

·基础研究·

# 游泳运动预处理对脑出血小鼠神经功能的影响及其机制研究

李永旭<sup>1,2</sup>, 林丽斌<sup>1,2</sup>, 卢陶陶<sup>1,2</sup>, 魏伟<sup>1</sup>, 林志诚<sup>1</sup>, 薛偕华<sup>1,3\*</sup>

1 福建中医药大学附属康复医院, 福建 福州 350003;

2 福建中医药大学康复医学院, 福建 福州 350122;

3 福建省认知功能康复重点实验室, 福建 福州 350003

\* 通信作者: 薛偕华, E-mail: 465356738@qq.com

收稿日期: 2022-05-20; 接受日期: 2022-08-03

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(82004436); 福建省自然科学基金项目(2020J01759)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.02006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**摘要** **目的:** 观察游泳运动预处理(SEP)对脑出血(ICH)小鼠神经功能及血肿周围组织中脑源性神经营养因子(BDNF)、苏氨酸蛋白激酶(Akt)和过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 共激活因子1- $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ )蛋白表达的影响。**方法:** 选择60只雄性C57BL/6小鼠, 采用随机数字表法分为假手术组、脑出血7 d组、游泳运动预处理+脑出血7 d组(预处理1组)、脑出血14 d组和游泳运动预处理+脑出血14 d组(预处理2组), 每组12只。预处理1组和预处理2组先进行4周游泳运动预处理。4周后, 脑出血7 d组、预处理1组、脑出血14 d组和预处理2组小鼠右侧纹状体立体定向注射IV型胶原酶诱导ICH模型, 假手术组注射生理盐水。脑出血7 d组和预处理1组于造模后第7天进行神经功能评定、神经代谢物检测; 假手术组、脑出血14 d组和预处理2组于造模后第14天进行神经功能评定、神经代谢物检测。采用改良神经功能评分(mNSS)和Y迷宫实验检测小鼠的神经功能; 采用旷场实验法检测其运动能力; 采用磁共振波谱(MRS)分析小鼠血肿周围组织肌酸(Cr)、N-乙酰天冬氨酸(NAA)、胆碱(Cho)、肌醇(MI)和乳酸(Lac)的相对代谢水平; 采用Western blot法检测BDNF、p-Akt/Akt和PGC-1 $\alpha$ 蛋白的表达。**结果:** ① 神经功能和运动功能: 与假手术组比较, 脑出血7 d组和脑出血14 d组mNSS评分明显上升, 旷场运动总路程、旷场平均速度、Y迷宫正确交替率明显下降( $P < 0.05$ )。与脑出血7 d组比较, 预处理1组和预处理2组小鼠旷场运动总路程、旷场平均速度、Y迷宫正确交替率明显升高( $P < 0.05$ ), mNSS评分明显下降( $P < 0.05$ )。与脑出血14 d组比较, 预处理1组和预处理2组小鼠旷场运动总路程、旷场平均速度、Y迷宫正确交替率明显升高( $P < 0.05$ ), mNSS评分明显下降( $P < 0.05$ )。② 神经代谢: 与假手术组比较, 脑出血7 d组和脑出血14 d组NAA/Cr、Cho/Cr明显下降( $P < 0.05$ ), MI/Cr明显上升( $P < 0.05$ )。与脑出血7 d组、脑出血14 d组比较, 预处理1组和预处理2组NAA/Cr、Cho/Cr明显上升( $P < 0.05$ ), MI/Cr和Lac/Cr明显下降( $P < 0.05$ )。与预处理1组比较, 预处理2组小鼠血肿周围组织NAA/Cr、Cho/Cr、MI/Cr和Lac/Cr差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。③ BDNF、p-Akt和PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达: 与假手术组比较, 脑出血7 d组BDNF蛋白表达明显下降( $P < 0.05$ ), 脑出血7 d组及脑出血14 d组p-Akt/Akt、PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与脑出血7 d组比较, 预处理1组BDNF和PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达明显上升( $P < 0.05$ ), p-Akt/Akt蛋白差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与脑出血14 d组比较, 预处理2组p-Akt/Akt蛋白表达明显上升( $P < 0.05$ ), BDNF和PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与预处理1组比较, 预处理2组BDNF和PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), p-Akt/Akt蛋白表达明显上升( $P < 0.05$ )。**结论:** SEP可改善ICH小鼠神经功能和血肿周围组织的神经代谢, 其机制可能与BDNF、p-Akt/Akt和PGC-1 $\alpha$ 蛋白的上调有关。

**关键词** 脑出血; 游泳运动预处理; 神经功能; 运动功能; 脑源性神经营养因子; 苏氨酸蛋白激酶

引用格式: 李永旭, 林丽斌, 卢陶陶, 等. 游泳运动预处理对脑出血小鼠神经功能的影响及其机制研究[J]. 康复学报, 2023, 33(2): 127-135.

LI Y X, LIN L B, LU T T, et al. Effect and mechanism of swimming exercise preconditioning on neurological function of mice with intracerebral hemorrhage [J]. Rehabil Med, 2023, 33(2): 127-135.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.02006

自发性脑出血(intracerebral haemorrhage, ICH) 占有脑血管疾病的15%~20%,具有较高的病死率和致残率,并伴有严重的神经功能障碍和运动功能障碍<sup>[1]</sup>。研究表明,有氧运动和脑卒中存在明显负相关<sup>[2]</sup>,运动可以增加高密度脂蛋白胆固醇水平,改善血液流变学和血管内皮功能<sup>[3]</sup>。运动预处理(exercise preconditioning, EP)能有效改善脑缺血损伤,其机制与促进血管生成、抑制谷氨酸过度激活、保护血脑屏障、抑制细胞凋亡和炎症介质密切相关<sup>[4]</sup>。水基疗法优于陆基干预,可以改善中风患者的功能<sup>[5]</sup>。游泳运动可促进脑出血小鼠微管动力学介导的神经保护和神经可塑性<sup>[6]</sup>。游泳训练具有适度的有氧运动、水动力降低身体负荷和多种感官刺激输入等特点。但是游泳运动预处理(swimming exercise preconditioning, SEP)在脑出血方面的研究及其相关机制尚未深入阐明。

脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)是神经营养因子家族的一员,是参与神经保护、神经发生和神经可塑性的关键分子,也是脑卒中后运动学习和康复的关键调节因子<sup>[7]</sup>。苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine kinase, Akt)是生长因子诱导细胞存活的关键介质,与神经突分支、延长和直径增加有关,磷酸化的Akt促进神经元生长并参与神经元极性的形成<sup>[8]</sup>。过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 共激活因子1- $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  co-activator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ )是线粒体生物发生的关键驱动因子,参与许多对运动训练有益的适应调节<sup>[9]</sup>。BDNF、Akt和PGC-1 $\alpha$ 在脑卒中运动康复过程中发挥着重要作用,但是BDNF、Akt和PGC-1 $\alpha$ 在脑出血EP中的作用机制尚不清楚。本研究通过观察SEP对实验性ICH小鼠神经功能及血肿周围组织BDNF、Akt和PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达的影响,探讨SEP对ICH神经功能的影响及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选择8~10周SPF级雄性C57BL/6小鼠60只,体质量25~30 g,购买于中国江苏集萃药康公司[许可证号:SCXK(苏)2018-0008]。小鼠饲养于福建中医药大学SPF级动物实验室[实验动物生产许可证号:SYXK(闽)2020-0002],自由进食、饮水,12 h光照/黑暗周期。本研究通过福建中医药大学动物实验伦理委员会批准(审批号:FJTCMIACUC 2020091)。

### 1.2 主要实验设备与试剂

立体定位仪(中国瑞沃德公司);微量注射泵(美国KD Scientific公司,型号:78-8130);旷场实验设备、Supermaze软件、Y迷宫实验设备(上海欣软信息科技有限公司);7.0 T小动物磁共振系统(Bruker BioSpec70/20 USR)、TOPSPIN软件包(V3.1)均购自德国Bruker BioSpin公司;研磨仪(上海净信实业发展有限公司, JXFSTPRP-24L);IV型胶原酶(美国Sigma化学公司, C5138);BCA定量试剂盒(美国赛默飞世尔科技公司);p-Akt抗体(4060S)、Akt抗体(4691S)均购自美国Cell Signaling Technology公司;BDNF抗体(ab108319)、PGC-1 $\alpha$ 抗体(ab191838)均购自英国Abcam公司; $\beta$ -actin抗体(60004-1-Ig)、离子钙结合衔接分子1(Ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba1)抗体(10904-1-AP)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(16825-1-AP)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;显影液(上海百赛生物技术股份有限公司, Super ECL Plus S6009M)。

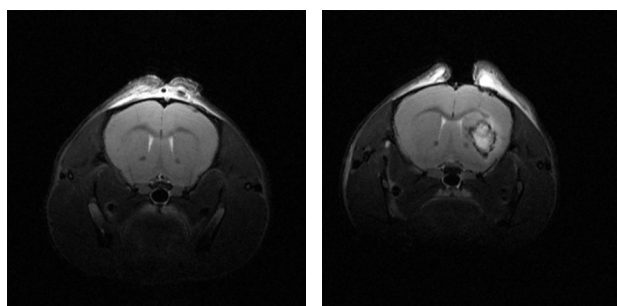
### 1.3 实验方法

**1.3.1 实验动物分组** 60只雄性C57BL/6小鼠采用SPSS 20.0生成的随机数字表分为假手术组、脑出血7 d组、游泳运动预处理+脑出血7 d组(预处理1组)、脑出血14 d组和游泳运动预处理+脑出血14 d组(预处理2组),每组12只。

**1.3.2 游泳运动预处理** 参照KINOSHITA等<sup>[10]</sup>脑出血模型的EP时间和ZHENG等<sup>[11]</sup>脑出血模型的游泳训练方法对预处理1组和预处理2组进行SEP干预。具体训练方法如下:同笼小鼠在同1个游泳池(泳池尺寸:100 cm $\times$ 80 cm $\times$ 60 cm,水深50 cm,水温36~38 $^{\circ}$ C)训练,用小渔网驱使小鼠进行游泳。训练过程中需随时观察小鼠状态,保证充足的空间,防止相互踩踏导致溺水,当小鼠沉下水面暂停训练。每次训练结束后,需尽快擦干小鼠身上的水,吹干皮毛,清洁泳池,并放回原笼位。2组小鼠先适应性游泳训练1周,第1天10 min,第2~4天每天增加10 min,第5天游泳时间50 min,之后每天持续游泳50 min,共干预4周。造模后,不再进行游泳训练。

**1.3.3 动物模型制备** 参照ROSENBERG等<sup>[12]</sup>提出的胶原酶诱导ICH大鼠模型制备方法进行动物模型制备。具体方法如下:通过向脑出血7 d组、预处理1组、脑出血14 d组和预处理2组小鼠右侧纹状体立体定位注射IV型胶原酶诱导ICH模型。用

3.5%异氟烷麻醉小鼠,将麻醉后的小鼠俯卧位固定在立体定位仪上,调整立体定位仪使前囟和后囟处于同一平面。维持温度在36.5~37.5℃,用牙科钻钻1个圆孔(直径约1.0 mm),不损伤硬脑膜。30号微量注射器通过颅骨上的钻孔插入右侧纹状体(立体定向坐标:中线外侧2.0 mm,前囟向前0.8 mm,颅骨下方3.5 mm)。设定微量注射泵注射速度为50 nL/min。向脑实质内注射含0.037 5 U IV型胶原酶的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)0.4 μL诱导ICH。术后,用骨蜡封闭小孔,并用手术线缝合伤口。假手术组以等体积生理盐水代替胶原酶溶液,其余步骤同其他组。采用核磁共振(magnetic resonance imaging, MRI) T2加权成像(T2 weighted image, T2WI)显示ICH血肿来鉴定造模是否成功<sup>[13]</sup>。假手术组小鼠T2WI序列呈现低信号,未见血肿;脑出血的小鼠T2WI序列呈现高信号,可见明显的血肿占位,并且血肿主要集中在基底节区,表示ICH模型造模成功。见图1。



