

母子分离对青年 CD-1 雄鼠认知功能及海马 BDNF 介导的 LTP 的影响

王亚涛¹, 张月明¹, 韦琪瑶², 吴永芳¹, 陈贵海¹

摘要 目的 探究海马脑源性神经营养因子(BDNF)介导的长时程增强(LTP)是否参与母子分离(MS)导致子雄鼠青年期认知功能受损的过程。方法 新生 CD-1 雄鼠随机分为母子分离组(MS 组)和对照组(CON 组),其中,MS 组小鼠从出生后第 4~21 天每日与母鼠分开 3 h,CON 组不进行任何干预。两组小鼠在 3 月龄时用 Morris 水迷宫实验检测小鼠空间学习记忆能力,Western blot 和 RT-PCR 检测小鼠海马 BDNF 表达水平,电生理技术检测海马 CA3-CA1 通路的 LTP。结果 与对照组相比,MS 组学习期潜伏期及游泳路程均延长($P < 0.01$),记忆期靶象限时间及路程百分比均减少($P < 0.05$)。同时 MS 组海马的 BDNF 表达水平下降($P < 0.05$)和 CA3-CA1 通路的 LTP 受损($P < 0.01$)。结论 一定强度的母子分离操作可以损害青年 CD-1 雄鼠的认知功能,且可能与海马区 BDNF 表达水平下降及 LTP 受损有关。**关键词** 母子分离;学习记忆;脑源性神经营养因子;长时程增强

中图分类号 R 741.02

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)05-0720-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.009

生命早期的负性生活事件如母子分离(maternal separation, MS)是神经精神类疾病的高危因素,可导致机体一系列的神经心理行为的改变,严重者可能造成持久的情绪和认知功能障碍^[1-2],但其具体机制不明。现有研究^[3]表明 MS 会加速子代老年期的认知功能损害,其中涉及兴奋性突触传递的长时程增强(long-term potentiation, LTP)受损。然而由于采取的动物品系与分离程序各不相同,MS 对青年期认知功能的影响结果矛盾^[4-5],且是否涉及突触可塑性的改变尚不清楚。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)作为内源性蛋白

之一,是海马等脑区突触可塑性的重要调节因子^[6],在脑发育及脑功能中起关键作用。研究表明,MS 导致的认知功能改变与 BDNF 水平有关^[7],后者是否联系认知损害相关的突触可塑性有待研究。该研究旨在探讨早期 MS 对青年期雄鼠认知功能及海马 BDNF 介导的 LTP 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 CD-1 小鼠(SPF 级,6~8 周)购自于北京维通利华责任有限公司。将 14 只健康 CD-1 孕鼠照料至其自然生产。随后将子代雄鼠随机分配至 MS 组及对照(CON)组,其中 MS 组的新生幼鼠在出生后第 4 天开始,每日上午 9:00—12:00 将母鼠与子鼠分离,直至出生后第 21 天断奶,CON 组不进行任何干预。期间给予母鼠及子鼠充足的食物,维持室温 22~24℃、湿度 50%~60%、明暗周期 12 h/12 h。断奶后,将两组幼鼠分笼饲养至 3 月龄。最终每组各纳入 13 只,其中 8 只用于行为学、Western blot 及实时荧光定量 PCR 的检测,另外 5 只用于离体海马 LTP 的诱导。实验程序均经安徽医科大学实验动物委员会批准。

1.2 研究方法

1.2.1 Morris 水迷宫实验 采用 Morris 水迷宫实验评估幼鼠空间学习和记忆能力。水迷宫由一圆形水池和水下平台组成。实验分为定位航行期(学习期)和空间探索期(记忆期)两部分。① 定位航行期:每次测试将小鼠头部面向池壁随机从 4 个象限投入水中,小鼠在规定时间内(60 s)内爬上平台或未能找到平台均让其在平台适应 30 s。每天进行 4 次测试,间歇 15 min,实验持续 7 d。② 空间探索期:在定位航行实验的最后一天,撤去平台,将小鼠从靶象限的相反象限放入水中,让其自由探索 60 s。使用 Any-Maze 分析定位航行期中受试小鼠找到平台的潜伏期、游泳路程及速度,以及空间探索期的靶象限时间及路程百分比。

