

妊娠期和哺乳期连续微波辐射对小鼠学习 记忆功能的影响与甲状腺激素作用研究

陈纯海 屈占东 杨学森 张广斌 钟敏 余争平

(第三军医大学劳动卫生学教研室电磁辐射医学防护教育部重点实验室 重庆 400038)

摘要 本研究主要探讨妊娠期间和哺乳期间连续微波辐射,对胎鼠和乳鼠成年后学习记忆功能的影响,以及甲状腺激素 T₃、T₄ 在其中的作用。实验采用 SPF 级昆明小鼠 48 只,分为妊娠期组与哺乳期组,并分别设立对照组,采用 30 mW/cm² 的微波,每天一次性辐射 20 min,连续辐射,其中对照组只做假辐射处理。妊娠期组自妊娠第 1 天起辐射至孕鼠分娩,共辐射 21 天;哺乳期组自出生第 1 天起连续辐射 21 天。在辐射第 15 天时分别取孕鼠和乳鼠血清,采用放免法测血清中游离 T₃、T₄ (FT₃、FT₄) 含量,待胎鼠及乳鼠成年后(2 月龄)采用 Morris 水迷宫检测其学习记忆功能。研究发现妊娠期辐射组血清 FT₄ 明显低于对照组 ($p < 0.05$),而 FT₃ 没有显著变化;在定位导航实验中,其寻找平台的潜伏期明显高于对照组 ($p < 0.05$),空间搜索实验中在目的象限的停留时间(17.70±7.07 s)明显低于对照组(27.14±5.36 s) ($p < 0.05$),跨越虚拟平台的次数(0.83±0.41)也明显低于对照组(1.67±0.52) ($p < 0.01$)。哺乳期辐射组血清 FT₄ 没有显著变化,而 FT₃ 显著降低 ($p < 0.05$);在 Morris 水迷宫实验中,其各项检测指标与对照组相比,没有显著差异。以上结果表明,哺乳期间连续微波辐射能导致乳鼠血清 FT₃ 降低,但对乳鼠成年后学习记忆功能无明显影响;妊娠期间连续微波辐射能导致孕鼠血清 FT₄ 降低,胎鼠成年后学习记忆功能下降,提示 FT₄ 下降可能是微波辐射致胎鼠成年后学习记忆功能下降的因素之一。

关键词 微波,哺乳期,妊娠期, Morris 水迷宫,学习记忆功能

中图分类号 R112, R122.4, R134+2

随着社会工业化程度的不断加深和信息化发展,充斥在人类生存空间中的微波(Microwave, MW)越来越强,微波污染已成为公众日益关注的焦点问题,其对人类健康的影响已成为亟待解决的课题之一。大量证据表明,微波辐照可对人体多个系统及器官造成危害,特别是神经系统。研究表明,中枢神经系统(CNS)是微波损伤的主要靶器官之一,长期微波辐照可损伤包括学习记忆功能在内的多种神经行为功能^[1,2]。但目前对微波生物效应的研究主要集中在对成年机体的研究,对发育期间的影​​响尤其是 CNS 发育的影响研究较少。随着微波污染问题的日趋严重,解决这一问题已越来越迫切。

妊娠期间和哺乳期间是机体各系统发育的关键时期,也是机体对外界刺激较为敏感的时期。中枢神经系统的发育主要在妊娠期和哺乳期的前一阶段

完成,外界有害因素在这一阶段的刺激往往会造成中枢神经系统的不可逆损伤,从而表现为成年后学习记忆功能障碍等。研究表明,相对于成年机体而言,发育期间机体对微波刺激更为敏感^[3]。因此,探讨妊娠期和哺乳期这两个 CNS 发育的关键阶段,低强度微波连续辐射对机体成年后学习记忆功能的影响及其机制显得尤其重要。

甲状腺激素(TH)是机体早期发育必须的激素之一,在机体发育期间作用显著,在中枢神经系统的发育过程中,TH 广泛参与了神经细胞的分化、迁移和成熟等^[4]。微波这种物理因素作用于机体后,极有可能造成机体多系统功能异常,从而改变了 CNS 所处的微环境,间接影响到 CNS 的正常发育。因此,本工作试从微波辐照后引起 TH 的下降来阐述微波生物效应的可能机制。

