DOI:10.16016/j.1000-5404.201603013

长期中负荷运动提高老年大鼠高难度运动学习的能力

孙 琳[1],吴广延[2],刘树雷[2],姚 娟[2],隋建峰[2],夏思永[1] (400715 重庆,西南大学体育学院[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部基础医学教学实验中心[2])

[摘要] **目的** 探讨不同负荷运动对老年大鼠高低难度运动学习能力的影响。**方法** 将 72 只老年 SD 雄性大鼠分为 6 组:低难度高负荷运动组、低难度中负荷运动组、低难度对照组,高难度高负荷运动组、高难度中负荷运动组和高难度对照组,每组 12 只。4 组负荷运动组大鼠分别进行连续 8 周两种负荷的跑台运动。分析不同负荷运动对强条件刺激(conditioned stimulus,CS)和弱 CS 下的眨眼条件反应(conditioned responses,CR)的发生率、CR 峰幅度以及首次达到学会标准的训练次数的影响。**结果** 在弱 CS 条件下,长期中负荷的运动可以显著地减少老年大鼠首次达到学会标准的训练次数($P<0.05$),提高了老年大鼠的 CR 发生率和 CR 峰幅度($P<0.05$),而长期高负荷运动则会显著地增加老年大鼠首次达到学会标准的训练次数($P<0.05$),降低 CR 发生率和 CR 峰幅度($P<0.05$)。但是在强 CS 条件下,长期高负荷和中负荷运动对老年大鼠首次达到学会标准的训练次数($P>0.05$),CR 发生率和 CR 峰幅度均无显著影响($P>0.05$)。**结论** 长期中负荷运动能提高老年大鼠高难度运动学习的能力,长期高负荷运动反而损害这种能力,两种负荷运动对低难度学习能力均无明显影响。

[关键词] 老年大鼠;运动性学习;眨眼条件反射
[中图法分类号] G804.2 [文献标志码] A

Long-term moderate load exercise improves motor learning ability of high skilled movement in aged rats

Sun Lin[1], Wu Guangyan[2], Liu Shulei[2], Yao Juan[1], Sui Jianfeng[2], Xia Siyong[1] ([1]College of Physical Education, Southwest University, Chongqing, 400715; [2]Experimental Center of Basic Medicine, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of different load exercises on motor learning ability of high and low skilled movements in aged rats. **Methods** Seventy-two aged male rats (16 months old) were randomly divided into 6 groups ($n=12$, for each group). Four groups were trained with two load exercises of treadmill for 8 consecutive weeks. We analyzed the effects of different load exercises on eyeblink conditioned response (CR) upon a strong or weak conditioned stimulus (CS) in aged rats according to the incidence of eyeblink CR, CR peak amplitude and training times for reaching learning criterion. **Results** In the presence of weak CS, the long-term high and moderate load exercises exerted different effects on the motor learning ability. The former significantly decreased the training times ($P<0.05$), and improved the incidence of CR and CR peak amplitude ($P<0.05$), whereas the latter significantly increased the training times($P<0.05$), and reduced the incidence of CR and CR peak amplitude ($P<0.05$). In contrast, under the strong CS, both load exercises had no significant impacts on the training times, the incidence of CR and CR peak amplitude (all $P>0.05$). **Conclusion** Differing from the negative effect of long-term high load exercise, long-term moderate load exercise is beneficial for motor learning of high skilled movement in aged rats. However, both load exercises have no effects on the motor learning ability of low skilled movement.

[**Key words**] aged rats; motor learning and memory; eyeblink conditioning

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81171249), the General Program of China Postdoctoral Fund (2014M562592) and the Special Project of China Postdoctoral Fund (2015T81091). Corresponding author: Xia Siyong, E-mail: xiasy@swu.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81171249);中国博士后基金面上项目(2014M562592);中国博士后基金特别项目(2015T81091)
[通信作者] 夏思永,E-mail: xiasy@swu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160504.0935.009.html(2016-05-04)

神经系统随着年龄的增长会逐渐出现老化现象,并且伴随出现一定程度的脑认知功能障碍[1-2]。运动对于维持健康的积极作用已广泛得到认可,机体缺乏有效的运动则会引起机体在分子、细胞、组织、器官和系统水平上的功能减退。相关研究已经表明运动能提高学习记忆能力,特别是对空间学习记忆的改善作用已得到广泛地验证[3-4]。但是关于不同的运动负荷强度对于其他类型的学习记忆的影响差异如何,特别是对习得不同难度的运动性学习任务影响少见报道。眨眼条件反射是一种广泛地应用于研究运动性学习记忆模型之一,并且改变条件刺激(conditioned stimulus, CS)强度能就改变该模型的难易程度[5-9]。本研究采用该模型作为运动性学习记忆的模型,探讨不同负荷运动对老年大鼠习得不同难度运动性学习任务的影响,为进一步探索运动抗脑老化和促进学习记忆的作用机制提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物

