

母鼠孕期慢性应激对子代学习记忆功能及海马脑源性神经营养因子表达的影响

付有娟, 刘志宏, 赵枫, 关素珍

宁夏医科大学公共卫生与管理学院, 宁夏 银川 750004

摘要:

[背景] 孕期慢性应激刺激会对子代的生长发育产生长远的影响, 其中最严重的损害是引起子代学习记忆能力下降。研究发现孕早期和孕晚期母源性应激对胎儿大脑发育的影响最明显, 可引起海马组织中单胺类神经递质及胰岛素样生长因子 II 表达异常, 但突触相关蛋白脑源性神经营养因子 (BDNF) 的表达及其与学习记忆功能之间的关联较少报道。

[目的] 观察孕期慢性应激后子鼠学习记忆功能的变化, 检测海马组织突触相关蛋白 BDNF 的表达情况, 并分析其与子代学习记忆功能之间的关联。

[方法] 选择 SPF 级未曾受孕、80~90 日龄的 Wistar 雌鼠 20 只, 随机分为模型组和对照组, 每组 10 只; SPF 级 90~100 日龄的 Wistar 雄鼠 15 只, 随机分为模型组 10 只和对照组 5 只。适应性饲养一周后, 通过慢性不可预知温和应激 (CUMS) 建立母鼠孕期应激模型, 模型组母鼠每天给予刺激, 连续 21 d 不间断; 对照组母鼠正常环境饲养。应激刺激开始的第 3 天, 将模型组雌鼠与雄鼠按照 1:1 合笼, 对照组按 2:1 合笼。母鼠应激前 1 d 和应激后 1、7、14 d 分别进行内眦静脉取血, 采用 ^{125}I 皮质醇放射免疫试剂盒对血浆皮质醇的含量进行测定, 根据公式计算皮质醇浓度, 当模型组皮质醇浓度高于对照组表示建模成功。子鼠出生后 21 d (记为 PND21) 时断乳, 两组均从不同窝别中随机抽取 16 只子鼠 (雌、雄各 8 只), 分别为对照子鼠组和模型子鼠组, 编号后每笼 4 只正常环境饲养。PND28 时, 测量子鼠体重。PND42 时测量子鼠体重, 利用 Morris 水迷宫 (主要指标为逃避潜伏期和跨越平台次数) 和 Y 迷宫 (主要指标为达标所需训练的次数和正确反应率) 对子代学习记忆能力进行测定, 通过 HE 染色及电镜对子鼠海马组织形态学进行观察, 采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blotting 法测定海马组织突触相关蛋白 BDNF mRNA 和蛋白的表达水平。

[结果] 在应激第 7 天, 模型组母鼠血浆皮质醇水平 $[(348.50 \pm 13.24) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$ 高于对照组 $[(224.00 \pm 39.84) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$ 且达到高峰 ($P < 0.05$), 在应激第 14 天, 模型组大鼠皮质醇水平 $[(258.38 \pm 22.77) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$ 仍高于对照组 $[(218.78 \pm 16.68) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$, 提示模型组大鼠处于应激状态。Morris 水迷宫实验结果显示: 模型子鼠组逃避潜伏期时间 $[(32.00 \pm 3.61) \text{s}]$ 长于对照子鼠组 $[(20.01 \pm 4.12) \text{s}]$ ($F = 7.30, P < 0.05$); 模型子鼠组跨越平台次数 $[(5.54 \pm 2.11) \text{次}]$ 少于对照子鼠组 $[(7.38 \pm 1.38) \text{次}]$ ($t = 2.26, P < 0.05$)。在 Y 迷宫试验中, 模型子鼠组达标所需的训练次数 $[(31.32 \pm 17.12) \text{次}]$ 多于正常子鼠组 $[(19.38 \pm 11.22) \text{次}]$, 而记忆正确反应率 ($45\% \pm 15\%$) 低于对照子鼠组 ($89\% \pm 25\%$), 且差异均有统计学意义 ($t = 6.77, P < 0.05$)。模型子鼠组海马组织结构清晰度弱于对照子鼠组, 细胞形态不规则, 胞体缩小, 细胞间距明显增大, 细胞排列松散。模型子鼠组的海马突触相关蛋白 BDNF mRNA 相对表达 (0.61 ± 0.15) 低于对照子鼠组 (1.00 ± 0.22) ($t = 3.79, P < 0.05$); 与对照子鼠组 (0.50 ± 0.02) 相比, 模型子鼠组 BDNF 蛋白相对表达 (0.15 ± 0.10) 也降低 ($t = 28.11, P < 0.05$)。子鼠的逃避潜伏期 ($r = -0.59, P < 0.05$) 和训练次数 ($r = -0.59, P < 0.05$) 与突触相关蛋白 BDNF 相对表达存在负相关关系, 其正确反应率与 BDNF 蛋白相对表达存在正相关关系 ($r = 0.66, P < 0.05$)。

