

• 论 著 •

3 种不同标志物对人淋巴管道内皮细胞鉴定效果研究^{*}

王沛靓, 刘雁林

(新疆医科大学第五附属医院妇科, 新疆 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的 了解 3 种不同标志物对人淋巴管道内皮细胞鉴定效果。方法 培养人淋巴管道内皮细胞, 分别采用细胞免疫组织化学法及普通聚合酶链式反应(PCR)法检测同源异型盒基因转录因子-1(Prox-1)、淋巴管内皮透明质酸受体-1(LYVE-1)和血管内皮生长因子受体 3(VEGFR-3)蛋白及 mRNA 表达水平。结果 人淋巴管道内皮细胞传代后细胞免疫化学可见 PROX1、LYVE1 表达, 未见 VEGFR-3 表达; 普通 PCR 可见 PROX1、LYVE1 和 VEGFR-3 3 种标志物 mRNA 均有表达, VEGFR-3 mRNA 表达水平明显下降。结论 Prox-1、LYVE-1 和 VEGFR-3 可用于相适合的人淋巴管道内皮细胞鉴定, 结合文献分析 VEGFR-3 表达强弱可动态变化。

[关键词] 人淋巴管道内皮细胞; 细胞免疫化学; 普通聚合酶链式反应; 鉴定

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.14.001

中图法分类号: R322.2

文章编号: 1009-5519(2024)14-2341-03

文献标识码: A

Identification effect study of three different markers on human lymphatic endothelial cells^{*}

WANG Peiliang, LIU Yanlin

(Department of Gynecology, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

[Abstract] **Objective** To understand the identification effect of three different markers on human lymphatic endothelial cells. **Methods** Human lymphatic endothelial cells were cultured. The expression of Prox-1, LYVE-1, and VEGFR-3 protein and mRNA were detected by immunochemistry and PCR, respectively. **Results** The expression of PROX1 and LYVE1 was observed in the immunochemistry of human lymphatic endothelial cells after passage, but the expression of VEGFR-3 was not observed. Normal PCR showed that PROX1, LYVE1 and VEGFR-3 mRNA were expressed, and the expression of VEGFR-3 mRNA was significantly decreased. **Conclusion** Prox-1, LYVE-1 and VEGFR-3 can be used to identify suitable human lymphatic endothelial cells, and the expression of VEGFR-3 can be dynamically changed according to the literature analysis.

[Key words] Human lymphatic endothelial cells; Immunochemistry; Common polymerase chain reaction; Identification

淋巴系统与血管系统都是人体重要的脉管系统, 二者的发现时间均已久远, 但在微细生理功能和大多病理机制的阐述方面, 前者长期以来均远远落后于后者, 主要原因是淋巴系统不易辨别。近数十年来, 已报道了 10 余种淋巴系统主要是淋巴管道内皮细胞标志物, 促进了淋巴管生成、肿瘤淋巴转移、免疫功能、体液运输、心血管及骨关节疾病等基础研究^[1-6]。本研究采用 3 种常用淋巴管道内皮细胞标志物, 比较了其对淋巴管道内皮细胞的鉴定功能, 可为针对淋巴系统不同方面研究选择合适鉴定材料及方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 人淋巴管道内皮细胞购自美国 ScienCell 公司, 是从人淋巴结分离而来, 分析证明书中表

型特征 Facotr 8 和 CD-31 阳性; 培养液为美国 ScienCell 公司配套内皮细胞专用培养液; 接种于塑料培养板及培养皿(美国 Corning 公司)置于 5% CO₂ 孵箱 37 °C 培养, 传代后用于后续鉴定试验。

