【论著】

气态甲醛致小鼠微核作用的实验研究

王晓平[1,2], 段丽菊[2], 赵倩[2], 李晨岚[2], 杨旭[2]

[摘　要]　**目的**: 探讨气态甲醛对细胞遗传物质可能产生的损伤作用。**方法**: 选用 SPF 级昆明种纯系雄性小鼠作为研究对象, 用不同剂量气态甲醛对小鼠进行连续动态染毒处理 72 h, 于染毒结束后 24 h 观察骨髓嗜多染红细胞微核形成率, 于首次染毒后第 15 d 观察睾丸细胞的微核率。**结果**: 气态甲醛能诱导小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率和早期精细胞微核率增加, 均呈现一定的剂量—反应关系。表现出显著的遗传毒性 ($P < 0.01$) 和生殖毒性 ($P < 0.05$; $P < 0.01$)。**结论**: 气态甲醛对小鼠体细胞和生殖细胞的染色体具有明显的损伤作用。

[关键词]　气态甲醛; 小鼠; 微核; 遗传毒性; 生殖毒性

[中图分类号] R994.6　　[文献标识码] A　　[文章编号] 1003 - 8507 (2006) 01 - 0001 - 03

EXPERIMENTAL STUDY ON THE EFFECT OF GASEOUS FORMALDEHYDE ON MICRONUCLEI IN MICE.

WANG Xiao-ping, DUAN Li-ju, ZHAO Qian, et al. Department of chemistry and biology, Guangxi Yulin Normal College, Yulin, 537000

Abstract: Objective: To explore potential demage effect of gaseous formaldehyde on genetic material of cells. **Methods:** SPF - class Kun - Ming male mice were used in experiment. The mice were exposed in different concentration of gaseous formaldehyde, the agent was administrated by continuous dynamic inhalation. After finished exposure to formaldehyde for 24 hours, micronucleus rate in bone marrow polychromatic erythrocytes was measured. Exposed for 15 days, the micronucleus rate in sperm cells was measured. **Results:** Gaseous formaldehyde could induce the increase of micronucleus rate in bone marrow polychromatic erythrocytes and early stage sperm cells all with a dose - dependent relationship between them. it indicates significant genetic toxicity ($P < 0.01$) and reproductive toxicity ($P < 0.05$; $P < 0.01$). **Conclusion:** Gaseous formaldehyde has significant demage effect on chromsome in body cells and sperm cell.

Key words: Gaseous formaldehyde; Mice; Micronucleus; Genetic toxicity; Reproductive toxicity

近年来, 随着人们生活水平的不断提高, 室内装修已成为时尚。随之而来的室内空气污染及其对人体健康的危害, 已经成为环境科学领域中的一个突出问题。在诸多室内污染物中, 甲醛以其来源广、毒性大、污染水平高、污染时间长等特点, 成为我国重要的室内空气污染物之一, 对其进行生物安全性评价不容忽视。微核试验是检测外来化合物对染色体损伤的重要方法, 为进一步探讨甲醛的致突变作用, 本实验采用骨髓嗜多染红细胞和生精细胞微核分析的方法, 结合动态气体灌流染毒技术, 对甲醛的遗传毒性和生殖毒性进行了研究。

1　材料与方法

1.1　**试验动物**　SPF 级昆明种纯系雄性小鼠, 鼠龄 7～10 周, 体重 (28 ±5) g, 购自湖北省医学实验动物中心。

1.2　**试剂**　10 %的福尔马林溶液为 Sigma 公司产品; 甲醇、环磷酰胺、胰酶均为国产分析纯。Giemsa 贮存液: 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, 用研钵研磨至糊状后将剩余的丙三醇全部加入, 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。睾丸细胞分离液 (TM 液): NaCl60.5g, KCl33.9g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$1.8g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$3.0g, $Na_2HPO_4$8.5g, $KH_2PO_4$0.9g, 葡萄糖 10 g, 加蒸馏水至 10 L, 调 pH 至 7.2～7.3, 4 ℃保存。

1.3　**仪器**　WH - 2 小型智能环境气候舱, 4160 - 2 甲醛测定仪, 普通光学显微镜等。

1.4　**染毒方法**　小鼠生殖细胞和骨髓嗜多染红细胞微核实验的分组和染毒方法均相同, 分批进行。即每一实验均将 20 只昆明纯系雄性小鼠随机分为 4 组: 阴性对照组和 3 个甲醛染毒组, 每组 5 只小鼠。甲醛气体由 WH - 2 小型智能环境气候舱提供, 将一定浓度的液态甲醛置于小型智能环境气候舱中, 使舱持续稳定地输出一定浓度的甲醛染毒气体。舱参数为: 舱气温为 (23 ±0.5) ℃, 舱气湿为 (45 ±5) %, 过舱气体流量为 1L/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。

