

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.40.023 [http://www.crter.org]

高延明, 张路. 骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足过程中血管内皮生长因子的表达[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(40):7169-7174.

骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足过程中血管内皮生长因子的表达*

高延明, 张路(大连医科大学附属第二医院, 辽宁省大连市 116011)

文章亮点:

1 此问题的已知信息: 糖尿病足是糖尿病常见的并发症之一, 降糖、降压、降脂扩血管、改善循环等常规治疗效果不理想。

2 文章增加的新信息: 糖尿病足溃疡在常规治疗的基础上, 应用骨髓间充质干细胞移植治疗, 通过上调血管内皮生长因子的表达, 促进新生血管的形成, 发挥治疗作用, 能够获得理想的效果, 治疗时间短, 创面愈合良好。

3 临床应用的意义: 骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足具有巨大的潜能, 但其广泛应用仍有待于进一步的深入研究。

关键词:

干细胞; 干细胞学术探讨; 骨髓间充质干细胞; 糖尿病足; 血管内皮生长因子; 移植; 肉芽组织; 溃疡; 坏疽; 静息痛; 间歇性跛行

主题词:

间质干细胞; 骨髓细胞; 干细胞移植; 糖尿病; 皮肤溃疡; 足溃疡

摘要

背景: 目前已有研究证明骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足能够获得良好的效果。

目的: 评价骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足溃疡的效果以及血管内皮生长因子的表达情况。

方法: 应用文献检索的方法获取骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足及血管内皮生长因子表达的相关研究文献, 对符合研究标准的文献进行深入的数据分析, 文章选取骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足的实验研究和临床应用进行分析, 实验研究中, 建立大鼠糖尿病足溃疡模型, 给予骨髓间充质干细胞移植治疗, 观察创面溃疡的愈合情况, 并分析血管内皮生长因子的表达情况。临床应用研究中, 对应用骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足的患者进行观察随访, 观察创面溃疡的愈合情况以及不良反应发生情况。

结果与结论: 实验研究显示骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足创面溃疡的愈合快于常规治疗, 但是与正常足溃疡愈合相比仍较慢, 且移植治疗后血管内皮生长因子的表达升高, 但是低于正常足溃疡对照的水平。临床应用研究显示糖尿病足溃疡患者经骨髓间充质干细胞移植治疗后, 创面溃疡基本均可完全愈合, 且无心、脑血管疾病、肝肾功能损伤以及出血时间改变等不良反应发生。

Expression of vascular endothelial growth factor in the treatment of diabetic foot using bone marrow mesenchymal stem cell transplantation

Gao Yan-ming, Zhang Lu (The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation has been confirmed to have excellent effect on the treatment of diabetic foot.

OBJECTIVE: To assess the therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on diabetic foot ulcers and the expression of vascular endothelial growth factor.

METHODS: Literatures concerning the effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on foot diabetic and expression of vascular endothelial stem cells were retrieved. Articles that met the criteria were analyzed in depth. Here, we analyzed the experimental research and clinical application of bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of diabetic foot. In experimental studies, rat models of diabetic foot ulcers were established and subjected to bone marrow mesenchymal stem cell transplantation to observe wound healing of ulcers and analyze the expression of vascular endothelial growth factor. In clinical research, the follow-up was conducted in diabetic foot patients undergoing bone marrow mesenchymal stem cell transplantation to observe the wound healing of ulcers and adverse reactions.

