

[文章编号] 1000-4718(2009)11-2182-05

心理应激和体力运动对大鼠海马 NE 及其合成酶 TH、代谢酶 MAOA 的影响*

王 静, 马 强[△], 安改红, 陈学伟, 刘洪涛
(军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050)

[摘要] 目的: 本研究通过比较慢性心理应激(以下简称应激)和长期体力运动(以下简称运动)2种过程对大鼠海马去甲肾上腺素(NE)水平及其合成酶酪氨酸羟化酶(TH)和代谢酶单氨氧化酶 A(MAOA)的影响, 探讨体力运动减缓海马应激损伤的相关机制。方法: 动物分别施予自愿跑轮动物模型 4 周和慢性束缚应激模型 3 周后, 高效液相色谱法比较海马 NE 变化; 蛋白免疫印迹法检测 NE 合成酶 TH、代谢酶 MAOA 蛋白表达变化。结果: 与对照组相比, 应激大鼠体重增长缓慢, 糖水偏嗜量明显降低, NE 水平明显降低 [303.46 ± 24.36 ng/g $P < 0.05$], TH、MAOA 蛋白表达升高, 分别为 (1.35 ± 0.94) 倍和 (2.22 ± 0.62) 倍 ($P < 0.05$); 运动组大鼠 NE 水平明显升高 [418.53 ± 70.64 ng/g $P < 0.05$], TH、MAOA 蛋白表达亦升高, 分别为 (1.22 ± 0.59) 倍和 (1.85 ± 0.36) 倍 ($P < 0.05$)。结论: 结果提示 NE 水平变化可能与运动减缓应激性海马损伤的关系密切, NE 水平的改变与 NE 的合成与代谢关系不密切, 可能存在其它机制。

[关键词] 慢性心理应激; 体力运动; 海马; 去甲肾上腺素

[中图分类号] R338.2 **[文献标识码]** A

Comparison of central noradrenaline levels and its TH, MAOA between chronic psychological stress and physical exercise in rats

WANG Jing MA Qiang AN Gai-hong CHEN Xue-wei LIU Hong-tao

(Academy of Military Medical Sciences, Institute of Healthy and Environmental Medicine, Tianjin 300050, China. E-mail: maqingw@sina.com)

[ABSTRACT] **AM:** To investigate the changes of hippocampus noradrenaline levels and its tyrosine hydroxylase (TH), monoamine oxidase A (MAOA) expressions during chronic psychological stress procedure and physical exercise in rats. **METHODS** Male Wistar rats ($n = 24$) were randomly assigned to three conditions: (1) restraint stress (S) at 6 h/d for 3 weeks; (2) 24 h access to activity wheel running (E) for 4 weeks; (3) a sedentary control group (C). Levels of NE were assayed by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Protein expression of TH and MAOA were detected by Western blotting. **RESULTS** Compared to C, weight loss and sucrose consumption rate decrease were induced in S, and NE was lower while TH and MAOA expressions increased significantly. In E group, NE was higher and TH, MAOA increased distinctly. **CONCLUSION:** It is suggested that hippocampus NE level may play an important role in the mechanism on the protection of physical exercise to chronic psychological stress, there is no close connection between NE change and TH, MAOA. Other mechanisms may exist.

[KEY WORDS] Chronic psychological stress; Physical exercise; Hippocampus; Norepinephrine

中枢去甲肾上腺素能系统在情绪和记忆的调节中发挥重要作用^[2], 慢性心理应激可导致情绪和脑认知改变, 中枢海马受损。但慢性心理应激条件下, 中枢 NE 系统如何变化还未明了。运动的健脑功能得到广泛认可, 体力运动具有减缓海马应激性损伤的作用^[3]。但其机制是否涉及改善海马 NE 系统仍

不清楚, 因此, 阐明去甲肾上腺素系统在体力运动对抗应激性海马损伤中的作用意义重大, 为探明运动健脑提供理论依据。本研究首先观察慢性心理应激和体力运动对海马 NE 水平及其合成酶 (tyrosine hydroxylase, TH)、代谢酶 (monoamine oxidase A, MAOA) 的影响, 寻找 NE 系统关键靶位, 为阐明运动

