

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2025.10.004  
文章编号: 1005-8982 (2025) 10-0019-11

实验研究·论著

## 间充质干细胞与淋巴管内皮祖细胞联合移植对小鼠后肢淋巴水肿的影响\*

金智伟<sup>1</sup>, 薛泽款<sup>1</sup>, 李义杰<sup>1</sup>, 于云飞<sup>1</sup>, 杨栋栋<sup>1</sup>, 武兴刚<sup>2</sup>, 黄永周<sup>2</sup>, 赵新春<sup>2</sup>, 侯吉学<sup>2</sup>

(1. 石河子大学医学院, 新疆 石河子 832000; 2. 石河子大学第一附属医院 甲乳外科, 新疆 石河子 832000)

**摘要:** **目的** 研究间充质干细胞(MSCs)与淋巴管内皮祖细胞(LEPCs)联合移植对小鼠后肢淋巴水肿的影响,为淋巴水肿疾病的细胞疗法提供新思路。**方法** 从C57BL/6小鼠骨髓中分离并培养MSCs,培养至3~4代,使用流式细胞术鉴定表型,使用成脂、成骨及成软骨分化实验鉴定多系分化潜能;从小鼠骨髓中分离单个核细胞后扩增培养,通过磁珠分选筛选出CD34<sup>+</sup>VEGFR-3<sup>+</sup>细胞,使用免疫荧光染色鉴定细胞表面标志物、内皮潜能,成管实验鉴定淋巴管分化能力;通过手术方式复制后肢淋巴水肿模型,将MSCs与LEPCs注射于淋巴水肿部位,测量足垫厚度,观察水肿变化,通过免疫组织化学染色观察淋巴管面积及数量变化,通过Western blotting检测淋巴管内皮透明质酸受体-1(LYVE-1)蛋白表达。对照组、MSCs组、LEPCs组和MSCs+LEPCs组各组间进行比较。**结果** ①分离并培养的MSCs呈长梭形,流式细胞术结果显示CD29、CD44和Sca1阳性表达,表达率分别为99.80%、99.70%和96.48%;CD45和CD11b阴性表达,表达率分别为0.04%和0.03%,符合间充质干细胞形态学特征及表型特征。成脂诱导分化可见脂滴形成,成骨诱导分化可见钙盐沉淀形成的“骨结节”,成软骨诱导分化可见软骨球形成,以上诱导分化实验验证了其具有三系分化能力。②分离并培养的LEPCs呈“铺路石”样,通过免疫荧光染色鉴定LEPCs细胞特异性表面抗原表达,VEGFR-3、CD34和CD133表达阳性,符合LEPCs细胞形态学特征及特异性标志物特征。Dil-Ac-LDL和FITC-UEA-1双荧光染色可见细胞质摄取Dil-Ac-LDL后呈现红色荧光,细胞膜结合FITC-UEA-1后显示绿色荧光,证明其具有内皮潜能。LYVE-1荧光染色阳性证明其具有向淋巴管内皮细胞分化能力。成管实验可见小管形成,证明其具有分化为淋巴管的能力。③通过手术方式成功复制稳定的小鼠后肢淋巴水肿模型,术后第1天开始出现水肿,水肿至少持续4周,至第7天左右达到最大程度,足垫厚度为(3.984±0.171)mm。单纯手术组与非手术组第1、4、7、10、13、16、19、22、25、28、31天足垫厚度比较,结果:a.不同时间点足垫厚度比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ );b.单纯手术组与非手术组间足垫厚度比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ );c.两组足垫厚度变化趋势比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。术后第7和31天,单纯手术组足垫厚度均大于非手术组( $P<0.05$ )。④对照组、MSCs组、LEPCs组和MSCs+LEPCs组第1、4、7、10、13、16、19天足垫厚度比较,结果:a.不同时间点足垫厚度比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ );b.4组足垫厚度比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );c.4组足垫厚度变化趋势比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。第19天,MSCs组、LEPCs组、MSCs+LEPCs组足垫厚度均小于对照组( $P<0.05$ ),且MSCs+LEPCs组足垫厚度小于LEPCs组和MSCs组( $P<0.05$ )。MSCs+LEPCs组的淋巴管面积小于MSCs组、LEPCs组、对照组( $P<0.05$ ),LYVE-1蛋白相对表达量高于MSCs组、LEPCs组、对照组( $P<0.05$ )。**结论** MSCs、LEPCs移植可以改善淋巴水肿,且两者联合移植改善淋巴水肿效果优于单一移植。

**关键词:** 间充质干细胞;淋巴管内皮祖细胞;淋巴水肿

**中图分类号:** R543.6

**文献标识码:** A

## Effect of combined transplantation of mesenchymal stem cells and lymphatic endothelial progenitor cells on hindlimb

收稿日期: 2025-01-13

\* 基金项目: 国家自然科学基金(No:82260105);石河子大学创新发展专项课题(No:CXFZ202211);“天山英才”医药卫生高层次人才培养计划

[通信作者] 侯吉学, E-mail: hix1506@163.com; Tel: 13677551605

## lymphedema in mice\*

Jin Zhi-wei<sup>1</sup>, Xue Ze-kuan<sup>1</sup>, Li Yi-jie<sup>1</sup>, Yu Yun-fei<sup>1</sup>, Yang Dong-dong<sup>1</sup>, Wu Xing-gang<sup>2</sup>, Huang Yong-zhou<sup>2</sup>,  
Zhao Xin-chun<sup>2</sup>, Hou Ji-xue<sup>2</sup>