国家自然科学基金(30670490)资助

第一作者:陈纯海,男,1981年5月出生,2004年毕业于第三军医大学,硕士生,主要研究方向为电磁辐射神经生物效应,助教

通讯联系人:钟敏

收稿日期:初稿 2008-10-13,修回 2009-01-04

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

MT-200 Morris 水迷宫视频跟踪系统(成都泰盟科技有限公司, 中国); 微波发射源(西安黄河厂, 中国); HP8991A 脉冲功率计(HP 公司, 美国); GC-991r 免疫计数器(中国中佳光电仪器厂, 中国); FT3、FT4 放射免疫分析试剂盒(北京科美东雅生物技术有限公司, 中国)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物及分组 SPF 级昆明小鼠妊娠第一天孕鼠 24 只及刚出生的乳鼠 24 只, 购自第三军医大学实验动物中心, 实验动物分为两大组, 即妊娠期组与哺乳期组, 每组分别设立对照组。

1.2.2 微波辐射方法 微波辐射在反射近似零的微波暗室内进行, 辐射环境温、湿度保持恒定。动物置于可透射微波的专用辐射盒内, 在 H、E 场强均匀分布的平台上接受平均功率密度为 30 mW/cm^2 , 每天 20 min 一次的全身辐射。妊娠期组从妊娠第一天开始辐射, 直至孕鼠分娩, 共 21 天; 哺乳期组从小鼠出生第一天开始, 连续辐射 21 天。其中对照组只做假辐射处理, 即只将小鼠放入专用的辐射盒内, 置于暗室内相同时间, 但是不辐射。

1.2.3 Morris 水迷宫实验 待胎鼠及乳鼠长至 2 月龄后, 采用 Morris 水迷宫检测其学习记忆功能。水迷宫直径 80 cm, 高 30 cm, 池壁由灰色金属板组成, 池内水深 28.5 cm, 用一加热器使水温保持在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 实验前水中加入适量奶粉, 使水混浊。在池内任意象限放一圆形站台, 没于水下 0.5~1 cm。自动记录系统包括迷宫上方的摄像头, 电脑, 同步记录小鼠的运动轨迹。训练时保持环境安静, 迷宫内外参照物保持不变。

整个实验过程分为定位航行实验和空间探索实验。

定位航行试验 (Place Navigation Test): 用于测量动物在水迷宫中的学习和记忆功能。实验共 6 天, 每天训练 4 次, 依次从东南西北 4 个入水点随机选择一个, 将小鼠面向池壁放入水中, 记录动物寻找并爬上平台所需时间, 即逃避潜伏期 (Escape Latency)。如果小鼠在 60 s 内未找到平台, 由实验者将其引至平台, 逃避潜伏期记为 60 s; 每次训练结束后, 让小鼠在平台上停留 30 s。每只小鼠共训练 6 天, 每天 4 次。计算每天各组 4 次逃避潜伏期的平均值。

空间搜索试验 (Spatial Probe Test): 用于测量动物对平台空间位置的记忆功能, 即记忆保持能力。在定位航行实验第 6 天训练完成后撤除平台, 让小鼠休息 2 h, 任选一个入水点将小鼠放入水中, 让其自由游泳 60 s, 检测 60 s 内小鼠跨越虚拟平台的次数、在目标象限停留的时间、搜索平台的轨迹。

1.2.4 放免法检测 FT3、FT4 至辐射第 15 天时, 分别从妊娠期组及哺乳期组取辐射组及对照组动物各 6 只, 实验动物麻醉后经心脏取血, 置于 EP 管中, 所取血样在 4°C 下保存, 充分凝血后 (约 4~5 h), 4°C , 3000 转离心 10 min, 取上清到新的 EP 管中, 待测。将血清按照 FT3、FT4 放免试剂盒说明书要求处理后上机检测。

1.3 统计分析

实验数据采用 SPSS13.0 软件进行方差分析和 t 检验, 实验结果用均数士标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 乳鼠成年后学习记忆功能的改变

2.1.1 定位航行实验结果 由图 1 可知, 在定位航行实验中, 哺乳期对照组和辐射组小鼠寻找平台的逃避潜伏期逐渐降低, 说明小鼠在定位航行中训练效果显著, 但辐射组寻找平台的逃避潜伏期与对照组相比没有显著差异。结果提示, 哺乳期连续微波辐射对乳鼠成年后的学习记忆功能无显著影响。

