

# 小剂量氙水宫内辐射对出生后仔鼠行为、学习及记忆能力的影响

王 冰 周湘艳

(卫生部工业卫生实验所, 北京 100088)

**摘要** 报道了在妊娠期以单次腹腔注入氙水, 宫内受到累积剂量分别为 0、0.05、0.10 和 0.30 Gy  $\beta$  射线辐射后, 对雄性仔鼠行为、学习及记忆能力的影响。研究发现 0.10 Gy 以上剂量组对旷场行为, 跳台学习及记忆能力、食物迷宫、水迷宫和孔板探究等多项测试指标均有影响, 表现为早期兴奋性增强、晚期抑制及学习记忆能力的减退。结果提示阈剂量大约在 0.05 和 0.10 Gy 之间。

**关键词** 氙水, 内辐照, 脑发育, 行为阈值, 学习记忆能力, 动物实验, 小鼠

胚胎处于高度分化阶段, 对辐射的敏感性较高。由于中枢神经系统的重要性和复杂性, 故有关电离辐射对发育中的中枢神经系统效应的研究受到人们的高度重视。有资料表明, 妊娠后 8—15 周为敏感期, 其辐射损害主要表现为出生后的智力障碍<sup>[1]</sup>。随着核能的和平应用, 环境氙水平将逐渐升高, 而氙可以氙水形式通过母体胎盘进入胚胎。目前对这种内辐照效应的研究, 多限于胚胎生长发育、新生反射和脑细胞数等方面, 为此本实验通过对宫内胎儿期受氙照射的小鼠出生后不同阶段行为、学习及记忆能力的测试, 旨在探讨小剂量氙内辐照对仔代动物高级神经活动是否具有影响及其阈值问题。

## 1 材 料 和 方 法

### 1.1 动物及照射条件

实验选用 10 周龄 C 57 BL/6 J 纯系小鼠(由北京医科大学动物部提供), 经阴道涂片观察在动情期的雌鼠与雄鼠 1:1 合笼过夜。次日凌晨查到阴栓, 作为妊娠第 0 d。

氙水由中国科学院上海原子核研究所提供, 经蒸馏水稀释到适当浓度, 用 RSC-CBI 型低本底闪烁计数器标定。

孕鼠在妊娠第 12.5 d, 按每克体重一次性腹腔注入相应量的氙水, 使受照各组仔鼠在出生前分别受到累积剂量 0.05、0.10、和 0.30 Gy 的辐射。氙的累积吸收剂量估算参考文献[2]的方法。

母鼠自然分娩, 哺育仔鼠。在仔鼠第 21 d 龄时, 与母鼠分窝饲养。本研究所用仔鼠均雄性, 在 0、0.05、0.10 和 0.30 Gy 剂量组, 雄性仔鼠数分别为 39、21、26 和 24 只。

### 1.2 实验程序

**1.2.1 旷场行为测试** 旷场由圆形铁盒改装而成直径 45 cm, 壁高 50 cm。距旷场中央 60 cm 放处置一盏 40 W 灯泡进行照明。测试在暗环境下进行, 旷场分为面积近似的 25 个小格。将第 22 d 龄的仔鼠置于旷场中央的格中, 记录其走出中央格的潜伏期及 2 min 内双后肢走过的格子数。

收稿日期: 1992-07-20

**1.2.2 学习、记忆能力测试** 实验装置为  $20\text{ cm} \times 20\text{ cm} \times 30\text{ cm}$  的方型有机玻璃箱, 底部铺设不锈钢栅, 箱底的一角固定一个  $3\text{ cm} \times 3\text{ cm} \times 2\text{ cm}$  的木块。在仔鼠第 53、54 和 59 d 龄时进行训练, 每只仔鼠每天训练 10 次。训练时把仔鼠放在箱底部与固定木块对应的角上, 鼠头向木块, 5 s 后钢栅通电, 以 38 V 电压电击鼠脚 5 s, 仔鼠慌忙逃窜, 在奔跑中偶然跳上安全台, 让它停留 10 s, 取出休息, 30 s 后再重复训练。在每天训练结束后再进行 10 次测试, 不用电击, 以在 10 s 内跳上木块为反应正确, 如 10 次测试中反应正确次数为 7、8 和 9 次(分别在第 53、54 和 55 d 测试)定为达标。在最后一天测试达标鼠作为已产生记忆鼠。记录累积反应正确动物数, 并将最后一天测试达标鼠作为已产生记忆鼠, 进行下述测试。

