

· 基础研究 ·

预运动对脑缺血大鼠前额叶皮质抗坏血酸水平及学习记忆能力恢复的影响

荣湘江 周军 张玉芹 张晓林 刘海旭 刘坤

【摘要】目的 观察缺血前预运动对大鼠前额叶皮质内抗坏血酸水平及学习记忆能力的影响。**方法** 选取健康 3 月龄雄性 SD 大鼠 24 只,按随机数字表法将其分为运动缺血组、运动对照组、缺血对照组和假手术组,每组 6 只。运动缺血组和运动对照组大鼠进行跑台训练,共 3 周,运动缺血组在此基础上采用双侧颈总动脉结扎(2-VO)制备慢性脑缺血大鼠模型,缺血对照组和假手术组大鼠不进行跑台运动训练,常规饲养 3 周后,缺血对照组建立慢性脑缺血大鼠模型,假手术组仅暴露双侧颈总动脉,不行结扎处理。脑缺血前、后采用活体动物脑内微透析采样及在线电化学分析技术对大鼠的抗坏血酸水平进行测定,脑缺血后 24 h 应用被动回避反射评价大鼠的学习记忆能力。**结果** 脑缺血前,运动缺血组、运动对照组、缺血对照组及假手术组大鼠前额叶皮质的抗坏血酸基础浓度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);运动缺血组大鼠的抗坏血酸浓度在缺血后 5 min 开始上升,最高值为基础浓度的(203.69 ± 46.48)%,与缺血前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);运动对照组和假手术组的抗坏血酸浓度与治疗前比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);缺血对照组大鼠的抗坏血酸浓度在脑缺血后 5 min 内上升至基础浓度的(222.37 ± 42.37)% ($P < 0.05$),且在缺血后 1 h 内上升至(316.98 ± 32.46)%,与缺血前基础浓度比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。组间比较发现,运动缺血组缺血后各时间点的抗坏血酸浓度均低于缺血对照组($P < 0.05$)。脑缺血后 24 h,运动缺血组大鼠的被动回避反射时间长于缺血对照组,提示运动缺血组大鼠的学习记忆能力优于缺血对照组($P < 0.05$)。**结论** 脑缺血前预运动可提高大鼠前额叶皮质的抗坏血酸水平,促进其学习记忆能力恢复。

【关键词】 脑缺血; 微透析; 前额叶皮质; 抗坏血酸; 被动回避反射

Pre-ischemia physical activity improved cognition and modified ascorbate change in medial prefrontal cortex after cerebral ischemia RONG Xiang-jiang, ZHOU Jun, ZHANG Yu-qin, ZHANG Xiao-lin, LIU Hai-xu, LIU Kun. Department of Health Care and Rehabilitation, School of Sports Science and Health, Capital University of Physical Education and Sports, Beijing 100191, China

Corresponding author: LIU Kun, Email: liukun@cupes.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the effect of pre-ischemia physical activity on cognition and ascorbate content in medial prefrontal cortex (mPFC) after cerebral ischemia. **Methods** Twenty-four Sprague-Dawley rats were enrolled in this study and randomly divided into the following 4 groups: running-ischemia group, running group, ischemia group and sham operation group. Cerebral ischemia was brought about by permanent 2 vessels occlusion (2-VO) method. Treadmill running was used as physical activity training. Ascorbate in mPFC was monitored with in vivo microdialysis coupled with on-line electrochemical flow cell analysis. Passive avoidance was used to test cognitive function at 24 hours after 2-VO cerebral ischemia. **Results** Neurochemistry study showed that ascorbate level in mPFC increased within 3 hours after 2-VO ischemia and the increase was attenuated in the running-ischemia group. The baseline level of mPFC ascorbate in the four groups has no significant difference. Behavioral data indicated that 3 weeks pre-ischemia running promoted cognitive function recovery after 2-VO ischemia. **Conclusion** The pre-ischemia physical activity could increase the ascorbate storage in mPFC and enhance the antioxidant ability of this region. Therefore, it is one of the possible neurochemical mechanism underlying pre-ischemia physical activity for the improvement of cognitive function after cerebral ischemia. Thus pre-ischemia physical activity can be of benefit to cognition rehabilitation after stroke.

