

· 基础研究 ·

高功率微波辐射对大鼠脑皮质及海马神经肽 Y、nNOS 表达的影响

王丽峰 胡向军 彭瑞云 王旭 高亚兵 马俊杰 王水明 胡文华 王德文 苏镇涛

【摘要】目的 探讨高功率微波 (HPM) 辐射对大鼠脑皮质和海马形态结构以及神经元神经肽 Y (NPY)、神经型-氧化氮合酶 (nNOS) 表达的影响。**方法** 分别采用 10, 30 和 100 mW/cm² HPM 辐射 Wistar 大鼠, 并于微波辐射后 6 h, 1 d, 3 d, 7 d, 14 d 和 28 d 时处死, 同时取出大脑皮质和海马组织。通过 HE 染色观察实验大鼠脑皮质及海马的形态结构改变情况; 采用免疫组化和图像分析技术检测实验大鼠脑皮质和海马神经元 NPY、nNOS 表达的变化。**结果** 实验大鼠经 10, 30, 100 mW/cm² HPM 辐射后, 其脑皮质及海马区神经元固缩、深染; HPM 辐射后 3 d 时, 大鼠神经元胞浆内 nNOS 表达显著增加 ($P < 0.05$), NPY 表达显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** 10, 30 及 100 mW/cm² HPM 辐射可引发大鼠脑皮质和海马神经元损伤, 致使其 NPY 及 nNOS 表达异常。

【关键词】 高功率微波; 大脑皮质; 海马; 神经肽 Y; 神经型-氧化氮合酶

The influence of high power microwave irradiation on the expression of neuropeptide Y and neural nitric oxide synthase in the rat cerebral cortex and hippocampus WANG Li-feng, HU Xiang-jun, PENG Rui-yun, WANG Xu, GAO Ya-bing, MA Jun-jie, WANG Shui-ming, HU Wen-hua, WANG De-wen, SU Zhen-tao. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Corresponding author: HU Xiang-jun, PENG Rui-yun, Email: fangchang_14@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of high power microwave (HPM) irradiation on neuropeptide Y (NPY) and neural nitric oxide synthase (nNOS) expression in the cerebral cortex and hippocampus of Wistar rats. **Methods** A total of 110 Wistar rats were used for this study. Three groups of 30 Wistar rats were exposed to HPM irradiation at intensities of 3, 10, 30 and 100 mW/cm², respectively. Twenty rats served as controls and were exposed to sham HPM irradiation. At 6 h, and at 1, 3, 7, 14 and 28 d after irradiation, five rats from each group were sacrificed, and their cerebral cortices and hippocampi were harvested. HE staining was used to highlight any change in the structure of the cerebral cortex or hippocampus. Immunohistochemistry techniques and image analysis were used to study the changes in NPY and nNOS expression. **Results** 10 to 100 mW/cm² HPM irradiation caused pyknosis and deep staining of some neurons in the cerebral cortex and hippocampus. The increase in nNOS expression and decrease in NPY expression observed were significant at 3 days after irradiation. **Conclusion** HPM irradiation can induce injury in neurons of the cerebral cortex and hippocampus, and abnormal NPY and nNOS expression.

【Key words】 High power microwaves; Cerebral cortex; Hippocampus; Neuropeptide; Neural nitric oxide synthase

微波是指波长为 1 mm ~ 100 cm、能量为 $10^{-6} \sim 10^{-3}$ eV 的电磁波, 它广泛存在于日常工作及生活等多个领域中, 同时微波对生物体的损伤效应也日益受到人们关注。高功率微波 (high power microwave, HPM) 是指峰值功率大于 100 mW 的微波, 而神经系统是微波辐射最为敏感的靶部位之一, 目前关于 HPM 对神经系统损伤的报道较少。相关研究表明, 神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 与记忆力的保持及脑血管意外、外伤、癫痫等疾病的病理生理过程有着密切关系, 而神经型一氧化氮合酶 (neural nitric oxide synthase, nNOS) 参

