

## ◇预防医学研究◇

## 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

唐伟,王正玉,程娟,韩振敏,姚余有

**摘要** 目的 探讨产前应激是否进一步加剧慢性应激所致的6月龄雄性APPswe/PS1dE9子鼠学习记忆损伤及其可能机制。方法 以APPswe/PS1dE9双转基因小鼠为研究对象,实验分为产前慢性应激-子代慢性应激组(TT组)、产前慢性应激-子代正常处理组(TC组)、产前正常处理-子代慢性应激组(CT组)和产前正常处理-子代正常处理组(CC组)。应用Morris水迷宫检测子代小鼠的空间学习、记忆能力。通过HE染色观察小鼠海马CA3区神经元的病理组织形态。采用Congo red染色检查小鼠脑组织的淀粉样斑块,采用Western blot法检测小鼠海马组织淀粉样前体蛋白(APP)、淀粉样前体蛋白β位点分裂酶1(BACE1)和β-淀粉样蛋白1-42(Aβ<sub>42</sub>)的表达量。运用ELISA法检测血清皮质酮含量。结果 与CC组相比,CT组小鼠的逃避潜伏期

和游泳距离延长( $P < 0.05$ )。平台象限游泳时间和穿越平台次数减少( $P < 0.05$ )。海马CA3区损伤的神经元数目明显增加( $P < 0.05$ ),排列疏松紊乱,脱失现象明显,核固缩、浓染;脑组织淀粉样斑块数目增多;海马组织APP、BACE1和Aβ<sub>42</sub>的表达量升高( $P < 0.05$ );血清皮质酮浓度升高( $P < 0.05$ )。与CT组相比,TT组小鼠的逃避潜伏期和游泳距离进一步延长( $P < 0.05$ )。平台象限游泳时间和穿越平台次数进一步减少( $P < 0.05$ )。脑组织淀粉样斑块和海马CA3区损伤的神经元数目进一步增加( $P < 0.05$ )。海马组织APP、BACE1和Aβ<sub>42</sub>的表达量和血清皮质酮浓度进一步升高( $P < 0.05$ )。结论 产前应激进一步加剧慢性应激所致的子鼠学习记忆损伤,其机制可能与其升高小鼠血清皮质酮水平,促进APP和BACE1表达,进而增加Aβ<sub>42</sub>的生成,最终引起海马CA3区神经元损伤有关。

**关键词** 产前应激;慢性应激;皮质酮;淀粉样前体蛋白;学习记忆

**中图分类号** R 338.64

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2015)04-0466-06

慢性应激会导致下丘脑-垂体-肾上腺轴的过度激活和功能紊乱,损害大脑的认知功能<sup>[1]</sup>。海马

## The experimental study of immobilization of biotin on the titanium implant surface

Du Mingliang, Qian Haiyan, Wu Mingyue, et al

(Stomatologic Hospital & College, Anhui Medical University, Key Lab. of Oral Diseases  
Research of Anhui Province, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To covalently immobilize biotin on the surface of the titanium substrate by biotin-avidin technology. Eventually, the study provides new experimental methods for titanium implant surface grafting bioactive molecules. **Methods** The surface of the titanium substrate was treated by 3-aminopropylphosphonic acid (APP), and enabled them to obtain free amino groups, which reacted with carboxyl groups to form amide bond to immobilize the biotin-avidin system on the surface of titanium implant by carbodiimide (EDC)-mediated. **Results** The samples were characterized by environmental scanning electron microscopy, fourier transform infrared spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy and immunofluorescence, which demonstrated that biotin was successfully bonded to the titanium surface. **Conclusion** The biotin can be successfully immobilized on the surface of titanium implant with grafted amino groups through biotin-avidin technology. This study develops a new research approach and experimental foundation of the biolization modification on the surface of titanium implant.

