

共培养下脂肪源性干细胞对内皮祖细胞活性的影响及其相关机制

曹乐¹, 丁振飞², 孙凯¹, 范海涛¹, 杨海涛¹

摘要 目的 探讨脂肪源性干细胞(ADSC)与内皮祖细胞(EPC)共培养对EPC活性的影响及ADSC对EPC增殖、迁移、分化及成血管活性产生影响的机制。方法 体外分离、培养、扩增并鉴定大鼠来源的ADSC与EPC。实验分为EPC组、EPC+ADSC共培养组、EPC+ADSC+PI3K-inhibitor组,三组细胞使用Transwell共培养处理48 h后,分别通过CCK-8实验、划痕实验和血管形成实验评估ADSC与EPC共培养和PI3K/AKT通路对EPC活性的影响;通过Western blot检测EPC中血管内皮生长因子A(VEGFA)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、血管内皮细胞钙粘连蛋白(VE-cadherin)、CD133、磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶(p-PI3K)和磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)的表达水平来探究ADSC与EPC共培养和PI3K/AKT通路对EPC向成熟内皮细胞分化能力的影响。结果 CCK-8检测结果显示,EPC+ADSC共培养组中EPC在不同时间点吸光度值均高于EPC组和EPC+ADSC+PI3K-inhibitor组,差异有统计学意义($P < 0.01$);划痕实验结果显示,EPC+ADSC共培养组24 h后划痕相对距离小于EPC组和EPC+ADSC+PI3K-inhibitor组,差异有统计学意义($P < 0.01$);血管形成实验结果显示,EPC+ADSC共培养组24 h形成管腔样结构平均数量高于EPC组和EPC+ADSC+PI3K-inhibitor组,差异有统计学意义($P < 0.01$);Western blot检测显示,EPC+ADSC共培养组中EPC的VEGFA、eNOS、VE-cadherin、p-PI3K和p-AKT表达水平高于EPC组和EPC+ADSC+PI3K-inhibitor组,而CD133表达水平低于EPC组和EPC+ADSC+PI3K-inhibitor组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 ADSC与EPC共培养能够提高EPC增殖、迁移、分化和成血管等活性,其机制可能是通过调控PI3K/AKT通路实现的。

关键词 脂肪源性干细胞;内皮祖细胞;PI3K/AKT

中图分类号 R 681.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0547-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.005

2023-02-15 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目(编号:KJ2019A0261);安徽医科大学校科研基金(编号:2020xkj059、2020xkj225)

作者单位:¹安徽医科大学附属阜阳医院骨科,阜阳 236000

²安徽医科大学研究生学院,合肥 230032

作者简介:曹乐,男,硕士,主治医师;

杨海涛,男,副主任医师,责任作者,E-mail: 59215199@

qq.com

在临床中治疗大体积骨缺损十分棘手。自体骨移植受限于缺损的大小和供体部位出现的各种并发症,所以脱钙骨基质移植在大体积骨缺损的治疗中被广泛使用。然而,移植物缺乏血管化影响了其骨形成能力^[1],容易导致治疗失败。

组织工程技术在治疗大体积骨缺损中提供了新的策略。为了解决移植物血管化能力的问题,几十年来,不同来源和功能的种子细胞被投入研究^[2-3]。脂肪源性干细胞(adipose-derived stem cells, ADSC)易于分离和培养,可作为骨形成细胞来源^[4]。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)不但能够促进血管新生,而且也具有促成骨作用^[5]。ADSC和EPC的联合应用以增加血管化和骨形成似乎是一种有前途的方法。而磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine kinase proteins, AKT)信号通路作为在细胞增殖、分化和凋亡中的经典通路,也被证实有重要作用。但它在ADSC促进EPC增殖、迁移和成血管能力中的作用也值得我们深入探讨。该研究旨在通过ADSC和EPC共培养验证ADSC是否能通过旁分泌提高EPC的活性,并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 I型胶原酶、LG-DMEM培养基、PI3K特异性抑制剂LY29400(上海碧云天生物技术有限公司);大鼠ADSC成骨诱导培养基、大鼠ADSC成脂诱导培养基、大鼠ADSC成软骨诱导培养基(美国Sigma公司);EGM-2完全培养基(瑞士Lonza公司);鼠纤维连接蛋白(美国Gene Operation公司);大鼠淋巴细胞分离液试剂盒(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒、蛋白裂解液(合肥白鲨生物科技有限公司);蛋白酶抑制剂(美国Thermo公司);电化学发光发光液(美国Millipore公司);一抗

血管内皮细胞钙粘连蛋白(vascular endothelial-cadherin, VE-cadherin)、CD133、CD44、血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)及二抗山羊抗兔 IgG/FITC、山羊抗兔 IgG/TRITC(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.2 实验动物 SPF级雌性SD大鼠均购自安徽省实验动物中心。

