

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00586

高表达血管生长素的自体骨髓基质细胞移植治疗猪缺血性心脏病

徐驯宇^{1*}, 陈前顺¹, 黄 郴¹, 林 兴¹, 黄盛东², 韩 涛¹

1. 福建省立医院胸外科, 福建医科大学省立临床医学院, 福州 350001
2. 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 将高表达血管生长素(ANG)的自体骨髓基质细胞移植于慢性心肌缺血猪模型, 观察移植后血管新生程度及对心功能的影响。**方法** 建立猪慢性缺血性心脏病动物模型, 随机分为3组: 转染 ANG 重组腺病毒载体(Ad-ANG)的自体骨髓基质细胞移植组(组 I, $n=11$), 单纯自体骨髓基质细胞移植组(组 II, $n=10$), 注射无血清 DMEM 培养液的对照组(组 III, $n=10$)。体外培养自体骨髓基质细胞, 利用 Ad-ANG 转染培养细胞, 用 CM-DiI 标记细胞, 移植于模型猪心脏的缺血区域。观察指标包括: 冠状动脉(冠脉)造影 Rentrop 分数及心脏射血分数、梗死区百分数、荧光显微镜下标记细胞、血管数量及 ANG 的表达和分泌。**结果** 与组 II 及组 III 相比, 组 I 冠脉造影 Rentrop 分数、心脏射血分数增高; 缺血心肌区新生血管计数增高, 可见大量 CM-DiI 标记的移植成活细胞, 梗死区面积较小, ANG 蛋白表达增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 高表达 ANG 的自体骨髓基质细胞移植于慢性缺血心肌, 移植细胞成活率高, 能明显改善缺血心肌局部血运, 改善心功能。

[关键词] 缺血性心脏病; 骨髓基质细胞; 血管生长素; 细胞移植; 腺病毒

[中图分类号] R 542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)06-0586-06

Transplantation of autologous angiogenin-overexpressing marrow stromal cells in treatment of a porcine chronic ischemia model

XU Xun-yu^{1*}, CHEN Qian-shun¹, HUANG Chen¹, LIN Xing¹, HUANG Sheng-dong², HAN Tao¹

1. Department of Thoracic Surgery, Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian, China
2. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of autologous angiogenin(ANG)-overexpressing marrow stromal cells transplantation on the neoangiogenesis and cardiac function in a porcine model of chronic ischemia. **Methods** Porcine models of chronic ischemia were established and were randomized into the following 3 groups: autologous marrow stromal cells transfected with Ad-ANG (Group I, $n=11$), autologous marrow stromal cells without transfection (Group II, $n=10$), and controls injected with serum-free DMEM medium (Group III, $n=10$). The autologous marrow stromal cells were cultured and were transfected with Ad-ANG, and the cells were labeled by CM-DiI. The cells were transplanted to the ischemia site of porcine heart. The parameters we observed included Rentrop score, ejection fraction, percentage of infarcted area, CM-DiI labeled cells under fluorescence microscope, number of blood vessels and expression of ANG protein. **Results** Compared with group II and III, Group I had significantly increased Rentrop score, ejection fraction, numbers of blood vessels in the infarcted areas, CM-DiI labeled cells, and ANG protein expression, but significantly decreased infarcted area ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Transplantation of autologous angiogenin-overexpressing marrow stromal cells can yield a high survival rate of cells, greatly improving the blood supply of the infarcted cardiac area and cardiac function in porcine model.

[Key words] ischemic heart disease; marrow stromal cells; angiogenin; cell transplantation; adenovirus

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(6): 586-591]

冠状动脉(冠脉)梗阻导致心肌细胞缺血损伤、坏死而引发的缺血性心脏病是人类死亡的主要原因之一。健康细胞移植替代损伤、坏死心肌细胞可明显促进局部血管新生, 改善心功能, 防止心室壁变薄

[收稿日期] 2013-12-06 **[接受日期]** 2014-05-04

[基金项目] 福建省医学创新基金(2012-CX-5), Supported by Medical Innovation Program of Fujian Province(2012-CX-5).

