基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001158

格列本脲对 U-251 细胞增殖迁移的影响

郭　玲，朱淑娟，陈　清，杨清华，盛华均
（重庆医科大学基础医学院人体解剖教研室，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：探讨格列本脲对 U-251 细胞增殖迁移的影响。**方法**：使用浓度为 12.5~1 600 μmol/L 的格列本脲（Glib）处理人胶质瘤细胞 U-251，应用细胞增殖毒性检测试剂盒测定细胞增殖率并进行药物浓度筛选，划痕实验和 Transwell 法检测各实验组（使用浓度为 100 μmol/L、300 μmol/L、500 μmol/L 的 Glib 处理细胞）及对照组（未加 Glib）细胞迁移与侵袭情况。**结果**：CCK8 法检测显示，在 100~800 μmol/L 范围内，Glib 可抑制 U-251 细胞增殖，并呈浓度依赖性，其 48 h 的半数抑制浓度（IC50）为 400 μmol/L（F=150.30，P=0.000）；划痕实验显示 Glib 实验组细胞在 24 h 及 48 h 迁移宽度明显小于对照组，且随着药物浓度的增加迁移宽度比率降低（F=130.60，P=0.000）；Transwell 结果显示，Glib 抑制细胞迁移能力与划痕试验结果一致，Transwell 显示实验组迁移细胞数比对照组明显减少（F=86.68，P=0.000），实验组侵袭细胞数量比对照组明显下降（F=55.30，P=0.000），随着 Glib 浓度的增加，抑制迁移和侵袭能力逐渐增强，具有浓度依赖性。**结论**：格列本脲能够抑制 U-251 细胞增殖迁移过程。

【关键词】格列本脲；钾离子；胶质母细胞瘤；U251；迁移；侵袭
【中图分类号】R739.41　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-06-24

Effect of inhibition of potassium ions on the proliferation and migration of U-251 cells

Guo Ling, Zhu Shujuan, Chen Qing, Yang Qinghua, Sheng Huajun
(*Teaching and Research Section of Human Anatomy, College of Basic Medcine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effect of inhibition of potassium ions on the proliferation and migration of U-251 cells. ***Methods***: U-251 cells were treated by concentrations of Glib in 12.5 μmol/L to 1 600 μmol/L; the rates of inhibition cells proliferation and screen of concentration were measured by CCK-8 kit; the changes of cells of experimental groups (cells treatment with Glib by 100 μmol/L, 300 μmol/L and 500 μmol/L) and control group (without Glib) migration and invasion were monitored by wound healing assay and Transwell method. ***Results***: CCK8 assay showed the inhibition of U-251 cell proliferation by Glib range from 100 μmol/L to 800 μmol/L and inhibition of U-251 cell proliferation by Glib in a dose-dependent manner, and the median inhibition concentration (IC_{50}) of 48 h was 400 μmol/L (F=150.30, P=0.000). Wound healing assay revealed that the width of experimental groups were bigger than that of the control group at 24 h and 48 h and mobility width rates were negatively correlated with drug concentration (F=130.60, P=0.000). Transwell results showed that the drug inhibition of cell migration ability was consistent with the wound healing results in that the number of migrating cells in the experimental group was significantly fewer than those of the control group (F=86.68, P=0.000). Moreover, Transwell method showed that invasion ability of treatment with glib decreased compared with the control group (F=55.30, P=0.000), suggesting that the inhibition rates of migration and invasion were dose-dependent. ***Conclusion***: Glib plays an inhibiting role for the proliferation and migration of U-251 cells.

【Key words】Glib; potassium ion; glioblastoma; U-251; proliferation; migration

作者介绍：郭　玲，Email：linlingguo92@163.com，
研究方向：神经生物学。
通信作者：盛华均，Email：shjxxh@sina.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30771109）；重庆市科委基础与前沿资助项目（编号：cstc2014jcyjA10028）；重庆医科大学基础医学院资助项目（编号：2013-5）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170104.1004.006.html
（2017-01-04）

