

莫诺昔对脑缺血再灌注大鼠皮层肝细胞生长因子及血管性血友病因子表达的影响

魏仁平^{1,2}, 孙芳玲², 刘婷婷², 程 华², 艾厚喜²,
郭德玉², 田 欣², 祝自新², 王宇峰², 郑文荣², 王 文^{1,2,3}

(1. 河北北方学院, 河北 张家口 075000; 2. 首都医科大学宣武医院实验动物室, 北京市老年病医疗研究中心, 北京 100053; 3. 北京市脑重大疾病研究院, 北京 100069)

【摘要】 目的 研究莫诺昔对脑缺血再灌注 7 d 大鼠患侧皮层肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 及血管性血友病因子 (von willebrand factor, vWF) 表达的影响。**方法** 25 只健康成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠采用改良 Zealanga 线栓法制备大鼠大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型, 术后随机分为假手术组、模型组、莫诺昔小剂量组、中剂量组及大剂量组, 每组 5 只。造模后 3 h 按照 30, 90, 270 mg/kg 剂量每天一次灌胃给予莫诺昔。免疫印迹法和免疫荧光法分别检测莫诺昔对脑缺血再灌注 7 d 大鼠患侧皮层 HGF 及 vWF 表达的影响。**结果** 脑缺血再灌注 7 d 后, 免疫印迹法显示, 与假手术组相比, 模型组 HGF 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 同模型组相比, 莫诺昔给药组 (30 mg/kg, 90 mg/kg, 270 mg/kg) HGF 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。免疫荧光法显示, 与假手术组相比, 模型组 vWF 表达显著升高 ($P < 0.001$); 同模型组相比, 莫诺昔中、大剂量组 (90 mg/kg, 270 mg/kg) vWF 表达显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。**结论** 莫诺昔可以上调 HGF 及 vWF 在脑内的表达, 促进局灶性脑缺血大鼠血管新生。

【关键词】 莫诺昔; 脑缺血再灌注; 免疫印迹; 免疫荧光; HGF; vWF

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0024-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.006

Effects of morroniside on the expression of the HGF and vWF in peri-infarct cortex after cerebral ischemia-reperfusion in rats

WEI Ren-ping^{1,2}, SUN Fang-ling², LIU Ting-ting², CHENG Hua¹, AI Hou-xi², GUO De-yu²,
TIAN Xin², ZHU Zi-xin², WANG Yu-feng², ZHENG Wen-rong², WANG-Wen^{1,2,3}

(1. Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075000, China; 2. Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases of Ministry of Education, Beijing 100053, China;
3. Beijing Institute for Brain Disorders, Beijing 100069, China)

【Abstract】 Objective To study the effects of morroniside on the expression of the HGF and vWF of the ischemic ipsilateral cortex 7 days after ischemia reperfusion. **Methods** 25 male Sprague-Dawley rats were subjected to MCAO model with modified Zea Longa's method, then randomly divided into sham group ($n=5$), ischemia group ($n=5$), and morroniside groups (low, medium, and high dosage groups, $n=5$). Morroniside were then administered intragastrically

【基金项目】 国家自然科学基金 (81373994; 81173575); “重大新药创制”科技重大专项 (2012ZX09102201-106)。

【作者简介】 魏仁平 (1988-), 女, 硕士生, 主要研究方向: 神经药理。E-mail: weirenping1@126.com。

【通讯作者】 王文 (1968-), 男, 研究员, 研究方向: 神经药理, 中药药理。E-mail: lzwwang@163.com。

once a day at dose of 30 mg/kg, 90 mg/kg and 270 mg/kg after operation. The expression of HGF and vWF of the ischemic ipsilateral cortex were detected by western blotting and Immunofluorescence 7 days after ischemia-reperfusion.

Results Compared with the sham group, the expression of HGF in ischemia group increased significantly ($P < 0.01$) 7 days after MCAO. Compared with the ischemia group, the expression of HGF in the morroniside groups (30 mg/kg, 90 mg/kg, 270 mg/kg) showed significant increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). Compared with the sham group, the expression of vWF in ischemia group increased significantly ($P < 0.001$). Compared with the ischemia group, the expression of vWF in the morroniside groups (90 mg/kg, 270 mg/kg) showed significant increased ($P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** Morroniside could increase the expression of HGF and vWF in the ischemic ipsilateral cortex, promoting the process of angiogenesis in focal cerebral ischemia rat.

