

网络出版时间: 2022-11-29 09:44 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20221128.1716.017.html>

妊娠期慢性应激致子代小鼠杏仁核神经元损伤和抑郁样行为

刘锐¹, 屠心茹¹, 陶龙¹, 徐家雯¹, 江瑞¹, 姚余有^{1,2}

摘要 目的 探究妊娠期慢性应激对仔鼠青春期抑郁样行为影响的性别差异,以及杏仁核是否参与介导仔鼠抑郁样行为及其可能机制。方法 采用 C57BL/6J 小鼠,雌雄合笼,将孕鼠随机分为正常对照(CON)组和妊娠期慢性应激(CPS)组,孕鼠分娩当天为产后第0天(PND0),将CON组和CPS组的仔鼠进一步分成雌性(Female)组、雄性(Male)组。在PND35,开始测试仔鼠抑郁样行为, Golgi-Cox 染色观察基底外侧杏仁核(BLA)锥体神经元形态, TUNEL 检测 BLA 神经元凋亡情况, ELISA 检测仔鼠血清促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)含量, Western blot 技术检测杏仁核哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和磷酸化 mTOR [p-mTOR(Ser2448)] 表达水平。结果 妊娠期慢性应激导致仔鼠出现抑郁样行为,其与性别间存在交互作用。在强迫游泳实验中, CPS 组子代雌鼠、雄鼠的不动时间均增加($P < 0.05$, $P < 0.001$),且雄鼠较雌鼠表现出更为严重的绝望行为($P < 0.05$),糖水偏好测试中,相较于CON组, CPS 组的子代雌鼠糖水偏好率降低

($P < 0.05$),子代雄鼠也有下降的趋势,但差异无统计学意义。相较于CON组, CPS 组的雌性和雄性仔鼠 BLA 区域的神经元树突分支密度降低($P < 0.01$)、神经元凋亡程度增加($P < 0.001$), CPS 组的雌雄仔鼠的杏仁核 p-mTOR 表达水平均显著降低($P < 0.001$)。妊娠期慢性应激导致仔鼠血清 CRH 含量升高($P < 0.001$),且 CPS 组雌性仔鼠的血清 CRH 水平高于雄性仔鼠($P < 0.05$)。结论 妊娠期慢性应激导致子代青春期小鼠出现抑郁样行为并存在性别差异,且妊娠期慢性应激导致仔鼠 BLA 神经元的树突萎缩和凋亡,其作用机制可能是仔鼠杏仁核 m-TOR 的激活受到抑制, CRH 可能参与介导妊娠期慢性应激致仔鼠抑郁样行为的性别差异和 BLA 神经元损伤。

关键词 妊娠期慢性应激; 青春期抑郁; 杏仁核; 性别差异; p-mTOR; CRH

中图分类号 R 749.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)12-1947-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.017

2022-08-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81773452)

作者单位: ¹安徽医科大学公共卫生学院卫生检验与检疫学系, 合肥 230032

²人口健康与优生安徽省重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 刘锐, 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

青少年抑郁具有高复发率和高自杀率, 现已成为严重的全球公共卫生问题^[1]。产前应激会影响胎儿的神经发育, 儿童在出生后患有抑郁等精神障碍的风险增加^[2]。研究^[3]表明, 抑郁的发生与杏仁核、海马等的神经元结构和功能异常有关, 课题组前期研究^[4]表明, 妊娠期慢性应激诱导子代雄鼠抑郁

increased in the Glivec + Gap27 group compared to the Glivec and Gap27 groups ($P < 0.01$). *In vitro* muscle strip experiments revealed that the frequency and tone of bladder muscle strip contractions were lower in the experimental group compared to the blank control group ($P < 0.05$), and that muscle strip contractions were weaker in the experimental group after administration of acetylcholine (ACH) compared to the control group ($P < 0.05$). Immunofluorescence showed that c-Kit was co-expressed with Cx43 on ICCs cells. qRT-PCR and Western blot suggested that the protein expression level and gene expression level of Cx43 in bladder tissues were lower after inhibition of c-Kit than in the blank control ($P < 0.05$); after inhibition of Cx43, the protein expression level and gene expression level of c-Kit in bladder tissues the levels of c-Kit protein expression and gene expression in bladder tissues were lower than those in the blank control group ($P < 0.05$). Electron microscopy revealed that the mitochondrial structure of bladder smooth muscle was disrupted after simultaneous inhibition of c-Kit and Cx43. **Conclusion** Cx43 is expressed on bladder ICCs and the two may be jointly involved in regulating bladder contractile function; the joint reduction of Cx43 and c-Kit may have disrupted the mitochondria of bladder smooth muscle, affecting its function and consequently bladder contractile function.

