

网络出版时间: 2018-4-23 09:59 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180420.1545.020.html>

## CRH 介导妊娠期慢性应激致子代雄鼠抑郁

况亮<sup>1</sup>, 吕逸丽<sup>1</sup>, 韩振敏<sup>1</sup>, 陈鹏<sup>1</sup>, 姚余有<sup>1,2</sup>, 唐伟<sup>3</sup>

**摘要** 目的 探讨促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)是否介导妊娠期慢性应激致子代抑郁及其可能机制。方法 实验分为正常对照组(Control组)、产前应激+溶剂对照组(CPS组)、产前应激+CRHR1拮抗剂组(CPS+ANT组)。应用强迫游泳实验、糖水偏好实验和旷场实验对子代雄鼠的抑郁程度进行检测。应用HE染色法观察小鼠海马CA3区神经元的组织病理形态。Western blot法检测子代雄鼠海马组织雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的表达量,运用ELISA法检测子代雄鼠海马CRH水平。结果 与Control组相比,CPS组强迫游泳实验中小鼠不动时间增多( $P < 0.05$ );糖水偏好实验中糖水偏好率下降( $P < 0.05$ );旷场实验中站立次数、平均速度、穿越格子次数、鼠爬行总路程减少( $P < 0.05$ );海马CA3区神经元细胞数目较少,脱失现象明显,排列疏松紊乱,核浓染固缩;海马组织mTOR的表达量减少( $P < 0.05$ );海

马CRH浓度升高( $P < 0.05$ )。与CPS组相比,CPS+ANT组强迫游泳实验中小鼠不动时间减少( $P < 0.05$ );糖水偏好率增高( $P < 0.05$ );旷场实验中鼠爬行总路程、平均速度、穿越象限次数、站立次数增加( $P < 0.05$ );海马CA3区神经元细胞数目较多,脱失现象明显减少,核固缩浓染减少;海马组织mTOR的表达量增多( $P < 0.05$ );海马CRH浓度下降( $P < 0.05$ )。结论 CRH介导了妊娠期慢性应激致子代抑郁,其机制可能与妊娠期慢性应激致子代海马CRH升高,下调mTOR蛋白表达,同时与CA3区神经元的减少有关。

**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;抑郁

中图分类号 R 749.42

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)04-0584-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.04.019

2017-12-14 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2016A354)

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

<sup>3</sup> 安徽医科大学第二附属医院检验科,合肥 230601

作者简介:况亮,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-q71@aliyun.com

抑郁症是一种常见的心境障碍,实验研究<sup>[1]</sup>显示,抑郁的发病与下丘脑、杏仁核、大脑皮层和海马等部位异常有关。本课题组前期研究<sup>[2]</sup>显示,妊娠期慢性应激可引起子代雄鼠呈现抑郁症状,但其机制不明。促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)主要由下丘脑室旁核分泌,大脑皮层、杏仁核、海马等脑组织也表达一定量

## Effect of antibacterial peptide C8gpm11 on oral common pathogenic bacteria

Hou Mengyao<sup>1</sup>, Sun Yingming<sup>1,2</sup>, Ying Xiu<sup>3</sup>, et al

(<sup>1</sup>Wuxi Clinical College of Anhui Medical University, Wuxi 214044; <sup>2</sup>Dept of Stomatology,

The PLA 101th Hospital, Wuxi 214044; <sup>3</sup>Dept of Stomatology, Bengbu Medical College, Bengbu 233000)

**Abstract Objective** To study the antibacterial activity and mechanism of the novel antimicrobial peptide C8gpm11 against oral common pathogenic microorganisms. **Methods** The microbicidal activity of C8gpm11 was analyzed by MIC, MBC, FIC, FBC, and the bacteriostatic ring diameter of C8gpm11 in the saliva environment. Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the bacterial membrane. **Results** C8gpm11 showed the microbicidal activity with a concentration-dependent manner. The bacteriostatic ability of C8gpm11 in oral salivary-environment was not weakened obviously. C8gpm11 in combination with CHX had a synergistic antimicrobial effect. **Conclusion** C8gpm11 has a bactericidal effect against oral common pathogenic microorganisms, and provides a basis for its clinical value.