假手术组 脑出血组

图1 2组MRI T2WI加权成像对比图

Figure 1 Comparison of weighted T2WI MRI images between two groups

**1.3.4 观察指标** 脑出血7 d组和预处理1组于造模后第7天进行神经功能评定、神经代谢物检测;假手术组、脑出血14 d组和预处理2组于造模后第14天进行神经功能评定、神经代谢物检测。

**1.3.4.1 神经功能和运动功能评价** 采用改良神经功能评分(modified neurological severity score, mNSS)和Y迷宫实验评定神经功能;旷场实验评价运动功能。

(1)mNSS评分 mNSS评分主要包括以下4个部分。①运动试验:提尾试验;将小鼠置于地板观察其能否正常行走。②感觉试验:放置试验(视觉、触觉测试);本体感觉试验(向桌子边缘压鼠爪刺激肢体肌肉);平衡木试验。③反射丧失和异常运

动:耳廓反射(接触外耳道时摇头);角膜反射(用棉丝轻触角膜时眨眼);惊恐反射(对快弹硬纸板的噪音有运动反应)。④癫痫、肌阵挛、肌张力障碍。如果小鼠不能完成某一任务,记1分。总分0~18分,其中1~6分为轻度损伤;7~12分为中度损伤;13~18分为重度损伤<sup>[14]</sup>。

(2)Y迷宫实验 Y迷宫实验主要用于检测工作记忆和探索活动<sup>[15]</sup>。Y迷宫由3个大小为35 cm×5 cm×15 cm的臂组成,以角度120°围绕中心区域连接排列。每只小鼠被放置在中心区域,让其自由探索8 min,视频成像系统捕捉进入臂的次数和正确交替次数,连续进入3个不一样的臂为1次交替,用正确交替率评价工作记忆功能。

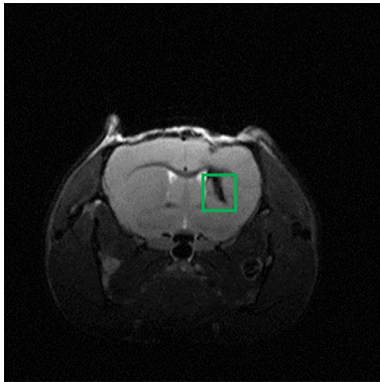
正确交替率=正确交替的次数/(进入臂的总次数-2)

(3)旷场实验 采用旷场实验评价实验动物运动功能<sup>[16]</sup>。将小鼠从中心点放入旷场(50 cm×50 cm×45 cm),让其自由探索10 min,计算机软件以及相应的摄像工具捕捉其运动路径并且对实验过程进行录像,后期运用Supermaze软件计算小鼠运动总路程、平均速度、中心区域运动路程比等行为学指标。

**1.3.4.2 神经代谢物水平比较** 采用7.0 T小动物磁共振波谱(magnetic resonance spectroscopy, MRS)检测5组小鼠血肿周围组织肌酸(creatine, Cr)、N-乙酰天冬氨酸(N-acetylaspartate, NAA)、胆碱(choline, Cho)、肌醇(myo-inositol, MI)和乳酸(lactate, Lac)的相对代谢水平。小鼠经2%~3%异氟烷麻醉后,俯卧位置于扫描床上,生理感应垫片监测小鼠呼吸频率。采集包括定位像、T2WI及波谱扫描。T2WI采用弛豫增强快速采集序列。T2WI具体参数:回波时间(time of echo, TE)=35 ms;重复时间(time of repetition, TR)=4 200 ms;平均次数(averages)=4;层厚(slice thickness)=0.5 mm;视野(field of view)=20 mm×20 mm;矩阵(matrix)=256×256。最后进行MRS扫描,在T2WI加权的冠状面上选取纹状体为感兴趣区域(1 mm×1 mm×1 mm)。见图2。匀场抑水使半高宽<20 Hz后进行扫描。MRS具体参数:TE=20 ms, TR=1 500 ms, averages=256。

使用TOPSPIN软件包计算Cr、Cho、NAA、MI和Lac的相对代谢水平。肌酸(Cr)峰作为波谱内参。神经代谢物质化学位移采用百万分之一( $\times 10^{-6}$ )进行描述。Cr、Cho、NAA、MI和Lac等神经化学物质的位置分别为 $3.05 \times 10^{-6}$ 、 $3.20 \times 10^{-6}$ 、 $2.02 \times 10^{-6}$ 、 $3.56 \times 10^{-6}$ 和 $1.33 \times 10^{-6}$ 。采用量子估计(QUEST)方法计算Cho与Cr曲线下面积的比值(Cho/Cr),该比值代

表Cho的化学代谢水平。用同样的方法计算NAA(NAA/Cr)、MI(MI/Cr)和Lac(Lac/Cr)的化学代谢水平。



注:绿色方框表示感兴趣区域。

Note: The green box indicates the areas of interest.

