

基础医学

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000638

VEGF-C联合 HGF 促进间充质干细胞向 淋巴管内皮细胞分化的研究

石正华¹, 薛斌¹, 蒋娟²

(1. 重庆医科大学附属第一医院烧伤整形外科, 重庆 400016; 2. 重庆钢铁医院妇产科, 重庆 400016)

【摘要】目的:使用血管内皮细胞生长因子 C (vascular endothelial growth factor C, VEGF-C) 与肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 联合诱导大鼠骨髓间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs) 向淋巴管内皮细胞 (lymphatic endothelial cells, LECs) 方向分化, 寻求最适 HGF 浓度, 探索 HGF 的促分化机制。**方法:**原代培养获得 BMSCs, 流式细胞仪检测相关表面抗原以及向成骨诱导分化鉴定干细胞特性, 取原代培养第 3 代细胞进行诱导实验。设置 50 ng/ml VEGF-C 分别联合 10、20、40、60、80、100 ng/ml HGF 配置诱导培养基的 6 个联合诱导组以及同时设置 50 ng/ml VEGF-C 诱导组、50 ng/ml HGF 诱导组和空白对照组, 诱导 10 d 后利用 real-time PCR 检测各组 LECs 标志性分子淋巴管内皮细胞透明质酸受体-1 (lymphatic endothelial hyaluronan receptor 1, LYVE-1), 同源异形盒蛋白 1 (prospero homeobox protein 1, Prox1) 的表达, 得出 HGF 最适浓度。Western blot、real-time PCR 检测 HGF 诱导组、空白对照组、VEGF-C 诱导组的 LECs 标志性分子 LYVE-1、Prox1 的表达, 以及检测空白对照组、VEGF-C 诱导组、HGF 联合 VEGF-C 诱导组的 integrin α 9 的表达。**结果:**成功分离获得原代培养大鼠 BMSCs, 80 ng/ml HGF 联合 50 ng/ml VEGF-C 诱导组的 LYVE-1、Prox1 的 mRNA 表达量最高 ($P_{\text{Prox1}}=0.000$, $P_{\text{LYVE-1}}=0.000$), 同时 HGF 诱导组未检测到相关 LECs 标志性分子的表达, HGF 联合 VEGF-C 诱导组的 integrin α 9 的表达较 VEGF-C 诱导组明显提高 ($P_{\text{Western blot}}=0.001$, $P_{\text{real-time PCR}}=0.000$)。**结论:**当 HGF 浓度为 80 ng/ml 时, 此时 HGF 联合 VEGF-C 可更好地促进大鼠 BMSCs 向 LECs 分化。同时, 在该浓度条件下 HGF 不具有单独诱导大鼠 BMSCs 分化为 LECs 的能力, 但能在诱导分化过程中明显提高 integrin α 9 的表达, 证明在促分化过程中 HGF 可能是通过间接上调 integrin α 9 表达发挥作用。

【关键词】骨髓间充质干细胞; 血管内皮细胞生长因子 C; 肝细胞生长因子; 淋巴管内皮细胞

【中图分类号】R619.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-11-20

VEGF-C combined with HGF promotes the differentiation of mesenchymal stem cells into lymphatic endothelial cells

Shi Zhenghua¹, Xue Bin¹, Jiang Juan²

(1. Department of Burns and Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital of Chongqing Iron and Steel)

【Abstract】Objective: To explore the optimal concentration of hepatocyte growth factor (HGF) and the mechanism of marrow stem cells (BMSCs) differentiate into lymphatic endothelial cells (LECs) by HGF synergizing with vascular endothelial growth factor C (VEGF-C). **Methods:** BMSCs were isolated and cultured. Flow cytometry (FCM) was used to detect the relative surface antigen of rat BMSCs and the ability of multipotent differentiation was identified. The 3th generation of rat BMSCs were used in the experiment and were divided into 6 synergizing groups including 50 ng/ml VEGF-C synergizing with 10, 20, 40, 60, 80, 100 ng/ml HGF and 50 ng/ml VEGF-C inducing group, 50 ng/ml HGF inducing group, blank control inducing group were established. After 10 d inducing, lymphatic endothelial hyaluronan receptor 1 (LYVE-1) and prospero homeobox protein 1 (Prox1), the cell makers of LECs were detected using real-time PCR. Prox1 and LYVE-1 in blank control group, VEGF-C inducing group and HGF inducing group after 10d inducing were detected by using Western blot and real-time PCR. Expression of integrin α 9 in blank control group, VEGF-C inducing group and HGF synergizing with VEGF-C group was detected by Western blot and real-time PCR. **Results:** Purifica-

