

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☆

蔡黔, 董方, 刘毅

Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of diabetic foot ulcers in rats and vascular endothelial growth factor expression

Cai Qian, Dong Fang, Liu Yi

Abstract

BACKGROUND: Autologous bone marrow stem cells and autologous peripheral blood stem cells are commonly used to treat diabetic foot ulcer in clinic. Few studies have addressed basic research of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) for diabetic foot ulcer.

OBJECTIVE: To investigate the effect of local transplantation of allogeneic BMSCs in the treatment of rats with diabetic foot ulcers and the systemic and local expression of vascular endothelial growth factor (VEGF).

METHODS: A total of 90 male Wistar rats were randomly divided into three groups: control group (normal foot ulcers), BMSCs treatment group and diabetic control group. Rat models of type 2 diabetic foot ulcers were established in the BMSCs treatment group and diabetic control group. Following model induction, allogeneic BMSCs and stem cell medium DMEM were respectively injected. At 1, 4 and 8 days following model establishment, rat ulcer area was observed in each group. Nucleus staining tracing and pathological examination were conducted. Enzyme linked immunosorbent assay was utilized to measure VEGF concentration in peripheral blood. Western blot assay was employed to detect VEGF concentration in local region.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with diabetic control group, ulcer healed faster in the BMSCs treatment group, but slower than control group. Peripheral blood VEGF expression increased, but did not reach normal levels. In early days of allogeneic BMSCs treatment (1-4 days), VEGF concentration was significantly elevated, but slightly elevated in late days (8 days). In the BMSCs treatment group, healing was slow; epidermis was not completely covered. The healing was significantly early compared with diabetic control group, and epidermis was obviously covered. Nucleus staining demonstrated that transplanted stem cells gathered in the regions surrounding ulcers. These indicated that allogeneic BMSCs can promote the healing of diabetic foot ulcers in rats. The mechanism may be that it increased the VEGF expression in systemic condition, especially local condition.

Cai Q, Dong F, Liu Y. Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of diabetic foot ulcers in rats and vascular endothelial growth factor expression. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(36): 6733-6737. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Department of Burns and Plastic Surgery, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Area Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Cai Qian☆, Doctor, Associate professor, Department of Burns and Plastic Surgery, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Area Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China
caiqxsf@yahoo.com.cn

Received: 2010-04-08
Accepted: 2010-08-06

摘要

背景: 目前在临床多采用自体骨髓干细胞及自体外周血干细胞治疗糖尿病足溃疡, 少见利用骨髓间充质干细胞治疗糖尿病足溃疡的基础研究。

目的: 观察局部移植异体骨髓间充质干细胞治疗大鼠糖尿病足溃疡的效果及血管内皮生长因子的全身及局部表达情况。

方法: 取雄性 Wistar 大鼠 90 只, 随机数字表法分为 3 组: 对照组(正常足部溃疡)、干细胞治疗组、糖尿病对照组。干细胞治疗组、糖尿病对照组建立 2 型糖尿病足溃疡模型, 造模后分别注射同种异体骨髓间充质干细胞、干细胞培养基 DMEM。造模后第 1, 4, 8 天观察各组大鼠溃疡面积、细胞核染色示踪及病理学检查, ELISA 法测外周血血管内皮生长因子浓度、Western-blotting 法测局部血管内皮生长因子浓度。

结果与结论: 与糖尿病对照组比较, 干细胞治疗组溃疡愈合速度迅速, 但仍较对照组愈合缓慢, 外周血中血管内皮生长因子表达增高, 也未达到正常水平。异体骨髓间充质干细胞治疗前期(1~4 d)能明显提高局部血管内皮生长因子浓度, 但在后期(8 d)局部浓度提高不足。干细胞治疗组愈合缓慢, 表皮覆盖不完全, 但较糖尿病对照组愈合明显提前, 表皮覆盖较明显; 细胞核染色示移植后干细胞均聚集于溃疡区周围。提示异体移植骨髓间充质干细胞可促进大鼠糖尿病足溃疡的愈合, 其促进愈合的可能机制为其上调了血管内皮生长因子在全身尤其局部的表达。

