

韩雪, 蒋莉, 张远, 等. CdCl_2 与尼古丁对精原细胞联合作用方式的初步研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 50-58.
Han X, Jiang L, Zhang Y, et al. Preliminary studies on the mode of activity of CdCl_2 in combination with nicotine in spermatogonial cells [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 50-58.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.007

CdCl_2 与尼古丁对精原细胞联合作用方式的初步研究

韩雪^{1,2}, 蒋莉^{1,2}, 张远^{1,2}, 吴德生^{1,2*}, 黄海燕², 刘建军²

(1. 山西医科大学公共卫生学院, 太原 030000; 2. 深圳市疾病预防控制中心深圳市现代毒理学重点实验室, 深圳市卫生毒理学医学重点学科 (2020-2024), 广东 深圳 518055)

【摘要】 目的 探讨 CdCl_2 与尼古丁联合作用对小鼠精原 GC-1 细胞周期和凋亡的影响及其联合作用方式。**方法** 设置 CdCl_2 组、尼古丁组以及联合作用组 24 h (简称联用组) 3 组, 采用 CCK-8 法检测对 GC-1 细胞增殖的抑制, 流式细胞术检测对 GC-1 细胞周期和凋亡的影响。**结果** 随着浓度的升高, CdCl_2 、尼古丁对 GC-1 细胞增殖的抑制作用增强, CdCl_2 、尼古丁对 GC-1 细胞的 24 h IC_{50} 分别为 5.409 和 2814 $\mu\text{mol/L}$ 。 CdCl_2 和尼古丁联用, 在尼古丁浓度为 0.175、0.350、0.700 和 1.400 mmol/L 时, 其对 GC-1 细胞的 IC_{50} 分别为 4.422、4.532、3.309 和 2.532 $\mu\text{mol/L}$, 呈明显的递减过程, 均低于 CdCl_2 单独作用组, CdCl_2 和尼古丁联合作用时具有协同作用。细胞周期结果显示, CdCl_2 浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时联用组 G_2/M 期细胞占比上升 ($P < 0.01$), 与 CdCl_2 组、尼古丁组比较, 联用组增强将细胞阻滞在 G_2/M 期的效应, 对细胞周期的影响具有协同作用, 且 CdCl_2 对于协同作用的影响更强。细胞凋亡结果显示, 与 CdCl_2 组、尼古丁组比较, 联用组细胞凋亡比例显著增加 ($P < 0.01$), 对细胞凋亡的影响具有协同作用, 且 CdCl_2 对于协同作用的影响更强。**结论** CdCl_2 和尼古丁联合时具有协同作用, 对小鼠精原细胞毒性作用增强, 细胞周期发生阻滞, 促进凋亡, 且 CdCl_2 对协同作用的影响更强。

【关键词】 尼古丁; CdCl_2 ; 联合作用; 雄性; 精原细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0050-09

Preliminary studies on the mode of activity of CdCl_2 in combination with nicotine in spermatogonial cells

HAN Xue^{1,2}, JIANG Li^{1,2}, ZHANG Yuan^{1,2}, WU Desheng^{1,2*}, HUANG Haiyan², LIU Jianjun²

(1. College of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China.

2. Shenzhen Key Laboratory of Modern Toxicology, Shenzhen Medical Key Discipline of Health Toxicology (2020-2024), Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055)

【Abstract】 Objective To investigate the combined effect of CdCl_2 and nicotine on the cell cycle and apoptosis of mouse spermatogonium (GC-1). **Methods** A CCK-8 assay was used to detect the inhibition of GC-1 cell proliferation in the CdCl_2 groups, nicotine groups, and combined groups at 24 hours. Flow cytometry was used to detect the effects of

【基金项目】 深圳市医疗卫生三名工程项目 (SZSM202211010); 深圳市医学重点学科建设经费资助项目 (SZXK069)。

【作者简介】 韩雪 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 卫生毒理学。E-mail: hanxue202122@163.com

【通信作者】 吴德生 (1976—), 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 遗传毒理学和生态毒理学。E-mail: dswucn@126.com

CdCl₂, nicotine, and the combined treatment on the cell cycle and apoptosis of GC-1 cells at 24 hours. **Results** The inhibitory effect on the proliferation of GC-1 cells increased with the rise in CdCl₂ and nicotine concentrations. The IC₅₀ values of CdCl₂ and nicotine alone were 5.409 μmol/L and 2814 μmol/L, respectively. The IC₅₀ values of CdCl₂ and nicotine combined for GC-1 cells were 4.422, 4.532, 3.309, and 2.532 μmol/L at nicotine concentrations of 0.175, 0.350, 0.700, and 1.400 mmol/L, respectively, thus there was an obvious decrease with nicotine concentration. The IC₅₀ values were lower than those of the group administered CdCl₂ alone, and the combined action of CdCl₂ and nicotine had synergistic effects. Cell cycle result showed that CdCl₂ concentration of 2.5 μmol/L increased the percentage of G₂/M phase cells in the combination groups. Cells were arrested in the G₂/M phase in the combined groups ($P<0.01$). When combined, CdCl₂ and nicotine had a synergistic effect on the cell cycle, and the synergistic effect of CdCl₂ was stronger. The result of apoptosis showed the proportion of cells in apoptosis increased in the 2.5 μmol/L CdCl₂ group. Compared with the CdCl₂ and nicotine single-treatment groups, the CdCl₂ and nicotine combined group's percentage of cells in apoptosis increased significantly ($P<0.01$), and CdCl₂ had a stronger synergistic effect. **Conclusions** Combinations of CdCl₂ and nicotine had a synergistic effect on mouse spermatogonium (GC-1) and led to enhanced cytotoxicity, G₂/M cell cycle arrest, and cell apoptosis. CdCl₂ was the main effect factor in the synergistic effect.