**Key words** titanium implant; 3-aminopropylphosphonic acid; biotin-avidin system; covalently bonding

和前额叶是最易因应激而损伤的脑区，与学习记忆密切相关<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>表明，慢性应激可导致实验动物学习记忆能力明显受损，出现老年痴呆样病理改变<sup>[4~7]</sup>。此外，实验<sup>[8~9]</sup>表明，产前慢性应激可致子代行为学和神经生物学上的改变。然而，目前极少有学者研究产前慢性应激联合子代慢性应激对子代学习记忆的影响。研究<sup>[10]</sup>显示产前慢性应激会显著增加雌性子代小鼠的抑郁和焦虑行为，对雄性子代则以学习记忆损伤为主。APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠是常用的老年痴呆小鼠模型，在 6~7 月龄时脑内由淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 经淀粉样前体蛋白  $\beta$  位点分裂酶 1 ( $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1, BACE1) 降解产生的  $\beta$ -淀粉样蛋白 1~42 (amyloid  $\beta$ -peptide protein, A $\beta$ <sub>42</sub>) 开始升高并逐渐出现淀粉样斑块。该研究拟用此双转基因小鼠，探讨产前慢性应激是否进一步恶化慢性应激所致的雄性子代小鼠的学习记忆损伤及其可能的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂和仪器** BACE1、A $\beta$ <sub>42</sub> 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司);  $\beta$ -actin 单克隆抗体 (德国 Santa Cruz 公司); APP 单克隆抗体、山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗、动物基因组 DNA 抽提试剂盒 (上海生物工程公司); Western blot 法化学发光检测试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司); 电泳仪、凝胶成像分析系统 (北京 Tanon 公司); 小鼠血清皮质酮酶联免疫试剂盒 (武汉华美公司); Morris 水迷宫图像采集及分析系统 (北京医学科学院药物研究所)。

**1.2 实验动物与分组** 实验的时间轴见图 1。SPF 级 Tg (APPswe, PSEN1dE9) 双转基因雄鼠 10 只及普通 C57bl/6 雌鼠 60 只，均为 10 周龄，30~40 g，购自南京大学模式动物研究中心。小鼠饲养遵循安徽医科大学生物医学伦理委员会的要求。室温 (23 ± 1) °C，相对湿度 50%，自由摄食饮水；正常饲养 7 d，使其适应周围环境。于晚 20:00 点雌雄 2:1 合笼，次日早上 08:00 检查阴栓，查到阴栓者取出单笼饲养，记为孕第 1 天 (G1)，并将孕鼠随机分为产前慢性应激组和产前正常处理组。产前慢性应激组正常饲养至孕第 7 天 (G7)，开始施加不可预测的慢性复合应激：夹尾 (距尾尖 2 cm 处，5 min)、束缚 (50 ml 带多个小孔的离心管，2 h)、冰水游泳 (4~6 °C，5 min)、温水游泳 (28~35 °C，15 min)、夜相给亮 (12 h)、禁水 (24 h)、禁食 (24 h)

等 7 种应激方式。每天随机采用 1 种方法对小鼠进行应激刺激，每天 2 次 (最后 3 种应激方式除外)，持续至孕第 20 天 (G20)。产前正常处理组小鼠不接受应激，正常饲养。仔鼠于产后 21 d (P21) 断奶。雄性仔鼠于产后 25 d (P25) 剪取尾尖 (<5 mm) 组织采用 PCR 法进行基因鉴定<sup>[8]</sup>。雄性 APPswe/PS1dE9 子代小鼠分笼 (2 只/笼) 饲养。产后 180 d (P180) 将子代小鼠分为产前慢性应激 - 子代慢性应激组 (TT 组, n = 18)、产前慢性应激 - 子代正常处理组 (TC 组, n = 18)、产前正常处理 - 子代慢性应激组 (CT 组, n = 18) 和产前正常处理 - 子代正常处理组 (CC 组, n = 19)。TT 组和 CT 组小鼠接受 4 周如上所述的不可预测的慢性复合应激。

