

CRH 调节妊娠期慢性应激致子代雄性大鼠抑郁

陈鹏¹, 况亮¹, 吕逸丽¹, 张阔¹, 姚余有^{1,2}

摘要 目的 探讨妊娠期慢性应激诱导子代雄鼠抑郁的作用机制。方法 将30只雌性SD孕鼠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+子代侧脑室注射溶剂对照组(CON组)、妊娠期正常对照+子代侧脑室注射CRHR1拮抗剂组(CON+ANT组)、妊娠期慢性应激+子代侧脑室注射CRHR1拮抗剂组(CUMS+ANT组)、妊娠期慢性应激+子代侧脑室注射溶剂对照组(CUMS组)。子代雄鼠出生后10~30d侧脑室微量注射CRHR1拮抗剂,对照组注射溶剂。观察子代抑郁样行为,海马CA3区神经细胞变化,海马组织促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)水平及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和磷酸化mTOR [p-mTOR (Ser2448)]蛋白含量。体外培养10d大鼠海马脑片,实验分为正常对照组(Control组)、 1.0×10^{-6} mol/L CRH + 不同剂量CRHR1拮抗剂组和 1.0×10^{-6} mol/L CRH + 溶剂对照组(CRH组),Western blot检测海马脑片中mTOR蛋白含量。结果 与CON组相比,CUMS组大鼠糖水偏好实验中糖水偏好率下降($P < 0.05$)。强迫游泳实验中不动时间增长($P < 0.05$)。海马组织CRH浓度升高($P < 0.05$)。CA3区神经细胞数量减少,排列疏松,细胞核固缩明显;大鼠海马组织中mTOR和p-mTOR蛋白表达量均下降($P < 0.05$)。与CUMS组相比,CUMS+ANT组大鼠糖水偏好率提高($P < 0.05$)。游泳不动时间减少($P < 0.05$)。海马组织CRH浓度下降,海马CA3区病理损伤改善;大鼠海马组织中mTOR和p-mTOR蛋白表达量均上升($P < 0.05$)。海马脑片结果显示,与Control组相比,CRH组大鼠海马脑片mTOR蛋白表达量下降($P < 0.05$)。与CRH组相比,低、中和高CRHR1拮抗剂组大鼠海马脑片mTOR蛋白表达量增加($P < 0.05$)。结论 妊娠期慢性应激使得子代雄鼠海马组织CRH水平升高,子代出现的抑郁样行为可能与mTOR通路的抑制,海马CA3区病理改变有关。

关键词 妊娠期慢性应激;促肾上腺皮质激素释放激素;CRHR1拮抗剂;海马CA3区

中图分类号 R 749.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0410-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.017

2019-12-20 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¹营养与食品卫生学系,²人口健康与优生安徽省重点实验室,合肥 230032

作者简介:陈鹏,男,硕士研究生;

姚余有,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:yaoan-qi71@aliyun.com

抑郁症是一种慢性精神疾病,特点是思维缓慢、反复发作,严重者甚至危及生命。研究^[1]发现,抑郁症患者海马、大脑皮层、杏仁核等部位发生明显异常。抑郁和焦虑可能与下丘脑分泌过多的促肾上腺皮质激素释放激素(corticotrophin-releasing hormone, CRH)有关^[2-4]。课题组以往的实验^[5]结果显示,妊娠期慢性应激可引发子代雄鼠抑郁,但目前尚不清楚是否由CRH分泌增多引起。CRH和CRH受体1(CRH receptor 1, CRHR1)广泛分布于全脑,参与并影响海马、大脑皮层、杏仁核等部位众多生理功能^[6-7]。因此,现使用慢性不可预测的轻度应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)方式作用于妊娠期大鼠,通过向其子代雄鼠侧脑室微量注射CRHR1拮抗剂(NBI30775),观察子代雄鼠行为学和组织病理学改变,并利用体外培养实验来研究子代雄鼠抑郁的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 CRHR1拮抗剂NBI30775(英国Tocris Bioscience公司); anti-mTOR、anti-p-mTOR (Ser2448) (美国Cell Signaling Technology公司); BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);酶联免疫试剂盒(ELISA) (上海江莱生物技术有限公司); MEM(美国Hyclone公司);马血清(美国Gibico公司);插入式微孔滤膜(美国Millipore公司);强迫游泳实验分析系统(上海欣软信息科技有限公司);大鼠脑立体定位仪、微量注射器和微量给药套管(深圳瑞沃德生命科技有限公司); Western blot相关仪器(北京六一厂); ELX全自动酶标仪(美国BD公司); CO₂恒温培养箱(美国Thermo公司)。

