

分类号：
学号：20222014089

密级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



PI3K/AKT/mTOR 信号通路在 MSCs 分泌 IGF-1 调控 LEPCs 增殖中的机制研究

学位申请人	薛泽款
指导教师	黄桂林 教授 侯吉学 副教授
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	临床医学
研究方向	外科学
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子
2025年5月

分类号:
学号: 20222014089

密级: 公开
单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



PI3K/AKT/mTOR 信号通路在 MSCs 分泌 IGF-1 调控 LEPCs 增殖中的机制研究

学位申请人	薛泽款
指导教师	黄桂林 教授
	侯吉学 副教授
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	临床医学
研究方向	外科学
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子
2025年5月

**Mechanistic study of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in the
proliferation of LEPCs regulated by MSCs secreting IGF-1**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Xue Ze-kuan

(Surgery)

Dissertation Supervisor: Prof. Huang Gui-lin

Assoc.Prof. Hou Ji-xue

May , 2025

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：薛济毅 时间：2015年5月21日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：薛济毅 时间：2015年5月21日
导师签名：曹桂林 时间：2015年5月21日

摘要

目的:

本研究旨在探讨间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) 调控淋巴内皮祖细胞 (Lymphatic endothelial progenitor cells, LEPCs) 增殖的具体机制。

方法:

1. 从 C57BL/6 J 小鼠的骨髓中提取、培养 MSCs 和 LEPCs。
2. 通过诱导培养及细胞染色检测 MSCs 的多向分化能力, 基质胶成管实验检测 LEPCs 的成管能力, 流式细胞术和免疫荧光检测细胞的表面标记物以鉴定 MSCs 和 LEPCs。
3. 通过 CCK-8、EdU 实验检测 MSCs 及胰岛素样生长因子 1 (Insulin-like growth factor 1, IGF-1) 对 LEPCs 增殖的影响, 流式细胞术和 Western blot 实验检测 MSCs 对 LEPCs 凋亡的影响。
4. Elisa 实验检测 MSCs 和 LEPCs 培养基中 IGF-1 的含量, CCK-8 及 EdU 实验检测 IGF-1 对 LEPCs 增殖的影响, 流式细胞术检测 IGF-1 对 LEPCs 周期的影响。
5. 通过 RNA 测序及 Western blot 实验检测 IGF-1 对 LEPCs 中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响。使用 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂联合 IGF-1 处理 LEPCs 后, 通过 CCK-8 及 EdU 实验检测细胞的增殖能力。
6. 通过靶向质谱分析 IGF-1 及 mTOR 通路对 LEPCs 代谢物的影响, 使用 Western blot 实验检测 LEPCs 中核糖核苷酸还原酶相关蛋白 RRM1 及 RRM2 的表达水平。

结果:

1. 从小鼠骨髓中提取的 MSCs 增殖状态良好; 流式细胞术结果显示 MSCs 的表面标记物 CD29、CD44 及 Sca-1 呈阳性, CD45 及 CD11b 呈阴性; MSCs 在特定诱导培养基的培养下可以成功进行成脂分化、成骨分化及成软骨分化。
2. 从小鼠骨髓中提取的 LEPCs 呈内皮细胞样生长; LEPCs 同时表达干细胞标记物 CD34 和淋巴管内皮细胞标志物 VEGFR-3; LEPCs 与 UEA-I-FITC 的结合和对 Dil-Ac-LDL 的摄取均呈阳性; LEPCs 表达淋巴管内皮细胞标志物 LYVE-1; 在基质胶上培养的 LEPCs 能构成稳定的管状结构。
3. MSCs 在 24 h、48 h 及 72 h 均可以促进 LEPCs 的增殖能力 ($t=11.693$, $P<0.001$; $t=42.414$, $P<0.001$; $t=7.473$, $P=0.002$); MSCs 降低 LEPCs 中凋亡蛋白 Bax 及 Bcl-2 的比值 ($t=13.996$, $P<0.001$), 并降低 LEPCs 的总凋亡率 ($t=3.617$, $P=0.022$)。
4. Elisa 结果显示, IGF-1 在 MSCs 条件培养基中的含量显著高于 LEPCs 条件培养基中的含量 ($t=17.861$, $P<0.001$); IGF-1 在 24 h、48 h 及 72 h 以浓度依赖的方式促进 LEPCs 的增殖 ($F=39.911$, $P<0.01$; $F=295.865$, $P<0.001$; $F=187.840$, $P<0.001$); IGF-1 影响 LEPCs 细胞周期并促进其 S 期进展 ($t=4.766$, $P=0.009$); CCK-8 及 EdU 结果均表明使用中和抗体阻断 MSCs-LEPCs 共培养体系中的 IGF-1 可以逆转 MSCs 对 LEPCs 的促增殖作用 ($F=172.534$, $P<0.001$; $F=98.167$, $P<0.001$)。
5. KEGG 功能富集分析表明, IGF-1 处理 LEPCs 后, 比较组之间的差异基因在 PI3K/AKT 信号通路中显著富集; Western blot 实验结果显示 IGF-1 显著升高 LEPCs 中 PI3K/AKT/mTOR 通路关键蛋白 AKT 及 S6 的磷酸化水平 ($t=12.109$, $P<0.001$; $t=113.887$, $P<0.001$), MSCs 也显著升高了 LEPCs 中 AKT 和 S6 的磷酸化水平 ($F=911.916$, $P=0.001$; $F=84.791$, $P<0.001$), 而 MSCs-LEPCs 共培养体系中的 IGF-1 被中和之后, MSCs 对 AKT 和 S6 的磷酸化激活效应被逆转了 ($F=911.916$,

$P < 0.001$; $F = 84.791$, $P < 0.001$) ; PI3K 信号通路抑制剂 LY294002 ($P < 0.001$) 和 mTOR 信号通路抑制剂雷帕霉素 ($P < 0.001$) 均可以逆转 IGF-1 对 LEPCs 的促增殖效应。

6. 靶向代谢组学结果提示 IGF-1 及 mTOR 通路参与影响 LEPCs 的部分核苷酸代谢物水平; IGF-1 可以显著影响 LEPCs 中 AMP ($F = 8.359$, $P = 0.002$)、ATP ($F = 10.385$, $P < 0.001$) 及 GTP ($F = 7.624$, $P = 0.001$) 的表达, mTOR 通路抑制剂雷帕霉素可以部分逆转 IGF-1 对 ATP 表达量的提升作用 ($F = 10.385$, $P = 0.007$) ; IGF-1 显著提高了 LEPCs 中 RRM2 的表达 ($F = 130.084$, $P < 0.001$) , 雷帕霉素则逆转了这一效应 ($F = 130.084$, $P < 0.001$) 。

结论:

1. 间充质干细胞可以促进淋巴内皮祖细胞的增殖并抑制其凋亡。
2. 间充质干细胞分泌的 IGF-1 通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进淋巴内皮祖细胞的增殖。
3. IGF-1 及 mTOR 通路参与影响淋巴内皮祖细胞的核苷酸代谢物水平。

关键词: 间充质干细胞; 淋巴内皮祖细胞; 细胞增殖; IGF-1; PI3K/AKT/mTOR

Abstract

Object:

The aim of this study is to investigate the specific mechanisms by which mesenchymal stem cells (MSCs) regulate the proliferation of lymphatic endothelial progenitor cells (LEPCs).

Methods:

1. MSCs and LEPCs were extracted and cultured from bone marrow of C57BL/6 J mice.
2. The multidirectional differentiation ability of MSCs was detected by induction culture and cell staining, the tube-forming ability of LEPCs was detected by matrix gel tube-forming assay, and the surface markers of cells were detected by flow cytometry and immunofluorescence to identify MSCs and LEPCs.
3. The effects of MSCs and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) on the proliferation of LEPCs were detected by CCK-8, EdU assay, and the effects of MSCs on the apoptosis of LEPCs were detected by flow cytometry and Western blot assay.
4. Elisa assay for the detection of IGF-1 in the culture medium of MSCs and LEPCs, CCK-8 and EdU assay detected the effect of IGF-1 on the proliferation of LEPCs, and flow cytometry detected the effect of IGF-1 on the cycle of LEPCs.
5. The effects of IGF-1 on the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in LEPCs were detected by RNA sequencing and Western blot experiments. After treating LEPCs with PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibitors combined with IGF-1, the proliferative ability of the cells was detected by CCK-8 and EdU assays.
6. Analyzing the effects of IGF-1 and mTOR pathway on metabolites of LEPCs by targeted mass spectrometry, and Western blot experiments were used to detect the expression levels of the ribonucleotide reductase-related proteins RRM1 and RRM2 in LEPCs.

Results:

1. MSCs extracted from mouse bone marrow were in good proliferation status; flow cytometry results showed that MSCs were positive for the surface markers CD29, CD44 and Sca-1, and negative for CD45 and CD11b; MSCs could be successfully cultured in specific induction medium for lipogenic differentiation, osteogenic differentiation and chondrogenic differentiation.
2. LEPCs extracted from mouse bone marrow showed endothelial cell-like growth; LEPCs expressed both the stem cell marker CD34 and the lymphatic vessel endothelial cell marker VEGFR-3; LEPCs were positive for UEA-I-FITC binding and uptake of Dil-Ac-LDL; LEPCs expressed the lymphatic vessel endothelial cell marker LYVE-1; cultured on stromal gel LEPCs were able to form stable tubular structures.
3. MSCs could promote the proliferative ability of LEPCs at 24 h, 48 h and 72 h ($t=11.693$, $P<0.001$; $t=42.414$, $P<0.001$; $t=7.473$, $P=0.002$); MSCs decreased the ratio of apoptotic proteins Bax and Bcl-2 in LEPCs ($t=13.996$, $P<0.001$), and decreased the total apoptosis rate in LEPCs ($t=3.617$, $P=0.022$).
4. Elisa results showed that the content of IGF-1 in the conditioned medium of MSCs was significantly higher than that in the conditioned medium of LEPCs ($t=17.861$, $P<0.001$); IGF-1 promoted the proliferation of LEPCs in a concentration-dependent manner at 24 h, 48 h and 72 h ($F=39.911$, $P<0.01$; $F=295.865$, $P<0.001$; $F=187.840$, $P<0.001$); IGF-1 affected the cell cycle of LEPCs and promoted their

S-phase progression ($t=4.766$, $P=0.009$); and the results of CCK-8 and EdU both indicated that blocking IGF-1 in the co-culture system of MSCs-LEPCs using a neutralizing antibody reversed the pro-proliferative effect of MSCs on LEPCs ($F=172.534$, $P<0.001$; $F=98.167$, $P<0.001$).

5. KEGG functional enrichment analysis showed that after IGF-1 treatment of LEPCs, the differential genes between the comparison groups were significantly enriched in the PI3K/AKT signaling pathway; the results of Western blot experiments showed that IGF-1 significantly elevated the phosphorylation levels of the key proteins of the PI3K/AKT/mTOR pathway, AKT and S6, in the LEPCs ($t=12.109$, $P<0.001$; $t=113.887$, $P<0.001$), and MSCs also significantly elevated the phosphorylation levels of AKT and S6 in LEPCs ($F=911.916$, $P=0.001$; $F=84.791$, $P<0.001$), whereas, after neutralization of IGF-1 in the MSCs-LEPCs co-culture system, the activation effects of MSCs on AKT and S6 phosphorylation activation effects were reversed ($F=911.916$, $P<0.001$; $F=84.791$, $P<0.001$); both the PI3K signaling pathway inhibitor LY294002 ($P<0.001$) and the mTOR signaling pathway inhibitor rapamycin ($P<0.001$) reversed the pro-proliferative effects of IGF-1 on LEPCs.