作者介绍: 石正华, Email: 812307861@qq.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: 重庆市科委基础与前沿研究计划资助项目 (编号: CSTC 2013jcyjA10062); 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/detail/50.1046.r.20150519.1803.007.html> (2015-05-19)

tion of rat bone marrow mesenchymal stem cells was successfully isolated and cultured. The expressions of LYVE-1 and Prox1 were the highest ($P_{\text{Prox1}}=0.000$, $P_{\text{LYVE-1}}=0.000$) in 80 ng/ml HGF synergizing with VEGF-C group. Meanwhile, LECs markers were not detected in HGF inducing group. Higher expression of integrin α 9 was observed in HGF synergizing with VEGF-C group than in VEGF-C inducing group ($P_{\text{Western blot}}=0.001$, $P_{\text{real-time PCR}}=0.000$). **Conclusion:** HGF synergizing with VEGF-C can better enable rat BMSCs differentiate into LECs when the concentration of HGF is 80 ng/ml, but HGF alone could not induce rat BMSCs differentiate into LECs at this concentration. HGF can up-regulate integrin α 9 expression indirectly in the process of differentiation, indicating that HGF may promote the differentiation through up-regulating integrin α 9 expression indirectly.

[Key words] marrow stem cells; vascular endothelial growth factor-C; hepatocyte growth factor; lymphatic endothelial cells

淋巴水肿是由淋巴吸收缺陷以及转运障碍引起的一种难治性疾病。干细胞的组织工程技术提供了一种新的治疗方向,以往实验成功将大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)应用于动物体内淋巴管的重建^[1-2]。大量研究证实了血管内皮细胞生长因子 C (vascular endothelial growth factor C, VEGF-C) 具有诱导淋巴管内皮细胞(lymphatic endothelial cells, LECs)生成的作用^[3-4],同时有关于血管内皮细胞生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)分别联合 VEGF-C 诱导 BMSCs 向 LECs 分化的报道^[5-6],而 VEGF-A、FGF 自身并不能单独诱导 BMSCs 向 LECs 分化,它们通过间接上调血管内皮细胞生长因子受体 3 (vascular endothelial growth factor receptor 3, VEGFR3) 实现促分化作用^[7-8]。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)作为间质组织分泌的一种强力的促有丝分裂剂,是多种组织和细胞种类的生长因子。相关研究已经证明 HGF 在肿瘤淋巴转移中的作用,同时促进 LECs 增殖、迁移和淋巴管腔形成^[9-11],但目前尚未有报道 HGF 是否有单独诱导干细胞向 LECs 分化的报道。所以有理由推断, HGF 联合 VEGF-C 可以更好地促进 BMSCs 向 LECs 分化,探索更好的 BMSCs 向 LECs 分化的诱导方案。此次实验也将探索 HGF 联合 VEGF-C 促进 BMSCs 向 LECs 分化过程中 HGF 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料和仪器

F12-DMEM 培养基(Gibco),胎牛血清(Gibco),0.25%胰酶,大鼠重组 VEGF-C(Prospect),大鼠重组 HGF(Peprotech),

PE 标记抗大鼠 CD45、CD90、CD44 流式抗体(BD),兔抗大鼠 LYVE-1、Prox1、integrin α 9 抗体(Abcam),凝胶制备试剂盒(康为),兔抗大鼠 β -actin 抗体(博士德),羊抗兔荧光二抗(博士德),引物合成(上海英俊),逆转录试剂盒(Takala),Trizol 试剂盒(Takala),倒置相差显微镜(奥林巴斯),流式细胞仪(BD),PCR 仪(Biometra)

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠 BMSCs 的分离和培养 取 4 周龄雄性 SD 大鼠(来自于重庆医科大学动物实验中心),本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准,腹腔注射水合氯醛麻醉,颈部脱臼处死。将其放入 75%乙醇中 5 min,用无菌镊及手术剪剥离下肢股骨及胫骨。在干骺端剪一小开口,空针管吸取 F12 DMEM 培养基,冲刷骨髓腔,收集培养液将其装入离心管中。800 r/min 离心 5 min,倒去上清,加入 F12 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清)重悬,接种于 100 ml 培养瓶中。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的恒温培养箱培养。每 3 d 换液,约 12 d 细胞达到 90%融合状态时,用 0.25%胰酶消化 1 min,含 10%血清的培养基终止消化,离心重悬,按 1:4 比例传代接种于 25 ml 培养瓶中。倒置相差显微镜观察细胞的生长和形态变化情况。

