

· 基础研究 ·

860 MHz 微波电磁辐射对豚鼠双任务 眨眼条件反射行为的影响

范蕊 范郑丽 李轩 吴广延 隋建峰 虞璟 虞乐华

【摘要】目的 观察 860 MHz 微波电磁辐射对痕迹性和延迟性眨眼条件反射双任务豚鼠模型的影响。**方法** 采用抽签法将 24 只已建立双任务模型的豚鼠随机分为辐射 1 h 组、辐射 20 min 组、假辐射组和正常对照组,每组 6 只。辐射 1 h 组和辐射 20 min 组豚鼠头部接受频率为 860 MHz、功率密度为 1.0 mW/cm^2 的电磁辐射,每日 1 次,每次分别辐射 1 h 和 20 min,连续 3 d,假辐射组和正常对照组豚鼠不进行辐射,辐射结束后各组均进行眨眼条件反射训练。**结果** 与正常对照组豚鼠相比,辐射 1 h 组豚鼠的痕迹性和延迟性眨眼条件反射的习得率、峰幅度有明显下降($P < 0.05$),潜伏期无明显变化($P > 0.05$),辐射 20 min 组、假辐射组和正常对照组的行为学参数均无明显变化($P > 0.05$)。**结论** 860 MHz、 1.0 mW/cm^2 、持续 1 h 的微波电磁辐射可以使豚鼠眨眼条件反射两种任务的习得率和峰幅度均有显著下降,对豚鼠的学习记忆能力有影响。

【关键词】 豚鼠; 眨眼条件反射; 双任务模型; 电磁辐射

Effects of 860 MHz electromagnetic radiation on dual task eyeblink conditioning in guinea pigs FAN Rui*, FAN Zheng-li, LI Xuan, WU Guang-yan, SUI Jian-feng, YU Jing, YU Le-hua. *Physical Therapy and Rehabilitation Medicine Department, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China Corresponding author: YU Le-hua, Email: yulehuadoc@yahoo.com.cn

【Abstract】Objective To observe the effects of 860 MHz microwave radiation on an established dual task model of trace and delay eyeblink conditioning in guinea pigs. **Methods** Twenty-four guinea pigs with an established dual task model of trace and delay eyeblink conditioning were assigned randomly into four groups: a microwave-exposed 1 h group, a microwave-exposed 20 min group, a sham-exposed group and a normal control group. The guinea pigs in the 1 h and 20 min groups were irradiated on the head daily for 3 days using 860 MHz electromagnetic radiation at a power density of 1 mW/cm^2 for 1 h and for 20 min, respectively. After radiation the guinea pigs were trained with classical dual task eyeblink conditioning. **Results** Compared with the normal control group, the behavioral parameters (acquisition rate and peak amplitude of trace and delay eyeblink) of guinea pigs in the microwave-exposed 1 h group had decreased significantly with no obvious change in latency. The behavioral parameters of guinea pigs in the microwave-exposed 20 min group, the sham-exposed group and the normal control group showed no obvious change. **Conclusions** Microwave radiation at 860 MHz and 1.0 mW/cm^2 for 1 h can cause changes in dual trace and delay eyeblink conditioning in guinea pigs and decrease learning and memory capacity.

【Key words】 Guinea pigs; Eyeblink conditioning; Dual task model; Microwave

随着科技飞速发展和社会的巨大进步,微波广泛应用于通讯、医疗、军事等领域。微波在方便人们生活的同时,也使人们更多地暴露在电磁辐射下。中枢神经系统是对电磁辐射高度敏感的靶部位,许多研究发现微波电磁辐射可以导致人或动物明显的神经行为学障碍^[1,2]。经典眨眼条件反射(eyeblink classical condi-

tioning, EBCC)模型是广泛用于联合型学习和记忆的神经生物机制研究的重要模型^[3]。以 EBCC 为基础的相关研究在阐明联合型学习记忆的神经机制中发挥了巨大作用。该模型的特点是稳定可靠,行为反应和刺激参数可被严格量化和精确分析,但迄今为止尚未见将该模型应用于电磁辐射神经生物学效应研究的报道。本实验在既往 EBCC 单任务模型的基础上进行改进,建立了痕迹性眨眼条件反射(trace eyeblink conditioning, TEBC)和延迟性眨眼条件反射(delay eyeblink conditioning, DEBC)的双任务模型,并以 860 MHz 连续微波模拟手机微波电磁辐射,探讨该电磁辐射对中枢神经系统的影响。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.07.005

