

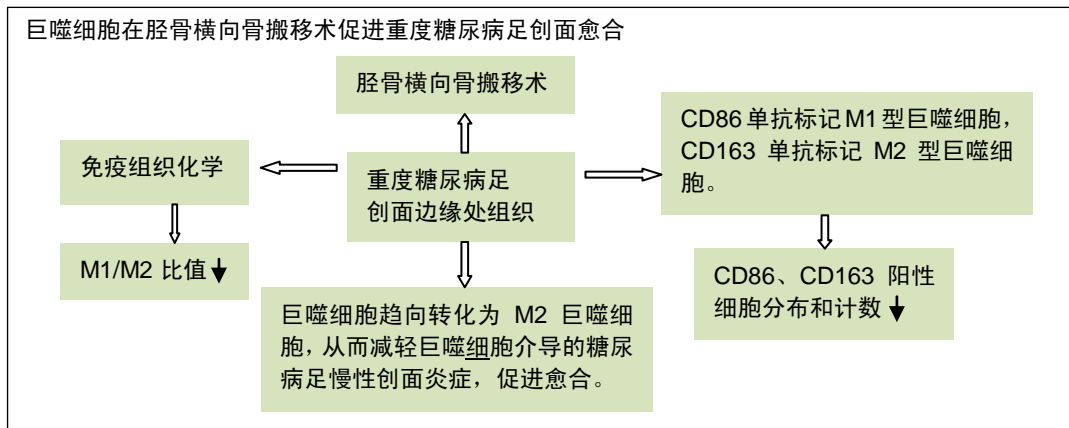
胫骨横向骨搬运后巨噬细胞促进重度糖尿病足创面的愈合

高伟, 林震迅, 镇普祥, 陈炎, 邝晓聪, 花奇凯(广西医科大学第一附属医院骨关节外科, 广西壮族自治区南宁市 530021)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0616

ORCID: 0000-0002-5490-7930(高伟)

文章快速阅读:



高伟, 男, 1990年, 河南省濮阳县人, 汉族, 2018年广西医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事骨组织工程、组织再生、胫骨横向骨搬运治疗糖尿病足的研究。

通讯作者: 花奇凯, 博士, 主任医师, 广西医科大学第一附属医院骨关节外科, 广西壮族自治区南宁市 530021

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2018-08-07



文题释义:

胫骨横向骨搬运术: 作为一项治疗糖尿病足的新技术, 让患者免去截肢的风险。“胫骨横向骨搬运术”原理来自 Ilizarov 张力-应力法则。该法则是俄罗斯医学专家 Ilizarov 于 20 世纪 50 年代创立的肢体再生与功能重建的理论, 被公认为近代矫形骨科的第四个里程碑。该法则原理是: 生物组织被缓慢牵拉时会产生一定的张力, 可刺激组织再生和活跃生长。人的骨骼和人体的上皮组织、结缔组织一样, 具有很大的再生潜力和可塑性, 给骨骼一个合适的应力性牵拉, 骨骼及其附着的肌肉、筋膜、血管、神经就会同步生长。
胫骨横向骨搬运前后局部创面巨噬细胞不同亚型的分布、计数及其比例比较: 可以认识胫骨横向骨搬运术可减轻由巨噬细胞介导的糖尿病足创面局部炎症, 促进创面的愈合。

摘要

背景: Ilizarov 生物学理论——张力-应力法则技术通过生物组织缓慢牵拉产生一定张力可刺激组织的再生和活跃生长。

目的: 探究巨噬细胞在胫骨横向骨搬运术促进重度糖尿病足创面愈合的作用。

方法: 以 2017 年 12 月至 2018 年 1 月在广西医科大学第一附属医院骨关节外科行胫骨横向骨搬运术治疗的 10 例重度糖尿病足(Wagner3 级及以上)患者为研究对象, 在征求患者同意及伦理委员会许可后于治疗前及治疗后 1 个月取其创面边缘处组织制成组织切片, 应用免疫组织化学技术, 以 CD86 单抗标记 M1 型巨噬细胞, CD163 单抗标记 M2 型巨噬细胞, 染色后在高倍镜视野下对阳性细胞进行计数, 并应用 Image pro plus 6.0 软件对图像中的像素点进行采集分析, 计算出 M1/M2 比值的变化。

