

论 著

(基础研究)

CO₂高暴露对雌性大鼠生殖系统及胚胎发育的影响

陈琪珍, 田淑娜, 陈 雄

【摘要】 目的 研究慢性低氧高二氧化碳(CO₂)环境下SD雌大鼠生殖器官发育的影响。 **方法** 30只SD雌鼠随机分为对照组和实验组,对照组雌鼠常温常压下喂养,实验组雌鼠每天暴露于低氧高CO₂环境8 h,4周后与雄鼠合笼,18 d后比较2组大鼠生殖器官脏器指数、生殖器官组织形态学,ELISA法检测大鼠血清血管内皮生长因子(VEGF)、雌二醇(E₂)和孕激素受体(PR)水平差异。 **结果** 2组大鼠在生殖器官脏器指数、子宫内膜厚度、肌层厚度和腺体直径方面差异无统计学意义($P>0.05$);实验组大鼠血清 VEGF、E₂ 和 PR 水平显著低于对照组[(13.44±1.88)ng/L vs (15.61±2.32)ng/L, (51.72±11.64)ng/L vs (68.78±9.91)ng/L, (1.09±0.13)ng/L vs (1.24±0.15)ng/L, $P<0.05$];实验组窦前卵泡数和卵泡总数显著少于对照组[(5.61±2.01)个 vs (9.10±4.85)个, (9.90±3.85)个 vs (12.10±5.05)个, $P<0.05$];2组平均着床数比较差异无统计学意义($P>0.05$),实验组活胎率显著少于对照组(72.9% vs 94.2%, $P<0.05$)。 **结论** CO₂高暴露未对雌性大鼠生殖器结构改变,但可显著影响卵泡生成能力并下调血清 VEGF、E₂ 和 PR 表达水平,导致孕鼠生育能力下降。

【关键词】 CO₂;大鼠;子宫;卵巢

【中图分类号】 R332 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2019)02-0130-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.02.004

Effects of chronic hypoxic hypercapnia on genital system and embryo of SD rat

CHEN Qi-zhen, TIAN Shu-na, CHEN Xiong

(Department of Obstetrics and Gynecology, Shanghai First People's Hospital Baoshan Branch, Shanghai 200940, China)

【Abstract】 Objective To study the effects of chronic hypoxia and high carbon dioxide (CO₂) on the development of reproductive organs in SD female rats. **Methods** Thirty SD female rats were randomly divided into control group and experimental group. Female rats in the control group were fed under normal temperature and pressure, while rats in the experimental group were exposed to low oxygen and high CO₂ for 8 hours per day. The viscera index and reproductive organ morphology of two groups were compared. The expression levels of VEGF, E₂ and PR in serum were determined by ELISA. **Results** There was no significant difference in visceral index and endometrial thickness, muscle thickness and gland diameter between two groups ($P>0.05$). The expression levels of serum VEGF, PR and E₂ in the experimental group were significantly lower than those in the control group [(13.44±1.88)ng/L vs (15.61±2.32)ng/L, (51.72±11.64)ng/L vs (68.78±9.91)ng/L, (1.09±0.13)ng/L vs (1.24±0.15)ng/L, $P<0.05$]. The number of follicles and corpus luteum at both levels were significantly less in the experimental group than those in the control group [(5.61±2.01) vs (9.10±4.85), (9.90±3.85) vs (12.10±5.05), $P<0.05$]. There was no significant difference in the number of implantation of embryos between two groups. However, the number of live births in the experimental group was significantly less than that in the control group (72.9% vs 94.2%, $P<0.05$). **Conclusion** High CO₂ exposure did not change the genital structure of female rats, but it could significantly affect the follicle generating ability and decrease expression of VEGF, E₂ and PR, which leading to the reducing fertility in pregnant rats.

基金项目:上海市宝山区科技创新项目(16-E-2)

作者单位:200940 上海,上海市第一人民医院宝山分院妇产科(陈琪珍、田淑娜、陈 雄)

