

网络出版时间: 2021-2-5 14:17 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210205.1120.034.html>

◇基础医学研究◇

# 海马 CRHR1 受体介导妊娠期慢性应激致子代雄性小鼠抑郁

张阔<sup>1</sup> 陈鹏<sup>2</sup> 钱志侃<sup>1</sup> 陶龙<sup>1</sup> 姚余有<sup>1,3</sup>

**摘要** 目的 探讨妊娠期慢性应激诱导子代雄性小鼠抑郁的作用机制。方法 将8周龄含有纯和 *flox* 基因的雌性 C57 小鼠 [*flox/flox*, 促肾上腺皮质激素释放激素受体 1 (CRHR1) 基因正常表达] 与含有杂合 *flox* 基因且含有 *cre* 基因的雄性 C57 小鼠 (*flox/+*, with *cre*; CRHR1 基因条件性敲除) 合笼, 待母鼠怀孕后将其随机分为正常处理组和慢性应激组, 子鼠出生后选取雄性子鼠, 分为妊娠期正常对照 + 子代基因正常组 (CON 组)、妊娠期正常对照 + 子代 CRHR1 基因敲除杂合子组 (CON + CKOH 组)、妊娠期正常对照 + 子代 CRHR1 基因敲除纯合子组 (CON + CKOA 组)、妊娠期慢性应激 + 子代基因正常组 (CUMS 组)、妊娠期慢性应激 + 子代 CRHR1 基因敲除杂合子组 (CUMS + CKOH 组)、妊娠期慢性应激 + 子代 CRHR1 基因敲除纯合子组 (CUMS + CKOA 组)。通过强迫游泳实验、悬尾实验和糖水偏好实验检测子代的抑郁程度; 运用 TUNEL 染色观察海马 CA3 区锥体神经元病理改变; Western blot 技术测定海马组织 mTOR 和 p-mTOR (Ser2448) 蛋白含量。结果 妊娠期慢性应激导致雄性子代呈现抑郁样行为, 海马 CA3 区神经元凋亡指数增加, 海马 mTOR 和 p-mTOR 蛋白的表达水平降低。而小鼠经海马 CRHR1 基因条件性敲除后, 可改善妊娠期慢性应激造成的子代抑郁样行为和海马 CA3 区神经元细胞凋亡, 上调子代 mTOR 和 p-mTOR 蛋白的表达水平。结论 妊娠期慢性应激可致子代出现抑郁样行为, 其作用机制可能是妊娠期慢性应激通过 CRH 作用于海马 CRHR1 受体, 从而抑制 mTOR 通路的激活, 导致海马 CA3 区神经细胞损伤, 进而使子代抑郁。

**关键词** 抑郁; 妊娠期慢性应激; 海马; 促肾上腺皮质激素释放激素受体 1; 条件性基因敲除; *cre/loxP* 技术

中图分类号 R 749.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)03-0337-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.001

抑郁症是一种常见的、令人虚弱的潜在致命精神疾病<sup>[1]</sup>。抑郁症患者核心症状为情绪低落、思维迟缓、意志活动减退, 还可能出现睡眠障碍、反复自杀念头等。抑郁症的发病原因尚未完全阐明, 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。课题组的前期研究<sup>[3]</sup>显示妊娠期慢性应激致子代雄鼠抑郁, 侧脑室注射促肾上腺皮质激素释放激素受体 1 (corticotropin-releasing hormone receptor1, CRHR1) 拮抗剂可改善妊娠期慢性应激致子代雄鼠抑郁程度<sup>[4]</sup>。由于 CRHR1 广泛分布于大脑皮层、海马、杏仁核和下丘脑等多个脑区域<sup>[5]</sup>, 为了确定海马 CRHR1 是否介导妊娠期慢性应激致子代抑郁, 该研究通过与江苏赛业公司共同建立了海马 CRHR1 基因条件性敲除鼠模型, 利用海马 CRHR1 基因条件性敲除鼠进一步研究海马 CRHR1 是否介导妊娠期慢性应激致子鼠抑郁及其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 从江苏赛业生物公司引进 2 只雌性 mCrhr1 CK877-*tsd*-2D12 *flox/+* 小鼠和 2 只雄性 mCrhr1 CK877-*tsd*-2D12 *flox/+* 小鼠以及一对特异性在小鼠海马 CRHR1 基因中表达 CRE 重组酶的 *Pomc-cre* 小鼠。小鼠品系为 C57BL/6。实验动物引入安徽医科大学基础 P2 级动物实验室, 在室温 (24 ± 1) °C 和 50% 的相对湿度下饲养, 隔离观察 1 周末发现异常后转入饲养区, 严格按照 SPF 级动物管理规定进行饲养和动物实验。

