

脐带间充质干细胞促血管新生在治疗下肢缺血中的研究与应用

李晓玲¹, 朱旅云¹, 宋光耀²(¹解放军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 050000)

文章亮点:

1 此问题的已知信息: 间充质干细胞在一定诱导条件下可分化成为血管内皮细胞及平滑肌细胞, 参与新生毛细血管网的建立, 促进缺血下肢血管新生和有效循环的建立, 改善糖尿病远端缺血肢体供血。

2 文章增加的新信息: 通过分析 2000 至 2015 年 PubMed 数据库、维普中文科技数据库及万方数据相关文献, 证实脐带间充质干细胞可在特定的诱导条件下向血管内皮细胞分化, 并通过自分泌及旁分泌作用动员多种血管生长因子、趋化因子、神经营养因子等, 参与新生毛细血管的生成, 改善肢端微循环, 促进糖尿病下肢神经血管修复。

3 临床应用的意义: 采用干细胞移植治疗能够促使糖尿病足患者的新生血管形成, 改善下肢缺血, 与目前内科保守及外科介入治疗相辅相成, 具有广阔的应用前景。

关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 脐带间充质干细胞; 移植; 糖尿病血管病变; 糖尿病; 河北省自然科学基金

主题词:

脐带; 间质干细胞; 糖尿病

基金资助:

河北省自然科学基金(H2013505067)

摘要

背景: 干细胞在一定诱导条件下可分化成为血管内皮细胞, 促进缺血下肢血管新生和有效循环的建立, 改善糖尿病远端缺血肢体供血。

目的: 概述脐带间充质干细胞生物学特性、促血管新生的机制, 探讨脐带间充质干细胞修复神经病变及慢性创面等基础研究和临床研究现状。

方法: 检索 2000 至 2015 年 PubMed 数据库、维普中文科技数据库及万方数据相关文献。英文检索词为“stem cells transplantation, umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell, diabetic angiopathies”; 中文检索词为“干细胞移植, 脐带间充质干细胞, 糖尿病血管病变”。

结果与结论: 与目前外周血干细胞及骨髓间充质干细胞移植相比, 脐带间充质干细胞来源更广泛, 采集方便, 扩增能力强, 无免疫原性, 不存在伦理学争议, 成为促血管新生和基因治疗缺血性疾病的理想靶细胞和种子细胞。脐带间充质干细胞能够分化为血管内皮细胞和成纤维细胞参与创面愈合, 也可促进神经营养因子表达, 促进缺血组织神经再生, 并通过旁分泌与自分泌细胞因子、抗炎及免疫调节等参与受损组织的组织修复, 加快溃疡面愈合, 对于改善糖尿病下肢缺血、修复糖尿病周围神经病变和促进慢性溃疡创面愈合等治疗中具有广阔的应用前景。与单纯的干细胞移植比较, 脐带间充质干细胞联合细胞因子基因治疗可进一步提高干细胞存活率及促进血管新生。

李晓玲, 朱旅云, 宋光耀. 脐带间充质干细胞促血管新生在治疗下肢缺血中的研究与应用[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(36):5878-5885.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.36.025

Umbilical cord mesenchymal stem cells promote angiogenesis of ischemic lower limbs

Li Xiao-ling¹, Zhu Lv-yun¹, Song Guang-yao² (¹Department of Endocrinology, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China; ²Department of Endocrinology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Under certain conditions, stem cells can be induced to differentiate into vascular endothelial cells, which can promote the angiogenesis of ischemic lower limbs and the establishment of effective circulation and improve distal blood supply of the ischemic limbs.

OBJECTIVE: To review the biological characteristics and pro-angiogenesis mechanism of umbilical cord mesenchymal stem cells and to investigate the current status of umbilical cord mesenchymal stem cells in the repair of neuropathy and chronic wounds.

李晓玲, 女, 1975 年生, 河北省邯郸市人, 汉族, 2015 年河北医科大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事糖尿病及其血管并发症发生发展的科研及临床工作。

通讯作者: 朱旅云, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 解放军白求恩国际和平医院内分泌科, 河北省石家庄市 050082

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2015)36-05878-08

稿件接受: 2015-07-25

http://www.crter.org

Li Xiao-ling, M.D., Associate chief physician, Department of Endocrinology, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China

Corresponding author: Zhu Lv-yun, M.D., Chief physician, Master's supervisor, Department of Endocrinology, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China

Accepted: 2015-07-25

METHODS: PubMed, VIP and Wanfang databases were searched for relevant articles published from 2000 to 2015 using the keywords of "stem cells transplantation, umbilical cord mesenchymal stem cell, diabetic angiopathies" in English and Chinese, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with peripheral blood stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells, umbilical cord mesenchymal stem cells are characterized as more widespread sources, easy collection, stronger amplification ability, no immunogenicity, and no ethical controversy, which have become ideal target and seed cells for pro-angiogenesis and gene therapy in ischemic diseases. Umbilical cord mesenchymal stem cells can differentiate into vascular endothelial cells and fibroblasts involved in wound healing. In addition, these cells can promote the production and expression of neurotrophic factors, promote nerve regeneration in ischemic tissues, and participate in tissue repair and accelerate healing of ulcers by paracrine and autocrine cytokines, anti-inflammation and immunomodulation. Therefore, umbilical cord mesenchymal stem cells have a broad prospect in the improvement of diabetic lower limb ischemia, repair of diabetic peripheral neuropathy and promotion of chronic ulcer healing. Compared with stem cell transplantation alone, umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation combined with gene therapy can further enhance cell survival and pro-angiogenesis.

