

脐带间充质干细胞移植治疗糖尿病下肢血管病变

李晓玲¹, 朱旅云¹, 宋光耀², 贾黎静³, 杨少玲¹, 胡丽叶¹(¹白求恩国际和平医院内分泌科, 河北省石家庄市 050082; ²河北省人民医院内分泌科, 河北省石家庄市 050051; ³河北省第三人民医院内分泌科, 河北省石家庄市 050051)

文章亮点:

脐带间充质干细胞采集简单, 容易获得、免疫原性弱, 无伦理问题, 诱导分化后具有更加有效的干细胞潜能, 试验特征性地采用脐带间充质干细胞移植治疗糖尿病下肢血管病变, 可改善下肢缺血症状, 降低坏疽及截肢率, 且无明显不良反应。

关键词:

干细胞; 移植; 脐带干细胞; 脐带间充质干细胞移植; 2型糖尿病; 下肢血管病变; 河北省自然科学基金

主题词:

脐带; 间质干细胞移植; 糖尿病, 2型; 糖尿病血管病变

基金资助:

河北省自然科学基金课题(H2013505067)

摘要

背景: 与骨髓和自体外周血干细胞相比, 脐带间充质干细胞更原始, 扩增能力更强, 且免疫原性弱, 无伦理问题, 对于年老体弱的糖尿病患者更具有重要意义。

目的: 分析脐带间充质干细胞移植治疗糖尿病下肢血管病变的有效性和安全性。

方法: 56例中老年2型糖尿病下肢血管病变患者, 随机分为对照组和观察组, 对照组采用常规药物治疗, 观察组采用脐带间充质干细胞移植治疗。

结果与结论: 观察组临床显效率高于对照组的临床显效率, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 两组治疗后皮温、经皮氧、踝肱指数值均有好转表现, 观察组踝肱指数值好转更明显($P < 0.05$); 两组均未发现明显的不良反应。结果可见脐带间充质干细胞移植治疗糖尿病下肢血管病变是一种简便、安全、有效的治疗方法, 近期疗效显著。

李晓玲, 朱旅云, 宋光耀, 贾黎静, 杨少玲, 胡丽叶. 脐带间充质干细胞移植治疗糖尿病下肢血管病变[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(23):3670-3675.

Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation for treatment of diabetic lower limb vascular disease

Li Xiao-ling¹, Zhu Lv-yun¹, Song Guang-yao², Jia Li-jing³, Yang Shao-ling¹, Hu Li-ye¹ (¹Department of Endocrinology, the Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China; ²Department of Endocrinology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China; ³Department of Endocrinology, the Third People's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Compared with bone marrow and autologous peripheral blood stem cells, umbilical cord mesenchymal stem cells are characterized as more primitive, more powerful amplification and lower immunogenicity, no ethical problems, which are more important to the elderly patients with diabetes mellitus.

OBJECTIVE: To evaluate the efficacy and safety of umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation in the treatment of the elderly patients with diabetic lower limb vascular disease.

METHODS: Fifty-six elderly patients with diabetic lower limb vascular disease were randomly divided into observation group and control group. The control group was treated with conventional therapy, while the observation group was treated with umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation.

RESULTS AND CONCLUSION: Observation group showed a higher efficiency than the control group, with significant difference ($P < 0.05$). After treatment, foot skin temperature, transcutaneous oxygen pressure, and ankle brachial index were all improved in both two groups, and the ankle brachial index showed a better value in the observation group ($P < 0.05$). There were no significant adverse reactions in the two groups. Umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation is a simple, safe and effective therapy for the elderly patients with diabetic lower limb vascular disease, with better short-term curative effect.

Subject headings: umbilical cord; mesenchymal stem cell transplantation; diabetes mellitus, type 2; diabetic angiopathies

Funding: the Natural Science Foundation of Hebei Province, No. H2013505067

李晓玲, 女, 1975年生, 河北省邯郸市人, 在读博士, 副主任医师, 主要从事干细胞培养及移植治疗糖尿病方面的研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.23.011
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)23-03670-06
稿件接受: 2014-03-23

Li Xiao-ling, Studying for doctorate, Associate chief physician, Department of Endocrinology, the Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China

Accepted: 2014-03-23

Li XL, Zhu LY, Song GY, Jia LJ, Yang SL, Hu LY. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation for treatment of diabetic lower limb vascular disease. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(23):3670-3675.

