

• 短篇论著 •

不同强度运动对幼龄大鼠海马组织 BDNF 及 NMDA R1 mRNA 表达的影响

Influence of different exercise intensities on expression of BDNF and NMDA R1 mRNA in hippocampus of young SD rats

姜淑杰^{1*}, 刘瑾彦^{1,2}, 陈佩杰¹

(1. 上海体育学院运动科学系, 上海 200438; 2. 东华大学体育部, 上海 200051)

[摘要] **目的:** 分析不同强度跑台运动对幼龄大鼠海马组织脑源性神经营养因子(BDNF)和谷氨酸 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体 mRNA 水平的影响。**方法:** 将 43 只 5 周龄雄性 SD 大鼠随机分为对照组、小强度、中等强度和大强度运动组。通过定量 real-time PCR 技术, 分析 1 周跑台运动后各组大鼠海马组织内 BDNF 和 NMDA R1 mRNA 的水平。**结果:** 各组大鼠海马内 BDNF mRNA 水平分别是: 对照组为 746 ± 338 , 小强度运动组为 $1\,308 \pm 688$, 中等强度运动组为 $1\,036 \pm 649$, 大强度运动组为 722 ± 426 ; NMDA R1 mRNA 水平分别是: 对照组为 34 ± 19 , 小强度运动组为 286 ± 230 , 中等强度运动组为 174 ± 132 ; 大强度运动组为 20 ± 14 。结果表明小强度运动既可明显诱导海马 BDNF 基因表达($P < 0.01$), 也可明显诱导海马内 NMDA R1 基因的表达($P < 0.01$); 中等强度运动可明显诱导 NMDA R1 受体基因的表达($P < 0.01$), 但对 BDNF 的表达已没有明显作用; 而大强度运动对 2 种因子的基因表达皆无明显影响。**结论:** 不同强度的运动可调节海马内 BDNF 和谷氨酸 NMDA R1 受体基因的表达, 但以小强度跑台运动促进作用最强, 中等运动强度次之, 而大强度运动基本没有影响。

[关键词] 运动(exercise); 海马; 脑源性神经营养因子; N 甲基天冬氨酸; RNA, 信使

[中图分类号] R 338.2 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2007)08-0916-03

脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)是一种重要的神经营养因子, 它不仅影响神经元的存活, 还影响神经可塑性和神经突触的功能。BDNF 表达水平的降低, 被认为与神经退化和慢性应激及抑郁所导致的行为改变有关。影响 BDNF 基因表达的因素很多, 如运动、抗抑郁药物、神经损伤、缺血、缺氧等, 而运动作为一种可促进身体健康的刺激因素, 在维持或代偿受损神经功能方面的作用已被越来越多的研究所证实。如运动有利于维持老年人的健康和认知功能^[1], 可促进损伤后中枢神经系统功能的恢复^[2], 以及诱导成年动物的神经再生^[3]等。此外, 不同形式的运动, 如游泳、跑转轮等, 也可增加动物脑内某些区域和脊髓的营养因子表达, 包括 BDNF^[4-5]。但不同强度运动对海马内 BDNF 表达状态的影响却不是很清楚。

N-甲基-D-门冬氨酸(NMDA)受体是谷氨酸的特异受体之一, 具有重要的生物学功能, 尤其与学习和记忆有密切的关系, 与海马的长时程增强(long-term potentiation, LTP)关系密切^[6]。Shimizu 等^[7]以敲除 NMDA R1 的小鼠和正常小鼠为研究对象, 分析了转轮运动对海马神经再生的影响, 结果发现转轮运动仅促进了正常小鼠海马的神经再生, 而对敲除 NMDA R1 受体的小鼠则没有产生促进作用。这提示运动引起的海马神经再生依赖于 NMDA 受体, 但关于不同强度运动对海马表达 NMDA R1 的影响同样不是很清楚。所以, 本研究以 5 周龄 SD 大鼠为研究对象, 观察了不同强度的跑台运动对幼龄大鼠海马内 BDNF 和 NMDA R1 mRNA 水平的影响。