[收稿日期] 2009-01-05 [修回日期] 2009-03-20

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30700389)

△ 通讯作者 Tel: 022-84655196 E-mail: maqingw@sina.com

性 NE 系统改变, 减缓海马应激性损伤的机制奠定基础。

材 料 和 方 法

1 动物与模型

成年 Wistar 雄性大鼠, 清洁级, 体重 200–220 g 由军事医学科学院动物中心提供。动物随机分为 3 组, 每组 8 只: 对照组 (C), 安静环境下静养; 慢性心理应激组 (S), 束缚应激 3 周, 6 h/d 体力运动组 (E), 自愿跑轮运动 4 周。

2 大鼠体重和糖水偏嗜量的测定

实验第 1 d、第 21 d 依次称重。实验第 0 d、第 22 d、第 29 d 进行糖水实验。具体办法: 适应饲养的第 3 d 在安静、隔噪音房间进行糖水饮用训练。每笼同时放置 2 个水瓶, 第 1 个 24 h 2 瓶均装有 1% 蔗糖水, 随后 24 h, 1 瓶蔗糖水, 1 瓶纯水。之后禁食禁水 23 h 后, 给予 60 min 1 瓶 1% 蔗糖水、1 瓶纯水进行动物的基础糖水/纯水消耗实验。实验前 24 h 和实验结束恢复 24 h 各测定 1 次, 记录蔗糖水饮用量和纯水饮用量, 测量蔗糖偏嗜量。蔗糖偏嗜量 (%) = 蔗糖水饮用量 / (蔗糖水饮用量 + 纯水饮用量) × 100%。

3 海马 NE 的测定

模型结束 24 h 后, 大鼠断头处死, 取双侧海马液氮冻存待测。高效液相色谱-电化学检测法测海马 NE 水平。样本称重后超声均浆, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 加 0.1 mol HClO₄ 1 mL, 加入内标准二羟苯甲酸 (DHBA) 20 μL, 进样检测。流动相: 磷酸盐缓冲液, pH = 3.2。

4 脑组织蛋白提取和定量测定

海马称重后置于脑组织蛋白提纯缓冲液中 [20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% PMSE] 低温匀浆, 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 用 BCA 法测蛋白含量并分装, -20 °C 保存, 用于 Western blotting 检测。

5 Western blotting 检测 TH、MAOA 蛋白表达

将提取的脑组织蛋白 (10 μg) 加 2 × SDS 上样缓冲液 (总体积为 10 μL) 经 95 °C 变性 10 min, 上样于 10% SDS 聚丙烯酰胺 (Sigma) 凝胶中电泳 1.5 h, 用半干转膜仪 (北京六一) 将蛋白转到 PVDF 膜 (millipore) 上, 约 60 min。10% 脱脂奶粉溶液于室温封闭 1 h, TBST 漂洗 3 次 × 10 min, 加入兔抗人 TH、MAOA (1:500–1 000, Santa Cruz) 室温 1 h 后 4 °C 过夜, TBST 漂洗 3 次 × 10 min, 加入 HRP-抗兔 IgG (1:20 000, Santa Cruz) 室温孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次

× 10 min, 加 ECL 发光显色剂, 暗室内压片 (Kodak); 用洗脱缓冲液洗 PVDF 膜 30 min。同法显示 HRP 标记的 GAPDH 单克隆抗体 (1:10 000, 上海康成)。

6 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。统计方法采用 *t* 检验。Western blotting 胶片经照相后, 采用 Image-pro-plus 5.0 图像处理分析系统测定照片条带的吸光度值, 并以各蛋白吸光度与同一样品中 GAPDH 吸光度比值作为蛋白的相对含量。

结 果

1 大鼠体重和糖水消耗量的变化

S 组大鼠体重增长缓慢, 21 d 体重增长 (65.75 ± 12.33) g, $P < 0.05$, 糖水消耗率明显降低 47.85% ± 8.68%, $P < 0.05$, 而 E 组与 C 组无差异, 见图 1–4。

