

腺相关病毒介导的 shRNA 敲低大鼠双侧臂旁 外侧核 EP3 受体对发热反应的影响

何田慧¹,王楠萍¹,吴思濂²,魏滢麟²,胥建辉¹,张洁¹

摘要 目的 研究腺相关病毒(AAV)介导的短发夹 RNA (shRNA)敲低臂旁外侧核(LPB)EP3受体表达对LPB微量注射前列腺素E₂(PGE₂)和腹腔注射脂多糖(LPS)引起的发热反应的影响。方法 构建干扰EP3受体表达的AAV载体,采用立体定位方法分别向shRNA-control组和shRNA-EP3组大鼠LPB注射AAV2-CMV-EGFP和AAV2-shRNA-Ptger3(EP3)-EGFP病毒。4周后,利用荧光显微镜观察AAV病毒的转染效率;采用实时荧光定量PCR检测LPB EP3受体mRNA表达的变化,以验证敲低效果;采用无线遥测和能量代谢测定的方法检测LPB微量注射生理盐水、PGE₂或腹腔注射LPS对shRNA-control组和shRNA-EP3组大鼠的体温(T_{core})和能量代谢(EE)的影响。结果 shRNA-EP3组及shRNA-control组大鼠AAV病毒转染主要集中于LPB脑区;与shRNA-control组相比,AAV病毒注射敲低了shRNA-EP3组大鼠LPB的EP3受体mRNA的表达(P<0.05);shRNA-control组和shRNA-EP3组大鼠的基础体温无明显差异,LPB微量注射生理盐水引起T_{core}和EE均出现短暂轻微的升高,但2组间无明显差异;与shRNA-control组相比,PGE₂升高shRNA-EP3组大鼠T_{core}作用明显减弱(P<0.05);shRNA-EP3组大鼠腹腔注射LPS后仍能引起发热反应,但与shRNA-control组相比,发热反应减弱,腹腔注射LPS后5.5 h的体温升高幅度明显降低(P<0.01)。结论 敲低LPB的EP3受体表达减弱了LPB微量注射PGE₂和腹腔注射LPS引起的发热反应,提示,LPB的EP3受体介导LPB PGE₂的致热作用,部分参与了LPS性发热。

关键词 发热;EP3受体;臂旁外侧核;脂多糖;前列腺素E₂

中图分类号 R 338;R 339.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)11-1872-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.012

外周注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)能够

诱导体温调节中枢视前区合成释放发热介质前列腺素E₂(prostaglandin E₂, PGE₂),PGE₂与诱导发热的关键受体即EP3受体结合后,引起炎症性发热^[1-4]。研究^[5-7]表明,参与前馈体温调节的臂旁外侧核(lateral parabrachial nucleus, LPB)也介导了发热反应。在清醒和麻醉大鼠LPB局部应用PGE₂均能引起明显的发热反应,其效应器机制与棕色脂肪代谢产热和骨骼肌战栗产热增强,尾部皮肤散热减少有关^[6-7]。在LPS致热过程中,LPB局部能够合成PGE₂,而且不管是减少LPB的PGE₂生成,还是直接毁损LPB,均减弱了LPS性发热反应,提示LPB部分参与了LPS致热反应,但LPB的PGE₂是否通过EP3受体参与LPS性发热尚不清楚。该实验采用RNA干扰、脑立体定位、无线遥测、能量代谢测定和实时荧光定量PCR等方法观察敲低LPB的EP3受体表达对LPB微量注射PGE₂和腹腔注射LPS引起的发热反应的影响,以研究EP3受体是否介导LPB PGE₂参与LPS致热反应的过程。

