

不同负荷运动对学习记忆障碍小鼠脑内自由基的影响

刘新霞 赵燕燕 陈春生 田芳露 崔彦龙 仇鹏

【摘要】目的 研究不同负荷运动对学习记忆障碍小鼠脑内自由基的影响。**方法** 取昆明种小鼠 60 只,将其分为 6 组:空白对照组、模型对照组、尼莫地平组、高负荷运动组、中负荷运动组及低负荷运动组。采取被动跑转笼方式对高、中、低负荷运动组小鼠进行运动训练。实验进行第 6 周时各组小鼠均腹腔注射亚硝酸钠制作学习记忆障碍模型,空白对照组则同期腹腔注射等量生理盐水。尼莫地平组小鼠从实验第 5 周开始给予尼莫地平药物治疗,直至整个实验结束。于实验进行第 8 周时采用分光光度计检测各组小鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量。**结果** 与模型对照组比较,尼莫地平组小鼠 SOD 活性显著升高($P < 0.05$),MDA 含量有降低趋势,但组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。高、中、低负荷运动组小鼠 SOD 活性均较模型对照组显著增强($P < 0.01$),MDA 含量均较模型对照组显著降低($P < 0.05$),且上述影响与运动负荷间无明显依赖关系。**结论** 高、中、低负荷运动均能显著增强学习记忆障碍小鼠脑内 SOD 活性,降低 MDA 含量,提高脑内自由基清除能力。

【关键词】 运动量; 学习记忆; 自由基; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

The effects exercise load on free radicals in the brains of mice with memory disorders LIU Xin-xia*, ZHAO Yan-yan, CHEN Chun-sheng, TIAN Fang-lu, CUI Yan-long, QIU Peng. * Medical Department of Hebei University, Baoding 071000, China

Corresponding author: ZHAO Yan-yan, Email: zhaoyany606@tom.com

【Abstract】 Objective To study the effects of different exercise loadings on free radicals in the brains of mice with memory disorders. **Methods** Sixty mice were, at random, divided into a control group, a model group, a nimodipine group, a group with a high load of exercise, a group with a moderate load of exercise and a group with a low load of exercise. The three exercise groups trained to run on a wheel. In the 6th week of the experiment, all the groups were injected with sodium nitrite in the abdominal cavity to model mice with memory disorders, except the control group which was injected with the same amount of sodium chloride. From the 5th week, the nimodipine group was treated with $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of nimodipine once daily until the end of the experiment. In the 8th week, the superoxide dismutase (SOD) activity and the malonic aldehyde (MDA) content in the brain tissue of mice in each group were measured with a spectrophotometer. **Results** Compared with the model contrast group, SOD activity in the nimodipine group was significantly elevated. MDA content had a tendency to decrease, but the differences among the groups were not statistically significant. SOD activity and MDA levels in the three exercise groups increased significantly. There was no significant dependence of any of these effects on the exercise load. **Conclusions** Any loading of exercise can significantly enhance SOD activity in the brains of mice with memory disorders, lower the level of MDA and elevate the ability to clean up free radicals.

【Key words】 Exercise loading; Memory; Free radicals; Superoxide dismutase; Malonic aldehyde

随着当前社会人口日渐老龄化,老年痴呆发病率

呈逐年上升趋势。老年痴呆的核心症状是记忆力、认知力障碍,不仅影响患者生活质量,而且给其家庭及社会带来沉重负担。由于目前老年痴呆发病机制尚未完全阐明,故临床缺乏有效防治手段。有研究报道称,适宜运动锻炼能增强机体免疫功能、延缓衰老^[1]、促进脑缺血后学习记忆功能恢复^[2],其作用机制可能与增强胆碱能神经功能^[3]、提高相关营养因子表达^[4]等有关。本研究通过观察不同负荷运动对学习记忆障碍小鼠脑内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及丙二醛(malondi aldehyde, MDA)含量的影响,为

DOI:10.3760/ema.j.issn.0254-1424.2010.02.002

基金项目:河北省教育厅资助项目(2009315);河北省卫生厅资助项目(20090570);河北省中医药管理局资助项目(05015,2008072);保定市科技局科学研究与发展计划项目(09ZF010);2008年河北大学大学生创新性试验计划项目(STCP08024);河北大学医学部科研基金项目(青年项目2007Q01)

