

甲醛和乙苯联合染毒对小鼠脑组织 DNA 的损伤

申梦童, 原福胜

摘要: [目的] 探讨不同浓度甲醛和乙苯单独及联合染毒对小鼠脑组织 DNA 的损伤作用, 分析其联合作用的类型。

[方法] 采用 4×4 析因设计, 利用单细胞凝胶电泳实验方法, 研究甲醛 (0、0.2、2.0、20.0 mg/kg) 和乙苯 (0、50、250、500 mg/kg) 单独以及二者联合染毒后小鼠脑组织 DNA 的损伤情况。[结果] 甲醛和乙苯单独及联合染毒组小鼠脑细胞彗星拖尾率、尾部 DNA 含量和尾矩均高于对照组 ($P < 0.05$); 彗星细胞拖尾率随染毒剂量的增加而增大, 高剂量联合组小鼠的拖尾率高于其他各组 ($P < 0.05$); 尾部 DNA 含量和尾矩均随乙苯剂量的增加而增大; 低、中剂量染毒组的尾部 DNA 含量和尾矩随着甲醛剂量的增加而增大, 但高剂量组减小; 二者之间存在交互作用 ($P < 0.05$)。[结论] 甲醛和乙苯均可对小鼠脑组织造成 DNA 的损伤, 联合染毒组的脑组织损伤程度重于单独染毒组, 二者的联合效应表现为协同作用。

关键词: 甲醛; 乙苯; 脑组织; DNA 损伤

Toxicity of Combined Exposure to Formaldehyde and Ethylbenzene on DNA Damage in Brain Cells of Mice SHEN Meng-tong, YUAN Fu-sheng (Department of Environmental Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China). Address correspondence to YUAN Fu-sheng, E-mail: fsyuan@sohu.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the toxicity of single or combined exposure to formaldehyde and ethylbenzene on DNA damage in brain cells of mice and to analyze the type of joint toxic effect. [Methods] Based on a 4×4 factorial experiment design, single cell gel electrophoresis (SCGE) technique was used to investigate DNA damage in mice brain cells exposed to formaldehyde (0, 0.2, 2.0, and 20.0 mg/kg), ethylbenzene (0, 50, 250, and 500 mg/kg), and both. [Results] Compared with the control group, the comet cells ratio, the percentage of tail DNA, and the Olive tail moment in all exposure groups increased significantly ($P < 0.05$). The comet cells ratio showed a significant upward tendency with increasing chemicals' doses, and was significantly elevated in the group treated with high-dose mixture compared with the other exposure groups ($P < 0.05$). The percentage of tail DNA and the Olive tail moment were also increased as the dose of ethylbenzene or formaldehyde increased, but not in the group treated with high dose of formaldehyde. An interaction between toxic effects of formaldehyde and ethylbenzene was identified ($P < 0.05$). [Conclusion] Formaldehyde and ethylbenzene could cause DNA damage in mice brain cells and the joint exposure show severer effect than either single exposure. The joint toxic effect on DNA damage appears to be synergistic.

Key Words: formaldehyde; ethylbenzene; brain tissue; DNA damage

随着人们住房装修档次的不断提高, 木质胶合板、油漆、涂料等装修材料的使用量也越来越大, 室内空气污染造成的对人体健康的危害也逐渐引起人们重视^[1]。甲醛和苯系物是室内空气污染的主要物质, 关于二者对人体的危害已有颇多研究; 但是对于苯系物中的乙苯, 以及乙苯与甲醛联合作用的神经毒性, 还少有报道。本研究拟通过对小鼠进行不同浓度的甲醛和乙苯单独及联合染毒, 研究其对小鼠脑组织 DNA 的损伤作用, 并分析二者的联合作用类型。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

甲醛, 分析纯, 天津市化学试剂三厂; 乙苯, 分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司; 正常熔点琼脂糖 (NMPA)、低熔点