**Key words** antibacterial peptides; C8gpm11; oral pathogenic microorganisms

的 CRH<sup>[3]</sup>。以往研究<sup>[2,4]</sup>显示高水平 CRH 可能与抑郁的发生有关,但 CRH 是否介导妊娠期慢性应激致抑郁尚不清楚。因此,该研究拟用妊娠期慢性不可预见性复合应激建立子代雄鼠抑郁模型,并用 CRHR1 拮抗剂(antalarmin)对子鼠进行干预,观察子代雄鼠抑郁程度并进一步探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂与仪器** antalarmin hydrochloride(美国 Sigma 公司);雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)单克隆抗体(美国 Abcam 公司); $\beta$ -actin 单克隆抗体、山羊抗兔二抗、化学发光检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);小鼠 CRH 酶联免疫试剂盒(武汉华美生物公司);电泳仪、凝胶成像分析系统(北京 Tanon 公司);强迫游泳图像采集及分析系统(上海欣软公司);旷场实验图像采集及分析系统(荷兰 Noldus 公司)。

**1.2 实验动物与分组** 8 周龄 SPF 级小鼠,雌性 40 只,雄性 10 只,由安徽医科大学实验动物中心提供。遵循安徽医科大学生物医学伦理委员会动物饲养要求,室温为( $23 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,摄食饮水自由,50%的相对湿度,饲养 1 周。按照雌雄比例 2:1 在晚上 19:00 合笼,第 2 天早上 07:00 前检查阴栓,查到阴栓的小鼠单独饲养,并标记为受孕第 1 天,并将孕鼠按 2:1 随机分为慢性应激组和正常处理组。慢性应激组正常饲养 1 周,受孕第 8 天施加应激:束缚、禁水(24 h)、夹尾(5 min)、温水游泳(30 $^{\circ}\text{C}$ ,15 min)、禁食(24 h)、改变居住环境(让鼠在潮湿的垫料上生存 24 h)、冰水游泳(4 $^{\circ}\text{C}$ ,5 min)等 7 种应激方式。小鼠每天随机接受一种应激方法(禁水、禁食除外),直至小鼠分娩。正常处理组正常饲养即可。子代雄鼠母乳喂养 21 d 断奶,随机分为三组( $n=10$ ):正常对照组(Control 组)、产前应激+溶剂对照组(CPS 组)、产前应激+CRHR1 拮抗剂组(CPS+ANT 组),CPS+ANT 组子代雄鼠于产后 21~41 d 每天腹腔注射微量 CRHR1 拮抗剂<sup>[5]</sup>(20  $\mu\text{g/g}$ ),CPS 组和 Control 组注射等量的生理盐水。

## 1.3 行为学实验

**1.3.1 旷场实验** 每组随机选取 8 只子代雄鼠于产后 45 d 进行旷场实验,在实验的过程中确保实验室安静,旷场实验时将小鼠转移至试验箱的中央,于 2 min 后开始测试,记时 3 min,记录小鼠爬行总路程、平均速度、穿越象限次数、站立次数。每结束一次实验,用酒精擦拭旷场实验箱并清理小鼠的粪便

和尿液,待酒精挥发完,再换下一只小鼠进行实验。

**1.3.2 强迫游泳实验** 每组随机选取 8 只子代雄鼠于产后 47 d 进行强迫游泳实验,第 1 天将三组小鼠置于装有 25 $^{\circ}\text{C}$  水的钢化玻璃桶中游泳 15 min(水深 30 cm,直径 20 cm),一次实验只能用一只鼠,以免小鼠互相影响。第 2 天,随机将子代雄鼠放入装有水的钢化玻璃桶中(水深及温度与前 1 d 相同),录像、记录并观察小鼠 6 min 内后 4 min 小鼠在桶内禁止不动时间,即小鼠在水面漂浮不动或仅有四肢微小的动作维持身体平衡的时间。

**1.3.3 糖水偏好实验** 每组随机选取 4 只子代雄鼠于产后 50 d 进行糖水偏好实验,小鼠单笼饲养在安静的鼠房内,每笼放置两个水瓶(大小、形状、颜色相同)。第一个 24 h,两瓶都放置相同重量 1% 的蔗糖水,使小鼠适应蔗糖的甜味;第二个 24 h,让小鼠适应两种不同甜味的饮用水,其中一瓶装有 1% 的蔗糖溶液,第二瓶装相同体积的饮用水;第三个 24 h,禁食禁水 24 h,随后给予相同重量的蔗糖水和纯水进行糖水偏好实验,24 h 后对两水瓶进行称重,计算糖水偏好率。