1.2 动物与分组 8周龄SPF级Sprague Dawley大鼠,雌鼠30只,雄鼠15只,由安徽医科大学实验动物中心提供。动物饲养方法:室温(24±1)℃,相对湿度50%,正常提供食物和水,饲养7d以适应周围环境。7d后,按照雌雄比例2:1在20:00点合笼,次日早上07:00点查阴。标记、称重查到阴栓的母

鼠单笼饲养并记录为受孕第1天。为研究不同妊娠期应激时间对子代大鼠行为学的影响,将妊娠期母鼠分为妊娠期正常对照组(CON组)、妊娠中期(7~14 d)处理组(MIDDLE组)、妊娠晚期(15~21 d)处理组(LATE组)和妊娠中晚期(7~21 d)处理组(MID-LATE组)。随机取出同一组孕鼠孕育的子代雄鼠,于出生后30 d做行为学实验,选取最强致子代抑郁的应激方式。在上述基础上重新应激孕鼠(应激时间为7~21 d)。待子鼠出生后,按妊娠期应激与不应激将子代雄鼠分成以下4组:妊娠期正常对照+子代对照组(CON组)、妊娠期正常对照+子代侧脑室注射CRHR1拮抗剂组(CON+ANT组)、妊娠期慢性应激+子代侧脑室注射CRHR1拮抗剂组(CUMS+ANT组)、妊娠期慢性应激+子代对照组(CUMS组)。

1.3 慢性应激方法 慢性应激组:正常喂养1周后,受孕第8天起开始慢性不可预知性轻度刺激:夹尾巴(离尾尖5 cm处,5 min)、禁水(24 h)、冰水游泳(水温4℃,15 min)、改变居住环境(让鼠在潮湿的垫料上生活24 h)、昼夜颠倒、禁食(24 h)、摇床振荡等,每天随机施加1种刺激方式(禁水、禁食除外),直到大鼠分娩。

1.4 给药方式 产后10 d,用4%的水合氯醛腹腔注射麻醉子鼠,并利用脑立体定位仪定位侧脑室(以前囟为原点,AP-0.7 mm、L2.0 mm、V3.3 mm),将不锈钢导管插入侧脑室,用牙托粉和牙托水将其固定。手术后皮下注射抗生素(0.1×10^4 U/只,每天1次),持续注射3 d防止子鼠感染。NBI30775给药剂量为2.5 mg/(kg·d),给药周期为10~30 d。

1.5 抑郁模型大鼠行为学评价

1.5.1 强迫游泳实验(forced swimming test, FST)

试验第1天进行预实验,将大鼠置于直径20 cm玻璃桶中游泳15 min[水深30 cm,水温(24±1)℃]。第2天,将大鼠置于桶中游泳6 min,拍摄大鼠在桶中的运动情况,统计后4 min不动时间总和。

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

试验第1天进行预实验,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。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%。

1.6 HE染色观察海马形态学改变 行为学实验全部结束后,取出全脑4%多聚甲醛固定脑组织。24 h后进行脱水、包埋,做冠状切片,染色。在显微镜(200倍)下拍摄海马CA3区神经细胞,保存图片。用Image-Pro Plus软件的计数功能标记出神经元的数目并求出平均值。