通信作者:陈 雄, E-mail:smmuchexiong@msn.com

【Key words】 carbon dioxide; rat; uterus; ovarian

0 引言

CO₂是人正常生理活动不可或缺的生理气体,但当其含量超过 2 kPa(15 mmHg, 1 mmHg=0.133 kPa)时,便会形成高碳酸血症,对机体会产生毒性作用,影响机体正常生理功能,CO₂中毒^[1]。临床研究及动物模型试验均已表明高碳酸血症会对人体及动物多项生理功能产生影响。现实生活中部分人群由于某些呼吸系统疾病,腹腔镜手术治疗或特殊的工作环境均会处于慢性低氧高 CO₂状态。研究高碳酸血症对人体各项功能的影响,有助于了解 CO₂与人体相互影响的机制,对于防治 CO₂中毒有重要的意义^[2]。有研究报道发现雌性大鼠血清 CO₂浓度变化与后代畸形相关。笔者前期研究发现 CO₂高暴露对大鼠血清性激素水平产生影响^[3],本研究观察了慢性低氧高 CO₂条件下雌大鼠生殖器官组织形态学的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 50 d龄性成熟清洁级 SD 大鼠雌鼠(体重 160~180 g)和雄鼠(200~220 g)各 30 只,均购于第二军医大学实验动物中心[许可证号:SCXK(沪)2016-2020],动物自由取食,供水充足,动物房温度控制在(23±2)℃,24 h 昼夜循环。

1.2 主要仪器 低氧高 CO₂培养箱(美国公司),电热恒温水浴箱(上海医用恒温设备厂),电泳仪(北京六一仪器厂型),凝胶成像系统(英国公司),Thermo 紫外分光光度计 BioMate 3S(美国公司),美国 BIO-RAD model 680 酶标仪,日本奥林巴斯 BX40 光学显微镜。

1.3 SD 大鼠饲养方法 用 0.5% 品红液在鼠背标志将 30 只 SD 雌鼠随机分为实验组和对照组各 15 只,分笼分室饲养。鼠的饲养温度应控制在 20~25℃,湿度应控制在(50±10)%,室内的风速应控制在 0.1~0.2 m/s,大鼠的笼架,笼具避开风口。光照时间 7 am~7 pm 开灯,12 h 交替。将 CO₂钢瓶置于实验组实验室中,打开阀门,控制流量持续放气人为营造常压低氧高 CO₂环境,参照文献[4]建立低氧高 CO₂模型,充入 N₂和 CO₂,维持舱内氧气浓度在(10±1)%,CO₂浓度为(11±2)%,舱内温度 22~23℃,

每天 8 h。其余时间同对照组与正常环境中饲养,动物自由取食饮水,共持续 4 周。

1.4 孕鼠的获取 按 1:1 比例将雌鼠与雄鼠 7 pm 合笼过夜,于次日 7 am 检查阴道涂片,以涂片查到精子定为孕 1 d。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 一般反应、体重变化 实验开始至动物解剖当天观察孕鼠存活,体征变化,行为变化情况。每隔 3 d 测定鼠体重。雌鼠受孕后于孕 18 d 检查胚胎存活情况,先用眼科弯取出左右两侧含胚胎子宫,沿着子宫系膜对策打开宫腔,将胚胎从子宫玻璃,记录胚胎活胎数、死胎数、吸收胎数,计算公式:

$$\text{活胎率} = \text{活胎仔数} / \text{胎仔总数} \times 100\%$$

$$\text{吸收胎率} = (\text{早期吸收数} + \text{中期吸收数} + \text{晚期吸收数}) / \text{胎仔总数} \times 100\%$$

$$\text{死胎率} = \text{死胎数} / \text{胎仔总数}$$

$$\text{着床后丢失率} = (\text{吸收胎} + \text{死胎}) / \text{着床数} \times 100\%$$

1.5.2 生殖器官脏器指数 2 组孕鼠于孕 18 d 称重后处死取出卵巢及子宫,分析天平称湿重,计算脏器指数。计算公式:

$$\text{卵巢指数} = \text{卵巢质量} / \text{体重}$$

$$\text{子宫指数} = \text{子宫质量} / \text{体重}$$

1.5.3 SD 大鼠生殖器官组织形态学观察 将 SD 雌鼠卵巢及子宫用 4% 多聚甲醛固定,常规乙醇梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋切成 5 μm 厚度切片,做常规 HE 染色。光学显微镜下观察染色结果。

1.5.4 ELISA 法检测 SD 雌鼠血清细胞因子及雌激素水平 剪开大鼠腹部皮肤暴露主动脉,用真空采血管取 5 mL 血液,3000 r/min 离心 10 min,取上层血清后严格按照试剂说明书方法操作,450 nm 波长处检测吸光度。检测指标:血清血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、雌二醇(estradiol, E2)和孕激素受体(progesterone receptor, PR)。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,当数据符合正态分布后采用独立样本 *t* 检验进行组间比较;计数资料用百分比形式表示,组间比较采用 χ^2 检验。