1.2.2 Western blot 采用 Western blot 法检测两组子鼠大脑海马区 BDNF 的相对含量。水迷宫结束后

2022-02-04 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81671316)

作者单位:¹ 安徽医科大学附属巢湖医院神经内科(睡眠障碍科),巢湖 238000

² 安徽医科大学第二附属医院神经内科,合肥 230601

作者简介:王亚涛,男,硕士研究生;

陈贵海,男,博士,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,

E-mail:doctoregh@163.com

15 d 将两组小鼠颈椎脱臼后取脑,剥离海马组织并充分研磨后,加入 RIPA 细胞裂解液进行裂解。12 000 r/min 离心 10 min。收集上清液,在收集的蛋白样品中按照 1:4 加入 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液。沸水浴加热 10 min,以充分变性蛋白。随后按照 Western blot 法的步骤操作,一抗为 BDNF 抗体,二抗为羊 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 和山羊抗小鼠 IgG。使用 Image J 软件分析蛋白条带,计算 BDNF 的相对表达量。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 提取海马组织,加入 TRIzol 裂解液进行研磨,提取总 RNA,利用分光光度计检测其纯度。使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录生成 cDNA,将其作为荧光定量的模板,反应体系包括:5 μl 的 2×SYBR Green Mixture、1 μl 的上游引物、1 μl 的下游引物、1 μl 的 cDNA、2 μl 的 RNase Free water。反应条件为:95 ℃ 预变性、单循环 1 min,95 ℃、20 s,60 ℃、1 min,共计 40 个循环。mRNA 相对含量计算方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	引物(5'-3')
β-actin	R:AGTGTGACGTTGACATCCGT F:TCCTAGGAGCCAGAGCAGTA
BDNF	R:TTACTCTCTGGGTTCTCTGA F:ACGTCCACTTCTGTTCTCTT

1.2.4 离体海马 CA1 区 LTP 诱导 将小鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉、处死,从颅腔中取出脑组织,将切除嗅球和小脑的脑组织直立粘于标本底座,固定于标本槽内。调整刀片高度,振动切片进行连续切片,切取包含背侧海马的 400 μm 厚冠状脑片。脑片在记录之前,在持续通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体的人工脑脊液中孵育 1 h。加入各组药物后进行场电位记录。将刺激电极钨丝电极置于海马 CA3 区,玻璃记录电极置于 CA1 区,记录 CA1 区的场兴奋性突触后电位。场电位经放大器放大后,输出信号经数模转换器处理,由数据采集系统进行数据采集、分析和处理。记录时首先找到能引起可观察场兴奋性突触后电位 (field excitatory postsynaptic potential, fEPSP) 的最小刺激,再逐渐增大刺激强度,记录每次刺激引起的突触前动作电位和突触后 fEPSP 的幅度。刺激方波的波宽为 0.1 ms,刺激频率为 0.033 Hz。以能引起最大 fEPSP 幅度 50% 的刺激强度作为测试刺激强度。给予时间间隔分别为 20、40、60、80、100、150、200、400、600、800 ms 和 1 s

的双脉冲刺激,计算第 2 个 fEPSP 与第 1 个 fEPSP 幅度的比率。以能引起最大 fEPSP 幅度的 50% 刺激强度作为测试刺激强度,稳定记录 30 min 作为基线,由高频电刺激(100 Hz、1 000 ms × 2, 30 s 间隔诱导),诱导后持续记录 90 min。