1.7 ELISA法检测海马组织中CRH含量 实验时称取一定量的海马组织,按照酶联免疫试剂盒(ELISA)使用书的说明进行操作,测定海马组织CRH的含量,海马组织CRH的浓度单位用CRH/总蛋白(pg/mg)表示。

1.8 Western blot法检测海马组织哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)和p-mTOR(Ser2448)蛋白含量 称量40 mg的海马组织,加入PBS轻摇洗涤,匀浆4℃离心后分离上清液,重复1次。灌制8%的胶,电泳(60 V/90 min,120 V/180 min),转膜(250 mA/250 min) 纯水洗膜3次后封闭1.5 h 孵育一抗(4℃过夜)。TBST洗膜4次后孵育二抗。加适量显色液显影并拍照,保存图片分析结果。抗体浓度β-actin鼠抗(1:2000)、mTOR兔抗(1:2000)、p-mTOR兔抗(1:2000)、二抗羊抗兔(1:5000)。

1.9 Western blot法检测体外培养海马脑片中mTOR蛋白含量 取10 d的SD大鼠大脑,制作冠状切片(180 μm),切下的脑片置于4℃的HBSS中,最后将切片放置在装有培养基的Millicell-CM微孔膜上。培养基组成成分为50% MEM、25%马血清、24% HBSS溶液、1%的100 U/ml青链霉素双抗、6.5 mg/ml葡萄糖,pH 7.25。放入37℃、5% CO₂培养箱培养,24 h内换液,随后1周内每隔1 d更换1次培养基,以提供海马脑片充足的营养和适宜的生长环境。1周以后,将实验分为 1.0×10^{-6} mol/L CRH + 0.1×10^{-6} mol/L CRHR1拮抗剂组(Low组)、 1.0×10^{-6} mol/L CRH + 1.0×10^{-6} mol/L CRHR1拮抗剂组(Middle组)、 1.0×10^{-6} mol/L CRH + 10×10^{-6} mol/L CRHR1拮抗剂组(High组)、 1.0×10^{-6} mol/L CRH + 溶剂对照组(CRH组)和正常对照组(Control组)。其中CRHR1拮抗剂终浓度设定为(0.1~10)×10⁻⁶ mol/L,CRH浓度为 1.0×10^{-6} mol/L。

1.10 统计学处理 SPSS 23.0统计软件分析实验所得数据,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。

2 结果

2.1 妊娠期不同应激阶段对子代雄鼠的影响 如表 1 所示,与 CON 组相比,MIDDLE、LATE 和 MID-LATE 组的大鼠糖水偏好率均下降 ($P < 0.05$),强迫游泳不动时间均增长 ($P < 0.05$);与 MIDDLE 组和 LATE 组相比,MID-LATE 组大鼠强迫游泳不动时间更长 ($P < 0.05$),糖水偏好率下降 ($P < 0.05$)。

表 1 各组子代大鼠行为学实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	糖水偏好率 (%)	强迫游泳不动时间 (s)
CON	88.01 ± 9.14	45.81 ± 7.35
MIDDLE	76.34 ± 4.12*	65.35 ± 3.27*
LATE	67.37 ± 5.98*	79.72 ± 6.95*
MID-LATE	61.56 ± 6.46* #	89.60 ± 7.61* #
F 值	28.81	47.16

与 CON 组比较: * $P < 0.05$; 与 MIDDLE 组、LATE 组比较: # $P < 0.05$

2.2 CRHR1 拮抗剂对子代雄鼠行为学影响 如表 2 所示,与 CON 组相比,CUMS 组大鼠糖水偏好率下降 ($P < 0.05$),强迫游泳不动时间增长 ($P < 0.05$);与 CUMS 组相比,CUMS + ANT 组大鼠糖水偏好率上升 ($P < 0.05$),强迫游泳不动时间减少 ($P < 0.05$);与 CON 组相比,CON + ANT 组大鼠糖水偏好率和强迫游泳不动时间无明显变化。

