

干细胞治疗糖尿病足的实验研究进展

郭勇英^{1,2} 高怀林^{1,3,4*}

(¹河北医科大学研究生学院, 石家庄 050017; ²河北以岭医药研究院, 国家中医药管理局重点研究室(心脑血管络病), 石家庄 050035; ³河北医科大学附属以岭医院, 河北省中医药络病理论指导糖尿病足防治重点研究室, 石家庄 050091; ⁴河北省络病重点实验室, 石家庄 050035)

摘要 糖尿病足是指因糖尿病血管病变和(或)神经病变及感染等综合因素, 导致慢性进行性波及肢体大、中、微血管, 引起足部疼痛、皮肤深溃疡或肢体坏疽的一种病变, 是糖尿病的严重并发症之一。临床治疗非常棘手, 难以取得令人满意的疗效, 最终导致截肢甚至危及病患生命。因此, 临床上迫切需要找到创伤小、易接受、疗效好的新的治疗方法。干细胞具有高度增殖和分化成为体内各种细胞的潜能, 其可塑性强, 为糖尿病足的治疗带来新前景, 目前是国内外学者研究的热点之一。该文就干细胞移植治疗糖尿病足的实验研究进展作一综述。

关键词 糖尿病足; 干细胞移植; 实验研究

The Progress of Experimental Study on Stem Cell Therapy for Diabetic Foot

Guo Yongying^{1,2}, Gao Huailin^{1,3,4*}

(¹Graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ²Yiling Medical Research Institute of Hebei Province, Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine (cardio-cerebral vascular network disease), Shijiazhuang 050035, China; ³Yiling Hospital of Hebei Medical University, Department of Guidance in Prevention and Treatment of Diabetic Foot on Hebei Province Chinese Medicine Theory of Collateral Disease, Shijiazhuang 050091, China; ⁴Key Laboratory of Network Disease of Hebei Province, Shijiazhuang 050035, China)

Abstract The diabetic foot (DF) is caused by diabetic vascular disease and/or neuropathy and infections as well as other factors, resulting in chronic progressive affected limb, micro vessel, and causing foot pain, skin ulcers or gangrene of limbs in deep. It is one of the serious complications of diabetes, occasionally causing amputation and even death. It is hard to obtain satisfactory effect, and clinical treatment is very difficult. Therefore, there is an urgent need to find a new treatment with fewer traumas, easier delivery, and good curative effect. Stem cells are capable of proliferation and differentiation into various kinds of cells. Their stronger plasticity brings new prospect for the treatment of diabetic foot. Currently, the stem cells attract attention of researchers worldwide. Here we review the progress on stem cell transplant therapy for the treatment of diabetic foot.

Key words diabetes foot; stem cell transplantation; experimental study

随着社会进步和人们生活、饮食方式的转变, 18日公布的健康信息推测, 全国糖尿病患者已近1
糖尿病发病率随年龄的增长而增加。2010年11月 18日公布的健康信息推测, 全国糖尿病患者已近1
亿。2011年据国际糖尿病联盟(international diabetes

收稿日期: 2013-08-07 接受日期: 2013-11-25

国家高技术研究发展计划(863计划)(批准号: 2011AA020115)、国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2012CB518606)和河北省中医药管理局课题(批准号: 2012112)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0311-88609772, E-mail: gaohuailin@126.com

Received: August 7, 2013 Accepted: November 25, 2013

This work was supported by the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (Grant No.2011AA020115), the National Basic Research Program of China (973 Program) (Grant No.2012CB518606) and Hebei Province Administration of Traditional Chinese Medicine Research (Grant No.2012112)

*Corresponding author. Tel: +86-311-88609772, E-mail: gaohuailin@126.com

网络出版时间: 2014-04-01 14:02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0239.html>

federation, IDF)估计, 目前全球糖尿病患者有3.66亿, 预测到2030年, 将增加至5.52亿。其中, 糖尿病足(diabetic foot, DF)是糖尿病最严重的并发症和非外伤性截肢的主要原因。随着我国人口老龄化的发展, DF发病率逐年增高, 将给社会和家庭带来巨大的经济负担。DF因其病变特点为远端血管流出道差, 故内科药物保守治疗和外科血管旁路移植、动脉搭桥、血管介入、超声消融等方法难以取得令人满意的疗效, 又因其预后较差, 最终导致溃疡、截肢甚至死亡, 正成为威胁人类健康的世界性公共卫生问题^[1]。

近年来, 干细胞(stem cell)移植治疗DF的研究已日趋广泛, 通过干细胞移植可促进缺血肢体的新生血管形成, 改善和恢复肢体血流, 从而达到治疗肢体缺血的目的^[2], 并最终达到治疗DF的目的。

1 干细胞移植治疗糖尿病足的应用

干细胞移植血管再生技术又称为细胞性血管搭桥术(cellularity of vascular bypass)^[3]。2002年, Tateishi-Yuyama等^[2]最早使用干细胞移植治疗下肢缺血性疾病, 取得了良好效果。根据干细胞在一定条件下可在体内分化为血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)和平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)并分泌大量的促血管生成因子, 可将干细胞移植到缺血下肢, 使其逐渐分化并形成新生毛细血管, 参与缺血局部的代偿性血管重建, 改善和恢复下肢血流。

目前, 用于移植的干细胞主要来源是骨髓、外周血及脐血、脐带, 根据其培养获取方式的不同分为单个核细胞(mononuclear cells, MNCs)、内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。正常状态下, 干细胞主要存在于骨髓中, 外周血中的干细胞数量仅为骨髓中的0.1%~1%, CD34⁺细胞则仅占外周血单个核细胞的0.01%~0.1%^[4]。MNCs是一群混合性细胞, 主要含有淋巴细胞、单核细胞及干/祖细胞, 其中骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs)是指骨髓中细胞核为单个的细胞总称, 包括造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)、成纤维细胞、成骨细胞、巨噬细胞、EPCs等, 是具有自我更新和多向分化增殖能力的原始骨髓细胞, 动物实验多采用密度梯度离心法获得。外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PB-MNCs)可通过骨髓动员剂粒细胞集落刺激因子(granulocyte

