

# PI3K/Akt通路在低氧诱导脂肪干细胞增殖和向内皮细胞分化中的作用

殷令妮, 陈德宣(上海健康医学院附属嘉定区中心医院老年病科, 上海市 201800)

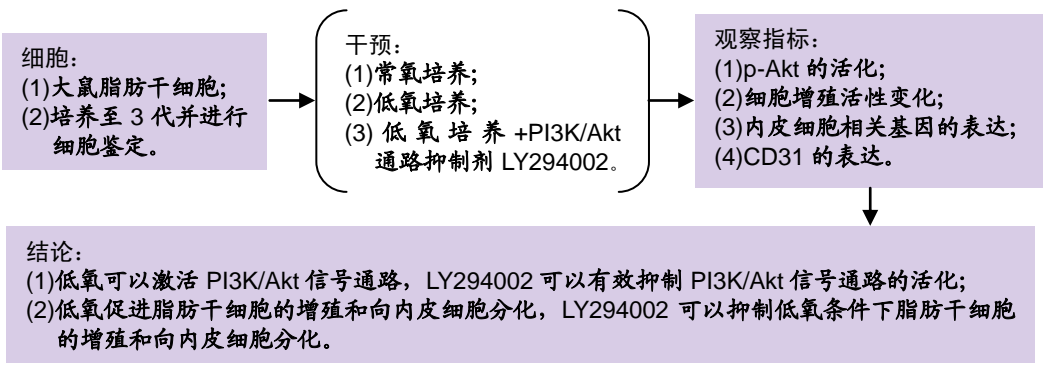
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2038

ORCID: 0000-0001-8454-263X(殷令妮)

文章快速阅读:

### 文章特点一

- (1)脂肪干细胞已被证明植入体内后可以促进缺血组织的血管化,但缺血组织中的低氧环境如何影响脂肪干细胞的生物学功能,相关报道较少;
- (2)在低氧培养条件下PI3K/Akt通路可被激活,而PI3K/Akt信号通路抑制剂LY294002可以有效抑制PI3K/Akt通路的激活;
- (3)加入LY294002后抑制了低氧条件下脂肪干细胞的增殖和向内皮细胞分化,说明PI3K/Akt通路在此过程中发挥了重要的作用。



殷令妮, 女, 1987年生, 山东省济宁市人, 硕士, 医师, 主要从事干细胞和老年代谢方面的应用研究。

通讯作者: 陈德宣, 硕士, 主任医师, 上海健康医学院附属嘉定区中心医院老年病科, 上海市 201800

文献标识码:A

投稿日期: 2019-07-04

送审日期: 2019-07-09

采用日期: 2019-08-09

在线日期: 2019-11-18



### 文题释义:

PI3K/Akt 信号通路: Akt 是 PI3K/Akt 信号转导通路的核心, 其分子质量约为 60 kD, 是原癌基因 c-akt 表达编码的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。外源性抑制剂 LY294002 或 wortmannin 均可负向调节 PI3K/Akt 信号通路, 导致第二信使 PIP3 逆行转化为 PIP2, 阻断其调节作用。

低氧: 氧体积分数是机体微环境的重要组成部分, 直接影响着细胞的成活和生物学行为。在体外培养过程中氧体积分数为 1%-5% 时即可为脂肪干细胞的增殖和功能提供足够的刺激, 同时维持细胞形态和多向分化能力不变, 因此可以认为低氧环境可以更好地为干细胞特性的维持提供信号传导。

### 摘要

背景: 大量研究证明低氧可以促进干细胞的增殖和分化, 但目前尚不清楚其通过何种途径发挥作用。

目的: 观察低氧对脂肪干细胞增殖和向内皮细胞分化的影响, 并探讨 PI3K/Akt 通路在此过程中的作用。

方法: 取培养至第 3 代的 Wistar 大鼠脂肪干细胞, 分为常氧组、低氧组、低氧+LY294002 组, 3 组均在体积分数为 20% O<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 然后低氧组转移至体积分数为 2% O<sub>2</sub> 培养箱中进行培养, 常氧组继续在体积分数为 20% O<sub>2</sub> 培养箱中培养, 低氧+LY294002 组在低氧培养环境下的细胞培养基中加入终浓度为 25 mmol/L 的 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002。培养 24 h 后, Western blot 检测 p-Akt 的表达明确 PI3K/Akt 通路的激活情况; CCK-8 法检测各组脂肪干细胞的增殖情况; 各组脂肪干细胞加入血管内皮细胞诱导培养基进行诱导分化 10 d, 分别通过 qRT-PCR 及抗 CD31 免疫荧光染色检测各组脂肪干细胞分化为内皮细胞的情况。

