

基于PERK/ATF4/CHOP通路探讨游泳运动干预血管性痴呆大鼠的机制

刘芳¹, 李梦醒², 王玉³, 唐巍^{2*}

1 安庆医药高等专科学校医学院, 安徽 安庆 246052;

2 安徽中医药大学针灸推拿学院, 安徽 合肥 230012;

3 安庆师范大学体育学院, 安徽 安庆 246113

* 通信作者: 唐巍, E-mail: tangwei2633@163.com

收稿日期: 2022-12-09; 接受日期: 2023-03-08

基金项目: 安徽省高校自然科学基金项目(KJ2019A1233、KJ2020A0377); 安徽省高校优秀青年人才支持项目(gxyqZD2022109)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.04007

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



摘要 **目的:** 基于PERK/ATF4/CHOP通路探讨游泳运动对血管性痴呆(VD)大鼠的脑保护作用。**方法:** 选择48只SPF级雄性SD大鼠,按随机数字表法分为假手术组和实验组,分别为12、36只。实验组采用永久性结扎双侧颈总动脉法进行模型制备,按随机数字表法分为模型组、游泳运动组和药物组,每组12只。游泳运动组给予无负重游泳训练30 min/(次·d),连续4周;药物组腹腔注射单唾液酸四己糖神经节苷脂钠0.33 mg/(kg·d),连续4周;其余2组自由活动4周。干预4周后,采用Morris水迷宫实验观察大鼠的行为学变化;采用透射电镜观察大鼠海马CA1区神经元超微结构;采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)、Western blot法分别检测蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)、活化转录因子4(ATF4)、C/EBP同源蛋白(CHOP)mRNA水平及蛋白的相对表达量。**结果:** ①行为学变化:与假手术组比较,模型组平均逃避潜伏期明显延长,穿越平台次数明显减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,游泳运动组、药物组平均逃避潜伏期明显缩短,穿越平台次数明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。②神经元超微结构:模型组胞浆内细胞器数量减少,胞浆基质溶解空泡化,线粒体嵴断裂,结构不清晰,神经纤维可见坏死、溶解;与模型组比较,游泳运动组胞浆内各细胞器结构、空泡样变程度明显改善。③脑组织PERK、ATF4、CHOP mRNA水平及蛋白含量:与假手术组比较,模型组海马CA1区PERK、ATF4、CHOP mRNA水平均明显升高($P < 0.05$),PERK、ATF4、CHOP蛋白含量均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,游泳运动组、药物组海马CA1区PERK、ATF4、CHOP mRNA水平及蛋白含量均明显降低($P < 0.05$)。**结论:** 游泳运动可保护VD大鼠脑组织,改善其认知功能;其作用机制可能与调控PERK/ATF4/CHOP通路,抑制VD大鼠海马区ERS相关蛋白PERK、ATF4、CHOP mRNA及蛋白表达有关。

关键词 血管性痴呆; 游泳运动; 脑保护; 认知功能; 内质网应激; PERK/ATF4/CHOP通路

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是一种因为脑组织缺血、缺氧导致神经系统受损而致认知功能减退的病症,主要表现为记忆力下降、计算能力下降、执行功能障碍和精神障碍等,其中空间记忆障碍高达60%左右,对患者生活质量产生了严重的

影响^[1-2]。持续性的脑灌注不足被认为是导致VD认知障碍的最常见原因^[3]。有研究显示,内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)在VD发生发展中起着重要的作用^[4-5]。内质网(endoplasmic reticulum, ER)是蛋白质合成、折叠、修饰与转运的重要场

引用格式: 刘芳, 李梦醒, 王玉, 等. 基于PERK/ATF4/CHOP通路探讨游泳运动干预血管性痴呆大鼠的机制[J]. 康复学报, 2023, 33(4): 333-340.

LIU F, LI M X, WANG Y, et al. Mechanism of swimming exercise intervention on rats with vascular dementia based on PERK/ATF4/CHOP pathway [J]. Rehabil Med. 2023, 33(4): 333-340.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.04007

所,缺血、缺氧时内质网中未折叠/错误折叠的蛋白质积累,未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)激活。UPR细胞信号转导通路主要有蛋白激酶R样内质网激酶通路(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)、活化转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)通路和肌醇酶-1(inositol requiring enzyme 1 IRE1)通路^[6]。UPR发生时这些被激活的通路可以保护急性期ERS的神经元,恢复被扰乱的稳态^[7-8]。研究发现,慢性持久的ERS可通过UPR中C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)诱导神经元发生凋亡^[4]。可见,内质网在细胞存活和凋亡中起着重要的作用,以内质网为靶点可能是治疗VD的潜在策略。

