

· 基础研究 ·

运动训练对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马 GAP-43 表达的影响

樊振勇 陈丽娜 徐琳峰 纵亚 胡坚勇 于向华 顾伟忠

【摘要】目的 研究运动训练对血管性痴呆 (VD) 大鼠学习记忆功能恢复及组织生长相关蛋白-43 (GAP-43) 表达的影响。**方法** 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, 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。运动组大鼠每天进行滚筒、转棒训练, 时间为 1 h; 制动组大鼠被限制自由活动; 假手术组置于普通笼中自由活动。3 组分别于术后第 27、28 天进行跳台试验测定学习、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海马 CA1 区 GAP-43 的表达。**结果** 以跳台试验对学习记忆能力进行的评估示运动组优于制动组 ($P < 0.01$), 运动组 GAP-43 在海马 CA1 区的表达第 1 天后逐渐增高, 第 7 天时达高峰, 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海马 CA1 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

The effects of rehabilitation training on learning, memory and expression of GAP-43 in hippocampus CA1 area of rats with vascular dementia FAN Zhen-yong*, CHENG Li-na, XU Lin-feng, ZONG ya, HU Jian-yong, YU Xiang-hua. GU Wei-zhong. Department of Rehabilitation, the First people Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310006, China

【Abstract】Objective To study the effects of rehabilitation training on learning and memory ability and the expression of growth-associated protein-43 (GAP-43) in rats with vascular dementia. **Methods** Forty-four female Sprague-Dawley rats were randomly assigned to a rehabilitation group ($n = 20$), an immobilization group ($n = 20$), and a sham-operation group ($n = 4$). The rats in the former 2 groups were operated on to establish the experimental vascular dementia model by repeatedly ischemia/reperfusion injury of brain induced by ligation of bilateral common carotid arteries and lowering of blood pressure induced by intraabdominal injection of sodium nitroprusside. The rats in rehabilitation group were administered with rotating bar and rolling cage exercises for 1 hour once daily, while those in the immobilization group were immobilized and without any exercise; the rats in sham-operation group could move freely in cage. Learning and memory tests were preformed by using step-down avoidance test at the 27th and 28th days after operation. Immunohistochemical staining was used to detect GAP-43 expression in hippocampus CA1 area at different time points after operation. **Results** The rats in rehabilitation group demonstrated better learning and memory ability than those in immobilization group ($P < 0.01$), and more GAP-43 expression in hippocampus CA1 area than those in immobilization group and sham-operation ($P < 0.01$). **Conclusion** Rehabilitation training can improve the learning and memory ability of rats with experimental vascular dementia, and the mechanism is probably related to the increase of GAP-43 in hippocampus CA1 area.

【Key words】 Vascular dementia; Rehabilitation training; Learning and memory; Growth-associated protein

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 为中老年人人群的多发病、常见病, 是因脑血管病变所致的智能及认知功能障碍的临床综合征, 患者主要表现为记忆、认知等

功能障碍。病理机制主要与脑血管病变所引起的局部或全脑缺血或缺氧后脑部和认知记忆等相关的特定神经组织神经元损害有关, 从而导致学习记忆能力下降。生长相关蛋白-43 (growth-associated protein-43, GAP-43) 是一种神经组织特异性磷酸蛋白质, 与神经发育、轴突再生和突触可塑性密切相关, 主要表达于轴突生长锥质膜面, 通过加速生长锥基部膜的扩展而促进轴突生长^[1]。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

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.07.001

基金项目: 杭州市医药卫生科技计划项目 (2006B001)

作者单位: 310006 杭州, 杭州市第一人民医院康复医学科 (樊振勇、陈丽娜、徐琳峰、纵亚、胡坚勇、于向华) 浙江大学附属儿童医院病理科 (顾伟忠)

忆能力的改变以及 GAP-43 在海马 CA1 区不同时间点的表达,旨在探讨早期运动训练对血管性痴呆大鼠学习记忆以及海马 CA1 区 GAP-43 表达的影响。

材料和方法

一、实验动物与分组

选择成年雌性 SD 大鼠 44 只,由浙江大学医学院附属第一医院动物实验中心提供,体重 218 ~ 270 g,周龄 10 ~ 12 周,清洁型。将其随机分为运动组 20 只、制动组 20 只和假手术组 4 只,运动组和制动组在组内又分为术后 1, 7, 14, 21, 28 d 5 个时间点,每个时间点 4 只大鼠。

