

网络出版时间: 2020-12-14 14:17 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201211.1421.002.html>

外源性 Apelin-13 通过调控 VEGF/PI3K/Akt 信号通路促进大鼠股骨骨折愈合

曾昭池, 汤 勇, 张先慧, 朱志勇, 吴开元, 袁永端

摘要 目的 探讨 Apelin-13 调控 VEGF/PI3K/Akt 信号通路对大鼠股骨骨折愈合的影响。方法 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分成假手术组 (sham 组)、模型组 (Model 组)、Apelin-13 低剂量组 [Apelin-13 L 组, 25 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$] 和 Apelin-13 高剂量组 [Apelin-13 H 组, 75 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], 每组 10 只。建立大鼠股骨骨折模型, 立即给予相应药物处理, 治疗 4 周。采用 Micro CT 和 X 射线分别检测各组大鼠股骨显微参数和骨痂直径; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察骨组织病理变化; 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测血清中成骨标记物骨源性碱性磷酸酶 (BALP)、I 型前胶原氨基端前肽 (PINP) 和破骨标记物抗酒石酸酸性磷酸酶-5b (TRACP-5b)、I 型胶原 C 端肽 (CTX) 表达水平; qRT-PCR 检测骨痂组织中血管内皮生长因子 A (VEGFA) mRNA 表达水平; Western blot 检测骨痂组织中 VEGF/PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达水平。结果 与 sham 组比较, Model 组大鼠股骨病理损伤较严重, 股骨骨密度、组织矿物质密度、骨体积分数和 X 射线评分均降低, 血清中 BALP 和 PINP 水平降低, 而 TRACP-5b、CTX 含量均增加, 骨痂组织中 VEGFA mRNA 以及 VEGFA、VEGFR2、

PI3K p85、p-Akt 等蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Model 组比较, Apelin-13 H 组大鼠股骨病理损伤改善明显, 股骨骨密度、组织矿物质密度、骨体积分数、X 射线评分和骨痂直径均增加, 血清中 BALP 和 PINP 含量增加, TRACP-5b 和 CTX 含量减少, 骨痂组织中 VEGFA mRNA 以及 VEGFA、VEGFR2、PI3K p85、p-Akt 蛋白表达水平增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 Apelin-13 L 组与 Model 组比较, 相关指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 外源性 Apelin-13 可促进大鼠股骨骨折愈合, 其机制可能与 VEGF/PI3K/Akt 信号通路的激活有关。

关键词 Apelin-13; 股骨骨折; 血管新生; VEGF/PI3K/Akt 信号通路

中图分类号 R 683

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)01-0048-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.010

骨折是最常见的外科损伤, 促进骨再生、骨质生成和钙化在骨缺损修复中十分重要^[1]。Apelin 是血管紧张素 II 1 型受体相关蛋白 (APJ) 的内源性配体, 可介导血管生成和血管形成^[2], Apelin-13 是其中研究最为广泛的一类 Apelin。有研究^[3]表明, Apelin-13 可参与调节糖尿病、肥胖、高血压、心血管等疾病的病理生理过程, 但目前有关 Apelin-13 促进

2020-07-16 接收

基金项目: 湖南省卫健委科研计划项目 (编号: C2015-29)

作者单位: 解放军联勤保障部队第九二二医院骨科, 衡阳 421002

作者简介: 曾昭池, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: shushu0508@

163.com

different concentration of Cur (0, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect the changes in cell proliferation at different time points (24, 48, 72 h). Hoechst 33258 fluorescence staining was used to observe cell status of apoptosis. Flow cytometry was used to detect apoptosis and cell cycle. However, the changes of related protein expression in PI3K/p53 signaling pathway were detected by Western blot. **Results** MTT results showed that the proliferation of SGC-7901 cells was inhibited by Cur in concentration-dependent manners. The results of cell fluorescence staining showed that Cur could promote the apoptosis of SGC-7901 cells, and the bright blue fluorescence intensity of cells reduced. The results of flow cytometry showed that compared with the control group, the apoptosis rate increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and G_0/G_1 phase cell was blocked in the group with different concentrations of Cur groups ($P < 0.05$). Western blot results showed that the protein level of PI3K and the phosphorylation level of Akt in cells of different concentrations reduced compared with the control group ($P < 0.01$), but the expression levels of p21 and p53 increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Cur inhibits the proliferation of SGC-7901 cell, induce G_0/G_1 phase arrest and promote apoptosis, which may be closely related to the regulation of PI3K/p53 signaling pathways.

