

VEGF 重组质粒 pcDNA/V 的构建及其在大鼠急性心肌缺血模型中的表达 Construction of VEGF Recombinant Plasmid pcDNA/V and its Expression in Model Rats with Acute Myocardial Ischemia

王雅梅 刘 冰 孙丽翠 闫豫东 司 杨 祁雅慧*

WANG Ya-Mei , LIU Bing , SUN Li-Cui , YAN Yu-Dong , SI Yang and Qi Ya-Hui *

首都医科大学实验中心, 北京 100054

Experiment Center , Capital University of Medical Sciences , Beijing 100054 , China

摘 要 构建人血管内皮细胞生长因子(VEGF₁₆₅)真核表达载体,并研究其在细胞水平和大鼠急性心肌梗死动物模型中的表达。利用 RT-PCR 方法,从扁桃腺组织中扩增人 VEGF₁₆₅ 基因,构建真核表达载体 pcDNA/V。应用脂质体介导的基因转移技术,将 pcDNA/V 转染至人胚肾细胞(293 细胞)中,经 G418 筛选获得稳定表达的重组质粒细胞克隆。ELISA、Western blot 检测证实重组质粒 pcDNA/V 能在 293 细胞中高效表达外源 VEGF 基因。鸡胚绒毛尿囊膜血管生成实验证实表达产物具有促血管生成的活性。进一步的体内表达研究,建立大鼠急性心肌梗死模型,将重组质粒 pcDNA/V、空质粒 pcDNA3.1(+)分三点注射于梗死交界处心肌内,四周后取材。经免疫组化染色检测,pcDNA/V 组在梗死交界区有 VEGF 阳性表达;电镜观察显示,pcDNA/V 组在梗死交界处心肌细胞间有大量毛细血管内皮细胞增生。实验结果表明,成功克隆了人 VEGF₁₆₅ 基因,构建了其真核表达载体。体内、外表达研究证实重组质粒的表达产物具有促血管生成的生物学活性,为 VEGF 基因治疗缺血性心肌病的研究提供实验基础。

关键词 血管内皮细胞生长因子,真核表达载体,基因表达,心肌梗死

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)02-0220-06

Abstract The cDNA encoding human Vascular Endothelial Growth Factor 165 (VEGF₁₆₅) was amplified using RT-PCR from human tonsil tissue and cloned into eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+). The recombinant plasmid pcDNA/V was transferred into 293 cells mediated by liposome and the cells stably expressing VEGF were selected under the pressure of G418. ELISA and Western blotting demonstrated that the eukaryotic expression vector pcDNA/V was successfully constructed and its corresponding protein could be expressed efficiently in vitro. Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) bioassay showed that recombinant protein has biological activity of hVEGF. Model rats with acute myocardial ischemia were used to further study the expression of VEGF in vivo. The model rats were divided randomly into three groups: control group, pcDNA3.1(+) group and pcDNA/V group. 50 μL naked plasmid DNA or saline was intramyocardially injected at three sites into the border zone of infarction. The hearts of rats were excised and fixed histologically, then the infarction sizes were studied by immunohistochemical staining and electron microscope after four weeks. Immunohistochemical staining for VEGF appeared to be negative in control and

Received: October 8, 2005; Accepted: December 20, 2005.

This work was supported by a grant from the Fund of Beijing Municipal Science and Technology Commission (No. 954024800).

* Corresponding author. Tel: 86-10-83911324; Fax: 86-10-83911319; E-mail: yh_qi45@hotmail.com

北京市科委科技合同项目基金资助 (No. 954024800).

pcDNA3.1(+) groups. In pcDNA/V group, myocardial cells in infarction border zone showed positive staining for VEGF in cytoplasm. Ultrastructural analysis showed that there were visible hyperplasia of vascular endothelium in pcDNA/V group. The control and pcDNA3.1(+) groups showed less capillary hyperplasia. In this study, VEGF₁₆₅ gene was successfully cloned and its protein expressed *in vitro* and *in vivo* was of bioactivity, which provides a basis for the further study of biological functions of human VEGF.

