DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00048

·论 著·

自愿运动对快速老化小鼠学习记忆能力和海马生长相关蛋白43的影响

苑振云,姜向明,王铭维*,顾 平,杨秀芬,苏冠丽,杨 涛,李 斌
河北医科大学第一医院,河北省脑老化与认知神经科学实验室,石家庄 050031

[摘要] **目的** 观察自愿运动对快速老化小鼠(senescence-accelerated mouse prone 8, SAMP8)学习记忆能力和海马生长相关蛋白43(growth-associated protein-43, GAP43)表达的影响,探讨运动提高认知能力延缓衰老的机制。**方法** 60只3个月龄雌性SAMP8小鼠随机平均分为跑笼环境组(RCE组)和标准环境组(SE组)。饲养3个月后,用Morris水迷宫测试小鼠的寻找平台潜伏期及搜索策略。行为学测试后,各组分别取10只小鼠的鼠脑用RT-PCR法检测海马GAP43 mRNA的表达;取10只小鼠的鼠脑用免疫印迹实验检测海马GAP43蛋白的表达;剩余10只取鼠脑用免疫组织化学实验观察海马GAP43免疫反应产物的表达。**结果** Morris水迷宫实验表明RCE组小鼠寻找平台潜伏期较SE组缩短($P<0.01$, $P<0.05$),在第Ⅰ象限游泳时间比SE组延长($P<0.01$),在第Ⅳ象限游泳时间比SE组缩短($P<0.05$)。RCE组与SE组比较,海马GAP43表达增加($P<0.01$)。**结论** 自愿运动能提高SAMP8小鼠学习记忆能力,其机制可能与运动能促进海马GAP43表达有关。

[关键词] 运动;快速老化小鼠;环境;GAP-43蛋白
[中图分类号] R 749.16 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2012)01-0048-05

Effects of voluntary exercise on learning ability, memory and hippocampus growth-associated protein 43 expression in senescence-accelerated prone mouse

YUAN Zhen-yun, JIANG Xiang-ming, WANG Ming-wei*, GU Ping, YANG Xiu-fen, SU Guan-li, YANG Tao, LI Bin
First Hospital of Hebei Medical University, Brain Aging and Cognitive Neuroscience Laboratory of Hebei Province, Shijiazhuang 050031, Hebei, China

[**Abstract**] **Objective** To observe the effects of voluntary exercise on the learning ability, memory and hippocampus growth-associated protein 43 (GAP43) expression in senescence-accelerated prone mouse (SAMP8), so as to explore the possible mechanism of exercises on improving the cognitive ability and delaying aging. **Methods** A total of 60 three-month old female SAMP8 mice were evenly assigned to running cage environment (RCE) group and standard environment (SE) group at random. After three months, Morris water maze test was used to test the platform-seeking latency and search strategy. Then 10 mice were sacrificed in each group for RT-PCR analysis of hippocampus GAP43 mRNA expression, 10 for Western blotting analysis of hippocampus GAP43 protein expression, and 10 for immunohistochemistry staining of hippocampus GAP43 expression. **Results** Morris water maze test showed that RCE mice had a significant shorter platform-seeking latency than SE mice($P<0.01$, $P<0.05$), and RCE mice had a significant longer time in the first quadrant ($P<0.01$) and a shorter time in the fourth quadrant ($P<0.05$) compared with SE mice. RCE mice had a significantly higher GAP43 expression in the hippocampus compared with SE mice ($P<0.01$). **Conclusion** Voluntary exercise can improve the learning ability and memory of SAMP8, which might be associated with the increase of GAP43 in the hippocampus.

[**Key words**] exercise; senescence accelerated mouse; environment; GAP-43 protein
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1): 48-52]

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是中枢神经系统一种常见的进行性神经退行性疾病,以认知功能下降和大脑皮质及海马神经元的缺失为特征,是老年人常见的神经退行性疾病之一。随着世界人口日趋老龄化,AD患者数量显著增加,已经成为医学领域亟待解决的问题之一。当前的治疗只能暂时缓解AD的症状,几乎不能影响AD的发病进程。然而,国外一项流行病学调查显示,健康的生活

