

## 甲醛和苯单独及联合染毒对小鼠神经系统的毒性作用

刘晓丽, 原福胜\*, 张文珍, 张志红, 白剑英, 赵五红, 梁瑞峰

**摘要:** [目的] 研究甲醛和苯单独及联合染毒对小鼠神经系统的毒性作用, 为综合评价甲醛和苯的联合毒性提供科学依据。[方法] 选用健康清洁级昆明种纯系小鼠 60 只, 随机分为 10 组, 每组 6 只, 雌雄各半, 分别是阴性对照组(清洁空气)(G0); 低( $1\text{ mg}/\text{m}^3$ )(G1), 中( $3\text{ mg}/\text{m}^3$ )(G2), 高( $5\text{ mg}/\text{m}^3$ )(G3)剂量甲醛组; 低( $500\text{ mg}/\text{m}^3$ )(G4), 中( $1500\text{ mg}/\text{m}^3$ )(G5), 高( $2500\text{ mg}/\text{m}^3$ )(G6)剂量苯组; 低( $0.5\text{ mg}/\text{m}^3$ 甲醛 + $250\text{ mg}/\text{m}^3$ 苯)(G7)、中( $1.5\text{ mg}/\text{m}^3$ 甲醛 + $750\text{ mg}/\text{m}^3$ 苯)(G8)、高( $2.5\text{ mg}/\text{m}^3$ 甲醛 + $1250\text{ mg}/\text{m}^3$ 苯)(G9)剂量联合组。采用静式吸入染毒, 每天 2 h, 连续染毒 14 d。染毒结束后, 采用 Morris 水迷宫实验检测小鼠的学习记忆能力, 并测定脑组织的氧化损伤水平。[结果] Morris 水迷宫实验结果显示: 在定位航行实验中, 高剂量甲醛组, 中、高剂量苯组和各联合剂量组小鼠逃避潜伏期长于对照组( $P < 0.05$ ); 与甲醛、苯单独组比较, 中、高剂量联合组逃避潜伏期明显延长( $P < 0.05$ ); 在空间探索实验中, 与对照组比较, 中、高剂量甲醛组和高剂量苯组及各联合剂量组在目标象限游泳时间所占百分比减小( $P < 0.05$ ); 与甲醛、苯单独染毒组比较, 各联合剂量组在目标象限游泳时间所占百分比均明显减小( $P < 0.05$ )。甲醛和苯单独染毒中、高剂量组及各联合剂量组的 SOD 活力均低于阴性对照组( $P < 0.05$ ); 各剂量甲醛组、高剂量苯组和各联合剂量组 MDA 含量均高于其阴性对照组( $P < 0.05$ )。与甲醛、苯单独染毒组比较, 各联合剂量组 SOD 活力明显下降( $P < 0.05$ ), MDA 含量明显升高( $P < 0.05$ )。[结论] 较高剂量甲醛和苯单独染毒对小鼠神经系统有一定毒性作用, 甲醛和苯联合染毒对小鼠神经系统的毒性作用大于甲醛、苯单独染毒时的作用, 二者联合毒性可能具有协同作用。

关键词: 甲醛; 苯; 学习; 记忆; 氧化损伤

**Neurotoxicity of Joint Exposure to Formaldehyde and Benzene in Mice** LIU Xiao-li, YUAN Fu-sheng\*, ZHANG Wen-zhen, ZHANG Zhi-hong, BAI Jian-ying, ZHAO Wu-hong, LIANG Rui-feng (School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China). \*Address correspondence to YUAN Fu-sheng; E-mail: fsyuan@sohu.com

