

# Apelin 可促进脊髓损伤大鼠运动和脊髓形态的修复

刘卿<sup>1</sup>, 王笑<sup>1</sup>, 谷成旭<sup>1</sup>, 郭绮莹<sup>1</sup>, 李希凯<sup>1</sup>, 张璐萍<sup>1</sup>, 黄飞<sup>1,2</sup>

https://doi.org/10.12307/2022.1018

投稿日期: 2022-01-30

采用日期: 2022-03-12

修回日期: 2022-04-20

在线日期: 2022-05-26

中图分类号:

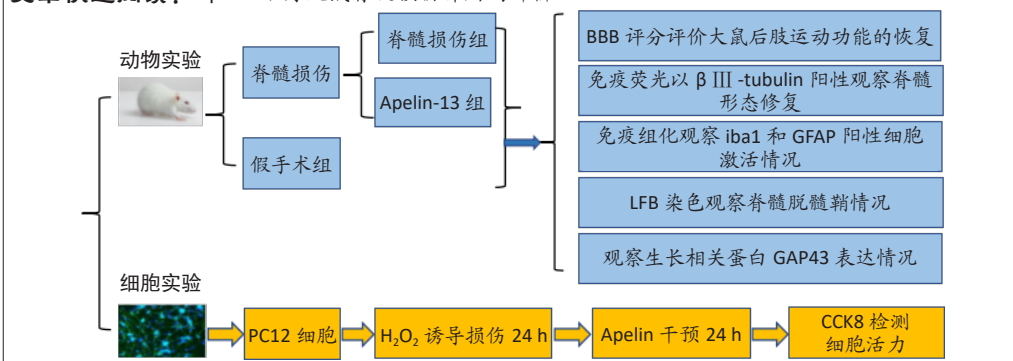
R446; R318; R496

文章编号:

2095-4344(2023)11-01744-06

文献标识码: B

## 文章快速阅读: Apelin 治疗大鼠脊髓损伤作用的评价



### 文题释义:

Apelin: 是G蛋白偶联受体APJ的内源性配体, 在体内具有多种活性形式, 如Apelin-13、Apelin-17和Apelin-36。Apelin/APJ在调节细胞增殖、凋亡、抑制炎症反应和血管重建等方面显示出功能。

生长相关蛋白43(growth associated protein-43, GAP43): 是一种轴突膜蛋白和神经特异性的蛋白, 参与神经细胞生长及突触发育形成和神经细胞再生, 在神经元发育和再生的过程中或神经损伤后表达升高。

### 摘要

背景: 研究表明, Apelin/APJ在调节细胞增殖、凋亡、抑制炎症反应和血管重建等方面显示出功能。因此, 推测Apelin在脊髓损伤中具有类似的功能。

目的: 评价Apelin对大鼠脊髓损伤的治疗作用。

方法: ①体内实验选用大鼠横断脊髓损伤模型, 采用45只雌性SD大鼠, 随机分为假手术组、脊髓损伤组、Apelin-13组。脊髓损伤组和Apelin-13组大鼠采用横断损伤法建立脊髓损伤模型, Apelin-13组每日腹腔注射Apelin-13 0.2 mg/kg, 其余2组每日注射等量生理盐水, 连续治疗14 d。于大鼠造模后第1, 3, 7, 14天采用BBB运动评定量表评定大鼠后肢运动功能; 于第14天收集大鼠脊髓, 用于免疫组化、免疫荧光、RT-PCR等分析。②体外实验利用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导PC12细胞损伤, 加入不同浓度(1, 2, 4 μmol/L)的Apelin-13, CCK8法检测其对诱导损伤的PC12细胞的活力的影响, 探索Apelin的神经保护作用。

结果与结论: ①脊髓损伤后大鼠后肢功能完全丧失, 损伤后3 d开始观察到运动恢复, 但脊髓损伤组各时间点之间差异无显著性意义; Apelin促进了脊髓损伤大鼠的运动功能恢复; ②脊髓损伤导致脊髓局部连续性破坏, Apelin促进了大鼠损伤脊髓形态的修复; ③假手术组仅有少数离子钙接头蛋白分子1(Iba1)阳性细胞, 脊髓损伤导致局部该阳性细胞数量和星形胶质细胞显著增加, Apelin干预减少了局部星形胶质细胞和小胶质细胞激活( $P < 0.05$ ); ④脊髓损伤后严重脱髓鞘, LFB染色阳性面积明显降低, Apelin减少了脊髓损伤带来的脱髓鞘; ⑤脊髓损伤后生长相关蛋白43表达量显著增加( $P < 0.001$ ), 给予Apelin进一步增加了生长相关蛋白43蛋白的表达; ⑥Apelin增加了H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的PC12损伤的细胞活力( $P < 0.05$ )。总之, Apelin促进了脊髓损伤大鼠运动和脊髓形态的修复。

关键词: 脊髓损伤; Apelin; 小胶质细胞; PC12细胞; 星形胶质细胞; 生长相关蛋白43; 脱髓鞘; 炎症

缩略语: 离子钙接头蛋白分子1: ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba1; 胶质纤维酸性蛋白: glial fibrillary acidic protein, GFAP

## Apelin promotes locomotor recovery and spinal cord morphology repair in rats with spinal cord injury

Liu Qing<sup>1</sup>, Wang Xiao<sup>1</sup>, Gu Chengxu<sup>1</sup>, Guo Qixuan<sup>1</sup>, Li Xikai<sup>1</sup>, Zhang Luping<sup>1</sup>, Huang Fei<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Basic Medical University, Yantai 256699, Shandong Province, China; <sup>2</sup>School of Health and Life Sciences, University of Health and Rehabilitation Science, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Liu Qing, Master candidate, Department of Anatomy, Basic Medical University, Yantai 256699, Shandong Province, China

