

·基础研究·

运动预适应介导氧化应激调控PI3K/Akt和Nrf2/HO-1通路对大鼠认知和学习障碍的影响

孔海军^{1,2}, 李新龙², 王风华³, 谌晓安^{1*}

1 吉首大学体育科学学院, 湖南 吉首 416000;

2 喀什大学体育学院, 新疆 喀什 844000;

3 新疆师范大学体育学院, 新疆 乌鲁木齐 830054

* 通信作者: 谌晓安, E-mail: 812557453@qq.com

收稿日期: 2022-11-26; 接受日期: 2023-03-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660736); 新疆维吾尔自治区高校科技计划项目(XJEDU2021SY040)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.03006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



摘要 目的:探究运动预适应调控PI3K/Akt、Nrf2/HO-1信号通路和氧化应激减轻低氧暴露大鼠认知、学习障碍的基本机制。**方法:**将60只6周龄SPF级雄性SD大鼠,按照随机数字表法分为对照组、运动组、暴露组和运动+暴露组,每组15只。对照组和暴露组不进行运动预适应干预,运动组与运动+暴露组接受运动预处理干预(跑台训练,2次/d,6 d/周,共训练4周);运动预适应结束次日,暴露组和运动+暴露组大鼠接受7 d低氧暴露。7 d低氧暴露后,采用旷场实验及Morris水迷宫实验评估大鼠认知、学习能力;采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清SOD、GSH活性,MDA含量和IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平;通过尼氏染色观察海马CA1区尼氏小体变化;RT-PCR检测PI3K、Nox1、Duox2、Akt mRNA相对表达水平;采用Western blot法检测海马组织Nox1、Duox2、GCLM蛋白及PI3K/Akt、Nrf2/HO-1通路蛋白相对表达量。**结果:**与对照组和运动组比较,暴露组3 d逃避潜伏期上升($P<0.05$),穿越平台次数和平台所在象限停留时间明显降低($P<0.05$);血清MDA含量,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均明显上升($P<0.05$),SOD、GSH活性明显下降($P<0.05$);CA1区尼氏小体数量下降($P<0.05$);PI3K、Nox1、Duox2 mRNA相对表达水平上升($P<0.05$),同时Akt mRNA相对表达水平下降($P<0.05$);海马组织Nox1、Duox2、GCLM蛋白相对表达量显著上升($P<0.05$),p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 比值和Nrf2、HO-1蛋白相对表达量明显下调($P<0.05$)。与暴露组比较,运动+暴露组中心区域活动时间、3 d逃避潜伏期降低($P<0.05$),穿越平台次数和平台所在象限停留时间上升($P<0.05$);血清MDA含量,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均明显下降($P<0.05$),SOD、GSH活性明显上升($P<0.05$);CA1区神经元损伤减轻,尼氏小体数量上升;海马组织PI3K、Nox1、Duox2 mRNA相对表达水平下降($P<0.05$),Akt mRNA相对表达水平上升($P<0.05$);海马组织Nox1、Duox2、GCLM蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$),p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 比值和Nrf2、HO-1蛋白相对表达量明显上升($P<0.05$)。**结论:**运动预适应可能通过激活PI3K/Akt和Nrf2/HO-1信号通路参与调节脑组织氧化应激并减轻损伤程度,进而改善低氧暴露大鼠神经行为功能。

关键词 运动预适应;氧化应激;PI3K/Akt通路;Nrf2/HO-1通路;低氧暴露;认知与学习能力

低氧是高海拔地区最典型的环境特征,低氧暴露(hypoxic exposure, HE)可能对机体正常生理功能

产生不利影响。众所周知,脑组织不同区域对缺氧的敏感性可能存在较大差异^[1],海马体在生物体学

引用格式:孔海军,李新龙,王风华,等.运动预适应介导氧化应激调控PI3K/Akt和Nrf2/HO-1通路对大鼠认知和学习障碍的影响[J].康复学报,2023,33(3):231-240.

KONG H J, LI X L, WANG F H, et al. Effects of exercise preconditioning mediating oxidative stress to regulate PI3K/Akt and Nrf2/HO-1 pathways to alleviate cognitive and learning disorders in rats [J]. Rehabil Med, 2023, 33(3): 231-240.
DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.03006

习、视觉空间能力、认知能力和记忆过程中发挥至关重要的作用,但极易遭受缺氧性应激损伤,急性缺氧诱导的认知缺陷可能通过抑制机体神经元功能及心理表现,并形成长期的心理和生理障碍。经研究证实,暴露于10%氧含量(均6 000 m海拔)环境下7 d即可导致机体认知功能、执行功能受损,MRI检查显示脑组织海马体和尾状体在低氧暴露后出现不同程度萎缩^[2]。现阶段研究认为,HE诱发的脑组织损伤是不可逆的^[3]。因此,针对急性低氧暴露的保护策略研究至关重要。

研究显示,低氧刺激通过磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/Akt途径相关的核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)通路诱导神经组织炎症^[4]。此外,在核因子E2相关因子2(nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)介导血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的激活过程,该因子在保护细胞抵抗炎症反应和氧化损伤反应中发挥重要作用^[5]。动物实验已经证明了低氧/缺血预适应对缺血性脑卒中诱导神经元损伤的抑制作用,其作用机制存在趋同性,即一般通过损伤前给予脑组织缺血/缺氧刺激,从而诱导对后续损伤的耐受或抵抗能力^[6]。定量适应运动诱导的组织保护作用称为运动预处理(exercise preconditioning, EP),运动被视为轻度外部压力源,是典型的预适应刺激^[7]。运动通过上调Nrf2和HO-1表达抑制低氧应激诱导的NF- κ B活化,从而发挥免疫调节和炎症抵抗作用。有研究证实,EP可通过诱导线粒体自噬抑制HE对海马线粒体的氧化应激损伤^[8]。但现有研究缺乏EP对HE机体学习、认知等脑行为学功能直接干预的证据,且现阶段EP在HE中是否可调控PI3K/Akt和Nrf2/HO-1信号通路及其保护作用尚不清楚。