colony-stimulating factor, G-CSF)动员3~5 d, 抽取外周血, 采用密度梯度离心法获得。EPCs^[5]是VEC的前体细胞, 通过自身的分化、增殖, 形成新生血管, 不需要依赖原来的血管系统, 这与传统血管生成(angiogenesis)方式(通过VEC的迁移、增殖、出芽形成血管)完全不同, 生理情况下很少发生, 目前命名为出生后的血管发生^[6-7]。相对于外周血和脐血来说, 骨髓中EPCs的含量更为丰富, 且增殖能力更强^[8]。EPCs则在获取MNCs的基础上, 用M199诱导培养液于37 °C、5%二氧化碳的饱和湿度培养箱中培养获得。MSCs最早被Friedenstein等^[9]于骨髓中发现, 具有分化为成骨细胞、成软骨细胞、成脂肪细胞、肌细胞及神经细胞的潜能。由于其分化的多样性及在体外易分离培养和扩增的特性, 使其成为组织工程学的理想种子细胞, 主要存在于骨髓、脂肪组织、软骨及骨组织、脐带血、胎盘中, 其中以骨髓中含量最丰富。目前主要有4种方法用于MSCs的分离: 贴壁筛选法、密度梯度离心法、免疫磁珠法和流式细胞仪分离法^[10-12]。

脐带血中含丰富的干细胞, 与骨髓相比, 脐血资源丰富、成本低廉、干细胞采集简单无痛苦, 且因容易获得、免疫原性弱、不引起社会及法律伦理问题而备受瞩目^[13]。脐血EPCs数量和质量较优, 其数量是外周血的10~20倍, 细胞增殖能力也较强, 且其配型要求较低, 因此, 脐带血EPCs受到越来越多科学家的青睐。通过抽取足月新生儿脐血, 分离脐血MNCs, 培养细胞7 d, 获得EPCs。脐带是胎儿时期连接母体与胎儿的索状结构, 其内含2条脐动脉、1条脐静脉, 外被羊膜, 在动静脉之间含有一种特殊的胚胎黏液样结缔组织——华尔通氏胶(Wharton's Jelly), 从华尔通氏胶分离得到的基质细胞即为人脐带MSCs。近年来研究发现, 作为胎儿细胞储存器的脐带是一个很有前途的多能干细胞来源。2003年, Mitchell等^[14]最先提出人脐带华尔通氏胶来源的基质细胞具有多能干细胞特性, 随后越来越多的研究在对华尔通氏胶来源的脐带MSCs的认识和利用方面取得了很大的进展。华尔通氏胶来源的间质细胞具有MSCs特性, 其为一类免疫缺陷细胞, 异体基因移植不会发生免疫排斥反应。

本文就干细胞移植治疗糖尿病下肢缺血、糖尿病溃疡、糖尿病周围神经病变的动物实验研究进展进行综述。

2 干细胞移植治疗糖尿病下肢缺血的实验研究

实验研究多选用小鼠、大鼠、豚鼠及裸鼠等,通过腹腔或静脉注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ),或选用兔子通过耳缘静脉注射四氧嘧啶(alloxan, ALX)或加高脂喂养后制作糖尿病动物模型。采用结扎单侧后肢股动脉,单侧股动静脉、大隐动脉、旋髂外动静,双后肢股动脉及其分支,或髂外动脉远端、股动脉远端及股动脉分支并切断股动脉等方法制作糖尿病下肢缺血模型。

2.1 骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs)移植

Hirata等^[15]对糖尿病下肢缺血雄性豚鼠行BM-MNCs移植后检测缺血后肢血流,结果显示:BM-MNCs移植组侧枝血管和新生血管形成明显增加,通过不同时期血浆血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平测定,表明治疗性BM-MNCs移植诱导血管生成不会影响全身的血管增殖;自体糖尿病大鼠BM-MNCs同样具有血管生成因子和内皮细胞分化潜力。孟建波等^[16]建立糖尿病下肢缺血新西兰兔动物模型,通过用重组人粒细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte-colony stimulating factor, rhG-CSF)动员、局部BM-MNCs移植及rhG-CSF动员联合局部BM-MNCs移植进行治疗。28 d后检测肌组织微血管密度及VEGF表达水平,结果显示, rhG-CSF动员和局部BM-MNCs移植均可用于治疗糖尿病下肢缺血性疾病。康胜群等^[17]进一步指出, rhG-CSF动员后联合BM-MNCs移植治疗的效果明显优于单纯用rhG-CSF治疗和单纯BM-MNCs移植治疗。实验结果表明, BM-MNCs可以在缺血组织中存活分化为血管内皮细胞,参与缺血组织的血管新生,并且rhG-CSF动员有利于增加归巢至缺血组织中的骨髓干细胞数量,从而更明显地促进缺血组织的血管新生。

2.2 骨髓内皮祖细胞(bone marrow endothelial progenitor cells, BM-EPCs)移植

于萍等^[18-20]将日本大耳白兔随机分为糖尿病磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)对照组、糖尿病BM-EPCs移植治疗组和正常血糖BM-EPCs移植治疗组,通过右后肢局部肌肉注射BM-EPCs,移植14 d后的检测结果显示:糖尿病BM-EPCs移植治疗组毛细血管密度、毛细血管数/肌束数及肌肉

VEGF、多普勒测下肢血流、动脉显影血管数和血管生成基因表达上调倍数显著高于对照组。实验结果也提示,无论有无糖尿病, BM-EPCs均能促进血管生成。王宁等^[21-22]的实验结果同样显示, BM-EPCs与BM-MSCs移植治疗均可明显发现新生血管形成和侧枝循环建立, BM-EPCs治疗组血管数虽然多于BM-MSCs治疗组,但差异无统计学意义。EPCs移植可能部分分化为VEC,也可能改变了缺血的微环境,使VEGF显著增加,促进髂内动脉分支新生血管形成,可以增加下肢血流,改善缺血肢体的血流灌注。采用基质细胞衍生因子-1 α (stromal cell derived factor-1 α , SDF-1 α)预处理BM-EPCs组移植,下肢动脉显影血管数明显多于BM-EPCs组和对对照组,表明SDF-1 α 能够增强EPCs的增殖、黏附功能,对EPCs移植治疗糖尿病大鼠下肢缺血的疗效有促进作用,其血供改善主要来自于新生血管形成和/或原有细小血管的代偿性增粗。

