

利用遗传谱系示踪技术探究小鼠胚胎期多器官静脉内皮的动脉命运转归

郑欣妍¹, 丁晓晨², 侯思元², 江美林¹, 刘兵^{3*}, 兰雨^{1,4*}

¹暨南大学基础医学与公共卫生学院血液学研究所再生医学教育部重点实验室, 广东广州 510632; ²解放军总医院医学创新研究部, 北京 100853; ³解放军总医院第五医学中心血液病医学部研究所/细胞生态海河实验室/血液与健康全国重点实验室, 北京 100071; ⁴中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)/细胞生态海河实验室/血液与健康全国重点实验室, 天津 300020

[中图分类号] R329.2; R543.5; R394; R654.3; Q132 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1611.2025.1120
[声明] 本文所有作者声明无利益冲突
[引用本文] 郑欣妍, 丁晓晨, 侯思元, 等. 利用遗传谱系示踪技术探究小鼠胚胎期多器官静脉内皮的动脉命运转归[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(12): 1540-1548.
[收稿日期] 2025-08-05 [录用日期] 2025-11-01 [上线日期] 2025-11-20

[摘要] **目的** 利用遗传谱系示踪技术探究静脉-动脉转化发生的时间窗口及胚胎期静脉来源的动脉内皮细胞在胚胎发育中后期、新生小鼠和成体器官中的命运转归。**方法** 利用核受体亚家族2F组成员2(Nr2f2)-CrexER;Gja5-增强型绿色荧光蛋白(EGFP);Rosa-H2b-mcherry遗传谱系示踪小鼠模型, 分别在胚胎期E9.5和E11.5进行他莫昔芬单次诱导, 并在E15.5、E18.5、新生儿期(出生后7d)及成体期(成体8周)取脾、胸腺、肾上腺, 进行免疫荧光染色和流式细胞分析, 探究胚胎期静脉谱系对器官内动脉内皮的贡献情况及命运转归。**结果** E9.5诱导时, 静脉内皮能持续贡献脾、胸腺和肾上腺动脉内皮至成体期, 表明胚胎期静脉来源的动脉内皮细胞在血管网络中能够长期存在; 小鼠胚胎E13.5时, Nr2f2仍呈现与动脉标志基因Gja5互斥的表达模式, 表现为静脉内皮特征。E11.5诱导时, 静脉谱系仍然能够贡献脾、胸腺和肾上腺动脉内皮, 表明胚胎期E11.5仍存在静脉-动脉转化事件。**结论** 胚胎期E9.5-E11.5为静脉-动脉转化发生的时间窗口, 胚胎期静脉内皮能够长期贡献脾、胸腺和肾上腺动脉内皮。

[关键词] 血管内皮细胞; 动脉生成; 遗传谱系示踪; 静脉-动脉转化; 胚胎发育

Genetic lineage tracing reveals arterial fate conversion of venous endothelia in multiple organs during mouse embryogenesis

Zheng Xin-Yan¹, Ding Xiao-Chen², Hou Si-Yuan², Jiang Mei-Lin¹, Liu Bing^{3*}, Lan Yu^{1,4*}

¹Key Laboratory for Regenerative Medicine of Ministry of Education, Institute of Hematology, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

²Medical Innovation Research Division, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

³Institute of Hematology, Department of Hematology, Fifth Medical Center, Chinese PLA General Hospital/Haihe Laboratory of Cell Ecosystem/State Key Laboratory of Experimental Hematology, Beijing 100071, China

⁴Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College/Haihe Laboratory of Cell Ecosystem/State Key Laboratory of Experimental Hematology, Tianjin 300020, China

*Corresponding author. Liu Bing, E-mail: bingliu17@yahoo.com; Lan Yu, E-mail: rainyblue_1999@126.com

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFA1103501)

[Abstract] **Objective** To investigate the temporal window of venous-to-arterial conversion and the long-term fate of embryonic venous-derived arterial endothelial cells during mid-to-late gestation, in neonates, and in adulthood through genetic

[基金项目] 国家重点研发计划(2022YFA1103501)

[作者简介] 郑欣妍, 硕士研究生, 主要从事血管发育方面的研究

[通信作者] 刘兵, E-mail: bingliu17@yahoo.com; 兰雨, E-mail: rainyblue_1999@126.com

lineage tracing. **Methods** Using the *Nr2f2-CrexER*; *Gja5-EGFP*; *Rosa-H2b-mcherry* genetic lineage tracing mouse model, tamoxifen induction was performed at embryonic days E9.5 and E11.5. Tissues (spleen, thymus, adrenal gland) were collected at E15.5, E18.5, neonatal stage (postnatal day 7), and adult stage (8-week-old) for immunofluorescence staining and flow cytometry to assess venous lineage contribution to arterial endothelial cells and fate conversion. **Results** Tamoxifen induction at E9.5 revealed that venous endothelia persistently contributed to arterial endothelial cells in the spleen, thymus, and adrenal gland into adulthood, indicating the long-term persistence of embryonic venous-derived arterial endothelial cells within the vascular network. At E13.5, *Nr2f2* expression still showed a pattern mutually exclusive with the arterial marker gene *Gja5*, thus displaying venous endothelial characteristics. The venous lineage was able to contribute to the arterial endothelial cells of the spleen, thymus, and adrenal gland when induced at E11.5, indicating that venous-to-arterial conversion events still occurred at E11.5. **Conclusion** The time window for venous-to-arterial conversion spans from E9.5 to E11.5 in mouse embryos. Embryonic venous endothelia can make a long-term contribution to the arterial endothelial cells of the spleen, thymus, and adrenal gland.

[Key words] vascular endothelial cells; arteriogenesis; genetic lineage tracing; venous-to-arterial fate conversion; embryonic development

哺乳动物胚胎发育过程中，心血管系统是最先构建完成并发挥功能的系统^[1]。紧密连接的单层血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)构成血管管腔^[2]，逐步发育为包含不同等级分支动静脉和毛细血管的完整血管网络，并根据所供应组织器官的需要进行特化。在胚胎血管发育早期，动脉曾被普遍认为是通过已有动脉产生分支或未特化毛细血管动脉化的方式产生的^[3-6]，但该动脉发育模式与近年来人们对于动脉分化和细胞周期阻滞特征相耦合的认识存在矛盾^[7-8]。研究者们通过命运示踪发现，在斑马鱼尾鳍再生、后脑血管化、小鼠视网膜和心脏冠脉系统形成等过程中均存在静脉向动脉命运转化的动脉形成方式^[9-14]。例如在小鼠心脏发育研究中，通过时间特异性标记 *Apj*⁺ 毛细血管丛 VECs 发现，小鼠胚胎期静脉窦来源的静脉 VECs 经历细胞命运转换形成动脉前体亚群并参与构建冠状动脉^[4,15]。有研究结合高精度单细胞转录组测序和双同源重组遗传谱系示踪技术，从转录组、免疫表型和命运 3 个层面揭示了胚胎血管发育早期广泛存在静脉-动脉转化，改写了相关领域内对胚内动静脉形成传统模式的认识^[16]。综上，静脉-动脉转化可能作为一个共通机制在多种发育和病理情境下发挥作用，但胚胎期发生静脉-动脉转化的时间窗口尚不明确，静脉谱系来源的动脉内皮在器官建成后乃至成体阶段是否持续存在仍不清楚。

