

再生医学在糖尿病下肢动脉病变的研究进展

毕艺鸣 林玉平 范冠杰 殷 贝 李安香 黄锦珠 王献哲

摘 要 糖尿病下肢动脉病变是糖尿病慢性大血管并发症之一,同时也是糖尿病致残的重要原因。恢复血流是治疗糖尿病下肢动脉病变的关键。干细胞治疗、基因治疗等再生医学疗法可通过“治疗性血管生成”促进血运重建,为血管再生提供科学的发展方向,是治疗糖尿病下肢动脉病变的新手段。因此,本文分别从干细胞治疗、基因治疗以及联合治疗等再生医学疗法对糖尿病下肢动脉病变的治疗进行相关综述。

关键词 糖尿病下肢动脉病变 再生医学 干细胞治疗 基因治疗

中图分类号 R587.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.09.039

糖尿病是一种威胁公共卫生安全的慢性代谢性疾病,下肢动脉病变(lower extremity arterial disease, LEAD)是糖尿病的慢性并发症之一,其临床病理主要表现为一条或多条下肢动脉部分堵塞或完全堵塞,临床症状为肢体功能障碍,出现间歇性跛行、静息痛、麻木、冷沉重感、溃疡和坏疽等。根据流行病学调查,全球下肢动脉病变患者已经达到 2.02 亿,虽然糖尿病患者中 LEAD 的确切患病率难以估算,但许多研究已证实,糖尿病是下肢动脉病变的独立危险因素,糖尿病 LEAD 的发生率是普通人群的 2~4 倍^[1]。与非糖尿病患者比较,糖尿病合并 LEAD 疾病病情更复杂、进展更迅速,更容易影响远端肢体动脉,并成为糖尿病足发病的诱因,与糖尿病患者致残、致死密切相关。随着医疗技术的不断发展,目前糖尿病合并 LEAD 的治疗手段不断增加,除内科药物治疗、外科血运重建治疗外,再生医学如干细胞治疗以及基因治疗等新型疗法的提出,为糖尿病合并 LEAD 的防治提供了新的方向与思路。现就再生医学在糖尿病合并 LEAD 的治疗现状及前景进行综述。

一、再生医学的概念及发展应用

在现代医学中,“再生”的概念诞生于 20 世纪 50 年代,在动物模型中进行的首次骨髓移植实验中,该实验为人类干细胞治疗疾病带来了曙光,并由此衍生

出多类与“再生”相关的分支学科。近年来,随着基础研究的不断深入,一系列新兴技术如基因编辑技术、细胞测序技术、生物信息技术以及高通量组学技术的出现,极大地丰富了再生医学的研究范畴,使再生医学不仅成为了解基础生物学和疾病发病机制的研究手段之一,同时也为再生医学的临床应用奠定了基础。目前,再生医学已经成为一门综合生命科学、生物材料科学、组织工程学以及计算机技术等科学,旨在通过利用干细胞和(或)祖细胞的潜能,刺激受损机体的修复机制,从而恢复身体组织或器官的功能,实现治疗疾病的作用^[2]。再生医学疗法可分为干细胞和组织工程两大重要分支,其中细胞工程又分为基因治疗以及细胞移植治疗,这些疗法不仅在皮肤科、烧伤科及骨科等外伤疾病中应用广泛,也在心血管疾病、神经系统疾病及内分泌代谢疾病等领域取得了一定的研究成果,展示出再生医学广阔的发展应用空间^[3-5]。

二、再生医学在糖尿病下肢动脉病变的优势及局限

预防缺血,改善肢体供血以及恢复肢体功能状态是糖尿病 LEAD 治疗的主要目的,如何使血管功能恢复成为治疗糖尿病 LEAD 的重点,大约在 20 年前,“治疗性血管生成”的概念诞生,该概念被定义为在生长因子的刺激下,从原有的血管中生长出新的血管,是一种治疗临床疾病的手段。在再生医学领域,血管再生可通过细胞工程得以实现。细胞疗法主要包括基因疗法和干细胞移植,随着医学技术的发展,已有研究者对细胞进行基因修饰,与其他生长因子等联合运用治疗糖尿病下肢血管病变,并表现出各自的优越性及局限性。

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划项目(2015BAI04B09);广东省中医院临床研究专项基金资助项目(YN10101904);广东省中医院中医药科学技术研究专项基金资助项目(YN2019QL13)

