练阻抗, 训练阻抗每2周进行重新评估。每次训练1min休息1min, 每天训练20次, 每周5d, 一共持续8周。见表1。

1.3 相对侧支血流量的检测

表1 分组及相应处理

组别	第1周	第2周	第3—8周
对照组	皮下注射生理盐水1ml/只 生理盐水灌胃1ml/只	皮下注射生理盐水1ml/只 生理盐水灌胃1ml/只	生理盐水灌胃1ml/只
心肌缺血组	皮下注射 iso 10mg/kg 生理盐水灌胃1ml/只	皮下注射 ISO 10mg/kg 生理盐水灌胃1ml/只	生理盐水灌胃1ml/只
等长收缩运动训练组	皮下注射 iso 10mg/kg 生理盐水灌胃1ml/只 等长收缩运动训练(5d/w)	皮下注射 ISO 10mg/kg 生理盐水灌胃1ml/只 等长收缩运动训练(5d/w)	生理盐水灌胃1ml/只+等长收缩运动训练(5d/w)
来氟米特组	皮下注射 iso 10mg/kg 来氟米特灌胃10mg/kg 等长收缩运动训练(5d/w)	皮下注射 ISO 10mg/kg 来氟米特灌胃10mg/kg 等长收缩运动训练(5d/w)	来氟米特灌胃10mg/kg+等长收缩运动训练(5d/w)

相对侧支血流量的检测(relative collateral blood flow, RCBF), 等长收缩运动训练结束后, 用10%的水合氯醛麻醉大鼠后, 开胸暴露心脏, 先将150ul的橙色微球从大鼠左心耳处注入, 然后结扎冠状动脉左前降支, 再将150ul的紫色微球注入。微球注入后, 分离心脏, 取左心室局部心肌, 室温自然腐败3w, 经过充分消化、染料提取后, 测定提取液中的吸光度值, 使用微球公司提供的公式, 依据吸光度值计算得到的微球量即为实际的微球回收量(粒/g)。RCBF=CCBF/CBF×100%, 其中CBF为未结扎左前降支时心肌中的微球数量(粒/g), CCBF为结扎左前降支后心肌中的微球数量(粒/g)。

1.4 小动脉密度及单核细胞的免疫组化检测

训练结束后进行心肌取材, 置于4%多聚甲醛中, 以备镜检。经常规石蜡包埋, 切片, 然后蒸馏水洗。脱蜡后的组织切片置于抗原修复缓冲液中行抗原修复后, 加相应一抗过夜, 滴加以辣根过氧化物酶标记的相应二抗, 加入DAB显色液(丹麦DAKO公司)显色, Harris苏木紫复染3min左右脱水封片观察。

小动脉密度(artery density, AD): a-SMA单克

隆抗体染色后, 每个样本先在低倍镜观察阳性染色的小动脉, 小动脉的直径定为10μm以上^[11]。选择染色最多的区域, 然后在200倍光学显微镜下, 使用Image pro plus 6.0图像处理系统, 随机选取5个不重复的高倍视野计数血管数目(n/mm²), 作为取均值代表每一样本动脉数。

单核细胞数量: CD68是单核细胞/巨噬细胞可靠的标记物, 细胞浆出现棕色或棕黄色颗粒状染色为CD68阳性。首先在显微镜低倍视野下选取CD68染色最密集、最明显的部位, 光学显微镜高倍视野下(200倍)观察并选取典型视野摄片。使用Image pro plus 6.0图像处理系统, 每个切片任取5个200倍高倍镜视野, 采用Image pro plus 6.0测定其积分光密度值(integrated optical density, IOD), 取平均值。

1.5 MCP-1的蛋白表达检测

将心肌组织清洗并剪碎, 经彻底匀浆、离心取上清液, 即为总蛋白溶液。以BCA蛋白浓度定量试剂盒测定蛋白浓度。上样并行SDS-PAGE电泳, 然后进行转膜。加入稀释的一抗孵育, 过夜。经摇床脱色后, 加入稀释的二抗, 室温孵育30min后, 再次用

