

本文引用:刘猛. 急性力竭运动大鼠脑皮质运动区组织中 caspase-3 的表达[J]. 新乡医学院学报,2017,34(1): 22-25. DOI:10. 7683/xyxyxb. 2017. 01. 006.

【基础研究】

急性力竭运动大鼠脑皮质运动区组织中 caspase-3 的表达

刘 猛
(新乡市中心医院神经外科,河南 新乡 453000)

摘要: **目的** 观察急性力竭运动大鼠脑皮质运动区组织中 caspase-3 活性和蛋白表达,探讨不同强度力竭运动对脑皮质运动区细胞凋亡的影响。**方法** 健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 80 只随机分为对照组($n=8$)、中等强度力竭运动组($n=36$)和高强度力竭运动组($n=36$)。对照组大鼠不进行力竭运动,中等强度力竭运动组和高强度力竭运动组大鼠建立急性力竭运动模型,分别在力竭运动后 6 h 和 1、4、7 d 采集大鼠脑皮质运动区组织,采用荧光分析法检测脑皮质运动区组织中 caspase-3 活性,Western blot 法检测 caspase-3 蛋白水平,比较 3 组大鼠脑皮质运动区组织中 caspase-3 活性和蛋白水平。**结果** 力竭运动后 6 h,中等强度力竭运动组和高强度力竭运动组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性显著高于对照组($P<0.05$),高强度力竭运动组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性显著高于中等强度力竭运动组($P<0.05$)。力竭运动后 1、4 d,高强度力竭运动组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性显著高于中等强度力竭运动组和对对照组($P<0.05$),但中等强度力竭运动组与对照组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性比较差异无统计学意义($P>0.05$)。力竭运动后 7 d,3 组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。中等强度力竭运动组大鼠力竭运动后 6 h 脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性显著高于力竭运动后 1、4、7 d 时($P<0.05$)。高强度力竭运动组大鼠力竭运动后 1 d 时脑皮质运动区组织中 caspase-3 活性显著高于力竭运动后 6 h 和 4、7 d 时($P<0.05$),力竭运动后 6 h 和 4 d 时脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性显著高于力竭运动后 7 d 时($P<0.05$)。与对照组比较,中等强度力竭运动组大鼠力竭运动后 6 h 和 1、4、7 d 时脑组织中 caspase-3 蛋白表达无显著变化($P>0.05$);高强度力竭运动组大鼠力竭运动后脑组织中 caspase-3 蛋白表达逐渐升高,力竭运动后 4、7 d 时 caspase-3 蛋白表达显著高于对照组和中等强度力竭运动组($P<0.05$)。**结论** 力竭运动可能通过上调 caspase-3 活性和蛋白表达而促进大鼠脑皮质运动区细胞凋亡,且力竭运动强度越高,细胞凋亡越明显。

关键词: caspase-3;力竭运动;皮质运动区;细胞凋亡
中图分类号: R874 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2017)01-0022-04

Expression of caspase-3 in the cerebral cortical motor area tissue of rats after acute exhaustive exercise

LIU Meng
(Department of Neurosurgery,Xinxiang Central Hospital,Xinxiang 453000,Henan Province,China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of exhaustive exercise on the apoptosis of nerve cells through detecting the activity and protein expression of caspase-3 in the the cerebral cortical motor area tissue of rats after acute exhaustive exercise. **Methods** Eighty healthy male Sprague-Dawley rats were divided into control group($n=8$),moderate intensity exhaustive exercise group($n=36$) and high intensity exhaustive exercise group($n=36$). The rats in control group didn't accept exhaustive exercise,and the rats in moderate intensity exhaustive exercise group and high intensity exhaustive exercise group were used to establish the acute exhaustive exercise model. The cerebral cortical motor area tissues of rats were collected at the time points of 6 hours,4 and 7 days after exhaustive exercise. Caspase-3 activity in the cerebral cortical motor area tissues was detected by fluorescence analysis,and the level of caspase-3 protein was detected by Western blot method. The activity and protein level of caspase-3 in the cerebral cortical motor area tissues of rats were compared among the three groups. **Results** Six hours after exhaustive exercise,the activity of caspase-3 in the cerebral cortical motor area tissues of rats in moderate intensity exhaustive exercise group and high intensity exhaustive exercise group was significantly higher than that in control group ($P<0.05$),and the activity of caspase-3 in the cerebral cortical motor area tissues of rats in high intensity exhaustive exercise group was significantly higher than that in moderate intensity exhaustive exercise group ($P<0.05$). One and four days after exhaustive exercise,the activity of caspase-3 in the cerebral cortical motor area tissues of rats in high intensity exhaustive exercise group was significantly higher than that in moderate intensity exhaustive exercise group and control group ($P<0.05$),but

