

# Apelin 经 Akt/AMPK 信号通路促进心肌微血管内皮细胞血管生成

张 普 刘铭雅 朱 伟 杨霄曼 魏 盟

**【摘要】** 目的:探讨 apelin-13 对大鼠心肌微血管内皮细胞(MVECs)的生物学效应及其可能的信号通路。 方法:体外培养大鼠的心肌微血管内皮细胞。给予不同浓度 apelin-13,采用 MTT 法观察细胞增殖能力、划痕损伤修复和 Transwell 方法观察细胞迁移能力、体外管腔样结构形成方法观察细胞管腔成能力。进一步采用蛋白印迹法观察 apelin-13 对 Akt 和 AMPK 分子蛋白的磷酸化水平的影响。 结果:Apelin-13 能增加大鼠微血管内皮细胞的增殖、迁移和体外管腔形成能力,且呈剂量依赖性在 200 nmol/L 浓度时促血管生成能力最佳。Apelin-13 能上调细胞的 Akt 和 AMPK 磷酸化程度。 结论:Apelin-13 可促进 MVECs 的血管生成,可能与上调 Akt 和 AMPK 的磷酸化相关。

**【关键词】** 微血管内皮细胞;Apelin;血管生成

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2013.01.015

**Apelin promotes angiogenesis of myocardial micro-vascular endothelial cells via Akt/AMPK pathway**

ZHANG Pu<sup>1</sup>, LIU Ming-ya<sup>2</sup>, ZHU Wei<sup>2</sup>, YANG Xiao-man<sup>1</sup>, WEI Meng<sup>2</sup>. 1. Soochow University, 2. Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University

**【Abstract】 Objective:** To investigate whether apelin-13 has angiogenesis effects in myocardial micro-vascular endothelial cells (MVECs). **Methods:** Rat MVECs were cultured in vitro. The cells were treated with apelin-13 at different concentrations. MTT assay was used to determine the proliferation ability. Migration ability was measured using cell scratches and a modified boyden chamber. The tube formation ability of MVECs was tested by Matrigel. The phosphorylation of AMPK and Akt which may be induced by apelin-13 was measured with Western blot. **Results:** Apelin enhanced the proliferation, migration and tube-like structure formation of MVECs in vitro, which was concentration dependent. Furthermore, apelin-13 significantly up-regulated the phosphorylation levels of both Akt and AMPK. **Conclusion:** Apelin has angiogenesis effect in MVECs, which may be related to the upgrading of Akt/AMPK phosphorylation.

**【Key words】** Myocardial micro-vascular endothelial cells; Apelin; Angiogenesis

Apelin 是 1998 年日本学者 Tatemoto 等<sup>[1]</sup>首先从牛胃分泌物中提取,并纯化出的孤儿 G 蛋白偶联受体(APJ)的天然配体。它可发挥多种生物学效应,表达遍布人体各个组织器官,其对心血管功能、水盐平衡、下丘脑内分泌、炎症、免疫、葡萄糖代谢

等具有重要的调节作用<sup>[2,3]</sup>。Apelin 是重要的血管生成的调节器,其高表达在胚胎脉管的内皮及视网膜血管的内皮层和基质层,但是在血管稳定后其表达表现为下调<sup>[4,6]</sup>。Apelin 可被肽酶分解成 apelin-36、-17、-13、-12 等,其中 apelin-13 可能是 APJ 主要的内源性配体<sup>[2,7]</sup>。本研究拟通过观察 apelin-13 对大鼠心肌微血管内皮细胞增殖、迁移、体外毛细血管管腔样结构形成的影响以及对丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)和腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)蛋白表

基金项目:上海市科委自然科学基金(10ZR1422900)

作者单位:215006 苏州大学(张 普,杨霄曼);200233 上海交通大学附属第六人民医院心内科(刘铭雅,朱 伟,魏 盟)

