

跑台训练对慢性脑缺血大鼠海马区 Notch1 和突触素表达的影响*

郭雅碧^{1,2} 郑彩霞¹ 陆敏^{1,3}

摘要

目的:研究跑台训练对慢性脑缺血大鼠海马区 Notch1 和突触素(SYN)表达的影响,从而探讨跑台训练对慢性脑缺血的康复作用及其可能的分子机制。

方法:选取雄性的SD大鼠90只,随机分为9组,3个假手术对照组(7d、14d、28d)、3个模型组(7d、14d、28d)和3个跑台训练组(7d、14d、28d),每组10只。采用双侧颈总动脉永久性结扎法制备慢性脑缺血模型,假手术组仅分离双侧颈总动脉不结扎。跑台训练组于术后第3天开始跑台训练,1周训练6d。在各个时间点,应用 Western-blot 和免疫组化分析各组大鼠海马区 Notch1 和突触素表达的变化情况。

结果:与同时段的假手术组相比较,模型组和跑台训练组海马组织 Notch1 蛋白含量和表达在28d时都发生明显降低($P < 0.05$);其中,模型组对比跑台组降低更为明显($P < 0.05$)。模型组和跑台训练组较假手术组突触素(synaptophysin, SYN)蛋白含量和表达也发生降低。其中,跑台训练组 Notch1 和 SYN 蛋白含量和表达在28d时要明显高于模型组($P < 0.05$)。

结论:跑台训练可以增加慢性脑缺血大鼠海马区 Notch1 和突触素的表达。

关键词 慢性脑缺血;跑台训练;Notch1;突触素

中图分类号:R743.3,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2017)-01-0033-06

Effects of treadmill training on the expression of Notch1 and synaptophysin in hippocampus of rats with chronic cerebral ischemia/GUO Yabi, ZHENG Caixia, LU Min//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2017,32(1): 33—39

Abstract

Objective: To investigate effects of treadmill training on the expression of Notch1 and synaptophysin in the hippocampus of rats with chronic cerebral ischemia.

Method: Ninety male SD rats (250—300g) were randomly divided into nine groups including three sham groups (7 days, 14 days and 28 days), three model groups (7 days, 14 days and 28 days) and three treadmill training groups (7 days, 14 days and 28 days). N=10 for each group. The chronic cerebral ischemia models in both model groups and treadmill training groups were prepared by ligating bilateral common carotid artery permanently, while the sham groups only isolated bilateral common carotid artery without ligation. Treadmill training started at the third day after surgery with six days training for every week. At different time points, analyzing the expression level of Notch1 and synaptic in hippocampus by immunohistochemical staining and Western Blot test.

Result: The expression of both Notch1 and SYN proteins in rats of sham groups were significantly higher than those in the rats of both model groups and treadmill training groups on day 28($P < 0.05$), while the expression

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.01.008

*基金项目:湖北省自然科学基金面上项目(2015CFB468)

1 华中科技大学同济医学院附属同济医院康复科,武汉,430033; 2 湖北文理学院附属襄阳市中心医院康复科; 3 通讯作者

作者简介:郭雅碧,女,硕士研究生,住院医师; 收稿日期:2015-10-08

of both Notch1 and SYN proteins in treadmill training groups were significantly higher than those in the rats of the model groups on day 28($P < 0.05$).

Conclusion: Treadmill training could increase the expression of both Notch1 and synaptophysin in hippocampus of the rats with chronic brain ischemia.

