

Apelin-13 通过 eNOS/NO 促进糖尿病小鼠主动脉细胞焦亡相关蛋白的表达

王炆佳, 张 佳, 李 宾, 曾翔俊*

(首都医科大学 生理学与病理生理学系, 北京 100069)

摘要:目的 探讨血管活性多肽 apelin-13 是否通过 eNOS/NO 途径影响糖尿病小鼠主动脉细胞焦亡相关蛋白的表达。方法 以 8 周龄 C57/BL 小鼠作为对照组小鼠;以 8 周龄 kkAy 小鼠作为 2 型糖尿病小鼠模型。给糖尿病小鼠皮下埋植缓释泵,持续灌注 apelin-13 处理 14 d,剂量为 30 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 或 apelin-13 和 L-NAME[NG-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME, eNOS 抑制剂,剂量为 10 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]共同处理 14 d。用无创尾压法检测各组小鼠处理前后的血压值;取血检测血糖和糖化血红蛋白;取腹主动脉,进行 HE 染色,显微镜下观察血管形态学改变,免疫组织化学染色分析小鼠主动脉内 eNOS 和细胞焦亡相关信号蛋白 NLRP3、caspase-1、gasdermin D 的表达水平。结果 与对照组相比,糖尿病组小鼠主动脉中 eNOS 含量明显升高 ($P < 0.05$),焦亡相关信号蛋白 NLRP3、caspase-1、gasdermin D 的表达水平升高,经过 apelin-13 处理后,糖尿病小鼠血管壁 eNOS 含量进一步升高 ($P < 0.05$),焦亡相关信号蛋白 NLRP3、caspase-1、gasdermin D 的表达水平也随之升高 ($P < 0.05$),给予 eNOS 抑制剂 L-NAME 之后,糖尿病小鼠主动脉 eNOS 含量降低 ($P < 0.05$),焦亡相关信号蛋白 NLRP3、caspase-1、gasdermin D 的表达水平也随之降低 ($P < 0.05$)。结论 Apelin-13 可能通过 eNOS/NO 途径促进糖尿病小鼠主动脉细胞焦亡相关蛋白的表达,导致糖尿病小鼠血管结构损伤和功能。

关键词: 糖尿病;主动脉;apelin-13;焦亡;eNOS

中图分类号:R363 文献标志码:A

Apelin-13 promotes expression of pyroptosis related protein in aortic cells in diabetic mice through eNOS/NO pathway

WANG Yang-jia, ZHANG Jia, LI Bin, ZENG Xiang-jun*

(Department of Physiology and Pathophysiology, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective To observe the effects and mechanisms of Apelin-13 on expression of pyroptosis related proteins in aorta of diabetic mice. **Methods** C57/BL mice of eight weeks old were used as control group;kkAy mice of eight weeks old were used as type 2 diabetic models;osmotic pumps were used to treat kkAy mice with apelin-13 at a rate of 30 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, and L-NAME(eNOS inhibitor) was injected intraperitoneally at a dose of 10 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ to kkAy mice. Blood was collected for detection of Hb1Ac. The aortae were harvested and fixed. Morphological changes were observed with HE staining. Expression of eNOS, NLRP3, caspase-1 and gasdermin D were measured with immunohistochemical staining. **Results** Compared to the control group, the level of eNOS in

收稿日期:2018-11-30 修回日期:2019-03-28

基金项目:国家自然科学基金(81270815)

* 通信作者 (corresponding author):megan_zeng@163.com

the aorta of diabetic mice was significantly higher than that in control mice ($P < 0.05$), the levels of NLRP3, caspase-1 and gasdermin D were also higher than that in control mice. After apelin-13 treatment, the expressions of eNOS, NLRP3, caspase-1 and gasdermin D were further increased ($P < 0.05$). After L-NAME and apelin-13 treatment, the expressions of eNOS, NLRP3, caspase-1 and gasdermin D were reduced as compared to apelin-13 treatment alone ($P < 0.05$). **Conclusions** Apelin-13 may promote the expression of pyroptosis related protein in aortic cells by increasing eNOS/NO pathway, which would induce structural and functional damage in diabetic arteries.

