

运动疲劳对大鼠皮质M1区mGluR1和mGluR5蛋白表达的影响*

苏美华^{1,2} 刘晓莉¹ 乔德才^{1,3}

摘要

目的:疲劳是导致机体工作能力下降的重要原因,通过观察反复力竭运动大鼠皮质主运动区中mGluR1和mGluR5在运动前后的表达变化,探讨I组代谢型谷氨酸受体介导运动疲劳产生的作用效应。

方法:选用雄性Wistar大鼠32只,随机分为对照组(CG)、力竭即刻组(0EG)和运动后24h组(24EG),运动后48h组(48EG),每组8只,采用免疫组化染色和计算机图像分析系统检测并观察各组mGluR1和mGluR5表达的阳性细胞数和积分光密度(IOD)。

结果:与对照组相比,力竭后即刻组及运动后24h组,大鼠皮质主运动区中mGluR1和mGluR5阳性细胞数量和IOD值均显著升高($P<0.05$);运动后48h组mGluR1的蛋白表达较对照组仍有显著升高($P<0.05$),而运动后48h组的mGluR5蛋白表达和对照组无显著差异($P>0.05$)。

结论:运动疲劳可导致大鼠中枢运动皮质代谢型谷氨酸受体的表达上调,不同亚型受体蛋白表达的时间效应不一样,提示mGluR1和mGluR5可能是中枢神经系统中介导运动疲劳产生的重要新型受体靶点。

关键词 运动疲劳;大鼠;皮质;代谢型谷氨酸受体;M1区

中图分类号:R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2020)-01-0005-05

Effects of exercise fatigue on mGluR1 and mGluR5 expression in primary motor cortex of rats/SU Meihua, LIU Xiaoli, QIAO Decai//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2020, 35(1): 5—9

Abstract

Objective: Fatigue is the crucial reason for the decline of working ability. By observing the expression changes of mGluR1 and mGluR5 in cortex M1 zone of rats pre and post exercise, the paper discussed the effects of mGluR1 and mGluR5 on the central nervous system induced by the exhaustive exercise.

Method: Totally 32 male Wistar rats were randomly divided into four groups, CG, 0EG, 24EG and 48 EG, 8 rats for each. Meanwhile, immunohistochemistry (IMM) technique was used to investigate the expression of positive cell and integrated optical density (IOD) of mGluR1 and mGluR5 in different groups.

Result: Compared with CG, the expression of positive cell and integrated optical density (IOD) of mGluR1 in 0EG and 24EG both significantly increased ($P<0.01$). The expression of mGluR5 in 0EG and 24EG ($P<0.01$) also enhanced dramatically compared with CG. However, the expression of mGluR1 in the 48EG was still higher than the CG ($P<0.05$), while the expression of mGluR5 in the 48EG was not different from CG ($P>0.05$).

Conclusion: Repeated exhaustive exercise could result in up-regulation the expression of mGluR1 and mGluR5 in cortex M1 zone of rats, which suggested that mGluR1 and mGluR5 with different time effects were another important receptors related with the production of exercise fatigue.

Author's address Beijing Normal University, 100875

Key word exercise fatigue; rats; cortex; mGluRs; M1 zone

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2020.01.002

*基金项目:福建省自然科学基金面上项目(2019J01754);福建省高校杰出青年人才计划项目(2005-B11504)

