

# 精氨酸加压素兴奋视前区正中核谷氨酸能神经元及其机制

侯晓钰<sup>1</sup>, 宋宜安<sup>1</sup>, 何田慧<sup>2</sup>, 高文敏<sup>2</sup>, 张洁<sup>2</sup>, 胥建辉<sup>2</sup>

**摘要** 目的 研究精氨酸加压素(AVP)对小鼠视前区正中核谷氨酸能(MnPO<sup>Vglut2</sup>)神经元放电活动的影响及其机制。方法 采用Vglut2-tdTomato雄性小鼠制作脑片,通过荧光显微镜找到表达红色荧光蛋白的MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元,应用全细胞膜片钳技术观察AVP对MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元放电频率的影响;或观察突触传递阻断剂(STBs)对AVP引起的MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元放电频率改变的影响;或观察AVP的V1a受体拮抗剂对AVP引起的MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元放电频率改变的影响。结果 与灌流人工脑脊液(ACSF)时比较,灌流ACSF+AVP时,MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元的平均放电频率明显升高( $P < 0.01$ ),表明AVP可兴奋MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元。与灌流ACSF+STBs时比较,灌流ACSF+STBs+AVP时,MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元的平均放电频率仍明显升高( $P < 0.001$ );此外,与灌流ACSF+AVP时比较,灌流ACSF+STBs+AVP时,AVP引起的MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元的放电频率增加幅度无明显改变( $P > 0.05$ ),提示AVP通过突触后的机制直接兴奋MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元。与灌流ACSF+STBs+AVP时比较,灌流ACSF+STBs+AVP+V1a受体拮抗剂时,AVP引起的MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元的放电频率增加幅度明显下降( $P < 0.01$ ),提示AVP通过V1a受体直接兴奋MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元。结论 AVP可通过突触后的机制经V1a受体直接兴奋MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元。该研究揭示了AVP作用的MnPO神经元的分子标记。

**关键词** 精氨酸加压素;视前区正中核;谷氨酸能神经元;体温调节

中图分类号 R 338; R 339.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0418-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.012

精氨酸加压素(arginine vasopressin, AVP)是一种九肽神经激素。它可由室旁核和视交叉上核等核团的神经元合成并释放到中枢,参与机体内源性降

温以及体温昼夜节律的形成<sup>[1-4]</sup>。视前区正中核(median preoptic nucleus, MnPO)是整合多种体温调节信号的重要核团<sup>[5]</sup>。近年研究<sup>[2,4]</sup>提示释放到中枢的AVP可能通过影响MnPO神经元的活动发挥降温作用。但是目前还不清楚介导AVP降温作用的MnPO神经元的分子标记。MnPO神经元可分为表达囊泡型谷氨酸转运蛋白2(vesicular glutamate transporter2, Vglut2)的谷氨酸能神经元和表达氨基丁酸转运蛋白的 $\gamma$ -氨基丁酸能神经元。研究<sup>[6-7]</sup>发现,激活MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元可引起体温降低;但是激活MnPO的 $\gamma$ -氨基丁酸能神经元无法引起明显的体温变化,提示释放到MnPO的AVP可能通过激活MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元引起体温降低。作者据此推测AVP可能兴奋MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元,目前尚无相关报道。因此,该研究利用Vglut2-tdTomato报告基因小鼠,通过脑片膜片钳技术观察AVP对MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元放电活动的影响,并探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、主要试剂和仪器** 由Vglut2-IRES-Cre小鼠和Rosa-ttdTomato小鼠杂交产生Vglut2-ttdTomato红色荧光蛋白报告基因小鼠(上海科技大学神经与代谢研究实验室提供),经过鉴定为阳性子代后用于实验。实验用Vglut2-ttdTomato雄性小鼠32只,均自由饮食和进水,饲养温度( $25 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,明暗时间各12 h,8周后开始实验。本动物实验经过了本单位实验动物伦理委员会的批准(批号:2021014)。NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaHCO<sub>3</sub>、葡萄糖和戊巴比妥钠等试剂均购自成都科龙化工试剂厂。AVP、AVP的V1a受体拮抗剂(V1a receptor antagonist, V1a ant)、乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA)、羟乙基等哌嗪乙磺酸(HEPES)、Mg-ATP和Na<sub>2</sub>GTP、CNQX、AP5和bicuculline均购自美国Sigma公司,玻璃电极购自美国Sutter公司。人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF): 124 mmol/L NaCl, 26 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 5 mmol/L KCl, 2.4 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1.3 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 1.24 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mmol/L 葡萄