关键词: 糖尿病足; 溃疡; 大鼠; 骨髓间充质干细胞; 血管内皮生长因子; 移植

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.36.019

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[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(36):6733-6737. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

解放军兰州军区兰州总医院烧伤整形科, 甘肃省兰州市 730050

蔡黔☆, 男, 1965年生, 贵州省贵阳市人, 汉族, 2001年解放军第三军医大学毕业, 博士, 副教授, 主要从事创面修复研究。
caiqxsf@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2010)36-06733-05

收稿日期: 2010-04-08
修回日期: 2010-08-06
(20100408003/GW · Q)

0 引言

糖尿病足溃疡与坏疽是糖尿病的严重并发症, 目前认为有多种因素参与了糖尿病足的形成, 其中下肢末梢动脉闭塞和缺血, 是导致其形成的重要因素^[1-3]。骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cell,

BMSCs)是一种具有多分化潜能的成体干细胞^[4]。

BMSCs是一种取材方便, 不被异体免疫排斥, 具有多向分化潜能的干细胞^[5], 曾有利用BMSCs修复缺血性心肌、促进骨组织再生修复等报道, 在治疗难愈性创面的研究中多有报道。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种高度特异地作用于血管内皮细胞的有丝分裂原, 是上调血管生

成的重要因子, 同时能非常显著地延长血管内皮细胞的寿命, 有使血管内皮细胞倍增次数增加的作用, 从而促进创面愈合^[6-8]。目前在干细胞治疗糖尿病足溃疡研究领域内多采用自体骨髓干细胞及自体外周血干细胞的临床研究^[9-10], 利用BMSCs治疗糖尿病足溃疡的基础研究涉及尚浅。

本实验从异体BMSCs治疗大鼠糖尿病足溃疡入手^[11], 探讨BMSCs与VEGF关系^[12-13], 从而寻找治疗糖尿病足溃疡的新方法。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2008-09/2009-09在解放军兰州军区兰州总医院完成。

材料:

实验动物: 雄性Wistar大鼠5只, 体质量120~150 g, 用于BMSCs的分离、培养; Wistar大鼠90只, 体质量(200±15)g, 均由甘肃省中医学提供, 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
链脲佐菌素(STZ), 胰蛋白酶, 二甲基亚砜	Sigma 公司
DMEM-F12 培养基 高脂饲料	GIBCO 公司 解放军兰州军区兰州总医院实验动物科
胎牛血清	杭州四季青公司, 中国
VEGF 酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒	ADL 公司
BCA 蛋白定量试剂盒	博奥森公司, 中国
血糖试剂盒	迈克科技公司, 中国
兔抗大鼠 VEGF 多克隆抗体	Abcom 公司
兔抗大鼠 CD34 抗体, FITC 标记的羊抗兔 IgG	博士德公司, 中国
CO ₂ 恒温培养箱	Heracell 公司
Vitab21 全自动生化仪	Vitabl Scientific 公司
MULTISKAN MK3 酶标仪	THERMO 公司

实验方法:

BMSCs的分离、培养、纯化: 取Wistar大鼠, 无菌条件下采集双侧股骨、胫骨, 剪开两端, 用5 mL体积分数为10%胎牛血清的DMEM-F12培养液冲出骨髓, 200目筛网过滤, 然后平均接种于5个25 mL塑料培养瓶中, 加体积分数为10%胎牛血清的培养基至8 mL, 置于37 °C, 体积分数为5%CO₂饱和湿度培养箱, 每3 d换液1次, 通过传代纯化细胞, 取第3代进行移植^[14-16]。

