

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.14.005

香烟烟雾染毒对雄性大鼠睾丸组织一氧化氮水平的影响*

张 静¹,邓 晟²,仲春雪¹,黄云飞¹,张 晨^{1△},何丽娟¹,邹 莹¹
(1. 新疆医科大学公共卫生学院毒理学教研室,乌鲁木齐 830011;2. 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心,乌鲁木齐 830001)

[摘要] **目的** 探讨香烟烟雾染毒对大鼠睾丸组织结构及睾丸组织一氧化氮(NO)水平的影响。**方法** 清洁级成年雄性 SD 大鼠 160 只,分为对照组和低、中、高剂量染毒组,各组大鼠分别染毒 2、4、6、8、12 周,每组 10 只。染毒组采用呼吸道静式染毒,每天 1 次,每次 0.5 h。观察大鼠睾丸组织结构,检测各组大鼠体质量及睾丸组织 NO 水平。**结果** 染毒 4、6、8、12 周时,中、高剂量染毒组大鼠体质量与对照组和低剂量组相比均明显降低($P<0.05$),染毒 8、12 周时,高剂量染毒组大鼠体质量与中剂量组相比明显降低($P<0.05$),并且随着染毒剂量的增加,降低更加明显。染毒 2、4、6、8 周时,高剂量组大鼠睾丸组织 NO 水平与对照组和低、中剂量组相比均明显升高($P<0.05$);染毒 8 周时,中剂量组大鼠睾丸组织 NO 水平与对照组相比明显升高($P<0.05$);染毒 12 周时,低、中、高剂量组大鼠睾丸组织 NO 水平与对照组相比均明显升高($P<0.05$),中、高剂量组大鼠睾丸组织 NO 水平与低剂量组相比明显升高($P<0.05$)。**结论** 香烟烟雾染毒可致雄性大鼠睾丸组织 NO 水平升高,导致雄性大鼠睾丸组织损伤。

[关键词] 睾九;烟草;烟雾;毒物;雄性大鼠;一氧化氮
[中图分类号] R114 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)14-1885-04

The effect of cigarette smoke exposure on nitric oxide level in testis of male rats*
Zhang Jing¹,Deng Sheng²,Zhong Chunxue¹,Huang Yunfei¹,Zhang Chen^{1△},He Lijuan¹,Zou Ying¹
(1. Department of Toxicology, College of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi, the Xinjiang Uygur Autonomous Region 830011, China; 2. Xinjiang Center for Disease Control and Prevention, Urumqi, the Xinjiang Uygur Autonomous Region 830001, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of cigarette smoke exposure on testis structure and nitric oxide (NO) level in testis of rats. **Methods** A total of 160 adult male SD rats were divided into control group and low, medium, high dose groups. The smoke-exposed rats were respectively exposed to the smog for the periods of 2, 4, 6, 8 and 12 weeks, 10 rats in each group. The smoke-exposed rats were exposed to cigarette smoke for 0.5 h per day. The testicular tissue structure was observed and the body mass and the NO level of testis were measured. **Results** Compared with the control group and low dose group, the body mass of the rats was significantly lower in the medium and high dose groups exposed for 4, 6, 8, 12 weeks ($P<0.05$). Compared with the medium dose groups, the body mass of the rats was significantly lower in the high dose group exposed for 8 weeks and 12 weeks ($P<0.05$). And with the increase of exposure dose, the reducing was even more obvious. Compared with the control group and low and medium dose groups, NO level in testis of rats was significantly increased in the high dose groups exposed for 2, 4, 6, 8 weeks ($P<0.05$). Compared with the control group, NO level in testis of rats was significantly increased in the medium dose groups exposed for 8 weeks ($P<0.05$). Compared with the control group, NO level in testis of rats was significantly increased in the low, medium and high dose groups exposed for 12 weeks ($P<0.05$); and compared with the low dose group, NO level in testis of rats was significantly increased in the medium and high dose groups ($P<0.05$). **Conclusion** Cigarette smoke exposure may have impacts on testis tissue and lead to the increase of NO level in testis of male rats.