2.3 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)移植

吴春朋等^[23]采用贴壁培养获取BM-MSCs, BrdU标记,自股动脉离断处起分10个点将其悬液注射入模型SD大鼠左后肢股直肌和腓肠肌中,右后肢注射等量生理盐水作为对照。结果表明,干细胞移植2 w、6 w后大鼠双后肢血管显影及后肢股直肌与腓肠肌的毛细血管密度,左侧均高于右侧,此结果证实移植的BM-MSCs参与了后肢缺血的血管重建; BrdU标记阳性移植细胞参与了左后肢微动脉血管壁的构成,表明局部注射移植BM-MSCs可能在缺血的环境下分化成VEC和血管SMC,形成新的血管,改善糖尿病后肢缺血大鼠的血供。

2.4 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PB-MNCs)移植

Schatteman等^[24]应用外周血CD34⁺细胞注入糖尿病缺血肢体,结果显示, CD34⁺能迅速和显著改善四肢血流。丁海霞等^[25]将制作的雄性SD糖尿病双后肢缺血大鼠随机分组: G-CSF动员后行PB-MNCs移植组、骨髓动员组和空白对照组,分不同时间点检测内皮素(endothelin, ET)水平。结果显示:骨髓动员和动员后MNCs移植均可改善糖尿病大鼠的内皮功能;毛细血管密度的测定结果显示:骨髓动员和动员后MNCs移植均可促进缺血后肢毛细血管的生成;动员后MNCs移植效果优于单纯骨髓动员治疗糖尿

病大鼠后肢缺血。血浆ET水平的升高,在一定程度上反应血管内皮功能的损伤程度,骨髓动员和动员后干细胞移植组ET水平较对照组明显降低,表明骨髓动员和动员后干细胞移植均可改善糖尿病大鼠全身血管氧化应激情况,并且骨髓动员使骨髓中EPCs数量增加^[26-27],趋化到缺血局部的EPCs相应增加,从而促进缺血局部的血管形成。

2.5 外周血内皮祖细胞(peripheral blood endothelial progenitor cells, PB-EPCs)移植

赵焜等^[28]对糖尿病双下肢缺血雄性SD大鼠分别肌注PB-EPCs(左侧后肢)和PB-MNCs(右侧后肢)移植治疗,结果显示,VIII因子染色阳性的毛细血管密度、肌肉VEGF相对含量在PB-EPCs组与PB-MNCs组均高于对照组,移植PB-EPCs及含有相当数量PB-EPCs的PB-MNCs对糖尿病大鼠后肢血管病变的改善作用相似。外周血干细胞包括HSC和EPC,这两种细胞存在共同前体细胞即成血-血管细胞。EPC作为血管EC的祖细胞,能直接分化为EC。其次,EPC本身可以分泌VEGF等细胞生长因子,通过旁分泌效应促进局部VEC增殖,即增强血管生成效应,从而改善供血,因此PB-EPCs可能在PB-MNCs移植中发挥主要作用。

2.6 人脐血单个核细胞(human umbilical cord blood mononuclear cells, HUCB-MNCs)移植

张弛等^[29]通过密度梯度离心提取HUCB-MNCs和同源异体SD大鼠的BM-MNCs,并沿缺血下肢股动脉走向肌肉注射干细胞,移植治疗28 d后处死糖尿病大鼠,取心脏、肺脏、肝脏、脾脏和肾脏,均未发现肿瘤的发生,指出HUCB-MNCs与BM-MNCs移植治疗的安全性;HUCB-MNCs组、BM-MNCs组较生理盐水组左下肢VEGF含量及毛细血管密度明显增高;HUCB-MNCs组与BM-MNCs组比较,左下肢VEGF含量及毛细血管密度无明显差异。脐血干细胞移植能有效改善糖尿病大鼠下肢缺血,其疗效可达到骨髓干细胞移植的效果。脐血干细胞可能在移植部位部分分化为VEC;也可能自体表达血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2),促进VEGF的趋化,进而促进周围原有血管内皮增殖,均可使新生血管增多,血供增加。此外,实验采取人脐血干细胞移植治疗糖尿病下肢缺血大鼠,也存在人与动物之间的伦理问题。

2.7 人脐血内皮祖细胞(human umbilical cord blood endothelial progenitor cells, HUCB-EPCs)移植

彭艳等^[30-32]应用射线照射减轻糖尿病下肢缺血大鼠排斥反应,分别经尾静脉注射和局部肌肉注射HUCB-EPCs移植治疗,荧光示踪,观察大鼠双后肢溃疡变化情况,通过对腓肠肌中VIII因子与VEGF mRNA表达的比较,认为HUCB-EPCs治疗糖尿病下肢缺血有效且治疗方式对治疗效果影响不大。静脉注射可以避免目前局部肌肉注射需要的无菌手术室条件,减少局部肌肉多点注射的费用及患者自身痛苦,为糖尿病足患者临床治疗带来极大的希望。但本实验没有检测血液中VEGF的变化、视网膜变化以及静脉注射干细胞是否影响全身,尤其临床针对患有糖尿病视网膜病变患者,可能有加重视网膜病变的危险,需要进一步实验研究证实。

2.8 人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUC-MSCs)移植

樊明世等^[33]对糖尿病双下肢缺血日本大耳白兔左后肢肌肉注射HUC-MSCs(贴壁培养获得)悬液为移植组,右后肢注射生理盐水为对照,HUC-MSCs移植2,4 w后取材,在荧光镜下观察,显示其参与了新生毛细血管的生成;并作组织切片观察毛细血管的密度,脐带干细胞移植组侧支血管及新生血管较生理盐水对照组均有明显增加;且干细胞移植组皮温明显高于对照组。与骨髓和外周血干细胞相比,脐带资源丰富、间充质干细胞更原始、分化扩增能力更强,且细胞采集简单、容易获得、免疫原性弱的优势为糖尿病下肢缺血提供了一种有效的治疗方法,具有较好的应用前景。

以上实验研究结果证实,不同来源的干细胞移植均能促进缺血区的血管新生,依据干细胞含有多种细胞亚群在血管新生时发挥的作用机制不同,具体分述如下:MSCs可在缺血组织内分化成内皮细胞,促进血管新生。刘丹丹等^[34]报道,MSCs具备内皮分化的细胞免疫学基础,它是一种过渡细胞类型,即MSCs→过渡性细胞群→EPC→内皮细胞。目前,MSCs促进“血管新生”的机制仍不明确,一般认为MSCs既可分化成VEC和血管SMC,直接形成新的血管,又可通过旁分泌VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血管生成素-2、血管生成素-1等多种血管生成因子来参与血

