

亚磁场对雄性小鼠神经递质、 激素和血常规的影响

张盈盈^{①②} 田兰香^{①*}

① 中国科学院地质与地球物理研究所地球与行星物理重点实验室, 中国科学院地球科学研究院,
中-法趋磁多细胞生物进化与发育联合实验室 北京 100029; ② 中国科学院大学 北京 100049

摘要: 本研究主要是探讨连续亚磁场环境暴露对 C57BL/6 雄性小鼠 (*Mus musculus domesticus*) 神经递质、激素含量和血常规参数的影响。实验组为亚磁场暴露组 (1.1 ± 0.5) μT , 对照组为地磁场组 (53.3 ± 0.2) μT 。实验对象分别为 3 周龄幼年小鼠和 8 周龄成年小鼠。幼年小鼠随机分为实验组与对照组, 每组 42 只; 成年小鼠也随机分为实验组与对照组, 每组 36 只。幼年小鼠在两种磁场环境中的暴露时间为 1~5 周, 成年小鼠的暴露时间为 1、3、6、9、12 周。采用液相色谱-质谱联用法 (LC-MS) 检测小鼠脑组织及血清中的神经递质含量, 包括 5-羟色胺 (5-HT)、多巴胺 (DA)、乙酰胆碱 (ACh)、去甲肾上腺素 (NA)、 γ -氨基丁酸 (GABA); 用 ELISA 方法检测小鼠血清中的激素含量, 包括甲状腺素 (T4)、生长激素 (GH)、去甲肾上腺素 (NA); 血常规在北京大学医学部检测。采用独立样本 *t* 检验对实验组与对照组的检测结果进行差异分析。与地磁场组相比, 亚磁场组幼年小鼠脑组织多巴胺 (DA) 含量在第 5 周有显著降低 ($P < 0.05$), 血清中的甲状腺素 (T4) 含量在第 2 和 5 周有显著降低 ($P < 0.05$), 去甲肾上腺素 (NA) 含量在第 4 周出现显著性降低 ($P < 0.01$); 与地磁场组相比, 成年小鼠脑组织 5-羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NA) 含量在处理 1 周时均出现显著性降低 ($P < 0.05$), 血清中 5-羟色胺 (5-HT) 含量在第 3 周也出现显著性降低 ($P < 0.01$), 甲状腺素 (T4) 含量在第 3、6、12 周出现显著性降低 ($P < 0.05$)。血常规结果显示, 成年和幼年小鼠的白细胞 (WBC) 在暴露早期第 1 周和第 2 周分别出现显著性增多 ($P < 0.01$), 其他参数基本无变化。本研究发现, 两个年龄段的小鼠对亚磁场响应的指标不完全一致, 仅甲状腺素 (T4) 在两个年龄段小鼠的体内都出现显著性降低。通过本研究说明, 甲状腺素 (T4)、5-羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NA)、多巴胺 (DA) 和白细胞 (WBC) 可能是不同年龄段小鼠对亚磁场环境暴露较为敏感的生理指标, 可在今后的亚磁场生物效应研究中重点关注。

关键词: 亚磁场; 地磁场; 神经递质; 激素; 血常规

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 04-538-11

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 41674071, 41621004), 中国科学院项目 (No. QYZDJ-SSW-DQC024);

* 通讯作者, E-mail: tianlx@mail.iggcas.ac.cn;

第一作者介绍 张盈盈, 女, 硕士研究生; 研究方向: 亚磁场对动物生理的影响; E-mail: zyy@mail.iggcas.ac.cn。

收稿日期: 2019-04-08, 修回日期: 2019-05-21 DOI: 10.13859/j.cjz.201904011

Effects of Hypomagnetic Field on Neurotransmitter, Hormone and Blood Parameters in Male Mice

ZHANG Ying-Ying^{①②} TIAN Lan-Xiang^{①*}

① Key Laboratory of Earth and Planetary Physics, Institute of Geology and Geophysics, Chinese Academy of Sciences, Institutions of Earth Science, Chinese Academy of Sciences, France-China International Laboratory of Evolution and Development of Magnetotactic Multicellular Organisms, Beijing 100029; ② University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: We aimed to investigate the effects of continuous exposure to hypomagnetic field on neurotransmitter, hormone content and blood routine parameters in juvenile (three weeks old) and adult (eight weeks old) male C57BL/6 mice (*Mus musculus domesticus*). The experimental group was exposed to the hypomagnetic field at density of $1.1 \pm 0.5 \mu\text{T}$, while the control group was exposed to the geomagnetic field at density of $53.3 \pm 0.2 \mu\text{T}$. A total of 84 and 72 male juvenile and adult mice were randomly divided into the experimental group and the control group, 42 and 36 in each group, respectively. Juvenile mice were exposed to the two kinds of magnetic field for 1 to 5 weeks while adult mice for 1, 3, 6, 9, and 12 weeks. The contents of neurotransmitters and hormones including gamma-aminobutyric acid (GABA), serotonin (5-HT), dopamine (DA), acetylcholine (Ach), noradrenaline (NA), thyroxine (T4) and growth hormone (GH) in the brain tissue or serum samples were measured using LC-MS and ELISA. Blood routine parameters were also measured in Peking University Health Science Center. We compared the results of the experimental and control groups with independent sample t-test. The results showed that the contents of 5-HT and NA in the brain tissues of adult mice exposed to hypomagnetic field decreased significantly after 1-week exposure ($P < 0.05$) (Fig. 1), and the contents of 5-HT in serum decreased significantly after 3-week exposure ($P < 0.01$). The contents of T4 decreased significantly at the 3rd, 6th, 12th week ($P < 0.05$) (Fig. 2). The content of DA in brain tissues of juvenile mice decreased at the 5th week ($P < 0.05$) (Fig. 1). The content of T4 in serum decreased significantly at the 2nd and 5th week ($P < 0.05$) while NA decreased significantly at the 4th week ($P < 0.01$) (Fig. 2). Blood routine examination showed that white blood cells (WBC) increased significantly at the 1st week for adult and 2nd week for juvenile mice, respectively ($P < 0.01$). Other parameters had no significant differences (Fig. 3 and appendix 1). This study shows that the parameters responding to the exposure to hypomagnetic field for juvenile and adult mice are not completely consistent, excepting that T4 reduces significantly in both groups. The results indicate that T4, 5-HT, NA, DA and WBC may be physiological parameters sensitive to the hypomagnetic-field exposure, which should be paid special attention to in future studies.

