

张媛媛,周苗苗,徐凯勇,等. 舒郁胶囊改善慢性温和应激大鼠子代发育研究[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(7): 990-999.

ZHANG Y Y, ZHOU M M, XU K Y, et al. Study on the improvement of offspring development in chronic mild stress rats by Shuyu Capsules [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(7): 990-999.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.07.006

## 舒郁胶囊改善慢性温和应激大鼠子代发育研究

张媛媛<sup>1</sup>,周苗苗<sup>2</sup>,徐凯勇<sup>3</sup>,刘彦锋<sup>4</sup>,张浩<sup>3</sup>,吴丽丹<sup>5</sup>,郑智勇<sup>6</sup>,  
陈凯<sup>6</sup>,李园<sup>7,8</sup>,吕世盟<sup>7\*</sup>,李自发<sup>3\*</sup>

- (1. 潍坊护理职业学院,山东 潍坊 262500;2. 山东中医药大学中医药创新研究院,济南 250355;  
3. 山东中医药大学实验中心,济南 250355;4. 泗水县人民医院,山东 济宁 273200;  
5. 山东中医药大学药物研究院,济南 250355;6. 山东省药学科学院,济南 250101;  
7. 山东中医药大学第一临床医学院,济南 250014;8. 山东中医药大学附属医院,济南 250014)

**【摘要】** 目的 以孕前慢性温和应激(CMS)方式模拟现代社会应激,通过 CORT-BDNF-ERK1/2 信号级联介导的海马损伤探讨孕前肝气郁结母鼠所产雄性子代情绪、行为、神经发育改变的机制,阐释母代遭受生活负性事件对后代的影响及舒郁胶囊的干预机制。**方法** 采用 CMS 应激诱导母鼠孕前抑郁情绪反应(肝气郁结状态),予以舒郁胶囊及氟西汀胶囊干预,经筛选后与雄性大鼠交配,每组各挑选 12 只雄性子代,对其进行行为学测试及采用 ELISA 检测各组雄性子代大鼠血清 CORT 含量;Western Blot 检测海马 BDNF、ERK1/2、p-ERK1/2、CREB、p-CREB 蛋白含量;RT-PCR 检测海马 BDNF、ERK1、ERK2、CREB mRNA 表达;验证孕前 CMS 对子代 BDNF-ERK1/2-CREB 信号通路的影响,及舒郁胶囊干预母鼠孕前肝气郁结证对其所产雄性子代情绪和学习记忆相关行为的关键微观机制。**结果** 母鼠孕前肝气郁结证所产雄性子代大鼠行为评价及机制探索实验结果,行为学检测结果显示:模型组子代旷场实验中央区路程、中央区进入次数及中央区停留时间显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ );水迷宫实验探索期逃避潜伏期显著延长( $P < 0.05$ ),游泳路程、目标象限持续时间、平台穿越次数减少( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );强迫游泳实验悬浮不动时间及次数增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),潜伏期缩短( $P < 0.05$ )。经舒郁胶囊及氟西汀预防性给药治疗后,模型组子代抑郁样行为及认知受损得到改善和纠正。生化检测结果显示:CMS 模型组子代皮质酮含量升高( $P < 0.05$ );子代海马 BDNF、p-ERK1/2、p-CREB 蛋白含量下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ),BDNF、ERK1、ERK2、CREB mRNA 表达均显著降低( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。经舒郁胶囊及氟西汀干预治疗后的母鼠雄性子代 CORT 含量、BDNF、ERK1/2、CREB 蛋白及 mRNA 表达结果显示出不同程度的增高趋势。**结论** 子代高水平 CORT 会选择性作用于海马,通过下调 BDNF-ERK1/2 信号级联对大鼠情绪及学习记忆功能产生不利影响。中药舒郁胶囊可通过纠正糖皮质激素水平及通路异常,降低宫内不良环境对子代发育的影响。

**【关键词】** 抑郁症;雄性子代;舒郁胶囊;行为表型;BDNF-ERK1/2-CREB

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 07-0990-10

### Study on the improvement of offspring development in chronic mild stress rats by Shuyu Capsules

[基金项目]山东省自然科学基金项目(ZR2023QH309,ZR2023LZY015)。

Funded by Shandong Provincial Natural Science Foundation Project (ZR2023QH309, ZR2023LZY015).

[作者简介]张媛媛,女,博士,讲师,研究方向:情志病证发病和中医药干预机制。Email:zyy19862699991@163.com

[通信作者]李自发,男,学士,高级实验师,研究方向:中医药实验动物学。Email:zifa\_0611@163.com;

吕世盟,男,在读博士研究生,研究方向:情志病证发病和中医药干预机制。Email:simonx24@163.com。

\* 共同通信作者

ZHANG Yuanyuan<sup>1</sup>, ZHOU Miaomiao<sup>2</sup>, XU Kaiyong<sup>3</sup>, LIU Yanfeng<sup>4</sup>, ZHANG Hao<sup>3</sup>, WU Lidan<sup>5</sup>,  
ZHENG Zhiyong<sup>6</sup>, CHEN Kai<sup>6</sup>, LI Yuan<sup>7,8</sup>, LYU Shimeng<sup>7\*</sup>, LI Zifa<sup>3\*</sup>

(1. Weifang Nursing Vocational College, Weifang 262500, China; 2. Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 3. Experimental Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 4. Sishui County People's Hospital, Jining 273200, China; 5. Institute of Pharmaceutical Research, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 6. Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250101, China; 7. First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China; 8. Shandong University of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Jinan 250014, China)  
Corresponding author: LYU Shimeng. E-mail: simonx24@163.com; LI Zifa. E-mail: zifa\_0611@163.com

