

电磁脉冲暴露对雄性 BALB/c 幼鼠生殖系统发育的影响

王亚峰^{1,2,3} 苗霞¹ 杨明娟¹ 郎海洋¹

蒋大鹏¹ 张杰¹ 赵涛¹ 曾丽华^{1,2} 郭国祯^{1,2}

¹ (第四军医大学放射医学教研室 西安 710032)

² (西安交通大学电力设备电气绝缘国家重点实验室 西安 710049)

³ (海军总医院海军卫生防疫队 北京 101113)

摘要 将3周龄雄性 BALB/c 幼鼠 80 只随机分为假辐照组和辐照组两组。假辐照组给予假辐照处理,辐照组给予场强 200 kV/m、脉冲数 400 个的电磁脉冲(Electromagnetic pulse, EMP)辐照,每天一次,持续照射 2 周。分别于最后一次照射后的第 1、7、14 和 28 天处死幼鼠,对比分析两组幼鼠的体重和睾丸重量;采用放射免疫法分析生长激素(Growth hormone, GH)、睾酮(Testosterone, T)和促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)的水平;生精小管直径以十字交叉法进行测量。结果显示,与对照组相比,EMP 辐照期间,辐照组小鼠体重自照射第 10 天起增长速度减缓。辐照结束后,小鼠体重从第 4 天开始下降明显。与假辐照组相比,EMP 暴露组小鼠的睾丸重量、睾丸指数均有下降,血清 GH、T 和 GnRH 水平降低明显,且生精小管直径亦有所缩短。提示幼鼠经电磁脉冲辐照会影响其生殖系统发育,表现为性激素水平的降低、睾丸指数下降、生精小管直径明显缩短。

关键词 电磁脉冲, BALB/c 幼鼠, 睾丸指数, 生长激素, 睾酮, 生精小管直径

中图分类号 Q64, TL71

随着电子科技的进步,电磁辐射已被视为一种新的环境污染源而受到普遍关注,人类自出生之日起就暴露于各种电磁环境中,如极低频电磁场、工频辐射、手机辐射、微波辐射、脉冲式电磁波。其中,电磁脉冲(Electromagnetic Pulse, EMP)是一种高能宽谱的复合式电磁波^[1]。因此,在工业、农业、国防等领域的应用日渐广泛,EMP 的生物学效应也成为学术界研究的热点。生殖系统是人类繁衍的基础,而睾丸是精子发生和成熟的最重要场所。同时,睾丸组织对各种环境刺激因素都比较敏感,如温度、药物、疾病、辐射、多种化学物质等,均可对精子发生过程、正常精子的功能产生影响。近年来,有关电磁辐射对生殖系统影响的研究文献很多,但因辐照参数、辐照时间、实验对象、研究指标等条件的不同,致使不少结果相互矛盾^[2-5]。本研究旨在观察雄性 BALB/c 幼鼠在接受电磁脉冲辐照后,对其生殖系统发育的影响。

1 实验材料与方法

1.1 材料

EMP 发生器;SL801 型电子天平:上海民桥电子仪器厂;BP110S 型精密电子天平:德国 Sartorius;Olympus CH 型显微镜:BH2 日本工业株式会社;TP1020 型生物组织自动脱水机:德国 Leica 公司;ZMN-7803 全自动组织包埋机:常州华利电子公司;RM-2135 型石蜡切片机:德国 Leica 公司;DMI4000B 型倒置显微镜:德国 Leica 公司;放射免疫分析试剂盒:血清 T (HY-10027),血清 GH (HY-10035),血清 GnRH (HY-100176)均购自北京华英生物技术研究所。

1.2 动物及分组

雄性 BALB/c 幼鼠 80 只,3 周龄,体质量 9~11g,

基金项目:973 计划(NO.2011CB503704)、国家自然科学基金(No.60971055)和电力设备电气绝缘国家重点实验室(EIPE12210)项目资助

