

## · 基础研究 ·

# 运动训练对痴呆小鼠记忆功能的影响及其可能机制

杨红旗 李学 蒋秋焕 蔡西国 马建军

**【摘要】目的** 研究运动训练对痴呆小鼠空间记忆功能的影响及其可能分子机制。**方法** 将 30 只昆明小鼠分为正常对照组(对照组)、痴呆组和痴呆加运动训练组(运动训练组),每组 10 只。痴呆组与运动训练组腹腔注射东莨菪碱制作痴呆模型,运动训练组在注射东莨菪碱 30 min 后利用滚筒式网状训练器进行运动训练 6 周。检测各组小鼠水迷宫的逃避潜伏期,Western 印迹检测海马源性神经营养因子(BDNF)和蛋白激酶(Akt)磷酸化的表达,并检测海马一氧化氮(NO)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性。**结果** 腹腔注射东莨菪碱成功模拟小鼠的记忆缺失模型,表现为水迷宫逃避潜伏期延长。与痴呆组小鼠相比,运动训练组小鼠的水迷宫逃避潜伏期缩短( $P < 0.01$ ),且海马 Akt 的磷酸化和 BDNF 的表达增加( $P < 0.05$ );痴呆小鼠较对照组小鼠海马 NO 含量增加而 SOD 活性降低( $P < 0.01$ ),而运动训练部分逆转了上述现象。**结论** 运动训练能显著提高注射东莨菪碱所致痴呆小鼠的空间记忆能力,痴呆小鼠行为功能的改善可能与海马 Akt 的磷酸化和 BDNF 表达的增加、NO 含量的降低和 SOD 活性的增加有关。

**【关键词】** 运动训练; 痴呆; 水迷宫测试

**Effects of exercise on memory of mice with dementia and possible mechanisms** YANG Hong-qi\*, Li Xue, JIANG Qiu-huan, CAI Xi-guo, Ma Jian-jun. \* Department of Neurology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of exercise on memory impairment in demented mice and possible molecular mechanisms. **Methods** Thirty Kunming mice were divided into a normal control group, a dementia group and a dementia plus exercise training group (exercise training group), 10 mice/group. Dementia models were established by intraperitoneal injection of scopolamine. Exercise training was begun 30 min after the injection and lasted for a 6-week period. A water maze test was performed after the exercise training. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression and protein kinase (Akt) phosphorylation in the hippocampus were detected by Western blot analysis. Nitric oxide (NO) content and superoxide dismutase (SOD) activity in the hippocampus were also measured. **Results** Dementia models were successfully induced as indicated by prolonged escape latency in the water maze test. After exercise training the escape latency had shortened significantly and hippocampal BDNF expression and Akt phosphorylation had increased. NO content increased and SOD activity decreased after the injections, but these effects were partially reversed after exercise training. **Conclusions** Exercise can improve spatial memory significantly after scopolamine-induced dementia in mice. The increased hippocampal BDNF expression and Akt phosphorylation, increased SOD activity and decreased NO content may partially explain the behavior improvement induced by exercise.

**【Key words】** Exercise; Dementia; Water maze test

老年性痴呆以进行性的记忆、认知功能减退和精神障碍为特征,发病率高,致残率高,病程长,治疗效果差,费用昂贵,呈慢性进行性加重态势,目前尚无有效的治愈方法,给家庭和社会带来巨大的负担。研究表明,运动训练能增强机体免疫功能,促进缺血性脑卒中患者神经功能恢复<sup>[1]</sup>。但运动训练对老年痴呆小鼠

记忆能力的影响鲜见报道。本研究旨在研究运动训练对痴呆小鼠空间记忆功能的影响及其可能机制。

## 材料与方法

### 一、主要试剂

单克隆小鼠抗 Akt 抗体(473Ser 磷酸化和非磷酸化)由美国 Cell Signaling Technology 公司提供;多克隆兔抗脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)抗体由美国 Santa Cruz 公司提供;一氧化氮(nitric oxide, NO)和超氧化物歧化酶(superoxide