[Key words] testis; tobacco; smog; poisons; male rats; nitric oxide

男性生殖健康问题是影响家庭和谐和社会稳定的重要医学问题。目前,男性精液质量下降造成的不育问题已经引起了全世界的关注。香烟烟雾中含有多种致癌物质和细胞诱变剂,可能对男性生育产生不利影响^[1]。WHO 指出,烟草危害是现今全球最严峻的公共卫生问题之一^[2]。据统计,全球 15 岁以上人群中吸烟者占 22%,每年约有 600 万人死于吸烟相关疾病,与吸烟相关的死亡已占全世界死因构成第 1 位^[3]。有一些学者报道吸烟会对雄性生殖产生不利影响^[4-7],但至今毒性机理尚不明确。本研究建立大鼠吸烟模型,观察香烟烟雾暴露对大鼠睾丸组织的损害特点,检测香烟烟雾暴露对大鼠睾丸组织

中一氧化氮(NO)水平的影响,为探讨香烟烟雾暴露对雄性生殖毒性的机制提供依据。
1 材料与方法
1.1 材料 (1)实验动物:清洁级成年雄性 SD 大鼠 160 只,由新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心提供,动物许可证号为 SCXK(新)2011-0001,大鼠体质量为 180~220 g。(2)受试物:新疆卷烟厂生产的某品牌过滤嘴香烟,烟气烟碱量每支 1.2 mg,焦油量每支 12.0 mg。(3)主要试剂:NO 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260433);新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2014211C015)。 作者简介:张静(1979—),副教授,博士,主要从事生殖发育毒理方面研究。 △ 通信作者, E-mail: zhangchendr@163.com。

1.2 方法

1.2.1 实验方法 实验动物分为对照组和及低(10 根)、中(20 根)、高(30 根)染毒剂量组,各组大鼠分别染毒 2、4、6、8、12 周,每组 10 只。染毒组大鼠置于自制染毒箱内(80 cm×60 cm×80 cm),采用呼吸道静式染毒,香烟烟雾由真空泵抽入,1 次/天,0.5 小时/次。对照组大鼠每天相同时间放置于染毒箱内,但未进行染毒。

1.2.2 标本采集 实验结束后各组大鼠腹腔注射水合氯醛(按每 100 g 体质量 0.3 mL 计算)麻醉,迅速摘取睾丸和附睾,放入 4℃生理盐水中漂洗,滤纸吸干水分后,用电子天平称其湿质量,右侧睾丸制备组织匀浆,左侧睾丸 4%多聚甲醛固定,制作病理切片。

1.2.3 睾丸组织匀浆制备 称取适量睾丸组织,按质量:体积=1:9 的比例加入生理盐水,机械匀浆,2 500 r/min,离心 10 min,取上清液,即为 10%浓度睾丸组织匀浆;取生理盐水 10 倍稀释该组织匀浆,得 1%浓度睾丸组织匀浆。

1.2.4 测定方法

1.2.4.1 考马斯亮蓝法测定睾丸组织匀浆中蛋白水平 取 1%浓度睾丸组织匀浆按说明书步骤加样,吹打混匀,静置 10 min,于波长 595 nm 处,测定各管样品吸光度值。按公式计算各样品蛋白浓度。

1.2.4.2 NO 水平测定 取 10%浓度睾丸组织匀浆,按说明书操作步骤加样,吹打混匀,室温静置 10 min 后在波长 550 nm 处,测定各管样品吸光度值,按公式计算各样品 NO 水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 One-way ANOVA 进行组间差异分析,采用 LSD-*t* 法进行组间多重比较,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察 对照组大鼠被毛洁净有光泽,活动敏捷,精神状态良好,饮水、饮食正常,试验期内体质量增加明显。染毒组大鼠被毛无光泽,倦怠懒动,行动活跃度降低,出现不同程度饮水、饮食量减少,体质量增长缓慢。其中高剂量染毒组大鼠在染毒后期进食差,体质量减轻,行动迟缓,精神萎靡。