6. The results of targeted metabolomics suggested that IGF-1 and the mTOR pathway were involved in influencing the levels of some nucleotide metabolites in LEPCs; IGF-1 could significantly affect the expression of AMP ($F=8.359$, $P=0.002$), ATP ($F=10.385$, $P<0.001$) and GTP ($F=7.624$, $P=0.001$) in LEPCs. The mTOR pathway inhibitor rapamycin partially reversed the elevating effect of IGF-1 on ATP expression ($F=10.385$, $P=0.007$); IGF-1 significantly increased the expression of RRM2 in LEPCs ($F=130.084$, $P<0.001$), and rapamycin reversed this effect ($F=130.084$, $P<0.001$).

Conclusion:

1. MSCs can promote the proliferation and inhibit the apoptosis of lymphatic endothelial progenitor cells.
2. IGF-1 secreted by MSCs promotes the proliferation of lymphatic endothelial progenitor cells through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.
3. IGF-1 and mTOR pathways are involved in influencing the levels of nucleotide metabolites in lymphatic endothelial progenitor cells.

Key words: Mesenchymal stem cells; Lymphatic endothelial progenitor cells; Cell proliferation; IGF-1; PI3K/AKT/mTOR

目录

摘要.....	I
Abstract	III
中英文对照缩略词表	VII
前言	1
1 材料	3
1.1 实验动物	3
1.2 主要试剂	3
1.3 主要耗材	7
1.4 主要仪器设备	8
2 方法	10
2.1 间充质干细胞（MSCs）的分离、培养和鉴定	10
2.1.1 MSCs 的分离和培养	10
2.1.2 MSCs 的传代	11
2.1.3 MSCs 的表面标记物检测	12
2.1.4 MSCs 的分化能力检测	12
2.2 淋巴内皮祖细胞（LEPCs）的分离、培养和鉴定	16
2.2.1 小鼠骨髓单个核细胞的分离	16
2.2.2 LEPCs 的分选培养和传代	16
2.2.3 LEPCs 的表面标记物检测	17
2.2.4 LEPCs 的诱导分化及分化细胞的免疫荧光染色	18
2.2.5 LEPCs 的吞噬及结合功能检测	19
2.2.6 LEPCs 的成管实验	19
2.3 细胞计数	20
2.4 MSCs 和 LEPCs 的共培养	20
2.5 Cell Counting Kit-8（CCK-8）实验	21
2.6 EdU 实验	21
2.7 酶联免疫吸附实验（ELISA）	23
2.8 流式细胞术检测细胞凋亡	24
2.9 流式细胞术检测细胞周期	24
2.10 蛋白质免疫印迹（Western Blot）	24
2.10.1 细胞蛋白质的提取	24

2.10.2	BCA 法检测蛋白质浓度.....	25
2.10.3	Western Blot 检测.....	25
2.11	RNA sequencing (RNA 测序)	28
2.12	LC-MS 靶向代谢组学分析.....	29
2.13	统计学分析.....	29
3	结果.....	31
3.1	MSCs 的特征.....	31
3.1.1	MSCs 的生长形态.....	31
3.1.2	MSCs 的表面标记物表达.....	32
3.1.3	MSCs 的多向分化潜能.....	32
3.2	LEPCs 的特征.....	33
3.2.1	LEPCs 的生长形态.....	33
3.2.2	LEPCs 的表面标记物表达.....	34
3.2.3	LEPCs 的吞噬与结合特性.....	34
3.2.4	LEPCs 的分化能力和成管能力.....	35
3.3	MSCs 对 LEPCs 的增殖及凋亡的影响.....	36
3.3.1	MSCs 促进 LEPCs 的增殖.....	36
3.3.2	MSCs 抑制 LEPCs 的凋亡.....	37
3.4	MSCs 通过分泌 IGF-1 促进 LEPCs 的增殖.....	39
3.4.1	MSCs 条件培养基中的 IGF-1 含量高于 LEPCs 条件培养基.....	39
3.4.2	不同浓度 IGF-1 对 LEPCs 增殖的影响.....	40
3.4.3	IGF-1 参与 MSCs 促进 LEPCs 增殖.....	41
3.5	IGF-1 通过调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进 LEPCs 的增殖.....	43
3.5.1	IGF-1 处理组 KEGG 富集与 PI3K/AKT 信号通路相关.....	43
3.5.2	MSCs 通过分泌 IGF-1 激活 LEPCs 的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路.....	45
3.5.3	IGF-1 通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进 LEPCs 的增殖.....	49
3.6	mTOR 信号通路介导 IGF-1 影响 LEPCs 的核苷酸代谢.....	53
讨论	57
结论	61
综述	62
参考文献	67
致谢	78
作者简介	79

