汽车尾气染毒动物模型的构建及其对雄鼠生殖功能影响的初步研究

姚基伟[1,2],杨 伟[2],丁 杰[1],万 凌[1],王浩宇[2],李前伟[2],李为兵[2],李川海[1],鄢俊安[2] (1. 重庆市人口和计划生育科学技术研究院,重庆 401147;2. 第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨汽车尾气染毒动物模型的构建方法,并初步研究其对雄性 C57BL/6 小鼠生殖系统的影响。**方法** 设计构建汽车尾气染毒装置,观测该装置内氧气含量的变化和小鼠生存状态,明确通入汽车尾气的时间和间隔;为了评估本染毒装置的可靠性,将 24 只 C57BL/6 小鼠随机分成染毒组和对照组,染毒组予以汽车尾气暴露,而对照组予以正常空气。40 d 后对比 2 组生殖腺质量的变化、精子活力、精子数目和精子畸形率,并检测血和睾丸中活性氧含量(ROS)。**结果** 向染毒装置持续 4 min 通入汽车尾气,此时装置内氧气含量为(17.33 ±0.09)%,间隔 20 min 后装置内氧气的含量接近空气中的含量。染毒模型构建结束后,染毒组小鼠的生殖腺质量、精液质量明显下降,而血和睾丸 ROS 的含量均高于对照组。**结论** 该研究为构建汽车尾气的染毒模型提供了方法且效果良好,明确了汽车尾气染毒后可损伤生殖系统。

[关键词] 汽车尾气染毒模型;生殖功能;活性氧;精液质量

[中图分类号] R691.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)06-0599-03

Primary research of automobile exhaust exposed animal model and its impact on male rerpoductive function

YAO Ji-wei[1,2], YANG Wei[2], DING Jie[1], WAN Ling[1], WANG Hao-yu[2], LI Qian-wei[1], LI Wei-bing[2], LI Chuan-hai[1], YAN Jun-an[2] (1. Population and Family Planning Institute of Science and Technology in Chongqing, Chongqing 401147, China; 2. Department of Urology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective The purpose of this research was to discuss the method of the automobile exhaust exposed animal model and to determine the effects of automobile exhaust exposure on male C57BL/6 mouse reproductive system. **Methods** An automobile exhaust exposed device was designed and made. By detecting the change of the oxygen content of the device and C57BL/6 mice could be alive or not, we made sure the time and time interval of vehicle exhaust emissions. In order to assess the reliability of the automobile exhaust exposed device, 24 male C57BL/6 mice were divided into two groups randomly. Automobile exhaust exposure group lived with high concentration of automobile exhaust for 40 days, control group was suffered from fresh air. The effect of automobile exhaust on the mouse reproductive system was measured by comparing the two group changes of sexual gland weight and semen quality (sperm motility, sperm abnormol rate and sperm count) and evaluated the oxidative stress by detecting ROS(serum and testicular tissue). **Results** We made the 4 min as the time of vehicle exhaust emissions and oxygen content was (17.33 ±0.09)% in the device. Within 20 min oxygen content in the device was close to the content of oxygen in the air. After automobile exhaust exposure, we found that the average gonad weight and sperm semen quality were declined significantly in the automobile exhaust exposure group compared to the control group ($P<0.05$) and ROS in automobile exhaust exposure group were higher than it in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Our work provides a good model of automobile exhaust exposure and makes sure that automobile exhaust exposure is harmful to male reproductive system.

Keywords: automobile exhaust exposed animal model; reproductive function; ROS; semem quality

环境是人类生存和发展的基础,生殖健康是人类进化和繁衍的必要条件。然而近 50 年来男性生殖健康水平逐年下降[1],在众多影响因素中,环境污染因素一直都是国际上研究的热点[2]。汽车尾气污染是环境污染的主要组成部分[3],是引发雾霾天气的罪魁祸首之一。随着国家经济的快速发展和城市化的推进,汽车的保有量持续上升[4],由此带来的汽车尾气污染将会更加严重。国外研究表明,长期暴露于汽车尾气中的特殊人群均可出现生殖健康受损[5]。汽车尾气的生殖毒性及机制的研究国内报道较少,主要原因之一就是没有较为可靠的尾气染毒模型。因此,本实验拟构建一套有效可行的汽车尾气染毒装置和方法,并运用其初步探讨汽车尾气对雄鼠生殖系统的影响,为相关分子机制的研究创造条件。

doi:10.11659/jjssx.01E015087

[基金项目] 重庆市基本科研业务费计划项目(2012CSTC-jbky-01703)