0 引言 Introduction

糖尿病下肢血管病变是糖尿病较严重的并发症之一, 发病率呈明显上升趋势, 尤其是下肢动脉流出道闭塞侧支循环未建立的患者, 常导致足部溃疡或坏疽而截肢致残。目前临床上一般采用药物、血管搭桥、介入手术等方式治疗, 但均具有一定的局限性, 对于动脉流出道差无法行动脉搭桥或介入者, 或体质差无法耐受搭桥手术者的治疗方法有限, 因此迫切需要寻求新的治疗方法^[1-5]。20世纪90年代以来, 人们开始应用血管生长因子及基因治疗方法来促进缺血肢体的血管再生, 以达到改善患肢血液供应的目的^[6]。

近年来, 干细胞移植用于下肢缺血性疾病的治疗, 通过促进缺血肢体的血管新生和侧支循环形成, 使缺血症状得到明显改善, 这种新的治疗方法已成为研究热点^[7-11]。已有人采用干细胞的基因修饰以及细胞因子的联合运用等多种手段治疗糖尿病下肢血管病变, 并表现出各自的优越性。目前临床上用于移植治疗的干细胞主要有骨髓造血干细胞、骨髓单核细胞、内皮祖细胞和间充质干细胞, 其中间充质干细胞来源于脐血、脐带和脂肪组织等。骨髓间充质干细胞可以通过血管重建或介入的方法来达到恢复缺血肢体血流灌注的目的^[12-14], 但采集外周血或骨髓干细胞风险较大、操作复杂, 而且糖尿病下肢血管病患者多为年老体弱的老年人, 其自体干细胞数量、增殖分化、黏附和成血管能力均较低。与骨髓和自体外周血干细胞相比, 脐带资源丰富, 间充质干细胞更原始, 扩增能力更强, 诱导分化后具有更加有效的干细胞潜能, 且细胞采集简单, 容易获得、免疫原性弱, 无伦理问题, 对于年老体弱的糖尿病患者更具有重要意义^[15-23]。脐带间充质干细胞治疗尚处于临床研究实验起步阶段, 特别是用于中老年2型糖尿病下肢血管病变患者的研究不多, 本研究分别采用脐带间充质干细胞移植和传统的前列地尔等药物进行治疗, 探讨脐带间充质干细胞治疗中老年糖尿病下肢血管病变的有效性和安全性。

1 对象和方法 Subjects and methods

设计: 随机对照研究。

时间及地点: 资料收集于2010年2月至2012年10月白求恩国际和平医院内分泌科。

对象:

诊断标准: ①符合《中国2型糖尿病防治指南》2007版推荐诊断标准。②有肢体缺血性表现。

纳入标准: ①入组患者均具有足部和(或)下肢出现麻凉、疼痛、间歇性跛行等症状继续发展为静息痛。②踝肱指数0.4-0.8。③CTA或彩超证实周围动脉有不同程度的狭

窄或闭塞, 病变远端流出道差。④对治疗方法知情同意, 并签署知情同意书者。

排除标准: ①合并有肝、肾等严重危及生命的疾病。②可能影响糖代谢及脂代谢的其他内分泌疾病和其他全身性疾病患者。

根据以上标准纳入2型糖尿病下肢血管病患者56例, 男32例, 女24例; 年龄38-78岁; 病程5-25年。糖尿病足23例, 其中合并感染15例, 坏疽8例; 动脉硬化闭塞症13例; 血栓性闭塞性脉管炎10例。56例患者按随机数字表法分成观察组和对照组, 观察组男17例, 女13例, 对照组男15例, 女11例, 两组一般资料比较差异无显著性意义, 具有可比性($P > 0.05$)。

方法:

脐带间充质干细胞制备: 将无菌条件下取得的健康正常孕周的剖宫产产妇的脐带(家属签署知情同意书, 北科公司与白求恩国际和平医院妇产科合作), 用生理盐水洗涤去除血液。将脐带剪切成1.0-2.0 cm大小的片段, 剔除血管(1条脐静脉, 2条脐动脉)避免内皮细胞污染。取出其中的Wharton's Jelly, 将其剪碎, 大小约1 mm³, 将组织块置于培养瓶中, 加入无血清培养基, 按 $1 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度将细胞接种到75 cm²的培养瓶中。放置在37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中培养。1周后首次换液, 此后三四天换液1次。至2周后可见成纤维细胞生长。在这种情况下, 用0.05%胰蛋白酶/EDTA收集细胞, 传代到新培养瓶中继续扩增。所制备干细胞数 $>1 \times 10^7$ 个, 无菌条件下分离、培养、传代。收集第3-5代细胞, 利用倒置相差显微镜和流式细胞仪对于细胞形态学、细胞表面标记、无菌、支原体、内毒素等多种项目进行鉴定, 再用于移植。