结果与结论: ①治疗后 1 个月患者 M1/M2 比值显著低于治疗前($P < 0.05$); ②治疗后 CD86、CD163 阳性细胞分布和计数均较治疗前减少($P < 0.05$); ③结果表明, 胫骨横向骨搬运术可以使巨噬细胞趋向转化为 M2 巨噬细胞, 从而减轻巨噬细胞介导的糖尿病足慢性创面炎症, 促进愈合。

关键词:

巨噬细胞; 重度糖尿病足; 胫骨横向骨搬运; 创面愈合; 组织构建

主题词:

巨噬细胞; 糖尿病足; 伤口愈合; 组织工程

基金资助:

广西自然科学基金项目(2017GXNSFAA198293)

Macrophages promote the healing of severe diabetic foot wounds after tibial transverse transport

Gao Wei, Lin Zhenxun, Zhen Puxiang, Chen Yan, Kuang Xiacong, Hua Qikai (Department of Bone and Joint Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Ilizarov biological theory, tension stress technology, produces a certain tension by biological tissue stretch that can induce tissue regeneration and growth.

Gao Wei, Master, Physician, Department of Bone and Joint Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author:

Hua Qikai, MD, Chief physician, Department of Bone and Joint Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

OBJECTIVE: To explore the role of macrophages in promoting the healing of severe diabetic foot wounds by tibial transverse transport.
METHODS: Ten patients with severe diabetic foot (Wagner grades ≥ 3), admitted in the Department of Bone and Joint Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University from December 2017 to January 2018 were enrolled. With the consent of the patients and the permission of the ethics committee, the tissue sections were obtained from the edge of the wound before and at 1 month after surgery. The immunohistochemical technique was used to mark the M1 macrophages with CD86 monoclonal antibody, and the M2 macrophages with CD163 monoclonal antibody, and the positive cells were counted in the high magnification field. The Image pro plus 6.0 software was used to collect and analyze the pixels in the image, and the change of M1/M2 ratio was calculated.
RESULTS AND CONCLUSION: The 1-month postoperative M1/M2 ratio was significantly lower than that of the preoperative patients ($P < 0.05$). Postoperative CD86-positive cells and CD163-positive cells were significantly decreased in 400-fold positive cells counting compared with preoperation ($P < 0.05$). These findings suggest that tibial transverse transport can turn the macrophages into M2 macrophages, reduce the inflammation of the chronic wound of diabetic foot mediated by macrophages, and promote wound healing.
Subject headings: Macrophages; Diabetic Foot; Wound Healing; Tissue Engineering
Funding: the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 2017GXNSFAA198293

0 引言 Introduction

近年的文献报道, 糖尿病的发病率逐年增加, 根据国际糖尿病联盟(International Diabetes Federation, IDF)的统计, 2015年全世界约有4.15亿的成人糖尿病患者, 且呈不断升高的趋势, 特别是在中低收入国家, 而预计到2040年全世界的糖尿病患者将达到6.42亿^[1]。而其中约25%的糖尿病患者在疾病发展过程中因体内高血糖状态及自身免疫力下降而合并神经病变及各种不同程度的末梢血管病变, 导致下肢感染、溃疡形成和深部组织的坏死, 发生糖尿病足^[2]。目前糖尿病足的治疗方法主要有游离带血管蒂皮瓣治疗、同种异体脱水羊膜移植治疗、经皮血管腔内血管成形联合支架植入术治疗、介入溶栓治疗、干细胞移植治疗等, 创面愈合率为75%–90%, 但这些方法在重度糖尿病足(Wagner 3级及以上)的溃疡创面疗效欠佳, 有5%–24%的患者需要截肢^[3-6]; 并且糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)复发率高, 1年内、3年内和5年内的复发率分别可达40%、60%和65%^[7]。

基于“张力-应力”法则的Ilizarov技术常被用于骨科难治性创面和缺损修复的治疗^[8]。近年动物实验发现, 截骨牵拉的区域首先有大量微血管网再生, 通过现代血管造影技术也观察到截骨牵拉区有新生血管再生与微循环重建^[9-10]。鉴于此, 将胫骨横向骨搬运术率先应用于治疗重度糖尿病足中^[11-12], 获得了良好的疗效, 但其细胞机制尚不清楚。