**[Abstract] Objective** To simulate modern social stress using a pre-pregnancy chronic mild stress (CMS) model and to explore the mechanisms of emotional, behavioral, and neurodevelopmental changes in male offspring of pre-pregnancy liver qi stagnation female mice through corticosterone (CORT)-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 signaling cascade-mediated hippocampal injury. This study aimed to elucidate the impact of negative life events on offspring and the interventional mechanism of Shuyu Capsules. **Methods** CMS stress was used to induce pre-pregnancy depression in female rats (liver qi stagnation state), followed by intervention with Shuyu and fluoxetine capsules. After screening, male rats were mated and 12 male offspring from each group were selected for behavioral testing and detection of serum CORT levels by enzyme-linked immunosorbent assay. BDNF, ERK1/2, phospho (*p*)-ERK1/2, cAMP-response element binding protein (CREB), and *p*-CREB protein levels in the hippocampus were detected by Western Blot, and BDNF, ERK1, ERK2, and CREB mRNA levels in the hippocampus were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), to verify the effects of pre-pregnancy CMS on the BDNF-ERK1/2-CREB signaling pathway and to investigate the key micro-mechanisms of Shuyu Capsules on emotional and learning memory-related behaviors of male offspring of females with pre-pregnancy liver qi stagnation syndrome. **Results** The distance, number of entries, and duration of stay in the central area in open-field experiments were significantly reduced in offspring in the model group (all  $P < 0.05$ ). The escape latency during the exploration period of the water-maze experiment was significantly prolonged ( $P < 0.05$ ) and the swimming distance, duration of the target quadrant, and number of platform crossings were significantly reduced ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the suspension time and frequency in the forced-swimming experiment were increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the incubation period was shortened ( $P < 0.05$ ) in offspring in the model group. Prophylactic treatment with Shuyu Capsules and fluoxetine improved the depression-like behavior and cognitive impairment in the offspring in the model group. Biochemical tests showed that CORT levels were increased in the CMS model group ( $P < 0.05$ ), BDNF, *p*-ERK1/2, and *p*-CREB protein levels in the hippocampus were decreased (all  $P < 0.05$ ), and BDNF, ERK1, ERK2, and CREB mRNA levels were significantly reduced ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). Treatment with Shuyu Capsules and fluoxetine increased the CORT content and BDNF, ERK1/2, and CREB protein and mRNA levels in male offspring to varying degrees. **Conclusions** High levels of CORT in offspring act selectively on the hippocampus, exerting adverse effects on the emotional and learning memory functions of rats by downregulating the BDNF-ERK1/2 signaling cascade. The Chinese medicine Shuyu Capsules can reduce the impact of an adverse intrauterine environment on offspring development by correcting abnormal levels and pathways of glucocorticoids.

**[Keywords]** depression; male offspring; Shuyu Capsules; behavioral phenotype; BDNF-ERK1/2-CREB  
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

抑郁症是所有年龄段人群常见的情感性障碍疾病,终生患病率高达20%,具有高复发率、致残率、死亡率,目前影响全球超过3亿人<sup>[1]</sup>。该病

为遗传及环境因素相互作用的结果<sup>[2]</sup>,于胚胎形成时期亲代的遗传信息或抑郁症的易感基因决定了子代的易感性。基于此,寻找可能与抑郁症

遗传易感性有关的特定遗传因素是目前研究抑郁症的热点疑难问题。

中医认为女子孕期处于特殊生理-心理-社会状况,情感上要经历巨大变化,易为七情所累,更易产生“惊”“恐”“忧”等诸类负性情绪。七情之病,必从肝起,肝失条达,则气血不和、脏腑病生,而情志内伤病因的长期性与持续性决定了肝疏泄失常,气机郁结诱发病证的动态演变过程,提示肝疏泄失常、气机郁结,不仅伤及机体自身,还可影响胎孕,对子代产生负性影响。

现代相关研究表明,母体孕期应激导致的子代出生后发生抑郁或社交障碍是抑郁症遗传性研究的新方向。目前,在人类中,关于孕期压力暴露对后代长期影响的研究大部分是从回顾性研究中获得的。在动物实验研究中,关于抑郁情绪母病及子代的研究主要集中于孕前应激(prenatal stress, PS),证实母体孕期遭受外界不良应激或心理应激不仅损及孕妇自身,影响胎孕、分娩,亦可影响子代神经元形态、数量和神经突触可塑性致使学习、记忆、认知功能受损,增加子代成年后对抑郁、焦虑等症的易感性<sup>[3]</sup>。涉及的机制包括生命早期应激、表观遗传等。但关于母代孕前应激对子代影响的研究较少。本研究立足生命早期应激——母体孕前抑郁,以胚胎性致病因素为切入点,探讨抑郁情绪母子传递的中医机理及可能发生机制,对更深层次认识成年慢性疾病的发育起源,

目前,抑郁症的发病机制研究方向逐步转向受体后信号转导途径。其中,通过增强脑内脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达,激活细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular regulated kinase 1/2, ERK1/2),继而激活环磷酸腺苷反应原件结合蛋白(cyclic AMP response element-binding protein, CREB),从而促进多种基因表达的观点已被诸多学者认可。且皮质醇/皮质酮(cortisol, CORT)的胎内过度暴露是子代情感障碍疾病高发的风险因素<sup>[4]</sup>。但BDNF-ERK1/2-CREB是否参与了生命早期应激所致的抑郁情绪传递过程,以及CORT的过度暴露与该通路有何种关系尚不明确。

因此,本研究用慢性温和应激范式(chronic mild stress, CMS)制备孕前肝气郁结模型,并以中

药调肝方舒郁胶囊及一线抗抑郁药氟西汀为干预药物,观察母鼠所产雄性子代的行为变化,并对雄性子代大鼠血清CORT及海马脑区BDNF、ERK1/2、CREB含量进行检测,探讨子代大鼠抑郁样行为表型变化与血清皮质酮及海马BDNF-ERK1/2信号通路的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实验动物

健康未生育SPF级雌性Wistar大鼠,40只,体质量( $140 \pm 10$ )g,5~6周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。动物饲养于山东中医药大学【SYXK(鲁)2022 0009】。将大鼠置于稳定环境饲养,环境温度 $20 \sim 24^\circ\text{C}$ ,湿度45%,昼夜交替(12 h/12 h)下适应性喂养1周。所有动物实验操作均遵循美国NIH颁布的《实验动物护理和使用指南》,并经过山东中医药大学实验动物福利伦理审查委员会批准(SDUTCM20210426012)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

舒郁胶囊(Shu Yu)(山东中医药大学天然药化研究所研发自制);盐酸氟西汀胶囊(FLX)(礼来苏州制药有限公司);大鼠CORT酶联免疫试剂盒(武汉华美);CREB抗体(Abclonal);BDNF抗体(Abclonal);ERK1/2抗体(CST)。XR-SuperMaze动物行为分析系统(上海欣软信息科技有限公司);XR-XZ301旷场实验(open field test, OFT)系统(上海欣软信息科技有限公司);EPM实验系统(上海欣软信息科技有限公司);强迫游泳实验(forced swimming test, FST)系统(上海欣软信息科技有限公司);明暗穿梭实验系统(上海欣软信息科技有限公司);Morris水迷宫实验系统(上海欣软信息科技有限公司)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 母代大鼠模型制备及行为学评价

