

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¹, 宋宜安¹, 何田慧², 高文敏², 张洁², 胥建辉²

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^{Vglut2})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^{Vglut2}神经元,应用全细胞膜片钳技术观察AVP对MnPO^{Vglut2}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^{Vglut2}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^{Vglut2}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^{Vglut2}神经元的平均放电频率明显升高($P < 0.01$),表明AVP可兴奋MnPO^{Vglut2}神经元。与灌流ACSF+STBs时比较,灌流ACSF+STBs+AVP时,MnPO^{Vglut2}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^{Vglut2}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^{Vglut2}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^{Vglut2}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^{Vglut2}神经元。结论 AVP可通过突触后的机制经V1a受体直接兴奋MnPO^{Vglut2}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^[1-4]。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^[5]。近年研究^[2,4]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 γ -氨基丁酸能神经元。研究^[6-7]发现,激活MnPO^{Vglut2}神经元可引起体温降低;但是激活MnPO的 γ -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^{Vglut2}神经元引起体温降低。作者据此推测AVP可能兴奋MnPO^{Vglut2}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^{Vglut2}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 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,明暗时间各12h,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、CaCl₂、MgCl₂、MgSO₄、KH₂PO₄、NaHCO₃、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Na₂GTP、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 NaHCO₃, 5 mmol/L KCl, 2.4 mmol/L CaCl₂, 1.3 mmol/L MgSO₄, 1.24 mmol/L KH₂PO₄, 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¹第一附属医院产科、²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 Na₂GTP, and 1 mmol/L CaCl₂。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^[4,8]的方法,戊巴比妥钠麻醉小鼠,断头取脑,置于充以混合氧(95% CO₂和5% O₂)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^{Vglut2}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^[7],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^[9-10],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6MΩ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GΩ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^[4],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^{Vglut2}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^{Vglut2}神经元。活性较好的MnPO^{Vglut2}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^{Vglut2}神经元放电频率的影响 共有16个MnPO^{Vglut2}神经元完成了实验程序。灌流ACSF时,MnPO^{Vglut2}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^{Vglut2}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^{Vglut2}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^{Vglut2}神经元放电频率改变的影响 共有16个MnPO^{Vglut2}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^{Vglut2}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^{Vglut2}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)。

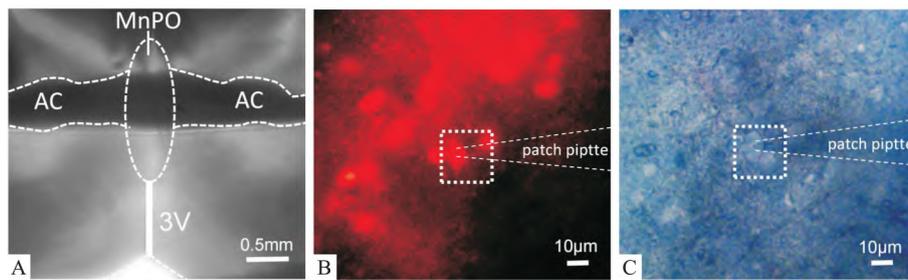


图1 显微镜下包含 MnPO 的冠状脑片和 MnPO^{Vglut2} 神经元

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^{Vglut2} 神经元; C: 普通光源下的 MnPO^{Vglut2} 神经元; patch pipette: 膜片钳玻璃电极