Corresponding author: Huang Fei, MD, Professor, Department of Anatomy, Basic Medical University, Yantai 256699, Shandong Province, China; School of Health and Life Sciences, University of Health and Rehabilitation Science, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Co-corresponding author: Zhang Luping, MD, Associate professor, Department of Anatomy, Basic Medical University, Yantai 256699, Shandong Province, China

<sup>1</sup>滨州医学院基础医学院解剖学教研室, 山东省烟台市 256699; <sup>2</sup>康复大学健康与生命科学学院, 山东省青岛市 266071

第一作者: 刘卿, 女, 1996年生, 山东省泰安市人, 汉族, 滨州医学院在读硕士, 主要从事脊髓损伤修复研究。

通讯作者: 黄飞, 博士, 教授, 滨州医学院基础医学院解剖学教研室, 山东省烟台市 256699; 康复大学健康与生命科学学院, 山东省青岛市 266071

并列通讯作者: 张璐萍, 博士, 副教授, 滨州医学院基础医学院解剖学教研室, 山东省烟台市 256699

https://orcid.org/0000-0002-9759-7784(刘卿)

基金项目: 国家自然科学基金(81870985, 81171142), 项目负责人: 黄飞

引用本文: 刘卿, 王笑, 谷成旭, 郭绮莹, 李希凯, 张璐萍, 黄飞. Apelin可促进脊髓损伤大鼠运动和脊髓形态的修复[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(11):1744-1749.



## Abstract

**BACKGROUND:** Apelin/APJ exhibits functions in regulating cell proliferation, apoptosis, inhibiting inflammatory responses and vascular remodeling. Therefore, it is speculated that Apelin has similar functions in spinal cord injury.

**OBJECTIVE:** To evaluate the effects of Apelin in rats with spinal cord injury.

**METHODS:** A rat model of spinal cord transection was used in an *in vivo* experiment. Forty-five female Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham group, spinal cord injury group and Apelin-13 group. Rats in the latter two groups were submitted to make animal models of spinal cord transection. Rats were given the intraperitoneal injection of 0.2 mg/kg Apelin-13 in the Apelin group or the same amount of normal saline in the other two groups for 14 consecutive days. The motor function of rat's hind limbs was assessed by Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale at the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, and 14<sup>th</sup> days after modeling. The spinal cord tissues were collected at the 14th day after spinal cord injury and used for immunohistochemical, immunofluorescence and RT-PCR analyses. In *in vitro* experiments, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used to induce PC12 cell injury followed by treatment with different concentrations (1, 2, 4 μmol/L) of Apelin-13. We then used cell counting kit-8 to detect the effect of Apelin-13 on the viability of injured PC12 cells, thereby exploring the neuroprotective effect of Apelin.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) After spinal cord injury, the hindlimb function of the rats was completely lost and motor recovery was observed 3 days after injury. However, there was no significant difference in the spinal cord injury group at different time points. Apelin promoted motor function recovery post spinal cord injury. (2) Spinal cord injury disrupted the local continuity of the spinal cord, and Apelin restored the injured morphology induced by spinal cord injury. (3) There were only a few cells positive for ionized calcium binding adapter protein 1 in the sham group. Spinal cord injury led to a sharp increase in the number of local positive cells and astrocytes. Apelin could alleviate the local activation of astrocytes and microglia ( $P < 0.05$ ). (4) Severe demyelination occurred after spinal cord injury and the positive area of Luxol Fast Blue staining was significantly reduced. Apelin could attenuate demyelination caused by spinal cord injury. (5) The expression of growth-related protein 43 was significantly increased after spinal cord injury ( $P < 0.001$ ). Apelin could further promote the expression of growth-related protein 43 ( $P < 0.05$ ). (6) Apelin increased the cell viability of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated PC12 cells *in vitro* ( $P < 0.05$ ). To conclude, Apelin promotes locomotor recovery and spinal cord morphology repair in rats after spinal cord injury.

**Key words:** spinal cord injury; Apelin; microglia; PC12 cell; astrocyte; growth-related protein 43; demyelination; inflammation

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, Nos. 81870985 and 81171142 (to HF)

**How to cite this article:** LIU Q, WANG X, GU CX, GUO QX, LI XK, ZHANG LP, HUANG F. Apelin promotes locomotor recovery and spinal cord morphology repair in rats with spinal cord injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(11):1744-1749.

## 0 引言 Introduction

脊髓损伤是一种严重的神经系统损伤, 给患者带来严重的感觉和运动障碍<sup>[1]</sup>。脊髓损伤通常被划分为原发性和继发性损伤<sup>[2]</sup>, 继发性损伤常伴有小胶质细胞和星形胶质细胞过度激活并分泌促炎因子、神经元死亡、脱髓鞘反应、氧化应激等一系列病理反应<sup>[3]</sup>, 其中炎症反应和神经元死亡是造成不良预后的重要原因。因此, 如何减轻炎症反应、减少神经元死亡是当前研究的重点问题。

脊髓损伤常伴随着小胶质细胞的迅速激活, 小胶质细胞和巨噬细胞均参与炎症反应<sup>[3]</sup>, M1 巨噬细胞的激活常与炎症反应有关, 并促进星形胶质细胞的激活和极化。脊髓损伤常伴随星形胶质细胞迅速激活, 被称为星形胶质细胞增多症, 过度激活的星形胶质细胞会在损伤局部形成胶质瘢痕, 胶质瘢痕的形成阻碍了轴突的生长<sup>[4]</sup>, 从而限制了损伤的修复, 因此, 抑制小胶质细胞和星形胶质细胞的激活是促进脊髓损伤修复的重要途径。

PC12 细胞是常见的研究神经损伤的细胞之一<sup>[5]</sup>, 过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 诱导细胞损伤是目前研究神经损伤常见的细胞模型, 通过该模型可以有效的探讨脊髓损伤的治疗手段。