## 1.2 试剂与仪器

**1.2.1 主要仪器** 垂直电泳仪、转移槽、凝胶成像系统 (北京 Tanon 公司); ELX 全自动酶标仪 (美国 BD 公司); Centrifuge5424R 冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 强迫游泳图像采集及分析系统 (上海欣软公司); 正置荧光显微镜 (德国徕卡仪器有限公司); 扩增仪 (美国 ThermoFisher 公司); DNA 电泳槽 (上海天能科技有限公司)。

**1.2.2 主要试剂** mTOR 单克隆抗体、p-mTOR

2020-11-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81773452)

作者单位: 安徽医科大学公共卫生学院<sup>1</sup> 卫生检验与检疫学系、<sup>2</sup> 营养与食品卫生学系、<sup>3</sup> 人口健康与优生安徽省重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 张阔, 男, 本科;

姚余有, 男, 副教授, 硕士生导师, 通讯作者, E-mail: yaoan-q71@aliyun.com

(Ser2448) 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司); 山羊抗兔 IgG 抗体(中杉金桥公司); 总蛋白 BCA 测定试剂盒(上海碧云天生物有限公司);  $\beta$ -actin 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司); TUNEL 试剂盒(上海罗氏制药有限公司); DNA 引物(英潍捷基上海贸易有限公司); 小鼠 CRHELISA 酶联免疫试剂盒(上海江莱生物有限公司)。

**1.3 海马 CRHR1 基因特异性敲除小鼠的繁育方案及分组** 小鼠的繁育方案如下:  $\delta / \eta$  flox 杂合子小鼠(flox/+ )与  $\eta / \delta$  flox 杂合子小鼠(flox/+ )交配后获得 flox 纯合子小鼠(flox/flox); 同时  $\delta / \eta$  (flox/+ )小鼠与  $\eta / \delta$  Pomc-cre 小鼠交配后获得 CRHR1 基因条件性敲除杂合子小鼠(flox/+ ,with cre); 最后  $\eta$  (flox/flox) 小鼠与  $\delta$  (flox/+ ,with cre) 小鼠交配可产生(flox/flox ,with cre) 小鼠(CRHR1 基因敲除纯合子,CKOA 组)、(flox/+ ,with cre) 小鼠(CRHR1 基因敲除杂合子,CKOH 组)以及(flox/flox ,no cre) 小鼠(CRHR1 基因表达正常)和(flox/+ ,no cre) 小鼠(CRHR1 基因表达正常)。小鼠鉴定方法为酚氯仿法提取 DNA 测定子代小鼠基因型。

实验时选取 30 只 8 周龄(flox/flox) 小鼠雌鼠(CRHR1 基因正常表达)与 15 只 8 周龄(flox/+ ,with cre) 小鼠雄鼠(CRHR1 基因条件性敲除)在 20:00 以雌雄 2:1 合笼,第 2 天 07:00 查阴栓,检查到阴栓的将其分出单笼喂养,记为怀孕的第 1 天。常规饲养 1 周后选择 15 只孕鼠进行慢性不可预测性温和应激(the chronic unpredictable mild stress, CUMS)。应激方式包括:①夜间照明 12 h;②禁水 24 h;③温水游泳 5 min;④束缚应激 2 h;⑤禁食 24 h;⑥夹紧尾巴 5 min;⑦冷水游泳 5 min;⑧笼倾斜 45°角 24 h。自孕第 7 天开始,每天使用抽签法随机选择 1 种应激方式(如与前 1 天相同,重新抽签)直至孕鼠分娩,这种应激方式可以引起孕鼠 HPA 轴激活<sup>[6-7]</sup>,避免孕鼠产生应激耐受性。子鼠出生后依据其基因型选取雄性子鼠(酚氯仿法提取 DNA 测定子代小鼠基因型),分为妊娠期正常对照 + 子代基因正常组(CON 组)、妊娠期正常对照 + 子代 CRHR1 基因敲除杂合子组(CON + CKOH)、妊娠期正常对照 + 子代 CRHR1 基因敲除纯合子组(CON + CKOA)、妊娠期慢性应激 + 子代基因正常组(CUMS 组)、妊娠期慢性应激 + 子代 CRHR1 基因敲除杂合子组(CUMS + CKOH)、妊娠期慢性应激 + 子代 CRHR1 基因敲除纯合子组(CUMS + CKOA),每组  $n = 10$ 。

