·基础研究·

不同强度训练负荷对大鼠认知情绪变化及NMDA受体、PSD-95和KIF-17 mRNA和蛋白表达的影响*

任鹤菲[1] 陈立军[1,2] 于利人[1] 靳秋月[1]

摘要

目的：建立SD大鼠中等和高强度持续训练运动模型，探究不同训练负荷下，大鼠海马N-甲基-D-天冬氨酸受体（NMDARs）、突触后致密物质-95（PSD-95）和驱动蛋白家族蛋白17（KIF-17）表达及认知和情绪功能的变化。

方法：实验建立SD大鼠跑台运动模型，分别进行中等和高强度持续训练4周，中等强度运动时采用递增负荷训练，高强度运动时采用高速训练，并设立正常对照组。测量运动后大鼠体质量减轻程度的变化，real-time PCR和Western blotting分别检测不同训练负荷对大鼠海马NMDA受体，PSD-95和KIF-17 mRNA和蛋白表达的影响。

结果：相比对照组，中等强度持续运动精神状态明显更佳，高强度持续运动状态萎靡。中等强度持续训练组PSD-95、KIF-17和NMDA受体的mRNA和蛋白的表达显著上升（$P<0.05$），而高强度持续训练组mRNA和蛋白的表达则受到抑制（$P<0.05$）。

结论：不同训练负荷对大鼠认知情绪及精神状态有较大影响，可以影响大鼠NMDA受体、PSD-95和KIF-17 mRNA和蛋白的表达。适量的运动训练不仅可以减轻缺氧对海马的损害，更可以有效地改善海马的功能。

关键词 训练负荷；氧化应激；谷氨酸受体；认知；情绪

中图分类号：R493 **文献标识码：**A **文章编号：**1001-1242（2016）-07-0746-05

Effects of different training loads on cognitive and emotional functions and mRNA and protein expressions of N-methyl-D-aspartate receptor subunits, postsynaptic density 95 and kinesin family member 17 in hippocampus of rats/REN Hefei, CHEN Lijun, YU Liren, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(7): 746—751

Abstract

Objective: To explore the changes of cognitive and emotional functions as well as the mRNA and protein expressions of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs), postsynaptic density 95 (PSD-95) and kinesin family member 17 (KIF-17) in hippocampus for long-term moderate-intensity and high-intensity training models in rats.

Method: The exercise model of SD rats were established by treadmill running of moderate or high intensity for 4 weeks. The rats in the moderate intensity group were given endurance training with incremental intensity, while the high-speed training in the high intensity group. And we also set the normal control group. The body weight of rats was measured before and after exercise in order to determine the reduction. Real-time PCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expressions of NMDARs, PSD-95 and KIF-17 in hippocampus under different training loads.

Result: Compared with those in the control group, the rats in the moderate-intensity group had better mental status, while a dispirited mental status in the high-intensity group. In the moderate-intensity group, the mRNA and protein expressions of PSD-95, KIF-17 and NMDARs were significantly increased ($P<0.05$) with the sup-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.07.006

*基金项目：武警后勤学院重点项目（WKH2009Z02）

1 中国人民武装警察部队后勤学院，天津市东丽区，300309；2 通讯作者

作者简介：任鹤菲，女，本科在读生；收稿日期：2015-12-10

pressed expressions in the high-intensity group (P<0.05).

Conclusion: Different training loads have great influences on the cognition, emotion and mental status of rats, and can affect the mRNA and protein expressions of NMDARs, PSD-95 and KIF-17. Appropriate training can not only alleviate the damage of hypoxia to hippocampus, but also effectively improve the function of hippocampus.

Author's address Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin, 300309

Key word training load; oxidative stress; glutamate receptors; cognitive; emotions

运动可以引起机体适应性改变,增强机体运动适应的能力,合理的运动锻炼能促进脑的健康,改善脑的学习记忆和情绪调控能力[1],并且提高机体的代谢水平和工作能力,但超负荷训练和各种军事体育竞赛引起的过强的应激则可能导致机体各项功能出现障碍,同时对学习记忆及情绪调控也会产生一定负面影响[2],更是抑郁症状的重要表现。海马是边缘系统的重要组成部分,是学习记忆的重要部位,又是最易受疲劳应激损伤的敏感部位[3]。N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptors, NMDARs)是一类兴奋性氨基酸受体,可引起不同强度运动所致的学习记忆能力和情绪的变化,与抑郁症的进展及相应的针对性治疗密切相关[4]。