琼脂糖 (LMPA), 美国 Amresco 公司; 十二烷基肌氨酸钠 (SLS), 美国 Amresco 公司; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 美国 Sigma 公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 天津市化学试剂一厂; TritonX-100, 美国 Amresco 公司; 乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA-2Na), 北京化工厂; 溴化乙锭 (Ethidium bromide, EB), 美国 Amresco 公司。

1.2 主要仪器

低速自动平衡离心机, 北京时代北利离心机有限公司; 超低温高速冷冻离心机, 香港力康发展有限公司; 电热恒温三用水浴箱, 北京市永光明医疗仪器厂; DYY-7C 电泳仪及 DYCP-33A 电泳槽, 北京市六一仪器厂; BX51 荧光显微镜, 日本 Olympus 公司。

1.3 实验动物及分组染毒方法

选择健康清洁级昆明小鼠 96 只, 平均体重 (23.06 ± 1.86) g, 由山西医科大学实验动物中心提供。按照 4×4 析因设计^[2]要求, 将小鼠根据体重随机分为 16 组, 每组 6 只, 雌雄各半。为使染毒剂量精确, 采取腹腔注射染毒, 染毒容量为 10 mL/kg, 每天上午 9:00 染毒, 连续 10 d。甲醛用生理盐水配制, 乙苯用花生油配制, 对照组注射相应溶剂。具体分组及染毒剂量见表 1。

[作者简介] 申梦童 (1988—), 女, 硕士生; 研究方向: 环境卫生学; E-mail: 296shentian@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 030001

表 1 4×4 析因设计分组情况

乙苯 (mg/kg)	甲醛 (mg/kg)			
	0	0.2	2.0	20.0
0	阴性对照	甲醛低	甲醛中	甲醛高
50	乙苯低	甲醛低+乙苯低	甲醛中+乙苯低	甲醛高+乙苯低
250	乙苯中	甲醛低+乙苯中	甲醛中+乙苯中	甲醛高+乙苯中
500	乙苯高	甲醛低+乙苯高	甲醛中+乙苯高	甲醛高+乙苯高

1.4 单细胞凝胶电泳实验

染毒结束后次日处死小鼠，迅速取出脑组织，将部分脑组织用眼科剪剪成糜状，用200目尼龙网过滤，离心后弃上清，再用磷酸盐缓冲液重悬细胞并调整细胞密度，制成单细胞悬液。按照相关文献^[3-4]介绍的方法稍加改进，在全磨砂载玻片上铺3层凝胶：第一层为80μL的1.0% NMPA，第二层为70μL的0.8% LMPA 与待测细胞悬液的混合液（2：1），第三层为80μL的0.5% LMPA，每层均加盖玻片4℃冷凝10min。铺片完毕浸入新鲜冰冷的裂解液中4℃避光裂解60min，碱性电泳液中室温解旋20min，固定电压25V、电流300mA条件下电泳20min，后用中和液浸洗5min×3次。最后经溴化乙锭（EB）染色，在BX51荧光显微镜下观察、拍照。每个剂量组计数200个细胞，求出细胞拖尾率。并用CASP彗星图像分析软件分析彗星细胞尾部DNA含量及彗星细胞尾矩^[5]，每个剂量组至少随机挑选50个细胞测定。

1.5 统计分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计处理，实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用析因设计方差分析的方法分析数据，并通过单独效应的计算^[6]和二者交互影响的均值图^[7]判断其联合作用的类型。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