运动干预因其安全性、可操作性、有效性在VD干预研究中受到广泛的关注。临床研究发现,有氧运动能够有效提高VD患者的认知能力^[9-10]。实验研究亦证实有氧运动能够通过提高相关神经营养因子的表达,改善氧化应激进而改善VD大鼠的认知功能^[11-12],但其具体作用机制尚不明确。游泳运动是有氧运动的重要方式之一,本研究从PERK/ATF4/CHOP通路探讨游泳运动对脑缺血损伤大鼠海马神经元保护的可能机制,以期对VD的临床治疗提供进一步的理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠48只,7~8周龄,体质量(280±20)g,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(鲁)2019-0003]。置于室温22~26℃,湿度(55±5)%的独立通风笼中饲养,自由饮水进食,适应性饲养1周。实验操作严格遵循科技部关于《关于善待实验动物的指导性意见》。所有实验程序均严格按照动物实验伦理规章进行(审批号:AHUCM-rats-2020006)。

1.2 主要实验试剂与仪器

1.2.1 实验试剂 Anti-PERK(生产批号:ab229912)、Anti-ATF4(生产批号:ab216839)、Anti-CHOP抗体(生产批号:ab11419)均购自英国Abcam公司;羊抗兔HRP标记二抗(美国SAB公司,生产批号:L3012);BCA蛋白定量试剂盒(生产批号:PICPI23223)、RT-PCR试剂盒(生产批号:K0223)、RIPA组织细胞快速裂解液(生产批号:89900)均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;总RNA提取试剂(生产批号:10606ES60)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公

司;逆转录试剂盒(立陶宛Fermentas公司,生产批号:K1622);发光液(德国默克密理博公司,生产批号:WBKLS0100);单唾液酸四己糖神经节苷脂钠(齐鲁制药有限公司,生产批号:5070017FN)。

1.2.2 实验仪器 水迷宫(四川省成都泰盟科技有限公司,型号:WMT-200型);电泳仪(美国BIO-RAD公司,型号:Mini Protean 3 Cell);电转仪(辽宁省大连竞迈科技有限公司,型号:PS-9);酶标检测仪(美国BioTek公司,型号:SYNERGYH1);台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司,型号:5417R);RM2016切片机(德国徕卡公司);H-800透射电镜(日本日立公司);显微镜(日本尼康公司,型号:Nikon Eclipse);7300PCR检测仪(美国ABI公司)。

1.3 实验动物分组与模型制备

1.3.1 造模前实验动物筛选 模型制备前通过Morris水迷宫实验剔除反应特别激烈或在水中漂浮不动的大鼠。选取48只大鼠作为实验动物,如实验过程中出现动物死亡及时进行补充。

1.3.2 动物模型制备与分组

1.3.2.1 动物模型制备 48只大鼠按随机数字表法分为假手术组和实验组,分别为12、36只。实验组模型制备采用永久性结扎双侧颈总动脉法(common carotid arteries, CCA)进行VD模型制备^[13]。操作方法如下:大鼠吸入异氟烷麻醉后,消毒切开充分暴露双侧颈总动脉以4号手术线分别于近心端与远心端结扎,并从中间剪断,消毒缝合后肌肉注射青霉素钠注射液。保温处理等苏醒后将其置于干净笼盒中常规饲养。假手术组同实验组操作,但仅分离双侧颈总动脉不结扎。术后常规护理7d后,2组大鼠进行第2次Morris水迷宫实验。若(实验组平均逃避潜伏期值-假手术组平均逃避潜伏期)/实验组平均逃避潜伏期值>20%,即造模成功^[14]。

1.3.2.2 动物分组 实验组按照随机数字表法分为模型组、药物组和游泳运动组,每组12只。

1.3.3 干预方法

1.3.3.1 游泳运动组 每日进行无负重游泳训练。具体方法如下:将大鼠置于1个桶壁光滑的黑色圆形水池(直径100cm)中,水温(26±2)℃,水深40cm,以确保大鼠尾巴不能触及底部支撑进行休息。先适应性训练2d,10min/(次·d),待适应训练结束后,进行无负重游泳训练,30min/(次·d),连续干预4周。训练时严密观察大鼠在水中的情况,防止大鼠溺水死亡,游泳后及时用吹风机吹干大鼠身体^[15]。

1.3.3.2 药物组 模拟人体表面积换算,药物组通过腹腔注射单唾液酸四己糖神经节苷脂钠,注射剂量为0.33 mg/(kg·d),连续干预4周^[14]。

1.3.3.3 模型组 自由饮食,自由活动4周。

1.3.3.4 假手术组 自由饮食,自由活动4周。

1.4 观察指标

1.4.1 行为学观察 于干预4周后4组进行Morris水迷宫实验。Morris水迷宫为一圆形水池,在水池上面架一摄像机连接电脑。定位航行实验时,将水池等分为E(东)、S(南)、W(西)、N(北)4个象限,在E象限放置一个圆形平台,没入水下1 cm,在水中滴入墨水使其呈不透明色。将大鼠分别从4个象限的同一入水点放入水池,记录游泳情况,以大鼠四肢完全站上平台的耗时为逃避潜伏期,每次限时90 s。如果大鼠未在规定时间内站上平台,需实验员诱导至平台,逃避潜伏期计为90 s,共测试5 d。以实验第3~5天平均耗时为平均逃避潜伏期。实验第6天进行空间探索实验,撤除平台,余操作同前5 d,记录