Key words vascular endothelial growth factor, eukaryotic expression vector, gene expression, myocardial infarction

缺血性心脏病是心血管外科领域常见的疾病之一,由于冠状动脉狭窄或闭塞造成病理改变,引起冠状血流和心肌需求之间的不平衡,导致不同程度的心肌缺血。目前临床的治疗方法主要有药物溶栓、冠脉搭桥和经皮腔内冠状动脉成形术等介入疗法,都各有其适应症和局限性。近年来,随着基因重组技术的发展,从分子水平治疗缺血性心脏病的新方法逐渐受到了人们的重视。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血管内皮细胞的特异性有丝分裂原,能够刺激血管内皮细胞的分裂、增殖和趋化作用,增加血管通透性,促进新血管的生成^[1,2]。VEGF 有显著促进血管侧支循环的作用^[3,4],为冠心病的治疗提供了又一新途径。通过输入外源性 VEGF 达到促进缺血心肌侧支循环的建立、改善心肌缺血、防治心肌梗死、用来辅助治疗缺血性心脏病成为近年来人们研究的热点^[5,6]。

目前,国内外 VEGF 基因治疗的动物实验,在慢性心肌缺血方面取得了许多新的进展,而急性心肌梗塞治疗的基础研究尚不充分。应用 VEGF 的临床试验还仅限于治疗慢性心绞痛,已进入 II 期临床试验阶段。为了深入研究 VEGF 对急性缺血组织血管新生的作用,本研究进行了 VEGF₁₆₅ 基因的克隆及其真核表达载体的构建,检测了重组质粒表达产物促进鸡胚尿囊绒毛膜血管生成的生物活性,并进一步通过心肌注射重组质粒,研究 VEGF 在大鼠急性心肌梗死动物模型中的应用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、细胞株及质粒:大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 293 细胞为本室保存。质粒 pcDNA3.1(+) 载体购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 酶与化学试剂:TaqDNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、限制酶及 WizardTM PCR Preps DNA Purification System 均为 Promega 公司产品;QIAquick gel Extraction kit、QIAGEN plasmid mini/midi kit 为 Qiagen 公司产

品;TRIzol 试剂、Prestained Protein MW Stds-Hights、LipofectAMINETM Reagent、DMEM 培养基均为 GibcoBRL 公司产品;鼠抗人 VEGF 单抗为 Sigma 公司产品;兔抗人 VEGF 多抗为 Santa Cruze 公司产品;羊抗鼠 IgG-HRP、羊抗兔 IgG-HRP 购自华美生物工程公司;人 VEGF 定量 ELISA 试剂盒购自北京中山生物公司;Lumi-Light Western Blotting Substrate 为 Boehringer Mannheim 公司产品;胎牛血清为 HyClone 公司产品;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR):用 TRIzol 试剂、提取人扁桃体组织总 RNA,经 AMV 反转录酶合成 VEGF cDNA。根据文献报道的人 VEGF cDNA 基因序列,设计合成一对引物,引物中引入 *Hind* III 酶切位点,然后进行 PCR 反应。

引物序列:

5'-AAG CTT ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG
GTG C-3'

5'-AAG CTT TCA CCG CCT CGG CTT GTC-3'

扩增参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2min;94 $^{\circ}$ C 45s,68 $^{\circ}$ C 3min,30 个循环,末次反应于 72 $^{\circ}$ C 延伸 8min。

1.2.2 重组真核表达质粒 pcDNA/V 的构建:将特异的 PCR 扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳回收、纯化。纯化产物与真核表达质粒 pcDNA3.1(+) 分别用 *Hind* III 酶切,载体酶切后去磷酸化,琼脂糖凝胶电泳分离、回收。经 T4 DNA 连接酶连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,提取重组质粒 DNA,酶切鉴定,并筛选插入片段为正向连接的重组质粒 pcDNA/V,筛选出的重组质粒进一步测序鉴定。

质粒 DNA 的制备、片段回收、酶切、连接、转化参照文献 [7] 进行。

1.2.3 重组质粒 pcDNA/V 转染 293 细胞:将 293 细胞接种于六孔板中,每孔 2×10^5 个细胞,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24h。采用常规阳离子脂质体转染重组质粒 pcDNA/V 经脂质体 Lipofectamine 介导,转染 293 细胞。同时以 pcDNA3.1(+) 为阴性对照,转染培养液为空白对照。转染 4h 后更换 DMEM 完