以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SD 雌鼠子宫组织及卵巢组织 HE 染色结果 2 组胎鼠外观及生殖器均未发现畸形, HE 染色结果可见实验组 SD 雌鼠的子宫与卵巢组织形态结构与对照组比较均未发生明显改变, 见图 1。

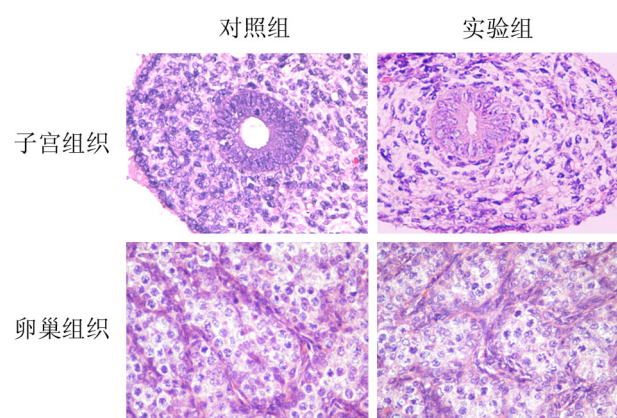


图 1 受孕 SD 雌鼠子宫组织及卵巢组织镜下观察 (HE $\times 400$)

2.2 生殖器官脏器指数比较 2 组受孕 SD 雌鼠卵巢指数及子宫指数比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.3 生殖组织形态比较 2 组受孕 SD 雌鼠在子宫内膜厚度、肌层厚度和腺体直径比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.4 受孕 SD 雌鼠血清 VEGF、E2 和 PR 水平比较 经过 1 个月喂养, 实验组 SD 雌鼠血清 VEGF、E2 和

PR 水平均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 1 受孕 SD 雌鼠生殖器官脏器指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	卵巢		子宫	
		卵巢质量 (g)	卵巢指数 (%)	子宫质量 (g)	子宫指数 (%)
对照组	15	3.71 \pm 0.54	0.65 \pm 0.19	0.13 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01
实验组	15	3.65 \pm 0.51	0.62 \pm 0.23	0.12 \pm 0.02	0.04 \pm 0.00

表 2 受孕 SD 雌鼠生殖组织形态比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

组别	n	内膜厚度	肌层厚度	腺体直径
对照组	15	530.94 \pm 42.09	212.46 \pm 50.32	48.05 \pm 11.32
实验组	15	521.62 \pm 39.88	214.89 \pm 51.73	44.37 \pm 9.68

表 3 受孕 SD 雌鼠血清 VEGF、E2 和 PR 水平比较 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

组别	n	VEGF	E2	PR
对照组	15	15.61 \pm 2.32	68.78 \pm 9.91	1.24 \pm 0.15
实验组	15	13.44 \pm 1.88*	51.72 \pm 11.64*	1.09 \pm 0.13*

与对照组比较, * $P < 0.05$

2.5 各级卵泡及黄体数量比较 实验组窦前卵泡数和卵泡总数显著少于对照组 ($P < 0.05$), 2 组在窦状卵泡数、成熟卵泡数和黄体数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4。

2.6 胚胎存活情况 所有雌鼠均成功受孕, 2 组平均着床数比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 实验组活胎率显著少于对照组 ($P < 0.05$), 2 组均未发现死胎, 实验组吸收胎率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 见表 5。

表 4 受孕 SD 雌鼠各级卵泡及黄体数量比较 ($\bar{x} \pm s, \text{个}$)

组别	n	各级卵泡				黄体
		窦前卵泡	窦状卵泡	成熟卵泡	总数	
对照组	15	9.10 \pm 4.85	12.10 \pm 5.05	1.05 \pm 0.39	21.60 \pm 9.42	11.20 \pm 5.04
实验组	15	5.61 \pm 2.01*	9.90 \pm 3.85	1.02 \pm 0.38	14.20 \pm 8.45*	11.24 \pm 4.86

与对照组比较, * $P < 0.05$

表 5 受孕 SD 雌鼠胚胎存活情况比较

组别	n	着床数	平均着床数 ($\bar{x} \pm s$)	活胎数	活胎率 (%)	死胎率 (%)	吸收胎率 (%)
对照组	15	211	15.50 \pm 2.02	208	94.2	0	5.8
实验组	15	198	13.91 \pm 2.72	144	72.9*	0	27.1*