常规治疗: 包括严格控制血糖、降压、降血脂、改善循环、抗感染、抗凝、营养神经、局部理疗等; 组织破溃者给予局部清创换药, 应用盐酸山嵛若碱、硫酸庆大霉素、雷夫奴尔外敷, 待局部感染控制, 破溃处组织新鲜或愈合后进行移植。①对照组: 常规治疗应用生理盐水100 mL, 前列地尔10 μg(北京泰德制药有限公司), 滴壶给药, 1次/d改善微循环, 治疗2周。②观察组: 细胞数量 $(1.8-2.3) \times 10^7$, 一般稀释至100-120 mL, 局麻下, 沿患肢血管走行方向自上而下行多点局部肌注脐带间充质干细胞1 mL, 每点1-3 mL, 每个穿刺点间隔2.0-3.0 cm, 注射深度1.5-2.0 cm。术后用无菌纱布包扎, 共注射1次, 5-7 d出院。

主要观察指标:

临床症状评价: 两组患者在治疗期间监测血压、血糖、凝血功能、血常规等。观察临床症状、体征, 主观指标如跛行距离、肢体冷感、肢体疼痛状况等, 随访3个月后续评疗效, 显效: 自觉症状消失或不明显, 存在足部病变者创

面愈合80%以上;有效:自觉症状明显减轻,存在足部病变者创面愈合40%以上;无效:病情改善不明显,存在足部病变者虽有改善,创面愈合不足40%,或病情继续进展,疼痛加重,创面扩大。

客观指标评价: 随访3个月后检测以下指标: ①踝肱指数(ABI): 日本林电器株工会社制造的ES-i000 SPM多普勒血流控制仪检测。②红外皮温仪检测: 瑞士产PICCOLO多功能红外线体温仪检测下肢皮温。③经皮氧分压(TcPO₂)检测: 用瑞典PERIMMED公司PF5000经皮氧分压监测。

统计学分析: 采用SPSS 18.0统计学软件处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析及 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 脐带间充质干细胞的形态 组织块培养第2天时, 开始有细胞从组织块爬出(图1A); 第3代的细胞形态均一, 呈梭形或成纤维形(图1B)。

2.2 细胞免疫表型鉴定 分离培养的第3代脐带间充质干细胞表达CD44(91.4%)、CD29(91.3%)、CD105(99.2%), 不表达CD34(0.2%)、CD45(0.9%)、CD14(0.6%)(图2)。第7代、第10代脐带间充质干细胞表达的免疫表型与第3代相比无明显差别。

2.3 两组基线资料比较 两组一般资料差异无显著性意义, 具有可比性($P > 0.05$, 表1)。

2.4 随机试验中主题进展的流程图 见图3。

2.5 临床疗效 观察组临床显效率为54%, 高于对照组的临床显效率(34%), 差异有显著性意义($P < 0.05$, 表2); 两组治疗后各项临床观察指标及足温、经皮氧分压、踝肱指数值与治疗前比较差异均有好转表现($P < 0.05$), 治疗后3个月观察组各项临床观察指标及踝肱指数值好转更明显(表3)。

