糖尿病足

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001181

脂肪间充质干细胞移植治疗糖尿病足的研究进展

吴绮楠，陈　兵，梁自文
（第三军医大学第一附属医院内分泌科，重庆　400030）

【摘　要】糖尿病足是糖尿病的严重并发症之一，近年来的研究显示，脂肪间充质干细胞（adipose mesenchymal stem cells，A-MSCs）作为一种来源充足的干细胞，在糖尿病足治疗方面具有很大的潜力。我们总结了近年来 A-MSCs 应用于糖尿病足的研究进展，并提出了其可能的机制及展望。

【关键词】糖尿病足；脂肪源间充质干细胞；治疗
【中图分类号】R586.9　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-07-26

Progress of adipose mesenchymal stem cells transplantation in the treatment of diabetic foot

Wu Qinan, Chen Bing, Liang Ziwen
(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of the Third Military Medical University*)

【Abstract】Diabetic foot is one of the serious complications of diabetes. Adipose mesenchymal stem cells are an abundant source of stem cells, and emerging results suggested that adipose mesenchymal stem cells play essential roles in the treatment of diabetic foot. Here we discuss the advance of adipose mesenchymal stem cells in diabetic foot. Roles and functional mechanisms of adipose mesenchymal stem cells in diabetic foot are summarized, and insights into current and future studies are presented.

【Key words】diabetic foot; adipose mesenchymal stem cells; treatment

随着人们生活、饮食方式的转变，糖尿病发病率一再上升。其中，由于糖尿病下肢血管病变、周围神经病变和（或）感染等原因所导致的糖尿病足（diabetic foot，DF）是糖尿病最严重的并发症和非外伤性截肢的主要原因。据统计，糖尿病患者发生严重下肢缺血性疾病而不得不截肢的发生概率是非糖尿病患者的 40 倍，约 85%的截肢为糖尿病患者，约 15%的糖尿病患者一生中会出现糖尿病足溃疡，其治疗费用占糖尿病治疗总费用的 22%，其致残、致死率较高[1]。常规疗法如药物、高压氧疗、激光、超声刀清创治疗，由于没有从根本上改变糖尿病足血管病变的病理基础，故疗效不佳。近年来，血管介入技术的开展给单一的局部缺血性疾病带来了新的希望。主要方法有动脉内溶栓、球囊扩张、支架置入、内膜下血管成形术等，具有微创性、见效快、疗效好、长期随访稳定等优点，目前已广泛应用于临床治疗心脑血管疾病和单纯的下肢血管病变。虽然下肢血管介入手术也可用于糖尿病足下肢血管病变的治疗，但单纯的下肢血管介入治疗只能暂时性地开通局部血管，对下肢循环的重建作用有限，不适用于 DF 弥漫的大中小微血管和神经病变，长期随访再狭窄率和周围循环恢复情况不佳，再截肢率居高不下。因此，DF 正成为威胁人类健康的世界性公共卫生问题[1]。

1　干细胞移植治疗 DF 的应用

近年来，干细胞移植治疗 DF 的研究已日趋广泛。2002年有学者最早使用干细胞移植治疗下肢缺血性疾病，取得了良好效果。目前认为其机制是干细胞在一定条件下可在体内分化为血管内皮细胞（vascular endothelial cell，VEC）和平滑肌细胞（smooth muscle cell，SMC）并分泌大量促血管生成因子，

作者介绍：吴绮楠，Email：wqn11@163.com，
研究方向：糖尿病及其慢性并发症的防治。
通信作者：梁自文，博士后，副教授，现任第三军医大学西南医院内分泌科主任。重庆市中西医结合内分泌专委会副主任委员、常务秘书。从事内分泌临床工作十余年，获得国家自然科学基金等国家级科研项目 3 项，国家烧伤、创伤及复合伤重点实验室开放课题 1 项。在国内外专业期刊发表论文 28 篇，参加编写《实用糖尿病学》专著 1 部。具有丰富的临床经验，在糖尿病、骨质疏松症诊治方面有丰富临床经验和科研能力，尤其擅长治疗糖尿病足。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81670711）；西南医院百项临床新技术计划技术提升型一般资助项目（编号：SWH2016JSTSYB-11）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170313.1122.069.html（2017-03-13）

