

运动疲劳对大鼠纹状体单胺类递质含量及多巴胺受体表达的影响^{*}

侯莉娟¹ 刘晓莉¹ 乔德才^{1,2}

摘要

目的:通过测定纹状体单胺类神经递质及多巴胺受体表达量在运动疲劳前后的变化,探讨纹状体多巴胺系统信号通路在运动疲劳后中枢调控中的作用。

方法:雄性SD大鼠随机分为对照组和实验组,每组12只大鼠。以10天递增负荷游泳运动建立大鼠运动疲劳模型。采用高效液相色谱法及实时荧光定量PCR技术,测定纹状体区5-羟色胺、去甲肾上腺素、5-羟基吲哚乙酸、肾上腺素、多巴胺、3,4-二羟基苯乙酸、高香草酸及多巴胺受体的表达量。

结果:实验组纹状体5-羟色胺含量较对照组增加14.23% ($P<0.05$),多巴胺含量增加27.35% ($P<0.01$);运动疲劳后纹状体多巴胺Ⅰ型受体没有出现显著浓度变化,而多巴胺Ⅱ型受体浓度显著升高 ($P<0.01$)。

结论:运动疲劳使纹状体区5-羟色胺、多巴胺与多巴胺Ⅱ型受体含量增高,多巴胺可能与Ⅱ型受体结合激活间接通路影响锥体外系对运动功能的调节。

关键词 运动疲劳;纹状体;单胺类递质;多巴胺受体

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2010)-07-0639-04

Influence of exercises-induced fatigue on monoamine neurotransmitters and dopamine receptors in striatum in rats/HOU Lijuan, LIU Xiaoli, QIAO Decai/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(7): 639—642

Abstract

Objective: To testing monoamine neurotransmitters and dopamine receptors concentration after exercises-induced fatigue and to discuss the role of striatum in central regulation of dopamine system signal path way after exercises-induced fatigue.

Method: SD rats were randomly divided into experiment group and control group, 12 rats in each group. Ten-day swimming exercises with progressively increasing load protocol was used to set up exercises fatigue rat model. HPLC and real-time PCR were used to determine the changes of 5-HT, NE, DA, and their metabolic products contents and dopamine receptors.

Result: In experiment group the contents of 5-HT in striatum increased by 14.23% compared with that in control group ($P<0.05$), DA increased by 27.35% ($P<0.01$); D₂DR increased significantly compared with that in control group ($P<0.01$).

Conclusion: After exercises-induced fatigue, the increased dopamine maybe combine with D₂DR to activate indirect pathway to regulate extrapyramidal system.

Author's address Physical Education and Sports College, Beijing Normal University, Beijing, 100875

Key words exercises-induced fatigue; striatum; monoamine neurotransmitters; dopamine receptor

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.07.006

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30771050);北京市自然科学基金资助项目(5072024)

1 北京师范大学体育与运动学院,北京,100875; 2 通讯作者

作者简介:侯莉娟,女,博士,实验师;收稿日期:2009-08-10

多巴胺(dopamine, DA)是中枢神经系统中重要的儿茶酚胺类神经递质,它控制着认知、情感、摄食和内分泌调节等许多功能。近些年来,研究证明基底神经节的某些运动性疾病,如帕金森病、抽动秽语综合征、多动综合征等都与 DA 神经递质传递障碍有关^[1]。DA 在运动中枢调控中的作用也越来越引起广大学者的关注。有研究发现,动物脑组织中 DA 活性增强可抑制 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 合成与代谢,当 5-HT/DA 增加时,可破坏动物运动协调性,使运动能力下降,同时诱发运动性疲劳^[2];如果服用安非他明,可使脑内 DA 代谢水平升高,DA 能神经元的活性增加,耐力性运动成绩提高^[3]。本实验室前期实验观察到,大鼠运动疲劳后纹状体特定区域的即刻早期基因表达显著增高,这些特定区域均接受来自黑质的 DA 能神经元投射,推测 DA 系统可能参与运动疲劳后纹状体神经元电活动的调节。为此,本研究采用高效液相色谱法 (high-performance liquid chromatography, HPLC)测定运动疲劳前后大鼠纹状体区单胺类递质的含量,同时采用荧光定量 PCR(real time-PCR, RT-PCR)分子生物学方法,测定运动疲劳后纹状体中多巴胺 I 型受体(D₁ dopamine receptor, D₁DR)和多巴胺 II 型受体(D₂ dopamine receptor, D₂DR)的表达,探讨 DA 神经递质及受体在纹状体神经元信号转导调节中的作用。

