

甲醛和苯联合吸入致雄性小鼠骨髓细胞的遗传毒性

张文珍, 原福胜*, 刘晓丽, 杨守林, 张志红, 白剑英, 梁瑞峰, 赵五红

摘要: [目的] 研究甲醛和苯联合吸入染毒对雄性小鼠骨髓细胞的遗传毒性作用。为评价甲醛和苯的安全性提供科学依据。[方法] 60 只健康清洁级昆明种纯系雄性小鼠, 随机分为 10 组, 每组 6 只。各组分别为阴性对照组(清洁空气), 甲醛低(1.0 mg/m³)、中(3.0 mg/m³)、高(5.0 mg/m³)剂量组; 苯低(500.0 mg/m³)、中(1 500.0 mg/m³)、高(2 500.0 mg/m³)剂量组, 联合染毒低(0.5 mg/m³ 甲醛 + 250.0 mg/m³ 苯)、中(1.5 mg/m³ 甲醛 + 750.0 mg/m³ 苯)、高(2.5 mg/m³ 甲醛 + 1 250.0 mg/m³ 苯)剂量组。采用静式吸入染毒, 每天 2 h, 连续 14 d。染毒结束次日处死小鼠, 采用微核试验和单细胞凝胶电泳试验(彗星试验)检测甲醛和苯单独或联合染毒致骨髓细胞的遗传毒性。[结果] 与阴性对照组相比, 甲醛、苯单独及联合染毒各剂量组均呈现骨髓细胞微核率升高、彗星尾部 DNA 含量增多、尾距增大($P < 0.05$)。与相应单独染毒组相比, 联合染毒各剂量组骨髓细胞微核率明显升高($P < 0.05$); 联合染毒低、中剂量组彗星尾部 DNA 含量增多、尾距增大($P < 0.05$); 联合染毒高剂量组彗星尾部 DNA 含量和尾距高于甲醛高剂量染毒组($P < 0.05$), 与苯高剂量染毒组比较, 其差异无统计学意义。[结论] 甲醛和苯联合吸入染毒对雄性小鼠骨髓细胞的遗传损伤作用大于甲醛、苯单独染毒时的作用, 二者对雄性小鼠骨髓细胞的联合遗传毒性作用可能具有协同作用。

关键词: 甲醛; 苯; 骨髓细胞; 遗传毒性

Genotoxicity of Formaldehyde and Benzene Joint Inhalation on Bone-marrow Cells of Male Mice
ZHANG Wen-zhen, YUAN Fu-sheng*, LIU Xiao-li, YANG Shou-lin, ZHANG Zhi-hong, BAI Jian-ying, LIANG Rui-feng, ZHAO Wu-hong (School of Public Health, Shanxi Medical University, Shanxi Taiyuan, 030001, China). *Address correspondence to YUAN Fu-sheng; E-mail: fsyuan@sohu.com

Abstract: [Objective] To explore genotoxicity of formaldehyde and benzene joint inhalation on bone-marrow cells of male mice, and to provide a scientific basis about evaluating the safety exposure to formaldehyde and benzene. [Methods] Sixty healthy and clean Kunming inbred strain male mice were randomly divided into 10 groups with 6 mice in each group. The negative control group were exposed to clean air. The 3 formaldehyde treatment groups were exposed to formaldehyde at dosage of 1.0 mg/m³ (the low dose group), 3.0 mg/m³ (the moderate dose group), or 5.0 mg/m³ (the high dose group). The benzene treatment groups were exposed to benzene at dosage of 500.0 mg/m³ (the low dose group), 1 500.0 mg/m³ (the moderate dose group), or 2 500.0 mg/m³ (the high dose group). The joint treatment groups of formaldehyde and benzene were exposed to those at dosage of 0.5+250.0 mg/m³ (formaldehyde+benzene), 1.5+750.0 mg/m³, and 2.5+1 250.0 mg/m³ respectively. The treatments were conducted by static inhaling for two consecutive weeks, two hours a day, then the mice were killed on 15th day. The genotoxicity of formaldehyde and benzene was tested by micronucleus assay and single cell gel electrophoresis (comet assay). [Results] Compared with the negative control group, micronucleus rate, tail DNA% and tail moment in each dose group of formaldehyde or benzene exposure groups and joint exposure groups were much higher ($P < 0.05$). Compared with single exposure groups, the micronucleus rate of each dose group of the joint exposure groups was much higher ($P < 0.05$), the tail DNA% and tail moment in the low dose group and the moderate dose group of the joint exposure groups were much higher ($P < 0.05$). The tail DNA% and tail moment in the high dose group of the joint exposure groups were much higher than single formaldehyde high dose group ($P < 0.05$), but not higher than single benzene high dose group. [Conclusion] The genotoxic effect of combined exposure to formaldehyde and benzene on the bone-marrow cells of the male mice was more severe than that of the single exposure, which may be caused by the synergistic toxic effect.