1.3 统计学处理 采用 Graphpad Prism 8.0 进行统计分析。所有计量资料均符合正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。Morris 水迷宫学习期潜伏期、游泳路程及速度均采用重复测量方差分析进行统计学分析,记忆期靶象限时间及路程百分比、BDNF 及其信使 RNA 含量、fEPSP 斜率均采用两独立样本 *t* 检验进行分析。检验水准设定值为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 母子分离对小鼠空间记忆的影响 定位航行期,两组寻找平台的潜伏期 [$F_{(6,84)} = 109.6, P < 0.01$] 以及游泳路程 [$F_{(6,84)} = 76.06, P < 0.01$] 均随天数的增加而逐渐减小;与 CON 组小鼠相比,MS 组小鼠定位航行期潜伏期 [$F_{(1,14)} = 30.10, P < 0.01$] (图 1A) 及游泳路程 [$F_{(1,14)} = 64.95, P < 0.01$] (图 1C) 增加;而处理因素 × 天数的交互效应对潜伏期 [$F_{(6,84)} = 1.813, P > 0.05$] 及游泳路程 [$F_{(6,84)} = 0.9567, P > 0.05$] 无显著性影响。空间探索期,与 CON 组小鼠相比,MS 组小鼠靶象限时间百分比 ($P < 0.05$, 图 1B) 及游泳路程百分比 ($P < 0.05$, 图 1D) 均下降。游泳速度 [$F_{(6,84)} = 0.6063, P > 0.05$] 不随天数发生改变,且组间比较无统计学差异 [$F_{(1,14)} = 0.7241, P > 0.05$] (图 1E)。

2.2 母子分离对小鼠海马区 BDNF 水平的影响

两独立样本 *t* 检验结果表明,与 CON 组相比,MS 组海马区 BDNF 蛋白含量降低 ($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 母子分离对小鼠海马区 BDNF mRNA 水平的影响 实时荧光定量 PCR 结果显示,MS 组 BDNF mRNA 相对含量低于 CON 组 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 母子分离对小鼠海马 CA1 区 LTP 的影响

使用 θ 爆发刺激 (TBS) 诱导海马 CA3-CA1 通路 LTP,与对照组相比,MS 组 LTP 振幅降低 ($P < 0.01$)。见图 4。

3 讨论

生命早期是个体神经系统发育的关键时期,这一时期神经元的发育及功能完善极易受应激事件的影响,引起一系列神经生物学变化,从而导致成年后的认知功能损害^[1]。母子分离通过母爱剥夺这一