Key words: diabetes; aorta; apelin-13; pyroptosis; eNOS

血管并发症是2型糖尿病患者发病率和病死率的主要原因,血管并发症的主要发病机制与高血糖导致氧化应激和炎症反应增加密切相关^[1]。糖尿病导致的血管壁内炎症反应可以引起血管内皮细胞和平滑肌细胞死亡、增殖、迁移和黏附分子蛋白异常表达等^[2]。近年的研究表明炎症反应与细胞焦亡的发生密切相关^[3]。细胞焦亡又称细胞炎性坏死,是一种独特的依赖于caspase-1^[4]的新型细胞死亡方式,其特征在于细胞会不断胀大直至胞膜破裂,同时伴随强烈的炎症反应^[5]。

焦亡作为细胞死亡的一种方式与其他类型的细胞死亡具有一定的联系,而之前的研究发现,血管活性多肽apelin参与心血管系统中细胞坏死、凋亡、自噬及炎症反应^[6-7]。Apelin可介导内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的激活,通过eNOS途径产生的NO对许多内皮细胞功能起到重要作用^[8],同时还可以通过eNOS调节心肌细胞凋亡及坏死的发生发展^[9]。那么,糖尿病发病过程中,血清中增加的apelin是否通过eNOS/NO途径影响糖尿病小鼠血管壁细胞焦亡,从而影响血管结构及功能呢?

本研究通过观察apelin-13及L-NAME对糖尿病小鼠主动脉壁细胞焦亡相关蛋白表达的影响,探讨apelin是否通过其下游信号通路eNOS/NO影响糖尿病引起的血管壁细胞焦亡。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物:野生雄性C57/BL小鼠(SPF级,8周龄)作为正常对照组,体质量22~25 g(北京维通利华实验动物技术有限公司)。雄性kkAy小鼠(糖尿病小鼠,SPF级,8周龄),体质量25~30 g(北京华

阜康实验动物技术有限公司)。

1.1.2 药品与试剂:apelin-13(Santa Cruz公司,规格为1 mg);N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride(L-NAME)(Sigma-Aldrich公司);植入式渗透压泵管(北京西美杰科技有限公司);免疫组织化学染色试剂盒(上海基因科技有限公司);小鼠糖化血红蛋白(GHbA1c)ELISA试剂盒(武汉华美生物工程有限公司);重组兔单克隆caspase-1抗体和重组兔单克隆NLRP3抗体(华安生物公司);Gasdermin D抗体(Cell Signaling Technology公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物的分组及处理:对照组小鼠(C57/BL小鼠),糖尿病小鼠(kkAy小鼠),apelin-13处理糖尿病小鼠组[kkAy小鼠皮下埋植缓释泵持续灌注apelin 14 d,剂量为30 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]和apelin-13与L-NAME共同处理糖尿病小鼠组[apelin灌注kkAy小鼠的同时,腹腔注射L-NAME,剂量为10 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]。

1.2.2 检测随机血糖和糖化血红蛋白:尾静脉取血测随机血糖,取全血,并分离血清和血细胞,反复冻融法使红细胞碎裂,ELISA试剂盒测定糖化血红蛋白值。

1.2.3 检测血压:用无创尾压法检测各组小鼠处理前后的血压值。

1.2.4 HE染色观察主动脉形态学变化:常规制片,HE染色,光学显微镜下观察主动脉组织形态学的变化。

1.2.5 免疫组织化学染色分析主动脉中eNOS及NLRP3、caspase-1、gasdermin D的表达:60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片20 min,脱蜡至水,0.01 mol/L柠檬酸修复液进行抗原修复;3% H_2O_2 溶液避光孵育10~15 min;血清封闭30 min;加一抗(eNOS,兔来源,1:200;NLRP3,