结果与结论: ①第 3 代脂肪干细胞呈现出典型的梭形结构, 流式细胞仪检测结果显示 CD34 和 CD45 表达阴性, CD105 表达阳性, 并可向成骨及成脂细胞方向分化; ②低氧培养条件下 p-Akt 的表达明显升高, 加入 LY294002 后 p-Akt 的表达受到明显抑制; ③低氧组细胞增殖率明显高于常氧组和低氧+LY294002 组 ( $P < 0.05$ ), 低氧+LY294002 组脂肪干细胞的增殖率低于低氧组 ( $P < 0.05$ ); ④低氧组内皮细胞基因及特异性蛋白 CD31 的表达明显高于常氧组和低氧+LY294002 组 ( $P < 0.05$ ), 低氧+LY294002 组内皮细胞基因及特异性蛋白 CD31 的表达低于低氧组 ( $P < 0.05$ ), 但仍高于常氧组 ( $P < 0.05$ ); ⑤结果证实 PI3K/Akt 通路在低氧诱导的脂肪干细胞增殖及向内皮细胞分化过程中发挥重要作用。

### 关键词:

脂肪干细胞; 低氧; 细胞增殖; 细胞分化; PI3K/Akt 通路

中图分类号: R459.9; R394.2; R318

Yin Lingni, Master, Physician, Department of Geriatrics, Jiading Central Hospital, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201800, China

Corresponding author: Chen Dexuan, Master, Chief physician, Department of Geriatrics, Jiading Central Hospital, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201800, China

## The role of PI3K/Akt pathway in hypoxia-induced cell proliferation and endothelial cell differentiation of adipose-derived stem cells

Yin Lingni, Chen Dexuan (Department of Geriatrics, Jiading Central Hospital, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201800, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** A large number of studies have confirmed that hypoxia can promote the proliferation and differentiation of stem cells, but the pathway by which it plays its role remains unclear.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of hypoxia on the proliferation of adipose-derived stem cells and their differentiation into endothelial cells and investigate the role of PI3K/Akt pathway in this process.

**METHODS:** Passage 3 adipose-derived stem cells of Wistar rats were divided into three groups according to the different culture conditions: normoxia group, hypoxia group, and hypoxia+LY294002 group. Three groups of cells were cultured for 24 hours in an incubator containing 20% O<sub>2</sub>. Cells in the hypoxia group were cultured in an incubator containing 2% O<sub>2</sub>, and those in the normoxia group were still cultured in an incubator containing 2% O<sub>2</sub>. Cells in the hypoxia+LY294002 group were cultured in medium supplemented with 25 mmol/L PI3K/Akt pathway inhibitor LY294002 under the hypoxic culture conduction. After 24 hours of culture, p-Akt expression was detected by Western blot assay to indicate the activation of PI3K/Akt pathway. The proliferation of adipose-derived stem cells was measured by CCK-8 method. Three groups of adipose-derived stem cells were induced to differentiate into vascular endothelial cells for 10 days. The differentiation of adipose-derived stem cells into endothelial cells was detected by qRT-PCR and anti-CD31 immunofluorescence staining.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Adipose-derived stem cells at passage 3 exhibited elongated fibroblast-like morphology. Cytometry analysis showed most of adipose-derived stem cells at passage 3 were negative for CD 34 and CD45 and positive for CD105 and could be induced towards osteogenic and adipogenic differentiation. The expression of p-Akt was significantly increased after hypoxic culture, which was inhibited obviously after adding LY294002. CCK-8 showed that the proliferation of adipose-derived stem cells in the hypoxia group was significantly higher than that in the normoxia group and hypoxia+LY294002 group ( $P < 0.05$ ). The proliferation of adipose-derived stem cells in the hypoxia+LY294002 group was significantly lower than that in the hypoxia group ( $P < 0.05$ ). The results of qRT-PCR and anti-CD31 immunofluorescence staining showed that the expression of endothelial cell gene and specific protein CD31 in the hypoxia group was significantly higher than that in the normoxia and hypoxia+LY294002 groups ( $P < 0.05$ ). The expression of CD31 in the hypoxia+LY294002 group was significantly lower than that in the hypoxia group ( $P < 0.05$ ), but it was significantly higher than that in the normoxia group ( $P < 0.05$ ). These results suggest that the PI3K/Akt pathway plays an important role in hypoxia-induced cell proliferation and vascular endothelial cell differentiation of adipose-derived stem cells.