胶质瘤是源自神经上皮的肿瘤，占颅脑肿瘤的40%~50%，是最常见的神经系统肿瘤[1]。根据其病理特点，世界卫生组织（World Health Organization，WHO）将胶质瘤分为 4 个不同的级别，其中 3~4 级属高恶性胶质瘤[2]。高恶性胶质瘤具有侵袭性强、增殖生长不受控制、易迁移且难以治愈的特点[3]，给临床治疗带来极大的挑战。由于放疗、化疗效果不佳，手术是目前首选治疗方法，但术后易复发，难以根除[4]。且大部分患者在诊断后 2 年内死亡，对患者生存造成了极大的危害[2,5]。因此，对神经胶质瘤生物学特性的深入研究，寻找一种能够有效抑制神经胶质瘤细胞增殖、迁移的治疗方法，具有十分重要的意义。

钾离子通道（potassium channels）属跨膜通道蛋白，通过控制跨细胞膜的钾电流参与细胞增殖、分化、迁移和凋亡[6]。目前临床上尚未有以钾离子通道为靶标治疗肿瘤细胞的特定药物，为此，积极寻找此类药物并研究其作用机制刻不容缓。Glib 为目前临床上常用的磺酰脲类口服降糖药，研究[7]表明，Glib 抑制肿瘤细胞中钾离子通道的表达，影响细胞周期，减缓细胞增殖。众所周知，胶质瘤细胞进程不仅包括增殖和细胞周期，同时易迁移和侵袭性强为其难以治愈的重要原因。因此，本实验以离体胶质瘤 U-251 细胞为研究对象，不同浓度 Glib 为诱导剂，探讨钾离子通道抑制剂对 U-251 细胞增殖、迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系与药物 U-251 细胞来自复旦 IBS 细胞资源中心，Glib（纯度>95%）购于 Sigma 公司，溶于二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）稀释浓度为 2×10^5 μmol/L，0.22 μm 超滤除菌，-20 ℃储存，使用时用 DMEM 培养基稀释。

1.1.2 试剂与器材 DMEM 培养基、胎牛血清、青链霉素、L-谷氨酰胺（HyClone 公司）；CCK-8（日本同仁化学研究所）；Transwell 小室（Coster 公司）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 U-251 细胞加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基置于培养瓶中，放入 37℃、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养，2~3 d 传代，取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 CCK-8 法观察药物对细胞的抑制率 取对数生长的 U-251 细胞，调整细胞至 5×10^5 个/mL，以每孔 100 μL 接种 96 孔板内，设空白组、对照组、不同药物浓度实验组，共 5 组重复组，细胞贴壁后加不同浓度的 Glib（12.5、25、50、100、200、400、600、800、1 600 μmol/L），分别培养 48 h，每孔加入 10 μL CCK-8，3 h 后在波长为 450 μm 的酶标仪中测出吸光度（absorbance，A）值，实验重复 3 次，计算细胞增殖抑制率=（对照组-实验组）/（对照组-空白组）×100%。

1.2.3 划痕检测细胞迁移情况 用 marker 笔在 6 孔板背后划横线，每孔划 5 条；取密度为 2×10^5 个/mL 的 U-251 细胞加入 6 孔板内；贴壁后加不同浓度 Glib（100、300、500 μmol/L）作用 48 h，同时设置对照组（未加 Glib）；48 h 后用枪头比着直尺垂直于背后的横线划痕；0.01 mol/L PBS 轻轻清洗细胞 3 次，去除划下的细胞；加入无血清培养基，放入 37℃、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养，按 0、24、48 h 取样，拍照。实验重复 3 次，计算细胞迁移宽度比率=（各组 0 h 细胞间划痕宽度-各组相应时间细胞间划痕宽度）/各组 0 h 细胞间划痕宽度×100%。

1.2.4 Transwell 法检测细胞侵袭和迁移情况 ①迁移：制备药物（100、300、500 μmol/L）处理过 48 h 的细胞悬浮液，同时设置对照组（未加 Glib），调整细胞数为 2.5×10^5 个/mL，加入 200 μL 于小室上层，下层加入 600 μL 含有 10%胎牛血清的培养基，37 ℃孵育 24 h，4%多聚甲醛室温固定 30 min，0.01 mol/L PBS 清洗 3 次，1%结晶紫室温染色 30 min 后用棉签擦掉多余的结晶紫，再用 0.01 mol/L PBS 清洗 3 次于显微镜下观察计数。②侵袭：用无血清的预冷培养基 DMEM 稀释 Matrixgel 基质胶至终浓度为 2 mg/mL，在小室上层加入 100 μL 稀释后的基质胶，于 37 ℃孵育过夜；制备药物（100、300、500 μmol/L）处理过 48 h 的细胞悬浮液，同时设置对照组（未加 Glib），调整细胞数为 2.5×10^5 个/mL，加入小室上层 200 μL，下层加入 600 μL 含有 10%胎牛血清的培养基，37 ℃孵育 24 h，4%多聚甲醛室温固定 30 min，0.01 mol/L PBS 清洗 3 次，1%结晶紫室温染色 30 min 后用棉签擦掉多余的结晶紫，再用 0.01 mol/L PBS 清洗 3 次于显微镜下观察计数。