[作者简介] 徐驯宇, 博士, 副教授、主任医师, 硕士生导师。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0591-88217453, E-mail: xunyux@126.com

及瘢痕的扩大^[1-2]。但在缺血环境中移植细胞成活率较低,提高细胞的成活率有助于进一步提高移植治疗效果。黄盛东等^[3]成功制备了血管生长素(angiotensin, ANG)衍生物重组腺病毒(Ad-ANG),并发现其具有促进缺血局部血管增生的潜能。因此,本研究将 Ad-ANG 体外转染自体骨髓基质细胞(marrow stromal cells, MSCs),再注射移植到慢性心肌缺血猪模型,观测缺血区心肌血管再生、MSCs 的成活情况及其对心功能的影响,以探讨高表达 ANG 的自体基质细胞移植对缺血性心脏病心功能的保护和促血管新生作用。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂 呼吸机、磁共振(MRI)仪及冠脉数字减影血管造影(DSA)机(德国 Siemens 公司);HP 5500 心脏彩色超声仪(美国 Hewlett-Packard 公司);荧光显微镜(德国 Leica 公司);冠脉缩窄环(Ameriod 环,美国 Research Instruments 公司);兔抗人 ANG 抗体,免疫组化染色试剂盒(美国 Santa Cruz 公司);抗兔辣根过氧化物酶(美国 Vector Laboratories 公司);ECL 化学发光系统(上海普飞生物科技有限公司);CM-DiI(美国 Molecular Probes 公司);胎牛血清、胰酶(美国 Gibco 公司);手术器械(上海手术器械厂)。

1.2 动物模型的建立及分组 选用 Yorkshire 实验猪 36 只,体质量 20~25 kg,雌雄不限,购自第二军医大学实验动物中心(许可证号:后医动字 1101 号)。动物模型的建立和缺血心肌 MSCs 细胞的注射均在麻醉下完成。麻醉采用气体吸入和静脉注射复合麻醉(氯胺酮 5 mg/kg,2%异氟烷吸入维持),气管插管。麻醉后右侧卧位,左侧经第 3 肋间进胸,打开心包暴露心脏,在冠脉左旋支(LCx)近心端安置冠脉缩窄环。术后恢复呼吸后,常规饲养。约在术后第 28 天常规冠脉造影,心脏短轴面经 TTC(1,3,5-三苯基氯化四氮唑)染色,评价动物模型的效果。模型动物随机分 3 组,每组 12 只。组 I 为高表达 ANG 的自体 MSCs 移植组(Ad-ANG-MSCs 组);组 II 为单纯自体 MSCs 移植组(Ad-null-MSCs 组);组 III 为注射无血清 DMEM 培养液的对照组(Control 组)。

1.3 高表达 ANG 的 MSCs 的制备 Ad-ANG 的获得:ANG 衍生物 cDNA 的克隆与测序,E1、E3 缺陷型重组腺病毒黏粒构建,Ad-ANG 的产生和扩增

详见文献^[3]。MSCs 的分离培养:骨髓细胞取自猪自体髂骨骨髓,利用 Ficoll 密度梯度离心法获得其中的骨髓基质细胞,贴壁培养(37℃、含 20%FBS 的 IMDM 培养液、5% CO₂、72 h)后获得高纯度的 MSCs^[4]。高表达 ANG 的 MSCs 的获得:Ad-ANG 转染培养细胞(感染复数为 50,24 h)。同时以 Ad-GFP(高表达绿色荧光蛋白)检验转染率,经检测该法可接近 100%的转染率。

1.4 活细胞标记及 MSCs 的注射移植 首先制备 MSCs 单细胞悬液,加入 CM-DiI,25℃ 下混悬 20 min。用荧光显微镜观察 MSCs 细胞可见染色均匀,红色荧光强度高于背景 100 倍,说明标记成功。MSCs 的注射移植:慢性心肌缺血模型一般在 4 周可成功建立。将经冠脉造影评价为成功的动物模型再次麻醉开胸,沿 LCx 分布的心肌缺血区均匀选择 9 个点进行 MSCs 的注射移植。组 I 注射移植高表达 ANG 的自体 MSCs;组 II 注射移植未转染 Ad-ANG 的自体 MSCs;组 III 则注射无血清 DMEM 培养液。细胞密度为 2×10^7 /mL,注射量约每点 0.5 mL。为防止细胞自针眼逆向流出,在针眼处心外膜用 6-0 prolene 线“U”字缝闭针眼。

