

诱导多能干细胞促进糖尿病足溃疡愈合的研究进展

高春辰 陈金安 王爱萍

东部战区空军医院内分泌科, 糖尿病足中心, 南京 210002

通信作者: 王爱萍, Email: wap454hospital@hotmail.com

【摘要】 糖尿病足溃疡等慢性创伤在人群中广泛流行, 给患者和社会都带来了巨大的负担。而在现有的治疗方式下, 糖尿病足溃疡往往愈合不良且容易复发, 因此找寻新型疗法显得尤为迫切和重要。干细胞疗法作为一种新兴的治疗方式, 其在糖尿病足溃疡愈合中的作用已得到大量基础和临床研究的证实。然而, 由于获取干细胞往往依赖于侵入性手段, 免疫排斥和移植后的细胞存活率低等问题也限制了干细胞疗法的大规模应用和推广。近年来, 随着诱导多能干细胞(iPSC)技术的发展和进步, 其在糖尿病足溃疡的治疗中表现出很强的转化潜能。该文将围绕 iPSC 在包括糖尿病溃疡和肢体缺血在内的创伤愈合动物模型中的应用及前景、临床应用的局限性和改善安全性的方法展开综述。

【关键词】 糖尿病足; 溃疡; 诱导多能干细胞; 干细胞移植; 创面修复

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81770810)

Research progress of induced pluripotent stem cells in promoting wound healing of diabetic foot ulcers

Gao Chunchen, Chen Jin'an, Wang Aiping

Department of Endocrinology, Air Force Hospital of Eastern Theater Command, Diabetic Foot Center, Nanjing 210002, China

Corresponding author: Wang Aiping, Email: wap454hospital@hotmail.com

【Abstract】 Chronic wounds such as diabetic foot ulcers are epidemic, which bring huge burdens to both the patients and the society. However, with current treatment methods, diabetic foot ulcers often heal poorly and recur frequently, so it is urgent and important to find new and advanced therapies. Stem cell therapy has been proved by a large number of pre-clinical and clinical studies as a potential treatment for chronic wounds. However, the acquisition of stem cells often depends on invasive techniques, and immunogenicity and limited cell survival in vivo also limit the large-scale application and promotion of stem cell therapy. In the recent years, with the development and advance of induced pluripotent

stem cell (iPSC) technology, it has shown a strong translational potential in the treatment of chronic wounds such as diabetic foot ulcers. This article reviews the applications and prospect of iPSCs in animal wound healing models including diabetic ulcers and limb ischemia, the limitations of their clinical application, and the methods to improve their safety.

【Key words】 Diabetic foot; Ulcer; Induced pluripotent stem cells; Stem cell transplantation; Wound repair

Fund program: General Program of National Natural Science Foundation of China (81770810)

皮肤再生和创面愈合是复杂的生物过程, 在世界范围内都是充满挑战的临床问题。创面愈合是一个涉及多种细胞的动态生理过程, 包括止血、炎症、增殖和重塑 4 个相互重叠、高度协调有序的阶段^[1-2]。当患者出现持续的高血糖或血糖控制不良时, 上述环节可能出现失调, 将导致炎症、缺氧、外周神经痛和缺血, 创面愈合延迟甚至不愈合, 进而引起足部畸形和糖尿病足溃疡(DFU)。血管生成是创面愈合过程中的重要环节, 它的重建可使受损组织进行血液再灌注, 并为创面的修复提供必要的营养支持。然而, 在慢性难愈性创面中, 缺氧环境会导致血管生成减少, 进而延缓创面愈合, 同时, 糖尿病患者的内皮祖细胞在损伤部位的归巢能力会减弱, 这进一步抑制了血管生成; 在创面愈合过程中, 糖尿病患者的 Fb 功能受损, 其合成胶原蛋白、纤维连接蛋白和蛋白多糖等成分的能力随之降低, 致使 ECM 合成减少, 创面愈合受阻^[3-5]。

慢性创面处理的标准疗法包括对病因的准确判断、感染的控制、缺血状况的改善、坏死组织的清创以及减压。NPWT 也是目前治疗 DFU 的重要方式^[6]。然而在目前的标准疗法下, 仅有 50% 的 DFU 患者可在 12~20 周内痊愈, 而另外 50% 的 DFU 患者会在 18 个月内复发^[7]。因此找寻可替代的新型疗法显得尤为迫切和重要。

干细胞由于具有自我更新和多向分化等特征, 使得其在 DFU 的治疗中表现出巨大潜力。当干细胞被移植到创面时,

DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20210630-00230

本文引用格式: 高春辰, 陈金安, 王爱萍. 诱导多能干细胞促进糖尿病足溃疡愈合的研究进展[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2022, 38(9): 864-869. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20210630-00230.