Subject headings: Umbilical Cord; Mesenchymal Stem Cells; Diabetes Mellitus

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

Li XL, Zhu LY, Song GY. Umbilical cord mesenchymal stem cells promote angiogenesis of ischemic lower limbs. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(36):5878-5885.

0 引言 Introduction

随着社会进步和人口老龄化加剧, 糖尿病的发病率正逐年快速增长, 根据2013年国际糖尿病联盟(IDF)公布的数据, 全球糖尿病患者数量已达3.82亿, 中国糖尿病的患病率为11.6%, 总患病人数超过1.14亿, 约占世界三分之一, 已成为世界糖尿病第一大国, 估计到2035年全球将有近5.92亿人患糖尿病。糖尿病下肢血管闭塞导致溃疡坏死是糖尿病足主要病因, 也是糖尿病最严重及非创伤性截肢的主要原因^[1-4]。每年的截肢患者中50%-60%是糖尿病患者, 且截肢后的总死亡率为25%-50%, 围手术期的死亡率为10%-20%^[5-7], 糖尿病足病变特点往往为多节段弥漫性, 多累及小腿动脉及足背动脉, 缺乏远端动脉流出道, 临床传统治疗方法主要包括内科药物治疗(抗凝、抗血小板聚集、抗氧化应激等)和外科的血流重建(血管旁路移植术、血管搭桥术、血管介入及超声消融术等)^[8-9], 然而对于因动脉闭塞性病变导致的足部缺血, 近50%的患者不适合介入或外科血管重建, 且此类患者多年老体弱, 常伴有多种心脑血管病变, 多数无法承受手术搭桥等刺激^[10], 故以上传统治疗显然存在一定局限性^[11], 不能从根本上解决问题, 难以取得令人满意的疗效, 最终的结局是溃疡、截肢甚至死亡“三部曲”^[12-13], 这部分患者也被称为“无治疗选择”的患者, 因此临床迫切希望探索新的治疗手段重建血运改善缺血^[14], 近年来研究显示干细胞移植为下肢缺血性疾病治疗带来了希望^[15-20]。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者检索2000至2015年PubMed数据库、维普中文科技数据库及万方数据。英文检索词为“stem cells transplantation; umbilical cord mesenchymal stem cell; diabetic angiopathies”; 中文检索词为“干细胞移植, 脐带间充质干细胞, 糖尿病血

管病变”。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准: ①文章所述内容需与下肢血管病变的发病相关。②外周血干细胞移植、间充质干细胞移植治疗糖尿病下肢缺血的基础研究及临床应用。③细胞因子基因治疗联合干细胞移植研究。

排除标准: 重复性研究。

1.3 数据提取及质量评价 检索文献量总计150篇, 其中中文文献60篇, 英文文献90篇, 经阅读文题筛选排除与本文目的关系不密切的文献40篇, 经阅读摘要筛选排除20篇, 最终纳入90篇符合标准的文献进行归纳分析。

2 结果 Results

2.1 脐带间充质干细胞来源及生物学特性 干细胞是一类早期未分化的具有自我复制更新和多向分化潜能的细胞, 根据细胞来源, 干细胞可分成胚胎干细胞和成体干细胞, 目前由于各国对胚胎干细胞道德伦理的争论, 限制了胚胎干细胞的基础和临床应用, 因此成体干细胞成为研究方向。间充质干细胞是具有多向分化潜能的成体干细胞, 可以从骨髓、脂肪、羊水、胎盘、脐血以及脐带中分离出来, 以骨髓含量最丰富, 而长期的临床应用发现, 骨髓中间充质干细胞含量易受年龄因素影响, 对供者也有一定的创伤性, 且糖尿病患者自体骨髓微环境不利于间充质干细胞转化, 加之骨髓间充质干细胞分离纯化的难度大、病毒感染率高。相比之下, 由脐带华尔通氏胶(Wharton's Jelly)分离得到的脐带间充质干细胞具有无可比拟的优势^[21-22]: 首先, 脐带作为分娩废弃物, 其来源更广泛, 成本较低, 取材方便, 培养成功率较高, 增殖能力强, 不受任何伦理道德的限制, 且病毒感染概率低; 其次, 不会引起畸胎瘤, 且具有抑癌性。另外, 脐带间充质干细胞还具有低免疫原性、免疫调节、基质支持、旁分泌、归巢迁移和基因稳定性, 可能成为骨髓间充质干细胞的理想替代物, 并具有更大的应用潜能,

越来越成为国内外学者关注的焦点。

目前最常用组织块贴壁培养分离获得脐带间充质干细胞, 同时发现高密度接种、低浓度血清、细胞因子联合培养等均有利于脐带间充质干细胞的分化^[23-24], 根据国际细胞疗法间充质与组织干细胞委员会制定的最低标准, 间充质干细胞需符合以下条件: ①在标准培养条件下细胞呈贴壁生长。②表达干细胞抗原CD105、CD73和CD90, 不表达内皮细胞、成纤维细胞、造血干细胞、血细胞抗原如CD45、CD14、CD34或CD11b、CD79a或CD19和HLA-DR。③在体外给予适当的刺激因子, 能向成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞等方向分化。脐带间充质干细胞呈贴壁生长, 随着细胞传代次数增加, 细胞形态、排序趋于一致, 表达干细胞抗原CD73、CD90、CD105、CD166、CD10、CD13、CD29、CD44及HLA-ABC, 不表达CD34、CD45、CD31等造血干细胞标记或CD33、CD14、CD56及HLA-DR、-DA、-2DP、-DQ, 同时脐带间充质干细胞具有高度增殖能力, 易纯化, 均一性好, 多次传代扩增后仍具有间充质干细胞特性, 无免疫排斥的特性。在特定培养环境下能分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、内皮细胞、肝细胞、神经元细胞等^[25-27]。另外, 对脐带间充质干细胞免疫学特性研究发现, 脐带间充质干细胞在宿主体内可诱导免疫耐受, 其具有低免疫原性和较低的抗原递呈能力, 推测输注到异基因宿主体内的间充质干细胞可逃避宿主免疫系统的监视, 而在宿主体内长期存活。