1 北京师范大学体育与运动学院,北京,100875; 2 闽南师范大学体育学院; 3 通讯作者

第一作者简介:苏美华,女,博士,副教授; 收稿日期:2018-11-20

谷氨酸(Glutamate)是中枢神经系统重要的兴奋性神经递质,以大脑皮质、小脑、纹状体的含量为最高,其次在下丘脑、脑干也有分布。它的变化直接影响中枢神经的兴奋性,而受体介导中枢和外周神经系统内细胞间的信息传递,其活性变化、数目增减将会对突触传递效能产生影响,谷氨酸通过激活两种类型的受体即离子型谷氨酸受体(ionotropic glutamate receptors, iGluRs)和代谢型谷氨酸受体(metabotropic glutamate receptors, mGluRs)来发生效应^[1],因此运动对谷氨酸受体的影响将直接决定谷氨酸的递质效应。mGluRs属于G蛋白偶联受体,分为I组、II组和III组,与G蛋白偶联,通过调节细胞内第二信使的产生而导致细胞内代谢改变,广泛分布于皮质、纹状体、黑质等脑区,因其变化几乎不伴随神经毒副作用,成为目前临床神经医学等方面备受关注的新型受体^[2]。I组代谢型谷氨酸受体,包括mGluR1和mGluR5,它们在介导谷氨酸能传入神经纤维对运动皮质神经元的兴奋性发挥重要作用^[2],而有关运动疲劳对代谢型谷氨酸受体的影响却鲜有报道。大脑皮质运动区包括运动皮质(primary motor cortex, M1区)即4区、运动前区、辅助运动区和后顶叶皮质等^[3]。因此,本实验通过观察运动疲劳后大鼠运动皮质(M1区)谷氨酸受体mGluR1和mGluR5蛋白表达的变化,探讨运动疲劳与I组代谢型谷氨酸受体的变化关系,以期延缓中枢疲劳的产生提供新思路。

1 对象与方法

1.1 实验对象与分组

实验选用清洁级健康雄性Wistar大鼠32只,鼠龄8周,体重 $260\pm 10\text{g}$,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2006-0009。随机分为对照组(CG)、力竭即刻组(0EG)和运动后24h组(24EG)、运动后48h组(48EG),每组8只。常规分笼饲养,自由饮水进食,自然光照,动物房内温度 $20\pm 3^{\circ}\text{C}$,相对湿度为40%—60%。本实验于北京师范大学体育与运动学院运动生理实验室完成,所有动物实验均按照动物伦理委员会的规定操作。

1.2 大鼠运动疲劳模型方案

运动组大鼠先进行3天适应性跑台训练,每天1

次,每次15min。从第3天开始正式进行跑台训练,负荷方案为:跑台坡度为 0° ,每级跑速分别为 8.2m/min 、 15m/min 、 20m/min ,第I、II级各运动15min,第III级运动直至力竭,运动持续时间为7天^[4]。力竭判定标准:动物不能维持预定速度,长期滞留于跑道后挡板不动,使用声、光、电刺激驱赶均无效,并伴有呼吸急促,腹卧跑台,垂头不起等行为表现。建立模型期间同时对动物运动能力、体重及活动状态进行观察。

1.3 实验仪器及试剂

实验仪器:SP-801型动物跑台、Olympus显微镜拍照系统、Image-Pro Plus6.0图像分析系统(加拿大MediaCybernetics公司)。

实验试剂:mGluR1和mGluR5一抗及二抗试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)试剂盒,由北京博奥森生物工程有限公司提供;其他药品:多聚甲醛、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、蔗糖、氯化钠、铬矾、明胶、甲醇、30%过氧化氢、TritonX-100、无水乙醇、95%乙醇、中性树胶等,由北京博奥森生物工程有限公司提供。

1.4 灌流、取脑、切片、染色、拍片

对照组和实验组分别用10%水合氯醛麻醉大鼠,剂量为 3.5ml/kg 体重,将麻醉的大鼠仰卧位固定于手术台上。小心剪开腹壁,暴露隔肌后,再剪开隔肌与胸壁与心包,使之暴露心脏。用穿刺针经心尖部刺入左心室至主动脉根部,随即快速用止血钳固定。然后在右心耳处剪一小口,可见血液流出。紧接着先用温生理盐水约200ml灌注,待右心耳流出的液体变清亮时,再用 4°C 预冷的4%多聚甲醛磷酸缓冲液(0.01M , $\text{pH}=7.4$)约200ml灌注,直至肝脏变硬变白为止,一般灌注时间不少于20min。灌注完成后,迅速断头,将头部放在冰盘上,剪开头顶的皮肤,打开颅腔,暴露出全脑并取出,放在4%的多聚甲醛磷酸缓冲液(0.01M , $\text{pH}=7.4$)中24h左右。接下来脱水、包埋、切片,切片厚度为 $5\mu\text{m}$,然后按照mGluR1和mGluR5免疫组化染色试剂盒的说明对大鼠脑切片进行免疫组化染色操作(DAB法),试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.5 统计学分析