染毒采用吸入式染毒, 将小鼠置于染毒缸中连续动态染毒 72h, 染毒缸进气口甲醛浓度分别设定为 0.5 mg/m^3 (23 ℃)、1.0 mg/m^3 (23 ℃) 和 3.0 mg/m^3 (23 ℃), 阴性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。

1.5　**骨髓嗜多染红细胞微核试验**　主要检测气态甲醛对小鼠骨髓嗜多染红细胞的遗传毒性。各试验组小鼠在染毒后

[基金项目] 国家科技部"十五"科技攻关计划基金 (2001BA704B01, 2004BA809B0604, 2004BA809B0605)

[作者单位] 1. 广西玉林师范学院化学与生物系, 玉林, 537000; 2. 华中师范大学生命科学学院环境科学实验室

[作者简介] 王晓平 (1968～), 女, 研究生, 讲师, 主要从事动物生理学和分子生物学研究.

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

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。用止血钳挤出骨髓，涂于滴有 1 μl 生理盐水的载玻片上，按血清学常规涂片方法将骨髓细胞均匀涂开，自然干燥，甲醇固定 10 min，晾干，用 10 % Giemsa 染液染色 30 min，蒸馏水轻轻冲洗载玻片，自然晾干。采用双盲法油镜下每只动物计数 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。

1.6 **生殖细胞微核试验** 主要检测气态甲醛对小鼠生精细胞的生殖毒性。各试验组小鼠从首次染毒日起计至第 15 d 脱臼处死，取一侧睾丸，置 10 ml TM 液中除去其被膜后剪碎，加入 15 mg 胰酶。置于电磁搅拌器上，低速搅拌 15 min 后，以单层擦镜纸过滤，再以 1 000 r/min 的转速离心 5 min，废弃上清液，加适量 TM 液制成混合均匀的细胞悬液。取适量细胞悬液推片，自然干燥，固定染色方法同上。采用双盲法油镜下每只动物计数 1 000 个生精细胞，统计其微核（MN）细胞率，微核率以千分率表示。

1.7 **统计分析** 采用 SigmaPlot8.0 统计分析软件对实验数据进行分析，用 t - 检验法检验各染毒组与对照组之间差异的显著性。

2 结果

2.1 **气态甲醛对小鼠骨髓细胞微核率的影响** 小鼠骨髓细胞微核实验结果见表 1，从表 1 可以看出各染毒组与阴性对照组相比其细胞微核率差异均统计学意义（$P < 0.01$），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加，表明气态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 1 骨髓细胞微核率（$\times 10^{-3}$）

染毒剂量组 (mg/m^2)	动物数 (只)	PCE 细胞数 (个)	小鼠骨髓细胞微核率 ($\bar{x} \pm s$)
阴性对照	5	2000 ×5	1.29 ±0.24
0.5	5	2000 ×5	2.75 ±0.65 **
1.0	5	2000 ×5	3.92 ±1.03 **
3.0	5	2000 ×5	8.79 ±0.82 **

注：** $P < 0.01$

2.2 **气态甲醛对小鼠生殖细胞微核率的影响** 气态甲醛各剂量组小鼠的早期精细胞微核率均高于阴性对照组，0.5 mg/m^3 剂量组的微核率与阴性对照组比较，差异有统计学意义（$P < 0.05$）；1.0 mg/m^3、3.0 mg/m^3 剂量组的微核率与阴性对照组比较，差异有统计学意义（$P < 0.01$），并且随着气态甲醛浓度的升高，生殖细胞微核率也逐渐升高，并呈良好的剂量 - 效应关系。虽然甲醛也引起初级和次级精母细胞的微核率增加，但差异无统计学意义，见表 2。

表 2 各阶段生殖细胞微核率（$\times 10^{-3}$）

组别 (mg/m^3)	动物数 (只)	观察细胞 (个)	初级精母细胞微核 ($\bar{x} \pm s$)	次级精母细胞微核 ($\bar{x} \pm s$)	早期精细胞微核 ($\bar{x} \pm s$)
阴性对照	5	5000	0.00 ±0.00	0.40 ±0.55	1.00 ±1.00
0.5	5	5000	0.00 ±0.00	1.00 ±0.71	2.60 ±0.55 *
1.0	5	5000	0.00 ±0.00	0.80 ±1.10	4.00 ±1.00 **
3.0	5	5000	0.20 ±0.45	0.80 ±0.84	8.20 ±0.59 **

