

网络出版时间: 2023-12-28 12:09:27 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231227.0759.019>

海马 CRHR1 调节慢性应激致老年前期小鼠学习记忆损伤的机制

屠心茹¹ 徐家雯¹ 刘锐¹ 陆雨琳² 王书³ 姚余有^{1,4}

摘要 目的 探究海马促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)受体1型(CRHR1)在慢性应激致老年前期小鼠学习记忆损伤中的作用机制。方法 12~14月龄的C57BL/6J小鼠根据性别、基因型以及是否予以慢性不可预测应激(CUS)进行分组,对应激组施加为期30d的CUS。使用聚合酶链式反应(PCR)、琼脂糖凝胶电泳和实时荧光定量PCR(RT-qPCR)对小鼠进行基因型鉴定。新物体识别实验和Morris水迷宫测定学习记忆能力。Golgi-Cox染色观察海马神经元树突受损情况,Western blot测定海马组织雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、p-mTOR(Ser2448)、核糖体蛋白S6激酶(p70S6K)、p-p70S6K(Thr389/Thr412)蛋白表达,ELISA检测血清CRH水平。结果 相较于慢性应激前,WT应激各组小

鼠慢性应激后的认知系数下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而KN应激各组小鼠慢性应激前后认知系数差异无统计学意义。与WT应激组相比,WT对照组小鼠逃避潜伏期均缩短($P < 0.05$)、穿越平台和目标象限次数上升($P < 0.01$)。KN各组小鼠上述差异无统计学意义。相较于WT对照组,WT应激组小鼠海马CA1、CA3、DG区神经元复杂性降低($P < 0.05$)。海马p-mTOR、p-p70S6K表达水平均降低($P < 0.05$)。而KN应激组与KN对照组相比,除雌性组小鼠海马p-mTOR表达水平降低外($P < 0.05$),其余均无显著性差异。此外,与对照组相比,应激各组小鼠血清CRH水平均上升,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 海马CRHR1调控慢性应激所致的老年前期小鼠的学习记忆损伤和神经元树突受损,其机制可能是慢性应激引起的高水平CRH无法与受体CRHR1结合,减轻了高水平CRH所抑制的mTOR/p70S6K信号通路表达。

关键词 慢性应激; 学习记忆损伤; CRHR1; p-mTOR; p-p70S6K

中图分类号 R 749.16

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0117-10
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.019

2023-10-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81773452); 安徽医科大学第三附属医院基础与临床合作提升计划培育专项(编号: 安徽医科大学处室文件 科字(2022)6号)

作者单位: 安徽医科大学¹ 公共卫生学院卫生检验与检疫学系、² 第一临床医学院, 合肥 230032

³ 安徽医科大学第三附属医院老年医学科, 合肥 230061

⁴ 人口健康与优生安徽省重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 屠心茹, 女, 硕士研究生;

姚余有, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 1988500004@ahmu.edu.cn

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的主要特征是大脑中神经元的逐渐丧失致认知功能受

cular endothelial growth factor (VEGF)- α and VEGF receptor 2 (VEGFR-2), matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, mitogen-activated protein kinase (MEK) and phosphorylated MEK (p-MEK), and extracellular regulated protein kinase (ERK) and phosphorylated ERK (p-ERK) expression. **Results** MTT assay showed that the cell proliferation rate of 3T3-F442A preadipocytes decreased after 100, 200, and 400 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin treatment compared with the control group ($P < 0.001$); Oil Red O staining assay showed that the accumulation of red lipid droplets of the cells in the 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin assay group significantly decreased; RT-qPCR assay showed that mRNA expression of *C/EBP α* , *C/EBP β* , *PPAR γ* , *aP2*, *VEGF- α* , *VEGFR-2*, *MMP-2*, and *MMP-9* was down-regulated in 3T3-F442A adipocytes treated with 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin compared with the control group ($P < 0.001$); Western blot assay showed that protein expression of *C/EBP α* , *C/EBP β* , *PPAR γ* and *aP2* was down-regulated in 3T3-F442A adipocytes treated with 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin ($P < 0.001$), and the phosphorylation level of p-MEK/MEK and p-ERK/ERK proteins was down-regulated compared with the control group ($P < 0.001$); ELISA assay showed that the protein concentrations of MMP-2 and MMP-9 in the cell supernatant were down-regulated ($P < 0.001$) in 3T3-F442A adipocytes treated with 160 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin. **Conclusion** Silibinin inhibited 3T3-F442A adipocyte differentiation and adipogenesis through inhibition of the MEK/ERK pathway and matrix metalloproteinase activity.

Key words Silibinin; adipocytes; cell differentiation; lipogenesis; transcription factor; matrix metalloproteinase

损^[1]。海马是大脑中与认知有关的关键区域,既往有研究^[2-3]显示,慢性应激在引起促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)的基因表达改变的同时,导致海马神经元损伤。但CRH是否通过结合海马CRH受体1型(CRH receptor 1, CRHR1)致老年前期鼠海马神经元损伤和记忆下降,未见报导。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)失调会引起神经退行性疾病^[4],课题组的前期研究^[5]显示,应激水平的CRH引起体外培养的海马片mTOR表达下降,CRHR1拮抗剂可以上调下降的mTOR。然而,慢性应激是否通过升高CRH结合海马CRHR1抑制海马mTOR表达有待进一步研究。该研究采用12~14月龄海马CRHR1条件性基因敲除鼠模拟人老年前期,对其施加慢性不可预测应激(chronic unpredictable stress, CUS),观测学习记忆能力、海马区域神经元的树突变化以及相关蛋白表达水平等,进一步探究慢性应激致老年前期小鼠认知功能损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 主要仪器 行为学图像采集及分析系统购自上海欣软信息科技有限公司; NanoDrop 1000 分光光度计购自美国 Thermo Scientific 公司; LightCycler 96 荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司; 7000smz 振动切片机购自英国 Campden Instruments 公司; 正置荧光显微镜购自德国 Leica 仪器公司; 多功能成像系统购自德国 Chem Studio 公司; EXL 全自动酶标仪购自美国 BD 公司。

1.1.2 主要试剂 Anti- β -actin、Anti-m-TOR 一抗、Anti-p-mTOR(Ser2448)、山羊抗鼠 IgG 抗体、山羊抗兔 IgG 抗体购自上海 Abmart 生物医药公司; Anti-p70S6K 一抗、Anti-p-p70S6K(Thr389/Thr412) 购自成都正能生物公司; SPARK script II RT Plus Kit (With gDNA Eraser) 试剂盒、2 \times SYBR Green qPCR Mix (With ROX) 试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自山东思科捷公司; 小鼠 ELISA 试剂盒购自武汉 Elabscience 公司。