[通讯作者] 李川海, E-mail: lchjsw@126.com; 鄢俊安, E-mail: pest1976@qq.com

[收稿日期] 2015-01-24 [修回日期] 2015-02-26

1 材料与方法

1.1 实验动物

24 只清洁级雄性(SPF 级)C57BL/6 小鼠购自第三军医大学大坪医院动物中心,9 ~ 10 周龄,体质量 23 ~ 25 g;提供充足饮食饮水,室温(22 ± 1)℃,光照与黑暗周期均为 12 h(7∶00 ~ 19∶00),汽车尾气染毒时间为每天 14∶00 ~ 20∶00。

1.2 染毒装置

染毒装置由发电机(伊藤动力)及其进气口、小型风扇及其进气口、排气管、采样口、和自制玻璃染毒柜 5 个部分构成。发电机产生汽车尾气从进气口进入染毒装置内,小型风扇持续向染毒柜内通入空气,排气管实现染毒柜内的气体与外界气体进行交换,运用氧含量检测仪(希玛 AR8100)于采样口检测氧含量。

1.3 实验方法

首先设计自制汽车尾气染毒装置(图 1a),并根据设计构建染毒模型。将 24 只 C57BL/6 小鼠随机分为尾气暴露组和对照组,各 12 只。尾气暴露组放入染毒装置内且持续向其通汽车尾气 4 min,间隔 20 min 后再次通注尾气;以此类推每天循环 6 h 且持续 40 d;对照组则暴露于正常空气中。染毒结束后用天平称取 2 组小鼠的体质量及睾丸、附睾尾的质量,记录并比较各组质量。取附睾尾的精子制成精子悬液。利用计算机辅助精液分析技术来评估精子总数、总活动力和前向运动力[6];取部分精子悬液加入 4% 多聚甲醛固定,吸取适量固定后的精子标本推片晾干用 2% 的伊红染色 2 h,清水冲洗干燥后计数完整精子(500 条/只)中的畸形精子数,并计算精子畸形率。心脏抽取血离心取上清;取 0.1 g 睾丸组织并匀浆。按照活性氧(ROS)测定试剂盒的说明书进行血和睾丸 ROS 含量进行检测。

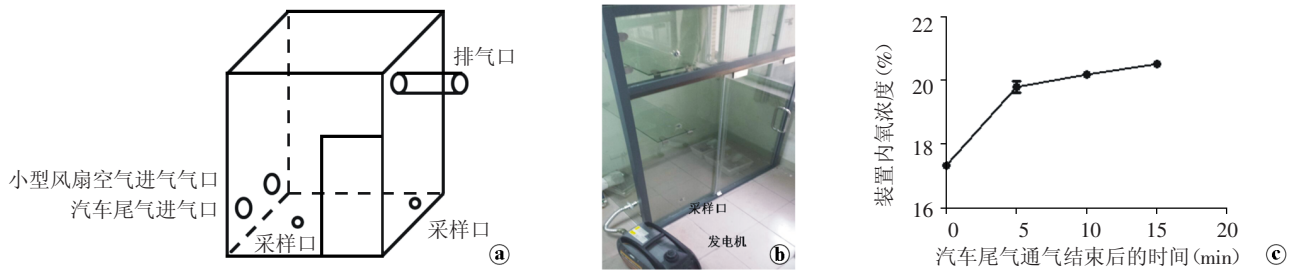
1.4 统计方法

数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用 SPSS 13.0 软件进行 student-t 检验并进行统计分析。显著性检验水平设置为 $P < 0.05$。

