网络首发时间：2024-10-21 12:03:14
网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241018.0838.016

昼夜节律紊乱对雄性青少年小鼠下丘脑和睾丸的影响

刘　宇[1],刘召平[2],蒲建林[1],向　波[1,3],刘可智[1,3],蔡端芳[1],邬建飞[1]
(西南医科大学附属自贡医院[1] 自贡市脑科学研究院、[2] 检验科,自贡　643020;
[3] 西南医科大学附属医院精神科,泸州　646000)

摘要　目的　探讨昼夜节律紊乱(CRD)对青少年小鼠下丘脑神经元变化和睾丸功能的影响。**方法**　选取30只SPF级1月龄C57雄性小鼠,随机分为Control组和CRD组,每组15只,Control组保持12 h暗/12 h明的循环光照,CRD组保持24 h光照,造模共计61 d。统计各组小鼠的生长曲线;利用高架十字迷宫和旷场实验检测小鼠行为变化;利用尼氏染色检测神经元形态;利用免疫荧光染色和Western blot技术检测离子钙结合适配器分子1(Iba1)和神经元特异性核蛋白(NeuN)在下丘脑的分布和表达;利用RT-qPCR检测睾酮合成相关基因类固醇激素合成急性调节蛋白(StAR)和3β-羟基类固醇脱氢酶-1(HSD3B1)以及生精相关基因配子生成素结合蛋白2(GGNBP2)和无精症缺失样(DAZL)在睾丸中的表达情况。**结果**　在第61天时,CRD组小鼠体质量显著高于Control组。高架十字迷宫中,CRD组小鼠进入开臂时间、开臂次数和开臂时间百分比都显著少于Control组小鼠;旷场测试中,CRD组小鼠在中心区停留时间和进入中心区频率都显著少于Control组小鼠。尼氏染色结果显示CRD组小鼠下丘脑阳性细胞数量显著少于Control组小鼠;免疫荧光和Western blot结果显示CRD组小鼠下丘脑的Iba1蛋白表达上调,NeuN蛋白表达下调。RT-qPCR结果显示CRD组小鼠睾丸中HSD3B1的表达显著低于Control组小鼠,GNBP2和DAZL的表达显著低于Control组小鼠。**结论**　CRD处理不仅会导致青少年小鼠出现焦虑抑郁样行为,同时还会降低雄性青少年小鼠生精能力。

关键词　C57小鼠;昼夜节律紊乱;抑郁症;下丘脑;睾丸
中图分类号　R 742
文献标志码　A　**文章编号**　1000－1492(2024)10－1802－07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000－1492.2024.10.015

地球自转经历着24 h的光/暗交替,为了适应这种环境循环,生物进化出了昼夜节律的生理机制[1]。但随着社会迅速发展,青少年昼夜节律紊乱(circadian rhythm disorder,CRD)现象日趋严重,CRD将造成青少年身体发育异常、认知记忆能力受损以及产生抑郁焦虑情绪等[2]。下丘脑是哺乳动物调控昼夜节律的中枢结构,视网膜接收的光信号首先被传递至下丘脑视交叉上核(suprachiasmatic nucleus,SCN),然后信号通过神经系统和激素释放系统反馈至下游脑区,最后通过调控时钟相关基因的表达实现昼夜周期的调节[3]。

同时,下丘脑是哺乳动物生殖调控的核心器官,下丘脑分泌释放的激素对雄性动物睾丸的发育和精子的产生至关重要[4]。研究[5]报道,CRD会损害雄性大鼠生殖系统,睾丸出现病理性损伤,支持细胞数量和精子数量低于正常大鼠。男性青少年下丘脑和睾丸还处于快速发育成熟的阶段,同时CRD广泛存在于青少年群体,但缺乏CRD对青少年小鼠下丘脑和睾丸的系统性研究,因此,该研究旨在探究CRD对雄性青年小鼠下丘脑和睾丸的影响,为神经系统和繁殖系统的相互作用提供新的视角。

1　材料与方法

1.1　实验动物　实验用SPF级C57BL/6J小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证号为SCXK(沪)2022-0004。随机挑选1月龄雄性子代30只,实验分为Control组和CRD组,每组15只。实验动物室内温度23～25 ℃,相对湿度(55±10)%,保证小鼠自由采食和饮水。Control组保持12 h暗/12 h明的循环光照,CRD组保持24 h光照,光照处理61 d[6]。

1.2　主要材料　高架十字迷宫和旷场箱均购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司;冰冻切片机(CM1950)购自德国Leica公司;实时荧光定量PCR

2024－06－27接收
基金项目:四川省科技计划项目(编号:2023NSFSC0124);四川省自贡市科技计划项目(编号:2023YKY11、2023-NKY-02-13、2023-NKY-02-14);四川省自贡市卫生健康委员会科研课题(编号:22yb001)
作者简介:刘　宇,男,硕士,助理研究员;
邬建飞,男,硕士,助理研究员,通信作者,E-mail:179507209@qq.com