1.2 实验动物及分组

1.2.1 实验动物 本课题组与江苏赛业生物公司共同构建 mCrhr1 CK877-*tsd-2D12flox/+* 品系小鼠 4 只(雌雄各 2 只),并购买 1 对在鼠海马中特异性表达 CRE 重组酶的 Pomc-Cre 小鼠,所有小鼠品系

为 C57BL/6J。小鼠饲养于安徽医科大学基础医学院 SPF 级动物实验室,严格按照安徽医科大学生物医学伦理委员会基本要求开展实验。

1.2.2 实验分组 通过 Cre/loxP 系统繁育获得海马 CRHR1 条件性基因敲除(knockout, KN)纯合子小鼠(KN 组)和野生型(wild type, WT)小鼠(WT 组)将其饲养至 12~14 月龄。根据小鼠性别、基因型以及是否予以 CUS,将小鼠分为以下 8 组,每组 13 只:雌性 WT 小鼠对照组(WT-CO- ♀ 组);雌性 WT 小鼠应激组(WT-CU- ♀ 组);雌性 KN 小鼠对照组(KN-CO- ♀ 组);雌性 KN 小鼠应激组(KN-CU- ♀ 组);雄性 WT 小鼠对照组(WT-CO- ♂ 组);雄性 WT 小鼠应激组(WT-CU- ♂ 组);雄性 KN 小鼠对照组(KN-CO- ♂ 组);雄性 KN 小鼠应激组(KN-CU- ♂ 组)。

1.3 CUS 方案 使用随机数表法对应激组小鼠加以应激,持续 30 d,慢性应激方法在参考文献^[6]基础上结合实际情况加以优化:①禁食 24 h;②禁水 24 h;③昼夜颠倒;④潮湿垫料 24 h;⑤夹尾(距尾尖 2 cm 处,5 min);⑥束缚 60 min;⑦热水游泳(28~35 $^{\circ}\text{C}$, 10 min);⑧冰水游泳(4~6 $^{\circ}\text{C}$, 5 min)。

1.4 CRHR1 条件性基因敲除鼠鉴定

1.4.1 基因型鉴定 剪去小鼠尾尖约 0.5 cm,采用三氯甲烷法提取小鼠 DNA,在 NanoDrop 1000 分光光度计上测定 DNA 的浓度和纯度。PCR 进行 DNA 的扩增,扩增结束后,配制 2% 琼脂糖凝胶进行琼脂糖凝胶电泳(110 V, 1 h)。使用多功能成像系统观察结果,比对 DNA marker 分析样本基因型。

1.4.2 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 测定海马区 CRHR1 mRNA 表达水平 取出小鼠脑组织海马区域,使用 TRIzol 法提取总 RNA,测定 RNA 浓度。使用 SPARK script II RT Plus Kit (With gDNA Eraser) 试剂盒进行逆转录制备 cDNA,再使用 2 \times SYBR Green qPCR Mix (With ROX) 试剂盒制备扩增体系,在 LightCycler 96 荧光定量 PCR 仪上进行 RT-qPCR。数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法归一化 GAPDH 表达式后的相对表达量表示。反向引物序列为:5'-ATGACGGCAATGTGGTAGTGC-3';正向引物序列为:5'-GGGCAGCCCCGTGTGAATTATT-3'。

1.5 行为学测试

1.5.1 新物体识别测试 测试前 1 d 将小鼠移至测试房间进行环境适应。实验第一阶段:在 40 cm \times 40 cm \times 40 cm 的透明箱体中放入相同的物体 A 和 A',小鼠自由探索 10 min。实验第二阶段:1 h

后,将物体 A 替换为不同形状的物体 B,小鼠自由探索 5 min,使用 Visual track 软件记录小鼠对 A、B 两物体的头部探究时间,计算认知系数。认知系数 = 新物体的探索时间(s) / [新物体的探索时间(s) + 旧物体的探索时间(s)]

1.5.2 Morris 水迷宫测试 ① 定位巡航试验:将直径 120 cm 的水池用不同的视觉线索分为 4 个象限,目标象限放置一个略微没过水面的透明平台。小鼠从 4 个象限分别投放,每次游泳 1 min,连续试验 6 d,即 1 min/次 4 次/d,共 6 d。小鼠找到平台 3 s 后该次结束,若未找到平台,则轻轻引导至平台并停留 10 s。② 空间探索试验:试验第 7 天,将上述目标象限中的平台撤去,在选定象限入水,记录 1 min 内小鼠穿越各个象限的时间以及穿越平台区域的次数。

1.6 脑组织 Golgi-Cox 染色 每组随机选取 4 只小鼠于冰上取左侧脑,将脑组织放置于 30 ml Golgi-Cox 染液中,室温避光放置一周取出,后浸泡在 30% 蔗糖溶液中 24 h。参照小鼠脑立体定位图谱,从前囟后 1.70 mm 处开始,使用震荡切片连续切出包含有海马组织的脑冠状切片,厚度为 200 μ m,然后进行显影、脱水、封片、干燥等操作。显微镜拍摄神经元图片,使用 NeuronStudio 软件合成后,在 Image J 软件中对神经元树突进行分析并对 DG 区神经元进行 Sholl 同心圆分析。

1.7 Western blot 检测海马区域蛋白表达水平 取小鼠脑组织海马区域,提取总蛋白,用 BCA 法测定总蛋白浓度并定至 500 ng/ μ l。配制 6% ~ 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭,纯水洗膜,一抗孵育(β -actin 鼠单抗,1:5 000; mTOR 鼠单抗、p-mTOR 兔单抗、p70S6K 兔单抗、p-p70S6K 兔单抗均 1:1 000),二抗孵育(β -actin、mTOR 羊抗鼠, p-mTOR、p70S6K、p-p70S6K 羊抗兔,1:5 000),使用化学发光成像仪进行显影,使用 Image J 软件进行灰度分析。

1.8 ELISA 检测血清中 CRH 含量 经小鼠眼球取血,室温放置 2 ~ 4 h 后 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 10 min,吸取血清,置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。实验过程严格按照说明书进行操作。使用 OriginPro 9.1 软件制作标准曲线并计算血清中 CRH 浓度。

1.9 统计学处理 使用 SPSS 23.0 软件对数据进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用配对 *t* 检验对海马 CRH mRNA 表达及新物体识别数据进行分析;使用多因素方差分析对高尔基染色、尼氏染色等进行分

析,当交互效应显著时,对单独效应进行最小显著差异法(least significant difference, LSD)事后分析。Morris 水迷宫试验逃避潜伏期差异比较采用双因素重复测量方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 海马 CRHR1 条件性基因敲除鼠模型构建情况

