DOI:10.16016/j.2097-0927.202307080

跑台训练对急性高原低氧暴露大鼠海马髓鞘再生及认知功能的影响

张 庆[1],刘 媛[2],罗浩东[1],苏 虹[1],钟 娟[1],杨 策[2],王海燕[2],李 森[2],殷 樱[1],谭波涛[1] 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院康复医学科[1];400042 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)大坪医院特殊环境战伤防治研究室,创伤与化学中毒全国重点实验室[2]

[**摘要**] **目的** 探讨跑台训练对急性高原低氧暴露大鼠海马髓鞘结构及认知功能的影响。**方法** SPF级6~8周龄雌性SD大鼠30只(体质量200~220 g),6只用于损伤后髓鞘形态观察;其余24只随机分为(n=8):对照组、低压缺氧组和跑台训练组。实验组放入海拔6 000 m的低压氧舱内,连续7 d。对照组动物放入密闭舱室内相同时间而不进行缺氧处理。跑台训练组于造模结束后第2天开始4周的跑台训练。训练结束后对各组大鼠进行旷场和Morris水迷宫实验检测观察大鼠认知功能变化;透射电镜(transmission electron microscopy,TEM)观察海马脱髓鞘改变;免疫荧光染色及Western blot检测海马CA1和CA3区少突胶质细胞转录因子2(oligodendrocyte transcription factor 2,Olig2)、髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein,MBP)的表达情况。**结果** 行为学检测结果显示:低压缺氧组进入旷场中心区域次数、总路程和路程比及Morris水迷宫穿越平台次数和目标区域路程较对照组减少(P<0.05),而跑台训练组较低压缺氧组有所增加(P<0.05)。免疫荧光染色显示:低压缺氧组海马CA1和CA3区单位面积内Olig2阳性细胞数量及MBP的平均荧光强度较对照组明显减少(P<0.05),而跑台训练组较低压缺氧组有所增加(P<0.05)。Western Blot结果显示:低压缺氧组海马Olig2和MBP蛋白表达水平较对照组显著降低(P<0.01),而跑台训练组较低压缺氧组有所增加(P<0.01)。**结论** 跑台训练能够促进急性高原低氧暴露大鼠CA1和CA3区少突胶质谱系细胞数量和髓鞘相关蛋白的表达增加,并促进海马髓鞘结构修复,从而改善缺氧导致的焦虑样行为及记忆功能障碍。

[**关键词**] 低压缺氧;跑台训练;髓鞘再生;认知功能

[**中图法分类号**] R322.81; R339.4; R339.54 [**文献标志码**] A

Effects of treadmill training on remyelination in hippocampus and cognitive function in rats exposed to acute plateau hypoxia

ZHANG Qing[1], LIU Yuan[2], LUO Haodong[1], SU Hong[1], ZHONG Juan[1], YANG Ce[2], WANG Haiyan[2], LI Sen[2], YIN Ying[1], TAN Botao[1] [1]Department of Rehabilitation Medicine, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, Department of Special War Wound, Daping Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of treadmill training on the structure of hippocampal myelin and cognitive function in rats exposed to acute plateau hypoxia. **Methods** With 30 SPF-grade female SD rats (aged 6-8 weeks, weighing 200-220 g), 6 of them were used for observation of myelin structure after injury, and the remaining 24 rats were randomly divided into control group, hypobaric hypoxia group and treadmill training group (n=8). The rats in above experimental groups were placed in a low-pressure oxygen

[**基金项目**] 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放课题(SKLKF20.2112);国家自然科学基金青年科学基金(82002377)

[**通信作者**] 谭波涛,E-mail:303518@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

chamber at an altitude of 6 000 m for 7 consecutive days, and the rats of the control group were placed in the confined chamber for the same period without hypoxia. Then, the rats of the treadmill training group received a 4-week treadmill training scheme since the day after hypoxia. Finally, all the rats were tested for cognitive function with open field test (OFT) and Morris water maze (MWM). Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the changes of demyelination in the hippocampus. The expression of oligodendrocyte transcription factor 2 (Olig2) and myelin basic protein (MBP) in the hippocampal CA1 and CA3 regions was measured by immunofluorescence staining and Western blotting. **Results** Behavioral tests showed that the number into the central area, total distance, distance ratio in OFT and the number of platform crossings and distance to the target area in MWM were reduced in the hypobaric hypoxia group than the control group ($P<0.05$), while these indexes were increased in the treadmill training group than in the hypobaric hypoxia group ($P<0.05$). Immunofluorescence staining indicated that the number of Olig2 positive cells per unit area and the mean fluorescence intensity of MBP in the CA1 and CA3 regions were significantly lessen in the hypobaric hypoxia group than the control group ($P<0.05$), while these indicators were higher in the treadmill training group than the hypobaric hypoxia group ($P<0.05$). Western blotting displayed that the expression levels of Olig2 and MBP in the hippocampus were obviously lower in the hypobaric hypoxia group than the control group ($P<0.01$), while the levels were increased in the treadmill training group than the hypobaric hypoxia group ($P<0.01$). **Conclusion** Treadmill training promotes the number of the oligodendrocyte spectrum cells in CA1 and CA3 regions, enhances the expression of myelin-related proteins and improves myelin repair in hippocampus of hypobaric hypoxia rats, and thereby ameliorates hypoxia-induced anxiety-like behaviors and memory dysfunction.

[**Key words**] hypobaric hypoxia; treadmill training; myelin regeneration; cognitive function

Supported by the Open Project of State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injuries (SKLKF20.2112) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82002377). Corresponding author: TAN Botao, E-mail: 303518@cqmu.edu.cn

高原环境暴露是影响直升机飞行人员作业效能的重要因素,缺氧是高原环境的主要特点。研究表明,急性或长期慢性暴露在缺氧环境下会引发机体生理和心理参数的改变,其中学习记忆能力、反应速度和任务执行能力下降尤为显著,且症状随海拔高度的增加而加剧[1-2]。脑是机体耗氧量最多的器官之一,其中海马组织对缺氧高度敏感[3],急性高原缺氧暴露后不仅出现神经元细胞的凋亡,还出现显著的白质疏松症,表现为少突胶质细胞死亡和严重的脱髓鞘病变[4]。因此,再髓鞘化是修复缺氧损伤后脑白质结构的基础,并对机体认知功能的恢复和直升机飞行员军事作战能力的提升起着重要作用。

