

# 妊娠期慢性应激对不同性别子代抑郁的影响

韩振敏<sup>1</sup>, 况亮<sup>1</sup>, 王正玉<sup>1</sup>, 唐伟<sup>2</sup>, 姚余有<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨妊娠期慢性应激对不同性别子代小鼠抑郁程度的影响及其可能机制。方法 实验分为妊娠期正常处理-子代正常处理 (Control) 组、妊娠期慢性应激-子代正常处理 (CPS) 组、妊娠期正常处理-子代慢性应激 (COS) 组、妊娠期慢性应激-子代慢性应激 (COS+CPS) 组。通过强迫游泳实验观察子代小鼠的抑郁程度; HE 染色观察子代小鼠海马 CA 3 区神经元病理组织形态变化; Western blot 法检测小鼠海马中雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 的表达量; ELISA 法检测小鼠血清中促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 的含量。结果 与 Control 组相比, 子代雄鼠 COS 组不动时间延长 ( $P < 0.05$ ) 海马 CA 3 区神经元细胞损伤的数目明显增加, 神经元排列疏松、紊乱、核固缩、浓染; 海马组织中 mTOR 表达量减少 ( $P < 0.05$ ); 血清 CRH 浓度升高 ( $P < 0.05$ ); 子代雌鼠 COS 组不动时间延长 ( $P < 0.05$ ) 海马组织中 mTOR 表达量减少 ( $P < 0.05$ ) 其余指标未呈现类似结果。与 COS 组相比, 子代雄鼠 COS+CPS 组不动时间延长 ( $P < 0.05$ ) 海马 CA 3 区神经元进一步损伤, 海马组织中 mTOR 的表达量减少 ( $P < 0.05$ ) 血清中 CRH 浓度升高 ( $P < 0.05$ ); 子代雌鼠 COS+CPS 组的上述指标亦未进一步改变。结论 妊娠期慢性应激进一步加剧慢性应激所致的子代雄鼠抑郁, 其机制可能与其升高小鼠血清 CRH 水平, 抑制 mTOR 的表达, 最终引起海马 CA 3 区神经元损伤有关。妊娠期慢性应激未能进一步加剧子代雌鼠应激所致的抑郁程度。

**关键词** 妊娠期应激; 慢性应激; 促肾上腺皮质激素释放激素; 抑郁

中图分类号 R 749.42

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-0998-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.012

抑郁症是一种常见的心境障碍, 大约 10% ~ 30% 的女性和 7% ~ 15% 的男性一生中曾患抑郁, 给国家带来沉重的经济压力和社会负担<sup>[1]</sup>。抑郁症的发病机制尚未完全阐明, 众多研究<sup>[2]</sup>显示, 前额

叶皮层、海马、杏仁核和下丘脑等部位异常与抑郁的发病有关。妊娠期的慢性应激长期影响子代动物的下丘脑-垂体-肾上腺轴, 导致这些子代小鼠在正常或应激状况下中枢和血液促肾上腺皮质激素释放激素 (corticotropin-releasing hormone, CRH) 水平显著升高<sup>[3]</sup>。以往的实验<sup>[4]</sup>显示, 妊娠期慢性应激可以致子代出现抑郁症状。然而, 目前很少有学者研究妊娠期慢性应激联合子代慢性应激对子代抑郁程度的影响与其性别差异。该研究拟探讨妊娠期慢性应激是否对不同性别子代抑郁程度产生影响及可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与分组** 健康昆明小鼠, 清洁级, 雄性 10 只, 雌性 40 只, 8 周龄, 30 ~ 35 g, 由安徽医科大学 SPF 级动物房提供。饲养条件: 室温 (23 ± 1) °C, 相对湿度 50%, 按安徽医科大学生物医学伦理委员会的要求饲养, 皆自由饮食饮水, 正常饲养 7 d, 使其适应周围环境。

