实验研究
Experiment

香烟烟雾对雄性大鼠睾丸组织代谢酶的毒性研究

买提娜什·那吾塔依[1]，黄小溪[1]，姚艳玲[1]，李林林[1]，张静[1,2]

1. 新疆医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室，新疆 乌鲁木齐 830011
2. 海南医学院公共卫生学院，海南 海口 571199

摘要：

[背景] 香烟烟雾中含有多种致癌物质和诱变剂，可能对男性生殖系统产生不利的影响。烟草可以通过直接影响睾丸及其功能，使生精能力下降以及改变精子功能状态，从而降低男性生育能力。雄性大鼠睾丸组织中碱性磷酸酶（AKP）、γ-谷氨酰转肽酶（γ-GT）、β葡糖醛酸糖苷酶（β-GD）和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G-6-PD）的活力与雄性大鼠生殖健康有关。

[目的] 探讨香烟烟雾对雄性大鼠睾丸组织中AKP、γ-GT、β-GD、G-6-PD活力的影响。

[方法] SPF级成年健康SD雄性大鼠200只，随机分成对照组、低剂量染毒组（10支香烟/d）、中剂量染毒组（20支香烟/d）、高剂量染毒组（30支香烟/d），分别染毒2、4、6、8、12周，共20个亚组，每个亚组10只。实验组采用呼吸道静式染毒，在染毒柜内每天进行一次香烟烟雾暴露染毒，每次30 min，对照组不参与染毒实验外，其余处理与染毒组相同。每个染毒周的最后一天，测定各组大鼠的体重，处死大鼠，取睾丸和附睾观察其形态，测量睾丸和附睾的重量，计算脏器系数，测定睾丸组织中AKP、γ-GT、β-GD、G-6-PD的活力。

[结果] 随着染毒剂量的增加，大鼠体重增长缓慢，高剂量组大鼠体重出现明显的降低，暴露剂量和暴露时间存在交互效应（$P<0.01$）。大鼠睾丸和附睾重量及其脏器系数没有明显的变化，但是暴露剂量和暴露时间存在交互效应（$P<0.01$）。睾丸组织病理学结果显示，随着染毒剂量的增加，曲细精管出现不同程度的病理损伤。中、高剂量组AKP的活力低于同期对照组（$P<0.05$），暴露剂量和暴露时间不存在在交互效应（$P>0.05$）；第4周开始中、高剂量组γ-GT的活力出现降低（$P<0.05$），且暴露剂量和暴露时间存在交互效应（$P<0.01$）；各染毒剂量组β-GD的活力从第6周开始低于同期对照组（$P<0.05$），且暴露剂量和暴露时间存在交互效应（$P<0.01$）；中、高剂量组的G-6-PD活力从第4周开始低于同期对照组（$P<0.05$），且暴露剂量和暴露时间存在交互效应（$P<0.01$）。

[结论] 香烟烟雾可改变AKP、γ-GT、β-GD、G-6-PD的活力，引起睾丸组织损伤。

关键词：香烟烟雾；雄性大鼠；睾丸组织；酶；毒性

Toxicity of cigarette smoke to metabolic enzymes in testicular tissues of male rats

Maitinashi·NAWUTAYI[1], HUANG Xiao-Xi[1], YAO Yan-ling[1], LI Lin-lin[1], ZHANG Jing[1,2] (1.*Department of Toxicology, School of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang* 830011*, China;* 2.*School of Public Health, Hainan Medical University, Haikou, Hainan* 571199*, China*)

Abstract:

[Background] Cigarette smoke contains a variety of carcinogens and mutagens, which may adversely affect male reproductive system. Tobacco can reduce spermatogenesis and alter sperm function by directly affecting the testis and their functions, thereby reducing male fertility. The activities of alkaline phosphatase (AKP), γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT), β-glucuronidase (β-GD), and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) in the testis are closely related to the reproductive health of male rats.

[Objective] The purpose of this *in vivo* experiment is to explore the effects of cigarette smoke on AKP, γ-GT, β-GD, and G-6-PD enzymatic activities in the testis of male rats.

[Methods] Two hundred males SPF SD rats were randomly divided into control group (no cigarette exposure), low dose group (10 cigarettes a day), medium dose group (20 cigarettes a day), and high dose group (30 cigarettes a day), and the administration lasted for 2, 4, 6, 8,

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19343

基金项目
国家自然科学基金（81660547）；新疆维吾尔自治区自然科学基金（2018D01C179）

作者简介
买提娜什·那吾塔依（1991—），女，硕士生；E-mail：1263638420@qq.com

通信作者
张静，E-mail：iris0912@sina.com

伦理审批 已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2019-05-20
录用日期 2019-11-06

文章编号 2095-9982(2019)12-1143-08
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
买提娜什·那吾塔依，黄小溪，姚艳玲，等. 香烟烟雾对雄性大鼠睾丸组织代谢酶的毒性研究[J]. 环境与职业医学，2019，36（12）：1143-1149，1155.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19343

Funding
This study was funded.

Correspondence to
ZHANG Jing, E-mail: iris0912@sina.com

Ethics approval Obtained
Competing interests None declared
Received 2019-05-20
Accepted 2019-11-06

▸To cite
Maitinashi·NAWUTAYI, HUANG Xiao-Xi, YAO Yan-ling, et al. Toxicity of cigarette smoke to metabolic enzymes in testicular tissues of male rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(12): 1143-1149, 1155.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19343

and 12 weeks, respectively. There were a total of 20 subgroups, with 10 rats in each subgroup. The experimental groups were exposed to tobacco smoke by static inhalation in an exposure cabinet once a day, 30 min each time. The control group did not participate in the exposure, and the rest of treatment was the same as the exposure groups. On the last day of each exposure week, the rats were weighed and then sacrificed. The morphology of testis and epididymis was observed, the weights and organ coefficients of testis and epididymis were weighed and calculated, and the activities of AKP, γ-GT, β-GD, and G-6-PD in testicular tissues were measured.

