

甲醛对小鼠离体和体内骨髓细胞 DNA 的损伤作用

李婧, 董杰影*

(温州医学院生物学实验教学中心, 浙江 温州 325035)

摘要: 目的 探讨甲醛对离体和体内小鼠骨髓细胞 DNA 的损伤作用。方法 采用单细胞凝胶电泳技术检测骨髓细胞 DNA 的损伤作用。以 6、30、60、120 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛浓度处理离体小鼠骨髓细胞。以 0.2、2、20 mg/kg 的甲醛腹腔注射染毒, 连续 5 d。结果 6、30、60 $\mu\text{mol/L}$ 剂量的甲醛对小鼠骨髓细胞 DNA 迁移显著高于对照组 ($P < 0.01$), 30 $\mu\text{mol/L}$ 时 DNA 损伤最为明显 ($P < 0.001$), 但甲醛浓度为 120 $\mu\text{mol/L}$ 时 DNA 迁移与对照组差异无显著性。腹腔注射 0.2、2、20 mg/kg 的甲醛组小鼠骨髓细胞 DNA 迁移显著高于对照组 ($P < 0.01$), 以 2 mg/kg 组 DNA 迁移最为明显 ($P < 0.001$)。结论 甲醛对小鼠离体和体内骨髓细胞 DNA 均有明显的损伤作用, 进一步证实甲醛具有遗传毒性。

关键词: 甲醛; DNA 损伤; 骨髓细胞; 单细胞凝胶电泳

中图分类号: O623.511 R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)03-0143-03

Damage effect of formaldehyde on DNA of bone-marrow cells in vivo and in vitro

LI Qiang, DONG Jie-ying*

(Department of Biology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract Objective To study the damage effect of formaldehyde on DNA of bone marrow cells of mice both in vivo and in vitro. **Method** The single cell gel electrophoresis technique was used for detecting the damage effect of formaldehyde on DNA of bone marrow cells in mice, the experimental mice were injected i.p. with 0.2, 2 or 20 mg/kg of formaldehyde respectively for 5 days, while the isolated bone marrow cells were exposed to 6, 30, 60 and 120 $\mu\text{mol/L}$ of formaldehyde in vitro respectively. **Result** It was shown that in vitro migration length and comet incidence of DNA of bone marrow cells were increased remarkably in 6, 30 and 60 $\mu\text{mol/L}$ dose group ($P < 0.01$), especially in 30 $\mu\text{mol/L}$ group ($P < 0.001$), but there was no any significant difference between 120 $\mu\text{mol/L}$ group and control group. In vivo, all the formaldehyde exposed groups the migration length and comet incidence of DNA of bone marrow cells in formaldehyde injected mice were significant higher than that of control group ($P < 0.01$), especially the 2 mg/kg group ($P < 0.001$). **Conclusion** The result suggested that formaldehyde has the damage effect on DNA of mice bone marrow cell both in vivo and in vitro, which further approves that formaldehyde is a genotoxic substance.

Key words: Formaldehyde; DNA damage; Bone marrow cell; Single cell gel electrophoresis

自 Swenberg 首先用动物实验表明甲醛具有致癌性以来^[1], 其致癌、致突变性已成为国内外研究的热点, 但其对骨髓细胞进行遗传毒性的实验报道却不多。本实验采用单细胞凝胶电泳 (SCGE), 检测甲醛对离体和体内小鼠骨髓细胞 DNA 的损伤作用, 为进一步探讨甲醛对骨髓细胞的遗传性损伤提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

正常熔点琼脂糖、低熔点琼脂糖, Pionega 公司; 二甲基亚砜, Sigma 公司; 36%~38% 甲醛溶液, 宜兴市化学试剂厂; 十二烷基肌氨酸钠, 华美生物工程公司; TritonX-100, FARCO 公司; 溴乙锭, Sigma 公司。

清洁级健康雄性 ICR 小鼠 45 只, 体重 (25 \pm 2)

g, 由温州医学院实验中心提供 (医动字 220030002 号)。取 40 只小鼠随机分 4 组, 每组 10 只, 设 3 个甲醛染毒组, 染毒剂量分别为 0.2、2、20 mg/kg, 设一个对照组。染毒时将甲醛配成水溶液后腹腔注射, 注射的剂量为 0.02 ml/g。甲醛各染毒组按其相应剂量连续染毒 5 d, 每天 1 次。对照组注射等体积生理盐水。于第 6 天颈椎脱臼处死小鼠, 取骨髓细胞进行测定。腹腔注射甲醛。

