

自体外周血单个核细胞移植治疗严重肢体缺血30例：3年安全性随访*★

闻进朝, 黄平平

Autologous peripheral blood mononuclear cells transplantation in treatment of 30 cases of critical limb ischemia: 3-year safety follow-up

Wen Jin-chao, Huang Ping-ping

Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Wen Jin-chao★, Master, Associate chief physician, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China
wuting@126.com

Correspondence to: Huang Ping-ping, Doctor, Chief physician, Doctoral supervisor, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China
huangpp66@yahoo.com.cn

Supported by: a grant of the Key Science and Technology Project of Tianjin City, No.08ZCKFSF03200*

Received: 2010-08-08
Accepted: 2010-09-21

Abstract

BACKGROUND: Stem cell therapy for vascular diseases has been a hot research point. At present, no reports have addressed diagnostic criteria or long-term safety.
OBJECTIVE: To assess safety, efficacy and feasibility of the application of autologous transplantation of peripheral blood stem cells (PBSC) in the treatment of critical limb ischemia (CLI).
METHODS: A total of 60 patients with CLI (30 cases of diabetic foot, 22 cases of atherosclerosis obliterans and 8 cases of thromboangiitis obliterans) were enrolled and randomized to the transplant group and control group. In the transplant group, the patients received subcutaneous injection of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (600 μg/d) for 5 days to mobilize stem/progenitor cells, and their peripheral blood mononuclear cells were collected and transplanted by multiple intramuscular injections into ischemic limbs. All patients were followed up after at least 3 months, but those in the transplant group were at least 3 years.
RESULTS AND CONCLUSION: The main manifestations, including lower limb pain and ulcers, were significantly improved in patients of the transplant group. The results of laser Doppler flowmetry showed that blood perfusion of lower limbs increased from (0.42±0.13) to (0.59±0.12) perfusion units ($P < 0.001$). Mean ankle-brachial pressure index was increased from (0.47±0.22) to (0.59±0.27) ($P < 0.001$). A total of 28 of 40 limb ulcers (70.0%) of transplanted patients were completely healed after cell transplantation, whereas only 26.8% of limb ulcers (11 of 41) were healed in the control patients ($P=0.012$). Angiographic scores were significantly improved in the transplant group compared with the control group ($P = 0.002$). One patient received a lower limb amputation in the transplanted patients. In control group, five control patients received a lower limb amputation ($P = 0.005$). No adverse effects specifically related to cell transplantation were observed in the transplant group at least 3 years after treatment. These results indicate that blood stem cell transplantation standard scheme for CLI is simple, safe and effective.

Wen JC, Huang PP. Autologous peripheral blood mononuclear cells transplantation in treatment of 30 cases of critical limb ischemia: 3-years safety follow-up. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(45): 8526-8530. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 应用于干细胞治疗成为血管性疾病治疗研究的热点。目前尚无相关诊疗标准,也未发现远期安全性报道。
目的: 评估血液干细胞移植标准化方案治疗严重肢体缺血的安全性、有效性和可行性。
方法: 将60例严重肢体缺血患者(糖尿病足30例,动脉硬化闭塞症22例,血栓闭塞性脉管炎8例),随机分为移植组 and 对照组。移植组患者接受了连续5 d的重组人粒细胞集落刺激因子(600 μg/d)的皮下注射,以此来动员干/祖细胞,然后采集外周血单个核细胞,多点肌肉注射。所有的患者接受3个月的疗效随访,移植组患者接受3年以上的安全性随访。
结果与结论: 移植组患者的主要临床症状体征包括下肢疼痛和溃疡明显改善,激光多普勒血流仪的测定结果显示他们的下肢动脉血流量从(0.42±0.13)灌注单位增加到(0.59±0.12)灌注单位($P < 0.001$),平均踝肱指数在0.47±0.22的基础上增加到0.59±0.27($P < 0.001$)。移植组患者中有70.0%(28/40)溃疡完全治愈,而对照组患者中只有26.8%(11/41)的溃疡被治愈($P=0.012$);相比对照组,移植组患者的血管造影评分显著改善($P=0.002$)。移植组1例患者进行了截肢,而对照组5例患者接受下肢截肢($P=0.005$)。移植组3年的安全性随访未发现移植相关不良反应。结果表明血液干细胞移植标准化方案治疗严重肢体缺血是简单、安全、有效的。
关键词: 自体血液干细胞; 干细胞移植; 严重肢体缺血; 疗效; 安全性
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.45.039