2023-03-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31771289、32100926); 成都医学院自然科学基金项目(编号: CYZYB21-46); 成都市医学科研课题(编号: 2022093)

作者单位: 成都医学院<sup>1</sup>第一附属医院产科、<sup>2</sup>体温与炎症四川省高校重点实验室, 成都 610500

作者简介: 侯晓钰, 女, 主治医师;

胥建辉, 男, 助理研究员, 责任作者, E-mail: helloxjh@126.com

糖。电极内液: 130 mmol/L potassium gluconate, 10 mmol/L EGTA, 10 mmol/L HEPES, 2 mmol/L Mg-ATP, 2 mmol/L Na<sub>2</sub>GTP, and 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>。渗透压调至 295 mOsm/kg, pH 调至 7.2 ~ 7.4。EPC-10 膜片钳放大器购自德国 HEKA 公司, FN1 荧光显微镜购自日本尼康公司, P97 电极拉制仪和 MPC-385 电动式微操纵器购自美国 Sutter 公司, TC324B 和 CL-100 温度控制仪购自美国 warner 公司, LEAD-2 蠕动泵购自保定兰格恒流泵有限公司。

**1.2 脑片制备** 参照以往报道<sup>[4,8]</sup>的方法,戊巴比妥钠麻醉小鼠,断头取脑,置于充以混合氧(95% CO<sub>2</sub>和5% O<sub>2</sub>)的0~4℃ ACSF中冷冻,1~2 min后取出修块,用少量502胶将修好的组织块固定在切片机上,切下约250 μm厚的包含 MnPO 的冠状脑片,在充以混合氧的34℃ ACSF中孵育1 h以上备用。

**1.3 MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元的选择与鉴定** 利用恒温灌流系统将充以混合氧的 ACSF 维持在 36℃ 左右。此后,将包含 MnPO 的脑片移入充满 ACSF 的灌流槽内,参考 Paxinos-Watson 小鼠脑图谱,在显微镜下找到 MnPO 区。参照既往文献<sup>[7]</sup>,荧光显微镜下散发红色荧光的神经元即为 Vglut2 神经元。

**1.4 突触传递阻断剂(synaptic transmission blockers STBs)的选择** N-甲基-D-天冬氨酸受体阻断剂(CNQX)和 α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑受体阻断剂(AP5)是兴奋性神经递质谷氨酸的受体阻断剂,bicuculline 是抑制性神经递质 γ-氨基丁酸的受体阻断剂。参考既往文献<sup>[9-10]</sup>,本研究通过往 ACSF 中加入 CNQX(10 μmol/L)、AP5(50 μmol/L)和 bicuculline(50 μmol/L)混合液的方式阻断突触传递。

**1.5 全细胞膜片钳记录** 在显微镜下挑选状态良好的 Vglut2 神经元,选择入水电阻 6M Ω 左右的玻璃电极进行细胞封接。调整微操纵器使玻璃电极靠近细胞,在电极入水直至电极接触细胞之前持续给予 10~30 mm 水柱正压,接触细胞时放开正压,通过细胞自然回弹或者负压吸引封堵电极口形成 G Ω 阻抗封接,封接稳定后电击破膜,此后切换至电流钳模式(I=0),记录 Vglut2 神经元的膜电位变化,电流信号经放大器放大后显示在计算机上。此后,往 ACSF 中加入 AVP(1 μmol/L)。为了进一步观察 STBs 对 AVP 及其受体拮抗剂作用的影响,将各种 STBs 以混合液的方式加入 ACSF 中。灌流 2.5 min