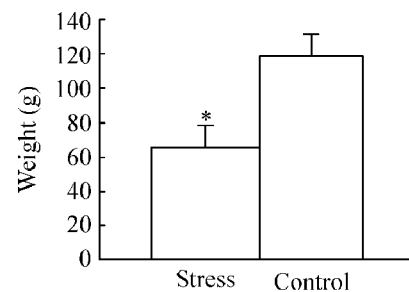


Fig 1 Effect of chronic psychological stress (S) on weight of rats $\bar{x} \pm s$, $n = 8$, * $P < 0.05$ vs control

图 1 慢性心理应激对大鼠体重的影响

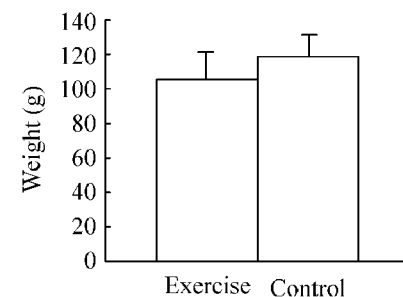


Fig 2 Effect of physical exercise (E) on weight of rats $\bar{x} \pm s$, $n = 8$

图 2 体力运动对大鼠体重的影响

2 大鼠海马 NE 水平的变化

S 组大鼠海马 NE 水平明显降低至 (303.46 ± 24.36) ng/g, $P < 0.05$, 而 E 组大鼠海马 NE 水平显著升高为 (418.53 ± 70.64) ng/g, $P < 0.05$, 见图 5、6。

3 大鼠海马 TH 蛋白表达变化

S 组 TH 蛋白表达升高 (1.35 ± 0.94) 倍, $P < 0.05$, E 组升高 (1.22 ± 0.59) 倍, $P < 0.05$ 。表明慢性应激和体力运动均可引起 TH 的蛋白表达升高, 可能使大脑 NE 合成加速, 见图 7、8。

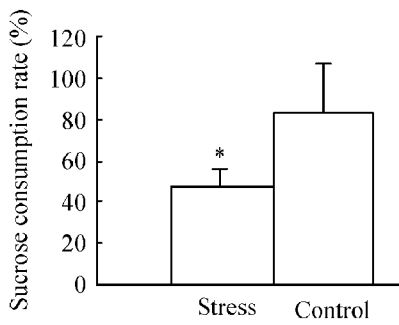


Fig 3 Effect of chronic psychological stress (S) on sucrose consumption rate of rats $\bar{x} \pm s$ $n = 8$ * $P < 0.05$ vs control

图 3 慢性心理应激对大鼠糖水消耗量的影响

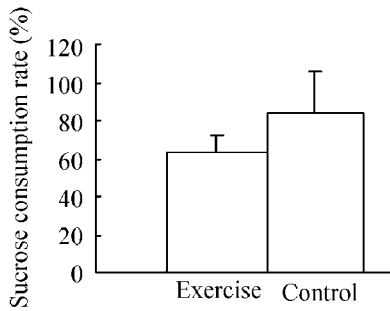


Fig 4 Effect of physical exercise (E) on sucrose consumption rate of rats $\bar{x} \pm s$ $n = 8$

图 4 体力运动对大鼠糖水消耗率的影响

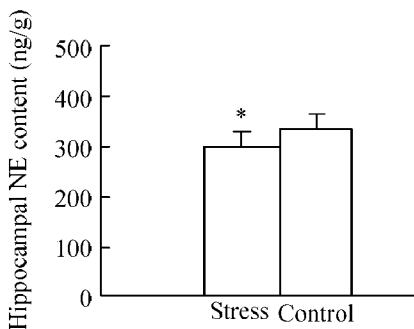


Fig 5 Hippocampus NE contents in chronic psychological stress (S) rats $\bar{x} \pm s$ $n = 8$ * $P < 0.05$ vs control