基于此,本研究拟针对EP大鼠HE后海马组织损伤情况及PI3K/Akt通路和Nrf2/HO-1信号通路表达情况进行分析,探究EP通过调控PI3K/Akt通路和Nrf2/HO-1信号通路减轻HE大鼠认知、学习障碍的基本机制,为运动员高原训练、移居高原人群体育锻炼及官兵高原驻训提供理论依据及参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60只6周龄SPF级雄性SD大鼠,体质量(170±10)g,购自新疆医科大学医学实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(新)2016-0002,动物使用许可证号:SYXK(新)2016-0003。饲养条件:自由饮食,

环境温度23~25℃,湿度55%~60%,光照条件12 h/d。实验动物的处理均严格按照动物伦理准则和指南的相关条例执行。

1.2 主要仪器

常压低氧发生设备(Hypoxic Tent System);旷场箱及旷场实验视频分析系统(XR-XZ301);Morris水迷宫实验仪器(XR-XM101-Z);大鼠实验跑台(BHW-PT/5s);全自动组织切片机(KH-Q330);显微图像分析系统(NGI-2000U);PCR扩增仪(Biometra);酶标仪(Bio-Rad);高速冷冻离心机(Eppendorf);EP凝胶成像系统(Alpha);电泳系统(Bio-Red);紫外分光光度计(Eppendorf)。

1.3 主要实验试剂

谷胱甘肽(glutathione, GSH, A006-1-1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA, A003-1-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, A001-2-1)、白介素-6(interleukin-6, IL-6, H007-1-1)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β , H002-1-2)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , H052-1-2)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;Nissle染色试剂盒(C0107B)、Trizol总RNA抽提试剂(R0016)、cDNA合成试剂盒(D7170M)、双链cDNA合成试剂盒(D7172)、dNTP Mixture(D7371)、Taq PCR Master-Mix(D7233)购自碧云天生物有限公司;cDNA引物Oligo(7186)购自上海生物工程有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0010S)、NADPH氧化酶1(NADPH-oxidase 1, Nox1)抗体(17772-1-AP)、双氧化酶2(dual oxidase 2, Duox2)抗体(15535-1-AP)、GCLM抗体(14241-1-AP)、PI3K抗体(21739-1-AP)、Akt抗体(10176-2-AP)、GSK-3 β 抗体(22104-1-AP)、Nrf2抗体(16396-1-AP)、HO-1抗体(10701-1-AP)购自美国Proteintech公司; β -actin抗体(AA128)、Mouse源二抗(A0216)、Rabbit源二抗(A0277)、6.6 cm×8.5 cm PVDF膜(FFP77)购自碧云天生物有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组 动物于实验动物中心适应性喂养3 d后,按照随机数字表法分为4组,即空白对照组(简称对照组)、单纯低氧暴露组(简称暴露组)、单纯运动预适应组(简称运动组)、运动预适应+低氧暴露组(简称运动+暴露组),每组15只。

1.4.2 实验干预方案

1.4.2.1 预适应方案 运动预适应干预前运动组及运动+暴露组大鼠进行跑台运动适应性训练,

1次/d, 15 min/次, 10~12 m/min, 坡度0°, 共训练3 d。运动预适应周期为4周。对照组及暴露组大鼠保持正常饮食及活动, 不参与运动预适应方案。运动组及运动+暴露组大鼠进行跑台训练, 负荷安排如下: ①第1周, 2次/d, 早晚各1次, 30 min/次, 10 m/min, 坡度0°, 运动环境为常压常氧, 周日休息; ②第2周, 2次/d, 早晚各1次, 30 min/次, 15 m/min, 坡度0°, 运动环境为常压常氧, 周日休息; ③第3周, 2次/d, 早晚各1次, 45 min/次, 15 m/min, 坡度5°, 运动环境为常压常氧, 周日休息; ④第4周, 2次/d, 早晚各1次, 45 min/次, 20 m/min, 坡度5°, 运动环境为常压常氧, 周日休息。

1.4.2.2 低氧暴露方案 运动预适应结束次日, 对照组和运动组正常条件喂养; 暴露组和运动+暴露组大鼠置于低氧帐篷生活, 喂养条件与其他组一致, 氧含量10%(约6 000 m海拔), 光照条件12 h/d, 气压50 kPa, 温度23~25 °C, 湿度55%~60%。暴露组和运动+暴露组大鼠自1 000 m海拔进入低氧帐篷, 海拔上升速度150 m/min, 直至6 000 m为止, 于低氧帐篷生活7 d, 每日补充水、饲料及更换垫料时间20 min。

1.4.3 动物处置和取样 7 d低氧暴露后, 各组随机选取10只大鼠, 空腹、麻醉状态尾静脉取血; 迅速断头处死, 沿枕骨大孔剪开颅骨, 全脑置于冰台上, 剔除端脑组织, 小心剪取海马组织, 生理盐水反复漂洗, 吸水纸擦干水分, 经液氮急速低温后转移至-80 °C超低温冰箱保存备用。大鼠全血室温自凝45 min, 4 °C、2 000 r/min, 离心10 min, 取上清即为血清; 取400 mg大鼠海马组织, 剪碎, 加入PBS匀浆介质, 2 000 r/min匀浆1 min, 匀浆液转移至离心管, 4 °C、6 000 r/min, 离心10 min, 取上清-80 °C保存。

1.5 观察指标

1.5.1 旷场实验及Morris水迷宫实验 ①各组剩余大鼠($n=5$)进行旷场实验和Morris水迷宫实验。大鼠面朝黑色内壁并置于旷场箱(规格: 100 cm×100 cm×50 cm), 箱内区分为中心区域及周边区域, 大鼠于箱内自由活动5 min, 经视频系统记录大鼠运动轨迹、中心区域活动时间及跨越格栅数, 并计算其运动总路程。每只大鼠完成实验后, 75%乙醇擦拭并清理旷场箱内壁和底部, 以消除气味踪迹, 待晾干后更换大鼠重复上述实验流程。②旷场实验结束后进行Morris水迷宫实验, 每次实验前将大鼠置于无平台水池(圆形, 180 cm×180 cm×60 cm, 水

