

跑台运动对自然衰老小鼠海马突触可塑性及其相关蛋白表达的影响

王思诺¹, 曹娅军¹, 向青², 严家敏¹, 林燕婷¹, 庄悦阳¹, 郭小琴¹, 柳维林^{2*}

1 福建中医药大学康复医学院, 福建 福州 350122;

2 福建中医药大学康复产业研究院, 福建 福州 350122

* 通信作者: 柳维林, E-mail: liuweilin12@fjtc.edu.cn

收稿日期: 2023-01-07; 接受日期: 2023-03-30

基金项目: 国家级人才计划青年拔尖人才(2901-750072202)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.03007

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



摘要 **目的:**探索认知功能相关因子及BDNF/TrkB/PI3K信号通路在跑台运动干预自然衰老小鼠认知记忆功能下降过程中的作用及其可能机制。**方法:**将16月龄C57BL/6J小鼠按照随机数字表法分为老年组和运动组2组,每组8只,另取8只6月龄同品系小鼠作为成年组。运动组进行为期6周的跑台运动,每次1h,每天1次,每周5d,持续6周。通过水迷宫实验检测各组小鼠干预前的记忆功能,采用巴恩斯(Barnes)迷宫实验、T迷宫实验、新物体识别实验进行干预后各组小鼠记忆功能的检测,以尼氏染色检测海马神经元形态,高尔基染色检测海马树突棘数量,RT-PCR检测认知功能相关因子在老年小鼠海马内的变化,Western blot检测海马BDNF/TrkB/PI3K信号通路相关蛋白的改变。**结果:**老年组小鼠巴恩斯迷宫逃避潜伏期时间较成年组明显延长($P<0.05$)、T迷宫自主交替率、新物体识别率显著下降($P<0.05$),但跑台运动干预后,运动组巴恩斯迷宫逃避潜伏期时间较老年组明显减少($P<0.05$),T迷宫自主交替率、新物体识别率增加($P<0.05$)。相较于成年组,老年组海马神经元染色浅,数量减少,排列稀疏;而与老年组比较,运动组染色渐深,排列有序,数量较多。与成年组小鼠比较,老年组小鼠海马树突棘密度明显降低($P<0.05$),而运动组小鼠海马树突棘密度较老年组增加($P<0.05$)。RT-PCR检测结果显示,老年组小鼠海马中Dlga2、GNG4和KCNQ2 mRNA表达相较于成年组均降低,其中GNG4和KCNQ2 mRNA表达明显减少($P<0.05$),而运动组小鼠海马中Dlga2、GNG4和KCNQ2 mRNA较老年组表达则有所增加,且GNG4 mRNA表达显著增加($P<0.05$)。此外,老年组小鼠海马组织中BDNF、TrkB、CREB、PI3K以及Akt的蛋白含量显著低于成年组($P<0.05$),而跑台运动干预后,运动组小鼠海马组织中BDNF、TrkB蛋白含量较老年组增加($P<0.05$)。**结论:**6周跑台运动可改善自然衰老小鼠认知记忆功能,其可能机制是通过激活BDNF/TrkB/PI3K信号通路,增加认知功能相关因子在自然衰老小鼠脑海马中的表达,减少海马神经损伤,增强突触可塑性,从而改善记忆功能。

关键词 衰老; 认知功能; 跑台运动; BDNF/TrkB/PI3K信号通路; 突触可塑性

衰老是随着时间推移,生物学变化积累导致机体功能衰退的一种现象,伴随着疾病和死亡风险的增加^[1-2]。研究表明,衰老带来认知功能的改变,包括记忆、注意、推理和执行能力等方面的功能下降^[3],其中记忆功能下降是衰老最常见的认知障

碍^[4]。衰老作为神经退行性疾病和痴呆的基础,在增加人口预期寿命的同时,会导致认知能力下降和痴呆患病率增加^[5]。然而,自然衰老过程中认知能力下降的风险因素和预测因素尚不完全清楚。研究发现,DLG相关蛋白2(disk large-associated pro-

引用格式:王思诺,曹娅军,向青,等.跑台运动对自然衰老小鼠海马突触可塑性及其相关蛋白表达的影响[J].康复学报,2023,33(3):241-250.

WANG S N, CAO Y J, XIANG Q, et al. Effects of treadmill exercise on hippocampal synaptic plasticity and expression of related proteins in aging mice [J]. Rehabil Med, 2023, 33(3): 241-250.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.03007

tein 2, Dlgap2)、钾电压门控通道亚族 Q 成员 2 (potassium voltage-gated channel subfamily Q member 2, KCNQ2) 与 G 蛋白亚基 $\gamma 4$ (G protein subunit gamma 4, GNG4) 是与认知能力相关的基因^[6-7]。海马体作为记忆的关键场所,在认知记忆功能方面起着关键作用^[8]。1 项通过对人脑组织数据集分析的研究发现,相对于其他大脑区域,GNG4 和 KCNQ2 在人类海马组织中的表达水平最高,但其表达会随着年龄的增长而降低^[6]。此外,位于神经元突触中的 Dlgap2 是神经元之间信号的关键受体,对学习记忆和神经元上树突棘的形成具有重要影响,其表达高低与小鼠记忆丧失的程度相关^[7]。因此,研究如何调节 Dlgap2、GNG4 和 KCNQ2 在海马中的表达可以帮助预防并延缓衰老引起的认知能力下降。

