

apelin干预骨髓间充质干细胞在缺血缺氧条件下的生存和血管再生

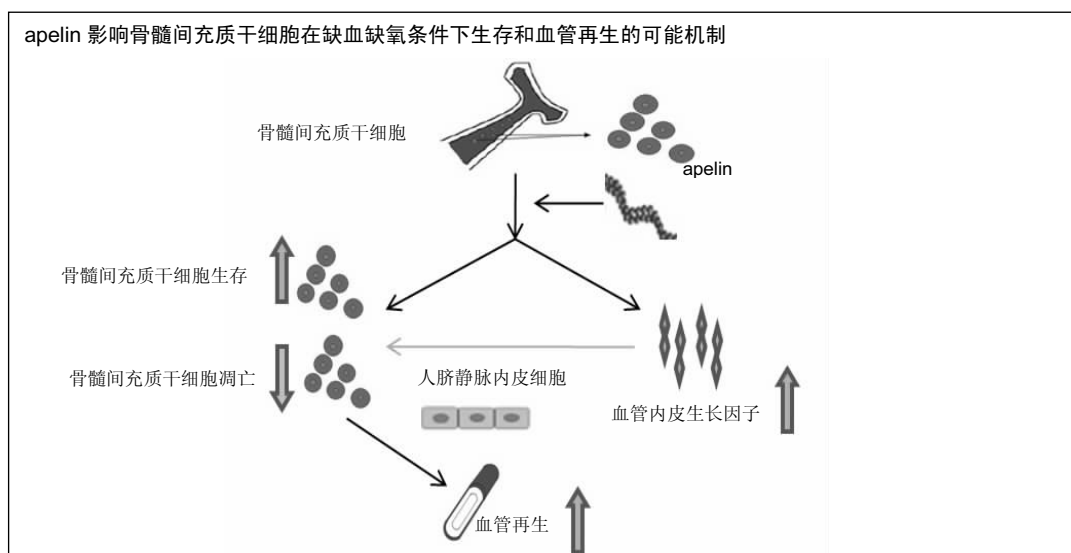
侯靖瑛, 汪 蕾, 钟婷婷, 周长青, 郭天柱, 龙会宝, 伍权华, 郑韶欣, 吴 浩, 王 彤(中山大学孙逸仙纪念医院急诊科, 广东省广州市 510120)

引用本文: 侯靖瑛, 汪蕾, 钟婷婷, 周长青, 郭天柱, 龙会宝, 伍权华, 郑韶欣, 吴浩, 王彤. apelin 干预骨髓间充质干细胞在缺血缺氧条件下的生存和血管再生[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(1):6-12.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.01.002

ORCID: 0000-0003-0492-2216(侯靖瑛)

文章快速阅读:



侯靖瑛, 女, 1985 年生, 安徽省庐江县人, 汉族, 2012 年中山大学孙逸仙纪念医院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事干细胞与心血管疾病方面的研究。

通讯作者: 王彤, 博士, 博士生导师, 教授, 主任医师, 研究员, 中山大学孙逸仙纪念医院急诊科, 广东省广州市 510120

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2017)01-00006-07

稿件接受: 2016-11-28

文题释义:

血管紧张素受体 AT1 相关的受体蛋白内源性配体(putative receptor protein related to the angiotensin receptor AT1 endogenous ligand, apelin): 血管紧张素受体 AT1 相关的受体蛋白(putative receptor protein related to the angiotensin receptor AT1, APJ)是 G 蛋白耦联大家族中的一种跨膜蛋白, apelin 作为 APJ 的内源性配体, 与 APJ 构成 apelin/APJ 系统。apelin 在不同组织的血管内皮细胞中均有表达, 在血管平滑肌细胞和心肌细胞中也有一定的表达, 在参与血管功能的维持和调控中具有重要作用。

血管内皮生长因子: 也称血管通透性因子或促血管素, 最初是由多种培养的肿瘤细胞系中发现的一种新型的生长因子, 它能增加微血管与小静脉血管的通透性。后来发现, 该因子特异性地作用于血管内皮细胞, 并促进血管内皮细胞的增殖, 所以定名为血管内皮生长因子。

摘要

背景: 课题组前期研究发现骨髓间充质干细胞移植能够改善大鼠心肌梗死后心功能, 但整体效果并不太理想, 骨髓间充质干细胞在心肌梗死组织局部的生存力和新生血管密度低下。

目的: 观察血管紧张素受体 AT1 相关的受体蛋白内源性配体(apelin)对骨髓间充质干细胞在缺血缺氧条件下的生存和血管形成能力的影响并探讨相关机制。

方法: 体外培养的骨髓间充质干细胞分为骨髓间充质干细胞组和骨髓间充质干细胞+apelin 组, 分别于正常条件(完全培养基, 体积分数为 20%O₂)和缺血缺氧条件(无血清, 体积分数为 1%O₂)下培养 24 h, 其中骨髓间充质干细胞+apelin 组在培养同时加入 apelin-13(5 μmol/L)刺激骨髓间充质干细胞。MTS 法检测细胞增殖能力, TUNEL 法检测细胞凋亡情况。取细胞培养液分别刺激人脐静脉内皮细胞, 观察骨髓间充质干细胞血管形成能力。Western blot 检测骨髓间充质干细胞中血管内皮生长因子的表达。

