· 论著 ·

人造板材释放的甲醛对小鼠骨髓细胞微核率影响

赵倩 段丽菊 刘英帅 鲁志松 乔琰 严彦 杨旭

【摘要】目的 探讨不同浓度气态甲醛对暴露小鼠的骨髓嗜多染红细胞微核的诱发效应。方法 用不同剂量气态甲醛对小鼠进行连续动态染毒处理 72 h, 取小鼠骨髓细胞制片, 观察小鼠骨髓嗜多染红细胞微核形成率, 从而判断气态甲醛对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核的诱发效应。结果 经甲醛染毒处理后, 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率逐渐升高, 与对照组相比有极显著性意义。结论 甲醛可不同程度地影响小鼠骨髓嗜多染红细胞的微核形成率, 并呈良好的剂量- 效应关系。

【关键词】甲醛; 小鼠骨髓细胞; 微核

【中图分类号】Q 7 【文献标识码】A 【文章编号】1006-2483(2004)06-00018-03

Effect of Formaldehyde from Artificial Based Boards on Micronucleus of Mice Marrow Polychromatic Erythrocyte

ZHAO Qian, DUAN Li-ju LIU Ying-shuai, LU Zhi-song, QIAO Yan, YAN Yan, YANG Xu. Staff Room of Basic Medicine, Coal Sanitation School of Henan, Ping Dingsan 467013, China

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effects induced by various concentrations of gaseous formaldehyde on the formation of micronucleus in mice marrow polychromatic erythrocyte. **Methods** Mice were consistently exposed to different doses of gaseous formaldehyde for 72 hours; MN formation rate in marrow PCE was detected. **Results** Compared with the control, MN formation rate increases significantly. **Conclusion** Different concentrations of formaldehyde can affect the formation of MN in marrow PCE respectively, which showed a significant dose-related effect.

【**Key words**】 formaldehyde; mice marrow polychromatic erythrocyte; micronuleus

甲醛是一种常见的装修型化学性室内空气污染物。在诸多的室内污染物中, 甲醛以其来源广、毒性大、污染水平高、污染时间长等特点, 成为我国家庭和职业最严重的室内空气污染物之一。室内甲醛可来源于室外的工业废气、汽车尾气、光化学烟雾、室内的建筑材料、装饰材料和生活用品, 以及家用燃料和烟叶的不完全燃烧等。随着人们生活水平的不断提高, 室内装修已成为时尚, 由装修所用木质人造板材所释放的甲醛成为室内甲醛的主要来源。新装修房屋室内甲醛浓度一般在 0.1 mg/m^3～4.0 mg/m^3 之间[1], 远远超出国家规定的卫生标准(我国居室内甲醛浓度的卫生标准为 0.08 mg/m^3 (GB/T 16127-1995), 公共场所空气中甲醛浓度标准[2]为 0.12 mg/m^3, 木质人造板材的甲醛释放量限值为 0.12 mg/m^3)[3]。大量研究表明, 甲醛对人体健康有多方面的危害, 主要涉及到: 对呼吸道和眼部刺激作用、致敏作用和免疫毒性、遗传毒性和致癌作用、神经毒性等诸多方面[4,5]。研究采用小鼠骨髓嗜多染红细胞(polychromatophilic erythroblasts, PCE)微核试验, 对木质人造板材释放的气态甲醛的遗传毒性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

昆明种纯系小鼠, 雄性, 鼠龄 5 周, 体重 22～25 g, 购自湖北省疾病预防控制中心。

1.2 试剂

甲醇: 国产分析纯; Giemsa 染液: 将 Giemsa 原液用 pH 7.4 的磷酸缓冲 1∶9 稀释(Giemsa 原液的配制: 称取 Giemsa 粉 1.5 g, 量取丙三醇 75 ml、甲醇 75 ml。于 Giemsa 粉中加少量丙三醇, 用研钵研磨, 将 75 ml 丙三醇全部加入, 并转移至烧杯中。于 60℃水浴中放置 2 h, 时时搅拌。冷却后将 75 ml 甲醇加入, 过滤后倒入储备瓶中保存备用。)