[Results] With the increase of treatment dose, the weight growth of the rats was slower, the body weight of rats in the high dose group was significantly reduced, and there was an interaction effect between exposure dose and exposure time ($P<0.01$). There were no significant changes in rat testis and epididymis weights and organ coefficients, but there was an interaction effect between exposure dose and exposure time ($P<0.01$). The testicular histopathology test results showed that with the increase of exposure dose, seminiferous tubules presented different degrees of pathological damage. The activities of AKP in the medium and high dose groups were lower than that in the control group ($P<0.05$), and there was no interaction effect between exposure dose and exposure time ($P>0.05$). The activities of γ-GT were reduced in the medium and high dose groups since week 4 ($P<0.05$), and there was an interaction effect between exposure dose and exposure time ($P<0.01$). The activities of β-GD of all exposed groups were lower than that of the control group of the same period from week 6 ($P<0.05$), and there was an interaction effect between exposure dose and exposure time ($P<0.01$); the activities of G-6-PD in the medium and high dose groups also presented the same pattern since week 4 ($P<0.05$), and there was the same interaction effect between exposure dose and exposure time ($P<0.01$).

[Conclusion] Cigarette smoke can alter the activities of AKP, γ-GT, β-GD, and G-6-PD, causing testicular tissue damage.

Keywords: cigarette smoke; male rat; testicular tissue; enzyme; toxicity

人们早已认识到吸烟对人体健康的危害，但关于吸烟对生殖系统损害的认识较为缺乏。香烟烟雾中含有4 700多种化合物，其中已鉴定出3 000多种具有致癌、致畸和致突变作用[1]。睾丸组织代谢旺盛，对烟草中的有害物质很敏感。国内外动物实验[2-3]和流行病学调查显示[4-7]，吸烟会影响雄（男）性生殖能力，引起雄（男）性生殖相关指标的变化。大烟量（>20支/d）、长烟龄组的男性精液液化时间延长，精子密度、成活率、活动率、活动度等显著降低[8]，说明吸烟对精子质量的危害随着烟量的增加、吸烟时间的延长而加剧。Lam等[9]对中国香港819名性功能正常男性进行的调查结果显示，与不吸烟者相比，每天吸烟超过20支的男性患性功能障碍的风险显著增大。

有研究表明[10-11]，睾丸组织中的酶在精子发生和精子成熟过程中起着很重要的作用。酶是生物体内新陈代谢的催化剂，是组织、细胞发挥生理机能的关键，因此酶的活性可以作为判定睾丸组织生理活性的依据[12]。碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AKP）参与各级生精细胞营养物质的转运，与睾丸生精细胞的分裂密切相关[13]。AKP是一种与膜组织结合的酶，所以AKP活力降低意味着细胞膜尤其是输精管膜的受损[14]。γ-谷氨酰转肽酶（γ-glutamyl transpeptidase，γ-GT）是睾丸组织支持细胞的特异性标志酶，参与支持细胞的成熟和增殖，γ-GT活力降低意味着支持细胞的损伤和生精过程的抑制[15]。睾丸组织中的β葡糖醛酸糖苷酶（β-glucuronidase，β-GD）主要存在于支持细胞的溶酶体和线粒体内，参与各种葡糖醛酸糖苷键的水解、细胞器的降解和细胞的更新，是支持细胞的标志酶[16]。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（glucose-6-phosphate dehydrogenase，G-6-PD）是氧化旁路的重要酶，存在于生精小管的间质细胞、支持细胞和精细胞内，主要存在于间质细胞内，是间质细胞的标志酶，是反映间质细胞功能的指标。因此，本研究以AKP、γ-GT、β-GD和G-6-PD等4种酶的活力作为判定睾丸组织生理活性的指标。

尼古丁是烟草中主要的有害物质和致命毒素。尼古丁的代谢途径复杂，其中70%在肝脏中通过细胞色素P450酶系代谢为可替宁，尼古丁在血浆中的半衰期较短（1~2 h），而可替宁的半衰期较长（16~19 h）[17]，且可替宁在唾液、血液、尿液中都容易测到，因此可将它作为主动或被动香烟暴露的生物标志物。尼古丁的毒理作用呈剂量-效应关系[18]。在香烟烟雾体内暴露的研究中，研究者运用不同染毒方法和动物模型对香烟的生物学效应进行了研究[19-25]。Haber定律指出评估有毒气体的暴露剂量及生物学效应的关系时，可运用公式：毒性效应（K）=毒性气体浓度（C）×时间（t）。本研究欲通过Haber理论建立敏感的香烟烟雾吸入模型，观察睾丸组织的病理变化，检测吸烟对大鼠睾丸组织中AKP、γ-GT、β-GD和G-6-PD活力的影响，为香烟烟雾对雄性大鼠的生殖毒性及其可能作用机制的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及受试物

由新疆医科大学实验动物中心提供8周龄健康

SPF 级 Sprague-Dawley（SD）雄性大鼠 200 只，体重为（200±20）g/ 只，实验动物许可证编号：SYXK（新）2017-0001。动物实验经新疆医科大学第一附属医院伦理委员会审批（批准号：IACUC-20170706-05）。受试物为新疆卷烟厂生产的红河牌过滤嘴香烟，烟气一氧化碳含量为 12 mg/ 支，焦油含量为 10 mg/ 支，烟碱量为 0.9 mg/ 支。

