

过度运动对海马神经元形态及脑源性神经营养因子表达的影响

满君¹ 田野² 高颀¹

1 北京体育大学(北京 100084)

2 国家体育总局体育科学研究所

摘要 目的:观察过度运动后海马神经元形态及其脑源性神经营养因子表达的变化,探讨过度运动导致海马组织学与超微结构改变及其脑源性神经营养因子表达的变化与运动性中枢疲劳的关系。方法:采用过度运动大鼠为实验对象,用 HE 染色、甲苯胺蓝染色观察海马神经元形态变化,用透射电镜观察海马神经元超微结构变化。采用 SABC 免疫组织化学染色方法观察脑源性神经营养因子的变化。结果:过度运动可导致海马神经元组织学与细胞超微结构改变,使海马神经元排列松散、紊乱,并且与周围神经元联络减少。部分神经元细胞体固缩、细胞核内陷、染色质聚集、线粒体肿胀或其内部出现空泡。过度运动后发生组织学形态改变的海马神经元脑源性神经营养因子表达增加,而没有组织形态改变的海马神经元脑源神经营养因子表达无变化。

关键词 过度运动;海马神经元;形态;脑源性神经营养因子

Influence of Excessive Exercise on the Morphology and Brain - derived Neurotrophic Factor Expression of Hippocampus Neurons

Man Jun¹, Tian Ye² and Gao Qi¹

1 Beijing Sport University, Beijing, China 100084

2 China Institute of Sports Science, Beijing, China 100061

Abstract The aim of this paper is to observe whether excessive exercise could induce the morphological changes in hippocampus neurons, to determine the potential role of hippocampus neurons in the exercise - induced central fatigue. HE, Toluidine blue histochemical staining method and electronic microscope were used to observe the morphological changes in hippocampus neurons. SABC immunohistochemistry was used to test the expression of brain - derived neurotrophic factor in hippocampus of excessive exercise rats. The following changes were found in excessive exercise rats: the neurons were loosely arrayed and some were disarrayed, the connections among neuron were decreased and some neurons were shrunked; "dents" were found in some nuclei; chromatin were clustered; and vacuoles were also found in mitochondria. The expression of brain - derived neurotrophic factor in damaged rat hippocampal neurons increased. Results suggested that excessive exercise could induce morphological changes of the hippocampal neurons.

Key words excessive exercise, hippocampus neurons, morphology, BDNF

研究证明,运动性疲劳时神经 - 内分泌系统机能紊乱是运动能力下降的主要原因之一^[4,5],但目前关于运动对神经 - 内分泌影响的研究大都集中在 HPA 轴和 HPG 轴(下丘脑 - 垂体 - 性腺轴),并对下丘脑的关注较多。运动是一种典型的应激,边缘系

统是介导应激的重要中枢,而海马是边缘系统的重要组成部分,在下丘脑调节内分泌的变化过程中,海马对下丘脑的影响非常重要^[1-3],因此研究海马与运动性疲劳的关系对探讨运动性中枢疲劳机理有重要意义。本研究采用大鼠为实验对象,从海马的神

基金项目:国家教育部高等院校博士点基金项目

通讯作者:满君,Email: bsumanjun@yahoo.com.cn; Tel: 010 - 62989582

经元形态方面探讨过度运动对中枢神经系统的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与运动方式

雄性 Sprague - Dawley (SD) 大鼠 40 只, 体重 80 ~ 100g。动物级别为三级。购于北京市动物中心。饲养条件: 分笼饲养, 每笼 5 只, 自由饮食, 自然昼夜节律光照, 室温在 20 ± 5。相对湿度在 40 % 至 60 %。将动物随机分为对照组 (n = 20) 与运动组 (n = 20)。训练 6 周后取材, 此时动物体重在 280g 至 340g 之间。