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)作为脑健康功能的关键神经蛋白,参与调节神经元可塑性,在衰老记忆回路中发挥了重要的神经保护作用,其表达随年龄增加呈下降趋势^[9]。针对年龄相关功能障碍的治疗方法目前相对缺乏,运动作为非药物干预的首选方法,不仅具有良好的干预疗效,还可降低年龄相关功能障碍的发病率^[10]。研究证实,运动介导 BDNF 诱导海马可塑性^[11],改善认知功能,同时,BDNF/酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinase receptor B, TrkB)/磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)信号通路,在运动改善认知功能中发挥着重要作用^[12-13]。此外,BDNF/TrkB/PI3K 信号通路可以调节衰老大脑中神经元活动,改善认知功能。然而,与认知功能相关的因子在衰老中如何表达并影响认知功能以及运动是否能调节其表达并改善认知功能,目前还不清楚。因此,本课题探索运动对自然衰老小鼠认知相关因子的作用及其与 BDNF/TrkB/PI3K 和认知功能相关因子的内在关系,为运动改善衰老所致的认知功能下降提供更多实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 6 月龄和 16 月龄(体质量 28~32 g)共 24 只,购自杭州子源实验动物科技有限公司[生产许可证号:SCXK(浙)2019-0004],饲养于福建中医药大学实验动物中心[许可证号:SYXK(闽)2020-0002],每笼 5 只,适应性喂养 1 周,光照/黑暗 12 h 间隔更换,给予充足的食物和水。实验全部按照实验动物伦理规章要求进行,并

经福建中医药大学动物实验管理委员会批准同意(审批号:FJTCMIACUC2020092)。

1.2 主要仪器设备

小动物跑台、Morris 水迷宫、T 迷宫、巴恩斯(Barnes)迷宫(上海欣软信息科技有限公司,中国),小动物呼吸麻醉机(深圳瑞沃德生命科技有限公司,中国)。

1.3 实验分组与干预

本实验将 16 月龄 C57BL/6J 小鼠按照随机数字表法分为老年组和运动组,每组 8 只,另取 8 只 6 月龄同品系小鼠作为成年对照组(简称成年组)。运动组进行为期 6 周的跑台运动干预^[14]。跑台训练分为适应期和训练期。适应期为 1 周,干预时间为 5 d,每天 30 min,速度分别为 4、6、8、10、12 m/min,跑台坡度设置为 0°。训练期:速度设定为 12 m/min,跑台坡度设置为 0°,每天 1 h,1 次/d,每周 5 d,持续 6 周。在相同的环境下,将老年组小鼠放在固定的跑步机上 1 h。

1.4 观察指标

1.4.1 空间学习记忆能力

1.4.1.1 Morris 水迷宫 检测跑台运动前小鼠空间学习记忆能力^[15]。Morris 水迷宫测试由定位航行实验和空间探索实验 2 个部分组成。① 定位航行实验:小鼠每天 4 次实验,每一象限 1 次,为期 4 d,记录小鼠在 90 s 内从每个象限到隐藏的平台时间。当小鼠登上平台并保持 3 s 时记录所用时间,即逃避潜伏期。90 s 内找不到平台,则在结束后将小鼠引导至平台上,并学习 15 s,最终逃避潜伏期时间为每只小鼠 4 次潜伏期的均值。② 空间探索实验:第 5 天,撤离逃生平台,从对角线的象限放入小鼠,记录小鼠在 90 s 内穿越逃生平台的次数。

1.4.1.2 巴恩斯迷宫 评价跑台运动后小鼠空间学习记忆能力。巴恩斯迷宫实验分为适应阶段、学习阶段、测试阶段 3 个阶段。实验开始前 1 d,将小鼠从目标洞置于躲避盒内适应 4 min,实验 1~4 d 将小鼠置于平台中的启动盒中 20 s,移走启动盒,采用 85 dB 噪声刺激以及 200 W 灯光直射刺激动物进入躲避洞口,软件记录小鼠在 180 s 的探索情况。当小鼠找到并进入逃生盒,则停止记录,记为逃避潜伏期,每天 4 次,连续 4 d;在实验第 5 天,逃生盒撤除,记录小鼠在 90 s 内的探索正确洞口次数以及目标象限停留时间。试验前后均用 75% 消毒酒精清洁平台、逃生盒一遍。

1.4.2 空间工作记忆 根据小鼠T迷宫的自主交替选择行为,检测小鼠的空间工作记忆^[16]。T迷宫试验包括2个部分:首次强迫试验和14次自由选择试验。最先将小鼠置于初始臂探索15 s,被动至左侧目标臂,当小鼠返回初始臂后,关闭初始臂闸门15 s。探索15 s后打开所有闸门,使其自由进入任一目标臂,当进入了一侧目标臂时,对侧目标臂将被关闭,待小鼠探索完返回到起始臂后,关闭起始臂闸门15 s,每只小鼠进行14次,记录小鼠每一次进入目标臂的方向和次数。

自主交替率=自主交替次数/总的选择次数(14次)×100%

1.4.3 新物体识别记忆 采用新物体识别行为学评估小鼠对物体的识别记忆能力。新物体识别实验设备为白色无盖木箱,配备3个实心物体,其中物体1与物体2相同,与物体3不同。新物体识别实验分为适应阶段、学习阶段和测试阶段。①适应阶段:小鼠在敞箱中进行自由活动5 min后放回饲养笼;②学习阶段:物体1、2放箱内两个角落,小鼠面向物体对面背对物体放入箱中自主探索10 min;③测试阶段:主要为2个阶段,即1 h测试和24 h测试。学习1 h后进行记忆测试,物体“1”位置不变,物体“3”放于物体“2”的位置,同样的方式放置小鼠,自主探索5 min,记录小鼠对旧“1”、新“3”物体的探索时间。

1.5 脑组织准备

小鼠进行6周跑台运动后进行干预后行为学检测,最后一个行为学巴恩斯测试完成24 h后,肌注舒泰50进行深度麻醉后立即打开胸腔,将自心尖口插入小号灌注针并固定,剪开右心耳,用0.9%生理盐水冲洗至水无色,再用4%多聚甲醛灌注,待小鼠前肢及颈背部僵硬,肝组织变白并僵硬后,灌注结束,取脑。完整取出脑组织,放于4%多聚甲醛中进行固定,后期用于组织病理学实验。

1.6 尼氏染色

小鼠脑组织固定,脱水并包埋,切片后进行常规脱蜡处理。使用尼氏染色试剂盒中试剂A滴加于脑片上覆盖并避光,置入56℃孵育箱中1 h后纯水洗去。后用试剂B分化1~2 min,直至镜下背景颜色接近无色为止,纯水洗净,中性树胶封片,避光保存。