脾和胸腺是哺乳动物体内重要的免疫器官^[17]，肾上腺是内分泌系统中的重要腺体，在维持机体正常生理功能和内环境稳态中共同发挥核心调节作用；这些器官的血管网络异常与多种重大疾病的发生发展密切相关。脾血管稳态失调可参与门静脉高压、脾功能亢进及多种血液性疾病的病理进程，其病理性血管生成及血管稳态紊乱导致脾内微血管结构异常与微循环障碍，加剧脾充血状态，并为脾淋巴组织增生与纤维化提供了病理基础^[18]。胸腺作为 T 细

胞发育的中枢免疫器官，其血管微环境的完整性对于建立正常免疫应答及防止自身免疫性疾病至关重要，胸腺血管稳态的早期改变包括血管层级结构失衡与血管内环境紊乱，是导致 T 细胞发育微环境恶化并诱发胸腺功能障碍的关键机制^[19]。肾上腺具有高度密集的血管网络，是其执行内分泌功能的结构基础，血管系统异常可能参与肾上腺功能亢进或衰竭等病理过程^[20]。综上，VECs 网络及其层级结构的正确建立，对维持各器官的正常生理功能具有重要意义。然而，脾、胸腺、肾上腺的血管网络如何建成，胚胎期是否发生静脉-动脉转化事件及如何贡献这些组织的动脉仍缺乏研究。因此，本研究以核受体亚家族 2F 组成员 2 (*Nr2f2*)-*CrexER* 静脉谱系示踪小鼠作为重要工具，解析小鼠脾、胸腺、肾上腺动脉的胚胎期起源，确认胚胎期是否发生静脉-动脉转化事件及静脉谱系如何贡献这些器官动脉，帮助拓宽静脉-动脉转化事件的认识和理解，为动脉修复与再生研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雌鼠(*Nr2f2-CrexER*^[16], $n=15$)与雄鼠(*Gja5-EGFP*; *Rosa-H2b-mcherry*^[16], $n=10$)饲养于军事科学院军事医学研究院实验动物中心 SPF 标准级小鼠饲养房。本研究获军事科学院军事医学研究院实验动物管理与使用委员会审批(IACUC-DWZX-2021-056, IACUC-DWZX-2024-026)。实验过程符合国家和单位有关实验动物的管理和使用规定。

1.2 主要试剂及仪器 注射用他莫昔芬(T5648)、I型胶原酶(C2674)、IV型胶原酶(C5138)、脱氧核糖核酸酶(10104159001)购自美国 Sigma 公司；玉米油(ST1177)购自上海碧云天生物技术有限公司；4%多聚甲醛通用型组织固定液(BL539A)购自中国 Biosharp 公司；1× 红细胞裂解液(EG1150H)、别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)标记的 CD45 单克隆抗体(317-

0451-83)、多甲藻素-叶绿素蛋白-花菁 5.5(peridinin-chlorophyll protein-cyanine 5.5, Percp-cy5.5) 标记的 7-AAD 单克隆抗体(00-6993-50)购自美国 eBioscience 公司; TSA 显色剂(DFTST6650)、Fluoreffer 封片剂(ZU-9556)、Cystal Mount(EPPlus)购自北京皓赛拓华生物科技有限公司; 封闭用羊血清(ZU-9022)、内源性过氧化物酶阻断剂(PV-6000)、酶标山羊抗兔 IgG 聚合物(PV-6001)、免疫组化抗原修复缓冲液(ZLI-9066)购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 无水乙醇(10009218)购自上海国药集团化学试剂有限公司; APC 标记的 CD41 单克隆抗体(559777)、APC 标记的 CD43 单克隆抗体(560663)、亮紫 421(brilliant violet 421, BV421)标记的 CD144 单克隆抗体(747749)购自美国 BD 公司; 藻红蛋白(phycoerythrin-cyanine 7, PE-Cy7)标记的 CD31 单克隆抗体(102524)购自美国 BioLegend 公司; CD31 单克隆抗体(77699S)、绿色荧光蛋白(GFP)单克隆抗体(2965s)购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 红色荧光蛋白(RFP)抗体多克隆抗体(600-401-379)购自美国 Rockland 公司; 雌激素受体(estrogen receptor, ER)单克隆抗体(ab27595)购自英国 Abcam 公司。解剖镊(F1027-13)购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司; 解剖显微镜(S8APO)购自德国 Leica 公司; 生物净化工作台(SCB-920)购自北京东联哈尔仪器公司; 台式高速离心机(S804R)购自德国 Eppendorf 公司; 流式细胞仪(LSRFortessa)购自美国 BD 公司; 激光共聚焦显微镜(LSM980)购自德国 Zeiss 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠胚胎期器官取材 将雌鼠(*Nr2f2-CrexER*)与雄鼠(*Gja5-EGFP; Rosa-H2b-mcherry*)交配, 检出阴道栓当日中午 12:00 记为 E0.5; 在 9 d 后(E9.5)或 E11.5 采用灌胃法对孕鼠进行他莫昔芬单次诱导(剂量为 1 mg/10 g 小鼠体重), E15.5 和 E18.5 采用颈椎脱臼法处死后取出孕囊, 用解剖镊逐个分离卵黄囊和胚胎, 转移至荧光显微镜下挑选三基因阳性胚胎, 依次分离阳性胚胎的脾、胸腺、肾上腺(图 1), 置于 2% 胎牛血清(FBS)/磷酸盐缓冲溶液(PBS)中, 并保留部分阴性胚胎组织作为阴性对照。

1.3.2 胚胎期器官单细胞悬液制备 将解离的组织置于含有 I 型胶原酶(终浓度为 0.05 mg/ml)中剪碎, 上下摇晃使组织在震荡中解离, 37 °C 消化 30 min; 加入 2% FBS/PBS 终止消化, 350×g 离心 6 min, 弃上清。脾组织中每管加入 500 μl 1×红细胞裂解液常温静置 10 min, 加入 800 μl 2% FBS/PBS 终止; 离心弃上清, 2% FBS/PBS 清洗 1 次, 离心弃上清备用。