Key words detrusor underactivity; interstitial cells of Cajal; connexin 43; ultrastructure; guinea pigs

并伴有海马病理改变,但仔鼠的抑郁样行为是否存在性别差异还有待进一步研究,妊娠期慢性应激是否诱导仔鼠杏仁核神经元损伤及其机制尚不清楚。研究^[5]表明,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号的抑制可以介导应激所致的大脑神经树突重塑。因此,该研究建立妊娠期慢性应激(chronic pregnancy stress, CPS)模型,行为学实验测试子代雌雄小鼠青春期的抑郁情况,探究CPS对青春期仔鼠抑郁样行为的影响是否存在性别差异,并观测杏仁核区域神经元的树突结构、凋亡情况和相关蛋白表达水平;探究CPS对杏仁核神经元的影响及杏仁核是否介导妊娠期慢性应激致仔鼠青春期抑郁样行为及其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 主要仪器 行为学图像采集及分析系统(上海欣软信息科技有限公司); Vibroslice 振动切片机(美国Neuralynx公司); 正置荧光显微镜(德国Leica仪器公司); Western blot 仪器(北京Tanon公司); Centrifuge5424R 冷冻离心机(德国Eppendorf公司); EXL 全自动酶标仪(美国BD公司)。

1.1.2 主要试剂 Anti-mTOR、Anti-p-mTOR(上海Abmart生物医药公司); 酶联免疫(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技公司); Anti- β -actin(美国Santa Cruz公司); 山羊抗鼠IgG抗体、山羊抗兔IgG抗体(北京中杉金桥生物技术公司); BCA试剂盒(上海碧云天生物公司); TUNEL试剂盒(上海Roche公司); Golgi-Cox 染液(FD NeuroTech, 上海瓦兰生物科技公司)。

1.2 实验动物及分组

1.2.1 实验动物 C57BL/6J小鼠购自常州卡文斯实验动物公司,动物饲养严格按照安徽医科大学生物医学伦理委员会要求,光/暗周期为12 h/12 h,室温为(24 ± 1) °C,相对湿度为50%,小鼠可自由进食和饮水。

1.2.2 实验分组 8周龄C57BL/6J小鼠,于晚上8点,雌雄比例为2:1进行合笼,次日早晨8点检查雌鼠阴栓,将查到阴栓的孕鼠标记后单笼饲养,记录为妊娠第0天[(gestation day, GD) 0]。将孕鼠随机分为妊娠期正常对照组(CON组)和妊娠期慢性应激组(CPS组),CPS组在GD7开始慢性不可预测性应激,CON组除日常饲养操作外不受任何干扰。孕鼠分娩当天为产后第0天[(post-natal day, PND)

0],仔鼠在PND21断奶,从每窝随机抽取不同性别仔鼠2~3只,做好标记后按性别分笼饲养,避免潜在的窝别效应。CON组和CPS组的仔鼠分为雄性(Male)组和雌性(Female)组。

1.3 CPS方案 此方案参考以往的妊娠期应激模型^[6]并结合实验情况做了适当修改。CPS组孕鼠在GD7开始实施慢性不可预测性应激至GD20,应激方式如下:夹尾(5 min)、禁水(24 h)、禁食(24 h)、冰水游泳(水温4~6 °C, 5 min)、温水游泳(水温25 °C ± 1 °C, 15 min)、昼夜颠倒(12 h/12 h)、束缚(2 h)。每天随机抽取并施加一种应激方式(与前1天相同则重新抽取),避免禁食和禁水连续施加。

1.4 仔鼠行为学测试 行为学实验在PND35正式开始,从每组中随机选择10只仔鼠开展实验,每次行为学实验间隔24 h,以免连续行为测试对小鼠产生应激效应。

1.4.1 强迫游泳测试(forced swimming test, FST) 实验第1天为适应训练,将小鼠置于直径10 cm,水深18 cm,水温(24 ± 1) °C的透明塑胶桶内游泳15 min,实验第2天,将小鼠置于相同条件的桶中游泳,记录6 min内小鼠在后4 min中的不动(小鼠在水中停止挣扎呈漂浮状态,仅有细小的肢体运动以保持头部浮在水面)时间总和。

1.4.2 糖水偏好测试(sucrose preference test, SPT)

正式实验开始前,对小鼠进行72 h的蔗糖饮水适应性训练,在笼内放置1%蔗糖水与纯水各一瓶,此期间两瓶不定时调换位置,72 h后禁食禁水24 h。随后开始24 h的SPT:将2瓶体积(50 ml)相等的纯水和1%蔗糖水置于鼠笼内,24 h后,记录纯水与糖水消耗量,计算糖水偏好率: [糖水消耗量(g)/消耗纯水和糖水的总量(g)] × 100%。