2.2 脐带间充质干细胞促血管新生的基础研究 如何促进缺血下肢血管新生和有效循环的建立是治疗糖尿病下肢动脉闭塞的关键, 血管新生包括: ①血管生成: 指源于毛细血管后微静脉, 以“出芽”方式新生毛细血管。在成体, 主要由组织缺氧诱导因子1 α 表达并活化包括血管内皮生长因子、血管内皮生长因子受体1和血管生成素2等诸多基因的转录而来。②动脉生成: 指血管造影可以鉴别的足够管径的侧支循环的成熟或新生。它通常发生在局部缺血组织之外, 与动脉狭窄局部剪切应力变化导致的血液中单个核细胞的聚集有关。目前对其认识尚不深刻, 似乎与一系列生长因子包括血小板源性生长因子、血管内皮生长因子、肝细胞生长因子、趋化因子的释放有关。③血管形成: 通过内皮祖细胞直接参与血管新生, 并主要通过分泌生长因子如血管内皮生长因子、白细胞介素8和基质金属蛋白酶发挥作用产生新的血管^[28]。

研究表明, 在老龄、糖尿病、内皮细胞凋亡和微血管堵塞及动脉粥样硬化等病理状态下, 血管内皮祖细胞的数量下降, 其增殖、黏附和血管生成功能障碍, 对基质细胞衍生因子1反应性降低, 血管内皮祖细胞特异分子如血管内皮生长因子受体1、CD133和钙黏蛋白的

mRNA水平明显低于健康对照^[29], 这说明糖尿病患者自发的血管新生潜能低下, 限制再血管化; “治疗性血管新生”以固有的血管为基础, 补充血管内皮祖细胞和血管内皮生长因子等, 通过血管新生建立丰富的侧支循环, 成为治疗糖尿病足等血管闭塞性疾病的最佳治疗策略之一。

干细胞移植治疗性血管生成作用成为目前国内外研究热点, 间充质干细胞具有高度增殖、多向分化潜能、可塑性强、扩增迅速、受缺血组织趋化, 可在缺氧条件下向内皮细胞、血管平滑肌细胞、许旺细胞分化等优点, 并通过自分泌及旁分泌机制分泌细胞因子如血管内皮生长因子、基质细胞衍生因子1、单核细胞趋化蛋白、神经营养因子等, 促进血管新生, 恢复局部组织血流^[30-31]。

目前, 间充质干细胞促进血管新生的机制仍不明确, 多数研究认为间充质干细胞的分化与它所处的微环境密切相关, 在损伤或缺血条件下, 可能是病变组织微环境中含有多不同因子促进间充质干细胞向其环境需要的细胞或组织方向分化, 推断可能与以下机制有关: ①间充质干细胞移植后一方面整合于受损的血管中, 参加缺血组织的血管形成, 为新生血管提供内皮细胞^[32-33]。②间充质干细胞通过旁分泌产生多种细胞因子和生长因子, 如血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、肝细胞生长因子、缺氧诱导因子1 α 、白细胞介素8、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 等诱导微血管的生成, 刺激周围成熟内皮细胞增殖和迁移, 改善缺血组织微环境来参与血管新生, 为脐带间充质干细胞移植治疗下肢缺血提供了基础^[34-37]。研究表明, 脐带间充质干细胞提取分离后, 表达间充质干细胞特异性标志物, 并分化成脂肪细胞和成骨细胞。在高糖、缺氧等条件诱导下, 脐带间充质干细胞和血管内皮生长因子共同在体外进行培养, 脐带间充质干细胞表达CD31、vWF和VE-钙黏蛋白、血管内皮生长因子受体1和血管内皮生长因子受体2等特征性内皮细胞基因, 促进血管新生相关蛋白表达, 免疫荧光显示CD31、CD34染色阳性, 血管生成测定和低密度脂蛋白摄取实验表明: 脐带间充质干细胞向血管内皮细胞分化, 形成具有内皮细胞功能的血管样结构, 具有摄取低密度脂蛋白的内皮功能^[38-39]。流式细胞仪鉴定细胞的分化效率可达50%-60%, 新生血管检测发现血管长度、直径和面积也比较正常^[40]。对下肢缺血动物模型进行脐带间充质干细胞移植治疗, 观察发现毛细血管密度及新生血管增加, 肢体缺血状态明显改善, 表明脐带间充质干细胞能够在体内缺血环境下分化为内皮细胞, 诱导内源性血管内皮生长因子表达, 局部微血管增生, 抑制细胞凋亡, 参与血管新生, 改善下肢缺血^[41-42]。将脐带间充质干细胞移植到受损的小鼠股动脉, 可修复损伤血管内皮细胞, 保持其完整性, 并抑制内膜增生等而发挥积极作用^[43], 在临床相继有报道脐带间充质干细