Key words curcumin; human gastric cancer cell; proliferation; apoptosis; PI3K/p53 signaling pathway; cell cycle

骨折愈合的研究鲜有报道。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 作为一种重要的血管生成因子,具有促进内皮细胞增殖、促进血管生成等重要的生物学功能。众多研究^[4-5]表明,VEGF 可调控 PI3K/Akt 信号通路的激活,由此推测 Apelin-13 可能通过 VEGF/PI3K/Akt 信号通路诱导血管新生从而促进骨折愈合。该研究拟通过构建股骨骨折大鼠模型,探讨 Apelin-13 对骨折愈合的影响及可能作用机制,为临床上骨折的愈合研究提供新的方向和思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康 SPF 级 6~7 周龄雄性 SD 大鼠 40 只,体质量(240±20)g,由湖南嘉泰实验动物有限公司提供,动物生产许可证编号:SCXK(湘)2019-0003。饲养条件为 SPF 级环境,温度为(23±2)℃,湿度为 50%~60%,12 h/12 h 明暗交替,自由饮水、进食。

1.2 主要试剂与仪器 Apelin-13 (批号:SC-351718,规格:1 mg) 购自美国 Santa Cruz 公司;大鼠骨源性碱性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, BALP)、I 型前胶原氨基端前肽 (amino terminal-propeptide of type I procollagen, PINP)、I 型胶原 C 端肽 (C-terminal telopeptides of type I collagen, CTX)、抗酒石酸酸性磷酸酶-5b (tartrate resistant acid phosphatase-5b, TRACP-5b) ELISA 试剂盒购于美国 R&D 公司;VEGFA、VEGFR2、PI3K p85、Akt、p-Akt (Ser473) 和 β -actin 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司;BCA 试剂盒、苏木精、伊红购于上海碧云天生物公司;TRIzol、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;FC 全自动酶标仪购于美国 Thermo 公司;SYSTEM GelDoc XR + 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物造模及分组处理 40 只雄性 SD 大鼠,适应性饲养 1 周后,随机分成 4 组:假手术组 (sham 组)、模型组 (Model 组)、Apelin-13 低剂量组 (Apelin-13 L 组) 和 Apelin-13 高剂量组 (Apelin-13 H 组),每组 10 只。除 sham 组外,其他各组大鼠均参照文献^[6]构建大鼠股骨骨折模型。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,将大鼠局部脱毛,肢备皮消毒,取髁骨内侧及股外侧切口,置入直径 1 mm 克氏针,骨折钳将股骨干中段剪断,反复冲洗后逐层缝合切口归笼。sham 组大鼠不剪断股骨,其他操作一致。

术后立即进行 X 射线拍摄,观察到大鼠右股骨骨折,对位良好,髓内针固定在位,确认造模成功。造模成功后即进行药物干预,Apelin-13 L 组和 Apelin-13 H 组大鼠分别腹腔注射 25 μ g/(kg·d) 和 75 μ g/(kg·d) 的 Apelin-13,而 sham 组和 Model 组大鼠分别注射等量 0.9% 氯化钠溶液,连续 4 周。

1.3.2 Micro CT 测定骨显微参数 药物干预结束后处死大鼠,剥离股骨收集全长股骨。通过 Micro CT 扫描检测各组大鼠股骨显微结构参数,包括骨密度、组织矿物质密度、骨体积分数 (BV/TV)。

1.3.3 X 射线观察骨愈合情况 收集各组大鼠的全长股骨进行 X 线检测,测量正、侧位片上骨痂最大直径大小,采用两者的平均值为骨痂的最大直径 (callus diameter)。采用 Lane-Sandhu X 线评分标准^[7]进行骨折愈合评分,摄片结果采用双盲法由两位影像科医生进行评分,取平均值,比较两组骨折愈合的差异。

1.3.4 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察 取各组大鼠侧股骨,去除股骨周围肌肉等软组织,保留完整骨痂,置于 10% 中性甲醛固定 48 h,使用乙二胺四乙酸脱钙液开始 4 周的脱钙过程,完成脱钙后进行石蜡包埋并行 HE 染色,于显微镜下观察病理改变,依据 Huo-associates 评分标准^[8]对各组骨痂形态进行评分。