兔来源, 1 : 200; caspase-1, 兔来源, 1 : 400; gasdermin D, 兔来源, 1 : 200), 37 °C 孵育 2 h; 室温静置 30 min, 二抗(驴抗兔, 1 : 200), 室温孵育 30 min; 光学显微镜下 DAB 显色; 苏木精染核 1 min, 盐酸乙醇分化 1 s; 梯度脱水透明, 中性树脂胶封片。采用 Image Pro Plus 3 图像分析软件, 计算阳性区域面积占血管总面积的比例。

1.3 统计学分析

实验结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组样本的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Student-Newman-Keuls 法。

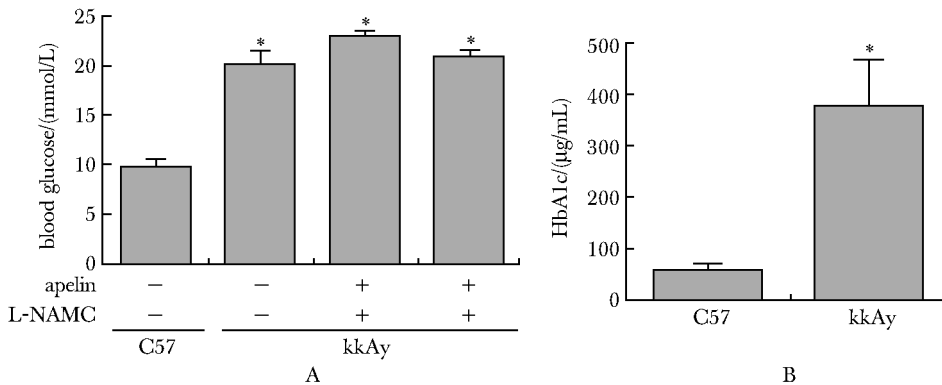
2 结果

2.1 随机血糖和糖化血红蛋白的结果

与对照组相比, 糖尿病小鼠、apelin-13 处理组小鼠和 apelin-13 和 L-NAME 共同处理组小鼠的随机血糖明显升高($P < 0.05$)。糖尿病小鼠的糖化血红蛋白值明显高于对照组($P < 0.05$) (图 1)。

2.2 血压测量的结果

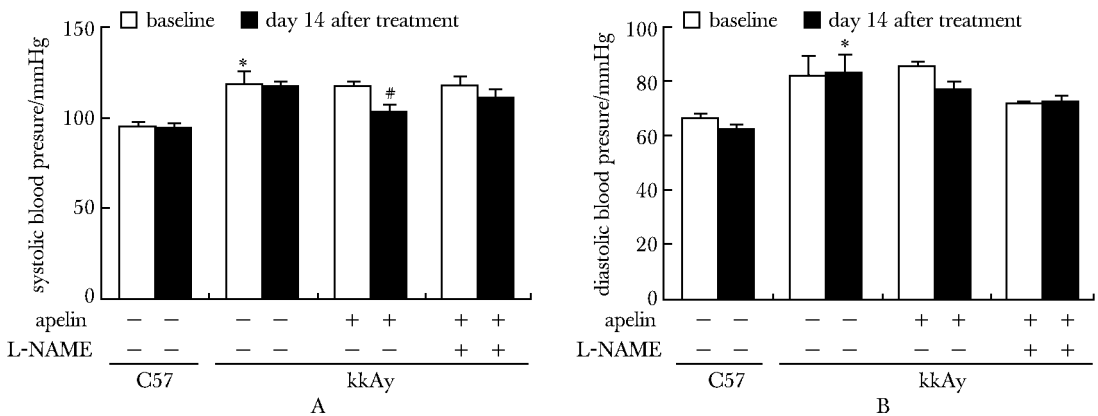
与对照组相比, 糖尿病小鼠的收缩压和舒张压明显升高($P < 0.05$); 给 apelin-13 后收缩压明显下降($P < 0.05$) (图 2)。



C57. control group; kkAy. diabetes group; A. random blood glucose of each group; B. HbA1c in C57 and kkAy group of mice; * $P < 0.05$ compared with control group

图 1 各组小鼠的随机血糖值及对对照组和糖尿病组小鼠的糖化血红蛋白值

Fig 1 Random blood glucose of each group mice and the levels of glycated hemoglobin (HbA1c) in control and diabetic group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



