第十届全国大气环境学术会议论文集

大气环境科学技术研究进展

俞学曾　主编

中国环境科学学会大气环境分会

2003.10　南宁

室内空气污染物甲醛的遗传毒性实验研究

杨旭 李睿 刘杰 王光学 鲁志松 严彦 乔琰

华中师范大学生命科学学院环境科学实验室　　武汉　　430079

摘　要　目的：气态甲醛是目前我国最主要的装修型化学性室内空气污染物，本项课题着重研究气态甲醛的遗传毒性。方法：实验方法包括单细胞凝胶电泳实验 (single cell gel electrophoresis, SCGE)；细胞微核实验；超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性实验。 为了更为真实地研究气态甲醛的生物效应，我们在研究中采用了“仿真式制气”和“仿真式染毒”的技术，设计和使用了动态气体灌流染毒暴露装置。 结果与结论：研究表明气态甲醛的遗传毒性至少存在三类分子机理：第一类是细胞分裂期染色体断裂和姐妹染色单体交换；第二类是甲醛作为强氧化剂对 DNA 分子的直接氧化，形成 8 羟脱氧鸟苷，直接引起 DNA 碱基突变或者造成 DNA 断裂损伤和 DNA-DNA, DNA-蛋白质分子交联；第三类是甲醛作为酶类抑制剂，对 DNA 分子的间接氧化损伤。 例如作为 SOD 酶的抑制剂，使氧自由基的清除不力，间接引起 DNA 分子的氧化损伤。

关键词　甲醛 遗传毒性 室内空气质量 动态气体灌流染毒装置 SCGE 微核实验 SOD

气态甲醛是一种污染十分严重的室内空气污染物。 根据国内近期的现场调查[1~3]，高达 67%～94%新装修的办公室房间和居室，其室内空气甲醛的浓度超过我国《公共场所卫生标准》[4]和《居室空气中甲醛的卫生标准》[5]（标准值分别为 0.12mg/m^3 和 0.08mg/m^3），而且，平均污染水平为国家环境卫生标准的 3~10 倍。 室内甲醛污染的主要原因是使用了由劣质人造板材所制成的家具、地板、门窗等，以及使用了含有甲醛的涂料。 气态甲醛污染对人体健康可以造成严重的危害，例如，引起“不良建筑物综合征”（sick building syndrome, SBS），诱发过敏性鼻炎和哮喘；长期吸入高浓度水平（>3.7mg/m^3）的甲醛，还可能导致鼻咽癌和肺癌的发生[6]。

为了全面深入研究气态甲醛污染所致的健康危害，本实验室在华中师范大学引进人才启动基金，校自然科学基金的资助下，已开展了一系列的相关研究。 研究的结果得到国内同行专家的关注和好评，并主动接纳本实验室参加了国家科技部十五科技攻关项目“室内空气重点污染物健康危害评价技术研究”（项目编号:2001BA704B01），由本实验室专门负责气态甲醛的环境毒理学研究。

气态甲醛对人体健康的危害主要包括三个方面：作用于眼部、皮肤和呼吸道的神经末梢，引起刺激感觉和气道神经源性炎症；作用于机体的免疫细胞和分子，引起气道过敏反应（或称“变态反应”），例如过敏性鼻炎和支气管哮喘；作用于细胞遗传物质 DNA，引起遗传毒性。 本实验室正在有计划地进行这三方面的研究实验。 在本文中，我们主要就已经完成的，有关气态甲醛遗传毒性的部分实验结果进行报道。

1　材料和方法

详细的实验方法和步骤请见参考文献[7-10]，简述如下。

1.1 暴露染毒装置和方法

为了更为真实地研究气态甲醛对人体健康的危害，我们在研究中采用了“仿真式制气”和“仿真式染毒”的技术：用于染毒的甲醛气体，我们采用的是真实的木质人造胶合板释放甲醛的方式制备，而不是用液体甲醛试剂配制。这种气体是我们日常生活中实际接触的污染气体；采用的染毒方法，我们采用的是接近真实暴露方式的动态气体灌流染毒技术，而不是用液体灌注染毒或者静态气体封闭染毒。这两项技术的应用，保证了我们实验研究的先进性。我们采用的动态气体灌流染毒暴露装置见图 1。