巨噬细胞在创面的局部抗感染免疫及组织再生中都发挥着重要作用, 该研究通过观察胫骨横向骨搬运前后创面皮肤M1和M2巨噬细胞的定位、分布以及两者比例变化, 初步探索其机制。

1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 临床基础研究。

1.2 时间与地点 实验于2018年3至5月在广西医科大学附属口腔医院病理科完成。

1.3 对象 在征求患者同意及伦理委员会许可后, 取广西医科大学第一附属医院骨关节外科2017年12月至2018年1月入院经胫骨横向骨搬运治疗的重度糖尿病足患者术前创面边缘组织10例及术后1个月时创面愈合边缘处的组织10

例, 患者基本资料见表1。

表1 经胫骨横向骨搬运治疗的重度糖尿病足患者10例基本资料
Table 1 Baseline data of 10 patients with severe diabetic foot undergoing tibial transverse transport

编号	性别	年龄(岁)	Wagner 分级	足部溃疡 病程(月)	术式
1	男	64	4	12	经胫骨横向骨搬运
2	女	85	4	12	经胫骨横向骨搬运
3	男	57	3	2	经胫骨横向骨搬运
4	男	81	4	4	经胫骨横向骨搬运
5	男	47	3	0.5	经胫骨横向骨搬运
6	男	59	4	1	经胫骨横向骨搬运
7	女	86	4	2	经胫骨横向骨搬运
8	女	74	4	1	经胫骨横向骨搬运
9	女	71	3	0.5	经胫骨横向骨搬运
10	男	58	3	0.5	经胫骨横向骨搬运

纳入标准: 重度糖尿病足患者(Wagner 3级及以上)。

排除标准: ①下肢动脉B超或下肢CT血管造影(CTA)检查示腘动脉流出道狭窄 $>85\%$, 甚至堵塞; ②患者存在精神疾患不能配合完成外固定架的调节及护理; ③近期发生过心脑血管意外, 或有较高心脑血管意外发生可能, 不能耐受手术的患者。

1.4 材料 兔抗人CD86单克隆抗体(Abcam)、兔抗人CD163单克隆抗体(Abcam)、免疫组织化学染色试剂盒(中杉金桥, 内含: 10 mL/kit封闭用正常羊血清原液、生物素标记羊抗兔IgG、1 mL/kit辣根酶标记链霉卵白素原液)、二氨基联苯(Diaminobenzidine, DAB)。

1.5 方法

1.5.1 标本收集 取糖尿病足患者骨搬运治疗前及治疗后1个月创面边缘组织, 大小约1 cm \times 0.5 cm \times 0.3 cm, 经体积分数4%甲醛固定4–8 h, 冲洗、脱水、石蜡包埋、切片后备用。

1.5.2 免疫组织化学染色观察M1巨噬细胞、M2巨噬细胞在骨搬运治疗前及治疗后1月的分布及计数 免疫组织化学实验按免疫组织化学试剂盒内说明书上的步骤完成: 脱蜡前将切片放入60 °C恒温箱中烘烤20 min, 脱蜡及水化, 将切片在柠檬酸盐缓冲液中进行抗原修复, PBS冲洗3次, 经3%新制过氧化氢溶液处理后用血清封闭; 滴入已稀释的兔抗人CD86单克隆抗体(1 : 500)用于标记M1巨噬细胞、

兔抗人CD163单克隆抗体(1:500)用于标记M2巨噬细胞, 4℃过夜, 第2天从冰箱中取出后37℃复温45 min, 加入已稀释的生物素标记羊抗兔IgG(1:100)后放入37℃恒温烤箱中15 min, 滴加辣根酶标记链霉卵白素稀释液(1:100), 37℃孵育15 min, 上述各步骤之间均用PBS洗3次, 每次2 min, 行DAB显色, 复染, 分色, 返蓝, 脱水, 透明, 封固。显微镜下观察染色结果。以胞膜棕黄色着色为阳性细胞, 分别取3个视野(x400)计数每个视野下阳性细胞数。

1.5.3 M1/M2比例的计算 显微镜下观察切片时进行拍照, 运用Image pro plus 6.0图片分析软件对所采集图像中CD86、CD163阳性像素点数量进行统计, 计算出光密度(OD), 将两者相除得出M1/M2比例。

1.6 主要观察指标 治疗前后创面边缘组织CD86及CD163免疫组织化学染色结果、阳性细胞计数及M1/M2比值。

1.7 统计学分析 所有数据应用SPSS 22.0统计软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较选用配对t检验, $P < 0.05$ 时认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 患者治疗前后创面边缘组织CD86及CD163免疫组织化学染色结果 见图1, CD86阳性细胞主要分布于表皮层,

