文章编号:1000-5404(2011)04-0327-04

论著

葡萄糖干预对电磁辐射所致大鼠学习记忆功能障碍的影响

卢永辉,何旻蒂,张彦文,周 舟,张广斌,余争平,钟 敏 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院劳动卫生学教研室,电磁辐射医学防护教育部重点实验室)

【摘要】 目的 观察平均功率密度为30 mW/cm^{2}的连续微波辐射对大鼠学习记忆功能和海马葡萄糖摄取(glucose uptake)的影响及葡萄糖干预作用。**方法** 成年雄性SD大鼠48只,其中18只用于Morris水迷宫实验,分为对照组、暴露组、葡萄糖干预暴露组,每组6只;暴露组、葡萄糖干预暴露组接受平均功率密度30 mW/cm^{2}的微波连续暴露28 d,每天20 min,暴露结束后Morris水迷宫检测大鼠学习记忆功能变化,Morris水迷宫训练前30 min,葡萄糖干预暴露组大鼠按500 mg/kg腹腔注射葡萄糖,对照组和暴露组腹腔注射生理盐水。另30只用于海马葡萄糖摄取实验,分为对照组,暴露7、14、21、28 d组,每组6只,分别接受0、7、14、21、28 d平均功率密度为30 mW/cm^{2}的微波暴露,各组暴露期满后,液体闪烁计数法检测大鼠海马组织对^{3}H-2脱氧葡萄糖(^{3}H-2DG)的摄取量变化。**结果** 平均功率密度为30 mW/cm^{2}的微波连续暴露28 d后,暴露组大鼠第4、5、6、7天逃避潜伏期较对照组延长($P<0.05$),葡萄糖干预暴露组大鼠逃避潜伏期较对照组差异无显著性($P>0.05$);暴露组大鼠在目标象限停留时间[(18.66±2.77)s]和跨越虚拟平台次数(1.60±0.54)均较对照组[(30.75±8.02)s,(2.80±0.83)]下降($P<0.05$),葡萄糖干预暴露组大鼠目标象限停留时间[(26.84±4.75)s]和跨越虚拟平台次数(3.20±1.03)较对照组无显著性差异($P>0.05$)。微波暴露21 d组和28 d组大鼠海马对^{3}H-2-D-Glucose摄取量[(3 959±390),(3 764±192)]较对照组(5 284±711)显著减少($P<0.05$)。**结论** 腹腔注射葡萄糖可以改善微波暴露引起的学习记忆功能障碍,海马葡萄糖摄取减少可能是电磁辐射致学习记忆功能障碍的重要因素。

【关键词】 电磁辐射;葡萄糖;海马;学习;记忆
【中图法分类号】 R363.124;R749.16;R977.6 **【文献标志码】** A

Glucose intervention attenuates learning and memory dysfunction induced by electromagnetic radiation in rats

Lu Yonghui, He Mindi, Zhang Yanwen, Zhou Zhou, Zhang Guangbin, Yu Zhengping, Zhong Min (Department of Occupational Hygiene, Key Laboratory of Electromagnetic Radiation Protection of Ministry of Education, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the change of glucose uptake in the hippocampus after whole-body exposure to 30 mW/cm^2 microwave, and explore the effect of glucose intervention on learning and memory dysfunction induced by electromagnetic radiation (EMR) in rats. **Methods** A total of 18 adult male SD rats were randomly divided into control group, microwave exposure group (MW), microwave exposure and glucose intervention group (MW + GLU), with 6 animals in each group. The rats of MW and MW + GLU group received 30 mW/cm^2 microwave exposure 20 min per day for 28 d, and then their learning and memory were detected by Morris water maze. In 30 min before training, the MW + GLU group were administered intraperitoneally 500 mg/kg of glucose every day from the start of training. Another 30 rats received 30 mW/cm^2 microwave exposure 20 min once a day were sacrificed in 0, 7, 14, 21, and 28 d respectively, 6 for each time point, and then glucose uptake in the hippocampus was determined by liquid scintillation counter. **Results** After exposure to 30 mW/cm^2 microwave for 28 d, the escape latency of MW group was increased in 4, 5, 6 and 7 d after training when compared to the control ($P<0.05$), but there was no significant difference in MW + GLU group and control ($P>0.05$). The time in target quadrant and the number of times through virtual platform were also

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(30670490)
【通信作者】 钟 敏,电话:(023)68752733,E-mail:zhmin999@yahoo.com.cn

decreased in MW group than in control (18.66 ± 2.77 *vs* 30.75 ± 8.02 s, and 1.60 ± 0.54 *vs* 2.80 ± 0.83, respectively, $P < 0.05$), but there was no significant difference in MW + GLU group and control (26.84 ± 4.75 s and 3.20 ± 1.03 respectively, $P > 0.05$). The glucose uptake in the hippocampus was significantly decreased in 21 and 28 d after exposure compared to control (3 959 ± 390 and 3 764 ± 192 *vs* 5 284 ± 711, $P < 0.05$). **Conclusion** Glucose treatment attenuates the impairment of learning and memory induced by EMR, and the reduction of hippocampal glucose uptake may be a reason of learning and memory dysfunction induced by EMR.

