工程化脂肪源性间充质干细胞及其衍生物治疗严重下肢缺血的研究进展

徐嘉怡[1]，张安娜[2]，陈舰[2]，赵涵玥[2]，李燕[1]，刘新颖[1]，罗倩[1]，马磊[2]
1. 延安大学延安医学院，陕西延安　716000；2. 西安市第九医院血管介入科，陕西西安　710054

[摘要] 严重下肢缺血（critical limb ischemia，CLI）作为外周动脉疾病的危重阶段常面临无手术选择的困境。脂肪源性间充质干细胞（adipose-derived mesenchymal stem cell，ADSC）凭借旁分泌促血管生成与免疫调节潜能成为治疗新希望。既往研究表明移植细胞在缺血微环境中面临存活率低、靶区滞留不足等瓶颈，限制其应用；通过预处理、基因增强及生物材料载体等工程化手段可提升ADSC及其衍生物疗效已成为趋势。本文综述ADSC及其衍生物治疗CLI的作用机制与研究进展，并探讨相关工程化策略及临床转化展望。

[关键词] 脂肪源性间充质干细胞；下肢缺血；血管生成；基因修饰；递送系统；细胞预处理
[中图分类号] R654.3　　[文献标识码] A　　[DOI] 10.3969/j.issn.1673-9701.2026.24.027

严重下肢缺血（critical limb ischemia，CLI）是外周动脉疾病（peripheral arterial disease，PAD）的晚期进展阶段，以缺血性静息痛、难愈溃疡和坏疽为临床特征，致残与致死风险高。流行病学数据显示全球PAD患者超2亿，其中CLI患者确诊1年内的死亡率与截肢率合计达22%[1-2]。目前，药物治疗与血管腔内介入或旁路手术等血运重建是其标准疗法，但约20%的患者因血管流出道差或全身合并症无手术选择，截肢风险极高[3]。近年来，再生医学为解决这一难题提供新思路。间充质干细胞（mesenchymal stem cell，MSC）可在缺氧损伤环境下，通过旁分泌释放细胞因子、生长因子，促进血管新生和微环境改善[4]。其中脂肪源性间充质干细胞（adipose-derived mesenchymal stem cell，ADSC）因取材便捷、来源丰富、低免疫原性，被认为是极具临床转化潜力的种子细胞[5]。本文重点阐述ADSC治疗CLI的作用机制、疗效瓶颈及工程化优化策略的研究进展。

1　ADSC的生物学特性及作用机制

1.1　生物学特性

ADSC是一类存在于脂肪组织基质血管组分中的多能干细胞，主要通过胶原酶消化、离心分离及贴壁培养获得。依据国际细胞治疗协会鉴定标准，ADSC体外培养呈梭形贴壁生长，高表达CD73、CD90、CD105等间充质表面标志物，而几乎不表达CD34、CD45等造血或内皮细胞系标志[6]；且在特定诱导下可向成脂、成骨及成软骨方向分化[7]。与骨髓间充质干细胞（bone marrow mesenchymal stem cell，BM-MSC）相比，ADSC在下肢缺血治疗中具有独特转化优势：ADSC可通过吸脂术微创获取，供区损伤小、细胞得率高，可明显缩短体外扩增周期[8]。有对比研究证实ADSC在分泌细胞外基质成分（extracellular matrix，ECM）、金属蛋白酶及血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）等方面表现出更强的旁分泌活性，为缺血组织修复奠定生物学基础[9]。

1.2　作用机制

旁分泌效应被认为是ADSC治疗CLI的核心机制，主要通过以下途径发挥协同修复作用。在缺血缺氧微环境中，ADSC响应性释放富含生物活性的分泌组，其中包括VEGF、碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）和肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor，HGF）等关键因子，可动员内源性内皮祖细胞增殖、迁移与管腔形成而构建侧支循环[10]。除直接驱动血管新生外，ADSC还可调控局部微环境实现协同修复。针对缺血伴随的炎症，ADSC通过分泌前列腺素E2（prostaglandin E2，PGE2）和转化生长因子-β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）诱导巨噬细胞从促炎M1型转向抗炎修复M2型，营造利于再生的免疫微环境[11]。此外，ADSC分泌的超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）及激活的磷脂酰肌醇-3-激酶（phosphatidylinositol-3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）信号通路，可有效对抗缺血再灌注引发的氧化应激，抑制