(1. School of Medicine, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China; 2. Department of Thyroid and Breast Surgery, The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of combined transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) and lymphatic endothelial progenitor cells (LEPCs) on hindlimb lymphoedema in mice, and to provide new insights into cellular therapies for lymphedema. **Methods** MSCs were isolated from the bone marrow of C57BL/6 mice and cultured for 3 to 4 passages. Phenotypes of MSCs were identified by flow cytometry, and their multilineage differentiation potential was assessed through adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation assays. Single nucleated cells isolated from mouse bone marrow were expanded and cultured, and CD34<sup>+</sup> VEGFR-3<sup>+</sup> endothelial progenitor cells were screened by magnetic bead sorting. Cell surface markers and endothelial potential were identified by immunofluorescence staining. Lymphatic vessel differentiation capacity was identified by tube formation assay. The hindlimb lymphedema model was established by surgery. MSCs and LEPCs were injected into the site of lymphoedema, and changes in edema were observed by measuring the thickness of the footpad. Immunohistochemistry was used to observe the alterations in the area and number of lymphatic vessels. Western blot was used to observe the changes in the level of LYVE-1 protein. Comparisons were made among the control group, MSCs group, LEPCs group, and MSCs+LEPCs group. **Results** (1) The isolated and cultured MSCs exhibited a long, spindle-shaped morphology. Flow cytometry analysis revealed positive expression of CD29, CD44 and Sca1 with their expression rates being 99.80%, 99.70% and 96.48%, alongside negative expression of CD45 and CD11b with their expression rates being 0.04% and 0.03%, consistent with the morphological and phenotypic characteristics of MSCs. Adipogenic differentiation was evidenced by the formation of lipid droplets. Osteogenic differentiation could be indicated by the "bone nodules" formed by the precipitation of calcium salts. Chondrogenic differentiation could be supported by the formation of cartilage pellets. These induction experiments confirmed the tri-lineage differentiation potential of the cells. (2) The isolated and cultured LEPCs were shaped like "paving stones". Immunofluorescence staining confirmed the expression of surface markers specific to LEPCs, including VEGFR-3, CD34, and CD133. These findings were consistent with the morphological and phenotypic characteristics of LEPCs. Dual fluorescence staining of Dil-Ac-LDL and FITC-UEA-1 showed red fluorescence in the cytoplasm due to the uptake of Dil-Ac-LDL and green fluorescence on the cell membrane from FITC-UEA-1 binding, indicating the endothelial potential of the cells. Positive LYVE-1 fluorescence staining confirmed their capacity to differentiate into lymphatic endothelial cells. Furthermore, the tube formation assay showed they could differentiate into lymphatic vessels. (3) A stable hindlimb lymphedema mouse model was successfully established surgically. Edema appeared one day postoperatively, peaked at day 7 (footpad thickness:  $3.984 \pm 0.171$  mm), and persisted for at least 4 weeks. A comparison was made in terms of the footpad thickness on days 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, and 31 between the surgery-only group and the non-surgery group, which demonstrated that the footpad thickness was different among the time points ( $P < 0.05$ ) and between the groups ( $P < 0.05$ ), and that the change trend of the footpad thickness was different between the two groups ( $P < 0.05$ ). On days 7 and 31 postoperatively, the footpad thickness was greater in the surgery-only group than in the non-surgery group ( $P < 0.05$ ). (4) A comparison was made in terms of the footpad thickness on days 1, 4, 7, 10, 13, 16 and 19 in the control group, MSCs group, LEPCs group, and MSCs+LEPCs groups, which revealed that the footpad thickness was different among the time points ( $P < 0.05$ ) but not among the groups ( $P > 0.05$ ), and that the change trend of the footpad thickness was different among the four groups ( $P < 0.05$ ). On day 19, the footpad thickness of the MSCs group, the LEPCs group, and the MSCs+LEPCs group was lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ), and the footpad thickness of the MSCs+LEPCs group was even lower than that of the LEPCs group and the MSCs group ( $P < 0.05$ ). The area of lymphatic vessels in the MSCs+LEPCs group was smaller than that of the MSCs group, the LEPCs group, and the control group ( $P < 0.05$ ). The relative expression of LYVE-1 protein in the MSCs+LEPCs group was higher than that of MSCs group, LEPCs group, and control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Transplantation of

MSCs and LEPCs improves lymphoedema, and combined transplantation of both is more effective than the single transplantation.

**Keywords:** mesenchymal stem cells; lymphatic endothelial progenitor cells; lymphedema

全世界约有 2 亿人患有淋巴水肿, 已成为一种严重的全球性疾病<sup>[1]</sup>。淋巴水肿是淋巴系统发育不良或者继发性淋巴系统受损引起淋巴回流障碍, 导致进行性软组织肿胀<sup>[2]</sup>。淋巴水肿通常分为原发性和继发性淋巴水肿。原发性淋巴水肿主要是遗传缺陷引起, 仅占一小部分<sup>[3]</sup>; 继发性淋巴水肿则是后天淋巴系统受损导致, 常见原因包括癌症治疗、创伤及寄生虫感染等。其中癌症患者行放疗或淋巴结清扫常引起继发性淋巴水肿<sup>[4]</sup>, 例如接受乳腺癌手术的患者约 30% 可能发展为患侧上肢淋巴水肿<sup>[5]</sup>。淋巴水肿的患者会出现肿胀、疼痛和疲劳, 严重的可导致四肢畸形及功能障碍, 降低患者的生活质量<sup>[6]</sup>。尽管肿瘤的手术策略取得了重大进展, 但肿瘤手术所致继发性淋巴水肿的治疗选择却非常有限。

近年来, 使用具有分化能力的细胞已成为继发性淋巴水肿治疗的一个热点<sup>[7]</sup>。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 具有显著的再生潜能, 可分化为多系细胞。MSCs 通过分泌调节因子和分化为淋巴管内皮细胞来促进血管和淋巴管的生成<sup>[8]</sup>, 这使其成为缓解淋巴水肿的选择。淋巴管内皮祖细胞 (lymphatic endothelial progenitor cells, LEPCs) 是内皮祖细胞的一个亚型<sup>[9]</sup>, 表达人类白细胞分化抗原 34 (cluster of differentiation 34, CD34)、血管内皮生长因子受体-3 (vascular endothelial growth factor receptors-3, VEGFR-3) 和人类白细胞分化抗原 133 (cluster of differentiation 133, CD133)。LEPCs 主要参与淋巴系统的调节, 具有向淋巴管内皮细胞分化的能力。MSCs 与 LEPCs 均具有向淋巴管内皮分化的潜能, 从而调节淋巴系统。因此笔者考虑通过复制小鼠淋巴水肿模型来观察 MSCs、LEPCs 对淋巴水肿的缓解情况, 并观察联合移植对淋巴水肿的影响是否优于单一细胞移植。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

本实验所用动物均为 C57BL/6 雌性小鼠, 提取细胞使用 3~4 周龄小鼠, 复制动物模型使用 6 周龄

小鼠, 均购于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2024-0001, 实验动物使用许可证号: SYXK (新) 2023-0003。本实验通过石河子大学第一附属医院实验动物伦理委员会审批 (审批号: A2023-189-01), 所有操作均按照规范实施。本实验使用小鼠 42 只, 其中 6 只用于细胞提取, 12 只用于验证小鼠模型 (随机分为两组: 单纯手术组和非手术组, 各 6 只), 24 只用于模型复制并观察 MSCs 与 LEPCs 对淋巴水肿的影响 (随机分为 4 组: 对照组、MSCs 组、LEPCs 组和 MSCs+LEPCs 组, 各 6 只)。

### 1.2 主要试剂与仪器

**1.2.1 主要试剂** 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Omnimabs 公司 (OM625657), 胰酶购自苏州新赛美生物科技有限公司 (C100C1), 青霉素-链霉素溶液、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)、放射免疫沉淀法裂解缓冲液 (radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA)、苯甲磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 及 BCA 蛋白定量试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司 (P1400、P1020、R0020、P0100、PC0020), MEM- $\alpha$  培养基购自上海源培生物科技股份有限公司 (L570KJ), EGM-2 MV 培养基购自瑞士 Lonza 公司 (CC-3162), 人类白细胞分化抗原 29 (cluster of differentiation 29, CD29) 抗体购自美国 Biolegend 公司 (102216), 人类白细胞分化抗原 44 (cluster of differentiation 44, CD44)、干细胞抗原-1 (stem cell antigen 1, Sca-1)、人类白细胞分化抗原 45 (cluster of differentiation 45, CD45)、人类白细胞分化抗原 11b (cluster of differentiation 11b, CD11b)、CD34、CD133、VEGFR-3 抗体及 Cy3 标记羊抗兔、FITC 标记羊抗鼠购自美国 Invitrogen 公司 (11-0441-81、45-5981-80、17-0451-82、12-0112-82、14-0341-82、14-1331-82、PA5-109731、A10520、A18866), 淋巴管内皮透明质酸受体-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1, LYVE-1) 抗体及血管内皮生长因子-C (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 重组蛋白购自英国 Abcam 公司 (ab218535、ab283476), 成

