

基因调控

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000016

整合素 $\alpha 9$ 在人脂肪源性间充质干细胞向淋巴管内皮细胞分化过程中的表达变化

蒋 娟, 薛 斌, 李 晶

(重庆医科大学附属第一医院烧伤整形外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:从人体脂肪组织中分离培养出脂肪源性间充质干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs), 诱导其向淋巴管内皮细胞(lymphatic endothelial cells, LECs)分化, 同时探讨分化过程中整合素 $\alpha 9$ (integrin $\alpha 9$) 表达的变化, 旨在寻找淋巴水肿分子治疗靶点, 为 ADSCs 应用于淋巴水肿的分子治疗奠定实验基础。**方法:**①从吸脂术后废弃的人体脂肪组织中分离培养出 ADSCs, 倒置相差显微镜观察原代及传代细胞的形态特征。②流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测第 3 代 ADSCs 表面特征性抗原 CD90、CD29、CD34 及 CD45 的表达; MTT 法绘制生长曲线。③用人血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)-C、人 VEGF-A、血小板源性生长因子 BB(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)诱导其向 LECs 方向分化, 同时以人 LECs 作为阳性对照组。④Western blot 检测各组细胞 LECs 表面特征性抗原淋巴管内皮细胞透明质酸受体-1(lymphatic endothelial hyaluronan receptor-1, LYVE-1)、血管内皮细胞特征性抗原 CD34 及 integrin $\alpha 9$ 的表达。⑤FCM 检测各组细胞周期, 使用 SPSS17.0 对实验数据进行统计分析。**结果:**①ADSCs 贴壁生长, 呈长梭形, 第 1、3、5 代 ADSCs 的生长曲线均呈 S 形; 细胞表面抗原为 CD90⁺、CD29⁺、CD34⁻、CD45⁻。②实验组及阳性对照组 LYVE-1 表达阳性、CD34 表达均阴性, integrin $\alpha 9$ 的表达趋势与 LYVE-1 一致, 且二者在实验组的表达水平低于阳性对照组; 三者阴性对照组的表达均为阴性。③各组 G0/G1 期细胞比例有明显统计学差异($P < 0.01$), 实验组与阳性对照组 G0/G1 期细胞比例显著小于阴性对照组($P < 0.01$), 实验组与阳性对照组之间无明显统计学差异($P = 0.083$)。**结论:**ADSCs 离体培养, 具有向 LECs 分化的潜能。使用 VEGF-C、VEGF-A、PDGF-BB 可诱导部分人 ADSCs 向 LECs 分化。在人 ADSCs 向 LECs 分化过程中 integrin $\alpha 9$ 的表达增强, 分化前后细胞的周期发生了改变。该分子在 LECs 的形成过程中可能发挥着极为重要的作用, 将有望在淋巴水肿的再生治疗中成为重要的分子靶点之一。

【关键词】脂肪源性间充质干细胞; 淋巴管内皮细胞; 血管内皮细胞生长因子 C; 淋巴管内皮细胞透明质酸受体-1; 整合素 $\alpha 9$

【中图分类号】R619.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-01-04

Changes in the expression of integrin $\alpha 9$ in the differentiation of adipose-derived stem cells to lymphatic endothelial cells

Jiang Juan, Xue Bin, Li Jing

(Department of Burns and Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To isolate and culture adipose-derived stem cells (ADSCs) from human adipose tissues, to induce the differentiation of ADSCs to lymphatic endothelial cells (LECs), to explore the changes in the expression of integrin $\alpha 9$ in the differentiation process so as to find a molecular target and to make contribution to the molecular treatment of lymphedema with ADSCs. **Methods:** ① ADSCs were isolated and cultured from human adipose tissue which derived from the liposuction surgery. Morphological characteristics were observed with inverted phase contrast microscope. ② Expression of CD90, CD29, CD34 and CD45 in the cell membrane was assayed by using flow cytometry (FCM). Growth curve was drawn with MTT assay. ③ Lymphendothelial differentiation of ADSCs was induced with human vascular endothelial growth factor C (VEGF-C), human vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and platelet-derived growth factor BB (PDGF BB) in vitro. Human LECs were taken as positive control group. ④ Expression of lymphatic endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1), integrin $\alpha 9$ and CD34 was detected by Western blot. ⑤ Cell cycles of the three groups were determined with FCM. Then the data were analyzed with SPSS 17.0. **Results:** ① ADSCs was in spindle shape and adherent growth. Growth curves of 1th, 3th and 5th passage of ADSCs all presented S shape. The expression of CD90⁺ was positive, and the expression of CD34⁺ and CD45⁺ was negative. ② LYVE-1 expressed positively in experiment group and posi-