仔鼠在第 62、69、76 和 118 d 龄, 每天进行 3 次测试, 装置及方法同上。在 3 次测试中均反应正确者认为保持记忆; 对未保证记忆者, 在下一一次的检测时如仍为未保持记忆者, 记入累积数中。

**1.2.3 食物迷宫测试** 迷宫结构如图 1 所示。食物箱内有葵花籽和饲料。将 50 d 龄仔鼠禁食 36 h 放入箱内并计时, 至其进食时止所用时间为首次进食时间。仔鼠进食 10 s 后, 打开活动门 I, 将仔鼠赶出食物箱, 关闭活动门 I, 打开活动门 II 并计时至其经活动门 II 进入食物箱时止, 所用时间为首次获食时间。在小鼠寻获食物并进食 10 s 后, 关闭活动门 II, 打开活动门 I 并重复上述程序。以小鼠由 I 门至 II 门最短行走路程为正确路程, 记录小鼠从 I 门被赶出至由 II 门进入食物箱所用时间, 及所走的错误路径次数, 如此连续 3 次。每只小鼠以其三次所得测试指标的均值作为其统计值, 组中各小鼠统计值的平均值每个剂量组的平均获食时间。平均错误路径次数(以下称平均错误)的计算与平均获食时间的计算相同。

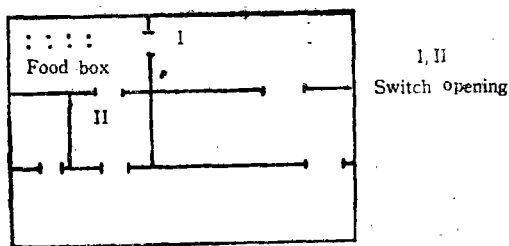


Fig 1. Sketch map of food labyrinth

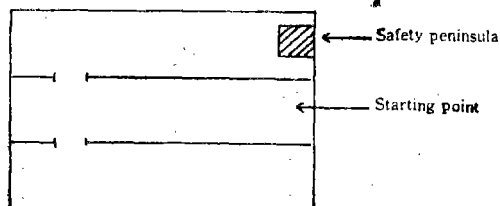


Fig 2. Sketch map of Water Maze

**1.2.4 水迷宫测试** 迷宫结构为一个  $50\text{ cm} \times 35\text{ cm} \times 20\text{ cm}$  的有机玻璃池(见图 2)。水深 16 cm, 水温  $22 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在仔鼠第 60 d 龄测试。仔鼠从中间小池的起始点(跳台)入水。首次登岸(安全台)时间、平均登岸时间和平均错误等指标的计算与上述 1.2.3 测试相仿; 但小鼠每次登岸后要休息 30 s, 再进行下一次测试。

**1.2.5 孔板探究** 将一直径 23.5 cm 圆形木板置于一经改制的塑料桶中部, 板距桶底 15 cm, 桶距上缘 40 cm, 板上钻有 9 个间距 1.5 cm 的小孔。将第 100 d 龄的仔鼠置于孔板上, 记录其从被放入至将头第一次探入孔中所用的时间, 即首次探孔时间及其 2 min 内探孔的次数, 探孔定义为仔鼠将头主动探入孔中。

### 1.3 统计学方法

测试项目 1.2.1、1.2.3、1.2.4 和 1.2.5 中的各项指标结果以  $\bar{X} \pm S.D.$  表示, 用 t 检验方法(必要时用方差分析方法和近似法 t' 检验)或 Mann-Whitney 的 U 检验进行统计分析; 测试项目 1.2.2 中的资料统计用  $X^2$  检验的方法, 必要时用四格表的确切概率法进行分析比较。

