

· 基础研究 ·

运动训练对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及 大脑皮质区生长相关蛋白-43 表达的影响*

樊振勇¹ 陈丽娜¹ 徐琳峰¹ 纵 亚¹ 胡坚勇¹ 于向华¹ 顾伟忠²

摘要

目的: 研究运动训练对血管性痴呆大鼠学习记忆功能恢复及组织生长相关蛋白(GAP-43)表达的影响。

方法: 采用双侧颈总动脉反复缺血再灌注加降血压法制作血管性痴呆大鼠模型。选择 SD 雌性大鼠 44 只,随机分为运动组 20 只,制动组 20 只和假手术组 4 只。运动组大鼠进行滚筒、转棒训练,1h/d;制动组大鼠限制其自由活动;假手术组置于普通笼中自由活动。3 组分别于术后第 27、28 天进行跳台实验测定学习、记忆能力。取脑组织采用免疫组织化学染色方法观察不同时间点大脑皮质区 GAP-43 的表达。

结果: 跳台实验对学习记忆能力进行评估,运动组优于制动组($P<0.01$),运动组 GAP-43 在皮质区的表达第 1 天逐渐增高,第 7 天达高峰,较制动组和假手术组均有明显增加($P<0.01$)。

结论: 运动训练可改善 VD 大鼠学习记忆能力,其机制可能与运动训练能促进皮质区上 GAP-43 表达有关。

关键词 血管性痴呆;运动训练;学习记忆;生长相关蛋白-43

中图分类号:R742, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2010)-06-0514-05

The effects of exercises training on learning, memory and expression of GAP-43 in cortex area of rat with vascular dementia/FAN Zhenyong, CHENG Lina, XU Linfeng, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(6): 514—518

Abstract

Objective: To study the effects of exercises training on the improvement of learning and memory ability and the expression of growth associated protein-43(GAP-43) in vascular dementia rats.

Method: The imitative vascular dementia model was established by repeatedly clipping the common carotid arteries of both side for ischemia-reperfusion and reducing blood pressure with an abdominal injection of sodium nitroprusside. Forty-four female SD rats were randomly assigned to exercises training group (20 cases), immobilization group (20 cases), and sham-operation group (4 cases). The rats in exercises training group were administered exercises with a rotating bar and rolling tube for 1h daily, while those in immobilization group were immobilized without any exercises; the rats in the sham-operation group can free exercises in cage. Learning and memory tests were performed by using step-down avoidance test at the 27th d, 28th d after operation. Immunohistochemical staining was used to detect the GAP-43 expression around the hippocampus CA1 area at different time points after operation.

Result: Exercises training group showed better learning and memory ability and more GAP-43 expressions in the cortex area than immobilization group($P<0.01$) and sham-operation group($P<0.01$).

Conclusion: Exercises training can improve ability of learning and memory in vascular dementia rats, and the mechanism possibly is related to the increase of GAP-43 in the cortex area.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.06.005

* 基金项目:杭州市医药卫生科技计划项目资金资助(2006B001)

1 杭州市第一人民医院康复科,杭州,310006; 2 浙江大学附属儿童医院病理科

作者简介:樊振勇,男,硕士,主治医师;收稿日期:2009-06-16

Author's address Department of Rehabilitation,the First People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou, 310006

Key words vascular dementia; exercises training; learning and memory; growth-associated protein-43

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是因脑血管病变所致智能及认知功能障碍的临床综合征,患者主要表现为记忆、认知、言语、行为障碍和人格改变等临床综合征。VD是中老年人群的多发病、常见病。病理机制主要与脑血管病变导致局部或全脑缺血或缺氧后引起脑部与认知记忆等相关的特定神经组织神经元损害有关,引起学习记忆能力下降。生长相关蛋白(growth-associated protein, GAP-43)是神经元特异性蛋白,与神经发育、轴突再生和突触重建密切相关。随着脑的发育成熟, GAP-43的表达逐渐降低,当出现脑损伤后,其表达又会增高。关于运动训练对血管性痴呆大鼠学习记忆能力恢复及大脑皮质区 GAP-43表达的影响目前尚缺少相关报道。本实验采用双侧颈总动脉反复缺血再灌注加降血压法制作 VD 模型,通过运动训练来观察其学习记忆能力的改变以及 GAP-43 在皮质区不同时相点的表达,旨在探讨早期运动训练对血管性痴呆大鼠学习记忆成绩以及皮质区 GAP-43 表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组