[结论] 孕期慢性应激可使子代学习记忆功能和海马突触相关蛋白 BDNF 的相对表达下降, 且学习记忆能力的下降与 BDNF 蛋白的相对表达下降有关。

关键词: 孕期; 慢性应激; 子鼠; 学习记忆; 脑源性神经营养因子

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19662

基金项目

国家自然科学基金地区基金项目 (81960591); 宁夏自然科学基金项目 (2018AAC02007); 2019 年宁夏医科大学优势学科群建设项目 (3); 宁夏医科大学 2019 年校级大学生创新创业训练计划项目 (14)

作者简介

付有娟 (1993—), 女, 硕士生;
E-mail: 15121816109@163.com

通信作者

关素珍, E-mail: guansz_nx2017@sina.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-09-25

录用日期 2020-01-18

文章编号 2095-9982(2020)03-0267-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

付有娟, 刘志宏, 赵枫, 等. 母鼠孕期慢性应激对子代学习记忆功能及海马脑源性神经营养因子表达的影响 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (3): 267-273.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19662

Funding

This study was funded.

Correspondence to

GUAN Su-zhen, E-mail: guansz_nx2017@sina.com

Competing interests None declared

Received 2019-09-25

Accepted 2020-01-18

►To cite

FU You-juan, LIU Zhi-hong, ZHAO Feng, et al. Effects of maternal chronic stress during pregnancy on learning and memory function and expression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor in offspring rats [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(3): 267-273.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19662

Effects of maternal chronic stress during pregnancy on learning and memory function and expression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor in offspring rats FU You-juan, LIU Zhi-hong, ZHAO Feng, GUAN Su-zhen (School of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract:

[Background] Chronic stress stimulation during pregnancy will have a long-term impact on the growth and development of offspring, and the most serious damage is the decline of learning and memory ability. Previous studies have found that maternal stress in early or late pregnancy has the most significant effect on the development of fetal brain, such as abnormal expressions of monoamine neurotransmitter and insulin-like growth factor II in hippocampus, but there are few reports about the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) and its relationship with learning and memory function.

[Objective] This experiment is designed to observe the changes of learning and memory function in offspring of pregnant rats with chronic stress, detect the expression of BDNF in hippocampus, and analyze the relationship between BDNF and learning and memory of offspring rats.

[Methods] Twenty female Wistar rats of SPF grade aged 80-90 days and not pregnant were randomly divided into a model group and a control group, with 10 rats in each group. Fifteen male Wistar rats of SPF grade aged 90-100 days were randomly divided into a model group with 10 rats and a control group with 5 rats. After one week of adaptive feeding, a stress model of female rats was established by chronic unpredictable mild stress (CUMS) for 21 consecutive days, while the female rats in the control group were fed in normal environment. On the 3rd day of the stress stimulation, the female and male rats in the model group were caged according to 1 : 1 sex ratio, and the control rats were caged according to 2 : 1. One day before the stress and 1, 7, and 14 days after the stress, blood samples were collected from the angular vein of the female rats, plasma cortisol content was measured by ^{125}I cortisol radioimmunoassay, and the concentration of corticosterone was calculated. If the concentration of corticosterone in the model group was higher than that in the control group, the model was considered successful. On postnatal day 21 (PND21), the offspring rats were weaned, and 16 pups (eight females and eight males) were randomly selected from different nests of the two groups, named correspondingly as model offspring group and control offspring group, and four pups were raised in normal environment in each cage after being grouped. On PND28, the body weight of the pups was recorded. On PND42, the body weight of the pups was recorded, the learning and memory ability of the pups was detected by Morris water maze (escape latency and the number of crossing platform) and Y maze (the training times for reaching learning criterion and correct response rate), the morphology of hippocampus was observed after HE staining using electron microscopy, and the mRNA and protein expressions of *BDNF* were measured by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blotting respectively.