图2 MRS定位图

Figure 2 Location map of MRS

**1.3.4.3 Western blot 法检测 BDNF、Akt、p-Akt 和 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达** 行为学检测完毕后,每组随机抽取4只小鼠,1%戊巴比妥钠(0.3 mL/100 g)麻醉小鼠,在冰上迅速剥离脑组织。用手术刀片沿冠状位切取血肿周围脑组织(针孔周围2 mm),再切除健侧脑组织。在每个样本(约0.05 g)内加入相应体积的裂解液(约500  $\mu$ L),研磨仪研磨(45 s);离心,取上清液,进行蛋白定量,变性;上样后开始电泳;经转膜、封闭、孵育一抗4  $^{\circ}$ C过夜、孵育二抗进行显影,保存并用Image Lab<sup>TM</sup> Software软件分析目的蛋白灰度值。

**1.4 统计学方法**

采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析。计量资料符合正态分布采用( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用ANOVA单因素方差分析,若方差齐,两两比较采用LSD-*t*检验;若方差不齐则采用Games-Howell法。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 5组小鼠神经功能和运动功能比较**

**2.1.1 5组小鼠 mNSS 评分比较** 与假手术组比较,脑出血7 d组和脑出血14 d组 mNSS 评分明显升高( $P<0.05$ )。与脑出血7 d组和脑出血14 d组比较,预处理1组、预处理2组 mNSS 评分明显降低( $P<0.05$ )。见表1。

表1 5组 mNSS 评分比较( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 1 Comparison of mNSS score in five groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	mNSS 评分
假手术组	6	1.12 $\pm$ 0.35
脑出血7 d组	6	4.37 $\pm$ 0.52 <sup>1)</sup>
脑出血14 d组	6	3.87 $\pm$ 0.64 <sup>1)</sup>
预处理1组	6	2.75 $\pm$ 0.46 <sup>2)3)</sup>
预处理2组	6	2.62 $\pm$ 0.52 <sup>2)3)</sup>

注:与假手术组比较,1)  $P<0.05$ ;与脑出血7 d组比较,2)  $P<0.05$ ;与脑出血14 d组比较,3)  $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the ICH 7 d group, 2)  $P<0.05$ ; compared with the ICH 14 d group, 3)  $P<0.05$ .

**2.1.2 5组小鼠旷场实验和Y迷宫实验结果比较** 旷场轨迹显示,与假手术组、预处理1组、预处理2组比较,脑出血7 d组和脑出血14 d组小鼠旷场轨迹明显减少( $P<0.05$ )。见图3。旷场实验和Y迷宫实验结果显示,与假手术组比较,脑出血7 d组和脑出血14 d组旷场运动总路程、旷场平均速度、Y迷宫正确交替率明显下降( $P<0.05$ )。与脑出血7 d组、脑出血14 d组比较,预处理1组、预处理2组小鼠旷场运动总路程、旷场平均速度、Y迷宫正确交替率均明显升高( $P<0.05$ )。5组小鼠旷场实验中心区域运动路程比值差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与预处理1组比较,预处理2组小鼠旷场运动总路程、旷场平均速度、Y迷宫正确交替率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图3、表2。

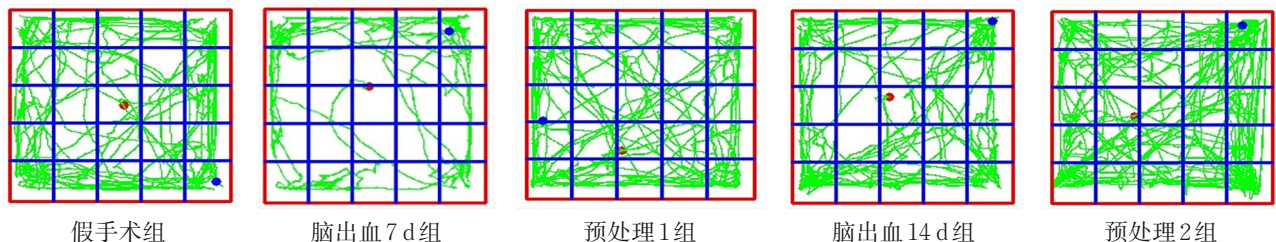


图3 5组旷场轨迹图

Figure 3 Open field track in five groups

表2 5组旷场实验和Y迷宫实验结果比较( $\bar{x}\pm s$ )Table 2 Comparison of open field test and Y maze test in five groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	运动总路程/mm	平均速度/(mm/s)	中心区域运动路程比	Y迷宫正确交替率
假手术组	6	28 199.00±4 174.75	101.60±16.48	0.18±0.05	0.78±0.03
脑出血7 d组	6	16 422.49±4 076.32 <sup>1)</sup>	54.80±13.60 <sup>1)</sup>	0.14±0.04	0.56±0.08 <sup>1)</sup>
脑出血14 d组	6	16 454.93±4 860.97 <sup>1)</sup>	54.91±16.22 <sup>1)</sup>	0.15±0.04	0.56±0.09 <sup>1)</sup>
预处理1组	6	24 202.76±2 129.50 <sup>2)3)</sup>	80.77±7.09 <sup>2)3)</sup>	0.18±0.06	0.71±0.08 <sup>2)3)</sup>
预处理2组	6	31 241.05±6 554.34 <sup>2)3)</sup>	104.25±21.87 <sup>2)3)</sup>	0.16±0.03	0.72±0.03 <sup>2)3)</sup>

注:与假手术组比较,1)  $P<0.05$ ;与脑出血7 d组比较,2)  $P<0.05$ ;与脑出血14 d组比较,3)  $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the ICH 7 d group, 2)  $P<0.05$ ; compared with the ICH 14 d group, 3)  $P<0.05$ .

## 2.2 5组小鼠血肿周围组织NAA、Cho、MI和Lac相对代谢水平比较

与假手术组比较,脑出血7 d组和脑出血14 d组NAA/Cr、Cho/Cr明显下降,MI/Cr明显上升( $P<0.05$ ),脑出血7 d组Lac/Cr明显上升( $P<0.05$ )。与

脑出血7 d组、脑出血14 d组比较,预处理1组、预处理2组NAA/Cr、Cho/Cr均明显上升,MI/Cr、Lac/Cr均明显下降( $P<0.05$ )。与预处理1组比较,预处理2组小鼠血肿周围组织NAA/Cr、Cho/Cr、MI/Cr和Lac/Cr差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图4、表3。