大鼠在90 s内穿越原平台区域的次数。

1.4.2 神经元超微结构观察 干预结束后4组大鼠均给予异氟烷吸入麻醉,断头取脑,冰上分离双侧海马组织CA1区立即用预冷的生理盐水漂洗吸干水分,避光置入戊二醛溶液中。双蒸水漂洗2次,逐级丙酮脱水,浸透、包埋、修块,超薄切片机切取厚度60 nm,枸橼酸铅、醋酸铀双重染色,采用透射电镜(日本日立公司,型号:H800)观察神经元结构并摄片。

1.4.3 脑组织PERK、ATF4、CHOP mRNA水平 每组随机选择3只大鼠,干预结束后同上述麻醉断头取脑,冰上取大鼠海马CA1区组织。采用TRIzol法提取总RNA,将反转录出的cDNA保存于-80℃冰箱备用。实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)扩增步骤:95℃预变性1 min;95℃变性20 s,60℃退火60 s,循环40次。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因相对表达量。引物序列见表1。

表1 PERK、ATF4、CHOP mRNA 引物序列

Table 1 PERK, ATF4, CHOP mRNA Primer sequence

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
PERK	上游:TGGTGAGGGATGGTAAAG	173
	下游:GACGGATGATTGCAGGTA	
ATF4	上游:GCATCTGTATGAGCCCTGAG	107
	下游:AGAACCACGAGGAACACC	
CHOP	上游:CTTCACTACTCTTGACCCTG	125
	下游:CCTCCTGAGCCATAGAAC	
GAPDH	上游:TATCGGACGCCTGGTTAC	140
	下游:CTGTGCCGTTGAACTTGC	

1.4.4 脑组织PERK、ATF4、CHOP蛋白含量 参照“1.4.3”项RT-qPCR步骤,分离海马CA1区组织,加入裂解液、匀浆、裂解、离心收集总蛋白溶液存于-80℃冰箱。按照Western blot法,采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白含量。电泳(浓缩胶80 V, 20 min,分离胶120 V, 60 min),半干转膜法转膜(25 V, 30 min),封闭(5%脱脂牛奶,室温下30 min),加一抗孵育过夜(1:1 000稀释,4℃),二抗孵育(1:5 000稀释),加ECL发光液避光5 min后显影。使用ImageJ软件读取灰度值,以各目的条带蛋白与内参蛋白 β -actin表达量比值作为其相对表达量。

1.5 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析。计量资料符合正态分布,数据采用($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 4组大鼠行为学比较

与假手术组比较,模型组平均逃避潜伏期明显延长,穿越平台次数明显减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,游泳运动组、药物组平均逃避潜伏期明显缩短,穿越平台次数明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表2、图1。

表2 4组平均逃避潜伏期及穿越平台次数比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of average escape latency time and times of platform crossing in four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	平均逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次
假手术组	12	24.289±0.451	6.917±1.505
模型组	12	54.500±0.491 ¹⁾	1.750±1.055 ¹⁾
游泳运动组	12	31.542±0.505 ²⁾	4.333±1.074 ²⁾
药物组	12	31.539±0.548 ²⁾	4.333±1.303 ²⁾

注:与假手术组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the sham operation group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$.

2.2 4组大鼠CA1区神经元超微结构比较

假手术组海马CA1区神经元细胞核呈椭圆形,

核膜清晰,染色质丰富,胞浆内可见线粒体和粗面内质网等细胞器,神经细胞突起穿行于神经纤维之间。模型组神经元细胞核染色体凝集、边集,核膜断续缺失,胞浆内细胞器数量明显减少,胞浆基质溶解空泡化,线粒体嵴断裂,结构不清晰,有髓神经纤维和无髓神经纤维均可见坏死、溶解。游泳运动组神经元核膜、核仁清晰,色质部分边聚,细胞器较模型组丰富,线粒体、粗面内质网分布均匀,可见部分萎缩的细胞器,但结构及空泡样变较模型组有较大改善。药物组细胞核染色体轻微边集,核膜趋向完整,内质网结构不清晰,胞浆内仍可见较大空泡及神经纤维坏死。见图2。

