

基础研究

Apelin-13对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤的保护作用

吴光勇¹, 李 亮², 廖达光¹, 王知非¹¹中南大学湘雅三医院神经外科, 湖南 长沙 410013; ²湖南省娄底市中心医院神经外科, 湖南 娄底 417000

摘要:目的 探讨Apelin-13对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤(CIRI)的保护作用及其可能的机制。方法 改良线栓法建立S-D大鼠局灶性CIRI模型,分假手术组、模型组、小剂量Apelin-13干预A组、中剂量B组、大剂量C组共5组,Apelin-13进行侧脑室注射,分别进行神经功能评分,脑水肿、脑梗死体积测定,观察细胞凋亡;检测脑组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性和细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)。结果 (1)B、C组较模型组神经功能评分降低($P<0.05$),含水量、脑梗死体积降低($P<0.05$);模型组梗死组织可见水肿、坏死,较多深染、固缩核细胞;B组、C组TUNEL阳性细胞数低于模型组($P<0.05$);(2)B、C组缺血周边脑组织MDA含量降低,SOD的活性增加($P<0.05$);(3)各组ERK1/2蛋白表达无差异性($P>0.05$);模型组和干预组p-ERK1/2蛋白表达高于假手术组($P<0.05$);干预组高于模型组($P<0.05$)。结论 Apelin-13可能通过抑制氧化应激反应对大鼠局灶性CIRI起保护作用;ERK1/2信号通路可能参与了Apelin-13保护作用机制。

关键词:Apelin-13;脑缺血-再灌注损伤;MDA;SOD;ERK1/2

Protective effect of Apelin-13 on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

WU Guangyong¹, LI Liang², LIAO Daguang¹, WANG Zhifei¹¹Department of Neurosurgery, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Hunan Province, Changsha 410013, China;²Department of Neurosurgery, the Central Hospital of Loudi City, Hunan Province, Loudi 417000, China

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of Apelin-13 on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** Focal transient cerebral ischemia-reperfusion injury was induced in male SD rats using modified suture occlusion technique. The rats were randomly divided into 5 groups: Sham group, Model group, Apelin-low dose (A) group, Apelin-middle dose (B) group and Apelin-high dose (C) group. Apelin-13 was injected into lateral cerebral ventricle, and the neurological function score, brain edema, infarct volume, apoptosis, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and extracellular regulated kinase1/2 (ERK1/2) protein were measured. **Results** Neurological function scores, percentage of brain water content, infarct volumes and TUNEL-positive cells in B and C groups were lower than those in Model group ($P<0.05$). The level of MDA in the tissue homogenate of brain tissue in the surrounding area of ischemia of B and C groups was lower than that of Model group, while the activity of SOD was higher ($P<0.05$). There was no significant difference in ERK1/2 protein expression among the groups ($P>0.05$). p-ERK1/2 increased in Model group and A, B, and C groups compared with Sham group ($P<0.05$), and that of A, B, and C group was higher than that of Model group ($P<0.05$). **Conclusion** Apelin-13 may play an important role by inhibiting oxidative stress to protect against focal cerebral ischemia-reperfusion injury; ERK1/2 signaling pathway may be involved in the protective mechanism of Apelin-13.

Key word: apelin-13; brain ischemia-reperfusion injury; malondialdehyde; superoxide dismutase; extracellular regulated kinase1/2

脑血管疾病(cerebrovascular disease, CVD)是神经系统常见病及多发病,严重威胁人民的身体健康^[1],缺血性脑血管病(ischemic cerebrovascular disease, ICVD)占CVD的70%左右。脑缺血梗死后血液再通会出现脑缺血-再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI),其机制十分复杂。Apelin是一种小分子内源性神经肽,是血管紧张素受体样蛋白J受体的天然

配体,不仅参与了神经系统的生理功能调节,也与其发生、发展密切相关,具有神经保护作用^[2-4]。Apelin可被肽酶分解成多种相对分子量不同的成熟活性肽,以Apelin-13的生物活性最强。本研究拟观察Apelin-13对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤的作用,探讨其作用机制,为CIRI的防治提供新的方法和策略。