大鼠入室后适应性饲养1周,每日行抓握、抚摸平行操作,消除人为操作影响。于第7天行OFT,依据基线期数据(baseline)随机分为4组,每组10只,即:正常(Control,灌胃蒸馏水 $10\text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ )组、模型(CMS,灌胃蒸馏水 $10\text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ )组、舒郁胶囊(CMS + Shu Yu,灌胃

舒郁胶囊 408 mg/(kg·d))组、氟西汀(CMS + FLX,灌胃氟西汀 2.67 mg/(kg·d))组。除正常组外,其余接受应激刺激的大鼠均隔离单独饲养,造模持续 4 周,每日包含 2 ~ 5 种不同应激刺激。应激源包括:湿笼,24 h、束缚,3 h、禁食禁水,24 h、限制禁食刺激,每天 3 片饲料、倾斜鼠笼 45°,24 h、持续光照,12 h、8 °C 冰水游泳,5 min、频闪光,每分钟 100 次、间断式白噪声,85 dB,10 min、陌生异物、气味刺激及空瓶刺激。正常组大鼠隔间另养。造模期间同时给药,造模后通过 OFT、糖水偏好实验对母代大鼠进行行为学评价,待母鼠肝气郁结模型鉴定成功即结束应激刺激,并与 12 周龄 Wistar 雄鼠同笼配对(雌:雄 = 2:1)。母鼠受孕情况由阴道涂片法测定,受孕大鼠于妊娠期单居饲养。仔鼠出生当天被记为产后第 0 天(postnatal day 0, PND 0)。子代于 PND 22 断乳,根据性别分笼,每笼 3 ~ 4 只。本研究选用 8 周龄雄性子代大鼠,每只母鼠选 1 ~ 2 只子代,正常组、模型组、舒郁胶囊组及氟西汀组各母代组中均挑选 12 只子代。

### 1.2.2 子代大鼠行为学评价

首先进行 OFT,该行为测试采用 XR-SuperMaze 视频跟踪分析系统,时间为 6 min,将待测试大鼠置于箱体中央区,采用摄像及视频合成系统采集其活动情况,并分析各大鼠在箱内的运动总路程、中央区路程、中央区进入次数、中央区停留时间等相关参数。

Morris 水迷宫实验(Morris water maze, MWM):水迷宫基本结构包括圆形水池、置于水面下 2 cm 的圆形逃避平台和图像采集分析处理系统。水迷宫池直径:160 cm,高:60 cm;逃避平台直径:12 cm,高:35 cm;测试前于池中注水,水深水温固定(37 cm,22 °C),水中溶解适量食品级黑色色素,以便池上方摄像机同步记录动物的运动轨迹。逆时针方向将池面匀分为 I、II、III、IV 象限。测试时应尽量减少对大鼠的干扰、保持稳定环境,水温需恒定至 22 °C,实验人员静默操作,同时开启视频记录分析系统实时跟踪运动全过程。

空间探索测试(space exploration testing, SPT):将平台对面象限设为大鼠入水点,记录池中的运动轨迹,分析测试潜伏期、平台象限停留时间、平台位置穿越次数等相关参数。

FST:将各大鼠单独放入固定水深及水温(30 cm,23 °C)的有机玻璃圆筒(高:50 cm,直径:24 cm)中。在预实验中将其置于水中 15 min 后转移至干燥环境(30 °C,30 min),正式实验于 24 h 后开始,将大鼠再次置于水中 5 min,期间摄像机记录,每只大鼠取出后及时换水,清洁筒壁。悬浮不动行为以大鼠被动悬浮,仅做轻微运动以保持鼻孔高于水面为判断标准。

### 1.2.3 样品收集与处理

待行为学检测结束后处死大鼠。腹主动脉取血,4 °C 离心机离心血样(3000 r/min,15 min),取上清置于-80 °C 冰箱,ELISA 试剂盒检测 CORT 含量;剥离完整大脑,迅速置于冰盘,分离左、右海马组织。左海马 Western Blot 检测 BDNF、ERK1/2、p-ERK1/2、CREB、p-CREB 蛋白表达。右海马 RT-PCR 检测 BDNF、ERK1/2、p-ERK1/2、CREB、p-CREB mRNA 的表达。

### 1.2.4 分子生物学检测

(1)ELISA 检测血清 CORT 含量变化:ELISA 试剂盒检测 CORT 含量,具体操作步骤如下:(1)根据说明书配置相关溶液;(2)酶标板取出,设一个空白孔,不做处理;设标准孔和样本空,每孔加入 50 μL 标准品或者样品;(3)于各孔加入酶结合物 50 μL(空白对照孔除外),随后依序加 50 μL 抗体,轻微震荡均匀后覆上封片,将孔板置于避光孵育箱中温育(37 °C,1 h);(4)洗板,拍去孔内混合液,于各孔注入 200 μL 缓冲液洗涤,静置 10 s 后甩干,共重复 3 次,拍干;(5)加显色液,A 液、B 液各 50 μL 振荡混匀后,避光显色(37 °C,15 min);(6)加终止液 50 μL;(7)酶标仪在 450 nm 波长检测各孔 OD 值。待反应终止后 10 min 内检测。

(2)Western Blot 检测海马脑区 BDNF、ERK1/2、p-ERK1/2、CREB、p-CREB 蛋白含量变化:将组织按比例置于预先加好蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂混合物的离心管中,低温研磨得到组织匀浆,离心,取上清液,BCA 试剂盒进行蛋白定量。经电泳、电转、封闭后分别加入对应一抗室温孵育后 4 °C 过夜;次日将孵育一抗的膜用 TBST 洗膜 3 次,二抗于室温孵育 30 min,TBST 洗膜 3 次,最后使用化学发光,计算条带灰度值。

(3) RT-PCR 检测大鼠海马脑区 BDNF、ERK1/2、CREB mRNA 表达结果:提取细胞总 RNA,取 100 mg 冻存的组织样本,液氮研磨粉碎,加 1 mL TRIzol,充分吹打混匀,冰上孵育 30 min。加入 200  $\mu$ L 氯仿,震荡 15 s,冰上静置 5 min。相关操作后,加入 75%乙醇 1 mL 洗涤 RNA 沉淀 4 次。每次洗涤后离心。弃上清,瞬离,弃去残余上清液,置于室温环境下干燥 10 min,加入 DEPC 水融解 RNA。使用超微量分光光度计测定 RNA 样品浓度,并使用核酸电泳测定 RNA 提取质量。质量达标的 RNA 冻存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。经定量后反转录。反应条件为:预变性  $95^{\circ}\text{C}$  2 min;变性  $95^{\circ}\text{C}$  15 s;退火  $58^{\circ}\text{C}$  30 s,共 40 个循环;延伸  $72^{\circ}\text{C}$  5 min。