1.2.2 大鼠 BMSCs 的表面抗原鉴定 取原代培养第 3 代细胞,检测干细胞表面标志抗原 CD45、CD90、CD44。用 0.25%胰酶消化细胞,PBS 漂洗 3 遍,转移至 1.5 ml EP 管中,离心倒去上清。每个标本至少保证 10^6 个细胞,按照抗体说明书加入直标荧光流式抗体,等待 1 h 然后上机检。

1.2.3 BMSCs 的成骨诱导 取原代培养第 3 代细胞,传代接种于 6 孔板上,按照成骨诱导培养说明书配置诱导培养基,每 3 d 换 1 次诱导培养液。成骨诱导 7 d 即可见细胞形态变化,细胞略成圆形,可见伪足及基质外少量钙盐沉积,成骨诱导 20 d 后,弃培养基,PBS 漂洗 2 次,然后每孔加入 4%甲醛 30 min,茜素红染色 10 min,镜下观察。

1.2.4 实验分组 基础培养基为 F12-DMEM 培养基,同时加入 10%胎牛血清,设置 50 ng/ml VEGF-C 分别联合 10、20、40、60、80、100 ng/ml HGF 配置诱导培养基的 6 个联合诱导组,以及同时设置 50 ng/ml VEGF-C 诱导组、50 ng/ml HGF 诱

导组和和不予任何细胞因子的空白对照组,分别编号为A、B、C、D、E、F、G、H、I组,诱导10 d后对各组利用 real-time PCR 检测 LECs 标志分子 LYVE-1、Prox1 的表达,以得出最适 HGF 浓度。设置最适浓度的 HGF 诱导组、空白对照组、50 ng/ml VEGF-C 诱导组,诱导10 d后 Wsetern blot、real-time PCR 检测相应 LECs 标志物 LYVE-1、Prox1 的表达,验证HGF 是否有单独诱导 BMSCs 向 LECs 分化的能力。设置空白对照组、50 ng/ml VEGF-C 诱导组、最适浓度 HGF联合 50 ng/ml VEGF-C 诱导组,诱导10 d后 Wsetern blot、real-time PCR 检测 integrin α 9 的表达,探索 HGF 在促分化过程中的机制。

1.2.5 Real-time PCR 收集细胞,Trizol 试剂盒提取细胞总 mRNA,紫外分光光度计测定各组 mRNA 浓度。PCR 引物如下:Prox1 上游 5'-TAAACGAGAAGGCAGCAACAAA-3';下游 5'-GAGGTGGGAAGACCTGAGGAAC-3';LYVE-1 上游 5'-GCTGTGCTGGGTGTTGCT-3';下游 5'-TTTGCTGGACT-CTTGGGC-3';integrin α 9 上游 5'-GAGCTCAAAAGTGCCC-TCTC-3';下游 5'-AGAGGGAGGAAAAAGAAGCA-3';逆转录制备 cDNA,所得 cDNA 置于-20℃保存。PCR 反应体系(总体积 20 μ l):2.0 μ l cDNA、0.6 ml Primers、10 μ l 2 $\times$ SYBR-Green、7.4 μ l 无菌水。PCR 反应条件:94℃-5 min $\rightarrow$ (94℃-30 s $\rightarrow$ 57℃-30 s $\rightarrow$ 72℃-30 s) $\times$ 35 个循环 $\rightarrow$ 72℃-10 min。结果分析采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

1.2.6 Wsetern blot 诱导10 d后将各组细胞用预冷 PBS 漂洗2遍,每瓶加入 200 μ l 细胞裂解液于冰上裂解30 min,然后刮取瓶底细胞并混匀,收集裂解液转移至 1.5 ml EP 管中,于 4℃,12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清。取其中 10 μ l 进行蛋白浓度测定,其余按 4:1 比例加入蛋白上样缓冲液固定,沸水浴 10min。配制凝胶,上样,切胶,然后电转至

PVDF 膜上,用 5%脱脂奶粉封闭 1 h,加入兔抗大鼠 LYVE-1 一抗或兔抗大鼠 Prox1 一抗或兔抗大鼠 integrin α 9 一抗,4℃孵育 12 h,PBST 漂洗。用辣根过氧化物酶标记二抗于 37℃下孵育 1 h,PBST 漂洗,避光 DAB 显色,拍照条带,Quantity one 分析各组灰度值, β -actin 为内参。

1.3 统计学分析

本课题使用 SPSS 17.0 统计软件,结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计描述,为计量资料,多样本均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 BMSCs 细胞形态学观察

