

# Apelin-13 体外促进猴视网膜血管内皮细胞增殖和迁移及管腔形成

谢坤鹏<sup>1</sup>, 刘平<sup>2</sup>, 王新<sup>2</sup>, 杜军辉<sup>3</sup>

基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划——面上项目(No. 2013020)

作者单位:<sup>1</sup>(450003)中国河南省郑州市,河南省立眼科医院;  
<sup>2</sup>(450003)中国河南省郑州市,郑州人民医院眼科;<sup>3</sup>(710054)  
中国陕西省西安市第九医院眼科

作者简介:谢坤鹏,毕业于郑州大学,硕士,主治医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:刘平,主任医师,主任,研究方向:角膜病、眼视光。

Lxylp2388@sina.com

收稿日期:2016-12-29 修回日期:2017-05-08

## Research on the promoting role of apelin-13 in proliferation, migration and capillary-like tube formation of RF/6A cells

Kun - Peng Xie<sup>1</sup>, Ping Liu<sup>2</sup>, Xin Wang<sup>2</sup>, Jun - Hui Du<sup>3</sup>

**Foundation item:** Natural Science Foundation of Shaanxi for Basic Research (No. 2013020)

<sup>1</sup>Henan Eye Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China;

<sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Ninth Hospital of Xi'an, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Ping Liu. Department of Ophthalmology, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. Lxylp2388@sina.com

Received:2016-12-29 Accepted:2017-05-08

## Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of apelin-13 on proliferation, migration and capillary-like tube formation of a monkey choroid / retinal endothelial cell line, RF/6A, to clarify whether apelin-13 could promote retinal angiogenesis *in vitro*.

• **METHODS:** RF/6A cells in good conditions were administrated with DMSO (the control group), apelin-13 at 0.1 μmol/L (low dose group) or apelin-13 at 1 μmol/L (high dose group). Cell proliferation, migration and capillary-like tube formation were detected by using the MTT assay, scratch assay and matrigel assay, respectively, at 24h after plating the cells.

• **RESULTS:** Cell proliferation was promoted in both low and high dose apelin-13 groups compared to the control cells ( $P < 0.05$ ); the cell migration distance of both apelin-

13 groups was significantly greater than that of the control group ( $P < 0.05$ ); and the number of capillary-like tube structures of both apelin-13 groups was significantly larger than that of the control cells ( $P < 0.05$ ). In addition, cell proliferation, migration and tube formation increased as the concentration of apelin-13 increased.

• **CONCLUSION:** Apelin-13 could obviously promote the angiogenesis capacity of RF/6A cells, suggesting that apelin-13 was an important pro-angiogenic factor in retinal endothelial cells.

• **KEYWORDS:** apelin; apelin-13; angiogenesis; retinal neovascularization

**Citation:** Xie KP, Liu P, Wang X, et al. Research on the promoting role of apelin-13 in proliferation, migration and capillary-like tube formation of RF/6A cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(6):1042-1046

## 摘要

**目的:**通过观察 apelin-13 对体外培养的猴脉络膜/视网膜内皮细胞(RF/6A)增殖、迁移和毛细血管样管腔形成的影响,探讨 apelin-13 是否对视网膜新生血管的发生具有促进作用。

**方法:**取生长状况良好的 RF/6A 细胞,分为对照组、低剂量组(0.1 μmol/L apelin-13)和高剂量组(1 μmol/L apelin-13)。培养细胞 24h 后采用 MTT 法检测细胞增殖,细胞划痕法检测细胞迁移,基质胶法检测管腔形成。

**结果:**不同浓度 apelin-13 作用 24h 的细胞增殖强于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),不同浓度 apelin-13 组 RF/6A 细胞 24h 的迁移距离大于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),不同浓度 apelin-13 组毛细血管样管腔形成数明显多于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且细胞增殖、迁移和管腔形成均随着 apelin-13 浓度的升高而增加。