1.2 方法

1.2.1 细胞的获得及甲醛处理 体外实验细胞染毒: 取 5 只未处理过的小鼠, 颈椎脱臼处死, 取出骨髓, 用磷酸缓冲液 (PBS) 制备细胞悬液, 调细胞密度到 $0.3 \times 10^{10} \sim 6 \times 10^{10}$ 个/L, 用 0.5 ml 塑料离心管分装细胞悬液 90 μl /管, 加入甲醛 10 μl 使终浓度为 6、30、60、120 $\mu\text{mol/L}$; 阴性对照组加 10 μl PBS 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 h, 离心去掉上清液, 以 90 μl PBS 重悬细胞, 用于单细胞凝胶电泳实验。体内甲醛处理组, 腹腔连

收稿日期: 2005-07-15; 修回日期: 2005-09-19

作者简介: 李婧 (1975-), 女, 助理实验师, 研究方向: 生物遗传。

* 通讯作者, Email: djy@wzmc.net

续注射5 d 浓度为0.2、2、20 mg/kg 的甲醛，颈椎脱臼处死小鼠，取出骨髓，用磷酸缓冲液 PBS 制备细胞悬液，调细胞密度到 $0.3 \times 10^{10} \sim 6 \times 10^{10}$ 个/L，即刻用于单细胞凝胶电泳实验。

1.2.2 单细胞凝胶电泳实验 参照 Sight 等的方法加以改进^[2]，具体制片程序：(1) 800 μ l 1% 正常熔点琼脂糖凝胶浇注于磨砂载玻片上，室温凝固刮去；(2) 浇注 0.5% 正常熔点琼脂糖 80 μ l，加盖玻片，4 $^{\circ}$ C，固化 10 min；(3) 37 $^{\circ}$ C 细胞悬液与低熔点琼脂糖混匀的悬液 (10 μ l 细胞悬液 + 140 μ l 低熔点琼脂糖) 80 μ l 浇注第二层，加盖玻片，同前固化；(4) 移去盖玻片，同前铺第三层无细胞 0.8% 低熔点琼脂糖；(5) 浸入新配制裂解液 (pH=10)，4 $^{\circ}$ C 冰箱避光裂解 1 h；(6) 水平电泳电压 25 V，电流 80 mA；(7) 电泳结束后中性化 (0.4 mol/L pH7.5 Tris-HCl)，溴乙锭染色。

1.2.3 计数 将染好的胶片置蒸馏水中浸泡 10 min 后擦干，在荧光显微镜下用波长为 450~490 nm 的荧光观察。每个样品计数 100 个细胞，每一处理组共计数 400 个细胞，计算彗星细胞的百分率。根据彗星尾部的 DNA 含量将 DNA 损伤程度分为 5 级^[3]。0 级：<5%，无损伤，细胞核完整；1 级：5%~20%，轻度损伤，可见彗尾，细胞核缩小；2 级：20%~40%，中度损伤，可见明显彗尾，细胞核缩小；3 级：40%~95%，重度损伤，彗尾荧光信号强而密，并见明显缩小的细胞核；4 级：>95%，完全损伤，仅见荧光强而密的彗尾，细胞核基本消失。

1.3 统计分析

DNA 损伤分级指标比较采用秩和检验，图像分析指标比较采用方差分析，检验水准 $\alpha=0.05$ ，用 SPSS 10.0 统计软件。

2 结果

2.1 单细胞凝胶电泳检测甲醛对离体骨髓细胞 DNA 损伤的影响

表 1、表 2 可见，各剂量组的小鼠骨髓细胞均出现彗星现象，表明细胞均受到损伤，与阴性对照组相比，其结果差异均有显著性。30 μ mol/L 浓度组中，其细胞彗星率最高，尾长最长。120 μ mol/L 浓度组中，其细胞彗星率和尾长反而比其他浓度组的细胞要小，与阴性对照组相比差异无显著性。

2.2 单细胞凝胶电泳检测甲醛对腹腔注射染毒的骨髓细胞 DNA 损伤的影响

表 3、4 可见，各剂量组与与阴性对照组相比，其结果差异均有显著性，且以 2 mg/kg 组变化最显著。

表 1 甲醛对离体骨髓细胞 DNA 损伤的影响 (分级计数)

甲醛剂量 (μ mol/L)	观察细胞数	各级损伤的细胞数					损伤率 (%)
		0 级	1 级	2 级	3 级	4 级	
阴性对照	400	367	29	3	2	0	10
6	400	163	108	75	36	18	59.3 *
30	400	71	140	100	59	30	82.3 *
60	400	146	127	77	41	9	63.5 *
120	400	329	50	10	8	3	17.8 *

