

运动干预对脑缺血再灌注大鼠学习记忆的影响及机制

杨子欣¹, 王艳红², 凌小妹², 宋艳丽², 苏晓云³, 贺继平³

(1.黑龙江护理高等专科学校 临床医学系, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2.中北大学 体育学院, 山西 太原 030051; 3.山西医科大学 汾阳学院护理系, 山西 汾阳 032200)

摘要: **目的** 本研究主要通过测量 4 周跑台运动干预对脑缺血再灌注(CI/R)大鼠脑梗死体积、海马组织炎症因子和海马 CA1 区突触素相关蛋白表达的影响, 探讨跑台运动干预改善 CI/R 大鼠认知功能的可能机制。 **方法** 40 只 SD 雄性大鼠进行脑缺血再灌注(CI/R)造模, 造模前 CI/R 运动组大鼠进行 4 周递增负荷跑台运动。CI/R 72 h 后, 评估所有大鼠学习记忆能力, 测量大鼠脑梗死体积百分比、海马 TNF- α 、IL-6 水平及海马 CA1 区 SYN 及 PSD-95 的表达。 **结果** 1) 与假手术组比较, CI/R 模型组大鼠水迷宫实验中逃避潜伏期显著增加, 穿越平台次数显著下降; 脑梗死体积% 及海马组织中 IL-6、TNF- α 水平显著增加, 海马 CA1 区 SYN 及 PSD-95 平均光密度值(MOD)显著下降。 2) 4 周跑台运动干预可显著改善 CI/R 大鼠学习记忆能力、脑梗死体积% 及海马组织中 TNF- α 水平显著减少, 海马 CA1 区 SYN 及 PSD-95 MOD 显著增加。 **结论** 跑台运动干预可通过减轻海马神经炎症反应、减少脑梗死体积、增加突触相关蛋白表达, 从而预防 CI/R 后的记忆缺陷, 被认为是预防脑缺血性损伤的有效策略。

关键词: 跑台运动干预; 脑缺血再灌注; 学习记忆; 海马炎症因子; 突触素表达

中图分类号: G804.7 文献标识码: A 文章编号: 1003-983X(2024)03-0100-07

Effects of Exercise Preintervention on Learning and Memory and Synaptic Proteins Expression in Hippocampus CA1 of the Cerebral Ischemia Reperfusion Rats

YANG Zixin¹, WANG Yanhong², LING Xiaomei², SONG Yanli², SU Xiaoyun³, HE Jiping³

(1.Department of Clinical Medicine, Heilongjiang Nursing College, Haerbin Heilongjiang, 150086; 2. Physical Education Institute, North University of China, Taiyuan Shanxi, 030051; 3. Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang Shanxi, 032299)

Abstract: **Objective** The aim of the present study was to explore the possible mechanism of 4 weeks treadmill exercise preintervention in improving cognitive function of cerebral ischemia reperfusion (CI/R) rats by measuring the cerebral infarction volume, hippocampus inflammatory biomarkers levels and the synaptic proteins expression in hippocampus CA1. **Methods** 40 SD male rats were modeled for CI/R and the CI/R exercise group rats were subjected to 4 weeks of incremental load treadmill exercise before modeling. After 72 h of CI/R, the learning and memory ability of rats were evaluated, the cerebral infarction volume%, the level of TNF- α , IL-6 in hippocampus and the expression of SYN and PSD-95 in hippocampal CA1 region were measured. **Results** 1) Compared with the sham operation group, the escape latency significantly increased and the number of crossing the platform significantly decreased in the morris water mazet test; cerebral infarction volume% and the level of IL-6 and TNF- α in hippocampus significantly increased, while the MOD of SYN and PSD-95 in hippocampus CA1 significantly decreased. 2) The 4-week treadmill exercise preintervention can significantly improve the learning and memory ability of CI/R rats, the cerebral infarction volume% and the TNF- α level in hippocampus significantly decreased; the MOD of SYN and PSD-95 had a significant up-regulation in hippocampus CA1 region in CI/R exercise group rats when compared with the CI/R model group. **Conclusion** Treadmill exercise preintervention might prevent memory deficits after CI/R through reducing hippocampal neuroinflammatory response, reducing cerebral infarction volume and increasing the synaptic associated protein expression in hippocampal CA1, which is considered to be an effective strategy to prevent ischemic injury.

Keywords: exercise preintervention; cerebral ischemia reperfusion; learning and memory; hippocampal inflammatory cytokines; synaptophysin expression

收稿日期: 2023-11-22

基金项目: 山西省自然科学基金项目(20210302123060)。

第一作者简介: 杨子欣(2000~), 女, 山西太原人, 助理医师, 研究方向: 临床医学。

通讯作者简介: 苏晓云(1982~), 女, 山西运城人, 硕士, 副教授, 研究方向: 运动与健康, E-mail: 1666485669@qq.com。

缺血性脑损伤或缺血性中风是世界范围内死亡和致残的主要原因^[1]。由于脑组织在脑缺血发生后的几分钟内发生细胞

死亡,因此闭塞血管的快速血运重建和及时再灌注被认为是脑缺血损伤治疗的最有效方法之一,可最大限度地减少脑组织损伤,减少梗死面积,从而降低患者的发病率和死亡率^[2]。然而矛盾的是,血供恢复后的再灌注也会进一步加重脑组织的损伤,导致更严重的神经损伤和脑功能障碍,称为脑缺血—再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion, CI/R),常引起迟发性神经元损伤及认知功能障碍,严重影响卒中患者的生活质量,给社会和家庭带来沉重的经济压力^[3]。因此,预防和控制 CI/R 损伤的发生和发展具有重要意义。

