

·基础研究·

有氧运动干预对衰老大鼠学习记忆能力及小脑生长相关蛋白-43表达的影响*

范佳¹ 李雪¹ 王璐¹ 王军威¹ 张树玲¹ 袁琼嘉^{1,2}

摘要

目的:探讨衰老过程中进行有氧运动干预对大鼠学习记忆能力及小脑神经生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)表达的影响。

方法:45只成年雄性SD大鼠随机分为生理盐水对照组(Na组, n=15)、有氧运动干预组(S组, n=15)和衰老对照组(N组, n=15)。S组进行6周的衰老造模同时进行有氧运动干预, N组大鼠进行6周的衰老造模, Na组大鼠注射6周的生理盐水进行对照实验。三组大鼠造模结束后分别进行7天的Morris水迷宫实验测试大鼠的学习记忆能力, Morris水迷宫结束后24h内取大鼠的小脑, 利用实时PCR法检测小脑内GAP-43 mRNA表达水平, Western-blotting法检测小脑GAP-43蛋白含量。

结果:Morris水迷宫定位航线实验当中:第2天和第1天相比, 第3天和第2天相比, Na组、N组和S组大鼠平均潜伏期均缩短且存在显著性差异($P<0.01$);第4天和第3天相比, N组大鼠平均潜伏期存在显著性差异($P<0.01$), Na组和S组平均潜伏期无显著性差异($P>0.05$);第5天和第4天相比, 第6天和第5天相比, Na组、N组和S组大鼠平均潜伏期无显著性差异($P>0.05$)。Morris水迷宫空间探索实验结果显示:Na组和S组穿越原平台位置次数多于N组且存在显著性差异($P<0.01$)。实时PCR实验和Western-blotting结果显示:Na组和S组大鼠小脑内GAP-43表达量皆高于N组大鼠且存在显著性差异($P<0.01$)。

结论:在衰老过程中进行有氧运动干预在一定程度上可以促进脑衰老大鼠的学习记忆能力和小脑内GAP-43的表达, 这可能是有氧运动延缓脑衰老学习记忆能力下降的分子机制之一。

关键词 衰老; 学习记忆; 小脑; GAP-43

中图分类号: R338.64, R493 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2019)-04-0392-05

Effects of aerobic exercise intervention on learning and memory ability and expression of GAP-43 in cerebellum of aging rats/FAN Jia, LI Xue, WANG Lu, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(4): 392—396

Abstract

Objective: To investigate the effects of aerobic exercise intervention on learning and memory ability and expression of growth associated protein-43(GAP-43) in the cerebellum in aging rats.

Method: Forty-five male adult SD (Sprague-Dawley) rats were randomly divided into normal saline control group (Na group, n=15), aerobic exercise intervention group (S group, n=15) and aged control group (N group, n=15). Group S performed 6 weeks of aging modeling while performing aerobic exercise intervention, Group N rats were subjected to aging modeling for 6 weeks, and Na group rats were injected with physiological saline for 6 weeks for control experiments. Rats' learning and memory ability was tested by Morris water maze for 7 days after the completion of each model. Rat's cerebellum was taken within 24 hours after Morris water maze

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.04.005

*基金项目: 国家自然科学基金项目(31371202);四川省科学技术厅基础设施建设项目;四川省教育厅资助项目(D60070421);国家体育总局成都体育学院运动医学重点实验室研究经费项目;成都体育学院创新团队

1 成都体育学院, 四川省成都市, 610041; 2 通讯作者

作者简介: 范佳, 男, 助理实验师; 收稿日期: 2018-04-09

was completed. The expression of GAP-43 mRNA in cerebellum was detected by real-time PCR, and the content of GAP-43 protein in cerebellum was measured by Western-blotting method.