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.01.005

基金项目:河南省医学科技攻关项目资助(200703093)

作者单位:450003 郑州,河南省人民医院神经内科(杨红旗、李学、蒋秋焕、马建军),康复医学科(蔡西国)

dismutase, SOD) 活性测定试剂盒由 Fluka 公司提供; 电化学发光 (electrochemi-luminescence, ECL) 试剂盒由英国 Amersham 公司提供; Western 印迹系统仪器由美国 BIO-RAD 公司提供。

## 二、痴呆小鼠模型的制作及脑组织的处理

将清洁级昆明小鼠 30 只 (由河南省实验动物中心提供) 分为正常对照组 (对照组)、痴呆组和痴呆加运动训练组 (运动训练组), 每组 10 只。参照 Li 等<sup>[2]</sup> 的方法, 痴呆组和运动训练组小鼠均腹腔注射东莨菪碱 (2 mg/kg 体重), 每周注射 5 d, 每天注射 1 次, 共注射 6 周。运动训练组在每次注射药物 30 min 后进行运动训练, 直到实验全部结束。对照组小鼠不做处理, 正常笼养。实验结束后, 处死动物, 断头取脑, 小心分离小鼠海马组织 (冰上操作), 分别于 -70 °C 冰箱冻存备用。

## 三、运动训练

对照组及痴呆组小鼠正常笼养, 不予运动训练。运动训练组小鼠利用自制的滚筒式网状训练器 (直径 20 cm) 进行运动训练, 5 d/周, 2 次/d, 30 min/次, 共 6 周。网状训练器为长 50 cm 的圆形网状仪器, 可同时训练 5 只小鼠, 底座安装固定架, 两端各有一手摇柄, 按照 7 转/min 的摇速进行转动训练。在该器械内可同时对小鼠进行抓握、旋转、行走等功能训练。

## 四、水迷宫测定潜伏期

利用水迷宫检测小鼠的空间记忆功能。水迷宫装置为一圆形水池, 直径 100 cm, 水深 30 cm。将迷宫均分为 4 个象限, 直径为 8 cm 的一圆形平台位于第一象限水面下 10 cm 左右。将实验动物放入水池中, 同时记录其在 120 s 内寻找平台的时间 (逃避潜伏期), 若 120 s 仍未找到平台, 则由实验者引导小鼠到达平台, 并停留 60 s, 本次成绩记作 120 s。实验训练阶段为 5 d, 每只小鼠每天接受 4 次训练, 每次训练的入水点为按随机顺序排列的 4 个象限。每相邻 2 d 的入水顺序不同, 小鼠入水时头部朝向池壁。在 6 周后测量各组小鼠的水迷宫逃避潜伏期。

## 五、Western 印迹检测

测定蛋白浓度后, 取 20 μg 蛋白进行 7.5% ~ 10% 十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfale-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。先在 100 V 电泳 20 min, 随后 150 V 电泳 60 min; 然后在 200 mA 的条件下电转膜 90 min, 将蛋白质转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上; 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入 1:2000 多克隆兔抗 BDNF 抗体, 1:1000 单克隆小鼠抗 Akt 抗体/磷酸化的 Akt 抗体 (473Ser) 后 4 °C 过夜; 磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 充分洗膜后加入生物素化的二抗 (1:1000), 室温孵育 1 h, PBS 洗膜; 加入

显色液后行化学发光显色, 压片, 冲片。Western 印迹条带用德国 ZEISS 公司 AxioCam 数码相机 (分辨率 1200 万像素) 采集图像, 灰度用 KS 400 图像分析系统 (Version 3.0) 处理。