1.5 Golgi-Cox染色观察基底外侧杏仁核(basolateral amygdala, BLA)锥体神经元形态 每组随机选择4只仔鼠,于冰上取左侧大脑置于Golgi-Cox染液中室温避光浸染7 d后再经30%蔗糖溶液浸渍增加韧性。在杏仁核位置上进行200 μm厚度切片,然后进行显色、透明、封片、干燥。显微镜(×200)拍摄相同位置切面的BLA完整锥体神经元不同焦距下的图片,经NeuronStudio软件合成后,用Image J软件对神经元树突分支进行重塑,使用Sholl Analysis对树突分支进行分析:以神经元胞体中心为圆心、20 μm为最小半径、200 μm为最大半径,每隔10 μm做同心圆,统计神经元树突分支与同心圆的交点数。

1.6 TUNEL 法检测 BLA 神经元凋亡情况 每组取 4 只仔鼠大脑,经石蜡包埋后制成切片,用二甲苯对切片进行脱蜡,在梯度乙醇中水化,PBS 清洗后用细胞通透液在室温下处理组织 10 min。PBS 清洗后滴加 TUNEL 反应工作液,37 °C 避光孵育 1 h,PBS 清洗后滴加 DAPI 染液复染,避光孵育 10 min 后滴加防荧光淬灭剂封片,荧光显微镜($\times 200$)拍摄 BLA 区域,计算凋亡细胞数与细胞总数的比值即凋亡指数(apoptotic index, AI)。

1.7 Western blot 技术检测杏仁核 mTOR 和磷酸化 mTOR(phosphorylated mTOR p-mTOR) (Ser2448) 表达水平 剖取仔鼠杏仁核组织,提取总蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度为 400 ng/ μ l。灌制 8% SDS-PAGE,上样电泳(55 V、60 min,110 V、80 min),转膜(220 mA、300 min),纯水洗膜,封闭(室温 2 h),再次纯水洗膜,一抗孵育(β -actin 鼠单抗,1:5 000,4 °C 过夜;mTOR 鼠单抗、p-mTOR 兔单抗,1:1 000,4 °C 48 h),TBST 洗膜,二抗孵育(β -actin、mTOR 羊抗鼠,p-mTOR 羊抗兔,1:5 000,室温 1.5 h),TBST 洗膜后进行 ECL 显色拍照,使用 Image J 软件测光密度,以 β -actin 为内参分析结果。

1.8 ELISA 法检测血清促肾上腺皮质激素释放激素(corticotrophin releasing hormone, CRH) 含量 小鼠眼球取血,室温静置 2 h,4 °C、3 000 r/min 离心 15 min,收集血清,严格按照试剂盒说明进行实验,用 OriginPro 9.1 软件对血清 CRH 浓度进行定量计算。

1.9 统计学处理 使用 SPSS 23.0 软件对数据进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用双因素方差分析(Two-way ANOVA)对行为学结果和血清 CRH 水平进行分析,当交互效应显著时,对单独效应进行最小

显著差异法(least significant difference, LSD) 事后分析,两组间的均数比较采用两独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CPS 对仔鼠抑郁样行为的影响

2.1.1 FST 结果 主效应分析显示,CPS($F = 33.259, P < 0.001$)对仔鼠强迫游泳不动时间有影响,性别($F = 2.240, P > 0.05$)无显著影响,两种因素对强迫游泳不动时间有交互效应($F = 5.031, P < 0.05$)。LSD 事后分析显示:雌鼠 CPS 组的强迫游泳不动时间长于 CON 组($P < 0.05$)。雄鼠 CPS 组相较于 CON 组的强迫游泳不动时间也 longer($P < 0.001$),CPS 组雄鼠比雌鼠的强迫游泳不动时间更长($P < 0.05$),CON 组的漂浮不动时间雌雄无差异。见图 1 A。

2.1.2 SPT 结果 双因素方差分析确定 CPS、性别两种因素对仔鼠糖水偏好的影响,主效应分析显示,CPS($F = 7.306, P < 0.05$)对糖水偏好率有影响,性别($F = 0.104, P > 0.05$)对糖水偏好率无显著影响,两因素对糖水偏好无交互作用($F = 0.930, P > 0.05$)。雌雄分别做两独立样本 t 检验,结果显示,在雌鼠中,CPS 组仔鼠的糖水偏好率低于 CON 组($t = 2.462, P < 0.05$),在雄鼠中,CPS 组与 CON 组的差异无统计学意义($t = 1.299, P > 0.05$)。见图 1 B。