**结论:**Apelin-13 能够明显促进 RF/6A 细胞的血管生成过程,提示 apelin-13 是一种促视网膜新生血管形成的重要因子。

**关键词:** apelin; apelin-13; 血管生成; 视网膜新生血管

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.6.08

**引用:**谢坤鹏,刘平,王新,等. Apelin-13 体外促进猴视网膜血管内皮细胞增殖和迁移及管腔形成. 国际眼科杂志 2017;17(6):1042-1046

## 0 引言

糖尿病性视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是一种严重的糖尿病眼部微血管并发症和致盲性眼病<sup>[1-2]</sup>。当疾病发展至增殖期 (proliferative diabetic retinopathy, PDR), 就会出现病理性的视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV)。RNV 的形成是一个涉及多种细胞因子的复杂过程<sup>[3-4]</sup>, 关键因子——血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的高表达与 DR 的发展有密切关联<sup>[5]</sup>。尽管临床已证实抗-VEGF 治疗 DR 是有效的, 但疗效持续时间较短, 并不能完全抑制 RNV 和视网膜细胞增殖, 且 VEGF 的水平也并非完全与 DR 的严重程度相关<sup>[6-8]</sup>, 提示还有其它因子在促进 DR 的发展中也发挥作用。近年的基础研究发现, 与代谢相关的脂肪因子 apelin 在血管内皮细胞高表达, 且其信号通路可能参与 RNV 生成<sup>[9-14]</sup>。临床研究也发现, PDR 患者玻璃体腔的 apelin 浓度明显高于非糖尿病患者<sup>[15]</sup>。apelin 在体内多种组织细胞广泛表达, apelin-13 是 apelin 在体内活性程度最高的产物, 为了观察 apelin-13 是否直接影响 RNV 的形成, 本研究采用体外培养的恒河猴脉络膜视网膜血管内皮细胞 (RF/6A 细胞), 观察分析 apelin-13 对该细胞增殖、迁移和毛细血管样管腔形成的影响, 以期为进一步研究 apelin 在糖尿病视网膜病变 RNV 形成中的作用提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** RF/6A 细胞系购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库; Apelin-13、二甲基亚砜 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司; DMEM 培养液、胎牛血清购自美国 GIBCO 公司; MTT 试剂盒购自北京索莱宝生物技术有限公司; 基质胶 Matrigel 购自美国 BD 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与分组** RF/6A 细胞在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中, 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中生长至细胞融合, 以 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取 3~5 代细胞用于实验。细胞在上述培养基中生长至 70%~80% 时, 换成含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 24h 后, 分别给予 0 (对照组)、0.1 μmol/L (低剂量组)、1 μmol/L (高剂量组) apelin-13 刺激 24h 后, 收集细胞进行实验。

**1.2.2 MTT 法分析细胞增殖** 取 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔板, 待细胞生长至 60%~80% 时, 换用含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 24h, 然后根据不同分组分别用 0、0.1、1 μmol/L apelin-13 (每种浓度设置 6 个平行孔) 处理细胞, 24h 后每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL, 在培养箱中继续孵育 4h, 弃去各孔培养液, 每孔加入 200 μL 的 DMSO。用自动酶标仪测定 490 nm 波长的吸光度值。每组重复检测 3 次。

**1.2.3 划痕法分析细胞迁移** 将 RF/6A 细胞按照每孔 2×10<sup>5</sup> 个的悬液接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁长至约 90%~95% 时, 用无菌枪头在培养板上划一条直径约 3 mm 的平直划痕, 用 PBS 反复漂洗去掉被刮下的悬浮细胞, 换成含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 高倍显微镜下拍照记录, 设为 0h 观测点。然后根据不同分组加入 0、0.1、1 μmol/L apelin-13 孵育 24h, 每组设 3 个复孔, 显微镜下观察拍照