1 对象与方法

1.1 动物及分组

雄性 SD 大鼠,体重 230±20g,动物分笼饲养,自由饮食(术前禁食除外),动物房内温度 20—22℃,相对湿度为 60%—70%,光照周期为 12h(7:00—19:00 光照;19:00—7:00 黑暗)。动物随机分为对照组(control group, CG)(n=12)和实验组(experiment group, EG)(N=12),各组包括 HPLC 组(n=6)和 RT-PCR 组(n=6),共 24 只。

1.2 运动疲劳动物模型的建立

动物完成 3d 适应性游泳运动(15min/d)后开始建模,参照本实验室建立的 10d 递增负荷游泳运动方式^[4]。训练时间为 10d,训练在直径为 120cm 的塑钢圆桶中进行,静水深 90cm,水温 30±1℃。第 1—2 天动物游泳训练时间为 30min,第 3—5 天每天递增

30min,第 6—7 天每天进行一次力竭性游泳训练,第 8—10 天每天进行 2 次力竭性游泳训练,次间间隔 6h。游泳训练期间对动物运动能力及活动状态进行观察。对照组相同条件饲养,不参加游泳训练。

1.3 样品制备及 HPLC 实验

实验组大鼠运动疲劳建模后即刻断头处死,迅速剥离大脑,分离左侧纹状体,称重后放入 Epp 管中用液氮快速冷冻。根据脑组织重量加入溶液:纹状体 160mg 以下加入 475μl 0.1M HClO₄ 和 25μl 的 DHBA, 160mg 以上的加入 665μl 的 0.1M HClO₄ 和 35μl、2μg/μl 的 DHBA。

测定条件:①色谱条件:色谱柱为 4.6×150mm, Nova-pakC18, 5μm(大连色谱中心填充);流动相为 50mM, pH 为 3.5 的柠檬酸-乙酸钠缓冲液(内含 0.6mM 的 B-8 离子对试剂, 1.0mM 二丁正胺, 0.3mM 的 Na₂EDTA, 2%甲醇),流速为 1.0ml/min;玻璃碳工作电极,检测电压为 0.75V。②标准液成分为:10μl 的 0.1M HClO₄ 中含有 NE 5ng、5ng、EDHBA 1ng、DOPAC 5ng、DA 5ng、5HIAA 10ng、HVA 10ng、5-HT 10ng。

测定时取 20μl 上清液进样检测单胺类神经递质及其主要代谢产物的浓度,包括去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、肾上腺素(epinephrine, E)、DA、5-HT 及其代谢产物 5-羟基吲哚乙酸(5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA)、3,4-二羟基苯乙酸(3,4-dihydroxy-phenylacetic acid, DOPAC)和高香草酸(homovanillic acid, HVA),含量以 ng/g(脑组织湿重)表示。

1.4 荧光定量 PCR 实验

DA 两种受体基因的引物序列:D₁DR(500bp)引物设计,上游 5'-GTA GGG TTC TTA ACG GTC TGG-3',下游 5'-CTC TTC CTT CTT CAG GTC CTC-3'。D₂DR(310bp)引物设计,上游 5'-TTC AGA GCC AAC CTG AAG ACA CCA-3',下游 5'-GCT TTC TGC GGC TCA TCG TCT TAA-3'。反应体系:10×SYBR Green PCR buffer(2.5μl),mgcl(25mM)(3μl),dNTP mix(2μl),ampliTaq gold(5U/μl)(0.125μl),ampErase UNG(1U/μl)(0.25μl),primer(5pmol)(2μl),Template +ddH₂O(15.125 μl)。

1.5 统计学分析

所得数据以均数 $\pm$ 标准差表示,并用 SPSS13.0 进行统计分析,各组间差异用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 运动疲劳后纹状体单胺类神经递质含量变化

如图 1 所示,HPLC 组大鼠纹状体 5-HT 含量较对照组增加 14.23% ($P<0.05$);NE 含量较对照组增加 7.93%,有增高趋势,但差异无显著性 ($P>0.05$);DA 含量较对照组增加 27.35% ($P<0.01$);实验组 DOPAC 与 HVA 较对照组分别升高 15.28% 和 10.72%,差异无显著性 ($P>0.05$)。

