

医学康复

• 基础研究 •

三七皂苷对运动性贫血大鼠海马 BDNF 表达的影响

缪吉¹, 雷涛¹, 杨光显¹, 金丽²

【摘要】 目的:探讨运动性贫血对大鼠海马 BDNF 表达的影响以及三七皂苷在运动性贫血发生发展过程中对大鼠神经系统的作用。**方法:**将 24 只健康雄性 4 周龄 SD 大鼠随机分为对照组、运动组和灌药组各 8 只。对运动组和灌药组大鼠进行为期 10 周的递增负荷跑台运动,并从第 5 周开始对灌药组大鼠进行三七皂苷药物干预。应用 Real-time PCR 检测海马组织 BDNF mRNA 的基因表达情况;应用 ELISA 测定海马组织 BDNF 的蛋白含量。**结果:**10 周训练后,运动组大鼠海马 BDNF mRNA 含量及 BDNF 蛋白含量测定均较对照组及灌药组低($P<0.05$),灌药组与对照组比较差异无统计学意义。**结论:**运动性贫血导致大鼠脑部发生缺血缺氧性损伤,三七皂苷能促进大鼠海马 BDNF 的表达,对运动性贫血造成的脑缺血缺氧性损伤发挥保护作用。

【关键词】 运动性贫血;三七皂苷;海马;BDNF

【中图分类号】 R49;R743.3 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2017.06.013

Effects of PNS on the Hippocampal BDNF expression in sports anemia rats Miao Ji, Lei Tao, Yang Guangxian, et al. Rehabilitation Department of Wuhan Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430015, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of sports anemia on the expression of BDNF in rat hippocampi and the roles of PNS in rat nervous system in the sports anemia development. **Methods:** Twenty-four healthy male 4-week-old SD rats were randomly divided into control group, sports group and PNS intervention group. The rats in both sports group and PNS intervention group were subjected to the increasing load treadmill exercise for 10 weeks, and those in the PNS intervention group were given drug intervention from the fifth week additionally. Hippocampal BDNF mRNA gene expression was detected using real time PCR, and BDNF protein content was determined by ELISA. **Results:** After ten weeks increasing load treadmill training, the hippocampal BDNF mRNA and protein expression in sports group was significantly lower than in control group and PNS intervention group ($P<0.05$). Both BDNF mRNA and protein expression showed no significant difference between PNS intervention group and control group. **Conclusion:** These results suggest that sports anemia may induce brain hypoxic-ischemic injury in rats. The PNS can promote the expression of BDNF in rat hippocampi, which may play a protective role in sports anemia-induced brain hypoxic-ischemic injury.

【Key words】 sports anemia; PNS; Hippocampal; BDNF

运动性贫血导致机体缺血缺氧,各项机能尤其是神经系统均会受到不同程度的影响,三七皂苷作为三七提取物,已经被证实耐缺氧、抗衰老、提高机体免疫力等方面的药理作用显著。脑源性神经营养因子 BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF)

是神经营养因子 NTFs 家族中的重要一员,1982 年由德国学者 Barde 等^[1]首次从猪脑中纯化并获得,主要表达部位在皮层和海马,是一种对神经有广泛性营养作用的碱性蛋白。BDNF 能够维持多类神经元的存活和生长,促进树突和轴突的长出,改变脑内神经元的形态及功能可塑性,在维持中枢神经系统和周围神经系统神经元生存中起重要作用^[2]。本实验通过检测大鼠海马 BDNF mRNA 及对应蛋白的表达情况来研究运动性贫血对大鼠神经系统的影响以及三七皂苷在运动性贫血发生发展过程中对大鼠神经系统的作用。

基金项目:霍英东教育基金会青年教师基金基础性研究项目(121103)

收稿日期:2017-06-06

作者单位:1. 华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院康复医学科,武汉 430015;2. 武汉体育学院健康科学学院,武汉 430079