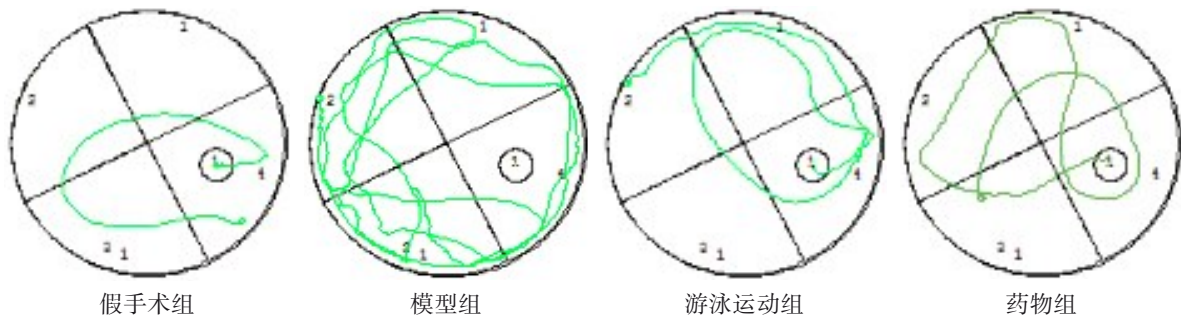


图1 4组游泳轨迹比较

Figure 1 Comparison of swimming trajectory in four groups

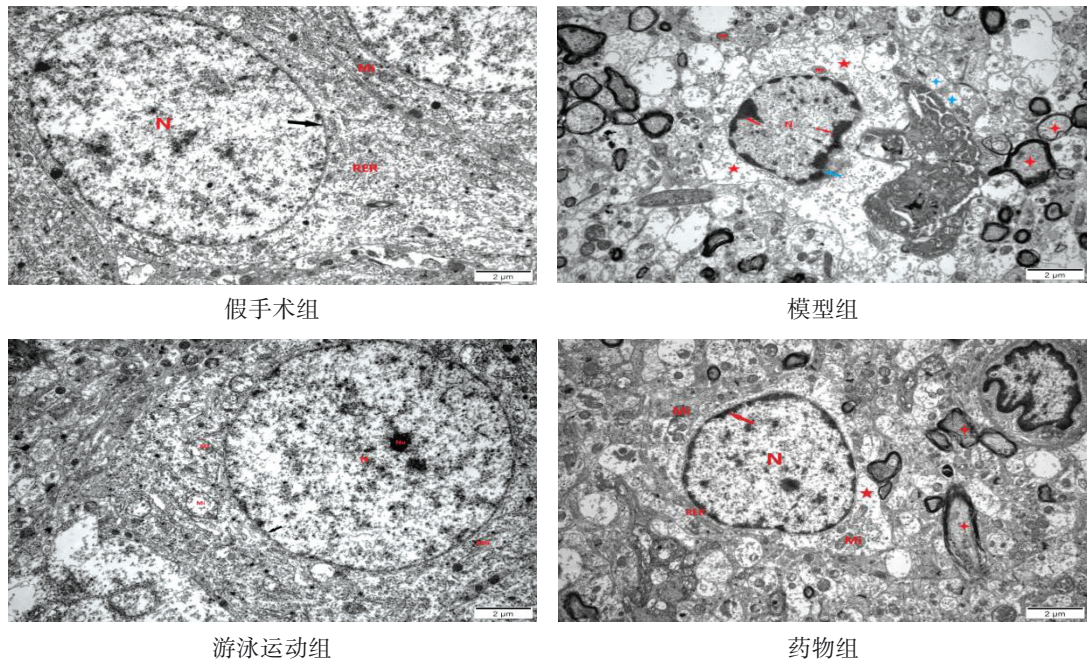


图2 4组CA1区神经元超微结构比较($\times 10\ 000$)

Figure 2 Comparison of ultrastructure of neurons in CA1 region in four groups ($\times 10\ 000$)

2.3 4组大鼠CA1区PERK、ATF4、CHOP mRNA水平比较

与假手术组比较,模型组PERK、ATF4、CHOP mRNA水平明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

与模型组比较,游泳运动组和药物组PERK、ATF4、CHOP mRNA水平均明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表3 4组海马组织PERK、ATF4、CHOP mRNA水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of mRNA levels of PERK, ATF4 and CHOP in hippocampus in four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PERK	ATF4	CHOP
假手术组	3	1.103±0.203	1.036±0.318	1.002±0.086
模型组	3	7.456±0.974 ¹⁾	4.744±0.894 ¹⁾	6.096±1.431 ¹⁾
游泳运动组	3	2.668±0.294 ²⁾	2.257±0.114 ²⁾	2.152±0.156 ²⁾
药物组	3	1.697±0.265 ²⁾	2.021±0.112 ²⁾	1.583±0.112 ²⁾

注:与假手术组比较,1) $P < 0.05$;与模型组比较,2) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the sham operation group, 1) $P < 0.05$; compared with the model group, 2) $P < 0.05$.