1 材料与方法

1.1 材料 雄性SD大鼠20只,体质量140~160 g,购自成都达硕实验动物有限公司,在标准饲养条件下单笼饲养。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)介导的AAV2-CMV-EGFP病毒(3.15×10¹² v. g./ml)及AAV2-shRNA-Ptger3(EP3)-EGFP病毒(3.42×10¹² v. g./ml)由上海吉凯基因化学技术有限公司提供, RNA Later购自美国Life公司, TRIzol购自美国Ivotrogen公司, PrimeScript™ RT reagent Kit购自大连TaKaRa公司, FastStart Essential DNA Probes Master及实时荧光PCR探针购自美国Roche公司。脑立体定位仪(68018)购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司,动物能量代谢分析系统(CLAMS-HC-8R)及温度传感器(G2 E-Mitter transponders)均购自美国Columbus Instruments公司,冰冻切片仪(CM1950)购自德国Leica公司,自动荧光显微镜(BX63)购自日本奥林巴斯公司,实时荧光定量PCR仪(CFX96)购自美国BIO-RAD公司。

2023-06-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:32100926,31771289);成都医学院校基金(编号:CYTD19-04);成都医学院研究生创新基金(编号:YCX2022-01-01)

作者单位:成都医学院¹ 体温与炎症四川省高校重点实验室、² 临床医学院,成都 610500

作者简介:何田慧,女,硕士;

张洁,女,教授,责任作者,E-mail:zhangjiefa8888@126.com

1.2 动物分组 20只SPF级雄性SD大鼠随机分为shRNA-control组(对照组)和shRNA-EP3组(实验组)各10只,每组动物中,5只用于实时荧光定量PCR实验,5只用于体温(T_{core})和能量代谢(EE)测定以及转染情况观察。分别向shRNA-control组和shRNA-EP3组大鼠LPB内注射AAV2-CMV-EGFP和AAV2-shRNA-Ptger3-EGFP病毒,2周后植入温度传感器,3周后植入留置导管,4周后进行相关指标检测,实验结束后处死大鼠制备含有LPB冰冻脑切片观察转染情况。

1.3 AAV2-shRNA-Ptger3-EGFP病毒合成 shRNA干扰序列的筛选和病毒载体的构建由上海吉凯基因化学技术有限公司完成。根据Ptger3(EP3受体)基因设计并合成3条shRNA干扰序列(表1)。经过外源筛选有效RNAi载体实验检测得知shRNA b序列对目的基因的表达有敲减作用,因而该靶点为有效靶点。最终通过AAV将shRNA b序列包装为AAV2-shRNA-Ptger3-EGFP病毒。

表1 大鼠Ptger3的3条shRNA及阴性对照shRNA

shRNA	序列(5'-3')
shRNA a	ATGCAAGACGCAGATGGGAAA
shRNA b	CTGCTGCTAAGAAAGATCCTT
shRNA c	CACCATGATGGTCACTGGCTT
shRNA 对照	CGCTGACTACTTCGAAATGTC

1.4 脑立体定位和病毒干扰 140~160g的大鼠经4%戊巴比妥钠(1ml/kg,腹腔注射)麻醉后,进行脑立体定位。LPB坐标为前囟后8.30~8.35mm,中线左右旁开2.10mm,深6.35~6.45mm。每只大鼠LPB的2个位点分别注射250nl病毒,注射速率为50nl/min。3周后,于LPB上方植入留置导管。术后连续3d肌肉注射头孢曲松钠(10mg/100g)以防止术后感染。

1.5 温度传感器植入和遥控测温 大鼠麻醉后,参照文献^[6-7]的方法,腹腔植入温度传感器。实验前连续7d,每天上午10时对实验大鼠进行头颈部抚摸(handle),以减轻大鼠的应激反应。实验前1天下午,将大鼠移入清洁代谢笼,置于人工气候箱内的无线遥测接收板上进行适应性过夜,并开启动物代谢分析系统监测大鼠 T_{core} 和EE。每日上午9:30—10:30利用大鼠头部留置导管向大鼠LPB注射生理盐水(0.1μl)、PGE₂(0.1μg/0.1μl)或腹腔注射脂多糖(100μg/kg),随后连续同步监测记录10h大鼠自由活动时的 T_{core} 和EE。