Key words: Hypomagnetic field; Geomagnetic field; Neurotransmitters; Hormones; Blood parameters

亚磁场 (hypomagnetic field, HMF) 通常指磁感应强度低于 $5 \mu\text{T}$ 的静态弱磁场 (莫炜川等 2012)。亚磁环境是宇航员空间探测所面临

的不同于地球环境的主要环境因素之一, 潜水艇舱和磁屏蔽室等环境都属于亚磁环境 (丁海敏等 2014)。人们对空间辐射、失重的生物学

效应研究较多,但是亚磁环境对生物的影响机制认识还很不全面。目前亚磁环境的生物学效应及防护措施是空间生物学、航天医学关注的重点 (Kopanev et al. 1979, 莫炜川等 2012)。动物的生长发育和代谢活动需要相对稳定的内环境来维持,神经递质、激素和血细胞参数是判断内环境状态的可靠指标。动物体内的神经递质和激素广泛参与机体代谢、节律、情绪、学习等活动,神经递质的变化直接影响生物体的行为和活动,并与多种神经性疾病密切相关 (张蕾等 2013)。因此神经递质、激素以及血常规检测是研究评估环境因子对动物生理健康影响的快速且有效的方法。前人在对亚磁场生物效应方面的研究发现,亚磁场暴露 1 个月后金黄仓鼠 (*Mesocricetus auratus*) 基底核和小脑中 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 含量逐渐降低,而大脑皮层 γ -氨基丁酸含量没有变化,亚磁环境对不同脑区递质的影响程度不完全一致,可能与各脑区功能有关 (李俊凤等 2001)。亚磁场暴露 3 个月后大鼠 (*Rattus norvegicus*) 大脑皮层微循环及氧化还原酶活性发生紊乱,导致脑节律失调 (Zaporozhan et al. 2002)。本课题组曾报道 3 周龄雄性 SD 大鼠在亚磁场环境连续暴露 6 周,同时在暴露的第 3 周结束后进行 2 周的返场实验,结果显示从暴露的第 2 周开始血清中生长激素 (growth hormone, GH) 和甲状腺素 (thyroxine, T4) 都呈现显著性降低,且返场后可恢复到地磁场 (geomagnetic field, GMF) 水平,这说明亚磁场对激素的影响需要一定的作用时间,且这种影响是可恢复的 (田兰香等 2018)。亚磁场暴露 72 h 会引起 8 周龄雄性 C57 小鼠 (*Mus musculus domesticus*) 产生焦虑行为 (Ding et al. 2019),而暴露 30 d 的 4~6 周龄的雄性 C57 小鼠无焦虑样行为,但其热敏性增加,外周血中的去甲肾上腺素 (noradrenaline, NA) 含量出现显著降低 (Mo et al. 2015)。这些研究说明某些神经递质和激素会对某些时长的亚磁场暴露有响应。血常规研究发现,亚磁场连续

暴露 1~4 周会引起成年 BALB/c 小鼠的淋巴细胞百分比 (lymphocytes percentage, LY%) 和白细胞 (white blood cells, WBC) 数量出现先降低后恢复的趋势,而对红细胞数量 (red blood cell, RBC) 等其他参数无显著影响 (贾斌等 2011); 成年 C57 小鼠亚磁场暴露 30 d 会引起其血液中性粒细胞 (neutrophils, NE) 水平显著上升,红细胞、总体白细胞和血小板指标无显著变化 (丁海敏等 2014)。通过上述研究可以发现,血常规参数中的白细胞、淋巴细胞及中性粒细胞会对亚磁场暴露具有积极响应,而亚磁场对其他血细胞基本无影响。

此外,亚磁场暴露会抑制小鼠胚胎早期发育 (Fesenko et al. 2010),引起蝾螈 (*Cynops pyrrhogaster*) 早期胚胎发育畸形率升高 (Asashima et al. 1991),导致家兔 (*Oryctolagus cuniculus domesticus*) 个体发育质量下降且幼仔死亡率升高 (Kopanev et al. 1979); 动物行为会表现暴躁、焦虑、学习记忆能力下降等 (莫炜川等 2012, Binhi et al. 2017)。总结前人研究发现,亚磁场对动物的胚胎发育和情绪行为这两方面有显著效应,我们期望能从与这两方面有关的神经递质和激素中筛选出对亚磁场产生响应的指标,后期可对亚磁场响应的神经递质和激素作用的信号通路开展相关研究。甲状腺素是动物体关键的代谢激素,它参与调节了几乎所有的代谢途径,如氧消耗和蛋白质、脂质、糖以及维生素代谢等,除在细胞代谢活动中的作用之外,它还参与调节神经发育和空间学习等任务 (Smith et al. 2002)。有研究发现 5-羟色胺 (serotonin, 5-HT) 在动物调节情绪、情感行为和睡眠的脑系统中有重要作用 (Bellintani-Guardia et al. 1996)。1965 年, Schildkraut 曾提出了经典的“单胺假说”,即抑郁症的发生与脑内去甲肾上腺素 (NA) 和 5-羟色胺 (5-HT) 等单胺水平低下密切相关。多巴胺 (dopamine, DA) 参与认知过程的形成 (Backman et al. 2010)。 γ -氨基丁酸 (GABA) 是脑内主要的抑制性神经递质,与情绪障碍有

关, 狂躁动物体内 γ -氨基丁酸含量高于正常动物, 而低水平的 γ -氨基丁酸又会导致抑郁症产生 (Petty 1995, Shiah et al. 1998)。乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 与形成完整连贯意识有关, 并参与调控选择性注意活动 (Perry et al. 1999)。因此本研究选择上述几种神经递质和激素进行检测, 并且针对前人研究存在的亚磁场暴露时长检测不连续 (多数研究涉及的亚磁场为一次性暴露)、检测指标少和缺乏对幼年、成年不同发育年龄组动物的对比研究等问题, 开展从幼年到成年小鼠脑组织和血液中神经递质、激素和血细胞参数的连续性亚磁场暴露检测及对比分析, 将对认识亚磁场影响小鼠的效应时间点、筛选响应亚磁场环境的有效生理参数都具有十分重要的意义, 为认识亚磁场的生物效应提供重要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验环境