脂、成骨、成软骨诱导分化培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司(PD-003、PD-004、PD-005), Percoll 分离液购自美国 GE Healthcare 公司(17-0891-01), 山羊血清、GAPDH 抗体及 HRP 标记羊抗兔/鼠均购自北京中杉金桥生物技术有限公司(sap-9100、ta-08、zb-2301、zb-305), 牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自德国 Biofroxx 公司(9048-46-8), 荆豆凝集素 I-FITC 标记(fluorescein labeled ulex europaeus agglutinin I, FITC-UEA-1)及 DiI 标记乙酰化低密度脂蛋白(dil-acetylated low density lipoprotein, Dil-ac-LDL)购自上海懋康生物科技有限公司, 基质胶购自美国 Corning 公司(354234), 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、钙黄绿素 AM、4% 多聚甲醛、柠檬酸抗原修复液、DAB 显色试剂盒、苏木精染液、苏木精分化液、苏木精返蓝液及 ECL 超敏发光液均购自武汉赛维尔生物科技有限公司(G1012、G1728、G1101、G1219、G1212、G1004、G1039、G1040、G2020), 中性树脂购自上海国药集团化学试剂有限公司(10004160)。

**1.2.2 主要仪器** 二氧化碳恒温培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 流式细胞仪购自美国 Agilent 公司, 磁性分选系统购自德国 Miltenyi 公司, 荧光倒置显微镜购自日本 Olympus 公司, 光学显微镜购自日本 Nikon 公司, 垂直电泳仪、转印电泳仪及电泳电源购自美国 Bio-rad 公司, 凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 MSCs 的提取与培养** 取 3~4 周龄 C57BL/6 雌鼠 6 只, 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉后脱颈处死, 置于 75% 乙醇中浸泡 5 min, 剪去后肢股骨及胫骨, 分离肌肉组织, 将股骨及胫骨置于装有 PBS 溶液的皿中, 剪去股骨及胫骨的两侧骨骺端, 移至一新的培养皿中, 并用含 10% FBS 的 MEM- $\alpha$  培养基反复冲洗骨髓, 离心后红细胞裂解液裂解 5 min, 将培养皿置于 37 °C、5% 二氧化碳饱和湿度的培养箱中进行培养, 培养 24 h 后进行第 1 次换液, 后间隔 72 h 换液 1 次。

**1.3.2 MSCs 的鉴定** 第 3 代细胞培养至 80%~90%, 取各组样本, 取  $1 \times 10^6$  个细胞, 100  $\mu$ L PBS 重悬后, 每组分别加入 CD29、CD44、Sca-1、CD45 及 CD11b 抗体, 4 °C 避光孵育 30 min; 加入 PBS 洗涤,

4 °C、2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 再次使用 PBS 重悬, 通过流式细胞仪分析。

根据 MSCs 成脂、成骨和成软骨诱导分化试剂盒说明书进行配置及细胞培养, 其中细胞经成软骨诱导后形成软骨球, 制作为石蜡切片。分别用茜素红、油红 O 染色和阿利新蓝染色观察 MSCs 的成脂、成骨和成软骨分化能力。

**1.3.3 LEPCs 的提取与培养** 同上述方法冲洗小鼠骨髓后, 使用 Percoll 分离液 2 000 r/min 密度梯度离心 30 min, 分离骨髓单个核细胞, 用含有人成纤维细胞生长因子-B(human fibroblast growth factor B, hFGF-B)、VEGF-C、R3 胰岛素样生长因子 1(R3 insulin-like growth factor 1, R3-IGF-1)、抗坏血酸、人表皮生长因子(human epidermal growth factor, hEGF)及硫酸庆大霉素-两性霉素(gentamicin sulfate-amphotericin-1000, GA-1000)等生长因子的 EGM-2 MV 培养基(VEGF-C 50 ng/mL, 其余生长因子根据培养基推荐浓度加入)培养 24 h, 收集未贴壁细胞转移至明胶包被的皿中继续培养 3 d。

胰酶消化细胞后细胞计数, 取  $1 \times 10^8$  个细胞于 500  $\mu$ L 的 buffer 中重悬, 加入 CD34 抗体, 4 °C 孵育 30 min。使用 buffer 冲洗细胞, 后再加 300  $\mu$ L 重悬细胞, 加入对应二抗包被的磁珠后孵育 15 min。将分离柱置于 MASC 磁场中, 加入 500  $\mu$ L 的 buffer 在重力下自然流下, 收集洗脱成份, 离心弃上清后以同样方法孵育 VEGFR-3 抗体, 收集洗脱成份后再次离心后, 使用 EGM-2 MV 培养基重悬并继续培养。

**1.3.4 LEPCs 的免疫荧光鉴定** 取所培养细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 用 0.1% 曲拉通透化 10 min, 山羊血清封闭 30 min。细胞与 CD34 抗体、VEGFR-3 抗体在 4 °C 下孵育过夜, 后用对应荧光素偶联的二抗室温避光孵育 1 h。最后用 DAPI 进行细胞核染色。同上述方法, 孵育 VEGFR3 抗体和 CD133 抗体。荧光显微镜下观察并证明其为所分选细胞。

取所培养细胞与 Dil-Ac-LDL 室温避光孵育 4 h, PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 10 min 后再与 FITC-UEA-1 室温避光孵育 1 h。荧光显微镜观察证明 LEPCs 具有内皮分化潜能。

取所培养细胞, 使用 LYVE-1 抗体 4 °C 孵育过夜, 使用 FITC 偶联的山羊抗兔室温孵育 1 h, 最后用 DAPI 进行细胞核染色。荧光显微镜下观察证明

LEPCs具有向淋巴管内皮细胞分化的能力。

**1.3.5 成管实验** 在24孔板中加入50  $\mu\text{L}$ 预先融化的冷基质胶,置于37  $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中使胶凝固。取生长状态良好的LEPCs制成细胞悬液,细胞按 $1 \times 10^5$ 个/孔的密度进行接种,放置于培养箱进行培养,镜下观察有无小管形成。小管形成后加入钙黄绿素AM,室温避光孵育30 min,更换37  $^{\circ}\text{C}$ 预热的培养基,再次避光孵育30 min,使用荧光显微镜拍照,证明LEPCs具有分化为淋巴管能力。

**1.3.6 小鼠后肢淋巴水肿模型的复制** 取6周龄C57BL/6小鼠,术前使用脱毛膏对后肢区域进行备皮,腹腔注射1%戊巴比妥钠,麻醉满意后,使用碘伏消毒手术区域,于足踝处注射0.01 mL亚甲蓝溶液,然后于腘窝近端约5 mm处开一小口,用锋利的剪刀做一环形切口,钝性分离近端及远端皮肤,充分暴露出蓝染的腘窝淋巴结(popliteal lymph node, PLN)、淋巴结远端的2个淋巴管(distal lymph vessel, DLV)及淋巴结近端的1个淋巴管(proximal lymph vessel, PLV),切除腘窝淋巴结并用10-0尼龙缝线结扎近端及远端淋巴管,使用生理盐水彻底冲洗腿部,后将皮肤缝合于周围肌肉,留下2~3 mm间隙,术后创面涂抹红霉素软膏预防感染<sup>[10]</sup>。术后第1天开始使用游标卡尺测量足垫厚度,3 d测量1次。

**1.3.7 细胞注射** 通过手术方式复制小鼠后肢淋巴水肿,于术后第7天开始注射细胞。3 d注射1次,共注射3次。将P3~P4代MSCs消化为悬浮细胞后,细胞计数 $1 \times 10^6$ 个溶于100  $\mu\text{L}$ 生理盐水中,注射于MSCs组小鼠淋巴水肿部位;将P3~P4代LEPCs消化为悬浮细胞后,细胞计数 $1 \times 10^6$ 个溶于100  $\mu\text{L}$ 生理盐水中,注射于LEPCs组小鼠淋巴水肿部位;将P3~P4代MSCs和LEPCs消化为悬浮细胞后,各细胞计数 $5 \times 10^5$ 个溶于100  $\mu\text{L}$ 生理盐水中,注射于MSCs+LEPCs组小鼠淋巴水肿部位;对照组注射100  $\mu\text{L}$ 生理盐水<sup>[11]</sup>。