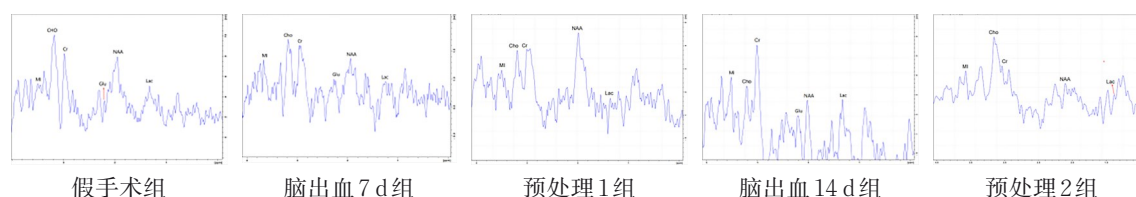


图4 5组典型MRS代谢图

Figure 4 Representative MRS graphs in five groups

表3 5组NAA/Cr、Cho/Cr、MI/Cr和Lac/Cr比值比较( $\bar{x}\pm s$ )Table 3 Comparison of ratios of NAA/Cr, Cho/Cr, MI/Cr and Lac/Cr in five groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	NAA/Cr	Cho/Cr	MI/Cr	Lac/Cr
假手术组	6	1.30±0.23	1.42±0.03	0.52±0.19	0.47±0.19
脑出血7 d组	6	0.62±0.11 <sup>1)</sup>	0.81±0.11 <sup>1)</sup>	1.35±0.20 <sup>1)</sup>	0.71±0.12 <sup>1)</sup>
脑出血14 d组	6	0.54±0.14 <sup>1)</sup>	0.73±0.17 <sup>1)</sup>	1.02±0.30 <sup>1)</sup>	0.57±0.27
预处理1组	6	1.13±0.06 <sup>2)3)</sup>	1.44±0.28 <sup>2)3)</sup>	0.55±0.20 <sup>2)3)</sup>	0.33±0.11 <sup>2)3)</sup>
预处理2组	6	1.29±0.20 <sup>2)3)</sup>	1.55±0.28 <sup>2)3)</sup>	0.67±0.26 <sup>2)3)</sup>	0.39±0.17 <sup>2)3)</sup>

注:与假手术组比较,1)  $P<0.05$ ;与脑出血7 d组比较,2)  $P<0.05$ ;与脑出血14 d组比较,3)  $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the ICH 7 d group, 2)  $P<0.05$ ; compared with the ICH 14 d group, 3)  $P<0.05$ .

## 2.3 5组小鼠血肿周围组织BDNF、p-Akt/Akt和PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达比较

与假手术组比较,脑出血7 d组BDNF蛋白表达明显下降( $P<0.05$ ),脑出血7 d组及脑出血14 d组p-Akt/Akt、PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与脑出血7 d组比较,预处理1组BDNF和PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达明显上升( $P<0.05$ ),p-Akt/Akt

蛋白差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与脑出血14 d组比较,预处理2组p-Akt/Akt蛋白表达明显上升( $P<0.05$ ),BDNF和PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与预处理1组比较,预处理2组BDNF和PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ),p-Akt/Akt蛋白表达明显上升( $P<0.05$ )。见图5、表4。

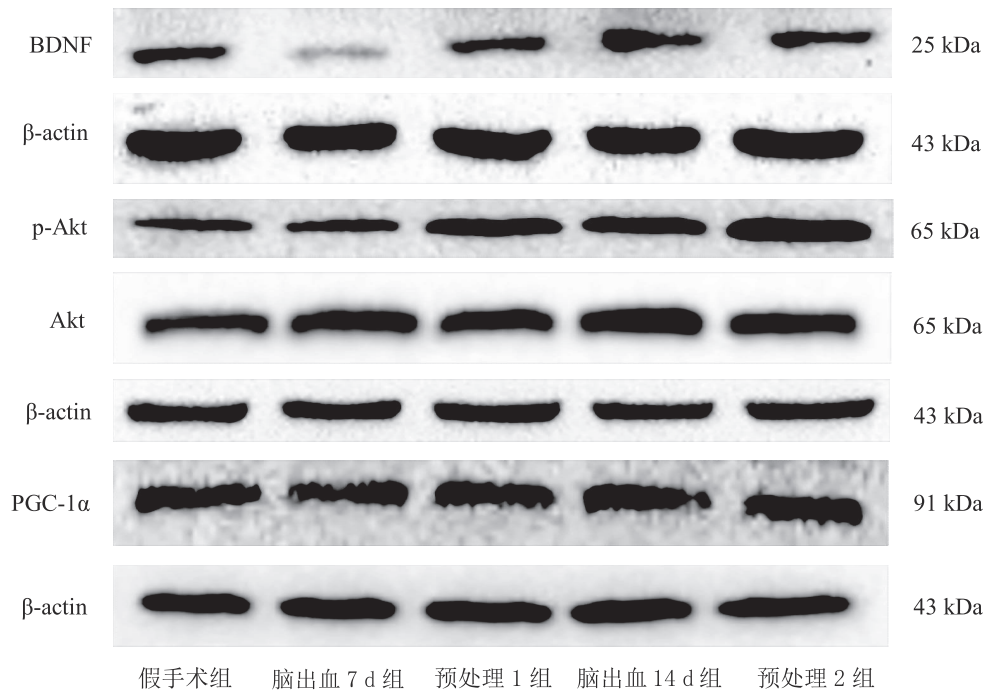


图5 5组BDNF、p-Akt、Akt和PGC-1α蛋白电泳图

Figure 5 Electrophoretogram of BDNF, p-Akt, Akt and PGC-1α in five groups

表4 5组BDNF、p-Akt/Akt和PGC-1α蛋白表达比较(̄x±s)

Table 4 Comparison of expression levels of BDNF, p-Akt/Akt, and PGC-1α protein in five groups (̄x±s)

组别	n	BDNF	p-Akt/Akt	PGC-1α
假手术组	4	0.81±0.20	0.34±0.12	0.49±0.03
脑出血7 d组	4	0.35±0.06 <sup>1)</sup>	0.23±0.08	0.47±0.14
脑出血14 d组	4	0.81±0.19	0.32±0.09	0.59±0.13
预处理1组	4	0.65±0.11 <sup>2)</sup>	0.32±0.16	0.75±0.15 <sup>1)2)</sup>
预处理2组	4	0.74±0.19 <sup>2)</sup>	1.18±0.66 <sup>1)2)3)4)</sup>	0.83±0.03 <sup>1)2)</sup>