RESULTS AND CONCLUSION: Experimental studies have shown that bone marrow mesenchymal stem cell transplantation is better than conventional treatment in the treatment of diabetic foot ulcers, but the healing of diabetic foot ulcers is still slower than that of normal ulcers. After cell transplantation, the expression of vascular endothelial stem cells is elevated but still lower than that in the normal ulcer controls. Clinical studies have shown that for patients with diabetic foot ulcers, the ulcer wound can be healed after bone marrow mesenchymal stem

高延明★, 男, 1967年生, 辽宁省大连市人, 汉族, 1992年白求恩医科大学毕业, 硕士, 副教授, 主要从事周围神经损伤研究。

wwl_999@yahoo.com.cn

通讯作者: 张路, 硕士, 主治医师, 大连医科大学附属第二医院, 辽宁省大连市 116011

andrew76aa@163.com

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2013)40-07169-06

收稿日期: 2013-02-18

修回日期: 2013-06-27

(201302012/SJ·W)

Gao Yan-ming★, Master, Associate professor, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China
wwl_999@yahoo.com.cn

Corresponding author: Zhang Lu, Master, Attending physician, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China
andrew76aa@163.com

Received: 2013-02-18

Accepted: 2013-06-27

cell transplantation, as well as there are no cardiovascular and cerebrovascular diseases, liver and kidney damage and changes in bleeding and coagulation time.

Subject headings: mesenchymal stem cells; bone marrow cells; stem cell transplantation; diabetes mellitus; skin ulcer; foot ulcer

Gao YM, Zhang L. Expression of vascular endothelial growth factor in the treatment of diabetic foot using bone marrow mesenchymal stem cell transplantation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(40):7169-7174.

0 引言 Introduction

糖尿病足是糖尿病的严重并发症之一, 发病率高, 危险性大, 糖尿病患者中15%以上会发生足溃疡或坏疽, 并且呈逐年上升的趋势, 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, 糖尿病足溃疡患者占一半以上比例, 其有效治疗的迫切性更为明显^[1-4]。

糖尿病足是糖尿病患者由于合并神经病变及各种不同程度的末梢血管病变而导致的下肢感染、溃疡形成和/或深部组织的破坏。目前糖尿病足的发病机制被认为是由于糖尿病患者长期高血糖引起血管病变, 最终导致肢端缺血和周围神经病变而失去感觉, 且并发感染而形成。神经病变、缺血和感染时主要的病理基础, 但同时也需要外部因素的诱发作用。

近年来, 随着医学技术的飞速发展, 干细胞移植血管再生技术成为研究的热门课题之一, 动物实验和临床应用研究均已经证实, 将骨髓造血干细胞、外周血造血干细胞移植至缺血肢体后, 可分化形成新生血管, 改善患肢的血供^[5-7]。骨髓间充质干细胞是存在于骨髓中不同于造血干细胞的另一类成体干细胞, 既有自我更新和不断增殖的能力, 又具有多向分化的潜能, 此外还具有其独特的优点, 获取方便, 扩增能力强, 能够定向诱导分化, 免疫原性弱, 减少了排斥反应的发生, 经过多次传代后仍具有干细胞的特征^[8]。目前已有研究报道了骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足, 并且获得较好的治疗效果。

文章对骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足的实验研究和临床应用进行分析, 同时研究血管内皮生长因子在治疗过程中的表达水平变化, 以明确骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足的效果以及应用的可行性。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 以检索数据库的方法获取研究文献^[9], 检索时间范围2005至2012年, 检索词为“骨髓间充质干细胞; 糖尿病足; 血管内皮生长因子”, 检索出相关研究文献25篇, 纳入研究的文献共8篇^[10-17]。