作者介绍: 蒋 娟; Email: jiangjuancqmu@163.com,

研究方向: 创面愈合与瘢痕防治。

通信作者: 薛 斌; Email: cqxuebin@126.com。

基金项目: 重庆市基础与前沿研究计划项目(编号: CSTC2013jcyjA10062);

重庆市卫生局重点课题资助项目(编号: 2013-1-014)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000016.html>

tive control group; CD34 expressed negatively in experiment group and positive control group; expression of integrin $\alpha 9$ was similar to LYVE-1 and expression of integrin $\alpha 9$ and LYVE-1 were lower in experiment group than in positive control group; integrin $\alpha 9$, LYVE-1 and CD34 expressed negatively in negative control group. ③ There were differences in proportion of cells at G0/G1 stage, higher in negative control group than in experiment group and positive control group ($P < 0.01$). There was no difference in proportion of cells at G0/G1 stage between experiment group and positive control group ($P = 0.083$). **Conclusions:** Human ADSCs can differentiate into LECs but not vascular endothelial cells when culture in vitro with VEGF-C, VEGF-A and PDGF-BB. Cell cycle will change and the expression of integrin $\alpha 9$ will elevate during this process. Integrin $\alpha 9$ may make an important role in the formation of LECs and may obtain the opportunity to become a molecular target in the treatment of lymphedema.

[Key words] adipose-derived stem cells; lymphatic endothelial cells; vascular endothelial growth factor C; lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1; integrin $\alpha 9$

淋巴水肿是由于淋巴回流受阻导致的淋巴系统疾病,在我国,最常见的淋巴水肿致病因素是丝虫病及链球菌感染。而近年来,丝虫病导致的淋巴水肿的发病率已经明显降低,取而代之的是恶性肿瘤根治术及放化疗引起的淋巴水肿,其发病率正逐年升高,其中最常见的病因是乳腺癌根治术后及放化疗后。对于淋巴水肿的治疗目前并无突破,仍停留在传统的治疗方案上,如烘绑疗法及手术治疗,该类疗法都只能暂时性的降低水肿症状,无法从根本上达到治疗淋巴水肿的目的。要想治愈淋巴水肿,最根本的办法只能是加强淋巴管的再生,促进组织间液回流。已经有大量研究证实间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有向淋巴管内皮细胞(lymphatic endothelial cells, LECs)分化的能力^[1-3],其中骨髓间充质干细胞的研究相对较多,而具有获取方便、分泌与脉管生成相关的生长因子等多方向优势的脂肪源性间充质干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)向 LECs 分化的研究目前并不多见^[4]。

本实验从吸脂手术废弃的脂肪组织中分离培养出 ADSCs,利用人血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)C、VEGF-A、血小板源性生长因子 BB(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)诱导其向 LECs 分化^[2],通过对分化前后整合素 $\alpha 9$ (integrin $\alpha 9$) 表达变化的分析,探索 integrin $\alpha 9$ 在 LECs 生成中可能起到的重要作用,分析其成为淋巴水肿分子治疗靶点之一的可能性,丰富 ADSCs 应用于淋巴管水肿分子治疗的基础研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验仪器与试剂 CO₂ 细胞培养箱(SHEL-LAB1815Tc