there was no significant difference in the activity of caspase-3 between moderate intensity exhaustive exercise group and control group ($P>0.05$). Seven days after exhaustive exercise, there was no significant difference in the activity of caspase-3 in the cerebral cortical motor area tissues of rats among the three groups ($P>0.05$). The activity of caspase-3 in the cerebral cortical motor area tissues of rats at the time point of 6 hours after exhaustive exercise was significantly higher than that at the time points of 1, 4 and 7 days after exhausting exercise in moderate-intensity exhaustive exercise group ($P<0.05$). The activity of caspase-3 in the cerebral cortical motor area tissues of rats at the time point of 1 day after exhaustive exercise was significantly higher than that at the time points of 6 hours, 4 and 7 days after exhausting exercise in high intensity exhaustive exercise group ($P<0.05$). The activity of caspase-3 in the cerebral cortical motor area tissues of rats at the time points of 6 hours and 4 days after exhaustive exercise was significantly higher than that at the time point of 7 days after exhausting exercise in high intensity exhaustive exercise group ($P<0.05$). There was no significant difference in the expression of caspase-3 in the cerebral cortical motor area tissues of rats between moderate intensity exhaustive exercise group and control group at the time points of 6 hours, 4 and 7 days after exhaustive exercise ($P>0.05$). The expression of caspase-3 in the cerebral cortical motor area tissues of rats in high intensity exhaustive exercise group increased gradually. Four and seven days after exhaustive exercise, the expression of caspase-3 in the cerebral cortical motor area tissues of rats in high intensity exhaustive exercise group was significantly higher than that in control group and moderate intensity exhaustive exercise group ($P<0.05$). **Conclusions** Exhaustive exercise may promote the apoptosis in the cerebral cortical motor area of rats by up-regulating caspase-3 activity and protein expression. With the increase of exhaustive exercise intensity, the apoptosis is more obvious.

Key words: caspase-3; exhaustive exercise; cortical motor area; apoptosis

研究证明,力竭运动会导致心肌细胞及骨骼肌细胞凋亡,其机制与运动后的细胞损伤有关^[1];亦有研究发现,运动后胸腺细胞和淋巴细胞凋亡与运动员呼吸系统感染高发病率及机体免疫功能丧失相关^[2-3]。力竭运动后人体细胞凋亡是组织自我保护功能的下降,是机体清除部分损伤细胞的正常生理过程,但是,力竭运动中大量的细胞凋亡则会造成人体组织器官功能下降,其可能是运动性疲劳的机制之一^[3]。中枢运动神经系统是调节、控制人体随意运动的重要系统,对人体运动起主导作用,因此,揭示不同时间、不同强度的力竭运动与中枢神经系统(central nervous system, CNS)细胞凋亡之间的内在联系,分析其可能的机制或功能影响,对探讨力竭运动与 CNS 功能、运动与细胞凋亡的关系具有重要意义^[3-5]。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 80 只,体质量 386 ~ 422 g,由新乡医学院实验动物中心提供。动物适应性喂养 1 周后随机分为对照组($n=8$)、中等强度力竭运动组($n=36$)和高强度力竭运动组($n=36$)。

1.2 主要试剂及仪器 兔抗小鼠 caspase-3 一抗、山羊抗兔二抗(美国 Santa 公司),二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司),caspase-3 活性检测试剂