Key Words: formaldehyde; benzene; bone-marrow cells; genotoxicity

[基金项目] 山西医科大学科技创新基金(编号: 01200720)

[作者简介] 张文珍(1985-), 女, 硕士生; 研究方向: 环境毒理学; E-mail: zhangwenzhen0523@163.com

[*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

甲醛和苯是我国室内环境的主要污染物, 二者不仅污染水平高, 而且生物毒性大, 均具有致突变性, 其对健康的危害日益受到普遍关注。目前有关甲醛和苯联合遗传毒性作用及其机制的研究较少。本研究通过甲醛和苯单独、联合吸入染毒试验探讨甲醛和苯联合染毒对小鼠骨髓细胞的遗传毒性效应及其机制, 为室内环境污染研究提供理论参考。

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 型大气采样器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); BX51 荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司); DYY-7C 电泳仪(北京市六一仪器厂); DYCP-33A 电泳槽(北京市六一仪器厂)。Giemsa 染液(上海索莱宝生物科技有限公司); 正常熔点琼脂糖(NMPA)、低熔点琼脂糖(LMPA)(Amresco 公司); 十二烷基肌氨酸钠(SLS)(Amresco 公司); 三羟甲基氨基甲烷(Tris)(Sigma 公司); 二甲基亚砜(天津市化学试剂一厂); Triton-x-100(Amresco 公司); 乙二胺四乙酸二钠盐(Na₂-EDTA)(北京化工厂); 溴化乙锭(EB)(Amresco 公司); 0.4% 台盼蓝溶液(Sigma 公司); 甲醛(分析纯, 天津市化学试剂三厂); 苯(分析纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心); 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物

选择健康清洁级昆明种纯系雄性小鼠 60 只, 体重 18~22 g, 由山西医科大学动物中心提供(许可证号: 山西医学字第 070102 号), 在屏蔽环境(该系统中的动物、饲料、饮水、垫料、空气及其他物品均需进行严格的微生物控制)中进行饲养。饲养条件: 温度(24±2)℃, 相对湿度(55±10)%。

1.3 方法

1.3.1 动物分组和染毒 按体重将小鼠随机分为 10 组, 每组 6 只。各组染毒剂量根据小鼠吸入甲醛和苯的 LC₅₀, 并结合本实验室预实验的情况设计。甲醛低(1.0 mg/m³, F1)、中(3.0 mg/m³, F2)、高(5.0 mg/m³, F3)剂量组; 苯低(500.0 mg/m³, B1)、中(1 500.0 mg/m³, B2)、高(2 500.0 mg/m³, B3)剂量组; 联合低(0.5 mg/m³ 甲醛+250.0 mg/m³ 苯, J1)、中(1.5 mg/m³ 甲醛+750.0 mg/m³ 苯, J2)、高(2.5 mg/m³ 甲醛+1 250.0 mg/m³ 苯, J3)剂量组; 阴性对照组(清洁空气, C)。采用静式吸入染毒, 每天 2h, 连续 14d。染毒结束次日, 处死小鼠, 无菌取出小鼠股骨骨髓。