基金项目: 国家"十五"科技攻关项目(2001BA 704B 01)

作者单位: 467013 平顶山, 河南煤炭卫生学校基础医学教研室(赵倩); 华中师范大学生命科学学院(段丽菊、刘英帅、鲁志松、乔琰、严彦、杨旭)

第一作者简介: 赵倩(1972-), 女, 讲师, 研究方向: 分子毒理学

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3　仪器

WH-2 小型智能环境气候舱(武汉市宇信科技开发有限公司), 4160-2 甲醛测定仪(美国 INTERSCAN 公司), 普通光学显微镜, 解剖剪, 大、小镊子各 1 把, 止血钳, 晾片架, 载玻片。

1.4　方法

1.4.1　染毒

将 20 只昆明纯系雄性小鼠随机分为 4 组: 对照组和三个甲醛染毒组, 每组 5 只小鼠。甲醛气体采用仿真方案制备, 将木质人造板放在 WH-2 小型智能环境气候舱中, 调节板材数量, 使舱持续稳定地输出一定浓度的甲醛染毒气体。舱参数: 舱气温为(23±0.5)℃, 舱气湿为(45±5)%, 过舱气体流量为 1 L/min, 气体的甲醛浓度由美国产 4160-2 型甲醛测定仪测定, 灵敏度为 0.012 mg/m^3, 准确度为±0.024 mg/m^3, 数字显示。

实验染毒采用吸入式染毒, 将实验小鼠置于染毒缸(8.4 L 通气式干燥器改制而成)中连续动态染毒 72 h, 进气口甲醛浓度分别设定为 0.7 mg/m^3(23℃)、1.0 mg/m^3(23℃)和 3.0 mg/m^3(23℃), 对照组也在同样的染毒缸中吸入经过滤的新鲜空气(甲醛浓度< 0.01 mg/m^3)。染毒期间动物可以自由进食和饮水。

1.4.2　制片与染色

取材: 各试验组小鼠在染毒后 24 h 脱臼处死, 取其股骨, 用纱布擦净骨骼表面的肌肉, 剪掉股骨头, 露出骨髓腔。

涂片: 用止血钳挤出骨髓, 涂于滴有 2 μl 生理盐水的载玻片上, 按血清学常规涂片, 约 2～3 cm 长度, 在空气中自然晾干。

固定: 将载玻片放入甲醇中固定 5～10 min, 然后在空气中晾干。

染色: 用 Giemsa 染液染色 10～15 min。蒸馏水轻轻冲洗载玻片, 自然晾干。

1.4.3　观察与统计

Giemsa 染色后, 嗜多染红细胞呈灰蓝色, 成熟红细胞呈粉红色。选择细胞形态完整, 分散均匀, 染色良好, 背景清晰的区域, 在油镜下观察计数嗜多染红细胞的微核, 以有核细胞形态完好作为判断制片优劣的标准。典型的微核多为单个、圆形、边缘光滑整齐, 嗜色性与核质一致, 呈紫红色或蓝紫色, 微核在胞浆内离开主核或与主核相切, 其直径通常为红细胞的 1/20 至 1/5。每只动物计数 2 000 个嗜多染红细胞(PCE)细胞, 统计其微核(MN)细胞率, 微核率以千分率表示。微核判断标准参照 Heddle(1984 年)[6]的报道。采用 t 检验法分析各染毒组与对照组之间以及各对照组之间差异的显著性。

2　结果

2.1　染毒缸进气口的甲醛浓度测量值见表 1

表 1 为舱输出气管(即染毒缸进气口)的甲醛浓度测量值。从表 1 可见, 实际染毒剂量的平均水平(0.6822 mg/m^3、1.088 mg/m^3、2.9709 mg/m^3)和设定值(0.7 mg/m^3、1.0 mg/m^3、3.0 mg/m^3)非常吻合, 而且在染毒过程中浓度非常稳定, 变异系数仅为 13.7%、9.17%和 6.00%, 说明用环境气候舱制备和提供用于染毒的气体甲醛是可靠、可行的。