通信作者：马磊，电子信箱：Dr_yusuf@163.com

组织细胞及内皮凋亡，保护受损组织[12]。见图1。

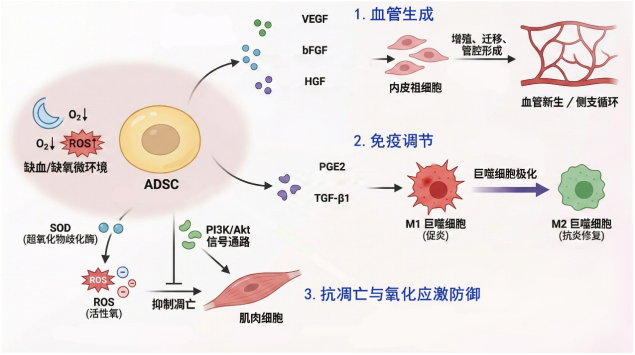


图1 ADSC治疗下肢缺血性疾病的机制

2 ADSC治疗下肢缺血的临床研究现状

2.1 安全性与初步疗效

多项临床研究已证实ADSC在治疗慢性创面及下肢缺血中的安全性与有效性。一项针对糖尿病足溃疡的前瞻性研究显示，异体ADSC与纤维蛋白凝胶联合应用可显著加快创面愈合进程，且未观察到严重不良事件[13]。Park等[14]的Ⅰ/Ⅱa期临床试验进一步证实肌内注射异体ADSC簇可有效缓解CLI患者的静息痛并延长无痛行走距离。在保肢疗效上，日本多中心前瞻性研究（TACT-ADRC试验）数据显示，自体ADSC移植6个月后主要无截肢生存率达94.1%，溃疡面积显著缩小，尽管踝肱指数无统计学差异，但重症亚组中皮肤灌注压的显著升高提示ADSC主要通过改善微循环而非重建大血管发挥作用[15]。

2.2 临床应用的局限性

尽管ADSC在早期临床试验中展现出良好的安全性与初步疗效，但天然细胞疗法在实际应用中仍受限于缺血微环境下的生物学瓶颈，主要体现为移植细胞存活率低、靶向归巢不足及治疗反应的个体差异[16-17]。供体DNA追踪分析显示受局部炎症风暴与氧化应激影响，异体ADSC移植后第21天仅存微量残留，难以维持持续的修复效应[13]。研究证实长期暴露于糖尿病高糖环境中的ADSC的胞内活性氧（reactive oxygen species，ROS）水平异常升高，并伴随不可逆的DNA损伤[18]。同时，高糖毒性还会扰乱细胞骨架动力学，抑制ADSC的定向迁移能力，阻碍其向缺血损伤深层组织的有效归巢[19]。上述“存活受限”与“功能受损”相叠加导致的疗效瓶颈在长周期临床随访中也得到印证。一项长达16年的回顾性队列研究显示对合并严重感染或免疫抑制的高危患者，单纯细胞疗法的保肢获益随时间推移呈衰减趋势，部分患肢最终仍面临缺血复发或截肢风险[20]。当前研究重点已从单纯疗效验证转向工程化改造，即通过细胞预处理、基因修饰及递送系统优化，系统提升ADSC的逆境适应性与治疗效能。

3 ADSC疗法的优化与工程化改造

3.1 物理与药理学预处理

物理与药理学预处理旨在通过短期外源刺激调节ADSC的生物学状态，因不改变基因组结构且工艺简便，易于临床转化。低氧预处理是目前研究较多的一种方式。体外短期低氧暴露（如1%O_2）可稳定缺氧诱导因子-1α（hypoxia-inducible factor-1 alpha，HIF-1α），上调VEGF、Bcl-2等关键因子，进而增强细胞的抗凋亡能力，并提升促血管生成活性[21]。动物实验表明低氧预处理可降低细胞内ROS水平并增加SOD表达，并通过分泌VEGF-A和基质细胞衍生因子-1α（stromal cell-derived factor-1 alpha，SDF-1α）动员内皮祖细胞构建侧支循环[22-23]。

