

apelin-13 侧脑室注射对脂多糖诱导小鼠发热的缓解作用

杨艳杰¹, 王丽君², 叶文凌¹, 吕双瑜^{1*}

1. 河南大学 医学院, 河南 开封 475004

2. 郑州工业应用技术学院 医学院, 河南 郑州 451150

摘要: **目的** 探讨侧脑室注射 apelin-13 对小鼠体温的作用及对脂多糖诱导小鼠发热的解热作用。**方法** 小鼠随机分为对照组, 脂多糖 50、150 ng 组, apelin-13 3、10 nmol 组, 脂多糖 150 ng+apelin-13 3 nmol 组和脂多糖 150 ng+apelin-13 10 nmol 组。药物或生理盐水以 10 μ L/min 的恒定速度侧脑室注射, 注射体积为 4 μ L。给药后 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h 分别监测记录各组小鼠的体温, 计算各组小鼠在各时间点体温的变化。根据实验结果绘制温度变化曲线, 并计算出曲线下面积 (area under the curve, AUC)。**结果** 与对照组比较, 脂多糖 150 ng 组温度均显著升高 ($P < 0.05$), 引起发热效果明显, 因此选择注射 150 ng 脂多糖作为模型组。侧脑室单独注射 3、10 nmol apelin-13 对小鼠温度变化没有明显影响。侧脑室注射 3 nmol apelin-13 在 1.5 h 降低 150 ng 脂多糖引起的发热 ($P < 0.05$); 而 10 nmol apelin-13 在 1.5、2.0、3.0 h 均降低 150 ng 脂多糖引起的发热 ($P < 0.05$)。与脂多糖 150 ng 组比较, 脂多糖 150 ng+apelin-13 10 nmol 组体温 AUC 显著减少 ($P < 0.05$); 脂多糖 150 ng+apelin-13 3 nmol 组体温 AUC 虽然减少, 但是并不具有显著性差异。**结论** 中枢 apelin-13 对小鼠的体温没有影响, 但侧脑室注射 10 nmol apelin-13 能够明显降低脂多糖引起的小鼠体温升高, 具有缓解脂多糖诱导的小鼠发热作用。

关键词: apelin-13; 脂多糖; 发热; 体温变化

中图分类号: R963 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2016)01-0021-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2016.01.005

Antipyretic effect of introcerebroventricular apelin-13 on lipopolysaccharide-induced fever in mice

YANG Yan-jie¹, WANG Li-jun², YE Wen-ling¹, LÜ Shuang-yu¹

1. School of Medicine, Henan University, Kaifeng 475004, China

2. School of Medicine, Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 451150, China

Abstract: **Objective** To study the influence of introcerebroventricular (icv) administered with apelin-13 on body temperature of mice, and investigate antipyretic effect on lipopolysaccharide (LPS)-induced fever in mice. **Methods** Mice were randomly divided into control group, LPS 50 and 150 ng groups, apelin-13 3 and 10 nmol groups, LPS 150 ng + apelin-13 3 nmol group, and LPS 150 ng + apelin-13 10 nmol group. Drugs or normal saline were icv administered at a constant speed of 10 L/min, and the injection volume was 4 μ L. Body temperature was monitored and recorded at the point of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, and 4.0 h after treatment. The changes of body temperature in mice were calculated. Temperature change curve was drawn according to the experiment, and area under the curve (AUC) was also calculated. **Results** Compared with the control group, body temperature in LPS 150 ng group was significantly increased ($P < 0.05$), so it was selected as model group in the next experiment. There were no changes of body temperature in mice after icv administered with apelin-13 3 and 10 nmol. Apelin-13 could decrease 150 ng LPS-induced fever in mice with the dosage of 3 nmol during 1.5 h ($P < 0.05$), and also with the dosage of 10 nmol during 1.5, 2.0, and 3.0 h ($P < 0.05$). Compared with the LPS 150 ng group, the change of AUC of body temperature in LPS 150 ng + apelin-13 10 nmol group was significantly decreased ($P < 0.05$), but that in LPS 150 ng + apelin-13 3 nmol group had no significant differences. **Conclusion** Apelin-13 in central system has no effect on the body temperature of mice. But icv 10 nmol apelin-13 can relieve the body temperature

收稿日期: 2015-10-23

基金项目: 河南大学科研启动经费项目 (B2014094)

作者简介: 杨艳杰 (1985—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为多肽生物化学。Tel: 15565125693 E-mail: yangyj04@163.com

*通信作者 吕双瑜 (1986—), 男, 博士, 副教授, 从事多肽生理与药理方向的研究。Tel: (0371)23880585 E-mail: shuangyulv@163.com

of mice with LPS-induced fever, and has antipyretic effect on LPS-induced fever in mice.

