

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.13.010

Apelin-13 在改善自体动静脉内瘘血管狭窄中的机制

白桂林, 刘 思[△]

陕西省榆林市第二医院血液净化室, 陕西榆林 719000

摘要:目的 探讨内源性配体 13 (Apelin-13) 在改善自体动静脉内瘘血管狭窄中的机制。方法 将该院收治的 30 例自体动静脉内瘘血管狭窄患者纳入观察组, 30 例自体动静脉内瘘非血管狭窄患者纳入对照组, 检测所有研究对象血清中 Apelin-13、血管紧张素 II (Ang II)、一氧化氮(NO) 水平。在细胞水平, 采用 Apelin-13 干扰序列(shApelin 组) 和无义序列(Scramb 组) 转染人脐静脉内皮细胞(HUVECS); 采用 Ang II、Apelin-13 刺激 HUVECS, 并通过免疫印迹试验检测细胞中磷酸化内皮型一氧化氮合酶(peNOS) 和非磷酸化内皮型一氧化氮合酶(eNOS) 的表达情况。同时检测细胞培养上清液中 NO 水平。结果 观察组血清 Apelin-13 水平明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($t=13.23, P<0.05$); 观察组血清中 Ang II 水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($t=10.45, P<0.05$)。观察组 NO 水平低于对照组, 差异有统计学意义 ($t=9.83, P<0.05$)。shApelin 组的 Apelin-13、peNOS 表达量低于 Scramb 组 ($t=19.82, 83.28, P<0.05$), 但两组 eNOS 表达量差异无统计学意义 ($t=1.52, P>0.05$)。shApelin 组 NO 水平明显高于 Scramb 组, 差异有统计学意义 ($t=10.37, P<0.05$)。免疫印迹试验结果显示, 与未进行 Ang II 刺激的 HUVECS 对比, Ang II 刺激后 HUVECS 的 peNOS 表达量降低 ($t=1.02, P<0.05$), 而 eNOS 表达量差异无统计学意义 ($t=0.60, P>0.05$)。未进行 Ang II 刺激的 HUVECS 与 Ang II 刺激后的 HUVECS 细胞中 NO 的水平比较, 差异有统计学意义 ($t=5.58, P<0.05$); Ang II 刺激后的 HUVECS 中 peNOS 表达量与 Ang II、Apelin-13 同时刺激的 HUVECS 中 peNOS 表达量比较, 差异有统计学意义 ($t=16.04, P<0.05$), 但 eNOS 表达量差异无统计学意义 ($t=1.71, P>0.05$)。Ang II 及 Apelin-13 同时刺激所培养细胞的上清液中 NO 水平低于 Ang II 刺激的 NO 水平 ($t=5.97, P<0.05$)。结论 Apelin-13、Ang II 通过共同刺激和介导 peNOS/NO 的信号通路发挥调控作用, 从而改善血管狭窄情况。

关键词: 内源性配体 13; 自体动静脉内瘘; 血管紧张素 II

中图分类号: R459.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)13-1830-04

Mechanism of Apelin-13 in improvement of autogenous arteriovenous fistula patients with angiostenosisBAI Guilin, LIU Si[△]

Department of Blood Decontamination Center, Yulin Second Hospital, Yulin, Shaanxi 719000, China

Abstract: **Objective** To discuss the mechanism of endogenous ligand 13 (Apelin-13) in improvement of autogenous arteriovenous fistula patients with angiostenosis. **Methods** A total of 30 autogenous arteriovenous fistula patients with angiostenosis were selected as the observation group and 30 autogenous arteriovenous fistula patients without angiostenosis were selected as the control group. The levels of Apelin-13, angiotensin II (Ang II), nitric oxide (NO) were detected. At the cellular level, interference sequence of Apelin-13 (shApelin group) and nonsense sequence (Scramb group) were used to transfect human umbilical vein endothelial cells (HUVECS). At the same time, Ang II and Apelin-13 were used to stimulate the HUVECS, in addition, phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (peNOS) and unphosphorylated endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were detected by Western blot. In the supernatant of cell culture, the levels of NO were detected. **Results** The serum Apelin-13 level in the observation group was significantly lower than that of the control group ($t=13.23, P<0.05$). The level of Ang II in the observation group was significantly higher than that of the control group ($t=10.45, P<0.05$). The NO level of the observation group was significantly lower than that of the control group ($t=9.83, P<0.05$). Apelin-13 and peNOS expression levels of shApelin group were significantly lower than that of Scramb group ($t=19.82$ and $83.28, P<0.05$), but the difference in eNOS expression between the two groups was not statistically significant ($t=1.52, P>0.05$). The NO level in the shApelin group was significantly higher than Scramb group ($t=10.37, P<0.05$). Western blot showed that compared with HUVECS without Ang II stimulation, peNOS expression level of HUVECS had decreased af-

