

丰富环境对孕期慢性应激大鼠子代海马 IGF-II 和 NF- κ B 表达的干预研究

赵枫, 刘志宏, 付有娟, 关素珍

宁夏医科大学公共卫生与管理学院, 宁夏 银川 750004

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19612

摘要:

[背景] 生命早期生活环境对子代成长发挥着重要作用, 孕期应激性事件会造成母体宫内环境改变, 进而对子代生长发育产生影响。胰岛素样生长因子-II (IGF-II) 和核因子- κ B (NF- κ B) 蛋白主要分布在脑内与认知和情感记忆相关的区域, 与单胺类神经递质去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA) 共同调节机体注意力和反应能力。丰富环境通过神经发生、突触发生、脑血管再生等神经重塑作用, 在促进神经再生的同时可改善学习和记忆能力。

[目的] 探讨丰富环境干预对孕期慢性应激大鼠子代海马突触相关蛋白 IGF-II 和 NF- κ B 表达的影响。

[方法] 将 20 只 Wistar 雌鼠随机分为模型组和对照组, 每组 10 只; 15 只 Wistar 雄鼠随机分为模型交配组 10 只和对照交配组 5 只。模型组选择慢性不可预知温和应激 (CUMS) 模型进行为期 21 d 的应激, 在应激第 3 天按 1:1 雌雄比例合笼; 对照组于正常环境饲养, 同期按 2:1 雌雄比例合笼。雌鼠在应激前 1 d 和应激第 1、7、14 天进行眼内眦静脉采血, 利用放射免疫法测定血浆皮质醇质量浓度并计算皮质酮质量浓度。子鼠出生后 21 d (PND21) 断乳, 将对照组的子鼠随机分为对照子鼠组和对照+丰富环境组, 模型组的子鼠分为模型子鼠组和模型+丰富环境组, 每组 16 只。进行丰富环境干预时, 将子鼠每天暴露于丰富环境 6 h (13:00—19:00), 干预周期为 30 d, 未干预组于正常环境饲养。PND50 时称重, 并利用自制散箱进行子鼠的行为学指标测定, 指标包括水平运动得分和垂直运动得分。在 PND55 时处死各组子鼠, 取海马组织。ELISA 法检测子鼠海马组织单胺类神经递质 NE 和 DA 的水平, 通过实时定量 PCR 和 Western blotting 法分别测定子鼠海马组织 IGF-II 和 NF- κ B mRNA 和蛋白的相对表达水平。

[结果] 模型组雌鼠在应激第 7、14 天血浆皮质酮质量浓度分别为 $[(348.50 \pm 13.24) \text{ 和 } (258.38 \pm 22.77) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$, 均高于对照组雌鼠 $[(224.00 \pm 39.84) \text{ 和 } (218.78 \pm 16.68) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$ ($P < 0.05$), 提示模型组大鼠在孕期处于应激状态。丰富环境干预后, PND50 时模型+丰富环境组和对照+丰富环境组子鼠体重 $[(191.70 \pm 18.31) \text{ 和 } (208.80 \pm 21.40) \text{ g}]$ 分别高于模型子鼠组和对照子鼠组 $[(175.70 \pm 8.12) \text{ 和 } (190.40 \pm 16.47) \text{ g}]$ ($P < 0.05$)。模型+丰富环境组子鼠水平及垂直运动得分分别为 (46.10 ± 9.26) 和 (23.50 ± 7.99) , 高于模型子鼠组 $[(24.40 \pm 8.30) \text{ 和 } (16.30 \pm 4.42)]$ ($P < 0.05$); 对照+丰富环境组子鼠垂直运动得分为 (27.20 ± 9.94) , 较对照子鼠组 (21.70 ± 6.83) 高 ($P < 0.05$)。模型+丰富环境组子鼠 NE 和 DA 的水平 $[(1.42 \pm 0.65) \text{ 和 } (2.85 \pm 0.75) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$ 高于模型子鼠组 $[(0.89 \pm 0.26) \text{ 和 } (1.94 \pm 0.64) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$ ($P < 0.05$)。与模型子鼠组 $[(0.50 \pm 0.19) \text{ 和 } (0.96 \pm 0.30)]$ 相比, 模型+丰富环境组 $[(1.11 \pm 0.53) \text{ 和 } (1.55 \pm 0.69)]$ 子鼠海马组织 IGF-II 和 NF- κ B mRNA 的相对表达水平升高 ($P < 0.05$)。模型+丰富环境组子鼠海马组织 IGF-II 和 NF- κ B 蛋白相对表达水平 $[(0.83 \pm 0.10) \text{ 和 } (0.67 \pm 0.27)]$ 高于模型子鼠组 $[(0.40 \pm 0.07) \text{ 和 } (0.30 \pm 0.16)]$ ($P < 0.05$), 对照+丰富环境组子鼠海马组织 IGF-II 和 NF- κ B 蛋白相对表达水平 $[(1.41 \pm 0.11) \text{ 和 } (0.75 \pm 0.30)]$ 高于对照子鼠组 $[(0.76 \pm 0.07) \text{ 和 } (0.59 \pm 0.07)]$ ($P < 0.05$)。