Gao CC, Chen JA, Wang AP. Research progress of induced pluripotent stem cells in promoting wound healing of diabetic foot ulcers[J]. Chin J Burns Wounds, 2022, 38(9): 864-869. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20210630-00230.



其可通过分泌大量细胞因子和生长因子,促进参与创面愈合的其他细胞募集,进而发挥免疫调节、促进 ECM 重塑和血管生成的作用^[8]。有研究表明,间充质干细胞(MSC)等成体干细胞可发挥较好的促进糖尿病患者慢性创面愈合的作用,并且 Graftix、Stravix 等包含 MSC 的外用治疗产品已经被用于 DFU 的临床治疗^[9-10]。但由于干细胞的获取往往依赖侵入性的手段,可能会对供体造成一定的破坏,同时免疫排斥、细胞存活率低、伦理等问题也限制了干细胞疗法的大规模应用和推广^[11]。近年来,诱导多能干细胞(iPSC)技术的发展和进步,使其成为 DFU 治疗领域中非常有潜力的新型替代方式^[12]。

1 iPSC 的优势及其在 DFU 愈合中的作用机制

iPSC 技术最初报道于 2006 年,iPSC 是来源于成体实质细胞的多能干细胞,指成体实质细胞通过 4 种转录因子包括 Oct4/Y 染色体性别决定区域相关促 HMG 盒 2/c-Myc/Krüppel 样因子 4 或 Oct4/Y 染色体性别决定区域相关促 HMG 盒 2/NANOG/LIN28 体外诱导成为具有自我更新和多向分化潜能的干细胞^[13-14]。虽然最初获取 iPSC 时需要通过逆转录病毒的转染,可能为其临床应用带来一定的安全隐患;但最新的研究通过使用非整合技术或非病毒技术诱导 iPSC,极大程度上提高了 iPSC 临床应用的安全性^[15]。iPSC 与胚胎干细胞相似,具有多能性和自我更新能力,同时具有分化为机体各种细胞类型的潜能。在组织再生和慢性创面愈合过程中,iPSC 与其他类型干细胞相比具有明显优势:(1)由于 iPSC 来源于成体实质细胞而不是胚胎,其在临床应用中面临的伦理问题较少;(2)iPSC 易于获取,如皮肤中的 Fb 可作为 iPSC 的来源,避免了通过侵入性的方式获取骨髓或脂肪组织中的干细胞;(3)由于 iPSC 理论上可以从包括皮肤在内的各种成体组织中获得,因此可获取的 iPSC 数量比其他类型的干细胞多很多数量级;(4)由于 iPSC 可分化为机体各种类型的细胞,因此其具有治疗不同组织器官疾病的潜能;(5)利用自体 iPSC 移植可避免免疫排斥反应,增加细胞在体内的存活率^[16]。

目前 iPSC 在器官的三维打印、创面愈合和血管生成等领域的研究仍处于临床前研究阶段,在 iPSC 真正应用于临床之前,还需要进一步评估其安全性。目前已经开展了 iPSC 针对多种疾病的临床研究,包括心肌病、自闭症谱系障碍、冠状动脉疾病、肿瘤和囊性纤维化等^[17]。

iPSC 可分化为 3 个胚层中所有的细胞类型,由 iPSC 衍生而来的终末分化细胞有可能通过其旁分泌作用或直接的细胞效应促进 DFU 的愈合。既往研究提示,在炎症期,DFU 患者多种细胞因子的分泌均受到抑制,这是造成其组织破坏和创面延迟不愈的一个重要因素。而 iPSC 来源的终末分化细胞则可通过分泌多种生长因子和细胞因子代偿 DFU 患者细胞因子水平不足的问题,进而促进巨噬细胞、KC 及 Fb 的募集和小鼠创面的愈合^[18-19]。除此之外,DFU 患者创面的祖细胞归巢能力受损,而将 iPSC 直接应用于创面处可促进祖细

胞归巢能力的恢复^[20]。在增殖期,iPSC 可通过向内皮细胞、平滑肌细胞、Fb、周细胞、KC 或 MSC 分化,进而促进血管生成并增加胶原沉积。在重塑期,创面愈合过程高度依赖功能性肌 Fb,因此该阶段 iPSC 来源的肌 Fb 对于创面愈合至关重要^[21]。

2 iPSC 的来源

大量研究表明,iPSC 可从一系列成体实质细胞诱导得来。Fb 是诱导获得 iPSC 最常用的细胞类型,也是首先被 Yamanaka 团队用来诱导人源性和小鼠源性 iPSC 的细胞类型。除 Fb 外,血细胞和毛发 KC 也可作为 iPSC 的重要来源。这些细胞具有易于从机体分离获取的优点,而且与 Fb 相比,血细胞和毛发 KC 的重编程效率更高。

