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）

Signaling pathway in the differentiation process from HADSCs into LECs

Dou Qianying, Xue Bin

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

【Abstract】***Objective***: To explore the regulatory pathways from human adipose-derived stem cells (HADSCs) differentiate into lymphatic endothelial cells (LECs) by vascular endothelial growth factor C (VEGF-C156s) in the early lymphangiogenesis. ***Methods***: HADSCs were randomly divided into 5 groups: blank control group, VEGF-C inducing group (containing 100 ng/mL VEGF-C), VEGF-C unite inhibitor "a" group (containing 100 ng/mL VEGF-C+5 μmol/L VEGFR3 phosphorylase inhibitor MAZ51), VEGF-C unite inhibitor "b" group (containing 100 ng/mL VEGF-C+10 μg/mL Anti-Integrinα9 function blocking antibody Y9A2), VEGF-C unite inhibitor "a" and "b" group. After 10 d culturing, the relative expression level of LECs markers VEGFR3, Integrinα9, LYVE-1 were detected by Western blot and immunofluorescence. The induced cells with VEGF-C were incubated by anti-Integrinα9 function blocking antibody and MAZ51; quantity of cell migration in all groups were calculated using Transwell. ***Results***: Compared with that in induction group, the expression level of LYVE-1 was modestly weakened with blocking VEGFR3 and Integrinα9 pathways ($P_{Western}$=0.000, P_{IF}=0.000), and there was no statistical difference in LYVE-1 level between the two inhibitors at the concentration above ($P_{Western}$=0.164, P_{IF}=0.927). Blocking one of the two pathways, the expression of another had no change ($P_{Western\ VEGFR3}$(BVSD)=0.804, $P_{IF\ VEGFR3}$(BVSD)=0.528, $P_{Western\ Integrin\alpha9}$(BVSC)=0.914, $P_{IF\ Integrin\alpha9}$(BVSC)=0.593). Compared with that of no inhibitors, the quantity of cell migration suffered a modest decrease with blocking VEGFR3 and Integrinα9 (P=0.000), while the numbers of cell migration was further reduced when blocking VEGFR3 and Integrinα9 at the same time (P=0.000). ***Conclusion***: There are two independent pathways: VEGF-C/VEGFR3 and VEGF-C/Integrinα9 in the differentiation process from stem cells into LECs. VEGFR3 and Integrinα9 play major role in the migration of induced cells.

【Key words】human adipose-derived stem cells; lymphatic endothelial cells; vascular endothelial growth factor C; Integrinα9; vascular endothelial growth factor receptor 3

淋巴系统的先天缺陷或后天损伤都会造成淋巴管功能缺陷而产生淋巴水肿，作为种子细胞的多能干细胞（胚胎干细胞、外周血干细胞、骨髓间充质干细胞[1-3]）都证明可以被内皮细胞生长因子 C（vascular endothelial growth factor C，VEGF-C）诱导为淋巴管内皮细胞（lymphatic endothelial cells，LECs）。脂肪间充质干细胞（adipose-derived stem cells，HADSCs）由于其取材方面、来源丰富等优点近几年更是成为研究的热点，以往实验证明 HADSCs 在 VEGF-C 联合 bFGF、VEGF-A、PDGF 等细胞因子下，在体外被诱导分化为 LECs[4-6]。以往研究发现 VEGF-C是通过与其受体 VEGFR3 和 Integrinα9 结合促进淋巴管的生成[7]，敲除 VEGFR3 和 Integrinα9 基因的小鼠都会死于淋巴管功能缺陷[8-9]。所以在淋巴管生成过程中可能存在两条通路：VEGF-C/VEGFR3 和 VEGF-C/Integrinα9。

VEGF-C 通过与其受体 VEGFR2、VEGFR3 的结合，分别促进干细胞向血管内皮细胞、LECs 分化[10]。有实验表明在 VEGF-C 诱导胚胎干细胞向内皮细胞分化过程中，VEGFR2 和 VEGFR3 可以形成二聚体而存在交叉激活作用[10]。由此猜想在 VEGF-C 诱导 LECs 分化过程中，VEGFR3 和 Integrinα9 之间是否存在交叉激活作用？本实验在 VEGF-C156s（作为 VEGF-C 的一种突变体可以选择性的与 VEGFR3 结合而不能与 VEGFR2 结合，从而特异性的诱导干细胞向 LECs 分化[4]）诱导 HADSCs 向LECs 分化过程中，应用分别阻断 VEGFR3 和 Integrinα9的抑制剂，从而探索两条通路之间的关系和对 LECs 生成的影响。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂和仪器