**Key words:** adipose tissue derived stem cells; hypoxia; cell proliferation; cell differentiation; PI3K/Akt pathway

## 0 引言 Introduction

脂肪干细胞是从脂肪组织中分离提取得到的一种具有多向分化潜能的干细胞,已被证明移植后可以通过分化为内皮细胞及分泌多种细胞因子促进缺血组织的血管新生,从而达到治疗疾病的目的,如心肌缺血、脑卒中、糖尿病引起的慢性创面等<sup>[1-3]</sup>。由此可见,植入体内的脂肪干细胞活性及功能直接决定了其治疗效果。缺血组织中氧体积分数明显低于正常组织,必然会直接影响植入体内的脂肪干细胞的生物学行为。大量研究证明体外低氧培养可以促进脂肪干细胞增殖及向内皮细胞分化<sup>[4-5]</sup>,且在相同低氧培养条件下,脂肪干细胞呈现出比骨髓间充质干细胞更强的增殖能力,相同诱导条件下更多更快地分化为内皮细胞,说明脂肪干细胞具有应用于血管化治疗的巨大优势<sup>[6]</sup>。但是,目前尚不明确低氧通过何种作用机制调节移植后的脂肪干细胞生物学行为。PI3K/Akt是一个保守的信号转导酶家族,广泛参与细胞增殖、分化、旁分泌功能和血管生成等多种过程<sup>[7-9]</sup>。该研究拟观察低氧培养环境对脂肪干细胞增殖及向内皮细胞分化的影响,并探讨PI3K/Akt通路在此过程中的作用。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年7月至2019年2月在上海健康医学院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 3周龄雄性Wistar大鼠6只, SPF级, 体重45-55 g, 由上海实验动物研究中心提供, 动物使用许可证号: 沪ICP备09084966号。实验过程中对动物处置符

合动物学伦理学标准。

1.3.2 实验试剂和仪器 胎牛血清(Gibco公司); DMEM及0.25%胰酶(美国Invitrogen公司); EDTA、青霉素、链霉素、成骨及成脂诱导试剂盒(上海代轩生物公司); TRIZOL、反转录试剂盒(美国Invitrogen公司); 抗CD34、抗CD45及抗CD105流式抗体(美国BD公司); 抗CD31及抗p-Akt抗体(美国Abcam公司); CCK-8试剂、PI3K/Akt通路抑制剂LY294002(美国Sigma-Aldrich公司); 光学显微镜、流式细胞仪、全自动酶标仪(BIO-RAD550)及Real-time PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 脂肪干细胞的培养 无菌条件下取3周龄雄性Wistar大鼠腹股沟脂肪组织, PBS洗涤3遍, 剪成颗粒状, 加入2% IV型胶原酶于摇床上消化30 min, 离心(1 500 r/min, 3 min)后弃去上层油脂及上清液, 加入适量低糖DMEM培养基(含体积分数为10%胎牛血清、100 U/mL青霉素及100 mg/L链霉素)重悬细胞后接种于培养皿中, 于37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>、体积分数为20%O<sub>2</sub>培养箱中培养, 48 h后首次换液, 以后每3 d换液1次并在倒置显微镜下观察细胞生长状态。待细胞融合至90%时, 使用2%胰酶消化细胞行传代培养, 实验中使用第3代脂肪干细胞进行下一步实验。

1.4.2 脂肪干细胞的表面标志物鉴定 第3代脂肪干细胞长满至90%时, 吸去培养基, 清洗、消化后收集细胞, 转入15 mL离心管中, 1 500 r/min离心5 min, 弃上清, 加入PBS重悬细胞沉淀, 计数后分装入1.5 mL EP管中, 分别使用抗CD34、CD45及CD105的流式抗体孵育细胞, 未加入抗体的细胞作为空白对照, 避光冰浴孵育30 min; 加入500 μL PBS洗掉未结合抗体, 1 500 r/min离心5 min, 弃

上清, 加入1 mL PBS充分重悬细胞, 制备成单细胞悬液上机行流式检测。

**1.4.3 脂肪干细胞的成骨、成脂诱导分化** 根据成骨、成脂分化诱导试剂盒说明书介绍的方法, 消化收集第3代脂肪干细胞接种于6孔板中, 置于37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>、体积分数为20%O<sub>2</sub>培养箱中培养, 24 h后换液, 分别加入成骨诱导液和成脂诱导液进行诱导分化培养, 每3 d换液1次, 2周后去除培养基, PBS漂洗后分别进行茜素红染色和油红O染色, 在倒置相差显微镜下观察染色结果并拍照。

#### 脂肪干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	Wistar 大鼠腹股沟脂肪
原代培养方法:	胶原酶消化法
基础培养基:	L-DMEM 培养基
添加材料:	体积分数为 10% 无菌胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 mg/L 链霉素
原代培养时间:	原代细胞培养 3 d 时行首次换液, 之后每 2 d 换液 1 次, 培养六七天后开始传代
细胞传代:	细胞融合至 90% 用 2.5% 胰蛋白酶消化传至下 1 代, 传代比例为 1 : 3, 五六天传代 1 次, 传代第 3 代
细胞鉴定:	流式鉴定及成骨、成脂诱导分化
伦理学批准:	经上海健康医学院附属嘉定区中心医院动物实验伦理委员会批准