2.4 4组CA1区PERK、ATF4、CHOP蛋白含量比较

与假手术组比较,模型组海马CA1区PERK、ATF4、CHOP蛋白含量均明显升高,差异具有统计

学意义($P < 0.05$);与模型组比较,游泳运动组和药物组海马CA1区PERK、ATF4、CHOP蛋白含量均明显减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表4、图3。

表4 4组海马组织PERK、ATF4、CHOP蛋白含量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of levels of PERK, ATF4 and CHOP in hippocampus in four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PERK	ATF4	CHOP
假手术组	3	0.348±0.117	0.263±0.291	0.404±0.046
模型组	3	1.009±0.894 ¹⁾	0.852±0.158 ¹⁾	0.893±0.082 ¹⁾
游泳运动组	3	0.696±0.119 ²⁾	0.508±0.148 ²⁾	0.606±0.062 ²⁾
药物组	3	0.564±0.113 ²⁾	0.380±0.124 ²⁾	0.738±0.034 ²⁾

注:与假手术组比较,1) $P < 0.05$;与模型组比较,2) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the sham operation group, 1) $P < 0.05$; compared with the model group, 2) $P < 0.05$.

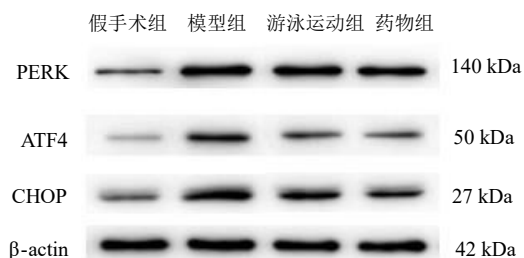


图3 4组PERK、ATF4、CHOP蛋白条带图

Figure 3 Protein band figure of PERK, ATF4 and CHOP in hippocampus in four groups

3 讨论

3.1 游泳运动可减轻神经元病理学改变,改善VD大鼠认知功能

本研究结果显示,与模型组比较,游泳运动组平均逃避潜伏期明显缩短,穿越平台次数明显增加。提示游泳运动对VD大鼠海马神经元具有保护

作用,可改善VD大鼠认知功能。与研究显示游泳运动能够改善VD大鼠认知功能和脑组织病理改变的结果基本一致^[15-16]。这可能与以下因素有关:①游泳运动时大鼠浸泡在水中,由于静水压力作用能够增加大鼠心脏的每搏输出量和平均动脉压,VD大鼠的脑血流量(cerebral blood flow, CBF)增加^[17]。VD大鼠在进行中等强度的游泳运动时,潮气末CO₂分压轻度增加,从而促进CBF增加^[18]。CBF增加能够减少脑缺血区神经元损伤和海马神经损伤,从而改善VD大鼠认知功能。这与前期文献研究结果相似^[19-22]。②本团队前期研究还发现VD神经元受损还与神经炎症反应有关^[23]。本研究中模型组神经元细胞核染色体凝集、核膜断续缺失,线粒体嵴断裂,结构不清晰,提示可能存在神经炎症反应,这与相关神经炎症研究结果相似^[24]。而游泳运动组神经元核膜、核仁清晰,色质仅部分边聚,线粒体分布均匀,结合前期研究结果推测游泳运动改善VD大

鼠神经元损伤可能与神经炎症反应有关,但后期仍需相关研究进行验证。

3.2 游泳运动对VD神经保护作用可能与调节PERK/ATF4/CHOP通路有关

本研究结果显示,与模型组比较,游泳运动组PERK、ATF4、CHOP mRNA及蛋白表达均明显降低。这提示游泳运动对VD大鼠神经元保护作用可能与PERK/ATF4/CHOP信号通路有关。与YUAN等^[25]研究证实游泳运动可抑制ERS和PERK途径,改善VD大鼠认知功能的结果基本一致。这可能与以下因素有关:PERK、ATF4、CHOP蛋白是UPR反应过程的重要蛋白,持续性的脑灌注不足导致VD大鼠的大脑组织中UPR反应被启动,原本以非活性形式结合的GRP78/PERK分离,PERK发生自磷酸化^[26]。磷酸化的PERK招募并磷酸化真核细胞起始因子2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α , eIF2 α)。而磷酸化的eIF2 α 可以抑制蛋白质翻译,减少内质网内未折叠/错误蛋白质的积累,减轻细胞应激,使细胞存活。但因VD大鼠长时间的脑灌注不足,持续的ERS可跳过eIF2 α 磷酸化,激活PERK下游ATF4,被激活的ATF4可提高CHOP的转录和表达^[27]。CHOP作为关键的促凋亡分子,CHOP表达通过诱导细胞死亡导致神经元损伤^[28-29],继而发生上述的神经元病理性改变。游泳运动能够调节UPR反应中PERK/ATF4/CHOP信号通路,抑制脑缺血再灌注大鼠海马区ERS相关蛋白PERK、ATF4与CHOP蛋白表达,从而发挥神经元保护作用^[30-32]。