注：* $P < 0.05$，** < 0.01

3 讨论

甲醛对人体健康的影响涉及诸多方面，比如呼吸道和眼部刺激作用，致敏作用和免疫毒性，遗传毒性和癌症，肺功能损害等[1]，2004 年 6 月 15 日，世界卫生组织将甲醛提升为 A Ⅰ类化合物——人类致癌物[2]。我国职业流行病学调查资料证实，甲醛接触者恶性肿瘤及某些部位肿瘤的危险性有增加趋势[3]，动物研究表明甲醛是一种染色体断裂剂及非整倍体诱变剂[4]，大鼠吸入高浓度甲醛可诱发鼻鳞状细胞癌[5]。

哺乳动物微核试验是目前最常用的遗传毒理学试验之一，也可以用于生殖毒性的评价。微核试验的遗传学终点是观察染色体或有丝分裂器的损伤。由于测定方法比较简便、可靠，并且与染色体畸变率有很好的一致性，因此，近年来已成为筛选化学致突变物的一种常规方法。

3.1 **气态甲醛与微核的产生** 本实验采用动态气体灌流的方式，即通过吸入法进行染毒，这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。实验结果表明，气态甲醛在一定的浓度下能够诱发小鼠骨髓 PCE 微核和早期精细胞微核的形成，且呈明显的剂量 —效应关系，进一步肯定了甲醛是染色体断裂剂和基因毒性因子。甲醛诱发细胞遗传物质损伤的机制一方面可能是甲醛通过在体内自氧化和酶促氧化过程产生自由基，引起膜脂质过氧化作用，影响附着在膜上的蛋白质和各种酶的结构和功能，间接影响蛋白质、DNA 的损伤和修复过程，使细胞生理代谢紊乱、遗传物质受损伤；另一方面，在此过程中所产生的自由基还可攻击 DNA 链上嘌呤的 C8、胞嘧啶的 C5 和 C6 之间的双烯键，引起碱基损伤，导致碱基置换、脱嘌呤、DNA 链断裂等基因突变[6]。

3.2 **气态甲醛对骨髓细胞的遗传毒性** 小鼠骨髓微核试验是由 Sohid 和 Heddel 等在鉴别小鼠骨髓嗜多染红细胞（PCE）微核基础上建立的体内微核试验方法，并指出测定骨髓 PCE 微核发生率是检测细胞遗传损伤的一个非常有用的指标。文献报道，断裂剂在红细胞成熟的最后两个分裂周期达到有效浓度，对染色体的损伤最为严重，国内学者孟紫强[7]的研究表明，根据成年小鼠骨髓红细胞最后 2 次

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

分裂所需时间及分裂后到核逸出的时间，染毒后 24 h 微核率达最高值。本实验在连续动态染毒结束后 24 h 观察小鼠骨髓 PCE 微核，发现气态甲醛能够诱发小鼠骨髓 PCE 微核的形成，且随着染毒剂量的加大，出现微核的细胞数量显著增加，存在明显的剂量—效应关系。提示气态甲醛对小鼠体细胞染色体具有损伤效应，且随着浓度增加，对实验细胞的遗传毒性也在增强。

3.3　**气态甲醛对睾丸生精细胞的生殖毒性**　早期精细胞微核试验，是检测环境诱变剂对雄性生殖细胞染色体损伤作用有较好敏感性的一种方法，试验阳性是提示发生遗传损伤的有力指标。根据 Oakberg[8]的报道，小鼠从初级精母细胞的前细线期发育至早期精细胞需要 2 周左右。Tates[9]等的研究表明，初级精母细胞前细线期是检测依赖 S 期化学诱变剂的最佳作用阶段。本实验采用连续动态染毒 72 h 的方式，至杀鼠日止，相当于 2 周的时间，结果发现在气态甲醛浓度为 0.5 mg/m^3 时，就可引起早期精细胞微核率显著增加，而初级精母细胞和次级精母细胞与阴性对照组没有显著差异，表明甲醛是一种染色体的断裂剂，在很低的浓度下就可以诱发小鼠减数分裂前细线期的初级精母细胞发生染色体断裂增多，提示甲醛对雄性小鼠生殖细胞具有较强的遗传损伤作用，可能与精子畸形有关。

3.4　**微核与癌变**　一般认为微核是由染色体断裂遗留下来的断片（Fragments）演化而来的，在理论上，由诱变物诱发的微核，就其性质而言，也属于染色体畸变[10]。张昌杰[11]认为，可以考虑微核是恶变的先兆之一，先于癌细胞的出现，更早于临床症状之前。目前致癌机理研究中，染色体不稳定假说有愈来愈多的实验所支持。众多研究者认为，染色体的非随机断裂及由其所形成的染色体畸变，改变了细胞中遗传物质的平衡，使细胞的生长、分化失去协调，终而使细胞恶变。