## 1.4 行为学实验

### 1.4.1 强迫游泳测试(forced swimming test, FST)

实验第 1 天,将每组中的 10 只小鼠进行预实验,将小鼠置于直径 20 cm 玻璃桶中游泳 15 min(水深 30 cm,水温 24 °C 左右)。第 2 天,将小鼠置于桶中游泳 6 min,拍摄小鼠在桶中的运动情况,统计后 4 min 不动时间总和。

**1.4.2 悬尾实验(tail suspension test, TST)** 实验时从每组中随机选出 10 只小鼠,用夹子(夹子中塞棉花)夹住小鼠尾部距尾尖 2 cm 处,随后将其悬挂在实验箱内,录像机记录其 6 min 中内的动态变化,统计 6 分钟后后 4 min 的不动时间总和。

### 1.4.3 糖水偏好实验(sucrose preference test, SPT)

实验第 1 天,从每组中随机选出 10 只小鼠进行预实验,在每个笼子两侧放 2 瓶 1% 蔗糖水(50 ml 的透明玻璃瓶)。第 2 天,禁食、禁水 1 d。第 3 天,每个笼子一侧放 1 瓶 1% 蔗糖水,另外一侧放 1 瓶纯净水。称重并记录 1% 蔗糖水和纯净水消耗量。实验结束后,分析得到数据并且计算糖水偏好值 = (糖水前后重量差值/总液体前后重量差值) × 100%。

**1.5 Western blot 法测海马组织 mTOR 和 p-mTOR(Ser2448) 蛋白含量** 行为学实验结束后,每组取 4 只鼠,冰上取脑,分离出海马组织,根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒的操作说明测定海马总蛋白浓度。根据测出的蛋白总量确定上样量,8% SDS-PAGE 用于分离样品,然后经过上样,电泳(120 V,180 min)转膜(250 mA,4 h),封闭(5% 脱脂奶粉),一抗(兔单抗,1:1 000)4 °C 过夜,TBST 洗膜,二抗(羊抗兔,1:2 000)孵育,TBST 洗过后加入显影液进行 ECL 显色,测其吸光度值分析结果。以  $\beta$ -actin 为内参。

**1.6 TUNEL 法测海马 CA3 区椎体神经元的凋亡指数** 将海马组织用石蜡包埋,切片后得到石蜡切片,然后经脱蜡水化,3% 过氧化氢甲醇浸洗 10 min,滴加蛋白酶 K(20  $\mu$ g/ml)工作液,37 °C 15 min,PBS 清洗后滴加新鲜配置的 TUNEL 反应混合物,37 °C 避光孵育 60 min,PBS 清洗后滴加 DAPI 细胞染色液复染,避光孵育 10 min,在荧光显微镜下( $\times 200$ )观察。统计 TUNEL 染色阳性的细胞与细胞总数,计算两者比值即为 AI。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 23.0 统计软件分析实验所得数据,所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,用单因素方差分析(ANOVA)比较多组间均数差异,用最小显著

差异法(least significant difference, LSD)作两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。见图1、2。

## 2 结果

**2.1 CRHR1 条件性敲除对妊娠期慢性应激的子代雄鼠行为学影响** 强迫游泳和悬尾实验结果显示, CON组、CON + CKOH组和CON + CKOA组的小鼠强迫游泳和悬尾不动时间差异无统计学意义;与CON组相比, CUMS组、CON + CKOH组和CON + CKOA组小鼠强迫游泳和悬尾不动时间均较长( $P < 0.05$ );与CUMS组相比, CUMS + CKOA组小鼠强迫游泳和悬尾不动时间减少( $P < 0.05$ );与CUMS + CKOH组相比, CUMS + CKOA组不动时间也减少( $P < 0.05$ )。但CUMS组和CUMS + CKOH组间小鼠强迫游泳和悬尾不动时间差异无统计学意义。见图1、2。