表 1　动态染毒缸进气口气态甲醛浓度的测量值

染毒装置(一)		染毒装置(二)		染毒装置(三)	
时间(h)	浓度(mg/m^3)	时间(h)	浓度(mg/m^3)	时间(h)	浓度(mg/m^3)
0.00	0.82	0.00	1.08	0.00	3.28
7.00	0.89	5.00	1.05	5.00	2.85
12.00	0.68	12.00	1.06	7.00	3.24
23.00	0.67	23.00	1.20	9.00	3.06
27.00	0.70	30.00	1.32	23.00	2.87
33.00	0.67	38.00	1.00	30.00	2.90
48.00	0.61	48.00	1.01	37.00	3.06
52.00	0.60	52.00	1.01	48.00	2.90
57.00	0.59	62.00	1.05	55.00	2.83
72.00	0.57	72.00	1.10	72.00	2.74
平均值($\bar{x}$)	0.6822	平均值($\bar{x}$)	1.088	平均值($\bar{x}$)	2.9709
标准差(s)	0.0937	标准差(s)	0.1065	标准差(s)	0.1849
变异系数(%)	13.7	变异系数(%)	9.17	变异系数(%)	6.00

2.2　气态甲醛对小鼠骨髓细胞微核率的影响见表 2

由表 2 得出, 各染毒剂量组微核率均高于对照组, 且在 3.0 mg/m^3 水平下可见部分细胞的细胞核呈不规则松散状。各染毒组与对照组相比细胞微核率差异均有极显著性(P < 0.01), 说明气态甲醛具有明显的诱导小鼠骨髓产生嗜多染红细胞微核的作用。各染毒剂量组微核率随着染毒浓度的增大而增大, 表明甲醛可不同程度地影响小鼠骨髓嗜多染红细胞的微核形成率, 并呈良好的剂量-效应关系。

表 2　气态甲醛对小鼠骨髓细胞微核率的影响

染毒剂量组	动物数(只)	PCE 细胞数	小鼠骨髓细胞微核率(‰)
对照组	5	2000×5	1.29±0.24
0.7 mg/m^3	5	2000×5	2.75±0.65**
1.0 mg/m^3	5	2000×5	3.92±1.03**
3.0 mg/m^3	5	2000×5	8.79±0.82**

注: 各染毒组与对照组相比, ** P < 0.01

2.3　微核形态

在油镜下观察发现, 嗜多染红细胞呈灰蓝色, 细

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

胞形态完整, 分散均匀, 染色良好, 背景清晰。微核形态圆形, 边缘光滑整齐, 着色与主核一致, 多为单个微核, 偶见双微核。高剂量(3.0mg/m³)组出现部分细胞的细胞核呈不规则松散状。

3 讨论

3.1 甲醛与微核的产生

微核试验是检测各种理化诱变因子所致遗传损伤的一个常用指标, 是致癌危险性及其它遗传危害短期测试的有效整体动物实验方法, 也是室内环境污染物遗传损伤的检测指标之一。小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验具有经济、简便、快速等优点, 且试验结果可信度高, 是国际上公认的检测化学物质致突变性的标准方法之一。

王光学[7]等研究了木质人造板材释放的甲醛对蚕豆根尖细胞微核率的影响, 结果表明, 蚕豆根尖细胞微核率与甲醛气体的浓度有良好的正相关性, 甲醛气体可以通过液相的吸收产生高浓度的蓄积, 从而引起浸泡其中的根尖细胞发生DNA 损伤。