[结论] 丰富环境对孕期慢性应激大鼠子代的体重及运动能力有一定的促进作用, 可能与其提高子鼠海马组织 NE 和 DA 水平以及突触相关蛋白 NF- κ B 和 IGF-II 的表达水平有关。

关键词: 丰富环境; 胰岛素样生长因子-II; 核因子- κ B; 孕期慢性应激; 去甲肾上腺素; 多巴胺

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); 宁夏回族自治区 2019 年大学生创新创业训练计划项目 (S201910752018)

作者简介

赵枫 (1994—), 男, 硕士生;
E-mail: ZhaoFeng0205@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 2019-09-04

录用日期 2020-01-17

文章编号 2095-9982(2020)03-0274-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

赵枫, 刘志宏, 付有娟, 等. 丰富环境对孕期慢性应激大鼠子代海马 IGF-II 和 NF- κ B 表达的干预研究 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37(3): 274-280.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19612

Funding

This study was funded.

Correspondence to

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

Competing interests None declared

Received 2019-09-04

Accepted 2020-01-17

To cite

ZHAO Feng, LIU Zhi-hong, FU You-juan, et al. Intervention of enriched environment on expressions of IGF-II and NF- κ B in hippocampus of offspring of rats with chronic stress during pregnancy [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(3): 274-280.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19612

Intervention of enriched environment on expressions of IGF-II and NF- κ B in hippocampus of offspring of rats with chronic stress during pregnancy ZHAO Feng, LIU Zhi-hong, FU You-juan, GUAN Su-zhen (School of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract:

[Background] The early-life living environment plays an important role in the growth of offspring. Stressful events during pregnancy can induce changes in maternal intrauterine environment, which in turn affects the growth and development of offspring. Insulin like growth factor- II (IGF- II) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) are mainly distributed in the areas related to cognition and emotional memory in the brain, they work together with monoamine neurotransmitters norepinephrine (NE) and dopamine (DA) to regulate the attention and response ability of the body. Enriched environment can improve learning and memory ability while promoting nerve regeneration through neurogenesis, synapsis, cerebrovascular regeneration and other neural remodeling effects.

[Objective] This experiment is designed to investigate the effects of enriched environmental intervention on the expressions of hippocampal synapse-associated proteins such as IGF-II and NF- κ B in offspring of rats with chronic stress during pregnancy.

[Methods] Twenty female Wistar rats were randomly divided into a model group and a control group of 10 rats each; 15 male Wistar rats were randomly divided into a model group of 10 rats and a control group of 5 rats. The female rats of the model group received chronic unpredictable mild stress (CUMS) for 21 d, and were caged at a 1 : 1 female-to-male ratio on the 3rd day of the CUMS protocol. The female rats of the control group were reared in normal environment and caged at a 2 : 1 ratio. Blood samples were collected from the iliac vein of the female rats 1 day before and 1, 7, and 14 days after the CUMS protocol, and measured for plasma cortisol content by radioimmunoassay to calculate corticosterone concentration. The offspring rats were weaned on postnatal day 21 (PND21). The control offspring rats were randomly divided into a control offspring group and a control + enriched environment offspring group. The model offspring rats were divided into a model offspring group and a model + enriched environment offspring group, with 16 pups in each group. The offspring rats of two enriched environment groups were exposed to enriched environment for 6 h (13:00-19:00) every day, and the intervention period was 30 d. The other offspring rats were raised in normal environment. The offspring body weight was weighed on PND50, and behavioral parameters were measured, including horizontal movement score and vertical movement score, using a self-designed open box. Then the offspring rats were sacrificed and hippocampal tissue samples were collected. The levels of monoamine neurotransmitters norepinephrine (NE) and dopamine (DA) in hippocampus of the offspring rats were detected by ELISA. The relative expression levels of *IGF-II* and *NF- κ B* mRNA and protein in hippocampus of the offspring rats were determined by real-time quantitative PCR and Western blotting, respectively.