1.3.2 微核试验 小鼠处死后取股骨骨髓、涂片、固定、染色、每只小鼠镜检 1 000 个嗜多染红细胞(PCE)、记录微核数、计算微核率[微核率=(微核数/嗜多染红细胞数)×1000‰]。

1.3.3 彗星试验 采用单细胞凝胶电泳技术, 按文献[1, 2]方法操作并稍加改进。取股骨骨髓制成单细胞悬液, 在全磨砂载玻片上铺 3 层凝胶, 将凝胶在 4℃ 下于裂解液中裂解 1h 后, 在 25V、300mA 碱性条件下电泳 20min, 用 EB(20 μg/mL)染色, 24h 内在 BX51 荧光显微镜下以目镜(10×)、物镜(20×)观察。每一剂量组每一个样本至少做两张片子, 随机拍摄 50 个细胞, 用 CASP 彗星图像分析软件测量彗星细胞尾部 DNA 含量及彗星细胞尾距。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 10.0 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 甲醛、苯染毒对小鼠骨髓细胞微核率的影响(表 1)

甲醛、苯单独及联合染毒各剂量组骨髓细胞微核率均高于阴性对照组($P < 0.05$); 与相应单独染毒组相比, 联合染毒各

剂量组骨髓细胞微核率均升高($P < 0.05$)。

表 1 甲醛、苯吸入对小鼠骨髓细胞微核率的影响($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of formaldehyde and benzene inhalation on micronucleus rate of bone-marrow cells of mice($n = 6, \text{Mean} \pm \text{SD}$)

组别 Group	剂量(mg/m ³)(Dose)		微核数(个) Micronucleus number	微核率(‰) Micronucleus rate
	甲醛 Formaldehyde	苯 Benzene		
C	0.0	0.0	25.0	4.17 ± 1.67
F1	1.0	0.0	61.0	10.17 ± 2.14 ^a
F2	3.0	0.0	116.0	19.33 ± 2.07 ^a
F3	5.0	0.0	128.0	21.33 ± 2.34 ^a
B1	0.0	500.0	69.0	11.50 ± 2.17 ^a
B2	0.0	1 500.0	122.0	20.33 ± 2.42 ^a
B3	0.0	2 500.0	137.0	22.83 ± 3.19 ^a
J1	0.5	250.0	120.0	20.00 ± 2.83 ^{abc}
J2	1.5	750.0	148.0	24.67 ± 2.07 ^{abc}
J3	2.5	1 250.0	169.0	28.17 ± 2.14 ^{abc}

[注]^a: 与阴性对照组比较(each exposure group compared with negative control group), $P < 0.05$; ^b: 联合染毒低、中、高剂量组分别与甲醛单独染毒低、中、高剂量组比较(the low dose group, the moderate dose group and the high dose group of the joint exposure groups were compared with corresponding formaldehyde exposure groups), $P < 0.05$; ^c: 联合染毒低、中、高剂量组分别与苯单独染毒低、中、高剂量组比较(the low dose group, the moderate dose group and the high dose group of the joint exposure groups were compared with corresponding benzene exposure groups), $P < 0.05$ 。

2.2 甲醛、苯染毒对小鼠骨髓细胞的 DNA 损伤作用(表 2)

表 2 甲醛、苯吸入对小鼠骨髓细胞的 DNA 损伤作用($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Damage effect of formaldehyde and benzene inhalation on DNA of bone-marrow cells of mice($n = 6, \text{Mean} \pm \text{SD}$)

