

甲醛、苯单独和联合致 NIH/3T3 细胞转化的研究

肖芸, 朱丽瑾, 徐承敏, 张幸

(浙江省医学科学院, 浙江 杭州 310013)

摘要: 目的 探讨苯、甲醛单独和联合致 NIH/3T3 细胞转化活性。方法 采用细胞灶法观察甲醛、苯单独和联合致 NIH/3T3 细胞的转化作用。结果 苯、甲醛及苯和甲醛联合染毒组均有细胞转化灶形成, 其形成率均呈现剂量依赖关系。联合作用分析显示, 苯 25 $\mu\text{g/ml}$ + 甲醛 25 $\mu\text{g/ml}$ 、苯 25 $\mu\text{g/ml}$ + 甲醛 50 $\mu\text{g/ml}$ 、苯 50 $\mu\text{g/ml}$ + 甲醛 25 $\mu\text{g/ml}$ 、苯 50 $\mu\text{g/ml}$ + 甲醛 50 $\mu\text{g/ml}$, 两化合物联合作用转化率实测值分别为 3.6%、5.8%、5.7% 和 7.6%。而预期转化率分别为 3.5%、5.6%、5.6%、7.7%。说明在等剂量原则下, 苯、甲醛单独染毒的转化细胞灶形成率之和与两化合物同时染毒的转化细胞灶形成率非常接近; 析因分析表明两者间无交互作用 ($F=0.07$, $P>0.05$)。结论 苯、甲醛具有细胞转化活性, 二者联合作用类型呈相加作用。

关键词: NIH/3T3 细胞转化; 苯; 甲醛; 联合作用

中图分类号: O623.511; O625.11 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)03-0139-04

Transformation of NIH/3T3 cells induced by formaldehyde and benzene alone or in combination in vitro

XIAO Yun, ZHU Li-jin, XU Cheng-min, ZHANG Xing

(Institute of Hygiene, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Abstract Objective To investigate the role of transformation of NIH/3T3 cells induced by benzene and formaldehyde alone or in combination in vitro. **Method** Using cell-focus method to observe the induction of NIH/3T3 cells transformation by benzene and formaldehyde alone or in combination in vitro. **Result** Transformed foci of NIH/3T3 cell could be induced by benzene, formaldehyde and their collaborative exposure. The transformation rates were dose-dependent. The collaborative exposure experiment showed that the transformation rates by collaborative exposure of benzene and formaldehyde at the dosage of 25 $\mu\text{g/ml}$ + 25 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ + 50 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ + 25 $\mu\text{g/ml}$ and 50 $\mu\text{g/ml}$ + 50 $\mu\text{g/ml}$ were 3.6%, 5.8%, 5.7% and 7.6% respectively, the predicted frequencies were 3.5%, 5.6%, 5.6%, 7.7% respectively, suggesting that on the basis of equal dose principle, the transformation rates were quite close each other whether benzene and formaldehyde alone treated groups or their collaboratively treated groups. factorial analysis did not support any interaction between the two chemicals. **Conclusion** It is suggested that both benzene and formaldehyde have cell transformation activity, and the pattern of the combined effect is only additive.

Key words: NIH/3T3 cell transformation; Benzene; Formaldehyde; Combined effect

近几年, 随着室内装饰装修的盛行及生活上各种香味剂、化妆品、除臭剂、品种繁多的洗涤剂进入家庭居室, 造成室内空气的严重污染。苯和甲醛是室内空气污染物中两种主要的污染物, 均具有致癌性。但关于两者联合致癌的作用特征未见报道。本研究采用细胞灶法对苯、甲醛联合致 NIH/3T3 细胞转化活性进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

NIH/3T3 成纤维细胞株, 购自中科院上海生化细胞所。

主要试剂: 甲醛、苯、*N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍 (MNNG) 购自杭州宏博生物工程有限公司。甲

醛、MNNG 用水配成质量浓度为 1 mg/ml 的储备液, 苯用二甲基亚砜配成质量浓度为 1 mg/ml 的储备液, 滤过除菌, 4℃冰箱保存备用。超级新生牛血清, 杭州四季青生物材料工程公司产品。噻唑蓝 (MTT) 和胰蛋白酶为美国 Amresco 公司产品; RPMI1640 培养基, 美国 Gibco 公司产品。