将干细胞移植到缺血下肢，使其逐渐分化并形成新生毛细血管，参与缺血局部的代偿性血管重建，改善和恢复下肢血流[2]。

目前，用于移植的干细胞主要来源是骨髓、外周血及脐血、脂肪等，根据其培养获取方式的不同分为单个核细胞（mononuclear cells，MNCs）、内皮祖细胞（endothelial progenitor cells，EPCs）和间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）。其中，来源于早期中胚层和外胚层的 MSCs 是研究最多的干细胞之一，尤其是在组织损伤和修复方面。MSCs 主要存在于骨髓、脂肪组织、软骨及骨组织、脐带血和胎盘中。MSCs 在形态上呈纺锤形，根据国际细胞治疗学会的标准，MSCs 具有以下特征：①贴壁生长。②具有以下表型：>95%的细胞表达 CD105、CD73 和 CD90，绝大多数不表达 CD45、CD34、CD14、CD11b、CD79a 和 CD19 等，也不表达 MHCII 类分子如HLA2DR 抗原等。③具有分化为成骨细胞、成软骨细胞、成脂肪细胞 3 类细胞的潜能[3-7]。此外，近年的研究还发现，MSCs 还具有免疫调节作用，可抑制免疫细胞增殖及抗炎症等作用[8]。本文就目前主要应用的脂肪间充质干细胞（adipose mesenchymal stem cells，A-MSCs）移植治疗 DF 的研究进展进行综述。

2 A-MSCs 移植治疗糖尿病周围血管病变

糖尿病与周围血管病变（peripheral artery disease，PAD）密切相关，是周围血管病变的独立危险因素。美国约有 80 万糖尿病患者合并周围血管病变，中国 50 岁以上的糖尿病患者合并周围血管病变的概率为 6.9%~23.8%，严重肢体缺血的糖尿病患者预后极差，5 年生存率仅为 50%，截肢后的总死亡率为 25%~50%。因此，对于糖尿病合并 PAD 的患者来说，保肢意义重大[1]。尽管目前外科技术和介入技术不断发展，仍有 40%的患者不符合外周血管介入和手术的适应证，且药物治疗效果不好，称为无治疗选择的患者，对于这部分患者来说，干细胞治疗显示出其独特的优势。

Zuk 等[9]首次从人脂肪组织中分离出脂肪干细胞（adipose-derived stem cells，ASCs），由于其与骨髓间充质干细胞形态相似，故又称为 A-MSCs，此后多个研究团队也先后分离获得 A-MSCs。由于脂肪组织具有来源广泛、易于大量获取的优点，据统计，每毫升脂肪组织能提取大约 40 万个脂肪干细胞，每克脂肪组织能产生 200 000~290 000 个干细胞，在细胞获得率、老化、转染和粘附特性等方面与骨髓间充质干细胞无显著差异。因此，A-MSCs 成为另一有希望的干细胞来源[10-12]。

A-MSCs 目前已被广泛应用于多种疾病的基础和临床研究。在欧洲，慢性心衰和急性心梗的 A-MSCs 治疗已进入临床试验阶段[10]。还有学者利用 A-MSCs 作为药物细胞载体，成功抑制小鼠黑色素瘤的生长[11]。A-MSCs 用于 DF 治疗的机制如下：①具有分化为内皮细胞及上皮细胞的能力，从而改善伤口局部血供，重建微循环[9,13-14]。②可加速 DF 创面的再血管化进程，分泌各类细胞因子促进修复细胞的增殖、迁移，促进创面愈合。进一步研究显示，A-MSCs 分泌的血管生成因子除了可以诱导组织再生，还参与细胞的免疫调节过程，在慢性伤口愈合中发挥的作用更为明显[13-15]。

有研究证实移植 A-MSCs 可分化为内皮细胞，显著改善糖尿病和非糖尿病下肢缺血动物模型的血流和毛细血管密度[16-17]，在裸鼠下肢缺血模型中，移植 A-MSCs 通过分泌血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）和Von Willibrand 因子，促进内皮细胞增生，减少内皮细胞凋亡，促进局部微循环重建[18-19]。Madonna 等[20]发现，结扎了下肢血管的糖尿病下肢缺血大鼠中移植 A-MSCs 可显示增加横纹肌肌动蛋白、血管内皮生长因子和肝细胞生长因子的表达，磁共振成像（magnetic resonance imaging，MRI）血管造影提示血管密度显著增加，血供明显改善。Jiang 等[21]对体外模拟糖尿病环境中的 A-MSCs 过表达 PGC-1α 后发现，这种方法能减少高糖低氧所致的线粒体活性氧增多，降低干细胞凋亡率，这也许可以提高移植效率。Gálvez-Martí 及其同事为 A-MSCs 的保存体系提出了要求：-4 ℃，20%白蛋白，5%葡萄糖的乳酸林格氏液体系中不超过 48 h[22]。此外，三维培养技术也可促进 A-MSCs 的肝细胞生长因子分泌，可能提高移植效率[23]。