1.3 大鼠 EPC 的分离与培养 参照文献^[5]中的方法,从80~120 g的大鼠胫骨和股骨中收集髓腔内容物,使用大鼠骨髓淋巴细胞分离试剂盒按照试剂盒说明使用差速离心法收集单核细胞,使用EBM-2培养基重新悬浮细胞,将细胞接种于预先包被纤维粘连蛋白的培养板中,48 h后更换培养基以去除未贴壁细胞,以后每48 h更换培养基1次,最初分离后7~10 d出现内皮祖细胞集落,细胞生长至80%融合后连续传代至纤维连接蛋白涂层表面。

1.4 大鼠 ADSC 的分离与培养 参照文献^[5]中的方法,由200~220 g大鼠腹股沟皮下处收集脂肪,将脂肪组织与2倍体积的0.1% I型胶原酶A混合后严格密封,然后在37℃水浴锅中缓慢摇晃消化60 min,1 200 r/min离心20 min,去除上层油脂、未消化的脂肪组织及纤维结缔组织等,200 μm细胞过滤器过滤后再次离心以去除油脂。用PBS冲洗2次后,剩余细胞重新悬浮在含有10%胎牛血清的LG-DMEM中,接种于6孔板中,置于恒温培养箱中培养,每隔3 d更换1次培养基,细胞生长至80%融合后按1:3传代。

1.5 免疫荧光检测 ADSC 和 EPC 表面标志物 调整第3代ADSC和第3代EPC浓度为 3×10^5 /ml,按每孔0.5 ml接种于预先铺好细胞爬片的24孔板中。待细胞贴壁后移除培养基,4%多聚甲醛固定,山羊血清封闭30 min。分别将CD44及CD133使用PBS按照1:200稀释,将ADSC与CD44一抗共同孵育过夜后滴加稀释好的荧光二抗,湿盒中20~37℃孵育1 h,滴加DAPI后避光孵育5 min后,对上述细胞爬片进行核染,PBST洗去多余的DAPI后用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,荧光显微镜下观察采集图像。

1.6 ADSC 的功能鉴定 第3代ADSC生长80%~90%融合后,分别按照操作指南使用成软骨诱导分化培养基、成骨诱导分化培养基、成脂诱导分化培养基培养ADSC,并分别使用甲苯胺蓝、茜素红、油红O染色后镜下观察ADSC是否能够分化为软骨细

胞、成骨细胞和脂肪细胞。

1.7 EPC 的功能鉴定 第3代EPC细胞悬液接种于铺被了基底胶的96孔板,培养箱中孵育24 h。倒置显微镜观察,以能形成管腔样结构为阳性结果。

取融合度达80%的第3代EPC,加入4 μg/ml的Dil标记乙酰化低密度脂蛋白(dilacetylated low density lipoprotein, Dil-acLDL),培养箱中孵育4 h。PBS洗3次后多聚甲醛固定15 min,加入10 mg/L的FITC标记荆豆凝集素-1(FITC-Ulex europaeus agglutinin-1, FITC-UEA-1),孵育1 h。激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.8 ADSC 与 EPC 共培养 实验共分3组:空白对照组(EPC组),将第3代EPCs细胞单独接种至Transwell下室中;实验组(EPC+ADSC共培养组),在Transwell按照EPC:ADSC为1:2接种;EPC+ADSC+PI3K-inhibitor组,在共培养的基础上加入磷脂酰肌醇3-激酶抑制剂。共培养48 h后取出Transwell上室、下室中的EPC细胞用于后续其他检测。

1.9 CCK-8 检测 共培养48 h后调整细胞密度接种于96孔板,在第0、6、12、24、36、48 h分别对细胞增殖情况进行检测,每个检测时间点每孔加入15 μl的CCK-8试剂,37℃、5% CO₂培养箱内培养避光孵育2 h。酶标仪450 nm波长测出同一时间点吸光度(absorbance, A)值,用测得的A值进行细胞增殖影响的分析。

1.10 细胞划痕实验 共培养48 h后,调整EPC细胞密度接种于6孔板,用200 μl枪头垂直于孔板制造细胞划痕,尽量保证各个划痕宽度一致。吸去细胞培养液,用PBS冲洗孔板3次,洗去划痕产生的细胞碎片。分别于0 h和48 h在显微镜下采集每组细胞相同划线部位的图像。应用Image J图像软件对每一组细胞的迁移距离进行定量统计分析。

1.11 血管形成实验 基质胶10 μl加入24孔板中,覆盖整个皿底,37℃、30 min使Matrigel聚合成胶。取上述各组处理48 h的细胞,调整细胞浓度合适后,接种到Matrigel基质胶包被的24孔板中。24 h后于光学显微镜下观察拍照,统计100倍镜下每个视野管腔形成数目并进行分析。

