

·基础研究·

运动训练对高血压大鼠认知功能及脑内血管内皮一氧化氮合成酶的影响*

张丽颖¹ 胡昔权^{1,2} 郑海清¹ 陈曦¹ 罗婧¹

摘要

目的:研究运动训练对高血压大鼠认知功能及脑内血管内皮一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的影响。

方法:将30只3月龄自发性高血压易卒中(stroke-prone spontaneously hypertensive, SHRSP)大鼠随机分为对照组(SHRSP-Con)和训练组(SHRSP-PE),采用相同周龄的Wistar Kyoto(WKY)大鼠15只作为正常血压对照组(WKY-Con)。SHRSP-PE组给予持续4个月的跑笼训练;SHRSP-Con组和WKY-Con组不予任何针对性训练。各组大鼠在3及7月龄分别测血压、认知功能,观察皮质及海马的eNOS、 β -secretase(BACE1)、 β -amyloid(A β)的表达。

结果:3月龄SHRSP大鼠的血压明显高于WKY大鼠,差异有显著性意义($P<0.05$),各组大鼠认知功能无明显差异。7月龄SHRSP-Con组与WKY组比较,血压明显升高,认知功能减退,脑内eNOS表达减少、BACE1表达增加及A β 沉积增加,差异有显著性意义($P<0.05$)。与SHRSP-Con组相比,4个月的运动训练可以明显降低血压、改善认知功能且可以增加eNOS表达,减少BACE1和A β 的表达,差异有显著性意义($P<0.05$)。

结论:运动训练能够改善慢性高血压大鼠的认知功能,其机制可能与其促进脑内eNOS表达,进而减少BACE1表达和A β 沉积有关。

关键词 运动训练;高血压;认知功能障碍;血管内皮一氧化氮合成酶;淀粉样蛋白

中图分类号:R493,R544.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2019)-08-0888-07

Effects of physical exercise on cognitive function and eNOS expression in stroke-prone spontaneously hypertensive rats/ZHANG Liying, HU Xiquan, ZHENG Haiqing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(8): 888—894

Abstract

Objective: To investigate the effect of physical exercise on cognitive function, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and β -amyloid (A β) in cortex and hippocampus of stroke-prone spontaneously hypertensive (SHRSP) rats.

Method: Experiments were carried out on 3-month-old male SHRSP rats (n=30) or age-matched normotensive Wistar Kyoto (WKY) rats (n=15). SHRSP rats were randomly divided into control (SHRSP-Con, n=15) and physical exercise (SHRSP-PE, n=15) groups. A 4-month exercise protocol with a wheel (21 cm in diameter, made in China) was implemented to rats in SHRSP-PE.

Result: Compared with Wistar Kyoto (WKY) rats, the hypertensive challenge caused cognitive impairment, decreased eNOS levels and increased β -secretase (BACE1) and A β levels in the cortex and hippocampus. 4-month exercise lowered blood pressure (BP), promoted eNOS expression, ameliorated Alzheimer's pathology, and improved cognitive function in SHRSP-PE rats.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.08.003

*基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81601979);广东省医学科学基金项目(A2016053)

1 中山大学附属第三医院康复医学科,广州,510630; 2 通讯作者

作者简介:张丽颖,女,主治医师; 收稿日期:2018-05-08

Conclusion: Long-term exercise initiated in rats at young age promoted eNOS expression and attenuated vascular-related Alzheimer's pathology in SHRSP-PE rats.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510630

Key word physical exercise; hypertension; cognitive impairment; endothelial nitric oxide synthase; β -amyloid

慢性高血压,尤其是中年开始的高血压导致晚年认知障碍甚至痴呆已被大量研究证实^[1-2]。认知障碍严重影响患者的日常生活活动能力,给患者、家庭和社会造成沉重的负担。然而,高血压导致认知障碍尚缺乏研究,其机制目前亦不明确,临床预防、治疗均未得到应有的重视。近来研究发现,高血压可以引起脑内A β 的沉积^[3-4],且可导致血管内皮损伤^[5],血管内皮在A β 的产生及清除中起重要的作用^[6]。eNOS是血管内皮分泌的重要物质,可以有效地保护血管内皮,eNOS表达减少可能参与高血压引起的A β 的沉积^[7]。本研究将通过观察运动训练对高血压大鼠血压、认知功能、皮质及海马eNOS、BACE1、A β 的表达的影响,探讨运动训练对高血压大鼠认知功能的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及血压监测