全培养基,继续培养 72h。用含 G418(800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的培养液进行选择培养,每隔 3 天更换培养液一次。至空白对照细胞完全死亡后,降低 G418 浓度至 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,继续培养至转染孔出现阳性克隆,收集细胞克隆。

1.2.4 重组 VEGF 在 293 细胞中的表达:将筛选出的 G418 抗性克隆(转染空载体 pcDNA3.1(+))转染 pcDNA/V 的 293 细胞及未转染的 293 细胞培养至对数生长期,接种于培养瓶(25 cm^2)中,每瓶 8×10^5 个细胞,进行扩大培养。培养 72h 后,收集培养上清 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000r/min 离心, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。用 PBS (pH 7.2) 洗涤细胞 2 次后,加入 1mL 细胞裂解缓冲液,振荡混匀,超声处理,使细胞进一步裂解,离心收集上清, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.5 Western-blotting 检测:将上步收集的各组细胞培养上清样品、细胞裂解样品,加 6 \times SDS 上样缓冲液,煮沸 5min,各样品取等量,进行 SDS-PAGE。将凝胶中的蛋白转移到硝酸纤维素膜上,按 Western-blotting 常规操作依次进行封闭、与一抗鼠抗人 hVEGF 单克隆抗体反应,洗涤后与 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 反应,然后按照试剂盒的操作说明进行发光反应。

1.2.6 ELISA 法检测 VEGF 蛋白表达水平:按照人 VEGF 的 ELISA 试剂盒说明书测定标准品及 1.2.4 收集的各组细胞培养上清液中 VEGF 蛋白含量。每组做 3 个平行孔,根据 490nm 所测标准品吸光度绘制标准曲线,将各孔细胞上清测得的吸光值在标准曲线上确定其中 VEGF 蛋白含量。

1.2.7 鸡胚绒毛尿囊膜血管生成实验:利用鸡胚绒毛尿囊膜法检测 rhVEGF 在 293 细胞中表达产物的生物学活性,实验方法参照文献 [8] 进行。9 日龄的鸡胚在气室下方开 0.5 cm^2 的小洞露出绒毛尿囊膜,分别取 1.2.4 收集的各组细胞培养上清浓缩样品 10 μL (VEGF₁₆₅ 总量 0.2 μg),加在无菌滤纸小圆片(直径 4mm),并将该滤纸片放于绒毛尿囊膜上,并以等量的生理盐水为对照。用透明胶封口,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中继续培养 3 天,观察鸡胚血管生成情况。

1.2.8 重组质粒体内表达检测:

(1) 大鼠急性心肌梗死动物模型的制作及给药方法

选取体重 280~320g 之间的雄性 SD 大鼠 20 只(首都医科大学实验动物科学部提供,清洁级)。随机分为三组:对照组(盐水组) 6 只;pcDNA3.1(+)空质粒组,6 只;pcDNA/V 组,8 只;用戊巴比妥

(30mg/kg)腹腔麻醉,行左侧开胸术暴露心脏,结扎冠状动脉左前降支。将 50 μL 盐水或质粒 DNA (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)分三点注射于梗死交界处心肌内,关胸后放回笼中饲养。

(2) 取材及免疫组织化学染色

术后 4 周,乙醚麻醉大鼠后开胸,取出心脏,去除心耳和右室,在左心室长轴中点处垂直于长轴将左室一分为二(即为左心室的赤道平面),赤道面上半部分用 10% 的福尔马林中性缓冲液固定,石蜡包埋,组织切片,用兔抗人 VEGF 抗体为一抗,羊抗兔 IgG-HRP 为二抗,DAB 显色,对每组切片行免疫组织化学染色。

(3) 电镜样本取材及观察

取左心室赤道平面下半部分,于梗死交界处随机切取 1mm \times 1mm \times 1mm 组织,放入 3% 戊二醛磷酸盐缓冲液中固定、切片、染色。透射电子显微镜下观察心肌组织超微结构的变化。