管的新生^[35]。

EPCs促进新血管生成的机制主要如下:一是迁移到局部通过自身分化为成熟的VEC,再增殖形成新生血管;二是通过自分泌和旁分泌机制分泌促血管生成物质如VEGF、肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子、G-CSF等;三是EPCs存在VEGF受体,倒入外源性血管生长因子基因或直接给予血管生长因子能促进血管新生;四是EPCs可作为支持细胞分泌促血管生成的细胞因子优化局部微环境来发挥作用。

MNCs是一群混合性细胞,其中包括EPCs。赵滢等^[28]的动物实验结果表明,EPCs可能在MNCs移植中发挥主要作用。因MNCs含有多种细胞亚群,在MNCs移植后有多向分化的潜能,故其疗效的长期安全性尚不确定。

3 干细胞移植治疗糖尿病溃疡(ulcer)的实验研究

大鼠通过腹腔注射STZ或高脂喂养后,腹腔注射STZ制作糖尿病模型,再在大鼠背部、肢体部或足背部人工制造创面来建立糖尿病溃疡模型。

3.1 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)移植

BM-MSCs是自我更新能力极强的一类具有多向分化潜能的非造血干细胞,通过调节炎症介质、旁分泌生长因子类物质及归巢特性,对糖尿病足溃疡有一定的治疗效果。蔡黔等^[36]将Wistar大鼠足背部切除3 mm×7 mm矩形区域全层皮肤,制备足溃疡模型,随机分为正常大鼠足溃疡组、糖尿病对照组和干细胞治疗组。对前两组注射干细胞培养基DMEM,干细胞治疗组在大鼠创缘肉膜层多点注射同种异体BM-MSCs。观察不同时间点各组大鼠溃疡面积、外周血和局部VEGF水平。VEGF是一种促进血管再生的重要因子,在创面愈合中发挥重要作用。实验结果提示,移植的BM-MSCs通过调动机体产生VEGF,并同时具有旁分泌作用完成自体转化与组织修复,促进糖尿病大鼠足溃疡的愈合。梁文佳等^[37]则对干细胞治疗组经尾静脉注射转染Ad-EGFP 72 h后的BM-MSCs悬液,糖尿病对照组及正常大鼠足溃疡组注射等量PBS溶液。移植后14 d可在糖尿病大鼠胰腺、肾脏及皮肤溃疡面观察到Ad-EGFP标记的BM-MSCs。与糖尿病对照组相比,糖尿病干细胞治疗组大鼠体重明显恢复、血糖显著降低、足溃

疡愈合加速。

万江波等^[38-39]将DAPI标记的BM-MSCs分别于双侧后足背皮下(BM-MSCs创缘皮下移植组)和双侧小腿肌肉内(BM-MSCs小腿肌肉移植组)注射,移植后分不同时间点观测指标。结果显示,两种移植方式均促进了大鼠DFUs的愈合,但在愈合的后期(第11 d),小腿肌肉内的移植方式表现出更好的持续性及高表达的VEGF。BM-MSCs能够分泌VEGF,诱导血管生成,并为创面修复带来介质及充足的营养并带走局部代谢产物,此外,VEGF还能刺激肉芽组织及上皮的形成、角质形成细胞和成纤维细胞的移行,进而促进溃疡面愈合;由于DFUs创面的微环境中存在大量的细胞毒物及炎症介质,具有蛋白水解的生物学作用,BM-MSCs移植到此环境中很难定位及生长,因而容易在局部创伤组织中死亡,难以发挥再生和旁分泌能力,故小腿肌肉内的移植方式疗效更优。

钟晓红等^[40-41]将5-BrdU标记的BM-MSCs注射在糖尿病大鼠背部人工造成圆形创面组织周围,分别于细胞移植后2, 3 w切取创面中央再生组织制备切片。结果显示, BrdU染色阳性细胞出现在创面新生表皮、真皮及皮下组织各层,部分阳性细胞位于皮脂腺及腺导管上皮中,同时也表达角蛋白,提示BM-MSCs具有向表皮细胞和皮肤腺上皮细胞分化的潜能,参与了皮肤附属器结构的组成,提高创面愈合率,促进糖尿病大鼠创面的愈合。赵李平等^[42]用改性聚乳酸-I型胶原荷载BM-MSCs移植到背部中央全层皮肤缺损创面处,结果显示,与改性聚乳酸-I型胶原支架对照组和空白对照组相比,改性聚乳酸-I型胶原载BM-MSCs组创面愈合快,新生表皮较厚,新生血管及皮肤附属器较多。提示创面愈合与BM-MSCs能够释放促进创面愈合的生长因子、细胞因子及其所处的微环境相关细胞有关。

3.2 脐带血干细胞(human umbilical cord blood stem cells, HUCB-SCs)移植

Elsharawy等^[43]将大鼠随机分为三组:对照组、糖尿病对照组和干细胞治疗组,制备糖尿病大鼠右前肢溃疡模型。采用免疫磁珠法获得人脐血CD34+干细胞,对干移植治疗组伤口创面注射人脐带血CD34+干细胞。通过光显微镜、电子显微镜提示:CD34+干细胞具有分化潜能,分化成VECs促进血管生成,或通过旁分泌的方式来刺激新生血管形成,并

有助于新角质细胞的形成及真皮成纤维细胞胶原沉积, 促进创面愈合。这为糖尿病溃疡治疗提供了新方法、新手段。但本实验存在不同种属之间干细胞移植治疗的危险性, 也存在人与动物之间的伦理问题。

正常创伤愈合是一个具有活力且复杂的过程, 它包括血管的闭合、血块的凝固、急性炎症反应、细胞迁移、增殖、分化、血管生成、上皮形成和细胞外基质的合成及重建^[44]等。而肉芽沉积和上皮化是人类所有慢性溃疡愈合最常见和最主要的机制。有研究显示, 糖尿病慢性创面难以愈合主要在于缺乏血管生成^[45]。BM-MSCs能够分泌可溶性、具有促血管增生及细胞保护性作用的因子如VEGF, 不仅是目前已知的一种最强的血管生成因子, 还能刺激肉芽组织及上皮的形成、角质形成细胞和成纤维细胞的移行; BM-MSCs能够向创伤或炎症病灶中迁移, 通过旁分泌生长因子、基质重塑、免疫调节和抗炎等参与受损组织的再生, 刺激细胞的增殖和分化, 促进受损组织的修复^[46-47]。虽然目前还没有干细胞治疗人类疾病时发生癌变的报道, 但Mishra等^[48]和Tolar等^[49]分别发现BM-MSCs能够分化为癌相关肌成纤维细胞和肉瘤, 因此, 应用于临床时应注重干细胞治疗的安全性。