组别 Group	剂量(mg/m ³)(Dose)		彗尾 DNA 含量 Tail DNA%	彗星细胞尾距 Tail moment
	甲醛 Formaldehyde	苯 Benzene		
C	0.0	0.0	9.45 ± 1.45	3.97 ± 0.18
F1	1.0	0.0	16.62 ± 2.77 ^a	12.85 ± 2.93 ^a
F2	3.0	0.0	30.69 ± 7.58 ^a	25.01 ± 8.61 ^a
F3	5.0	0.0	22.01 ± 4.67 ^a	12.31 ± 4.39 ^a
B1	0.0	500.0	17.07 ± 1.61 ^a	13.46 ± 1.21 ^a
B2	0.0	1 500.0	31.06 ± 13.86 ^a	27.06 ± 12.93 ^a
B3	0.0	2 500.0	32.28 ± 10.74 ^a	30.15 ± 11.29 ^a
J1	0.5	250.0	24.44 ± 7.78 ^{abc}	23.30 ± 7.90 ^{abc}
J2	1.5	750.0	45.89 ± 10.39 ^{abc}	63.34 ± 11.03 ^{abc}
J3	2.5	1 250.0	24.99 ± 7.26 ^{ab}	26.66 ± 7.90 ^{ab}

[注]^a: 与阴性对照组比较(each exposure group compared with negative control group), $P < 0.05$; ^b: 联合染毒低、中、高剂量组分别与甲醛单独染毒低、中、高剂量组比较(the low dose group, the moderate dose group and the high dose group of the joint exposure groups were compared with corresponding formaldehyde exposure groups), $P < 0.05$; ^c: 联合染毒低、中、高剂量组分别与苯单独染毒低、中、高剂量组比较(the low dose group, the moderate dose group and the high dose group of the joint exposure groups were compared with corresponding benzene exposure groups), $P < 0.05$ 。

甲醛、苯单独及联合染毒各剂量组彗星细胞尾部 DNA 含量和尾距均高于阴性对照组 ($P < 0.05$)。与相应单独染毒组相比,联合染毒低、中剂量组的彗星细胞尾部 DNA 含量增多、尾距增大 ($P < 0.05$);而联合染毒高剂量组彗星尾部 DNA 含量和尾距高于甲醛高剂量染毒组 ($P < 0.05$),与苯高剂量染毒组比较,其差异无统计学意义。

3 讨论

近年来,由室内装修引起的室内空气污染问题日趋严重,已成为危害公共健康的重要环境因素之一。甲醛和苯是人类致癌物^[3],现已成为室内空气污染物的主要成分,是我国室内空气质量的主要评价指标。二者常以较高的浓度共存于室内,所造成的遗传毒性倍受人们的重视。

微核是染色体的断片在细胞有丝分裂后期,不能进入子代细胞细胞核中,而在间期的子代细胞胞质内形成的游离团块物质,它与细胞主核染色一致,呈圆形或椭圆形。其生物学本质是遗传物质 DNA 遭到损伤破坏的结果。微核发生率是检测细胞遗传损伤的重要指标。本实验通过对小鼠进行甲醛和苯单独及联合吸入染毒,测定其骨髓嗜多染红细胞微核率,结果显示,甲醛和苯单独染毒均可引起小鼠骨髓细胞微核率增高,与阴性对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且随着染毒剂量的增加骨髓细胞微核率上升。这与有关文献资料一致^[4-5]。提示甲醛和苯对小鼠骨髓细胞具有遗传损伤效应,甲醛和苯可以干扰纺锤丝的功能,或作用于染色体的化学键,使染色体断裂形成微核,还可以引起机体 DNA 单链断裂,导致 DNA 损伤,引起微核率升高。联合染毒各剂量组骨髓细胞微核率明显高于阴性对照组,且联合染毒的低、中、高剂量组分别高于相应的单独染毒组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),表明甲醛和苯联合染毒造成小鼠骨髓细胞遗传损伤更严重,二者对骨髓细胞的联合遗传毒性表现为协同作用,其协同作用机制有待于进一步研究。由于在较低浓度时,未能发现遗传毒性,并结合本实验室预实验的情况,本次实验染毒剂量较高。