[Results] On the 7th day of stress, the plasma corticosterone level of the model female rat group $[(348.50 \pm 13.24) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$ was higher than that of the control female rat group $[(224.00 \pm 39.84) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$ and reached a peak ($P < 0.05$). On the 14th day of stress, the corticosterone level of the model female rat group $[(258.38 \pm 22.77) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$ was still higher than that of the control female rat group $[(218.78 \pm 16.68) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$, suggesting that the model group was stressed. The results of Morris water maze experiment showed that the escape latency of the model offspring group $[(32.00 \pm 3.61) \text{s}]$ was longer than that of the control offspring group $[(20.01 \pm 4.12) \text{s}]$ ($F = 7.30, P < 0.05$); the number of crossing platform of the model offspring group (5.54 ± 2.11) was less than that of the control offspring group (7.38 ± 1.38) ($t = 2.26, P < 0.05$). In the Y maze test, the training times in the model offspring group (31.32 ± 17.12) were significantly higher than that in the control offspring group (19.38 ± 11.22) , while the correct response rate in the model offspring group $(45\% \pm 15\%)$ was lower than that in the control offspring group $(89\% \pm 25\%)$ ($t = 6.77, P < 0.05$). The hippocampal structure of the model offspring group was not as clear as that of the control offspring group, the cell morphology was irregular, the cell body was reduced, the cell spacing was significantly increased, and the cell arrangement was loose. The mRNA relative expression level of *BDNF* in the model offspring group (0.61 ± 0.15) was lower than that in the control offspring group (1.00 ± 0.22) ($t = 3.79, P < 0.05$), and the protein relative expression of BDNF in the model offspring group (0.15 ± 0.10) was also lower than that in the control offspring group (0.50 ± 0.02) ($t = 28.11, P < 0.05$). The escape latency ($r = -0.59, P < 0.05$) and training times ($r = -0.59, P < 0.05$) were negatively correlated with the protein relative expression of BDNF, and the correct response rate ($r = 0.66, P < 0.05$) was positively correlated with the protein relative expression of BDNF in the offspring rats.

[Conclusion] Chronic stress during pregnancy can decrease the learning and memory function and the relative expression of synaptic related protein BDNF in hippocampus of offspring rats, and the decline of learning and memory ability is related to the decline of BDNF protein relative expression.

Keywords: pregnancy; chronic stress; offspring rat; learning and memory; brain-derived neurotrophic factor

研究表明, 实验动物孕期受到慢性应激后可以引起母体体重减轻, 血浆皮质酮含量增加及一系列焦虑抑郁等反应, 甚至引起子代学习记忆功能的减退^[1-2]。海马是调节学习记忆功能最重要的组织, 同时也是对慢性应激最敏感的部位^[3]。脑源性神经营养

因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 的主要作用是调控神经元的生长、分化和再生, 参与海马突触细胞的可塑性调节, 进而影响学习记忆能力^[4]。目前国内外对应激引起子代学习记忆能力减弱的研究相对较多^[5-6], 但是对子代海马突触相关蛋白 BDNF 表

达及其与学习记忆能力的相关性研究较少。故本研究通过建立母鼠孕期慢性应激模型,比较子代学习记忆能力的变化及海马BDNF蛋白的表达差异,并对二者的相关性进行分析,为孕期慢性应激致子代学习记忆能力损伤机制的相关研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂及仪器

1.1.1 实验动物与分组 SPF级未曾受孕、80~90日龄的Wistar雌鼠20只,体重(255±15)g;SPF级90~100日龄的Wistar雄鼠15只,体重(325±25)g。雌鼠分组:随机分为模型组(1只/笼)与对照组(5只/笼),各10只;雄鼠分组:随机分为模型组10只与对照组5只,每笼5只,均正常饲养。实验动物购买于新疆医科大学实验动物中心,合格证编号:SCXK(新)2011-000。动物实验全过程均在普通动物房进行,饲养环境的温度为18~20℃,相对湿度为50%~60%,保证足够量的新鲜干燥食物,自由饮水。该实验过程完全遵循实验动物管理和使用的伦理要求。

1.1.2 实验试剂及仪器 ^{125}I 皮质醇放射免疫试剂盒(北京北方生物技术,中国),蔗糖(北京化学试剂,中国), β -actin抗体及BDNF抗体(Santa,美国)等。主要的实验仪器:Morris水迷宫及MG-3Y迷宫刺激器(成都泰盟科技有限公司,中国),高速离心机(型号:1-15K型;Sigma,美国)等。

1.2 建立孕期慢性应激模型

大鼠适应性饲养1周后,采用慢性不可预知温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)建立母鼠应激模型^[7],模型组母鼠于每天随机进行一种刺激,连续21d不间断。方法有:①31℃温水游泳1h;②42℃热应激5min;③湿度60%~70%的潮湿环境24h;④食物剥夺24h;⑤水剥夺24h;⑥0.5mA,60个不可回避足底电击;⑦夹尾1min;⑧30min的摇晃应激(1次/s);⑨24h拥挤环境(每笼10只)、笼具倾斜30°。刺激方式①②⑥⑦⑧均在10:00—13:00进行。

应激刺激开始的第3天,将模型组雌鼠与雄鼠按照1:1合笼,对照组雌鼠与雄鼠按照2:1合笼,合笼过程中对模型组雌鼠的刺激不间断。合笼后次日早晨检查母鼠阴栓,并进行阴道涂片,确认母鼠是否受孕。记录母鼠生殖的基本情况,包括孕天数、雌雄比例、子鼠数量等信息。母鼠应激前1d,应激后1、7、14d