胞通过静脉输注或局部肌肉注射治疗糖尿病足, 显示平均60%的缺血肢体血供得到改善, 踝肱比值增加, 造影显示有明显侧支循环产生, 截肢率有所降低, 大部分溃疡愈合, 且未出现任何相关严重并发症, 有较好的临床安全性和有效性^[44-46]。

2.3 细胞因子与脐带间充质干细胞基因治疗下肢缺血的研究

研究表明, 脐带间充质干细胞具备多向分化潜能、促血管生成因子的能力, 但实际治疗应用中的疗效存在差异, 研究推断可能与植入细胞数量、类型、细胞存活效率以及病变区域的微环境有关^[47], 如缺血缺氧的高糖等微环境可使移植的脐带间充质干细胞大量快速死亡, 从而限制了脐带间充质干细胞移植后治疗潜能的发挥^[48-49]。

随着基因转染等新技术开展, 转基因治疗成为目前治疗性血管生成主要方式之一, 脐带间充质干细胞不仅具有多向分化自我更新潜能, 还易于外源基因的高效转染和表达, 且基因表达具有明显的组织特异性, 因此脐带间充质干细胞有可能成为一种新型的基因治疗载体。通过转基因的方法, 可以将利于定向分化的血管生成因子基因携带到脐带间充质干细胞, 通过不同方式输送到受累血管周围, 修复受损血管内膜, 促进新生血管生成, 从而建立侧支循环, 改善组织供血^[50]。

治疗性血管生成是将多种促血管生成因子和(或)成血管细胞导入体内, 在特定环境下诱导缺血区侧支血管生成, 间充质干细胞在新生血管形成的过程中许多细胞因子均起到关键作用^[51], 其中血管内皮生长因子是血管形成中最核心的因素之一, 血管内皮生长因子通过两个高亲和力的络氨酸激酶受体相结合, 激活一氧化氮合成酶反应, 提高内皮细胞的定植存活率, 促进内皮细胞的迁移分化、成血管样结构形成, 增加微血管通透性, 是诱导血管再生的早期重要步骤, 在调节生理和病理性血管新生, 维持血管系统的内稳态发挥重要作用^[52-53]。血管内皮生长因子家族中血管内皮生长因子165活性最强, 众多的细胞因子是在不同的阶段以不同的浓度和不同的组合发挥着精确的调控作用, 缺氧诱导因子1 α 是与血管内皮生长因子表达密切相关的细胞因子, 缺氧后可使血管内皮生长因子表达增加^[36]; 缺氧诱导因子1可与血管内皮生长因子相互协同, 刺激血管新生和侧支血管的形成。

将血管内皮生长因子基因裸质粒DNA直接注入缺血动物肌肉内, 可达到短时间表达并改善缺血部位血流灌注及缓解临床症状的效果。但由于血管内皮生长因子的提取及纯化困难, 半衰期短, 并迅速降解成为无活性的片段, 一次用药难以维持较高的有效药物浓度^[54]。联合细胞因子与干细胞移植治疗, 有可能通过血管内皮生长因子的抗炎、抗氧化应激、抗凋亡、促进血管生成等作用改善缺血后微环境, 有效地发挥血管内皮生长因子

和脐带间充质干细胞的血管再生功效^[55], 从而为提高脐带间充质干细胞移植后的定位归巢和存活率提供实验基础。

脐带间充质干细胞具有能自动归巢于损伤及炎症区域的能力。归巢是一个多步骤协调的过程, 许多细胞因子、化学因子、黏附因子和细胞外基质降解蛋白酶参与其中: ①组织损伤后局部可表达不同的趋化因子: 如CXC趋化因子受体4(CXCL4)、CXCL12、CXCL6等, 这些趋化因子是间充质干细胞归巢所必需的, 而且局部微环境是其归巢的始动因素。②旁分泌作用: 脐带间充质干细胞分泌各种促血管新生的细胞因子^[56-57]。此外组织发生缺血缺氧时在白细胞介素1、白细胞介素7等炎症因子趋化作用下向血管损伤部位移行, 促进脐带间充质干细胞的迁移和归巢到损伤部位, 发生增殖分化, 修复损伤的血管内皮或形成新生血管^[58-60]。有研究表明Toll样受体3(TLR3)活化可抑制细胞增殖, 并诱导促炎症细胞因子产生, 可能是脐带间充质干细胞归巢至新生血管部位的关键调节剂^[61]。③黏附分子的作用: 间充质干细胞表达的黏附分子为血管细胞黏附因子1、迟发抗原4和可溶性P选择素^[62]。④基质金属蛋白酶: 血管的再生和延伸需要基质金属蛋白酶分解细胞外基质, 利于内皮细胞的迁移。间充质干细胞可分泌多种蛋白酶, 调节和降解细胞外基质, 从而利于其归巢^[63-66]。体外培养发现基质金属蛋白酶2、膜型基质金属蛋白酶1与脐带间充质干细胞向内皮迁移归巢的能力显著相关^[67-68]。⑤其他: 脐带间充质干细胞的归巢机制受多种因素影响, 如损伤组织部位、移植数量、移植途径和时机等。

研究发现通过基因转染间充质干细胞, 可以促使间充质干细胞高效归巢。在血管内皮生长因子基因转染间充质干细胞移植治疗中, 血管内皮生长因子通过激活内皮细胞内的一氧化氮酶, 增加血管通透性, 促进间充质干细胞归巢移动到受损靶组织。此外其他还包括用CXC趋化因子受体4、缺氧诱导因子1 α 、碱性成纤维细胞生长因子等基因转染间充质干细胞, 可以提高细胞向缺血靶组织和器官归巢迁移的数量, 达到改善移植治疗缺血性疾病的疗效^[69-71]。目前脐带间充质干细胞作为新型基因治疗靶细胞越来越受到关注。