分别从4个实验组相同两层的连续切片中选取5张切片,参照《大鼠脑立体定位图谱》在每张切片的皮质M1区选取5个视野($200\times$),采用Image-Pro

Plus 6.0真彩色病理图像分析系统进行阳性细胞计数和积分光密度(integrated optical density, IOD)分析。所得数据以平均值 $\pm$ 标准差表示,并用SPSS11.0进行统计分析,各组间差异用单因素方差分析检验, $P<0.05$ 表示有显著性意义。

2 结果

2.1 大鼠体重的变化情况

见表1。对照组的大鼠进行正常饲养,自由活动,体重正常增长;各运动组的大鼠则按照疲劳模型运动1周后,结果显示力竭即刻组、运动后24h和48h组的大鼠多数出现精神萎靡,觅食及活动减少,毛发无光泽,体重与对照组相比均出现明显的下降趋势。

表1 训练期间各组大鼠体重变化 ($\bar{x}\pm s$, n=8)

训练时间	CG(g)	0 EG(g)	24 EG(g)	48 EG(g)
训练前	253.13 $\pm$ 7.31	249.83 $\pm$ 6.74	251.36 $\pm$ 5.44	252.21 $\pm$ 6.82
第一天	251.67 $\pm$ 6.87	250.58 $\pm$ 6.87	251.26 $\pm$ 4.99	251.68 $\pm$ 7.67
第二天	253.24 $\pm$ 7.54	251.33 $\pm$ 6.21	250.47 $\pm$ 5.52	252.23 $\pm$ 6.71
第三天	256.45 $\pm$ 7.24	252.28 $\pm$ 5.25 ^①	251.89 $\pm$ 8.12 ^①	251.78 $\pm$ 6.28 ^①
第四天	259.50 $\pm$ 7.04	249.33 $\pm$ 4.13 ^②	247.83 $\pm$ 5.98 ^②	250.33 $\pm$ 6.15 ^②
第五天	262.58 $\pm$ 7.63	248.67 $\pm$ 7.64 ^②	248.40 $\pm$ 5.29 ^②	249.79 $\pm$ 8.73 ^②
第六天	264.47 $\pm$ 6.32	248.00 $\pm$ 6.57 ^②	246.33 $\pm$ 4.97 ^②	248.05 $\pm$ 7.79 ^②
第七天	268.38 $\pm$ 5.91	245.67 $\pm$ 8.09 ^②	246.87 $\pm$ 5.82 ^②	247.12 $\pm$ 7.49 ^②

注:与CG比较,① $P<0.05$,② $P<0.01$

2.2 运动疲劳对M1区 mGluR1 和 mGluR5 蛋白 IOD 的影响

由图1可知,与对照组相比,力竭即刻及运动后24h时,大鼠M1区中mGluR1蛋白IOD显著升高($P<0.01$; $P<0.01$);运动后24h的mGluR1蛋白IOD较即刻组无显著差异($P>0.05$),运动后48h仍显著高于对照组($P<0.05$)。力竭即刻及运动后24h时,大鼠M1区中mGluR5蛋白IOD较对照组显著升高($P<0.01$; $P<0.05$),运动后48h的mGluR5蛋白IOD则与对照组无显著差异($P>0.05$)。