实验动物选用16月龄(大鼠先经历8周的运动负荷训练和1周的手术恢复,训练学习记忆行为时,大鼠是19月龄)的雄性SD大鼠72只(第三军医大学实验动物中心提供),避免选择运动功能障碍的大鼠,按照是否运动、运功负荷以及条件刺激(CS)强弱,采用随机抽签法分为低难度高负荷运动组、低难度中负荷运动组、低难度对照组,高难度高负荷运动组、高难度中负荷运动组和高难度对照组,每组12只。实验期间,所有大鼠均单笼饲养,给予自由进食和饮水,饲养环境保持12 h循环光照。

1.2　运动负荷训练

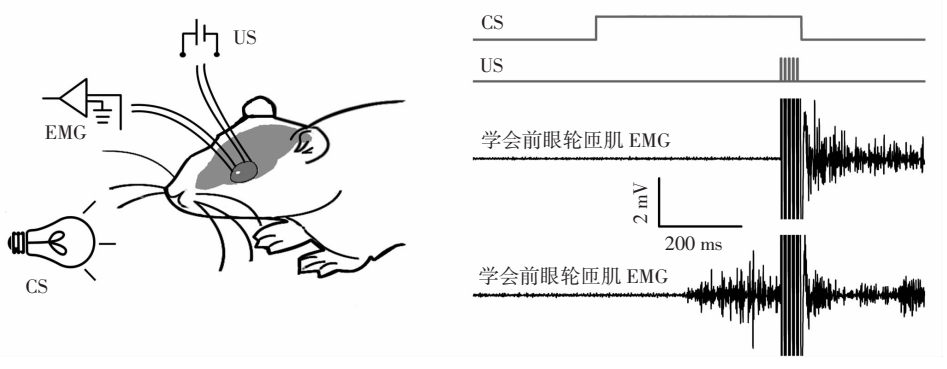
在学习记忆行为训练手术前8周,根据Bedford等[10]的运动负荷标准对4组不同运动负荷组大鼠进行跑台运动训练,每天训练1次,总共进行56 d运动训练。4组不同运动负荷组大鼠先进行适应性跑台训练7 d,跑台坡度0°,先后以跑速为10、15 m/min和20 m/min的速度持续10 min。7 d适应性跑台训练后,2组中等负荷运动组大鼠每天以20 m/min运动30 min,2组高负荷运动组大鼠20 m/min速度运动直至力竭。判断大鼠力竭的标准:大鼠跑姿变为伏地式,呼吸急促,滞留在跑道后1/3处3次以上,神情倦怠,光和声音刺激驱赶无效,电刺激大鼠尾部仍跟不上预定速度。

1.3　手术方法

参考本实验室前期的方法[8,11-13]。将麻醉后的大鼠头部固定在脑立体定向仪上(Model 940, David Kopf Instruments, USA),常规消毒后,切开头皮,将4颗已消毒的不锈钢螺丝钉(直径:0.8 mm)拧入颅骨,然后将2对绝缘微电极丝(76.2 μm, A-M Systems, USA)植入大鼠左侧上眼睑,1对用于给予电刺激,另外1对用于记录眼轮匝肌的肌电活动,同时将电极上的地线与螺丝钉链接(图1A)。最后用牙科水泥固定螺丝钉和电极。恢复1周后,对全身和眨眼状况恢复良好的大鼠进行眨眼条件反射训练。

1.4　眨眼条件反射训练

参考本实验室前期的方法[8,11-13]。将大鼠置于长方体塑料盒(35 cm×25 cm×20 cm)内并放置在隔光、隔音的屏蔽柜内进行眨眼条件反射训练。2 d的适应期大鼠只给予100次的CS,CS参数与配对训练相同。眨眼条件反射配对训练在适应期结束后1 d开始,每天100次,连续训练10 d。6组大鼠都采用延迟性眨眼条件反射模式训练。CS为持续500 ms的500 nW/mm^2(强CS,低难度学习任务)或0.5 nW/mm^2(弱CS,高难度学习任务)的470 nm蓝光,由3 W的470 nm LED给予,通过电流控制光强,US是一个50 ms的眶周电刺激(100 Hz,1 ms脉宽,2~3 mA),由电刺激器和隔离器给予(Master-9, ISO-Flex, A.M.P.I, Isroel)。每天配对训练包括10组,每组由9次CS和