于第 8 天晚 20:00 将雌雄小鼠以 2 : 1 的比例进行合笼, 次日早晨 8:00 检查阴栓, 查到阴栓者取出单笼饲养, 记为孕第 1 天。所有孕鼠随机分为妊娠期慢性应激组和妊娠期对照组。妊娠期慢性应激组正常饲养至孕第 7 天, 开始施加不可预测的慢性复合应激: 夹尾 (距尾尖 2 cm 处, 5 min)、束缚应激 (50 ml 带多个小孔的离心管, 3 h)、冰水游泳 (4 ~ 6 °C, 5 min)、温水游泳 (28 ~ 35 °C, 15 min)、夜相给亮 12 h、禁水 24 h、禁食 24 h 等 7 种应激方式。每天随机采用一种方法对小鼠进行应激, 持续至孕第 21 天。妊娠期对照组小鼠不接受应激, 正常饲养<sup>[5]</sup>。

子鼠产后 21 d 断奶。雌雄分笼饲养。于产后 30 d 雌雄分别随机分为子代对照组和子代慢性应激组。即本研究的子代实验小鼠分成妊娠期慢性应激-子代对照 (chronic prenatal stress-offspring control group, CPS) 组、妊娠期对照-子代慢性应激 (prenatal control-chronic offspring stress group, COS) 组、妊娠期慢性应激-子代慢性应激 (chronic prenatal stress-

2017-03-09 接收

基金项目: 安徽省高校省级自然科学研究重点项目 (编号: KJ2016A354)

作者单位: 安徽医科大学公共卫生学院<sup>1</sup> 营养与食品卫生学系、<sup>2</sup> 卫生检验与检疫学系, 合肥 230032

作者简介: 韩振敏, 女, 硕士研究生;

姚余有, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yaoanqi71@aliyun.com

chronic offspring stress group (COS+CPS) 组和妊娠期对照-子代对照 (prenatal control-offspring control group, Control) 组, 每组各 20 只。COS+CPS 组、COS 组小鼠接受 28 d 上述应激。

**1.2 主要试剂与仪器**  $\beta$ -actin 单克隆抗体 (德国 Santa Cruz 公司); mTOR 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); 山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗 (上海生物工程公司); Western blot 法化学发光检测试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司); 电泳仪、凝胶成像分析系统 (北京 Tannon 公司); 小鼠血清 CRH 酶联免疫试剂盒 (武汉优尔生公司); 强迫游泳图像采集及分析系统 (上海欣软公司)。

**1.3 抑郁行为学测试** 采用强迫游泳实验<sup>[6]</sup>。在底面直径为 10 cm, 高 20 cm 的圆柱型玻璃缸中, 每缸放入 1 只小鼠, 小鼠运动轨迹由玻璃缸正前方连接于显示系统的摄像机采集。缸中水深 10 cm, 水温 25 °C。每组各 10 只随机选取小鼠做此实验, 历时 2 d。实验动物第 1 天在上述条件下进行强迫游泳 15 min, 使其适应记录环境。第 2 天, 记录小鼠 6 min 内运动轨迹, 然后观察后 4 min 运动状态, 累计此 4 min 内小鼠在水中停止挣扎, 或呈漂浮状态, 仅有细小的肢体运动以保持头部浮在水面的持续时间 (记为不动时间)。

**1.4 HE 染色** 实验结束后, 将小鼠用颈椎脱臼法处死, 冰上取脑, 将右侧脑组织用 4% 多聚甲醛固定, 脱水、包埋后, 在前囟后 3 mm 处, 作冠状切片 (约 6  $\mu$ m), 在每个小鼠脑组织样本的相同位置取 2 张切片进行 HE 染色, 在光学显微镜下观察海马组织形态学的变化并拍照。