**1.3.8 免疫组织化学染色** 术后19 d将小鼠麻醉处死,于手术切口下1 cm环形切取组织,置于4%多聚甲醛固定24~48 h,再行脱水、浸蜡包埋、切片,切片厚4  $\mu\text{m}$ 。切片脱蜡后,置于柠檬酸抗原修复液中进行抗原修复,山羊血清封闭,滴加一抗LYVE-1,4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。室温复温1 h,滴加对应的二抗,室温孵育1 h,PBS缓冲液洗涤后加入DAB显色剂显

色,苏木精复染,中性树脂封片,镜下观察。

**1.3.9 Western blotting检测LYVE-1蛋白表达** 小鼠麻醉处死后,取后肢组织于EP管中,加入RIPA裂解液与PMSF,超声裂解后提取组织蛋白,并通过BCA蛋白质检测试剂盒分析浓度。将等量的蛋白质上样到SDS-PAGE凝胶进行电泳。将蛋白质转移到PVDF膜上,封闭,使用LYVE-1抗体在4  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,经洗涤后,使用一抗对应的二抗于室温孵育1 h,使用ECL化学发光液显影,拍照。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算LYVE-1蛋白相对表达量。

## 1.4 统计学方法

数据分析采用SPSS 26.0和GraphPad Prism 9.5统计软件。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析,两两比较用Tukey检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

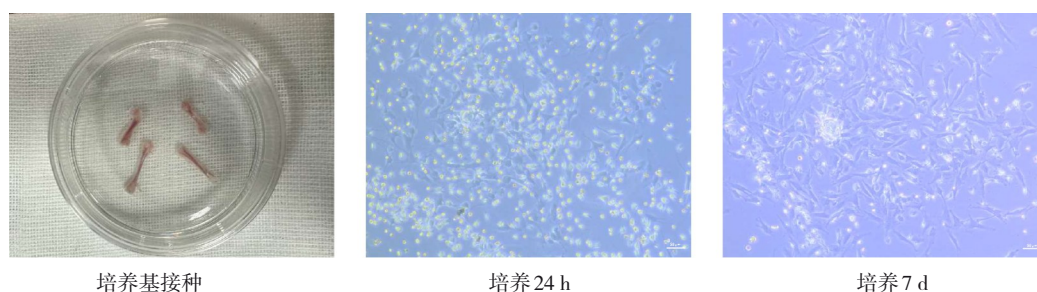
## 2 结果

### 2.1 MSCs细胞形态及多系分化能力

骨髓细胞接种于培养基后,细胞呈圆形,大小不一;培养24 h后细胞开始贴壁生长,呈短梭形或不规则三角形;培养7 d左右,细胞大量增殖,并呈长梭形(见图1)。稳定传代后使用第3代细胞,通过流式细胞仪对MSCs细胞表型进行鉴定,阳性标志物CD29、CD44和Sca1表达率分别为99.80%、99.70%和96.48%,在细胞中表达均 $> 90\%$ ;CD45和CD11b分别为0.04%和0.03%,阳性率 $\leq 5\%$ ,呈阴性;符合MSCs特征(见图2)。此外,干细胞具有多向分化潜能,可分化为脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞。通过特异性染色鉴定体外成脂、成骨和成软骨诱导后的分化能力。细胞成脂分化诱导2周左右可见细胞质内出现油滴,经油红O染色后为红色(见图3A)。细胞成骨分化诱导3周左右可见钙盐沉积形成的“骨结节”,经茜素红染色后可见沉积的结节呈红色(见图3B);细胞成软骨分化诱导后3周左右形成软骨球,制作为切片后进行阿利新蓝染色,可见蓝色区域为软骨组织(见图3C)。

### 2.2 LEPCs细胞形态及成管能力

从骨髓提取的单个核细胞呈圆形、短梭形,培养48 h后可见细胞集落形成(见图4A)。通过磁珠分选出CD34 $^{+}$ 及VEGFR-3 $^{+}$ 细胞后,使用含有生长因



培养基接种

培养 24 h

培养 7 d

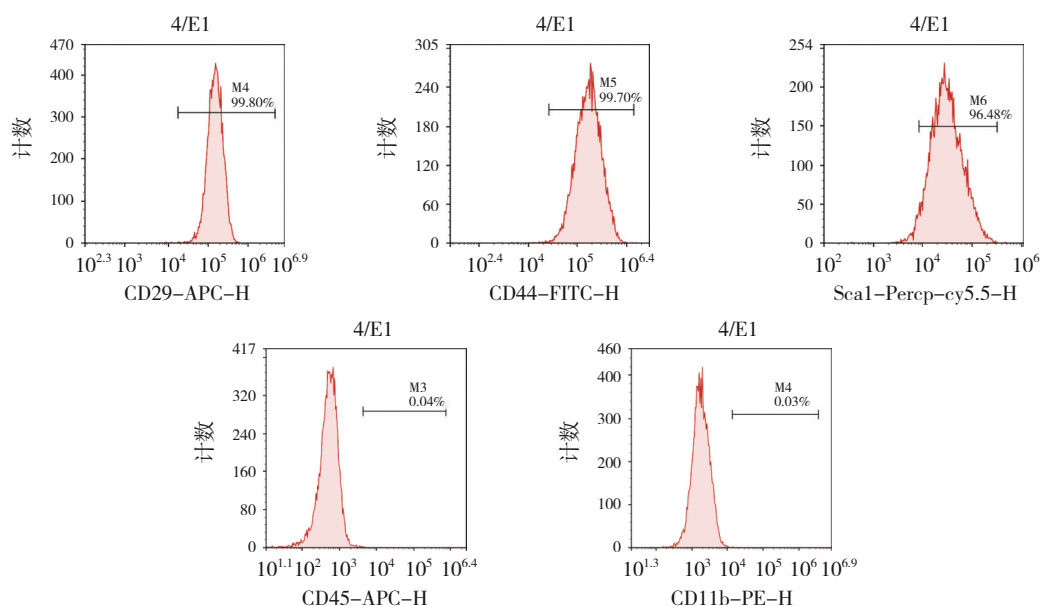
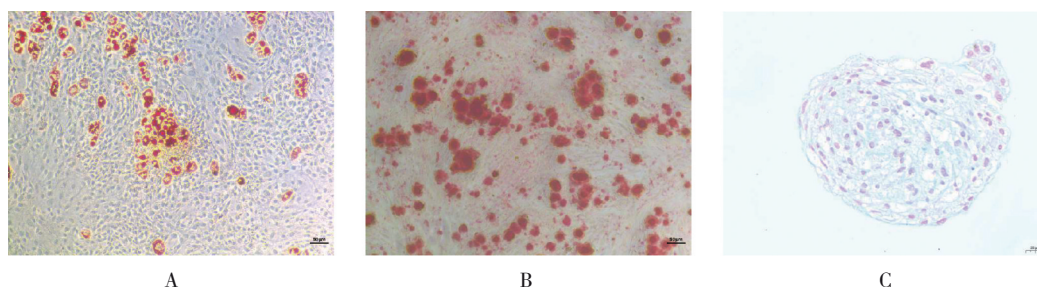
图 1 MSCs 细胞培养 24 h 和 7 d 形态 ( $\times 100$ )