通信作者:刘铭雅,Email:llmylmy@126.com

达影响,探讨 apelin 参与血管生成的可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

胎牛血清(FBS)、高糖培养基(DMEM, Gibco 公司)、噻唑蓝(MTT, Singma 公司)、ABC 免疫化学试剂盒(碧云天公司)。Transwell 小室(Corning 公司)、Matrigel 胶(BD 公司),Akt 抗体、AMPK 抗体、二抗(CST 公司),兔抗鼠 CD34、CD31 单克隆抗体(Antibody Diagnostica Inc),兔抗人Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体(DAKO 公司),其他试剂均为国产分析纯以上级别。

1.2 心肌微血管内皮细胞(MVECs)培养与鉴定

选取 6~8 周龄雄性 Wistar 大鼠(60~100 g),1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉、注入 200U 肝素,75%乙醇浸泡 30 min,逐层打开胸腔,暴露并剪下心脏,剔除其他组织,保留左心室。剔除心内膜及心外膜,剪碎组织块为 1~2 mm<sup>3</sup>,均匀铺于培养皿,组织块间隔 1~2 mm,加少许 FBS,细胞孵育箱培养约 40 min。加含 20% FBS 的高糖培养液,每两天换液 1 次,72 h 后去除组织块,3~5 d 细胞铺满皿底,进行细胞传代,实验均取用第 2 代细胞。细胞鉴定通过 CD31、CD34 抗体免疫细胞化学染色和Ⅷ因子抗体免疫荧光染色法鉴定(95%以上细胞胞质呈阳性着色),并进行形态学鉴定。

1.3 分组与处理

实验分为 6 组,加入 apelin 至终浓度为 6、20、60、200、600 nmol/L,对照组不加 apelin。96 孔板每孔接种细胞 5000/200 μl,细胞贴壁后进行干预,以 MTT 方法分别取不同时间点(0、12、16、20、24 h)测光密度(OD)值检测增殖情况。6 孔板接种细胞至细胞生长融合后以 200 μl 枪头进行划痕损伤后干预,不同时间点(0、12、16、20、24 h)测划痕之间距离检测迁移修复能力。接种细胞 1×10<sup>4</sup>/200μl 于 Transwell 上室中,下室加入 800 μl 含不同浓度

apelin 的培养液,体外培养 12 h,结晶紫染色计数微孔膜下层细胞,检测细胞迁移能力。96 孔板预铺 50 μl Matrigel 胶 30 min 后每孔接种细胞 1×10<sup>4</sup>/200 μl,药物干预 12 h 后计数血管管腔形成数目,检测细胞体外血管管腔形成能力。实验均做 4 复孔。

1.4 蛋白印迹

实验以 100 mm 培养皿培养细胞至 90%融合后以 apelin 200 nmol/L 浓度刺激,在不同时间点(0、10、30、60、120 min)提取蛋白,测定蛋白浓度。取总蛋白量 30μg 上样于 7.5%的聚丙烯凝胶中,室温下垂直电泳 1h,转移蛋白至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(4℃,2h),含 5%脱脂牛奶的 TBST 封闭 1h,摇床上与相应的一抗孵育(4℃,过夜),充分漂洗。摇床上与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:1500)室温孵育 1 h,充分漂洗,将 ECL 显影液覆盖 PVDF 膜,室温下反应 5 min,置于紫外显影系统曝光 5 min,摄片并进行条带灰度的定量测定,实验重复 3 次。

1.5 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件分析数据,组间比较采用单因素方差分析和多因素方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 增殖能力

使用 MTT 方法检测,发现细胞在不同浓度 apelin 刺激 12、16、20、24 h 时,OD 值高于对照组,这一作用具有时间依赖趋势(P<0.05,见表 1)。

2.2 迁移能力

2.2.1 划痕损伤修复法 划痕损伤后,在 12、16、20、24 h 时观察划痕损伤后细胞迁移情况,结果显示 apelin 刺激后细胞体外损伤修复能力明显增强,随 apelin 浓度的增加作用增强(P<0.05),但培养时间对划痕损伤后细胞迁移情况无明显影响(P>0.05),见表 2。

表 1 MTT 法检测细胞增殖能力 (OD 值)