Author's address Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430033

Key word chronic cerebral ischemia;treadmill training;Notch1;synaptophysin

慢性脑缺血(chronic cerebral ischemia, CCI)是血管性认知障碍发生与发展的重要因素,如不及时进行有效治疗与控制将会导致持久性或进展性的认知与神经功能障碍^[1-2]。早期及时对慢性脑缺血患者进行有效的干预和治疗,改善认知功能,对患者的生存质量和日常活动提高有着重大的意义。Notch通路能够影响神经系统的发生和发展,以及轴突、树突的生长等有关功能^[3]。Notch通路直接影响学习和记忆功能,Notch信号通路在成年小鼠大脑记忆形成中起着关键作用^[4]。突触素(synaptophysin, SYN)可以比较好的反映神经系统对缺血性损伤的突触可塑性,作为检测突触的密度和脑缺血后突触重建的指标,是突触重新建立的重要标志。慢性脑缺血导致的学习记忆功能障碍可能与海马区和齿状回突触异常有关^[5]。多项研究已经证明了运动对脑缺血有一定影响,包括增强生存率、减少神经损伤,改善血脑屏障(blood brain barrier, BBB)功能障碍和维护神经与血管的完整性^[6-10]。本课题组前期研究表明跑台训练可以改善慢性脑缺血大鼠的学习记忆功能。本研究采取双侧颈总动脉永久性结扎法,旨在探讨Notch1和突触素在跑台训练改善慢性脑缺血大鼠的学习和记忆功能中的可能机制,为临床跑台训练改善学习记忆功能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雄性SD大鼠,SPF级别,90只,重量250—300g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。所有大鼠于独立通风笼中在协和动物中心适应性饲养1周,大鼠自然昼夜节律光照,自由饮水和摄食,(21±2)℃恒温。适应性喂养1周,随机分为跑台训练组、假手术组和模型组。每组以时间点的不同,又分为7d、14d和28d三个亚组,每亚组10只大鼠。

1.2 主要实验试剂和仪器

Notch1、突触素和 β -actin抗体:武汉博士德生物有限公司;苏木素染色液:碧云天生物技术研究所;RIPA裂解液和显影定影试剂盒,北京全氏金生物技术有限公司;动物实验跑台:北京京远天地科技有限公司;电泳仪电源、垂直电泳槽和电转仪,北京六一仪器厂。

1.3 动物模型制备

术前对所有大鼠进行12h的禁食,4h的禁水。称重后,腹腔注射水合氯醛(0.3—0.35ml/100g)麻醉,将大鼠仰卧位固定,颈前部去毛备皮,常规碘伏局部消毒,7号刀片在颈正中线切开一切口,长约2cm左右,止血钳缓慢分离皮下组织,暴露出双侧胸锁乳突肌后,玻璃分针分离出双侧颈总动脉,分离颈总动脉时应小心谨慎,不要触到迷走神经而导致其损伤。分离出颈总动脉后,使用手术线结扎好双侧颈总动脉的远、近心端,结扎好后仔细观察大鼠的呼吸是否正常及是否出现抽搐的现象,以此判断是否失误将迷走神经结扎,确保无误后,从结扎的中间剪断血管,以完全阻断颈总动脉血流,用无菌生理盐水清洁伤口,检查伤口,无明显出血后缝合切口,假手术组仅分离出颈总动脉,不结扎。手术过程中注意保护迷走神经,严密观察大鼠的呼吸变化,注意无菌操作,保持大鼠肛温约在36.5℃。待大鼠苏醒后将其放回独立通风笼中饲养,术后每日腹腔注射青霉素20万U/kg,连续3天,防止术后感染。

1.4 跑台训练

跑台训练组在模型制作前2天将实验动物置于跑台上进行适应训练,每天10min。制备模型后,跑台组于第3天开始训练,训练强度为每天30min,每天训练1次,每周训练6d,休息1d。跑台参数设置为10m/min,斜度0°。跑台训练安排在晚上6点以后。模型和假手术组环境及饮食同跑台组,同等抓取但

是不进行跑台运动训练。

1.5 取材及检测

1.5.1 蛋白免疫印迹法(Western blot):每组随机抽取5只大鼠,于7d、14d和28d时断头处死大鼠。沿着枕骨大孔剪开皮肤肌肉,剥离颅骨,分离出海马组织,加入预先放入PMSF的RIPA组织裂解液1ml,于冰上充分碾磨后放置30min,置于高速离心机中以12000r/min,4℃离心30min,取上清液,以BCA法检测蛋白浓度。配制10%的SDS-PAGE分离胶和5%的SDS-PAGE浓缩胶,以80V电泳30min后,120V电泳分离1h,转移至PVDF膜上,室温摇床封闭2h。Notch1(1:1000)和SYN(1:200)一抗4℃孵育过夜,洗涤后加入TBST稀释HRP标记二抗,浸泡PVDF膜,室温摇床孵育2h。放入显影液显影和定影液定影。借助ImageJ 2X图像分析软件,以Notch1和SYN蛋白累积光密度和内参蛋白 β -Actin蛋白累积光密度为标准,量化分析各组大鼠的脑部海马组织在不同时间点时Notch1和SYN蛋白表达量变化。