[Key words] electromagnetic radiation; glucose; hippocampus; learning; memory

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30670490). Corresponding author: Zhong Min, Tel: 86-23-68752733, E-mail: zhmin999@yahoo.com.cn

目前,电磁技术在国防和民用领域广泛应用,电磁辐射职业暴露人群增多,电磁辐射对人体健康的危害正日益受到关注。中枢神经系统,特别是海马区是对电磁辐射最为敏感的靶器官之一。电磁辐射可以引起动物学习记忆功能下降[1],职业暴露于电磁辐射可出现记忆力减退,并是促进痴呆和阿尔兹海默病(Alzheimer's disease,AD)发生的高危因素[2]。葡萄糖摄取对学习记忆功能发挥重要作用,给予葡萄糖可以促进人和啮齿动物记忆功能,改善其在认知行为中的表现,并能够减轻胆碱能系统和阿片类系统拮抗剂引起的记忆功能损伤[3],而破坏脑葡萄糖代谢可引起AD样改变[4]。海马是参与哺乳动物学习记忆的主要脑区之一,海马相关的学习记忆过程中海马细胞外葡萄糖水平降低,表明学习记忆过程需要海马对葡萄糖大量摄取。因此,本实验通过观察在平均功率密度为30 mW/cm^{2}微波辐射作用下大鼠学习记忆功能改变及葡萄糖干预作用,并观察电磁辐射对大鼠海马葡萄糖摄取的影响,探讨海马葡萄糖摄取改变在电磁辐射引起的学习记忆功能障碍中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级成年雄性SD大鼠48只,体质量(200 ± 20) g,购于第三军医大学实验动物中心。Morris水迷宫实验18只大鼠均分为对照组、暴露组、葡萄糖干预暴露组;海马葡萄糖摄取实验(30只)分为对照组,暴露7、14、21、28 d组,各实验组6只大鼠。

1.2 试剂及仪器

MT-200 Morris水迷宫视频跟踪系统(成都泰盟科技,中国)、微波发射源(西安黄河厂,中国)、D-葡萄糖(glucose,上海生工,中国)、^{3}H-2-D-葡萄糖(^{3}H-2DG,8.0 Ci/mmol,PerkinElmer,美国)、液体闪烁计数仪(Beckman公司,美国)、Micro slicer(DSK公司,日本)、人工脑脊液(NaCl 124 mmol/L, KCl 3 mmol/L, $MgCl_2$ 2 mmol/L, NaH_2PO_4 1.25 mmol/L, $NaHCO_3$ 26 mmol/L, $CaCl_2$ 2 mmol/L, glucose 10 mmol/L)、蛋白质定量测定试剂盒(Bio-Rad公司,美国)。

1.3 方法

1.3.1 微波暴露 微波暴露在反射近似零的微波暗室内进行,环境温度(23 ± 1)℃,湿度50% ~70%。电磁辐射源为特定频率的微波源,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 1次的全身暴露。对照组接受0 mW/cm^{2}的假暴露,其他处理条件与处理组相同。Morris水迷宫实验大鼠暴露组,葡萄糖干预暴露组连续暴露28 d,海马葡萄糖摄取实验暴露7、14、21、28 d组分别连续暴露7、14、21、28 d。

1.3.2 动物给药 每天训练前30 min,葡萄糖干预暴露组大鼠按500 mg/kg腹腔注射葡萄糖[5],暴露组和对照组大鼠腹腔注射相应体积生理盐水。

1.3.3 Morris水迷宫实验 水迷宫直径120 cm,高60 cm,池内水深45 cm,水温(25 ± 1)℃,加入适量奶粉使水浑浊。在任意象限中央放一圆形(直径10 cm)站台,没于水下1 ~1.5 cm。训练环境保持不变。实验分为定位航行和空间探索实验。大鼠暴露28 d后开始训练,训练时依次从东南西北4个入水点随机选择1个,将大鼠面向池壁放入水中,记录动物游泳速度和逃避潜伏期,如果大鼠在60 s内未找到平台,将其引至平台,逃避潜伏期记为60 s。共训练7 d,每只大鼠每天训练4次。第7天训练完成后撤除平台,让大鼠休息2 h,任选一个入水点将大鼠放入水中自由游泳60 s,记录60 s内大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。