4 干细胞移植治疗糖尿病周围神经病变的实验研究

糖尿病周围神经病变模型通过经腹腔注射STZ或加高脂饲料喂养后腹腔注射制作。

4.1 骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs)移植

Kim等^[50]沿大鼠坐骨神经肌肉注射BM-MNCs后, 分不同时间段检测神经传导速度(nerve conduction velocity, NCV)、神经滋养管血流量、神经血流量、血管坐骨神经荧光成像、共聚焦显微镜分析内皮细胞及其内的血管结构形态特征, 定量逆转录聚合酶链式反应测定神经中的血管生成因子和神经营养因子等。结果表明, BM-MNCs可改善糖尿病大鼠运动神经传导速度、增加神经血流、增强神经血管新生以及诱导神经营养因子的高表达, 对糖尿病周围神经病变起到治疗作用。Naruse等^[51]单侧后肢骨骼肌注射BM-MNCs, 对侧后肢骨骼肌注射生理盐水作为对照, BM-MNCs移植2 w后, 进行坐骨神经传导速度

(sciatic nerve conduction velocity, MNCV)、感觉神经传导速度(sensory nerve conduction velocity, SNCV)、坐骨神经血流量(sciatic nerve blood flow, SNBF)、神经营养因子-3(neurotrophins-3, NT-3)的mRNA表达水平和组织学检测。与生理盐水相比, 糖尿病大鼠肌肉注射BM-MNCs移植痛觉异常(如机械冷痛觉过敏)显著改善, 并减缓MNCV、SNCV和减少SNBF, 减少NT-3的mRNA表达和改善后肢肌肉微血管数, 但对表皮内神经纤维密度无明显效果。这些结果充分阐明BM-MNCs移植治疗糖尿病神经病变的作用机制: 在局部缺血组织诱导的血管生成因子、细胞因子如VEGF、bFGF、SDF-1 α 和单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)作用下, 形成新生血管, 缓解末梢血流障碍; 诱导神经保护因子、营养因子生成, 减缓糖尿病神经病理学改变, 进而为未来的临床研究提供一种新方法。

4.2 骨髓内皮祖细胞(bone marrow endothelial progenitor cells, BM-EPCs)移植

Jeong等^[52]对BM-EPCs进行CM-Dil标记, 沿C57BL/6J小鼠坐骨神经皮下肌肉注射, 对照组注射相同体积的生理盐水, 分不同时间段检测指标显示: EPC移植改善糖尿病小鼠的神经功能, 运动和感觉NCV逐渐恢复正常水平; 甩尾实验显示, 与非糖尿病对照组小鼠相比, DM-saline组小鼠甩尾温度显著增加, 相反地, DM-EPC组小鼠甩尾温度显著降低, 指示感觉神经功能恢复; 肢体激光多普勒血流成像显示, 与DM-saline小鼠相比, DM-EPC的血流量、血流量率及神经滋养管均明显增加; 坐骨神经和股肌血管荧光成像显示, BM-EPCs优先移植到坐骨神经, 并在神经中检测到SDF-1 α 和MCP-1的表达, 而肌肉中未检测到, 肌肉注射EPCs通过神经直接调制发挥治疗作用, 不通过肌肉内的血管新生。组织学检查发现, 在后肢肌肉中移植的EPCs是少数, 且大多数的EPCs 8 w内消失, 然而在坐骨神经中EPCs存活了12 w; BM-EPCs移植到神经部分分化成VEC, 通过旁分泌生成雪旺氏细胞、细胞因子、神经营养因子, 促进神经滋养管新生, 对BM-EPCs移植为治疗糖尿病周围神经病变提供一个新选择。

4.3 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)移植

Shibata等^[53]将从成年大鼠骨髓中分离出的MSCs移植到STZ诱导8 w后的糖尿病大鼠下肢骨骼

肌内, 移植后4 w对移植位点进行评估。结果发现, 在注射BM-MSCs的糖尿病大鼠下肢肌肉内, *VEGF*和*bFGF*的mRNA表达显著升高; 糖尿病大鼠痛觉减退、MNCV传导延迟、SNBF降低、腓肠肌毛细血管数与肌纤维比值降低等均可通过BM-MSCs移植得到改善, 且BM-MSCs移植可使糖尿病大鼠的轴突圆度恢复正常。实验结果提示, BM-MSCs具有多向分化潜能, 自体分泌血管生成因子, 如*VEGF*和*bFGF*; 改善移植周围微环境, 维持移植时存活率; 可能分化成神经细胞, 如星形胶质细胞、少突胶质细胞及雪旺氏细胞; 也可能分化成血管结构等, 进而对糖尿病周围神经病变起到治疗作用。

4.4 人脐血内皮祖细胞(human umbilical cord blood endothelial progenitor cells, HUCB-EPCs)移植

Naruse等^[54]将雄性免疫缺陷裸鼠(F344/N rnu/rnu)随机分为正常组和糖尿病模型组, 通过腹腔注射STZ诱导糖尿病模型, 两组分别局部肌肉注射HUCB-EPCs和生理盐水。结果显示, 糖尿病模型组单侧肌肉注射HUCB-EPCs与生理盐水相比, 后肢骨骼肌显著改善受损的MNCV和SNBF, 与正常组相比, 结果无显著性差异。组织学研究表明, 与生理盐水注射侧相比, 糖尿病模型组HUCB-EPC注射侧后肢骨骼肌微血管数量的增加, 与正常组相比, 结果无显著性差异。这些发现表明, HUCB-EPCs移植可避免同种异体移植不良免疫反应的发生, HUCB-EPCs移植在局部缺血区分化诱导新生血管, 增加缺血区血液供应, 减缓血液流动障碍; 且HUCB-EPCs与其他来源的EPCs相比, 具有较高的增殖能力, 可能是一种治疗人类糖尿病周围神经病变的有效方法。