摇床脱色。蛋白条带用ECL试剂盒显影,将胶片进行扫描存档,Alpha软件处理分析目标带的光密度值,蛋白的相对表达量用MCP-1的灰度值与GAPDH的比值代表,一抗、二抗及其他试剂均购自于武汉谷歌生物有限公司。

1.6 MCP-1的mRNA表达检测

用Trizol试剂盒将100mg心肌组织中的RNA提取出来,MCP-1 RNA引物的设计和合成由武汉谷歌生物科技有限公司完成,GAPDH为内参。

MCP-1:

上游引物:5'-CATCAACCCTAAGGA5'CTTCAGC-3';
片段长度:106;退火温度:60℃

下游引物:5'-TCTACAGAAGTGCTTGAGGTGGT-3'

GAPDH:

上游引物:5'-TTCCTACCCCAATGTATCCG-3';片段
长度:281;退火温度:60℃

下游引物:5'-CATGAGGTCCACCACCCTGTT-3'

荧光定量PCR采用SYBGreen荧光染料法测定。反应体系20ul,MCP-1的扩增条件:95℃预变性10min。PCR反应为:95℃ 15s,60℃ 30s(共循环40次)。溶解曲线:75℃→95℃,每20s升温1℃,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来计算MCP-1 mRNA的相对表达水平。

1.7 统计学分析

数据均以均数±标准差表示。所有数据均经SPSS 17.0统计学软件检验呈正态性分布且方差齐性。用单因素方差分析法分别对各组间的实验数据进行组间差异性检验,组间多重比较采用Bonferroni检验。

2 结果

2.1 大鼠死亡情况

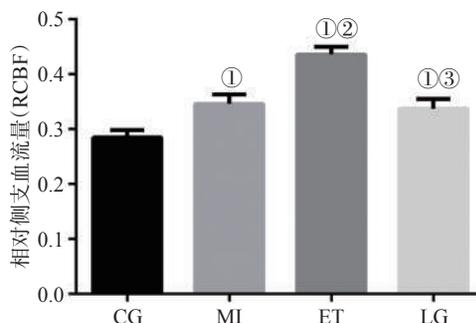
实验过程中,2只大鼠在皮下注射时发生窒息死亡,2只在皮下注射异丙肾上腺素后出现室性心动过速死亡,还有2只在灌胃后一天不明原因死亡。剩余的24只大鼠随机分配至各个实验组。

2.2 缺血心肌相对侧支循环血流量

持续8周的等长收缩运动训练实验终点时,统计学显示组间数据具有可比性($F=90.366, P<0.001$)。进一步分析显示:CG组的RCBF(0.285±0.012)显著低于其余3组($P<0.001$),ET组的RCBF(0.436±0.012)显著高于其余3组($P<0.001$),而LG组的RCBF(0.337±0.015)虽然与CG组有显著性差

异($P<0.001$),但是与MI组RCBF(0.346±0.016)相比,无显著性差异($P>0.05$),并且LG组的RCBF显著低于ET组($P<0.001$)。见图2。

图2 各组大鼠缺血心肌相对血流量



与CG组相比:① $P<0.001$;与MI组相比:② $P<0.001$;与ET组相比:③ $P<0.001$

2.3 缺血心肌处小动脉密度变化

持续8周的等长收缩运动训练实验终点时,统计学显示组间数据具有可比性($F=61.750, P<0.001$)。免疫组化结果显示:ET组的小动脉密度(35.500±1.049)显著高于其余3组($P<0.001$),MI组的小动脉密度(25.000±1.414)显著高于CG组(21.667±1.751)($P=0.042$),而LG组的小动脉密度(23.833±2.927)与CG组和MI组相比均无显著性差异(与CG组相比: $P=1$;与MI组相比: $P=0.39$)。见图3。