由于皮肤组织中具有大量异质性的细胞类型,包括 KC、Fb、表皮细胞等,因此皮肤组织是获取 iPSC 的重要细胞库。成体干细胞如骨髓来源的 MSC、脂肪来源的 MSC、神经干细胞、牙髓干细胞、唾液腺来源的干细胞和 Wharton's Jelly 源性的 MSC,也可作为诱导 iPSC 的细胞来源。研究表明,由于成体干细胞是未分化的细胞,拥有更强的可塑性,因此与其他终末分化的成体细胞相比,利用成体干细胞进行 iPSC 诱导的效率更高,诱导获得的 iPSC 数量也更多。而且与其他终末分化的成体细胞相比,成体干细胞中积累表观遗传学改变、点突变和染色质损伤的可能性更低,因此成体干细胞可能是诱导 iPSC 的重要细胞类型。然而,由于皮肤组织中的终末分化细胞具有易于分离获得、含量丰富等优点,使得皮肤组织依然是目前最常用于提取 iPSC 的组织^[22]。

3 iPSC 的诱导方式

iPSC 的诱导方式主要分为两大类:整合性诱导和非整合性诱导。整合性诱导是指将重编程因子的基因片段整合至宿主细胞基因组的诱导方式,是目前获得 iPSC 最常用的方式,可确保重编程因子在宿主细胞中持续异位表达。整合性诱导系统包括利用病毒载体如反转录病毒、慢病毒等,或利用非病毒载体如转座子等,将重编程因子整合入宿主细胞的基因组。然而,整合性诱导方式存在以下弊端,如可能引起插入突变、重编程因子的基因沉默或不合时宜的重新活化,这些因素都制约着 iPSC 的临床应用。尽管存在以上弊端,由于整合性诱导的高效性,目前的研究依然大量使用整合性诱导方式获取 iPSC^[22-24]。

为了克服整合性诱导方式的弊端,通过非整合性诱导方式获得 iPSC 成为目前的研究热点。该方式不改变宿主细胞基因组,而是通过利用腺病毒、质粒、合成性的 mRNA 和重组蛋白等诱导系统,实现重编程因子在细胞质的瞬时表达,因此很大程度地避免了插入突变发生的可能性。因此,通过非整合性诱导方式获得 iPSC 为其未来的临床应用带来了希望^[22]。

除利用重编程因子诱导获得 iPSC 的方式外,小分子化合物也可用于加强 iPSC 的诱导效率。研究表明,维生素 C 和

丙戊酸可显著提高 iPSC 的重编程效率。Hou 等^[25]利用一系列小分子(包括丙戊酸、糖原合成酶激酶 3 抑制剂、TGF- β 抑制剂、环磷酸腺苷激动剂和 S-腺苷高半胱氨酸水解酶抑制剂等)的组合替代外源性的重编程因子诱导 iPSC, 该方式可通过调控非特异的多能性分子途径, 使宿主细胞获得多向分化潜能。除此之外, 糖原合成酶激酶 2 抑制剂可激活 Wnt 信号通路, 使细胞获得自我更新能力并维持细胞的多能性。有研究还表明, 多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1 可替代重编程因子 c-Myc 而发挥作用, 促进衰老 Fb 的重编程。因此, 通过组合利用小分子化合物和重编程因子可提高 iPSC 的诱导效率^[22]。

4 iPSC 的应用

4.1 人源性 iPSC (hiPSC) 来源的内皮细胞 (hiPSC-EC)

hiPSC-EC 的血管生成作用对创面愈合至关重要, 损伤组织周围血管的重建可促进创面愈合。然而在难以愈合的慢性创面, 缺氧微环境往往导致血管生成严重受阻。而且对于糖尿病患者, 创面愈合过程中内皮前体细胞向创面的募集受到抑制, 进一步抑制了血管生成, 导致创面难以愈合。内皮细胞是参与血管生成关键的细胞类型之一, 因此在治疗 DFU 时, hiPSC-EC 可能具有促进创面愈合的潜能^[26]。

目前的研究显示, hiPSC-EC 可能通过以下机制促进创面愈合。在小鼠全层皮肤缺损创面模型中观察到, 与不采用细胞治疗的创面相比, 用 hiPSC-EC 处理小鼠创面的 4 d 内, 创面血管灌注和血管密度均增加。同时观察到, hiPSC-EC 处理后的创面胶原沉积增多, 巨噬细胞募集也增多, 血管生成相关因子如内皮细胞黏附分子和 VEGF 等均上调^[18]。Kim 等^[27]将 hiPSC-EC 与 hiPSC 来源的平滑肌细胞移植到糖尿病小鼠创面, 结果显示相比单独使用 hiPSC-EC, 两者联合使用可以发挥促进创面处新生血管生成的作用, 其治疗效果更佳、创面愈合速度更快、血管灌注和血管密度明显增加。而且与终末分化的内皮细胞相比, hiPSC-EC 可合成分泌更多的 VEGF、EGF 和 FGF 等血管生成相关因子, 并发挥更强的促进平滑肌细胞迁移的能力。