[Key words] Morroniside; Cerebral ischemia-reperfusion; Western blotting; Immunofluorescence; HGF; VWF

成年动物缺血性脑损伤后可使神经血管单元的微环境改变,能够诱导血管发生,但所诱发的神经血管因子的高表达只是在短时间内有明显变化,自体应激产生血管新生过程短暂,不足以恢复神经血管单元稳态,因此需要通过外源性药物等作用增强和加速内源性脑神经血管稳态重构,促进血管新生。肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是一种多肽生长因子,能特异性的促进内皮细胞增殖^[1],进而促进缺血组织的血管新生。因此 HGF 可作为一种有效的促血管新生因子和神经保护因子,对缺血性脑损伤后的血管新生和神经发生等起重要作用^[2]。血管性血友病因子 (von willebrand factor, vWF) 是由血管内皮细胞及巨核细胞合成和分泌,是一种存在于血浆、内皮细胞表面的糖蛋白,可作为血管内皮细胞的标记物^[3]。

药物莫诺昔是从中药山茱萸中分离得到的单体化合物。前期研究发现,莫诺昔能减小局灶性脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积、促进内源性的神经干细胞增殖、促进血管生成素 1 (Ang-1) 及其受体 (Tie-2) 的表达^[4-8],促进血管新生。本研究采用 MCAO 模型观察脑缺血再灌注 7 d 后患侧皮层 HGF 及 vWF 的表达变化,进一步探讨莫诺昔对缺血性脑损伤后血管新生的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

尼龙栓线,直径 0.26 mm (2634-100): 北京沙东生物技术有限公司;超声波细胞破碎粉碎机: JY92-II 型,宁波市新芝科技研究所;电泳仪和小型垂直电泳槽: 美国 Biorad 公司;高分辨率多模式分子成像系统: 美国 Carestream Health 公司;全波长酶标仪: 美国 Thermo Fisher 公司。HGF 抗体: Abcam; β -actin 抗体: 中山金桥; vWF 抗体: Millipore; CY3-标

记荧光二抗: Invitrogen。

化合物莫诺昔,白色结晶,由宣武医院药物研究室自行从山茱萸中提取制备,高效液相色谱仪对组分进行分析 (C18 柱,柱温 35℃,乙腈-水混合 (15:85) 洗脱糖苷类,流速 1.0 mL/min,检测波长 240 nm),纯度 98.5%。

1.2 实验动物分组及给药

SPF 级健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 25 只,体重 260 ~ 280 g,购于北京维通利华实验动物中心【SCXK (京) 2006-0009】,由首都医科大学宣武医院 SPF 级实验动物室常规饲养【SYXK (京) 2010-0013】,预适应环境 1 周后进行实验,环境温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$,湿度 $55 \pm 5\%$ 。将大鼠编号 1 ~ 25 只,用随机数字表法分为假手术组、模型组、莫诺昔小 (30 mg/kg)、中 (90 mg/kg)、大 (270 mg/kg) 剂量组,共 5 组,每组 5 只。莫诺昔溶于蒸馏水, MCAO 造模后 3 h 按照 30、90、270 mg/kg 剂量每天一次灌胃给药,连续给药 7 d。假手术组和模型组给予等体积的蒸馏水。

1.3 MCAO 模型制备及行为学评分

模型的制备参照 Longa 法^[9]并稍加改进。本实验经过首都医科大学宣武医院伦理委员会评估,尊重实验中动物的福利。大鼠术前禁食不禁水 12 h。称重后将体重在 260 ~ 280 g 之间的大鼠用 10% 水合氯醛 4 mL/kg 进行腹腔注射麻醉。将麻醉后的大鼠仰卧置于手术操作台上,用安尔碘进行颈部周围消毒。在大鼠右侧颈部切口约 2 cm 后,对肌肉及筋膜进行分离,注意避开甲状腺。暴露右侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA),分离出右侧颈内动脉 (internal carotid artery, ICA) 和颈外动脉 (external carotid artery, ECA)。结扎 ECA 接近分叉处及 CCA 近心端,用动脉夹夹闭 ICA,在 CCA 用眼科剪剪一个斜行的细小切口,将栓线小心插入,缓慢轻推栓