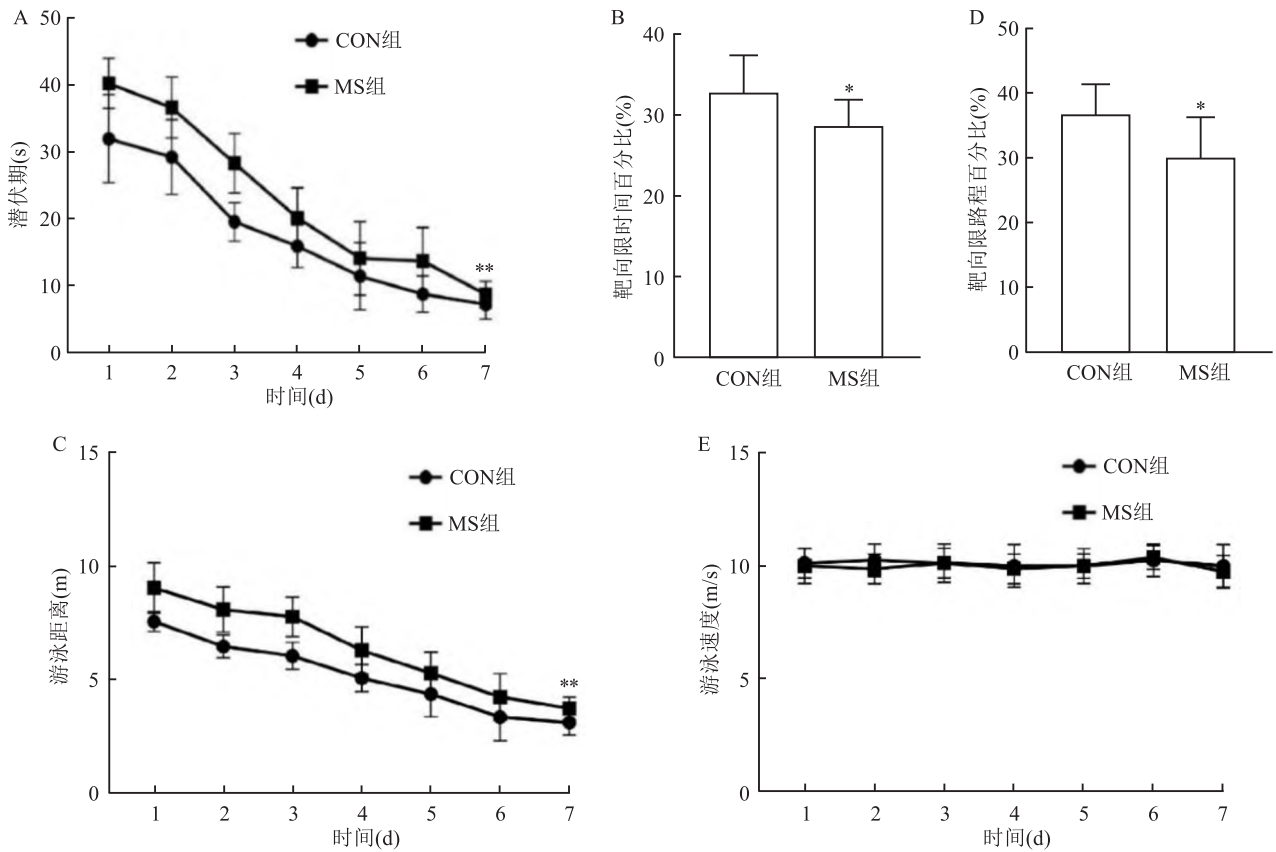


图1 两组 CD-1 小鼠在 Morris 水迷宫中的测试情况

A: 定位航期潜伏期; B: 空间探索期靶象限时间百分比; C: 定位航期游泳距离; D: 空间探索期靶象限路程百分比; E: 游泳速度; 与 CON 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