1.3 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 19.0 软件包进行数据分析，实验数据均以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示；采用单因素方差分析，两两相互比较采用 LSD-t 方差分析，迁移宽度比例采用重复测量数据的方差分析，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 CCK-8 法检测 Glib 对 U-251 的影响

分别使用 12.5、25、50、100、200、400、800、1 600 μmol/L Glib 浓度，与 U-251 细胞共培养 48 h 后，结果显示 Glib 对U-251 细胞增殖具有抑制作用；其 48 h 的 IC_{50} 是 400 μmol/L

（分别是 4.71 ± 4.38、6.81 ± 5.68、10.77 ± 8.79、20.30 ± 6.70、30.37 ± 4.50、51.56 ± 4.55、81.54 ± 2.46、95.97 ± 2.57，F=147.035，P=0.000）。当 Glib 浓度低于 50 μmol/L 时，对细胞抑制作用很小，统计结果显示与对照组比较，差异无统计学意义（P>0.05）。实验结果显示，随着药物浓度增高，细胞增殖抑制率逐渐上升，呈明显的量效关系（图 1）。本实验将采用 100、300、500 μmol/L 的 Glib 继续后续实验。

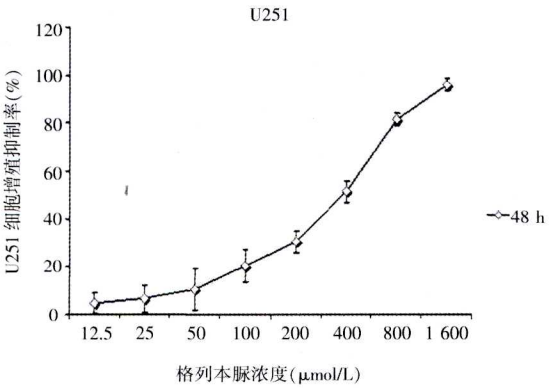


图 1 U251 细胞增殖抑制率的量效关系（n=3，$\bar{x} \pm s$）

Fig.1 Relation of cell proliferation inhibition with concentration（n=3，$\bar{x} \pm s$）

2.2 划痕法检测细胞迁移情况

分别使用 100、300、500 μmol/L Glib 浓度与 U-251 细胞共培养 24 h 及 48 h 后，对照组细胞划痕后在同等条件下迁移宽度比率明显小于实验组，药物浓度越高，这种趋势越明显，表明随着 Glib 浓度增高，细胞迁移能力逐渐降低（F=130.60，P=0.000）（表 1、图 2）。