采用雄性,SPF级,SHRSP共30只,(140—160g,3月龄,血压 178 ± 6 mmHg)随机分为,对照组(SHRSP-Con)和训练组(SHRSP-PE),每组各15只,采用相同月龄的Wistar Kyoto(WKY)大鼠15只作为正常血压对照组(WKY-Con),共3组,45只大鼠,分组前记录大鼠基础血压,之后每周监测大鼠血压。

1.2 各组大鼠的认知功能评估及运动训练

Morris水迷宫:①获得性训练,将大鼠头朝池壁放入水中,放入位置随机取东、西、南、北四个起始位置之一。记录动物找到水下平台的时间(s),即逃逸潜伏期。每只动物每天训练4次,两次训练之间间隔15—20min,连续训练6d。②探查训练,最后一次获得性训练结束后的第二天,将平台撤除,开始60s的探查训练。记录动物在目标象限所花的时间和进入该象限的次数,以此作为空间记忆的检测指标。各组大鼠在3月龄和7月龄分别检测。

运动训练方案:采用自行研发的实验动物跑笼训练器进行运动训练^[8-10]。跑笼直径20cm,长度

40cm,由电动马达带动,控制器设定转速、时间或路程,转速可从1r/min调至25r/min。认知功能评估后,首先检测每只大鼠的最大运动速度,运动训练组大鼠经1周的预训练后,大鼠由起始转速5r/min,持续30s,随后以每30s增加2转的速度直至达到85%—90%的最大速度,最后以每30s增加1转的速度,当大鼠不能或不愿意继续在跑笼中跑动时的转速为最大运动速度,根据每只大鼠运动潜能的不同,整个过程共需要4—6min。选最大运动速度的1/2作为大鼠的最终运动速度,每天训练1h,每周训练6d,训练持续24周。对照组和假手术组的大鼠不予上述任何针对性强化训练,但可以在笼内饮水、进食、自由活动。

1.3 实验动物的脑组织取材

脑组织取材:麻醉后的大鼠,开胸暴露心脏,0.2ml肝素抗凝,用4℃生理盐水150ml快速冲洗,4%多聚甲醛固定液灌注固定30min。灌注后,取脑组织,经固定、脱水、包埋并制作冰冻切片。用于进行Elisa检测的脑组织只用生理盐水快速冲洗,后迅速进行蛋白提取。

1.4 免疫荧光

选取每只大鼠从前囟+4.0到-6.0mm的冰冻切片,每隔24片取1片,用于检测皮质和海马部位eNOS、BACE1和A β 的表达。阴性对照只加抗体稀释液,不加一抗。将冰冻切片恢复至室温、组化笔划圈后,用0.01M PBS水化5min。滴加0.3% Triton X-100,室温孵育30min,增加抗体对细胞膜的通透性;0.01M PBS漂洗1次,5min;滴加正常山羊血清,室温下孵育1h,不漂洗,封闭非特异性结合位点;滴加一抗(用抗体稀释液稀释):eNOS(1:200)、BACE1(1:100)和A β (1:400),4℃孵育过夜(约20h);0.01M PBS漂洗3次,每次5min;滴加二抗(抗体稀释液稀释):DylightTM 488山羊抗小鼠IgG(1:1000),室温避光孵育1h;0.01M PBS漂洗3次,每次5min。用带DAPI的防荧光淬灭封片

剂封片,避光自然晾干;BX51 荧光显微镜下观察并拍照。

1.5 Elisa 法

对脑组织中的 A β 进行定量检测:脑组织中 A β 的检测步骤按照 Elisa 试剂盒中步骤进行,简述步骤如下:配置溶液,加样,37℃反应 120min,弃去液体,甩干,不用洗涤。每孔加生物素标记抗体工作液,37℃反应 60min,弃去液体,甩干,洗板,甩干。加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液,37℃,反应 60min 后,弃去液体,甩干,洗板,甩干。依序每孔加底物,37℃避光显色。终止反应。用酶联仪测量各孔的光密度(OD 值)。

1.6 图像分析和计数

选取每只大鼠从前囟+4.0 到-6.0mm 的冰冻切片,每隔 24 片取一片,取梗死边缘区 3—4 个不相邻视野于 400 倍镜相同曝光强度下拍照,输入电脑用 Image Pro Plus 图像分析软件(Media Cybernetics, Sliver Spring, MD, 美国)进行定量计算。

1.7 统计学分析

所有数值资料均以均数 $\pm$ 标准差表示。采用 SPSS20.0(SPSS Inc, Chicago, IL, 美国)进行统计分析,行为学结果采用重复测量的方差分析进行统计分析。各组间 IF 及 Elisa 检测结果采用方差分析进行统计分析。 $P<0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 运动训练降低高血压大鼠的血压值