本实验参照Bedford等[5]的方法,建立中等和高强度持续训练大鼠跑台运动训练模型。测试大鼠训练4周后NMDA相关受体以及突触后致密物质-95(postsynaptic density 95, PSD-95)和驱动蛋白家族蛋白17(kinesin family member 17, KIF-17)水平的变化,深入研究训练所致海马功能改变的可能机制,对于不同训练负荷下如何缓解疲劳、改善疲劳机体认知和情绪功能有非常重要的意义,同时为科学训练提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性清洁级SD大鼠16只,鼠龄2个月,体质量(215±11)g,由北京大学医学部实验动物科学部提供(许可证号:SCXK2002-0001),动物房维持在温度(23±2)℃,湿度40%—60%,每日按自然昼夜照明,自由进食饮水。

1.2 运动方案及样本制备

每次由专人在同一时间对大鼠进行训练,训练时间从8:00开始。实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。大鼠适应性饲养1周,然后进行3d适应性跑台训练(坡度为0°,速度8.2m/min,10min/d)后,将SD大鼠24只随机分为正常对照组(C)、中等强度持续训练组(N)和高强度持续训练组(H),每组各8只。实验参照Bedford等[5]的方法,中等强度持续训练组采用递增负荷训练,起始速度为15m/min,每间隔5min速度增加3m/min,运动至速度为20m/min后维持此速度并增加跑台坡度为5°,时间60min,运动强度为64%—76% VO_2max;高强度持续训练组训练速度为50m/min,时间6min,休息5min后,继续依此训练3次,运动强度>80% VO_2max[6]。训练时使用电刺激或毛刷刺激,维持大鼠在跑台跑道前1/3处,以保证运动强度恒定。每次实验后均检查动物是否受伤,如有受伤则及时治疗和休息调整。训练4周,每周6d。正常对照组大鼠正常笼内生活,不运动。训练后即刻处死大鼠,对照组同时断头取脑,称重。冰上分离海马组织,Trizol 法提取总RNA,凝胶电泳鉴定其完整性,酶标仪测定其纯度和含量。

1.3 大鼠肛温(rectal temperature, Tr)与体质量减轻程度(weight loss)测定

运动后即刻测定大鼠Tr。用数字温度计(北京师范大学司南仪器厂SN2202型)插入大鼠肛门括约肌内约5cm,待温度读数稳定(约5s)后读数。用Tr代表大鼠核心体温(Tc)。大鼠在训练后即刻称重,并计算每周的体质量减轻程度。

1.4 实时定量PCR反应体系

利用逆转录试剂盒,经RT-PCR生成相应的cDNA。反应条件如下:30℃,10min;42℃,30—50min;95℃,5min;4℃,5min。以各组相应的cDNA为模板,利用两步法进行real-time PCR,荧光实时定量PCR 仪为Applied Biosystems公司产品,反应条

件如下：预热94℃，5min；94℃，15s；34s (NR1 56℃；NR2A，PSD-95和β-actin均为58℃；NR2B和KIF-17为60℃)，共循环35次，最后在72℃下保温10min。反应结束后，使用StepOne软件(ABI公司产品)分析PCR过程各检测样本的CT值.根据相对定量法mRNA的相对变化量公式Ratio=$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算目标片段的扩增比例。扩增产物以2%的琼脂糖凝胶电泳进行观察。各样本重复3次，以β-actin作为内参。设计的引物序列如下：

NR1:

(forward)5'-ACCATGCACCTGCTGACATT-3'

(reverse)5'-CTTCAGCACCTCGGACAGCA-3'

NR2A:

(forward)5'-TCCACCTTCTCCGGCTACAG-3'

(reverse)5'-GTCGGTGCTGCACTGTCTTG-3'

NR2B:

(forward)5'-GGATTCTGCATTGTGAGCTG-3'

(reverse)5'-TCGCTTGCATATCCACATAA-3'

PSD-95:

(forward)5'-ACG ACAAGACCAAGGACTGC-3'

(reverse)5'-TGGCCTTTAACCTGGACCAC-3'

KIF-17:

(forward)5' - AAGGTACCGCGTGTGAACCTGCTTA-CAA-3'

(reverse)5' - AAAAGCTTCCATCGAAGGTGAACT-GCTT-3'

1.5 Western blotting检测

分别取50μg样品进行SDS-PAGE电泳，然后转入PVDF膜上，加入5%脱脂奶粉封闭液，在摇床上缓慢摇动室温封闭60min。按比例加入一抗(1∶1000, Abcam, UK)4℃孵育过夜。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔抗体(1∶5000;Abgent, USA)37℃孵育1h。ECL荧光显色后在暗室中X射线摄片曝光，结果用凝胶成像系统分析拍照并利用Quantity One V4.40 (Bio-Rad, USA)对条带的信号强度进行定量分析。

1.6 统计学分析

应用SPSS 19.0统计学软件对数据进行统计学分析，结果数据分析采用单因素方差分析和t检验，$P<0.05$为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 不同训练强度下大鼠身体外形及精神状态的改变

经过长期观察，训练前后大鼠的身体外形及精神状态有了明显的改变。相比对照组，中等强度持续运动组健康状况良好，精神状态明显更佳；高强度持续训练组则食欲下降，精神萎靡。见表1。

2.2 不同训练强度下大鼠的体质量减轻程度

与训练前相比，训练2周，中等强度持续运动组体质量减轻程度要低于高强度持续训练组；训练4周，中等强度训练组的体质量减轻更为明显。见表2。

2.3 Real-time PCR检测NMDA受体、PSD-95和KIF-17 mRNA表达情况

与对照组相比，NR2A、NR2B、PSD-95和KIF-17在中等强度持续运动组中的表达显著上升，而高强度持续训练组则表现出明显下降趋势($P<0.05$，图1)。此外，NR1 mRNA的含量在中等强度持续运动组的表达无明显变化(中等强度运动组：109%±8%，对照组：100%±0%；$P>0.05$)。

2.4 Western blotting检测NMDA受体、PSD-95和KIF-17蛋白表达

相对于对照组，NR2A、NR2B、PSD-95和KIF-17在中等强度持续运动组中的表达均显著上升，而NMDA受体和KIF-17高强度持续训练组中则表现出明显下降趋势，其差异有显著性意义($P<0.05$，图2)。

表1 大鼠身体外形及精神状态的改变 ($\bar{x}\pm s$)

组别	Tr(℃)	身体外形	安静时精神状态	训练时精神状态
对照组	37.18±0.18	体型肥胖，毛色正常	安静，不好动，饲料食用完全	–
中等强度持续训练组	40.62±0.57①	体型健硕，毛色发亮	活泼，好动，饲料食用完全	积极
高强度持续训练组	39.70±0.21①	体型瘦削，毛色灰暗	萎靡，易激惹，饲料常有剩余	躁狂

①与对照组相比$P<0.05$

表2 大鼠体质量减轻程度 ($\bar{x}\pm s$,g)

组别	训练时间(周)			
	1	2	3	4
中等强度持续训练组	8.4±1.7	7.7±2.1①	9.4±1.5	8.2±1.5①
高强度持续训练组	8.1±2.8	9.4±2.2	8.9±2.2	6.6±2.1

注：与高强度持续训练组相比，①$P<0.05$

与对照组相比,NR1中等强度持续运动组中的表达水平差异无显著性意义(中等强度运动组:103.7%±2.2%,对照组:100.0%±1.9%,P>0.05)。除此之外,PSD-95在高强度持续训练组中的表达并无显著差异(高强度持续训练组:95.4%±1.3%,对照组:100.0%±0.9%,P>0.05)。

3 讨论

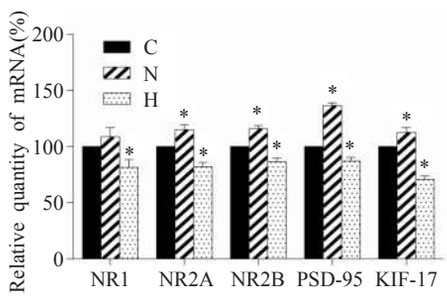
3.1 不同强度训练负荷对大鼠认知情绪变化的影响

现代医学研究证实,不同强度的运动负荷可以影响运动个体的身体外形及精神状态。有研究发现,认知和情绪能力降低是抑郁症状的重要表现,过度应激可以引起大鼠及人类认知和情绪能力的减退[6]。本实验结果显示,运动训练可导致大鼠健康状况和精神状态发生明显改变,而不同强度运动负荷产生的影响也各不相同。适宜的运动强度可以使大鼠保持身心愉悦,训练效果也更佳,进而促进认知和情绪功能,并可以在一定程度上缓解实验动物的焦虑行为。且本实验发现,高强度运动可使大鼠体重减轻明显,表现出显著的抑郁症状,这与以往的研究结果相符合。

