

· 基础研究 ·

丰富环境结合运动训练对快速衰老小鼠学习记忆能力的影响

吴冰洁 王铭维 顾平 崔冬生

【摘要】目的 探讨丰富环境及运动训练对快速衰老小鼠学习记忆的影响。**方法** 选择 12 周龄雄性快速衰老小鼠 40 只,随机分为丰富环境组、标准环境组、丰富环境运动组 and 标准环境运动组。运动方法采用跑笼训练。8 周后采用 Morris 水迷宫测试小鼠空间学习记忆能力,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测小鼠海马脑源性神经营养因子(BDNF)mRNA 的表达。**结果** 与标准环境组比较,丰富环境运动组、丰富环境组、标准环境运动组 Morris 水迷宫逃避潜伏期显著缩短($P < 0.05$),探索轨迹较多位于原平台象限,海马 BDNF mRNA 表达显著增强($P < 0.05$)。**结论** 丰富环境结合运动训练可更有效地改善快速衰老小鼠的学习记忆能力,BDNF 可能参与了其学习记忆能力的改善。

【关键词】 丰富环境; 运动; 脑源性神经营养因子; 学习记忆; 老年性痴呆

Effects of enriched environment and therapeutic exercise on learning and memory abilities in SAMP8 mice

WU Bing-jie, WANG Ming-wei, GU Ping, CUI Dong-sheng. Department of Rehabilitation Medicine, the 2nd Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author: WANG Ming-wei, Email: wmw@jyyy.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of enriched environmental stimulation and therapeutic exercise on learning and memory abilities in senescence accelerated mice (SAMP8). **Methods** Forty mice of 12 weeks old were randomly divided into 4 groups: an enriched environment group, a standard environment group, an enriched environment plus therapeutic exercise group, a standard environment plus therapeutic exercise group. The mice of the therapeutic exercise group were administered with exercise with the running wheels, the learning and memory abilities were evaluated by Morris water maze test after 8 weeks of intervention, meanwhile, the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in hippocampus of mice were measured by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** As compared with the standard environment group, the escape latencies was significantly shorter ($P < 0.05$), probe tracks were more significantly in initial platform quadrant, the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in hippocampus were significantly increased ($P < 0.05$) in the enriched environment group, enriched environment plus therapeutic exercise group and the standard environment plus therapeutic exercise group. **Conclusion** Enriched environment combined with therapeutic exercise was beneficial in improving the learning and memory abilities in SAMP8 mice. Brain-derived neurotrophic factor in hippocampus might be involved in the improvement of learning and memory abilities in SAMP8.

【Key words】 Enriched environment; Exercise; Brain-derived neurotrophic factor; Learning and memory; Alzheimer's disease

老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)是一原因未明,以学习记忆能力减退为主要临床表现的神经系统退行性疾病。晚期患者大都生活不能自理,给社会和家庭带来很大负担,目前临床上尚无特效治疗。研究表明,丰富环境(enriched environment)可改善自然衰老小鼠的空间记忆能力^[1],有氧训练可增强正常小鼠的学习记忆能力^[2]。但丰富环境结合运动训练对 AD 学习记忆

能力的改善及其机制国内外研究较少。本研究选用快速衰老小鼠(senescence accelerated mouse prone, SAMP)为 AD 动物模型,探讨丰富环境结合运动训练对其学习记忆及海马脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达的影响,希望为应用丰富环境结合运动干预 AD 提供理论依据。

材料与方法

一、动物及分组

SAMP8 雄性小鼠 40 只,12 周龄,体重(25.24 ± 0.28)g,由香港中文大学解剖学系提供。随机分为丰

作者单位:050000 石家庄,河北医科大学第二医院康复科(吴冰洁);河北医科大学第一医院神经内科(王铭维、顾平);河北省脑老化与认知神经科学实验室(崔冬生)