图 5 慢性心理应激组海马 NE 含量变化

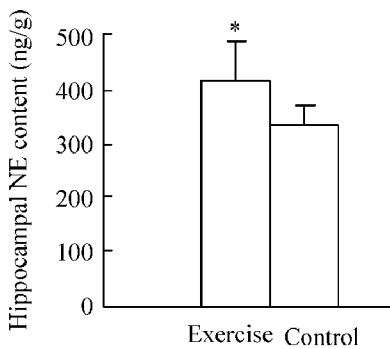


Fig 6 Hippocampus NE contents in physical exercise (E) rats $\bar{x} \pm s$ $n = 8$ * $P < 0.05$ vs control

图 6 体力运动组海马 NE 含量变化

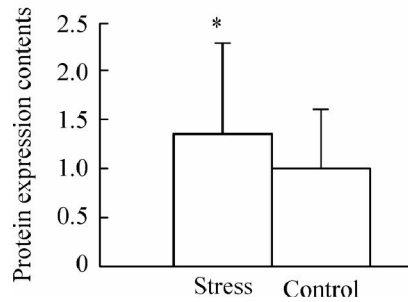
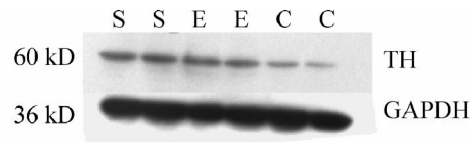


Fig 7 Hippocampal TH expression in chronic psychological stress (S) rats $\bar{x} \pm s$ $n = 8$ * $P < 0.05$ vs control

图 7 慢性心理应激组大鼠海马 TH 表达变化

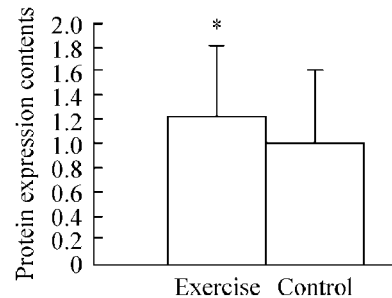


Fig 8 Hippocampal TH expression in physical exercise (E) rats $\bar{x} \pm s$ $n = 8$ * $P < 0.05$ vs control

图 8 体力运动组大鼠海马 TH 表达变化

4 大鼠海马 MAOA 蛋白表达变化

S 组 MAOA 蛋白表达升高 (2.22 ± 0.62) 倍, $P < 0.05$, E 组升高 (1.85 ± 0.36) 倍, $P < 0.05$, 表明慢性应激和体力运动均使 MAOA 表达升高, 大鼠大脑 NE 代谢水平升高, 见图 9、10。

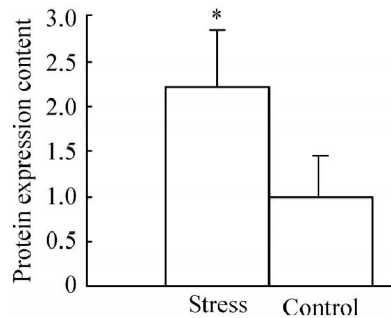
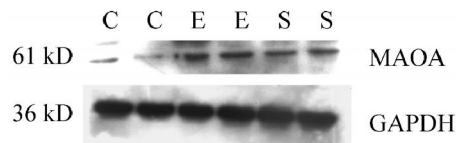


Fig 9 Hippocampal MAOA expression in chronic psychological stress (S) rats $\bar{x} \pm s$ $n = 8$ * $P < 0.05$ vs control

图 9 慢性心理应激组大鼠海马 MAOA 表达变化

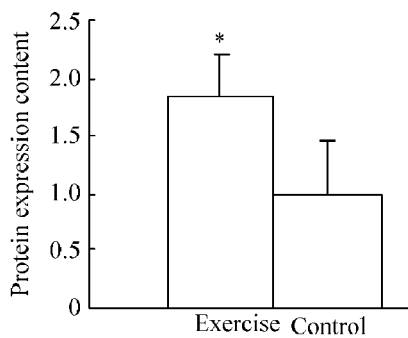


Fig 10 Hippocampal MAOA expression in physical exercise (E) rats $\bar{x} \pm s$ $n = 8$ * $P < 0.05$ vs control