型),倒置相差显微镜(Olympus),流式细胞仪(flow cytometry, FCM)(Partec),酶标仪(Sunrise),凝胶成像仪(Bio-Rad),蛋白电泳系统(Bio-Rad),低糖 DMEM 培养基(Gibco),胎牛血清(Gibco),I 型胶原酶(Sigma),双抗(HyClone),FITC 标记的 CD29、CD34、CD45、CD90 流式抗体(eBioscience)、VEGF-A、VEGF-C 及 PDGF-BB(Biovision),兔抗人淋巴管内皮细胞透明质酸受体-1(lymphatic endothelial hyaluronan receptor-1, LYVE-1)多克隆抗体、兔抗人 Integrin $\alpha 9$ 多克隆抗体、兔抗人 CD34 多克隆抗体及山羊抗兔二抗(santa-cruz),人 LECs 细胞株(PriCells),增强化学发光试剂盒(ECL)及 BCA 蛋白定量试剂盒(Millipore),蛋白裂解液(RIPA)及 SDS-PAGE 配胶试剂盒(凯基生物)。

1.1.2 培养液的配制 基础培养基:低糖 DMEM 培养基,10%胎牛血清,青霉素、链霉素 100 U/ml。诱导培养基:低糖 DMEM 培养基,10%胎牛血清,青霉素、链霉素 100 U/ml,VEGF-A 30 ng/ml、VEGF-C 300 ng/ml、PDGF-BB 10 ng/ml。

1.2 实验方法

1.2.1 ADSCs 的分离、培养 从重庆医科大学附属第一医院烧伤整形外科取得吸脂术后废弃的脂肪组织与生理盐水等的混合物 50 ml, PBS 冲洗 3 遍,获得脂肪组织约 25 ml,加入 25 ml 的 0.1% I 型胶原酶于 37 °C 气浴恒温振荡器上消化 30 min,使用 25 ml 的基础培养基终止消化,200 目细胞筛过滤,滤液 2 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀重悬接种于直径 10 cm 的培养皿内。48 h 后首次换液,用 PBS 冲洗去除悬浮的组织残块和杂质细胞。以后 3 d 换液 1 次,2 周后细胞可达到 80%融合,用 1 ml 0.25%胰酶消化传代。

1.2.2 ADSCs 表面抗原测定 ①取第 3 代 ADSCs,弃培养基,使用 PBS 轻轻冲洗两边,加入 0.25%胰酶 1 ml,置入 37 °C 孵箱内,显微镜下观察,细胞脱落后加入 1 ml 含血清的培养基终止消化。②800 r/min 离心 5 min,弃上清后, PBS 重悬,显微镜下计数,调整细胞浓度为 1.0×10^7 个/ml。取 5 只 0.5 ml EP 管,分别编号为 A、B、C、D、E 置于冰上,各加入细胞悬液 95 μ l。③A 管为阴性对照组,加入 PBS 液 5 μ l, B-D 管分别避光加入鼠抗人 CD90 FITC 抗体、鼠抗人 CD29 FITC 抗体、鼠抗人 CD45 FITC 抗体、鼠抗人 CD34 FITC 抗体 5 μ l,于冰

上避光孵化 30 min 后,使用 FCM 检测各表面抗原的表达。

1.2.3 MTT 法绘制 ADSCs 生长曲线 ①选第 1、3、5 代人 ADSCs 用 0.25%胰蛋白酶消化后计数,以 1.0×10^4 个/ml 接种于 10 块 96 孔板内,每代细胞接种 5 孔,每孔加入细胞悬液 200 μ l。周围孔用 PBS 进行封闭,减少蒸发。②每隔 24 h 取出一块 96 孔板,吸出原培养基,每孔加入不含血清的培养基 180 μ l 及 MTT 20 μ l,在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 4 h,稍倾斜孔板吸出上清液,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO),在摇床上震荡 10 min。③选择 492 nm 波长,使用酶标仪测定吸光度(absorbance, A)值(每隔 24 h 检测一块 96 孔板 A 值,连续测量 10 d)。以培养时间(d)为横坐标, $A_{492\text{ nm}}$ 为纵坐标,绘制各代细胞生长曲线。

1.2.4 使用 VEGF-C、VEGF-A、PDGF-BB 诱导人 ADSCs 向 LECs 分化 实验分为 3 组:将 LECs 组设立为阳性对照组,使用基础培养基进行培养,同时取第 3 代人 ADSCs 分别设为实验组与阴性对照组,实验组使用诱导培养基,阴性对照组使用基础培养基进行培养。10 d 后取各组细胞进行相应检测。