第一作者:王亚峰,男,1986 年 9 月出生,2013 年于第四军医大学军事预防医学专业获硕士学位,现工作于海军总医院海军卫生防疫队

通讯作者:曾丽华,Email: lzwei1998@gmail.com

收稿日期:初稿 2013-03-15,修回 2013-04-16

由第四军医大学实验动物中心提供[合格证号: scxk(军) 2007-007]。80 只幼鼠按体重随机分为假辐照组和辐照组两组, 每组 40 只, 每组再分为 4 个时间点, 每个时间点 10 只。电磁脉冲每天辐照一次, 每次 400 个脉冲, 持续照射 14 d, 在最后一次辐照后第 1、7、14 和 28 天, 4 个时间点以摘除眼球的方式采血, 后脱颈处死小鼠, 取双侧睾丸称重。每个时间点上, 假辐照组与辐照组各取 3 只小鼠的睾丸进行苏木精-伊红 (Hematoxylin-eosin, HE) 染色法常规染色, 观察其病理改变, 并测量生精小管直径, 其余睾丸组织冻存备用。

1.3 动物布放及电磁脉冲辐照

辐照组小鼠每 4 只放入一个内部空间为 16 cm × 5.5 cm × 4 cm 的带孔有机塑料盒中, 接受场强 200kV/m 的 EMP 辐照, 脉冲数为 400 个, 每天一次, 脉冲前沿 3.5 ns, 脉宽 15 ns, 重复频率 0.1 Hz, 持续照射 2 周, 照射时间为每日 15:00-17:00, 室内温度 22℃-24℃。假辐照组小鼠给予假辐照处理, 动物数以及在 EMP 发生器中停留时间、声音刺激等均同于辐照组。假辐照组与辐照组进入 EMP 发生器的顺序每隔一天轮换一次。

1.4 小鼠体重监测

3 周龄雄性 BALB/c 小鼠领取后称重, 进行适应性喂养; 在辐照第 1 天对小鼠进行称重, 随后辐照期间每 2 d 或 4 d、最后一次辐照后每 4 d 称重一次, 每次称重时间相同 (上午 10 时许), 饲养室温度 22℃-24℃。

1.5 血清中激素水平的测定

小鼠于最后一次辐照后的第 1、7、14 和 28 天以摘除眼球的方式取血, 4℃静置 4 h 后, 离心分离血清, -20℃冻存待测; 血清中生长激素 (Growth hormone, GH)、睾酮 (Testosterone, T) 和促性腺激素释放激素 (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 含量采用放射免疫法测定。

1.6 睾丸指数的测定

照后各时间点小鼠处死前 1 h 内称重, 处死后取双侧睾丸称重, 按下述公式计算睾丸指数:

$$\text{睾丸指数} = \text{睾丸重量 (g)} / \text{小鼠体重 (g)} \times 100\%$$

1.7 HE 染色及生精小管直径的测量

小鼠睾丸于 Bouin's 液中固定 24 h 后, 梯度酒精脱水、透明、石蜡包埋。按冠状面切片 (厚度约 4 μm)。使用 HE 染色, 显微镜下观察, 以十字交叉法测量生精小管直径, 每个时间点 3 只小鼠, 每只小鼠计量 50 个生精小管。

1.8 统计学分析

应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 *t* 检验。以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 EMP 辐照对小鼠体重的影响

EMP 辐照期间, 与假辐照组相比, 辐照组小鼠在照射 10 d 和 14 d 后, 体重有较为明显的下降, 差别具有统计学意义 ($p < 0.05$), 见图 1。

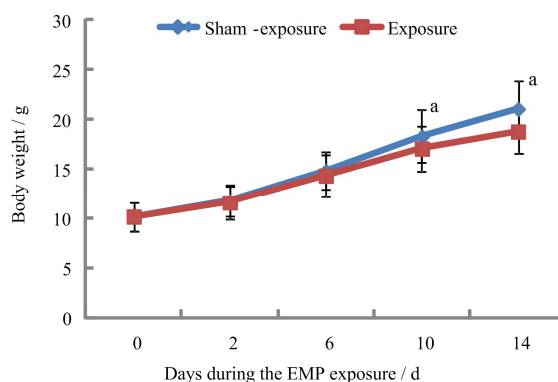


图 1 EMP 辐照过程中不同时间点小鼠体重变化情况
Fig.1 Changes in body weight of mice during the 14 days of EMP exposure ($n=40$)
^a $p < 0.05$ vs. sham-exposure group