4.2 hiPSC 来源的 Fb

Fb 在创面愈合的过程中发挥着合成 ECM 成分, 包括胶原、纤维连接蛋白和蛋白聚糖的作用, ECM 对再上皮化和创面愈合至关重要^[28]。研究显示, 与正常人相比, DFU 患者 Fb 增殖相关基因、细胞存活相关基因和抑制凋亡相关基因的表达均下调, 可能是导致创面愈合速度减慢的原因^[29]。因此, 从 DFU 患者中获得正常的 Fb 对于创面愈合具有积极的意义。

Kashpur 等^[30]和 Gerami-Naini 等^[31]均观察到, 从 DFU 患者获取的 hiPSC 来源的 Fb 与从 DFU 患者获取的 Fb 相比, 具有更好的促进创面愈合的作用。进一步的研究显示, 从健康人和 DFU 患者获取的 hiPSC 来源的 Fb 具有相似的基因表达谱; 而 hiPSC 来源的 Fb 和原代 Fb 相比, 细胞增殖、迁移、黏附、ECM 的重塑, 以及对刺激的应答能力均存在差异。同时

该研究还观察到, 局部使用 hiPSC 来源的 Fb 可促进糖尿病小鼠创面愈合; 来自健康人和 DFU 患者 hiPSC 来源的 Fb 比 DFU 患者来源的 Fb 更能促进创面愈合。因此提示, hiPSC 来源的 Fb 具有临床转化潜能。

4.3 hiPSC 来源的 MSC (hiPSC-MSC)

MSC 是一类非常重要的多能干细胞, 具有归巢至创面并分化为多种细胞类型的潜能, 在创面愈合过程中发挥着积极作用。除直接的分化潜能外, MSC 还可通过产生促进血管生成和再上皮化的细胞因子, 促进皮肤组织定居干细胞的迁移, 并参与免疫调节, 进而促进创面愈合^[9]。研究表明, 来源于糖尿病患者的 MSC 的增殖、分化和促血管生成的能力均受损^[32]。然而, hiPSC-MSC 可能具有更好的加速 DFU 慢性创面愈合的潜力。

Nakayama 等^[33]利用健康人和大疱性表皮松解症患者的 KC 成功建立了 hiPSC-MSC, 并通过裸鼠模型研究其创面愈合潜能。该研究结果显示, 通过皮下注射和静脉注射 hiPSC-MSC 可成功在裸鼠真皮和表皮的交界处观察到人源性的 VII 型胶原; 且通过静脉注射 hiPSC-MSC 可更好地促进创面愈合。

5 iPSC 的移植方式

目前, 如何提高 iPSC 移植后的存活率并使其发挥最佳的促进创面愈合效果是 iPSC 用于临床治疗的研究热点之一。研究显示, iPSC 与仿生材料结合具有良好的应用前景。研究表明, 将 hiPSC、内皮祖细胞和血管前体细胞搭载在透明质酸水凝胶上可有效促进糖尿病小鼠全层皮肤缺损创面愈合, 该材料可促进自体巨噬细胞向创面处的募集, 同时这些细胞群可快速定植于创面新生血管, 释放更多的血管生成相关因子, 进而促进创面处血管生成和创面愈合^[34]。

与直接注射 hiPSC-EC 组相比, 利用电纺聚己内酯和明胶支架向小鼠背部进行 hiPSC-EC 的细胞递送, 可显著促进支架周围组织的血液灌注和小动脉密度, 并增强局部免疫反应, 为创面愈合创造有利条件^[35]。另一项研究显示, 将脂肪干细胞搭载在利用三维打印技术获得的姜黄素明胶甲基丙烯酸酯水凝胶后移植至糖尿病小鼠全层皮肤缺损创面, 与单独使用脂肪干细胞相比, 可发挥更强的促进创面愈合的作用^[36]。

然而, 由于目前对于 iPSC 治疗 DFU 移植方式的探索仍停留在基础研究阶段, 而且探索的深度和广度尚且不足, 因此未来仍需要通过大量的基础和临床研究, 寻找并确立提高 iPSC 移植后的存活效率、确保安全性并使其发挥最佳的促进创面愈合效果的移植方式。

6 iPSC 的临床应用风险及可能的解决方案

6.1 致瘤风险

尽管 iPSC 具有广阔的应用前景, 但 iPSC 具有分化为 3 个胚层中任意细胞的潜能, 因此 iPSC 存在致瘤风险^[12]。同时研究者观察到, 由于 iPSC 的复杂性, 将 10 个制备和获取方