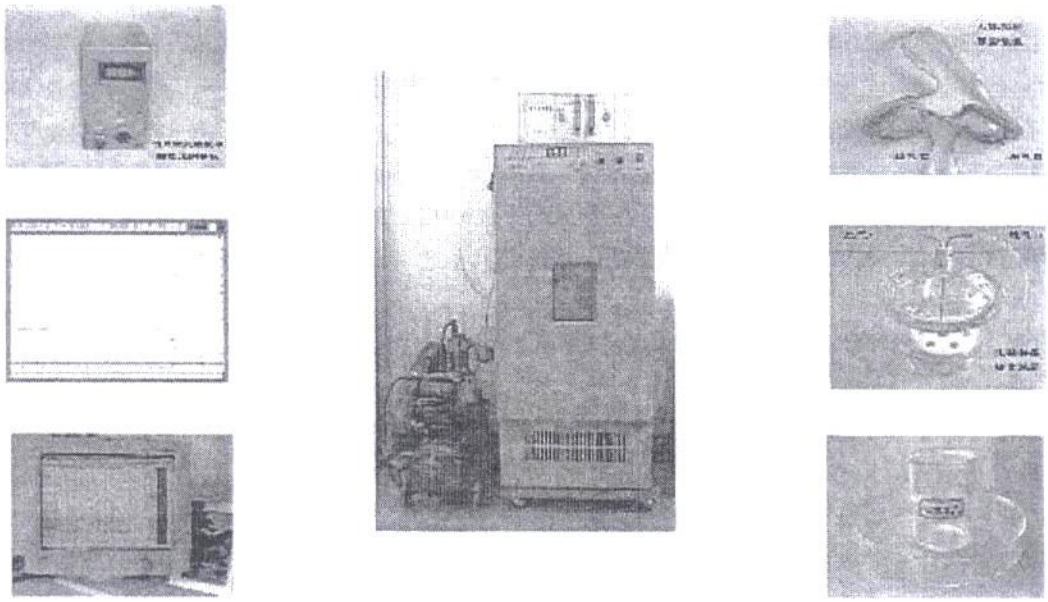

图 1 动态气体灌流染毒/暴露装置

1.2 染毒剂量监测及制备

用于染毒的甲醛气体用木质人造板释放气体配制，染毒剂量计划值分别为 0.00，1.24 和 3.71 mg/m^3（相当于 0，1，3 ppm）。检测仪器为美国原装 4160 型甲醛分析仪（见图 1 左上分图）。测量方法简单易行，测量结果的稳定性和重现性均较好。通过对木质人造板甲醛稳定释放量的测量，可以推算和采用合适的人造板材装载量，来配制含不同甲醛浓度水平的染毒气体。木质人造板至少要在小型舱中提前运行 3 小时，待甲醛浓度水平稳定之后方可以作实验之用，以保证染毒暴露剂量的准确。

1.3 实验方法、材料和项目

实验方法包括：单细胞凝胶电泳[11]；细胞微核实验[8, 12]；超氧化物歧化酶活性实验[13]。单细胞凝胶电泳和细胞微核实验是目前测试污染物质遗传毒性的主要研究方法，超氧化物歧化酶活性实验用于探讨甲醛遗传毒性作用的分子机理。实验材料包括：健康人血淋巴细胞（武汉中心血站提供）；大白鼠（Wistar 品系，雄性，体重 400-500g，湖北省防疫站动物实验中心提供）肝细胞；小白鼠（SPF 昆明纯系小鼠，雄性，体重 20-25g，湖北省防疫站动物实验中心提供）胸骨骨髓嗜多染红细胞和脑、肺、心、肝、肾五种器官；蚕豆（纯系

敏感松滋青皮蚕豆，本校生命科学学院金波教授培植）根尖细胞。 实验项目包括：人血淋巴细胞和大白鼠肝细胞单细胞凝胶电泳实验；小白鼠胸骨骨髓嗜多染红细胞和蚕豆根尖细胞的细胞微核实验；小白鼠脑、肺、心、肝、肾的超氧化物歧化酶活性实验等。

1.4 统计分析

应用 Excel 软件制图，SigmaPlot 3.2 软件进行 t 检验。

2 实验结果

有关实验的结果均已在相应论文中报道[8~10]， 本文将有关结果概括如下。

2.1 人血淋巴细胞和大白鼠肝细胞的单细胞凝胶电泳实验

将盛有细胞的培养皿直接放置于环境气候舱中，将舱气温调节至 37℃，舱湿度调节至 45%，实现气体灌流，染毒时间为 1h。 甲醛浓度分别 1.24 mg/m^3 和 3.71 mg/m^3。 另取末经染毒的细胞进行阴性对照实验。 单细胞凝胶电泳实验见表 1 和表 2。

表 1 大白鼠肝细胞的 SCGE 实验结果

甲醛剂量分组	观察细胞数	拖尾细胞		尾长（μm）
		数目	百分率(%)	$\bar{X} \pm S$
阴性对照	100	10	10	5.6 ± 1.7
1.24mg/m^3	100	34	34##	17.3 ± 6.3**
3.71mg/m^3	100	15	15##	10.2 ± 3.6**

与阴性对照比较，##：χ^2 检验，p<0.01；**：t 检验，p<0.01.