### 1.3 统计学分析

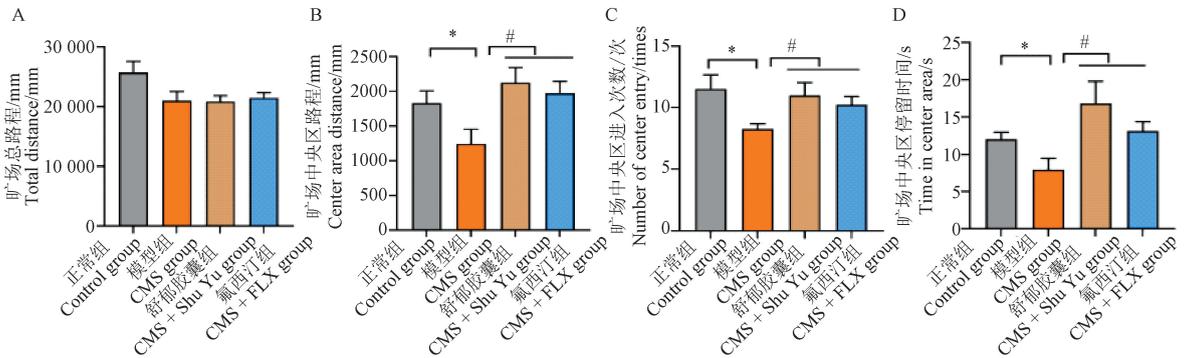
结果采用 GraphPad Prism 9.0 进行数据统计,除水迷宫训练期采用双因素方差分析外,其

他指标均采用非配对  $t$  检验进行组间两两比较。数据被表示为平均值  $\pm$  标准误差 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ),  $P < 0.05$  表示差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 行为学结果

各组母鼠所产雄性子代 OFT 总路程各组间无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (图 1A)。各组间的 OFT 中央区路程、中央区进入次数及中央区停留时间具有显著性差异。非配对  $t$  检验显示:相较于对照组,模型组显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ), 药物干预后恢复至对照组相近水平 (舒郁胶囊组:  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ; 氟西汀组:  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ) (图 1B ~ 图 1D)。提示各组大鼠运动能力未受到影响,但应激组子代探究能力下降,经舒郁胶囊及氟西汀治疗后的母鼠所产子代与正常组子代无异。



注:A:旷场总路程比较;B:旷场中央区路程比较;C:旷场中央区进入次数比较;D:旷场中央区停留时间比较;与正常组相比,\*  $P < 0.05$ ;与模型组相比,#  $P < 0.05$ 。(下图同)

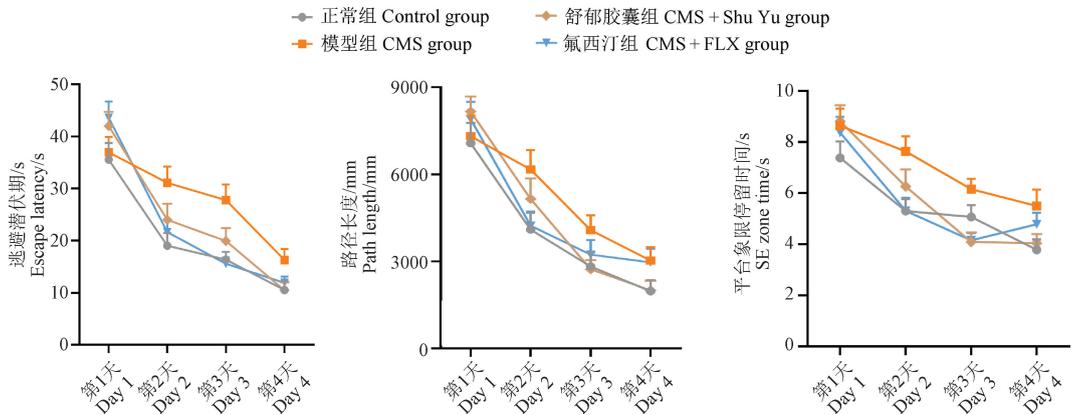
图 1 各组子代大鼠 OFT 行为比较

Note. A. Comparison of the total distance of the open field. B. Comparison of distances in the central area of the open field. C. Comparison of the number of entries in the central area of the open field. D. Comparison of dwell time in the central area of the open field. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ . Compared with the CMS group, #  $P < 0.05$ . (The same in the following figures)

Figure 1 Comparison of OFT experimental behavior among offspring rats in different groups

MWM 结果显示,双因素方差分析各组子代 MWM 训练期的逃避潜伏期、游泳距离、目标象限停留时间各参数有显著的时间效应(图 2)。但 Bonferroni 事后检验比较各组子代间无显著性差异。各组母鼠所产雄性子代大鼠 MWM 探索期运动距离、平台象限进入次数、平台象限停留时间组间具有显著性差异。非配对  $t$  检验显示模型组子代较对照组子代显著下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。用药后恢复至对照组子代水平

(舒郁胶囊组:  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ; 氟西汀组:  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) (图 3A ~ 图 3C)。各组间子代大鼠 MWM 探索期逃避潜伏期具有显著性差异。非配对  $t$  检验显示模型组子代较对照组显著增长 ( $P < 0.05$ ), 药物干预后恢复至对照组相近水平 (舒郁胶囊组:  $P < 0.05$ ; 氟西汀组:  $P < 0.01$ )。表明模型组子代大鼠的记忆提取 (memory retrieval) 能力下降,应激母鼠经舒郁胶囊及氟西汀干预治疗后子代大鼠的记忆提取