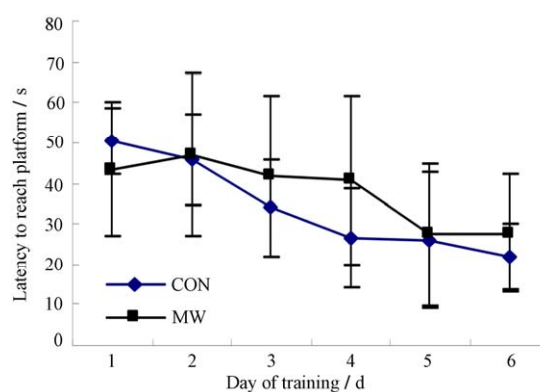


Fig.1 Mean escape latency during the 6 training sessions of gestation group, MW-microwave irradiation group, CON-control group. ($n=6$)

2.1.2 空间搜索实验结果 在空间搜索实验中, 辐射组在目的象限搜索时间 (21.36 ± 5.84) 与对照组 (21.36 ± 5.84) 相比没有显著差异 ($p > 0.05$); 辐射组跨越虚拟平台的次数 (2.61 ± 0.44) 与对照组 (2.01 ± 0.69) 也没有显著差异 ($p > 0.05$)。空间搜索实验轨迹图 (见图 2 和图 3) 显示, 辐射组与对照

组小鼠搜索平台方式基本相同，均大多集中在平台附近，反复来回寻找平台。结果提示哺乳期连续微波辐射对乳鼠成年后的记忆功能无显著影响。

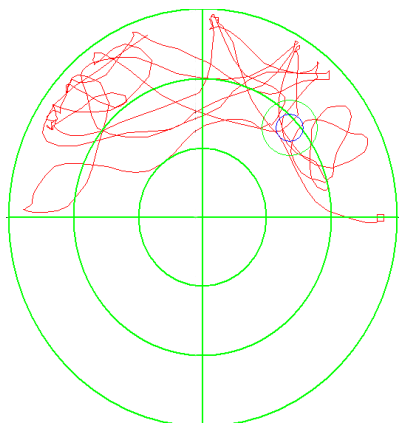


Fig.2 Swimming path of control group

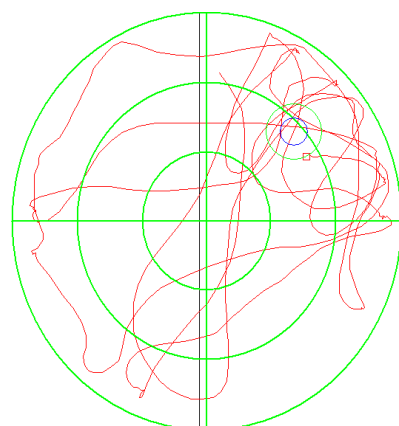


Fig.3 Swimming path of irradiation group

2.2 乳鼠血清甲状腺激素的改变

哺乳期小鼠连续微波辐射第 15 天时，其血清 FT3 (1.23 ± 0.40 ng/mL) 与对照组 (2.43 ± 0.49 ng/mL) 相比，明显降低 ($p < 0.05$)，但是下降幅度不大；而 FT4 (2.85 ± 1.29 ng/mL) 与对照组 (3.23 ± 1.12 ng/mL) 相比没有显著差异 ($p > 0.05$)。说明哺乳期间连续微波辐射能够导致乳鼠血清 FT3 降低，但对 FT4 影响不大。

2.3 胎鼠成年后学习记忆功能的改变

2.3.1 定位航行实验结果 由图 4 可见，通过训练，对照组和辐射组小鼠寻找平台的逃避潜伏期均逐渐降低，表明训练效果显著，辐射组在定位航行实验中，第 4 d、5 d、6 d 寻找平台的逃避潜伏期明显高于对照组 ($p < 0.05$)。结果表明，妊娠期连续微波辐射能够导致胎鼠成年后学习记忆功能降低。

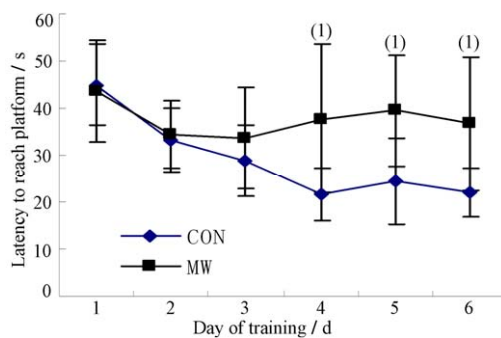


Fig.4 Mean escape latency during the 6 training sessions of lactation group, MW-microwave irradiation group, CON-control group. ($n=6$, ⁽¹⁾ $p < 0.05$, Compare with control group)