仪(QuantStudioTM3)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;荧光倒置显微镜(Ti2-u)和激光共聚焦显微镜(C2)购自日本尼康公司;多功能成像系统(FUSION Fx6)购自法国 Vilber 公司。尼氏染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;多克隆兔抗 Iba1 和多克隆鼠抗 NeuN 购自美国 Cell signaling technology 公司;山羊抗鼠 IgG H&L 和山羊抗兔 IgG H&L 购自北京博奥森生物技术有限公司;RT-qPCR 八联管、各种型号枪头、离心管均购自上海科进生物技术有限公司;4% 多聚甲醛固定液购自武汉博士德生物工程有限公司;RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和 SYBR Green Master Mix 试剂购自南京诺唯赞公司;多克隆兔抗 GAPDH 购自美国 Proteintech 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京酷来搏科技有限公司。

1.3 生长曲线 将 1 月龄小鼠体质量作为初始体质量,然后每 4 天记录 1 次子代体质量,共计 61 d。

1.4 行为实验

1.4.1 *高架十字迷宫实验* 把小鼠放在十字迷宫的中心位置,记录小鼠 5 min 内进入开臂、闭臂的次数及在两臂滞留的时间。并计算小鼠进入开臂次数、在开臂滞留时间及在开臂滞留时间占总时间的百分比。

1.4.2 *旷场实验* 待小鼠 3 月龄时进行动物行为学实验。从旷场箱中心区中心点投放小鼠,记录小鼠 5 min 内在旷场箱中的总移动距离、进入中心区频率和在中心区停留时间。

1.5 尼氏染色 行为学试验结束后安乐处死各组小鼠。利用 PBS 对小鼠进行充分灌注后迅速剥离小鼠脑组织,然后 4% 多聚甲醛固定和蔗糖梯度脱水。脱水完成后利用冰冻切片将脑组织切成 5 μm 厚的脑片,将脑片黏附至载玻片。尼氏染色流程如下:依次过 ddH_2O 1 min、70% 乙醇 1 min、95% 乙醇 5 min、100% 乙醇 10 min、二甲苯 20 min、100% 乙醇 10 min、95% 乙醇 1 min、50% 乙醇 1 min、甲基紫溶液 10 min(56 ℃水浴加热)、分化液 1 min、100% 乙醇 5 min、二甲苯 20 min,最后封片显微镜下观察。

1.6 免疫荧光 将经固定和脱水后的小鼠脑组织切 10 μm 厚的脑片,然后进行免疫荧光试验。免疫荧光流程如下:0.5% Triton X-100 室温通透细胞 20 min,通透结束后用 PBS 轻洗 3 次;5% BSA-PBS 溶液室温封闭 30 min,封闭结束后用吸出溶液,不洗;湿盒 4 ℃过夜孵育 Iba1 抗体和 NeuN 抗体(均 1∶250稀释),结束用 PBS 轻洗 3 次;室温避光孵育二抗(1∶1 000稀释)2 h,结束后 PBS 洗 3 次;用 DAPI(1∶5 000稀释)染核,室温避光孵育 15 min,结束用 PBS 洗 3 次;封片后利用激光共聚焦显微镜下成像观察。

1.7 Western blot 实验 每组随机挑选 3 只小鼠提取下丘脑蛋白,然后利用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。制备 12% 的 SDS-PAGE 凝胶,每孔加入 30 μg 蛋白样品,然后 80 V 恒压电泳 30 min,120 V 恒压电泳 60 min;将 PVDF 膜在甲醇中活化 1 min,随后 200 mA 恒流转膜 2 h,将蛋白转到 PVDF 膜上;将 PVDF 膜置于 5% 的脱脂奶粉中封闭 1 h,洗膜后分别将膜与多克隆兔抗 Iba1(1∶1 000)、多克隆鼠抗 NeuN(1∶1 000)和多克隆兔抗 GAPDH(1∶50 000)4 ℃下摇床孵育过夜;次日,一抗孵育完成后用 TBST 洗涤 3 次,然后用相应二抗在室温下孵育 1 h;在 ECL 化学发光显影后用 Vilber FUSION Fx6 成像系统采集图像,使用 Image J 软件分析各组蛋白条带的灰度值。