2.4 缺血心肌中单核细胞数量变化

持续8周的等长收缩运动训练实验终点时,统计学显示组间数据具有可比性($F=27.708, P<0.001$)。免疫组化结果显示:ET组单核细胞的IOD值(144.085±10.869)显著高于其余3组($P<0.001$),LG组单核细胞的IOD值(92.767±18.426)与CG组(79.594±12.740)和MI组(104.849±4.973)相比均无显著性差异(与CG组相比: $P=1$;与MI组相比: $P=1$),而MI组单核细胞的IOD值显著高于CG组($P=0.020$)。见图4。

2.5 缺血心肌中MCP-1蛋白表达变化

持续8周的等长收缩运动训练实验终点时,统计学显示组间数据具有可比性($F=26.525, P<0.001$)。CG组的MCP-1蛋白表达(0.160±0.018)显著低于MI组(0.241±0.025)($P=0.018$)和ET组(0.334±0.062)($P<0.001$),而与LG组(0.184±0.019)无显著性差异($P=1$);ET组的MCP-1蛋白表达显著

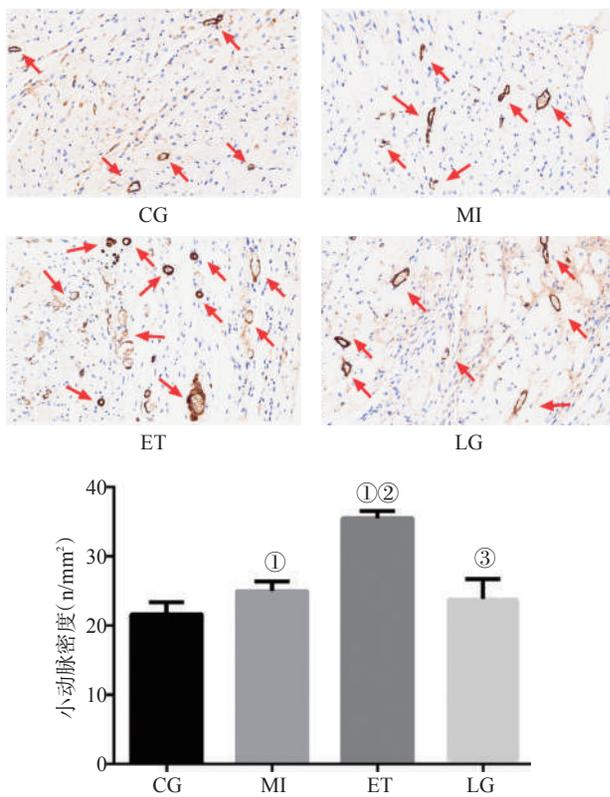
高于其余3组($P < 0.001$),而MI组的MCP-1蛋白表达与LG组相比无明显差异($P = 0.208$)。见图5。

2.6 缺血心肌中MCP-1 mRNA表达变化

持续8周的等长收缩运动训练实验终点时,统计学显示组间数据具有可比性($F = 51.545, P < 0.001$)。CG组的MCP-1 mRNA表达(1.737 ± 0.306)显著低于