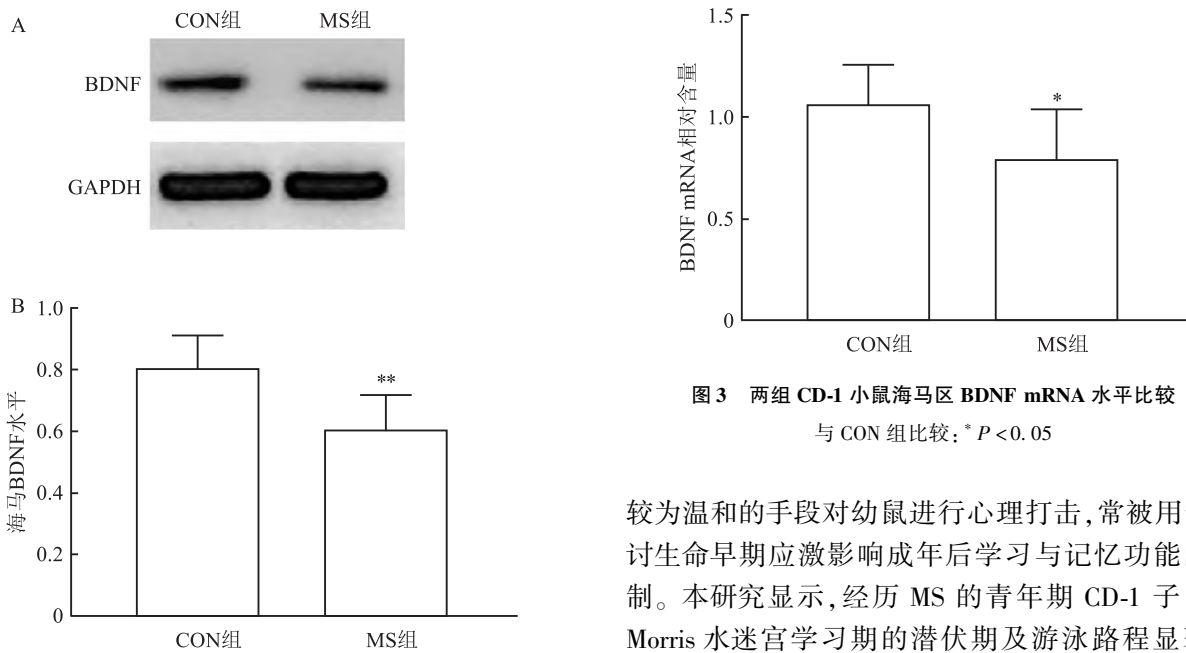


图2 两组 CD-1 小鼠海马区 BDNF 蛋白含量的表达比较

A: BDNF 蛋白条带; B: BDNF 蛋白相对含量; 与 CON 组比较: ** $P < 0.01$

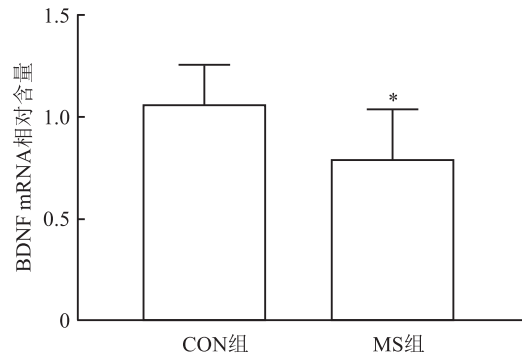


图3 两组 CD-1 小鼠海马区 BDNF mRNA 水平比较

与 CON 组比较: * $P < 0.05$

较为温和的手段对幼鼠进行心理打击,常被用于探讨生命早期应激影响成年后学习与记忆功能的机制。本研究显示,经历 MS 的青年期 CD-1 子鼠在 Morris 水迷宫学习期的潜伏期及游泳路程显著延长,在记忆期靶象限时间及路程百分比显著降低,而运动能力(即游泳速度)未发生损害。这表明婴儿期的 MS 经历可损害青年期的空间学习记忆功能。

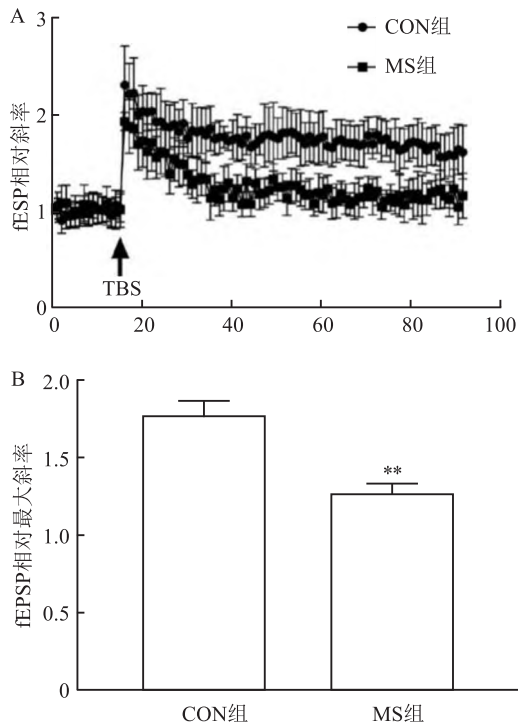


图4 离体海马CA1区LTP

A: fEPSP 模式图; B: fEPSP 相对斜率统计图; 与 CON 组比较;