2.2 运动疲劳后纹状体 DA 受体含量变化

见表 1。与对照组相比,RT-PCR 组实验动物运动疲劳后纹状体 D_1 DR 表达没有出现显著的变化,而 D_2 DR 比对照组显著升高 ($P<0.01$)。

图 1 运动疲劳后纹状体单胺递质含量变化 (ng/g 湿组织)



* 与 CG 组比较 $P<0.05$; ** 与 CG 组比较 $P<0.01$

表 1 运动疲劳后纹状体多巴胺受体表达的变化

组别	D_1 DR	D_2 DR
CG 组	0.029549	0.01878272
EG 组	0.026201	0.04058527 ^①

①与 CG 组比较 $P<0.01$

3 讨论

3.1 运动疲劳对纹状体单胺类神经递质含量影响

正常生理状态下,中枢兴奋性和抑制神经递质的代谢处于动态平衡,使神经元保持稳定的自发电状态,调节机体的功能活动与执行。本实验运动疲劳后纹状体神经核团 5-HT 及 DA 浓度增加显著高于对照组,说明这两类神经递质参与了运动疲劳后纹状体神经元电活动变化的调节。

中枢神经系统内富含 5-HT 神经元的中脑神经纤维投射到纹状体和黑质 (substantia nigra, SN),电

生理和神经化学研究均显示这种投射主要起抑制作用,5-HT 可通过抑制色氨酸羟化酶 (tryptophan hydroxylase, TPH) 的活性及纹状体突触小体中 DA 的释放而抑制纹状体细胞的活性。Davis 认为 5-HT 可抑制 DA 能系统和 NE 能系统,并且这种抑制可因 DA 能系统的损伤或功能减弱而变得更加显著,纹状体中 DA 和 NE 在运动后的变化可能是 DA 进一步代谢和受到 5-HT 调控的结果^[5],同时 5-HT 受体因 5-HT 的释放而发挥生理作用,并可能对 5-HT 的释放起到调节作用。Chennaoui 等^[6]报道经过 7 周的运动训练,大鼠纹状体的 5-HT_{1B} 受体 mRNA 表达水平没有发生显著的变化,认为运动对于中枢神经系统的影响在不同脑区表现不尽相同。同时也提示运动对于纹状体 5-HT 系统的影响可能是通过其受体下调的作用机制而完成的。纹状体是脑组织中 DA 含量最高的组织,占全脑的 70%—80%,这与脑内 DA 神经元的细胞体和神经纤维的投射有关^[7]。Chaouloff 研究小组以及 Bailey 研究小组的研究均证实:运动中 DA 的合成和代谢加速,其活性的增强对于保持体力活动和耐力是必需的^[8],所以本实验中 DA 含量的升高除调节神经元电变化外,对于动物疲劳后活动能力的维持也起到一定的作用。

3.2 DA 受体在运动疲劳后纹状体电变化中的调节作用

中枢神经系统产生变化的神经递质最终对神经元起什么样的作用,主要取决于神经递质结合的受体类型^[9-10]。DA 受体对其他神经递质或神经肽的调节作用,是黑质投射到纹状体的 DA 神经系统调节锥体外系运动的重要环节,当 DA 作用到纹状体的 D_1 DR 和 D_2 DR 后,能够调节直接和间接回路巧妙地平衡锥体外系运动功能^[11]。

D_1 DR 位于纹状体直接回路 γ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA)/P 物质 (substance P, SP)/强啡肽 (dynorphin, DYN) 神经元上。 D_2 DR 位于间接回路的 GABA/脑啡肽 (enkephalin, ENK)/神经降压肽 (neurotensin, NT) 神经元上。DA 通过 D_1 DR 与激活型 G 蛋白正偶联,兴奋直接回路的运动活动,又通过兴奋 D_2 DR 与抑制型 G 蛋白负偶联,对间接回路的运动活动有去抑制作用^[12-13]。 D_2 DR 是 DA 自身受体存在于 DA 神经末梢和胞体-树突两个部