**1.4 HE 染色观察病理形态学改变** 所有行为学实验结束后,随机选取 5 只小鼠,眼球取血,颈椎脱臼处死,在冰上取脑。用 4% 多聚甲醛将取下来的脑组织固定,然后脱水、包埋,最后于前囟后 3 mm 作 6  $\mu\text{m}$  的冠状切片。应用 HE 染色技术将每组相同位置的脑组织切片进行染色,每组取 6 张,在显微镜下观察海马 CA3 区神经元的形态变化,拍照保存。然后用 Image-Pro Plus Image 软件计算出神经元的数目并求出平均值。

**1.5 Western blot 法检测海马组织 mTOR 的表达量** 冰上取脑结束后,将取出的全脑在冰上进行海马剥离,置于匀浆机中,提取总蛋白,应用 BCA 试剂盒测定海马组织蛋白的总浓度并定量,变性 10 min。灌制 8% 的胶,每孔上样 28  $\mu\text{g}$ ;电泳(60 V/50 min,120 V/300 min);转膜(200 mA/300 min);室温封闭 1.5 h;洗膜 3 次;一抗 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 h;洗膜 3 次;二抗室温孵育 1.5 h;洗膜,滴加显影液,测量条带的光密度值。所用抗体浓度:一抗  $\beta$ -actin(兔单抗,1:2 000)、mTOR(兔单抗,1:1 000),二抗(羊抗兔,1:2 000)。

**1.6 ELISA 法检测海马 CRH 水平** 用研磨机将海马研碎,按照说明书离心取海马组织上清液并测量海马组织 CRH 浓度。

**1.7 统计学处理** 应用 SPSS 18.0 软件对数据进

行分析,并用  $\bar{x} \pm s$  表示,三组数据采用单因素方差分析,每组之间比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CRHR1 拮抗剂抑制妊娠期慢性应激致子代雄鼠抑郁** 与 Control 组相比,CPS 组强迫游泳实验中小鼠不动时间增多( $P < 0.05$ );糖水偏好实验中糖水偏好率下降( $P < 0.05$ );旷场实验中鼠爬行总路程、平均速度、穿越象限次数、站立次数减少( $P < 0.05$ );与 CPS 组相比,CPS + ANT 组强迫游泳实验中小鼠不动时间减少( $P < 0.05$ ),糖水偏好率增高( $P < 0.05$ ),旷场实验中鼠爬行总路程、平均速度、穿越象限次数、站立次数增加( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.2 CRHR1 拮抗剂改善妊娠期慢性应激所致的子代雄鼠海马 CA3 区神经元病理改变** HE 染色结果显示,Control 组小鼠海马 CA3 区神经元染色清晰,数量相对较多,排列紧密,细胞核表现出圆形,核仁较明显;CPS 组神经元排列疏松,数量相对较少,脱失现象明显,部分细胞核浓染、固缩。CPS + ANT 组小鼠海马 CA3 区神经元染色清晰,数量较多,呈椎体状、圆球状,细胞核呈圆形,核仁明显。用 Image-Pro PlusImage 分析软件计数海马 CA3 区神经元总数,结果显示与 Control 组( $173.000 \pm 8.888$ )相比,CPS 组( $85.667 \pm 8.737$ )神经元总数明显减少

( $P < 0.05$ );与 CPS 组相比,CPS + ANT 组( $171.667 \pm 6.506$ )神经元总数明显增多( $P < 0.05$ )。见图 1。

**2.3 CRHR1 拮抗剂上调妊娠期慢性应激子代雄鼠海马下降的 mTOR 的表达** Western blot 结果显示,与 Control 组相比,CPS 组小鼠海马组织 mTOR 表达量减少( $P < 0.05$ );与 CPS 组相比,CPS + ANT 组小鼠海马组织的 mTOR 表达量增加( $P < 0.05$ );Control 组与 CPS + ANT 组小鼠海马组织 mTOR 表达量差异无统计学意义。见图 2。

