

## Apelin-13 促进骨髓间充质干细胞增殖

李兰芳,何璐,吴娣,伍乐乐,黄仕芳,陈临溪

(南华大学药物药理研究所,湖南衡阳 421001)

**摘要:** **目的** 探讨 apelin-13 是否促进骨髓间充质干细胞增殖。**方法** 分离和培养大鼠骨髓间充质干细胞,用不同浓度 apelin-13(0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、1.0  $\mu\text{mol/L}$  和 10.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞 24 h 后,分别用流式细胞术和噻唑蓝比色法(MTT),观察 apelin-13 对骨髓间充质干细胞增殖的影响。**结果** 倒置显微镜下观察到 apelin-13 促进大鼠骨髓间充质干细胞增殖,流式细胞术检测结果表明,apelin-13 刺激后处于 S 期和 G2-M 期的细胞数目显著增加, G0-G1 期的细胞数目显著减少。进一步 MTT 结果表明,apelin-13 处理后大鼠骨髓间充质干细胞增殖显著增加,并呈浓度依赖性。**结论** apelin-13 能促进骨髓间充质干细胞增殖。

**关键词:** apelin-13; APJ; 骨髓间充质干细胞; 增殖

中图分类号:R96 文献标识码:A

## Apelin-13 Promotes Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Proliferation

LI Lanfang, HE Lu, WU Di, et al

(Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract:** **Objective** Apelin is the ligand of G-protein coupled receptor APJ. We aim to explore the effect of apelin-13 on the proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Methods** Rat bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured, and treated by different concentrations of apelin-13(0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 1.0  $\mu\text{mol/L}$ , 10.0  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 hours. Cell proliferation was observed by flow cytometry and 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. **Results** Apelin-13 decreased the proportion of cells in G0/G1 phase while increasing the number of cells in S and G2-M phases. MTT results showed that apelin-13 can significantly stimulate the proliferation of rat BMSCs in a concentration-dependent manner. **Conclusion** We determine that apelin-13 stimulates the proliferation of rat BMSCs.

**Key words:** apelin-13; APJ; BMSCs; proliferation

1993 年 O'Down 等<sup>[1]</sup>首次发现 7 次  $\alpha$  螺旋的跨膜区段组成的 G 蛋白偶联受体 APJ (apelin-angiotensin receptor-like, APJ)。1998 年, Tatemoto 等<sup>[2]</sup>从牛的胃蛋白提取并纯化 APJ 的内源性配体 apelin。Apelin/APJ 系统组织分布广泛,生物学功能多样。研究发现, Apelin 具有舒张血管、降低血压、增强心肌收缩力、调节下丘脑—垂体激素释放、抑制抗利尿激素的释放、调节摄食饮水以及抵抗艾滋病毒侵入细胞等多种生物学效应。Apelin/APJ 系统还参与糖

尿病肾病、大血管并发症、视网膜新生血管的发展,是一种重要的生理调节肽。

Apelin/APJ 系统具有促进细胞增殖的作用。Apelin 在人的成骨细胞大量表达,可刺激成骨细胞的增殖。在鼠的胃上皮细胞含有大量 Apelin,并证明在体外 Apelin 刺激胃上皮细胞的增殖。Apelin 具有血管生成因子的作用,研究发现在视网膜血管内皮细胞中, Apelin-13 和 Apelin-36 呈浓度依赖性促进细胞迁移、增殖和毛细血管形成。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 主要来源于骨髓组织,具有多向分化潜能,增殖迅速、可塑性、可移植性及自我更新能力强。在体外可被诱导分化为成骨细胞、脂肪细胞、血管内皮细胞、

神经元样细胞等,这正是其多向分化潜能特点的体现。文献[3]报道 apelin 能够参与多种细胞增殖的过程,但 apelin 是否能影响骨髓间充质干细胞的增殖尚不清楚,也未见相关报道。本文旨在探究 apelin 是否促进骨髓间充质干细胞的增殖。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂与材料** Sprague-Dawley (SD) 大鼠购自湖南农业大学动物部;Apelin-13 多肽(057-19)购自美国 Phoenix Biotech 公司;培养基、血清、胰酶等均购自美国 Gibco 公司;MTT 购自美国 Sigma 公司;GNP-9080 隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);酶标仪(美国 Labsystem Dragon 公司)。