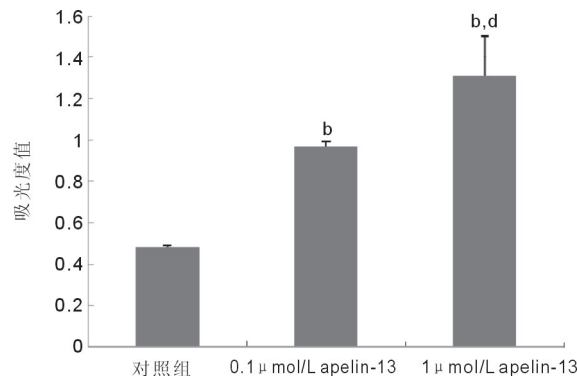


图1 各组细胞吸光度值情况 <sup>b</sup>*P*<0.001 vs 对照组, <sup>d</sup>*P*<0.001 vs 0.1 μmol/L apelin-13 组。

记录细胞迁移情况, 采用 Image J 图像处理软件进行图像分析, 计算划痕宽度, 以此代表细胞的迁移活性。实验重复 3 次。

**1.2.4 Matrigel 法分析毛细血管样管腔形成** 在 4℃ 条件下融化 Matrigel 胶过夜, 预冷 96 孔板和枪头。取 96 孔板在冰上操作, 每孔缓慢加入 100 μL 液态 Matrigel 胶。37℃ 孵育 30~60 min, 使 Matrigel 胶凝固; 按上述分组加入相应的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 将 RF/6A 细胞稀释为 2×10<sup>5</sup> 个/mL 细胞悬液, 每组加入 50 μL, 根据不同分组加入相应的含或不含 apelin-13 的培养基 50 μL。孵育 24h 后在显微镜下观察, 随机取 5 个放大 200 倍的视野照相, 采用 Image J 图像分析软件对形成的完整管腔进行计数 (每 3 个分叉处记为一个血管腔), 取平均值。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

统计学分析: 所有实验数据均采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理。计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多样本均数的比较采用单因素方差分析, 若存在差异, 进一步两组间的比较采用 LSD-*t* 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 apelin-13 促进 RF/6A 细胞增殖** MTT 结果显示, 培养 24h 不同分组细胞的吸光度值分别为: 对照组 0.48 ± 0.01、0.1 μmol/L apelin-13 组 0.97 ± 0.02、1 μmol/L apelin-13 组 1.31 ± 0.19, 三组间吸光度值有统计学差异 (*F* = 85.37, *P* < 0.001), 进一步组间两两比较发现, 对照组与 0.1 μmol/L apelin-13 组间的差异具有统计学意义 (*P* < 0.001), 对照组与 1 μmol/L apelin-13 组间的差异具有统计学意义 (*P* < 0.001), 0.1 μmol/L 与 1 μmol/L apelin-13 组间的差异具有统计学意义 (*P* < 0.001), 见图 1。apelin-13 组的吸光度值均高于对照组, 且随着 apelin-13 刺激浓度的升高, 其促增殖效应都相应增强。结果表明, apelin-13 能以浓度依赖性的方式促进 RF/6A 细胞增殖。

**2.2 apelin-13 促进 RF/6A 细胞迁移** 细胞划痕法实验结果显示, 培养 24h 后, 大量 RF/6A 细胞迁移入细胞划痕裸区 (图 2)。不同分组细胞的迁移距离分别为: 对照组 186 ± 58 μm、0.1 μmol/L apelin-13 组 267 ± 62 μm、1 μmol/L apelin-13 组 395 ± 71 μm, 三组间细胞迁移距离有统计学差异 (*F* = 15.89, *P* < 0.001), 与对照组相比, 各

