

重症下肢缺血治疗的研究进展*

杨川综述,郭发才[△],周栋审校
(兰州大学第二医院血管外科,兰州 730030)

关键词:重症下肢缺血;腔内治疗;手术转流;动脉静脉化;血管外科手术

中图分类号:R654.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)04-0544-04

重症下肢缺血(critical limb ischemia, CLI)是指由下肢动脉硬化、闭塞等病变导致的肢体缺血性静息痛和组织损害,长期血液供应不足导致严重肢体缺血,并掀起一系列病理生理反应,最终导致静息痛或腿部的营养性病变,或者二者均发生^[1]。后者包括下肢远端缺血性溃疡或坏疽。因此,CLI被认为是“终末期”的外周动脉疾病(PAD)。该疾病具有高病死率、高致残率的特点。尽管目前针对 CLI 的治疗方法很多,但都难以获得理想的效果,临床研究发现 CLI 的 1 年的肢体保存率仅 5%,死亡率可以达到 25%。CLI 依然是严重困扰血管外科医生和难以有效解决的临床难题。本文主要探讨的内容是腔内治疗、手术转流、静脉动脉化、干细胞移植、基因治疗及高压氧治疗对 CLI 所起的作用,以指导临床应用。

1 CLI 定义

关于 CLI 定义的国际共识是任何慢性缺血性病变引起的下肢静息痛,溃疡或有客观证据证明由动脉闭塞疾病导致的坏疽。虽然 CLI 是一种临床诊断,它应该在疾病过程的早期通过踝肱指数(ABI),趾端收缩压客观地确认。CLI 患者踝部收缩压小于 50 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),趾端收缩压小于 30 mmHg,相当于 Fontaine 分级 III~IV 期或 Rutherford 分类 4~6 期^[2]。

2 治疗方式

目前对于 CLI 最主要的治疗方法有多种,但还缺乏系统的循证医学证据来指导血管外科医生选择恰当的治疗方法。其结果显示,同一类患者在不同治疗中心可能会被采用不同的治疗策略,最后可能获得截然不同的预后。

2.1 腔内治疗 近年来,随着血管腔内治疗材料的发展与进步,CLI 的血管腔内治疗技术已经有了更新的发展,在观念上也有了新的认识。CLI 的腔内治疗显示出令人鼓舞的成果。膝下腔内治疗已被公认为是膝下闭塞性病变的首选治疗方法。

2.1.1 切割球囊 有研究认为利用切割式球囊导管可改善血管内斑块的弹性和纤维的连续性,降低球囊扩张压力,并可获得最大管腔直径^[3]。切割球囊在切割内壁时,既防止弹性反冲,同时又允许较低压力内的腔内扩张,从而限制了气压性创伤^[4]。最近一项研究表明^[5],在股浅动脉粥样硬化导致的短段动脉闭塞的评估治疗中,以切割球囊成形术(CBA)与传统球囊成形术即经皮腔间血管成形术(PTA)为随机对照试验,2 个月后随访,PTA 组再狭窄率是 30%(9/30),CBA 组仅为 13%(4/30)。基于试验结果,CBA 似乎比 PTA 治疗更安全、更有效。

2.1.2 药物洗脱球囊(DEB) 近年来,将传统球囊扩张技术与最新的药物释放技术相结合的药物洗脱球囊(DES),是在无

聚合物和均一药物释放的全新理念下设计而成的,是除支架植入术外,血管再生治疗方式的又一种有效选择^[5]。DEB 与药物支架相比具有一定的优势,其药物只在球囊与血管壁接触的部位发挥作用。在初始化治疗中,DEB 能积极将抑制化合物转移到腔内壁,而近距离放疗气囊提供辐射以抑制血管成形术后的内膜增生反应。这些独特的方式可增强即刻和短期的疗效,同时减少下肢血管支架的使用^[6]。药物球囊是治疗药物洗脱支架(DES)再狭窄的新方法。Schmidt 等^[7]研究结果表明,与普通球囊相比,DEB 能明显降低长段膝下动脉疾病的早期再狭窄率。而刚刚公布的 PEPCAD-DES 研究^[8]则是比较了 DEB 与普通球囊在 DES 再狭窄中的应用。术后 6 个月随访,造影显示 DEB 组靶病变及全节段晚期管腔丢失或再狭窄率均明显降低。除此之外,新一代的 DEB 正试图更好应用于外周血管疾病,比如加强药物递送、制作膝下动脉专用导管、减少因长球囊上药物剂量的增加而导致的药物毒性、使药物在不同组织非均匀吸收、避免因药物涂层裂解引起的末端微循环堵塞等^[9]。