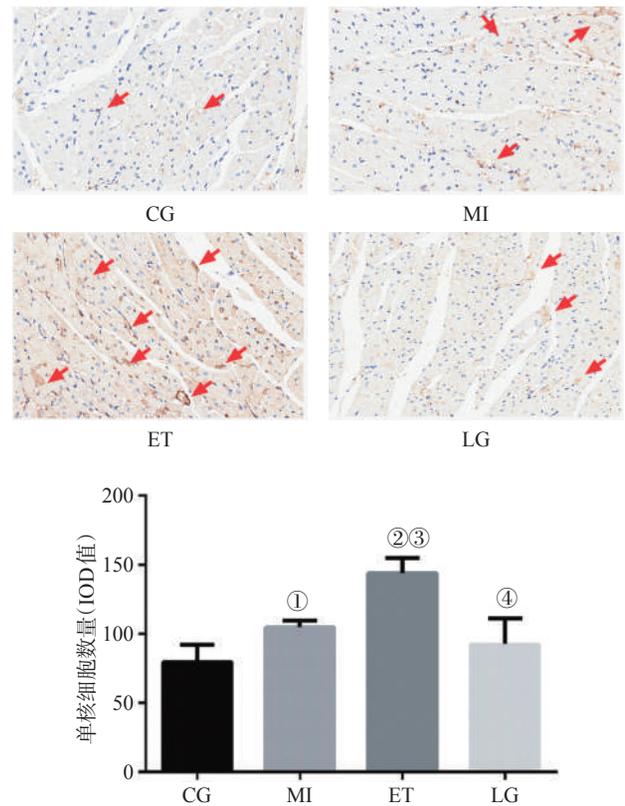
其余3组(与MI组相比: $P = 0.006$;与ET组相比: $P < 0.001$;与LG组相比: $P = 0.038$),而ET组的MCP-1 mRNA表达(5.717 ± 0.656)则显著高于其余3组($P < 0.001$),MI组(2.890 ± 0.471)与LG组(2.695 ± 0.627)的MCP-1 mRNA表达无显著性差异($P = 1$)。

图3 各组缺血心肌中小动脉密度 (×200)



与CG组相比:① $P < 0.05$;与MI组相比:② $P < 0.001$;与ET组相比:③ $P < 0.001$

图4 各组缺血心肌中单核细胞增殖情况 (×200)



与CG组相比:① $P < 0.05$;② $P < 0.001$;与MI组相比:③ $P < 0.001$;与ET组相比:④ $P < 0.001$

3 讨论

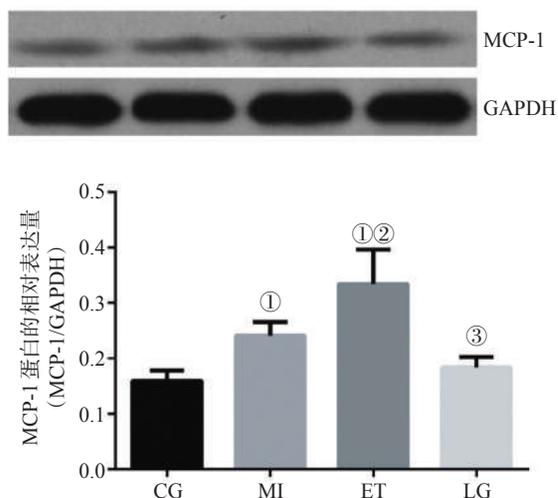
冠心病的发病率和死亡率在全球范围内均非常高,改善缺血区域心肌灌注是冠心病治疗的主要目的,而促进侧支动脉生成是改善缺血组织血流供应的重要方法之一^[12]。本实验的研究结果显示:等长收缩运动训练能刺激缺血心肌MCP-1表达的增加,从而促进侧支动脉的生成。

3.1 等长收缩运动训练对大鼠缺血心肌侧支动脉生成的影响

血管新生是仅仅分化出新生的、不具有完整中

膜结构的毛细血管;而动脉生成可以形成具有中膜结构的功能性动脉,可以更有效地促进心肌血流灌注。本课题组前期的研究发现,持续6周的等长收缩训练可以促进缺血心肌的血流灌注^[13-14],但是其机制是血管新生还是动脉生成,尚无明确结论。本实验结果显示,ET组的相对侧支血流量明显高于MI组($P < 0.01$),提示持续8周的等长收缩运动训练可以增加缺血心肌处的相对侧支血流量,与之前的研究结果一致。同时,毛细血管的直径一般在6—9 μm ,而直径大于10 μm 的血管可归为小动脉^[11]。本