1.3.5 ELISA 检测血清骨转换标记物含量 取各组大鼠血清,按照试剂盒说明书采用 ELISA 法检测血清成骨标志物 BALP、PINP 和破骨标志物 TRACP-5b、CTX 表达水平。

1.3.6 qRT-PCR 检测 收集各组大鼠骨痂组织,按照 TRIzol 试剂说明书提取骨痂样本总 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,根据反转录试剂盒说明将提取得 RNA 反转录成 cDNA 后进行 qRT-PCR 检测。引物序列: VEGFA, (F) 5'-ACTGGACCCTG-GCTTTACTG-3', (R) 5'-GCTTTCTGCTCCCCTTCT-GT-3'; β -actin, (F) 5'-CATCCTGCGTCTGCACCTGG-3', (R) 5'-TGGAAGGTGGACAGTGAGGC-3'。反应条件:95℃ 预变性 10 min,95℃、10 s,55℃、20 s,40 个循环。熔解曲线:95℃、1 min,55℃、1 min,95℃、10 s,以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 VEGFA 相对表达量。

1.3.7 Western blot 检测 收集各组大鼠骨痂组织置于组织匀浆器内,加入蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂于冰上研磨匀浆,12 000 r/min,4℃ 离心 20 min,取上清液,采用 BCA 法测蛋白含量,上样到 12%

SDS-PAGE 凝胶电泳中分离蛋白,并转移至聚偏二氟乙烯膜,5% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗 VEGFA、VEGFR2、PI3K p85、Akt、p-Akt 和 β -actin 抗体,4 °C 过夜孵育,次日用洗膜缓冲液洗涤 3 次,加标记辣根过氧化物酶的二抗室温孵育 1 h,滴加 ECL 试剂,在全自动凝胶成像系统中曝光显影,并用 Image J 软件统计灰度值,计算相对表达量。

1.4 统计学处理 本实验数据均采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Apelin-13 对大鼠股骨显微结构参数的影响

与 sham 组比较,Model 组大鼠股骨的骨密度、组织矿物质密度和骨体积分数均降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 Model 组比较,Apelin-13 H 组大鼠的骨密度、组织矿物质密度和骨体积分数均增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 Apelin-13 L 组差异无统计学意义。见表 1。

表 1 各组大鼠股骨显微结构参数比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	骨密度 (mg/cm^2)	组织矿物质密度 (mg/cm^3)	骨体积分数 (%)
sham	711.20 ± 15.24	697.93 ± 18.41	72.03 ± 2.11
Model	$599.08 \pm 12.85^{**}$	$577.57 \pm 13.49^{**}$	$67.04 \pm 2.04^{**}$
Apelin-13 L	612.45 ± 13.09	585.07 ± 15.72	68.47 ± 1.95
Apelin-13 H	$688.61 \pm 14.07^{##}$	$659.90 \pm 20.63^{##}$	$71.76 \pm 2.45^{##}$
<i>F</i> 值	49.931	30.518	4.627
<i>P</i> 值	< 0.0001	< 0.0001	0.037

与 sham 组比较: $^{**}P < 0.01$; 与 Model 组比较: $^{##}P < 0.01$

2.2 Apelin-13 对大鼠股骨愈合情况的影响 与 sham 组比较,Model 组大鼠股骨 X 射线评分降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 Model 组比较,Apelin-13 H 组大鼠股骨 X 射线评分和骨痂直径增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 Apelin-13 L 组差异无统计学意义。见表 2。

表 2 各组大鼠骨痂直径和 X 射线评分比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	骨痂直径(mm)	Lane-Sandhu X 线评分
sham	—	11.70 ± 0.21
Model	4.92 ± 0.17	$2.47 \pm 0.15^{**}$
Apelin-13 L	5.17 ± 0.12	2.73 ± 0.22
Apelin-13 H	$5.82 \pm 0.24^{##}$	$9.87 \pm 0.23^{##}$
<i>F</i> 值	23.202	549.464
<i>P</i> 值	0.002	< 0.0001

与 sham 组比较: $^{**}P < 0.01$; 与 Model 组比较: $^{##}P < 0.01$

2.3 Apelin-13 对大鼠股骨组织病理学的影响

sham 组软骨组织完整,轮廓清晰;Model 组和 Apelin-13 L 组新生骨小梁松质骨较稀疏,排列比较紊乱,可见大量软骨细胞浸润生长;Apelin-13 H 组新生骨小梁结构较多,排列致密有序,可见较成熟的骨组织,骨痂逐渐吸收。见图 1A。与 sham 组比较,Model 组 Huo-associates 评分降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 Model 组比较,Apelin-13 H 组 Huo-associates 评分增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 Apelin-13 L 组差异无统计学意义。见图 1B。

