

## 胚胎期炎症影响衰老海马 SNAP-25 含量及认知功能

韦琪瑶<sup>1</sup>, 吴永芳<sup>2</sup>, 张雨欣<sup>1</sup>, 王亚涛<sup>2</sup>, 曾立平<sup>2</sup>, 陈贵海<sup>2</sup>, 曹磊<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨胚胎期炎症暴露对中老年期海马突触体相关蛋白 25 (SNAP-25) 水平和认知功能的影响。方法 在 CD-1 母鼠孕第 15~17 天每天腹腔注射脂多糖 (LPS 50 μg/kg) 或等容积生理盐水, 对应子鼠分别为 LPS 组和 CON 组。分别于青年 (3 月龄) 和中老年 (15 月龄) 用 Morris 水迷宫评估空间学习记忆能力, 用免疫组织化学染色及 Western blot 技术检测海马 SNAP-25 蛋白含量。结果 与 3 月龄 CON 组相比, 15 月龄 CON 组学习期游泳路程增加 ( $P < 0.01$ ), 记忆期靶象限游泳路程百分比降低 ( $P < 0.01$ ), 海马各亚区 SNAP-25 蛋白水平均升高 ( $P < 0.01$ )。15 月龄 LPS 组较同龄 CON 组学习期游泳路程增加 ( $P < 0.05$ ), 记忆期游泳路程百分比下降 ( $P < 0.05$ )。海马 CA1 区及 DG 区 SNAP-25 水

平增加 ( $P < 0.01$ )。Pearson 相关分析显示海马 CA1 区、DG 区 SNAP-25 蛋白水平与学习期游泳路程呈正相关, 而与记忆期靶象限游泳路程百分比呈负相关。结论 胚胎期炎症暴露可加速中老年小鼠学习记忆能力损害和海马 CA1 区、DG 区 SNAP-25 蛋白的升高, 且两者可能存在关联。

**关键词** 衰老; 炎症; 学习记忆; SNAP-25

中图分类号 R 339.38; R 338.64

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0604-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.018

胚胎期炎症暴露会加速小鼠年龄相关的记忆减退<sup>[1]</sup>, 但其确切机制仍不清楚。研究<sup>[2]</sup>表明年龄相关的记忆减退可能与突触可塑性相关蛋白含量的改变有关。突触体相关蛋白 25 (synaptosomal-associated protein 25, SNAP-25) 是可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体 (SNARE) 的囊泡蛋白, 参与突触可塑性和神经递质的胞吐过程<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明 SNAP-25 在成年大鼠海马中过表达会导致记忆巩固的解除以及突触传递障碍, 即 SNAP-25 可以通过改变突触可塑性来影响认知能力。细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰阴性菌细胞壁的成分, 会使机体发生神经炎症, 可用于制作经典的炎症模型<sup>[5]</sup>。本课题组前期研究<sup>[6]</sup>显示胚胎期暴露 LPS

2022-03-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 81671316); 安徽省自然科学基金 (编号: 1708085QH182)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学第二附属医院神经内科, 合肥 230601

<sup>2</sup>安徽医科大学附属巢湖医院神经内科 (睡眠障碍科), 巢湖 238000

作者简介: 韦琪瑶, 女, 硕士研究生;

陈贵海, 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: doctoregh@163.com;

曹磊, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: caolei0531@163.com

terine growth restriction (IUGR) during pregnancy. **Methods** Four weeks female CD-1 mice were divided into two groups: control mice (CTRL) and vitamin D deficiency mice (VDD). VDD mice were fed with diet with low concentration of vitamin D and mated with normal male mice. Several pregnant mice were killed on gestational sixteenth day, and the placentas, serum of maternal and fetal mice were collected. Proteins of placental key enzymes of steroid hormone synthesis and signaling pathways of oxidative stress were measured using Western blot. Serum estrogen, progesterone and 25-(OH)-D were measured via radioimmunoassay. The remaining pregnant mice were killed. Placentas and fetus were weighted, fetus height and placental diameter were calculated. The pregnancy outcomes were observed. **Results** Diet with low concentration of vitamin D were used and VDD mice model were established after five weeks. Maternal VDD during pregnancy decreased the weight of placenta and fetus, reduced the height of fetus and the diameter of placentas. The expression of placental aromatase cytochrome p450 (CYP19) and the level of estrogen were increased in VDD pregnant mice. Besides, maternal VDD during pregnancy increased the expressions of placental heme oxygenase 1 (HO-1), NADPH oxidase 4 (NOX-4) and 3-nitrotyrosine (3-NT). VDD promoted placental nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf-2) nuclear translocation. **Conclusion** Maternal vitamin D deficiency during pregnancy causes IUGR partially through evoking placental oxidative stress and promoting estrogen synthesis.