3.2 不同强度训练负荷对NMDA受体、PSD-95和KIF-17表达的影响

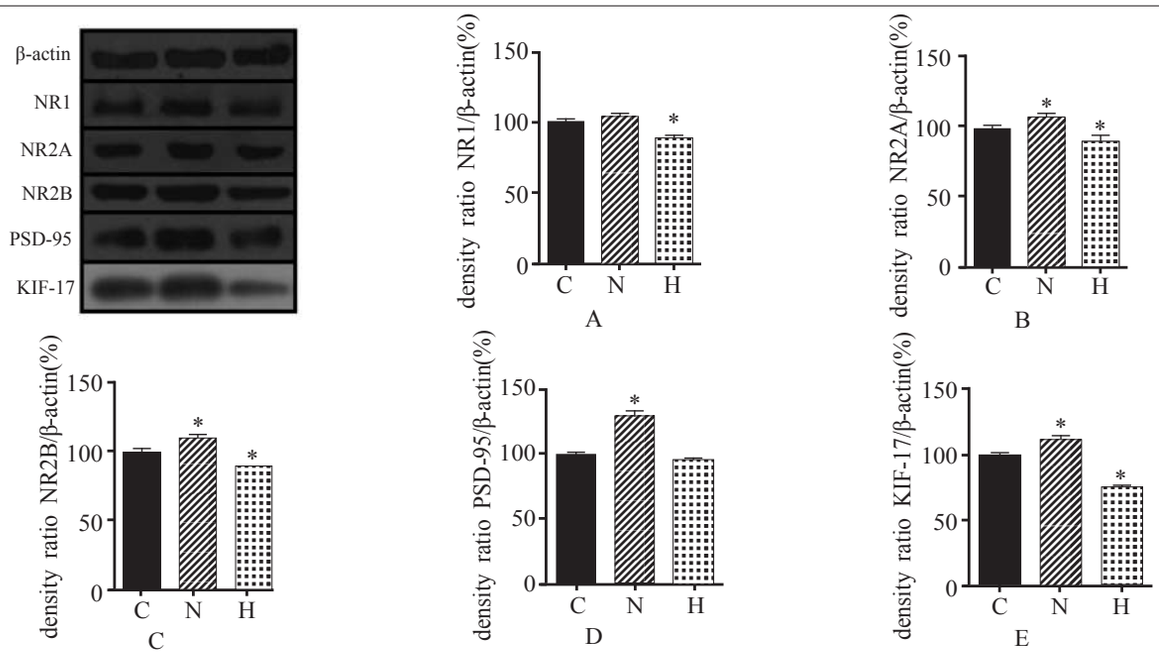
NMDA受体是一种离子通道型谷氨酸受体,主要是由NR1和NR2(A或B)组成的异聚体,需同时结合谷氨酸和甘氨酸才能被激活,发挥生物学功能[7],主要分布于中枢神经系统突触后膜,在海马等前脑部位表达最高。PSD-95是一种支架蛋白,主要位于突触后致密区,在谷氨酸受体的信号整合和转导中具有关键性作用。KIF-17是kinesin-2的家族成员,是由驱动蛋白单体组成的二聚体结构,特异性地分布

图1 NMDA受体、PSD-95和KIF-17 mRNA相对表达量



注:与对照组相比,*P<0.05

图2 NMDA受体,PSD-95和KIF-17蛋白表达情况



注:与对照组相比,*P<0.05

于神经系统和睾丸组织中。

NMDA受体、PSD-95和KIF-17三者之间也有着密不可分的联系。PSD-95广泛分布在人脑，并且与NMDA受体分布的区域重叠，NR1-NR2B 的C末端与PSD-95相连。现已知NR2B为KIF-17的主要运送细胞内组分，因此KIF-17的转运功能下降往往会造成NR2B的表达量发生相应的改变从而导致机体的多种疾病和病理状态。PSD-95可以与KIF-17结合，当破坏或抑制KIF-17时将不能转运NR2B。故而，PSD-95和KIF-17的结合对NMDA受体突触的传递格外重要。