CI/R 损伤是一个涉及多种因素的复杂病理生理事件,可促进细胞因子、趋化因子和 ROS 的释放,激活各种细胞死亡程序,如炎症、凋亡或自噬等^[4]。其中,神经炎症被认为是 CI/R 损伤的关键因素^[5]。有研究表明,核因子 κ B 可通过调控脑缺血相关靶基因的转录表达及其他通路的活性,增加脑组织促炎因子如白细胞介素 1β (interleukin 1β , IL- 1β) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的释放,加重脑损伤^[6]。海马体作为边缘系统的一部分,在长期记忆的形成中起着关键作用。研究表明,海马是对 CI/R 损伤最敏感的大脑区域之一,尤其是海马 CA1 区锥体神经元更容易受到缺血性损伤^[7]。研究认为,脑卒中后认知功能的缺陷与海马体的突触异常有关。突触相关蛋白,特别是突触前蛋白突触素(synaptophysin, SYN) 和突触后密度蛋白 95 (postsynaptic density protein-95, PSD-95) 分别在突触可塑性和认知功能中发挥重要作用^[8],而 SYN 和 PSD-95 的缺失与神经退行性疾病如阿尔茨海默病和衰老的认知能力下降相关^[9]。此外, Liu 等^[10]研究发现,小胶质细胞激活引起的神经炎症可导致神经元丢失和突触功能障碍。因此可以认为,CI/R 损伤导致的认知功能受损可能与海马神经炎症反应增强及突触功能障碍有关。

研究表明,体育锻炼作为一种有效的预处理因素,被认为可以预防缺血性卒中的发生,可有效诱导脑缺血耐受,从而减少 CI/R 损伤,改善患者预后^[11]。动物实验证实,4 周跑台运动可通过增强梗死区 SYN 及 PSD-95 表达改善脑卒中小鼠运动功能和短期记忆^[12]。并且 Zhu 等^[13]研究发现,3 周运动干预可通过调控 NF- κ B 炎症信号通路改善脑 CI/R 诱导的神经功能缺损,减少梗死体积,发挥神经保护作用。基于上述文献可知,运动干预可能通过抗炎途径及增加突触相关蛋白的表达减轻 CI/R 大鼠的脑组织损伤。因此,本研究对 CI/R 大鼠进行 4 周中等强度有氧运动干预,通过测量 CI/R 大鼠脑梗死体积及海马炎症因子(TNF- α 及 IL-6 水平)和海马 CA1 区 SYN 及 PSD-95 表达的变化,从分子学角度进一步探讨运动预处理对 CI/R 大鼠脑损伤保护的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

47 只 SPF 及雄性 SD 大鼠(220~230g),购自山西医科大学实验动物中心,实验室饲养环境(室温 $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $55\%\pm 5\%$,12 h/12 h 光—暗循环,允许自由获得食物和水)。适应实验室环境 1 周后,将 47 只大鼠随机分为 3 组:假手术组(sham group, $n=13$)、CI/R 模型组(CI/R model group, $n=18$,最后剩余 14 只)及 CI/R 运动组(CI/R exercise group, CI/R+EX; $n=16$,最后剩余 13 只)。所有动物程序均按照实验室动物护理

和使用指南进行操作。

1.2 试剂和仪器

IL-6 及 TNF- α 试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司;兔抗大鼠 SYN 及 PSD-95 一抗、SABC 免疫组化试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)试剂购于美国 Sigma 公司;水合氯醛购于天津市凯通化学试剂有限公司。动物实验跑台购于成都泰盟有限公司;Morris 水迷宫购于中国医学科学院药物研究所。

1.3 方法

1.3.1 跑台运动干预方案

正式跑台训练前,CI/R 运动组所有大鼠进行 2 d、30 min/d 的适应性跑台训练(5~8 m/min,坡度为 0°)。正式训练时,跑台速度 20 m/min(坡度为 0°),每天持续运动 60 min,连续 5 d/周,共 4 周^[14]。

1.3.2 大鼠 CI/R 模型建立

参照 Longa 等^[15]的方法制备大鼠 CI/R 模型,CI/R 模型组及 CI/R 运动组腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉大鼠后,大鼠颈部正中切口,暴露右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA)。在距 CCA 分叉处约(5.00~8.00 mm)处结扎 ECA,并结扎 CCA 近心端,用动脉夹夹闭 CCA 远心端,动脉夹下方系一活结,剪一切口,将直径为 0.25 mm 的尼龙线沿切口插入近心端,沿右侧 ICA 走向缓慢推进(18~20 mm)左右,直至遇轻微阻力,阻断大脑中动脉(MCAO)血流 90 min。缺血 90 min 后拔出线栓,再灌注 24 h。在整个手术过程中,将大鼠置于加热垫上,使其直肠温度保持在 37°C 。假手术组线栓不插入大脑中动脉,其余操作相同。

再灌注 24 h 后采用所描述的方法^[15]测定所有存活动物的神经功能结果,将评分为 1—3 的大鼠纳入实验。具体评分如下:0 分(无神经功能活动障碍);1 分(提尾时缺血侧前肢不能伸展);2 分(大鼠不能直行,向左侧转圈);3 分(行走困难,行走时向左侧转圈、倾倒);4 分(严重意识障碍,无法行走或陷入昏迷)。本研究共排除 7 只大鼠,其中 CI/R 模型组死亡 3 只,评分为 4 分 1 只;CI/R 运动组死亡 2 只,评分为 0 分 1 只。