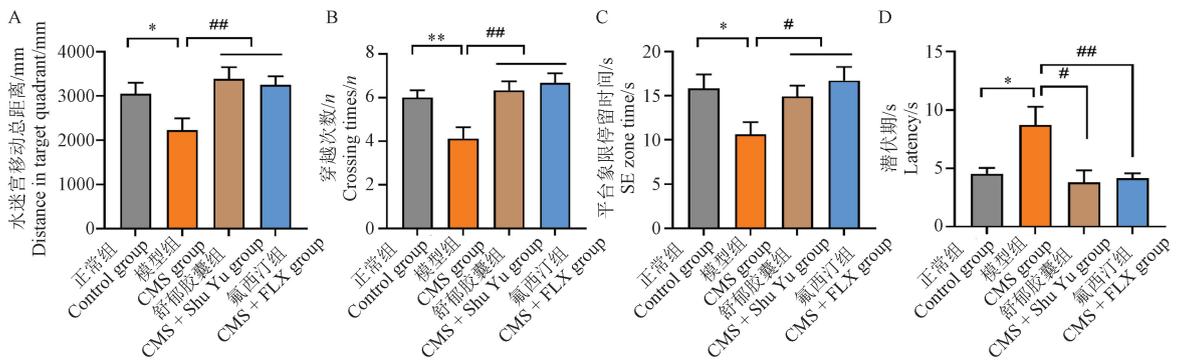


注:A:各子代大鼠逃避潜伏期比较;B:各子代大鼠游泳距离比较;C:各子代大鼠平台象限停留时间比较。

图2 各子代大鼠 MWM 训练期行为比较

Note. A. Comparison of escape latency in offspring rats of each group. B. Comparison of swimming distance among offspring rats in different groups. C. Comparison of platform quadrant dwell time among offspring rats of different groups.

Figure 2 Comparison of MWM training behavior among offspring rats in each group



注:A:各子代大鼠游泳距离比较;B:各子代大鼠的平台象限穿越次数比较;C:各子代大鼠的平台象限停留时间比较;D:各子代大鼠逃避潜伏期比较;与正常组相比, \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组相比, ###  $P < 0.01$ 。(下图同)

图3 各子代大鼠 MWM 探索期行为比较

Note. A. Comparison of swimming distance among offspring rats in each group. B. Comparison of platform quadrant crossing frequency among offspring rats of different groups. C. Comparison of platform quadrant dwell time among offspring rats of different groups. D. Comparison of escape latency periods among offspring rats in different groups. Compared with the control group, \*\*  $P < 0.01$ . Compared with the CMS group, ###  $P < 0.01$ . (The same in the following figures)

Figure 3 Comparison of MWM exploration behavior among offspring rats in each group

能力可恢复至正常水平(图 3D)。

FST 结果显示,相较于对照组子代,模型组子代强迫游泳实验悬浮不动时间、不动次数增多,差异具有显著性( $P < 0.05, P < 0.01$ )(图 4A,图 4C);潜伏期缩短,差异具有显著性( $P < 0.05$ )(图 4B)。母代接受应激并予以舒郁胶囊及氟西汀治疗的大鼠可有效逆转大鼠的绝望行为,其不动时间( $P < 0.01, P < 0.05$ )及不动次数减少( $P < 0.01, P < 0.05$ ),潜伏期延长( $P < 0.01, P < 0.05$ )。

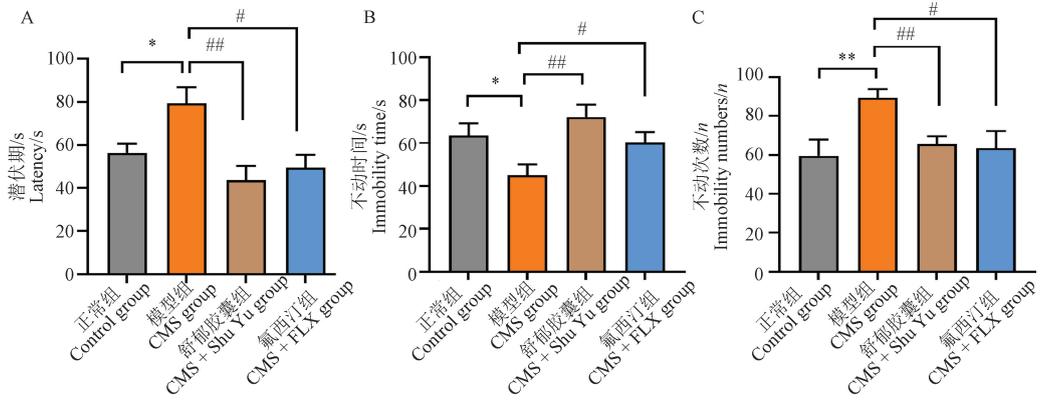
## 2.2 分子生物学检测结果

### 2.2.1 ELISA 检测结果

ELISA 结果显示,模型组子代 CORT 含量升高,差异具有显著性( $P < 0.05$ );舒郁胶囊组子代 CORT 含量降低,差异具有显著性( $P < 0.05$ ),氟西汀组子代 CORT 含量无显著性差异( $P > 0.05$ )(图 5)。

### 2.2.2 Western Blot 检测结果

Western Blot 检测结果显示:相较于对照组子代,模型组子代大鼠 BDNF 灰度值降低,差异具有



注:A:各组大鼠悬浮不动潜伏期比较;B:各组大鼠悬浮不动时间比较;C:各组大鼠悬浮不动次数比较。

图4 各组子代大鼠 FST 行为比较

Note. A. Comparison of suspension latency in different groups of rats. B. Comparison of immobility time in different groups of rats. C. Comparison of the number of times each group of rats remained motionless in suspension.

Figure 4 Comparison behavior of FST offspring rats in each group

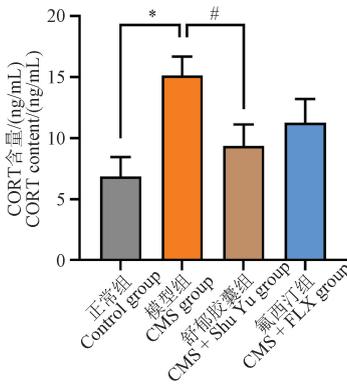


图5 各组子代大鼠 CORT 含量检测结果

Figure 5 Results of CORT content detection in offspring rats of each group

显著性( $P < 0.05$ ) (图 6A);  $p$ -ERK1/2 灰度值降低,差异具有显著性( $P < 0.05$ ) (图 6C);  $p$ -CREB 灰度值降低,差异具有显著性( $P < 0.05$ ) (图 6E); CREB 和 ERK1/2 灰度值无变化( $P > 0.05$ ) (图 6B,图 6D)。相较于模型组子代,舒郁胶囊组  $p$ -ERK1/2、 $p$ -CREB 灰度值增高,差异有显著性( $P < 0.01, P < 0.05$ ) (图 6C,图 6E); 氟西汀组 BDNF、 $p$ -CREB 灰度值增高( $P < 0.05, P < 0.05$ ) (图 6A,图 6E)。