1.2.5 Western blot 检测各组 LYVE-1、integrin α 9 及 CD34 的蛋白表达 ①蛋白提取及定量。细胞培养 10 d 后,取每组细胞各 10 瓶,弃培养液, PBS 漂洗 2 次;每瓶分别加入 1 ml PBS,用细胞刮刀轻柔刮下细胞,分别收集各组细胞悬液,800 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀加入 400 μ l 细胞裂解液(RI-PA)吹打混匀,放入冰盒置于摇床上裂解 30 min 后,4 $^{\circ}$ C 离心机 12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清,取 2 μ l 用于蛋白定量,按照蛋白定量试剂盒说明书操作。余下加 1/4 蛋白体积的蛋白上样 Buffer,沸水中煮沸 10 min,分别标注阳性对照组、实验组与阴性对照组, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。②Western blot 检测。按照配胶试剂盒说明配制分离胶和积层胶,每条泳道蛋白样品 40 μ g 上样电泳(根据测定的蛋白浓度进行计算),旁边泳道加入 marker 4 μ l,电泳结束后将蛋白转印至 PVDF 膜上,用 5%脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入一抗(LYVE-1、integrin α 9 及 CD34 稀释浓度 1:500, β -actin 稀释度 1:4 000),4 $^{\circ}$ C 过夜后,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入山羊抗兔二抗(稀释浓度 1:5 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,增强化学发光试剂(ECL)显色后,凝胶成像系统采集

图像。

1.2.6 FCM 检测各组细胞周期 分别取各组细胞,胰蛋白酶消化,计数,调整细胞密度为 1.0×10^6 个/ml,4 $^{\circ}$ C 预冷的 75%乙醇固定过夜,4 $^{\circ}$ C 预冷 PBS 漂洗离心,37 $^{\circ}$ C 的 RNase 处理 30 min,离心后加入 0.5 ml 的 PI,4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min, FCM 检测各组细胞周期。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 17.0 统计软件对实验结果进行统计分析,得到的数据符合正态分布,使用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行统计描述,单因素方差分析比较 3 组之间的差异,同时使用 SNK- q 法进行两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ADSCs 细胞形态学观察

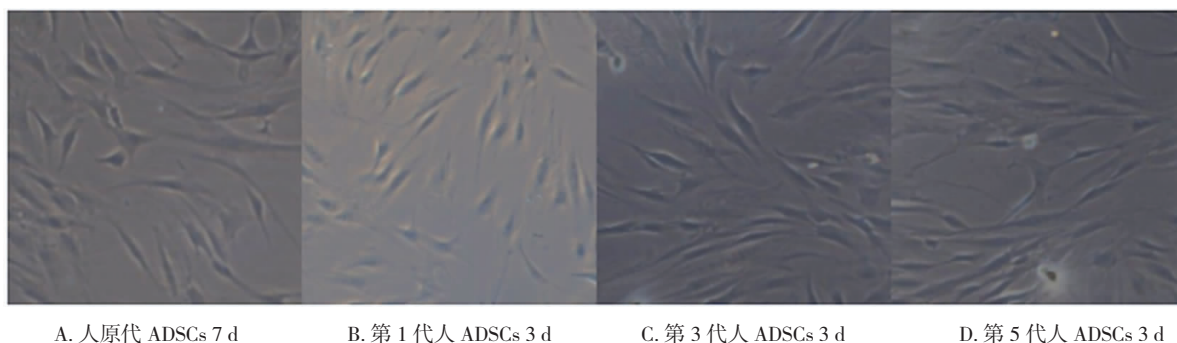
原代培养的 ADSCs:细胞接种时镜下可见絮状物及大量脂滴,24 h 后可见少量贴壁细胞,48 h 后贴壁细胞数目增多,多数细胞显圆形或者短梭形,3~5 d 可见细胞显集落生长,6~8 d 集落中细胞数量逐渐增多且细胞体积逐渐增大,显长梭形。9~11 d 集落间即相互融合,逐渐铺满瓶底,12~14 d 即可见细胞显旋涡状,可进行传代。传代后细胞生长迅速,24 h 即可完全贴壁显长梭形,7~8 d 可达 80%以上融合,前 5 代细胞形态无明显改变(图 1)。