【**Keywords**】 nicotine; CdCl₂; combined effect; male; spermatogonium

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

吸烟是人类社会司空见惯同时又充满争议的行为。据统计,2020 年全球吸烟者(包括卷烟吸食者和其他烟草产品使用者)为 13.2 亿人,15 岁及以上人口吸烟率为 22.8%,其中男性为 37.5%、女性为 8.0%^[1]。香烟燃烧后,烟雾中有害物质会造成呼吸、循环、生殖等系统损害^[2]。随着不孕不育人群逐渐增多,吸烟对生殖毒性的研究已成为热点问题之一,越来越受到人们的关注。

香烟烟雾含有 7000 多种化学物质^[3],包括尼古丁、多环芳烃、重金属、亚硝胺、羰基化合物、酚类化合物、杀虫剂、苯及其化合物以及其他可能释放到环境中并通过废弃烟头或吸烟成为污染源的化合物,这些释放物被认为可能对人类健康和环境造成威胁^[4]。香烟的燃烧会在主流烟雾(mainstream smoke, MS),即吸烟期间吸入肺部的烟雾中产生潜在的有毒物质。尼古丁(nicotine)在 MS 中的含量为 1191.07 μg/cig,金属化合物镉(Cd)在 MS 中的含量为 0.35 μg/cig^[5]。尼古丁和 Cd 均是香烟烟雾中的有害成分。关于 Cd 与尼古丁是通过哪种联合作用方式产生对生殖系统的危害,尚无文献报道。本研究以小鼠精原细胞 GC-1 为研究对象,通过 CdCl₂ 与尼古丁联合暴露,观察两者对 GC-1 细胞周期及凋亡的影响,以期提供吸烟对男性生殖系统影响的基础数据。

1 材料和方法

1.1 细胞株

小鼠精原细胞 GC-1 细胞株购自中国科学院昆

明细胞库(批号:220825)。

1.2 主要试剂与仪器

CdCl₂(纯度 99.99%, sigma, 202908); DMSO 二甲基亚砜(sigma, 67-68-5);尼古丁(纯度 ≥95%, 麦克林, N964558); DMEM 高糖培养基(GIBCO, 11965092), FBS 胎牛血清(GIBCO, 10091148);胰蛋白酶(0.25%, GIBCO, 15050065);胰蛋白酶-EDTA (0.25%, GIBCO, 25200056);青霉素-链霉素(thermofisher, 15070063);CCK-8 试剂盒(dojindo, CK04);Annexin V 凋亡检测试剂盒(FITC/PI 双染法, BBI, E606336-0100);细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(碧云天, C1052)。

酶标仪(spark, 瑞士);流式细胞仪(BD C6 Plus, 美国);CO₂ 恒温培养箱(Thermo Scientific, 美国);生物安全柜(Nuaire, 美国);普通光学显微镜(ZEISS, 德国);分析天平(METTLER TOLEDO, 瑞士)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养及传代

小鼠精原细胞 GC-1 培养用 DMEM 高糖培养液,含 10%胎牛血清、1%双抗(5000 U/mL 青霉素和 5000 μg/mL 链霉素),在 37 ℃、饱和湿度、体积分数 5%的 CO₂ 培养箱中常规传代培养,待细胞长至约占瓶底 80%~90%融合度时按 1:2 进行传代。

1.3.2 细胞增殖

取对数生长期的 GC-1 细胞,调整细胞浓度为 4.5×10⁴/mL,以每孔 100 μL 接种于 96 孔板,每组设 6 个复孔,培养箱中培养 24 h。分为 CdCl₂ 组(4、8、12、16、20 μmol/L)、尼古丁组(250、500、750、

1000、1250、1500、1750、2000 $\mu\text{mol/L}$), 每个浓度设置 6 个平行复孔, 并同时设置阴性对照组 (不加药) 和空白对照组, 继续培养 24 h 后, 每孔中加入 10 μL CCK-8 试剂, 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 继续培养 2 h, 酶标仪下测定各孔 450 nm 处光密度值 (OD 值)。按照公式: 细胞活力 = $[(\text{OD}_{\text{实验孔}} - \text{OD}_{\text{对照孔}}) / (\text{OD}_{\text{空白孔}} - \text{OD}_{\text{对照孔}})] \times 100\%$, 计算不同浓度下的细胞活力, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件计算各组毒物的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC_{50}) 值。

1.3.3 染毒浓度及配制

CdCl_2 储备液的配置: 用分析天平精准称量 0.549 96 g CdCl_2 粉末于离心管中, 加入 3 mL 纯水, 轻轻震荡, 充分溶解, 终浓度为 1 mol/L; 尼古丁储备液的配置: 在加入 1 mL 纯水的离心管中加入 157.20 μL 尼古丁原液, 轻轻震荡, 充分溶解, 终浓度为 1 mol/L。实验时用培养基按比例稀释。

1.3.4 联合暴露

取对数生长期的 GC-1 细胞, 调整细胞浓度为 $4.5 \times 10^4/\text{mL}$, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔板, 每个组设 6 复孔, 培养箱中培养 24 h。根据“1.3.2”计算出的 IC_{50} 值确定后续实验浓度, 将 GC-1 细胞分为 CdCl_2 组 (0.3125、0.625、1.25、2.5 $\mu\text{mol/L}$)、尼古丁组 (175、350、700、1400 $\mu\text{mol/L}$)、联用组 (共 16 个组), 联用组中 CdCl_2 和尼古丁按照 1:1 的体积混合, 每个浓度设置 6 个平行复孔, 并同时设置阴性对照组 (不加药) 和空白对照组, 继续培养 24 h, 每孔中加入 10 μL CCK-8 试剂, 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 继续培养 2 h, 酶标仪下测定各孔 450 nm 处光密度值 (OD 值)。按照公式: 细胞抑制率 = $[1 - (\text{OD}_{\text{实验孔}} - \text{OD}_{\text{对照孔}}) / (\text{OD}_{\text{空白孔}} - \text{OD}_{\text{对照孔}})] \times 100\%$, 计算不同浓度下的细胞抑制率, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件计算各组毒物的 IC_{50} 值并绘图。采用 Compusyn 1.0 软件计算 CdCl_2 与尼古丁的联合指数 (combination index, CI), $\text{CI} < 1$ 提示协同效应, $\text{CI} = 1$ 提示加性效应, $\text{CI} > 1$ 提示拮抗作用。