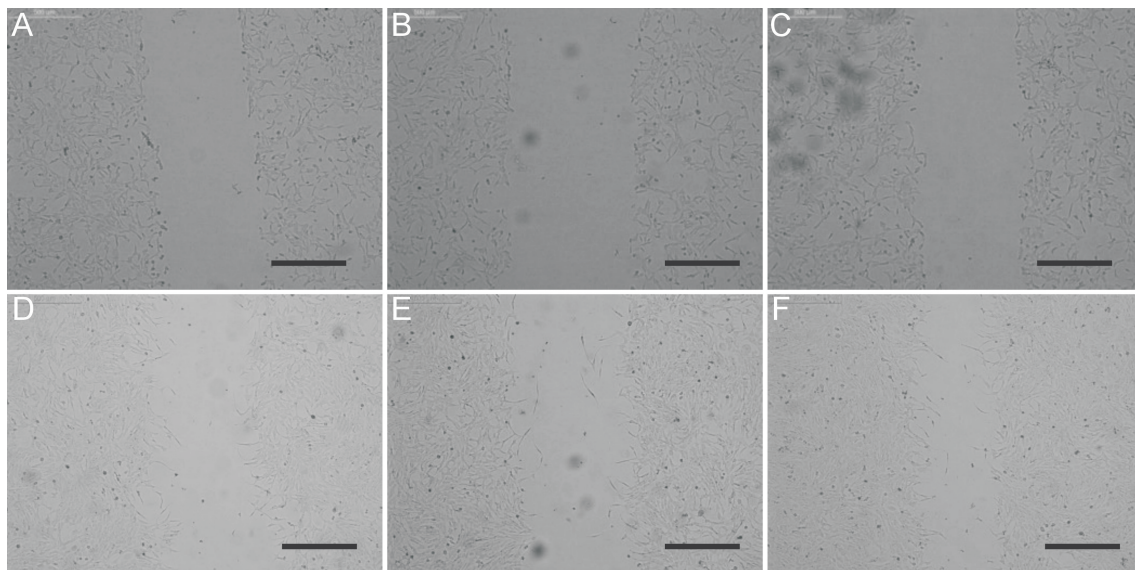


图2 显微镜下观察 RF/6A 细胞迁移图像( $\times 100$ ) A:对照组 0h;B:0.1  $\mu\text{mol/L}$  apelin-13 组 0h;C:1  $\mu\text{mol/L}$  apelin-13 组 0h;D:对照组 24h;E:0.1  $\mu\text{mol/L}$  apelin-13 组 24h;F:1  $\mu\text{mol/L}$  apelin-13 组 24h。

浓度 apelin-13 组 RF/6A 细胞迁移明显增强,有统计学差异( $P < 0.001$ ),且高浓度组细胞迁移高于低浓度组,有统计学差异( $P < 0.001$ ),见图3。结果提示用 apelin-13 刺激 RF/6A 细胞后,迁移细胞的数量比对照组增加,说明 apelin-13 刺激促进 RF/6A 细胞迁移。

### 2.3 apelin-13 促进 RF/6A 细胞毛细血管样管腔形成

Matrigel 实验结果显示,对照组和不同浓度 apelin-13 组 RF/6A 细胞形成的完整管腔数分别为:对照组  $3.2 \pm 1.5$  个、0.1  $\mu\text{mol/L}$  apelin-13 组  $6.5 \pm 2.3$  个、1  $\mu\text{mol/L}$  apelin-13 组  $11.5 \pm 3.8$  个(图4),三组间细胞管腔形成数有统计学差异( $F = 14.41, P < 0.001$ ),低浓度组细胞迁移高于对照组,有统计学差异( $P < 0.05$ ),高浓度 apelin-13 组管腔形成数高于对照组,有统计学差异( $P < 0.001$ ),也高于低浓度 apelin-13 组( $P < 0.01$ ),两组之间的差异均具有统计学意义,见图5。结果提示 apelin-13 能够促进 RF/6A 细胞毛细血管样管腔的形成。