药理学预处理则侧重于特定病理背景下的功能修复。针对糖尿病ADSC中HIF-1α表达不足的问题，去铁胺作为低氧模拟剂可在常氧下稳定HIF-1α，恢复细胞的血管生成潜能[24]。短期雷帕霉素处理可有效改善衰老ADSC的旁分泌功能，提高缺血肢体的保肢率[25]。上述策略可显著提升ADSC在缺血早期的适应性，但其效应多为短期可逆，对长期再灌注损伤及慢性炎症阶段的保护效果尚需进一步研究。

3.2 基因工程修饰

与预处理相比，基因工程修饰侧重于对ADSC核心功能的持久增强，尤其适用于逆转糖尿病或衰老背景下的细胞损伤。在改善代谢及抗氧化方面，过表达乙二醛酶-1（glyoxalase-1，*GLO1*）可降低胞内ROS水平，缓解糖毒性诱导的氧化应激。Peng等[26]在链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠缺血模型中发现过表达*GLO1*的ADSC可解毒晚期糖基化终产物的前体，逆转高糖引发的细胞损伤；移植14d后，患肢血流与毛细血管密度显著增加，使糖尿病ADSC的存活率及促血管疗效恢复至接近健康对照水平。在增强归巢与环境耐受方面，针对缺血组织高表达SDF-1的特点，Kim等[27]利用慢病毒载体上调ADSC的CXCR4受体表达，体外证实其跨膜迁移率提升2倍以上；在小鼠后肢缺血模型中，靶向归巢至缺血肌肉的细胞数量显著增多，局部滞留密度的提高有效促进微血管网的重建；而通过转染质子感受器*GPR65*基因，可赋予细胞对酸性环境的耐受性，通过抑制酸中毒诱导的凋亡维持移植细胞活性[28]。尽

管上述靶向基因修饰在动物实验中初见成效，但面对CLI复杂的病理微环境，其长期疗效的稳定性仍有待验证。未来如何实现靶向基因的精准时空可控表达是推向临床应用的关键。目前多数基因工程策略仍依赖病毒载体或其他长期表达系统，潜在存在插入突变、致瘤风险及免疫原性等安全问题[29]。近年来，脂质纳米颗粒及CRISPR/Cas9 核糖核蛋白等非病毒系统凭借无基因组整合及低免疫原性优势正成为基因修饰的安全新选择[30]。

3.3　递送系统与无细胞化策略

在优化ADSC本身功能的基础上，构建合适的递送系统实现原位长效滞留和时空可控释放，是进一步提高疗效的关键环节，见图2。

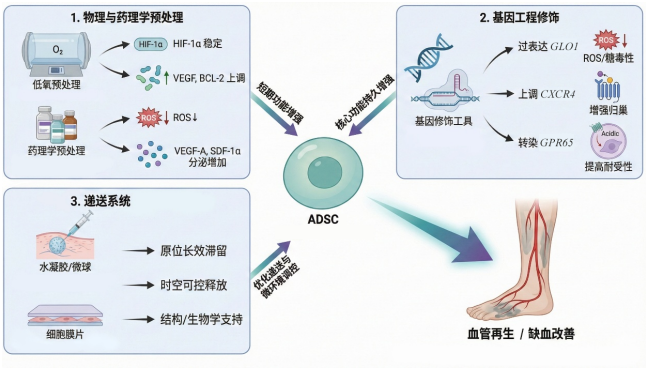


图2　ADSC治疗下肢缺血的工程化改造与优化策略

3.3.1　*水凝胶与微球系统*　水凝胶与微球系统可模拟ECM的三维理化特性，通过微创注射实现原位成胶或定植，有效克服传统细胞悬液移植存活率低、易流失的问题。Tian等[31]设计的温敏型含硒水凝胶可原位包裹ADSC，其持续释硒可清除局部ROS，抑制细胞凋亡并促进巨噬细胞M2型极化。小鼠下肢缺血模型证实该支架使细胞滞留时间显著延长，下肢坏死率较单纯注射组下降近40%。