**Key words** vitamin D deficiency; mice; estrogen; oxidative stress; fetal intrauterine growth restriction

会加速年龄相关的记忆减退的发生。然而,海马 SNAP-25 蛋白水平改变是否参与胚胎期炎症暴露导致的认知功能损害仍未见相关报道。故该研究拟探讨胚胎期炎症暴露是否会引起中老年小鼠海马 SNAP-25 蛋白水平改变,及其是否与学习记忆损害相关。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及模型建立** 清洁级 2 月龄 CD-1 小鼠购自湖南省斯莱克景达实验动物公司。雌鼠 24~26 g, 雄鼠 27~29 g。小鼠饲养于温度(23 ± 2) °C, 湿度(50 ± 5)%, 明暗周期 12 h 交替进行的环境中, 自由获取食物和水。小鼠按 2: 1(雌: 雄)于 21:00 合笼, 次日 07:00 查阴栓, 首次查到阴栓者定为受孕第 0 天(G0)。孕鼠单笼饲养并随机在孕第 15~17 天每天腹腔注射 LPS(50 μg/kg), 或等容积生理盐水, 对应子鼠分别为 LPS 组和 CON 组。每组选取 3 月龄(6 只雄鼠)和 15 月龄(6 只雄鼠)纳入实验。本实验所有操作均符合安徽医科大学动物实验伦理委员会的要求。

**1.2 Morris 水迷宫(MWM)** 采用 MWM 任务评估小鼠空间学习和记忆能力。实验装置为黑色圆形水池(直径 150 cm, 高 30 cm)及黑色圆柱状逃生平台(直径 10 cm, 高 24 cm), 池内水温保持(22 ± 2) °C。水迷宫上方安装摄像头采集小鼠运动轨迹, 运用 Any-maze 软件分析图像。水迷宫周围用白色帘布(距水池边缘 50 cm)包围, 并在距水池底 1.5 m 高处等距离悬挂 3 个黑色线索。整个实验过程中, 平台位于靶象限内, 并低于水面 1 cm。实验过程分为: ① 学习期(定位航行期): 首次测试前, 将小鼠放到平台 30 s, 再将小鼠分别从不同象限面向池壁放入水中, 每次给予 60 s 时间来寻找水下平台。每次测试间隔 15 min, 每天完成 4 次测试, 连续 7 d。记录平均游泳路程, 作为小鼠学习能力的指标。② 记忆期(空间探索期): 小鼠完成第 7 天学习期实验后, 休息 1 h, 在移除平台的情况下, 从与靶象限相对的象限再次入水。小鼠被允许在水池中自由游泳 60 s。记录靶象限游泳路程占总路程的百分比, 作为空间记忆能力的指标。

**1.3 试剂与仪器** RIPA 细胞裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司; ECL 超敏发光试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 鼠抗 SNAP-25(sc-20038) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; 羊抗鼠二抗(ZB-2305)、鼠抗 β-actin(TA-09) 均购自北京

中杉金桥生物技术有限公司。徕卡切片机(德国 Leica 公司); 数字扫描仪(Motic 公司)。

**1.4 标本制备** 行为学实验结束两周后, 小鼠颈椎脱臼处死, 冰上取脑, 并快速分离出海马。将左脑于 4% 的多聚甲醛溶液中固定, 脱水、浸蜡、包埋。蜡块经 -20 °C 冷冻后, 3 μm 厚连续冠状切片进行免疫组化分析。

**1.5 免疫组织化学染色及摄片** 采用链霉亲和素-生物素复合素法(SABC)进行检测。一抗为鼠源性抗 SNAP-25 蛋白抗体, 二抗用生物素标记的山羊抗小鼠 IgG, 最后用 DAB 显色。用数字扫描仪拍摄海马整体, 然后用 4 × 20 倍显微镜分别对海马 CA1、CA3、DG 区进行拍摄。应用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件进行图像分析。采用平均光密度值(average optical density, AOD)作为 SNAP-25 蛋白相对含量进行统计分析。