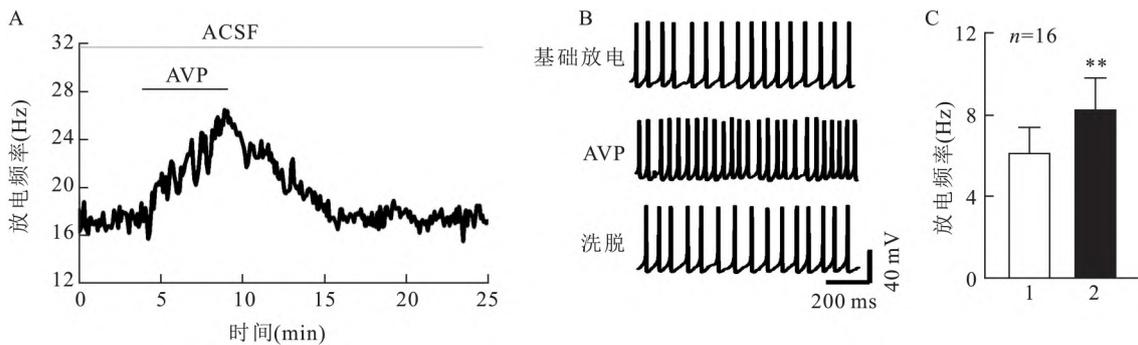


图2 AVP 增加 MnPO^{Vglut2} 神经元的放电频率

A: 在 ACSF 中加入 AVP 前后 MnPO^{Vglut2} 神经元的典型放电频率改变图; B: 加入 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; 1: 基础放电; 2: AVP; 与基础放电比较: ** $P < 0.01$

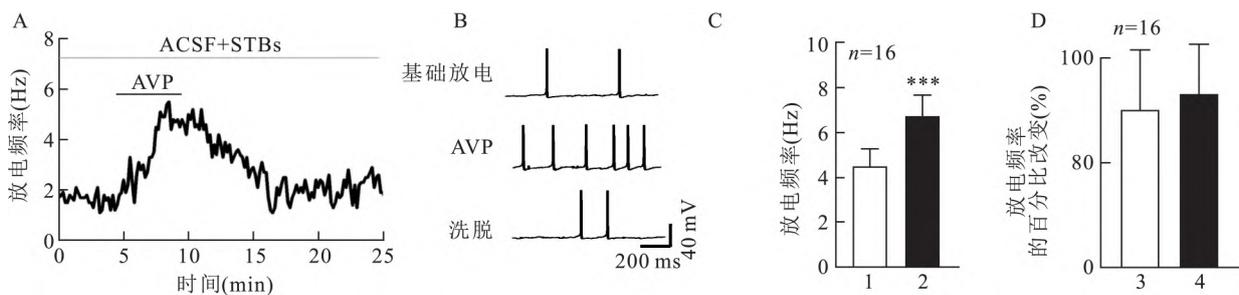


图3 STBs 未消除 AVP 对 MnPO^{Vglut2} 神经元的兴奋作用

A: 在含有 STBs 的 ACSF 中加入 AVP 前后 MnPO^{Vglut2} 神经元的典型放电频率变化图; B: 加入 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; 1: 基础放电; 2: AVP; D: 在灌流的 ACSF 中加入 STBs 前后 AVP 引起的 MnPO^{Vglut2} 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^{Vglut2} 神经元放电频率改变的影响 共有 7 个 MnPO^{Vglut2} 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^{Vglut2} 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^{Vglut2} 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^{Vglut2} 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。