1.6 AAV病毒转染位点形态学检测 大鼠麻醉后,经升主动脉灌注生理盐水和多聚甲醛溶液进行前固定,剥离鼠脑后后进行后固定。用30%蔗糖溶液脱水,在冰冻切片机中沿冠状面切片,制备30μm厚含有LPB的脑切片,贴于黏附性玻片上,用抗荧光衰减封片剂封片后,用荧光显微镜检测病毒注射的位点及转染情况。

1.7 LPB EP3受体mRNA表达水平检测 大鼠麻醉后,断头取脑,参照文献^[6]用显微镊在冰上快速分离出LPB脑组织并转移至RNA later中,储存于-20℃备用。根据TRIzol试剂说明书提取样品总RNA,并测定总RNA的浓度和纯度。引物由成都擎科梓熙科技有限公司合成(表2)。根据PrimeScript逆转录试剂盒说明书,将样品总RNA反转录为cDNA。根据FastStart Essential DNA Probes Master试剂盒说明书检测β-肌动蛋白(β-actin)和Ptger3(EP3受体)的mRNA水平。EP3受体mRNA通过β-actin(内参)mRNA表达水平进行相对定量,计算方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

表2 实时荧光定量PCR引物

引物	引物序列(5'-3')
β-actin	F:CCCGCGAGTACAACCTTCT R:CGTCATCCATGGCGAACT
Ptger3	F:GATCCTTCTTCGAAAGTCTCTGC R:CTGGGGGAAGAAATTCTCATACT

1.8 统计学处理 采用SPSS 21.0统计软件进行数据分析。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,每组例数均为5。能量代谢用相对于基础值(给药前0.5h能量代谢平均值)的变化百分率即(测定值-基础值)/基础值×100%表示。shRNA-control组和shRNA-EP3组的LPB EP3受体mRNA表达水平差异、LPB注射PGE₂或生理盐水后 T_{core} 及EE的组间差异及腹腔注射LPS后2.5h和5.5h T_{core} 的组间差异均采用两样本独立t检验进行分析,LPB注射PGE₂或生理盐水或腹腔注射LPS后不同时间点相对于基础值的变化采用重复测量设计方差分析。

2 结果

2.1 AAV成功转染大鼠LPB并敲低LPB EP3受体mRNA的表达 由于对照病毒和干扰病毒均携带增强绿色荧光蛋白EGFP,故利用绿色荧光来观察病毒表达部位。在荧光显微镜下观察到shRNA-EP3组及shRNA-control组大鼠AAV病毒转染均主

要集中于 LPB 脑区(图 1A、B),提示 AAV 病毒成功转染至两组大鼠的 LPB。接下来,通过实时荧光定量 PCR 验证 2 组大鼠 LPB 的 EP3 受体 mRNA 表达的变化。结果显示,与 shRNA-control 对照组相比,AAV 病毒注射敲低了 shRNA-EP3 组大鼠 LPB 的 EP3 受体 mRNA 的表达($P < 0.05$) (图 1C)。提示,AAV 介导的 shRNA 有效敲低了大鼠 LPB EP3 受体 mRNA 的表达。

2.2 敲低 LPB 的 EP3 受体表达对基础体温的影响
shRNA-control 组和 shRNA-EP3 组大鼠在 24 °C 环

境中的基础体温差异无统计学意义;向 2 组清醒大鼠 LPB 微量注射生理盐水均引起 T_{core} 和 EE 出现短暂轻微的升高,但 2 组间差异无统计学意义(图 2)。

2.3 敲低 LPB 的 EP3 受体表达对 LPB PGE_2 致热作用的影响
向 shRNA-control 组清醒大鼠 LPB 注射 PGE_2 引起 T_{core} 和 EE 均明显升高,其峰值分别出现在给药后的 30 min 和 25 min。而往 shRNA-EP3 组大鼠 LPB 注射 PGE_2 引起清醒大鼠 T_{core} 和 EE 均仅有轻微升高,与 shRNA-control 组相比, T_{core} 升高作用明显减弱,EE 也有降低趋势(图 3)。