2.2 ADSCs 表面抗原的表达

通过 FCM 检测结果显示:CD90⁺的表达率为 91.46%, CD29⁺的表达率为 94.00%, CD45⁻的表达率为 2.18%, CD34⁻的表达率为 2.73%(图 2),结果表明,间充质干细胞表面特征性抗原 CD90、CD29 均为阳性表达,而造血细胞表面特征性抗原 CD34 及白细胞表面特征性抗原 CD45 均为阴性表达,符合间充质干细胞的特性,说明采用该实验方法,可成功培养出纯度较高的 ADSCs,为后续试验提供细胞来源。

2.3 人 ADSCs 生长曲线

第 1 代、3 代、5 代细胞生长曲线均呈现 S 型,生长特征基本一致,潜伏期为 3~4 d,4 d 后进入对数生长期,第 7~8 天可以到达 80%以上融合,进入平台期(图 3)。



A. 人原代 ADSCs 7 d

B. 第 1 代人 ADSCs 3 d

C. 第 3 代人 ADSCs 3 d

D. 第 5 代人 ADSCs 3 d

图 1 人 ADSCs 原代及传代细胞 (100 $\times$)

Fig.1 Primary and passage human ADSCs (100 $\times$)

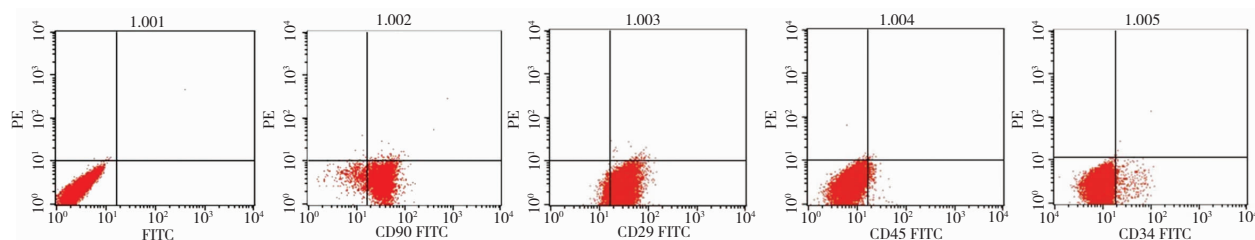


图2 ADSCs 表面抗原的表达

Fig.2 Expressions of antigens in the cell membrane of ADSCs

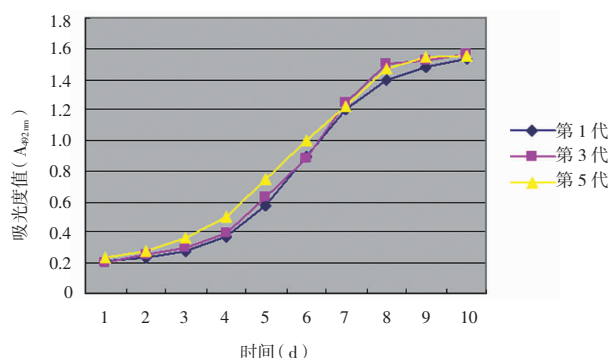
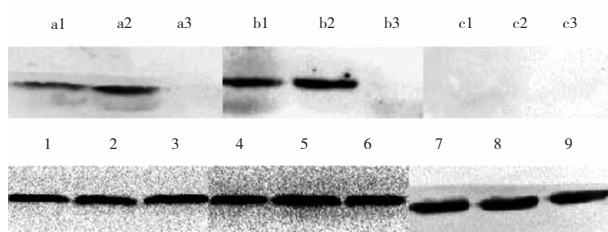