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30771769)

作者单位:400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院康复理疗科(范蕊、虞乐华);第三军医大学基础部生理学教研室(范郑丽、李轩、吴广延、隋建峰);重庆医科大学临床学院(虞璟)

通信作者:虞乐华, Email: yulehuadoc@yahoo.com.cn

材料与方法

一、实验动物和仪器

实验选用健康 8 ~ 10 周龄雄性英国种白化豚鼠 24 只, 体重 350 ~ 450 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供。采用抽签法将其随机分为辐射 1 h 组、辐射 20 min 组、假辐射组和正常对照组, 每组 6 只。豚鼠单笼饲养, 动物室内的环境温度为 20 ~ 25℃, 24 h 循环灯照, 可自由进食、饮水, 并适当补充维生素 C。实验在上午 9 点至下午 5 点间进行。

微波辐射系统为重庆大学研制, 由四部分构成: 信号源、功率放大器、角型天线和体积为 97 cm × 60 cm × 60 cm 的金属屏蔽室, 调整该系统参数使微波辐射的稳定输出频率为 860 MHz。并用国产 AV3941E 型辐射危险计校正功率密度为 1.0 mW/cm²。

二、豚鼠头部小型头颅固定装置的安装

用 1% 戊巴比妥钠 (0.01 ml/kg 体重, 腹腔注射) 和速眠新 II (0.1 ml, 肌肉注射) 复合麻醉动物, 并用日本产 SR-6N 型脑立体定向仪将其头部固定。常规备皮消毒, 在眼后至耳间的区域沿颅骨中线切开皮肤和皮下组织。暴露颅骨后, 钻 4 个直径 1.0 mm 的小孔 (孔 1 和 2 位于前囟后 2.0 mm, 双侧旁开 3.5 mm; 孔 3 和 4 位于前囟后 12.0 mm, 双侧旁开 3.5 mm)。分别用 4 颗已消毒并磨去尖端的不锈钢螺丝钉 (直径为 1.0 mm, 螺距为 400 μm, 重量为 0.3 g) 反旋入孔 1 至孔 4 内。将矩形头部固定支架 (大小 1.0 cm × 1.0 cm × 0.4 cm, 材料为有机玻璃, 重量为 0.5 g) 嵌合在与孔 1 至孔 4 相对应的不锈钢螺丝钉之间, 而后用 502 强力胶拌牙科水泥固定螺丝钉和矩形支架, 并覆盖伤口。术后给予动物必要的抗感染处理, 恢复 1 周。

三、行为训练方法

行为训练在隔光、隔音的屏蔽柜内进行, 保持环境安静。完整的训练周期包括 2 d 适应期、9 d 训练期和 3 d 处理期。

1. 适应期: 在适应期内, 清醒的豚鼠被放置于屏蔽柜内有机玻璃材料制成的长方体固定盒 (20 cm × 8 cm × 5 cm) 中。通过固定盒前端孔洞将其头颈部暴露于盒外, 身体在固定盒内可适当活动。使用耳杆固定豚鼠头颅的固定支架, 将其头部固定在脑立体定位仪上。每天 1 次, 每次适应时间 50 min, 在此期间不给予任何刺激。

2. 训练期: 行为训练在适应期结束后第 2 天开始, 每天训练 1 次, 连续进行 9 d, 豚鼠固定方法同适应期。将气流喷嘴放置于正对豚鼠左侧眼角膜的位置, 距离约 1.0 cm。非条件刺激为持续 100 ms、压强为 20 kPa 的束状氧气流; 条件刺激为由持续 500 ms 的 1 kHz 低