1.3.3 小鼠新生儿期及成体期器官取材 在 E18-

E19 采用颈椎脱臼法处死他莫昔芬诱导后的孕鼠, 剖腹术接生, 子代由昆明乳母鼠饲养, 在出生后 3~4 d 进行基因型鉴定, 分别在出生后 7 d 和成体 8 周采用颈椎脱臼法处死阳性小鼠, 取脾、胸腺、肾上腺(图 1), 置于 2% FBS/PBS 中, 保留部分阴性组织作为阴性对照。

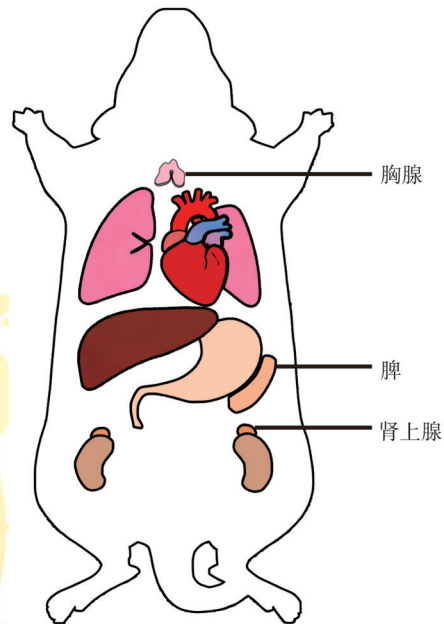


图 1 小鼠取材部位示意图

Fig.1 Sampling locations of mice

1.3.4 小鼠新生儿期及成体期器官单细胞悬液制备 将组织置于含有 IV 型胶原酶(终浓度为 0.2 mg/ml)中 37 °C 消化 50~60 min, 加入 2% FBS/PBS 终止消化, 350×g 离心 6 min, 弃上清。脾组织中每管加入 500 μl 1×红细胞裂解液常温静置 10 min, 加入 800 μl 2% FBS/PBS 终止, 清洗 1 次, 4 °C 下 350×g 离心 6 min 弃上清; 2% FBS/PBS 清洗 1 次, 4 °C 下 350×g 离心 6 min 弃上清备用。

1.3.5 免疫荧光染色 将脾、胸腺、肾上腺置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 经包埋、切片、干燥、脱蜡复水、柠檬酸盐微波抗原修复、过氧化物酶抑制剂孵育、山羊血清封闭、一抗(稀释比例: CD31 1:100、RFP 1:1000、GFP 1:200、ER 1:200)孵育过夜、二抗孵育(原液)、TSA 免疫荧光显色、封片剂封片后, 于共聚焦激光扫描显微镜下观察和拍照。采用 ZEN 3.4 (blue edition) 软件分析 *Nr2f2* 标志的静脉内皮对器官内动脉内皮的贡献情况。

1.3.6 流式细胞分析 在超净台中避光用 1% 牛血清白蛋白(BSA)/PBS 配制抗体组合液, 重悬细胞后 4 °C 避光孵育 30 min, 0.1% BSA/PBS 中和, 70 μm 滤网过滤, 离心后弃上清。加入 7-AAD 抗体避光常温孵育 5 min, 0.1% BSA/PBS 中和, 转移至流式管后进行流

式细胞分析。为排除造血细胞对内皮细胞分析结果的潜在干扰,通过检测CD41、CD43和CD45的表达情况,将三者均为阴性的细胞群体定义为非造血细胞,在此群体中进一步圈选CD31和CD144双阳性的内皮细胞群体,并借助动脉标志基因*Gja5-EGFP*的表达确认动脉内皮身份。CD41、CD43和CD45抗体均对阴性群体进行分析,故可用同一通道,选用APC通道是由于该通道的上述抗体经实验验证具有稳定的荧光信号和良好的分群效果^[16]。使用FlowJo 10.8.1软件对流式数据进行分析,使用GraphPad Prism 9.0.0软件对数据进行处理。

1.4 统计学处理 使用FlowJo 10.8.1软件对各器官流式细胞分析数据进行设门分析;使用GraphPad Prism 9.0.0软件分析FlowJo 10.8.1获得的细胞百分比数据并绘制直方图,直观展示不同群体的分布情况;使用ZEN 3.4(blue edition)软件采集免疫荧光染色图像并进行处理。

2 结果

2.1 胚胎期静脉谱系对脾、胸腺、肾上腺动脉内皮的贡献 在E9.5对*Nr2f2-CrexER;Gja5-EGFP;Rosa-H2b-mCherry*胚胎进行单次他莫昔芬诱导,E15.5取孕囊中的脾、胸腺、肾上腺,采用免疫荧光染色结合内皮细胞标志(CD31)、动脉内皮标志(*Gja5-EGFP*),对诱导时间窗内静脉谱系来源的细胞在器官建成后的动脉命运转归进行追踪,结果显示,*Nr2f2-CrexER*谱系标记的VEC广泛分布于各个器官的脉管系统中,包括*Gja5-EGFP*标识的动脉内皮(图2A)。随后,对在E9.5诱导,E15.5和E18.5时的脾、胸腺和肾上腺进行流式细胞分析,结果显示,静脉来源的VECs对胚胎发育后期脾、胸腺和肾上腺的动脉内皮均有不同程度的贡献,尤其对E15.5时的胸腺和肾上腺动脉内皮细胞的贡献较为显著,达50%左右(图2B、C)。为了追踪胚胎期静脉VECs的长期命运转归,在E9.5对*Nr2f2-CrexER;Gja5-EGFP;Rosa-H2b-mCherry*胚胎进行单次他莫昔芬诱导,在新生儿期(出生后7d)和成体期(成体8周)取脾、胸腺、肾上腺进行免疫荧光染色,结果显示,静脉内皮来源的VECs能够广泛贡献新生儿期至成体期3个器官内的动脉内皮(图3)。

2.2 *Nr2f2*在胚胎发育中后期的表达谱 基于*Nr2f2-CrexER*小鼠的构建策略,ER与*Nr2f2*表达耦联,故ER的组织学染色可反映*Nr2f2*的表达特征。在E13.5取*Nr2f2-CrexER;Gja5-EGFP*小鼠胚胎胸腺和肾上腺,进行免疫荧光染色,确定*Nr2f2*在胚胎发育中后期胸腺和肾上腺血管系统中的表达特征,结果显示,小鼠E13.5胸腺和肾上腺中,*Nr2f2*在*Gja5-EGFP*⁺动脉血管中不表达,在*Gja5-EGFP*静脉血管中表达,并