图3 人 ADSCs 生长曲线

Fig.3 Growth curves of human ADSCs

2.4 Western blot 检测各组 LYVE-1、integrin $\alpha 9$ 及 CD34 的表达结果

阳性对照组中 LECs 表面特征性抗原 LYVE-1 的阳性表达,血管内皮细胞表面特征性抗原 CD34 阴性表达, integrin $\alpha 9$ 的表达与 LYVE-1 的表达趋势一致;实验组 LYVE-1 亦为阳性表达、且 CD34 为阴性表达,明确了 LECs 的生成, integrin $\alpha 9$ 为阳性表达,同时 LYVE-1 及 integrin $\alpha 9$ 的表达水平低于二者在阳性对照组中的表达;阴性对照组中 LYVE-1、integrin $\alpha 9$ 及 CD34 的表达均为阴性(图 4)。



a1、a2、a3 分别为实验组、阳性对照组和阴性对照组 LYVE-1 (40 kD) 的表达;b1、b2、b3 分别为实验组、阳性对照组和阴性对照组 integrin $\alpha 9$ (115 kD) 的表达;c1、c2、c3 分别为实验组、阳性对照组和阴性对照组 CD34 (90~120 kD) 的表达;1、4、7 为实验组 β -actin (42 kD) 的表达,2、5、8 为阳性对照组 β -actin (42 kD) 的表达,3、6、9 为阴性对照组 β -actin (42 kD) 的表达

图4 Western blot 检测 LYVE-1、integrin $\alpha 9$ 及 CD34 的表达Fig.4 Expression of LYVE-1, integrin $\alpha 9$ and CD34 detected by Western blot

2.5 FCM 检测各组细胞周期结果

对 3 组数据使用正态性检验, $P=0.341$, 符合正态分布, 使用方差分析比较 3 组细胞 G0/G1 期的差异, SNK- q 法进行两两比较, 结果显示 3 组细胞 G0/G1 期百分比有明显差异, 实验组与阳性对照组 G0/G1 期百分比明显小于阴性对照组, $P \leq 0.05$, 差异具有统计学意义; 实验组与阳性对照组之间差异不具有统计学意义, $P=0.083$ (表 1、表 2)。

表 1 3 组细胞 G0/G1 期的比较

Tab.1 Comparison of three groups at G0/G1 phase

组别	样本数	G0/G1 期百分比 ($\bar{x} \pm s$)
实验组	3	65.46 $\pm$ 2.73
阳性对照组	3	62.35 $\pm$ 0.50
阴性对照组	3	88.79 $\pm$ 1.53
F 值		186.77
P 值		0.000

注: $P < 0.01$, 差异均具有统计学意义

表 2 SNK 法对各组间 G0/G1 期的比较

Tab.2 Comparison of three groups at G0/G1 phase by SNK

组别	q 值	P 值
实验组与阴性对照组 ^a	22.06	0.000
阳性对照组与阴性对照组 ^b	25.01	0.000
实验组与阳性对照组 ^c	2.94	0.083

注: a, $P < 0.01$, b, $P < 0.01$, 差异均具有统计学意义; c, $P > 0.05$, 差异不具有统计学意义

3 讨论

探寻淋巴水肿分子治疗的靶点, 丰富将 ADSCs 运用于淋巴水肿治疗的基础研究, 是本实验的根本目的。ADSCs 的原代培养目前已比较成熟^[5-6], 本实验从吸脂手术废弃的脂肪组织中, 成功分离培养出 ADSCs, 通过分析发现细胞表面抗原的检测结果, MSCs 表面特征性抗原 CD29、CD90 阳性表达, 造血细胞表面特征性抗原 CD34 及白细胞表面特征性抗原 CD45 阴性表达, 说明本实验培养的细胞为脂肪组织来源的 MSCs, 而非造血干细胞或者白细胞。在

ADSCs 的原代培养中,细胞呈现明显的集落生长,密度依赖性极高,密度过低细胞生长极其缓慢,培养 4 周以上才可进行首次传代。原代细胞贴壁后细胞形态不一,有长梭形、短梭形、多角形、圆形,可见短的突起,细胞核居中。细胞传代后生长速度增快,且细胞形态不发生明显改变。观察第 1、3、5 代细胞的形态及生长曲线,无明显变化,说明 ADSCs 在传代培养中保持着稳定的生物学特性,且各代细胞增殖能力无明显差异。