表 2 人血淋巴细胞的 SCGE 实验结果

甲醛剂量分组	观察细胞数	拖尾细胞		尾长（μm）
		数目	百分率(%)	$\bar{X} \pm S$
阴性对照	100	9	9	11.0 ± 2.6
1.24mg/m^3	100	37	37##	21.5 ± 6.3**
3.71mg/m^3	100	18	18##	13.8 ± 3.2*

与阴性对照比较，##：χ^2 检验，p<0.01；*：t 检验，p<0.05；**：t 检验，p<0.01.

从表 1 和表 2 中可以看出：在两种浓度下，大鼠肝细胞和人淋巴细胞均出现慧星现象，表明两种细胞的 DNA 均受到损伤。 与阴性对照组相比，其结果均有显著性差异。 但在 3.71mg/m^3 浓度组中，其细胞慧星率和尾长反而比 1.24mg/m^3 浓度组的细胞要少、要短。 这种现象可以从甲醛所具有的致使 DNA 发生交联的作用得到解释。

2.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验

将 15 只小鼠，随机分为 3 组（甲醛染毒组和对照组），每组 5 只小鼠。 实验采用吸入式染毒，染毒组在 8.4L 玻璃染毒缸中动态染毒 72h，染毒缸进气口甲醛浓度为 1.24mg/m^3 和 3.71mg/m^3，进气口气流温度为 23℃。 换气率为：60（L/h）/ 8.4（L）= 7.14（次/h）。染毒期间，动物可以自由进食和饮水；对照组也在同样的染毒缸中吸入经过滤的新鲜空气。

每只动物计数 5000 个嗜多染红细胞，观察含有微核的嗜多染红细胞数，畸变率以千分率表示，一个嗜多染红细胞中出现两个或更多微核，仍按一个微核细胞计数。 细胞微核率实验结果见表 3。

表 3　对照组与不同染毒组的骨髓嗜多染红细胞微核率（‰）

分组	样品量	各个小鼠的细胞微核率（‰）					平均值	标准差
阴性对照组	5	1.82	2.05	1.75	2.24	2.08	1.965	0.224
1.24mg/m³	5	3.00	3.04	2.84	2.82	3.18	2.925**	0.111
3.71mg/m³	5	6.32	6.01	6.25	7.03	6.18	6.380**	0.447

与阴性对照比较，**：t 检验，$p<0.01$。

从表 3 可以看出，染毒组的细胞的微核率明显高于阴性对照组，统计学检验，差别有极显著意义，说明在 1.24mg/m³ 和 3.71mg/m³ 的浓度水平下，甲醛对哺乳动物小白鼠 DNA 已经产生明显的遗传毒性。同时，在 3.71 mg/m³ 浓度下微核率比 1.24 mg/m³ 也有显著性升高，呈剂量/效应正相关。

2.3 蚕豆根尖细胞微核实验

将制备的染毒气体（1.24mg/m³、3.71mg/m³ 两组）通入 8.4L 染毒缸（气温 23℃，换气率为 7.14 次/h），将浸种催芽准备的蚕豆（根尖初生根长至 1.5~2cm）此染毒 24h；阳性对照组蚕豆放入盛有 2mg /L 的环磷酰胺溶液的培养皿中，使根尖浸泡于环磷酰胺溶液，置室温下（20℃左右）分别处理 4h 和 24h；空白对照组在洁净空气中放置 24h。上述各组完成染毒后转移到蒸馏水中恢复培养 24h。从蚕豆的根尖顶端切下 1cm 长的幼根，用 Carnoy's 固定液固定 24h，然后转入 70%的乙醇溶液中，放在 4℃的冰箱中保存。样品观测在三周内完成，并采用双盲实验法，即知道样品编号的实验人员不进行观测；进行样品观测的实验人员不知道样品编号。