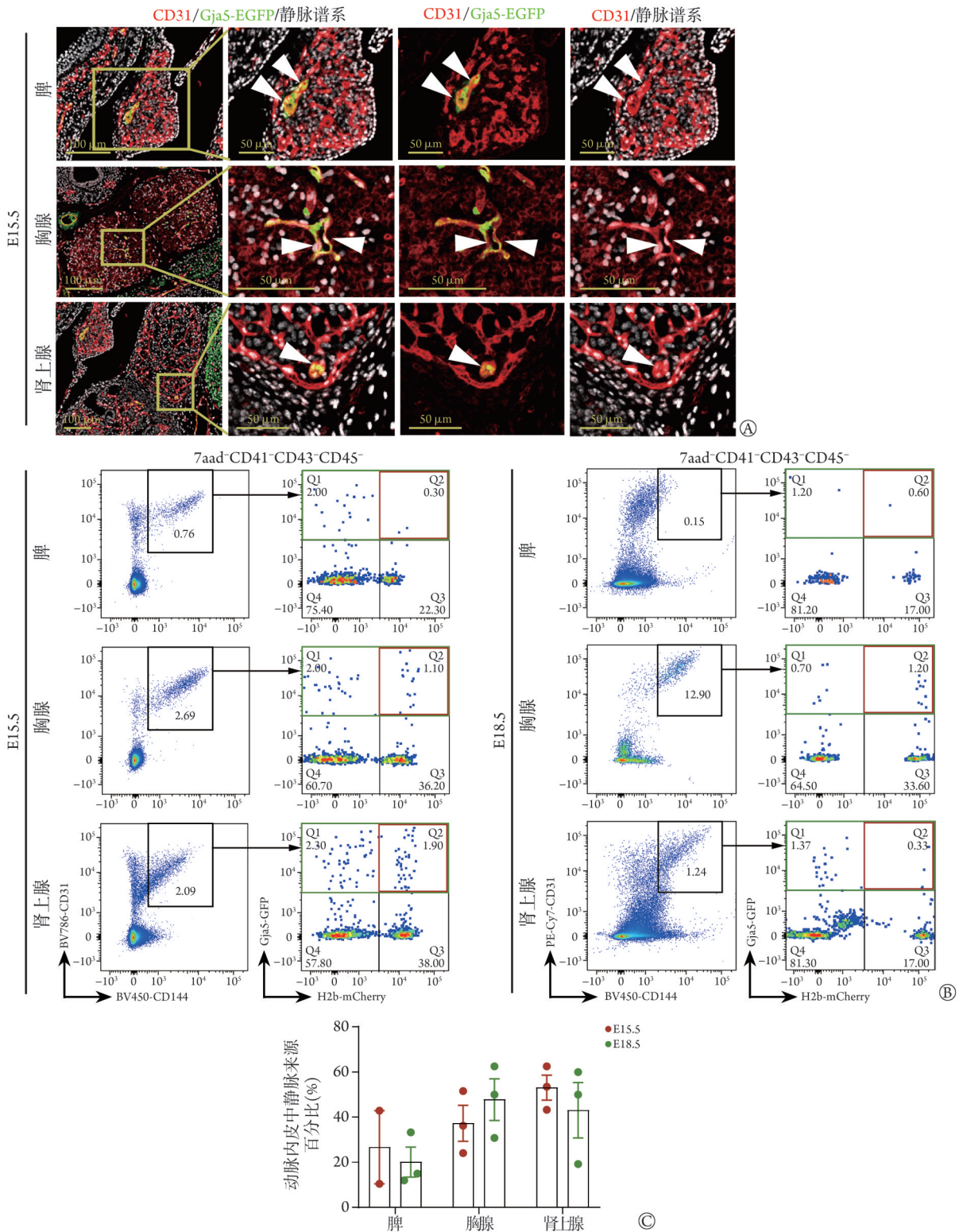
与动脉特异性标记*Gja5-EGFP*呈现互斥的表达模式,表明其在胚胎发育中后期仍可作为静脉特异性标记(图4)。

2.3 胚胎期发生静脉-动脉转化的时间窗口 基于E9.5-E13.5时*Nr2f2*在静脉内皮而非*Gja5-EGFP*⁺的动脉内皮表达,在E11.5对*Nr2f2-CrexER;Gja5-EGFP;Rosa-H2b-mcherry*胚胎进行单次他莫昔芬诱导,E15.5取胸腺进行免疫荧光染色,结果显示,E11.5诱导时,静脉谱系来源的细胞仍能贡献胸腺的动脉内皮(图5A)。随后,对在E11.5诱导,E15.5和E18.5时的脾、胸腺和肾上腺进行流式细胞分析,结果显示静脉谱系对胚胎发育中后期脾、胸腺和肾上腺的动脉内皮均有贡献(图5B、C)。进一步探究E11.5诱导时静脉谱系来源动脉内皮的长期命运转归情况。在E9.5对*Nr2f2-CrexER;Gja5-EGFP;Rosa-H2b-mCherry*胚胎进行单次他莫昔芬诱导,在新生儿期(出生后7d)和成体期(成体8周)取脾、胸腺进行免疫荧光染色,结果显示E11.5标记的静脉谱系来源的细胞均能够贡献新生儿期和成体期脾和胸腺内的动脉内皮(图6)。表明静脉-动脉转化发生的时间窗口并非局限于血管发育早期E9.5,在发育中期E11.5仍然会广泛发生,且对器官动脉内皮的贡献同样能持续到成体期。

3 讨论

准确界定VECs及其异质性亚群的分子身份,是理解其命运决定与谱系特化的基础。长期以来,血小板内皮细胞黏附分子-1(PECAM1)、血管内皮钙黏蛋白(CDH5)、激酶插入域受体(KDR)、内皮黏蛋白(EMCN)等经典标志物为识别内皮细胞提供了分子基础^[21];而对肝配蛋白B2(*Efnb2*)、 δ 样配体4(*Dll4*)、神经源性基因座Notch同源蛋白1(*Notch1*)、缝隙连接蛋白 $\alpha 4$ (*Gja4*)、*Gja5*等动脉特征基因,以及*Nr2f2*、神经纤毛蛋白-2(*Nrp2*)、阿片样肽受体(*Aplnr*)等静脉特征基因进行鉴定,可在更高的分辨率下解析动脉与静脉内皮身份^[16,22-24]。单细胞转录组测序等新技术的应用,极大地拓展了对内皮异质性的认知。近年来,一系列新型内皮细胞标志物[如紧密连接蛋白5(CLDN5)、表皮生长因子样结构域7(EGFL7)]和动脉特异性分子[如SRY相关HMG盒基因17(SOX17)、C-X-C趋化因子受体4(CXCR4)、胃动蛋白3(GKN3)]不断被发现^[25-28],这些分子共同构成了更为精细且动态的动脉内皮分子图谱。以上标志物的发现,尤其是结合可用于体内遗传谱系示踪的模型小鼠,为深入揭示内皮细胞命运可塑性及其调控机制提供了关键的技术支撑。