2.3.2 空间搜索实验结果 在空间搜索实验中，辐射组在目的象限的停留时间 (17.70 ± 7.07 s) 明显低于对照组 (27.14 ± 5.36 s) ($p < 0.05$)；辐射组跨越平台次数 (0.83 ± 0.41) 明显少于对照组 (1.67 ± 0.52) ($p < 0.01$)。空间搜索实验轨迹图 (见图 5 和图 6) 显示，辐射组小鼠多沿四壁绕圈游动，4 个象限侧重性不太强，而对照组小鼠大多集中在目标象限，反复来回寻找平台。结果提示妊娠期连续微波辐射能够导致胎鼠成年后的记忆功能降低。

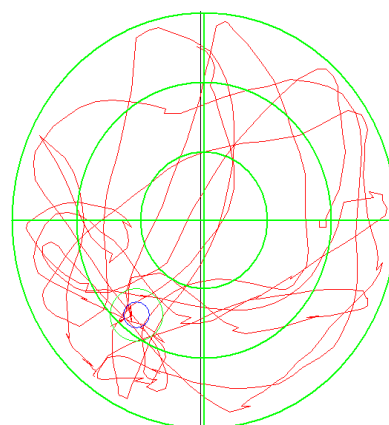


Fig.5 Swimming path of control group

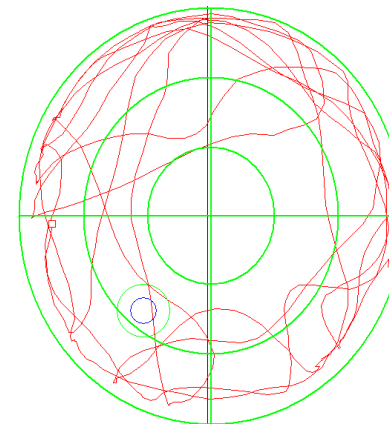


Fig.6 Swimming path of irradiation group

2.4 孕鼠血清甲状腺激素的改变

妊娠期小鼠连续微波辐射第 15 天时, 孕鼠血清 FT3 (2.82 ± 1.02 ng/mL) 与对照组 (2.42 ± 0.78 ng/mL) 相比, 没有显著差异 ($p > 0.05$); 而 FT4 (0.31 ± 0.25 ng/mL) 与对照组 (2.82 ± 0.45 ng/mL) 相比, 明显降低 ($p < 0.01$)。说明妊娠期连续微波辐射能够导致孕鼠血清 FT4 显著降低, 而对 FT3 影响不大。

3 讨论

微波污染的日趋严重导致微波对机体的影响及其机理探讨成为亟待解决的重大科学问题, 目前对微波生物效应的研究主要集中在对成年机体的影响, 对发育期间的影响研究涉及较少, 尤其是微波对发育期间 CNS 的影响, 而相对于成年机体而言, 发育期间机体对外界环境有害因素的刺激更为敏感。本研究定位于研究妊娠期及哺乳期连续微波辐射对胎鼠及乳鼠的影响, 并从 TH 变化的角度探讨其可能的机制, 以此来阐明在妊娠期和哺乳期这两个 CNS 发育的关键时间段微波暴露所产生的影响。实验采用平均功率密度为 30 mW/cm² 微波连续辐射妊娠期和哺乳期小鼠, 采用 Morris 水迷宫实验检测胎鼠及乳鼠成年后的学习记忆功能, 发现在妊娠期连续微波辐射后, 胎鼠成年后的学习记忆功能降低, 而在哺乳期连续微波辐射后, 对其成年后的学习记忆功能影响不大。

Morris 水迷宫是常用的检测学习记忆功能的方法, 其最常用的参数是寻找平台的潜伏期, 即根据训练过程中潜伏期的长短来判定学习记忆功能的高低。在空间搜索实验中, 通常采用在目的象限停留时间、跨越虚拟平台的次数和空间搜索轨迹图等参数来反映记忆功能^[5]。本研究在分析小鼠在 Morris 水迷宫中的表现时, 采用定位航行实验中的潜伏期与空间搜索实验中在目的象限停留时间、跨越虚拟平台的次数和空间搜索轨迹图等参数相结合, 从多个角度较全面的反映了小鼠的学习记忆功能。