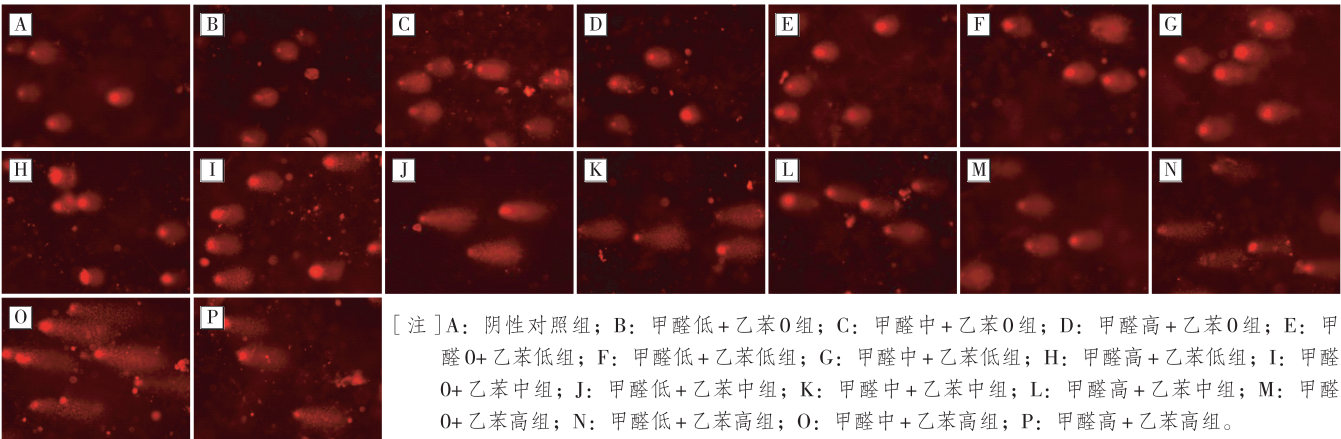


图 1 各组小鼠脑细胞彗星实验照片

表 3 各组小鼠脑细胞彗星试验方差分析结果

影响因素	细胞拖尾率(%)		彗星尾部DNA含量(%)		彗星细胞尾矩(μm)	
	F	P	F	P	F	P
甲醛	82.443	<0.001	74.004	<0.001	188.727	<0.001
乙苯	188.953	<0.001	106.992	<0.001	355.378	<0.001
甲醛+乙苯	4.770	<0.001	2.041	0.045	4.935	<0.001

2.2 DNA 损伤联合作用评价

由表3可见，甲醛和乙苯联合染毒对小鼠脑细胞的彗星

2 结果

2.1 甲醛和乙苯单独及联合染毒导致的DNA损伤情况

阴性对照组的细胞头部DNA致密，无明显尾部或尾部很短；各染毒组细胞头部DNA亮度较强，出现不同程度扫帚状拖尾现象。由表2和图1可见，单独及联合染毒组小鼠脑细胞彗星拖尾率、尾部DNA含量和尾矩均高于阴性对照组（ $P<0.05$ ）；彗星细胞拖尾率随二者染毒剂量的增加而增大，联合高剂量组小鼠的拖尾率高于其他各组（ $P<0.05$ ）；尾部DNA含量和尾矩均随乙苯剂量的增加而增大，但只有低、中剂量组随甲醛剂量的增加而增大，而高甲醛组明显减小。由表3可见，甲醛和乙苯联合染毒对小鼠脑组织DNA的损伤存在交互作用（ $P<0.05$ ）。

表 2 各组小鼠脑细胞彗星实验结果比较 ($\bar{x} \pm s, n=100 \times 6$)

指标	乙苯	甲醛			
		阴性对照	低	中	高
细胞拖尾率(%)	阴性对照	12.50±0.44	17.59±0.91*	20.01±1.85*	29.07±3.15*
	低	16.55±0.29*	22.13±1.26*	25.76±1.99*	31.77±2.92*
	中	22.93±0.97*	28.84±1.97*	33.99±1.70*	38.78±5.59*
	高	29.68±1.42*	37.72±5.46*	41.04±6.90*	55.06±8.32*
彗星尾部DNA含量(%)	阴性对照	11.32±0.85	18.29±2.07*	22.69±3.73*	15.48±2.92*
	低	16.00±1.60*	24.60±4.99*	31.27±2.56*	20.69±5.00*
	中	19.89±3.25*	31.25±3.75*	35.81±4.49*	25.73±6.73*
	高	24.42±5.87*	39.65±2.68*	48.86±2.68*	35.07±5.70*
彗星细胞尾矩(μm)	阴性对照	0.93±0.08	5.79±1.16*	8.41±1.38*	1.26±0.14*
	低	3.28±0.68*	7.03±1.11*	10.29±0.71*	5.18±0.36*
	中	7.50±0.89*	15.32±2.04*	17.87±1.79*	10.88±1.67*
	高	9.73±1.85*	19.39±1.41*	22.53±3.29*	14.39±1.61*