1.2 入选标准 ①研究的主题包括骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足的实验研究以及临床应用, 以及糖尿病足发生的机制研究。其中排除其它类型干细胞移植治疗糖尿病足研究的内容以及护理研究的内容。②研究所撰写的文章类型包括原著、实验分析、病例分析以及个案报道等。其中排除综述以及评论类文章。③文献的来源包括学术期刊和学位论文, 排除会议论文、年鉴、报纸等。④纳入研究的文献应为不同研究的文献, 即不能为同一实验项目和同一组实验人员, 否则发表的文献定为重复文献。对于重复文献选取其中1篇纳入研究进行深入分析。⑤糖尿病足发生机制尚不完全清楚, 文章选择血管内皮生长因子的变化与骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足的相关性进行研究。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足过程中血管内皮生长因子表达的实验研究 董方^[10]、万江波等^[11]和蔡黔等^[12]分别对骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠糖尿病足以及血管内皮生长因子的表达进行了实验研究。董方^[10]研究中对90只大鼠进行对比分析, 其中30只大鼠为正常对照组, 将正常大鼠制备成足溃疡模型; 另30只大鼠为糖尿病足溃疡对照组, 制备成糖尿病足溃疡模型; 剩余30只大鼠为糖尿病足溃疡治疗组, 同样制备成糖尿病足溃疡模型。治疗组中30只糖尿病足溃疡模型大鼠于溃疡成形后第1天, 在溃疡周围边缘1 cm处4点皮下肉膜层注射移植0.1 mL计数后骨髓间充质干细胞悬液, 其余2组均注射磷酸盐缓冲液, 观察各组大鼠于造模后第1, 4, 8天时的溃疡愈合面积, 应用细胞核荧光染色示踪、酶联免疫吸附实验检测外周血中血管内皮生长因子的表达, 应用Western免疫印记检测局部血管内皮生长因子的表达情况。

结果显示溃疡形成后第1天注射移植骨髓间充质干细胞于溃疡周围, 移植后1, 4, 8 d进行冰冻切片观察, 均可见淡蓝色荧光聚集生长于溃疡周围皮下。骨髓间充质干细胞移植后第4天可见糖尿病足溃疡治疗组大鼠溃疡平均愈合面积快于糖尿病足溃疡对照组, 但却慢于正常对照组, 治疗组大鼠溃疡面积为 $(23.62 \pm 2.26) \text{ mm}^2$, 糖尿病足溃疡对照组大鼠溃疡面

积为(25.50±6.79) mm², 而正常对照组大鼠溃疡面积为(20.16±3.68) mm²; 第8天检测时, 可见糖尿病足溃疡治疗组大鼠溃疡平均愈合面积明显快于糖尿病足溃疡对照组, 但却仍慢于正常对照组, 治疗组大鼠溃疡面积为(7.56±1.91) mm², 糖尿病足溃疡对照组大鼠溃疡面积为(13.20±1.74) mm², 而正常对照组大鼠溃疡面积为(3.64±0.92) mm²。骨髓间充质干细胞移植后第4天于外周血中测定血管内皮生长因子浓度, 正常对照组为(1.58±0.06) μg/L, 糖尿病足溃疡治疗组为(1.53±0.08) μg/L, 糖尿病足溃疡对照组为(1.04±0.05) μg/L; 移植后第8天时检测外周血中血管内皮生长因子浓度, 正常对照组为(1.70±0.04) μg/L, 糖尿病足溃疡治疗组为(1.50±0.04) μg/L, 糖尿病足溃疡对照组为(1.14±0.07) μg/L, 检测结果均可见糖尿病足溃疡治疗组中血管内皮生长因子的浓度高于糖尿病足溃疡对照组, 但却低于正常对照组。局部血管内皮生长因子浓度检测结果显示骨髓间充质干细胞移植后第1, 4, 8天, 糖尿病足溃疡对照组的检测结果均明显低于正常对照组, 正常对照组在第1, 4, 8天的检测结果分别为(1.04±0.05), (1.81±0.06), (1.64±0.06) μg/L, 糖尿病足溃疡对照组在第1, 4, 8天的检测结果分别为(0.21±0.02), (0.24±0.02), (0.19±0.02) μg/L, 而糖尿病足溃疡治疗组的在第1, 4, 8天的检测结果分别为(2.44±0.25), (2.86±0.11), (0.85±0.06) μg/L, 糖尿病足溃疡治疗组血管内皮生长因子的水平在第1和第4天时明显高于正常对照组, 但是在第8天时降至低于正常对照组的水平。病理切片观察可见糖尿病足溃疡治疗组在肉芽生长速度及表皮覆盖速度均明显快于糖尿病足溃疡对照组, 但是与正常对照组相比较, 仍较慢。