1.5 冠脉造影 将实验动物麻醉,自股动脉建立动脉插管,DSA 机下完成。每只模型动物在注射移植 MSCs 前及注射移植后 4 周分别行两次冠脉造影,用于评估动物模型的建立(LCx 已完全闭塞或闭塞大于 95%认为是有效的动物模型),并评估移植治疗的效果。移植治疗效果常用侧支循环指数(Rentrop 计分法)进行评估:主血管完全充盈评为 3 分;主血管部分充盈评为 2 分;分支血管微弱充盈,主血管不充盈评为 1 分;未见到侧支血管评为 0 分^[5]。

1.6 心脏彩色超声检查 在实验动物麻醉状态下,采用心脏彩色超声仪检测心功能各项指标,如射血分数(EF)、缺血区心室壁厚度(IWT)、左室舒张末容积(LVEDV)等的变化。

1.7 病理组织学检查 在实验完成后处死动物(麻醉下推注高浓度 KCl 液),心脏停跳后立即取出心脏标本。左室梗死区的百分数计算:将标本沿心脏冠状面切成厚约 0.5 cm 薄片,并双面拍照,去除心房及右心室后,称量每一薄片。利用 Scion Image Analysis program 软件系统测出每一片心肌梗死区的百分数,并取上下两面间的平均值。左室梗死区的百分数等于每一片心肌梗死区的百分数与该片心肌质量的乘积之和除以整个左心室的总质量。成活的

移植细胞观察:制作冰冻切片,在荧光显微镜下观察 MSCs 注射移植区,比较成活 MSCs 细胞的分布、数量等。血管计数:常规制作石蜡切片,观察 MSCs 注射移植区的新生血管情况并计算总血管数。

1.8 蛋白质印迹检测 ANG 蛋白的表达 提取 MSCs 注射移植区组织样本蛋白,电泳、转膜。按顺序加入兔抗人 ANG 抗体、抗兔辣根过氧化物酶, ECL 显色。定量分析底片灰度 (Image-Quant 软件)。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件包进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, Rentrop 分数采用 Kruskal-Wallis 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 慢性缺血性心脏病猪模型的建立 3 只猪在建模手术后死亡,1 只猪在二次手术时失误导致死亡,另 1 只在二次手术后因感染死亡,剩余 31 只猪存活至实验完成,纳入后续研究。其中组 I 11 只,组 II 10 只,组 III 10 只。在两次外科手术中各组间的血流动力学(心率、血压)无差异。安放 Ameroid 环后 4 周,经冠脉造影示 LCx 100% 闭塞,LCx 支配区域无明显搏动;左前降支(LAD)支配区域则无改变,保持 100% 通畅;心脏短轴面经 TTC 染色,缺血或梗死心肌不着色,而正常心肌呈砖红色(图 1)。结果提示心肌慢性缺血猪模型成功建立。