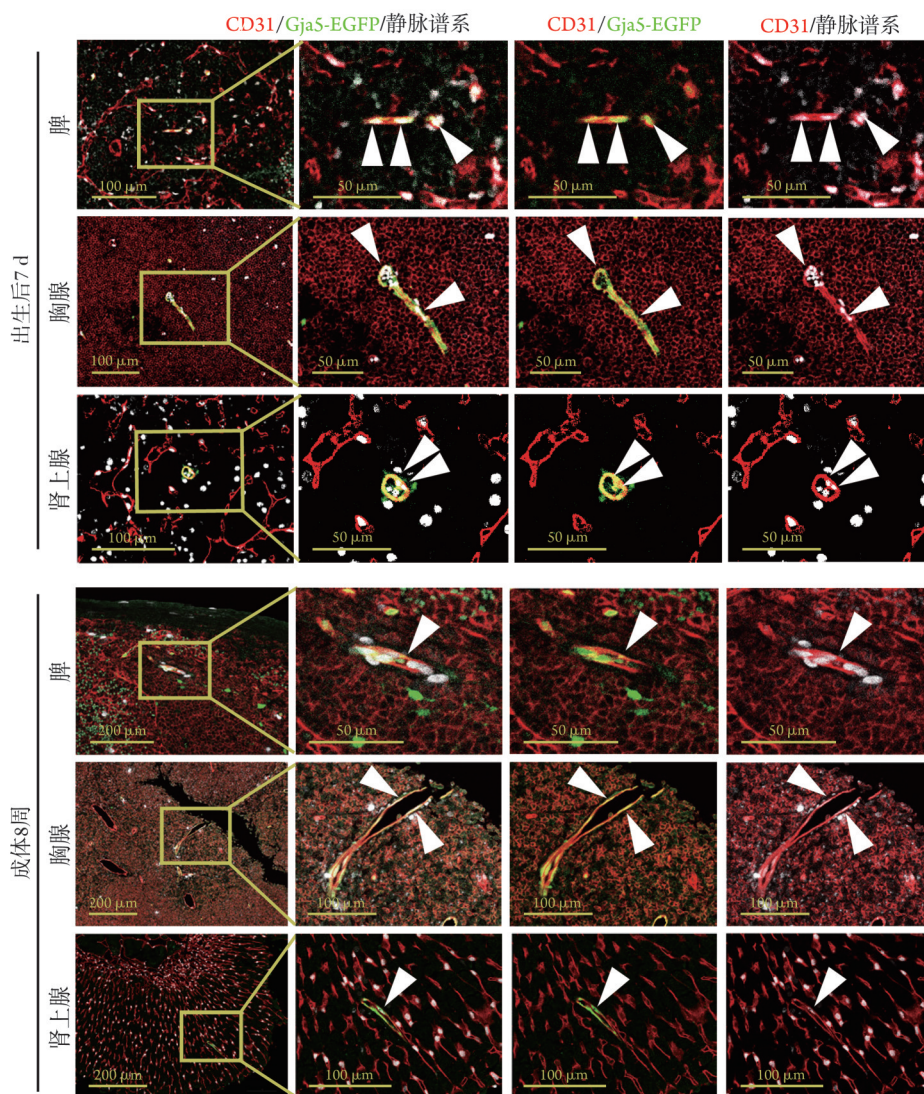
利用基于经典静脉特征基因*Nr2f2*构建的静脉谱



EGFP. 增强型绿色荧光蛋白; A. *Nr2f2-CrexER; Gja5-EGFP; Rosa-H2b-mCherry* 胚胎 E9.5 诱导后, E15.5 取脾、胸腺和肾上腺进行免疫荧光染色[右侧图像为黄框区域的高倍放大, 在 *Gja5-EGFP*⁺ 动脉内皮中观察到静脉谱系标记的红色荧光蛋白(RFP)⁺ 内皮细胞(白色箭头示)]; B. *Nr2f2-CrexER; Gja5-EGFP; Rosa-H2b-mCherry* 胚胎 E9.5 诱导后, E15.5、E18.5 取脾、胸腺和肾上腺进行流式细胞分析(黑框代表 *CD41⁺CD43⁺CD45⁻* 非造血群体中的 *CD31⁺CD144⁺* 双阳内皮群体, 绿框代表 *Gja5-EGFP⁺* 动脉内皮群体, 红框代表动脉内皮中起源于静脉的 RFP⁺ 内皮细胞); C. 直方图示 E9.5 诱导后, 静脉谱系对 E15.5 和 E18.5 时各器官动脉内皮的标记情况[E9.5 诱导后, E15.5 检测的细胞总量为脾($n=21.24 \times 10^5$ 、 3.90×10^4), 胸腺($n=31.57 \times 10^5$ 、 1.66×10^5 、 2.09×10^5), 肾上腺($n=31.09 \times 10^5$ 、 8.17×10^5 、 1.79×10^5); E9.5 诱导, E18.5 检测的细胞总量为脾($n=31.67 \times 10^5$ 、 1.79×10^5 、 3.14×10^5), 胸腺($n=33.17 \times 10^5$ 、 4.26×10^5 、 4.21×10^5), 肾上腺($n=32.46 \times 10^4$ 、 2.37×10^4 、 3.14×10^4)]

图2 遗传谱系示踪揭示小鼠胚胎期静脉内皮的命运转归

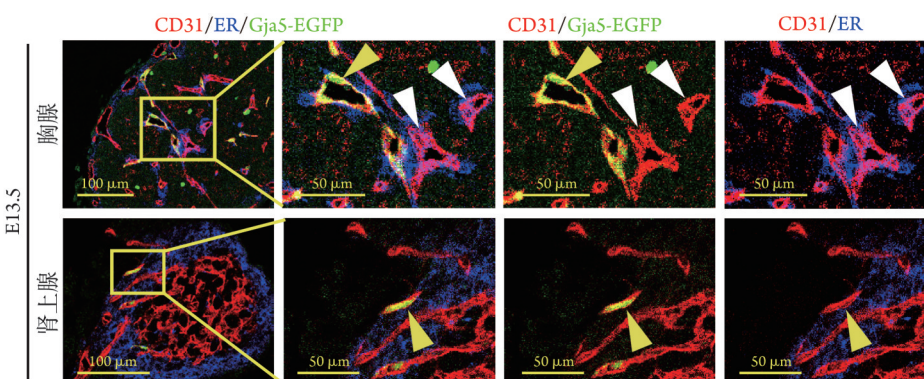
Fig.2 Fate conversion of murine embryonic venous endothelial cells revealed by genetic lineage tracing