Lee 及其同事发现[24]，虽然糖尿病患者的自体 A-MSCs 增殖能力较正常人有所下降，但经过多点肌内注射移植自体 A-MSCs随访 6 个月后，约 2/3 糖尿病下肢缺血的患者得到临床缓解（包括静息疼痛和步行距离），血管造影提示侧支循环显著增加。另一项针对那些无法行血管重建手术的非糖尿病下肢缺血人群中的研究也显示 A-MSCs 移植可显著改善下肢经皮氧分压，促进局部溃疡的愈合，证明该疗法在非糖尿病下肢缺血患者中也同样适用[25]。

A-MSCs 目前主要集中在基础研究领域，注册人体的临床试验绝大部分试验仍在进行中，结果尚未揭晓。目前认为，A-MSCs 研究主要面临以下 3 个方面的问题：①未发现其特异性的细胞标志，这是 A-MSCs 分离鉴定和提纯所面临的最大问题。②A-MSCs 在体外培养的情况与其在动物模型中是否一致需要进一步研究。③在人体研究中，有报道称来源于糖尿病下肢血管缺血患者自体 A-MSCs 移植后出现了 2 例血栓栓塞事件的发生（NCT01257776），而在非糖尿病下肢血管缺血人群中移植自体 A-MSCs 没有出现（NCT01745744），这可能与糖尿病患者的自体 A-MSCs 纤溶活性降低有关，尽管在另一项糖尿病下肢血管缺血患者的自体骨髓单个核细胞移植中没有类似情况发生（NCT00872326），这也提示在糖尿病患者中进行间充质干细胞移植需要防止血栓方面的安全性问题[26]。

尽管如此，随着科学技术的进一步发展，A-MSCs 的研究会更加深入，其参与 DF 康复的机制将成为研究热点，这将为 A-MSCs 应用于 DF 的临床治疗提供前提与保障。

3 A-MSCs 移植与糖尿病溃疡

创伤愈合是一个复杂的过程，包括 4 个相互重叠的阶段：凝血、炎症、迁移、增殖和重塑。糖尿病性伤口愈合不良是一个重要的问题，伤口的形成与周围血管疾病、创伤、感染和神经病变这些复杂并发症有关，因此需要多学科合作[27]。合适的伤口管理需要根据伤口产生原因，采取如清创、足够的

减压、抗感染治疗、高压氧治疗、血运重建旁路手术和局部敷料等措施[28]。然而，这些治疗方法对于糖尿病性溃疡效果并不好[29]。因此，临床上迫切需要寻找一些更实用的疗法。

A-MSCs 作为干细胞又一丰富且风险低的来源，自然受到移植再生学界的重视。研究显示，糖尿病小鼠在移植 A-MSCs 后溃疡愈合显著改善，虽然局部的血管密度和长度未增加，但抑制了纤维组织的增生[30]。另一项动物实验也证实 A-MSCs 有助于糖尿病小鼠皮肤溃疡的愈合[31]，还有研究显示将提取的 A-MSCs 制成可注射的微粒化脂肪细胞基质可有效改善糖尿病皮肤溃疡的小鼠伤口愈合，为缺血性糖尿病溃疡愈合提供了一种简单、安全、微创的组织修复方法[32]。一项针对那些无法行血管重建手术的非糖尿病下肢缺血人群中的研究也显示 A-MSCs 移植可显著改善下肢经皮氧分压，促进局部溃疡愈合，证明该疗法在非糖尿病下肢缺血患者中同样适用[25]。

综上所述，正常创伤愈合是一个复杂的过程，包括血管的闭合，血块的凝固，急性炎症反应，细胞迁移、增殖、分化，血管生成，上皮形成和细胞外基质的合成及重建等[33]。虽然 A-MSCs 来源广泛，提取方法较为方便，但目前应用于糖尿病溃疡的基础和临床研究较少，其机制和安全性并不清楚，尚需进一步探索研究。

4 A-MSCs 移植与糖尿病周围神经病变

糖尿病周围神经病变是一种常见的糖尿病并发症，高血糖高血脂等代谢紊乱造成不断增加的氧化应激，内皮功能不全，导致微血管缺血及神经营养障碍是其病理生理基础。虽然控制血糖，抑制醛糖还原酶和 α 硫辛酸有一定疗效，但对于该病的进展尚无成熟的疗法[34]。