1.7 高尔基染色

异氟烷麻醉后,肌注舒泰深度麻醉,断头取脑,取完整脑放入沉淀24 h后取出的高尔基A、B液的上清中,避光浸泡2周左右,中途进行3~4次摇晃

混匀。A、B液浸泡结束,将组织放入C液中浸泡3~5 d去除背景。然后用OCT进行包埋,并置于-20℃冰冻切片机中进行冰切,厚度100 μm。切片完成后,吸取多余C液,至室温下避光晾干。用D、E液进行染色,使用梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。镜下观察和拍片,进行数据分析。

1.8 海马组织总RNA提取

1.8.1 RNA提取方法 取出右侧冰冻海马组织,放入装有Trizol的管中,超声仪进行组织匀浆,匀浆结束后加入1/2的氯仿,震荡摇匀于4℃静置5 min,12 000 r/min,4℃,10 min离心,取400 μL上清并加入等体积的异丙醇,15 min静置(-20℃),12 000 r/min,4℃,15 min离心,弃上清,在沉淀中加入1 mL 75%乙醇,振荡器振荡,12 000 r/min,4℃,5 min离心,弃上清,重复2次,室温下晾2~3 min,加入20 μL RAase-Free水溶解沉淀,进行浓度、纯度检测。

1.8.2 RT-PCR检测海马组织Dlga2、GNG4和KCNQ2 mRNA相对表达水平 将海马组织所提取的总RNA进行逆转录合成cDNA。引物合成序列如表1所示。实时定量PCR(Real-time PCR, RT-PCR)反应条件:95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃退火延伸20 s,共40个循环,循环延伸末收集荧光信号,绘制扩增曲线,并对Dlga2、GNG4、KCNQ2等mRNA相对定量进行分析,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算其相对表达量。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence of target gene	
基因名称	引物序列(5'-3')
Dlga2	F: 5' CACACGGAGCATCGACAAGG3'
	R: 5' CTGACCTTGGGTAGGGTTGA3'
GNG4	F: 5' ATAACAGCACCACCAGCATCT3'
	R: 5' CTTCACAGTAGGCCAGGAGG3'
KCNQ2	F: 5' CGACTTCTTGGTGAGCATCTATAC3'
	R: 5' GAGCGGACGATCTTAATGATACAG3'
GAPDH	F: 5' TGGAAAGCTGTGGCGTGATG3'
	R: 5' TACTTGGCAGTTTCTCCAGG3'

1.9 Western blot检测海马组织中BDNF、TrkB、CREB、Akt、PI3K的蛋白表达量

将冰箱中左侧海马组织取出,质量/体积按1:10比例加入裂解液[PMSF和RIPA buffer(1:50)],用超声仪匀浆40~80 s,离心机12 000 r/min,4℃,5 min,离心取上清液,BCA测定蛋白浓度,100℃金属浴5 min,变性后于-80℃储存。配置10%分离胶与5%浓缩胶,每组蛋白加样7 μL,电泳时100 V恒压100 min,使用100 V恒压进行转膜,室温下5%脱脂

奶粉封闭1 h,一抗4 °C摇床过夜孵育GAPDH[鼠单克隆抗体(1:8 000)]、BDNF、TrkB、CREB、Akt和PI3K[兔单克隆抗体(1:1 000)],TBST漂洗,特异性二抗(1:5 000),室温摇床孵育1 h,洗膜,ECL显影,自动成像仪曝光。采用Image Lab 3.0软件进行分析。

1.10 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0软件作图和SPSS 25.0进行数据统计分析。计量资料符合正态分布采用($\bar{x}\pm s$)表示,Morris水迷宫和巴恩斯迷宫逃避潜伏期采用重复测量方差分析,其余数据采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验或Dunnett-*t*检验。 $P<0.05$ 表明差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3组小鼠干预前基线比较

2.1.1 3组干预前体质量比较 相较于成年组而言,老年组小鼠毛色稀疏且发白,身体骨架发生改变,进食较少且行动缓慢。3组干预前体质量比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表2 3组干预前体质量比较($\bar{x}\pm s$) g

Table 2 Weight comparison in three groups

before intervention ($\bar{x}\pm s$)		
组别	<i>n</i>	体质量
成年组	8	32.54±1.81
老年组	8	33.25±2.82
运动组	8	33.75±3.73
<i>F</i> 值		0.350
<i>P</i> 值		0.709

2.1.2 3组干预前Morris水迷宫逃避潜伏期时间比较 通过Morris水迷宫验证老年组小鼠较成年组小鼠学习记忆能力下降的情况,在定位航行期间,利用重复测量方差分析逃避潜伏期,结果显示:时间效应差异具有统计学意义($F=111.192, P<0.05$),表明各组小鼠逃避潜伏期随时间而变化,而组别与时间效应差异无统计学意义($F=0.883, P>0.05$)。见表3。进一步分析发现,成年组第1天逃避潜伏期时间分别与老年组、运动组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),而在第2、3、4天与成年组比较,老年组和运动组逃避潜伏期时间延长($P<0.05$)。

表3 3组干预前Morris水迷宫逃避潜伏期时间比较($\bar{x}\pm s$) s

Table 3 Comparison of escape latency time of Morris water maze in three groups before intervention ($\bar{x}\pm s$) s

组别	<i>n</i>	第1天	第2天	第3天	第4天
成年组	8	71.39±14.19	46.94±6.05	26.42±2.95	17.56±3.86
老年组	8	82.72±10.10	70.04±13.76 ¹⁾	49.38±12.72 ¹⁾	28.31±7.99 ¹⁾
运动组	8	82.47±8.87	68.54±18.82 ¹⁾	44.69±12.69 ¹⁾	29.01±4.67 ¹⁾
<i>F</i> 值		2.628	6.908	10.652	9.826
<i>P</i> 值		0.096	0.005	0.001	0.001

注:与成年组比较,1) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the adult group, 1) $P<0.05$.