2.1.1 基因型鉴定结果 小鼠 *mCrhr1* CK877-*tsd-2D12lox/+* 基因和 *Pomc-Cre* 基因扩增后进行琼脂糖凝胶电泳,根据电泳结果判定小鼠基因型并进行分组,见图 1。实验所用 KN 小鼠为海马 CRHR1 条件性基因敲除纯合子小鼠(*CRHR1*^{loxP+/+} *Pomc-Cre*),WT 小鼠为海马 CRHR1 条件性基因表达正常 WT 小鼠(*CRHR1*^{loxP+/+}、*CRHR1*^{loxP+/-}、*CRHR1*^{loxP-/-}、*CRHR1*^{loxP-/-} *Pomc-Cre*)。



图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

红框区域: *Pomc-cre* 基因阳性; 绿框区域: *Pomc-cre* 基因阴性; 蓝框区域: *CRHR1*^{loxP+/-} (Targeted: 248 bp; Wildtype: 192 bp); 黄框区域: *CRHR1*^{loxP+/+}; 紫框区域: *CRHR1*^{loxP-/-}

2.1.2 KN 组小鼠和 WT 组小鼠海马 CRHR1 mRNA 表达水平 使用 RT-qPCR 检测 KN 组、WT 组小鼠海马区 *CRHR1* mRNA 表达水平。如图 2 显示,雌性和雄性 KN 组小鼠较 WT 组小鼠海马区 *CRHR1* mRNA 表达均下降(雌性: $t = 3.981$, $P < 0.05$; 雄性: $t = 7.437$, $P < 0.01$)。

2.2 各组小鼠行为学实验结果

2.2.1 新物体识别实验结果 应激前各组小鼠认知系数差异无统计学意义。应激后 WT-CU-♀ 组和 WT-CU-♂ 组相较应激前均降低(雌性: $t = 5.216$, $P < 0.001$; 雄性: $t = 2.516$, $P < 0.05$)。应激后 WT-CU-♀ 组相比于 WT-CO-♀ 组($t = 5.685$, $P < 0.001$)、KN-CU-♀ 组($t = 3.503$, $P < 0.01$) 认知系数下降且较 WT-CU-♂ 组($t = 2.585$, $P < 0.05$) 下降更为明

显。见图3。

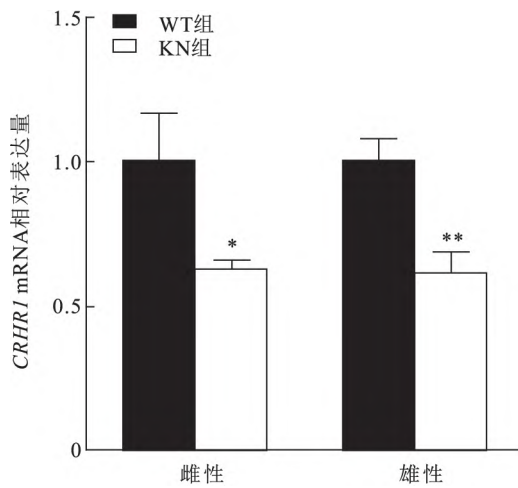


图2 小鼠海马组织 CRHR1 mRNA 表达量 (n=4)

与雌性 WT 组比较: * P < 0.05; 与雄性 WT 组比较: ** P < 0.01

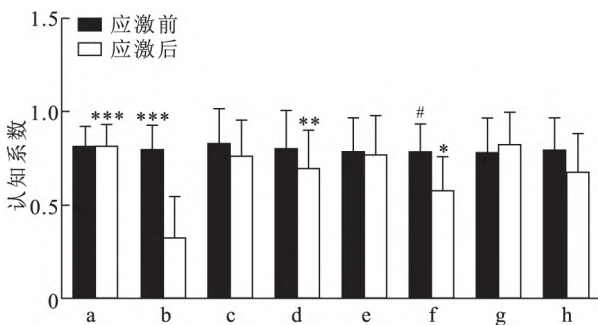


图3 各组小鼠新物体实验识别系数 (n=8)

a: WT-CO-♀组; b: WT-CU-♀组; c: KN-CO-♀组; d: KN-CU-♀组; e: WT-CO-♂组; f: WT-CU-♂组; g: KN-CO-♂组; h: KN-CU-♂组; 与应激后 WT-CU-♀组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001; 与应激后 WT-CU-♂组比较: # P < 0.05

2.2.2 Morris 水迷宫实验结果 在训练阶段各组小鼠的游泳速度无差异(图4B)。在定位巡航实验中,各组小鼠的逃避潜伏期逐日缩短,且第3~6天 WT-CO-♀组相较于 WT-CU-♀组逃避潜伏期缩短 (P < 0.05 P < 0.01 P < 0.001 P < 0.001),第4~6天 WT-CO-♂组较 WT-CU-♂组逃避潜伏期缩短 (P < 0.01 P < 0.001 P < 0.001),差异有统计学意义。第4~6天,WT-CU-♂组较 WT-CU-♀组逃避潜伏期缩短,差异有统计学意义 (P < 0.05)。此外,第5天和第6天,KN-CU-♀组较 WT-CU-♀组 (P < 0.001)、KN-CU-♂组较 WT-CU-♂组 (P < 0.01) 逃避潜伏期均有缩短,差异有统计学意义。见图4C。

使用多因素方差分析对各组小鼠穿越平台次数、穿越目标象限次数进行分析。结果显示(表1),基因敲除和 CUS 对小鼠穿越平台次数、穿越目标象限次数均存在显著影响 (P < 0.05),基因敲除和

CUS 两种因素对穿越平台次数、穿越目标象限次数存在交互作用 (P < 0.01),而基因敲除、CUS 和性别三种因素对穿越平台次数、穿越目标象限次数无交互作用 (P > 0.05)。LSD 事后分析显示,WT-CO-♀组和 KN-CU-♀组与 WT-CU-♀组相比、WT-CO-♂组和 KN-CU-♂组与 WT-CU-♂组相比,小鼠穿越平台次数、穿越目标象限次数均降低,差异有统计学意义 (P < 0.05)。见图4D、E。

表1 各组小鼠穿越平台次数、穿越目标象限次数的多因素方差分析结果

来源	穿越平台次数		穿越目标象限次数	
	F 值	P 值	F 值	P 值
基因敲除	11.111	0.002	6.467	0.015
CUS	40.111	<0.001	21.864	<0.001
性别	1.000	0.323	1.945	0.171
基因敲除 × CUS	16.000	<0.001	10.236	0.003
CUS × 性别	0.111	0.741	1.945	0.171
基因敲除 × 性别	0.000	1.000	0.330	0.569
基因敲除 × CUS × 性别	0.000	1.000	0.814	0.372