**1.2 大鼠骨髓间充质干细胞的分离与培养** 将 SD 大鼠浸泡于 75% 医用酒精中 15 min,在无菌条件下切开大鼠组织,取股骨,去除表面软组织,冲出骨髓,接种于培养瓶。用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基,37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培育箱中孵育培养。当培养的原代细胞生长密度达到 70% ~ 80% 以上后,弃去原培养液,用 PBS 洗 2 次,加入 0.05% 胰蛋白酶消化液,放置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 5 min;用巴式吸管吸取培养基反复吹打培养瓶壁,当贴壁的细胞悬浮后,取悬浮液 800 r/min 离心 8 min;弃去上清液,加入培养基,继续培养至细胞重新悬浮时,分瓶进行传代培养。倒置显微镜观察细胞生长状态。

**1.3 流式细胞术检测细胞周期** 将细胞以  $1 \times 10^6$  cells/L 接种于六孔板,直到细胞生长至 70% ~ 80%

状态时,用含有 0.1% 胎牛血清胞培养 24 h(细胞同步化),然后分别加入不同浓度 apelin-13 继续孵育 24 h 后用胰酶消化并收集细胞,PBS 洗两遍,弃上清,加入 1 mL 70% 预冷乙醇中,吹打均匀,4 °C 固定 12 h。PBS 洗涤去乙醇,1 000 r/min,5 min,洗两遍。0.5 mL PBS 重悬细胞,加入 PI 和 RNaseA 至终浓度 50  $\mu$ g/mL,37 °C 温浴 30 min,上流式细胞仪测定细胞周期。

**1.2.3 MTT 比色法测定细胞增殖** 将细胞以  $1 \times 10^6$  cells/L 的浓度接种在 96 孔板中,直到细胞生长至 70% ~ 80% 状态时,再用含有 0.1% 胎牛血清胞培养 24 h(细胞同步化),然后分别加入不同浓度 apelin-13 继续孵育 24 h,每孔加入浓度为 5 g/L 的 MTT 20  $\mu$ L,继续培养 3 h,然后吸出孔内培养液后,加入 DMSO 在 37 °C 中孵育 15 min 以后将其震荡混匀,再经酶联免疫检测仪测定 OD 值(570 nm 处的检测波长)。

**1.2.4 统计学分析** 使用 SPSS 13.0 软件进行统计与分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用单因素方差分析,当  $P < 0.05$  即具有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 倒置显微镜观察 apelin-13 对骨髓间充质干细胞增殖的影响** 分别采用不同浓度 apelin-13 (0.1  $\mu$ mol/L、1.0  $\mu$ mol/L 和 10.0  $\mu$ mol/L) 处理大鼠骨髓间充质干细胞 24 h 后,倒置显微镜下观察细胞增殖,结果提示:apelin-13 显著促大鼠骨髓间充质干细胞的增殖(见图 1)。

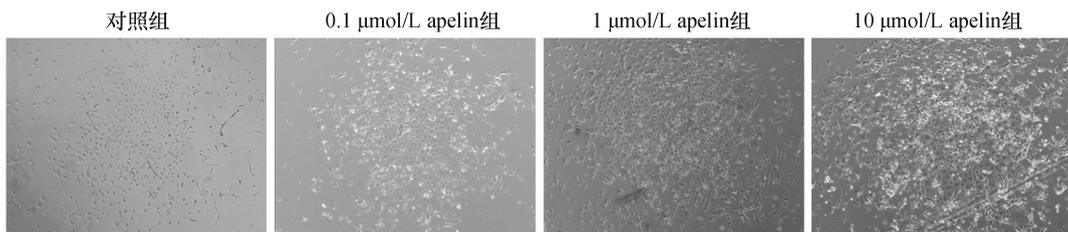


图 1 不同浓度 apelin-13 对大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响

**2.1 流式细胞术检测 apelin-13 对骨髓间充质干细胞增殖的影响** 表 1 表明,与对照组相比较,apelin-13 刺激后处于 S 期和 G<sub>2</sub>-M 期的细胞数目显著增加,G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期的细胞数目显著减少。apelin-13 刺激后增殖指数(PI)显著增加。提示:apelin-13 显著

促进大鼠骨髓间充质干细胞的增殖。

**2.2 MTT 法观察 apelin-13 对大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响** 图 2 表明 apelin-13 (0.1  $\mu$ mol/L、1.0  $\mu$ mol/L 和 10.0  $\mu$ mol/L) 处理大鼠骨髓间充质干细胞后,呈浓度依赖性促进细胞的增殖,且在 apelin-13 浓

表 1 不同浓度 apelin-13 对大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响 (n = 6)