**1.6 Western blot 分析** 收集组织样本, 加入蛋白质中性裂解缓冲液(RIPA)后提取上清液, 在提取的蛋白组织中按照 1:4 加入 5 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 沸水浴加热 10 min, 充分变性蛋白。样品冷却至室温后, 把样品上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内, 电泳仪先用 80 V、30 min, 然后改为 120 V、1 h。恒流转膜 30 min, 漂洗 5 min, 加入 5% 脱脂奶粉后于室温封闭 2 h。然后加入一抗(anti-SNAP-25, 鼠抗, 1:1 000 稀释) 4 °C 缓慢摇动孵育过夜, 使用 PBST 洗涤。再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:20 000), 室温孵育 1 h, PBST 洗涤后, 用 ECL 发光试剂盒来检测蛋白。使用 Image 软件分析蛋白条带, 计算 SNAP-25 的相对表达量。

**1.7 统计学处理** 使用 SPSS 23.0 统计软件进行分析, 数据符合正态分布, 用均数 ± 标准误表示。Morris 水迷宫学习期成绩采用重复测量方差分析, 记忆期成绩和 SNAP-25 含量采用两因素方差分析, 观察处理因素和年龄因素的影响。组间两两比较采用 LSD 检验。采用 Pearson 相关分析法分析 SNAP-25 含量与行为学数据之间的相关性。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Morris 水迷宫实验

**2.1.1 学习期** 小鼠的游泳路程随天数增加而减少 [ $F_{(6, 120)} = 132.034, P < 0.01$ ], 且四组间游泳路程差异有统计学意义 [ $F_{(3, 20)} = 45.707, P < 0.01$ ]。两两比较分析表明, 15 月龄 CON 组游泳路程长于 3

月龄 CON 组 [ $F_{(1,10)} = 19.811, P = 0.001$ ], 见图 1A; 15 月龄 LPS 组游泳路程较同龄 CON 组延长 [ $F_{(1,10)} = 34.690, P < 0.01$ ], 见图 1C; 而 3 月龄 LPS 组与 3 月龄 CON 组间游泳路程差异无统计学意义 [ $F_{(1,10)} = 3.163, P = 0.106$ ], 见图 1B。

**2.1.2 记忆期** 四组间小鼠靶象限游泳路程百分比差异有统计学意义 [ $F_{(3,20)} = 21.243, P < 0.01$ ]。组间比较显示, 与 3 月龄 CON 组比较, 15 月龄 CON 组的靶象限游泳路程百分比下降 [ $F_{(1,10)} = 15.421, P = 0.003$ ], 见图 1D; 与 15 月龄 CON 组比较, 15 月龄 LPS 组的靶象限游泳路程百分比下降 [ $F_{(1,10)} = 5.909, P = 0.035$ ]; 而 3 月龄 LPS 组与 CON 组间差异无统计学意义 [ $F_{(1,10)} = 2.858, P = 0.122$ ]。

**2.2 海马 SNAP-25 蛋白水平** 免疫组织化学和 Western blot 结果显示 SNAP-25 蛋白在海马 DG、CA1、CA3 区均表达(图 2), 且四组间海马 SNAP-25 总体水平差异有统计学意义 [ $F_{(3,20)} = 170.100, P < 0.01$ ], 见图 3。两两比较显示, 15 月龄 CON 组比 3 月龄 CON 组的海马 SNAP-25 总体水平升高 [ $F_{(1,10)} = 12.861, P = 0.005$ ], 见图 3B, 且在海马 CA1、DG、CA3 区均增加 [ $F_{(1,10)} = 82.916, 53.368, 14.110, P < 0.01$ ], 见图 3C; 3 月龄 LPS 组较同龄 CON 组海马 SNAP-25 总含量增加 [ $F_{(1,10)} = 120.532, P <$