2 结果

2.1 人 VEGF 基因 cDNA 的 RT-PCR 结果

以人扁桃体组织总 RNA 为模板,经 RT-PCR 扩增后,PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,在标准核酸分子量 500bp 左右出现 2 条扩增条带(图 1),这 2 条带的大小与文献报道的 VEGF₁₆₅、VEGF₁₂₁ cDNA 的大小一致。

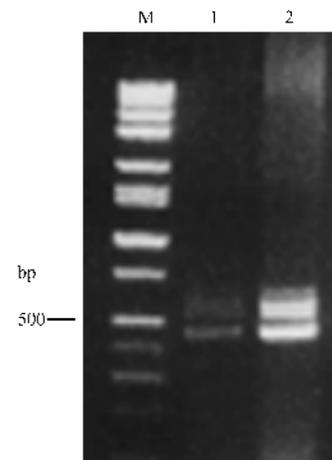


图 1 人扁桃体组织 RT-PCR 结果

Fig. 1 Electrophoresis analysis of RT-PCR products
M: Hi-Lo DNA marker; 1, 2: RT-PCR products.

2.2 真核表达质粒的构建与鉴定

将 576bp VEGF₁₆₅ 的 PCR 扩增产物与 pcDNA3.1(+)质粒分别进行 *Hind* III 酶切,回收纯化,经 T4 DNA 连接酶连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。

提取的重组质粒,用 *Hind* III 酶切鉴定,得到 579bp 左右的条带,大小与预计的 VEGF₁₆₅ 片段一致。用 *Nco* I 鉴定插入基因片的方向性,*Nco* I 在 VEGF 片段上有一个切点,在 pcDNA3.1(+) 载体上有 3 个切点,*Nco* I 对重组质粒进行酶切后,得到 4 个片段,其中一个片段在基因正向插入时是 384bp,而基因反向插入时为 794bp,通过 *Hind* III 单酶切和 *Nco* I 单酶切筛选出正向插入的重组质粒(图 2),表明得到了真核表达质粒 pcDNA/V。重组质粒以 T7 引物测序鉴定,结果证实插入片段为全长 576bp 的 VEGF₁₆₅ cDNA,其序列与 GenBank (AF 486837) 报道的完全一样。

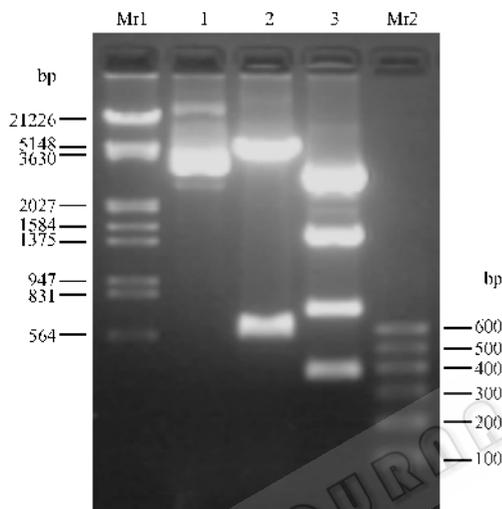


图 2 重组质粒 pcDNA/V 的酶切分析

Fig. 2 Digestion of pcDNA/V with endonuclease

M1: λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III marker; M2: 100bp DNA Ladder marker; 1: pcDNA/V; 2: pcDNA/V digested with *Hind* III; 3: pcDNA/V digested with *Nco* I.