结果与结论: 与骨髓间充质干细胞组相比较, 骨髓间充质干细胞+apelin 组正常条件和缺血缺氧条件下增殖能力显著增强, 凋亡减少, 血管管腔样结构明显增多, 血管内皮生长因子的表达明显增高。以上结果提示 apelin 能够增强骨髓间充质干细胞在缺血缺氧环境下的生存和血管形成能力, 此效应可能与其上调血管内皮生长因子的表达相关。

关键词:

干细胞; 骨髓间充质干细胞; 血管紧张素受体 AT1 相关的受体蛋白; 骨髓间充质干细胞; 缺血缺氧; 血管形成; 血管内皮生长因子; 国家自然科学基金

主题词:

骨髓; 间质干细胞; 受体, 血管紧张素, 1 型; 配体; 细胞增殖; 细胞凋亡; 心血管生理过程; 组织工程

Hou Jing-ying, Master, Attending physician, Department of Emergency, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Corresponding author: Wang Tong, M.D., Doctoral supervisor, Professor, Chief physician, Researcher, Department of Emergency, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

基金资助:

国家自然科学基金(81070125) “抗凋亡与促血管生成 miRNA-378 干预 MSCs 治疗心肌梗死后心衰的机制研究”; 国家自然科学基金(81270213) “ANG II/AT1/SMAD/CX43 通路在心肌干细胞提高心肌梗死大鼠心电生理学稳定性和室颤阈值的作用机制研究”; 国家自然科学基金(81670306) “心肌干细胞经 IGF-1/STAT/miR-155 通路下调 AT1R 改善心肌梗死后心电生理稳定性机理研究”; 广东省科技计划项目(2014A020211002) “LncRNA-Bvht/MESP1/N-cadherin 通路调控 MSCs 向心肌细胞定向分化的机制研究”; 广东省科技计划项目(2010B031600032) “抗凋亡与促血管生成 miRNA-378 干预 MSCs 治疗心肌梗死后心衰的机制研究”; 高校基本科研业务费中山大学青年教师重点培育项目(13ykzd16) “PPAR- γ /TGF- β 1/Smad/CX43 通路在 PPAR- γ 干预 MSCs 治疗心肌梗死后心衰的疗效及机制研究”; 广东省医学科研基金(A2016264) “心肌干细胞经由 HIF-1 α /Apelin/APJ/ACE2 通路下调 ANGII 改善心肌梗死大鼠心电生理学稳定性的机制研究”

Influence of apelin on survival and vascularization potential of bone marrow mesenchymal stem cells under hypoxic and ischemic conditions

Hou Jing-ying, Wang Lei, Zhong Ting-ting, Zhou Chang-qing, Guo Tian-zhu, Long Hui-bao, Wu Quan-hua, Zheng Shao-xin, Wu Hao, Wang Tong (Department of Emergency, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Our previous work demonstrated that bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation could improve cardiac function in rats with myocardial infarction. However, the overall efficacy was not satisfactory. The implanted cells presented a low survival rate and newly formed vascular-like structures were sparse in the local infarct tissues.

OBJECTIVE: To observe the influence of putative receptor protein related to the angiotensin receptor AT1 endogenous ligand (apelin) on the survival and vascularization potential of BMSCs in hypoxic and ischemic conditions and to investigate relevant mechanisms.

METHODS: The bone marrow mesenchymal stem cells were obtained and cultured *in vitro* with or without apelin-13 (5 μ mol/L) stimulation under hypoxic-ischemic condition (serum-free medium, 1% O₂) for 24 hours, or cultured under normoxia (complete culture medium, 20% O₂) as a negative control during the whole process. All the experimental groups were further co-cultured with human umbilical vein endothelial cells to promote vascular differentiation for another 6 hours. Cell proliferation, apoptosis, and vascular density were assessed and the expression of vascular endothelial growth factor was detected using western blot assay thereafter.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the BMSCs group, BMSCs+apelin group presented more rapid cell growth, higher proliferation rate, and lower apoptosis percentage under normoxic and hypoxic conditions. In the BMSCs+apelin group, a larger number of vascular branches formed on matrigel under normoxic and hypoxic-ischemic conditions; and the expression of vascular endothelial growth factor was significantly enhanced. These findings suggest that apelin could effectively promote BMSCs survival and vascularization under hypoxic-ischemic conditions *in vitro*. It might function via upregulating the expression of vascular endothelial growth factor.

Subject headings: Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Receptor, Angiotensin, Type 1; Ligands; Cell Proliferation; Apoptosis; Cardiovascular Physiological Processes; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81070125, 81270213, 81670306; the Scientific Plan Projects of Guangdong Province, No. 2014A020211002, 2010B031600032; Fundamental Research Funds for the Universities for Young Teachers Cultivation in Sun Yat-sen University, No. 13ykzd16; the Medical Science Research Fund of Guangdong Province, No. A2016264

Cite this article: Hou JY, Wang L, Zhong TT, Zhou CQ, Guo TZ, Long HB, Wu QH, Zheng SX, Wu H, Wang T. Influence of apelin on survival and vascularization potential of bone marrow mesenchymal stem cells under hypoxic and ischemic conditions. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(1):6-12.