分别行内眦静脉采血,离心分离血浆,采用 ^{125}I 皮质醇放射免疫试剂盒对血浆皮质醇含量进行测定^[8]。啮齿类动物体中最主要的糖皮质激素是血浆皮质酮,血浆皮质酮含量升高是动物受到应激刺激的标志^[9]。大鼠血浆皮质酮与皮质醇含量之比约为50:1。因此换算公式为:血浆皮质酮浓度=血浆皮质醇浓度 $\times 50$ ^[10]。

1.3 子鼠选择与分组

所有子鼠于5d内全部娩出,子鼠出生当天为PND0(即为出生后第0天),PND21时断乳,按照每笼的分娩只数及性别比例从不同窝别中随机抽取16只子鼠(雌、雄各8只),分别为对照子鼠组和模型子鼠组,编号后每笼4只,雌雄分笼,正常环境饲养。PND28时,记录子鼠体重。PND42时,称重后处死,并进行相关检测。

1.4 子鼠学习记忆能力测定

通过Morris水迷宫对子鼠的空间学习记忆能力进行测定,训练5d(PND42~PND46)后,再测试5d(PND47~PND51),使子鼠在水中自由游泳2min,记录其找到平台的时间,第6天将平台撤去,记录2min内的运动轨迹,利用软件分析其找到平台所用的时间(逃避潜伏期)及跨越平台的次数。

利用Y迷宫测定子鼠工作记忆能力,测试2d,指标包括达标所需的训练次数和记忆正确反应率。

1.5 子鼠海马组织取材及病理学观察

子鼠学习记忆能力测定完成后,腹腔注射水合氯醛,冰上剥离大脑,将右侧海马放入液氮冻存,左侧海马切为两部分,一部分用4%多聚甲醛固定(常温),另一部分用2.5%戊二醛固定(4℃)。

取经4%多聚甲醛固定的子鼠海马组织,经梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片机切片,苏木素-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色后,用光学显微镜观察海马CA1区形态结构的改变。取经2.5%戊二醛固定的子鼠海马组织,经浸洗、脱水、渗透、包埋、聚合后在JEM-1230型透射电镜下观察。

1.6 子鼠海马中BDNF mRNA含量检测

使用液氮研磨子鼠海马组织,经一系列离心处理后取沉淀,选用核酸蛋白定量仪检测RNA浓度与 D_{260}/D_{280} 值,采用电泳法检测RNA完整性,通过实时荧光定量PCR法采用ABI7500荧光定量PCR检测BDNF mRNA含量。

1.7 海马组织中BDNF蛋白表达测定

海马突触相关蛋白BDNF的含量采用Western

blotting 法进行测定, 用 ChemiScoPe3000 化学发光仪检测、拍照, 计算目的蛋白 BDNF 与内参蛋白 β -actin 的灰度值及比值。

1.8 统计学分析

利用 SPSS 23.0 统计软件分析实验数据, 首先对实验数据进行正态性检验, 均服从正态分布, 故用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行统计描述, 采用重复测量资料方差分析对母鼠血浆皮质酮、水迷宫中逃避潜伏期的实验结果进行比较, 用独立样本 t 检验分析水迷宫中跨平台次数、达标所需的训练次数及记忆正确反应率, 采用 Pearson 相关分析对子鼠学习记忆能力与突触相关蛋白 BDNF 表达的相关性进行分析。检验水准 $\alpha=0.05$, 双侧检验。

2 结果

2.1 孕期母鼠血浆皮质酮水平和生殖情况

应激前 1 天和应激后第 1、7、14 天模型组与对照组母鼠皮质酮水平差异有统计学意义 ($F=15.00$, $P<0.05$), 表明慢性应激对孕期大鼠血浆皮质酮有影响。在应激第 7 天, 模型组母鼠血浆皮质酮水平 $[(348.50 \pm 13.24) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$ 高于对照组 $[(224.00 \pm 39.84) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$ 且达到高峰 ($P<0.05$); 在应激第 14 天, 模型组大鼠皮质酮水平 $[(258.38 \pm 22.77) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$ 仍高于对照组 $[(218.78 \pm 16.68) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$, 提示模型组大鼠处于应激状态。

与对照组母鼠相比 $[(19.80 \pm 1.10) \text{d}$ 、 $(13.00 \pm 1.77) \text{只}]$, 模型组母鼠的孕天数和所产只数 $[(18.40 \pm 1.70) \text{d}$ 、 $(9.17 \pm 1.89) \text{只}]$ 均减少, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

