

· 综述 ·

骨髓间充质干细胞促进糖尿病溃疡创面愈合的研究现状

郑淑娟 贾赤宇



Present status of research in bone marrow-derived mesenchymal stem cells for promoting the healing of diabetic ulcer
 ZHENG Shu-juan, JIA Chi-yu. Center of Plastic Surgery and Burns, the 309th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China
 Corresponding author: JIA Chi-yu, Email: 13911238533@163.com, Tel: 010-66775459

【Abstract】 The delayed healing of diabetic ulcer has been haunting the surgeons and researchers for a long time. Although we have been researching and exploring the effective therapies for many years, the progress has been limited. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) have gradually won worldwide attention for their characteristics of differentiating into tissue repair cells and secreting multiple cytokines as well as growth factors. In recent years, the role of BMSCs in the treatment of diabetic ulcer has been drawing more and more attention. This article reviewed the advancement in the research of BMSCs in promoting the healing of diabetic ulcer. Through a discussion of the treatment of diabetic ulcer, the related research in BMSCs, as well as its role in diabetic ulcer treatment, the mechanism of BMSCs in promoting healing of diabetic ulcers is discussed. We expect through further research, unified criteria for the quality of BMSCs, application approach and dosage of BMSCs could be established.

【Key words】 Bone marrow; Mesenchymal stem cells; Fibroblasts; Diabetic ulcer; Wound healing

【关键词】 骨髓; 间质干细胞; 成纤维细胞; 糖尿病溃疡; 创面愈合

糖尿病溃疡创面延迟愈合是长期困扰临床的难题,其治疗方式有限,手术虽然能解决部分问题,但疗效不稳定。部分患者受基础疾病的影响或经济条件的限制,难以承受手术。是否可通过非手术治疗来解决这一问题?有学者提出干细胞修复创面的理论,理由是骨髓间充质干细胞(BMSC)来源丰富、分离培养容易、增殖分化能力强^[1]。现将近年这方面

的研究进展综述如下。

1 BMSC 的概况

BMSC 来源于中胚层,有很强的自我复制和多向分化潜能,广泛存在于全身结缔组织和器官间质中。该细胞具有容易获得,便于体外增殖培养,免疫原性小、移植后反应较弱,不涉及伦理道德等特点,因而被认为是理想的种子细胞。研究证实,BMSC 可以分化为多种不同类型的细胞,包括 Fb、肌肉(骨骼肌和平滑肌)及神经细胞等^[2]。其分化为何种组织细胞与其所处微环境密切相关,最主要的决定因素是该环境中的细胞因子。受创面微环境的影响,BMSC 的表型可转变为 Fb 等,补充受损创面修复细胞的不足,从而加速创面愈合,提高愈合质量^[3]。

2 BMSC 与糖尿病溃疡

2.1 相关基础研究进展

2.1.1 复合间充质干细胞(MSC)的组织工程皮肤

组织工程皮肤即应用组织工程学的方法,将种子细胞与适当的支架相结合,在体外构建具有一定功能的皮肤替代物。利用皮肤干细胞的增殖分化特性制备人工皮肤是目前重要的研究方向^[4],表皮干细胞、BMSC、毛囊干细胞和脂肪干细胞等较受关注。有实验表明,MSC 复合胶原构建的组织工程皮肤替代物移植于创面后,能加速新生血管形成,促进创面修复,可用于皮肤缺损的修复治疗^[5]。与传统治疗方法相比,使用组织工程皮肤具有减少对供体组织的需求、对大面积急性创面实现快速覆盖、可作为传递外界生长因子的载体等优点。

2.1.2 BMSC 与创面愈合

有研究证实,BMSC 在体外条件下可以分化为内皮细胞,在体内可以形成毛细血管样结构;BMSC 局部应用于创面后,可分化为表皮细胞,从而促进创面愈合;绿色荧光蛋白标记的 BMSC 移植于创面后,可以分化为皮肤组织^[6-7]。Branski 等^[8]认为,胎儿和成人的干细胞可以长期自我更新,而且可分化为各种类型的组织;其来源丰富,比如骨髓、脐带血、外周血、脂肪组织、皮

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2012.04.019

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2012CB518104);全军医学科学技术研究“十二五”计划专项课题(BWS11C061);北京市自然科学基金(7123229、7122179)