式基本相似的商品化 hiPSC 细胞系对免疫缺陷小鼠进行移植后,它们的致癌风险、成瘤的潜伏期和肿瘤体积均存在差异,这可能和 iPSC 的移植部位和移植后不同的突变有关,因此目前其在临床试验中的应用仍然受到很大的限制^[37]。虽然局部使用 iPSC 是否会形成畸胎瘤尚未可知,但研究者们观察到,在小鼠皮下注射 hiPSC 来源的终末分化细胞可导致畸胎瘤的形成^[38]。因此,合理利用 iPSC 在治疗 DFU 创面上的巨大潜能,同时避免细胞移植带来的致畸风险可能是未来 iPSC 临床应用的方向。

外泌体是包含蛋白质、mRNA 和微小 RNA 的 30~150 nm 的细胞外小囊泡,研究表明,外泌体可发挥与 iPSC 类似的促进慢性创面愈合的作用。但由于外泌体不包含细胞核,并不涉及细胞分裂过程,可消除移植后畸胎瘤的形成风险,因此 iPSC 来源外泌体的移植成为一种治疗 DFU 创面愈合非常有潜力的候选疗法。hiPSC-MSC 来源的外泌体可通过促进胶原合成和血管生成,进而发挥促进皮肤创面愈合的作用。特别值得注意的是,当利用 hiPSC-MSC 来源的外泌体进行糖尿病小鼠溃疡创面治疗时,创面处皮肤再上皮化能力更强,创面面积减小,同时创面处血管密度更高,因此创面愈合更快。体外研究表明,在 hiPSC-MSC 来源外泌体的作用下,体外培养的人 Fb 表现出更强的增殖和迁移能力,同时观察到这群细胞的纤维连接蛋白、I 型和 III 型胶原以及弹性蛋白的表达均上调。除此之外,研究者们还观察到,在 hiPSC-MSC 来源外泌体的作用下,体外培养的人脐静脉内皮细胞增殖、迁移、成管和分支能力均得到促进。iPSC 的临床应用面临和需要克服的主要障碍是其存在致瘤风险。而利用 iPSC 来源的外泌体进行 DFU 治疗不仅能够发挥 iPSC 的治疗潜能,同时不存在致瘤风险,因此可能是未来 iPSC 用于 DFU 创面治疗的重要方向^[39-40]。

除了使用 iPSC 来源的外泌体外,移植分化后的 iPSC 也是降低畸胎瘤形成风险的重要手段。例如,移植 hiPSC-EC、hiPSC-MSC 和 hiPSC 来源的 Fb 均可促进创面愈合。然而,由于在获得 iPSC 来源终末分化细胞的过程中,可能难以避免地残留未分化的 iPSC,因此这种细胞移植策略依旧存在致瘤风险。事实上,已经有研究表明,当利用 hiPSC 来源的神经细胞或软骨细胞进行移植时,可在小鼠中导致畸胎瘤的产生^[12]。因此,需要通过可靠的体外分化方案与筛选分析相结合,确保在 DFU 治疗开展前,终末分化的细胞中没有残留的 iPSC^[38]。

除此之外,为解决 iPSC 致瘤性问题,研究者在诱导 iPSC 的过程中不利用 c-Myc 进行诱导,而是加入槲皮素和 YM155 等小分子,结果显示经过这些小分子处理的 hiPSC,在移植后可显著减少糖尿病小鼠肿瘤的形成^[41]。研究还表明,将利用多能细胞特异性抑制剂如油酸合成抑制剂处理后的 iPSC 移植至免疫缺陷小鼠,肿瘤形成明显受到抑制^[42]。这些抑制剂是目前市面上可用于预防形成畸胎瘤的药物。以上这些技术进展可能是 iPSC 更加安全有效地应用于临床的有效手段。

6.2 免疫排斥反应

基于人源化小鼠的研究表明,未分化 iPSC 的移植将在机体引发较强的免疫排斥反应,但是移植 iPSC 来源的终末分化细胞引起的免疫排斥反应较弱^[22]。然而,一些 iPSC 来源的终末分化细胞如平滑肌细胞的移植可能引起免疫排斥反应。

研究表明,持续的免疫抑制处理可在一定程度上降低自体 iPSC 来源分化细胞的移植引起的免疫排斥反应,然而该方式可能会增加感染风险;通过自体 iPSC 或拥有相同人类白细胞抗原(HLA)分型的 iPSC 的移植可降低免疫排斥的发生风险^[43]。除此之外,诱导小鼠 iPSC 的主要组织相容性复合体 I (MHC I) 和 MHC II 失活或 CD47 的过表达,对于存在 HLA 排异的供受体而言,可提高移植细胞的存活率^[44]。