Result: In the Morris water maze locator route experiment, compared to the second day and the first day, compared to the third day and the second day, the average latency of the Na group, the N group and the S group was shortened and there was a significant difference ($P<0.01$); compared with the fourth day and the third day, the average latency of group N was significantly different ($P<0.01$), and there was no significant difference in average latency between group Na and group S ($P>0.05$); compared to the fifth day and the fourth day, compared to the sixth day and the fifth day, there was no significant difference in the average latency between the Na group, the N group, and the S group ($P>0.05$). The Morris water maze space exploration experiment results show that: Na group and S group crossing the original platform position more than N group and there is a significant difference ($P<0.01$). Real-time PCR and Western-blotting results showed that the expression of GAP-43 in the cerebellum of Na group and S group was higher than that of N group rats and there was a significant difference ($P<0.01$).

Conclusion: Aerobic exercise intervention during the aging process can promote the learning and memory ability and the expression of GAP-43 in the cerebellum of rats in a certain extent, which may be one of the molecular mechanisms of aerobic exercise retarding the decline of learning and memory abilities of brain aging.

Author's address Chengdu Sports Institute, Sichuan, Chengdu, 610041

Key word aging; learning and memory; cerebellum; GAP-43

研究表明,学习记忆障碍在老年人中普遍存在,学习记忆能力下降严重影响老年人的生活质量^[1]。随着现在老龄化人口的增加,如何有效延缓老年人学习记忆能力的下降,维持脑健康,提高生活质量,成为一个研究热点。大量实验研究表明,合理有效的运动可以改善学习记忆能力,促进脑健康^[2-3]。虽然其神经机制现在还不完全清楚,但是神经可塑性被认为是学习记忆形成的重要神经生物学基础^[4]。随着衰老的进行,神经细胞突触可塑性和功能均会降低,这被认为衰老时学习记忆能力下降的重要原因^[5]。实验研究证实,适当的有氧运动可以通过改变机体内脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经细胞粘附因子(neural cell adhesion molecule, NCAM)、小脑神经生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-PX)等物质的表达量从而影响神经突触可塑性^[2,6-8]。GAP-43是一种和神经发育、突触重建、轴突再生紧密相关的胞膜磷酸蛋白,在神经发育、再生和突触可塑性中都具有重要作用^[9]。在神经的再生和发育过程中,GAP-43的高水平表达有利于促进神经突触的再生和发育^[10],神经突触的再生

和发育有利于提高大鼠的学习记忆能力^[11-12]。大量已有研究表明,大脑中海马脑区的功能与学习记忆能力密切相关,而本研究意在探讨大鼠小脑区域与学习记忆能力之间的关系。本研究参考文献中方法^[13],采用连续6周给予大鼠腹腔注射D-半乳糖的方法诱导脑衰老模型,并在诱导脑衰老模型过程中给予大鼠有氧游泳运动干预,然后采用实时PCR和Western-blotting检测小脑内GAP-43的表达,探讨衰老过程中进行有氧运动干预对大鼠学习记忆能力及小脑GAP-43表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

4月龄SPF级雄性SD大鼠45只,体重 $400\pm 20\text{g}$,分笼饲养,室内温度 $(24\pm 2)^{\circ}\text{C}$,相对湿度40%—60%,自然光照,自由摄食和饮水。大鼠适应性喂养3天后,随机分为三组:生理盐水对照组(Na组, $n=15$)、有氧运动干预组(S组, $n=15$)和衰老对照组(N组, $n=15$)。本实验造模方案通过学校动物实验伦理学会审核并通过。

1.2 干预方案

各组大鼠具体干预方案见表1。

大鼠衰老造模采用经典的D-半乳糖衰老模型,

表1 各组大鼠具体干预方案

组别	具体方案
生理盐水对照组(Na组)	生理盐水注射6周
有氧运动干预组(S组)	衰老造模+有氧运动干预6周
衰老对照组(N组)	衰老造模6周

依据大鼠体重,采用腹腔注射法在大鼠腹部注射D-半乳糖 100mg/kg/d^[14]。但在注射前需要用生理盐水将D-半乳糖配成5%浓度溶液再进行注射,连续注射6周并且在每日上午进行注射,1次/天。生理盐水注射组大鼠,根据大鼠的体重,采用和D-半乳糖注射组大鼠相同的注射量计算方法、注射方法和位置注射生理盐水。