1.3.5 细胞周期

取 GC-1 细胞 $4.5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 6 孔板中, 设置空白对照组、 CdCl_2 组、尼古丁组、联用组, 4 组细胞毒物作用浓度同“1.3.4”, 每组设置 3 个平行对照, 经过 24 h 处理后, 收集全部细胞, 根据细胞周期检测试剂盒说明书, 配制碘化丙啶染色液, 每管细胞样品中加入 0.5 mL 碘化丙啶染色液, 用流式细胞仪进行检测和分析。

1.3.6 细胞凋亡

取 GC-1 细胞 $4.5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 6 孔板中, 设置空白对照组、 CdCl_2 组、尼古丁组、联用组, 4 组细胞药物作用浓度同“1.3.4”, 每组设置 3 个平行对照, 经过 24 h 处理后, 收集全部细胞, 根据 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒说明书, 配制试剂, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据统计分析, 采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图, 计量资料以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用多因素方差分析。统计检验为双侧, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验均进行 3 次有效重复。

2 结果

2.1 细胞活力

CdCl_2 和尼古丁单独暴露时, 对精原细胞 GC-1 增殖的抑制作用均随浓度增加而增强。将 0~20 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 , 0~200 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁作用于 GC-1 细胞 24 h 后, CdCl_2 对 GC-1 细胞的 IC_{50} 为 5.409 $\mu\text{mol/L}$, 尼古丁对 GC-1 细胞的 IC_{50} 为 2814 $\mu\text{mol/L}$ (见图 1A、1B)。根据上述计算出的 IC_{50} 值, 将剂量组设置为空白对照组, 0.3125、0.625、1.25、2.5 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 组, 175、350、700、1400 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁组、联用组, 将 GC-1 细胞处理 24 h 后, 联合作用的结果如表 1 和图 1C 所示, 联用组 IC_{50} 浓度均显著低于 CdCl_2 单独作用浓度, CdCl_2 浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时联用组 IC_{50} 浓度低于尼古丁单独作用浓度, 可见 CdCl_2 在联合作用中的协同作用更为明显。 CdCl_2 、尼古丁、 CdCl_2 和尼古丁联合作用时 IC_{50} 曲线如图 1 所示。根据 GC-1 细胞在不同浓度的 CdCl_2 和尼古丁单独及联合作用下的细胞活力, 用 CompuSyn 8.0 软件分析得到等效线图及联合方案的联合指数 CI。随着 CdCl_2 浓度上升, $\text{CI} < 1$, 出现协同作用, CdCl_2 浓度为 0.625、1.25、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时数据点均在等效线下方, 且 $\text{CI} < 1$, 提示协同作用, 如图 1D 所示。光学显微镜下 GC-1 细胞的形态见图 1E。

2.2 细胞周期

加药处理 24 h 后, 流式细胞术检测空白对照组、 CdCl_2 组、尼古丁组、联合组。细胞周期结果显示, 与空白对照组相比, CdCl_2 浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 和尼古丁浓度为 1.4 mmol/L 时 G_0/G_1 期细胞占比下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 0.3125、

0.625、1.25 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 单独作用时相比,联用组 G_0/G_1 期细胞占比显著下降 ($P < 0.01$); 与 2.5 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 单独作用时相比,联用组的尼古丁浓 度为 0.175、0.7、1.4 mmol/L 时 G_0/G_1 期细胞占比显著下降 ($P < 0.05$)。与 0.175、0.35、0.7、1.4 mmol/L 尼古丁单独作用时相比,联用组 G_0/G_1 期

表 1 CdCl_2 和尼古丁联合作用于 GC-1 细胞 24 h 后的 IC_{50}

Table 1 IC_{50} values of GC-1 cells 24 hours after exposure to CdCl_2 and nicotine		
氯化镉/($\mu\text{mol/L}$) CdCl_2	尼古丁/($\mu\text{mol/L}$) Nicotine	半数抑制浓度 IC_{50}
0.3125、0.625、1.25、2.5	175	4.422
0.3125、0.625、1.25、2.5	350	4.532
0.3125、0.625、1.25、2.5	700	3.309
0.3125、0.625、1.25、2.5	1400	2.532
0.3125	175、350、700、1400	8457
0.625	175、350、700、1400	12460
1.25	175、350、700、1400	3260
2.5	175、350、700、1400	1782