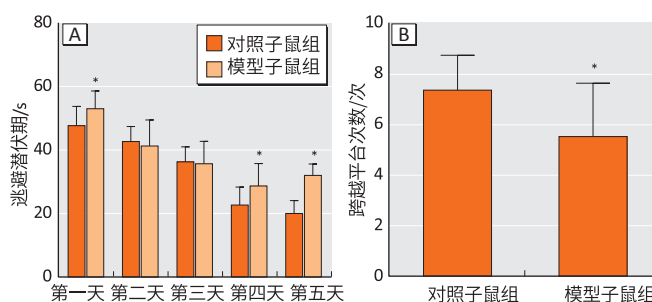
2.2 子鼠的体重及学习记忆能力

2.2.1 子鼠的体重 PND28 和 PND42 时模型子鼠组体重 $[(37.87 \pm 3.57)$ 、 $(127.56 \pm 19.56) \text{g}]$ 低于对照子鼠组 $[(42.58 \pm 2.38)$ 、 $(142.28 \pm 22.34) \text{g}]$ ($P<0.05$)。

2.2.2 Morris 水迷宫检测结果 重复测量资料方差分析的结果显示, 两组子鼠学习记忆能力差异存在统计学意义 ($F=7.58$, $P<0.05$)。由图 1A 可知: 在测试第 5 天, 模型子鼠组逃避潜伏期时间 $[(32.00 \pm 3.61) \text{s}]$ 长于对照子鼠组 $[(20.01 \pm 4.12) \text{s}]$ ($F=7.30$, $P<0.05$)。模型子鼠组跨越平台次数 $[(5.54 \pm 2.11) \text{次}]$ 少于对照子鼠组 $[(7.38 \pm 1.38) \text{次}]$ ($t=2.26$, $P<0.05$) (图 1B)。

2.2.3 Y 迷宫实验结果 模型子鼠组在 Y 迷宫试验中达标所需的训练次数 $[(31.32 \pm 17.12) \text{次}]$ 高于正常子鼠组 $[(19.38 \pm 11.22) \text{次}]$, 而记忆正确反应率 ($45\% \pm 15\%$)

低于对照子鼠组 ($89\% \pm 25\%$), 且差异均具有统计学意义 ($t=6.77$, $P<0.05$)。

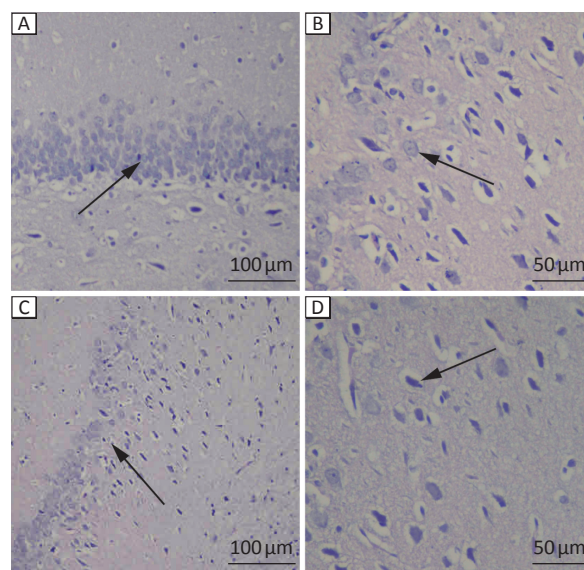


[注] A: 逃避潜伏期; B 跨越平台次数。*: 与同期对照子鼠组比较, $P<0.05$ 。

图 1 两子鼠组 Morris 水迷宫学习记忆能力情况

2.3 子鼠海马组织病理学情况

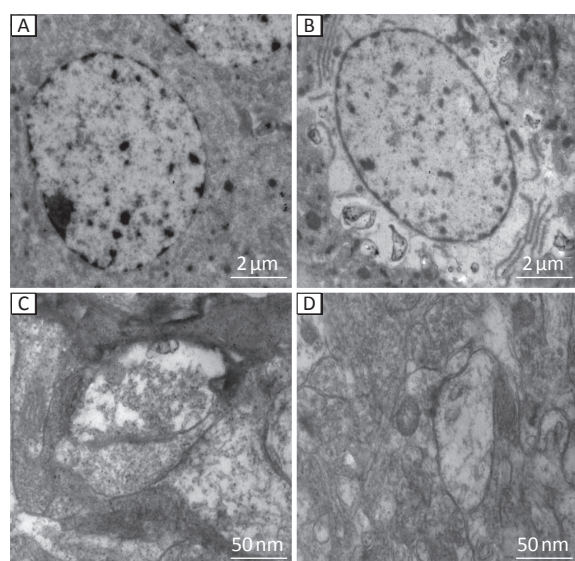
光镜下, 对照子鼠组海马组织结构层次清晰, 细胞排列整齐, 细胞质中尼氏小体较多, 位于边缘, 细胞核居中。模型子鼠组海马组织结构清晰度弱于对照子鼠组, 细胞形态呈现不规则, 排列松散, 同时胞体缩小, 细胞间距增大。见图 2。