1.3.3 水迷宫测试

CI/R 后 72 h,采用 Morris 水迷宫(Morris water maze, MWM)评价大鼠空间学习记忆能力。水迷宫由一个大的圆形水池组成[直径 150 cm,高 60 cm,深 45 cm,水温($22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$)]。水池被划分为 4 个相等的假象限,每个象限包括 4 个点(东、北、南、西),水面以下 1.5 cm 处放置一隐藏的圆形平台(直径 10 cm),在 MWM 上方安装一台数码相机记录大鼠的游泳路径。1)定位航行实验:定位航行实验历时 5 天,每天训练 4 次(2 次之间间隔时间 15~20 min),将大鼠面向池壁,随机从 4 个入水点(东、北、南、西)下水,记录大鼠在 90 s 内寻找到平台的时间(逃避潜伏期),4 次潜伏期成绩的平均值作为当日最终成绩进入最后统计。如果大鼠在 90 s 内未找到平台,被引导到平台停留 15 s。2)空间探索实验:第 6 天,将平台移除,将大鼠从第一象限放入水中,测量大鼠在 90 s 内穿过原平台的次数(次)。

1.3.4 TTC 染色测定脑梗死体积

水迷宫测试结束后,每组随机取 3 只大鼠,腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉大鼠后立即取出大脑,连续切成 5 个冠状切片(2 mm)。切片置于 2% 2,3,5—三苯基四氮唑(TTC)中,37℃ 避光染色 15 min。正常脑组织被染成红色,梗死组织被染成白色。切片经多聚甲醛固定后利用 Image-proplus 6.0 图像分析软件计算大鼠的脑梗死体积,梗死体积%=(梗死体积/同侧半球体积)%。

1.3.5 ELISA 法检测海马组织炎症细胞因子水平

水迷宫测试结束即刻称重后,每组 6 只大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后断头处死,打开颅腔将脑组织取出,迅速于冰盘上分离海马,滤纸吸干后加入 4℃ 生理盐水用玻璃匀浆器制成 10% 的海马组织匀浆,4℃ 离心 15 min (转速 4 000 r/min),取上清液按试剂盒说明书测定海马 TNF- α 及 IL-6 水平。

1.3.6 免疫组化测定海马 CA1 区 SYN 的表达

水迷宫实验结束后,每组剩余大鼠以 10% 水合氯醛麻醉后,经左心室迅速灌入 300 mL 生理盐水,先快后慢灌入 4% 多聚甲醛 300 mL,取大鼠右侧大脑半球,石蜡包埋脑组织行海马冠状位切片(5 μ m),烘烤箱内烘烤 2 h,二甲苯、酒精脱蜡水化后入 3% 双氧水 37℃ 孵育 30 min,PBS 液冲洗(2 次 $\times$ 5 min)后滴加山羊血清封闭液,37℃ 孵育 15 min 后加入兔抗 SYN 及 PSD-95(1:200),室温孵育 1 h 后 4℃ 过夜,PBS 液冲洗(2 次 $\times$ 5 min)后滴加生物素标记的二抗(1:300),37℃ 孵育 1 h,PBS 液漂洗 3 次 $\times$ 5 min 后 DAB 显色(1~3 min),自来水冲洗 1 min 后梯度酒精脱水、透明和封片。

每组选 10 张切片,每张切片随机选取 5 个不重复视野,

利用 Image-proplus 6.0 图像分析软件统计缺血侧海马 CA1 区 400 倍下 SYN 及 PSD-95 阳性区域平均光密度值(mean optical density,MOD)。

1.4 数据分析

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理,数据结果用 mean $\pm$ SD 表示,组间比较采用单因素方差分析,homogeneity of variance test 进行方差齐性检验,方差齐采用 LSD 法检验组间差异,方差不齐采用 Dunnetts 法检验组间差异;双因素重复分析用于分析运动及脑缺血再灌注对大鼠逃避潜伏期的影响,以 $p<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠学习记忆能力结果

2.1.1 大鼠定位航行实验中逃避潜伏期结果

双因素重复方差分析显示,水迷宫训练的 1~5 天,3 组大鼠每天逃避潜伏期均有显著差异(均 $p<0.01$,见表 1);两两比较显示,水迷宫训练的 1~5 天与假手术组比较,Ci/R 模型组及 Ci/R 运动组大鼠逃避潜伏期均显著增加(均 $p<0.01$)。与 Ci/R 模型组比较,Ci/R 运动组大鼠水迷宫训练 1~5 天逃避潜伏期均显著缩短(均 $p<0.01$)。

2.1.2 各组大鼠空间探索实验中穿越平台次数结果

空间探索实验中各组大鼠穿越平台次数经单因素方差分析,差异具有统计学意义($p<0.01$);两两比较显示,与假手术组比较,Ci/R 模型组及 Ci/R 运动组大鼠空间探索实验中穿越平台次数均显著下降(均 $p<0.01$)下降幅度分别为 45.95%及 22.25%;与 Ci/R 模型组比较,经过 4 周跑台运动干预,Ci/R 运动组大鼠穿越平台次数显著增加($p<0.01$),增加幅度为 43.85%。

表 1 各组大鼠定位航行实验中逃避潜伏期结果($\bar{x}\pm s$, $n=40$)

组别	逃避潜伏期/s				
	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
假手术组	34.55 $\pm$ 7.67	28.09 $\pm$ 5.43	25.73 $\pm$ 4.39	23.18 $\pm$ 7.12	20.64 $\pm$ 6.38
Ci/R 模型组	45.09 $\pm$ 3.89**	42.73 $\pm$ 4.18**	40.55 $\pm$ 4.56**	38.64 $\pm$ 5.78**	35.09 $\pm$ 3.92**
Ci/R 运动组	41.83 $\pm$ 7.18***##	38.58 $\pm$ 8.03***##	32.17 $\pm$ 6.26***##	29.83 $\pm$ 5.69***##	26.75 $\pm$ 5.09***##
F	36.675	55.230	67.029	73.690	23.652
p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:** $p<0.01$,与假手术组相比;## $p<0.01$,与 Ci/R 模型组相比。下表同。

表 2 各组大鼠空间探索实验中穿越平台次数结果($\bar{x}\pm s$, $n=40$)