注:与假手术组比较,1)  $P < 0.05$ ;与脑出血7 d组比较,2)  $P < 0.05$ ;与脑出血14 d组比较,3)  $P < 0.05$ ;与预处理1组比较,4)  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the sham group, 1)  $P < 0.05$ ; compared with the ICH 7 d group, 2)  $P < 0.05$ ; compared with the ICH 14 d group, 3)  $P < 0.05$ ; compared with the preconditioning group 1, 4)  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

#### 3.1 SEP可以改善ICH小鼠神经功能和血肿周围组织的神经代谢

本研究结果显示,与脑出血7 d组和脑出血14 d组比较,预处理1组和预处理2组mNSS评分、MI/Cr和Lac/Cr明显降低,Y迷宫正确交替率、旷场运动总路程、旷场平均速度以及NAA/Cr和Cho/Cr明显上升。提示SEP能明显改善ICH小鼠神经功能缺损、运动功能障碍和血肿周围组织神经代谢。可能与以下因素有关:① SEP通过触发细胞和生物体表达内在的保护因子,帮助小鼠获得耐受性和防御未来

可能的损伤,诱导ICH损伤产生耐受或抵抗,进而改善ICH小鼠的神经功能。其可能的机制是SEP通过促进血管生成、调节炎症反应和抑制神经元凋亡从而发挥对ICH小鼠的神经保护作用。这与BAILLIEUL等<sup>[17-19]</sup>研究发现规律的运动能促进血管性痴呆、阿尔茨海默病等神经系统疾病小鼠模型脑功能恢复的结果一致。② NAA通过作用于细胞代谢和髓鞘形成,在生理上控制脑细胞发育,参与神经元的功能和代谢,在神经系统的功能维持中发挥关键作用<sup>[20-21]</sup>。Cho是神经递质乙酰胆碱的前体分子,参与神经细胞膜的形成,神经元数量的增加可以表现为Cho峰的增加<sup>[22]</sup>。本研究中小鼠在ICH后,

NAA/Cr和Cho/Cr明显下降,并出现神经功能障碍,但是经过SEP治疗的小鼠在ICH后,NAA/Cr和Cho/Cr明显上升,神经功能明显改善,SEP可能通过提高NAA和Cho的相对代谢水平从而改善ICH小鼠的神经功能。③MI通常被认为是胶质细胞增生和神经炎症反应的标志,主要存在于神经胶质细胞中<sup>[23]</sup>。缺血和缺氧后Lac水平升高<sup>[24]</sup>。在本研究中,经过SEP干预的ICH小鼠MI/Cr和Lac/Cr明显下降,SEP可能通过降低MI和Lac的相对代谢水平从而改善ICH小鼠的神经功能。与预处理1组比较,预处理2组mNSS评分、Y迷宫正确交替率、旷场运动总路程、旷场平均速度以及神经代谢水平差异均无统计学意义,表明小鼠具有较强的神经损伤自我修复能力。

### 3.2 SEP改善神经功能可能与BDNF、p-Akt/Akt和PGC-1 $\alpha$ 蛋白上调有关

本研究结果显示,与脑出血7d组比较,预处理1组BDNF和PGC-1 $\alpha$ 的蛋白表达明显增加。与脑出血14d组比较,预处理2组p-Akt/Akt蛋白的表达明显上升。提示SEP可能通过上调BDNF、p-Akt/Akt和PGC-1 $\alpha$ 蛋白的表达,促进神经发生和神经可塑性,减少脑梗死体积,从而改善ICH小鼠的神经功能。可能与以下因素有关:①BDNF是一种重要的神经营养因子,参与运动学习、恢复和中风后的神经康复。SEP可能促进小鼠脑内BDNF的表达;脑内高水平的BDNF促进神经发生和神经可塑性,减少脑梗死体积,从而改善ICH小鼠的神经功能。这与VAYNMAN等<sup>[25-28]</sup>研究结果发现运动可以通过增加BDNF的表达,促进突触可塑性的结果一致。②Akt是丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员,是细胞信号转导的重要节点,在细胞生存、增殖和凋亡中发挥着关键作用。经SEP治疗后,小鼠脑内p-Akt蛋白的表达明显上升。高水平的p-Akt蛋白促进神经元生长并参与神经元极性的形成,以及调控神经元的凋亡和增殖,从而改善ICH小鼠的神经功能。这与MANNING等<sup>[29-31]</sup>研究结果发现强制跑步运动通过调节Akt改善认知障碍和海马神经发生障碍,促进p-Akt蛋白的表达,增加空间学习记忆能力的结果一致。③PGC-1 $\alpha$ 是一种转录共激活因子,是线粒体生物发生的关键因子,SEP促进了小鼠脑内PGC-1 $\alpha$ 蛋白的表达,高水平的PGC-1 $\alpha$ 蛋白预防神经元缺失,正向调节线粒体稳定性和抗氧化途径,增加抗凋亡因子,从而改善ICH小鼠的神经功能。这与KIM等<sup>[32-34]</sup>研究发现运动诱导的PGC-1 $\alpha$ 通过激活

小鼠脑内Akt信号分子减少缺血诱导神经元损伤的结果一致。

## 4 小 结

SEP可以改善ICH血肿周围的神经代谢,发挥对ICH小鼠的神经保护作用,其机制可能与SEP可以上调小鼠脑内BDNF、p-Akt/Akt和PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达有关。但本研究仍存在一些不足之处,如尚未发现SEP促进脑出血小鼠血肿吸收的直接证据,且未就不同的运动训练时间、方式、剂量等对ICH后神经功能的影响进行深入研究。下一步研究中将使用BDNF、p-Akt/Akt和PGC-1 $\alpha$ 抑制剂来深入探讨SEP改善脑出血神经功能的具体机制,为脑出血非药物治疗提供进一步的理论支持。