1.12 Western blot 实验 按照分组培养EPC 48 h后,收集EPC细胞沉淀,加入RIPA裂解液提取蛋白并使用BCA法测定蛋白浓度。将蛋白上样至配好的聚丙烯酰胺凝胶胶孔中,在浓缩胶80 V、20 min,分离胶120 V、1 h条件下进行电泳。电泳完成后转膜并分别加入稀释的一抗PI3K抗体(1:200)、AKT

抗体(1:200)、磷酸化蛋白激酶 B(phospho-protein kinase B p-AKT) 抗体(1:200)、磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶 (phospho-phosphatidylinositol 3-kinase , p-PI3K) 抗体(1:200)、VEGFA 抗体(1:200)、eNOS 抗体(1:200)、VE-cadherin 抗体(1:200)和 CD133 抗体(1:200)。加入一抗后 4 ℃ 孵育过夜,洗涤后再加入相应二抗,37 ℃ 孵育 1 h。以 β -actin 为内参,ECL 显色发光并记录灰度值。蛋白相对含量反映目标蛋白条带灰度值与 β -actin 灰度值的比值。

1.13 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件统计进行分析,数据资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,三组间均数比较用单因素方差分析,两两比较行 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPC 的培养和鉴定 分离出来的 EPC 经 72 h 后可见细胞贴壁,细胞传代后形态呈现为“鹅卵石样”。在铺被了基质胶的 24 孔板可形成毛细血管样结构。免疫细胞化学 CD133 抗体荧光检测结果显示,细胞高表达 CD133,同时 EPC 也能够摄取 Dil-acLDL 并结合 FITC-UEA-1(图 1)。细胞形态呈纺锤状,高表达 EPC 表面抗原 CD133,且具有内化乙

酰化 acLDL 和 UEA-1 的能力,结合上述结果可确定培养的细胞为 EPC。

2.2 ADSC 的培养和鉴定 培养的脂肪干细胞呈成纤维细胞样长纺锤形。免疫细胞化学 CD44 抗体荧光检测显示 ADSC 高表达 CD44。ADSC 经成软骨诱导培养后甲苯胺蓝染色呈蓝色,成脂诱导培养后油红 O 染色呈红色,成骨诱导培养后茜素红染色呈红色(图 2)。细胞形态呈长梭形,高表达 ADSC 表面抗原 CD44,且具有多向分化能力,结合上述结果可确定培养的细胞为 ADSC。

2.3 三组细胞中 EPC 增殖、迁移及成血管能力的比较 用 CCK-8 检测各组 EPC 的增殖活性,绘制生长曲线。各组细胞生长曲线形态相似,细胞吸光度值逐渐升高。三组细胞在第 6、12、24、36、48 h 时间点的吸光度值差异有统计学意义($F = 44.853, 128.534, 252.827, 207.560, 336.782, P < 0.01$)。其中第 6、12、24、36、48 h,EPC + ADSC 共培养组吸光度值高于 EPC 组,而 EPC + ADSC + PI3K-inhibitor 组在第 12、24、36、48 h 吸光度值低于 EPC + ADSC 共培养组。结果表明 ADSC + EPC 共培养组中的 EPC 增殖活性强于 EPC 组,但在加入 PI3K-inhibitor 后 EPC 的增殖活性受到抑制。见图 3。