**1.5 Western blot 法检测海马组织中 mTOR 表达量** 将左侧脑组织中海马组织剥离。每组取海马组织 8 mg, 置于玻璃匀浆器中, 并加入 3  $\mu$ l 苯甲基磺酰氟, 300  $\mu$ l 组织细胞裂解液, 匀浆, 冰上静置 30 min, 4 °C、15 000 r/min 离心 15 min。吸取上清液<sup>[7]</sup>。经 BCA 法测定蛋白浓度后定量, 98 °C 变性 5 min。灌胶, 上样。电泳 60 V/30 min、120 V/180 min 结束; 300 mA/360 min 将分离胶中的蛋白转移至 PVDF 膜上; 用 5% 的奶粉室温封闭 1 h; 一抗 4 °C 过夜; 复温 30 min, 洗膜, 孵相应的二抗, 放置在室温下 1.5 h; 洗膜, 滴加化学发光试剂, 凝胶成像分析系统扫描条带分析光密度值。实验中使用抗体及其稀释浓度:  $\beta$ -actin (鼠单抗, 1 : 800)、mTOR (兔多抗, 1 : 2 000)、二抗 (兔抗鼠, 1 : 10 000; 羊抗兔, 1 : 5 000)。

**1.6 ELISA 法检测血清 CRH 含量** 实验结束后, 摘取小鼠眼球取血, 分离血清, 按照 ELISA 试剂盒的说明书进行操作, 测定血清中 CRH 的含量。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 结果均采用单因素方差分析, 组间采用 LSD 比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 妊娠期慢性应激对不同性别子鼠抑郁的影响

强迫游泳实验显示, 与 Control 组相比, 子代雄鼠 COS 组、CPS 组、COS+CPS 组不动时间均有延长 ( $F = 37.94$ ,  $P < 0.05$ ), 其中 COS+CPS 组较 COS 组不动时间进一步延长, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 子代雌鼠 COS 组、COS+CPS 组不动时间延长 ( $F = 4.34$ ,  $P < 0.05$ ), CPS 组不动时间有延长趋势, 但差异无统计学意义, COS+CPS 组较 COS 组不动时间也有延长趋势, 但差异无统计学意义。见图 1。

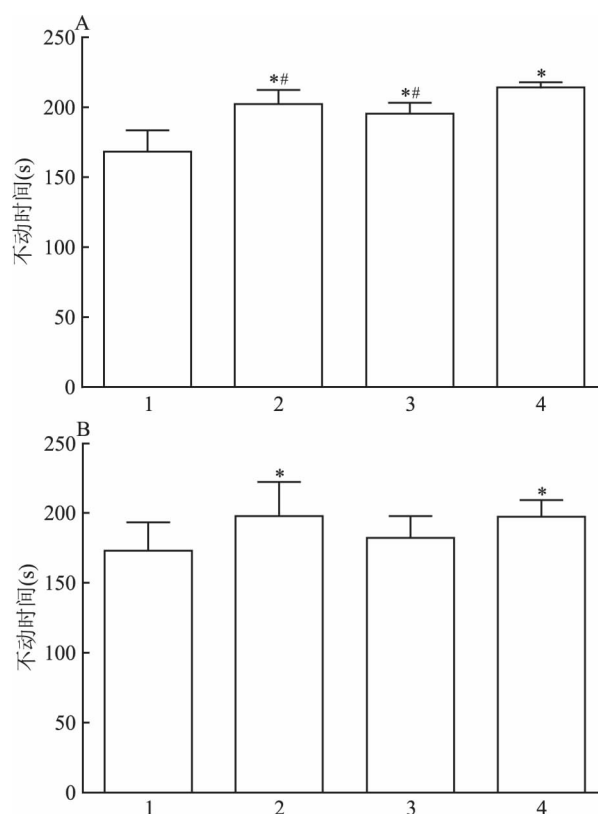


图 1 妊娠期慢性应激对不同性别子鼠强迫游泳实验中不动时间的影响

A: 雄鼠; B: 雌鼠; 1: Control 组; 2: COS 组; 3: CPS 组; 4: COS+CPS 组; 与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 COS+CPS 组比较: #  $P < 0.05$