万江波等^[11]研究中将36只大鼠随机分为3组, 骨髓间充质干细胞经小腿肌肉移植组、正常足溃疡对照组和糖尿病足溃疡对照组, 每组12只大鼠。正常足溃疡对照组建立足溃疡模型, 糖尿病足溃疡对照组建立糖尿病足溃疡模型, 骨髓间充质干细胞经小腿肌肉移植组将大鼠建立糖尿病足溃疡模型后, 在双侧小腿注射50 μL骨髓间充质干细胞悬液, 而其余2组均注射等量的磷酸盐缓冲液。移植后第2, 5, 8, 11天评估各组大鼠溃疡创面的愈合率, 应用酶联免疫吸附实验和反转录聚合酶链反应检测血管内皮生长因子的表达, 应用苏木精-伊红染色法检测肉芽组织厚度。

结果显示, 骨髓间充质干细胞移植后第2天, 各组大鼠溃疡创面形成黄褐色或黑色干痂, 痂皮较薄, 创面周围稍有红肿, 且有少许脓性分泌物; 从第5天开始, 创面炎症反应逐渐减轻, 痂皮干燥, 面积逐渐缩小; 第8天时, 有干痂脱落, 露出新生表皮, 但此时新生表皮尚无毛发覆盖。正常足溃疡对照组的溃疡

创面愈合最快, 第8天和第11天时骨髓间充质干细胞经小腿肌肉移植组溃疡创面愈合率明显高于糖尿病足溃疡对照组。苏木精-伊红染色检测显示第2天时, 各组溃疡创面的肉芽组织厚度无明显差异, 但均有大量炎性细胞浸润; 第5天时, 正常足溃疡对照组和骨髓间充质干细胞经小腿肌肉移植组溃疡创面的肉芽组织厚度相同, 均比糖尿病足溃疡对照组厚; 第8天时, 各组大鼠的创面周围干痂下已有大量新生表皮形成, 无肉芽组织, 但皮下缺少毛囊和腺管等组织, 仍属于不成熟表皮。正常足溃疡对照组和糖尿病足溃疡对照组血管内皮生长因子浓度在第8天达到高峰, 而骨髓间充质干细胞经小腿肌肉移植组血管内皮生长因子浓度一直在增加, 第11天时达高峰。第11天时骨髓间充质干细胞经小腿肌肉移植组血管内皮生长因子浓度明显高于正常足溃疡对照组, 而正常足溃疡对照组血管内皮生长因子浓度则仍高于糖尿病足溃疡对照组。

蔡黔等^[12]研究中将90只大鼠随机分为3组, 正常足溃疡对照组、糖尿病足溃疡对照组和骨髓间充质干细胞移植治疗组, 每组30只大鼠。正常足溃疡对照组大鼠建立足溃疡模型, 糖尿病足溃疡对照组和骨髓间充质干细胞移植治疗组大鼠建立糖尿病足溃疡模型, 并分别注射干细胞培养基DMEM和骨髓间充质干细胞。模型建立后第1, 4, 8天观察各组大鼠的创面溃疡面积和病理学检查, 应用酶联免疫吸附实验检测外周血中血管内皮生长因子的表达, 应用Western免疫印记检测局部血管内皮生长因子的表达情况。