2.3 运动疲劳对M1区 mGluR1 和 mGluR5 阳性细胞数量的影响

运动疲劳对大鼠运动皮质M1区mGluR1和mGluR5阳性细胞数量的影响见表2、图2—3,正常大鼠mGluR1和mGluR5在运动皮质有神经元阳性细胞表达,深棕色,部分在突起也有表达,浅棕色的纤维表达广泛分布;而各运动组的mGluR1和mGluR5在运

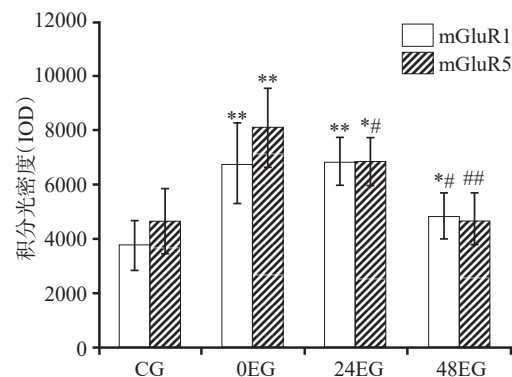
动皮质的神经元阳性细胞表达随着运动后恢复时间的延长呈现不同的变化。由表2可知,与对照组相比,力竭即刻组及运动后24h时,大鼠M1区中mGluR1阳性细胞数量显著升高($P<0.01$, $P<0.01$),而运动后48h时大鼠M1区中mGluR1阳性细胞数量仍显著高于对照组($P<0.05$),并没有恢复至对照组水平。力竭即刻组及运动后24h时,大鼠M1区中mGluR5阳性细胞数量也是显著高于对照组($P<0.01$, $P<0.05$),而运动后48h的mGluR5阳性细胞数量则恢复至对照组水平($P>0.05$)。

表2 各组大鼠皮质M1区 mGluR1 和 mGluR5 的阳性表达细胞数 ($\bar{x}\pm s$, n=8, n/mm²)

组别	mGluR1	mGluR5
CG	42.38 $\pm$ 5.39	35.88 $\pm$ 9.70
0 EG	65.88 $\pm$ 12.84 ^②	63.75 $\pm$ 12.37 ^②
24 EG	68.13 $\pm$ 13.08 ^②	51.63 $\pm$ 10.45 ^{①③}
48 EG	52.63 $\pm$ 9.75 ^{①③}	32.88 $\pm$ 6.29 ^④

注:与CG相比,① $P<0.05$,② $P<0.01$;与0EG相比,③ $P<0.05$,④ $P<0.01$

图1 运动疲劳后大鼠皮质M1区 mGluR1 和 mGluR5 IOD 的变化

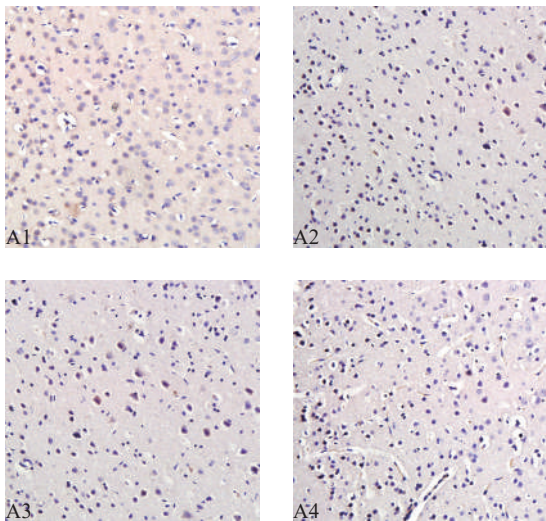


与CG相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与0EG相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$