$0.01$ ], 区域差异表现为 DG 区和 CA1 区升高 [ $F_{(1,10)} = 62.846, 389.145, P < 0.01$ ], 而 CA3 区降低 [ $F_{(1,10)} = 146.263, P < 0.01$ ]; 15 月龄 LPS 组海马 SNAP-25 蛋白水平也高于同龄 CON 组 [ $F_{(1,10)} = 613.344, P < 0.01$ ], 具体也是海马 DG 和 CA1 区增加 [ $F_{(1,10)} = 174.102, 411.898, P < 0.01$ ], 而在 CA3 区呈临界意义下降 [ $F_{(1,10)} = 4.959, P = 0.050$ ]。

**2.3 海马 SNAP-25 水平与空间学习记忆能力的相关性** Pearson 相关分析结果显示, 15 月龄 LPS 组和 CON 组小鼠海马 SNAP-25 总体水平与学习期游泳路程呈正相关 ( $r = 0.949, P = 0.004; r = 0.917, P = 0.010$ ), 与记忆期靶象限游泳路程百分比呈负相关 ( $r = -0.901, P = 0.014; r = -0.929, P = 0.007$ ); 具体到海马亚区则是 CON 组和 LPS 组的海马 CA1 ( $r = 0.867, P = 0.025; r = 0.877, P = 0.022$ ) 和 DG ( $r = 0.817, P = 0.047; r = 0.947, P = 0.004$ ) 区 SNAP-25 水平与学习期游泳路程呈正相关, 与记忆期靶象限游泳路程百分比呈负相关 (CA1:  $r = -0.817, P = 0.047; r = -0.894, P = 0.016$ ; DG:  $r = -0.939, P = 0.005; r = -0.843, P = 0.035$ )。3 月龄各组海马总体和各亚区及 15 月龄各组 CA3 区 SNAP-25 水平与学习期游泳路程和记忆期靶象限游泳路程百分比均无相关性 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

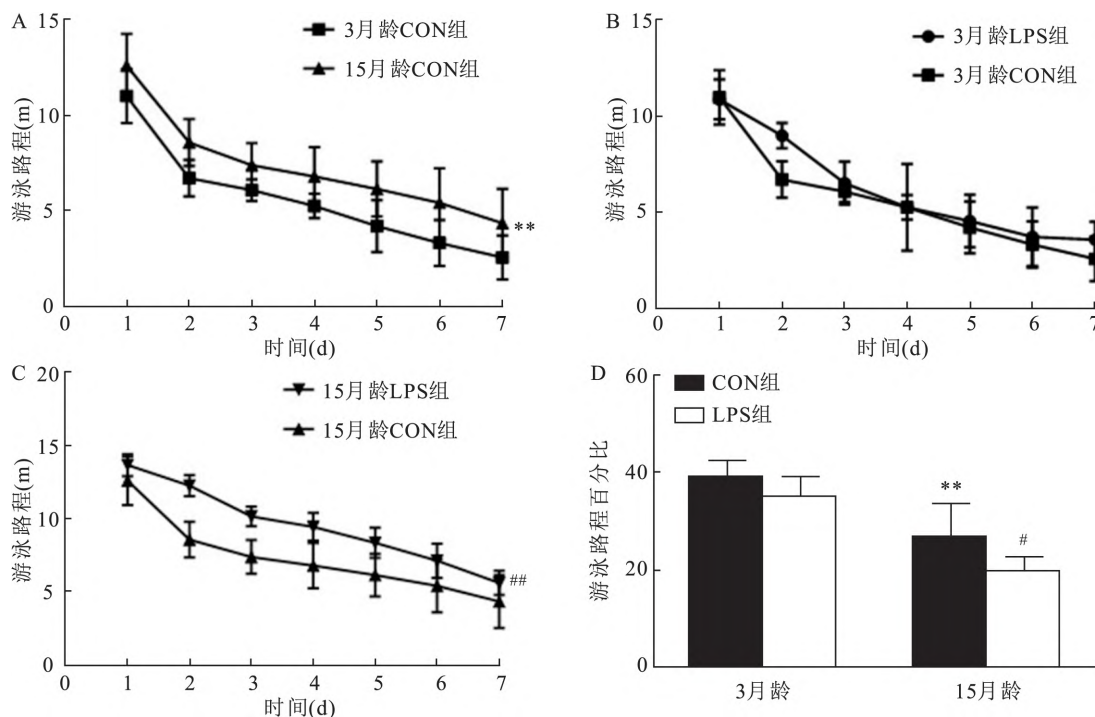


图 1 各组小鼠学习期游泳路程和记忆期靶象限游泳路程百分比比较

A、B、C: 各组学习期游泳路程; D: 记忆期靶象限游泳路程百分比; 与 3 月龄 CON 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 15 月龄 CON 组比较: #  $P < 0.05$ ,