[收稿日期] 2011-07-30 [接受日期] 2011-10-27
[基金项目] 河北省卫生厅课题(20090338),河北省引进留学人员经费资助项目. Supported by Grant from Health Department of Hebei Province (20090338) and Fund for Recruited Overseas Scholars of Hebei Province.
[作者简介] 苑振云,博士,副主任医师、副教授. E-mail: yuanzy2001@yahoo.com.cn
* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0311-85917005, E-mail: wmw@jyyy.com.cn

方式可能有助于延缓 AD 的发病和进展[1]。最近的研究认为运动训练是缓解 AD 进展的较好的策略[2],运动能抑制转基因 AD 鼠神经细胞死亡[3],降低与 AD 有关的神经病理改变[4]。国内在这方面的报道较少。本研究基于快速老化小鼠(senescene-accelerated mouse prone 8,SAMP8)模型[5],探讨自愿运动对快速老化小鼠海马生长相关蛋白 43(growth-associated protein 43,GAP43)表达的影响,为探讨自愿运动对预防和延缓 AD 发生的研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 *实验动物与分组* 选用雌性 3 个月龄 SAMP8 小鼠 60 只,体质量(21.5±2.3)g。按体质量采用随机数字法将小鼠分为跑笼环境(running cage environment, RCE)组和标准环境(standard environment,SE)组,每组各 30 只,分别在不同的环境中饲养 3 个月。

1.2 *实验试剂及器材* GAP43 引物(上海生工生物工程技术服务有限公司);RT 反应体系试剂及 PCR 反应体系试剂(美国 Promega 公司);兔源 GAP43 多克隆抗体(美国 Chemicon 公司);丙烯酰胺(美国 Biomol 公司);蛋白酶抑制剂(美国 Roche 公司);PVDF 膜(美国 Millipore 公司);四甲基乙二胺(TEMED)及二巯基乙醇(美国 Amresco 公司);溴酚蓝(美国 Sigma 公司);其他试剂均为国产优级纯或分析纯。

SLY-WMS Morris 水迷宫(安徽淮北正华生物仪器有限公司);DYY-Ⅲ-6B 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂);JEDA801E 型凝胶成像分析系统(江苏捷达科技发展有限公司);PTC-200 PCR 热循环仪(美国 MJ Research 公司); Nikon 显微照相机(德国 Nikon 公司);5417R 型离心机、Biophotometer 分光光度计(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 *方法*

1.3.1 *饲养环境* 小鼠跑笼环境:52 cm×37 cm×22 cm 的塑料笼,笼内除垫料外,还备有 2 个塑料跑笼,跑笼直径为 15 cm,有一底座为固定架。小鼠可自愿到塑料跑笼上运动(站立、慢走、快走、慢跑、快跑均可),运动时间及运动方式由小鼠自由掌握,完全不受人为因素的影响。标准环境:52 cm×37 cm×22 cm 的塑料笼,笼内只有垫料。RCE 组小鼠饲养于跑笼环境内,每笼 5 只。SE 组小鼠饲养于标准环境内,每笼 5 只。

1.3.2 *Morris 水迷宫实验* Morris 水迷宫主要由一直径 120 cm、高 50 cm,内含平台的圆形水池和记录装置组成。水池分为 4 个象限:Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ,池内平台直径为 14 cm、高为 20 cm。池内加水至超出平台高度 1~1.5 cm,为避免小鼠看到平台,在水中加入墨水,水温保持在(22±2)℃。计算机自动跟踪计时并记录小鼠游泳轨迹。

定位航行实验:测试时,将平台固定于圆池内第Ⅰ象限,小鼠每日分别从 4 个象限面向池壁放入水中,记录该鼠自入水后至找到平台所需时间(寻找平台潜伏期)。以 4 次潜伏期成绩的平均值为当日最终成绩。如小鼠在 120 s 内未找到平台,则将其引向平台,其潜伏期记为 120 s。每次测试间隔 60 s,连续 4 d。