A-MSCs 较其他细胞来源有显著的优势：①微创手术取材；②位于成熟的间充质；③不需要体外培养；④免疫原性小；⑤商业化程度高，可方便购买。由于没有体外培养的步骤，染色体畸变的危险就可消除。A-MSCs 已用于多种疾病的治疗[35]，其机制包括归巢于目标细胞、释放神经营养因子（表皮生长因子、转化生长因子 β、VEGF、bFGF、HGF、IGF-1、BDGF），而其中很多因子在糖尿病周围神经病变表现为缺乏。此外，还有免疫调节功能，这点与其他干细胞类似[36]。一项临床队列研究显示，自体移植 A-MSCs 可改善糖尿病下肢缺血患者的周围神经病变[24]，虽然也有研究显示糖尿病慢性缺血性并发症的患者自体脂肪干细胞较正常人活力和分化能力有所下降，并不是理想的干细胞来源[37-38]，但需要进一步的动物实验和临床研究证实。

5 如何提高移植干细胞的移植效率和治疗效果

为了提高干细胞移植的治疗效果，必须保证有活力的干细胞能直接作用于病变的局部，在实际操作中，有时干细胞可能未能到达病变位置，有时干细胞可能被慢性炎症杀灭，也有研究发现糖尿病的自体干细胞增殖效率、促进新生血管形成的能力和伤口的愈合程度有所下降[39]。因此，明确哪些因素影响糖尿病自体干细胞移植效率及对糖尿病自体干细胞进行预处理以提高其移植效率是必要的[40]。

Meng 等[41]发现，在敲除 osteopontin 基因的糖尿病溃疡小鼠中移植骨髓间充质干细胞（bone marrow mesenchymal stem cells，BMMSCs）可显著缩短愈合时间，说明 osteopontin 是 BMMSCs 移植治疗糖尿病溃疡的关键调节因素；Li 等[42]发现一种 BMMSCs 的条件培养基可通过降低局部活性氧的生成和降低 MEK1/2 和 Erk1/2 的磷酸化促进糖尿病溃疡的愈合；通过乙醇提取的卡马拉树皮提取物可提高间充质干细胞（mesenchymal stem cell，MSC）的增殖，改善移植效率。当然，BMMSCs 移植联合自体血小板凝胶也可大大提高伤口愈合的效率[43]，但该经验是否可用于脂肪干细胞尚有待探索。Liu 等[44]在 BMMSCs 中过表达 PGC-1α 可减少移植细胞凋亡，提高移植后溃疡的愈合效率，Jiang 等[21]在 A-MSCs 中的移植试验也证明了类似的效应。此外，一种化合物 14S，21R-dihydroxydocosa-4Z，7Z，10Z，12E，16Z，19Z-hexaenoic 酸（14S，21R-diHDHA）与 BMMSCs 共同移植可进一步提高伤口局部VEGF 的分泌，促进糖尿病小鼠伤口局部微循环的重建和伤口的愈合[45]，但 A-MSCs 是否会有类似效应还需要进一步研究。过表达EGF 也可提高 ICAM-1、VCAM-1 介导的粘附反应和 Akt 信号途径的激活，促进血管的生成和局部循环的重建，达到更好的伤口愈合效果[46]。还有学者通过缺氧预处理提高 BMMSCs 的存活率，通过增加自噬促进血管生成，并显著降低细胞凋亡[47]。在另一项研究中，研究者对比了来自同一个捐献者原代提取的 A-MSCs 和体外缺氧环境中去分化的 A-MSCs，发现两者在表面标志上基本一致，但经过缺氧处理去分化的干细胞中端粒酶活性有所增高，分化为脂肪细胞和成骨细胞的能力更强，细胞衰老的现象明显减少。一方面，说明缺氧预处理提高其增殖分化能力[48]；另一方面，多种细胞可通过转入端粒酶活性亚单位 h-TERT 使之实现永生化。因此，端粒-端粒酶系统也可能在提高干细胞移植效率中扮演重要角色[49]。局部红外线照射也可提高间充质干细胞的增殖分化[50]。最近还有研究发现，在小鼠中使用唑来膦酸注射液后可抑制 mTOR 信号途径，减轻外界条件对于 DNA 的损伤，降低 BMMSCs 的凋亡[51]。

另外，尽管目前间充质干细胞移植治疗 DF 在临床上取得了一定的成功，但优化细胞治疗平台仍然非常重要，间充质干细胞具有很大的组织工程潜力，如何使之产生更好更大的移植效率一直是人们不断探索的目标，仿生基质和支架的产生可为移植间充质干细胞提供一个附着、增殖、分化的结构基础，局部运用丝素蛋白支架也可增加内皮细胞的迁移能力，增加血管生成素的分泌，提高 A-MSCs 治疗糖尿病小鼠皮肤溃疡的愈合速度[52]。此外，还有很多在其他疾病中使用的支架可供参考[53-56]。