ter Ang II stimulation ($t=0.60, P<0.05$), while eNOS expression level had no statistically significant difference ($t=1.02, P>0.05$). The levels of NO produced by HUVECS without Ang II stimulation had statistically significant difference with HUVECS stimulated by Ang II ($t=5.58, P<0.05$). PeNOS expression produced by HUVECS after stimulation by Ang II had statistically significant difference with HUVECS cells stimulated by Ang II and Apelin-13 at the same time ($t=16.04, P<0.05$), but the difference of eNOS expression was not statistically significant ($t=1.71, P>0.05$). The NO level in the supernatant cultured by Ang II and Apelin-13 at the same time was significantly lower than that of only stimulated by Ang II ($t=5.97, P<0.05$). **Conclusion** By stimulating the peNOS/NO signal pathway together, Apelin-13 and Ang II could effectively improve the vascular stenosis.

Key words: endogenous ligand 13; autogenous arteriovenous fistula stenosis; angiotensin II

自体动静脉内瘘是用于终末期肾病患者血液透析治疗的一种血管通路,在临床中应用广泛^[1]。其在血液透析患者的治疗中具有较好的安全性及实用性,但随着使用时间延长,患者可能发生自体动静脉内瘘相关的并发症,故防止自体动静脉内瘘血管狭窄在终末期肾病治疗中具有重要意义^[2-3]。血管紧张素 II (Ang II) 与血管紧张素 II 1 型受体 (AGTR1) 可以调控血管内皮细胞实际凋亡情况,也会进一步增加血管的损伤,最后因血管内膜增生导致血管狭窄形成^[4-5]。内源性配体 13 (Apelin-13) 对高血压及动脉粥样硬化有较好的治疗效果,与此同时,能够有效舒张肠系膜小动脉且加速血流量恢复^[6]。相关研究发现,Apelin-13 对 Ang II 可能具有拮抗作用,共同维持血压平稳^[7-9]。本研究选择 60 例自体动静脉内瘘患者为研究对象,分析 Apelin-13 水平在自体动静脉内瘘血管狭窄患者中的临床意义及其介导血管舒张的机制,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 1 月至 2018 年 1 月于本院接受血液透析治疗的 60 例患者为研究对象,将自体动静脉内瘘血管狭窄的 30 例患者纳入观察组,其中男 16 例、女 14 例,平均 (42.6 ± 3.5) 岁;将自体动静脉内瘘非血管狭窄患者 30 例纳入对照组,其中男 17 例、女 13 例,平均 (42.4 ± 3.7) 岁。纳入标准: (1) 终末期肾病,且采取规律血液透析治疗患者; (2) 意识清楚,能够正常交流; (3) 采取桡动脉-头静脉方式进行端侧吻合; (4) 中度内瘘狭窄,即血液透析流量 < 150 mL/min,狭窄血管与邻近血管直径比值为 $0.5 \sim 0.7$ 。排除标准: (1) 恶性肿瘤; (2) 严重感染; (3) 未检出原因的发热; (4) 既往激素治疗或采取免疫抑制剂治疗时间 ≥ 12 个月。本研究经过本院伦理委员会批准后实施。两组患者年龄、性别构成等一般资料比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 生化指标检测 采集患者的外周静脉血约 2 mL 于抗凝管内,分离血清,检测血清中一氧化氮

(NO) 水平,应用 ELISA 法检测血清中 Apelin-13、Ang II 水平。

1.2.2 细胞培养 人脐静脉内皮细胞 (HUVECS) 购自中国科学院细胞库,以浓度 10% 的胎牛血清 + 1640 培养液在 37°C 及 5% CO_2 培养箱中进行培养。Ang II 刺激方案: 在孔板上接种细胞,处于上述环境中进行培养约 1 d,加入浓度为 1 nmol/L 的 Ang II 进行刺激,保证在培养箱中培养 1 d。Ang II 及 Apelin-13 共同刺激的方案: 同样在孔板上接种细胞,和单独刺激的环境相同进行为期 1 d 的培养,加入浓度为 1 nmol/L 的 Ang II 及 1 nmol/L 的 Apelin-13 共同刺激,并置于培养箱内培养 1 d。