**2.4 妊娠期慢性应激致子代雄鼠海马 CRH 水平升高** ELISA 法检测小鼠海马 CRH 结果显示,3 组子代雄鼠海马 CRH 浓度差异有统计学意义,与 Control 组相比,CPS 组子代雄鼠海马 CRH 水平升高( $P < 0.05$ );与 CPS 组相比,CPS + ANT 组小鼠海马 CRH 水平降低( $P < 0.05$ )。见图 3。

## 3 讨论

CRH 神经元处于 HPA 轴顶端、具有整合心理和物理刺激的功能,被公认为是应激反应的中枢驱动力<sup>[6]</sup>。CRH 主要由下丘脑室旁核分泌,大脑皮层、海马、杏仁核等脑组织也表达一定量的 CRH<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,CPS 组较 Control 组海马组织 CRH 浓度上升,说明妊娠期慢性应激可致子代海马组织 CRH 升高。

表 1 CRHR1 拮抗剂抑制妊娠期慢性应激致子代雄鼠抑郁( $\bar{x} \pm s$ )

组别	不动时间 (s $n=8$ )	糖水偏好率 (% $n=4$ )	爬行总路程 (m $n=8$ )	平均速度 (m/s $n=8$ )	穿越象限次数 ( $n=8$ )	站立次数 ( $n=8$ )
Control	74.49 ± 17.00	92.49 ± 1.83	16.64 ± 4.74	0.09 ± 0.026	97.14 ± 28.22	37.57 ± 7.14
CPS	153.56 ± 27.00*	83.87 ± 1.41*	9.07 ± 1.89*	0.05 ± 0.010*	55.57 ± 15.77*	27.71 ± 5.77*
CPS + ANT	46.95 ± 21.67 <sup>#</sup>	90.49 ± 2.74 <sup>#</sup>	14.43 ± 2.62 <sup>#</sup>	0.08 ± 0.015 <sup>#</sup>	81.86 ± 19.23 <sup>#</sup>	39.71 ± 10.32 <sup>#</sup>
F 值	43.248	19.021	9.648	9.526	6.562	4.509
P 值	<0.001	0.001	0.001	0.002	0.007	0.026

与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 CPS 组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$

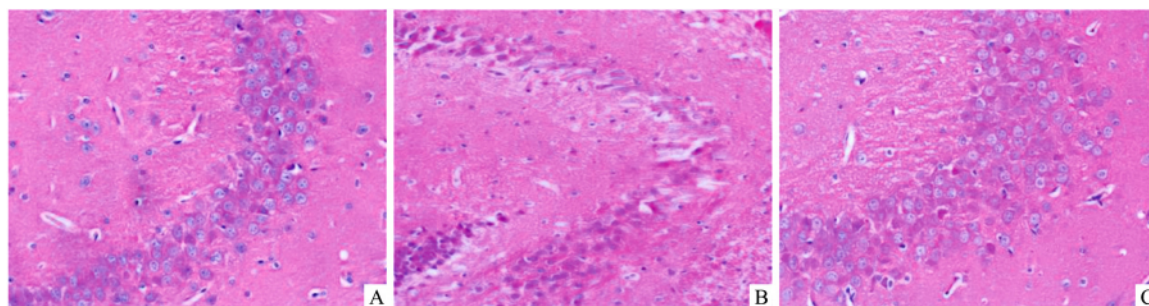


图 1 CRHR1 拮抗剂改善妊娠期慢性应激所致的子代雄鼠海马 CA3 区神经元 HE × 40

A: Control 组; B: CPS 组; C: CPS + ANT 组

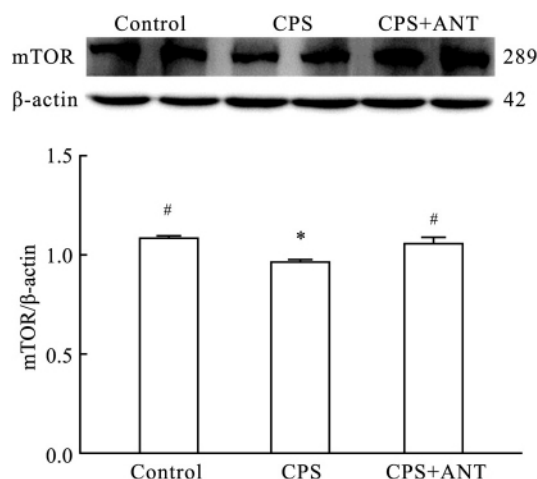


图2 CRHR1拮抗剂上调妊娠期慢性应激子代雄鼠海马下降的mTOR的表达量  
与Control组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与CPS组比较: #  $P < 0.05$