1.2 主要仪器和试剂

微型离心机（珠海黑马医学仪器有限公司，中国），超声波细胞破碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司，中国），高速冷冻离心机（Thermo，美国），电子天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司，中国），酶标仪（Thermo，美国），显微镜（Olympus，日本），电热恒温干燥箱（北京市永光明医疗仪器厂，中国），石蜡切片机（Leica，德国），二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒（Thermo，中国），总蛋白测定试剂盒（考马斯亮蓝法）、AKP 试剂盒、γ-GT 试剂盒、β-GD 试剂盒（南京建成生物工程研究所，中国），G-6-PD 试剂盒（碧云天生物工程研究所，中国），苏木素染色液（北京中杉金桥生物技术有限公司，中国），伊红染色液（北京世济合力生物科技有限公司，中国）。

1.3 染毒剂量的确定

预试验以本课题组以往研究为基础，分为 10、20、30、40 支 /d 香烟染毒剂量组[26-27]，采用呼吸道静式染毒（具体染毒方法见 1.4），按照精子发生周期（48~55 d）染毒 8 周后，测定血浆尼古丁、可替宁浓度，结果显示不同剂量组大鼠血中尼古丁、可替宁浓度不同（F=12.072，P=0.017；F=18.673，P=0.001），见表 1。染毒剂量根据可替宁浓度确定，分为低、中、高剂量染毒组，即 10、20、30 支 /d 香烟剂量染毒组。

表 1 香烟烟雾染毒大鼠血浆中尼古丁和可替宁浓度
（$\bar{x}\pm s$，n=5，μg/L）

染毒剂量	尼古丁	可替宁
10 支 /d	29.24±3.58	20.84±9.47
20 支 /d	22.20±6.68	47.84±3.87
30 支 /d	10.24±4.83	101.08±57.80
40 支 /d	62.53±11.51	155.13±39.81
对照组	39.08±3.77	3.68±1.48
F	12.072	18.673
P	0.017	0.001

1.4 动物分组与染毒方法[28]

雄性大鼠经过一周适应性喂养后，随机分为 5 个对照组（每组 10 只，共 50 只）和 2、4、6、8、12 周实验组（每组 30 只，共 150 只）。各时间点的实验组染毒剂量为低（10 支香烟 /d）、中（20 支香烟 /d）、高（30 支香烟 /d），每个剂量染毒 10 只大鼠。将高、中、低染毒剂量组的 3 笼动物（5 只 / 笼，共 15 只）依次放置于容积为 80 cm×60 cm×80 cm 的染毒箱内，采用呼吸道静式染毒，一次性点燃 10 支香烟，立即放入染毒箱内盖紧染毒箱的盖子并检查密闭性，当染毒箱处于适宜的密闭状态时，10 支香烟将在 10 min 内燃尽，香烟烟雾逐渐充满整个染毒箱内，使大鼠充分暴露于香烟烟雾中。半小时后，拿出染毒箱里最上面的低剂量组大鼠，防止大鼠窒息，通风半小时后按以上方法一次性再点燃 10 支香烟，处理半小时后取出中剂量组大鼠，通风半小时；依次类推，直至高剂量组大鼠染毒完毕。染毒周期为 2、4、6、8、12 周，连续不间断染毒（1 次 /d）。对照组除不暴露于香烟烟雾外，其他处理与实验组相同。染毒期间，每天观察大鼠的毛色、精神状态、行为活动、饮食等一般情况，称重并记录。

1.5 样本采集及病理学观察

分别在染毒第 2、4、6、8、12 周的最后一天分批处理实验组和同期对照组大鼠（处理大鼠前一天开始禁食禁水）。将雄性大鼠以水合氯醛腹腔注射麻醉后，剪开腹腔，立即腹主动脉采血；取左侧睾丸、附睾，称湿重，迅速放入液氮固定后保存于 -80℃冰箱中备用；将右侧睾丸、附睾，称湿重，放入 4% 多聚甲醛中固定，梯度乙醇脱水、浸蜡、包埋、修片、切片、捞片、烤片，进行 HE 染色，光学显微镜下观察大鼠睾丸组织结构的病理情况。

1.6 称量睾丸和附睾的重量并计算脏器系数

处死大鼠后，立即取出双侧睾丸及附睾，在冰冷的生理盐水中漂洗，除去血液，剥离脂肪组织，用滤纸拭干，准确称量睾丸和附睾的重量，计算睾丸及附睾的脏器系数。脏器系数 =［脏器重量（g）/ 动物体重（g）］×100%。

1.7 大鼠睾丸组织匀浆中 AKP、γ-GT、β-GD 和 G-6-PD 活力的测定

称取部分睾丸组织，按重量（g）：体积（mL）=1：9 的比例加入生理盐水，机械匀浆，低温离心机 4℃、离心 20 min（离心半径为 113.64 cm），10 000 r/min，所得上清液即为 10% 质量浓度的睾丸组织匀浆。用考马斯亮蓝法测定每个样品的蛋白浓度。取大鼠睾丸组织匀浆上清液，按照试剂盒说明书给定步骤测定 AKP、γ-GT、β-GD 和 G-6-PD 的活力。

1.8 统计学分析

利用SPSS 21.0软件进行分析，所有数据均为计量资料，实验数据符合正态分布，实验结果用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。采用单因素方差分析（one-way ANOVA）进行组间比较，组间两两比较采用LSD检验（最小显著差异法）。运用析因设计的方差分析验证暴露时间和暴露剂量间是否存在交互作用，检验水准α=0.05，双侧检验。