1.3 Morris水迷宫实验

各组大鼠造模结束后,采用Morris水迷宫检测各组大鼠的空间学习记忆能力。Morris水迷宫包括定位航行训练和空间探索实验两部分:前6天进行定位航行训练,1次/天,最后1天进行1次空间探索实验。Morris水迷宫实验期间,水池周围参照物保持不变。

定位航行训练主要用来评估大鼠空间学习能力。定位航行实验时间最长为120s,大鼠从第一象限入水,如果大鼠在120s内能找到站台就讓其在站台上停留10s,实验结束;大鼠如果在120s内不能找到站台,则需要人为的将大鼠引导至站台上,并讓其在站台上停留10s后实验结束。定位航行实验所记录的时间为大鼠的潜伏期时间。

空间探索实验可评估大鼠空间记忆能力。在定位航行实验结束之后的第2天进行空间探索实验。进行空间探索实验时要求拆除站台,由做定位航行试验的同一人以同样的方式从第一象限将大鼠放入水中,软件将自动分析统计出大鼠在60s的时间内穿越原站台位置的次数。

1.4 取材和检测

各组大鼠Morris水迷宫实验完成后,进行取材,断头取脑,然后用冰生理盐水漂洗大脑将血渍除去,再用滤纸拭干后于冰上切割大脑。将分割好的小脑装入冷冻管中,并将冻存管迅速放入液氮中保存。后期用于提取RNA和蛋白质,分别用做实时PCR实验和Western-blotting实验。

实时PCR检测小脑GAP-43mRNA表达:采用

Trizol法提取小脑中的RNA,取适量的小脑组织,按比例50-100mg/ml Trizol加入Trizol;使用分光光度计检测mRNA含量,估算其纯度和浓度,用2%的琼脂糖凝胶检测总RNA的完整性;采用iScript™ cDNA Synthesis Kit试剂盒(BIO-RAD)将RNA反转录成cDNA;采用SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD)试剂盒(BIO-RAD)进行实时PCR反应。引物序列(TaKaRa宝生物工程有限公司):GAP-43(扩展长度185bp)上游:5'-CTA AAC AAG CCG ATG TGC CT-3',下游:5'-TTC TTT ACC CTC ATC CTG TCG-3'。内参序列(扩展长度99bp)上游:5'-CGT AAA GAC CTC TAT GCC ACC A-3',下游:5'-TAG GAG CCA GGG CAG TAA TC-3'。反应结束后,数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法(Livak法)进行分析处理,再根据所得的数据计算出小脑GAP-43的相对表达量。将各组的基因表达检测值与各自的 β -actin表达值相比,以其比值作为目的基因的表达量。

Western-blotting检测小脑内GAP-43蛋白表达:取部分小脑,按照1mg小脑加入20 μ l蛋白裂解混合液(RIPA:PMSF=100:1)提取蛋白,测定蛋白浓度,然后用上样缓冲液将各组总蛋白稀释成同一水平,于100℃沸水中变性10min,-20℃中保存备用;进行SDS-PAGE凝胶电泳,然后将蛋白转模至聚偏二氟乙烯膜(PVDF),将PVDF膜置于5%的脱脂奶粉中1h,然后采用5%的脱脂奶粉稀释一抗(1:1000)密封4℃过夜,次日进行二抗处理,最后采用辣根过氧化物酶HRP-ECL检测蛋白表达量。将各组的蛋白表达检测值与各自的 β -actin表达值相比,以其比值作为目的蛋白的表达量。