6.3 尚未建立 iPSC 临床诊疗标准

由于 iPSC 用于 DFU 治疗的临床数据尚不足,目前仍未建立起 iPSC 用于 DFU 治疗的临床诊疗标准,这也是制约其临床应用的限制因素之一。为解决该问题,需深入开展 iPSC 用于 DFU 治疗的基础研究和临床试验,通过完善的实验设计和严格细致的观察,确立起 iPSC 治疗 DFU 的一套临床标准,包括 iPSC 的来源、用量、递送方式等^[45]。为推进 iPSC 在临床治疗中的应用,根据美国食品药品监督管理局近期关于 iPSC 治疗的指南,iPSC 及 iPSC 产品的临床转化需要经过体外的染色体核型分析、细胞系稳定性鉴定、多能性抗原表达、分化能力、异质性和纯度分析,同时需要经过体内致瘤性或畸胎瘤形成能力、分化潜能、已分化细胞的稳定性的分析,以及确定治疗的最佳细胞用量。同时还需要鉴定利用 iPSC 来源细胞产品进行治疗时可能产生的器官毒性,包括由于激发免疫应答对邻近组织产生的破坏。另外,建立起一个基于 HLA 信息的 iPSC 库对 iPSC 治疗具有重要意义,但是由于涉及大量复杂患者 HLA 信息的收集、检测和匹配,人力和费用的消耗依然是一大挑战^[46]。

7 总结与展望

综上,作为一种新型干细胞,iPSC 具有自我增殖潜能,同时获取 iPSC 的过程对供体侵入性伤害较小,面临的伦理方面的问题也较少,因此 iPSC 可能为再生医学、遗传性疾病和药物治疗等领域带来颠覆性的改变。大量基于动物模型的基础研究表明,iPSC 有望促进慢性难愈性创面的愈合,并可促进创面愈合和血管再灌注。虽然从 iPSC 的产生至今,研究者们为将其投入临床应用,已对其生产和后续的应用进行了大量优化,但由于 iPSC 存在致瘤风险和引发免疫排斥反应等安全隐患,仍需通过大量全面而深入的研究,为其今后的临床应用打下坚实基础。此外,虽然 DFU 患者的 iPSC 与健康个体的 iPSC 具有相似的功能,但仍有研究表明,来自肥胖诱导的糖尿病小鼠的 iPSC-EC 在促进创面愈合和血管生成方面的能力均下降。因此,需要通过进一步的研究阐明来自 DFU 患者和健康个体的 iPSC 之间的差异。