实验条件分为亚磁场环境和对照地磁场环境。亚磁场环境由三轴赫姆霍兹线圈系统通过抵消或补偿地磁场分量而产生。线圈系统由 3 组正交排列的方形线圈 (边框长 1.5 m) 组成, 每组线圈均由一个直流电源控制, 在 X、Y、Z 三方向上产生实验要求的磁场分量, 从而在中心区域 $50\text{ cm} \times 50\text{ cm} \times 50\text{ cm}$ 的空间内提供均匀度很好的亚磁场。均匀区域内亚磁场强度为 $(1.1 \pm 0.5)\ \mu\text{T}$ 。小鼠放在亚磁场均匀区域内饲养, 进行实验需要时长的亚磁场暴露。地磁场环境由同一间屋内同尺寸方形 (边框长 1.5 m) 木质框架提供, 框架处于自然地磁场环境中, 磁场强度为实验室当地地磁场强度 $(53.3 \pm 0.2)\ \mu\text{T}$ 。两套实验装置都由相同规格的黑色尼龙布包围, 用于阻挡外部光源, 光照由实验室日光灯定时提供, 两套线圈中心点距离 3.0 m。实验装置位于中国科学院地质与地球物理研究所生物地磁实验室。实验开始前进行 3 d 磁场环境参数监测, 确保实验磁场的均匀性和稳定性。两组磁场中实验动物所处环境

除磁场强度不同之外, 其他环境参数均保持一致。温度 $(20 \pm 1)\ ^\circ\text{C}$, 相对湿度 35% ~ 40%, 光照时间 8:00 ~ 20:00 时, 整个实验期间小鼠都处于实验磁场中持续不间断暴露, 食物和水充足供应。

1.2 实验动物

清洁级 C57BL/6 雄性幼年小鼠 (3 周龄) 84 只, 成年小鼠 (8 周龄) 72 只。幼年小鼠在地磁场环境适应 1 d 后随机分为亚磁场 (HMF) 组和地磁场 (GMF) 对照组, 每组 42 只放入相应的实验环境中; 成年小鼠在地磁场环境适应 1 周后, 随机分为亚磁场组和地磁场对照组, 每组 36 只放入相应的实验环境中。动物在新的饲养环境通常需适应 1 周, 但幼年小鼠 3 周龄断乳至 5 周龄性成熟 (秦川等 2015) 之间的实验周较短, 因此将幼年鼠的适应时间调整为 1 d。

1.3 实验处理

幼年小鼠在亚磁场中连续暴露 5 周, 每周对亚磁场组和地磁场对照组各 7 只个体进行取样; 成年小鼠在亚磁场中连续暴露 12 周, 分别第 1、3、6、9 和 12 周对亚磁场组和地磁场对照组各 6 只个体进行取样。暴露处理是双盲实验。取样的小鼠个体用异氟烷麻醉后摘眼球取血, $4\ ^\circ\text{C}$ 静置 4 h 后, $3\ 000\ \text{r}/\text{min}\ 4\ ^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 取血清分装, $-80\ ^\circ\text{C}$ 冻存, 用于后续检测神经递质和激素; 采血后迅速断头、在冰盒上剥离脑组织于液氮速冻, 然后于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存, 用于检测神经递质含量。实验检测指标包括 5-羟色胺 (5-HT)、多巴胺 (DA)、 γ -氨基丁酸 (GABA)、乙酰胆碱 (Ach)、去甲肾上腺素 (NA)、甲状腺素 (T4)、生长激素 (GH) 以及血常规指标。实验的取材时间完全一致, 实验样品统一编号, 地磁场组和亚磁场组的样品同时进行测试, 这样可排除来自系统的误差。

1.4 检测方法

1.4.1 液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 法检测小鼠脑组织和血清中的神经递质 样品前处理: 小鼠左半脑冰浴融化 (右半脑作为备份冻存) 后置于 1.5 ml 离心管中使用电子天平

(Sartorius-BSA224S, 德国, 量程 0~220 g, 精度 0.000 1 g) 称量湿重。每只个体的左半脑装入 1.5 ml 离心管后加入 800 μ l 预冷沉淀液 (含 1%甲酸的乙腈溶液) 和 4 μ l 内标 3,4-二羟苯胺 (3,4-dihydroxybenzylamine, DHBA, 100 mg/L) 后冰浴快速匀浆 60 s, 冰浴超声破碎 10 s, 11 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 取上清 200 μ l, 利用 Labconco CentriVap 离心浓缩仪 (美国) 离心浓缩干, 加入 200 μ l 复溶液 (含 0.1%甲酸和 10 mmol 乙酸铵的水溶液) 涡旋溶解, 11 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 离心 2 次取上清装入进样瓶待测。检测结果以每克脑 (湿重) 中神经递质含量表示。取 100 μ l 血清冰浴融化, 加入 400 μ l 预冷的沉淀液 (含 1%甲酸的乙腈溶液) 和 5 μ l 内标 (DHBA, 25 mg/L) 涡旋 15 s, 沉淀蛋白。11 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 取上清 300 μ l 离心浓缩干后加入 150 μ l 复溶液涡旋溶解, 11 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 离心 2 次取上清装入进样瓶待测, 检测结果以每毫升血清中神经递质含量表示。

检测使用 HPLC-MS/MS 仪器 (Waters ACQUITY UPLC I-Class, AB SCIEX Triple QuadTM 4500, 美国) 和 100 \times 2.1 mm、1.8 μ m 色谱柱 (Waters ACQUITY UPLCTM HSS PFP, 美国)。色谱的流动相分为有机相和水相, 有机相使用含 0.1%甲酸和 10 mmol 乙酸铵的乙腈溶液 (Thermo Fisher Scientific, USA), 水相使用含 0.1%甲酸和 10 mmol 乙酸铵的水溶液; 采

用流速为 0.2 ml/min 的梯度洗脱, 进样量为 10 μ l, 柱温为 30 $^{\circ}$ C。离子源为电喷雾离子源 (ESI), 源温度为 300 $^{\circ}$ C。质谱采用正离子模式多反应监测 (MRM), 质谱参数见表 1。实验使用内标标准曲线法对所测神经递质进行相对定量, 所用标准品 5-羟色胺 (5-HT)、多巴胺 (DA)、乙酰胆碱 (Ach)、 γ -氨基丁酸 (GABA)、去甲肾上腺素 (NA) 和 3,4-二羟苯胺 (DHBA) 均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), 标准品和内标使用含 50%甲醇的水溶液配制成为 1.0 g/L 母液, 分装后 -20 $^{\circ}$ C 冻存, 标准品母液在使用时避免反复冻融。