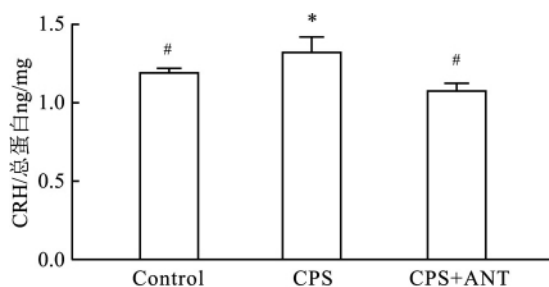


图3 妊娠期慢性应激致子代雄鼠海马CRH水平升高  
与Control组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与CPS组比较: #  $P < 0.05$

强迫游泳实验、糖水偏好实验和旷场实验是目前测量小鼠抑郁程度的常用实验。实验很好的分析了小鼠的无助程度、对快感缺乏的程度和在新环境中的探索行为。本研究行为学实验显示CPS组子代雄鼠较Control组小鼠静止漂浮时间增多;糖水偏好实验中糖水偏好率下降;旷场实验中鼠爬行总路程、平均速度、穿越象限次数、站立次数减少。CPS+ANT组较CPS组小鼠静止漂浮时间减少,糖水偏好率上升,旷场实验中鼠爬行总路程、平均速度、穿越象限次数、站立次数增多。说明妊娠期慢性应激导致子代雄鼠行为学改变,使子代雄鼠产生抑郁样行为,CRHR1拮抗剂可逆转妊娠期慢性应激致子代雄鼠抑郁,提示CRH介导了妊娠期慢性应激致子代雄鼠抑郁。

实验研究<sup>[8-9]</sup>显示,海马部位异常与抑郁的发病有关,其中CA3区与抑郁的形成密切相关。因此该区神经元数目、形态结构和功能的改变必然会导致行为学的改变。本实验的海马CA3区HE染色结果显示,CPS组较Control组海马CA3区神经元数量

明显减少,并且排列疏松紊乱,异常神经元明显增多,部分细胞核浓染、固缩,而CPS+ANT组较CPS组海马CA3区神经元染色清晰,数量较多,核浓染、固缩减少。说明CRHR1拮抗剂逆转妊娠期慢性应激致子代雄鼠海马CA3区神经元损伤,提示CRH致海马CA3区神经元损伤可能是妊娠期慢性应激致子代雄鼠抑郁的原因。

mTOR信号通路是调控细胞生长与增殖的一个关键通路,该通路将从营养分子、能量状态以及生长因子传来的信号整合在一起,从而调控生命过程。mTOR分为mTORC1和mTORC2,mTORC1信号在调节神经元的存活和分化、树突的长度和分支、轴突的生长和突触的可塑性中发挥重要作用,同时也介导抑郁的发病<sup>[10-11]</sup>。本研究显示,CPS组较Control组海马mTOR明显下降,CPS+ANT组较CPS组海马mTOR明显上升并接近Control组水平。说明CRH受体拮抗剂可上调mTOR水平。提示妊娠期慢性应激通过升高的CRH下调mTOR的表达进而致子代雄鼠抑郁。

本研究结果还显示,CPS+ANT组较CPS组海马组织CRH浓度下降,提示CRHR1拮抗剂可以降低海马CRH水平,其机制是否与CRHR1拮抗剂下调糖皮质激素浓度有关尚不清楚,有待于进一步研究。

综上所述,CRH介导了妊娠期慢性应激致子代抑郁<sup>[12-13]</sup>,其机制可能与妊娠期慢性应激致子代海马CRH升高,下调mTOR蛋白表达,进而引起海马CA3区神经元损伤有关。