2 结果

2.1 一般情况观察

对照组大鼠反应灵敏、动作活泼、活动正常、精神状态良好、毛色光润、饮水、排泄均正常，无明显异常表现。香烟烟雾染毒期间，实验组大鼠毛发均黄涩、失去光泽、毛发蓬松、神情稍倦怠、精神萎靡、活动迟缓、烦躁不安、自主活动及摄食饮水量减少，且随着染毒时间和染毒剂量的增加而更加明显。

2.2 香烟烟雾对各组大鼠体重的影响

对照组大鼠体重随时间的增加而增长，实验组大鼠的体重随染毒时间和染毒剂量的增加而缓慢增长，有的甚至出现负增长。由表2可见，随着染毒剂量的增加，与同期对照组相比，第2、6周的大鼠体重在高剂量组出现降低，第4、8、12周的大鼠体重在中、高剂量组出现降低，差异均有统计学意义（P<0.05）。析因设计的方差分析结果显示，$F_{暴露剂量}$=53.27，$F_{暴露时间}$=172.05，$F_{交互作用}$=5.41，P<0.01。

表2 香烟烟雾对各组大鼠体重的影响（g，$\bar{x}\pm s$，n=10）

时间	对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
第2周	348.95±44.13	329.15±26.23	319.84±14.43	253.09±25.68*
第4周	396.05±47.03	389.67±21.58	329.94±49.66*	347.08±19.92*
第6周	439.90±46.91	411.35±40.57	413.95±52.06	352.59±47.77*
第8周	458.86±49.79	414.40±34.78	389.24±26.72*	338.36±52.31*
第12周	518.08±59.25	488.36±21.97	449.39±17.87*	382.81±76.19*

[注] 与对照组比较，*：P<0.05。

2.3 香烟烟雾对大鼠睾丸和附睾的脏器系数的影响

由表3可见，随着染毒剂量的增加，与同期对照组比较，睾丸系数在第12周中、高剂量组降低，差异均有统计学意义（P<0.05）。随着染毒时间的延长，与第2周比较，对照组在第4周开始睾丸系数降低，低剂量组睾丸系数在第6、12周降低，中剂量组睾丸系数在第6、8、12周降低，高剂量组睾丸系数从第4周开始降低，差异均有统计学意义（均P<0.05）。析因设计的方差分析结果显示，$F_{暴露剂量}$=3.81，P=0.01；$F_{暴露时间}$=25.68，P<0.01；$F_{交互作用}$=2.74，P<0.01，提示随着暴露剂量的增加和暴露时间的延长，大鼠睾丸系数有下降趋势。

随着染毒剂量的增加，与同期对照组比较，附睾系数在第2周的低、中剂量组降低，第4、8周的中剂量组升高，差异均有统计学意义（P<0.05）。随着染毒时间的延长，与第2周比较，对照组附睾系数在第4、8、12周降低，低、中剂量组的附睾系数在第4、8周升高，差异均有统计学意义（P<0.05）。析因设计的方差分析结果显示，$F_{暴露剂量}$=1.11，P=0.35；$F_{暴露时间}$=3.23，P=0.01；$F_{交互作用}$=3.37，P<0.01。随着暴露时间的延长，大鼠附睾系数有下降趋势，暴露剂量对大鼠附睾系数没有影响。

表3 香烟烟雾对大鼠睾丸和附睾的脏器系数的影响（%，$\bar{x}\pm s$，n=10）

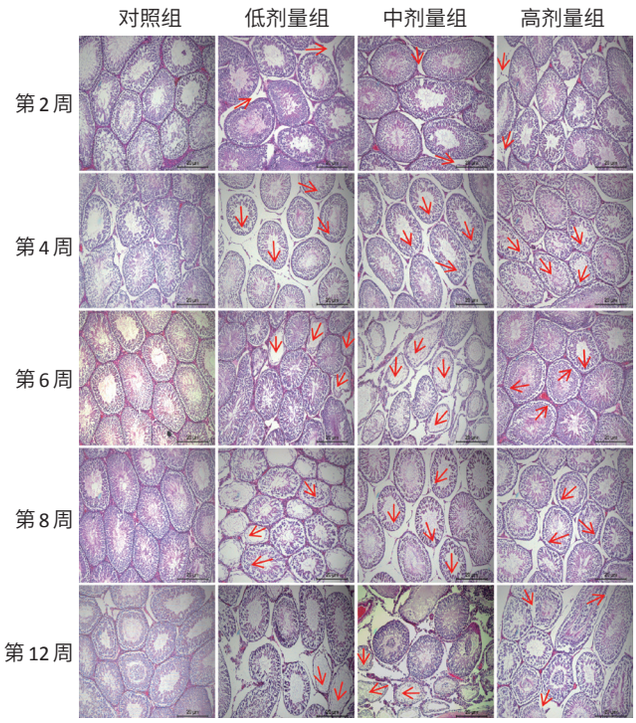
指标	组别	第2周	第4周	第6周	第8周	第12周
睾丸系数	对照组	0.98±0.10	0.83±0.10A	0.77±0.08A	0.72±0.08A	0.64±0.16A
	低剂量组	0.86±0.15	0.82±0.08	0.68±0.21A	0.77±0.18	0.55±0.24A
	中剂量组	1.03±0.16	0.99±0.24	0.74±0.21A	0.85±0.14A	0.44±0.16*A
	高剂量组	1.13±0.12	0.87±0.13A	0.73±0.24A	0.73±0.38A	0.83±0.23*A
附睾系数	对照组	0.36±0.06	0.28±0.04A	0.31±0.05	0.27±0.07A	0.28±0.07A
	低剂量组	0.26±0.08*	0.32±0.04A	0.28±0.06	0.32±0.05A	0.26±0.06
	中剂量组	0.25±0.06*	0.38±0.09*A	0.29±0.08	0.34±0.04*A	0.23±0.05
	高剂量组	0.31±0.03	0.31±0.03	0.30±0.06	0.31±0.07	0.32±0.08