作者单位:100091 北京,解放军总参谋部总医院整形美容烧伤修复中心

通信作者:贾赤宇,Email:13911238533@163.com,电话:010-66775459

肤和毛囊。他们提出应用基因与干细胞结合的方法治疗各种急、慢性创面行之有效。Ichioka 等^[9]利用大鼠微循环模型,观察由 BMSC 分化的胶原对创面愈合的作用,结果显示创面血管生成显著增多。

2.1.3 BMSC 的作用机制 BMSC 可促进创面愈合已被公认,但对其作用机制看法不一。目前被多数学者认同的机制有:(1)MSC 可分化为 Fb 和内皮祖细胞;(2)MSC 可分泌多种细胞因子,这些因子通过不同机制在创面愈合各阶段起着重要作用^[10]。蔡黔等^[11]的研究显示,采用同种异体 BMSC 治疗糖尿病足溃疡创面,在治疗早期(1~4 d)能显著提高局部血管内皮生长因子(VEGF)浓度,缩短创面愈合时间,提高表皮覆盖率;其促进创面愈合的机制可能是上调了 VEGF 在全身尤其是在局部的表达。Fathke 等^[12]报道,在 5-溴脱氧尿苷标记的小鼠模型中,远隔部位的 BMSC 可促进表皮尤其是皮肤损伤创面的 Fb 重建。Han 等^[13]的研究表明,应用 BMSC 治疗后,相对于创面局部 Fb 而言,局部胶原、成纤维细胞生长因子和 VEGF 增加更多,证实以 BMSC 治疗创面具有应用前景。

2.1.4 BMSC 的应用途径及剂量 目前 BMSC 的主要应用途径有:复合组织工程皮肤移植、静脉注射和局部应用。但关于其最佳应用途径及剂量尚未达成共识。Luo 等^[14]在用人脐带血 MSC 治疗大鼠皮肤损伤创面的研究中,局部外敷 2.5×10^6 个/mL 的 MSC,剂量为 $100 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 。有学者在 BMSC 对豚鼠深 II 度创面愈合影响的研究中,局部使用浓度分别为 2×10^6 、 2×10^7 个/mL 的 BMSC 外敷创面,创面愈合速度均加快;2 组在愈合速度及局部组织微血管密度方面比较,差异无统计学意义(P 值均大于 0.05)^[15]。另外有学者于糖尿病创面局部注射 1×10^9 个/L 的 BMSC,观察其向表皮分化的可能性,结果证实 BMSC 可分化为皮肤附属器^[16]。

2.1.5 BMSC 的安全性 BMSC 的低免疫原性及定向分化等特征,为其临床应用提供了可能性。目前研究尚未见不良反应出现,但其安全性仍需进一步验证。BMSC 的定向分化过程复杂,信号调节通路较多,在 BMSC 分化的不同时期,局部细胞因子调控着其定向分化程度和方向。董学君等^[17]观察到,在某些细胞因子、药物等作用下, BMSC 在形态和功能上可向成体细胞分化。程峰等^[18]证实,含 EGF、bFGF 的诱导培养基可诱导大鼠 BMSC 向神经细胞分化,分化的神经细胞在 3~5 d 时活力最强,凋亡较少。由此引发思索:应用 BMSC 治疗创面时

如何控制其生长状态及分化方向?若局部条件有所改变,是否会影响 BMSC 演变为所需要的细胞?由 BMSC 分化的细胞是否受其凋亡周期的变化而逐渐凋亡,形成新的创面?

2.1.6 同种 BMSC 与异种 BMSC 的异同点 目前研究中以同种异体 BMSC 的应用较多。杨俐敏^[19]报道,使用去细胞神经材料进行异种移植,未见明显免疫排斥反应,早期即有血管化迹象,与自体神经移植类似;使用同种异体 BMSC 作为种子细胞复合构建的组织工程化神经材料,尚无证据显示宿主出现免疫抑制或免疫排斥现象,宿主免疫应答状态与自体神经移植或自体干细胞移植时的免疫应答状态无明显差别。

2.2 相关临床研究进展

2.2.1 糖尿病治疗 Yusof 等^[20]的研究表明:糖尿病足患者皮肤的平均血管数、内皮细胞数及内皮细胞层数均高于非糖尿病足患者,这可能导致其产生溃疡。文献显示,由于糖尿病患者神经障碍、局部缺血和感染等因素的作用,糖尿病足部溃疡截肢率高达 38.1%~75.0%,早期用游离皮瓣修复可控制创面感染,降低截肢率,提高生活质量^[21]。