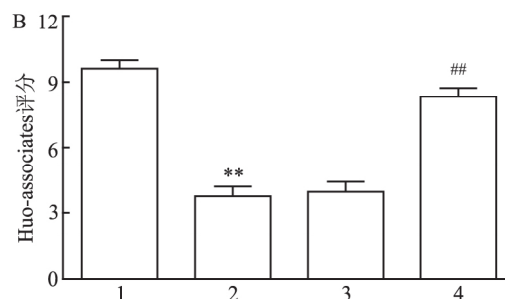
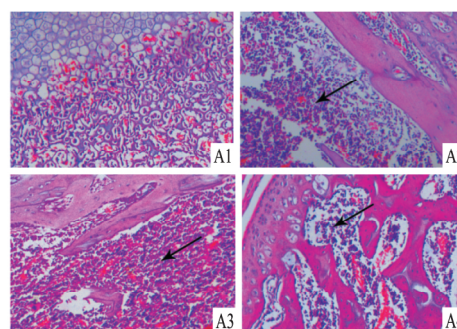


图 1 各组大鼠股骨组织切片病理观察

A: HE 染色 $\times 100$; B: Huo-associates 评分; 1: sham 组; 2: Model 组; 3: Apelin-13 L 组; 4: Apelin-13 H 组; 与 sham 组比较: $^{**}P < 0.01$; 与 Model 组比较: $^{##}P < 0.01$

2.4 Apelin-13 对大鼠血清中骨转换标记物含量的影响 与 sham 组比较,Model 组大鼠血清中 BALP、PINP 水平降低,TRACP-5b、CTX 含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 Model 组比较,Apelin-13 H 组大鼠血清中 BALP、PINP 水平增加,TRACP-5b、CTX 含量降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 Apelin-13 L 组差异无统计学意义。见表 3。

2.5 Apelin-13 对大鼠骨痂组织中 VEGFA 表达水平的影响 与 sham 组比较,Model 组大鼠骨痂组织中 VEGFA mRNA 和蛋白表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 Model 组比较,Apelin-13 H 组大鼠骨痂组织中 VEGFA mRNA 和蛋白表达水平

表3 各组大鼠血清中 BALP、PINP、TRACP-5b 和 CTX 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	BALP(ng/ml)	PINP(pg/ml)	TRACP-5b(ng/ml)	CTX(ng/ml)
sham	5.36 ± 0.24	4 760 ± 157.41	6.89 ± 0.11	4.48 ± 0.12
Model	2.31 ± 0.16 ^{**}	2 205 ± 61.96 ^{**}	11.59 ± 0.37 ^{**}	8.86 ± 0.11 ^{**}
Apelin-13 L	3.02 ± 0.08	2 479 ± 164.22	10.48 ± 0.32	8.04 ± 0.17
Apelin-13 H	14.79 ± 0.12 ^{##}	7 969 ± 65.10 ^{##}	4.20 ± 0.11 ^{##}	2.46 ± 0.21 ^{##}
F 值	81.707	98.936	69.026	168.676
P 值	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

与 sham 组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与 Model 组比较: ^{##} $P < 0.01$

上升,差异有统计学意义($P < 0.01, P < 0.001$)。而 Apelin-13 L 组与 Model 组比较,VEGFA mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义。见图 2。

