

## 2周和6周冷水游泳运动对大鼠海马中神经营养索家族及其mRNA表达水平的影响\*

于动震<sup>1</sup> 张立立<sup>1</sup> 黄永京<sup>2</sup>

### 摘要

**目的:**分别探讨2周和6周冷水游泳对大鼠海马中神经营养索家族及其mRNA表达水平的影响。

**方法:**将64只SD大鼠随机分为4组:空白对照组1(C1),空白对照组2(C2),冷水游泳2周组(S2)和冷水游泳6周组(S6),每组16只。S2组和S6组分别进行冷水游泳训练,并分别在2周和6周最后一次冷水游泳后24h取材,分离出海马。ELISA检测脑中BDNF、NGF和NT-3的蛋白水平,RT-PCR检测BDNF、NGF和NT-3 mRNA的表达水平。

**结果:**C1和C2组大鼠海马中BDNF、NGF、NT-3及其mRNA的表达水平均没有显著性差异。与C1相比,S2组大鼠海马中BDNF、NGF及其mRNA的水平显著升高,但是NT-3及其mRNA的水平未发生显著性改变。与C2相比,S6组大鼠海马中BDNF、NGF和NT-3的表达水平均显著性升高BDNF和NGF mRNA的表达水平显著升高,NT-3 mRNA的表达水平未见显著性改变。与S2组相比,S6组大鼠海马中BDNF及其mRNA的表达水平显著降低,但是NGF、NT-3及其mRNA的表达水平未发生显著性改变。

**结论:**2周和6周冷水游泳均可对大鼠海马中神经营养索家族及其mRNA的表达水平产生影响,6周冷水游泳影响的程度更为广泛。随着冷水游泳时间的加长,大鼠海马中神经营养索水平可能有适应性下降的趋势,表现为6周冷水游泳对BDNF及其mRNA的影响比2周时的水平降低。

**关键词** 大鼠;海马;神经营养索家族;冷水游泳

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2013)-09-0817-05

Effects of 2-week and 6-week cold water swim training on the levels of neurotrophins and their mRNA in hippocampus of rats brain/YU Dongzhen, ZHANG Lili, HUANG Yongjing//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(9): 817-821

### Abstract

**Objective:** To investigate the effects of 2-week and 6-week cold water swimming on the levels of neurotrophins and their mRNA in hippocampus of rats brain.

**Method:** A total of 64 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups: blank control group 1 (C1, n=16), blank control group 2 (C2, n=16), 2-week cold water swimming group(S2) and 6-week cold water swimming group (S6, n=16). Twenty-four h after the last swim training rats were sacrificed by decapitation. ELISA and real time-PCR were used to detect the expressions of brain-derived neurotrophic factor(BDNF), nerve growth factor(NGF), neurotrophins-3(NT-3), and their mRNA respectively.

**Result:** The levels of BDNF, NGF, NT-3 and their mRNA didn't change in group C1 and group C2. Compared with C1 group, the levels of BDNF, NGF and their mRNA both increased in hippocampus in S2 group. The levels of BDNF, NT-3 and BDNF mRNA both increased, but NT-3 mRNA didn't change in hippocampus in S6 group compared with C2 group. Compared with S2 group, the BDNF and its mRNA decreased in hippo-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.09.006

\*基金项目:国家教育部人文社科青年基金项目(10YJCLX052),石家庄学院博士科研启动基金项目(12BS012)

1 石家庄学院体育系,石家庄,050035; 2 河北联合大学体育部

作者简介:于动震,女,博士,副教授;收稿日期:2012-11-06

campus in S6 group.

**Conclusion:** The 2-week and 6-week cold water swim training could both affect the levels of NTs in hippocampus of rat's brain, and 6-week cold water swim training maybe produce more extensive effects. With the prolonged cold water swim training, NTs could be down-regulated adaptively, because the expressions of BDNF and its mRNA were decreased after 6-week cold water swimming compared with 2-week cold water swimming.