本实验研究发现: 哺乳期连续微波辐射后, 辐射组小鼠在定位航行实验中寻找平台的逃避潜伏期以及空间搜索实验中在目标象限停留时间、跨越虚拟平台次数和搜索轨迹与对照组相比没有显著差异, 说明辐射组小鼠在学习记忆能力和记忆保持能力方面与对照组相比无显著差异。这表明在本实验条件下, 哺乳期连续微波辐射对乳鼠成年后的学习

记忆功能无显著影响。妊娠期间连续微波辐射后, 胎鼠成年后经 Morris 水迷宫检测发现在定位航行实验中辐射组寻找平台的逃避潜伏期明显高于对照组, 空间搜索实验中在目标象限停留时间、跨越虚拟平台次数明显少于对照组, 其搜索轨迹与对照组相比更为杂乱及无目的性, 说明辐射组小鼠在学习记忆功能和记忆保持能力方面显著低于对照组。这表明在本实验条件下, 妊娠期连续微波辐射会导致胎鼠成年后学习记忆功能下降。

微波辐射是否引起学习记忆功能的改变, 目前报道还存在一定的争议。Sienkiewicz 等^[2]采用 900MHz 微波辐射成年雄性 C57 小鼠, 发现小鼠在八臂迷宫实验中学习能力与对照组相比无明显区别; Cobb 等^[6]将乳鼠采用微波辐射, 发现其在水迷宫和操作性行为中的学习能力均无改变; 而文献^[7]研究发现, S 波段微波辐射可以引起乳鼠学习记忆功能下降^[1]; 隋建峰等用 X 波段 10、20、40 mW/cm² 脉冲微波辐射孕鼠后, 发现足月胎鼠爬竿反应、穿梭箱回避反应的获得和保持率均有所下降, 表明学习记忆功能下降, 这与本实验结论一致^[8]。这些实验结果存在差异的主要原因可能是由于各实验室采用的辐射模式不同, 辐射剂量差异较大, 辐射的频段也存在差异。研究对象的不同也是造成差异的主要因素之一, 本实验所研究的实验动物均为在 CNS 发育期间接受辐射, 可能在这一阶段 CNS 对辐射更为敏感。

微波对 CNS 的影响可能通过其直接作用而产生的热效应和非热效应所导致, 也有可能通过其作用于其它非神经系统或器官, 改变了 CNS 所处的微环境, 间接影响到 CNS。大量研究表明, 妊娠期间母体 TH 的缺乏会导致包括智力障碍在内的一系列生理疾病, 其中 CNS 发育障碍是其主要原因之一; 在哺乳期间, TH 的缺乏同样会导致 CNS 的不可逆损伤, 如髓鞘形成障碍等多种 CNS 的发育障碍^[4,9]。TH 是维持 CNS 正常发育不可缺少的激素之一, 其中, 在妊娠期间, 起主要生物学作用的主要是 FT4, 因为它能够透过胎盘屏障, 通过胎儿体内 II 型脱碘酶 (D2) 转化为 T3 而发挥生物效应; 而在出生后, 起主要作用的主要是 FT3, 因为结合的 T3、T4 基本无生物学活性, 而 FT3 生物学效应远远比 FT4 强^[9]。本室前期研究发现微波辐射可严重影响甲状腺功能, 导致血清 T3、T4 浓度下降。本实验发现微波连续辐射后, 在胎鼠 CNS 发育的关键

时期 E15, 检测到孕鼠血清 FT4 明显降低, 而母体 FT4 是妊娠早期 (在小鼠约为 17 d 以前) 胎儿 TH 的唯一来源, 是胎儿妊娠晚期 (在小鼠约为 17 d 以后) TH 的主要来源之一, 母体 TH 的缺乏将导致胎儿 CNS 发育障碍。本实验研究发现在 CNS 发育的关键时期妊娠第 15 天时, TH 明显下降, 提示微波连续辐射所导致的 TH 的缺乏可能是胎鼠成年后学习记忆功能障碍的主要原因之一。在乳鼠辐射 15 d 后虽有检测到 FT3 下降, 但是乳鼠在成年后学习记忆功能影响不大, 可能原因有两点。其一, 由于本实验没有对 TH 作动态监测, 只是取了一个时间点来检测, 因此可能是连续辐射导致 TH 下降需要一定的时间, 而在这一段时间内, 小鼠 CNS 发育已基本趋于成熟, 短期的轻微的 TH 下降对其不造成影响; 其二, 可能是 TH 下降时间为 CNS 发育晚期, 下降幅度较小, 其影响也较小, 主要表现为一些微观层次的变化, 不表现为成年后的学习记忆功能障碍, 或是短期的 TH 轻微下降导致的影响在后期甲状腺功能恢复后得到了一定修复, 但其具体机制还有待进一步探讨。