2.1.3 3组逃生平台穿越次数比较 在空间探索期间,老年组与运动组小鼠穿越逃生平台次数减少($P<0.05$),表明年龄的增长会导致记忆功能下降,同时老年组小鼠与运动组小鼠干预前基线一致。见表4。

预后,与老年组比较,运动组在第1、2、3、4天逃避潜伏期时间减少($P<0.05$)。见表5。

表4 3组逃生平台穿越次数比较($\bar{x}\pm s$) 次

Table 4 Comparison of number of escape platform

crossings in three groups ($\bar{x}\pm s$)		
组别	<i>n</i>	穿越平台次数
成年组	8	7.00±1.69
老年组	8	4.75±1.67 ¹⁾
运动组	8	4.63±0.92 ¹⁾
<i>F</i> 值		6.614
<i>P</i> 值		0.006

注:与成年组比较,1) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the adult group, 1) $P<0.05$.

2.2 3组小鼠空间学习记忆比较

2.2.1 3组巴恩斯迷宫逃避潜伏期时间比较 学习阶段潜伏期结果显示,利用重复测量方差分析3组小鼠逃避潜伏期,结果表明随着时间的变化3组小鼠逃避潜伏期发生改变,而组别与时间效应差异无统计学意义($F=2.052, P>0.05$)。与成年组比较,老年组小鼠的第1~4天逃避潜伏期时间均延长,差异均有统计学意义($P<0.05$);经过6周跑台运动干

表5 3组巴恩斯迷宫逃避潜伏期时间比较($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Comparison of escape latency time of Barnes maze in three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	第1天	第2天	第3天	第4天
成年组	8	93.22±18.85	36.81±9.77	25.84±8.98	18.47±2.87
老年组	8	129.54±12.14 ¹⁾	94.25±25.29 ¹⁾	89.28±19.59 ¹⁾	70.73±11.24 ¹⁾
运动组	8	108.96±15.35 ²⁾	59.12±19.54 ²⁾	47.06±14.98 ²⁾	38.08±12.69 ²⁾
<i>F</i> 值		10.785	18.023	36.342	56.603
<i>P</i> 值		0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与成年组比较,1) $P<0.05$;与老年组比较,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the adult group, 1) $P<0.05$; compared with the aged group, 2) $P<0.05$.

2.2.2 3组发现正确目标洞口次数比较 测试阶段结果显示,与成年组比较,老年组小鼠发现并找到正确洞口的次数明显下降($P<0.05$);与老年组相比,运动组小鼠发现并找到正确洞口的次数有所增加,但其增加未达到统计学意义($P>0.05$),表明衰老会降低小鼠空间学习记忆功能,而运动在一定程度上可以改善其空间学习记忆功能。见表6。

表6 3组发现正确目标洞口次数比较($\bar{x}\pm s$) 次

Table 6 Comparison of number of correct target openings found in three groups ($\bar{x}\pm s$) times

组别	<i>n</i>	正确洞口次数
成年组	8	4.13±0.83
老年组	8	2.13±0.99 ¹⁾
运动组	8	3.13±1.35
<i>F</i> 值		6.822
<i>P</i> 值		0.005

注:与成年组比较,1) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the adult group, 1) $P<0.05$.

2.3 3组T迷宫自主交替率比较

与成年组比较,老年组小鼠自主交替率均显著下降($P<0.05$);而与老年组比较,运动组自主交替率明显增加($P<0.05$),表明运动可以提高老年小鼠T迷宫自主交替率,改善自然衰老小鼠空间工作记忆能力。见表7。

2.4 3组新物体识别记忆比较

在1 h测试中,与成年组比较,老年组新物体识别率明显下降($P<0.05$),而相较于老年组而言,运动组新物体识别率提高($P<0.05$);在24 h测试中,与成年组比较,老年组新物体识别率降低($P<0.05$),而运动组则未表现出明显差异。结果说明,跑台运动可以提高老年小鼠新物体识别率,改善新物体识别

记忆功能。见表8。

表7 3组T迷宫自主交替率比较($\bar{x}\pm s$) %

Table 7 Comparison of spontaneous alternation rate of T maze in three groups ($\bar{x}\pm s$) %

组别	<i>n</i>	自主交替率
成年组	8	70.54±8.04
老年组	8	44.52±8.51 ¹⁾
运动组	8	58.93±5.05 ²⁾
<i>F</i> 值		25.079
<i>P</i> 值		<0.001

注:与成年组比较,1) $P<0.05$;与老年组比较,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the adult group, 1) $P<0.05$; compared with the aged group, 2) $P<0.05$.

表8 3组新物体识别记忆比较($\bar{x}\pm s$) %

Table 8 Comparison of new object recognition memory in three groups ($\bar{x}\pm s$) %

组别	<i>n</i>	1 h新物体识别率	24 h新物体识别率
成年组	8	53.57±7.37	56.99±12.37
老年组	8	30.27±8.35 ¹⁾	32.78±12.78 ¹⁾
运动组	8	41.90±5.49 ²⁾	43.96±8.59
<i>F</i> 值		21.128	9.032
<i>P</i> 值		<0.001	0.001

注:与成年组比较,1) $P<0.05$;与老年组比较,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the adult group, 1) $P<0.05$; compared with the aged group, 2) $P<0.05$.

2.5 3组海马区神经元比较

尼氏染色观察各组小鼠脑海马区神经元形态与结构,结果见图1。在10倍显微镜下观察海马区发现,成年组小鼠神经元分布整齐、排列有序、染色较深,老年组小鼠脑海马区神经元数量显著减少、排列散乱、染色变浅,但运动组小鼠神经元数量较老年组增加并有序排列。