0 引言 Introduction

骨髓间充质干细胞移植已逐渐成为心血管病, 尤其是急性心肌梗死治疗领域中的一个新策略^[1-3]。课题组前期研究亦证实了骨髓间充质干细胞移植能够改善心肌梗死后心力衰竭大鼠的心功能^[4-6], 然而即便如此, 骨髓间充质干细胞移植治疗中仍存在诸多问题, 现阶段治疗效果并不令人满意, 其在局部缺血缺氧心肌组织中的生存和血管形成能力低下是影响其疗效的一个重要因素^[7]。

血管紧张素受体AT1相关的受体蛋白内源性配体 (putative receptor protein related to the angiotensin

receptor AT1 endogenous ligand, apelin)与骨髓间充质干细胞在缺血缺氧环境中的生存、凋亡和分化密切相关。apelin可促进骨髓间充质干细胞在缺血缺氧环境中扩增、生存并抑制其凋亡^[8-9]。现有证据表明apelin不仅促进骨髓间充质干细胞生存, 而且能够诱导一些骨髓和循环血来源的祖细胞进行血管再生^[10-11], 但是apelin对骨髓间充质干细胞在缺血缺氧条件下的血管形成能力具有怎样的影响及中间的分子机制如何目前鲜有相关研究报道。为此, 作者通过体外实验观察apelin对骨髓间充质干细胞在缺血缺氧条件下生存和血管形成能力的影响并探讨相关

机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 于2016年1至6月在中山大学孙逸仙纪念医院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级雄性C57BL/6小鼠10只, 3周龄, 体重10 g, 由中山大学实验动物中心提供, 许可证号SCXK(粤)2014-0011, 用于骨髓间充质干细胞分离、培养、鉴定和血管形成实验。

1.3.2 主要试剂及仪器 原代人脐静脉内皮细胞(广州奕源生物科技有限公司); 胎牛血清、DMEM培养基、双抗、胰蛋白酶、PBS(Hyclone公司); cellTiter96AQ单溶液细胞增殖检测试剂盒、TUNEL试剂盒(美国Promega公司); 6孔细胞培养板、24孔细胞培养板、48孔细胞培养板(美国CORNING公司); 12孔细胞培养板、96孔细胞培养板(美国NEST公司); BCA 法蛋白含量检测试剂盒(Abcam, 美国); PVDF膜、发光液(Millipore, 美国); VEGFA兔多克隆抗体(Abcam, 美国); 一抗及二抗稀释液(Millipore, 美国); 辣根过氧化物酶连接的二抗(Southern Biotech, 美国); *apelin*-13(Abcam, 美国); Matrigel(美国BD公司)。超净工作台、恒温CO₂培养箱、酶标仪(Thermo, 美国); 台式常温高速离心机、微量移液器(Eppendorff, 德国); 电热恒温水槽(上海深信实验仪器有限公司); 高温灭菌器(樱花牌NSS-20, 日本); 缺氧培养箱(Eppendorff/Galaxy[®]48 R)(美国Eppendorff/Galaxy公司); 普通培养箱(HERACELL150i)(美国Thermo Scientific公司); 倒置荧光显微镜(Leica, 德国); 巴氏吸管(美国JET BIOFIL公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 C57BL/6小鼠骨髓间充质干细胞的分离培养 课题组已形成成熟的培养方法^[4-6], 即采用全骨髓法分离培养骨髓间充质干细胞。小鼠脱颈处死, 收集双侧股骨全骨髓, 用注射器反复冲打骨髓液, 制成单细胞悬液。将单细胞悬液离心(1 500 r/min, 10 min), 弃上清, 加入DMEM完全培养基, 吹打散细胞, 计数细胞并以 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于培养瓶, 置37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中培养。利用差异贴壁培养法纯化细胞。于接种后48 h首次换培养液, 以后每3 d更换培养液, 以除去不贴壁的细胞, 细胞长满至80%-90%进行传代: 去除培养液, 加骨髓间充质干细胞消化液(0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA)至刚好盖过瓶底, 在倒置显微镜下观察细胞间隙增大, 细胞变圆并开始脱落, 加入等量完全培养基终止消化, 轻轻吹打瓶底, 将细胞吹打下来, 转移至离心管, 离心(1 500 r/min, 10 min), 去上清, 加入培养基, 吹打散细胞, 按1:2传代, 消化细胞时间为1-3 min, 采用第3代

细胞用于后续实验研究。

1.4.2 细胞分组和缺血缺氧培养 上述细胞分为骨髓间充质干细胞组和骨髓间充质干细胞+*apelin*组(*apelin*-13, 5 μmol/L进行刺激), 分别于正常条件(完全培养基, 体积分数为20% O₂)和缺血缺氧条件下培养24 h。缺血缺氧处理: 缺血缺氧前1 d对细胞株进行传代, 接种第3代细胞于25 cm²培养瓶培养至90%-95%铺满后, 更换为无血清低糖培养基, 置于体积分数为1%O₂、5%CO₂、94%N₂ Galaxy[®]48R培养箱中缺血缺氧培养24 h, 然后收集细胞及培养上清以备后续实验用。

1.4.3 MTS检测细胞增殖 缺血缺氧培养24 h, 消化细胞后吹打散细胞, 计数, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种到96孔板, 每孔100 μL, 即每孔细胞为 1×10^4 个, 待细胞贴壁后, 收集各个时间点的细胞(0, 24, 48, 72 h)加入cellTiter96AQ单溶液细胞增殖检测试剂, 比例为1/10, 即100 μL培养液加入10 μL检测液。孵育4 h后, multiscan MK3酶标仪读板, MTS检测读取A₄₉₀值。