目前, 已经提出几种糖尿病周围神经病变的机制, 包括缺血及缺氧性因素、神经多元醇代谢病变、神经营养因子降低、活性氧物质产生、神经微血管病变等。干细胞移植治疗也可促进血管新生、促进神经滋养管新生, 且在神经中存活时间比肌肉中更长, 促进神经营养因子生成, 进而治疗糖尿病周围的神经病变。

5 小结

综上所述, 干细胞移植作为治疗糖尿病足的一项新技术, 是血管再生的研究热点, 利用干细胞的高

度增殖、自我更新和多向分化潜能, 其可塑性强, 移植后能分化为VEC、SMC、星形胶质细胞、少突胶质细胞、雪旺氏细胞等多种细胞。通过自分泌及旁分泌机制分泌血管生成因子、细胞因子及神经营养因子如*VEGF*、*bFGF*、*SDF-1 α* 、*MCP-1*、*NT-3*等, 促进血管新生, 恢复局部组织血流。在糖尿病足动物实验中取得了显著疗效, 并在短期内均未出现明显不良反应和严重后果。干细胞移植技术在国内外开展的实验中均取得了成功, 为临床应用干细胞移植治疗技术提供有效性和安全性依据。

目前, 干细胞移植治疗糖尿病足动物实验的方法有局部肌肉注射法和静脉血管输注法, 多采用局部肌肉注射法。实验研究表明, 局部肌肉注射法优于静脉血管注射法, 但此法有增加感染的风险; 静脉血管输注法更符合干细胞的归巢、趋化作用原理, 但干细胞经静脉血管输注可移植全身, 可能加重糖尿病视网膜病变, 有待进一步研究。

近年来, 大量动物模型体内研究表明, 干细胞移植可以促进局部的治疗性血管形成。植入的干细胞在特定的诱导条件下, 能够分泌大量的细胞因子及生长因子, 参与新的毛细血管的生成, 改善局部微循环, 增加末梢足部血供, 促进糖尿病足愈合, 在糖尿病下肢缺血、糖尿病溃疡和糖尿病周围神经病变治疗中具有广阔的应用前景, 已经成为当今生命科学的研究热点。然而, 干细胞移植作为一项新技术, 移植治疗糖尿病足实验开展时间较短, 还存在如下问题: (1)如何获得更多的干细胞; (2)如何提高干细胞的纯度; (3)如何统一干细胞质量检测的方法; (4)干细胞移植时所需的数量、时机及有效成分, 如何能达到最佳的治疗效果; (5)干细胞移植到动物体内后, 如何鉴定其存活率、有效率及远期疗效; (6)其远期治疗是否出现无法控制的细胞分化、增殖等并发症及有无可能出现致瘤性; (7)如何进一步明确其治疗机制。随着动物实验研究的深入, 相信以上这些问题会逐渐得到解决。

参考文献 (References)

- 1 Muhs BE, Gagan EP, Sheehan P. Peripheral arterial disease: Clinical assessment and indications for revascularization in the patient with diabetes. *Curr Diab Rep* 2005; 5(1): 224-9.
- 2 Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murobara T, Ikeda U, Shintani H, Masaki H, *et al*. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemic by autologous transplantation of bone-marrow cells: A pilot study and a randomized controlled trail. *Lancet*