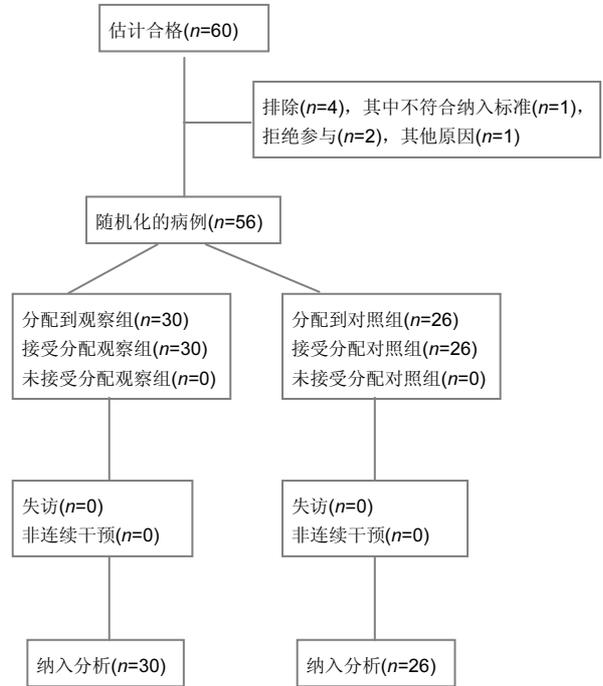


图3 随机试验中主题进展的流程图
Figure 3 Flowchart of the randomized trial

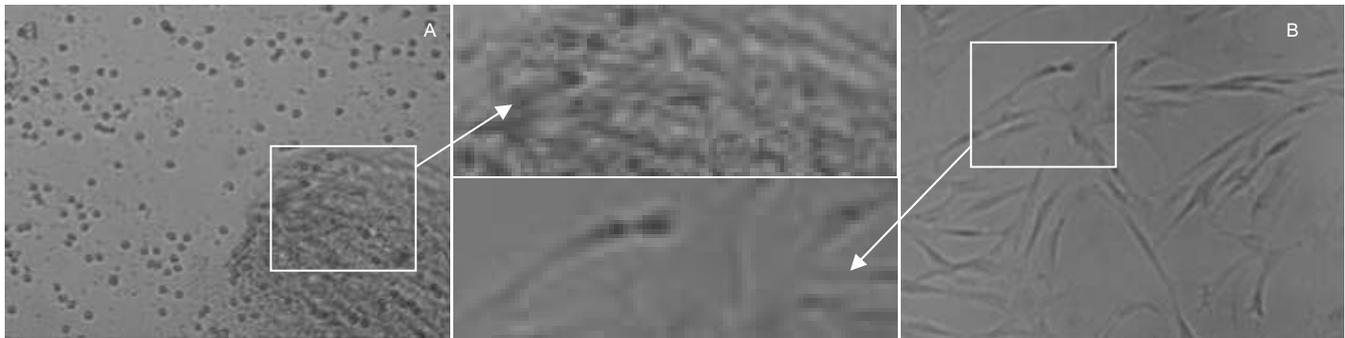


图1 脐带间充质干细胞的形态

Figure 1 Morphology of umbilical cord mesenchymal stem cells

图注: A 为组织块培养第2天, 开始有细胞从组织块爬出($\times 250$); B 为第3代脐带间充质干细胞形态均一, 呈梭形或成纤维形($\times 400$)。

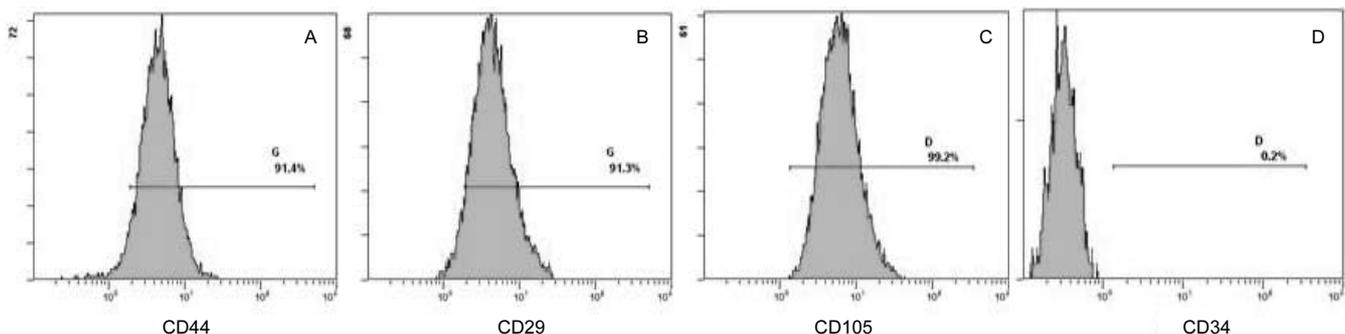


图2 第3代脐带间充质干细胞的免疫表型

Figure 2 Immunophenotyping of umbilical cord mesenchymal stem cells at passage 3

表 1 两组 2 型糖尿病下肢血管病变患者基线资料比较

项目	观察组(n=30)	对照组(n=26)
年龄(年)	57.5±4.2	7.8±5.2
病程(年)	7.8±5.2	8.5±4.3
空腹血糖(mmol/L)	9.2±1.7	8.8±1.6
餐后血糖(mmol/L)	12.3±2.8	13.5±3.4
糖化血红蛋白(%)	9.7±1.4	9.8±1.8