在非手术治疗方面,如前文所述,BMSC 可以促进糖尿病溃疡创面愈合,且具有向皮肤附属器及表皮分化的潜力。Pinilla 等^[22]通过调查研究糖尿病足的发病率与足部护理的关系,建议医疗队伍向患者提供相关培训,并进一步提高门诊诊疗及指导水平。Ulusal 等^[23]在应用封闭式负压吸引治疗糖尿病足的研究中观察到,治疗组患者平均住院时间较换药组明显缩短。Cheng 等^[24]证实骨髓干细胞与基质细胞衍生因子 1 联用可降低小鼠血糖水平,延长其生存时间,恢复血中胰岛素的水平。

2.2.2 关于糖尿病创面难愈的问题 有实验证实,高血糖所继发的糖基化终末产物蓄积可能是糖尿病创面难愈的一个重要原因^[25]。谷涌泉等^[26]介绍,在血管外科中,自体干细胞是治疗下肢缺血的方法之一,其适应证的选择必须严格,主髂动脉病变应是干细胞移植的禁忌证。有文献报道,来自糖尿病小鼠的 BMSC 表现出功能障碍,但机制不明确^[27]。作者通过广泛筛选炎症因子、细胞周期调节分子、ECM 分子和细胞黏附分子,探讨糖尿病小鼠 BMSC 功能障碍,结果显示糖尿病小鼠较正常小鼠 BMSC 表面的 c-kit 明显减少,且 BMSC 向内皮细胞分化能力降低,但其产生 VEGF 的能力无明显差异^[27]。陆树良等^[28]认为,在糖尿病皮肤中,发挥正常功能

活性的细胞因子较少,这可能是因为在高糖环境下,生长因子蛋白发生了糖基化改变。

基于以上研究,应考虑:BMSC 应用于糖尿病溃疡创面后是否能转化为有活性的 Fb 而促进创面愈合?如何影响 Fb 数目及活性的变化?这是值得研究的方向之一。

3 问题与展望

虽然目前对 BMSC 与糖尿病溃疡创面愈合关系的研究不乏其数,但尚存在不少悬而未决的问题。如:(1)BMSC 在动物糖尿病溃疡模型中可以促其愈合,但具体机制尚未阐明;(2)BMSC 在动物模型中应用较多,结论相对统一和明确,但在实际临床应用中疗效却不明显;(3)关于 BMSC 的质量标准尚未达成共识;(4)BMSC 的临床应用途径及剂量没有确定;(5)BMSC 的来源问题尚未得到真正解决,大多数是科研机构自产自销;(6)异体 BMSC 的免疫排斥、传染性疾病及伦理学等问题尚无明确结论;(7)相关多中心随机对照临床研究仍是空白。

然而在困难面前,我们更需积极应对。首先要探索 BMSC 在糖尿病溃疡创面愈合中的机制,同时对 BMSC 的质量、应用途径及剂量制订出统一的规范化标准。其次,在基础研究取得明确结论的基础上,应进行规范化、科学化的多中心随机对照临床研究,使基础与临床有机结合,把基础成果转化为临床实践,以期服务于临床、造福于人类。