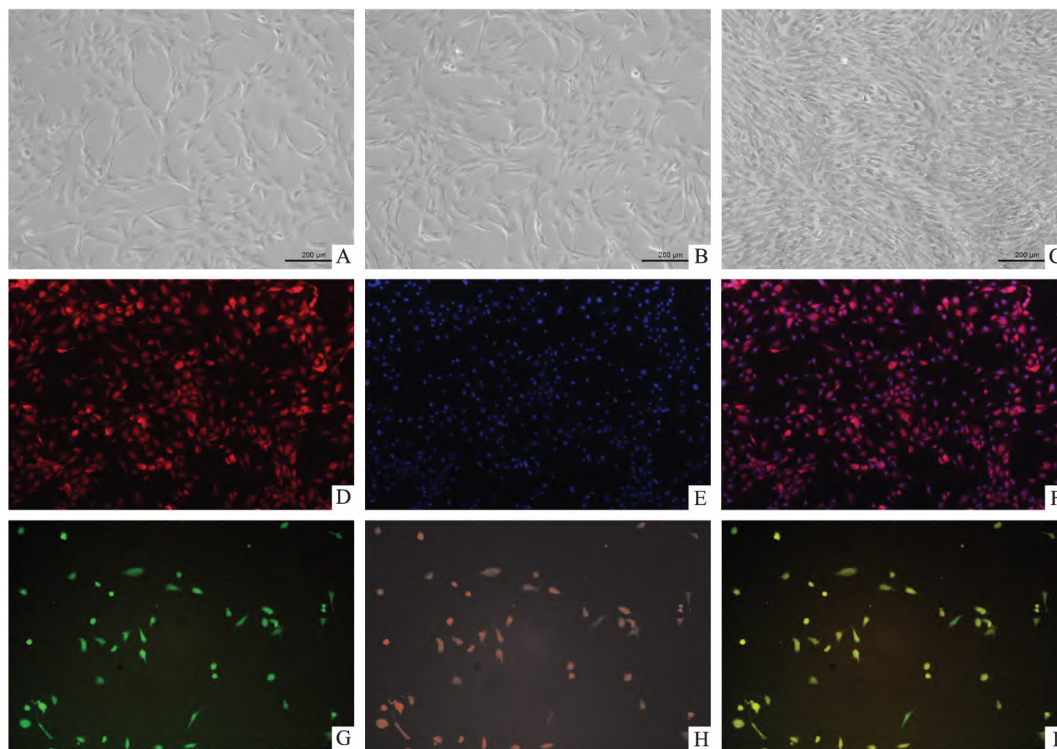


图 1 EPC 的形态学鉴定、表面抗原鉴定和功能鉴定 $\times 100$

A: EPC 原代培养 3 d; B: EPC 原代培养 5 d; C: 第 2 代 EPC; D: CD133 表达阳性; E: DAPI 细胞核染阳性; F: CD133 阳性表达和 DAPI 核染融合图; G: 结合 FITC-UEA-1 能力阳性; H: 摄取 Dil-acLDL 能力阳性; I: FITC 阳性和 Dil 阳性融合图

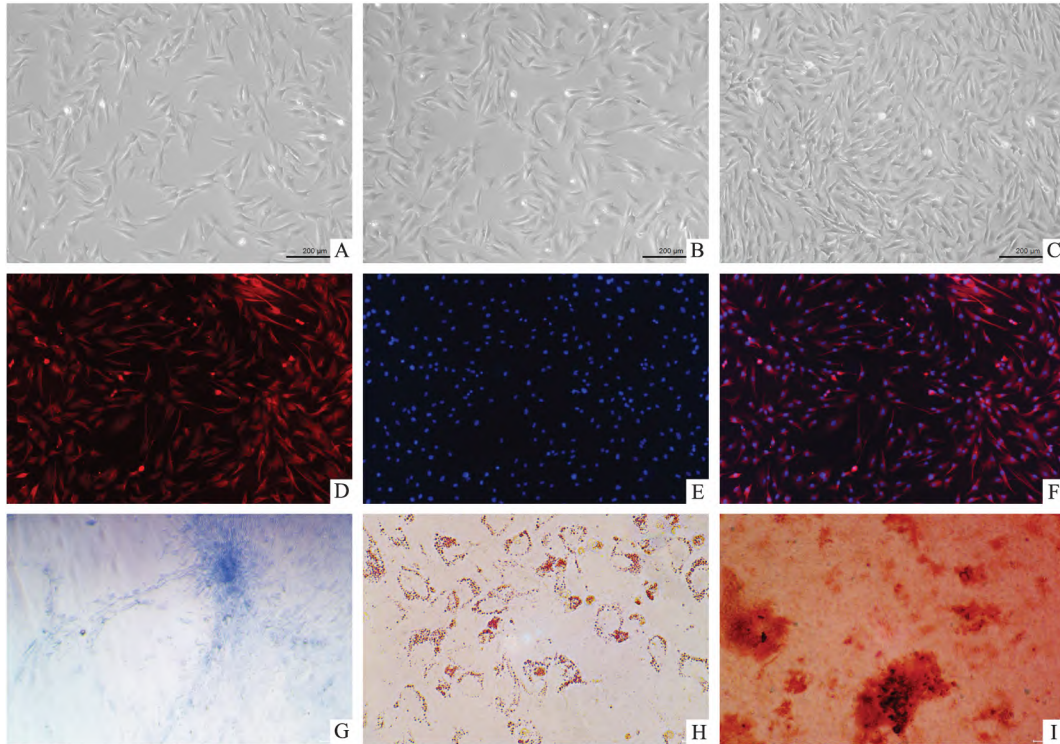


图2 ADSC的形态学鉴定、表面抗原鉴定和功能鉴定 ×100

A: ADSC 原代培养 3 d; B: ADSC 原代培养 5 d; C: 第 2 代 ADSC; D: CD90 表达阳性; E: DAPI 细胞核染阳性; F: CD90 阳性表达和 DAPI 核染融合图; G: 成软骨诱导培养后甲苯胺蓝染色阳性; H: 成脂诱导培养后油红 O 染色阳性; I: 成骨诱导培养后茜素红染色阳性