## 2 结 果

### 2.1 旷场行为测试

表1中列出了旷场行为测试的结果。仔鼠离开旷场中央的潜伏期和仔鼠走格数二项指标,在0.10 Gy及以上剂量组与对照组相比,具有非常显著的差异( $p < 0.01$ ),表现为潜伏期的缩短和走格数的增加。

### 2.2 用跳台法观察氚辐射对仔代学习、记忆的影响

表2及表3总结了对仔鼠学习及其记忆能力测试的结果。在学习能力上,0.10 Gy及以上剂量组在学习第1 d和第2 d与对照组相比,错误次数多,表示辐射组在学习能力上明显减低

Tab 1. Effects of low level prenatal  $\beta$ -irradiation of tritiated water on postnatal spontaneous activities in mice

| Dose/Gy | n  | Latency/s          | Movement score    |
|---------|----|--------------------|-------------------|
| 0       | 39 | $3.3 \pm 3.4$      | $104 \pm 32$      |
| 0.05    | 21 | $2.4 \pm 2.1$      | $108 \pm 30$      |
| 0.10    | 26 | $1.4 \pm 1.4^{**}$ | $145 \pm 36^{**}$ |
| 0.30    | 24 | $1.4 \pm 0.8^{**}$ | $177 \pm 29^{**}$ |

$^{**}P < 0.01$

Tab 2. Effects of low level prenatal  $\beta$ -irradiation of tritiated water on electric shock avoidance training

| Dose<br>/Gy | n  | Training time(day age of offspring) |              |                 |               |                 |               |
|-------------|----|-------------------------------------|--------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
|             |    | 53 th day                           |              | 54 th day       |               | 55 th day       |               |
|             |    | No. of<br>C.A.                      | No. of<br>F. | No. of*<br>C.A. | No. of*<br>F. | No. of*<br>C.A. | No. of*<br>F. |
| 0           | 39 | 8                                   | 31           | 36              | 3             | 39              | 0             |
| 0.05        | 21 | 0                                   | 21           | 18              | 3             | 21              | 0             |
| 0.10        | 26 | 0                                   | 26*          | 18              | 8*            | 24              | 2             |
| 0.30        | 24 | 0                                   | 24*          | 12              | 12**          | 22              | 2             |

Note: 1. No. of C. A. number of Criterion Achieved, No. of F. number of Failures

2.\* Number the accumulative numbers

3. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$

Tab 3. Effects of low level prenatal  $\beta$ -irradiation of tritiated water on memory retaining test

| Dose<br>/Gy | n  | Test time(day age of offspring) |                |                |                |                |                |                |                |
|-------------|----|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|             |    | 62th day                        |                | 69 th day      |                | 76 th day      |                | 118 th day     |                |
|             |    | No.of<br>M.R.                   | No. of<br>M.L. | No.of*<br>M.R. | No.of*<br>M.L. | No.of*<br>M.R. | No.of*<br>M.L. | No.of*<br>M.R. | No.of*<br>M.L. |
| 0           | 39 | 38                              | 1              | 35             | 4              | 33             | 6              | 20             | 9              |
| 0.05        | 21 | 18                              | 3              | 15             | 6              | 15             | 6              | 13             | 9              |
| 0.10        | 24 | 22                              | 2              | 14             | 10**           | 14             | 10*            | 12             | 12*            |
| 0.30        | 22 | 20                              | 2              | 13             | 9**            | 12             | 10*            | 10             | 12*            |

Note: 1. No. of M. R. number of Memory retainers, No. of M. L. number of Memory losers

2.\* Number the accumulative numbers

3. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$

( $p<0.05$ ), 其中 0.30 Gy 辐射组在第 2 d 的学习中与对照组比, 差异更为显著( $p<0.01$ ); 而在第 3 d 的学习时, 虽然 0.10 Gy 及以上剂量组中, 仍各有两只仔鼠未产生记忆, 但这种差异已不具有统计学上的意义。说明学习能力逐渐恢复。