2.2 CPS 对仔鼠 BLA 锥体神经元树突分支的影响 Golgi-Cox 染色结果显示,CPS 组的雌雄仔鼠 BLA 锥体神经元树突分支密度均低于 CON 组,见图 2 A ~ D 相较于 CON 组,雌雄 CPS 组距胞体中心 20 ~ 200 μ m 间的交点数下降,雌性 CPS 组和雄性 CPS 组完整神经元的交点总数均减少(Female: $t = 5.406,$

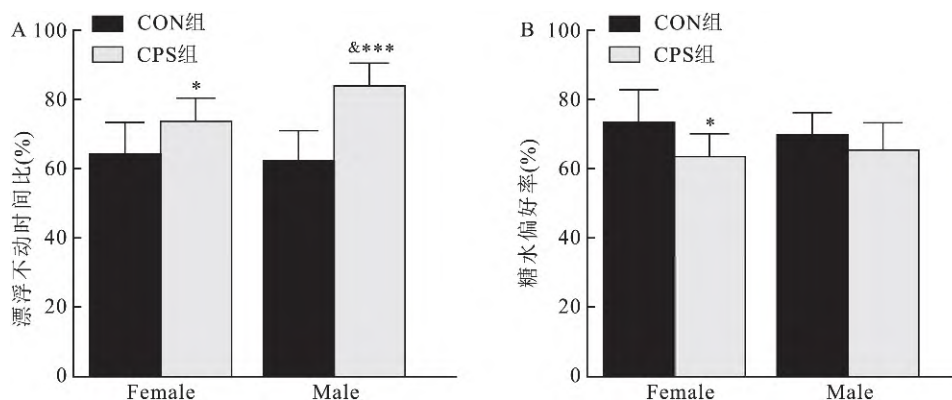


图 1 仔鼠抑郁样行为测试结果($n = 8$)

A: 仔鼠 FST 漂浮不动时间比; B: 仔鼠糖水偏好率; 与 CON 组相比: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与 Female CPS 组比较: & $P < 0.05$

$P < 0.01$; Male: $t = 4.226$ $P < 0.01$) ,见图 2E、F。

2.3 CPS 对仔鼠 BLA 神经元凋亡的影响 荧光显微镜($\times 200$)拍摄 BLA 区域 DAPI 和 TUNEL 染色的荧光图(DAPI 染色细胞核呈蓝色荧光,标记总细胞;TUNEL 染色断裂的 DNA 呈绿色荧光,标记正在凋亡的细胞),两种荧光图合成 MERGE 图片,见图 3A~D。与 CON 组相比,雌性仔鼠 CPS 组(0.1417 ± 0.0084)和雄性 CPS 组(0.1459 ± 0.0052)的凋亡指数均升高(Female: $t = 31.680$ $P < 0.001$, Male: $t = 54.728$ $P < 0.001$) ,见图 3E。

2.4 CPS 对仔鼠杏仁核 mTOR 和 p-mTOR (Ser2448) 表达的影响 Western blot 检测结果显示,相较于 CON 组,CPS 组的仔鼠杏仁核 mTOR 蛋白表达水平差异无统计学意义(Female: $t = 0.848$ $P > 0.05$; Male: $t = 0.256$ $P > 0.05$),p-mTOR 蛋白表达水平降低(Female: $t = 8.756$ $P < 0.001$; Male: $t = 15.485$ $P < 0.001$) ,见图 4。

2.5 CPS 对仔鼠血清 CRH 水平的影响 主效应分析显示,CPS 对仔鼠血清 CRH 有显著影响($F = 153.015$ $P < 0.001$) 相较于 CON 组,CPS 组的仔鼠

血清 CRH 水平升高(Female: $t = 10.26$ $P < 0.001$; Male: $t = 7.412$ $P < 0.001$)。性别对仔鼠血清 CRH 水平同样有显著影响($F = 8.322$ $P < 0.01$) ,CPS 组雌鼠血清 CRH 水平高于雄鼠($t = 2.262$ $P < 0.05$) ,CON 组雌雄血清 CRH 水平差异无统计学意义($t = 1.908$ $P > 0.05$)。两因素对血清 CRH 水平无交互效应($F = 0.055$ $P > 0.05$) ,见图 5。