主要仪器: 美国 Sheldon 有限公司 2300 型 CO₂ 培养箱, 日本 Olympus CKX31 型倒置显微镜, 苏州安泰空气技术有限公司 SW-CJ-1F 型洁净工作台, 瑞士 Tecan 公司 Sunrise 型酶标仪。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞毒性实验 (MTT 实验)^[1] 调整细胞密度至 5×10^4 个/ml, 接种到 96 孔板, 每孔 100 μl ; 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养 24 h, 加入不同浓度的苯、甲醛, 各设 12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$ 5 个

收稿日期: 2005-12-09; 修回日期: 2006-12-16

基金项目: 浙江省卫生厅优秀青年基金 (2003A70303E)

作者简介: 肖芸 (1970—), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 劳动卫生与环境卫生。

浓度组。同时设阴性对照组（RPMI1640 完全培养液），每组均设 8 个重复孔。37℃，5%CO₂ 条件下分别处理 8、16、24、32、40、48 h。作用时间结束前 4 h 加入 50 μl MTT，继续培养 4 h 后弃去培养液，每孔加 150 μl DMSO，振荡 5 min，充分混合以溶解细胞内紫色结晶物 Formazan（FM），在酶标仪 570 nm 波长下测定各孔吸光度（A）值。以下式间接表示细胞存活率，细胞相对存活率（%）=（试验组的吸光度值/溶剂对照组的吸光度值）× 100%，并以 Reed-Muench's 法计算细胞半数生长抑制浓度 IC₅₀。

1.2.2 细胞转化实验 分组：（1）阴性对照组，RPMI1640 完全培养液。（2）阳性对照组，MNNG。（3）苯，设 25、50、100 μg/ml 3 个剂量组。（4）甲醛，设 12.5、25、50 μg/ml 3 个剂量组。（5）联合作用，采用 2×2 析因设计，设苯 25 μg/ml+ 甲醛 25 μg/ml、苯 25 μg/ml+ 甲醛 50 μg/ml、苯 50 μg/ml+ 甲醛 25 μg/ml、苯 50 μg/ml+ 甲醛 50 μg/ml 4 个浓度组。采用细胞灶法，将制备好的细胞悬液接种于 25 ml 培养瓶中，每瓶 5×10⁴ 个细胞，每浓度组 10 瓶，24 h 后按所设计浓度染毒，3 d 后更换培养液，再染毒 3 d。每 3 d 更换培养液，至第 21 天终止培养。固定，染色，计数克隆数，观察鉴定转化灶，单盲法观察，由 2 人共同认定。转化灶的判定标准采用“第二届全国细胞和组织培养专题研讨会”通过的鉴定指标^[2]：凡有 50 个以上聚集的细胞可认为是一个细胞灶。正常细胞灶，灶内细胞排列规则，束状，细胞灶外围区的细胞单层生长，规则。转化细胞灶，灶内细胞由正

常的长梭形变为短梭状，失去接触抑制，呈复层生长，排列紊乱，形成交叉和旋涡。转化细胞经软琼脂实验、刀豆素凝集实验验证。

1.2.3 联合作用特征 采用实测转化率与预期转化率相比较的方法（两受试物单独作用的实测转化率之和为联合作用的预期转化率）。

1.3 统计学处理

MTT 实验统计学处理采用方差分析中 Dunnett's test, SPSS13.0 软件分析, 并以 Reed-Muench's 法计算细胞半数生长抑制浓度 (IC₅₀)。细胞转化实验, 两者单独作用时的转化活性用 χ² 检验; 两者联合作用类型的判定采用 2×2 析因设计, SAS9.0 统计软件分析。

2 结果

2.1 细胞毒性实验

倒置显微镜下观察，阴性对照组细胞结构完整，呈梭形、多角形，胞质透明，胞核清楚，椭圆形，细胞铺展较好，有角状突起，增殖迅速。染毒组和阳性对照组细胞在 8 h 内，细胞形态与阴性对照相比无明显改变，随着培养时间的延长，细胞逐渐出现胞体肿胀、变圆，胞核明显变大，结构不清，胞质中含有大量空泡和颗粒，铺展性和透光性差。48 h 时观察，高浓度组的细胞绝大部分崩解死亡，仅存活极少量的细胞。苯处理的 25 μg/ml、50 μg/ml、100 μg/ml 组细胞 48 h 相对存活率分别为 80%、53%、30%，细胞的 IC₅₀ 为 58.43 μg/ml。甲醛处理的 25 μg/ml、50 μg/ml、100 μg/ml 组细胞 48 h 相对存活率分别为 89%、74%、34%，甲醛处理组的 IC₅₀ 为 75.07 μg/ml。见表 1。