1.4.2 ELISA (酶联免疫) 检测小鼠血清中激素含量 血清样品从 -80 $^{\circ}$ C 取出 (避免反复冻融), 室温溶化后 3 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 按照 ELISA 试剂盒 (武汉华美, 中国) 操作说明检测激素含量, 检测结果以每毫升血清中激素含量表示。小鼠甲状腺素 (T4) 酶联免疫试剂盒检测范围为 20~320 μ g/L, 灵敏度 20 μ g/L, 批次内变异系数 < 15%, 批次间变异系数 < 15%; 小鼠去甲肾上腺素 (NA) 酶联免疫试剂盒检测范围为 7.5~300 ng/L, 灵敏度 7.5 ng/L, 批次内变异系数 < 15%, 批次间变异系数 < 15%; 小鼠生长激素 (GH) 酶联免疫试剂盒检测范围为 3.12~200 ng/L, 灵敏度 0.78 ng/L, 批次内变异系数 < 8%, 批次间变异系数 < 10%。

1.4.3 血细胞参数检测 小鼠摘眼球取血,

表 1 质谱参数

Table 1 Parameters in mass spectrometry analysis

分析物 Analysis	母离子-子离子 Precursor-product (m/z) Q1-Q3	去簇电压 Declustering potential (V) DP	入口电压 Entrance potential (V) EP	碰撞能 Collision energy (eV) CE	碰撞室出口电压 Collision exit potential (V) CXP
多巴胺 (DA) Dopamine	154.0-137.0	6	7	14	12
5-羟色胺 (5-HT) Serotonin	177.0-160.0	2	5	17	15
乙酰胆碱 (Ach) Acetyl choline	146.1-87.1	6	4	18	5
γ -氨基丁酸 (GABA) γ -aminobutyric acid	104.0-87.0	40	9	14	10
去甲肾上腺素 (NA) Norepinephrine	170.0-152.1	5	8	10	15
3,4-二羟苯胺 (DHBA) 3,4-dihydroxybenzylamine	140.1-123.1	40	5	16	10

移液枪迅速准确吸取 20 μl 全血加入到 2 ml 含无水硫酸钠 ($\geq 0.9\%$) 和 Tris ($\geq 0.1\%$) 的等渗弱碱水溶液中, 轻轻混匀制备细胞悬液(除去凝血和溶血样品), 2 h 内送至北京大学医学部实验动物中心检测, 使用 MEK-6410C 型全自动血细胞分析仪进行血常规分析。

1.5 统计学分析

实验数据以平均值 \pm 标准差表示, 使用 SPSS 21.0 对数据进行处理分析。组间差异以实验磁场为分组变量, 所测指标为检测变量, 采用独立样本 t 检验进行分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 亚磁场不同暴露时长对小鼠脑组织中神经递质含量的影响

与地磁场组相比, 亚磁场组的幼年小鼠脑

组织中多巴胺 (DA) 含量在第 5 周有显著下降 ($P < 0.05$); 成年小鼠脑组织中 5-羟色胺 (5-HT) 和去甲肾上腺素 (NA) 含量在第 1 周有显著降低 ($P < 0.05$), 但在后续暴露周内没有呈现差异性。亚磁场组和地磁场组的小鼠脑组织中神经递质随着暴露时间延长, 整体变化趋势基本一致 (图 1)。

2.2 亚磁场不同暴露时长对小鼠血清中激素和神经递质含量的影响

与地磁场组相比, 亚磁场组的幼年小鼠血清中甲状腺激素 (T4) 含量在第 2 周出现显著降低 ($P < 0.05$), 但在第 3、4 周恢复到地磁场水平, 在第 5 周又出现显著降低 ($P < 0.05$); 亚磁场组成年小鼠血清中甲状腺激素 (T4) 的含量在第 3 周、第 6 周有显著下降 ($P < 0.05$), 到第 9 周恢复到地磁场水平, 到第 12 周又出现显著降低 ($P < 0.05$), 亚磁场组 T4 含量整体

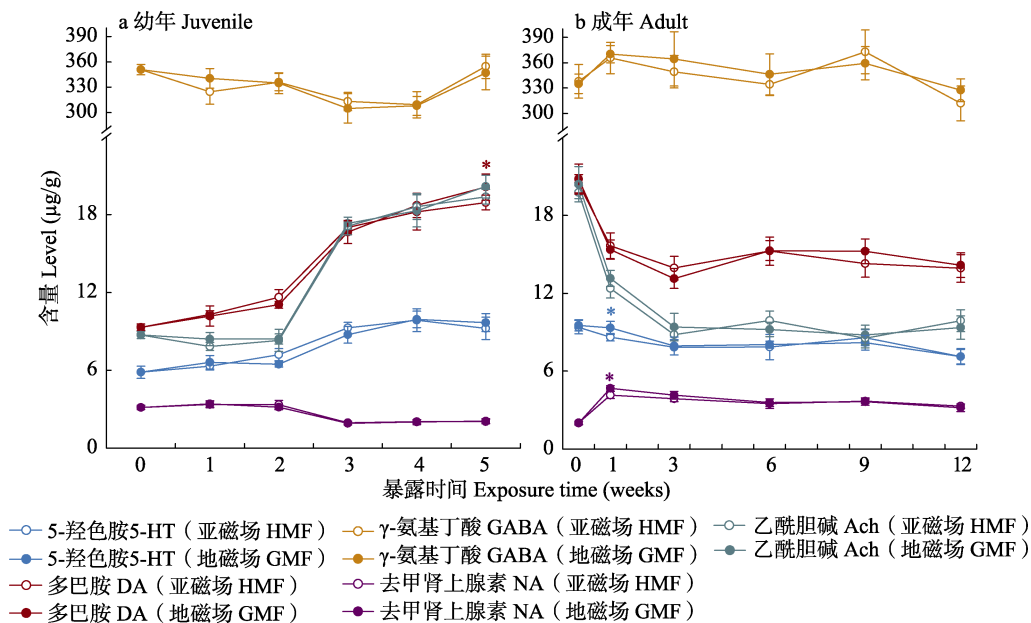


图 1 在亚磁场不同暴露时长条件下小鼠脑组织中神经递质含量

Fig. 1 Comparison of the contents of several neurotransmitters in brain tissue of mice exposed to hypomagnetic field and geomagnetic field.

a. 幼年; b. 成年。a. Juvenile; b. Adult. * $P < 0.05$.