[Results] The plasma corticosterone concentrations of the female rats in the model group on the 7th and 14th days of stress [(348.50 $\pm$ 13.24) and (258.38 $\pm$ 22.77) μ g $\cdot$ L⁻¹] were higher than those of the female rats in the control group [(224.00 $\pm$ 39.84) and (218.78 $\pm$ 16.68) μ g $\cdot$ L⁻¹] (P < 0.05), suggesting that the female rats in the model group were stressed during pregnancy. After the enriched environment intervention, the body weights of the offspring rats in the model + enriched environment group and the control + enriched environment group on PND50 [(191.70 $\pm$ 18.31) and (208.80 $\pm$ 21.40) g] were higher than those of the offspring rats in the model group and the control group [(175.70 $\pm$ 8.12) and (190.40 $\pm$ 16.47) g] (P < 0.05). The scores of horizontal movement and vertical movement of the offspring rats in the model + enriched environment group [(46.10 $\pm$ 9.26) and (23.50 $\pm$ 7.99)] were higher than the scores of the offspring rats in the model group [(24.40 $\pm$ 8.30) and (16.30 $\pm$ 4.42)] (P < 0.05). The vertical movement score of the offspring rats in the control + enriched environment group (27.20 $\pm$ 9.94) was higher than that of the offspring rats in the control group (21.70 $\pm$ 6.83) (P < 0.05). The levels of NE and DA of the model + enriched environment offspring group [(1.42 $\pm$ 0.65) and (2.85 $\pm$ 0.75) μ g $\cdot$ L⁻¹] were higher than those of the model offspring group [(0.89 $\pm$ 0.26) and (1.94 $\pm$ 0.64) μ g $\cdot$ L⁻¹] (P < 0.05). Compared with the model offspring rats [(0.50 $\pm$ 0.19) and (0.96 $\pm$ 0.30)], the relative expression levels of *IGF-II* and *NF- κ B* mRNA in hippocampus of the model + enriched environment offspring rats were increased [(1.11 $\pm$ 0.53) and (1.55 $\pm$ 0.69)] (P < 0.05). The relative expression levels of IGF- II and NF- κ B proteins in hippocampus of the model + enriched environment offspring rats [(0.83 $\pm$ 0.10) and (0.67 $\pm$ 0.27)] were higher than those of the model offspring rats [(0.40 $\pm$ 0.07) and (0.30 $\pm$ 0.16)] (P < 0.05); the relative expression levels of IGF-II and NF- κ B proteins in hippocampus of the control + enriched environment offspring rats [(1.41 $\pm$ 0.11) and (0.75 $\pm$ 0.30)] were higher than those of the control offspring rats [(0.76 $\pm$ 0.07) and (0.59 $\pm$ 0.07)] (P < 0.05).

[Conclusion] Enriched environment can promote the weight gain and exercise capacity of the offspring of chronically stressed rats during pregnancy, and can increase the expressions of monoamine neurons NE and DA and synaptic related proteins NF- κ B and IGF-II in offspring hippocampus.

Keywords: enriched environment; insulin-like growth factor- II ; nuclear factor- κ B; chronic stress during pregnancy; norepinephrine; dopamine

应激是机体对外界多种不利因素作出反应时所呈现的一种身心紧张状态。在某些特定生理阶段, 各种急、慢性心理应激对母体及子代健康的影响更为明显。有研究发现, 妊娠期暴露于多种慢性应激环境的大鼠, 其子代出生后可发生行为学的改变^[1]。目前研究证实胰岛素样生长因子-II (insulin-like growth

factor-II, IGF-II) 和核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 蛋白在脑内主要分布于大脑前额皮层、纹状体以及海马等与认知和情感记忆相关的区域, 与单胺类神经递质去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE)、多巴胺 (dopamine, DA) 共同调节机体注意力和反应能力^[2]。丰富环境 (enriched environment, EE) 通过神经发生、

突触发生、脑血管再生等神经重塑作用,在促进神经再生的同时可改善学习和记忆能力^[3-4],但能否缓解因慢性应激而导致的子代行为学改变尚未明确。因此,探讨丰富环境对孕期慢性应激子鼠行为学指标的改变及该过程中IGF-II和NF- κ B的变化,有利于为丰富环境的机制研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂与仪器

本研究实验动物购自新疆医科大学实验动物中心,成年未受孕的健康Wistar大鼠合格证编号:SCXK(新)2011-000。其中雌鼠20只,体重(255 $\pm$ 15)g;雄鼠15只,体重(325 $\pm$ 25)g。整个实验过程遵循了新疆医科大学实验动物中心实验动物管理和使用的有关规定。适应性饲养一周,每笼5只。雌鼠随机分为孕期慢性应激组(以下简称模型组)和孕期正常对照组(以下简称对照组),每组10只;雄鼠分为模型交配组10只和对照交配组5只。除模型组单笼饲养外,其余各组饲养环境均为每笼5只。

¹²⁵I皮质醇放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所,中国),BCA Protein Assay Kit、RIPA裂解液(Solarbio公司,美国),DA、NE测试盒(南京建成生物工程研究所,中国),NF- κ B、IGF-II、 β -actin的一抗及二抗IgG(Solarbio公司,美国)。

蛋白电泳仪及化学显影仪(上海勤翔科学仪器有限公司,中国),荧光酶标仪(Bio-rad公司,美国)。

1.2 孕期慢性应激大鼠模型的建立

动物模型选择慢性不可预知温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)模型^[5]。适应期后,对模型组大鼠进行21d的CUMS刺激,每日1次。具体方法包括:①31 $^{\circ}$ C温水游泳1h;②42 $^{\circ}$ C热应激5min;③湿度为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 $\cdot$ s⁻¹);⑨24h拥挤环境、笼具倾斜30 $^{\circ}$ 。刺激方式①②⑥⑦⑧均在10:00—13:00进行。随机实施不同的刺激方式,7d内不相同。刺激完成后放回原饲养环境。