腺病毒载体因其颗粒比较稳定、在宿主细胞内可获得大量表达、不会整合至宿主染色体、安全性高、可以纯化和浓缩、可感染非分裂细胞、转染效率极高, 避免了突变危险等特点, 成为研究应用最多的载体。绿色荧光蛋白标记技术是一种新型细胞标记技术, 可以实现目的基因在活细胞的示踪定位, 标记细胞可以通过荧光显微镜直接观察, 而不需要反应底物, 无需复杂的免疫组织化学分析, 且不影响被标记细胞的多向分化潜能^[72-73]。研究发现携带VEGF-EGFP重组基因的腺病毒转染脐带间充质干细胞后, 脐带间充质干细胞

可以分泌较高水平血管内皮生长因子。在48 h后, 免疫荧光可检测出有血管内皮生长因子的表达。转染24 h通过ELISA可在细胞培养上清中检测到血管内皮生长因子目的蛋白的分泌, 4-7 d达到分泌高峰, 此后逐渐下降, 但仍保持在较高分泌水平^[74-75]。制备大鼠急性后肢缺血模型, 将大鼠骨髓间充质干细胞经表皮生长因子转染或预处理后分点注射入模型大鼠后肢缺血肌肉中, 移植后4周表皮生长因子转染间充质干细胞移植组大鼠缺血后肢毛细血管密度均较单纯间充质干细胞移植明显丰富, 发挥细胞因子与干细胞联合的治疗性血管形成作用, 促进血管新生^[76-77]。

2.4 脐带间充质干细胞修复神经及慢性创面的研究 干细胞移植治疗既可促进血管新生, 也可促进神经营养因子表达, 促进缺血组织神经再生, 进而治疗糖尿病周围神经病变^[78]。研究发现, 将大鼠间充质干细胞移植到糖尿病大鼠下肢骨骼肌内, 4周后, 注射移植肌肉组织血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的表达显著升高; 糖尿病大鼠神经传导速度、毛细血管密度等均得到明显改善。脐带间充质干细胞可在体外诱导分化为许旺细胞参与外周神经修复, 可积极治疗和改善糖尿病神经病变^[79-80]。

研究显示, 缺乏血管生成是糖尿病慢性难治性创面主要病因, 脐带间充质干细胞能够分化为血管内皮细胞和成纤维细胞参与创面愈合, 并通过旁分泌与自分泌细胞因子、抗炎及免疫调节等参与受损组织的组织修复, 加快溃疡面愈合^[81-85]。通过制备足溃疡模型, 采取不同途径(如创缘肉膜层多点注射、尾静脉注射、小腿肌肉移植组等)移植脐带间充质干细胞, 结果显示无论通过何种移植方式脐带间充质干细胞能通过自分泌及旁分泌等参与神经血管转化与组织修复, 促进糖尿病大鼠足溃疡的愈合^[86-87], 且小腿肌肉内的移植方式体现出更好的持续性及高表达的血管内皮生长因子, 诱导血管生成, 考虑可能由于糖尿病足创面存在大量的炎性递质及细胞毒物, 在这种微循环下脐带间充质干细胞直接移植于创面很难存活定位、发挥再生和旁分泌能力, 故小腿肌肉内的移植方式疗效更优。此外提示脐带间充质干细胞还具有向表皮干细胞及皮肤附属器部分结构分化演变, 如汗腺、皮脂腺、上皮细胞、间质细胞等, 参与糖尿病大鼠创面的修复愈合^[88]。

3 存在问题及展望 Existing problems and prospects

研究表明, 间充质干细胞可在特定的诱导条件下向血管内皮细胞分化, 并通过自分泌及旁分泌作用动员多种血管生长因子、趋化因子、神经营养因子等, 参与新生毛细血管的生成, 改善肢端微循环, 促进糖尿病下肢神经血管修复, 对于改善糖尿病下肢缺血、修复糖尿病

周围神经病变和促进慢性溃疡创面愈合等具有广阔的应用前景。

脐带间充质干细胞移植作为一项生物医学领域新技术, 还不可避免面临许多问题: ①如何建立严格规范统一的脐带间充质干细胞质检标准, 确定脐带间充质干细胞的培养及鉴定的标准, 更为客观的评价脐带间充质干细胞分化潜能与不同细胞亚群的关系。②如何评估脐带间充质干细胞移植时所需的数量、时机及有效成分从而达到最佳的治疗效果。③脐带间充质干细胞归巢机制及在体内增殖及分化的条件尚未完全阐明。④如何观察和评价脐带间充质干细胞治疗的潜在致癌性、多向分化潜能。⑤脐带间充质干细胞免疫抑制的不可调控性等^[89]。随着研究的深入, 相信以上这些问题会逐渐得到解决^[90]。

虽然脐带间充质干细胞目前研究所面临的基础理论、实验技术、行业法规, 法律伦理等问题, 使其在真正走向临床应用的道路还很艰难, 但新技术和新方法的出现将为这方面的研究注入新的活力, 并且随着不断发展和完善干细胞监管体系, 会更好地促进干细胞研究临床转化和干细胞产业健康规范地向前发展, 值得期待。