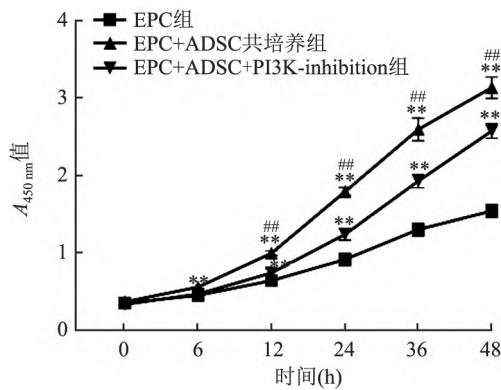


图3 三组 EPC 细胞增殖能力的比较

与 EPC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 ADSC + EPC + PI3K-inhibitor 组比较: ## $P < 0.01$

细胞划痕实验检测结果显示, EPC + ADSC 共培养组的 EPC 细胞在 24 h 后划痕相对距离小于 EPC 组 ($F = 42.478, P < 0.01$); EPC + ADSC + PI3K-inhibitor 组 24 h 后划痕相对距离 (24 h/0 h) 较 EPC + ADSC 共培养组降低 ($F = 42.478, P < 0.01$)。说明 ADSC + EPC 共培养组中的 EPC 迁移能力强于 EPC 组,但在加入 PI3K-inhibitor 后 EPC 的迁移能力受到抑制。见图 4。

将 EPC 在铺被了 Matrigel 的 6 孔板上培养 24 h 后镜下观察,可见每个高倍镜视野下 EPC + ADSC 共培养组管腔样结构数目平均为高于 EPC 组,差异有统计学意义 ($F = 211.021, P < 0.01$);在加入 PI3K 抑制剂后, EPC + ADSC + PI3K-inhibitor 组小管样结构平均数目比 EPC + ADSC 共培养组减少,差异有统计学意义 ($F = 211.021, P < 0.01$)。以上结果说明 ADSC + EPC 共培养组中的 EPC 成血管能力强于 EPC 组,但在加入 PI3K-inhibitor 后 EPC 的成血管能力减弱。见图 5。

2.4 Western blot 检测 VEGFA、eNOS、VE-cadherin、CD133 表达水平的变化 Western blot 检测结果显示,与 EPC 单独培养组 EPC + ADSC + PI3K-inhibitor 组相比, EPC + ADSC 共培养组 VEGFA、eNOS、VE-cadherin 的表达升高 ($F = 68.085, 147.032, 874.771, P < 0.01$), CD133 表达下降 ($F = 20.973, P < 0.01$)。结果表明, EPC + ADSC 共培养组中的 EPC 向成熟内皮细胞分化的程度更高,分泌促血管生成的生长因子更多。见图 6。

2.5 Western blot 检测 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 表达水平的变化 Western blot 检测结果显示,与 EPC 单独培养组相比,共培养 48 h 后, EPC +

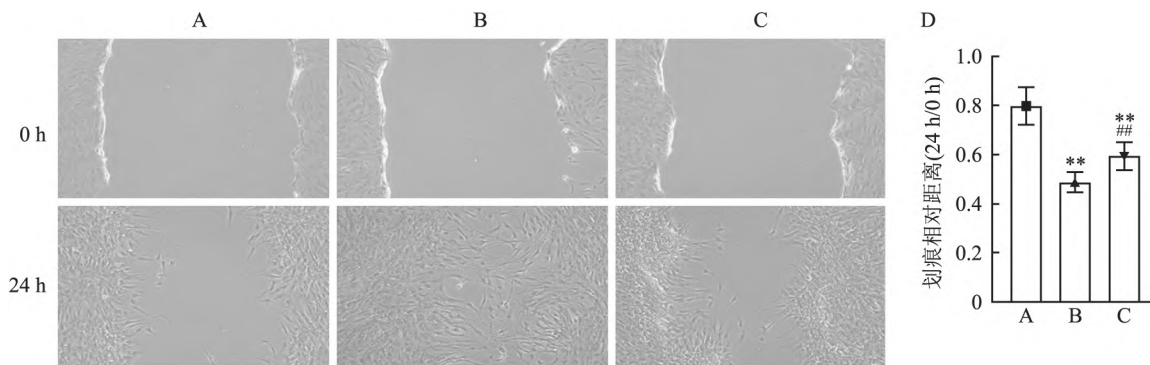


图4 三组 EPC 细胞迁移能力的比较 ×100

A: EPC 组; B: EPC + ADSC 共培养组; C: EPC + ADSC + PI3K-inhibitor 组; D: 划痕相对距离(24 h/0 h) 柱状图; 与 EPC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 EPC + ADSC 共培养组比较: ## $P < 0.01$