## 六、NO 和 SOD 活性检测

NO 含量测定按照试剂盒提供的操作步骤进行。NO 的测定采用格氏 (Griess) 还原法: 收集细胞上清液, 加入等量的格氏还原液和反应液, 然后加入磷酸溶液, 室温孵育 20 min 后测定其在 540 nm 的光密度值。各组测定值与对照组相比, 作为 NO 的相对含量。SOD 活性检测采用水溶性四氮唑盐 (water-soluble tetrazolium, WST) 法: 酶标板依次加入待测样品、WST 工作液、稀释工作液和 SOD 反应工作液, 充分混匀后 37 °C 孵育 20 min, 然后测定在 450 nm 的光密度值。各组测定值与对照组相比, 作为 SOD 的相对活性 (%)。

## 七、统计学分析

所有数据用 SPSS 11.0 版统计软件包进行处理。各组数据均以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组之间的比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

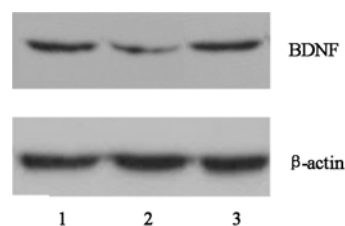
# 结 果

## 一、运动训练对痴呆小鼠逃避潜伏期的影响

30 只小鼠第一天逃避潜伏期为 ( $80.78 \pm 30.25$ ) s, 6 周后对照组逃避潜伏期为 ( $31.12 \pm 12.47$ ) s; 痴呆组小鼠逃避潜伏期为 ( $78.32 \pm 45.13$ ) s, 较对照组显著延长 ( $P < 0.01$ ), 提示记忆缺失痴呆小鼠模型制作成功; 运动训练组小鼠经运动训练后逃避潜伏期为 ( $40.65 \pm 50.91$ ) s, 较痴呆组小鼠显著缩短 ( $P < 0.01$ )。

## 二、运动训练对痴呆小鼠 BDNF 表达的影响

如图 1 所示, 对照组、痴呆组和运动训练组小鼠 BDNF/ $\beta$ -actin 的面积灰度比值分别为 ( $1.00 \pm 0.08$ )、( $0.48 \pm 0.05$ ) 和 ( $0.96 \pm 0.12$ ); 与对照组比较, 痴呆组小鼠海马 BDNF 表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), 运动训练组 6 周的运动训练使 BDNF 表达较痴呆组显著提高 ( $P < 0.05$ ), 接近对照组小鼠。

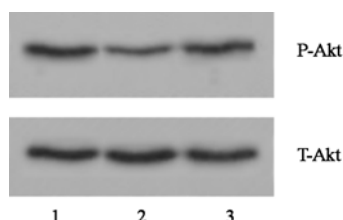


注: 1 为对照组; 2 为痴呆组; 3 为运动训练组。痴呆组与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 运动训练组与痴呆组比较,  $P < 0.05$

图 1 3 组小鼠海马 BDNF 的表达

### 三、运动训练对痴呆小鼠 Akt 磷酸化的影响

如图 2 所示,3 组小鼠磷酸化与非磷酸化 Akt 的比值分别为  $(1.00 \pm 0.09)$ 、 $(0.56 \pm 0.06)$  和  $(0.89 \pm 0.14)$ 。与对照组比较,痴呆组小鼠海马 Akt 磷酸化显著降低 ( $P < 0.05$ ),运动训练组 6 周的运动训练使 Akt 的磷酸化显著增加 ( $P < 0.05$ )。



注:1 为对照组;2 为痴呆组;3 为运动训练组。痴呆组与对照组比较,  $P < 0.05$ ;运动训练组与痴呆组比较,  $P < 0.05$ 。P-Akt 表示磷酸化 Akt, T-Akt 表示非磷酸化 Akt

图 2 3 组小鼠海马 Akt 磷酸化的表达

### 四、运动训练对痴呆小鼠海马 NO 含量和 SOD 活性的影响

如表 1 所示,与对照组比较,痴呆组小鼠的 NO 含量显著增加 ( $P < 0.01$ ),SOD 活性下降 ( $P < 0.01$ ),而运动训练则部分逆转了上述现象 ( $P < 0.05$ )。