**Author's address** Physical Education Department, Shijiazhuang College Shijiazhuang, 050035

**Key word** rat; hippocampus; neurotrophins; cold water swim

运动作为对机体的一种应激性刺激,其有益于脑健康的理念逐步在世界范围内得到公认,国内外学者的很多研究表明,机体多个脑区或者核团中多条生理生化途径参与了上述过程<sup>[1-3]</sup>。海马在应激导致行为变化过程中起着毋庸置疑的重要作用<sup>[4-5]</sup>,在该脑结构中多种神经递质含量丰富并且作用活跃,而且,国内外的研究学者的研究结果都表明,当进行有氧游泳运动训练时,大鼠海马中神经营养素的表达水平的变化,在保护脑健康和延缓脑衰老方面发挥着重要的作用<sup>[6-7]</sup>。神经营养素(neurotrophins, NTs)家族在脊椎动物神经系统中,发挥调节该系统的发生、存活、功能的作用,主要成员在现有的研究水平下主要包括:神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养素(NT-3、NT-4、NT-5)等,它们通过调节多种神经细胞亚型的存活、生长、分化、发育和新陈代谢等过程,从而实现运动对脑健康的积极作用<sup>[8-9]</sup>。以往的研究结果表明,游泳运动可以使动物海马中NTs发生不同程度的变化<sup>[6-7]</sup>,冷水游泳是游泳运动的一种特殊形式,也是常见的运动健身形式,作为一种对机体的强应激,冷水游泳主要通过改变相关脑区或核团中神经元突触的可塑性(以长时程增强为主导)来实现对机体行为的影响,并最终导致行为变化<sup>[10-11]</sup>。故本研究采用冷水游泳运动应激模型,探讨不同刺激时间条件下大鼠海马中神经营养素家族主要成员及其mRNA水平的变化,为探索运动与脑健康的关系提供理论基础和研究靶点。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验动物材料

64只两月龄雄性Sprague-Dawley (SD)大鼠(购自河北医科大学医学实验动物中心,批号:201107,

清洁级),体重(185±15)g。适应性喂养1周,在整个实验进程中,动物饲养环境温度控制为22±3℃,相对湿度控制为55%±5%,每天光照时间为12h,饮水和进食自由。

### 1.2 冷水训练方案

实验动物适应性饲养7d,在此期间内S2组和S6组大鼠每天上午9:00开始进行冷水游泳适应训练,参考文献方案略作修改<sup>[12]</sup>,水池直径2m,水深35cm,水温10℃,从第1天游泳3min开始,每天训练1次,每次时间延长1min,第7天延长至10min。第1周开始进行正式训练,S2组和S6组大鼠每天上午9:00开始冷水游泳,每次10min,C1组和C2组常规饲养,整个实验过程中均不进行任何训练。

### 1.3 实验取材

正式进行冷水游泳训练2周,最后一次训练结束后24h,把C1和S2组全部实验动物断颈处死。迅速分离海马,左右侧同放,液氮中速冻处理后,-70℃超低温冰箱保存海马。正式冷水游泳6周,最后一次训练结束后24h,把C2和S6组全部实验动物断颈处死,迅速分离海马,左右侧同放,其余操作步骤与前次取材相同。

### 1.4 ELISA 检测方法

将所取海马置于buffer悬浮液中,冰浴中进行匀浆处理,低温采用5000r/min离心,提取上清液。严格参照试剂盒(北京赛驰生物科技有限公司提供)中对BDNF、NGF和NT-3蛋白检测的操作说明,测定3种蛋白在海马中的含量。

### 1.5 RT-PCR 检测方法

将冰冻保存的海马置于匀浆器中,加入Trizol充分匀浆后,按照RNA提取试剂盒操作说明加入反应物,260nm紫外分光光度计测定RNA浓度后反转录合成cDNA,-20℃低温保存。引物由上海顺勃生物工程技术有限公司合成,

BDNF 上游引物:5'-CTGACACAGCAGGTGTCTCAG-3',

下游引物:5'-CGGTAGCCTCTAATCTGGTCT-3'。

NGF 上游引物:5'-TAATCATGCATACCACGAC-3',

下游引物:5'-ATCGCGTGAACGACTTCTGA-3'。

NT-3 上游引物:5'-CGAGCGTATCTTGCTAAGCTC-3',

下游引物:5'-ATCTCATGACTTCTTTGAGCG-3'。

内参基因 GADPH 上游引物:5'-GTGCTCCATGAGT-CATTTCATC-3',

下游引物:5'-CTAATGGGAGCTCTGTGTAT-3'。

反应体系如下:10×缓冲液 2.5μl, H<sub>2</sub>O 15.1μl, 上下游引物分别为0.3μl, SYBR 0.5μl, dNTP 2μl, 10×缓冲液 2.5μl, Mg<sup>2+</sup>2μl, Taq HS 0.3μl, 模板 2μl。反应条件如下:96℃ 2min 1循环;94℃ 10s, 61℃ 10s, 72℃ 45s, 40 cycle。62℃退火。每个样品重复检测3次,将检测所得 Ct 值与其相对应的 GADPH Ct 值相减进行校正,最后结果以待测样品的平均拷贝数(mean quantity, Mean Qty)表示。