闻进朝, 黄平平. 自体外周血单个核细胞移植治疗严重肢体缺血30例: 3年安全性随访[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(45):8526-8530. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

肢体缺血性疾病包括动脉硬化性闭塞症、血栓闭塞性脉管炎、糖尿病足、雷诺氏病等。随着生活水平的提高及人口老龄化,糖尿病等引起的肢体缺血性疾病在中国的发病率呈逐年上升的趋势,既往治疗手段主要包括药物、血

管搭桥和介入手术等,疗效常不理想,预后较差。近年来干细胞移植技术成为肢体缺血性病变的一种新生治疗手段,基础及临床研究显示,干细胞移植能促使缺血肢体生成新生血管,即治疗性血管新生,改善肢体的血液供应,达到临床治疗的目的。

经中国医学科学院血液学研究所血液病医院医学伦理委员会同意,报请上级卫生行政管

理部门批准后, 课题组于2002-12在国际上首次开展了动员后的自体血液干细胞(peripheral blood stem cells, PBSC)移植治疗肢体缺血性疾病的临床研究^[1-3]。目前全国有许多个医院开展了本项目, 本方法的远期安全性研究逐渐引起人们的重视。本文选择经PBSC移植标准化方案治疗和安全性随访观察3年以上的严重肢体缺血患者进行研究。

1 对象和方法

设计: 随机对照的临床观察。

时间及地点: 入选病例为中国医学科学院血液病医院内科2002-12/2006-02的住院患者; 长期安全性随访时间2008-12/2009-09。

对象:

入选标准: ①患者有严重的下肢缺血表现: 持续的反复发作需要止痛措施的静息痛; 皮肤色泽改变; 间歇性跛行; 溃疡、坏疽或无法治愈的脚伤; 经肢体血流仪, 或下肢动脉彩色多普勒, 或DSA动脉造影, 或MRI血管造影, 或经皮氧分压或红外线皮温仪判定下肢血管狭窄或闭塞; 至少1个下肢踝肱指数(ABI值)小于0.9。②患者自愿参加, 并签定了同意书。

慎用标准: ①各种急性下肢血栓性疾病。②各种仪器及设备检查证实有大、中血管病变而流出道正常。③相对稳定的心、脑血管及肺部疾病。

排除标准: ①有严重心、脑血管及肺部疾病。②下肢大面积皮肤、软组织溃疡及坏疽, 或局部严重感染未控制。

符合上述标准60例患者, 男39例, 女21例, 年龄31~82岁, 平均年龄63岁, 病程6个月~20年。糖尿病足30例(其中1例并发肾功能衰竭6年, 连续4年进行血液透析), 动脉硬化闭塞症22例, 血栓闭塞性脉管炎8例。60例患者中累及双下肢病变54例, 其中2例已行一侧肢体截肢; 6例为单肢病变, 共累及的肢体为112条。按Fontaine分期法, 60例中I期0例, II期3例(5%), III期8例(13.3%), IV期49例(81.7%), III期加IV期为53例(95%)。

分组方法: 患者按1:1的比例随机分成移植组和对照组。

方法: 所有自愿者均接受常规治疗, 对肢体溃疡者进行溃疡局部处理, 清创或引流、换药等。如果溃疡合并感染, 则应用广谱抗生素, 在细菌培养和药敏的基础上调整治疗方案。糖