在传统治疗中，单纯移植细胞易死亡，而单独注射生长因子又极易在体内降解。Wang等[32]利用微流控技术制备负载FGF19的甲基丙烯酰化明胶（gelatin methacryloyl，GelMA）微球，实现ADSC与FGF19的共递送。该微球提供三维物理支撑，其缓释的FGF19通过旁分泌途径提升细胞存活率，并激活Wnt/β-catenin通路，在下肢缺血模型中促进血管新生与受损骨骼肌再生。此外，材料的功能多肽修饰可进一步强化细胞黏附，如通过在壳聚糖水凝胶中引入IGF-1C结构域，可利用其特异性位点增强干细胞在缺氧组织的靶向黏附与增殖，降低凋亡率并增加缺血肢体的侧支血管密度[33]。

此类递送策略在无细胞治疗领域也极具潜力，利用GelMA微球负载经低氧预处理的ADSC外泌体，可在创面表面形成具有支架和保湿作用的局部微环境，维持外泌体在创面处的相对高浓度，并实现促血管因子的缓释，加速老年及糖尿病患者创面的闭合和血管形成[34-35]。现阶段，部分递送系统已进入临床试验。如负载异体ADSC的水凝胶膜片在糖尿病足溃疡治疗中已推进至Ⅲ期临床，初步证实该类载体的转化潜力[36]。但对新型复合载体而言，规模化制备、成本控制及其在体内的远期生物相容性仍是未来转化面临的主要挑战。

3.3.2　*细胞膜片技术*　细胞膜片技术是一种不依赖外源支架的细胞递送形式，其特点是利用高密度培养条件下细胞自身分泌的ECM形成连续细胞层，移植时以整体膜片形式覆盖于受损组织表面。与传统悬液注射相比，细胞膜片在移植过程中保留内源性ECM和细胞间连接，赋予移植细胞更强的组织黏附力与原位滞留率。针对糖尿病难愈创面，Hamada等[37]应用整体ADSC膜片覆盖缺损区，有效避免外源材料降解引发的异物反应，膜片内高活性的ADSC持续释放高浓度的VEGF与HGF，促进新生血管与肉芽组织形成，加速创面闭合。尽管该技术对制备工艺条件要求较高，且目前仍处于实验研究阶段，但当前研究正趋向将细胞预处理、基因修饰与先进载体相融合。如联合低氧预处理或基因修饰的外泌体技术，并辅以凝胶支架或膜片复合递送，通过整合多维工程化优势，有望进一步突破CLI微环境的治疗瓶颈[32,34-35]。

4　临床转化与展望

4.1　分层治疗策略

针对CLI的异质性病理状态，单一细胞干预难以覆盖临床需求，有必要探索个体化分层策略：①早期或中度缺血微环境损伤较轻，可优先评估物理或药理预处理的ADSC，以迅速改善微循环；②重度缺血伴溃疡（如糖尿病足）的高氧化应激限制细胞存活，可联合生物材料递送体系以提高局部有效暴露，或采用细胞膜片覆盖创面；③合并高危感染或免疫抑制者，活细胞移植风险较高，无细胞衍生物（如细胞外囊泡）的可控性与安全性更佳，但有效性仍待验证。

4.2 临床进展与质控体系

天然ADSC的临床应用已具一定基础，但在复杂缺血微环境中，其远期保肢获益呈衰减趋势。目前，多维工程化策略正逐步走向临床。部分递送系统与物理修饰手段已进入临床试验。但理论疗效更优的靶向基因修饰及无细胞衍生物等前沿技术仍多停留在临床前阶段，缺乏大规模数据支撑。

为推动工程化制剂的规范应用，未来需重点关注：①开展大样本多中心随机对照试验，统一给药标准与评价终点；②建立GMP质控体系，规范规模化制备与产品放行准则；③完善长效随访机制，严密监测外源基因整合或材料降解引发的致瘤与免疫风险。

5 小结

ADSC及其衍生物通过促进血管新生、免疫调节及抗氧化应激等多维机制，为无血运重建指征的CLI患者提供新的治疗策略。然而，在复杂缺血微环境中，天然细胞的远期存活率低且保肢获益有限。因此，涵盖细胞预处理、靶向基因修饰及先进递送系统的多维工程化改造已成为突破上述转化瓶颈的关键研究方向。未来，仍需依托大样本、多中心随机对照试验及符合GMP标准的质控体系，进一步确证不同工程化策略的有效性与安全性，进而构建基于病理特征的个体化分层治疗框架，以期为实现CLI的精准保肢治疗提供科学依据。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

[1] Duff S, Mafilios M S, Bhounsule P, et al. The burden of critical limb ischemia: A review of recent literature[J]. Vasc Health Risk Manag, 2019, 15: 187–208.