2.2 EMP 辐照对小鼠睾丸指数的影响

如表 1 所示, 解剖时, 辐照组小鼠体重在照后不同时间点均有不同程度的下降, 但与假辐照组相比没有显著性差异 ($p > 0.05$); 与假辐照组相比, 辐照组小鼠的睾丸重量在照后 7 d 和 14 d 明显降低, 差别具有统计学意义 ($p < 0.05$); 辐照组小鼠的睾丸指数在照后 7 d、14 d、28 d 均有所降低, 与假辐照组显示出统计学差异 ($p < 0.05$)。

表 1 EMP 暴露后不同时间小鼠体重、睾丸重量和睾丸指数的变化

Table 1 Changes in body weight, testis weight and testis index of mice on different days after EMP exposure ($\bar{X} \pm s$, $n=10$)

时间/d Time	体重/g Body weight		睾丸重量/g Testis weight		睾丸指数/% Testis index	
	假暴露 Sham exposure	暴露 Exposure	假暴露 Sham exposure	暴露 Exposure	假暴露 Sham exposure	暴露 Exposure
1	20.8±2.86	19.3±3.02	0.1230±0.020	0.1190±0.014	0.62±0.08	0.62±0.06
7	21.3±3.37	20.9±1.80	0.1548±0.021	0.1308±0.019 ^a	0.73±0.04	0.63±0.06 ^a
14	24.5±2.30	24.3±3.25	0.1815±0.014	0.1549±0.021 ^a	0.74±0.05	0.64±0.06 ^a
28	24.2±2.18	23.8±4.00	0.1991±0.014	0.1950±0.021	0.84±0.03	0.78±0.05 ^a

注：a 表示与假辐照相比 $p<0.01$ 。

Note: ^a $p<0.01$ vs sham-exposure group.

2.3 EMP 辐照对小鼠血清中激素水平的影响

2.3.1 EMP 辐照对小鼠血清 GH 的影响 放射免疫分析法检测血清中生长激素的含量，结果见图 2。与对照相比，辐照组小鼠生长激素水平在照后第 7、14 和 28 天均有明显的降低，差别有统计学意义 ($p<0.05$)。

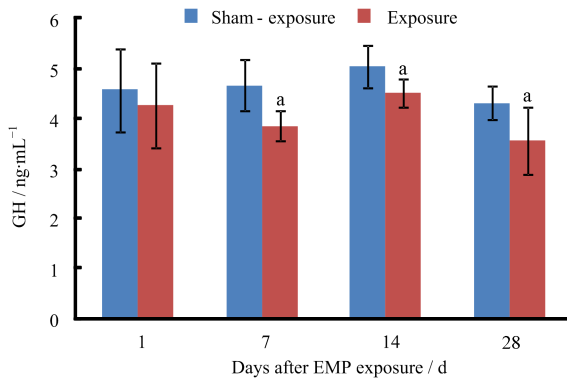


图 2 EMP 暴露后不同时间小鼠血清 GH 的含量

Fig.2 Contents of serum GH in mice on different days after EMP exposure ($n=10$)