在 iPSC 真正应用于临床治疗之前,仍有许多障碍需要

克服。(1)首先,需要通过更加高效和快速的非整合技术(最好是通过蛋白质和小颗粒转移的技术)获取 iPSC;(2)其次,在获得用于临床治疗的 iPSC 细胞系时,需制订标准化的检测方案,以排除 iPSC 形成畸胎瘤的可能性;(3)另外,需要通过大量细致的研究,寻找并确立将 iPSC 输送至 DFU 创面的最佳方式和最佳递送位置,以延长移植细胞存活率并确保其治疗效果的发挥;(4)同时,在进行 iPSC 来源的终末分化细胞移植之前,需通过更加安全的方式消除具有致癌风险的未分化的细胞;(5)除此之外,由于目前 iPSC 用于 DFU 愈合治疗的效果评估和安全性评估多集中在小鼠和大鼠模型上,其皮肤结构和愈合方式和人类有所不同,因此后续的研究可采用更接近人类皮肤的大型动物皮肤创面模型进行评估;(6)最后,由于 iPSC 促进创面愈合治疗潜能的发挥可能更加依赖于旁分泌作用,因此对 iPSC 来源外泌体的治疗效果、递送方式和安全性的研究可能是未来的研究热点之一,对 iPSC 的临床转化具有重要意义。因此,在 iPSC 治疗技术真正应用于临床治疗之前,需要对 iPSC 的特征进行更加深入的探索,同时需要通过更多的基础研究和临床研究验证 iPSC 的治疗效果、评估其安全性并确立 iPSC 发挥最佳疗效的递送方式,期待不久的将来 iPSC 技术可以成为再生治疗的有力工具。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yu Q, Qiao GH, Wang M, et al. Stem cell-based therapy for diabetic foot ulcers[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 812262. DOI: 10.3389/fcell.2022.812262.
- [2] Doğruel H, Aydemir M, Balci MK. Management of diabetic foot ulcers and the challenging points: an endocrine view[J]. *World J Diabetes*, 2022, 13(1):27-36. DOI: 10.4239/wjd.v13.i1.27.
- [3] Holl J, Kowalewski C, Zimek Z, et al. Chronic diabetic wounds and their treatment with skin substitutes[J]. *Cells*, 2021, 10(3): 655. DOI: 10.3390/cells10030655.
- [4] Theocharidis G, Thomas BE, Sarkar D, et al. Single cell transcriptomic landscape of diabetic foot ulcers[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):181. DOI: 10.1038/s41467-021-27801-8.
- [5] Wang A, Lv G, Cheng X, et al. Guidelines on multidisciplinary approaches for the prevention and management of diabetic foot disease (2020 edition) [J/OL]. *Burns Trauma*, 2020, 8: tkaa017[2022-04-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32685563/>. DOI: 10.1093/burnst/tkaa017.
- [6] Ji S, Liu X, Huang J, et al. Consensus on the application of negative pressure wound therapy of diabetic foot wounds[J/OL]. *Burns Trauma*, 2021, 9: tkab018[2022-04-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34212064/>. DOI: 10.1093/burnst/tkab018.
- [7] Jeffcoate WJ, Vileikyte L, Boyko EJ, et al. Current challenges and opportunities in the prevention and management of diabetic foot ulcers[J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(4):645-52. DOI: 10.2337/dc17-1836.
- [8] Buchade S, Desai S, Bhonde R, et al. Stem cells: a golden therapy for diabetic wounds[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2021, 17(2): 156-160. DOI: 10.2174/1573399816666200716200450.
- [9] Cao Y, Gang X, Sun C, et al. Mesenchymal stem cells improve healing of diabetic foot ulcer[J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 9328347. DOI: 10.1155/2017/9328347.
- [10] Xu SM, Liang T. Clinical observation of the application of autologous peripheral blood stem cell transplantation for the treatment of diabetic foot gangrene[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(1): 283-288. DOI: 10.3892/etm.2015.2888.
- [11] Foo JB, Looi QH, Chong PP, et al. Comparing the therapeutic potential of stem cells and their secretory products in regenerative medicine[J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 2616807. DOI: 10.1155/2021/2616807.
- [12] Gorecka J, Kostiuk V, Fereydooni A, et al. The potential and limitations of induced pluripotent stem cells to achieve wound healing[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 87. DOI: 10.1186/s13287-019-1185-1.
- [13] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5):861-872. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [14] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4):663-676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [15] Haridhasapavalan KK, Borgohain MP, Dey C, et al. An insight into non-integrative gene delivery approaches to generate transgene-free induced pluripotent stem cells[J]. *Gene*, 2019, 686:146-159. DOI: 10.1016/j.gene.2018.11.069.
- [16] Lopes L, Setia O, Aurshina A, et al. Stem cell therapy for diabetic foot ulcers: a review of preclinical and clinical research [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):188. DOI: 10.1186/s13287-018-0938-6.
- [17] Singh VK, Kalsan M, Kumar N, et al. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2015, 3: 2. DOI: 10.3389/fcell.2015.00002.
- [18] Clayton ZE, Tan RP, Miravet MM, et al. Induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells promote angiogenesis and accelerate wound closure in a murine excisional wound healing model[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(4):BSR20180563. DOI: 10.1042/BSR20180563.
- [19] Wang AYL. Human induced pluripotent stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for various diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4):1769. DOI: 10.3390/ijms22041769.
- [20] Liu X, Li Q, Niu X, et al. Exosomes secreted from human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent osteonecrosis of the femoral head by promoting angiogenesis[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(2):232-244. DOI: 10.7150/ijbs.16951.
- [21] Martin PE, O'Shaughnessy EM, Wright CS, et al. The potential of human induced pluripotent stem cells for modelling diabetic wound healing in vitro[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(15): 1629-1643. DOI: 10.1042/CS20171483.
- [22] Choudhury S, Surendran N, Das A. Recent advances in the induced pluripotent stem cell-based skin regeneration[J]. *Wound Repair Regen*, 2021, 29(5):697-710. DOI: 10.1111/wrr.12925.
- [23] Hoffmann D, Schott JW, Geis FK, et al. Detailed comparison of retroviral vectors and promoter configurations for stable and high transgene expression in human induced pluripotent stem cells[J]. *Gene Ther*, 2017, 24(5):298-307. DOI: 10.1038/gt.2017.20.
- [24] Johnson WE. Origins and evolutionary consequences of ancient endogenous retroviruses[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(6): 355-370. DOI: 10.1038/s41579-019-0189-2.
- [25] Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds[J]. *Science*, 2013, 341(6146):651-654. DOI: 10.1126/science.1239278.