3 讨论

动物反复暴露在相同的应激源下可能会适应性减少应对压力的激素分泌^[7],因此,该研究采取慢性不可预测性复合应激^[6]的方式建立了 CPS 模型。有研究^[8]报道,产前压力对男性和女性胎儿大脑的发育有不同程度的影响,在研究产前压力对子代抑郁的影响时,探究性别差异有着重要意义,故该研究同时探究了雌雄仔鼠在经历妊娠期慢性应激后的青春期抑郁样行为。FST 和 SPT 是测试小鼠抑郁样行为的经典方法,分别反应小鼠在逆境中的绝望程度和快感缺乏程度^[9]。实验结果显示,CPS 和性别对子代绝望行为都有显著影响,且两者间有显著

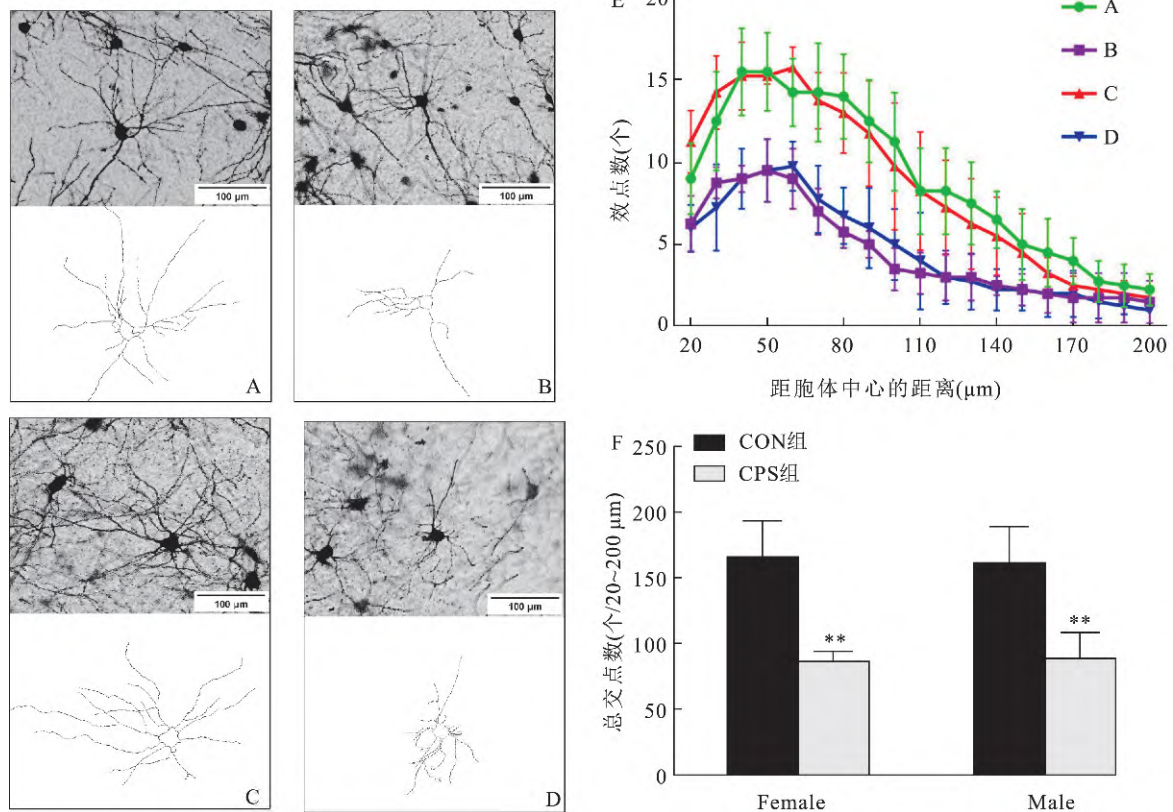


图 2 BLA 锥体神经元与树突分支重塑示意图及同心圆交点数 $\times 200$

A: Female CON 组; B: Female CPS 组; C: Male CON 组; D: Male CPS 组; E: 20 ~ 200 μm 半径同心圆交点数分布; F: Sholl 分析总交点数; 与 CON 组比较: ** $P < 0.01$