1 材料与方法

1.1 材料

Apelin-13为美国Sigma公司产品,MDA测试盒和SOD测试盒购自武汉博士德生物工程公司;兔抗ERK1/2多克隆抗体和兔抗p-ERK1/2多克隆抗体为美

收稿日期:2015-03-22

基金项目:湖南省科学技术厅科技计划一般项目(2012FJ4312)

作者简介:吴光勇,博士,主治医师, E-mail: gywu7508@163.com

通信作者:王知非,博士,教授,电话:0731-88618018, E-mail: doctorwangzhifei@163.com

国 Cell Signaling Biotechnology 公司产品。Apelin-13 溶解于 0.9% 的生理盐水中, 配置成不同浓度的溶液(单位 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。

1.2 实验动物与分组

选取 8 周龄的健康 S-D 雄性大鼠 100 只, 体质量 250~300 g (中南大学实验动物学部提供)。随机分为 5 组: 假手术组(只分离血管 20 只)、缺血再灌注模型组(20 只)、Apelin-13 干预组(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 为干预 A 组、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 为 B 组、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 为 C 组, 每组 20 只), 再灌注前 15 min 侧脑室注射 Apelin-13 溶液 5 μL 。假手术组和模型组注射相同剂量的生理盐水。每组随机取 5 只大鼠, 断头处死取出整个脑组织, 进行 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色, 观察梗死的体积; 5 只大鼠取全脑组织, 称取大脑湿质量, 然后 108 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 72 h 后, 再称干质量; 5 只大鼠进行 TUNEL 染色; 余下 5 只大鼠在断头处死后取出全脑组织后, 取缺血半暗带脑组织, 用于 MDA 和 SOD 以及 Western blotting 检测。

1.3 侧脑室埋管与动物模型制备

所有实验 S-D 大鼠在实验室恒温、恒湿动物房中适应环境一周, 12 h 昼夜交替, 自由饮食, 避免不良刺激。术前禁食 12 h, 自由饮水, 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉后固定在脑立体定位仪上, 矢状缝和冠状缝愈合处向后 3~4 mm, 中线旁开 1.5 mm 处, 深度为 3.5 mm, 钻孔埋入插管套管, 骨蜡封闭固定。每次注药 3 min 并留针 1 min^[5]。埋管后, 参照 zea-Longa 线栓法^[6], 并略加改进制备大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血模型。颈部正中切口, 分离右侧颈总、颈内、外动脉, 在动脉分叉处结扎颈外动脉, 颈总动脉剪一小口, 插入头端呈圆钝形的尼龙鱼线(直径 0.28 mm), 插入长度约 18 mm, 在大脑中动脉起始端堵塞动脉。将颈总动脉和尼龙鱼线一起结扎, 缝合皮肤。在阻断血流 2 h 后, 通过拔出尼龙鱼线实现再灌注 72 h。假手术组只分离血管, 不结扎动脉, 不插入尼龙鱼线。大鼠苏醒后左侧肢体瘫痪, 站立不稳, 左上肢屈曲、行走时向左侧转圈的大鼠为造模成功, 用于后续实验^[7]。

1.4 临床症状观察、肌力检查、神经功能评分

观察肢体瘫痪, 站立, 肢体屈曲, 行走情况。采用 Longa^[6] 的 5 级 4 分法进行神经功能评分: 无明显神经功能缺损记为 0 分; 左前肢伸展障碍记为 1 分; 行走时向左侧旋转打圈记为 2 分; 行走时向左侧倾倒记为 3 分; 不能自发行走, 意识丧失, 昏迷记为 4 分; 动物死亡记为 5 分。评分为 0 分、4 分和 5 分的大鼠均被剔除, 剔除的大鼠在后续实验中得到补充^[8]。

1.5 含水量、脑梗死体积计算和 TUNEL 染色

大鼠脑缺血 2 h 再灌注 72 h 后, 断头取出全脑, 去掉低位脑干、嗅球和小脑, 用电子秤称取大脑湿质量, 然后 108 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 72 h 后, 再称取大脑的干质量。脑组织含水量的计算公式为: (湿质量 - 干质量)/湿质量 $\times 100\%$ 。