作者单位:510504 广州中医药大学第二临床医学院(毕艺鸣、殷贝、李安香、黄锦珠、王献哲);510120 广州中医药大学第二附属医院内分泌科(林玉平、范冠杰)

通讯作者:范冠杰,主任医师,博士生导师,电子信箱:fanfanfangj@163.com

1. 基因疗法治疗糖尿病 LEAD: 基因疗法是生命科学与临床医学结合而诞生的新兴疗法, 通过改变甚至改造基因, 从而达到治疗疾病的目的。多种生长因子如管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 和成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 已经被证实是血管生成信号的关键调节因子, 随着年龄增长, 内源性生长因子生成和分泌减少, 可能是导致一系列疾病出现的诱因。已经有报道认为, 某些生长因子的分泌水平与糖尿病 LEAD 的发展有关^[6]。Solovyeva 等^[7]利用 VEGF 及 SDF-1 的质粒载体转染人脐静脉源性内皮细胞, 可刺激毛细血管祥的形成; Guo 等^[8]利用 VEGF 及 SDF-1 腺病毒载体转染脑梗死大鼠 4 周后, 发现大鼠体内 VEGF 及 SDF-1 的表达上调, 免疫荧光结果提示梗死病灶微循环改善, 血管生成增加; Iris 等^[9]对 6 例即将截肢的患者进行多次 FGF-1 表达载体肌内注射, 在数天后, 对截肢后的肌肉进行检测, 结果发现该区域内高度表达 FGF 基因及其受体, 这些实验结果初步说明这些内源性生长因子通过基因编辑均可用于治疗缺血性疾病。有研究者通过基因诱导的血管生成方法对 65 例糖尿病下肢动脉病变患者进行治疗, 随访 6 个月后, 接受基因治疗的患者 TcPO₂ 以及 PFWD 明显改善; 随访 1 年后, 截肢率及致死并发症发生率显著下降^[10]。然而, 另外有研究者对 280 例糖尿病下肢动脉缺血患者进行随机对照研究, 结果发现基因治疗虽然具有降低 ABI 的趋势, 但与治疗组比较, 差异无统计学意义, 同时基因治疗并不能使截肢率和病死率下降^[11]。最近一项 Meta 分析结果也表明, FGF、HGF 及 VEGF 等生长因子并不能降低大面积截肢率及 LEAD 致死率, 但可能会改善糖尿病 LEAD 患者血流动力学状态, 降低轻度截肢的风险^[12]。以上临床试验说明生长因子基因治疗似乎是安全的, 但其有效性仍未明确; 其次, 由于生长因子属于生物高分子, 其自身稳定性差, 半衰期短, 通常需要多次给药以维持治疗效果, 因此, 真正要将生长因子基因疗法应用到临床治疗仍存在很大障碍。

2. 干细胞移植治疗糖尿病 LEAD: 干细胞是一类具有多向分化潜能和自我复制能力的原始细胞, 是人体内各种组织器官形成的基石, 医学界将其称为“万用细胞”。根据不同发育阶段, 干细胞可分为胚胎和成体干细胞。在出生后和成年阶段, 内源性成体干细胞在生理应激、缺氧、炎症等多种情况下可从来源组

织向外周血液动员, 并在器官损伤后的修复中发挥作用。根据供体的不同, 干细胞移植疗法又分为自体移植和异体移植。细胞类型可包括骨髓单核细胞、间充质干细胞、外周血干细胞、胎盘干细胞等。这类细胞在促进组织再生、保护缺血组织、调节炎症和自身免疫方面具有显著潜能^[3]。许多动物研究也显示, 干细胞不仅具有分化为血管的潜能, 还具有旁分泌功能, 通过分泌各种生长因子如血基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1) 及胰岛素样生长因子等 (insulin-like growth factors, IGF-1), 抑制细胞死亡, 促进血管内皮迁移增殖, 激活缺血组织中的干细胞/祖细胞, 并为缺血病灶募集额外的干细胞/祖细胞, 参与血管新生的全过程, 增加糖尿病缺血下肢的血流量, 改善肢体缺氧状态以及修复肌肉损伤^[13, 14]。