在应激开始的第3天模型组与模型交配组按1:1雌雄比例进行合笼,次日早晨检查雌鼠阴栓及阴道涂片来确认是否成功妊娠,确认妊娠后,模型组孕鼠继续单笼饲养。此过程中,应激不间断。对照组与对照

交配组同期按2:1雌雄比例进行合笼,确定妊娠后,对照组孕鼠每笼5只,孕18d开始单笼饲养。

模型确认标准:经统计学分析,模型组大鼠血浆皮质酮在同一时间点高于对照组,且差异有统计学意义($P<0.05$),表明大鼠处于应激状态^[6]。

1.3 子鼠分组及饲养环境

孕鼠分娩后,两组母鼠及子鼠饲养于同一饲养间,水和食物的供应充足。在出生后21d(记为PND21)时断乳、雌雄分笼饲养。将不同窝别对照组子鼠随机分为对照子鼠组、对照+丰富环境组,不同窝别模型组子鼠分为模型子鼠组、模型+丰富环境组,每组各16只,雌雄各半,编号并称重。对照+丰富环境组与模型+丰富环境组饲养于自制大笼中,每笼8只,每天暴露于丰富环境6h(13:00—19:00),其余时间饲养于普通笼中,每笼4只。对照子鼠组与模型子鼠组饲养于普通笼中,每笼4只。各组均继续饲养30d。

参照Nithianantharajah等^[7]的设计,自制丰富环境笼子(90cm $\times$ 50cm $\times$ 60cm),其中底面为不锈钢板(铺满木屑),四周为透明玻璃,上为装有可开关的金属网盖。笼内放置各种彩色玩具,如小球、金属楼梯、可以运转的跑车轮、积木和平台隧道,每天更换1次。普通笼(60cm $\times$ 40cm $\times$ 25cm)中只铺有锯屑末。

1.4 指标测定方法

1.4.1 孕期应激模型的确认及子鼠体重测定 在应激前1天和应激第1、7、14天对两组雌鼠进行内眦静脉取血,收集血浆,-80 $^{\circ}$ C冰箱冷冻待测。采用¹²⁵I皮质醇放射免疫试剂盒测定血浆皮质醇质量浓度(后称“浓度”),皮质酮浓度换算公式为:皮质酮浓度=50 $\times$ 皮质醇浓度^[8]。PND21、PND50时称量子鼠体重,观察丰富环境对慢性应激大鼠子代体重的影响。

1.4.2 子鼠行为学指标测定 采用敞箱实验^[9]评价子鼠的活动度,根据文献[10]自制敞箱,呈立方体(40cm $\times$ 80cm $\times$ 80cm),四周为黑色壁,底面由25个面积相等的方块组成。水平运动得分以动物经过的底面块数累积所得,三爪以上同时跨入1格记1分;垂直运动得分以直立次数(两前爪腾空或攀附墙壁)为准,双足离开底面记1分。每次实验3min,连续4d。

1.4.3 子鼠海马NE、DA水平测定 腹腔注射水合氯醛麻醉子鼠,在冰面上剥离大脑、分离海马。将子鼠右侧海马存于冻存管内,迅速放入液氮中速冻,再移至-80 $^{\circ}$ C冰箱冷冻保存待测。取出待测组织,解冻后

称重。加入 10 倍体积的酸性 (pH=6) 正丁醇制作组织匀浆, 离心, 取上清液, 采用 ELISA 法检测。

1.4.4 海马组织 IGF- II 和 NF- κ B mRNA 相对表达水平测定 通过实时定量 PCR 法, 严格按照说明书进行子鼠海马组织总 RNA 提取, 采用紫外分光光度法测定 RNA 纯度。 D_{260}/D_{280} 值位于 1.8~2.0 之间时; 再经凝胶电泳清晰显示出两条带, 且 18s 条带量约为 28s 条带量的一半, 表明 RNA 样品保持完好。确定 RNA 符合纯度标准后, 进行逆转录合成 cDNA。引物设计序列具体见表 1。PCR 反应条件为: ①预变性 2 min、50℃, ②变性 2 min、95℃, ③退火 15 s、95℃, ④延伸 1 min、60℃; 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达水平。

表 1 基因序列

基因名称	正向引物	反向引物	扩增产物长度 / bp
IGF-II	5'-TACCTCTCAGGCCGTACTTC-3'	5'-TCCAGGTGTCGAATTGAAGA-3'	74
NF- κ B	5'-CATACGCTGACCCCTAGCCTG-3'	5'-TTTCTTCAATCCGGTGCGA-3'	135
β -actin	5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'	5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	150