结果显示, 骨髓间充质干细胞移植后第1天, 3组溃疡愈合无明显差异; 第4天比较时各组间开始出现差异, 正常足溃疡对照组创面愈合最快, 而其他2组创面溃疡愈合无明显差异; 第8天时正常足溃疡对照组创面溃疡较其他2组明显愈合快, 而骨髓间充质干细胞移植治疗组较糖尿病足溃疡对照组创面愈合也明显较快。外周血血管内皮生长因子检测可见骨髓间充质干细胞移植后第1天, 各组中血管内皮生长因子浓度无明显差异; 第4天时正常足溃疡对照组外周血血管内皮生长因子浓度明显高于骨髓间充质干细胞移植治疗组和糖尿病足溃疡对照组, 而骨髓间充质干细胞移植治疗组和糖尿病足溃疡对照组之间外周血血管内皮生长因子浓度无明显差异; 第8天时正常足溃疡对照组外周血血管内皮生长因子浓度高于骨髓间充质干细胞移植治疗组, 而骨髓间充质干细胞移植治疗组则高于糖尿病足溃疡对照组。病理切片可见模型建立后第1天, 溃疡深度均为全层皮肤, 第4天和第8天可见正常足溃疡对照组肉芽组织生长迅速, 表皮覆盖完全, 糖尿病足溃疡对照组可见创面溃疡愈合缓慢, 表皮覆盖不完全, 骨髓间充质干细胞移植治疗

组创面溃疡较糖尿病足溃疡对照组愈合快, 表皮覆盖较明显, 但是与正常足溃疡对照组相比较愈合仍较慢。

上述3组实验研究中均给予正常大鼠腹腔注射链脲佐菌素制备糖尿病足大鼠模型, 当检测随机血糖水平 ≥ 16.0 mmol/L, 并出现多饮、多尿、体质量减轻等症状时, 切除大鼠足部皮肤组织, 建立糖尿病足模型。研究结果显示骨髓间充质干细胞移植可促进糖尿病足溃疡的愈合, 其促进愈合的机制可能是通过上调局部、全身外周血中血管内皮生长因子的表达, 从而促进局部微血管的形成, 进而促进溃疡创面的愈合, 达到有效治疗的作用。

2.2 骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足的临床应用研究

付汉东等^[13]对骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足进行了临床应用研究, 对30例糖尿病足患者血管内皮生长因子的变化以及血管内皮生长因子mRNA的表达水平变化进行了观察。30例患者中, 男23例, 女7例, 年龄58-81岁, 糖尿病病程5-17年。给予控制血糖、扩张血管、改善微循环等常规治疗后给予骨髓间充质干细胞移植治疗。结果显示, 移植治疗前血管内皮生长因子和mRNA的表达水平分别为 (165 ± 36) ng/L和 $(1.7\pm 2.3)\times 10^4$ copy/ μ L, 治疗后2, 4, 8, 12周时分别为 (336 ± 39) ng/L和 $(38.7\pm 32.4)\times 10^4$ copy/ μ L、 (241 ± 46) ng/L和 $(76.4\pm 9.6)\times 10^4$ copy/ μ L、 (192 ± 41) ng/L和 $(9.9\pm 1.2)\times 10^4$ copy/ μ L、 (167 ± 31) ng/L和 $(4.8\pm 3.6)\times 10^4$ copy/ μ L。各组间结果比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

陈兵等^[14]对骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足进行了临床应用研究, 研究对象为40例糖尿病足患者, 其中男22例, 女18例, 年龄 (64.3 ± 12.7) 岁。按wagner分级, 2级8例, 主要表现为静息痛或间歇性跛行; 3级18例, 主要表现为不同程度的足部溃疡、化脓性痿道形成; 4级14例, 其中伴有干性坏疽8例, 湿性坏疽6例。按数字表法随机分为骨髓间充质干细胞移植治疗组22例, 常规治疗组18例。常规治疗组给予降血糖、降压调脂、抗感染、抗凝、营养神经、扩张血管等药物治疗, 局部常规换药, 有坏疽者行截趾治疗; 骨髓间充质干细胞移植治疗组在常规治疗基础上, 按密度梯度离心和贴壁法分离制备骨髓间充质干细胞悬液, 并于培养鉴定、扩增后行自体骨髓间充质干细胞移植。比较2组患者治疗效果, 以及不良反应、并发症等发生情况。

结果显示, 治疗后1个月, 骨髓间充质干细胞移植治疗组患者肢体疼痛、冷感、间歇性跛行等症状均有改善, 踝肱指数明显升高, 双下肢血管显像血流灌注增加, 与常规治疗组比较差异均有显著性意义。且移植后3个月随访患者均无异常症状体征出现, 血、