少突胶质前体细胞(oligodendrocytes precursor cells,OPCs)在整个生命周期中均匀分布,部分 OPCs 亚群分化为成熟少突胶质细胞(oligodendrocytes,OLs)包裹髓鞘,部分形成反应性多功能细胞群以代偿机体疾病损伤而实现自发修复[5]。但自发髓鞘再生是有限的,大量受损的髓鞘无法向轴突提供代谢支持从而引发轴突和神经变性[6],进而导致长期运动和认知缺陷。尽管氯马斯汀、孟鲁司特等[7-8]药物被证明具有促进髓鞘更新的作用,但为避免带药飞行等情况,科学的康复治疗手段仍受到广泛关注。生理和病理条件下,运动训练都会对机体产生有益影响。研究表明,自愿跑步运动以皮层依赖的方式促进正常小鼠 OPCs 增殖和分化并提高基线认知水平[9];采取运动干预(跑台、转轮等)能够促进脱髓鞘模型动物[10-12](多发性硬化、饲铜、慢性脑灌注不足)髓鞘碎片的清除和再髓鞘化进而实现功能改善。然而,既往研究主要基于多发性硬化和脊髓损伤等常见病变观察髓鞘变化,运动对特殊环境急性缺氧暴露后少突胶质谱系细胞变化及髓鞘化的影响尚不清楚。因此,本研究以促进高原环境急性暴露后海马髓鞘再生为切入点,探讨跑台训练对成年大鼠缺氧损伤后髓鞘再生及认知功能改善的影响,旨在维护直升机飞行人员大脑认知能力,保障飞行安全,提升飞行效能。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

30 只 6~8 周龄雌性 SPF 级 SD 大鼠,体质量 200~

220 g,由陆军军医大学大坪医院实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(渝)20170002]。饲养于12 h/12 h昼夜交替、湿度40%~60%、室温25 ℃的通风环境中,给予自由饮食。其中6只大鼠按随机数字表法平均分为对照组和低压缺氧组(n=3)用于验证缺氧模型;余24只大鼠按随机数字表法平均分为3组:对照组、低压缺氧组、跑台训练组(n=8)。模型验证大鼠于伤后2周取材,其余大鼠于伤后5周取材。随机实验按照重庆医科大学动物伦理委员会相关规定进行。

1.2 急性高原暴露缺氧模型制备

将实验组大鼠每天8:00~11:00放入低压氧舱内(塔望科技:mProOx-810L),15 min内海拔升至6 000 m,允许自由进食,造模结束后15 min内恢复至常压环境,第2天再进行升压操作。连续造模7 d,其余时间正常饲养。对照组动物放入密闭舱室内相同时间而不进行缺氧处理。造模期间,实时监测大鼠动态并记录舱内压力及CO_2浓度。

1.3 跑台训练方案

实验前对大鼠进行3 d适应性训练,速度为2 m/min持续5 min,5 m/min持续5 min,8 m/min持续20 min。造模后第1天即开始正式训练,9 m/min热身5 min,跑台组对应一级速度为18 m/s[13-14],坡度为0°;30 min/d,5 d/周,训练4周。低压缺氧组则放在静止的跑台中30 min。

1.4 灌注、取材

1%戊巴比妥麻醉大鼠后,打开腹腔经心脏处依次灌入0.01 mol/L的磷酸盐缓冲液(PBS,C0103,博奥森,北京)和4%多聚甲醛(PFA,科隆,成都),完整取下大鼠脑组织。用于Western blot检测的样本则经PBS灌注后于冰板上快速剥离双侧海马组织。

1.5 冰冻切片

每组各取3只大鼠用作免疫荧光检测,灌注取下的脑组织浸泡在4%PFA溶液中4 ℃固定48 h,然后在18%、24%、30%的蔗糖溶液中梯度脱水2、2、4 d,使用O.C.T.组织包埋剂(4583,SaKuRa,美国)包埋,沿着大脑冠状面对海马组织进行18 μm冰冻切片(Cryo Star NX50,赛默飞,中国)。

1.6 透射电镜(transmission electron microscopy,TEM)

按上述步骤,将依次灌注PBS和PFA后的大鼠海马组织放入2.5%戊二醛溶液(G916055,麦克林,上海)中保存,脱水、包埋、切片。放大15 000倍拍摄海马区。

1.7 免疫荧光染色

冰冻切片室温复温10 min,0.01 mol/L PBS浸洗3次,每次8 min;0.3%Triton(T8787,Sigma,美国)通透20 min;0.01 mol/L PBS浸洗3次,每次8 min;使用免疫荧光封闭液(P0260,碧云天,上海)室温封闭30 min;加入一抗后4 ℃冰箱湿盒孵育过夜,一抗分别为:兔来源抗少突胶质细胞转录因子2(oligodendrocyte transcription factor 2,Olig2)抗体(1∶200;ab254043,abcam,英国),豚鼠来源抗神经元特异性核蛋白(NeuN)抗体(1∶800;ABN90,Millipore,美国),兔来源抗髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein,MBP)抗体(1∶200;78896S,CST,美国),小鼠来源抗β微管蛋白Ⅲ(β-tubulin Ⅲ)抗体(1∶800;T8578,Sigma,美国);24 h后放入37 ℃孵箱复温45 min,0.01 mol/L PBS浸洗3次,每次8 min;加入Alex Fluor-488和Alex Fluor-594标记的驴来源抗豚鼠、小鼠和兔的荧光二抗(1∶400,Jackson Laboratories,美国)后37 ℃避光孵育35 min;0.01 mol/L PBS浸洗3次,每次8 min;DAPI(0.5 μg/mL;Sigma,美国)复染3 min;0.01 mol/L PBS浸洗3次,每次8 min;晾干封片;然后在激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP8 SR)下观察染色情况,使用Image J对图像进行细胞计数和平均荧光强度分析。

1.8 Western blot检测

每组各取5只大鼠用作Western blot检测,取下的海马组织称量后加入含磷酸酶、蛋白酶抑制剂的裂解液,每1 g组织需加入含磷酸酶、蛋白酶抑制剂的裂解液10 mL。将组织块剪碎,超声粉碎5 min,12 000×g离心20 min后取上清,BCA法检测蛋白浓度后加入Loading buffer煮沸10 min分装,-80 ℃保存。