1.4.4 TUNEL法检测细胞凋亡 缺血缺氧培养24 h, 取出爬片24 h后采用TUNEL法检测细胞凋亡情况。培养好的细胞用PBS洗去培养液, 体积分数为4%甲醛溶液4 °C固定25 min; PBS洗涤5 min, 2次; 0.2% Triton X-100室温孵育5 min; PBS洗涤5 min, 2次; 加100 μL Equilibration Buffer室温平衡10 min; 加入50 μL TdT工作液37 °C湿盒避光孵育60 min。在高倍镜下随机选择5个视野进行凋亡细胞计数, 每个实验组计数至少重复3遍。

1.4.5 血管形成实验^[7] 缺血缺氧培养24 h后进行血管形成实验。48孔板中每孔加入200 μL Matrigel 37 °C包被2 h。取 2×10^4 人脐静脉内皮细胞重悬于200 μL条件培养基中(骨髓间充质干细胞培养上清液), 加入到已经包被的48孔板中, 常氧条件下培养6 h, 普通光镜下观察并拍照, 分别在×100倍镜下随机选取5个管型分布均匀的视野, 计数管腔数, 取均值。

1.4.6 Western blot检测骨髓间充质干细胞中血管内皮生长因子表达 缺血缺氧培养24 h后检测血管内皮生长因子表达。按1 mL裂解液加10 μL PMSF(100 mmol/L)和10 μL Cocktail, 摇匀置于冰上, 每管骨髓间充质干细胞加100 μL含PMSF和Cocktail的裂解液, 于冰上裂解30 min, 裂解后4 °C下14 000 r/min离心10 min, 提取上清液中总蛋白。采用BCA法测定各样品蛋白浓度, 常规SDS-PAGE电泳及蛋白电转, 转膜后的PVDF膜, 用5%脱脂奶粉溶液室温封闭1 h或4 °C过夜; TBST洗膜5 min, 3次; 滴加相应的一抗稀释液4 °C过夜或37 °C孵育2 h; TBST洗膜5 min, 3次; 滴加相应二抗稀释液37 °C孵育1 h; TBST洗膜5 min, 3次; 蒸馏水漂洗膜2 min, 弃去液体, 共洗3次; 将总体积为0.125 mL/cm²膜面积的发光液均匀加到膜的表面, 室温孵育5 min, 小心吸去膜表面多余的发光液, 放至暗盒后

显影。

1.5 主要观察指标 各组骨髓间充质干细胞扩增、凋亡和血管形成情况以及血管内皮生长因子的表达。

1.6 统计学分析 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 采用SPSS 16.0 for windows软件处理, 多组间比较采用单因素方差分析, 两独立样本的资料采用Student's 双尾 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 apelin对骨髓间充质干细胞增殖的影响 MTS检测结果显示, 骨髓间充质干细胞+apelin组在缺血缺氧后24, 48, 72 h的 A_{490} 值均高于骨髓间充质干细胞组($P < 0.01$, 图1A), 细胞增殖率明显高于骨髓间充质干细胞组($P < 0.01$, 图1B), 而抑制率则较骨髓间充质干细胞组明显降低

($P < 0.01$), 差异均有显著性意义(图1C), 表明apelin促进骨髓间充质干细胞在缺血缺氧条件下的增殖。

2.2 apelin对骨髓间充质干细胞凋亡的影响 TUNEL检测结果显示, 骨髓间充质干细胞组和骨髓间充质干细胞+apelin组正常情况下的凋亡比例分别为 0.046 ± 0.005 和 0.016 ± 0.004 , 而缺血缺氧条件下的凋亡比例分别为 0.090 ± 0.010 和 0.029 ± 0.003 , 与骨髓间充质干细胞组相比较, 骨髓间充质干细胞+apelin组的凋亡率明显减少, 差异有显著性意义($P < 0.01$, 图2)。

2.3 血管形成能力 人脐静脉内皮细胞分别与各组骨髓间充质干细胞培养液上清共培养后, 在matrigel 中均形成血管腔样结构(图3A)。与骨髓间充质干细胞组相比较, 在正常条件和缺血缺氧条件下, 骨髓间充质干细胞+apelin组对人脐静脉内皮细胞形成血管腔样结构有更加明显的促进

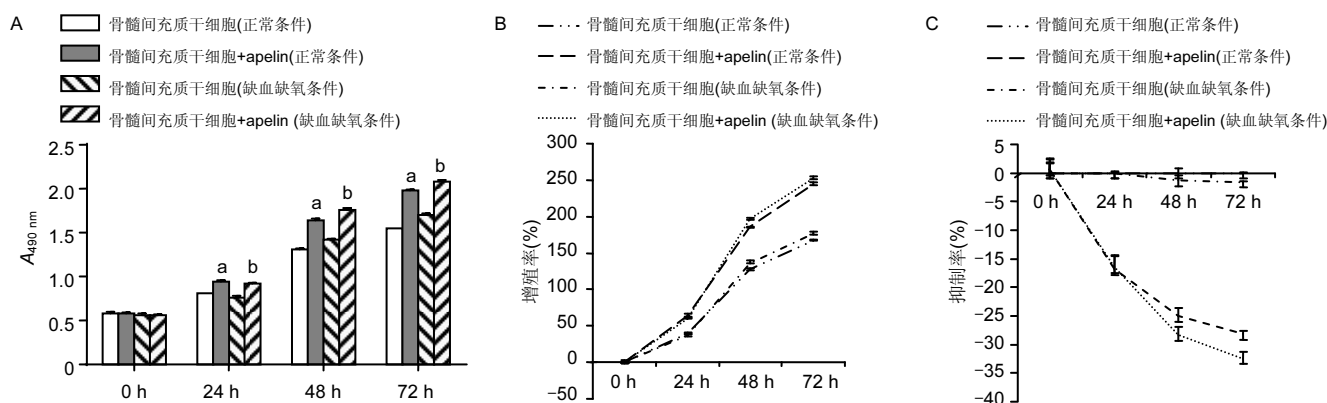


图1 各组骨髓间充质干细胞的增殖情况

Figure 1 Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in different experimental groups