通讯作者:王铭维,Email:wmw@jyyy.com.cn

富环境组、标准环境组、丰富环境运动组 and 标准环境运动组, 每组 10 只。

二、饲养环境

丰富环境组和丰富环境运动组小鼠饲养于 45 cm × 28 cm × 25 cm 的透明玻璃笼内, 每笼 5 只, 笼内设有金属制小桥和斜架、直径 3 cm 隧道(聚氯乙烯树脂材料制成)、塑料跑笼、金属链条、各种形状及颜色的塑料玩具(球、盒、铃铛等)和木制积木(图 1), 每 2 ~ 3 d 清洁并更换 1 次。标准环境组和标准环境运动组小鼠饲养于 30 cm × 18 cm × 25 cm 的透明玻璃笼内, 每笼 5 只, 笼内有垫料(图 2)。环境温度保持 23 ~ 25℃, 维持 12 h 照明、12 h 黑暗的光照周期, 实验动物自由进食、饮水。

三、运动方式

应用直径为 15 cm 的圆形金属跑笼, 栅距为 1 cm (图 3)。丰富环境运动组和标准环境运动组小鼠放入笼内, 适应后即开始主动跑笼。第 1 ~ 4 周, 每日运动 10 min, 每周 5 d; 第 5 ~ 8 周, 每日运动 20 min, 每周 5 d。



图 1 丰富环境笼

图 2 标准环境笼

图 3 跑笼

四、行为学检测

采用安徽产 SLY-WMS Morris 水迷宫分析系统, 主要由两部分组成, 即内设平台的圆形水池和记录装置。水池由不锈钢材料制成, 直径 120 cm、高 50 cm。池壁上标有东、南、西、北 4 个入水点, 将水池分为 4 个象限。平台直径 14 cm、高 20 cm, 加水至高出平台 1 ~ 1.5 cm, 在水中加入碳素墨水, 以避免小鼠直接看见平台, 水温保持 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。迷宫上方安置带有显示系统的摄像机, 计算机自动跟踪计时并记录游泳轨迹。保持实验室内光线良好, 周围参照物固定不变。测试内容包括定位航行试验(place navigation test)和空间探索试验(spatial probe test)。

定位航行试验: 测试前, 撤除平台让小鼠自由游泳 2 d 以熟悉环境。测试时, 将平台随机置于圆池内某一象限并固定, 每日分别从东、西、南、北 4 个象限将小鼠面向池壁轻轻放入水中, 记录其从入水至找到平台所需时间, 即逃避潜伏期, 计算平均值作为当日最终成绩进入最后统计。如小鼠在 120 s 内找不到平台, 则由实验者将其引向平台, 逃避潜伏期计为 120 s。每次测试间隔 60 s, 连续测试 3 d。

空间探索试验: 定位航行实验结束后撤除平台, 从

任一入水点将小鼠面向池壁放入水中, 观察其 120 s 内寻找平台的游泳轨迹。

五、定量逆转录-聚合酶反应(RT-PCR)分析

Trizol 试剂、Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自北京天为时代生物技术有限公司, 反转录试剂盒购自 Fermentas 公司, 引物由北京三博远志生物公司合成, 扩增引物为 445 bp。上游: 5'-TCG CTT CAT CTT AGG AGT 3'; 下游: 5'-TCA ACA TAA ACC ACC AAC 3'。Morris 水迷宫测试结束后, 每组随机抽取 6 只小鼠断头处死, 迅速剥取全脑, 分离海马, 置液氮中保存备用。用 Trizol 试剂提取海马总 RNA, 以 β -actin 为内参照, 采用 RT-PCR 法测定 mRNA 的相对表达量。用凝胶成像分析系统分析 PCR 产物电泳条带光密度值。表达水平以待测 mRNA 与 β -actin mRNA 的光密度值之比表示。

六、统计学分析

所有数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 Stata 8.0 版统计软件进行分析, 多组间均数比较采用方差分析和 q 检验, 2 组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。小鼠探索轨迹采用 Photoshop 软件进行叠加处理。

结 果

一、行为学检测

1. 定位航行试验: 方差分析显示, 丰富环境和运动的干预均可使逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$), 并且环境和运动没有交互影响 ($P > 0.05$)。组间两两比较结果如下: 与标准环境组比较, 丰富环境运动组、标准环境运动组及丰富环境组逃避潜伏期均显著缩短 ($P < 0.05$)。丰富环境组与标准环境运动组比较, 逃避潜伏期虽有缩短趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。丰富环境运动组与丰富环境组比较, 第 1, 2 天逃避潜伏期显著缩短 ($P < 0.05$); 第 3 天虽有缩短但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。具体数据见表 1。