本研究通过小鼠整体实验表明, 木质人造板材所释放的气态甲醛能够诱发小鼠骨髓 PCE 微核的形成, 且随染毒浓度的增大, 微核率明显升高, 存在明显的剂量- 效应关系。提示木质人造板材所释放的气态甲醛对动物的染色体具有损伤效应。在高剂量(3.0mg/m³)作用下出现部分细胞的细胞核呈不规则松散状, 提示高浓度气态甲醛不仅对动物细胞的染色体具有损伤效应, 而且可能在细胞核水平上具有损伤作用。气态甲醛引起细胞染色体损伤的机制尚未完全阐明, 需进一步研究。

3.2 仿真式染毒方案的应用

研究中采用了仿真式染毒方案。其"仿真"主要体现在两方面: 一、气态甲醛的制备是采用真实的木质人造板材所释放的甲醛气体, 而不是市售甲醛溶液来配制的染毒气体; 二、仿真式暴露染毒, 即通过吸入法进行染毒, 这也是机体暴露于室内甲醛的实际方式, 使得这种染毒方案更接近于真实情况, 所得实验结果也能比较好地说明实际生活中气态甲醛的毒性特征。

3.3 试验方法的改进

取材方法的改进。常规的小鼠骨髓微核试验常采用小牛血清冲洗骨髓腔的方法采取小鼠骨髓细胞, 本研究则直接采用止血钳挤压的方法采取小鼠骨髓细胞, 并且不必离心, 直接涂片, 从而简化了试验步骤, 并大大降低了试验成本, 同时也可减少因离心而造成的对细胞不必要的损伤。

涂片方法的改进。为防止涂片不均匀、细胞重叠而影响观察, 同时也为防止细胞缩水, 本研究在涂片时滴加了适量生理盐水。经反复实验发现, 滴加生理盐水量过少, 则达不到预期目的; 滴加生理盐水量过多, 则细胞密度过低, 不能满足试验需要。以每片滴加 2 μl 生理盐水最为合适, 镜检发现细胞单层排列, 分布均匀, 密度适当。

3.4 安全限值标准的考虑

我国居室内甲醛浓度的卫生标准为0.08mg/m³(GB/T 16127-1995), 公共场所空气中甲醛浓度标准[2]为 0.12mg/m³, 木质人造板材的甲醛释放量限值为 0.12mg/m³[3], 这些标准数值均与相应的国际标准相当或一致。但是我国的职业场所甲醛浓度标准高达3.0mg/m³(2.5ppm)[8], 远远高于美国的职业阈限值 0.37mg/m³[9]。研究结果表明, 在 0.6822mg/m³、1.088mg/m³和2.9709mg/m³水平的甲醛气体作用下, 小鼠骨髓细胞微核率均较空白对照组出现明显升高的现象($P < 0.01$), 提示在这种浓度水平下, 存在一定的安全隐患。认为 3.0mg/m³ 的职业卫生标准限值值得进一步考虑。

【参考文献】

[1] 鲁志松, 杨旭. 室内空气甲醛对人体健康的危害[J]. 中国环境卫生, 2003, 6(1): 22-30.

[2] 袁国良, 王金玲, 张晓峰, 等. 公共场所卫生[M]. 北京: 中国建材工业出版社, 1997. 628-629.

[3] GB18580- 2001, 室内建筑装饰装修材料- 人造板及其制品中甲醛释放限量[S].

[4] WHO, Formaldehyde, Concise International Chemical Assessment Document 40[R]. World Health Organization, Geneva, 2002. 12-16.

[5] 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(5): 704-708.

[6] Heddle JA. The bone marrow micronucleus test. In: Kilbey B J ed. Hanbook of mutagenicity test procedures, 2nd Ed[M]. Amstcrdam: Elsevier Press, 1984. 441-457.

[7] 王光学, 王芸, 严彦, 等. 木质板材释放的甲醛对蚕豆根尖细胞微核的影响[J]. 中国环境科学, 2003, 23(1): 38-41.

[8] 张敏轩. 劳动卫生与职业病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 248-249.

[9] 曹佳. 微核试验——原因、方法及其载人群监测和毒性评价中的应用[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000. 12.

(收稿日期: 2004-09-12)

(本文编辑: 唐婴)

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net