##  $P < 0.01$

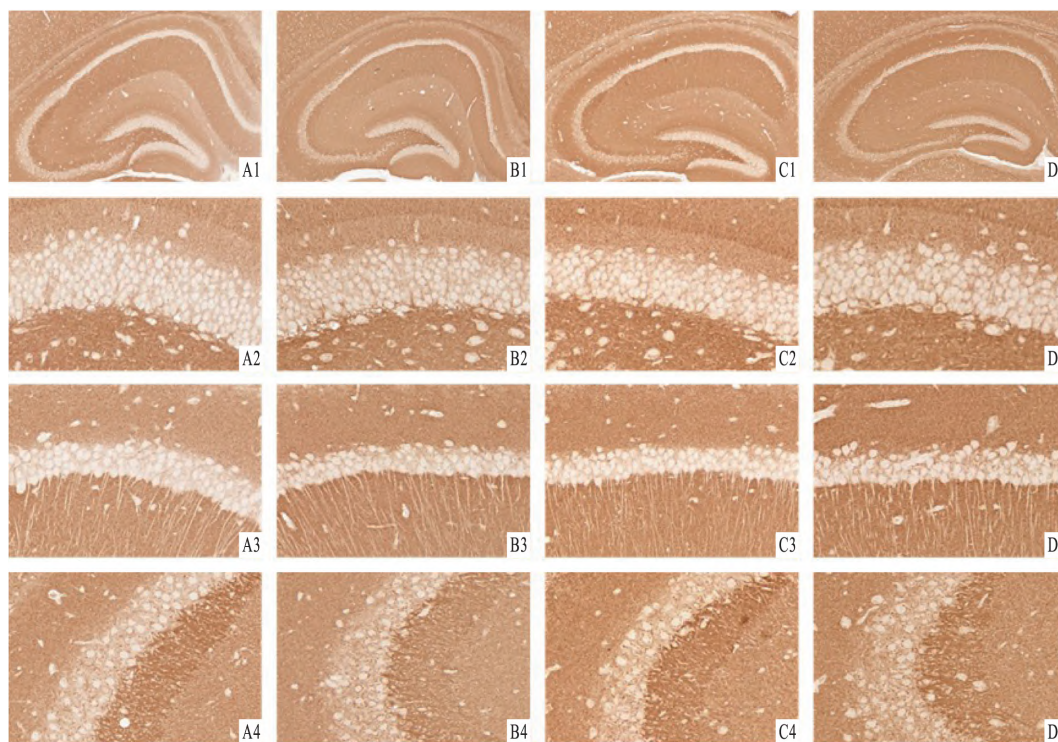


图2 各组小鼠 SNAP-25 蛋白在海马各亚区中的表达

A: 3 月龄 CON 组; B: 3 月龄 LPS 组; C: 15 月龄 CON 组; D: 15 月龄 LPS 组; 1: 海马区 ×4; 2: DG 区 ×20; 3: CA1 区 ×20; 4: CA3 区 ×20