2 实验结果

2.1 汽车尾气染毒动物模型的构建

持续染毒装置内(图 1b)通尾气 1 ~ 4 min 小鼠活动逐渐减弱或躁动,平均 5 min 左右出现窒息死亡。故我们将通注尾气时间保守地设定为 4 min,此时染毒装置内的氧气含量为(17.33 ± 0.09)%。4 min 后关闭发动机,关闭 5 min、10 min 和 15 min 后,染毒装置内对应的氧气含量分别为(19.80 ± 0.17)%、(20.20 ± 0.06)% 和(20.53 ± 0.03)%,见图 1c。15 min后氧气含量与大气中的含量相近,但装置内尾气的含量仍然较高;20 min 后装置内尾气的气味较弱。因此,设定每次通气的时间间隔为 20 min。



a:汽车尾气染毒装置设计图;b:染毒装置实物图;c:不同时间段尾气染毒装置内氧含量

图 1 汽车尾气染毒装置及染毒动物模型的构建

2.2 汽车尾气暴露对生殖系统的影响

尾气暴露组小鼠平均体质量和睾丸质量与对照组比较无明显统计学差异($P > 0.05$),但附睾质量较对照组明显下降($P < 0.01$),见表 1。评估 2 组小鼠精液质量时,在运用计算机辅助静液分析技术检测小鼠精液质量的过程中,其中 4 个样品(每组各 2 只小鼠)由于所使用的培养基受到污染导致精子大量死亡,无法满足实验需求而排除。结果发现对照组小鼠精子数目、总活动力和前向活动力均明显高于尾气暴露组($P < 0.01$),而精子畸形率低于尾气暴露组($P < 0.01$),见表 2。

表 1 小鼠体质量及生殖腺质量变化($n = 12$,g)

组别	体质量	睾丸质量	附睾质量
对照组	27.441 ± 0.370	0.205 ± 0.005	0.071 ± 0.002
尾气暴露组	26.582 ± 0.331	0.211 ± 0.004	0.065 ± 0.001
P	0.100	0.328	0.003

表 2 2 组小鼠精液质量对比($n = 10$)

组别	精子计数(10^6/mL)	精子畸形率(%)	总活动率(%)	前向活动力(%)
对照组	83.208 ± 3.962	4.920 ± 0.289	65.972 ± 3.181	20.928 ± 1.367
尾气暴露组	66.344 ± 4.222	12.680 ± 0.525	53.981 ± 1.475	14.549 ± 1.293
P	0.009	0.003	0.001	0.003

2.3 小鼠血和睾丸组织中 ROS 的变化

实验中由于每组各 2 只小鼠的血液无法满足 ROS 检测而被排除。因此本组结果中各组都只有 10 个样品。尾气暴露组小鼠血 ROS 为(952.692 ± 7.35)U/mL,睾丸组织中的 ROS 为(48.948 ± 1.294)U/mgogrot,均明显高于对照组小鼠的(335.498 ± 5.509)U/mL 和(20.746 ± 0.649)U/mgogrot,2 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),表明汽车尾气暴露可能增加血液和生殖系统活性氧含量。

3 讨论

在各类环境污染中,汽车尾气引发的大气污染及其对人类健康的危害,逐渐被全世界视为研究的重点。汽车尾气成分复杂,含多种化学物质,其主要分为有害气体和颗粒物[7]。较长时间暴露于尾气环境中,可造成机体多个系统损伤,主要表现在呼吸系统[8-9]、内分泌系统[10]、心脑血管系统[11]以及生殖系统等损伤[12]。而我们课题组则密切关注着汽车尾气对生殖方面的不利影响。

构建可靠的汽车尾气染毒装置是开展该方向研究的前提条件。目前国内外已报道了多种汽车尾气染毒模型的构建方法,常见的染毒模型主要包括腹腔注射或咽后壁注射机动车尾气颗粒物(认可度较高)[11]、机动车怠速持续释放汽车尾气[13]、大流量气体采样器收集汽车尾气提取物后腹腔注射、自制染毒缸、直接暴露于车流量较大的环境中等方法,建模周期、染毒时间和效果参差不齐。为了解决上述问题,我们设计并构建了一套简单、科学有效的汽车尾气染毒装置,通过对装置内氧气浓度的测定以及小鼠致死时间的监测,实现了在实验小鼠存活的状态下,提高单位时间内小鼠吸收汽车尾气量的目的,成功构建了有效且建模周期短的尾气染毒模型。