2.3 各组小鼠脑组织 Golgi-Cox 染色结果 使用多因素方差分析判断小鼠基因敲除、CUS 及性别对海马 CA1、CA3 区椎体神经元基底树突分支数和基底树突总长度的影响(表2)。主效应分析显示,基因敲除和 CUS 对 CA1、CA3 区椎体神经元基底树突分支数和基底树突总长度均存在显著影响 (P < 0.05) 而性别对其影响不显著。基因敲除和 CUS 两种因素对分支数和总长度存在交互作用 (P < 0.01),基因敲除、CUS 和性别三种因素对分支数和总长度无交互作用 (P > 0.05)。LSD 事后分析显

表2 海马 CA1、CA3 区椎体神经元基底树突分支数及树突总长度的多因素方差分析结果

来源	类别	树突分支数		树突总长度	
		F 值	P 值	F 值	P 值
基因敲除	CA1	7.466	0.012	10.000	0.004
	CA3	6.377	0.019	8.023	0.009
CUS	CA1	7.402	0.012	14.627	0.001
	CA3	15.904	0.001	25.527	<0.001
性别	CA1	0.529	0.474	0.291	0.594
	CA3	0.604	0.445	0.400	0.533
基因敲除 × CUS	CA1	10.552	0.003	19.460	<0.001
	CA3	16.642	<0.001	14.266	0.001
CUS × 性别	CA1	0.001	0.981	0.718	0.405
	CA3	1.358	0.255	0.132	0.720
基因敲除 × 性别	CA1	3.654	0.068	0.094	0.762
	CA3	0.038	0.848	3.054	0.093
基因敲除 × CUS × 性别	CA1	1.574	0.222	0.142	0.709
	CA3	0.943	0.341	1.668	0.209

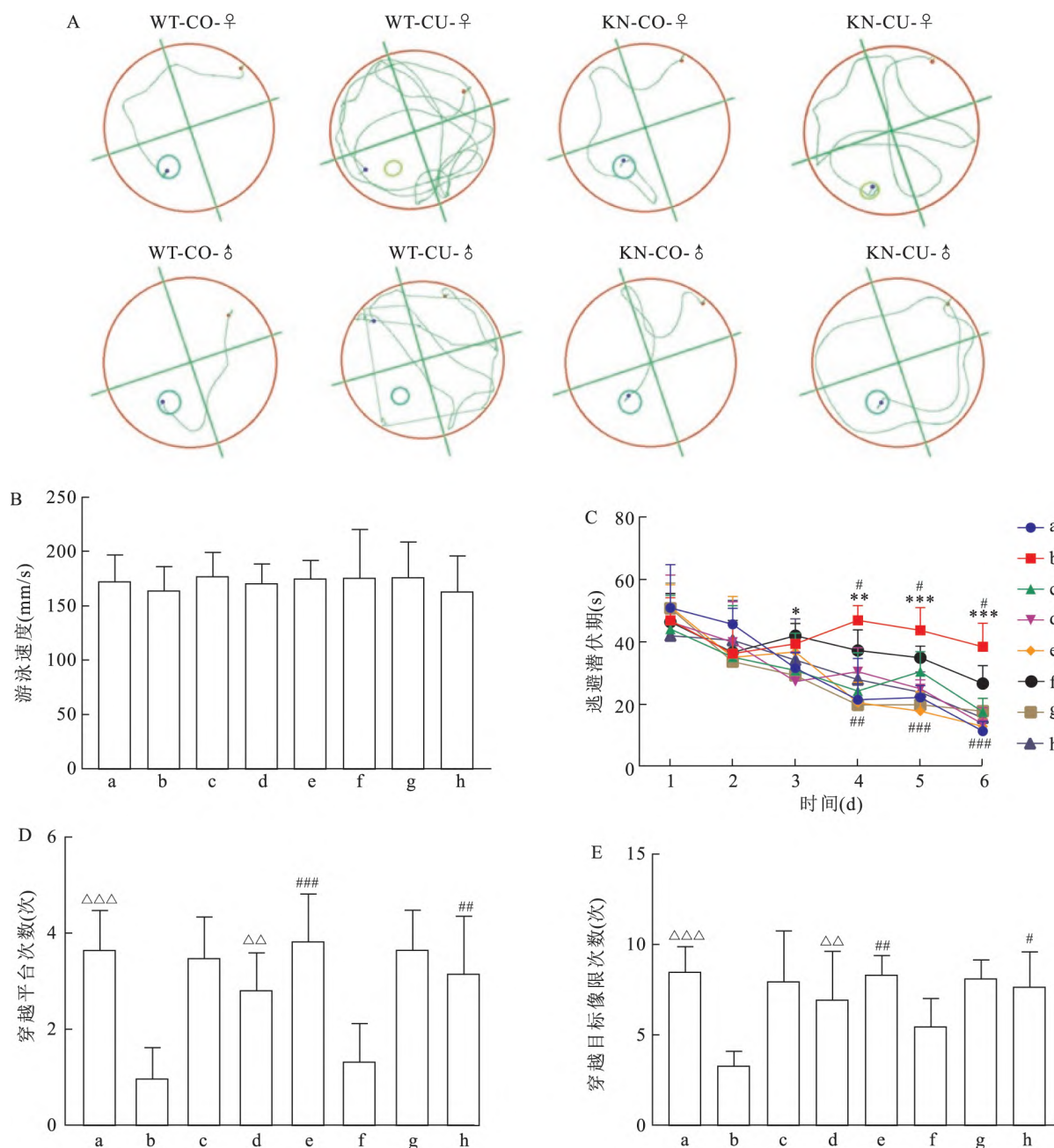


图4 各组小鼠 Morris 水迷宫实验结果图($n=6$)

A: 各组小鼠第6天定位巡航试验游泳轨迹代表图; B: 各组小鼠游泳速度; C: 各组小鼠逃避潜伏期; D: 各组小鼠穿越平台次数; E: 各组小鼠穿越目标象限次数; a: WT-CO-♀组; b: WT-CU-♀组; c: KN-CO-♀组; d: KN-CU-♀组; e: WT-CO-♂组; f: WT-CU-♂组; g: KN-CO-♂组; h: KN-CU-♂组; 与 WT-CO-♀组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 WT-CU-♂组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 WT-CU-♀组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

示, WT-CU-♀组较 WT-CO-♀组 ($P < 0.01$)、WT-CU-♀组较 KN-CU-♀组 ($P < 0.01$) 以及 WT-CU-♂组较 WT-CO-♂组 ($P < 0.05$) 对 CA1、CA3 区椎体神经元基底树突分支数和基底树突总长度均明显降低, WT-CU-♂组较 KN-CU-♂组在 CA1 区椎体神经元基底树突总长度 ($P < 0.01$) 及 CA3 区椎体神经元基底树突分支数 ($P < 0.05$) 明显降低。见图 5A ~