分组	12h	16h	20h	24h
对照组	0.355 ± 0.016	0.416 ± 0.022	0.534 ± 0.023	0.712 ± 0.032
6 nmol/L	0.375 ± 0.014	0.435 ± 0.023	0.585 ± 0.028 <sup>(1)</sup>	0.777 ± 0.029 <sup>(1)</sup>
20 nmol/L	0.397 ± 0.022	0.474 ± 0.029 <sup>(1)</sup>	0.656 ± 0.032 <sup>(1)</sup>	0.903 ± 0.033 <sup>(1)</sup>
60 nmol/L	0.410 ± 0.026 <sup>(1)</sup>	0.504 ± 0.022 <sup>(1)</sup>	0.715 ± 0.026 <sup>(1)</sup>	0.930 ± 0.023 <sup>(1)</sup>
200 nmol/L	0.423 ± 0.018 <sup>(1)</sup>	0.544 ± 0.013 <sup>(1)</sup>	0.798 ± 0.029 <sup>(1)</sup>	0.977 ± 0.021 <sup>(1)</sup>
600 nmol/L	0.428 ± 0.018 <sup>(1)</sup>	0.560 ± 0.017 <sup>(1)</sup>	0.812 ± 0.029 <sup>(1)</sup>	1.111 ± 0.029 <sup>(1)</sup>

注:与对照组比较,<sup>(1)</sup> P<0.05

表 2 划痕实验检测细胞迁移能力

(μm)

分组	12h	16h	20h	24h
对照组	76.97 ± 6.50	116.03 ± 7.49	156.74 ± 12.05	184.59 ± 13.89
6 nmol/L	91.97 ± 7.44	132.72 ± 3.48 <sup>(1)</sup>	175.95 ± 4.97 <sup>(1)</sup>	209.05 ± 7.75 <sup>(1)</sup>
20 nmol/L	113.09 ± 4.50 <sup>(1)</sup>	148.69 ± 6.63 <sup>(1)</sup>	186.01 ± 8.66 <sup>(1)</sup>	219.81 ± 7.47 <sup>(1)</sup>
60 nmol/L	122.20 ± 6.24 <sup>(1)</sup>	161.60 ± 8.54 <sup>(1)</sup>	193.03 ± 8.80 <sup>(1)</sup>	231.37 ± 7.17 <sup>(1)</sup>
200 nmol/L	142.66 ± 10.19 <sup>(1)</sup>	185.54 ± 8.73 <sup>(1)</sup>	215.78 ± 7.93 <sup>(1)</sup>	270.47 ± 6.95 <sup>(1)</sup>
600 nmol/L	146.93 ± 7.50 <sup>(1)</sup>	194.91 ± 8.26 <sup>(1)</sup>	222.58 ± 8.33 <sup>(1)</sup>	291.98 ± 8.73 <sup>(1)</sup>

注:与对照组比较,<sup>(1)</sup>*P*<0.05

2.2.2 Transwell 法 结晶紫染色后计数 Transwell 微孔膜下层细胞,经 apelin 刺激后体外迁移能力明显强于对照组 (*P*<0.05),而且随 apelin 浓度的增加作用增强(见图 1、表 3)。

2.3 体外毛细血管管腔样结构形成能力 计数血管管腔形成数目结果显示 apelin 刺激后管腔样结构形成能力明显强于对照组,随 apelin 浓度的增加作用越强 (*P*<0.05,见图 2、表 3)。