取40 μg蛋白样品进行SDS-PAGE凝胶电泳,采用PVDF膜湿转,5%脱脂奶粉摇床封闭90 min。4 ℃摇床一抗孵育过夜:兔抗Olig2(1∶2 000)、兔抗MBP(1∶1 000)、小鼠抗β-actin(1∶2 000;3700S,CST,美国),次日TBST摇床清洗3次,每次8 min;二抗驴抗兔(1∶2 000,Jackson Laboratories,美国)、驴抗小鼠(1∶3 000,Jackson Laboratories,美国)室温孵育1 h,TBST摇床清洗3次后ECL化学发光法显影,蛋白成像仪(Tanon,4600SF)扫描并成像。使用Image J对灰度值进行定量分析,以目的蛋白与内参蛋白(β-actin)灰度值比值作为目标蛋白的表达水平。

1.9 行为学检测

1.9.1 旷场实验(open field test,OFT)

4周跑台训练结束后,进行旷场实验检测每组8只大鼠的情绪

状态。大鼠于安静环境下在 100 cm×100 cm 的开阔空间自由活动 5 min,中心四格区域划分为中心区域,其余为周围区域。记录大鼠进入中央心域的次数,总路程和中央路程与周围路程比值。

1.9.2 水迷宫实验(morris water maze,MWM) 旷场实验检测结束后,每组 8 只大鼠首先进行游泳预训练,各排除 3 只不适应水性大鼠,接下来每组 5 只大鼠进行 MWM 实验检测空间学习、记忆能力。该实验共持续 6 d,前 5 天大鼠进行空间定位巡航训练,第 6 天进行空间探索测试。空间定位巡航训练:随机数产生 4 个象限顺序,依次从各象限将大鼠面朝池壁放入水中,大鼠找到平台所用的时间(s)即为逃避潜伏期,90 s 为终止时间。若大鼠未成功找到平台,则用光滑木棒引导大鼠于平台处学习 15 s,逃避潜伏期则记为 90 s。空间探索测试:去掉平台,记录大鼠 120 s 内穿越平台的次数和目标区域路程。

1.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 进行数据统计分析。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 Shapiro-Wilk test 进行正态性检验。采用 Kruskal-Wallis test 非参数检验分析事后组间比较穿越平台次数。采用双因素方差分析(two-way ANOVA)和 Tukey's multiple comparisons test 事后组间比较大鼠逃避潜伏期。其余数据均采用单因素方差分析,并采用 Tukey's multiple comparisons test 进行事后组间比较。$P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 低压缺氧大鼠模型建立与验证

TEM 结果显示相比于对照组,低压缺氧组大鼠海马髓鞘变薄、分层,且中央轴索溶解、变形(图 1)。以上结果表明,本实验条件下得到低压缺氧大鼠海马脱髓鞘模型,为后续研究髓鞘再生奠定基础。

2.2 跑台训练促进低压缺氧暴露后大鼠情绪和认知功能的改善

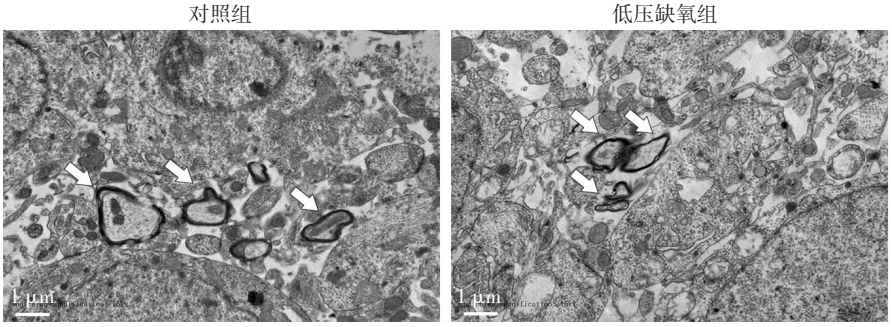
旷场实验(图 2A)结果显示:低压缺氧组进入中心区域(中央 4 方格即为中心区域)的次数、开放场地活动总路程和中心/周围路程比值较对照组减少($P<0.01$),而跑台训练组较低压缺氧组显著增加($P<0.05$,图 2B~D)。Morris 水迷宫(图 2E)结果显示:低压缺氧组潜伏期较对照组有增加的趋势,但差异无统计学意义,跑台训练组较低压缺氧组有所减小,第 1、3 天差异有统计学意义($P<0.05$),其余时间点差异无意义(图 2F)。低压缺氧组穿越平台次数和目标区域路程较对照组减少($P<0.05$),跑台训练组较低压缺氧组有所增加($P<0.05$,图 2G~H)。以上结果表明,跑台训练可以促进低压缺氧大鼠焦虑情绪和记忆功能的改善。

2.3 跑台训练促进低压缺氧暴露后海马 CA1 和 CA3 区少突胶质谱系细胞数量增加

本实验主要观察部位为海马 CA1 和 CA3 区(图 3A)。免疫荧光双标染色(图 3B、D)结果显示,低压缺氧组 CA1 和 CA3 区单位面积内少突胶质谱系细胞(Olig2 阳性)数量较对照组明显减少($P<0.05$,图 3C、E),而跑台训练组少突胶质谱系细胞(Olig2 阳性)数量较低压缺氧组有所增加($P<0.05$,图 3C、E)。以上结果表明,跑台训练促进海马 CA1 和 CA3 区少突胶质谱系细胞的数量增加。