【Key words】 Cerebral ischemia; In vivo microdialysis; Medial prefrontal cortex; Ascorbate; Passive avoidance

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.07.003

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30900709);北京市科技计划重点项目(KZ201010029031);北京市属高等学校人才强教深化计划“中青年骨干人才培养计划”项目(PHR201008179);北京市教委科技创新平台项目(PXM2012_014206_000003)

作者单位:100191 北京,首都体育学院运动科学与健康学院保健康复教研室

通信作者:刘坤,Email:liukun@cupes.edu.cn

脑缺血疾病的致死率和致残率较高,严重危害着人类的生命健康^[1]。在国内,脑缺血疾病是导致患者死亡的主要疾病之一^[2]。适量运动可以预防脑缺血发生并促进脑缺血后的神经功能恢复^[3-4],但具体机制还有待于进一步研究。神经化学研究表明^[1,5],适量运动可提高脑的抗氧化能力,提升脑内葡萄糖储备,调控谷氨酸释放。神经生物学研究亦证实^[6-7],跑步、游泳等运动可提高脑内神经营养因子的储备量,改善海马脑区的神经再生能力。前额叶皮质作为脑内重要的感觉运动中枢,不仅参与学习记忆、动作感知及执行过程,还与动机形成和情绪控制存在密切关系^[8,9]。同时,前额叶皮质脑区的神经元密度和代谢率较高,易受到缺血缺氧损伤的影响,由缺血缺氧损伤所导致的前额叶皮质损伤,可显著影响脑的高级功能,如学习记忆能力^[10-11]。基于上述研究背景,本研究利用活体脑内微透析技术和在线电化学分析技术,观察缺血前跑台运动对大鼠前额叶皮质内抗坏血酸水平的影响,并利用被动回避反射评价大鼠的学习记忆能力。

材料与方法

一、实验动物及分组

选取健康 3 月龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 24 只,体重 250 ~ 350 g,由北京大学医学部实验动物中心提供,实验前均单独分笼饲养,自由进食饮水,并给予自然昼夜节律光照。将大鼠按随机数字表法分为运动缺血组、运动对照组、缺血对照组和假手术组,每组 6 只。

二、预运动训练方法及模型制备

采用段氏 PT2000 型鼠类跑台(中国杭州产),参照 Bedford 等^[12]提出的有氧运动负荷标准,设定跑台速度为 15 m/min,坡度 0°,每日 1 h,共 5 d,每周休息 2 d,连续 3 周。运动缺血组和运动对照组大鼠进行 3 周跑台运动后,运动对照组大鼠不作其它特殊处理,运动缺血组采用双侧颈总动脉结扎(two-vessels occlusion, 2-VO)制备慢性脑缺血大鼠模型。缺血对照组和假手术组大鼠不进行跑台运动训练,常规饲养 3 周后,缺血对照组利用 2-VO 建立慢性脑缺血大鼠模型,假手术组仅暴露双侧颈总动脉,不行结扎处理。

三、脑立体定位手术

预运动训练结束后,采用 10% 水合氯醛(3.5 ml/kg)进行腹腔麻醉,完成后将其固定于立体定位仪上,以双侧耳杆对称固定外耳道,用鼻夹将门齿固定于耳间线以下 3.3 mm,保证颅骨表面处于水平位置。切开颅顶皮肤,暴露前囟及后囟。根据大鼠脑立体定位图谱确定海马背侧脑区的三维位置,将微透析探针导轨植入海马脑区,其靶点位置为:前后(AP) =