CD163阳性细胞主要分布于真皮层, 且骨搬移治疗后1月CD86阳性细胞及CD163阳性细胞分布均明显较治疗前减少。

2.2 CD86及CD163阳性细胞计数结果 骨搬移治疗前患者400倍镜下CD86阳性细胞计数为 156.270 ± 33.034 , CD163阳性细胞计数为 39.900 ± 11.120 ; 骨搬移治疗后1个月患者CD86阳性细胞计数为 73.930 ± 15.065 , CD163阳性细胞计数为 28.950 ± 8.774 , 治疗后1个月CD86阳性细胞及CD163阳性细胞计数均较治疗前减少($P < 0.05$)。

2.3 创面边缘组织M1/M2比值 骨搬移治疗前患者M1/M2比值为 4.072 ± 0.502 , 治疗后1个月患者M1/M2比值为 3.098 ± 0.548 , 治疗后1个月M1/M2比值低于治疗前($P < 0.05$), 见表2, 图2, 3。

表2 重度糖尿病足患者治疗前后M1、M2计数及M1/M2变化情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Count of M1 and M2 macrophages and M1/M2 ratio in severe diabetic foot before and after treatment

项目	治疗前	治疗后1个月	P值
M1细胞计数	156.270±33.034	73.930±15.065	<0.001
M2细胞计数	39.900±11.120	28.950±8.774	0.025
M1/M2	4.072±0.502	3.098±0.548	0.001

表注: 治疗后1个月患者M1巨噬细胞计数、M2巨噬细胞计数及M1/M2比值均较术前减少。

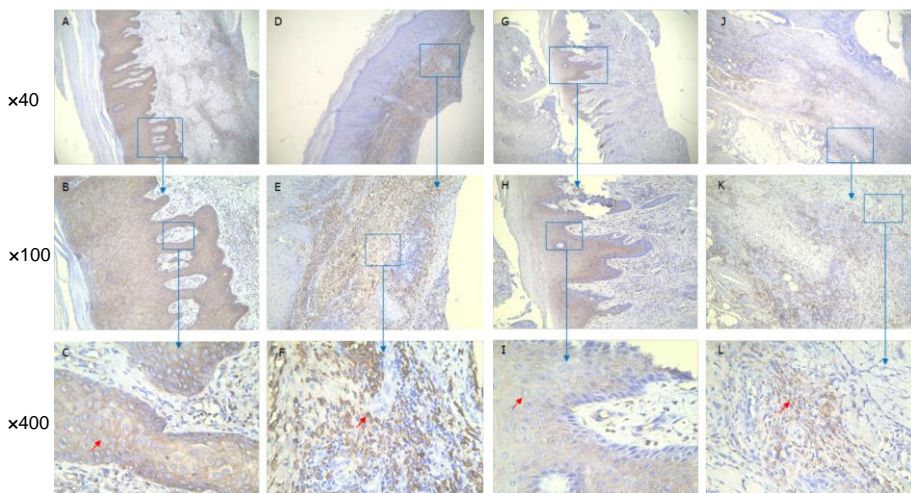


图1 重度糖尿病足患者治疗前后CD86和CD163免疫组织化学染色情况
Figure 1 Immunohistochemical staining of CD86 and CD163 in severe diabetic foot before and after treatment

图注: 图A, B, C为术前CD86免疫组织化学染色情况, CD86阳性细胞主要集中在表皮层; D, E, F为术前CD163免疫组织化学染色情况, CD163阳性细胞主要集中在真皮层; G, H, I为术后1个月CD86免疫组织化学染色情况, CD86阳性细胞分布较术前减少; J, K, L为术后1个月CD163免疫组织化学染色情况, CD163阳性细胞分布较术前减少。