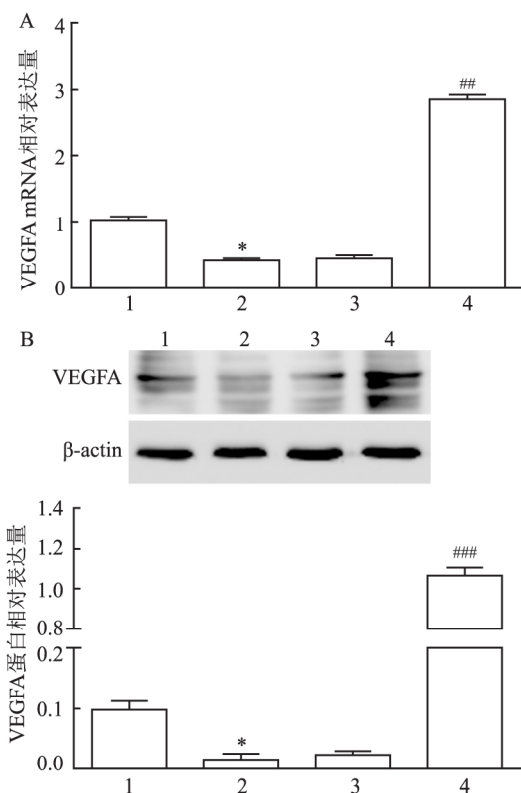


图2 各组大鼠骨组织中 VEGFA 表达水平比较

A: qRT-PCR 检测 VEGFA 的 mRNA 表达水平; B: Western blot 检测 VEGFA 的蛋白表达水平; 1: sham 组; 2: Model 组; 3: Apelin-13 L 组; 4: Apelin-13 H 组; 与 sham 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 Model 组比较: ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$

2.6 Apelin-13 对大鼠骨组织中 VEGF/PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的影响 与 sham 组比较, Model 组大鼠骨组织中 VEGFR2、PI3K p85、p-Akt 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.01$), Akt 蛋白表达水平差异无统计学意义; 与 Model 组比较, Apelin-13 H 组大鼠骨组织中 VEGFR2、PI3K p85 和 p-Akt 蛋白表达水平增加,差异有统计

学意义($P < 0.001$), Akt 蛋白表达水平差异无统计学意义。而 Apelin-13 L 组与 Model 组比较,以上蛋白表达水平差异无统计学意义。见图 3。

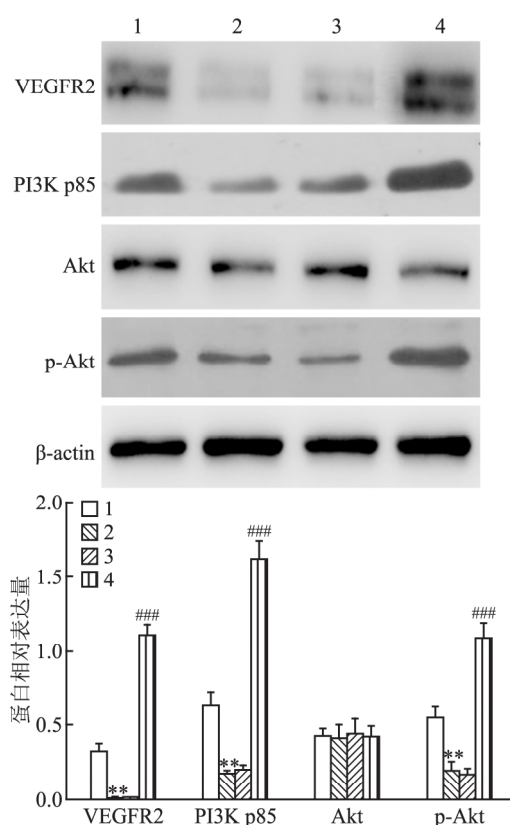


图3 各组大鼠骨组织中 VEGFR2、PI3K p85、Akt、p-Akt 蛋白表达水平比较

1: sham 组; 2: Model 组; 3: Apelin-13 L 组; 4: Apelin-13 H 组; 与 sham 组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与 Model 组比较: ^{###} $P < 0.001$

3 讨论

局部血管生成对骨折愈合及其重要,而新生血管的形成过程主要依赖于血管内皮的增殖、迁移和毛细血管样管道的形成。有研究^[8]报道,Apelin 具有促进血管生成、降低血压、调节水盐平衡及调节免疫等多种生物学效应,可将 Apelin 看作是一种新的

血管形成因子,介导血管再生。而 VEGF 是血管发生的中枢调节因子,具有调控血管发生和维持血管内皮细胞的作用,可促进新生血管的形成^[3]。Li et al^[3] 研究表明 Apelin-13 可通过激活 PI3K/Akt 信号通路,促进人视网膜血管内皮细胞的增殖、迁移和毛细管样管道的形成;Huang et al^[4] 研究表明,Apelin-13 可显著增加动脉栓塞动物模型中 VEGF 及其受体 VEGFR2 的表达水平,其作用机制可能与 Apelin-13 能促进血管生成有关。这些涉及血管发生的因子可能成为诱导血管新生潜在研究靶点。本研究结果显示,Apelin-13 可通过激活 VEGF/PI3K/Akt 信号通路,上调成骨标记物水平,同时下调破骨标记物水平,增加骨折局部的新骨形成,促进大鼠股骨骨折愈合。