4.4 mm,左右侧(L) = 3.0 mm,垂直轴(V) = 2.5 mm。在探针导轨周围的颅骨板上固定 3 个螺钉,用牙科水泥固定颅骨表面的探针导轨,封盖颅顶伤口。微透析采样分析当日,以同样方法和剂量再次麻醉已放置导轨的大鼠,将 2 mm 膜长微透析探针经导轨插入相应脑区。实验过程中,利用恒温垫维持大鼠体温处于 37 °C。

四、脑内抗坏血酸水平测定

利用活体动物脑内微透析采样及在线电化学分析技术^[13-14],对大鼠脑缺血前 1 h 至脑缺血后 3 h 内的抗坏血酸水平进行测定。采样时,使用微量注射泵以恒定速度向微透析探针内灌注人工脑脊液,取得的脑透析液直接流入薄层流动电解池中进行抗坏血酸的持续在线电化学检测。在线电化学分析系统由薄层流动电解池和活体动物脑内微透析系统两部分组成,薄层流动电解池是一种薄层放射流动池,由直径为 6 mm 的玻碳电极(工作电极)、Ag/AgCl 电极(参比电极)和 1 根不锈钢管(对电极)组成。活体在线测定脑内抗坏血酸水平系统如图 1 所示。

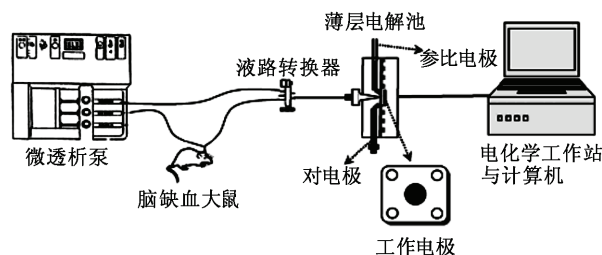
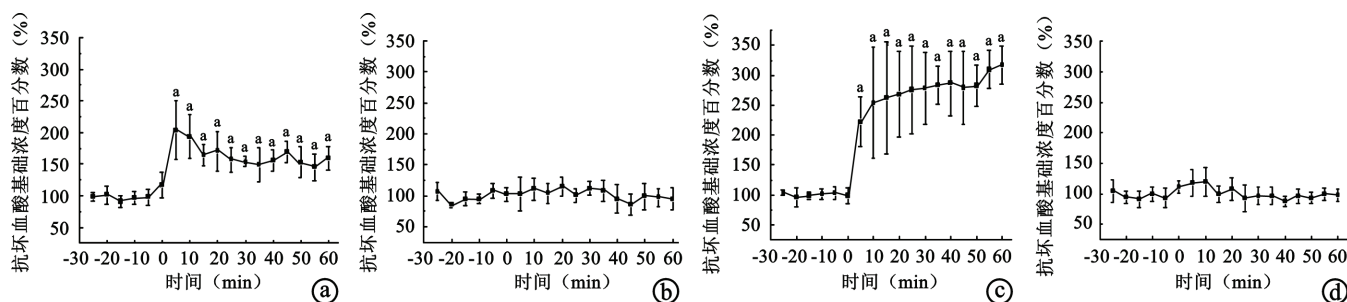


图1 活体在线测定脑内抗坏血酸水平系统

五、学习记忆能力评定

脑缺血后 24 h,利用被动回避反射评价大鼠的学习记忆能力。评定选择在一个改良后的被动回避反射训练箱中进行。训练箱采用有机玻璃制成,分为明室和暗室,明室较小,长、宽、高分别为 20 cm、28 cm、8 cm;暗室较大,长、宽、高分别为 20 cm、28 cm、42 cm,明室与暗室的室壁上有 1 个 7 cm × 7 cm 的间隔孔,有活动滑门阻隔,可供大鼠在训练时通过。暗室底部由多根直径为 5 mm 的金属杆构成,金属杆之间相隔 1.5 cm。在被动回避反射训练时,暗室底部的金属杆可通电产生 1.5 mA 电流。训练箱放置于单独的动物训练房中,保持环境安静。训练分 2 次进行,初次训练时,动物被放入明室,经过 2 min 适应后,打开明、暗室间隔,记录打开明、暗室间隔至动物进入暗室的时间。待动物进入暗室后,关闭室间隔,通电,给予暗室底部金属杆 5 s 的电刺激,打开室间隔,动物自动返回明室。24 h 后,再次进行训练,将动物置于明室,适应 2 min 后,打开明、暗室间隔,记录动物在明室内的滞留时间。