3 月龄 SHRSP 大鼠血压值明显高于 WKY 大鼠($P<0.05$)。SHRSP 大鼠随着年龄增长,血压逐渐升高,7 月龄 SHRSP 大鼠血压值明显高于 WKY 大鼠($P<0.05$),运动训练可以显著降低 SHRSP 的血压值($P<0.05$),SHRSP-PE 组大鼠血压值与 WKY-Con 大鼠相比差异无显著性意义($P>0.05$)。见表 1。

2.2 运动训练改善高血压大鼠的认知功能

3 月龄 SHRSP 大鼠与 WKY 大鼠相比,逃逸潜伏期、目标象限停留时间及穿越平台次数无明显差异(表 1, $P>0.05$)。7 月龄 SHRSP-Con 组与 WKY-Con 组大鼠比较,认知功能明显减退,主要表现在逃逸潜伏期延长($P<0.05$)、目标象限停留时间缩短($P<0.05$)、穿越平台次数减少($P<0.05$)。运动训练

表 1 各组大鼠训练前后血压及认知功能的比较 ($\bar{x}\pm s$)

	正常 血压组	高血压 对照组	高血压 训练组
血压(mmHg,3 月龄)	126 $\pm$ 5	178 $\pm$ 7 ^①	179 $\pm$ 5 ^①
血压(mmHg,7 月龄)	136 $\pm$ 4	203 $\pm$ 5 ^①	146 $\pm$ 6 ^②
游泳速度(mm/s,3 月龄)	315 $\pm$ 47	299 $\pm$ 48	300 $\pm$ 45
游泳速度(mm/s,7 月龄)	376 $\pm$ 76	371 $\pm$ 68	371 $\pm$ 23
逃逸潜伏期(s,3 月龄)	15 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	13 $\pm$ 2
逃逸潜伏期(s,7 月龄)	11 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1 ^①	13 $\pm$ 2 ^②
目标象限停留时间(s,3 月龄)	26 $\pm$ 2	27 $\pm$ 2	25 $\pm$ 3
目标象限停留时间(s,7 月龄)	23 $\pm$ 3	11 $\pm$ 3 ^①	22 $\pm$ 2 ^②
穿越平台次数(次,3 月龄)	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2
穿越平台次数(次,7 月龄)	5 $\pm$ 1	1.2 $\pm$ 1 ^①	4 $\pm$ 1 ^②

注:①与正常血压组比较 $P<0.05$;②与高血压对照组比较 $P<0.05$

可以显著改善 SHRSP 大鼠的认知功能,SHRSP-PE 组与 SHRSP-Con 组大鼠相比,逃逸潜伏期缩短($P<0.05$)、目标象限停留时间延长($P<0.05$)、穿越平台次数增加($P<0.05$)。SHRSP-PE 组与 WKY-Con 组大鼠相比逃逸潜伏期、目标象限停留时间及穿越平台次数无明显差异($P>0.05$)。

2.3 运动训练促进皮质及海马 eNOS 的表达

免疫荧光检测皮质和海马血管内皮一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)阳性细胞的表达(图 1A)。与 WKY-Con 组大鼠相比(图 1B,C),SHRSP-Con 组大鼠皮质及海马 eNOS 阳性细胞表达明显减少($P<0.05$)。运动训练能够显示促进皮质及海马 eNOS 的表达(图 1B,C),SHRSP-PE 组与 SHRSP-Con 组比较,皮质及海马 eNOS 阳性细胞表达明显增加($P<0.05$),SHRSP-PE 组与 WKY-Con 组比较,eNOS 阳性细胞表达无明显变化($P>0.05$)。

2.4 运动训练减少皮质及海马 BACE1 的表达

免疫荧光检测皮质和海马 BACE1 阳性细胞的表达(图 2A)。与 WKY-Con 组大鼠相比(图 2B,C),SHRSP-Con 组大鼠皮质及海马 BACE1 阳性细胞表达明显增加($P<0.05$)。运动训练能够减少皮质及海马 BACE1 的表达(图 2B,C),SHRSP-PE 组与 SHRSP-Con 组比较,皮质及海马 BACE1 阳性细胞表达明显减少($P<0.05$),SHRSP-PE 组与 WKY-Con 组比较,BACE1 阳性细胞表达无明显变化($P>0.05$)。