尿病患者进行强化治疗, 使血糖、血脂、血压、心脏功能等各项指标达标。

对照组患者静脉注射90~200 μg/d前列腺素E1。

移植组患者标准化治疗方案: ①外周血干细胞的动员、采集、保存: 用重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF, 金磊赛强, 长春金赛药业公司或吉粒芬, 杭州九源药业公司)300 U, 皮下注射, 2次/d, 连用5 d, 进行外周血干细胞的动员。外周血中白细胞增加 $(3.5\sim 6.7)\times 10^4 L^{-1}$, 平均为 $4.6\times 10^4 L^{-1}$ 。由中国医学科学院血液学研究所细胞室通过FACSCalibur™流式细胞仪, 采用CD45/CD34双荧光标记法(Becton, Dickinson公司, San Jose, CA), 监测外周血CD34阳性细胞数, 第5天用COBE Spectra Version 血细胞分离机单独采集和分离干细胞。配制成 $1\times 10^{11} L^{-1}$ 的PBSC混悬液供移植用。部分细胞冻存于液氮中备用。②在手术室内严格无菌操作。在双下肢肌肉一次性按3 cm×3 cm间距, 做干细胞混悬液(3×10^9 细胞数/肢)肌肉注射。每隔大约40 d后, 复苏冻存干细胞, 采用相同方法和细胞数给较重的下肢进行再次干细胞混悬液的肌肉内注射, 最多3次。③并发症的防治: 动员过程中为避免因白细胞增多或高凝状态导致急性动脉血栓形成或心脑血管意外, 用肝素钙10 000 U加入250 mL生理盐水静脉点滴, 1次/d, 共5 d。细胞注射后, 为预防感染, 予青霉素 $400\times 10^4 U$ 加入生理盐水100 mL中静脉点滴或予左氧氟沙星0.2 g, 2次/d, 1周。

下肢缺血检查: ①彩色多普勒检查: 60例患者均经下肢血管彩色多普勒检查, 股浅、股深动脉狭窄或闭塞35例, 腘动脉狭窄或闭塞30例, 60例均有不同程度的胫前、胫后或腓动脉狭窄或闭塞, 足背动脉全部闭塞。②数字减影动脉血管造影: 数字减影血管造影39例, 10例髂外动脉闭塞, 36例股深、股浅动脉狭窄或闭塞, 35例有腘动脉以下流出道狭窄或闭塞, 尤以糖尿病足严重, 而且罕见侧支建立。③在室温21℃左右环境下, 用Medacord PVL肢体血流仪检查下肢末梢血流和踝肱指数, 全部患者血流波幅减低。④移植前后选择患者双下肢各4个具有代表性的区域(左下肢L1~L4; 右下肢R1~R4)进行激光多普勒(Lisca Developments Co., Linköping, Sweden)扫描检查, 观察双下肢皮肤血流灌注量的改变情况(单位PU)。

中国医学科学院北京协和医学院血液学研究所血液病医院, 天津市300020

闻进朝★, 男, 1971年生, 内蒙古自治区包头市人, 汉族, 2007年北京协和医学院毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事内科血液学的临床和科研工作。现在包钢公司第三医院工作。wrtung@126.com

通讯作者: 黄小平, 博士, 主任医师, 博士生导师, 中国医学科学院北京协和医学院血液病医院血栓血管科, 天津市300020 huangpp66@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)45-08526-05

收稿日期: 2010-08-08
修回日期: 2010-09-21
(20091208029/M·Q)

主要观察指标:

资料收集和标准化评估: 观察3个月后, 主要参考Tateishi-Yuyama等^[4-8]的标准来进行移植前后疗效评估。主要包括评估临床症状和体征(静息痛、无痛行走距离); 评估检查指标(踝压指数、PVL肢体血流仪检查足趾的血流量、激光多普勒扫描观察双下肢血流灌注情况、数字减影血管造影观察侧支血管形成数量)。无痛步行距离: 在同一通道上测量, 单位为m。患者分别于治疗1个月前和12周后接受了数字减影血管造影术, 血管造影的定量分析分为以下等级: +0级(没有侧支血管生成), +1级(有少量侧支血管生成), +2级(中等量侧支血管生成), +3级(丰富的侧支血管生成)。

安全性随访观察: 移植组患者先进行3个月的短期安全性随访观察总结; 随后再进行3年以上的长期安全性随访观察。主要观察有无移植相关的心、脑血管栓塞并发症等, 有无移植相关的异常症状、体征出现; 有无移植相关的血、尿、便常规, 肝肾功能, 出、凝血时间的改变。

设计、实施、评估者: 实验设计为通讯作者, 资料收集和实施为第一作者, 结果评估为研究生张彦、郝晓红, 未采用盲法评估。

统计学分析: 连续变量是以 $\bar{x}\pm s$ 来表达的, 基线到12周的变量变化通过成对的双侧t检验和 χ^2 检验来分析。 χ^2 检验分析似然比。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。所有的统计学分析都是在Windows环境下SPSS 11.5版本下进行的(SPSS, Chicago, IL)。