A:实验设计示意图;B:眨眼条件反射检测　CS:条件刺激;US:非条件电刺激;EMG:肌电活动;上:眨眼条件反射训练中CS和US时间关系;中:大鼠学会眨眼反射前眼轮匝肌;EMG;下:大鼠学会眨眼反射后眼轮匝肌EMG

图1　实验设计和眨眼记录

US 配对和 1 次单独 CS 组成。CS 与 US 配对呈现时,CS 和 US 同时结束,每次配对训练间隔时间为 20 ~ 40 s(图 1B)。

1.5 数据分析

大鼠左侧眼轮匝肌的肌电活动通过 16 通道差分放大器差分后(0.1 ~3 kHz)采用生理记录系统记录,采样频率为 10 kHz。数字信号存储于电脑中,并使用自编的程序处理分析眨眼行为数据。显著的眨眼活动满足以下标准:上眼睑肌电活动值≥基线值平均值加 4 倍标准差,并持续时间超过 5 ms。眨眼条件反应(eyeblink conditioned response,CR)定义为 CS 结束后 100 ms 至 US 开始前这一时间段内发生了显著眨眼活动。眨眼反应参数定义如下:CR 峰幅度为 CR 最大值与基线值之间的幅度间隔。学会标准是连续 10 次训练中至少有 8 次训练中有 CR。基线期定义为 CS 开始前 1 ~300 ms 这一阶段。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 18.0 统计软件中重复测量双因素方差分析和拆分重复测量单因素方差分析进行统计学处理,多重比较采用 Tukey 法,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同运动负荷对老年大鼠运动性学习速度的影响

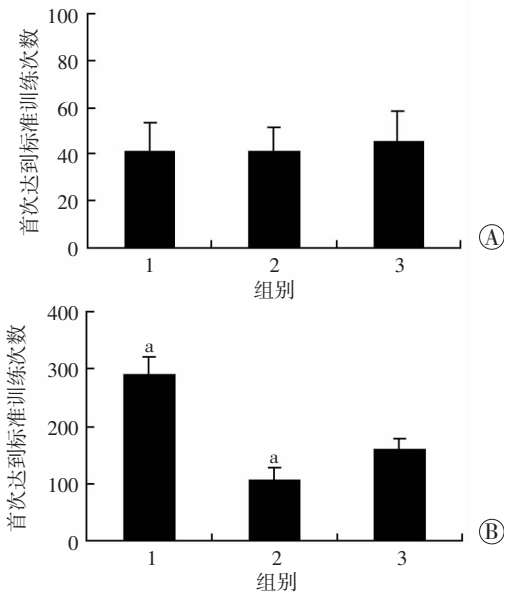
3 组老年大鼠都能很快学会强 CS 下的延迟性眨眼条件反射(低难度学习任务),其学习速度差异无统计学意义($P > 0.05$,图 2A)。虽然 3 组老年大鼠都能学会弱 CS 下的延迟性眨眼条件反射(高难度学习任务),但是与对照组比较,高负荷运动组大鼠的学习速度显著降低($P < 0.01$,图 2B),而中负荷运动组大鼠的学习速度明显上升($P < 0.01$,图 2B)。

2.2 不同运动负荷对老年大鼠 CR 习得率的影响

6 组老年大鼠经过 10 d 的配对训练,强 CS 条件下的 CR 习得率随着训练天数的增加而迅速增加,并且很快达到并保持在一个稳定的水平,弱 CS 条件下的 CR 习得率也随着训练天数的增加而上升,最后达到并保持在一个稳定的水平,表明 6 组老年大鼠均能成功习得眨眼条件反射。在强 CS 条件下,3 组老年大鼠的 CR 习得率差异无统计学意义($P > 0.05$,图 3A)。在弱 CS 条件下,在配对训练的第 1 ~6 天,高负荷运动组大鼠的 CR 习得率均显著低于对照组大鼠($P < 0.05$,图 3B);在配对训练的第 1 天和第 2 天,中负荷运动组大鼠的 CR 习得率显著高于对照组大鼠($P < 0.05$,图 3B)。