**Abstract:** [Objective] To study the neurotoxicity of joint exposure to formaldehyde and benzene in mice, so as to provide scientific basis for the synthetic evaluation of the toxicity of formaldehyde and benzene. [Methods] Sixty KM mice were randomly divided into 10 groups. The formaldehyde treatment groups were exposed at dosage of  $1\text{ mg}/\text{m}^3$ ,  $3\text{ mg}/\text{m}^3$ ,  $5\text{ mg}/\text{m}^3$ ; the benzene treatment groups were exposed at dosage of  $500\text{ mg}/\text{m}^3$ ,  $1500\text{ mg}/\text{m}^3$ ,  $2500\text{ mg}/\text{m}^3$ ; and the combined formaldehyde and benzene treatment groups were exposed at dosage of  $0.5\text{ mg}/\text{m}^3+250\text{ mg}/\text{m}^3$ ,  $1.5\text{ mg}/\text{m}^3+750\text{ mg}/\text{m}^3$ ,  $2.5\text{ mg}/\text{m}^3+1250\text{ mg}/\text{m}^3$  respectively. The mice were exposed to formaldehyde and benzene by static state inhalation in a chamber for 14 days, 2 hours a day. Then their behavior of learning and memory were tested by Morris water maze experiment and oxidative damage was detected in the cerebral tissue. [Results] Morris water maze test in space training and learning indicated that escape latency significantly extended in the high dose of formaldehyde treatment group, the moderate and high dose of benzene treatment groups and all the combined treatment groups ( $P < 0.05$ ). Compared with single exposure groups, escape latency significantly extended in the moderate and high dose of combined treatment groups ( $P < 0.05$ ). In space exploration experiments, the proportion of time of the target quadrant in the moderate and high dose of formaldehyde treatment groups, the high dose of benzene treatment group, and all the combined treatment groups were less than the negative control groups ( $P < 0.05$ ). The proportion of time of the target quadrant in the every dose of combined treatment groups were significantly decreased compared with single exposure ( $P < 0.05$ ). The activities of SOD in the moderate and high-dose formaldehyde and benzene treatment groups and all the joint exposure groups were decreased, while the contents of MDA increased in the high dose of benzene treatment group, all the formaldehyde's and joint exposure groups increased. Compared with formaldehyde or benzene exposure groups, the activities of SOD in joint exposure groups were significantly decreased ( $P < 0.05$ ) and contents of MDA were obviously increased ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] Formaldehyde

[基金项目] 山西省自然科学基金资助项目(编号: 2009011049-2)

[作者简介] 刘晓丽(1984-), 女, 硕士生; 研究方向: 环境毒理学

[\*通信作者] 原福胜教授; E-mail: fsyuan@sohu.com

[作者单位] 山西医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 山西 太原 030001

and benzene have obvious toxic effects on central nervous system in mice. The neurotoxicity of formaldehyde and benzene combined exposure in mice is more severe than their single exposure, which may be caused by synergistic toxic effect.

**Key Words:** formaldehyde; benzene; learning; memory; oxidative damage

近年来,由室内装修引起的室内空气污染问题日趋严重。甲醛和苯是室内主要挥发性有机物,不仅污染水平高,而且生物毒性大,可能对暴露人群产生联合毒性效应。目前,国内外大量研究资料表明,甲醛和苯具有神经毒性。谢永玲等<sup>[1]</sup>报道,暴露于胶合板释放物甲醛可使染毒组小鼠学习及测试阶段通过迷宫时间延长,犯错误次数增加。苯的毒性作用比较广泛,涉及多个器官系统,急性中毒的靶器官主要是脑和肾上腺,表现出中枢神经系统的麻醉作用。目前,对甲醛和苯的单独毒性作用研究较多,但对两者的联合神经毒性效应和机制研究较少。为探讨甲醛和苯联合神经毒性作用,本研究拟采用 Morris 水迷宫实验检测小鼠的学习记忆能力,并测定脑组织的氧化损伤水平,观察不同浓度甲醛和苯联合吸入染毒致小鼠神经系统毒性作用,为综合评价甲醛和苯的安全性提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

50L 静式染毒柜(山西医科大学木器厂), CD-1 大气采样器(江苏省金坛市荣华制造有限公司), Morris 水迷宫(中国医学科学院药物研究所), 电热恒温三用水浴箱(北京市永光明医疗仪器厂), VIS-7220 分光光度计(北京瑞利公司)。

37%~40% 甲醛溶液(天津市化学试剂三厂), 99.5% 苯试剂(天津市科密欧化学试剂开发中心), SOD 试剂盒、MDA 试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(均购自南京建成生物工程研究所)。