Apelin 是 G 蛋白偶联受体 APJ 的内源性配体<sup>[6]</sup>, 在体内具有多种活性形式, 如 Apelin-13、Apelin-17 和 Apelin-36。Apelin 的短型, 如 Apelin-13 和 Apelin-17, 比长型发挥更大的作用<sup>[7]</sup>。在 Apelin 对心血管系统疾病和神经退行性疾病的研究中证实了 Apelin 的抗炎及促血管生成作用<sup>[8-9]</sup>。在中枢系统中, 给予 Apelin-13 可以松弛脑血管以增加血液供应, 从而对具有良好侧支循环的缺血性脑卒中患者具有保护作用<sup>[10]</sup>, 这预示着给予 Apelin 可以减轻脑缺血再灌注损伤, 从而为缺血性脑卒中患者提供保护。然而, Apelin 对于脊髓损伤的治疗作用报道较少。

基于上述描述, 该实验旨在评价 Apelin 对脊髓损伤大鼠模型及对体外神经元损伤模型的影响, 为脊髓损伤的治疗

提供新的靶点。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 随机对照动物实验。相同处理不同时间点的比较行单因素方差分析, 两种处理不同时间点的比较行析因设计的方差分析。

**1.2 时间及地点** 实验于 2020 年 5 月至 2021 年 6 月在滨州医学院解剖教研室实验室内完成。

### 1.3 材料

**1.3.1 实验动物** SPF 级雌性 SD 大鼠 45 只, 体质量 220-250 g, 购于济南朋悦实验动物繁育有限公司, 生产许可证号: SCXK (鲁)2019 0003。动物分笼饲养于滨州医学院神经生物学研究所动物房, 在滨州医学院实验动物饲养中心标准条件下饲养, 温度为 (23±2) °C, 相对湿度为 (55±10)%, 控制光照光/暗周期 =12 : 12, 提供自由摄取的水和粮食, 饲养 1 周后进行动物实验。所有动物实验方案均获得滨州医学院实验动物伦理委员会批准。

**1.3.2 实验用主要试剂和仪器** 胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)、离子钙接头蛋白分子 1 (ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba-1)、生长相关蛋白 43 (growth associated protein 43, GAP43) 抗体 (美国 Abcam 公司); anti-β-III-tubulin (Proteintech); Luxol Fast Blue 髓鞘染色液 (Solarbio 公司); SP9000 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒 (20×, 中杉金桥, ZLI-9018), 荧光倒置显微镜 (美国 Echo)。

**1.3.3 药品及细胞** Apelin-13 (0.2 mg/kg, 纯度: 99.80%, MCE 公司); 肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12 细胞 [iCell-r025, 赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司]; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (安研科技)。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 分组、造模及给药** 将 45 只大鼠随机分为 3 个组, 假手术组、脊髓损伤组、Apelin-13 组。脊髓损伤组和 Apelin-13

组大鼠采用横断损伤法建立脊髓损伤模型<sup>[11]</sup>，大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 行麻醉，待角膜反射消失后俯卧固定，以 T<sub>9</sub>-T<sub>11</sub> 节段为中心做 3 cm 切口，切开筋膜并去除棘突上肌肉，蚊式咬骨钳咬除棘突，完全暴露脊髓，7 号刀片在 T<sub>9</sub> 处将脊髓全横断，离断即刻可见大鼠后肢抽动、甩尾，随后下肢及尾部张力消失，足弓反张。假手术组大鼠不损伤脊髓。将大鼠止血后，逐层缝合肌肉、筋膜及皮肤，保暖至大鼠苏醒，膀胱按摩排尿 3 次/d 直至大鼠可自行排尿。Apelin-13 组大鼠在术后 30 min 以 Apelin-13(0.2 mg/kg, 纯度: 99.80%) 进行腹腔注射，脊髓损伤组和假手术组大鼠给予同等剂量的生理盐水，1 次/d，连续治疗 14 d。

#### 组织工程实验动物造模过程中相关问题

造模目的	观察因子 Apelin 对大鼠脊髓损伤后的运动功能及脊髓形态的影响
选择动物的条件	SPF 级健康雌性 SD 大鼠，体质量 220-250 g
模型与所研究疾病的关系	脊髓损伤模型，用于脊髓损伤修复的研究
动物品系	SPF 级雌性 SD 大鼠
造模技术描述	大鼠麻醉，以 T <sub>9</sub> -T <sub>11</sub> 节段为中心做 3 cm 切口，切开筋膜并去除棘突上肌肉，蚊式咬骨钳咬除棘突，完全暴露脊髓，7 号刀片在 T <sub>9</sub> 处将脊髓全横断。止血后，逐层缝合肌肉、筋膜及皮肤，保暖至大鼠苏醒，膀胱按摩排尿 3 次/d 直至大鼠可自行排尿
动物数量及分组方法	将 45 只大鼠随机分为 3 组，假手术组、脊髓损伤组和 Apelin-13 组
造模成功评价指标	脊髓离断即刻可见大鼠后肢抽动、甩尾，随后下肢及尾部张力消失，足弓反张
造模后实验观察指标	① BBB 评分评价大鼠后肢行为功能恢复；② 免疫荧光以 β-III-tubulin 阳性观察纵切脊髓的连续性；③ 免疫组化观察 iba1 和 GFAP 阳性细胞数量以观察小胶质细胞和星形胶质细胞数量；④ 观察生长相关蛋白表达情况
造模后动物处理中的用药	造模后于第 1, 3, 7, 14 天各取 5 只大鼠采用 BBB 评分评价大鼠后肢运动功能，大鼠在给药第 14 天麻醉后进行多聚甲醛灌注取脊髓组织
伦理委员会批准	实验所涉及的动物处理均符合滨州医学院实验动物保护及使用规章制度及国家卫生部医学实验动物管理实施细则，动物实验均在具有统计学意义的前提下尽量减少实验动物数量