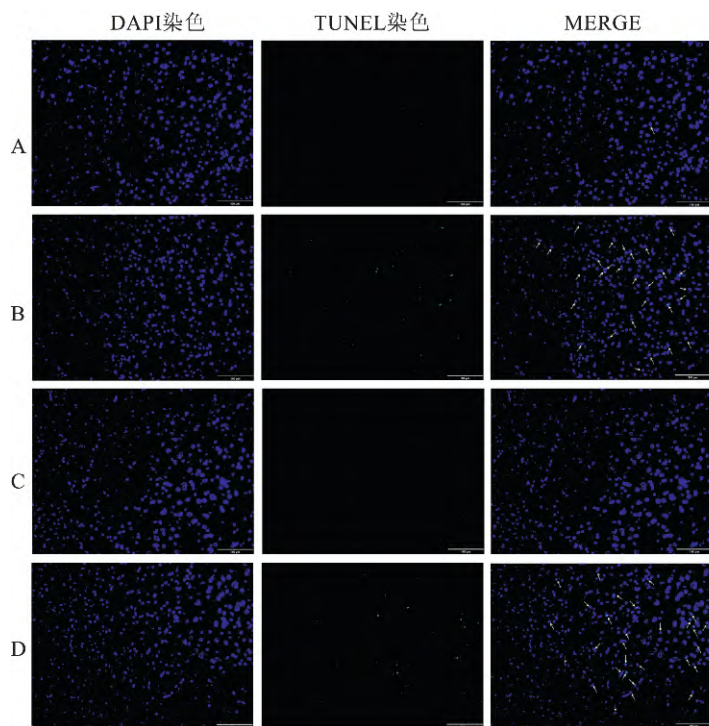


图3 BLA 神经元 DAPI、TUNEL 荧光染色和 MERGE 图片及 AI ×200

A: Female CON 组; B: Female CPS 组; C: Male CON 组; D: Male CPS 组; E: AI; 与 CON 组比较: *** $P < 0.001$; →: 指向凋亡细胞

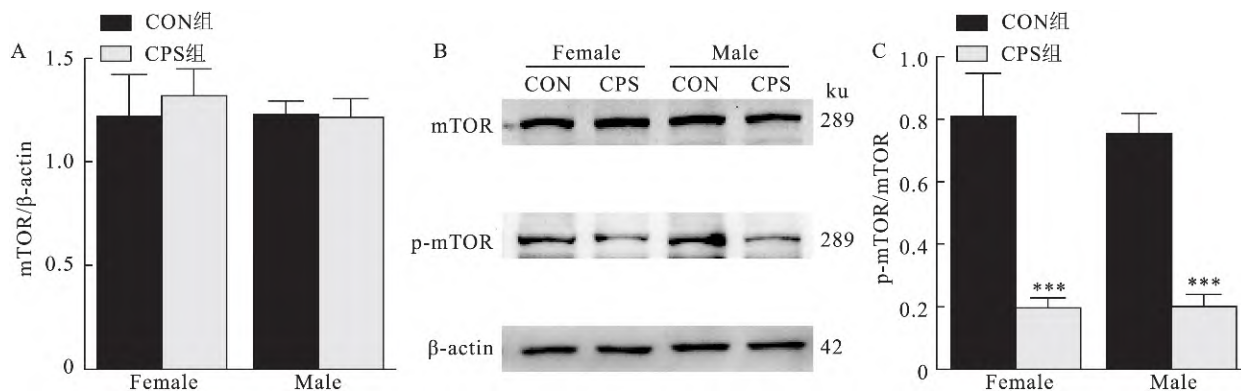


图4 mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达水平 (n=4)

A: mTOR 表达水平; B: Western blot 检测各组蛋白表达情况; C: p-mTOR 表达水平; 与 CON 组比较: *** $P < 0.001$

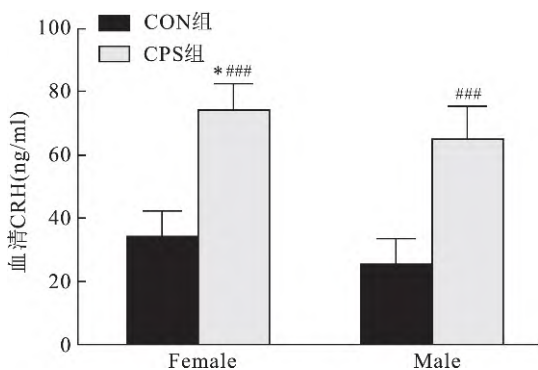


图5 仔鼠血清 CRH 水平 (n=6)

与 CON 组比较: *** $P < 0.001$; 与 Male CPS 组比较: * $P < 0.05$

交互效应,不管是雌鼠还是雄鼠,在经历 CPS 后,强

迫游泳的不动时间均显著增加,且 CPS 组雄鼠的强迫游泳时间较雌鼠更长,提示 CPS 可以导致仔鼠青春期抑郁样行为并有性别特异性作用。SPT 结果显示,CPS 对仔鼠糖水偏好有显著影响,雌鼠 CPS 组的糖水偏好率较 CON 组显著降低,反映经历 CPS 的子代雌鼠有明显的快感缺乏现象,进一步证实 CPS 可以导致子代雌鼠抑郁。但单独对雄鼠进行分析时,与 CON 组相比,CPS 组子代雄鼠的糖水偏好率有下降趋势,但差异无显著性,这与之前的实验结果不同^[4],提示 SPT 实验可能受动物品系和年龄的影响。