HADSCs（广州赛业），DMEM/F12 培养基（Gibco），人重组 VEGF-C156s（R&D），磷酸化酶抑制剂 MAZ51 和 Anti-Integrinα9 封闭性抗体 Y9A2（merck-milli pore），p-VEGFR3 单克隆抗体（pharmingen），兔源 VEGFR3、LYVE-1 多克隆抗体和鼠源 Integrinα9 多克隆抗体（Santa Cruz），羊抗兔/鼠荧光二抗（Abbkine），Transwell 小室（Corning），HEPA Class 100 型 CO_2 孵箱（Thermo），倒置相差显微镜和荧光共聚焦显微镜（Olympus）。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 取 P3-P6 代细胞分为空白对照（A 组）、VEGF-C 诱导组（B 组，含 100 ng/mL VEGF-C）、VEGF-C 联合抑制剂 a 组（C 组，含 100 ng/mL VEGF-C+5 μmol/L MAZ51）、VEGF-C 联合抑制剂 b 组（D 组，含 100 ng/mL VEGF-C+10 μg/mL 的 Anti-Integrinα9 封闭性抗体）、VEGF-C 联合抑制剂 a+b 组（E 组，含 100 ng/mL VEGF-C+同前浓度的 2 种抑制剂），连续培养 10 d 后对各组利用 Wsetern blot、细胞免疫荧光检测加入 2 种抑制剂前后 VEGFR3、Integrinα9 和 LYVE-1 的表达变化。另取 100 ng/mL VEGF-C 诱导 10 d 后的细胞，B 组细胞不加任何处理，C、D 组细胞分别用 5 μmol/L VEGFR3 磷酸化酶抑制剂 MAZ51 和 30 μg/mL 的 Anti-Integrinα9 封闭性抗体 Y9A2，E 组同时用上述 2 种抑制剂，冰上孵育 30 min，未诱导的 HADSCs 为 A 组（空白对照组），各组细胞通过 Transwell 小室检测 VEGFR3 和 Integrinα9 在细胞迁移中的作用。

1.2.2 Wsetern blot 各组细胞连续培养 10 d，按照蛋白提取试剂盒提取蛋白，BCA 法测定蛋白溶度，依次配制分离胶和浓缩胶，按照 40 μg 蛋白/孔上样，然后电转至 PVDF 膜上，用 5%脱脂奶粉封闭 1 h，分别加入兔抗人 VEGFR3、LYVE-1 抗体（1:500），鼠抗人 Integrinα9 抗体（1:500），PBST 漂洗后加入相应二抗（1:2 000），37 ℃孵育 2 h，增强化学发光试剂显影，获取图像，Fusion FX7 凝胶成像分析系统进行灰度分析。

1.2.3 细胞免疫荧光 各组细胞接种于 24 孔板中细胞爬片上，每组 4 个复孔，连续培养 10 d。取出细胞爬片，4%多聚甲醛固定 15 min，5% BSA/PBS 封闭，其中 2 个复孔加入鼠源 Anti-Integrinα9 抗体（1:50）和兔源 Anti-VEGFR3 抗体（1:50）的混合液（免疫荧光双标记），另外 2 个复孔加入兔源 Anti-LYVE-1 抗体（1:50），4 ℃ 孵育过夜。再分别用荧光标记的二抗 37 ℃ 孵育 1.5 h，DAPI 核染色，在荧光共聚焦显微镜各条件设定不变的情况下对各组细胞观察、照相，采集图片，用 NIH Image J 软件进行荧光强度定量分析。各组高倍镜视野下随机选取 3 个视野，每个视野再随机选取 5 个相同的视野面积进行荧光强度定量灰度分析，经软件所读取的荧光强度值进行统计学分析。