成年雌性 SD 大鼠 44 只,体重 218—270g,周龄 12 周,清洁型,由浙江省医学科学院实验动物中心提供(实验动物机构许可证号 SYXK(浙)2005-0072)。44 只大鼠随机分为运动组 20 只、制动组 20 只和假手术组 4 只,运动组在术后第 1 天开始运动训练;制动组术后置于 (60×40×20)cm³ 的网状笼内固定,在头端有一容器给予食物和水,四肢和身体处于固定状态,限制其自由活动;假手术组只剥离双侧颈总动脉,既不夹闭血管,也不降血压。运动组和制动组在组内又分为术后第 1、7、14、21、28 天 5 个时间组,每个时间组 4 只。前两组分别于造模后第 1、7、14、21、28 天分批处死,假手术组第 28 天处死,进行组织染色、免疫组织化学染色。

1.2 VD 模型制作

采用双侧颈总动脉反复缺血再灌注加降血压法制作动物模型^[1]。用氯氨酮(0.75ml/mg/kg)安定(1mg/kg)腹腔注射麻醉。将大鼠仰卧固定,行颈正中

切口,钝性分离双侧颈总动脉,穿线备用。硝普钠按 2.5mg/kg 腹腔注射造成低血压。立即用无创血管夹夹闭双侧颈总动脉 10min,再通 10min,如此反复 3 次,撤线缝合切口,放回笼中饲养。动物苏醒后出现 Homer 综合征,提尾时前肢内收屈曲,爬行时划圈者为手术成功的标志^[2]。

1.3 运动训练

自制滚筒式网状训练器为长 50cm,直径 30cm 的圆形网状仪器,底座有固定架,一端有一手摇柄,可手摇按 8 转/min 训练。将大鼠放入该仪器内可训练大鼠的抓握、旋转、行走等运动;转棒训练取长 150cm,直径 4.5cm 的木棒一根,其中点固定,以 3 转/min 转动,分别向左右交替转动,训练大鼠从该棒的一端走到另一端,以训练其动态平衡功能。运动组训练以上 2 个项目,每项各 10min,中间休息 10min,1 次/d,5 次/周。

1.4 学习记忆能力的评定

跳台实验装置为自制(40×40×40)cm³的被动回避反应箱^[3]。箱底为可通电的铜网,反应箱的一侧放置回避电击的安全台,面积(10×10)cm²,高 10cm。在第 27 天测试学习成绩,将大鼠放入箱内适应 5min,即刻通以 36V 交流电,大鼠受电击后,其正常反应是跳到安全台躲避电击,记录通电后其跳至安全台上的时间,作为反应期时间,观察 5min 内大鼠跳下安全台受电击的次数为错误次数及 5min 内的受电击时间,以反应期、错误次数和受电击时间作为其学习成绩。24h 后重复试验测试记忆成绩,将大鼠置于安全台上,即刻通电,5min 内大鼠从台上跳至铜网上的时间为潜伏期,受电击次数为错误次数及 5min 内的受电击时间,以潜伏期、错误次数和受电击时间为记忆成绩。

1.5 组织石蜡切片

大鼠大脑组织标本在 pH7.4 的中性缓冲福尔马林固定 12h 后,脱水如下:自来水洗 30min,70%乙醇洗 30min,95%乙醇洗 1h×2 次,100%乙醇洗 1h×2 次,二甲苯透明 20min×2 次,浸蜡 58—60℃ 3h,包埋组织切片,取皮质区连续冠状切片,厚 4μm,黏附于载玻片上,60—62℃烘箱(隔水式恒温培养箱 GNP-