与神经活性物质 NO 的合成, 如 NO 过剩会导致神经毒性作用。目前关于微波辐射对机体 NPY 及 nNOS 影响的报道较少, 因此本实验通过观察大鼠经 HPM 辐射后其脑形态结构、NPY 及 nNOS 表达的改变情况, 从而探讨 HPM 对脑组织的损伤效应及可能机制。

材料与方法

一、实验动物及辐射方法

共选取 110 只二级雄性 Wistar 大鼠, 体重 (180 ± 20) g, 由军事医学科学院实验动物中心提供。将其随机分为假辐射组 (20 只)、10, 30 及 100 mW/cm² 辐射组 (每组 30 只)。所用仪器主要为脉冲微波源, 微波室内布满吸收材料, 进行微波辐射时将大鼠置于有机

作者单位: 100850 北京, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所病理室

通讯作者: 胡向军、彭瑞云, Email: fangchang_14@163.com

玻璃盒内,微波辐射时间为 5 min。

二、实验检测方法

1. HE 染色检测:将各辐射组大鼠分别于微波辐射后 6 h, 1 d, 3 d, 7 d, 14 d 及 28 d 时各取 5 只处死,取其大脑皮质和海马组织,用 10% 缓冲福尔马林液固定后行石蜡包埋、切片及 HE 染色^[1],观察实验大鼠脑皮质和海马结构的形态学改变。

2. 免疫组化(SP 法)检测:所用试剂包括兔抗 NPY 及 nNOS,均购于武汉博士德生物工程有限公司;Bio-羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素(horseradish peroxidase-streptavidin, HRP-SA)以及 DAB 均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。按文献[2]报道的方法及试剂盒说明对 SP 检测法进行改进,取石蜡切片,脱蜡至水,加入兔抗 NPY 和 nNOS (1:100),于 37℃ 环境下反应 1 h, 4℃ 过夜;再分别加入 Bio-羊抗兔 IgG 和 HRP-SA,于 37℃ 环境下反应 1 h;加抗体前均用 0.01 M PBS 液冲洗 5 min,共冲洗 3 次;DAB 显色,苏木素复染核,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。阴性对照采用 PBS 液代替一抗,其它步骤同前;阳性结果呈棕黄色,位于神经元胞浆中。

3. 图像分析及定量方法:在普通光镜(10×40 倍)视野下,应用 CMIAS-II 型图像分析仪对大鼠 NPY 和 nNOS 免疫组化结果进行积分光密度(integral optical density, IOD)和平均光密度(mean optical density, MOD)测定,每张切片均随机选取 10 个视野进行检测。

三、统计学分析

所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Origin 7.0 版软件进行统计学分析(选用 *t* 检验方法), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、HPM 辐射后大鼠脑皮质及海马组织的病理形态学改变

本研究实验大鼠经 HPM 辐射后,其脑皮质锥体细胞和颗粒细胞层、海马 CA1-CA4 区及齿状回区均有部分细胞固缩呈三角形,胞核嗜碱性及胞浆嗜酸性增强,部分胶质细胞固缩、深染,血管周间隙增宽。各组大鼠在经 HPM 辐射后 3 d 内,其神经元损伤呈进行性加重趋势,于 3 d 时达到峰值,此时可见神经元固缩、深染,血管周间隙增宽;7 d 后呈现恢复趋势。通过剂量-效应分析后发现,以神经元损伤程度为参照标准,可见海马组织损伤程度重于大脑皮质,各组大鼠的损伤程度依次为:100 mW/cm² 辐射组 > 30 mW/cm² 辐射组 > 10 mW/cm² 辐射组。