5-HT. Serotonin; DA. Dopamine; Ach. Acetylcholine; GABA. Gamma-aminobutyric acid; NA. Noradrenaline. HMF. Hypomagnetic field; GMF. Geomagnetic field.

都低于地磁场组的，且有缓慢降低趋势。与地磁场组相比，亚磁场组幼年小鼠去甲肾上腺素（NA）含量在第4周出现极显著性降低（ $P < 0.01$ ），其他暴露周均无显著性差异。亚磁场组成年小鼠血清中的5-羟色胺（5-HT）在第3周出现极显著降低（ $P < 0.001$ ），在后续暴露周恢复到地磁场水平（图2）。

2.3 亚磁场不同暴露时长对小鼠血细胞参数的影响

与地磁场组相比，亚磁场组的幼年小鼠白细胞（WBC）含量在第2周有极显著升高（ $P < 0.001$ ），在后续处理周恢复到地磁场水平，淋巴细胞百分比（LY%）在第4周出现显著升高（ $P < 0.05$ ），其他暴露周无显著差异；成年小鼠白细胞（WBC）含量在第1周有极显著升高（ $P < 0.001$ ），在后续暴露周恢复到地磁场水平（图3）。此外，红细胞（RBC）、血小板（blood platelets, PLT）、血红蛋白（hemoglobin, HGB）

均无显著性差异，统计结果见附录1。

2.4 小鼠生理指标随年龄增长的含量范围

地磁场条件下清洁级 C57BL/6 雄性小鼠（3~20周龄）脑组织中的神经递质、血液中的激素和神经递质及血细胞参数随年龄增长的含量范围详见附录1~3。实验数据显示，成年小鼠脑组织中的多巴胺（DA）和乙酰胆碱（Ach）含量变化基本一致：即第8~10周龄含量出现降低，但11~20周龄变化不大，多巴胺（DA）含量为13.14~15.29 $\mu\text{g/g}$ ，乙酰胆碱（Ach）含量为8.79~13.15 $\mu\text{g/g}$ （附录2）。结合幼年小鼠的多巴胺（DA）和乙酰胆碱（Ach）含量曲线（图1）来看，在实际年龄上，成年小鼠磁场暴露第0周对应着幼年小鼠磁场暴露的第5周，即都为8周龄小鼠，其神经递质的含量也基本一致。小鼠随年龄增长其血清中T4含量呈现逐渐降低的趋势（附录3）；小鼠的红细胞（RBC）、血小板（PLT）及血红蛋白（HGB）

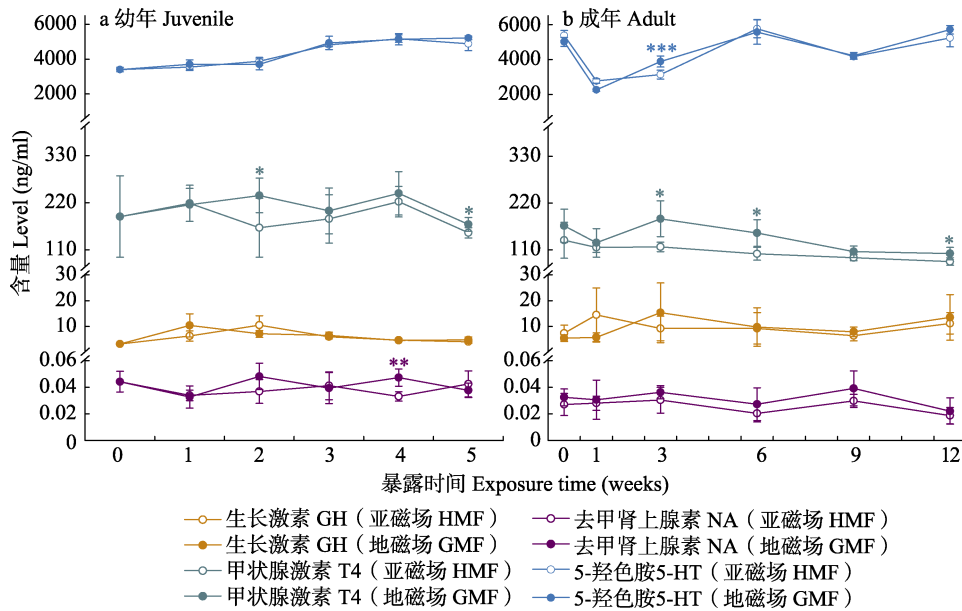


图2 在亚磁场不同暴露时长条件下小鼠血清激素和神经递质含量

Fig. 2 Comparison of contents of several hormones and neurotransmitters in serum of mice exposed to hypomagnetic field and geomagnetic field

a. 幼年; b. 成年。a. Juvenile; b. Adult. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

GH. Growth hormone; T4. Thyroxine; NA. Noradrenaline; 5-HT. Serotonin. HMF. Hypomagnetic field; GMF. Geomagnetic field.