位。在 DA 能神经系统中, D_2DR 具有调节 DA 生物合成和释放的双重功能。 D_2DR 选择性激动剂有反馈性抑制作用, 能被 DA 受体拮抗剂所阻滞, D_1DR 选择性激动剂则无上述的抑制作用^[14]。另一方面, DA 受体激动剂通过兴奋突触前 D_2DR 自身受体, 抑制酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)活力, 使 DA 生物合成和 DA 更新率发生改变。相反的, 对 D_2DR 拮抗剂阻滞突触前 DA 自身受体, 使 TH 变构激活, 增强 TH 活动, 加快 DA 的生物合成^[15]。当 D_2DR 激活时, 使突触前环磷酸腺苷(cycle adenosine mono phosphate, cAMP)浓度降低, 导致依赖 cAMP 的蛋白激酶 A 的蛋白激酶活力随之下降, 通过黑质-纹状体的长反馈通路影响 DA 的合成, 所以本实验中观察到的 DA 含量增高可能由 D_2DR 介导。

本实验只对运动疲劳后受体表达量的变化进行了观察, 而受体亲和力、特异性变化、自身抗体的改变以及受体-效应器偶联机制异常等因素都对受体后作用起到调节作用。为此, 要想确定运动疲劳后 DA 系统确切的生物学效应, 还有待进一步电生理学研究的证实。

4 小结

运动疲劳后纹状体 5-HT 和 DA 含量显著增高, D_2DR 受体表达量显著增加。 D_2DR 的激活可通过突触前膜受体负反馈调节 DA 的合成, DA 可能与 D_2DR 结合激活间接通路调节锥体外系的功能。

参考文献

- [1] 高强, 何成奇. 帕金森病患者运动功能评定与运动疗法的进展[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(5): 473—476.
- [2] Gilbert C. Optimal physical performance in athletes: key roles of dopamine in a specific neurotransmitter/hormonal mechanism [J]. Mech Ageing Dev, 1995, 84(2): 83—102.
- [3] Dishman RK. Brain monoamines, exercise, and behavioral stress: animal models[J]. Med Sci Sports Exerc, 1997, 29(1): 63—74.
- [4] 侯莉娟, 刘晓莉, 乔德才. 大鼠游泳运动疲劳模型建立的研究[J]. 实验动物科学与管理, 2005, 22(1): 1—3.
- [5] McCloskey DP, Adamo DS, Anderson BJ. Exercise increases metabolic capacity in the motor cortex and striatum, but not in the hippocampus[J]. Brain Research, 2001, 891(1—2): 168—175.
- [6] Chennaoui M, Drogou C, Gomez-Merino D, et al. Endurance training effects on 5-HT_{1B} receptors mRNA expression in cerebellum, striatum, frontal cortex and hippocampus of rats[J]. Neurosci Lett, 2001, 7(1): 33—36.
- [7] Davis JM, Alderson NL, Welsh RS. Serotonin and central nervous system fatigue: nutritional considerations [J]. Am J Clin Nutr, 2000, 72(2): 573—578.
- [8] Chaouloff F. Physical exercise and brain monoamines [J]. Acta Physiol Scand, 1989, 137(1): 1—13.
- [9] MacDonald SW, Nyberg L, Backman L. Intra-individual variability in behavior: links to brain structure, neurotransmission and neuronal activity [J]. Trends Neurosci, 2006, 29(8): 474—480.
- [10] 吴永涛, 刘宏亮, 陈兴书, 等. 大麻素受体在成年大鼠脑组织中的分布特点[J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24(3): 197—199.
- [11] Bracci E, Centonze D, Bernardi G, et al. Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum [J]. J Neurophysiol, 2002, 87(4): 2190—2194.
- [12] Ariano MA, Aronin N, Difiglia M, et al. Striatal neurochemical changes in transgenic models of Huntington's disease[J]. J Neurosci Res, 2002, 68(6): 716—729.
- [13] 何静杰, 张通. 帕金森病康复疗效的分析[J]. 中国康复医学杂志, 2002, 17(5): 311—312.
- [14] Powrozek TA, Sari Y, Singh RP, et al. Neurotransmitters and substances of abuse: effects on adult neurogenesis [J]. Curr Neurovasc Res, 2004, 1(3): 251—260.
- [15] Backman L, Nyberg L, Lindenberg U, et al. The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: current status and future prospects[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2006, 30(6): 791—807.