1.2.4 Transwell 利用膜孔径为 8 μm 的 Transwell 小室放入 24 孔板来构建细胞体外迁移模型。上述 5 组细胞分别以 5×10^4 个细胞接种于 Transwell 小室的上室，下室中加入 600 μL 含 50 ng/mL VEGFC 的培养基，放入孵箱继续培养 4 h。各组小室用 4%多聚甲醛固定 30 min，PBS 漂洗风干后，用 0.2%结晶紫染色 20 min，然后用棉签拭去上室未迁移细胞。显微镜观察、计数迁移到小室膜下表面的细胞，每组按上下左右中随机选取 5 个视野，用 5 个视野细胞总数的均数进行统计分析，每组 3 个复孔。

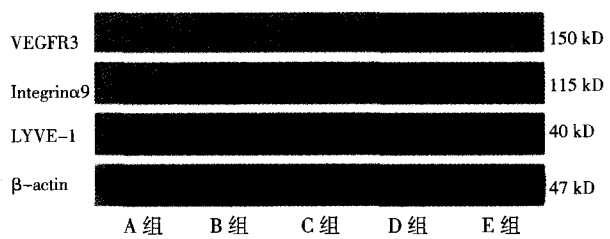
1.3 统计学分析

使用 SPSS 19.0 统计软件，结果以 均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）进行统计描述，多组均数间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-t 法，检验水准 α=0.05。

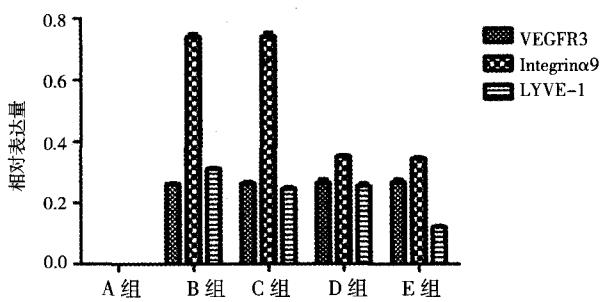
2 结 果

2.1 Wsetern blot 检测结果

本课题组前期试验证实，5 μmol/L 的 VEGFR3 磷酸化酶抑制剂 MAZ51 可明显减弱磷酸化 VEGFR3（p-VEGFR3）的表达水平。VEGF-C 诱导组（B 组）同时表达 LECs 标志性分子 LYVE-1、Integrinα9 和 VEGFR3，提示成功分化为具有淋巴管表型的细胞，而 3 种蛋白在 A 组中不表达。VEGFR3 在 B、C、D、E 各组中阳性表达且表达量无差异（P=0.990）；Integrinα9 在 A、B、C、D、E 各组中的表达量具有统计学差异（F=1 787.863，P=0.000），两两比较，B、C 2 组间无统计学差异（P=0.914），D、E 2 组间无统计学差异（P=0.612），且 D、E 组表达量明显低于 B、C 组（P=0.000）；LYVE-1 在 A、B、C、D、E 各组中的表达量具有统计学差异（F=644.322，P=0.000），两两比较 LYVE-1 在 B、C/D、E 组中的表达依次降低（P=0.000），而 C、D 2 组间不具有统计学差异（P=0.164）。Integrinα9、VEGFR3 和 LYVE-1 的具体表达量见图 1，表 1。



A. Western blot 检测后果



B. 柱状图

A. 空白对照组；B. VEGF-C 诱导组；C. VEGF-C+ MAZ51 组；D. VEGF-C+ Anti-Integrinα9 封闭性抗体 Y9A2 组；E. VEGF-C+ 同前浓度的两种抑制剂组

图 1 各组中 Integrin α 9、VEGFR3 和 LYVE-1 的表达量（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.1 Expression of Integrin α 9, VEGFR3 and LYVE-1 detected by Western blot and the bar chart of Integrin α 9, VEGFR3 and LYVE-1 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