A. C57 was control group; kkAy was diabetes group, changes of systolic blood pressure before and after treatment in each group of mice were performed; B. changes of diastolic blood pressure before and after treatment in each group of mice were performed; * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with diabetic mice group

图 2 各组小鼠处理前后的血压变化

Fig 2 Changes of blood pressure before and after treatment in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.3 主动脉形态学改变

与对照组相比,糖尿病小鼠主动脉内皮细胞排列紊乱,血管平滑肌细胞肥大、扭曲、弹力纤维排列紊乱、细胞核大小不一,细胞膜及胞核不清晰、不完整,胞质染色不均,可见肌纤维断裂;与糖尿病组小鼠相比,apelin-13 处理组、apelin-13 和 L-NAME 共同处理组,糖尿病小鼠的主动脉弹力纤维和内皮细胞排列紊乱没有明显改变(图 3)。

2.4 主动脉中 eNOS、NLRP3、caspase-1 及 gasdermin D 的表达

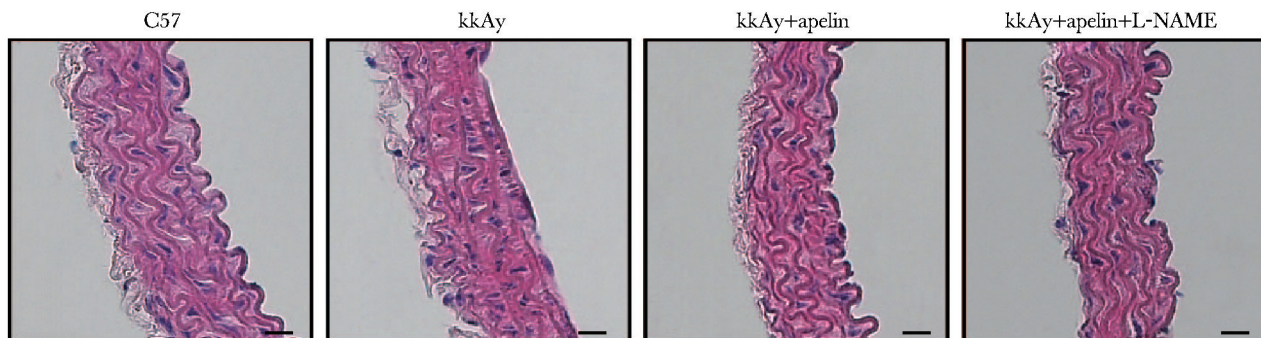
与对照组相比,糖尿病组小鼠主动脉 eNOS 表达升高 170% ($P < 0.05$),与糖尿病组小鼠相比,apelin-13 处理后,小鼠主动脉 eNOS 表达进一步升高 118% ($P < 0.05$),与 apelin-13 处理组相比,给予 apelin-13 和 L-NAME 共同处理后,糖尿病小鼠主动脉 eNOS 表达减少 25% ($P < 0.05$)。

与对照组相比,糖尿病组小鼠主动脉焦亡相关蛋白表达升高(NLRP3: 160%, $P < 0.05$; caspase-1: 141%; gasdermin D: 109%);与糖尿病组小鼠相比,

Apelin-13 处理后,糖尿病小鼠主动脉焦亡相关蛋白表达进一步升高(NLRP3: 67%, $P < 0.05$; caspase-1: 44%, $P < 0.05$; gasdermin D: 115%, $P < 0.05$);与 apelin-13 处理组相比,给予 apelin-13 和 L-NAME 共同处理后,糖尿病小鼠主动脉焦亡相关蛋白表达减少(NLRP3: 48%, $P < 0.05$; caspase-1: 46%, $P < 0.05$; gasdermin D: 75%, $P < 0.05$) (表 1, 图 4)。

3 讨论

Apelin 是从牛胃的分泌物中分离并提取一种小分子活性肽,是 G 蛋白耦联受体 APJ (putative receptor related to AT_1) 的内源性天然配体,在 2 型糖尿病的发生发展中起着重要的作用。并且 apelin-13 在血管内皮中分布尤为广泛^[10],属于血管源性活性肽,其作用于 APJ 受体,可通过调节细胞坏死、凋亡、自噬和炎症反应等参与各种疾病的发展^[7,11]。同时研究发现,糖尿病患者及动物血清中 apelin 浓度明显增加^[12],那么 apelin 是否参与糖尿病血管结构损伤的发生发展呢?