[注] A、B 分别为对照子鼠组光镜下放大 200、400 倍; C、D 分别为模型子鼠组光镜下放大 200、400 倍。箭头指的是海马细胞。

图 2 子鼠海马组织光镜观察结果 (HE 染色)

电镜下, 对照子鼠组海马神经元细胞的细胞核及线粒体结构完整, 形态正常 (图 3A、C)。模型子鼠组海马神经元细胞部分变性, 细胞核缩小, 核膜内陷, 核仁减少, 核周有空泡 (图 3B)。模型子鼠组的海马神经元细胞核出现纤维素样蛋白质包涵物, 内质网呈现轻度扩张, 核糖体与突触前膜颗粒明显减少 (图 3D)。

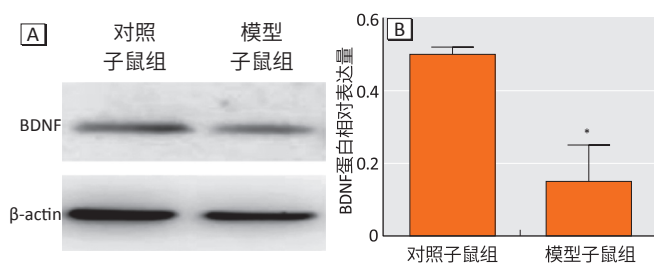


[注] A、B 分别为对照子鼠组、模型子鼠组电镜下 ($\times 12\,000$) 的海马神经元细胞；C、D 分别为对照子鼠组、模型子鼠组电镜下 ($\times 50\,000$) 的海马突触细胞。

图3 子鼠海马神经元细胞和突触细胞电镜观察结果

2.4 子鼠海马BDNF mRNA和蛋白水平的变化

模型子鼠组中BDNF mRNA相对表达 (0.61 ± 0.15) 低于对照子鼠组 (1.00 ± 0.22) ($t=3.79$, $P<0.05$)；与对照子鼠组 (0.50 ± 0.02) 相比，模型子鼠组BDNF蛋白相对表达 (0.15 ± 0.10) 也降低 ($t=28.11$, $P<0.05$)。见图4。



[注] A：BDNF电泳结果；B：BDNF蛋白表达灰度值。*：与对照子鼠组比较， $P<0.05$ 。

图4 子鼠海马组织突触相关蛋白BDNF蛋白表达

2.5 子鼠学习记忆能力与BDNF蛋白相对表达的相关性分析

除跨越平台次数外，逃避潜伏期、达标所需训练次数和记忆正确反应率均与BDNF蛋白表达存在相关关系。Morris水迷宫中的逃避潜伏期和Y迷宫中的训练次数与BDNF蛋白表达存在负相关关系 (r 分别为-0.59和-0.59，均 $P<0.05$)，Y迷宫中的记忆正确反应率与BDNF蛋白相对表达存在正相关关系 ($r=0.66$, $P<0.05$)。见表1。

表1 子鼠学习记忆能力与BDNF蛋白相对表达的相关性 (r)

测试方法	学习记忆能力指标	BDNF蛋白表达
Morris水迷宫 ^a	逃避潜伏期	-0.59*
	跨越平台次数	0.26
Y迷宫	训练次数	-0.59*
	正确反应率	0.66*

[注] *： $P<0.05$ 。a：测试第5天的数据。

3 讨论

当机体受到环境中各种应激源刺激后，可使下丘脑-垂体-肾上腺轴 (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 兴奋，引起血浆皮质醇含量升高，较高浓度的皮质醇导致焦虑抑郁等情绪的改变，进而加重应激效应^[11]。通常实验中，将升高的血浆皮质酮含量作为应激刺激的标志^[9]。本研究结果表明：在应激第7天，模型组大鼠的血浆皮质酮含量高于同期对照组，且达高峰，进一步提示模型组大鼠处于应激状态。

国内外流行病学研究发现：妊娠期的慢性应激或心理紧张会增加低体重儿、早产及孕期缩短等不良妊娠结局^[12-13]。在本次实验中，所选择的Wistar大鼠妊娠期一般为19~21d，平均为20d，孕鼠受惊吓易造成流产或早产。对模型组母鼠连续进行21d慢性不可预知温和应激刺激，可能导致母鼠妊娠期缩短，基于以上因素考虑，选择在应激第3天进行合笼。此外，模型子鼠组PND 28和PND 42体重均低于同期对照子鼠组，同时模型组母鼠孕天数及所产子鼠只数均低于对照组，说明孕期慢性应激刺激影响母鼠的妊娠能力，出现早产和低体重的现象。

海马位于颞叶内侧面基底部，参与机体空间学习记忆过程^[14]。大量研究表明，胎儿时期是大脑中大量神经连接回路形成的关键时期，在此阶段慢性应激极易引起损伤^[15]。本研究中Morris水迷宫与Y迷宫实验的结果表明，模型子鼠组的逃避潜伏期较对照子鼠组延长，跨越平台次数减少，达标所需训练的次增多及记忆正确反应率降低，提示孕期慢性应激可使子代学习记忆能力下降，与已有研究的结果一致^[16-17]。