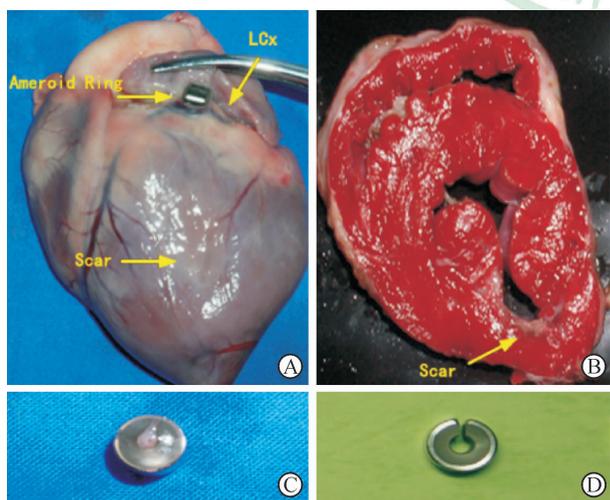


图 1 慢性心肌缺血动物模型的建立

Fig 1 Establishment of porcine chronic ischemic heart model A: An ameroid occluder around left circumflex (LCx) coronary artery and formation of the infarction area; B: A left ventricle cross-section showing the infarction area; C: An occluded ameroid ring 4 weeks after implantation; D: An pre-implantation ameroid ring

2.2 MSCs 移植前形态和 CM-DiI 染色 MSCs 形态呈梭形,贴壁生长,细胞生长较迅速(图 2A);荧光显微镜下, MSCs 细胞 CM-DiI 染色均匀,荧光强(图 2B)。

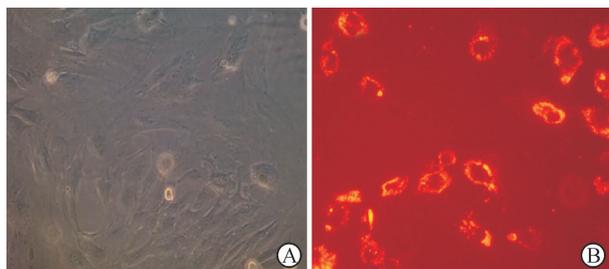


图 2 MSCs 移植前形态和 CM-DiI 染色

Fig 2 Pre-implanted marrow stromal cells (MSCs) morphology and CM-DiI staining under fluorescence microscopy

A: MSCs grew rapidly with spindle morphology; B: MSCs showed uniform CM-DiI staining. Original magnification: $\times 200$

2.3 冠脉造影及 Rentrop 评分 动物模型建立后经冠状动脉造影行 Rentrop 评分,各组差异无统计学意义。经过干预治疗,4 周后再行冠状动脉造影及 Rentrop 评分,显示组 I 分值升高最为显著,与治疗前及组 II 和组 III 治疗后比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 3, 表 1)。

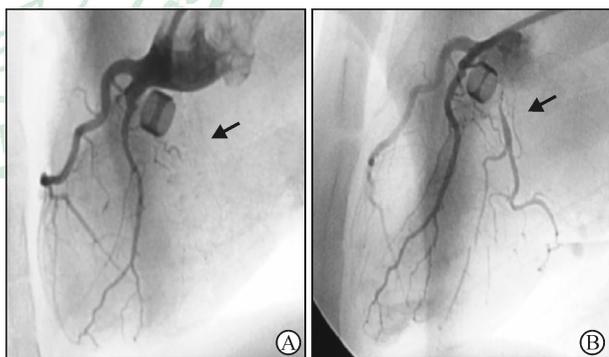


图 3 治疗前后冠脉造影比较

Fig 3 Comparison of coronary angiography analysis before and after treatment

The collateral vessel formation and enhanced perfusion of left circumflex (LCx) 4 weeks after marrow stromal cell implantation (arrows). A: Pre-treatment; B: Post-treatment

2.4 心脏超声检查 动物模型建立后,心脏彩色超声检查显示左心室明显增大,LCx 供血区心室壁变薄,心脏搏动减弱,收缩力降低,EF 明显降低。经干预治疗后 4 周,组 I 变薄心肌厚度有所增加, LV-EDV 减小,心肌收缩明显改善,EF 增加,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。组 II 改善程度较组 I 弱,组 III 则缺血区心室壁继续变薄,缺血区面积增大 ($P <$

0.01,表2~表4)。

表1 各组 Rentrop 分值的改变情况

Tab 1 Changes of Rentrop scores by coronary artery angiography in each group

Group	n	Pre-treatment	Post-treatment	$\bar{x} \pm s$ Δ Score
I	11	0.79±0.66	1.89±0.81**	1.10±0.31 $\Delta\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle$
II	10	0.86±0.69	1.32±0.76**	0.46±0.22 $\Delta\Delta$
III	10	0.78±0.71	1.01±0.75	0.23±0.11