1.4.5 海马组织 IGF-II、NF- κ B 蛋白表达水平测定 通过 Western blotting 法测定蛋白表达水平, 即向待测海马组织加入 RIPA 裂解液 (每 50 g 组织对应 500 μ L), 充分裂解后离心, 采用二喹啉甲酸法测定蛋白含量。电泳样品缓冲液与样品按 5:1 体积比例进行混合, 取总蛋白 50 μ g 进行电泳, 采用半干法将凝胶转移至硝酸纤维素膜上, 封闭 1 h 后分别加入一抗、二抗, 待显色后以目的蛋白与 β -actin 蛋白的光密度 (D) 比值来表示目的蛋白的相对表达量。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件分析数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验; 重复测量数据采用重复测量资料的方差分析; 多组间的比较采用方差分析, 进一步的两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$, 双侧检验。

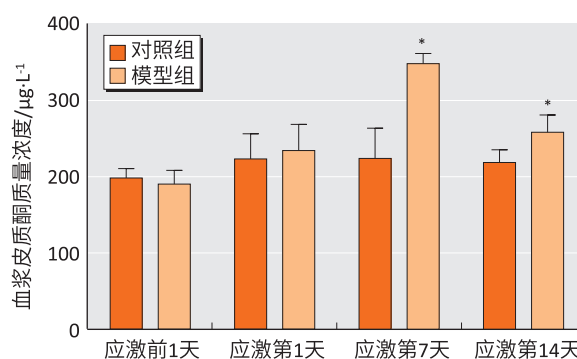
2 结果

2.1 孕期慢性应激模型的确认及雌鼠孕产情况

重复测量资料的方差分析结果显示: 血浆皮质酮的浓度在模型组与对照组雌鼠之间存在统计学差异 ($F=14.996$, $P=0.001$)。模型组雌鼠在应激第 7、14 天血浆皮质酮浓度分别为 [(348.50 $\pm$ 13.24) 和 (258.38 $\pm$ 22.77) μ g·L⁻¹], 高于对照组雌鼠 [(224.00 $\pm$ 39.84) 和 (218.78 $\pm$ 16.68) μ g·L⁻¹] ($t=9.378$, $P<0.05$; $t=$

4.437, $P<0.05$), 提示模型组大鼠在孕期处于应激状态。见图 1。

模型组雌鼠孕天数 [(18.40 $\pm$ 1.70) d] 与对照组 [(19.80 $\pm$ 1.10) d] 的差异有统计学意义 ($t=2.186$, $P=0.042$), 所产子鼠雌雄比例分别为 (1.47 $\pm$ 0.74) 和 (1.02 $\pm$ 0.44), 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 模型组每窝所产子鼠数量 [(9.17 $\pm$ 1.89) 只] 低于对照组 [(13.00 $\pm$ 1.77) 只] ($t=3.145$, $P=0.012$)。

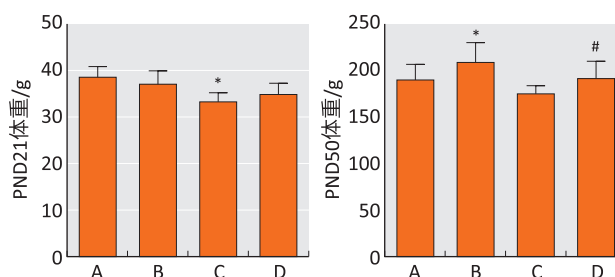


[注]: * 与同期对照组比较, $P<0.05$ 。

图 1 不同时间母鼠血浆皮质酮质量浓度的变化

2.2 丰富环境对子鼠体重和行为学指标的影响

PND21 时模型子鼠组体重低于对照子鼠组 ($t=6.988$, $P<0.001$); 丰富环境干预后 PND50 时各组子鼠体重存在差异 ($F=6.488$, $P=0.001$), LSD- t 法两两比较显示, 模型+丰富环境组和对照+丰富环境组子鼠体重 [(191.70 $\pm$ 18.31) 和 (208.80 $\pm$ 21.40) g] 分别高于模型子鼠组和对照子鼠组 [(175.70 $\pm$ 8.12) 和 (190.40 $\pm$ 16.47) g] ($t=3.195$, $P<0.05$; $t=2.726$, $P<0.05$)。见图 2。

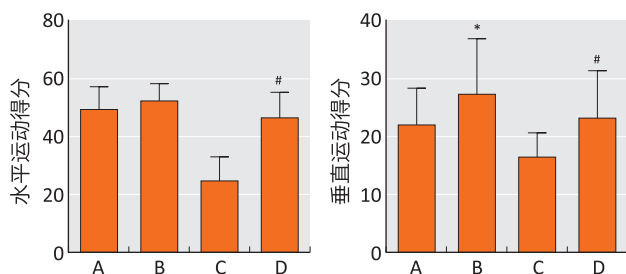


[注]: A: 对照子鼠组; B: 对照+丰富环境组; C: 模型子鼠组; D: 模型+丰富环境组。*: 与对照子鼠组比较, $P<0.05$; #: 与模型子鼠组比较, $P<0.05$ 。