图 2 MSCs 细胞表面标志物的鉴定



A

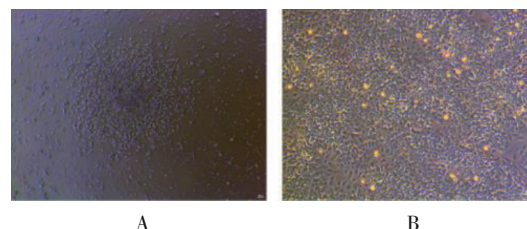
B

C

A: 成脂分化 ( $\times 100$ ); B: 成骨分化 ( $\times 100$ ); C: 成软骨分化 ( $\times 400$ )。

图 3 MSCs 细胞三系分化

子的 EGM-2 MV 培养基进行培养, 稳定传代后可见细胞呈“铺路石”样生长(见图 4B), 形态符合 LEPCs 细胞的特性。取第 3 代细胞行免疫荧光, 可见 CD34、VEGFR-3 及 CD133 表达阳性, 符合 LEPCs 细胞的标志物(见图 5A、B)。取第 3 代 LEPCs 行 Dil-Ac-LDL 和 FITC-UEA-1 荧光染色鉴定, 于荧光镜下观察到细胞质摄取 Dil-Ac-LDL 后呈现红色, 细胞膜结合 FITC-UEA-1 后显示绿色, 表示 LEPCs 细胞具有内皮潜能(见图 6)。取第 3 代 LEPCs 细胞行 LYVE-1



A

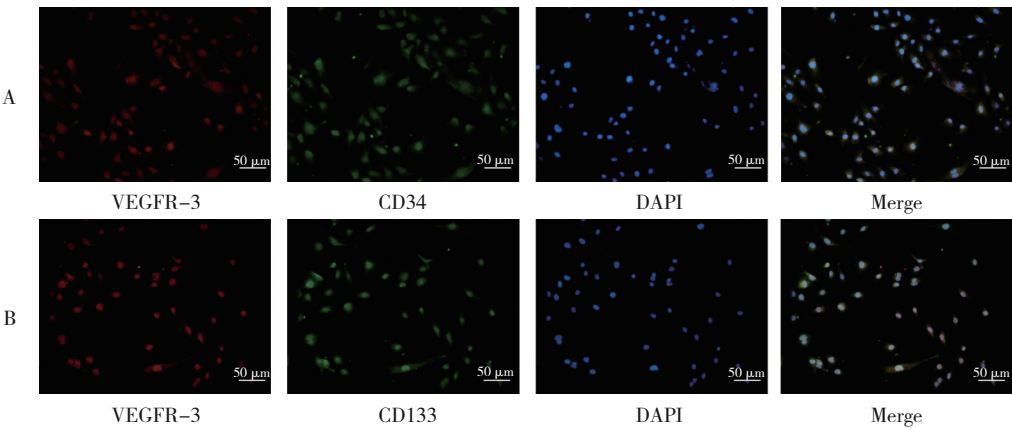
B

A: 单个核细胞培养 48 h 细胞集落图 ( $\times 50$ ); B: 稳定传代 LEPCs 呈“铺路石”样 ( $\times 100$ )。

图 4 LEPCs 细胞形态图

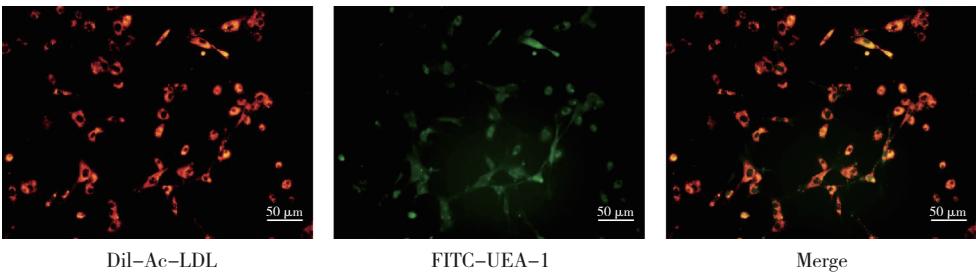
免疫荧光染色,于荧光显微镜下可见细胞表达绿色荧光,即表达淋巴管内皮细胞标志物 LYVE-1,表示 LEPCs 细胞具有向淋巴管内皮细胞分化的能力(见图 7)。LEPCs 细胞在基质胶中进行培养,2~3 h 开

始形成小管结构(见图 8A),5~7 h 成管数量达到峰值,钙黄绿素染色验证细胞活力(见图 8B),成管实验验证 LEPCs 细胞具有分化为淋巴管的能力。



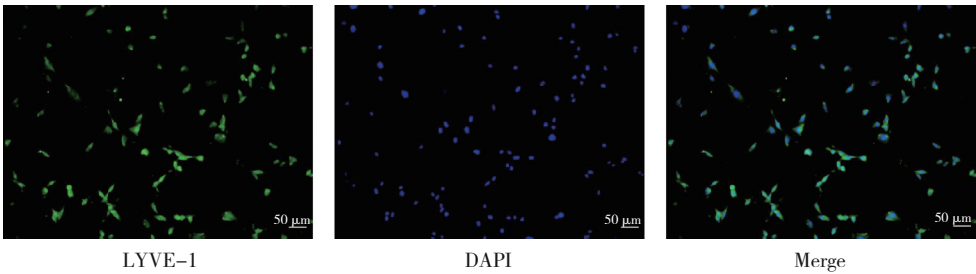
A: VEGFR-3 阳性呈红色, CD34 阳性呈绿色, DAPI 阳性呈蓝色(细胞核); B: VEGFR-3 阳性呈红色, CD133 阳性呈绿色, DAPI 阳性呈蓝色(细胞核)。

图 5 LEPCs 细胞标志物鉴定 (× 200)



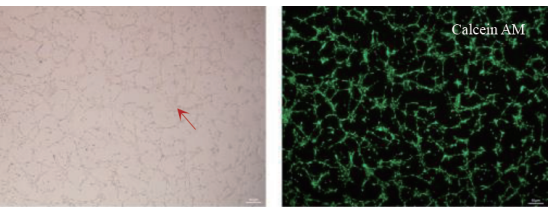
细胞质摄取 Dil-Ac-LDL 呈红色, 细胞膜结合 FITC-UEA-1 呈绿色。

图 6 LEPCs 细胞内皮潜能的鉴定 (× 200)



LYVE-1 阳性呈绿色, DAPI 阳性呈蓝色(细胞核)。

图 7 LEPCs 细胞分化潜能鉴定 (× 100)



A: 红色箭头示淋巴管; B: 钙黄绿素染色。

图 8 成管实验及钙黄绿素染色 (× 100)

### 2.3 手术复制模型对小鼠足垫水肿的影响

通过手术复制小鼠后肢淋巴水肿模型,可见亚甲蓝染色后的淋巴结及淋巴管解剖结构[腭窝淋巴结、淋巴结远端的 2 个淋巴管(DLV1 和 DLV2)及淋巴结近端的 1 个淋巴管(PLV)](见图 9A)。于侧面及腹侧面观察小鼠术后肿胀情况,可见手术侧水肿程度明显高于非手术侧(见图 9B~D)。单纯手术组与非手术组第 1、4、7、10、13、16、19、22、25、28、31 天

足垫厚度比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点足垫厚度比较,差异有统计学意义( $F=168.495, P=0.000$ ),表明术后水肿程度随时间变化;②单纯手术组与非手术组间足垫厚度比较,差异有统计学意义( $F=266.724, P=0.000$ ),单纯手术组水肿程度高于非手术组;③两组足垫厚度变化趋势比较,差异有统计学意义( $F=191.070, P=$