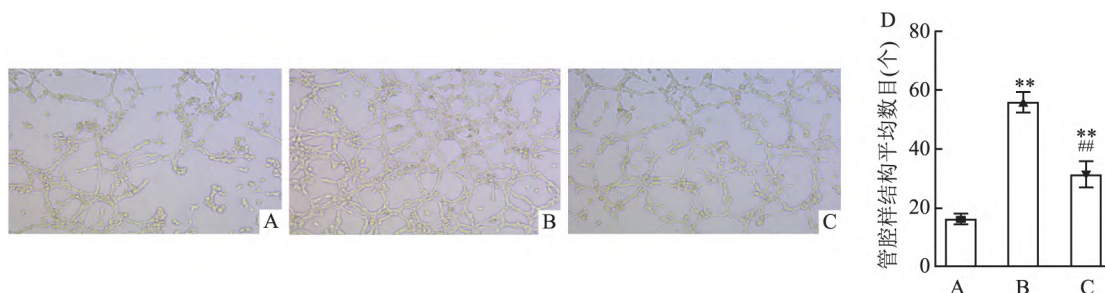


图5 三组 EPC 细胞管腔样结构形成能力的比较 ×100

A: EPC 组; B: EPC + ADSC 共培养组; C: EPC + ADSC + PI3K-inhibitor 组; D: 管腔样结构形成数目统计分析柱状图; 与 EPC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 EPC + ADSC 共培养组比较: ## $P < 0.01$

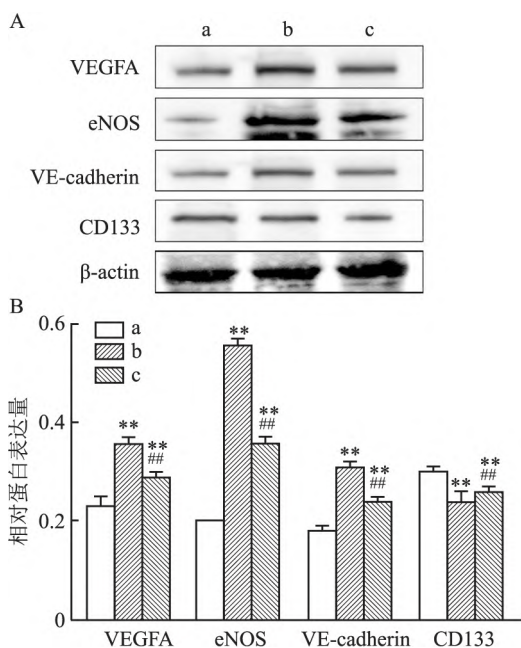


图6 三组 EPC 细胞 VEGFA、eNOS、VE-cadherin 及 CD133 相对表达量的比较

A: 三组 EPC 相关蛋白表达的 Western blot 检测图; B: 三组 EPC 相关蛋白表达水平比较; a: EPC 组; b: EPC + ADSC 共培养组; c: EPC + ADSC + PI3K-inhibitor 组; 与 EPC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 EPC + ADSC 共培养组比较: ## $P < 0.01$

ADSC 组的 p-PI3K 及 p-AKT 表达升高; 加入 PI3K 抑制剂后, 与 EPC + ADSC 组相比, EPC + ADSC 组的 p-PI3K 及 p-AKT 的表达下降, 差异有统计学意义 ($F = 685.002, 1958.849, P < 0.01$)。见图 7。

3 讨论

同种异体骨移植和自体干细胞移植用于治疗大块骨缺损已经被广泛研究, 但是在治疗过程中自体干细胞移植的低存活率仍旧难以解决。移植细胞的死亡与吸收会导致移植后血管形成不良, 这说明了使用组织工程治疗骨缺损的过程中, 血管新生与骨新生具有同样重要的作用。

研究^[6]表明, ADSC 在特定微环境下可以分化为其他类型细胞, 如成骨细胞、血管内皮细胞。本研究也证实了 ADSC 具有多向分化能力。ADSC 不但能够直接分化为成骨细胞, 还能分泌多种促进成骨和成血管的功能性生长因子, 从而广泛应用于骨再生和血管再生^[7], 这一结论在该研究中也得到了证实。而 EPC 作为内皮细胞的前体细胞, 广泛存在于骨髓并可动员到外周血中, 不仅在体外具有成血管能力, 还在体内也起着构建血管的作用。许多研