E。

对 DG 区神经元进行 Sholl 同心圆分析(图 5F) 结果显示, WT-CU-♀组在 10 ~ 190 μm 的交点数少于其他各组, 在距胞体 70、90、110 μm 处交点数少于 WT-CO-♀组 ($P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.05$), 在距胞体 70 μm ($P < 0.05$) 和 90 μm ($P < 0.01$) 处交点数少于 KN-CU-♀组; WT-CU-♂组在

10 ~ 190 μm 的交点数低于其他各组, WT-CU- δ 组在距胞体 70 μm 、90 μm 处交点数少于 WT-CO- δ 组、KN-CU- δ 组 ($P < 0.05$) ,见图 5G、H。

2.4 各组小鼠脑组织海马区 mTOR、p-mTOR、p70S6K 和 p-p70S6K 表达情况 使用 Western blot

检测小鼠脑组织海马区蛋白表达情况。如图 6 所示, 雌性各组小鼠, 海马 mTOR 表达水平无统计学意义 ($P > 0.05$) 。主效应分析显示, 基因敲除和 CUS 对海马 p-mTOR、p70S6K 水平的表达均有显著影响 ($P < 0.05$) , 基因敲除和 CUS 两种因素对海马

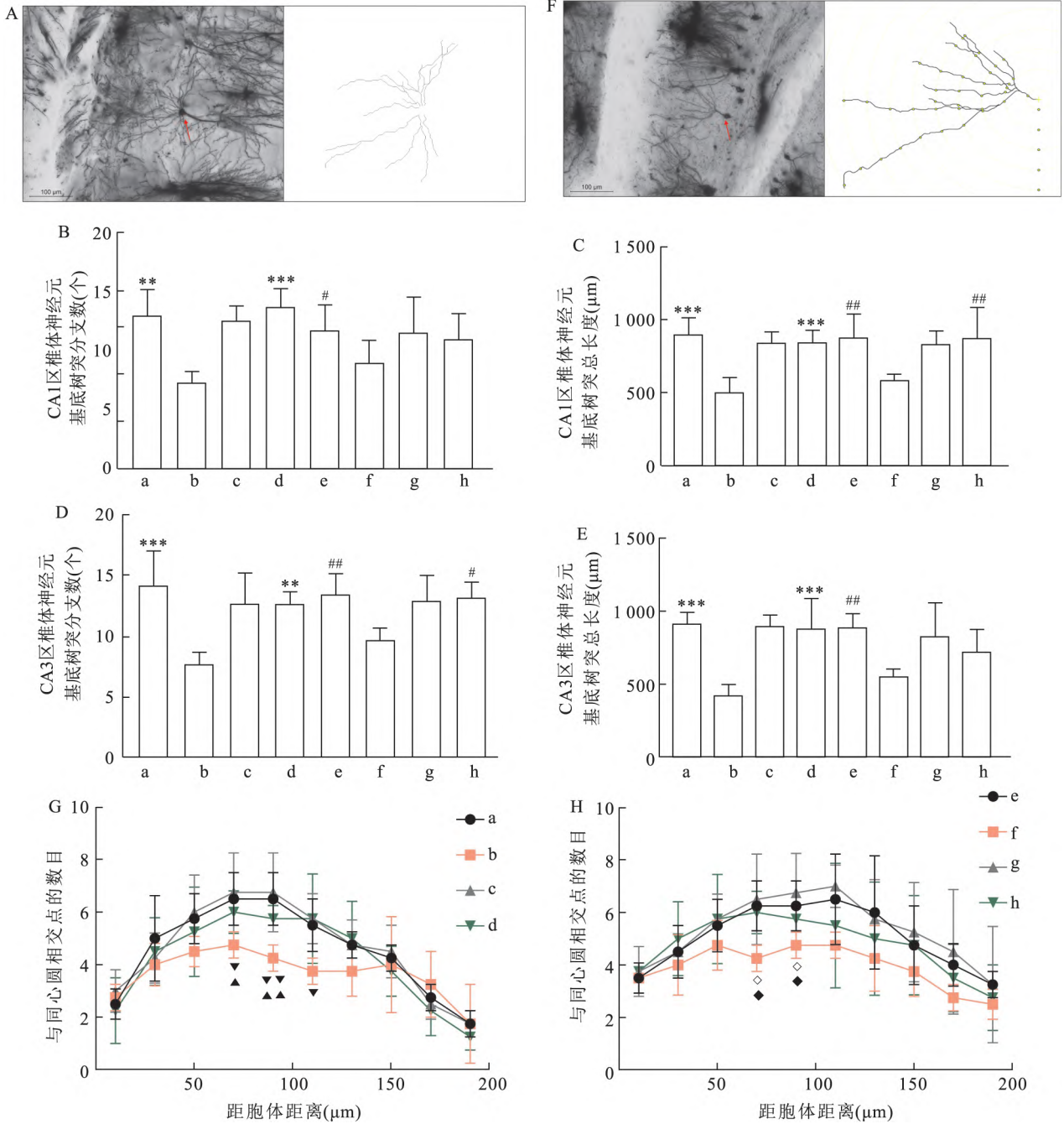


图 5 海马 CA1、CA3、DG 区高尔基染色结果 ($n = 4$)

A: 小鼠海马神经元基底树突及其轨迹例图 $\times 200$; B、D: CA1、CA3 区椎体神经元基底树突分支数; C、E: CA1、CA3 区椎体神经元基底树突总长度; F: DG 区神经元 Sholl 分析示意图 $\times 200$; G、H: DG 区神经元与同心圆的交点数目; a: WT-CO- η 组; b: WT-CU- η 组; c: KN-CO- η 组; d: KN-CU- η 组; e: WT-CO- δ 组; f: WT-CU- δ 组; g: KN-CO- δ 组; h: KN-CU- δ 组; 与 WT-CU- η 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 WT-CU- δ 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 WT-CO- η 组比较: $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$; 与 WT-CO- δ 组比较: $\diamond P < 0.05$; 与 KN-CU- δ 组比较: $\blacklozenge P < 0.05$