频声音和持续 300 ms 的 3 kHz 高频声音组成的正弦波纯音 (声强为 80 ~ 90 dB, 升降时间为 5 ms)。高、低频声音随机出现, 各 70 次, 并启动 SBO-1 型条件反射与识别学习行为自动训练系统, 按照设定的参数释放氧气流, 具体方法参见文献 [4]。

DEBC 配对训练时, 低频声音开始 400 ms 后, 对左眼角膜施予非条件刺激, 条件刺激和非条件刺激同时结束; 而在 TEBC 配对训练时, 高频声音开始 600 ms 后, 对左眼角膜施予非条件刺激, 条件刺激和非条件刺激的刺激间隔 (trace interval) 300 ms。每次配对训练声音间隔时间为 15 ~ 30 s (平均为 20 s), 每次训练时间约为 50 min, 连续训练 9 d 后根据不同分组给予动物不同处理。

3. 处理期: 辐射 1 h 组、辐射 20 min 组和假辐射组在 9 d 训练结束后, 将动物分别放置于 860 MHz 微波辐射系统内, 前两组设置输出频率为 860 MHz, 功率密度为 1.0 mW/cm², 每次微波辐射时间分别为 1 h 和 20 min, 假辐射组不给予微波辐射, 每日 1 次, 连续 3 d。每次辐射结束后立即进行双任务眨眼条件反射训练, 训练方法同上。正常对照组在 9 d 训练结束后, 继续训练 3 d。

四、眼轮匝肌活动的记录

训练时, 用末端带有尼龙细线的蛙心夹夹住豚鼠左侧上眼睑, 尼龙细线另一端连接肌肉张力换能器, 将眨眼引起的张力变化转换为电位波动 (1 mV 的电位波动对应 0.25 mm 的眨眼幅度)。眨眼活动信号、条件刺激信号由多通道电生理信号采集系统同步记录, 采样频率为 20 kHz, 灵敏度 5 mV, 扫描速度 100 ms/格, 数字信号存储于电脑中。

五、数据分析和统计学处理

使用眨眼条件反射行为特征传感器信号分析软件 V2.2 版 (重庆大学和第三军医大学联合研制) 分析眨眼数字信号。显著的眨眼活动满足以下标准: ①上眼睑活动值 (t) $\geq$ 眼睑活动基线值 + 1 mV; ②满足条件 ①的时间总和超过 15 ms。非条件眨眼反应 (unconditioned response, UR) 定义为非条件刺激开始后 1 ~ 100 ms 发生显著眨眼活动。条件性眨眼反应 (conditioned eyeblink response, CR) 定义为非条件刺激开始前 200 ms 这一阶段发生显著眨眼活动。CR 参数定义如下: ①习得率, CR 出现的次数和总训练次数的比值; ②峰幅度, CR 最大值与基线值之间的幅度间隔; ③潜伏期, 非条件刺激开始前 200 ms 与 CR 最大值对应时间点的间隔。

所有数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并用 SPSS 18.0 版软件进行数据的统计学分析。使用拆分单因素重复测量方差分析和重复测量方差分析比较时间效应和组间差