干细胞运输系统也非常重要。一个完美的干细胞运输系统可为伤口局部的干细胞提供粘附、增殖、分化的环境，水凝胶是最常用的系统之一，其三维不溶性网状结构可保持局部的水分和生活活性[57]。聚乙二醇（polyethylene glycol，PEG）水凝胶可为干细胞的粘附、增殖、分化提供支架[58]。PEG 水凝胶可很好地维持干细胞表型[59]。多聚普鲁士蓝凝胶可抗活性氧

的产生，减少移植干细胞的凋亡[60]。由于纤维蛋白具有良好的生物相容性，可生物降解，在伤口愈合过程中必不可少，因此，开发了许多以纤维蛋白为基础的细胞注射输送系统。有研究发现，纤维蛋白细胞传递的效率和干细胞的增殖取决于纤维蛋白原和凝血酶溶液的浓度。因此，必须对这些因素考虑周全[61]。Bensaïd 等[62]报道，活性纤维蛋白原和凝血酶的纤维蛋白支架可让 MSCs 良好地增殖和迁移。由纤维蛋白原-凝血酶制成的生物蛋白胶联合血小板衍生生长因子可有效促进间充质干细胞移植的治疗效果[63]。有研究显示，分别运用一种胶原支架[64]和一种纤维蛋白喷雾系统可提高骨髓间充质干细胞移植的效率，显著改善糖尿病小鼠溃疡的愈合[65]。另有研究证实，骨髓间充质干细胞溃疡局部注射移植并覆盖自体皮肤胶原膜，可显著提高糖尿病患者皮肤溃疡的愈合速度[66]，但 A-MSCs 是否会有类似效应还需进一步研究。将 A-MSCs 富集于含胶原基质的硅膜上可进一步提高糖尿病小鼠皮肤溃疡的愈合效率[67]。Jiang 等[68]发明了一种等离子聚合丙烯酸涂层的薄膜载体用于传递 A-MSCs 到伤口局部，显示其可显著下调肿瘤坏死因子 α 所依赖的炎症反应，增加抗炎的 M2 巨噬细胞，诱导转化生长因子 β 所依赖的血管生成、成纤维细胞分化和肉眼组织的形成，提高组织的修复效率。此外，三维培养技术也可使 A-MSCs 的肝细胞生长因子分泌，可能提高移植效率[69]。

细胞外基质是真皮层最主要的组成成分，在伤口愈合中占有重要地位，其微环境决定了干细胞分化的谱系[70]。因此，利用模拟的细胞外基质培养和移植间充质干细胞是一种可行的提高移植效率的方法。Kim 等通过一种胶原纤维支架建立的三维培养方式可有效激活间充质干细胞中 VEGF 和MMP9 的表达，缩短伤口愈合时间，其中胶原纤维就是细胞外基质的主要成分，可促进干细胞的增殖分化[71-72]。还有学者也通过将纤维连接蛋白附着在多聚乳酸-乙醇酸薄膜上，用以控制间充质干细胞的形态[73]。PEG 材料具有良好的吸水性、无免疫原性、多孔且交联密度可控，被认为是运送储存间充质干细胞最好的材料[74]。但利用合成材料运送间充质干细胞最大的局限在于细胞与之接触可能会诱发凋亡，从而造成细胞数量的不足[75-77]。在间充质干细胞与细胞外基质的接触中，整合素在调控间充质干细胞的凋亡和迁移中占有重要地位[77]。此外，合成材料使用后的降解也是一个问题，学者们将粘附成分制成网状结构，可以提高伤口愈合的速度。

综合以上研究成果，对某些特殊的基因进行调控，采用多种方法不断优化和完善干细胞的支持和输送系统，以及利用模拟的细胞外基质培养和移植间充质干细胞可以提高干细胞的数量、质量和移植成功率。但到目前为止，这些研究中仅有少量使用 A-MSCs 作为目的细胞，大多使用非 A-MSCs，其使用经验是否能在 A-MSCs 中得到验证，尚需进一步研究。

6 小结与展望

综上所述，A-MSCs 通过其高度增殖、自我更新和多向分化潜能，移植后能分化为多种细胞参与组织修复；可作用于免疫系统，调节 T 细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞及树突状细胞的免疫应答，抗感染，调节炎症反应；并通过自分泌及旁分泌机制分泌血管生成因子、细胞因子及神经营养因子，促进血管新生，恢复局部组织血流，修复神经病变；还能通过以上效应修复胰岛细胞功能，维持血糖的平衡[69]。