表 2 各组子代大鼠行为学实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	糖水偏好率 (%)	强迫游泳不动时间 (s)
CON	84.50 ± 1.69	50.10 ± 5.13
CON + ANT	87.48 ± 4.91	43.01 ± 6.52
CUMS	61.52 ± 6.31*	91.21 ± 3.77*
CUMS + ANT	77.73 ± 7.25* #	68.20 ± 9.26* #
F 值	38.07	54.88

与 CON 组比较: * $P < 0.05$; 与 CUMS 组比较: # $P < 0.05$

2.3 CRHR1 拮抗剂对子代雄鼠海马病理学影响

HE 染色结果显示,CON 组与 CON + ANT 组海马 CA3 区神经细胞数量较多,细胞排列紧密,核仁界限清晰、明显。CUMS 组海马 CA3 区神经细胞数量较少,细胞排列疏松,发生核固缩的细胞较多。用 Image-Pro Plus 分析软件的计数功能标记海马 CA3 区神经细胞数量,分析结果显示,与 CON 组 (121.01 ± 9.64) 相比,CUMS 组 (83.00 ± 5.24) 神经元总数减少 ($P < 0.05$);与 CUMS 组 (83.00 ± 5.24) 相比,CUMS + ANT 组 (101.25 ± 5.91) 神经元总数增加 (P

< 0.05);而 CON 组与 CON + ANT 组 (125.67 ± 7.51) 相比神经元总数无明显区别。见图 1。

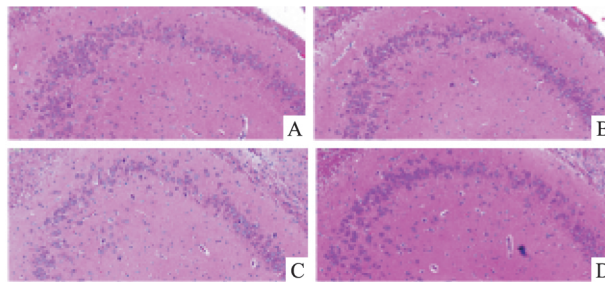


图 1 各组子代雄鼠海马 CA3 区 HE 染色图 ×200

A: CON 组; B: CON + ANT 组; C: CUMS 组; D: CUMS + ANT 组

2.4 CRHR1 拮抗剂对子代雄鼠海马组织中 CRH 水平影响

ELISA 检测结果显示,与 CON 组大鼠相比,CUMS 组大鼠海马组织中 CRH 水平升高 ($P < 0.05$);与 CUMS 组相比,CUMS + ANT 组大鼠海马组织中 CRH 水平降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

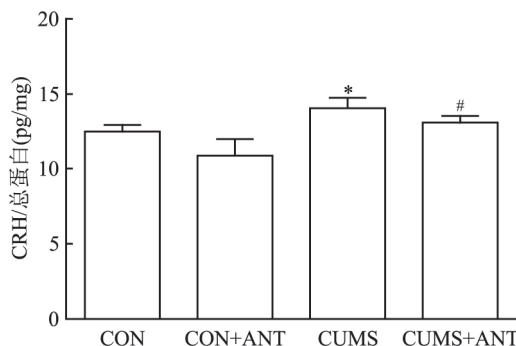


图 2 各组子代大鼠海马组织 CRH 水平影响 ($n=3$)

与 CON 组比较: * $P < 0.05$; 与 CUMS 组比较: # $P < 0.05$

2.5 CRHR1 拮抗剂对子代海马 mTOR、p-mTOR 蛋白表达影响

采用 Western blot 法检测 mTOR 和 p-mTOR 蛋白水平。图 3 显示,与 CON 组相比,CUMS 组大鼠海马组织中 mTOR 表达量下降 ($P < 0.05$);与 CUMS 组相比,CUMS + ANT 组大鼠海马组织中 mTOR 表达量上升。图 4 显示,与 CON 组相比,CUMS 组大鼠海马组织中 p-mTOR 水平下降 ($P < 0.05$);与 CUMS 组相比,CUMS + ANT 组大鼠海马组织中 p-mTOR 表达量上升。CON 组和 CON + ANT 组大鼠海马组织中 mTOR 和 p-mTOR 表达量均无统计学差异。