1.5 统计学分析

本实验所得数据用SPSS16.0进行统计分析,用平均数 $\pm$ 标准差表示,采用单因素方差分析进行组间差异分析,采用偏相关分析GAP-43与学习记忆能力之间的关系。 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 大鼠学习记忆能力

大鼠连续经过6天的定位航行测试,每天定位航行平均潜伏期结果见表2。

各组大鼠从第一象限入水的平均潜伏期的结果见表2,第2天和第1天相比,第3天和第2天相比,均呈现显著性缩短($P<0.01$);第4天和第3天相比,N组平均潜伏期呈显著性缩短($P<0.05$),Na组和S组无显著性变化($P>0.05$);第5天和第4天,第6天和第5天各组之间均无显著性变化($P>0.05$)。

空间探索实验中各组大鼠从第一象限入水,60s时间内空间探索平均穿越原站台位置的次数见图1。根据各组大鼠穿越站台次数的结果可知:大鼠从第一象限入水,Na组和S组平均穿越站台次数均显著高于N组($P<0.01$)。Na组和S组大鼠穿越站台次数之间无显著性差异($P>0.05$)。

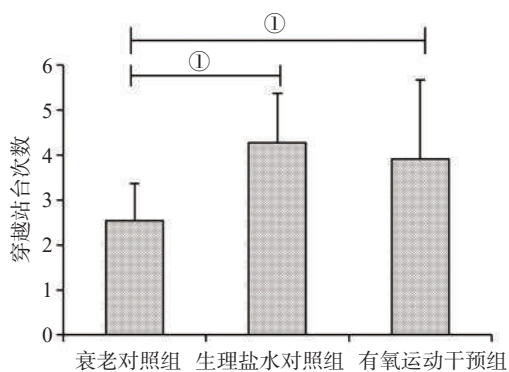
2.2 大鼠小脑 GAP-43 表达结果

大鼠小脑内 GAP-43mRNA 和蛋白表达情况见表3。

表2 各组大鼠定位航行平均潜伏期 ($\bar{x}\pm s, s$)			
测定时间	N组	Na组	S组
第1天	71.76 $\pm$ 5.71	71.29 $\pm$ 5.09	69.16 $\pm$ 6.45
第2天	53.18 $\pm$ 10.51 ^①	39.04 $\pm$ 5.18 ^①	38.54 $\pm$ 3.08 ^①
第3天	31.33 $\pm$ 6.12 ^{①②}	19.96 $\pm$ 3.04 ^{①②}	20.54 $\pm$ 2.74 ^{①②}
第4天	20.18 $\pm$ 3.90 ^{①②④}	18.96 $\pm$ 4.44 ^{①②}	18.75 $\pm$ 3.63 ^{①②}
第5天	18.97 $\pm$ 5.23 ^{①②④}	16.42 $\pm$ 2.40 ^{①②③}	16.04 $\pm$ 3.11 ^{①②④}
第6天	15.75 $\pm$ 4.08 ^{①②④}	14.50 $\pm$ 2.26 ^{①②④}	14.97 $\pm$ 2.53 ^{①②④}

注:后一天与前一天相比的结果中:组内与第1天相比:① $P<0.01$;组内与第2天相比:② $P<0.01$;组内与第3天相比:③ $P<0.05$,④ $P<0.01$

图1 各组大鼠穿越原站台位置次数



①与N组相比 $P<0.01$

表3 各组大鼠小脑内 GAP-43 表达结果 ($\bar{x}\pm s$)		
组别	PCR 检测结果	WB 检测结果
衰老对照组(N组)	0.78 $\pm$ 0.06	1.0011 $\pm$ 0.03079
生理盐水对照组(Na组)	0.99 $\pm$ 0.08 ^①	1.2977 $\pm$ 0.04383 ^①
有氧运动干预组(S组)	0.98 $\pm$ 0.08 ^①	1.3004 $\pm$ 0.02518 ^①