表 3 两组 2 型糖尿病下肢血管病变患者足温、经皮氧分压和踝肱指数比较

Table 3 Comparison of foot skin temperature, transcutaneous oxygen pressure, and ankle brachial index between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	观察组(n=30)	对照组(n=26)
皮温(°C)		
治疗前	20.1±4.0	21.2±5.0
治疗后 3 个月	25.3±7.0 ^a	24.5±8.0 ^a
经皮氧分压(kPa)		
治疗前	20.6±3.6	20.7±4.2
治疗后 3 个月	25.3±4.5 ^a	24.5±5.1 ^a
踝肱指数		
治疗前	0.81±0.11	0.88±0.09
治疗后 3 个月	1.09±0.15 ^{ab}	0.94±0.12 ^a
肢体疼痛(分)		
治疗前	2.88±0.69	2.83±0.76
治疗后 3 个月	1.70±0.15 ^{ab}	2.70±0.62
患肢冷感(分)		
治疗前	3.84±0.28	3.80±0.32
治疗后 3 个月	0.83±0.27 ^{ab}	2.93±0.42
间歇性跛行(分)		
治疗前	3.49±0.26	3.40±0.20
治疗后 3 个月	1.44±0.42 ^{ab}	0.98±0.32 ^a

表注: 对照组用传统药物前列地尔治疗, 观察组进行脐带间充质干细胞移植治疗。与治疗前比较, ^a $P < 0.05$; 与对照组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.6 患肢局部治疗结果 部分足趾溃疡经清创后创面新鲜, 再给予脐带干细胞移植治疗, 8-26 d后创面即达到1级愈合。

2.7 不良事件 移植后1-7 d内部分患者自觉移植下肢有发热感, 而且疼痛、麻木、发凉症状一过性减轻, 持续一两周, 观察3个月期间内无死亡病例, 无心脑血管急性并发症, 肝、肾功能、出凝血时间等无特殊改变, 未见其他不良反应。

3 讨论 Discussion

随着人民生活水平的不断提高, 糖尿病的发病率在快速增长, 其并发的周围血管病变的发生率也越来越高, 成为糖尿病患者截肢致残的主要原因, 患者可因血管严重狭窄或闭塞而导致肢体坏疽、截肢, 严重影响患者的生存质量。传统治疗主要是内科的药物治疗和外科的血流重建, 然而对于因远端流出道动脉闭塞性病变导致的足部缺血来说, 药物治疗不能从根本上解决问题, 外科血流重建是首先应该考虑的方法。但是, 此类患者多年老体弱, 经常伴

表 2 两组 2 型糖尿病下肢血管病变患者临床疗效比较

组别	n	显效	有效	无效	总有效
观察组	30	13/54 ^a	5/32 ^a	7/29	18/86 ^a
对照组	26	6/34	9/29	10/35	15/63

表注: 对照组用传统药物前列地尔治疗, 观察组进行脐带间充质干细胞移植治疗。与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

有心脑血管病变, 无法接受动脉搭桥或下肢动脉介入等外科治疗而经常面临着截肢的危险^[3-4,23]。总之, 目前临床上一般采用药物、血管搭桥、介入手术等方式治疗, 都具有一定局限性, 远期效果很不理想, 如何促进糖尿病缺血下肢血管再生和有效循环的建立是治疗关键。

近年来骨髓干细胞移植重建肢体血管的可行性和有效性已得到大量实验及临床证实, 采用血管新生疗法治疗下肢缺血性疾病是近年刚开展的一项新技术。自2002年Tateishi Yuyama等^[24]首次应用自体骨髓干细胞移植成功治疗缺血性下肢血管病, 国内外许多研究报道均证实自体骨髓干细胞移植治疗糖尿病足溃疡的安全性及有效性^[25-26]。将自体骨髓或外周血干细胞移植入缺血肢体后, 在缺血、缺氧环境下可诱导生成血管内皮细胞、平滑肌细胞等, 使其分化、形成新生毛细血管, 促进血管再生^[27-32]; 新近研究表明, 干细胞可通过自分泌或旁分泌途径等反应性分泌多种生长因子, 如血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子和神经生长因子等细胞因子, 与内皮细胞膜上的相应受体结合, 促进内皮细胞增殖、迁移、重塑, 形成新生血管^[33], 进一步促进局部新生血管形成、神经再生和重构等^[27-30], 最终可改善和恢复患肢血流, 提高患肢皮肤温度, 缓解下肢疼痛及冷、凉感觉, 使溃疡面缩小或愈合^[31-34]。目前采用的自体干细胞移植, 主要是指骨髓源和外周血来源的干细胞; 然而, 无论是骨髓干细胞移植, 还是外周血干细胞移植, 在治疗下肢缺血的临床应用中都存在着一定的局限性。传统的骨髓干细胞移植, 由于采集骨髓干细胞风险较大, 对患者年龄、身体条件、心理接受程度要求较高, 且糖尿病下肢缺血患者多为年龄偏大的老年患者, 不论是其自体骨髓还是外周血来源的干细胞, 干细胞移植后向血管内皮祖细胞分化能力下降, 其增殖、黏附和参与血管形成能力都降低, 机体不能为移植的细胞提供满意的增殖分化环境等问题, 使其临床疗效降低^[35-36], 而脐带间充质干细胞与骨髓间充质干细胞在生物学特性方面极为相似, 且来源更广泛, 采集方便, 扩增能力更强, 免疫原性弱, 具有更加有效的干细胞潜能, 脐带中含有丰富的间充质干细胞及造血干细胞, 间充质干细胞更原始, 分化扩增能力更强, 诱导分化后获得足量干细胞且向血管、骨、肌肉、神经分化能力更强大, 具有更加有效的干细胞潜能, 且不存在伦理争议, 故脐带间充质干细胞无论是从来源上还是从生物学特性及临床效果上均优于骨髓及外周血干细胞^[37-38], 是