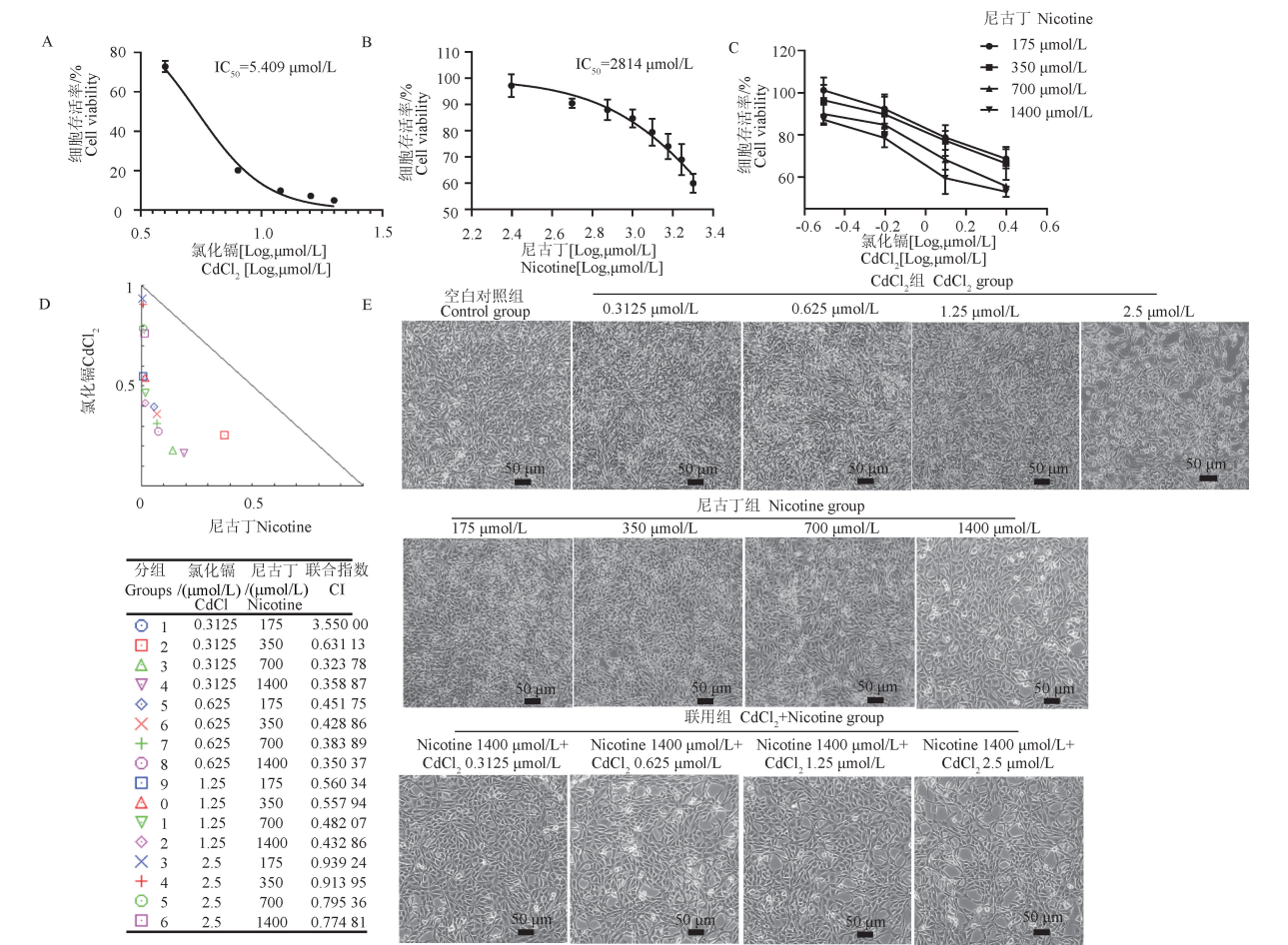


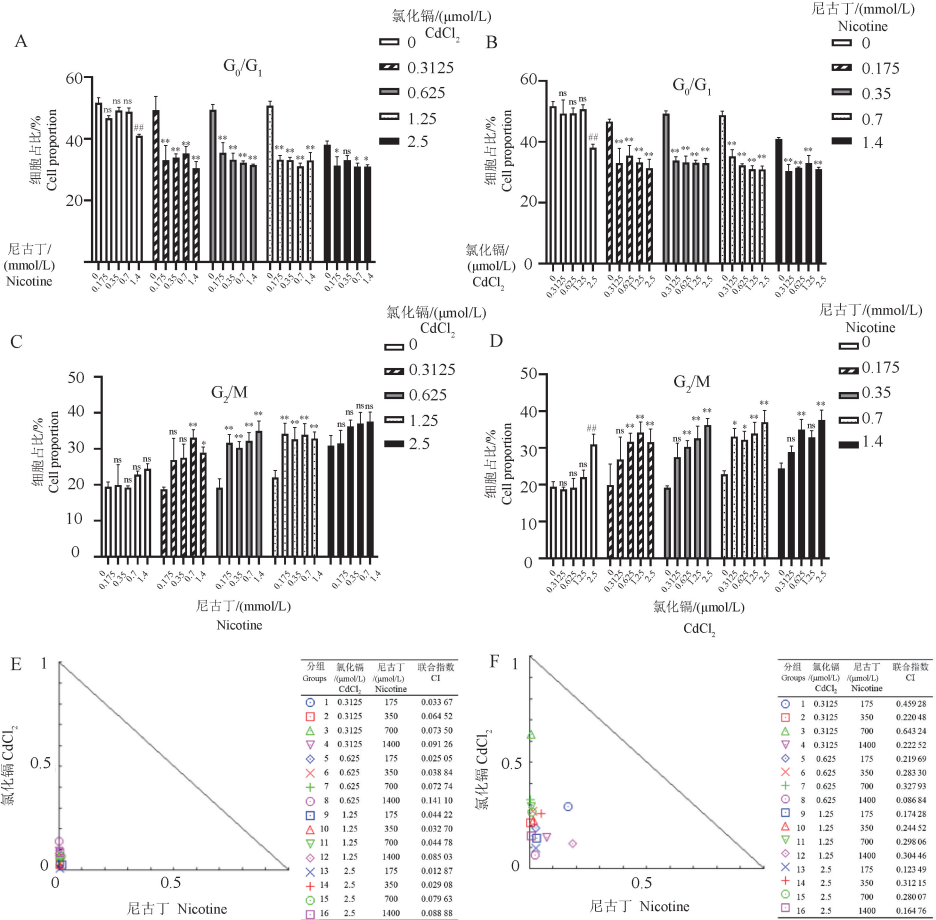
图 1 CdCl_2 和尼古丁对 GC-1 细胞增殖的抑制作用

Note. A, Cell viability after 24 hours of different concentrations of CdCl_2 in GC-1 cells. B, Cell viability after 24 hours of different concentrations of nicotine in GC-1 cells. C, Cell viability after 24 hours of different concentrations of CdCl_2 and nicotine combined in GC-1 cells. D, Compusyn software calculates and plots the CI values for the combination of CdCl_2 and nicotine. E, Morphology of GC-1 cells under a light microscope.