2.6 CRHR1 拮抗剂对体外培养海马脑片中 mTOR 蛋白水平影响

采用 Western blot 法检测体外培养的海马脑片 mTOR 蛋白水平,结果显示,与

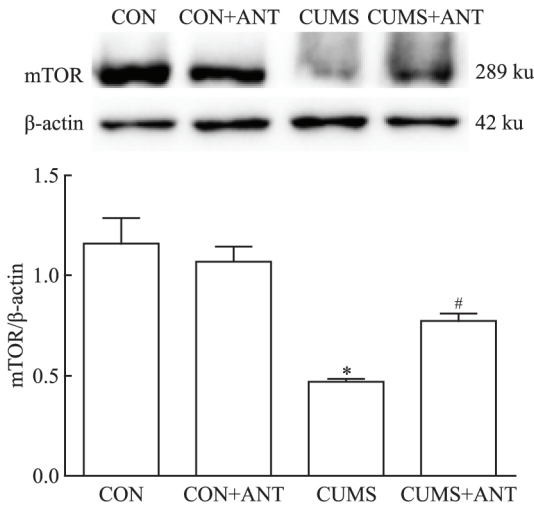


图3 CRHR1拮抗剂对海马组织中mTOR蛋白表达的影响(n=3)
与CON组比较:*P<0.05;与CUMS组比较:#P<0.05

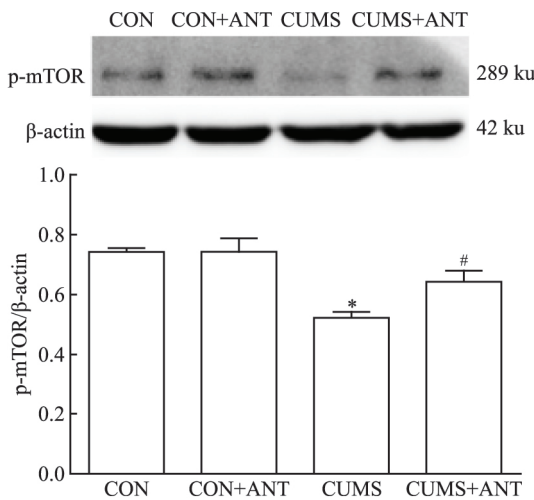


图4 CRHR1拮抗剂对海马组织中p-mTOR蛋白表达的影响(n=3)
与CON组比较:*P<0.05;与CUMS组比较:#P<0.05

对照组相比,CRH组大鼠海马脑片mTOR表达量下降(P<0.05);与CRH组相比,低、中和高剂量CRHR1拮抗剂组大鼠海马脑片mTOR表达量增加(P<0.05);但低、中和高剂量CRHR1拮抗剂组与对照组相比,大鼠海马脑片mTOR表达量差异无统计学意义,且低、中和高剂量CRHR1拮抗剂组3组之间组内比较大鼠海马脑片mTOR表达量差异无统计学意义。见图5。