单唾液酸四己糖神经节苷脂钠是治疗VD的常用药,具有抑制细胞凋亡,改善认知功能的作用^[33]。但单唾液酸四己糖神经节苷脂钠长期服用可能会出现不良反应,如呼吸困难、过敏性休克、血压升高以及视物模糊等^[34]。本研究结果显示,与游泳运动组比较,药物组在行为学、PERK/ATF4/CHOP通路相关蛋白表达差异均无统计学意义,这说明游泳运动在改善VD大鼠神经元损伤、提高认知功能方面与药物组效果相当。因此,游泳运动在改善VD大鼠脑缺血损伤方面可能更具优势。

4 小 结

游泳运动对VD大鼠具有一定的脑保护作用,能在一定程度上改善VD大鼠认知功能,可能与调控UPR反应中PERK/ATF4/CHOP通路抑制ERS支持神经元存活有关。但本研究仍存在一些不足之

处,如实验动物样本量较少、未区分游泳运动训练强度和未从分子生物学角度深入阐释游泳运动改善VD大鼠认知功能的具体机制等。下一步研究将探究游泳运动的时间和训练强度对VD大鼠行为学的影响,并继续深入探究游泳运动改善ERS的具体作用机制,为游泳运动干预VD大鼠认知功能障碍提供依据。

参考文献

- [1] JIANG W X, GONG L, LIU F, et al. Stem cells and vascular dementia: from basic science to the clinic [J]. *Cell Tissue Bank*, 2020, 21(3):349-360.
- [2] 杨坤,宋小鸽,阮静茹,等. 艾灸改善血管性痴呆大鼠认知功能及对海马神经元凋亡相关蛋白的影响[J]. *中国针灸*, 2021, 41(12):1371-1378.
YANG K, SONG X G, RUAN J R, et al. Effect of moxibustion on cognitive function and proteins related with apoptosis of hippocampal neurons in rats with vascular dementia [J]. *Chin Acupunct Moxibust*, 2021, 41(12):1371-1378.
- [3] YU W W, LI Y, HU J, et al. A study on the pathogenesis of vascular cognitive impairment and dementia: the chronic cerebral hypoperfusion hypothesis [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(16):4742.
- [4] NIU X L, JIANG X, XU G D, et al. DL-3-n-butylphthalide alleviates vascular cognitive impairment by regulating endoplasmic reticulum stress and the Shh/Ptch1 signaling pathway in rats [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8):12604-12614.
- [5] XU C, DAI Y X, BAI J, et al. 17 β -oestradiol alleviates endoplasmic reticulum stress injury induced by chronic cerebral hypoperfusion through the Haemoglobin/HIF 1 α signalling pathway in ovariectomized rats [J]. *Neurochem Int*, 2021, 148:105119.
- [6] PLUQUET O, POURTIER A, ABBADIE C. The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 308(6):C415-C425.
- [7] QIU J, WANG X, WU F, et al. Low dose of apelin-36 attenuates ER stress-associated apoptosis in rats with ischemic stroke [J]. *Front Neurol*, 2017, 8:556.
- [8] LIN Y W, CHEN T Y, HUNG C Y, et al. Melatonin protects brain against ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(1):182-192.
- [9] 杨椅,王坤,刘恒旭,等. 有氧运动对老年轻度认知障碍患者认知功能的改善[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(29):4716-4722.
YANG Y, WANG K, LIU H X, et al. Aerobic exercise improves the cognitive function of elderly patients with mild cognitive impairment [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2022, 26(29):4716-4722.
- [10] BARHA C K, HSIUNG G Y R, BEST J R, et al. Sex difference in aerobic exercise efficacy to improve cognition in older adults with vascular cognitive impairment: secondary analysis of a randomized controlled trial [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 60(4):1397-1410.
- [11] FU Y, ZHANG Y T, YUAN Q J. Aerobic exercise ameliorates