注: a 为运动缺血组, b 为运动对照组, c 为缺血对照组, d 为假手术组, $^a P < 0.05$ 表示差异有统计学意义

图 2 脑缺血后大鼠前额叶皮质抗坏血酸的浓度变化

六、统计学处理

采用 SPSS 17.0 版统计学软件对相关数据进行统计学分析。计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 形式表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

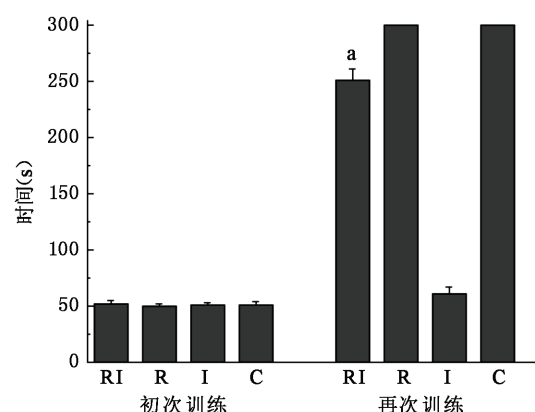
结 果

脑缺血前, 运动缺血组、运动对照组、缺血对照组及假手术组大鼠前额叶皮质的抗坏血酸基础浓度分别为 $(48.15 \pm 2.94) \mu\text{mol/L}$ 、 $(52.02 \pm 3.47) \mu\text{mol/L}$ 、 $(50.76 \pm 2.82) \mu\text{mol/L}$ 、 $(49.97 \pm 4.03) \mu\text{mol/L}$, 组间比较后, 发现各组间抗坏血酸的基础浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。脑内微透析采样分析结果显示, 运动缺血组大鼠前额叶皮质抗坏血酸浓度在脑缺血后 5 min 即开始上升, 最高值达到基础浓度的 $(203.69 \pm 46.48)\%$, 与缺血前比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见图 2a。运动对照组大鼠跑台运动后的抗坏血酸浓度与运动前比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 详见图 2b。缺血对照组大鼠脑缺血后, 前额叶皮质抗坏血酸浓度在 5 min 内即上升至基础浓度的 $(222.37 \pm 42.37)\%$ ($P < 0.05$), 且在缺血后 1 h 内持续上升至 $(316.98 \pm 32.46)\%$, 与缺血前基础浓度比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见图 2c。假手术组大鼠在假手术后的抗坏血酸浓度与假手术前基础浓度比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 详见图 2d。组间比较发现, 运动缺血组缺血后各时间点的抗坏血酸浓度均低于缺血对照组 ($P < 0.05$)。

脑缺血后 24 h, 运动缺血组大鼠的被动回避反射时间长于缺血对照组, 提示运动缺血组大鼠的学习记忆能力优于缺血对照组 ($P < 0.05$)。与运动对照组和假手术组比较, 运动缺血组大鼠的被动回避反射时间较短, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见图 3。