**1.4.4 实验细胞分组** 将第3代脂肪干细胞分为常氧组、低氧组、低氧+LY294002组。收集第3代脂肪干细胞, 计数接种后放于37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>、体积分数为20%O<sub>2</sub>培养箱中培养24 h, 然后低氧组转移至37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>、体积分数为2%O<sub>2</sub>培养箱中进行培养; 常氧组继续在体积分数为20%O<sub>2</sub>培养箱中培养; 低氧+LY294002组在低氧培养环境下的细胞培养基中加入终浓度为25 mmol/L的LY294002, 以观察抑制PI3K/Akt通路后脂肪干细胞的增殖及向内皮细胞分化情况。

**1.4.5 Western blot检测低氧培养条件下PI3K/Akt通路的激活** 低氧培养24 h后收集细胞, 采用Western blot法检测各组细胞的磷酸化Akt(p-Akt)表达, 以GAPDH作为参照物。p-Akt的表达即表示PI3K/Akt通路得到激活<sup>[10]</sup>。

**1.4.6 CCK-8检测脂肪干细胞增殖情况** 将第3代脂肪干细胞以2 000个/孔的密度接种于96孔板, 按实验分组分别进行常氧和低氧培养, 于第1-3天每天同一时间点行CCK-8法检测细胞增殖情况, 每次取3个复孔, 以加入单纯完全培养基的3个复孔为空白对照, 每孔加入CCK-8 10 μL, 培养箱孵育3 h, 酶标仪在450 nm波长处检测各孔的吸光度值。以时间为横轴, 吸光值为纵轴绘制生长曲线。

**1.4.7 脂肪干细胞向内皮细胞分化** 第3代脂肪干细胞制备成单细胞悬液后, 分别以每孔2×10<sup>5</sup>的数量接种于6孔板中, 按实验分组分别进行常氧和低氧培养24 h, 每孔加入1 mL血管内皮细胞诱导培养基(90%低糖DMEM+体积分

数为10%胎牛血清+50 μg/L血管内皮生长因子165+10 μg/L碱性成纤维细胞生长因子), 隔天换液1次, 诱导培养10 d。

**1.4.8 qRT-PCR检测内皮细胞相关基因的表达** 收集上述各组细胞, 提取RNA, 反转录为cDNA并扩增, 运用qRT-PCR技术检测内皮细胞相关基因vWF、flt-1、flk-1的表达。在GeneBank中查找出大鼠基因序列, 使用Primer 5进行目标基因的引物设计, 见表1, 由上海生工生物科技有限公司合成。以GAPDH作为内参基因, 采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法, 以常氧组的基因表达作为标准, 计算其余两组各基因的相对表达量。

表1 内皮细胞相关基因引物序列

Table 1 Primer sequences of endothelial cells-related genes

基因	引物序列(5'-3')
vWF	Sense: 5'-GAT GAC CCT GAT GCT GTC T-3'
	Anti-sense: 5'-GTC TCC CTT GTT GCC ATT GT-3'
flt-1	Sense: 5'-ATC CCT CAG CCT ACC ATC AA-3'
	Anti-sense: 5'-AAA GCC GTT TGG CAC ATC T-3'
flk-1	Sense: 5'-CCC GCA CGA ATG ATA TCC CA-3'
	Anti-sense: 5'-TCC TGC AGT GCA TAA CCT GG-3'
GAPDH	Sense: 5'-CTC ATG GCC TAC ATG GCC TC-3'
	Anti-sense: 5'-CTC ATG GCC TAC ATG GCC TC-3'

**1.4.9 抗CD31免疫荧光染色** 收集上述各组细胞, 去除培养液, PBS漂洗2次, 40 g/L多聚甲醛固定15 min, PBS清洗3次, 加入500 μL 3% BSA封闭非特异性抗原, 30 min后去掉封闭液, 加入1 : 50的CD31抗大鼠抗体, 4 °C孵育过夜, 吸弃一抗, PBS清洗3次, 加入1 : 50的二抗, 避光孵育1 h, 吸弃二抗, PBS清洗3次, 加入500 μL DAPI工作液染色细胞核15 min, 弃去染色液, PBS清洗后于倒置相差显微镜下观察、拍照。