Group I: Ad-ANG-MSCs group; Group II: Ad-null-MSCs group; Group III: Control group. ** $P < 0.01$ vs pre-treatment; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs group III; $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ vs group II. ANG: Angiogenin; MSCs: Marrow stromal cells; Δ Score: Rentrop score difference before and after treatment

表2 各组 EF 值的变化情况

Tab 2 Changes of ejection fraction (EF) by echocardiography in each group

Group	n	Pre-treatment	Post-treatment	$\bar{x} \pm s$ Δ EF
I	11	0.43±0.12	0.71±0.19**	0.28±0.19 $\Delta\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle$
II	10	0.45±0.09	0.58±0.18**	0.12±0.17 $\Delta\Delta$
III	10	0.45±0.15	0.40±0.16	-0.05±0.04

Group I: Ad-ANG-MSCs group; Group II: Ad-null-MSCs group; Group III: Control group. ** $P < 0.01$ vs pre-treatment; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs group III; $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ vs group II; ANG: Angiogenin; MSCs: Marrow stromal cells; Δ EF: EF difference before and after treatment

表3 各组缺血区心室壁厚度的变化情况

Tab 3 Changes of ischemic wall thickness (IWT) by echocardiography in each group

Group	n	Pre-treatment	Post-treatment	$\bar{x} \pm s$ l/mm, Δ IWT
I	11	8.2±1.8	9.8±1.3*	1.6±0.8 $\Delta\Delta\Delta\blacktriangle$
II	10	8.4±1.9	8.9±1.4*	0.6±0.7 $\Delta\Delta$
III	10	8.1±1.7	7.4±1.6	-0.7±0.6

Group I: Ad-ANG-MSCs group; Group II: Ad-null-MSCs group; Group III: Control group. * $P < 0.05$ vs pre-treatment; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs group III; $\Delta P < 0.05$ vs group II; ANG: Angiogenin; MSCs: Marrow stromal cells; Δ IWT: IWT difference of IWT before and after treatment

表4 各组左室舒张末容积的变化情况

Tab 4 Changes of left ventricular end diastolic volume (LVEDV) by echocardiography in each group

Group	n	Pre-treatment	Post-treatment	$\bar{x} \pm s$, V/mL Δ LVEDV
I	11	106±23	96±19*	-8±7 $\Delta\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle$
II	10	110±27	107±25	-3±3 $\Delta\Delta$
III	10	107±24	112±27	5±6

Group I: Ad-ANG-MSCs group; Group II: Ad-null-MSCs group; Group III: Control group. * $P < 0.05$ vs pre-treatment; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs group III; $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ vs group II; ANG: Angiogenin; MSCs: Marrow stromal cells; Δ LVEDV: LVEDV difference before and after treatment

2.5 病理组织学检查 左室侧壁 LCx 供血区心室壁厚度获得维持,组 I 心脏的几何构型接近正常,心肌缺血区面积较小(图 4A),组 III 心脏几何构型破坏,心肌缺血坏死区面积较大(图 4B)。组 I 缺血坏死百分数为(3.35±1.35)%,组 II 为(6.57±3.11)%,组 III 为(16.47±5.31)%,统计分析表明,组 I 与组 II、组 III 比较缺血区减小($P < 0.05$),组 II 较组 III 减小($P < 0.05$)。

在心肌缺血边缘,组 I 可见较大数量成活的经 CM-DiI 标记的移植细胞(图 4C),这些细胞与成纤维细胞和自体心肌细胞形成了较小的缺血区面积,维持了心脏的几何结构。组 II 也可见成活的经 CM-DiI 标记的移植细胞,但其呈零星样分布,数量明显较组 I 少。组 I 在缺血的边缘区明显可见新生血管形成(图 4D),其高倍视野下的血管数量为(33.5±11.6)个/HPF,而组 II、组 III 分别为(11.2±6.6)和(1.3±0.5)个/HPF。各组之间差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。

