文章编号: 1001-0580(2006)06-0709-02　中图分类号: R 122.1　文献标识码: A　【实验研究】

亚急性甲醛吸入对小鼠肝细胞 DNA 损伤作用 *

王丽,乔琰,鲁志松,丁书茂,严彦,杨旭

摘　要: 目的　检测亚急性甲醛吸入对小鼠肝细胞的损伤作用,并探讨用归一化处理方法解决单细胞凝胶电泳重复性差的可行性。**方法**　将小鼠分别暴露于不同浓度的气态甲醛(0.5,1.0 和 3.0 mg/m^3)中染毒 14 d,每天 6 h,用单细胞凝胶电泳技术检测肝细胞 DNA 的损伤程度。**结果**　0.5 和 1.0 mg/m^3 的甲醛可造成 DNA 的严重断裂($P<0.001$),而 3.0 mg/m^3 的甲醛则引起显著的交联作用,归一化的结果与之相符,并表明不同浓度的甲醛导致不同程度和类型的 DNA 损伤。**结论**　甲醛可造成机体内肝细胞 DNA 的断裂和交联,该损伤可能是甲醛致癌机制之一;归一化可以弥补单细胞凝胶电泳实验重复性不佳的缺陷。

关键词: 气态甲醛;肝细胞 DNA 损伤;单细胞凝胶电泳;归一化

Damage effect of subacute formaldehyde on hepatocytic DNA in mice

WANG Li, QIAO Yan, LU Zhisong, et al. College of Life Sciences, Central China Normal University (Wuhan 430079, China)

Abstract: Objective　To explore the hepatocellular DNA damage after subacute formaldehyde exposure and the application of normalization as a statistic method to improve the reproducibility of single cell gel electrophoresis (SCGE, comet assay). **Methods**　Mice were respectively exposed to different concentrations of gaseous formaldehyde for 14 d, 6 h per day. SCGE was performed to detect the DNA damages. And normalization was used to discuss the reproducibility of SCGE assay. **Results**　Formaldehyde could induce different kinds of DNA damages: formaldehyde caused significant DNA strands breaks at concentrations of 0.5 and 1.0 mg/m^3 ($P<0.001$) while crosslinks were induced at 3.0 mg/m^3. Results from normalization were in consistent with the former results and indicated that DNA damages were enhanced with the increase of formaldehyde level. **Conclusion**　Formaldehyde was both a DNA strands breaks and crosslinks agent to the hepatocytes *in vivo*, which may be one of the possible mechanisms of formaldehyde as a carcinogen. Normalization could improve the reproducibility of SCGE assay.

Key words: gaseous formaldehyde; hepatocellular DNA damage; single cell gel electrophoresis; normalization

甲醛(formaldehyde, FA)已被列入确定的人类致癌物[1]。由于甲醛致癌的原因还不甚清楚,故本文依据我国新颁布的职业卫生标准[2],模拟甲醛在生产和生活中的实际暴露方式,建立亚急性染毒模型,检测气态甲醛对小鼠肝细胞的损伤作用。同时,单细胞凝胶电泳技术(SCGE)虽然应用广泛[3],但是该技术受诸多因素影响,实验结果往往不能得到很好的重复。故本文引入归一化的数学处理方法,对单细胞凝胶电泳实验中可重复性差的问题加以探讨,以期使该技术得到更为广泛的应用和发展。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂　WH-2 型小智能环境气候舱(武汉市宇信科技开发有限公司);8.4L 通气式干燥器;4160-2 型甲醛测定仪(美国 INTERSCAN 公司);DYY-Ⅱ型电泳槽(北京市六一仪器厂);DYY-11B 型三恒电泳仪(北京市六一仪器厂);低温冷冻离心机(SIGM);BH-2 型荧光显微镜(OLYMPUS);0.635 cm 150 万相素数码相机(日本 Nikon 公司)。10%福尔马林溶液(美国 Sigma 公司);正常熔点琼脂糖(Shanghai);低熔点琼脂糖(美国 Premega 公司);吖啶橙(A);磷酸盐缓冲液(PBS)(无 Ca^{2+} Mg^{2+});0.4%台盼蓝溶液;其他试剂均为分析纯。