表 4　各组蚕豆根尖细胞微核率实验数据

分组	每个蚕豆根尖观测到的微核千分率（‰）												微核率（$\overline{X}\pm S$）
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
阴性对照组	0.89	1.11	1.41	1.82	1.20	1.38	1.57	1.65	1.16	1.24	1.48	1.93	1.41±0.305
1.24mg/m³	2.01	2.51	2.48	2.48	3.51	3.54	3.36	2.77	3.27	3.18	3.54	3.04	2.97±0.512
3.71mg/m³	6.58	5.63	4.62	5.75	4.91	4.45	5.83	4.20	5.05	5.45	4.10	3.93	5.04±0.819
阳性对照组 1	4.95	3.29	3.81	5.07	4.43	4.10	3.58	4.42	3.42	3.16	3.15	3.04	3.87±0.714
阳性对照组 2	4.82	5.14	4.91	4.71	5.30	3.97	5.32	4.68	4.94	3.80	--	--	4.76±0.512

注：蚕豆根尖细胞微核率（MCN）=（出现微核的细胞数/所观察的细胞总数）×1000 ‰

染毒组 VS 阴性对照组 $p<0.01$；阳性对照组 1 为环磷酰胺处理 4h 组；阳性对照组 2 为环磷酰胺处理 24h 组。

从表 4 可以看出，染毒组的细胞的微核率明显高于阴性对照组，统计学检验，差别有极显著意义，说明在 1.24mg/m³ 和 3.71mg/m³ 的浓度水平下，陆生植物蚕豆的根尖细胞发生 DNA 损伤，出现超正常微核率，甲醛对陆生植物蚕豆的根尖细胞 DNA 已经产生明显的遗传毒性。同时，在 3.71 mg/m³ 浓度下微核率比 1.24 mg/m³ 也有显著性升高，呈良好的正相关性。

2.4 小白鼠脑、肺、心、肝、肾 SOD 酶活性实验

为小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验同一批染毒动物（见 2.2）。染毒结束后脱颈处死，立即取出脑、心、肺、肝、肾等 5 种组织器官，在冰冷的生理盐水中洗净并剪碎，用玻璃

匀浆器在含有 1.17 % KCl 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液（pH7.4）中冰浴匀浆，匀浆液通过二层纱布过滤后在 4℃下 10000 r/min 离心 20min，取上清液，立即放于 4℃冰箱中等候测定。SOD 活性测定参照 Dhindsa R S 的方法（NBT 法）进行[13]。酶活力计算：（ACK－A_0）×V1/（ACK×50%×V_0×M），ACK 为对照管的吸光度，A_0 为样品反应液的吸光度，V1 为反应液体积，V_0 为加入反应液中的酶液体积，M 为蛋白质含量。

表 5　小鼠吸入甲醛对不同组织器官 SOD 酶活性的影响（$\bar{X} \pm S$）

组别	组织器官				
	脑	心	肺	肝	肾
阴性对照组	1.57 ± 0.08	1.98 ± 0.06	2.06 ± 0.05	1.48 ± 0.07	1.50 ± 0.08
1.24 mg/m³	1.50 ± 0.06	1.98 ± 0.06	2.02 ± 0.05	1.27 ± 0.14**	1.41 ± 0.09
3.71 mg/m³	1.57 ± 0.06	1.95 ± 0.05	1.93 ± 0.06*	0.86 ± 0.07***	1.33 ± 0.06**

注：与对照组相比，经 t 检验，*：p<0.05，**：p<0.01，***：p<0.001；表内数字为 5 只小鼠均值 ± 标准差，SOD 酶活性以 U/mg 蛋白质表示。

表 5 总结了甲醛吸入对昆明纯系小鼠不同组织器官 SOD 酶活性影响的研究结果。从表中可见，对于 1.24 mg/m³ 而言，所试全部器官（脑、心、肺、肝、肾），只有肝组织的 SOD 酶活力明显下降（p<0.01）；而在 3.71 mg/m³ 的实验中，肝、肾、肺的 SOD 活性都有明显下降（p<0.001，p<0.01，p<0.05），尤其是肝脏的 SOD 活性更为显著，表现出器官特异性。