C57 was control group; kkAy was diabetes group

图 3 各组小鼠主动脉横截面 HE 染色

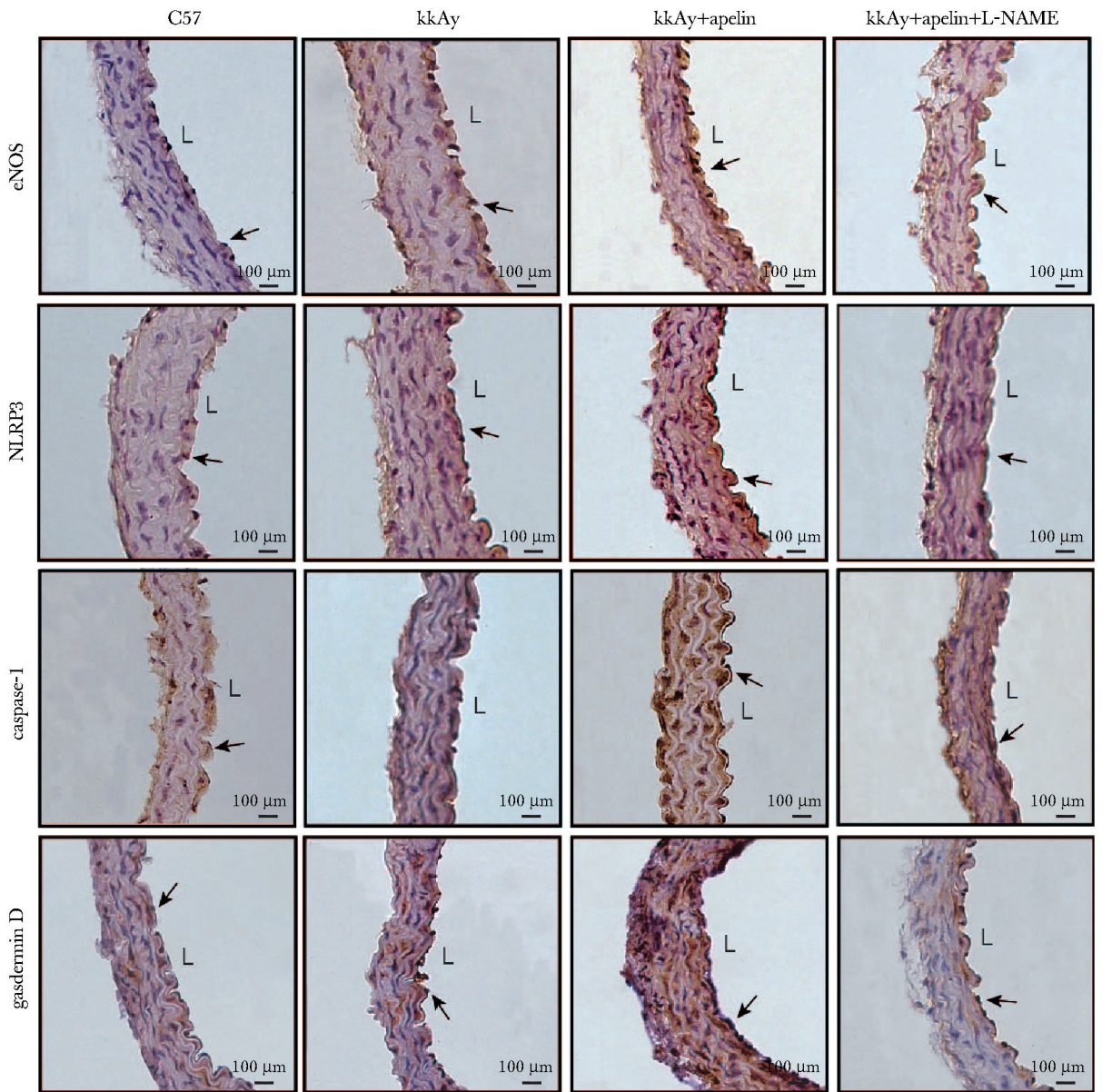
Fig 3 Aortic cross section H&E staining of each group (scale bar = 10 μ m)