2.1.3 DES 关于 DES 再狭窄的治疗方式选择仍有争议,因为各种方法都缺乏充分的证据支持,特别是目前还没有介入治疗和外科手术的对比资料。因此,现阶段推荐的 DES 再狭窄治疗的选择应当遵循个体化的原则^[10]。DES 主要原理为通过药物对血管平滑肌增殖、细胞迁移抑制作用来抑制内膜增生。Achilles 试验是一个对比 DES 与标准球囊成形疗效的对比性研究^[11],研究结果显示 DES 的疗效明显优于标准球囊成形。DESTINY 试验是一个 DES 与普通支架成形的对比性研究^[12],结果发现 DES 的疗效明显优于普通支架。有作者报道了 DES 的疗效长期结果,结果显示对 DES 的疗效肯定。Werner 等^[13]对 158 例 DES 治疗膝下动脉病变随访 5 年,结果显示血管通畅率:半年为 97.0%,1 年为 87.0%,而 5 年高达 83.3%;144 例随访(31.1±20.3)个月的临床改善率:重度缺血者改善率为 92%,间歇性跛行者改善率为 77%。这些都充分说明了 DES 对膝下动脉疾病治疗的优势非常明显。不过,由于目前 DES 的长度所限,对于动脉长段病变治疗则受到一定的限制,因为多枚支架的植入,将使其费用大大提高。

2.1.4 腔内溶栓治疗 随着腔内治疗的飞速发展,重症下肢动脉缺血导管溶栓已成为腔内治疗的一种方法,起到治疗和辅助的作用。动脉腔内导管溶栓(catheter-directed thrombolytic, CDT)对于急性动脉缺血的治疗能取得与手术治疗相当的效果,同时又避免了手术的风险。CDT 创伤小,导管不直接接触动脉壁,相较于取栓手术,对血管内膜的损伤小,可降低因内膜

* 基金项目:甘肃省科技计划青年科技基金项目(145RJA255)。
通讯作者,E-mail:8smart@163.com。

作者简介:杨川(1988—),硕士,主要从事血管外科临床研究。△ 通

损伤继发血栓的概率。其对于微循环内的继发血栓也有溶解作用,并开放侧支循环。CDT 开放血流缓慢、渐进,从而避免了手术取栓瞬间开放动脉血流后炎症介质释放所造成的再灌注损伤。其次,作用于血栓内,局部浓度高,显著降低了溶栓药物的总剂量,从而减少了出血的风险。殷敏毅等^[14]报道腔内治疗泛大西洋协作组织修订标准(TASC II)C、D 型慢性下肢缺血病变的技术成功率为 93.8%。术后 12 个月的一期通畅率、辅助通畅率及二期通畅率分别为 64.6%、72.4% 和 81.5%。导管局部溶栓同传统手术相比,有较突出的优势,首先溶栓是通过酶的作用使血栓溶解,所以可以同时解决血管分支及远端血管床内的血栓,另外,该法逐步开通病变血管,减轻或避免了再灌注损伤所带来的全身及局部损伤。最后溶栓治疗可以发现引起 AU 的血管狭窄和闭塞病变。成功处理这些病变,可以明显提高术后通畅率^[15]。有研究显示局部溶栓治疗在 30 d 内的病死率和远期保肢率上优于传统手术^[16]。