原代培养细胞 24 h 后少部分贴壁,至 72 h 后贴壁细胞明显增多。且呈长梭形,成纤维样细胞,呈集落样生长。接种到第 7 天,细胞开始迅速生长增殖速度加快到 12 d 开始传代。传代细胞增长速度快于原代细胞,24 h 即贴壁完全,第 3 天细胞开始进入对数期生长,到第 7 天即可以传代(图 1)。

2.2 BMSCs 表面抗原的表达及向成骨诱导

流式结果显示:CD90 的表达率为 99.90%,CD44 的表达率为 99.89%,CD45 的表达率为 2.55%(图 2),结果表明,间充质干细胞表面特征性抗原 CD90、CD44 均为阳性表达,而造血细胞表面特征性抗原 CD45 为阴性表达,排除造血细胞的可能性,符合间充质干细胞的特性。同时,成骨诱导实验显示,诱导 7 d 即可见细胞形态变化,细胞略成圆形,可见伪足及基质外少量钙盐沉积,20 d 后,茜素红染色显示细胞外基质的钙盐被染成红色(图 3)。

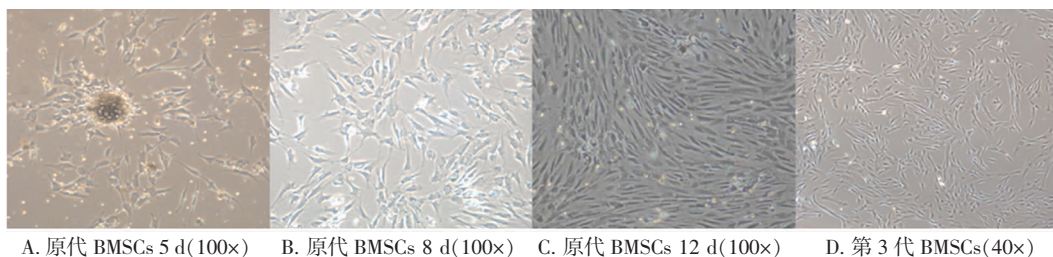


图 1 大鼠 BMSCs 原代及传代细胞

Fig.1 The primary and passage rat BMSCs

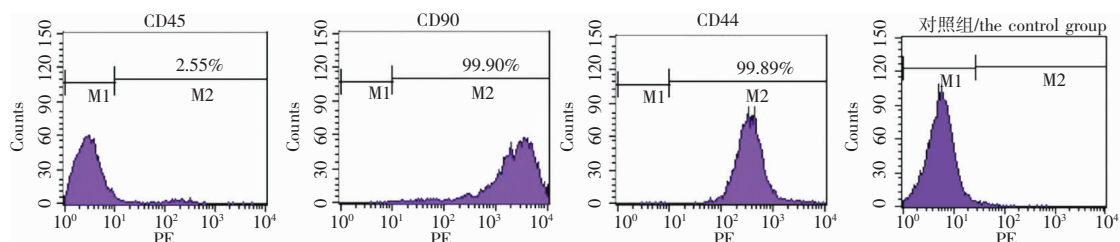


图 2 大鼠 BMSCs 表面标志抗原

Fig.2 Expression of antigens in the cell membrane of BMSCs

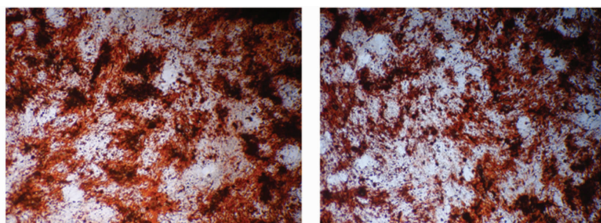


图 3 大鼠 BMSCs 细胞成骨诱导 20 后茜素红染色 (100 ×)

Fig.3 Alizarin red staining of rat BMSCs by inducing osteogenesis after 20 d (100 ×)