^a $p<0.05$ vs. sham-exposure group

2.3.2 EMP 辐照对小鼠血清 GnRH 的影响 如图 3 所示，辐照组小鼠血清中促性腺激素释放激素的水平在照后第 1 天和 28 天时，与假辐照组相比，有明显降低 ($p<0.05$)。

2.3.3 EMP 辐照对小鼠血清 T 的影响 与假辐照组相比，血清睾酮的含量在 EMP 辐照后第 1、7 和 28 天的小鼠体内有明显的下降，差别有统计学意义 ($p<0.05$)。具体见图 4。

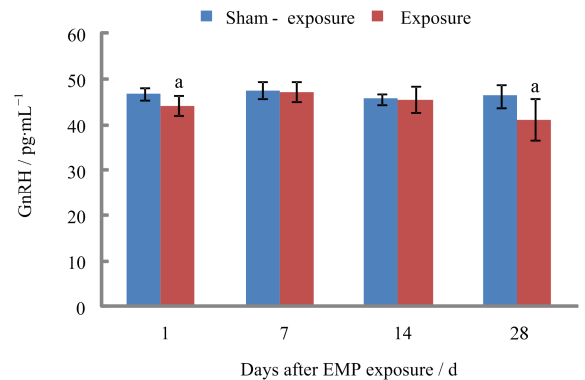


图 3 EMP 暴露后不同时间小鼠血清 GnRH 的含量

Fig.3 Contents of serum GnRH in mice on different days after EMP exposure ($n=10$)

^a $p<0.05$ vs. sham-exposure group

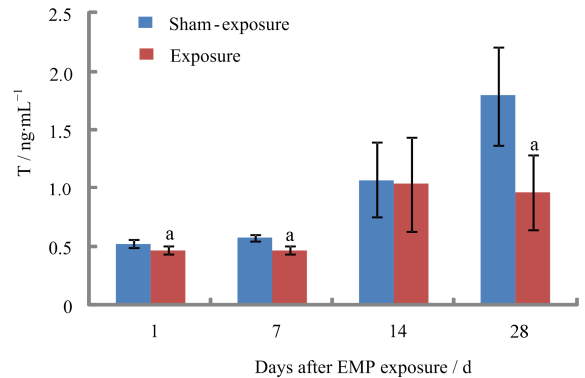


图 4 EMP 暴露后不同时间小鼠血清 T 的含量

Fig.4 Contents of serum T in mice on different days after EMP exposure ($n=10$)

^a $p<0.05$ vs. sham-exposure group

2.4 EMP 辐照对小鼠睾丸生精小管直径的影响

20 倍物镜视野下睾丸组织 HE 染色结果，生精小管“十字交叉法”测量直径的实际操作见图 5，

在照后第 1、7 和 28 天时，辐照组小鼠生精小管直径较假辐照组明显缩短，差别有统计学意义 ($p<0.05$)，具体结果见表 2。

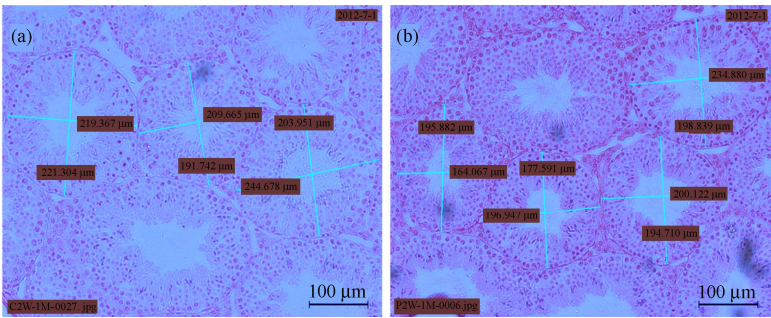


图 5 睾丸组织 HE 染色结果(4 μm), 照后 28 d: (a)假辐照组, (b)辐照组
Fig.5 HE staining of mouse testis (4 μm) on Day 28 after sham exposure (a) and EMP exposure (b) (200×)

表 2 EMP 暴露后不同时间小鼠睾丸生精小管直径的变化
Table 2 Changes in of diameter of seminiferous tubules in mice after EMP exposure ($\bar{X} \pm s, n=150$)