动物模型的建立与分组: 将90只雄性Wistar大鼠随机

数字表法分为对照组、糖尿病对照组、干细胞治疗组, 每组30只。将糖尿病对照组、干细胞治疗组高脂饲料喂养。2个月后, 糖尿病对照组、干细胞治疗组禁食16 h后腹腔注射由柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 4.4)配制的链脲佐菌素45 mg/kg, 第7天测空腹血糖>16 mmol/L者入选模型, 足背部切除3 mm×7 mm矩形区域全层皮肤, 建立糖尿病足溃疡模型, 并计为第0天^[17-20]。对照组仅足背部切除3 mm×7 mm矩形区域全层皮肤, 制备正常足溃疡模型。

BMSCs移植及标记: 将培养第3代的BMSCs染色, PBS洗涤5次后, 胰酶消化, 制成浓度为5×10⁸ L⁻¹的DMEM-F12培养基悬浊液。于创面形成后第1天干细胞治疗组大鼠创缘肉膜层多点注射细胞悬浊液0.4 mL, 对照组和糖尿病对照组各注射同等体积的培养基。

溃疡愈合面积观察: 注射细胞后第1, 4, 8天, 3组大鼠溃疡均用数码相机拍照, 然后行Image-Pro Plus.V6.0处理得出溃疡面积, 比较各组溃疡愈合情况。

ELISA测定外周血VEGF蛋白水平: 细胞注射后第1, 4, 8天经内眦静脉取外周血1.5 mL, 5 000 r/min离心4 min后, 取100 μL血浆, 进行ELISA检测(按试剂盒说明书操作), 酶标仪450 nm波长测样品A值于标准曲线查出样品浓度。

Western-blotting皮肤局部VEGF浓度测定: 于注射细胞后第1, 4, 8天将每组随机抽取的10只大鼠处死, 取大鼠足背部全层皮肤, 加入组织裂解液(50 mmol/L Tris-HCL, pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1%NP-40, 0.25%去氧胆酸钠, 1 mmol/L PMSF, 0.1%SDS)后提取蛋白, 进行BCA蛋白定量上样20 μg, 120 V分离胶(12%)电泳, 4 °C转膜2 h, 封闭2 h, TBST洗膜10 min, 加入兔抗大鼠VEGF(1:1 000)抗体4 °C孵育过夜, TBST洗膜3×10 min, 羊抗兔IgG 37 °C(1:300)孵育1.5 h, ECL显色, 柯达胶片曝光10 s, 结果扫描入电脑并经图像分析软件处理, 得出相对吸光度值。

分别于溃疡造模后第1, 4, 8天取3组大鼠溃疡组织皮肤行苏木精-伊红染色, 观察溃疡愈合情况。

主要观察指标: ①各组溃疡面积的测量。②ELISA法检测各组外周血中VEGF的浓度。③Western-blotting法测量各组局部VEGF的表达。④骨髓间充质干细胞荧光染色示踪。⑤苏木精-伊红染色组织学观察各组溃疡愈合情况。

设计、实施、评估者: 实验设计为第一作者, 干预实施为第一、二作者, 评估为第一、二、三作者。均经过正规培训, 采用盲法评估。

统计学分析: 由第一、二作者采用SPSS 10.0软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析, 两组之间比较采用LSD法, 以P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 90只大鼠, 造模成功79只, 最后79只进入结果分析。

2.2 BMSCs培养结果 原代培养第9或10天时可见培养瓶底有多量散在的梭型、多角型BMSCs, 第14天BMSCs基本铺满瓶底, 传代后第6天左右可铺满瓶底, 第2, 3代呈均匀一致的长梭形, 见图1。

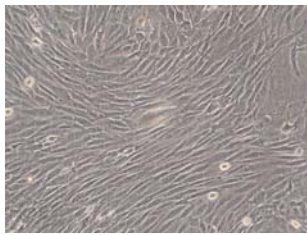


Figure 1 Adherent cultured third passage of bone marrow mesenchymal stem cells under phase contrast microscope ($\times 200$)
图1 贴壁法培养第3代骨髓间充质干细胞的相差显微镜下观察($\times 200$)