图 10 体力运动组大鼠海马 MAOA 表达变化

讨 论

体力运动具有减缓应激性脑损伤的作用^[4], 研究发现, 数周 (4-8 周) 的自愿跑轮运动可明显减缓随后的慢性心理应激 (3 周) 对大鼠海马 LTP 的损伤, 并维持血浆 GCs 水平正常^[11]。但目前为止, 运动减缓应激性海马损伤作用的相关机理尚不甚清楚, 相关报道较少。NE 是中枢神经系统中的重要神经递质, 参与诸多神经生理过程的调控。NE 系统功能与 NE 神经传递密切相关, 主要体现为 NE 合成、NE 水平、NE 受体数量和受体活性等。但 NE 系统在运动减缓应激性海马损伤中的作用不明; 因此本研究通过比较慢性心理应激和长期自愿体力运动 2 种过程对大鼠海马去甲肾上腺素水平及其合成酶 TH 和代谢酶 MAOA 的影响, 为研究体力运动减缓海马应激损伤的机制奠定基础。

本研究结果表明, 慢性心理应激组大鼠海马 NE 水平明显降低而运动组大鼠 NE 水平显著升高。提示运动有升高海马 NE 水平的作用, 从而可能减缓应激对海马的损伤。Xu 等^[5]报道, 在长期不可预知的刺激导致慢性心理应激模型中, NE 水平明显降低。Nowakowska 等^[6]报道, 21 d 慢性应激后, 海马 NE 水平降低。而在脑室直接应用低剂量 NE 可延长 LTP, 增强突触可塑性^[7]。另外, Waters 等^[8]研究蜥蜴束缚应激和强迫运动对中枢儿茶酚胺类神经递质的影响时发现, 束缚应激组海马 NE 明显降低, 而运动后可使 NE 水平翻转至对照组水平, 表明束缚应激对海马 NE 水平影响迅速, 即使运动至力竭状态也会减缓应激对 NE 的影响。Ma 等^[9]亦报道束缚应激后海马 NE 水平降低, 而体力运动组大鼠 NE 水平升高明显。以上报道支持本实验结果, 提示运动后海马 NE 水平升高, 可能是运动减缓海马应激性损伤的基础。

酪氨酸羟化酶 TH 专一性强, 活性较低, 在 NE 的合成过程中成为一个限速因子, 而单氨氧化酶

MAOA 主要存在于交感神经末梢, 作用于 NE 和 5-HT, 因此, 本实验主要分析这 2 种酶的表达变化, 以探讨 NE 水平变化的上游调节机制。本研究结果显示, TH、MAOA 蛋白表达应激组均升高 ($P < 0.05$); 而运动组也均升高 ($P < 0.05$)。表明慢性心理应激和体力运动可引起 NE 的合成增加, 代谢也增加。神经冲动到来时引起 TH 活性增加, 使 NE 合成加速^[10]。但文献关于应激或运动状态下脑 TH 蛋白表达如何变化仍不明了。Droste 等^[11]在自愿运动对大鼠 HPA 轴的影响中发现, TH 选择性地在大鼠肾上腺髓质 mRNA 表达升高, 而 O'Neala 等^[12]报道大鼠跑台运动训练后对大鼠脑蓝斑核 TH mRNA 无明显影响, 是促生长激素神经肽 (prepro-galanin GAL) GAL 在脑去甲肾上腺素系统对运动的适应过程中起到神经调节作用。本研究结果提示, 从蛋白表达水平可能不能充分反映出运动和应激对 NE 相关酶的真正影响, 还需要对酶的活性做进一步测量。