3 讨论

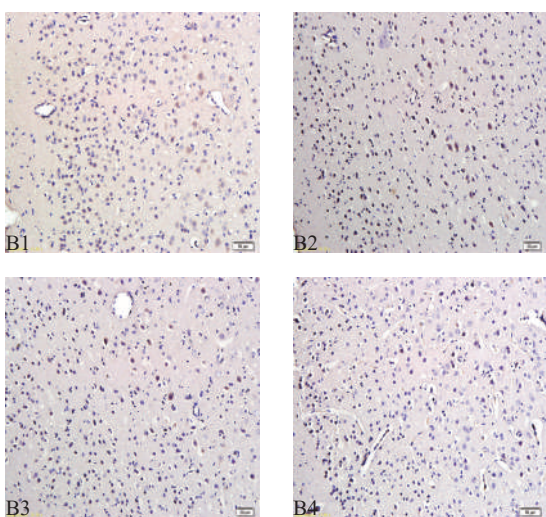
近年来,谷氨酸受体在神经系统疾病中的研究备受关注,其中mGluR5是中枢神经系统疾病的重要病理标志物之一^[5]。疲劳是降低机体工作能力的重要原因,随着中枢疲劳机制的深入研究,延缓中枢疲劳的措施成为人们日益关注的热点。谷氨酸是中枢神经系统内含量最高的兴奋性神经递质,其与中枢疲劳的产生有着极为密切的关系^[6-7],目前mGluR5可能是调控癌症相关疲劳(cancer-related

图2 各组 mGluR1 免疫组化切片 (×200)



A1: 对照组; A2: 力竭即刻组; A3: 运动后 24h 组; A4: 运动后 48h 组

图3 各组 mGluR5 免疫组化切片 (×200)



B1: 对照组; B2: 力竭即刻组; B3: 运动后 24h 组; B4: 运动后 48h 组

fatigue, CRF) 的一种新型治疗方案^[8]。谷氨酸的兴奋毒性由其受体所介导,其主要受体有 iGluRs 和 mGluRs,其中 mGluRs 在突触前和突触后既可介导兴奋性效应,也可介导抑制性效应;激活 mGluRs 后能够影响神经元变性过程,既可导致神经毒性作用,亦可发挥神经保护性作用,因此引起了人们的广泛关注^[9-10]。而有关运动对不同脑区 I 组代谢型谷氨酸受体表达影响的研究目前尚缺乏报道,临床上相关研究相对较多,其中 mGluR5 是帕金森病治疗的主要靶点^[10],mGluR1 是癫痫治疗的重要新型靶点^[11]。

有文献报道^[12],PD 模型动物纹状体 mGluR5 表达增强,利用 mGluR5 受体拮抗剂阻断其活性,可有效改善 PD 动物模型运动功能障碍,并认为纹状体内 mGluR5 受体表达变化在锥体外系运动功能调控方面发挥特殊作用。运动训练可以使缺血再灌注大鼠 I 组代谢型谷氨酸受体(mGluRI)水平下调,这可能是抑制兴奋毒性谷氨酸产生的重要机制之一^[13]。Zhang 等^[14]报道,适度运动训练可通过降低 mGluR5 受体的 mRNA 水平表达,从而提高脑缺血耐受率。mGluR1 和 mGluR5 正是 Glu 能神经元作用于皮质运动神经元的特异受体,其表达强弱将会影响到谷氨酸能神经元的作用效应^[15]。本实验结果发现,运动皮质 M1 区 mGluR1 和 mGluR5 蛋白表达在力竭即刻及运动后 24h 显著高于对照组;其中 mGluR1 在运动后 48h 的蛋白表达虽较运动后 24h 组有显著降低,但仍显著高于对照组;而 mGluR5 在运动后 48h 的蛋白表达却已恢复到对照组水平,说明运动疲劳能够导致运动皮质 mGluR1 和 mGluR5 表达增强,这两种受体亚型随着运动后恢复时间的延长呈现出表达时程不一的效应,但总体呈先升高后降低的趋势,这与文献报道类似,研究报道了 mGluR5 蛋白表达在颅脑伤后呈短暂升高而后低水平表达^[16],另有研究报道了 mGluR1 α 参与了缺氧诱导的二次脑损伤^[17],这些报道为有效预防疲劳和治疗缺氧性脑损伤的方法提供了实验依据。分子生物学研究表明 mGluR1、mGluR5 属于 G 蛋白偶联受体,作用机制为通过活化磷脂酶 C(PLC),将膜内的磷酸肌醇(PI)水解为甘油二酯(DAG)和三磷酸肌醇(IP₃),IP₃ 作为第二信使可引起内源性 Ca²⁺ 的释放,引发突触后神经元的钙超载,从而介导了细胞的损伤^[18]。