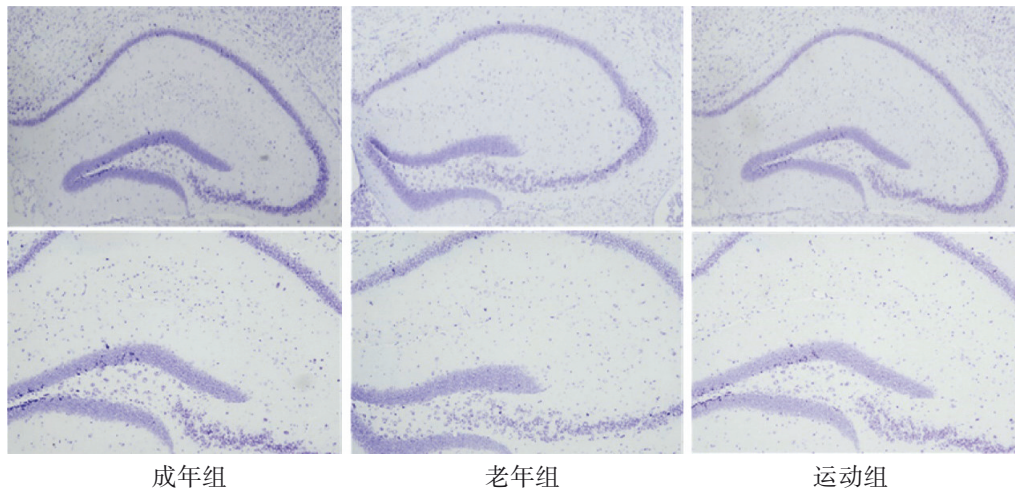
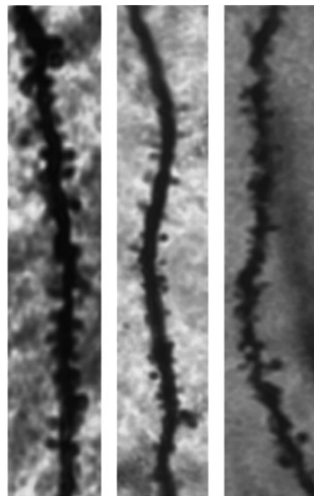


图1 3组海马神经元比较(×10)

Figure 1 Comparison of hippocampal neurons in three groups (×10)

2.6 3组海马区树突棘密度比较

采用高尔基染色观察跑台运动对自然衰老小鼠海马区突触结构中树突棘密度的影响。结果表明,与成年组比较,老年组小鼠海马区树突棘密度显著降低($P<0.05$),而运动组小鼠海马区的树突棘密度显著高于老年组($P<0.05$)。见图2和表9。



成年组 老年组 运动组

图2 3组海马区染色比较

Figure 2 Comparison of staining in hippocampus in three groups

2.7 3组认知功能相关因子 mRNA 相对表达水平比较

通过对自然衰老小鼠海马区进行认知功能相关因子检测发现,与成年组比较,老年组小鼠海马中 Dlgap2、GNG4 和 KCNQ2 mRNA 相对表达水平均降低,其中 GNG4 和 KCNQ2 mRNA 相对表达水平显

著下降($P<0.05$),而相较于老年组而言,运动组小鼠海马中 Dlgap2、GNG4 和 KCNQ2 mRNA 相对表达水平则有所增加,且 GNG4 mRNA 相对表达水平在跑台运动干预后,相较于老年组而言表达水平显著增加($P<0.05$),这表明跑台运动在一定程度上会改善或维持自然衰老小鼠认知功能。见表10。

表9 3组小鼠树突棘密度比较($\bar{x}\pm s$) 个/ μm

Table 9 Comparison of dendritic spine density of mice in three groups ($\bar{x}\pm s$) numbers/ μm

组别	<i>n</i>	树突棘密度
成年组	3	0.69±0.20
老年组	3	0.29±0.07 ¹⁾
运动组	3	0.48±0.10 ²⁾
μ 值		12.984
<i>P</i> 值		0.001

注:与成年组比较,1) $P<0.05$;与老年组比较,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the adult group, 1) $P<0.05$; compared with the aged group, 2) $P<0.05$.

表10 3组认知功能相关因子 mRNA 相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 10 Comparison of mRNA relative expression levels of cognitive function related factors in three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Dlgap2	GNG4	KCNQ2
成年组	3	1.14±0.61	1.29±0.26	1.48±0.40
老年组	3	0.67±0.15	0.46±0.05 ¹⁾	0.79±0.15 ¹⁾
运动组	3	0.91±0.12	1.17±0.16 ²⁾	1.27±0.13
<i>F</i> 值		1.249	19.324	5.684
<i>P</i> 值		0.352	0.002	0.041

注:与成年组比较,1) $P<0.05$;与老年组比较,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the adult group, 1) $P<0.05$; compared with the aged group, 2) $P<0.05$.

2.8 3组BDNF/TrkB/PI3K信号通路相关蛋白表达量比较

与成年组比较,老年组小鼠海马内BDNF表达量明显下降($P<0.05$),而运动会增加脑内BDNF的表达量,且与老年组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。进一步研究发现,运动可以通过BDNF/TrkB/

PI3K信号通路介导海马突触可塑性,结果显示,与成年组相比较,老年组海马区TrkB、CREB、Akt以及PI3K的表达量均显著下降($P<0.05$);与老年组比较,运动组海马区CREB、Akt、PI3K表达量均增加,但其增加较于老年组差异无统计学意义($P>0.05$),见表11和图3。

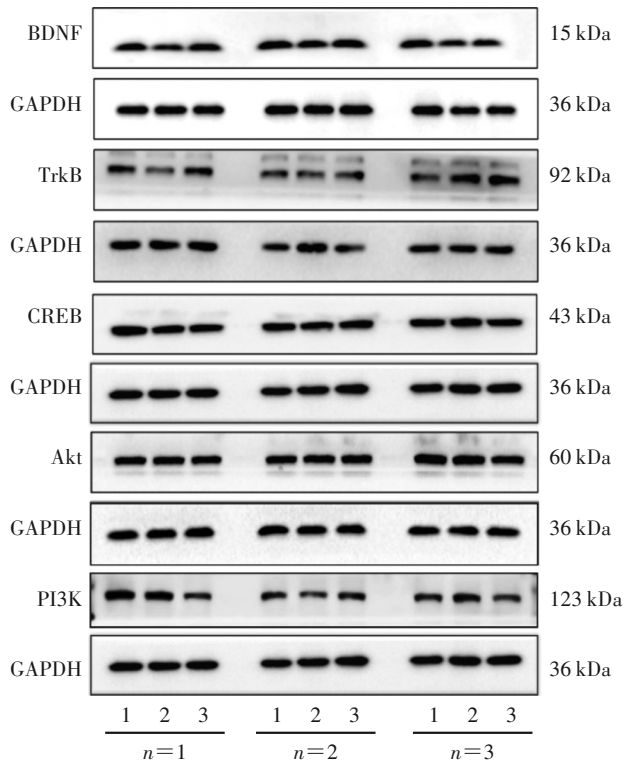
表11 3组BDNF/TrkB/PI3K信号通路相关蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s$)