[注] 与对照组比较，*：P<0.05；与第2周比较，A：P<0.05。

2.4 大鼠睾丸组织病理变化

图1可见，对照组大鼠睾丸组织曲细精管间质组织结构正常，上皮细胞紧密，曲细精管形态规则、结构完整，曲细精管基膜完整，管腔中央可见精子，各级生精细胞形态清晰，由内而外紧密排列，且支持细胞和间质细胞结构正常。染毒第2周开始大鼠睾丸组织曲细精管间隙较同期对照组增大，间质细胞数量较同期对照组减少。第4周低、中、高剂量组大鼠睾丸组织生精细胞排列紊乱、疏松，生精细胞间隙增大，生精细胞层数减少，但管腔内仍可见大量的生精细胞。第6周低、中剂量组大鼠睾丸组织生精细胞脱落，数量较同期对照组明显减少，有些管腔内甚至看不到生精细胞和精子；高剂量组大鼠睾丸组织界膜剥脱。第8周低、中、高剂量组大鼠睾丸组织曲细精管内结构紊乱，生精上皮固有膜及基膜破坏明显，仅见少量的支持细胞和少量的精子。第12周低、中、高剂量组

大鼠睾丸组织与同期对照组比较，基膜未见支持细胞，管腔内未见游离的精子，甚至各级生精细胞消失，曲细精管结构破坏。



[注] 第 2 周的箭头所指为曲细精管间隙；第 4 周的箭头所指为生精细胞排列紊乱、疏松；第 6 周箭头所指为剥脱的组织界膜；第 8 周箭头所指为生精上皮固有膜及基膜破坏；第 12 周箭头所指为曲细精管结构破坏。

图 1 睾丸组织 HE 染色（×100）

2.5 香烟烟雾对雄性大鼠睾丸组织中 AKP、γ-GT、β-GD 和 G-6-PD 活力的影响

2.5.1 香烟烟雾对雄性大鼠睾丸组织中 AKP 活力的影响

由表 4 可见，随着染毒剂量的增加，与同期对照组相比，第 2、4、6 周 AKP 活力在中、高剂量组出现降低，第 8、12 周 AKP 活力在低、中、高剂量组降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。析因设计的方差分析结果显示，$F_{暴露剂量}=58.40$，$P<0.01$；$F_{暴露时间}=0.87$，$P=0.50$；$F_{交互作用}=0.86$，$P=0.60$。随着暴露剂量的增加，AKP 的活力下降，而暴露时间对 AKP 的活力没有影响。

表 4 香烟烟雾对大鼠睾丸组织中 AKP 活力的影响
（$\times10^3$ U/g，以蛋白计；$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 12 周
对照组	1.95±0.19	2.20±0.20	2.22±0.19	2.23±0.31	2.31±0.07
低剂量组	1.93±0.02	1.72±0.08	1.64±0.32	1.50±0.24*	1.50±0.38*
中剂量组	1.40±0.11*	1.26±0.31*	1.25±0.20*	1.16±0.12*	1.17±0.29*
高剂量组	1.10±0.28*	1.17±0.22*	0.89±0.13*	0.87±0.05*	0.85±0.21*

[注] 与对照组比较，*：$P<0.05$。

2.5.2 香烟烟雾对雄性大鼠睾丸组织中 γ-GT 活力的影响

由表 5 可见，随着染毒剂量的增加，与同期对照组比较，第 4、8、12 周各染毒组 γ-GT 活力降低，第 6 周的 γ-GT 活力在中、高剂量组出现降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。随着染毒时间的延长，与第 2 周相比，对照组 γ-GT 活力在第 8、12 周升高，低剂量组 γ-GT 活力在第 4 周出现降低，中、高剂量组的 γ-GT 活力第 4、6、12 周降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。析因设计的方差分析结果显示，$F_{暴露剂量}=69.18$，$F_{暴露时间}=19.56$，$F_{交互作用}=7.94$，均 $P<0.01$。随着暴露剂量的增加和暴露时间的延长，γ-GT 的活力下降。

表 5 香烟烟雾对大鼠睾丸组织中 γ-GT 活力的影响
（U/g，以蛋白计；$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 12 周
对照组	1.65±0.06	1.73±0.06	1.79±0.20	2.62±0.04A	2.60±0.00A
低剂量组	2.15±0.45	1.34±0.10*A	1.67±0.02	1.65±0.08*	1.90±0.21*
中剂量组	1.85±0.35	0.76±0.08*A	1.09±0.15*A	1.64±0.27*	0.86±0.07*A
高剂量组	1.47±0.00	0.88±0.17*A	0.98±0.04*A	1.28±0.02*	1.00±0.05*A

[注] 与对照组比较，*：$P<0.05$；与第 2 周比较，A：$P<0.05$。

2.5.3 香烟烟雾对雄性大鼠睾丸组织中 β-GD 活力的影响

由表 6 可见，随着染毒剂量的增加，与同期对照组比较，第 6、8、12 周各染毒组 β-GD 的活力明显降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。随着染毒时间的延长，与第 2 周比较，低剂量组的 β-GD 活力在第 12 周降低，中剂量组在第 6 周开始降低，高剂量组在第 8 周开始降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。析因设计的方差分析结果显示，$F_{暴露剂量}=59.44$，$F_{暴露时间}=6.75$，$F_{交互作用}=3.50$，均 $P<0.01$。随着暴露剂量的增加和暴露时间的延长，β-GD 的活力下降。