深50 cm, 水温23~25 °C), 自由游泳2 min熟悉迷宫环境。实验持续4 d, 分为定位航行实验及空间探索实验。首先进行定位航行实验, 持续3 d, 每天于固定时间段训练4次, 水池上方架设视频跟踪及分析系统。水池壁上标记4个等距离点N、E、S、W作为实验起始点, 水池分为4个象限, 随机选择某一象限在中央放置平台(平台与池壁圆心距离相等)。随机选择起始点将大鼠面向池壁放入水池, 视频跟踪系统记录大鼠找到平台的时间和游泳路径, 4次训练不同。大鼠找到平台后或120 s内找不到平台(潜伏期计为120 s), 则由实验者将其引导到平台, 在平台上休息10 s, 再进行下次实验。定位航行实验后24 h进行空间探索实验, 撤除平台, 任选一相同入水点将大鼠放入水中, 记录大鼠在120 s内的游泳路径及路程, 记录平台所在象限停留时间和穿越平台次数, 观察空间定位能力及在空间探索过程中的变化规律。

1.5.2 血清氧化应激标志物和炎症因子相对表达水平 取预先制备血清, 按照酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒说明书稀释标准品至10 µg/mL, 加样并设空白孔和待测样品孔, 37 °C孵育20 min, 甩干液体, PBST重复洗涤3次, 待测样品孔加入酶标试剂液, 37 °C孵育20 min, PBST重复洗涤3次, TMB底物显色, 加入终止液, 450 nm处测A值, 浓度转换, 以此检测血清SOD、GSH活性, MDA含量和IL-1β、IL-6、TNF-α相对表达水平。

1.5.3 尼氏染色 取大鼠海马组织, PBS冲洗, 4%多聚甲醛固定24 h; 梯度乙醇(75%、85%、95%×2次、100%×2次)各脱水1 h, 二甲苯透明, 重复2次, 各30 min; 50~52 °C浸蜡2次, 各1 h; 组织包埋, 凝固后转移至4 °C冰箱保存。沿样品横截面切片, 厚度8 µm, 40 °C水浴展片, 60 °C烤片过夜。二甲苯脱蜡3次, 各10 min; 梯度乙醇(100%×2、95%×2次、85%、75%)及蒸馏水各复水5 min。尼氏(Nissle)染色; 固定、烤干、封片; 镜下观察海马CA1区病理特征及尼氏体损伤状况。采用ImageJ软件对镜下对切片中细胞进行计数, 以评价海马组织神经元死亡率及尼氏小体数量。

1.5.4 基因表达检测 取海马组织匀浆液, 采用Trizol法提取组织液总RNA, 分光光度仪检测RNA纯度及浓度。使用逆转录试剂盒逆转录成cDNA, 采用实时荧光定量PCR(RT-PCR)法检测mRNA相对表达水平。PCR反应体系20 µL: cDNA模板1 µL、ddH₂O 7 µL、正向引物1 µL、反向引物1 µL、2×Taq

PCR Master Mix 10 μ L, 条件为 95 $^{\circ}$ C 初始变性 55 s; 然后在 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 40 个循环。每组实验重复 3 次。根据熔解曲线剔除异常数据, 导入相对定量公式 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 逐个计算样品基因的相对表达水平, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence of target gene	
基因名称	引物序列
PI3K	F: 5' CGAGAGTGTCTGTCACAGTGTC 3'
	R: 5' TGTTCGCTTCCACAAACACAG 3'
Akt	F: 5' GTGGACTTACCTTATCCCCTCA 3'
	R: 5' TTGGCTTTGGTCTGTTCTGTTT 3'
Nox1	F: 5' CAGCTCGTGTCCGACTCAATC 3'
	R: 5' CGGGTATCATCGGGTTAATGG 3'
Duox2	F: 5' TGACGGTGTGTTTATCAGGCTCT 3'
	R: 5' TTTGCCCTTAGCGACAGCATC 3'
β -actin	F: 5' AAGGCCAACC GCGAGAAGAT 3'
	R: 5' ACAGCCTGGATAGCAACGTACA 3'

1.5.5 蛋白表达检测 取海马组织匀浆液, 采用 RIPA 法提取组织总蛋白, 4 $^{\circ}$ C, 15 000 $\times g$ 离心 20 min; 取上清液使用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度, 加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 min。配置 SDS-PAGE 凝胶, 浓缩胶恒压 80 V 电泳 30 min, 分离

胶恒压 110 V 电泳至溴酚蓝到达分离胶底部, 20 μ g 上样, 用电转法将蛋白质转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入一抗 (1:1 000 稀释), 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜; TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次, 加二抗 (1:3 000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min; TBST 洗膜 10 min $\times$ 5 次。ECL 法显影, 凝胶成像系统成像后使用 Quantity One 3.0 软件分析, 计算目的蛋白相对表达量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件进行统计分析。计量资料符合正态分布者采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 若方差齐, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验; 若方差不齐则采用 Games-Howell 法。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4 组大鼠自主行为及探究行为比较

旷场实验结果表明, 各组大鼠运动总路程差异无统计学意义 ($P>0.05$); 对照组和运动组跨越格栅数高于暴露组 ($P<0.05$); 运动+暴露组跨越格栅数高于暴露组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 对照组、运动组及运动+暴露组中心区域活动时间均低于暴露组 ($P<0.05$), 说明运动预适应能在一定程度上改善 7 d 低氧暴露大鼠空间探索能力。见表 2。

表 2 4 组大鼠旷场实验比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of open field test in four groups of rats ($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	运动总路程/m	跨越格栅数/个	中心区域活动时间/s
对照组	5	12.93 $\pm$ 2.12	72.45 $\pm$ 13.91	18.51 $\pm$ 4.07
运动组	5	12.81 $\pm$ 1.94	74.80 $\pm$ 16.14	18.44 $\pm$ 3.90
暴露组	5	13.04 $\pm$ 2.24	60.13 $\pm$ 12.57 ¹⁾²⁾	22.39 $\pm$ 5.15 ¹⁾²⁾
运动+暴露组	5	12.88 $\pm$ 2.31	67.57 $\pm$ 14.34	19.16 $\pm$ 4.74 ³⁾

注: 与对照组比较, 1) $P<0.05$; 与运动组比较, 2) $P<0.05$; 与暴露组比较, 3) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P<0.05$; compared with the exercise group, 2) $P<0.05$; compared with the exposure group, 3) $P<0.05$.