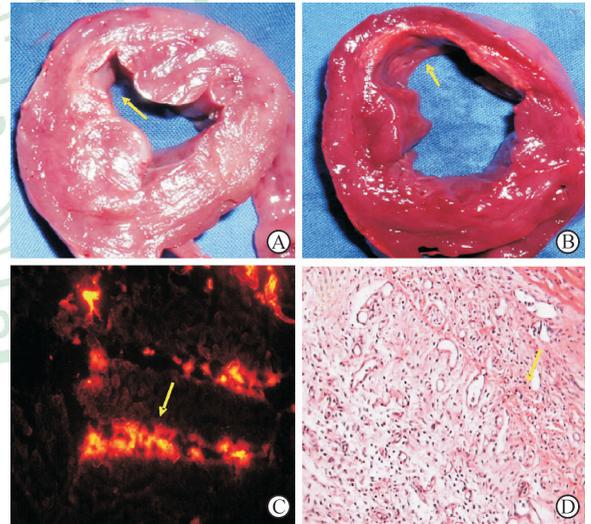


图4 病理学检查图片

Fig 4 Pathological examination

A: Group I (treated with autologous marrow stromal cells transfected with angiogenin) had smaller ischemic area, preserved thickness of the lateral wall, and the geometry of the left ventricle (arrow); B: Group III (treated with serum-free DMEM medium) had geometry loss of the left ventricle and ventricle wall thinning (arrow); C: Group I had a large number of CM-DiI labeled marrow stromal cells (arrow) on fluorescence microscope; D: Group I had distinct angiogenesis and increased vascular vessels in the marginal zone by H-E staining. Original magnification: $\times 100$ (C), $\times 200$ (D)

2.6 心肌 ANG 蛋白的表达 组 I 左室侧壁缺血区 ANG 蛋白相对表达量为 0.325±0.058,组 II 为

0.079±0.025,组Ⅲ为0.091±0.019,前者明显高于后两者($P<0.01$),后两者间差异无统计学意义。

3 讨论

一系列研究证实细胞移植能明显增强缺血心肌心功能,但机制并不明确^[6-8]。目前比较明确的观点是细胞移植能够促进血管新生,改善局部血液供应,维持心室壁厚度,防止心室扩张,进而改善心功能,推迟心功能衰竭的发生^[9-10]。然而移植细胞在缺血环境中能否成活及成活时间长短是影响其治疗效果的重要因素。由于植入体内的 Ameroid 环缓慢膨胀,使环内的血管逐渐缩窄,约经过3~4周可使血管完全闭塞,因此较好地模拟了人类由于粥样斑块形成逐渐阻塞冠状动脉而形成缺血性心脏病的慢性病理过程。猪作为大型动物,被认为是建立最接近人的慢性缺血性心脏病模型的动物^[11-12]。本研究中冠脉造影提示几乎所有动物均形成满意的模型。

移植 MSCs 能够维持心室壁厚度,防止心室几何结构破坏,从而改善心功能,这是由于其具有多向分化潜能的多能干细胞的特性,能分化成多种细胞类型,自我更新,替代缺血坏死的细胞、组织,达到治疗缺血性心脏病的目的^[11]。由于 MSCs 获得较为方便,细胞易于培养扩增,经常被应用为基因载体。本实验正是利用了这些特性,选用 MSCs 作为移植细胞。此外,应用自身的 MSCs 可避免异体移植所引起的免疫原性,从而提高了 MSCs 在缺血区的成活率。

ANG 属 RNA 酶超家族,相对分子质量约为 14 400,具有较为强大的促血管生成作用^[13-14]。体外实验发现 ANG 能够对包括平滑肌细胞、内皮细胞等表现出很强的促细胞增殖、增生作用;体内实验也显示其能够在局部刺激形成新生血管,促进局部血供^[15-16]。腺病毒介导的基因转染具有很高的转染效率(接近 100%),性质较稳定,对人类相对安全,且其宿主范围广,包装容量大,可达到很高滴度,在体内基因转移中具有较大优势。因此本研究采用腺病毒作为转染载体,蛋白质印迹结果也证实移植转染 Ad-ANG 的细胞 4 周后缺血心肌仍较强地表达 ANG 蛋白。