表 1 3 组小鼠海马 NO 含量和 SOD 活性检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 例数 | NO 含量 (%)          | SOD 活性 (%)        |
|-------|----|--------------------|-------------------|
| 对照组   | 10 | 100                | 100               |
| 痴呆组   | 10 | $182.7 \pm 15.8^a$ | $62.4 \pm 9.6^a$  |
| 运动训练组 | 10 | $105.8 \pm 12.4^b$ | $93.5 \pm 10.3^b$ |

注:与对照组比较,  $^a P < 0.01$ ;与痴呆组比较,  $^b P < 0.05$

## 讨 论

乙酰胆碱是参与形成记忆功能的重要神经递质,东莨菪碱由于可逆性地阻断突触后的乙酰胆碱受体从而部分模拟痴呆的某些特征(如记忆缺失)<sup>[2]</sup>。本研究显示,腹腔注射东莨菪碱成功地模拟了痴呆小鼠的记忆缺失模型,表现为水迷宫的逃避潜伏期较对照组延长,而给予运动训练则部分逆转痴呆小鼠的记忆功能障碍,使水迷宫的逃避潜伏期显著缩短;运动训练改善痴呆小鼠的记忆功能可能与其提高小鼠海马 BDNF 的表达和增加 Akt 磷酸化,以及降低 NO 含量和增加 SOD 含量有关。

BDNF 是学习、记忆、突触生长和神经元再生的必需分子。研究显示,BDNF 能保护神经元对抗毒性物质的损伤,如 BDNF 能增强中脑多巴胺能神经元对神经毒素 MPTP 诱导的抵抗性<sup>[3]</sup>,BDNF 能抑制星形菌孢素诱导的细胞凋亡<sup>[4]</sup>。磷酸化的 Akt 是一种细胞保护因子,其水平升高表示对抗外界损伤能力的提高,

Akt 磷酸化参与了多种细胞保护作用,如 Akt 磷酸化参与了血管形成素(angiotensin-1)保护过氧化氢诱导的细胞凋亡作用<sup>[5]</sup>;胶质源细胞源生长因子可以通过 Akt 磷酸化保护乙醇诱导的细胞损伤<sup>[6]</sup>;通过 Akt 的激活,丙酮酸可以在小脑颗粒细胞抵抗 6 羟基多巴胺诱导的细胞损伤<sup>[7]</sup>;Akt 的磷酸化介导了雌激素保护大鼠皮质神经元对 Aβ 的神经毒性作用<sup>[8]</sup>。由此推测,运动训练诱导的 BDNF 表达和 Akt 磷酸化增加可能是其改善痴呆小鼠行为缺陷的分子基础。

NO 是一种强活性的自由基,可以使神经元胞膜发生氧化和硝基化,造成脂质过氧化损伤<sup>[9]</sup>;而 SOD 可以清除自由基,阻断脂质过氧化。如果 SOD 活性降低,则会增加神经元对神经毒素的敏感性而易于损伤<sup>[10]</sup>。越来越多的证据表明,氧化损伤参与了痴呆尤其是阿尔茨海默病的发病过程,运动训练增加 SOD 活性并降低 NO 活性,提示运动训练能增强脑内自由基的清除,具有抗氧化作用。这些作用可能也参与了痴呆小鼠空间记忆能力的改善。

研究显示,运动训练能减少痴呆小鼠脑内炎症因子的产生和淀粉样斑块的沉积。如长期运动可增强小鼠海马神经元突触的可塑性(如长时程增强)和提高学习记忆功能<sup>[11]</sup>;Um 等<sup>[12]</sup>的研究显示,运动训练能减少痴呆小鼠脑内淀粉样斑块的沉积,并抑制凋亡基因的表达式;另有研究提示,运动能减少大鼠脑内炎症因子 IL-1β 和 IL-6 的含量<sup>[13]</sup>。有研究显示,运动增加 BDNF 表达和对 SOD 的作用<sup>[12,14]</sup>。本研究表明,增加脑内 Akt 磷酸化可能也参与了运动对痴呆小鼠记忆缺陷的改善。