线进入 ICA,直到产生阻挡感,说明栓线已经经 CCA 分叉处,通过 ICA 入颅进入了大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA),到达了大脑前动脉(anterior cerebral artery, ACA)起始部,阻断 MCA 的所有血供,造成了大脑中动脉阻塞。缝合肌肉,并在创口处涂少量青霉素,以预防伤口感染。栓塞 30 min 后,用眼科镊缓慢向外拔出栓线,实现再灌注。假手术组大鼠不插入栓线,其余操作与 MCAO 手术组相同。

MCAO 手术后的动物置于温控毯上 36.5℃ ~ 37.5℃ 保暖,直至动物苏醒后观察其行为。采用 Ludmila Belayev 12 分评分法进行术后行为学评分^[10]:1)提尾悬空试验:无明显神经功能缺失为 0 分,梗死对侧肢体屈曲为 1 分,侧推试验阳性为 2 分。2)前肢放置试验:A 视觉亚试验,实验者将动物握于手中,使其前爪悬空,让动物位于桌子前方,自桌面上方 10 cm 处向桌面缓慢斜线靠近,大鼠正常反应为前肢即抓向桌面,损伤大鼠则表现为肢体反应延迟。0 分:动物肢体放置反应正常;1 分:反应延迟但不超过 2 s;2 分:反应延迟且超过 2 s。侧方刺激,让动物位于桌子侧方,实验检测方法及评分标准同前方刺激。B 触觉亚实验:将动物双眼遮住,并使其前爪悬空,用其前爪背刺轻触桌面,刺激深度仅达皮肤和毛发,动物反应及评分通视觉试验,触觉刺激同样分前方和侧方刺激。C 本体觉亚实验:操作及评分同触觉亚实验,仅刺激深度不同,本体觉亚实验给予前爪较大压力,刺激深达肌肉及关节。评分 4 ~ 10 分为造模成功,选择入组。采用差额补充方法补足各组设计所需大鼠数量。

1.4 Westernblotting 分析 HGF 蛋白表达

造模 7 d 后将大鼠用 10% 水合氯醛 400 mg/kg 腹腔注射麻醉,迅速剥离大脑并将脑膜剥去,取出患侧皮层包入锡箔纸中,放入液氮中冻存片刻后,于 -80℃ 保存。取出患侧皮层于 5 mL EP 管中称重,加入预冷的裂解液 7 μL/mg 新鲜组织、PMSF 1 μL/100 μL RIPA,冰上充分超声粉碎。4℃ 12000 r/min 离心 30 min,取上清。采用 BCA 法定量蛋白浓度,并加入裂解液,调节各组总蛋白浓度一致。总蛋白加入 5 × 上样缓冲液 1:4 稀释,95℃ 变性 10 min。

取新鲜大鼠患侧皮层脑组织裂解提取蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳(分离胶 10%,浓缩胶 5%),每孔加入 50 μg 样品,先恒压 60 V 电泳 60 min;然后恒

压 90V 电泳至分离胶底部,电转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入 1:1000 稀释的兔抗大鼠 HGF 单克隆抗体,4℃ 过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,再加入 1:2000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP,室温摇床孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,ECL 试剂显色、曝光并拍照,以 β-actin 作为内参,将曝光后的图片导入软件 Quantity One 中分析。实验重复 3 次。

1.5 免疫荧光分析 vWF 表达水平

1.5.1 灌注及大脑切片

10% 水合氯醛 4 mL/kg 腹腔注射麻醉,固定四肢,迅速开胸暴露心脏,从左心室插管至主动脉根部,在右心耳剪开一小口做出口。快速灌注生理盐水,待右心耳流出液无色透明时,换 4% 多聚甲醛 150 mL 快速灌注,之后稍减慢灌注速度至动物四肢变硬。30 min 后断头取脑,将脑组织浸于 4% 多聚甲醛中。固定完全后,将脑标本从后固定液中取出,进行冠状面冰冻切片,厚度为 40 μm。