1.2.3 质粒转染 参照 Genbank 数据库中 Apelin 相关序列,设计出合成的干扰序列 shApelin 和无义序列 Scramb 两个序列,见表 1,且在 pLKO.1 的质粒之上进行转染,在转染的前 1 d,接种约 5×10^5 个细胞,然后转至 6 孔细胞培养板上接受培养,在转染的 0.5 h 前需换用没有血清的 DMEM 培养液再予以培养。将 200 μL 无血清的 DMEM 培养液、3 μg 质粒、9 μL ViaFectTM 转染试剂充分混合制作成转染液,放在室温环境下静置 10 min 左右。再将这些转染液加入 6 孔板内,注意轻摇混匀再放置到细胞培养箱内持续培养约 9 h,待转染完毕之后再换用浓度 10% 的胎牛血清所制的 DMEM 培养液中进行继续培养,时间为 1 d,最后测得两组序列,即 Scramb 组与 shApelin 组。

1.2.4 免疫印迹试验 使用免疫印迹试验检测所培养细胞中的磷酸化内皮型一氧化氮合酶 (peNOS)、非磷酸化内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 表达情况。选择二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白水平测定试剂盒对总蛋白水平进行测定。首先选择 40 μg 蛋白完成聚丙烯酰胺凝胶电泳试验。注意每 4 μL 蛋白质加入约 1 μL $5 \times$ SDS-PAGE 的上样缓冲液,充分混匀后,将蛋白放在 100°C 水浴中进行变性,维持 5 min 左右,然后冷却至室温后再上样电泳,当蓝色的染料到达了胶底部才可以停止电泳试验。选择冰水浴的时候使用 100 mA 的恒流进行转膜约 2 h,实现转膜后,采用聚偏二氟乙烯

膜以浓度 5% 脱脂奶粉在室温环境下封闭约 2 h; 将抗 Apelin、抗 peNOS、抗 eNOS、抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 置于 4 ℃ 环境下过夜进行孵育。洗涤 3 次后, 加入经辣根过氧化物酶进行标记后的山羊抗兔二

抗, 再置于室温环境下孵育约 1 h; 进行 3 次洗涤后, 加入 ECL 显色液且在凝胶成像仪之下进行有效曝光的拍摄。以 Image J 进行灰度值的测定, 注意将对照组灰度值调整到 1。

表 1 两个序列的设计

名称	序列
shApelin	F:CCG GCC TGG CTG TAG TTT GGA TGA TCT CGA GAT CAT CCA AAC TAC AGC CAG GTT TTT T R:AAA AAA CCT GGC TGT AGT TTG GAT GAT CTC GAG ATC ATC CAA ACT ACA GCC AGG
Scramb	F:CCG GAG TCC TTG TGA TGT TGG ATG CCT CGA GGC ATC CAA CAT CAC AAG GAC TTT TTT T R:AAA AAA AGT CCT TGT GAT GTT GGA TGC CTC GAG GCA TCC AAC ATC ACA AGG ACT

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件对数据进行分析, 呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 观察组与对照组血清 Apelin-13 水平比较 观察组血清 Apelin-13 水平为 (53.10 ± 5.75) pg/mL, 明显低于对照组的 (80.44 ± 9.75) pg/mL, 差异有统计学意义 ($t = 13.23, P < 0.05$)。

2.2 观察组与对照组血清中 Ang II、NO 水平比较 结果显示, 观察组和对照组血清中 Ang II 水平分别为 (173.52 ± 11.79) pg/mL 和 (146.55 ± 7.81) pg/mL, 差异有统计学意义 ($t = 10.45, P < 0.05$)。观察组与对照组 NO 水平分别为 (54.91 ± 5.44) μ mol/mL 和 (72.79 ± 8.35) μ mol/mL, 差异有统计学意义 ($t = 9.83, P < 0.05$)。

2.3 Scramb 组与 shApelin 组 Apelin-13、peNOS、eNOS 表达量、NO 水平比较 shApelin 组的 Apelin-13、peNOS 表达量低于 Scramb 组 ($t = 19.82, 83.28, P < 0.05$), 但两组 eNOS 表达量差异无统计学意义 ($t = 1.52, P > 0.05$)。shApelin 组 NO 水平高于 Scramb 组, 差异有统计学意义 ($t = 10.37, P < 0.05$)。见表 2。

表 2 Scramb 组与 shApelin 组 Apelin-13、peNOS、eNOS 表达量、NO 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Apelin-13 ($\times 10^3$)	peNOS ($\times 10^3$)	eNOS ($\times 10^3$)	NO (μ mol/mL)
Scramb 组	0.98 $\pm$ 0.16	1.05 $\pm$ 0.02	0.95 $\pm$ 0.03	17.11 $\pm$ 3.75
shApelin 组	0.40 $\pm$ 0.01	0.37 $\pm$ 0.04	0.94 $\pm$ 0.02	29.56 $\pm$ 5.40
t	19.82	83.28	1.52	10.37
P	<0.001	<0.001	0.13	<0.001