### 2.2 妊娠期慢性应激对不同性别子鼠海马 CA 3 区

神经元的影响 子代雄鼠 Control 组和 CPS 组海马 CA 3 区锥体细胞层神经元细胞染色清晰,排列整齐,数量多,大都呈椎体状、圆球状,核呈圆形,核仁明显;COS 组和 COS+CPS 组神经元数量偏少,排列紊乱、疏松,部分细胞体积偏小,细胞核固缩。见图 2。子代雌鼠各个组海马 CA 3 区锥体细胞层神经元细胞染色清晰,排列整齐紧密,数量较多,大多呈椎体状、圆球状,核呈圆形,核仁明显,各组之间无明显差异。见图 3。

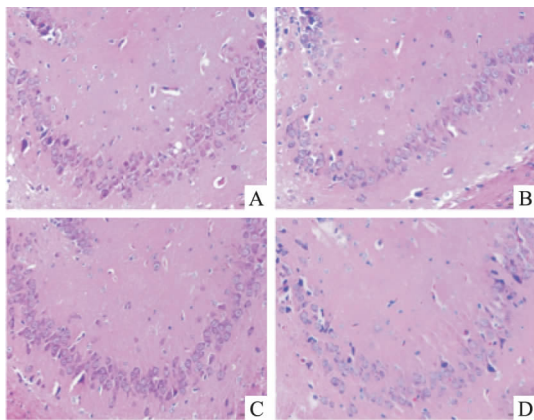


图 2 妊娠期慢性应激对子代雄鼠海马 CA 3 区神经元的影响 HE×400  
A: Control 组;B: COS 组;C: CPS 组;D: COS+CPS 组

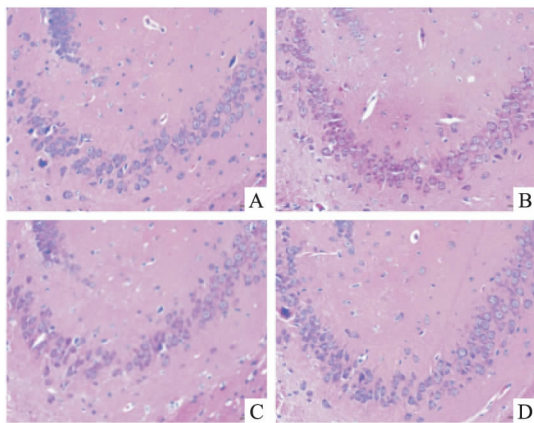


图 3 妊娠期慢性应激对子代雌鼠海马 CA 3 区神经元的影响 HE×400  
A: Control 组;B: COS 组;C: CPS 组;D: COS+CPS 组

2.3 妊娠期慢性应激对不同性别子鼠海马 mTOR 表达的影响 为研究妊娠期慢性应激促进子代抑郁是否与 mTOR 表达有关,本研究采用 Western blot 法检测海马组织中 mTOR 的蛋白水平,结果显示,与 Control 组相比,COS 组、CPS 组子代雌雄小鼠海马组织中 mTOR 的表达量均下降 ( $F = 19.37, 28.28, P$

$<0.05$ ) 雄性子鼠 COS+CPS 组较 COS 组海马组织的 mTOR 表达量进一步减少 ( $P < 0.05$ ),雌性子鼠 COS+CPS 组未出现上述结果。见图 4。