1.2 Anti-同源异型盒基因转录因子-1(Prox-1)细胞免疫化学 细胞传代后培养至大致铺满板壁, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤, 4%多聚甲醛固定 1 h, 1% Triton X-100-PBS 破膜 5 min, 3% BSA-PBS 封闭 30 min, Prox-1 一抗(英国 Abcam 公司)用 0.2% Triton+1% BSA-PBS 按 1:500 比例稀释, 4 °C 孵育过夜; PBS 泡洗后荧光标记二抗(1:500)37 °C 孵育 1.5 h; 宽场荧光显微镜(德国 Zeiss 公司)观察。以 PBS 代替一抗为阴性对照。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81260355)。

作者简介: 王沛靓(1976—), 硕士研究生, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤诊治的研究。

1.3 Anti-淋巴管内皮透明质酸受体-1(LYVE-1)细胞免疫化学 细胞培养同 1.2 项操作,4%多聚甲醛固定 2 h,1% TritonX-100-PBS 破膜 1.5 min,3% BSA-PBS 封闭 30 min,LYVE-1 一抗(英国 Abcam 公司)用 0.2% Triton+1%BSA-PBS 按 1:100 比例稀释,4℃孵育过夜;二抗标记、显微镜观察及对照同 1.2 项操作。

1.4 Anti-血管内皮生长因子受体 3(VEGFR-3)细胞免疫化学 细胞培养同 1.2 项操作,4%多聚甲醛先后分组固定 1、2 h,30 min,1% TritonX-100-PBS 先后分组破膜 1.5、5.0 min 及室温透膜 1.5 h,3% BSA-PBS 先后分组封闭 30 min 及 1、2 h,VEGFR-3 一抗(英国 Abcam)用 0.2% Triton+1%BSA-PBS 按(1:25)、(1:200)、(1:500)先后分组稀释,4℃孵育过夜;二抗标记、显微镜观察及对照同 1.2 项操作。

1.5 聚合酶链式反应(PCR) 细胞传代后培养至大致铺满板壁,PBS 洗涤,总 RNA 用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)按说明步骤提取,普通 PCR 按常规操作步骤进行,摸索后 55℃为最佳退火温度。所用引物分别为:Prox1(5'-GCCTAATGGTCTTTCAT-TCTGC-3';5'-TGGCCTTACAGGTCTGAATTC-3');LYVE-1(5'-CTGCTGGAGGAAAAGTCTGG-3';5'-GTCTTGATGTCTGCGTGGG-3');VEGFR-3(5'-GTGGGTGGGTAGTGAGGAGA-3',5'-AGGTCATCTTCGTCGTC-3')。

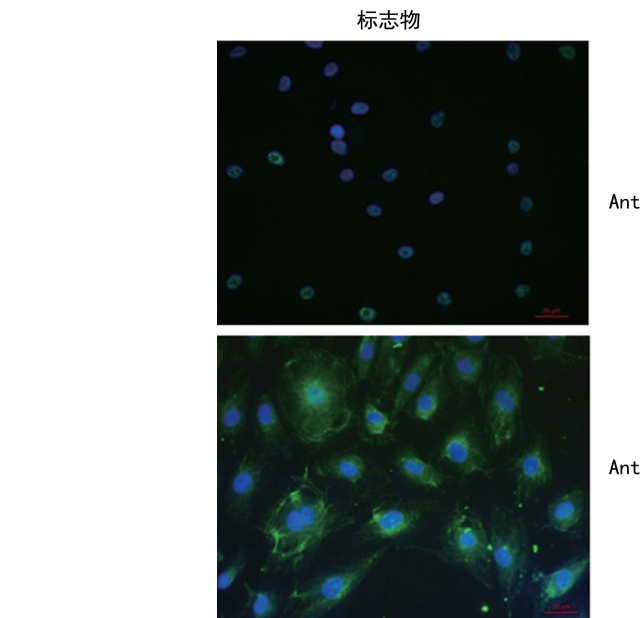


图2 人淋巴管道内皮细胞 PROX1,LYVE1 表达(比例尺为 20 μm)