1.5.2 免疫荧光染色

大脑切片用 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;置 0.1% Triton 破膜 20 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;加入 10% 正常山羊血清,室温孵育 2 h,倾去;分别加入 1:200 的 vWF 一抗,4℃ 孵育 24 h,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;加入 CY3-标记山羊抗鼠 IgG,室温孵育 2 h,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;滴一滴封片剂封片,晾干;正置荧光显微镜观察并摄片,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件计算 vWF 阳性血管的数目。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ 表示。应用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),采用 Scheffe 法进行组间两两比较,以 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫印迹法观察莫诺昔对缺血性脑损伤后 HGF 表达的影响

脑缺血再灌注 7 d 后,与假手术组相比,模型组 HGF 蛋白表达显著升高($P < 0.01$);同模型组大鼠相比,莫诺昔给药小剂量组(30 mg/kg)HGF 蛋白表达水平提高,具有统计学意义($P < 0.05$);莫诺昔中剂量组(90 mg/kg)和大剂量组(270 mg/kg)HGF 蛋白表达显著升高($P < 0.01$, $P < 0.01$)(图 1,表 1)。

表 1 免疫印迹法检测 HGF 表达变化统计结果

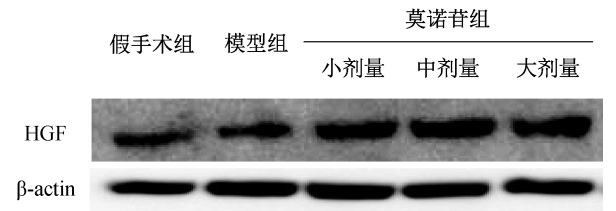
Tab.1 The statistical results of HGF expression changed by western blot

组别 Group	HGF/β-actin (Mean ± SEM)	P 值 p value
假手术组 (sham)	0.3384 ± 0.0096	0.001
模型组 (model)	0.5295 ± 0.0233 ^{##}	—
莫诺昔小剂量组 (30 mg/kg) Morrisonide (30 mg/kg)	0.6333 ± 0.0263 [*]	0.044
莫诺昔中剂量组 (90 mg/kg) Morrisonide (90 mg/kg)	0.6960 ± 0.0137 ^{**}	0.002
莫诺昔大剂量组 (270 mg/kg) Morrisonide (270 mg/kg)	0.8391 ± 0.0182 ^{***}	0.000

注: n = 5, Meam ± S. E. M. ^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01, ^{***} P < 0.001 与模型组相比; ^{##} P < 0.01 与假手术组相比。
Note: n = 5, Meam ± S. E. M. ^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01, ^{***} P < 0.001 vs. model; ^{##} P < 0.01 vs. sham.

2.2 免疫荧光法观察莫诺昔对缺血性脑损伤后 vWF 阳性血管数目的影响

vWF 免疫荧光染色结果显示:局灶性脑缺血后 7 d,模型组梗死灶周围可以看见一些清晰的 vWF 阳性血管结构(图 2B),莫诺昔给药中剂量组(90 mg/kg,图 2D)和大剂量组(图 2E)的 vWF 阳性血管数量明显增多。对 vWF 阳性血管数量进行统计,结果显示,与假手术组相比,模型组 vWF 阳性血管数量显著增加(P < 0.001);与模型组相比,莫诺昔中、大剂量组(90 mg/kg、270 mg/kg)的 vWF 阳性血管数量显著增多(P < 0.01, P < 0.001);莫诺昔小剂量组(30 mg/kg) vWF 阳性血管数量与模型组比无明显差别(图 2,表 2)。



注:A:假手术组;B:模型组;C:莫诺昔小剂量组(30 mg/kg);
D:莫诺昔中剂量组(90 mg/kg);E:莫诺昔大剂量组(270 mg/kg)。

图 2 各组大鼠患侧皮层 vWF 免疫荧光染色
(×20 标尺=50 μm)

Note:A: sham group; B: model group;
C: low morrisonide group (30 mg/kg);
D: middle morrisonide group (90 mg/kg);
E: high morrisonide group (270 mg/kg).