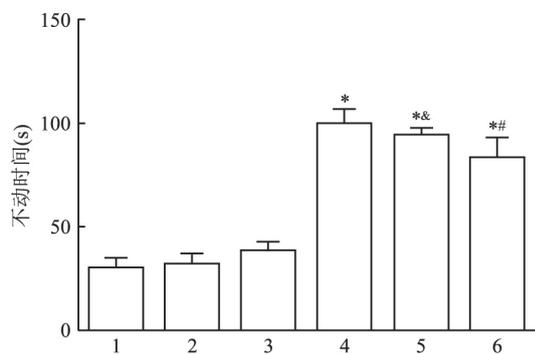


图1 妊娠期慢性应激对不同组别小鼠强迫游泳不动时间的影响

1: CON组; 2: CON + CKOH组; 3: CON + CKOA组; 4: CUMS组; 5: CUMS + CKOH组; 6: CUMS + CKOA组; 与CON组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与CUMS组比较: #  $P < 0.05$ ; 与CUMS + CKOA组比较: &  $P < 0.05$

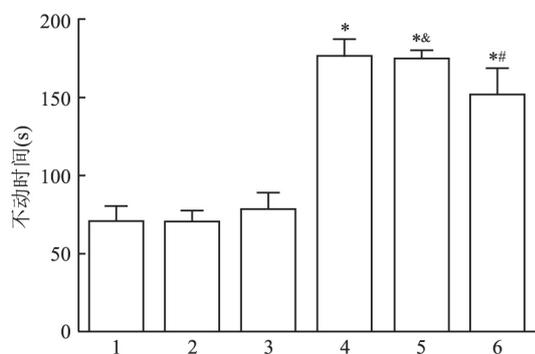


图2 妊娠期慢性应激对不同组别小鼠悬尾实验不动时间的影响

1: CON组; 2: CON + CKOH组; 3: CON + CKOA组; 4: CUMS组; 5: CUMS + CKOH组; 6: CUMS + CKOA组; 与CON组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与CUMS组比较: #  $P < 0.05$ ; 与CUMS + CKOA组比较: &  $P < 0.05$

糖水偏好实验结果如图3所示。CON组、CON + CKOH组和CON + CKOA组小鼠糖水偏好率差异

无统计学意义;与CON组相比, CUMS组小鼠糖水偏好率降低( $P < 0.05$ );与CUMS组相比, CUMS + CKOH组和CUMS + CKOA组糖水偏好率上升( $P < 0.05$ )。此外, CUMS + CKOH组与CUMS + CKOA组间小鼠糖水偏好率差异也有统计学意义( $P < 0.05$ )。

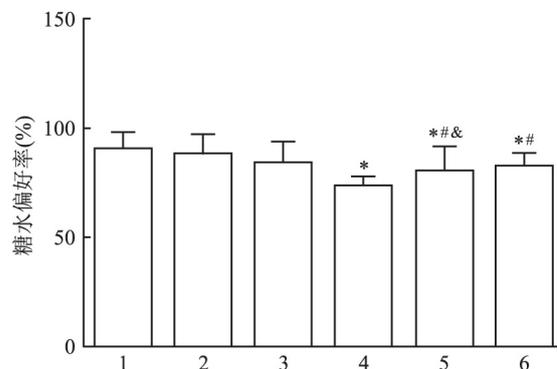


图3 妊娠期慢性应激对不同组别子鼠糖水偏好率的影响

1: CON组; 2: CON + CKOH组; 3: CON + CKOA组; 4: CUMS组; 5: CUMS + CKOH组; 6: CUMS + CKOA组; 与CON组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与CUMS组比较: #  $P < 0.05$ ; 与CUMS + CKOA组比较: &  $P < 0.05$