2.2 细胞免疫荧光检测结果

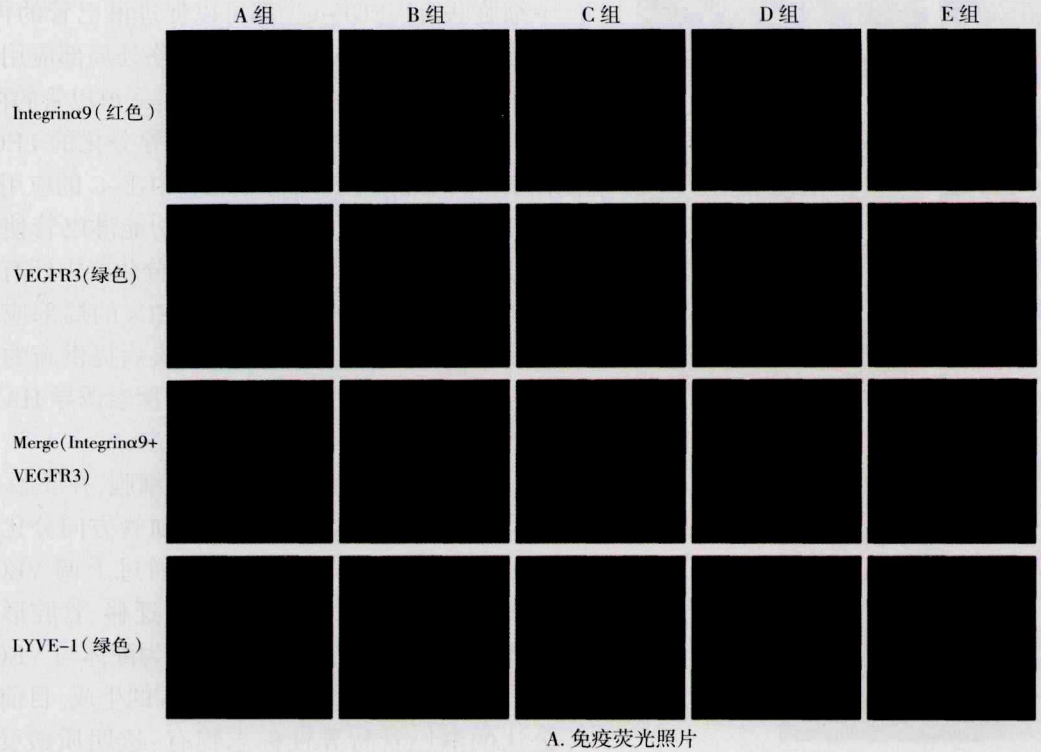
VEGF-C 诱导组(B 组)的细胞形态由长梭形变为为短梭形，可伸出伪足，呈集束辐射状排列且 LYVE-1(膜蛋白)、Integrinα9(跨膜蛋白)和 VEGFR3(跨膜蛋白)阳性表达，进一步提示成功分化为具有淋巴管表型的细胞。VEGFR3 在 B、C、D、E 各组中阳性表达且表达量无统计学差异(P=0.931)。Integrinα9 在 A、B、C、D、E 各组中表达量有统计学差异(F=188.304，P=0.000)，两两比较，B、C 2 组无统计学差异(P=0.593)，D、E 2组无统计学差异(P=0.736)，且 D、E 2 组表达量明显低于 B、C 2 组(P=0.000)。LYVE-1 在 A、B、C、D、E 各组中表达量有统计学差异(F=938.549，P=0.000)，两两比较 LYVE-1 在 B、C/D、E 组中的表达依次降低(P=0.000)，而 C、D 2 组间无统计学差异(P=0.301)。免疫荧光结果与前 Western blot 结果相符，Integrinα9、VEGFR3 和 LYVE-1 的具体表达量见图 2，表 1。

表 1 Western blot 和细胞免疫荧光检测各组 LYVE-1 的相对表达量($\bar{x}\pm s$，n=3)

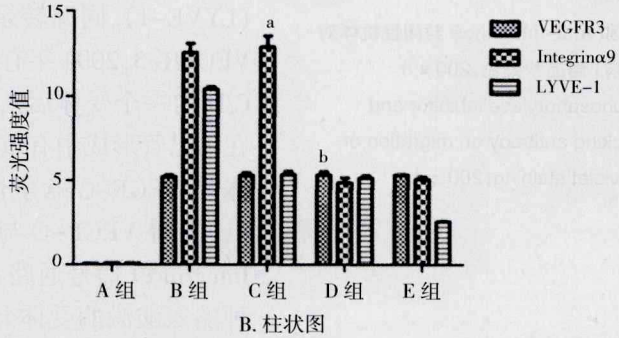
Tab.1 Relative expression of LYVE-1 detected by IF and Western blot($\bar{x}\pm s$，n=3)

组别	Western blot 检测 LYVE-1 的表达	免疫荧光检测 LYVE-1 的表达
A 组	0.000 ± 0.000	0.080 ± 0.010
B 组	0.312 ± 0.006	10.400 ± 0.262
C 组	0.245 ± 0.011[a]	5.347 ± 0.333[a]
D 组	0.256 ± 0.137[ab]	5.153 ± 0.235[ab]
E 组	0.122 ± 0.004[ac]	2.553 ± 0.038[ac]
F 值	644.322	938.549
P 值	0.000	0.000