图注: 图中 A 为 A_{490} 值; B 为增殖率曲线; C 为抑制率曲线。骨髓间充质干细胞+apelin 组 A_{490} 值增高, 细胞增殖率增高, 抑制率降低, 与骨髓间充质干细胞组(正常条件)比较, ^a $P < 0.01$, 与骨髓间充质干细胞组(缺血缺氧条件)比较, ^b $P < 0.01$ 。

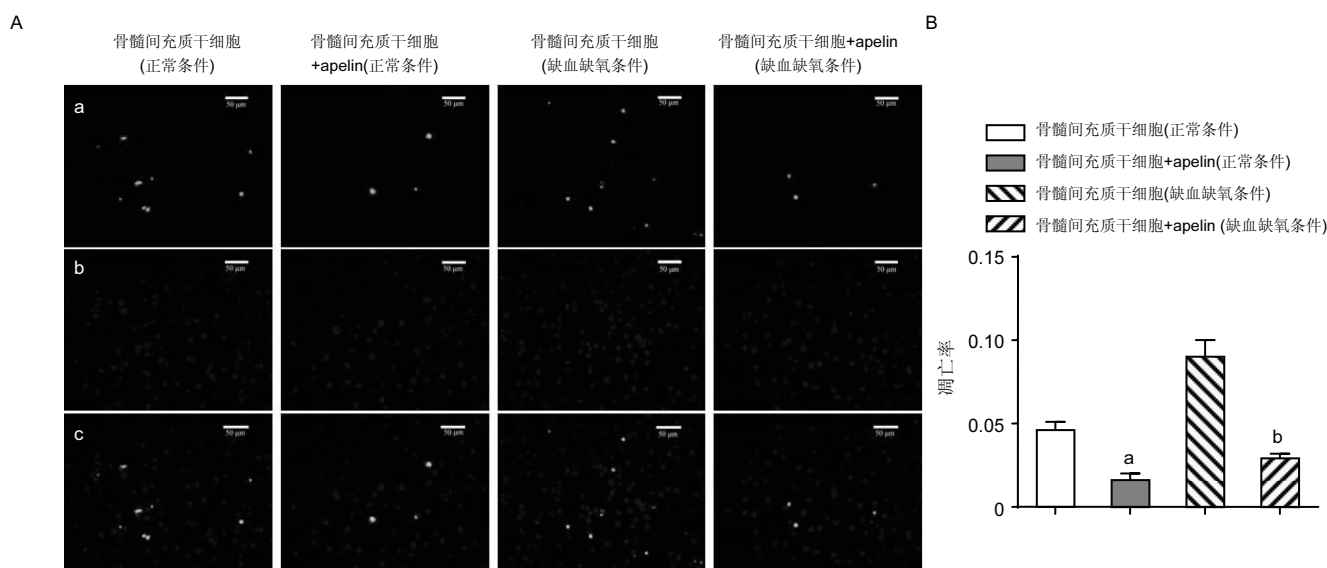


图2 各组骨髓间充质干细胞的凋亡情况

Figure 2 Apoptosis in bone marrow mesenchymal stem cells in different experimental groups

图注: 图中 A 为 TUNEL 法凋亡检测的染色结果($\times 200$), 其中 a 代表 TUNEL 染色, b 代表 DAPI 核定位, c 代表 a 与 b 的重叠图, 着染绿色荧光的为凋亡细胞; B 为各组细胞凋亡率的比较。结果提示骨髓间充质干细胞+apelin 组在正常情况和缺血缺氧条件下的细胞凋亡率较骨髓间充质干细胞组均显著减少。与骨髓间充质干细胞组(正常条件)比较, ^a $P < 0.01$, 与骨髓间充质干细胞组(缺血缺氧条件)比较, ^b $P < 0.01$ 。

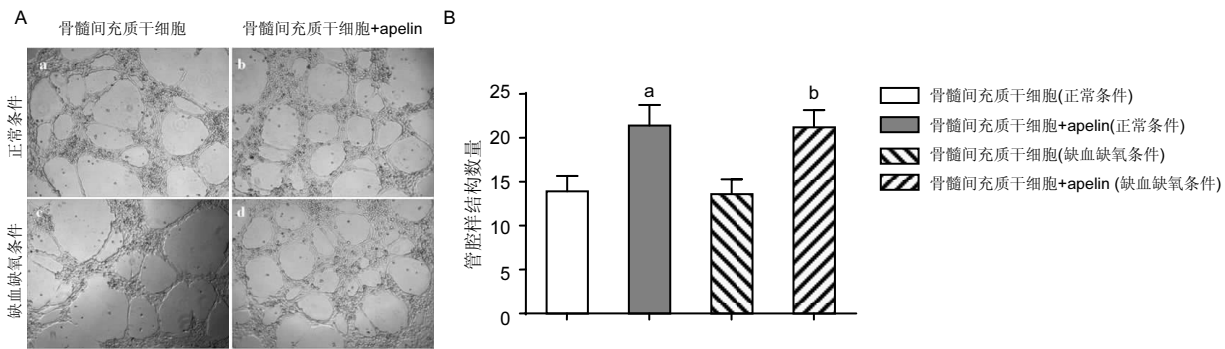


图3 各组骨髓间充质干细胞的血管形成情况

Figure 3 Vascularization potential of bone marrow mesenchymal stem cells in different experimental groups