空间探索实验:第 5 天撤除平台,自第Ⅳ象限作为入水点将小鼠面向池壁放入水中,观察小鼠 120 s 内寻找平台的轨迹,并计算其在第Ⅰ象限及第Ⅳ象限的游泳时间。

1.3.3 *RT-PCR 检测* 水迷宫实验后第 2 天,RCE 组和 SE 组各随机取 10 只小鼠,取出脑组织,迅速分离出两侧海马,提取总 RNA。测定 RNA 浓度,保存于−80℃冰箱内备用。合成 cDNA,保存于−38℃冰箱内备用。β-actin 上游引物:5′-TCA GGA GGA GCA ATG ATC TTG-3′,下游引物:5′-TCC TCC CTG GAG AAG AGC TA-3′;扩增片段长度为 302 bp。GAP43 上游引物:5′-CAG GAA AGA TCC CAA GTC CA-3′,下游引物:5′-GAA CGG AAC ATT GCA CAC AC-3′;扩增片段长度为 206 bp。循环参数:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,54℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,30 个循环扩增后 72℃延伸 5 min。将 GAP43 反应产物和 β-actin 的反应产物进行电泳,二者的比值作为 GAP43 mRNA 的相对表达量。

1.3.4 *免疫印迹分析* 水迷宫实验后第 2 天,RCE 组和 SE 组各随机取 10 只小鼠,取出脑组织,迅速分离出两侧海马,于−80℃保存待用。提取组织总蛋白。凝胶电泳分离蛋白质。然后转膜,结合兔源 GAP43 多克隆抗体。采用 Quantity One 软件进行条带光密度分析,以 GAP43/β-actin 值为 GAP43 表达量的相对值。

1.3.5 *免疫组织化学实验* 水迷宫实验后第 2 天,RCE 组和 SE 组各取剩余 10 只小鼠麻醉,取鼠脑。4%多聚甲醛固定 24 h。常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。连续 5 μm 切片,裱于载玻片上。切片常规脱蜡至水。0.01 mol/L PBS 清洗。0.3%

过氧化氢室温下孵育 20 min。0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)微波炉内修复抗原，98℃维持 20 min，10%山羊血清湿盒内孵育 30 min。加入一抗(兔源 GAP43 多克隆抗体，1∶400)，4℃过夜。0.01 mol/L PBS 清洗。滴加生物素化二抗(1∶100)工作液，37℃温箱湿盒内孵育 30 min。0.01 mol/L PBS 清洗。滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素(1∶100)工作液，37℃温箱湿盒内孵育 30 min。0.01 mol/L PBS 清洗。DAB 显色 2～5 min。自来水冲洗终止显色。封片。在相同光学条件下，对 RCE、SE 组切片进行观察，在 200 倍放大倍数下，每只小鼠连续扫描 5 个视野，统计每个视野中阳性细胞的光密度值，取其平均值。

1.4　统计学处理　结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SAS 8.1 统计软件对数据进行统计分析，两样本均数比较采用 t 检验，检验水平(α)为 0.05。

2　结　果

2.1　Morris 水迷宫实验结果

2.1.1　定位航行实验　RCE 组小鼠在第 1、2、3、4 天寻找平台潜伏期均较 SE 组缩短，差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$，表 1)。

表 1　Morris 水迷宫实验中寻找平台潜伏期的比较

Tab 1　Comparison of average latent periods in Morris water maze test

$n=30$，$\bar{x}\pm s$，t/s

Group	d1	d2	d3	d4
RCE	70.12±4.35**	60.29±6.31**	41.78±6.98*	32.76±8.12*
SE	81.32±6.56	72.05±7.80	45.20±7.65	38.19±5.75

RCE：Running cage environment；SE：Standard environment. * $P<0.05$，** $P<0.01$ vs SE group

2.1.2　空间探索实验　RCE 组小鼠在第Ⅰ象限的游泳时间较 SE 组延长($P<0.01$)，在第Ⅳ象限游泳时间较 SE 组缩短($P<0.05$)，见表 2。RCE 组小鼠轨迹绝大部分位于第Ⅰ象限内；而 SE 组小鼠轨迹部分位于第Ⅰ象限，部分位于第Ⅰ象限两侧的象限内。

表 2　空间探索实验中 SAMP8 小鼠在第Ⅰ象限及第Ⅳ象限游泳时间比较

Tab 2　Comparison of swimming time in the first and fourth quadrant in spatial probe test of SAMP8 mice

$n=30$，$\bar{x}\pm s$，t/s

Group	Quadrant(Ⅰ)	Quadrant(Ⅳ)
RCE	43.66±6.21**	16.77±3.55*
SE	37.53±4.38	20.29±4.86