诚然，A-MSCs 移植治疗糖尿病足实验开展时间较短，还存在以下问题：①更大数量 A-MSCs 的富集和检测鉴定方法还需要进一步探索。②提高 A-MSCs 的纯度也是移植面临的重大问题。③移植到动物体内的 A-MSCs 如何鉴定其存活率、有效率及远期疗效尚需进一步探索。④远期的各种不良事件及致瘤性还需要更多研究。⑤A-MSCs 治疗 DF 的具体机制还需要进一步研究。相信随着动物实验和临床研究的深入，以上这些问题会逐渐得到解决。

参 考 文 献

[1] Muhs BE, Gagne P, Sheehan P. Peripheral arterial disease: clinical assessment and indications for revascularization in the patient with diabetes[J]. Curr Diab Rep, 2005, 5(1): 24-29.

[2] 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[J]. Lancet, 2002, 360(9331): 427-435.

[3] Subramaniyam V, Waller EK, Murrow JR, et al. Bone marrow mobilization with granulocyte macrophage colony-stimulating factor improves endothelial dysfunction and exercise capacity in patients with peripheral arterial disease[J]. Am Heart J, 2009, 158(1): 53-60.

[4] Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation[J]. Exp Cell Res, 2005, 306(2): 330-335.

[5] Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, et al. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential[J]. Cytotherapy, 2004, 6(4): 372-379.

[6] Alborzi A, Mac K, Glackin CA, et al. Endochondral and intramembranous fetal bone development: osteoblastic cell proliferation, and expression of alkaline phosphatase, m-twist, and histone H4[J]. J Craniofac Genet Dev Biol, 1996, 16(2): 94-106.

[7] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317.

[8] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells[J]. Eur J Immunol, 2006, 36(10): 2566-2573.

[9] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. Tissue Eng, 2001, 7(2): 211-228.

[10] Chen FH, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(5): 223.

[11] Yamanaka S, Takahashi K. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures[J]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2006, 51(15): 2346-2351.

[12] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs[J]. Exp Hematol, 1976, 4(5): 267-274.

[13] Caplan AI. Mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 1991, 9(5): 641-650.

[14] Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead[J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(11): 1783-1787.

[15] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(12): 4279-4295.

[16] Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells[J]. Circulation, 2004, 110(3): 349-355.

[17] Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives[J]. Circulation, 2004, 109(5): 656-663.

[18] Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells[J]. Circulation, 2004, 109(10): 1292-1298.

[19] Moon MH, Kim SY, Kim YJ, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia[J]. Cell Physiol Biochem, 2006, 17(5-6): 279-290.

[20] Madonna R, Delli Pizzi S, Tartaro A, et al. Transplantation of mesenchymal cells improves peripheral limb ischemia in diabetic rats [J]. Mol Biotechnol, 2014, 56(5): 438-448.

[21] Jiang XY, Lu DB, Jiang YZ, et al. PGC-1α prevents apoptosis in adipose-derived stem cells by reducing reactive oxygen species production in a diabetic microenvironment[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2013, 100(3): 368-375.

[22] Gálvez-Martín P, Hmadcha A, Soria B, et al. Study of the stability of packaging and storage conditions of human mesenchymal stem cell for intra-arterial clinical application in patient with critical limb ischemia[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2014, 86(3): 459-468.

[23] Mineda K, Feng J, Ishimine H, et al. Therapeutic potential of human adipose-derived stem/stromal cell microspheroids prepared by three-dimensional culture in non-cross-linked hyaluronic acid gel[J]. Stem Cells Transl Med, 2015, 4(12): 1511-1522.

[24] Lee HC, An SG, Lee HW, et al. Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study[J]. Circ J, 2012, 76(7): 1750-1760.

[25] Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, et al. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia[J]. Cytotherapy, 2014, 16(2): 245-257.

[26] Acosta L, Hmadcha A, Escacena N, et al. Adipose mesenchymal stromal cells isolated from type 2 diabetic patients display reduced fibrinolytic activity[J]. Diabetes, 2013, 62(12): 4266-4269.

[27] Apelqvist J, Bakker K, Van Houtum WH, et al. International working group on the diabetic foot (IWGDF) editorial board. Practical guidelines on the management and prevention of the diabetic foot: based upon the International Consensus on the diabetic foot (2007) prepared by the International Working Group on the diabetic foot[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2008, 24(s1): 181-187.