中英文对照缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
MSCs	Mesenchymal stem cells	间充质干细胞
LEPCs	Lymphatic endothelial progenitor cells	淋巴内皮祖细胞
IGF-1	Insulin-like growth factor 1	胰岛素样生长因子 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase	磷脂酰肌醇 3 激酶
AKT (PKB)	Protein kinase B	蛋白激酶 B
mTOR	Mammalian target of rapamycin	哺乳动物雷帕霉素靶蛋白
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
LYVE-1	Lymphatic vessel endothelial receptor-1	淋巴管内皮透明质酸受体-1
MACS	Magnetic-activated cell sorting	磁性细胞分选技术
PVDF	Polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸缓冲盐溶液
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
OD	Optical density	光密度
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
LC-MS	Liquid chromatograph-mass spectrometer	液相色谱仪-质谱仪
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes	京都基因与基因组百科全书
GO	Gene ontology	基因本体
EPCs	Endothelial progenitor cells	内皮祖细胞
BCA	Bicinchoninic acid	二喹啉甲酸
CCK-8	Cell counting kit-8	细胞计数试剂盒-8
RNR	Ribonucleotide reductase	核糖核苷酸还原酶

前言

间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) 是一种可以自我更新, 增殖能力强且可以分化为多种组织细胞的干细胞^[1], 可以从不同组织中分离获得。近年来, 相关研究表明 MSCs 可通过旁分泌作用影响其他细胞的功能或者组织的再生和修复过程, 展现出了其潜在的应用价值。有研究表明 MSCs 分泌的外泌体在体外和免疫缺陷小鼠体内均可以促进内皮细胞的血管生成^[2]; MSCs 衍生的外泌体可以逆转过氧化氢诱导的内皮细胞凋亡并增强糖尿病小鼠伤口的肉芽组织形成的能力^[3]。此外, 缺氧条件下 MSCs 衍生的外泌体通过促进淋巴管内皮细胞的增殖, 迁移和对 AKT 信号的激活, 从而增强了淋巴管的生成能力^[4]。还有研究显示, 在血管受损部位注射 MSCs 可以分泌生长因子加速血管形成, 其通过分泌血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 促进内皮细胞的血管生成能力^[5]。

自从 1997 年 Asahara 等学者发现外周血中存在可以分化为血管内皮细胞的内皮祖细胞 (Endothelial progenitor cells, EPCs) 以来, 该细胞多年来在血管生成领域被广泛研究^[6-8]。2003 年, Salvend 等人从胎儿肝脏中分选出一种同时表达 CD34⁺VEGFR-3⁺CD133⁺的细胞群^[9], 该细胞群不仅具有 EPCs 的血管分化能力, 同时具有分化为淋巴管内皮细胞的潜能; 之后 Wang 等^[10]从脐带血中成功分离出同样表达 CD34⁺VEGFR-3⁺CD133⁺的细胞群, 并将其命名为淋巴内皮祖细胞 (Lymphatic endothelial progenitor cells, LEPCs)。近年来, 具有血管内皮分化潜能的 EPCs 和具有淋巴内皮细胞分化潜能的 LEPCs 被视为同属内皮祖细胞的两种亚群, 即血管内皮祖细胞亚群和淋巴内皮祖细胞亚群^[11,12]。这两种祖细胞虽然均表达部分干细胞表面标志物 (如 CD34、CD133), 但 LEPCs 特异性高表达 VEGFR-3、LYVE-1 等淋巴内皮分化关键因子, 通过这一特点, 有学者从人脐带血及鼠骨髓中分离 CD34⁺VEGFR-3⁺的单个核细胞群, 发现该细胞群可以作为 LEPCs 向淋巴管内皮细胞分化并参与淋巴管生成^[13,14]。