1.8 实时荧光定量 RT-qPCR 根据试剂盒的说明书提取睾丸总 RNA。使用分光光度计评估 RNA 的纯度和浓度。RNA 样本的 OD_{260}/OD_{280} 在 1.8 ~ 2.0 之间,$OD_{260}/OD_{230} \geqslant 2.0$。根据试剂盒说明书逆转录合成 cDNA。检索 NCBI 中的相关基因的基因序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,并交由擎科梓熙生物技术(成都)有限公司合成。使用 RT-qPCR 方法检测基因的表达,每个样品重复 3 次,GAPDH 作为内参基因校正。StAR 上游引物:5′-ACCTCGGTGCTTTAAGGTGA-3′,下游引物:5′-AGCCACAGTGTTTGCTGAAG-3′;HSD3B1 上游引物:5′-TCATTCCCAGGCAGACCATCC-3′,下游引物:5′-CCCTGCAACATCAACTGAGCTG-3′;DAZL 上游引物:5′-CATCAGCAACCACAAGTCAAGG-3′,下游引物:5′-GAGACAAATCCATAGCCCTTCG-3′;GGNBP2 上游引物:5′-CTCATTGGTGAACTTGACTGC-3′,下游引物:5′-TCACTGCTTTCTCGTCTGCGGTG-3′;GAPDH 上游引物:5′-CTCATGACCACAGTCCATGC-3′,下游引物:5′-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3′。qPCR 反应体系 20 μl:SYBR Green Master Mix 10 μl,cDNA 1 μl,上、下游引物各 0.4 μl,ddH_2O 8.2 μl。反应条件:95 ℃预变性 3 min;95 ℃变性 10 s,60 ℃退火 30 s,39 个循环;读取溶解曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算出各个基因相对表达量。

1.9 统计学处理 该研究数据分析采用软件为 SPSS 21.0,图片分析软件为 Image J,作图软件为

GraphPad Prism 8.0。利用独立 t 检验分析两组间是否存在显著性差异，试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，$P < 0.05$ 即认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRD 对青年小鼠体质量的影响 两组青少年小鼠在前 5 天体质量的增长速度均较快，但与 Control 组小鼠相比，CRD 组小鼠体质量增长更明显，在第 37 天、53 天和 61 天时 CRD 组小鼠的体质量显著高于 Control 组小鼠（$P < 0.05$）。见图 1。

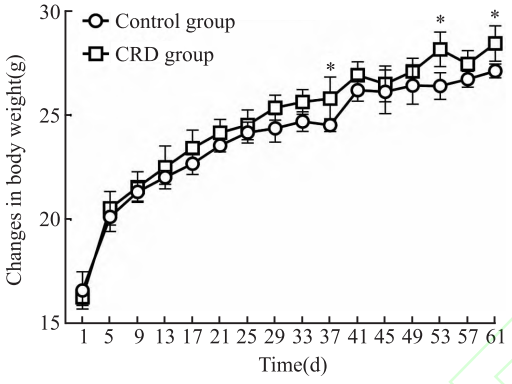

图 1 两组小鼠生长曲线

Fig. 1 Growth curves of mice in two groups

* $P < 0.05$ *vs* Control group.

2.2 行为实验 高架十字迷宫结果显示 CRD 组小鼠进入开臂时间、进入开臂次数和进入开臂时间百分比都显著低于 Control 组小鼠[$t = 3.138$（进入开臂时间）、$t = 1.936$（进入开臂次数）、$t = 3.151$（进入开臂时间百分比），$P < 0.05$]，见图 2A－2C。旷场测试结果显示两组小鼠运动距离差异无统计学意义，但 CRD 组小鼠进入中心区频率极显著低于 Control 组小鼠（$t = 3.423$，$P < 0.01$），CRD 组小鼠在中心区停留时间显著低于 Control 组（$t = 2.363$，$P < 0.05$），见图 2D－2F。

2.3 CRD 对青少年小鼠神经元形态数量的影响 对青少年小鼠下丘脑结构进行分区，将下丘脑分为背内侧核（dorsomedial hypothalamic nucleus，DMH）、腹内侧核（ventromedial hypothalamic nucleus，VMH）和弓状核（arcuate nucleus，ARC），见图 3A。CRD 组小鼠出现更多损伤神经元，主要表现为细胞呈不规则形状、细胞核皱缩和细胞染色更深等，见图 3B。对下丘脑神经元细胞数量进行统计，结果显示 CRD 组小鼠 DMH、VMH 和 ARC 脑区的阳性细胞数量都显著低于 Control 组小鼠（$P < 0.05$），见图 3C。

2.4 CRD 对青少年小鼠神经活性的影响 Iba1 免疫荧光结果显示，Iba1 阳性细胞均匀分布于 CRD 组小鼠下丘脑 DMH、VMH 和 ARC 脑区，而在 Control 组小鼠中，Iba1 阳性细胞零星分布于 VMH 和 ARC 脑区，见图 4A。CRD 组小鼠下丘脑 DMH 和 VMH