有研究报道,激活代谢型谷氨酸受体可引起神经元兴奋,从而加重谷氨酸兴奋毒性的神经元的死亡,当 mGluR1、mGluR5 受体表达增强,使其配体作用于神经元上谷氨酸受体的作用增强,使 Ca²⁺ 释放增强^[19],而以往研究^[20-21]也证实力竭运动可导致脑神经细胞内钙离子浓度的升高,因此 mGluR1 和 mGluR5 在运动皮质神经元中可能介导了谷氨酸的神经毒性兴奋作用,这也是导致运动疲劳产生的原因之一。

现已有研究证明,力竭运动可使大鼠脑中发生局域性缺血^[22],从而引起了一系列的病理生理反

应。在本实验中,力竭运动后即刻和恢复后的24h,运动皮质中mGluR1和mGluR5蛋白含量明显增加,这可能是在力竭运动后,机体在运动过程时消耗大量的ATP和氧气,使得脑中ATP和氧供应出现了相对不足,出现了脑区区域性缺血。有研究报道,急性脑缺血可引起mGluR1表达和mGluR5 mRNA表达上调,提示mGluR1和mGluR5参与了局灶性脑缺血损伤,可能促进了缺血性脑血管病的发展^[23-24],另有研究也发现力竭运动后90min大鼠丘脑底核mGluR5表达较对照组显著升高^[25],这些与本研究由于运动导致的缺血缺氧使得I组代谢型谷氨酸受体(mGluR1和mGluR5)表达上调,具有相似之处。提示,I组代谢型谷氨酸受体可能是中枢神经系统中介导运动疲劳产生的另一个重要受体靶点。

4 结论

运动疲劳能够导致运动皮质mGluR1和mGluR5表达增强,这两种受体亚型随着运动疲劳后恢复时间的延长呈现出表达时程不一的效应,但总体呈先升高后降低的趋势,提示mGluR1和mGluR5可能是中枢神经系统中诱导运动疲劳产生的重要新型受体靶点,I组代谢型谷氨酸受体可能是抗疲劳的新靶药。