作者单位:071000 保定,河北大学医学部(刘新霞、田芳露、崔彦龙、仇鹏),医学实验中心(赵燕燕),化学与环境科学学院(赵燕燕、陈春生)

通信作者:赵燕燕, Email: zhaoyany606@tom.com

寻找改善学习记忆障碍的适宜运动方式及运动量提供参考资料。现报道如下。

材料与方 法

一、主要实验试剂及仪器

主要实验试剂包括:尼莫地平(天津市中央药业有限公司,批号:070506)、亚硝酸钠(北京双环试剂厂,批号:20070406)、SOD/MDA 试剂盒(南京建成生物技术研究所,批号:20080111/20080112)。主要实验仪器包括:X-15R 型低温离心机(美国贝克曼有限公司)、UV-2550PC 型紫外分光光度计(日本岛津公司)、BS244S 型电子分析天平(德国赛多利斯公司)等。

二、实验动物及分组

取昆明种实验小鼠 60 只,体重 18~22 g,雌雄各半,由河北省实验动物中心提供,动物合格证号:DK0704-128。采用随机数字表法将小鼠分为 6 组,即空白对照组、模型对照组、尼莫地平组、高负荷运动组、中负荷运动组及低负荷运动组,每组 10 只。

三、运动干预

本研究所用转笼装置系河北大学医学实验中心自制,转笼直径 17 cm,由电机带动转笼转动(9 转/min),分别将高、中、低负荷运动组小鼠置于转笼内,让其进行被动跑笼运动,其中高负荷运动组小鼠第 1 天跑 30 min,以后则每天增加 20 min,直至每天跑 2 h;中负荷运动组小鼠第 1 天跑 20 min,以后则每天增加 15 min,直至每天跑 80 min;低负荷运动组小鼠第 1 天跑 10 min,以后则每天增加 10 min,直至每天跑 40 min^[5]。上述各组小鼠每周训练 5 d,周 4 及周日休息。空白对照组、模型对照组及尼莫地平组小鼠每次也于相同时间段置于转笼中,但期间转笼不转动。所有小鼠运动训练均在暗周期(6 pm 至 10 pm)内完成。

四、学习记忆障碍小鼠模型制作

于实验进行第 6 周后,除空白对照组腹腔注射相应剂量生理盐水外,其余各组小鼠于每天跑转笼训练结束后,按 125 mg/kg 体重腹腔注射亚硝酸钠,每天 1 次,连续注射 4 d,如实验小鼠符合文献[6]中关于学习记忆障碍模型的判定标准,则提示学习记忆障碍模型制作成功。尼莫地平组小鼠于实验进行第 5 周时采用灌胃方式给予尼莫地平(30 mg/kg 体重),每天 1 次,直至整个实验结束。

五、小鼠脑组织 SOD 活性及 MDA 含量测定

各组小鼠于实验进行第 8 周后断头取脑,分离脑组织,用预冷生理盐水冲洗脑组织表面血液,然后用滤纸拭干,称重后按 1 g 脑组织注入 9 ml 生理盐水(4℃)的比例制作脑组织匀浆,以 3000 转/min(4℃)离心 15 min,取上清液 30 μl,严格按照 SOD 试剂盒说

明书进行操作,置于分光光度计下检测 550 nm 处各组小鼠脑匀浆吸光度值,并按照 SOD 试剂盒说明书计算 SOD 活性^[7-8]。另取上述脑组织匀浆上清液 200 μl,严格按照 MDA 试剂盒说明书进行操作,置于分光光度计下检测 532 nm 处各组小鼠脑匀浆吸光度值,并按照 MDA 试剂盒说明书计算 MDA 含量^[7]。

六、统计学分析

本研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 版统计学软件包进行分析,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

尼莫地平及不同负荷运动训练对学习记忆障碍小鼠脑组织中 SOD 活性及 MDA 含量的影响详见表 1,表中数据显示,与空白对照组比较,模型对照组小鼠脑组织中 SOD 活性显著降低($P < 0.01$),MDA 含量明显升高($P < 0.01$);与模型对照组比较,尼莫地平组小鼠 SOD 活性显著升高($P < 0.05$),MDA 含量有下降趋势,但组间差异无统计学意义($P > 0.05$);高、中、低负荷运动组小鼠脑组织中 SOD 活性均较模型对照组显著升高($P < 0.01$ 或 0.001),MDA 含量均较模型对照组显著降低($P < 0.05$ 或 0.01),进一步分析发现,运动训练对学习记忆障碍小鼠脑组织中 SOD 活性及 MDA 含量的影响与运动负荷间无明显依赖关系。