二、HPM 辐射后大鼠脑皮质和海马神经元 NPY 表达的变化

1. 大鼠脑皮质神经元 NPY 表达的变化:本研究各辐射组大鼠分别经 10, 30, 100 mW/cm² 微波辐射后 3 d 时,发现其脑皮质神经元胞浆内 NPY 表达均明显减少($P < 0.01$);其中 10 mW/cm² 辐射组大鼠经微波作用后 7 d 内,脑皮质神经元胞浆 NPY 表达呈持续性降低($P < 0.01$),第 14 天时仍未恢复至正常水平;30 mW/cm² 辐射组大鼠经微波作用后 1 d 内即可见脑皮质神经元胞浆中 NPY 表达明显降低($P < 0.01$),3 d 后有所恢复,但仍显著低于假辐射组($P < 0.05$),表明 HPM 辐射可使大鼠脑皮质神经元 NPY 表达减少,其定量分析结果详见表 1, 2。

2. 大鼠海马神经元 NPY 表达的变化:本研究各辐射组大鼠分别经 10, 30, 100 mW/cm² 微波辐射后 3 d 时,发现其海马神经元 NPY 表达均显著降低($P < 0.01$);其中 10 mW/cm² 辐射组大鼠经微波作用后 7 d 内,海马神经元胞浆 NPY 表达呈持续性降低($P < 0.01$),第 14 天时仍未恢复至正常水平;30 mW/cm² 辐射组在微波作用后 14 d 内,其海马神经元胞浆 NPY 表达逐渐降低($P < 0.01$ 或 0.05),表明 HPM 辐射可使海马神经元 NPY 表达降低,其定量分析结果详见表 1, 2。

表 1 HPM 辐射后 3 d 时各组大鼠脑组织 NPY 表达的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	MOD		IOD	
	脑皮质	海马	脑皮质	海马
假辐射组	0.25 ± 0.02	0.20 ± 0.01	4.09 ± 0.54	4.23 ± 0.25
10 mW/cm ² 辐射组	0.15 ± 0.03 ^a	0.11 ± 0.01 ^a	3.39 ± 0.77 ^a	3.12 ± 0.75 ^a
30 mW/cm ² 辐射组	0.14 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.02 ^a	3.33 ± 0.60 ^a	3.06 ± 0.45 ^a
100 mW/cm ² 辐射组	0.14 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^a	2.09 ± 0.54 ^a	2.59 ± 0.42 ^a

注:与假辐射组比较,^a $P < 0.05$

表 2 HPM 辐射后各组大鼠脑组织 NPY 表达的动态变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	辐射后时间(d)	MOD		IOD	
		脑皮质	海马	脑皮质	海马
假辐射组	3	0.25 ± 0.02	0.20 ± 0.01	4.09 ± 0.54	4.23 ± 0.25
10 mW/cm ² 辐射组	3	0.15 ± 0.03 ^a	0.11 ± 0.01 ^a	3.39 ± 0.77 ^a	3.12 ± 0.75 ^a
	7	0.07 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.63 ± 0.08 ^a	1.47 ± 0.30 ^a
	14	0.08 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	2.20 ± 0.33 ^a	3.42 ± 0.69 ^a
30 mW/cm ² 辐射组	1	0.06 ± 0.01 ^a	—	2.05 ± 0.41 ^a	—
	3	0.14 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.02 ^a	3.33 ± 0.60 ^a	3.06 ± 0.45 ^a
	7	0.17 ± 0.03 ^a	0.17 ± 0.03 ^a	3.32 ± 0.78 ^a	1.96 ± 0.49 ^a
	14	0.14 ± 0.03 ^a	0.14 ± 0.03 ^a	3.02 ± 0.37 ^a	3.14 ± 0.70 ^a

注:与假辐射组比较,^a $P < 0.05$

3. 大鼠脑皮质神经元 nNOS 表达的变化:本研究各辐射组大鼠分别经 10, 30, 100 mW/cm² 微波辐射后 3 d 时,其脑皮质神经元 nNOS 表达均显著增加($P < 0.01$ 或 0.05);其中 30 mW/cm² 辐射组大鼠在微波作用后 3 d 时,脑皮质神经元 nNOS 表达显著增加($P < 0.01$),随后逐渐恢复,于第 28 天时基本恢复至正常水平,表明 HPM 辐射可使大鼠脑皮质神经元 nNOS 表达