讨 论

抗坏血酸不仅是脑内含量丰富的小分子氧化剂, 还是非常重要的神经调质^[15-16]。许多研究表明^[11, 13, 17],



注: RI 为运动缺血组, R 为运动对照组, I 为缺血对照组, C 为假手术组。与缺血对照组比较, $^a P < 0.05$

图 3 脑缺血后大鼠的被动回避反射时间

抗坏血酸与谷氨酸神经毒性、缺氧后细胞内去极化、细胞损伤修复及缺血后早期细胞因子表达等一系列生物化学变化有关。本研究发现, 在单纯前额叶皮质缺血损伤后, 大鼠的抗坏血酸浓度显著上升, 且保持上升趋势, 此结果与 Liu 等^[11]所报道的海马、皮质脑区因缺血缺血损伤最终导致神经细胞急性坏死的结论一致。由于神经元细胞内储存了大量的抗坏血酸, 其浓度可达细胞外浓度的 20 倍以上, 在缺血损伤发生后, 细胞将抗坏血酸释放至细胞外, 导致细胞外抗坏血酸浓度上升^[15]。此外, 皮质及海马等神经元密集的脑区在缺血后会释放出大量谷氨酸, 其可被正常神经元和神经胶质细胞通过谷氨酸转运体重吸收至细胞内, 同时向细胞外释放大量的抗坏血酸^[17], 因此, 脑缺血后抗坏血酸浓度的上升可能与该脑区的谷氨酸重吸收过程有关。本研究中, 大鼠前额叶皮质的抗坏血酸浓度在脑缺血发生后 1 h 内显著上升, 推测其可能与缺血缺氧导致细胞死亡有关, 也可能与细胞的谷氨酸-抗坏血酸异向交换过程有关。

本研究中, 运动缺血组大鼠在脑缺血前进行了 3 周的有氧跑台运动, 在脑缺血发生后 1 h 内, 其前额叶皮质的抗坏血酸浓度虽然升高, 但浓度明显低于未进行预运动的缺血对照组 ($P < 0.05$)。目前, 有关预运

动对脑缺血后抗坏血酸浓度影响的研究较少,但有较多研究均已证实^[18-20],运动可预防缺血后的细胞损伤,缓解细胞的缺氧程度,提高神经细胞对缺氧缺血损伤的耐受性。所以,大鼠在脑缺血前进行的预运动从一定程度上提高了神经细胞对缺血缺氧损伤的耐受能力,从而起到保护神经的作用。脑内抗坏血酸浓度降低可减少低氧诱导因子产生,通过其抗氧化能力及神经调质作用提高机体的神经保护能力^[21]。此外,谷氨酸-抗坏血酸异向交换也被认为具有重要的代谢调节作用^[22]。预运动可增加脑内蛛网膜和神经细胞上抗坏血酸转运体的数量,由此提高神经细胞内的抗坏血酸储量,增强其抗缺血缺氧的能力^[23-24]。行为学结果显示,运动缺血组大鼠的学习记忆能力恢复较好,提示缺血前预运动可促进缺血后认知功能恢复。