众多实验表明，甲醛是一种染色体断裂剂及非整倍体诱变剂，已知甲醛与多种肿瘤的发生有关。Merk O[12]通过在 V79 中国小鼠上进行的动物实验，证实甲醛可以明显引起 DPC、姐妹染色单体的交换以及细胞内微核的增多，金力奋等[13]的研究证明甲醛有致人体淋巴细胞染色体断裂的作用，而刘金玲等[14]研究发现，甲醛暴露者胃癌发病的危险性是非暴露者的 2.9 倍。本实验从体细胞和生殖细胞两方面进行了研究，结果显示气态甲醛可致小鼠体细胞和生殖细胞微核发生率明显增高，说明气态甲醛能穿过骨髓和血睾屏障引起染色体损伤，是一种较强的体细胞和雄性生殖细胞染色体断裂剂。许多学者认为，体细胞突变可能导致癌瘤，并有很多实验研究结果支持，已成为化学致癌机理的主要理论。而生殖细胞遗传物质的改变可能导致严重的潜在危害，将会造成男性精子变异、变少，出现不孕不育或出生的子代变异。

3.5　**安全限值标准的考量**　随着对甲醛致突变性和致癌性的进一步认识，许多国家在制定甲醛的卫生标准时显得更加谨慎。我国居室内甲醛浓度的卫生标准为 0.08 mg/m^3（GB/T16127-1995），公共场所空气中甲醛浓度标准[15]为 0.12 mg/m^3，这些标准值均与相应的国际标准相当或一致。根据我国职业卫生标准（GBZ2-2002），目前甲醛在工作场所的最高容许浓度为 0.5 mg/m^3，高于美国的职业阈限值 0.37 mg/m^3[16]。而本实验发现气态甲醛浓度为 0.5 mg/m^3 时，小鼠骨髓细胞和生精细胞微核率均较阴性对照出现明显升高的现象，说明气态甲醛在很低的浓度下，已经能够引起小鼠遗传物质的突变，损伤染色体形成微核。

因此，甲醛对人体健康的危害是不容忽视的，怎样降低空气中甲醛浓度，将危害减到最低限度，是职业卫生工作者应予重视的迫切问题。

[参考文献]

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

[2] WHO. International Agency for Research on Cancer, classifies formaldehyde as carcinogenic to humans, Press release No 153, June 15, 2004.

[3] 蒋学之，张瑞稳，王移兰，等. 甲醛工人肿瘤死亡流行病学 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志，1990，8: 261.

[4] 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，1997，9 (2): 123.

[5] 肖红侠，王岳人，张海青. 室内甲醛污染现状及防治措施 [J]. 技术交流，2004，6: 31-35.

[6] 张玉林. 自由基医学 [M]. 乌鲁木齐: 新疆医学院出版社，1994，67.

[7] 孟紫强，桑楠，张波. 二氧化硫体内衍生物诱发小鼠骨髓嗜多染红细胞微核的效应 [J]. 环境科学学报，2003，20 (2): 239-243.

[8] Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse [J]. Nature, 1957, 180 (23): 1137-1138.

[9] Tates A D. Validation studies with the micronucleus test for early spermatids of rats. A tool for detecting clastogenicity of chemicals in differentiating spermatogonia and spermatocytes [J]. Mutagenesis, 1992, 7: 411-419.

[10] 张天宝. 微核试验筛检化学诱变物的价值及方法学上的研究近况 [J]. 环境与健康杂志，1986，3 (1): 43.

[11] 张昌杰，蔡亚娜. 微核与癌 [J]. 肿瘤防治研究，1984，11 (3): 129.

[12] Merk O, Speit G. Significance of formaldehyde induced DNA protein crosslinks for mutagenesis [J]. Environ Mol mutagen, 1998, 32 (3): 260-268.

[13] 金力奋，金海燕，何继亮. 胞质阻断微核法在检测学生接触甲醛的应用 [J]. 浙江预防医学，1998，10 (1): 13.

[14] 刘金玲，崔毅，贾崇奇，等. 甲醛职业暴露与胃癌关系的回顾性队列研究 [J]. 中国慢性病预防与控制，1998，6 (4): 175-177.

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

[16] American conference of governmental industrial hygienists. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices [M]. Cincinnati: Technical information office, 2002.

[收稿日期] 2005—04—25

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