1.2　实验方法

1.2.1　实验动物及染毒方案　选用湖北省疾病预防控制中心提供的健康雄性 BALB/C 小鼠(20 g 左右)20 只,随机分为 4 组,即 1 个空白对照组和 3 个染毒组。采用动态吸入染毒,在玻璃缸中进行(由 8.4 L 通气式干燥器改制)。经 WH-2 型小型智能环境气侯舱配制后,持续稳定地输出浓度分别为 0.5,1.0 和 3.0 mg/m^3 的甲醛气体。甲醛浓度经 1460-2 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,染毒组每日染毒 6 h,连续 14 d。对照组在同等条件下的玻璃缸内,吸入经过滤的新鲜空气在不同浓度下进行重复实验。染毒期间,实验动物可以自由进食、进水。

1.2.2　肝细胞悬液制备　实验动物在染毒结束后禁食 24 h,颈椎脱臼处死。迅速取出肝脏,用眼科剪剪成糜状(约 1 mm^3 的组织块),4 层纱布过滤;将细胞滤液 1000 r/min 离心 5 min,用 PBS 重新悬浮离心管底的细胞,并调整细胞密度。台盼蓝排斥法检测细胞活力,细胞存活率接近 90%,细胞密度为 10^5～10^6 个/ml。

1.2.3　单细胞凝胶电泳实验　按文献[4,5]方法操作并稍加改进。在完全磨毛的载玻片上辅 3 层凝胶,将三明治式凝胶在 4 ℃下于裂解液中裂解 2 h 后,在 20 V、190 mA 碱性条件下电泳 20 min,再经 0.4 mol/L Tris 缓冲液(pH7.5)中和 30 min 后,用吖啶橙(20 mg/L)染色 5 min,双蒸水洗掉表面的染料,24 h 内在荧光显微镜下观察。

1.3　统计分析　分析不同浓度甲醛作用下单个细胞的拖尾

* 基金项目: 国家科技部"十五"科技攻关计划基金资助(2001BA704B01,2004BA809B0604,2004BA809B0605)

作者单位: 华中师范大学生命科学学院环境科学实验室,武汉 430079
作者简介: 王丽(1983-),女,四川泸州人,学士,主要从事环境毒理学和分子生物学研究。
通讯作者: 杨旭

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

率。通过荧光显微镜观察细胞,用 CASP 彗星图象分析软件(从 http://www.casp.of.pl/下载)自动分析。分析指标为尾部 DNA %和尾矩。实验测得的数据用 SigmaPlot 9.0 统计软件分析,作双尾 t 检验。将各数据进行归一化处理时,按以下公式计算:

$$\text{相对 Tail DNA \%} = \frac{\text{染毒组的尾矩(尾部 DNA \%)}}{\text{空白组的尾矩(尾部 DNA \%)}}$$

(令空白组的尾矩和尾部 DNA %为 1)。

2 结 果

2.1 亚急性甲醛吸入对小鼠肝细胞的损伤作用(表 1) 当甲醛浓度为 0.5 和 1.0 mg/m^3 时,尾部 DNA %及尾距与空白对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.001$)。说明此浓度下甲醛诱导 DNA 链的断裂。当甲醛浓度为 3.0 mg/m^3 时,尾部 DNA %与空白组基本保持一致,差异无统计学意义($P > 0.05$),而尾矩显著下降且低于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。说明在 3.0 mg/m^3 时甲醛诱导核内 DNA 交联物的形成,使 DNA 在电泳中泳动受阻,迁移率降低,参数值下降。

表 1 不同浓度气态甲醛对小鼠肝细胞 DNA 的损伤作用($\bar{x} \pm s$)

组别(mg/m^3)	尾部 DNA %	尾矩
气态甲醛浓度 0.5	43.01 ±0.69 **	13.65 ±0.37 **
空白对照组	38.72 ±0.80	10.59 ±0.34
气态甲醛浓度 1.0	49.77 ±0.83 **	18.85 ±0.50 **
空白对照组	40.64 ±1.30	13.88 ±0.73
气态甲醛浓度 3.0	36.54 ±1.33	11.19 ±0.71 **
空白对照组	41.11 ±2.33	15.15 ±1.28

注:t 检验,与同一组中的空白对照组相比,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$

2.2 归一化的处理结果(图 1) 从图中可以看出甲醛浓度与 DNA 损伤之间的效应趋势。在低浓度范围内,随甲醛浓度的升高,相对尾部 DNA %和相对尾矩呈上升趋势,在甲醛浓度升至 1.0 mg/m^3 时 2 个值都达到顶点,此时的 DNA 断裂程度最严重。当浓度进一步升高到 3.0 mg/m^3 时,相对值已经低于 1.0,表明细胞内产生了 DNA 交联物。