作者简介:缪吉(1989-),男,硕士,技师,主要从事运动康复与健康方面的研究。

通讯作者:金丽, jetty10000@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 动物造模 实验对象为24只SPF级健康雄性4周龄SD大鼠,购于华中科技大学同济医学院实验动物中心,质量155~197g。将24只大鼠适应性饲养1周后随机分为对照组、运动组和灌药组各8只。动物饲料为全价营养颗粒饲料,购于湖北省实验动物研究中心。动物分笼饲养,每笼4只,自由饮食,每天自然光照12h、黑暗12h,饲养环境温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度45%~65%。对运动组和灌药组大鼠进行为期10周,每周6天的递增负荷跑台训练,跑台坡度为 0° ,速度为30m/min。前2周每天训练1次,后8周每天训练2次,早上、下午各1次,第1次训练的时间为1min,之后每次训练增加2min,到第6周开始时,训练时间为每次97min,保持此速度3周,从第9周开始每次训练增加2min,直至10周训练结束。如果训练过程中大鼠出现严重力竭症状,即连续施加机械刺激大鼠不能继续跑动、下跑台后腹部触底严重呈“甲鱼状”,则允许其休息2~5min,再继续训练。从第5周开始对灌药组大鼠每天进行1次灌药。对大鼠每周进行称重,按每10g体重0.1ml的三七皂苷药物混合液进行灌胃。为消除灌药对大鼠行为及实验结果的影响,从第五周开始对照组和运动组的大鼠每天进行一次生理盐水的灌胃,剂量同样为每10g体重0.1ml。本实验所用药物为三七皂苷胶囊,由云南红云生物工程有限公司提供,每粒含三七皂苷330mg。人体推荐量为每人每天两粒,假设成人体重为60kg,折算后为每千克体重每天11mg。根据赵伟等^[3]进行的不同种实验动物间用药量换算的研究,我们将大鼠给药量设定为人体推荐量的10倍,即每千克体重每天110mg。采用灌胃法准确控制三七皂苷用量,溶剂为0.5%的生理盐水。

1.2 标本采集 10周训练结束后将大鼠腹腔麻醉后开胸,取心尖血4~5ml,测量血液中血红蛋白(Hemoglobin, Hb)浓度和红细胞数目(Red Blood Cell Number, RBC),然后断头取脑在冰冷的生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干,于冰上剥离海马,分装入冷冻管中,将海马迅速放入液氮中长期保存。

1.3 指标测试 ①血常规测试:利用BC-3000全自动血细胞分析仪对断尾取血采集到的血液进行血常规检测,测定Hb和RBC。②大鼠海马BDNF mRNA表达的测定:采用Real-time PCR法检测BDNF mRNA基因表达。操作步骤如下:a. mRNA的提取;b. 逆转录:将提取好的总mRNA在当天逆转录为cDNA;c. 实时荧光定量PCR反应,引物由Primer5.0软

件设计,并由英俊公司合成,上游引物TGCATACAGCCAGATACTAGAGC,下游引物:AAGTACCATTCCCCACCTCC,扩增产物长度为162bp。 β -actin上游引物:CGTTGACATCCGTAAAGACCTC,下游引物TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT,扩增产物长度为110bp;d. Real-time PCR数据处理。Real-time PCR数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行分析。在进行数据分析以前,先验证目标基因和参照基因 β -actin扩增效率都接近100%之后就可以运用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析不同样本中目标基因表达水平的相对差异,数据由stepone plus自动分析得出。③大鼠海马BDNF蛋白含量的测定:采用ELISA法测定海马组织BDNF的蛋白含量。BDNF蛋白的测定采用南京建成生物研究所提供的ELISA试剂盒,采用生物素双抗体夹心酶联免疫吸附法测定大鼠海马组织匀浆中蛋白含量。操作步骤如下:a. 匀浆,用微量电子天平称量海马组织,在锡箔纸上用剪刀剪碎放入匀浆管中,按照1mg组织加10 μl 预冷生理盐水的比例加入生理盐水,用匀浆器充分匀浆,2500rpm离心10min,取上清液即为10%的组织匀浆液;b. 标准品的稀释;c. 加样:空白孔,空白对照孔不加样品,生物素标记的抗BDNF抗体,链霉亲和素-HRP,只加显色剂A、显色剂B和终止液,其余各步操作相同,标准品孔,加入标准品50 μl ,链霉亲和素-HR 50 μl ,待测样品孔,加入样本(已经匀浆、离心后取出的上清液)40 μl ,然后各加入抗BDNF抗体10 μl 、链霉亲和素-HRP 50 μl ,盖上封板膜,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育60min,配液,将20倍浓缩洗涤液用蒸馏水稀释20倍后备用,洗涤,小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30s后弃去,如此重复5次,拍干,显色:每孔先加入显色剂A 50 μl ,再加入显色剂B 50 μl ,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色10min,终止,每孔加终止液50 μl ,终止反应,测定,以空白孔调零,450nm波长依序测量各孔的吸光度(OD值)。测定应在加终止液后10min内进行,计算,根据标准品的浓度及对应的OD值计算出标准曲线的直线回归方程,再根据样品的OD值在回归方程上计算出对应的样品浓度。