二、材料与试剂

石蜡切片机(德国 Microw HM340E);显微镜摄像机(日本 Olympus BX20 型);BMJ-III 型包埋机及冷冻台(中国江苏);GNP-9080 型隔水式恒温培养箱(中国上海);HPIAS-1000 病理图文分析系统(中国武汉同济千屏影像工程公司);EnVision™ 二步法免疫组化试剂盒为 DAKO 公司产品;GAP-43 为兔来源的多克隆抗体,为美国 Abcam 公司的产品。

三、VD 模型建立

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^[2]。用 5% 氯氨酮按 0.75 mg/kg 体重和安定 1 mg/kg 体重腹腔注射麻醉。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 2.5 mg/kg 体重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 10 min,再通 10 min,反复 3 次后,拆线缝合切口,放回笼中饲养。大鼠苏醒后出现 Honer 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]。假手术组只剥离双侧颈总动脉,既不夹闭血管,也不降血压。

四、运动训练

自制滚筒式网状训练器为长 50 cm、直径 30 cm 的圆形网状仪器,底座有固定架,一端有一手摇柄,可按 8 r/min 手摇进行训练。将大鼠放入该器内可训练大鼠的抓握、旋转、行走等运动;转棒训练取长 150 cm、直径 4.5 cm 的木棒一根,其中点固定,以 3 r/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。运动组在术后第 1 天开始训练以上 2 个项目,每项各 10 min,中间休息 10 min,每天 1 次,每周 5 次,共 4 周。制动组术后置于 60 cm × 40 cm × 20 cm 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。假手术组术后置于普通笼中自由活动。

五、学习记忆的评估

跳台试验装置为自制 40 cm × 40 cm × 40 cm 的被

动回避反应箱。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 cm × 10 cm,高 10 cm。在术后第 27 天测试学习成绩,将大鼠放入箱内适应 5 min,即刻通以 36 V 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 5 min 内大鼠跳下安全台受电击的次数为错误次数及 5 min 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。24 h 后重复试验测试记忆成绩,将大鼠置于安全台上,即刻通电,记录 5 min 内大鼠从台上跳至铜网上的时间(潜伏期),受电击次数(错误次数)及 5 min 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。

六、组织石蜡切片

大鼠大脑组织标本在 pH 7.4 的中性缓冲福尔马林固定 12 h 后,脱水如下:自来水洗 30 min,70% 乙醇洗 30 min,95% 乙醇洗 1 h × 2 次,100% 乙醇洗 1 h × 2 次,二甲苯透明 20 min × 2 次,浸蜡 58 ~ 60℃ 3 h,包埋组织切片,取海马、皮质区连续冠状切片,厚 4 μm,粘附于载玻片上,60 ~ 62℃ 烘箱烤片 4 h 后,进行苏木素-伊红染色和免疫组化染色。

七、苏木素-伊红染色

苏木素-伊红染色(HE 染色):切片经二甲苯脱蜡后,依次用无水乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇脱水;Gill 苏木素染色液 10 min,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 1 min,0.5% 伊红乙醇染色液 1 ~ 2 min,80% 乙醇适当分化,95% 乙醇,100% 乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

八、免疫组织化学染色

采用 EnVision™ 二步法:石蜡切片二甲苯脱蜡后,用无水乙醇、95%、80%、70% 乙醇至水化,蒸馏水洗,抗原修复采用高温高压修复(GAP43 采用 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲溶液,pH 值为 6.0),时间 100 s;蒸馏水洗,PBS 冲洗(5 min × 3 次),3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶 10 min,PBS 洗 5 min × 3 次,滴加一抗(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 ab16053;用 PBS 代替一抗为空白对照),4℃ 过夜。PBS 冲洗(5 min × 3 次),滴加山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体 37℃ 孵育 40 min,PBS 冲洗 5 min × 3 次,DAB 显色液显色 3 min,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 1 min,95%、100% 乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

九、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 GAP43 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 个海马 CA1 区视野($\times 200$ 倍),经过该系统自动分析测量获得该海马 CA1 区 5 个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。

十、统计学分析

采用 SPSS 12.0 版软件进行整理及统计分析。结果用($\bar{x} \pm s$)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采用 q 检验。