尿、便常规检测正常, 心电图和肝肾功能无特殊改变, 出凝血时间正常。

王秀慧等^[15]同样对骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足进行了临床应用研究, 研究对象为69例糖尿病足患者, 其中男39例, 女30例, 年龄45-84岁。69例患者中, 合并高血压42例, 血脂异常59例, 冠心病38例, 脑血管病11例。所有患者均给予降血糖、降压、降血脂、改善循环、抗感染、抗凝、营养神经、局部理疗等常规治疗, 组织破溃者给予局部清创换药等对症处理, 待局部感染控制后, 破溃处组织新鲜或愈合后进行骨髓间充质干细胞移植治疗。

结果显示, 所有患者膝以下溃疡共43处, 合并感染36例, 截趾16个, 行单侧肢体骨髓间充质干细胞移植26例。如创面较新鲜无明显感染表现可同时进行截趾后予骨髓间充质干细胞移植治疗。部分经清创后创面组织新鲜, 给予骨髓间充质干细胞移植, 7-25 d后创面即可达到I级愈合。双下肢CT血管成像、双下肢血管造影显示股浅动脉狭窄34例, 闭塞2例; 腘动脉狭窄74例, 闭塞6例; 胫前动脉狭窄89例, 闭塞57例; 胫后动脉狭窄74例, 闭塞67例; 腓动脉狭窄81例, 闭塞67例; 足背动脉狭窄62例, 闭塞47例。与治疗前相比较, 治疗后3个月踝肱指数升高0.1有12条肢体, 升高0.2有24条肢体, 升高0.3有10条肢体, 降低0.1有25条肢体, 降低0.2有19条肢体, 降低0.3有17条肢体; 治疗后6个月踝肱指数升高0.1有19条肢体, 升高0.2有27条肢体, 升高0.3有18条肢体, 降低0.1有18条肢体, 降低0.2有12条肢体, 降低0.3有5条肢体。对随访患者进行治疗前后主观症状评分和客观指标比较, 治疗前、移植治疗后3个月、6个月, 自觉疼痛症状评分分别为 (2.8 ± 1.7) , (2.4 ± 1.4) , (2.1 ± 1.3) 分, 冷感评分为 (2.0 ± 1.0) , (1.8 ± 0.8) , (1.6 ± 0.7) , 间歇性跛行评分为 (2.4 ± 1.3) , (2.1 ± 1.2) , (1.4 ± 1.1) 分, 各项指标治疗后评分均明显降低。测试皮肤温度分别为 (22.2 ± 5.0) , (24.4 ± 5.9) , (24.7 ± 5.5) °C, 经皮氧分压分别为 (20.1 ± 3.5) , (24.5 ± 4.1) , (25.2 ± 5.7) kPa, 皮肤温度和经皮氧分压在治疗后3个月与6个月比较结果差异无显著性意义, 治疗后3个月与治疗前比较结果差异具有显著性意义。骨髓间充质干细胞移植治疗后1-7 d内部分患者自觉移植下肢有发热感, 并且疼痛、麻木、发凉症状减轻, 但一两周后上述自觉症状消失, 所有患者随访6个月期间内无死亡病例, 无心脑血管疾病发生, 肝功能和出凝血时间等无特殊改变, 无其他不良症状发生。

陆德宾等^[16]和陈玲珍等^[17]分别对1例骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足进行了研究。陆德宾等^[16]研究中1例患者为女性, 66岁, 15年糖尿病史, 检查时可见左足深达真皮层的溃疡面, 左侧肢体症状分

级, 疼痛4级, 冷感3级, 间歇性跛行4级, 左足踝肱指数0.65。给予扩血管、改善循环、降血糖、抗感染等常规治疗, 4周后给予骨髓间充质干细胞移植左侧小腿肌肉注射治疗, 观察患者创面溃疡愈合情况。