2.3 PROX1、LYVE1 和 VEGFR-3 普通 PCR 鉴定 实验中所培养细胞的 PROX1、LYVE1 和 VEGFR-3 这 3 种标志物 mRNA 均有表达,PROX1 mRNA 表达最强,LYVE1 次之,VEGFR-3 mRNA 表达明显降低。见图 3。

2 结 果

2.1 细胞形态观察 内皮细胞培养液重悬培养,倒置相差显微镜进行形态观察,人淋巴管道内皮细胞贴壁、铺展,生长良好。见图 1。

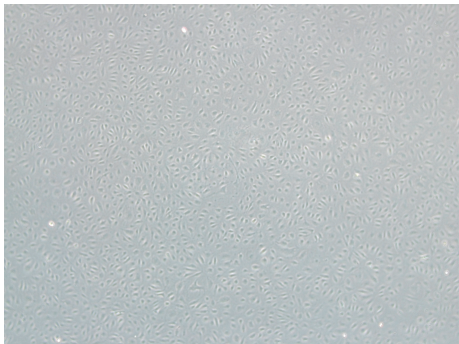


图1 人淋巴管道内皮细胞形态观察(100×)

2.2 Anti-PROX1、Anti-LYVE1 和 Anti-VEGFR 3 细胞免疫化学鉴定 已知淋巴管道内皮细胞可以特异性表达 PROX1、LYVE1 和 VEGFR-3,因此常用作此类细胞的标志物。本实验中所培养细胞:细胞核为 DAPI 蓝染;PROX1 在胞核内表达,多环绕于核内周,绿色荧光相对浓集但整体强度较弱;LYVE1 在核周围区域可见,绿色荧光相对较散但整体强度较强;见图 2。PBS 替代对照细胞同等条件下均不见荧光。Anti-VEGFR-3 孵育细胞未见绿色荧光,先后 3 次调整固定、破膜、封闭时间及一抗稀释浓度,均未见 VEGFR-3 表达。

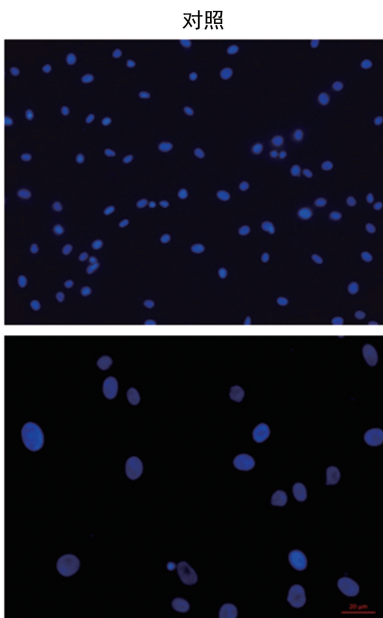


图3 人淋巴管道内皮细胞 PROX1、LYVE1 和 VEGFR3 mRNA 表达情况

3 讨 论

内皮细胞具有活跃的代谢功能,能够合成和分泌多种生物活性物质,血管内皮细胞已证实如此,越来越多的研究表明淋巴管内皮细胞也是如此。目前,已发现约 150 种基因在淋巴管内皮细胞中表达,其中有 10 余种用作淋巴管道细胞标志物^[7],常用的为 VEGFR-3、LYVE-1、podoplanin、Prox-1,已较多应用于人或动物淋巴系统科学研究中^[8-10]。

