

不同功率密度的微波辐射对小鼠学习记忆功能的影响

李景璐^a, 李曼^a, 蒋佳诺^a, 徐玉良^a, 李格^b, 任旷^c, 范红艳^c

摘要:

[目的] 观察频率为 2450 MHz 的不同功率密度微波辐射对小鼠学习记忆功能的影响, 并探究其影响机制。

[方法] 将 40 只 5 周龄昆明种小鼠作为观察对象, 雌雄各半, 随机分为对照组和 3 个辐射组。辐射组连续暴露于频率为 2450 MHz 的微波辐射 28 d, 1.5 h/d, 功率密度分别为 2.5、5.0、10.0 mW/cm²。通过 Y 迷宫实验和避暗实验观察各组小鼠学习记忆能力改变。检测小鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、S100B 蛋白、一氧化氮(NO)、天冬氨酸(Asp)、γ-氨基丁酸(GABA)及谷氨酸(Glu)含量。

[结果] 各辐射组小鼠 Y 迷宫错误逃逸次数明显增高, 脑组织中 SOD 活性及 Glu 含量降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 10.0 mW/cm² 辐射组小鼠避暗实验错误次数增加($P < 0.01$); 5.0、10.0 mW/cm² 辐射组小鼠避暗实验潜伏期减少, 小鼠脑组织中 S100B 蛋白浓度升高, NO 及 GABA 含量增高, Asp 含量降低, 与对照组相比, 具有统计学差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 随着微波辐射暴露功率密度的增加, 损伤逐渐加重。

[结论] 微波辐射可导致小鼠学习记忆功能减弱, 其机制可能为微波辐射造成脑组织氧化损伤, 使脑组织中 S100B 蛋白含量增高, 导致 NO 浓度增加, 进而造成 Glu 等氨基酸类神经递质代谢紊乱, 从而损害小鼠学习记忆能力减弱。

关键词: 微波辐射; 学习记忆; 氧化损伤; S100B 蛋白; 氨基酸类神经递质

引用: 李景璐, 李曼, 蒋佳诺, 等. 不同功率密度的微波辐射对小鼠学习记忆功能的影响[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(5): 445-448.
DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16751

Effects of different power densities of microwave radiation on learning and memory ability of mice LI Jing-lu^a, LI Man^a, JIANG Jia-nuo^a, XU Yu-liang^a, LI Ge^b, REN Kuang^c, FAN Hong-yan^c (a. College of Clinical Medicine b. College of Nursing c. College of Basic Medical Sciences, Jilin Medical University, Jilin, Jilin 132013, China). Address correspondence to FAN Hong-yan, E-mail: 13843245245@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To observe the effects of microwave radiation at 2450 MHz with different power densities on learning and memory ability of mice.

[Methods] Forty 5-week-old Kunming mice were (1:1 sex ratio) randomly divided into four groups with ten mice each: control group, 2.5 mW/cm² radiation group, 5.0 mW/cm² radiation group, and 10.0 mW/cm² radiation group. Three radiation groups were exposed to microwave radiation (2450 MHz) for 28 days, 1.5 h/d. The changes of learning and memory ability were evaluated with Y maze test and step-through test. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the levels of S100B protein, nitric oxide (NO), aspartic acid (Asp), gamma amino acid (GABA), and glutamate (Glu) were determined, respectively.

[Results] Compared with the control group, the incorrect run counts of Y-maze test in the three radiation groups were higher, the activity of SOD and the level of Glu were lower ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). In the step-through test, the incorrect counts of the 10.0 mW/cm² radiation group was higher ($P < 0.01$); the latencies of both the 5.0 mW/cm² and the 10.0 mW/cm² radiation groups were obviously lower than that of the control group, the levels of S100B protein were higher, the levels of NO and GABA were increased, and the levels of Asp were decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). With the increase of power density of microwave irradiation, the damage gradually aggravated.