2.1.5 体外循环下肢体高压灌注(Hypertensive extracorporeal limb perfusion,HELP) HELP 是近年对重症下肢缺血性疾病研究新方法^[17]。其在相关假设(对慢性下肢缺血而言,侧支循环的建立是跟内皮细胞所受剪切力与壁张力有关;对急性下肢缺血,根据泊肃叶定律,血压与血流是成比例的)下,通过特殊的腔内灌注器械及与血液透析仪相似的设备,在动物与人体实验中,运用体外循环并加压灌注促进侧支循环生成,建立不断增长的血流模型。而且发展和测试了间歇性的区域高压灌注在动脉通道系统的可行性,并在所有标准化治疗选择均无效而仍将面临重大截肢手术时,证实以上概念的可行性。从而,证实了高血压灌注比正常可控血压更能达到近端闭塞的下肢动脉远端,而植入动脉通道的设备可与体外循环的高压灌注泵间断、持续、反复、循环的连接。从长远来看,这是一种可并行发展的设备,当截肢成为唯一的选择时,应该考虑体外循环的高压灌注。

2.2 外科手术转流 外科手术转流治疗 CLI 疾病,特别是狭窄或阻塞病变局限,远侧流出道通畅的条件下,手术治疗效果显著,目前也广为外科医师和患者所接受。目前临床上外科手术转流主要有静脉动脉化、人工血管移植这两种方法,二者均有各自的优点和缺点,选择合适的治疗方法才能达到最好的疗效。

2.2.1 静脉动脉化 静脉动脉化手术是近十多年来应用于下肢动脉广泛性闭塞性疾病血供重建的方法,取得了良好疗效,但尚有许多基础和临床问题,故学术界对其实际应用价值仍有不少质疑。有学者回顾性分析 5 年 42 例施行静脉动脉化治疗 CLI,总保肢率达 95.0%,有效率为 92.6%,移植长期通畅率为 88.1%。虽然静脉动脉化的治疗效果是肯定的,但其确切的治疗机制仍然不明,从相关研究发现,可能与下列因素有关。(1)肢体侧支循环的建立:静脉动脉化一期手术形成动静脉瘘后,造影或者 CTA 检查发现局部肌肉组织中有丰富的侧支血管建立。(2)动脉血流逆向灌注:动静脉转流后,动脉血经静脉逆向灌注,可通过毛细血管以改善组织供血。(3)促进血管的生成,静脉动脉化后肢体缺血症状的改善不受逆向灌注或侧支循环影响,而是由于术后静脉压升高,使原动脉向远端灌注的有限血液在微循环中停留较长时间,足以向组织供氧并进行其他物质交换所致。系统回顾研究结果显示^[18],在临床研究报告 7 个研究组共 228 病例中,对一些无法行动脉旁路等常规手术的患者,采用静脉动脉化能成功的挽救重度缺血肢体,1 年随访期保肢率 71%,移植通畅率 46%。大多数患者溃疡

愈合,静息痛消失,且没有严重手术并发症。

2.2.2 人工血管移植 人工血管移植作为治疗 CLI 的传统方式,主要有以下 2 种方法:(1)股动脉-膝上或膝下腘动脉旁路移植,此方法是目前最常用的,是血管外科最常见的手术之一,特别是股动脉-膝上腘动脉旁路移植。尽管手术本身不复杂,但是经常达到非常好的结果。(2)下肢远端小动脉旁路移植,由于下肢动脉移植最远端的吻合口是在小腿动脉或足部动脉上,所以手术有较大的难度。因此,小口径人造血管(≤ 4 mm)作为替代物的研究与开发成为国内外近十年来的热点^[19]。然而,目前所有小口径人工血管材料都存在一个致命的共同问题:血液相容性差。当其移植入体内后,容易导致血栓形成,远期还易出现内膜增生。要解决这些问题的关键是促使人工血管的表面尽快内皮化,形成具有功能的完整的内皮层,有效抑制血管狭窄及堵塞的发生。理想的人工血管植入体内需要具有良好的力学性质,同时还能发挥一定的正常血管的生理功能。单纯从内皮化的角度可能还远远不够,还要从人工血管材料及基因修饰等多种手段,综合解决小口径血管临床应用所面临的问题。