对记忆保持情况的测试结果表明: 各剂量组在产生记忆后 1 周, 与对照组比记忆保持并无显著性差异; 而在 0.10 Gy 及以上剂量组, 记忆丧失的比例明显增加, 在第 2 周时差异水平为  $p<0.10$ , 第 3 及 9 周差异水平为  $p<0.05$ 。

Tab 4. Effects of low level prenatal  $\beta$ -irradiation of tritiated water on food labryrith test

| Dose /Gy | n  | Beginning time of eating/s | Beginning time of food found/s | Mean time of food found/s | Mean times of errors/s |
|----------|----|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|------------------------|
| 0        | 39 | 44.2 $\pm$ 34.9            | 167.5 $\pm$ 94.2               | 66.5 $\pm$ 33.9           | 2.7 $\pm$ 1.9          |
| 0.05     | 21 | 35.7 $\pm$ 18.8            | 103.4 $\pm$ 68.1**             | 55.4 $\pm$ 43.3           | 2.8 $\pm$ 1.4          |
| 0.10     | 26 | 17.1 $\pm$ 12.4**          | 100.4 $\pm$ 37.1**             | 30.7 $\pm$ 15.3**         | 2.9 $\pm$ 2.8          |
| 0.30     | 24 | 11.3 $\pm$ 5.0**           | 74.0 $\pm$ 60.3**              | 31.2 $\pm$ 19.8**         | 3.9 $\pm$ 1.7*         |

\*\* $p<0.01$  \* $p<0.05$

Tab 5. Effects of low level prenatal  $\beta$ -irradiation of tritiated water on water maze test

| Dose /Gy | n  | Beginning time of landing/s | Mean time in landing/s | Mean times of errors/s |
|----------|----|-----------------------------|------------------------|------------------------|
| 0        | 39 | 16.9 $\pm$ 14.4             | 13.6 $\pm$ 7.8         | 1.8 $\pm$ 1.4          |
| 0.05     | 21 | 19.3 $\pm$ 17.2             | 11.3 $\pm$ 4.1         | 2.7 $\pm$ 1.0**        |
| 0.10     | 26 | 28.4 $\pm$ 26.6             | 11.4 $\pm$ 5.8         | 3.3 $\pm$ 2.6**        |
| 0.30     | 24 | 26.2 $\pm$ 21.9             | 12.4 $\pm$ 8.9         | 3.8 $\pm$ 2.2**        |

\*\* $p<0.01$  \* $p<0.05$

Tab 6. Effects of low level prenatal  $\beta$ -irradiation of tritiated water on hole board dipping test

| Dose/Gy | n  | Beginning time of dipping/s | Mean times of dipping/s |
|---------|----|-----------------------------|-------------------------|
| 0       | 39 | 12.2 $\pm$ 13.2             | 9.0 $\pm$ 5.1           |
| 0.05    | 21 | 12.1 $\pm$ 10.0             | 7.1 $\pm$ 2.0*          |
| 0.10    | 26 | 31.2 $\pm$ 16.3**           | 3.6 $\pm$ 1.5**         |
| 0.30    | 24 | 45.3 $\pm$ 19.2**           | 2.4 $\pm$ 1.7**         |

\*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$

**2.3 食物迷宫测试** 从表 4 可见仔鼠首次进食时间和平均获食时间二项指标的结果, 在 0.10 Gy 照射组与对照组相比即显著缩短, 而首次获食时间的缩短在 0.05 Gy 辐射组已发生。平均错误次数的增加, 在 0.30 Gy 剂量组才具有显著差异 ( $p<0.05$ )。