1.5.2 免疫组织化学法:每组剩余的5只大鼠麻醉后,以4%的多聚甲醛液灌注后立即断头取脑,将取出的组织放入多甲中固定,常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,连续做冠状切片,片厚5 μ m。备用于Notch1蛋白和突触素的免疫组化。60℃电热恒温箱烘烤石蜡切片1h,脱蜡水化,为阻断内源性过氧化物酶的活性,在3% H₂O₂室温下孵育10min,PBS洗3次,抗原修复,将50 μ l 1:60稀释的兔抗大鼠Notch1抗体滴加到切片上,1:200稀释的小鼠抗大鼠SYN抗体,阴性对照组用PBS代替一抗,4℃过夜,PBS冲洗3次,每次约5min,将50 μ l的二抗滴加到每张切片上,室温湿盒中孵育20min,再次用PBS冲洗5min 3次,DAB显色剂显色,蒸馏水终止反应,自来水冲洗每张切片10min,苏木素复染1min,0.1%盐酸酒精分色,冲洗,反蓝,镜下观察细胞核染色程度,脱水、透明,封片。借助Image-Pro® Plus Version 6.0软件对图像进行分析,以400 \times 视野条件下各组大鼠脑部海马CA1区Notch1和SYN蛋白累积光密度减去该视野空白区域累积光密度为标准,量化分析各组大鼠的脑部海马CA1区在不同时间点时Notch1和SYN表达量变化。

1.6 统计学分析

各组数据均采用SPSS19.0进行统计学分析,以均数 \pm 标准误的形式。运用单因素方差分析实验结果, $P < 0.05$ 有显著性差异,两两比较使用Dunnnett-t检验法,结果均采用Graphpad Prism 6绘制。

2 结果

2.1 跑台训练对海马区Notch1的影响

采用Western blot检测海马区Notch1的表达,数据显示:各组大鼠在第7和14天时海马区Notch1蛋白表达没有明显的变化;模型组大鼠海马区Notch1蛋白表达在第28天时显著低于假手术组大鼠($P < 0.05$),跑台训练组Notch1表达高于模型组,低于假手术组,均有显著性差异($P < 0.05$)。采用免疫组化检测海马CA1区Notch1的表达,结果表明:各组大鼠在第7和14天时海马CA1区Notch1表达没有明显的变化;模型组大鼠在第28天时Notch1表达低于假手术组($P < 0.05$),而跑台训练组和假手术组相比无显著性差异,见图1—2,表1—2所示。

2.2 跑台训练对海马区突触素的影响

采用Western blot检测海马区SYN的表达,数据显示:第7天时各组大鼠海马区SYN蛋白表达没有明显的变化;跑台训练组和模型组大鼠在第14天时SYN蛋白表达低于假手术组($P < 0.05$);第28天时模型组蛋白表达低于假手术组($P < 0.05$),跑台训练组低于假手术组($P < 0.05$),高于模型组($P < 0.05$)。采用免疫组化检测海马CA1区SYN的表达,结果表明:第7天时各组SYN表达没有明显的变化;模型组大鼠在第14天时SYN表达低于假手术组($P < 0.05$),跑台训练组与假手术组和模型组均无显著性差异;第28天时,模型组低于假手术组($P < 0.05$),跑台训练组高于模型组($P < 0.05$),假手术组与跑台训练组无显著性差异。见图3—4,表3—4所示。

图1 Western blot 检测海马区Notch1的表达

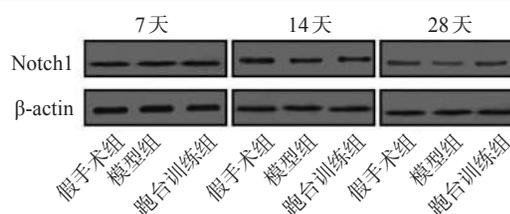


图2 免疫组化检测海马CA1区Notch1的表达

(×400)