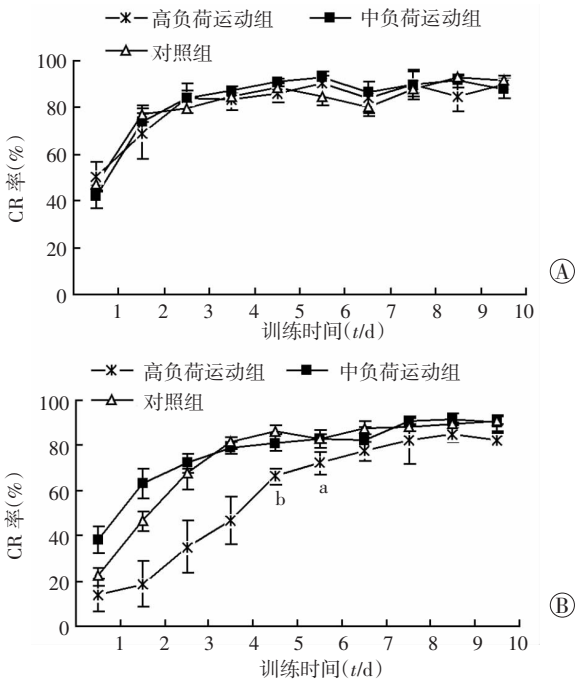
2.3 不同运动负荷对老年大鼠 CR 峰幅度的影响

6 组老年大鼠经过 10 d 的配对训练,CR 峰幅度都有增加。在强 CS 条件下,3 组老年大鼠的 CR 峰幅度差异无统计学意义($P > 0.05$,图 4A)。在弱 CS 条件下,在配对训练的第 2 天和第 3 天,高负荷运动组大鼠的 CR 峰幅度均显著低于对照组大鼠($P < 0.05$,图 4B);在配对训练的第 2 ~10 天,中负荷运动组大鼠的 CR 峰幅度均显著高于对照组大鼠($P < 0.05$,图 4B)。



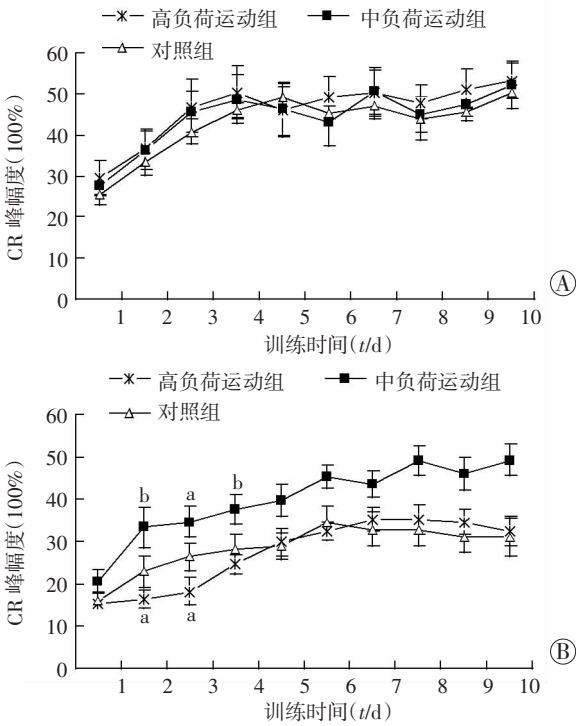
1:高负荷运动组;2:中负荷运动组;3:对照组 A:强 CS(低难度学习任务);B:弱 CS(高难度学习任务) a:$P < 0.01$,与对照组比较

图 2 不同运动负荷对老年大鼠运动性学习速度的影响



A:强 CS(低难度学习任务);B:弱 CS(高难度学习任务) a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与对照组比较

图 3 不同运动负荷对老年大鼠 CR 习得率的影响



A:强 CS(低难度学习任务);B:弱 CS(高难度学习任务)
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 4 不同运动负荷对老年大鼠 CR 峰幅度的影响

3 讨论

自从 Botwinick 与 Thompson 在 1968 年首先提出长期的适量运动能够明显改善脑老化引起的学习记忆功能减退以来,关于运动改善脑老化导致的学习记忆功能衰退的研究逐渐受到大家的重视。以前大量的工作采用八臂迷宫、水迷宫、高架桥等模型探讨运动如何改善脑老化对动物空间记忆的影响[14-16],但是关于不同运动负荷对脑老化导致的运动性学习记忆能力减退的影响,特别是对习得不同难度运动性学习任务的研究甚少。