Key words: apelin-13; lipopolysaccharide; fever; change of temperature

apelin 是一种新发现的内源性神经肽, 已被确认是 G 蛋白偶联受体 APJ 的内源性配体^[1]。apelin 前体肽 (preproapelin) 经过蛋白水解后成熟, 在不同的组织中最终生成具有生物活性的 apelin 片段, 如 apelin-36、apelin-17、apelin-13 等^[2]。apelin-13 的氨基酸序列在不同的物种中较为保守, 在活体内比其他 apelin 片段具有更强的与其受体结合的能力和激活能力^[1, 3]。apelin/APJ 系统广泛分布于中枢神经系统和外周组织, 包括大脑、心脏、肺、肾等^[2]。研究发现 apelin 及其受体 APJ 在下丘脑核团有表达, 包括下丘脑室旁核 (PVN) 和正中视前核 (MnPO)^[2], 这些结构在体温调节、发热和体液平衡中发挥作用^[4]。然而急性中枢注射 apelin 对小鼠体温调节的研究较少。apelin/APJ 系统参与体内多种生理功能和病理活动的调节, 如心血管疾病、免疫调节、体液平衡、内分泌、缺血再灌注损伤保护等^[2, 5-6]。发热是临床上常见的体征, apelin-13 对发热的作用仍然是未知的。本实验应用小鼠脂多糖发热模型对 apelin-13 的解热效应进行评价。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

apelin-13 由吉尔生化 (上海) 有限公司提供, 质量分数 >95%, 产品批号 P150602-CJ236245。脂多糖 (分离自大肠杆菌血清型 055:B55, 产品批号 084M4107V)、亚甲基蓝均购于美国 Sigma 公司, 并溶于无菌非致热源的生理盐水中, -20 °C 冻存, 备用。

BL-420E+生理记录仪购于成都泰盟科技有限公司, 测量直肠温度的传感器购自河北省高碑店新航机电设备有限公司。微量进样器购于上海医疗器械有限公司。

1.2 动物及分组

雄性成年昆明系小鼠由河南省动物实验中心提供, 动物许可证号 SCXK (豫) 2010-0002, 体质量 18~22 g。动物饲养温度为 21~25 °C, 相对湿度为 40%~60%, 自然光照, 普通饲料喂养。实验期间小鼠可自由饮水、摄食。

小鼠随机分为对照组, 脂多糖 50、150 ng 组, apelin-13 3、10 nmol 组, 脂多糖 150 ng+apelin-13 3

nmol 组和脂多糖 150 ng+apelin-13 10 nmol 组。apelin-13 剂量的选择依据文献报道^[7]。

1.3 处理

侧脑室注射依据 Haley 等的方法^[8]和本课题组报道方法^[3]。注射位点距离中缝 1.5 mm, 前囟 1 mm, 深度 3 mm。药物或生理盐水以 10 μ L/min 的恒定速度注射, 注射体积为 4 μ L。对照组注射等量的无菌 0.9% NaCl 溶液。测试完成后, 通过注射亚甲基蓝来检验注射位点是否正确。

1.4 体温检测

实验中实验环境安静, 避免小鼠躁动。实验时, 将小鼠放置在 Rosow 等^[9]发明的隔绝外热的特殊装置上。小鼠体温测量方法依据文献报道^[10]。实验前 8 h 禁食不禁水, 测定肛温前让动物排空粪便, 将温度传感器的一端探头上涂凡士林, 插入到小鼠直肠内 2.5 cm 处, 另一端连接在生理记录仪实验系统上记录小鼠的体温。给药前多次测量小鼠体温, 使小鼠习惯体温测定操作, 取各组小鼠于试验当天最后连续 3 次体温 (0.5 h 监测 1 次) 的平均值作为基础体温。给药后 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h 分别监测记录各组小鼠的体温, 计算各组小鼠在各时间点体温的变化 (实测体温-基础体温)。根据实验结果绘制温度变化曲线, 并计算出曲线下面积 (area under the curve, AUC)。