Figure 1 Inhibitory effect of CdCl_2 and nicotine on the proliferation of GC-1 cells

细胞占比均下降,差异有统计学意义($P<0.01$,图2)。可见,CdCl₂和尼古丁协同作用中,CdCl₂对G₀/G₁期细胞占比的影响更为显著。与空白对照组相比,CdCl₂浓度为2.5 μmol/L时G₂/M期细胞占比显著上升($P<0.01$)。与0.3125 μmol/L CdCl₂单独作用时相比,联用组尼古丁浓度为0.7 mmol/L时G₂/M期细胞占比显著上升($P<0.01$),联用组尼古丁浓度为1.4 mmol/L时G₂/M期细胞占比显著上

升($P<0.05$);与0.625、1.25 μmol/L CdCl₂单独作用时相比,联用组G₂/M期细胞占比显著上升($P<0.01$);与2.5 μmol/L CdCl₂单独作用时相比,联用组CdCl₂浓度为0.625、1.25、2.5 μmol/L时G₂/M期细胞占比显著上升($P<0.01$);与0.7 mmol/L尼古丁单独作用时相比,联用组CdCl₂浓度为0.3125、0.625 μmol/L时G₂/M期细胞占比显著上升($P<0.05$),CdCl₂浓度为1.25、2.5 μmol/L时G₂/M期



注:A: CdCl₂ 剂量固定为0、0.3125、0.625、1.25、2.5 μmol/L时,不同尼古丁联合作用时G₀/G₁期占比统计;B:尼古丁剂量固定为0、0.175、0.35、0.7、1.4 mmol/L时,不同CdCl₂联合作用时G₀/G₁期占比统计;C: CdCl₂ 剂量固定为0、0.3125、0.625、1.25、2.5 μmol/L时,不同尼古丁联合作用时G₂/M期占比统计;D:尼古丁浓度固定为0、0.175、0.35、0.7、1.4 mmol/L时,不同CdCl₂联合作用时G₂/M期占比统计;E:根据G₀/G₁期占比数据采用Compusyn软件计算CdCl₂和尼古丁联合作用时的CI值并绘图;F:根据G₂/M期占比数据采用Compusyn软件计算CdCl₂和CdCl₂联合作用时的CI值并绘图。与空白对照组相比,### $P<0.01$;与CdCl₂组和尼古丁组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图2 流式细胞仪检测细胞周期统计

Note. A. Percentage of G₀/G₁ phase cells after exposure to different dose of nicotine combined with 0、0.3125、0.625、1.25 and 2.5 μmol/L CdCl₂. B. Percentage of G₀/G₁ phase cells after exposure to different dose of CdCl₂ combined with 0、0.175、0.35、0.7、1.4 mmol/L nicotine. C. Percentage of G₂/M phase cells after exposure to different dose of nicotine combined with 0、0.3125、0.625、1.25 and 2.5 μmol/L CdCl₂. D. Percentage of G₂/M phase cells after exposure to different dose of CdCl₂ combined with 0、0.175、0.35、0.7、1.4 mmol/L nicotine. E. Compusyn software was used to calculate and plot the CI values for the combination of CdCl₂ and nicotine based on the G₀/G₁ phase data. F. Compusyn software was used to calculate and plot the CI values for the combination of CdCl₂ and nicotine based on the G₂/M phase data. Compared with control group, ### $P<0.01$. Compared with CdCl₂ group and nicotine group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

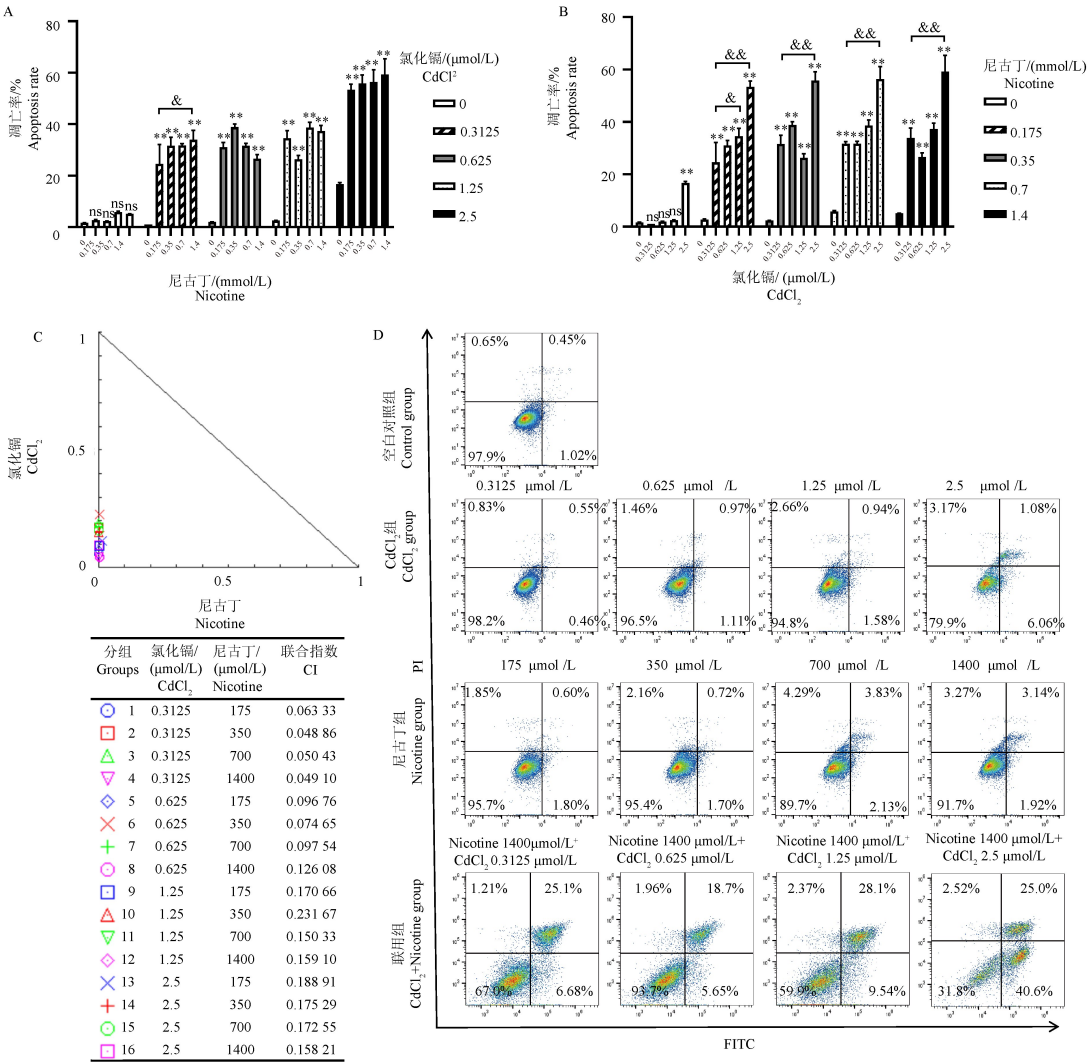
Figure 2 Cell cycle analysis by flow cytometry