以上后,继续加入 STBs + AVP,STBs + V1a 受体,或 STBs + V1a 受体 + AVP 混合液。加药完毕后洗脱 10 min,以去除药物对神经元的影响。

**1.6 统计学处理** 数据采集通过 Pachmaster 软件进行,采样频率 10 kHz,低通滤波 2 kHz。分析软件采用 Clampfit10.1。动作电位图形处理采用 origin9.0。参照以往文献<sup>[4]</sup>,计算加药前 1 min 神经元的放电频率平均值,作为基础放电值;计算加药时持续 1 min 的放电频率平均值,作为加药时的响应值。加药时,神经元放电频率的百分比改变(变化幅度) = (加药时的放电频率平均值 - 加药前的放电频率平均值) / 加药前的放电频率平均值。采用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验或配对 *t* 检验进行分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 显微镜下 MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元的细胞形态** 将显微镜视野定位至脑片的 MnPO 区后,高倍镜下散发红色荧光的神经元即为 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元。活性较好的 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元形态多呈椭圆形,细胞膜完整,表面光滑,边缘清晰,立体感强,细胞质内无颗粒状物,细胞表面接触电极尖端的位置可发生轻度凹陷。见图 1。

**2.2 AVP 对 MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元放电频率的影响** 共有 16 个 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元完成了实验程序。灌流 ACSF 时, MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的基础平均放电频率为 (6.1 ± 1.2) Hz (*n* = 16)。灌流 ACSF + AVP 时, MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的平均放电频率上升至 (8.3 ± 1.4) Hz,增加幅度为 75.5% ± 28% (*n* = 16)。与灌流 ACSF 时(基础放电)比较,加入 AVP 后,小鼠 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的平均放电频率明显升高 (*n* = 16, *P* < 0.01)。见图 2。

**2.3 STBs 对 AVP 引起 MnPO<sup>Vglut2</sup>神经元放电频率改变的影响** 共有 16 个 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元完成了实验程序。与灌流 ACSF + STBs 时比较(基础放电),灌流 ACSF + STBs + AVP 时, MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的平均放电频率仍明显增加 [(4.5 ± 0.7) Hz vs (6.7 ± 0.9) Hz, *n* = 16, *P* < 0.001],增加幅度为 82.5% ± 23.5%。此外,与灌流 ACSF + AVP 时比较,灌流 AVSF + STBs + AVP 时, AVP 引起的 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的放电频率增加幅度无明显改变 (75% ± 28% vs 82.5% ± 23.5%, *n* = 16, *P* > 0.05)。

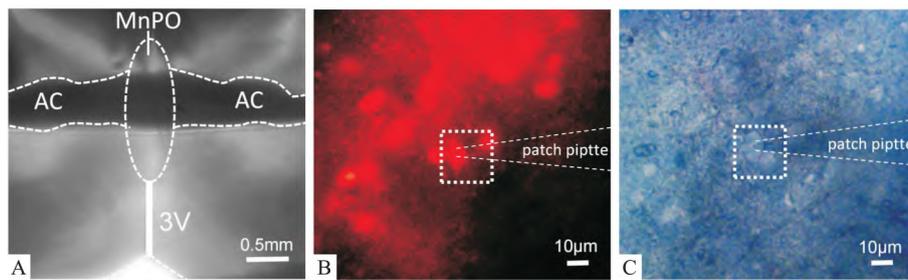


图1 显微镜下包含 MnPO 的冠状脑片和 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元

A: 显微镜下包含 MnPO 的冠状脑片; AC: 前联合; 3V: 第三脑室; B: 荧光激发光源下散发红色荧光的 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元; C: 普通光源下的 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元; patch pipette: 膜片钳玻璃电极