2.2 大鼠体质量变化 染毒 2 周时,各剂量组大鼠体质量与对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$);染毒 4、6、8、12 周时,低剂量染毒组大鼠体质量与对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$),中、高剂量染毒组大鼠体质量与对照组和低剂量组相比均明显降低($P<0.05$);染毒 8、12 周时,高剂量染毒组大鼠体质量与中剂量组相比明显降低($P<0.05$),并且随着染毒剂量的增加,体质量降低更加明显,见表 1。

2.3 睾丸及附睾重量、脏器系数比较 与对照组比较,各染毒组大鼠睾丸及附睾重量、脏器系数比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.4 大鼠睾丸组织病理变化 对照组大鼠睾丸精曲小管形态规则,生精上皮基膜完好无缺,各级生精细胞紧密排列,曲细精管管腔内还可见大量精子;染毒组大鼠生精小管和间质组织均可见明显的变性改变,界膜局部剥脱,曲细精管内生精细胞层数明显减少,细胞排列紊乱,各级生精细胞、精子数量降低,甚至未观察到游离精子。随着染毒剂量的增加和染毒时间的延长,大鼠睾丸组织损伤加重,见图 1。

2.5 大鼠睾丸组织 NO 水平比较 随着染毒剂量和染毒时间的增加,大鼠睾丸组织 NO 水平逐渐升高。方差分析结果显示:染毒 2~12 周时,各剂量组大鼠睾丸组织 NO 水平比较差异均有统计学意义($P<0.05$);进一步两两比较显示:染毒 2、4、6、8 周时,高剂量组大鼠睾丸组织 NO 水平与对照组和低、中剂量组比较均明显升高($P<0.05$);染毒 8 周时,中剂量组大鼠睾丸组织 NO 水平与对照组比较明显升高($P<0.05$);染毒 12 周时,低、中、高剂量组大鼠睾丸组织 NO 水平与对照组比较均明显升高($P<0.05$),中、高剂量组大鼠睾丸组织 NO 水平与低剂量组比较明显升高($P<0.05$),见表 3。

表 1 各组大鼠不同时间体质量比较 ($\bar{x} \pm s$, g)

组别	2 周	4 周	6 周	8 周	12 周
对照组	276.75±13.53	343.75±14.44	395.88±18.10	436.00±19.20	451.38±20.07
低剂量组	293.60±7.67	350.90±7.58	380.00±7.17	422.00±15.06	455.30±13.58
中剂量组	270.60±8.94	287.67±9.67 ^{ab}	315.00±13.15 ^{ab}	374.56±9.90 ^{ab}	407.78±13.70 ^{ab}
高剂量组	253.69±4.30	251.40±7.19 ^{ab}	281.33±25.10 ^{ab}	306.67±12.93 ^{abc}	348.25±7.23 ^{abc}