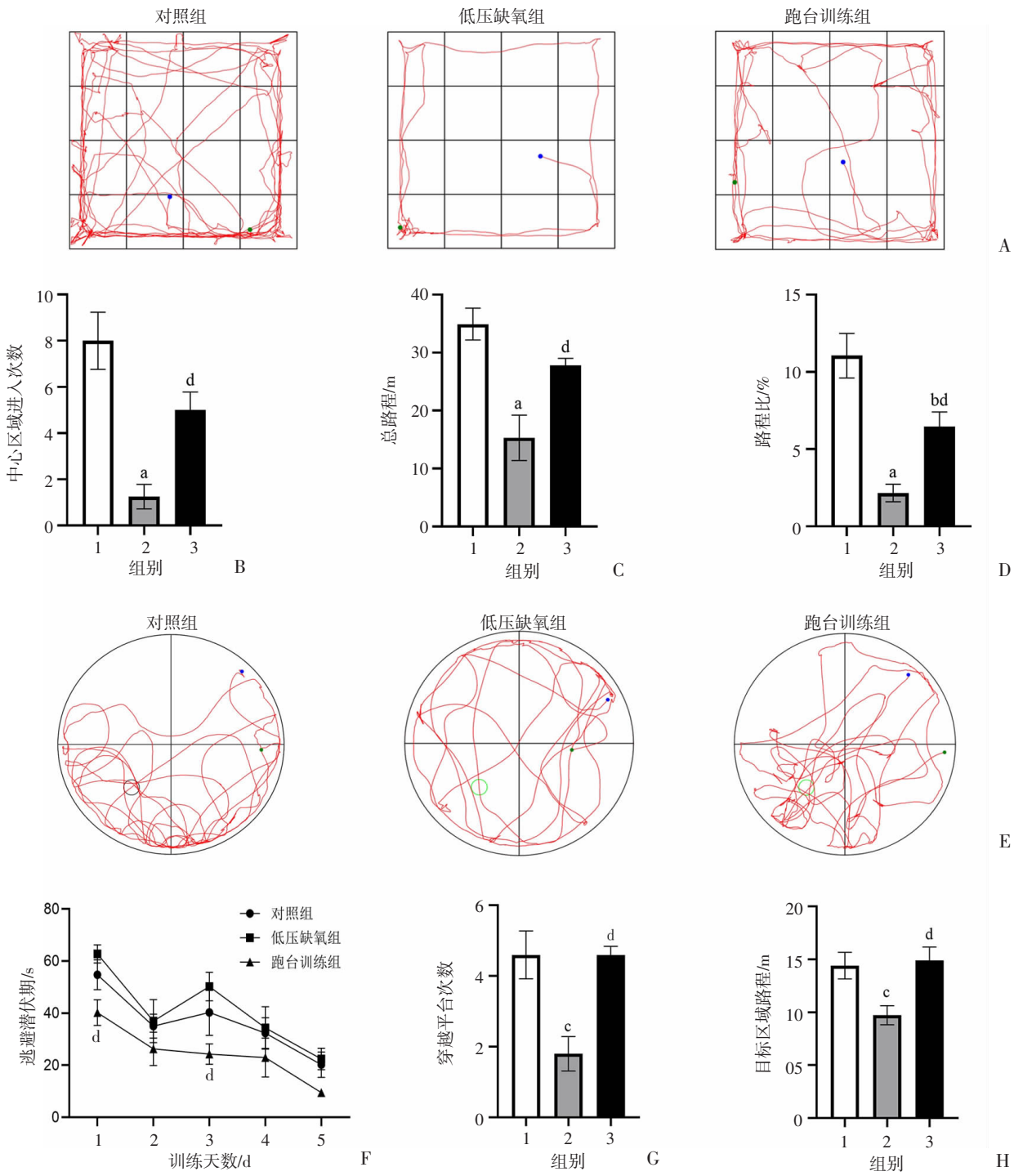
2.4 跑台训练促进低压缺氧暴露后海马 CA1 和 CA3 区髓鞘形成

免疫荧光双标染色(图 4A、C)结果显示:相比于对照组,低压缺氧组 CA1 和 CA3 区内 MBP 平均荧光强度显著下降($P<0.01$,图 4B、D),而跑台训练组 CA1 和 CA3 区内 MBP 平均荧光强度较低压缺氧组有所增加($P<0.05$,图 4B、D)。以上结果表明,跑台训练增加海马 CA1 和 CA3 区 MBP 的表达并促进髓鞘再生。