研究表明，BDNF在脑海马中含量最丰富，主要在海马CA1、CA3区的锥体细胞和齿状回颗粒细胞中分布^[18]。BDNF能使突触间信息传递显著增强，进一步影响神经元的可塑性及学习记忆功能^[19]。在本实验中，模型子鼠组的海马突触相关蛋白BDNF mRNA和蛋白相对表达水平均低于对照子鼠组，且BDNF蛋白表达水平与学习记忆功能相关。啮齿类动物应激后会出现BDNF基因和蛋白表达的下调^[20]，海马区

BDNF 表达降低可能会引起早期胚胎发育过程中海马的萎缩或细胞凋亡, BDNF 直接参与突触形态的调节, 其含量降低会直接影响参与学习记忆过程的海马功能^[21]。

相关性分析结果表明: 子鼠在 Morris 水迷宫和 Y 迷宫中学习记忆能力相关指标与 BDNF 蛋白表达有一定的相关性, 子鼠脑海马组织 BDNF 蛋白表达下降可能导致子鼠学习记忆能力下降, 这与 Bahramzadeh 等^[22]的研究结果一致。研究发现, 妊娠早期胎儿 HPA 轴尚未发育成熟, 妊娠晚期胎儿的体内的 HPA 轴尚不能诱导机体产生皮质醇, 即胎儿体内的皮质醇含量完全来自母体^[23]。在应激状态下, 大鼠血浆皮质酮水平会升高, 一定量的血浆皮质酮对机体有一定的保护作用, 但是在孕期过高浓度的血浆皮质酮会通过血胎盘屏障进入子鼠体内, 则会引起子代脑海马神经元损伤, 导致 CA3 区椎体树突的萎缩, 甚至抑制海马神经元长时程增强, 可引起学习记忆能力的损伤^[24]。BDNF 在海马长时程增强的维持中起关键作用, 研究表明血浆皮质酮升高可引起海马内 BDNF 蛋白表达的下降^[25]。本研究中 BDNF 蛋白表达的减少可能与血浆皮质酮升高引起海马损伤有关, 但 BDNF 蛋白的减少是因为 BDNF mRNA 转录水平的变化, 还是翻译水平的改变, 目前尚不清楚。血浆皮质酮是基于何机制调节 BDNF 蛋白表达也有待进一步研究。

综上所述, 母鼠孕期慢性应激可使子代学习记忆能力降低, 同时降低海马区 BDNF 蛋白的表达, 且海马突触相关蛋白 BDNF 表达量与海马学习记忆能力密切相关, 但 BDNF 发挥作用的过程和机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] MAO M, LI S, ZONG M, et al. Two-hit model of postintensive care syndrome induced by lipopolysaccharide challenge and subsequent chronic unpredictable stress in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 70 : 446-458.
- [2] HENNEBELLE M, BALASSE L, LATOUR A, et al. Influence of omega-3 fatty acid status on the way rats adapt to chronic restraint stress [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (7) : e42142.
- [3] WIRKNER J, VENTURA-BORT C, SCHWABE L, et al. Chronic stress and emotion : Differential effects on attentional processing and recognition memory [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2019, 107 : 93-97.
- [4] HU W, FENG Z, XU J, et al. Brain-derived neurotrophic factor modified human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived cholinergic-like neurons improve spatial learning and memory ability in Alzheimer's disease rats [J]. *Brain Res*, 2019, 1710 : 61-73.
- [5] 王艳. Gsk-3 β /p-Catenin/p-GluR1 在生命早期应激致小鼠类焦虑、抑郁行为中的作用机制的研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- [6] HAN H, DAI C, DONG Z. Single fluoxetine treatment before but not after stress prevents stress-induced hippocampal long-term depression and spatial memory retrieval impairment in rats [J]. *Sci Rep*, 2015, 5 : 12667.
- [7] ROTHMAN SM, MATTSON MP. Adverse stress, hippocampal networks, and Alzheimer's disease [J]. *Neuromolecular Med*, 2010, 12 (1) : 56-70.
- [8] 关素珍. 孕期慢性应激对子代学习记忆能力影响及其干预的实验研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2014.
- [9] BIRAN D, BRAW-TAL R, GENDELMAN M, et al. ACTH administration during formation of preovulatory follicles impairs steroidogenesis and angiogenesis in association with ovulation failure in lactating cows [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2015, 53 : 52-59.
- [10] LIU XH, QIAN LJ, GONG JB, et al. Proteomic analysis of mitochondrial proteins in cardiomyocytes from chronic stressed rat [J]. *Proteomics*, 2004, 4 (10) : 3167-3176.
- [11] 关素珍, 夏迪亚·夏尔甫丁, 徐仙, 等. 孕前慢性应激后仔鼠学习记忆与胰岛素样生长因子 II 表达相关性研究 [J]. *环境与职业医学*, 2014, 31 (6) : 472-475.
- [12] MEYER J, O'CAMPO P, WARREN N, et al. Association of birthweight with maternal trajectories of effort-reward imbalance and demand-control across pregnancy [J]. *J Occup Environ Med*, 2017, 59 (2) : 169-176.
- [13] LARSEN AD, HANNERZ H, JUHL M, et al. Psychosocial job strain and risk of adverse birth outcomes : a study within the Danish national birth cohort [J]. *Occup Environ Med*, 2013, 70 (12) : 845-851.
- [14] DING J, ZHANG C, ZHANG YW, et al. N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 regulates neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of schizophrenia-like mice [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14 (12) : 2112-2117.
- [15] CHARMANDARI E, KINO T, SOUVATZOGLU E, et al. Pediatric stress : hormonal mediators and human