异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

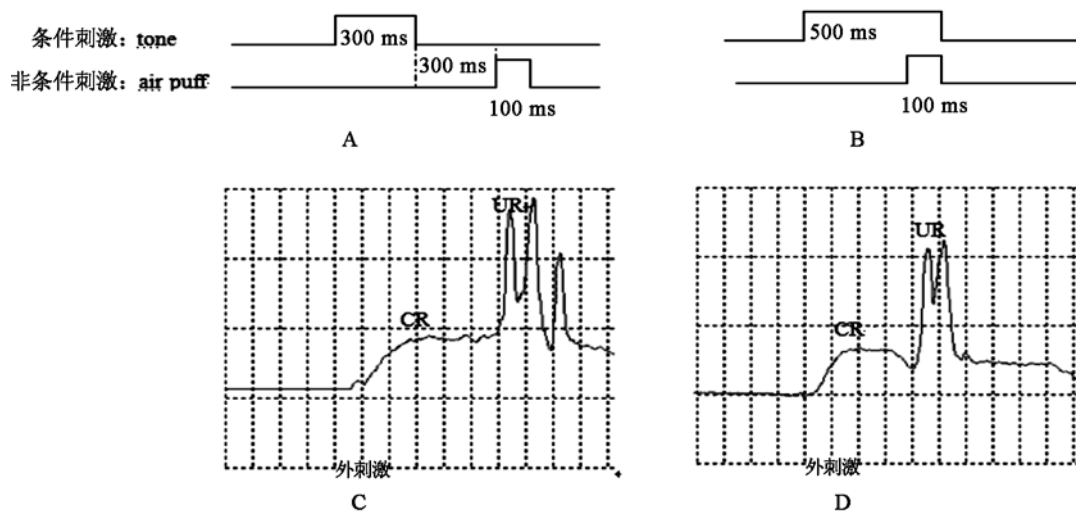
一、豚鼠 TEBC 和 DEBC 建立过程中的眨眼反射
从图 1 可以看出豚鼠已习得 TEBC 和 DEBC。

二、860MHz 电磁辐射对豚鼠 TEBC 和 DEBC 行为的影响

1. CR 习得率的比较: 如图 2 所示, 辐射 1 h 组、辐射 20 min 组、假辐射组和正常对照组豚鼠经过 9 d 的行为训练, 均习得 TEBC 和 DEBC, 二者的 CR 习得率随训练天数的增加而增高 ($P < 0.01$), 在训练第 9 天 CR 习得率分别达到 $(95.42 \pm 2.07)\%$ 和 $(84.95 \pm 3.46)\%$, 各组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。随后 3 d 对 4 组动物进行不同的辐射处理后立即进行行

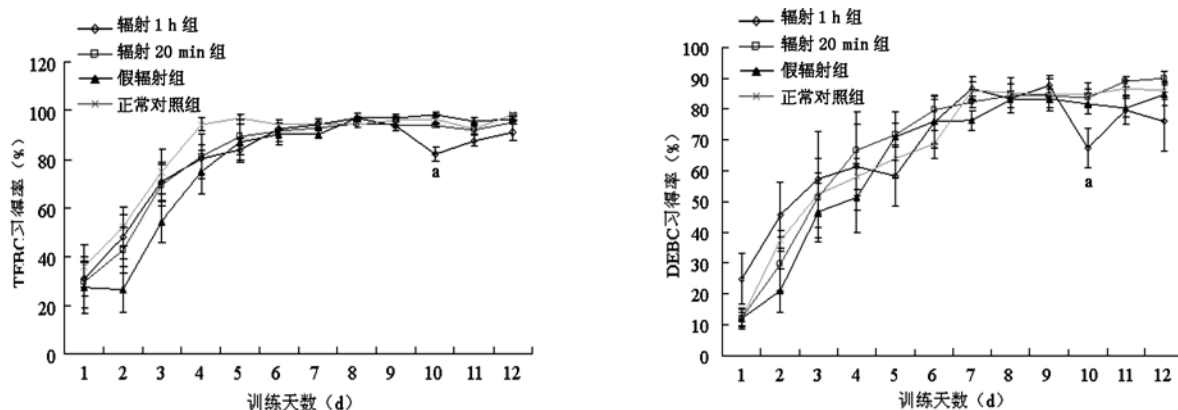
为训练, 辐射 1 h 组动物 TEBC 和 DEBC 的 CR 习得率在辐射后第 1 天均有明显下降 ($P < 0.05$), 在第 2、第 3 天恢复至之前水平 ($P > 0.05$)。