注：a.与 VEGF-C 诱导组比较 P=0.000；b：与 VEGF-C+VEGFR3 磷酸化酶抑制剂组比较 P_{IF}=0.301、P_{WB}=0.164；c：与 VEGF-C+VEGFR3 磷酸化酶抑制剂组及 VEGF-C+Integrin α 9 封闭性抗体组比较 P=0.000



A. 免疫荧光照片



B. 柱状图

注：a，与 VEGF-C 诱导组比较，P=0.593；b：与 VEGF-C 诱导组比较，P=0.528

图 2 各组细胞 Integrin α 9、VEGFR3 和 LYVE-1 表达的免疫荧光图片（400×）($\bar{x}\pm s$，n=3)

Fig.2 Immunofluorescen images of Integrin α 9，VEGFR3 and LYVE-1 and the bar chart of Integrin α 9，VEGFR3 and LYVE-1 detected by IF($\bar{x}\pm s$，n=3)

2.3　Transwell 小室检测结果

A、B、C、D、E 各组细胞继续培养 4 h 后，每 200 倍视野下细胞的迁移数量分别为(7.600 ± 1.140)、(76.400 ± 12.361)、(43.800 ± 5.167)、(41.000 ± 2.121)、(26.400 ± 2.074)，方差分析各组迁移细胞数量具有统计学差异(F=84.735，P=0.000)。两两比较显示，分别用两种抑制剂作用后细胞迁移数量较诱导组明显减少(P=0.000)，而 2 种抑制剂组之间不具有统计学差异(P=0.480)，同时加入 2 种抑制剂后迁移细胞数量进一步减少(P=0.000)。见图 3。

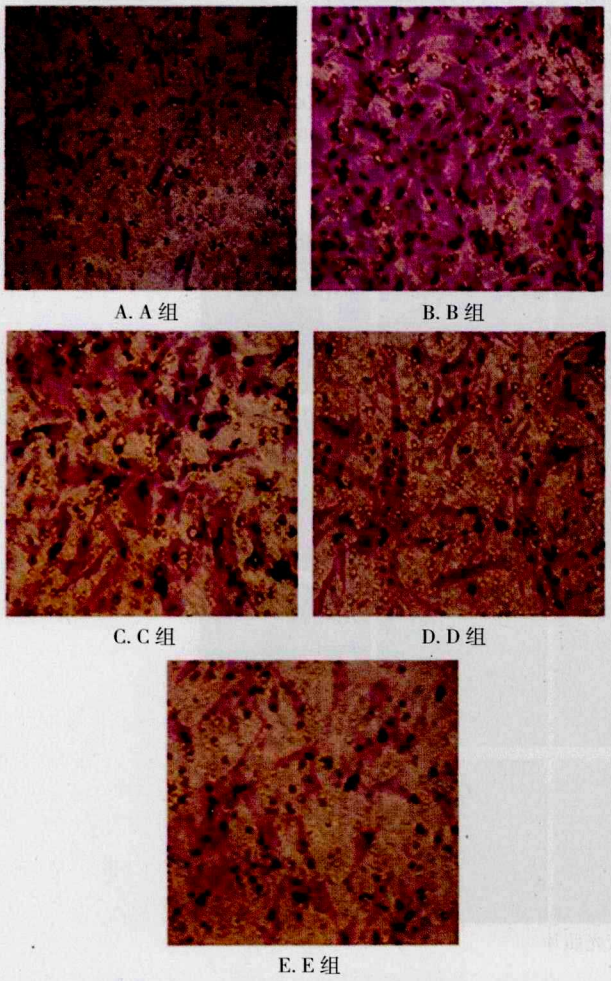


图 3　VEGFR3 磷酸化酶抑制剂和 Anti-Integrinα9 封闭性抗体对诱导后的细胞迁移的影响（结晶紫染色，200×）

Fig.3　Effect of VEGFR3 phosphorylase inhibitor and anti-Integrin α 9 function-blocking antibody on migration of induced cells (crystal violet staining, 200×)