增加,其定量分析结果详见表 3,4。

4. 大鼠海马神经元 nNOS 表达的变化:本研究各组大鼠分别经 10,30,100 mW/cm²微波辐射后 3 d 时,其海马神经元 nNOS 表达均显著增加 ($P < 0.01$ 或 0.05);其中 30 mW/cm² 辐射组大鼠经微波作用后 1 d 时,即可见海马神经元 nNOS 表达显著增加 ($P < 0.01$),于 14 d 时达到峰值,至 28 d 时仍未恢复至正常水平,表明 HPM 辐射可使海马神经元 nNOS 表达增加,其定量分析结果详见表 3,4。

表 3 HPM 辐射后 3 d 时各组大鼠脑组织 nNOS 表达的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	IOD	
	大脑皮质	海马
假辐射组	0.74 ± 0.10	0.63 ± 0.08
10 mW/cm ² 辐射组	1.19 ± 0.09 ^a	1.47 ± 0.38 ^a
30 mW/cm ² 辐射组	1.02 ± 0.12 ^a	0.80 ± 0.08 ^a
100 mW/cm ² 辐射组	0.91 ± 0.08 ^a	0.88 ± 0.14 ^a

注:与假辐射组比较,^a $P < 0.05$

表 4 大鼠经 30 mW/cm² HPM 辐射后其脑组织 nNOS 表达的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	辐射后时间(d)	IOD	
		大脑皮质	海马
假辐射组	3	0.74 ± 0.10	0.63 ± 0.08
30 mW/cm ² 辐射组	1	0.76 ± 0.09	0.84 ± 0.04 ^a
	3	1.02 ± 0.12 ^a	0.80 ± 0.08 ^a
	7	0.88 ± 0.06 ^a	1.39 ± 0.10 ^a
	14	0.86 ± 0.03 ^a	2.10 ± 0.36 ^a
	28	0.67 ± 0.02	0.83 ± 0.09 ^a

注:与假辐射组比较,^a $P < 0.05$

根据上述结果可以看出,本研究实验大鼠经 HPM 辐射后,其不同脑区(即大脑皮质和海马)间 nNOS 表达并无显著差异,只是 30 mW/cm² 辐射组经 HPM 辐射后,其海马神经元 nNOS 较早出现表达增强现象,且恢复速度较慢。

讨 论

有研究发现,微波辐射所产生的热效应对机体脑结构的影响是显而易见的,其病理改变包括充血、出血及神经元尼氏体减少、胞浆空泡化、线粒体肿胀、染色质溶解或核固缩以及神经胶质细胞反应性增生等^[3,4],而关于由微波非热效应引起的形态学改变目前报道较少。HPM 由于自身辐射能量较高,在不产生明显热效应的情况下即可引起机体组织结构发生改变,这是其不同于普通微波损伤的特点之一。有学者采用较高功率的脉冲微波(X 频段,3.0~5.8 W/cm²)辐射大鼠 1 h 后,发现大鼠脑血管充血、出血,神经元肿胀、溶解^[5];经 65 mW/cm² 电磁波辐射后即刻至随后 6 h 期间,发现大鼠海马组织内少数锥体细胞轻度

肿胀、胞体增大,细胞间隙轻度增宽;12 h 后海马组织结构疏松,沿颗粒细胞层下呈带状分布,神经元及血管周围间隙增宽;辐射后 24 h 见海马组织明显水肿,锥体细胞排列紊乱,部分神经元胞体浓缩呈三角形,正常结构消失,其损伤程度进一步加重^[6],但关于 HPM 辐射致脑损伤的剂量效应关系至今尚无定论。