表 1 不同浓度 Glib 对 U-251 细胞迁移宽度的影响（n=3，$\bar{x} \pm s$）

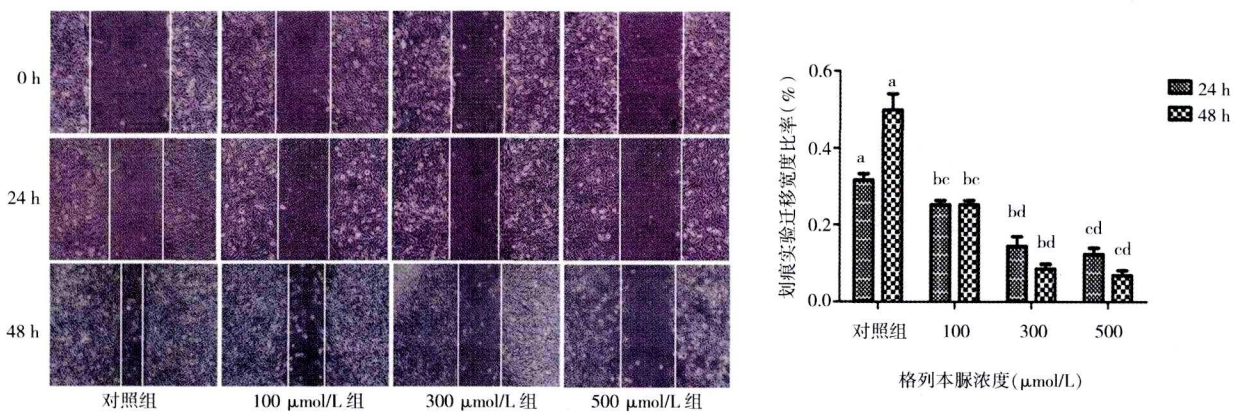
Tab.1 Effect of different Glib on width of cell migration（n=3，$\bar{x} \pm s$）

分组	24 h	48 h
对照组	31.75 ± 2.75[a]	49.87 ± 7.28[a]
100 μmol/L	25.27 ± 1.89[bc]	25.27 ± 1.89[bc]
300 μmol/L	14.35 ± 4.36[bd]	8.59 ± 2.04[bd]
500 μmol/L	12.29 ± 2.82[ad]	6.88 ± 2.25[ad]

注：$F_{组别}$=96.843，$P_{组别}$=0.000；$F_{时间}$=1.394，$P_{时间}$=0.255；$F_{交互}$=14.573，$P_{交互}$=0.000；a 表示不同时间点同组之间统计学比较，P<0.05；b 表示相同时间 100 μmol/L 浓度组与 300 μmol/L 浓度组比较，P<0.05；c 表示相同时间 100 μmol/L 浓度组与 500 μmol/L 浓度组比较，P<0.01；d 表示相同时间 300 μmol/L 浓度组与 500 μmol/L 浓度组比较，P>0.05

2.3 Transwell 法检测细胞迁移和侵袭情况

分别使用 100、300、500 μmol/L Glib 浓度，与 U-251 细胞共培养 48 h 后，Transwell 法显示对照组迁移细胞明显多于实验组，镜下计数统计后显示随着药物浓度的增加，细胞迁移率逐渐下降，各实验组与对照组有统计学意义（P<0.05）（表 2、图 3），各药物处理组之间有统计学意义（P 值分别为 0.000、0.000、0.000）；Transwell 显示对照组侵袭至小室下层的细胞数明显多于实验组，镜下计数统计后显示随着药物浓度的增加，抑制侵袭的能力越强，各实验组与对照组之间有统计学意义（P<0.05）（表 2、图 4），100 μmol/L 与 300 μmol/L、100 μmol/L 与 500 μmol/L 及 300 μmol/L 与 500 μmol/L 之间有统计学意义（P 值分别为 0.015、0.001、0.009）。实验结果表明，随着 Glib 的浓度增高，其抑制 U-251 细胞的迁移和侵袭逐渐增强。



注：$F_{组别}$=96.843，$P_{组别}$=0.000；$F_{时间}$=1.394，$P_{时间}$=0.255；$F_{交互}$=14.573，$P_{交互}$=0.000；a 表示不同时间点同组之间统计学比较，P<0.05；b 表示相同时间 100 μmol/L 浓度组与 300 μmol/L 浓度组比较，P<0.05；c 表示相同时间 100 μmol/L 浓度组与 500 μmol/L 浓度组比较，P<0.01；d 表示相同时间 300 μmol/L 浓度组与 500 μmol/L 浓度组比较，P>0.05

图 2 划痕法显示 Glib 对细胞迁移的影响（n=3，$\bar{x} \pm s$）

Fig.2 Inhibition of migration by Glib treatment using Wound healing assay（n=3，$\bar{x} \pm s$）