2.4 Ang II 刺激对 HUVECS 的 peNOS、eNOS 表达量及 NO 水平的影响 免疫印迹试验结果显示, 与未进行 Ang II 刺激的 HUVECS 对比, Ang II 刺激后

HUVECS 的 peNOS 表达量降低 ($t = 1.02, P < 0.05$), 而 eNOS 表达量差异无统计学意义 ($t = 0.60, P > 0.05$)。未进行 Ang II 刺激的 HUVECS 与 Ang II 刺激后的 HUVECS 细胞中 NO 水平分别为 (29.87 ± 6.27) μ mol/mL 和 (22.59 ± 3.44) μ mol/mL, 差异有统计学意义 ($t = 5.58, P < 0.05$)。

2.5 Apelin-13 对 Ang II 的拮抗作用 Ang II 刺激后的 HUVECS 细胞中 peNOS 表达量为 $(0.98 \pm 0.06) \times 10^3$, Ang II、Apelin-13 同时刺激的 HUVECS 细胞中 peNOS 表达量为 $(1.25 \pm 0.07) \times 10^3$, 差异有统计学意义 ($t = 16.04, P < 0.05$), 但 eNOS 表达量差异无统计学意义 [$(1.01 \pm 0.04) \times 10^3$ vs. $(1.03 \pm 0.05) \times 10^3, t = 1.71, P > 0.05$]。Ang II、Apelin-13 同时刺激的 HUVECS 细胞所培养的上清液中 NO 水平为 (21.46 ± 6.38) μ mol/mL, 低于 Ang II 刺激的 NO 水平 [(29.12 ± 2.95) μ mol/mL], 差异有统计学意义 ($t = 5.97, P < 0.05$)。

3 讨 论

自体动静脉内瘘是指吻合动脉及邻近的一些静脉所组成的血管通道, 目前, 自体动静脉内瘘已作为终末期肾脏病患者接受维持性血液透析治疗时的首选血管通路, 常用的自体动静脉内瘘为自体桡动脉与颈静脉的吻合^[10]。临床研究显示, 随着自体动静脉内瘘血液透析患者生存期的持续延长, 自体动静脉内瘘发生血管狭窄概率将增加, 对血液透析治疗效果及后期生活质量均产生较大影响, 因此, 对自体动静脉内瘘患者术前、术后同时给予有效干预措施, 对自体动静脉内瘘血管狭窄情况的预防有重要影响意义^[11-13]。Apelin 是 APLN 基因编码的包含 77 个氨基酸的前体蛋白, 包括 Apelin-13、Apelin-17、Apelin-36, 其中 Apelin-13 呈现的活性较高^[7,14-15]。有研究显示, Apelin 是 AGTR1 相关蛋白 (APJ) 重要内源配体, Apelin 主要表达于机体的心内膜及血管内皮细胞中, 而 APJ 主要定位在内皮、平滑肌细胞及心肌细胞^[6]。另外, Apelin、APJ 进行结合以后会参与多个生理反应过

程,如血管收缩、动脉粥样硬化、冠状动脉狭窄等^[16-18]。本研究对自体动静脉内瘘血管狭窄患者及未发生血管狭窄患者的血清进行检测,结果显示,观察组患者 Apelin-13 水平低于对照组($P<0.05$),说明 Apelin-13 可能对动静脉内瘘血管狭窄存在一定缓解作用。

Ang II 是一种重要的活性肽,参与血管张力调节及血管内皮结构生成等过程^[19-20]。有报道显示,Ang II 通过与 AGTR1 受体结合,诱导机体内皮细胞开始凋亡,使血管损伤加重、内膜增生,且最终导致发生血管狭窄^[21]。eNOS 为血管内皮细胞生成 NO 过程中一种重要的合成酶,其中 NO 能够保持血管张力稳定,使血管平滑肌产生一定抗炎及抗增殖作用^[20-21]。本研究使用 Ang II 对 HUVECS 进行有效刺激后,发现 peNOS 表达量及 NO 水平均降低。本研究采用 Apelin 干扰序列转染 HUVECS 后,也发现 peNOS 表达量及 NO 水平均降低,这提示 Apelin 有可能对 peNOS/NO 的信号通路产生正向调控效果。

本研究对 Apelin-13 在血液透析内瘘狭窄患者中的具体作用和机制进行了研究,但研究仍有一定不足:(1)研究只选用了存在中度自体动静脉内瘘血管狭窄的患者作为研究对象,并没有研究其他内瘘狭窄患者;(2)研究的细胞选择比较单一;(3)只在患者体外细胞水平方面研究了 Apelin-13、Ang II 具备的拮抗作用。因此,还需要后续进行深入研究,采用动物模型完成实证分析。

参考文献

[1] 顾雪梅,刘磊. Apelin-13 在血液透析内瘘狭窄患者中的表达及意义[J]. 河北医药,2019,41(18):2725-2729.