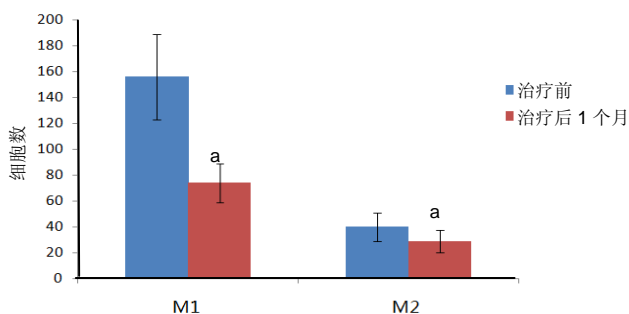


图2 重度糖尿病足患者治疗前后M1及M2细胞计数变化
Figure 2 Count of M1 and M2 macrophages in severe diabetic foot before and after treatment

图注: 与治疗前比较, $^a P < 0.05$ 。

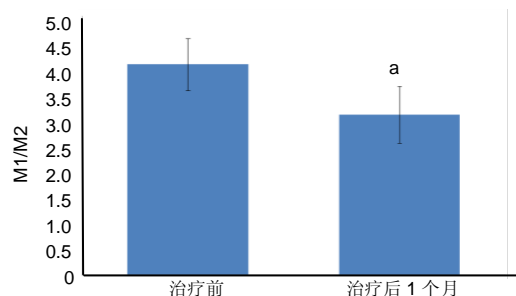


图3 重度糖尿病足患者治疗前后M1/M2变化
Figure 3 Change of M1/M2 ratio in severe diabetic foot before and after treatment

图注: 与治疗前比较, $^a P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

3.1 糖尿病足的病理生理 糖尿病足通常是糖尿病患者由于周围神经病变、足部畸形和外周动脉疾病等共同导致而出现的一种极其严重的并发症^[13]。长期血糖控制不佳的糖尿病患者体内的高血糖水平通过多种机制, 诸如晚期糖基化终产物的形成、蛋白激酶C的激活、DNA损伤、活性氧水平的增加、一氧化氮阻断、慢性炎症等导致神经纤维损伤, 产生有多种形式, 以远端感觉神经病变最为常见的糖尿病神经病变^[14-15]。神经病变和其他因素导致足部变形, 脚上的压力分布发生变化, 异常压力点出现。压力的反复作用导致作用处皮肤角化和愈伤组织形成, 施加在角化区域的过大压力会损伤足部组织并诱导在愈伤组织下形成溃疡^[16]。

外周动脉疾病是近50%的糖尿病患者形成足部溃疡的另一个重要原因^[17]。在糖尿病的早期阶段, 微循环障碍, 包括毛细血管尺寸的缩小, 基底膜的增厚和小动脉的透明变性等出现^[18], 且糖尿病患者更易发生动脉粥样硬化, 主要为胫骨的血管受到影响。糖尿病患者持续的高血糖状态可导致内皮功能障碍和平滑肌异常, 随后由于血管扩张剂的减少而导致血管收缩^[19]。最后, 血管收缩剂和血小板聚集激动剂血栓素A2的升高会使血浆呈高凝状态。所有的这些因素共同导致了闭塞性动脉疾病的发生和发展, 以及糖尿病足中缺血和溃疡的形成。

3.2 糖尿病足创面难愈的机制 异常的愈合过程导致伤口持续性导致了糖尿病足显著的发病率和死亡率。通常, 伤口愈合是在皮肤屏障破坏后发生的过程, 通常由免疫反应激活的不同细胞释放的生长因子和细胞因子介导, 包括成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞、血小板和角质形成细胞等^[20]。最终, 伤口闭合和神经再生由4个阶段组成: ①“he-mostasis”阶段, 涉及血小板和循环凝血因子在组织损伤部位的积聚; ②“炎症”阶段, 对组织损伤的反应并涉及炎症细胞的募集; ③“组织形成”阶段, 炎症消退后伤口床内的细胞的增殖和迁移; ④“重塑”阶段, 其中新形成的组织主要通过细胞外基质重塑和血管生成而沉积的^[21]。