1.4.2 免疫荧光染色 利用免疫荧光化学观察各组大鼠纵切面 β-III-tubulin 和横切面 GAP43 的表达。大鼠在损伤后第 14 天麻醉后进行多聚甲醛灌注取材，脊髓组织在 40 g/L 多聚甲醛中 4 °C 过夜，经 15%(24 h)、30%(48 h) 蔗糖 (PBS 配置, pH=7.2-7.4) 脱水，PBS 漂洗 2 次，滤纸充分吸干组织上的水分，将 OCT 挤入包埋盒中，置于干冰上，将合适大小的组织块放置于包埋盒中，超低温冰箱保存，冰冻切片切片 12 μm，待切片晾干后置于超低温冰箱保存，并于 2 周内进行实验。储存于超低温冰箱的切片拿出平衡至室温，PBS 浸泡去除 OCT，免疫组化笔圈出组织，滴加山羊血清封闭液，室温孵育 1-1.5 h，倾去血清封闭液，不洗，直接滴加一抗 anti-β-III-tubulin(1 : 500)，anti-GAP43(1 : 300)，避光湿

盒中 4 °C 孵育过夜，第 2 天在冰箱中取出湿盒，平衡至室温，防止脱片，PBS 洗玻片 3 次，每次 10 min，滴加相应二抗 (1 : 400)，室温避光孵育 2 h，PBS 洗去二抗 3 次，每次 10 min，DAPI 复染，室温孵育 8 min；PBS 洗去 DAPI，洗 3 次，每次 10 min，滴加抗荧光淬灭封片剂，载玻片角上滴加玻璃胶，盖玻片封固，荧光显微镜拍摄。

1.4.3 免疫组化染色 利用免疫组化染色观察小胶质细胞 (iba1) 和星形胶质细胞 (GFAP) 的激活情况。大鼠在损伤第 14 天进行多聚甲醛灌注取材，脊髓组织梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡后进行石蜡包埋，石蜡切片厚度为 4 μm，65 °C 烤片 2 h，常温保存。待进行实验时，二甲苯、梯度乙醇脱蜡至水，利用柠檬酸进行微波修复抗原，随后冷却至室温，免疫组化染色按照中杉金桥 SP-9000 通用 SP 试剂盒说明书执行，将冷却至室温的组织滴加内源性过氧化物酶阻断剂阻断内源性过氧化物酶，室温孵育 10 min，PBS 冲洗 3 min×3 次，山羊血清封闭液封闭 1 h，倾去血清滴加 anti-GFAP(1 : 1 000) 和 anti-iba1(1 : 500)，37 °C 孵育 1 h，洗去一抗，滴加生物素标记山羊抗兔 / 小鼠 IgG 聚合物，室温孵育 15 min，PBS 冲洗 3 min×3 次，滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液，室温孵育 15 min，PBS 冲洗 3 min×3 次，DAB 显色液进行显色，苏木精染液复染，盐酸乙醇分化，冲洗返蓝，脱水、透明、封固后光镜拍摄。

1.4.4 RT-PCR 检测 为了评估神经再生情况，用 RT-PCR 检测神经 GAP43 的表达情况。取出的脊髓组织放入 RNase-free 管中，保存于超低温冰箱，提 RNA 前取出组织，每个样本组织质量为 50-100 mg，所有过程需在冰上进行，防止 RNA 降解。剪碎后加入 Trizol 和高压过的磁珠，匀浆机迅速磨碎组织，拿出放在冰上降温，静置 10 min，离心 12 000 r/min，5 min，吸取上清；加入 200 μL 氯仿，剧烈震荡 15 s，室温静置 10 min 后，低温高速离心机 12 000 r/min，15 min；取上层清液，加入异丙醇沉淀，静置 10 min，离心 12 000 r/min，10 min；弃去液体，加入体积分数 75% 乙醇 (100% 乙醇与 RNase free water 配置)，离心 7 500 r/min，5 min；弃去液体，晾干，根据沉淀量加入 RNase free water，混匀后，紫外分光光度计测量浓度 (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> > 1.7, A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> > 2)；然后使用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche) 将纯化的 RNA 反转录为 cDNA。最后使用 Roche FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 进行上机检测定量 PCR，扩增条件为保温阶段 95 °C 30 s，PCR 阶段 95 °C 5 s，60 °C 30 s，进行 40 次循环，以 GAPDH 作为内参基因。所有引物由湖南爱科瑞生物工程有限公司合成。采用均值法，以 2<sup>-ΔΔCt</sup>(quantity) 作为结果进行统计分析。引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列  
Table 1 | Primer sequences

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')	产物长度 (bp)
GAP43	GGG AGA TGG CTC TGC TAC T	AGA CAG GGT TCA GGT GGG	203
GAPDH	GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC	TGG TGA AGA CGC CAG TGG A	89

1.4.5 LFB 染色 LFB 染色评估脊髓损伤后脱髓鞘情况。石蜡切片脱蜡至体积分数 95% 乙醇, 二甲苯透明; 将玻片泡在髓鞘染色液中 60℃ 烘箱中过夜进行染色; 第 2 天用体积分数 95% 乙醇洗去 LFB 染液, 髓鞘染色分化液分化, 体积分数 75% 乙醇脱色, 以髓鞘清晰为止; 95% 乙醇, 100% 乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封固, 避光保存, 光镜进行拍摄。

1.4.6 运动功能评分 于大鼠脊髓损伤术后第 1, 3, 7, 14 天采用 BBB 运动评定量表评定大鼠后肢运动功能<sup>[12]</sup>, 由 2 名不知晓实验分组的观察者进行, BBB 评分为 0 分 (无运动功能) 至 21 分 (正常运动功能), 取平均值作为每只大鼠运动功能的最终得分。

1.4.7 PC12 细胞培养及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤 取出冻存细胞, 37℃ 快速融化, 移入 15 mL 离心管中, 加入 5 mL 完全培养液稀释冻存液, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入完全培养基 (1640 培养基 + 体积分数 15% FBS + 1% 双抗) 重悬, 1 × 10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup> 5 mL 种于 T<sub>25</sub> 培养瓶中, 每天换液。传至第 3 代时按 CCK8 说明书种至 96 孔板中, 100 μL/孔, 以 30 μmol/L 剂量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤 24 h, 分别加入 1, 2, 4 μmol/L 的 Apelin, 24 h 后加入 CCK8 试剂, 测量吸光度值, 检测细胞活力。