2. CR 峰幅度的比较: 如图 3 所示, 辐射 1 h 组、辐射 20 min 组、假辐射组和正常对照组豚鼠经过 9 d 的行为训练, TEBC 和 DEBC 的 CR 峰幅度随训练天数的增加而增大 ($P < 0.01$), 在训练第 9 天 CR 峰幅度分别达到 (7.05 ± 0.92) mV 和 (5.51 ± 0.82) mV, 各组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。随后 3 d 对 4 组动物进行不同的辐射处理后立即进行行为训练, 辐射 1 h 组动物 TEBC 的 CR 峰幅度在辐射后第 1 天、第 2 天有明显下降 ($P < 0.05$), 第 3 天恢复至之前水平; DEBC 的 CR 峰幅度在辐射后第 1、第 3 天有明显下降 ($P < 0.05$)。



注: A. TEBC 示意图; B. DEBC 示意图; C. TEBC 单次训练截图, 横坐标每格表示 100 ms, 纵坐标每格表示 5 mV; D. DEBC 单次训练截图, 坐标同图 C

图 1 训练期第 6 天的 TEBC 和 DEBC 训练示意图

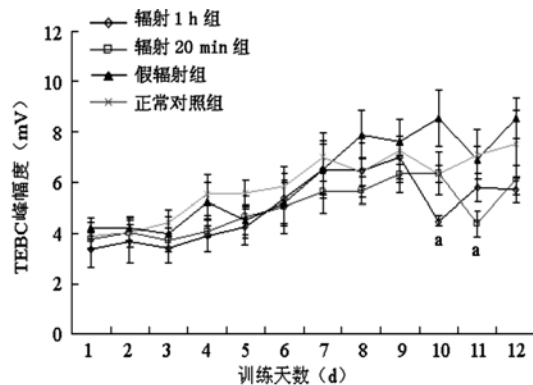


A. TEBC 习得率

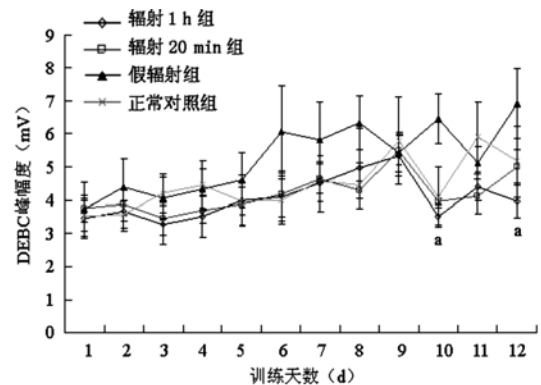
B. DEBC 习得率

注: 与辐射前比较, $^a P < 0.05$

图 2 微波辐射对 CR 习得率的影响



A. TEBC 峰幅度



B. DEBC 峰幅度

注:与辐射前比较,^a $P < 0.05$

图 3 微波辐射对 TEBC 和 DEBC 峰幅度的影响

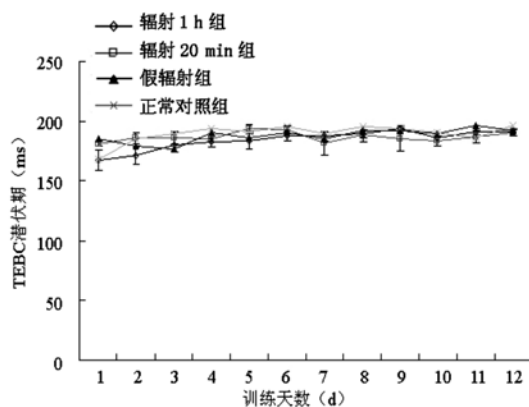
3. CR 潜伏期的比较:如图 4 所示,辐射 1 h 组、辐射 20 min 组、假辐射组和正常对照组豚鼠经过 9 d 的行为训练,TEBC 和 DEBC 的 CR 潜伏期随训练天数的增加而延长($P < 0.01$),在训练第 9 天 CR 潜伏期分别达到(191.04 ± 4.91)ms 和(190.91 ± 2.96)ms,各组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。经过 3 d 的处理期,各组动物 TEBC 和 DEBC 的 CR 潜伏期均未发生明显变化($P > 0.05$)。