[Conclusion] Microwave radiation can affect learning and memory ability of mice. Microwave radiation may cause oxidative

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目]吉林省卫生厅科技研究项目资助课题(编号: 20142105); 吉林省大学生创新创业训练计划项目(编号: 2015025)

[作者简介]李景璐(1994—), 女, 本科生; 研究方向: 神经药理; E-mail: lijinglu0203@163.com

[通信作者]范红艳, E-mail: 13843245245@163.com

[作者单位]吉林医药学院 a. 临床医学院 b. 护理学院 c. 基础医学院, 吉林 吉林 132013

damage, increase the levels of S100B protein and NO, and induce metabolic disturbance of amino acid neurotransmitters, which results in impaired learning and memory ability of mice.

Keywords: microwave radiation; learning and memory; oxidative damage; S100B protein; amino acid neurotransmitter

Citation: LI Jing-lu, LI Man, JIANG Jia-nuo, et al. Effects of different power densities of microwave radiation on learning and memory ability of mice[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(5): 445-448. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16751

微波是指频率为300 MHz~300 GHz的电磁波^[1],分为分米波、厘米波、毫米波和亚毫米波,是一个有限频带^[2]。2450 MHz微波广泛于微波炉等民用加热领域和工业领域,也是医学科研中常用的微波频段^[3]。研究表明,神经系统是微波辐射的敏感部位,微波辐射可引起人与动物的学习认知障碍、学习记忆能力下降^[4]。不同功率密度微波辐射致学习记忆障碍与其机制相关性报道较少。本实验旨在通过研究不同功率密度微波辐射暴露后,小鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、一氧化氮(NO)浓度、S100B蛋白浓度以及氨基酸类神经递质的变化,为揭示微波辐射致小鼠学习记忆障碍的机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及辐照方式

健康昆明种小鼠40只,5周龄,雌雄各半,清洁级,体重(20 ± 2)g,由吉林大学实验动物中心提供[合格证号SCXK(吉)2009-0005],环境温度为(25 ± 0.5)℃,相对湿度为(60 ± 1)%,自由进食水。小鼠随机分为对照组、辐射组(辐射功率密度分别为2.5、5.0、10.0 mW/cm²),辐照方式采用频率为2450 MHz的微波源,出口天线为矩形喇叭天线,功率200 W。照射时,将小鼠置入有机玻璃盒内,不含金属物质,矩形喇叭天线置于被照小鼠的正下方,照射参考点为小鼠腹部体表。照射时间1.5 h/d,连续28 d。各组小鼠适应性喂养1 d后,进行动物实验。每3 d称体重1次。微波辐射结束后观察小鼠学习记忆能力的改变。

1.2 试剂与仪器

SOD试剂盒、考马斯亮蓝试剂盒(南京建成生物工程公司产品,中国);NO试剂盒(上海碧云天试剂公司,中国);天冬氨酸(Asp)试剂盒(上海恒远生物科技有限公司,中国);钙结合蛋白家族S100B蛋白(S100B protein)试剂盒、 γ -氨基丁酸(GABA)试剂盒、谷氨酸(Glu)试剂盒(上海浩本生物科技有限公司,中国);722可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司,中国);Model 680型酶标仪(Bio-rad,美国);Y迷宫

装置、BA-200小鼠避暗仪(成都泰盟软件技术有限公司,中国);MY8C-1型微波功率源(南京汇研微波系统工程有限公司,中国)。

1.3 学习记忆能力的检测

1.3.1 Y迷宫实验 Y迷宫有I、II、III三臂,其控制面板上有电压和延时控制旋钮。开启后I、II、III三臂的信号灯随机亮,此时该臂不通电即安全区(亮灯区),交界区与其余两臂均通电为非安全区(电击区)。安全区无规律变换,小鼠受电击后从起步区直接逃到安全区为正确反应,若逃到非安全区域为错误反应。小鼠逃到安全区后,灯光继续作用15 s,熄灯后该次测试结束。小鼠所在支臂为下次测试的起步区,两次测试间隔为30 s,依次重复,每天测试20次,连续测试4 d。第5天采用实验模式,记录小鼠在300 s内错误逃逸次数作为测试结果。