图注: 图中 A 为各组普通光学显微镜拍照图片($\times 100$), 其中 a 和 c 分别为骨髓间充质干细胞在正常条件和缺血缺氧条件下的血管形成情况, b 和 d 分别为骨髓间充质干细胞+apelin 组在正常条件和缺血缺氧条件下的血管形成情况; B 为各组管腔样结构计数结果, 可见骨髓间充质干细胞+apelin 组管腔样结构数量显著增多。与骨髓间充质干细胞组(正常条件)比较, $^aP < 0.01$, 与骨髓间充质干细胞组(缺血缺氧条件)比较, $^bP < 0.01$ 。

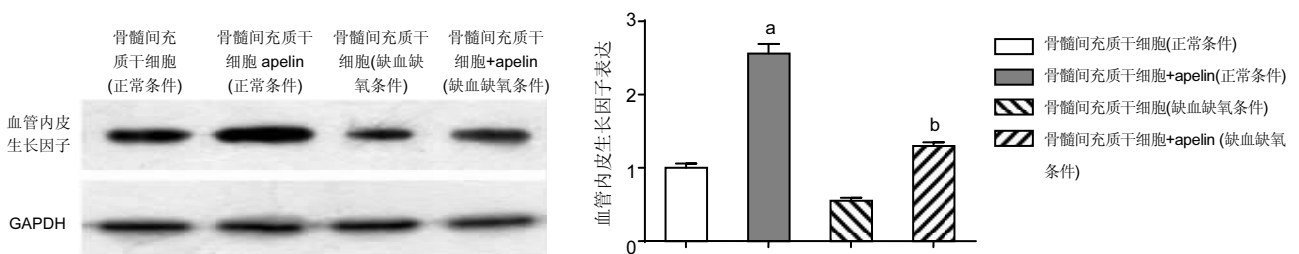


图4 各组骨髓间充质干细胞中血管内皮生长因子表达

Figure 4 Expression of vascular endothelial growth factor in different experimental groups

图注: 骨髓间充质干细胞+apelin 组较骨髓间充质干细胞组血管内皮生长因子表达显著增高, 提示 apelin 促进骨髓间充质干细胞生存与血管再生与上调血管内皮生长因子蛋白表达相关。与骨髓间充质干细胞组(正常条件)比较, $^aP < 0.01$, 与骨髓间充质干细胞组(缺血缺氧条件)比较, $^bP < 0.01$ 。

作用, 其在正常条件和缺血缺氧条件下管腔样结构数量分别为(21.40 ± 2.33)和(21.2 ± 1.96)个, 骨髓间充质干细胞组分别为(13.90 ± 1.76)和(13.60 ± 1.68)个, 前者较后者显著增多($P < 0.01$, 图3B)。

2.4 各组骨髓间充质干细胞中血管内皮生长因子的表达
骨髓间充质干细胞+apelin组血管内皮生长因子的表达在正常条件和缺血缺氧条件均显著高于骨髓间充质干细胞组, 差异有显著性意义($P < 0.01$, 图4)。

3 讨论 Discussion

骨髓间充质干细胞具有来源广泛、取材方便、容易扩增、较强的自我复制能力和多向分化潜能、低免疫原性、易进行基因修饰、能分化为心肌细胞和血管内皮细胞等优势, 且不存在伦理问题, 已成为心血管疾病细胞移植治疗的理想种子细胞^[1, 12-14]。尽管如此, 骨髓间充质干细胞移植的效果仍难以令人满意, 其中一个重要的因素就是细胞移植后的生存力低下, 新生血管密度较低^[7, 15-17]。骨髓间充质干细胞对缺血缺氧十分敏感, 心肌梗死后局部组织缺血缺氧微环境导致移植的骨髓间充质干细胞生存困难并直接影响了其修复作用的发挥。因此, 加强骨髓间充质干细胞对缺血缺氧的耐受性, 促进骨髓间充质干细胞在心肌梗死后缺血缺氧微环境中的生存和血管再生, 对于提高骨髓

间充质干细胞移植治疗的效率具有重要意义。现阶段已有一些策略用于增强骨髓间充质干细胞的生存力和血管再生能力, 但仍达不到理想水平^[18-21], 因此, 迫切需要寻找新的干预因素以进一步促进骨髓间充质干细胞在缺血缺氧状态下的生存和血管再生, 从而显著改善其移植治疗心肌梗死后心力衰竭的疗效。

apelin是血管紧张素受体AT1相关的受体蛋白的内源性配体^[22-23], 其在不同组织的血管内皮细胞中均有表达, 在血管平滑肌细胞和心肌细胞中也有一定的表达, 在参与血管功能维持和调控中具有重要作用^[24-25]。近年来研究发现apelin与骨髓间充质干细胞在缺血缺氧环境中的增殖、生存和凋亡密切相关。体外研究显示apelin促进骨髓间充质干细胞在缺氧条件下的扩增^[8, 26], 其可经浓度依赖的方式减少骨髓间充质干细胞的凋亡; 而体内实验同样表明apelin能够促进移植后的骨髓间充质干细胞在局部缺血组织微环境中的生存^[9, 27]。作者采用apelin在缺血缺氧条件下刺激骨髓间充质干细胞并观察骨髓间充质干细胞的生存情况, 结果亦显示骨髓间充质干细胞的增殖能力提高, 凋亡减少, 表明apelin能够显著提高骨髓间充质干细胞在缺血缺氧条件下的生存和对抗其发生凋亡。