①与N组相比 $P<0.01$

各组大鼠小脑内 GAP-43 基因实时PCR 检测结果进行单因素方差分析可知:Na组和S组大鼠小脑 GAP-43 基因表达水平均显著高于N组大鼠($P<0.01$)。Na组和S组大鼠小脑内 GAP-43 基因表达水平无显著性差异($P>0.05$)。

各组大鼠小脑内 GAP-43 蛋白表达水平检测结果(表3)比较可知:Na组和S组大鼠小脑 GAP-43 蛋白表达水平显著性高于N组大鼠($P<0.01$)。Na组和S组比较,差异并无显著性意义($P>0.05$)。

2.3 小脑内 GAP-43 表达与空间学习记忆能力的相关性

各组大鼠小脑内 GAP-43mRNA 表达量、GAP-43 蛋白表达量和穿越站台次数的数据在 SPSS 中偏相关相关性分析结果:各组大鼠小脑 GAP-43mRNA 表达量和 GAP-43 蛋白表达量之间呈正相关($R=0.633$, $P<0.01$);各组大鼠小脑 GAP-43mRNA 表达量和大鼠穿越站台次数之间呈正相关($R=0.528$, $P<0.05$);各组大鼠小脑内 GAP-43 蛋白表达量和大鼠穿越站台次数之间成正相关($R=0.496$, $P<0.05$)。

3 讨论

学习记忆能力是脑的高级神经功能之一,海马、额叶等多个脑区对其均发挥着重要作用^[4]。尽管如此,目前关于学习记忆的研究大多集中在海马区域,有关学习记忆与小脑的关系的研究较少。小脑位于大脑的后下部,小脑被中央的蚓部分为左右两个小脑半球,每个半球又分为小脑前叶、小脑后叶和绒球小结叶等亚结构。小脑参与语言、执行功能、空间加工、排序等多种认知过程的加工^[15],此外小脑也参与学习记忆过程^[16]。

GAP-43 是一种神经组织特异性磷酸化细胞膜蛋白,与神经发育、突触再生、突触可塑性密切相关^[9]。在神经发育和再生过程中,GAP-43 在神经元胞体内大量合成后运送到轴突,在生长锥、轴突及突触前末梢大量表达,通过加速生长锥基部胞膜的扩展而促进轴突分支、伸长,调节生长锥及突触形态,参与神经元损伤后轴突再生和突触重构过程,当神经再生完成后,GAP-43 又恢复到正常水平^[10]。因此,GAP-43 被认为是神经元发育和再生的一个内在决定因子和神经元损伤后再生的标志性蛋白^[17-18]。

大量实验研究也证实大脑内的GAP-43蛋白高表达和学习记忆能力密切相关^[19-21]。

现有大量研究表明适量的有氧运动干预可以促进学习记忆的形成^[2-3]。适当的有氧运动可以通过改变机体BDNF、NCAM、SOD、GSH-PX等物质的表达量,影响神经突触的可塑性^[2,6-8],增强的神经突触可塑性是影响学习记忆能力的重要机制之一^[22]。我们的实验数据也支持适当的有氧运动可以促进学习记忆能力形成这一结论。从各组大鼠Morris水迷宫定位航线实验的平均潜伏期结果(表2)可知:Na组大鼠和S组大鼠经过前3天的水迷宫训练之后形成了稳定的空间记忆能力,而N组大鼠在第4天之后才形成稳定的空间学习记忆能力。表明随着大鼠脑衰老的进行,大鼠的学习记忆能力会出现下降,但在衰老过程中进行适当的有氧运动干预可以提高脑衰老大鼠的空间学习记忆能力。从三组大鼠Morris水迷宫空间探索实验结果(图1)可知:Na组、S组穿越原平台位置的次数显著高于N组,Na组和S组大鼠表现出了更强的空间学习记忆提取能力。说明在D-半乳糖诱导的脑衰老过程中,大鼠的空间学习记忆能力会出现下降,但在D-半乳糖诱导脑衰老过程中进行有氧游泳运动干预可以有效地缓解学习记忆能力下降。这也证实了运动可以改善D-半乳糖诱导的脑衰老大鼠学习记忆功能障碍这一结论^[6,23]。为了探讨小脑内GAP-43表达量和学习记忆的关系,本研究通过对大鼠小脑内GAP-43表达量和学习记忆结果进行相关性分析结果发现:大鼠穿越站台次数与大鼠小脑内GAP-43mRNA和蛋白的表达量都成正相关,表明小脑内的GAP-43的表达与学习记忆能力有一定的关联性。