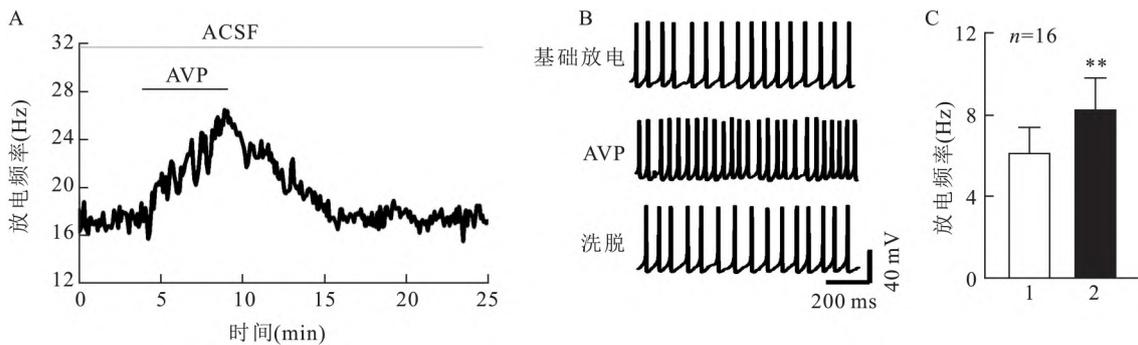


图2 AVP 增加 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的放电频率

A: 在 ACSF 中加入 AVP 前后 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的典型放电频率改变图; B: 加入 AVP 前后 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的原始动作电位图; C: 加入 AVP 前后 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的平均放电频率改变图; 1: 基础放电; 2: AVP; 与基础放电比较: \*\*  $P < 0.01$

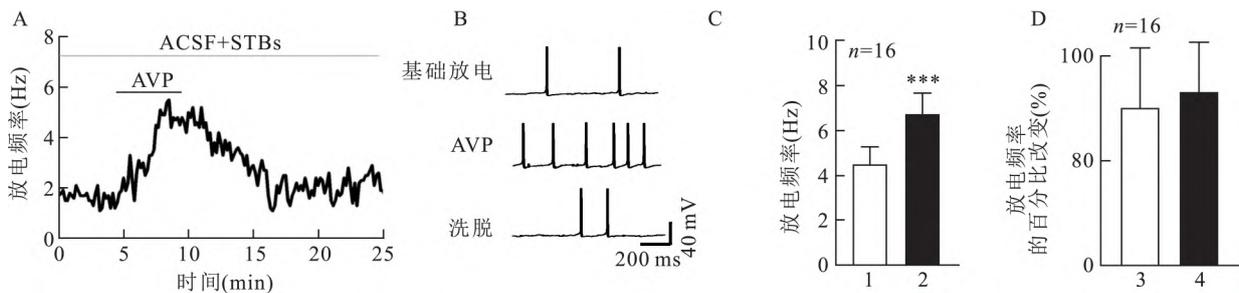


图3 STBs 未消除 AVP 对 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的兴奋作用

A: 在含有 STBs 的 ACSF 中加入 AVP 前后 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的典型放电频率变化图; B: 加入 AVP 前后 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的原始动作电位图; C: 加入 AVP 前后 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的平均放电频率改变图; 1: 基础放电; 2: AVP; D: 在灌流的 ACSF 中加入 STBs 前后 AVP 引起的 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的放电频率变化幅度图; 3: ACSF + AVP 组; 4: ACSF + STBs + AVP 组; 与基础放电比较: \*\*\*  $P < 0.001$

见图 3。

**2.4 V1a ant对 AVP 引起 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元放电频率改变的影响** 共有 7 个 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元完成了实验程序。与灌流 ACSF + STBs 时比较 (基础放电) ,灌流 ACSF + STBs + AVP 时 ,MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的平均放电频率明显增加 [(5.4 ± 2.8) Hz vs (9.1 ± 3.7) Hz  $n = 7$  ,  $P < 0.001$  ]。与灌流 ACSF + STBs

时比较 ,灌流 ACSF + STBs + AVP + V1a ant 时 ,MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的平均放电频率未发生明显改变 [(5.4 ± 3.2) Hz vs (5.9 ± 3.5) Hz ,  $n = 7$  ,  $P > 0.05$  ]。与灌流 ACSF + STBs + AVP 时比较 ,进一步加入 V1a ant 后 ,AVP 引起的 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的放电频率增加幅度明显下降 (102.6% ± 27% vs 13.4% ± 6.7%  $n = 7$  ,  $P < 0.01$  )。见图 4。