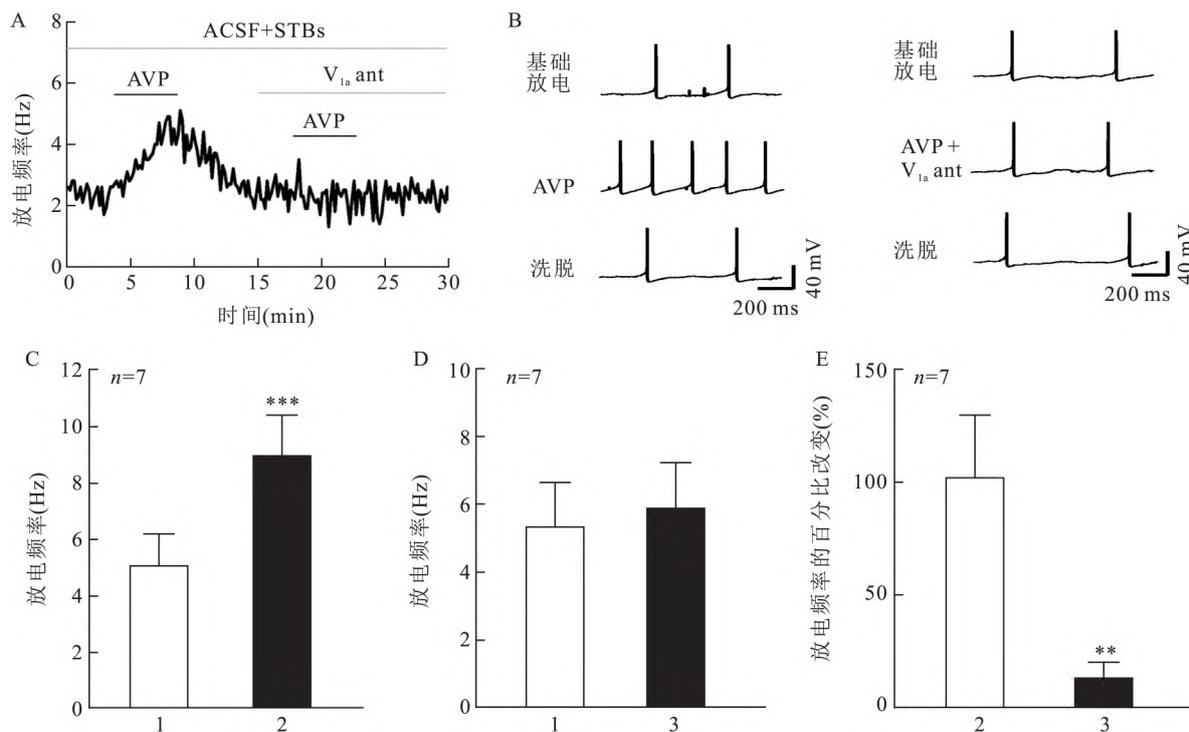


图4 V_{1a} ant可消除AVP对 $MnPO^{Vglut2}$ 神经元的直接兴奋作用

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^[11]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^[12]。本实验室及国内外同行的研究^[4,13]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^[2,13]。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^[6,14]。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^[2]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^[13]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^[4]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

神经元的兴奋作用,提示 AVP 通过突触后的机制直接兴奋 MnPO^{Vglut2} 神经元。

视前区分布有 AVP 的 V1a 和 V1b 受体^[11]。研究^[13]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^[4,13]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^{Vglut2} 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^{Vglut2} 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^{Vglut2} 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^{Vglut2} 神经元。此外,研究^[2,11]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^{Vglut2} 神经元上的 V1a 受体直接兴奋 Mn-PO^{Vglut2} 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^{Vglut2} 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, Ramírez-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 Xiaoyu¹, Song Yi'an¹, He Tianhui², Gao Wenmin², Zhang Jie², Xu Jianhui²

(¹Dept of Obstetrics, First Affiliated Hospital, ²Key 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^{Vglut2}) 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 Yumiao¹, Yang Jinxin², Zhu Shaoyue³, Ma Yulin¹, Xia Hanping¹,

Zhou Meng², Yang Shulei¹, Huang Taining¹, Ding Kexin², Liu Zongxiang^{1,2}

(¹Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004; ²Dept of Medical, ³Dept 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^{Vglut2} 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^{Vglut2} neurons, the effect of synaptic transmission blockers (STBs) on the AVP-induced change in the firing frequency of MnPO^{Vglut2} neurons, and the effect of AVP V1a receptor antagonist on the AVP-induced change in the firing frequency of MnPO^{Vglut2} neurons. **Results** The mean firing frequency of MnPO^{Vglut2} 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^{Vglut2} neurons. The mean firing frequency of MnPO^{Vglut2} 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^{Vglut2} neurons directly in a postsynaptic manner. The magnitude of AVP-induced increase in the firing frequency of MnPO^{Vglut2} 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^{Vglut2} neurons directly via V1a receptor. **Conclusion** AVP can excite MnPO^{Vglut2} 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