细胞占比显著上升($P<0.01$);与 1.4 mmol/L 尼古丁单独作用时相比,联用组 CdCl_2 浓度为 0.625、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时 G_2/M 期细胞占比显著上升($P<0.01$)。可见, CdCl_2 和尼古丁协同作用中, CdCl_2 对 G_2/M 期细胞占比的影响更为显著,表现为 G_2/M 期阻滞。根据 GC-1 细胞在不同浓度的 CdCl_2 和尼古丁单独及联合作用下的细胞周期占比,用 CompuSyn 软件分析得到等效线图及联合方案的联合指数 CI。两

毒物联合效应在 $\text{CI}=1.0$ 时为相加, $\text{CI}<1.0$ 时为协同, $\text{CI}>1.0$ 时为拮抗。联合作用数据点均在等效线下方,且 CI 值均 <1.0 ,提示两药具有协同作用。

2.3 细胞凋亡

如图 3 所示,加药处理 24 h 后,流式细胞术检测空白对照组、 CdCl_2 组、尼古丁组、联用组细胞凋亡结果显示, CdCl_2 浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞凋亡比例显著增加,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与



注:A: CdCl_2 剂量固定为 0、0.3125、0.625、1.25、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,不同 nicotine 联合作用时细胞凋亡统计;B: 尼古丁剂量固定为 0、175、350、700、1400 $\mu\text{mol/L}$ 时,不同 CdCl_2 联合作用时细胞凋亡统计;C: 采用 Compusyn 软件计算 CdCl_2 和 nicotine 联合作用时的 CI 值并绘图;D: 采用 FlowJo 10.8.1 软件绘制细胞凋亡图。与空白对照组相比, $^{###}P<0.01$;与 CdCl_2 组和尼古丁组相比, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与联用组相比, $^{\&}P<0.05$, $^{\&\&}P<0.01$ 。

图 3 流式细胞仪检测细胞凋亡统计图

Note. A, Apoptosis rate after exposure to different dose of nicotine combined with 0, 0.3125, 0.625, 1.25 and 2.5 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 . B, Apoptosis rate after exposure to different dose of CdCl_2 combined with 0, 175, 350, 700, 1400 $\mu\text{mol/L}$ nicotine. C, Compusyn software was used to calculate and plot the CI values for the combined effect of CdCl_2 and nicotine. D, Using FlowJo Software to generate cell apoptosis graphs. Compared with control group, $^{###}P<0.01$. Compared with CdCl_2 group and nicotine group, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$. Compared with combined group, $^{\&}P<0.05$, $^{\&\&}P<0.01$.

Figure 3 Statistical graph of apoptosis detected by flow cytometry

CdCl₂ 单独作用时相比,联用组细胞凋亡比例均显著增加($P<0.01$);CdCl₂ 浓度为 0.3125 $\mu\text{mol/L}$ 时,尼古丁浓度为 0.175、1.4 mmol/L 时细胞凋亡比例显著增加($P<0.05$)。与尼古丁单独作用时相比,联用组细胞凋亡比例均显著增加($P<0.01$);CdCl₂ 和尼古丁联合作用时,CdCl₂ 浓度为 0.625、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,尼古丁浓度为 0.175 mmol/L 时,细胞凋亡比例显著增加($P<0.05$);CdCl₂ 和尼古丁联合作用时,CdCl₂ 浓度为 0.3125、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,尼古丁浓度改变,细胞凋亡比例均显著增加($P<0.01$)。可见,CdCl₂ 和尼古丁协同作用中,CdCl₂ 对细胞凋亡比例增加的影响更为显著。根据 GC-1 细胞在不同浓度的 CdCl₂ 和尼古丁单独及联合作用下的细胞凋亡的变化,用 Compusyn 软件分析得到等效线图及联合方案的联合指数 CI。两毒物联合效应在 CI=1.0 时为相加,CI<1.0 时为协同,CI>1.0 时为拮抗。联合作用数据点均在等效线下方,且 CI 值均<1.0,提示两药具有协同作用。