组别	假手术组	Ci/R 模型组	Ci/R 运动组	F	p
穿越平台次数(次)	10.38 $\pm$ 2.66	5.61 $\pm$ 1.45**	8.07 $\pm$ 1.54***##	30.713	0.000

2.2 各组大鼠脑梗死体积百分比结果

各组大鼠脑梗死体积% 经单因素方差分析,差异有统计学意义($p<0.01$);两两比较显示,与假手术组比较,Ci/R 模型组及 Ci/R 运动组脑梗死体积% 均显著增加(均 $p<0.01$);与 Ci/R 模型组比较,经过 4 周跑台运动干预,Ci/R 运动组大鼠脑梗死体积% 显著下降($p<0.01$),下降幅度为 13.03%。

表 3 各组大鼠脑梗死体积百分比结果($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	统计片	梗死体积
假手术组	15	0.67 $\pm$ 0.72
Ci/R 模型组	15	40.53 $\pm$ 2.59**
Ci/R 运动组	15	35.25 $\pm$ 3.28***##
F		897.560
p		0.000

2.3 各组大鼠海马炎症因子 TNF- α 及 IL-6 水平结果

各组大鼠海马组织中 IL-6 及 TNF- α 水平经单因素方差分析差异均有统计学意义(均 $p < 0.01$);两两比较显示,与假手术组比较,CI/R 模型组及 CI/R 运动组大鼠海马组织中 IL-6 及 TNF- α 水平显著增加($p < 0.01, p < 0.05$);与 CI/R 模型组比较,经过 4 周跑台运动干预,CI/R 运动组大鼠海马组织中 TNF- α 水平显著下降($p < 0.01$),IL-6 水平两组之间无显著差异($p > 0.05$)。

表 4 各组大鼠海马炎症因子 TNF- α 及 IL-6 水平结果
($\bar{x} \pm s, n=18$)

组别	TNF- α /pg·mL ⁻¹	IL-6/pg·mL ⁻¹
假手术组	35.76 $\pm$ 4.85	34.07 $\pm$ 4.08
CI/R 模型组	77.19 $\pm$ 8.94**	50.54 $\pm$ 8.44**
CI/R 运动组	56.11 $\pm$ 6.62***##	43.79 $\pm$ 5.71*
F	51.931	10.243
p	0.000	0.002

2.4 各组大鼠海马 CA1 区突触素表达结果

由图 1A—1C 及图 2A—2C 可知,大鼠海马 CA1 区组织细胞可见 SYN 及 PSD-95 呈棕褐色的阳性表达物,主要以圆形或椭圆形分布在细胞膜上。CI/R 模型组大鼠海马 CA1 区 SYN 及 PSD-95 阳性产物染色均较浅,而假手术组大鼠海马

CA1 区 SYN 及 PSD-95 阳性产物染色较深。

表 5 各组大鼠海马 CA1 区突触素 MOD 结果($\bar{x} \pm s, n=13$)

组别	统计片	突触素(MOD)	PSD-95(MOD)
假手术组	10	0.53 $\pm$ 0.09	0.45 $\pm$ 0.11
CI/R 模型组	10	0.38 $\pm$ 0.06**	0.31 $\pm$ 0.06**
CI/R 运动组	10	0.46 $\pm$ 0.07*##	0.39 $\pm$ 0.08#
F		9.704	5.935
p		0.001	0.007

各组大鼠海马 CA1 区突触素表达水平经单因素方差分析差异具有统计学意义($p < 0.01$);两两比较显示,与假手术组比较,CI/R 模型组及 CI/R 运动组大鼠海马 CA1 区 SYN 及 PSD-95 MOD 均显著下降($p < 0.01, p < 0.05$),CI/R 运动组大鼠海马 CA1 区 SYN MOD 显著下降($p < 0.05$),但海马 CA1 区 PSD-95 MOD 与假手术组比较无显著差异($p > 0.05$)。与 CI/R 模型组比较,经过 4 周运动干预,CI/R 运动组大鼠海马 CA1 区 SYN 及 PSD-95 MOD 均显著增加($p < 0.05$)。

3 讨论

3.1 跑台运动干预对 CI/R 模型大鼠学习记忆的影响

研究认为,脑卒中已成为世界第四大死亡原因,并且局灶性脑缺血可导致严重的认知功能障碍,甚至血管性痴呆,严重影响患者的生活质量,增加死亡率和卒中复发风险^[16]。Ben-

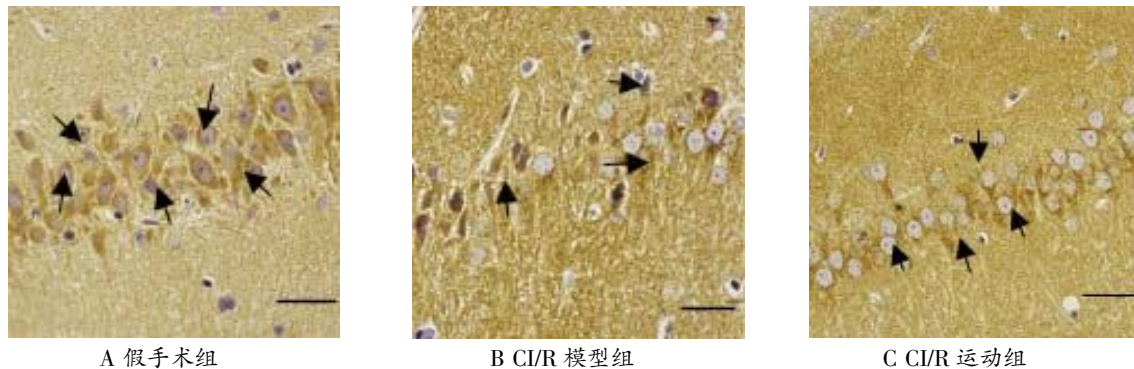


图 1 各组大鼠海马 CA1 区突触素表达比较(bar=25 μ m)