↑:示髓鞘结构

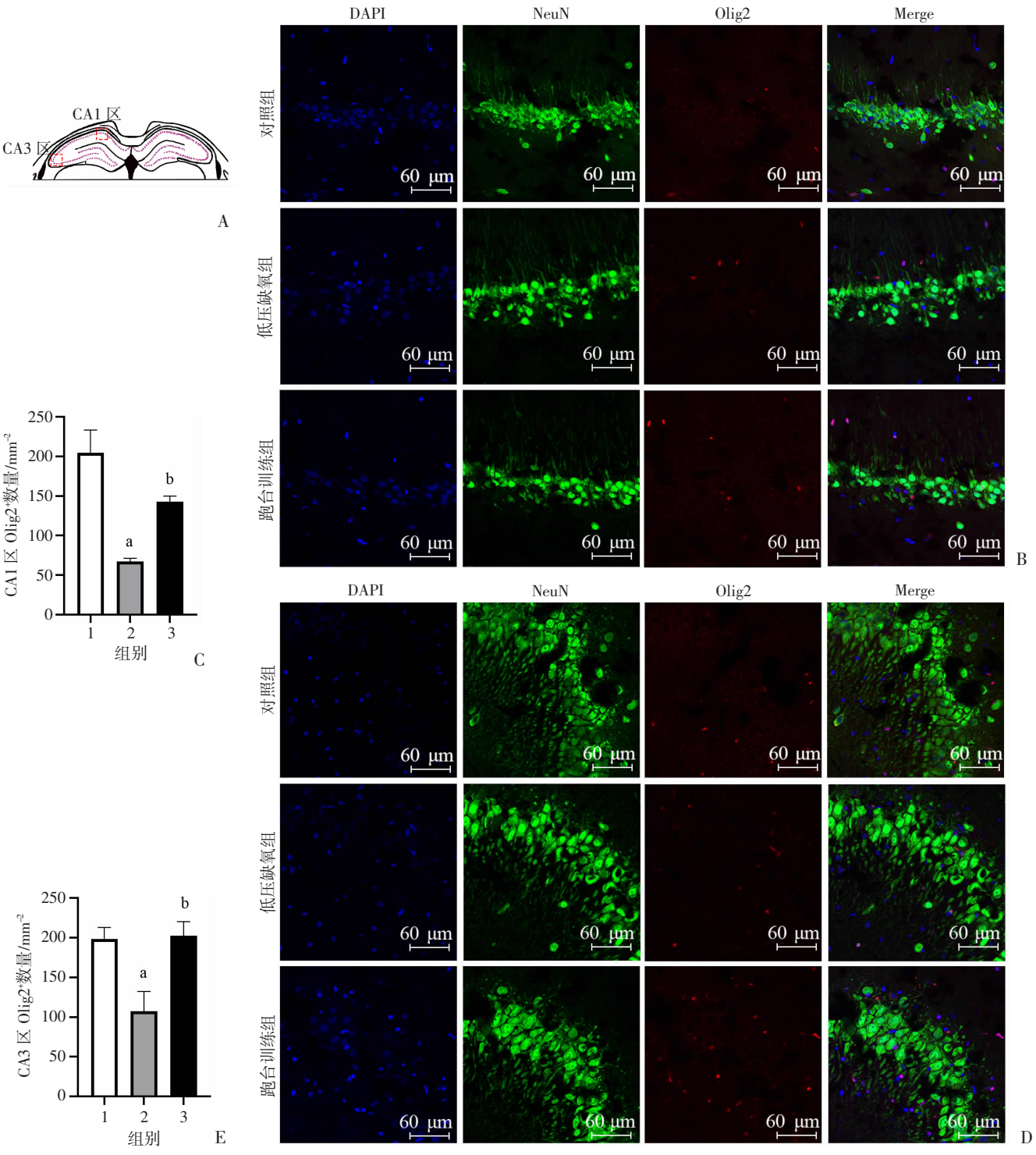
图 1 透射电镜观察大鼠高原低氧暴露后海马髓鞘变化



1:对照组, 2:低压缺氧组, 3:跑台训练组;a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,c:$P<0.05$,与对照组比较;d:$P<0.05$,与低压缺氧组比较

A:各组大鼠 5 min 旷场实验活动轨迹　蓝色:示起点,绿色:示终点,红色:示运动轨迹;B~D:各组大鼠中心区域进入次数、总路程和路程比($n=8$,$\bar{x}\pm s$);E:各组大鼠 2 min 空间探索轨迹　蓝色:示起点,绿色:示终点,红色:示运动轨迹;F~H 分别为各组大鼠逃避潜伏期、穿越平台次数和目标区域路程($n=5$,$\bar{x}\pm s$)

图 2　各组大鼠低压缺氧暴露后行为学变化情况



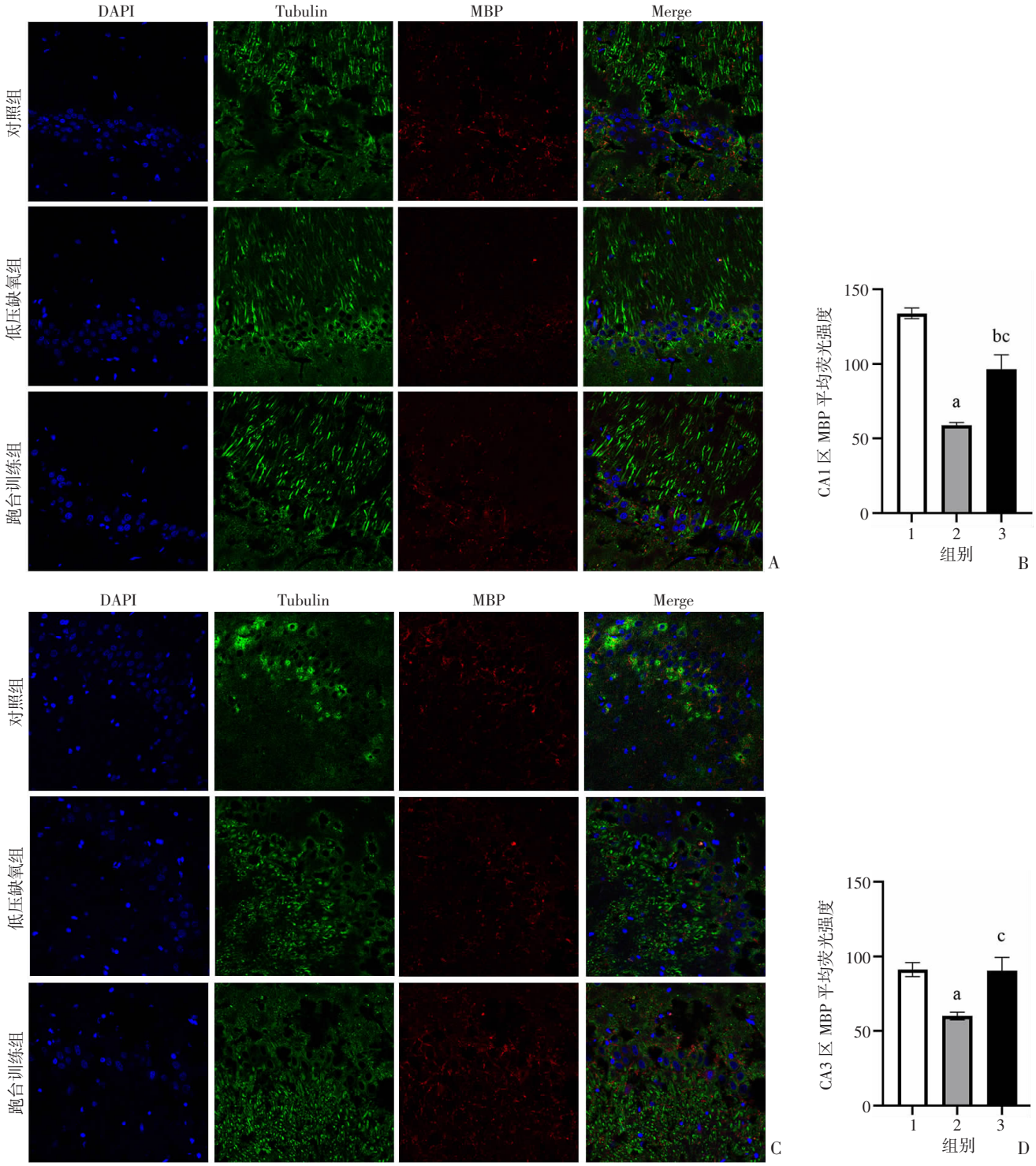
1:对照组, 2:低压缺氧组, 3:跑台训练组; a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与低压缺氧组比较

A:海马荧光染色观察区示意图　红色方框:示 CA1 和 CA3 区;B、D:免疫荧光染色观察少突胶质谱系细胞　绿色:示 NeuN(神经元),红色:示 Olig2(标记少突胶质谱系细胞),蓝色:示 DAPI;C、E:单位面积内 Olig2 阳性细胞数量

图 3　各组大鼠低压缺氧暴露后海马 CA1 和 CA3 区少突胶质谱系细胞的变化情况　($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