### 1.2 实验动物

采用健康清洁级昆明种纯系小鼠 60 只, 体重 18~22 g, 雌雄各半, 由山西医科大学动物中心提供[山西医学字第 070102 号], 在屏障环境中饲养(环境中的动物、饲料、饮水、垫料、空气及其它物品均需严格的微生物控制), 饲养条件为(24 ± 2) °C, 相对湿度为(55 ± 10)%。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 动物分组与染毒** 按体重将小鼠随机分为 10 组, 每组 6 只, 雌雄各半。参照小鼠吸入甲醛和苯的 LC<sub>50</sub>, 并结合本实验室预实验的情况, 染毒剂量分为对照组(清洁空气)(G0); 低(1.0 mg/m<sup>3</sup>)(G1)、中(3.0 mg/m<sup>3</sup>)(G2)、高(5.0 mg/m<sup>3</sup>)(G3) 剂量甲醛组; 低(500 mg/m<sup>3</sup>)(G4)、中(1 500 mg/m<sup>3</sup>)(G5)、高(2 500 mg/m<sup>3</sup>)(G6) 剂量苯组; 低(0.5 mg/m<sup>3</sup> 甲醛 + 250 mg/m<sup>3</sup> 苯)(G7)、中(1.5 mg/m<sup>3</sup> 甲醛 + 750 mg/m<sup>3</sup> 苯)(G8)、高(2.5 mg/m<sup>3</sup> 甲醛 + 1 250 mg/m<sup>3</sup> 苯)(G9) 剂量联合组。

采用 50L 染毒柜(顶置风扇)进行静式吸入染毒, 每天 2 h, 连续染毒 14 d。实验前先对染毒柜气密性、风扇转动性能等进行严格的检查和维修, 实验时运用胶带纸和凡士林使其达到完全密封并调整风扇转动时间以使柜内空气能够充分混匀。对小鼠进行静式染毒时, 将预定量的甲醛、苯试剂滴于纱布上, 分别放入染毒柜中, 密闭, 风扇吹 20 min 混匀, 并测定染毒柜内气体浓度。甲醛和苯浓度的测定分别采用乙酰丙酮分光光度法

和气相色谱法。

**1.3.2 Morris 水迷宫实验<sup>[2]</sup>** (1) 定位航行实验: 记录小鼠在 60 s 内从 4 个不同象限入水至发现并爬上平台的时间(以 s 记)作为训练潜伏期, 即逃避潜伏期。每天训练 1 次, 连续训练 4 d。(2) 空间探索实验: 第 5 天移走平台, 记录小鼠入水 60 s 内运动轨迹和在目标象限游泳时间所占的百分比, 作为小鼠的空间记忆能力的评价指标。

**1.3.3 脑组织 SOD 活力、MDA 含量的测定** 神经行为学测试结束后, 处死小鼠, 取其脑组织制成组织匀浆液, 离心后提取上清液。SOD 活力测定采用黄嘌呤氧化酶法, 在波长 550 nm 处读取光密度值, SOD 活力以 U/mg 蛋白质表示; MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法, 在波长 532 nm 处读取光密度值, MDA 含量以 nmol/mg 蛋白质表示; 蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法, 在波长 595 nm 读取光密度值, 蛋白含量以 g/L 表示。

### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计处理, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析和 LSD 法进行统计分析, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 小鼠 Morris 水迷宫学习记忆能力变化

**2.1.1 定位航行实验** 由表 1 可见, 高剂量甲醛组, 中、高剂量苯组和各剂量联合组小鼠逃避潜伏期均长于对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与甲醛、苯单独组比较, 中、高剂量联合组逃避潜伏期明显延长, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.1.2 空间探索实验** 由表 1 可见, 对照组在目标象限游泳时间所占的百分比最大, 中、高剂量甲醛组, 高剂量苯组及各剂量联合组与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与甲醛、苯单独组比较, 各剂量联合组在目标象限游泳时间所占的百分比明显减小, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 各组小鼠 Morris 水迷宫学习记忆能力比较( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Learning and memory capacity of Morris water maze in different groups of mice ( $n = 6$ , Mean  $\pm$  SD)