长久以来一直认为, 伴随着炎症阶段的结束及愈合时的“组织形成”阶段的开始, 伤口处的巨噬细胞表型从促炎症表型(通常以小鼠中的Ly6Chi细胞为特征; 人类中的CD14⁺CD16⁺细胞; 在功能上以炎症细胞因子群为特征)转换为抗炎表型(典型地以小鼠中的Ly6C⁺Lo细胞为特征; 人类中的CD14⁺CD16⁺细胞为功能性; 在功能上以抗炎细胞因子群为特征)。但是, 在2型糖尿病中, 这种巨噬细胞的功能/表型转换不容易发生, 且巨噬细胞主要保持在促炎症状态并且发生着慢性炎症, 导致糖尿病足患者溃疡坏死处巨噬细胞极化为M2型巨噬细胞不足, 炎症反应期无法顺利转为增殖期^[17, 22], 导致在糖尿病性伤口中, 未能通过上述程序化阶段进展并预防伤口正常愈合。

3.3 巨噬细胞亚型与糖尿病足 巨噬细胞是外周血中的

单核细胞进入组织定居后分化而来, 是机体重要的免疫细胞, 其可吞噬、杀灭细菌等病原微生物, 提呈抗原激活机体特异性免疫, 清除机体衰老死亡细胞, 分泌炎症性或细胞因子调节机体免疫反应与组织修复等^[23-24]。其在不同微环境的影响下, 可极化为经典活化型(M1)和替代活化型(M2)两类巨噬细胞。M1巨噬细胞可发挥抗原提呈、吞噬杀灭病原微生物的作用, 而M2巨噬细胞可抑制局部炎症反应, 促进组织的再生修复和创面的愈合^[25]。因此, 控制糖尿病足创面处的炎症反应, 促进巨噬细胞向M2型巨噬细胞极化, 分泌更多量的生长因子, 是可以考虑的加速创面愈合的治疗方法。

治疗过程中发现应用胫骨横向骨搬运术治疗重度糖尿病足患者后, 其原有创面被皮肤组织覆盖而非大量瘢痕组织填充, 是典型的组织再生现象。而巨噬细胞, 特别是M2型巨噬细胞与组织损伤的修复与再生密切相关。M2型巨噬细胞可调节炎症反应, 促进组织的修复、血管的再生及纤维化。其促进组织修复基本过程为吞噬作用, 细胞因子及生长因子的分泌, 细胞外基质重塑。所以作者考虑胫骨横向骨搬运术促进了创面处巨噬细胞向M2型巨噬细胞极化, 使原有的巨噬细胞极化从上述的失衡状态重归平衡。

在实验中选用CD86标记M1型巨噬细胞, 用CD163标记M2型巨噬细胞, 发现治疗后1个月患者愈合组织处的M1和M2细胞计数及M1/M2相较于治疗前明显降低, 表明在术前患者创面处因病原微生物刺激炎症反应持续存在, 巨噬细胞主要极化为M1巨噬细胞, 发挥抗原提呈、杀灭病原微生物、分泌促炎因子等抗感染免疫的作用, 但M1巨噬细胞长期存在时其分泌的活性氮、活性氧以及其诱导的Th1和Th17反应亦会对自身组织造成损伤, 加重足部溃疡及坏死; 而治疗后1个月时炎症已得到了控制, 巨噬细胞更多地极化为M2巨噬细胞, 其可分泌抗炎因子及生长因子, 从而调节抑制局部炎症反应, 促进组织的再生修复和创面的愈合^[26-27]。因此可以认为胫骨横向骨搬运术后患者局部创面的炎症反应得到了控制, 并且手术促进重度糖尿病足患者体内巨噬细胞向M2型巨噬细胞转化, 从而促进了其创面处溃疡的愈合。

综上所述, 巨噬细胞极化为M1型巨噬细胞增多, 而M2型巨噬细胞减少的巨噬细胞极化失衡是导致糖尿病足创面溃疡迁延不愈的重要因素, 而胫骨横向骨搬运术通过促进巨噬细胞极化平衡的重建可能是使重度糖尿病足的创面得以愈合的原因, 但其促进患者体内巨噬细胞极化平衡的机制仍需进一步研究。

作者贡献: 花奇凯及邝晓聪负责实验设计, 免疫组织化学实验实施为高伟, 林震迅及镇普祥负责标本取材, 实验评估为陈炎、邝晓聪及花奇凯, 高伟成文, 花奇凯审核。

经费支持: 该文章接受了“广西自然科学基金项目(2017GXNSFAA198293)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