图 2 不同组别子鼠体重的比较

经方差分析发现, 各组子鼠的水平运动得分、垂直运动得分的差异均有统计学意义 ($F=24.460$, $P<0.001$; $F=3.596$, $P=0.023$)。LSD- t 法两两比较发现: 模型+丰富环境组子鼠水平及垂直运动得分分别为 (46.10 $\pm$ 9.26)

和 (23.50 ± 7.99) ，高于模型子鼠组 $[(24.40 \pm 8.30)$ 和 $(16.30 \pm 4.42)]$ ($t=6.980, P<0.05$ ； $t=3.154, P<0.05$)；对照+丰富环境组子鼠垂直运动得分 (27.20 ± 9.94) ，较对照子鼠组 (21.70 ± 6.83) 为高 ($t=2.259, P<0.05$)。见图3。

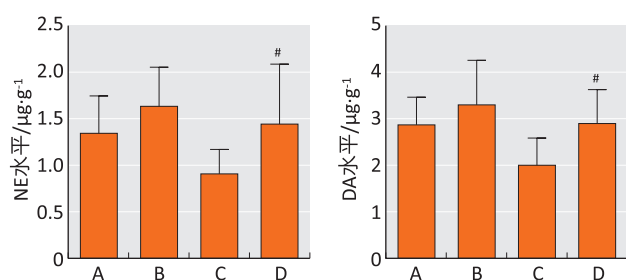


[注] A：对照子鼠组；B：对照+丰富环境组；C：模型子鼠组；D：模型+丰富环境组。*：与对照子鼠组比较， $P<0.05$ ；#：与模型子鼠组比较， $P<0.05$ 。

图3 不同组别子鼠行为学指标的比较

2.3 丰富环境对子鼠海马组织 NE、DA 表达的影响

丰富环境干预后，各组子鼠海马组织中 NE 和 DA 的水平差异有统计学意义 ($F=4.405, P=0.010$ ； $F=4.924, P=0.006$)。LSD- t 法进一步分析发现：模型+丰富环境组子鼠 NE 和 DA 的水平 $[(1.42 \pm 0.65)$ 和 $(2.85 \pm 0.75) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}]$ 高于模型子鼠组 $[(0.89 \pm 0.26)$ 和 $(1.94 \pm 0.64) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}]$ ($t=3.028, P<0.05$ ； $t=3.692, P<0.05$)。见图4。



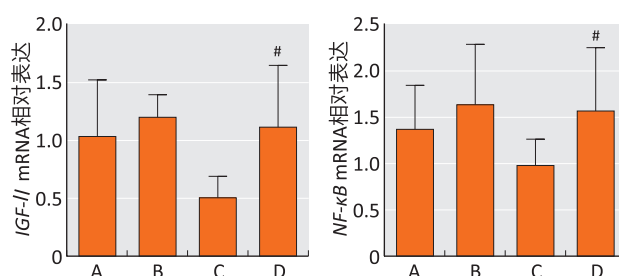
[注] A：对照子鼠组；B：对照+丰富环境组；C：模型子鼠组；D：模型+丰富环境组。#：与模型子鼠组比较， $P<0.05$ 。

图4 不同组别子鼠海马组织去甲肾上腺素 (NE) 和多巴胺 (DA) 的水平

2.4 丰富环境对子鼠海马组织 IGF-II 和 NF- κ B mRNA 表达的影响

丰富环境干预后，各组海马组织 IGF-II 和 NF- κ B mRNA 相对表达水平的差异有统计学意义 ($F=4.278, P=0.012$ ； $F=2.944, P=0.046$)。LSD- t 法分析发现：与模型子鼠组 $[(0.50 \pm 0.19)$ 和 $(0.96 \pm 0.30)]$ 相比，模型+丰富环境组子鼠海马组织 IGF-II 和 NF- κ B mRNA

的相对表达水平升高 $[(1.11 \pm 0.53)$ 和 $(1.55 \pm 0.69)]$ ($t=4.334, P<0.05$ ； $t=3.137, P<0.05$)。见图5。