| 组别<br>Group | 逃避潜伏期(s)<br>Escape latency  | 目标象限游泳时间百分比(%)<br>Target of quadrant |
|-------------|-----------------------------|--------------------------------------|
|             |                             | 对照组<br>Control group                 |
| G0          | 34.67 ± 5.77                | 39.77 ± 4.26                         |
| G1          | 36.52 ± 9.37                | 33.44 ± 7.69                         |
| G2          | 39.69 ± 4.19                | 27.46 ± 6.29 <sup>a</sup>            |
| G3          | 44.42 ± 2.49 <sup>a</sup>   | 25.25 ± 5.27 <sup>a</sup>            |
| G4          | 36.03 ± 3.36                | 35.59 ± 7.22                         |
| G5          | 40.17 ± 4.33 <sup>a</sup>   | 33.91 ± 3.95                         |
| G6          | 43.58 ± 2.57 <sup>a</sup>   | 26.75 ± 3.07 <sup>a</sup>            |
| G7          | 40.74 ± 6.48 <sup>a</sup>   | 22.09 ± 5.13 <sup>abc</sup>          |
| G8          | 45.82 ± 2.97 <sup>abc</sup> | 17.13 ± 2.60 <sup>abc</sup>          |
| G9          | 50.56 ± 2.72 <sup>abc</sup> | 14.37 ± 1.76 <sup>abc</sup>          |

[注] <sup>a</sup>: 与对照组比较(Compared with control group),  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>: 与甲醛组比较(Compared with formaldehyde treatment groups),  $P < 0.05$ ; <sup>c</sup>: 与苯组比较(Compared with benzene treatment groups),  $P < 0.05$ 。

## 2.2 小鼠脑组织中SOD活力及MDA含量变化

由表2可见,甲醛和苯单独染毒中、高剂量组和各剂量联合组的SOD活力均低于对照组( $P < 0.05$ );甲醛各剂量组、高剂量苯组和各联合剂量组MDA含量高于阴性对照组( $P < 0.05$ )。与甲醛、苯单独组比较,各联合剂量组SOD活力明显下降,MDA含量明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表2 各组小鼠脑组织SOD活力、MDA含量的情况( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The activities of SOD and the contents of MDA in brain of different groups of mice ( $n = 6$ , Mean  $\pm$  SD)

| 组别<br>Group | SOD活力(U/mg pro)<br>The activities of SOD | MDA含量(n mol/mg pro)<br>The concentrations of MDA |
|-------------|--|--|
| G0          | 123.08 $\pm$ 13.61                       | 1.72 $\pm$ 0.43                                  |
| G1          | 111.26 $\pm$ 23.14                       | 2.64 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>                     |
| G2          | 97.72 $\pm$ 14.99 <sup>a</sup>           | 2.73 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>                     |
| G3          | 90.76 $\pm$ 10.76 <sup>a</sup>           | 3.21 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>                     |
| G4          | 112.98 $\pm$ 4.70                        | 1.61 $\pm$ 0.44                                  |
| G5          | 105.56 $\pm$ 5.17 <sup>a</sup>           | 2.04 $\pm$ 0.37                                  |
| G6          | 103.05 $\pm$ 8.27 <sup>a</sup>           | 2.28 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>                     |
| G7          | 93.05 $\pm$ 5.17 <sup>abc</sup>          | 3.22 $\pm$ 0.52 <sup>abc</sup>                   |
| G8          | 85.27 $\pm$ 7.23 <sup>abc</sup>          | 4.16 $\pm$ 0.38 <sup>abc</sup>                   |
| G9          | 77.88 $\pm$ 7.71 <sup>abc</sup>          | 5.01 $\pm$ 0.41 <sup>abc</sup>                   |

[注]a: 与对照组比较(Compared with control group),  $P < 0.05$ ; b: 与甲醛组比较(Compared with formaldehyde treatment groups),  $P < 0.05$ ; c: 与苯组比较(Compared with benzene treatment groups),  $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

甲醛和苯都是挥发性有机化合物,是装饰材料中的常用化学品,已成为我国室内主要空气污染物。大量流行病学调查和动物实验显示,甲醛和苯具有神经毒性<sup>[3-4]</sup>,因此,研究两者的联合神经毒性效应及其发生机制具有重要意义。