[28] Frykberg RG, Zgonis T, Armstrong DG, et al. Diabetic foot disorders. A clinical practice guideline (2006 revision)[J]. J Foot Ankle Surg, 2006, 45(s5): 1-66.

[29] Aulivola B, Hile CN, Hamdan AD, et al. Major lower extremity amputation: outcome of a modern series[J]. Arch of Surg, 2004(139): 395-399.

[30] Maharlooei MK, Bagheri M, Solhjou Z, et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 93(2): 228-234.

[31] Kim SW, Zhang HZ, Guo L, et al. Amniotic mesenchymal stem cells enhance wound healing in diabetic NOD/SCID mice through high angiogenic and engraftment capabilities[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41105.

[32] Feng J, Doi K, Kuno S, et al. Micronized cellular adipose matrix as a therapeutic injectable for diabetic ulcer[J]. Regen Med, 2015, 10(6): 699-708.

[33] Maxson S, Lopez EA, Yoo D, et al. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair[J]. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(2): 142-149.

[34] Martin CL, Albers J, Herman WH, et al. Neuropathy among the diabetes control and complications trial cohort 8 years after trial completion[J]. Diabetes Care, 2006, 29(2): 340-344.

[35] Tobita M, Orbay H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives[J]. Discov Med, 2011, 11(57): 160-170.

[36] Mizukami H, Yagihashi S. Exploring a new therapy for diabetic polyneuropathy-the application of stem cell transplantation[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2014, 5: 45.

[37] Kočí Z, Turnovcová K, Dubsk M, et al. Characterization of human adipose tissue-derived stromal cells isolated from diabetic patient's distal limbs with critical ischemia[J]. Cell Biochem Funct, 2014, 32(7): 597-604.

[38] Xia N, Xu JM, Zhao N, et al. Human mesenchymal stem cells improve the neurodegeneration of femoral nerve in a diabetic foot ulceration rats[J]. Neurosci Lett, 2015(597): 84-89.

[39] Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes[J]. J Clin Invest, 2007, 117(5): 1219-1222.

[40] Rennert RC, Sorkin M, Januszyk M, et al. Diabetes impairs the angiogenic potential of adipose-derived stem cells by selectively depleting cellular subpopulations[J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(3): 79.

[41] Meng H, Wang Z, Wang W, et al. Effect of osteopontin in regulating bone marrow mesenchymal stem cell treatment of skin wounds in diabetic mice[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2014, 30(6): 457-466.

[42] Li M, Zhao Y, Hao H, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium improves the proliferation and migration of keratinocytes in a diabetes-like microenvironment[J]. Int J Low Extrem Wounds, 2015, 14(1): 73-86.

[43] Argôlo Neto NM, Del Carlo RJ, Monteiro BS, et al. Role of autologous mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma on healing of cutaneous wounds in diabetic mice[J]. Clin Exp Dermatol, 2012, 37(5): 544-553.

[44] Lu D, Zhang L, Wang H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α (PGC-1α) enhances engraftment and angiogenesis of mesenchymal stem cells in diabetic hindlimb ischemia[J]. Diabetes, 2012, 61(5): 1153-1159.

[45] Tian H, Lu Y, Shah SP, et al. 14S, 21R-dihydroxydocosahexaenoic acid remedies impaired healing and mesenchymal stem cell functions in diabetic wounds[J]. J Biol Chem, 2011, 286(6): 4443-4453.

[46] 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[J]. Lab Invest, 2010, 90(7): 985-996.

[47] Hou C, Shen L, Huang Q, et al. The effect of heme oxygenase-1 complexed with collagen on MSC performance in the treatment of diabetic ischemic ulcer[J]. Biomaterials, 2013, 34(1): 112-120.

[48] Watson JE, Patel NA, Carter G, et al. Comparison of markers and functional attributes of human adipose-derived stem cells and dedifferentiated adipocyte cells from subcutaneous fat of an obese diabetic donor[J]. Adv Wound Care(New Rochelle), 2014, 3(3): 219-228.

[49] Qi Nan W, Ling Z, Bing C. The influence of the telomere-telomerase system on diabetes mellitus and its vascular complications[J]. Expert Opin Ther Targets, 2015, 19(6): 849-864.

[50] François S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage [J]. Stem Cells, 2006, 24(4): 1020-1029.

[51] Misra J, Mohanty ST, Madan S, et al. Zoledronate attenuates accumulation of DNA damage in mesenchymal stem cells and protects their function[J]. Stem Cells, 2016, 34(3): 756-767.

[52] Navone SE, Pascucci L, Dossena M, et al. Decellularized silk fibroin scaffold primed with adipose mesenchymal stromal cells improves wound healing in diabetic mice[J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(1): 7.