参考文献

- [1] 左文彪,臧印竹,王慧.酸枣仁汤对PCPA致失眠大鼠大脑皮质代谢型谷氨酸受体mGluR1、mGluR2的影响[J].亚太传统医药,2018,14(3):4—7.
- [2] Yamamoto N, Soghomonian JJ. Metabotropic glutamate mGluR5 receptor blockade opposes abnormal involuntary movements and the increases in glutamic acid decarboxylase mRNA levels induced by L-DOPA in striatal neurons of 6-hydroxydopamine-lesioned rats[J]. The Journal of Neuroscience, 2009, 164(4):1171—1180.
- [3] 于龙华,张志强,卢光明.运动皮层区域病变的功能磁共振成像研究及应用[J].医学影像学杂志,2007,17(11):1240—1242.
- [4] 乔德才,吴迪,侯莉娟,等.运动疲劳对大鼠黑质致密区DA能神经元电活动的影响[J].上海体育学院学报,2010,34(1):43—45.
- [5] 黄敏,许涛,江伟.代谢型谷氨酸受体5与N-甲基-D-天冬氨酸受体的关系及其在疾病中的作用[J].上海交通大学(医学版),2018,38(7):825—828.
- [6] 胡琰茹,刘晓莉,乔德才.“黑质/苍白球—丘脑—皮质”通路5-羟色胺1B受体及多巴胺I型受体在大鼠运动疲劳调控中的作用[J].2017,32(5):501—508.
- [7] Mehnert JM, Silk AW, Lee JH, et al. A phase II trial of riluzole, an antagonist of metabotropic glutamate receptor 1 (GRM1) signaling, in patients with advanced melanoma[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2018, 31(4):534—540.
- [8] Feng LR, Fernández- Martínez JL, Zaal KJM, et al. mGluR5 mediates post-radiotherapy fatigue development in cancer patients[J]. Transl Psychiatry, 2018, 8(1):110—121.
- [9] Ribeiro FM, Vieira LB, Pires RG, et al. Metabotropic glutamate receptors and neuro-degenerative diseases[J]. Pharmacological Research, 2017, 115(1):179—191.
- [10] 江文,高华,黄远桂.代谢型谷氨酸受体及其与神经变性疾病[J].中国临床神经科学,1998,6(3):174—177.
- [11] 王玢.中药复方对戊四氮致痫大鼠海马mGluR1表达的影响[J].山东中医药大学学报,2010,34(6):533—536.
- [12] Breyse N, Baunez C, Spooren W, et al. Chronic but not acute treatment with a metabotropic Glutamate 5 receptor antagonist reverses the akinetic deficits in a rat model of Parkinsonism[J]. The Journal of Neuroscience, 2002, 22(13):5669—5678.
- [13] 张曦,郭青川,贾杰.运动训练对缺血再灌注大鼠纹状体中代谢型谷氨酸I组受体基因表达的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2008,30(11):730—733.
- [14] Zhang F, Jia J, Wu Y, et al. The Effect of Treadmill Training Pre-Exercise on Glutamate Receptor Expression in Rats after Cerebral Ischemia[J]. Int. J. Mol. Sci., 2010, 11(7):2658—2669.
- [15] Merlin LR. Differential roles for mGluR1 and mGluR5 in the persistent prolongation of epileptiform bursts[J]. J Neurophysiol, 2002, 87(1):621—625.
- [16] 蔡英,黄慧玲,范维佳,等.颅脑创伤后期大鼠代谢型谷氨酸受体5表达变化及牛磺酸治疗作用[J].中国现代神经疾病杂志,2016,16(8):503—508.
- [17] 李侠,章翔,费舟,等.急性缺氧对脑损伤大鼠脑皮层代谢型谷氨酸受体1α表达的影响[J].中华航空航天医学杂志,2000,11(4):229—232.
- [18] 白艳华,张军,史红阳,等.糖尿病大鼠回肠肌间神经丛mGluR1及mGluR5的表达[J].世界华人消化杂志,2008,16(33):3734—3739.
- [19] Zou J, Jiang JY, Yang JJ. Molecular Basis for Modulation of Metabotropic Glutamate Receptors and Their Drug Actions by Extracellular Ca^{2+} [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3):672—689.
- [20] 张安民,张青元,于芳,等.持续游泳运动对大鼠脑杏仁核神经细胞内钙离子的影响[J].成都体育学院学报,2009,35(6):70—72.
- [21] 胡旺平,李雪梅,化长林,等.力竭游泳对大鼠海马突触体内游离钙浓度的影响[J].中国运动医学杂志,2002,21(6):617—618.
- [22] 袁琼嘉,田佳,毕新奇,等.力竭运动对大鼠大脑微结构的影响[J].成都体育学院学报,1996,22(3):86—89.
- [23] 杨巧莲,张茂林,刘莺,等.局灶脑缺血大鼠代谢型谷氨酸受体5mRNA表达及意义[J].中风与神经疾病杂志,2008,25(6):684—686.
- [24] 冯晓东,李瑞青,宋晓磊,等.穴位埋线对脑缺血后肢体痉挛大鼠GABA_B、mGluR1表达的影响[J].康复学报,2015,25(3):35—39.
- [25] 王大磊,刘晓莉,乔德才.力竭运动大鼠丘脑底核mGluR5/GABA-ARα1表达及MPEP干预对皮层运动区兴奋性的影响[J].2010,29(5):542—546.