Table 11 Comparison of expression of BDNF/TrkB/PI3K signaling pathway related proteins in three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	BDNF/GAPDH	TrkB/GAPDH	CREB/GAPDH	Akt/GAPDH	PI3K/GAPDH
成年组	3	1.07±0.04	1.00±0.31	1.12±0.01	0.61±0.05	2.00±0.66
老年组	3	0.82±0.02 ¹⁾	0.43±0.16 ¹⁾	0.83±0.10 ¹⁾	0.45±0.05 ¹⁾	0.75±0.34 ¹⁾
运动组	3	0.98±0.11 ²⁾	0.95±0.028 ²⁾	0.94±0.10	0.51±0.05	1.20±0.20
F值		10.045	4.496	9.288	8.187	6.048
P值		0.012	0.064	0.015	0.019	0.036

注:与成年组比较,1) $P<0.05$;与老年组比较,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the adult group, 1) $P<0.05$; compared with the aged group, 2) $P<0.05$.



注:1为成年组;2为老年组;3为运动组;n=1为样本1;n=2为样本2;n=3为样本3。

Note: 1 means adult group; 2 means aged group; 3 means exercised group; n=1 means sample 1; n=2 means sample 2; n=3 means sample 3.

图3 3组BDNF/TrkB/PI3K信号通路相关蛋白的表达水平
Figure 3 Expression levels of BDNF/TrkB/PI3K signaling pathway related proteins in three groups

3 讨论

衰老作为一个与健康 and 疾病状态相互作用的过程,是认知能力下降和神经退行性疾病最危险的因素之一。研究表明,认知功能下降是当前老年人面临的最大的健康威胁之一,其中记忆功能下降最为常见^[5]。运动疗法是治疗认知下降的有效手段之一,长期适量运动可以增强海马神经元可塑性和突触可塑性,提高学习记忆功能,延缓或改善衰老性认知记忆功能下降^[17],这与本研究中检测结果一致。研究发现,跑台运动可以增加老年小鼠海马的神经发生和树突棘密度,促进神经细胞的增殖再生,提高突触可塑性和神经元可塑性,改善认知记忆功能^[18-19]。本实验通过检测海马区树突棘密度也证明,跑台运动干预可以增加衰老小鼠海马区树突棘密度,促进突触可塑性,改善记忆功能。

研究发现,与年龄相关的认知功能相关因子Dlga2、GNG4和KCNQ2在脑神经元中均有表达,其中GNG4和KCNQ2在海马体中高表达,但其表达量会随着年龄的增加而减少^[6-7]。通过尼氏染色观察发现,老年组小鼠脑海马区神经元数量显著减少,但运动后小鼠神经元数量相较于老年组而言有所增加,神经元数量的增加,可能会在一定程度上提高海马内Dlga2、GNG4及KCNQ2蛋白表达量。研究证明,神经元中Dlga2蛋白在突触缩放中具有关键作用^[20]。Dlga2作为突触后支架蛋白的主要成分之一,直接与DLG4和SHANKs相互作用,形成DLG4-Dlga2-SHANKs复合物,其在突触形态结构和功能

中起关键作用,并对认知记忆功能具有重要的调节意义^[21]。研究发现,Dlgap2敲除后,小鼠的突触后密度降低,且空间记忆受损,该结果表明缺乏Dlgap2,海马功能将变差^[22]。KCNQ是一种调节年龄依赖性记忆障碍的中心可塑性分子,其广泛的神经元表达使KCNQ通道在突触可塑性和记忆方面具有重要作用,但单一KCNQ表达随着年龄的增长在大脑中减少,并与年龄依赖性认知缺陷有关^[23]。KCNQ2是一种跨膜钾通道基因,对抑制过度的神经元信号传导有重要作用^[24]。既往研究表明,KCNQ2不仅与小鼠的记忆障碍有关^[25],还与果蝇年龄相关性的记忆障碍相关联^[23]。研究发现,急性应激诱导了大鼠空间记忆检索和海马LTP损伤,降低了海马体中KCNQ2的表达,而KCNQ/KV7通道会增加海马中KCNQ2的表达,改善海马空间记忆障碍^[26]。此外,GNG4作为多个跨膜信号系统的调制器和换能器^[6],不仅在AD啮齿动物模型的脑组织中下调,而且在神经退行性疾病中也降低^[27]。通过检测与年龄相关的认知功能相关因子在自然衰老小鼠海马中的相对表达水平发现,自然衰老小鼠海马中Dlgap2、GNG4和KCNQ2 mRNA的相对表达水平降低,表明年龄的增加会导致认知记忆功能的下降。

衰老会引发神经元功能受损和海马BDNF表达减少,突触可塑性降低,从而导致学习记忆功能下降^[28]。BDNF在海马记忆回路中发挥了重要的神经保护作用,可通过调控海马突触可塑性,改善海马依赖性的学习与记忆功能^[29]。然而,随着年龄的增长,BDNF和TrkB在脑内的表达水平降低,并推动神经退行性疾病的发生和发展^[30]。研究表明,运动可以降低炎症因子在海马中的表达,并且随着运动持续时间的增加,参与免疫调节和促进海马神经发生。同时,运动可通过BDNF相关的Caveolin-1/VEGF途径,调节脑缺血模型的神经发生和突触可塑性,改善运动和认知障碍^[31]。连续跑台运动可通过增加海马TrkB、t-PA、NR2B等蛋白表达,激活BDNF信号传导系统,改善大鼠空间学习记忆功能^[32]。本研究发现,运动后自然衰老小鼠海马中BDNF、TrkB表达增加,并激活下游信号分子CREB、PI3K、Akt,从而促进神经元的存活,改善学习记忆功能。