## 参考文献

- [1] WILSON D, ADAMS M E, ROBERTSON F, et al. Investigating intracerebral haemorrhage [J]. *BMJ*, 2015, 350: h2484.
- [2] KYU H H, BACHMAN V F, ALEXANDER L T, et al. Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart disease, and ischemic stroke events: systematic review and dose-response meta-analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *BMJ*, 2016, 354: i3857.
- [3] LEE I M, HENNEKENS C H, BERGER K, et al. Exercise and risk of stroke in male physicians [J]. *Stroke*, 1999, 30(1): 1-6.
- [4] ZHU L W, YE T, TANG Q, et al. Exercise preconditioning regulates the toll-like receptor 4/nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway and reduces cerebral ischemia/reperfusion inflammatory injury: a study in rats [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(11): 2770-2779.
- [5] VELDEMA J, JANSEN P. Aquatic therapy in stroke rehabilitation: systematic review and meta-analysis [J]. *Acta Neurol Scand*, 2021, 143(3): 221-241.
- [6] SUN L M, WANG G H, WU Z T, et al. Swimming exercise reduces the vulnerability to stress and contributes to the Akt/GSK3 $\beta$ /CRMP2 pathway and microtubule dynamics mediated protective effects on neuroplasticity in male C57BL/6 mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2021, 211: 173285.
- [7] LAMBOURNE K, TOMPOROWSKI P. The effect of exercise-induced arousal on cognitive task performance: a meta-regression analysis [J]. *Brain Res*, 2010, 1341: 12-24.
- [8] READ D E, GORMAN A M. Involvement of Akt in neurite outgrowth [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(18): 2975-2984.
- [9] LEICK L, LYNGBY S S, WOJTASZEWSKI J F P, et al. PGC-1 $\alpha$  is required for training-induced prevention of age-associated decline in mitochondrial enzymes in mouse skeletal muscle [J]. *Exp Gerontol*, 2010, 45(5): 336-342.
- [10] KINOSHITA K, HAMANAKA G, OHTOMO R, et al. Mature adult mice with exercise-preconditioning show better recovery after intracerebral hemorrhage [J]. *Stroke*, 2021, 52(5): 1861-1865.

- [11] ZHENG S L, ZHANG F X, LIU Q S, et al. Exercise training increases spatial memory via reducing contralateral hippocampal NMDAR subunits expression in intracerebral hemorrhage rats [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, 15: 1921–1928.
- [12] ROSENBERG G A, MUN-BRYCE S, WESLEY M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats [J]. *Stroke*, 1990, 21(5): 801–807.
- [13] LIU Y, YANG S S, CAI E L, et al. Functions of lactate in the brain of rat with intracerebral hemorrhage evaluated with MRI/MRS and *in vitro* approaches [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2020, 26(10): 1031–1044.
- [14] GERMANÒ A F, DIXON C E, D'AVELLA D, et al. Behavioral deficits following experimental subarachnoid hemorrhage in the rat [J]. *J Neurotrauma*, 1994, 11(3): 345–353.
- [15] KINOSHITA K, OHTOMO R, TAKASE H, et al. Different responses after intracerebral hemorrhage between young and early middle-aged mice [J]. *Neurosci Lett*, 2020, 735: 135249.
- [16] FENG L, HAN C X, CAO S Y, et al. Deficits in motor and cognitive functions in an adult mouse model of hypoxia-ischemia induced stroke [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 20646.
- [17] BAILLIEUL S, CHACAROUN S, DOUTRELEAU S, et al. Hypoxic conditioning and the central nervous system: a new therapeutic opportunity for brain and spinal cord injuries? [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017, 242(11): 1198–1206.
- [18] HÖTTING K, RÖDER B. Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2013, 37(9 Pt B): 2243–2257.
- [19] SAKAKIMA H. Endogenous neuroprotective potential due to preconditioning exercise in stroke [J]. *Phys Ther Res*, 2019, 22(2): 45–52.
- [20] CIRILLO J, MOONEY R A, ACKERLEY S J, et al. Neurochemical balance and inhibition at the subacute stage after stroke [J]. *J Neurophysiol*, 2020, 123(5): 1775–1790.
- [21] BASLOW M H. Functions of N-acetyl-L-aspartate and N-acetyl-L-aspartylglutamate in the vertebrate brain: role in glial cell-specific signaling [J]. *J Neurochem*, 2000, 75(2): 453–459.
- [22] TKÁC I, RAO R, GEORGIEFF M K, et al. Developmental and regional changes in the neurochemical profile of the rat brain determined by *in vivo* <sup>1</sup>H NMR spectroscopy [J]. *Magn Reson Med*, 2003, 50(1): 24–32.
- [23] SU L, BLAMIRE A M, WATSON R, et al. Whole-brain patterns of <sup>1</sup>H-magnetic resonance spectroscopy imaging in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies [J]. *Transl Psychiatry*, 2016, 6(8): e877.
- [24] CASTRO M A, BELTRÁN F A, BRAUCHI S, et al. A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid [J]. *J Neurochem*, 2009, 110(2): 423–440.
- [25] VAYNMAN S, YING Z, GOMEZ-PINILLA F. Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity [J]. *Neuroscience*, 2003, 122(3): 647–657.
- [26] RASMUSSEN P, BRASSARD P, ADSER H, et al. Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise [J]. *Exp Physiol*, 2009, 94(10): 1062–1069.
- [27] LUO L, LI C Q, DU X X, et al. Effect of aerobic exercise on BDNF/proBDNF expression in the ischemic hippocampus and depression recovery of rats after stroke [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 362: 323–331.
- [28] OTSUKA S, SAKAKIMA H, SUMIZONO M, et al. The neuroprotective effects of preconditioning exercise on brain damage and neurotrophic factors after focal brain ischemia in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 303: 9–18.
- [29] MANNING B D, TOKER A. Akt/PKB signaling: navigating the network [J]. *Cell*, 2017, 169(3): 381–405.
- [30] JI J F, JI S J, SUN R, et al. Forced running exercise attenuates hippocampal neurogenesis impairment and the neurocognitive deficits induced by whole-brain irradiation via the BDNF-mediated pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(2): 646–651.
- [31] SEO T B, CHO H S, SHIN M S, et al. Treadmill exercise improves behavioral outcomes and spatial learning memory through up-regulation of reelin signaling pathway in autistic rats [J]. *J Exerc Rehabil*, 2013, 9(2): 220–229.
- [32] KIM S H, KOH J H, HIGASHIDA K, et al. PGC-1 $\alpha$  mediates a rapid, exercise-induced downregulation of glycogenolysis in rat skeletal muscle [J]. *J Physiol*, 2015, 593(3): 635–643.
- [33] WRANN C D, WHITE J P, SALOGIANNIS J, et al. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 $\alpha$ /FND5 pathway [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(5): 649–659.
- [34] LI D J, LI Y H, YUAN H B, et al. The novel exercise-induced hormone irisin protects against neuronal injury via activation of the Akt and ERK1/2 signaling pathways and contributes to the neuroprotection of physical exercise in cerebral ischemia [J]. *Metabolism*, 2017, 68: 31–42.