[2] 余康,张宪生,尹杰,等. 自体动静脉内瘘真性动脉瘤的个体化治疗[J]. 中国微创外科杂志,2018,18(8):715-720.

[3] 丁霞娟,余文,尹娜,等. 超声引导经皮腔内血管成形术治疗血液透析患者自体动静脉内瘘狭窄[J]. 中国医学影像学杂志,2019,27(11):862-865.

[4] 陈丽华,王秀丽,陈静,等. 血管紧张素 II 和血管紧张素 1-7 及其受体在多囊卵巢综合征患者中的表达研究[J]. 中国全科医学,2017,20(24):2978-2983.

[5] 王嵩,管珊珊,万永凤,等. 血管紧张素转换酶与抑制肽结合模式的分子动力学研究[J]. 高等学校化学学报,2017,38(7):1216-1222.

[6] 李小荣,郑旭辉,李新立,等. 血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂在心衰治疗中的研究进展及展望[J]. 中国循环杂志,2018,33(2):195-198.

[7] 金延飞,范静静,宋德文,等. 脑得康口服液对脑卒中后昏迷患者 8-iso-PGF2 α 及 Apelin-13 蛋白水平的影响[J]. 中

国老年学杂志,2018,38(12):2844-2847.

[8] 徐巧绒,徐家萍,郭爱红,等. 急性缺血性脑卒中患者血清 Apelin-13 水平变化及其临床意义[J]. 山东医药,2017,57(27):49-51.

[9] 高红安,王彦喆,唐菱,等. 急性脑梗死患者血清 Apelin-13 水平及其临床研究[J]. 中风与神经疾病杂志,2018,35(5):415-419.

[10] 冯静静,张鲁伟,赵鹏,等. 彩色多普勒超声在终末期肾病患者自体动静脉内瘘术前评估及术后监测中的应用[J]. 山东大学学报(医学版),2018,56(7):65-69.

[11] 周敏,卢方平. 维持性血液透析患者后期自体动静脉内瘘功能不良/失功修复术后通畅率观察[J]. 中华医学杂志,2017,97(15):1175-1178.

[12] 彭小梅,刘园园,吴潮清,等. 维持性血液透析患者自体动静脉内瘘失功的危险因素研究[J]. 中国全科医学,2017,20(1):67-70.

[13] 徐元恺,甄景琴,张文云,等. 内瘘静脉最小内径可作为判断自体动静脉内瘘狭窄的指标[J]. 中华肾脏病杂志,2017,33(3):187-190.

[14] HAN X,ZHANG D L,YIN D X,et al. Apelin-13 deteriorates hypertension in rats after damage of the vascular endothelium by ADMA[J]. Can J Physiol Pharmacol,2013,91(9):708-714.

[15] MUGHAL A,O'ROURKE S T. Vascular effects of Apelin; Mechanisms and therapeutic potential [J]. Pharmacol Ther,2018,191(10):139-147.

[16] 韦建辉,廖兰,关玉珍,等. Apelin-13 对高糖诱导肾小管上皮细胞-间充质细胞转分化的影响[J]. 中国血液净化,2017,16(6):407-412.

[17] 李申涛,李贺,高明,等. D-dimer、PAF、Apelin-13、PCT 对严重多发伤患者发生 DIC 的早期临床评估[J]. 创伤外科杂志,2018,20(8):571-574.

[18] ZHOU Y,WANG Y,QIAO S. Apelin:a potential marker of coronary artery stenosis and atherosclerotic plaque stability in ACS patients [J]. Int Heart J,2014,55(3):204-212.

[19] LUMBERS E R,PRINGLE K G. Roles of the circulating renin-angiotensin-aldosterone system in human pregnancy [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,2014,306(2):R91-R101.

[20] 宋志明,余舒杰,杨建涛,等. 硫化氢通过调节 Sirt1/eNOS 信号通路延缓人脐静脉内皮细胞衰老[J]. 中国病理生理杂志,2018,34(2):258-263.

[21] 张鑫利,王敏,罗光华,等. 高密度脂蛋白-内皮型一氧化氮合酶信号通路在心血管系统中的作用及其影响因素的研究进展[J]. 中国病理生理杂志,2017,33(12):2293-2298.