本研究采用分离于淋巴结的原代培养淋巴管道细胞,不管是 mRNA 还是蛋白水平,Prox-1 和 LYVE-1 均表达明显,Prox-1 是目前唯一胞核内表达的淋巴管道内皮细胞标志物,LYVE-1 是与 CD-44 相关的胞膜糖蛋白,二者可用于相适合的淋巴管道内皮细胞或淋巴组织研究中。表达于胞膜的淋巴管道内皮细胞标志物还有 VEGFR-3、podoplanin 和 DPPIV^[7],其中 VEGFR-3 应用时间较长且较广泛,但在本研究中多次调整免疫细胞化学实验条件,均未见其表达,在普通 PCR 中可见表达但明显弱于 Prox-1 和 LYVE-1,结合既往相关文献发现这并不能断定 VEGFR-3 不能作为淋巴管道内皮细胞及淋巴组织的标志物,在个体发育不同阶段、不同器官或同一器官的不同时期及不同的生理和病理条件下,淋巴管道内皮细胞的生物活性分子表达是动态变化并且是可塑的。例如,LYVE-1 在个体发育早期阶段高表达而在成体阶段明显下调,在淋巴管道内皮细胞病理状态下表达也有变化^[7],这些均会影响到其作为标志物的稳定性。另外,作为来源于淋巴结的淋巴管道内皮细胞也可能区别于单纯淋巴管的内皮细胞,至少在人体免疫方面其有与功能相适应的特殊改变^[11-12]。

但还应注意的是,淋巴管道内皮细胞标志物并不是单纯表达于淋巴系统中。VEGFR-3 还可以表达于视网膜上皮细胞、肌上皮细胞及肿瘤血管,LYVE-1 还可以表达于正常肝窦的内皮细胞及肾、肾上腺、甲状腺及胰腺的上皮中^[7]。目前,Prox-1 尚未见于其他组织的表达,作为淋巴管道的祖细胞,其在淋巴管道发育中的出芽、增殖、移行并最终形成网状管道系统过程中起着举足轻重的作用,这些功能也可以为此方面研究标志物的选择提供参考。

参考文献

[1] SHIYA T,HIRASHIMA M. From lymphatic endothelial cell migration to formation of tubular lymphatic vascular network[J]. Front Physiol,2023,14:1124696.

[2] FUJIMOTO N,DIETERICH L C. Mechanisms

and clinical significance of tumor lymphatic invasion[J]. Cells,2021,10(10):2585.

[3] TAKEDA A,SALMI M,JALKANEN S. Lymph node lymphatic endothelial cells as multifaceted gatekeepers in the immune system[J]. Trends Immunol,2023,44(1):72-86.

[4] 樊天斐,高冉,郭文钧,等. 淋巴管内皮细胞在淋巴管生成异常相关疾病中的研究进展[J]. 生理科学进展,2021,52(4):253-258.

[5] WANG Y C,MENG W T,ZHANG H F,et al. Lymphangiogenesis, a potential treatment target for myocardial injury[J]. Microvasc Res, 2023,145:104442.

[6] CAO M,ONG M T Y,YUNG P S H,et al. Role of synovial lymphatic function in osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2022, 30(9):1186-1197.

[7] WANG P L,CHENG Y B. Gene expression profile of lymphatic endothelial cells[J]. Cell Biol Int,2011,35(12):1177-1187.

[8] CHUTIPONGPISIT K,PARACHURU V P, FRIEDLANDER L T, et al. Immunohistochemical and immunofluorescence expression profile of lymphatic endothelial cell markers in oral cancer[J]. Int J Exp Pathol,2021,102(6): 268-278.

[9] JABLON K L,AKERSTROM V L,LI M,et al. Isolation and short-term culturing of primary lymphatic endothelial cells from collecting lymphatics:a techniques study[J]. Microcirculation,2022,30(2/3):e12778.

[10] 谭立人,肖颂华,雷鸣. 小鼠软脑膜淋巴管内皮细胞的发育特点及其对行为功能的影响[J]. 中山大学学报(医学科学版),2022,43(3):331-343.

[11] TAKEDA A,SALMI M,JALKANEN S. Lymph node lymphatic endothelial cells as multifaceted gatekeepers in the immune system[J]. Trends Immunol,2023,44(1):72-86.

[12] JALKANEN S,SALMI M. Lymphatic endothelial cells of the lymph node[J]. Nat Rev Immunol,2020,20(9):566-578.

(收稿日期:2023-10-22 修回日期:2024-03-17)