1.5 主要观察指标 ①免疫荧光观察脊髓组织连续性; ②免疫组化观察小胶质细胞和星形胶质细胞的激活情况; ③免疫荧光和 RT-PCR 观察神经生长因子表达; ④ LFB 染色观察髓鞘密度; ⑤ CCK8 检测给药 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤的 PC12 细胞的活力, 观察 Apelin 对损伤细胞活力的影响。

1.6 统计学分析 所有数据用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计学分析及作图, 以  $\bar{x} \pm s$  的方式表示。相同处理不同时间点的比较行单因素方差分析, 两种处理不同时间点的比较行析因设计的方差分析。P < 0.05 说明差异有显著性意义。文章的统计学方法已经滨州医学院生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠 45 只, 分为 3 组, 全部进入结果分析。

2.2 Apelin 对脊髓损伤大鼠后肢运动障碍的影响 由 BBB 评分可知, 假手术组大鼠后肢运动功能正常, 脊髓损伤后大鼠后肢功能完全丧失, 损伤后 3 d 开始观察到运动恢复, 脊髓损伤组各时间点之间差异无显著性意义; 损伤 7, 14 d 与脊髓损伤组比较, Apelin-13 组增强了大鼠后肢运动功能的修复 (P < 0.05, P < 0.01), 见图 1。

2.3 Apelin 促进了大鼠损伤脊髓形态学的修复 通过免疫荧光染色 β III -tubulin 阳性结果显示大鼠脊髓连续性, 在假手术组中, β III -tubulin 阳性细胞密集且富有规律性, 脊髓损伤导致脊髓局部连续性破坏, 出现空洞, 给予 Apelin 干预 14 d 后脊髓形态学修复, 空洞减小, β III -tubulin 阳性细胞较脊髓损伤组更为规律, 见图 2。

2.4 Apelin 干预减少了局部星形胶质细胞和小胶质细胞激活 免疫组化结果显示, 在假手术组仅有少数 iba1 阳性细胞 (小

胶质细胞与巨噬细胞), 脊髓损伤导致局部 iba1 阳性细胞数量显著增加, 而给予 Apelin 干预后大鼠脊髓局部 iba1 阳性细胞显著减少 (P < 0.05)。GFAP 阳性细胞 (星形胶质细胞) 在损伤后同样显著增加, Apelin 干预减少了星形胶质细胞数量 (P < 0.05), 见图 3。

2.5 Apelin 减少了脊髓损伤带来的脱髓鞘 髓鞘染色结果显示, 在假手术组中髓鞘排列紧密、清晰且完整; 脊髓损伤带来了严重的脱髓鞘, LFB 染色阳性面积明显降低; 与脊髓损伤组相比, Apelin-13 组阳性表达面积升高, 空泡明显减少, 且排列更加紧密, 见图 4。

2.6 Apelin 促进了生长相关蛋白的表达 免疫荧光和 RT-PCR 结果显示 GAP43 在假手术组中表达量较低, RT-PCR 结果显示, 脊髓损伤组 GAP43 表达量显著增加 (P < 0.001), 给予 Apelin 进一步增加了 GAP43 的表达, 见图 5。

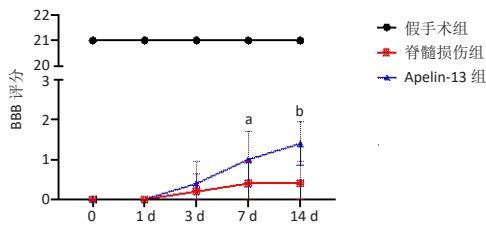
2.7 Apelin 增加了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 PC12 细胞损伤的细胞活力 CCK8 结果显示, 加药干预 24 h 后, 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的损伤组相比, 2 μmol/L 和 4 μmol/L 的 Apelin 干预组的吸光度值增加, 增加了 PC12 细胞的活力 (P < 0.05), 见图 6。

## 3 讨论 Discussion

脊髓损伤是一种严重的会造成运动和感觉障碍的神经系统损伤<sup>[13]</sup>, 通常被分为原发性损伤和继发性损伤<sup>[14]</sup>, 继发性损伤常伴随有小胶质细胞活化、炎症因子浸润<sup>[15]</sup>、胶质瘢痕形成<sup>[16]</sup>、神经元死亡<sup>[17]</sup>、脱髓鞘等病理改变, 现阶段仍没有有效的治疗方式, 因此, 开发一种新的有效的治疗方式尤为重要。

Apelin 是 G 蛋白偶联受体 APJ 的内源性配体, 有研究报道, Apelin 可通过抑制自噬、减轻细胞凋亡和抗炎来减轻创伤性脑损伤<sup>[18-20]</sup>, 还可以减少活性氧的累积, 减少诸如白细胞介素 1、白细胞介素 10 和肿瘤坏死因子 α 等炎症因子的分泌, 减少 Bax/Bcl-2 的比值和末端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 标记末端阳性细胞的数量。另一个实验表明, 经鼻给药 Apelin-13 促进了缺血性脑卒中小鼠的血管生成, 起到了神经保护作用<sup>[21]</sup>, 相似的促血管生成作用在心血管系统和血管内皮系统中也被观察到。Apelin 也被用于神经系统疾病的研究中, 如阿尔茨海默症、帕金森症和烟雾病等<sup>[22-24]</sup>。总之, Apelin/APJ 在调节细胞增殖、凋亡、抑制炎症反应和血管重建等方面显示出功能。因此, 推测 Apelin 在脊髓损伤中具有类似的功能。