表 1 免疫组织化学染色观察小鼠主动脉 eNOS、NLRP3、caspase-1 和 gasdermin D 的表达

Table 1 Positive expression of eNOS, NLRP3, caspase-1 and gasdermin D in aortic of each group were observed by immunohistochemistry staining ($\bar{x} \pm s$, %, $n = 3$)

group	eNOS	NLRP3	caspase-1	gasdermin D
control	1.00 \pm 0.78	1.17 \pm 0.28	2.18 \pm 1.16	1.77 \pm 0.95
kkAy	2.70 \pm 0.10*	3.05 \pm 0.45*	5.25 \pm 0.95	3.70 \pm 0.60
kkAy+apelin	5.93 \pm 0.41 Δ	5.11 \pm 0.21 Δ	7.57 \pm 2.38 Δ	7.95 \pm 2.43 Δ
kkAy+apelin+L-NAME	4.37 \pm 1.11 $\#$	2.63 \pm 0.70 $\#$	4.10 \pm 1.27 $\#$	2.00 \pm 0.92 $\#$

* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with diabetes group; $\#P < 0.05$ compared with the group treatment with apelin-13.



C57. control group; kkAy. diabetes group; the arrows indicated areas of positive staining; L. Lumen

图 4 免疫组织化学染色观察小鼠主动脉 eNOS、NLRP3、caspase-1 和 gasdermin D 的表达

Fig 4 Positive expression of eNOS, NLRP3, caspase-1 and gasdermin D in aortic of each group were observed by Immunohistochemistry staining (scale bar=10 μm)

本研究发现,与对照组小鼠相比, kkAy 小鼠的随机血糖和糖化血红蛋白 (HbA1c) 值明显升高,说明 kkAy 小鼠具有典型的糖尿病特征,可作为糖尿病模型小鼠使用, apelin 处理后,糖尿病小鼠血糖无明显变化。Apelin 处理可以明显降低糖尿病小鼠的收缩压,而 L-NAME 可以拮抗 apelin 降低糖尿病小鼠收缩压的作用。这些结果与报道一致^[13],提示 apelin 可能通过 eNOS/NO 途径影响糖尿病小鼠的血管功能,进而影响糖尿病小鼠的血压。那么

eNOS/NO 是否也通过影响血管壁细胞的结构介导 apelin 对糖尿病小鼠血管功能的影响呢?

本研究通过 HE 染色观察 apelin 对血管结构的影响,结果发现:与糖尿病组小鼠相比,给予 apelin 及 L-NAME 处理后,糖尿病小鼠血管结构损伤无明显改变。这一结果与报道不尽相同^[14],这可能是由于观察时间较短,从而不能观察到明显的结构改变。那么, apelin 对糖尿病小鼠早期血管功能的影响是否存在其他机制呢? 近年研究发现,高糖等刺激可

以引起血管壁内皮细胞和平滑肌细胞发生焦亡,从而导致血管结构和功能损伤^[15]。那么,apelin 对小鼠血管功能的影响是否与血管壁内细胞焦亡有关呢?