单细胞凝胶电泳技术是在核酸沉淀法和晕圈分析等基础上发展起来的一种在单细胞水平上检测有核细胞 DNA 断裂的新技术,具有快速、灵敏、简便的特点。本研究通过彗星试验检测甲醛和苯联合染毒对小鼠骨髓细胞的 DNA 断裂作用,实验结果表明,与阴性对照组相比,甲醛和苯单独及联合染毒各剂量组骨髓细胞核 DNA 断裂,断片增多,拖尾现象明显,彗星细胞尾部 DNA 含量增多,尾距增大,证实甲醛和苯单独及联合染毒均可诱导骨髓细胞 DNA 断裂。同时本研究发现,甲醛组随着染毒浓度的增加,高剂量组彗星细胞尾部 DNA 含量和尾距

低于中剂量组,可能与甲醛的浓度有关,在高剂量甲醛作用下,部分细胞 DNA 和蛋白质发生了交联作用,骨髓细胞核 DNA 泳出受阻,在核内集聚,从而使部分细胞不出现拖尾现象^[6]。与相应的单独染毒组比较,联合染毒低剂量组与中剂量组彗星细胞尾部 DNA 含量增加、尾距增大,且与甲醛高剂量染毒组比较,联合高剂量组彗星细胞尾部 DNA 含量增加、尾距增大,提示甲醛和苯协同作用于骨髓细胞使其产生较严重的 DNA 断裂。而联合高剂量组彗星细胞尾部 DNA 含量和尾距低于苯高剂量染毒组,可能与甲醛诱导骨髓细胞 DNA-蛋白质交联物形成有关^[7-8],其联合作用机制有待于进一步研究。无论 DNA 交联还是 DNA 断裂,其结果均提示甲醛和苯均能对骨髓细胞 DNA 产生一定的毒性。如果这两种 DNA 损伤类型同时发生在骨髓细胞中,其最终结果可能引起彼此增加各自所引起的 DNA 损伤程度。分析结果提示,甲醛和苯联合作用于骨髓细胞 DNA,可能引起其损伤的协同作用。

综上所述,甲醛和苯单独及联合染毒均可导致小鼠骨髓细胞遗传损伤。且联合染毒对小鼠的遗传损伤作用大于其单独染毒时的作用,二者联合遗传毒性可能具有协同作用。

参考文献:

- [1] TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing[J]. Environ Mol Mutagen, 2000, 35(3): 206-221.
- [2] 朱文文, 王晓涛. DNA 损伤检测—单细胞凝胶电泳技术的研究[J]. 微量元素与健康研究, 2007, 24(3): 6-7.
- [3] WHO. International Agency for Research on Cancer, classifies formaldehyde as carcinogenic to humans[R]. Geneva: WHO, 2004.
- [4] 池莉平, 简洁莹, 刘锐. 苯诱导小鼠骨髓嗜多染红细胞微核的研究[J]. 中国热带医学, 2007, 7(8): 1490.
- [5] 王晓平, 段丽菊, 赵倩, 等. 气态甲醛致小鼠微核作用的实验研究[J]. 现代预防医学, 2006, 33(1): 1-3.
- [6] 杨丹凤, 龚著革, 张华山, 等. 典型醛类污染物单独及联合作用对小鼠脾淋巴细胞 DNA 损伤的离体实验研究[J]. 卫生研究, 2000, 29(1): 30-32.
- [7] 周建华, 胡晓磐, 徐瑛, 等. 甲醛致淋巴细胞 DNA 交联作用的体内外实验研究[J]. 工业卫生与职业病, 2004, 30(6): 360-363.
- [8] 陆肇红, 时锡金, 周建华. 苯与甲醛致小鼠睾丸细胞 DNA 损伤联合作用[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(12): 1498-1499.

(收稿日期: 2009-10-20)

(编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)