

许多学者在探讨胆碱酯酶、单胺氧化酶等与黑色素合成的关系,提出交感神经兴奋性增加,可能导致褪黑激素等介质的释放增加,使黑色素合成减少;另一方面交感神经兴奋可能会导致单胺氧化酶活性增加,进而出现过氧化氢聚集导致黑色素合成减少。组织病理学结果显示皮肤表皮基底层、棘层可见黑染的黑色素细胞,但数量较对照组明显减少,毛囊内黑色素表达下降,部分毛囊无着色,与对照组比较,差异有统计学意义。该结果与文献中报道对叔丁基酚有脱色作用相一致,说明接触或使用含酚制品的个人中可出现色素脱失斑^[4-5]。

对叔丁基酚作为重要的精细化工中间体,广泛用于制造表面活性剂、紫外线吸收剂、农药以及油溶性酚醛树脂等产品,市场的需求量很大。此外,本品还可用于光气法制碳酸酯反应的终止剂、环氧树脂的改进、二甲苯树脂改性、聚氯乙烯稳定剂的原料、紫外线吸收剂、表面活性剂等^[6]。因其

涉及行业广泛,接触人员众多,故职业危害也比较大,本实验结果为现场病例观察及制定防御措施提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 赵辩. 皮肤病学 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2001: 638-639
- [2] Katsumaro T, Tohru H. Cholinesterase activities in the blood and brain of rats and mice as determined by a rapid colorimetric method [J]. Industrial Health 1985 23 (2): 75-80
- [3] 王靓, 龙子江, 陈明, 等. 祛白凝胶对实验性白癜风模型豚鼠的治疗作用 [J]. 中药药理与临床, 2006 22 (5): 49-50
- [4] 贾会林, 沈丽光, 杨荷载, 等. 对叔丁基酚致职业性白斑 2例临床分析 [J]. 工业卫生与职业病, 2005 31 (3): 133
- [5] Boissy RE, Manga P. On the etiology of contact occupational vitiligo [J]. Pigment Cell Res 2004 17 (3): 208-214
- [6] 霍稳周. 耐高温树脂催化剂催化合成对叔丁基酚的研究 [J]. 工业催化, 2005 增刊: 382-385

甲醛免疫毒性的体外实验

Study on immunotoxicity of formaldehyde in vitro

翟玲玲, 徐兆发*, 徐斌, 邓宇, 辛辛

ZHAILingling XU Zhao-fa*, XU Bin DENG Yu XIN Xin

(中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 甲醛在人群的暴露非常普遍, 国内外已经有许多证据证实, 甲醛可以通过直接或者间接的作用, 造成免疫系统的损害。本文通过体外实验方法, 观察甲醛对 T B淋巴细胞和细胞因子的毒性效应, 探讨甲醛免疫毒性机制。

关键词: 甲醛; 免疫毒性

中图分类号: R996 O623.511 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2010)03-0209-02

甲醛是室内空气污染首要污染物, 众多研究证实甲醛对其暴露者的健康危害很多, 国内外已经有许多证据表明, 甲醛可以通过直接或者间接的作用, 造成免疫系统的损害。Wanike等研究表明, 甲醛可以增加学龄儿童 IgE的产生^[1], 动物实验也证实甲醛可能对免疫器官、免疫细胞执行应答的功能产生影响^[2]。本文拟通过体外实验方法, 观察甲醛对体外培养小鼠脾脏 T B淋巴细胞和细胞因子的毒性效应, 进一步探讨甲醛免疫毒性机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂: 甲醛 (分析纯) 用双蒸水配制成 0.016 0.8 4. 20. 100. 500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度备用, Hanks液 (pH7.2), 1640完全培养液 (含 10%小牛血清、青霉素 100 U/ml 链霉

素 100 $\mu\text{g/ml}$)。IL-4和 IFN- γ ELISA试剂盒为国外分装。主要仪器: CO₂培养箱 (德国 Heraeus公司 HERAcell 150), 超净工作台 (苏州净化设备有限公司 SW-CJ1D), 倒置显微镜 (Nikon公司 T5100), 酶标仪 (美国伯乐 BD-RAD 680型)。

1.2 动物分组与染毒

实验动物: 健康成年 ICR清洁级昆明种小鼠 15只, 体重 (20 $\pm$ 2) g 由中国医科大学实验动物中心提供, 自由饮食进水, 自然光照。实验分组: 培养液中加入终浓度分别为 0 (对照组), 0.16 0.8 4. 20. 100. 500 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛, 处理细胞至实验结束。