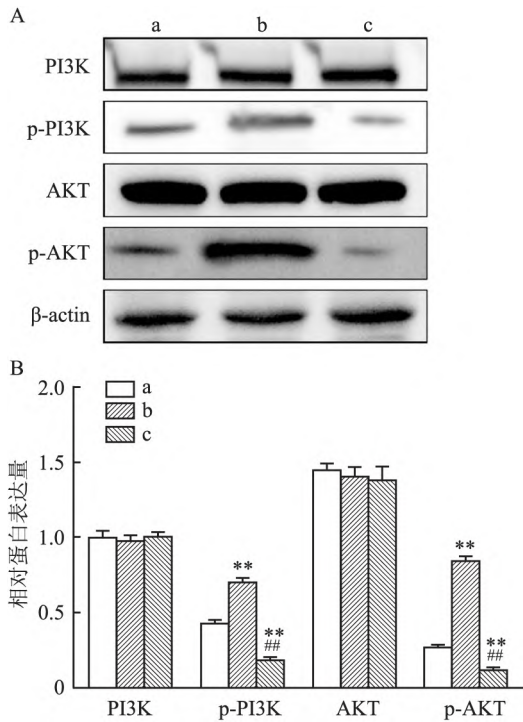


图7 三组 EPC 细胞 p-PI3K 及 p-AKT 相对表达量的比较

A: 三组 EPC 相关蛋白表达的 Western blot 检测图; B: 三组 EPC 相关蛋白表达水平比较; a: EPC 组; b: EPC + ADSC 共培养组; c: EPC + ADSC + PI3K-inhibitor 组; 与 EPC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 EPC + ADSC 共培养组比较: ## $P < 0.01$

究^[8]表明移植的 EPC 可以迁移到缺血或损伤部位, 可以通过直接分化为内皮细胞参与新血管构建, 且被动员的 EPC 还可以分泌多种血管生成因子来促进血管修复和血管新生。这提示将 ADSC 和 EPC 作为组织工程中的成骨和成血管种子细胞具有一定的理论基础。结合以往的研究^[5], 均表明在组织工程中使用 ADSC 和 EPC 作为种子细胞, 既可以提供成骨的种子细胞, 也可以促进移植部位血管生成, 从而解决组织工程中移植细胞存活率低的难题。

ADSC 能促进各类移植组织的血管再生已经被多项研究证实, 其可能的机制有两种, 多重分化和旁分泌信号转导。Zhao et al^[9]证实了 ADSC 促进血管生成的作用与旁分泌信号联系更紧密, 而不是直接分化为血管内皮细胞。本研究通过 EPC + ADSC 的共培养实验表明 ADSC 可以旁分泌促进 EPC 的成血管能力, 这一结果与 Gan et al^[10]的研究类似。通过对共培养后 EPC 表达的相关蛋白进一步定量分析结果显示, 与单独培养 EPC 相比, EPC 与 ADSC 共培养后 eNOS、VE-cadherin 的表达升高, CD133 表达下降, 证实了 ADSC 能够促进 EPC 向成熟内皮细胞分化, 而且共培养后还能促进内皮祖细胞大量分

泌促血管生成的细胞因子如 VEGFA, 两种细胞之间存在成血管能力的协同作用, 这一结论与 Wang et al^[11]的研究结果一致。

PI3K 是由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 构成二聚体, 当它与生长因子受体(如 EGFR) 结合后, 可改变 AKT 的蛋白结构并使其活化, 并以磷酸化作用激活或抑制下游一系列底物如凋亡相关蛋白 Bad、Caspase-9 活性, 从而调节细胞的增殖、分化、凋亡及迁移等表型^[12]。PI3K/AKT 信号转导通路对于 EPC 的动员、迁移、归巢及抗凋亡促分化的影响已经多项研究证实^[13]。Wang et al^[14]也在研究中叙述了能够起始 PI3K 的激活过程的多种生长因子和信号转导复合物, 包括成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子、人生长因子、胰岛素等。研究^[15]表明 ADSC 能够旁分泌血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子、成纤维细胞生长因子等, 从而具有改善损伤部位微环境及促进损伤部位血管新生的作用。上述这些研究证实 VEGF/PI3K/AKT 信号通路在 ADSC 通过旁分泌促进 EPC 的活性中可能占有重要地位。该研究在共培养体系中加入 PI3K 活化的抑制剂, 结果显示信号转导通路中 AKT 的磷酸化明显受抑制, 且 EPC 的增殖、迁移、分化和成血管能力均下降, 以上研究表明 ADSC 旁分泌的细胞因子能够通过 PI3K/AKT 信号通路发挥促进 EPC 活性的作用。

参考文献

- [1] Ashammakhi N, Hasan A, Kaarela O, et al. Advancing frontiers in bone bioprinting [J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(7): e1801048.
- [2] Shi R, Huang Y, Ma C, et al. Current advances for bone regeneration based on tissue engineering strategies [J]. *Front Med* 2019, 13(2): 160-88.
- [3] Simunovic F, Winninger O, Strassburg S, et al. Increased differentiation and production of extracellular matrix components of primary human osteoblasts after cocultivation with endothelial cells: a quantitative proteomics approach [J]. *J Cell Biochem* 2019, 120(1): 396-404.
- [4] Yamada Y, Okano T, Orita K, et al. 3D-cultured small size adipose-derived stem cell spheroids promote bone regeneration in the critical-sized bone defect rat model [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2022, 603: 57-62.
- [5] 曹乐, 方晓, 丁振飞等. 内皮祖细胞条件培养基对脂肪干细胞成骨分化的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(5): 8.
- [6] Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, et al. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010, 63(11): 1886-92.