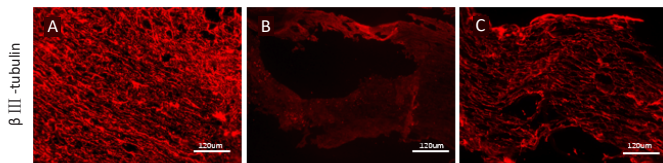
脊髓损伤相关的炎症发生由于小胶质细胞和星形胶质细胞的激活<sup>[25]</sup>, 随后反应性星形胶质细胞增生 (星形胶质细胞活化) 导致胶质细胞瘢痕形成, 造成轴突生长受限<sup>[25]</sup>, 进一步限制了脊髓损伤的修复。小胶质细胞是脊髓损伤后最重要的效应细胞, 在脊髓损伤中发挥了双重作用, M1 型巨噬细胞与多种促炎因子的产生有关, 如白细胞介素 1β 和肿瘤坏死因子 α, M1 表型的激活同时促进了星形胶质细胞的激活和极化, 进一步增加了炎症反应<sup>[26]</sup>。此次实验结果显示, Apelin 降低了小胶质细胞活化标记物 iba1 的阳性面积,



图注: 与脊髓损伤组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 1 | 各组大鼠在不同时间点的 BBB 评分 ( $n=5$ )

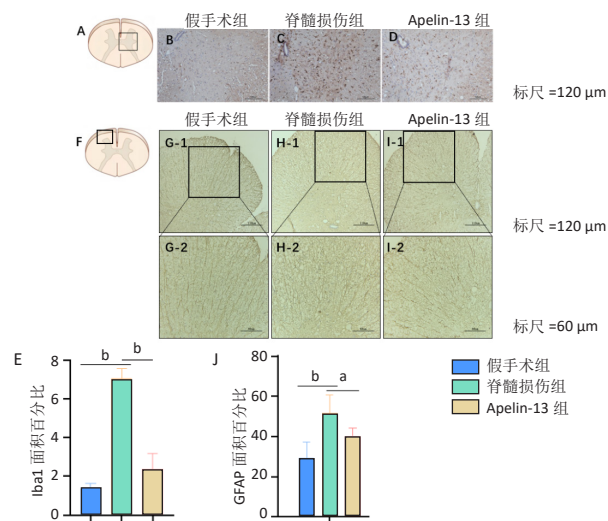
Figure 1 | Basso, Beattie, Bresnahan scale score of rats at different time point ( $n=5$ )



图注: 在假手术组中 (A)  $\beta$  III -tubulin 阳性细胞排列紧密且规律, 脊髓损伤后 14 d (B) 脊髓组织断裂, 出现空洞, Apelin-13 组 (C) 中脊髓损伤造成的空洞变小, 排列较为规律

图 2 | 各组大鼠脊髓组织纵切面  $\beta$  III -tubulin 免疫荧光染色 (标尺 = 120  $\mu$ m)

Figure 2 | Immunofluorescence staining of  $\beta$ III-tubulin of rat spinal cord tissue (scale bar=120  $\mu$ m)

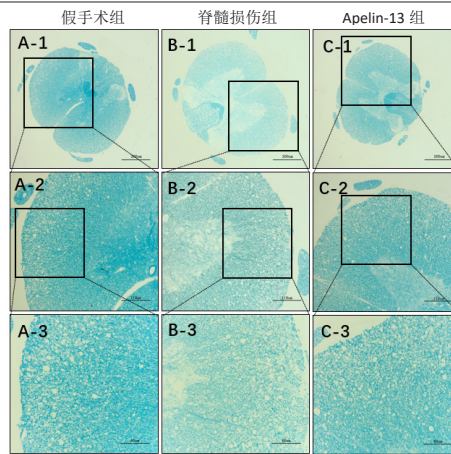


图注: 图 A, F 分别为 Iba1 和 GFAP 免疫组化结果的拍摄位置。假手术组大鼠脊髓内显示出 Iba1 和 GFAP 弱阳性免疫反应 (B, G1-2), 在脊髓损伤后 14 d, Iba1 和 GFAP 的阳性表达数量增加 (C, H1-2), Apelin-13 组脊髓内 Iba1 和 GFAP 阳性表达显著降低 (D, I1-2), 低倍图像 (G1, H1, I1) 中的方框用高倍放大图像 (G2, H2, I2) 表示; E, J 表示 Iba1 和 GFAP 的阳性面积统计。与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.001$ 。Iba1: 离子钙接头蛋白分子 1; GFAP: 胶质纤维酸性蛋白

图 3 | 各组大鼠脊髓中 Iba1 和 GFAP 的免疫组织化学染色 ( $n=5$ )

Figure 3 | Immunohistochemical staining of ionized calcium binding adaptor molecule-1 and glial fibrillary acidic protein in the spinal cord of rats ( $n=5$ )

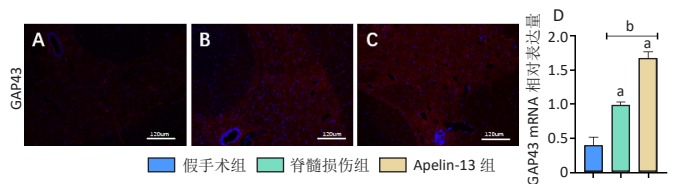
这可能是前期研究结果中促炎因子分泌减少的原因。同时, Apelin 的干预也降低了 GFAP 阳性细胞 (星形胶质细胞) 的面积, 减轻了胶质瘢痕的形成, 这可能是免疫荧光结果中  $\beta$  III -tubulin 阳性面积和连续性增加的原因。



图注: 在假手术组中 (A1-3) 髓鞘排列紧密且规律, 脊髓损伤后 (B1-3) LFB 染色阳性表达强度降低, 空泡化严重, Apelin-13 组 (C1-3) 阳性表达面积较高, 空泡明显减少, 且排列更加紧密。低倍图像中的方框 (图 A1, B1, C1 标尺 = 200  $\mu$ m, A2, B2, C2 标尺 = 110  $\mu$ m) 用高倍放大图像 (A3, B3, C3 标尺 = 60  $\mu$ m) 表示