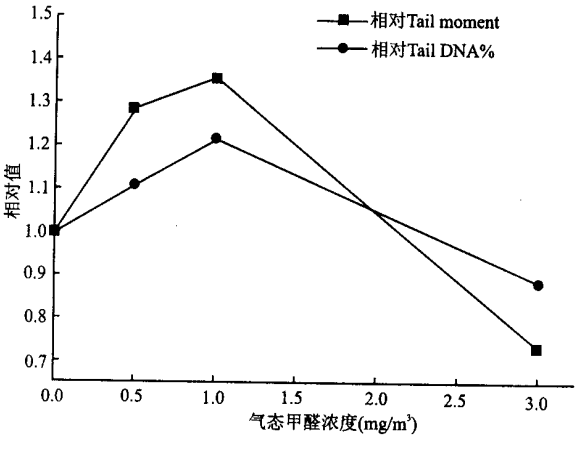

图 1 归一化后的统计结果

3 讨 论

本研究结果显示,不同浓度气态甲醛染毒 14 d 后,可导致小鼠肝细胞核 DNA 不同程度和类型的损伤。在 0.5,1.0 mg/m^3 浓度下,核 DNA 断裂程度明显高于对照组,在 3.0 mg/m^3 浓度作用下,彗星细胞的拖尾程度明显减轻,表明甲醛诱导了 DNA 交联物(DNA - DNA 交联和/或 DNA - 蛋白质交联)的产生,此结果与文献报道结果相吻合[5]。因此,根据本实验结果和其他相关报道[6]可以推测,甲醛引起的 DNA 断裂的交联应可能是甲醛致癌作用的机制之一。

单细胞凝胶电泳(SCGE)技术是近年来发展起来的一项在单细胞水平上检测 DNA 单双链断裂、碱性不稳定位点、DNA 交联和不完全切除修复位点等一系列 DNA 损伤的技术。但 SCGE 操作过程中的诸多因素,如环境温度、裂解及电泳条件、中和时间、光照等,都会影响实验结果,致使实验的可重复性较差[3,7,8]。同一项实验在不同的实验室甚至在同一实验室的不同时间也会出现不同的结果。本实验采用归一化的统计方法,以对照组为尺,即统一设置为 1,把各个剂量组与相应的对照组比对,用相对值表征 DNA 的损伤程度,从而探讨该方法的可行性。本研究结果证实了归一化的统计方法可以提高 SCGE 的可重复性,增加实验结果的准确性。因此,在实验过程中如果受实验条件限制,同一项研究不能在同一次实验中完成,或者由于实验本身的缺陷使实验的可重复性较差,建议采用归一化的处理方法弥补不可避免的环境因素或人为因素造成的实验误差。

(衷心感谢 Zbiniew Koza,Anddrzej Wojcik 和 Krzysztof Konca 3 位博士为本实验提供了 CASP 彗星分析软件)

参考文献

[1] International Agency for Research on Cancer[R]. IARC Classifies Formaldehyde as Carcinogenic to Humans,2004:30.
[2] 中华人民共和国国家职业卫生标准[S]. GBZ 2,2002.
[3] Tice RR,Agurell E,Anderson D,et al. Single Cell Gel/Comet Assay:Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing[J]. Environ Mol Muagen,2000,35:206 - 221.
[4] 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,1988,175:184 - 191.
[5] 鲁志松,严彦,乔琰,等. 气态甲醛对人体颊黏膜细胞遗传毒性的研究[J]. 中国环境科学,2003,23(6):566 - 569.
[6] Beall JR,Ulsamer AG. Formaldehyde and hepatotoxicity:a review[J]. J Toxicol Environ Health,1984,14(1):1 - 21.
[7] 鲁志松,乔琰,严彦,等. 人体颊黏膜细胞彗星实验方法学研究[J]. 环境科学研究,2004,173(23):66 - 70.
[8] Speit G,Trenz K,Schüpt,et al. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay[J]. Toxicology Letters,1999,110:73 - 78.

收稿日期:2005-09-18 (宋艳萍编辑 刘铁校对)

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net