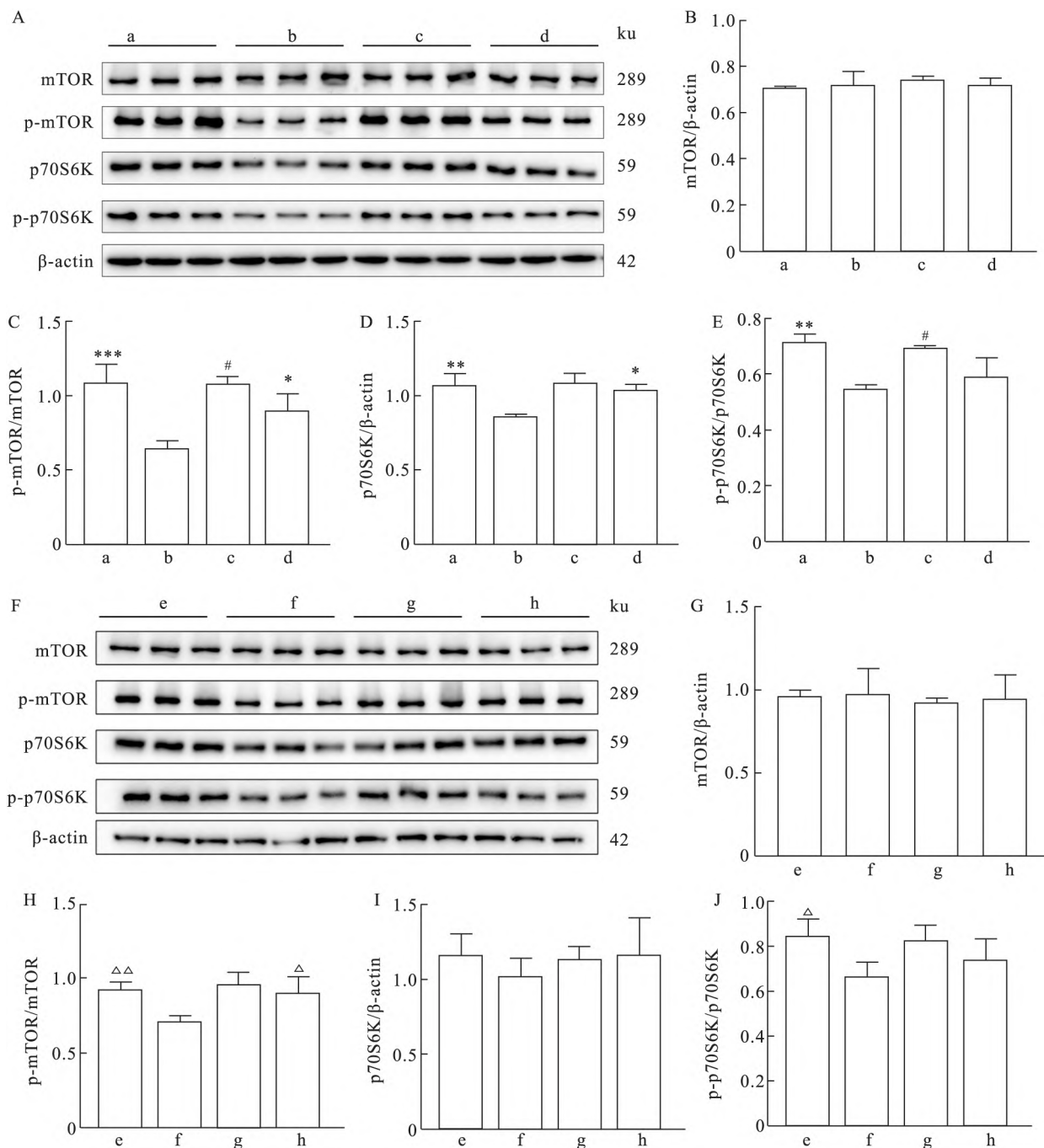


图6 mTOR、p-mTOR、p70S6K 和 p-p70S6K 表达情况

A、F: Western blot 检测雌性、雄性各组小鼠海马组织蛋白表达情况; B、G: 雌性、雄性各组 mTOR 表达水平; C、H: 雌性、雄性各组 p-mTOR 表达水平; D、I: 雌性、雄性各组 p70S6K 表达水平; E、J: 雌性、雄性各组 p-p70S6K 表达水平; a: WT-CO-♀组; b: WT-CU-♀组; c: KN-CO-♀组; d: KN-CU-♀组; e: WT-CO-♂组; f: WT-CU-♂组; g: KN-CO-♂组; h: KN-CU-♂组; 与 WT-CU-♀组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 KN-CU-♀组比较: # $P < 0.05$; 与 WT-CU-♂组比较: Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$

p-mTOR、p70S6K 水平的表达存在交互作用 ($P < 0.05$)。见表 3。LSD 事后比较结果显示, WT-CU-♀组相较 WT-CO-♀组、KN-CU-♀组海马 p-mTOR、p70S6K 表达下降 ($P < 0.05$); KN-CU-♀组与 KN-CO-♀组相比, 海马 p-mTOR 表达存在差异 ($P < 0.05$)。对于海马 p-p70S6K 的表达, 主效应分析显

示, CUS 对其表达有显著影响 ($P < 0.05$)。基因敲除则无显著性影响 ($P > 0.05$)。CUS 和基因敲除两种因素对其表达无交互作用 ($P > 0.05$)。WT-CU-♀组相较 WT-CO-♀组、KN-CU-♀组相较于 KN-CO-♀组海马 p-p70S6K 表达有统计学意义 ($P < 0.05$)。雄性各组小鼠, 海马 mTOR、p70S6K 表达水平

无统计学意义。主效应分析显示,基因敲除和 CUS 对海马 p-mTOR 水平的表达均有显著影响 ($P < 0.05$),CUS 对海马 p-p70S6K 水平的表达有显著影响 ($P < 0.05$),基因敲除和 CUS 两种因素对海马 p-mTOR、p-p70S6K 水平的表达均无交互作用 ($P > 0.05$)。LSD 事后比较结果显示,WT-CU- δ 组相较 WT-CO- δ 组、KN-CU- δ 组海马 p-mTOR 表达水平降低 ($P < 0.05$); WT-CU- δ 组相较 WT-CO- δ 组海马 p-p70S6K 表达水平降低 ($P < 0.05$)。

2.5 血清 CRH 水平 主效应分析显示(表 4), CUS 对小鼠血清 CRH 水平有显著影响 ($P < 0.001$),基因敲除和性别对小鼠血清 CRH 水平均无显著影响 ($P > 0.05$),基因敲除、CUS 和性别三种因素对小鼠血清 CRH 水平无交互效应 ($P > 0.05$)。如图 7 所示,WT-CU- δ 组较 WT-CO- δ 组 ($P < 0.001$)、KN-CU- δ 组较 KN-CO- δ 组 ($P < 0.01$)、WT-CU- δ 组较 WT-CO- δ 组 ($P < 0.001$)、KN-CU- δ 组较 KN-CO- δ 组 ($P < 0.001$) 血清 CRH 水平均上升。