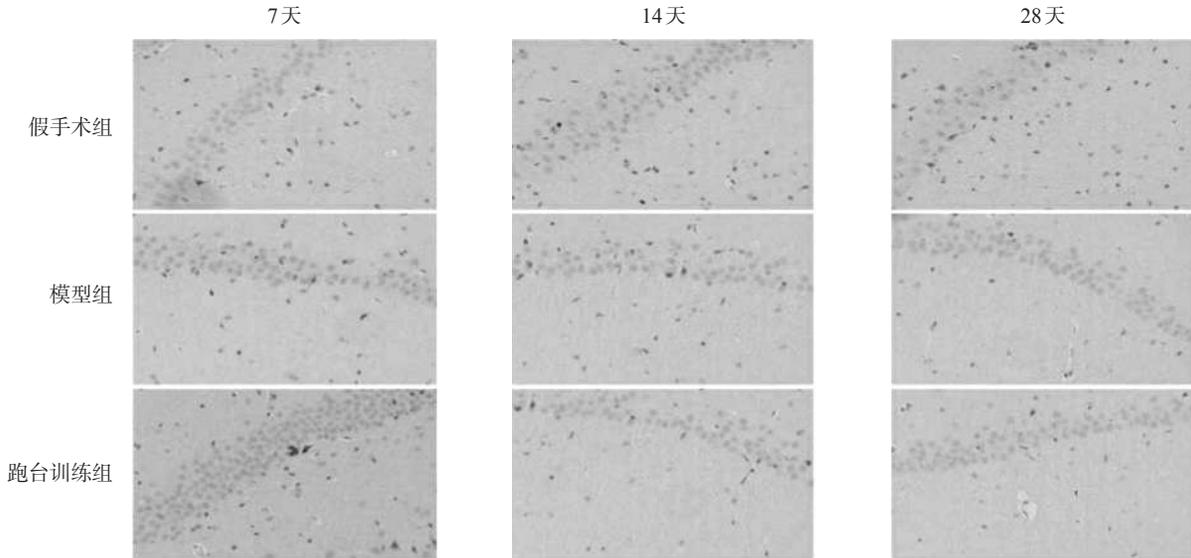


表1 各组大鼠Notch1蛋白相对表达量 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	7天	14天	28天
假手术组	0.58±0.02	0.57±0.04	0.65±0.02
模型组	0.61±0.06	0.60±0.05	0.50±0.03 ^①
跑台训练组	0.59±0.04	0.59±0.07	0.55±0.02 ^②

与假手术组相比,①P<0.05;与模型组相比,②P<0.05

表2 各组大鼠海马CA1区Notch1蛋白相对光密度的比较 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	7天	14天	28天
假手术组	0.48±0.02	0.47±0.04	0.40±0.02
模型组	0.51±0.06	0.55±0.05	0.30±0.03 ^①
跑台训练组	0.49±0.04	0.52±0.07	0.35±0.07

与假手术组相比,①P<0.05

表3 各组大鼠SYN蛋白相对表达量 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	7天	14天	28天
假手术组	0.41±0.02	0.40±0.04	0.39±0.02
模型组	0.39±0.03	0.30±0.05 ^①	0.29±0.03 ^①
跑台训练组	0.38±0.04	0.33±0.02 ^①	0.33±0.02 ^②

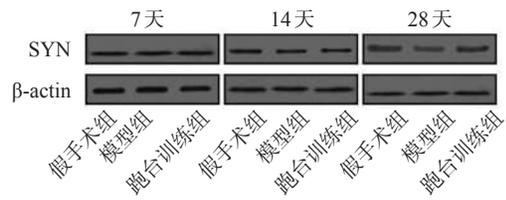
与假手术组相比,①P<0.05;与模型组相比,②P<0.05

表4 各组大鼠海马CA1区SYN蛋白相对光密度的比较 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	7天	14天	28天
假手术组	0.78±0.02	0.77±0.04	0.70±0.02
模型组	0.71±0.06	0.63±0.05 ^①	0.50±0.03 ^①
跑台训练组	0.69±0.04	0.72±0.07	0.65±0.07 ^②