结果显示, 移植时和移植后4周, 左侧肢体症状分级疼痛分别为4级和1级, 冷感分别为3级和1级, 间歇性跛行分别为4级和1级, 左足踝肱指数分别为0.66和0.79。移植时, 左足外侧、前背的溃疡面为3.0 cm×3.0 cm、2.0 cm×3.5 cm, 移植7 d后溃疡创面基本愈合。

陈玲珍等^[17]研究中1例患者为女性, 64岁, 糖尿病史3年, 合并有血脂异常和高血压病, 检查时可见右足趾干性坏疽, 右足底见深达真皮层的溃疡面, 伴有恶臭味, 且右足背动脉搏动消失。按wagner分级为IV级, 下肢血管彩色多普勒检查见右下肢各段动脉均有不同程度的狭窄或闭塞, 足背动脉全部闭塞。右侧肢体症状分级, 疼痛4级, 冷感3级, 间歇性跛行4级, 右足踝肱指数0.31。给予骨髓间充质干细胞移植治疗, 同时给予控制血糖、扩张血管、改善微循环、降压、降脂以及清创等治疗, 观察患者溃疡创面愈合情况。

结果显示, 骨髓间充质干细胞移植3个月后患者疼痛、冷感明显缓解, 麻木症状改善, 移植治疗6个月后, 疼痛消失, 踝肱指数明显升高, 创面溃疡完全愈合, 且行走间距延长, 下肢动脉造影CT三维重建及彩色多普勒检查可见患肢有明显的新生侧支血管、血流明显改善。治疗过程中无心、肺、肝、肾等重要器官功能的损伤。随访14个月, 未见相关并发症等不良反应发生。

3 讨论 Discussion

糖尿病患者因长期的血糖和血脂代谢紊乱, 导致血管内皮细胞和基底膜损害, 形成糖尿病血管并发症。当局部微血管发生病变, 循环障碍, 神经纤维受损, 则会导致肢体末梢的保护性感觉减弱或丧失以及足部生物力学的改变等, 使机体缺乏对足部的保护措施, 从而极易引起机械的或温度的损伤, 导致糖尿病患者足或下肢组织破坏, 称为糖尿病足。形成糖尿病足的根本原因是下肢动脉慢性闭塞, 可导致下肢远端组织缺血缺氧, 轻者组织细胞变性, 出现间歇性跛行、疼痛等, 重者组织细胞坏死, 出现下肢远端组织溃疡、坏疽^[18]。

血管内皮生长因子是20世纪70年代首次分离提纯出来的^[19], 血管内皮生长因子在血管形成的调控过程中起主导作用, 促进血管形成, 另外, 血管内皮生长因子是能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, 它通过其受体使血管内皮增殖, 从而发挥促血管形成作用。此外, 血管内皮生长因子还能够增加血管通透性, 主要增加毛细血管后静脉和小静脉的通透性, 是已知最强的血管通透剂。且有研究显示血管内皮生长因子能够非常显著地延长血管内皮细胞的寿命, 使血管内皮细胞的倍增次数增加15-20次, 能够刺激内皮细胞产生前蛋白激活酶, 从而促使渗漏到血管外区域的血浆蛋白形成纤维蛋白凝块, 作为血管新生的支持物。

正常的创面愈合要经历肉芽生成、血管新生、胶原沉积和组织重塑等阶段, 而创伤中的新生血管为其提供营养物质和其它介质以及排除一些代谢产物^[20]。研究发现糖尿病足溃疡中的生长因子及其受体绝对或相对减少是导致其难以愈合的重要因素^[21]。而20世纪就有实验证明, 糖尿病小鼠创面愈合缓慢与其血管生成受损有关, 而后者与编码血管内皮生长因子的mRNA和血管内皮生长因子的含量下降有关^[22]。血管内皮生长因子是目前已知的一种最强的促血管生成因子, 能增加微静脉和小静脉的通透性, 促进血管内皮细胞分裂与增殖, 诱导血管生成, 在创面修复过程中扮演着举足轻重的作用。因此, 细胞再生能力不足、促愈的细胞因子缺乏及血管化减少是影响糖尿病足修复的关键因素, 而有效的补充缺损部位干细胞的细胞疗法可能成为促进创面修复的新策略。