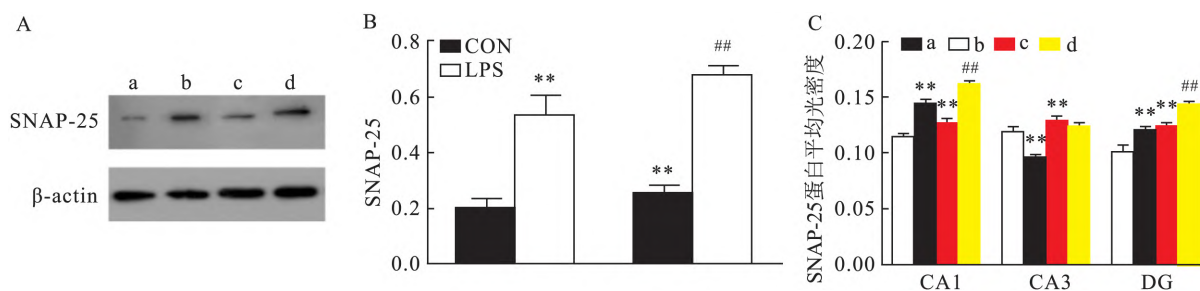


图3 各组小鼠海马 SNAP-25 蛋白水平比较

A: 各组免疫印迹条带图; B: 各组 SNAP-25 蛋白总体水平的比较; C: 各组海马亚区的 SNAP-25 蛋白水平的比较; a: 3 月龄 CON 组; b: 3 月龄 LPS 组; c: 15 月龄 CON 组; d: 15 月龄 LPS 组; 与 3 月龄 CON 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 15 月龄 CON 组比较: ##  $P < 0.01$

表1 海马各亚区 SNAP-25 相对含量与 Morris 水迷宫成绩的相关性 [ $r$  值 ( $P$  值)]

组别	任务期	SNAP-25 蛋白			SNAP-25
		CA1	CA3	DG	总体水平
3 月龄 CON	学习期	0.635 (0.176)	0.312 (0.547)	0.601 (0.207)	-0.355 (0.490)
	记忆期	-0.219 (0.676)	-0.459 (0.360)	0.357 (0.487)	-0.466 (0.352)
3 月龄 LPS	学习期	-0.464 (0.354)	-0.275 (0.599)	0.612 (0.196)	-0.551 (0.258)
	记忆期	0.415 (0.413)	0.388 (0.447)	-0.109 (0.837)	0.495 (0.318)
15 月龄 CON	学习期	0.867 (0.025) *	-0.409 (0.421)	0.817 (0.047) *	0.917 (0.010) *
	记忆期	-0.817 (0.047) *	0.513 (0.298)	-0.939 (0.005) **	-0.929 (0.007) **
15 月龄 LPS	学习期	0.877 (0.022) *	0.124 (0.815)	0.947 (0.004) **	0.949 (0.004) **
	记忆期	-0.894 (0.016) *	-0.245 (0.640)	-0.843 (0.035) *	-0.901 (0.014) *

\* 为具有统计学意义的相关系数 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

### 3 讨论

目前年龄相关的记忆减退对老龄人口的健康威胁日益加剧,为了提高老年人的生活质量,需要对衰老相关认知障碍机制进行深入研究。海马结构和功能的完整性在维持正常的学习和记忆巩固中发挥了重要作用<sup>[7]</sup>。众所周知,母亲孕期感染炎症是子代生命早期最常见的不良因素。以往研究<sup>[6]</sup>表明,母鼠孕晚期暴露于 LPS 会加剧子代海马依赖的年龄相关的记忆减退。本研究进一步支持了小鼠空间学习记忆能力呈年龄相关性损害的结论,即中老年小鼠的空间性学习记忆能力减退(表现为中老年小鼠在 MWM 中的表现较青年组差),而母体孕晚期炎症可恶化子代的这种效应(表现为中老年 LPS 组行为学表现较同龄对照组差)。

本课题组前期证实母鼠孕期经腹腔注射低剂量 LPS(50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 不会造成不良妊娠结局,且子鼠可经历正常的生长发育,但在衰老过程中会提前出现空间学习记忆能力减退<sup>[8]</sup>。其机制可能是母体中的促炎因子通过胎盘屏障,直接影响胎儿大脑或损害胎盘功能,进而导致后代行为和中枢神经系统结构(包括突触可塑性)及功能产生持久的或程序化变化<sup>[9]</sup>。突触可塑性是学习和记忆形成的基本机制,而突触相关蛋白水平的变化会导致突触结构发生微观改变和神经递质传递障碍。SNAP-25 作为突触相关蛋白,对神经递质释放及突触可塑性的调节起重要作用<sup>[10]</sup>。然而,胚胎期炎症暴露是否会导致中老年海马 SNAP-25 蛋白水平的改变尚未可知。研究显示 SNAP-25 在衰老的啮齿类海马的表达水平并不一致,比如在 Fischer 雌性老年(30 月龄)大鼠中发现海马 SNAP-25 蛋白质水平升高<sup>[11]</sup>,而在老年(18~24 月龄)Wistar 雄性大鼠中海马 SNAP-25 蛋白水平降低<sup>[12]</sup>。本课题组前期研究显示,老年(22 月龄)昆明小鼠海马和额叶的 SNAP-25 蛋白含量是增加的<sup>[13]</sup>。本研究结果与之一致,即中老年 CD-1 小鼠海马总体及各区的 SNAP-25 蛋白水平较青年期升高。