### 1.6 统计学分析

实验数据以均数 ± 标准差表示,全部数据用 SPSS15.0 软件处理,采用配对 *t* 检验和独立样本 *t* 检验, *P*<0.05 时具有显著性差异, *P*<0.01 时具有非常显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 冷水游泳对大鼠海马中 BDNF、NGF 和 NT-3 水平的影响

两周冷水游泳训练后,与 C1 比较, S2 组大鼠海马中 BDNF 和 NGF 的蛋白表达水平均为显著增加(分别为 *P*<0.01 和 *P*<0.05),但 NT-3 的表达水平未见显著性变化。6 周冷水游泳训练后,与 C2 组比较, S6 组大鼠海马中 BDNF、NGF 和 NT-3 的表达水平均显著升高(均为 *P*<0.05)。与 S2 组 BDNF 水平显著下降(*P*<0.05),但 NGF 和 NT-3 的表达水平均未见显著性改变(表 1)。

### 2.2 冷水游泳对大鼠海马中 BDNF、NGF 和 NT-3 mRNA 表达水平的影响

与 C1 组比较, S2 组大鼠海马中 BDNF 和 NGF mRNA 的表达水平均增加差异有显著性(均为 *P*<0.05);与 C2 组比较, S6 组大鼠海马中 BDNF 和 NGF mRNA 的表达水平升高差异有显著(*P*<0.05), NGF mRNA 的表达水平未见显著性变化;与 S2 组比较,

S6 组大鼠海马中 BDNF mRNA 的表达水平降低显著,但是 NGF 和 NT-3 mRNA 的表达水平均未发生显著性变化(见表 2)。

表 1 各组大鼠海马中 BDNF、NGF、NT-3 表达水平的变化 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	BDNF (ng/L)	NGF (pg/ml)	NT-3 (mmol/L)
空白对照组 1(C1)	8	617 ± 114	469 ± 103	153 ± 38
空白对照组 2(C2)	8	630 ± 129	452 ± 116	174 ± 36
冷水游泳 2 周组(S2)	8	1228 ± 146 <sup>②</sup>	736 ± 154 <sup>①</sup>	189 ± 44
冷水游泳 6 周组(S6)	8	876 ± 135 <sup>③</sup>	671 ± 157 <sup>③</sup>	230 ± 52 <sup>③④</sup>

与 C1 组比较<sup>①</sup>*P*<0.05, <sup>②</sup>*P*<0.01; <sup>③</sup>与 C2 组比较 *P*<0.05; <sup>④</sup>与 S2 组比较 *P*<0.05

表 2 各组大鼠海马中 BDNF、NGF、NT-3 mRNA 表达的平均拷贝数 (n=8, copy/ml)

组别	例数	BDNF mRNA	NGF mRNA	NT-3 mRNA
空白对照组 1(C1)	8	625 ± 102	507 ± 118	944 ± 227
空白对照组 2(C2)	8	616 ± 112	549 ± 152	1013 ± 304
冷水游泳 2 周组(S2)	8	1064 ± 135 <sup>②</sup>	738 ± 161 <sup>①</sup>	1194 ± 276
冷水游泳 6 周组(S6)	8	891 ± 129 <sup>③④</sup>	752 ± 150 <sup>③</sup>	1226 ± 328

与 C1 组比较<sup>①</sup>*P*<0.05, <sup>②</sup>*P*<0.01; 与 C2 组比较<sup>③</sup>*P*<0.05; 与 S2 组比较<sup>④</sup>*P*<0.05

## 3 讨论

冷水游泳刺激是一种作用机制较为复杂的应激源,既包括生理性应激,也包括心理性应激<sup>[13-14]</sup>。目前,研究者多用强迫性冷水游泳大鼠模型来探讨应激与焦虑行为之间的关系。与常温游泳运动相比,冷水游泳是一种在短期内伴随大量能量消耗的运动应激形式<sup>[15]</sup>。国内外的大量研究表明,运动可以保持和促进伤病后神经元的功能,但是有关运动影响神经元功能的分子和细胞机制尚无确切定论,目前公认的观点是一些营养类因子对神经网络的结构和功能起到很重要的调节和修饰作用<sup>[16-19]</sup>。由于神经系统本身结构和传导通路的复杂性(尤其是在海马),使得有关运动与脑健康关系的机制研究进展缓慢并且使部分实验结果具有多样性。本研究结果表明,2 周冷水游泳作为一种短期运动应激性刺激,导致大鼠海马中 BDNF 和 NGF 表达水平均显著升高,同时它们的 mRNA 表达水平也同步性升高。尽管以往的研究都显示短期冷水游泳导致大鼠出现炎症因子、个别激素等水平的变化,从而不利于大鼠神经功能的维持,有发展为神经系统受损并可能出现病理性变化的倾向<sup>[20-23]</sup>,但本研究结果从另外一个角度