盒(上海碧云天生物技术有限公司), β -tubulin(武汉艾美捷科技有限公司),caspase-3 活性显色底物 Ac-DEVD-pNA(德国 Merck 公司);PT98 型动物跑台(杭州立泰科技有限公司),离心管、移液器、电子天平(宁波江南仪器厂)。

1.3 急性力竭运动大鼠模型建立 各组大鼠在动物跑台上进行 2 d 适应性运动,休息 1 d,然后中等强度力竭运动组和高强度力竭运动组大鼠进行力竭运动,跑台开始速度为 $10\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$,逐渐提高速度,并在 5 min 内达到 $20\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ (中等强度力竭运动组)或 $36\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ (高强度力竭运动组),保持速度直至大鼠力竭,同时记录力竭所需的运动时间。力竭标准:毛刷驱赶大鼠无效,在跑台尾端停留 2 s 仍不愿跑,并失去快速翻正反射^[6]。对照组大鼠恢复性休息 1 d 后不进行力竭运动。

1.4 荧光分析法检测脑皮质运动区组织中 caspase-3 活性 中等强度力竭运动组和高强度力竭运动组大鼠分别于力竭运动后 6 h 及 1、4、7 d 随机选取 9 只大鼠,断头法处死大鼠,以颅前囟为界,经大脑前连合平面向后间隔 3 mm 取大脑皮质运动区组织^[6],于预冷的 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 磺基水杨酸中匀浆,取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 脑组织匀浆上清液,加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ caspase-3 活性显色底物(Ac-DEVD-pNA, $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 $80\text{ }\mu\text{L}$ 反应缓冲液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,应用荧光分光光度计检测波长 405 nm 处样本的吸光度值,计算对硝基苯胺(p-nitroaniline, pNA)浓度,计算公式: $y =$

-5.473 9 + 539.664 8*x*; *x* 为吸光度值, *y* 为 pNA 标准品浓度。

1.5 Western blot 法检测脑皮质运动区组织中 caspase-3 蛋白水平 脑组织取样后 -80 ℃ 储存, BCA 法测定 caspase-3 蛋白表达。100 g · L⁻¹ 聚丙烯酰胺凝胶(等量蛋白)加入上样孔进行电泳后, 蛋白转入聚偏氟乙烯膜, 应用含 50 g · L⁻¹ 脱脂牛奶的 TBST, 25 ℃ 封闭 1 h。4 ℃ 温度下 1 : 1 000 兔抗小鼠 caspase-3 多克隆抗体过夜, TBST 振荡冲洗 15 min, 共 3 遍, 然后山羊抗兔二抗(1 : 2 000)孵育 3 h, 再次振荡冲洗 15 min, 反复 3 遍, 增强化学发光液处理, 暗室显影, 照相。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用方差分析和 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性比较 结果见表 1。力竭运动后 6 h, 中等强度力竭运动组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性比较

Tab.1 Comparison of the activity of caspase-3 in the cerebral cortical motor area of rats among the groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | caspase-3 活性 | | | |
|-----------|----------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|
| | | 力竭运动后 6 h | 力竭运动后 1 d | 力竭运动后 4 d | 力竭运动后 7 d |
| 对照组 | 8 | 24.89 ± 7.96 | 24.89 ± 7.96 | 24.89 ± 7.96 | 24.89 ± 7.96 |
| 中等强度力竭运动组 | 9 | 38.97 ± 7.21 ^a | 25.15 ± 7.49 ^b | 25.02 ± 8.23 ^b | 24.91 ± 8.92 ^b |
| 高强度力竭运动组 | 9 | 53.12 ± 13.77 ^{acde} | 82.23 ± 19.95 ^{ac} | 38.66 ± 6.91 ^{acde} | 25.62 ± 9.79 ^d |

注: 与对照组比较^a*P* < 0.05; 与力竭运动后 6 h 比较^b*P* < 0.05; 与中等强度力竭运动组比较^c*P* < 0.05; 与力竭运动后 1 d 比较^d*P* < 0.05; 与力竭运动后 7 d 比较^e*P* < 0.05。