2.2 4 组大鼠学习和空间认知能力比较

Morris 水迷宫实验结果表明, 对照组和运动组 1~3 d 逃避潜伏期时间均低于暴露组和运动+暴露组 ($P<0.05$), 穿越平台次数及平台所在象限停留时间均高于暴露组及运动+暴露组 ($P<0.05$), 说明 7 d 低氧暴露造成大鼠学习及空间记忆能力下降; 运动+暴露组 1~3 d 逃避潜伏期时间低于暴露组 ($P<0.05$), 穿越平台次数及平台所在象限停留时间均高于暴露组 ($P<0.05$)。见表 3 和表 4。

2.3 4 组大鼠血清 MDA 含量和 SOD、GSH 活性比较

与对照组和运动组比较, 暴露组和运动+暴露组血清 MDA 含量均升高 ($P<0.05$); 与暴露组比较, 运动+暴露组血清 MDA 含量下降 ($P<0.05$)。在血清 SOD 活性方面, 对照组高于暴露组及运动+暴露组 ($P<0.05$), 运动+暴露组高于暴露组 ($P<0.05$)。对血清 GSH 活性而言, 对照组和运动组均高于暴露组及运动+暴露组 ($P<0.05$), 运动+暴露组高于暴露组 ($P<0.05$)。见表 5。

表3 4组大鼠逃避潜伏期时间比较($\bar{x}\pm s$)Table 3 Comparison of escape latency time in four groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	第1天	第2天	第3天
对照组	5	74.21±10.70	59.62±11.37	42.06±7.24
运动组	5	70.74±12.38	56.18±12.04	41.35±6.69
暴露组	5	99.80±15.56 ¹⁾²⁾	73.32±15.12 ¹⁾²⁾	65.47±10.20 ¹⁾²⁾
运动+暴露组	5	82.39±12.83 ¹⁾²⁾³⁾	65.46±12.35 ¹⁾²⁾³⁾	52.13±8.26 ¹⁾²⁾³⁾

注:与对照组比较,1) $P<0.05$;与运动组比较,2) $P<0.05$;与暴露组比较,3) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P<0.05$; compared with the exercise group, 2) $P<0.05$; compared with the exposure group, 3) $P<0.05$.

表4 4组大鼠空间探索能力比较($\bar{x}\pm s$)Table 4 Comparison of space exploration experiment in four groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	平均游泳速度/(cm/s)	穿越平台次数	平台所在象限停留时间/s
对照组	5	144.35±12.71	4.74±0.80	33.25±7.74
运动组	5	147.32±11.09	5.23±0.97	35.60±7.36
暴露组	5	142.47±12.35	1.41±0.51 ¹⁾²⁾	15.28±4.27 ¹⁾²⁾
运动+暴露组	5	144.62±10.87	3.55±0.72 ¹⁾²⁾³⁾	26.14±6.19 ¹⁾²⁾³⁾

注:与对照组比较,1) $P<0.05$;与运动组比较,2) $P<0.05$;与暴露组比较,3) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P<0.05$; compared with the exercise group, 2) $P<0.05$; compared with the exposure group, 3) $P<0.05$.

表5 4组大鼠血清MDA含量和SOD、GSH活性比较($\bar{x}\pm s$)Table 5 Comparison of serum MDA content and SOD, GSH activity in four groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	MDA/(nmol/mL)	SOD/(U/mL)	GSH/(mg/mL)
对照组	10	5.72±1.05	92.35±15.79	1.22±0.14
运动组	10	6.10±1.28	88.48±16.42	1.18±0.15
暴露组	10	12.35±3.47 ¹⁾²⁾	69.12±11.77 ¹⁾²⁾	0.83±0.11 ¹⁾²⁾
运动+暴露组	10	9.13±1.81 ¹⁾²⁾³⁾	80.51±12.04 ¹⁾³⁾	1.02±0.13 ¹⁾²⁾³⁾

注:与对照组比较,1) $P<0.05$;与运动组比较,2) $P<0.05$;与暴露组比较,3) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P<0.05$; compared with the exercise group, 2) $P<0.05$; compared with the exposure group, 3) $P<0.05$.

2.4 4组大鼠血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平比较

与对照组和运动组比较,暴露组和运动+暴露组血清IL-6、TNF- α 水平均升高($P<0.05$);与暴露

组比较,运动+暴露组血清IL-6、TNF- α 水平均下降($P<0.05$)。就血清IL-1 β 水平而言,对照组、运动组及运动+暴露组均低于暴露组($P<0.05$)。见表6。

表6 4组大鼠血清炎症反应标志物水平比较($\bar{x}\pm s$)Table 6 Comparison of serum inflammatory response biomarkers levels in four groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组	10	135.71±20.29	142.50±18.35	109.35±12.56
运动组	10	131.21±22.56	146.31±19.05	113.21±13.61
暴露组	10	189.54±28.09 ¹⁾²⁾	211.72±23.64 ¹⁾²⁾	218.81±16.70 ¹⁾²⁾
运动+暴露组	10	152.57±25.40 ³⁾	180.23±20.63 ¹⁾²⁾³⁾	162.93±15.04 ¹⁾²⁾³⁾

注:与对照组比较,1) $P<0.05$;与运动组比较,2) $P<0.05$;与暴露组比较,3) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P<0.05$; compared with the exercise group, 2) $P<0.05$; compared with the exposure group, 3) $P<0.05$.

2.5 4组大鼠海马组织CA1区病理特征

对照组及运动组大鼠海马组织CA1区尼氏小体数量高,神经元细胞结构完整、清晰;与对照组和运动组比较,暴露组和运动+暴露组大鼠海马组织CA1区尼氏小体数量下降,可见7 d低氧暴露可显著

降低大鼠海马组织CA1区尼氏小体数量;与暴露组比较,运动+暴露组海马组织CA1区尼氏小体数量呈上升趋势,说明运动预适应有效减轻了7 d低氧暴露大鼠海马组织CA1区尼氏小体消亡现象。见图1。