### 3 讨论

近年来随着糖尿病发病率的逐年攀升,人类的身体健康及生活质量受到严重威胁。复杂的分子机制导致糖尿病患者出现一系列微血管病变,进而使其出现严重的并发症,包括糖尿病肾脏病变、视网膜病变以及神经病变等。DR 是糖尿病微血管病变的常见并发症之一,是糖尿病患者失明的主要原因。目前,针对 DR 并发的眼部新生血管,激光、抗新生血管药物和玻璃体切除手术虽然具有一定的疗效,但全世界尚未获得完全安全和有效的治疗方法。因此,研究 DR 及 RNV 的病理机制和治疗方法已经成为了眼科的研究热点。DR 发病机制复杂,普遍认为长期、慢性的高血糖引发的炎症反应和氧化应激促使血管内皮功能受损是其发病基础<sup>[16]</sup>,但对于 DR 的发病机制尚不完全明确,还需要进一步研究与证实。

Apelin 是一种近年发现的天然内源性生物活性肽,通过与 G 蛋白偶联受体 apelin-血管紧张素样受体(apelin-angiotensin receptor-like, APJ)结合激活 APJ 后,发挥重要的生物学效应。apelin 具有多种亚型,其中研究最广泛的

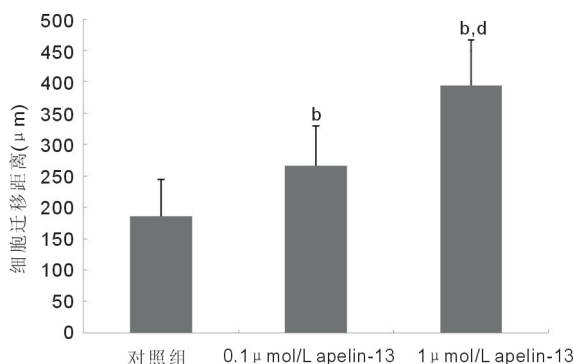


图3 各组细胞迁移距离情况 <sup>b</sup> $P < 0.001$  vs 对照组, <sup>d</sup> $P < 0.001$  vs 0.1  $\mu\text{mol/L}$  apelin-13 组。

是 apelin-13 和 apelin-36,而 apelin-13 比 apelin-36 具有更多生物潜能,其促增殖作用明显强于 apelin-36<sup>[17]</sup>。apelin-13 分布广泛,在人体大脑、心脏、胃、肾脏、视网膜、结肠、脐静脉、脂肪组织、骨间质祖细胞和血管内皮细胞中都能检测到 apelin-13 的表达。在糖尿病患者体内,apelin 的血浆水平较正常人低还是高,目前仍具有不少争议。有学者发现在糖尿病患者体内,apelin 的血浆水平是升高的<sup>[18]</sup>。然而,也有研究发现 apelin 在新诊断且未经治疗的糖尿病患者体内较正常对照组低<sup>[19]</sup>。据推测,在 2 型糖尿病或者合并肥胖、高血压等各种代谢紊乱的病理初期,机体启动自我保护机制,apelin 代偿性地升高,调控糖代谢稳态,随着病情的进展,病程的延长,胰岛素抵抗程度也随之增强,apelin 出现了失代偿性的降低。在 DR 的临床研究中,有研究发现无 DR、非增殖性 DR 和增殖性 DR 三组患者的血浆 apelin-36 水平无明显差异<sup>[20]</sup>。但也有学者发现增殖性 DR 血清中 apelin-13 的水平明显高于无 DR 的 2 型糖尿病患者<sup>[21]</sup>。这种差异可能与患者人群、样本量以及检测指标的不同有关。