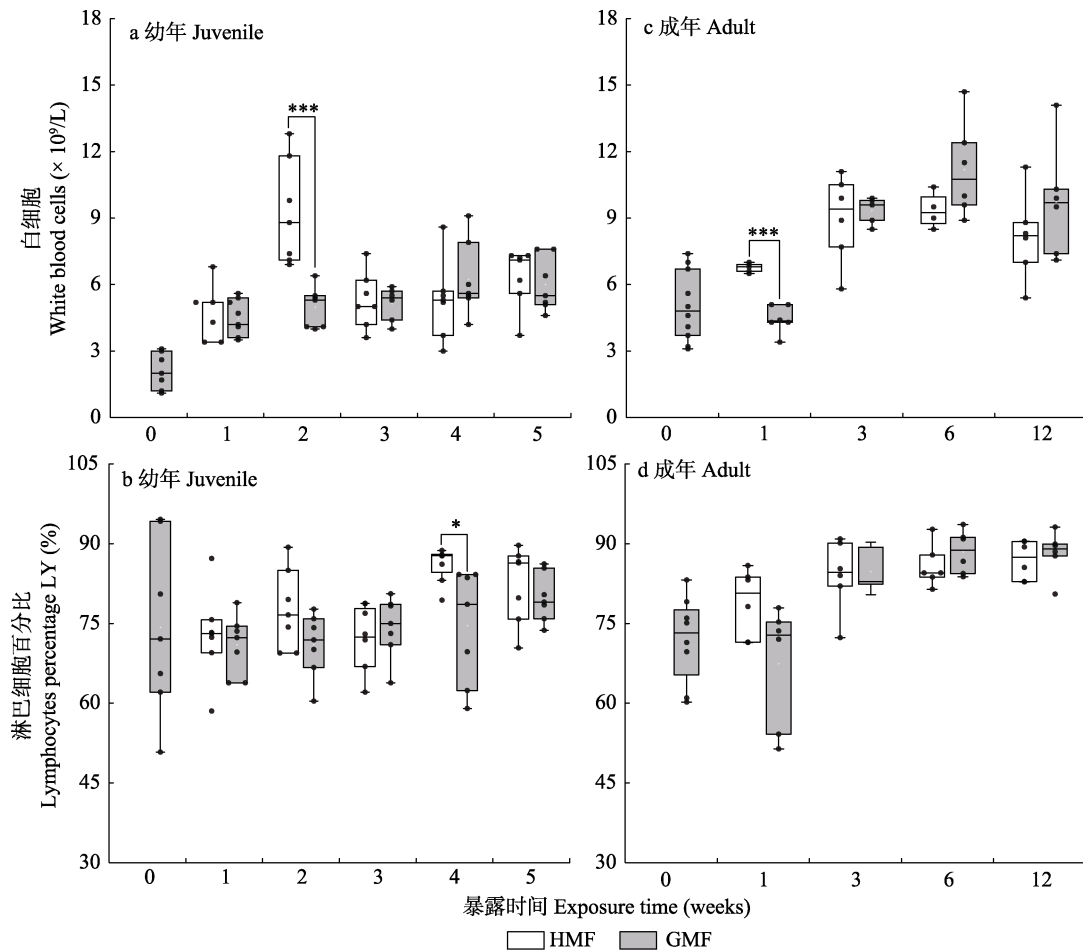


图 3 在亚磁场不同暴露时长条件下小鼠白细胞含量及淋巴细胞百分比

Fig. 3 Comparison of contents of white blood cells and lymphocytes percentage in blood of mice exposed to hypomagnetic field and geomagnetic field

a, b. 幼年; c, d. 成年。a, c. 白细胞; b, d. 淋巴细胞百分比。HMF. 亚磁场; GMF. 地磁场。* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ 。

a, b. Juvenile; c, d. Adult. a, c. White blood cell; b, d. Lymphocytes percentage. HMF. Hypomagnetic field; GMF. Geomagnetic field.

等参数在成年后, 含量趋于稳定(附录 1)。

3 讨论

3.1 亚磁场不同暴露时长对小鼠神经递质和激素的影响

在本研究检测的生理指标中, 小鼠亚磁场暴露组的甲状腺素(T4)是出现显著性降低周次最多的激素。成年小鼠血清中甲状腺素(T4)含量在第 3 周、第 6 周和第 12 周有显著降低, 而第 9 周亚磁场暴露其均值也降低, 但无显著

性差异; 幼年小鼠血清中 T4 含量在第 2 周和第 5 周有显著降低, 而中间的第 3 和 4 周亚磁场暴露其均值降低, 但无显著性差异。分析结果发现, 成年小鼠血清中甲状腺素(T4)的亚磁场效应时长和程度都高于幼年小鼠, 两个年龄段小鼠的甲状腺素(T4)含量随着亚磁场处理时间的增长均出现了含量降低-恢复-再次降低的趋势。有研究认为, 甲状腺激素除了在细胞代谢活动中发挥作用外, 还调节神经发育并影响中枢神经系统的正常功能, 甲状腺素(T4)

对认知功能具有增强作用,可显著提高大鼠学习及空间记忆的能力(Smith et al. 2002)。甲状腺功能障碍的孕鼠,其子代脑功能也受损害,而先天性甲状腺发育不全的儿童常伴有明显的脑发育障碍,根据理化分析和流行病学的研究证明,甲状腺素(T₄)能透过胎盘,这在多种哺乳动物包括人中均已得到确定,对胚胎早期发育有重要影响(蔡文琴 2007)。因此推测亚磁场长期暴露而导致动物发育和认知等功能异常可能与甲状腺素(T₄)有关。

在亚磁场暴露不同时长后,幼年小鼠脑组织中的多巴胺(DA)在第5周产生单周降低效应,成年小鼠脑组织和血清中的5-羟色胺(5-HT)及去甲肾上腺素(NA)在个别早期暴露周出现显著降低,随后暴露周很快就恢复到正常地磁场水平,这三种神经递质效应周的出现并没有一致性。因此,亚磁场的暴露对这些神经递质的影响并不具有持续性和积累性。多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)及去甲肾上腺素(NA)这三种神经递质都属于与情绪有关的单氨类神经递质(Clement et al. 1998, Nutt 2008),一些证据表明,5-羟色胺(5-HT)及去甲肾上腺素(NA)含量降低与抑郁症的发生密切相关,而使脑内这些相关的神经递质保持一定水平是抗抑郁剂起效的必要维持条件(陈乃宏 2012)。多巴胺(DA)在哺乳动物中枢神经系统中有着极其重要的生理功能,包括运动的整合、神经内分泌激素释放的调节、认知、情感、奖赏、意识和记忆。前人通过行为学研究发现,亚磁场处理30 d后不会导致成年C57小鼠的抑郁和焦虑行为(Mo et al. 2015),但是亚磁场短期暴露72 h后成年C57小鼠焦虑行为增加(Ding et al. 2019)。此外,对亚磁场暴露2 d的人神经母细胞瘤细胞转录组的分析结果暗示,5-羟色胺(5-HT)通路可能在亚磁场生物效应中发挥作用(Mo et al. 2014)。本研究筛选出能对亚磁场暴露早期产生响应的神经递质5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NA)、多巴胺(DA)和激素甲状腺素(T₄),这些指

标水平在亚磁场暴露下的个别周出现了显著降低。后续研究应该更加关注亚磁场短期(以天或小时为暴露时长)效应,可能在暴露的早期亚磁场效应最显著。亚磁场暴露造成动物学习记忆能力下降以及影响动物胚胎发育,很可能与甲状腺素(T₄)和多巴胺(DA)含量降低有关;而动物的焦虑、狂躁等行为很可能与5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NA)、多巴胺(DA)含量降低有关。亚磁场对动物的胚胎发育和情绪行为这两方面影响可能是通过多种神经递质和激素相互作用产生的结果,也可能是一种神经递质或激素含量的降低造成了多方面的结果。