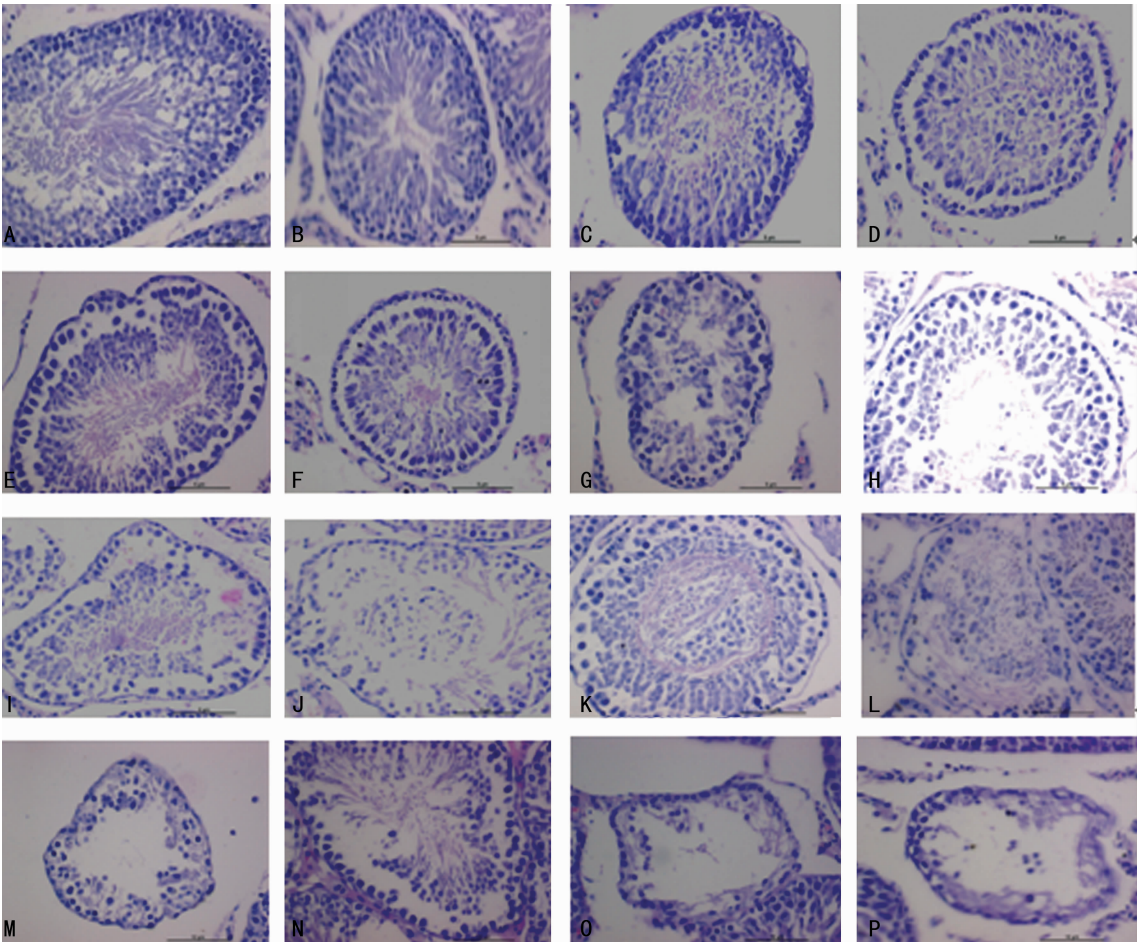
^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与低剂量组比较;^c: $P<0.05$,与中剂量组比较。

表 2 各组大鼠睾丸及附睾重量、脏器系数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	睾丸(g)	附睾(g)	睾丸脏器系数(mg/g)	附睾脏器系数(mg/g)
对照组	3.92±0.38	1.34±0.06	9.01±0.87	3.08±0.17
低剂量组				
2 周	3.06±0.07	0.79±0.04	10.47±0.24	2.70±0.12
4 周	3.56±0.09	1.21±0.03	10.16±0.26	3.44±0.06
6 周	3.54±0.12	1.22±0.01	9.31±0.22	3.21±0.07
8 周	3.17±0.21	1.19±0.07	7.59±0.57	2.84±0.19
12 周	3.42±0.20	1.33±0.05	7.49±0.33	2.93±0.08
中剂量组				
2 周	2.79±0.27	0.77±0.04	10.20±0.95	2.88±0.15

续表 2 各组大鼠睾丸及附睾重量、脏器系数比较(̄x±s,g)

组别	睾丸(g)	附睾(g)	睾丸脏器系数(mg/g)	附睾脏器系数(mg/g)
对照组	3.92±0.38	1.34±0.06	9.01±0.87	3.08±0.17
4周	3.20±0.13	0.92±0.03	11.14±0.31	3.21±0.09
6周	3.22±0.12	1.05±0.03	10.26±0.23	3.34±0.09
8周	3.13±0.19	1.05±0.04	8.64±0.20	2.90±0.12
12周	3.41±0.10	1.25±0.04	8.40±0.29	3.08±0.12
高剂量组				
2周	2.95±0.16	0.80±0.03	11.58±0.58	3.13±0.17
4周	3.12±0.17	0.91±0.04	12.47±0.61	3.62±0.16
6周	2.94±0.26	0.88±0.07	10.49±0.53	3.16±0.17
8周	2.97±0.10	1.02±0.03	9.78±0.35	3.38±0.11
12周	2.98±0.19	1.10±0.05	8.58±0.56	3.17±0.17