本研究通过观察 apelin 对糖尿病小鼠主动脉壁细胞内 NLRP3、caspase-1、gasdermin D 三种蛋白的表达的影响,分析 apelin 对糖尿病小鼠主动脉血管细胞焦亡相关蛋白表达的影响及其与血管结构损伤的关系。

结果发现,糖尿病小鼠主动脉中焦亡相关蛋白的表达增多,外源性给予 apelin-13 后,可观察到焦亡相关蛋白(NLRP3、caspase-1、gasdermin D)的表达进一步增多,说明糖尿病小鼠体内增加的 apelin-13 可能是引起糖尿病小鼠血管壁细胞内焦亡相关蛋白表达增加的因素之一。内皮一氧化氮合酶及其催化产生

的 NO 是 apelin 调节血管结构和功能的重要分子机制之一,那么 eNOS/NO 是否介导 apelin 引起的糖尿病血管细胞焦亡相关蛋白的表达呢?

本研究发现,apelin 可以增加糖尿病小鼠主动脉中 eNOS 的含量,而当利用 L-NAME 抑制 eNOS 催化产生 NO 之后,apelin 不再具有增加糖尿病小鼠主动脉壁细胞焦亡相关蛋白的表达(NLRP3、caspase-1、gasdermin D)的效应。这些结果提示,eNOS/NO 介导了 apelin 对糖尿病小鼠主动脉壁细胞焦亡相关蛋白表达的过程。

综上所述,apelin 增加糖尿病小鼠主动脉壁细胞焦亡相关蛋白的表达,其机制可能与上调内皮细胞中 eNOS/NO 途径有关。因此,apelin 及其下游信号分子 eNOS/NO 途径导致的血管壁内细胞焦亡可能成为治疗糖尿病血管损伤的靶点。

参考文献:

- [1] Domingueti CP, Dusse LM, Carvalho M, *et al.* Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications[J]. *J Diabetes Complications*, 2016, 30:738-745.
- [2] Jiang C, Jiang L, Li Q, *et al.* Acrolein induces NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis and suppresses migration via ROS-dependent autophagy in vascular endothelial cells[J]. *Toxicology*, 2018, 410:26-40.
- [3] Liu X, Lieberman J. A mechanistic understanding of pyroptosis: the fiery death triggered by invasive infection [J]. *Adv Immunol*, 2017, 135:81-117.
- [4] Xi H, Zhang Y, Xu Y, *et al.* Caspase-1 inflammasome activation mediates homocysteine-induced pyroptosis in endothelial cells[J]. *Circ Res*, 2016, 118:1525-1539.
- [5] Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells[J]. *Infect Immun*, 2005, 73:1907-1916.
- [6] Malyszko J, Malyszko JS, Pawlak K, *et al.* Apelin, a novel adipocytokine, in relation to endothelial function and inflammation in kidney allograft recipients[J]. *Transplant Proc*, 2008, 40:3466-3469.
- [7] Liu J, Liu M, Chen L. Novel pathogenesis: regulation of apoptosis by Apelin/APJ system [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2017, 49:471-478.
- [8] Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, *et al.* Protective role of endothelial nitric oxide synthase [J]. *J Pathol*, 2003, 199:8-17.
- [9] Takahashi T, Harris RC. Role of endothelial nitric oxide synthase in diabetic nephropathy: lessons from diabetic eNOS knockout mice [J]. *J Diabetes Res*, 2014, 2014: 590541. doi:10.1155/2014/590541.
- [10] Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, *et al.* Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1538:162-171.
- [11] Liu M, Li H, Zhou Q, *et al.* ROS-Autophagy pathway mediates monocytes-human umbilical vein endothelial cells adhesion induced by apelin-13 [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233:6839-6850.
- [12] Zhang BH, Wang W, Wang H, *et al.* Promoting effects of the adipokine, apelin, on diabetic nephropathy [J]. *PLoS One*, 2013, 8:e60457. doi:10.1371/journal.pone.0060457.
- [13] Akcilar R, Turgut S, Caner V, *et al.* The effects of apelin treatment on a rat model of type 2 diabetes [J]. *Adv Med Sci*, 2015, 60:94-100.
- [14] 张佳, 王炆佳, 曾翔俊. Apelin-13 减轻糖尿病小鼠主动脉损伤 [J]. *解剖学报* 2018, 49:81-86.
- [15] 李秀珍, 黄孝天, 符民桂. 细胞焦亡在动脉粥样硬化中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26:1-6.