2 结果

2.1 参与者数量分析 60例严重下肢缺血患者均进入结果分析, 按意向性处理分析。

2.2 两组基线资料比较

项目	移植组(n=30)	对照组(n=30)	t
男/女(n)	20/10	19/11	
平均年龄($\bar{x}\pm s$, 岁)	60.8±8.6(33~80)	61.7±8.3(31~82)	0.11 ^a
踝肱指数<0.9肢体数	55	57	
踝肱指数($\bar{x}\pm s$)	0.61±0.18	0.58±0.21	0.09 ^a
有溃疡的肢体数	40	41	
溃疡面积($\bar{x}\pm s, \text{cm}^2$)	2.53±1.28	2.48±1.35	1.88 ^a
溃疡部位(n)			
足前段	15	16	
足中断	8	6	
足后段	2	2	
病种(n)			
糖尿病足	16	14	
动脉硬化闭塞症	11	11	
血栓闭塞性脉管炎	3	5	

^aP > 0.05

2.3 临床表现 自体PBSC 移植3个月后的移植组, 主要的临床症状体征及客观检查都得到显著改善, 见表1,

表2。移植组的疼痛缓解率(27/30, 90%)显著性高于对照组(9/30, 30%)($P < 0.001$); 移植组的无痛行走间距延长(8/30, 26.7%)显著性高于对照组(1/30, 3.3%)($P < 0.001$); 移植组的无疼痛行走距离[从0.0±0.0增加到(300.3±280.5) m]显著性高于对照组[从0.0±0.0增加到(50.8±40.3) m]($P=0.001$); 移植组的溃疡治愈率(28/40, 70.0%)显著性高于对照组(11/41, 26.9%, $P=0.012$); 移植组中1例患者进行下肢截肢(1/55), 而对照组中有5例患者接受下肢截肢(5/57)($P=0.005$)。

表1 主要临床症状各阶段疗效观察
Table 1 Main clinical symptoms and therapeutic effects in each stage (n/%)

Time	Transplant group		
	Cases	Pain remission cases	Locomotion distance > 100 m cases
7 d posttreatment	30	11/36.7	0
30 d posttreatment	30	12/40	2/6.7
3 mon posttreatment	30	4/13.3	6/20
Time	Control group		
	Cases	Pain remission cases	Locomotion distance > 100 m cases
7 d posttreatment	30	5/16.7	0
30 d posttreatment	30	3/10	0
3 mon posttreatment	30	1/3.3	1/3.3

表2 主要临床指标不同阶段疗效观察结果
Table 2 Main clinical parameters and therapeutic effects in each stage after treatment

Primary clinical parameters	Number of limbs	Transplant group		
		Improved limbs/Follow-up limbs		
		7 d	30 d	3 mon
Ulcer	40	0/40	10/40	28/40
Ankle brachial index	55	0/55	2/40	28/43
Digital subtraction angiography	40	0/40	0/35	7/10
Primary clinical parameters	Number of limbs	Control group		
		Improved limbs/Follow-up limbs		
		7 d	30 d	3 mon
Ulcer	41	0/41	3/41	11/41
Ankle brachial index	57	0/57	0/43	6/40
Digital subtraction angiography	38	0/38	0/35	2/9

2.4 血流量的恢复 移植组观察到了静止时的踝肱指数增加。3个月后移植组中静止踝肱指数>0.1增加的下肢条数(28/43, 65%)显著性高于对照组(6/40, 15%)($P < 0.001$)。移植组平均踝肱指数在0.47±0.22的基础上增加到0.59±0.27($P < 0.001$), 10个足趾的血流量从(0.88±1.29) mm的基线上增加到(3.89±2.94) mm($P <$

0.001), 激光多普勒显示下肢血流灌注从(0.42±0.13)灌注单位的基础上增加到(0.59±0.12)灌注单位($P < 0.001$)。相反, 对照组的平均踝肱指数在0.43±0.28的基础上增加到0.51±0.21($P=0.223$), 10个足趾的血流量从(0.91±1.32) mm 的基础上增加到(1.43±1.38) mm ($P=0.104$)。