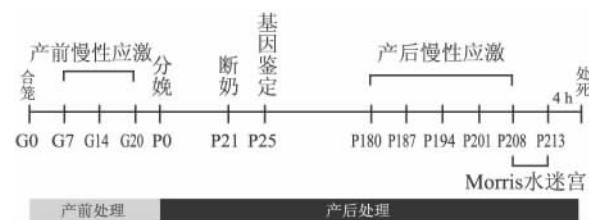


图 1 实验的时间轴

**1.3 学习记忆能力测试** 采用 Morris 水迷宫<sup>[11]</sup>。每组随机选取小鼠 [TT 组 (n = 8)、TC 组 (n = 8)、CT 组 (n = 8)、CC 组 (n = 9)] 做此实验，历时 5 d。前 4 d 进行定位航行实验，每天训练 4 次，每次依次从 4 个象限将小鼠面朝池壁上的入水点放入水中，观察小鼠登上平台所需时间 (逃避潜伏期)。每次训练的间隔为 15 min，记录逃避潜伏期、游泳距离和游泳速度。第 5 天，撤去平台，进行空间探索实验。记录小鼠 90 s 内的平台象限游泳时间和穿越平台次数。

**1.4 HE 染色观察病理改变** 应激结束后，颈椎脱臼法处死小鼠，冰上取脑。右侧脑组织经 4% 多聚甲醛固定、脱水、包埋后，于前囱后 3 mm 作冠状切片 (6 μm)。每个小鼠脑组织样本取 2 张切片进行 HE 染色，光学显微镜下观察海马组织形态学变化并拍照，之后用 Image-Pro Plus Image 分析软件计数海马 CA3 区神经元总数和异常神经元数。每组观察 3 只小鼠切片并取平均值。

**1.5 Congo red 染色法检测淀粉样斑块** 切片脱蜡至水后，直接浸入 Congo red 染色液 25 min，水洗，0.2% 碱性乙醇溶液分化数秒，充分水洗；苏木精液染色 1 min，水洗，1% 盐酸乙醇溶液分化数秒，

经充分水洗并用 0.25% 氨水溶液返蓝后，梯度乙醇溶液脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，光镜下观察淀粉样斑块并拍照。

**1.6 Western blot 法检测海马组织 APP、BACE1 和 A<sub>β</sub><sub>42</sub> 的表达量** 常规提取海马组织蛋白<sup>[11]</sup>，经 Lowery 法测定蛋白浓度后定量，98 ℃ 变性 5 min。灌制 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (A<sub>β</sub><sub>42</sub> 的检测配制 10~20% 的梯度 Tricine-聚丙烯酰胺凝胶)；每孔上样 30 μg；电泳 (65 V/30 min, 120 V/90 min)；然后，200 mA/100 min (A<sub>β</sub><sub>42</sub> 120 mA/30 min) 将凝胶中蛋白转移至 PVDF 膜上；以 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h；加一抗，于 4 ℃ 过夜；洗膜，加相应二抗，室温孵育 1 h；洗膜，滴加化学发光试剂，最后用凝胶成像分析系统分析各免疫印迹条带的光密度值 (optical density, OD)。实验中所使用的抗体及其稀释浓度：β-actin (鼠单抗, 1:800)、APP (兔多抗, 1:4 000)、BACE1 (兔多抗, 1:800)、A<sub>β</sub><sub>42</sub> (兔多抗, 1:1 000)、二抗 (羊抗鼠, 1:15 000；羊抗兔, 1:80 000)。

**1.7 ELISA 法检测血清皮质酮水平** 应激结束后 4 h，对未进行水迷宫实验的小鼠每组各取 10 只，眼球取血，分离血清，按照 ELISA 试剂盒的说明书进行血清皮质酮水平的检测。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS 15.0 软件进行分析，数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。水迷宫实验小鼠体重、逃避潜伏期和游泳距离的结果采用重复测量方差分析，其余