作者贡献: 作者独立进行实验设计、实施及评估。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 未涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 治疗性血管新生的意义? 将多种促血管生成和(或)成血管细胞导入患者体内, 诱导缺血区侧支血管生成, 以改善血供, 达到治疗缺血性疾病的目的。与传统的扩血管药物、血管搭桥和介入手术等维持原有血管通畅措施不同, 治疗性血管新生是以患者固有的血管为基础, 通过血管新生建立丰富的侧支循环, 是糖尿病足等血管闭塞性疾病的最佳治疗策略之一。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

4 参考文献 References

- [1] Wang A, Xu Z, Mu Y, et al. Clinical characteristics and medical costs in patients with diabetic amputation and nondiabetic patients with nonacute amputation in central urban hospitals in China. *Int J Low Extrem Wounds*. 2014; 13(1):17-21.
- [2] Bruun C, Siersma V, Guassora AD, et al. Amputations and foot ulcers in patients newly diagnosed with type 2 diabetes mellitus and observed for 19 years. The role of age, gender and co-morbidity. *Diabet Med*. 2013;30(8):964-972.
- [3] Leone S, Pascale R, Vitale M, et al. Epidemiology of diabetic foot. *Infez Med*. 2012;20 Suppl 1:8-13.

- [4] Becker F, Robert-Ebadi H, Ricco JB, et al. Chapter I: Definitions, epidemiology, clinical presentation and prognosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011;42 Suppl 2:S4-12.
- [5] Holman N, Young RJ, Jeffcoate WJ. Variation in the recorded incidence of amputation of the lower limb in England. *Diabetologia.* 2012;55(7):1919-1925.
- [6] Witsø E, Lium A, Langeng E, et al. Diabetic foot team and incidence of amputations. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2011; 131(8):804-805.
- [7] Vamos EP, Bottle A, Edmonds ME, et al. Changes in the incidence of lower extremity amputations in individuals with and without diabetes in England between 2004 and 2008. *Diabetes Care.* 2010;33(12):2592-2597.
- [8] Lobo R, Kiernan TJ, Jaff MR. Medical therapy for critical limb ischemia and the diabetic foot: an update. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2013;54(6):671-678.
- [9] Dinh T, Tecilazich F, Kafanas A, et al. Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration. *Diabetes.* 2012;61(11):2937-2947.
- [10] McEwen LN, Ylitalo KR, Herman WH, et al. Prevalence and risk factors for diabetes-related foot complications in Translating Research Into Action for Diabetes (TRIAD). *J Diabetes Complications.* 2013;27(6):588-592.
- [11] Schaper NC, Apelqvist J, Bakker K. Reducing lower leg amputations in diabetes: a challenge for patients, healthcare providers and the healthcare system. *Diabetologia.* 2012; 55(7):1869-1872.
- [12] Jørgensen ME, Almdal TP, Faerch K. Reduced incidence of lower-extremity amputations in a Danish diabetes population from 2000 to 2011. *Diabet Med.* 2014;31(4):443-447.
- [13] Malone M, White JM, Taylor L, et al. Update on the inaugural Sydney Diabetic Foot Conference 2013. *Int J Low Extrem Wounds.* 2013;12(3):242-244.
- [14] Ramachandran A, Lakshmi S, Arun N, et al. Role of industries in the care of diabetic foot. *Int J Low Extrem Wounds.* 2010; 9(3):116-121.
- [15] Dash SN, Dash NR, Guru B, et al. Towards reaching the target: clinical application of mesenchymal stem cells for diabetic foot ulcers. *Rejuvenation Res.* 2014;17(1):40-53.
- [16] 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.
- [17] Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(1): 44-50.
- [18] Keats EC, Khan ZA. Vascular stem cells in diabetic complications: evidence for a role in the pathogenesis and the therapeutic promise. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:37.
- [19] Mulder GD, Lee DK, Jeppesen NS. Comprehensive review of the clinical application of autologous mesenchymal stem cells in the treatment of chronic wounds and diabetic bone healing. *Int Wound J.* 2012c;9(6):595-600.
- [20] 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.
- [21] Watson N, Divers R, Kedar R, et al. Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: a viable source for mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2015;17(1):18-24.
- [22] 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.
- [23] De Bruyn C, Najjar M, Raicevic G, et al. A rapid, simple, and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment. *Stem Cells Dev.* 2011;20(3):547-557.
- [24] Ben Azouna N, Jenhani F, Regaya Z, et al. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. *Stem Cell Res Ther.* 2012;3(1):6.
- [25] Phillips JE, Petrie TA, Creighton FP, et al. Human mesenchymal stem cell differentiation on self-assembled monolayers presenting different surface chemistries. *Acta Biomater.* 2010;6(1):12-20.
- [26] Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev.* 2013;9(1): 32-43.
- [27] Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, et al. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20(5):655-667.
- [28] Mauro A, Buscemi M, Gerbino A. Immunohistochemical and transcriptional expression of matrix metalloproteinases in full-term human umbilical cord and human umbilical vein endothelial cells. *J Mol Histol.* 2010;41(6):367-377.
- [29] Neef K, Choi YH, Weichel A, et al. The influence of cardiovascular risk factors on bone marrow mesenchymal stromal cell fitness. *Cytotherapy.* 2012;14(6):670-678.
- [30] Bernardi S, Severini GM, Zauli G, et al. Cell-based therapies for diabetic complications. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012: 872504.
- [31] Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, et al. Concise review: Mesenchymal stem cell treatment of the complications of diabetes mellitus. *Stem Cells.* 2011;29(1):5-10.
- [32] Shen WC, Liang CJ, Wu VC, et al. Endothelial progenitor cells derived from Wharton's jelly of the umbilical cord reduces ischemia-induced hind limb injury in diabetic mice by inducing HIF-1 α /IL-8 expression. *Stem Cells Dev.* 2013;22(9): 1408-1418.
- [33] Whiteley J, Bielecki R, Li M, et al. An expanded population of CD34+ cells from frozen banked umbilical cord blood demonstrate tissue repair mechanisms of mesenchymal stromal cells and circulating angiogenic cells in an ischemic hind limb model. *Stem Cell Rev.* 2014;10(3):338-350.
- [34] Chen DY, Wei HJ, Lin KJ, et al. Three-dimensional cell aggregates composed of HUVECs and cbMSCs for therapeutic neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Biomaterials.* 2013;34(8):1995-2004.
- [35] Kwon YW, Heo SC, Jeong GO, et al. Tumor necrosis factor- α -activated mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell homing and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):2136-2144.
- [36] Huang CC, Chen DY, Wei HJ, et al. Hypoxia-induced therapeutic neovascularization in a mouse model of an ischemic limb using cell aggregates composed of HUVECs and cbMSCs. *Biomaterials.* 2013;34(37):9441-9450.