3 讨论

不同妊娠时期应激会对子代雄鼠的行为产生不同的影响。本实验结果显示,与CON组相比,MID-LATE、LATE和MID-LATE组的大鼠糖水偏好率下

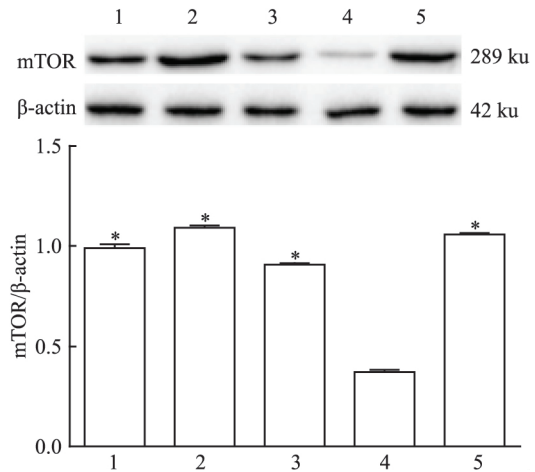


图5 CRHR1拮抗剂对体外培养海马脑片中mTOR蛋白表达的影响(n=3)

1:低剂量CRHR1拮抗剂组;2:中剂量CRHR1拮抗剂组;3:高剂量CRHR1拮抗剂组;4:CRH组;5:对照组;与CRH组比较:*P<0.05

降、强迫游泳不动时间增长,且MID-LATE组比MIDDLE和LATE组强迫游泳不动时间更长,糖水偏好率提高,提示MID-LATE妊娠期应激组子代雄性大鼠抑郁程度最严重。

CRH和CRHR1在全脑分布广泛,故本实验通过向妊娠期慢性应激子鼠侧脑室微量注射CRHR1拮抗剂,并结合体外培养海马脑片更有利于探讨妊娠期慢性应激诱导子代雄性大鼠抑郁的机制。实验结果显示,与CON组相比,CUMS组大鼠糖水偏好率下降,强迫游泳不动时间增长,说明妊娠期慢性应激致子代出现抑郁样症状。与CUMS组相比,CUMS+ANT组大鼠糖水偏好率上升,强迫游泳不动时间减少,提示CRH参与了妊娠期慢性应激致子代抑郁。HE染色和海马组织CRH浓度检测结果显示,与CON相比,CUMS组的子代雄鼠海马CA3区神经细胞损伤,海马组织CRH浓度升高,而加入CRHR1拮抗剂后,CUMS+ANT组子代雄鼠海马病理损伤改善,提示妊娠期慢性应激通过提高子代海马组织中CRH水平,导致海马CA3区损伤,从而引起抑郁样症状。本研究结果还显示,CRHR1拮抗剂可下调CUMS引起的升高的CRH,其机制不详,还有待于进一步研究。

mTOR是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,参与调控蛋白质翻译、细胞增殖与死亡等生理过程^[8]。研究^[9-10]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。本研究结果显示, CUMS 组大鼠海马组织中 mTOR 和 p-mTOR 蛋白的表达低于 CON 组, 但侧脑室注射 CRHR1 拮抗剂后 mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达升高, 提示 CRHR1 拮抗剂可上调妊娠期慢性应激导致的子鼠 mTOR 和 p-mTOR 的蛋白水平的降低。此外体外培养海马脑片结果显示, CRH、低、中和高剂量 CRHR1 拮抗剂组大鼠海马脑片 mTOR 蛋白表达量增加, 且中剂量组的 mTOR 蛋白表达水平接近正常水平, 进一步说明 CRHR1 拮抗剂可以上调 mTOR 蛋白表达水平, 提示妊娠期慢性应激通过下调子鼠海马 mTOR 蛋白水平致海马神经细胞损伤, 最终引起抑郁。遗憾的是, 本课题组尚未掌握体外观察海马脑片病理形态的技术, 无法在观察 mTOR 蛋白的同时观察海马脑片的病理改变。此外本研究也未能成功检查海马神经元凋亡状况, 也是本文不足之处。

综上所述, 妊娠期慢性应激可导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诱导子代海马组织 CRH 水平升高, 通过抑制 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。

参考文献

- [1] Dusi N, Barlati S, Vita A, et al. Brain structural effects of antidepressant treatment in major depression [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2015, 13(4): 458–65.
- [2] Liu R, Yang X D, Liao X M, et al. Early postnatal stress sup-