1.3 测定指标

1.3.1 T B淋巴细胞转化实验 拉颈处死小鼠, 打开腹腔, 无菌取出小鼠脾脏, 收集分离脾细胞, 加入 ConA使每孔最终浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 和 LPS使每孔最终浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ (ConA和 LPS分别刺激 T B淋巴细胞增殖) 并加入甲醛使其最终浓度为 0.016 0.8 4. 20. 100. 500 $\mu\text{mol/L}$ 。每组平行做 6孔, 置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 48 h 在培养细胞中加入 MTT液 (10 $\mu\text{l/well}$) 继续培养 4 h 小心吸弃上清, 每孔加入二甲基亚砜 (DMSO) 液 (100 $\mu\text{l/well}$) 将培养板置于微孔板振荡器上振荡 10 min 酶标仪 570 nm波长检测各孔 OD值, 计算淋巴细胞增殖指数:

增殖指数 (SI) = 染毒孔的 A值 / 对照孔的 A值

1.3.2 NF- γ 和 IL-4分泌水平测定 收集分离脾细胞, 加入甲醛使其最终浓度为 0.016 0.8 4. 20. 100. 500 $\mu\text{mol/L}$ 加入 ConA使每孔最终浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 48 h 离心收集上清液, 用双抗体夹心

收稿日期: 2010-01-15 修回日期: 2010-03-16

作者简介: 翟玲玲 (1977-), 女, 讲师, 博士在读, 从事室内空气污染对人群健康影响研究。

* 通讯作者, E-mail: zhaill@mail.smu.edu.cn

ELISA试剂盒分别检测 IL-4和 IFN- γ 的水平。酶标仪 450 nm 处测定 OD值。结果应用 SofMax Pro 4.3.1LS软件分析, 绘制标准曲线, 计算细胞因子含量 (pg/ml)。

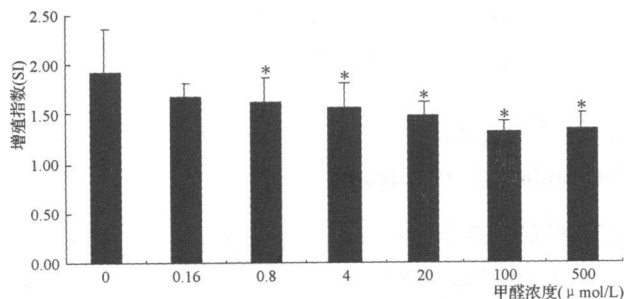
1.4 统计方法

所有数据均用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。实验数据采用 SPSS 13.0 进行统计处理, 组间差异采用 One-way ANOVA 分析, 之后采用 SNK法进行两两比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

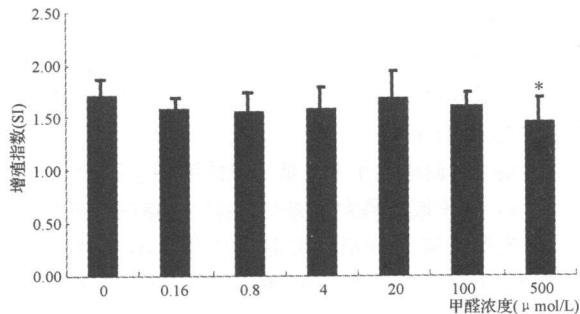
2.1 甲醛体外染毒对 T 和 B 淋巴细胞增殖的影响

甲醛作用 48 h 细胞增殖实验结果显示, 与对照组相比, 500 100 20 4 和 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组对 T 淋巴细胞的增殖能力显著抑制 ($P < 0.05$) (图 1); 但仅 500 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组对 B 淋巴细胞的增殖能力显著抑制 ($P < 0.05$) (图 2)。



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 不同剂量甲醛对 T 淋巴细胞增殖的影响



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 不同剂量甲醛对 B 淋巴细胞增殖的影响

2.2 IFN- γ 和 IL-4 分泌水平的比较

与对照组相比, 甲醛作用 48 h 100 20 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组体外染毒脾培养上清中 IL-4 的分泌水平升高 ($P < 0.05$), 4 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组培养上清中 IFN- γ 的分泌水平升高 ($P < 0.05$), 其它剂量组分泌水平并没有出现明显的变化; 各组脾培养上清中 IFN- γ / IL-4 比值同对照组相比有下降趋势, 但差异无统计学意义 (见表 1)。

