

·基础研究·

长期小强度跑台运动对 C57BL/6J 小鼠突触可塑性的影响*

赵 刚¹ 张 合¹ 刘慧莉^{1,2}

摘要

目的:本研究观察长期小强度跑台运动对 C57BL/6J 小鼠突触可塑性的影响,探讨运动提高学习和记忆能力的细胞机制。

方法:3月龄雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为运动组(12只)和对照组(12只)。运动组小鼠进行5个月小强度跑台训练,运动训练结束后进行 Morris 水迷宫检测学习和记忆行为学改变,1周后采用电生理学方法在体记录海马齿状回(DG)的群体峰电位(PS)和场兴奋性突触后电位(f-EPSP)的变化。电生理学测试后制备小鼠脑石蜡切片,采用免疫组织化学方法检测海马 DG 区突触素(SYP)的蛋白表达情况,并取海马组织利用 Western blot 方法检测 SYP 的蛋白表达。

结果:电生理学结果显示,高频刺激后运动组小鼠 PS 幅值和 f-EPSP 斜率百分数均高于对照组,差异具有显著性($P<0.05$);运动组小鼠海马组织突触素蛋白表达水平明显高于对照组,差异具有显著性($P<0.05$);运动组小鼠海马齿状回突触素阳性反应产物的整合光密度值明显高于对照组,差异具有显著性($P<0.05$)。

结论:5个月小强度跑台运动可增强 C57BL/6J 小鼠的突触结构和功能可塑性。

关键词 跑台运动;C57BL/6J 小鼠;突触可塑性

中图分类号:R339.4,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2020)-05-0522-05

Effects of low intensity treadmill training on synaptic plasticity in C57BL/6J mice/ZHAO Gang, ZHANG He, LIU Huili//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2020, 35(5): 522—526

Abstract

Objective: To investigate the effects of low intensity treadmill training on synaptic plasticity in C57BL/6J mice, and to elucidate the underlying cellular mechanism involved in exercise-induced learning and memory improvement.

Method: At three months of age, female C57 mice were randomly assigned into control group (Con, N=12) and exercised group (Exe, N=12). After 5-months treadmill exercise, electrophysiology studies were carried out. Population spike (PS) and field-excitatory postsynaptic (f-EPSP) in dentate gyrus were recorded. 6 brains of each group were embedded in paraffin for immunohistochemistry. 6 hippocampi were prepared for Western blot analysis. The protein expression of Synaptophysin was observed.

Result: After HFS, compared with control group, the exercised mice showed increased PS and f-EPSP ($P<0.05$). SYP protein levels were up-regulated in the hippocampus of the Exe mice when compared with Con mice ($P<0.05$). The results of immunohistochemical staining showed a notably increased expression of Synaptophysin in dentate gyrus of the exercised mice ($P<0.05$).

Conclusion: 5-months low intensity treadmill exercise improved synaptic plasticity in C57BL/6J mice.

Author's address Department of Sport Medicine, School of Fundamental Sciences, China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110122

Key word treadmill exercise; C57BL/6J mice; synaptic plasticity

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2020.05.003

*基金项目:国家自然科学基金项目(31100857);辽宁省教育厅科学技术研究项目(LK201657)

1 中国医科大学公共基础学院运动医学教研室,辽宁省沈阳市,110122; 2 通讯作者

第一作者简介:赵刚,男,博士,讲师; 收稿日期:2018-05-10

突触是神经元间相互接触部分的功能特化区,是神经元实现生理功能的关键部位。突触可塑性是指突触在一定条件下调整功能、改变形态及增减数目的能力,是学习和记忆活动的神经生物学基础,在神经系统的发育、成熟及学习记忆中起重要作用。近年来,突触可塑性成为神经科学领域的研究热点之一,可能成为神经系统疾病潜在的治疗靶点^[1]。

突触可塑性包括结构和功能两方面。突触功能可塑性是指突触的反复活动引起突触传递效率的增加或降低,其中长时程增强(long-term potentiation, LTP)与长时程抑制(long-term depression, LTD)是突触可塑性的两种主要表现形式,也是学习和记忆功能的重要细胞机制^[2-3]。突触形态可塑性是指在生理或者病理状态下,突触的数目或结构发生改变,是功能可塑性的基础。突触素(synaptophysin, SYP)是神经元和神经内分泌细胞突触囊泡膜上的一种糖蛋白,与神经递质释放,突触小泡胞吐作用以及突触可塑性关系密切相关。突触素在海马呈现颗粒状或点状免疫标记,可作为突触前终末的特异性标记物,检测突触的密度和分布^[4]。