除参与调节骨髓间充质干细胞增殖、生存和凋亡外,

apelin亦被证实与血管再生密切相关^[28-29]。apelin是血管形成中一个重要调节因子,其对心肌梗死后血管形成具有促进作用^[30-31]。不仅如此,apelin也能够促进干细胞进行血管再生,它通过诱导血管祖细胞向梗死区域归巢进而显著增强新生血管形成、减少心肌细胞凋亡和纤维化并改善心功能,且此作用与激活AKT和增强血管内皮生长因子的表达有关^[10]。另有报道在心肌梗死区域灌注apelin后能够通过招募循环血和心脏组织内APJ表达阳性的前体祖细胞在梗死区域聚集并上调血管内皮生长因子的表达促进边缘区新生血管的形成^[11]。以上充分说明了apelin在调节血管形成和促进干细胞血管再生中具有关键作用。作者在体外缺血缺氧条件下观察apelin对骨髓间充质干细胞血管再生能力的影响,结果显示在apelin刺激下骨髓间充质干细胞对人脐静脉内皮细胞形成血管腔样结构有更加明显地促进作用,表明apelin能够在缺血缺氧条件下显著提高骨髓间充质干细胞的血管形成能力。

因apelin能够促进骨髓间充质干细胞的生存和血管形成,故对其作用的具体机制进行了进一步的探索。研究表明血管内皮生长因子在促进骨髓间充质干细胞生存和血管再生中扮演了十分重要的角色,他人的研究和作者的前期研究也均证实了促进血管内皮生长因子的表达能够显著提高骨髓间充质干细胞的生存力和血管形成能力^[32-34]。证据表明apelin调节血管形成和促进干细胞血管再生与其上调血管内皮生长因子的表达密切相关^[10-11, 35],不仅如此,其还能够与血管内皮生长因子产生协同作用诱导骨髓间充质干细胞进行血管再生^[36]。最近有报道采用血管内皮生长因子包被的负载apelin的聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米颗粒转染人骨髓间充质干细胞能够在体外促进其向血管内皮细胞分化和血管形成,并且这些细胞植入肢端缺血动物模型后能够在体内分化为血管内皮细胞和显著促进血管再生^[36]。鉴于此,作者检测了各组骨髓间充质干细胞的血管内皮生长因子的表达,结果显示在正常条件和缺血缺氧条件下,骨髓间充质干细胞+apelin组血管内皮生长因子的蛋白表达水平均较骨髓间充质干细胞组明显增高,说明apelin增强骨髓间充质干细胞的生存和血管再生能力可能与其上调血管内皮生长因子的表达密切相关。

综上所述,apelin能够在体外缺血缺氧环境中促进骨髓间充质干细胞的生存和血管再生,并且此效应可能与其上调血管内皮生长因子的表达相关。此研究为阐明调控骨髓间充质干细胞生存和血管再生的相关分子机制提供了一个新的思路,同时也为进一步寻找提高骨髓间充质干细胞移植治疗疗效的新策略提供了一定的理论和实验依据。

作者贡献: 第一、八、九、十作者参与了课题的设计;第一、三、四、五、六、七作者对课题予以实施,第二、三、八作者对实验方法及结果予以评估。参与人员均受过相应的专业培训,采用盲法评估。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验中对动物处置方法取得中山大学伦理委员会批准,批准号:201411023。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

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,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。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”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] Wen Z, Zheng S, Zhou C, et al. Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2011; 15(5):1032-1043.
- [2] Faiella W, Atoui R. Therapeutic use of stem cells for cardiovascular disease. *Clin Transl Med*. 2016; 5(1):34.
- [3] Safari S, Malekvandfard F, Babashah S, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: A novel potential therapeutic avenue for cardiac regeneration. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2016; 62(7):66-73.
- [4] Wang T, Tang W, Sun S, et al. Intravenous infusion of bone marrow mesenchymal stem cells improves myocardial function in a rat model of myocardial ischemia. *Crit Care Med*. 2007;35(11):2587-2593.
- [5] Wang T, Tang W, Sun S, et al. Mesenchymal stem cells improve outcomes of cardiopulmonary resuscitation in myocardial infarcted rats. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(3):378-384.
- [6] Wang T, Tang W, Sun S, et al. Improved outcomes of cardiopulmonary resuscitation in rats with myocardial infarction treated with allogenic bone marrow mesenchymal stem cells. *Crit Care Med*. 2009;37(3):833-839.
- [7] Xing Y, Hou J, Guo T, et al. microRNA-378 promotes mesenchymal stem cell survival and vascularization under hypoxic-ischemic conditions in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(6):130.
- [8] Liang D, Han D, Fan W, et al. Therapeutic efficacy of apelin on transplanted mesenchymal stem cells in hindlimb ischemic mice via regulation of autophagy. *Sci Rep*. 2016;6: 21914.
- [9] Zeng X, Yu SP, Taylor T, et al. Protective effect of apelin on cultured rat bone marrow mesenchymal stem cells against apoptosis. *Stem Cell Res*. 2012;8(3):357-367.
- [10] Li L, Zeng H, Chen JX. Apelin-13 increases myocardial progenitor cells and improves repair postmyocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; 303(5): H605-618.
- [11] Tempel D, de Boer M, van Deel ED, et al. Apelin enhances cardiac neovascularization after myocardial infarction by recruiting apelin+ circulating cells. *Circ Res*. 2012;111(5): 585-598.