与对照组相比，* $P < 0.001$

表 2 甲醛对离体骨髓细胞 DNA 迁移的影响

甲醛剂量 (μ mol/L)	观察细胞数	尾矩 ($\bar{x} \pm s, \mu$ m)
阴性对照	70	11.2 ± 2.6
6	70	22.6 ± 22.4 *
30	70	36.0 ± 31.8 **
60	70	21.9 ± 18.2 *
120	70	15.3 ± 14.8

与对照组相比，* $P < 0.01$ ；** $P < 0.001$

表 3 甲醛对体内染毒的骨髓细胞 DNA 损伤的影响 (分级计数)

甲醛剂量 (μ mol/L)	观察细胞数	各级损伤的细胞数					损伤率 (%)
		0 级	1 级	2 级	3 级	4 级	
阴性对照	400	366	34	0	0	0	8.5
0.2	400	250	90	50	10	0	7.5 *
2	400	76	146	92	70	16	81.0 *
20	400	224	112	44	15	5	44.0 *

与对照组相比，* $P < 0.001$

表 4 甲醛对体内染毒的骨髓细胞 DNA 迁移的影响

甲醛剂量 (μ mol/L)	观察细胞数	尾矩 ($\bar{x} \pm s, \mu$ m)
阴性对照	70	9.7 ± 2.3
0.2	70	19.1 ± 15.9 *
2	70	27.3 ± 21.9 **
20	70	18.9 ± 17.5 *

与对照组比较，* $P < 0.01$ ；** $P < 0.001$

3 讨论

甲醛对 DNA 损伤作用已被大量的研究所证实。例如董红燕等^[4]在甲醛对豚鼠肺巨噬细胞 DNA 的损伤实验中得出，用使 95% 细胞存活的甲醛剂量染毒肺巨噬细胞即可引起 DNA-蛋白质交联和 DNA 单链断裂。董杰影等^[5]对小鼠睾丸细胞 DNA 的损伤的研究中得出甲醛对小鼠睾丸细胞具有遗传性损伤，在低剂量时是以细胞 DNA 断裂损伤为主。本实验采用 SCGE 技术，检测甲醛对离体和体内小鼠骨髓细胞 DNA 损伤情况，结果发现甲醛对离体和体内骨髓细胞 DNA 具有遗传性损伤作用，且高浓度时彗星细胞发生率反而比低浓度时要低，此时甲醛可能对细胞 DNA 的损伤已不再以断裂为主，而主要引起细胞 DNA 发生交联，由于交联的作用使核 DNA 泳出受阻，而在核内集聚，不出现彗星现象^[6]。本实验未发现甲醛所引起的剂量-效应关系，实验结果与杨丹凤等^[6]用彗星实

验检测甲醛对小鼠脾淋巴细胞的DNA损伤结果较一致。一般认为SCGE技术,可以迅速、简便、灵敏地检测和评价受试物对DNA的损伤作用,已广泛用于环境化学物质的遗传毒理研究。SCGE在评价高剂量甲醛的遗传毒性时,有一定的局限性,但由于环境空气中甲醛的浓度水平一般低于 1 mg/m^3 ,所以用SCGE来评价气态甲醛的遗传毒性还是可行的。

关于甲醛的环境污染和职业病危害已有许多的研究证明甲醛是一种染色体断裂剂及非整倍体诱变剂^[7]。国际癌症研究中心已经将甲醛列为对人类有潜在致癌作用的化学物^[8]。我国的职业流行病学调查资料证实,甲醛接触者恶性肿瘤的危险性有增加的趋势^[9],提示甲醛能引起全身系统损害,也是引起肿瘤发生的重要危险因素之一。当DNA的结构有变化时,有可能导致基因突变、染色体畸变、恶性转化或细胞凋亡等现象的发生,此问题值得重视。

本次实验虽仅说明低剂量的甲醛对骨髓细胞DNA的断裂损伤作用,高剂量时可能影响DNA其他方式的损伤,但也可为进一步探讨甲醛的致癌、致突变机制提供参考,为控制室内空气污染提供进一步实

验依据。

参考文献:

- [1] Svenberg JA, Kems WD, Mitchell RL, et al. Induction of squamous cell carcinomas of the rat nasal cavity by inhalation exposure to formaldehyde vapor [J]. *Cancer Research*, 1980, 40: 3398-3402.
- [2] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Exp Cell Res* 1998, 175: 184-191.
- [3] 余日安, 陈学敏. 镉对大鼠肝细胞DNA损伤作用的研究 [J]. *中国公共卫生学报*, 1998, 17 (2): 106-107.
- [4] 董红燕, 刘君卓, 陈冠英. 甲醛对豚鼠肺巨噬细胞DNA的损伤作用 [J]. *环境与健康杂志*, 1998, 15 (6): 253.
- [5] 董杰影, 楼哲丰, 郑重, 等. 用单细胞凝胶电泳技术检测甲醛对小鼠睾丸细胞的DNA损伤 [J]. *癌变·畸变·突变杂志*, 2004, 16 (3): 148-150.
- [6] 杨丹凤, 裘著革, 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损伤的离体实验研究 [J]. *卫生研究*, 2000, 29 (1): 30-32.
- [7] 王立, 韩志英, 孙忠欢. 甲醛接触工人的外周血淋巴细胞微核研究 [J]. *癌变·畸变·突变杂志*, 1997, 9 (2): 123.
- [8] Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poison [M]. 6th Edition. USA: McGraw-Hill, 2001. 284-285, 1005.
- [9] 蒋学之, 张瑞稳. 甲醛接触工人肿瘤死亡流行病学 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 1990, 8 (5): 261.

儿童酷似排尿性晕厥的亚硝酸盐中毒 1例

Nitrite poisoning just like micturition syncope in a child

周高良¹, 应志娟², 陈舜华²

(1. 永康市第二人民医院, 浙江永康 321307; 2. 永康市红十字会医院, 浙江永康 321300)

1 临床资料

患儿,女,2岁,2004年11月12日8时许在解小便时突然晕厥,被家属发现,约2min自行苏醒,伴有面色灰、口唇发绀、精神萎靡、哭声无力,不伴有大小便失禁、四肢抽搐、呼吸困难,1.5h急诊入院。在送往当地卫生院途中曾恶心、呕吐1次,非喷射性,吐出无特殊气味的胃内容物。早餐全家一起食用青菜鸡蛋面条,父母无殊。否认患儿既往有类似发作史及食物、药物过敏史。在当地曾化验血常规:WBC $20.4 \times 10^9/L$, N 0.55, L 0.45, Hb 122 g/L。因当时病情较重,诊断“败血症”,要求家属转送至本院急诊科。当日急诊来院。

查体:体重12 kg, T 36.5°C , P 150次/min, R 20次/min, BP 90/60 mmHg, 营养中等,发育良,精神较萎靡。查体时哭闹,声音低,呼吸平稳,双瞳孔等大等圆约0.2 cm,对光可,颈部稍抵抗(不合作),面色灰,口唇发绀,心率140~150次/min,律齐,心界正常,各瓣膜无杂音,双肺呼吸音正常,腹平软,肝脾未及,四肢温,活动可,末端发绀不明显,克、布氏征阴性,双巴氏征阴性,肌力、肌张力正常。急

·病例报告·

诊检验血糖 7.0 mmol/L , 电解质、心电图、胸片、头颅CT均正常,考虑“排尿性晕厥”、“败血症”收住病房。在送至病房途中,又再次排尿后晕厥1min,且除口唇发绀加剧外,四肢末端发绀也逐渐加剧,再次追问病史,家属诉患儿今晨起床后曾在父母打工处玩耍过浸泡剪刀用的含亚硝酸盐工业用水30min(不否认有饮用可能)。

根据以上病史及体征诊断“急性亚硝酸盐中毒”成立,立即吸氧、心电监护,同时给予亚甲蓝剂(1 mg/kg)12 mg、维生素C剂($100\sim 150\text{ mg/kg}$)1.5 g 静脉缓慢注射($> 10\text{ min}$),并给予其他对症处理。给药1次20min后患儿面色转红,口唇、四肢发绀、精神状态明显改善而未再给药。住院第2天,家属因经济困难,拒绝各项辅助检查复查,并要求签字自动出院。

2 讨论

亚硝酸盐作为防腐剂和增色剂广泛应用于工农业。亚硝酸盐可使正常血红蛋白的二价铁氧化成三价铁而形成高铁血红蛋白,造成机体各组织缺氧引起中毒。轻者黏膜发绀,重者发绀加重且嗜睡,呼吸急促,心率加快,恶心、呕吐,甚至惊厥、昏迷,乃至死亡。本例误诊的原因主要是:(1)亚硝酸盐中毒多数为误食所致,一旦发生则往往为集体用餐发病,以“排尿性晕厥”为首诊病例确实较少,本例过分依赖于常见临床表现;(2)首诊医生对该病认识不足,追问病史不够详细,包括接触史、误食史等;(3)急性亚硝酸盐中毒患儿多因中毒量不同而中毒表现轻重不一^[1],临床表现特异性多而重视不够。在此也提醒广大家长对幼儿应加强看护。

参考文献:

- [1] 陈海海. 急性亚硝酸盐中毒11例抢救体会 [J]. *中国危重病急救医学*, 2002, 14 (7): 423.