3 讨论

T B 细胞是机体中承担特异性细胞免疫应答、体液免疫应答以及进行免疫调节的主要细胞, T 淋巴细胞转化是反映细胞免疫功能的重要指标之一。本次实验中甲醛各染毒剂量组小鼠脾 T 淋巴细胞转化功能随甲醛染毒剂量的升高呈明显下降趋势, 有研究发现当机体接触甲醛以后, 可以出现 T 淋巴细胞的数目显著下降, 增殖能力以及功能下降^[3,4], 甲醛对

表 1 不同剂量甲醛对脾培养上清 IFN- γ 和 IL-4 分泌水平影响

染毒剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	IFN- γ (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IFN- γ / IL-4
0	60.12 $\pm$ 7.87	90.58 $\pm$ 20.11	0.67 $\pm$ 0.08
0.16	57.37 $\pm$ 8.53	121.86 $\pm$ 30.10	0.55 $\pm$ 0.23
0.8	64.88 $\pm$ 5.34	123.53 $\pm$ 37.77	0.46 $\pm$ 0.07
4	72.90 $\pm$ 9.78*	102.41 $\pm$ 24.12	0.80 $\pm$ 0.28
20	58.15 $\pm$ 5.34	141.56 $\pm$ 19.93*	0.43 $\pm$ 0.03
100	61.69 $\pm$ 2.43	138.85 $\pm$ 43.87*	0.52 $\pm$ 0.26
500	66.60 $\pm$ 2.35	129.96 $\pm$ 9.02	0.51 $\pm$ 0.03

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

淋巴细胞转化功能的抑制, 表明甲醛可抑制 T 淋巴细胞的免疫功能, 对 T 淋巴细胞有直接抑制作用。体液免疫是由 B 细胞识别抗原而导致抗体产生的过程, 是机体免疫防御的重要组成部分。本实验表明甲醛作用 48 h 仅 500 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组对 B 淋巴细胞的增殖能力显著抑制, 甲醛对 B 细胞是否有直接的抑制作用及其机制如何有待进一步研究。

在适应性免疫应答中, Th1 细胞和 Th2 细胞应处于相对平衡状态。许多疾病的发生和结局与 Th1 细胞 / Th2 细胞失衡有直接关系。本研究发现, 甲醛可诱导 Th2 细胞产生 IL-4 的能力增强, Th1 产生的 IFN- γ 的水平并没有出现明显的变化, 同 Hilton 研究一致^[5], IFN- γ / IL-4 比值下降, 从而导致机体 Th1 / Th2 功能失调, 产生免疫紊乱。可见甲醛可引起 Th1 / Th2 细胞的分泌细胞因子的功能产生障碍, 从而导致免疫病理学反应^[6]。

不过, 由于甲醛对免疫系统的影响是一种综合性的复杂作用, 同时存在实验条件和个体的差异, 因此对甲醛造成的免疫系统损伤及其机制需要更加深入的研究。

参考文献:

- [1] Wanke F, Demmer C M, Tappeler P, et al. Exposure to gaseous formaldehyde induces IgE-mediated sensitization to formaldehyde in school children [J]. Clin Exp Allergy 1996; 26 (3): 276-280.
- [2] Fujimaki H, Kuokawa Y, Kunugita N, et al. Differential immunogenic and neurogenic inflammatory responses in an allergic mouse model exposed to low levels of formaldehyde [J]. Toxicology 2004; 197 (1): 1-13.
- [3] Wieslander G, Norback D, Björnsson E, et al. Asthma and the indoor environment: the significance of emission of formaldehyde and volatile organic compounds from newly painted indoor surfaces [J]. Int Arch Occup Environ Health 1997; 69 (2): 115-124.
- [4] Baj Z, Majewska E, Zeman K, et al. The effect of chronic exposure to formaldehyde, phenol and organic chlorohydrocarbons on peripheral blood cells and the immune system in humans [J]. J Invest Allergol Clin Immunol 1994; 4 (4): 186-191.
- [5] Hilton J. Experiment assessment of the sensitizing properties of formaldehyde [J]. Food and Chemical Toxicology 1996; 34 (6): 571-578.
- [6] Ohtsuka R, Shutoh Y, Fujie H, et al. Rat strain difference in histology and expression of Th1- and Th2-related cytokines in nasal mucosa after short-term formaldehyde inhalation [J]. Exp Toxicol Pathol 2003; 54 (4): 287-291.