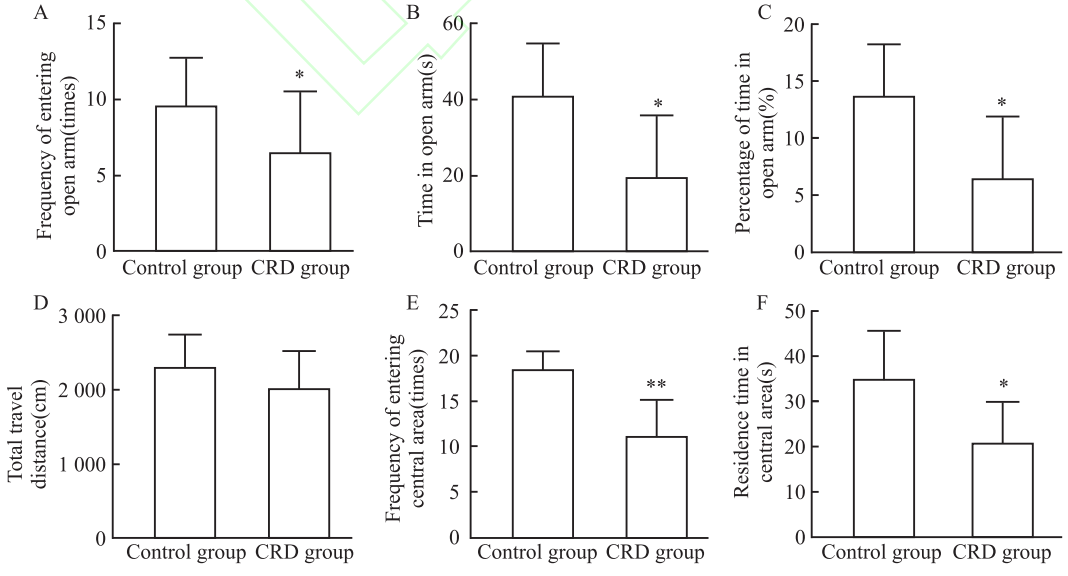

图 2 小鼠高架十字迷宫和旷场测试结果

Fig. 2 Results of the elevated cross maze and open field test

A: Frequency of entered into the open arms of the elevated plus maze; B: Time spent in the open arms of the elevated plus maze; C: Percentage of time spent in the open arms of the elevated plus maze; D: Distance traveled in the open field test; E: Frequency of entered into the center area of the open field test; F: Duration of stayed in the center area of the open field test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *vs* Control group.

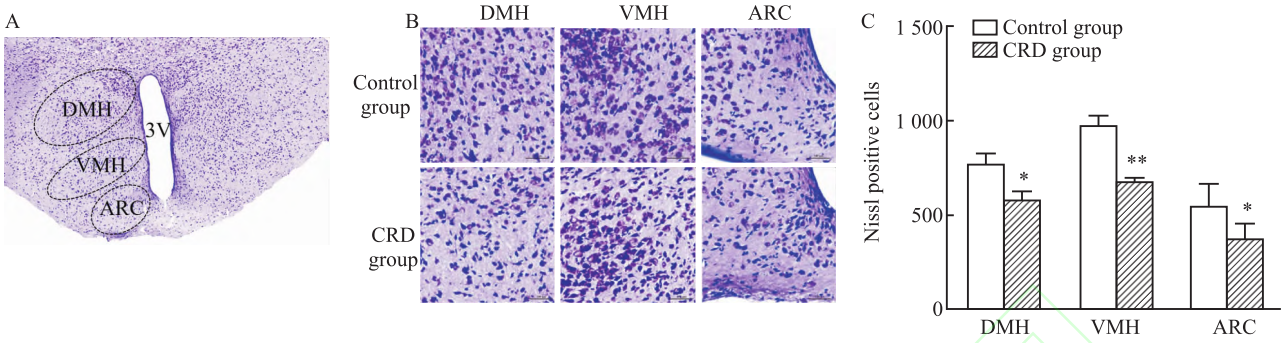

图3 尼氏染色结果 ×400

Fig. 3 The results of Nissl staining ×400

A: Hypothalamic subregions; B: Representative Nissl staining images of various hypothalamic regions; C: Statistical counts of Nissl-positive cells in various hypothalamic regions; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ *vs* Control group.

脑区 Iba1 的荧光强度显著高于 Control 组($P<0.05$),见图 4B。NeuN 免疫荧光结果显示 NeuN 阳性细胞均匀分布于 DMH 脑区,而在 VMH 和 ARC 脑区呈团聚状,见图 4C。同时,CRD 组小鼠 DMH 和 VMH 脑区 NeuN 的荧光强度极显著低于 Control 组小鼠($P<0.01$),见图 4D。

2.5 CRD 对青少年小鼠下丘脑 Iba1 和 NeuN 蛋白表达的影响 CRD 处理完成后,通过 Western blot 技术对 Iba1 和 NeuN 蛋白在下丘脑的表达进行检测。结果显示,CRD 组下丘脑 Iba1 蛋白表达极显著高于 Control 组($t=6.022$,$P<0.01$),见图 5A、5B;CRD 组下丘脑 NeuN 蛋白表达极显著低于 Control 组($t=6.506$,$P<0.01$),见图 5A、5C。