结果均采用单因素方差分析，组间比较采用 Bonferroni-t 检验。

## 2 结果

**2.1 产前慢性应激进一步加剧子代慢性应激所致的子鼠学习记忆能力损伤 体重监测显示在最后 1 周训练结束时，TT 组小鼠较 TC 组和 CC 组体重减低 ( $P < 0.05$ )，CT 组小鼠较 TC 组和 CC 组体重也减低 ( $P < 0.05$ )。水迷宫试验结果表明，随实验天数增加，4 组小鼠的逃避潜伏期均明显缩短 ( $F = 90.299, P < 0.05$ )，游泳距离明显缩短 ( $F = 80.531, P < 0.05$ )，表明通过训练小鼠已逐渐学会寻找平台，并对平台的空间定位产生记忆能力。与 CC 组相比，CT 组小鼠的逃避潜伏期和游泳距离延长 ( $P < 0.05$ )，平台象限游泳时间和穿越平台次数减少 ( $P < 0.05$ )，游泳速度差异无统计学意义。TT 组较 CT 组小鼠的逃避潜伏期和游泳距离进一步延长 ( $P < 0.05$ )，平台象限游泳时间和穿越平台次数进一步减少 ( $P < 0.05$ )。见图 2。**

**2.2 产前慢性应激进一步加剧子代慢性应激所致的子鼠海马 CA3 区神经元损伤 CC 组和 TC 组小鼠海马 CA3 区锥体细胞层神经元染色清晰，数量较多，排列整齐紧密，呈锥体状、圆球状，细胞核呈圆形，核仁明显；CT 组和 TT 组神经元排列疏松紊乱，数量较少，细胞体略小，细胞核浓染、固缩。见图 3。用 Image-Pro Plus Image 分析软件计数海马**

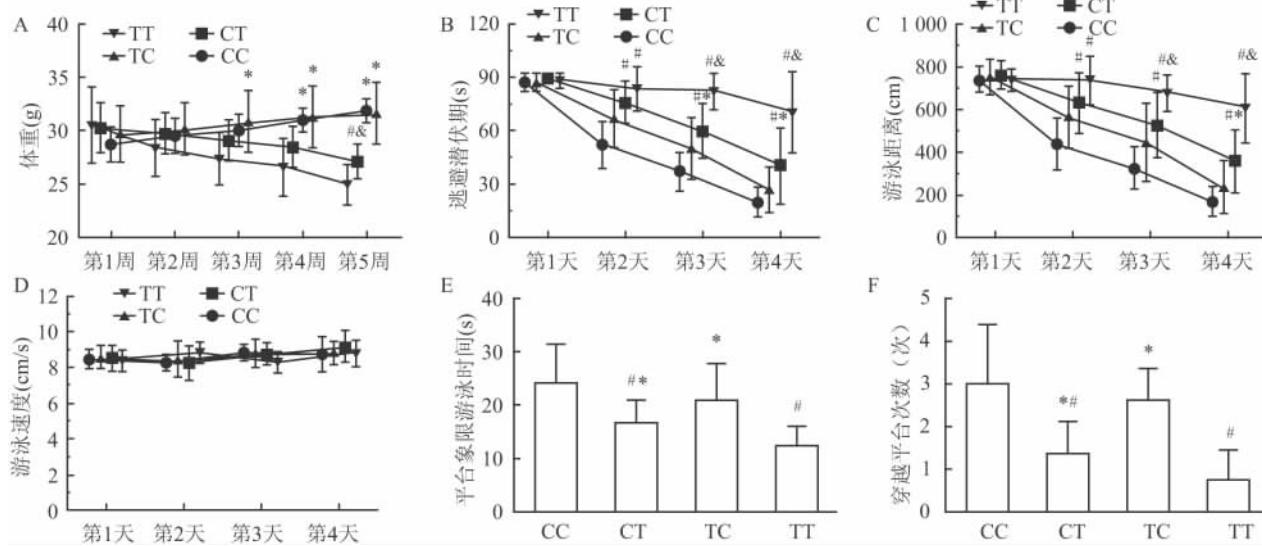


图 2 Morris 水迷宫产前慢性应激加剧 6 月龄雄性子代小鼠因慢性应激所致的学习记忆损伤

A: 体重监测；B: 定位航行实验中逃避潜伏期的比较；C: 定位航行实验中游泳距离的比较；D: 定位航行实验中游泳速度的比较；E: 空间探索实验中平台象限游泳时间的比较；F: 空间探索实验中穿越平台次数的比较；与 TT 组比较：<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ；与 CC 组比较：<sup>#</sup>  $P < 0.05$ ；与 TC 组比较：<sup>¶</sup>  $P < 0.05$