本研究采用 10,30,100 mW/cm² HPM 辐射实验大鼠,探讨其脑皮质及海马组织的变化规律,发现实验大鼠经 HPM 辐射后其神经元出现水肿、变性等改变,且呈一定的剂量效应关系。通过对大鼠脑皮质及海马组织进行观察,发现 100 mW/cm² 辐射组大鼠神经元固缩、深染现象最为多见(且海马损伤程度重于脑皮质),其次为 30 mW/cm² 辐射组及 10 mW/cm² 辐射组,提示随着微波平均功率密度的增加,HPM 辐射的损伤效应也不断加强(且具有区域性)。本研究通过在 HPM 辐射后不同时间点观察大鼠脑皮质及海马结构的变化特点,发现 HPM 辐射损伤在一定时间内遵循“损伤出现→加重→减轻→恢复”的变化规律;而且我们在实验过程中采用测量肛温的方法来评估 HPM 是否产生热效应,发现仅 100 mW/cm² 辐射组大鼠肛温升高超过 1℃ 以上,即提示该组可能存在热效应,而其它各组均考虑以非热效应为主。

近年来相关研究发现,NPY 在脑组织内分布广泛,中枢神经系统内 NPY 兼有神经递质和血管活性调节作用,与记忆力保持及脑血管意外、外伤、癫痫等疾病的病理生理过程有着密切关系^[7]。有研究表明,脑缺血后机体 NPY 阳性神经元减少甚至消失^[8]。NPY 神经元具有与 σ 受体配体相似的作用,可抑制突触前兴奋性氨基酸的释放,减轻由于 NMDA 受体拮抗剂引发的学习记忆功能障碍,且老年性痴呆大鼠脑内 NPY 阳性神经元数量亦可见明显减少^[9]。NPY 一般在神经元内合成,其表达减少与粗面内质网损伤后蛋白合成降低密切相关。目前关于微波辐射对 NPY 影响的报道较少,本研究采用免疫组织化学和图像分析技术检测 10,30,100 mW/cm² HPM 辐射对大鼠脑皮质及海马神经元 NPY 表达的影响,发现经微波辐射后各组大鼠脑皮质和海马神经元 NPY 表达均显著降低,且出现时间较早,这与脑缺血等损伤后的病理改变基本一致。NPY 减少可导致神经元功能障碍,进而加重其损伤,而神经元损伤又可导致 NPY 合成进一步减少。我们以往的研究发现,微波辐射能引起学习记忆功能降低^[10],NPY 表达减少可能是其中原因之一。

NOS 是体内合成 NO 的关键酶之一,在病理情况下,NO 作为自由基通过自由基链式反应产生其它自由基,过多的 NO 还可直接影响机体铁蛋白的功能及能量代谢,并对基因产生毒性作用,抑制 DNA 及蛋白

质合成,从而表现出强烈的细胞毒性作用^[11]。既往研究认为,微波辐射可影响 NOS 的含量,但一直存在争议。Boland 等^[12]通过观察微波连续或间断辐射对海马培养细胞的影响,发现电磁辐射可加重由 NO 诱导的氧化应激反应,促进细胞死亡,使 NO 的潜在神经毒性作用得以发挥。同时也有研究报道,陈瑞等^[13]采用 2 450、870、450 和 45 MHz 微波辐射小鼠后,发现小鼠神经元 NOS 水平无明显改变;而关于 HPM 辐射对 nNOS 表达影响的报道则更是少见。本研究采用免疫组织化学和图像分析等技术检测大鼠经 10、30、100 mW/cm² HPM 辐射后其脑皮质及海马神经元 nNOS 表达的变化,发现各辐射组大鼠经微波作用后 3 d 时,其脑皮质和海马神经元 nNOS 表达均显著增加,此变化出现的时间与脑损伤严重程度基本一致。本研究通过观察 nNOS 含量的变化来间接反映 NO 的生成量,发现实验大鼠经 HPM 辐射后,其 nNOS 表达增加,提示 NO 合成量亦显著提高;而 NO 过量可产生毒性作用,致使 Ca²⁺ 超载及脑结构、功能损伤。

综上所述,实验大鼠经 HPM 辐射后其脑皮质及海马区神经元固缩、深染,神经元胞浆 NPY 表达减少,nNOS 表达增加,引发 NO 大量蓄积,可致脑结构及功能损伤;同时神经元损伤后 NPY 表达减少,又进一步加重了脑功能障碍。

参 考 文 献

[1] 龚志锦,詹谔洲.病理组织制片和染色技术.上海:上海科学技术

出版社,1994;51-53.