1.3.4 海马葡萄糖摄取 大鼠分别微波暴露0、7、14、21、28 d后,麻醉,断头处死,快速将脑放入通有95% O_2和5% CO_2混合气体的冰冷人工脑脊液(aCSF)中分离海马。在通有95% O_2和5% CO_2混合气体的冰冷aCSF中,用Micro slicer将海马切为400 μm厚的切片,转入通有95% O_2和5% CO_2气体的aCSF中,37 ℃,1 h。然后海马脑片转入到含有0.1 μCi/ml ^{3}H-2DG的aCSF中,95% O_2和5% CO_2气体通气,37 ℃,45 min。结束后用冰冷PBS漂洗海马脑片4次,终止反应。用1 ml含0.5% $HClO_4$的PBS匀浆海马脑片,450 μl匀浆液用Bio-Rad蛋白检测试剂盒检测总蛋白浓度,另450 μl匀浆液加入150 μl 6 mol/L NaOH,60 ℃溶解至澄清,150 μl 6mol/L HCl中和后,液闪计数仪计数,本底每分钟计数(cpm)(30 ~50 cpm)小于总cpm的5%,将其在总cpm中扣除。

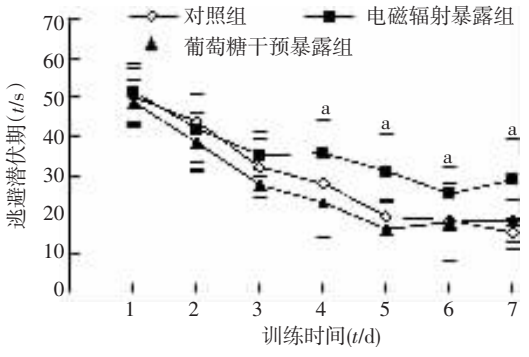
1.4 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 软件对逃避潜伏期数据进行单因素方差分析，对其余实验数据进行双样本 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠学习记忆功能改变及葡萄糖干预效果

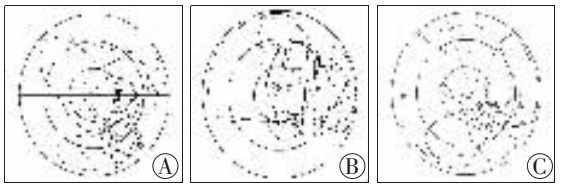
2.1.1 定位航行实验结果　在定位航行实验中，对照组、暴露组和葡萄糖干预暴露组 3 组大鼠寻找平台的逃避潜伏期逐渐降低，说明训练效果显著。暴露组在训练第 4、5、6、7 天逃避潜伏期明显高于对照组（$P<0.05$），葡萄糖干预暴露组大鼠的逃避潜伏期和对照组相比无显著差别（$P>0.05$），说明平均功率密度为 30 mW/cm^2 的微波连续暴露 28 d 后，大鼠学习记忆能力降低，腹腔注射葡萄糖有效减轻了微波辐射引起的学习记忆功能损伤（图 1）。



a：$P<0.05$，与对照组比较

图 1　连续微波暴露后各组大鼠逃避潜伏期变化

2.1.2 空间搜索实验结果　暴露组在目标象限停留时间［(18.66 ± 2.77) s］显著低于对照组［(30.75 ± 8.02) s，$P<0.05$］，而葡萄糖干预暴露组目标象限停留时间［(26.84 ± 4.75) s］与对照组比较无明显差异。暴露组跨越虚拟平台次数(1.60 ± 0.54)明显低于对照组(2.80 ± 0.83)（$P<0.05$），葡萄糖干预暴露组跨越虚拟平台次数(3.20 ± 1.03)与对照组比较差异无显著性（$P>0.05$）。空间搜索实验轨迹图（图 2）显示：暴露组大鼠轨迹散乱或贴壁游动，对照组和葡萄糖干预暴露组大鼠多集中在目标象限，反复寻找平台。结果提示：平均功率密度 30 mW/cm^2 的微波连续暴露 28 d 导致大鼠空间记忆功能损伤，腹腔注射葡萄糖可改善微波辐射引起的记忆功能损伤。



