

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.15.005

文章编号: 1005-8982(2016)15-0028-04

论著

小鼠孕早期暴露量子点对妊娠结局和 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的影响*

郑凤霞¹, 许恒毅², 傅芬¹

(1. 南昌大学第二附属医院 妇产科, 江西 南昌 330006; 2. 南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘要:目的 探讨小鼠孕早期暴露硫化锌量子点(QDs)对妊娠结局和外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的影响。**方法** 制备成年健康孕鼠并将其随机分为高剂量 QDs 组、低剂量 QDs 组和对照组, 分别于妊娠第 3~5 天尾静脉注射 0.50 和 0.05 μmol/L QDs, 以及生理盐水各 100 μl, 于妊娠第 15 天观察妊娠结局, 并采用流式细胞术分析孕鼠外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞比例。**结果** QDs 可引起流产、吸收胎和死胎等不良妊娠结局, 高剂量 QDs 使胚胎平均着床数、胎鼠均重及胎盘均重低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 且 QDs 暴露孕鼠外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的比例低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 小鼠孕早期暴露 QDs 具有胚胎毒性, 且其毒性机制可能与降低外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞比例、扰乱妊娠免疫耐受有关。

关键词: 量子点; 生殖毒理; CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞; 妊娠免疫耐受

中图分类号: R994

文献标识码: A

Effects of quantum dots on pregnancy outcomes and CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in early pregnant mice*

Feng-xia Zheng¹, Heng-yi Xu², Fen Fu¹

(1. Department of Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. National Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of quantum dots (QDs) on pregnancy outcomes and CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in early pregnant mice. **Methods** The pregnant mice were randomly divided into three groups (QDs high-dose exposure group treated with 0.5 μmol/L QDs, 100 μl/mice per day; low-dose exposure group treated with 0.05 μmol/L QDs, 100 ul/mice per day; and normal saline group treated with 0.9% NS, 100 μl/mice per day). Solutions of the different treatment materials were administered by tail vein injection on the 3rd-5th GD. The pregnant outcomes were observed and CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood were detected by flow cytometry on the 15th GD. **Results** In the QDs exposure groups, the pregnant mice showed abnormal pregnancy outcomes (abortion, stillbirth and fetal absorption). The average number of embryo implantation, offspring's body weight and placental weight in the high-dose exposure group were significantly lower than those of the control group ($P < 0.05$). The proportion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in CD4⁺ T cells in the QDs groups was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The exposure of pregnant mice to QDs during early pregnancy is harmful to embryos. One of the toxicity mechanisms may be related to the decrease of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood.

Keywords: quantum dot; reproductive toxicology; CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell; pregnancy immune tolerance

收稿日期: 2015-12-25

* 基金项目: 江西省青年科学基金(No: 20143ACB21003)

[通信作者] 傅芬, E-mail: fu_fen@163.com

近年随着纳米材料的规模化生产和纳米产品的普及,人类主动或被动接触纳米材料的机会越来越多,但纳米材料兼有材料本身引起的毒性和纳米尺寸效应、表面效应等而致的特殊毒性,纳米毒理学成为纳米技术可持续发展的关键环节,也是现代毒理学的前沿领域。生殖毒理学是一个关乎人类繁衍健康和社会发展的多领域交叉学科,研究纳米材料的生殖毒理具有重要意义。量子点 (quantum dots, QDs) 作为新型无机荧光纳米粒子具有荧光寿命长、耐光漂白、发射光谱窄而对称、激发光谱宽而连续等优点,在生物医学领域如生物分子检测、生物荧光标记、活体成像、荧光定位和动态示踪等表现出巨大的应用潜力^[1-2]。相对于量子点细胞毒性和一般活体毒性的研究而言,关于量子点生殖毒性及用于筛选和评价生殖损伤观察指标的研究报道较少^[3-4]。妊娠是一个复杂而又协调的过程,母胎界面正常免疫耐受的建立和维持是妊娠成功的关键。CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞起源于胸腺,可以抑制同种异体移植物的排斥反应,在妊娠免疫耐受中的作用备受关注。大量研究表明,其不但参与母胎免疫耐受机制的形成,而且对其维持发挥积极作用,CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞平衡的失调可影响妊娠的结局^[5-6]。本文以量子点为研究材料,以成年健康孕鼠为评价模型,研究评估小鼠孕早期暴露量子点引发的生殖毒性,并从 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞比例变化的角度探究其毒性机制,为认识量子点的生殖安全提供重要的实验参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择健康出生 7 周龄的 SPF 级昆明雌性小鼠 24 只,雄性 12 只,体重 28 ~ 30 g,由南昌大学动物科学部提供,动物合格证号为 SYXK(赣)2015-0002。本实验经实验动物研究伦理委员会批准,批准号为 0064257。实验动物在南昌大学动物房内饲养,室温保持 22 ~ 24℃,相对湿度为 55% ~ 60%,昼夜交替各 12 h,自由摄食、饮水,定期更换垫料。