图 4 | 各组大鼠脊髓组织髓鞘染色

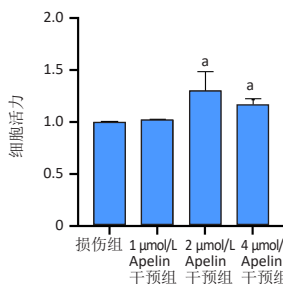
Figure 4 | Luxol Fast Blue staining of rat spinal cord tissue



图注: 免疫荧光染色显示 (标尺 = 120  $\mu$ m), 在假手术组中 (A) GAP43 阳性表达降低, 脊髓损伤后 (B) GAP43 表达量上升, Apelin-13 组 (C) 较损伤组有更高的表达量; RT-PCR (D) 显示了相同的结果, 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.001$ ; 与脊髓损伤组比较, <sup>b</sup> $P < 0.001$ 。GAP43: 生长相关蛋白 43

图 5 | 各组大鼠脊髓组织 GAP43 免疫荧光染色和 RT-PCR 结果 ( $n=5$ )

Figure 5 | Immunofluorescence staining and relative gene expression of growth-related protein 43 in rat spinal cord tissue ( $n=5$ )



图注: 与损伤组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$

图 6 | CCK8 检测不同剂量 Apelin 对  $H_2O_2$  诱导的 PC12 细胞活力的影响

Figure 6 | The effects of Apelin on the cell viability of  $H_2O_2$ -simulated PC12 cells evaluated by cell counting kit-8 assay

脱髓鞘是脊髓损伤的重要病理因素之一<sup>[27]</sup>, 因此, 损伤脊髓的再髓鞘化是调节功能恢复的一个重要因素。脊髓损伤造成了髓鞘的破坏, 轴突脱髓鞘导致信号传导障碍, 是运动和感觉损伤的重要原因。LFB 染色对髓磷脂敏感, 损伤髓鞘呈现不规律的粗空泡化<sup>[28]</sup>, 在此次实验结果中, 髓鞘染色结果显示脊髓损伤降低了髓鞘染色的阳性强度和密度, 导致髓鞘空泡增多, Apelin 治疗促进了损伤轴突的再髓鞘化, 增加 LFB 染色阳性密度和规律性, 减轻了由脊髓损伤带来的脱髓鞘, 促进了传导功能恢复, 为运动功能的恢复奠定了基础。

GAP43 被认为是神经系统有效再生反应的关键组成部分, 通过稳定肌动蛋白来介导神经元突起生长, 在脊髓损伤后表达升高<sup>[29]</sup>, 参与了损伤后神经再生过程<sup>[30-31]</sup>, 在此次实

验结果中,免疫荧光和 RT-PCR 结果显示,在脊髓损伤后 14 d, GAP43 表达量显著升高,给予 Apelin 干预后进一步显著增加了 GAP43 的表达量,提示 Apelin 促进了损伤脊髓的修复。

脊髓损伤后的不良微环境通常会导致局部神经元死亡<sup>[17]</sup>,神经元样 PC12 细胞通常用于研究脊髓损伤引起的神经元损伤<sup>[32]</sup>,在此次研究中,构建了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞损伤模型来研究 Apelin 对 PC12 细胞的神经保护作用,研究结果发现 Apelin 干预 24 h 后,剂量为 2, 4 μmol/L 的 Apelin 促进了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤的 PC12 细胞的细胞活力,起到了神经保护作用,这与 YUNJUN ZOU 等<sup>[33-34]</sup>的研究结果相同,这种保护作用是通过抑制氧化应激和自噬发生的。

综上所述,Apelin 促进了横断脊髓损伤大鼠的后肢运动功能,减少了炎性细胞(小胶质细胞和星形胶质细胞)的激活,促进了损伤脊髓形态学的修复,促进了再髓鞘化和生长相关蛋白的表达,在 PC12 细胞构建的模拟神经元损伤模型中,提高了细胞活力,起到了神经保护作用。实验为 Apelin 治疗脊髓损伤提供了依据,但是,如何应对 Apelin 的短半衰期<sup>[35]</sup>,并探索 Apelin 发挥作用的分子机制,是下一步研究的重点。

**作者贡献:**设计实验为黄飞、张璐萍、刘卿,实验实施为刘卿、王笑,行为学评分实施为谷成旭、郭绮莹,资料收集和数据分析为刘卿、李希凯。

**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。

**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。

**版权转让:**文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:**文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。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。

#### 4 参考文献 References

- YI XM, LI M, CHEN YD, et al. Neuregulin1 impacting bone marrow mesenchymal stem cell migration is conducive to functional recovery following spinal cord injury. *Mol Med Rep.* 2019;20(1):41-48.
- ZHOU X, HE X, REN Y. Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2014;9(20):1787-1795.
- LI C, JIAO G, WU W, et al. Exosomes from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neuronal Apoptosis and Promote Motor Function Recovery via the Wnt/β-catenin Signaling Pathway. *Cell Transplant.* 2019;28(11):1373-1383.
- CODELUPPI S, SVENSSON CI, HEFFERAN MP, et al. The Rheb-mTOR pathway is upregulated in reactive astrocytes of the injured spinal cord. *J Neurosci.* 2009;29(4):1093-1104.
- CHOI SJ, KIM JK, KIM HK, et al. 2,4-Di-tert-butylphenol from sweet potato protects against oxidative stress in PC12 cells and in mice. *J Med Food.* 2013;16(11):977-983.
- TATEMOTO K, HOSOYA M, HABATA Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human apj receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;251(2):471-476.
- LIM R, BARKER G, RILEY C, et al. Apelin is decreased with human preterm and term labor and regulates prolabor mediators in human primary amnion cells. *Reprod Sci.* 2013;20(8):957-967.
- ASHLEY EA, POWERS J, CHEN M, et al. The endogenous peptide apelin potentially improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res.* 2005;65(1):73-82.
- LUO H, HAN L, XU J. Apelin/APJ system: A novel promising target for neurodegenerative diseases. *J Cell Physiol.* 2020;235(2):638-657.
- DUAN J, CUI J, YANG Z, et al. Neuroprotective effect of Apelin 13 on ischemic stroke by activating AMPK/GSK-3β/Nrf2 signaling. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):24.