表 6 香烟烟雾对大鼠睾丸组织中 β-GD 活力的影响
（U/g，以蛋白计；$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 12 周
对照组	1.53±0.02	1.60±0.26	1.65±0.19	1.72±0.11	1.89±0.14
低剂量组	1.39±0.19	1.37±0.06	1.28±0.08*	1.19±0.11*	1.03±0.06*A
中剂量组	1.40±0.26	1.30±0.22	0.92±0.06*A	0.79±0.05*A	0.71±0.02*A
高剂量组	1.12±0.04	1.06±0.18	0.81±0.10*	0.74±0.07*A	0.65±0.20*A

[注] 与对照组比较，*：$P<0.05$；与第 2 周比较，A：$P<0.05$。

2.5.4 香烟烟雾对雄性大鼠睾丸组织中 G-6-PD 活力的影响

由表 7 可见，随着暴露剂量的增加，与同期对照组比较，第 6、12 周各染毒组的 G-6-PD 活力下降，中、高剂量组 G-6-PD 活力在第 4、8 周出现下降，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。随着暴露时间的延长，与第 2 周比较，对照组 G-6-PD 活力在第 12 周升高，低剂量组

G-6-PD 活力在第 12 周降低，中、高剂量组 G-6-PD 活力从第 6 周开始下降，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。析因设计的方差分析结果显示，$F_{暴露剂量}=263.26$，$F_{暴露时间}=37.06$，$F_{交互作用}=20.63$，均 $P<0.01$。随着暴露剂量的增加和暴露时间的延长，G-6-PD 的活力下降。

表 7 香烟烟雾对大鼠睾丸组织中 G-6-PD 活力的影响
（U/L，$\bar{x}\pm s$，n=10）

组别	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 12 周
对照组	41.88±2.25	42.65±1.48	44.52±1.07	41.54±1.56	49.11±0.82^{A}
低剂量组	41.85±2.85	41.72±0.03	39.60±0.23*	39.64±1.03	37.99±0.22^{*A}
中剂量组	37.61±1.98	36.35±0.01*	33.81±0.13^{*A}	31.08±0.06^{*A}	21.72±0.01^{*A}
高剂量组	36.20±0.08	32.84±0.01*	28.93±1.74^{*A}	25.02±3.25^{*A}	19.61±0.04^{*A}

[注] 与对照组比较，*：$P<0.05$；与第 2 周比较，A：$P<0.05$。

3 讨论

体重的变化可反映实验动物的生长发育状况和中毒效应。本研究发现，染毒第 2 周起各组间体重差异有统计学意义。与同期对照组相比，高剂量组大鼠体重减少有统计学意义。第 8 周中、高剂量组大鼠体重有不同程度的下降，推测其可能原因是香烟烟雾中的尼古丁在人类和动物中具有厌食和减轻体重的作用[29-30]。本研究中香烟烟雾对雄性大鼠产生毒性效应，抑制大鼠体重的增长，且暴露剂量和暴露时间对大鼠体重有影响，暴露剂量和暴露时间存在交互效应。

本研究中大鼠睾丸组织 HE 染色结果显示，随着染毒时间的延长和染毒剂量的增加，实验组大鼠睾丸组织结构出现不同程度的损伤，损伤程度越来越严重，提示香烟烟雾暴露导致睾丸组织损伤，从而影响睾丸的正常生精功能及精子的数量和质量。张英彪[31]研究苯与甲醛对小鼠睾丸组织影响时发现，毒物的剂量越高，实验小鼠睾丸组织病理改变越明显，与本研究结果一致。

徐宏伟等[32]研究发现，AKP 在精原细胞和早期发育时期的初级精母细胞内活性较强。本研究中，随着染毒剂量的增加，实验组大鼠 AKP 的活力在中、高剂量组较同期对照组明显下降，这可能与实验组大鼠香烟烟雾暴露后，睾丸组织中各级生精细胞排列紊乱和数量减少有关。暴露剂量对 AKP 的活力有影响，暴露时间对 AKP 的活力没有影响，暴露时间和暴露剂量不存在交互效应。

γ-GT 是临床上检测睾丸组织功能的标志酶之一，具有促进精子成熟的功能[33]，还具有为发育中的精子提供营养和保护、调节生精细胞周期的作用[34]，其活力改变与支持细胞的功能有关[35]。本研究发现，随着染毒剂量的增加，实验组大鼠 γ-GT 的活力在第 4 周低剂量组开始较同期对照组明显下降，可能原因是实验组大鼠香烟烟雾暴露后睾丸组织支持细胞受损和数量减少有关。第 2 周 γ-GT 活力先升高后下降，这可能是机体应激反应的结果。随着染毒时间的延长，中、高剂量组大鼠 γ-GT 的活力在第 4、6、12 周明显低于第 2 周，且 γ-GT 活力先降低后升高，在第 8 周到达峰值，这与精子发生周期一致。暴露时间和暴露剂量对 γ-GT 的活力有影响，暴露时间和暴露剂量存在交互效应。汤艳[36]等研究发现，十溴联苯醚亚慢性染毒后，雄性大鼠睾丸组织中 γ-GT 的活力下降，与本研究结果一致。