CA3 区神经元总数和异常神经元数目 ,结果显示与 CT 组 ( $101.33 \pm 7.62$ )、TC 组 ( $113.2 \pm 8.25$ ) 和 CC 组 ( $116.2 \pm 8.74$ ) 比较 ,TT 组 ( $96.83 \pm 8.16$ ) 小鼠海马 CA3 区神经元总数明显减少 ;与 CT 组 ( $17.50 \pm 2.69$ )、TC 组 ( $8.67 \pm 1.63$ )、CC 组 ( $7.33 \pm 1.03$ ) 比较 ,TT 组 ( $21.50 \pm 2.07$ ) 核固缩、浓染等退行性改变的异常神经元数明显增加 ,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

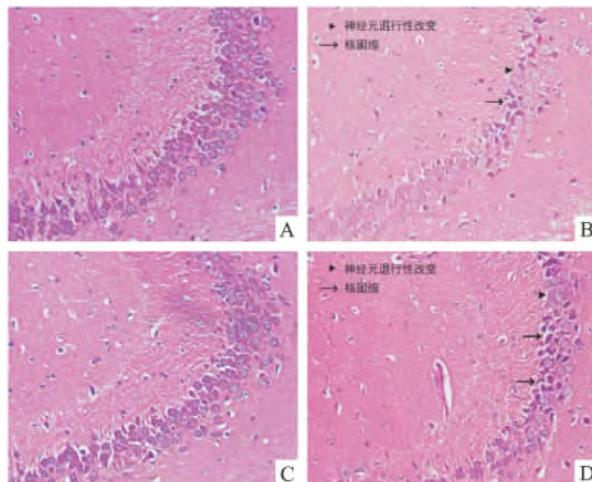


图3 产前慢性应激加剧 6月龄雄性子代小鼠因慢性应激所致的海马 CA3 区神经元损伤 HE  $\times 400$   
A: CC 组; B: CT 组; C: TC 组; D: TT 组

**2.3 产前慢性应激进一步加剧子代慢性应激所致的子鼠淀粉样斑块沉积** 4 组小鼠的前额叶皮质均有观察到明显的橘红色  $A\beta_{42}$  沉积 (箭头所指) , 形状不规则 , 呈斑块状 , 大小不一。TT 组小鼠的前额叶皮质的淀粉样斑块数量明显多于 CT 组、TC 组和 CC 组。见图 4。然而 4 组小鼠的海马组织中淀粉样斑块数量稀少 , 只在 CT 组和 TT 组的个别切片上观察到。见图 5。

**2.4 产前慢性应激进一步加剧子代慢性应激所致的子鼠海马 APP、BACE1 和  $A\beta_{42}$  表达** 子代慢性应激可增加海马组织 APP、BACE1 和  $A\beta_{42}$  的表达量 ( $F = 173.959, 114.965, 248.272, P < 0.05$ ) , 产前慢性应激也可增加海马组织 APP、BACE1 和  $A\beta_{42}$  的表达量 ( $F = 85.095, 17.146, 137.834, P < 0.05$ ) , 且对于 APP 和  $A\beta_{42}$  产前慢性应激和子代慢性应激存在交互效应 ( $F_{APP} = 12.829, F_{A\beta_{42}} = 16.424, P < 0.05$ )。与 CT 组相比 , TT 组小鼠海马组织的 APP 和  $A\beta_{42}$  更多表达 ( $P < 0.05$ ) ; 至于海马组织中 BACE1 的表达量 , 也有增多的趋势 , 但差异无统计学意义 ( $P = 0.055$ )。见图 6。

