

运动训练对D-半乳糖造阿尔茨海默病模型大鼠海马β位淀粉样蛋白42和裂解酶1的影响*

徐波^{1,2} 徐静² 余锋² 季浏^{1,2}

摘要

目的:探讨游泳+跑台的混合运动训练对D-半乳糖所致阿尔茨海默病(AD)模型大鼠海马内β位淀粉样蛋白42和裂解酶1(Aβ42、BACE1)的影响。

方法:将16只雄性SD大鼠随机分为安静注射组(C组)和运动注射组(T组),所有大鼠连续8周腹腔注射D-gal造阿尔茨海默病模型大鼠,同时,T组大鼠连续进行8周的游泳和跑台(均每周3次,交替进行)相结合的混合运动训练。运用Western Blot法检测大鼠海马Aβ42蛋白表达量,运用RT-PCR法检测大鼠海马BACE1 mRNA和IGF-1 mRNA的表达量。

结果:①与C组相比,T组大鼠海马内Aβ42蛋白表达量显著减少,具有极显著性差异($P<0.01$);②C组比T组大鼠海马内BACE1 mRNA表达量多,具有显著性差异($P<0.05$);③与C组相比,T组大鼠海马内胰岛素源生长因子(IGF)-1 mRNA表达增加,具有极显著性差异($P<0.01$)。

结论:游泳和跑步混合运动训练能延缓AD的发展进程,这可能与运动训练上调了AD大鼠海马内IGF-1 mRNA表达有关。

关键词 运动训练;D-半乳糖;阿尔茨海默病;海马;β-淀粉样前体蛋白42;β位淀粉样前体蛋白裂解酶1;胰岛素源生长因子

中图分类号:R493, R749.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-02-0111-04

Effects of exercise training on β-amyloid protein 42 and β-amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 in hippocampus of D-galactose induced Alzheimer's disease model rats/XU Bo, XU Jing, YU Feng, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(2): 111-114

Abstract

Objective: To study the effects of swimming and treadmill training on hippocampal β-amyloid precursor protein 42(Aβ42) and its cleaving enzyme 1(BACE1) in rat model of D-galactose induced Alzheimer's disease (AD).

Method: Sixteen SD male rats were randomly divided into sedentary injection group (C) and exercise injection group (T). All of the rats were received injection of D-galactose into abdominal cavity continuously for 8 weeks to make AD animal models. Group T were in addition given mixed training (swimming and treadmill training alternately each 3 times per week) for 8 weeks. The levels of hippocampal Aβ42 protein of rats were inspected by Western blot method. The expression levels of hippocampal BACE1 mRNA and insulin derived growth factor (IGF)-1 mRNA of rats were inspected by RT-PCR technique.

Result:①Compared with group C, expression of Aβ42 protein in group T reduced significantly in hippocampus of rats($P<0.01$). ②Expression of BACE1 mRNA was higher in group C than that in group T ($P<0.05$). ③Compared with group C, up-regulation of expression of hippocampal IGF-1 mRNA in group T was founded ($P<0.01$).

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.02.004

*基金项目:上海市浦江人才计划资助项目(44880240);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(44760030)

1 华东师范大学“青少年健康评价与运动干预”教育部重点实验室,上海,200241; 2 华东师范大学体育与健康学院

作者简介:徐波,男,博士,教授,博士生导师; 收稿日期:2011-09-02

Conclusion: This investigation demonstrates that swimming and treadmill training mixed exercise is a simple behavioral intervention, can inhibit the progression of AD. It may be related with the up-regulation of expression of hippocampal IGF-1mRNA by exercise training.

Author's address College of Physical Education and Health, East China Normal University, Shanghai, 200241

Key word exercise training; D-galactose; Alzheimer's disease; hippocampus; β -amyloid precursor protein 42; β -amyloid precursor protein cleaving enzyme; insulin derived growth factor

随着人口老龄化进程的加快,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发病率呈上升趋势,患者多有严重的认知功能障碍,日常生活能力严重下降^[1]。AD的发生机制目前有很多种说法, β 淀粉样蛋白(A β)学说比较主流的学说,A β 由第21号染色体编码,是淀粉样前体蛋白(amyloid-precursor protein, APP)经蛋白水解酶作用后的产物,是阿尔茨海默病脑内主要病理标志性蛋白之一,它的形成、沉积贯穿了AD的整个病理过程^[2]。