2.5 跑台训练促进低压缺氧暴露后海马 Olig2 和 MBP 相关蛋白表达

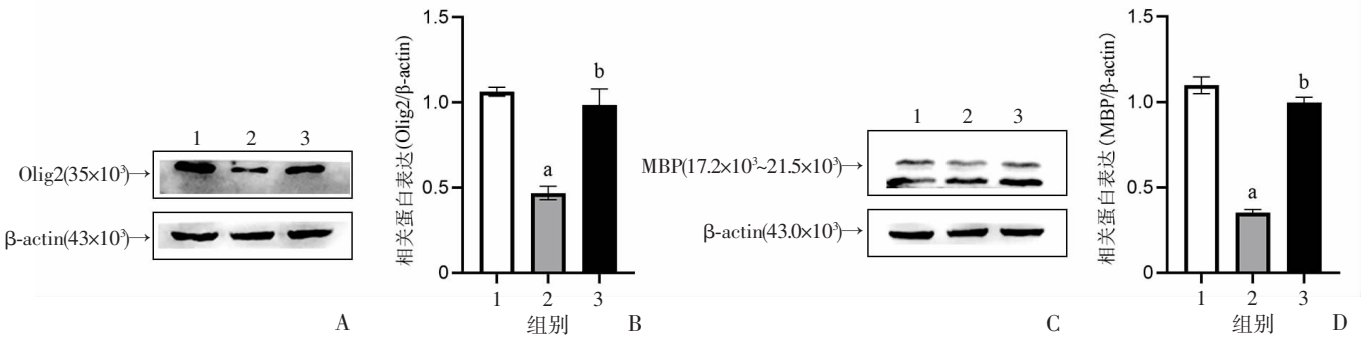
Western blot(图 5A、C)结果显示:相比于对照组,低压缺氧组 Olig2 和 MBP 表达显著下调($P<0.01$,图 5B、D);而跑台训练组较低压缺氧组表达上调($P<0.01$,图 5B、D)。以上结果表明跑台训练促进低压缺氧暴露后海马 Olig2 和 MBP 相关蛋白表达上调。



1:对照组;2:低压缺氧组;3:跑台训练组;a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较;c:$P<0.05$,与低压缺氧组比较

A、C:免疫荧光染色观察 CA1 和 CA3 区 MBP 阳性髓鞘染色情况 绿色:示 β-tubulinⅢ,红色:示 MBP,蓝色:示 DAPI;B、D:MBP 平均荧光强度统计结果

图 4 各组大鼠低压缺氧暴露后海马 CA1 和 CA3 区髓鞘变化情况 ($n=3,\bar{x}\pm s$)



1:对照组, 2:低压缺氧组, 3:跑台训练组;a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与低压缺氧组比较

A、C:海马组织 Olig2 和 MBP 蛋白表达;B、D:各组 Olig2 和 MBP 蛋白相对表达量

图 5 各组大鼠低压缺氧暴露后海马 Olig2 和 MBP 蛋白表达变化 ($n=5, \bar{x}\pm s$)

3 讨论

本研究通过模拟直升机飞行员高原环境暴露所造成的大鼠认知功能障碍,发现跑台训练对高原低氧暴露大鼠焦虑情绪和记忆功能的改善具有显著效应,同时初步揭示了促进海马 CA1 和 CA3 区少突胶质谱系细胞增加和髓鞘再生是其作用机理之一。

3.1 高原低氧暴露对机体情绪和认知功能的影响

高原地区大气压降低、氧分压下降,输送到组织的氧气减少,因此缺氧是高原暴露最主要的特点;且随着海拔升高,缺氧导致的高原应激越剧烈,严重情况下甚至会发展成致命性的急性高原病、高原肺水肿和脑水肿等。研究表明,急性暴露于海拔>3 000 m 数小时,机体出现应激反应;暴露在海拔>4 000 m 处,人的短期记忆明显下降[2],最大工作能力降低至低海拔处观察到基线能力的 50%[15]。高原低氧暴露对机体产生的影响往往是多重因素叠加,其中海拔高度和暴露时间起主要决定作用。本实验通过类比模拟直升机飞行员高原作战环境的条件,构建低压缺氧实验动物模型,并采取旷场实验和 Morris 水迷宫实验检测动物认知功能变化。本模型结合直升机巡航高度和任务执行时间,采用 6 000 m 海拔环境和连续 7 d、3 h/d 暴露时长的条件来模拟实际作战情况;此外,本研究中 Morris 水迷宫实验提示低氧暴露大鼠定位巡航能力明显下降,表明存在记忆受损,这支持了上述结果。有趣的是,旷场实验结果显示低压缺氧组大鼠进入中心区域次数和总路程均减少,这表明暴露于该急性高原低氧条件下不仅会损害记忆功能,还会导致焦虑情绪。

海马是机体情绪和认知功能的调节中心,缺氧导致的海马结构破坏被认为是情绪障碍和认知缺陷的重要病理因素之一。不同脑区受缺氧暴露的影响程度不同,既往研究发现高原暴露条件下对低氧敏感的海马 CA1 和 CA3 区不仅出现神经元凋亡,还表现为少突胶质细胞丢失和明显的脱髓鞘病变[4, 16]。暴露于 10% 低氧环境 12 h/d,连续 4 周,胼胝体和皮层中髓鞘和示踪阳性的少突胶质细胞数量显著减少[17]。此外,影像学提示美国空军(USAF)U2-飞行员(即在≥9 144 m 高空操作的军事飞行员)在接受高海拔密集训练后,仍被检测出弥漫性皮层下白质高强度信号(white matter hyperintensities, WMH)[18],并且高海拔缺氧条件产生的有害影响被认为是导致 WMH 的重要因素[19]。与上述结果一致,本研究发现高原低氧暴露后透射电镜观察到海马区髓鞘厚度变薄且轴索溶解,表明急性低氧暴露后髓鞘结构的破坏可能导致海马区功能障碍进而产生认知缺陷。

