

# 甲醛和苯联合致小鼠脑细胞 DNA损伤作用\*

刘晓丽, 原福胜, 张文珍, 张志红, 白剑英, 赵五红, 梁瑞峰

关键词: 甲醛; 苯; 单细胞凝胶电泳; DNA-蛋白质胶联

近年来, 由室内装修引起的室内空气污染问题日趋严重, 已成为危害公共健康的重要环境因素之一。甲醛和苯是室内主要挥发性有机物, 二者常具有共同污染源, 可能对暴露人群产生联合毒性效应。为探讨甲醛和苯联合神经毒性作用, 本研究采用单细胞凝胶电泳法和氯化钾-十二烷基磺酸钠(KCl-SDS)沉淀法测定小鼠脑细胞 DNA损伤, 观察不同浓度甲醛和苯单独及联合吸入染毒致小鼠神经系统毒性作用, 为综合评价甲醛和苯的安全性提供科学依据。

**材料与方 法** (1)仪器与试剂: 50L静式染毒柜(山西医科大学木器厂); CD-1大气采样器(江苏省金坛市荣华制造有限公司); DYY-7C电泳仪、DYCP-33A电泳槽(北京市六一仪器厂); BX51荧光显微镜(日本 OLYMPUS公司); RF-540荧光分光光度计(日本岛津公司); 超低温高速冷冻离心机(香港力抗发展有限公司)。甲醛(分析纯, 天津市化学试剂三厂); 苯(分析纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心); 正常熔点琼脂糖(NMPA)、低熔点琼脂糖(LMPA)、十二烷基肌氨酸钠(SLS)、溴化乙锭(EB)(美国 Am resco公司); 十二烷基磺酸钠、Hoechst 33258 荧光染料、小牛胸腺 DNA(美国 Sigma公司); 蛋白酶 K(美国 Merck公司)。(2)实验动物: 采用健康清洁级昆明种纯系小鼠(山西医科大学动物中心)60只, 鼠龄 7周, 体重 18~22 g, 雌雄各半, 在屏障环境中饲养, 饲养条件为(24±2)℃, 相对湿度为(55±10)%。(3)动物分组

与染毒: 将小鼠随机分为 10组, 每组 6只, 分别为对照组(清洁空气); 单纯甲醛 1.0 3.0 5.0 mg/m<sup>3</sup> 和苯 500 1 500 2 500 mg/m<sup>3</sup> 组; 甲醛苯联合染毒(0.5 甲醛+250 苯)、(1.5 甲醛+750 苯)、(2.5 甲醛+1250 苯) mg/m<sup>3</sup> 组。采用封闭静式吸入染毒, 每天 2 h 连续染毒 14 d, 次日处死小鼠。无菌取出脑组织, 制备脑细胞悬液待用。(4)单细胞凝胶电泳法: 按文献[1]方法操作, 在全磨砂载玻片上铺 3 层凝胶, 将凝胶在 4℃下裂解 1 h 后, 在 25 V、300 mA 碱性条件下电泳 20 min 用 EB(20 μg/ml)染色, 24 h 内在荧光显微镜 200 倍视野下观察结果, 每张片子随机观察 50 个细胞, 用彗星图像分析软件测量彗星细胞尾部 DNA 含量及彗星细胞尾距。(5)DNA-蛋白质交联(DPC)含量测定: 采用 KCl-SDS 沉淀法[2], 并计算 DPC 系数。计算公式: DPC 系数 = 交联 DNA / (交联 DNA + 自由 DNA)。(6)统计分析: 采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析和最小显著差法(LSD)两两比较。

**结 果** 单独给予甲醛和苯各剂量组小鼠脑细胞 DNA 均有不同程度损伤, 与对照组比较, 甲醛和苯单独染毒低、中剂量组脑细胞彗星尾部 DNA 含量增高, 尾距增大(表 1)。与甲醛、苯单独组分别比较, 联合染毒各剂量组彗星尾部 DNA 含量增高, 尾距增大(P<0.05)。甲醛和苯单独染毒中、高剂量组及联合染毒各剂量组的 DPC 系数高于对照(P<0.05), 随染毒剂量增加而升高。

表 1 甲醛、苯单独及其联合染毒对小鼠脑细胞 DNA 的影响(x±s)

组 别	甲醛 (mg/m <sup>3</sup> )	苯 (mg/m <sup>3</sup> )	彗尾 DNA 含量	彗星细胞尾距	DPC 系数 (%)
对照组	0	0	13.17±2.95	2.57±1.09	5.70±4.13
甲醛低剂量组	1	0	25.03±3.88 <sup>a</sup>	6.75±2.20 <sup>a</sup>	10.09±1.93
中剂量组	3	0	36.79±1.52 <sup>a</sup>	14.45±3.01 <sup>a</sup>	16.65±2.62 <sup>a</sup>
高剂量组	5	0	17.89±7.05	4.03±1.57	25.56±15.36 <sup>a</sup>
苯低剂量组	0	500	21.48±3.77 <sup>a</sup>	6.28±3.42 <sup>a</sup>	9.52±2.64
中剂量组	0	1 500	38.62±8.00 <sup>a</sup>	15.62±5.51 <sup>a</sup>	14.91±3.40 <sup>a</sup>
高剂量组	0	2 500	18.68±6.45	5.04±2.77	22.74±4.85 <sup>a</sup>
联合低剂量组	0.5	250	34.82±6.51 <sup>ab</sup>	11.33±3.72 <sup>ab</sup>	18.36±3.69 <sup>ab</sup>
中剂量组	1.5	750	49.84±6.15 <sup>ab</sup>	28.33±5.20 <sup>ab</sup>	30.52±6.30 <sup>ab</sup>
高剂量组	2.5	1 250	30.24±11.09 <sup>ab</sup>	9.97±4.01 <sup>ab</sup>	39.81±11.35 <sup>ab</sup>