9160)烤片 4h 后进行 HE 染色和免疫组化染色。

1.6 HE 染色和免疫组织化学染色

1.6.1 苏木素-伊红染色:二甲苯脱蜡 (10min×2 次), 依次脱水无水乙醇 (3min×2 次)、95%乙醇 2min、80%乙醇 2min、70%乙醇 2min、至自然水水化, Gill 苏木素染色液 10min, 自然水洗, 显微镜下控制 0.5%盐酸乙醇分化数秒, 流水冲洗、温水蓝化, 95%乙醇 1min, 0.5%伊红乙醇染色液 1—2min, 80%乙醇适当分化, 95%乙醇脱水 (3min×2 次), 100%乙醇脱水 (3min×2 次), 二甲苯透明 (5min×2 次), 中性树胶封片。

1.6.2 免疫组化 GAP43 染色:免疫组化采用 EnVisionTM 二步法 (DAKO 公司)。石蜡切片厚 4μm, 二甲苯脱蜡、无水乙醇、95%、80%、70%乙醇至水水化, 蒸馏水洗, 抗原修复采用高温高压修复 (GAP43 采用 0.01M 柠檬酸缓冲溶液, pH6.0); 时间 100s; 蒸馏水洗, PBS (5min×3 次), 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶 10min, PBS 洗 5min×3 次, 滴加一抗, 4℃过夜。PAP43 ab16053 为兔来源的多克隆抗体, 工作浓度为 1:150; 为美国 Abcam 公司的产品; 用 PBS 代替一抗为空白对照, PBS 冲洗 (5min×3 次), 每次, 滴加山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体 37℃孵育 40min, PBS 冲洗 5min×3 次, DAB 显色液显色 3min, 显微镜下控制反应, 自来水冲洗终止反应, Harris 苏木素液复染细胞核 1min, 95%、100%乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.7 图像分析

采用中国武汉同济千屏影像工程公司 HPIAS-1000 病理图文分析系统, 对免疫组化 GAP-43 染色的表达进行定量检测分析: 即每张切片随机分别采集 5 个皮质视野 (×200 倍), 经过该系统自动分析测量获得该皮质视野的表达强度的积分光密度值, 经系统平均后代表该标本的染色强度。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行整理及统计分析。结果用均数±标准差表示, 按完全随机成组设计资料进行方差分析, 组间比较采用单因素方差分析, 多个样本均数两两比较的采用 *q* 检验。

2 结果

2.1 学习和记忆成绩的结果

术后第 27 天测试的学习成绩, 运动组较制动组反应期时间明显缩短 ($P<0.01$)、错误次数减少 ($P<0.05$)、受电击时间也明显缩短 ($P<0.01$); 术后第 28 天的记忆成绩: 运动组较制动组潜伏期明显延长, 错误次数明显减少, 受电击时间也明显缩短 ($P<0.01$)。而运动组与假手术组所测试的学习记忆成绩差异无显著性 ($P>0.05$)。见表 1。

2.2 组织学和免疫化学染色

2.2.1 光镜下组织学观察:细胞核呈蓝色, 胞浆为淡红色。主要观察脑组织的缺血性损伤的情况。运动组和制动组皮质区的神经细胞部分结构不清, 细胞嗜酸性增加, 部分有水肿, 主要为缺血性改变, 特别在第 1 天明显, 未见特征性改变。假手术组: 脑组织结构清楚, 神经细胞排列整齐 (图 1)。

2.2.2 免疫组织化学指标实验结果:GAP-43 阳性表达部位主要在神经细胞, 神经元细胞的胞浆表达少, 在轴突内明显增多, 在皮质区均有广泛的表达。运动组和制动组表达明显增加, 且运动组的表达更高, 特别在第 1、7 天明显。而在假手术组的皮质神经元细胞的胞浆和轴突内表达较弱较少 (图 2)。

GAP-43 的表达在术后第 1 天时, 运动组较假手术组增高 ($P<0.05$), 差异有显著性意义; 术后第 7 天, 运动组的表达达高峰, 较制动组、假手术组明显增高 ($P<0.01$), 差异有显著性意义; 术后第 14、21 天, 运动组的表达下降, 与其他两组比较, 差异无显著性意义 ($P>0.05$); 术后第 28 天, 运动组与假手术组比较, 差异无显著性意义 ($P>0.05$) (表 2)。