- [37] Wan J, Cai Q, Liu Y. Effect of intramuscular bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in the leg for treatment of diabetic foot ulcers in rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2012;32(12):1730-1736.
- [38] Doan CC, Le TL, Hoang NS, et al. Differentiation of umbilical cord lining membrane-derived mesenchymal stem cells into endothelial-like cells. *Iran Biomed J*. 2014;18(2):67-75.
- [39] 郝晓娟,朱旅云. 缺氧预处理脐带间充质干细胞诱导分化为内皮样细胞[J].中国组织工程研究,2013,17(45):7869-7876.
- [40] Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*. 2006;108(12):3938-3944.
- [41] Li XY, Zheng ZH, Li XY, et al. Treatment of foot disease in patients with type 2 diabetes mellitus using human umbilical cord blood mesenchymal stem cells: response and correction of immunological anomalies *Curr Pharm Des*. 2013;19(27):4893-4899.
- [42] 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.
- [43] Afzal S, Lalani EN, Poulsom R, et al. MT1-MMP and MMP-2 mRNA expression in human ovarian tumors: possible implications for the role of desmoplastic fibroblasts. *Hum Pathol*. 1998;29(2):155-165.
- [44] 李晓玲,朱旅云,宋光耀,等.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.
- [45] 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.
- [46] 李晓玲,朱旅云,宋光耀,等.脐带间充质干细胞移植对1型糖尿病大鼠模型血糖及肾脏病变的影响研究[J].解放军医药杂志,2013,25(7):31-34.
- [47] Mathew SA, Rajendran S, Gupta PK, et al. Modulation of physical environment makes placental mesenchymal stromal cells suitable for therapy. *Cell Biol Int*. 2013;37(11):1197-1204.
- [48] He MC, Li J, Zhao CH. Effect of hypoxia on mesenchymal stem cells - review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2007;15(2):433-436.
- [49] Descheppe M, Manassero M, Oudina K, et al. Proangiogenic and pro-survival functions of glucose in human mesenchymal stem cells upon transplantation. *Stem Cells*. 2013;31(3):526-535.
- [50] Ikeda Y, Fukuda N, Wada M, et al. Development of angiogenic cell and gene therapy by transplantation of umbilical cord blood with vascular endothelial growth factor gene. *Hypertens Res*. 2004;27(2):119-128.
- [51] Kwon YW, Heo SC, Jeong GO, et al. Tumor necrosis factor- α -activated mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell homing and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(12):2136-2144.
- [52] Mikroulis D, Papanas N, Maltezos E, et al. Angiogenic growth factors in the treatment of peripheral arterial disease. *Curr Vasc Pharmacol*. 2007;5(3):195-209.
- [53] Ripa RS, Wang Y, Jørgensen E, et al. Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor-A165 plasmid followed by granulocyte-colony stimulating factor to induce angiogenesis in patients with severe chronic ischaemic heart disease. *Eur Heart J*. 2006;27(15):1785-1792.
- [54] Kobulnik J, Kuliszewski MA, Stewart DJ, et al. Comparison of gene delivery techniques for therapeutic angiogenesis ultrasound-mediated destruction of carrier microbubbles versus direct intramuscular injection. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(18):1735-1742.
- [55] Ishii M, Shibata R, Numaguchi Y, et al. Enhanced angiogenesis by transplantation of mesenchymal stem cell sheet created by a novel magnetic tissue engineering method. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(10):2210-2215.
- [56] Thibeault S, Rautureau Y, Oubaha M, et al. S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Mol Cell*. 2010;39(3):468-476.
- [57] Ponte AL, Marais E, Gallay N, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells*. 2007;25(7):1737-1745.
- [58] Lönne M, Lavrentieva A, Walter JG, et al. Analysis of oxygen-dependent cytokine expression in human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord. *Cell Tissue Res*. 2013;353(1):117-122.
- [59] Chen J, Liu Z, Hong MM, et al. Proangiogenic compositions of microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2014;9(12):e115316.
- [60] Han YF, Sun TJ, Han YQ, et al. Preparation of microencapsulated VEGF gene-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells and in vitro culture. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(2):217-223.
- [61] Grelier A, Cras A, Balitrand N, et al. Toll-like receptor 3 regulates cord blood-derived endothelial cell function in vitro and in vivo. *Angiogenesis*. 2013;16(4):821-836.
- [62] Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*. 2006;108(12):3938-3944.
- [63] Schneider RK, Anraths J, Kramann R, et al. The role of biomaterials in the direction of mesenchymal stem cell properties and extracellular matrix remodelling in dermal tissue engineering. *Biomaterials*. 2010;31(31):7948-7959.
- [64] Karow M, Popp T, Egea V, et al. Wnt signalling in mouse mesenchymal stem cells: impact on proliferation, invasion and MMP expression. *J Cell Mol Med*. 2009;13(8B):2506-2520.
- [65] Bertram H, Boeuf S, Wachters J, et al. Matrix metalloprotease inhibitors suppress initiation and progression of chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. *Stem Cells Dev*. 2009;18(6):881-892.
- [66] Kachgal S, Putnam AJ. Mesenchymal stem cells from adipose and bone marrow promote angiogenesis via distinct cytokine and protease expression mechanisms. *Angiogenesis*. 2011;14(1):47-59.
- [67] Ries C, Egea V, Karow M, et al. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*. 2007;109(9):4055-4063.
- [68] Mannello F, Tonti GA, Bagnara GP, et al. Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(3):475-481.
- [69] HoWangYin KY, Loinard C, Bakker W, et al. HIF-prolyl hydroxylase 2 inhibition enhances the efficiency of mesenchymal stem cell-based therapies for the treatment of critical limb ischemia. *Stem Cells*. 2014;32(1):231-243.
- [70] Nakamura Y, Ishikawa H, Kawai K, et al. Enhanced wound healing by topical administration of mesenchymal stem cells transfected with stromal cell-derived factor-1. *Biomaterials*. 2013;34(37):9393-9400.