2.3 寻求 HGF 联合 VEGF-C 诱导 BMSCs 向 LECs 分化的 HGF 最适浓度

Real-time PCR 检测各组 Prox1、LYVE-1 的 mRNA 表达情况,发现 50 ng/ml HGF 组、空白对照组未有相关 mRNA 的表达,其余各组的相对表达量如下(图 4、5,表 1)。Prox1 的 mRNA 表达的各组样本均数存在统计学差异 ($F=108.248, P=0.000$),其中 80 ng/ml HGF+50 ng/ml VEGF-C 组即 E 组表达最高 (2.664 ± 0.137),组间比较有统计学差异 ($P_{A\&E}=0.000, P_{B\&E}=0.000, P_{C\&E}=0.000, P_{D\&E}=0.002, P_{F\&E}=0.000, P_{G\&E}=0.000$)。LYVE-1 的 mRNA 表达的各组样本均数存在统计学差异 ($F=998.496, P=0.000$),其中 80 ng/ml HGF+50 ng/ml VEGF-C 组即 E 组表达最高 (4.731 ± 0.098),组间比较具有统计学差异 ($P_{A\&E}=0.000, P_{B\&E}=0.000, P_{C\&E}=0.000, P_{D\&E}=0.000, P_{F\&E}=0.000, P_{G\&E}=0.000$)。

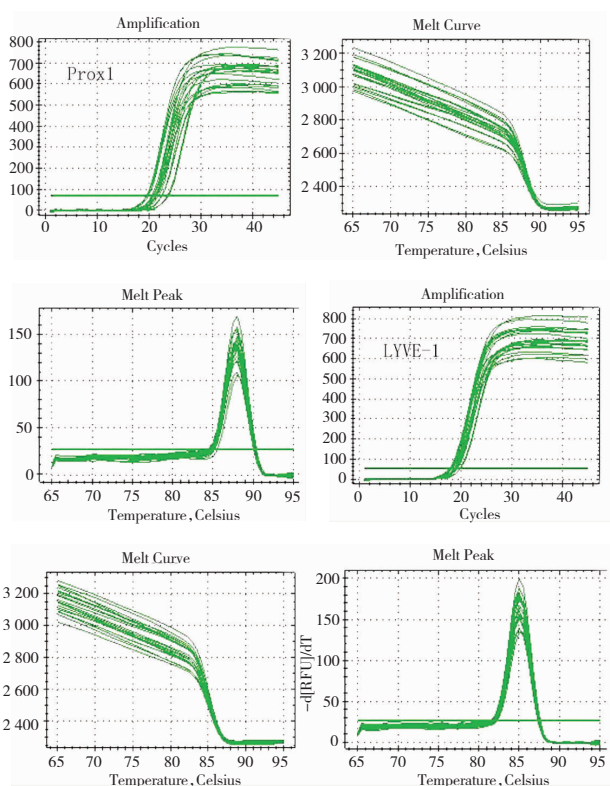
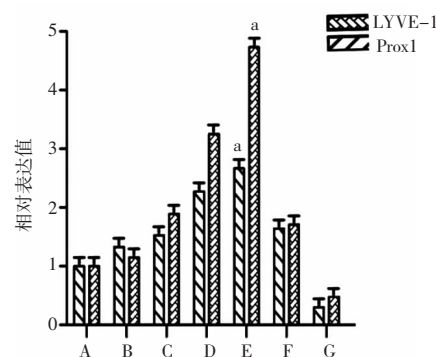


图 4 Prox1、LYVE-1 的扩增产物以及溶解曲线

Fig.4 Cycles and melt curve/peak of Prox1 and LYVE-1



A. 10 ng/ml HGF+50 ng/ml VEGF-C 组
B. 20 ng/ml HGF+50 ng/ml VEGF-C 组
C. 40 ng/ml HGF+50 ng/ml VEGF-C 组
D. 60 ng/ml HGF+50 ng/ml VEGF-C 组
E. 80 ng/ml HGF+50 ng/ml VEGF-C 组
F. 100 ng/ml HGF+50 ng/ml VEGF-C 组
G. 50 ng/ml VEGF-C 组

a, 与其他组相比, $P < 0.05$

图 5 各组 Prox1、LYVE-1 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.5 Relative expression of Prox1 and LYVE-1 in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 1 Real-time PCR 检测 Prox1、LYVE-1 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