2.6 CRD 对睾丸发育及激素分泌的影响 RT-qPCR 结果显示,与睾酮分泌的 2 个基因,StAR 在两组小鼠睾丸中的表达差异不显著,而 HSD3B1 在 CRD 组小鼠睾丸中的表达显著低于 Control 组小鼠($t=4.524$,$P<0.05$),见图 6A、6B。与睾丸生精的两个基因,GGNBP2 和 DAZL 在 CRD 组小鼠睾丸中的表达都显著低于 Control 组小鼠[$t=1.770$(GGNBP2),$t=3.646$(DAZL),$P<0.05$],见图 6C、6D。

3 讨论

CRD 是全球性的健康难题,CRD 增加了癌症、心血管疾病、免疫炎症和代谢失调等疾病的发生率,在青少年群体中,CRD 所导致的肥胖和抑郁焦虑尤为常见[3]。在该研究中,CRD 导致青年小鼠体质量显著增加。研究[7-8]表明,24 h 不睡将导致青少年身体能量消耗增加约 7%,能量消耗刺激下丘脑外侧食欲素能神经元产生食欲素,从而增加对食物的摄取,长期 CRD 会增加肥胖风险。CRD 还是人类产生情绪障碍的重要诱因,Qian et al[9]研究表明 CRD 的工人患抑郁和焦虑的风险比正常工人高出 25% ~40%。动物研究[8]表明急性睡眠剥夺(sleep deprivation,SD)会使小鼠产生抑郁焦虑样行为。该研究动物行为结果显示 CRD 增加小鼠抑郁焦虑倾向,揭示青年小鼠在 CRD 影响下可能产生抑郁焦虑样行为。

动物行为是中枢神经系统复杂的、多层次的、动态的最终输出,它控制着动物的运动和情绪,而下丘脑是控制动物昼夜节律的起搏器,CRD 将影响下丘脑神经元的活动。该研究显示 CRD 小鼠下丘脑神经元发生形态学变化,神经元细胞缩小并呈不规则形状,细胞核皱缩和颜色加深等,说明 CRD 致使下丘脑神经元损伤。而神经元的形态功能与动物行为学表型密切相关,神经元形态功能异常将导致小鼠抑郁焦虑样行为[10]。

小胶质细胞是中枢神经系统中重要的免疫细胞,其中 M1 型小胶质细胞标志物 Iba1 蛋白的表达与神经炎症密切相关,研究[8]表明,抑制小胶质细胞活化可以有效预防神经元损伤,因此,该研究进一步探究小胶质细胞状态与 CRD 的关系。结果显示,CRD 增加了小鼠下丘脑 DMH 和 VMH 脑区 Iba1 蛋白的表达,说明 CRD 增加了下丘脑神经炎症的风险。Wang et al[11]研究表明 CRD 将导致大鼠海马区 Iba1 阳性细胞数量增加,结合该研究下丘脑 Iba1 免疫荧光染色结果,推测 CRD 可能增加多个脑区 Iba1 的表达,进而诱发神经炎症。NeuN 是神经元有丝分裂后的独特标记,NeuN 蛋白的表达与神经发育和神经发生密切相关,NeuN 反应性丧失是神经元退化的