[2] Gornik H L, Aronow H D, Goodney P P, et al. 2024 ACC/AHA/AACVPR/APMA/ABC/SCAI/SVM/SVN/SVS/SIR/VESS guideline for the management of lower extremity peripheral artery disease: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association joint committee on clinical practice guidelines[J]. Circulation, 2024, 149(24): e1313–e1410.

[3] Kim T I, Vartanian S S, Schneider P A. A review and proposed classification system for the no-option patient with chronic limb-threatening ischemia[J]. J Endovasc Ther, 2021, 28(2): 183–193.

[4] Huerta C T, Voza F A, Ortiz Y Y, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy for non-healing wounds due to chronic limb-threatening ischemia: A review of preclinical and clinical studies[J]. Front Cardiovasc Med, 2023, 10: 1113982.

[5] Dong L, Li X, Leng W, et al. Adipose stem cells in tissue regeneration and repair: From bench to bedside[J]. Regen Ther, 2023, 24: 547–560.

[6] Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise review: Mesenchymal stem cells: From roots to boost[J]. Stem Cells, 2019, 37(7): 855–864.

[7] Suchanecka M, Grzelak J, Farzaneh M, et al. Adipose derived stem cells- sources, differentiation capacity and a new target for reconstructive and regenerative medicine[J]. Biomed Pharmacother, 2025, 186: 118036.

[8] Kunze K N, Burnett R A, Wright-Chisem J, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell treatments and available formulations[J]. Curr Rev Musculoskelet Med, 2020, 13(3): 264–280.

[9] Amable P R, Teixeira M V T, Carias R B V, et al. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly[J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(2): 53.

[10] Garcia J P, Avila F R, Torres R A, et al. Hypoxia-preconditioning of human adipose-derived stem cells enhances cellular proliferation and angiogenesis: A systematic review[J]. J Clin Transl Res, 2022, 8(1): 61–70.

[11] Kim R, Song B W, Kim M, et al. Regulation of alternative macrophage activation by MSCs derived hypoxic conditioned medium, via the TGF-β1/Smad3 pathway[J]. BMB Rep, 2020, 53(11): 600–604.

[12] Liu H, Shi M, Li X, et al. Adipose mesenchymal stromal cell-derived exosomes prevent testicular torsion injury via activating PI3K/AKT and MAPK/ERK1/2 pathways[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 8065771.

[13] Mrozikiewicz-Rakowska B, Szabłowska-Gadomska I, Cysewski D, et al. Allogenic adipose-derived stem cells in diabetic foot ulcer treatment: Clinical effectiveness, safety, survival in the wound site, and proteomic impact[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(2): 1472.

[14] Park Y M, Park J K, Kim H S, et al. A phase 1/2a clinical trial to evaluate the efficacy and safety of allogenic

adipose tissue-derived mesenchymal stem cell clusters in patients with critical limb ischemia[J]. Int J Stem Cells, 2025, 18(3): 254–262.

[15] Shimizu Y, Kondo K, Hayashida R, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with no-option critical limb ischemia by adipose-derived regenerative cells: TACT-ADRC multicenter trial[J]. Angiogenesis, 2022, 25(4): 535–546.

[16] Skrypnyk M. Current progress and limitations of research regarding the therapeutic use of adipose-derived stem cells: Literature review[J]. J Umm Al Qura Univ Appl Sci, 2025, 11(1): 63–75.

[17] Lu P, Ruan D, Huang M, et al. Harnessing the potential of hydrogels for advanced therapeutic applications: Current achievements and future directions[J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 166.