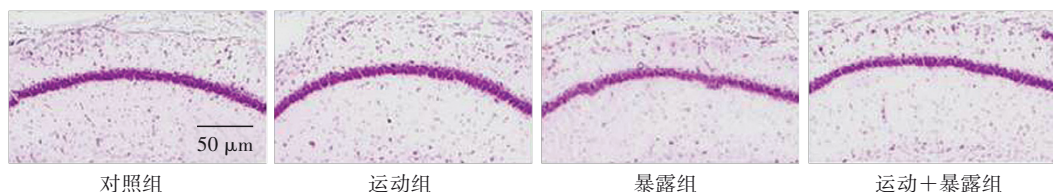


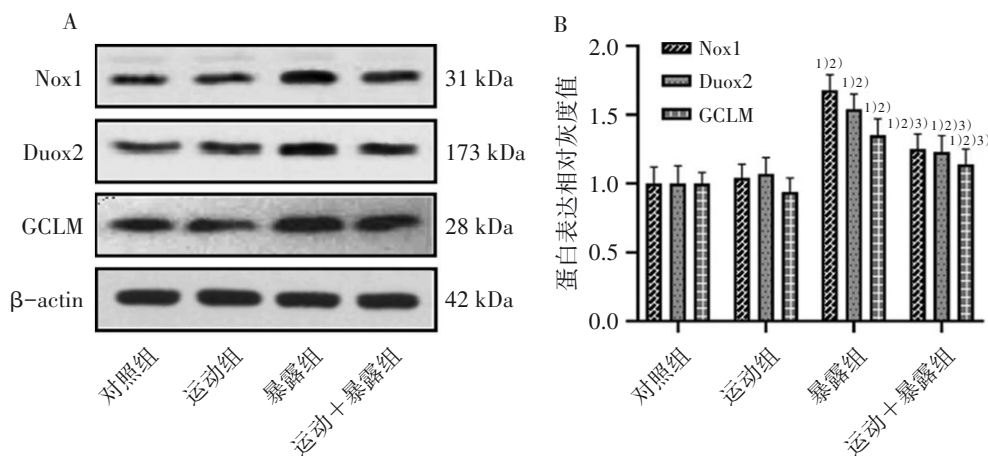
图1 4组大鼠海马CA1区尼氏染色比较($\times 200$)

Figure 1 Comparison of Nissl staining in CA1 area of hippocampus in four groups of rats ($\times 200$)

2.6 4组大鼠海马组织氧化应激蛋白相对表达量比较

与对照组比较,运动组大鼠海马组织Nox1、Duox2蛋白相对表达量上升,GCLM蛋白相对表达量降

低,但差异并无统计学意义($P>0.05$);与对照组和运动组比较,暴露组和运动+暴露组Nox1、Duox2、GCLM蛋白相对表达量上升($P<0.05$),运动+暴露组低于暴露组($P<0.05$)。见图2。



注:与对照组比较,1) $P<0.05$;与运动组比较,2) $P<0.05$;与暴露组比较,3) $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P<0.05$; compared with the exercise group, 2) $P<0.05$; compared with the exposure group, 3) $P<0.05$.

图2 4组大鼠海马组织氧化应激蛋白相对表达量比较

Figure 2 Comparison of relative expression levels of oxidative stress protein in hippocampus in four groups of rats

2.7 4组大鼠海马组织PI3K/Akt通路及氧化应激相关mRNA表达水平比较

与对照组和运动组比较,暴露组和运动+暴露组大鼠海马组织PI3K、Nox1、Duox2 mRNA表达水平均上升($P<0.05$),同时Akt mRNA表达水平下降($P<0.05$);但对照组与运动组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与暴露组比较,运动+暴露组大鼠海马组织PI3K、Nox1、Duox2 mRNA表达水平下降($P<0.05$),Akt mRNA表达水平上升($P<0.05$)。见表7。

2.8 4组大鼠海马组织PI3K/Akt通路和Nrf2/HO-1通路蛋白相对表达量比较

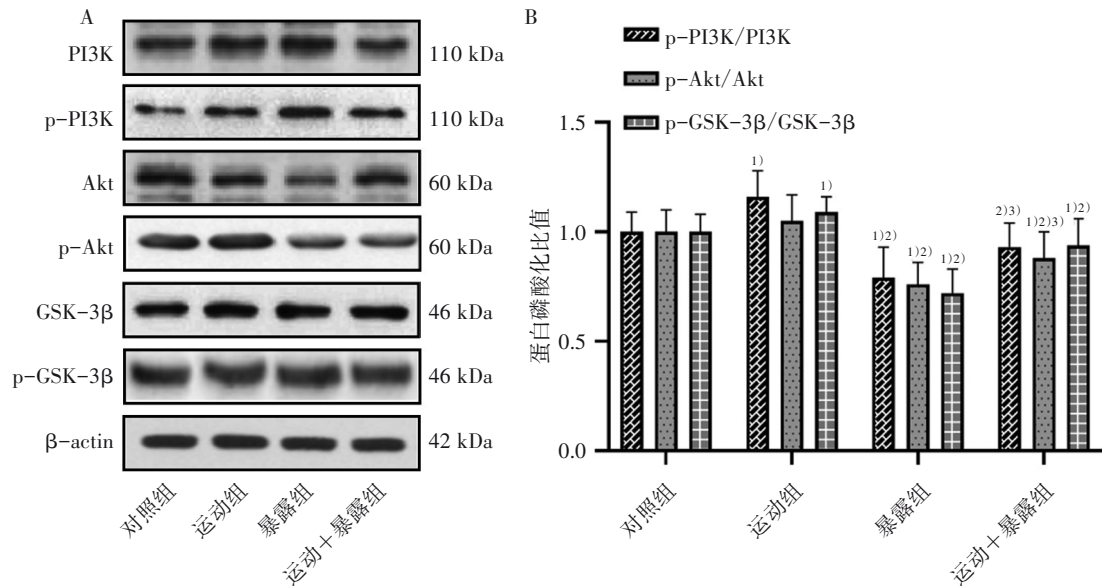
与对照组比较,运动组p-PI3K/PI3K和p-GSK-3 β /GSK-3 β 比值明显上升($P<0.05$);与对照组和运动组比较,暴露组大鼠海马组织p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 比值和Nrf2、HO-1蛋白相对表达量均下调($P<0.05$);与运动组比较,运动+暴露组大鼠海马组织p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 比值和Nrf2蛋白相对表达量下调($P<0.05$);与暴露组比较,运动+暴露组大鼠海马组织p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 比值和Nrf2、HO-1蛋白相对表达量上调($P<0.05$)。见图3和图4。

表7 4组大鼠海马组织PI3K/Akt通路及氧化应激相关mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s$)Table 7 Comparison of PI3K/Akt pathway and mRNA expression levels related to oxidative stress in hippocampus in four groups of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PI3K	Akt	Nox1	Duox2
对照组	10	1.00±0.08	1.00±0.12	1.00±0.09	1.00±0.11
运动组	10	1.02±0.12	1.04±0.11	0.97±0.12	0.98±0.09
暴露组	10	1.56±0.15 ¹⁾²⁾	0.64±0.11 ¹⁾²⁾	1.49±0.16 ¹⁾²⁾	1.52±0.15 ¹⁾²⁾
运动+暴露组	10	1.22±0.12 ¹⁾²⁾³⁾	0.87±0.14 ¹⁾²⁾³⁾	1.21±0.12 ¹⁾²⁾³⁾	1.30±0.11 ¹⁾²⁾³⁾

注:与对照组比较,1) $P < 0.05$;与运动组比较,2) $P < 0.05$;与暴露组比较,3) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$; compared with the exercise group, 2) $P < 0.05$; compared with the exposure group, 3) $P < 0.05$.