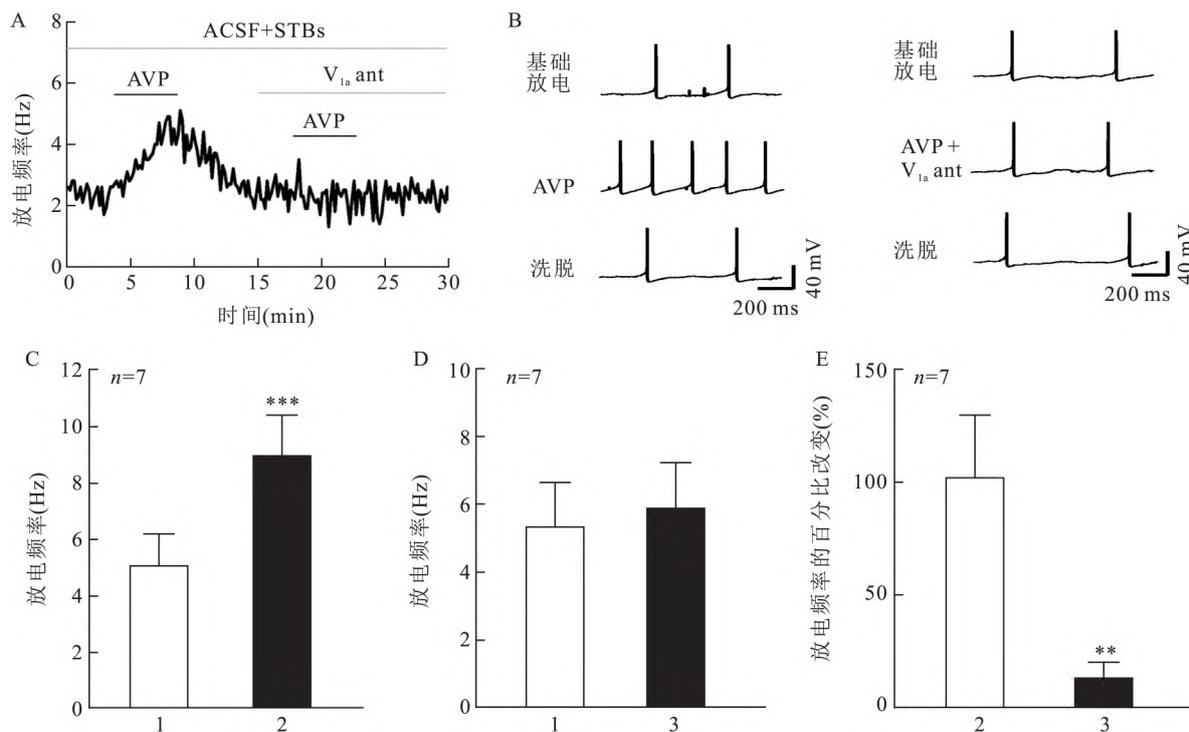


图4  $V_{1a}$  ant可消除AVP对 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元的直接兴奋作用

A: 在含有STBs的ACSF中加入AVP或 $V_{1a}$  ant + AVP前后 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元的典型放电频率改变图; B: 加入AVP或 $V_{1a}$  ant + AVP前后 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元的原始动作电位图; C: 加入AVP前后 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元的平均放电频率改变图; D: 加入 $V_{1a}$  ant + AVP前后 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元的平均放电频率改变图; E: 加入AVP或 $V_{1a}$  ant + AVP后 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元的放电频率变化幅度图; 1: 基础放电; 2: AVP; 3:  $V_{1a}$  ant + AVP; 与AVP组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与基础放电比较: \*\*\*  $P < 0.001$