## 参 考 文 献

- [1] Lubetzky-Vilnai A, Kartin D. The effect of balance training on balance performance in individuals poststroke: a systematic review. J Neurol Phys Ther, 2010, 34:127-137.
- [2] Li J, Huang H, Miezian Ezoulin JM, et al. Pharmacological profile of PMS777, a new AChE inhibitor with PAF antagonistic activity. Int J Neuropsychopharmacol, 2007, 10:21-29.
- [3] Tsukahara T, Takeda M, Shimohama S, et al. Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in monkeys. Neurosurgery, 1995, 37:733-739.
- [4] Nguyen TL, Kim CK, Cho JH, et al. Neuroprotection signaling pathway of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor against staurosporine induced apoptosis in hippocampal H19-7/IGF-IR. Exp Mol Med, 2010, 42:583-595.
- [5] Wang Z, Cui M, Sun L, et al. Angiotensin-1 protects H9c2 cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis through AKT signaling. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 359:685-690.
- [6] Villegas SN, Njaine B, Linden R, et al. Glial-derived neurotrophic factor (GDNF) prevents ethanol (EtOH) induced B92 glial cell death by both PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways. Brain Res

- Bull, 2006, 71: 116-126.
- [7] Fernandez-Gomez FJ, Pastor MD, Garcia-Martinez EM, et al. Pyruvate protects cerebellar granular cells from 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by activating the Akt signaling pathway and increasing glutathione peroxidase expression. *Neurobiol Dis*, 2006, 24: 296-307.
- [8] 杨红旗, 臧卫周, 徐军. Akt 激活在雌激素对  $\beta$  淀粉样蛋白毒性保护机制中的作用. *中华医学杂志*, 2008, 88: 1783-1786.
- [9] Cetin F, Dincer S. The effect of intrahippocampal beta amyloid (1-42) peptide injection on oxidant and antioxidant status in rat brain. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1100: 510-517.
- [10] Duzguner V, Kaya S. Effect of zinc on the lipid peroxidation and the antioxidant defense systems of the alloxan-induced diabetic rabbits. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42: 1481-1486.
- [11] van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 13427-13431.
- [12] Um HS, Kang EB, Leem YH, et al. Exercise training acts as a therapeutic strategy for reduction of the pathogenic phenotypes for Alzheimer's disease in an NSE/APPsw-transgenic model. *Int J Mol Med*, 2008, 22: 529-539.
- [13] Chennaoui M, Drogou C, Gomez-Merino D. Effects of physical training on IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-1 $\alpha$  concentrations in various brain areas of the rat. *Eur Cytokine Netw*, 2008, 19: 8-14.
- [14] Adlard PA, Perreau VM, Cotman CW. The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span. *Neurobiol Aging*, 2005, 26: 511-520.

(修回日期: 2011-08-02)

(本文编辑: 松 明)

## · 个案报道 ·

### 康复治疗肝昏迷后肝移植患者 1 例报道

王翔 朱晓军 周丽 李奇 范红娟 王彤

随着肝移植外科技术、麻醉及 ICU 等围手术期管理水平的提高, 终末期肝病的肝移植治疗目前也较为成熟。但肝移植后神经系统并发症发生率较高<sup>[1]</sup>, 其中脑病的发病率最高, 约为 7% ~ 32%<sup>[2]</sup>, 严重影响患者的存活率和生活质量, 且缺乏特效治疗方法。

2010 年 4 月我科收治 1 例肝昏迷肝移植术后并发认知及四肢功能障碍, 且日常生活活动完全依赖的患者。通过 40 d 的康复治疗, 取得了显著的效果, 现报道如下。