1 材料和方法

1.1 动物来源及分组 43 只健康雄性 5 周龄 Sprague-

Dawley(SD)大鼠购于上海中医药大学动物研究中心, 平均体质量为 (130.35 ± 4.73) g; 将其随机分为 4 组: 安静对照组($n=10$)、小强度运动组($n=11$)、中等强度运动组($n=11$)和大强度运动组($n=11$)。动物分笼饲养, 每笼 5~6 只, 自由饮食, 光照时间 7:00~19:00, 饲养环境温度 $(20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 45%~55%。

1.2 动物跑台运动方案 运动组大鼠每天在跑台(杭州段氏 PT98)上运动 30 min, 连续运动 1 周。运动强度分别为: (1)小强度运动组, 首先以 5 m/min 的速度运动 5 min, 接着跑速加至 8 m/min 持续 5 min, 最后以 11 m/min 的速度持续 20 min; (2)中等强度运动组, 首先以 8 m/min 的速度运动 5 min, 接着跑速加至 11 m/min 持续 5 min, 最后以 14 m/min 的速度持续 20 min; (3)大强度运动组, 首先以 8 m/min 的速度运动 5 min, 接着跑速加至 11 m/min 持续 5 min, 最后以 22 m/min 的速度持续 20 min。

1.3 RNA 抽提和 cDNA 合成 根据实验方案让大鼠连续运动 1 周后, 所有动物腹腔注射 0.4% 的戊巴比妥钠(1 ml/100 g 体质量)进行麻醉, 开颅取脑, 迅速剥离海马, 按常规方法抽提 RNA。用核酸蛋白测定仪检测 RNA 溶液在 260 nm 和 280 nm 光密度值, 计算 RNA 浓度后用于 cDNA 合成。用于合成 cDNA 的 RT 反应条件为 70°C 5 min; 4°C 2 min,

[基金项目] 国家自然科学基金(30570899), 上海市重点学科建设项目(T0901)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30570899) and Shanghai Leading Academic Discipline Project(T0901)。

[作者简介] 姜淑杰, 博士, 副教授, 硕士生导师。

* Corresponding author. E-mail: shujielou319@yahoo. com. cn

37℃, 5 min, 42℃ 60 min, 72℃ 10 min。

1.4 定量 real-time PCR 根据 GenBank 数据库中提供的基因序列, 设计 BDNF、NMDA R1 和管家基因 GAPDH 的引物和探针。各探针在 5' 端具有报告基团 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein, 6-FAM), 3' 端有猝灭基团 6-羧基-四甲基罗丹明 (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine, TAMRA), BDNF 引物和探针序列具体为: 上游 5'-CCA TAA GGA CGC GGA CTT GT-3', 下游 5'-GAG GCT CCA AAG GCA CTT GA-3', FAM-CAC TTC CCG GGT GAT GCT CAG CA-TAMRA; NMDA R1 引物和探针具体序列为: 上游 5'-AGC GGG TAA ACA ACA GCA ACA-3', 下游 5'-GTC CGC TTG GCC ACT GAG TA-3', FAM-TGG AAC GGA ATG ATG GGC GAG-TAMRA; GAPDH 引物和探针具体序列为: 上游 5'-GGA AGG TGA AGG TCG GAG TC-3', 下游 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3', FAM-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC-TAMRA。具体反应条件为: 首先 50℃ 5 min, 95℃ 5 min; 在接下来的 40 个循环中条件为 95℃ 20 s, 60℃ 60 s。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件对数据进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结 果

