

- [8] Kars M D, Iseri O D, Gunduz U, et al. Reversal of multidrug resistance by synthetic and natural compounds in drug-resistant MCF-7 cell lines [J]. *Chemotherapy*, 2008, 54 (3): 194-200.
- [9] Dönmez Y, Akhmetova L, İseri Ö D, et al. Effect of MDR modulators verapamil and promethazine on gene expression levels of MDR1 and MRP1 in doxorubicin-resistant MCF-7 cells [J]. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2011, 67 (4): 823-828.
- [10] Gajdács M, Nové M, Csonka Á, et al. Phenothiazines and Selenocompounds: A Potential Novel Combination Therapy of Multidrug Resistant Cancer [J]. *Anticancer Research*, 2020, 40 (9): 4921-4928.

## • 基础研究 •

# Apelin-13 对高糖诱导的功能障碍血管内皮的作用探讨

福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院老年科 (福州 350101) 周雨燕 林 帆 叶志强 朱鹏立<sup>1</sup>

**【摘要】目的** 探讨 Apelin-13 对高糖环境下人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 是否具有保护作用。**方法** 实验 I, CCK-8 法检测 48 h 后 HUVECs 在不同糖浓度环境下的增殖活性。实验 II, 实验分组为空白对照组、模型组、实验组, 分别培养 16、24、48 h, CCK-8 检测细胞增殖活性。实验 III, 实验分组为空白对照组、模型组、实验组, 48 h 后流式细胞术检测细胞凋亡率。**结果** 选择 33 mmol/L 作为高糖损伤模型的糖浓度。Apelin 可改善高糖环境下的 HUVECs 增殖活性, 且 48 h 作用时间、 $10^{-8}$  mol/L Apelin 的条件下, Apelin 的增益效果更明显。Apelin 可抑制高糖环境下的 HUVECs 的早期凋亡。**结论** Apelin/APJ 轴对高糖诱导的血管内皮功能障碍起保护作用。

**【关键词】** Apelin-13; 高糖; 凋亡; 增殖; 人脐静脉内皮细胞

**【中图分类号】** R587.1 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2021)04-0136-03

血管内皮功能障碍是糖尿病相关血管并发症 (如动脉粥样硬化) 的主要原因<sup>[1]</sup>。高糖环境介导的过量活性氧的产生可能通过损伤线粒体和调节内皮型一氧化氮合酶, 进而导致血管内皮功能障碍<sup>[2]</sup>。Apelin/APJ 系统在体内广泛分布, 尤其在血管内皮细胞中存在高度表达<sup>[3]</sup>。Apelin/APJ 系统在血管内皮功能障碍相关疾病中发挥重要作用, 包括动脉粥样硬化、糖尿病、高血压和心肌梗塞等<sup>[4-6]</sup>。在小鼠心肌内皮细胞方面, Apelin/APJ 系统对糖尿病小鼠的心肌内皮细胞的保护作用得到证实<sup>[7]</sup>。但是, Apelin/APJ 系统对高糖诱导的血管内皮细胞损伤及凋亡的作用及相关机制暂不明确。本研究旨在探讨 Apelin/APJ 系统对高糖诱导的脐静脉内皮细胞的早期凋亡的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料:** 人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 样本来源于我院妇产科健康产妇足月妊娠剖腹产后的新生儿脐带。本研究通过我院伦理委员会批准 (伦理审查编号: K2018-11-015), 并取得受试对象知情同意书。药品与试剂: Apelin-13 短肽, 规格: 每支 1 mg, 含量: >95%, 批号: 117M4853V, 购买于 Sigma 公司; 内皮细胞培养基购买于美国 ScienCell 公司; I 型胶原酶、胰蛋白酶购买于美国 Gibco 公司; 葡萄糖、CCK-8 试剂盒购买于美国 MCE 公司; 兔抗血管性血友病因子、羊抗兔二抗购买于英国 Abcam 公司; 异硫氰酸荧光素/碘化丙啉细胞凋亡检测试剂盒购买于 BD 公司。仪器: FACS Calibur 流式细胞仪, 美国 BD 公司产品。