本研究采用运动性学习记忆的常用模型——眨眼条件反射模型研究不同负荷运动对老年大鼠学习不同难度运动性学习任务的影响。结果显示与对照组老年大鼠比较,中负荷运动组的老年大鼠能较快的习得较难的眨眼条件反射(弱 CS),而且其眨眼幅度也更大。但是与中负荷运动的效应相反,与对照组老年大鼠比较,高负荷运动组的老年大鼠虽然也能成功习得较难的眨眼条件反应,但是其学习的速度较慢,眨眼幅度早期也较小。本结果还显示,高负荷运动和中负荷运动对老年大鼠低难度运动学习的能力没有显著影响。

本研究结果表明长期中负荷的运动训练可以提高老年大鼠高难度运动学习的能力。这可能是因为长期中负荷的运动能促进神经元和突触活动以及神经元释放的各种神经营养因子[17],从而提高老年大鼠的运动性学习记忆能力。有研究发现,长期的主动中负荷运动能提高老年大鼠海马内的内源性神经营养因子释放量,从而提高老年大鼠的学习记忆能力[18]。此外,本研究采用的弱 CS 条件下运动性学习记忆模型所涉及的神经环路与前额叶皮层、海马等前脑结构密切相关,而强 CS 条件下运动性学习记忆模型的神经环路并不涉及到前额叶皮层、海马等前脑结构[5-6,12]。研究表明[19],经过长期的中等负荷游泳训练能使老年大鼠的海马、前额叶皮层、纹状体和伏隔核的多巴胺代谢加强,增强老年大鼠学习记忆能力。因此,中负荷的运动训练对老年大鼠前额叶皮层、海马等前脑结构的积极影响可能是其促进老年大鼠习得高难度运动性学习任务的原因之一。此外,长期的中等负荷还能抑制大鼠海马细胞的凋亡,提高海马突触可塑性,进而促进学习记忆过程中的短时程增强和长时程增强发生,提高老年大鼠的运动性学习记忆能力。关于健康的老年人的研究[20]也表明,经过每天 1 次,每次 30 min,12 周的慢跑强化训练后,老年人的学习记忆能力比训练前也有显著提高。因此,长期中负荷的运动不仅对空间学习记忆有促进作用,对习得高难度的运动性学习任务也有显著的促进作用。

本研究结果还表明长期高负荷的运动锻炼能降低老年大鼠高难度运动学习的能力。研究提示高负荷运动训练能使老年大鼠极度疲劳,导致神经递质释放紊乱,动物处于应激状态,影响老年大鼠的学习记忆能力[21]。长期高负荷的运动训练还能导致脑组织诱导型一氧化氮合酶活性升高,产生大量的一氧化氮进而影响了老年大鼠的学习记忆能力[22]。形态学研究也表明经过 6 周高负荷的游泳运动后,老年大鼠的海马神经元形态和排列以及神经元的超微结构均发生了明显的变化,具体表现在神经元整体形态呈不规则的改变,排列紊乱,与周围细胞的联络减少,部分细胞核与细胞质发生固缩,细胞核内陷、偏位,染色质聚集,轴索发生空泡,线粒体肿胀等。因此,高负荷的运动训练对老年大鼠海马等前脑结构的不良影响,可能是其阻碍老年大鼠习得高难度的运动性学习任务的重要原因之一。

综上所述,长期中负荷的运动可以提高老年大鼠高难度运动学习的能力;相反,长期高负荷运动会对老年大鼠高难度运动学习的能力产生消极作用。但是两种负荷运动对老年大鼠低难度运动性学习的能力均不产生显著影响。

参考文献:

[1] Galeano P, Blanco E, Logica-Tornatore T M, *et al*. Life-long environmental enrichment counteracts spatial learning, reference and working memory deficits in middle-aged rats subjected to perinatal asphyxia[J]. Front Behav Neurosci, 2015, 8:406. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00406

[2] Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, *et al*. n-3 fatty acids effectively improve the reference memory-related learning ability associated with increased brain docosahexaenoic acid-derived docosanoids in aged rats[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1851(2): 203 – 209. DOI: 10.1016/j.bbalip.2014.10.009

[3] Anderson B J, Rapp D N, Baek D H, *et al*. Exercise influences spatial learning in the radial arm maze[J]. Physiol Behav, 2000, 70(5): 425 – 429.