采用游泳运动方式, 水深为大鼠身体长度的 2 倍, 水温保持在 33 至 36 之间, 每个游泳池随机分配 5 只大鼠。正式训练前运动组大鼠进行 5 天适应性训练。正式训练每周 6 天。第 1、2 周每天游泳 3 小时, 第 3、4 周每天游泳 4.5 小时, 第 5、6 周每天游泳 6 小时。在游泳过程中, 当动物运动协调性明显下降, 出现反复下沉时, 将动物取出休息 1 ~ 3 分钟, 再放入池中继续运动, 并使大鼠在训练过程中始终保持运动状态。

1.2 实验方法

最后一次运动后即刻, 取对照组与运动组大鼠各 8 只, 断头取血测定血红蛋白、血睾与血尿素。血红蛋白采用高铁氰化钾法测定, 血睾测定采用免疫竞争结合法, 血尿素采用二乙酰-脲化学方法测定。

最后一次运动后即刻, 取对照组与运动组大鼠各 6 只, 用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉动物 (35 ~ 50mg/kg 体重)。打开胸腔, 剪破右心耳, 自左心室插管, 并快速灌入 60ml 预冷的生理盐水冲洗血管, 随后用 4 % 多聚甲醛 100ml 前固定, 至肝脏变硬变白为止。然后迅速断头, 将头部放在冰盘上, 打开颅腔, 暴露全脑, 取出放在 10 % 的甲醛溶液中固定 48 小时后, 取矢状切面, 以大脑纵裂旁开 2mm, 取海马组织块。将其放在 10 % 中性福尔马林溶液固定 48 小时。乙醇常规脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。上海产 YL3 - A 型石蜡切片机切片, 厚度 5μm, 进行苏木素 - 伊红染色 (HE 染色) 与甲苯胺蓝染色。光镜下观察海马神经元细胞排列与细胞形态。

最后一次运动后即刻, 取对照组与运动组大鼠各 5 只, 进行上述的内固定后, 以大脑纵裂旁开 2mm, 取一小块海马组织。放在预冷的戊二醛固定液中。放在洁净的卡片纸上。滴一滴冷却的戊二醛, 切成 1mm³ 的小块, 用牙签将组织块放入预冷的 2 % 戊二醛溶液中固定 48 小时, 1 % 锇酸固定 2 小时 (4), 丙酮逐级脱水, 环氧树脂 (Epon618) 包埋, 超

薄片 (45 ~ 50nm), 常规铅染色 (柠檬酸铅), HT-TACHI H - 800 透射电镜下观察海马锥体细胞超微结构的变化。

采用 SABC 免疫组织化学染色方法观察 BDNF 的变化。石蜡切片微波修复抗原染色步骤: (1) 石蜡常规脱蜡至蒸馏水。(2) 将切片置于微波炉专用塑料切片盒内。(3) 在盒内加 10mmol/L 的 200ml 柠檬酸缓冲液, 并盖上带有小孔的盒盖。(4) 将塑料盒置于微波炉中央, 温度保持在 92 ~ 100 之间, 持续 3 个 5 分钟, 每次 5 分钟后加入蒸馏水, 以保证切片不干燥。(5) 将塑料盒移至室温冷却。(6) 蒸馏水洗 2 个 3 分钟。(7) 阻断内源性过氧化物酶, 蒸馏水新配置 3 % H₂O₂ 室温搁置 5 ~ 10 分钟, 蒸馏水洗 3 次。(8) 用 PBS 液洗 2 个 3 分钟。(9) 滴加正常山羊血清封闭液, 室温搁置 20 分钟。甩去多余液体, 不洗。(10) 滴加稀释一抗 (兔 IgG), 37 1 小时, 0.1M PBS 洗 2 分钟 × 3 次。(11) 滴加二抗, 生物素化山羊抗兔 IgG, 20 ~ 37 20 分钟。0.1M PBS 洗 2 分钟 × 3 次。(12) 滴加试剂 HIGH - SABC, 20 ~ 37 搁置 20 分钟。0.1M PBS 洗 5 分钟 × 4 次。(13) DBA 显色: 使用 DBA 显色试剂盒。取 1ml 双蒸水, 加试剂盒中试剂 A、B、C 各 1 滴, 混匀后加至切片。室温显色 10 分钟。(14) 苏木素轻度复染。脱水, 透明, 封片, 然后观察 BDNF 的表达。