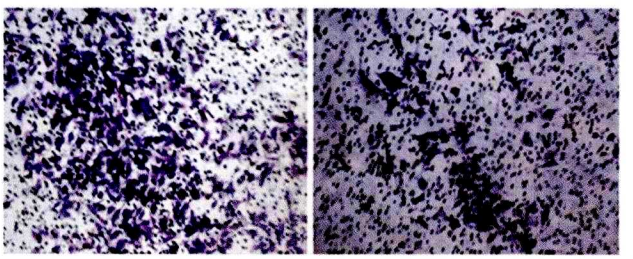
表 2　不同浓度 Glib 对 U-251 细胞迁移和侵袭的影响

（n=3，$\bar{x} \pm s$）

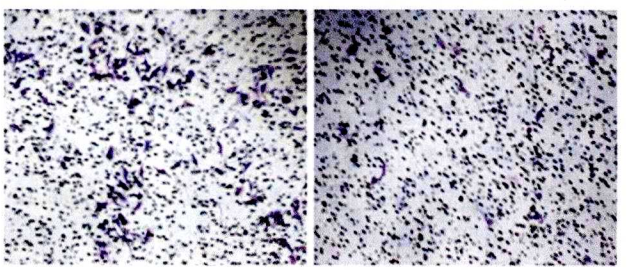
Tab.2　Effect of different Glib on cell migration and invasive

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

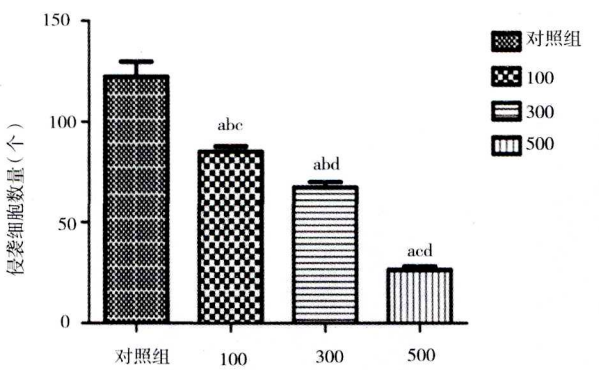
分组	迁移细胞数（个）	侵袭细胞数（个）
对照组	122.33 ± 13.01	115.00 ± 10.58
100 μmol/L	85.33 ± 4.51	87.33 ± 8.74
300 μmol/L	67.33 ± 4.73	58.00 ± 8.89
500 μmol/L	26.33 ± 3.06	31.00 ± 4.36
F 值	86.280	55.300
P 值	0.000	0.000



对照组　　100 μmol/L 组



300 μmol/L 组　　500 μmol/L 组

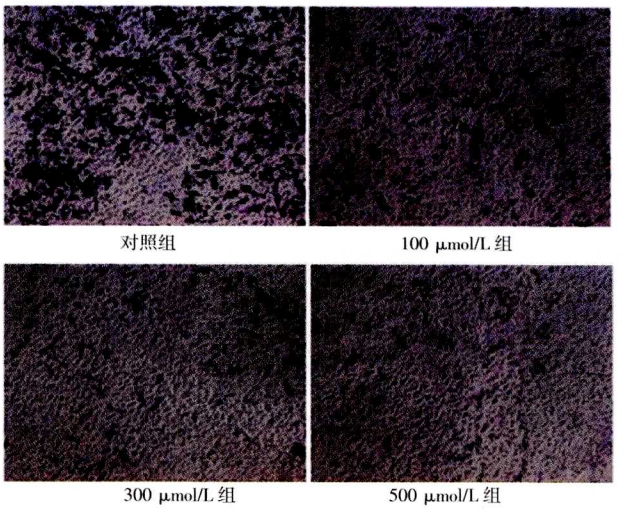


注：a 表示各实验组与对照组之间统计学比较，P<0.05；b 表示 100 μmol/L 浓度组与 300 μmol/L 浓度组比较，P<0.05；c 表示 100 μmol/L 浓度组与 500 μmol/L 浓度组比较，P<0.01；d 表示 300 μmol/L 浓度组与 500 μmol/L 浓度组比较，P<0.01

图 3　Transwell 法显示 Glib 对细胞迁移的影响（n=3，$\bar{x} \pm s$）

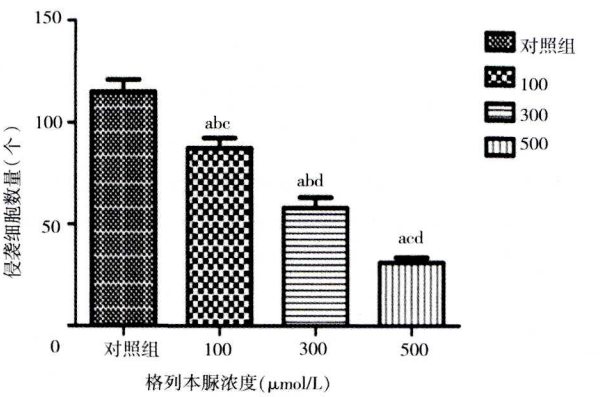
Fig.3　Inhibition of migration by Glib treatment using Transwell