2.2 各组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 蛋白表达比较 结果见图 1、图 2 和表 2。与对照组比较, 中等强度力竭运动组大鼠力竭运动后 6 h 和 1、4、7 d 时脑组织中 caspase-3 蛋白表达差异无统计学

意义(*P* > 0.05); 高强度力竭运动组大鼠力竭运动后 6 h 和 1、4、7 d 时脑组织中 caspase-3 蛋白表达逐渐升高, 力竭运动后 4、7 d 时 caspase-3 蛋白表达显著高于对照组和中等强度力竭运动组(*P* < 0.05)。

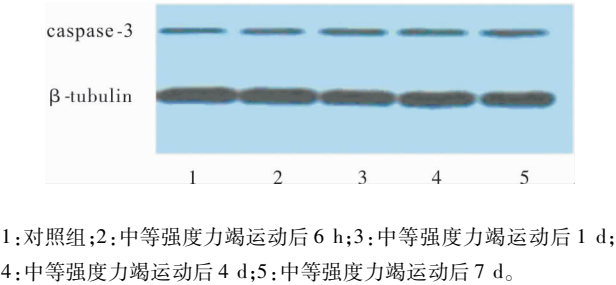


图 1 中等强度力竭运动组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 蛋白表达
Fig.1 Expression of caspase-3 protein in the cerebral cortical motor area of rats in moderate-intensity exhaustive exercise group

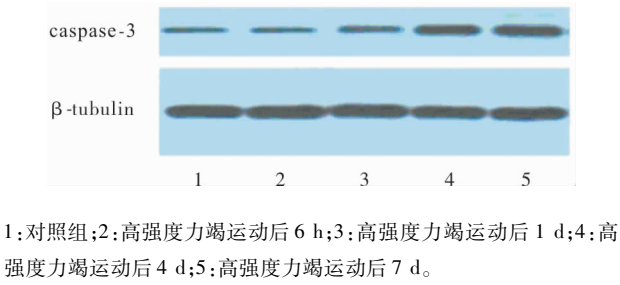


图 2 高强度力竭运动组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 蛋白表达
Fig.2 Expression of caspase-3 protein in the cerebral cortical motor area of rats in high-intensity exhaustive exercise group

表 2 3 组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 蛋白表达比较

Tab.2 Comparison of the expression of caspase-3 protein in the cerebral cortical motor area of rats among the groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | caspase-3 蛋白表达(相对灰度值) | | | |
|-----------|---|-----------------------|---------------|----------------------------|----------------------------|
| | | 力竭运动后 6 h | 力竭运动后 1 d | 力竭运动后 4 d | 力竭运动后 7 d |
| 对照组 | 8 | 1.010 ± 0.021 | 1.021 ± 0.022 | 1.005 ± 0.019 | 1.004 ± 0.021 |
| 中等强度力竭运动组 | 9 | 1.051 ± 0.023 | 1.062 ± 0.020 | 1.071 ± 0.021 | 1.079 ± 0.020 |
| 高强度力竭运动组 | 9 | 1.052 ± 0.022 | 1.102 ± 0.023 | 1.524 ± 0.021 ^a | 1.756 ± 0.026 ^a |

注:与对照组和中等强度力竭运动组比较^a*P* < 0.05。

3 讨论

运动作为机体的一种生理刺激,对机体自身具有正反 2 个方面的作用,即适当运动可有效改善机体形态与生理功能,而过量运动往往适得其反,导致 CNS 细胞凋亡,引起功能失调与障碍^[7]。神经胶质细胞在中枢神经系统内构成了网络支架,对神经元起到支撑和保护等多方面的作用。有形态学研究已经证实,力竭运动后 CNS 细胞凋亡均为神经胶质细胞^[8]。目前,国内外学者对中枢神经细胞凋亡现象及其作用已经开展了前期研究,但主要集中于形态学领域,有关力竭运动后凋亡相关蛋白时相变化仍需进一步证实^[8-9]。