- development [J]. *Horm Res*, 2003, 59 (4) : 161-179.
- [16] 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) : 466-471.
- [17] 黄月君, 史雪川, 陈思红, 等. 母鼠妊娠前慢性不可预见性应激对子代学习记忆能力及海马突触结合蛋白 I 和突触结合蛋白 IV 表达的影响 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2013, 21 (1) : 46-49, 53.
- [18] ZHANG F, KANG Z, LI W, et al. Roles of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B (BDNF/TrkB) signalling in Alzheimer's disease [J]. *J Clin Neurosci*, 2012, 19 (7) : 946-949.
- [19] MAJCHER-MAŚLANKA I, SOLARZ A, WĘDZONY K, et al. Previous early-life stress modifies acute corticosterone-induced synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex of adolescent rats [J]. *Neuroscience*, 2018, 379 : 316-333.
- [20] 杨焕新, 李磊, 于艳红. 舒郁宁心方对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及海马 BDNF, TrkB 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 (19) : 84-87.
- [21] TAYYAB M, FARHEEN S, MUBEENA M, et al. Antidepressant and neuroprotective effects of naringenin *via* sonic hedgehog-GLI1 cell signaling pathway in a rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. *Neuromolecular Med*, 2019, 21 (3) : 250-261.
- [22] BAHRAMZADEH ZS, ELAHDADI SM, LASHKARBOLOUKI T, et al. Hippocampal orexin receptor blocking prevented the stress induced social learning and memory deficits [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2019, 157 : 12-23.
- [23] SLOTKIN TA, SEIDLER FJ, WOOD CR, et al. Development of glucocorticoid receptor regulation in the rat forebrain : implications for adverse effects of glucocorticoids in preterm infants [J]. *Brain Res Bull*, 2008, 76 (5) : 531-535.
- [24] PYRZANOWSKA J, PIECHAL A, BLECHARZ-KLIN K, et al. The influence of the long-term administration of *Curcuma longa* extract on learning and spatial memory as well as the concentration of brain neurotransmitters and level of plasma corticosterone in aged rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2010, 95 (3) : 351-358.
- [25] YANG XH, SONG SQ, XU Y. Resveratrol ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behavior : involvement of the HPA axis, inflammatory markers, BDNF, and Wnt/ β -catenin pathway in rats [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2017, 13 : 2727-2736.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 陈姣; 校对: 韩凤婵)

· 告知栏 ·

《环境与职业医学》入选 2019—2020 年度 CSCD 核心库

2019 年 4 月 29 日, 中国科学院文献情报中心公布了 2019—2020 年度中国科学引文数据库 (Chinese Science Citation Database, CSCD) 1230 种来源期刊名单。CSCD 来源期刊分为核心库和扩展库两部分, 其中核心库 908 种, 扩展库 322 种, 《环境与职业医学》被 CSCD 核心库持续收录!

《环境与职业医学》2015 年首次成为 CSCD (扩展库) 来源期刊, 2017 年进入核心库。近年编辑部在布局数字化业务、拓展传播途径、提升编辑素养、稳定出版质量等方面持续付出不懈努力, 陆续发表了《尘肺病治疗中国专家共识 (2018 年版)》, “PM_{2.5} 污染及其健康影响”“环境内分泌干扰物的健康影响”等一系列热点文章和专栏, 建立了布局完善、功能强大的网站及微信公众号, 并于 2019 年度全新改版杂志, 全方位紧跟数字化出版趋势, 实现 CSCD、北大核心、科技核心全部持续收录。

杂志的点滴进步都离不开各位编委、审稿专家、作者和读者的支持和关注, 特此志谢! 衷心希望广大读者和作者一如既往支持本刊工作, 踊跃投稿!