- presses the developmental trajectory of hippocampal pyramidal neurons: the role of CRHR1 [J]. *Brain Struct Funct*, 2016, 221(9): 4525–36.
- [3] Pivina S G, Rakitskaya V V, Akulova V K, et al. Activity of the hypothalamic – pituitary – adrenal system in prenatally stressed male rats on the experimental model of post-traumatic stress disorder [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2016, 160(5): 601–4.
- [4] Gobinath A R, Mahmoud R, Galea L A. Influence of sex and stress exposure across the lifespan on endophenotypes of depression: focus on behavior, glucocorticoids, and hippocampus [J]. *Front Neurosci*, 2015, 8:420.
- [5] 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.
- [6] Wang X D, Labermaier C, Holsboer F, et al. Early-life stress-induced anxiety-related behavior in adult mice partially requires forebrain corticotropin-releasing hormone receptor 1 [J]. *Eur J Neurosci*, 2012, 36(3): 2360–7.
- [7] Binder E B, Nemeroff C B. The CRF system, stress, depression and anxiety – insights from human genetic studies [J]. *Mol Psychiatry*, 2010, 15(6): 574–88.
- [8] Laplante M, Sabatini D M. mTOR signaling in growth control and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(2): 274–93.
- [9] 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.
- [10] Wu R, Zhang H, Xue W, et al. Transgenerational impairment of hippocampal Akt-mTOR signaling and behavioral deficits in the offspring of mice that experience postpartum depression-like illness [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2017, 73: 11–8.

CRH regulate the chronic pregnancy stress inducing depression in offspring male rats

Chen Peng, Kuang Liang, Lü Yili, et al

(Dept of Nutrition and Food Hygiene School of Public Health Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the mechanism of chronic prenatal stress inducing depression in offspring male rats. **Methods** Thirty pregnant rats were randomly divided into the control group and the chronic unpredictable mild stress group (CUMS). After the rats were born, male offspring rats were randomly divided into the control + Solvent group (CON group), the control + CRHR1 antagonist group (CON + ANT group), the CUMS + CRHR1 antagonist group (CUMS + ANT group) and the CUMS + Solvent group (CUMS group). Solvent or CRHR1 antagonist were administered by lateral ventricle injection to 10–30-day-old rats. Then we observed depressive-like behaviors, number and morphology of hippocampal CA3 neurons, the level of corticotrophin-releasing hormone (CRH) in the hippocampus, mammalian target of rapamycin (mTOR) and p-mTOR (Ser2448) protein expression. Hippocampal slices of 10-day-old rats were cultured *in vitro*, and slices were divided into the control group (Control group), 1.0 μmol/L CRH + different dose of CRHR1 antagonist group and 1.0 μmol/L CRH + solvent control group (CRH group). Western blot was used to observe the expression of mTOR protein. **Results** Compared with the

网络出版时间: 2020-3-30 17:09 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200330.0846.018.html>

CBLC 在各分型分期乳腺癌中的表达差异及预后分析

李经纬¹, 肖斌², 陆景润¹, 邓淳¹, 李林海², 罗昭逊^{3,4}

摘要 目的 阐明 CBL 原癌基因 C (CBLC) 在乳腺癌中的生物学作用, 为乳腺癌的临床诊断与预后评估提供新的监测指标, 为乳腺癌的深入研究和治疗方案拟定提供指导性理论基础。方法 从 USCS Xena (<https://xenabrowser.net>) 中的 TCGA 数据集下载 1 104 例乳腺癌组织和 113 例癌旁组织的基因表达谱矩阵, 分析 CBLC 基因在乳腺癌各分子与病理分型、TNM 分期与肿瘤阶段中的表达差异及预后相关性; 利用免疫组化染色观察 CBLC 在 30 例乳腺癌患者肿瘤及其邻近正常组织中的表达水平; 利用 MCF7 乳腺癌细胞进行划痕实验、Transwell 实验及 CCK-8 实验, 观察 CBLC 对其增殖迁移的作用。结果 CBLC 在乳腺癌组表达量 ($P = 2.31 \times 10^{-20}$) 及 H-Score 评分 ($P = 0.014$) 均高于癌旁组, 在 Luminal