注: 与对照组比较, <sup>a</sup>P<0.05 与单独染毒低、中、高剂量组比较, <sup>b</sup>P<0.05 动物数=6

**讨 论** 甲醛和苯是室内空气中最主要的 2 种污染物, 流行病学调查和动物实验显示, 甲醛和苯具有神经毒性[3-4]。本次实验结果显示, 甲醛、苯单独及其联合染毒均能引起小鼠脑细胞 DNA 损伤, 低浓度时主要引起 DNA 链断裂, 拖尾现象明显, 较高浓度时可以引起明显的 DNA-蛋白质交联作用,

与文献结果一致[5]。表明甲醛和苯对 DNA 的损伤类型与其染毒剂量密切相关, 其作用机制可能是当细胞电泳时, 在 DNA 发生交联作用的情况下, 可使核 DNA 泳出受阻而积聚在核内, 从而使细胞不出现拖尾现象[6-7]。

与单独染毒比较, 联合染毒低、中剂量组彗星细胞核 DNA 产生断片增多, 拖尾现象明显, 高剂量组 DNA-蛋白质交联物含量增多明显。提示甲醛、苯联合染毒可引起小鼠脑细胞 DNA 断裂和 DPC 效应, 加重 DNA 损伤程度; 联合染毒对小鼠脑细胞的 DNA 损伤作用明显强于单独染毒作用, 表明二者联合染毒对神经损害可能具有协同作用。

\*基金项目: 山西省自然科学基金(2009011049-2)  
作者单位: 山西医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 太原 030001  
作者简介: 刘晓丽(1984-)女, 山西晋中人, 硕士在读, 研究方向: 环境毒理学。  
通讯作者: 原福胜

## 参考文献

- [1] 徐钱, 杨旭, 杨光涛, 等. 不同浓度甲醛致小鼠肾细胞 DNA 损伤效应研究[J]. 环境科学学报, 2007 27(2): 276-281.
- [2] 刘英帅, 鲁志松, 杨继文, 等. 甲醛致人血淋巴细胞 DNA-蛋白质交联作用的定量研究[J]. 湖北预防医学杂志, 2004 15(4): 4-7.
- [3] 施健, 朱士新, 童智敏, 等. 甲醛对职业接触工人健康效应的流行病学调查[J]. 中国职业医学, 2006 33(3): 237-238.
- [4] Malek FA, Moritz KU, Fanghane J, et al. Effect of a single inhalative exposure to formaldehyde on the open field behavior of mice

- [J]. Int J Hyg Environ Health 2004 207(2): 151.
- [5] 周砚青, 王昆, 杨光涛, 等. 甲醛致大鼠脑细胞 DNA 损伤的初步研究[J]. 公共卫生与预防医学, 2006 17(6): 5-7.
- [6] 周建华, 胡晓磐, 徐瑛, 等. 甲醛致淋巴细胞 DNA 交联作用的体内实验研究[J]. 工业卫生与职业病, 2004 30(6): 360-363.
- [7] 陆肇红, 时锡金, 周建华, 等. 苯与甲醛致小鼠睾丸细胞 DNA 损伤联合作用[J]. 中国公共卫生, 2006 22(12): 1498-1499.

收稿日期: 2009-10-21

(解学魁编校)

文章编号: 1001-0580(2010)04-0464-02

中图分类号: R512.6

文献标志码: A

【实验研究】

## NF- $\kappa$ B 对小鼠冠状病毒性肝炎致病作用\*

晁漪澜<sup>1</sup>, 林培政<sup>2</sup>, 罗炳德<sup>1</sup>, 李华峰<sup>2</sup>, 万为人<sup>1</sup>, 郭进强<sup>1</sup>