### 2.2.3 RT-PCR 检测结果

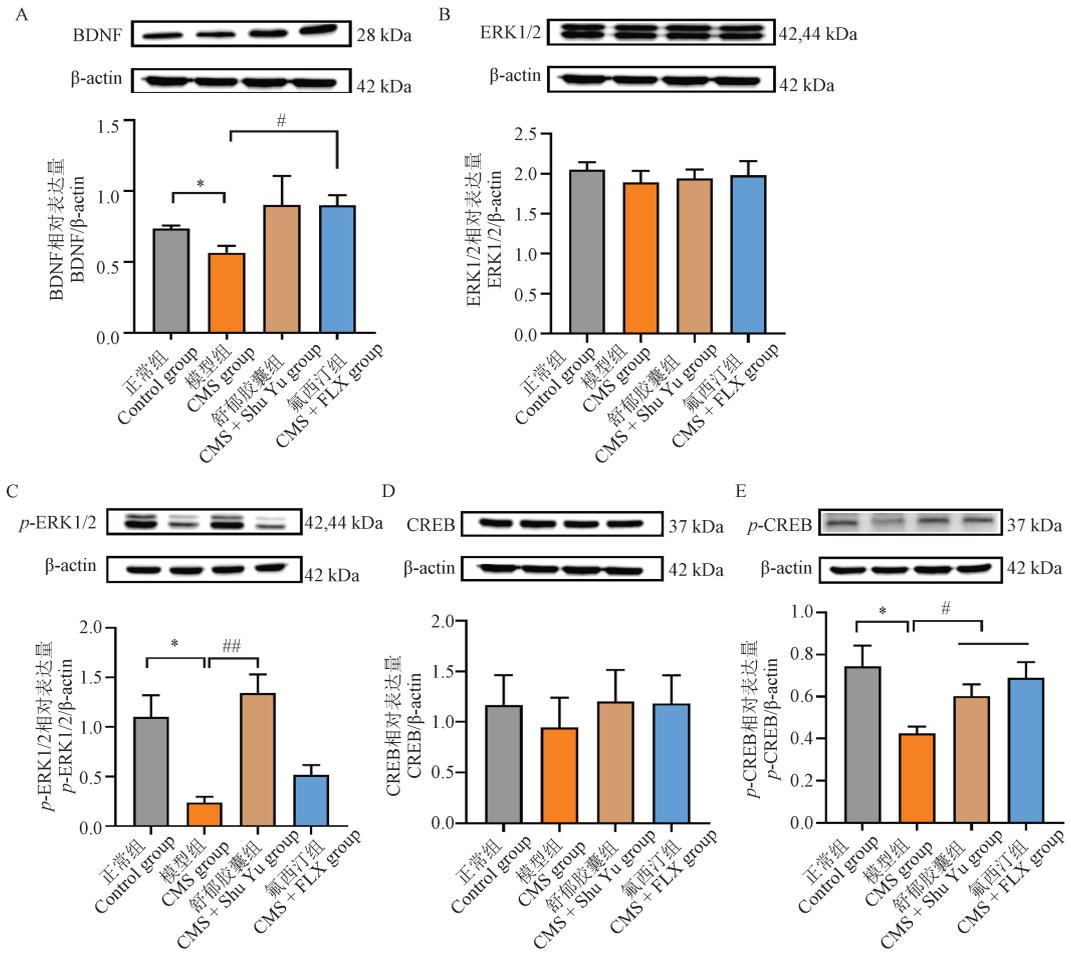
RT-PCR 检测结果显示:相较于对照组子代,模型组子代 BDNF、ERK1、ERK2、CREB mRNA 表达降低,差异具有显著性( $P < 0.01, P < 0.05, P < 0.01, P < 0.05$ )。与模型组子代相比,舒郁胶

囊组子代 BDNF、ERK2、CREB mRNA 表达增高( $P < 0.01, P < 0.05, P < 0.05$ ), ERK1 mRNA 虽无统计学意义,但有增高趋势; 氟西汀子代 BDNF、ERK2、CREB mRNA 无统计学意义( $P > 0.05$ ), ERK1 mRNA 表达增高,差异具有显著性( $P < 0.05$ ) (图 7)。

## 3 讨论

子代行为改变与生命早期应激密切相关,在胎儿和新生儿阶段,暴露于压力和不良生活事件是成年期焦虑、抑郁等情绪障碍的关键危险因素之一。动物实验及临床研究对于孕前母体应激对子代的行为效应已有大量报道<sup>[5-6]</sup>。在怀孕期间,尤其是产后暴露于压力的啮齿类动物模型也表现出焦虑、抑郁和情绪缺陷<sup>[7]</sup>。但对于孕前母体应激对子代的情绪行为效应研究相对较少,而抑郁为病,具有先伤神、后伤脏,先伤气、后伤形的特点,女子孕期处于特殊生理-心理-社会状况,情感上要经历巨大变化,易为七情所累,更易产生“惊”“恐”“忧”诸类的负性情绪。情志内伤病因的长期性与持续性决定了肝疏泄失常,气机郁结诱发病证的动态演变过程,诸如《景岳全书》言:“凡男女能孕所由,总在血气,若血气和平壮盛者,无不孕育”,提示肝疏泄藏血失职紊乱气血运行会影响到胎孕的形成。

临床所见抑郁母亲孕育子女中,女子乃多气



注:A:各组子代大鼠的 BDNF 与  $\beta$ -actin 电泳条带及相对表达量;B:各组子代大鼠的 ERK1/2 与  $\beta$ -actin 电泳条带及相对表达量;C:各组子代大鼠的 p-ERK1/2 与  $\beta$ -actin 电泳条带及相对表达量;D:各组子代大鼠的 CREB 与  $\beta$ -actin 电泳条带;E:各组子代大鼠的 p-CREB 与  $\beta$ -actin 电泳条带。