与假手术组相比,①P<0.05;与模型组相比,②P<0.05

图3 Western blot 检测海马区SYN的表达

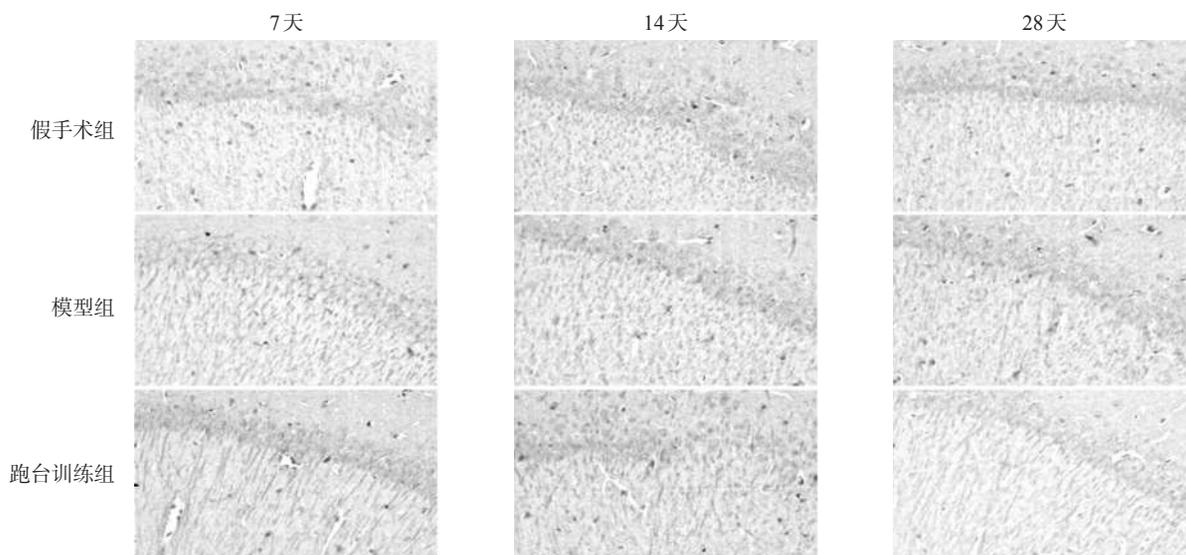


3 讨论

跑台训练在临床康复已经应用多年,可以有效改善患者的运动功能。与其他运动方式相比跑台训练更符合大鼠日常的运动情况,能够精确地调控大鼠的训练强度、改变其坡度和速度等。Notch通路是经典而保守的发育调控通路,与脑缺血损伤机制的相关研究越来越受到人们的重视。该通路成员在缺血损伤、缺血后再灌注、调控干细胞等方面均有研究报道。Notch通路在神经元的形态、突触可塑性及神经干细胞的调控方面发挥着重要作用^[11-13]。Notch通路成员中的受体Notch1已被证实在成人脑海马区域表达,影响海马区神经发育,并且参与脑缺血损伤后血管以及神经元的新生过程^[14]。海马Notch1的缺失使长时程增强和长时程抑制分离,使得学习能力及短期记忆能力下降甚至缺失^[15]。Notch信号通路在增强LTP和改善学习记忆方面起着重要作用^[16-17]。我们对慢性脑缺血大鼠海马区

图4 免疫组化检测海马CA1区SYN表达

(×400)



Notch1 表达进行检测,发现模型组和跑台训练组海马中 Notch1 的表达随着脑缺血时间的延长而变化。7d、14d 模型组和跑台训练组 Notch1 含量较假手术组有增高趋势,我们考虑可能是慢性脑缺血所致的 Notch 信号通路被激活导致 Notch1 代偿性的升高,以试图补偿缺血引起的神经元丢失。随着时间的延长,Notch 通路的激活逐渐减弱,甚至表现为抑制状态,所以 28 天时模型组 Notch1 下降明显。跑台训练组虽然也呈现下降趋势,但明显高于模型组,这提示在 28 天时间点 Notch1 的增高可能与运动训练有关。

突触素可以比较好的反映神经系统对缺血性损伤的突触可塑性,SYN 作为突触囊泡的跨膜蛋白,是神经修复和神经元间联系的重要结构蛋白,关联到突触的结构和功能,SYN 变化常被作为脑组织修复的一个观察指标^[18]。有研究发现跑台训练可以提高海马内 SYN,增强 LTP,提高学习记忆能力^[19]。本研究结果与之相符,我们观察到跑台训练能够增加慢性脑缺血大鼠海马区突触素的表达,训练第 28 天,跑台训练组较模型组突触素的表达量增多有显著性差异。慢性脑缺血后,海马区突触素的表达量下降,而进行跑台训练一定的周期可以增加突触素的表达。

综上,跑台训练可以改善海马区 Notch1 和突触

素的表达,大量的研究和我们前期的实验均已证实跑台训练可以提高大鼠的学习记忆能力。那么跑台训练对学习记忆康复作用的可能机制之一是否是通过影响 Notch1 和突触素的变化来实现的呢?慢性脑缺血后机体存在复杂的病理生理变化,虽然我们发现跑台训练 28 天后海马区 Notch1 的表达比模型组增加,提示跑台训练可能激活了 Notch 通路引起 Notch1 的变化,但是 Notch1 的表达受多种因素的影响和调控,而且 Notch 通路影响学习记忆功能的内在机制仍不十分明确,其受体 Notch1 调控学习和记忆功能的具体机制也不完全清楚,所以我们下一步的研究方向是观察通路的相关配体、靶基因以及调节因子的变化。由于我们的各检测时间点 Notch1 的含量变化不同,所以后期的研究将会延长训练时间,以便更好的观察 Notch1 的整个变化过程。