**2.2 CRHR1 条件性敲除对妊娠期慢性应激的子代雄鼠海马锥体神经元凋亡的影响** 在正置荧光显微镜( $\times 200$ )下观察每张切片,选取小鼠海马CA3区4个视野进行计数,DAPI染色的细胞核呈蓝色, TUNEL染色的细胞核呈绿色,统计TUNEL染色阳性的细胞与细胞总数,计算AI。TUNEL染色实验结果如图4所示。与CON组相比, CUMS组小鼠TUNEL染色阳性细胞数目增多,凋亡指数升高( $P < 0.05$ );与CUMS组相比, CUMS + CKOA组小鼠TUNEL染色阳性细胞数目减少,凋亡指数降低( $P < 0.05$ )。但CUMS组和CUMS + CKOH组间凋亡指数差异无统计学意义。

**2.3 CRHR1 条件性敲除对妊娠期慢性应激的子代海马 mTOR、p-mTOR(Ser2448) 蛋白表达影响**

采用Western blot方法检测海马脑组织中mTOR和p-mTOR蛋白含量,结果如图5和图6所示。CON组、CON + CKOH组和CON + CKOA组小鼠海马mTOR和p-mTOR表达量差异无统计学意义;与CON组相比, CUMS组、CUMS + CKOH组和CUMS + CKOA组小鼠海马mTOR和p-mTOR表达量均较低( $P < 0.05$ );与CUMS组相比, CUMS + CKOA组小鼠海马mTOR和p-mTOR表达量升高( $P < 0.05$ )。但CUMS + CKOH组与CUMS组相比小鼠海马mTOR和p-mTOR表达量差异无统计学意义。

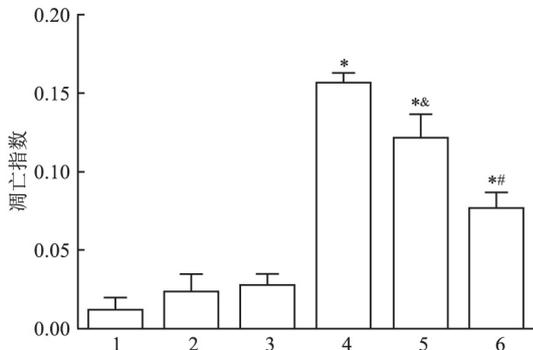
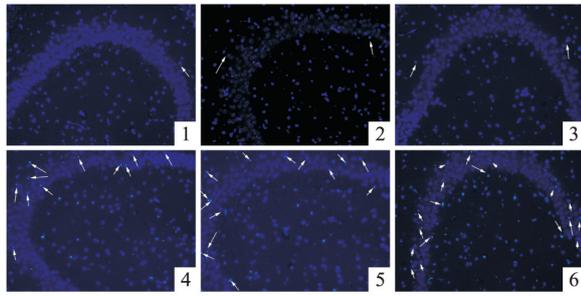


图4 不同组海马CA3区锥体神经元凋亡的 TUNEL 和 DAPI 染色检测结果 ×200

1: CON 组; 2: CON + CKOH 组; 3: CON + CKOA 组; 4: CUMS 组; 5: CUMS + CKOH 组; 6: CUMS + CKOA 组; 与 CON 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 CUMS 组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 CUMS + CKOA 组比较: &  $P < 0.05$ ; ↑: 指向凋亡细胞

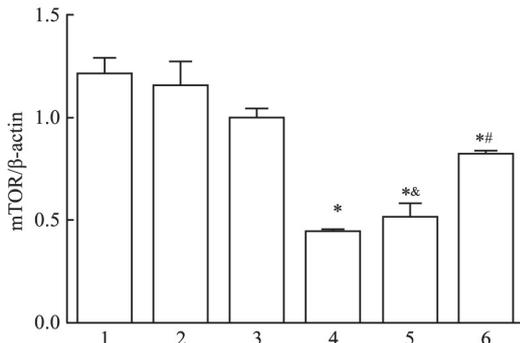
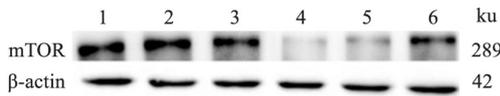


图5 不同组子鼠海马 mTOR 蛋白水平

1: CON 组; 2: CON + CKOH 组; 3: CON + CKOA 组; 4: CUMS 组; 5: CUMS + CKOH 组; 6: CUMS + CKOA 组; 与 CON 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 CUMS 组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 CUMS + CKOA 组比较: &  $P < 0.05$