3 讨论

近年来,由于吸烟人群的占比庞大,不孕不育人群逐渐增多,吸烟对雄性生殖系统的毒性作用也日益受到关注。睾丸作为雄性生殖系统的主要器官,具有分泌雄激素以及产生精子的功能。精子的发生,是处于睾丸曲细精管(生精小管的)中的精原细胞增殖分化形成成熟精子的过程。长期大量吸烟可产生睾丸毒性,使睾丸正常的精子发生过程受到干扰,造成精液质量和精子受精能力下降,而影响男性生育能力^[6];先前的研究表明,随暴露时间的延长,暴露剂量的增加,大鼠血浆尼古丁含量随之增加^[7];Nazar-Zadeh 等^[8]的实验表明,尼古丁可诱导生精上皮细胞变性,还可影响睾丸间质组织,使其密度和细胞数量减少,生精谱系细胞的聚集减少,各种细胞间隙增大;大鼠经香烟烟雾处理后睾丸组织出血、充血、生殖细胞核固缩,引起睾丸组织中相关激素的表达异常,造成睾丸组织结构病变,影响精子生成^[9];香烟烟雾冷凝物(cigarette smoke condensate, CSC)对精母细胞的生长抑制作用,涉及 AHR 和 MAPK 通路的调控^[10]。本研究中,用尼古丁处理 GC-1 细胞时,表现为细胞毒性增强,对于细胞增殖的抑制作用随剂量升高而增强,与先前研究结果相同。金属镉(cadmium, Cd)在人体内代谢缓慢,Uwagie-Ero 等^[11]的研究发现,CdCl₂ 通过下调破骨细胞生成诱导的雄性 Wistar 大鼠骨质疏松症;有

人群实验表明,Cd 在精浆中的高浓度与不育症患者的精子质量下降之间存在关联^[12];动物实验研究表明短时低剂量的 Cd 暴露可能会引起小鼠永久性的睾丸间质细胞损伤^[13];小鼠模型也证实了,Cd 以剂量和时间依赖方式引发了睾丸组织显著病变^[14];高剂量尼古丁对软骨细胞活力具有显著抑制作用^[15];Cd 作用于中国仓鼠卵巢细胞时,随着 Cd 浓度的增加,细胞生长呈剂量依赖性下降^[16]。在本次研究中,CdCl₂ 作用于对精原细胞 GC-1 时,对于细胞增殖的抑制作用随浓度增加而增加,与前人的研究结果一致。当用 CdCl₂ 和尼古丁联合处理 GC-1 细胞时,会产生协同作用,且 CdCl₂ 对于联合的协同增强作用较尼古丁强。

有研究表明,香烟烟雾会导致精母细胞^[17]和其他细胞类型^[18]生长周期停滞,其中对于精母细胞来说,主要阻断 S、G₂/M 期^[17],随后细胞死亡。有研究表明,Cd 诱导的 G₂/M 期阻滞是不可逆的^[19],一旦阻滞形成,无论从培养基中去除 Cd 还是连续供应 Cd,细胞都将保持停滞^[16]。本研究复现了先前的结论,CdCl₂ 组、尼古丁组、联用组均使细胞 G₀/G₁ 期占比下降,将细胞阻滞在 G₂/M 期;同时本研究进一步发现,对于细胞周期的阻滞作用中,CdCl₂ 的协同效应更强。

凋亡是一种细胞程序化死亡,主要分为内源性及外源性两种途径^[20],吸烟产生的大量有害物中,有研究表明尼古丁可损害生殖系统,引起睾丸组织结构破坏、生精上皮萎缩、生殖细胞凋亡,导致精子发生和成熟受到抑制,同时也能对精子的形态和运动能力造成不良影响^[21];尼古丁可以促进男性生殖细胞的凋亡,睾丸中 TNF 凋亡途径被激活,过表达的 TRIM27 可以上调去泛素化的 RIP1,导致 TNF 凋亡途径激活,并导致过度凋亡^[22]。急性和慢性镉暴露会导致男性生殖系统的结构和功能缺陷,包括生殖细胞死亡、睾丸类固醇生成抑制、睾丸坏死、前列腺癌、支持细胞损伤以及精子质量和血清睾酮水平下降,这些影响出现的可能性原因之一是精原细胞凋亡^[23]。精原细胞凋亡是镉诱导男性生殖毒性的的重要分子机制之一^[24];有研究表明,CdCl₂ 处理可以增加细胞内活性氧,降低线粒体膜电位,并提高精原细胞的凋亡率^[25]。本研究发现,高浓度 CdCl₂ 作用时会促进 GC-1 细胞凋亡,与前人的研究结果一致,CdCl₂ 和尼古丁联合作用时会显著促进 GC-1 细胞凋亡,且 CdCl₂ 在协同中的作用更强。

综上所述,香烟的主要成分尼古丁和重金属镉均会抑制雄性精原细胞增殖,引起细胞周期阻滞,导致细胞凋亡,造成精原细胞损伤。尼古丁和重金属镉同时存在时具有协同作用,使细胞毒性作用增强,其中重金属镉的含量对协同作用的影响更强。本研究为 CdCl₂ 和尼古丁联合作用对生殖系统产生的危害提供了科学的依据,以期为倡导戒烟、禁烟等措施,为社会创造一个良好的生活环境提供数据支持。

参考文献:

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO global report on trends in prevalence of tobacco use 2000-2025 3rd ed. [M]. Geneva: World Health Organization, 2019.
- [2] SOARES S R, MELO M A. Cigarette smoking and reproductive function [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2008, 20(3): 281-291.
- [3] COOKE M. The chemical components of tobacco and tobacco smoke [J]. Chromatographia, 2010, 71(9/10): 977-977.
- [4] NOVOTNY T E, SLAUGHTER E. Tobacco product waste: an environmental approach to reduce tobacco consumption [J]. Curr Environ Health Rep, 2014, 1(3): 208-216.
- [5] SOLEIMANI F, DOBARADARAN S, DE-LA-TORRE G E, et al. Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: a comprehensive systematic review [J]. Sci Total Environ, 2022, 813: 152667.
- [6] ABOULMAOUAHIB S, MADKOUR A, KAAROUCH I, et al. Impact of alcohol and cigarette smoking consumption in male fertility potential: Looks at lipid peroxidation, enzymatic antioxidant activities and sperm DNA damage [J]. Andrologia, 2018, 50(3): e12926.
- [7] 何丽娟, 仲春雪, 张静, 等. 香烟烟雾暴露对雄性大鼠血浆尼古丁、可替宁的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(6): 594-599.
HE L J, ZHONG C X, ZHANG J, et al. Effect of cigarette smoking-induced plasma nicotine and cotinine on male rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(6): 594-599.
- [8] NAZAR-ZADEH M, JALILI C, NIKGOFTAR FATHI A, et al. Royal-jelly-based apitherapy can attenuate damages to male reproductive parameter following nicotine administration [J]. Anim Model Exp Med, 2022, 5(2): 133-140.
- [9] 王倩, 苏德奇, 黄云飞. 香烟烟雾与慢性应激联合作用对大鼠生殖功能的影响 [J]. 毒理学杂志, 2021, 7(6): 491-495.
WANG Q, SU D Q, HUANG Y F. The combined effect of cigarette smoke and chronic stress on the reproductive function of rats [J]. J Toxicol, 2021, 7(6): 491-495.
- [10] ESAKKY P, HANSEN D A, DRURY A M, et al. Cigarette smoke-induced cell cycle arrest in spermatocytes[GC-2spd(ts)] is mediated through crosstalk between Ahr-Nrf2 pathway and