A:对照组;B:2周低剂量组;C:2周中剂量组;D:2周高剂量组;E:4周低剂量组;F:4周中剂量组;G:4周高剂量组;H:6周低剂量组;I:6周中剂量组;J:6周高剂量组;K:8周低剂量组;L:8周中剂量组;M:8周高剂量组;N:12周低剂量组;O:12周中剂量组;P:12周高剂量组。

图 1 各组大鼠睾丸组织病理图片(×400)

表 3 各组大鼠不同时间睾丸组织 NO 水平比较(̄x±s,μmolL)

组别	2周	4周	6周	8周	12周
对照组	0.68±0.11	0.68±0.11	0.68±0.11	0.68±0.11	0.68±0.11
低剂量组	0.67±0.11	0.66±0.13	0.78±0.11	1.79±0.25	3.60±0.58 ^a
中剂量组	0.84±0.13	0.75±0.21	0.92±0.19	2.03±0.20 ^a	5.34±0.44 ^{ab}
高剂量组	1.81±0.34 ^{abc}	3.18±0.25 ^{abc}	3.28±0.25 ^{abc}	5.26±0.84 ^{abc}	4.78±0.23 ^{ab}

^a:P<0.05,与对照组比较;^b:P<0.05,与低剂量组比较;^c:P<0.05,与中剂量组比较。

3 讨 论

吸烟是与人类生活环境最密切相关的行为之一,并给全世界公共卫生领域带来巨大的财政和医疗负担^[8]。吸烟对人体健康的危害是众所周知的,吸烟也被认为是男性不育的高危因素之一^[9]。长期吸烟对男性生殖系统的负面影响已在临床研究中得到证实^[10]。

本研究观察发现,染毒组大鼠体质量增长较对照组减缓。各组大鼠睾丸、附睾重量及脏器系数差异无统计学意义,推测其原因可能是由于低剂量组大鼠染毒剂量较小,而尼古丁(香烟中主要有害物质)代谢较快,尚未能引起实验大鼠体质量、睾丸脏器系数及附睾脏器系数的改变。此外,中、高剂量染毒组,尤其是高剂量组大鼠染毒后期,体质量增长缓慢,甚至出现负增长,也可能是染毒组大鼠睾丸、附睾脏器系数未出现显著变化的原因之一。

NO 在哺乳动物生殖系统中广泛存在,不仅与精子发生、成熟密切相关,还可调节雄激素分泌^[11]。NO 具有双重调节作用,低浓度 NO 可以通过捕捉氧自由基等作用使膜脂质过氧化减少,从而帮助精子免于氧自由基的损害,保障精子发生及睾酮分泌^[12];高浓度 NO 则会损伤脂膜,引起组织损伤,也可通过 cGMP 作用影响精子发生及睾酮分泌^[13]。Nobunaga 等^[14]报道生育组精浆中 NO 水平显著低于不育组,而精子活力显著高于不育组,提示高浓度 NO 可致精子活力降低。林霖等^[15]研究发现钼染毒组小鼠睾丸 NO 水平升高,且呈剂量-反应关系,随着染毒剂量的增加,睾丸组织损伤加重。乔彦等^[16]报道尼古丁染毒组小鼠睾丸组织中 NO 水平显著升高,睾酮水平显著下降,诱导型 NOS 蛋白表达增加,精子活力降低。本研究显示,随着香烟烟雾染毒剂量的增加和染毒时间的延长,大鼠睾丸组织中 NO 水平逐渐升高,睾丸组织损伤加重。这与前述研究^[14-16]结果相似。本课题组前期研究结果发现,吸烟可造成雄性小鼠睾丸组织匀浆中 NOS 水平升高,而 NOS 能催化 L-精氨酸分解成瓜氨酸产生 NO,使小鼠睾丸组织中 NO 水平升高^[17]。这也与本研究结果相吻合。