** $P < 0.01$

尽管 MS 导致学习和记忆功能受损的机制尚不明确,但海马作为记忆形成和维持的关键脑区可能参与其中。BDNF 在海马区广泛表达,并通过与酪氨酸激酶受体 B (tyrosine receptor kinase B, TrkB) 结合调节下游的 PI3K/AKT、PLC- γ 等信号通路,进而参与认知相关神经元的功能调节^[8-9]。该研究使用 Western blot 与实时荧光定量 PCR 分析结果表明,3 月龄 MS 组海马区 BDNF 的表达水平(蛋白和 mRNA)显著下降。以往母子分离研究对象多为分离程序持续整个哺乳期的大鼠或哺乳前中期的近交系小鼠。由于前者品系的差异及后者分离时间的不足,使得母子分离操作对认知功能的影响具有矛盾性^[10-11]。为改善这一模型,该研究选用对更能模拟人群特点的封闭群 CD1 小鼠进行足够强度的母子分离操作,并通过多种技术评估其 BDNF 的表达水平,同时利用电生理技术填补了该品系的小鼠 LTP 变化这一空白,进而显示负性生活事件如母爱剥夺导致海马区 BDNF 的表达水平下降,从而造成持久的认知功能减退。

目前研究 MS 对啮齿类动物突触可塑性的影响,其研究对象聚焦于大鼠,而鲜有研究关注小鼠的突触可塑性是否改变。仅有的一项研究显示,通过检测经历 MS 操作的 C57BL/6J 子鼠青春期第 35 ~

55 天海马不同通路的 LTP,结果提示,CA3-CA1 通路的 LTP 尚未受损,而颗粒细胞发出的轴突组成的苔藓纤维与 CA3 区锥体细胞通路的 LTP 下调^[11]。该研究电生理结果表明婴儿期经历 MS 的青年 CD-1 小鼠 CA3-CA1 通路的 LTP 受损。究其原因,可能是该研究采用的动物品系、分离程序以及检测时期的差异所致。

既往研究^[9]结果表明,BDNF 作为突触可塑性的重要调节因子,参与学习与记忆功能,其机制之一是通过与 TrkB 受体结合发挥调节作用。另有研究^[12]显示,通过选择性的降低海马 CA1/CA3 区 BDNF/TrkB 的表达,在突触前膜 BDNF 与 TrkB 结合参与 LTP 的诱导,二者在突触后膜结合用于维持 LTP。LTP 是 NMDA 受体突触传递效能持续增强的表现,在学习记忆过程中发挥重要作用。BDNF 可以通过促进 NMDAR 的转录、翻译过程,调节 NMDAR 的磷酸化水平从而促进谷氨酸突触传递,这一过程依赖于突触后 TrkB 的活化^[13]。此外,BDNF/TrkB 通路通过促进 Ca^{2+} 内流,活化蛋白激酶 C 诱导 NMDAR 的转运进而调节突触可塑性^[14]。以上研究提示,BDNF 可能通过介导突触可塑性在 MS 导致的青年期认知功能受损中发挥重要作用。

综上所述,一定强度的母子分离会导致青年期雄鼠的认知功能减退,后者可能与海马区 BDNF 介导的 LTP 受损有关。该实验的不足之处在于未采用免疫组化技术检测海马各亚区 BDNF 含量,未进一步向脑室注射外源性 BDNF 或转基因技术使 BDNF 在青年期过表达,观察能否逆转 MS 带来的 LTP 下调及学习记忆功能的损害。此外,BDNF 介导的 LTP 的下游通路如何参与 MS 导致认知功能损害的过程有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Short A K, Baram T Z. Early-life adversity and neurological disease: age-old questions and novel answers[J]. Nat Rev Neurol, 2019, 15(11):657-69.
- [2] Nishi M. Effects of early-life stress on the brain and behaviors: implications of early maternal separation in rodents[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19):7212.
- [3] Sousa V C, Vital J, Costenla A R, et al. Maternal separation impairs long term-potential in CA1-CA3 synapses and hippocampal-dependent memory in old rats[J]. Neurobiol Aging, 2014, 35(7):1680-5.
- [4] Yang Y, Cheng Z, Tang H, et al. Neonatal maternal separation impairs prefrontal cortical myelination and cognitive functions in rats through activation of Wnt signaling[J]. Cereb Cortex, 2017,