- 2002; 360(9331): 427-35.
- 3 Subramaniam V, Waller EK, Murrow JR, Manatunqa A, Lonial S, Kasirajan K, *et al.* Bone marrow mobilization with granulocyte macrophage colony-stimulating factor improves endothelial dysfunction and exercise capacity in patients with peripheral arterial disease. *Am Heart J* 2009; 158(1): 53-60.
- 4 To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cell. *Blood* 1997; 89(7): 2233-58.
- 5 Nishimura H, Asahara T. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascular formation. *EXS* 2005; (94): 147-54.
- 6 Madeddu P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp Physiol* 2005; 90(3): 315-26.
- 7 Lee DY, Cho TJ, Kim JA, Lee HR, Yoo WJ, Chung CY, *et al.* Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone* 2008; 42(5): 932-41.
- 8 Isner JM, Kalka C, Kawamoto A, Asahara T. Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 953: 75-84.
- 9 Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: *In vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20(3): 263-72.
- 10 Izadpanah R, Joswig T, Tsiens F, Dufour J, Kirijian JC, Bunnell BA. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques. *Stem Cell Dev* 2005; 14(4): 440-51.
- 11 Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Delforge A, Massy M, Mortier C, *et al.* Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: Phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy* 2004; 6(4): 372-9.
- 12 Alborzi A, Mac K, Glackin CA, Murray SS, Zernik JH. Endochondral and intramembranous fetal bone development: Osteoblastic cell proliferation, and expression of alkaline phosphatase, m-twist, and histone H4. *Craniofac Genet Dev Boil* 1996; 16(2): 94-106.
- 13 梁燕丹, 王培福, 杜继臣. 脐血干细胞的实验与临床应用. 中国组织工程研究与临床康复(Liang Yandan, Wang Peifu, Du Jichen. Experimental study and clinical application of umbilical cord blood stem cells. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering*) 2009; 13(27): 5349-52.
- 14 Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, *et al.* Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cell* 2003; 21(1): 50-60.
- 15 Hirata K, Li TS, Nishida M, Ito H, Matsuzaki M, Kasaoka S, *et al.* Autologous bone marrow cell implantation as therapeutic angiogenesis for ischemic hindlimb in diabetic rat model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284(1): H66-70.
- 16 孟建波, 康胜群, 康素娟, 杨彦, 周晨光. 骨髓干细胞移植治疗糖尿病兔下肢缺血效果观察. 郑州大学学报(医版)(Meng Jianbo, Kang Shengqun, Kang Suxian, Yang Yan, Zhou Chengguang. Effect of transplantation of autologous bone marrow stem cell on diabetic lowe limb ischemia of rabbits. *Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences)*) 2009; 44(6): 1168-70.
- 17 康胜群, 孟建波, 康素娟, 李玉坤. 自体骨髓干细胞移植治疗糖尿病下肢缺血性疾病的初步实验研究. 河北医科大学学报(Kang Shengqun, Meng Jianbo, Kang Suxian, Li Yukun. Experimental study of the transplantation of autologous bone marrow stem cell for the treatment of diabetic lower limb ischemia. *Journal of Hebei Medical University*) 2009; 30(3): 223-59.
- 18 于萍, 李强, 刘颖, 李静宜, 王薇, 孙玉倩, 等. 内皮祖细胞移植对糖尿病兔下肢缺血的病理及血管内皮生长因子的影响. 中国实用内科杂志(Yu Ping, Li Qiang, Liu Ying, Li Jingyi, Wang Wei, Sun Yuqian, *et al.* Pathologic and VEGF changes of transplantation of endothelial progenitor cells for hindlimb ischemia in diabetic rabbit model. *Chinese Journal of Practical Internal Medicine*) 2007; 27(15): 1207-9.
- 19 于萍, 李强, 刘颖, 李静宜, 王薇, 孙玉倩, 等. 内皮祖细胞移植对糖尿病兔下肢缺血区血管生成相关基因表达的影响. 中国糖尿病杂志(Yu Ping, Li Qiang, Liu Ying, Li Jingyi, Wang Wei, Sun Yuqian, *et al.* Upregulation of angiogenesis gene expression by transplanting endothelial progenitor cells to ischemic hindlimb in diabetic rabbit model. *Chin J Diabetes*) 2007; 15(10): 625-7.
- 20 于萍, 李强, 冷晓萍, 孙玉倩, 张中超. 内皮祖细胞移植对糖尿病兔下肢缺血的影像学改变. 中国糖尿病杂志(Yu Ping, Li Qiang, Leng Xiaoping, Sun Yuqian, Zhang Jinchao. Imaging improvements of hindlimb ischemia in diabetic rabbit model after transplantation of endothelial progenitor cells. *Chin J Diabetes*) 2009; 17(11): 826-9.
- 21 王宁, 张明琛, 姜涛, 段明军, 谢自敬. 内皮祖细胞移植治疗糖尿病大鼠下肢动脉缺血的动脉造影改变. 新疆医科大学学报(Wang Ning, Zhang Mingchen, Jiang Tao, Duan Mingjun, Xie Zijing. Angiogenesis observed by angiography in endothelial progenitor cells transplantation to hindlimb ischemia rat model with diabetes. *Journal of Xinjiang Medical University*) 2011; 34(1): 12-4.
- 22 王宁, 王护国, 姜涛, 段明军, 谢自敬. 基质细胞衍生因子1 α 预处理内皮祖细胞移植治疗糖尿病下肢缺血. 中国组织工程研究与临床康复(Wang Ning, Wang Huguo, Jiang Tao, Duan Mingjun, Xie Zi jing. Endothelial progenitor cells pre-cultured with stromal cell derived factor1alpha transplantation to treat hind limb ischemia in diabetic rats. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*) 2011; 15(36): 6749-52.
- 23 吴春朋, 张潜, 方宁, 蔡争, 石荣书, 刘祖林, 等. 骨髓间充质干细胞移植促进糖尿病大鼠后肢缺血血管的新生. 中国组织工程研究(Wu Chunpeng, Zhang Qian, Fang Ning, Cai Zheng, Shi Rongshu, Liu Zulin, *et al.* Angiogenesis in lower limb ischemia of diabetic rats after bone mesenchymal stem cells transplantation. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*) 2012; 16(1): 76-80.
- 24 Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000; 106(4): 571-8.
- 25 丁海霞, 王富军. 骨髓动员与动员后单个核细胞移植治疗糖尿病大鼠后肢缺血的疗效比较. 河北医科大学学报(Ding Haixia, Wang Fujun. A comparison on bone marrow mobilization and implantation of bone marrow mononuclear cells for the treatment of hindlimb ischemia in diabetic rat. *Journal of Hebei Medical University*) 2010; 31(5): 510-3.
- 26 Oh IY, Yoon CH, Hur J, Kim TY, Lee CS, Park KW, *et al.* Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle. *Blood* 2007; 110(12): 3891-9.
- 27 Schimieguel DM, Dominato JA, Zattar KC, Silva MR, de Souza