3.2 亚磁场不同暴露时长对小鼠血常规的影响

血常规参数的结果显示,成年小鼠和幼年小鼠白细胞(WBC)计数分别在第1周和第2周有显著升高,幼年小鼠淋巴细胞百分比(LY%)在暴露第4周出现显著增高。小鼠白细胞(WBC)和淋巴细胞百分比(LY%)对亚磁场的响应与前述神经递质和激素的响应类似,都是在单个周出现差异性,后续暴露周无差异。白细胞含量和淋巴细胞百分比增加暗示地磁场的减弱对动物体来说是不好的外界刺激因子,从而引起免疫细胞的反应,但机体很快做出调节,使其恢复到地磁场水平。此外,与地磁场相比,红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、血小板(PLT)这3项血常规参数在亚磁场暴露下并无差异(附录3)。本研究测得血常规结果与前人测得的C57小鼠淋巴细胞、红细胞等血常规结果基本一致(杨林等 2015)。在本研究中个别处理组的数据个体差异较大,这可能是未能发现持续性差异的原因之一。在后续的研究中应该加大同一组别动物样本量,以消除个体差异的影响。

本研究发现,亚磁场暴露对小鼠的部分神经递质和激素水平有显著影响,但是这些影响仅出现在个别周,并没有出现持续性差异,这说明亚磁场对这些生理指标的影响并不具有积累性。并且两个年龄段的小鼠对亚磁场响应的

指标不完全一致, 仅甲状腺素 (T4) 在两个年龄段小鼠的体内都出现显著性降低。通过本研究发现, 相对其他几种神经递质和激素, 甲状腺素 (T4)、5-羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NA)、多巴胺 (DA) 和白细胞可能是小鼠对亚磁场环境早期暴露较为敏感的生理指标。本研究结果对于认识亚磁场效应的作用时间点、筛选响应亚磁场效应的有效参数, 为进一步研究亚磁场的作用机理提供参考, 也为认识亚磁场对动物生理方面的影响以及宇航员深空探测的体检指标选择提供重要的实验依据和参考资料。

致谢 LC-MS 仪器测试由清华大学药物平台提供, 动物血常规测试由北京大学医学部实验动物中心提供, 动物饲养和取样过程中得到张兵芳、詹蔼生、余佳成同学的支持与帮助, 在此一并致以诚挚谢意。

参 考 文 献

- Asashima, M, Shimada K, Pfeiffer C J. 1991. Magnetic shielding induces early developmental abnormalities in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Bioelectromagnetics*, 12(4): 215–224.
- Backman L, Lindenberger U, Li S C, et al. 2010. Linking cognitive aging to alterations in dopamine neurotransmitter functioning: recent data and future avenues. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(5): 670–677.
- Bellintani-Guardia B, Schweizer M, Herbert H. 1996. Analysis of projections from the cochlear nucleus to the lateral paragigantocellular reticular nucleus in the rat. *Cell and Tissue Research*, 283(3): 493–505.
- Binhi V N, Prato F S. 2017. Biological effects of the hypomagnetic field: an analytical review of experiments and theories. *PLoS One*, 12(6): e0179340.
- Clement Y, Chapouthier G. 1998. Biological bases of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22(5): 623–633.
- Ding H M, Wang X, Mo W C, et al. 2019. Hypomagnetic fields cause anxiety in adult male mice. *Bioelectromagnetics*, 40(1): 27–32.
- Fesenko E E, Mezhevikina L M, Osipenko M A, et al. 2010. Effect of the “zero” magnetic field on early embryogenesis in mice. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 29(1-12): 1–8.
- Kopanev V I, Efimenko G D, Shakula A V. 1979. Biological effect of a hypogeomagnetic environment on an organism. *Biology Bulletin of the Academy of Sciences of the Union of Soviet Socialist Republics*, 6(3): 289.
- Mo W C, Fu J P, Ding H M, et al. 2015. Hypomagnetic field alters circadian rhythm and increases algesia in adult male mice. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 42(7): 639–646.
- Mo W C, Liu Y, Bartlett P F, et al. 2014. Transcriptome profile of human neuroblastoma cells in the hypomagnetic field. *Science China Life Sciences*, 57(4): 448–461.
- Nutt D J. 2008. Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 69: 4–7.
- Perry E, Walker M, Grace J, et al. 1999. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci*, 22(6): 273–280.
- Petty F. 1995. GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis. *Journal of Affective Disorders*, 34(4): 275–281.
- Schildkraut J J. 1965. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *American Journal of Psychiatry*, 122(5): 509–522.
- Shiah I, Yatham L N. 1998. GABA function in mood disorders: an update and critical review. *Life Sciences*, 63(15): 1289–1303.
- Smith J W, Tudor E A, Costall B, et al. 2002. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(1): 45–60.
- Zaporozhan V, Nasibullin B, Hozhenko A, et al. 2002. Effects of hypogeomagnetic fields on the structural-functional activity of rat cerebral cortex. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 48(3): 16–21.
- 蔡文琴. 2007. 发育神经生物学. 北京: 科学出版社, 541–568.
- 陈乃宏. 2012. 神经递质与神经疾患. 北京: 中国协和医科大学出版社, 326–337.
- 丁海敏, 莫炜川, 付晶鹏, 等. 2014. 成年小鼠血液系统对亚磁场的响应. *现代生物医学进展*, 14(26): 5001–5004.
- 贾斌, 张卫菊, 谢丽, 等. 2011. 亚磁场环境对小鼠血液系统的影响. *航天医学与医学工程*, 24(5): 318–322.
- 李俊凤, 吴奇久, 王倩, 等. 2001. 零磁空间对金黄仓鼠脑中几种神经递质的影响. *生物化学与生物物理进展*, 28(3): 358–361.
- 莫炜川, 刘纓, 赫荣乔. 2012. 亚磁场及其生物响应机制. *生物化学与生物物理进展*, 39(9): 7–14.
- 秦川, 魏泓. 2015. 实验动物学. 北京: 人民卫生出版社, 32–33.
- 田兰香, 潘永信. 2018. 地磁场与动物感磁. *科学通报*, 64(8): 761–772.
- 杨林, 朱叶萌, 刘科, 等. 2015. MRL/lpr 狼疮小鼠和 C57 小鼠血常规、主要脏器系数的测定与比较. *实验动物科学*, 32(3): 44–47.
- 张蕾, 孔令提, 孙兰, 等. 2013. LC-MS /MS 同时测定小鼠脑组织中 7 种神经递质含量. *中国实验方剂学杂志*, 19(20): 132–136.