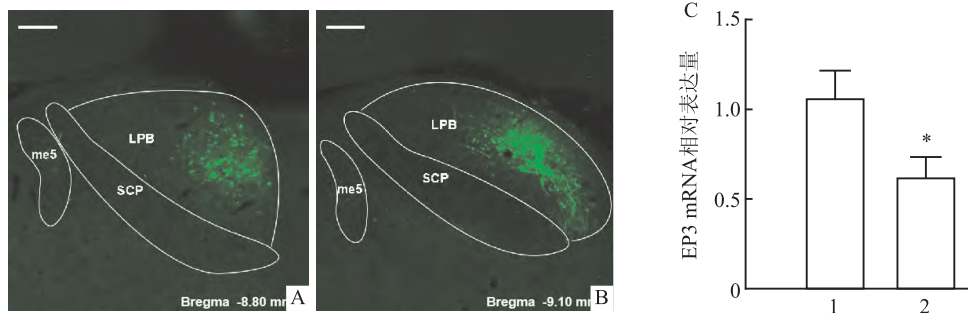


图 1 病毒注射 4 周后大鼠 LPB 转染效果以及 LPB EP3 受体 mRNA 表达的变化

A、B:大鼠 LPB 微量注射 AAV 4 周后,前后不同水平 LPB 病毒表达(绿色)示意图 ×40;me5:中脑三叉神经核;SCP:小脑上脚;C:大鼠 LPB 微量注射 AAV 4 周后,LPB 中 EP3 受体的基因表达水平;1:shRNA-control 组;2:shRNA-EP3 组;与 shRNA-control 组比较;* $P < 0.05$

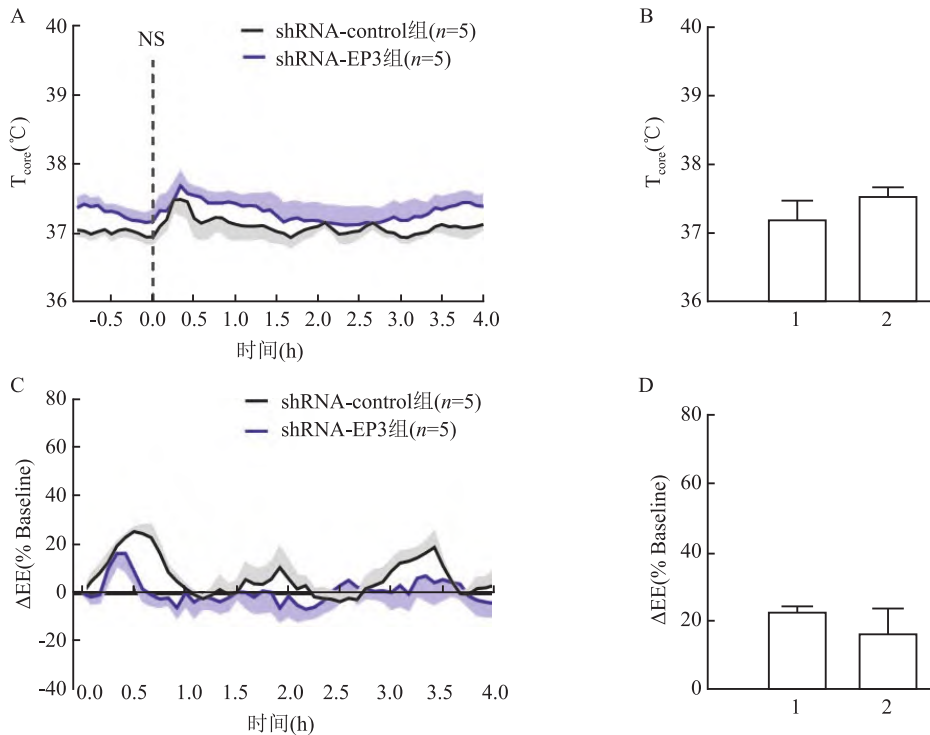


图 2 LPB 应用生理盐水对 shRNA-control 组和 shRNA-EP3 组大鼠 T_{core} 和 EE 的影响

A、C:同时监测 LPB 微量注射生理盐水对 2 组清醒大鼠 T_{core} 和 EE 的影响(虚线表示注射时间点);B、D:LPB 注射生理盐水后 2 组大鼠 T_{core} (30 min, A) 和 EE(25 min, B) 的比较;1:shRNA-control 组;2:shRNA-EP3 组