一项涉及 1186 例患者的自体干细胞移植治疗下肢动脉病变的 Meta 分析结果显示, 自体干细胞移植在改善踝臂指数 (ankle-brachial index, ABI), 经皮氧气张力 (transcutaneous oxygen pressure, TcPO₂), 无痛步行距离 (pain-free walking distance, PFWD) 等方面具有显著疗效, 并可降低糖尿病患者的截肢率及提高下肢溃疡的愈合率^[15]。但研究显示, 不同类型的自体干细胞可能具有不同的治疗效果, 有研究者对 28 例糖尿病下肢动脉病变的患者进行自体骨髓源性单核细胞或外周血干细胞移植治疗, 结果发现, 干细胞移植 6 个月后, 接受移植患者 TcPO₂ 显著改善, 截肢率下降, 且无全身性血管生成等不良反应出现, 骨髓源性单核细胞移植及外周血干细胞移植在改善肢体缺血方面比较差异无统计学意义^[16]。有研究者对自体骨髓间充质干细胞及骨髓源性单核细胞移植治疗糖尿病下肢血管病变的远期疗效进行了比较, 自体骨髓间充质干细胞在降低截肢率以及减少足部感染方面有一定优势, 随访 3 年后发现自体骨髓间充质干细胞可有效地降低肢体缺血及足部溃疡的复发率, 延长肢体抢救时间以及改善血流, 这说明骨髓间充质干细胞在自体干细胞移植治疗糖尿病 LEAD 中的潜在优势^[17]。由于临床中大部分糖尿病 LEAD 患者属于高龄, 身体状态较差, 多次采集自体干细胞使患者面临感染、组织坏死等的风险, 自体干细胞质量差, 其向血管内皮祖细胞分化能力低, 促血管生成活性低, 抗血管生成因子活性增高, 并有可能使患者面临血栓形成的危险, 这均限制了自体干细胞移植的应用。

因此,有研究者提出了异体干细胞移植。虽然异体干细胞移植具有加重炎症反应,诱发受者体液免疫和细胞免疫反应的风险。但一项 Meta 分析结果表明,异体干细胞移植安全且有效,疗效与自体干细胞移植相当^[18]。而脂肪干细胞取材广泛,活性较高,已经成为细胞疗法的重要研究对象之一。在一项前瞻性临床研究中,15 例严重肢体缺血的患者经过多次脂肪干细胞肌内注射后,66.7% 的患者出现临床症状缓解,在经过平均 6 个月的随访期后,所有患者疼痛等级量表以及 PFWD 均有所改善,治疗前后的血管造影提示,所有患者均形成新的血管侧支网络^[19]。脐带血、胎盘来源的间充质干细胞免疫原性低,分化潜能高,同样在异体移植的研究中成为热点。有研究以胎盘间充质干细胞对 4 例糖尿病 LEAD 患者进行肌内注射,并分别在治疗后第 0、4、12、24 周对糖尿病 LEAD 患者临床症状,血流动力学参数进行评估。结果发现,4 例患者临床缺血特征在随访 12 周后均得到改善,24 周后明显好转,PFWD 显著延长,同时 1 例患者下肢血管 MRA 提示侧支动脉形成,2 例患者下肢溃疡愈合;所有患者在随访 12 周后出现 TNF- α 下降,这初步提示了胎盘间充质干细胞具有治疗糖尿病 LEAD 患者的作用,并具有改善糖尿病炎症状态的能力。有研究报道认为,来源于胎盘的间充质干细胞增殖活性及促血管生成活性均优于脂肪干细胞及骨髓干细胞,无论其分离成功率如何,体外增殖的胎盘干细胞仍可用于移植,且“保质期”更长,胎盘源性间充质干细胞可能是异体移植治疗糖尿病 LEAD 的首选。然而,异体干细胞移植治疗糖尿病 LEAD 相关的临床研究较少,因此该结论仍需要进一步证实。

3. 基因转导干细胞疗法联合治疗糖尿病 LEAD: 与基因疗法比较,干细胞移植在临床上的应用可能更为成熟,但越来越多研究认为,高血糖环境以及与糖尿病有关的其他代谢异常可能影响移植干细胞的特性^[20]。为了使干细胞促血管生成的特性在糖尿病患者体内得到更好地发挥,有研究者提出以干细胞为载体,进行生长因子基因转导,联合应用于糖尿病 LEAD 的治疗中。Xiaoling 等^[21]通过糖尿病大鼠下肢缺血模型探讨 VEGF 过表达的脐带源性间充质干细胞的治疗作用,结果表明,与 VEGF 正常表达的脐带源性间充质干细胞比较,VEGF 过表达的干细胞增殖活性增加,在移植后 4 周 VEGF 表达达到峰值,扫描激光多普勒及 CTA 均显示血流量增加,血管生成增加,这可能与一系列促血管新生信号通路如