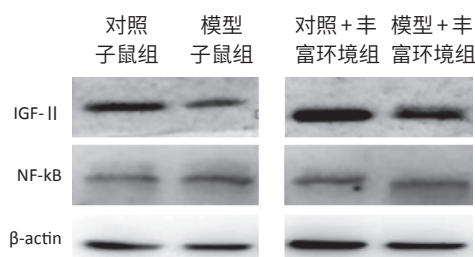


[注] A：对照子鼠组；B：对照+丰富环境组；C：模型子鼠组；D：模型+丰富环境组。#：与模型子鼠组比较， $P<0.05$ 。

图5 各子鼠组海马组织胰岛素样生长因子-II (IGF-II) 和核因子- κ B (NF- κ B) mRNA 的表达

2.5 丰富环境对子鼠海马组织 IGF-II 和 NF- κ B 蛋白表达的影响

丰富环境干预后，各组海马组织 IGF-II 和 NF- κ B 蛋白的表达差异有统计学意义 ($F=16.516, P<0.001$ ； $F=10.575, P<0.001$)。LSD- t 法分析发现：模型+丰富环境组子鼠海马组织 IGF-II 和 NF- κ B 蛋白相对表达水平 $[(0.83 \pm 0.10)$ 和 $(0.67 \pm 0.27)]$ 高于模型子鼠组 $[(0.40 \pm 0.07)$ 和 $(0.30 \pm 0.16)]$ ($t=14.091, P<0.05$ ； $t=4.716, P<0.05$)，对照+丰富环境组子鼠海马组织 IGF-II 和 NF- κ B 蛋白相对表达水平 $[(1.41 \pm 0.11)$ 和 $(0.75 \pm 0.30)]$ 高于对照子鼠组 $[(0.76 \pm 0.07)$ 和 $(0.59 \pm 0.07)]$ ($t=19.94, P<0.05$ ； $t=2.078, P<0.05$)。见图6。



[注] A：对照子鼠组；B：对照+丰富环境组；C：模型子鼠组；D：模型+丰富环境组。#：与模型子鼠组比较， $P<0.05$ ；*：与对照子鼠组比较， $P<0.05$ 。

图6 子鼠海马组织胰岛素样生长因子-II (IGF-II) 和核因子- κ B (NF- κ B) 蛋白的 Western blotting 电泳结果 (上) 和相对表达水平 (下)

3 讨论

孕期应激刺激不仅会使母体产生焦虑、紧张情绪,还会造成宫内环境改变,进而对子代生长发育产生影响。本研究选择 Wistar 大鼠,采用 CUMS 建立动物模型,模型周期为 21 d,而 Wistar 大鼠的妊娠期一般为 19~21 d,受到应激刺激可能会缩短妊娠期,故选择在应激第 3 天开始合笼。研究结果同样显示,模型组孕天数低于对照组孕天数。母鼠在孕期受到应激因素刺激,结果显示模型组血浆皮质酮含量在应激第 7、14 天明显高于对照组,表明母鼠处于应激状态,与江虹等^[11]的研究结果一致,其作用机制可能与下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic pituitary adrenal, HPA)轴的失衡有关,但随着应激时间的延长,HPA 轴会趋向于适应这种应激,反馈性调节血浆皮质酮的表达,使其在应激后期表达下降。

机体在早期接受针对性的丰富环境干预,可以有效促进机体对周边环境的探索能力^[12],反之在早期单调的隔离环境中则可能引起成年后的抑郁样行为,进而缺乏对周边环境探索的主动性^[13]。丰富环境相对于标准环境而言,可使动物的视觉、认知和运动接收到各种不断变化的刺激^[14]。本研究将丰富环境作为干预手段,在子鼠出生后 21 天开始经丰富环境连续干预 30 d 后发现:模型+丰富环境组子鼠的体重与模型子鼠组相比增加明显,与此同时,对照+丰富环境组子鼠的体重变化高于对照子鼠组,可能与环境改变促使其快感增加,继而增强食欲有关。丰富环境干预对子鼠的运动能力有一定的改善作用,研究结果显示模型+丰富环境组子鼠的水平运动得分和垂直运动得分明显高于模型子鼠组,对照+丰富环境组子鼠的垂直运动得分明显高于对照子鼠组。Song 等^[15]的研究同样得出丰富环境可以改善运动能力的结论,其机制可能是通过神经重塑作用使相关组织形态发生变化,以增强突触可塑性,继而影响行为学的改变。

中枢神经系统作为一个结构复杂的系统,既受基因等内在因素的调控,又可受学习训练、经验积累、环境刺激等外界因素的影响。单胺类神经递质作为中枢神经系统的一类重要神经递质,对机体注意力、记忆力和反应能力有着重要的调节作用,神经突触传递及突触的成熟均与其有着密切的关系^[16]。丰富环境干预对孕期慢性应激刺激子鼠海马组织中神经递质 NE 和 DA 的表达有促进作用,本研究结果显示,模型+丰富环境组子鼠海马单胺类神经递质 NE、DA 的表达

相比于模型子鼠组明显增加。同样有研究^[17]发现,丰富环境干预可增加帕金森病大鼠黑质-纹状体系统多巴胺能神经元数目。

NF- κ B 参与突触信号的传递,在记忆和学习过程中作为一种多向性转录调节蛋白发挥作用^[18]。本研究发现,丰富环境干预对孕期慢性应激子鼠海马组织中 NF- κ B mRNA 表达均有明显的改善作用,模型+丰富环境组子鼠 NF- κ B mRNA 表达较模型子鼠组增加;模型+丰富环境组子鼠海马组织中 NF- κ B 蛋白表达较模型子鼠组增高,对照+丰富环境组子鼠海马组织中 NF- κ B 蛋白表达较对照子鼠组增高。同时有研究发现 NF- κ B 的核异位可能通过参与突触信号的传递,进而在突触可塑性的调控和长时记忆的形成中发挥抑制作用^[19]。