综上所述,预运动可明显减少脑缺血所导致的抗坏血酸大量释放,提高脑缺血后的被动回避反射能力,促进学习记忆能力恢复,这一作用可能与预运动提高了神经细胞的抗缺血缺氧损伤能力有关。本研究中,缺血前进行的跑台运动并没有显著改变大鼠前额叶皮质的基础抗坏血酸浓度,但预运动是否改变了神经元内的抗坏血酸储量还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Rossi DJ, Brady JD, Mohr C. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci*, 2007, 10:1377-1386.
- [2] 刘青青,郭虹,王少峡,等. 脑缺血损伤机制的研究进展. *中华中医药学刊*, 2012, 30:1288-1230.
- [3] Middleton LE, Corbett D, Brooks D, et al. Physical activity in the prevention of ischemic stroke and improvement of outcomes: a narrative review. *Neurosci Biobehav Rev*, 2013, 37:133-137.
- [4] Prior PL, Hachinski V, Unsworth K, et al. Comprehensive cardiac rehabilitation for secondary prevention after transient ischemic attack or mild stroke: I: feasibility and risk factors. *Stroke*, 2011, 42:3207-3213.
- [5] Moro MA, Almeida A, Bolaños JP, et al. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radic Biol Med*, 2005, 39: 1291-1304.
- [6] Kobilo T, Liu QR, Gandhi K, et al. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem*, 2011, 18:605-609.
- [7] Chae CH, Lee HC, Jung SL, et al. Swimming exercise increases the level of nerve growth factor and stimulates neurogenesis in adult rat hippocampus. *Neuroscience*, 2012, 212:30-37.
- [8] Liu K, Steketee JD. Repeated exposure to cocaine alters medial prefrontal cortex dopamine D₂-like receptor modulation of glutamate and dopamine neurotransmission within the mesocorticolimbic system. *J Neurochem*, 2011, 119:332-341.
- [9] Ji G, Sun H, Fu Y, et al. Cognitive impairment in pain through amygdala-driven prefrontal cortical deactivation. *J Neurosci*, 2010, 30: 5451-5464.
- [10] Ahmad A, Rasheed N, Banu N, et al. Alterations in monoamine levels and oxidative systems in frontal cortex, striatum, and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress. *Stress*, 2010, 13: 355-364.
- [11] Liu K, Lin Y, Yu P, et al. Dynamic regional changes of extracellular ascorbic acid during global cerebral ischemia: studied with in vivo microdialysis coupled with on-line electrochemical detection. *Brain Res*, 2009, 1253:161-168.
- [12] Bedford TG, Loi PK, Crandall CC. A model of dynamic exercise: the decerebrate rat locomotor preparation. *J Appl Physiol*, 1992, 72:121-127.
- [13] Liu K, Lin Y, Xiang L, et al. Comparative study of change in extracellular ascorbic acid in different brain ischemia/reperfusion models with in vivo microdialysis combined with on-line electrochemical detection. *Neurochem Int*, 2008, 52:1247-1255.
- [14] Zhang M, Liu K, Gong K, et al. Continuous on-line monitoring of extracellular ascorbate depletion in the rat striatum induced by global ischemia with carbon nanotube-modified glassy carbon electrode integrated into a thin-layer radial flow cell. *Anal Chem*, 2005, 77:6234-6242.
- [15] Miller BR, Dörner JL, Bunner KD, et al. Up-regulation of GLT1 reverses the deficit in cortically evoked striatal ascorbate efflux in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem*, 2012, 121: 629-638.
- [16] Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci*, 2000, 23:209-216.
- [17] Harrison FE, May JM. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46:719-730.
- [18] Cechetti F, Worm PV, Elsner VR, et al. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Neurobiol Learn Mem*, 2012, 97:90-96.
- [19] Radak Z, Kumagai S, Taylor AW, et al. Effects of exercise on brain function: role of free radicals. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2007, 32: 942-946.
- [20] Kishi T, Hirooka Y, Katsuki M, et al. Exercise training causes sympathoinhibition through antioxidant effect in the rostral ventrolateral medulla of hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*, 2012, 34:278-283.
- [21] Giusti S, Fiszer de Plazas S. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves upregulation of hypoxia-inducible factor-1 in a prenatal model of acute hypoxia. *J Neurosci Res*, 2012, 90:468-478.
- [22] Qiu S, Li L, Weeber EJ, et al. Ascorbate transport by primary cultured neurons and its role in neuronal function and protection against excitotoxicity. *J Neurosci Res*, 2007, 85:1046-1056.
- [23] Harrison FE, Best JL, Meredith ME, et al. Increased expression of SVCT2 in a new mouse model raises ascorbic acid in tissues and protects against paraquat-induced oxidative damage in lung. *PLoS One*, 2012, 7:35623.
- [24] Pierce MR, Diasio DL, Rodrigues LM, et al. Combined vitamin C and E deficiency induces motor defects in gulo(-/-)/SVCT2(+/-) mice. *Nutr Neurosci*, 2013, 16:160-173.

(修回日期:2013-06-28)

(本文编辑:凌 琛)