$0.000$ ),表明手术干预影响水肿进程。进一步分析结果显示:术后第7天单纯手术组水肿程度达到峰值,单纯手术组足垫厚度大于非手术组( $P<0.05$ );术后第31天,单纯手术组足垫厚度仍大于非手术组( $P<0.05$ )(见表1)。水肿现象至少持续4周,在整个观察期间,手术组后肢水肿程度均高于非手术组(见图10)。

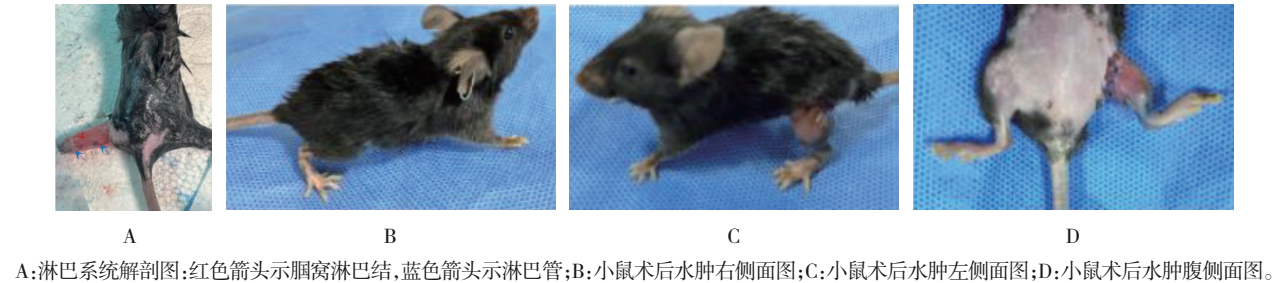


图9 小鼠腋窝淋巴结、淋巴管解剖图及手术后侧面观

表1 单纯手术组与非手术组不同时间点足垫厚度比较 ( $n=6, \text{mm}, \bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 0 d               | 1 d               | 4 d               | 7 d               | 10 d              | 13 d              |
|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 单纯手术组 | $2.190 \pm 0.057$ | $3.442 \pm 0.116$ | $3.794 \pm 0.134$ | $3.984 \pm 0.171$ | $3.830 \pm 0.151$ | $3.650 \pm 0.194$ |
| 非手术组  | $2.136 \pm 0.093$ | $2.142 \pm 0.084$ | $2.164 \pm 0.091$ | $2.176 \pm 0.101$ | $2.192 \pm 0.096$ | $2.216 \pm 0.101$ |

| 组别    | 16 d              | 19 d              | 22 d              | 25 d              | 28 d              | 31 d              |
|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 单纯手术组 | $3.432 \pm 0.169$ | $3.240 \pm 0.138$ | $3.148 \pm 0.116$ | $3.080 \pm 0.141$ | $2.998 \pm 0.134$ | $2.904 \pm 0.142$ |
| 非手术组  | $2.230 \pm 0.093$ | $2.250 \pm 0.090$ | $2.264 \pm 0.085$ | $2.284 \pm 0.083$ | $2.312 \pm 0.079$ | $2.334 \pm 0.080$ |

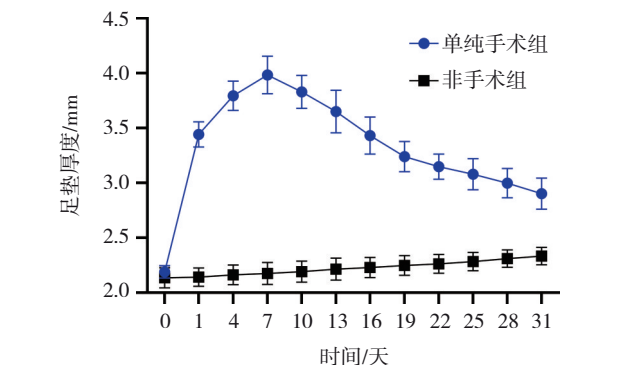


图10 单纯手术组与非手术组小鼠足垫厚度的变化趋势 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

2.4 不同组小鼠淋巴水肿的变化

2.4.1 不同组小鼠足垫厚度的变化 对照组、MSCs组、LEPCs组和MSCs+LEPCs组第1、4、7、10、13、16、19天足垫厚度比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点足垫厚度比较,差异有统计学意义( $F=713.123, P=0.000$ ),表明4组术后水肿程度随时间变化;②4组足垫厚度比较,差异无统计学

意义( $F=2.920, P=0.066$ );③4组足垫厚度变化趋势比较,差异有统计学意义( $F=8.310, P=0.000$ ),表明不同细胞注射方案对水肿进程有差异(见图11)。进一步分析结果显示:第16天, MSCs+LEPCs组足垫厚度小于MSCs组和对照组( $P<0.05$ );第19天, MSCs组、LEPCs组、MSCs+LEPCs组足垫厚度均小于对照组( $P<0.05$ ),且 MSCs+LEPCs组足垫厚度小于LEPCs组和MSCs组( $P<0.05$ )。见图11和表2。

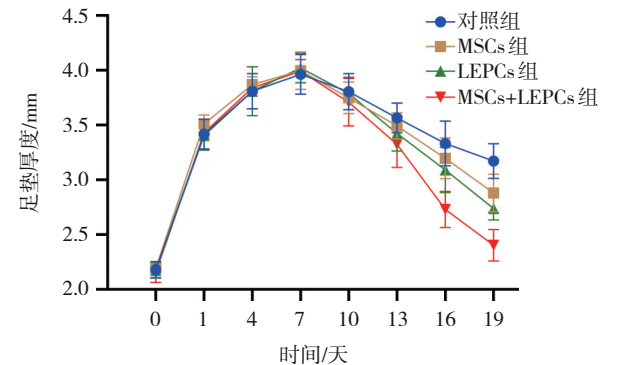


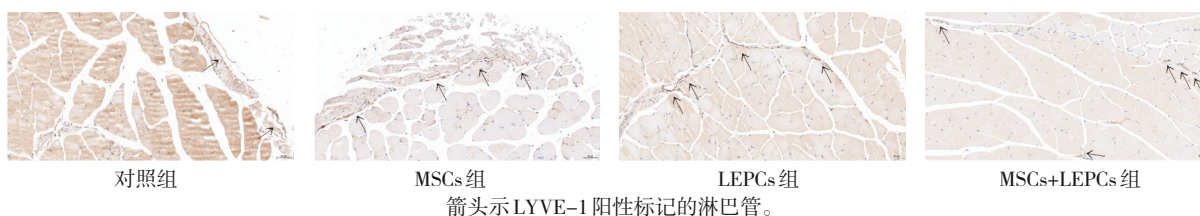
图11 4组小鼠足垫厚度的变化趋势 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

表 2 4 组不同时间点足垫厚度比较 ( $n=6$ , mm,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别           | 0 d           | 1 d           | 4 d           | 7 d           | 10 d          | 13 d          | 16 d          | 19 d          |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 对照组          | 2.180 ± 0.073 | 3.418 ± 0.137 | 3.810 ± 0.161 | 3.964 ± 0.181 | 3.806 ± 0.165 | 3.566 ± 0.137 | 3.332 ± 0.204 | 3.172 ± 0.159 |
| MSCs 组       | 2.190 ± 0.050 | 3.512 ± 0.083 | 3.870 ± 0.072 | 3.996 ± 0.171 | 3.748 ± 0.144 | 3.492 ± 0.119 | 3.196 ± 0.187 | 2.880 ± 0.171 |
| LEPCs 组      | 2.174 ± 0.070 | 3.406 ± 0.134 | 3.810 ± 0.223 | 4.022 ± 0.136 | 3.788 ± 0.148 | 3.424 ± 0.161 | 3.090 ± 0.206 | 2.738 ± 0.105 |
| MSCs+LEPCs 组 | 2.154 ± 0.090 | 3.430 ± 0.050 | 3.840 ± 0.193 | 3.992 ± 0.106 | 3.710 ± 0.217 | 3.324 ± 0.211 | 2.730 ± 0.165 | 2.404 ± 0.144 |