目前为止,医学界还没有找到能够治愈AD的有效手段,而我们知道适宜的体育锻炼对身体健康有一定的促进作用,对学习记忆也有积极的影响^[3-5],国外已有关于运动训练对阿尔茨海默病防治作用的研究^[6-8],如Paul等^[6]对转基因小鼠进行跑轮训练运动组小鼠大脑前额叶皮质及大脑皮质海马水平的 β -APP42(A β 42)与安静对照组相比显著减少。

国内目前还少有这方面的研究,主要原因是缺乏转基因AD动物,但国内学者通过给鼠腹腔注射D-半乳糖成功地造模了AD鼠^[9]。由此,本研究以D-半乳糖造AD模型的大鼠作为实验对象,并研究运动训练对AD大鼠海马中A β 42的影响。

另有文献报道,单一的运动训练方法(如跑轮)不能显著减少AD鼠脑内的A β 42,而包括运动在内的“丰富环境”更能减少A β 42的生成,更利于改善AD鼠的学习记忆能力,起到抵抗AD发展的作用^[10-11]。因此,本实验采用游泳+跑台的混合运动训练模式,旨在探索混合运动对AD大鼠A β 42的影响,观察运动训练是否具有预防AD的作用,以期为临床提供运动锻炼防治AD的基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性8周龄Sprague-Dawley(SD)大鼠16只,体重(213.95 \pm 7.32)g,常规分笼饲养,每笼2只,自

由饮水进食。动物饲养环境:室温22 \pm 1 $^{\circ}$ C,湿度40%—60%,自然昼夜节律光照。将16只SD大鼠随机分为安静注射组(C组, n=8)和运动注射组(T组, n=8),参考陆盈盈^[9]的文献进行AD鼠造模,所有大鼠每天上午10点腹腔注射D-半乳糖120mg/(kg·d),连续8周。注射前进行体重测量,按体重决定注射剂量。

1.2 运动训练模式

本实验采取游泳+跑台的混合运动模式,共训练8周。T组大鼠每周一三五进行游泳训练,水温控制在28 \pm 1 $^{\circ}$ C,游泳训练池为120cm \times 100cm \times 120cm,水面高度50cm;每周二四六进行有氧跑台训练,跑台运动负荷如表1所示。本实验采用的混合运动训练模式是根据徐波^[12-13]的运动模型综合而来,大鼠每周训练6次,训练均安排在晚间进行,每次游泳的训练时间与第二天跑台的训练时间一致(表1)。

表1 T组大鼠的跑台运动训练负荷

| 饲养时间 | 第1—2周 | 第3周 | 第4周 | 第5周 | 第6周 | 第7—8周 |
|--------------------|-------|-----|-----|-----|-----|-------|
| 运动时间(min/d) | 25 | 30 | 40 | 45 | 50 | 50 |
| 运动速度(km/h) | 0.8 | 0.8 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 1.0 |
| 跑台坡度($^{\circ}$) | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 |

1.3 取材及指标测试

在最后一次运动训练结束24h后将所有大鼠断髓处死,而后取头,打开大鼠颅腔,取双侧海马组织,置液氮速冻,随后迅速-80 $^{\circ}$ C保存,待测。取材过程均由固定人员在冰上操作。

1.3.1 大鼠海马A β 42蛋白表达测试(Western Blot法):取部分海马组织碾碎后放入1.5ml EP管中,注明编号,冰上操作。迅速加200 μ l蛋白裂解液进行匀浆,重复碾2—3次使组织尽量碾碎,裂解15min后,将EP管放入95 $^{\circ}$ C水浴锅中进行蛋白变性,持续5min。水煮后在4 $^{\circ}$ C离心机中以12000转/min离心5min,取上清液装于新的1.5ml EP管中备测。

本实验通过 β -actin的孵育进行蛋白质浓度的

测定。建立标准曲线,将样本溶液进行蛋白质浓度的调齐,并以 β -actin作为内参来调整样品目标蛋白浓度。Odyssey荧光二抗扫描:回收荧光二抗,用PBS膜漂洗3次,每次5min。最后取出膜放在odyssey荧光凝胶成像系统拍照,并进行结果计算。

β -actin 蛋白免疫印迹测试:按上述A β 42蛋白免疫印迹测试方法进行 β -actin 蛋白免疫印迹测试,只是一抗换做 β -actin(抗鼠)孵育,二抗换做Odyssey荧光二抗(1:4000稀释,兔抗鼠)孵育。