ERK、AKT 等的表达增强有关。而将转染 IGF 基因的人胎盘源性间充质干细胞移植到糖尿病小鼠缺血后肢,可提高该细胞存活率并促进血管生成,同时可有效减少组织纤维化^[22]。随后,Skórá 等^[23]以 VEGF 质粒表达载体导入骨髓单核细胞,对 16 例糖尿病下肢动脉病变患者进行临床试验,结果发现治疗后 2 周 VEGF 表达显著增加,治疗后 3 个月,所有患者 ABI 显著提高,间歇性跛行症状改善,12 例患者 CTA 提示侧支血管发育。

此外,体细胞还可通过基因编辑,获得与人胚胎干细胞相似的特性,此类体细胞被称为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。虽然 iPSCs 在形态、增殖、基因表达等方面与人体干细胞相似,但目前尚不明确其与人体干细胞在临床实践中差异是否有统计学意义,目前仅有动物实验证实, iPSCs 可通过调控外泌体的分泌促进小鼠血管新生,减轻肢体缺血^[24]。另外,由于 iPSCs 的诞生应用了反转录病毒载体及 c-myc 等癌基因,将该细胞应用于人体可能会导致肿瘤的发生,这使 iPSCs 在临床应用的安全性受到质疑^[5]。目前关于基因转导干细胞治疗糖尿病 LEAD 的临床研究仍较少,但这无疑为糖尿病 LEAD 的治疗提供了一个新的思路与方向。

三、展 望

糖尿病 LEAD 病变范围广,是多系统病变的结果,目前临床上以综合治疗为主。但部分临床研究结果提示,强化降糖、降压、调脂以及抗血小板治疗能改善糖尿病 LEAD 患者心血管预后,却不能延缓 LEAD 的发展,更不能降低 LEAD 患者下肢不良事件的发生率。尽管外科血运重建治疗是重症 LEAD 的首选方法,但糖尿病患者伤口愈合不全以及严重截肢的风险更高,住院时间更长,再次入院率也较高。此外,有部分重症糖尿病 LEAD 患者在保守治疗无效的情况下,也不适合进行外科治疗。在这种情况下,基因疗法、干细胞移植等再生疗法的应用,为糖尿病 LEAD 的治疗带来了新的选择。而作为再生医学的重要分支,目前以上疗法已经从基础实验过渡到临床研究阶段,并展示出各自不同的临床应用前景。基因疗法将生长因子装配于特定载体,直接导入缺血部位,该疗法操作简便,容易推广,但存在疗效持续时间短、疗效不稳定等问题,因此尚不能应用于临床。

与基因疗法比较,采用干细胞移植治疗糖尿病 LEAD 的疗效更确切,而间充质干细胞具有来源丰富、分化潜能高、细胞活力较强、免疫源性较低等优

点,已经成为了干细胞治疗的主要细胞类型,但干细胞提取、分离、纯化等程序复杂,技术要求高,对移植受者及供者的身体健康条件有一定要求,在临床中不易推广应用。而随着对再生医学的深入研究,糖尿病 LEAD 再生疗法的研究已经从单技术、单方法逐渐发展到多技术、多途径联合应用,基因转导干细胞的出现、诱导多能干细胞的诞生扩大了细胞治疗的应用前景,使得干细胞取材来源更丰富的同时,提高了干细胞活性,实现了生长因子的持续表达,减少了伦理争议。尤其是诱导多能干细胞的应用还从一定程度上简化了干细胞移植的步骤,虽然目前其治疗糖尿病 LEAD 的机制尚不明确,临床研究数据不充分,相关研究仍停留在动物实验层面,但其出现无疑开创了糖尿病 LEAD 再生治疗的新篇章,将成为未来血管再生临床应用的重点研究方向。