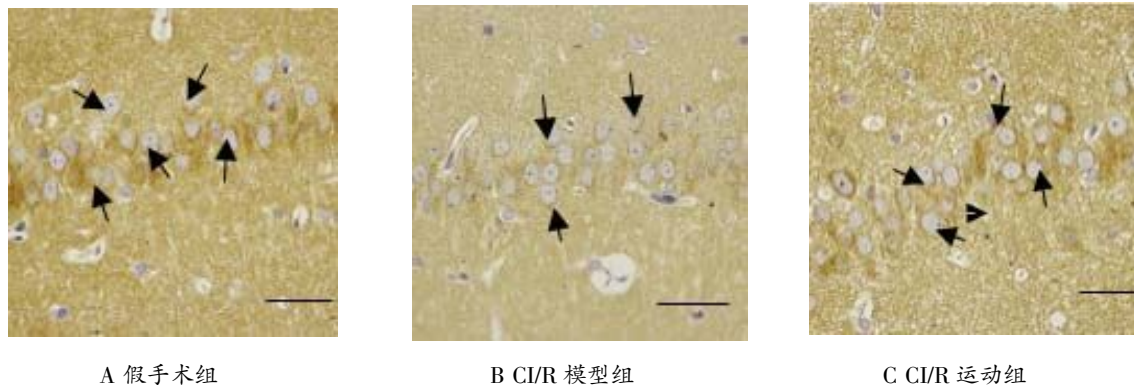


图 2 各组大鼠海马 CA1 区 PSD-95 表达比较(bar=25 μ m)

jamin 等^[17]研究发现,脑缺血/再灌注损伤患者中有超过(45%~70%)的患者存在认知功能障碍,较轻的病例表现出逆行性失忆症和健忘症等记忆功能障碍,而严重患者可能处于持续性植物状态。并且 Shi 等^[18]通过动物实验证实,Ci/R 损伤后大鼠脑梗死体积增加,学习记忆能力显著削弱。MCAO 是一种被广泛接受的研究缺血机制的动物模型,因此本研究采用结扎 MCAO 90 min、再灌注 24 h 的方法制备大鼠 Ci/R 模型,研究结果表明,与假手术组比较,Ci/R 模型组大鼠出现神经功能障碍,脑梗死体积显著增加;定位航行实验中 Ci/R 模型组大鼠逃避潜伏期显著增加,空间探索实验中跨越原平台次数显著下降,与上述学者研究结果一致。近来研究发现,缺血预处理可对大脑产生显著的神经保护作用,有效减轻 Ci/R 损伤,改善患者预后^[19]。而在众多的预防措施中,运动预处理被认为是一种可操作的、成本较低的有效预防缺血性脑卒中的方法,被证明可以增强认知功能,促进神经康复以及脑损伤后的运动功能改变^[11]。并且临床研究表明,运动康复在改善缺血性中风患者的生活质量方面与药物有相同的有益作用。之前的一项研究表明,至少 2 周的适当跑台运动对脑缺血大鼠具有神经保护作用;并且 Shamsaei 等^[20]研究发现,跑台运动干预(4 周,5 d/周)可有效改善脑缺血(60 min)再灌注(23 h)大鼠的行为和神经病理学指标,维持神经血管的完整性,减轻 Ci/R 大鼠脑水肿和运动障碍。此外 Egan 等^[21]研究发现,中等强度运动预处理 4 周(非负重游泳,60 min/d,6 d/周)可显著减少 Ci/R 诱导的梗死体积,改善大鼠神经行为评分。本研究采用 4 周中等强度跑台运动干预,结果发现,与 Ci/R 组大鼠比较,Ci/R 运动组大鼠脑梗死体积显著下降,认知功能显著改善,具体表现为定位航行实验中 Ci/R 运动组大鼠水迷宫训练 1~5 天逃避潜伏期均显著缩短,空间探索实验中穿越平台次数显著增加。脑梗死体积常被用来衡量缺血后神经保护的程度,梗死所占体积百分比可反映脑损伤的严重程度^[22]。因此可以认为,中等强度跑台运动干预可能通过降低脑梗死体积促进 Ci/R 大鼠认知功能恢复,对 Ci/R 大鼠起到神经保护作用,但是具体机制尚不清楚。

3.2 跑台运动干预对 Ci/R 模型大鼠海马神经炎症反应的影响

有证据表明,在脑缺血一再灌注损伤过程中,胶质细胞释放大炎症细胞因子,导致血脑屏障破坏、继发脑水肿,同时白细胞渗入大脑,最终导致缺血区神经炎症和细胞死亡,是脑缺血再灌注损伤进展的重要原因^[23]。TNF 做为 NF- κ B 的上游分子,可激活 NF- κ B 诱导 IL-1、IL-6、IL-8 和其他细胞因子的释放^[24]。Du 等^[25]研究发现,小胶质细胞在脑缺血发作的几分钟内被激活,产生过量的促炎介质,包括 IL-1 β 和 TNF- α ,在胶质细胞的活化和炎症细胞的浸润中起关键作用,进一步加重脑水肿,加剧缺血脑卒中后的脑损伤。此外,Ma 等^[26]研究发现,局灶性脑缺血再灌注可导致 Ci/R 大鼠脑组织炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 水平均显著升高,抗炎细胞因子 IL-4 和 IL-10 降低,而抗炎药物可通过抑制炎症反应、增强抗炎反应缓解脑缺血再灌注损伤,减少脑梗死体积及脑水肿,提示神经炎症在 Ci/R 神经损伤中起着关键作用。而 Khoshnazar 等^[27]研究表明,急性脑缺血和随后的再灌注可诱