Micro CT 可以直观地观察和定量分析组织的差异,清晰准确地了解骨折愈合的情况,是目前实验研究中最为可靠的检测骨显微结构的方法。本研究首先通过 Micro CT 测定各组大鼠的骨显微结构,同时通过 X 射线观察骨愈合情况,实验结果显示,股骨骨折模型组大鼠的骨密度、组织矿物质密度、骨体积分数以及股骨 X 射线评分较正常组均减小,与前人研究^[1] 一致,给予高剂量 Apelin-13 治疗后,大鼠的骨显微参数和骨愈合情况均得到明显改善,骨痂直径较模型组明显增加。HE 染色结果显示,模型组骨折端多为硬骨骨痂,伴随大量软骨细胞浸润生长,Apelin-13 高剂量治疗组内外骨痂变薄,硬骨痂逐渐吸收,可见较多新生骨小梁结构,说明 Apelin-13 可促进软骨骨痂形成及向硬骨骨痂转变,从而促进骨愈合。

BALP 是成骨细胞分化的早期标记物,可以反映成骨细胞的成熟和活性,能够促进骨基质的矿化及骨结构的形成;PINP 是在骨基质形成过程中胶原代谢的产物,与成骨细胞的活性密切相关^[2]。袁功武等^[1] 研究显示,吉非替尼治疗股骨骨折模型大鼠后,血清中 BALP 和 PINP 水平较对照组明显上升,说明吉非替尼可促进早期骨形成、成骨细胞分化和成熟。TRACP-5b 是由破骨细胞合成和分泌的代谢酶,介导骨基质的降解过程,CTX 是在骨吸收过程中 I 型胶原蛋白降解的羧基端产物,与破骨细胞介导的骨吸收程度密切相关。本研究结果显示,与正常组比较,模型组 BALP、PINP 含量下降,TRACP-5b、CTX 含量均上升,与前人研究^[1] 结果一致;与模型组比较,Apelin-13 高剂量治疗组大鼠血清中 BALP、PINP 含量上升,而 TRACP-5b、CTX 含量下

降,说明 Apelin-13 可促进成骨细胞的成熟和破骨细胞的重吸收功能,从而促进骨痂形成利于骨折愈合。

VEGF 是促进血管生成的重要因子,众多研究^[3] 认为 VEGF 的高表达能促进骨折愈合,而 PI3K/Akt 信号通路是 VEGF 下游重要的信号通路之一,在血管生成的生理方面发挥着重要作用。多数研究^[4] 认为 PI3K/Akt 通路促进血管形成的机制为:活化的 Akt 可通过磷酸化方式激活内皮型一氧化氮合酶(eNOS),eNOS 可催化合成微量一氧化氮,而一氧化氮具有刺激血管舒张、血管重塑和血管生成等一系列过程的功能。为了进一步证实 Apelin-13 是否通过激活 VEGF/PI3K/Akt 信号通路促进大鼠股骨骨折愈合,本实验对模型组使用不同剂量 Apelin-13 进行干预治疗,研究结果显示,与模型组比较,Apelin-13 高剂量组骨痂组织中 VEGFA、VEGFR2、PI3K p85 和 p-Akt 蛋白表达水平上升,说明 Apelin-13 确是通过激活 VEGF/PI3K/Akt 信号通路来发挥股骨骨折愈合的促进作用。

综上所述,外源性 Apelin-13 可通过调控 VEGF/PI3K/Akt 信号通路,改善股骨骨折大鼠的骨显微参数,促进成骨细胞成熟和破骨细胞重吸收,从而促进大鼠股骨骨折愈合。