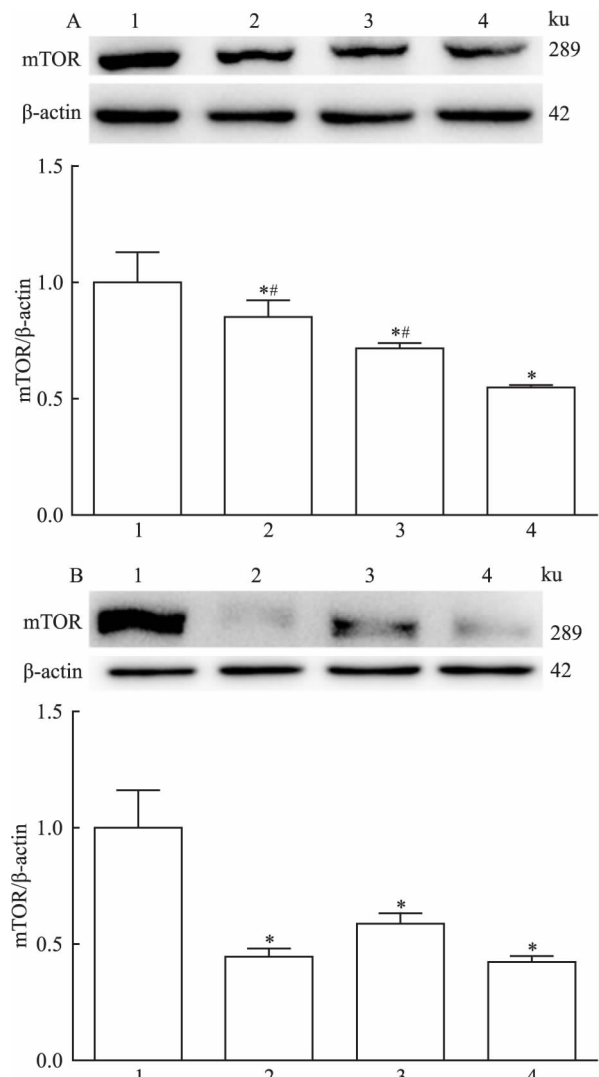


图 4 妊娠期慢性应激对不同性别子鼠海马 mTOR 表达的影响  
A: 雄鼠;B: 雌鼠;1: Control 组;2: COS 组;3: CPS 组;4: COS+CPS 组;与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ ;与 COS+CPS 组比较: #  $P < 0.05$

2.4 妊娠期慢性应激对不同性别子鼠血清中 CRH 水平的影响 ELISA 法测定血清中 CRH 的结果显示,4 组子代雄鼠血清 CRH 水平差异有统计学意义 ( $F = 10.33, P < 0.05$ ),COS 组雄鼠子代血清 CRH 的水平明显升高 ( $P < 0.05$ ),COS+CPS 组较 COS 组和 CPS 组血清 CRH 水平进一步升高 ( $P < 0.05$ )。子代雌鼠 COS+CPS 组较 Control 组 CRH 明显升高 ( $P < 0.05$ );COS 和 CPS 组 CRH 也有升高趋势,但差异无统计学意义。见图 5。

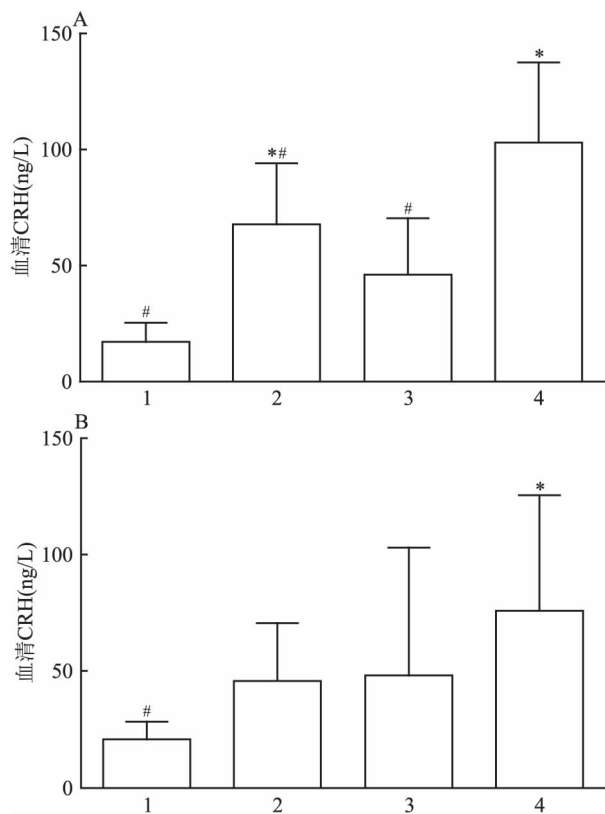


图5 妊娠期慢性应激对不同性别子鼠血清中 CRH 水平的影响  
A: 雄鼠; B: 雌鼠; 1: Control 组; 2: COS 组; 3: CPS 组; 4: COS+  
CPS 组; 与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 COS+CPS 组比较: #  $P < 0.05$