图 6 各组子代大鼠 Western Blot 检测结果

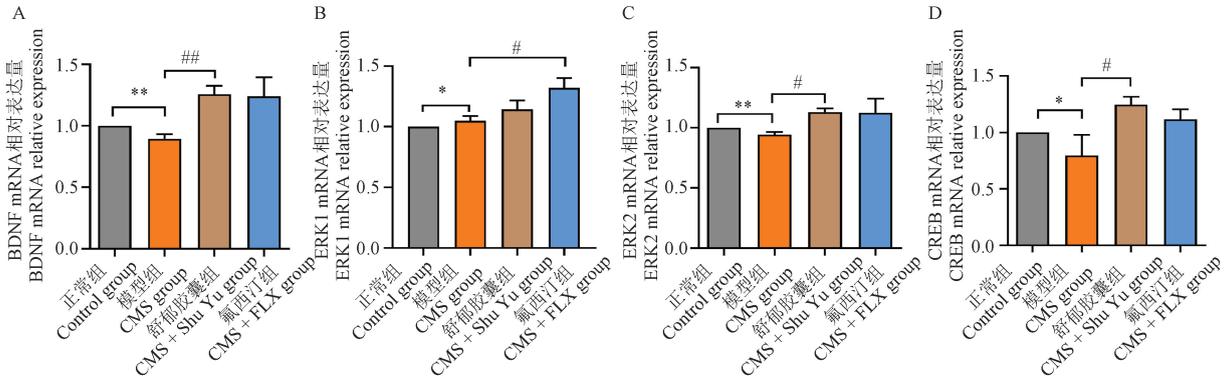
Note. A. BDNF and  $\beta$ -actin electrophoresis bands and relative expression of offspring rats in each group. B. ERK1/2 and  $\beta$ -actin electrophoresis bands and relative expression of offspring rats in each group. C. p-ERK1/2 and  $\beta$ -actin electrophoresis bands and relative expression of offspring rats in each group. D. CREB and  $\beta$ -actin electrophoresis bands of offspring rats in each group. E. p-CREB and  $\beta$ -actin electrophoretic bands of offspring rats in each group.

Figure 6 Western Blot detection results of offspring rats in each group

少血之体,较于男子更易出现气郁体质,但在本课题研究中,为消除成年雌性大鼠动情周期性激素的波动对行为学及分子生物学的潜在影响,本实验仅将雄性子代纳入研究。实验结果显示,应激子代大鼠出现快感缺失、探究能力下降等抑郁样表现,主要表现在旷场中央区进入次数、中央路程、停留时间的下降,提示应激子代有抑郁样情绪行为改变,这一抑郁可能性可被氟西汀和舒郁胶囊抵消和中和。FST 中 大 鼠 悬 浮 不 动 行 为 代 表 大 鼠 逃 生 行 为 的 失 败,予 以 药 物 治 疗 后 悬 浮 不 动 时 间 的 长 短 常 用 以 衡 量 药 物 的 抗 抑 郁

活性<sup>[8]</sup>。本实验观察到应激组子代较正常组子代悬浮不动次数增加、悬浮不动潜伏期减少,舒郁胶囊及氟西汀干预治疗后,其子代并未出现上述行为表型的变化,与正常组无异。

研究证实慢性持续应激可损及人体及动物的认知及学习、记忆功能<sup>[9]</sup>。孕期经历抑郁或焦虑情绪是母体产后抑郁症及子代情绪、认知行为异常的重要预测因素。本实验采用的 CMS 诱导的抑郁样表型可持续 4 周,提示母鼠孕期及子代胚胎形成阶段会持续受到慢性应激的影响。而胚胎期正值脑发育的关键时期,出生前应激可导



注:A:各子代大鼠海马 BDNF mRNA 相对表达量;B:各子代大鼠海马 ERK1 mRNA 相对表达量;C:各子代大鼠海马 ERK2 mRNA 相对表达量;D:各子代大鼠海马 CREB mRNA 相对表达量。

图 7 各组子代大鼠 RT-PCR 检测结果

Note. A. Relative expression levels of BDNF mRNA in the hippocampus of offspring rats in each group. B. Relative expression levels of ERK1 mRNA in the hippocampus of offspring rats in each group. C. Relative expression levels of ERK2 mRNA in the hippocampus of offspring rats in each group. D. Relative expression levels of CREB mRNA in the hippocampus of offspring rats in each group.

Figure 7 RT-PCR detection results of offspring rats in each group

致胎儿脑结构和形态的变化,继而损害成年子代的认知功能。

MWM 以测试待试动物对空间位置感及方向感(空间定位)的学习记忆能力。MWM 实验包括定位航行实验和空间探索实验两个基本程序,前者以“逃避潜伏期”检测动物学习能力,“逃避潜伏期”时间愈短,学习能力愈强;后者检测动物记忆能力,跨越平台次数愈多、平台区域停留时间、距离愈长、记忆水平愈好,反之则差<sup>[10]</sup>。本实验观察到提示母体孕前应激可导致子代对空间学习记忆能力障碍。

进一步检测发现,CMS 子代大鼠血清 CORT 水平显著高于正常大鼠子代,与其他类似研究结果一致。临床研究亦证实,女子孕期易感抑郁、焦虑、愤怒、环境变化、社会孤立等压力刺激,应对此类应激源和其他类似应激源的典型躯体反应是皮质醇激素(在啮齿类动物为皮质酮)升高,且皮质醇会透过胎盘,从而影响人类胎儿发育的各个方面<sup>[11]</sup>。并且在大部分抑郁症患者中,血液、唾液和尿液中的皮质醇浓度升高,肾上腺体积增大,活性增强。高皮质醇血症还可导致海马锥体神经元兴奋性毒性、树突萎缩、棘突缺失,抑制海马齿状回的神经发生。多余的 GCs 也可能减少海马体的体积,从而影响与情绪和奖励回路相关的大脑区域的功能,以上诸多改变可以通过抗抑郁药来挽救。

此外,实验还观察到 CMS 子代大鼠海马脑区 BDNF 蛋白及 mRNA 表达下降,经舒郁胶囊及氟西汀干预治疗后其子代 BDNF 水平可得到有效逆转,与其他研究结果一致<sup>[12]</sup>。此外,BDNF 可减少神经损伤,促进海马再生,在树突生长、轴突再生及突触可塑性调节中地位关键,是调节神经元活动最重要的基因之一<sup>[13]</sup>。ZHAO 等<sup>[14]</sup>开展的 Meta 分析发现 BDNF Val66Met 多态性调节了压力与抑郁症的关系,且遗传学研究已广泛探索抑郁症及认知功能障碍的遗传度,而 BDNF 基因多态性与抑郁症和认知功能均呈密切联系。本研究仅针对海马脑区 BDNF 含量及 mRNA 表达进行了检测,并未对海马神经元的轴突、树突、突触进行检测分析,下一步有待进行研究。