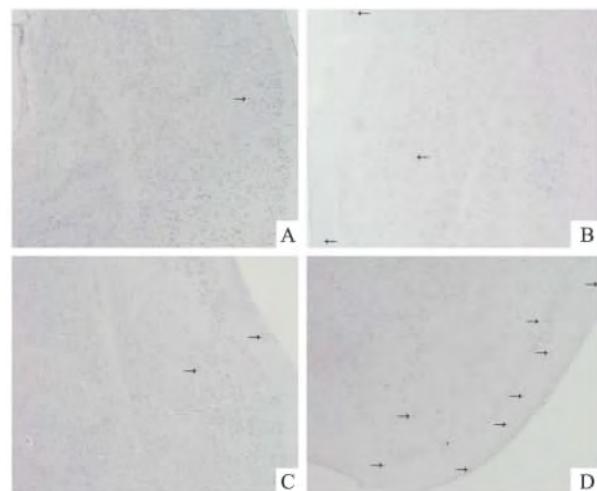


图4 产前慢性应激加剧 6月龄雄性子代小鼠因慢性应激所致的前额叶皮质淀粉样斑块沉积 Congo red  $\times 100$   
A: CC 组; B: CT 组; C: TC 组; D: TT 组

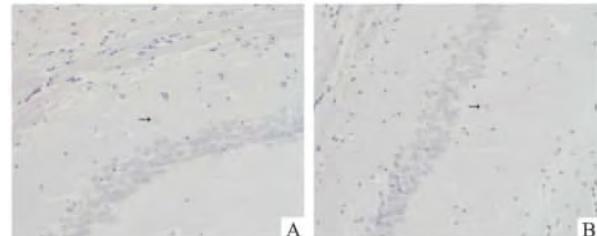


图5 产前慢性应激加剧 6月龄雄性子代小鼠因慢性应激所致的海马淀粉样斑块沉积 Congo red  $\times 400$   
A: CT 组; B: TT 组

**2.5 产前慢性应激进一步加剧子代慢性应激所致的子鼠血清皮质酮水平升高** 子代慢性应激可增加血清皮质酮水平 ( $F = 67.332, P < 0.05$ ) , 产前慢性应激也可增加血清皮质酮水平 ( $F = 10.840, P < 0.05$ ) , 且 TT 组小鼠较 CT 组有更高的血清皮质酮水平 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

当今社会竞争激烈 , 孕妇和其子代都有可能暴露于慢性应激环境中 , 故产前慢性应激对成年子代遭遇慢性应激所致的认知功能改变会产生怎样的影响就成了一个有意义且实际的问题 , 其机制更是值得探讨。本研究 Morris 水迷宫结果显示 CT 组子代小鼠较 CC 组逃避潜伏期和游泳距离延长 , 平台象限游泳时间和穿越平台次数减少 ; TT 组较 CT 组的逃避潜伏期和游泳距离进一步延长 , 平台象限游泳时间和穿越平台次数进一步减少 ; 说明产前慢性应激可加剧雄性子代小鼠因慢性应激所致的学习记忆

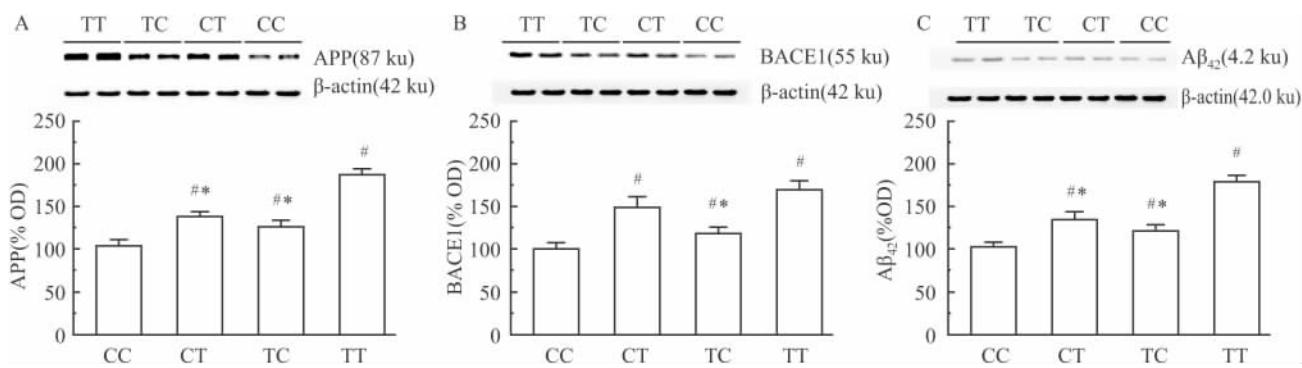


图 6 产前慢性应激加剧 6 月龄雄性子代小鼠因慢性应激所致的海马 APP、BACE1 和 A $\beta$ <sub>42</sub> 表达

A: APP; B: BACE1; C: A $\beta$ <sub>42</sub>; 与 TT 组比较: \* P < 0.05; 与 CC 组比较: #P < 0.05