1.4 统计学方法 数据资料采用统计软件SPSS 16.0进行分析,统计数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠Hb浓度、RBC计数结果 训练10周后,运动组大鼠Hb浓度及RBC计数均较对照组及灌药

组低($P<0.05$),灌药组与对照组比较差异无统计学意义。见表1。

表1 训练10周后大鼠Hb浓度及RBC计数3组间比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	Hb(g/dl)	RBC($10^6/\mu\text{l}$)
对照组	8	16.49 $\pm$ 1.05 ^a	9.10 $\pm$ 0.98 ^a
运动组	8	12.19 $\pm$ 0.57	7.08 $\pm$ 0.96
灌药组	8	13.24 $\pm$ 1.16 ^a	7.77 $\pm$ 0.68 ^a

与运动组比较,^a $P<0.05$

2.2 大鼠海马BDNF mRNA含量、BDNF蛋白含量测定结果 10周训练后,运动组大鼠海马BDNF mRNA含量及BDNF蛋白含量测定均较对照组及灌药组低($P<0.05$),灌药组与对照组比较差异无统计学意义。见表2。

表2 训练10周后大鼠海马BDNF mRNA含量、BDNF蛋白含量3组间比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	BDNF mRNA(ng/ml)	BDNF(ng/ml)
对照组	8	0.96 $\pm$ 0.09 ^a	4.26 $\pm$ 0.48 ^a
运动组	8	0.77 $\pm$ 0.03	3.49 $\pm$ 0.21
灌药组	8	0.86 $\pm$ 0.12 ^a	3.83 $\pm$ 0.42 ^a

与运动组比较,^a $P<0.05$

3 讨论

3.1 大鼠运动性贫血模型的建立 跑台运动具有运动强度容易控制、动物死亡率低等特点,是建立大鼠运动性贫血模型常用的运动方式。曹建民等^[4]研究发现运动组大鼠血红蛋白浓度、红细胞压积、红细胞计数均显著低于对照组,运动性贫血模型造模成功。赵杰修等^[5]在研究血红素代谢限速酶和珠蛋白代谢在运动性贫血发生机理中的功能和作用时成功建立了运动性贫血模型。建模采用了为期11周,每周训练6d的跑台训练,具体训练安排为:第1~2周每天训练1次,第3~11周每天训练2次,跑台速度为30m/min,坡度为0°,起始运动时间为1min,前5周每次训练递增2min,第6周每天训练时间固定为80min,第7周每天训练时间固定为85min,第8周开始训练时间从90min开始递增,每天增加2min,直至11周训练结束。综合分析各类模型的优缺点,本次研究采用了递增负荷跑台运动方式,在曹建民、赵杰修成功建立的运动性贫血大鼠模型基础上做了适当调整。结果显示,10周递增负荷跑台运动后,运动组大鼠Hb浓度比对照组低,在统计学上有显著性差异,运动组大鼠RBC计数比对照组低,说明大鼠运动性贫血模型造模成功。