参考文献

- [1] 付小兵, 盛志勇. 干细胞与烧伤创面修复. 中华烧伤杂志, 2008, 24(5):365-366.
- [2] 李强, 李维佳, 黄颖. 间充质干细胞在再生障碍性贫血治疗中的应用. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(6):1094-1097.
- [3] Fu X, Qu Z, Sheng Z. Potentiality of mesenchymal stem cells in regeneration of sweat glands. J Surg Res, 2006, 136(2):204-208.
- [4] 房瑞, 许零, 陈欣, 等. 组织工程皮肤支架材料和种子细胞的研究进展. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(47):9329-9333.
- [5] 刘德伍, 李国辉, 胡翔, 等. 骨髓间充质干细胞复合胶原构建组织工程皮肤修复皮肤缺损. 中国临床康复, 2005, 9(2):90-91, 插图 2-5.
- [6] McFarlin K, Gao X, Liu YB, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. Wound Repair Regen, 2006, 14(4):471-478.
- [7] Nakagawa H, Akita S, Fukui M, et al. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. Br J Dermatol, 2005, 153(1):29-36.
- [8] Branski LK, Gauglitz GG, Herndon DN, et al. A review of gene and stem cell therapy in cutaneous wound healing. Burns, 2009, 35(2):171-180.
- [9] Ichioka S, Kouraba S, Sekiya N, et al. Bone marrow-impregnated collagen matrix for wound healing: experimental evaluation in a microcirculatory model of angiogenesis, and clinical experience. Br J Plast Surg, 2005, 58(8):1124-1130.
- [10] Burdon TJ, Paul A, Noiseux N, et al. Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential. Bone Marrow Res, 2011, 2011:207326.
- [11] 蔡黔, 董方, 刘毅. 异体骨髓间充质干细胞治疗大鼠糖尿病足溃疡及血管内皮生长因子的表达. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(36):6733-6737.
- [12] Fathke C, Wilson L, Hutter J, et al. Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. Stem Cells, 2004, 22(5):812-822.
- [13] Han SK, Yoon TH, Lee DC, et al. Potential of human bone marrow stromal cells to accelerate wound healing in vitro. Ann Plast Surg, 2005, 55(4):414-419.
- [14] Luo C, Cheng W, He W, et al. Promotion of cutaneous wound healing by local application of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood. Wound Repair Regen, 2010, 18(5):506-513.
- [15] 呼和塔娜, 郭丽, 凌翎, 等. 骨髓间充质干细胞移植对豚鼠皮肤深 II 度烧伤的治疗作用. 中国康复理论与实践, 2005, 11(1):13-15.
- [16] 钟晓红, 王明刚, 赵李平, 等. 骨髓间充质干细胞在糖尿病模型创面中向表皮细胞分化的初步研究. 中国美容医学, 2010, 19(1):65-67.
- [17] 董学君, 孙荷, 张国荣, 等. 骨髓间充质干细胞的多向分化潜能研究进展. 中国细胞生物学学报, 2010, 32(1):49-55.
- [18] 程峰, 郝怀勇, 田和平, 等. 体外诱导骨髓间充质干细胞向神经细胞分化及凋亡的研究. 南京医科大学学报(自然科学版), 2010, 30(1):54-58.
- [19] 杨俐敏. 异种去细胞神经材料和异体 BMSCs 用于构建组织工程化神经修复神经缺损的相关实验研究. 广州:中山大学, 2010.
- [20] Yusof MI, Al-Astani AD, Jaafar H, et al. Morphometric analysis of skin microvasculature in the diabetic foot. Singapore Med J, 2008, 49(2):100-104.
- [21] 周捷, 黄晓元, 龙剑虹, 等. 47 例糖尿病足部溃疡外科治疗的临床研究. 中国现代医学杂志, 2010, 20(15):2353-2355, 2358.
- [22] Pinilla AE, Sánchez AL, Mejía A, et al. Primary-care prevention activities in outpatients suffering from diabetic foot care. Rev Salud Publica (Bogota), 2011, 13(2):262-273.
- [23] Ulusal AE, Sahin MS, Ulusal B, et al. Negative pressure wound therapy in patients with diabetic foot. Acta Orthop Traumatol Turc, 2011, 45(4):254-260.
- [24] Cheng H, Zhang YC, Wolfe S, et al. Combinatorial treatment of bone marrow stem cells and stromal cell-derived factor 1 improves glycemia and insulin production in diabetic mice. Mol Cell Endocrinol, 2011, 345(1/2):88-96.
- [25] 葛奎, 牛轶雯, 谢挺, 等. 糖基化终末产物对糖尿病大鼠烧伤创面愈合的影响. 中华烧伤杂志, 2009, 25(6):433-436.
- [26] 谷涌泉, 张建, 汪忠镐. 糖尿病足诊断与治疗的进展[J/CD]. 中华损伤与修复杂志:电子版, 2011, 6(4):503-508.
- [27] Li TS, Ikeda S, Kubo M, et al. Diabetic impairment of C-kit bone marrow stem cells involves the disorders of inflammatory factors, cell adhesion and extracellular matrix molecules [J/OL]. PLoS One, 2011, 6(10):E1[2011-09-21]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3184966/?tool=pubmed>. [published online ahead of print October 3, 2011].
- [28] 陆树良, 谢挺, 牛轶雯. 创面难愈机制研究——糖尿病皮肤的“微环境污染”. 中华烧伤杂志, 2008, 24(1):3-5.

(收稿日期:2011-09-21)

(本文编辑:罗勤)