EGFP. 增强型绿色荧光蛋白; *Nr2f2-CrexER;Gja5-EGFP;Rosa-H2b-mCherry* 胚胎 E9.5 诱导后, 新生儿期(出生后 7 d)和成体期(成体 8 周)不同器官的代表性免疫荧光染色[右侧图像为黄框区域的高倍放大, 在 Gja5-EGFP⁺动脉内皮中观察到静脉谱系标记的 RFP⁺内皮细胞(白色箭头示)]

图 3 E9.5 诱导后小鼠新生儿期(出生后 7 d)和成体期(成体 8 周)不同器官的免疫荧光染色

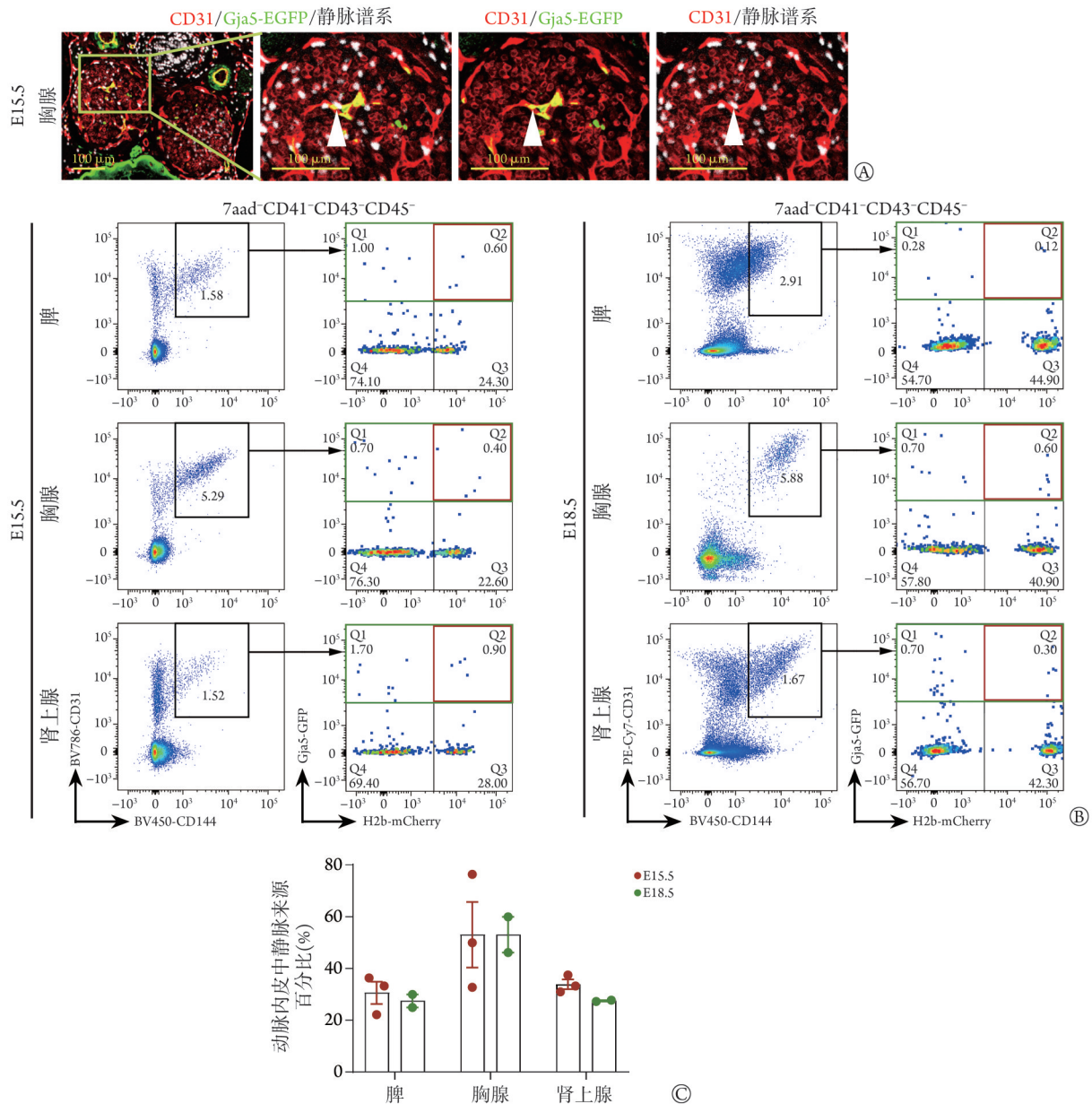
Fig.3 Immunofluorescence staining of different organs during the neonatal period (postnatal day 7) and adult period (8-week-old) after induced at E9.5



ER. 雌激素受体; EGFP. 增强型绿色荧光蛋白; *Nr2f2-CrexER;Gja5-EGFP* 胚胎 E13.5 胸腺、肾上腺代表性免疫荧光染色图(右侧图像为黄框区域的高倍放大, 黄色箭头示 Gja5⁺ER⁺的动脉血管, 白色箭头示 Gja5⁺ER⁺的静脉血管)