本研究首次观察了胚胎期炎症暴露对中老年海马 SNAP-25 蛋白的影响,发现与中老年对照组相比,同龄 LPS 组的海马总 SNAP-25 蛋白含量升高,贡献主要来自 DG 和 CA1 区。这表明胚胎期炎症暴露会上调中老年海马 DG 和 CA1 区 SNAP-25 蛋白的表达。青年 LPS 组小鼠的海马 DG 和 CA1 区 SNAP-25 蛋白水平也高于青年对照组。提示胚胎期

炎症暴露的小鼠可能在青年期就已经出现学习记忆功能损害的神经生物学基础,尽管行为学表型尚未发生改变。值得注意的是,两个年龄的 LPS 组海马 CA3 区 SNAP-25 蛋白表达有下降。这也许表明胚胎期炎症暴露的小鼠 SNAP-25 基因的表达可能存在海马区域特异性。

研究<sup>[1,4]</sup>表明,海马的一些突触可塑性相关蛋白(如 Syt1、PSD-95 和 GluA1)的改变均与年龄相关的认知损害有关。突触相关蛋白 SNAP-25 参与调控突触前和突触后机制<sup>[15]</sup>,可能是研究年龄相关的记忆减退的良好指标。McKee et al<sup>[4]</sup>的研究发现过表达海马 SNAP-25 会导致成年大鼠认知功能的损害。本课题组前期研究<sup>[13]</sup>也提示昆明小鼠和 ICR 小鼠年龄相关性记忆损害与海马 SNAP-25 含量升高有关。然而,海马 SNAP-25 蛋白的改变是否参与胚胎期炎症暴露导致的认知损害仍不清楚。本研究表明,中老年对照组和 LPS 组小鼠海马 CA1 区及 DG 区 SNAP-25 蛋白水平均与空间学习损害呈正相关,而与记忆损害呈负相关。这些发现进一步提示了海马 CA1 和 DG 区 SNAP-25 蛋白可能参与衰老或胚胎期炎症暴露导致的年龄相关性记忆损害的机制。然而,所有年龄组的小鼠海马 CA3 区 SNAP-25 蛋白水平与空间学习记忆损害无相关性,说明 CA3 区 SNAP-25 的降低未参与胚胎期炎症暴露加速年龄相关性记忆损害效应。

综上所述,中老年海马 DG 和 CA1 区的 SNAP-25 蛋白上调可能参与了胚胎期炎症暴露加速的年龄相关性认知功能损害。但是,未检测胚胎期炎症暴露导致的认知损害与 SNAP-25 蛋白之间关联的具体机制为本研究的主要缺陷。

### 参考文献

- [1] Zhang Z, Zhuang Z, Sun S, et al. Effects of prenatal exposure to inflammation coupled with stress exposure during adolescence on cognition and synaptic protein levels in aged CD-1 mice [J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12: 157.
- [2] Márquez Loza A, Elias V, Wong C P, et al. Effects of ibuprofen on cognition and NMDA receptor subunit expression across aging [J]. *Neuroscience*, 2017, 344: 276–92.
- [3] Agostini S, Mancuso R, Liuzzo G, et al. Serum miRNAs expression and SNAP-25 genotype in Alzheimer's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 52.
- [4] McKee A G, Loscher J S, O Sullivan N C, et al. AAV-mediated chronic over-expression of SNAP-25 in adult rat dorsal hippocampus impairs memory-associated synaptic plasticity [J]. *J Neurochem*, 2010, 112(4): 991–1004.