- 27(5):2871–84.
- [5] Wang Q, Li M, Du W, et al. The different effects of maternal separation on spatial learning and reversal learning in rats[J]. *Behav Brain Res*,2015,280:16–23.
- [6] Leal G, Bramham C R, Duarte C B. BDNF and hippocampal synaptic plasticity[J]. *Vitam Horm*,2017,104:153–95.
- [7] Ohta K I, Suzuki S, Warita K, et al. Prolonged maternal separation attenuates BDNF-ERK signaling correlated with spine formation in the hippocampus during early brain development [J]. *J Neurochem*,2017,141(2):179–94.
- [8] Zheng Q, Liu L, Liu H, et al. The Bu Shen Yi Sui formula promotes axonal regeneration *via* regulating the neurotrophic factor BDNF/TrkB and the downstream PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*,2019,10:796.
- [9] Numakawa T, Odaka H, Adachi N. Actions of brain-derived neurotrophin factor in the neurogenesis and neuronal function, and its involvement in the pathophysiology of brain diseases[J]. *Int J Mol Sci*,2018,19(11):3650.
- [10] Cordier J M, Aguggia J P, Danelon V, et al. Postweaning enriched environment enhances cognitive function and brain-derived neurotrophic factor signaling in the hippocampus in maternally separated rats[J]. *Neuroscience*, 2021,453:138–47.
- [11] Shin S Y, Han S H, Woo R S, et al. Adolescent mice show anxiety- and aggressive-like behavior and the reduction of long-term potentiation in mossy fiber-CA3 synapses after neonatal maternal separation[J]. *Neuroscience*,2016,316:221–31.
- [12] Lin P Y, Kavalali E T, Monteggia L M. Genetic dissection of pre-synaptic and postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synaptic efficacy of CA3-CA1 synapses[J]. *Cell Rep*,2018,24(6):1550–61.
- [13] Itoh N, Enomoto A, Nagai T, et al. Molecular mechanism linking BDNF/TrkB signaling with the NMDA receptor in memory: the role of Girdin in the CNS[J]. *Rev Neurosci*,2016,27(5):481–90.
- [14] Colgan L A, Hu M, Mislisler J A, et al. PKC α integrates spatiotemporally distinct Ca²⁺ and autocrine BDNF signaling to facilitate synaptic plasticity[J]. *Nat Neurosci*,2018,21(8):1027–37.

Effects of maternal separation on cognitive function and BDNF-induced LTP of hippocampus in young CD-1 male mice

Wang Yatao¹, Zhang Yueming¹, Wei Qiyao², Wu Yongfang¹, Chen Guihai¹

[¹*Dept of Neurology (Dept of Sleep Disorders), Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Hefei 238000;*

²*Dept of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601]*

Abstract Objective To explore whether long-term potentiation (LTP) induced by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) of hippocampus is involved in the process of maternal separation (MS) leading to impaired cognitive function of offspring in adolescence. **Methods** The newborn CD-1 mice were randomly divided into maternal separation group (MS group) and control group (CON group). Mice in MS group were separated from the mother mice for 3 h every day from postnatal day 4 to 21 while no intervention was taken in the CON group. The spatial learning and memory ability was assessed using Morris water maze at the age of 3 months. Western blot and real-time quantitative PCR were used to detect the levels of BDNF and BDNF mRNA in the hippocampus. LTP of the hippocampal CA3-CA1 neural pathway was recorded using electrophysiological techniques. **Results** Compared with CON group, the latency and distance of Morris water maze in maternal separation group were significantly longer ($P < 0.01$). The percentage of time and distance in target quadrant during the memory phase in MS group were obviously lower than those in control group ($P < 0.05$). The results of WB and Real-time quantitative PCR in MS group showed that the levels of BDNF and BDNF mRNA in MS group apparently decreased ($P < 0.05$). Compared with CON group, MS group showed a significantly lower LTP in CA3-CA1 neural pathway ($P < 0.01$). **Conclusion**

The certain intensity of maternal separation can impair learning and memory function in young CD-1 male mice, which may be associated with decreased expression of BDNF and impaired LTP in the hippocampus.

Key words maternal separation; learning and memory; brain-derived neurotrophic factor; long-term potentiation