图5 各组缺血心肌中MCP-1蛋白的表达



与CG组相比:① $P < 0.001$;与MI组相比:② $P < 0.001$;与ET组相比:③ $P < 0.001$

研究免疫组化染色显示ET组中 $10\mu\text{m}$ 以上的小动脉密度也明显高于MI组,提示8周的等长收缩运动训练可以促进缺血心肌中小动脉的生成。综上所述,等长收缩运动训练促进缺血心肌血流灌注的方法主要是通过侧支动脉生成实现的。

3.2 MCP-1在等长收缩运动训练促进大鼠缺血心肌侧支动脉生成中的作用

MCP-1是CC类趋化因子家族中的成员之一,MCP-1可以吸引单核细胞的聚集、游离出血管形成巨噬细胞,进而在局部产生各种因子[基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、碱性成纤维生长因子(basic-fibroblast growth factor, b-FGF)、血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)],这些因子可以促进血管内皮细胞和平滑肌细胞的有丝分裂活动,从而促进血管平滑肌细胞的增殖,形成功能性动脉的中膜结构。相对于仅仅由血管内皮细胞构成的毛细血管来说,这种重塑过程形成的具有平滑肌结构的功能性动脉,由于其相对较低的阻抗和对于血管活性物质的高反应性,使得它能够承载相当大容量的血液^[15]。在敲除MCP-1受体的大鼠上可以观察到侧支动脉生成受到抑制;而通过体外注射MCP-1至结扎股动脉近侧端,发现

可以有效增加侧支动脉生成^[16-17]。这些研究表明MCP-1的上调以及单核细胞的聚集、激活对于侧支动脉生成的重要作用。虽然MCP-1在侧支动脉生成中的作用已得到实验证实,但是外源性MCP-1使用却难以在临床上应用,其原因主要有两点:首先是MCP-1的获取较为困难,代价昂贵;其二是有些研究发现:在兔股动脉结扎模型上局部进行持续1周MCP-1注射后立刻检查发现与对照组相比,其血流量的恢复明显高于对照组;然而进行持续1周MCP-1注射的兔在6个月后进行血流量检测时发现,与对照组相比,血流量恢复并无明显差异^[18],相同的实验观察结果在临床试验中也有发现^[19],即MCP-1作用的实现需要长期维持一定浓度。持续长时间注射的高成本以及患者依从性低等特点,使得MCP-1难以在临床上得到应用。因此,如何通过内源性、长期地增加MCP-1的表达从而促进侧支动脉生成显得尤为重要。

本实验结果表明,ET组缺血心肌中MCP-1的蛋白及mRNA表达均明显高于其余3组,ET组缺血心肌中单核细胞的数量也明显高于其余3组,提示8周的等长收缩运动训练可以增加大鼠缺血心肌中MCP-1的表达,促进单核细胞的聚集。从以上的这些结果,我们可以初步认为等长收缩运动训练可以刺激缺血心肌中MCP-1的表达,从而促进侧支动脉生成。

为了更好地说明MCP-1在等长收缩运动训练促进侧支动脉生成中的作用,我们通过使用来氟米特作为MCP-1的抑制剂,来氟米特是一种新型的异唑类免疫抑制剂,有研究表明使用来氟米特干预后可以降低大鼠MCP-1的表达^[20]。本实验结果显示,LG组通过持续8周的到来氟米特灌胃后,相较于ET组,其MCP-1的蛋白和mRNA的表达均降低,说明来氟米特对MCP-1抑制作用得到确认;进一步的实验结果表明:LG组的RCBF和AD相较于ET组均明显降低($P < 0.01$),更能说明MCP-1在等长收缩运动促进侧支动脉生成过程中的作用。而ET组缺血心肌中单核细胞的数量明显高于其余3组,而LG组中单核细胞的数量与MI组没有明显差异($P > 0.05$),提示8周的等长收缩运动训练可以增加大鼠缺血心肌中单核细胞的数量,以及通过长期口服