**1.5 主要观察指标** ①第3代脂肪干细胞的形态及表面标志物CD34、CD45及CD105的表达; ②第3代脂肪干细胞的成骨及成脂分化能力; ③低氧培养条件下PI3K/Akt通路的激活情况; ④低氧培养条件下脂肪干细胞的增殖和向内皮细胞分化情况。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 18.0统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行正态性、方差齐性检验, 两样本均数比较采用独立样本t检验, P < 0.05为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 脂肪干细胞的形态及鉴定结果** 体外培养至第3代的脂肪干细胞呈现出典型的梭形结构。经流式细胞分析鉴定后发现间充质细胞表面标志物CD105表达阳性, 而造血细胞表面标志物CD34和CD45表达阴性, 说明培养至第3代的脂肪干细胞具有干细胞特性, 是一群均一的未分化干细胞, 见图1。加入成骨诱导液培养2周后, 显微镜下可见细胞表面有小片状钙结节形成, 茜素红染色阳性, 说明脂肪干细胞有向骨细胞分化的能力。加入成脂诱导液培

养2周后,细胞间质中出现折光性好的脂滴,油红O染色显示脂质变红,表明脂肪干细胞有向脂肪细胞分化的能力,见图2。

**2.2 Western blot检测低氧培养条件下PI3K/Akt通路的激活** 低氧培养24 h时,Western blot检测发现p-Akt的表达明显高于常氧组,加入LY294002后,p-Akt的表达受到明显抑制,说明LY294002可以有效抑制PI3K/Akt通路的激活,见图3。

**2.3 CCK-8检测细胞增殖** 在培养第1天时3组之间差异无显著性意义,第2天时低氧组的细胞增殖率明显高于常氧组、低氧+LY294002组( $P < 0.05$ ),常氧组、低氧+LY294002组之间差异无显著性意义( $P > 0.05$ ),而培养第3天时,3组之间两两比较差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ),说明加入LY294002后抑制了低氧诱导的脂肪干细胞增殖,见图4。

**2.4 qRT-PCR 检测内皮细胞特异性标志物的表达** 经过低氧培养后细胞vWF、flt-1及flk-1的表达明显高于常氧组( $P < 0.05$ ),低氧+LY294002组vWF、flt-1及flk-1的表达则明显低于低氧组( $P < 0.05$ ),且与常氧组比较差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ),见图5。

**2.5 抗CD31免疫荧光染色结果** 免疫荧光染色CD31抗原,显微镜下观察可见CD31抗原表达于细胞膜表面,低氧组CD31阳性细胞表达率远远高于常氧组( $P < 0.05$ ),低氧+LY294002组CD31阳性细胞表达率低于低氧组( $P < 0.05$ ),但仍高于常氧组( $P < 0.05$ ),见图6。

### 3 讨论 Discussion

脂肪干细胞是目前研究最广泛的成体干细胞,其来源广泛,分离容易,人体每克脂肪组织可以得到 $10^5$ – $10^6$ 个脂肪干细胞<sup>[11]</sup>。脂肪干细胞不仅可以进行自我更新,还具有多向分化潜能,可以分化为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、神经细胞、内皮细胞等多种细胞<sup>[12-15]</sup>。因此,从临床应用方面来说,脂肪组织来源的干细胞更加具有应用前景。脂肪中的氧体积分数一般低于3%,因此脂肪中的干细胞在生理条件下就处于一个相对缺氧环境<sup>[16]</sup>。在体外培养过程中氧体积分数为1%–5%时即可为脂肪干细胞的增殖和功能提供足够的刺激,同时维持细胞形态和多向分化能力不变,因此可以认为低氧环境可以更好地为干细胞特性的维持提供信号传导<sup>[16]</sup>。缺血组织中的低氧环境如何影响移植的脂肪干细胞的功能,目前仍不清楚。为了充分利用干细胞的功能,有必要深入认识低氧对干细胞的影响及其作用机制。

低氧已被证明是一种强大的细胞信号分子,直接影响着细胞的增殖、分化及基因表达<sup>[17-20]</sup>。该实验中,通过CCK-8法绘制脂肪干细胞的生长曲线,结果发现低氧环境可以明显促进脂肪干细胞的增殖,研究使用最经典的血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子作为内皮细胞诱导液<sup>[21-22]</sup>,经过低氧培养的脂肪干细胞更多地分化为内皮

细胞,表达内皮细胞特异性基因vWF、flt-1、flk-1,并表达特异性表面抗原CD31,这些结果与已发表的研究结果是一致的,说明低氧环境是一种有效的细胞增殖和向内皮细胞分化的刺激因子<sup>[4-5, 23]</sup>。