BDNF 和 NMDA R1 mRNA 的水平, 是根据 real-time PCR 标准曲线计算出样品中 BDNF 和 NMDA R1 mRNA 的基因拷贝数, 然后除以该样品中 GAPDH mRNA 的基因拷贝数得出的比值。各组幼龄大鼠海马内 BDNF mRNA 水平分别是: 对照组为 746 ± 338 , 小强度运动组为 $1\,308 \pm 688$, 中等强度运动组为 $1\,036 \pm 649$, 大强度运动组为 722 ± 426 ; NMDA R1 mRNA 水平分别是: 对照组为 34 ± 19 , 小强度运动组为 286 ± 230 , 中等强度运动组为 174 ± 132 ; 大强度运动组为 20 ± 14 。统计结果表明小强度运动既可明显诱导海马表达 BDNF 基因 ($P < 0.01$), 也可明显诱导海马内 NMDA R1 基因的表达 ($P < 0.01$); 中等强度运动也可明显诱导 NMDA R1 基因的表达 ($P < 0.05$), 但对 BDNF 的表达已无明显作用; 而大强度运动对 2 种因子的基因表达皆无影响 ($P > 0.05$)。提示被检测的大鼠海马组织中 BDNF、NMDA R1 mRNA 表达量随运动强度不同而发生相应改变, 且变化趋势基本一致, 即 BDNF、NMDA R1 mRNA 的表达量均在小强度运动组动物最高, 中等强度运动组次之, 而大强度运动组最少。但 BDNF、NMDA R1 mRNA 的绝对数相差很大, BDNF 远大于 NMDA R1。与对照组相比, 2 个基因在小强度运动组表达量增加的幅度也不同, 其中 NMDA R1 增加幅度达 8.4 倍, BDNF 则仅为 1.8 倍。从小强度到中等强度到大强度运动, BDNF mRNA 的表达分别下降 21.23% 和 30.56%, NMDA R1 则分别下降 39.15% 和 88.16%。

3 讨 论

有关运动调节海马 BDNF mRNA 表达的研究很多, 如转轮运动可下调老年痴呆症模型小鼠 BDNF mRNA 的表

达^[8]。但另有研究^[9]发现转轮运动可逆转慢性应激引起的大鼠海马 BDNF mRNA 表达的降低。此外, 有研究^[10]还发现 4 周的转轮运动可明显增加 2、15 和 24 个月龄大鼠海马的 BDNF mRNA 水平, 尤以 2 个月龄动物增加的幅度最大。这提示大多数情况下运动可上调海马 BDNF mRNA 的水平。但上述研究都是以转轮为运动工具, 是一种自主、随意的运动方式, 只能使用距离表达运动量, 无法进行运动强度的评估, 而跑台运动则可通过调节速度改变动物的运动强度。

本研究检测了不同强度的跑台运动对 5 周龄大鼠海马 BDNF mRNA 表达的影响, 结果表明海马 BDNF mRNA 的表达水平随运动强度改变而改变, 其中小强度的跑台运动对 BDNF mRNA 表达的促进作用最为显著。而大强度的跑台运动则对海马 BDNF mRNA 的表达没有产生促进作用。研究发现, 在神经可塑性、认知和神经再生现象的增强时, 都以 BDNF 基因表达的增加为基础^[11-12], 所以运动对 BDNF 基因表达的促进作用, 无疑对神经再生和学习记忆会产生促进作用, 这可能也是我们前期研究^[13-14]所观察到的小强度运动对 5 周龄大鼠海马神经再生和学习记忆产生促进作用的机制之一。

本研究分析了不同运动强度对 NMDA R1 mRNA 表达的影响, 发现海马 NMDA R1 mRNA 的表达同样受运动强度的影响, 而且变化趋势与 BDNF 相一致。关于运动对 NMDA 受体表达的影响, 目前仅有 1 篇报道, 但运动方式是随意的转轮运动, 检测的是 NMDA R2 mRNA 的表达, 发现转轮运动可明显促进大鼠海马齿状回 BDNF 和 NR2B mRNA 的表达^[12]。至于脑内 NMDA 受体表达改变的意义, 也与学习记忆和神经再生有一定的关系, 因为使用 NMDA 受体拮抗剂可阻断运动引起的 LTP 的增加。Smith-Roe 等^[15]给予非竞争性拮抗剂 MK-801 阻滞 NMDA 受体后, 发现大鼠出现学习记忆能力降低。相反, 当利用转基因技术使 NMDA 受体在小鼠脑内过度表达时, 则受体通道开放时间延长、活性增加, 同时转基因小鼠在多种行为测试中表现出更好的学习记忆能力^[7]。提示运动引起的 NMDA 受体的增加, 可能有利于神经再生和神经的可塑性, 同时可能也是我们所观察到的运动促进幼龄大鼠神经再生和学习记忆能力提高的机制之一^[12-13]。