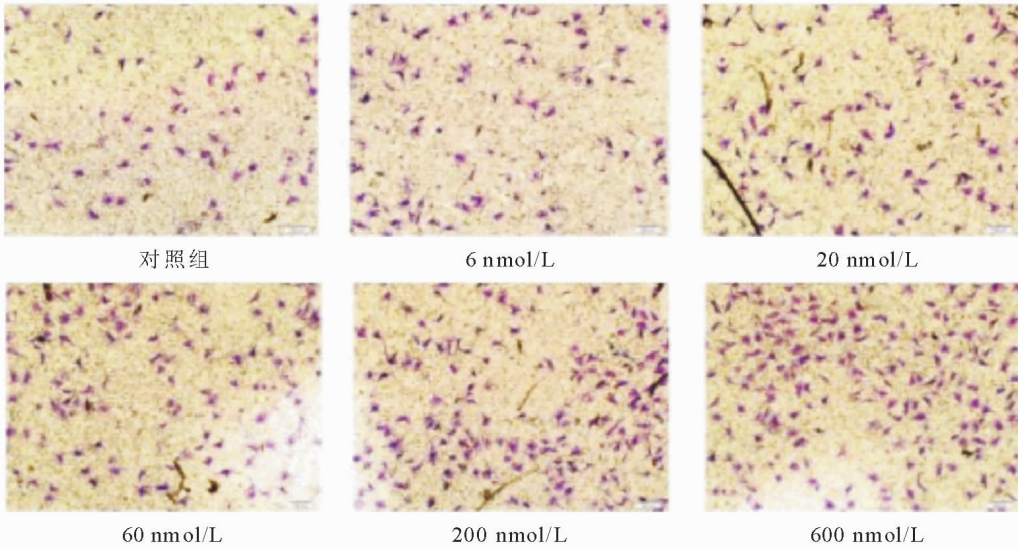


图 1 Transwell 法检测细胞迁移能力(×100)

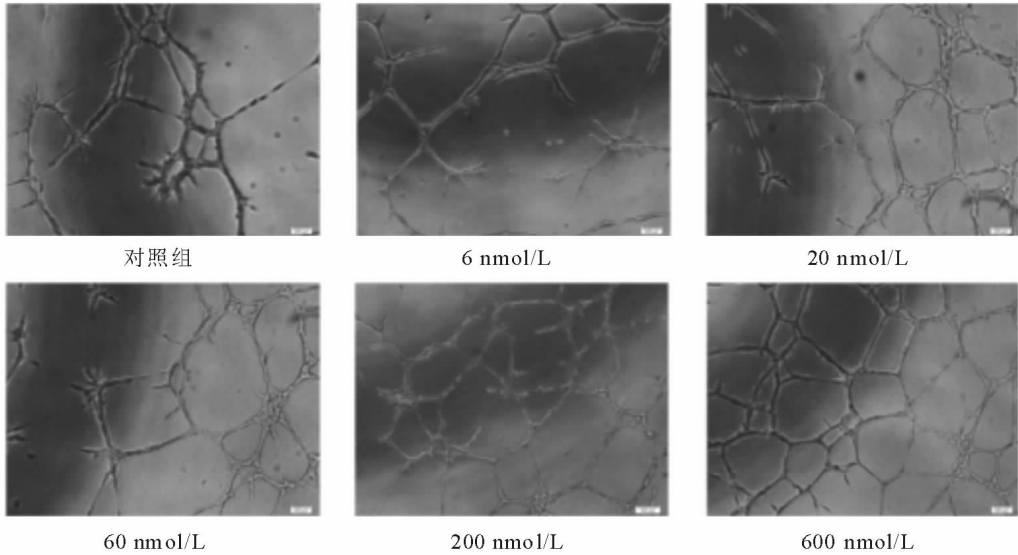


图 2 体外管腔形成实验检测细胞血管生成能力(×100)

表 3 各组 Transwell 法计数细胞数及  
体外管腔样结构形成条数

分组	Transwell(个)	管腔形成(条)
对照组	65.75 ± 5.13	23.67 ± 2.02
6nmol/L	72.66 ± 8.60	31.42 ± 1.52 <sup>(1)</sup>
20nmol/L	96.95 ± 4.85 <sup>(1)</sup>	40.42 ± 1.86 <sup>(1)</sup>
60nmol/L	118.50 ± 6.25 <sup>(1)</sup>	42.76 ± 2.90 <sup>(1)</sup>
200nmol/L	157.31 ± 5.63 <sup>(1)</sup>	60.42 ± 2.51 <sup>(1)</sup>
600nmol/L	167.23 ± 5.12 <sup>(1)</sup>	64.59 ± 3.10 <sup>(1)</sup>