大鼠断头处死后完整取出脑组织, 将大脑均匀切成 5 片冠状切片。脑片浸入 2% TTC 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中孵育 15 min 染色, 染色后取出于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后, 数码相机摄像, 红色区域为正常脑组织, 苍白色区域为梗死区, 相机微距拍摄, Image pro plus 5.1 图像分析软件分析并计算脑梗死体积。TUNEL 染色时先行缺血再灌注后, 麻醉后剪开胸腔, 暴露心脏, 从左心室快速灌注生理盐水 100 mL, 然后以 4% 多聚甲醛 200 mL 左右灌注固定, 石蜡包埋, 切片, 片厚约为 5 μm , 相邻切片分别予以 TUNEL 染色, 中性树胶封片, 观察脑组织凋亡情况。

1.6 缺血周边区脑组织的 MDA、SOD、ERK1/2 检测

大鼠断头取出脑组织, 然后取缺血周边半暗带脑组织, 低温粉碎、高速离心提取脑组织匀浆上清液, 按照试剂盒说明书进行操作, 采用分光光度法检测脑组织匀浆上清液中丙二醛 (MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性。提取脑组织总蛋白进行 Western Blotting, 采用蛋白裂解液试剂盒, 按说明书进行操作, 远红外荧光扫描成像系统扫描并测定目标带单位密度, β -actin 做为参照, 以 ERK1/2、p-ERK1/2 对 β -actin 的比值代表各组蛋白相对表达水平。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料数据用均数 $\pm$ 标准差来表示, 多组间差异的比较采用单因素方差分析, 然后组间差异的两两比较采用 LSD-T 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Apelin-13 对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经功能缺损的影响

如表 1 结果所示, 模型组神经功能评分明显高于评分为 0 的假手术组, 表明缺血再灌注造成了明显的神经功能缺损。Apelin-13 处理后, 肌力明显增强, 干预 B、C 组神经功能评分明显低于模型组 ($P < 0.05$), 干预 A 组与模型组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示较大剂量 Apelin-13 能够改善局灶性脑缺血再灌注损伤后的神经功能缺失。

2.2 Apelin-13 对脑缺血-再灌注损伤大鼠脑梗死体积的影响

如图 1 结果所示, 假手术组大鼠脑组织 TTC 染色表现为均匀一致的红色, 模型组缺血再灌注侧脑组织 TTC 染色出现大范围苍白色梗死区域。缺血损伤的体积中模型组为 $236 \pm 21 \text{ mm}^3$, A 组 $187 \pm 19 \text{ mm}^3$ 、B 组 $175 \pm 17 \text{ mm}^3$ 、C 组 $152 \pm 15 \text{ mm}^3$, Apelin-13 干预后梗死区域体积缩小 ($P < 0.05$), 提示 Apelin-13 能够减轻局灶性脑缺血再灌注损伤后的梗死体积, 从而产生神经保护作用。

表1 不同组大鼠Longa神经功能评分
Tab.1 Longa neurological function score in different groups

Group	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Model group	2.84±0.34	2.91±0.27	3.38±0.31	3.30±0.35	2.52±0.24
A group	2.61±0.24	2.81±0.32	3.21±0.40	2.98±0.31	2.34±0.26 [☆]
B group	2.32±0.31	2.43±0.26	1.89±0.18	1.26±0.13	0.91±0.12 [*]
C group	2.01±0.21	1.85±0.22	1.32±0.24	0.98±0.12	0.68±0.09 [*]

^{*}*P*<0.05 vs Model group, [☆]*P*>0.05 vs Model group.



图1 肉眼所见不同组别大鼠的梗死脑组织
Fig.1 Infarcted brain tissue of rats in different groups under the naked eye.