RCE：Running cage environment；SE：Standard environment. * $P<0.05$，** $P<0.01$ vs SE group

2.2　两组小鼠海马组织 GAP43 的表达

2.2.1　两组小鼠海马组织 GAP43 mRNA 表达　结果(图 1)显示，RCE 组海马 GAP43 mRNA 表达高于 SE 组(0.668 0±0.010 1 vs 0.507 3±0.016 2，$P<0.01$)。

2.2.2　两组小鼠海马组织 GAP43 蛋白表达　结果(图 2)显示，RCE 组海马 GAP43 蛋白表达高于 SE 组(0.827±0.029 vs 0.616±0.036，$P<0.01$)。

2.2.3　两组小鼠海马组织 GAP43 免疫组织化学染色结果　光镜下可见海马组织 GAP43 免疫反应产物为棕黄色环状或点状沉积，在神经元细胞膜表达明显 RCE 组可见较深染的棕黄色环状或点状阳性免疫反应产物在海马大量分布(图 3A、3C)，SE 组阳性免疫反应产物较 RCE 组着色浅、细胞数目少(图 3B、3D)，两组光密度值比较，差异有统计学意义(0.213 5±0.012 3 vs 0.180 9±0.015 2，$P<0.01$)。

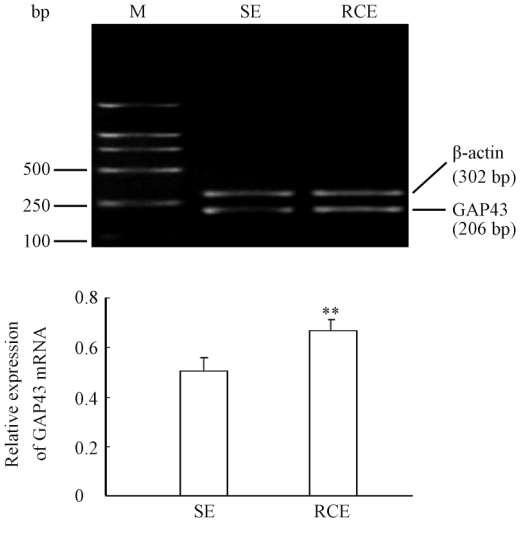

图 1　两组 SAMP8 小鼠海马组织 GAP43 mRNA 表达

Fig 1　Relative expression of GAP43 mRNA in hippocampus of SAMP8 mice in the two groups

RCE：Running cage environment；SE：Standard environment. ** $P<0.01$ vs SE group；$n=10$，$\bar{x}\pm s$

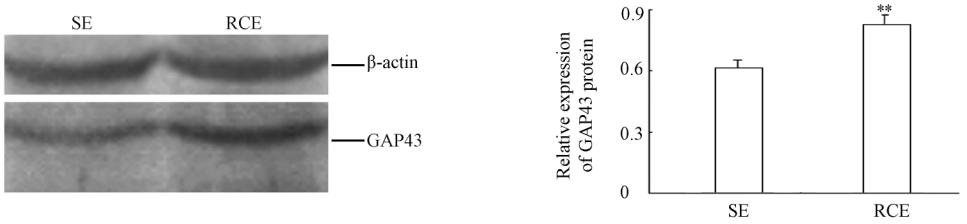

图 2 两组 SAMP8 小鼠海马组织 GAP43 蛋白的表达

Fig 2 Relative expression of GAP43 protein in hippocampus of SAMP8 mice in the two groups

RCE: Running cage environment; SE: Standard environment. ** $P<0.01$ vs SE group; $n=10$, $\bar{x}\pm s$