损伤。

海马是应激反应的靶部位,其 CA3 区与精确空间学习记忆的形成密切相关<sup>[12]</sup>;因此,该区域神经元数量、形态结构和功能的改变必然会导致学习记忆能力的变化。本研究病理形态学结果显示,CT 组子代小鼠较 CC 组海马 CA3 区神经元总数明显减少,核固缩、浓染等退行性改变的异常神经元明显增多;TT 组小鼠较 CT 组海马 CA3 区神经元总数进一步减少,异常神经元数进一步增加,提示产前慢性应激可加剧慢性应激所致的雄性子代小鼠海马 CA3 区神经元损伤,可能是 TT 组学习记忆能力下降的重要原因之一。

A $\beta$ <sub>42</sub> 容易聚集,是大脑组织中淀粉样斑块的主要组份<sup>[13]</sup>。研究<sup>[14]</sup>显示 A $\beta$ <sub>42</sub> 能降低细胞膜的流动性,导致炎症反应和氧化应激,因而具有较强的细胞毒性和促凋亡作用。本研究提示产前慢性应激加剧慢性应激所致的雄性子代小鼠海马 CA3 区神经元损伤,可能与其加剧子代小鼠海马组织 APP 和 BACE1 表达进而增加 A $\beta$ <sub>42</sub> 的生成有关。值得注意的是,在本实验中 4 组小鼠的前额叶皮质均有观察到明显的淀粉样斑块沉积(TT 组数量明显多于另外 3 组),而海马组织中淀粉样斑块数量稀少(只在 CT 组和 TT 组的个别切片上观察到),这可能有 3 个方面的原因:① 小鼠只有 6 月龄,斑块的产生很少;② 样本量有限;③ 前额叶皮质的分化相对较晚<sup>[15]</sup>,因而其神经元可能会在本实验进行的产前慢性应激期内受损。

研究<sup>[16~17]</sup>表明,在 APP 和 BACE1 的启动子区含有多个糖皮质激素反应元件。本研究结果显示,TT 组小鼠较其余 3 组有更高的血清皮质酮水平,提示产前慢性应激加剧子代海马组织 APP 和 BACE1 表达可能与其提高子代血清皮质酮水平,进

而作用于 APP 和 BACE1 启动子区的糖皮质激素反应元件有关。但确切机理还有待于进一步研究。

综上所述,产前慢性应激可加剧 6 月龄雄性 APPswe/PS1dE9 子代小鼠因慢性应激所致的学习记忆损伤,这可能与其进一步提高子代血清皮质酮水平,促进 APP 和 BACE1 表达,进而增加 A $\beta$ <sub>42</sub> 生成,最终引起海马 CA3 区神经元损伤有关。

## 参考文献

- [1] McEwen B S. Central effects of stress hormones in health and disease, understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 583 (2~3): 174~85.
- [2] 李亚,陈亚静,史建勋,等.慢性应激对小鼠学习记忆功能影响及突触作用[J].中国公共卫生,2012,28(12):1602~4.
- [3] Arnsten A F. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function[J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(6): 410~22.
- [4] Carroll J C, Iba M, Bangasser D A, et al. Chronic stress exacerbates tau pathology, neurodegeneration, and cognitive performance through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism in a transgenic mouse model of tauopathy[J]. J Neurosci, 2011, 31(40):14436~49.
- [5] Cuadrado-Tejedor M, Ricobaraza A, Frechilla D, et al. Chronic mild stress accelerates the onset and progression of the Alzheimer's disease phenotype in Tg2576 mice[J]. J Alzheimers Dis, 2012, 28(3): 567~78.
- [6] Rothman S M, Herdener N, Camandola S, et al. 3xTgAD mice exhibit altered behavior and elevated A $\beta$  after chronic mild social stress[J]. Neurobiol Aging, 2012, 33(4): 830.e1~12.
- [7] Huang H J, Liang K C, Ke H C, et al. Long-term social isolation exacerbates the impairment of spatial working memory in APP/PS1 transgenic mice[J]. Brain Res, 2011(1371): 150~60.
- [8] Siersma A S, Prickaerts J, Chouliaras L, et al. Behavioral and neurobiological effects of prenatal stress exposure in male and fe-