β-GD 是支持细胞的标志酶。本研究中，随着染毒剂量的增加，实验组大鼠 β-GD 活力在第 6 周低剂量组开始明显下降，可能原因是香烟烟雾暴露后大鼠睾丸组织中支持细胞数量减少有关，β-GD 活力下降影响睾丸组织的能量代谢，进而抑制生殖功能。随着染毒时间的延长，中剂量组 β-GD 的活力在第 6、8、12 周较第 2 周下降。暴露时间和暴露剂量对 β-GD 的活力有影响，且暴露时间和暴露剂量存在交互效应。

G-6-PD 是磷酸戊糖旁路的限速酶，G-6-PD 活力下降，说明还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸供应不足，从而影响睾丸内分泌功能。本研究结果显示，染毒 4 周后，G-6-PD 的活力随着染毒剂量的增加而下降。中、高剂量组 G-6-PD 的活力第 6 周开始明显低于第 2 周，并且随着染毒时间的增加，降低更加明显。原因可能是随着染毒时间和染毒剂量的增加，间质细胞受到损伤、数量减少，使其能量代谢活动受到抑制，从而降低 G-6-PD 的活力。暴露时间和暴露剂量对 G-6-PD 的活力有影响，且暴露时间和暴露剂量存在交互效应。金明华等[37]研究结果表明，氯化甲基汞可能影响睾丸酶的活性，使睾丸中 G-6-PD 活力随着染毒剂量的增加而下降。叶琳等[38]和谢颖等[39]研究发现，甲醛使睾丸中 G-6-PD 的活力随着染毒剂量的增加而下降，与本研究结果是一致的。

综上所述，在本实验的暴露时间和暴露剂量范围内，香烟烟雾暴露可引起睾丸组织病理损伤，使睾丸有关酶的活力发生改变，这可能是香烟烟雾造成雄性生殖系统损伤的机制之一。本研究中的染毒方式、时间和剂量是否会对大鼠其他系统造成影响，则还需要进一步探究。

参考文献

[1] JAROW J P. Male infertility [J]. J Urol，2003，170 (2)：675-676.

[2] AHMADNIA H，GHANBARI M，MORADI M R，et al. Effect of cigarette Smoke on spermatogenesis in rats [J]. Urol J，2007，4 (3)：159-163.

[3] 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.

[4] KOSKIMIES A I，SAVANDER M，ANN-MARIE N，et al. Sperm DNA damage and male infertility [J]. Duodecim，2010，126 (24)：2837-2842.

[5] HAMMADEH M E，HAMAD M F，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.

[6] COELHO C，JÚLIO C，SILVA G，et al. Tobacco and male infertility：a retrospective study in infertile couples [J]. Acta Med Port，2009，22 (6)：753-758.

[7] GAUR D S，TALEKAR M S，PATHAK V P，et al. 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] 吴晓玲，白金祥，赵豫凤，等. 吸烟对男性精液质量影响的探讨 [J]. 延安大学学报 (医学科学版)，2015，13 (2)：1-3.

[9] LAM T H，ABDULLAH A S，HO L M. et al. Smoking and sexual dysfunction in Chinese males：findings from men's health survey [J]. Int J Impot Res，2006，18 (4)：364-369.

[10] 江泉观，于永强. 雄 (男) 性生殖毒理学：理论与方法 [M]. 北京：北京医科大学，中国协和医科大学联合出版社，1994：225.

[11] 王一飞，孙广芳，吴恒宝. 人类睾丸及附睾的组织化学观察 [J]. 细胞生物学杂志，1983，5 (4)：7-10.

[12] 李玲，樊学敏，刘桂珠. DBP 对雄性小鼠睾丸标志酶活性的影响 [J]. 宁夏医学杂志，2010，32 (1)：3-5.

[13] 王心如. 毒理学基础 [M]. 4 版. 北京：人民卫生出版社，2003：238-240.

[14] CARREL M，ESCAMILLA V，MESSINA J，et al. Diarrheal disease risk in rural Bangladesh decreases as tubewell density increases：a zero-inflated and geographically weighted analysis [J]. Int J Health Geogr，2011，10：41.

[15] 田晓梅，李玲，宋琦如，等. 邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二 (2- 乙基己基) 酯联合染毒对雄性大鼠生殖毒性的影响 [J]. 环境与健康杂志，2010，27 (4)：290-292.

[16] 段志文，李海山，张玉敏. 丙烯腈对小鼠睾丸组织标志酶活性影响的研究 [J]. 中国工业医学杂志，2001，14 (1)：17-19.

[17] MILLER E I，NORRIS H R，ROLLINS D E，et al. A novel validated procedure for the determination of nicotine，eight nicotine metabolites and two minor tobacco alkaloids in human plasma or urine by solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2010，878 (9/10)：725-737.

[18] SOFIKITIS N，TAKENAKA M，KANAKAS N，et al. Effects of cotinine on sperm motility，membrane function，and fertilizing capacity *in vitro* [J]. Urol Res，2000，28 (6)：370-375.

[19] MAUDERLY J L，GIGLIOTTI A P，BARR E B，et al. Chronic inhalation exposure to mainstream cigarette smoke increases lung and nasal tumor incidence in rats [J]. Toxicol Sci，2004，81 (2)：280-292.

[20] COGGINS C R. An updated review of inhalation studies with cigarette smoke in laboratory animals [J]. Int J Toxicol，2007，26 (4)：331-338.

[21] GEBEL S，GERSTMAYER B，KUHL P，et al. The kinetics of transcriptomic changes induced by cigarette smoke in rat lungs reveals a specific program of defense，inflammation，and circadian clock gene expression [J]. Toxicol Sci，2006，93 (2)：422-431.

[22] HAMM J T，YEE S，RAJENDRAN N，et al. Histological alterations in male A/J mice following nose-only exposure to tobacco smoke [J]. Inhal toxicol，2007，19 (5)：405-418.