[4] Wang S, Chen L, Zhang L, *et al*. Effects of long-term exercise on spatial learning, memory ability, and cortical capillaries in aged rats[J]. Med Sci Monit, 2015, 21: 945 – 954. DOI: 10.12659/MSM.893935

[5] Wu G Y, Yao J, Zhang L Q, *et al*. Reevaluating the role of the medial prefrontal cortex in delay eyeblink conditioning[J]. Neurobiol Learn Mem, 2012, 97(3): 277 – 288. DOI: 10.1016/j.nlm.2012.02.001

[6] Wu G Y, Yao J, Hu B, *et al*. Reevaluating the role of the hippocampus in delay eyeblink conditioning[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71249. DOI: 10.1371/journal.pone.0071249

[7] Weiss C, Disterhoft J F. Eyeblink Conditioning and Novel Object Recognition in the Rabbit: Behavioral Paradigms for Assaying Psychiatric Diseases[J]. Front Psychiatry, 2015, 6: 142. DOI: 10.3389/fpsyt.2015.00142

[8] 杨艺, 赵传东, 李轩, 等. 老年小鼠与青年小鼠眨眼条件反射双任务模型中行为学参数的比较[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(18): 1826 – 1830. DOI: 10.16016/ j.1000-5404.2012.18.012

[9] 薛钰奇, 章利彬, 杨彦新, 等. 豚鼠延迟性和痕迹性眨眼条件反射消退的行为学特征[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(4): 310 – 310. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201409080

[10] Bedford T G, Tipton C M. Exercise training and the arterial baroreflex[J]. J Appl Physiol (1985), 1987, 63(5): 1926 – 1932.

[11] Wu G Y, Liu G L, Zhang H M, *et al*. Optogenetic stimulation of mPFC pyramidal neurons as a conditioned stimulus supports associative learning in rats[J]. Sci Rep, 2015, 5: 10065. DOI: 10.1038/srep10065

[12] 王晓, 吴广延, 吴冰, 等. CS-US 非配对刺激易化豚鼠经典瞬目条件反射的建立[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(19): 1960 – 1965. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201504137

[13] 李轩, 范郑丽, 范蕊, 等. 豚鼠双任务眨眼条件反射中的听觉惊吓反射特征参数及其对眨眼条件反射的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(20): 2103 – 2106. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.20.004

[14] Wang X Q, Wang G W. Effects of treadmill exercise intensity on spatial working memory and long-term memory in rats[J]. Life Sci, 2016, 149: 96 – 103. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.02.070

[15] Ji E S, Kim Y M, Shin M S, *et al*. Treadmill exercise enhances spatial learning ability through suppressing hippocampal apoptosis in Huntington's disease rats[J]. J Exerc Rehabil, 2015, 11(3): 133 – 139. DOI: 10.12965/jer.150212

[16] Motta-Teixeira L C, Takada S H, Machado-Nils A V, *et al*. Spatial learning and neurogenesis: Effects of cessation of wheel running and survival of novel neurons by engagement in cognitive tasks[J]. Hippocampus, 2016, 26(6): 794 – 803. DOI: 10.1002/hipo.22560

[17] 孙竹梅, 赵雅宁, 李建民, 等. 不同强度运动对脑缺血再灌注大鼠学习能力及氧自由基代谢的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2015, 21(1): 26 – 30. DOI:10.3969/j.issn.1006-9771.2015.01.007

[18] Yin M M, Wang W, Sun J, *et al*. Paternal treadmill exercise enhances spatial learning and memory related to hippocampus among male offspring[J]. Behav Brain Res, 2013, 253: 297 – 304. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.07.040

[19] Hamilton G F, Jablonski S A, Schiffino F L, *et al*. Exercise and environment as an intervention for neonatal alcohol effects on hippocampal adult neurogenesis and learning[J]. Neuroscience, 2014, 265: 274 – 290. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.01.061

[20] Fujie S, Hasegawa N, Sato K, *et al*. Aerobic exercise training-induced changes in serum adropin level are associated with reduced arterial stiffness in middle-aged and older adults[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 309(10): H1642-H1647. DOI: 10.1152/ajpheart.00338.2015

[21] Jung S, Ahn N, Kim S, *et al*. The effect of ladder-climbing exercise on atrophy/hypertrophy-related myokine expression in middle-aged male Wistar rats[J]. J Physiol Sci, 2015, 65(6): 515 – 521. DOI:10.1007/s12576-015-0388-1

[22] Hamilton G F, Rhodes J S. Exercise regulation of cognitive function and neuroplasticity in the healthy and diseased brain[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015, 135: 381 – 406. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2015.07.004

(**收稿**:2016-03-02;**修回**:2016-03-23)

(编辑 汪勤俭)