#### 一、病例资料

患者, 男, 54 岁, 因意识不清伴四肢活动不利 1 个月余入住我院康复医学科。主诉: 无明显诱因出现巩膜黄染, 肝功能异常, 肝炎病毒指标均为阴性; 病情逐渐加重, 13 d 后出现昏迷, 临床诊断为急性重症性肝炎并肝昏迷。先后给予 3 次血浆置换治疗无效, 昏迷 8 d 后在全麻下行“全肝移植术”。术后给予抗排异、抗感染、促醒、保肝等治疗, 肝功能有所改善, 但未能苏醒。术后 10 d 头颅 CT 提示“双侧大脑半球对称性多发性低密度灶伴枕叶少量出血。经 ICU 抢救, 患者于昏迷 21 d 后出现睁眼, 逐渐清醒, 能简单言语表达, 存在认知问题, 视物模糊; 四肢活动不利, 大小便不能自控, 留置导尿。

查体: 听理解欠佳, 言语不清晰, 命名欠差, 复述好; 问答欠切题。双侧巩膜轻度黄染, 右上睑下垂, 右眼球内聚差, 视物模糊, 有复视及左侧偏盲。四肢肌张力呈齿轮样增高; 双上肢活动时不自主抖动。被动关节活动范围, 双肩关节前屈 130°, 外

展 120°; 双髋关节内收 30°, 屈曲 90°; 踝背伸左侧 5°, 右侧 0°。徒手肌力测试 (manual muscle testing, MMT), 双上肢各肌群肌力均为 3 级, 双下肢关键肌肌力见表 1。四肢肌腱反射均未引出, 双踝阵挛 (+), 双侧病理征 (+)。双上肢浅感觉正常, 双下肢浅感觉及四肢本体觉减退, 双侧指鼻试验 (+)。Fugl-Meyer 运动功能评定 (Fugl-Meyer Assessment, FMA), 平衡功能为 0 分。简易精神状态量表 (mini-mental state examination, MMSE) 得分为 13 分 (定向 4 分, 记忆 4 分, 计算 0 分, 命名 2 分, 复述 1 分, 执行功能 2 分, 书写 0 分, 视空间 0 分)<sup>[3-4]</sup>。

表 1 双下肢 MMT 测试

| 侧别 | 屈髋肌 | 伸髋肌 | 髋内收肌 | 髋外展肌 | 屈膝肌 | 伸膝肌 | 踝背伸肌 | 踝跖屈肌 | 拇背伸肌 |
|----|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|------|
| 左侧 | 2+  | 2+  | 2+   | 2+   | 2+  | 2+  | 1    | 1    | 1    |
| 右侧 | 2+  | 2+  | 2+   | 2+   | 2+  | 2+  | 2    | 2    | 1    |

#### 二、方法

##### (一) 常规治疗

常规治疗包括监测血常规、肝肾功能及抗排异药的血药浓度; 改善微循环及补充白蛋白; 神经营养治疗。患者及家属均拒绝采用改善认知功能的药物治疗。

##### (二) 康复护理

入院后第 2 日拔除导尿管, 小便可自解, 测残余尿约 300 ml, 予以定时、定量饮水及间歇性导尿, 配合盆底肌训练及膀胱括约肌控制训练, 尿失禁次数及残余尿量渐减少, 至入院后 4 周恢复正常排尿及排便功能。

##### (三) 康复治疗

因患者正服用抗排异药物, 为避免感染, 针对患者的情况分 3 个阶段在床边及病区内进行康复治疗, 每日 2 次, 每次 1 h。

1. 第 1 阶段: 目标为预防并发症, 争取坐位 1 级平衡。

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-1424. 2012. 01. 006

作者单位: 210029 南京, 南京医科大学第一附属医院, 江苏省人民医院康复医学科 (王翔、周丽、李奇、范红娟、王彤); 江苏省省级机关医院 (朱晓军)

通信作者: 王彤, Email: wangtong60621@yahoo. com. cn