### 3 讨论

如今社会环境日趋复杂,孕产妇、青少年和儿童都容易暴露在长期不良的环境中,所以妊娠期慢性应激是否加剧子代应激所致的抑郁是一个值得研究的课题。本研究采用强迫游泳试验判断小鼠抑郁及程度,结果显示子代雌雄小鼠 COS 组较 Control 组不动时间均延长,雄鼠 COS+CPS 组较 COS 组的不活动时间进一步延长,说明妊娠期慢性应激可加剧子代雄鼠因慢性应激所致的抑郁程度;雌鼠 COS+CPS 组未出现与雄性子鼠类似结果,提示,子代雌鼠可能对妊娠期慢性应激不敏感。由于实验中评价小鼠抑郁行为只采用了强迫游泳实验,以后的研究中会考虑增加悬尾实验、旷场实验和糖水偏好实验,进行综合性评价。

海马是应激反应的靶部位,其中 CA 3 区尤为敏感<sup>[8]</sup>。本研究病理形态学结果显示,子代雄鼠 COS 组较 Control 组海马 CA 3 区神经元数目减少;COS+CPS 组较 COS 组的神经元数目进一步减少,神经元

排列疏松、紊乱,说明妊娠期慢性应激加剧了慢性应激所致的子代雄鼠海马 CA 3 区神经元损伤,这可能是 COS+CPS 组抑郁程度加重的重要原因之一。子代雌鼠不同组间差异不明显,提示不同性别子代对慢性复合应激所致的海马 CA 3 区损伤有差别。

在中枢神经系统,mTOR 信号调节神经元的存活和分化、树突的分枝、轴突的生长、突触发生和突触可塑性,在介导抑郁发病过程中发挥重要作用<sup>[9-10]</sup>。本研究显示,与 Control 组相比,CPS 组和 COS 组子代雌雄小鼠海马组织 mTOR 的表达量均下降。与 COS 组相比,只有雄性 COS+CPS 组子鼠海马组织的 mTOR 表达量减少,提示 mTOR 可能介导了妊娠期慢性应激加剧子代雄鼠抑郁的过程。

近年的研究<sup>[11]</sup>显示,CRH 分泌增多可能与抑郁的发生有关。本研究显示,CPS 组和 COS 组雄鼠子代血清 CRH 的水平明显升高;与 CPS 组和 COS 组相比,COS+CPS 组血清 CRH 水平进一步升高,提示妊娠期慢性应激加剧子代雄鼠的抑郁程度可能与 CRH 升高有关。子代雌鼠只有 COS+CPS 组血清 CRH 的水平升高,COS 组血清 CRH 水平有升高趋势,差异无统计学意义,已知 CRH 主要由下丘脑室旁核分泌<sup>[12]</sup>,因此血清中 CRH 水平变化可能稍不敏感。由于实验中未采用 CRH 受体阻断剂来观察 CRH 受体阻断后 mTOR 的变化以及抑郁是否改善。所以 CRH 是否通过调节 mTOR 的表达量介导妊娠期慢性应激加剧子代雄鼠的抑郁还有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] Abelaira H M, Réus G Z, Neotti M V, et al. The role of mTOR in depression and antidepressant responses [J]. Life Sci, 2014, 101 (1-2): 10-4.
- [2] Duman R S, Aghajanian G K. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets [J]. Science, 2012, 338 (6103): 68-72.
- [3] Brunton P J. Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring [J]. Reproduction, 2013, 146 (5): R175-89.
- [4] Liu Y, Murphy S K, Murtha A P, et al. Depression in pregnancy, infant birth weight and DNA methylation of imprint regulatory elements [J]. Epigenetics, 2012, 7 (7): 735-46.
- [5] 唐伟,王正玉,程娟,等. 产前应激加剧慢性子代应激诱导的子鼠学习记忆能力损伤 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50 (4): 466-71.
- [6] Porsolt R D, Bertin A, Jalfre M, et al. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants [J]. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1977, 229 (2): 327-36.