附录 1 地磁场组 3~20 周龄 C57BL/6 雄性小鼠部分血常规指标

Appendix 1 Blood parameters of male C57BL/6 mice (3 - 20 weeks)

周龄 Age (week)	白细胞 White blood cells WBC ($\times 10^9/L$)	淋巴细胞百分比 Lymphocytes percentage LY% (%)	红细胞 Red blood cell RBC ($\times 10^{12}/L$)	血小板 Blood platelets PLT ($\times 10^9/L$)	血红蛋白 hemoglobin HGB (g/L)
3	2.10 \pm 0.76	74.27 \pm 15.25	6.38 \pm 0.98	249.29 \pm 68.49	96.14 \pm 5.46
4	4.44 \pm 0.77	70.91 \pm 5.18	6.22 \pm 0.74	316.14 \pm 38.61	97.29 \pm 6.78
5	4.97 \pm 0.85	70.99 \pm 5.50	8.18 \pm 0.16	427.71 \pm 26.03	128.00 \pm 4.10
6	5.77 \pm 1.69	74.34 \pm 5.31	7.60 \pm 0.55	403.71 \pm 37.68	119.14 \pm 13.11
7	6.24 \pm 1.55	74.53 \pm 9.98	7.79 \pm 0.69	336.14 \pm 51.41	118.43 \pm 22.95
8	6.00 \pm 1.13	79.87 \pm 4.27	8.26 \pm 0.50	396.14 \pm 64.32	125.57 \pm 12.29
9	4.43 \pm 0.58	67.40 \pm 10.51	8.99 \pm 0.16	408.83 \pm 20.26	135.00 \pm 1.53
11	9.97 \pm 1.49	84.70 \pm 3.71	9.02 \pm 0.28	368.83 \pm 12.37	132.17 \pm 3.13
14	11.18 \pm 1.96	88.43 \pm 3.68	9.22 \pm 0.20	379.50 \pm 31.73	134.83 \pm 4.06
17	—	—	8.45 \pm 1.01	451.60 \pm 77.68	123.80 \pm 14.88
20	9.72 \pm 2.30	88.22 \pm 3.84	8.96 \pm 0.56	432.00 \pm 42.47	130.17 \pm 8.80

附录 2 地磁场组 3~20 周龄 C57BL/6 雄性小鼠脑组织神经递质含量

Appendix 2 Contents of neurotransmitter in brain tissue of male C57BL/6 mice (3 - 20 weeks)

周龄 Age (week)	5-羟色胺 Serotonin 5-HT ($\mu\text{g/g}$)	多巴胺 Dopamine DA ($\mu\text{g/g}$)	去甲肾上腺素 Noradrenaline NA ($\mu\text{g/g}$)	乙酰胆碱 Acetylcholine Ach ($\mu\text{g/g}$)	γ -氨基丁酸 Gamma-aminobutyric acid GABA ($\mu\text{g/g}$)
3	5.85 \pm 0.48	9.32 \pm 0.24	3.15 \pm 0.17	8.73 \pm 0.28	350.73 \pm 6.13
4	6.62 \pm 0.53	10.17 \pm 0.78	3.42 \pm 0.25	8.42 \pm 0.50	340.41 \pm 11.52
5	6.47 \pm 0.22	11.06 \pm 0.26	3.16 \pm 0.19	8.42 \pm 0.39	334.79 \pm 12.41
6	8.74 \pm 0.65	16.65 \pm 0.87	1.92 \pm 0.13	17.34 \pm 0.46	304.91 \pm 17.30
7	9.93 \pm 0.63	18.71 \pm 0.93	2.01 \pm 0.19	18.29 \pm 1.23	307.90 \pm 11.17
8	9.68 \pm 0.69	20.13 \pm 1.01	2.09 \pm 0.18	20.16 \pm 0.87	346.98 \pm 19.80
9	9.33 \pm 0.51	15.36 \pm 0.73	4.67 \pm 0.21	13.15 \pm 0.61	370.08 \pm 10.33
11	7.59 \pm 0.69	13.14 \pm 0.77	4.14 \pm 0.31	9.40 \pm 1.06	364.27 \pm 32.09
14	8.05 \pm 0.26	15.29 \pm 0.77	3.58 \pm 0.31	9.21 \pm 0.54	346.29 \pm 24.26
17	8.20 \pm 0.57	15.24 \pm 0.94	3.66 \pm 0.29	8.79 \pm 0.76	359.32 \pm 19.54
20	7.12 \pm 0.57	14.16 \pm 0.94	3.19 \pm 0.29	9.36 \pm 0.91	327.32 \pm 13.37

附录 3 地磁场组 3~20 周龄 C57BL/6 雄性小鼠血清神经递质和激素含量

Appendix 3 Contents of neurotransmitter and hormone in serum of male C57BL/6 mice (3 - 20 weeks)

周龄 Age (week)	5-羟色胺 Serotonin 5-HT (mg/L)	去甲肾上腺素 Noradrenaline NA (ng/L)	生长激素 Growth hormone GH ($\mu\text{g/L}$)	甲状腺素 Thyroxine T4 ($\mu\text{g/L}$)
3	3.41 \pm 0.12	44.2 \pm 7.8	3.31 \pm 0.39	187.60 \pm 94.95
4	3.70 \pm 0.27	32.8 \pm 8.3	10.48 \pm 4.53	215.22 \pm 38.51
5	3.71 \pm 0.32	48.2 \pm 9.8	7.20 \pm 1.37	236.90 \pm 40.55
6	4.94 \pm 0.38	39.3 \pm 11.6	6.62 \pm 1.30	200.85 \pm 53.48
7	5.15 \pm 0.33	47.2 \pm 6.5	4.64 \pm 0.36	241.73 \pm 50.42
8	5.23 \pm 0.11	37.7 \pm 5.3	4.89 \pm 1.08	169.45 \pm 16.06
9	2.28 \pm 0.09	30.7 \pm 14.7	5.88 \pm 1.61	126.68 \pm 33.41
11	3.89 \pm 0.32	36.3 \pm 4.9	15.35 \pm 11.52	183.07 \pm 42.15
14	5.57 \pm 0.71	27.2 \pm 12.3	9.83 \pm 7.64	149.70 \pm 31.57
17	4.21 \pm 0.19	39.2 \pm 13.1	8.01 \pm 1.81	105.77 \pm 13.28
20	5.70 \pm 0.25	22.2 \pm 9.8	13.60 \pm 8.80	101.57 \pm 14.25