表 1 3 组大鼠跳台实验的学习和记忆成绩

($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	学习成绩			记忆成绩		
		反应期(s)	错误次数(次)	受电击时间(s)	潜伏期(s)	错误次数(次)	受电击时间(s)
运动组	4	60.50±14.27 ^①	1.00±0.82 ^②	11.25±7.89 ^①	296.50±4.73 ^①	0.50±0.58 ^①	3.50 ±4.73 ^①
制动组	4	183.00±62.34 ^③	2.75±0.96 ^④	68.50 ±19.33 ^③	57.75 ±30.25 ^③	2.50±0.58 ^③	145.5±57.12 ^③
假手术组	4	40.50±5.92	0.50±0.58	5.50±6.40	297.50±5.00	0.25±0.50	2.50±5.00

与制动组比较:① $P<0.01$, ② $P<0.05$;与假手术组比较:③ $P<0.01$,④ $P<0.05$

表 2 3组大鼠皮质区 GAP-43 在不同时间点的表达

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
运动组	4	0.027±0.004 ^③	0.046 ±0.010 ^{②③}	0.032±0.002 ^{②③}	0.031±0.014	0.036±0.010 ^③
制动组	4	0.029±0.006 ^③	0.030±0.004 ^④	0.025±0.005 ^③	0.025±0.004	0.028±0.002 ^④
假手术组	4	0.015±0.001	0.015±0.001	0.015±0.001	0.015±0.001	0.015±0.001

与制动组比较:①P<0.01, ②P<0.05;与假手术组比较,③P<0.01,④P<0.05

图 1 各组 VD 大鼠手术后第 1 天皮质区形态学变化 (HE 染色, ×200)

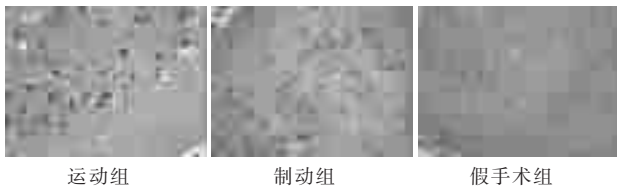
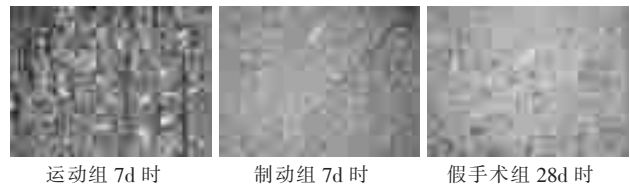


图 2 各组 VD 大鼠 GAP-43 在皮质区表达情况的比较 (免疫组织化学染色, ×200)



3 讨论

GAP-43(又名 B-50, F1, 神经调素)是 20 世纪 80 年代初发现的,与神经发育、轴突再生、突触重建密切相关的一种快速转运膜磷酸蛋白,被认为是神经元发育和再生的一个内在决定因子^[4-5]。它广泛分布于神经元、再生的雪旺细胞和神经胶质细胞,正常大鼠脑内许多区域有 GAP-43 免疫组化反应阳性物,在大脑内阳性物弥散分布于皮质中,在边缘系统和联合区,包括与突触可塑性相关的一些区域如海马和嗅球,GAP-43 呈持续高水平表达^[6-7]。GAP-43 在大鼠新皮质和海马表达高峰在生后两周期间,以后大部分脑区的 GAP-43 及其 mRNA 的表达都大大降低,但在边缘系统和联络区有丰富表达,GAP-43 及其 mRNA 在神经系统的表达分布特点表明它与长期记忆相关的可塑性有关^[5]。