3.2 跑台训练促进高原低氧暴露后海马髓鞘修复

当前针对高原暴露的预防和治疗主要采取药物服用的方法如:红景天、乙酰唑胺、地塞米松、西地那非等[20],这些药物虽可以减轻高原反应,但长期服用会对机体产生副作用,因此跑步、游泳等外源性干预具有较大的发展潜力。运动作为一种安全有效且患者主动配合的疗法,更加贴近康复医学的理念;不少动物实验也表明运动可以促进髓鞘再生和增加髓鞘厚度:正常小鼠连续 3 周,1 h/d 的跑步锻炼增加胼胝体成熟 OLs 标志物(CC1)阳性细胞数量和 MBP 的表达,提高 G-ratio[21];在抑郁症模型中,为期 4 周的跑步训练促进海马 CA1 区髓鞘再生及 DG 区 OPCs 的增殖[22]。然而,在高原低氧环境暴露后,跑台训练对海马髓鞘再生的影响尚不清楚。本研究结果发现,4 周的跑台训练可以增加海马 CA1 和 CA3 区 Olig2 阳性细胞数量和 MBP 平均荧光强度,进一步通过 Western blot 证实,跑台训练组海马体 Olig2 和 MBP 相关蛋白表达水平升高。此外,本团队前期研究发现,在脊髓 T10 打击模型中,4 周的跑台训练可以促进背侧皮质脊髓束 OPCs

的增殖、OLs 成熟和髓鞘化[23]。目前尚不清楚跑台训练会如何影响高原低氧暴露后大鼠海马少突胶质谱系细胞的演变,因此后续实验有必要进一步探讨。

3.3 跑台训练促进髓鞘再生的机制探讨

本研究已从组织学层面证明跑台训练可以促进急性低氧暴露后髓鞘再生修复,但具体机制仍不清楚,我们主要考虑以下途径:①运动可以增加神经元发生和提高神经元活性,故研究髓鞘形成过程中少突胶质细胞与神经元间的信息交流是有趣的。GIBSON 等[24]采用光遗传学技术激活清醒状态下的小鼠运动前皮层发现其投射至胼胝体的纤维髓鞘 G-ratio 增加,且皮层增殖细胞标志物(EdU)和少突胶质前体细胞标志物(PDGFRα)双阳性细胞数量增多,表明神经元电活动促进皮层下髓鞘增厚和 OPCs 的增殖。这一实验在体内揭示了神经元激活与髓鞘形成的直接联系。本团队前期研究中也观察到类似的结果,使用化学遗传技术 hM3Dq 联合氯氮平激活 M1 皮层神经元电活动促进脊髓损伤后背侧皮质脊髓束的髓鞘修复[25]。突触和细胞间离子通道被认为是桥接 OLs 和神经轴突的重要结构。BERGLES[26]和 GAUTIER 等[27]发现了哺乳动物海马体和小脑神经元与 OPCs 之间形成的功能性谷氨酸能突触。此外,KAPELL 等[28]发现在实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)中,炎症性脱髓鞘导致神经元钾离子通道 Kv7 表达上调和少突胶质细胞钾离子通道 Kir4.1 表达下调,而采用抗癫痫药(Kv7 离子通道开放剂)干预则降低了人和小鼠皮层神经元的过度兴奋性并改善了临床 EAE 体征,且对少突胶质细胞 Kir4.1 缺陷的 EAE 小鼠轴突和郎飞结具有保护作用。由此可见,跑台运动可能通过神经元和少突胶质细胞间的信号传导而促进髓鞘再生。②跑台运动可以下调前额叶皮层中糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β ,GSK3β)的表达[29]。近来有研究表明,在双环己酮草酰二腙(Cuprizone,CPZ)诱导的急性脱髓鞘模型中,采用转基因小鼠耗竭成熟 OLs 的 GSK3β 增加了成熟 OLs 的存活率并减少髓鞘丢失[30];此外,已有研究证明脑室给药 GSK3β 抑制剂足以刺激发育中大脑 OLs 的存活和髓鞘形成及脱髓鞘病变后成年脑 OPCs 的增殖分化[31],表明 GSK3β 是髓鞘发育的调控因子并可能在脱髓鞘疾病中发挥关键作用。故而我们推测跑台训练可能通过负调节 GSK3β 水平来实现高原低氧暴露后海马再髓鞘化。

3.4 研究不足与展望

我们注意到,在 Morris 水迷宫空间学习阶段,由于单个动物对水性的适应程度不同,这可能会直接影响学习结果,后续应通过增大样本量或选用其他行为学实验对大鼠学习能力进行检测来完善。情绪和学习记忆的调控机制尤为复杂,本研究仅从跑台训练影响髓鞘再生的角度初步探讨了保护机制,其对高原低氧暴露后神经再生、树突棘和突触重塑等方面的影响还不清楚。此外,造模期间实验动物完全暴露于高原低氧环境中,但目前我们仅对大脑海马的影响进行探讨,涉及血管、心功能和呼吸系统的变化仍值得进一步研究。

综上所述,跑台训练可以增加急性高原环境暴露大鼠海马少突胶质谱系细胞的数量和髓鞘碱性蛋白的表达,继而促进神经髓鞘的修复并改善焦虑情绪和记忆功能障碍,未来需深入研究跑台训练促进急性低氧暴露后髓鞘再生的分子机制,为直升机飞行员克服高原环境障碍、提高作战能力提供新的指导思路。

参考文献:

[1] RIMOLDI S F, REXHAJ E, DUPLAIN H, *et al*. Acute and chronic altitude-induced cognitive dysfunction in children and adolescents[J]. J Pediatr, 2016, 169: 238-243. DOI: 10.1016/j.jpeds.2015.10.009.

[2] DAVRANCHE K, CASINI L, ARNAL P J, *et al*. Cognitive functions and cerebral oxygenation changes during acute and prolonged hypoxic exposure[J]. Physiol Behav, 2016, 164(Pt A): 189-197. DOI: 10.1016/j.physbeh.2016.06.001.

[3] BAILEY D M. Oxygen and brain death; back from the brink[J]. Exp Physiol, 2019, 104(12): 1769-1779. DOI: 10.1113/ep088005.

[4] DHEER A, JAIN V, KUSHWAH N, *et al*. Temporal and spatial changes in glial cells during chronic hypobaric hypoxia: role in neurodegeneration[J]. Neuroscience, 2018, 383: 235-246. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.04.026.

[5] CRISTOBAL C D, LEE H K. Development of myelinating glia: an overview[J]. Glia, 2022, 70(12): 2237-2259. DOI: 10.1002/glia.24238.

[6] FRANKLIN R J M, FFRENCH-CONSTANT C. Regenerating CNS myelin—from mechanisms to experimental medicines[J]. Nat Rev Neurosci, 2017, 18(12): 753-769. DOI: 10.1038/nrn.2017.136.

[7] CHEN J F, LIU K, HU B, *et al*. Enhancing myelin renewal reverses cognitive dysfunction in a murine model of Alzheimer's disease[J]. Neuron, 2021, 109(14): 2292-2307.e5. DOI: 10.1016/j.neuron.2021.05.012.