图 4 小鼠 *Nr2f2*⁺ 内皮细胞的解剖学定位

Fig.4 Anatomical localization of *Nr2f2*⁺ endothelial cells of mice



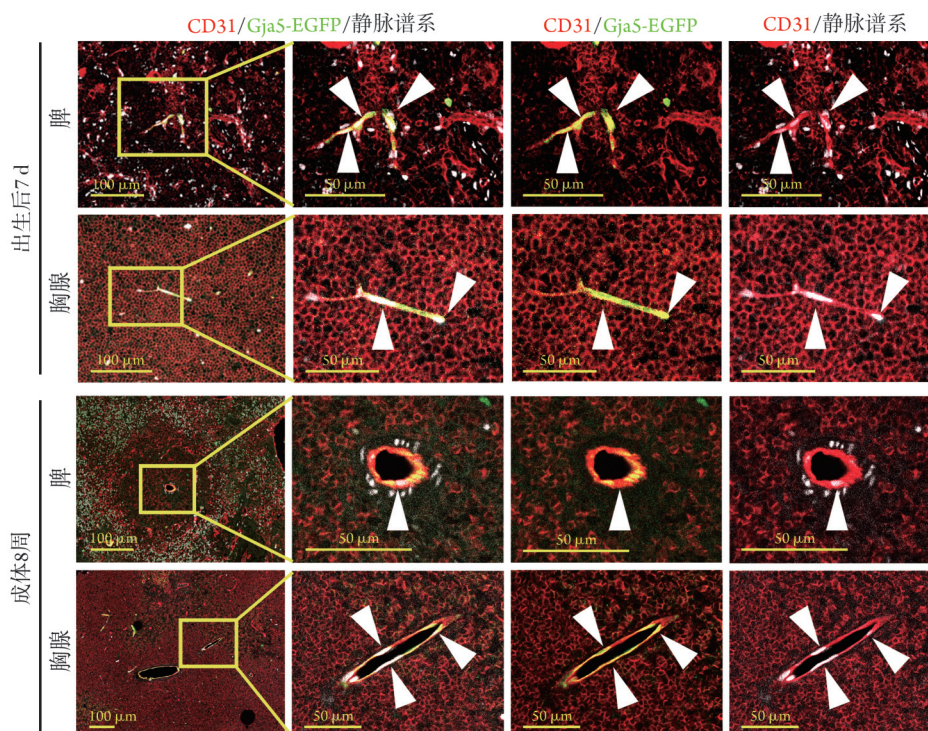
EGFP. 增强型绿色荧光蛋白; A. *Nr2f2-CrexER;Gja5-EGFP;Rosa-H2b-mCherry* 胚胎 E11.5 诱导后, E11.5 取胸腺进行免疫荧光染色[右侧图像为黄框区域的高倍放大, 在 *Gja5-EGFP*⁺ 动脉内皮中观察到静脉谱系标记的红色荧光蛋白(RFP)⁺ 内皮细胞(白色箭头)]; B. *Nr2f2-CrexER;Gja5-EGFP;Rosa-H2b-mCherry* 胚胎 E11.5 诱导后, E11.5、E18.5 取脾、胸腺和肾上腺进行流式细胞分析(黑框代表 CD41⁺CD43⁻CD45⁻ 非造血群体中 CD31⁺、CD144 双阳内皮群体, 绿框代表 *Gja5-EGFP*⁺ 动脉内皮群体, 红框代表动脉内皮中起源于静脉的 RFP⁺ 内皮细胞); C. 直方图显示 E11.5 诱导后, 静脉谱系对 E11.5 和 E18.5 时各器官动脉内皮的标记情况[E11.5 诱导, E11.5 检测的细胞总量为脾($n=34.82 \times 10^4$ 、 3.00×10^4 、 3.15×10^4), 胸腺($n=31.78 \times 10^5$ 、 1.66×10^5 、 1.19×10^5), 肾上腺($n=38.06 \times 10^4$ 、 3.72×10^4 、 3.54×10^4); E11.5 诱导, E18.5 检测的细胞总量为脾($n=24.15 \times 10^5$ 、 3.14×10^5), 胸腺($n=26.85 \times 10^5$ 、 8.27×10^5), 肾上腺($n=21.49 \times 10^5$ 、 1.46×10^5)]

图 5 小鼠胚胎期静脉-动脉转化的时间窗口探究

Fig.5 Defining the time window for venous-to-arterial conversion during embryonic development in mice

系示踪小鼠模型(*Nr2f2-CrexER*)和动脉报告小鼠模型(*Unc5b-tdTomato/Gja5-EGFP*), 研究者实现了对静脉 VECs 的命运追踪, 揭示了胚胎血管发育早期存在广泛的静脉-动脉命运转化事件^[16]。但该研究未探讨胚胎期静脉-动脉转化发生的时间窗口, 静脉源性动脉内皮在器官形成后血管网络中的长期命运转归等问题。因此, 本研究将诱导型 *Nr2f2-CrexER;Rosa-H2b-*

mcherry 谱系示踪小鼠与 *Gja5-EGFP* 动脉荧光报告小鼠交配, 在不同发育时间点诱导, 追踪器官建成初期、新生儿期及成体期静脉内皮的命运转归。结果发现, 静脉-动脉转化发生的时间窗口可持续到胚胎发育中期 E11.5, 并且胚胎期静脉谱系能持续贡献脾、胸腺、肾上腺的动脉内皮直至成体。但脾、胸腺及肾上腺动脉内皮细胞中静脉来源的比例存在差



EGFP. 增强型绿色荧光蛋白; *Nr2f2-CrexER;Gja5-EGFP;Rosa-H2b-mCherry* 胚胎 E11.5 诱导后, 新生儿期(出生后 7 d)和成体期(成体 8 周)不同器官的代表性免疫荧光染色[右侧图像为黄框区域的高倍放大, 在 *Gja5-EGFP*⁺ 动脉内皮中观察到静脉谱系标记的 RFP⁺ 内皮细胞(白色箭头示)]

图 6 E11.5 诱导后小鼠新生儿期(出生后 7 d)和成体期(成体 8 周)不同器官的免疫荧光染色

Fig. 6 Immunofluorescence staining of different organs of mice during the neonatal period (postnatal day 7) and adult period (8-week-old) after induced at E11.5

异, 这可能源于各器官独特的生理功能与微环境对其血管系统构成的特定需求。脾的滤过与免疫功能、胸腺的 T 细胞发育与屏障功能及肾上腺的内分泌快速应答特性^[29], 可能共同决定了其动脉 VECs 在发育与稳态维持中表现出不同的来源与可塑性特征。同一器官中, 不同诱导时间动脉内皮中静脉来源百分比变化反映了静脉-动脉转化事件发生的频率。如肾上腺在早期诱导(E9.5)时观察到较高的静脉-动脉转化比例, 提示该过程在器官发育初期被广泛激活, 而后期诱导(E11.5)比例的下降可能提示该转化事件频率减缓或趋于稳定, 也可能伴随其他来源的动脉内皮细胞的贡献增加。不同取材时间动脉内皮中静脉来源百分比变化则反映了静脉来源的动脉内皮在器官内血管网络中存在的持续性。综上, 这些发现不仅证实了静脉-动脉转化在胚胎发育中后期持续存在, 还提示该过程存在器官特异性与时间动态性。