LECs 形成的信号通路目前尚不明确,多数研究认为同源异形盒蛋白 1-血管内皮细胞生长因子受体 3(prospero homeobox protein 1-vascular endothelial growth factor receptor 3,Prox1-VEGFR3)信号通路在 LECs 生成过程中起了重要作用。但最近亦有研究发现 Prox1-integrin $\alpha 9$ 信号通路也可能在 LECs 的生成过程中发挥着重要的作用^[2,7-8],因此不禁会推想, integrin $\alpha 9$ 是否在 ADSCs 向 LECs 的分化过程中发挥着重要作用,能否成为淋巴水肿分子治疗的靶点之一。本实验使用含 30 ng VEGF-A, 300 ng/ml VEGF-C 及 10 ng/ml PDGF-BB 的诱导培养基诱导 ADSCs 向 LECs 分化^[2]。通过对 LECs 表面特征性抗原 LYVE-1 的检测,明确实验组细胞向 LECs 的成功分化,同时通过对血管内皮细胞表面特征性抗原 CD34 的检测,否定了实验组细胞向血管内皮细胞的分化。实验证实使用 VEGF-A、VEGF-C 及 PDGF-BB 可成功将 ADSCs 诱导分化为 LECs。通过对各组细胞的细胞周期的检测,发现实验组与阳性对照组 G0/G1 期细胞比例小于阴性对照组,说明人 ADSCs 大多数处于 G0/G1 期,具有强的分裂增殖潜能,符合干细胞的特性,在其向 LECs 分化后,处于静止期和 DNA 合成前期的细胞比例有所下降,更接近于 LECs G0/G1 期细胞的比例。说明在 ADSCs 向 LECs 分化过程中,细胞的增殖能力及细胞的活性发生了改变,具体发生了怎样的改变还有待后续实验的进一步研究。对比 3 组细胞 integrin $\alpha 9$ 的表达,发现 integrin $\alpha 9$ 的表达与 LECs 特征性抗原 LYVE-1 的表达趋势相一致,在实验组及阳性对照组中均为阳性表达, integrin $\alpha 9$ 在 ADSCs 向 LECs 分化过程中表达增强,说明该分子作为淋巴管形成过程中的 Prox1 基因的下游调节关键因子,在 LECs 形成的信号通路中可能发挥着极其重要的作用。根据实验结果可以进行

大胆的推断:通过增强 integrin $\alpha 9$ 的表达可能将有助于促进 LECs 的再生,在淋巴水肿的再生疗法中发挥重要作用, integrin $\alpha 9$ 也有可能在淋巴水肿的再生治疗中成为重要的分子靶点之一。但是关于 Prox1-integrin $\alpha 9$ 信号通路的具体调节机制目前还不十分清楚,有待进一步深入研究。

综上所述,本研究成功地从废弃的脂肪组织中分离培养出了纯度较高的 ADSCs,并成功使用 VEGF-A、VEGF-C 及 PDGF-BB 诱导其向 LECs 方向分化,通过检测 LYVE-1 及 CD34 的表达明确了 LECs 的生成,验证了 ADSCs 向 LECs 分化的潜能,实验还发现,作为 Prox1 基因下游调节关键因子的 integrin $\alpha 9$ 在 LECs 的形成过程中可能发挥着极其重要的作用,该分子有望在淋巴水肿的再生治疗中成为重要的分子靶点之一,但 Prox1-integrin $\alpha 9$ 信号通路的具体调节机制目前还并不清楚,有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Saaristo A, Veikkola T, Tammela T, et al. Lymphangiogenic gene therapy with minimal blood vascular side effects[J]. J Exp Med, 2002, 196(6): 719-730.
- [2] Mishima K, Watabe T, Saito A, et al. Prox1 induces lymphatic endothelial differentiation via integrin $\alpha 9$ and other signaling cascades[J]. Mol Biol Cell, 2007, 18(4): 1421-1429.
- [3] Conrad C, Niess H, Huss R, et al. Multipotent mesenchymal stem cells acquire a lymphendothelial phenotype and enhance lymphatic regeneration in vivo[J]. Circulation, 2009, 119(2): 281-289.
- [4] Nakagami H, Morishita R, Maeda K, et al. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy[J]. J Atheroscler Thrombo, 2006, 13(2): 77-81.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Huang XZ, Wu JF, Ferrando R, et al. Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin $\alpha 9\beta 1$ [J]. Mol Biol Cell, 2000, 20(14): 5208-5215.
- [8] Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins[J]. Nat Immunol, 2003, 5(1): 74-80.

(责任编辑:唐秋姗)