治疗缺血性疾病更为良好的种子细胞。

本研究采用脐带间充质干细胞移植治疗糖尿病下肢血管病变, 并与传统的药物治疗法进行对照, 结果发现两组均能治疗糖尿病下肢血管病变, 但是采用脐带间充质干细胞移植治疗的观察组比对照组临床疗效更为显著。且治疗后观察组下肢缺血临床症状及皮温、经皮氧分压、踝肱指数值好转情况要明显优于对照组。观察组足趾局部破溃部分糖尿病患者在治疗前进行彻底清创换药后, 并配合干细胞移植, 在较短期内达1级创面愈合, 缩短了治疗时间。

通过对患者干细胞移植前后各项指标的综合评估, 证实早期进行脐带间充质干细胞移植能有效地增加患者的下肢血流, 使一部分患者避免截肢或降低截肢平面, 在治疗中未发生严重并发症和不良反应^[39-40], 且方法简便、安全有效, 尤其对于合并心脑血管疾病的患者、经介入手术或血管搭桥效果不佳的老弱病残的糖尿病患者提供了一种新的治疗手段, 提示脐带间充质干细胞可能是促进局部缺血部位血管生成行之有效的、高效的物质。采用脐带间充质干细胞移植治疗能有效改善中老年2型糖尿病下肢血管病变。

另外在移植的短期内(多为1周), 患者自觉肢体发热、疼痛、麻木等症状减轻、皮温增加、皮肤色泽好转, 但此时新生血管尚未形成, 考虑可能是由于干细胞在细胞分化过程中分泌多种血管生成因子如血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子等对血管有扩张作用, 虽然这种作用是暂时的, 但仍为足部溃疡的愈合创造了条件^[41-43]。

研究表明: 干细胞移植早期阶段往往表现为血管扩张, 组织充血, 可收到明显的即时效果, 暂时达到了改善患肢血液供应的目的, 并非血管再生的功效, 本阶段持续2周左右。移植后期阶段组织反应逐渐减弱, 干细胞在移植局部提供内皮祖细胞和移植干细胞在局部释放多种细胞因子, 促进血管分化、再生及形成, 待毛细血管再生到一定程度即可达到改善患肢血液供应的目的, 使已经反弹的缺血症状逐渐改善可能是目前较为认可的机制^[44-47], 但干细胞移植的最佳时机、移植的部位、移植后干细胞在缺血组织内增殖分化潜能、新生血管的功能、再狭窄预防及自身影响干细胞存活和增殖等更多更复杂的机制有待于进一步研究^[48-50]。

总之, 应用脐带间充质干细胞移植治疗糖尿病下肢血管病变安全、有效、可行, 近期疗效显著, 但是还需要增加观察病例的数量及更远期随访观察, 随着对干细胞移植技术的不断摸索及完善, 干细胞移植治疗糖尿病下肢血管病变的治疗方法会更加规范化。

作者贡献: 实验设计为李晓玲、朱旅云, 实验实施为李晓玲, 实验评估为朱旅云、宋光耀, 资料收集为贾黎静、杨少玲、胡丽叶。李晓玲成文, 朱旅云教授及李晓玲副主任医师对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 由白求恩国际和平医院及北科公司合作成立的干细胞中心负责提取细胞, 符合国家干细胞移植要求, 试验方案获本院伦理委员会批准(伦理审批号: 20060708009)。