- [2] 蔡文琴,王伯云.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社,1992;8-12.
- [3] Inaloz SS, Dasdag S, Ceviz A, et al. Acceptable radiation leakage of microwave ovens on pregnant and newborn rat brains. Clin Exp Obstet Gynecol, 1997, 24: 215-219.
- [4] Fukui Y, Hoshino K, Inouye M, et al. Effects of hyperthermia induced by microwave irradiation on brain development in mice. J Radiat Res (Tokyo), 1992, 33: 1-10.
- [5] 谢燕,宁竹之,索玉兰,等.微波对大鼠学习记忆行为的影响.职业卫生与病伤,1997,12:72-74.
- [6] 杨学森,龚茜芬,张广斌,等.电磁辐射对大鼠学习记忆和海马神经元的影响.解剖学杂志,2004,6:91-94.
- [7] 张育才,汤定华,张宇明,等.神经肽 Y 在家兔内毒素性脑损伤模型中的时相变化.中华急诊医学杂志,2002,11:236-238.
- [8] Guan J, Bennet TL, George S, et al. Selective neuroprotective effects with insulin-like growth factor-1 in phenotypic striatal neurons following ischemic injury in fetal sheep. Neuroscience, 2000, 95: 831-839.
- [9] Bouchard P, Maurice T, Pierse ST, et al. Neuropeptide Y and the calcitonin gene-related peptide attenuate learning impairment induced by MK-801 via a sigma receptor-related mechanism. Eur J Neurosci, 1997, 9: 2142-2151.
- [10] 王丽峰,胡向军,彭瑞云,等.高功率微波辐射后小鼠行为学变化研究.中国行为医学科学,2004,14:32-34.
- [11] Bret DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. Free Radic Res, 1999, 31: 577-596.
- [12] Boland A, Delapierre D, Mossay D, et al. Effect of intermittent and continuous exposure to electromagnetic fields on cultured hippocampal cells. Bioelectromagnetics, 2002, 23: 97-105.
- [13] 陈瑞,侯燕芝,陈安宇,等.微波辐射对鼠脑 MDA、NOS 含量和 LDH 活性的影响.首都医科大学学报,2003,24:231-233.

(修回日期:2006-12-25)

(本文编辑:易 浩)

《中华物理医学与康复杂志》2007 年第 4 期 “继续教育园地”测试题

读杂志、获学分,本刊继续教育园地栏目每期推出,只要您每期阅读该栏目文章,正确填写答题卡寄回本刊编辑部,您就可获得国家 II 类继续教育学分,每期 1 分,全年可获得 12 分。

测试题(文章见本期 284 页,答题卡见本期 264 页):

1、临床上中枢神经系统损伤后的早期是指:

- A. 损伤 48 h 以内 B. 伤后 3 d 至 3 个月
C. 伤后 3 个月至 2 年 D. 伤后 2 年以上

2、关于中枢神经系统损伤后可塑性的主要表现形式,下述哪一项不正确:

- A. 突触传递效率的改变 B. 潜伏通路的开放
C. 损伤区周围功能重组 D. 轴突再生发芽

3、在实验动物的大脑皮质中,树突、轴突和神经胶质占皮质容积的比例约为:

- A. 90% B. 80%
C. 97% D. 3%

4、中枢神经系统损伤后,进行神经干细胞移植的最佳时期为:

- A. 伤后立即移植 B. 伤后 1~3 d
C. 伤后 8~10 d D. 伤后 2 个月

5、中枢神经系统损伤急性期,下列哪一项不是造成功能障碍的主要原因:

- A. 自由基损伤和钙超载所致的神经细胞死亡
B. 病灶周围水肿的压迫
C. 血管的反应性痉挛
D. 神经营养因子的缺乏