注:与对照组比较, <sup>(1)</sup>  $P<0.05$

2.4 Western-Blot 检测 Akt 和 AMPK 磷酸化程度

检测 Akt、AMPK 蛋白表达差异结果显示,总丝氨酸/苏氨酸激酶(T-Akt)和总腺苷酸活化蛋白激酶(T-AMPK)蛋白在 apelin 刺激后其表达没有变化,而磷酸化的丝氨酸/苏氨酸激酶(p-Akt)和磷酸化的腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMPK)在 apelin 刺激 10 min 后表达显著增加,p-Akt 在 apelin 刺激 30 min 时达到峰值,刺激 60 min 及 120 min 后表达开始下降,而 p-AMPK 表达在 apelin 刺激后 10 min 开始增加直到刺激 120 min 仍增加 ( $P<0.05$ ,见图 3、表 4)。

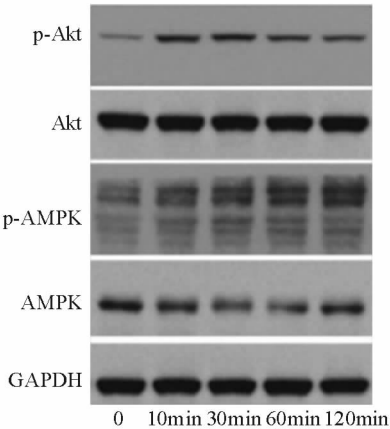


图 3 Apelin 200 nmol/L 时 Akt、AMPK 蛋白表达

表 4 Apelin 200 nmol/L 时 p-Akt、p-AMPK 蛋白表达

分组	p-Akt	p-AMPK
对照组	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07
10 min	5.43 ± 0.33 <sup>(1)</sup>	1.28 ± 0.09 <sup>(1)</sup>
30 min	5.50 ± 0.31 <sup>(1)</sup>	1.82 ± 0.15 <sup>(1)</sup>
60 min	3.66 ± 0.27 <sup>(1)</sup>	2.21 ± 0.20 <sup>(1)</sup>
120 min	3.47 ± 0.30 <sup>(1)</sup>	2.83 ± 0.22 <sup>(1)</sup>

注:与对照组比较, <sup>(1)</sup>  $P<0.05$

3 讨论

Apelin 在心血管系统中有重要的生理作用,鼠静脉应用 apelin 能够显著地降低平均动脉压<sup>[8,9]</sup>。Apelin 作用于下丘脑具有中枢调节血压的作用<sup>[10]</sup>。Cheng 等<sup>[11]</sup>发现,apelin 在扩血管降压的同时可以引起心率加快甚至心动过速,且对心脏有正性肌力作用,可以增加离体灌注鼠心脏的收缩力<sup>[12]</sup>。Apelin 能够降低左心室的前后负荷并能增加心脏的收缩储备而没有心肌肥厚的表现<sup>[13]</sup>。作为一种强有力的利尿肽,apelin 通过抑制精氨酸加压素(AVP)神经元的活动和 AVP 的释放,促进利尿,参与了机体的水平衡调节<sup>[14]</sup>。

Apelin 在心血管系统中有重要的生理学作用它还参与了胚胎的心脏起源和生理病理条件下的血管生成。在对鸡的绒毛尿囊的膜模型系统、光滑爪蟾和青蛙胚胎的研究发现,apelin 可影响内皮、造血干细胞和心血管分化功能,能刺激血管分支发生相当于给予血管内皮生长因子(VEGF),抑制 apelin 能明显减少胚胎发育中血管结构生成<sup>[12, 15, 16]</sup>。Apelin /APJ 被认为是哺乳动物心脏起源的重要发起者,能调节动物的中胚叶和心脏的形成规格<sup>[17]</sup>。在病理条件下视网膜中央静脉闭塞症<sup>[18]</sup>、糖尿病增殖性视网膜病变中,给予 apelin 能促进这些病变组织中的血管再生<sup>[18,19]</sup>。Apelin 还参与了肿瘤血管生成,导致肿瘤快速生长<sup>[20]</sup>。这些实验研究充分证明了 apelin 是有力的血管生成因子,但其发挥作用的信号途径还不清楚。参与血管生成的主要是内皮细胞,其过程包括了内皮祖细胞的分化、内皮细胞的增殖迁移、管腔形成等。

本研究显示不同浓度 apelin 能显著促进大鼠心肌微血管内皮细胞的增殖、迁移和体外管腔形成,促进大鼠心肌微血管内皮细胞形成毛细血管管腔样结构。Apelin 刺激大鼠的心肌微血管内皮细胞后能激活具有活性的 p-Akt 和 p-AMPK,由此我们推测 apelin 或许是通过激活 Akt-AMPK 信号途径,参与大鼠心肌微血管内皮细胞的血管形成。

参 考 文 献

[ 1 ] Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 251(2): 471-476.