导神经炎症反应导致大量神经细胞死亡,尤其是在海马区域。因此本研究我们聚焦海马,结果发现,与假手术组比较,Ci/R 模型组大鼠海马促炎因子 TNF- α 及 IL-6 水平显著增加。近期学者研究认为,Ci/R 后脑组织促炎因子的增加与中枢神经系统损伤及认知障碍有关^[28]。因此可以认为,本研究 Ci/R 大鼠空间学习记忆能力下降及脑梗死体积增加可能与神经促炎因子增加有关。因此,抑制神经胶质细胞的激活或促炎介质的活性可能是预防脑损伤的重要策略。

最近研究表明,体育锻炼可通过提高抗炎细胞因子和减少促炎细胞因子改善中枢神经系统损伤^[29]。Ding 等^[30]研究发现,3 周跑台运动(每天运动 30 min)预处理可通过减少缺血区炎症介质的表达减少 Ci/R 诱导的脑损伤,降低脑梗死面积。此外朱路文等^[31]研究发现,运动预处理可通过降低 Ci/R 大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 含量降低神经功能缺损。本研究结果发现,与 Ci/R 模型组比较,经过 4 周跑台运动干预,Ci/R 运动组大鼠海马促炎因子 TNF- α 水平显著下降,但 IL-6 水平无显著改变,说明此运动具有一定的抗神经炎症作用。而 Zhang 等^[32]研究发现,Ci/R 后早期有氧运动干预可通过下调脑组织 IL-1 β ,而不是 TNF- α 预防 Ci/R 损伤。因此,针对不同研究炎症因子的变化不同可能与运动干预时间点不同有关。赵军等^[33]研究认为,运动诱导的认知功能增强或保护作用可能与运动对全身,尤其是中枢炎症的调节作用有关。因此本研究 4 周跑台运动干预减少 Ci/R 大鼠脑梗死体积及改善认知功能改善至少在一定程度上是通过抑制海马炎症因子水平介导的。

3.3 跑台运动干预对 Ci/R 模型大鼠海马 CA1 区 SYN 及 PSD-95 表达的影响

神经元突触可塑性是脑损伤后功能恢复的重要机制^[34]。SYN 是一种主要的突触前囊泡膜蛋白,存在于所有神经末梢中,是突触发生和突触重建的重要蛋白标记物,PSD-95 是突触后膜致密区上一种核心支架蛋白可增加树突棘的数量和大小,并促进突触的稳定和可塑性,因此 Synaptophysin 和 PSD-95 是突触可塑性的重要指标,而上调两种突触蛋白可促进记忆巩固^[35-36]。Yao 等^[37]研究发现,双侧颈总动脉闭塞后 30 天脑缺血大鼠海马组织突触素表达显著减少,学习记忆能力显著下降,提示突触素表达水平下降可能是脑卒中后认知缺陷的机制之一。并且 Zhu 等^[38]研究发现,脑梗死后神经功能缺损与梗死周围皮层 PSD-95 和 SYN 表达降低有关。海马 CA1 区锥体神经元是对脑缺血最敏感的神经元,动物实验表明,6 min 的脑缺血就足以导致海马 CA1 区神经元的延迟死亡^[39]。因此,本实验我们聚焦梗死周围海马 CA1 区,结果发现与假手术组比较,Ci/R 模型组大鼠海马 CA1 区 SYN 及 PSD-95 表达显著下降,与上述学者研究结果一致,分析其原因可能与 Ci/R 导致的神经元各项生理代谢能力下降、导致 SYN 及 PSD-95 的合成锐减所致。先前的研究已经证实,脑组织中 SYN 及 PSD-95 的缺失是脑缺血致认知障碍的基础,在运动改善与脑缺血相关的脑功能方面起着至关重要的作用^[40]。Hong 等^[12]研究发现,跑台运动(28 天,30 min/天)可通过增加脑卒中后小鼠皮质和海马的 SYN 及 PSD-95 的表达和神经发生改善小鼠运动功能和短期记忆。并且 Seo 等^[41]研究发现,脑卒中后早期跑台

运动结合协调训练可通过增加海马齿状回及下丘脑突触素的表达,改善大鼠感觉运动表现。而卿鹏等^[42]通过对大鼠进行 2 周康复锻炼(滚筒式网状训练器训练、平衡木训练、网屏训练、转棒训练为主,30 min/天),结果发现 14 天康复锻炼对脑缺血再灌注大鼠海马 CA3 区突触素表达无显著改变。针对不同研究突触素表达水平出现不同变化可能与运动方式及运动时间和脑区域选择不同有关。本研究采取的运动干预时间为脑缺血再灌注前,结果发现,与 CI/R 模型组大鼠比较,CI/R 运动组大鼠海马 CA1 区 SYN 及 PSD-95 表达均显著增加。此外,本研究还发现,CI/R 运动组大鼠学习记忆能力显著增强,提示海马 CA1 区突触相关蛋白表达增强可能是运动干预改善 CI/R 大鼠认知功能缺陷的原因之一。已有研究表明,在神经炎症过程中,小胶质细胞分泌的促炎细胞因子可通过改变突触蛋白破坏神经元,引发突触功能障碍,是认知记忆障碍发展中的重要因素^[43]。因此可以认为,长期跑台运动干预可通过减轻海马神经炎症反应、减少脑梗死体积、增加 SYN 及 PSD-95 的表达,从而对 CI/R 大鼠认知功能下降起到保护作用,被认为是预防缺血性损伤的有效策略,然而 CI/R 诱导的神经炎症通过何种途径介导突触功能障碍尚不清楚,后续需要进一步研究证实。

参考文献:

- [1] DURUKAN A, TATLISUMAK T. Preconditioning-induced ischemic tolerance: a window into endogenous gearing for cerebroprotection [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2010, 2(1):2.
- [2] LIANG W, LIN C, YUAN L, et al. Preactivation of Notch1 in remote ischemic preconditioning reduces cerebral ischemia-reperfusion injury through crosstalk with the NF- κ B pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1):181.
- [3] GONG L, TANG Y, AN R, et al. RTN1-C mediates cerebral ischemia/reperfusion injury via ER stress and mitochondria-associated apoptosis pathways [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3080. DOI: 10.1038/cddis.2017.465.
- [4] 邱永升,魏巍,宗小川,等. α 2 肾上腺素能受体激动剂对缺血再灌注大鼠脑组织 NF- κ B 及炎症因子表达的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(7): 104-109.
- [5] 田士来,康军林,魏玉娥,等.紫檀芪对小鼠缺血性脑损伤的神经保护机制研究 [J]. *神经解剖学杂志*, 2020, 36(1): 71-76.
- [6] LIU H, ZHANG Z, ZANG C, et al. GJ-4 ameliorates memory impairment in focal cerebral ischemia/reperfusion of rats via inhibiting JAK2/STAT1-mediated neuroinflammation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267:113491.
- [7] PARK J H, AHN J H, KIM D W, et al. Altered Nurr1 protein expression in the hippocampal CA1 region following transient global cerebral ischemia [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21 (1): 107-114.
- [8] LIU J, CHANG L, ROSELLI F, et al. Amyloid- β induces caspase-dependent loss of PSD-95 and synaptophysin through NMDA receptors [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 22:541-556.
- [9] WAN L, AI J Q, YANG C, et al. Expression of the Excitatory Postsynaptic Scaffolding Protein, Shank3, in Human Brain: Effect of Age and Alzheimer's Disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13:717263.
- [10] LIU Y, ZHANG Y, ZHENG X, et al. Galantamine improves cognition, hippocampal inflammation, and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1):112.
- [11] SAKAKIMA H. Endogenous neuroprotective potential due to preconditioning exercise in stroke [J]. *Phys Ther Res*, 2019, 22(2):45-52.
- [12] HONG M, KIM M, KIM T W, et al. Treadmill Exercise Improves Motor Function and Short-term Memory by Enhancing Synaptic Plasticity and Neurogenesis in Photothrombotic Stroke Mice [J]. *Int Neurourol J*, 2020, 24(S1):28-38.
- [13] ZHU L, YE T, TANG Q, et al. Exercise Preconditioning Regulates the Toll-Like Receptor 4/Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway and Reduces Cerebral Ischemia/ Reperfusion Inflammatory Injury: A Study in Rats [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(11):2770-2779.
- [14] ZHANG Q, ZHANG L, YANG X, et al. The effects of exercise preconditioning on cerebral blood flow change and endothelin-1 expression after cerebral ischemia in rats [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2014, 23(6):1696-702.
- [15] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [16] GBD 2016 RUSSIA COLLABORATORS. The burden of disease in Russia from 1980 to 2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10153):1138-1146.
- [17] BENJAMIN E J, VIRANI S S, CALLAWAY C W, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association [J]. *Circulation: An Official Journal of the American Heart Association*, 2018, 137(12):e67-e492.
- [18] SHI C X, JIN J, WANG X Q, et al. Sevoflurane attenuates brain damage through inhibiting autophagy and apoptosis in cerebral ischemia reperfusion rats [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(1): 123-130.
- [19] LI S, HAFEEZ A, NOORULLA F, et al. Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia [J]. *Prog Neurobiol*, 2017, 157: 79-91.
- [20] SHAMSAEI N, ERFANI S, FEREIDONI M, et al. Neuroprotective Effects of Exercise on Brain Edema and Neurological Movement Disorders Following the Cerebral Ischemia and Reperfusion in Rats [J]. *Basic Clin Neurosci*, 2017, 8(1):77-84.
- [21] EGAN K J, JANSSEN H, SENA E S, et al. Exercise reduces infarct volume and facilitates neurobehavioral recovery: results from a systematic review and meta-analysis of exercise in experimental models of focal ischemia [J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2014, 28(8): 800-812.
- [22] 张弢宁,高维娟,周晓红,等.毛蕊异黄酮通过调控细胞色素 C/凋亡酶激活因子 1 凋亡信号通路减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤 [J]. *解剖学报*, 2021, 52(4):536-542.
- [23] 谢明,钟朕,欧阳训彦,等.川芎嗪防治大鼠脑缺血/再灌注损伤后炎症反应与细胞凋亡的作用 [J]. *解剖学报*, 2021, 52(6):845-854.
- [24] 李可,李宁川,林晨,等.游泳调控 NF- κ B 信号通路介导肥胖大鼠睾丸自噬干预炎症 [J]. *湖北体育科技*, 2023, 42(9): 845-851.
- [25] DU H, HE Y, PAN Y, et al. Danhong Injection Attenuates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats Through the Suppression of the Neuroinflammation [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 561237.
- [26] MA C, WANG X, XU T, et al. Qingkailing injection ameliorates