时间 /d Time	长轴长度 / μm Length of long axis		短轴长度 / μm Length of minor axis		平均长度 / μm Average length		长轴/短轴 Long axis/minor axis	
	假暴露 Sham	暴露 Exposure	假暴露 Sham	暴露 Exposure	假暴露 Sham	暴露 Exposure	假暴露 Sham	暴露 Exposure
1	190.92±20.82	178.94±23.59 ^a	156.56±13.62	146.37±15.65 ^a	173.74±13.98	162.66±16.93 ^a	1.23±0.15	1.23±0.16
7	201.07±20.17	182.95±24.60 ^a	168.63±14.14	153.43±19.38 ^a	184.85±13.60	168.19±20.23 ^a	1.20±0.14	1.20±0.12
14	207.50±21.31	202.18±20.93	177.10±12.72	173.29±17.39	192.30±15.56	187.73±16.83	1.17±0.09	1.17±0.12
28	231.12±25.41	217.85±25.16 ^a	196.97±16.09	185.47±18.14 ^a	214.05±17.94	201.66±19.21 ^a	1.18±0.12	1.18±0.12

注: a 表示与假辐照相比 $p<0.01$ 。
Note: ^a $p<0.01$ vs sham-exposure group.

3 讨论

生殖系统是物种繁衍的基础,对哺乳动物而言,睾丸是产生精子、分泌雄性激素、维系雄性性征的最重要器官。同时睾丸也被视为对电磁辐射最敏感的器官之一。电磁脉冲是一种高能、超宽频谱(几乎包含电磁波谱的所有频段)的电磁波,这一特殊的电磁辐射对电子设备具有严重的破坏作用,其对机体细胞的作用目前认为主要通过非热效应来实现^[6]。大量的研究显示,电磁脉冲暴露能够引起一系列的生殖健康问题,包括不育、先天畸形、围产期死亡、子宫内发育异常、性功能障碍和胚胎发育异常^[7]。

随着信息时代的到来,人类生存环境中的电磁能量密度逐渐增加,频谱逐渐增宽,在相同的生长发育期内,儿童青少年受到的电磁辐射总量急剧增多,而青春期又是生殖系统发育成熟的关键时期,而目前关于电磁辐射对未成年动物的实验研究还相对较少,因此我们在本课题中探讨电磁脉冲辐射对幼鼠生殖系统发育的影响。

幼龄雄鼠每日接受场强 200 kV/m、脉冲数为 400 个的 EMP 辐照,每天一次,持续 2 周,辐照后 7 d、14 d 睾丸重量明显降低,至照后 28 d 时,基本恢复到假辐照组水平;而辐照组的睾丸指数,自照后 7 d 开始降低,至照后 28 d 时仍未能恢复。

生长激素是腺垂体分泌的一种单一肽链的蛋白质激素,其主要作用是刺激骨、软骨细胞的生长和分化;调理蛋白质、糖及脂肪的代谢^[8]。方恒虎等^[9]研究表明,场强为 200 kV/m 的 EMP 辐照,可致大鼠腺垂体分泌细胞出现水肿,细胞内线粒体肿胀、空泡化及包涵体、髓鞘样结构形成,从而影响其合成和分泌功能。本实验的结果显示,幼鼠持续暴露于 EMP 后,血清 GH 水平呈下降趋势,自辐照后第 7 d 开始与假辐照组相比差异明显,至照后 28 d 时仍保持在较低水平;同时我们观察到:辐照期间,小鼠体重在辐照 10 d 和 14 d 时有明显下降,最后一次辐照后,辐照小鼠的体重在照后 4 d 有明显下降,在照后 8 d 至 28 d,小鼠体重虽亦有不同程度的下降,但与假辐照组相比,并无显著性差异。以上结