讨 论

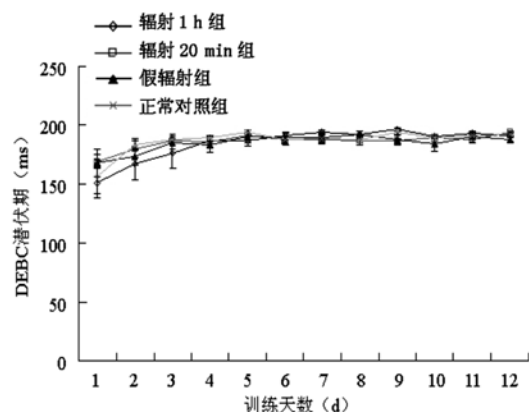
高剂量微波电磁辐射对神经系统的影响已得到证实,但低剂量微波电磁辐射对神经系统的影响尚未得到公认。Lai 等^[5]用 2450 MHz 脉冲微波(比吸收率 = 0.6 W/kg)辐射大鼠,使其工作记忆(working memory)受到损害,空间辨别能力受到明显影响。但也有一些研究对此持否定态度。Sienkiewicz 等^[6]发现,900 MHz 脉冲电磁辐射(比吸收率 = 0.05 W/kg)对大鼠的学习能力无明显影响;Dubreuil 等^[7]用 900 MHz 和

1800 MHz 的脉冲微波(比吸收率 = 3.5 W/kg)辐射大鼠后,也未发现其空间学习能力有明显改变。

微波电疗法中,分米波的工作频率为 300 ~ 3000 MHz,包括了移动通讯所使用的微波频率 800 ~ 2000 MHz^[8]。移动电话在使用时距离脑部最近,产生的电磁辐射可以直接影响脑部。学习和记忆属于中枢神经系统的高级功能,对电磁辐射等损伤因子更为敏感。本实验模拟手机辐射频率,对电磁辐射后豚鼠眨眼条件反射行为的变化进行了观察。结果表明,在微波辐射第 1 天,辐射 1 h 组的豚鼠在接受电磁辐射后,其 TEBC 和 DEBC 的 CR 习得率、峰幅度有明显下降($P < 0.05$),但潜伏期延长不明显($P > 0.05$)。类似的动物实验也观察到,给予电磁脉冲辐射干预后,大鼠的辨别性学习能力和记忆能力均明显下降^[9]。本研究结果也在一定程度上支持流行病学的调查结果:长期接触电磁辐射的人员可出现睡眠障碍、记忆力减退、头昏、乏力等神经衰弱的表现,有的伴植物神经功能紊乱^[10-11]。



A. TEBC 潜伏期



B. DEBC 潜伏期

图 4 微波辐射对 TEBC 和 DEBC 潜伏期的影响

本研究还发现,辐射 1 h 组 TEBC 和 DEBC 的 CR 习得率在微波辐射后第 1 天有明显下降,但在第 2 和第 3 天就可恢复至辐射前水平。此现象与郭明霞等^[12]在脉冲磁场对大鼠记忆能力影响的实验中观察到的情况相似。这可能与动物存在复杂的自身调节和适应性有关。但峰幅度的变化却不支持这一观点。习得率和峰幅度的不完全对应,可能与 CR 峰幅度不稳定、变异大有关,而本研究动物例数较少,很难消除峰幅度的变异。

从辐射 1 h 组和辐射 20 min 组动物行为学表现的变化来看,电磁辐射效应可能存在一定的量-效关系。有研究者认为,非热效应可能存在频率窗效应,其能量不是直接来源于电磁波本身,而是来源于电磁波所触发的生物系统新陈代谢产生的能量,此时生物系统利用的是电磁波携带的信息,而不是像热效应那样利用电磁波携带的能量^[13]。关于这方面还需要我们进行更为深入的实验研究来揭示电磁辐射和生物效应之间确切的量-效关系。另外,豚鼠头部起固定作用的不锈钢螺丝钉是否对电磁辐射的生物学效应有影响,也有待于进一步探讨。