本研究从时空两个维度对胚胎期静脉-动脉转化事件进行了更为深入的研究, 丰富了目前对于静脉-动脉转化事件的认识, 但本研究仍存在一定局限性和可进一步探索的问题。本研究利用 *Gja5-EGFP* 小鼠识别动脉内皮, 但 *Gja5* 随个体发育逐渐成为成熟动脉的标志, 单一以 *Gja5*⁺ 作为动脉内皮的判定标准可

能会系统性低估静脉谱系对 *Gja5* 小动脉群体的贡献。后续研究可考虑引入 *Dll4-tdTomato* 等泛动脉荧光报告小鼠^[16]或结合空间转录组学技术优化对器官内动脉内皮的认定, 从而提高对静脉-动脉转化事件的解析精度。此外, 本研究的检测范围仅局限于生理稳态情景, 在应激或病理情况下静脉谱系向动脉内皮转化的可塑性是否仍然存在以及可能发生的变化仍不明确。后续可利用本研究中的小鼠模型进行疾病造模或构建血管损伤模型, 通过流式细胞分析、免疫荧光染色及单细胞转录组测序等多种研究手段, 分析病理情况下静脉源性动脉内皮的命运转归及其分子特征的动态演变, 寻找有助于动脉血管的修复重建的研究靶点, 为探索病理情况下动脉再生机制提供新思路。

综上所述, 本研究利用静脉谱系示踪和动脉报告复合小鼠模型 *Nr2f2-CrexER;Gja5-EGFP;Rosa-H2b-mcherry*, 探究脾、胸腺、肾上腺在不同发育时间窗内静脉内皮的命运转归, 发现 *Nr2f2* 在胚胎发育中后期仍表现为静脉内皮特征, 静脉-动脉转化的时间窗口可持续到胚胎发育中期 E11.5, 并且胚胎期静脉谱系能持续贡献脾、胸腺、肾上腺的动脉内皮直至成体。

【参考文献】

- [1] Hirashima M, Suda T. Differentiation of arterial and venous endothelial cells and vascular morphogenesis[J]. *Endothelium*, 2006, 13(2): 137-145.
- [2] Rafii S, Butler JM, Ding BS. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells[J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 316-325.
- [3] Red-Horse K, Siekmann AF. Veins and arteries build hierarchical branching patterns differently: bottom-up *versus* top-down[J]. *Bioessays*, 2019, 41(3): e1800198.
- [4] Su T, Stanley G, Sinha R, *et al.* Single-cell analysis of early progenitor cells that build coronary arteries[J]. *Nature*, 2018, 559(7714): 356-362.
- [5] Simons M, Eichmann A. Molecular controls of arterial morphogenesis[J]. *Circ Res*, 2015, 116(10): 1712-1724.
- [6] Potente M, Mäkinen T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(8): 477-494.
- [7] Fang J S, Coon B G, Gillis N, *et al.* Shear-induced Notch-Cx37-p27 axis arrests endothelial cell cycle to enable arterial specification[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2149.
- [8] Luo W, Garcia-Gonzalez I, Fernández-Chacón M, *et al.* Arterialization requires the timely suppression of cell growth[J]. *Nature*, 2021, 589(7842): 437-441.
- [9] Hasan S S, Tsaryk R, Lange M, *et al.* Endothelial Notch signalling limits angiogenesis *via* control of artery formation[J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(8): 928-940.
- [10] Kaufman R, Weiss O, Sebbagh M, *et al.* Development and origins of zebrafish ocular vasculature[J]. *BMC Dev Biol*, 2015, 15:18.
- [11] Wild R, Klems A, Takamiya M, *et al.* Neuronal sFlt1 and Vegfaa determine venous sprouting and spinal cord vascularization[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 13991.
- [12] Xu C, Hasan S S, Schmidt I, *et al.* Arteries are formed by vein-derived endothelial tip cells[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5758.
- [13] Kametani Y, Chi NC, Stainier DY, *et al.* Notch signaling regulates venous arterialization during zebrafish fin regeneration[J]. *Genes Cells*, 2015, 20(5): 427-438.
- [14] Fujita M, Cha YR, Pham VN, *et al.* Assembly and patterning of the vascular network of the vertebrate hindbrain[J]. *Development*, 2011, 138(9): 1705-1715.
- [15] Red-Horse K, Ueno H, Weissman IL, *et al.* Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 549-553.
- [16] Hou S, Li Z, Dong J, *et al.* Heterogeneity in endothelial cells and widespread venous arterialization during early vascular development in mammals[J]. *Cell Res*, 2022, 32(4): 333-348.
- [17] 金学军, 卢楚沅. 白屈菜碱对小鼠肺癌细胞皮下移植瘤生长和血管生成的抑制作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(3): 612-619.
- [18] Yoshida H, Shimizu T, Yoshioka M, *et al.* The role of the spleen in portal hypertension[J]. *J Nippon Med Sch*, 2023, 90(1): 20-25.
- [19] Seydhasantehrani N, Burns CS, Verrinder R, *et al.* Intravital two-photon microscopy of the native mouse thymus[J]. *PLoS One*, 2024, 19(8): e0307962.
- [20] Chen ZW, Tsai CH, Pan CT, *et al.* Endothelial dysfunction in primary aldosteronism[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5214.
- [21] 丁程佳, 陀劲, 曹晶晶, 等. 血必净注射液抑制肺血管内皮糖萼降解改善重症中暑大鼠急性肺损伤[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(12): 1387-1394.
- [22] Trimm E, Red-Horse K. Vascular endothelial cell development and diversity[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(3): 197-210.
- [23] Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(6): 464-478.
- [24] Aoyagi Y, Schwartz AW, Li Z, *et al.* Changes in vascular identity during vascular remodeling[J]. *JVS Vasc Sci*, 2025, 6: 100282.
- [25] Hashimoto Y, Greene C, Munnich A, *et al.* The CLDN5 gene at the blood-brain barrier in health and disease[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2023, 20(1): 22.
- [26] Aoyagi Y, Schwartz AW, Li Z, *et al.* Sox17 mediates venous adaptive remodeling after arteriovenous fistula creation[J]. *JVS Vasc Sci*, 2025, 6: 100392.
- [27] Cimen I, Natarelli L, Abedi Kichi Z, *et al.* Targeting a cell-specific microRNA repressor of CXCR4 ameliorates atherosclerosis in mice [J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15(720): eadf3357.
- [28] Kalucka J, de Rooij L, Goveia J, *et al.* Single-cell transcriptome atlas of murine endothelial cells[J]. *Cell*, 2020, 180(4): 764-779.e720.
- [29] 陈劲松, 王丹. 肿瘤新抗原在肿瘤免疫治疗中的应用研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(10): 1213-1220.

(责任编辑: 纪方方)