2.3 干细胞移植 内皮祖细胞(EPC)是内皮细胞的前体细胞。1997 年 Ashara 等首次从成人外周血中分离出 EPC。之后 EPC 可以促进血管新生,缓解缺血的作用在众多临床前研究中获得证实。研究结果表明^[20],EPC 是一群主要存在于胎肝和脐带血及成人骨髓和外周循环血中的、能够分化为内皮细胞的多潜能细胞。EPC 不仅参与人胚胎血管发生,而且参与出生后新生血管形成和内皮损伤后的修复过程,近年有许多研究结果显示,成熟个体中骨髓来源的 EPC 经动员可以进入外周血循环中,并趋化至缺血部位,参与大脑、心脏、四肢的缺血区及创伤和肿瘤部位的血管再生,可见 EPC 与血管生成有着密切的关系,已成为治疗性血管形成的研究靶点^[21]。2002 年 Tateishi 等^[22]全球首次报道骨髓和外周血单个核细胞移植治疗 CLI 的前瞻性随机对照研究,取得缓解静息痛,促进溃疡愈合,挽救肢体的满意效果。之后,国内外其他学者也采用该方法,取得了相似疗效。目前 EPC 尚缺乏高度特异性的表面标志物,CD34 是目前常用的 EPC 识别和分离因子。通过分离骨髓或者外周血中的 CD34⁺ 或者 CD133⁺ 细胞可以获得 EPC。CD34 是造血干细胞、EPC 和成熟内皮细胞的共同表面分子,造血干细胞在缺血环境下可以分化成为 EPC,继而发挥缓解缺血的作用,因此 CD34⁺ 细胞是干细胞移植治疗 CLI 中的主要功能细胞,这也是上述采用骨髓或者外周血单个核细胞移植治疗 CLI 及国内外临床研究均将移植中 CD34⁺ 细胞含量作为重要质控指标的主要原因之一^[23]。有临床研究 1 年内采用纯化自体外周血 CD34⁺ 细胞移植治疗均不具备血管重建条件的下肢重度缺血 7 例,经 G-CSF 动员后第 5 天采集外周血单个核细胞,分选后获得纯化的 CD34⁺ 细胞,于患肢肌肉局部注射,观察不良反应及缺血缓解情况。结果 7 例患者均保肢成功,无严重不良反应。结果显示纯化自体外周血 CD34⁺ 细胞移植治疗下肢重度缺血安全,可行,有效^[24]。有研究报道^[25],通过对血管内皮生长因子、ABI、静息痛、缺血性溃疡愈合、血管造影等方面的随访检查,骨髓干细胞自体移植合并 VEGF165 基因治疗慢性下肢缺血,方法安全、简单、有效。尤其是对于下肢动脉没有流出道的患者,可使一部分患者免除截肢或降低截肢平面,改善生活质量。干细胞移植作为一种新方法,为此提供了治疗的可能。