- learning and memory deficits of aging rats induced by D-galactose via promoting SYP and BDNF expression in hippocampus [J]. *BIO Web Conf*, 2017, 8:1020.
- [12] 黎轶,王景振,刘瑞莲. 有氧运动联合白藜芦醇通过Nrf2/ARE信号通路抗血管性痴呆大鼠海马氧化损伤[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(12):3021-3025.
- LI Y, WANG J Z, LIU R L. Aerobic exercise combined with resveratrol protects hippocampus from oxidative damage in vascular dementia rats through Nrf2/ARE signaling pathway [J]. *Chin J Gerontol*, 2022, 42(12):3021-3025.
- [13] 孙旭,王蕾,赵婧,等. 血管性痴呆动物模型研究概述[J]. *广州中医药大学学报*, 2022, 39(10):2465-2470.
- SUN X, WANG L, ZHAO J, et al. Overview of the animal model of vascular dementia [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*, 2022, 39(10):2465-2470.
- [14] 张泓,黄桂兰,谭洁,等. 有氧运动对慢性缺血性认知障碍模型大鼠海马组织pCREB、PICK1及GluR2蛋白表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2018, 33(7):777-782, 799.
- ZHANG H, HUANG G L, TAN J, et al. Effects of aerobic exercise on the expression of pCREB, PICK1 and GluR2 proteins in hippocampus of rats with ischemic cognitive impairment [J]. *Chin J Rehabil Med*, 2018, 33(7):777-782, 799.
- [15] 邓畅,陈丹凤,仇蓉蓉,等. 有氧运动训练对血管性痴呆大鼠肠道菌群结构的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2022, 37(4):443-450.
- DENG C, CHEN D F, QIU R R, et al. Effects of aerobic exercise training on intestinal flora constructs of rats with vascular dementia [J]. *Chin J Rehabil Med*, 2022, 37(4):443-450.
- [16] GAO L, LIU F S, LIU R L. The mechanism of aerobic exercise regulating the PI3K/Akt-mTOR signaling pathway intervenes in hippocampal neuronal apoptosis in vascular dementia rats [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2023, 20(3):1893.
- [17] SHOEMAKER L N, WILSON L C, LUCAS S J E, et al. Swimming-related effects on cerebrovascular and cognitive function [J]. *Physiol Rep*, 2019, 7(20):e14247.
- [18] SHOEMAKER L N, WILSON L C, LUCAS S J E, et al. Acute exercise-related cognitive effects are not attributable to changes in end-tidal CO₂ or cerebral blood velocity [J]. *Eur J Appl Physiol*, 2020, 120(7):1637-1649.
- [19] 姚晓雯,唐巍,李梦醒,等. 基于SIRT1/PGC-1 α 通路探讨电针联合丰富康复训练对脑缺血大鼠氧化应激的影响[J]. *安徽中医药大学学报*, 2021, 40(2):47-53.
- YAO X W, TANG W, LI M X, et al. Effect of electroacupuncture combined with enriched rehabilitation training on oxidative stress in rats with cerebral ischemia based on the SIRT1/PGC-1 α pathway [J]. *J Anhui Univ Chin Med*, 2021, 40(2):47-53.
- [20] UEMURA M T, MAKI T, IHARA M, et al. Brain microvascular pericytes in vascular cognitive impairment and dementia [J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12:80.
- [21] MA C L, MA X T, WANG J J, et al. Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 317:332-339.
- [22] DAO E, HSIUNG G Y R, LIU-AMBROSE T. The role of exercise in mitigating subcortical ischemic vascular cognitive impairment [J]. *J Neurochem*, 2018, 144(5):582-594.
- [23] 刘芳,李梦醒,王玉,等. 艾灸督脉经穴通过p38 MAPK通路抑制血管性痴呆大鼠海马CA1区IL-1 β 和TNF- α 表达[J]. *安徽中医药大学学报*, 2023, 42(3):53-58.
- LIU F, LI M X, WANG Y, et al. Moxibustion at acupoints on the governor vessel inhibits the expression of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in the hippocampal CA1 region of rats with vascular dementia via the p38 MAPK pathway [J]. *J Anhui Univ Chin Med*, 2023, 42(3):53-58.
- [24] 仇蓉蓉,张泓,邓畅,等. 电针对血管性痴呆大鼠海马活性氧-NOD样受体蛋白3炎性通路及自噬相关蛋白的影响[J]. *针刺研究*, 2022, 47(4):298-304.
- QIU R R, ZHANG H, DENG C, et al. Effects of electroacupuncture on ROS-NLRP3 inflammatory pathway and autophagy related proteins in hippocampus of vascular dementia rats [J]. *Acupunct Res*, 2022, 47(4):298-304.
- [25] YUAN F Y, JU C, ZANG C X, et al. *Gardenia jasminoides* extract GJ-4 alleviates memory deficiency of vascular dementia in rats through PERK-mediated endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51(1):53-72.
- [26] YANG W, PASCHE W. Unfolded protein response in brain ischemia: a timely update [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(12):2044-2050.
- [27] ROZPEDEK W, PYTEL D, MUCHA B, et al. The role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress [J]. *Curr Mol Med*, 2016, 16(6):533-544.
- [28] LI X, YANG W. An update on the unfolded protein response in brain ischemia: experimental evidence and therapeutic opportunities [J]. *Neurochem Int*, 2021, 151:105218.
- [29] HU H, TIAN M X, DING C, et al. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection [J]. *Front Immunol*, 2019, 9:3083.
- [30] 龚丽,唐巍,邱镇,等. 电针联合丰富康复训练对脑缺血再灌注损伤大鼠海马神经细胞的保护机制[J]. *康复学报*, 2019, 29(5):33-39, 45.
- GONG L, TANG W, QIU Z, et al. Protective mechanism of electroacupuncture combined with enriched rehabilitative training on hippocampal neurons in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Rehabil Med*, 2019, 29(5):33-39, 45.
- [31] 周斯琪. 基于内质网应激反应探讨电针联合跑台训练对脑缺血再灌注大鼠海马神经细胞的保护机制[D]. 合肥:安徽中医药大学, 2018:24-26.
- ZHOU S Q. Protective mechanism of electroacupuncture combined with treadmill training on hippocampal neurons in rats with cerebral ischemia and reperfusion based on endoplasmic reticulum stress reaction [D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2018:24-26.
- [32] ZHANG Y, LIU X W, WEI J, et al. HIIT and MICT attenuate high-fat diet-induced hepatic lipid accumulation and ER stress via the PERK-ATF4-CHOP signaling pathway [J]. *J Physiol Bio-*