2 结果

2.1 过度运动对血红蛋白、血睾与血尿素的影响

由表 1 可见, 运动组大鼠体重显著性低于对照组 (P < 0.01), 血尿素显著性高于对照组 (P < 0.01), 血睾显著性低于对照组 (P < 0.05), 血红蛋白与对照组相比无显著性差异。

表 1 过度运动前后大鼠血液指标的变化

	对照组 (n = 8)	运动组 (n = 8)
血红蛋白 (g/L)	142.63 ± 28.56	130.88 ± 24.90
血尿素 (mg/dl)	43.23 ± 6.36	58.32 ± 7.37 **
血睾 (ng/dl)	214.11 ± 148.90	20.73 ± 6.45 *
体重 (g)	327.25 ± 11.28	303.62 ± 12.12 **

与对照组相比有显著性差异 * : P < 0.05, ** : P < 0.01

2.2 过度运动对海马神经元组织形态与超微结构的影响

光镜下对照组海马神经元排列整齐, 而在运动组可观察到海马神经元排列松散、紊乱, 并且与周围神经元的联络减少, 部分细胞固缩、呈不规则形状变

化(见图 1~6)。电镜下对照组海马细胞呈圆形紧密镶嵌排列,细胞核呈圆形,染色质均一、疏松。运动组细胞呈梭形或椭圆形,细胞排列紊乱,细胞之间出现较大空隙。细胞核呈不规则形,细胞核偏位内陷,染色质聚集。线粒体肿胀且内部出现空泡(见图 7~9)。

2.3 脑源性神经营养因子染色结果

对照组中,BDNF 在海马锥体细胞与齿状回颗粒细胞的胞浆内均匀表达,在海马锥体细胞与齿状回颗粒细胞的细胞核内呈颗粒状表达。在运动组中,细胞形态没有改变的神经元 BDNF 的表达特征与对照组相仿。形态发生改变的细胞内 BDNF 的表达明显增加,棕色染色加深(图 10 与图 11)。

3 讨论

血红蛋白、血尿素、血睾与体重是反映运动负荷的常用指标,本实验结果表明,本实验训练负荷下,大鼠对训练产生不适应,出现了疲劳的某些特征。

海马在抑制 HPA 轴的应激反应中起着非常重要的作用^[1-3],在应激反应中,海马可以抑制 HPA 轴的应激反应,而且可以促进应激状态下亢进的 HPA 轴恢复到基础水平。

本实验发现,过度运动导致海马神经元的形态改变。光镜下可观察到海马神经元排列松散,紊乱,与周围神经元的联络减少,部分细胞固缩、呈不规则形状变化。电镜下可见细胞核偏位,细胞核内陷,染色质聚集。线粒体肿胀且出现空泡,轴索出现空泡。Sunanda 报道^[6]每天 6 个小时共 21 天的束缚应激使海马 CA3 神经元萎缩。慢性应激引起海马细胞损伤的确切机制目前尚不清楚。已有报道提示应激引起神经元损伤可能与慢性应激使糖皮质激素的基础值维持在高水平以及应激时脑内谷氨酸水平显著升高有关^[6-8]。