Morris水迷宫实验是一种用于检测空间学习、记忆能力的实验,可以系统、全面地考察实验动物空间认知加工的过程,客观地反映其认知水平,可对动物的主动回避反应能力进行检测<sup>[5]</sup>。本研究用Morris水迷宫实验检测甲醛和苯联合吸入染毒对小鼠学习记忆能力的影响。结果显示,定位航行实验中,高剂量甲醛组,中、高剂量苯组和各剂量联合组小鼠逃避潜伏期长于对照组;与甲醛单独组比较,中、高剂量联合组逃避潜伏期也明显延长。空间探索实验中,对照组在目标象限游泳时间所占百分比最大,中高剂量甲醛组、高剂量苯组及各剂量联合组与对照组比较明显减小;与甲醛、苯单独组比较,各剂量联合组在目标象限游泳时间所占百分比明显减小。提示单独吸入较高浓度的甲醛和苯可使小鼠学习记忆能力下降,高剂量组表现更明显;与甲醛、苯单独染毒相比,联合吸入染毒对小鼠学习记忆能力的影响比单独染毒时明显,即甲醛和苯联合染毒对小鼠神经功能造成了更严重的损伤,两者联合对神经毒性有协同作用。

脂质过氧化损伤是许多毒物毒作用的损伤机制之一,发生

在细胞膜性组分并由自由基介导的脂质过氧化可导致细胞结构破坏、组织内容物外溢、细胞死亡的过程。SOD是体内抗氧化体系的关键酶,其活力是判断组织器官氧化损伤分子机制和损伤程度的一项重要生物学指标。MDA是脂质过氧化作用的最终分解产物之一,其含量可以间接地反映机体细胞受自由基攻击的严重程度<sup>[6]</sup>。本实验分别对甲醛和苯单独及联合染毒后小鼠脑组织中的SOD活力和MDA含量进行测定,结果显示,甲醛和苯单独吸入可引起小鼠脑组织SOD活力下降、MDA含量升高,较高剂量组更可引起明显的脂质过氧化损伤。已有资料证实,苯和甲醛都与机体脂质过氧化的关系密切<sup>[7]</sup>,本研究结果与之一致。与甲醛和苯单独染毒组比较,联合染毒组SOD活力明显下降、MDA含量明显升高,即甲醛和苯联合染毒对小鼠脑组织的氧化损伤程度比其单独作用时严重,两者表现为协同作用,从而导致机体氧化-抗氧化防御系统平衡失调。脑组织中增多的氧自由基可以攻击膜结构的磷脂不饱和脂肪酸,生成大量脂质过氧化物,损伤脑细胞及亚细胞膜,破坏细胞的正常功能,导致脑组织损伤,进而影响神经系统功能和活动,影响小鼠学习记忆能力,这可能是甲醛和苯联合染毒致神经系统损伤的机制之一。

综上所述,较高剂量的甲醛和苯吸入可引起小鼠学习记忆能力下降,联合染毒对小鼠神经系统毒性作用大于甲醛、苯单独染毒时的作用,两者对小鼠神经系统的毒性作用可能具有协同性,小鼠脑组织脂质过氧化损伤可能是甲醛和苯联合染毒致神经系统毒性作用的机制之一。

## 参考文献:

- [1] 谢永玲, 刘英华, 刘克明, 等. 胶合板释放物甲醛对小鼠神经行为功能的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24(7): 433-435.
- [2] 林雪玲, 程朝辉, 黄才欢, 等. 茶氨酸对小鼠学习记忆能力的影响[J]. 食品科学, 2004, 25(5): 171-173.
- [3] 施健, 朱士新, 童智敏, 等. 甲醛对职业接触工人健康效应的流行病学调查[J]. 中国职业医学, 2006, 33(3): 237-238.
- [4] MALEK F A, MÖRITZ K U, FANGHÄNEL J, et al. Effect of a single inhalative exposure to formaldehyde on the open field behavior of mice [J]. Int J Hyg Environ Health, 2004, 207(2): 151-158.
- [5] 胡镜清, 温泽淮, 赖世隆. Morris水迷宫检测的记忆属性与方法学初探[J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(2): 117-119, 187.
- [6] DIZDAROGLU M. Introduction to serial reviews on oxidative DNA damage and repair[J]. Free Radic Biol Med, 2002, 32(8): 677.
- [7] 李玲, 李铁骥, 于光艳, 等. 苯和甲醛联合染毒小鼠外周血象和超氧化物歧化酶活力的变化[J]. 中国职业医学, 2006, 33(4): 320-321.

(收稿日期: 2009-09-24)

(编辑: 洪琪; 校对: 徐新春)