**2.4.2 不同组 LYVE-1 阳性淋巴管的变化** 小鼠处死后行免疫组织化学染色,于显微镜下可见 LYVE-1 阳性的不规则管状结构,即为淋巴管(见图 12)。对照组、MSCs 组、LEPCs 组和 MSCs+LEPCs 组淋巴管面积分别为( $4\ 929.888 \pm 1\ 015.390$ )、( $2\ 767.951 \pm 269.783$ )、( $2\ 402.802 \pm 347.513$ )和( $714.134 \pm 202.337$ ) $\mu\text{m}^2$ ,经方差分析,差异有统计学意义( $F=28.475$ ,  $P=0.000$ )。进一步两两比较结果:

MSCs 组、LEPCs 组、MSCs+LEPCs 组淋巴管面积均小于对照组( $P<0.05$ ),MSCs+LEPCs 组淋巴管面积均小于 MSCs 组和 LEPCs 组( $P<0.05$ )(见图 12B)。对照组、MSCs 组、LEPCs 组和 MSCs+LEPCs 组淋巴管数分别为( $2.667 \pm 1.155$ )、( $4.333 \pm 0.577$ )、( $5.667 \pm 1.528$ )、( $5.667 \pm 0.577$ )个/HP,经方差分析,差异无统计学意义( $F=0.407$ ,  $P=0.752$ )。

图 12 4 组 LYVE-1 阳性淋巴管的组织学观察 ( $\times 200$ )

**2.4.3 不同组 LYVE-1 蛋白表达的变化** 对照组、MSCs 组、LEPCs 组和 MSCs+LEPCs 组 LYVE-1 蛋白相对表达量分别为( $0.118 \pm 0.031$ )、( $0.386 \pm 0.090$ )、( $0.400 \pm 0.108$ )、( $0.600 \pm 0.039$ ),经方差分析,差异有统计学意义( $F=20.717$ ,  $P=0.000$ );进一步两两比较结果:MSCs 组、LEPCs 组、MSCs+LEPCs 组 LYVE-1 蛋白相对表达量均高于对照组( $P<0.05$ );MSCs+LEPCs 组 LYVE-1 蛋白相对表达量均高于 MSCs 组和 LEPCs 组( $P<0.05$ )(见图 13)。

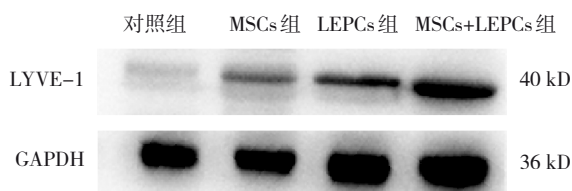


图 13 4 组 LYVE-1 蛋白表达条带图

### 3 讨论

淋巴水肿常见的疗法有保守治疗与手术治疗<sup>[12]</sup>,保守治疗包括皮肤护理、手动淋巴引流<sup>[13]</sup>、使用弹力袜加压和运动<sup>[14-15]</sup>等。手术治疗包括淋巴静

脉吻合术、淋巴结移植术等<sup>[16]</sup>。然而保守疗法治疗周期长,患者依从性差,且只能起到延缓效果。手术方式则依赖于显微外科的发展,对医院水平及医生技术要求高。因此目前淋巴水肿的治疗仍然是一项难题。随着再生医学发展,具有分化为淋巴管内皮细胞能力的细胞在治疗淋巴水肿中展现出巨大潜力。

MSCs 治疗淋巴水肿被称为有前途的细胞治疗方法<sup>[17]</sup>,其具有多向分化潜能及自我更新的潜力,常用于受损组织和器官的修复与再生<sup>[18]</sup>。有研究发现干细胞可以分化成淋巴管内皮细胞,并可以促进淋巴管内皮细胞的增殖和迁移。此外干细胞也可以产生多种生长因子和细胞因子,包括 IGF-1、VEGF-A 和 VEGF-C 等。这些生长因子和细胞因子促进血管和淋巴管生成<sup>[19]</sup>。MORITA 等<sup>[20]</sup>通过复制小鼠后肢淋巴水肿模型并注射 MSCs,发现淋巴水肿出现缓解。在复制的小鼠尾部淋巴水肿模型中,也发现了干细胞有缓解淋巴水肿的作用<sup>[21]</sup>。此外,也有研究发现,干细胞的异种移植也对淋巴水肿有治疗作用<sup>[20]</sup>。目前,干细胞也应用于临床研究中。有学者

通过人体试点研究,纳入 10 例乳腺癌术后患肢出现淋巴水肿的患者,通过注射干细胞后,发现 5 例患者减少了保守治疗的使用,根据患者报告的结果测量认为注射干细胞可改善淋巴水肿,且没有发生严重的不良事件<sup>[22]</sup>。

LEPCs 细胞是从内皮祖细胞中分离出来的表型为 CD34<sup>+</sup>/VEGFR3<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>的祖细胞,也能够分化为淋巴管内皮细胞来促进淋巴管生成。有研究发现,LEPCs 细胞移植于心肌梗死位置,可以促进心肌梗死的修复,并增强心脏淋巴管生成<sup>[9]</sup>。KWON 等<sup>[23]</sup>研究证明脐带血 LEPCs 细胞也可以促进淋巴管的生成,且与 GREM1、EPHB3、VEGFA、AMOT、THSD7A、ANGPTL4、SEMA5A、FGF2 和 GBX2 等部分促淋巴管生成基因相关。

此外,许多研究发现干细胞联合其他方式相较于单一细胞疗法治疗淋巴水肿效果更好。HAYASHIDA 等<sup>[24]</sup>通过干细胞和血管化淋巴结联合移植后,具有 LYVE-1 免疫反应性的淋巴管数量显著增加。JONAS 等<sup>[25]</sup>通过 VEGF-C 联合干细胞移植于淋巴受损部位,发现这两者共同移植对淋巴水肿的缓解有积极影响。

MSCs 与 LEPCs 细胞均具有向淋巴管内皮分化的潜能,进而影响淋巴系统。笔者在复制水肿模型后注射 MSCs 与 LEPCs,通过宏观评估发现 MSCs+LEPCs 组小鼠水肿明显缓解;在免疫组织化学染色中观察了淋巴管的面积及数量,淋巴管的面积直接反映淋巴水肿的情况。当淋巴水肿时,淋巴管扩张;经过细胞治疗后,可见淋巴水肿缓解,淋巴管扩张的程度也会缩小。淋巴管数量的增加会起到缓解淋巴水肿的作用。注射细胞后,观察可见淋巴管数量呈现增多趋势,遗憾的是暂未见差异有统计学意义;此外,在蛋白水平可见 LYVE-1 的表达也呈增加趋势,且差异有统计学意义。通过当前结果,笔者验证了 MSCs、LEPCs 细胞移植可以改善淋巴水肿,并且联合移植对淋巴水肿缓解的效果要优于单一细胞移植。