[注]*：与阴性对照组比较， $P<0.05$ 。

细胞拖尾率、彗星尾部DNA含量和彗星细胞尾矩的影响均存在交互作用（ $P<0.05$ ）。由表2分析彗星细胞拖尾率，以甲醛高和乙苯高联合染毒组为例，甲醛高的毒效应为16.57（29.07–12.50），乙苯高的毒效应为17.18（29.68–12.50），二者联合的毒效应42.56（55.06–12.50）大于其单独效应之和33.75（16.57+17.18）；其余组别算法同上。由此可见，二者的联合作用表现为协同作用。另外，由图2可见，甲醛和乙苯的剂量–效应曲线随剂量的增大而远离，说明甲醛和乙苯对小鼠脑组织

的细胞拖尾率影响表现为协同作用^[7]。

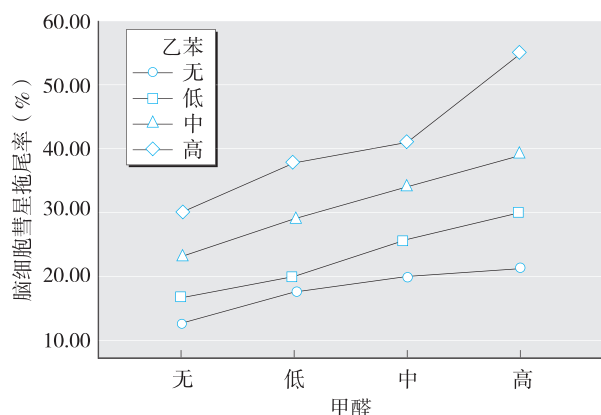


图2 甲醛和乙苯对小鼠脑细胞拖尾率交互影响的均值图

3 讨论

甲醛和苯系物是室内空气中污染最主要的两种有害物质, 已有大量流行病学调查和动物实验研究显示, 甲醛和乙苯具有神经毒性^[8-10]。彗星试验是一种在单细胞水平上检测 DNA 损伤的方法, 本研究采用彗星试验检测甲醛和乙苯对小鼠脑细胞的 DNA 损伤作用。

本研究欲探讨甲醛和乙苯对小鼠脑组织的毒性作用, 虽然室内空气污染的实际接触途径为经呼吸道吸入, 但乙苯的性质不适宜进行吸入染毒的造模方法。腹腔注射染毒后, 毒物主要经门静脉抵达肝脏后再分布到体循环, 从而进入到各个靶器官; 经吸入染毒后, 外源性毒物可直接经肺静脉进入全身血液循环, 并在全身组织器官分布。两种染毒方式均可达到本实验的主要目的, 且腹腔注射可使染毒剂量更精确, 因此本实验采用腹腔注射法进行动物染毒。

甲醛在体内首先被氧化为甲酸, 再进一步转化为二氧化碳和甲酸盐。甲醛代谢为甲酸的过程中最主要的酶类为甲醛脱氢酶, 现已发现人类的肝细胞、红细胞以及大鼠的呼吸道上皮细胞、嗅觉上皮细胞和肾、脑中都有甲醛脱氢酶存在。由此可见, 甲醛进入机体后可以进入脑组织, 从而对脑组织功能产生影响。乙苯进入人体后, 由于其脂溶性强, 故主要分布在含类脂质较多的组织和器官中, 一次性大量摄入, 大脑、肾上腺的含量最高; 中等量或长期摄入, 骨髓、脂肪和脑组织中含量较高。苯系物的活性代谢产物与 DNA 共价结合可形成加合物, 代谢产物产生的活性氧对 DNA 造成氧化物损伤, 因此乙苯可导致靶器官的 DNA 发生损伤。