3.2 运动性贫血对大鼠海马BDNF mRNA和蛋白表达的影响 不同的运动负荷条件对大鼠海马神经元造成的影响是不一样的。刘晓莉等^[6]对不同组别的SD大鼠分别进行了3、7及12d的游泳训练,每天训练60min。结果发现随着运动天数的增加,BDNF阳性

神经元表达数目也在增加,徐波等^[7]对6周龄SD大鼠进行了为期8周、每周5d的跑台训练。结果发现8周运动后运动组大鼠海马BDNF mRNA的表达水平显著高于对照组。有研究发现4周的转轮运动可明显增加2、15和24个月龄大鼠海马的BDNF mRNA水平,尤以2个月龄动物增加的幅度最大^[8]。Cechetti等^[9]研究却发现中等强度跑台运动(20min/d,连续2周)并未改变2~3月龄Wistar大鼠海马BDNF的含量。姜淑杰等^[10]对5周龄雄性SD大鼠分组进行了连续1周不同强度跑台运动,研究不同强度跑台运动对幼龄大鼠海马组织BDNF表达的影响,结果发现小强度跑台运动(5m/min 5min, 8m/min 5min, 11m/min 20min, 0°倾斜角)、中等强度跑台运动(8m/min 5min, 11m/min 5min, 14m/min 20min, 0°倾斜角)、大强度跑台运动(8m/min 5min, 11m/min 5min, 22m/min 20min, 0°倾斜角)均可增加5周龄SD大鼠海马齿状回的神经发生,小强度跑台运动可明显诱导海马BDNF基因表达,中等强度运动对BDNF表达已没有明显作用,而大强度运动对BDNF表达基本没有影响。在本实验中,10周递增负荷跑台运动后,运动组大鼠海马BDNF mRNA含量和BDNF蛋白含量比对照组低,在统计学上有显著性差异,这与大多数研究结果并不一致。原因可能是长时间大强度的运动导致了运动性贫血的发生,进而造成脑缺血缺氧性损伤,且损伤程度随着运动强度的不断增加而加重,使得翻译水平降低,BDNF的转录减少,BDNF蛋白含量减少。

3.3 三七皂苷对运动性贫血大鼠海马BDNF表达的影响 詹合琴等^[11]对成年雄性SD大鼠建立了大鼠脑缺血再灌注模型,并选择其中3组进行不同剂量的三七皂苷Rg1腹腔注射。研究发现三七皂苷Rg1能显著增加脑缺血后大鼠大脑皮质和海马BDNF阳性神经元的数量和蛋白含量。闫俊岭等^[12]建立了同样的雄性SD大鼠脑缺血再灌注模型,研究三七皂苷Rg1对大鼠脑缺血再灌注损伤后海马BDNF mRNA表达的影响,结果发现与模型组相比,三七皂苷Rg1均能增加脑缺血再灌注损伤后1d、3d、5d时大鼠海马阳性神经元中BDNF mRNA的含量。在本实验中,10周递增负荷跑台运动后,灌药组大鼠海马BDNF mRNA含量和BDNF蛋白含量比运动组显著增高。实验结果说明三七皂苷能促进大鼠海马神经元BDNF mRNA的表达,增加大鼠海马BDNF蛋白含量,对运动性贫血造成的缺血性脑损伤发挥保护作用。这与大多数学者所做的研究结果一致。