3　讨　论

淋巴管在维持组织液平衡和免疫监督中发挥重要作用，同时也是肿瘤细胞转移的一条重要途径[11]。由于创伤、烧伤、感染、恶性肿瘤、全身性疾病等引起的淋巴系统的损伤或缺陷会导致淋巴水肿。间充质干细胞的局部应用可以促进淋巴管再生和淋巴循环的重建，缓解淋巴水肿[2]。在众多的多能干细胞中，HADSCs 由于来源充足、取材方便，有更广阔的应用前景。已有 VEGF-C 联合其他生长因子诱导 HADSCs 向 LECs 分化的报道，本实验应用溶解于 10%FBS 的 DMEM/F12，浓度为 100 ng/mL 的VEGF-C156s 诱导 HADSCs 10 d 后，细胞由长梭形变为短梭形，并伸出伪足，IF、Western blot 检测到 LECs 标志性分子 VEGFR3、integrinα9 和 LYVE-1 的表达，提示向 LECs 分化成功。目前对淋巴水肿的治疗仅限于缓解症状的加压包扎和局部按摩，以往动物实验研究发现局部应用 VEGFC[12-13]、干细胞[2,14-15]、干细胞联合 VEGF-C[16]都可以促进淋巴管的再生，重建淋巴循环；最近有实验在创伤处局部应用干细胞体外分化而来的 LECs，结果引起了淋巴管的再生，促进了创伤愈合[17]，提示体外诱导分化的 LECs 具有正常的生理作用。由于过量 VEGF-C 的应用会使局部淋巴管畸形生长而变为无功能淋巴管使水肿加重[18]和局部注射干细胞的定向分化能力还有待考证[16]，干细胞体外分化而来的 LECs 的局部应用可为治疗淋巴水肿和淋巴管相关疾病提供新的细胞疗法。以后的试验中有必要继续探索诱导 HADSCs 向 LECs 的最佳方案。

淋巴管起源于前主静脉内皮细胞，在胚胎 9.5 d 时，不表达 Prox1 的原始静脉向血管方向分化而表达 Prox1 的原始静脉内皮细胞通过上调 VEGFR3 和 Integrinα9 的表达，实现增殖、迁移、管腔形成而向淋巴管方向分化[7]，VEGF-C 作为配体与 VEGFR3 和 Integrinα9 结合从而促进 LECs 的生成。目前比较公认的淋巴管特异性标志物有：透明质酸受体 1(LYVE-1)、同源转录因子(Prox-1)、podoplanin, 和 VEGFR-3，2004 年有学者发现 integrinα9 是 VEGF-C/D 的一个受体后[9]，越来越多实验证明 integrinα9 在淋巴管形成中有重要作用[19]。Integrinα9 封闭型抗体与 VEGF-C 竞争性的结合 Integrinα9 的某一位点，阻碍 VEGF-C 与 Integrinα9 的结合，从而阻断 Integrinα9 信号通路；VEGF-C 通过与 VEGFR3(一种酪氨酸激酶受体)结合，使其羧基末端酪氨酸残基磷酸化来传导下游信号，VEGFR3 磷酸化酶抑制剂 MAZ51 通过抑制此磷酸化过程来阻断 VEGFR3 信号通路。本实验用 VEGF-C156s 诱导 HADSCs 向

LECs分化过程中，5 μmol/L 的 MAZ51、10 μg/mL 的 Integrinα9 封闭性抗体分别使 p-VEGFR3 和 Integrinα9 的表达量明显降低，表明此浓度下药效显著。结果显示 Integrinα9 和 VEGFR3 中任一通路的阻断都会造成淋巴管生成受到阻碍(LYVE-1 的表达降低)，同时阻断两条通路则阻滞作用更加明显，提示 VEGF-C/Integrinα9 和 VEGF-C/VEGFR3是干细胞向 LECs 分化过程中的两条重要通路；当两条通路中的其中一条受到阻断时，另一通路的表达量都没有受到影响，说明在 VEGF-C 诱导的LECs 分化过程中，Integrinα9 和 VEGFR3 之间不像 VEGFR3 和 VEGFR2 那样存在交叉激活作用，两条通路都是直接、独立控制 LECs 的生成。淋巴管的形成需要具有 LECs 表型的细胞转移至特定部位，进而形成淋巴管腔，所以细胞的迁移是淋巴管形成的关键步骤，本实验对诱导分化的 LECs 分别阻滞 Integrinα9 和 VEGFR3 的功能，细胞迁移能力都会减弱，当同时阻滞两条通路时，细胞的迁移能力将进一步减弱，提示 Integrinα9 和 VEGFR3 在 LECs 的迁移过程中共同发挥重要作用。