### 3 讨论

研究<sup>[11]</sup>发现脑室内注射AVP或其受体拮抗剂可分别降低或升高大鼠的基础体温,表明AVP是一种内源性的降温物质。下丘脑视前区是体温调节的中枢,主要分为内侧视前区、外侧视前区和 $MnPO$ 。这些脑区均分布有大量的AVP能纤维<sup>[12]</sup>。本实验室及国内外同行的研究<sup>[4, 13]</sup>进一步发现AVP对视前区神经元的放电活动具有双向的调节作用,提示AVP可能通过影响该区不同类型神经元的放电活动发挥降温作用。但是目前介导AVP降温作用的神经元的特异性分子标记尚未明确。本研究结果显示:与灌流ACSF时比较,加入AVP后,小鼠 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元的平均放电频率明显升高,表明AVP可兴奋 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元。与此一致,近年发现 $MnPO$ 微量注射AVP可引起基础体温明显下降,相反内侧视前区微量注射AVP却可引起基础体温上升<sup>[2, 13]</sup>。此外,采用光遗传或化学遗传学的方法激活 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元可引起明显的体温降低<sup>[6, 14]</sup>。这些结果提示 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元介导了AVP的降温

作用;释放到视前区的AVP可能通过激活 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元降低体温。

既往研究<sup>[2]</sup>表明AVP对紧邻视前区的视交叉上核、终纹床核等核团的神经元放电活动具有明显的影响,这些核团与 $MnPO$ 之间存在着紧密的纤维联系。此外,研究<sup>[13]</sup>发现AVP可增加内侧视前区神经元的兴奋性突触后电流的频率,但不会改变该区神经元兴奋性突触后电流的幅度。综上,提示AVP可能通过突触前的机制间接兴奋 $MnPO$ 神经元。与此相对,既往研究<sup>[4]</sup>发现AVP可增加内侧视前区神经元的去极化前电位上升速率,提示AVP还可能通过突触后的机制直接兴奋 $MnPO$ 神经元。因此,为明确AVP是通过间接还是直接的作用影响 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元的放电活动,作者观察了阻断突触传递对AVP作用的影响。本研究结果显示:往含有STBs的ACSF中加入AVP后,小鼠 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元的平均放电频率仍明显升高;此外,与灌流ACSF + AVP时比较,灌流ACSF + STBs + AVP时,AVP引起的 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元的放电频率增加幅度未发生明显改变,表明STBs不能消除AVP对 $MnPO^{Vglut2}$ 神

经元的兴奋作用,提示 AVP 通过突触后的机制直接兴奋 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元。

视前区分布有 AVP 的 V1a 和 V1b 受体<sup>[11]</sup>。研究<sup>[13]</sup>发现内侧视前区的 V1a 受体主要表达于神经元上,V1b 受体则主要表达于星形胶质细胞上。与此一致,国内外学者<sup>[4,13]</sup>应用膜片钳技术发现 V1a 而不是 V1b 受体拮抗剂能够阻断 AVP 对内侧视前区神经元的兴奋作用,表明 AVP 可通过 V1a 受体兴奋内侧视前区神经元。但是目前尚不清楚 V1a 受体是否同样介导了 AVP 对 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的兴奋作用。本研究结果显示:与灌流 ACSF + STBs + AVP 时比较,进一步加入 V1a ant 后,AVP 引起的 Mn-PO<sup>Vglut2</sup> 神经元的放电频率增加幅度明显下降,表明 V1a ant 可消除 AVP 对 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元的直接兴奋作用,提示 AVP 同样可通过 V1a 受体直接兴奋 Mn-PO<sup>Vglut2</sup> 神经元。此外,研究<sup>[2,11]</sup>发现脑室内注射 V1a ant 可以阻断相同位点注射 AVP 引起的退热作用;MnPO 微量灌注 V1a ant 可以升高大鼠的基础体温,表明释放到视前区的 AVP 通过 V1a 受体发挥降温作用。这些结果提示释放到视前区的 AVP 可能通过 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元上的 V1a 受体直接兴奋 Mn-PO<sup>Vglut2</sup> 神经元,引起体核温度下降。