研究发现,GNG4和KCNQ2属于神经递质通路基因^[6],而BDNF可以促进神经递质释放和信号传递,以调控突触传递和可塑性^[33]。同时,对慢性脑灌注不足大鼠脑内BDNF、TrkB、KCNQ2等蛋白表达量进行检测发现,其表达量均下调^[34]。此外,小鼠

Dlgap2敲除后发现,突触后蛋白PSD95、BDNF等蛋白表达量降低,且表现出空间记忆功能受损^[22]。本研究发现,自然衰老小鼠BDNF、TrkB蛋白表达量增加与调节认知功能的相关因子的mRNA相对表达水平呈同向趋势,均较成年组下调,而运动后认知功能的相关因子的mRNA相对表达水平则随BDNF、TrkB蛋白表达量的增加而增加。这些提示运动可能通过调控BDNF、TrkB相关信号通路,调节与认知功能相关的因子的表达,以减少海马神经损伤,增强突触可塑性,改善学习记忆功能。

4 结 论

综上所述,跑台运动可以改善自然衰老小鼠认知记忆功能并调节认知功能相关因子,其可能是跑台运动增加自然衰老小鼠海马中BDNF的表达,进一步激活了TrkB相关信号通路及其下游信号分子,从而增加认知功能相关因子在自然衰老小鼠脑海马中的表达,减少海马神经损伤,促进突触可塑性的提高,改善记忆功能。但本研究仍然存在局限性:我们未对信号通路蛋白磷酸化进行检测;并且未对认知相关因子Dlgap2、GNG4和KCNQ2在自然衰老小鼠认知功能方面的作用进行更深入的探讨。因此,下一步研究将会对信号通路磷酸化水平及认知相关因子蛋白表达水平进行检测,进一步探讨认知相关因子对BDNF/TrkB/PI3K及其下游信号通路变化在跑台运动改善记忆功能中的作用。

参考文献

- [1] KRITSILIS M, RIZOU S V, KOUTSOUDAKI P, et al. Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10):2937.
- [2] HOU Y J, DAN X L, BABBAR M, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(10):565-581.
- [3] OGRODNIK M, EVANS S A, FIELDER E, et al. Whole-body senescent cell clearance alleviates age-related brain inflammation and cognitive impairment in mice [J]. *Aging Cell*, 2021, 20(2):e13296.
- [4] HARADA C N, NATELSON LOVE M C, TRIEBEL K L. Normal cognitive aging [J]. *Clin Geriatr Med*, 2013, 29(4):737-752.
- [5] CABEZA R, ALBERT M, BELLEVILLE S, et al. Maintenance, reserve and compensation: the cognitive neuroscience of healthy ageing [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2018, 19(11):701-710.
- [6] BONHAM L W, EVANS D S, LIU Y M, et al. Neurotransmitter pathway genes in cognitive decline during aging: evidence for GNG4 and KCNQ2 genes [J]. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 2018, 33(3):153-165.
- [7] OUELLETTE A R, NEUNER S M, DUMITRESCU L, et al. Cross-

- species analyses identify *Dlgap2* as a regulator of age-related cognitive decline and Alzheimer's dementia [J]. *Cell Rep*, 2020, 32(9):108091.
- [8] BEASON-HELD L L, SHAFER A T, GOH J O, et al. Hippocampal activation and connectivity in the aging brain [J]. *Brain Imaging Behav*, 2021, 15(2):711-726.
- [9] KONISHI K, CHERKERZIAN S, ARONER S, et al. Impact of BDNF and sex on maintaining intact memory function in early midlife [J]. *Neurobiol Aging*, 2020, 88:137-149.
- [10] CAMPISI J, KAPAHI P, LITHGOW G J, et al. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing [J]. *Nature*, 2019, 571(7764):183-192.
- [11] 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.
- [12] TANG L, KANG Y T, YIN B, et al. Effects of weight-bearing ladder and aerobic treadmill exercise on learning and memory ability of diabetic rats and its mechanism [J]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2017, 33(5):436-440.
- [13] CHO J W, JUNG S Y, KIM D Y, et al. PI3K-Akt-Wnt pathway is implicated in exercise-induced improvement of short-term memory in cerebral palsy rats [J]. *Int Neurol J*, 2018, 22(Suppl 3):S156-S164.
- [14] CHEN K, ZHENG Y H, WEI J A, et al. Exercise training improves motor skill learning via selective activation of mTOR [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(7):eaaw1888.
- [15] TOMÁS PEREIRA I, BURWELL R D. Using the spatial learning index to evaluate performance on the water maze [J]. *Behav Neurosci*, 2015, 129(4):533-539.
- [16] SPOWART-MANNING L, VAN DER STAAY F J. The T-maze continuous alternation task for assessing the effects of putative cognition enhancers in the mouse [J]. *Behav Brain Res*, 2004, 151(1/2):37-46.
- [17] BETTIO L E B, RAJENDRAN L, GIL-MOHAPEL J. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, 79:66-86.
- [18] ZHANG S S, ZHU L, PENG Y, et al. Long-term running exercise improves cognitive function and promotes microglial glucose metabolism and morphological plasticity in the hippocampus of APP/PS1 mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1):34.
- [19] DI LIEGRO C M, SCHIERA G, PROIA P, et al. Physical activity and brain health [J]. *Genes*, 2019, 10(9):720.
- [20] RASMUSSEN A H, RASMUSSEN H B, SILAHTAROGLU A. The *Dlgap* family: neuronal expression, function and role in brain disorders [J]. *Mol Brain*, 2017, 10(1):43.
- [21] JIANG-XIE L F, LIAO H M, CHEN C H, et al. Autism-associated gene *Dlgap2* mutant mice demonstrate exacerbated aggressive behaviors and orbitofrontal cortex deficits [J]. *Mol Autism*, 2014, 5:32.
- [22] HSIEH M Y, TUAN L H, CHANG H C, et al. Altered synaptic protein expression, aberrant spine morphology, and impaired spatial memory in *Dlgap2* mutant mice, a genetic model of autism spectrum disorder [J]. *Cereb Cortex*, 2023, 33(8):4779-4793.
- [23] CAVALIERE S, MALIK B R, HODGE J J L. KCNQ channels regulate age-related memory impairment [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e62445.
- [24] LI X X, ZHANG Q S, GUO P P, et al. Molecular basis for ligand activation of the human KCNQ2 channel [J]. *Cell Res*, 2021, 31(1):52-61.
- [25] PETERS H C, HU H, PONGS O, et al. Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(1):51-60.
- [26] LI C, HUANG P, LU Q, et al. KCNQ/Kv7 channel activator flupirtine protects against acute stress-induced impairments of spatial memory retrieval and hippocampal LTP in rats [J]. *Neuroscience*, 2014, 280:19-30.
- [27] BOUTER Y, KACPROWSKI T, WEISSMANN R, et al. Deciphering the molecular profile of plaques, memory decline and neuron loss in two mouse models for Alzheimer's disease by deep sequencing [J]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6:75.
- [28] BARRIENTOS R M, FRANK M G, CRYSDALE N Y, et al. Little exercise, big effects: reversing aging and infection-induced memory deficits, and underlying processes [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(32):11578-11586.
- [29] HOROWITZ A M, FAN X L, BIERI G, et al. Blood factors transfer beneficial effects of exercise on neurogenesis and cognition to the aged brain [J]. *Science*, 2020, 369(6500):167-173.
- [30] WU S Y, PAN B S, TSAI S F, et al. BDNF reverses aging-related microglial activation [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):210.
- [31] MEGHAN G, CONNOLLY. Exercise duration differentially effects age-related neuroinflammation and hippocampal neurogenesis [J]. *Neuroscience*, 2022, 490:275-286.
- [32] 邓方方. 不同强度跑台运动对大鼠学习记忆的影响及机制研究[D]. 滨州: 滨州医学院, 2020:1-67.
- DENG F F. Effects of different intensity treadmill exercise on learning and memory in rats and its mechanism [D]. Binzhou: Binzhou Medical University, 2020:1-67.
- [33] WU Y C, LIU Q, GUO B, et al. BDNF activates postsynaptic TrkB receptors to induce endocannabinoid release and inhibit presynaptic calcium influx at a Calyx-type synapse [J]. *J Neurosci*, 2020, 40(42):8070-8087.
- [34] ZHOU M, LI Y W, LIN K, et al. Chronic cerebral hypoperfusion-induced dysregulations of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated, KCNQ and G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels correlated with susceptibility and unsusceptibility to anxiety behaviors [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2022, 19(4):398-405.