2.3 Western-blotting 检测结果

Western-blotting 检测结果显示,在转染 pcDNA/V 质粒的 293 细胞培养上清中可以检测到相对分子质量为 22kD 的反应条带,与预计的 VEGF₁₆₅ 单体蛋白的分子量相符,而转染 pcDNA3.1(+) 质粒的 293 细胞裂解液样品、转染空质粒组及未转染组的细胞培养上清和裂解液样品中,均没有见到 VEGF₁₆₅ 的表达(图 3)。

2.4 ELISA 法检测结果

ELISA 法检测结果显示,VEGF 蛋白的标准曲线上 490nm 吸光值对数值与 VEGF 蛋白浓度的对数值成正比,表明两者线性关系良好。根据标准曲线得到各组 VEGF 蛋白的浓度。转染 pcDNA/V 的 293 细胞上清液中 VEGF 蛋白质浓度约为 4418 pg/mL,而

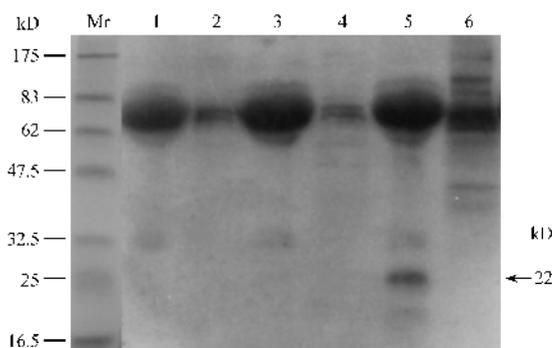


图 3 表达产物的 Western-blotting 分析

Fig. 3 Western-blotting analysis of the expression product

Mr: molecular weight standard; 1: culture medium of non-transfected 293 cells; 2: lysates of non-transfected 293 cells; 3: culture medium of 293 cells transfected with pcDNA3.1(+) vector; 4: lysates of 293 cells transfected with pcDNA3.1(+) vector; 5: culture medium of 293 cells transfected with pcDNA/V; 6: lysates of 293 cells transfected with pcDNA/V.

相应的转染空质粒组与未转染组则未检测到 VEGF 蛋白。

2.5 鸡胚绒毛尿囊膜血管生成实验结果

利用鸡胚绒毛尿囊膜法检测重组质粒 pcDNA/V 转染 293 细胞后表达产物的生物学活性,同时以生理盐水、pcDNA3.1(+) 转染 293 细胞的培养上清为对照。实验结果(图 4 A、B、C),显示与生理盐水组和 pcDNA3.1(+) 质粒对照组相比,pcDNA/V 组的细胞培养上清样品对鸡胚绒毛尿囊膜有较明显的促血管生成作用。

2.6 组织切片免疫组化染色结果

将大鼠急性心肌缺血动物模型组织切片进行 VEGF 免疫组织化学染色,实验结果:盐水组、pcDNA3.1(+) 空质粒组在梗死交界处心肌和肉芽组织内均未见棕黄色阳性染色,未检出人 VEGF 表达(图 5 A、B)。pcDNA/V 组梗死交界处的心肌细胞、血管内皮细胞胞浆可见棕黄色深染颗粒,说明有人 VEGF 的表达(图 5 C)。

2.7 透射电子显微镜观察结果

电镜观察结果显示盐水组和 pcDNA3.1(+) 空质粒组梗死交界处心肌细胞间内皮细胞增生不明显,增生的血管少(图 6 A、B 箭头处)。pcDNA/V 可见心肌细胞间大量毛细血管增生,内皮细胞核肿胀,呈分裂状态,可见到出芽式生长(图 6 C、D 箭头处)。