1.2 主要试剂与仪器

硫化锌量子点原液(浓度为 10 μmol/L,水化粒径为 8 ~ 10 nm,吸收光谱为 400 ~ 600 nm,发射光谱为 540 ~ 560 nm) 购自美国 Ocean NanoTech 公司, Anti-Mouse CD4- 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 单抗、Anti-Mouse CD25- 藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE) 单抗、Anti-Mouse IgG2a 抗体购

自美国 BD 公司。流式细胞仪购自美国 BD 公司,超净生物工作台购自苏州净化设备有限公司,电子天平购自上海梅特勒 - 托利多有限公司,恒温水浴箱购自江苏金坛市中大公司,离心机购自安徽中科中佳科学仪器公司。

1.3 实验动物分组及染毒

将所购小鼠适应性饲养 1 周后,于下午 5 : 00 将雌性、雄性小鼠以 2 : 1 比例合笼,次日清晨 8 : 00 检查阴栓,以查见阴栓日为妊娠第 1 天,其余妊娠天数依次类推。参照文献^[7-8]的量子点染毒剂量,将所得 24 只妊娠早期雌鼠完全随机化分为 3 组,分别为对照组(生理盐水)、低剂量(0.05 μmol/L)和高剂量(0.50 μmol/L)QDs 组,每组 8 只,于妊娠第 3、4 和 5 天采用尾静脉注射方式染毒,染毒容量为 100 μl/只,1 次/d,连续染毒 3 d。实验期间,每天上午 9 : 00 称量记录孕鼠体重,并观察记录其呼吸、神态、活动和阴道出血等情况。

1.4 孕鼠的解剖和胚胎毒性的观察

将所有孕鼠于妊娠第 15 天摘除眼球,收集新鲜抗凝血后颈椎脱臼处死,迅速沿腹中线剖开腹腔暴露子宫。首先观察记录死胎、活胎和吸收胎,然后剪除子宫,去掉血污后依次分离胎盘、胎鼠,称量胎鼠、胎盘的重量。

1.5 流式细胞术检测孕鼠外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的比例

取新鲜抗凝血 100 μl,加入 Anti-Mouse CD4-FITC 单抗 10 μl、Anti-Mouse CD25-PE 单抗 10 μl (同时设置 Anti-Mouse IgG2a 同型阴性对照反应管、Anti-Mouse CD4-FITC 单阳管和 Anti-Mouse CD25-PE 单阳管)轻微混匀,室温避光孵育 25 min,加入红细胞裂解液 2 ml,避光裂解 10 min,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 1 ml 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS)洗涤细胞,1 200 r/min 离心 5 min 后弃上清液。再加入 500 μl PBS 重悬细胞,30 min 内在流式细胞仪上机检测,根据前向角散射 (forward scatter, FSC) 和侧向角散射 (side scatter, SSC) 光信号圈定淋巴细胞群,根据同型阴性对照样品 (小鼠 IgG2a 同型对照反应管) 来调整仪器电压,用 CD4 单阳和 CD25 单阳样品来调整 FITC 和 PE 之间的荧光补偿,以淋巴细胞群设门来计算 CD4⁺ 淋巴细胞的比例,以 CD4⁺ 设门来计算 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞比例。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件分析处理实验数据, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间数据比较用 t 检验, 多组间数据比较用单因素方差分析 (One-way, ANOVA) 及 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般观察结果

观察期间各组孕鼠均未出现死亡现象, 高剂量 QDs 组孕鼠进食、进水量较对照组和低剂量 QDs 组明显减少, 其毛色晦暗, 嗜睡, 活动减少, 精神萎靡, 其中有 3 只孕鼠出现阴道流血、体重骤降等症状; 低剂量 QDs 组孕鼠注射药物后出现易激惹、躁动不安等症状; 对照组所有孕鼠未发现异常。观察期间高剂量 QDs 组、低剂量 QDs 组孕鼠体重净增长率 [孕期体重净增长率 = (妊娠当日体重 - 妊娠第 1 天体重) / 妊娠第 1 天体重 $\times 100\%$] 较对照组减少。见附图。