**1.2 方法:** 1) CCK-8 法检测细胞增殖活性: 取生长状态良好的细胞制备成一定浓度的细胞悬液, 每孔加入  $2 \times 10^3$

个/100  $\mu$ L 细胞, 细胞贴壁后, 每孔加入不同浓度的干预试剂, 孵育一段时间后弃去旧培养基, 更换新鲜培养基 (100  $\mu$ L/孔, 每孔含 10  $\mu$ L CCK-8 试剂)。将培养板放在 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱内孵育 4 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的增殖活性。细胞增殖活性越强, 吸光度越高。2) 用流式细胞术检测 HUVECs 的凋亡率: 将不同组别的 HUVECs 消化离心后, 将细胞调整至  $1 \times 10^6$  cell/mL, 分别加入 AV-FITC 5  $\mu$ L 和 PI 溶液 10  $\mu$ L。避光孵育 15 min 后, 加入 Binding Buffer 400  $\mu$ L, 1 h 内上机检测。以流式细胞仪的散点图右下象限 (FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) 为早期凋亡细胞。3) 实验分组: 实验 I, 根据人体的血糖波动范围, 选定糖浓度分别为 5.5、10、25、33、50 mmol/L 为研究对象, 更换培养环境为不同糖浓度的 ECM 培养液, 48 h 后用 CCK-8 法检测 HUVECs 的增殖活性。实验 II, HUVECs 分为空白对照组、模型组、实验组, 分别培养 16、24、48 h; 具体分组设置: 空白对照组: 糖浓度为 5.5 mmol/L; 模型组: 高糖浓度为 33 mmol/L; 实验组: 高糖 (33 mmol/L) + 不同浓度 Apelin ( $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  mol/L), 分别为实验组 1~4。用 CCK-8 法检测 HUVECs 的增殖活性。实验 III, HUVECs 分为空白对照组、模型组、实验组, 具体分组设置: 空白对照组: 糖浓度为 5.5 mmol/L; 模型组: 高糖浓度为 33 mmol/L; 实验组: 高糖 (33 mmol/L) + 不同浓度 Apelin ( $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  mol/L), 分别为实验组 1~4。分别培养 48 h, 用流式细胞术检测 HUVECs 早期凋亡率。

**1.3 统计学分析:** 用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。符合

<sup>1</sup> 通信作者

正态分布的计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间两两比较服从正态分布用独立样本  $t$  检验; 多组间两两比较, 需进行方差齐性检查, 采用 Levene 检验法 (检验水准 0.10), 方差齐性的组间样本均数采用单因素方差与 LSD 检验。假设检验采用双侧检验,  $P$  值小于 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CCK-8 探索高糖损伤模型的糖浓度:** HUVECs 细胞在高糖环境下作用 48 h 后, 糖浓度分别为 5.5、10、25、33、50 mmol/L 的组别的细胞增殖活性分别为  $(0.48 \pm 0.01)$ 、 $(0.58 \pm 0.01)$ 、 $(0.67 \pm 0.02)$ 、 $(0.42 \pm 0.01)$ 、 $(0.32 \pm 0.01)$ 。在 5.5~25 mmol/L 糖浓度环境下, 细胞增殖活性随着糖浓度呈梯度上升; 在 25~50 mmol/L 糖浓度环境下, 细胞增殖活性随着糖浓度呈梯度下降。结果提示, 33 mmol/L 糖浓度环境下, 高糖对 HUVECs 细胞的增殖出现负向抑制作用, 且糖尿病酮症酸中毒、高血糖高渗综合征患者的血糖常高达 33 mmol/L, 为模拟临床高糖状态, 故选定 33 mmol/L 为高糖损伤模型的糖浓度。

**2.2 Apelin 改善高糖环境下的 HUVECs 增殖活性:** 模型组、实验组, 与空白对照组人脐静脉内皮细胞增殖活力比较, 33 mmol/L 的高糖环境容易导致 HUVECs 增殖活力下降; Apelin ( $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  mol/L) 的干预可提高 HUVECs 的增殖活性; 在 24 h、48 h 小组中, Apelin ( $10^{-8}$  mol/L) 组的增益效果比 Apelin ( $10^{-9}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  mol/L) 更显著; 48 h 作用时间下, Apelin ( $10^{-8}$  mol/L) 组的增益效果比 16 h、24 h 更显著。因此选择 Apelin ( $10^{-8}$  mol/L) 作为干预指标, 48 h 作为最佳干预时间。见表 1。

表 1 不同浓度 Apelin 在不同时间对高糖环境诱导的人脐静脉内皮细胞增殖活力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	增殖活力		
	16 h	24 h	48 h
空白对照组	$0.63 \pm 0.01$	$0.63 \pm 0.03$	$0.63 \pm 0.01$
模型组	$0.41 \pm 0.03^*$	$0.41 \pm 0.02^*$	$0.47 \pm 0.02^*$
实验组 1 (高糖 + $10^{-9}$ mol/L Apelin)	$0.75 \pm 0.02^\#$	$0.75 \pm 0.02^\#$	$0.72 \pm 0.04^\#$
实验组 2 (高糖 + $10^{-8}$ mol/L Apelin)	$0.72 \pm 0.02^\#$	$0.86 \pm 0.03^\#$	$0.90 \pm 0.03^\#$
实验组 3 (高糖 + $10^{-7}$ mol/L Apelin)	$0.75 \pm 0.01^\#$	$0.76 \pm 0.02^\#$	$0.72 \pm 0.04^\#$
实验组 4 (高糖 + $10^{-6}$ mol/L Apelin)	$0.72 \pm 0.02^\#$	$0.65 \pm 0.04^\#$	$0.67 \pm 0.03^\#$