说明,在大鼠进行短期冷水游泳运动后, BDNF 和 NGF 水平的升高对大鼠海马起到明显的保护性作用。升高的 BDNF 和 NGF 可以保护受到应激性刺激的海马神经元突触可塑性,并且两者的保护性作用具有同步性。有研究表明,给予外源性神经营养素,可以使中枢和外周神经系统中受损的神经元生长和存活,在本实验条件下,海马中升高的 BDNF 和 NGF 可能是大鼠在短期内(2周)接受冷水游泳训练时,海马中神经内分泌系统出现应激性失衡,这可能是通过海马中 BDNF 和 NGF 的高表达,实现对冷水游泳导致的大鼠海马的各种不良反应,从而有利于维持神经功能的稳定性,达到抑制脑损伤的发生的积极作用。

6周冷水游泳训练后,大鼠海马中 BDNF、NGF 和 NT-3 的表达水平比空白对照组均显著升高,提示大鼠海马中神经营养素家族的保护性作用随着冷水游泳训练时间的延长持续存在。神经营养素家族是影响脊椎动物神经系统发育的一类二聚体蛋白,不同的神经营养素家族成员对神经元的不同细胞亚型的存活具有各自的生理功能<sup>[24]</sup>。而且,神经营养素家族的生理作用并不局限于阻止神经发育过程中细胞凋亡的发生,例如,NT-3 就是在神经元出现程序性死亡之前就开始发挥其生物学作用的<sup>[25]</sup>。神经营养素的快速作用不仅有益于促进突触效能,而且在调节中枢神经系统的发展和成熟过程中神经元连接性方面同样起着很重要的作用。在本实验中,2周冷水游泳结束时,NT-3 的表达水平尽管未见显著性变化,但是与空白对照组 1 相比,有升高的趋势(升高 20%)。当 6 周冷水游泳结束时,NT-3 的表达水平与空白对照组 2 和 2 周冷水游泳组相比均显著升高,该实验结果提示,与 BDNF 和 NGF 相比,尽管同属于神经营养素家族,但是它们对相同的冷水游泳运动发生的反应具有时相性差异。另外,与空白对照组 2 相比,6 周冷水游泳组大鼠海马中 NT-3 mRNA 未见显著性变化,究其原因可能是 NT-3 的表达水平在此训练时间段内,其 mRNA 对它的调控作用不是居主导地位的,可能主要受其他调节因子的影响。神经营养素家族的变化主要受其上游调节因子,如核转录因子环磷腺苷(cAMP)反应元件结合蛋白(cAMP-responsive element-binding protein,

p-CREB)的调节<sup>[26]</sup>,除此之外,该家族的特异性受体水平的变化也会影响神经营养素家族在海马中的表达水平<sup>[27-28]</sup>。所以,本研究组将继续从核转录因子和受体的变化研究,进一步揭示冷水游泳与海马中神经营养素家族之间的关系。

本实验同时发现,与 2 周冷水游泳组相比,6 周冷水游泳组大鼠海马中 BDNF 及其 mRNA 的水平显著下降,该结果表明,随着运动持续时间的延长,大鼠对冷水游泳训练可能有一个适应性过程, BDNF 作为一种神经营养因子对神经系统起保护作用外,其水平的反应性升高也提示机体在接受冷水游泳训练时的神经内分泌失调,当大鼠长期接受冷水游泳运动时, BDNF 水平的下降有利于维持大鼠海马中神经内分泌的稳定性。在大鼠中枢神经系统尤其是在海马中,神经元活性和其他神经递质的水平共同调控着 BDNF 的基因表达方式,这些神经递质主要包括乙酰胆碱,  $\gamma$ -氨基丁酸和单胺类等。

#### 4 结论

①短期和长期冷水游泳训练能够引起大鼠海马中神经营养素家族及其 mRNA 的表达水平发生程度不等的变化。②短期和长期冷水游泳训练均可以导致 BDNF 及其 mRNA 水平迅速变化,从而实现其对大鼠海马的保护作用。③短期冷水游泳训练不能使 NT-3 水平发生改变,长期冷水游泳训练其水平的改变可能并不是仅受到其 mRNA 的调节。④冷水游泳可以导致大鼠海马中神经营养素家族及其 mRNA 发生相应改变,从而实现对其神经系统的保护作用。