1.3.2 大鼠海马 BACE1 mRNA、IGF-1mRNA 测试 (RT-PCR 法):取适量大鼠海马组织,放入1.5ml的Eppendorf管中,加入1ml Trizol 裂解液,充分匀浆,使组织细胞裂解,提取海马总RNA,测浓度并定量后,进行逆转录。所有操作均在冰上进行。PCR扩增时的引物设计和序列:从Genbank查找所测基因的序列,使用Premier5.0软件进行引物设计,引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。引物序列如下:

BACE1引物:

上游:5'-AGAC GCTC AAAC TCCT GGTG-3'

下游:5'-CCTG GGTG TAGG GCAC ATAC-3'

IGF-1引物:

上游:5'-CTTT ACCA GCTC GGCC ACA-3'

下游:5'-TTGG TCCA CACA CGAA CTGA AG-3'

β -actin引物:

上游:5'-CCTC TATG CCAA CACA GTGC-3'

下游:5'-ATAC TCCT GCTT GCTG ATCC-3'

荧光实时定量PCR结果计算:根据荧光实时定量PCR仪给出的各反应孔的Ct值,然后根据公式计算各样品目的基因的相对表达量,并以此作为 β 位淀粉样前体蛋白裂解酶1(β site amyloid precursor protein cleaving enzyme-1, BACE1)mRNA、胰岛素源性生长因子(insulin derived growth factor, IGF)-1mRNA的表达水平参数,目的基因相对表达量=2^{- Δ Ct},其中 Δ Ct=ct'(目的基因mRNA的ct值)-ct(β -actin的ct值)。

1.4 统计学分析

使用SPSS18.0进行统计学分析计算,数据处理使用单因素方差分析,其中P<0.05有显著性差异,P<0.01有极显著性差异。数据结果用平均数 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 运动训练对大鼠海马 A β 42 蛋白表达的影响

由表2可知,在经过连续8周的D-半乳糖腹腔注射后,从大鼠的海马中检测出了A β 42, A β 42是发生AD的神经病理表现,这说明本实验造模成功。与C组相比,T组大鼠海马内A β 42蛋白表达量显著减少,具有极显著性差异(P<0.01)。

2.2 运动训练对大鼠海马 BACE1mRNA、IGF-1mRNA 表达的影响

由表3可知,C组比T组大鼠海马内BACE1 mRNA表达量多,具有显著性差异(P<0.05);与C组相比较,8周混合训练之后,T组大鼠海马内IGF-1mRNA有显著增加,具有极显著性差异(P<0.01)。

表2 运动训练对大鼠海马 A β 42 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 例数 | A β 42/actin(目的蛋白/内参) |
|----|----|-----------------------------|
| C组 | 8 | 0.834 \pm 0.22 |
| T组 | 8 | 0.415 \pm 0.09 |

表3 运动训练对大鼠海马 BACE1mRNA、IGF-1mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 例数 | BACE1/actin 相对表达量 | IGF-1/actin 相对表达量 |
|----|----|------------------------------|------------------------------|
| C组 | 8 | 2.54 \pm 0.97 | 0.39 \pm 0.16 |
| T组 | 8 | 1.91 \pm 0.47 ^① | 1.32 \pm 0.41 ^② |

与C组比较:①P<0.05;②P<0.01

3 讨论

3.1 运动训练对大鼠 A β 42 蛋白表达的影响

A β 来源于淀粉样前体蛋白(APP),脑内APP有两条水解途径。第一条为非A β 途径,APP先由 α -分泌酶作用于APP产生10kD的可溶性的 α -APP片段和C83肽,后者继续被 γ -分泌酶水解生成3kD的N端片段,整个过程不会产生A β ,是APP代谢的主要途径。第二条为A β 途径,APP先由 β -分泌酶将APP水解生成可溶性的 β -APP和C99肽,后者再经 γ -分泌酶产生A β 40和A β 42,其中A β 42是形成淀粉样斑块的主要成分^[1]。

A β 在正常情况下产生和降解保持平衡。A β 从可溶状态到不溶状态的转变是AD发病机制中的关键环节,这一过程涉及许多因素,主要与分子的疏水性、电荷数等特点有关,也受pH值、温度、金属离子

等因素影响。A β 的分子构型与A β 神经毒性关系密切, β 片层结构可促进A β 聚集成不溶性纤维, 形成极难溶的沉淀, 并由此生成斑块, 导致AD发生^[2]。