2.3 Apelin-13对缺血-再灌注损伤大鼠脑组织含水量的影响

如图2结果所示,模型组脑组织含水量(82.34±0.83)%明显高于假手术组(73.27±0.63)%(*P*<0.05),提示大脑中动脉缺血再灌注后造成了明显的脑水肿。不同剂量的Apelin-13处理后,B组含水量(78.36±1.14)%、C组含水量(75.78±1.01)%明显低于模型组(82.23±0.83)%(*P*<0.05),A组含水量(81.32±0.91)%与模型组差异无统计学意义(*P*>0.05),提示中、大剂量Apelin-13能够减轻局灶性脑缺血再灌注损伤后脑组织水肿。

2.4 Apelin-13对脑缺血再灌注细胞凋亡的影响

如图3结果所示,光镜下观察,假手术组脑组织切片见细胞形态完整,未见TUNEL阳性细胞。模型组梗死周围组织明显水肿、坏死,可见深染、固缩核细胞。运用Apelin-13干预后,C组TUNEL阳性细胞数(27.30±2.028/每高倍视野)、B组TUNEL阳性细胞数(31.48±3.178/每高倍视野)明显低于模型组(42.67±3.458/每高倍视野)(*P*<0.05);A组TUNEL阳性细胞数(40.74±1.158/每高倍视野)与模型组差异无统计学意义(*P*>0.05),提示中、大剂量Apelin-13能够减轻局灶性脑缺血再灌注损伤后的细胞凋亡。

2.5 Apelin-13对缺血周边区脑组织中MDA含量和SOD活性及ERK1/2蛋白水平的影响

如表2结果所示:与假手术组比较,模型组大鼠缺血周边区脑组织中MDA含量显著性增加,SOD活性显著性降低(均*P*<0.05);与模型组比较,干预B、C组大鼠缺血周边区脑组织中MDA水平均显著降低,SOD活性均显著增加,以C组更加明显(*P*<0.05);干预A组脑组

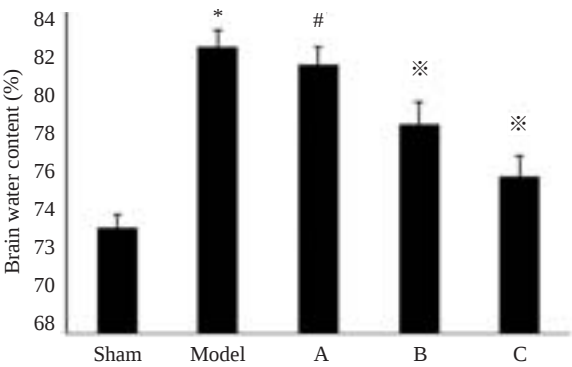


图2 各组脑组织含水量
Fig.2 Brain water content of different groups (%). ^{*}*P*<0.05 vs Sham group; [#]*P*>0.05 vs Model group; ^{*}*P*<0.05 vs Model group.

织中MDA含量及SOD活性与模型组比较没有显著性差异(*P*>0.05)。

如图4结果所示,Western blotting结果显示,各实验组均有ERK1/2蛋白表达,模型组与假手术组相比,表达无统计学差异(*P*>0.05),提示局灶性脑缺血再灌注损伤对脑组织中ERK1/2蛋白总量无明显影响。Apelin-13干预后结果显示,各干预组与假手术组ERK1/2表达差异无统计学意义(*P*>0.05)。另外各实验组均有p-ERK1/2表达,模型组和干预组p-ERK1/2蛋白表达高于假手术组(*P*<0.05),而且干预组高于模型组(*P*<0.05);提示局灶性脑缺血再灌注损伤后脑组织中ERK1/2蛋白磷酸化水平增强,Apelin-13干预后ERK1/2蛋白磷酸化水平增强更加明显。表明Apelin-13对局灶性脑缺血再灌注损伤后脑组织ERK1/2蛋白总量无明显影响,但能促进ERK1/2蛋白磷酸化。