[8] WANG J, HE X L, MENG H Y, *et al*. Robust myelination of regenerated axons induced by combined manipulations of GPR17 and microglia[J]. Neuron, 2020, 108(5): 876-886.e4. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.09.016.

[9] VON BERNHARDI J E, DIMOU L. Oligodendrogenesis is a key process for cognitive performance improvement induced by voluntary physical activity[J]. Glia, 2022, 70(6): 1052-

1067. DOI: 10.1002/glia.24155.
[10] JENSEN S K, MICHAELS N J, ILYNTSKYY S, *et al*. Multimodal enhancement of remyelination by exercise with a pivotal role for oligodendroglial PGC1α [J]. Cell Rep, 2018, 24(12): 3167-3179. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.08.060.
[11] SOHRABI P, PARNOW A, JALILI C. Treadmill aerobic training improve beam-walking test, up-regulate expression of main proteins of myelin and myelination in the hippocampus of cuprizone-fed mice [J]. Neurosci Lett, 2023, 792: 136936. DOI: 10.1016/j.neulet.2022.136936.
[12] JIANG T, LUO J, PAN X N, *et al*. Physical exercise modulates the astrocytes polarization, promotes myelin debris clearance and remyelination in chronic cerebral hypoperfusion rats [J]. Life Sci, 2021, 278: 119526. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119526.
[13] LU Y J, DONG Y, TUCKER D, *et al*. Treadmill exercise exerts neuroprotection and regulates microglial polarization and oxidative stress in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2017, 56(4): 1469-1484. DOI: 10.3233/JAD-160869.
[14] WU C Y, YANG L D, LI Y, *et al*. Effects of exercise training on anxious-depressive-like behavior in Alzheimer rat [J]. Med Sci Sports Exerc, 2020, 52(7): 1456-1469. DOI: 10.1249/MSS.0000000000002294.
[15] ZHANG G, ZHOU S M, ZHENG S J, *et al*. Astragalus on the anti-fatigue effect in hypoxic mice[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(8): 14030-14035.
[16] MAITI P, SINGH S B, MUTHURAJU S, *et al*. Hypobaric hypoxia damages the hippocampal pyramidal neurons in the rat brain[J]. Brain Res, 2007, 1175: 1-9. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.06.106.
[17] CHEN L, REN S Y, LI R X, *et al*. Chronic exposure to hypoxia inhibits myelinogenesis and causes motor coordination deficits in adult mice [J]. Neurosci Bull, 2021, 37(10): 1397-1411. DOI: 10.1007/s12264-021-00745-1.
[18] MCGUIRE S, SHERMAN P, PROFENNA L, *et al*. White matter hyperintensities on MRI in high-altitude U-2 pilots [J]. Neurology, 2013, 81(8): 729-735. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182a1ab12.
[19] FRIEDRICH M G, SKORA A, HANCOCK S E, *et al*. Tau is truncated in five regions of the normal adult human brain [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3521. DOI: 10.3390/ijms22073521.
[20] LUKS A M, MCINTOSH S E, GRISSOM C K, *et al*. Wilderness Medical Society practice guidelines for the prevention and treatment of acute altitude illness: 2014 update[J]. Wilderness Environ Med, 2014, 25(4 Suppl): S4-S14. DOI: 10.1016/j.wem.2014.06.017.
[21] CHEN K, ZHENG Y H, WEI J A, *et al*. Exercise training improves motor skill learning via selective activation of mTOR[J]. Sci Adv, 2019, 5(7): eaaw1888. DOI: 10.1126/sciadv.aaw1888.
[22] TANG J, LIANG X, DOU X Y, *et al*. Exercise rather than fluoxetine promotes oligodendrocyte differentiation and myelination in the hippocampus in a male mouse model of depression[J]. Transl Psychiatry, 2021, 11(1): 622. DOI: 10.1038/s41398-021-01747-3.
[23] 崔玥, 黄文烨, 孟凡成, 等. 中缝背核5-羟色胺能神经环路在慢性痛及焦虑共病中的研究进展[J]. 空军军医大学学报, 2023, 44(11): 1109-1112, 1117.
CUI Y, HUANG W Y, MENG F C, *et al*. Research progress of dorsal raphe nucleus serotonergic neural circuit in chronic pain and anxiety comorbidities[J]. J Air Force Univ, 2023, 44(11): 1109-1112, 1117.
[24] GIBSON E M, PURGER D, MOUNT C W, *et al*. Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain[J]. Science, 2014, 344(6183): 1252304. DOI: 10.1126/science.1252304.
[25] LUO M L, YIN Y, LI D F, *et al*. Neuronal activity-dependent myelin repair promotes motor function recovery after contusion spinal cord injury [J]. Brain Res Bull, 2021, 166: 73-81. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2020.11.009.
[26] BERGLES D E, ROBERTS J D, SOMOGYI P, *et al*. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus[J]. Nature, 2000, 405(6783): 187-191. DOI: 10.1038/35012083.
[27] GAUTIER H O B, EVANS K A, VOLBRACHT K, *et al*. Neuronal activity regulates remyelination via glutamate signalling to oligodendrocyte progenitors[J]. Nat Commun, 2015, 6: 8518. DOI: 10.1038/ncomms9518.
[28] KAPELL H, FAZIO L, DYCKOW J, *et al*. Neuron-oligodendrocyte potassium shuttling at nodes of Ranvier protects against inflammatory demyelination [J]. J Clin Invest, 2023, 133(7): e164223. DOI: 10.1172/JCI164223.
[29] MU L W, XIA D D, CAI J J, *et al*. Treadmill exercise reduces neuroinflammation, glial cell activation and improves synaptic transmission in the prefrontal cortex in 3×tg-AD mice[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(20): 12655. DOI: 10.3390/ijms232012655.
[30] XING B, BRINK L E, MAERS K, *et al*. Conditional depletion of GSK3b protects oligodendrocytes from apoptosis and lessens demyelination in the acute cuprizone model[J]. Glia, 2018, 66(9): 1999-2012. DOI: 10.1002/glia.23453.
[31] AZIM K, BUTT A M. GSK3β negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination in vivo[J]. Glia, 2011, 59(4): 540-553. DOI: 10.1002/glia.21122.

(收稿:2023-07-12;修回:2023-10-29)
(编辑 栾 嘉)