与对照组比较, * $P < 0.05$

3 讨 论

造成 CO₂中毒的一般都是空气流通不畅的室内密闭环境,但目前关于 CO₂在室内空气中的最大允许含量,学界尚无统一论。根据毒理学和流行病学研究结果,室内空气 CO₂浓度在 0.07% 时,人体感觉良好,CO₂浓度达到 0.10%,人会开始有不舒适感,当达到 0.15% 时不舒适感明显,而浓度继续升高甚至可能危及生命。人类对 CO₂中毒的研究已经有较长历史,动物模型试验揭示了急慢性 CO₂中毒会对器官功能造成损害,或者产生致癌效应,也部分研究显示会对哺乳动物生育能力和胚胎造成影响^[5-8]。

环境中高浓度 CO₂或疾病因素均可导致机体高碳酸血症,引起机体功能异常^[9]。研究发现高碳酸血症可影响糖代谢,导致胰岛素抵抗,并且可刺激儿茶酚胺、肾素、血管紧张素等的释放,引起自主神经功能及内分泌代谢紊乱,导致血压增高,并进而引起心、肺、脑、肾等多器官多系统的改变^[10]。儿童高碳酸血症可干扰脑能量代谢,引起内分泌功能紊乱,生长激素分泌减少,导致骨量减少和生长发育迟缓^[11-12]。

研究已经证高浓度 CO₂环境会对女性造成影响^[13]。Hardt 等^[14]2015 年的研究成果显示潜艇封闭空气环境 CO、CO₂和低 O₂对女性生殖和发育、性周期变化及性激素浓度长期的潜在不良影响。在某些医学场所也会有高 CO₂低 O₂的情况出现,如腹腔镜手术医护人员会直接打开阀门释放 CO₂,另外手术结束时腹腔内以及气腹机内的余气排放过程也会造成手术室内 CO₂浓度增高。研究证实腔镜手术室内 CO₂浓度在手术过程中均维持在较高水平,于手术结束时达最高值约 0.183%,和开腹手术组相比,腔镜手术组人员手术后心率和呼吸频率明显增快、pH 降低、PCO₂升高,疲倦严重增加^[15-16]。另一方面,研究发现接受腹腔镜手术女性患者,会因 CO₂造成高碳酸血症,对机体产生各种病理生理影响^[17]。因此在该环境下女性生殖内分泌是否有不良影响,是否引起女性生育能力的下降是本研究关注的焦点。

本研究比较了常压下和低氧高 CO₂暴露下雌性 SD 大鼠生殖器官组织形态学的影响。研究发现 2 组大鼠在生殖器官指数以及内膜厚度、肌层厚度和

腺体直径方面差异无统计学意义,证明低氧高 CO₂暴露条件下并未改变大鼠生殖器的正常发育,而且并未对受精卵着床造成影响,本研究雌鼠全部受孕,但是对各级卵泡及黄体数量比较发现实验组在窦前卵泡及总卵泡数量上显著少于对照组,证明该环境下可能造成 SD 雌性大鼠生殖细胞的正常发育,造成功能失调。雌激素在雌性生殖功能中起着决定性的作用,可以促进子宫肌细胞生长,增加子宫血流量,促使肌层增厚,并且可促进子宫内膜腺体和间质的修复和增殖,并且可协调卵泡雌激素促进原始卵泡向成熟卵泡的发育。PR 在调节雌性生殖道组织的生长、发育方面有重要的作用。VEGF 是重要的血管生成调控因子,对生殖器官的生长和发育有重要的影响,其表达水平可引起雌性各项生理效应的改变。研究通过 ELISA 反应发现实验组大鼠 VEGF、E2 和 PR 水平均显著下降,因此有可能由于内分泌的失调引起生殖功能异常^[18]。分析 2 组孕鼠胚胎情况,2 组平均着床数未有显著性差异,但是实验组活胎率显著低于对照组,而吸收胎率显著升高,虽然实验组未有死胎情况发生,但结果显示长期暴露于高 CO₂有可能产生生殖毒性,造成雌鼠生育率下降。

综上所述,本研究观察慢性低氧高 CO₂暴露 SD 雌性大鼠的生殖器官组织形态学变化,发现该条件下可造成大鼠体内 VEGF、E2 和 PR 分泌紊乱,卵泡数量减少,但是并未发现明显的组织形态学异常,另外该条件下孕鼠生育率发生明显变化,胚胎存活率下降,吸收胎率上升,表现出一定的生殖毒性,而对于上述生殖功能的变化是否与生殖器形态变化相关还需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 杜旭芹,郝凤桐. 二氧化碳中毒研究进展[J]. 中国工业医学杂志, 2010, 23(4): 273-276.
- [2] Chowdhuri S, Badr MS. Control of Ventilation in Health and Disease[J]. Chest, 2016, 151(4): 917-929.
- [3] 陈琪珍,陈 雄,田淑娜,等. 二氧化碳高暴露对 SD 雌性大鼠生育能力的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2017, 21(23): 60-63.
- [4] 杨秀艳,邵蒙蒙,金 露,等. 氢气对慢性低氧高二氧化碳大鼠学习记忆障碍的干预作用[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(3): 566-570.