愈多证据表明 ERK 在中枢神经系统可调节突触可塑性及大脑发育,在胚胎发育及成人脑功能调节中具有关键作用<sup>[15-18]</sup>。ERK 在学习记忆的形成过程中起重要作用,并且可通过 Thr202 和 Tyr204 磷酸化激活,其底物含组蛋白、转录因子及其他重要的细胞内激酶<sup>[19]</sup>。ERK1/2 激活后可从细胞质移至细胞核并激活特定的转录因子 CREB(ser133),从而诱导基因表达。CREB 可增强应激反应,在神经可塑性及神经发生中的作用愈加显著,对恢复神经元结构及功能具有重要意义<sup>[20-21]</sup>。CREB 缺陷小鼠存在神经可塑性障碍,主要损害认知功能和空间学习记忆能力。内源

性 *p*-CREB 表达升高后,学习记忆功能障碍得到逆转,即 *p*-CREB 能明显促进脑损伤后神经的恢复。慢性外周给药 BDNF 可增加抑郁小鼠 BDNF、*p*-ERK 和 *p*-CREB 的表达,提示 BDNF 水平的升高激活 ERK/CREB 信号通路的可能性。

综上所述,本研究发现应激子代大鼠皮质酮异常, BDNF-ERK1/2-CREB 相关蛋白及 mRNA 表达下调,海马功能受损,子代对抑郁症的易感性增加并出现学习记忆能力的下降。但 BDNF-ERK1/2 通路是否为 CORT 应激激素直接介导尚待进一步证实。

### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] BRÄNNSTRÖM J, LÖVHEIM H, GUSTAFSON Y, et al. Association between antidepressant drug use and hip fracture in older people before and after treatment initiation [J]. *JAMA Psychiatry*, 2019, 76(2): 172–179.
- [ 2 ] BECKER M, PINHASOV A, ORNOY A. Animal models of depression: what can they teach us about the human disease? [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11(1): 123.
- [ 3 ] 万海娇. 基于微透析等技术探讨恐伤孕鼠对其子代情志和认知发育的影响 [D]. 郑州: 河南中医药大学; 2016.
- [ 4 ] WANG H J. Research on the influence of terror stress in adult female on the offspring's emotion and cognition development based on microdialysis technology [D]. Zhengzhou: Henan University of Traditional Chinese Medicine; 2016.
- [ 5 ] ZHOU Y, CONG T, CHEN J, et al. Protective role of TRPV2 in synaptic plasticity through the ERK1/2-CREB-BDNF pathway in chronic unpredictable mild stress rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 721: 150128.
- [ 6 ] CASARRUBEA M, ROY V, SORBERA F, et al. Temporal structure of the rat's behavior in elevated plus maze test [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 237: 290–299.
- [ 7 ] MCKENNA B G, HENDRIX C L, BRENNAN P A, et al. Maternal prenatal depression and epigenetic age deceleration: testing potentially confounding effects of prenatal stress and SSRI use [J]. *Epigenetics*, 2021, 16(3): 327–337.
- [ 8 ] ZHANG Z, LI N, CHEN R, et al. Prenatal stress leads to deficits in brain development, mood related behaviors and gut microbiota in offspring [J]. *Neurobiol Stress*, 2021, 15: 100333.
- [ 9 ] ZANG X, ZHANG J, HU J, et al. Electroconvulsive therapy combined with esketamine improved depression through PI3K/AKT/GLT-1 pathway [J]. *J Affect Disord*, 2025, 368: 282–294.
- [ 10 ] HAGAN J J, HATCHER J P. Revised CMS model [J]. *Psychopharmacology*, 1997, 134(4): 354–356.
- [ 11 ] OTHMAN M Z, HASSAN Z, CHE HAS A T. Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory [J]. *Exp Anim*, 2022, 71(3): 264–280.
- [ 12 ] 苏婕. 皮质酮影响突触可塑性机制及白藜芦醇对其影响的作用研究 [D]. 广州: 广州中医药大学; 2017.
- [ 13 ] SU J. The mechanism of stress on transmission of synaptic and the effect of resveratrol on stress [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine; 2017.
- [ 14 ] FIELD T, DIEGO M. Cortisol: the culprit prenatal stress variable [J]. *Int J Neurosci*, 2008, 118(8): 1181.
- [ 15 ] COLUCCI-D'AMATO L, SPERANZA L, VOLPICELLI F. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7777.
- [ 16 ] ZHAO M, CHEN L, YANG J, et al. BDNF Val66Met polymorphism, life stress and depression: a meta-analysis of gene-environment interaction [J]. *J Affect Disord*, 2018, 227: 226–235.
- [ 17 ] 李丽娜. 噻拉嗪对大鼠脑神经系统 PKA、ERK1/2/CREB/BDNF 信号通路影响的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学; 2018.
- [ 18 ] LI L N. Effect of xylazine on PKA、ERK1/2/CREB/BDNF signaling pathway in brain nervous system of rats [D]. Harbin: Northeast Agricultural University; 2018.
- [ 19 ] CHE P, ZHANG J, YU M, et al. DI-3-n-butylphthalide promotes synaptic plasticity by activating the Akt/ERK signaling pathway and reduces the blood-brain barrier leakage by inhibiting the HIF-1 $\alpha$ /MMP signaling pathway in vascular dementia model mice [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(5): 1392–1404.
- [ 20 ] RYU H H, KIM T, KIM J W, et al. Excitatory neuron-specific SHP2-ERK signaling network regulates synaptic plasticity and memory [J]. *Sci Signal*, 2019, 12(571): eaau5755.
- [ 21 ] LU Y, SAREDDY G R, WANG J, et al. Neuron-derived estrogen regulates synaptic plasticity and memory [J]. *J Neurosci*, 2019, 39(15): 2792–2809.
- [ 22 ] IROEGBU J D, IJOMONE O K, FEMI-AKINLOSOTU O M, et al. ERK/MAPK signalling in the developing brain: perturbations and consequences [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2021, 131: 792–805.
- [ 23 ] LEAL G, COMPRIDO D, DUARTE C B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 76: 639–656.
- [ 24 ] GUAN W, NI M X, GU H J, et al. CREB: a promising therapeutic target for treating psychiatric disorders [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2024, 22(14): 2384–2401.