CM-DiI 是一种细胞膜荧光染色剂,通过与膜结构的脂质分子结合而标记细胞,染色率可达 100%,有着强而稳定的红色荧光。CM-DiI 对细胞无毒,对染色细胞的生长、分裂、分化和活力均无影响,可通过细胞分裂使子代细胞膜染色;且稳定长效,可在细胞表面保持半年到 1 年^[17]。本实验中,在移植后的

4 周,荧光显微镜下可见具有稳定红色荧光的移植细胞,说明 CM-DiI 是个良好的示踪剂,能够有效显示移植细胞在活体组织中的迁移及分化。

在本实验中,经心脏彩色超声检查并计算缺血区大小后发现,移植转染 Ad-ANG 的 MSCs 使 EF 增加,心脏功能较前明显改善,心室壁厚度增加,有效地防止心室几何结构破坏。未转染 Ad-ANG 的 MSCs 移植亦能使心功能改善,但其改善的程度较转染组小,而对照组则心室壁厚度进一步变薄,缺血梗死面积扩大,与既往文献^[4,6,11,18]结果类似。

针对转染 Ad-ANG 是否使局部 ANG 蛋白表达增高、是否促进局部血管增生以及是否促进移植的 MSCs 成活,本实验发现,转染组(组 I) Rentrop 计分、缺血区血管计数、ANG 蛋白表达高于其余两组;荧光显微镜下可见大量标记 CM-DiI 的移植细胞,而未转染组(组 II),其移植细胞成活的数量远较组 I 少。这些结果提示转染 Ad-ANG 的 MSCs 可以分泌较高水平的 ANG,能更好地促进局部血管新生,改善局部内环境,从而提高移植细胞的成活率,促进和改善心功能。

我们前期曾应用腺病毒介导的血管内皮生长因子(VEGF)进行类似实验^[19]。VEGF 能够较强烈地促进血管内皮细胞生长并诱导血管形成,但常使血管通透性增高;ANG 能对内皮细胞起作用,还能刺激血管平滑肌细胞及成纤维细胞增生,因此可能作用更强大。本实验虽未对 ANG 和 VEGF 进行比较,但我们观察发现 ANG 的促血管生成作用等同或超过 VEGF 的作用。

综上所述,将 Ad-ANG 转染 MSCs 并移植至缺血区心肌,不仅能通过 MSCs 细胞在局部产生促血管新生的 ANG 蛋白,改善局部血供,挽救缺血区受到损害的心肌细胞,提高移植细胞的成活率,而且移植的 MSCs 具有多向分化潜能,能分化成不同细胞类型,替代缺血坏死的心肌组织细胞。这种方法的两种效果在治疗缺血性心脏病中可达到协同和叠加作用,加之自体 MSCs 易获取、扩增且不具有免疫原性,因此应用转染 Ad-ANG 的 MSCs 移植治疗缺血性心脏病具有明确的优越性和良好的临床应用前景。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Williams A R, Trachtenberg B, Velazquez D L, McNiece