作为中枢神经系统有效的刺激形式,运动对大脑的功能重组和代偿起着重要作用,不仅可以提高普通人群的认知功能,还能延缓和减轻神经退行性疾病的学习和记忆功能障碍^[5-7]。但有关运动影响学习和记忆功能的细胞机制少见报道。

我们先前的研究发现,5个月小强度跑台运动提高C57BL/6J小鼠的空间学习和记忆能力^[8]。本研究进一步观察长期小强度跑台运动对C57BL/6J小鼠突触可塑性的影响,探讨运动和突触可塑性的关系,旨在探讨运动影响学习和记忆功能的细胞机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物购自中国医科大学实验动物中心。3月龄雌性C57BL/6J清洁级小鼠24只,随机分为对照组(Con)和运动组(Exe),每组12只。常规分笼饲养,每笼4只,自由进食和饮水。饲养室温度22—24℃,相对湿度40%—60%。实验动物饲养及取材遵守实验动物管理和保护的有关规定。

1.2 运动方案

Exe组小鼠进行2天跑台适应性训练,第一天以5m/min的速度运动10min,第二天以8m/min的速度运动10min。正式运动开始后,每日下午14:00后进行跑台运动30min,以5m/min的速度开始运动5min,后以8m/min的速度运动5min,最后以11m/min的速度运动20min。小鼠运动强度约为45%—55%最大摄氧量(VO_{2max})^[9]。每周运动5天,休息2天,持续5个月。

1.3 主要试剂与仪器

小鼠抗突触素蛋白单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),SP免疫组化染色超敏试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),小鼠抗GAPDH蛋白单克隆抗体(Santa cruz Biotechnology公司),小动物跑台(安徽正华生物仪器设备有限公司),凝胶成像分析系统(BIO—RAD公司)。

1.4 电生理学测试

小鼠经0.67%的戊巴比妥钠(0.01ml/g)腹腔麻醉后,固定于脑立体定位仪上,切开头皮,暴露颅骨。参照George和Keith所著的小鼠脑立体定位图谱^[6],将刺激电极插入右侧内嗅皮层的穿通路纤维(前囟后3.2mm,旁开2.0mm,深约3.6mm),用502胶固定,施加单脉冲或高频刺激(high-frequency stimulation, HFS)。将充满3MKCl溶液的玻璃微电极插入右侧海马齿状回(dentate gyrus, DG)的颗粒细胞层(前囟后1.9mm,旁开0.5mm,深约2.0mm)记录刺激诱发的群体锋电位(population spike, PS)。

首先找到单一脉冲刺激在DG诱发的稳定PS后,每分钟给予一次单脉冲刺激(强度10V,波宽0.1ms),记录刺激所诱发的PS,共记录30min。测量每次反应的PS幅值,并将所得的幅值平均,作为基线值(100%)。然后给予同样强度及波宽的短串高频条件刺激(100Hz、持续5s)后,再每分钟给予一次单脉冲检验刺激(强度10V,波宽0.1ms),记录所诱发的PS的幅值变化及此变化所持续的时间。实验过程中,保持组间及个体间刺激参数一致。HFS后PS的幅值变化值及兴奋性突触后电位(field-excitatory postsynaptic, f-EPSP)斜率以相对于基线值的百分数表示。如PS平均幅值高于基线值(至少10%以上,且 $P<0.05$),并持续30min以上,则高者被定义为LTP。

1.5 Western blot检测SYP蛋白表达

电生理测试结束后,每组6只小鼠取海马,液氮速冻,置于 -80°C 冰箱保存,待批量后采用 Western blot方法检测SYP的蛋白表达。取海马加入蛋白裂解液超声粉碎,提取总蛋白,进行蛋白检测与定量。制胶,检测样本在100高温使蛋白变性后,进行SDS-PAGE电泳。电泳后转膜、封闭,然后一抗、二抗孵育,最后ECL发光显影,用BIO-RAD凝胶电泳图像分析仪采图,Quantity One软件分析图像。内参选择GAPDH,将指标灰度值与对应内参灰度值比值进行统计学分析。