结 果

一、学习和记忆成绩的结果

术后 27 d 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 28 d 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无明显差异($P > 0.05$)。具体数据见表 1。

二、HE 染色

细胞核呈蓝色,细胞浆为淡红色。主要观察脑组织的缺血性损伤的情况。运动组和制动组:海马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 1 d 组明显。另外未见特征性改变。假手术组:脑组织结构清楚,神经细胞排列整齐(图 1)。

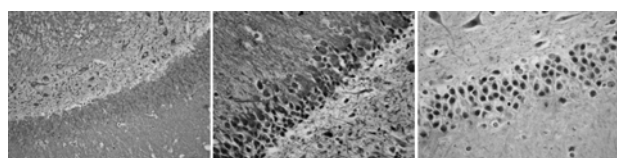


图 1 各组 VD 大鼠手术后 1 d 海马 CA1 区形态学变化(HE 染色, $\times 200$)

表 1 3 组大鼠跳台试验的学习和记忆成绩比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	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	20	60.50 $\pm$ 14.27 ^a	1.00 $\pm$ 0.82 ^b	11.25 $\pm$ 7.89 ^a	296.50 $\pm$ 4.73 ^a	0.50 $\pm$ 0.58 ^a	3.50 $\pm$ 4.73 ^a
制动组	20	183.00 $\pm$ 62.34 ^c	2.75 $\pm$ 0.96 ^d	68.50 $\pm$ 19.33 ^c	57.75 $\pm$ 30.25 ^c	2.50 $\pm$ 0.58 ^c	145.53 $\pm$ 57.12 ^c
假手术组	4	40.50 $\pm$ 5.92	0.50 $\pm$ 0.58	5.50 $\pm$ 6.40	297.50 $\pm$ 5.00	0.25 $\pm$ 0.50	2.50 $\pm$ 5.00

注:与制动组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$,与假手术组比较,^c $P < 0.01$,^d $P < 0.05$

表 2 3 组大鼠海马 CA1 区 GAP-43 在不同时间点的表达($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d	术后 28 d
运动组	20	0.031 $\pm$ 0.005	0.040 $\pm$ 0.002	0.029 $\pm$ 0.001	0.033 $\pm$ 0.009	0.031 $\pm$ 0.007
制动组	20	0.026 $\pm$ 0.005	0.029 $\pm$ 0.002 ^c	0.0251 $\pm$ 0.008	0.026 $\pm$ 0.010	0.030 $\pm$ 0.001 ^d
假手术组	4	0.021 $\pm$ 0.001 ^d	0.021 $\pm$ 0.001 ^a	0.021 $\pm$ 0.001	0.021 $\pm$ 0.001	0.020 $\pm$ 0.001

注:与制动组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$,与假手术组比较,^c $P < 0.01$,^d $P < 0.05$

三、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,在海马 CA1 区均有广泛的表达。运动组和制动组表达明显增加,海马 CA1 区阳性细胞呈整规排列,在轴突内呈高表达,细胞外膜淡染,内膜浅染。周围阳性细胞核固缩,呈散在性分布。而在假手术组的海马 CA1 区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 1 d 时,运动组较假手术组增高($P < 0.05$),差异有统计学意义;术后 7 d,运动组的表达达高峰,较制动组、假手术组明显增高($P < 0.01$),差异有统计学意义;术后 14 d,21 d,运动组的表达下降,与其他两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);术后 28 d,运动组与假手术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表 2。

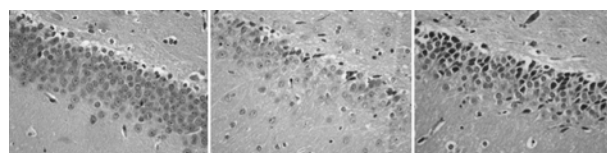


图 2 各组 VD 大鼠 GAP-43 在海马 CA1 区表达情况的比较(免疫组织化学染色, $\times 200$)

讨 论

VD 是指各种脑血管疾病引起的脑功能障碍而产生的获得性智能损害综合征。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损害有关。短暂性脑缺血或缺血后再灌注最易引起人和动物海马 CA1 区神经元损伤,引起学习记忆能力下降^[3]。