组别	G0 ~ G1 (%)	S (%)	G2 ~ M (%)	PI
对照组	94.60 ± 0.25	2.80 ± 0.12	2.60 ± 0.36	0.054 ± 0.010
0.1 μmol/L Apelin 组	91.20 ± 0.44	6.60 ± 0.28 <sup>a</sup>	3.50 ± 0.55	0.099 ± 0.020 <sup>a</sup>
1.0 μmol/L Apelin 组	87.90 ± 0.36	8.80 ± 0.49 <sup>b</sup>	5.20 ± 0.69	0.141 ± 0.030 <sup>b</sup>
10.0 μmol/L Apelin 组	84.30 ± 0.62	11.90 ± 2.37 <sup>b</sup>	6.90 ± 0.82	0.182 ± 0.060 <sup>b</sup>

与对照组比较, a: P < 0.05, b: P < 0.01

度为 1 μmol/L 时, 与对照组比较差异有显著性, 在 apelin-13 浓度为 10 μmol/L 时促增殖作用最显著。

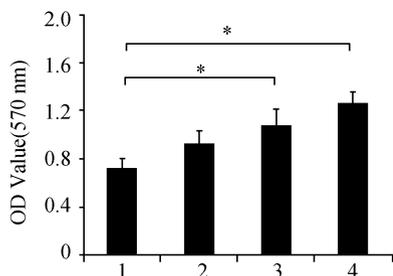


图 2 apelin-13 对大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响 (n = 6) 1: 对照组; 2~4 分别为 0.1、1.0 和 10.0 μmol/L apelin 组. 与对照组比较, \* : P < 0.05

### 3 讨 论

血管紧张素受体样受体 APJ 是一种孤儿 G 蛋白偶联受体<sup>[1]</sup>。Apelin 是 APJ 受体目前已知的唯一内源性配体<sup>[2]</sup>。大量实验表明, apelin 促进血管平滑肌细胞、视网膜血管内皮细胞、胃腺上皮细胞、脂肪细胞、成骨细胞等增殖过程。这些线索提示 apelin 可能参与骨髓间充质干细胞的增殖。

骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能, 具有快速增殖的能力, 可以在体外可被诱导分化为成骨细胞、脂肪细胞、血管内皮细胞、神经细胞等。骨髓间充质干细胞已在退行性及缺损性疾病、心血管疾病、肝移植、肺纤维化等疾病治疗方面取得良好效果。骨髓间充质干细胞的植入物具有修复动物骨缺损的能力。将人骨髓间充质干细胞在体外培养, 并贴附于生物材料上修复大鼠股骨干骨缺损也取得了好的效果。骨髓间充质干细胞在心梗后既能促进新血管的形成又有分化为心肌细胞的能力。

Apelin 促进细胞增殖<sup>[4,5]</sup>, 但 apelin 与骨髓间充质干细胞关系尚不清楚, 本实验采用不同方法初步证明 apelin-13 促进骨髓间充质干细胞增殖。分别给予 apelin-13 (0.1 μmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L) 处理细胞 24 h 后, 用流式细胞术和 MTT 比色法检测到 apelin-13 显

著促进大鼠骨髓间充质干细胞的增殖, 且在 apelin-13 浓度为 1 μmol/L 时, 与对照组比较有显著性差异, 10 μmol/L 时增殖最显著。以上结果表明 apelin-13 呈浓度依赖性促骨髓间充质干细胞的增殖。

骨髓间充质干细胞具有易获得、易培养、低免疫原性、易于外源基因的转入和表达等特性, 且具有自我更新能力, 并能迅速增殖, 在组织器官移植中具有重要的应用价值<sup>[6]</sup>。Apelin 能促进骨髓间充质干细胞的增殖, 因此, 高表达 apelin 的骨髓间充质干细胞或许能作为理想的种子细胞被广泛应用于组织工程、细胞移植、基因治疗及器官移植等领域。但 apelin 是如何影响骨髓间充质干细胞增殖, 其分子机制还有待将来的进一步探讨。

### 参考文献:

- [1] O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11 [J]. Gene, 1993, 136 (1-2): 355-360.
- [2] 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 Comm, 1998, 251 (2): 471-476.
- [3] Li F, Li L, Qin X, et al. Apelin-induced vascular smooth muscle cell proliferation: the regulation of cyclin D1 [J]. Front Biosci, 2008, 13 (5): 3786-3792.
- [4] Li L, Xie F. Jagged-1/Notch3 signaling transduction pathway is involved in apelin-13-induced vascular smooth muscle cells proliferation [J]. Acta Bio Biophys Sin, 2013, 45 (10): 875-881.
- [5] Yang L, Su T, Lv D, et al. ERK1/2 mediates lung adenocarcinoma cell proliferation and autophagy induced by apelin-13 [J]. Acta Bio Biophys Sin, 2014, 46 (2): 100-111.
- [6] Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, et al. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype [J]. Stem Cells, 2005, 23 (3): 392-402.

(此文编辑: 朱雯霞)