学术术语: Wharton's Jelly-华顿氏胶, 是脐带中包绕两条脐动脉和一条脐静脉的黏蛋白样结缔组织, 它在1656年首次被Thomas Wharton所描述, 故得名为Wharton's Jelly。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 马晓兰, 沈建国. 糖尿病合并外周动脉疾病的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(23): 5350-5354.
- [2] 谷涌泉, 张建, 赵峰, 等. 老年人糖尿病下肢动脉粥样硬化临床特点及相关因素的研究[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2007, 6(5): 325-328.
- [3] 谷涌泉, 张建, 汪忠镐, 等. 糖尿病性下肢缺血的外科治疗[J]. 中华糖尿病杂志, 2004, 12(5): 328-331.
- [4] 廖传军, 姜涛, 杨宝钟. 糖尿病对血管重建治疗慢性重症下肢缺血的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2011, 20(6): 575-578.
- [5] Gu YQ. Determination of amputation level in ischaemic lower limbs. ANZ J Surg. 2004; 74(1-2): 31-33.
- [6] Hang D, Wang Q, Guo C, et al. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with VEGF165 transgenic bone marrow mesenchymal stem cells in mongrel dogs. Cells Tissues Organs. 2012; 195(6): 495-506.
- [7] Putman DM, Liu KY, Broughton HC, et al. Umbilical cord blood-derived aldehyde dehydrogenase-expressing progenitor cells promote recovery from acute ischemic injury. Stem Cells. 2012; 30(10): 2248-2260.
- [8] Brenes RA, Jadowiec CC, Bear M, et al. Toward a mouse model of hind limb ischemia to test therapeutic angiogenesis. J Vasc Surg. 2012; 56(6): 1669-1679.
- [9] Smadja D, Silvestre JS, Lévy BI. Genic and cellular therapy for peripheral arterial diseases. Transfus Clin Biol. 2013; 20(2): 211-220.
- [10] Altaner C, Altanerova V, Cihova M, et al. Characterization of mesenchymal stem cells of "no-options" patients with critical limb ischemia treated by autologous bone marrow mononuclear cells. PLoS One. 2013; 8(9): e73722.
- [11] Mohammadzadeh L, Samedanifard SH, Keshavarzi A, et al. Therapeutic outcomes of transplanting autologous granulocyte colony-stimulating factor-mobilised peripheral mononuclear cells in diabetic patients with critical limb ischaemia. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2013; 121(1): 48-53.
- [12] Li Q, Yao D, Ma J, et al. Transplantation of MSCs in combination with netrin-1 improves neovascularization in a rat model of hind limb ischemia. J Surg Res. 2011; 166(1): 162-169.
- [13] Lu D, Chen B, Liang Z, et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. Diabetes Res Clin Pract. 2011; 92(1): 26-36.
- [14] Gabr H, Hedayet A, Imam U, et al. Limb salvage using intramuscular injection of unfractionated autologous bone marrow mononuclear cells in critical limb ischemia: a prospective pilot clinical trial. Exp Clin Transplant. 2011; 9(3): 197-202.