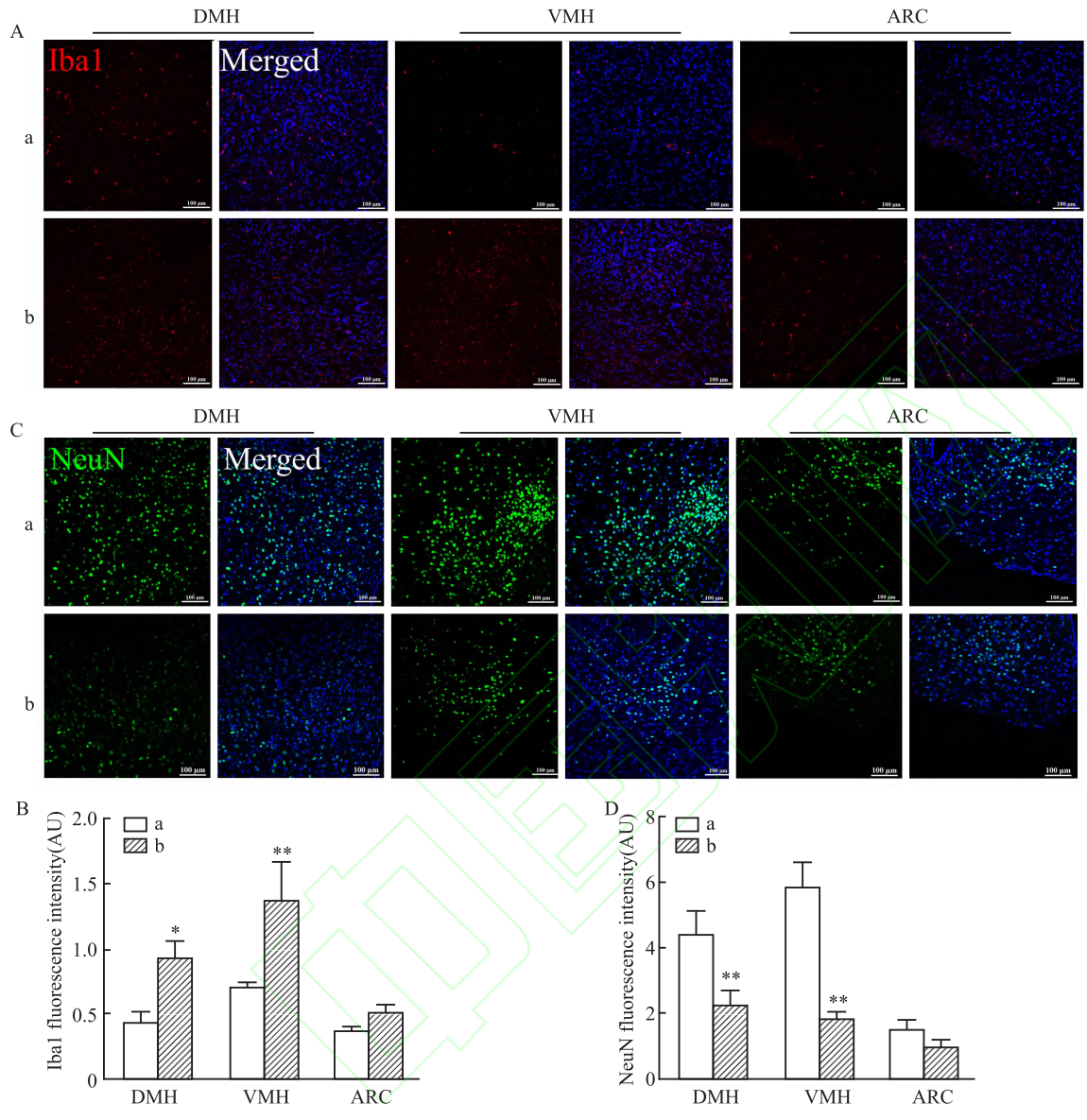

图 4　下丘脑 Iba1 和 NeuN 蛋白的定位和表达 ×200

Fig. 4　The localization and expression of Iba1 and NeuN proteins in the hypothalamus ×200

A: Localization and expression of Iba1 protein in the hypothalamus; B: Statistical analysis of Iba1 protein fluorescence intensity; C: Localization and expression of NeuN protein in the hypothalamus; D: Statistical analysis of NeuN protein fluorescence intensity; a: Control group; b: CRD group; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ *vs* Control group.

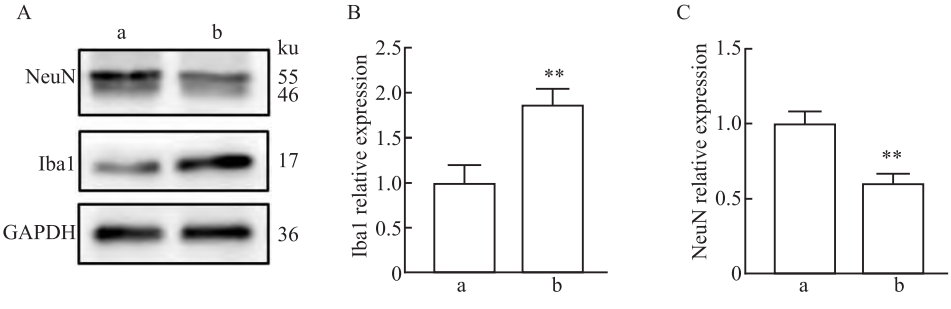

图 5　CRD 后各组下丘脑 Iba1 和 NeuN 表达情况

Fig. 5　Iba1 and NeuN expression in hypothalamus after CRD

A: Western blot bands of proteins; B, C: Relative level of protein expression; a: Control group; b: CRD group; $^{**}P<0.01$ *vs* Control group.