低氧环境可以激活低氧诱导因子1 $\alpha$ ,进一步刺激血管内皮细胞因子和成纤维细胞因子的表达,形成一个正反馈调节,从而促进脂肪干细胞的增殖及向内皮细胞分化,加入LY294002后,此促进作用受到抑制,说明PI3K/Akt通路参与了这些细胞因子引起的细胞生物学活动<sup>[5, 24]</sup>。此外,SHENG等<sup>[8]</sup>的研究结果表明加入LY294002抑制PI3K/Akt通路激活后,使得低氧诱导的骨髓间充质干细胞增殖及旁分泌能力受到抑制。此外,PI3K/Akt通路已被证明参与多种细胞的分化,例如胰腺导管细胞分化为胰岛素生成细胞<sup>[25]</sup>、骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞<sup>[26]</sup>、心肌干细胞分化为内皮细胞等<sup>[27]</sup>,阻断此通路后细胞的分化过程也受到抑制。过表达Akt基因的骨髓间充质干细胞移植入大鼠缺血心肌后,可以通过减少心肌内炎症、胶原沉积和心肌细胞肥大,抑制心肌重塑,使心肌收缩和舒张功能完全恢复正常,相比较于过表达lacZ的骨髓间充质干细胞,相同数量的过表达Akt基因的骨髓间充质干细胞可以恢复4倍大的心肌容积<sup>[28]</sup>。另外,有研究表明miR-181b-5p也可以通过上调PI3K/Akt的表达保护缺血再灌注引起的心肌损伤<sup>[29]</sup>。以上这些研究结果均说明PI3K/Akt通路在细胞增殖、细胞分化及稳定干细胞作用中发挥重要作用。在该研究中,细胞经过低氧培养后p-Akt呈现高表达,说明低氧激活了PI3K/Akt通路,加入LY294002后p-Akt的表达受到抑制,表明LY294002可以有效抑制PI3K/Akt通路的传导,低氧诱导的脂肪干细胞增殖和内皮细胞分化能力急剧下降。PI3K/Akt信号通路促进细胞增殖可能与其下游细胞因子磷酸化Bcl-2家族成员BAD或caspase-9前体,使这些蛋白失活,从而抑制细胞凋亡,促进细胞存活<sup>[30-31]</sup>。

综上所述,低氧培养不仅可以刺激脂肪干细胞增殖,还可以促进脂肪干细胞向内皮细胞分化,PI3K/Akt通路在此过程中发挥重要调节作用。这些研究结果有助于加深对干细胞移植治疗作用机制的认识,从而更好地发挥干细胞在再生医学中的应用潜力。

**作者贡献:** 实验设计、实验实施及资料收集为殷令妮,实验设计及实验评估为陈德宣。

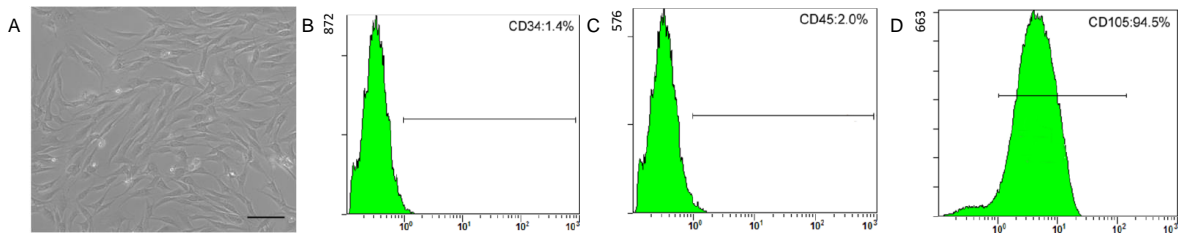
**经费支持:** 该文章没有接受任何经费支持。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经上海健康医学院附属嘉定区中心医院动物实验伦理委员会批准,批准号为20180172。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

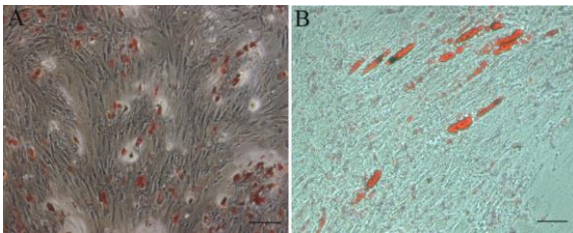
**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。



图注: 图中 A 为培养至第 3 代的脂肪干细胞, 呈现出典型的梭形结构( $\times 100$ ); B-D 为流式细胞分析第 3 代脂肪干细胞的 CD34、CD45、CD105 表达率分别为 1.4%、2.0%、94.5%

图 1 第 3 代 Wistar 大鼠脂肪干细胞的形态及流式鉴定结果

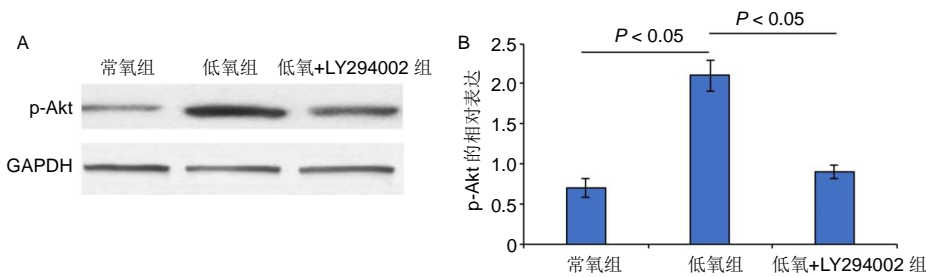
Figure 1 Morphology and flow cytometry of passage 3 adipose-derived stem cells of Wistar rats