果表明,小鼠在 EMP 辐照一段时间(10 d)和辐照 2 周后短时间内,体重增长较慢,明显低于假辐照组,这可能是由于辐照小鼠的生长激素水平较低所致。

γ 氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是神经系统中广泛存在的抑制性神经递质,可通过下丘脑 GABA_A 受体参与 GnRH 合成与释放的调节,本科室的前期研究表明^[10],EMP 辐照(场强 200 kV/m,脉冲次数 400 次)可使下丘脑 GABA_A 受体的表达明显增高,从而抑制下丘脑神经元分泌 GnRH,实验中我们观察到了血清 GnRH 的含量在照后 1 d 和 28 d 时减少。睾酮(T)由睾丸间质细胞合成和分泌,并受到下丘脑分泌的 GnRH 的调节,是影响睾丸发育,调节精子发生和形成成熟精子最重要的激素。相关的实验研究表明^[11],EMP 辐照可使大鼠睾丸间质细胞发生变性、水肿、线粒体肿胀、内质网扩张,从而导致睾酮的合成和分泌减少;Ozguner 等^[12]研究证实,900 MHz 的电磁辐射可以使生精小管直径明显变小,生精上皮平均厚度变薄,且血清中的睾酮水平显著降低。Al-Akhras 等^[13]研究也发现,长期暴露于极低频电磁场中的 SD 雄性大鼠,精囊腺、包皮腺及精子数显著减少,同时,暴露后 6 周和 12 周时血清睾酮明显降低。结果显示,幼年雄鼠暴露于 200 kV/m 的脉冲辐射,血清睾酮水平在照后 1 d、7 d 和 28 d 时明显降低,这可能与辐照过程中 GnRH 含量降低、间质细胞受损,T 的合成和分泌减少有关。

生精小管上皮主要由生精细胞(包括精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和精子)和支持细胞构成,是精子发生的部位,其发育水平可一定程度上代表产生精子的能力。从精原细胞到精子形成的连续增殖分化过程,称为精子发生(Spermatogenesis)。精子发生过程既受下丘脑-垂体-睾丸性腺轴调控,也受到睾丸自身分泌的各种细胞因子的调控。实验结果显示,生精小管的直径在辐照后出现明显的缩短,结合睾丸重量与睾丸指数的结果,说明电磁脉冲对睾丸组织的发育可以产生抑制作用,这些影响可能是由于血清睾酮水平的降低引起的。

本实验中观察到辐照组的 GH 和 T 的含量在辐照后保持降低趋势,这两种激素水平的降低必定会影响幼鼠的生长发育导致体重降低,同时也会累及睾丸的发育,以至于辐照后 28 d 时辐照组的睾丸指

数依然低于假辐照组,而辐照组生精小管的直径也在辐照后明显缩短。

本实验条件下的电磁脉冲辐照可能破坏了腺垂体的结构,从而抑制腺垂体的分泌功能,导致其生长激素和促性腺激素释放激素的水平降低,进而影响睾酮的合成和分泌,最终导致雄鼠生殖系统发育迟缓,影响其生殖能力,但其具体作用机制则有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Cobb B L, Jauchem J R, Mason P A, *et al.* Neural and behavioral teratological evaluation of rats exposed to ultra-wideband electro-magnetic fields [J]. *Bioelectromagnetics*, 2000, **21**(7): 524-537
- 2 Qin F, Zhang J, Cao H, *et al.* Effects of 1800-MHz radiofrequency fields on circadian rhythm of plasma melatonin and testosterone in male rats [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2012, **75**(18): 1120-1128
- 3 Agarwal A, Desai N R, Makker K, *et al.* Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an in vitro pilot study [J]. *Fertil Steril*, 2009, **92**(4): 1318-1325
- 4 Dasdag S, Akdag M Z, Ulukaya E, *et al.* Mobile phone exposure does not induce apoptosis on spermatogenesis in rats [J]. *Arch Med Res*, 2008, **39**(1): 40-44
- 5 Baste V, Riise T, Moen B E. Radiofrequency electromagnetic fields; male infertility and sex ratio of offspring [J]. *Eur J Epidemiol*, 2008, **23**(5): 369-377
- 6 Eibert T F, Alaydrus M, Wilczewski F, *et al.* Electromagnetic and thermal analysis for lipid bilayer membranes exposed to RF fields [J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 1999, **46**(8): 1013-1021
- 7 Knave B. Electric and magnetic fields and health outcomes--an overview [J]. *Scand J Work Environ Health*, 1994, **20** Spec No: 78-89
- 8 孙逊, 朱尚权. 生长激素的结构与功能 [J]. *国外医学: 生理病理科学与临床分册*, 1999, **19**(1): 6-9
Sun Xun, ZHU Shangquan. The structure and function of growth hormone [J]. *Foreign Medical: Sciences Pathophysiology and Clinical*, 1999, **19**(1): 6-9
- 9 方恒虎, 曾桂英, 聂青, 等. 电磁脉冲对大鼠腺垂体结构和分泌功能的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2010, **90**(45):