- MK, Nader HB, *et al.* Does mobilization for autologous stem cell transplantation damage stromal layer formation. *Hematology* 2009; 14(2): 76-83.
- 28 赵 滢, 王红祥, 毛 红, 李宾公, 邵诗颖, 邹 萍. 内皮祖细胞和单个核细胞移植对糖尿病大鼠血管病变疗效的比较. *中国糖尿病杂志*(Zhao Shi, Wang Hongxiang, Mao Hong, Li Bingong, Shao Shiyong, Zou Ping. Comparison of transplantation of endothelial progenitor cells and mononuclear cells on the treatment of ischemic disorder in the hind limb of diabetic rats. *Chin J Diabetes*) 2007; 15(4): 243-5.
- 29 张 弛, 肖日军, 张 娜, 李华珠, 杨晓春, 周桂莲, 等. 脐血干细胞移植治疗糖尿病大鼠下肢缺血的实验研究. *中华损伤与修复杂志*(Zhang Chi, Xiao Qijun, Zhang Na, Li Huazhu, Yang Xiaochun, Zhou Guilian, *et al.* Umbilical cord blood stem cells induce angiogenesis following the hindlimb ischemia in diabetic rats. *Chin J Injury Repair and Wound Healing (Electronic Edition)*) 2012; 7(1): 18-23.
- 30 彭 艳, 程 培, 徐 勇. 脐血内皮祖细胞尾静脉与局部注射治疗糖尿病下肢缺血. *中国组织工程研究与临床康复*(Peng Yan, Cheng Pei, Xu Yong. Intravenous and local injection of umbilical cord blood progenitor cells for treatment of diabetic lower limb ischemia. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*) 2011; 15(19): 3499-502.
- 31 彭 艳, 徐 玲, 徐 勇. 脐血内皮祖细胞治疗糖尿病大鼠下肢缺血的实验研究. *中国糖尿病杂志*(Peng Yan, Xu Ling, Xu Yong. Experimental study on treatment with umbilical cord blood endothelial progenitor cells for lower limb ischemia of diabetic rats. *Chin J Diabetes*) 2013; 21(1): 76-9.
- 32 彭 艳, 徐 玲, 徐 勇. 局部注射脐血内皮祖细胞治疗糖尿病大鼠下肢缺血的试验研究. *大家健康*(Peng Yan, Xu Ling, Xu Yong. Local injection cord blood progenitor cells to treat lower limb ischemia in diabetic rats. *For all Health*) 2013; 7(2): 20-2.
- 33 樊明世, 杨晓凤, 吴雁翔, 张轶斌, 许忆峰, 宋 楠, 等. 人脐带间充质干细胞移植改善糖尿病兔下肢缺血. *中国组织工程研究与临床康复*(Fan Mingshi, Yang Xiaofeng, Wu Yanxiang, Zhang Yibin, Xu Yifeng, Song Nan, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves lower limb ischemia of diabetic rabbits. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*) 2011; 15(1): 33-6.
- 34 刘丹丹, 王悦增, 赵东海, 李玉林. 人骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞诱导分化的研究. *中国应用生理学杂志*(Liu Dandan, Wang Yuezheng, Zhao Donghai, Li Yulin. Study on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into vascular endothelial cells. *Chin J Appl Physiol*) 2006; 22(4): 423-7.
- 35 Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: From biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12(2): 88-96.
- 36 蔡 黔, 董 方, 刘 毅. 异体骨髓间充质干细胞治疗大鼠糖尿病足溃疡及血管内皮生长因子的表达. *中国组织工程研究与临床康复*(Cai Qian, Dong Fang, Liu Yi. Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of diabetic foot ulcers in rats and vascular endothelial growth factor expression. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*) 2010; 14(36): 6733-7.
- 37 梁文佳, 蔡 黔, 刘 毅. Ad-EGFP修饰的MSCs在糖尿病足溃疡大鼠体内的示踪及疗效观察. *中国美容医学*(Liang Wenjia, Cai Qian, Liu Yi. Study of diabetic foot ulcer transplanted with bone marrow mesenchymal stem cells transfected with Ad-EGFP in rats. *Chinese Journal of Aesthetic Medicine*) 2011; 20(10): 1571-4.
- 38 万江波, 蔡 黔, 刘 毅. 小腿肌肉移植骨髓间充质干细胞治疗大鼠糖尿病足溃疡的疗效观察. *南方医科大学学报*(Wan Jiangbo, Cai Qian, Liu Yi. Effect of intramuscular bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in the leg for treatment of diabetic foot ulcers in rats. *J South Med Univ*) 2012; 32(12): 1730-6.
- 39 万江波, 蔡 黔, 刘 毅. 骨髓间充质干细胞不同移植方式治疗大鼠糖尿病足溃疡的疗效观察. *中南大学学报(医学版)*(Wan Jiangbo, Cai Qian, Liu Yi. Effect of different transplantations with bone-marrow derived mesenchymal stem cells on diabetic foot ulcers in rats. *J Cent South Univ (Med Sci)*) 2013; 38(4): 347-55.
- 40 钟晓红, 王明刚, 赵李平, 高新宇. 骨髓间充质干细胞在糖尿病模型创面中向表皮细胞分化的初步研究. *中国美容医学*(Zhong Xiaohong, Wang Minggang, Zhao Liping, Gao Xinyu. Preliminary study on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into epidermal cells in diabetic wound. *Chinese Journal of Aesthetic Medicine*) 2010; 19(1): 65-7.
- 41 钟晓红, 王明刚, 赵李平, 高新宇. 骨髓间充质干细胞在糖尿病创面中向皮肤腺上皮的分化. *中国组织工程研究与临床康复*(Zhong Xiaohong, Wang Minggang, Zhao Liping, Gao Xinyu. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into the cells of skin appendages in diabetic wound. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*) 2010; 14(6): 1019-22.
- 42 赵李平, 袁 芳, 贺 斌, 王明刚, 钟晓红. 改性聚乳酸-I型胶原荷载骨髓间充质干细胞对糖尿病大鼠创面愈合的影响. *中华实验外科杂志*(Zhao Liping, Yuan Fang, He Bin, Wang Minggang, Zhong Xiaohong. Modified poly L acid-type collagen I loaded with bone marrow mesenchymal stem cell for diabetic wound of rat. *Chin J Surg*) 2012; 29(6): 1083-4.
- 43 Elsharawy MA, Naim M, Greish S. Human CD34+ stem cells promote healing of diabetic foot ulcers in rats. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2012; 14(3): 288-93.
- 44 Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miaqkova A, Leroux MA. Concise review: Role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1(2): 142-9.
- 45 Marrotte EJ, Chen DD, Hakim JS, Chen AF. Manganese superoxide dismutase expression in endothelial progenitor cells accelerates wound healing in diabetic mice. *J Clin Invest* 2010; 120(12): 4207-19.
- 46 Kuo YR, Wang CT, Cheng JT, Wang FS, Chiang YC, Wang CJ. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced diabetic wound healing through recruitment of tissue regeneration in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Plast Reconstr Surg* 2011; 128(4): 872-80.
- 47 Hanson SE, Bentz ML, Hematti P. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds. *Plast Reconstr Surg* 2010; 125(2): 510-6.
- 48 Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, *et al.* Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008; 68(11): 4331-9.
- 49 Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, Panoskaltari Mortari A, McElmurry RT, Bell S, *et al.* Sarcoma derived from cultured mesenchymal

- stem cells. *Stem Cell* 2007; 25(2): 371-9.
- 50 Kim H, Park JS, Choi YJ, Kim MO, Huh YH, Kim SW, *et al.* Bone marrow mononuclear cells have neurovascular tropism and improve diabetic neuropathy. *Stem Cell* 2009; 27(7): 1686-96.
- 51 Naruse K, Sato J, Funakubo M, Hata M, Nakamura N, Kobayashi Y, *et al.* Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells improves mechanical hyperalgesia, cold allodynia and nerve function in diabetic neuropathy. *PLoS One* 2011; 6(11): e27458.
- 52 Jeong JO, Kim MO, Kim H, Lee MY, Kim SW, Li M, *et al.* Dual angiogenic and neurotrophic effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells on diabetic neuropathy. *Circulation* 2009; 119(5): 699-708.
- 53 Shibata T, Naruse K, Kamiya H, Kozakae M, Kondo M, Yasuda Y, *et al.* Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats. *Diabetes* 2008; 57(11): 3099-107.
- 54 Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Mizubayashi R, Kamiya H, *et al.* Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes* 2005; 54(6): 1823-8.