1.3.2 避暗实验 采用与Y迷宫实验相同的小鼠,避暗仪暗室底部铜栅通36 V、50 Hz交流电,先将小鼠放入避暗仪反应箱中训练3 min,小鼠受电击逃往明室。正式测试开始时将小鼠背对洞口放入明室,小鼠进入暗室则受到电击,避暗仪自动记录5 min内小鼠进入暗室的次数(错误次数)和首次进入暗室的时间(避暗潜伏期)。前4 d为训练适应期,第5天记录小鼠错误次数和避暗潜伏期作为测试结果。

1.4 脑组织中NO浓度、SOD活性检测

于行为学实验结束后,断髓处死小鼠迅速剥离其脑,取脑组织准确称重,用生理盐水在冰浴下制备质量分数为10%脑组织匀浆,4℃,3000 r/min(离心半径9.5 cm),离心10 min,取上清液,按照试剂盒要求用酶标仪测定脑组织中NO浓度。取质量分数为10%的脑组织匀浆液稀释至质量分数为1%,按照试剂盒要求采用黄嘌呤氧化酶法,用分光光度计测定脑组织中SOD活性。

1.5 脑组织中S100B蛋白含量检测

取质量分数为10%的脑组织匀浆液,按照试剂盒要求采用酶联免疫法测定脑组织中S100B蛋白含量。

1.6 脑组织中相关氨基酸类神经递质含量检测

取质量分数为10%的脑组织匀浆液,严格按照试剂盒操作步骤采用酶联免疫法测定Asp、GABA、Glu含量。

1.7 统计学分析

数据全部录入Excel 2007,采用SPSS 20.0统计软件包进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各辐射组与对照组比较,采用独立样本的t检验。相关分析用Pearson法,以相关系数(r)表示。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 微波辐射对小鼠学习记忆功能的影响

Y迷宫实验结果显示,与对照组相比,微波辐射组小鼠错误逃逸次数均增加,差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。避暗实验结果显示,与对照组相比,5.0、10.0 mW/cm²辐射组潜伏期缩短($P<0.05$),10.0 mW/cm²辐射组错误次数增加($P<0.01$)。见表1。

表1 微波辐射对小鼠学习记忆功能的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	功率密度 (mW/cm ²)	Y迷宫错误逃逸 次数(次)	避暗实验 潜伏期(s)	避暗实验错误 次数(次)
对照组	—	2.00 ± 1.00	264.79 ± 54.63	0.33 ± 0.52
辐射组	2.5	3.71 ± 1.50*	214.23 ± 81.52	0.83 ± 0.75
	5.0	4.17 ± 1.94*	193.31 ± 28.73*	1.20 ± 0.45
	10.0	5.33 ± 1.75**	162.53 ± 62.41*	1.67 ± 0.82**

[注]与对照组比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

2.2 小鼠脑组织中SOD活性、NO浓度以及S100B蛋白含量

各辐射组与对照组相比,小鼠脑组织中SOD活性均降低,差异具有统计学意义($P<0.01$); NO浓度呈逐渐增加的趋势($r=0.963$, $P=0.037$),5.0、10.0 mW/cm²辐射组高于对照组($P<0.01$); S100B蛋白含量逐渐增加的趋势($r=0.996$, $P=0.004$),5.0、10.0 mW/cm²辐射组高于对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。见表2。

表2 小鼠脑组织中SOD活性、NO浓度以及S100B蛋白含量
($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	功率密度 (mW/cm ²)	SOD (U/mg)	NO (μmol/L)	S100B蛋白 (μg/L)
对照组	—	6.41 ± 0.24	13.51 ± 6.81	244.38 ± 35.99
辐射组	2.5	5.24 ± 0.66**	21.19 ± 12.31	270.21 ± 31.73
	5.0	5.07 ± 0.17**	30.15 ± 8.59**	307.08 ± 35.78*
	10.0	4.92 ± 0.67**	35.63 ± 10.88**	352.92 ± 30.50**