综上所述,本研究发现 AVP 可通过突触后的机制经 V1a 受体直接兴奋 MnPO<sup>Vglut2</sup> 神经元。该研究揭示了释放到 MnPO 的 AVP 作用的神经元类型及其受体机制,为深入研究 AVP 降温的神经机制奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Zhang B, Qiu L, Xiao W, et al. Reconstruction of the hypothalamo-neurohypophysial system and functional dissection of magnocellular oxytocin neurons in the brain [J]. *Neuron*, 2021, 109(2): 331–46.
- [2] Guzmán-Ruiz M A, Ramirez-Corona A, Guerrero-Vargas N N, et al. Role of the suprachiasmatic and arcuate nuclei in diurnal temperature regulation in the rat [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(46): 15419–29.
- [3] Gizowski C, Bourque C W. Sodium regulates clock time and output via an excitatory GABAergic pathway [J]. *Nature*, 2020, 583(7816): 421–4.
- [4] Xu J H, Hou X Y, Tang Y, et al. Arginine vasopressin antagonizes the effects of prostaglandin E2 on the spontaneous activity of warm-sensitive and temperature-insensitive neurons in the medial preoptic area in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 662: 59–64.
- [5] Nakamura K, Nakamura Y, Kataoka N. A hypothalamomedullary network for physiological responses to environmental stresses [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2022, 23(1): 35–52.
- [6] Abbott S B G, Saper C B. Median preoptic glutamatergic neurons promote thermoregulatory heat loss and water consumption in mice [J]. *J Physiol*, 2017, 595(20): 6569–83.
- [7] Zhao Z D, Yang W Z, Gao C, et al. A hypothalamic circuit that controls body temperature [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(8): 2042–7.
- [8] 邴利洁,张平平,程娟,等.去甲肾上腺素对腹外侧视前区神经元的作用途径研究[J].*安徽医科大学学报*,2021,56(7): 1026–31.
- [9] Wang T A, Teo C F, Åkerblom M, et al. Thermoregulation via temperature-dependent PGD2 production in mouse preoptic area [J]. *Neuron*, 2019, 103(2): 309–22.
- [10] Kamm G B, Boffi J C, Zuza K, et al. A synaptic temperature sensor for body cooling [J]. *Neuron*, 2021, 109(20): 3283–97.
- [11] Roth J, Blatteis C M. Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever [J]. *Compr Physiol*, 2014, 4(4): 1563–604.
- [12] Rood B D, de Vries G J. Vasopressin innervation of the mouse (*Mus musculus*) brain and spinal cord [J]. *J Comp Neurol*, 2011, 519(12): 2434–74.
- [13] Tabarean I V. Activation of preoptic arginine vasopressin neurons induces hyperthermia in male mice [J]. *Endocrinology*, 2021, 162(2): bqaa217.
- [14] Harding E C, Yu X, Miao A, et al. A neuronal hub binding sleep initiation and body cooling in response to a warm external stimulus [J]. *Curr Biol*, 2018, 28(14): 2263–73.

## Excitatory effect of arginine vasopressin on median preoptic glutamatergic neurons and its mechanism

Hou Xiaoyu<sup>1</sup>, Song Yi'an<sup>1</sup>, He Tianhui<sup>2</sup>, Gao Wenmin<sup>2</sup>, Zhang Jie<sup>2</sup>, Xu Jianhui<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Obstetrics, First Affiliated Hospital, <sup>2</sup>Key Laboratory of Thermoregulation and Inflammation of Sichuan Higher Education Institutes, Chengdu Medical College, Chengdu 610500)

**Abstract Objective** To investigate the effect of Arginine Vasopressin (AVP) on the median preoptic glutamatergic (MnPO<sup>Vglut2</sup>) neurons and its mechanism. **Methods** Brain slices were prepared from male Vglut2-tdTomato

(下转第 428 页)

- Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 413(2): 353–7.
- [7] Hou J, Chen Y, Meng X, et al. Compressive force regulates ephrinB2 and EphB4 in osteoblasts and osteoclasts contributing to alveolar bone resorption during experimental tooth movement [J]. *Korean J Orthod*, 2014, 44(6): 320–9.
- [8] 徐晓南, 张丁. 促红细胞生成素肝细胞激酶受体及配体对骨改建的调控作用 [J]. *中国医学科学院学报*, 2018, 40(2): 294–8.
- [9] Heng B C, Wang S, Gong T, et al. EphrinB2 signaling enhances osteogenic/odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells [J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 87: 62–71.
- [10] Tonna S, Takyar F M, Vrahnas C, et al. EphrinB2 signaling in osteoblasts promotes bone mineralization by preventing apoptosis [J]. *FASEB J*, 2014, 28(10): 4482–96.