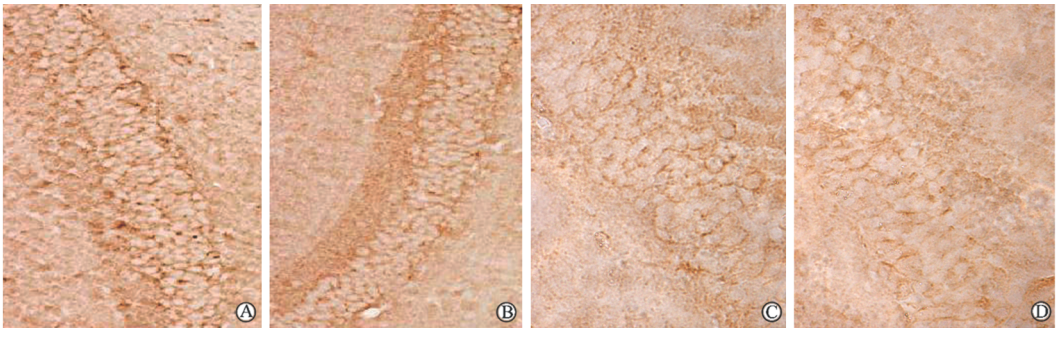

图 3 免疫组织化学观察两组 SAMP8 小鼠海马组织 GAP43 的表达

Fig 3 Expression of GAP43 in hippocampus of SAMP8 mice in the two groups by immunohistochemistry staining

RCE: Running cage environment; SE: Standard environment. A,C: RCE group; B,D: SE group. Original magnification: ×200(A,B), ×400 (C,D)

3 讨 论

AD 是一种多发生在老年,以进行性认知障碍和记忆能力损伤为主要临床症状的神经系统退行性疾病,在临床上尚无有效的治疗方法。有研究认为运动可以防治 AD。运动不仅能降低 AD 发生的危险,而且能延缓 AD 的进程[6]。关于其机制已有一些报道。有报道运动训练可以减少转基因小鼠的 Aβ 斑块沉积[7],或者可以减少转基因小鼠脑内 Aβ1-42/Aβ1-40 的生成比例[8-9]。Leem 等[10]研究结果表明,有氧耐力训练可以抑制转基因小鼠脑内 tau 蛋白的高度磷酸化,防止脑内神经元纤维缠结的产生。

SAMP8 小鼠是由日本京都大学 Takeda 教授精心培育而成的快速老化小鼠,平均寿命约 299 d,在 2 月龄就开始出现学习记忆功能衰退,并随增龄而加重,且显示了许多 AD 早期的特征,如逐渐增加的氧化应激、β 淀粉样蛋白改变、tau 蛋白的磷酸化,是典型的 AD 动物模型。已有学者对自愿运动和强迫运动对 AD 模型鼠的作用做了研究,结果显示自愿运动优于强迫运动[11]。本研究采用 3 个月龄 SAMP8 小鼠给予有跑笼环境和无跑笼的标准环境干预 3 个月,且有跑笼环境小鼠可以自愿运动,均可在跑笼上站立、慢走、快走、慢跑、快跑等,运动时间及运动方式由小鼠自由掌握,完全不受人为因素干扰。实验中我们发现 RCE 组小鼠常常 2 只或 3 只或 4 只结组一起在跑笼上做运动,而 SE 组小鼠却常常挤在一起睡觉。不同环境饲养 3 个月后,用 Morris水迷宫测试小鼠的学习记忆能力,结果发现 RCE 组小鼠寻找平台潜伏期较 SE 组缩短($P<0.01$或 $P<0.05$),在第Ⅰ象限游泳时间比 SE 组延长($P<0.01$),在第Ⅳ象限游泳时间比 SE 组缩短($P<0.05$),搜寻策略优于 SE 组。这反映了 RCE 组小鼠的空间学习记忆能力优于 SE 组。神经系统的发育及其神经元之间信号的转导依赖于脑组织中多种蛋白和酶的作用。GAP43 是与神经发育、轴突再生、突触重建密切相关的一种快速转运膜磷酸蛋白,被认为是神经元发育和再生的一个内在决定因子[12-14]。其广泛分布在神经元内,在轴突生长锥的质膜和突触前末端表达,特别在生长、分化、再生的轴突末端含量极高。GAP43 在海马区的多种细胞有着广泛的表达[15]。我们用 RT-PCR、免疫印迹实