[注]与对照组比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

2.3 小鼠脑组织中Asp、GABA、Glu含量变化

ELISA结果显示,5.0、10.0 mW/cm²辐射组与对照

组相比,小鼠脑组织中Asp、GABA含量的差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$); GABA含量呈逐渐增加趋势($r=0.988$, $P=0.012$);各辐射组Glu均低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表3。

表3 小鼠脑组织中Asp、GABA、Glu含量变化($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	功率密度 (mW/cm ²)	Asp (μg/L)	GABA (nmol/L)	Glu (nmol/L)
对照组	—	58.38 ± 5.96	337.64 ± 21.21	48.85 ± 8.29
辐射组	2.5	52.36 ± 6.93	352.95 ± 18.07	29.17 ± 5.57**
	5.0	50.99 ± 4.08*	363.05 ± 6.24*	24.06 ± 6.10**
	10.0	49.45 ± 3.00**	379.47 ± 15.08**	19.06 ± 6.27**

[注]与对照组比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

3 讨论

动物实验表明,微波辐射可使动物的空间记忆能力下降,影响学习记忆能力,微波辐射对学习记忆的影响机理的研究相对较少,主要集中在长时程增强(LTP)领域,例如,特定频段的微波辐射可诱发LTP,导致神经系统功能紊乱^[3]。微波辐射对氧化应激酶、S100B蛋白以及氨基酸类神经递质影响的报道不多,本研究从这方面入手,探究微波辐射对学习记忆的影响。

微波辐射作用于机体时,会产生大量自由基,与体内的活性氧发生链式反应,引发脂质的过氧化作用,导致氧化损伤。SOD是一种重要抗氧化酶,在保护细胞免受氧自由基的损伤中发挥重要作用。SOD能够通过歧化反应消除自由基和超氧阴离子,活力高低间接反应机体清除氧自由基的能力。NO在Glu的介导下由一氧化氮合酶(NOS)催化产生。NO作为一种信号分子,在神经系统中具有多种功能。NO通过激活鸟苷酸环化酶,使细胞内环磷鸟苷(cGMP)含量升高,cGMP又可改变离子通道活性,影响Glu释放^[5]。NO也可作为一种自由基,可以与超氧阴离子(O₂⁻)发生反应产生细胞毒性更强的过氧亚硝基(ONOO⁻),使SOD活性减低;也可作用于蛋白质分子中的酪氨酸残基和巯基,从而使蛋白质分子失活,影响细胞正常功能。本研究显示,小鼠接受2450 MHz微波辐射后,脑组织中SOD活性降低,NO含量升高,导致氧化损伤,使小鼠的学习记忆功能下降。

S100B蛋白是一种由星型胶质细胞和少突胶质细胞合成分泌钙结合蛋白,在S100蛋白家族中具有重要地位,脑组织中含量最高,为脑损伤的特异性标志。任何情况下脑损伤都会导致脑脊液和血液中S100B蛋

白含量升高。S100B蛋白具有广泛的生物学活性,其主要在细胞增殖、凋亡等过程发挥重要作用^[6]。低浓度S100B蛋白能够促进神经生长,高浓度S100B蛋白通过NO途径,诱导神经元的凋亡、坏死。本研究显示,辐射组小鼠脑组织中S100蛋白含量增加,推测微波辐射可通过氧化应激损伤小鼠脑组织,使S100B蛋白增高,进而诱导神经细胞的功能减退,表现为小鼠学习记忆功能下降。