1.6 免疫组织化学检测SYP蛋白表达

电生理测试结束后,每组6只小鼠制备光镜样本。将小鼠开胸,从左心室插管至升主动脉,先以30ml的生理盐水灌流冲洗,再以4%的多聚甲醛固定液灌注固定。灌毕后立即取脑,投入4%多聚甲醛固定液,置于 4°C 冰箱中固定过夜。次日将脑组织于70%、80%、90%、95%及100%酒精中梯度脱水,透明,浸蜡,石蜡包埋,切片,片厚 $5\mu\text{m}$ 。

采用链霉素抗生物素蛋白—过氧化酶(SP)连接法进行免疫组织化学检测,主要染色过程如下:石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精至水化,0.01M PBS冲洗 $5\text{min}\times 3$;枸橼酸缓冲液中,微波煮沸修复抗原,自然冷却,0.01M PBS洗 $5\text{min}\times 3$;滴加5%的山羊血清封闭液,室温孵育1h;甩去多余血清,滴加小鼠SYP单克隆抗体(1:200), 4°C 孵育过夜,阴性对照组以0.01M PBS缓冲液代替一抗,0.01M PBS洗 $5\text{min}\times 3$;SP试剂盒A液(1:200), 37°C 孵育30min,0.01M PBS洗 $5\text{min}\times 3$;B液(1:200), 37°C 孵育30min,0.01M PBS洗 $5\text{min}\times 3$;DAB显色,显微镜下观察染色强度,以控制反应时间,通常为3—5min;苏木素复染2—4min;盐酸酒精分化数秒,自来水充分冲洗;梯度酒精脱水;透明,中性树胶封片。光学显微镜下观察并采集图像。

每只小鼠随机选取脑切片5张(部位相同),取海马DG区拍照($\times 400$),使用ipp6.0软件分析海马SYP免疫反应产物的整合光密度值。

1.7 统计学分析

采用SAS8.1统计软件进行统计分析。实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差表示,电生理实验中PS幅值

及f-EPSP斜率百分数、突触素蛋白表达的组间比较采用方差分析,LTP发生率采用卡方检验。 $P<0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 小强度跑台运动对海马在体LTP的影响

电生理实验中,通过条件刺激诱导海马DG区产生LTP。Exe组LTP发生率(83.3%)高于Con组(75%),差异不具有显著性($P>0.05$)。

HFS后Exe组小鼠相对于基线值的PS幅值和f-EPSP斜率百分数[PS(156 ± 24)%; f-EPSP (170 ± 26)%]高于Con组[PS(131 ± 23)%; f-EPSP (142 ± 29)%],差异具有显著性($P<0.05$),见图1—2。

图1 HFS前后小鼠标准化PS幅值的变化

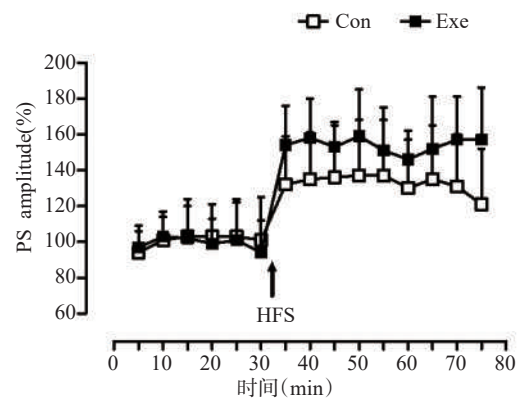
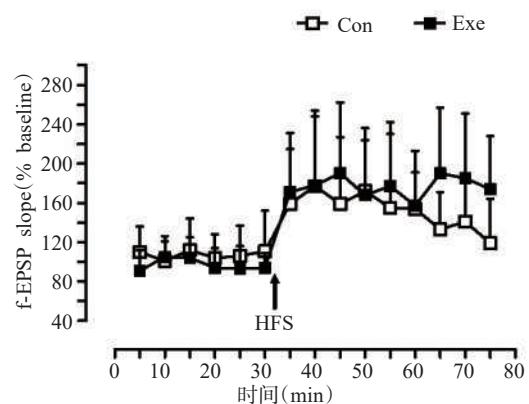


图2 HFS前后小鼠标准化f-EPSP斜率的变化



2.2 小强度跑台运动对海马SYP蛋白表达的影响

Western blot检测结果显示,Exe组小鼠海马SYP蛋白表达(100.00 ± 11.37)明显高于Con组(118.42 ± 14.21),差异具有显著性($P < 0.05$),见图3。

2.3 小强度跑台运动对海马齿状回SYP的影响

免疫组织化学染色后,棕褐色是突触素表达,蓝色是苏木素复染核。光镜下可见Con组小鼠齿状回突触素表达阳性产物呈棕黄色颗粒或点状,分布均匀密集,Exe组小鼠突触素免疫反应物阳性表达较Con组明显增加,见图4。