**2.4 水迷宫测试** 从表 5 可见平均错误次数的增加, 在 0.05 Gy 剂量组与对照组相比差异显著 ( $p<0.01$ ), 而首次登岸时间和平均登岸时间二项指标在各剂量组无显著差异。

**2.5 孔板探究测试** 从表 6 可见仔鼠首次探孔时间, 在 0.10 Gy 及以上剂量组与对照组相比时间延长, 0.05 Gy 剂量组与对照组相比平均探孔次数明显减少, 在 0.10 Gy 及以上剂量组这种差异更为显著。说明探究反应受抑制。

### 3 讨 论

旷场行为和探孔行为常用以检验受试动物对新环境的探求反应或应激性等方面的情况<sup>[3]</sup>。本实验结果提示, 宫内受辐射仔鼠刚与母鼠分窝后, 中枢神经系统处于兴奋状态, 具体表现为离开

旷场中央的潜伏期短,走格数增加,二者具有良好的剂量依赖关系;仔鼠100 d龄时为成年鼠,此时仔鼠孔板探究反应受抑制,体现在首次探孔时间的延迟和平均探孔数的减少,且上述改变呈现剂量-效应关系。类似现象和观点, Jensh 等<sup>[4]</sup>和 Norton<sup>[5]</sup>曾有报道。

用跳台法观察氚辐射对仔代学习、记忆的影响,迷宫测试用以研究氚辐射对仔代动物的本能及学习、记忆的影响。结果表明,在0.10 Gy 以上剂量组,仔鼠对短期学习发生障碍,获得记忆鼠所占比例显著低于对照;而在经过连续3 d 的30次训练后,这种差异已不明显,这似乎表明该剂量不会导致对长期学习能力的显著损害,或虽有损害但经多次训练尚可使仔代学会和掌握。在记忆保持上,上述两个剂量组仔鼠在学习结束2周后,记忆保持者所占比例不足60%,而对照组仍有89%以上保持记忆,这提示0.10 Gy 以上剂量组的仔鼠在长期记忆上已发生障碍,这是否由于辐射损害了仔鼠记忆有待于进一步研究。关于对仔鼠短期记忆损害的脑生化基础研究,已发现在0.30 Gy 累积吸收剂量下照射,仔代出生后下丘脑精氨酸加压素的含量显著降低(另有文报道);在脑病理学方面,符绍莲等<sup>[6]</sup>的研究表明,1.0 Gy  $\gamma$ 射线即可使Wistar 大鼠20 d 胎龄的胎鼠海马下托等脑皮质发生形态学的改变。记忆过程是一个极为复杂的心理过程,结合生化和组织学的进一步研究对探讨辐射损伤机理很有必要。

迷宫实验是一种空间、方位的辨别学习,水迷宫与食物迷宫相比,是一种强迫性的,对神经肌肉活动有较强的额外负荷。食物迷宫测试结果表明,50 d 龄仔鼠在0.10 Gy 剂量组即已表现为平均获食时间缩短,仔鼠在食物迷宫中首次进食时间比对照组跑动迅速和活跃,因此认为此时仔鼠仍处于中枢神经系统兴奋状态,有利于其尽快发现食物,同时增加了通过路径时的错误次数。在水迷宫测试中受照组仔鼠首次登岸时间与对照组相近,但其平均错误次数在0.05 Gy 组即已有明显增加;上述结果与食物迷宫结果测试结果不尽一致,这似乎提示60 d 龄的仔鼠在0.10 Gy 及以上剂量组中枢神经系统由兴奋开始转向抑制状态,结合孔板探究的检测结果,本次实验提示仔鼠宫内辐照受0.10 Gy 及以上剂量氚内辐照,在出生后22 d、50 d、60 d 至100 d,中枢神经系统呈现兴奋状态,而后转入抑制状态;学习和记忆能力受到损害,导致上述改变的阈剂量在0.05—0.10 Gy 之间,此值高于宫内氚辐照后仔鼠体重、新生反射和生理标志改变的测定值<sup>[7]</sup>。故反映辐射效应中,行为指标不如体重改变敏感,这与 Jensh 等<sup>[4]</sup>的观点一致。