2.4 敲低 LPB 的 EP3 受体表达对 LPS 性发热的影响 shRNA-control 组大鼠腹腔注射 LPS 引起典型的双相发热,体温分别在 2.5 h 和 5.5 h 左右达峰值,且均高于基础体温水平。shRNA-EP3 组大鼠腹腔

注射 LPS 后也引起体温升高,5.5 h 体温与基础体温比较明显升高,但与 shRNA-control 组相比,发热反应减弱,腹腔注射 LPS 后 5.5 h 的体温明显低于 shRNA-control 组,2.5 h 的体温也有降低趋势(图 4)。

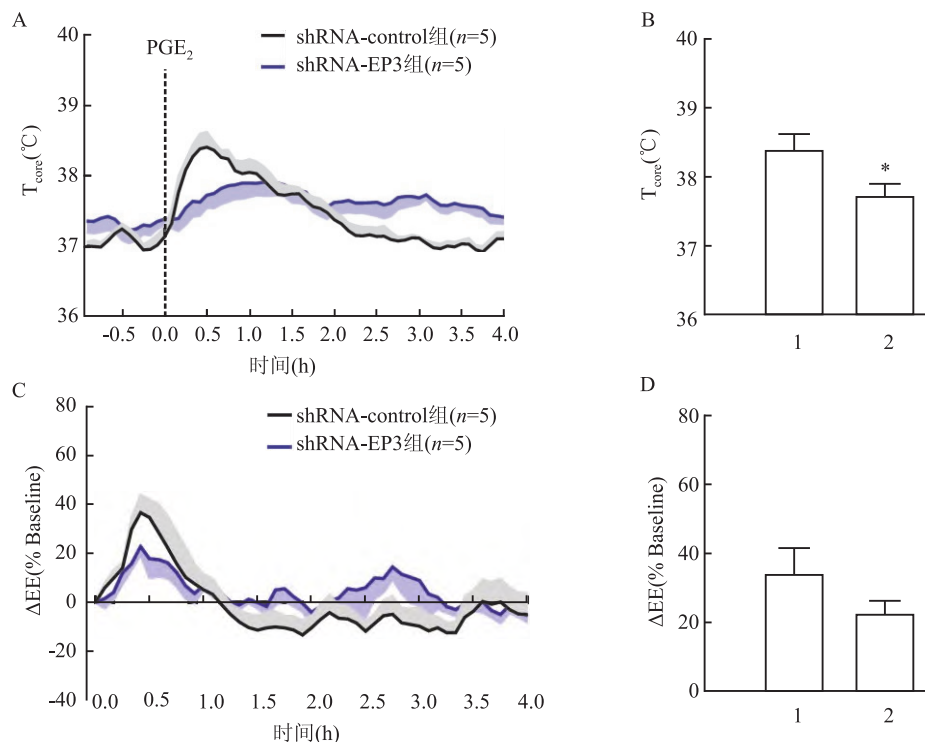


图3 LPB微量注射PGE₂对shRNA-control组和shRNA-EP3组大鼠T_{core}和EE的影响

A、C:同时监测LPB微量注射PGE₂对2组清醒大鼠T_{core}和EE的影响(虚线表示注射时间点);B、D:LPB注射PGE₂后2组大鼠T_{core}(30 min)和EE(25 min)的比较;1:shRNA-control组;2:shRNA-EP3组;与shRNA-control组比较:**P*<0.05