### 3 讨论

海马是抑郁症研究中最常研究的大脑区域之一<sup>[8]</sup>。研究<sup>[9]</sup>表明,抑郁症发病机理可能与海马体积缩小,海马神经元的减少、可塑性降低等有关。以往的研究<sup>[10]</sup>显示,CRH 可经 CRHR1 致海马神经元树突棘损伤,本课题组的前期研究显<sup>[11]</sup>示侧脑室注

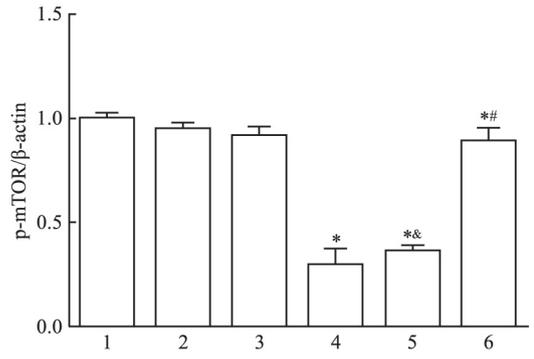
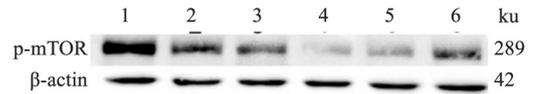


图6 不同组子鼠海马 p-mTOR 蛋白水平

1: CON 组; 2: CON + CKOH 组; 3: CON + CKOA 组; 4: CUMS 组; 5: CUMS + CKOH 组; 6: CUMS + CKOA 组; 与 CON 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 CUMS 组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 CUMS + CKOA 组比较: &  $P < 0.05$

射 CRHR1 拮抗剂可改善妊娠期慢性应激致子代雄鼠抑郁,但由于 CRHR1 广泛分布在皮层、海马和杏仁核和下丘脑等部位,故以往结果不能确定是哪个组织的 CRHR1 介导了妊娠期慢性应激致子代雄鼠抑郁,因此,本文利用海马 CRHR1 基因条件性敲除鼠,进一步研究海马 CRHR1 是否介导妊娠期慢性应激致子鼠抑郁及机制。

该研究采用慢性不可预测性温和应激进行实验,目的是避免孕鼠对单一应激产生了适应性。FST 和 TST 是基于绝望的行为学检测方法,SPT 是基于奖赏的行为学检测方法,均是反映抑郁模型抑郁程度的指标。在 FST 和 TST 实验中不动时间越长,表明小鼠抑郁程度越重;在 SPT 实验中糖水偏好率越低也表示小鼠抑郁程度越重<sup>[12]</sup>。海马 CRHR1 基因条件性敲除鼠行为学实验结果显示:在 FST 和 TST 实验中,与 CON 组相比,CUMS 组、CUMS + CKOH 组和 CUMS + CKOA 组不动时间均增长,而与 CUMS 组相比,CUMS + CKOA 组的不动时间减少;在 SPT 实验中,与 CON 组相比,CUMS 组、CUMS + CKOH 组和 CUMS + CKOA 组糖水偏好率均下降,而与 CUMS 组相比,CUMS + CKOH 组和 CUMS + CKOA 组的糖水偏好率上升。这些结果表明,海马 CRHR1 的全缺失或半缺失会降低妊娠期慢性应激所引起的子代的抑郁程度,说明海马 CRHR1 参与了妊娠期慢性应激致子代抑郁。

以往研究<sup>[13-14]</sup>显示海马 CA3 区与抑郁样行为存在密切关系,本研究 TUNEL 试验结果显示,与 CON 组相比,CUMS 组、CUMS + CKOH 组和 CUMS + CKOA 组海马 CA3 区 TUNEL 染色阳性细胞数量

均增多, 凋亡指数增高 ( $P < 0.05$ ); 与 CUMS 组相比, CUMS + CKOA 组凋亡指数下降 ( $P < 0.05$ ), 提示妊娠期慢性应激可能经海马 CRHR1 引起海马神经元凋亡, 导致子代抑郁。

mTOR 是一种普遍表达的丝氨酸 - 苏氨酸激酶, 它感知并整合了多种细胞内的环境线索, 以协调细胞生长和代谢等主要过程。研究<sup>[15]</sup>发现, 激活 mTOR 通路, 可通过上调多种相关蛋白的磷酸化水平, 提高神经元的可塑性, 产生抗抑郁效果。本次研究结果显示, 与 CON 组相比, CUMS 组海马 mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达量显著下降; 与 CUMS 组相比, CUMS + CKOA 组小鼠海马 mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达量显著增加, 这说明海马 CRHR1 的敲除可以上调妊娠期慢性应激引起的下降的 mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达水平, mTOR 通路被激活, 海马神经元凋亡程度下降。