表 3 各组小鼠海马 p-mTOR、p70S6K、p-p70S6K 表达水平的多因素方差分析结果

来源	类别	雌性组		雄性组	
		F 值	P 值	F 值	P 值
基因敲除	p-mTOR	5.437	0.048	7.215	0.028
	p70S6K	9.639	0.015	-	-
	p-p70S6K	0.348	0.572	0.380	0.555
CUS	p-mTOR	34.349	<0.001	10.749	0.011
	p70S6K	16.980	0.003	-	-
	p-p70S6K	39.721	<0.001	9.105	0.017
基因敲除 × CUS	p-mTOR	5.538	0.046	3.584	0.095
	p70S6K	6.744	0.032	-	-
	p-p70S6K	2.500	0.153	1.109	0.323

表 4 各组小鼠血清 CRH 水平的多因素方差分析结果

来源	F 值	P 值
基因敲除	0.003	0.959
CUS	73.375	<0.001
性别	0.419	0.521
基因敲除 × CUS	0.016	0.901
CUS × 性别	0.992	0.325
基因敲除 × 性别	0.044	0.834
基因敲除 × CUS × 性别	0.001	0.971

3 讨论

慢性应激影响大脑的结构和功能,导致突触可塑性降低和认知功能障碍,海马作为控制认知和记忆功能的重要脑区,慢性应激可致海马退行性改

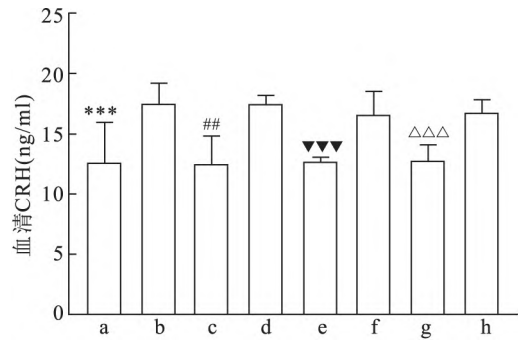


图 7 各组小鼠血清 CRH 水平 (ng/ml) (n=6)

a: WT-CO- δ 组; b: WT-CU- δ 组; c: KN-CO- δ 组; d: KN-CU- δ 组; e: WT-CO- δ 组; f: WT-CU- δ 组; g: KN-CO- δ 组; h: KN-CU- δ 组; 与 WT-CU- δ 组比较: *** $P < 0.001$; 与 KN-CU- δ 组比较: ## $P < 0.01$; 与 WT-CU- δ 组比较: $P < 0.001$; 与 KN-CU- δ 组比较: $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

变^[7]。CRH 通过与 CRHR1 结合构成应激反应的关键因素^[8],且在应激条件下,雌性较雄性小鼠血清 CRH 水平上升更为显著,雌鼠记忆损伤更为严重^[9]。本研究使用海马 CRHR1 条件性基因敲除鼠进行实验,探讨海马 CRHR1 是否调控慢性应激致老年前期小鼠学习记忆损伤及其相关机制。海马 CRHR1 条件性基因敲除鼠的模型构建的结果显示, *CRHR1*^{loxP/+} *Pomc-Cre* 小鼠海马中 CRHR1 含量显著降低,但 loxP/Cre 系统没有完全抑制 CRHR1 在海马中的表达,这可能与 *Pomc-Cre* 在海马的表达效率有关。

基于啮齿类动物对探索新物体的先天偏好,使用新物体识别实验测量识别记忆。结果显示,各组小鼠应激前学习记忆无差异,而应激后 WT 小鼠学习记忆下降显著,且雌性较雄性更为明显,而 KN 小鼠相较于对照组,应激组学习记忆有所下降但差异无统计学意义。在 Morris 水迷宫实验中,也呈现出相似差异。以上行为学实验结果提示海马 CRHR1 条件性基因敲除可改善慢性应激致老年前期小鼠学习记忆损伤。

有证据^[10]表明,海马体是 AD 期间最早受到影响的区域之一。海马体是一个被广泛研究的大脑区域,其分为四个亚区域: DG、CA1、CA2 和 CA3。研究^[11]表明,应激状态下 CA3 神经元比 CA1、DG 神经元更敏感。使用 Golgi-Cox 染色观察海马 CA1、CA3、DG 区神经元树突结构,结果显示,WT 应激组雌雄小鼠的 CA1、CA3、DG 区神经元树突分支数量、总长度和复杂性均显著降低,而 KN 应激组雌雄小鼠相较于对照组则无统计学差异。值得注意的是,

KN 应激组相较于 WT 应激组,雌性小鼠 CA1、CA3 区的神经元树突分支数量和总长度均有显著性差异,而雄性小鼠 CA1 区树突分支数和 CA3 区树突总长度差异无统计学意义。该结果可能是由于本实验样本数量较小而存在个体差异,或提示海马 CRHR1 条件性基因敲除雌雄小鼠在应激状态下神经元损伤存在性别差异,需要进一步探究。以上研究结果提示,海马 CRHR1 条件性基因敲除可改善慢性应激致老年前期小鼠海马区神经元病理损伤。

mTOR/p70S6K 信号通路在调节细胞凋亡和自噬中起着至关重要的作用^[12],研究^[13]表明,在海马体中 mTOR 磷酸化激活了 mTOR 在学习记忆中起着重要作用。本实验结果显示,WT 雌雄小鼠,与对照组相比,应激组 p-mTOR、p-p70S6K 表达水平降低,差异有统计学意义,而 KN 小鼠的应激组与对照组雌雄小鼠间差异无统计学意义。该结果提示,海马 CRHR1 条件性基因敲除可能通过 mTOR/p70S6K 信号通路改善慢性应激致老年前期小鼠学习记忆损伤。

CRH 广泛分布于中枢神经系统,由下丘脑室旁核和脑其他部位的 CRH 神经元大量表达,是激素、行为和自主神经对应激反应的重要调节因子^[14]。研究^[15]表明,应激引起鼠海马、杏仁核神经元树突棘损伤,学习记忆能力下降,CRHR1 拮抗剂可以明显改善应激所致的上述变化。本课题组前期研究^[16]显示,对大鼠海马 CA1 区脑立体定位注射应激水平 CRH,致 CA1 区基底神经元树突分支数和树突总长度减少,同时树突棘密度下降,说明应激水平 CRH 可致海马树突损伤。血清 CRH 结果显示,与对照组相比,应激组的雌雄 WT 小鼠和 KN 小鼠血清 CRH 水平均升高,且应激各组间的血清 CRH 水平无显著性差异,提示慢性应激引起的高水平 CRH 无法与海马 CRHR1 条件性基因敲除鼠中海马区 CRHR1 受体结合,从而改善老年前期小鼠的学习记忆损伤和神经元病理损伤。现已证实^[17],海马、杏仁核、前额叶皮层等区域与认知存在着密切关联,且应激可致上述区域损伤,但应激是否通过升高的 CRH 致上述区域损伤,从而导致认知功能障碍,还有待于进一步研究。