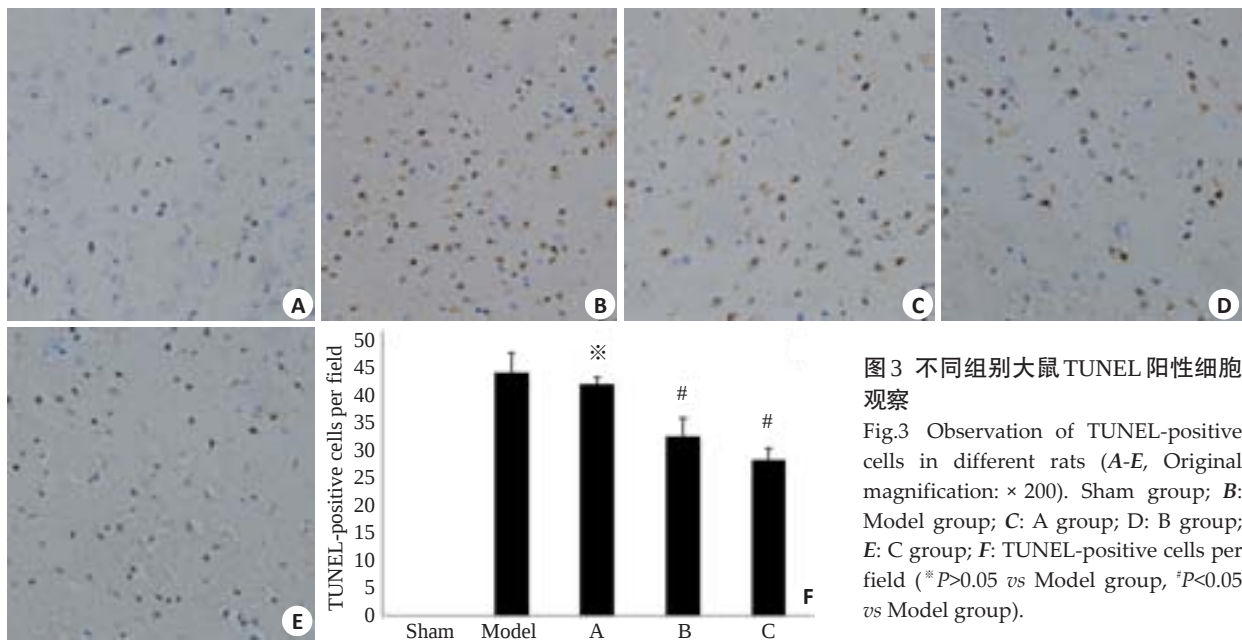


图3 不同组别大鼠 TUNEL 阳性细胞观察
Fig.3 Observation of TUNEL-positive cells in different rats (A-E, Original magnification: $\times 200$). Sham group; B: Model group; C: A group; D: B group; E: C group; F: TUNEL-positive cells per field (* $P>0.05$ vs Model group, $^{\#}P<0.05$ vs Model group).

表2 不同组别大鼠脑组织MDA含量和SOD活性
Tab.2 MDA content and SOD activity in different groups (n=5)

Group	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)
Sham group	325.68±19.21	12.54±2.34
Model group	112.32±15.28*	50.25±4.56*
A group	125.54±16.32 [#]	48.32±3.68 [#]
B group	250.25±18.02 [^]	36.28±3.52 [^]
C group	301.28±18.36 [^]	20.12±2.84 [^]

* $P<0.05$ vs sham group, [#] $P>0.05$ vs Model group, [^] $P<0.05$ vs Model group.

3 讨论

动脉粥样硬化所致的心肌梗塞、脑梗塞等缺血性组织损伤是导致病人死亡的主要原因,研究表明缺血-再灌注损伤加重了脑缺血疾病对机体的损害^[9],增加了死亡率和致残率。其机理十分复杂,氧化应激、过量自由基的产生是重要原因^[10-12]。再灌注神经损伤的严重程度主要取决于缺血梗死面积、持续时间以及内源性神经保护机制的启动。寻找一种新的安全有效的防治脑缺血-再灌注损伤的方法具有十分重要的意义。