Effects of Treadmill Exercise on Hippocampal Synaptic Plasticity and Expression of Related Proteins in Aging Mice

WANG Sinuo¹, CAO Yajun¹, XIANG Qing², YAN Jiamin¹, LIN Yanting¹, ZHUANG Yueyang¹, GUO Xiaoqin¹, LIU Weilin^{2*}

¹ College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

² The Academy of Rehabilitation Industry, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China

*Correspondence: LIU Weilin, E-mail: liuweilin12@fjtc.edu.cn

ABSTRACT Objective: To explore the role and possible mechanism of cognitive function-related factors and BDNF/TrkB/PI3K signaling pathway in the treadmill exercise intervention with the decline of cognitive memory function in naturally aging mice. **Methods:** A total of 16 months old C57BL/6J mice were randomly divided into the aged group and the exercise group, through a random number table method, with 8 mice in each group. And 6-month-old mice of the same strain were taken as the adult group ($n=8$). The exercise group performed a 6-week treadmill exercise, 1 hour each time, once a day, and 5 days a week, for 6 weeks. The baseline memory function was detected by Morris water maze test before intervention. The memory function of mice in each group after intervention was detected by Barnes maze test, T maze test and new object recognition test. Nissl staining was used to detect the morphology of hippocampal neurons, Golgi staining was used to detect the number of dendritic spines in the hippocampus. RT-PCR was used to detect the changes of cognitive function-related factors in the hippocampus of aged mice, and Western blot was used to detect the changes of BDNF/TrkB/PI3K signaling pathway related proteins in the hippocampus. **Results:** The escape latency time of Barnes maze in the aged group was significantly longer than that in the adult group ($P<0.05$), and the spontaneous alternation rate of T maze and the recognition rate of new objects significantly decreased ($P<0.05$). However, after treadmill exercise, the escape latency time of Barnes maze in the exercise group was significantly shorter than that in the aged group ($P<0.05$), and the spontaneous alternation rate of T maze and the recognition rate of new objects increased ($P<0.05$). Compared with the adult group, the hippocampal neurons in the aged group were lightly stained, the number reduced, the arrangement was sparse; compared with the aged group, the exercise group showed darker staining, arranged in order, and more in quantity. Compared with the adult group, the density of hippocampal dendritic spines in the aged group significantly decreased ($P<0.05$), while the density of hippocampal dendritic spines in the exercise group increased than that of the aged group ($P<0.05$). The results of RT-PCR showed that the expression of Dlgap2, GNG4 and KCNQ2 mRNA in the hippocampus of mice in the aged group was lower than that in the adult group, and the expression of GNG4 and KCNQ2 mRNA significantly decreased ($P<0.05$), while the expression of Dlgap2, GNG4 and KCNQ2 mRNA in the hippocampus of mice in the exercise group increased, and the expression of GNG4 mRNA significantly increased than that of the aged group ($P<0.05$). In addition, the protein contents of BDNF, TrkB, CREB, PI3K and Akt in the hippocampus of the aged group were significantly lower than those of the adult group ($P<0.05$), while the protein contents of BDNF, TrkB in the hippocampus of the exercise group were higher than those of the aged group ($P<0.05$). **Conclusion:** The 6-week treadmill exercise can improve the cognitive memory function of aging mice. The possible mechanism is to increase the expression of cognitive function-related factors in the hippocampus of aging mice by activating the BDNF/TrkB/PI3K signaling pathway, reduce hippocampal nerve damage, and enhance synaptic plasticity, thereby improving memory function.

KEY WORDS aging; cognitive function; treadmill exercise; BDNF/TrkB/PI3K signaling pathway; synaptic plasticity

DOI:10.3724/SP.J.1329.2023.03007