表 1 不同浓度的苯、甲醛对小鼠 NIH/3T3 细胞增殖的影响 (x̄±s)

Table 1 Absorbance of mouse NIH/3T3 cells treated by benzene and formaldehyde (x̄±s)

质量浓度 dose (μg/ml)	吸光度值 (Absorbance of NIH/3T3 cells)					
	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h	48 h
阴性对照						
Negative control	0.097±0.010	0.126±0.002	0.220±0.007	0.312±0.006	0.402±0.010	0.486±0.006
苯 benzene						
12.5	0.097±0.006	0.128±0.002	0.233±0.007	0.337±0.004	0.402±0.006	0.461±0.006*
25	0.101±0.006	0.131±0.003	0.207±0.011*	0.303±0.009*	0.346±0.006*	0.388±0.009*
50	0.112±0.006	0.109±0.004*	0.152±0.005*	0.181±0.004*	0.225±0.009*	0.257±0.008*
100	0.093±0.003	0.108±0.004*	0.117±0.006*	0.112±0.006*	0.145±0.007*	0.146±0.016*
200	0.078±0.004*	0.087±0.003*	0.101±0.004*	0.109±0.004*	0.064±0.005*	0.073±0.004*
甲醛 formaldehyde						
12.5	0.109±0.004	0.147±0.003	0.247±0.006	0.312±0.007	0.410±0.008	0.461±0.015*
25	0.119±0.005	0.131±0.003	0.220±0.008	0.321±0.002	0.358±0.004*	0.432±0.013*
50	0.101±0.004	0.109±0.003*	0.143±0.003*	0.181±0.005*	0.249±0.006*	0.359±0.011*
100	0.095±0.005	0.073±0.003*	0.088±0.008*	0.103±0.008*	0.141±0.004*	0.165±0.008*
200	0.086±0.003*	0.059±0.002*	0.062±0.005*	0.072±0.003*	0.064±0.006*	0.087±0.006*

* 与阴性对照组比较 (compared with the negative control), P<0.05, 方差分析 (One-Waay ANOVA)
©1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 2 细胞转化实验

2 2. 1 形态学观察 阴性对照组在培养过程中, 存在接触性抑制现象。培养 21 d 结束, 固定染色后, 无自发转化灶, 可见生长状态良好的正常细胞灶, 见图 1。甲醛、苯、MNNG 处理组在接触受试物 14 d 左右, 细胞生长开始失去方向性, 走行紊乱, 细胞生长倍增时间缩短。21 d 后, 各浓度组可见有典型的细胞转化灶形成, 见图 2~4。