研究表明,长期适当的有氧运动可以上调大鼠脑内的GAP-43表达量^[24-26],大脑内GAP-43的表达量和学习记忆密切相关^[19-21]。故我们推测:有氧运动促进大鼠小脑内GAP-43表达量升高,小脑内GAP-43表达水平升高可以延缓D-半乳糖诱导的脑衰老大鼠学习记忆能力下降。为验证此推测,我们利用实时PCR和Western-blotting对大鼠小脑内的GAP-43表达量进行了检测与分析。实验结果表明:随着衰老的发生,小脑内GAP-43的表达量会出现下降;但在衰老的过程中进行适当的有氧运动干预,

可以缓解脑衰老引起的小脑内GAP-43表达量下降。脑衰老大鼠小脑内高表达的GAP-43可以促使小脑内的受损的神经元突触修复或是再生,从而延缓脑衰老过程中学习记忆能力下降。

4 结论

大鼠空间学习记忆能力和小脑内GAP-43表达量随着衰老会出现下降。在衰老过程中进行有氧运动干预在一定程度上可以促进脑衰老大鼠的学习记忆能力,促进小脑内GAP-43的表达可能是有氧运动延缓脑衰老学习记忆能力下降的分子机制之一。

参考文献

- [1] Ritchie SJ, Dickie DA, Cox SR, et al. Brain volumetric changes and cognitive ageing during the eighth decade of life[J]. Hum Brain Mapp, 2015, 36(12):4910—4925.
- [2] 崔建梅, 杨文艳, 药宏慧, 等. 有氧运动对慢性应激大鼠空间学习记忆及海马齿状回BDNF表达的影响[J]. 首都体育学院学报, 2018, 30 (1):78—82+87.
- [3] 周娜, 赵雅宁, 李佳宁, 等. 不同强度炮台运动对脑缺血大鼠学习记忆能力及细胞周期蛋白表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(6):654—660.
- [4] 于龙川. 神经生物学[M]. 北京: 北京大学出版社, 2012:380—389.
- [5] Yang L, Zhanhua L, Jing L, et al. Downregulation of caveolin-contributes to the synaptic plasticity deficit in the hippocampus of aged rats[J]. neural Regen Res, 2013, 29(8): 2725—2733.
- [6] 栾海云, 李娜, 王桂华, 等. 游泳运动对D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆和胆碱能系统功能的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2016, 35(1):36—39.
- [7] 亢依婷, 赵新娟, 张静, 等. 神经细胞粘附分子对脑学习记忆功能的影响及其运动干预展望[J]. 辽宁体育科技, 2018, 40 (1):36—39.
- [8] 董军涛, 林阳阳, 燕铁斌, 等. 不同形式的运动训练对血管痴呆大鼠学习记忆能力及海马区突触可塑性的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2016, 31(7):716—722.
- [9] 孙树敏, 刘浩. 神经生长相关蛋白与突触可塑性[J]. 天津医科大学学报, 2007, 3(1):118—121.
- [10] 吴银侠, 陈新胜, 袁小燕, 等. 参茸葡萄糖注射液对脊髓损伤后运动功能恢复及GAP-43和NF200表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(2):44—49.
- [11] 宋晨晨. 美金刚和瑞舒伐他汀对血管痴呆大鼠血管再生及神经功能的影响[D]. 天津: 天津医科大学, 2015.

(下转第421页)