以人群为研究对象的研究[14]结果提示,汽车尾气对男性生殖系统的最直接的影响表现在男性精液质量下降(精子密度、精子活力、精子活率等各方面较正常人均有所下降)。通过对雄鼠的研究,我们发现经过本自制汽车尾气染毒装置染毒 40 d 后可以引起雄鼠精液质量下降,该结果与上述报道的现象相似;同时,我们还发现小鼠的附睾也发生一定程度的萎缩。由于精子从精原细胞发育为成熟的精子细胞的环节繁杂、相关调控因素众多,汽车尾气作用于其中的任何一个过程均会影响到最后的精液质量的高低。结合国内外现有报道,汽车尾气损伤雄性生殖健康(尤其是精液质量下降)的初步机制可能与以下几个方面的原因有关:①直接损伤生殖细胞;②影响下丘脑 - 垂体 - 性腺轴(内分泌失调、环境内分泌干扰物);③氧化应激反应引发的过氧化损伤[15];④诱导睾丸中基因表达的改变等。我们在研究中也发现尾气暴露组血液和睾丸内 ROS 的含量上升,同样印证了汽车尾气可能激活机体乃至睾丸组织的氧化应激反应,但具体是通过何种途径引发氧化应激反应仍有待明确。

综上所述,随着全国汽车保有量的持续增加,尾气排放所带来的环境问题(尤其是雾霾)的关注度逐步增加。汽车尾气可能给机体带来的不利影响及机制有待深入研究,尤其是对男性生殖健康的影响方面。本研究构建的汽车尾气的染毒装置和染毒方法,为我们在该方向上进一步深入研究具体的作用靶点创造了条件,从而有益于寻找到新的预防和诊治的切入点。

[参考文献]

[1] Nordkap L, Joensen UN, Blomberg Jensen M, et al. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: Semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures[J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 355(2): 221 - 230.

[2] 王忠尧,唐爱发,蔡志明. 汽车尾气对男性生殖功能的影响[J]. 中华男科学, 2009, 23(4): 66 - 68.

[3] 张丽亚,彭文英. 首都圈雾霾天气成因及对策探讨[J]. 生态经济, 2014, 30(9): 172 - 176.

[4] 李瑞敏,何 群,李 帅. 中国机动车保有量发展趋势分析[J]. 城市交通, 2013, 5(11): 69 - 75.

[5] Calogero AE, La Vignera S, Condorelli RA, et al. Environmental car exhaust pollution damages human sperm chromatin and DNA[J]. J Endocrinol Invest, 2011, 34(6): 139 - 143.

[6] Zhou N, Cui Z, Yang S, et al. Air pollution and decreased semen quality: A comparative study of Chongqing urban and rural areas[J]. Environ Pollut, 2014, 187: 145 - 152.

[7] Zielinska B, Sagebiel J, McDonald JD, et al. Emission rates and comparative chemical composition from selected in-use diesel and gasoline-fueled vehicles[J]. J Air Waste Manag Assoc, 2004, 54(9): 1138 - 1150.

[8] Gamble JF, Nicolich MJ, Boffetta P. Lung cancer and diesel exhaust: an updated critical review of the occupational epidemiology literature[J]. Crit Rev Toxicol, 2012, 42(7): 549 - 598.

[9] 唐思文,刘克剑,徐登峰,等. 汽车尾气暴露小鼠肺损伤毒性机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 483 - 484.

[10] Karthikeyan S, Thomson EM, Kumarathasan P, et al. Nitrogen Dioxide and Ultrafine Particles Dominate the biological effects of inhaled diesel exhaust treated by a catalyzed diesel particulate filter[J]. Toxicol Sci, 2013, 135(2): 437 - 450.

[11] Miller MR, Mclean SG, Duffin R, et al. Diesel exhaust particulate increases the size and complexity of lesions in atherosclerotic mice [J]. Part Fibre Toxicol, 2013, 10(1): 95 - 103.

[12] Lewtas J. Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects[J]. Mutat Res, 2007, 636(1 - 3): 95 - 133.

[13] 王海青,成要平,何玉洁. 妊娠期大鼠汽车尾气暴露对仔鼠生殖毒性及遗传毒性研究[J]. 环境与健康杂志, 2011, 28(2): 122 - 124.

[14] Rengaraj D, Kwon WS, Pang MG. Effects of motor vehicle exhaust on male reproductive function and associated proteins [J]. J Proteome Res, 2015, 14(1): 22 - 37.

[15] Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, et al. Oxidative stress and male reproductive health[J]. Asian J Androl, 2014, 16(1): 31 - 38.

(编辑:周小林)