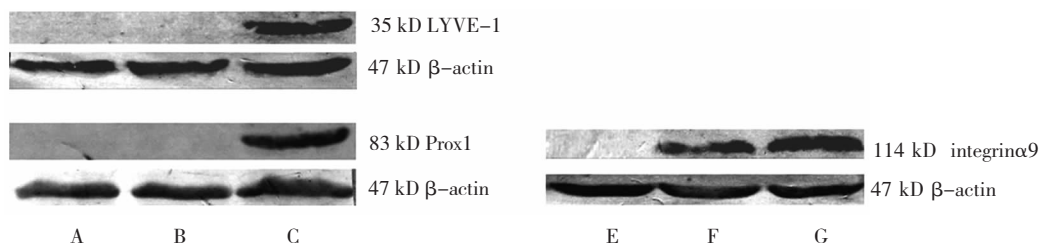
Tab.1 The relative expression of Prox1 and LYVE-1 detected by real-time PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Prox1	LYVE-1
10 ng/ml HGF+50 ng/ml VEGF-C 组 (A 组)	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
20 ng/ml HGF+50 ng/ml VEGF-C 组 (B 组)	1.325 ± 0.198	1.149 ± 0.084
40 ng/ml HGF+50 ng/ml VEGF-C 组 (C 组)	1.527 ± 0.164	1.890 ± 0.159
60 ng/ml HGF+50 ng/ml VEGF-C 组 (D 组)	2.271 ± 0.112	3.254 ± 0.065
80 ng/ml HGF+50 ng/ml VEGF-C 组 (E 组)	2.664 ± 0.137 ^a	4.731 ± 0.098 ^b
100 ng/ml HGF+50 ng/ml VEGF-C 组 (F 组)	1.644 ± 0.230	1.711 ± 0.093
50 ng/ml VEGF-C 组 (G 组)	0.304 ± 0.021	0.486 ± 0.025
F 值	108.248	998.496
P 值	0.000	0.000

注: a. 在 Prox1 表达的各组中, E 组分别与其他各组比较为 $P_{A\&E}=0.000, P_{B\&E}=0.000, P_{C\&E}=0.000, P_{D\&E}=0.002, P_{F\&E}=0.000, P_{G\&E}=0.000$;
b. 在 LYVE-1 表达的各组中, E 组分别与其他各组比较为 $P_{A\&E}=0.000, P_{B\&E}=0.000, P_{C\&E}=0.000, P_{D\&E}=0.000, P_{F\&E}=0.000, P_{G\&E}=0.000$

2.4 探讨 HGF 的促分化机制

BMSCs 诱导 10d 后, Western blot、real-time PCR 检测 HGF 诱导组中 LECs 标志性分子 LYVE-1、Prox1 为阳性表达,空白对照组 LECs 标志性分子 LYVE-1、Prox1 亦阴性表达,而 VEGF-C 诱导组 LECs 标志性分子 LYVE-1、Prox1 阳性表达。检测 HGF 联合 VEGF-C 诱导组中 integrin $\alpha 9$ 的表达较 VEGF-C 诱导组明显提高且有统计学差异 ($P_{\text{Western blot}}=0.001, P_{\text{real-time PCR}}=0.000$),而空白对照组未有 integrin $\alpha 9$ 的表达(图 6、7,表 2)。