2.3 各组溃疡愈合面积的比较 见表1。

表1 各组大鼠溃疡面积比较
Table 1 Comparison of ulcer area of rats in all groups ($\bar{x} \pm s, n=79, \text{mm}^2$)

Group	1 d	4 d	8 d
Control	31.25 \pm 4.36	20.16 \pm 3.68	3.64 \pm 0.92
BMSCs treatment	31.90 \pm 3.66	23.62 \pm 2.26	7.56 \pm 1.91
Diabetic control	32.18 \pm 7.53	25.50 \pm 6.79	13.20 \pm 1.74
<i>F</i>	0.077	7.174	85.662
<i>P</i>	0.926	0.002	0.000 13

BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells

从各组溃疡面积的愈合结果可见, 移植后第1天, 3组间溃疡愈合差异均无显著性意义($P > 0.05$); 第4, 8天组间开始有差异, 进一步行LSD法两两比较: 第4天对照组比其他两组愈合明显, 糖尿病对照组与干细胞治疗组愈合差异不明显($P=0.230$); 第8天对照组明显较其他两组愈合快, 干细胞治疗组的愈合速度快于糖尿病对照组($P=0.000 13$)。

2.4 外周血VEGF蛋白水平 见表2。

表2可见, 移植后第1天各组差异无显著性意义($P > 0.05$); 第4天对照组明显高于干细胞治疗、糖尿病对照组($P < 0.01$), 干细胞治疗组、糖尿病对照组间差异无显著性意义($P > 0.05$); 第8天对照组高于干细胞治疗组($P < 0.01$), 干细胞治疗组高于糖尿病对照组($P < 0.01$)。从各组1, 4, 8 d时间纵断面上看, 对照组VEGF质量浓度明显增高($P < 0.01$), 干细胞治疗组亦显示出增高趋

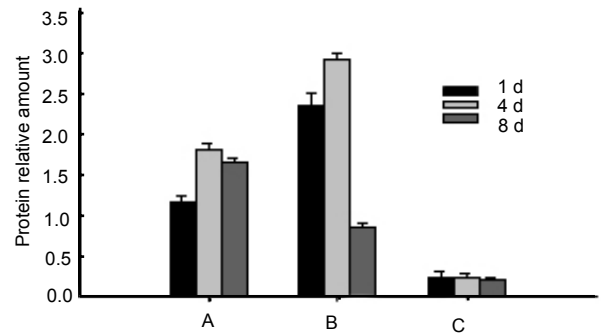
势($P < 0.05$), 糖尿病对照组却显示出降低趋势($P < 0.05$)。

表2 各组大鼠外周血 VEGF 蛋白水平比较
Table 2 Comparison of vascular endothelial growth factor protein level in peripheral blood of rats in all groups ($\bar{x} \pm s, n=79, \mu\text{g/L}$)

Group	1 d	4 d	8 d
Control	1.40 \pm 0.07	1.58 \pm 0.06	1.70 \pm 0.04
BMSCs treatment	1.47 \pm 0.07	1.53 \pm 0.08	1.50 \pm 0.04
Diabetic control	1.45 \pm 0.10	1.04 \pm 0.05	1.14 \pm 0.07
<i>F</i>	2.227	220.996	310.069
<i>P</i>	0.127	0.000 24	0.000 16

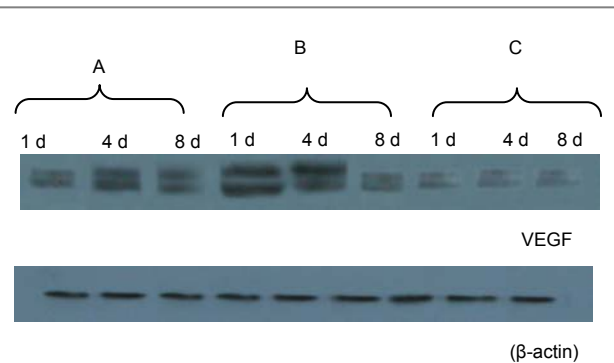
BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells

2.5 Western-blotting检测皮肤局部VEGF水平 见图2, 3。



A: control group; B: bone marrow mesenchymal stem cells treatment group; C: diabetic control group

Figure 2 Vascular endothelial growth factor levels in local region of the skin in each group
图2 各组皮肤局部血管内皮生长因子水平



A: control group; B: bone marrow mesenchymal stem cells treatment group; C: diabetic control group

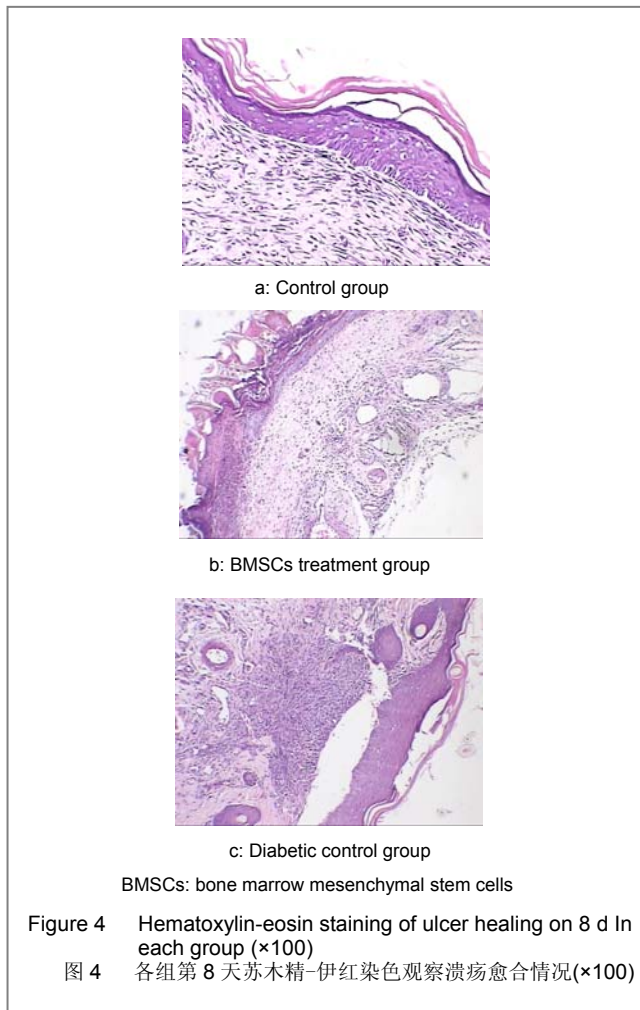
Figure 3 Photographic band results and relative absorbance value of vascular endothelial growth factor (VEGF) and β -actin expression in local region at 1, 4 and 8 d in each group