综上,本研究认为:①长期递增负荷跑台运动导致大鼠发生运动性贫血。②运动性贫血导致大鼠脑部发

生缺血缺氧性损伤。③三七皂苷能促进大鼠海马BDNF的表达,对运动性贫血造成的脑缺血缺氧性损伤发挥保护作用。

【参考文献】

- [1] Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain[J]. Eur Molec Biolog J, 1982, 25(1): 549-553.
- [2] Mertz K, Koscheck T, Schilling K. Brain-derived neurotrophic factor modulates dendritic morphology of cerebellar basket and stellate cells; an in vitro study[J]. Neuroscience, 2000, 97(2): 303-310.
- [3] 赵伟,孙国志. 不同种实验动物间用药量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010, 1(5): 52-54.
- [4] 曹建民. 营养干预对运动性贫血时铁代谢及其相关指标影响的研究[D]. 北京:北京体育大学博士学位(毕业)论文, 2003.
- [5] 赵杰修,田野,曹建民,等. 跑台运动和营养补充对大鼠血红素代谢限速酶和珠蛋白 mRNA 表达与活性水平的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2009, 25(4): 440-444.
- [6] 刘晓莉,李红,乔德才. 适量运动对大鼠海马神经元脑源性神经营养因子表达的影响[J]. 沈阳体育学院学报, 2008, 27(3): 5-6.
- [7] 徐波,黄涛,季浏. 跑台训练增强大鼠的学习记忆及其海马BDNF基因表达[J]. 北京体育大学学报, 2011, 34(4): 51-53.
- [8] Adlard PA, Perreau VM, Cotman CW. The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span[J]. Neurobiology of aging, 2005, 26(4): 511-520.
- [9] Cechetti F, Fochesatto C, Scopel D, et al. Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus[J]. Brain Res, 2008, 1188(2): 182-188.
- [10] 姜淑杰,刘瑾彦,陈佩杰. 不同强度运动对幼龄大鼠海马组织BDNF及NMDA R1 mRNA表达的影响[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(8): 916-918.
- [11] 詹合琴,尹志奎,翟成凯,等. 三七皂苷 Rg1 对脑缺血后大脑皮质和海马BDNF蛋白的影响[J]. 山东医药, 2006, 46(5): 9-10.
- [12] 闫俊岭,王云波,杨克红,等. 三七皂苷 Rg1 对大鼠脑缺血再灌注损伤后海马BDNF mRNA表达的影响[J]. 中成药, 2007, 29(12): 1826-1828.

沉痛悼念杨树萱教授

中国共产党党员、华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科教授、主任医师杨树萱同志因病医治无效,于2017年9月22日凌晨1时不幸逝世,享年87岁。

杨树萱教授,汉族,男,祖籍广东,1930年4月20日出生于上海。1954年毕业于广州岭南大学医学院,分配至中南同济医学院协和医院工作,1956年7月来武汉医学院附二院医疗体疗科(现同济医院康复医学科)工作,历任助教、住院医师、讲师、主治医师、副教授、副主任医师、教授、主任医师。一直致力于运动医学和康复专业疾病的诊疗和预防工作,对本学科常见病、多发病特别是对运动损伤的诊治精准、规范,经验独到。他医术精湛,视病人如亲人,深受患者好评;他孜孜不倦,积极探索,积多年临床实践工作经验,撰写了多篇有影响的学术论文;他博闻广识,精心带教,授业解惑,退休后仍乐此不疲,深受广大学生与晚辈的尊敬与爱戴。

杨树萱教授热心学会工作,曾任中华医学会武汉分会运动医学会副主任委员、中国体育科学会湖北分会常务理事、武汉残疾人福利基金会康复协会常务理事、中国中西医结合学会湖北分会常委,为学会建设与发展做出了积极贡献。

杨树萱教授一向关心和支持杂志工作,在担任《中华物理医学与康复杂志》审稿、定稿专家和《中国康复》杂志编委期间乃至退休以后,认真审稿、严把学术关,在提高杂志学术水平和引领学科发展方面发挥了重要作用。

杨树萱教授作为一名共产党员,严于律己,宽以待人,仁爱为怀,助人为乐。不仅对工作兢兢业业、一丝不苟,对身边同志更是关心、爱护和帮助,经常在工作、学习和生活上对年轻同事进行指导和帮助,深受同事信赖与尊敬。

杨树萱教授的逝世,使我们失去了一位仁爱的长者和良师益友。但他严谨求实的治学精神和科学求真、精益求精的工作作风,以为我们树立了崇高的典范,将永远铭记在我们心中!他的学者风范将与世长存!

《中国康复》编辑部

《中华物理医学与康复杂志》编辑部