Exe组小鼠齿状回突触素阳性反应产物的整合光密度值(72.60 ± 10.42)高于Con组(61.19 ± 3.15),差异具有显著性($P < 0.05$)。

图3 Western blot检测观察小强度跑台运动对小鼠海马SYP蛋白表达的影响

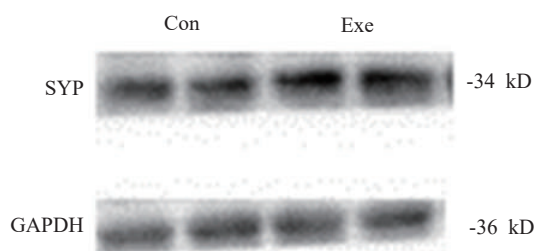
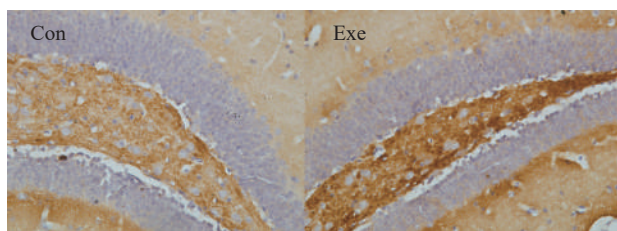


图4 免疫组织化学方法观察小强度跑台运动对小鼠齿状回SYP蛋白表达的影响 (×400)



3 讨论

学习和记忆是脑的高级功能,学习和记忆的神经基础是中枢神经系统高度的可塑性,包括神经网络、神经环路及突触连接等不同水平的可塑性,其中突触连接是神经元之间信息传递的重要结构,是神经可塑性的关键部位。海马是负责学习和记忆功能的重要脑区。因此,学习和记忆与海马突触可塑性

的关系越来越受人们的关注,成为各科学领域关注的重点。突触功能可塑性主要表现为突触传递效能的增强或减弱。LTP是中枢传入纤维受到高频刺激后,神经元突触传递效能的持续性增强,是表现突触功能可塑性的重要电生理指标,与脑学习和记忆的形成和储存有关。我们应用细胞外微电极记录单脉冲刺激穿通路纤维在海马齿状回诱发的PS幅值,并测量高频刺激前后单脉冲刺激诱发的PS幅值的变化及f-EPSP斜率的变化,用以反映小鼠在体LTP的表现。突触数目的改变是突触形态可塑性的研究内容之一。SYP作为突触前终末的特异性标记物,常用来检测突触的密度和分布。应用免疫组织化学技术,测定SYP免疫反应产物的平均光密度值,在光镜下对突触进行定量分析,从而推测突触数量的变化,其结果与在电镜下观测的突触密度的资料一致^[10-11]。我们先前的研究中发现,长期小强度跑台运动提高C57BL/6J小鼠在Morris水迷宫试验中的学习和记忆能力^[8]。在本研究中进一步发现,运动组小鼠高频刺激后PS幅值和f-EPSP斜率明显升高,并伴有海马DG区SYP蛋白表达明显增加,说明长期小强度跑台运动提高C57BL/6J小鼠海马的突触结构和功能可塑性。

大脑具有修改自身结构和功能的能力,以适应环境的改变。神经系统结构和功能可塑性是神经系统的重要特征,受多种因素的影响,如饮食、复杂环境、运动、感觉刺激等。其中运动是中枢神经系统最有效的刺激形式之一,所有运动都可向中枢神经系统提供感觉、运动和反射性传入。运动对大脑的功能重组和代偿起重要作用,其机制可能与突触前末梢线粒体数量增多、突触数量增多、多样性突触出现、穿孔突触数量增加及突触信号传递相关蛋白表达增加等有关。

研究表明,阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)发病早期,及年龄相关的轻微认知损害(mild cognitive impairment, MCI)在中枢神经系统的主要病理改变都发生在海马^[12]。因此,诊断为早期AD和MCI的患者会出现依赖海马记忆的选择性损害。目前,有充分的证据证明,突触可塑性调节这种记忆^[13]。近年来的研究证实,突触缺失和神经可塑性成为解释AD病理机制的重要观点。已经证明,