## Overexpression of ephrinB2 in canine periodontal ligament stem cells regulates osteogenic differentiation

Liu Yumiao<sup>1</sup>, Yang Jinxin<sup>2</sup>, Zhu Shaoyue<sup>3</sup>, Ma Yulin<sup>1</sup>, Xia Hanping<sup>1</sup>,  
Zhou Meng<sup>2</sup>, Yang Shulei<sup>1</sup>, Huang Taining<sup>1</sup>, Ding Kexin<sup>2</sup>, Liu Zongxiang<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004; <sup>2</sup>Dept of Medical, <sup>3</sup>Dept of Science and Education, The Affiliated Stomatological Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002)

**Abstract Objective** Investigate osteogenic differentiation of canine periodontal ligament stem cells (cPDLSCs) via over-expression ephrinB2 in cPDLSCs. **Methods** cPDLSCs were isolated from the premolars and molars of Beagle. After transfected with EfnB2-GFP-Bsd and GFP-Bsd empty Vector, cPDLSCs were induced to osteogenic differentiation. Western blot was used to invest the expression of ephrinB2 protein. The effect of osteogenic differentiation of EfnB2-cPDLSCs and Vector-cPDLSCs were analyzed by RT-PCR, CCK-8, Alizarin-red S staining and ALP. **Results** There was no significant difference in cell proliferation between EfnB2-cPDLSCs and Vector-cPDLSCs. While EfnB2-cPDLSCs displayed an enhanced ALP activity and more prominent mineralized nodules compared with Vector-cPDLSCs. The odonto-/osteogenic genes in EfnB2-cPDLSCs were also highly enhanced. **Conclusion** The results of our study indicated that ephrinB2 gene-transfected cPDLSCs showed enhanced osteogenic differentiation.

**Key words** cPDLSCs; ephrinB2; gene transfection; osteogenic differentiation

(上接第 422 页)

mice. MnPO<sup>Vglut2</sup> neurons expressing red fluorescent protein were located by using fluorescence microscope. Whole-cell patch clamp technique was used to observe the effect of AVP on the firing frequency of MnPO<sup>Vglut2</sup> neurons, the effect of synaptic transmission blockers (STBs) on the AVP-induced change in the firing frequency of MnPO<sup>Vglut2</sup> neurons, and the effect of AVP V1a receptor antagonist on the AVP-induced change in the firing frequency of MnPO<sup>Vglut2</sup> neurons. **Results** The mean firing frequency of MnPO<sup>Vglut2</sup> neurons increased during perfusion with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) and AVP compared with that during perfusion with ACSF ( $P < 0.01$ ), indicating that AVP excited the MnPO<sup>Vglut2</sup> neurons. The mean firing frequency of MnPO<sup>Vglut2</sup> neurons still increased during perfusion with ACSF, STBs, and AVP compared with that during perfusion with ACSF and STBs ( $P < 0.001$ ); moreover, the magnitude of AVP-induced increase in firing frequency didn't change significantly during perfusion with ACSF, STBs, and AVP compared with that during perfusion with ACSF and AVP ( $P > 0.05$ ), suggesting that AVP excited the MnPO<sup>Vglut2</sup> neurons directly in a postsynaptic manner. The magnitude of AVP-induced increase in the firing frequency of MnPO<sup>Vglut2</sup> neurons declined during perfusion with ACSF, STBs, AVP, and V1a receptor antagonist compared with that during perfusion with ACSF, STBs, and AVP ( $P < 0.01$ ), suggesting that AVP excited MnPO<sup>Vglut2</sup> neurons directly via V1a receptor. **Conclusion** AVP can excite MnPO<sup>Vglut2</sup> neurons via V1a receptor directly in a postsynaptic manner. This study reveals the molecular marker of MnPO neurons which AVP act on.

**Key words** arginine vasopressin; median preoptic nucleus; glutamatergic neurons; thermoregulation