(n=3, $\bar{x} \pm s$)



对照组　　100 μmol/L 组

300 μmol/L 组　　500 μmol/L 组



注：a 表示各实验组与对照组之间统计学比较，P<0.05；b 表示 100 μmol/L 浓度组与 300 μmol/L 浓度组比较，P<0.05；c 表示 100 μmol/L 浓度组与 500 μmol/L 浓度组比较，P<0.01；d 表示 300 μmol/L 浓度组与 500 μmol/L 浓度组比较，P<0.01

图 4　Transwell 法显示 Glib 对细胞侵袭的影响（n=3，$\bar{x} \pm s$）

Fig.4　Inhibition of invasion by Glib treatment using Transwell

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

3　讨　论

Glib是常见的糖尿病降糖药物，近年有研究[7]发现 Glib 可抑制胶质瘤 U87 细胞中钾离子内流，影响细胞周期，抑制细胞增殖。为此，本研究选择 Glib 为诱导剂，探讨 Glib 通过抑制 U-251 细胞的钾离子内流达到抑制其增殖、迁移的效果，为临床胶质瘤治疗用药提供一定的实验依据。本研究发现，Glib 能够抑制 U-251 细胞增殖和迁移，并且在有效剂量范围内，Glib 抑制 U-251 细胞增殖和迁移具有浓度和时间依赖性。

众所周知，钾离子通道属于跨膜蛋白，通过调控质膜上钾电流而调节多种生物过程，其在众多离子通道蛋白中最具多样化，可分为 4 个家族：电压门控性钾通道（voltage-gated potassium channels，Kv）、钙激活型钾通道（calcium-activated potassium channels，KCa）、内向整流型钾通道（inwardly rectifying potassium channels，Kir），以及双孔域钾通道（two-pore-domain potassium channels，K2P）[8]，它们在中枢神经系统中高表达。

近年来，钾离子通道在胶质瘤增殖生长及迁移过程中发挥的作用研究颇多。研究[6,9]表明，不同的钾离子通道在胶质瘤的发生发展过程中扮演着不同的角色，它们可能通过膜电位震荡、细胞体积变化、细胞周期、钙信号和胞内 pH 等多途径参与细胞增殖、分化、迁移和凋亡。①细胞周期是由周期蛋白依赖性激酶、周期蛋白、周期蛋白依赖性激酶抑制剂等调控的一个复杂精细的过程[9]。众多研究[7,10-12]表明，钾离子通道与细胞周期密切相关。同时，细胞膜上钾离子通道活性在 G1 期起关键作用，主要表现在 3 个方面：钾离子通道开放剂刺激细胞有丝分裂[13]。钾离子通道阻滞剂抑制细胞有丝分裂；有丝分裂原促进钾离子通道的表达并增强其活性。如未孕小鼠卵子细胞中 BK 通道（即 K^+通道亚型之一大电导 KCa1.1 通道）在 M 期和 G1 期十分活跃，在 S 期和 G2 期不活跃[14]。钡离子（Ba^{2+}）可阻滞 Kir4.1 通道并将细胞阻滞在 G2/M 期[10]。课题组实验结果[15]显示，Kir4.1 基因沉默可显著抑制 U-251 细胞周期的 G2 期，促使细胞生长停滞在 S 期。4-氨基吡啶类似物 ZC88 抑制 hERG1 通道和 hERG1b 通道且将细胞周期抑制在 G0/G1 期[6,11]。多沙唑嗪诱导 LN-229 和 U-87 细胞发生凋亡，亦使细胞周期停留在 G0/G1 期[12]；Ru 在实验中也发现 U87 细胞接触 K^+通道阻断剂 48 h 后，细胞百分比在 G0/G1 期明显增强，而 S 期细胞比例显著减少[7]。可见，钾离子通道主要调控 G1/S 期转换点，影响细胞增殖[16]。研究还发现[9,17]，钾离子通道可控制细胞膜上电位变化及电信号参与调节细胞周期，影响增殖与凋亡。②钾离子的运动影响细胞膜上电流变化。研究显示，在神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞中 G1/S 期伴随超级化的发生，且超级化阶段与钾离子流出增加有关。在小鼠淋巴细胞中，从 G0 期到 M 期的转换伴随着去极化，DNA复制时伴随着超级化[6,11]。Higashimori 等[10]发现神经胶质细胞瘤系 D54-MG 中 Kir4.1 通道表达诱发持续超级化，将细胞从 G2/M 期转换到静态 G0/G1 期，从而阻滞细胞生长。③钾离子通道还能调控 Ca^{2+}信号[6,16]。KCa3.1 通道对细胞内钙离子（Ca^{2+}）高度敏感，少量 Ca^{2+}流入胞内，即可引起 KCa3.1 通道的大量开放，由此带来的巨大驱动力加速 Ca^{2+}涌入，进而激活 CLC-3 和 KCa3.1 通道，形成循环致细胞过度增生和表型转化，参与迁移[18,19]。④钾离子通道调节钾离子流和细胞内渗透压，是细胞体积的中央监管机构[6]，而细胞体积和形状发生改变，将为细胞迁移做准备。除此之外，钾离子通道还通过细胞质域之间蛋白质与蛋白质的相互作用引发信号级联，影响细胞进程[6]。因此，钾离子通道在胶质瘤细胞增殖生长及迁移过程中发挥着重要作用[20]。