文章研究显示应用骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足溃疡, 无论是动物实验研究中还是临床应用实验中均显示出良好的治疗效果, 加快的糖尿病足溃疡的愈合时间, 并且对心、肺、肝、肾等重要脏器功能无损伤, 无不良反应发生。此外, 根据研究结果推测移植修复治疗的机制可能是通过上调血管内皮生长因子的表达, 促进局部新生血管的形成, 达到治愈效果。

作者贡献: 高延明负责实验设计, 张路负责实验实施及评估, 并解析相关数据, 高延明对文章负责并进行审校。

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。

伦理要求: 无涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病的移植方法-包括动脉内注射法和肌肉注射法, 治疗的观察指标包括静息痛、跛行距离、踝肱指数、下肢血流成像、溃疡愈合率等。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 董砚虎, 钱荣立. 糖尿病及并发症当代治疗[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1994:183.
- [5] Sica V, Williams-Ignarro S, de Nigris F, et al. Autologous bone marrow cell therapy and metabolic intervention in ischemia-induced angiogenesis in the diabetic mouse hindlimb. *Cell Cycle*. 2006;5(24):2903-2908.
- [6] Padilla L, Krötzsch E, De La Garza AS, et al. Bone marrow mononuclear cells stimulate angiogenesis when transplanted into surgically induced fibrocollagenous tunnels: results from a canine ischemic hindlimb model. *Microsurgery*. 2007;27(2):91-97.
- [7] 谷涌泉, 张建, 苏力, 等. 自体外周血单个核细胞移植治疗下肢缺血53例的临床研究[J]. 中华普通外科杂志, 2006, 21(12):848-851.
- [8] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(6):507-520.
- [9] 中国知网. 中国学术期刊总库 [DB/OL]. 2013-08-15. <https://www.cnki.net>
- [10] 董方. 骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠糖尿病足溃疡及其VEGF表达的实验研究[D]. 甘肃: 兰州大学, 2009:1-46.
- [11] 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[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(12):1730-1736.
- [12] 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.
- [13] 付汉东, 张爱华, 鲁艳, 等. 自体骨髓干细胞移植治疗糖尿病足患者血管内皮生长因子的表达及意义[J]. 中国全科医学, 2010, 13(23):2554-2556.
- [14] 陈兵, 陆德宾, 梁自文, 等. 自体骨髓间充质干细胞体外扩增后移植治疗糖尿病足[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(32):6227-6230.
- [15] 王秀慧, 王雅丽, 王广宇, 等. 自体骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足69例临床分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(31):3936-3937.
- [16] 陆德宾, 陈兵, 梁自文, 等. 自体骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足1例[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(11):1125.
- [17] 陈玲珍, 陈嘉榆, 巫进明, 等. 自体骨髓间充质干细胞移植治疗严重糖尿病足: 1例报告[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(23):4359-4362.
- [18] 曾春雪, 傅红春. 骨髓间充质干细胞自体移植治疗糖尿病足部溃疡[J]. 泸州医学院学报, 2010, 33(2):212-214.
- [19] McCourt M, Wang JH, Sookhai S, et al. Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch Surg*. 1999;134(12):1325-1331; discussion 1331-1332.
- [20] Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, et al. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009;153(2):347-358.
- [21] Lobmann R, Schultz G, Lehnert H. Molecular fundamentals of wound healing in diabetic foot syndrome. *Med Klin (Munich)*. 2003;98(5):292-301.
- [22] Rivard A, Silver M, Chen D, et al. Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J Pathol*. 1999;154(2):355-363.