综上所述,在本实验条件下,香烟烟雾染毒可致雄性大鼠睾丸组织 NO 水平升高,并导致雄性大鼠睾丸组织损伤。

参考文献

- [1] Belcheva A, Ivanova-Kicheva M, Tzvetkova P, et al. Effects of cigarette smoking on sperm plasma membrane integrity and DNA fragmentation[J]. *Int J Androl*, 2004, 27(5): 296-300.
- [2] 李秀菊. 我国控制吸烟的现状分析与对策研究[D]. 天津: 天津大学, 2007.
- [3] Organization WH. World health statistics 2012[J]. Geneva Switzerland Who, 2012, 118(7): 1373.
- [4] Ahmadnia H, Ghanbari M, Moradi MR, et al. Effect of cigarette smoke on spermatogenesis in rats[J]. *Urol J*, 2007, 4

(3): 159-163.

- [5] 张诚, 梁超, 张大明, 等. 吸烟对大鼠生精细胞发育影响的研究[J]. *中华男科学杂志*, 2009, 15(11): 1007-1013.
- [6] Hammadeh ME, Hamad MF, Montenarh M, et al. Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers[J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(11): 2708-2720.
- [7] Gaur DS, Talekar MS, Pathak VP. Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2010, 53(1): 35-40.
- [8] Alberg AJ. Cigarette smoking: health effects and control strategies[J]. *Drug Today*, 2008, 44(12): 895-904.
- [9] Polsky JY, Aronson KJ, Heaton JP, et al. Smoking and other lifestyle factors in relation to erectile dysfunction[J]. *BJU International*, 2005, 96(9): 1355-1359.
- [10] Tazsarek HG, Depa Martynow M, Derwich K, et al. The influence of cigarette smoking on sperm quality of male smokers and non-smokers in infertile couples[J]. *Przegl Lek*, 2005, 62(10): 978-981.
- [11] Buldregini E, Mahfouz RZ, Vignini A, et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene (Glu298Asp variant) in infertile men with asthenozoospermia[J]. *J Androl*, 2010, 31(5): 482-488.
- [12] 寇素茹, 谢雪兰, 段斐, 等. 锌对小鼠睾丸组织 NO 的含量及抗氧化作用的影响[J]. *现代预防医学*, 2008, 35(19): 3855-3857.
- [13] Weissman BA, Niu E, Ge R, et al. Paracrine modulation of androgen synthesis in rat leydig cells by nitric oxide[J]. *J Androl*, 2005, 26(3): 369-378.
- [14] Nobunaga T, Tokugawa Y, Hashimoto K, et al. Elevated nitric oxide concentration in the seminal plasma of infertile males: nitric oxide inhibits sperm motility[J]. *Am J Reprod Immunol*, 1996, 36(4): 193-197.
- [15] 林霖, 任洪涛, 张才, 等. 钼对小鼠睾丸 NO 含量及 ATPase 活性的影响[J]. *江苏农业科学*, 2014(8): 195-196.
- [16] 乔彦. 尼古丁对雄性小鼠睾丸中一氧化氮含量的影响[J]. *中国临床保健杂志*, 2011, 14(4): 404-405.
- [17] 张静, 邓晟, 黄云飞, 等. 烟草烟雾染毒小鼠精子形态和睾丸某些生化指标的变化[J]. *毒理学杂志*, 2014, 2(28): 117-120.

(收稿日期: 2016-11-18 修回日期: 2017-01-06)

《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的涉及人的生物医学研究论文, 作者应说明所在用的试验程序是否经过伦理审查委员会(单位性的、地区性的或国家性的)评估, 注明批准号。涉及患者(受试者)的应签订知情同意书。

《重庆医学》编辑部