A 分子分型 ($P = 1.68 \times 10^{-4}$) 及黏液癌病理分型 ($P = 4.00 \times 10^{-5}$) 中表达量最高, 在乳腺癌 stage I 期至 stage II 期中表达量呈下降趋势 ($P = 0.0494$)。以中位数划分, CBLC 高表达组乳腺癌患者的生存率高于低表达组 ($P = 0.054$)。CBLC 过表达能够抑制乳腺癌细胞增殖和迁移。结论 CBLC 在乳腺癌各分型分期中的表达具有显著差异, 其在低恶性的 Luminal A 分子分型、高分化型的黏液癌组织病理分型、早期乳腺癌中高表达, 与乳腺癌患者生存良好呈正相关, 可抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移, 可能是新的乳腺癌分子诊断或靶向治疗的潜在靶标。

关键词 CBLC 蛋白; 乳腺癌; 分型分期; 预后影响

中图分类号 R 730.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0415-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.018

2020-02-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81802634); 广东省自然科学基金 (编号: 2018A030310014); 军队后勤科研项目 (编号: CWH17C017)

作者单位: ¹ 贵州医科大学医学检验学院临床检验学教研室, 贵阳 550004

² 中国人民解放军南部战区总医院检验科, 广州 510010

³ 贵州医科大学附属贵州省儿童医学中心, 贵阳 550004

⁴ 贵州医科大学儿科学院, 贵阳 550004

作者简介: 李经纬, 女, 硕士研究生;

罗昭逊, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: luozhaoxun@gmc.edu.cn

近年我国乳腺癌发病率和死亡率急剧增加, 2015 年新发病例达 26.86 万, 死亡 6.95 万^[1]。目前, 基于乳腺癌分型的精准诊断方法逐渐完善, 但缺少有效且临床反应良好的治疗靶标。因此, 寻找一种针对乳腺癌分型分期、具预后评估效能的靶标对于乳腺癌靶向药物研发十分重要。Cbl Proto-Oncogene 家族蛋白是一组 RF 泛素连接酶 (E3 Ubiquitin Ligases, E3), 哺乳动物细胞中有 3 种 CBL 家族蛋白: CBL、CBLB 和 CBLC (别名 CBL-3、CBL-SL 和

CON group, the offspring rats in CUMS group had more motion time in forced swimming test ($P < 0.05$) and less sugar preference rate in the sugar preference test ($P < 0.05$). The hippocampus CRH concentration increased ($P < 0.05$) and the neuropathological changes were characterized by decreased neuron number, loosed neurons and the soma condensation in CA3 field of hippocampus. Moreover, the expression of mTOR and p-mTOR both decreased in hippocampus ($P < 0.05$). Compared with the CUMS group, the offspring rats in CUMS + CRHR1 antagonist group had less motion time in forced swimming test ($P < 0.05$) and more sugar preference rate in the sugar preference test ($P < 0.05$). The level of CRH in hippocampus was down-regulated, the neuropathological damage in hippocampus CA3 region was improved and the expression of mTOR and p-mTOR both increased ($P < 0.05$). The results of hippocampal slices culture showed that the expression of mTOR decreased more in CRH group than that in Control group ($P < 0.05$). Low, middle and high concentration of CRHR1 antagonist could upregulate the decreased level of mTOR induced by CRH ($P < 0.05$). **Conclusion** Depression of male offspring caused by chronic prenatal stress may be associated with the increased level of CRH in the hippocampus which inhibit the expression of mTOR protein and cause the neuropathological damage in the CA3 field of hippocampus.

Key words chronic prenatal stress; corticotrophin-releasing hormone; CRHR1 antagonist; hippocampal CA3