2.2 量子点对妊娠结局的影响

本研究观察期间高剂量 QDs 组有 3 只孕鼠发生流产, 解剖其余 5 只孕鼠见 3 只死亡胚胎及 4 个吸收胎等不良妊娠结局, 各组胚胎平均着床数比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 8.927, P = 0.002$)。各组胎鼠均重比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 87.824, P = 0.000$)。各组胎盘均重比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 21.640, P = 0.000$)。量子点暴露孕鼠平均着床数、胎鼠均重和胎盘均重低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 QDs 对 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的影响

高剂量 QDs 组、低剂量 QDs 组孕鼠外周血中 CD4⁺ T 细胞的比例比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 73.199, P = 0.000$)。CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞比例比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 210.998, P = 0.000$)。QDs 暴露孕鼠外周血中

CD4⁺ T 细胞的比例及 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞比例低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 孕鼠妊娠早期暴露量子点对妊娠结局的影响
($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	平均着床数 / 个	胎鼠均重 / g	胎盘均重 / g
对照组	15.13 \pm 2.64	0.33 \pm 0.25	0.14 \pm 0.01
低剂量 QDs 组	12.67 \pm 1.86	0.29 \pm 0.01	0.12 \pm 0.10
高剂量 QDs 组	9.00 \pm 3.24	0.23 \pm 0.13	0.10 \pm 0.01
t_1 值	3.527	-18.205	-4.123
P_1 值	0.010	0.000	0.004
t_2 值	-4.230	12.802	-12.694
P_2 值	0.013	0.000	0.000

注: t_1, P_1 值: 低剂量 QDs 组与对照组比较; t_2, P_2 值: 高剂量 QDs 组与对照组比较

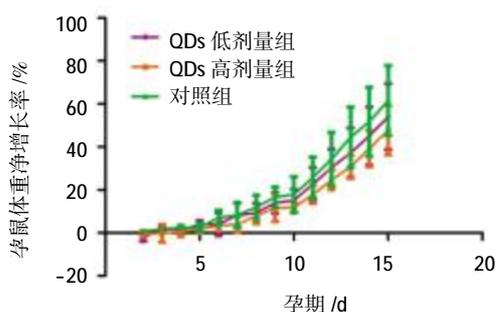
表 2 孕鼠妊娠早期 QDs 对外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的影响 ($n = 8, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ /CD4 ⁺
对照组	31.90 \pm 2.75	37.13 \pm 2.60
低剂量 QDs 组	26.88 \pm 1.91	23.70 \pm 1.07
高剂量 QDs 组	18.57 \pm 0.61	19.90 \pm 0.87
t_1 值	-8.230	-29.327
P_1 值	0.017	0.025
t_2 值	-56.087	-51.095
P_2 值	0.000	0.011

注: t_1, P_1 值: 低剂量 QDs 组与对照组比较; t_2, P_2 值: 高剂量 QDs 组与对照组比较

3 讨论

纳米材料的生殖毒性研究主要包括对生殖能力、宫内胚胎发育和子代的影响等方面。2008 年 CHAN 等^[9]发现, QDs 具有小鼠囊胚发育毒性, 可诱导囊胚凋亡, 经 QDs 染毒后的囊胚种植到子宫内膜后, 其发育较对照组缓慢。HSIEH 等^[10]通过体外实验研究发现 QDs 有较明显的胚胎发育毒性, 经 QDs 干预后发育的胚胎着床后吸收胎率增加, 胎盘及胎儿重量明显减轻。但目前关于妊娠早期 QDs 的生殖毒性及其机制的动物体内实验较少见, 且妊娠早期是哺乳动物最为敏感的时期, 妊娠母体在该阶段接触药物或化学材料更易对子代造成不同程度的影响, 研究纳米材料的胚胎毒性对环境保护和健康有重要意义。本实验在小鼠妊娠的第 3 ~ 5 天经尾静脉注



附图 量子点对孕鼠净体重变化的影响

射QDs,结果发现 QDs 暴露孕鼠的平均胎仔数、胎鼠均重和胎盘均重等较对照组减少,且高剂量 QDs 组孕鼠出现流产、死胎及吸收胎等不良妊娠结局,表明小鼠孕早期以静脉注射方式暴露一定量的 QDs 可导致胚泡着床障碍和胚胎宫内发育迟缓等毒性。