我们研究发现,运动组 GAP-43 在大脑皮质区的表达,术后第 1 天开始增高,第 7 天达到高峰,较制动组明显增高,以后逐渐降低,第 14 天降至最低,第 21 天、第 28 天略有增高。这与其他文献报道相一致^[8]。郑青立等^[9]应用线栓法建立大鼠大脑中动脉阻塞再灌注模型。采用 Bedeison 神经功能评分法评价脑缺血 90min 再灌注 2h、12h、1d、2d、3d、7d 和 14d 等时间点大鼠神经功能情况,采用原位杂交技术检测 NCAM mRNA 和 GAP-43 mRNA 的表达。结果大鼠脑缺血再灌注后,神经功能评分于再灌注第 2 天开始降低,神经功能逐渐恢复。结论脑缺血再灌注后,GAP-43 mRNA 的表达增强可能与损伤神经的功能恢复有关。观察早期运动训练对大鼠大脑中动脉缺血再灌注后功能恢复的影响发现 GAP-43

mRNA 在缺血再灌注后第 3—7 天升高,2 周左右升高达峰值,此后虽有下降,但直至第 21 天仍持续高于基线水平。故认为早期运动促进大鼠大脑缺血后的功能恢复,其分子机制也可能与 GAP-43 mRNA 表达水平的增高有关。

研究采用跳台实验评定 VD 大鼠在经过早期运动训练后第 27、28 天时的学习、记忆能力,结果表明运动组的学习、记忆成绩明显好于制动组,与假手术组比较无明显差异。研究结果表明 VD 大鼠在经过早期运动训练后,学习记忆成绩明显好于制动组,与假手术组比较无明显差异。提示运动训练能促进 VD 大鼠学习、记忆的改善。研究表明合理的运动训练能够促进新陈代谢,增强活力,改善学习记忆能力^[11-12]。其机制是早期运动训练的介入激活神经元促进了神经元轴突的修复和再生以及神经突触的连接重建。神经损伤与再生时,轴突 GAP-43 的含量可增加 20—100 倍^[11-12],为神经元轴突的修复和再生提供了足够地营养供给。神经元生长过程中 GAP-43 可能是靠改变生长锥中 G 蛋白的活性,影响轴突的生长生长锥是轴突生长和延伸的引导,生长锥中的 G 蛋白与其受体反应产生抑制信号,导致生长锥停止生长,而 GAP-43 与 G 蛋白结合后解除抑制信号允许轴突继续生长^[13]。王亚男等^[14]在研究大鼠大脑中动脉闭塞模型时发现,定量免疫组织化显示运动训练(游泳)组的 GAP-43 免疫活性水平在缺血后第 7、14、28 天显著高于对照组,运动组的功能评分在第 3 天后也显著高于对照组,说明运动训练可以通过 GAP-43 的表达上调而促进神经功能的恢复。另外,Paratcha 等^[15]研究认为,经过运动训练的动物纹

状态内的 GAP-43 磷酸化的水平闭塞的模型比对照组减少 31%, 这种内源性 GAP-43 磷酸化水平的降低可能是由于突触浆膜中蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的活性降低所致, 说明运动训练可使脑内的 GAP-43 浓度保持较高水平, 有利于神经的再生。因此, 我们认为早期对 VD 大鼠康复训练能明显改善学习记忆的能力, 这可能与 GAP-43 在皮质表达增强有关。

GAP-43 确实与神经元生长发育、突触可塑性、神经再生、长时程增强关系密切, 但其促进神经发育和再生的具体机制却并未完全阐明。深入了解其表达调控机制以及生理作用, 找到神经元中与其相互作用的特异性蛋白质, 将有助于全面理解轴突生长、突触连接重建的全过程, 为运动训练改善血管性痴呆学习记忆力提供充分的理论根据。

参考文献

- [1] 罗任, 闫兵, 何利雷. 电针刺激对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及大脑一氧化碳含量的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(6): 500—502.
- [2] 徐莉, 李玲. 运动训练后脑梗死大鼠功能恢复的评估及机理研究进展 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22(5): 307—310.
- [3] 王昊, 阎小萍, 金迪儿. 血管性痴呆动物模型探讨 [J]. 中日友好医院学报, 2005, 19(2): 87—89.
- [4] 覃华丽, 周雪, 章为. 生长相关蛋白 GAP-43 的研究现状 [J]. 四川解剖学杂志, 2002, 10(2): 78—83.