2.4 基因治疗 缺血性血管疾病包括冠心病和外周血管闭塞

性疾病已成为发达国家及许多发展中国家的主要疾病之一。血管重建包括血管新生、血管生成及动脉生成,是机体在血管闭塞状态下的病理生理性代偿反应。以改善缺血为目的,基因治疗已经成为当前缺血性疾病治疗的研究热点。血管生成是一个相当复杂的过程,诸多的因素在其中发挥了重要的作用。血管生成的过程最初是由生长因子刺激引起的。一些血管生成因子促进血管生成,另外一部分产生抑制作用。因此,血管生成是因子之间相互平衡的结果。促进血管生成的生长因子包括: VEGF (VEGF-A、-B、-C、-D、-E) 及其受体 (VEGFR-1、-2、-3); 肝细胞生长因子 (HGF)、血小板来源生长因子 (PDGF); 成纤维细胞生长因子 (FGF) 及其受体; 血管生成素 (Ang)/Tie 系统^[26-27]。VEGF 作为目前研究得最多,被认为功能最重要的促血管生成因子之一,其能特异性作用于血管内皮细胞,促进血管内皮细胞分裂、增殖,并在体内诱导血管生成。VEGF 是目前已知的作用最强的促血管生成因子,在动物建立的活体模型中,VEGF-B 缺失的小鼠的血管生成情况受到明显影响。实验结果表明 VEGF 通过激活动脉特殊信号调控动脉形成,然后阻碍内皮细胞向静脉分化^[28]。并且,如果 VEGF 高表达,能增加血管密度^[29]。肌肉内直接注射质粒 VEGF 能有效促进血栓闭塞性脉管炎患者的下肢血管重建,消除静息痛,促使溃疡愈合,避免了截肢^[30]。Muona 等^[31]通过对 54 例行 VEGF-A 基因治疗的外周动脉闭塞性疾病患者 10 年随访调查发现,短暂的 VEGF-A 介导的基因治疗并没有增加其 10 年的随访时间中患癌症、糖尿病、视网膜病或其他疾病概率,并且在截肢或导致死亡的数量上也未检测到显著差异。不但证明血管内皮生长因子基因治疗安全性、耐受性良好的短期研究,而且为其长期影响提供了非常可靠的证据。在分子生物学的最新进展中,采用肌注转染基因编码血管生成的细胞因子是一种治疗 PDA 的潜在新策略。HGF 是一种强效促血管生成因子。Shigematsu 等^[32]在一项多中心、随机、双盲、安慰剂对照试验中,对 CLI 的患者行裸质粒编码 HGF 肌肉注射的疗效和安全性进行了研究。结果发现没有发生重大安全问题,也改善了生活质量。这说明 HGF 基因治疗是安全和有效的。Morishita 等^[33]近来的研究也证明肌肉注射裸体 HGF 质粒是安全可行的,并且可以视为缺血肢体惟一治疗成功的改进。移植 Lewis 肺癌小鼠的研究中发现通过阻断 VEGF 表达可以减少 86% 的肿瘤新生血管形成。但单纯阻断 VEGF 表达不能完全阻止肿瘤新生血管形成,因为其存在抗 VEGF 治疗的耐受,原因可能与肿瘤组织中同时存在其他促血管因子如血管生成素有关。VEGF-A 受体 1 和 VEGF-A 受体-2 都能在内皮细胞表面表达。VEGF-A 受体 1 并能在单核细胞/巨噬细胞和动脉外膜成纤维细胞表面表达。已经有报道称 Ang2 能刺激动脉外膜成纤维细胞的 Flt-1 表达的增加。血小板来源生长因子-BB(PDGF-BB)和 FGF-2 也已经被报道有协同效应^[34], VEGF 和 FGF-2 的协同效应在内皮细胞增殖和出芽方面发挥着重要的作用^[35]。另外已经有研究证实了通过联合注射 VEGF 和 FGF-2 促进血管生成改善血流灌注的效果远好于单独注射。

2.5 高压氧治疗(HBO) 对 CLI 患者而言,由于动脉闭塞性病导致血流量不足以供给肢体所需的氧气,长期血液供应不足导致严重肢体缺血,造成肢体静息痛及(或)组织损害^[1]。而组织供氧不足引起创面基底缺血是创面愈合失败最常见的原因^[36]。HBO 治疗慢性创面的原理是提升传递到创面的氧含量和新生的血管化。有研究表明^[37], HBO 可以通过动员外周循环中 EPCs 促进下肢创伤后慢性创面的愈合。尽管高压氧

治疗通常用于未愈合伤,对于 CLI 的患者,其疗效尚未确立。但对那些在血运重建技术方面不可行或尝试后失败的患者来说,这或许是能对他们产生一定效用的治疗方式^[38]。

3 展 望

目前 CLI 的治疗方法如腔内治疗、手术转流、静脉动脉化、干细胞移植、基因治疗及高压氧治疗等,在全球各个治疗中心已广泛开展,其中部分 CLI 患者取得了良好疗效,但 CLI 的肢体保肢率仍不高,还缺乏系统、完整、客观的循证医学依据,来指导选择恰当的治疗策略,目前仍未形成统一的治疗指南。血管重建(血管新生、血管生成和动脉生成)等以改善缺血为目的,应用促血管因子、基因治疗和血管祖细胞补充治疗已成为当前缺血性血管疾病治疗的研究热点。目前动物模型和临床的研究结果是激动人心的,治疗性血管重建可能会成为未来富有前景的治疗新策略。