纳米材料本身及其释放的重金属离子毒性可与其干扰性激素水平、调节机体免疫和相关氧化应激水平等因素相关^[11-12]。从生殖免疫学观点来看,胚胎拥有一半父源性遗传物质,一次成功的妊娠形同一次成功的同种异体移植,胚胎所携带的父源性抗原刺激母体免疫活性细胞进行免疫应答,但同时母体内具有免疫抑制功能的细胞也增加,使免疫应答和免疫抑制相平衡,才能使胎儿正常发育直至分娩,母胎界面正常免疫耐受的建立和维持是妊娠成功的关键。CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞是一群具有免疫调节功能的细胞群,是机体调控不适当或者过强免疫应答的关键机制之一,其通过调控抑制性 T 细胞,抑制自身反应性 T 细胞,亦能促进一些抑制性细胞因子(如转化生长因子和白细胞介素 -10)的分泌等,在防止自身免疫性疾病及母胎免疫耐受机制的形成和维持中发挥重要作用^[5-6]。研究表明,正常妊娠时孕体外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞比例升高,而不明原因复发性流产者或其他病理妊娠机体外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞比例较正常妊娠者减少^[13-14]。ROWE 等^[15]报道在易发流产的机体外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞数量较正常妊娠组明显减少,CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞缺乏可导致母体产生针对胎儿的免疫排斥,使流产率增加。本实验中通过流式细胞术检测不同处理组孕鼠外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞,结果发现,QDs 暴露孕鼠外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞比例较对照组降低,且高剂量 QDs 组最低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。推测孕鼠妊娠早期暴露于 QDs 引发的胚泡着床障碍、胚胎宫内发育迟缓等胚胎毒性,可能与其降低 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞比例破坏母胎免疫耐受平衡有关,但关于新型纳米材料量子点的生殖毒性的具体机制及其有关因素有待进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] GUO Z, HAO T, DU S, et al. Multiplex electrochemiluminescence immunoassay of two tumor markers using multicolor quantum dots as labels and graphene as conducting bridge[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 44: 101-107.
- [2] KAREEM AL-KAZAZ A. Detection of the ovarian cancer biomarker CA-125 using chemiluminescence resonance energy transfer to graphene quantum dots[J]. *Chem Commun*, 2014, 50(11): 1344-1346.
- [3] KATSUMITI A, GILLILAND D, AROSTEGUI I, et al. Cytotoxicity and cellular mechanisms involved in the toxicity of CdS quantum dots in hemocytes and gill cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Aquat Toxicol*, 2014, 153: 39-52.
- [4] WU T, TANG M. Toxicity of quantum dots on respiratory system[J]. *Inhal Toxicol*, 2014, 26(2): 128-139.
- [5] SHARMA S. Natural killer cells and regulatory T cells in early pregnancy loss[J]. *Int J Dev Biol*, 2014, 58: 219-229.
- [6] DU M R, GUO P F, PIAO H L, et al. Embryonic trophoblasts induce decidual regulatory T cell differentiation and maternal-fetal tolerance through thymic stromal lymphopoietin instructing dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2014, 192(4): 1502-1511.
- [7] CHU M, WU Q, YANG H, et al. Transfer of quantum dots from pregnant mice to pups across the placental barrier[J]. *Small*, 2010, 6(5): 670-678.
- [8] SU Y, PENG F, JIANG Z, et al. In vivo distribution, pharmacokinetics, and toxicity of aqueous synthesized cadmium-containing quantum dots[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(25): 5855-5862.
- [9] CHAN W H, SHIAO N H. Cytotoxic effect of CdSe quantum dots on mouse embryonic development[J]. *Acta pharmacol Sin*, 2008, 29(2): 259.
- [10] HSIEH M S, SHIAO N H, CHAN W H. Cytotoxic effects of CdSe quantum dots on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development[J]. *Int J Mol Sci*, 2009, 10(5): 2122-2135.
- [11] SARHAN O M, HUSSEIN R M. Effects of intraperitoneally injected silver nanoparticles on histological structures and blood parameters in the albino rat[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9: 1505-1517.
- [12] CHATTERJEE N, EOM H J, CHOI J. Effects of silver nanoparticles on oxidative DNA damage-repair as a function of p38 MAPK status: a comparative approach using human jurkat T cells and the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2014, 55: 122-133.
- [13] 阮静,沈洁,汪铮,等.调控量子点对小鼠胚胎干细胞活性影响的研究[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2011, 30(1): 24-28.
- [14] 夏欣一,杨滨,熊婷,等.反复自然流产患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的检测[J]. *中华男科学杂志*, 2008, 14(12): 1106-1108.
- [15] ROWE J H, ERTELT J M, XIN L, et al. Regulatory T cells and the immune pathogenesis of prenatal infection[J]. *Reproduction*, 2013, 146(6): 191-203.

(童颖丹 编辑)