表 1 各组小鼠脑组织中 SOD 活性及 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	只 数	SOD 活性 (U/ml)	MDA 含量 (nmol/mg)
空白对照组	10	95.3 ± 24.2	28.5 ± 5.8
模型对照组	10	37.4 ± 9.1 ^a	47.9 ± 3.2 ^a
尼莫地平组	10	86.4 ± 32.6 ^b	39.6 ± 12.9
高负荷运动组	10	83.1 ± 16.1 ^c	29.9 ± 8.1 ^b
中负荷运动组	10	81.4 ± 22.2 ^c	27.0 ± 5.3 ^c
低负荷运动组	10	94.6 ± 14.1 ^c	26.0 ± 2.5 ^c

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型对照组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

讨 论

老年性记忆功能障碍的主要临床表现为近期或远期记忆、认知、语言、行为障碍以及人格改变。从病理学方面分析,临床常见的老年痴呆类型主要有 4 种,包括:①阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD);②血管性痴呆(vascular dementia, VD);③同时具有 AD、VD 特征的混合性痴呆;④由其它原因引起的痴呆,如帕金森病、脑外伤等^[9]。AD 及 VD 是临床上最常见的老年痴呆类型。近年来研究表明,这两种痴呆均与脑缺血、缺氧有关^[10]。一次性腹腔注射亚硝酸钠(按每 kg 体重注射 120 mg)是制作学习、记忆功能障碍小鼠模型

的常用方法^[6]。大量亚硝酸钠进入机体后,使正常血红蛋白变为高铁血红蛋白,失去携氧功能,从而引起机体脑组织缺氧^[11]。本研究通过观察各实验小鼠注射亚硝酸钠后的表现,如眼神暗淡无光、毛发稀疏且无光泽等,提示学习、记忆障碍小鼠模型制作成功。

目前临床尚无明确干预手段可以全面治疗老年痴呆,常用药物包括改善脑循环制剂、脑代谢激活剂、脑保护药物等。如尼莫地平可选择性改善脑循环、增加脑血流,有效调节细胞内钙离子浓度,促进脑细胞功能恢复,对 VD 及 AD 患者记忆功能改善均有一定疗效,为临床治疗老年痴呆的常用药物。运动锻炼作为抗衰老的重要手段之一,其临床应用已有 100 多年历史。大量研究表明,合理运动锻炼能够促进机体新陈代谢、增强活力、改善心血管功能、提高学习记忆能力^[12,13]。目前国内、外基础研究多选用小鼠或大鼠作为运动训练对象,其运动训练方式主要包括:①平板跑台运动(treadmill running);②游泳运动(swimming);③跑转笼运动等,其中被动跑转笼训练不但可避免平板跑台运动造成的应激反应,而且还与人类的跑步动作类似,故本研究选用被动跑转笼方式对实验小鼠进行运动训练,同时参照陈运才等^[14]研究结果确定各运动组小鼠最终运动负荷。

自由基是具有未配对电子的原子、原子团、分子或特殊状态的大分子物质。自由基与多不饱和脂肪酸形成脂质过氧化物,其分子中含有较强过氧键,易断裂成自由基,同时可代谢生成 MDA。MDA 及自由基可诱发机体生物膜损伤,使 DNA 发生突变、交联、单链断裂等结构及功能改变,从而影响生物信息传递、转录及复制,导致蛋白质合成能力下降或错误蛋白质合成,是老年痴呆的重要发病机制之一^[15]。机体中自由基清除系统包括 SOD、过氧化氢酶(Catalase)、谷胱甘肽及谷胱甘肽过氧化物酶、维生素 E 等。脑组织中抗过氧化物酶(如 Catalase 和谷胱甘肽过氧化物酶)含量通常较低,SOD 能清除超氧阴离子自由基,抑制脂质过氧化反应,保护细胞免受损伤,故通过检测 SOD 水平可在一定程度上反映机体清除自由基的能力。MDA 是脂质过氧化过程中的终末产物,性质较稳定,其含量可反映机体脂质过氧化水平,同时也能间接反映自由基对机体生物膜的损伤程度。