图注: 图中 A 为脂肪干细胞成骨诱导后茜素红染色, 可见细胞表面有小片状钙结节形成; B 为脂肪干细胞成脂诱导后油红 O 染色, 细胞间质中出现折光性好的脂滴

图 2 脂肪干细胞的成骨、成脂诱导分化能力(倒置相差显微镜,  $\times 40$ )

Figure 2 The osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells (inverted phase microscope,  $\times 40$ )



图注: 低氧培养条件下 p-Akt 的表达高于常氧, 而加入 LY294002 后 p-Akt 的表达则受到明显抑制

图 3 Western blot 检测各组脂肪干细胞中 p-Akt 的表达

Figure 3 Detection of p-Akt in adipose-derived stem cells in each group by Western blot assay

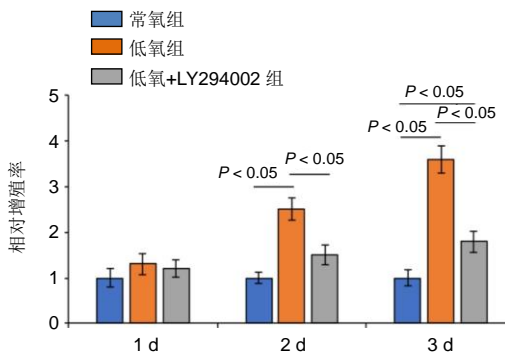


图 4 CCK-8 法检测各组脂肪干细胞的相对增殖率

Figure 4 Detection of cell proliferation of adipose-derived stem cells by CCK-8

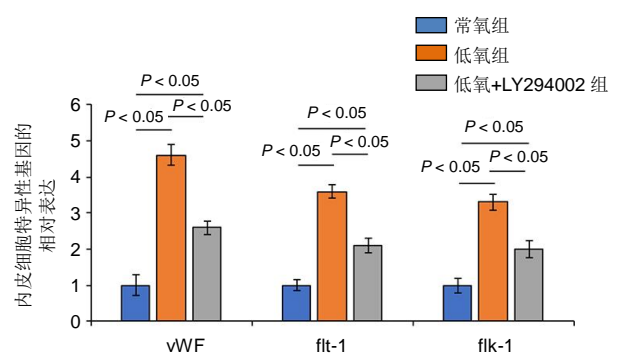
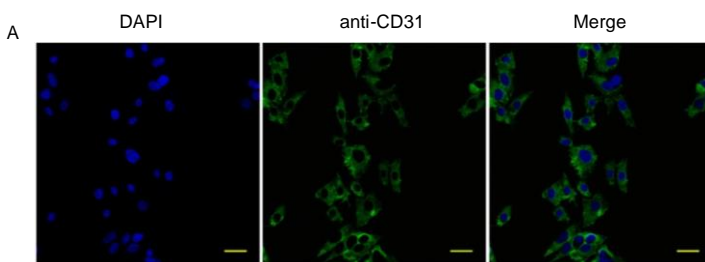


图 5 qRT-PCR 检测诱导培养 10 d 后各组内皮细胞特异性基因的表达

Figure 5 Detection of the expression of endothelial cell-specific genes in each group by qRT-PCR after 10 days of induced culture



图注: 图中 A 为抗 CD31 免疫荧光染色的代表性图片( $\times 100$ ), DAPI 阳性为细胞核, CD31 表达于细胞膜表面, 为内皮细胞特异性抗原, DAPI 和 CD31 融合后即表示内皮细胞; B 为各组 CD31 阳性细胞表达率

图 6 各组脂肪干细胞诱导培养 10 d 后抗 CD31 免疫荧光染色

Figure 6 Immunofluorescence staining of adipose-derived stem cells for detection of CD31 expression after 10 days of induced culture