[ 2 ] Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, et al. Molecular and

- functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin[J]. J Biol Chem, 2000, 275(28): 21061-21067.
- [3] Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, et al. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1538(2-3): 162-171.
- [4] Devic E, Rizzoti K, Bodin S, et al. Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of Xenopus X-msr and human APJ[J]. Mech Dev, 1999, 84(1-2): 199-203.
- [5] Saint-Geniez M, Argence CB, Knibiehler B, et al. The msr/apj gene encoding the apelin receptor is an early and specific marker of the venous phenotype in the retinal vasculature[J]. Gene Expr Patterns, 2003, 3(4): 467-472.
- [6] Kasai A, Shintani N, Oda M, et al. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 325(2): 395-400.
- [7] Lee DK, Cheng R, Nguyen T, et al. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor[J]. J Neurochem, 2000, 74(1): 34-41.
- [8] Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism[J]. Regul Pept, 2001, 99(2-3): 87-92.
- [9] Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, et al. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo[J]. J Biol Chem, 2004, 279(25): 26274-26279.
- [10] Kagiya S, Fukuhara M, Matsumura K, et al. Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats[J]. Regul Pept, 2005, 125(1-3): 55-59.
- [11] Cheng X, Cheng XS, Pang CC. Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats[J]. Eur J Pharmacol, 2003, 470(3): 171-175.
- [12] Szokodi I, Tavi P, Földes G, et al. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility[J]. Circ Res, 2002, 91(5): 434-440.
- [13] Ashley EA, Powers J, Chen M, et al. The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo[J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(1): 73-82.
- [14] Llorens-Cortes C, Moos F. Opposite potentiality of hypothalamic coexpressed neuropeptides, apelin and vasopressin in maintaining body-fluid homeostasis[J]. Prog Brain Res, 2008, 170: 559-570.
- [15] Ribatti D, Vacca A, Roncali L, et al. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis[J]. Int J Dev Biol, 1996, 40(6): 1189-1197.
- [16] Zhong JC, Huang Y, Yung LM, et al. The novel peptide apelin regulates intrarenal artery tone in diabetic mice[J]. Regul Pept, 2007, 144(1-3): 109-114.
- [17] Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V, et al. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts[J]. Circulation, 2004, 110(11 Suppl 1): II 187- II 193.
- [18] Zhao T, Lu Q, Tao Y, et al. Effects of apelin and vascular endothelial growth factor on central retinal vein occlusion in monkey eyes intravitreally injected with bevacizumab: a preliminary study[J]. Mol Vis, 2011, 17: 1044-1055.
- [19] Tao Y, Lu Q, Jiang YR, et al. Apelin in plasma and vitreous and in fibrovascular retinal membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(8): 4237-4242.
- [20] Sorli SC, Le Gonidec S, Knibiehler, et al. Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis[J]. Oncogene, 2007, 26(55): 7692-7699.

(收稿:2012-03-31 修回:2012-10-09)

(本文编辑:丁媛媛)

## • 敬告读者 •

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道及影响,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》、《中国核心期刊(遴选)数据库》和《中文科技期刊数据库》,并已被中国科学技术信息研究所收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。如作者不同意将文章编入这些数据库,请在投稿时声明,我们将做适当处理。

稿件一经刊用,将一次性支付作者著作权使用稿酬(包括印刷版、光盘版和信息网络传播权等各种传播方式的报酬),并赠当期杂志 2 本。

欢迎广大心血管专业医生、研究生投稿,本刊免收审稿费。

本刊编辑部