辐射对发育着的中枢神经系统的作用研究,目前受到了 UNSCEAR 的关注,并将此作为当今重要的研讨问题之一<sup>[8,9]</sup>。以往研究多以外辐照、大剂量为主,研究指标也多为脑形态学、脑重及生长发育指标为主<sup>[1]</sup>。本研究是前一阶段对生长发育研究的继续,旨在观察不同发育阶段脑功能方面改变的情况及氚辐射对发育着的中枢神经系统的效应。

吕慧敏同志在氚水稀释、标定、剂量估算及染毒方面作了大量工作,特此致谢。

### 参 考 文 献

- 1 ICRP Publication, No. 49, 1986
- 2 董金婵,周湘艳. 中华放射医学与防护杂志, 1991, 11(3): 176
- 3 Adams J. Methods in Behavioral teratology. In: Riley E P. Vorhees C V eds. Handbook of Behavioral Teratology. New York: Plenum Press, 1986, 67
- 4 Jensh R P, Brent R L. Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 1986, 181: 611
- 5 Norton S. Toxic. Appl. Pharmacol., 1986, 83: 240
- 6 符绍莲等. 北京医科大学学报, 1990, 22(2): 85
- 7 王 冰, 周湘艳等. 中华放射医学与防护杂志, 1993 (印刷中)
- 8 UNSCEAR Report, No. 39, 1990
- 9 UNSCEAR Report, No. 40, 1991

(下转第192页 Continued to P 192)

## THE EFFECTS OF RADIATION ON T-LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD AND CFU-TL

Cao Xia    Wang Tao    Li Yanyi

(Department of Radiation Medicine, Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

**ABSTRACT** The kinetics, metabolism and radiosensitivity of T-lymphocytes in peripheral blood and colony forming unit-T lymphocyte (CFU-TL) were studied with technique of tissue culture with methycellulose and  $^3\text{H}$ -TdR incorporation. The linear relationship was observed between the number of CFU-TL and the planted mononucleus cells at a certain concentration of cells. The number of colonies increased with planted cells in the range of  $(0.5-1.5) \times 10^5$ . It was found that in the cells cultured for 12 days,  $^3\text{H}$ -TdR incorporation still can be achieved but incorporation was lower than that in fresh separated mononucleus cells, which suggests decreased in the exposed cells. After  $\gamma$ -irradiation, both the number of colonies and CPM of  $^3\text{H}$ -TdR incorporation decreased rapidly. The result indicates that CFU-TL is more sensitive,  $D_0 = 2.3 \text{ Gy}$ .

**KEYWORDS** T-lymphocyte colony forming unit (CFU-TL), Proliferation characteristic, Radiosensitivity, Biological radiation effects

---

(上接第188页 Continued from P 188)

## EFFECTS OF LOW LEVEL PRENATAL BETA-IRRADIATION OF TRITIATED WATER ON POSTNATAL BEHAVIOR, LEARNING AND MEMORY ABILITY IN MICE

Wang Bing    Zhou Xiangyan

(Laboratory of Industrial Hygiene, Ministry of Public Health, Beijing 100088)

**ABSTRACT** Pregnant adult C57 BL/6 J strain mice, randomly assigned to 1 of 4 experimental groups, were irradiated with exponentially decreasing doses of tritium beta-rays but group 1 (used as a control) by single injection of tritiated water (HTO) at their 12.5 th day of gestation. Offsprings of male, received accumulative doses of 0, 0.5, 0.10 or 0.30 Gy in uterus were trained or examined on learning and memory ability or with behavioral tests. Significant dose-response relationships for alternations in those tests were found due to exposure to 0.10 Gy or above. These results indicate that exposure to HTO during the fetal period in mice results in dose-dependent alteration in postnatal behavior, learning and memory ability. 0.05--0.10 Gy exposure may represent a threshold for the experimental conditions of this research using these parameters.

**KEYWORDS** Tritiated water, Internal irradiation, Threshold brain development, Behavior test, Learning and memory ability, Animal experiment, Mouse