#### 参考文献

- [1] Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity[J]. Trends in Neuroscience, 2002, 25(6): 295-301.
- [2] Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2008, 11(9):58-65.
- [3] Cotman CW, Engesser-Cesar C. Exercise enhances and protects brain function[J]. Exercise and Sports Sciences Reviews, 2002, 30(2):75-79.
- [4] Kim JJ, Yoon KS. Stress: metaplastic effects in the hippocampus[J]. Trends in Neurosciences, 1998, 21(12):505-509.
- [5] Yun SJ, Park HJ, Yeom MJ, et al. Effects of electroacupunc-

- ture on the stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus[J]. *Neuroscience Letters*, 2002,318(2):85—88.
- [6] 娄淑杰, 刘瑾彦, 陈佩杰. 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[J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28(8):916—918.
- [7] 刘晓莉, 李红, 乔德才. 适量运动对大鼠海马神经元脑源性神经营养因子表达的影响[J]. *沈阳体育学院学报*, 2008,27(3):5—7.
- [8] Vaynman S, Ying Z, Gomez-Ponilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2004, 20(10):2580—2590.
- [9] Neeper SA, Gomez-Ponilla F, Choi J, et al. Exercise and brain neurotrophins[J]. *Nature*, 1995, 373(6510):109—115.
- [10] Taltavull JF, Chefer VI, Shippenberg TS, et al. Severe brain hypothermia as a factor underlying behavioral immobility during cold-water forced swim[J]. *Brain Research*, 2003, 13(975):244—247.
- [11] Dugue B, Leppanen E. Adaptation related to cytokines in man: effects of regular swimming in ice-cold water[J]. *Clinical Physiology*, 2000, 20(2):114—121.
- [12] Bidzinska B, Petraglia F, Angioni S, et al. Effect of different chronic intermittent stressors and acetyl-L-carnitine on hypothalamic  $\beta$ -endorphin and GnRH and on plasma testosterone levels in male rats[J]. *Neuroendocrinology*, 1993, 57(6):985—990.
- [13] Seta KA, Jansen HT, Kreitel KD, et al. Cold water swim stress increases the expression of neurotensin mRNA in the lateral hypothalamus and medial preoptic regions of the rat brain[J]. *Molecular Brain Research*, 2001,86(1):145—152.
- [14] Christianson JP, Drugan RC. Intermittent cold water swim stress increases immobility interferes with escape performance in rat[J]. *Behavioral Brain Research*, 2005, 165(1):58—62.
- [15] McArdle WD, Toner MM, Magel JR, et al. Thermal responses of men and women during cold-water immersion: influence of exercise intensity[J]. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 1992, 65(3):265—270.
- [16] Deckwerth TL, Elliott JL, Knudson CM, et al. BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development[J]. *Neuron*, 1996,17(3):401—411.
- [17] Estevez AG, Spear N, Manuel SM, et al. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation[J]. *The Journal of Neuroscience*, 1998, 18(3):923—931.
- [18] Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H, et al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) prevents the degeneration of motor neurons after axotomy[J]. *Nature*, 1990, 345(6274):440—441.
- [19] Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, et al. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section[J]. 1992, 360:757—758.
- [20] Yeghiayan SK, Luo S, Shukitt-Hale B, et al. Tyrosine improves behavioral and neurochemical deficits caused by cold exposure[J]. *Physiology and Behavior*, 2001, 72(3):311—316.
- [21] Harri M, Dannenberh T, Oksanen-Rossi R, et al. Related and unrelated changes in response to exercise and cold in rats: a reevaluation[J]. *Journal of Applied Physiology*, 1984, 57(5):1489—1497.
- [22] O'Brien C, Young AJ, Lee DT, et al. Role of core temperature as a stimulus for cold acclimation during repeated immersion in 20C water[J]. *Journal of Applied Physiology*, 2000,89(1):242—250.
- [23] Maier SF. Exposure to the stressor environment prevents the temporal dissipation of behavioral depression/learned helplessness[J]. *Biological Psychiatry*, 2001, 49(9):763—773.
- [24] Kalb R. The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons[J]. *Trends in Neuroscience*, 2005, 28(1):5—11.
- [25] Gomez-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]. *European Journal of Neuroscience*, 2001, 13(6):1078—1084.
- [26] Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, et al. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses[J]. *Neuron*, 1997, 19(5):1031—1047.
- [27] Dechant G, Barde YA. The neurotrophin receptor p75NTR: novel functions and implications for diseases of the nervous system[J]. *Nature of Neurosciences*, 2002, 5(11):1131—1136.
- [28] Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, et al. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2003, 23(1):349—357.