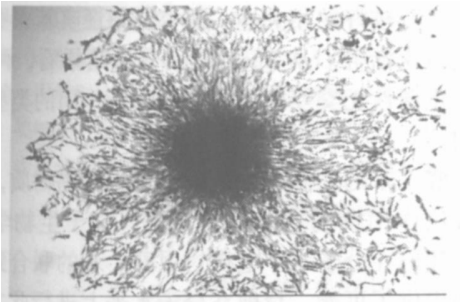


图 1 正常走行的 NIH/ 3T3 细胞 4× 10 倍

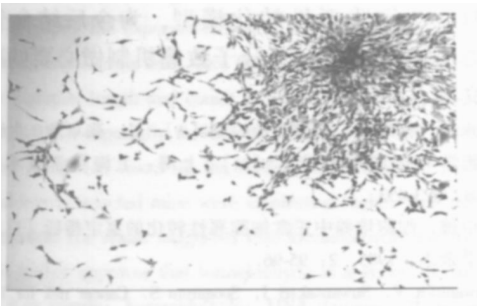


图 2 MNNG 组细胞转化灶 4× 10 倍

2 2. 2 转化灶形成率 阴性对照组无自发转化灶形成; 阳性对照组呈较高的转化率。受试物相同, 浓度不同的各组间, 随浓度的增高, 转化灶形成率增高。

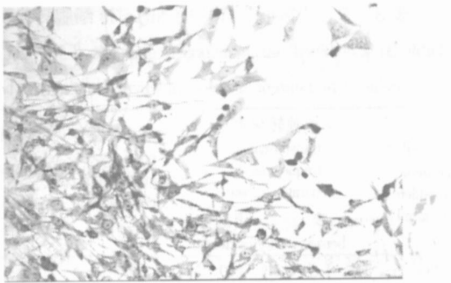


图 3 苯25+ 甲醛 25 μg/ml 组细胞转化灶 10× 10 倍

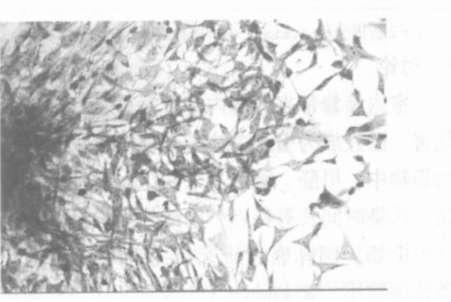


图 4 苯50+ 甲醛 50 μg/ml 组细胞转化灶 10× 10 倍

苯、甲醛 100 μg/ml 组呈较高的转化率, 分别为 5. 6%和 5. 4%。25 μg/ml 组苯和甲醛的转化率分别为 1. 5%、2. 0%。联合作用组也呈同样的剂量依存关系。见表 2。

2 2. 3 联合作用特征 采用2× 2 析因设计对苯和甲醛交互作用进行统计分析, 苯两水平为 25、50 μg/ml, 甲醛两水平为 25、50 μg/ml。应用统计软件 SAS9. 0 分析结果 $F=0. 07$, $P>0. 05$, 两者间无交互作用。联合作用下的实测转化率和预期转化率见表 3。

表 2 不同浓度的苯、甲醛对 NIH/ 3T3 细胞转化作用

Table 2 Transformation frequencies of NIH/ 3T3 cells induced by benzene and fomaldehde respectively

组别 treatment and dose (μg/ml)		培养瓶数 cultured flask	总存活灶数 foci survival	总转化灶数 foci transformed	存活率 (%) viability	转化率 (%) transformation frequencies
苯 benzene	25	10	272	4	80	1.5 [*]
	50	10	156	6	50	3.6 [*]
	100	10	56	3	18	5.6 [*]
甲醛 formaldehyde	25	10	304	6	90	2.0 [*]
	50	10	256	10	75	4.1 [*]
	100	10	108	6	32	5.4 [*]
苯+ 甲醛 benzene + formaldehyde	25+25	10	232	8	68	3.6 [*]
	25+50	10	172	10	50	5.8 [*]
	50+25	10	136	8	39	5.7 [*]
阳性对照 positive control	50+50	10	116	9	30	7.6 [*]
	0.75	10	240	12	60	5.0 [*]
阴性对照 negative control		0	10	336	0	100

* 与阴性对照组比较 (compared with the negative control), $P<0. 05$, χ^2 检验。
?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3 苯、甲醛联合作用的 NIH/3T3 细胞转化率

Table 3 Combined transformation frequencies of NIH/3T3 cells induced by benzene and formaldehyde simultaneously

苯+ 甲醛 benzene+ formaldehyde ($\mu\text{g/ml}$)	单独转化率 transformation frequencies in separate exposure		预期转化率 predictive transformation frequencies (%)	实测转化率 real transformation frequencies (%)
	苯 benzene	甲醛 formaldehyde		
25+25	1.5	2.0	3.5	3.6
25+50	1.5	4.1	5.6	5.8
50+25	3.6	2.0	5.6	5.7
50+50	3.6	4.1	7.7	7.6

2×2 析因分析 (factorial analysis), $F=0.07$, $P>0.05$

3 讨论

室内装修带来的室内空气污染及其对人体健康的危害, 已经成为引人关注的环保问题。在诸多的室内污染物中, 甲醛、苯以其来源广、毒性大、污染水平高、污染时间长等特点, 已成为我国最重要的室内空气污染物。国际癌症研究机构 (IARC) 确定苯为 I 类致癌物质。Wiwatitkit V^[3] 等研究认为长期接触含苯汽车尾气的交通警察患癌症的危险性增高。对台湾几个影印中心的调查研究也表明, 其室内空气污染物中的苯浓度远远超过正常标准值, 在影印中心工作的人群患癌症的危险度是正常人群的数倍^[4]。

大量关于各种终点效应的实验显示, 甲醛具有遗传毒性和致癌活性, 即甲醛可以引起 DNA 损伤、基因突变、染色体断裂、姐妹染色单体互换以及通过破坏基因组抑制 DNA 的修复^[5]。在对职业暴露人群进行流行病学研究, 有学者应用回顾性队列研究发现接触甲醛人群恶性肿瘤的死亡率明显高于同期对照人群, 其中肝癌、胃癌、肺癌等死亡率明显增加。IARC 于 2004 年 6 月将甲醛上升为 I 类致癌物质。