3　讨论

3.1　室内气态甲醛污染的主要特征

是目前我国最主要的装修型化学性室内空气污染物，对广大公众的健康造成了很大的危害。室内气态甲醛污染的主要特征有：(1) 污染范围广，在绝大多数新装修家庭和办公室都存在，其主要原因是木质人造板材中尿醛树脂的应用，而尿醛树脂是由甲醛与尿素聚合反应生成的一种树脂，其中所含的游离甲醛和发生降解时所产生的甲醛都可以释放出来，污染室内空气。(2) 污染时间长，可以持续数年之久。这是因为尿醛树脂的降解是一个长期不间断过程。曾有文献报道这一持续过程可能长达 14 年[14]。(3) 污染浓度高：在所有因室内装修引起的有机类空气污染物中，例如苯、二甲苯、其他的醛、酮、酚、烷等，甲醛的污染水平常可以高达 0.1-4mg/m³，这样的浓度水平不但远远高于其他单个污染物的水平，有时甚至高于其他挥发性有机化合物（VOC）的总量。所占的比重，其他污染物难以相比。(4) 生物毒性大[15]：按照美国政府工业卫生会议（American conference of governmental industrial hygienists, ACGIH）制定的化学物质的阈限值（threshold limit values, TLVs），化学物质的致癌性分成为 5 类：A1，为经证实的人类致癌物（confirmed human carcinogen）；A2，可疑的人类致癌物（suspected human carcinogen）；A3，经证实的动物致癌物（confirmed animal carcinogen）；A4，分类不属于人类致癌物（not classifiable as a human carcinogen）；A5，非人类致癌物（not suspected as a human carcinogen）。而甲醛属于 A2 类化合物，且 TLV 仅为 0.37mg/m³，表明其生物毒性很大。(5) 毒理作用的分子机理不清楚：

这是甲醛污染的又一重要的特征。在甲醛的三大毒性之中，目前[6]仅对甲醛的遗传毒性作用的分子机理有部分的了解，而对室内气态甲醛污染的其他主要健康危害，例如：导致获得性过敏体质[6]、诱发哮喘引起死亡、引起过敏性鼻炎、广泛引起不良建筑物综合征等等，其毒理作用的分子机理不清楚。基于上述特征，我们认为对室内气态甲醛污染的毒理学研究，特别是其分子毒理学研究应当是环境毒理学研究领域中的一项紧迫工作。

3.2 气态甲醛遗传毒性实验所反映的主要信息

遗传毒性是气态甲醛对人体健康的主要危害之一。美国职业卫生阈限值（threshold limit values, TLVs）制订中所依据的终点效应仅包括“刺激”与“癌症”（irritation, cancer）[15]。而遗传毒性是产生癌症的主要原因，研究气态甲醛的遗传毒性及其分子机理对于防治气态甲醛的健康危害有重要意义。我们近期的研究，所反映的主要信息有：

(1) 根据我们的单细胞凝胶电泳实验和微核实验的结果，可以看出：1.24 和 3.71mg/m^3（1-3 ppm）浓度水平的气态甲醛对陆生植物，例如蚕豆；哺乳动物，例如小白鼠、大白鼠；和人体血液淋巴细胞等都具有一定的遗传毒性，这与大多数其他研究者的结论一致[6]。

(2) 根据我们的单细胞凝胶电泳实验的研究结果，表明气态甲醛是一种 DNA 交联剂，这与文献报道的结论一致[6]。我们的研究还发现，在暴露时间为 1h 的条件下，1.24mg/m^3 浓度水平的气态甲醛对大白鼠肝和人体淋巴细胞的遗传毒性主要表现为使 DNA 分子的断裂；3.71mg/m^3 浓度水平的气态甲醛的遗传毒性主要表现为使 DNA 分子交联[10]。根据文献报道[16]，DNA 分子交联包括 DNA-蛋白质交联和 DNA-DNA 交联：甲醛所致的 DNA-蛋白质交联，其共价键发生于赖氨酸的氨基与 DNA 的碱基之间；甲醛所致的 DNA-DNA 交联，形成五种交联物，即 G-C、A-A、A-G、A-C 和 G-C 交联。DNA-蛋白质交联物可以作为生物分子标记物，采用 ^{125}I-标记法检测。

(3) 根据我们的单细胞凝胶电泳实验结果、小白鼠五种组织器官超氧化物歧化酶活性实验结果和相关文献报道，表明气态甲醛的遗传毒性至少存在三类分子机理：第一类是细胞分裂期染色体断裂和姐妹染色单体交换[6]；第二类是甲醛作为强氧化剂对 DNA 分子的直接氧化[16]，形成 8 羟脱氧鸟苷[17]，直接引起 DNA 碱基突变或者造成 DNA 断裂损伤和 DNA-DNA, DNA-蛋白质分子交联；第三类是甲醛作为酶类抑制剂，对 DNA 分子的间接氧化损伤。例如我们的实验还发现，甲醛还可以作为 SOD 酶的抑制剂，使正常的氧自由基水平失衡，氧自由基的清除不力，在组织中的含量增高，间接导致 DNA 分子的氧化损伤，引起 DNA 碱基突变。这是我们的一项新发现。