EBCC 根据条件刺激和非条件刺激在发生时间上是否重叠,可以分为 TEBC 和 DEBC,DEBC 的神经通路定位在小脑和脑干,而 TEBC 的关键调控结构是前额叶和海马^[14-15]。本实验提示,电磁辐射对 TEBC 和 DEBC 的影响是相似的,其原因可能与 TEBC 的痕迹间隔不够长有关,刺激间隔为 300 ms 的 TEBC 对海马和前额叶的依赖可能没有刺激间隔为 500 ms 的 TEBC 那样明显。

综上所述,本研究结果显示,即使小剂量微波电磁辐射也可使豚鼠学习记忆能力有所下降。提示长期使用手机人员应尽量减少接听时间和次数;尽管微波疗法采用短时间(约 10 ~ 20 min)辐射,治疗时也应注意患者头面部的保护,尤其是长期接触微波的医务人员更要加强个人防护。

参 考 文 献

- [1] D' Andrea JA, Thomas A, Hatcher DJ. Rhesus monkey behavior during exposure to high-peak-power 5.62 GHz microwave pulses. *Bioelectromagnetics*, 1994, 15: 163-176.
- [2] Jang CG, Lee SY, Yoo JH, et al. Impaired water maze learning performance in muopiod receptor knock out mice. *Brain Res Mol Brain Res*, 2003, 117: 68-72.
- [3] Ohyama T, Nores WL, Murphy M, et al. What the cerebellum computes. *Trends Neurosci*, 2003, 26: 222-227.
- [4] 隋建峰,高洁,罗俊,等.适用于低等哺乳动物的视听分辨行为自动训练系统. *第三军医大学学报*, 2005, 27: 89.
- [5] Lai H, Horita A, Guy AW. Microwave irradiation affects radial arm maze performance in the rat. *Bioelectromagnetics*, 1994, 15: 95-104.
- [6] Sienkiewicz ZJ, Biachwell RP, Haylock R, et al. Low-level exposure to pulsed 900 MHz microwave radiation does not cause deficits in the performance of a spatial learning task in mice. *Bioelectromagnetics*, 2000, 21: 151-158.
- [7] Dubreuil D, Jay T, Edeline JM. Does head-only exposure to GSM-900 electromagnetic fields affect the performance of rats in spatial learning tasks? *Behav Brain Res*, 2002, 129: 203-210.
- [8] 陈光弟,许正平,姜槐.移动电话射频电磁场与健康关系的体外实验研究. *中华预防医学杂志*, 2005, 39: 285-287.
- [9] 赵梅兰,马强,曹晓哲,等.电磁脉冲对大鼠学习记忆能力和长时程增强的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2001, 23: 69-71.
- [10] 马菲,熊鸿雁,张耀,等.高强度电磁辐射对军事作业人员神经行为功能影响的流行病学调查. *第三军医大学学报*, 2004, 26: 2048-2050.
- [11] 杨瑞,彭瑞云,王德文.电磁辐射对学习和记忆功能的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 762-764.
- [12] 郭明霞,王明时,王学民,等.脉冲磁场对大鼠记忆能力和海马神经递质的影响. *中国生物医学工程学报*, 2002, 21: 196-203.
- [13] 牛中奇,侯建强,王海彬,等.电磁波的生物学窗效应. *中国生物医学工程学报*, 2003, 22: 126.
- [14] Kotani S, Kawahara S, Kirino Y. Classical eyeblink conditioning in decerebrate guinea pigs. *Eur J Neurosci*, 2002, 15: 1267-1270.
- [15] Kotani S, Kawahara S, Kirino Y. Trace eyeblink conditioning in decerebrate guinea pigs. *Eur J Neurosci*, 2003, 17: 1445-1454.

(修回日期:2011-02-12)

(本文编辑:吴倩)