本实验的研究提示, 妊娠期连续微波辐射会导致胎鼠成年后的学习记忆功能障碍, 辐射所导致的 TH 下降可能是其主要的的原因之一; 哺乳期间连续微波辐射虽可导致 TH 下降, 但不表现出学习记忆功能的变化, 其具体影响还有待研究。本研究结果揭示了妊娠期及哺乳期连续微波辐射对机体学习记忆功能的影响, 并从 TH 的角度探讨了其可能的机制, 为深入探讨微波对发育期间机体的生物效应及

其机理打下了基础, 也为微波损伤的防护提供了新的靶点。

参考文献

- 1 D'Andrea J A, Adair E R, de Lorge J O, *et al.* Bioelectromagnetics Supplement, 2003, **6**: S39-S62
- 2 Sienkiewicz Z, Jones N, Bottomley A. Bioelectromagnetics, 2005, Supplement 7: S116-S126
- 3 Feychting M, Ahlbom A, Kheifets L. Public Health, 2005, **26**: 165-89
- 4 Ahmed O M, El-Gareib A W, El-bakry A M, *et al.* Int J Devl Neuroscience, 2007, DN-1127: 1-63
- 5 D'Hooge R, De Deyn P P. Brain Research Reviews, 2001, **36**(1): 60-90
- 6 Cobb B L, Jauchem J R, Mason P A, *et al.* Bioelectromagnetics, 2000, **21**(7): 524-537
- 7 王丽峰, 胡向军, 彭瑞云, 等. 中国行为医学科学, 2005, **14**(1): 32-34
WANG Lifeng, HU Xiangjun, PENG Ruiyun, *et al.* Chinese J Behav Med Sci, 2005, **14**(1): 32-34
- 8 隋建峰, 吴宗耀, 熊鹰. 中国行为医学科学, 1999, **8**(2): 84-87
SUI Jianfeng, WU Zongyao, XIONG Ying. Chinese J Behav Med Sci, 1999, **8**(2): 84-87
- 9 de Escobar G M, Obregón M J, del Rey F E. Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism, 2004, **18**(2): 225-248

The influence of microwave irradiation during lactation and gestation on the role of thyroid hormone in dysfunction of learning and memory with mice

CHEN Chunhai QU Zhandong YANG Xuesen ZHANG Guangbin ZHONG Min YU Zhengping

(The Department of Occupational Hygiene, Key Laboratory of Electromagnetic Radiation Protection,
The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT It was investigated that the influence of continuous microwave (MW) irradiation during lactation and gestation on the function of learning and memory as well as the role of FT3 and FT4 in this process. 48 SPF KM mice were divided into lactation group, gestation group and control group. All mice were irradiated by MW of 30 mW/cm² for 20 min each day except control groups. The gestation group was continuous irradiated until childbirth, about 21 days in total. The lactation group was continuous irradiated for 21 days. The blood serum was obtained on the 15 th day of irradiation and then serum FT3 and FT4 were determined by radioimmunoassay. In the gestation irradiation group, FT3 was not significantly changed while FT4 decreased compare to control group. In Place Navigation

Test, the escape latency was prolonged in the gestation irradiation group, while there was not significantly changed in the lactation irradiation group. In Spatial Probe Test, the time spent in target quadrants was much longer and the frequency passing through the platform was much more compare to control group. In lactation group, no such change was observed in Morris water maze. The serum FT3 in the lactation irradiation group was decreased while FT4 did not change significantly. The results suggest that continuous MW irradiation during lactation could down regulate serum FT3 level, but could not induce learning and memory function injured. Continuous MW irradiation during gestation could down regulate serum FT4 level and induce learning and memory function injured. The serum TH decrement may be one of the main reasons for learning and memory dysfunction induced by MW.

KEY WORDS Microwave, Lactation, Gestation, Morris water maze, Learning and memory function

CLC R112, R122.4, R134+.2