致谢：本项研究为国家“十五”科技攻关项目资助（2001BA704B01），特此感谢中国疾病控制中心戚其平研究员和徐东群博士对本研究组的信任和支持。

参 考 文 献

[1] 徐家颖、赖补英、黄升永，广州地区室内空气污染特征初探[M]，国家环境保护总局科技标准司编，室内环境与健康，中国环境科学出版社，北京，2002：47-51

[2] 李 、牛星梅、田锋、等，128 家室内空气中甲醛浓度水平[M]，国家环境保护总局科技标准司编，室内环境与健康，中国环境科学出版社，北京，2002：47-51

[3] 陆海涛、曲波、张恒、等，沈阳市装修后室内空气质量现状调查分析[M]，国家环境保护总局科技标准司编，室内环境与健康，中国环境科学出版社，北京，2002：278-280

[4] 中华人民共和国，公共场所卫生标准[S]，（GB9663-1996~GB16153-1996）

[5] 中华人民共和国，居室空气中甲醛的卫生标准[S]，（GB/T16127-1995）

[6] WHO, Formaldehyde (CICAD 40)[S], Geneva, 2002

[7] 李睿、杨旭、刘杰、等，用于体内和体外实验的动态气体灌流染毒装置[J]，中国卫生工程学. 2003, 2(1): 33-34

[8] 刘杰、姚汉超、王光学、等，人造板材释放的甲醛所致遗传毒性的研究[J]，环境科学学报. 2003, 23(2): 134-137

[9] 王光学、王芸、严彦、等，木质人造板材所释放的甲醛气体对蚕豆根尖细胞微核率影响的研究[J]，中国环境科学. 2003, 23(1): 38-41

[10] 刘杰、刘宏亮、王光学、等，气态甲醛对小白鼠不同组织器官的氧化损伤作用[J]，环境与健康杂志. 2003, 20(2): 58-60

[11] 张遵真、衡正昌，用单细胞凝胶电泳技术检测和砷化物的 DNA 损伤作用[J]，中华防医学杂志. 1997, 31(6): 365-7

[12] 陈光荣、李 明、金 波、等，利用蚕豆（*Vicia faba*）根尖的微核技术监测青山湖污染的研究[J]. 中国环境科学. 1985, 5(4): 1-7

[13] 孟紫强、张波、秦国华，二氧化硫对小鼠不同组织器官的氧化损伤作用[J]. 环境科学学报，2001, 21(6): 768-773

[14] Joint Research Center Institute for the Environment, Commission of the European Communities, Indoor Air Pollution by Formaldehyde in European Countries[S], Report No. 7 of Environment and Quality of Life, EUR 13216 EN, 1990.

[15] American conference of governmental industrial hygienists, TLVs and BEIs[S], p69, 1330 Kemper Meadow Drive, Cincinnati, OH 45240-1634, USA, 2002.

[16] 夏世钧、吴中亮主编，分子毒理学基础[M]，，湖北科学技术出版社，武汉，2001：105, 181

[17] 裘著革、晁福寰、孙咏梅、等，高效液相色谱-电化学检测法测定脱氧核糖核酸分子氧化损伤标志物8-羟基脱氧鸟苷，[J]分析化学，2001, 29(7): 765-767

Studies on the Gonoto Xicity of Indoor Air Formaldehyde

Yang Xu, Li Rui, Liu Jie, Wang Guangxue, Lu Zhisong, Yan Yan, Qiao Yan

Lab. of Environmental Science, College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079

Abstract Objective: To understand more about genotoxicity of indoor air formaldehyde. Methods: Bio-markers are single cell gel electrophoresis (SCGE), cellular micro-nucleolus assay and organic superoxide dismutase (SOD): emulation mode were used for making "indoor air formaldehyde" and for subjects' exposure. Result: the genotoxicity of gaseous formaldehyde at 3 mg/m^3 on cells is very clear. Discussion: Three possible molecular mechanisms on the genotoxicity are discussed in this paper.

Keywords formaldehyde, genotoxicity, IAQ, emulation mode for subject exposure, SCGE, cellular micro-nucleolus assay, SOD