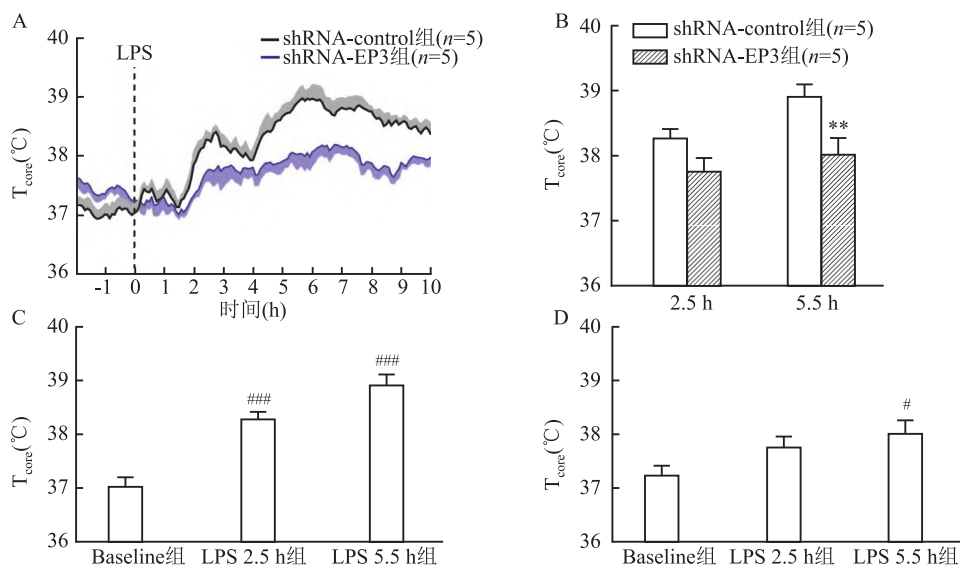


图4 腹腔注射LPS对shRNA-control组和shRNA-EP3组大鼠T_{core}的影响

A:腹腔注射LPS对2组清醒大鼠T_{core}的影响(虚线表示注射时间点);B:腹腔注射LPS后2组大鼠2.5 h和5.5 h T_{core}的比较;C、D:腹腔注射LPS后shRNA-control组和shRNA-EP3组;与shRNA-control组比较:***P*<0.01;与Baseline组比较:##*P*<0.05,###*P*<0.001

3 讨论

在 LPS 等致热源的刺激下,发热介质 PGE₂ 合成并释放到参与体温调节的脑区,与其受体结合后引起发热^[1-4]。PGE₂ 受体包括 EP1-EP4 4 个类型,其中 EP3 受体介导了 PGE₂ 的大部分中枢发热效应,是诱导发热的关键受体^[2]。研究^[6-7]表明,LPB 也参与发热反应,是 PGE₂ 在视前区外的又一致热作用部位,但 LPB PGE₂ 的致热作用是否由 EP3 受体介导尚需证实。该研究通过 AAV 介导的 shRNA 敲低大鼠 LPB EP3 受体表达的模型,观察 LPB EP3 受体表达降低对发热反应的影响,以研究 LPB EP3 受体是否介导 LPB PGE₂ 的致热作用以及 LPS 引起的全身性发热反应。该研究采用脑立体定位注射的方式将 AAV 直接注入 LPB,并参考文献^[8],选择注射 AAV 病毒 4 周这个时间点观察病毒转染和敲低效率。在荧光显微镜下,shRNA-EP3 组及 shRNA-control 组大鼠 AAV 病毒转染主要集中于 LPB 脑区,确保了干扰部位的局限性;与 shRNA-control 对照组相比,shRNA-EP3 组大鼠 LPB 的 EP3 受体 mRNA 的表达明显减少,表明 AAV2-shRNA-Ptger3-EGFP 病毒有效敲低了 LPB 的 EP3 受体表达。shRNA-control 组和 shRNA-EP3 组大鼠的基础体温无明显差异,LPB 微量注射生理盐水引起 2 组大鼠均出现核团注射操作引起的 T_{core} 和 EE 的短暂轻微升高,但 2 组间无明显差异,提示,LPB EP3 受体未参与基础体温的调节以及注射操作引起的应激性体温升高。往 shRNA-control 组清醒大鼠 LPB 注射 PGE₂ 引起 EE 和 T_{core} 明显升高,其峰值分别出现在给药后的 25 min 和 30 min,这与先前研究^[6] LPB PGE₂ 通过增加产热,诱导发热的结果一致。而向 shRNA-EP3 组大鼠 LPB 注射 PGE₂ 引起清醒大鼠 T_{core} 和 EE 均仅有轻微升高,与 shRNA-control 组相比,T_{core} 升高作用明显减弱,EE 增加也有减弱趋势,提示 EP3 受体介导了 LPB PGE₂ 的致热作用。