综上所述，干细胞分化而来的 LECs 有望成为治疗淋巴水肿的新方法，有必要探索更高效率的诱导方法。VEGFR3 和 Integrinα9 是 VEGF-C 诱导干细胞向 LECs 分化过程中的重要通路，并在此过程中直接独立控制 LECs 的生成，且 VEGFR3 和 Integrinα9 在细胞的迁移中均发挥重要作用。对淋巴管生成过程分子机制的探索，进而通过操纵这些分子来促进或抑制淋巴管的生成，从而对治疗淋巴水肿和抑制淋巴管畸形增长、肿瘤转移提供新的思路和理论依据。

参 考 文 献

[1] Kono T, Kubo H, Shimazu C, et al. Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(9): 2070-2076.

[2] 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.

[3] Wei L, Liu Y, Chen G, et al. Differentiation of lymphatic endothelial cells from bone marrow mesenchymal stem cells with VEGFs[J]. Lymphology, 2012, 45(4): 177-187.

[4] 蒋 娟，薛 斌，李 晶. 整合素 α9 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[J]. 重庆医科大学学报，2014, 39(5): 674-678.

[5] 石正华，薛 斌，蒋 娟. 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[J]. 重庆医科大学学报，2015, 40(6): 850-855.

[6] Yang Y, Chen XH, Li FG, et al. In vitro induction of human adipose-derived stem cells into lymphatic endothelial-like cells[J]. Cell Reprogram, 2015, 17(1): 69-76.

[7] Mishima K, Watabe T, Saito A, et al. Prox1 induces lymphatic endothelial differentiation via integrin alpha9 and other signaling cascades[J]. Mol Biol Cell, 2007, 18(4): 1421-1429.

[8] He Y, Kozaki K, Karpanen T, et al. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling[J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(11): 819-825.

[9] Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, et al. The Lymphangiogenic Vascular Endothelial Growth FactorsVEGF-C and -D Are Ligands for the Integrinα9 β1[J]. J Biol Chem, 2005, 280(6): 4544-4552.

[10] Suzuki H, Watabe T, Kato M, et al. Roles of vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling in differentiation of mouse embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells into endothelial cells[J]. Blood, 2005, 105(6): 2372-2379.

[11] Witte MH, Jones K, Wilting J, et al. Structure function relationships in the lymphatic system and implications for cancer biology[J]. Cancer Metastasis Rev, 2006, 25(2): 159-184.

[12] Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice[J]. Science, 1997, 276(5317): 1423-1425.

[13] Saaristo A, Tammela T, Farkkila A, et al. Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing[J]. Am J Pathol, 2006, 169(3): 1080-1087.

[14] Baker A, Kim H, Semple JL, et al. Experimental assessment of pro-lymphangiogenic growth factors in the treatment of post-surgical lymphedema following lymphadenectomy[J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(5): R70.

[15] Lähteenvuo M, Honkonen K, Tervala T, et al. Growth factor therapy and autologous lymph node transfer in lymphedema[J]. Circulation, 2011, 123(6): 613-620.

[16] Yan A, Avraham T, Zampell JC, et al. Adipose-derived stem cells promote lymphangiogenesis in response to VEGF-C stimulation or TGF-β1 inhibition[J]. Future Oncol, 2011, 7(12): 1457-1473.

[17] Lee SJ, Park C, Lee JY, et al. Generation of pure lymphatic endothelial cells from human pluripotent stem cells and their therapeutic effects on wound repair[J]. Sci Rep, 2015, 5: 11019.

[18] Rutkowski JM, Moya M, Johannes J, et al. Secondary lymphedema in the mouse tail: Lymphatic hyperplasia, VEGF-C upregulation, and the protective role of MMP-9[J]. Microvasc Res, 2006, 72(3): 161-171.

[19] Ito K, Morimoto J, Kihara A, et al. Integrin α9 on lymphatic endothelial cells regulates lymphocyte egress[J]. Proc Natl Acad, 2014, 111(8): 3080-3085.

（责任编辑：冉明会）