参考文献

- Fowkes FG, Aboyans V, Fowkes FJ, *et al.* Peripheral artery disease: epidemiology and global perspectives[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14(3): 156–170
- 王玥,施慧琳,许丽,等. 再生医学发展态势及发展建议[J]. *生命科学*, 2019, 31(7): 644–650
- Wang J, Chen Z, Sun M, *et al.* Characterization and therapeutic applications of mesenchymal stem cells for regenerative medicine[J]. *Tissue Cell*, 2020, 64: 101330
- Wernly B, Mirna M, Rezar R, *et al.* Regenerative cardiovascular therapies: stem cells and beyond[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1420–1433
- Kondo Y, Toyoda T, Inagaki N, *et al.* iPSC technology – based regenerative therapy for diabetes[J]. *J Diabetes Investig*, 2018, 9(2): 234–243
- Ratushnyy A, Ezdakova M, Buravkova L. Secretome of senescent adipose – derived mesenchymal stem cells negatively regulates angiogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1802–1818
- Solovyeva VV, Chulpanova DS, Tazetdinova LG, *et al.* In vitro angiogenic properties of plasmid DNA encoding SDF – 1 α and VEGF165 genes[J]. *App Biochem Biotechnol*, 2020, 190(1): 773–788
- Hu GJ, Feng YG, Lu WP, *et al.* Effect of combined VEGF(165)/SDF – 1 gene therapy on vascular remodeling and blood perfusion in cerebral ischemia[J]. *J Neurosurg*, 2017, 127(3): 670–678
- Iris B, Nicolas C, Anthony C, *et al.* Local gene transfer and expression following intramuscular administration of FGF – 1 plasmid DNA in patients with critical limb ischemia[J]. *Mol Ther*, 2009, 17(5): 914–921
- Kalinin RE, Suchkov IA, Deev RV, *et al.* Gene – mediated induction of angiogenesis in inoperable patients with atherosclerosis and diabetes mellitus[J]. *Angiol Sosud Khir*, 2018, 24(2): 33–40
- Belch J, Hiatt WR, Baumgartner I, *et al.* Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo – controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia[J]. *Lancet*, 2011, 377(9781): 1929–1937
- Gorenoi V, Brehm MU, Koch A, *et al.* Growth factors for angiogenesis in peripheral arterial disease[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 6(6): D11741
- Al – Rifai R, Nguyen P, Bouland N, *et al.* In vivo efficacy of endothelial growth medium stimulated mesenchymal stem cells derived from patients with critical limb ischemia[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 261–282
- Fujita Y, Kawamoto A. Stem cell – based peripheral vascular regeneration[J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2017, 120: 25–40
- Gao W, Chen D, Liu G, *et al.* Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease: a systematic review and Meta – analysis of randomized controlled trials[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 140–154
- Dubsky M, Jirkovska A, Bem R, *et al.* Both autologous bone marrow mononuclear cell and peripheral blood progenitor cell therapies similarly improve ischaemia in patients with diabetic foot in comparison with control treatment[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2013, 29(5): 369–376
- Lu D, Jiang Y, Deng W, *et al.* Long – term outcomes of BMMSC compared with BMMNC for treatment of critical limb ischemia and foot ulcer in patients with diabetes[J]. *Cell Transpl*, 2019, 28(5): 645–652
- Lorkeers SJJO, Eding JEC, Vesterinen HM, *et al.* Similar effect of autologous and allogeneic cell therapy for ischemic heart disease: systematic review and Meta – analysis of large animal studies[J]. *Circ Res*, 2015, 116(1): 80–97
- Lee HC, An SG, Lee HW, *et al.* Safety and effect of adipose tissue – derived stem cell Implantation in patients with critical limb ischemia[J]. *Cir J*, 2012, 76(7): 1750–1760
- Tatiana C, Andrew M, Alexandra S, *et al.* Reversible secretome and signaling defects in diabetic mesenchymal stem cells from peripheral arterial disease patients[J]. *J Vasc Surg*, 2018, 68(6S): 137S–151S
- Xiaoling L, Kexin G, Guangyao S, *et al.* VEGF gene transfected umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improve the lower limb vascular lesions of diabetic rats[J]. *J Diabetes Its Complicat*, 2015, 29(7): 872–881
- Zhao N, Yue Z, Cui J, *et al.* IGF – 1C domain – modified hydrogel enhances therapeutic potential of mesenchymal stem cells for hindlimb ischemia[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 129–141
- Skóra J, Barć P, Pupka A, *et al.* Transplantation of autologous bone marrow mononuclear cells with VEGF gene improves diabetic critical limb ischaemia[J]. *Endokrynol Pol*, 2013, 64(2): 129–138
- Ye M, Ni Q, Qi H, *et al.* Exosomes derived from human induced pluripotent stem cells – endothelial cells promotes postnatal angiogenesis in mice bearing ischemic limbs[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(1): 158–168

(收稿日期: 2020 – 04 – 18)

(修回日期: 2020 – 04 – 29)