- [5] Mastinu A, Bonini S, Rungratanawanich W, et al. Gamma-oryzanol prevents LPS-induced brain inflammation and cognitive impairment in adult mice [J]. *Nutrients*, 2019, 11(4): 728.
- [6] 孙似玉, 葛荷花, 庄战强, 等. 孕晚期炎症暴露对中老年子鼠海马谷氨酸受体1含量及与认知损害相关性研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(4): 492–6.
- [7] Tsai S, Ku N, Wang T, et al. Long-term moderate exercise rescues age-related decline in hippocampal neuronal complexity and memory [J]. *Gerontology*, 2018, 64(6): 551–61.
- [8] Wu Y, Zhang Y, Ge H, et al. Effects of embryonic inflammation and adolescent psychosocial environment on cognition and hippocampal staufen in middle-aged mice [J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12: 578719
- [9] Rideau Batista Novais A, Crouzin N, Cavalier M, et al. Tiagabine improves hippocampal long-term depression in rat pups subjected to prenatal inflammation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106302.
- [10] Irfan M, Gopaul K R, Miry O, et al. SNAP-25 isoforms differentially regulate synaptic transmission and long-term synaptic plasticity at central synapses [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6403.
- [11] Sato Y, Yamanaka H, Toda T, et al. Comparison of hippocampal synaptosome proteins in young-adult and aged rats [J]. *Neurosci Lett*, 2005, 382(1): 22–6.
- [12] Canas P M, Duarte J M N, Rodrigues R J, et al. Modification upon aging of the density of presynaptic modulation systems in the hippocampus [J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(11): 1877–84.
- [13] Cao L, Wang F, Yang Q, et al. Reduced thyroid hormones with increased hippocampal SNAP-25 and Munc18-1 might involve cognitive impairment during aging [J]. *Behav Brain Res*, 2012, 229(1): 131–7.
- [14] Sun S, Li X, Ge H, et al. Effects of gestational inflammation with postpartum enriched environment on age-related changes in cognition and hippocampal synaptic plasticity-related proteins [J]. *Neural Plast*, 2020, 2020: 1–11.
- [15] Hussain S, Ringsevjen H, Schupp M, et al. A possible postsynaptic role for SNAP-25 in hippocampal synapses [J]. *Brain Struct Funct*, 2019, 224(2): 521–32.

## Effects of embryonic inflammation on aging hippocampal SNAP-25 and cognitive function

Wei Qiyao<sup>1</sup>, Wu Yongfang<sup>2</sup>, Zhang Yuxin<sup>1</sup>, Wang Yatao<sup>2</sup>, Zeng Liping<sup>2</sup>, Chen Guihai<sup>2</sup>, Cao Lei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

<sup>2</sup>Dept of Neurology( Dept of Sleep Disorders), The Affiliated Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Hefei 238000 ]

**Abstract Objective** To investigate the effects of embryonic inflammation on the hippocampal synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) level and cognitive function in middle-aged. **Methods** During gestational days 15–17, the CD-1 maternal mice received a daily intraperitoneal injection of lipopolysaccharides (LPS, 50 μg/kg) or the equal volume of normal saline, and the corresponding offspring were regarded as LPS group and CON group respectively. At the age of young (3-month-old) and middle-aged (15-month-old), the spatial learning and memory ability was assessed using Morris water maze (MWM), and the expression of hippocampal SNAP-25 protein was detected by immunohistochemical method and Western blot. **Results** Compared with the 3-month CON group, the 15-month CON group had longer swimming distance ( $P < 0.01$ ), lower swimming distance percentage ( $P < 0.01$ ) in the target quadrant, and higher hippocampal subregions (CA1, CA3, DG) SNAP-25 levels ( $P < 0.01$ ). The same results were obtained in 15-month LPS group compared with 15-month CON group in learning and memory phase ( $P < 0.05$ ), and higher hippocampal subregions (CA1, DG) SNAP-25 levels ( $P < 0.01$ ). Pearson correlation analysis indicated that the hippocampal CA1 and CA3 subregions SNAP-25 level was positively correlated with the swimming distance, but negatively correlated with the percentage of swimming distance in the target quadrant. **Conclusion** Embryonic inflammation can accelerate the impairment of spatial learning and memory and the increase of hippocampal CA1 and CA3 subregions SNAP-25 protein in middle-aged CD-1 mice, and there may be a correlation between them.

**Key words** aging; inflammation; learning and memory; SNAP-25