在临床治疗中, 经历淋巴结清扫术或者放射治疗的癌症患者, 往往因淋巴系统遭到不同程度的破坏而出现淋巴水肿, 这严重影响患者的疾病恢复和生活质量^[15]。淋巴水肿可以采用手术治疗和非手术治疗, 手术治疗虽然会给水肿患者带来一些益处, 但存在较大的创伤; 而非手术治疗往往因效果不佳需要反复进行, 从而导致水肿加重。近年来, 干细胞移植疗法在很多疾病领域展现出良好的应用前景。干细胞在淋巴管生成过程中进行靶向诱导, 促进淋巴回流通道的形成, 这一发现可能成为治疗淋巴水肿的新策略^[16,17]。

MSCs 为干细胞治疗淋巴水肿等相关疾病提供了更多的可能性, 其可以通过自身的

分泌功能作用于内皮细胞或内皮祖细胞从而影响淋巴管或血管的生成。有研究发现 MSCs 的条件培养基可以刺激淋巴管的生成^[18]；MSCs 可以分泌多种淋巴管生长因子，包括胰岛素样生长因子-1 (Insulin-like growth factor 1, IGF-1)，表皮生长因子 (Epidermal growth factor, EGF)，肝细胞因子 (Hepatocyte growth factor, HGF) 及 VEGF 等^[18,19]，这些因子可以参与血管或淋巴管生成^[20,21]。其中，IGF-1 可以诱导蛋白激酶 AKT 的磷酸化，促进人类或小鼠淋巴管内皮细胞的增殖和迁移，直接或间接参与淋巴管形成^[22]；还有学者发现 IGF-1 可以增强 EPCs 的克隆形成及血管形成的能力^[23,24]。

基于上述背景，MSCs 和 LEPCs 都在淋巴管生成中发挥作用，本研究推测它们或许可以协同参与淋巴管生成，但是关于它们之间相互作用的机制报道较少。课题组前期研究发现 MSCs 可以促进 LEPCs 的增殖，通过注射 LEPCs 可以缓解小鼠淋巴水肿，而 MSCs 是如何发挥对 LEPCs 的促增殖作用以及 MSCs 是否影响 LEPCs 的其它生物学功能，是本课题的研究重点。为了探讨其中的潜在机制，深化对 MSCs 及 LEPCs 相互作用的理解，本研究通过分离小鼠骨髓的 MSCs 与 LEPCs，揭示了 IGF-1 及 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在 MSCs 促进 LEPCs 增殖中发挥的作用，为干细胞联合治疗淋巴管生成及相关疾病治疗提供了新的思路。

1 材料

1.1 实验动物

本研究中用于提取 MSCs 及 LEPCs 的动物为 4 周龄的清洁级雌性 C57BL/6J 小鼠，小鼠购买于中国北京斯贝福生物技术有限公司（动物生产许可证号：SCXK（京）2024-0001）。实验小鼠在受控的条件下（温度 22℃；8：00~20：00 光照/20：00~8：00 黑暗，相对湿度 55%，每笼最多 4 只小鼠）饲养于石河子大学的动物实验中心。小鼠可以随意获取食物和水。动物适应环境一周后开始实验。本研究中小鼠的实验与操作均符合石河子大学生物伦理委员会（A2024-408）关于实验动物操作与动物福利的要求。

1.2 主要试剂

表 1-1 实验试剂

试剂	生产公司
磷酸缓冲盐溶液（PBS）	北京索莱宝科技有限公司
胎牛血清（FBS）	美国 Omnimabs 公司
MEM α 基础培养基	上海源培生物科技股份有限公司
EBM-2 基础培养基	瑞士 Lonza 公司
青霉素-链霉素双抗溶液	北京索莱宝科技有限公司
红细胞裂解液	北京天根生化科技有限公司
戊巴比妥钠	美国 Sigma 公司
75%酒精	山东浩中化工科技有限公司
VEGF-C	英国 Abcam 公司
牛血清白蛋白（BSA）	北京索莱宝科技有限公司
0.25%胰蛋白酶-EDTA	苏州新赛美生物科技有限公司
抗小鼠 CD29-APC	美国 Biolegend 公司
抗小鼠 CD44-FITC	美国 invitrogen 公司