- [5] 张晓慧,张爱荣,赵敬杰,等.持续 CO₂气腹环境对卵巢癌细胞生物学行为的影响[J].中国病理生理杂志,2008,24(6): 1225-1227.
- [6] 单舒,韩萍,辛德梅,等.二氧化碳气腹对大鼠卵巢功能影响的研究[J].中国妇幼保健,2014,29(18): 2970-2972.
- [7] 郝爱喜,韩萍,辛德梅,等.CO₂气腹对大鼠卵巢形态学变化的研究[J].中国妇幼保健,2014,29(5): 784-787.
- [8] 郑德燕,黄惠娟.环境因素对雌鼠卵巢损害的研究进展[J].东南国防医药,2015,17(5): 511-513.
- [9] 樊荣,卢园园,黄晓颖,等.知母宁对低氧高二氧化碳肺心病大鼠心肌、肝组织丙二醛和SOD含量的影响[J].中国新药杂志,2012,21(7): 804-807.
- [10] Guais A, Brand G, Jacquot L, *et al.* Toxicity of carbon dioxide: a review[J]. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24(12): 2061-2070.
- [11] 蔡晓红,李秀翠,李美丽,等.儿童阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征多系统影响的研究[J].中华儿科杂志,2012, 50(2): 93-97.
- [12] Ferreira AMC, Cardoso M. Indoor air quality and health in schools[J]. *J Bras Pneumol*, 2014, 40(3): 259-268.
- [13] 朱美英,韩丽娜,曹鄂洪.阻塞性睡眠呼吸暂停相关高血压和氧化应激[J].医学研究生学报,2013,26(7): 751-753.
- [14] Hardt DJ, James RA, Jr GC, *et al.* Evaluation of submarine atmospheres: effects of carbon monoxide, carbon dioxide and oxygen on general toxicology, neurobehavioral performance, reproduction and development in rats. II. Ninety-day study[J]. *Inhal Toxicol*, 2015, 27(3): 121-137.
- [15] 杨美玲,王琰,王巧桂,等.腹腔镜 CO₂气腹对洁净手术室空气质量及医护人员健康的影响[J].江苏医药,2011, 37(21): 2590-2591.
- [16] 徐晓,张培培,李莎,等.手术室 CO₂气腹污染程度及对医护人员健康的影响[J].中国实用护理杂志,2013, 29(5): 56-59.
- [17] 陈伟国,单欢,叶金明,等.手术室二氧化碳气腹对医护人员健康的影响[J].中华劳动卫生职业病杂志,2017, 35(3): 193-195.
- [18] Ezraty B, Ducret A, Maisonneuve E, *et al.* CO₂ exacerbates oxygen toxicity[J]. *Embo Reports*, 2011, 12(4): 321-326.
- (收稿日期:2018-04-09; 修回日期:2018-06-07)
(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)

第十四届全军骨科学术年会暨第二届军事医学大会通知

在习主席一切为军的总要求下,为适应新时代的军事训练和战争形式,探讨军民融合的新方式,进一步改进提高军事医学领域的卫勤保障能力,由中国人民解放军医学科学技术委员会骨科专业委员会主办,东部战区总医院承办,《东南国防医药》协办的第十四届全军骨科学术年会将于2019年6月28-29日在南京钟山宾馆(江苏省会议中心)盛大召开。

此次盛会将在关节、脊柱、创伤、运动医学、护理、基础研究等多个领域展开讨论,聚焦卫勤保障和前沿技术,创新名城南京将以崭新姿态迎接军内外骨科专家及学者,期待与广大同道聚首南京。

大会会务组联系方式:东部战区总医院骨科联系人孟嘉,电话:+86-13645195753,邮箱:michaelmengjia@163.com;东部战区总医院骨科联系人包倪荣,电话:+86-15951866580,邮箱:bnrbnr@sina.com;解放军总医院骨科联系人王秀丽,电话:+86-13910141187。