脑源性神经营养因子(BDNF)是一种主要由脑组织合成、能够维持中枢神经系统多种神经元存活

及促进神经纤维生长的碱性蛋白。大脑皮质、海马及纹状体为 BDNF 的主要分布区域。BDNF 能提高神经元的生物活性,减少损伤后神经元的自然死亡。BDNF 不但对多种神经元的发育分化和生长再生具有维持和促进作用,也能通过为损伤神经元提供营养而挽救中枢神经系统损伤的神经元^[9,10]。本研究发过度运动使海马神经元 BDNF 的表达发生变化,主要表现为形态改变的海马神经元的 BDNF 表达增加,表明过度运动可导致海马神经元的损伤。

4 参考文献

- [1] Jacobson L and Sapolsky R. The role of hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic - pituitary - adrenocortical axis. *Endocrine Reviews*, 1991, 12 : 118 - 133.
- [2] Seeman TE and Robbins RJ. Aging and hypothalamic - pituitary - adrenal response to challenge in humans. *Endocr Res*, 1994, 15: 235.
- [3] 杨权. 下丘脑 - 垂体 - 肾上腺皮质轴应激反应的中枢控制. *生理科学进展*, 2000, 31(3): 222 - 226.
- [4] 陈佩杰,等. 6 周不同负荷训练后大鼠下丘脑、垂体和血浆内啡肽、强啡肽等的变化. *中国运动医学杂志*, 1999, 19(1): 36 - 38.
- [5] Newsholm EA, et al. The plasma level of some amino acid and physical and mental fatigue, *Experientia*, 1996, 52(5): 413 - 415.
- [6] Sunanda, et al. Restraint stress - induced alterations in the levels of biogenicamines, amino acids and AchE activity in the hippocampus. *Neurochem Res*, 2000, 25(12): 1547 - 1552.
- [7] 严进,等. 应激对大鼠行为和部分脑区谷氨酸含量的影响. *心理学报*, 1995, 4: 422 - 427.
- [8] 曹建淳,等. 谷氨酸对大鼠海马神经元的毒性反应. *上海铁道大学学报*, 2000, 9: 13 - 15.
- [9] 姜晓丹. 脑源性神经营养因子与中枢神经修复再生. *临床神经病杂志*, 2000, 13(4): 254 - 255.
- [10] 曲伸. 脑源性神经营养因子在神经系统疾病中的应用. *临床神经病杂志*, 1997, 10(1): 61 - 63.

(2003.05.26 收稿;2004.05.10 修回)