MCP-1的抑制剂来氟米特可以抑制等长收缩运动训练增加大鼠缺血心肌中单核细胞的过程。

综上所述,等长收缩运动训练可以刺激缺血心肌MCP-1表达的增加,MCP-1的增加可以有效促进缺血部位单核细胞的增殖,从而促进侧支动脉的生成。此外,本实验局限性为:①本实验提供的样本模型相对较少;②本文仅对MCP-1这一个动脉生成相关因子作研究,是否有其他因子参与等长收缩运动促进侧支动脉生成过程,我们未做更深入研究。

参考文献

- [1] Taylor RS, Brown A, Ebrahim S, et al. Exercise-based rehabilitation for patients with coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Am J Med*, 2004, 116(10):682—692.
- [2] Jolliffe JA, Rees K, Taylor RS, et al. Exercise-based rehabilitation for coronary heart disease[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2001, (1):D1800.
- [3] Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise[J]. *Physiol Rev*, 2008, 88(3):1009—1086.
- [4] Pollock ML, Franklin BA, Balady GJ, et al. AHA Science Advisory. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: benefits, rationale, safety, and prescription: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association; Position paper endorsed by the American College of Sports Medicine[J]. *Circulation*, 2000, 101(7):828—833.
- [5] Lin S, Lu X, Chen S, et al. Human coronary collateral recruitment is facilitated by isometric exercise during acute coronary occlusion[J]. *J Rehabil Med*, 2012, 44(8):691—695.
- [6] 李咏雪,林松,陆晓,等.生理性缺血训练对冠心病患者循环血管内皮祖细胞的影响[J].*中国康复医学杂志*,2012,27(4):293—299.
- [7] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis[J]. *Nature Medicine*, 2000, 6(4):389—395.
- [8] Faber JE, Chilian WM, Deindl E, et al. A brief etymology of the collateral circulation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(9):1854—1859.
- [9] Arras M, Ito WD, Scholz D, et al. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(1):40—50.
- [10] 高谦,杜军保,张清友,等.1,6二磷酸果糖对慢性心肌缺血大鼠脑损伤的保护作用[J].*中国临床康复*,2005,(29):96—98.
- [11] Ranjbar K, Rahmani-Nia F, Shahabpour E. Aerobic training and l-arginine supplementation promotes rat heart and hind-leg muscles arteriogenesis after myocardial infarction[J]. *J Physiol Biochem*, 2016, 72(3):393—404.
- [12] Degen A, Millenaar D, Schirmer SH. Therapeutic approaches in the stimulation of the coronary collateral circulation [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2014, 10(1):65—72.
- [13] 姜峰,管骏涛,宋佳成,等.等长收缩训练促进犬慢性缺血心肌血流灌注的研究[J].*中国康复医学杂志*,2016,31(6):611—616.
- [14] 沈梅.骨骼肌等长收缩缺血训练对远隔缺血部位血管新生的作用和机理[D].南京:南京医科大学,2008.
- [15] Voskuil M, van Royen N, Hoefer IE, et al. Modulation of collateral artery growth in a porcine hindlimb ligation model using MCP-1[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 284(4):H1422—H1428.
- [16] Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S, et al. Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2[J]. *Circ Res*, 2004, 94(5):671—677.
- [17] Ito WD, Arras M, Winkler B, et al. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion[J]. *Circ Res*, 1997, 80(6):829—837.
- [18] van Royen N, Hoefer I, Buschmann I, et al. Effects of local MCP-1 protein therapy on the development of the collateral circulation and atherosclerosis in Watanabe hyperlipidemic rabbits[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(1):178—185.
- [19] Sedighiani F, Nikol S. Gene therapy in vascular disease[J]. *Surgeon*, 2011, 9(6):326—335.
- [20] 于为民,朱忠华.来氟米特对糖尿病肾病大鼠MCP-1表达的影响[J].*中国中西医结合肾病杂志*,2008,(7):589—592.