Hyun等^[7]以13个月大的NSE/APP^{sw}转基因小鼠为研究对象, 发现16周的跑台训练使小鼠海马内的A β 42显著下降, 使小鼠Morris水迷宫成绩提高, 表明运动训练可成为治疗AD的一个辅助方法。本实验研究表明, 8周混合训练之后, T组大鼠比C组大鼠海马内A β 42蛋白表达量明显减少, 具有极显著性差异, 故此推测运动能减少A β 42的蛋白表达量, 并抵抗了由于注射D-gal而引起的AD大鼠海马内淀粉样蛋白沉积带来的不利影响。

3.2 运动训练对AD模型大鼠海马BACE1 mRNA表达的影响

β -裂解酶(BACE)是诱导APP产生不溶性沉淀A β 的关键酶。由于BACE使APP分离出C99的多肽片段, 然后在 γ -裂解酶的作用下, 此多肽片段分解为A β 40和A β 42, 其中A β 42是不溶性的物质, 能在大脑皮质及海马等组织中形成沉淀斑块。目前已经确认了2种高度同源的 β -裂解酶: BACE1 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme, BACE1) 和BACE2 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme, BACE2)。研究发现 BACE1 (β 位淀粉样前体蛋白裂解酶1) 是主要的 β 位APP裂解酶, 其抑制剂可以减少脑内的A β 含量, 增加 α -裂解酶的APP代谢途径^[14]。因此, 通过BACE1的变化可以间接判断A β 42生成的多少。

从本实验结果上看, 混合训练组大鼠的BACE1 mRNA表达量比安静组大鼠的要少, 有显著性差异($P < 0.05$), 说明混合训练能抵抗由于注射D-gal而引起的BACE1的增加, 从而减少A β 42的生成。Paul等^[6]也发现转基因小鼠在跑轮运动训练后, 运动组大鼠海马内BACE的蛋白表达少于安静对照组。

3.3 运动训练对大鼠海马IGF-1mRNA表达的影响

IGF-1对神经元的生长和分化, 神经递质的合成和释放, 认知功能均有重要作用。本实验研究结果表明, 8周混合运动可以提高大鼠海马的IGF-1的mRNA表达增加, 这与Wolf等^[10]的报道一致, 这说明运动训练对脑的损伤有保护作用。其机制与以下文

献所报道相类似。Trejo等^[15]研究发现, 运动训练能通过IGF-1的增加促使海马的新生神经元数量增加, 从而介导运动训练对海马神经元的增殖作用。另有报道^[16]发现, 跑台运动可以诱导成年的雄性Wistar大鼠海马神经元吸收血液中的IGF-1, 从而介导运动对脑功能的促进作用。Ding等^[17]发现, 运动能使大鼠海马内的IGF-1的mRNA表达增加, 学习记忆能力提高。

4 结论

8周混合运动训练抵抗了由于注射D-gal而引起的AD大鼠海马内A β 42的生成, 抵抗了过多的BACE1基因表达, 这可能与运动训练上调了AD大鼠海马内IGF-1mRNA表达有关, 提示适当的运动训练能延缓AD的发展进程。

参考文献

- [1] 庄莹, 陈杰. 阿尔茨海默病病因及发病机制研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2008, 29(2): 101—104.
- [2] Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure[J]. Science, 2002, 298 (5594): 789—791.
- [3] Van Praag H, Shubert T, Zhao C, et al. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice[J]. J Neurosci, 2005, 25(38): 8680—8685.
- [4] Uysal N, Tuqyan K, Kayatekin BM, et al. The effect of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory[J]. Neurosci Letters, 2005, 383: 241—245.
- [5] 张春美, 徐波, 杨毅飞, 等. 游泳训练对大鼠空间学习记忆能力及海马、纹状体内c-fos、c-jun mRNA表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(8): 724—727.
- [6] 谢敏, 徐波, 王泽军. 游泳训练对大鼠空间学习记忆能力与海马、前额叶皮质环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷水平的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24(11): 1002—1005.
- [7] 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/APP^{sw}-transgenic model[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2008, 22: 529—539.
- [8] Cracchiolo JR, Mori T, Nazian SJ, et al. Enhanced cognitive activity—over and above social or physical activity—is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce A β deposition, and increase synaptic immunoreactivity[J]. Neurobiology of Learning and Memory, 2007, 88: 277—294.
- [9] 陆盈盈, 高良才, 袁崇刚. D-半乳糖致老年性痴呆模型的评价和海马脑区甘丙肽表达研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2007, 14(4): 191—193.
- [10] Mirochnic S, Wolf S, Staufienbiel M, et al. Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse

(下转第119页)