A、B、C 分别为 HGF 诱导组、空白对照组、VEGF-C 诱导组, E、F、G 分别为空白对照组、VEGF-C 诱导组、HGF 联合 VEGF-C 诱导组

图 6 Western blot 检测 LYVE-1、Prox1、integrinα9 的表达

Fig.6 Expression of LYVE-1, Prox1 and integrinα9 detected by Western blot

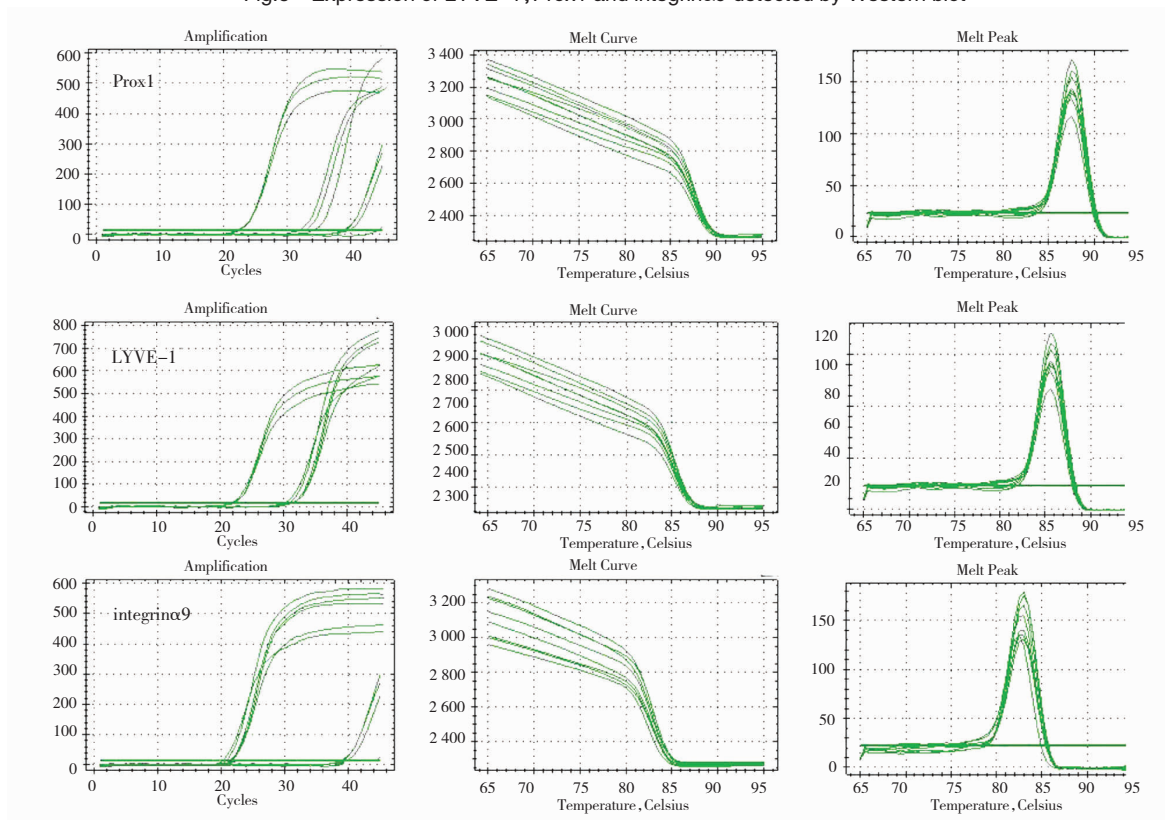


图 7 Prox1、LYVE-1、integrinα9 的扩增产物以及熔解曲线

Fig.7 Relative expression of Prox1, LYVE-1, integrinα9

表 2 检测各组 integrinα9 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.2 The expression of integrinα9 in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Western blot 检测 integrinα9 的表达	real-time PCR 检测 integrinα9 的表达
VEGF-C 诱导组	0.412 ± 0.046	1.000 ± 0.000
HGF 联合 VEGF-C 诱导组	0.827 ± 0.064	1.565 ± 0.228
F 值	103.910	109.609
P 值	0.001	0.000

3 讨论

淋巴水肿是由淋巴吸收缺陷以及转运障碍引起的一种难治性疾病,目前通过诱导 BMSCs 向 LECs 分化的组织工程技术是治疗淋巴水肿等相关疾病

的热门研究方向,本实验致力于探索更好的 BMSCs 向 LECs 分化的诱导方案并探讨相关作用机制。采用提取培养技术较为成熟的大鼠 BMSCs,检测 BMSCs 特定表面抗原 CD90、CD44 阳性表达,造血细胞特定表面抗原 CD45 阴性表达,同时具有向成骨方向分化的能力。取性状稳定的原代培养第 3 代细胞进行诱导实验。

过往研究已经证实 VEGF-C 可以诱导 BMSCs 向 LECs 分化,但存在诱导效率不高的问题,所以也常见 VEGF-C 联合 VEGF-A、FGF 等细胞因子促进诱导分化^[5-6]。HGF 作为 LECs 生成的一种重要细胞因子,在促进 LECs 增殖、迁移和管腔形成具有重要作用,同时具有促进肿瘤淋巴转移的作用^[9-11]。在

HGF促进 LECs 增殖作用的浓度探讨实验中,研究人员将浓度梯度范围设置从 0 到 100 ng/ml,发现当 HGF 为 50 ng/ml 时,其促增殖作用最强^[12],参照该浓度范围,设置多组 HGF 浓度联合 VEGF-C 诱导大鼠 BMSCs 向 LECs 分化,利用定量分析更加精确的 real-time PCR 技术检测 LECs 相关标志性分子 LYVE-1、Prox1 的 mRNA 表达量,发现当 HGF 浓度为 80 ng/ml 时,其标志性分子的 mRNA 表达量最高即联合 VEGF-C 因子的促分化作用最强。