注: 空白对照组, 5.5 mmol/L 糖环境; 模型组, 33 mmol/L 高糖环境; 实验组, 33 mmol/L 高糖 + 不同浓度 Apelin ( $10^{-9}$  mol/L、 $10^{-8}$  mol/L、 $10^{-7}$  mol/L、 $10^{-6}$  mol/L) 环境。HUVECs 在各环境下分别孵育 16、24、48 h。与空白对照组比较,  $* P < 0.05$ ; 与高糖组比较,  $\# P < 0.05$ 。

**2.3 Apelin 抑制高糖环境下的 HUVECs 的早期凋亡:** 在细胞增殖活力实验中, 我们探索到  $10^{-8}$  mol/L Apelin 持续作用 48 h 可改善 33 mmol/L 高糖环境下的 HUVECs 增殖活性。另一方面, 在细胞凋亡实验中, 我们探索不同浓度 Apelin 持续作用 48 h 是否可抑制高糖环境下的 HUVECs 的

早期凋亡。在 48 h 作用时间下, 空白对照组、模型组、实验组 ( $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  mol/L Apelin) 的细胞早期凋亡率分别为  $(6.95 \pm 0.93)$ 、 $(22.88 \pm 1.20)$ 、 $(11.60 \pm 1.14)$ 、 $(11.15 \pm 0.95)$ 、 $(12.05 \pm 0.95)$ 、 $(9.70 \pm 1.01)$ 。

## 3 讨论

糖尿病患者容易并发多支冠状动脉粥样硬化、狭窄, 因此临床上糖尿病患者一旦并发冠心病, 冠状动脉支架植入术常无法解决广泛多支冠脉狭窄的问题, 一大部分患者需行冠状动脉搭桥术。因此, 在糖尿病早期预防冠状动脉粥样硬化极为重要。糖尿病诱导冠心病的重要初始环节为高糖对血管内皮功能的损伤, 脐静脉内皮细胞为典型的动脉化的血管内皮细胞, 成为本文研究模型。

本文的创新性在于, 探讨在高糖诱导的 HUVECs 凋亡模型中, Apelin / APJ 系统是否起到保护作用。本实验设立不同糖浓度组, 结合临床及实验结果, 选择 33 mmol/L 作为高糖损伤模型的糖浓度。通过 CCK-8 法观察, Apelin 可改善高糖环境下的 HUVECs 增殖活性, 且 48 h 作用时间、 $10^{-8}$  mol/L Apelin 的条件下, Apelin 的增益效果更明显。另一方面, 通过流式细胞术观察, Apelin 可抑制高糖环境下的 HUVECs 的早期凋亡。因此, 我们认为, Apelin / APJ 轴可能在高糖诱导的血管内皮功能障碍中起重要的保护作用。

然而, Apelin / APJ 轴的下游机制并不明确。值得注意的是, Apelin 与 AMPK 信号通路十分密切。比如, Apelin 通过 AMPK 途径减少未折叠蛋白反应, 从而减少内皮细胞凋亡<sup>[8]</sup>。也有文献说明, Apelin 通过激活 AMPK 信号通路, 对缺血性卒中的神经起保护作用<sup>[9]</sup>。此外, Apelin-13 通过激活 SIRT1, 进而抑制核因子  $\kappa B$ , 从而改善慢性常压缺氧诱导的小鼠焦虑样行为<sup>[10]</sup>。因此, 我们推测, Apelin/APJ 轴的保护作用, 其中机制可能与 AMPK、SIRT1 等信号通路相关, 其中具体的机制有待后期进一步研究。

本文的局限性在于: 1) 因为时间关系缺乏动物实验的验证体系, 我们将在后期实验中补充动物实验; 2) 本实验单纯采用 VIII 因子相关抗原免疫荧光鉴定方法, 未结合其他的细胞鉴定方法; 3) 本实验仅通过流式细胞术探测早期凋亡率, 未探测凋亡相关蛋白水平如 Cleaved caspase-3、Bcl-2 等; 4) 本文仅检测了细胞的增殖与凋亡, 未研究炎症因子的变化。

本文结果提示, Apelin / APJ 轴可能在高糖诱导的血管内皮功能障碍中起重要的保护作用。我们的发现为 Apelin 对高糖诱导的内皮细胞早期凋亡的有益作用提供了新的见解。在预防糖尿病引起的冠状动脉广泛多支狭窄病变方面, Apelin/APJ 系统有望成为新型的预防性药物。有关 Apelin/APJ 的保护机制的研究有待进一步完善。

## 参考文献

- [1] Zhang W, Sui Y. CircBPTF knockdown ameliorates high glucose-induced inflammatory injuries and oxidative stress by targeting the miR-384/LIN28B axis in human umbilical vein endothelial cells [J]. Mol Cell Biochem, 2020, 471 (1-2): 101-111.

(下转第 140 页)