## Effect and Mechanism of Swimming Exercise Preconditioning on Neurological Function of Mice with Intracerebral Hemorrhage

LI Yongxu<sup>1,2</sup>, LIN Libin<sup>1,2</sup>, LU Taotao<sup>1,2</sup>, WEI Wei<sup>1</sup>, LIN Zhicheng<sup>1</sup>, XUE Xiehua<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> The Affiliated Rehabilitation Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China;

<sup>2</sup> School of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

<sup>3</sup> Fujian Provincial Key Laboratory of Cognitive Function Rehabilitation, Fuzhou, Fujian 350003, China

\*Correspondence: XUE Xiehua, E-mail: 465356738@qq.com

**ABSTRACT Objective:** To observe the effect of swimming exercise preconditioning on neurological function and expression levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF), serine-threonine kinase (Akt) and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) proteins in perihematoma tissues of mice with intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods:** A total of 60 male C57BL/6 mice were randomly divided into sham group, ICH 7 d group, SEP+ICH 7 d group (preconditioning group 1), ICH 14 d group and SEP+ICH 14 d group (preconditioning group 2), with 12 cases in each group. The preconditioning group 1 and preconditioning group 2 were preconditioned with swimming exercise for four weeks. After four weeks, ICH model was induced by stereotactic injection of collagenase type IV into the right striatum of mice in the ICH 7 d group, the preconditioning group 1, the ICH 14 d group and the preconditioning group 2, while normal saline was injected into the sham group. Neurological function was evaluated and neurometabolites were detected on the 7th day after modeling in the ICH 7 d group and the preconditioning group 1, and on the 14th day after modeling in the sham group, the ICH 14 d group and the preconditioning group 2. Modified neurological severity score (mNSS) and Y maze method were used to detect the neurological function; open field test was used to detect the motor function. Magnetic resonance spectroscopy (MRS) was used to analyze the relative metabolism levels of creatine (Cr), choline (Cho), N-acetylaspartate (NAA), myo-inositol (MI), and lactate (Lac) in surrounding tissues of hematoma. Western blot was used to detect the expression levels of BDNF, p-Akt/Akt and PGC-1 $\alpha$ . **Results:** (1) Neurological function and motor function: compared with the sham group, the mNSS score in the ICH 7 d group and the ICH 14 d group significantly increased, and the total movement distance, the average velocity of the open field test and correct alternation rate of Y maze significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the ICH 7 d group, mNSS in the preconditioning group 1 and the preconditioning group 2 significantly decreased, and the total movement distance, the average velocity of the open field test and correct alternation rate of Y maze significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the ICH 14 d group, mNSS score in the preconditioning group 1 and the preconditioning group 2 significantly decreased, and the total movement distance, the average velocity of the open field test and correct alternation rate of Y maze significantly increased ( $P < 0.05$ ). (2) Neurometabolism: compared with the sham group, NAA/Cr and Cho/Cr in the ICH 7 d group and the ICH 14 d group significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and MI/Cr significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the ICH 7 d group and the ICH 14 d group, NAA/Cr and Cho/Cr in the preconditioning group 1 and the preconditioning group 2 significantly increased ( $P < 0.05$ ), and MI/Cr and Lac/Cr significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the preconditioning group 1, there were no significant differences in NAA/Cr, Cho/Cr, MI/Cr and Lac/Cr in the preconditioning group 2 ( $P > 0.05$ ). (3) The expression levels of BDNF, p-Akt and PGC-1 $\alpha$ : compared with the sham group, the expression of BDNF in the ICH 7 d group significantly decreased ( $P < 0.05$ ), there were no significant difference in p-Akt/Akt and PGC-1 $\alpha$  in the ICH 7 d group and the ICH 14 d group ( $P > 0.05$ ). Compared with the ICH 7 d group, the expression levels of BDNF and PGC-1 $\alpha$  in the preconditioning group 1 significantly increased ( $P < 0.05$ ), there was no significant differences in p-Akt/Akt protein ( $P > 0.05$ ). Compared with the ICH 14 d group, the expression of p-Akt/Akt protein in the preconditioning group 2 significantly increased ( $P < 0.05$ ), there were no significant difference in BDNF and PGC-1 $\alpha$ . Compared with the preconditioning group 1, there were no significant difference in expression of BDNF and PGC-1 $\alpha$  in the preconditioning group 2 ( $P > 0.05$ ), the expression of p-Akt/Akt significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Swimming exercise preconditioning contributes to the recovery of neurological function and the improvement of neurological metabolism around hematoma in ICH mice, which may be related to the upregulation of BDNF, p-Akt/Akt and PGC-1 $\alpha$  proteins.

**KEY WORDS** intracerebral hemorrhage; swimming exercise preconditioning; neurological function; motor function; BDNF; Akt

**DOI:**10.3724/SP.J.1329.2023.02006