3 讨论

心脏血管的形成有三种途径:在已经存在的毛细血管网的基础上,分叉长出新的毛细血管;已经存



图 4 rhVEGF 诱导鸡胚绒毛尿囊膜血管新生

Fig. 4 Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) bioassay of rhVEGF

A. Saline control group; B. pcDNA3.1(+) group; C. pcDNA/V group.

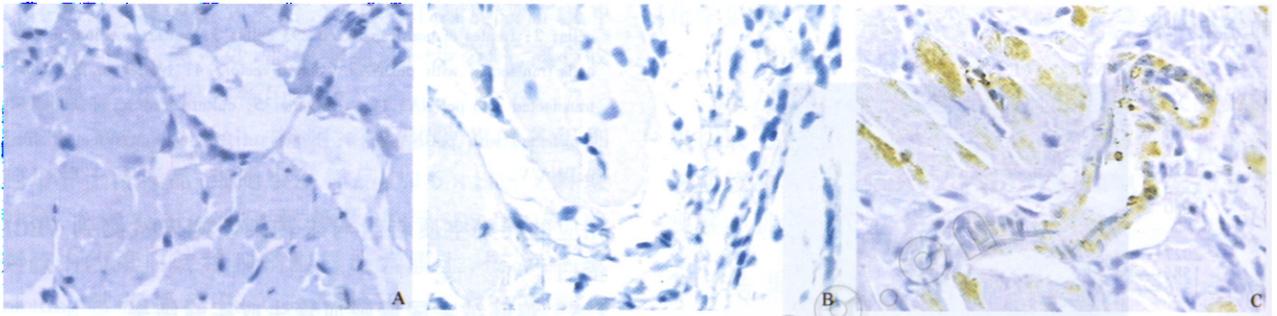


图 5 pcDNA/V 注射大鼠急性心肌缺血动物模型免疫组织化学染色

Fig. 5 Immunohistochemical staining of model rats with acute myocardial ischemia injected with pcDNA/V

A. Saline control group (400 ×); B. pcDNA3.1(+) group (400 ×); C. pcDNA/V group (400 ×).

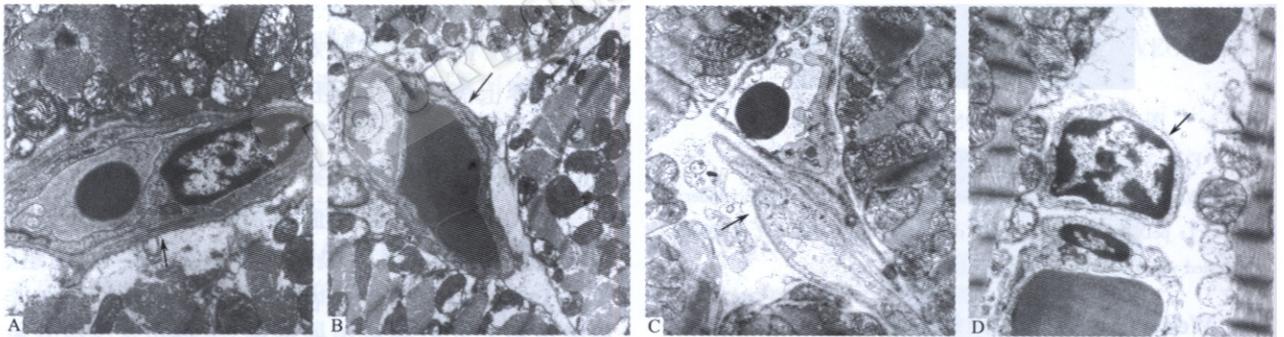


图 6 pcDNA/V 注射大鼠急性心肌缺血动物模型电镜观察

Fig. 6 Electron micrographs of model rats with acute myocardial ischemia injected with pcDNA/V

A: Saline control group(× 8000); B: pcDNA3.1(+)group(× 6000); C: pcDNA/V group(× 6000); D: pcDNA/V group(× 12000).

在的侧枝血管转变成小心肌动脉;由多能内皮干细胞形成新血管。VEGF 能诱导缺血心肌中毛细血管和小侧枝血管的生成,因此用 VEGF 治疗心肌缺血是一条可行的途径^[9]。VEGF 治疗心肌缺血有两种形式:蛋白治疗和基因治疗。尽管许多实验证明 VEGF 蛋白对缺血心肌具有促进侧枝形成、增加缺血区血流、改善心功能的效应,但 VEGF 蛋白价格昂贵、不易制备、体内半衰期短、需反复多次给药。目前,VEGF 基因治疗研究较多的方法有两种,一种是以复制缺陷型腺病毒为载体携带编码 VEGF 的

DNA,另外一种是直接应用编码 VEGF 的裸质粒 DNA。基因的应用有冠脉内、心肌内、心包内、心外膜和心内膜等多种途径。

腺病毒载体本身在体内表达时间短,同时腺病毒蛋白引发的免疫反应使载体在体内被加速清除,缩短了载体在体内的存留时间,限制了该基因疗法的使用。而编码分泌型蛋白的裸基因分泌的基因产物具有旁分泌效应,与细胞内蛋白相比,其生物学效应更有意义^[10]。Tio 等人^[11]将编码 VEGF₁₆₅的裸质粒 DNA 直接注射到慢性心肌缺血猪的心肌缺血区,