实验结果中, 单独及联合染毒组小鼠脑细胞彗星拖尾率、尾部 DNA 含量和尾矩均高于阴性对照组 ($P < 0.05$), 提示, 甲醛和乙苯均可造成小鼠脑细胞 DNA 的损伤, 表现为甲醛和乙苯使小鼠脑细胞 DNA 发生断裂, 生成 DNA 断片, 从而产生拖尾现象。彗星细胞拖尾率随二者染毒剂量的增加而增大, 联合

高剂量组小鼠的拖尾率高于其他各组 ($P < 0.05$), 提示, 二者对小鼠脑细胞 DNA 的损伤存在一定的剂量-反应关系, 且联合染毒可增强彼此的毒性效应。尾部 DNA 含量和尾矩随乙苯剂量的增加而增大, 但只有低、中剂量组随甲醛剂量的增加而增大, 而高剂量组明显减小, 这种现象与文献^[11]报道的关于甲醛神经毒性的研究一致, 可能是因为高剂量甲醛可以使部分断裂的 DNA 片段发生交联, 当细胞电泳时交联的 DNA 积聚在核内, 进而出现尾部 DNA 含量降低和尾矩缩短的现象^[12]。析因设计分析结果提示, 甲醛和乙苯联合染毒对小鼠脑组织 DNA 的损伤存在交互作用 ($P < 0.05$), 且交互作用的类型可能为协同作用。

甲醛和乙苯均可致小鼠脑细胞 DNA 损伤, 且二者联合染毒对神经的损害可能具有协同作用, 因此研究甲醛和苯系物对机体神经系统的损害有重要意义。对于其联合毒性作用的机制尚不清楚, 尚有待进一步研究予以阐明。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] 许真, 金银龙. 室内空气主要污染物及健康效应[J]. 卫生研究, 2003, 5(3): 279-283.
- [2] 张蕾, 徐镜波, 杨丽. 析因试验设计在环境污染物联合毒性研究中的应用[J]. 干旱环境检测, 2004, 3(18): 20-22.
- [3] 徐钱, 杨旭, 杨光涛, 等. 不同浓度甲醛致小鼠肾细胞 DNA 损伤效应研究[J]. 环境科学学报, 2007, 27(2): 276-281.
- [4] 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, 12(22): 1498-1500.
- [5] 周砚青, 王昆, 杨光涛, 等. 甲醛致大鼠脑细胞 DNA 损伤的初步研究[J]. 公共卫生与预防医学, 2006, 17(6): 5-7.
- [6] 王君霞, 原福胜, 王鸿, 等. 甲醛和甲苯联合染毒对小鼠骨髓细胞的遗传毒性研究[J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(12): 1043-1045.
- [7] 顾兵, 王心如. 联合作用特征的评价[J]. 中国工业医学杂志, 2000, 1(13): 55-58.
- [8] THRASHER JD, KILBURN KH. Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde[J]. Arch Environ Health, 2001, 56(4): 300.
- [9] 曾昭慧, 邓海, 杨柯, 等. 乙苯吸入毒性研究[J]. 公共卫生与职业病, 1994, 20(6): 354-356.
- [10] 张明, 王廷让, 杨德一, 等. 乙苯对职业人群神经行为的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2011, 29(2): 128-130.
- [11] SHAHAME J, BOMSTEIN Y, MELTZER A, et al. DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Int J occup Environ Health, 1997, 13(2): 95-104.
- [12] GÜNTHER S, PETRA S, JOSEF H, et al. Characterization of the genotoxic potential of formaldehyde in V79 cells[J]. Mutagenesis, 2007, 22: 387-394.

(收稿日期: 2012-12-25)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 张晶; 校对: 徐新春)