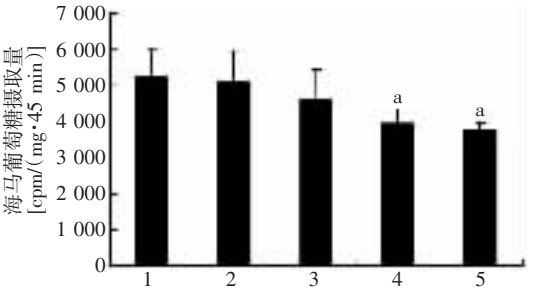
A：对照组；B：电磁辐射暴露组；C：葡萄糖干预暴露组

图 2　微波连续暴露 28 d 后各组大鼠空间搜索轨迹图

2.1.3 游泳速度　葡萄糖干预暴露组大鼠游泳速度［(25.34 ± 5.78) cm/s］与对照组［(25.55 ± 6.12) cm/s］和暴露组［(26.64 ± 5.73) cm/s］大鼠相比差异均无显著性（$P>0.05$）。

2.2 海马葡萄糖摄取功能改变

随暴露时间的增加，大鼠海马葡萄糖摄取量逐渐降低，微波连续暴露21 d 组、28 d 组大鼠海马^{3}H-2-D-葡萄糖摄取量较对照组显著减少（$P<0.05$，图 3）。



1：对照组；2：连续辐射 7 d 组；3：连续辐射 14 d 组；4：连续辐射 21 d 组；5：连续辐射 28 d 组；a：$P<0.05$，与对照组比较

图 3　连续微波暴露后各组大鼠海马葡萄糖摄取变化

3 讨论

中枢神经系统是电磁辐射作用的重要靶器官之一，电磁辐射对中枢神经系统的影响主要表现为神经行为的改变。职业暴露于电磁场中可出现头痛、头晕、乏力疲劳、记忆力减退、睡眠障碍等精神症状[6]，并是痴呆、AD 等神经退行性变发生的高危险因素[2]。实验[1]表明，电磁辐射可以引起动物学习记忆功能下降，如空间参照记忆能力和空间学习效率以及操作能力明显受损。海马是参与哺乳动物学习记忆的主要脑区，并在动物空间学习记忆中发挥重要作用[7]。其本身对电磁辐射较为敏感。电磁辐射可以引起海马 CA1 区和 CA3 区神经元萎缩和缺失[8-9]，并导致海马神经元突触结构和功能损伤[10]。本研究结果显示大鼠微波暴露 28 d 后逃避潜伏期延长，在目标象限停留时间和跨越虚拟平台次数较对照组分别降低 40% 和 43%，说明电磁辐射引起大鼠空间参考学习记忆功能降低，并可能由电磁辐射所致的海马损伤引起。

葡萄糖是脑组织最主要的能量来源，神经递质和细胞膜胆固醇都来源于葡萄糖代谢产物乙酰辅酶 A。此外，脑内 ATP 主要来源于葡萄糖，且对绝大多数的细胞和分子代谢至关重要，如蛋白的合成、排列、运输和分解，以及突触传递的保持。葡萄糖摄取促进记忆能力的作用最先由 Lapp[11] 发现。口服葡萄糖可以增强健康老年人的语言情境记忆能力，以及多种神经认

知能力,如设计能力和视觉记忆。同样,口服葡萄糖也被发现能够增强健康青年和儿童的语言情境记忆能力[3,12]。在阿尔兹海默病患者中,也证实了葡萄糖摄入对患者的记忆能力改善作用[12]。在实验动物中,葡萄糖全身和大脑局部注射可以增强动物对有害物质、食物、异常刺激和空间的记忆,并能够减轻胆碱能系统和阿片类系统拮抗剂引起的记忆功能损伤[3]。海马依赖的学习记忆过程与海马葡萄糖供应相关。SD大鼠海马细胞外液葡萄糖含量在海马依赖的学习记忆任务测试中降低了30% ~40%[13],给予葡萄糖可以减轻大鼠海马细胞外液葡萄糖含量降低并提高大鼠在这些学习记忆任务测试中的表现[14]。海马细胞外液葡萄糖浓度降低反映了学习记忆处理过程中海马对葡萄糖的大量需求,外源性葡萄糖可能缓冲了海马在学习记忆处理过程中的葡萄糖耗竭。