本研究结果发现 BDNF 和 NMDA 受体表达同时增加。二者之间是否可以产生相互作用呢? Black 等^[16]采用膜片钳技术, 发现 BDNF 可通过增加 NMDA 受体通道的开放频率, 特异性地增强突触后致密物上 NMDA 亚单位的磷酸化, NMDA 受体被激活时, 使 Ca^{2+} 通透性增加, 导致钙离子大量进入细胞内。钙离子可进一步激活细胞内钙离子依赖的酶, 从而引起一系列生化过程, 改变突触效率, 产生相应的效应^[16]。由此可见, 运动引起的 BDNF 和 NMDAR mRNA 表达量的同时增加有其一定生物学意义。

至于运动强度影响 BDNF 和 NMDA 受体基因表达的机制, 可能与运动强度改变脑血流相关, 因为小强度运动引起脑血流量增加, 而大强度运动引起脑血流量降低, 从而引起 BDNF 和 NMDA 受体基因表达的改变^[17]。此外, 也可能与运动引起的能量消耗有关, 因为能量代谢的改变可降低 BD-

NF mRNA 的表达^[18]。所以,很有可能,BDNF 和 NMDA 基因表达的改变是多种因素协同的结果。本研究结果充分提示,运动对脑功能产生的有益作用与运动强度有一定的关系,此对人们制定运动方案应有重要的参考意义。

[参考文献]

[1] Galloway M T, Jokl P. Aging successfully: the importance of physical activity in maintaining health and function[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2000, 8: 37-44.

[2] Jones T A, Chu C J, Grande L A, et al. Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats[J]. J Neurosci, 1999, 19: 10153-10163.

[3] Kempermann G, van Praag H, Gage F H. Activity-dependent regulation of neuronal plasticity and self repair[J]. Prog Brain Res, 2000, 127: 35-48.

[4] Neeper S A, Gómez-Pinilla F, Choi J, et al. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain[J]. Brain Res, 1996, 726: 49-56.

[5] Gómez-Pinilla F, Ying Z, Opazo P, et al. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle[J]. Eur J Neurosci, 2001, 13: 1078-1084.

[6] MacDonald J F, Jackson M F, Beazely M A. G protein-coupled receptors control NMDARs and metaplasticity in the hippocampus[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1768: 941-951.

[7] Shimizu E, Tang Y P, Rampon C, et al. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation[J]. Science, 2000, 290: 1170-1174.

[8] Wolf S A, Kronenberg G, Lehmann K, et al. Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease[J]. Biol Psychiatry, 2006, 60: 1314-1323.

[9] Zheng H, Liu Y, Li W, et al. Beneficial effects of exercise and

its molecular mechanisms on depression in rats[J]. Behav Brain Res, 2006, 168: 47-55.

[10] Adlard P A, Perreau V M, Cotman C W. The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across lifespan[J]. Neurobiol Aging, 2005, 26: 511-520.

[11] Vaynman S, Ying Z, Gómez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition[J]. Eur J Neurosci, 2004, 20: 2580-2590.

[12] Farmer J, Zhao X, van Praag H, et al. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats *in vivo* [J]. Neuroscience, 2004, 124: 71-79.

[13] 刘瑾彦, 姜淑杰, 陈佩杰. 跑台运动对幼龄大鼠海马齿状回神经再生的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2006, 25: 171-175.

[14] 姜淑杰, 刘瑾彦, 杨若愚, 等. 跑台运动促进幼龄大鼠学习能力[J]. 生理学报, 2006, 4: 365-369.

[15] Smith-Roe S L, Sadeghian K, Kelley A E. Spatial learning and performance in the radial arm maze is impaired after N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor blockade in striatal subregions [J]. Behav Neurosci, 1999, 113: 703-717.

[16] Black I B. Trophic regulation of synaptic plasticity[J]. J Neurobiol, 1999, 41: 108-118.

[17] Vaynman S, Ying Z, Wu A, et al. Coupling energy metabolism with a mechanism to support brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity[J]. Neuroscience, 2006, 139: 1221-1234.

[18] Hellström G, Fischer-Colbrie W, Wahlgren N G, et al. Carotid artery blood flow and middle cerebral artery blood flow velocity during physical exercise[J]. J Appl Physiol, 1996, 81: 413-418.

[收稿日期] 2007-04-13 [修回日期] 2007-06-22
[本文编辑] 尹 茶