该研究表明海马 CRHR1 基因敲除可以改善妊娠期慢性应激引起的异常的子代雄鼠的行为学、病理以及 mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达, 但未能使子代的上述指标恢复至正常子鼠水平, 这提示除海马外, 可能还有其他相关的脑部区域发挥着重要作用, 杏仁核和前额皮层的 CRHR1 受体是否也参与妊娠期慢性应激致子代雄鼠抑郁, 有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Stringaris A. Editorial: What is depression [J]. *J Child Psychol Psychiatry*, 2017, 58(12): 1287-9.
- [2] Duman RS, Aghajanian GK. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets [J]. *Science* 2012, 338(6103): 68-72.
- [3] 韩振敏, 况亮, 王正玉, 等. 妊娠期慢性应激对不同性别子代抑郁的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(7): 998-1002.
- [4] 陈鹏, 况亮, 吕逸丽, 等. CRH 调节妊娠期慢性应激致子

- 代雄性大鼠抑郁 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(3): 410-5.
- [5] Maras PM, Baram TZ. Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH [J]. *Trends Neurosci*, 2012, 35(5): 315-24.
- [6] Kiryanova V, Smith VM, Dyck RH, Antle MC. Circadian behavior of adult mice exposed to stress and fluoxetine during development [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2017, 234(5): 793-804.
- [7] Fatima M, Srivastav S, Ahmad MH, et al. Effects of chronic unpredictable mild stress induced prenatal stress on neurodevelopment of neonates: Role of GSK-3 $\beta$  [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1305.
- [8] Liu W, Ge T, Leng Y, et al. The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex [J]. *Neural Plast*, 2017, 2017: 6871089.
- [9] Juruena MF. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression [J]. *Epilepsy Behav*, 2014, 38: 148-59.
- [10] Chen Y, Dube CM, Rice CJ, et al. Rapid loss of dendritic spines after stress involves derangement of spine dynamics by corticotropin-releasing hormone [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(11): 2903-11.
- [11] Maras PM, Baram TZ. Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH [J]. *Trends Neurosci*, 2012, 35(5): 315-24.
- [12] 牛晨旭, 郝瀚, 张海林. 啮齿类动物抑郁症模型的行为学检测方法 [J]. *河北医科大学学报*, 2015, 36(3): 370-2.
- [13] Terauchi A, Gavin E, Wilson J, et al. Selective inactivation of fibroblast growth factor 22 (FGF22) in CA3 pyramidal neurons impairs local synaptogenesis and affective behavior without affecting dentate neurogenesis [J]. *Front Synaptic Neurosci*, 2017, 9: 17.
- [14] Li J, Luo Y, Zhang R, et al. Neuropeptide Trefoil factor 3 reverses depressive-like behaviors by activation of BDNF-ERK-CREB signaling in olfactory Bulbectomized Rats [J]. *Int J MolSci*, 2015, 16(12): 28386-400.
- [15] Abelaira HM, Reus GZ, Neotti MV, et al. The role of mTOR in depression and antidepressant responses [J]. *Life Sci*, 2014, 101(1-2): 10-4.

## Hippocampal CRHR1 mediates chronic stress during pregnancy inducing depression in male offspring mice

Zhang Kuo<sup>1</sup>, Chen Peng<sup>2</sup>, Qian Zhikan<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Hygiene Inspection and Quarantine, <sup>2</sup>Dept of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Anhui Medical University Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the mechanism of chronic stress during pregnancy inducing depression in male offspring mice. **Methods** 8-week-old female C57 mice containing pure *flox* gene [*flox/flox*, corticotropin-releasing hormone receptor1 (CRHR1) gene normal expression] and male C57 mice containing heterozygous *flox* gene and containing cre gene (*flox/+*, with *cre*; CRHR1 gene conditions Sex knockout) were put in cage together. The