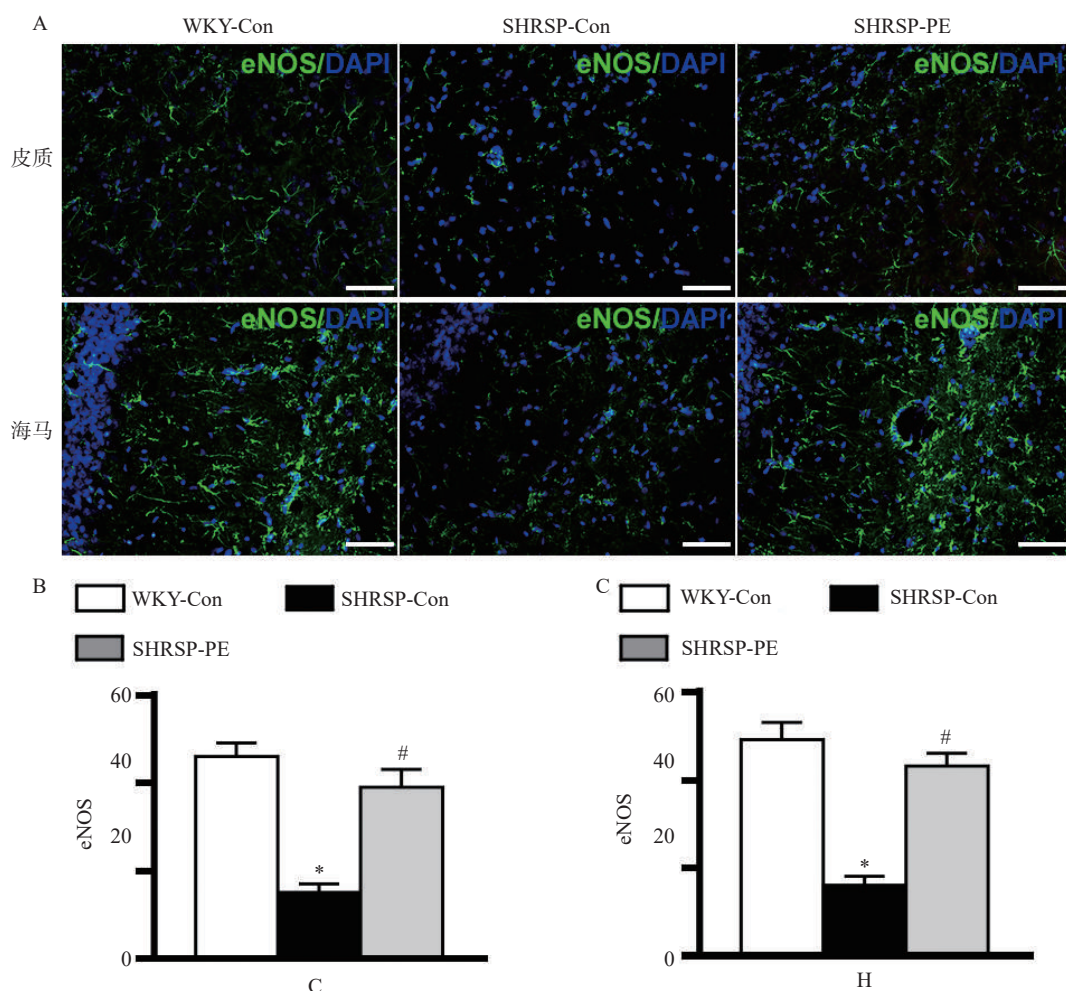
2.5 运动训练减少皮质及海马 A β 沉积

免疫荧光检测皮质(图 3A)和海马(图 3B)部位 A β 沉积,Elisa 对 A β 沉积进行定量检测(图 3C,D)。

与WKY-Con组大鼠相比(图3C,D),SHRSP-Con组大鼠皮质及海马A β 沉积明显增加($P<0.05$)。运动训练能够减少皮质及海马A β 沉积(图3C,D),

SHRSP-PE组与SHRSP-Con组比较,皮质及海马A β 沉积明显减少($P<0.05$),SHRSP-PE组与WKY-Con组比较,A β 沉积无明显变化($P>0.05$)。

图1 各组大鼠脑内血管内皮一氧化氮合酶(eNOS)表达 (免疫荧光染色, $\times 400$)



A 各组大鼠皮质和海马eNOS的免疫荧光检测,标尺:25 μ m。B 各组大鼠皮质eNOS阳性细胞数比较(*与WKY-Con组比较, $P<0.05$;#与SHRSP组比较, $P<0.05$)。C 各组大鼠海马eNOS阳性细胞数比较(*与WKY-Con组比较, $P<0.05$;#与SHRSP组比较, $P<0.05$)。