- I, Altman P, Rouy D, et al. Intramyocardial stem cell injection in patients with ischemic cardiomyopathy: functional recovery and reverse remodeling [J]. *Circ Res*, 2011, 108:792-796.
- [2] Karpov A A, Uspenskaya Y K, Minasian S M, Puzanov M V, Dmitrieva R I, Bilibina A A, et al. The effect of bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation on myocardial remodeling in the rat model of ischaemic heart failure [J]. *Int J Exp Pathol*, 2013, 94:169-177.
- [3] 黄盛东,董书强,张宝仁,梅 举,李白翎. 人血管生长素衍生物的重组腺病毒制备[J]. *第二军医大学学报*, 2000, 21:420-422.
- Huang S D, Dong S Q, Zhang B R, Mei J, Li B L. Preparation of human D116H-ANG recombinant adenovirus [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2000, 21:420-422.
- [4] Zeng B, Lin G, Ren X, Zhang Y, Chen H. Over-expression of HO-1 on mesenchymal stem cells promotes angiogenesis and improves myocardial function in infarcted myocardium [J]. *J Biomed Sci*, 2010, 17:80.
- [5] Balci B, Yilmaz O. Extent of coronary collateral vessel decrease with advanced age [J]. *Acta Cardiol*, 2004, 59:431-434.
- [6] Habib M, Shapira-Schweitzer K, Caspi O, Gepstein A, Arbel G, Aronson D, et al. A combined cell therapy and *in-situ* tissue-engineering approach for myocardial repair [J]. *Biomaterials*, 2011, 32:7514-7523.
- [7] Mauritz C, Martens A, Rojas S V, Schnick T, Rathert C, Schecker N, et al. Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived Flk-1 progenitor cells engraft, differentiate, and improve heart function in a mouse model of acute myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32:2634-2641.
- [8] Rajasingh J, Thangavel J, Siddiqui M R, Gomes I, Gao X P, Kishore R, et al. Improvement of cardiac function in mouse myocardial infarction after transplantation of epigenetically-modified bone marrow progenitor cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6:e22550.
- [9] Park J H, Yoon J Y, Ko S M, Jin S A, Kim J H, Cho C H, et al. Endothelial progenitor cell transplantation decreases lymphangiogenesis and adverse myocardial remodeling in a mouse model of acute myocardial infarction [J]. *Exp Mol Med*, 2011, 43:479-485.
- [10] Picichè M, Fadel E, Kingma J G Jr, Dagenais F, Robillard J, Simard D, et al. Blood flow to the heart from noncoronary arteries: an intriguing but challenging research field [J]. *Cardiovasc Revasc Med*, 2012, 13:25-29.
- [11] Lassaletta A D, Chu L M, Robich M P, Elmadhun N Y, Feng J, Burgess T A, et al. Overfed Ossabaw swine with early stage metabolic syndrome have normal coronary collateral development in response to chronic ischemia [J]. *Basic Res Cardiol*, 2012, 107:243.
- [12] Loffredo F S, Steinhauser M L, Gannon J, Lee R T. Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8:389-398.
- [13] Pizzo E, Sarcinelli C, Sheng J, Fusco S, Formiggini F, Netti P, et al. Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 regulates stress-induced subcellular localization of angiogenin and controls its growth and survival activities [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 18):4308-4319.
- [14] Kendall A C, Whatmore J L, Harries L W, Winyard P G, Smerdon G R, Eggleton P. Changes in inflammatory gene expression induced by hyperbaric oxygen treatment in human endothelial cells under chronic wound conditions [J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318:207-216.
- [15] Jang S H, Song H D, Kang D K, Chang S I, Kim M K, Cho K H, et al. Role of the surface loop on the structure and biological activity of angiogenin [J]. *BMB Rep*, 2009, 42:829-833.
- [16] Trouillon R, Kang D K, Park H, Chang S I, O'Hare D. Angiogenin induces nitric oxide synthesis in endothelial cells through PI-3 and Akt kinases [J]. *Biochemistry*, 2010, 49:3282-3288.
- [17] Hu K X, Wang M H, Fan C, Wang L, Guo M, Ai H S. CM-Dil labeled mesenchymal stem cells homed to thymus inducing immune recovery of mice after haploidentical bone marrow transplantation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11:1265-1270.
- [18] Tang T, Wu M, Yang J. Transplantation of MSCs transfected with SHH gene ameliorates cardiac dysfunction after chronic myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168:4997-4999.
- [19] 徐驯宇,黄盛东,陆方林,崔 勇,鲍春荣,张宝仁,等. Ad. VEGF 转染自体骨髓基质细胞移植治疗猪慢性缺血性心脏病 [J]. *第二军医大学学报*, 2005, 26:381-385.
- Xu X Y, Huang S D, Lu F L, Cui Y, Bao C R, Zhang B R, et al. Transplantation of VEGF gene transfected autologous marrow stromal cells in a porcine chronic ischemic heart model [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2005, 26:381-385.