- [26] Kaushik K, Das A. Endothelial progenitor cell therapy for chronic wound tissue regeneration[J]. *Cytotherapy*, 2019,21(11): 1137-1150. DOI: 10.1016/j.jcyt.2019.09.002.
- [27] Kim KL, Song SH, Choi KS, et al. Cooperation of endothelial and smooth muscle cells derived from human induced pluripotent stem cells enhances neovascularization in dermal wounds[J]. *Tissue Eng Part A*, 2013,19(21/22):2478-2485. DOI: 10.1089/ten.TEA.2012.0768.
- [28] Dash BC, Xu Z, Lin L, et al. Stem cells and engineered scaffolds for regenerative wound healing[J]. *Bioengineering (Basel)*, 2018, 5(1):23. DOI: 10.3390/bioengineering5010023.
- [29] Januszyk M, Chen K, Henn D, et al. Characterization of diabetic and non-diabetic foot ulcers using single-cell RNA-sequencing [J]. *Micromachines (Basel)*, 2020, 11(9): 815. DOI: 10.3390/mi11090815.
- [30] Kashpur O, Smith A, Gerami-Naini B, et al. Differentiation of diabetic foot ulcer-derived induced pluripotent stem cells reveals distinct cellular and tissue phenotypes[J]. *FASEB J*, 2019,33(1):1262-1277. DOI: 10.1096/fj.201801059.
- [31] Gerami-Naini B, Smith A, Maione AG, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from diabetic foot ulcer fibroblasts using a nonintegrative Sendai virus[J]. *Cell Reprogram*, 2016, 18(4): 214-223. DOI: 10.1089/cell.2015.0087.
- [32] Cassidy FC, Shortiss C, Murphy CG, et al. Impact of type 2 diabetes mellitus on human bone marrow stromal cell number and phenotypic characteristics[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2476. DOI: 10.3390/ijms21072476.
- [33] Nakayama C, Fujita Y, Matsumura W, et al. The development of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem/stromal cells from normal human and RDEB epidermal keratinocytes[J]. *J Dermatol Sci*, 2018, 91(3): 301-310. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2018.06.004.
- [34] Shen YI, Cho H, Papa AE, et al. Engineered human vascularized constructs accelerate diabetic wound healing[J]. *Biomaterials*, 2016,102:107-119. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.06.009.
- [35] Tan RP, Chan AHP, Lennartsson K, et al. Integration of induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells with polycaprolactone/gelatin-based electrospun scaffolds for enhanced therapeutic angiogenesis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):70. DOI: 10.1186/s13287-018-0824-2.
- [36] Xia S, Weng T, Jin R, et al. Curcumin-incorporated 3D bioprinting gelatin methacryloyl hydrogel reduces reactive oxygen species-induced adipose-derived stem cell apoptosis and improves implanting survival in diabetic wounds[J/OL]. *Burns Trauma*, 2022, 10: tkac001[2022-04-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35291229/>. DOI: 10.1093/burnst/tkac001.
- [37] Yasuda S, Kusakawa S, Kuroda T, et al. Tumorigenicity-associated characteristics of human iPS cell lines[J]. *PLoS One*, 2018,13(10): e0205022. DOI: 10.1371/journal.pone.0205022.
- [38] Qiao Y, Agboola OS, Hu X, et al. Tumorigenic and immunogenic properties of induced pluripotent stem cells: a promising cancer vaccine[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2020, 16(6): 1049-1061. DOI: 10.1007/s12015-020-10042-5.
- [39] Dash BC, Korutla L, Vallabhajosyula P, et al. Unlocking the potential of induced pluripotent stem cells for wound healing: the next frontier of regenerative medicine[J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2022, 11(11): 622-638. DOI: 10.1089/wound.2021.0049.
- [40] Kobayashi H, Ebisawa K, Kambe M, et al. Effects of exosomes derived from the induced pluripotent stem cells on skin wound healing[J]. *Nagoya J Med Sci*, 2018, 80(2): 141-153. DOI: 10.18999/nagjms.80.2.141.
- [41] Lee MO, Moon SH, Jeong HC, et al. Inhibition of pluripotent stem cell-derived teratoma formation by small molecules[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013,110(35):E3281-3290. DOI: 10.1073/pnas.1303669110.
- [42] Ben-David U, Gan QF, Golan-Lev T, et al. Selective elimination of human pluripotent stem cells by an oleate synthesis inhibitor discovered in a high-throughput screen[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(2):167-179. DOI: 10.1016/j.stem.2012.11.015.
- [43] Doss MX, Sachinidis A. Current challenges of iPSC-based disease modeling and therapeutic implications[J]. *Cells*, 2019, 8(5):403. DOI: 10.3390/cells8050403.
- [44] Deuse T, Hu X, Gravina A, et al. Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(3):252-258. DOI: 10.1038/s41587-019-0016-3.
- [45] Azuma K, Yamanaka S. Recent policies that support clinical application of induced pluripotent stem cell-based regenerative therapies[J]. *Regenerative Therapy*, 2016, 4: 36-47. DOI: 10.1016/j.reth.2016.01.009.
- [46] Mahmood N, Suh TC, Ali KM, et al. Induced pluripotent stem cell-derived corneal cells: current status and application[J/OL]. *Stem Cell Rev Rep*, 2022, (2022-08-01)[2022-08-31]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35913555/>. DOI: 10.1007/s12015-022-10435-8. [published online ahead of print].

(收稿日期:2022-06-30)