## LncRNA SNHG9 敲除对胶质瘤细胞增殖影响及其作用机制的生物信息学探讨

叶静静<sup>1,2</sup> 陈天兵<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 利用 CRISPR-Cas9 结合流式单细胞分选构建 lncRNA SNHG9 基因敲除的 U251 细胞株,检测基因敲除对细胞增殖能力的影响。利用生物信息学分析探讨 SNHG9 基因发挥功能的可能机制。方法 在 SNHG9 基因上、下游分别设计一个 Cas9 作用靶点,将两对单链向导 RNA 的引物模板退火连接 px330-EGFP 载体,构建成功的目的质粒共转染 U251 细胞后,通过流式单细胞分选在 96 孔板中培养,通过 PCR 扩增和测序验证筛选得到 SNHG9 敲除成功的单克隆细胞株并扩大培养。RTCA 方法检测 SNHG9 敲除后细胞增殖能力的改变。利用在线工具分析 lncRNA SNHG9 的表达情况,查找共表达基因并进行富集分析。结果 构建成功用于

SNHG9 敲除的质粒。培养共存活了 8 个克隆,且得到 1 株 SNHG9 成功敲除的细胞株。敲除细胞的增殖能力明显降低 ( $P < 0.05$ )。分析显示 SNHG9 在胶质母细胞瘤 (GBM) 组织中高表达,富集分析显示共表达基因主要与线粒体的功能相关。结论 成功建立了 SNHG9 敲除的克隆细胞株且能抑制 U251 细胞的增殖,生物信息学分析显示 SNHG9 可能参与线粒体的功能调控。

**关键词** CRISPR-Cas9; SNHG9; 胶质瘤; 细胞增殖; 生物信息学分析

中图分类号 R 739.41; Q 789

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)03-0342-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.002

2020-10-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(编号: 81901519); 安徽省自然科学基金青年项目(编号: 1908085QH380)

作者单位: 皖南医学院<sup>1</sup> 重大疾病非编码 RNA 转化研究安徽普通高校重点实验室、<sup>2</sup> 弋矶山医院中心实验室 芜湖 241001

作者简介: 叶静静,女,检验技师初级;

陈天兵,男,博士,助理研究员,责任作者, E-mail: ctb0410021@qq.com

胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 是最常见和恶性程度最高的颅内肿瘤<sup>[1]</sup>,具有病程短、进展快、预后差、死亡率高的特点<sup>[2]</sup>。目前传统治疗方法,如放疗等并没有明显改善胶质瘤患者的预后<sup>[3-4]</sup>。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200 核苷酸但不编

pregnant mice were randomly divided into the control group and the chronic stress group. After the mice were born, the male offspring mice were randomly divided into the control group (CON group), the control + CRHR1 gene knockout heterozygous mice group (CON + CKOH group), the control + CRHR1 gene knockout homozygous mice group (CON + CKOA group), the chronic unpredictable mild stress group (CUMS group), the chronic unpredictable mild stress + CRHR1 gene knockout heterozygous mice group (CUMS + CKOH group), the chronic unpredictable mild stress + CRHR1 gene knockout homozygous mice group (CUMS + CKOA group). The degree of depression in male offspring mice was observed by sucrose preference experiment, tail suspension experiment and forced swimming experiment. TUNEL staining was used to observe apoptosis in hippocampal CA3 area. Western blot was used to quantitatively detect the expression of mTOR and p-mTOR (Ser2448) in hippocampus. **Results** Chronic stress during pregnancy induced depression-like behavior, increased neuronal apoptosis index in hippocampal CA3 area, and attenuated the level of hippocampal mTOR and p-mTOR protein significantly in male offspring mice. Hippocampal CRHR1 gene conditional knockout could significantly improve depressive-like behavior, neuronal apoptosis in the hippocampus CA3 region and the levels of mTOR and p-mTOR proteins in the male offspring mice whose mother suffered from chronic stress during pregnancy. **Conclusion** Chronic stress during pregnancy can lead to depression-like behavior in male offspring mice through activating CRHR1 of hippocampus and attenuating mTOR protein expression in the hippocampus, which results in neuronal injury in the CA3 region of offspring hippocampus.

**Key words** depression; chronic prenatal stress; hippocampus; corticotrophin-releasing hormone receptor1; conditional knockout; *cre/loxp*