血管形成是一个复杂的生物过程,包括细胞迁移、增殖、各种血管生长因子和细胞因子的调节以及周围组织在各种刺激作用下对内皮细胞释放各种因子的反应等,因此

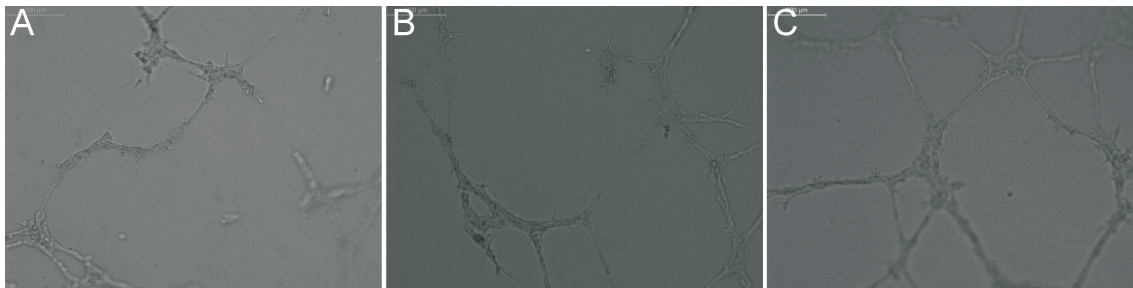


图4 显微镜下观察 RF/6A 细胞毛细血管状结构形成图像 (×200) A: 对照组 24h; B: 0.1 μmol/L apelin-13 组 24h; C: 1 μmol/L apelin-13 组 24h。

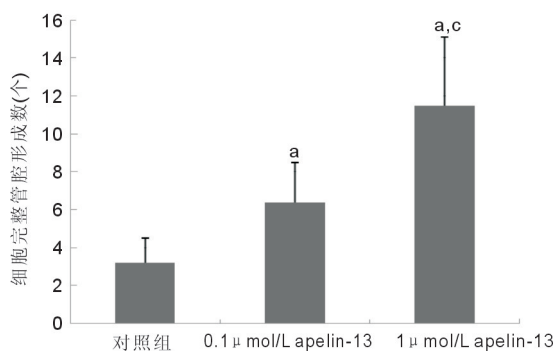


图5 各组细胞完整管腔形成数情况 <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组, <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 0.1 μmol/L apelin-13 组。

完整的网络状的血管形成是一个综合且累积的过程。研究发现, apelin-13 作为一种新型的生物调节肽, 对血管生成的细胞功能具有多重调节作用。Egr-1 对血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖和迁移具有重要意义, apelin-13 可能通过 Erk 上调 Egr-1 的表达, 从而促进 VSMC 的增殖<sup>[22-24]</sup>。另外, apelin-13 对于视网膜上皮细胞通过 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路诱导其增殖<sup>[25]</sup>。

本研究的结果表明, apelin-13 可以明显促进 RF/6A 细胞的增生、迁移和血管生成, 且均随着 apelin-13 浓度的升高而增加。由于新生血管的形成过程依赖于血管内皮细胞的增殖、迁移和毛细血管样管腔的形成, 可以认为, apelin-13 是一种新的血管形成因子。本次研究为 apelin-13 促视网膜新生血管形成提供了理论依据, 由于 apelin 与糖尿病的发生发展关系密切, 所以也为 apelin 参与 PDR 患者 RNV 的发生机制提供了间接证据。apelin-13 信号通路广泛分布于外周与中枢组织, 参与多种生理病理过程的调节。在疾病动物模型的研究中发现, apelin-13 可通过血管生成促进小鼠局部脑血供重建, 具有治疗缺血性脑卒中的潜能<sup>[26]</sup>。对严重下肢缺血小鼠, apelin-13 也可通过促进血管生成过程明显改善血流灌注和恢复血管功能, 具有治疗或协同治疗外周缺血性疾病的潜能<sup>[27]</sup>。不过, 目前对 apelin-13 信号系统功能的研究处于初始阶段。在今后的研究中, 一方面需要我们设立多个 apelin-13 浓度梯度, 进一步明确 apelin-13 促进 RF/6A 细胞血管形成过程的信号通路, 并对其作用机制深入研究; 另一方面, 还需要将 apelin-13 信号通路作为 PDR 等视网膜新生血管性疾病的治疗靶点进行针对性的临床前研究。由于 apelin 具有广泛的生物活性, 所以 APJ 可能成为药理设计的一个