[53] Yu HS, Won JE, Jin GZ, et al. Construction of mesenchymal stem cell-containing collagen gel with a macrochanneled polycaprolactone scaffold and the flow perfusion culturing for bone tissue engineering[J]. Biores Open Access, 2012, 1(3): 124-136.

[54] Trombi L, D'Alessandro D, Pacini S, et al. Good manufacturing practice-grade fibrin gel is useful as a scaffold for human mesenchymal stromal cells and supports in vitro osteogenic differentiation[J]. Transfusion, 2008, 48(10): 2246-2251.

[55] Neuss S, Stainforth R, Salber J, et al. Long-term survival and bipotent terminal differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC) in combination with a commercially available three-dimensional collagen scaffold[J]. Cell Transplant, 2008, 17(8): 977-986.

[56] Zhong W, Zhang W, Wang S, et al. Regulation of fibrochondrogenesis of mesenchymal stem cells in an integrated microfluidic platform embedded with biomimetic nanofibrous scaffolds[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61283.

[57] Peppas NA, Bures P, Leobandung W, et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2000, 50(1): 27-46.

[58] Benoit DS, Schwartz MP, Durney AR, et al. Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells[J]. Nat Mater, 2008, 7(10): 816-823.

[59] Tibbitt MW, Kloxin AM, Dyamenahalli KU, et al. Controlled two-photon photodegradation of PEG hydrogels to study and manipulate subcellular interactions on soft materials[J]. Soft Matter, 2010, 6(20): 5100-5108.

[60] Wong VW, Rustad KC, Glotzbach JP, et al. Pullulan hydrogels improve mesenchymal stem cell delivery into high-oxidative-stress wounds[J]. Macromol Biosci, 2011, 11(11): 1458-1466.

[61] Ho W, Tawil B, Dunn JC, et al. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure[J]. Tissue Eng, 2006, 12(6): 1587-1595.

[62] Bensaïd W, Triffitt JT, Blanchat C, et al. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation[J]. Biomaterials, 2003, 24(14): 2497-2502.

[63] Mogford JE, Tawil B, Jia S, et al. Fibrin sealant combined with fibroblasts and platelet-derived growth factor enhance wound healing in excisional wounds[J]. Wound Repair Regen, 2009, 17(3): 405-410.

[64] 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[J]. Diabetes, 2013, 62(7): 2588-2594.

[65] Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, et al. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds[J]. Tissue Eng, 2007, 13(6): 1299-1312.

[66] Vojtassák J, Danisovic L, Kubes M, et al. Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot[J]. Neuro Endocrinol Lett, 2006, 27(s2): 134-137.

[67] Nambu M, Kishimoto S, Nakamura S, et al. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix[J]. Ann Plast Surg, 2009, 62(3): 317-321.

[68] Jiang D, Qi Y, Walker NG, et al. The effect of adipose tissue derived MSCs delivered by a chemically defined carrier on full-thickness cutaneous wound healing[J]. Biomaterials, 2013, 34(10): 2501-2515.

[69] Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, et al. Concise review: mesenchymal stem cell treatment of the complications of diabetes mellitus[J]. Stem Cells, 2011, 29(1): 5-10.

[70] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification[J]. Cell, 2006, 126(4): 677-689.

[71] Kumar V, Abbas AK, Fausto N, et al. Robbins and cotran pathologic basis of disease[M]. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010.

[72] Wang F, Li Z, Khan M, et al. Injectable, rapid gelling and highly flexible hydrogel composites as growth factor and cell carriers[J]. Acta Biomater, 2010, 6(6): 1978-1991.

[73] Tay CY, Yu H, Pal M, et al. Micropatterned matrix directs differentiation of human mesenchymal stem cells towards myocardial lineage [J]. Exp Cell Res, 2010, 316(7): 1159-1168.

[74] Fisher OZ, Khademhosseini A, Langer R, et al. Bioinspired materials for controlling stem cell fate[J]. Acc Chem Res, 2010, 43(3): 419-428.

[75] Karoubi G, Ormiston ML, Stewart DJ, et al. Single-cell hydrogel encapsulation for enhanced survival of human marrow stromal cells[J]. Biomaterials, 2009, 30(29): 5445-5455.

[76] Nuttelman CR, Tripodi MC, Anseth KS. In vitro osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells photoencapsulated in PEG hydrogels[J]. J Biomed Mater Res A, 2004, 68(4): 773-782.

[77] Stupack DG, Cheresh DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt19): 3729-3738.

（责任编辑：唐秋姗）