本研究结果显示,大鼠海马葡萄糖摄取能力受到30 mW/cm^{2}电磁辐射的影响。连续暴露21、28 d后,大鼠海马向细胞内摄取^{3}H-2脱氧葡萄糖量较对照组分别减少26%和29%,表明电磁辐射损害了大鼠海马对葡萄糖的摄取能力。本实验室前期研究[15]表明,电磁辐射暴露后,犬脑组织细胞间液内未被摄取的葡萄糖量呈升高趋势,神经元ATP含量进行性下降,与本研究结果一致。海马作为学习记忆中枢,细胞外葡萄糖水平在海马依赖的行为过程中呈快速和暂时性下降[14],表明学习记忆过程需要葡萄糖的大量摄取。因此,海马对葡萄糖摄取的减少很可能参与了电磁辐射引起的大鼠学习记忆功能降低。本研究发现,在Morris水迷宫训练前30 min给大鼠腹腔注射葡萄糖,改善了电磁辐射引起的学习记忆障碍。外源性葡萄糖干预可能通过缓和空间学习记忆过程中海马细胞外液葡萄糖的耗竭,增加海马葡萄糖的供应而拮抗电磁辐射引起的海马葡萄糖摄取率降低,从而起到改善电磁辐射导致的学习记忆障碍。此实验结果进一步提示海马葡萄糖摄取减少可能是电磁辐射引起大鼠学习记忆功能障碍的重要原因之一。此外,大脑前额皮层、杏仁核等区域也与动物空间学习记忆相关,电磁辐射是否同样引起这些区域的葡萄糖摄取能力降低,葡萄糖干预对大鼠空间学习记忆的改善是通过增加海马葡萄糖供应还是通过共同改善上述区域葡萄糖供应起作用还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Narayanan S N, Kumar R S, Potu B K, *et al*. Spatial memory performance of Wistar rats exposed to mobile phone[J]. Clinics (Sao Paulo), 2009, 64(3): 231 - 234.

[2] Qiu C, Fratiglioni L, Karp A, *et al*. Occupational exposure to electromagnetic fields and risk of Alzheimer's disease[J]. Epidemiology, 2004, 15(6): 687 - 694.

[3] Messier C. Glucose improvement of memory: a review[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 490(1/3): 33 - 57.

[4] Weinstock M, Shoham S. Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity[J]. J Neural Transm, 2004, 111(3): 347 - 366.

[5] Okaichi Y, Okaichi H. Effects of glucose on scopolamine-induced learning deficits in rats performing the Morris water maze task[J]. Neurobiol Learn Mem, 2000, 74(1): 65 - 79.

[6] 马菲, 熊鸿雁, 张耀, 等. 高强度电磁辐射对军事作业人群神经行为功能影响的流行病学调查[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(22): 2048 - 2050.

[7] Gilbert P E, Brushfield A M. The role of the CA3 hippocampal subregion in spatial memory: a process oriented behavioral assessment[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2009, 33(5): 774 - 781.

[8] Narayanan S N, Kumar R S, Potu B K, *et al*. Effect of radio-frequency electromagnetic radiations (RF-EMR) on passive avoidance behaviour and hippocampal morphology in Wistar rats[J]. Ups J Med Sci, 2010, 115(2): 91 - 96.

[9] 史长华, 路国兵, 李玉红. 电磁辐射对大鼠学习记忆能力和海马神经元形态的影响[J]. 承德医学院学报, 2009, 26(4): 356 - 358.

[10] 王丽峰, 彭瑞云, 胡向军, 等. 微波辐射对大鼠海马突触结构和功能的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2007, 25(4): 211 - 214.

[11] Lapp M E. Effects of glycemic alterations and noun imagery on the learning of paired associates[J]. J Learn Disabil, 1981, 14(1): 35 - 38.

[12] Smith M A, Riby L M, Eekelen J A, *et al*. Glucose enhancement of human memory: a comprehensive research review of the glucose memory facilitation effect[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2010, 35(3): 770 - 783.

[13] McNay E C, Gold P E. Food for thought: fluctuations in brain extracellular glucose provide insight into the mechanisms of memory modulation[J]. Behav Cogn Neurosci Rev, 2002, 1(4): 264 - 280.

[14] McNay E C, Fries T M, Gold P E. Decreases in rat extracellular hippocampal glucose concentration associated with cognitive demand during a spatial task[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(6): 2881 - 2885.

[15] 许商成, 张蕾, 余争平, 等. 微波对神经元Tfam表达的影响及与能量代谢障碍的关系[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2008, 26(5): 305 - 308.

(收稿:2010-11-03 修回:2010-11-29)

(编辑 吴培红)