有研究提示 IGF-II 作为神经营养因子家族中的重要成员,在机体的生长发育中发挥着重要的作用,在海马区有较高的表达^[20]。本研究发现,丰富环境干预对孕期慢性应激子鼠海马组织 IGF-II mRNA 表达有改善作用,模型+丰富环境组子鼠 IGF-II mRNA 表达较模型子鼠组增加;模型+丰富环境组子鼠海马组织中 IGF-II 的蛋白表达也较模型子鼠组增高,对照+丰富环境组子鼠海马组织中 IGF-II 的蛋白表达较对照子鼠组明显增高,该结果提示,丰富环境干预对孕期受到慢性应激刺激子鼠海马组织中相关蛋白的表达有改善作用,进而缓解因慢性应激而导致的子代行为学改变。

综上所述,丰富环境作为一种干预手段,对孕期慢性应激子鼠的体重及运动能力有一定的改善作用,可能与其增加子鼠海马组织单胺类神经 NE 和 DA 以及突触相关蛋白 NF- κ B 和 IGF-II 的表达有关。

参考文献

- [1] LAPLANTE D P, BRUNET A, SCHMITZ N, et al. Project ice storm: prenatal maternal stress affects cognitive and linguistic functioning in 5½-year-old children [J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2008, 47 (9): 1063-1072.
- [2] 陈小平. 抑郁症患者中医不同辨证分型脑内 5-HT、NE、DA 神经递质变化规律的研究 [D]. 北京:北京中医药大学, 2014.
- [3] KIVIPELTO M, MANGIALASCHE F, NGANDU T. Lifestyle interventions to prevent cognitive impairment, dementia and Alzheimer disease [J]. Nat Rev Neurol, 2018, 14 (11):

- 653-666.
- [4] SHILPA BM, BHAGYA V, HARISH G, et al. Environmental enrichment ameliorates chronic immobilisation stress-induced spatial learning deficits and restores the expression of BDNF, VEGF, GFAP and glucocorticoid receptors [J]. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2017, 76 : 88-100.
- [5] HUANG HJ, CHEN XR, HAN QQ, et al. The protective effects of Ghrelin/GHSR on hippocampal neurogenesis in CUMS mice [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 155 : 31-43.
- [6] 李少源. 耳甲区电刺激对CUMS模型大鼠抗抑郁效应及ERK信号通路作用机制[D]. 北京: 中国中医科学院, 2018.
- [7] NITHIANANTHARAJAH J, HANNAN AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7 (9) : 697-709.
- [8] 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.
- [9] 杨柳叶, 张斌, 康辉, 等. 多环芳烃对大鼠学习记忆的影响及其机制研究 [J]. *中国预防医学杂志*, 2019, 20 (10) : 893-896.
- [10] 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.
- [11] 江虹, 秦夏青, 潘芳. 青少年时期创伤应激对大鼠成年后情绪和学习记忆能力的影响 [C]. 中国心理学会. 第二十一届全国心理学学术会议摘要集. 北京: 中国心理学会, 2018 : 59-60.
- [12] 苑振云, 姜相明, 顾平, 等. 不同饲养环境对快速老化小鼠学习记忆能力和海马突触蛋白 I 的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33 (17) : 4196-4198.
- [13] 李春禄, 张佳婧, 王冬梅, 等. 丰富环境对野生小家鼠和昆明小鼠空间学习记忆能力的影响 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2011, 20 (7) : 624-626.
- [14] CYMERBLIT-SABBA A, LASRI T, GRUPER M, et al. Prenatal Enriched Environment improves emotional and attentional reactivity to adulthood stress [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 241 : 185-190.
- [15] SONG Y, GAN Y, WANG Q, et al. Enriching the housing environment for mice enhances their NK cell antitumor immunity via sympathetic nerve-dependent regulation of NKG2D and CCR5 [J]. *Cancer Res*, 2017, 77 (7) : 1611-1622.
- [16] BAEK JY, TRINH TA, HUH W, et al. Electro-acupuncture alleviates cisplatin-induced anorexia in rats by modulating ghrelin and monoamine neurotransmitters [J]. *Biomolecules*, 2019, 9 (10) : 624.
- [17] 庄顺芝. 丰富环境干预对帕金森大鼠中脑 miR-133b 表达影响的研究 [D]. 广州: 广州医科大学, 2017.
- [18] WAN G, XIE M, ZHANG X, et al. Chang-wei-qing, a Chinese herbal formula, ameliorates colitis-associated tumour development via inhibiting NF- κ B and STAT3 signalling pathway [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57 (1) : 231-237.
- [19] BOERSMA MC, DRESSELHAUS EC, DE BIASE LM, et al. A requirement for nuclear factor- κ B in developmental and plasticity-associated synaptogenesis [J]. *J Neurosci*, 2011, 31 (14) : 5414-5425.
- [20] 关素珍, 夏迪亚·夏尔甫丁, 徐仙, 等. 孕前慢性应激后小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.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 陈姣; 校对: 韩凤婵)