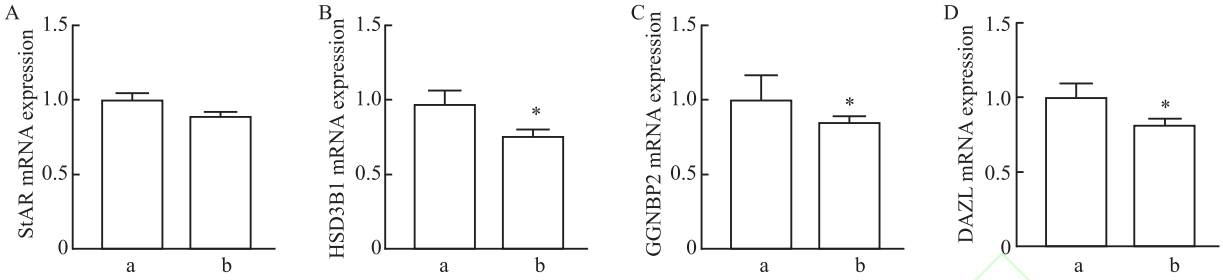

图 6 睾酮分泌及生精相关基因表达结果

Fig. 6 Results of gene expression related to testosterone secretion and spermatogenesis

A: StAR gene expression; B: HSD3B1 gene expression; C: GGNBP2 gene expression; D: DAZL gene expression; a: Control group; b: CRD group; * $P<0.05$ *vs* Control group.

标志[12]。CRD 小鼠下丘脑 NeuN 的表达低于对照组,说明 CRD 是诱导小鼠下丘脑神经元退化的风险因素。该研究结果显示,CRD 导致小鼠下丘脑 Iba1 蛋白表达的上调和 NeuN 蛋白表达的下调可能是小鼠产生焦虑抑郁样行为的重要诱因。

下丘脑还是控制雄性动物睾丸发育和生殖活动的重要组织,下丘脑神经系统的异常变化将导致哺乳动物生殖活动出现紊乱[4]。睾丸是雄性哺乳动物的重要生殖器官,其中 StAR 大量存在睾丸间质细胞线粒体中,StAR 蛋白调控睾丸间质细胞产生睾酮[13]。HSD3B1 可以催化肾上腺前体类固醇转化为睾酮[14]。GGNBP2 是维持精子正常形态和精子分化的重要基因[15]。DAZL 调控精子发生时的减数分裂过程[16]。该研究结果显示,CRD 组小鼠 HSD3B1 基因表达低于对照组,说明 CRD 是导致小鼠睾酮合成分泌减少的风险因素。同时,CRD 小鼠生精相关基因 DAZL 和 GGNBP2 表达也低于对照组,说明 CRD 可能会导致雄性青年小鼠生精能力下降。

综上所述,CRD 会增加青少年小鼠肥胖的风险,并导致青少年小鼠出现抑郁焦虑样行为。CRD 将造成青少年小鼠下丘脑神经元形态异常,并上调 Iba1 蛋白的表达和下调 NeuN 蛋白的表达。CRD 处理还影响青少年小鼠睾酮的生成和分泌,降低睾丸生精能力。该研究提示 CRD 不仅导致青少年小鼠下丘脑神经元异常,同时还降低雄性青少年的生殖能力,但下丘脑神经元变化和睾丸生殖功能下降的深入机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] Tu H Q, Li S, Xu Y L, et al. Rhythmic cilia changes support SCN neuron coherence in circadian clock[J]. Science, 2023, 380(6648): 972-9. doi:10.1126/science.abm1962.

[2] Coel R A, Pujalte G G A, Applewhite A I, et al. Sleep and the young athlete[J]. Sports Health, 2023, 15(4): 537-46. doi: 10.1177/19417381221108732.

[3] Sanford A B A, da Cunha L S, Machado C B, et al. Circadian rhythm dysregulation and leukemia development: the role of clock genes as promising biomarkers[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(15): 8212. doi:10.3390/ijms23158212.

[4] Sang Q, Ray P F, Wang L. Understanding the genetics of human infertility[J]. Science, 2023, 380(6641): 158-63. doi:10.1126/science.adf7760.

[5] Ogo F M, Siervo G E M L, de Moraes A M P, et al. Extended light period in the maternal circadian cycle impairs the reproductive system of the rat male offspring[J]. J Dev Orig Health Dis, 2021, 12(4): 595-602. doi:10.1017/S2040174420000975.

[6] Hong F, Pan S, Xu P, et al. Melatonin orchestrates lipid homeostasis through the hepatointestinal circadian clock and microbiota during constant light exposure[J]. Cells, 2020, 9(2): 489. doi:10.3390/cells9020489.

[7] Chaput J P, McHill A W, Cox R C, et al. The role of insufficient sleep and circadian misalignment in obesity[J]. Nat Rev Endocrinol, 2023, 19(2): 82-97. doi:10.1038/s41574-022-00747-7.

[8] Yang D F, Huang W C, Wu C W, et al. Acute sleep deprivation exacerbates systemic inflammation and psychiatry disorders through gut microbiota dysbiosis and disruption of circadian rhythms[J]. Microbiol Res, 2023, 268: 127292. doi: 10.1016/j.micres.2022.127292.