氨基酸类神经递质包Glu、Asp兴奋性氨基酸类神经递质以及GABA、甘氨酸(Gly)抑制性氨基酸类神经递质,由突触前膜释放后立即与相应的突触后膜受体结合,使突触产生去极化电位或超极化电位,导致突触后神经兴奋性升高或降低,并参与突触可塑性的相关过程^[7-8],在学习记忆等联想性活动中具有至关重要的作用^[9]。兴奋性神经递质和抑制性神经递质在脑内共同调节学习记忆的功能。Glu是神经系统内最主要的兴奋性神经递质,几乎对脑内所有的功能具有调节作用^[10]。Asp也是脑部重要的兴奋性神经递质,与谷氨酸共同参与了学习记忆的全过程^[11]。GABA是脑组织中最为重要的抑制性神经递质,主要是通过作用于突触后膜导致阴离子内流,抑制神经元兴奋产生,从而调节学习记忆等各种认知功能^[12-13]。本研究显示,5.0、10mW/cm²辐射组小鼠脑组织中Asp含量和Glu含量均降低,GABA含量升高,与Wang等^[10]和Zhao等^[14]的研究结果相一致。微波辐射可以造成小鼠脑内氨基酸类神经递质代谢的紊乱,影响小鼠学习记忆功能。

综上所述,5、10mW/cm²微波辐射可使小鼠脑组织中SOD活性降低,引起S100B蛋白、NO浓度增加,氧化应激以及NO毒性可能导致兴奋性以及抑制性氨基酸类神经递质代谢紊乱,造成小鼠学习记忆能力下降,但更深入的信号转导机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Hao Y H, Zhao L, Peng R Y. Effects of microwave radiation on brain energy metabolism and related mechanisms[J]. Mil Med Res, 2015, 2(1): 4.
- [2] 张渊, 张建波, 唐俊, 等. 900MHz电磁辐照对大鼠学习记忆能力和血脑屏障通透性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(3): 217-221.
- [3] 赵亚丽, 彭小东, 杨玉华, 等. 2450 MHz微波辐射对大鼠海马长时程增强和脑组织脂褐素的影响[J]. 航天医学与医学工程, 2004, 17(2): 111-113.
- [4] Mortazavi S M, Taeb S, Dehghan N. Alterations of visual reaction time and short term memory in military radar personnel[J]. Iran J Public Health, 2013, 42(4): 428-435.
- [5] 王帅, 贾琦珍, 矫继峰, 等. 苦马豆素对大鼠不同脑区NO-cGMP-Glu含量的影响[J]. 西南农业学报, 2015, 28(5): 2278-2283.
- [6] Lange R T, Brubacher J R, Iverson G L, et al. Differential effects of alcohol intoxication on S100B levels following traumatic brain injury[J]. J Trauma, 2010, 68(5): 1065-1071.
- [7] Gundersen V, Storm-Mathisen J, Bergersen L H. Neuroglial transmission[J]. Physiol Rev, 2015, 95(3): 695-726.
- [8] Avoli M, Krnjević K. The long and winding road to gamma-amino-butyric acid as neurotransmitter[J]. Can J Neurol Sci, 2016, 43(2): 219-226.
- [9] Rohan J G, Carhuatanta K A, McInturf S M, et al. Modulating hippocampal plasticity with *in vivo* brain stimulation[J]. J Neurosci, 2015, 35(37): 12824-12832.
- [10] Wang H, Peng R Y, Zhao L, et al. The relationship between NMDA receptors and microwave-induced learning and memory impairment: a long-term observation on Wistar rats[J]. Int J Radiat Biol, 2015, 91(3): 262-269.
- [11] Ghisleni C, Bollmann S, Poil S S, et al. Subcortical glutamate mediates the reduction of short-range functional connectivity with age in a developmental cohort[J]. J Neurosci, 2015, 35(22): 8433-8441.
- [12] Lett T A, Kennedy J L, Radhu N, et al. Prefrontal white matter structure mediates the influence of *GAD1* on working memory [J]. Neuropsychopharmacology, 2016, 41(9): 2224-2231.
- [13] Paine T A, Cooke E K, Lowes D C. Effects of chronic inhibition of GABA synthesis on attention and impulse control[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2015, 135: 97-104.
- [14] Zhao L, Peng R Y, Wang S M, et al. Relationship between cognition function and hippocampus structure after long-term microwave exposure[J]. Biomed Environ Sci, 2012, 25(2): 182-188.

(收稿日期: 2016-11-18; 录用日期: 2017-03-20)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 陶黎纳)