**摘要:** 目的 探讨肝脏核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和血清辅助性 T 淋巴细胞 (Th1/Th2) 细胞因子方面对小鼠冠状病毒性肝炎的致病机制。方法 采用 4 周龄雄性 BALB/c 小鼠, 以鼠肝炎冠状病毒 (MHV-A59) 和大肠埃希菌作为生物致病因子, 建立 MHV-A59 鼠肝炎模型和大肠埃希菌鼠肝炎对照模型, 以正常健康小鼠为空白对照, 采用免疫组化法检测小鼠肝脏 NF- $\kappa$ B 表达 [吸光度 (A) 值], ELISA 法检测小鼠血清白介素-4 (IL-4)、干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 水平。结果冠状病毒模型组、大肠埃希菌对照小鼠肝脏 NF- $\kappa$ B 表达分别为 A=0.305 A=0.245, 外周血 Th1/Th2 (IFN- $\gamma$ /IL-4) 比值分别为 (2.17 $\pm$ 0.16), (2.09 $\pm$ 0.06) pg/mL, 均比正常组有明显升高, 差异有统计学意义 (P<0.05 或 P<0.01), 但冠状病毒模型组升高更明显。结论 肝脏 NF- $\kappa$ B 表达增强及血清 Th1/Th2 细胞因子失衡可能是小鼠冠状病毒性肝炎的致病机制之一。

**关键词:** 鼠肝炎冠状病毒; 致病机制; 肝脏核因子  $\kappa$ B; 血清辅助性 T 淋巴细胞

Expression of NF- $\kappa$ B and Th1/Th2 in mice with mouse hepatitis virus infection CHAO Yi-lan, LIN Pei-zheng, LUO Bing-de, et al. Department of Child and Adolescent Health School of Tropical Medicine and Public Health, Southern Medical University (Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** Objective To study expressions of NF- $\kappa$ B and T helper 1 (Th1)/T helper 2 (Th2) in mice with mouse hepatitis virus (MHV) infection. Methods Four weeks old BALB/c male mice were divided into three groups randomly: control group, MHV model group, and Bacillus coli group. The expression of NF- $\kappa$ B in mouse liver tissue was analyzed with immunohistochemistry. The level of interleukin-4 (IL-4) and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) in mouse serum were detected with ELISA. Results The expressions of NF- $\kappa$ B and Th1/Th2 (IFN- $\gamma$ /IL-4) of MHV group and Bacillus coli group increased obviously compared to that of control group (P<0.05 or P<0.01). Conclusion The increased expression of NF- $\kappa$ B in mouse liver and the disequilibrium of Th1/Th2 in serum are one of pathogenic mechanisms of mouse hepatitis.

**Key words:** MHV-A59; Pathogenic mechanism; NF- $\kappa$ B; Th1/Th2

病毒性肝炎与 NF- $\kappa$ B 表达的关系十分密切。Toll 样受体 (TLRs) 是宿主细胞识别各种病原微生物的受体<sup>[1]</sup>, 核因子  $\kappa$ B 是其中炎症反应的中枢因子, 在机体的炎症、免疫反应等方面发挥重要作用; 细胞因子是 NF- $\kappa$ B 所调控基因的表达产物, 介导和调节免疫应答和炎症反应<sup>[2]</sup>; 许多疾病的发生也与 Th1/Th2 类细胞失衡相关<sup>[3]</sup>。为探讨冠状病毒性肝炎与肝脏核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和血清辅助性 T 淋巴细胞 (Th1/Th2) 细胞因子的关系, 本研究建立冠状病毒鼠肝炎模型与大肠埃希菌鼠肝炎模型, 结合 MHV-A59 的嗜肝性特征, 从小鼠肝脏 NF- $\kappa$ B 表达水平和血清 Th1/Th2 细胞因子 [血清白介素-4 (IL-4)、干扰素 (IFN- $\gamma$ )] 比值变化进行观察。现将结果报告如下。

\* 基金项目: 国家自然科学基金; 广东省联合基金 (U0632009)

作者单位: 1 南方医科大学公共卫生与热带医学学院儿少卫生学系, 广州 510515 2 广州中医药大学

作者简介: 晁漪澜 (1988-), 女, 内蒙古人, 硕士在读, 研究方向为发热的病理生理学。

通讯作者: 罗炳德, 林培政

### 1 材料与方法

1.1 材料 (1) 动物与饲料: 清洁级 BALB/c 雄性小鼠, 4 周龄, 体重 (13 $\pm$ 2) g (南方医科大学动物实验中心, 动物合格证号: NO. 0030668); 普通饲料 (南方医科大学动物实验中心); 内生热饲料 (广东省医学实验动物中心) 配方: 80% 基础饲料 + 8% 蜂蜜 + 12% 猪油。(2) 试剂与仪器: NF- $\kappa$ B 一抗 (美国 Santa Cruz 公司); NF- $\kappa$ B 二抗, 二氨基联苯胺 DAB 显色试剂盒 (上海西唐科技有限公司); IL-4 原装试剂盒、IFN- $\gamma$  原装试剂盒 (上海轩昊试剂公司, IL-4 批号: A1010A0104U, IFN- $\gamma$  批号: A1010A0123U)。BX50 型显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); Powerwave HT 型酶标仪 (美国 Biotek 公司); JD801 数码医学显微图像分析系统 (江苏省捷达科技发展有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模 根据文献 [4] 造模。将 BALB/c 小鼠 18 只随机分为正常组、冠状病毒模型组和大肠埃希菌对照组, 每组 6 只。正常组予以普通饲料, 自由饮水及自然环境饲养。模型组和肠菌组小鼠先予以内生热饲料, 自由饮水和自