验、免疫组织化学实验对不同环境组小鼠海马组织 GAP43 的表达进行了测试。结果表明不论从基因水平还是蛋白水平，RCE 组小鼠海马组织 GAP43 的表达均高于 SE 组。RCE 组小鼠学习记忆能力高于 SE 组小鼠，其机制可能与运动训练促进海马组织 GAP43 mRNA 及蛋白表达有关。运动训练促使海马组织 GAP43 表达的上调，而 GAP43 位于神经元轴突生长锥质膜，能启动生长锥形成，引导轴突生长，调节轴突形成新的突触联系，从而改善脑功能，预防和延缓痴呆。有报道运动训练可改善血管性痴呆(VD)大鼠学习记忆能力，其机制可能与运动训练能促进皮质区上 GAP43 表达有关[16]。那么自愿运动是否改善 SAMP8 小鼠大脑皮质等部位 GAP43 的表达以及对 GAP43 上游及下游信号因子的影响，我们将作进一步研究。

4　利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] Pope S K, Shue V M, Beck C. Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease? [J]. Annu Rev Public Health, 2003, 24: 111-132.

[2] Hoveida R, Alaei H, Oryan S, Parivar K, Reisi P. Treadmill running improves spatial memory in an animal model of Alzheimer's disease[J]. Behav Brain Res, 2011, 216: 270-274.

[3] Um H S, Kang E B, Koo J H, Kim H T, Jin-Lee, Kim E J, et al. Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. Neurosci Res, 2011, 69: 161-173.

[4] Nation D A, Hong S, Jak A J, Delano-Wood L, Mills P J, Bondi M W. Stress, exercise, and Alzheimer's disease: a neurovascular pathway[J]. Med Hypotheses, 2011, 76: 847-854.

[5] Pallas M, Camins A, Smith M A, Perry G, Lee H G, Casadesus G. From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8) [J]. J Alzheimers Dis, 2008, 15: 615-624.

[6] Scarmeas N, Luchsinger J A, Brickman A M, Cosentino S, Schupf N, Xin-Tang M, et al. Physical activity and Alzheimer disease course[J]. Am J Geriatr Psychiatry, 2011, 19: 471-481.

[7] Cracchiolo J R, Mori T, Nazian S J, Tan J, Potter H, Arendash G W. Enhanced cognitive activity—over and above social or physical activity—is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce Abeta deposition, and increase synaptic immunoreactivity[J]. Neurobio Learn Mem, 2007, 88: 277-294.

[8] Um H S, Kang E B, Leem Y H, Cho I H, Yang C H, Chae K R, 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[J]. Int J Mol Med, 2008, 22: 529-539.

[9] Mirochnic S, Wolf S, Staufenbiel M, Kempermann G. Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease[J]. Hippocampus, 2009, 19: 1008-1018.

[10] Leem Y H, Lim H J, Shim S B, Cho J Y, Kim B S, Han P L. Repression of tau hyperphosphorylation by chronic endurance exercise in aged transgenic mouse model of tauopathies[J]. J Neurosci Res, 2009, 87: 2561-2570.

[11] Yuede C M, Zimmerman S D, Dong H, Kling M J, Bero A W, Holtzman D M, et al. Effects of voluntary and forced exercise on plaque deposition, hippocampal volume, and behavior in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Dis, 2009, 35: 426-432.

[12] Carulli D, Buffo A, Strata P. Reparative mechanisms in the cerebellar cortex [J]. Prog Neurobiol, 2004, 72: 373-398.

[13] Kaneda M, Nagashima M, Nunome T, Muramatsu T, Yamada Y, Kubo M, et al. Changes of phosphor-growth-associated protein 43 (phosphor-GAP43) in the zebrafish retina after optic nerve injury: a long-term observation[J]. Neurosci Res, 2008, 61: 281-288.

[14] Paredes R G, Larriva-Sahd J. Medullary neurons in the core white matter of the olfactory bulb: a new cell type[J]. Cell Tissue Res, 2010, 339: 281-295.

[15] Casoli T, Di Stefano G, Gracciotti N, Giovagnetti S, Fattoretti P, Solazzi M, et al. Cellular distribution of GAP-43 mRNA in hippocampus and cerebellum of adult rat brain by *in situ* RT-PCR[J]. J Histochem Cytochem, 2001, 49: 1195-1196.

[16] 樊振勇，陈丽娜，徐琳峰，纵　亚，胡坚勇，于向华，等. 运动训练对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及大脑皮质区生长相关蛋白-43 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志，2010，25：514-518.

[本文编辑]　周燕娟，孙　岩