知情同意问题: 参与实验的所有患者及其家属自愿参加,并对实验过程完全知情同意,在充分了解治疗方案及实验方法的前提下签署“知情同意书”。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Ibrahim A. IDF Clinical Practice Recommendation on the Diabetic Foot: A guide for healthcare professionals. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017;127:285.
- [2] Suh HS, Oh TS, Lee HS, et al. A New Approach for Reconstruction of Diabetic Foot Wounds Using the Angiosome and Supermicrosurgery Concept. *Plast Reconstr Surg*. 2016;138(4):702e-9e.
- [3] 于吉祥,樊琳琳,李禹.分析糖尿病足坏疽合并下肢动脉硬化闭塞症介入治疗适应证的选择[J].*糖尿病新世界*,2016,19(1):52-53.
- [4] Shu X, Shu S, Tang S, et al. Efficiency of stem cell based therapy in the treatment of diabetic foot ulcer: a meta-analysis. *Endocr J*. 2018;65(4):403-413.
- [5] Rosenblum BI. A Retrospective Case Series of a Dehydrated Amniotic Membrane Allograft for Treatment of Unresolved Diabetic Foot Ulcers. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2016;106(5):328-337.
- [6] 毛启东,张喜婷,吴丹.经皮血管球囊成形术联合支架植入术治2型糖尿病足病的临床分析[J].*重庆医学*,2017(A02):212-213.
- [7] Armstrong DG, Ajm B, Bus SA. Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. *N Engl J Med*. 2017;376(24):2367-2375.
- [8] Gubin AV, Borzunov DY, Marchenkova LO, et al. Contribution of G. A. Ilizarov to bone reconstruction: historical achievements and state of the art. *Strategies Trauma Limb Reconstr*. 2016;11(3):145-152.
- [9] 张定伟,秦泗河,臧建成. Ilizarov微循环重建技术治疗Wagner 4级糖尿病足临床疗效分析[J].*中国矫形外科杂志*, 2017,25(4):354-356.
- [10] 洗呈,赵劲民,苏伟,等.外固定架骨搬移系统修复糖尿病足:功能与影像学评价[J].*中国组织工程研究*,2015,19(46):7539-7544.
- [11] 武黎黄英.胫骨横向搬移术治疗重度糖尿病足及其骨髓干细胞动员的机制研究[D].南宁:广西医科大学,2017.
- [12] 花奇凯,秦泗河,赵良军,等. Ilizarov技术胫骨横向骨搬移术治疗糖尿病足[J].*中国矫形外科杂志*,2017,25(4):303-307.
- [13] Bakker K, Schaper NC. The development of global consensus guidelines on the management and prevention of the diabetic foot 2011. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012; 28(S1): 116-118.
- [14] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107(9):1058-1070.
- [15] Pop-Busui R, Boulton AJM, Feldman EL, et al. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2017;40(1):136-154.
- [16] Lavery L, Peters E, Williams JD, et al. Reevaluating the way we classify the diabetic foot: restructuring the diabetic foot risk classification system of the International Working Group on the Diabetic Foot. *Diabetes Care*. 2008;31(1):154-156.
- [17] Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Adv Ther*. 2014;31(8):817-836.
- [18] Karri VVSR, Kuppusamy G, Talluri SV, et al. Current and emerging therapies in the management of diabetic foot ulcers. *Curr Med Res Opin*. 2015;32(3):1-68.
- [19] Hinchliffe RJ, Brownrigg JRW, Andros G, et al. Effectiveness of revascularization of the ulcerated foot in patients with diabetes and peripheral artery disease: a systematic review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2016;32(S1):136-144.
- [20] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314-321.
- [21] Wicks K, Torbica T, Mace KA. Myeloid cell dysfunction and the pathogenesis of the diabetic chronic wound. *Semin Immunol*. 2014;26(4):341-353.
- [22] Davis FM, Kimball A, Boniakowski A, et al. Dysfunctional Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers: New Crossroads. *Curr Diab Rep*. 2018;18(1):2.
- [23] Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496(7446):445-455.
- [24] Guillemins M, Ginhoux F, Jakubzick C, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(8):571-578.
- [25] 熊思东.疾病发病中的巨噬细胞极化:机制与作用[J].*现代免疫学*, 2010(5):353-360.
- [26] Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14-20.
- [27] Mulder R, Banete A, Basta S. Spleen-derived macrophages are readily polarized into classically activated (M1) or alternatively activated (M2) states. *Immunobiology*. 2014;219(10):737-745.