关于 MAOA 在应激和运动状态下的表达文献报导不尽相同。阿尔海默氏病人受损脑区的 MAOAmRNA 表达明显升高, MAOA 活性升高^[13], 反复经历社会失败应激模型的大鼠缝核 MAOAmRNA 表达水平升高^[14]。而 Avgustinovich 等^[15]却有相反报道: 在社会失败的慢性心理应激中, 大鼠海马 MAOA 活性降低。本研究应激组 MAOA 蛋白表达升高, 这可能与不同的慢性应激模型有关, 并且 NE 系统的调节作用随脑区变化而不同。在运动模型中, Morishimal 等^[16]报道 SPORT 模型的大鼠, 海马 MAOAmRNA 表达与对照组比无明显变化, 但海马 MAOA 活性受损, 蛋白表达降低, 并认为 MAOA 活性减退可能与该模型动物的高跑轮能力的启动有关。SPORT 模型是 Morishimal 等^[16]建立的一系 Wistar 大鼠, 具有很高的跑轮运动能力。本研究结果与此不同可能因为所选大鼠不同, 运动模型不一致所致。

总之, 结果提示, NE 水平变化可能在运动性 NE 系统的改变对抗应激性海马损伤的作用中发挥重要作用。TH 与 MAOA 的变化趋势表明 2 种过程均使海马 NE 合成增强, 且失活也增强, 但从蛋白表达水平可能不能充分反映出运动和应激对 NE 相关酶的真正影响, 并且由于 NE 释放后生理作用的消失主要由于重摄取^[10], 因此 NE 水平的改变与 NE 的合成与代谢关系不密切, 是否在 NE 受体或重摄取方面存在其它机制, 有待进一步研究。

(致谢: 感谢研究室安改红博士、陈学伟博士的辛勤工作, 感谢马强副研究员、刘洪涛研究员对本研究的指导。感谢所有给予帮助的同事们!)

[参 考 文 献]

- [1] 马 强, 王 静, 刘洪涛, 等. 体力运动减缓慢性应激对海马的损伤作用 [J]. 生理学报, 2002, 54(5): 427 - 430
- [2] 余善法, 姚三巧, 丁 辉, 等. 抑郁症状与职业紧张的关系 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24(3): 129 - 133
- [3] Hu H, Real E, Takamiya K, et al. Emotion enhances learning via norepinephrine regulation of AMPA - receptor trafficking [J]. Cell, 2007, 131(1): 160 - 173
- [4] Laura E, Dick S, Paul L, et al. Exercise, cognition and Alzheimer's disease. More is not necessarily better [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2006, 30(4): 562 - 575
- [5] Xu SF, Zhuang LX, Tang CZ, et al. Effects of acupuncture and embedding thread on central monoamine neurotransmitters in the depression model rat [J]. Zhongguo Zhen Jiu, 2007, 27(6): 435 - 437.
- [6] Nowakowska E, Chodera A, Kus K, et al. Reversal of stress - induced memory changes by moclobemide: the role of neurotransmitters [J]. Pol J Pharmacol, 2001, 53(3): 227 - 233
- ocampal norepinephrine and serotonin levels under physical exercise and psychological stress [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(8): 1549 - 1552
- [10] 韩济生. 神经科学原理 [M]. 第 2 版. 北京: 北京医科大学出版社, 1999, 458
- [11] Droste SK, Chandramohan Y, Hill LE, et al. Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic - pituitary - adrenocortical axis mainly at the adrenal level [J]. Neuroendocrinology, 2007, 86(1): 26 - 37.
- [12] O'Neala HA, Van Hoomissen JD, Holmes PV, et al. Prepro - galanin messenger RNA levels are increased in rat locus coeruleus after treadmill exercise training [J]. Neurosci Lett, 2001, 299(1 - 2): 69 - 72
- [13] Emilsson L, Saetre P, Balciuniene J, et al. Increased monoamine oxidase messenger RNA expression levels in frontal cortex of Alzheimer's disease patients [J]. Neurosci Lett, 2002, 326(1): 56 - 60
- [14] Filipenko ML, Beilina AG, Alekseyenko OV, et al. Repeated experience of social defeats increases serotonin transporter and monoamine oxidase A mRNA levels in raphe nuclei of male mice [J]. Neurosci Lett, 2002, 321(1 - 2): 25 - 28