Oishi et al^[9] 研究表明,特异性敲除小鼠神经系统的 EP3 受体,消除了 LPS 诱导的发热反应,提示神经系统的 EP3 受体介导了 LPS 性发热。进一步的研究^[4] 表明,视前区的 EP3 受体在 LPS 性发热中起关键作用。另有报道^[10] 显示,选择性抑制环氧酶-1,减少 PGE₂ 生成,可阻断 LPS 诱导的发热反应和 LPB 等脑区的 Fos 蛋白(神经元激活标志物)表达。敲除 PGE₂ 合成的终端酶 mPGES-1 也明显减少了 LPS 诱导的 LPB 等脑区 Fos 蛋白表达。先前实

验^[6-7] 显示,腹腔注射 LPS 后,大鼠 LPB 的环氧酶-2 与 mPGES-1 的 mRNA 和蛋白的表达均明显上调;而且不管是向双侧 LPB 注射环氧酶-2 抑制剂减少 PGE₂ 的生成,还是应用鹅膏氨酸直接毁损 LPB,均减弱了 LPS 性发热反应幅度,提示,LPB 合成的 PGE₂ 可能参与了 LPS 性发热,但该过程是否由 LPB EP3 受体介导尚不清楚。在 shRNA-control 组中,大鼠腹腔注射 LPS 引起典型的双相发热,体温分别在 2.5 h 和 5.5 h 左右达峰值,这与先前研究^[1,6-7] 报道的 LPS 致热反应一致,说明 AAV 病毒注射对 LPS 性发热没有影响。在 shRNA-EP3 组,大鼠腹腔注射 LPS 后也引起体温升高,5.5 h 体温明显高于基础体温,但与 shRNA-control 组相比,发热反应明显减弱,腹腔注射 LPS 后 5.5 h 的体温低于 shRNA-control 组,提示敲低 LPB EP3 受体表达削弱了 LPS 引起的发热,LPB EP3 受体部分参与了 LPS 引起的全身性发热。

综上所述,敲低 LPB 的 EP3 受体表达不但削弱了 LPB 局部应用 PGE₂ 引起的发热反应,还减弱了腹腔注射 LPS 引起的全身性发热。提示 LPB PGE₂ 的致热作用由 EP3 受体介导,表明除了视前区 EP3 受体,LPB 的 EP3 受体也在 LPS 性发热中起一定作用。

参考文献

- [1] Nakamura K, Nakamura Y, Kataoka N. A hypothalamomedullary network for physiological responses to environmental stresses[J]. Nat Rev Neurosci, 2022, 23(1):35-52.
- [2] Machado N L S, Bandaru S S, Abbott S B G, et al. EP3R-expressing glutamatergic preoptic neurons mediate inflammatory fever[J]. J Neurosci, 2020, 40(12):2573-88.
- [3] Osterhout J A, Kapoor V, Eichhorn S W, et al. A preoptic neuronal population controls fever and appetite during sickness[J]. Nature, 2022, 606(7916):937-44.
- [4] Osaka T. The EP(3) and EP(4) receptor subtypes both mediate the fever-producing effects of prostaglandin E(2) in the rostral ventromedial preoptic area of the hypothalamus in rats[J]. Neuroscience, 2022, 494:25-37.
- [5] Yang W Z, Du X, Zhang W, et al. Parabrachial neuron types categorically encode thermoregulation variables during heat defense[J]. Sci Adv, 2020, 6(36):eabb9414.
- [6] Cheng Y, Xu J, Zeng R, et al. The role of prostaglandin E₂ synthesized in rat lateral parabrachial nucleus in LPS-induced fever[J]. Neuroendocrinology, 2022, 112(4):399-416.
- [7] 高文敏,何田慧,姚 兰,等. 大鼠臂旁外侧核化学毁损模型对脂多糖致热反应的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2022, 48(6):1375-81.