图3 各组在1, 4, 8 d局部血管内皮生长因子及 β -actin表达的条带结果与相对吸光度值

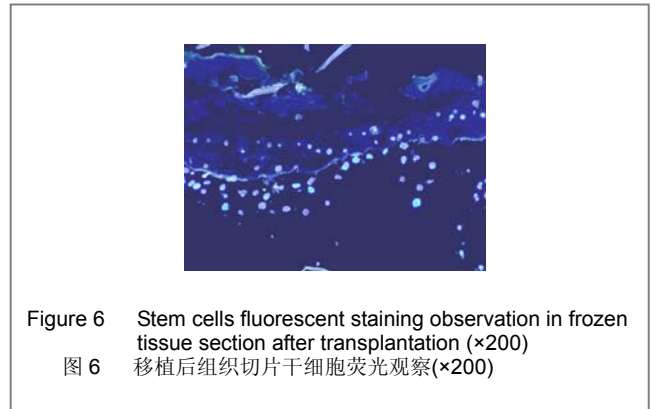
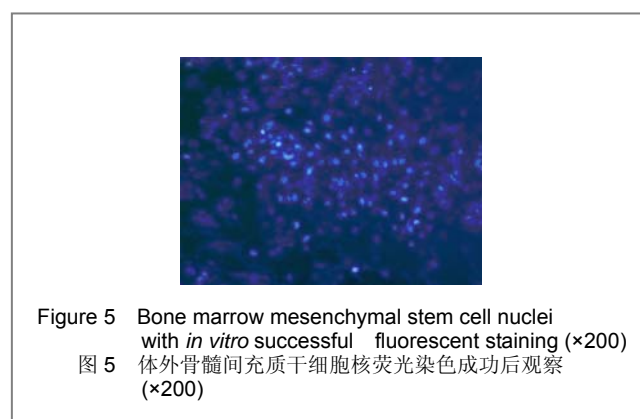
相对吸光度值测量后, 可得VEGF浓度的相对量:

第1, 4, 8天糖尿病对照组明显少于其他两组($P < 0.01$), 干细胞治疗组在第1, 4天的浓度高于糖尿病对照组, 但在第8天却少于对照组($P < 0.01$)。

2.6 苏木精-伊红染色观察溃疡愈合情况 病理切片观察见3组大鼠在造模第1天, 溃疡深度均为全层皮肤, 第4天及第8天可见对照组肉芽生长迅速, 表皮覆盖完全, 见图4, 糖尿病对照组愈合缓慢, 表皮覆盖不完全, 干细胞治疗较糖尿病对照组愈合明显提前, 表皮覆盖较明显, 但比对照组差。



2.7 BMSCs荧光观察结果 见图5, 6。



荧光显微镜下可见培养皿贴壁细胞染色成功, 细胞核呈白亮色椭圆形, 干细胞治疗组大鼠行局部注射后于1, 4, 8 d行冰冻切片观察, BMSCs核呈白亮色荧光均匀分布在皮肤筋膜层下, 部分BMSCs被吞噬, 第8天仍可见BMSCs存活。

3 讨论

糖尿病足溃疡是糖尿病患者致残致死的重要原因之一。糖尿病患者中15%以上将在其生命的某一时间发生足溃疡或坏疽^[21], 其中14%~24%的糖尿病足溃疡患者需要截肢, 在非外伤性下肢截肢患者中, 糖尿病足溃疡患者所占比例超过一半^[22-23]。目前传统治疗方法效果不佳, 形成很多的研究热点, 寻求解决糖尿病足溃疡的治疗方法^[24-25]。

本实验在前期工作建立大鼠糖尿病足溃疡模型的基础上, 观察采用异体BMSCs局部移植治疗大鼠糖尿病足溃疡VEGF在外周血及局部浓度的变化, 结果表明同种异体BMSCs具有明显促进糖尿病足溃疡的愈合作用, 但还不能达到对照组水平; 移植BMSCs后外周血中VEGF浓度有明显的提高, 但仍较对照组少; 糖尿病对照组局部VEGF明显缺乏, 干细胞治疗组在移植细胞后数天出现外周血、局部血管内皮生长因子浓度增高明显, 但后期局部浓度降低至正常水平以下; 免疫荧光显示局部移植同种异体BMSCs后, BMSCs在第8天时组织中仍见定居存活。

通过VEGF的测定可判定糖尿病足溃疡存在VEGF分泌不足, 局部移植BMSCs后可以促进糖尿病足溃疡的愈合, 并提高外周血及局部VEGF浓度; 但单次移植BMSCs后, 局部VEGF后期分泌不足可能是导致移植治疗组后期愈合缓慢的重要原因。