2.5 血管造影 数字减影血管造影术的分析表明了细胞移植后有新生血管的大量生成。在3个月随访结束时, 移植组已形成丰富的新生侧支血管(+3)的缺血肢体数量(7/10, 70.0%)明显高于对照组(2/9, 22.2%)($P=0.002$)。

2.6 CD34⁺细胞百分比 在移植组中, PBSC中的CD34⁺细胞在rhG-CSF动员前和动员后5 d百分比分别是(0.011±0.004)%和(0.132±0.023)% ($P < 0.001$)。在最终收集的经rhG-CSF动员的PBSC混悬液中, CD34⁺细胞的百分比为(0.412±0.052)%。

2.7 移植组安全性随访观察结果

3个月的短期安全性随访观察总结: 所有患者下肢肌肉注射PBSC后所致局部不适, 至多在1周内消失, 肌肉注射部位未出现过感染情况, 未发现导致肿瘤情况; 在观察中发现有2例合并冠心病患者干细胞动员期内出现胸闷, 心电图显示心肌缺血稍有加重, 对症治疗后胸闷消失, 心电图恢复, 未影响移植进程; 4例合并糖尿病视网膜病变患者眼底复查无加重, 其他糖尿病患者眼底复查也无特殊改变; 7例有脑血管病变史患者无复发或加重情况; 观察期内其他患者无移植相关的异常症状体征出现; 复查外周血象、心电图、出凝血时间和肝肾功能无特殊改变。

3年以上的长期安全性随访观察总结: 患者注射PBSC的下肢未发现导致肿瘤情况, 患者全身其他部位也未发现导致肿瘤情况; 16例有心脑血管病变史患者未发现因干细胞移植复发或加重情况; 4例合并糖尿病视网膜病变患者眼底复查无加重; 观察期内患者无移植相关的异常症状体征出现; 复查外周血象、出凝血时间和肝肾功能无特殊改变。

3 讨论

既往和本次的临床研究表明自体PBSC移植治疗严重肢体缺血是方便有效的^[1-3,7-9], 探讨其作用机制, 可考虑自体PBSC移植中移植的细胞不仅包括CD34⁺的干细胞及内皮祖细胞, 而且包括CD34⁺的基质细胞, 因此, 自体PBSC移植治疗严重的下肢缺血的确切机制虽不清楚, 但相关基础与临床研究提示可能与以下机制有关: 其一, 在移植局部提供内皮祖细胞以达到血管新生和血管生成; 其二, 移植细胞中的基质细胞在移植局部释放多种血管活性因子(如VEGF、bFGF、angiopoietin-1等), 这些血管活性因子促进了内皮祖细胞的血管新生及

血管生成。Maarten的研究也表明: CD34⁺细胞与CD34⁻细胞的协同作用促进了内皮祖细胞的血管新生及血管生成。

医科院血研所的Li等^[10]报道, 实验组用荧光蛋白标记的人体PBSC注射进免疫缺陷小鼠缺血后肢, 移植后7, 14, 28 d, 激光多普勒扫描血流量增加。毛细血管密度增加, 截肢率降低。证实了荧光蛋白标记的人体PBSC通过直接参与到新生毛细血管中而促进血管新生。在缺血组织中, 血管内皮细胞生长因子及移植的PBSC共同存在。对照组去除了CD34⁺细胞后注射进小鼠缺血后肢, 未见血管新生。结果表明PBSC通过直接参与到新生毛细血管中和产生血管新生因子而促进血管新生。