- [15] Wang H, Qiu X, Ni P, et al. Immunological characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells and the therapeutic effects of their transplantation on hyperglycemia in diabetic rats. *Int J Mol Med*. 2014;33(2):263-270.
- [16] Zhang HC, Liu XB, Huang S, et al. Microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells stimulated by hypoxia promote angiogenesis both in vitro and in vivo. *Stem Cells Dev*. 2012;21(18):3289-3297.
- [17] Duya P, Bian Y, Chu X, et al. Stem cells for reprogramming: could hUMSCs be a better choice. *Cytotechnology*. 2013;65(3):335-345.
- [18] Chen Y, Yu B, Xue G, et al. Effects of storage solutions on the viability of human umbilical cord mesenchymal stem cells for transplantation. *Cell Transplant*. 2013;22(6):1075-1086.
- [19] Cabrera C, Carriquiry G, Pierinelli C, et al. The role of biologically active peptides in tissue repair using umbilical cord mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1270:93-97.
- [20] 刘阁玲, 李伟娟, 俞芳, 等. 自体骨髓干细胞移植治疗糖尿病合并下肢缺血性疾病20例报告[J]. 军事医学科学院院刊, 2007, 31(2): 196-197.
- [21] 王爱红, 许樟荣. 干细胞移植——治疗糖尿病缺血性下肢血管病变的新手段[J]. 国外医学: 内分泌学分册, 2005, 25(6): 430-432.
- [22] 刘慧纯, 张培培, 王世民, 等. 脐带间充质干细胞移植治疗大鼠脑缺血损伤[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(19): 3471-3475.
- [23] 吴石白, 关小宏. 干细胞移植治疗糖尿病下肢动脉缺血性病变及糖尿病足的现状与未来[J]. 空军总医院学报, 2008, 24(4): 235-237.
- [24] 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.
- [25] Liew A, O'Brien T. Therapeutic potential for mesenchymal stem cell transplantation in critical limb ischemia. *Stem Cell Res Ther*. 2012;3(4):28.
- [26] Hart CA, Tsui J, Khanna A, et al. Stem cells of the lower limb: their role and potential in management of critical limb ischemia. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013;238(10):1118-1126.
- [27] 王广宇, 朱旅云, 马利成, 等. 干细胞移植治疗糖尿病足[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(1):173-180.
- [28] Setacci C, de Donato G, Teraa M, et al. Chapter IV: Treatment of critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011;42 Suppl 2:S43-59.
- [29] Napoli C, Williams-Ignarro S, de Nigris F, et al. Beneficial effects of concurrent autologous bone marrow cell therapy and metabolic intervention in ischemia-induced angiogenesis in the mouse hindlimb. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(47):17202-17206.
- [30] 樊明世, 杨晓凤, 吴雁翔, 等. 人脐带间充质干细胞移植改善糖尿病兔下肢缺血[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(1): 33-36.
- [31] 吴春朋, 张潜, 方宁, 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[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(1): 76-80.
- [32] 杨辉, 邓显, 施森, 等. 自体外周血干细胞移植联合血管腔内成形术治疗下肢缺血性疾病的疗效观察[J]. 实用医院临床杂志, 2012, 9(5): 96-98.
- [33] 谷涌泉, 郭连瑞, 张建. 自体干细胞移植治疗下肢缺血[J]. 临床外科杂志, 2006, 14(5): 318-320.
- [34] 谷涌泉, 齐立行, 郭连瑞, 等. 自体骨髓干细胞移植治疗严重下肢缺血5例[J]. 中国康复医学杂志, 2004, 19(9): 687-688.
- [35] 杨娥, 郑红梅, 边竞. 自体骨髓干细胞移植治疗糖尿病足的监护2例[J]. 中国实用护理杂志, 2005, 21(9): 18-19.
- [36] Li Q, Yao D, Ma J, et al. Transplantation of MSCs in combination with netrin-1 improves neoangiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. *J Surg Res*. 2011;166(1):162-169.
- [37] 孔霞, 郑飞, 郭凌郎, 等. VEGF通过细胞外信号调节激酶途径促进骨髓源间充质干细胞的增殖[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(5): 1292-1296.
- [38] 彭锦, 迟路湘. 细胞间直接接触对骨髓间充质干细胞分化为血管内皮细胞的作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(21): 2286-2289.
- [39] 付阿丹, 邓琳. 老年糖尿病周围血管病变患者外周血干细胞采集效果影响因素分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(7): 799-802.
- [40] 李晓玲, 朱旅云, 赵芳. 脐带Wharton's Jelly中间充质干细胞的生物学特性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(32):5979-5982.
- [41] 吴春朋, 张潜, 方宁, 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[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(1): 76-80.
- [42] Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004;22(7):1330-1337.
- [43] Setacci C, de Donato G, Teraa M, et al. Chapter IV: Treatment of critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011;42 Suppl 2:S43-59.
- [44] Madonna R, Pizzi SD, Tartaro A, et al. Transplantation of Mesenchymal Cells Improves Peripheral Limb Ischemia in Diabetic Rats. *Mol Biotechnol*. 2014. [Epub ahead of print]
- [45] Powell RJ, Comerota AJ, Berceci SA, et al. Interim analysis results from the RESTORE-CLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2011;54(4):1032-1041.
- [46] Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 2002;106(22):2781-2786.
- [47] 李鹏, 周长勇, 尹磊, 等. 低氧对人脐带间充质干细胞活性和内皮分化能力的影响及VEGF的干预作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(4):329-340.
- [48] 侯跃龙, 李彤, 张臣, 等. CoCl₂缺氧处理对脐带间充质干细胞促血管生长因子表达的影响[J]. 心脏杂志, 2011, 23(1): 59-64.
- [49] 王惠荃, 吕静雅, 胡雅楠, 等. VEGF通过调节黏着斑促进间充质干细胞的黏附及铺展[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(10): 967-975.
- [50] 陈明卫, 李燕萍, 唐益忠, 等. 不同来源和移植途径的自体干细胞治疗糖尿病缺血性下肢血管病变的随机对照研究[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(14): 6418-6423.