关于两者的联合致癌作用及其致癌机理, 国内外研究较少。张美荣^[6] 等采用³H-胸腺嘧啶 (³H-TdR)、¹⁴C-尿嘧啶 (¹⁴C-UR) 掺入技术, 检测不同剂量甲醛和苯对小鼠淋巴细胞 DNA 和 RNA 合成的影响, 证实

甲醛和苯联合染毒时, 小鼠脾脏、胸腺淋巴细胞³H-TdR 和¹⁴C-URdpm 相对百分数显著低于甲醛、苯单独染毒时³H-TdR 和¹⁴C-URdpm 相对百分数。

本研究以甲醛、苯为受试物, 处理 NIH/3T3 细胞, 观察了它们的细胞毒性和细胞转化活性。结果显示, 甲醛、苯及两者的混合物均对体外培养的 NIH/3T3 细胞产生毒性作用, 抑制细胞生长, 引起细胞损伤, 干扰细胞正常分裂。细胞转化实验与长期动物致癌实验具有较好的相关性。研究结果证实苯、甲醛具有细胞转化活性。从 2×2 析因分析结果看, 两者的细胞转化活性无交互作用, 两者联合作用的类型为相加作用。

甲醛、苯的来源广泛, 两者均为致癌物质, 但其联合致癌作用机制目前并不清楚。分子生物学的发展, 为我们在分子水平上探讨甲醛、苯的联合致癌作用机制提供了可能。目前在分子水平上进行此方面研究的文献还比较少。本研究通过建立甲醛、苯联合诱发 NIH/3T3 细胞恶性转化模型, 为今后结合分子生物学方法研究甲醛、苯分子致癌机制做必要的准备。

参考文献:

- [1] 卢永科, 仲来福. 细胞毒性检测 [A]. 见: 张卓然, 主编. 培养细胞学与细胞培养技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004. 423-433.
- [2] 李申德. 细胞培养中正常细胞恶性转化的鉴定指标 [J]. 细胞生物学杂志, 1985, 2: 95-96.
- [3] Wiwatitkit V, Suwansakri J, Sooganm S. Cancer risk for Thai traffic police exposed to traffic benzene vapor [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2005, 6 (2): 219-220.
- [4] Lee CW, Dai YT, Chien CH, et al. Characteristics and health impacts of volatile organic compounds in photocopy centers [J]. Environ Res, 2006, 100 (2): 139-149.
- [5] Speit G, Schutz P, Merk O. Induction and repair of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in repair-deficient human cell lines [J]. Mutagenesis, 2000, 15 (1): 85-90.
- [6] 张美荣, 周建华, 时锡金. 甲醛和苯联合染毒对小鼠淋巴细胞 DNA、RNA 合成的影响 [J]. 中国职业医学, 2005 32(3): 14-16.

书 讯

由杨乐华主任医师主编, 湖南省劳动卫生职业病防治所组织编写的《建设项目职业病危害因素识别》一书, 借鉴国内外建设项目安全评价和环境影响评价等学科中的一些原理、观点与方法, 系统地阐述了职业病危害因素识别的作用、原理、原则、程序和方法, 详细介绍了特殊环境, 如燃煤火力发电机组、燃气 (燃油) 发电机组、核电机组、耐火材料与铁合金制造、铁矿石烧结与高炉炼铁、炼钢与轧钢、有色金属冶炼、石油炼制、酸碱化肥工业、胶黏剂制造与应用、机械制造、焊接工艺、表面处理和造纸工业的职业病危害因素识别问题。

本书文字简洁易懂, 科学性、实用性和可操作性强, 是从事建设项目职业病危害评价、职业病防治管理、职业卫生监测、职业性体检和职业病临床、急性职业中毒事故救助、厂矿职业卫生工作人员及大专院校相关专业师生的实用参考书。该书已由化学工业出版社正式出版发行。定价: 59 元/本。全国各地新华书店有售。

欲购者也可与湖南省劳动卫生职业病防治所杨乐华联系。地址: 湖南省长沙市雨花路 21 号, 邮编: 410007。

电话: 0731-5602072 (办), 13627318523; E-mail: yanglh@21cn.com