新的靶点, 可以为治疗 PDR 等寻找新的靶点提供理论依据, 这将为 DR 治疗的研究开辟新领域。

#### 参考文献

- 1 Negi A, Vernon SA. An overview of the eye in diabetes. *J R Soc Med* 2003;96(6):266-272
- 2 Tielsch JM, Sommer A, Witt K, et al. Blindness and visual impairment in an American urban population. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol* 1990;108(2):286-290
- 3 Li SY, Fu ZJ, Lo AC. Hypoxia-induced oxidative stress in ischemic retinopathy. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:426769
- 4 Maxwell PH, Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13(1):29-37
- 5 Ozturk BT, Bozkurt B, Kerimoglu H, et al. Effect of serum cytokines and VEGF levels on diabetic retinopathy and macular thickness. *Mol Vis* 2009;15:1906-1914
- 6 Simo R, Hernandez C. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia* 2008;51(9):1574-1580
- 7 Wirosko B, Wong TY, Simo R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Prog Retin Eye Res* 2008;27(6):608-621
- 8 Patel JI, Tombran-Tink J, Hykin PG, et al. Vitreous and aqueous concentrations of proangiogenic, antiangiogenic factors and other cytokines in diabetic retinopathy patients with macular edema: implications for structural differences in macular profiles. *Exp Eye Res* 2006;82(5):798-806
- 9 Yue P, Jin H, Aillaud M, et al. Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298(1):59-67
- 10 Wang Z, Nakayama T. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm* 2010;2010:535918
- 11 Masri B, van den Berghe L, Sorli C, et al. Apelin signalling and vascular physiopathology. *J Soc Biol* 2009;203(2):171-179
- 12 Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, et al. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol* 2006;296(1):177-189
- 13 Kojima Y, Quertermous T. Apelin-APJ signaling in retinal angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(10):1687-1688
- 14 Zhao T, Lu Q, Tao Y, et al. Effects of apelin and vascular endothelial growth factor on central retinal vein occlusion in monkey eyes intravitreally injected with bevacizumab: a preliminary study. *Mol Vis* 2011;17:1044-1055
- 15 Tao Y, Lu Q, Jiang YR, et al. Apelin in plasma and vitreous and in fibrovascular retinal membranes of patients with proliferative diabetic

retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(8):4237-4242

16 卢百阳,武志峰. 糖尿病视网膜病变发病机制研究进展. *国际眼科杂志* 2008;8(11):2308-2311

17 Simpkin JC, Yellon DM, Davidson SM, et al. Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2007;102(6):518-528

18 Li L, Yang G, Li Q, et al. Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006;14(10):544-548

19 Erdem G, Dogru T, Tasci I, et al. Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008;116(5):289-292

20 Du JH, Li X, Li R, et al. Elevation of serum apelin-13 associated with proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients. *Int J Ophthalmol* 2014;7(6):968-973

21 Yonem A, Duran C, Unal M, et al. Plasma apelin and asymmetric dimethylarginine levels in type 2 diabetic patients with diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;84(3):219-223

22 李峰,李兰芳,秦旭平,等. Apelin-13 促血管平滑肌细胞增殖作用研究. *中国药理学通报* 2007;23(7):949-953

23 Li X, Zhang X, Li F, et al. 14-3-3 mediates apelin-13-induced enhancement of adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells. *Acta Biochim Biophys Sin* 2010;42(6):403-409

24 Liu QF, Yu HW, You L, et al. Apelin-13-induced proliferation and migration induced of rat vascular smooth muscle cells is mediated by the upregulation of Egr-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;439(2):235-240

25 Qin D, Zheng XX, Jiang YR. Apelin-13 induces proliferation, migration, and collagen I mRNA expression in human RPE cells via PI3K/Akt and MEK/Erk signaling pathways. *Mol Vis* 2013;19:2227-2236

26 Chen D, Lee J, Gu X, et al. Intranasal delivery of apelin-13 is neuroprotective and promotes Angiogenesis after ischemic stroke in mice. *ASN Neuro* 2015;7(5):1-15

27 Samura M, Morikage N, Suehiro K, et al. Combinatorial treatment with apelin-13 enhances the therapeutic efficacy of a preconditioned cell-based therapy for peripheral ischemia. *Sci Rep* 2016;6:19379