既往研究生命早期应激对子代杏仁核的影响更集中于利用功能磁共振成像 (fMRI) 技术观察杏仁

核与前额皮层等脑区回路之间的功能和结构连通性^[10] ,或者采用电生理学检测杏仁核的谷氨酸能和 GABA 能神经元活性^[11] 。近年研究^[12] 表明 ,前额叶、海马神经元的树突萎缩和棘突密度降低与应激诱导的抑郁等精神疾病有关 ,但妊娠期慢性应激是否引起杏仁核神经元的树突结构变化及其机制还有待进一步研究。有研究^[13] 表明 ,杏仁核不同亚区介导应激反应时有不同作用 ,BLA 是杏仁核接收并处理外来压力信息的主要区域 ,在调节应激反应的过程中发挥关键作用。因此 ,该研究采用对神经元有独特识别能力的 Golgi-Cox 染色法来观察 BLA 神经元的树突结构 ,结果显示 ,经历 CPS 的雌雄仔鼠的 BLA 锥体神经元树突分支密度和复杂性均显著降低 ,表现出树突萎缩 ,同时实验检测到 CPS 组仔鼠 BLA 区域的神经元凋亡 ,以上结果提示 BLA 神经元损伤与应激所致子代抑郁样行为有关。

mTOR 可以通过整合生长因子、能量状态等信号来调节代谢和蛋白质合成等过程 ,mTOR 通过磷酸化激活 ,参与调节神经元的存活和分化、突触可塑性等^[14] 。实验结果显示 ,经历 CPS 的子代小鼠 ,其杏仁核 p-mTOR 的表达水平显著降低 ,提示 CPS 抑制了仔鼠杏仁核 mTOR 通路的激活 ,导致 BLA 区域神经元存活和分化受限并出现凋亡 ,致使 BLA 神经元损伤。但实验未能观察到 mTOR 和 p-mTOR 在雌、雄子代间的差异化表达。

CRH 是一种由下丘脑室旁核合成和分泌的神经肽 ,参与 HPA 的应激调节 ,是情绪行为和认知记忆等的重要调节物质。有研究^[15] 表明 ,CRH 分泌紊乱与抑郁发生的有关 ,影响杏仁核等大脑部位的神经可塑性、连通性等。仔鼠血清 CRH 检测结果显示 ,CPS 导致血清 CRH 水平升高 ,且 CPS 雌性血清 CRH 水平高于雄性 ,以上结果提示 CRH 可能是介导应激反应性别差异性的重要因素^[16] ,其潜在的分子机制值得进一步研究。

综上所述 ,CPS 引起子代青春期小鼠出现抑郁样行为并存在性别差异 ,CRH 可能在介导抑郁样行为性别差异性中发挥作用 ,CPS 可能通过抑制 mTOR 信号的激活引起杏仁核神经元损伤导致子代青春期的抑郁样行为。

参考文献

[1] Rice F , Riglin L , Lomax T , et al. Adolescent and adult differ-

- ences in major depression symptom profiles [J]. *J Affect Disord* , 2019 243: 175 - 81.
- [2] Stoye D Q , Blesa M , Sullivan G , et al. Maternal cortisol is associated with neonatal amygdala microstructure and connectivity in a sexually dimorphic manner [J]. *Elife* , 2020 9: e60729.
- [3] Zhang F F , Peng W , Sweeney J A , et al. Brain structure alterations in depression: Psychoradiological evidence [J]. *CNS Neurosci Ther* , 2018 24(11) : 994 - 1003.
- [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] Luo Y F , Ye X X , Fang Y Z , et al. mTORC1 signaling pathway mediates chronic stress-induced synapse loss in the hippocampus [J]. *Front Pharmacol* , 2021 12: 801234.
- [6] Su W , Zhang Y , Chen Y , et al. NLRP3 gene knockout blocks NF- κ B and MAPK signaling pathway in CUMS-induced depression mouse model [J]. *Behav Brain Res* , 2017 322(Pt A) : 1 - 8.
- [7] Fitzgerald E , Parent C , Kee M , et al. Maternal distress and offspring neurodevelopment: challenges and opportunities for pre-clinical research models [J]. *Front Hum Neurosci* , 2021 15: 635304.
- [8] Sutherland S , Brunwasser S M. Sex differences in vulnerability to prenatal stress: a review of the recent literature [J]. *Curr Psychiatry Rep* , 2018 20(11) : 102.
- [9] Hao Y , Ge H , Sun M , et al. Selecting an appropriate animal model of depression [J]. *Int J Mol Sci* , 2019 20(19) : 4827.
- [10] Scheinost D , Sinha R , Cross S N , et al. Does prenatal stress alter the developing connectome? [J]. *Pediatr Res* , 2017 81(1 - 2) : 214 - 26.
- [11] Wang G , Zhu Z , Cui S , et al. Glucocorticoid induces incoordination between glutamatergic and GABAergic neurons in the amygdala [J]. *PLoS One* , 2016 11(11) : e0166535.
- [12] Chen F , Polsinelli B , Nava N , et al. Structural plasticity and molecular markers in hippocampus of male rats after acute stress [J]. *Neuroscience* , 2020 438: 100 - 15.
- [13] Guadagno A , Kang M S , Devenyi G A , et al. Reduced resting-state functional connectivity of the basolateral amygdala to the medial prefrontal cortex in preweaning rats exposed to chronic early-life stress [J]. *Brain Struct Funct* , 2018 223(8) : 3711 - 29.
- [14] Wang A , Zou X , Wu J , et al. Early-life stress alters synaptic plasticity and mTOR signaling: correlation with anxiety-like and cognition-related behavior [J]. *Front Genet* , 2020 11: 590068.
- [15] Rana T , Behl T , Sehgal A , et al. Exploring the role of neuropeptides in depression and anxiety [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* , 2022 114: 110478.
- [16] Bangasser D A , Wiersielis K R. Sex differences in stress responses: a critical role for corticotropin-releasing factor [J]. *Hormones (Athens)* , 2018 17(1) : 5 - 13.