续表 1-1 实验试剂

试剂	生产公司
抗小鼠 CD45-APC	美国 invitrogen 公司
抗小鼠 CD11b-PE	美国 invitrogen 公司
抗小鼠 Sca-1- PerCP-Cy5.5	美国 invitrogen 公司
小鼠骨髓 MSCs 成脂、成骨及成软骨诱导分化培养基	武汉普诺赛生命科技有限公司
油红 O 染色液	武汉普诺赛生命科技有限公司
4%多聚甲醛固定液	武汉赛维尔生物科技有限公司
琼脂糖	武汉赛维尔生物科技有限公司
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
环保型脱蜡液	武汉赛维尔生物科技有限公司
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司
核固红染液	武汉赛维尔生物科技有限公司
Trizol	美国 Thermo 公司
异丙醇	北京索莱宝科技有限公司
基质胶	美国 Corning 公司
阿利新蓝染色液	武汉赛维尔生物科技有限公司
小鼠骨髓单个核细胞分离液试剂盒	天津灏洋华科生物科技有限公司
茜素红染色液	武汉普诺赛生命科技有限公司
重组小鼠 IGF-1 蛋白	英国 Abcam 公司
大鼠抗小鼠 CD34 抗体	美国 invitrogen 公司
兔抗小鼠 VEGFR-3 抗体	美国 invitrogen 公司
山羊抗大鼠 Cy3 抗体	美国 invitrogen 公司
山羊抗兔 FITC 抗体	美国 invitrogen 公司
Anti IGF-1 抗体	英国 Abcam 公司
红色荧光乙酰低密度脂蛋白	上海懋康生物科技有限公司
FITC 标记荆豆凝集素	上海懋康生物科技有限公司
兔抗小鼠 LYVE-1 抗体	英国 Abcam 公司
小鼠 IGF-1 ELISA Kit	杭州联科生物技术股份有限公司

续表 1-1 实验试剂

试剂	生产公司
FITC 标记山羊抗兔 IgG	美国 invitrogen 公司
Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒	杭州联科生物技术股份有限公司
Calcein AM	武汉赛维尔生物科技有限公司
曲拉通 X-100	北京索莱宝科技有限公司
Cell Counting Kit-8	美国 APExBIO 公司
EdU Imaging Kits (Cy3)	美国 APExBIO 公司
高效 RIPA 裂解液	北京索莱宝科技有限公司
10% PAGE 凝胶超快速配制试剂盒	武汉赛维尔生物科技有限公司
蛋白 Marker 26616	美国 Thermo 公司
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5X)	武汉赛维尔生物科技有限公司
高分辨快速电泳缓冲液 (5X)	武汉赛维尔生物科技有限公司
甲醇	北京索莱宝科技有限公司
快速转膜缓冲液 (10X)	武汉赛维尔生物科技有限公司
Tris 缓冲盐水 (TBS, 粉末)	武汉赛维尔生物科技有限公司
Tween-20	北京索莱宝科技有限公司
兔抗小鼠 p-AKT、AKT	美国 CST 公司
兔抗小鼠 p-S6、S6	美国 CST 公司
兔抗小鼠 Bax	武汉三鹰生物科技有限公司
兔抗小鼠 Bcl-2	武汉三鹰生物科技有限公司
小鼠单抗 GAPDH	北京中衫金桥生物技术有限公司
辣根酶标记山羊抗兔 IgG	北京中衫金桥生物技术有限公司
辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG	北京中衫金桥生物技术有限公司
兔抗小鼠 RRM1	美国 CST 公司
兔抗小鼠 RRM2	美国 CST 公司
蛋白磷酸化酶抑制剂 (100X)	北京索莱宝科技有限公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	北京索莱宝科技有限公司