3 讨论

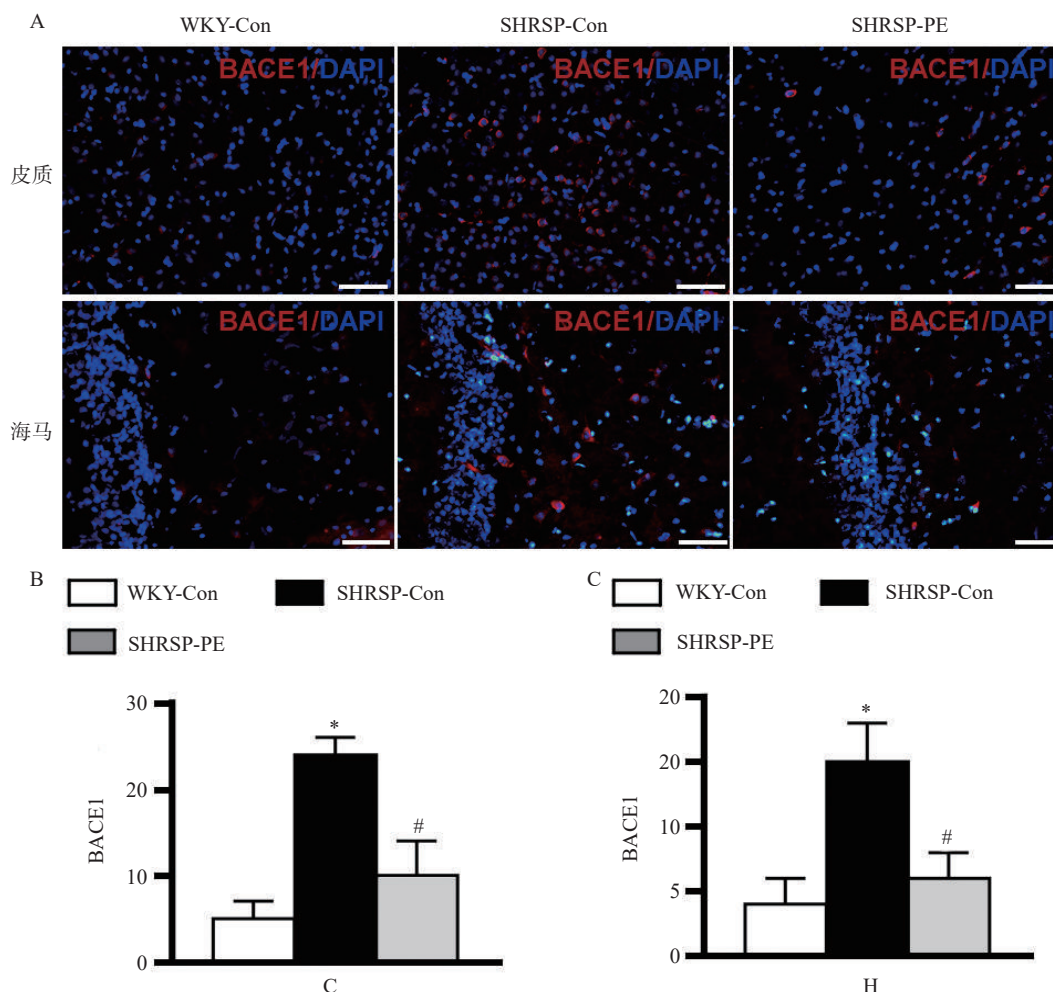
本实验观察了运动训练对高血压大鼠皮质及海马eNOS、BACE1表达及A β 沉积的影响。研究发现高血压会引起脑内eNOS表达减少,BACE1表达及A β 沉积增加,认知功能减退;运动训练能够促进eNOS的表达,减少BACE1表达及A β 沉积,进而改善认知功能。

慢性高血压导致脑卒中、冠心病、慢性肾功能障碍等靶器官损害已引起高度关注,但是高血压引起

的老年脑功能损害的状况,即从轻度认知障碍到痴呆的序贯性改变,尚未得到应有的重视。认知障碍患者脑功能损害持续性、进行性加重,导致日常生活或社会活动能力的明显减退,发展为痴呆,是神经系统疾病治疗中最困难的问题之一。大量的临床研究已经证实^[2,4,6,11],高血压可以导致认知障碍。Launer^[12]研究发现,中年时收缩压 >160 mmHg或者舒张压 >90 mmHg的患者与正常血压对照组相比,20—26年后发生痴呆的相对风险率为3.8—4.8,而未经治