参考文献

- [1] Kim HA, Miller AA, Drummond GR, et al. Vascular cognitive impairment and Alzheimer's disease: role of cerebral hypoperfusion and oxidative stress[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2012, 385(10): 953—959.
- [2] Lapi D, Colantuoni A. Remodeling of Cerebral Microcirculation after Ischemia-Reperfusion[J]. *J Vasc Res*, 2015, 52(1): 22—31.
- [3] Ables JL, Breunig JJ, Eisch AJ, et al. Notch just develop-

- ment: Notch signalling in the adult brain[J]. *Nat Rev Neurosci*,2011,12(5):269—283.
- [4] Sargin D, Botly LC, Higgs G, et al. Disrupting Jagged1-Notch signaling impairs spatial memory formation in adult mice[J]. *Neurobiol Learn Mem*,2013, 103:39—49.
- [5] Takasaki K, Uchida K, Fujikawa R, et al. Neuroprotective effects of citidine-5-diphosphocholine on impaired spatial memory in a rat model of cerebrovascular dementia[J]. *Journal of Pharmacological Sciences*,2011, 116(2): 232—237.
- [6] Stetler RA, Leak RK, Gan Y, et al. Preconditioning provides neuroprotection in models of CNS disease: Paradigms and clinical significance[J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 114: 58—83.
- [7] Yang JL, Lin YT, Chuang PC, et al. BDNF and exercise enhance neuronal DNA repair by stimulating CREB-mediated production of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1[J]. *Neuromol Med*, 2014, 16(1): 161—174.
- [8] Zhang Q, Zhang L, Yang X, et al. The effects of exercise pre-conditioning on cerebral blood flow change and endothelin-1 expression after cerebral ischemia in rats[J]. *J Stroke Cerebro-vasc Dis*, 2014, 23(6): 1696—1702.
- [9] Dornbos D, Zwagerman N, Guo M, et al. Preischemic exercise reduces brain damage by ameliorating metabolic disorder in ischemia/reperfusion injury[J]. *J Neurosci Res*, 2013, 91(6):818—827.
- [10] Tahamtan M, Allahtavakoli M, Abbasnejad M, et al. Exercise preconditioning improves behavioral functions following transient cerebral ischemia induced by 4-vessel occlusion (4-VO) in rats[J]. *Arch Iran Med*, 2013, 16(12): 697—704.
- [11] Johnson EA. HIF takes it up a notch[J]. *Sci Signal*,2011,4(181) : pe33.
- [12] Oya S, Yoshikawa G, Takai K, et al. Attenuation of Notch signaling promotes the differentiation of neural progenitors into neurons in the hippocampal CA1 region after ischemic injury[J]. *Neuroscience*, 2009, 158(2): 683—692.
- [13] Huang SS, Lu YJ, Huang JP, et al. The essential role of endothelial nitric oxide synthase activation in insulin-mediated neuroprotection against ischemic stroke in diabetes[J]. *J Vasc Surg*,2014,59(2):483—491.
- [14] Oswald F, Winkler M, Cao Y, et al. RBP-J(κ)/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes [J]. *Mol Cell Biol*,2005, 25: 10379—10390.
- [15] Alberi L, Liu S, Wang Y, et al. Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks[J]. *Neuron*, 2011, 69(3):437—444.
- [16] Alberi L, Liu S, Wang Y, et al. Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks[J]. *Neuron*, 2011, 69(3):437—444.
- [17] Conboy L, Seymour CM, Monopoli MP, et al. Notch signalling becomes transiently attenuated during long-term memory consolidation in adult Wistar rats[J]. *Neurobiol Learn Mem*,2007, 88:342—351.
- [18] Machado AG, Cooperrider J, Furmaga HT, et al. Chronic 30-Hz deep cerebellar stimulation coupled with training enhances post-ischemia motor recovery and peri-infarct synaptophysin expression in rodents[J]. *Neurosurgery*,2013,73(2):344—353.
- [19] Berchtold NC, Castello N, Cotman CW. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory[J]. *Neuroscience*, 2010,167(3): 588—597.