不同类型的AD转基因模型出现海马LTP减弱^[14-15]。有实验发现,AD患者突触素免疫反应性在额叶皮质和海马显著减少,并且与认知功能损害呈负相关^[16]。且动物实验也报道突触素表达水平与空间记忆能力密切相关,突触素表达较高的动物在Morris水迷宫测试中的成绩更好^[17]。因此,寻找具有神经突触修复的药物和方法,增强AD患者的突触重塑,以促进神经功能恢复,具有重要的临床意义。除AD外,一些神经系统疾患(如脑卒中、脑损伤等)也可出现不同程度的学习和记忆损害,增加患者家庭和社会负担。小强度的运动方案可能成为一项行之有效的预防及治疗手段,通过提高神经系统的突触可塑性,改善学习和记忆功能,加速患者认知功能的康复进程,使患者尽早回归家庭和社会。

大量研究证明运动在我们一生中各个年龄段均能增强大脑功能^[18-19]。适宜运动通过增强大脑的神经可塑性提高学习和记忆能力^[7],突触可塑性的调节可能是运动增强认知功能的潜在机制,因此,明确运动对突触可塑性的影响可以为AD患者执行运动康复提供理论依据。

运动对脑认知功能的影响与运动类型、运动强度、运动时间等因素有关,运动方案不同经常得到不同的结果。我们采用无刺激的跑台运动,这种“自愿”的跑台运动模式降低精神压力对健康造成的负面影响,更接近为人类制订的运动处方。一项对4月龄Wistar大鼠短期跑台运动干预的研究表明,7天跑台运动即可对LTP和学习记忆能力产生积极的改善作用^[20]。一项关于健康个体体力活动水平与认知功能关系的研究发现,体力活动水平越高,认知能力越好^[21]。研究显示,中等强度运动训练可以增强海马区突触可塑性,并可改善由于年龄增长造成的SYP水平降低,SYP表达增加与神经发芽与新突触形成有关^[22],且提示神经细胞之间形成的突触联系增多^[23-24]。新突触形成、突触数密度增加是突触重塑的主要体现。但是,另一项研究中发现高强度运动抑制大鼠海马CA1区LTP前期和后期的形成,说明过量运动对脑健康不利^[25]。我们的研究结果显示,5个月的小强度跑台运动(45%—55% VO2 max),每天运动30分钟,不仅能引起C57BL/6J小鼠突触功能可塑性的增强,同时也引起形态可塑性的

积极变化。制订运动处方时,在安全性和有效性的原则下,采用更小的运动强度可能达到良好的治疗效果,且运动处方更容易被执行。

如上所述,长期规律的小强度跑台运动引起C57BL/6J小鼠突触可塑性的变化,小鼠突触不仅发生了功能改变,也发生了结构变化。但形态学改变究竟是功能改变产生和维持的结构基础,还是功能改变诱发的伴随效应,即两者之间的因果关系尚不能定论。运动这种非药物治疗手段有望成为延缓神经退行性疾病的重要策略,但仍然需要深入探讨运动与认知改善程度的量效关系。

参考文献

- [1] Singh A, Abraham WC. Astrocytes and synaptic plasticity in health and disease[J]. Exp Brain Res, 2017, 123(6):1645—1655.
- [2] Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation—a decade of progress?[J]. Science, 1999, 285(5435):1870—1874.
- [3] Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches[J]. Neuron, 2004, 44(1):5—21.
- [4] Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, et al. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses[J]. J Neurocytol, 1996, 25(12):821—828.
- [5] Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity[J]. Trends Neurosci, 2002, 25(6): 295—301.
- [6] Intlekofer KA, Cotman CW. Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Dis, 2013, 57:47—55.
- [7] Lin TW, Tsai SF, Kuo YM. Physical exercise enhances neuroplasticity and delays Alzheimer's disease[J]. Brain Plasticity, 2018, 4(1):95—110.
- [8] 刘慧莉, 赵刚. 小强度跑台运动对小鼠空间学习记忆及海马糖原合成酶激酶-3 β 的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2013, 19(11):1016—1019.
- [9] Baker EJ, Gleeson TT. The effects of intensity on the energetics of brief locomotor activity[J]. J Exp Biol, 1999, 202(Pt 22):3081—3087.
- [10] Walnas SI, Jahn R, Greengard P. Quantitation of nerve terminal populations synaptic vesicle-associated proteins as markers for synaptic density in the rat neostriatum [J]. Synapse, 1988, 2(5):516—520.
- [11] Davies CA, Mann DMA, Sumpter PQ, et al. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic con

(下转第538页)