[9] Qian J, Vujovic N, Nguyen H, et al. Daytime eating prevents mood vulnerability in night work[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(38): e2206348119. doi:10.1073/pnas.2206348119.

[10] Wang R, Liu Z H, Bi N, et al. Dysfunction of the medial prefrontal cortex contributes to BPA-induced depression- and anxiety-like behavior in mice[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 259: 115034. doi:10.1016/j.ecoenv.2023.115034.

[11] Wang Y, Zhang Y, Wang W, et al. Effects of circadian rhythm disorder on the hippocampus of SHR and WKY rats[J]. Neurobiol Learn Mem, 2020, 168: 107141. doi: 10.1016/j.nlm.2019.

107141.

[12] Santamaría G, Rengifo A C, Torres-Fernández O. NeuN distribution in brain structures of normal and Zika-infected suckling mice [J]. J Mol Histol, 2023, 54(3): 245 - 53. doi:10.1007/s10735 - 023 - 10128 - 7.

[13] Tuckey R C, Headlam M J, Bose H S, et al. Transfer of cholesterol between phospholipid vesicles mediated by the steroidogenic acute regulatory protein (StAR)[J]. J Biol Chem, 2002, 277(49): 47123 - 8. doi:10.1074/jbc.M206965200.

[14] Gomez-Sanchez C E, Lewis M, Nanba K, et al. Development of monoclonal antibodies against the human 3β-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase isozymes[J]. Steroids, 2017, 127: 56 - 61. doi:10.1016/j.steroids.2017.08.011.

[15] Chen A, Li J, Song L, et al. GGNBP2 is necessary for testis morphology and sperm development[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2998. doi:10.1038/s41598 - 017 - 03193 - y.

[16] Vangompel M J W, Xu E Y. The roles of the DAZ family in spermatogenesis: more than just translation? [J]. Spermatogenesis, 2011, 1(1): 36 - 46. doi:10.4161/spmg.1.1.14659.

Effects of circadian rhythm disturbances on the hypothalamus and testis in male adolescent mice

Liu Yu[1], Liu Zhaoping[2], Pu Jianlin[1], Xiang Bo[1,3], Liu Kezhi[1,3], Cai Duanfang[1], Wu Jianfei[1]

([1]*Zigong Institute of Brain Science*, [2]*Dept of Laboratory*, *The Zigong Affiliated Hospital of Southwest Medical University*, *Zigong* 643020; [3]*Dept of Psychiatry*, *Affiliated Hospital of Southwest Medical Universit*, *Luzhou* 646000)

Abstract ***Objective*** To explore the mechanisms of circadian rhythm disorder (CRD) on behavior and testicular spermatogenic capacity in adolescent mice. ***Methods*** Thirty SPF grade C57 mice were selected and randomly divided into the control and CRD groups with 15 mice in each group. The control group kept 12 h dark / 12 h bright circulating light, and the CRD group kept 24 h light. The trial lasted for 61 days. The growth curves of mice in each group were counted; the elevated plus maze test and open field test were performed to detect mice behavior; neuronal morphology was visualized by Nissl staining. The distribution of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) and neuron-specific nuclear protein (NeuN) in the hypothalamus were detected by immunofluorescence and Western blot. Expression of testosterone synthesis-related genes steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 (HSD3B1) and spermatogenesis-related genes gametogenetin binding protein 2 (GGNBP2) and deleted in azoospermia-like (DAZL) were determined by RT-qPCR. ***Results*** The weight of the CRD group was significantly higher than that of control group at 61 days; in the elevated plus maze test, the time, frequency, and percentage of time in the open arm of the CRD group were significantly less than those of the control group; in the open field test, there was no significant difference in movement distance between the two groups; however, the residence time of the central area in the CRD group was significantly less than that in the control group; the frequency of entering the central area in the CRD group was significantly less than that in the control group. Nissl staining results showed that the positive cells in the CRD group were significantly lower than the control group. Immunofluorescence and Western blot results showed that Iba1 protein expression was up-regulated and NeuN protein expression was down-regulated in the hypothalamus of the CRD group. In the RT-qPCR experiment, the expression of HSD3B1 in the CRD group was significantly lower than that of the control group; the expression of GGNBP2 and DAZL in the CRD group was significantly lower than that in the control group. ***Conclusion*** The CRD treatment can not only lead to depressive behavior in adolescent mice but also reduce the development of reproductive system in male adolescent mice.

Key words C57 mice; circadian rhythm disorder; depression; hypothalamus; testis

Fund programs Scientific and Technological Project of Sichuan Province (No. 2023NSFSC0124); Scientific and Technological Project of Zigong of Sichuan Province (Nos. 2023YKY11, 2023-NKY-02-13, 2023-NKY-02-14); Research Project of Zigong Health Commission (No. 22yb001)

Corresponding author Wu Jianfei, E-mail: 179507209@qq.com