- cerebral ischemia-reperfusion injury and modulates the AMPK/NLRP3 Inflammasome Signalling pathway[J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1):320.
- [27] KHOSHNAZAR M, PARVARDEH S, BIGDELI M R. Alpha-pinene exerts neuroprotective effects via anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2020, 29(8):104977.
- [28] LI Y, LI S, LI D. Brevescapine Alleviates Cognitive Impairments Induced by Transient Cerebral Ischemia/Reperfusion through Its Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Properties in a Rat Model[J]. ACS Chem Neurosci, 2020, 11(24):4489-4498.
- [29] 陈敏,张晚波,罗玉珍,等.运动锻炼改善抑郁症的神经生物学相关机制研究进展[J].中国体育科技,2021,57(4):89-97.
- [30] DING Y H, YOUNG C N, LUAN X, et al. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion[J]. Acta Neuropathol, 2005, 109(3):237-46.
- [31] 朱路文,叶涛,吴孝军,等.运动预处理对脑缺血再灌注大鼠血清炎症因子水平的影响[J].中国康复理论与实践,2015,21(1):22-25.
- [32] ZHANG Y, CAO R Y, JIA X, et al. Treadmill exercise promotes neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury via downregulation of pro-inflammatory mediators[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2016, 12:3161-3173.
- [33] 赵军,褚亚君,梁晋裕,等.跑台运动对糖尿病大鼠学习记忆及海马炎症因子和 NGF 表达的影响[J].中国比较医学杂志,2020,30(11):65-71.
- [34] SARKAKI A, FARBOOD Y, MANSOURI S M T, et al. Chrysin prevents cognitive and hippocampal long-term potentiation deficits and inflammation in rat with cerebral hypoperfusion and reperfusion injury[J]. Life Sci, 2019, 226:202-209.
- [35] 左旺盛,张钰,张玲,等.丁苯酞通过调节海马突触相关蛋白表达和线粒体结构改善 db/db 小鼠认知功能障碍[J].中国比较医学杂志,2021,31(4):27-32.
- [36] GARDONI F, SCHRAMA L H, KAMAL A, et al. Hippocampal synaptic plasticity involves competition between Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and postsynaptic density 95 for binding to the NR2A subunit of the NMDA receptor[J]. J Neurosci, 2001, 21(5):1501-1509.
- [37] YAO Y, WANG F, YANG X, et al. Bombesin attenuated ischemia-induced spatial cognitive and synaptic plasticity impairment associated with oxidative damage [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 87-93.
- [38] ZHU L, TANG T, FAN R, et al. Xuefu Zhuyu decoction improves neurological dysfunction by increasing synapsin expression after traumatic brain injury[J]. Neural Regen Res, 2018, 13(8): 1417-1424.
- [39] GAD S N, NOFAL S, RAAFIAT E M, et al. Lixisenatide Reduced Damage in Hippocampus CA1 Neurons in a Rat Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion Possibly Via the ERK/P38 Signaling Pathway [J]. J Mol Neurosci, 2020, 70(7): 1026-1037.
- [40] LEARDINI-TRISTÃO M, ANDRADE G, GARCIA C, et al. Physical exercise promotes astrocyte coverage of microvessels in a model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1):117.
- [41] SEO H G, KIM D Y, PARK H W, et al. Early motor balance and coordination training increased synaptophysin in subcortical regions of the ischemic rat brain[J]. J Korean Med Sci, 2010, 25(11):1638-1645.
- [42] 卿鹏,柴铁劬,丁红梅,等.双侧电针结合康复训练对局灶性脑缺血/再灌注损伤大鼠海马 CA3 区神经生长相关蛋白 43 及突触素表达的影响[J].针刺研究,2016,41(4):314-320.
- [43] YANG L, JIN P, WANG X, et al. Fluoride activates microglia, secretes inflammatory factors and influences synaptic neuron plasticity in the hippocampus of rats[J]. Neurotoxicology, 2018, 69:108-120.

(上接第80页)

- 影响[J].中国公共卫生,2021,37(1):61-65.
- [29] 段颖萍,尹建强.公园建成环境对城中村儿童体力活动影响研究:以深圳城中村儿童为例[J].农业与技术,2022,42(1):129-131.
- [30] 翟宝昕,朱玮.儿童户外活动视角下的上海市建成环境评价研究[J].上海城市规划,2018(1):90-94.
- [31] 翟宝昕,朱玮.上海建成环境对儿童及其家长户外活动和健康自评的影响[J].规划师,2019,35(16):23-29.
- [32] 翟宝昕,朱玮.基于儿童户外活动偏好的建成环境评价与优化:以上海市中心区为例[J].上海城市规划,2021(5):137-144.
- [33] 朱玮,翟宝昕.城市建成环境认知对儿童户外活动的影响:模型建构及上海的实证[J].城市规划,2019,43(12):45-54.
- [34] 孟雪,李玲玲,付本臣.基于小学学龄儿童户外休闲活动实态调查的邻里建成环境优化设计研究[J].建筑学报,2020(S2):164-70.
- [35] 徐梦一,沈瑶,张潇,等.环境行为学视角下建成环境与儿童出行影响机制研究[J].中国园林,2022,38(8):54-59.
- [36] 何玲玲,林琳.学校周边建成环境对学龄儿童上下学交通方式的影响:以上海市为例[J].上海城市规划,2017(3):30-36.
- [37] 刘吉祥,肖龙珠,周江评,等.建成环境与青少年步行通学的非线性关系:基于极限梯度提升模型的研究[J].地理科学进展,2022,41(2):251-263.
- [38] 邢慧楠,黄晓燕,夏伊凡.社区和学校建成环境对儿童积极通学的影响:基于交叉分类多层模型的西安实证[J].西北大学学报(自然科学版),2023,53(5):749-760.
- [39] 吴升臻,王伯勋,邓锐,等.影响自闭症儿童社交行为的城市建成环境要素研究[J].家具与室内装饰,2022,29(4):92-96.
- [40] 周素红,刘明杨,张琳.青少年心理健康与城市建成环境营造研究:以广州市为例[J].中国名城,2021,35(7):25-33.
- [41] 论宇超,王辉,韩增林.社区和学校邻里建成环境对青少年体质健康的影响:以大连市初中学生为例[J].地理研究,2023,42(7):1842-1855.
- [42] 王娇娇,王熙,张一,等.社区建成环境与儿童青少年含糖饮料摄入的关联性研究[J].现代预防医学,2022,49(23):4317-4321.
- [43] CERIN E, CAIN K L, CONWAY T L, et al. Neighborhood Environments and Objectively Measured Physical Activity in 11 Countries[J]. Medicine and Science in Sports and Exercise, 2014, 46(12):2253-2264.