- [7] Tajima S, Tobita M, Mizuno H. Current status of bone regeneration using adipose-derived stem cells [J]. *Histol Histopathol*, 2018, 33(7): 619–27.
- [8] Jia Y, Zhang C, Zheng X, et al. Co-cultivation of progenitor cells enhanced osteogenic gene expression and angiogenesis potential *in vitro* [J]. *J Int Med Res* 2021, 49(4): 3000605211004024.
- [9] Zhao L, Johnson T, Liu D. Therapeutic angiogenesis of adipose-derived stem cells for ischemic diseases [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 125.
- [10] Gan F, Liu L, Zhou Q, et al. Effects of adipose-derived stromal cells and endothelial progenitor cells on adipose transplant survival and angiogenesis [J]. *PLoS One* 2022, 17(1): e0261498.
- [11] Wang Z, Feng C, Liu H, et al. Hypoxic pretreatment of adipose-derived stem cells accelerates diabetic wound healing *via* circ-cap14 and HIF-1 α /VEGF mediated angiopoiesis [J]. *Int J Stem Cells* 2021, 14(4): 447–54.
- [12] Chen J, Yue C, Xu J, et al. Downregulation of receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 in preeclampsia placenta inhibits human trophoblast cell proliferation, migration, and invasion by PI3K/AKT/mTOR pathway accommodation [J]. *Placenta*, 2019, 82: 17–24.
- [13] Zhao Z, Ma X, Ma J, et al. Naringin enhances endothelial progenitor cell (EPC) proliferation and tube formation capacity through the CXCL12/CXCR4/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 286: 45–51.
- [14] Wang D, Zhao W, Liu J, et al. Effects of HIF-1 α on spermatogenesis of varicocele rats by regulating VEGF/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Reprod Sci* 2021, 28(4): 1161–74.
- [15] Zhou X, Ning K, Ling B, et al. Multiple injections of autologous adipose-derived stem cells accelerate the burn wound healing process and promote blood vessel regeneration in a rat model [J]. *Stem Cells Dev* 2019, 28(21): 1463–72.

The effect of ADSC on the activity of EPC under co-culture and its related mechanism

Cao Le¹, Ding Zhenfei², Sun Kai¹, Fan Haitao¹, Yang Haitao¹

(¹ Dept of Orthopaedic, Fuyang Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Fuyang 236000;

² Anhui Medical University Graduate School, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of co-culture of adipose-derived stem cells (ADSC) and endothelial progenitor cells (EPC) on the activity of EPC and its related mechanism. **Methods** Rat ADSC and EPC were isolated, cultured, expanded and identified *in vitro*. The experiment was divided into three groups: EPC group, EPC + ADSC co-culture group, and EPC + ADSC + PI3K-inhibitor group. After 48 hours of co-culture, the cells of the three groups were treated with Transwell. The effects of ADSC and EPC co-culture and PI3K/AKT pathway on EPC activity were evaluated by CCK-8 assay, scratch assay and angiogenesis assay, respectively. Western blot was used to detect vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS), vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin), CD133, phospho-phosphatidylinositol 3-kinase (phospho-phosphatidylinositol 3-kinase (p-PI3K) and phospho-protein Kinase B (p-AKT) expression levels in EPC to detect the effects of ADSC and EPC co-culture and PI3K/AKT pathway on the differentiation ability of EPC into mature endothelial cells. **Results** CCK-8 results showed that the absorbance at 450 nm of EPC in EPC + ADSC co-culture group was higher than that in EPC group and EPC + ADSC + PI3K-inhibitor group at different time points, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The scratch test showed that the relative scratch distance of EPC + ADSC co-culture group was smaller than that of EPC group and EPC + ADSC + PI3K-inhibitor group after 24 hours, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Tube formation assay showed that the average number of tube-like structures formed in EPC + ADSC co-culture group was higher than that in EPC group and EPC + ADSC + PI3K-inhibitor group, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Western blot showed that the expression levels of VEGFA, eNOS, VE-cadherin, p-PI3K and p-AKT of EPC in EPC + ADSC co-culture group were higher than those in EPC group and EPC + ADSC + PI3K-inhibitor group. The expression level of CD133 in EPC group was lower than that in EPC + ADSC + PI3K-inhibitor group, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Co-culture of ADSC and EPC can improve the proliferation, migration, differentiation and vasogenic activity of EPC through the regulation of PI3K/AKT pathway.

Key words adipose-derived stem cells; endothelial progenitor cells; PI3K/AKT