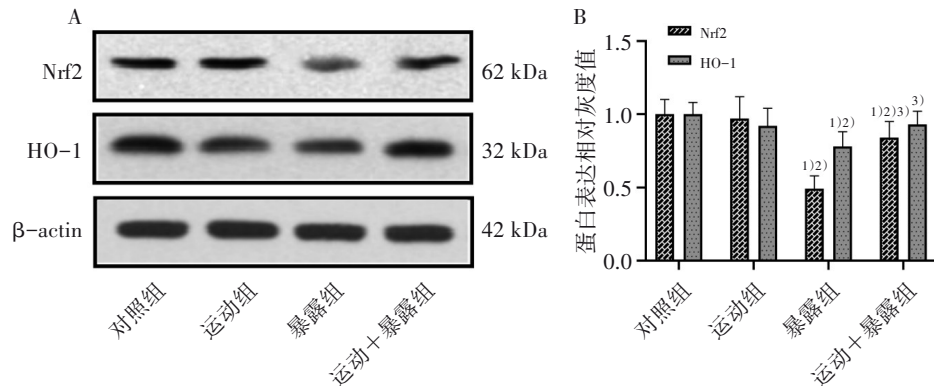


注:与对照组比较,1) $P < 0.05$;与运动组比较,2) $P < 0.05$;与暴露组比较,3) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$; compared with the exercise group, 2) $P < 0.05$; compared with the exposure group, 3) $P < 0.05$.

图3 4组大鼠海马组织PI3K/Akt通路相关蛋白相对表达量比较

Figure 3 Comparison of PI3K/Akt pathway related proteins in hippocampus in four groups of rats



注:与对照组比较,1) $P < 0.05$;与运动组比较,2) $P < 0.05$;与暴露组比较,3) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, 1) $P < 0.05$; compared with the exercise group, 2) $P < 0.05$; compared with the exposure group, 3) $P < 0.05$.

图4 4组大鼠海马组织Nrf2/HO-1通路相关蛋白表达比较

Figure 4 Comparison of expression of Nrf2/HO-1 pathway related proteins in hippocampus in four groups of rats

3 讨论

3.1 EP改善HE大鼠学习认知、障碍和神经炎症

既往的研究认为,HE导致动物探究能力下降,表现为旷场实验中动物跨格数降低和中心区域活动时间延长,但并不能造成自主运动行为改变^[9]。本研究也发现了类似的结果,在HE后(HE期间低氧为唯一变量)进行旷场实验,避免了其他外源性刺激对自主运动、情绪及探索选择倾向的影响。也有研究显示,HE小鼠跨格数及运动总路程较对照组显著上升,但中心区域活动时间并无明显改变,动物运动活跃度及探究行为增强,但中心区域活动时间并无明显改变^[10]。这与本研究结果部分相悖,可能与动物种属、动物习性、低氧剂量及“预练习”等因素有关。本研究还发现,运动+暴露组大鼠在HE后空间探索能力显著高于暴露组,这可能与HE干预造成的神经源性因素有关。现阶段研究认为低氧暴露程序及环境氧浓度剂量是决定低氧环境影响机体空间学习能力的主要因素^[11]。过长时间或极限低氧暴露造成中枢神经系统损伤及功能抑制,进而诱导氧化应激和炎症反应,主管学习、记忆功能的海马组织水肿、神经元结构异常,最终限制机体对外周环境的适应进程^[12]。早期运动可能通过“预调节”机制改善中枢神经系统神经活性、促进神经元发生、提高脑组织血液灌注效率等方式,提高脑组织低氧耐受能力,在HE后仍保持较高的工作效率^[13]。但由于动物运动行为和空间认知能力的复杂性,EP对HE大鼠自主行为、探究行为及空间认知能力作用的具体机制仍有待进一步研究。

研究证实,EP可有效减轻急性运动或低氧暴露后的氧化应激损伤,抑制蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)和局灶性脑缺血(focal cerebral ischemia, FCI)模型小鼠的脑组织氧化应激反应,并改善SAH和FCI后的早期脑损伤^[14]。有研究认为,游泳预训练可以通过抑制谷氨酸酶并促进一氧化氮(nitric oxide, NO)释放来缓解低氧应激条件下的氧化损伤现象^[15]。EP可减轻脑缺血再灌注期间脑组织氧化损伤,长期和短期EP均可有效提高海马组织及大脑皮层抗氧化酶活性,降低丙二醛含量并抑制氧化应激反应,从而减轻脑缺血再灌注后的脑组织氧化损伤,EP的抗氧化应激效应伴随机体运动感觉功能和学习记忆能力的改善^[16]。在本研究中也发现了类似的现象,经过4周的运动预处理有效调控了7 d低氧暴露后大鼠氧化应激相关蛋白表