## 参考文献

- [1] Duman R S, Aghajanian G K. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. [J] Science, 2012, 338(6103): 68-72.
- [2] 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.
- [3] Ivy A S, Rex C S, Chen Y, et al. Hippocampal dysfunction and cognitive impairments provoked by chronic early-life stress involve excessive activation of CRH receptors[J]. J Neurosci, 2010, 30(39): 13005-15.
- [4] Brunton P J. Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring[J]. Reproduction, 2013, 146(5): R175-89.
- [5] Liu R, Yang X D, Liao X M, et al. Early postnatal stress suppresses the developmental trajectory of hippocampal pyramidal neurons: the role of CRHR1[J]. Brain Struct Funct, 2016, 221

- (9): 4525–36.
- [6] Galesi F L, Ayanwuyi L O, Mijares M G, et al. Role of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis and corticotropin-releasing factor stress system on cue-induced relapse to alcohol seeking[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 788: 84–9.
- [7] Maras P M, Baram T Z. Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH[J]. *Trends Neurosci*, 2012, 35(5): 315–24.
- [8] Morales-Medina J C, Iannitti T, Freeman A, et al. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: The hippocampal pathway[J]. *Behav Brain Res*, 2017, 317: 562–75.
- [9] Gilbert P E, Brushfield A M. The role of the CA3 hippocampal subregion in spatial memory: a process oriented behavioral assessment[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009, 33(5): 774–81.
- [10] Child N D, Benarroch E E. mTOR: its role in the nervous system and involvement in neurologic disease[J]. *Neurology*, 2014, 83(17): 1562–72.
- [11] Li N, Lee B, Liu R J, et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists[J]. *Science*, 2010, 329(5994): 959–64.
- [12] Chen Y, Dube C M, Rice C J, 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.
- [13] Erhardt A, Muller M B, Rodel A, et al. Consequences of chronic social stress on behaviour and vasopressin gene expression in the PVN of DBA/2OlaHsd mice – influence of treatment with the CRHR1-antagonist R121919/NBI 30775[J]. *J Psychopharmacol*, 2009, 23(1): 31–9.

## CRH mediate chronic pregnancy stress inducing depression in offspring male mice

Kuang Liang, Lü Yili, Han Zhenmin, et al

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

**Abstract Objective** To explore whether the corticotropin-releasing hormone (CRH) mediate offspring depression induced by chronic pregnancy stress and the possible mechanism. **Methods** Male offspring were randomly divided into the control group (Control group), the chronic prenatal stress group (CPS group), and the chronic prenatal stress + CRHR1 antagonist group (CPS + ANT group). Offspring male mice depression was investigated by the open field test, sucrose preference test, and forced swimming test, and the light microscope was used to examine the histopathologic changes in CA3 field of the hippocampus. In addition, Western blot was used to observe the expression of mTOR in hippocampus. Furthermore, ELISA was used to examine the hippocampus levels of CRH in the offspring mice. **Results** The CPS group offspring mice had less motion time compared with the Control group ( $P < 0.05$ ). The sugar preference rate was decreased in the sugar preference test ( $P < 0.05$ ). In the open field test, the distance, the mean speed, the number of line crossings and the number of standing times were decreased ( $P < 0.05$ ) and the neuropathological changes were characterized by the soma condensation, loosed neurons, decreased neuron number, nuclear pyknosis in the CA3 field of hippocampus. Moreover, the expression of mTOR were decreased in hippocampus and the hippocampus CRH concentration were increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the CPS group, the offspring mice had more motion time in CPS + ANT group ( $P < 0.05$ ). The sugar preference rate was increased in the sugar preference test ( $P < 0.05$ ). In the open field test, the distance, the mean speed, the number of line crossings and the number of standing times were increased ( $P < 0.05$ ), and the neuropathological changes were characterized by the increased neuron number, decreased number of damaged neuron in the CA3 field of hippocampus. The expression of mTOR were increased in hippocampus, and the hippocampus CRH concentration were decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** CRH mediates offspring depression induced by chronic pregnancy stress, which may be related to chronic pregnancy stress increasing the level of CRH in offspring hippocampus, decreasing the mTOR protein expression and resulting in the neuron injury in the CA3 field of hippocampus.

**Key words** chronic pregnancy stress; corticotropin-releasing hormone; CRHR1 antagonists; depression