表 1 各组不同时间的 Morris 水迷宫逃避潜伏期比较 ($s, \bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	第 1 天	第 2 天	第 3 天
丰富环境运动组	10	43.08 ± 4.10 ^{ab}	31.23 ± 3.40 ^{ab}	21.13 ± 3.75 ^a
标准环境运动组	10	73.00 ± 7.89 ^a	54.13 ± 6.04 ^a	35.23 ± 3.49 ^a
丰富环境组	10	65.64 ± 5.66 ^a	43.22 ± 3.73 ^a	31.59 ± 4.58 ^a
标准环境组	10	97.43 ± 5.42	73.19 ± 4.78	50.12 ± 5.05

注: 与标准环境组比较, ^a $P < 0.05$; 与标准环境运动组比较, ^b $P < 0.05$

2. 空间探索试验: 丰富环境运动组、丰富环境组及标准环境运动组探索轨迹较多围绕原平台象限, 以丰富环境运动组显著。标准环境组探索轨迹大多围绕池壁, 穿越原平台的次数明显少于其它 3 组(图 4)。

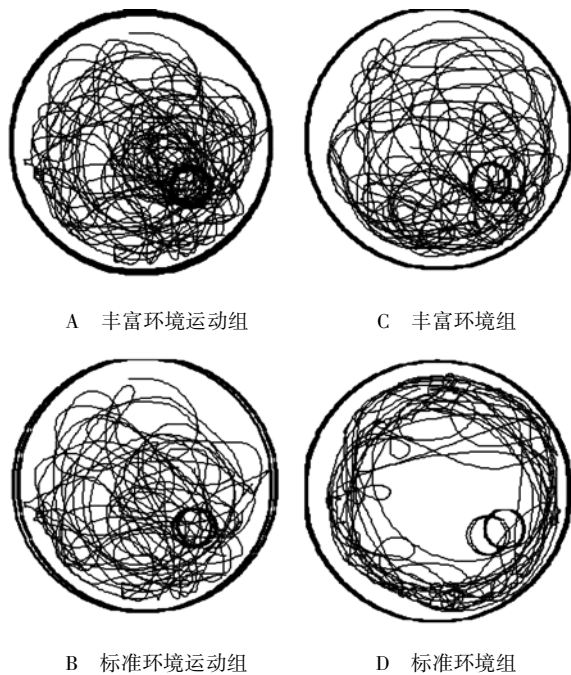
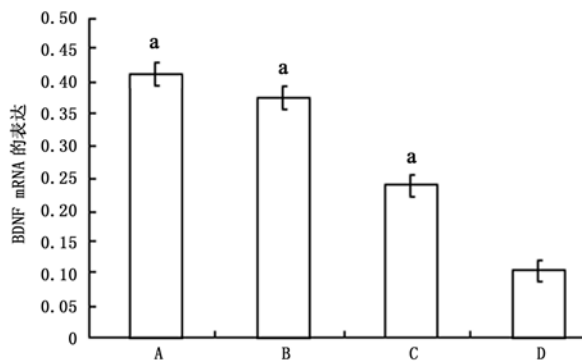


图 4 各组空间探索轨迹

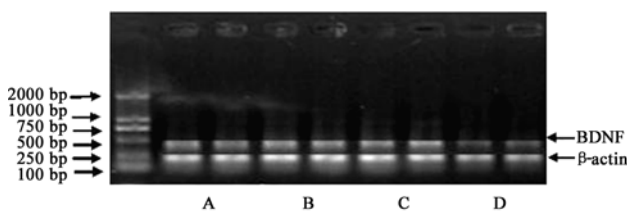
二、海马 BDNF mRNA 的表达

SAMP8 小鼠海马 BDNF mRNA 与 β -actin mRNA 的光密度比值见图 5, 与标准环境组比较, 丰富环境运动组、标准环境运动组及丰富环境组 BDNF mRNA 的表达均有显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。BDNF mRNA 凝胶电泳图像见图 6。