Apelin是由 Tatamoto 等从牛的胃分泌物中分离纯化的一种小分子内源性神经肽,是血管紧张素受体样蛋白 J 受体 (putative receptor protein related to the angiotensin receptor ATL, APJ) 的天然配体。Apelin/APJ 系统在神经元的胞体和神经纤维中均有大量的表达^[13-14],具有神经保护作用,能对抗兴奋性毒性损伤、氧化应激损伤,抑制神经细胞的凋亡等,是一种内源性神经保护因子。不同长度的 Apelin 多肽片段在体内的分布、与 APJ 的结合能力、体内外生理与药理作用都不尽相同。Apelin 能抑制大脑皮质细胞中活性氧的产生、细

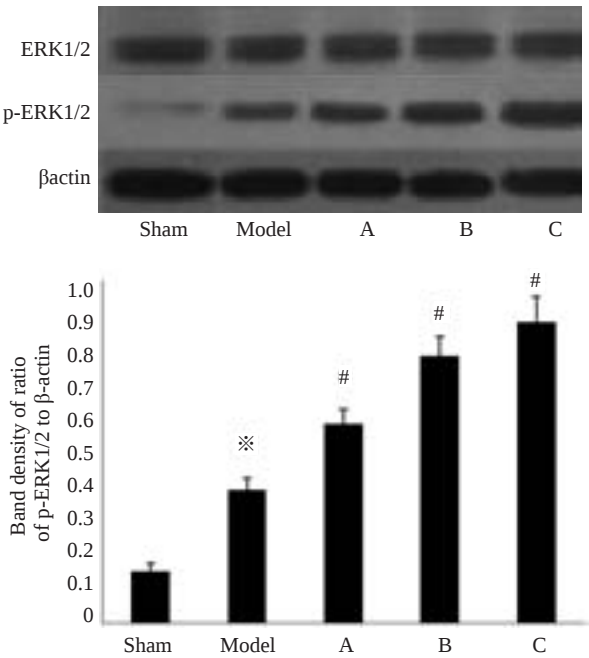


图4 不同组别大鼠 ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白电泳情况
Fig.4 Expression of ERK1/2 and p-ERK1/2 in different rats. * $P<0.05$ vs Sham group, $^{\#}P<0.05$ vs Model group.

胞色素 C 的释放以及 caspase-3 的激活,促进 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化,抑制大脑皮质细胞凋亡,减少 Ca^{2+} 积聚,降低钙蛋白酶 calpain 的活化,保护大脑皮质神经元抵抗谷氨酸的兴奋性毒性损伤^[15]。

Apelin 前体肽在蛋白水解酶的作用下可分解为长度不同的多肽片段,以 Apelin-13 生物活性最强^[16-17]。Apelin-13 在神经系统的表达水平较高,与神经系统疾病的关系非常密切。本研究采用 Apelin-13 对脑缺血-再灌注损伤大鼠进行治疗,其结果显示,Apelin-13 改善了脑缺血-再灌注损伤大鼠模型的临床症状、神经功能

缺损,增强肌力,显著性降低了脑组织的含水量和脑水肿的程度,也显著性降低神经功能评分和脑梗死体积和比例。同时本研究通过TUNEL染色对缺血周边脑组织神经细胞凋亡进行观察发现,中、大剂量Apelin-13干预后,TUNEL阳性细胞明显减少,表明Apelin-13可抑制局灶性脑缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡。

机体在遭受有害刺激时出现氧化应激反应,产生了大量的活性氧自由基,超出了机体对其清除能力,从而对细胞的DNA、蛋白质和脂质等造成巨大的损伤。MDA是活性氧发生脂质过氧化的终产物,是衡量机体内细胞发生氧化应激的指标之一。SOD是清除体内活性氧自由基的主要自由基清除剂,通过催化超氧化物发生歧化反应而清除自由基^[18]。本研究结果显示干预B组和C组通过Apelin-13处理明显抑制了缺血周边脑组织中氧化应激的产生,降低了MDA含量,显著增加了SOD的活性。结果表明Apelin-13抑制了氧化应激反应达到保护脑缺血-再灌注损伤。与以往的研究发现Apelin能通过抗氧化应激^[19],对抗肌萎缩性侧索硬化症的进展,发挥神经保护作用相一致。