1.5 数据统计

实验数据表示采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式。数据的差异性采用 unpaired *t* 检验分析。

2 结果

2.1 apelin-13 对小鼠各时间点体温变化的影响

与对照组比较, 脂多糖 50 ng 组仅在 3.5、4.0 h 温度显著升高 ($P < 0.05$), 脂多糖 150 ng 组在 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h 温度均显著升高 ($P < 0.05$), 引起发热效果明显, 因此选择注射 150 ng 脂多糖作为模型组进行下一步实验。侧脑室单独注射 3、10 nmol apelin-13 对小鼠温度变化没有明显影响。侧脑室注射 3 nmol apelin-13 在 1.5 h 降低 150 ng 脂多糖引起的发热 ($P < 0.05$); 而 10 nmol apelin-13 在 1.5、2.0、3.0 h 均降低 150 ng 脂多糖引起的发热 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 apelin-13 对小鼠体温变化的影响
Table 1 Effect of apelin-13 on change of body temperature in mice

组别	剂量	动物数/只	体温变化值/°C			
			0.5 h	1.0 h	1.5 h	2.0 h
对照	—	9	0.33±0.26	0.09±0.23	0.01±0.18	-0.37±0.25
脂多糖	50 ng	10	0.17±0.17	0.16±0.24	-0.03±0.18	0.24±0.17
	150 ng	12	0.68±0.12	0.60±0.15	0.53±0.07*	0.63±0.10*
apelin-13	3 nmol	9	0.33±0.21	0.20±0.13	0.03±0.17	-0.14±0.15
	10 nmol	9	0.43±0.21	0.18±0.20	-0.06±0.12	0.04±0.22
脂多糖+	150 ng+3 nmol	10	0.52±0.16	0.62±0.18	0.12±0.16 [#]	0.42±0.12
apelin-13	150 ng+10nmol	13	0.20±0.26	0.31±0.12	0.25±0.11 [#]	0.22±0.10 [#]

组别	剂量	动物数/只	体温变化值/°C			
			2.5 h	3.0 h	3.5 h	4.0 h
对照	—	9	-0.23±0.30	-0.07±0.20	-0.13±0.26	-0.39±0.26
脂多糖	50 ng	10	0.14±0.14	0.24±0.15	0.57±0.14*	0.77±0.09*
	150 ng	12	0.67±0.11*	1.14±0.13*	1.40±0.13*	1.43±0.17*
apelin-13	3 nmol	9	0.10±0.12	0.09±0.16	-0.11±0.13	0.06±0.14
	10 nmol	9	0.02±0.15	0.13±0.17	-0.25±0.23	-0.17±0.18
脂多糖+	150 ng+3 nmol	10	0.57±0.16	1.18±0.17	1.11±0.18	1.22±0.12
apelin-13	150 ng+10nmol	13	0.45±0.11	0.73±0.13 [#]	1.09±0.14	1.02±0.16

与对照组比较: * $P<0.05$; 与脂多糖 150 ng 组比较: [#] $P<0.05$
* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs lipopolysaccharide 150 ng group

2.2 apelin-13 对小鼠体温曲线下面积的影响

与对照组比较, 150 ng 脂多糖导致小鼠体温 AUC 明显增加($P<0.05$)。与脂多糖 150 ng 组比较, 脂多糖 150 ng+apelin-13 10 nmol 组体温 AUC 显著减少 ($P<0.05$); 脂多糖 150 ng+apelin-13 3 nmol 组体温 AUC 虽然减少, 但是并不具有显著性差异, 见表 2。

表 2 apelin-13 对小鼠体温变化的曲线下面积的影响
Table 2 Effect of apelin-13 on change of AUC of body temperature in mice