- 3231-3234
FANG Henghu, ZENG Guiying, NIE Qing, *et al.* Effects on structure and secretion of pituitary gland in rats after electromagnetic pulse expo-sure [J]. National Journal of Andrology. 2010, **90**(45): 3231-3234
- 10 杨明娟, 刘海强, 郭娟, 等. 电磁脉冲(EMP)辐照对雄性子代大鼠下丘脑 GABA_A 受体表达的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2011(07): 1257-1260
YANG Mingjuan, LIU Haiqiang, GUO Juan, *et al.* Effects of electromagnetic pulse on the expression of GABA_A receptor in hypothalamus of male offsprings of rats [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011(07): 1257-1260
- 11 侯武刚, 赵洁, 张远强, 等. 电磁脉冲辐射对小鼠睾丸血-睾屏障的影响 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2005, **23**(6): 366-370
HOU Wugang, ZHAO Jie, ZHANG Yuanqiang, *et al.* Radiation effects of electromagnetic pulses on mouse blood-testis barrier [J]. Radiat Res Radiat Process, 2005, **23**(6): 366-370
- 12 Ozguner M, Koyu A, Cesur G, *et al.* Biological and morphological effects on the reproductive organ of rats after exposure to electromagnetic field [J]. Saudi Med J, 2005, **26**(3): 405-410
- 13 Al-Akhras M A, Darmani H, Elbetieha A. In-fluence of 50 Hz magnetic field on sex hormones and other fertility parameters of adult male rats [J]. Bioelectromagnetics, 2006, **27**(2): 127-131

Effects of electromagnetic pulse exposure on the development of reproduction system of male BALB/c mice

WANG Yafeng^{1,2,3} MIAO Xia¹ YANG Mingjuan¹ LANG Haiyang¹
JIANG Dapeng¹ ZHANG Jie¹ ZHAO Tao¹ ZENG Lihua^{1,2} GUO Guozhen^{1,2}

¹(Department of Radiation Medicine, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

²(State Key Laboratory of Electrical Insulation and Power Equipment, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

³(Navy Health and Epidemic Prevention Team, Navy General Hospital, Beijing 101113, China)

ABSTRACT Eighty mice aged 3 weeks were divided into electromagnetic pulse (EMP) exposure and sham exposure groups, with 40 mice in each group. The EMP group was exposed to electromagnetic pulses for 14 days with a daily dose of 400 pulses at 200 kV/m. On Day 1, 7, 14 and 28 after exposure, the mice were weighed and killed. The mouse testis were observed and the testis indexes were calculated. Serum growth hormone (GH), testosterone (T) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) were measured by radiomunoassay. Hematoxylin-eosin (HE) staining combined with decussation imaging analysis was carried out to measure the diameter of seminiferous tubules. The results show that the body weights of the exposure group are significantly lower than those in shame-exposure group on Day 10 of the EMP exposure and on Day 4 after the EMP exposure. After exposure, the testis weights of exposure group are significantly lower than those of sham-exposure group. Compared with the testis indexes of the control group, those of exposure group decline more obviously. The contents of serum GH, T and GnRH significantly declined. And the seminiferous tubules' diameters of exposure group also decline. These suggest that EMP exposure can inhibit the development of reproduction in growing male mice, such as reducing the contents of sex hormone, the testis indexes and the diameters of seminiferous tubules.

KEYWORDS Electromagnetic pulse, BALB/c mice, Testis index, Growth hormone, Testosterone, Diameters of seminiferous tubules

CLC Q64, TL71