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过上海健康医学院附属嘉定区中心医院生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] WANG Z, XING H, HU H, et al. Intraglandular transplantation of adipose-derived stem cells combined with platelet-rich fibrin extract for the treatment of irradiation-induced salivary gland damage. *Exp Ther Med*. 2018;15(1):795-805.
- [2] CHAN TM, HARN HJ, LIN HP, et al. The use of ADSCs as a treatment for chronic stroke. *Cell Transplant*. 2014;23(4-5):541-547.
- [3] GADELKARIM M, ABUSHOUK AI, GHANEM E, et al. Adipose-derived stem cells: Effectiveness and advances in delivery in diabetic wound healing. *Biomed Pharmacother*. 2018;107:625-633.
- [4] SHANG T, LI S, ZHANG Y, et al. Hypoxia promotes differentiation of adipose-derived stem cells into endothelial cells through demethylation of ephrinB2. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):133.
- [5] DENG Y, HUANG G, CHEN F, et al. Hypoxia enhances buffalo adipose-derived mesenchymal stem cells proliferation, stemness, and reprogramming into induced pluripotent stem cells. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):17254-17268.
- [6] FAN LJ, XIAO QR, LIN KS, et al. Comparison of endothelial differentiation capacity of adipose-derived stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells from rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2016;36(9):1247-1254.
- [7] 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. *Placenta*. 2019;82:17-24.
- [8] SHENG L, MAO X, YU Q, et al. Effect of the PI3K/AKT signaling pathway on hypoxia-induced proliferation and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Ther Med*. 2017;13(1):55-62.
- [9] CHEN H, LIU Y, JIANG CJ, et al. Calcium-Activated Chloride Channel A4 (CLCA4) Plays Inhibitory Roles in Invasion and Migration Through Suppressing Epithelial-Mesenchymal Transition via PI3K/AKT Signaling in Colorectal Cancer. *Med Sci Monit*. 2019;25:4176-4185.
- [10] TONG X, PELLING JC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR axis by apigenin for cancer prevention. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013;13(7):971-978.
- [11] HONG SJ, TRAKTUEV DO, MARCH KL. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(1):86-91.
- [12] ZUK PA, ZHU M, ASHJIAN P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-4295.
- [13] FRESE L, DIJKMAN PE, HOERSTRUP SP. Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. *Transfus Med Hemother*. 2016;43(4):268-274.
- [14] WYSTRYCHOWSKI W, PATLOLLA B, ZHUGE Y, et al. Multipotency and cardiomyogenic potential of human adipose-derived stem cells from epicardium, pericardium, and omentum. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):84.
- [15] ZHAO K, LI R, BI S, et al. Combination of mild therapeutic hypothermia and adipose-derived stem cells for ischemic brain injury. *Neural Regen Res*. 2018;13(10):1759-1770.
- [16] BUERK DG, SHONAT RD, RIVA CE, et al. O<sub>2</sub> gradients and countercurrent exchange in the cat vitreous humor near retinal arterioles and venules. *Microvasc Res*. 1993;45(2):134-148.
- [17] SHANG T, LI S, ZHANG Y, et al. Hypoxia promotes differentiation of adipose-derived stem cells into endothelial cells through demethylation of ephrinB2. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):133.
- [18] BEKHITE MM, FINKENSIEPER A, REBHAN J, et al. Hypoxia, leptin, and vascular endothelial growth factor stimulate vascular endothelial cell differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev*. 2014;23(4):333-351.
- [19] WANG F, ZACHAR V, PENNISI CP, et al. Hypoxia Enhances Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells toward the Smooth Muscle Phenotype. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):E517.
- [20] HERS I, VINCENT EE, TAVARÉ JM. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*. 2011;23(10):1515-1527.
- [21] KHAN S, VILLALOBOS MA, CHORON RL, et al. Fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor play a critical role in endotheliogenesis from human adipose-derived stem cells. *J Vasc Surg*. 2017;65(5):1483-1492.
- [22] LI D, XIE K, ZHANG L, et al. Dual blockade of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (FGF-2) exhibits potent anti-angiogenic effects. *Cancer Lett*. 2016;377(2):164-173.
- [23] LEE EY, XIA Y, KIM WS, et al. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen*. 2009;17(4):540-547.
- [24] SONG SY, CHUNG HM, SUNG JH. The pivotal role of VEGF in adipose-derived-stem-cell-mediated regeneration. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(11):1529-1537.
- [25] WATANABE H, SAITO H, UEDA J, et al. Regulation of pancreatic duct cell differentiation by phosphatidylinositol-3 kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;370(1):33-37.
- [26] OUYANG N, ZHANG P, FU R, et al. Mechanical strain promotes osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells from ovariectomized rats via the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2018;17(1):1855-1862.
- [27] XIAO X, WANG W, LIU D, et al. The promotion of angiogenesis induced by three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold with different interconnection sizes via activation of PI3K/Akt pathways. *Sci Rep*. 2015;5:9409.
- [28] MANGI AA, NOISEUX N, KONG D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*. 2003;9(9):1195-1201.
- [29] YUAN L, FAN L, LI Q, et al. Inhibition of miR-181b-5p protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury by targeting AKT3 and PI3KR3. *J Cell Biochem*. 2019 Jul 11. doi: 10.1002/jcb.29271. [Epub ahead of print]
- [30] DATTA SR, DUDEK H, TAO X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91(2):231-241.
- [31] CARDONE MH, ROY N, STENNICKE HR, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998;282(5392):1318-1321.