此外,本研究中也存在着一定的局限性。本研究在蛋白水平上可见 LYVE-1 表达呈增加趋势且差异有统计学意义,在组织学水平观察淋巴管数量也可见增多趋势,但未见差异有统计学意义。考虑此结果的原因可能为观察时间较短。此外,笔者通过

组织学水平观察淋巴管的面积,验证了 MSCs、LEPCs 细胞移植可以缓解淋巴水肿,初步研究并探讨了通过促进淋巴管生成缓解淋巴水肿这一途径,在组织学水平观察淋巴管数量可见增多趋势,但未见差异有统计学意义,但淋巴水肿出现缓解。考虑此情况存在通过其他途径促进了淋巴水肿缓解的可能。有研究显示,免疫功能与淋巴系统的功能也存在着一定联系,淋巴管损伤时可通过以下方式影响淋巴水肿,包括以 CD4 T 细胞为主的炎症反应, M2 型巨噬细胞的募集, Th2 细胞所致的纤维化等<sup>[26]</sup>。因此,未来可以进一步探讨免疫系统在干细胞与祖细胞治疗淋巴水肿中的作用。此外,虽然一些研究证明了细胞疗法在临床应用中的可行性,但尚未被大规模纳入临床应用中。未来需要更多临床前试验及大样本随机对照临床研究,为标准化细胞治疗淋巴水肿提供更多证据。同时也期望在将来能为严重淋巴水肿患者的治疗性淋巴管生成策略提供一定的参考依据。

#### 参 考 文 献 :

- [1] ROCKSON S G, RIVERA K K. Estimating the population burden of lymphedema[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1131: 147-154.
- [2] MANRIQUE O J, BUSTOS S S, CIUDAD P, et al. Overview of lymphedema for physicians and other clinicians: a review of fundamental concepts[J]. *Mayo Clin Proc*, 2022, 97(10): 1920-1935.
- [3] LEE B B, VILLAVICENCIO J L. Primary lymphoedema and lymphatic malformation: are they the two sides of the same coin? [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2010, 39(5): 646-653.
- [4] KEELEY V. Advances in understanding and management of lymphoedema (cancer, primary) [J]. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2017, 11(4): 355-360.
- [5] DISIPIO T, RYE S, NEWMAN B, et al. Incidence of unilateral arm lymphoedema after breast cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(6): 500-515.
- [6] LAFUENTE H, JAUNARENA I, ANSUATEGUI E, et al. Cell therapy as a treatment of secondary lymphedema: a systematic review and meta-analysis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12 (1): 578.
- [7] ZHIDU S, YING T, RUI J, et al. Translational potential of mesenchymal stem cells in regenerative therapies for human diseases: challenges and opportunities[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 266.
- [8] JIA W, HE W, WANG G, et al. Enhancement of lymphangiogenesis by human mesenchymal stem cell sheet[J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11(16): e2200464.

- [9] ZHANG H F, WANG Y L, TAN Y Z, et al. Enhancement of cardiac lymphangiogenesis by transplantation of CD34(+) VEGFR-3(+) endothelial progenitor cells and sustained release of VEGF-C[J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(6): 43.
- [10] WIINHOLT A, JØRGENSEN M G, BUČAN A, et al. A revised method for inducing secondary lymphedema in the hindlimb of mice[J]. *J Vis Exp*, 2019, (153): e60578.
- [11] YOSHIDA S, HAMUY R, HAMADA Y, et al. Adipose-derived stem cell transplantation for therapeutic lymphangiogenesis in a mouse secondary lymphedema model[J]. *Regen Med*, 2015, 10(5): 549-562.
- [12] TORGBENU E, LUCKETT T, BUHAGIAR M A, et al. Guidelines relevant to diagnosis, assessment, and management of lymphedema: a systematic review[J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2023, 12(1): 15-27.
- [13] THOMPSON B, GAITATZIS K, JANSE de JONGE X, et al. Manual lymphatic drainage treatment for lymphedema: a systematic review of the literature[J]. *J Cancer Surviv*, 2021, 15(2): 244-258.
- [14] WANG L, SHI Y X, WANG T T, et al. Breast cancer-related lymphoedema and resistance exercise: an evidence-based review of guidelines, consensus statements and systematic reviews[J]. *J Clin Nurs*, 2023, 32(9-10): 2208-2227.
- [15] BLOOMQUIST K, KRUSTRUP P, FRISTRUP B, et al. Effects of football fitness training on lymphedema and upper-extremity function in women after treatment for breast cancer: a randomized trial[J]. *Acta Oncol*, 2021, 60(3): 392-400.
- [16] GALLAGHER K K, LOPEZ M, ILES K, et al. Surgical approach to lymphedema reduction[J]. *Curr Oncol Rep*, 2020, 22(10): 97.
- [17] 陈君哲, 邓呈亮. 干细胞治疗淋巴水肿的基础及临床应用研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2024, 38(01): 99-106.
- [18] 高和平, 米焱, 王彩丽, 等. 人脐带间充质干细胞对糖尿病肾病大鼠肾脏 HIF-1 $\alpha$  表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(09): 39-49.
- [19] AHMADZADEH N, ROBERING J W, KENGELBACH-WEIGAND A, et al. Human adipose-derived stem cells support lymphangiogenesis in vitro by secretion of lymphangiogenic factors[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 388(2): 111816.
- [20] MORITA Y, SAKATA N, NISHIMURA M, et al. Efficacy of neonatal porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cell xenotransplantation for the therapy of hind limb lymphedema in mice[J]. *Cell Transplant*, 2024, 33: 9636897241260195.
- [21] 周晨笑, 苏万春, 李娜, 等. 脂肪干细胞局部注射改善淋巴水肿的实验研究[J]. *首都医科大学学报*, 2020, 41(6): 869-875.
- [22] TOYSERKANI N M, JENSEN C H, TABATABAEIFAR S, et al. Adipose-derived regenerative cells and fat grafting for treating breast cancer-related lymphedema: Lymphoscintigraphic evaluation with 1 year of follow-up[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2019, 72(1): 71-77.
- [23] KWON H, KWON J Y, SONG J, et al. Decreased lymphangiogenic activities and genes expression of cord blood lymphatic endothelial progenitor cells VEGFR3(+) /Pod(+) /CD11b(+) cells in patient with preeclampsia[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4237.
- [24] HAYASHIDA K, YOSHIDA S, YOSHIMOTO H, et al. Adipose-derived stem cells and vascularized lymph node transfers successfully treat mouse hindlimb secondary lymphedema by early reconnection of the lymphatic system and lymphangiogenesis[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2017, 139(3): 639-651.
- [25] JONAS F, KESA P, PARAL P, et al. The effect of vascular endothelial growth factor C and adipose-derived stem cells on lymphatic regeneration in a rat vascularized lymph node transfer model[J]. *J Reconstr Microsurg*, 2023, 39(4): 311-319.
- [26] DAVIS M J, ZAWIEJA S D, KING P D. Transport and immune functions of the lymphatic system[J]. *Annu Rev Physiol*, 2025, 87(1): 151-172.

(童颖丹 编辑)

**本文引用格式:** 金智伟, 薛泽款, 李义杰, 等. 间充质干细胞与淋巴管内皮祖细胞联合移植对小鼠后肢淋巴水肿的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2025, 35(10): 19-29.

**Cite this article as:** JIN Z W, XUE Z K, LI Y J, et al. Effect of combined transplantation of mesenchymal stem cells and lymphatic endothelial progenitor cells on hindlimb lymphedema in mice[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2025, 35(10): 19-29.