Fig.2 vWF expressions in the ischemic ipsilateral cortex of the rats in each group stained by immunofluorescence(×20 Bar=50 μm)

表 2 免疫荧光检测 vWF 血管数量统计结果

Tab.2 The statistical results of vWF vessels tested by immunofluorescence

组别 Group	vWF vessels/mm ² (Mean ± SEM)	P 值 p value
假手术组 (Sham)	10.2000 ± 0.8602	0.000
模型组 (Model)	29.4000 ± 2.9428 ^{###}	—
莫诺昔小剂量组 (30 mg/kg) Morrisonide (30 mg/kg)	31.4000 ± 1.1662	1.000
莫诺昔中剂量组 (90 mg/kg) Morrisonide (90 mg/kg)	48.8000 ± 2.1541 ^{**}	0.01
莫诺昔大剂量组 (270 mg/kg) Morrisonide (270 mg/kg)	63.8000 ± 1.8547 ^{***}	0.000

注: n = 5, Meam ± S. E. M. ^{**} P < 0.01, ^{***} P < 0.001 与模型组相比; ^{###} P < 0.001 与假手术组相比。
Note: n = 5, Meam ± S. E. M. ^{**} P < 0.01, ^{***} P < 0.001 vs. model; ^{###} P < 0.001 vs. sham.

3 讨论

脑卒中因其高致残率及高死亡率已严重威胁人类健康,成为我国居民第二死因和成人第一位致残原因^[11]。其中,缺血性脑卒中,在中国脑血管疾病中居第一位^[12],因此一直以来是临床研究的热点。对于缺血性脑卒中来说,脑血管重塑过程依赖于局部产生的血管生长因子,当局部组织损伤后,刺激血管生长因子释放,然后到达预先存在的血管内皮细胞,刺激其发生一系列生物活性和表型的改变,进而使血管芽生,形成有功能腔的导管^[13]。新生的血管可为神经发生提供神经营养因子,并为新生的神经细胞迁移到缺血周边区域提供依附的支架,是梗死周边区域脑组织抗损伤和神经元修复的结构基础^[14-16]。此外,有研究表明缺血性脑损伤患者脑内新生血管密度与患者的存活时间存在相关性,新生血管密度增加多的患者,预后较好^[17]。

肝细胞生长因子 HGF 等能通过不同的分子途径促进内皮细胞的分裂和增殖从而促进缺血组织的血管新生^[18]。Miyagawa^[19]等将载有 HGF 基因的质粒转染入小鼠心梗心肌,发现能活化转录因子 ETs,使梗死范围减少,梗死区血管新生较单纯心肌细胞移植组显著增加。HGF 过表达能刺激血管新生和侧支血管形成^[20]。可见,HGF 在新生血管形成过程中发挥重要的作用。并且不论在体内还是体外试验,HGF 的促血管生成活性已被证实比 VEGF 及 bFGF 更强一些^[21-22]。

vWF 是一种大分子糖蛋白,内皮细胞是血浆 vWF 的主要合成场所。vWF 在成人糖尿病和心血管疾病中表达升高,vWF 水平升高是内皮细胞损伤

或激活的标志^[23]。vWF 是血管内皮细胞 (vascular endothelial cells, VEC) 特异性标志之一^[24], 因此常用来鉴定 VEC, 检测血管新生。

本研究发现, 在大鼠局灶性脑缺血再灌注 7 d 时, 模型组患侧皮层 HGF、vWF 表达明显上调, 提示缺血性脑损伤使脑梗死边缘区神经血管微环境改变, 诱导 HGF 的表达短时间内升高, 血管数量增加。而灌胃给予莫诺昔后, HGF、vWF 表达水平比模型组进一步提高, 且升高水平与莫诺昔给药剂量表现出正相关趋势, 表明莫诺昔能促进缺血性脑损伤后 HGF 的表达增强, 促进内皮细胞增殖, 进而促进血管新生。结合前期的研究, 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠血管新生相关因子血管生成素 1 及其受体 Tie-2 具有显著的促进作用^[13], 我们推测莫诺昔通过促进 HGF 表达, 改善神经血管修复的微环境, 进而发挥促血管新生的作用。