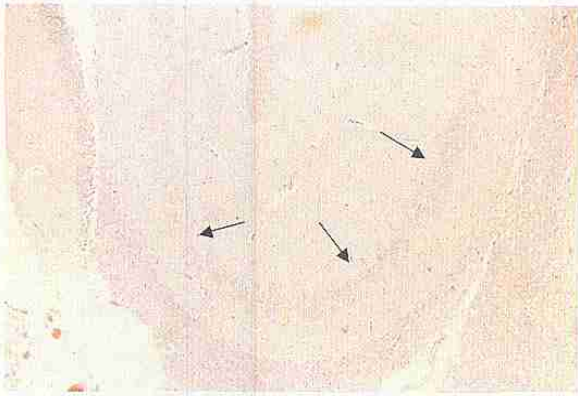


图1 对照组，海马神经元排列整齐。HE × 40

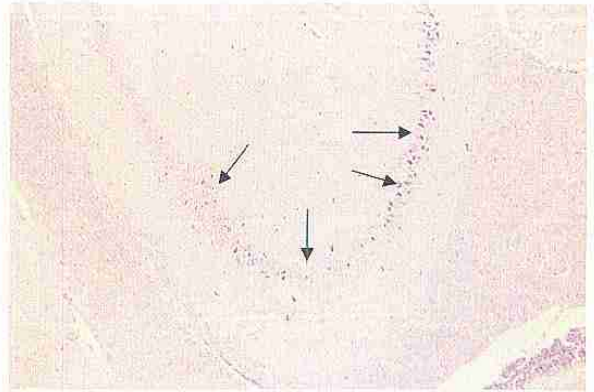


图2 过度运动组，海马神经元排列紊乱，细胞固缩。HE × 40

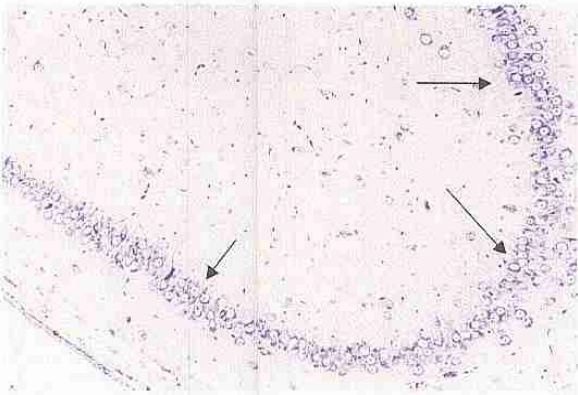


图3 对照组，海马神经元排列整齐。甲苯胺蓝 × 40

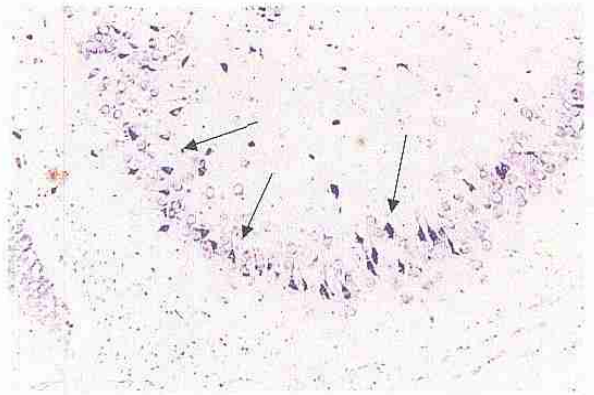


图4 过度运动组，海马神经元排列紊乱，细胞固缩。甲苯胺蓝 × 40

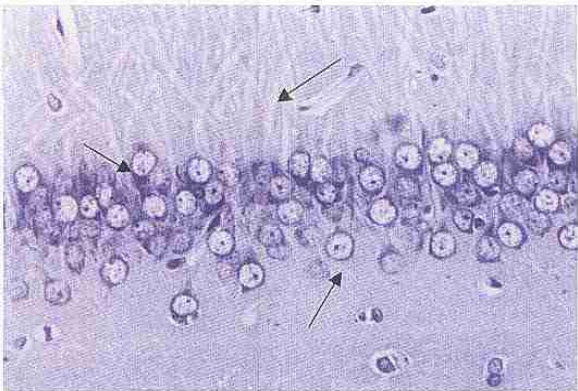


图5 对照组，海马神经元细胞体与突起排列整齐清晰。甲苯胺蓝 × 200

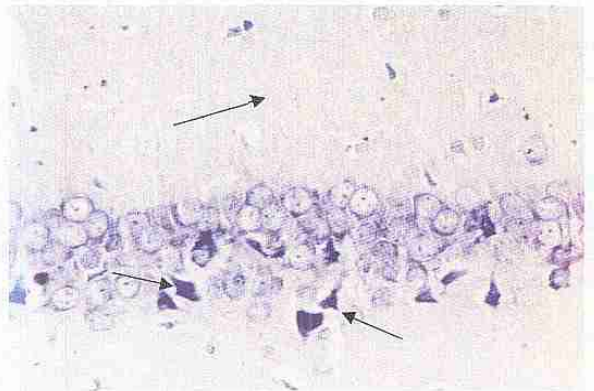