参考文献:

- [1] Cequier Á, Carrascosa C, Diez-Tejedor E, et al. Comments on the ESC guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases. A report of the task force of the clinical practice guidelines committee of the spanish society of cardiology[J]. Rev Esp Cardiol, 2012, 65(2): 119-124.
- [2] Varu VN, Hogg ME, Kibbe MR. Critical limb ischemia [J]. J Vasc Surg, 2010, 51(1): 230-241.
- [3] Castriota F, de Campos Martins EC, Setacci C, et al. Cutting balloon angioplasty in percutaneous carotid interventions[J]. J Endovas Ther, 2008, 15(6): 655-662.
- [4] Davies MG, Anaya-Ayala JE. Endovascular techniques in limb salvage; cutting, cryo, brachy, and drug-eluting balloons[J]. Methodist Debaque Cardiovasc J, 2013, 9(2): 69-72.
- [5] Poncyljusz W, Falkowski A, Safranow K, et al. Cutting-balloon angioplasty versus balloon angioplasty as treatment for short atherosclerotic lesions in the superficial femoral artery; randomized controlled trial [J]. CVIR, 2013, 36(6): 1500-1507.
- [6] Sharma S, Kukreja N, Christopoulos C, et al. Drug-eluting balloon; new tool in the box[J]. Expert Rev Med Devices, 2010, 7(3): 381-388.
- [7] Schmidt A, Piorkowski M, Werner M, et al. First experience with drug-eluting balloons in infrapopliteal arteries restenosis rate and clinical outcome[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(11): 1105-1109.
- [8] Rittger H, Brachmann J, Waliszewski M, et al. TCT-69 PEPCAD-DES; A randomized, multicenter, single blinded trial comparing paclitaxel coated balloon angioplasty with plain balloon angioplasty in drug-eluting-stent restenosis-12 months results[J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 60(17): 1810-1815.
- [9] Karnabatidis D, Spiliopoulos S, Katsanos K, et al. Below-the-knee drug-eluting stents and drug-coated balloons[J]. Expert Rev Med Devices, 2012, 9(1): 85-94.
- [10] Dangas GD, Claessen BE, Caixeta A, et al. In-stent restenosis in the drug-eluting stent era[J]. J Am Coll Cardiol