综上所述,海马 CRHR1 条件性基因敲除可改善慢性应激所致的老年前期小鼠学习记忆损伤,其机制可能是由慢性应激引起的高水平 CRH 无法与 CRHR1 受体结合,减轻了高水平 CRH 所抑制的 mTOR/p70S6K 信号通路表达,进而改善了老年前期

小鼠海马神经元和学习记忆损伤。

参考文献

- [1] Wang W, Zhao F, Ma X, et al. Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances [J]. *Mol Neurodegener*, 2020, 15(1): 30.
- [2] Saghaei E, Nasiri B S, Safavi P, et al. Diosmetin mitigates cognitive and memory impairment provoked by chronic unpredictable mild stress in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 5725361.
- [3] Bhakta A, Gavini K, Yang E, et al. Chronic traumatic stress impairs memory in mice: potential roles of acetylcholine, neuroinflammation and corticotropin releasing factor expression in the hippocampus [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 335: 32–40.
- [4] Wei X, Luo L, Chen J. Roles of mTOR signaling in tissue regeneration [J]. *Cells*, 2019, 8(9): 1075.
- [5] Lv Y, Chen P, Kuang L, et al. Role of corticotropin-releasing hormone in the impact of chronic stress during pregnancy on inducing depression in male offspring mice [J]. *Brain Res*, 2020, 1747: 147029.
- [6] Ge F, Yang H, Lu W, et al. Ovariectomy induces microglial cell activation and inflammatory response in rat prefrontal cortices to accelerate the chronic unpredictable stress-mediated anxiety and depression [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 3609758.
- [7] Lauren P S, Mitchell H O, Anthony J K, et al. Corticosteroid-induced dendrite loss and behavioral deficiencies can be blocked by activation of Abl2/Arg kinase [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2017, 85: 226–34.
- [8] Andrés U, Nils C G, Maximilian F W, et al. Prefrontal cortex corticotropin-releasing factor receptor 1 conveys acute stress-induced executive dysfunction [J]. *Biol Psychiatry*, 2016, 80(10): 743–53.
- [9] 徐家雯, 屠心茹, 刘锐, 等. 慢性应激致老年雌小鼠学习记忆损伤 [J]. *基础医学与临床*, 2023, 43(2): 225–32.
- [10] Jiang P, Yang X, Sun Z. Dynamics analysis of the hippocampal neuronal model subjected to cholinergic action related with Alzheimer's disease [J]. *Cogn Neurodyn*, 2020, 14(4): 483–500.
- [11] Zhuang P C, Tan Z N, Jia Z Y, et al. Treadmill exercise reverses depression model-induced alteration of dendritic spines in the brain areas of mood circuit [J]. *Front Behav Neurosci*, 2019, 13: 93.
- [12] Yang B, Zhao S. Polydatin regulates proliferation, apoptosis and autophagy in multiple myeloma cells through mTOR/p70s6k pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 935–44.
- [13] Schomig C, Oberholz L, Fink G, et al. Hippocampal mTOR dysregulation and morphological changes in male rats after fetal growth restriction [J]. *Nutrients*, 2022, 14(3): 451.
- [14] Zhao P, Zhao M, Wang H, et al. Long-range input of cortical neurons containing corticotropin-releasing hormone [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 12209.
- [15] Bangasser D A, Kawasumi Y. Cognitive disruptions in stress-related psychiatric disorders: a role for corticotropin releasing factor (CRF) [J]. *Horm Behav*, 2015, 76: 125–35.

- [16] 徐家雯. CRH 介导慢性应激致老年雌鼠学习记忆损伤[D]. 合肥: 安徽医科大学 2023.
- [17] Oroian B A , Ciobica A , Timofte D , et al. New metabolic , diges-

tive , and oxidative stress-related manifestations associated with posttraumatic stress disorder [J]. *Oxid Med Cell Longev* , 2021 , 2021: 5599265.

Mechanism of hippocampal CRHR1 regulating chronic stress-induced learning and memory impairment in early aged mice

Tu Xinru¹ , Xu Jiawen¹ , Liu Rui¹ , Lu Yulin² , Wang Shu³ , Yao Yuyou^{1 #}

(¹*Dept of Health Inspection and Quarantine , School of Public Health ,*

²*The First Clinical Medical College Anhui Medical University , Hefei 230032;*

³*Dept of Geriatrics , The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230061;*

⁴*Anhui Provincial Key Laboratory of Population Health and Eugenics Hefei 230032)*

Abstract Objective To explore the mechanism of hippocampal corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor type 1 (CRHR1) in chronic stress-induced learning and memory impairment in early aged mice. **Methods** C57BL/6J mice aged 12 – 14 months were divided into two groups according to gender , and then divided into wild type (WT) group and hippocampal CRHR1 conditional gene knockout (KN) group according to genotype. Mice in each group were randomly divided into control group and stress group , and the stress group was subjected to chronic unpredictable stress (CUS) for 30 days. Genotyping of mice was performed using polymerase chain reaction (PCR) , agarose gel electrophoresis and real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) . The new object recognition experiment and Morris Water maze measured learning and memory ability. Golgi-Cox staining was used to observe damage to hippocampal neuronal dendrites. The protein expressions of target protein of rapamycin (mTOR) , p-mTOR (Ser2448) , ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) and p-p70S6K (Thr389/Thr412) were detected by Western blot. Serum levels of corticotropin releasing hormone (CRH) were measured by ELISA. **Results** Compared to mice without chronic stress , the cognitive coefficient of WT stress groups decreased after chronic stress , and the difference was statistically significant ($P < 0.05$) , while there was no significant difference in cognitive coefficient of KN stress groups before and after chronic stress. Compared with the WT stress group , the escape latency of the WT control group was shortened ($P < 0.05$) , and the number of crossing the platform and target quadrant increased ($P < 0.01$) , and there was no significant difference in the KN groups above. Compared with the WT control group , the WT stress group had a significant reduction in the neuronal complexity in the hippocampal CA1 , CA3 and DG regions ($P < 0.05$) and significant reductions in the expression of p-mTOR and p-p70S6K in the hippocampus ($P < 0.05$) . There was no significant difference in the expression of p-mTOR between the KN stress group and the KN control group ($P > 0.05$) , except that the expression of p-mTOR in the hippocampus of the female group decreased ($P < 0.05$) . In addition , the serum level of CRH in the stress group was higher than that in the control group ($P < 0.01$) . **Conclusion** Hippocampal CRHR1 regulates learning and memory impairment and neuronal dendrite damage in early aged mice induced by chronic stress. The mechanism may be that high levels of CRH induced by chronic stress cannot bind to CRHR1 receptor , thereby enhancing the expression of down-regulated mTOR/p70S6K signaling pathway.

Key words chronic stress; impairment of learning and memory; CRHR1; p-mTOR; p-p70S6K