达,氧化应激抑制可能是EP改善脑缺血/缺氧耐受的基本机制。

3.2 EP调控HE大鼠PI3K/Akt和Nrf2/HO-1信号通路

最近研究的结果表明,PI3K/Akt作为上游信号通路介导Nrf2/HO-1通路调控组织细胞炎症和氧化损伤有关的防御系统功能^[17]。Nrf2是调节Ⅱ期抗氧化蛋白合成的关键转录因子,通过清除组织细胞自由基发挥细胞保护效应。机体遭受强烈应激反应时,Nrf2与Keap1解离并被快速降解,Nrf2抑制易位信息诱导HO-1表达降低^[18]。作为细胞内Ⅱ相酶家族的成员,HO-1被认为在氧化还原平衡的调节中起着重要作用,现阶段其抗凋亡和抗炎作用已被充分证实^[19]。本研究也发现类似的现象,HE抑制大鼠海马组织CA1区Nrf2及HO-1表达。Nrf2抑制可激活抗炎细胞因子IL-10表达,且IL-10与活性氧(reactive oxygen species, ROS)的沟通可能激活胞质接头蛋白(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)-Nrf2结构域中的巯基,从而抑制Nrf2多泛素化并导致Nrf2核易位,可见Nrf2与IL-10可能存在交互作用。低氧刺激可能导致Nrf2激活Cullin3蛋白(CUL3)-环框蛋白1(recombinant ring box protein 1, Rbx1)-Keap1复合物的表达,为了调节其靶基因表达,Nrf2被蛋白激酶广泛磷酸化,通过E3泛素连接酶 β -转导重复相容蛋白(β -transducin repeats-containing proteins, β -TrCP)促进其泛素化^[20]。进而诱导糖原合成酶激酶-3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β , GSK-3 β)在氧化应激反应中表达上升,以进一步促进ROS激活并加速Keap1-Nrf2复合物裂解^[21]。基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)是一种由内皮细胞、小胶质细胞和星形胶质细胞生成的协同酶,主要调控细胞外基质和基底层蛋白的降解,在缺血再灌注后参与组织损伤、炎症和白细胞浸润,且通过上调自身表达改变血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)通透性并诱导脑组织水肿^[22]。研究表明,EP通过上调MMP-9及内源性抑制剂基质金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-1)表达改善脑组织BBB功能障碍并增强脑组织基底层缺氧耐受能力^[23]。PI3K/Akt通路可能影响Nrf2/HO-1信号通路,前文提及,HE造成了Nrf2和HO-1表达降低^[24]。脑外伤后海马神经元中还还原型辅酶Ⅱ(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶2(NADPH-oxidase 2, Nox2)高度表达,因此,大鼠脑组织Nox2

蛋白水平被作为评估脑组织氧化应激的金标准^[25]。本研究通过Western blot分析显示,HE后大鼠海马组织Nox1及Duox2蛋白表达上升。经过4周的运动预处理显著降低了HE后海马组织Nox1、Duox2蛋白表达。PI3K/Akt信号通路通过调控多个下游效应分子影响细胞代谢及氧化应激反应,其神经保护机制涉及多种细胞内信号和效应蛋白,主要通过活化的磷酸化Akt作用于下游靶点,发挥抗氧化、抗凋亡作用^[26]。可见,激活PI3K/Akt信号通路可能有利于EP在HE后发挥抗氧化作用,从而发挥神经保护作用。

运动预适应可以抑制低氧暴露大鼠氧化应激和神经炎症反应,减轻低氧暴露海马组织损伤并改善神经行为功能,其机制可能与激活PI3K/Akt和Nrf2/HO-1信号通路激活有关,但其作用机制仍有待进一步验证。

参考文献

- [1] FINDER M, BOYLAN G B, TWOMEY D, et al. Two-year neurodevelopmental outcomes after mild hypoxic ischemic encephalopathy in the era of therapeutic hypothermia [J]. *JAMA Pediatr*, 2020, 174(1): 48-55.
- [2] AGGARWAL M, BURNS J, MARTIN L J, et al. Imaging neurodegeneration in the mouse hippocampus after neonatal hypoxia-ischemia using oscillating gradient diffusion MRI [J]. *Magn Reson Med*, 2014, 72(3): 829-840.
- [3] HAUKVIK U K, MCNEIL T, LANGE E H, et al. Pre- and perinatal hypoxia associated with hippocampus/amygdala volume in bipolar disorder [J]. *Psychol Med*, 2014, 44(5): 975-985.
- [4] RAZANI E, POURBAGHERI-SIGAROODI A, SAFAROGHLI-AZAR A, et al. The PI3K/Akt signaling axis in Alzheimer's disease: a valuable target to stimulate or suppress? [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2021, 26(6): 871-887.
- [5] SONI D, KUMAR P. GSK-3 β -mediated regulation of Nrf2/HO-1 signaling as a new therapeutic approach in the treatment of movement disorders [J]. *Pharmacol Rep*, 2022, 74(4): 557-569.
- [6] ZHU Y H, SUN Y L, HU J C, et al. Insight into the mechanism of exercise preconditioning in ischemic stroke [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 866360.
- [7] QUINDRY J C, HAMILTON K L. Exercise and cardiac preconditioning against ischemia reperfusion injury [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2013, 9(3): 220-229.
- [8] 李海英, 苗卫国, 马静芬, 等. 线粒体自噬在运动预适应抗急性性低氧大鼠海马组织损伤中的作用[J]. *中国运动医学杂志*, 2014, 33(6): 524-529.
- [9] LI H Y, MIAO W G, MA J F, et al. The protective role of mitophagy in acute hypobaric hypoxia-induced hippocampal injury [J]. *Chin J Sports Med*, 2014, 33(6): 524-529.
- [10] ANDO S, KOMIYAMA T, SUDO M, et al. The interactive effects of acute exercise and hypoxia on cognitive performance: a narrative review [J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2020, 30(3): 384-398.
- [11] KARA J B, DANIEL G M. Time course of recovery from acute hypoxia exposure as measured by vigilance and event-related potentials [J]. *Physiol Behav*, 2021, 239: 113508.
- [12] CHAN Y L, SAAD S, MACHAALANI R, et al. Maternal cigarette smoke exposure worsens neurological outcomes in adolescent offspring with hypoxic-ischemic injury [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 306.
- [13] HUANG T D, HUANG X M, LI H, et al. Maternal cigarette smoke exposure exaggerates the behavioral defects and neuronal loss caused by hypoxic-ischemic brain injury in female offspring [J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 818536.
- [14] DE LIMA W V, VISONA I, SCHOR N, et al. Preconditioning by aerobic exercise reduces acute ischemic renal injury in rats [J]. *Physiol Rep*, 2019, 7(14): e14176.
- [15] TEYMURI KHERAVI M, NAYEBIFAR S, ALETAHA S M, et al. The effect of two types of exercise preconditioning on the expression of TrkB, TNF- α , and MMP2 genes in rats with stroke [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 5595368.
- [16] HAFEZ S, KHAN M B, AWAD M E, et al. Short-term acute exercise preconditioning reduces neurovascular injury after stroke through induced eNOS activation [J]. *Transl Stroke Res*, 2020, 11(4): 851-860.
- [17] TONELLI C, CHIO I I C, TUVESON D A. Transcriptional regulation by Nrf2 [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(17): 1727-1745.
- [18] BAIRD L, YAMAMOTO M. The molecular mechanisms regulating the Keap1-Nrf2 pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40(13): e00099-e00020.
- [19] 万志刚, 李正宇, 殷小平. HO-1调控脑出血后炎症过程的研究进展[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2018, 58(3): 82-85.
- [20] WAN Z G, LI Z Y, YIN X P. Research progress of HO-1 in regulating inflammation after intracerebral hemorrhage [J]. *J Nanchang Univ Med Sci*, 2018, 58(3): 82-85.
- [21] 王林佳, 王瑞琪, 李祥宁, 等. SFN激活Nrf2提高小鼠低氧环境下运动耐力和红白肌乳酸代谢[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(12): 1473-1480.
- [22] WANG L J, WANG R Q, LI X N, et al. Activation of Nrf2 by SFN improves hypoxic exercise endurance and lactate metabolism in red and white skeletal muscles of mice [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2020, 36(12): 1473-1480.
- [23] BELLEZZA I, GIAMBANCO I, MINELLI A, et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(5): 721-733.
- [24] DING X Q, JIAN T Y, WU Y X, et al. Ellagic acid ameliorates oxidative stress and insulin resistance in high glucose-treated HepG2 cells via miR-223/keap1-Nrf2 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 85-94.
- [25] LIN X Y, BAI D P, WEI Z X, et al. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264. 7 cells by increasing the activity of antioxidant

- enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway [J]. *PLoS One*, 2019, 14(5):e0216711.
- [24] FENG H, WANG L, ZHANG G X, et al. Oxidative stress activated by Keap-1/Nrf2 signaling pathway in pathogenesis of preeclampsia [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(3):382-392.
- [25] MA M W, WANG J, DHANDAPANI K M, et al. NADPH oxidases in traumatic brain injury: Promising therapeutic targets? [J]. *Redox Biol*, 2018, 16:285-293.
- [26] XU F, NA L X, LI Y F, et al. Roles of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in neurodegenerative diseases and tumours [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10(1):54.

Effects of Exercise Preconditioning Mediating Oxidative Stress to Regulate PI3K/Akt and Nrf2/HO-1 Pathways to Alleviate Cognitive and Learning Disorders in Rats

KONG Haijun^{1,2}, LI Xinlong², WANG Fenghua³, CHEN Xiaolan^{1*}

¹ College of Physical Education Science, Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China;

² College of Physical Education, Kashgar University, Kashgar, Xinjiang 844000, China;

³ College of Physical Education, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang 844000, China

*Correspondence: CHEN Xiaolan, E-mail: 812557453@qq.com

ABSTRACT Objective: To explore the basic mechanism of exercise preconditioning regulating PI3K/Akt and Nrf2/HO-1 signaling pathways and oxidative stress to alleviate cognitive and learning disabilities in rats with hypoxic exposure. **Methods:** A total of sixty 6-week-old SPF male SD rats were divided into control group, exercise group, exposure group and exercise + exposure group according to random number table method, with 15 rats in each group. The control and exposure groups received no exercise preconditioning intervention, while the exercise and exercise + exposure groups received exercise preconditioning intervention (treadmill training, twice a day, 6 days a week, a total of 4 weeks of training). The day after exercise preconditioning, rats in the exposure and exercise + exposure groups received hypoxia exposure for 7 days. After 7 days of hypoxia exposure, the cognition and learning ability of rats were evaluated by open field test and Morris water maze test. SOD and GSH activities, MDA content and IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels in serum of rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The changes of Nissl corpuscles in CA1 region of hippocampus were observed by Nissl staining. mRNA expression levels of PI3K, Nox1, Duox2 and Akt were detected by RT-PCR. The relative expression levels of Nox1, Duox2, GCLM and PI3K/Akt and Nrf2/HO-1 pathway proteins in hippocampus were detected by Western blot. **Results:** Compared with the control group and the exercise group, the 3 d escape latency of the exposed group increased ($P<0.05$). The times of the platform crossings and the residence time in platform significantly decreased ($P<0.05$). Serum MDA content, IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels significantly increased ($P<0.05$), while SOD and GSH activities significantly decreased ($P<0.05$). The number of Nissl bodies in CA1 region decreased ($P<0.05$). The mRNA expression levels of PI3K, Nox1 and Duox2 increased ($P<0.05$), while the mRNA expression level of Akt decreased ($P<0.05$). The relative expressions of Nox1, Duox2 and GCLM proteins in hippocampus significantly increased ($P<0.05$), while the ratios of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-GSK-3 β /GSK-3 β and the relative expressions of Nrf2 and HO-1 proteins significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the exposure group, the movement time in the central area, the 3 d escape latency decreased ($P<0.05$), the number of platform crossings and the platform quadrant residence time increased ($P<0.05$) in the exercise + exposure group. Serum MDA content, IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels significantly decreased ($P<0.05$), while SOD and GSH activities significantly increased ($P<0.05$). The damage of neurons in CA1 region was reduced and the number of Nissl corpuscles increased. The mRNA expression levels of PI3K, Nox1 and Duox2 in hippocampus tissues decreased ($P<0.05$), while the mRNA expression level of Akt increased ($P<0.05$). The relative expression levels of Nox1, Duox2 and GCLM proteins in hippocampus significantly decreased ($P<0.05$), while the ratio of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-GSK-3 β /GSK-3 β and the relative expression levels of Nrf2 and HO-1 proteins significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** Exercise preconditioning may be involved in the regulation of oxidative stress in brain tissue by activating PI3K/Akt and Nrf2/HO-1 signaling pathways, and thereby improves the neurobehavioral functions of hypoxia exposed rats.

KEY WORDS exercise preconditioning; oxidative stress; PI3K/Akt signaling pathway; Nrf2/HO-1 signaling pathway; hypoxic exposure; cognition and learning ability

DOI:10.3724/SP.J.1329.2023.03006