- ol, 2010, 56(23):1897-1907.
- [11] Scheinert D, Katsanos K, Zeller T, et al. A prospective randomized mul-ticenter comparison of balloon angioplasty and infrapopliteal stenting with the sirolimus-eluting stent in patients with ischemic peripheral arterial disease; 1-year results from the ACHIL-LES trial[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(22):2290-2295.
- [12] Bosiers M, Scheinert D, Peeters P, et al. Randomized comparison of everolimus-eluting versus bare-metal stents in patients with critical limb ischemia and infrapopliteal arterial occlusive disease[J]. *J Vasc Surg*, 2012, 55(2):390-398.
- [13] Werner M, Schmidt A, Freyer M, et al. Sirolimus-eluting stents for the treatment of infrapopliteal arteries in chronic limb ischemia: long-term clinical and angiographic follow-up[J]. *J Endovasc Ther*, 2012, 19(1):12-19.
- [14] 殷敏毅, 黄新天, 陆信武, 等. TASC II C, D 型股腘动脉闭塞腔内治疗的操作技巧与疗效分析[J/CD]. *中国血管外科杂志: 电子版*, 2011, 3(2):109-110.
- [15] 李子川, 杨军, 耿树军, 等. 老年患者急性下肢动脉缺血介入溶栓及支架置入治疗[J]. *介入放射学杂志*, 2010, 30(8):651-654.
- [16] Creager MA, Kaufman JA, Conte MS. Acute limb ischemia[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(23):2198-2206.
- [17] Khin NY, Dijkstra ML, Huckson M, et al. Hypertensive extracorporeal limb perfusion for critical limb ischemia[J]. *J Vasc Surg*, 2013, 58(5):1244-1253.
- [18] Lu XW, Idu MM, Ubbink DT, et al. Meta-analysis of the clinical effectiveness of venous arterialization for salvage of critically ischaemic limbs[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2006, 31(5):493-499.
- [19] Avci-Adali M, Paul A, Ziemer G, et al. New strategies for in vivo tissue engineering by mimicry of homing factors for self-endothelialisation of blood contacting materials[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(29):3936-3945.
- [20] 王琴, 仇红刚. EPC 细胞生物学特征及其临床意义[J]. *中国实验诊断学*, 2008, 11(12):1477.
- [21] Scharner D, Rössig L, Carmona G, et al. Caspase-8 is involved in neovascularization-promoting progenitor cell functions[J]. *Arterioscl Throm Vas*, 2009, 29(4):571-578.
- [22] Tateishi E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells; a pilot study and a randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2002, 360(9331):427-435.
- [23] Horie T, Onodera R, Akamastu M, et al. Long-term clinical outcomes for patients with lower limb ischemia implanted with G-CSF-mobilized autologous peripheral blood mononuclear cells[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 208(2):461-466.
- [24] Dong Z, Chen B, Fu W, et al. Transplantation of purified CD34⁺ cells in the treatment of critical limb ischemia[J]. *J Vasc Surg*, 2013, 58(2):404-411.
- [25] Skóra J, Barc P, Pupka A, et al. Transplantation of autologous bone marrow mononuclear cells with VEGF gene improves diabetic critical limb ischaemia[J]. *Endokrynol Pol*, 2013, 64(2):129-138.
- [26] Chislock EM, Ring C, Pendergast AM. Abl kinases are required for vascular function, Tie2 expression, and angiopoietin-1-mediated survival[J]. *PNAS*, 2013, 110(30):12432-12437.
- [27] Qin D, Trenkwalder T, Lee S, et al. Early vessel destabilization mediated by Angiopoietin-2 and subsequent vessel maturation via Angiopoietin-1 induce functional neovascularization after ischemia[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e61831.
- [28] Özgür E, Heidenreich A, Dagtekin O, et al. Distribution of EphB4 and EphrinB2 in normal and malignant urogenital tissue[J]. *Urol Oncol*, 2011, 29(1):78-84.
- [29] Olivey HE, Svensson EC. Epicardial-myocardial signaling directing coronary vasculogenesis[J]. *Circ Res*, 2010, 106(5):818-832.
- [30] Vijayakumar A, Tiwari R, Kumar Prabhuswamy V. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease)-current practices[J]. *Int J Inflam*, 2013, 20(13):1569.
- [31] Muona K, Mäkinen K, Hedman M, et al. 10-year safety follow-up in patients with local VEGF gene transfer to ischemic lower limb[J]. *Gene Ther*, 2011, 19(4):392-395.
- [32] Shigematsu H, Yasuda K, Iwai T, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia[J]. *Gene Ther*, 2010, 17(9):1152-1161.
- [33] Morishita R, Makino H, Aoki M, et al. Phase I/IIa clinical trial of therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor gene transfer to treat critical limb ischemia[J]. *Arterioscl Throm Vas*, 2011, 31(3):713-720.
- [34] Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2[J]. *Nat Med*, 2003, 9(5):604-613.
- [35] Browning AC, Dua HS, Amoaku WM. The effects of growth factors on the proliferation and in vitro angiogenesis of human macular inner choroidal endothelial cells[J]. *Br J Ophthalmol*, 2008, 92(7):1003-1008.
- [36] Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, et al. Oxygen in acute and chronic wound healing[J]. *Br J Dermatol*, 2010, 163(2):257-268.
- [37] 马轅华, 雷永红, 周敏, 等. 高压氧治疗下肢慢性创面愈合与外周血内皮祖细胞的相关性[J]. *中华医学杂志*, 2012, 91(45):3214-3218.
- [38] Schanzer A, Conte MS. Critical limb ischemia[J]. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2010, 12(3):214-229.