Glib 可抑制钾电流是否通过上述某一条或几条途径参与调控肿瘤细胞增殖和迁移有待进一步深入研究。另外，Glib 是一个降糖药物，临床应用中如何平衡其降糖作用和抑制细胞生长的作用，寻找最合适用药剂量等多个问题同样亟待解决。

参 考 文 献

[1] Ru Q，Shang BY，Miao QF，et al. A cell penetrating peptide-integrated and enediyne-energized fusion protein shows potent antitumor activity[J]. Eur J Pharm Sci，2012，47(4)：781-789.

[2] Van Meir EG，Hadjipanayis CG，Norden AD，et al. Exciting new advances in neuro-oncology：the avenue to a cure for malignant glioma [J]. CA Cancer J Clin，2010，60(3)：166-193.

[3] Turner KL，Sontheimer H. Cl^- and K^+ channels and their role in primary brain tumour biology[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci，2014，369(1638)：20130095.

[4] Walbert T，Chasteen K. Palliative and supportive care for glioma patients[J]. Cancer Treat Res，2015，163：171-184.

[5] Siegel RL，Miller KD，Jemal A. Cancer statistics，2016[J]. CA Cancer J Clin，2016，66(1)：7-30.

[6] Huang X，Jan LY. Targeting potassium channels in cancer[J]. J Cell Biol，2014，206(2)：151-162.

[7] Ru Q，Tian X，Wu YX，et al. Voltage-gated and ATP-sensitive K^+ channels are associated with cell proliferation and tumorigenesis of human glioma[J]. Oncol Rep，2014，31(2)：842-848.

[8] Comes N，Serrano-Albarras A，Capera J，et al. Involvement of potassium channels in the progression of cancer to a more malignant phenotype[J]. Biochim Biophys Acta，2015，1848(10 Pt B)：2477-2492.