chem, 2022, 78(3): 641-652.

[33] 张双, 邓华江, 张丽云, 等. 单唾液酸四己糖神经节苷脂对大鼠脑出血后 PAPR-1/AIF 通路的影响[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(23): 5018-5021.

ZHANG S, DENG H J, ZHANG L Y, et al. Effect of monosialotetrahexosyl ganglioside on the PAPR-1/AIF pathway after intracerebral hemorrhage in rats [J]. Chin J Gerontol, 2020, 40(23):

5018-5021.

[34] 肖望重, 于慧, 龙琼, 等. 单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液不良事件及其救护措施[J]. 安徽医药, 2022, 26(3): 633-636.

XIAO W Z, YU H, LONG Q, et al. Adverse drug events and treatment of monosialotetrahexosyl ganglioside sodium injection [J]. Anhui Med Pharm J, 2022, 26(3): 633-636.

Mechanism of Swimming Exercise Intervention on Rats with Vascular Dementia Based on PERK/ATF4/CHOP Pathway

LIU Fang¹, LI Mengxing², WANG Yu³, TANG Wei^{2*}

¹ School of Medicine, Anqing Medical and Pharmaceutical College, Anqing, Anhui 246052, China;

² College of Acupuncture and Moxibustion, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012, China;

³ School of Physical Education, Anqing Normal University, Anqing, Anhui 246113, China

*Correspondence: TANG Wei, E-mail: tangwei2633@163.com

ABSTRACT Objective: To explore the neuroprotective effects of swimming exercise on rats with vascular dementia (VD) based on the PERK/ATF4/CHOP pathway. **Methods:** A total of 48 male SPF SD rats were randomly divided into sham operation group and experimental group, with 12 and 36 cases respectively. The permanent bilateral common carotid artery occlusion method was used to establish the model in the experimental group, which was randomly divided to model group, swimming exercise group and drug group, with 12 cases in each group. The swimming exercise group underwent load-free swimming training for 30 min/(time·day), lasting for four weeks; the drug group received intraperitoneal injections of monosialotetrahexose ganglioside sodium, 0.33 mg/(kg·day), lasting for four weeks; the other two groups were allowed free activity for four weeks. After four weeks of intervention, Morris water maze experiment was used to observe behavioral changes of rats; transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructure of neurons in the hippocampal CA1 region of rats; real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the relative expression levels of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), activating transcription factor 4 (ATF4), and C/EBP homologous protein (CHOP) mRNA and protein. **Results:** (1) Behavioral changes: compared with the sham operation group, the average escape latency in the model group was significantly prolonged, and the number of platform crossing significantly reduced, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the model group, the average escape latency of the swimming exercise group and the drug group were significantly shortened, and the number of platform crossing significantly increased ($P < 0.05$). (2) Neuron ultrastructure: in the model group, the number of organelles in the cytoplasm decreased, cytoplasmic matrix dissolution and vacuolization occurred, mitochondria cristae were broken and unclear, and neural fiber necrosis and dissolution were visible; compared with the model group, the swimming exercise group showed significant improvement in the structure of various organelles in the cytoplasm and the degree of vacuolar changes. (3) Expression levels of brain tissue PERK, ATF4, CHOP mRNA and protein: compared with the sham operation group, the expression levels of PERK, ATF4, CHOP mRNA, and protein in the hippocampal CA1 region of the model group significantly increased ($P < 0.05$); compared with the model group, the expression levels of PERK, ATF4, CHOP mRNA and protein in the hippocampal CA1 region of the swimming exercise group significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Swimming exercise can protect brain tissue in rats with VD and improve their cognitive functions. The mechanism may be related to the regulation of the PERK/ATF4/CHOP pathway, suppressing the expression of ERS-related proteins PERK, ATF4, CHOP mRNA and protein in the hippocampal region of rats with VD.

KEY WORDS vascular dementia; swimming exercise; neuroprotection; cognitive function; endoplasmic reticulum stress; PERK/ATF4/CHOP pathway

DOI:10.3724/SP.J.1329.2023.04007