NR1是功能亚基，其表达紊乱可引起受体功能的丧失；NR2是调节亚基，可以辅助NMDA受体形成多元化结构[8]。近年来研究发现，NMDA受体对认知功能有重要作用，敲除NR2B的小鼠其树突棘的密度明显降低，相关的各项功能也受到了干扰[9]。以往的研究和本实验结果提示，运动4周后，大鼠海马NMDA受体的表达水平随运动负荷强度改变而改变，其中中等强度训练对其表达的促进作用最为显著。适宜的运动可能通过提高NR1、NR2A和NR2B基因表达水平来影响NMDA受体的功能，易化突触信息传递。此外，实验发现适量的运动并不能显著提高NR1的表达，对其产生原因和相关机制仍有待进一步研究。

有研究表明，当大鼠处于高强度运动时，NMDA受体接受如Ca^{2+}等多种离子以及突触后致密物PSD的调控，使脑组织内的细胞Ca^{2+}浓度升高[10]。而NR2B在与PSD-95之间产生相互作用的同时，还可以产生兴奋性神经毒作用，即NMDA受体过度激活，导致Na^{+}大量内流，引起胞内Ca^{2+}超载，激活下游Ca^{2+}依赖性蛋白酶（如一氧化氮合成酶，nNOS）[11]，从而产生大量的NO和氧自由基，使线粒体受到损伤，最后导致神经细胞的坏死及凋亡[12]，造成机体重要器官的全面损伤[13]。本实验结果表明，高强度的跑台训练则对海马NMDA受体的表达没有产生促进作用。高强度跑台训练下调海马NR1、NR2A和NR2B基因表达水平以及大鼠自身的反常表现，推测可能与大强度运动产生的自由基的抑制作用有关。

在空间记忆的形成过程中，PSD-95可被招募至相应的突触膜表面，有助于NMDA受体的簇集和锚定，增强了突触可塑性过程中突触传递的效能[14]。在KIF-$17^{-/-}$小鼠神经元中，KIF-17介导的NR2B运送被阻断，致使NR2B的转录能力大大下降，从而影响了学习记忆能力[15]。本实验分析了不同训练强度对PSD-95和KIF-17表达的影响，发现海马PSD-95和KIF-17的表达同样受训练强度的影响，而且变化趋势与NMDA受体基本相一致。因此可做出推测，PSD-95和KIF-17的表达上调很有可能是二者结合后通过增强对NR2相关亚基的转运，进一步促进了NR2亚基的表达。

3.3 认知情绪变化与NMDA受体、PSD-95和KIF-17的关系

NMDA受体可结合兴奋性神经递质，参与神经元发育和突触可塑性，特别是长时程增强(long-term potentiation，LTP)，并且与学习记忆以及情绪认知方面有着密不可分的联系[16]。Kaut等[17]通过对NMDA受体的甲基化检测以及相关分析研究证实NR2A与重度抑郁症密切相关。有研究认为，某些特异性基因表达的增加反映了神经元或突触数目的增加，从而增强了相应的生理功能[18]。例如，人们发现Mg^{2+}浓度可以增加NMDA受体的表达，通过钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ磷酸化突触后膜致密区增加其下游的信号通路，从而增强NMDA受体依赖的LTP[19—20]，LTP的形成又可以促进NR2B亚基的表达，形成良性循环。LTP是海马在学习记忆过程中突触可塑性的主要表现形式，可以增强突触信息的传递效能，从而影响认知和情绪功能[21]。PSD-95和KIF-17相结合，通过NMDA受体在突触传递、学习记忆及情绪调控、大脑病理生理紊乱例如脑梗死和疼痛等功能中发挥重要作用。在本实验中，与对照组相比，中等强度持续训练组精神状态明显更佳，NMDA受体、PSD-95和KIF-17的表达相应升高；而高强度持续训练组则精神萎靡，表现为明显的抑郁状态，其表达则受到不同程度的抑制。但是目前对其三者对认知情绪影响机制仍缺乏统一的认识，有待进一步研究。

综上所述，不同训练方式对海马功能作用不同，其机制复杂，适量的运动训练不仅可以减轻缺氧对海马的损害，更可以有效地改善认知和情绪功能，但

对运动训练引起海马功能改变的机制以及与认知情绪之间的关系,以及训练方式和训练量的选择研究尚不系统,仍有待进一步研究。

参考文献

[1] Radahmadi M, Alaei H, Sharifi MR, et al. The effect of synchronized forced running with chronic stress on short, mid and long- term memory in rats[J]. Asian J Sports Med, 2013, 4(1):54—62.