ERK介导的细胞信号转导通路可能是多种刺激的共同通路。本实验研结果显示,脑缺血再灌注后,脑组织中ERK1/2总量并未发生明显的改变,而ERK1/2磷酸化水平增强,说明ERK1/2的活化在脑缺血再灌注中扮演了重要角色。本实验对Apelin-13的研究中发现,Apelin-13处理对缺血再灌注脑组织有保护作用,表现在减轻神经功能缺损、脑水肿以及抑制细胞凋亡。同时发现Apelin-13处理后进一步增加了脑组织ERK1/2的磷酸化水平,提示p-ERK1/2可能在脑缺血再灌注后扮演着一个保护性的角色;同时也提示,Apelin-13干预在脑缺血再灌注后发挥一系列保护作用可能与ERK1/2蛋白活化相关。

总之,本研究表明Apelin-13对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤有保护作用,其机制可能与Apelin-13抑制氧化应激有关。Apelin-13是防治脑缺血-再灌注损伤的一种有效途径和新的方法,为脑缺血-再灌注损伤提供了新的治疗靶点和策略。

参考文献:

[1] Bell ML. Comment: temperature and risk of stroke mortality in China[J]. *Neurology*, 2013, 81(12): 1064-70.
[2] 武 菲, 张秋玲. Apelin/APJ系统的神经保护作用及其机制[J]. *生理科学进展*, 2013, 44(1): 39-44.
[3] Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, et al. Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: species differences with rat[J]. *Peptides*, 2012, 33(1): 139-48.
[4] Zeng XJ, Yu SP, Zhang L, et al. Neuroprotective effect of the

endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(11): 1773-83.
[5] Drougard A, Duparc T, Brenachot X, et al. Hypothalamic apelin/reactive Oxygen species signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(4): 557-73.
[6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
[7] Yuluğ E, Türedi S, Karagüzel E, et al. The short term effects of resveratrol on ischemia-reperfusion injury in rat testis [J]. *J Pediatr Surg*, 2014, 49(3): 484-9.
[8] Dachir S, Shabashov D, Trembovler V, et al. Inosine improves functional recovery after experimental traumatic brain injury [J]. *Brain Res*, 2014, 1555(1): 78-88.
[9] Cong WT, Ling J, Tian HS, et al. Proteomic study on the protective mechanism of fibroblast growth factor 21 to ischemia-reperfusion injury [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2013, 91(11): 973-84.
[10] Tie R, Ji L, Nan Y, et al. Achyranthes bidentata polypeptides reduces oxidative stress and exerts protective effects against myocardial ischemic/reperfusion injury in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(10): 19792-804.
[11] Xue L, Wu Z, Ji XP, et al. Effect and mechanism of salvianolic acid B on the myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7(4): 280-4.
[12] Kurtoglu T, Basoglu H, Ozkisacik EA, et al. Effects of cilostazol on oxidative stress, systemic cytokine release, and spinal cord injury in a rat model of transient aortic occlusion [J]. *Ann Vasc Surg*, 2014, 28(2): 479-88.
[13] Carpené C, Dray C, Attané C, et al. Expanding role for the apelin/APJ system in physiopathology [J]. *J Physiol Biochem*, 2007, 63(4): 359-73.
[14] Lang L, Ingorokva S, Hausott B, et al. Selective up-regulation of the vasodilator peptide apelin after dorsal root but not after spinal nerve injury [J]. *Neuroscience*, 2010, 170(3): 954-60.
[15] Cook DR, Gleichman AJ, Cross SA, et al. NMDA receptor modulation by the neuropeptide apelin: implications for excitotoxic injury [J]. *J Neurochem*, 2011, 118(6): 1113-23.
[16] Hosoya M, Kawamata Y, Fulmsumi S, et al. Molecular and functional characteristics of APJ [J]. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(28): 21061-7.
[17] Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T, et al. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(1): 231-6.
[18] Hagar H, Al Malki W. Betaine supplementation protects against renal injury induced by Cadmium intoxication in rats: role of oxidative stress and caspase-3 [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 37(2): 803-11.
[19] Kasai A, Kinjo T, Ishihara R, et al. Apelin deficiency accelerates the progression of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23968.

(编辑: 经 媛)