- OLSON HE, ROONEY GE, GROSS L, et al. Neural stem cell- and schwann cell-loaded biodegradable polymer scaffolds support axonal regeneration in the transected spinal cord. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(7):1797-805.
- CHIO CC, LIN JW, CHANG MW, et al. Therapeutic evaluation of etanercept in a model of traumatic brain injury. *J Neurochem.* 2010;115(4):921-929.
- HE S, WANG Z, LI Y, et al. MicroRNA-92a-3p enhances functional recovery and suppresses apoptosis after spinal cord injury via targeting phosphatase and tensin homolog. *Biosci Rep.* 2020;40(5):BSR20192743.
- HE Y, LI M, WUJISIGULENG, LV B, et al. Zhenbao Pill reduces Treg cell proportion in acute spinal cord injury rats by regulating TUG1/miR-214/HSP27 axis. *Biosci Rep.* 2018;38(6):BSR20180895.
- ZHAN G, SERRANO F, FENIK P, et al. NADPH oxidase mediates hypersomnolence and brain oxidative injury in a murine model of sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(7):921-929.
- ROCHA DN, BRITES P, FONSECA C, et al. Poly(trimethylene carbonate-co-ε-caprolactone) promotes axonal growth. *PLoS One.* 2014;9(2):e88593.
- YIN H, TIAN H, LI Q, et al. Jia-Ji Electro-Acupuncture Improves Locomotor Function With Spinal Cord Injury by Regulation of Autophagy Flux and Inhibition of Necroptosis. *Front Neurosci.* 2021;14:616864.
- XU W, LI T, GAO L, et al. Apelin-13/APJ system attenuates early brain injury via suppression of endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation and oxidative stress in a AMPK-dependent manner after subarachnoid hemorrhage in rats. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):247.
- LIU Y, ZHANG T, WANG Y, et al. Apelin-13 attenuates early brain injury following subarachnoid hemorrhage via suppressing neuronal apoptosis through the GLP-1R/PI3K/Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;513(1):105-111.
- BAO HJ, ZHANG L, HAN WC, et al. Apelin-13 attenuates traumatic brain injury-induced damage by suppressing autophagy. *Neurochem Res.* 2015;40(1):89-97.
- CHEN D, LEE J, GU X, et al. Intranasal delivery of Apelin-13 is neuroprotective and promotes angiogenesis after ischemic stroke in mice. *ASN Neuro.* 2015;7(5):1759091415605114.
- AMINYAVARI S, ZAHMATKESH M, KHODAGHOLI F, et al. Anxiolytic impact of Apelin-13 in a rat model of Alzheimer's disease: Involvement of glucocorticoid receptor and FKBP5. *Peptides.* 2019;118:170102.
- LUO H, XIANG Y, QU X, et al. Apelin-13 Suppresses Neuroinflammation Against Cognitive Deficit in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease Through Activation of BDNF-TrkB Signaling Pathway. *Front Pharmacol.* 2019;10:395.
- ZHU J, DOU S, JIANG Y, et al. Apelin-13 protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease model mice through inhibiting endoplasmic reticulum stress and promoting autophagy. *Brain Res.* 2019;1715:203-212.
- PATIL V, O'CONNELL E, QUINLAN LR, et al. A robust platform for high-throughput screening of therapeutic strategies for acute and chronic spinal cord injury. *iScience.* 2021;24(3):102182.
- LI X, GUO Q, YE Z, et al. PPAR gamma Prevents Neuropathic Pain by Down-Regulating CX3CR1 and Attenuating M1 Activation of Microglia in the Spinal Cord of Rats Using a Sciatic Chronic Constriction Injury Model. *Front Neurosci.* 2021;15:620525.
- HUANG SQ, TANG CL, SUN SQ, et al. Demyelination initiated by oligodendrocyte apoptosis through enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions and Id2 expression after compressed spinal cord injury in rats. *CNS Neurosci Ther.* 2014;20(1):20-31.
- WALKER MR, ZHONG J, WASPE AC, et al. Acute MR-Guided High-Intensity Focused Ultrasound Lesion Assessment Using Diffusion-Weighted Imaging and Histological Analysis. *Front Neurol.* 2019;10:1069.
- ZHANG H, WU F, KONG X, et al. Nerve growth factor improves functional recovery by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced neuronal apoptosis in rats with spinal cord injury. *J Transl Med.* 2014;12:130.
- HUA XY, QIU YQ, WANG M, et al. Enhancement of Contralateral Motor Control Promotes Locomotor Recovery after Unilateral Brain Lesion. *Sci Rep.* 2016;6:18784.
- CHIANG JH, CHENG WS, HOOD L, et al. An epigenetic biomarker panel for glioblastoma multiforme personalized medicine through DNA methylation analysis of human embryonic stem cell-like signature. *OMICS.* 2014;18(5):310-323.
- WU Z, LU Z, OU J, et al. Inflammatory response and oxidative stress attenuated by sulfiredoxin1 in neuronlike cells depends on nuclear factor erythroid2-related factor 2. *Mol Med Rep.* 2020;22(6):4734-4742.
- YUNJUN ZOU YJ, WANG B, FU W, et al. Apelin-13 Protects PC12 Cells from Corticosterone-Induced Apoptosis Through PI3K and ERKs Activation. *Neurochem Res.* 2016;41(7):1635-1644.
- FOROUGH K, KHAKSARI M, RAHMATI M, et al. Apelin-13 Protects PC12 Cells Against Methamphetamine-Induced Oxidative Stress, Autophagy and Apoptosis. *Neurochem Res.* 2019;44(9):2103-2112.
- WALLER JD, MCNEILL EH, ZHONG F, et al. Plasma Apelin Unchanged With Acute Exercise Insulin Sensitization. *J Sports Sci Med.* 2019;18(3):537-543.

(责任编辑: WZH, ZN, ZJP)