- [71] Yang D, Sun S, Wang Z, et al. Stromal cell-derived factor-1 receptor CXCR4-overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells accelerate wound healing by migrating into skin injury areas. *Cell Reprogram*. 2013;15(3):206-215.
- [72] Wang GX, Hu L, Zhang Z, et al. Construction of an adenoviral expression vector carrying FLAG and hrGFP-1 genes and its expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Genet Mol Res*. 2014;13(1):1070-1078.
- [73] Zhang G, Lan X, Yen TC, et al. Therapeutic gene expression in transduced mesenchymal stem cells can be monitored using a reporter gene. *Nucl Med Biol*. 2012;39(8):1243-1250.
- [74] Liang W, Cai Q, Liu Y. Transfection of human vascular endothelial growth factor 165 gene into rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2011;25(11):1383-1388.
- [75] 李晓玲,朱旅云,宋光耀,等.腺病毒介导血管内皮生长因子转染脐带间充质干细胞的实验研究[J].解放军医药杂志,2014, 26(5): 5-9.
- [76] Amin AH, Abd Elmageed ZY, Nair D, et al. Modified multipotent stromal cells with epidermal growth factor restore vasculogenesis and blood flow in ischemic hind-limb of type II diabetic mice. *Lab Invest*. 2010;90(7):985-996.
- [77] 李玉玲,李红,胡明均,等.腺病毒装载人vegf-165基因转染的间充质干细胞对下肢缺血性坏死大鼠模型促血管新生的作用[J].中国实验血液学杂志, 2010,18(6):1568-1573.
- [78] Hsieh JY, Wang HW, Chang SJ, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. *PLoS One*. 2013;8(8):e72604.
- [79] Kang EJ, Lee YH, Kim MJ, et al. Transplantation of porcine umbilical cord matrix mesenchymal stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;7(3):169-182.
- [80] Zhou N, Wang QP, Jin XF, et al. Effect of human umbilical mesenchymal stromal cells implantation on the BDNF expression in diabetic foot rats. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2013;44(6):931-934.
- [81] Zhao QS, Xia N, Zhao N, et al. Localization of human mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and their role in repair of diabetic foot ulcers in rats. *Int J Biol Sci*. 2013; 10(1):80-89.
- [82] 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.
- [83] Liu L, Yu Y, Hou Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. *PLoS One*. 2014;9(2):e88348.
- [84] Han Y, Tao R, Han Y, et al. Microencapsulated VEGF gene-modified umbilical cord mesenchymal stromal cells promote the vascularization of tissue-engineered dermis: an experimental study. *Cytotherapy*. 2014;16(2):160-169.
- [85] Sun TJ, Tao R, Han YQ, et al. Therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells with Wnt/ β -catenin signaling pathway pre-activated for the treatment of diabetic wounds. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(17):2460-2464.
- [86] Shrestha C, Zhao L, Chen K, et al. Enhanced healing of diabetic wounds by subcutaneous administration of human umbilical cord derived stem cells and their conditioned media. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:592454.
- [87] O'Loughlin A, Kulkarni M, Creane M, et al. Topical administration of allogeneic mesenchymal stromal cells seeded in a collagen scaffold augments wound healing and increases angiogenesis in the diabetic rabbit ulcer. *Diabetes*. 2013;62(7):2588-2594.
- [88] Fong CY, Tam K, Cheyyatraivendran S, et al. Human Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium enhance healing of excisional and diabetic wounds. *J Cell Biochem*. 2014;115(2):290-302.
- [89] Li XY, Zheng ZH, Li XY, et al. Treatment of foot disease in patients with type 2 diabetes mellitus using human umbilical cord blood mesenchymal stem cells: response and correction of immunological anomalies. *Curr Pharm Des*. 2013;19(27): 4893-4899.
- [90] Bartel RL, Booth E, Cramer C, et al. From bench to bedside: review of gene and cell-based therapies and the slow advancement into phase 3 clinical trials, with a focus on Aastrom's Ixmyelocel-T. *Stem Cell Rev*. 2013;9(3):373-383.