- [7] 程娟,王涛涛,唐伟,等.慢性复合应激致老年小鼠学习记忆损伤及机制研究[J].安徽医科大学学报,2013,48(12):1466-9.
- [8] Gilbert P E,Brushfield A M, et al. The role of the CA 3 hippocampal subregion in spatial memory: a process oriented behavioral assessment [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009, 33(5): 774-81.
- [9] Child N D, Benarroch E E. mTOR: its role in the nervous system and involvement in neurologic disease [J]. *Neurology*, 2014, 83(17): 1562-72.
- [10] 朱滨,杨春.东莨菪碱对强迫游泳大鼠雷帕霉素靶蛋白及脑源性神经营养因子表达的影响[J].齐齐哈尔医学院学报,2014,35(5):625-6.
- [11] Erhardt A, Müller M B, Rödel A, et al. Consequences of chronic social stress on behaviour and vasopressin gene expression in the PVN of DBA/201aHsd mice—influence of treatment with the CRHR1-antagonist R121919/NBI 30775 [J]. *J Psychopharmacol*, 2009, 23(1): 31-9.
- [12] Joseph A M. Corticotropin-releasing hormone physiology [J]. *Eur J Endocrinol*, 2006, 155(5): S71-S76.

## Effect of chronic prenatal stress on depression in different sex of offspring mice

Han Zhenmin, Kuang Liang, Wang Zhengyu, et al

(School of Public Health Anhui Medical University Hefei 230032)

**Abstract Objective** To explore the effect of chronic prenatal stress on depression in different sex of offspring mice, and the possible mechanism. **Methods** Offspring mice were randomly divided into four groups: the prenatal control-offspring control group (control group), the chronic prenatal stress-offspring control group (CPS group), the prenatal control-chronic offspring stress group (COS group), and the chronic prenatal stress-chronic offspring stress group (COS+CPS group). Forced swimming test was used to investigate depression in mice, and the histopathologic changes in CA 3 field of the hippocampus were examined under a light microscope. Additionally, Western blot was used to observe the expression of mammalian target of rapamycin (mTOR) expression in hippocampus. Furthermore, ELISA was used to examine the serum levels of corticotropin-releasing hormone (CRH) in the offspring mice. **Results** Compared with the control group, the results showed that male offspring mice in COS group had more motionless time ( $P < 0.05$ ), and the neuropathological changes were characterized by the disintegrated pyramidal layered structure, decreased neuron number, worse cell morphology, soma condensation, nuclear pyknosis in the CA 3 field of hippocampus in the COS group ( $P < 0.05$ ). Moreover, the expression of mTOR in hippocampus were decreased, and the serum CRH concentration in the COS group were increased ( $P < 0.05$ ). There were no similar results in COS group of female offspring except that the motionless time was extended ( $P < 0.05$ ) and the expression of mTOR in hippocampus were decreased ( $P < 0.05$ ). Noteworthy, the motionless time and neuropathological changes stated above were worsen in COS+CPS group of male offspring mice than those in COS group ( $P < 0.05$ ). There were also no similar results in COS+CPS group of female offspring. **Conclusion** Chronic stress may exacerbate the level of depression in male offspring mice who also suffer chronic stress, which may be related to chronic prenatal stress reduce the production of mTOR through increasing expression of CRH resulted the neuropathological changes in the CA 3 field of hippocampus. Chronic prenatal stress could not exacerbate the degree of depression elicited by chronic stress in female offspring mice.

**Key words** prenatal stress; chronic stress; corticotropin-releasing hormone; depression