参考文献:

- [1] Yu F, Lin Y, Zhan T, *et al.* HGF expression induced by HIF-1 α promote the proliferation and tube formation of endothelial progenitor cells[J]. *Cell Biol Int*, 2015, 39(3): 310–317.
- [2] Sobrino MN, Rosell A, Guillaumon M, *et al.* A large screening of angiogenesis biomarkers and their association with neurological outcome after ischemic stroke[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 216: 205–211.
- [3] Du R, Wang Y, Teng JF, *et al.* Effect of integrin combined laminin on peripheral blood vessel of cerebral infarction and endogenous nerve regeneration [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2015, 29(1): 167–174.
- [4] 艾厚喜, 李蕾, 许栋明, 等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠皮层总抗氧化能力影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2009, 15(9): 833–834.
- [5] 艾厚喜, 汪莹, 许栋明, 等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠皮层 IL-1 β 的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2010, 16(10): 928–930.
- [6] 汪莹, 高东明, 许栋明, 等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠 caspase-3 活化程度的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2010, 16(9): 801–802.
- [7] Fang-Ling Sun, Wen Wang, Wei Zuo, *et al.* Promoting neurogenesis via Wnt/ β -catenin signaling pathway accounts for the neurorestorative effects of morroniside against cerebral ischemia injury [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2014, 738: 214–221.
- [8] 刘婷婷, 孙芳玲, 程华, 等. 莫诺昔对局灶性脑缺血再灌注大鼠血管生成素 1 及其受体 Tie-2 的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2015, 21(1): 9–11.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. *Stroke*,

- 1989, 20(1): 84–91.
- [10] Belayev L, Alonso OF, Busto R, *et al.* Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model[J]. *Stroke*, 1996, 27(9): 1616–1622.
- [11] Feigin VL, Global and regional burden of stroke during 1990–2010; findings from the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2014, 383(9913): 245–254.
- [12] Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA, *et al.* Mechanisms, challenges and opportunities in stroke [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4(5): 399–415.
- [13] Paola Chiodelli. Heparin/Heparan sulfate proteoglycans glycomic interactome in angiogenesis: biological implications and therapeutical use[J]. *Molecules*, 2015, 20(4): 6342–6388.
- [14] Goldman SA, Chen Z. Perivascular instruction of cell genesis and fate in the adult brain[J]. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 1382–1389.
- [15] Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, *et al.* A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery [J]. *J Neurosci*, 2006, 26: 1269–1274.
- [16] Wang L, Chopp M, Gregg SR, *et al.* Neural progenitor cells treated with epo induce angiogenesis through the production of vegf[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28: 1361–1368.
- [17] Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, *et al.* A Neurovascular niche for neurogenesis after stroke[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(50): 13007–13016.
- [18] Cao Z, Wang X. The endocrine role between β cells and intra-islet endothelial cells[J]. *Endocr J*, 2014, 61(7): 647–654.
- [19] Pyun WB, Hahn W, Kim DS, *et al.* Naked DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor induces collateral artery augmentation in a rabbit model of limb ischemia[J]. *Gene Ther*, 2010, 17(12): 1442–1452.
- [20] Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, *et al.* Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty [J]. *Circulation*, 2002, 105(21): 2556–2562.
- [21] Fumihiro Sanada, Yoshiaki Taniyama, Junya Azuma, *et al.* Therapeutic Angiogenesis by Gene Therapy for Critical Limb Ischemia; Choice of Biological Agent [J]. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*, 2014, 14(1): 32–39.
- [22] Nakamura M, Takahashi T, Matsui H, *et al.* TAlteration of angiogenesis in *Helicobacter heilmannii*-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: interaction with c-Met and hepatocyte growth factor[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29(4): 70–76.
- [23] Lip GY, Blann A. Von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders [J]? *Cardiovasc Res*, 1997, 34(2): 255–265.
- [24] Jaffe EA, Nachman RL, Becher CG, *et al.* Cultured of human endothelial cells derived from umbilical vein. Identification by morphologic and immunologic criteria[J]. *J Clin Invest*, 1973, 52: 2745–2756.