[18] Ahmed S M, Elkhenany H A, Ahmed T A, et al. Diabetic microenvironment deteriorates the regenerative capacities of adipose mesenchymal stromal cells[J]. Diabetol Metab Syndr, 2024, 16(1): 131.

[19] Song J, Zhao T, Wang C, et al. Cell migration in diabetic wound healing: Molecular mechanisms and therapeutic strategies (Review)[J]. Int J Mol Med, 2025, 56(2): 126.

[20] Sojakova D, Kahle M, Husakova J, et al. Efficacy of autologous cell therapy on limb salvage in patients with chronic limb-threatening ischemia: 16-year single-center experience[J]. Stem Cell Res Ther, 2025, 16(1): 362.

[21] Zhuo H, Chen Y, Zhao G. Advances in application of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cell-derived exosomes[J]. Front Cell Dev Biol, 2024, 12: 1446050.

[22] Suryawan I G R, Andrianto A, Cahyaningtias R D, et al. Hypoxic preconditioning decrease ROS and increase SOD expression in adipose-derived mesenchymal cell[J]. Pharmacogn J, 2020, 12(3): 430–435.

[23] Zhao Y, Zhang M, Lu G L, et al. Hypoxic preconditioning enhances cellular viability and pro-angiogenic paracrine activity: The roles of VEGF-a and SDF-1a in rat adipose stem cells[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 580131.

[24] Tajali R, Eidi A, Ahmadi T H, et al. Restoring the angiogenic capacity of the human diabetic adipose-derived mesenchymal stem cells primed with deferoxamine as a hypoxia mimetic agent: Role of HIF-1α[J]. Adv Pharm Bull, 2023, 13(2): 350–360.

[25] Cao Y L, Chen W L, Lei Q, et al. The transplantation of rapamycin-treated senescent human mesenchymal stem cells with enhanced proangiogenic activity promotes neovascularization and ischemic limb salvage in mice[J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(11): 2885–2894.

[26] Peng Z, Yang X, Qin J, et al. Glyoxalase-1 over-expression reverses defective proangiogenic function of diabetic adipose-derived stem cells in streptozotocin-induced diabetic mice model of critical limb ischemia[J]. Stem Cells Transl Med, 2017, 6(1): 261–271.

[27] Kim M, Kim D I, Kim E K, et al. CXCR4 over-expression in human adipose tissue-derived stem cells improves homing and engraftment in an animal limb ischemia model[J]. Cell Transplant, 2017, 26(2): 191–204.

[28] 陈一泓. 质子感受器GPR65改善ADSCs在严重下肢缺血中应用功效的研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019.

[29] Baranovskii D S, Klabukov I D, Arguchinskaya N V, et al. Adverse events, side effects and complications in mesenchymal stromal cell-based therapies[J]. Stem Cell Investig, 2022, 9: 7.

[30] Kim M, Hwang Y, Lim S, et al. Advances in nanoparticles as non-viral vectors for efficient delivery of CRISPR/Cas9[J]. Pharmaceutics, 2024, 16(9): 1197.

[31] Tian X, Yan X, Zang N, et al. Injectable thermosensitive selenium-containing hydrogel as mesenchymal stem cell carrier to improve treatment efficiency in limb ischemia[J]. Mater Today Bio, 2024, 25: 100967.

[32] Wang R, Wang F, Lu S, et al. Adipose-derived stem cell/FGF19-loaded microfluidic hydrogel microspheres for synergistic restoration of critical ischemic limb[J]. Bioact Mater, 2023, 27: 394–408.

[33] Wang X, Zhang J, Cui W, et al. Composite hydrogel modified by IGF-1C domain improves stem cell therapy for limb ischemia[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(5): 4481–4493.

[34] Li S, Sun J, Yang J, et al. Gelatin methacryloyl (GelMA) loaded with concentrated hypoxic pretreated adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) conditioned medium promotes wound healing and vascular regeneration in aged skin[J]. Biomater Res, 2023, 27(1): 11.

[35] Hu N, Cai Z, Jiang X, et al. Hypoxia-pretreated ADSC-derived exosome-embedded hydrogels promote angiogenesis and accelerate diabetic wound healing[J]. Acta Biomater, 2023, 157: 175–186.

（下转第136页）