- [5] Larry IB, Aryeh R. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity [J]. TINS, 1997, 20(2): 94.
- [6] Larry IB, Aryeh R. A membrane phosphoprotein associated with neuronal development, axonal regeneration, phospholipid metabolism, and synaptic plasticity [J]. TLNS, 1987, 10(12): 527.
- [7] Stewart HIS, Cawen T, Curtis R, et al. GAP-43 immunoreactivity is widespread in the autonomic neurons and sensory neurons of the rat [J]. Neuroscience, 1992, 47(3): 673.
- [8] 刘广义, 张笛, 杜秀民, 等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 GAP-43 及 IGF-I 促进神经元再生表达的实验研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24(4): 398—4402.
- [9] 郑青立, 李翔, 张美增, 等. 脑缺血后神经细胞粘附分子和生长相关蛋白-43 的表达与神经功能恢复的关系 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27(8): 464—467.
- [10] 赵燕燕, 陈春生, 刘新霞, 等. 运动训练对亚硝酸钠致记忆障碍模型小鼠学习记忆能力的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24(2): 110—112.
- [11] Tolner EA, van V liet EA, Holtmaat AJ, et al. GAP-43 mRNA and protein expression in the hippocampal and parahippocampal region during the course of epileptogenesis in rats [J]. Eur J Neuro Sci, 2003, 17(11): 2369—2380.
- [12] Carrasco J, Penkowa M, Giralto M, et al. Role of metallothionein-III following central nervous system damage [J]. Neurobiol Dis, 2003, 13(1): 22—36.
- [13] McIlvoin VA, Robertson DR, Maimone MM, et al. Abnormal thalamocortical pathfinding and terminal arborizations lead to enlarged barrels in neonatal GAP-43 heterozygous mice [J]. Comp Neurol, 2003, 462: (2) 252—264.
- [14] 王亚男, 杨永洁, 石秉霞, 等. 运动训练对大鼠脑梗死后肢体功能和 GAP-43, MAP-2 表达水平的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2004, 19: 272—275.
- [15] Paratcha GC, Ibarra GR, Cabrera R, et al. Decreased phosphorylation of GAP-43/B-50 in striatal synaptic plasma membranes after circling motor [J]. Neurochem Res, 1998, 23: 1241—1249.

国际康复工程与辅助技术大会 7 月份将在上海隆重召开

国际康复工程与辅助技术大会(简称 I-CREATE)是由泰国国家电子与计算机技术中心、新加坡治疗、辅助与康复技术中心、北美康复工程与辅助技术学会、欧洲辅助技术促进协会、澳大利亚康复辅助技术协会联合发起的一年一度的行业学术盛会。

此次, 第四届国际康复工程与辅助技术大会(简称 I-CREATE2010), 由中国教育部批准, 上海交通大学、上海理工大学、新加坡南洋理工大学、新加坡新启科技中心、泰国国家电子与计算机技术中心、上海枫林国际医学交流和发展中心主办、联合医学承办, 并得到复旦大学附属华山医院、国家康复辅具研究中心、国康复研究中心, 中国生物医学工程学会等单位的大力支持, 将于 2010 年 7 月 21 日至 24 日在上海光大会展中心隆重召开。

盛会中的“大学生设计挑战赛”活动, 更是吸引了来自全世界 30 支学生队伍报名参加, 在现场就自行设计的作品进行海报展示、口头演讲、现场演示。专题分会上预计将吸引三百多位来自全世界康复领域的专家学者、政府领导、技术研发人员以及生产企业等单位参与。届时, 泰国公主也将莅临现场, 参加会议并作主题演讲。

各国的高科技展商将在展会上进行产品展示及技术讲解, 展出产品覆盖目前国际上最新的康复工程与辅助产品; 而“企业风采海报展示区域”则利用海报展示的方式宣传展品。此次, 前来参展的国际展商大多首次来华, 大会组委会推出了展商增值服务——“一对一”商务合作洽谈会, 帮助国际展商开发国际市场, 寻找海外合作伙伴。

详情请登陆浏览大会官方网站: <http://www.icreateasia.org/chinese/>; 大会地址: 漕宝路 88 号(上海光大会展中心); 联系人: 李纯诺, 张立人; 邮箱: squall.lee@unionmed.org.cn; 电话: 86-021-22819537; 传真: 86-21-54659861