- MAPK signaling [J]. J Mol Cell Biol, 2015, 7(1): 73-87.
- [11] UWAGIE-ERO E A, ABIAEZUTE C N, NWAEHUJOR C O, et al. Osteocyte viability and bone density in cadmium chloride-induced osteoporosis ameliorated with *Pilostigma thonningii* stem bark-extracted D-3-O-methy-chiroinositol [J]. Anim Model Exp Med, 2019, 2(1): 25-33.
- [12] ZAFAR A, EQANI S A, BOSTAN N, et al. Toxic metals signature in the human seminal plasma of Pakistani population and their potential role in male infertility [J]. Environ Geochem Health, 2015, 37(3): 515-527.
- [13] WU X, GUO X, WANG H, et al. A brief exposure to cadmium impairs Leydig cell regeneration in the adult rat testis [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6337.
- [14] SILVA J D, GONÇALVES R V, DE MELO F C S A, et al. Cadmium exposure and testis susceptibility: a systematic review in murine models [J]. Biol Trace Elem Res, 2021, 199(7): 2663-2676.
- [15] 韩贵宾, 张寿, 孙薇薇, 等. 尼古丁抑制 MIA 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(3): 40-45.
HAN G B, ZHANG S, SUN W W, et al. Inhibition of nicotine on apoptosis of chondrocytes induced by monosodium iodoacetate [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(3): 40-45.
- [16] YANG P M, CHIU S J, LIN K A, et al. Effect of cadmium on cell cycle progression in Chinese hamster ovary cells [J]. Chem Biol Interact, 2004, 149(2/3): 125-136.
- [17] ESAKKY P, HANSEN D A, DRURY A M, et al. Modulation of cell cycle progression in the spermatocyte cell line[GC-2spd(ts) Cell-Line] by cigarette smoke condensate (CSC) via arylhydrocarbon receptor-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Ahr-Nrf2) pathway [J]. Biol Reprod, 2014, 90(1): 9.
- [18] FIELDS W R, LEONARD R M, ODOM P S, et al. Gene expression in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells following *in vitro* exposure to cigarette smoke condensate [J]. Toxicol Sci, 2005, 86(1): 84-91.
- [19] CHAO J I, YANG J L. Opposite roles of ERK and p38 mitogen-activated protein kinases in cadmium-induced genotoxicity and mitotic arrest [J]. Chem Res Toxicol, 2001, 14(9): 1193-1202.
- [20] 王迅, 王李桃, 张波. 土木香内酯对 C6 脑胶质瘤细胞迁移侵袭及凋亡的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 317-322.
WANG X, WANG L T, ZHANG B. Effect of alantolactone on migration, invasion and apoptosis in glioma C6 cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(3): 317-322.
- [21] 曾颖斐, 杨望, 邹鹏, 等. 尼古丁抑制小鼠睾丸间质细胞睾酮生成中的线粒体损伤作用 [J]. 现代预防医学, 2019, 46(8): 1376-1381.
ZENG Y F, YANG W, ZOU P, et al. Mitochondrial damage in nicotine-induced inhibition of testosterone production in TM3 mouse leydig cells [J]. Mod Prev Med, 2019, 46(8): 1376-1381.

[22] WU J, XU W, ZHANG D, et al. Nicotine inhibits murine Leydig cell differentiation and maturation via regulating Hedgehog signal pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 510 (1): 1-7.

[23] HABIB R, WAHDAN S A, GAD A M, et al. Infliximab abrogates cadmium-induced testicular damage and spermiotoxicity via enhancement of steroidogenesis and suppression of inflammation and apoptosis mediators [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2019, 182: 109398.

[24] JI Y L, WANG H, LIU P, et al. Pubertal cadmium exposure

impairs testicular development and spermatogenesis via disrupting testicular testosterone synthesis in adult mice [J]. Reprod Toxicol, 2010, 29(2): 176-183.

[25] LIU H, WANG R, OUYANG H, et al. Cadmium induced mouse spermatogonia apoptosis via mitochondrial calcium overload mediated by IP₃R-MCU signal pathway [J]. Toxicology, 2023, 486: 153448.

[收稿日期] 2024-05-09

编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》2025 年征订启事

《中国比较医学杂志》由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与人类生命与健康密切相关的实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,重点刊载比较医学成果和进展。要求来稿数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。开设栏目:研究报告、综述与专论、研究快报、研究简讯、技术与方法、经验交流、学术动态、国外研究进展、学术信息、简讯等。读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。

刊期及订价:月刊,大 16 开本,180 页。月末出版。每期 50 元,全年 12 期,共计 600 元。邮发代号:82-917。

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行

帐号:11220201040003764

单位抬头全称:中国实验动物学会

请注明订刊数量,并写明刊物寄往地址及收件人。收到汇款后,我们会及时将发票寄给您。