VEGF是一种促进血管再生的重要因子, 在创面的愈合中发挥着重要的作用, VEGF在糖尿病足溃疡模型中较对照组严重缺乏, 说明VEGF的缺乏可能对糖尿病足溃疡的难愈性发挥着重要的作用^[26-27], 本实验在移植BMSCs后, 外周血浓度增高, 可假设其通过BMSCs的

信号转导作用调动机体产生VEGF, 而同时具有旁分泌作用完成自身定居转化过程参与组织修复, 在此过程中相对快速激活周围局部VEGF的分泌达到一定的高浓度, 但某些机制却抑制了后期VEGF的产生, 以上的现象及机制仍需进一步研究。

4 参考文献

- [1] Lubart R, Landau Z, Jacobi J, et al. A new approach to ulcer treatment using broadband visible light. *Laser Ther.* 2007;16(1): 7-10.
- [2] Arora S, Pompeselli F, LoGerfo FW, et al. Cutaneous microcirculation in the neuropathic diabetic foot improves significantly but not completely after successful lower extremity revascularization. *Vasc Surg.* 2002;35(3): 501-505.
- [3] Eriko TY, Hiroaki M, Toyooki M, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone marrow cells; a pilot Study and a randomized controlled trial. *Lancet.* 2002;360(9274):427-435.
- [4] Kirana S, Stratmann B, Lammers D, et al. Wound therapy with autologous bone marrow stem cells in diabetic patients with ischaemia-induced tissue ulcers affecting the lower limbs. *Int J Clin Pract.* 2007;61(4):690-692.
- [5] Encina NR, Billotte WG, Hofmann MC. Immunomagnetic isolation of osteoprogenitors from human bone marrow stroma. *Lab Invest.* 1999; 79(4): 449-457.
- [6] Liu BL, Zhang XQ. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2007;11(46):9242-9246.
刘伯龄, 张锡庆. hVEGF165基因转染后骨髓间充质干细胞蛋白分泌功能及成骨活性的检测[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(46): 9242-9246.
- [7] Chen L, Tredget EE, Liu C, et al. Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. *PLoS One.* 2009;4(9):7119.
- [8] Andrew B. The diabetic foot: epidemiology, risk factors and the status of care. *Diabetes Voice.* 2005;50(special issue):5-7.
- [9] Wu WJ. *Xin Yixue.* 2008;39(2):86-88.
吴文俊. 自体外周血干细胞移植治疗严重糖尿病足18例分析[J]. *新医学*, 2008, 39(2): 86-88.
- [10] Jiang Y. *Yixue Lilun yu Shijian.* 2008;21(2):179-180.
江茵. 自体外周血干细胞移植治疗糖尿病足11例临床报告[J]. *医学理论与实践*, 2008, 21(2): 179-180.
- [11] Zhang Z, Liu WS, Zhao JZ. *Shiyong Linchuang Yixue.* 2007; 8(8): 58-60.
张忠, 刘文申, 赵秀兰. 自体骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足溃疡[J]. *实用临床医学*, 2007, 8(8): 58-60.
- [12] Qian HG, Zhu DX, Zhu JZ, et al. *Zhongguo Weixunhuan.* 2007; 11(5): 303-307.
钱寒光, 朱栋晓, 祝建中, 等. 骨髓间充质干细胞自体移植促进缺血肢体血管生成的实验研究[J]. *中国微循环*, 2007, 11(5): 303-307.
- [13] Hanft JR, Pollak RA, Barbul A, et al. Phase I trial on the safety of topical rhVEGF on chronic neuropathic diabetic foot ulcers. *J Wound Care.* 2008;17(1):30-32,34-37.
- [14] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4): 568-584.
- [15] Liu PD, Wang W, Mei XF. *Zhongguo Linchuang Kangfu.* 2005; 9(18): 18-40.