[2] Aguiar AS Jr, Castro AA, Moreira EL, et al. Short bouts of mild- intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling[J]. Mechan Ageing Dev, 2011, 132(11): 560—567.

[3] Xuan A, Long D, Li J, et al. Hydrogen sulfide attenuates spatial memory impairment and hippocampal neuroinflammation in beta- amyloid rat model of Alzheimer's disease[J]. J Neuroinflammation, 2012, 9(1): 202.

[4] Burnashev N, Szepetowski P. NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders[J]. Curr Opin Pharmacol, 2015,20:73—82.

[5] Levine BD. VO_2max：what do we know, and what do we still need to know?[J]. J Physiol, 2008, 586(1): 25—34.

[6] Wolf OT, Bauser DS, Daum I. Eyeblink conditional discrimination learning in healthy young men is impaired after stress exposure[J]. Psychophysiology, 2012, 49(2):164—171.

[7] Henneberger C, Bard L, King C, et al. NMDA receptor activation: two targets for two co- agonists[J]. Neurochem Res, 2013, 38(6): 1156—1162.

[8] Tanaka K. Brain development and glutamate[J]. Brain Nerve, 2013, 65(10):1121—1132.

[9] Brigman JL, Wright T, Talani G, et al. Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs Long-Term Depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning[J]. J Neurosci, 2010, 30(13): 4590—4600.

[10] Robles JC, Sturek M, Parker JL, et al. Ca^{2+} sensitization and PKC contribute to exercise training-enhanced contractility in porcine collateral- dependent coronary arteries[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 300(4): H1201—H1209.

[11] Marmol F, Sanchez J, Lopez D, et al. Role of oxidative stress and adenosine nucleotides in the liver of aging rats [J]. Physiol Res, 2010, 59(4): 553—560.

[12] Hardingham GE. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events[J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(Pt 6): 1147.

[13] Miller LE, McGinnis GR, Kliszczewicz B, et al. Blood oxidative- stress markers during a high- altitude trek[J]. Int J Sport Nutr Exerc Metab, 2013, 23(1):65—72.

[14] Delint-Ramírez I, Salcedo-Tello P, Bermudez-Rattoni F. Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD- 95 to synaptic lipid rafts[J]. J Neurochem, 2008, 106(4): 1658—1668.

[15] Yin X, Takei Y, Kido MA, et al. Molecular motor KIF17 is fundamental for memory and learning via differential support of synaptic NR2A/2B levels[J]. Neuron, 2011, 70(2): 310—325.

[16] Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders[J]. Nat Rev Neurosci, 2010, 11(10): 682—696.

[17] Kaut O, Schmitt I, Hofmann A, et al. Aberrant NMDA receptor DNA methylation detected by epigenome-wide analysis of hippocampus and prefrontal cortex in major depression[J]. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2015, 265(4): 331—341.

[18] Burnouf S, Martire A, Derisbourg M, et al. NMDA receptor dysfunction contributes to impaired brain-derived neurotrophic factor- induced facilitation of hippocampal synaptic transmission in a Tau transgenic model[J]. Aging Cell, 2013, 12(1): 11—23.

[19] Müller L, Tokay T, Porath K, et al. Enhanced NMDA receptor-dependent LTP in the epileptic CA1 area via upregulation of NR2B[J]. Neurobiol Dis, 2013, 54: 183—193.

[20] Shipton OA, Paulsen O. GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014, 369(1633): 20130163—20130163.

[21] Shin MK, Jung WR, Kim HG, et al. The ganglioside GQ1b regulates BDNF expression via the NMDA receptor signaling pathway[J]. Neuropharmacology, 2014, 77(2):414—421.