注: A 为丰富环境运动组, B 为标准环境运动组, C 为丰富环境组, D 为标准环境组; 与标准环境组比较, $^a P < 0.05$

图 5 各组 BDNF mRNA 表达



注: A 为丰富环境运动组, B 为标准环境运动组, C 为丰富环境组, D 为标准环境组

图 6 各组海马 BDNF mRNA 凝胶电泳图像

讨 论

快速老化小鼠 (senescence accelerated mice, SAM) 由日本京都大学竹田俊男教授经二十年近代延交培育而成, 具备均一的遗传背景和稳定的老化病理特征, 目前为止已经选育出 18 种近交系 SAM 小鼠, 其中 14 种为快速衰老小鼠 (senescence accelerated mouse prone, SAMP) 系, 4 种为衰老抗性小鼠 SAMR 系。SAMP8 既有自然衰老小鼠特征, 又有类似 AD 的脑部病理改变, 自 2 月龄开始出现学习记忆功能衰退, 并随着鼠龄增长而加重, 是目前研究 AD 较理想的动物模型, 已在许多国家得到应用^[3,4]。

丰富环境是相对于标准环境而言, 体现在空间和内部设置上。丰富环境生活空间大, 内置物体丰富而新奇, 不仅提供充分的多感官及运动刺激, 还提供训练和学习的机会。对空间记忆起支配作用的器官是海马, 以海马为中心的大脑边缘系统对记忆的形成起着重要的作用。丰富环境这类多样、新异的刺激可使海马区厚度增加, 使海马神经细胞新生或活性增强^[5]。学习记忆作为脑的高级活动之一, 实质上就是对复杂的信息获取、传递与整合的过程。信息来自环境, 不同环境发出信息的质和量也不同。我们推测丰富环境组和丰富环境运动组 SAMP8 小鼠学习记忆能力显著优于标准环境组可能与此有关。

研究证实, 动物在某些特定学习行为后, 海马 BDNF 表达量明显增高, 提示 BDNF 参与了动物学习记忆这种高级脑活动^[6]。不同环境刺激可导致海马各种神经营养因子的表达水平不同^[7]。丰富环境干预后, 动物神经生长因子, 尤其是 BDNF 的表达显著增高^[8]。流行病学研究发现, 单纯生活方式的改变可影响 AD 的发生和进展^[9]。生活方式, 包括职业、休闲活动以及体育运动的选择都可延缓认知能力的衰退^[10]。Adlard 等^[11]选用转基因 AD 小鼠, 自 1 月龄开始进行跑笼训练至 5 月龄, Morris 水迷宫测试结果显示, 对照组第 1, 2, 3 天寻找平台的能力显著低于运动组, 证实增加运动训练可以改善 AD 小鼠的学习记忆能力。其机制可能与运动对脑内神经营养因子的影响有关^[12]。Ogonovszky 等^[13]研究了不同运动负荷对 BDNF 和学习记忆能力的影响, 发现规律运动可促进学习记忆能力并伴随 BDNF 增加, 过度训练不会导致动物学习记忆能力下降。

丰富环境结合运动干预对 SAMP8 学习记忆的影响, 目前国内鲜见报道。我们将 12 周龄 SAMP8 饲养于丰富环境或标准环境中, 同时进行自主跑笼训练, 8 周后采用 Morris 水迷宫测定其空间学习记忆能力, 发现与标准环境组比较, 丰富环境运动组、标准环境运动

组、丰富环境组逃避潜伏期均显著缩短($P < 0.05$),说明丰富环境和运动训练改善了 SAMP8 的空间学习记忆能力,与文献报道一致^[1,2,11]。采用 RT-PCR 检测海马 BDNF mRNA 的表达,发现丰富环境运动组、标准环境运动组及丰富环境组的 BDNF mRNA 表达明显高于标准环境组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。由此我们推测丰富环境和运动训练可能通过增强海马 BDNF mRNA 的表达而改善 SAMP8 的学习记忆能力。

我们发现,无论是丰富环境还是运动都可改善 SAMP8 的学习记忆能力。但丰富环境和运动究竟哪一方作用更明显,目前国内外尚无报道。本研究结果显示,丰富环境组与标准环境运动组比较,逃避潜伏期虽有缩短趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$);而标准环境运动组海马 BDNF mRNA 的表达较丰富环境组强($P < 0.05$)。由此我们认为,丰富环境和运动训练在改善 SAMP8 学习记忆能力上可能无差别,但运动对海马 BDNF mRNA 表达的影响可能优于丰富环境的作用。