以往相关研究证明在干细胞向 LECs 分化过程中存在着 3 条信号通路即 Prox1-VEGFR3、Prox1-VEGFR2、Prox1-integrin α 9 信号通路^[13-14],然而在 LECs 形成过程中最重要的还是 Prox1 介导下游 VEGFR3 和 integrin α 9 信号通道,VEGF-C 与 VEGFR-3 受体结合可以诱导淋巴内皮增殖、移行,与 integrin α 9 受体结合促进内皮细胞膜形成、淋巴内皮细胞形态、迁移变化。VEGFR3、integrin α 9 均为 VEGF-C 配体^[15],本实验结果显示 80 ng/ml 浓度的 HGF 不能单独诱导大鼠 BMSCs 向 LECs 分化,则表明 HGF 在该浓度条件下可能通过其他机制联合 VEGF-C 促进 BMSCs 向 LECs 诱导分化。而有研究证明 HGF 可间接上调 LECs 的 integrin α 9 的表达^[12],且本实验结果也显示 HGF 联合 VEGF-C 诱导过程中 integrin α 9 的表达较 VEGF-C 单独诱导过程中明显提高,提示 HGF 可能与 VEGF-A、FGF 一样,在联合促分化过程中,它们本身并不能单独诱导 BMSCs 向 LECs 分化,而是通过其他机制联合 VEGF-C 促进分化,不同的是,VEGF-A、FGF 通过间接上调 VEGFR3 受体的表达促分化,而 HGF 可能通过间接上调 integrin α 9 的表达促分化。所以本研究得出结论,在 HGF 联合 VEGF-C 诱导 BMSCs 向 LECs 分化过程中,HGF 可能通过间接上调 integrin α 9 的表达,使 VEGF-C 与更多表达的 integrin α 9 结合促进诱导分化。在 BMSCs 向 LECs 分化过程中,VEGF-C 是必须的起始因子,通过其他方式增加 Prox1 下游信号分子 VEGFR3 或 integrin α 9 受体的表达,均可促进 BMSCs 向 LECs 分化,这为本课题组进一步研究干细胞向 LECs 的诱导分化机制提供实验依据。

综上所述,本实验成功分离培养出纯度较高大鼠 BMSCs,在多组浓度 HGF 联合 VEGF-C 诱导大鼠 BMSCs 向 LECs 分化过程中,发现当 HGF 浓度为 80 ng/ml 时,HGF 联合 VEGF-C 诱导 BMSCs 向 LECs

分化的效率最高,同时发现 HGF 在联合 VEGF-C 促诱导分化过程中可能通过间接上调 integrin α 9 的表达发挥作用。

参 考 文 献

- [1] 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): 281-289.
- [2] 刘振川, 李宏博, 周 华, 等. BMSCs 联合 VEGF-C 治疗兔肢体淋巴水肿[J]. *中国现代普通外科进展*, 2014, 17(6): 426-429.
- [3] Zampell JC, Avraham T, Yoder N, et al. Lymphatic function is regulated by a coordinated expression of lymphangiogenic and anti-lymphangiogenic cytokines[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 302(2): C392-404.
- [4] 白英伟, 田兴松. BMSCs 向 LECs 的分化潜能[J]. *中国现代普通外科进展*, 2011, 14(5): 343-349.
- [5] 李 波, 刘艳丽, 魏璐婉. 血管内皮细胞生长因子 C 诱导 BMSCs 分化为 LECs 的研究[J]. *山东大学学报*, 2011, 49(11): 8-12.
- [6] 蒋 娟, 薛 斌, 李 晶. Integrin α 9 在人 ADSCs 向 LECs 分化过程中表达变化的相关研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2014, 39(5): 674-678.
- [7] Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis[J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(3): 673-700.
- [8] Chang LK, Garcia-Cardena G, Farnebo F, et al. Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(32): 11658-11663.
- [9] Jiang WG, Davies G, Martin TA, et al. The potential lymphangiogenic effects of hepatocyte growth factor/scatter factor in vitro and in vivo[J]. *Int J Mol Med*, 2005, 16(4): 723-728.
- [10] Cao RI, Björndahl MA, Gallego MI, et al. Hepatocyte growth factor is a lymphangiogenic factor with an indirect mechanism of action[J]. *Blood*, 2006, 107(9): 3531-3536.
- [11] Sennino B, Ishiguro-Oonuma T, Schriver BJ, et al. Inhibition of c-Met reduces lymphatic metastasis in RIP-Tag2 transgenic mice[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(12): 3692-3703.
- [12] Kajiya K, Hirakawa S, Ma B, et al. Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function[J]. *The EMBO Journal*, 2005, 24(16): 2885-2895.
- [13] Mishima K, Watabe T, Saito A, et al. Prox1 induces lymphatic endothelial differentiation via integrin α 9 and other signaling cascades[J]. *Molecular biology of the cell*, 2007, 18(4): 1421-1429.
- [14] 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]. *Nature Immunology*, 2003, 5(1): 74-80.
- [15] Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, et al. The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin α 9 β 11[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(6): 4544-4552.

(责任编辑:冉明会)