图6 过度运动组，海马神经元细胞体固缩，突起模糊。甲苯胺蓝 × 200

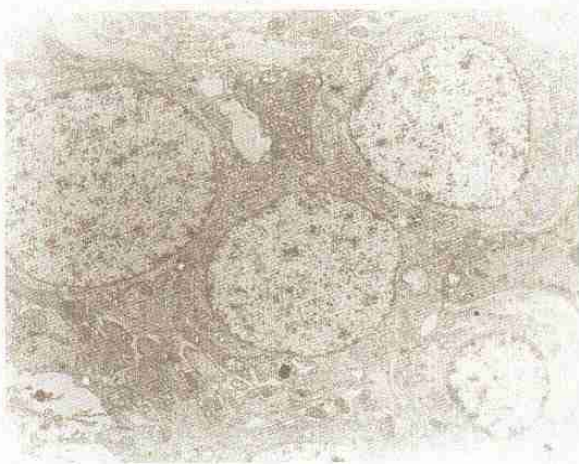


图7 对照组，海马神经元排列整齐。× 3500

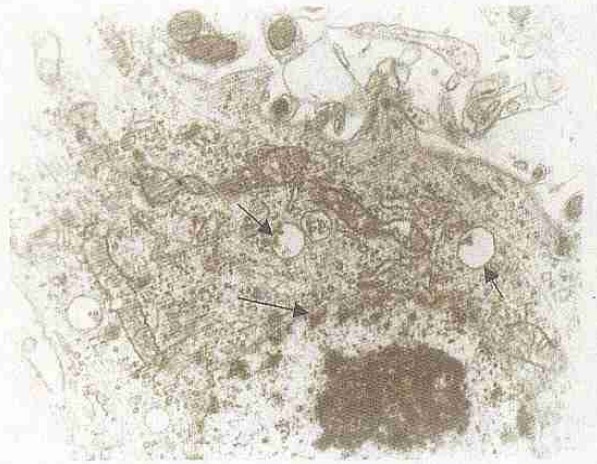


图8 过度运动组，海马神经元线粒体空泡化，染色质聚集。× 8000



图9 过度运动组，海马神经元细胞体变形，细胞核内陷。× 3500

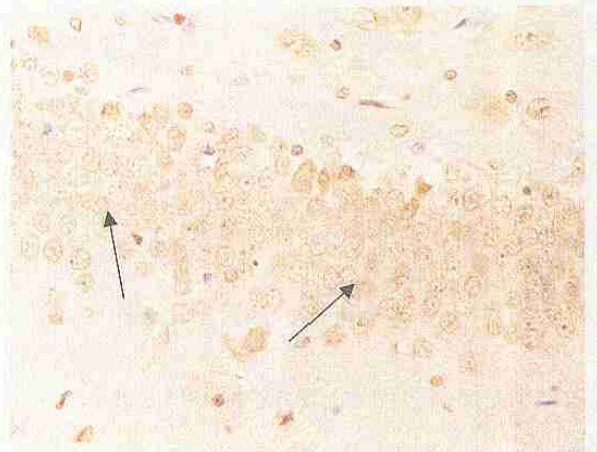


图10 对照组，海马神经元BDNF均匀表达。SABC染色

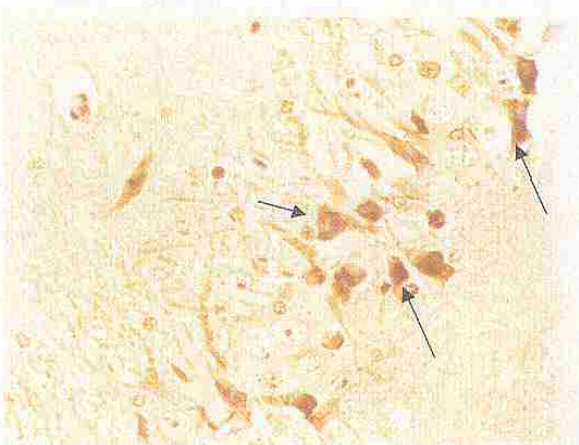


图11 过度运动组，海马神经元BDNF在变形细胞内表达增加。SABC染色

说明：箭头指示神经元排列与形态的变化及SABC组化染色的变化。