目前全国有许多医院开展了本项目, 本方法的远期安全性研究尚未见报道, 应引起人们的重视。治疗性血管新生的潜在风险之一为G-CSF进行干细胞动员可能引起心脑血管栓塞的发生^[7-8]。应用G-CSF进行干细胞动员, 引起外周血白细胞总数骤增, 从而造成原本高黏素质的患者血黏度在短期内进一步增高, 增高的血黏度又通过以下机制促进或加重心、脑及肢体的缺血: 促进动脉粥样硬化形成及血栓形成, 促进粥样硬化动脉狭窄远端的缺血; 使凝血-纤溶平衡失调, 通过凝血因子及纤溶蛋白的作用而促进血栓形成。除此之外, 白细胞还是微血管损伤和动脉粥样硬化形成的主要促进因素之一。其机制可概括为白细胞浸润和堵塞小血管, 白细胞动力学异常, 白细胞释放的氧自由基和蛋白溶解酶对血管内皮的损伤等。白细胞可通过其变形性及黏附性影响血液的流变性。白细胞在未进入组织间隙前, 必须靠近血管壁, 黏附在血管壁上, 造成血管壁粗糙不平, 血流阻力增加, 影响毛细血管血流灌注, 引起缺血性疾病的发展或加重。有研究发现用G-CSF动员期间因外周血白细胞增多或血液高凝状态而诱发心、脑血管栓塞并发症, 发生率4.65%。为防止动员过程中心脑血管意外的发生, 采取了以下措施: ①干细胞动员的同时积极控制原发病。对糖尿病, 高血压, 高血脂, 冠心病及脑梗死患者积极应用药物治疗, 密切观察病情变化, 监测血糖, 血脂和血压等相关指标。②干细胞动员的同时应用肝素钙1 000 U加入250 mL生理盐水静脉点滴, 1次/d。③动员剂剂量的掌握。G-CSF每天5~10 μg/kg, 分2次皮下注射, 动员期间每日监测外周血白细胞总数, 以此为依据调整动员剂剂量。④把握干细胞采集时机。一般为动员四五天, 外周血白细胞升至(40~50)×10⁹ L⁻¹左右时采集。结果较好地预防了干细胞动员过程中心、脑血管栓塞等并发症的发生。

治疗性血管新生的另一潜在风险为血管内皮细胞生长因子等促血管新生引起的风险。血管内皮细胞生长因子可能促进肿瘤的血管新生, 并且可能促进隐匿存在

的恶性肿瘤的生长, 还可能使增殖性或出血性视网膜病加重。目前试验结果并未证明治疗性血管新生能增加恶性肿瘤生长或转移的风险, 但需要长期随访观察才能确认^[1-32]。100 多例接受血管内皮细胞生长因子 1 和血管内皮细胞生长因子 2 治疗的患者(几乎 1/3 患有糖尿病或视网膜病), 在基因转染前后由不知情的眼科医生作一系列眼底镜检查, 随访 4 年未见新的视网膜病的发生。另外一个可能的并发症是进行性的新生血管内膜增厚, 有观点认为血管内皮细胞生长因子可能加速了动脉粥样硬化的进展, 但动物实验和临床试验并未证实这一观点, 动物实验还发现血管内皮细胞生长因子能明显减轻内膜的增厚。本次长期安全性随访观察结果未发现上述情况。

总之, 本次移植组患者先进行的短期和长期安全性随访观察结果令人满意, 初步表明自体 PBSC 移植治疗严重肢体缺血是简单, 安全, 有效的。目前的临床研究报告中样本量小, 观察时间短。单个医院的 PBSC 移植患者数量有限, 要得到具有可比性的足够病例数量比较困难, 这就要求多单位合作, 开展多中心前瞻随机对照研究。

4 参考文献

[1] Huang PP, Li SZ, Han MZ, et al. Zhonghua Xueyexue Zazhi. 2003; 24(6):308-311.
黄平平, 李尚珠, 韩明哲, 等. 自体外周血干细胞移植治疗下肢动脉硬化闭塞症[J]. 中华血液学杂志, 2003, 24(6):308-311.

[2] Huang PP, Li SZ, Han MZ, et al. Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterans of lower extremities. Thromb Haemost. 2004;91(3):606-609.

[3] Huang P, Li S, Han M, et al. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. Diabetes Care. 2005;28(9):2155-2160.

[4] Tateishi-Yuyama 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. Lancet. 2002;360(9331):427-435.

[5] Lasala GP, Silva JA, Gardner PA, et al. Combination stem cell therapy for the treatment of severe limb ischemia: safety and efficacy analysis. Angiology. 2010;61(6):551-556.

[6] Eton D, Yu H. Enhanced cell therapy strategy to treat chronic limb-threatening ischemia. J Vasc Surg. 2010;52(1):199-204.

[7] Kudo FA, Nishibe T, Nishibe M, et al. Autologous transplantation of peripheral blood endothelial progenitor cells (CD34+) for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. Int Angiol. 2003;22(4):344-348.