图2 各组大鼠脑内BACE1表达

(免疫荧光染色, ×400)

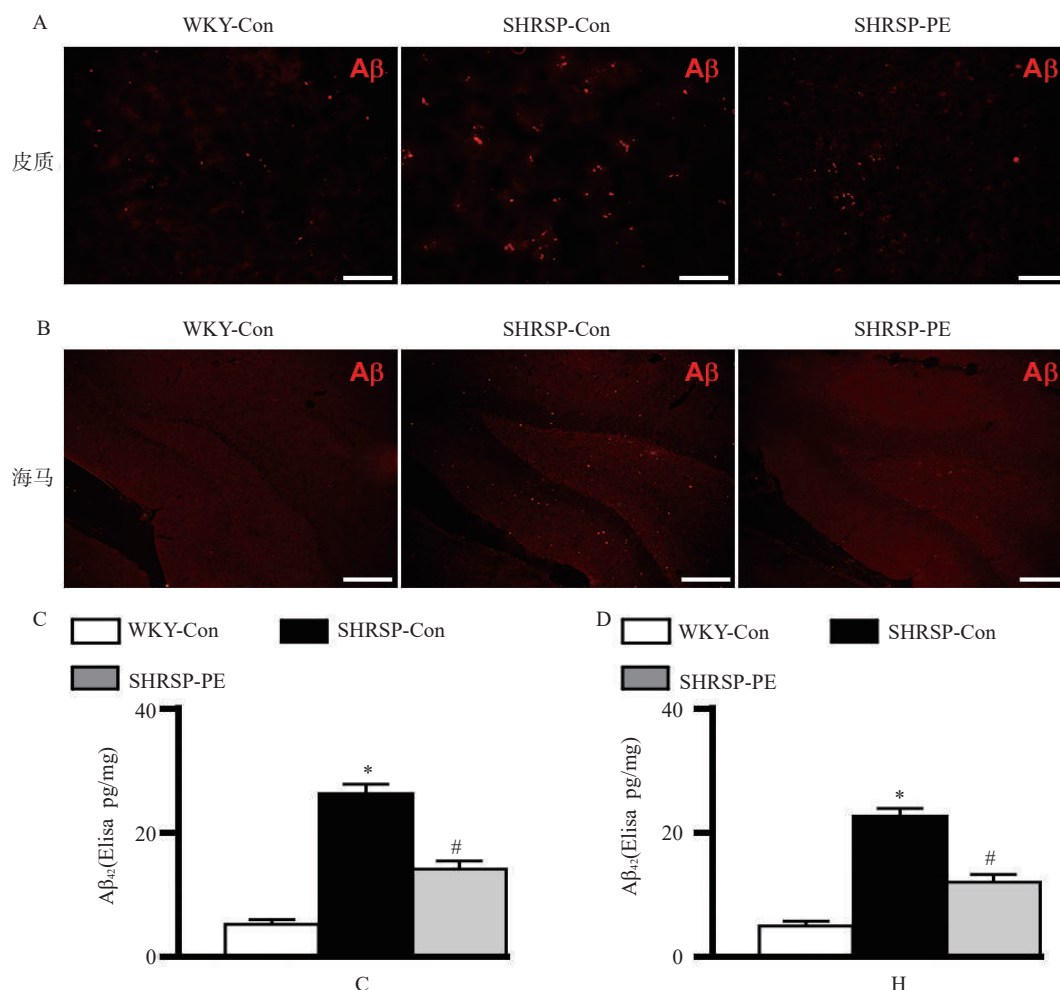


A 各组大鼠皮质和海马BACE1的免疫荧光检测,标尺:25 μ m。B 各组大鼠皮质BACE1阳性细胞数比较(*与WKY-Con组比较, $P<0.05$;#与SHRSP组比较, $P<0.05$)。C 各组大鼠海马BACE1阳性细胞数比较(*与WKY-Con组比较, $P<0.05$;#与SHRSP组比较, $P<0.05$)。

疗的高血压患者,发生痴呆的危险性更高。Feldman^[13]的研究也发现,降压药物治疗,可以降低患者发生痴呆的风险。本研究同样发现,长期慢性高血压,如不予以干预及治疗,可引起认知功能减退。因此,高血压是认知障碍重要的危险因素,长期慢性高血压会引起认知功能减退甚至痴呆。

高血压状态对脑组织的损害是一个缓慢而持续进展的过程,以往的研究认为^[6],其主要导致血管内皮结构和功能异常、动脉粥样硬化、脑灌注不足、脑白质疏松及脑卒中,进而引起血管性认知障碍(vascular cognitive impairment, VCI),其与以A β 沉积形成老年斑为主要病理特征的Alzheimer病