结果治疗组缺血区血供明显改善,侧支血管数量明显增加。说明该方法产生的 VEGF 蛋白足以增加侧枝形成和心肌灌注。

在研究慢性心肌缺血基因治疗的同时,人们开始关注急性心肌梗死的基因治疗。Schwarz 等人^[12]通过结扎左冠状动脉的方法制作了鼠的心肌梗死模型,模型成功四周后,将 500 μ g 裸质粒 DNA phVEGF₁₆₅ 直接注射于梗塞区域边缘的心肌内,结果发现该方法能诱导梗塞心肌边缘的血管形成,证明了这是治疗心肌梗塞的一种较有前途的方法,但病理结果发现有血管瘤形成,认为是剂量过大引起的,表明 VEGF 裸质粒 DNA 的剂量和应用途径是影响治疗结果的重要因素。由于急性心肌梗塞治疗的基础研究尚不充分,临床方面的试验仍无进展。

本实验免疫组化染色结果显示:对照组和空载体组未检测出人 VEGF 蛋白的表达;VEGF 组大鼠梗死心肌交界处检测出 VEGF 蛋白的表达,但蛋白表达呈灶性分布,未见 VEGF 蛋白大量集中表达。由此认为,以 pcDNA3.1(+)为载体,携带人 VEGF₁₆₅ 基因,直接注射于活体心脏梗死交界处心肌内,能表达出相应蛋白。推测可能是由于该载体的表达时间短,四周时不是蛋白表达的高峰,因此免疫组织化学染色时蛋白表达呈灶性分布,而不是大量集中表达。透射电子显微镜观察结果显示:VEGF 组电子显微镜下表现为血管的出芽生长和内皮细胞的增生,表明 VEGF₁₆₅ 主要是促进内皮细胞增生。在本实验中,体内、外的表达研究均证实了重组质粒 pcDNA/V 表达产物具有促血管生成的生物学活性,为基因治疗缺血性心肌病的研究提供了实验基础。

REFERENCES (参考文献)

[1] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 1997, **18**(1): 4 - 25

- [2] Leurg DW, Cachianes G, Kuang WJ *et al*. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 1989, **246**: 1306 - 1309
- [3] F Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, **161**: 851 - 855
- [4] Castilla MA, Caramelo C, Gazapo RM *et al*. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in endothelial cell protection against cytotoxic agents. *Life Sciences*, 2000, **67**: 1003 - 1013
- [5] Cooper DN, Krawczak M *eds*. *Venous thrombosis: from genes to clinical medicine*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd, 1997, pp. 1 - 29
- [6] Masuda S, Doi K, Satoh S *et al*. Vascular endothelial growth factor enhances vascularization in microporous small caliber polyurethane grafts. *ASAIO J*, 1997, **43**(5): M530 - 534
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp. 41 - 56
- [8] Fu SF (付生法), Lu YL (陆应麟), Zhang CS (张朝山) *et al*. Angiogenesis effect detected chick chorioallantoic membrane (CAM) technique. *Bull Acad Mill Med Sci (军事医学科学院院刊)*, 1993, **17**(4): 295 - 297
- [9] Kastrup J, Jorgensen E, Drvota V *et al*. Vascular growth factor and gene therapy to induce new vessels in the ischemic myocardium. Therapeutic angiogenesis. *Scand Cardiovasc J*, 2001, **35**(5): 291 - 296
- [10] Ferreira AC. Therapeutic angiogenesis: the present and the future. *Arq Bras Cardiol*, 2002, **78**(2): 145 - 147
- [11] Tio RA, Tkebuchava T *et al*. Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Hum Gene Ther*, 1999, **10**(18): 2953 - 2960
- [12] Schwarz ER, Speakman MT *et al*. Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat-angiogenesis and angioma formation. *J Am Coll Cardiol*, 2000, **35**(5): 1323 - 1330

本刊加入《中国学术期刊(光盘版)》声明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《生物工程学报》编辑部