[23] BOLTON S J，PINNION K，OREFFO V，et al. Characterisation of the proximal airway squamous metaplasia induced by chronic tobacco smoke exposure in spontaneously hypertensive rats [J]. Respir Res，2009，10：118.

[24] TSUJI H，LEE K M，YOSHINO K，et al. Comparison of the physiological and morphological effects of cigarette smoke exposure at comparable weekly doses on Sprague-Dawley rats [J]. Inhal Toxicol，2011，23 (1)：17-32.

[25] DE FLORA S，BALANSKY R M，D'AGOSTINI F，et al. Molecular alterations and lung tumors in *p53* mutant mice exposed to

(下转第 1155 页)

(8)：16-19.

[23] CAMINS A，VERDAGUER E，FOLCH J，et al. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration [J]. Drug News Perspect，2006，19 (8)：453.

[24] MIAO Y，DONG LD，CHEN J，et al. Involvement of calpain/p35-p25/Cdk5/NMDAR signaling pathway in glutamate-induced neurotoxicity in cultured rat retinal neurons [J]. PLoS One，2012，7 (8)：e42318.

[25] TIAN F，XU LH，WANG B，et al. The neuroprotective mechanism of puerarin in the treatment of acute spinal ischemia-reperfusion injury is linked to cyclin-dependent kinase 5 [J]. Neurosci Lett，2015，584：50-55.

[26] ZHANG H，CHANG L，ZHANG H，et al. Calpain-2/p35-p25/Cdk5 pathway is involved in the neuronal apoptosis induced by polybrominated diphenyl ether-153 [J]. Toxicol Lett，2017，277：41-53.

[27] SUZUKI K，HATA S，KAWABATA Y，et al. Structure，activation，and biology of calpain [J]. Diabetes，2004，53 (S1)：S12-S18.

[28] BAUDRY M，BI X. Calpain-1 and Calpain-2：the yin and yang of synaptic plasticity and neurodegeneration [J]. Trends Neurosci，2016，39 (4)：235-245.

[29] MINCHEVA-TASHEVA S，SOLER RM. NF-κB signaling pathways：role in nervous system physiology and pathology [J]. Neuroscientist，2013，19 (2)：175-194.

[30] SHARMA SK，CARLSON EC，EBADI M. Neuroprotective actions of Selegiline in inhibiting 1-methyl，4-phenyl，pyridinium ion（MPP+）-induced apoptosis in SK-N-SH neurons [J]. J Neurocytol，2003，32 (4)：329-343.

（**英文编辑**：汪源；**编辑**：陈姣；**校对**：韩凤婵）

（上接第 1149 页）

cigarette smoke [J]. Cancer Res，2003，63 (4)：793-800.

[26] 张静，邓晟，仲春雪，等. 香烟烟雾染毒对雄性大鼠睾丸组织一氧化氮水平的影响 [J]. 重庆医学，2017，46 (14)：1885-1888.

[27] 仲春雪，何丽娟，张静，等. 香烟烟雾暴露对大鼠睾丸超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活力及丙二醛含量的影响 [J]. 环境与健康杂志，2017，34 (11)：982-984.

[28] 李林林，张静，黄云飞，等. 香烟烟雾对雄性大鼠血清及睾丸组织中一氧化氮（NO）含量和一氧化氮合酶（iNOS）活性的影响 [J]. 医学动物防制，2019，35 (6)：562-566.

[29] FILOZOF C，FERNÁNDEZ PINILLA MC，FERNÁNDEZ-CRUZ A. Smoking cessation and weight gain [J]. Obes Rev，2004，5 (2)：95-103.

[30] MINEUR YS，ABIZAID A，RAO Y，et al. Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons [J]. Science，2011，332 (6035)：1330-1332.

[31] 张英彪. 苯与甲醛对雄性小鼠生殖毒性的研究 [D]. 衡阳：南华大学，2008.

[32] 徐宏伟，马爱国. 维生素A缺乏对大鼠生精能力及睾丸标志酶活性的影响 [J]. 中国公共卫生，2002，18 (11)：1298-1299.

[33] 刘英姿，刘浩然，周源，等. 山茱萸总皂苷对糖尿病大鼠睾丸病变的改善作用 [J]. 中国现代医学杂志，2012，22 (22)：10-13.

[34] 杨麦贵，杨阳，郝晓柯，等. 人精液中一氧化氮和γ-谷氨酰基移换酶活性的关系 [J]. 第四军医大学学报，2004，25 (16)：1516-1518.

[35] 张作涛，谢高宇，陈凯，等. 腺嘌呤致大鼠睾丸损伤中标志酶的变化及淫羊藿总黄酮的干预作用 [J]. 重庆医学，2012，41 (7)：683-685.

[36] 汤艳，汪春梅，何鸿雁，等. 亚慢性十溴联苯醚对成年大鼠睾丸组织一氧化氮和一氧化氮合酶及标志酶的影响 [J]. 环境与健康杂志，2016，33 (2)：109-111.

[37] 金明华，孙志伟，石龙，等. 甲基汞对小鼠睾丸细胞酶活性的影响 [J]. 中国公共卫生，2001，17 (9)：789.

[38] 叶琳，任淑萍，吕毅，等. 甲醛对雄性小鼠睾丸中酶活力的影响 [J]. 环境与健康杂志，2005，22 (1)：21-22.

[39] 谢颖，易义珍，唐明德，等. 甲醛对雄性小鼠生殖细胞的毒性 [J]. 环境与健康杂志，2003，20 (2)：84-85.

（**英文编辑**：汪源；**编辑**：陈姣；**校对**：韩凤婵）