[8] Moriya J, Minamino T, Tateo K, et al. Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. Circ Cardiovasc Interv. 2009;2(3):245-254.

[9] Yang XF, Wu YX, Wang HM, et al. Zhonghua Neike Zazhi. 2005; 44(2):95-98.
杨晓风, 吴雁翔, 王红梅, 等. 自体外周血干细胞移植治疗 62 例缺血性下肢血管病的临床研究[J]. 中华内科杂志, 2005, 44(2):95-98.

[10] Li S, Zhou B, Han ZC. Therapeutic neovascularization by transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. A comparison between CD34+ and CD34-mononuclear cells. Thromb Haemost. 2006;95(2):301-311.

[11] Wei WT. Zhongguo Xueye Liubianxue Zazhi. 1994;4(4):23-24.
魏文太. 白细胞增多对血液粘度的影响[J]. 中国血液流变学杂志, 1994, 4(4):23-24.

[12] Zhang YB, Yang XF, Wang HM, et al. Linchuang Neike Zazhi. 2005; 22(6):422.
张轶斌, 杨晓风, 王红梅, 等. 自体外周血干细胞移植治疗下肢缺血性疾病术前干细胞动员引发心脑血管危险因素探讨[J]. 临床内科杂志, 2005, 22(6):422.

[13] Liu M, Han ZC. Mesenchymal stem cells: biology and clinical potential in type 1 diabetes therapy. J Cell Mol Med. 2008;12(4): 1155-1168.

[14] Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. J Clin Invest. 2000;105(11):1527-1536.

[15] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(7): 3422-3427.

[16] Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. Circulation. 2004;109(22):2692-2697.

[17] Losordo DW, Schatz RA, White CJ, et al. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. Circulation. 2007;115(25):3165-3172.

[18] Tse HF, Siu CW, Zhu SG, et al. Paracrine effects of direct intramyocardial implantation of bone marrow derived cells to enhance neovascularization in chronic ischaemic myocardium. Eur J Heart Fail. 2007;9(8):747-753.

[19] Miura M, Numaguchi Y, Ishii M, et al. Differentiation capacity of endothelial progenitor cells correlates with endothelial function in healthy young men. Circ J. 2009;73(7):1324-1329.

[20] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. EMBO J. 1999;18(14):3964-3972.

[21] Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, et al. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. Circulation. 2006;114(20):2163-2169.

[22] Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, et al. Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. Circ J. 2007; 71(2):196-201.

[23] Lian F, Xue S, Gu P, et al. The long-term effect of autologous endothelial progenitor cells from peripheral blood implantation on infarcted myocardial contractile force. J Int Med Res. 2008;36(1): 40-46.

[24] Ishikawa M, Asahara T. Endothelial progenitor cell culture for vascular regeneration. Stem Cells Dev. 2004;13(4):344-349.

[25] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. N Engl J Med. 2003;348(7):593-600.

[26] Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008;28(9):1584-1595.

[27] Yasu T. Differentiation of endothelial progenitor cells: a useful biomarker? Circ J. 2009;73(7):1199-1200.

[28] Cho HJ, Lee N, Lee JY, et al. Role of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart. J Exp Med. 2007;204(13):3257-3269.

[29] Zhao LR, Singhal S, Duan WM, et al. Brain repair by hematopoietic growth factors in a rat model of stroke. Stroke. 2007;38(9):2584-2591.

[30] Veschini L, Belloni D, Foglieni C, et al. Hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha determines sensitivity of endothelial cells to the proteasome inhibitor bortezomib. Blood. 2007;109(6): 2565-2570.

[31] Ballard VL, Edelberg JM. Stem cells and the regeneration of the aging cardiovascular system. Circ Res. 2007;100(8):1116-1127.

[32] Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). J Vasc Surg. 2007;45 Suppl S:S5-67.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 天津市科技支撑计划重点项目 (08ZCKFSF03200)。“成体干细胞治疗重大疾病的临床规范化应用研究”的分课题——自体外周血干细胞移植治疗外周血管性疾病临床规范化研究。

致谢: 感谢实验血液学国家重点实验室程涛教授; 感谢国家干细胞工程技术研究中心韩忠朝教授; 感谢中国医学科学院血液病医院血栓血管科、干细胞移植科、细胞室全体工作人员。

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。