- male APPswe/PS1dE9 mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2012, 34(1): 319–37.
- [9] Gutiérrez-Rojas C, Pascual R, Bustamante C. Prenatal stress alters the behavior and dendritic morphology of the medial orbitofrontal cortex in mouse offspring during lactation [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2013, 31(7): 505–11.
- [10] Glover V, Hill J. Sex differences in the programming effects of prenatal stress on psychopathology and stress responses: an evolutionary perspective [J]. *Physiol Behav*, 2012, 106(5): 736–40.
- [11] 程娟, 王涛涛, 唐伟, 等. 慢性复合应激致老年小鼠学习记忆损伤及机制研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(12): 1466–9.
- [12] 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.
- [13] Pimplikar S W. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(6): 1261–8.
- [14] Peters I, Igbavboa U, Schütt T, et al. The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788(5): 964–72.
- [15] Kostovic I, Judas M, Petanjek Z, et al. Ontogenesis of goal-directed behavior: anatomo-functional considerations [J]. *Int J Psychophysiol*, 1995, 19(2): 85–102.
- [16] Green K N, Billings L M, Rozendaal B, et al. Glucocorticoids increase amyloid- $\beta$  and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(35): 9047–56.
- [17] Sambamurti K, Kinsey R, Maloney B, et al. Gene structure and organization of the human  $\beta$ -secretase (BACE) promoter [J]. *FASEB J*, 2004, 18(9): 1034–6.

## Chronic prenatal stress exacerbates learning and memory impairments in adult male APPswe/PS1dE9 offspring mice who also suffer chronic stress

Tang Wei, Wang Zhengyu, Cheng Juan, et al

(School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To determine whether chronic prenatal stress could exacerbate learning and memory impairments in 6-month-old male APPswe/PS1dE9 offspring mice who also suffer chronic stress, and if so, what the underlying mechanism is. **Methods** There were four groups: the prenatal control-offspring control group (CC group), the prenatal control-chronic offspring stress group (CT group), the chronic prenatal stress-offspring control group (TC group), and the chronic prenatal stress-chronic offspring stress group (TT group). Morris water maze was used to investigate learning and memory impairments in mice, and the histopathologic changes in CA3 field of the hippocampus (HE stain and Congo red stain) in hippocampus were examined under a light microscope. Furthermore, western blot was used to observe the expression levels of amyloid precursor protein (APP),  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) and amyloid- $\beta$  protein ( $A\beta_{42}$ ) in hippocampus. Additionally, we also used ELISA to examine the serum levels of corticosterone in the offspring mice. **Results** Compared with the CC group, the results showed that CT group mice had more escape latency and swimming distance ( $P < 0.05$ ), less number of crossing the platform site and swimming time in the quadrant of the platform ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the neuropathological changes were characterized by the disintegrated pyramidal layered structure, decreased neuron number, worse cell morphology, soma condensation, nuclear pyknosis in the CA3 field of hippocampus in the CT group ( $P < 0.05$ ). Moreover, the expression of APP, BACE1 and  $A\beta_{42}$  in hippocampus were increased, as well as the serum corticosterone concentration in the CT group ( $P < 0.05$ ). Noteworthy, the learning and memory impairments and neuropathological changes stated above were worse in TT group mice compared to CT group mice ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Chronic stress could exacerbate learning and memory impairments in 6-month-old male APPswe/PS1dE9 offspring mice who also suffer chronic stress, which may be related to chronic prenatal stress potentiate the production of  $A\beta_{42}$  mediated by glucocorticoids through increasing expression of APP and BACE1 gene.

**Key words** prenatal stress; chronic stress; corticosterone; amyloid precursor protein; learning and memory