Neuron injury of amygdala and depression – like behavior in offspring mice induced by chronic pregnancy stress

Liu Rui¹, Tu Xinru¹, Tao Long¹, Xu Jiawen¹, Jiang Rui¹, Yao Yuyou^{1,2}

(¹Dept of Hygiene Inspection and Quarantine, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Anhui Provincial Key Laboratory of Population Health and Eugenics, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the sex difference of the effects of chronic pregnancy stress on depression-like behavior in offspring adolescent mice and whether the amygdala is involved in mediating depression-like behavior and its possible mechanism. **Methods** Male and female of C57BL/6J mice were put in cage together. Pregnant mice were randomly divided into normal control group (CON group) and chronic pregnancy stress group (CPS group). The day of delivery was recorded as post-natal day (PND0). The offspring of different groups were divided into Female group and Male group according to sex, respectively. From PND35, the depressive-like behavior of offspring was monitored in different groups. Morphological structure of basolateral amygdala (BLA) cone neurone was observed by Golgi-Cox staining, and apoptosis of BLA neurone was detected by TUNEL. Serum corticotrophin-releasing hormone (CRH) was detected by ELISA. The level of protein associated with amygdala mammalian target of rapamycin (mTOR) and phosphorylated mammalian target of rapamycin [p-mTOR (Ser2448)] was detected by Western blot. **Results** Depression-like behavior was appeared in different sexual offspring by chronic pregnancy stress, and there was an interaction between chronic pregnancy stress and gender. In the forced swimming test, the immobility time of offspring in the CPS group prominently increased (Female: $P < 0.05$, Male: $P < 0.001$). Interestingly, compared with female offspring, despairing behavior of male offspring was much more clearly observed in CPS group ($P < 0.05$). Compared with offspring of CON group, the rate of sucrose preference was significantly reduced in the female offspring of CPS group ($P < 0.05$), while no obvious difference was observed in the male offspring. Compared with the CON group, the density of neuronal dendrite branches in the BLA of offspring mice in the CPS group decreased (Female: $P < 0.01$, Male: $P < 0.01$) and the degree of neuronal apoptosis increased (Female: $P < 0.001$, Male: $P < 0.001$), the expression level of p-mTOR in amygdala of offspring mice in CPS group significantly decreased (Female: $P < 0.001$, Male: $P < 0.001$). Chronic pregnancy stress increased the serum CRH level of offspring mice ($P < 0.001$), and the gender had significant influence on serum CRH level, the serum CRH level of female in CPS group was higher than that of male ($P < 0.05$). **Conclusion** Chronic pregnancy stress leads to depression-like behavior in offspring adolescent mice, and the depression-like behavior has gender differences. In addition, chronic pregnancy stress leads to dendrite atrophy and apoptosis of BLA neurons in offspring mice, and the mechanism may be that the activation of mTOR in the amygdala of offspring mice is inhibited. CRH may be involved in mediating sex differences in depression-like behavior and BLA neuron damage in offspring induced by chronic pregnancy stress.

Key words chronic pregnancy stress; adolescent depression; amygdala; gender difference; p-mTOR; CRH