细胞凋亡是一种受基因调控的主动性细胞死亡方式,caspase-3 是参与细胞凋亡的主要效应酶,其表达升高表明细胞凋亡比较活跃^[10-13]。本研究结果显示,力竭运动后 6 h,中等强度力竭运动组和高强度力竭运动组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性均显著高于对照组,高强度力竭运动组 caspase-3 活性显著高于中等强度力竭运动组;这表明力竭运动后早期大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性就已经有明显增强。力竭运动后 1、4 d,高强度力竭运动组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性显著高于中等强度力竭运动组和对照组,但中等强度力竭运动组与对照组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性比较无差异,这表明中等强度力竭运动后大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性很快恢复,细胞凋亡水平恢复正常。力竭运动后 7 d,3 组大鼠脑皮质运动区脑组织中 caspase-3 活性比较差异无统计学意义,这表明经过较长时间的机体适应后,高强度力竭运动后大鼠脑皮质运动区脑组织凋亡水平也恢复正常。

本研究结果显示,与对照组比较,中等强度力竭运动组大鼠力竭运动后 6 h 和 1、4、7 d 时脑组织中 caspase-3 蛋白表达无显著变化;高强度力竭运动组大鼠力竭运动后 6 h 和 1、4、7 d 时脑组织中 caspase-3 蛋白表达逐渐升高,力竭运动后 4、7 d 时 caspase-3 蛋白表达显著高于对照组和中等强度力竭运动组。力竭运动后 CNS 细胞凋亡增加,且运动强度越大,

caspase-3 蛋白表达增加越明显,恢复正常越慢。

综上所述,力竭运动大鼠脑皮质运动区组织中 caspase-3 活性和蛋白表达均显著升高,提示细胞凋亡增加,且高强度力竭运动后细胞凋亡更明显,恢复过程缓慢。

参考文献:

[1] SIU P M,TAM E W,TENG B T,*et al.* Muscle apoptosis is induced in pressure-induced deep tissue injury[J]. *J Appl Physiol*,2009,107(4):1266-1275.

[2] MOOREN F C,BIMING D,LECHTERMANN A,*et al.* Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise[J]. *J Appl Physio*,2002,93(1):127-128.

[3] 陆阿明,陆爱云,夏春林. 急性力竭运动对中枢神经系统细胞凋亡的影响[J]. *体育与科学*,2007,28(2):62-66.

[4] 王斌,张蕴珉,李靖,等. 力竭运动对大鼠纹状体、中脑及下丘脑单胺类神经递质含量的影响[J]. *中国运动医学杂志*,2002,21(3):248-252.

[5] FAN W Y,DAI Y X,XU H C,*et al.* Caspase-3 modulates regenerative response after stroke[J]. *Stem Cells*,2014,32(2):473-486.

[6] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:112-115.

[7] JIN J J,KO I G,KIM S E,*et al.* Swimming ameliorates multiple sclerosis-induced impairment of short-term memory by suppressing apoptosis in the hippocampus of rats[J]. *J Exerc Rehabil*,2014,10(2):67-74.

[8] LO S C,WANG Y Y,WEBER M,*et al.* Caspase-3 deficiency results in disrupted synaptic homeostasis and impaired attention control[J]. *J Neurosci*,2015,35(5):2118-2132.

[9] JARSKOG L F,SELINGER E S,LIEBERMAN J A,*et al.* Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia;high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation[J]. *Am J Psychiatry*,2014,161(1):109-115.

[10] DUAN H,CHAI J,SHENG Z,*et al.* Effect of burn injury on apoptosis and expression of apoptosis-related genes/proteins in skeletal muscles of rats[J]. *Apoptosis*,2009,14(1):52-65.

[11] 马岚,张奕霞,练海东,等. 右美沙芬对糖尿病视网膜神经病变中 caspase-3 表达的影响[J]. *眼科新进展*,2015,35(5):432-434.

[12] 赵文峰,高建芝,张金盈. 心肌缺血再灌注损伤时细胞凋亡的信号转导通路[J]. *新乡医学院学报*,2015,32(4):374-377,380.

[13] ADHIHETTY P J,O'LEARY M F,CHABI B,*et al.* Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle[J]. *J Appl Physiol*,2007,102(3):1143-1151.