GAP-43 是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]。海马是学习记忆的关键部位,突触可塑性又是学习记忆的神经

基础,长时程增强(long-term potentiation, LTP)是突触可塑性的典型表现^[5]。GAP-43 与海马长时程增强密切相关,是研究神经可塑性的分子标志。因 LTP 与记忆有关,表明 GAP-43 基因与学习、记忆的调节有关^[6]。

本研究结果表明,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,与假手术组无明显差别。提示运动训练能促进 VD 大鼠学习、记忆的改善。这是因为在缺氧缺血性脑损伤后,海马组织的自我修复非常活跃,同时学习记忆相关的可塑性得到增强,如果此时能利用其增强的可塑性进行早期干预,将有利于学习记忆功能的恢复。海马是学习记忆的功能区,尤其是 CA1 区,CA3 区和 DG 区在学习记忆活动中发挥着重要作用^[7]。早期运动能促进大鼠大脑缺血后的功能恢复,其分子机理也可能与 GAP-43 mRNA 表达水平的增高有关^[8]。

本研究发现,运动组 GAP-43 在海马 CA1 区的表达,术后第 1 天开始增高,7 d 达到高峰,较制动组明显增高,以后逐渐降低,14 d 降至最低,21 d、28 d 略有增高,这与其它文献报道相一致^[9]。可能与以下原因有关:GAP-43 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;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^[10];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;在成熟正常的神经元中,可能是由于靶器官产生的某种抑制信号通过逆行轴浆转运至胞体,从而抑制 GAP-43 的表达,在神经损伤后,损伤局部吸收而逆行转运至胞体的某种正反馈信号或本身由胞体产生的某种正反馈信号刺激其表达 GAP-43^[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体内的 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 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 大鼠行运动训练能明显改善学习记忆的能力,这可能与 GAP-43 在海马 CA1 区表达增强。

但是, GAP-43 促进神经发育和再生的具体机制

尚未完全阐明。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,将有助于全面了解轴突生长、突触连接重建的全过程,为运动训练改善 VD 学习记忆力提供充分的理论根据。

参 考 文 献

- [1] 孙皓,郭富强. 脑卒中后康复训练影响神经功能恢复机制的研究进展. 中华物理医学与康复杂志, 2008, 30:340-342.
- [2] 王蕊,杨秦飞,唐一鹏,等. 大鼠拟“血管性痴呆”模型的改进. 中国病理生理杂志, 2000, 10:914-916.
- [3] 徐莉,李玲. 康复训练后脑梗死大鼠功能恢复的评估及机理研究进展. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22:307-310.
- [4] 覃华丽,周雪,章为. 生长相关蛋白 GAP-43 的研究现状. 四川解剖学杂志, 2002, 16:1078-1083.
- [5] McIlvain VA, Robertson DR, Maimone MM, et al. A normal thalamocortical pathfinding and terminal arborization lead to enlarged barrels in neonatal GAP-43 heterozygous mice. Comp Neurol, 2003, 462: 252-264.
- [6] Routtenberg A, Cantalupo I, Zaffuto S, et al. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 7657.
- [7] 鲁利群,赵聪敏,蒲昭霞. 生长相关蛋白在缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马中的表达变化. 第三军医大学学报, 2006, 28:2160-2162.
- [8] 王炳高,王守彪,郭云良,等. 早期康复训练对脑缺血后行为恢复的影响及其分子机制. 中国康复医学杂志, 2004, 19:196-199.
- [9] 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. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24:398-402.
- [10] 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. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27:464-467.
- [11] Tolner EA, van Vliet EA, Holtmaat AJ, et al. GAP-43 mRNA and protein expression in the hippocampal and parahippocampal region during the course of epileptogenesis in rats. Eur J Neurosci, 2003, 17:2369-2380.
- [12] Carrasco J, Penkowa M, Giraldo M, et al. Role of metallothionein-III following central nervous system damage. Neurobiol Dis, 2003, 13: 22-36.
- [13] Chen B, Wang JF, Sun X, et al. Regulation of GAP-43 expression by chronic desipramine treatment in rat cultured hippocampal cells. Biol Psychiatry, 2003, 3: 530-537.
- [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. 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. Neurochem Res, 1998, 23:1241-1249.

(修回日期:2009-05-16)

(本文编辑:阮仕衡)