本研究结果表明,与空白对照组比较,模型对照组小鼠脑组织中 SOD 活性显著降低($P < 0.01$),MDA 含量明显升高($P < 0.01$),表明大量亚硝酸钠进入机体后,引起机体组织缺氧,诱发自由基生成增多,提示学习、记忆障碍小鼠模型制作成功。尼莫地平组小鼠脑组织中 SOD 活性显著升高($P < 0.05$),MDA 含量有降

低趋势($P > 0.05$),提示尼莫地平对机体自由基具有一定清除能力。高、中、低负荷运动组小鼠脑组织中 SOD 活性均较模型对照组显著增强($P < 0.01$),MDA 含量均较模型对照组明显降低($P < 0.05$ 或 0.01),表明高、中、低负荷运动均能较好地清除脑内自由基,且疗效明显优于尼莫地平药物治疗,提示通过运动锻炼既能有效增强脑内自由基清除能力、预防老年痴呆,还可避免因长期服药引发的不良反应。另外本研究结果还发现,运动锻炼清除脑内自由基的能力与运动负荷间无明显依赖关系,即低负荷运动与高负荷运动对小鼠脑内自由基的清除能力相当,故本研究建议老年人群采用低负荷量运动锻炼(如慢跑或散步等)以提高脑内自由基清除功能,从而预防老年痴呆发生。

参 考 文 献

- [1] 邵邻相,巩菊芳,洪华婧. 急性游泳后小鼠学习记忆和自由基反应的动态观察. 中国运动医学杂志,2002,21:613-616.
- [2] 高谦,吴宗耀,姚志彬,等. 运动训练促进小鼠脑局灶缺血后功能恢复. 中华物理医学与康复杂志,2000,22:273-275.
- [3] Danielle H, Henry L, Jaehoon C, et al. Exercise reverses chronic stress-induced Bax oligomer formation in the cerebral cortex. Neurosci Lett,2008,438:290-294.
- [4] 蒙兰青,廖维靖,杨万同,等. 运动训练对大鼠脑缺血再灌注后功能恢复及 VEGF 表达的影响. 中国康复医学杂志,2006,21:197-199.
- [5] 刘新霞,赵燕燕,陈春生,等. 不同运动量对小鼠微循环及耐缺氧能力的影响. 中国康复医学杂志,2008,23:786-788.
- [6] Morris R. Developments of watermaze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods,1984,11:47-60.
- [7] 刘新霞,纪雪飞,陆玲玲,等. 文冠果果壳乙醇提取物对学习记忆障碍的改善作用. 中药新药与临床药理,2007,18:23-25.
- [8] 杜厚伟,刘楠,陈荣华,等. 康复训练对脑缺血大鼠神经功能恢复和脑组织中白介素-10 含量变化的影响. 中华物理医学与康复杂志,2006,28:149-152.
- [9] 张娟,张建英,董圣山,等. 阿尔茨海默病的治疗药物应用现状. 中西医结合心脑血管病杂志,2005,3:343-344.
- [10] Berislav V, Zlokovic H. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. Trends in Neurosci,2005,28:202-208.
- [11] 侯悦,吴春福,何祥,等. 氟哌啶醇对小鼠在避暗实验中学习记忆获得、巩固和再现过程的影响. 中国临床康复,2006,10:99-102.
- [12] 茹杰. 运动与原发高血压. 中国临床康复,2003,21:30-32.
- [13] 陈一飞,徐维. 运动性疲劳的发生机制与高压氧的应用. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:187-190.
- [14] 陈运才,姚志彬,顾耀铭,等. 长期运动对小鼠运动功能年龄变化的影响. 中国运动医学杂志,1996,15:2-6.
- [15] 何明大,刘石梅,苏南湘. 脑心通胶囊对拟血管性痴呆大鼠学习记忆及抗氧化作用的影响. 中西医结合心脑血管病杂志,2006,4:315-317.

(修回日期:2009-06-20)

(本文编辑:易浩)