- [8] Zhou Q, Fu X, Xu J H, et al. Hypothalamic warm-sensitive neurons require TRPC4 channel for detecting internal warmth and regulating body temperature in mice[J]. *Neuron*, 2023, 111(3): 387–404.
- [9] Oishi Y, Yoshida K, Scammell T E, et al. The roles of prostaglandin E₂ and D2 in lipopolysaccharide-mediated changes in sleep [J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 47:172–7.
- [10] Zhang Y H, Lu J, Elmquist J K, et al. Specific roles of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced fever and Fos expression in rat brain[J]. *J Comp Neurol*, 2003, 463(1):3–12.

The effect of adeno-associated virus delivery of shRNA against EP3 receptors in the bilateral lateral parabrachial nucleus of rats on fever

He Tianhui¹, Wang Nanping¹, Wu Sihao², Wei Yanlin², Xu Jianhui¹, Zhang Jie¹

(¹Key Laboratory of Thermoregulation and Inflammation of Sichuan Higher Education Institutes,

²School of Clinical Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500)

Abstract Objective To investigate the effect of adeno-associated virus (AAV) delivery of short hairpin RNA (shRNA) against the Ptger3 gene in the lateral parabrachial nucleus (LPB) on the fever induced by microinjection of prostaglandin E₂ (PGE₂) into the LPB and the intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). **Methods** AAV2-shRNA-Ptger3 (EP3)-EGFP (shRNA-EP3) and AAV2-CMV-EGFP (shRNA-control) viruses were constructed and transfected the rat LPB by stereotaxic injection. Four weeks later, the transfection efficiency of AAV viruses was observed by fluorescence microscopy, and the knockdown efficiency was determined by real-time PCR of EP3 receptor mRNA on the LPB. The effects of microinjection of saline or PGE₂ in the LPB or intraperitoneal injection of LPS on body temperature (T_{core}) and energy expenditure (EE) of shRNA-control group and shRNA-EP3 group were monitored using an animal monitoring system with temperature telemetry. **Results** AAV virus transfection of shRNA-EP3 group and shRNA-control group was mainly found in the LPB. The EP3 receptor mRNA level in LPB of shRNA-EP3 group was reduced compared with that of shRNA-control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in basal body temperature between shRNA-control group and shRNA-EP3 group. T_{core} and EE were briefly and slightly increased after microinjection of saline in the LPB, but there was no significant difference between the two groups. Compared with the shRNA-control group, the febrile response induced by LPB PGE₂ was attenuated in the shRNA-EP3 group ($P < 0.05$). Furthermore, the knockdown of EP3 receptor of LPB also attenuated the LPS-induced fever, and the T_{core} 5.5 h post-LPS in the shRNA-EP3 rats increased compared with the baseline ($P < 0.05$), which was lower than that in the shRNA-control rats ($P < 0.01$). **Conclusion** EP3 receptor knockdown in LPB attenuates the febrile response induced by microinjection of PGE₂ in the LPB and intraperitoneal injection of LPS, suggesting that EP3 receptors of LPB mediate the pyrogenic action of LPB PGE₂ and partly participate in LPS-induced fever.

Key words fever; EP3 receptors; lateral parabrachial nucleus; lipopolysaccharide; prostaglandin E₂