刘品端, 王伟, 梅晰凡. 大鼠骨髓间充质干细胞的分离与培养-贴壁分离和消化控制相结合可否为简便高效的技术方法[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(18): 18-40.
- [16] Zhang BS, Wang F, Deng L, et al. *Zhongguo Zuzhi Huaxue yu Xibao Huaxue Zazhi.* 2003; 12(2):161-165.
张本斯, 王凡, 邓力, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的分离纯化与初步鉴定[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2003, 12(2): 161-165.
- [17] Lau TW, Sahota DS, Lau CH, et al. An in vivo investigation on the wound-healing effect of two medicinal herbs using an animal model with foot ulcer. *Eur Surg Res.* 2008; 41(1):15-23.
- [18] Zhu YQ, Cheng YS, Li MH, et al. Shanghai Jiaotong Daxue Xuebao: *Yixueban.* 2008; 28(1): 1-4.
朱悦琦, 程英升, 李明华, 等. 糖尿病足溃疡动物模型的建立[J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2008, 28(1):1-4.
- [19] Zhao XH, Song Z, Li X, et al. *Zhonghua Yufang Yixue Zazhi.* 1999; 33(5): 300.
赵晓华, 宋真, 李兴, 等. 胰岛素抵抗性非胰岛素依赖性糖尿病大鼠模型研制[J]. *中华预防医学杂志*, 1999, 33(5): 300.
- [20] Zhang RX, Jia ZP, Wang J, et al. *Xibei Guofang Yixue Zazhi.* 2007; 28(3): 161-163.
张学, 贾正平, 王娟, 等. 实验性2型糖尿病大鼠模型的建立和评价(I)——体重、血糖和肝糖原的变化[J]. *西北国防医学杂志*, 2007, 28(3): 161-163.
- [21] Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004;27(5):1047-1053.
- [22] Pinzur MS, Slovenkai MP, Trepman E, et al. Guidelines for diabetic foot care: recommendations endorsed by the Diabetes Committee of the American Orthopaedic Foot and Ankle Society. *Foot Ankle Int.* 2005;26(1):113-119.
- [23] Weltermann A, Wolzt M, Petersmann K, et al. Large amounts of vascular endothelial growth factor at the site of hemostatic plug formation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(7): 1757-1760.
- [24] Ferrara N, Davis Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18(1): 4-25.
- [25] Loeffler M, Roeder I. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and model a conceptual approach. *Cells Tissue Organs.* 2002;171(1): 8-26.
- [26] Li YS, Huo XJ, Ji L, et al. *Zhongguo Laonianxue Zazhi.* 2007; 11(27): 2171-2173.
李树岩, 回学军, 纪磊, 等. bFGF重组腺病毒转染骨髓间充质干细胞促进VEGF的表达[J]. *中国老年学杂志*, 2007, 11(27): 2171-2173.
- [27] Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, et al. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg.* 1998;28(6):964-973.

来自本文课题的更多信息——

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: ①建立了简便、稳定、便于测量的糖尿病足溃疡模型。②骨髓间充质干细胞局部移植后对干细胞进行荧光示踪, 并使用 Image-ProPlus.V6.0 计算溃疡面积, 结果准确可靠。③将各组大鼠血管内皮生长因子的全身及局部表达进行比较, 初步探讨糖尿病足溃疡的发病机制。检测方法成熟、可信度高。

课题评估的“金标准”: 尚无评估金标准。

设计或课题的偏倚与不足: 糖尿病足的发生原因复杂, 有多因素、多机制参与, 本模型仅从模拟血管缺血机制入手探讨, 且大鼠高脂饲养时间较长, 微血管变化的影像学检测要求条件高, 因此本模型有待于实验动物学的进一步发展。

提供临床借鉴的价值: 从骨髓间充质干细胞、血管内皮生长因子等方面入手, 促进创面愈合。通过探索高效获取自体或异体间充质干细胞、提高局部血管内皮生长因子含量、量化血管内皮生长因子的用量等技术问题及有效结合干细胞、基因及血管内皮生长因子的表达等思路寻求解决糖尿病足溃疡的成熟方法。