总之,丰富环境结合运动训练,能更有效地改善 SAMP8 的空间学习记忆能力,至于如何将丰富环境和运动应用到 AD 患者的临床治疗中,还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Frick KM, Fernandez SM. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging*, 2003, 24:615-626.
- [2] 孙国欣,田振军. 有氧训练及大强度疲劳训练对小鼠学习、记忆能力的影响. *西安体育学院学报*, 2002, 19:45-47.
- [3] Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence. *Exp Gerontol*, 1997, 32:105-109.
- [4] Flood JF, Morley JE. Learning and memory in the SAMP8 mouse. *Neurosci Biobehav Rev*, 1998, 22:1-20.
- [5] Bindu B, Alladi PA, Mansoorlikhan BM, et al. Short-term exposure to an enriched environment enhances senescent branching but not brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus of rats with ventral subicular lesions. *Neuroscience*, 2007, 144:412-423.
- [6] 张文瑜. 神经营养因子 NGF、BDNF 与围绝经期妇女认知功能关系的研究进展. *现代生物医学进展*, 2007, 7:306-308.
- [7] Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, et al. Environmental enrichment and the brain. *Progr Brain Res*, 2002, 138:109-133.
- [8] Sale A, Putignano E, Cancedda L, et al. Enriched environment and acceleration of visual system development. *Neuropharmacology*, 2004, 47:649-660.
- [9] Lazarov O, Robinson J, Tang YP, et al. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*, 2005, 120:701-713.
- [10] Jankowsky JL, Melnikova T, Fadale DJ, et al. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2005, 25:5217-5224.
- [11] Adlard PA, Perreau VM, Pop V, et al. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2005, 25:4217-4221.
- [12] Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Neurosciences*, 2002, 25:295-301.
- [13] Ogonovszky H, Berkes I, Kumagai S, et al. The effects of moderate, strenuous and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory in rat brain. *Neurochem Int*, 2005, 46:635-640.

(收稿日期:2007-05-19)

(本文编辑:吴倩)

· 短篇论著 ·

肌力训练在膝关节创伤术后功能障碍康复中的作用

覃东 孙乐蓉 黄杰

膝部骨折、韧带损伤手术后常会遗留关节功能障碍,在后期康复中,患者往往会忽视肌力训练的重要性,不仅会使康复周期延长,增加患者的痛苦和经济负担,更会影响到关节功能最终恢复的程度,可能造成患者生活质量的明显下降。本研究旨在探讨肌力训练在膝关节创伤术后功能障碍康复中的作用。

一、资料与方法

60 例膝关节外伤手术后功能障碍患者均来自骨科病房和康复科门诊,男 35 例,女 25 例,年龄 21 ~ 60 岁,平均(42.6 ± 6.72)岁。手术方式:骨折切开复位 + 内固定及韧带断裂重建

术。入选标准:患者病程为术后 1 ~ 3 个月,且 X 片复查骨折愈合良好,患膝关节活动范围(range of motion, ROM)较健侧减少 30° 以上。患者分为训练组和对照组,每组 30 例,两组之间年龄、病程、治疗前 ROM 及两组性别、损伤类型情况见表 1。

对照组采用关节松动手法结合中药薰蒸治疗。关节松动手法为:①髌骨侧方滑动、上下滑动;②股胫关节长轴牵引、前后向滑动、侧方滑动、屈膝摆动或伸膝摆动。每个动作重复 3 次,每次间隔 6 ~ 10 s,并逐渐加大手法强度,以患者耐受度为限;中药薰蒸治疗即把用水浸泡过的药包(30 cm × 15 cm)蒸透后冷却至 50 ~ 60℃ 左右,置于患者膝上及两侧,药包的主要成分为红花、桂枝、苏木、牛膝、陈皮、艾叶等,每次治疗时间为 30 min。

作者单位:443000 宜昌,湖北省宜昌市第一人民医院康复医学科