组别	剂量	动物数/只	AUC
对照	—	9	-16.46±39.52
脂多糖	50 ng	10	56.60±32.45
	150 ng	12	191.32±18.58*
apelin-13	3 nmol	9	15.94±24.67
	10 nmol	9	12.19±25.38
脂多糖+	150 ng+3 nmol	10	154.50±27.34
apelin-13	150 ng+10nmol	13	112.58±28.18 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与脂多糖 150 ng 组比较: [#] $P<0.05$
* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs lipopolysaccharide 150 ng group

3 讨论

脂多糖是革兰阴性菌细胞壁的主要成分, 是一种常见的外源性致热原, 可作为致热原激活单核巨噬细胞产生内生致热原而导致机体发热^[11]。侧脑室直接注射脂多糖经常作为急性神经炎症的动物模型。研究证实中枢微量的脂多糖就能引起剂量相关性的发热, 小鼠模型解热实验常用脂多糖剂量为 100~125 ng/只^[10], 本实验中 150 ng 剂量引起的发热趋势与文献报道一致。

apelin/APJ 系统在中枢神经系统的分布提示其可能在体温调节中发挥作用。目前 apelin 对体温调节的研究甚少。Valle 等^[12]发现第三脑室连续 10 d 注射 1 μg apelin-13 增加了 C57BL/6 小鼠的体温, 但是该体温的升高完全依赖于小鼠活动量的增加。Jászberényi 等^[13]发现侧脑室 10 μg apelin-13 增加了 Wistar 大鼠的体温, 但是这种作用并没有排除小鼠运动活动的影响。在本实验测量小鼠体温时将小鼠提前固定, 因而排出了运动产热这个因素的影响。在无运动因素影响时, 急性侧脑室 3、10 nmol apelin-13 对小鼠体温没有明显的影响。侧脑室 3

nmol apelin-13 具有降低脂多糖引起的小鼠发热作用,但是差异并不显著;10 nmol apelin-13 能够明显降低脂多糖引起的小鼠体温升高,提示 10 nmol apelin-13 具有缓解脂多糖诱导的小鼠发热作用,但其解热机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, *et al.* Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251(2): 471-476.
- [2] Pitkin S L, Maguire J J, Bonner T I, *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIV. Apelin receptor nomenclature, distribution, pharmacology, and function [J]. *Pharmacol Rev*, 2010, 62(3): 331-342.
- [3] Lv S Y, Qin Y J, Wang H T, *et al.* Centrally administered apelin-13 induces depression-like behavior in mice [J]. *Brain Res Bull*, 2012, 88(6): 574-580.
- [4] Nakamura K. Central circuitries for body temperature regulation and fever [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, 301(5): R1207-R1228.
- [5] 吕双瑜, 秦耀军, 杨艳杰, 等. Apelin 在能量平衡中的作用 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(4): 464-467.
- [6] Yang Y, Lv S Y, Lyu S K, *et al.* The protective effect of apelin on ischemia/reperfusion injury [J]. *Peptides*, 2015, 63: 43-46.
- [7] Sunter D, Hewson A K, Dickson S L. Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 353(1): 1-4.
- [8] Haley T, McCormick W G. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse [J]. *Br J Pharmacol Chemother*, 1957, 12(1): 12-15.
- [9] Rosow C E, Miller J M, Pelikan E W, *et al.* Opiates and thermoregulation in mice. I. Agonists [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1980, 213(2): 273-283.
- [10] Wang Y Q, Wang S B, Ma J L, *et al.* Neuropeptide FF receptor antagonist, RF9, attenuates the fever induced by central injection of LPS in mice [J]. *Peptides*, 2011, 32(4): 702-706.
- [11] 刘用国, 王江融, 黄天宏, 等. 注射用炎琥宁对脂多糖发热模型家兔解热机制的研究 [J]. *现代药物与临床*, 2013, 28(6): 851-854.
- [12] Valle A, Hoggard N, Adams A C, *et al.* Chronic central administration of apelin-13 over 10 days increases food intake, body weight, locomotor activity and body temperature in C57BL/6 mice [J]. *J Neuroendocrinol*, 2008, 20(1): 79-84.
- [13] Jászberényi M, Bujdosó E, Telegdy G. Behavioral, neuroendocrine and thermoregulatory actions of apelin-13 [J]. *Neuroscience*, 2004, 129(3): 811-816.