- [12] Hou J, Wang L, Hou J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes mesenchymal stem cells to express connexin43 via the inhibition of $\text{tgf-}\beta\text{1}$ /smads signaling in a rat model of myocardial infarction. *Stem Cell Rev.* 2015; 11(6):885-899.
- [13] Psaltis PJ, Schwarz N, Toledo-Flores D, et al. Cellular therapy for heart failure. *Curr Cardiol Rev.* 2016; 12(3): 195-215.
- [14] Suzuki G. Translational research of adult stem cell therapy. *World J Cardiol.* 2015; 7(11):707-718.
- [15] Narita T, Suzuki K. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *Heart Fail Rev.* 2015; 20(1):53-68.
- [16] Khan I, Ali A, Akhter MA, et al. Preconditioning of mesenchymal stem cells with 2,4-dinitrophenol improves cardiac function in infarcted rats. *Life Sci.* 2016; 162:60-69.
- [17] Xue X, Liu Y, Zhang J, et al. Bcl-xL genetic modification enhanced the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of heart infarction. *Stem Cells Int.* 2015; 2015:176409.
- [18] Park JS, Suryaprakash S, Lao YH, et al. Engineering mesenchymal stem cells for regenerative medicine and drug delivery. *Methods.* 2015; 84:3-16.
- [19] Karantalis V, Suncion-Loescher VY, Bagno L, et al. Synergistic Effects of Combined Cell Therapy for Chronic Ischemic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 66(18): 1990-1999.
- [20] Tanaka Y, Shirasawa B, Takeuchi Y, et al. Autologous preconditioned mesenchymal stem cell sheets improve left ventricular function in a rabbit old myocardial infarction model. *Am J Transl Res.* 2016; 8(5):2222-2233.
- [21] Bader AM, Klose K, Bieback K, et al. Hypoxic preconditioning increases survival and pro-angiogenic capacity of human cord blood mesenchymal stromal cells in vitro. *PLoS One.* 2015; 10(9):e0138477.
- [22] Goidescu CM, Vida-Simiti LA. The Apelin-APJ system in the evolution of heart failure. *Clujul Med.* 2015; 88(1):3-8.
- [23] Dalzell JR, Rocchiccioli JP, Weir RA, et al. The emerging potential of the Apelin-APJ system in heart failure. *J Card Fail.* 2015; 21(6):489-498.
- [24] O'Carroll AM, Lolait SJ, Harris LE, et al. The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. *J Endocrinol.* 2013; 219(1):R13-35.
- [25] Yamaleyeva LM, Shaltout HA, Varagic J. Apelin-13 in blood pressure regulation and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2016; 25(5):396-403.
- [26] Li L, Li L, Zhang Z, et al. Hypoxia promotes bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation through apelin/APJ/autophagy pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2015; 47(5):362-367.
- [27] Mottaghi S, Larijani B, Sharifi AM. Apelin 13: a novel approach to enhance efficacy of hypoxic preconditioned mesenchymal stem cells for cell therapy of diabetes. *Med Hypotheses.* 2012; 79(6):717-718.
- [28] Novakova V, Sandhu GS, Dragomir-Daescu D, et al. Apelinergic system in endothelial cells and its role in angiogenesis in myocardial ischemia. *Vascul Pharmacol.* 2016; 76:1-10.
- [29] Hou X, Zeng H, He X, et al. Sirt3 is essential for apelin-induced angiogenesis in post-myocardial infarction of diabetes. *J Cell Mol Med.* 2015; 19(1):53-61.
- [30] Yang X, Zhu W, Zhang P, et al. Apelin-13 stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in myocardial microvascular endothelial cells. *Mol Med Rep.* 2014; 9(5): 1590-1596.
- [31] Momiyama Y. Association between plasma apelin levels and coronary collateral development in patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis.* 2014; 235(2):349-350.
- [32] Lu F, Zhao X, Wu J, et al. MSCs transfected with hepatocyte growth factor or vascular endothelial growth factor improve cardiac function in the infarcted porcine heart by increasing angiogenesis and reducing fibrosis. *Int J Cardiol.* 2013; 167(6):2524-2532.
- [33] Penna C, Perrelli MG, Karam JP, et al. Pharmacologically active microcarriers influence VEGF-A effects on mesenchymal stem cell survival. *J Cell Mol Med.* 2013; 17(1):192-204.
- [34] Moon HH, Joo MK, Mok H, et al. MSC-based VEGF gene therapy in rat myocardial infarction model using facial amphipathic bile acid-conjugated polyethyleneimine. *Biomaterials.* 2014; 35(5):1744-1754.
- [35] Huang C, Dai C, Gong K, et al. Apelin-13 protects neurovascular unit against ischemic injuries through the effects of vascular endothelial growth factor. *Neuropeptides.* 2016; 60:67-74.
- [36] Park JS, Yang HN, Yi SW, et al. Neoangiogenesis of human mesenchymal stem cells transfected with peptide-loaded and gene-coated PLGA nanoparticles. *Biomaterials.* 2016; 76: 226-237.