参考文献

- [1] Foulke B A, Kendal A R, Murray D W, et al. Fracture healing in the elderly: a review [J]. *Maturitas*, 2016, 92: 49–55.
- [2] Antushevich H, Wójcik M. Review: apelin in disease [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 483: 241–8.
- [3] Kartal H, Comu F M, Kucuk A, et al. Effect of Apelin-13 on erythrocyte deformability during ischaemia-reperfusion injury of heart in diabetic rats [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2017, 118(3): 133–6.
- [4] Zhu G S, Tang L Y, Lv D L, et al. Total flavones of *abelmoschus manihot* exhibits pro-angiogenic activity by activating the VEGF-A/VEGFR2-PI3K/Akt signaling axis [J]. *Am J Chin Med*, 2018, 46(3): 567–83.
- [5] Liu Y, Liu J, Xia T, et al. MiR-21 promotes fracture healing by activating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(7): 2727–33.
- [6] Melincovici C S, Boşca A B, Şuşman S, et al. Vascular endothelial growth factor(VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2018, 59(2): 455–67.
- [7] 付宇. 脉冲电磁场对骨质疏松性骨折愈合与成骨细胞增殖分化的影响 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2018.
- [8] Wu L, Chen L, Li L. Apelin/APJ system: a novel promising therapy target for pathological angiogenesis [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 466: 78–84.
- [9] Li Y, Bai Y J, Jiang Y R, et al. Apelin-13 is an early promoter of

- cytoskeleton and tight junction in diabetic macular edema via PI3K/Akt and MAPK/Erk signaling pathways [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 3242574.
- [10] Huang C, Dai C, Gong K, et al. Apelin-13 protects neurovascular unit against ischemic injuries through the effects of vascular endothelial growth factor [J]. *Neuropeptides*, 2016, 60: 67–74.
- [11] 袁功武, 兰生辉, 刘曦明. 抑制表皮生长因子受体信号通路对大鼠股骨骨折愈合的作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(4): 731–3.
- [12] Bai J, Xu Y, Dieo Y, et al. Combined low-dose LiCl and LY294002 for the treatment of osteoporosis in ovariectomized rats [J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14(1): 177–84.
- [13] Meeson R, Sanghani-Keri A, Coathup M, et al. VEGF with AMD3100 endogenously mobilizes mesenchymal stem cells and improves fracture healing [J]. *J Orthop Res*, 2019, 37(6): 1294–302.
- [14] Ha J M, Jin S Y, Lee H S, et al. Regulation of retinal angiogenesis by endothelial nitric oxide synthase signaling pathway [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2016, 20(5): 533–8.

Exogenous Apelin-13 promotes femoral fracture healing in rats by regulating the VEGF/PI3K/Akt signaling pathway

Zeng Zhaochi, Tang Yong, Zhang Xianhui, et al

(*Dept of Orthopaedics, The 922nd Hospital of The Joint Service Support Force of The PLA, Hengyang 421002*)

Abstract Objective To investigate the effect of Apelin-13 regulation of VEGF/PI3K/Akt signaling on femoral fracture healing. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into sham group, Model group, Apelin-13 low-dose group [Apelin-13 L, 25 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$] and Apelin-13 high-dose group [Apelin-13 H, 75 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], and 10 rats in each group. The model of femoral fracture was established and immediately treated with appropriate drugs for 4 weeks. Micro CT and X-ray were used to detect bone microscopic parameters and callus diameter. HE staining was used to observe bone tissue pathological changes. ELISA was used to detect the expression levels of serum bone markers BALP, PINP and osteoclast TRACP-5b, CTX. qRT-PCR was used to detect VEGFA mRNA expression levels in callus tissues, and Western blot was used to detect the expression levels of related proteins in the VEGF/PI3K/Akt signaling pathway in callus. **Results** Compared with the sham group, the Model group had severe pathological damage of femur and decreased femur bone density, tissue mineral density, bone mass fraction and X-ray score. BALP and PINP levels in serum decreased, while TRACP-5b and CTX levels increased, and VEGFA mRNA, VEGFA, VEGFR2, PI3K p85 and p-Akt expression levels in callus decreased. Compared with the Model group, the pathological injury of the femur in the Apelin-13 H group improved. Bone mineral density, tissue mineral density, bone volume fraction, X-ray score and callus diameter all increased. BALP and PINP levels in serum increased ($P < 0.05$), while TRACP-5b and CTX levels decreased, and VEGFA mRNA, VEGFA, VEGFR2, PI3K p85 and p-Akt expression levels in callus increased. There was no significant difference between Apelin-13 L group and Model group ($P > 0.05$). **Conclusion** Exogenous Apelin-13 can promote femoral fracture healing in rats, and its mechanism may be related to the activation of the VEGF/PI3K/Akt signaling pathway.

Key words Apelin-13; femoral fractures; angiogenesis; VEGF/PI3K/Akt signaling pathway