基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001004

脂肪干细胞诱导分化为淋巴管内皮细胞信号通路的探究

豆倩影，薛　斌
（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：探讨血管内皮细胞生长因子 C（vascular endothelial growth factor C，VEGF-C156s）诱导脂肪间充质干细胞（adipose-derived stem cells，ADSCs）向淋巴管内皮细胞（lymphatic endothelial cells，LECs）早期分化的调控通路。**方法**：取人脂肪间充质干细胞（human adipose-derived stem cells，HADSCs）随机分为 5 组：空白对照组（常规 DMEM/F12）、VEGF-C 诱导组（含 100 ng/mL VEGF-C）、VEGF-C 联合抑制剂 a 组（含 100 ng/mL VEGF-C+ 5 μmol/L 的 VEGFR3 磷酸化酶抑制剂 MAZ51）、VEGF-C联合抑制剂 b 组（含 100 ng/mL VEGF-C+10 μg/mL 的 Anti-Integrinα9 功能封闭性抗体 Y9A2）、VEGF-C 联合抑制剂 a+b 组，连续培养 10 d 后，Western blot 和细胞免疫荧光（IF）检测 LECs 标志性分子 VEGFR3、Integrinα9、LYVE-1 的相对表达量；VEGF-C 诱导分化后的细胞用 Anti-Integrinα9 封闭性抗体和 MAZ51 作用后，Transwell 小室检测各组细胞迁移数量的变化。**结果**：与诱导组相比，分别阻断 VEGFR3 和 Integrinα9 通路都会相应减弱 LYVE-1 的表达（$P_{Western}$=0.000，P_{IF}=0.000），且在上述溶度下两抑制剂对 LYVE-1 的减弱作用无统计学差异（$P_{Western}$=0.164，P_{IF}=0.927）；而分别阻断任一通路对另一通路的表达量都没有影响（$P_{Western\ VEGFR3}$(BVSD)=0.804，$P_{IF\ VEGFR3}$(BVSD)=0.528，$P_{Western\ Integrin\alpha9}$(BVSC)=0.914，$P_{IF\ Integrin\alpha9}$(BVSC)=0.593）。与抑制剂作用之前相比，分别阻断 Integrinα9 和 VEGFR3 会使迁移细胞数量相应减少（P=0.000），而同时阻断 Integrinα9 和 VEGFR3 会使迁移细胞数量进一步减少（P=0.000）。**结论**：VEGF-C 诱导 HADSCs 向 LECs 分化过程中有 VEGF-C/VEGFR3 和 VEGF-C/Integrinα9 两条独立信号通路，且 Integrinα9 和 VEGFR3 在诱导后的细胞的迁移中均发挥重要作用。

【关键词】脂肪干细胞；淋巴管内皮细胞；血管内皮生长因子 C；人整合素 α9；血管内皮生长因子受体 3
【中图分类号】R619.9　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-11-25

作者介绍：豆倩影，Email：526965106@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/detail/50.1046.r.20160623.1546.014.html
（2016-06-23）

[9] 韩　璐，张　红，狄翠霞. 离子通道与肿瘤关系研究现状[J]. 生命科学进展，2014，45(3)：225-229.
[10] Higashimori H，Sontheimer H. Role of Kir4.1 channels in growth control of glia[J]. Glia，2007，55(16)：1668-1679.
[11] Wei X，Sun H，Yan H，et al. ZC88，a novel 4-amino piperidine analog，inhibits the growth of neuroblastoma cells through blocking hERG potassium channel[J]. Cancer Biol Ther，2013，14(5)：450-457.
[12] Staudacher I，Jehle J，Staudacher K，et al. HERG K^+ channel-dependent apoptosis and cell cycle arrest in human glioblastoma cells[J]. PLoS One，2014，9(2)：e88164.
[13] 胡　力，杨孔宾. 钾离子通道与胶质瘤关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学，2013，21(2)：440-442.
[14] Chandy KG，Decoursey TE，Cahalan MD，et al. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation[J]. Journal of Experimental Medicine，1984，160(2)：369-385.
[15] 朱淑娟，甘胜伟，冉建华. Kir4.1 基因沉默对 U-251 细胞周期的影响[J]. 重庆医科大学学报，2015，40(1)：18-22.
[16] Urrego D，Tomczak AP，Zahed F，et al. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci，2014，369(1638)：20130094.
[17] Bates E. Ion channels in development and cancer[J]. Annu Rev Cell Dev Biol，2015，31(1)：231-247.
[18] Turner KL，Honasoge A，Robert SM，et al. A proinvasive role for the Ca^{2+}-activated K^+ channel KCa3.1 in malignant glioma[J]. Glia，2014，62(6)：971-981.
[19] Turner KL，Sontheimer H. KCa3.1 modulates neuroblast migration along the rostral migratory stream(RMS) in vivo[J]. Cereb Cortex，2014，24(9)：2388-2400.
[20] Le Guennec JY，Ouadid-Ahidouch H，Soriani O，et al. Voltage-gated ion channels，new targets in anti-cancer research[J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov，2007，2(3)：189-202.

（责任编辑：张辉洁）