(Alzheimer's disease, AD)不具有相关性。Petrovitch^[1]经过36年的跟踪研究(Honolulu-Asia Aging study)发现,高血压患者脑组织中可见皮质、海马的萎缩及大量老年斑沉积。提示高血压引起的痴呆,不仅具有血管性痴呆(vascular dementia, VaD)的病变特点,而且表现出AD样病理改变。A β 是AD的特征性病变老年斑的主要成分,老年斑在脑组织、脑血管及其他组织的沉积,在AD的发生及发展中起核心作用^[14]。A β 异常沉积会引起神经突起损害,大量神经元丢失^[4]。A β 由淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)经 β 分泌酶(β -site APP-cleaving enzyme 1, BACE1)和 γ 分泌酶顺

图3 各组大鼠脑内A β 表达(免疫荧光染色, $\times 400$)

A 各组大鼠皮质A β 的免疫荧光检测,标尺:25 μ m。B 各组大鼠海马A β 的免疫荧光检测,标尺:200 μ m。C Elisa检测各组大鼠皮质A β 含量的比较(*与WKY-Con组比较, $P<0.05$;#与SHRSP组比较, $P<0.05$)。D Elisa检测各组大鼠海马A β 含量的比较(*与WKY-Con组比较, $P<0.05$;#与SHRSP组比较, $P<0.05$)。

序切除后产生^[12],APP有两条分解代谢途径:非淀粉样蛋白生成途径和淀粉样蛋白生成途径,BACE1是淀粉样蛋白产生途径中的起始酶和限速酶,在A β 的异常聚集过程中起核心作用^[15]。A β 产生增加,并在脑内蓄积会引起认知功能减退,有研究认为,BACE1不仅是A β 产生的关键酶,其对神经系统的损害不仅通过增加A β 生成,且是AD发生的独立危险因素^[15]。本实验中发现慢性高血压可以引起皮质和海马BACE1表达的增加,并可见A β 的沉积,且慢性高血压大鼠的认知功能减退,说明高血压可以引起AD样病理改变^[4,6]。同时本研究发现,运动训练可以降低高血压大鼠的血压值,并减少脑内BACE1

的表达及A β 的沉积,进而改善高血压大鼠的认知功能。然而,本研究中未能明确A β 与神经细胞的定位关系,我们将在今后的研究中进一步检测A β 的细胞定位,明确A β 的细胞来源。

运动训练可以改善认知功能,已有大量研究证实^[16-18]。但其对高血压引起的认知功能减退的作用及机制,尚缺乏研究。正常功能的血管内皮细胞在细胞迁移、重组、增殖、凋亡,蛋白及分子的产生、分泌、代谢,调节血管平滑肌收缩中起重要作用^[19]。eNOS是血管内皮产生的重要物质,其产生的NO,通过舒张血管,起到良好的降压作用^[19-20]。高血压引起血管内皮细胞结构破坏及功能异常,eNOS的

分泌减少^[21]。Austin^[22]发现,与正常小鼠相比,eNOS缺陷小鼠的脑血管内皮BACE1表达增加,同时发现其脑组织中的BACE1、APP、A β 表达增加,且BACE1的活性也明显增高。本研究中同样发现,高血压可以引起脑内eNOS的表达减少,BACE1表达及A β 沉积增加;运动训练可以显著增加脑内eNOS的表达,并降低BACE1的表达及A β 的沉积。说明运动训练可能是通过促进高血压大鼠脑内eNOS的表达^[20],作用于A β 产生的关键酶BACE1^[23-24],减少A β 的生成,使皮质和海马A β 沉积减少。皮质及海马是脑内支配认知功能的关键部位^[3,9],A β 沉积可引起皮质和海马神经元损伤,引起认知功能减退。运动训练通过调节eNOS表达,减少BACE1表达及A β 沉积,进而改善高血压引起的认知功能。

综上所述,本研究表明运动训练可以通过调节高血压大鼠脑内eNOS的表达,减少BACE1的表达及A β 沉积,进而改善受损的认知功能。

参考文献

- [1] Petrovitch H, White LR, Izmirlian G, et al. Midlife blood pressure and neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and brain weight at death: The haas. Honolulu-asia aging study [J]. *Neurobiol Aging*, 2000,21(1):57—62.
- [2] Perrotta M, Lembo G, Carnevale D. Hypertension and dementia: Epidemiological and experimental evidence revealing a detrimental relationship[J]. *Int J Mol Sci*, 2016,17(3):347.
- [3] Gentile MT, Poulet R, Di Pardo A, et al. Beta-amyloid deposition in brain is enhanced in mouse models of arterial hypertension[J]. *Neurobiol Aging*, 2009,30(2):222—228.
- [4] Faraco G, Park L, Zhou P, et al. Hypertension enhances abeta-induced neurovascular dysfunction, promotes beta-secretase activity, and leads to amyloidogenic processing of app[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016,36(1):241—252.
- [5] Li H, Witte K, August M, et al. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006,47(12):2536—2544.
- [6] Carnevale D, Mascio G, D'Andrea I, et al. Hypertension induces brain beta- amyloid accumulation, cognitive impairment, and memory deterioration through activation of receptor for advanced glycation end products in brain vasculature [J]. *Hypertension*, 2012,60(1):188—197.
- [7] Chu Y, Heistad DD. No answer to Alzheimer's disease? [J]. *Circ Res*, 2010,107(12):1400—1402.
- [8] Zhang L, Hu X, Luo J, et al. Physical exercise improves functional recovery through mitigation of autophagy, attenuation of apoptosis and enhancement of neurogenesis after meao in rats[J]. *BMC Neurosci*, 2013,14:46.
- [9] Pan X, Jiang T, Zhang L, et al. Physical exercise promotes novel object recognition memory in spontaneously hypertensive rats after ischemic stroke by promoting neural plasticity in the entorhinal cortex[J]. *Front Behav Neurosci*, 2017, 11:185.
- [10] Jiang T, Zhang L, Pan X, et al. Physical exercise improves cognitive function together with microglia phenotype modulation and remyelination in chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Front Cell Neurosci*, 2017,11:404.
- [11] Bueche CZ, Hawkes C, Garz C, et al. Hypertension drives parenchymal beta-amyloid accumulation in the brain parenchyma[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2014,1(2):124—129.
- [12] Launer LJ, Ross GW, Petrovitch H, et al. Midlife blood pressure and dementia: The honolulu-asia aging study[J]. *Neurobiol Aging*, 2000,21(1):49—55.
- [13] Feldman L, Vinker S, Efrati S, et al. Amlodipine treatment of hypertension associates with a decreased dementia risk [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2016,38(6):545—549.
- [14] Lee JH, Jahrling JB, Denner L, et al. Targeting insulin for alzheimer's disease: Mechanisms, status and potential directions[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018,64:427—453.
- [15] Chen Y, Huang X, Zhang YW, et al. Alzheimer's beta-secretase(BACE1) regulates the camp/pka/creb pathway independently of beta- amyloid[J]. *J Neurosci*, 2012,32(33): 11390—11395.
- [16] He XF, Liu DX, Zhang Q, et al. Voluntary exercise promotes glymphatic clearance of amyloid beta and reduces the activation of astrocytes and microglia in aged mice[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017,10:144.
- [17] Lee JM, Kim CJ, Park JM, et al. Effect of treadmill exercise on spatial navigation impairment associated with cerebellar purkinje cell loss following chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Molecular medicine reports*, 2018,17:8121—8128.
- [18] Frith E, Loprinzi PD. 15-year secular trends in cognitive function among older adults in the united states [J]. *Psychological reports*, 2018:33294118765227.
- [19] Matter K, Balda MS. Holey barrier: Claudins and the regulation of brain endothelial permeability [J]. *J Cell Biol*, 2003,161(3):459—460.
- [20] Lin YY, Lee SD, Su CT, et al. Long-term treadmill training ameliorates endothelium-dependent vasorelaxation mediated by insulin and insulin-like growth factor-1 in hypertension[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2015,119(6):663—669.
- [21] Mohammadi MT. Overproduction of nitric oxide intensifies brain infarction and cerebrovascular damage through reduction of claudin-5 and zo-1 expression in striatum of ischemic brain[J]. *Pathol Res Pract*, 2016,212(11):959—964.
- [22] Austin SA, Combs CK. Amyloid precursor protein mediates monocyte adhesion in ad tissue and apoe(-)/(-) mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2010,31(11):1854—1866.
- [23] Austin SA, d'Uscio LV, Katusic ZS. Supplementation of nitric oxide attenuates abetapp and bace1 protein in cerebral microcirculation of enos- deficient mice[J]. *J Alzheimers Dis*, 2013,33(1):29—33.
- [24] Austin SA, Katusic ZS. Loss of endothelial nitric oxide synthase promotes p25 generation and tau phosphorylation in a murine model of alzheimer's disease[J]. *Circ Res*, 2016,119(10):1128—1134.