阳性株(17.1%),单独检出 mefA阳性株(6.6%),与上述报道基本一致,提示本地区肺炎链球菌对红霉素的耐药机制是 ermB基因和/或 mefA基因同时或单独介导耐药,其中以 ermB基因为主。此外,有 4株红霉素耐药的肺炎链球菌未检出 ermB和 mefA基因,提示可能存在其他耐药机制,有待进一步研究。

参考文献

〔1〕 Felmingham D, Canton R, Jenkins SG. Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001-2004[J]. J Infect, 2007, 55(2): 111-118.

〔2〕 Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Eighteenth Informational Supplement[S]. NCCLS, 2008.

〔3〕 Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(11): 2562-2566.

〔4〕 Schito GC. Resistance trends in *Streptococcus pneumoniae* (PROTEKT years 1-3[1999-2002])[J]. J Chemother, 2004, 16(Suppl 6): 19-33.

〔5〕 范火炤,王素萍,赵启玉,等.社区获得性肺炎流行特征及病原学分布[J].中国公共卫生,2008,24(7):825-827.

〔6〕 Song JH, Chang HH, Suh JY, et al. Macrolide resistance and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: a study of the Asian Network for surveillance of resistant pathogens(ANSORP)[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 53(3): 457-463.

〔7〕 Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(9): 2727-2734.

〔8〕 Pérez-Trallero E, Garcia-de-la-Fuente C, Garcia-Rey C, et al. Geographical and ecological analysis of resistance, coresistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain[J]. Antimicrob Agents and Chemother, 2005, 49(5): 1965-1972.

〔9〕 杨慧,饧永弘,Elisabet Nielsen,等.肺炎链球菌耐药基因 ermB、mefA、teM与转座子整合酶基因 intTn的检测[J].中华微生物学和免疫学杂志,2005,25(8):677-682.

〔10〕 曾雪峰,雷秉钧,吕晓菊,等.肺炎链球菌对抗生素的耐药性调查及对大环内酯类抗生素耐药机制研究[J].中国抗感染化疗杂志,2004,4(3):150-153.

收稿日期:2009-09-07 (孔繁学编辑 解学魁校对)

文章编号:1001-0580(2009)12-1517-02 中图分类号:R994.6 文献标志码:A 【实验研究】

甲醛对小鼠源性巨噬细胞 DNA损伤作用*

贺庆芝,许雪梅,孙杰

摘 要:目的 探讨甲醛对小鼠源性巨噬细胞(RAW264.7细胞)DNA的损伤作用。方法 用0,20,40,80,160,320 μmol/L甲醛处理 RAW264.7细胞 1 h。采用单细胞凝胶电泳技术检测甲醛对 RAW264.7细胞 DNA的损伤作用。结果 甲醛剂量为20,40,80,160 μmol/L时,RAW264.7细胞 DNA的迁移率和尾长分别为33.0%,49.7%,82.3%,38.3%和11.2,22.6,30.1,18.9 μm,与空白对照组4.3%和9.7 μm比较,差异有统计学意义($P<0.05$);当甲醛浓度达320 μmol/L时,细胞 DNA的迁移率和尾长分别为6.3%和9.3 μm,与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 低浓度甲醛可造成 RAW264.7细胞 DNA的损伤。

关键词:甲醛;DNA损伤;RAW264.7细胞

Damage effect of formaldehyde on DNA of RAW264.7 cell HE Qing-zhi, XU Xue-mei, SUN Jie. Branch of Cell Biology, Department of Life Science, School of Pharmacy and Life Science, Nanhua University (Hengyang 421001, China)

Abstract **Objective** To explore damage effect of formaldehyde on DNA of RAW264.7 cell. **Methods** Single cell gel electrophoresis was used for detecting the damage effect of formaldehyde on DNA of RAW264.7 cell. The RAW264.7 cell were exposed to 0, 20, 40, 80, 160, and 320 μmol/L of formaldehyde for 1 hr, respectively. **Results** It was shown that comet incidence and migration length of DNA of RAW 264.7 cells were increased remarkably in 20, 40, 80, 160 μmol/L group. But the comet incidence and migration length of DNA in 40 μmol/L group(49.7%, 22.6±18.5 μm) were more serious than 160 μmol/L group(38.3%, 18.9±17.5 μm). There was no differrence in comet incidence and migration length between 320 μmol/L group and control group. **Conclusion** The formaldehyde has damage effect on DNA of RAW264.7 cell.

Key words formaldehyde; DNA damage; RAW264.7 cell

甲醛是室内装修污染物的主要来源,也是一种生物内源性有机化合物。因其来源广、毒性大、污染水平高、污染时间长等特点,已成为当前环境监测的主要指标。动物实验表明,甲醛具有很强的免疫毒性和致癌作用,国际癌症研究所已将其列为人类致癌物质[1]。巨噬细胞是体内的一种主要免疫细胞,具有吞噬和清除外来异物、病毒、细菌、突变细胞等作用,从而保护机体健康。RAW264.7细胞是一种鼠源单核细胞源性巨噬细胞,本实验将此细胞用不同浓度的甲醛进行染毒处理,检测其 DNA的损伤情况,评价甲醛的遗传毒性。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 RAW264.7细胞(武汉大学中国典型培养物保藏中心);PRMI 1640培养基(美国 GIBCO公司);胎牛血清(杭州四季清公司);胰蛋白酶(美国 Hyclone公司);10%甲

* 基金项目:湖南省卫生厅基金(B2006105)
作者单位:南华大学药学与生命科学学院生物科学系细胞生物学教研室,湖南 衡阳 421001
作者简介:贺庆芝(1976-),女,湖南安仁人,讲师,硕士,主要从事遗传毒理学研究。

中国公共卫生 CPH

醛溶液、低熔点琼脂糖、正常熔点琼脂糖,溴化乙锭(美国 Sigma公司);十二烷基肌氨酸钠(华美生物工程公司);其余试剂均为国产分析纯。CO_2培养箱(美国 Shill公司);超净工作台(苏州安泰空气有限公司);DYY-2Ⅲ型电泳仪槽、DYY-21-1B型电泳仪(北京六一仪器厂);1×70型倒置荧光显微镜(日本 Olympus公司)。

1.2 细胞培养及分组处理 用含 10%胎牛血清的 PRMI 1640培养液调细胞密度至 1×10^5个/mL,37 ℃,5% CO_2条件培养。取对数生长期细胞,用 0.25%的胰酶消化,1 000 r/min离心 5 min,用磷酸盐缓冲液(PBS)制备单细胞悬液并调整细胞密度为 10^5~10^6个/mL,胎盼蓝法计数细胞活力。细胞活力应>95%。分装于 7支 2.0 mL的离心管中,其中 6支依次加入甲醛,终浓度分别为空白对照组,20,40,80,160和 320 μmol/L,同时设 H_2O_2阳性对照组。将细胞放于 37 ℃培养箱内培养 1 h。

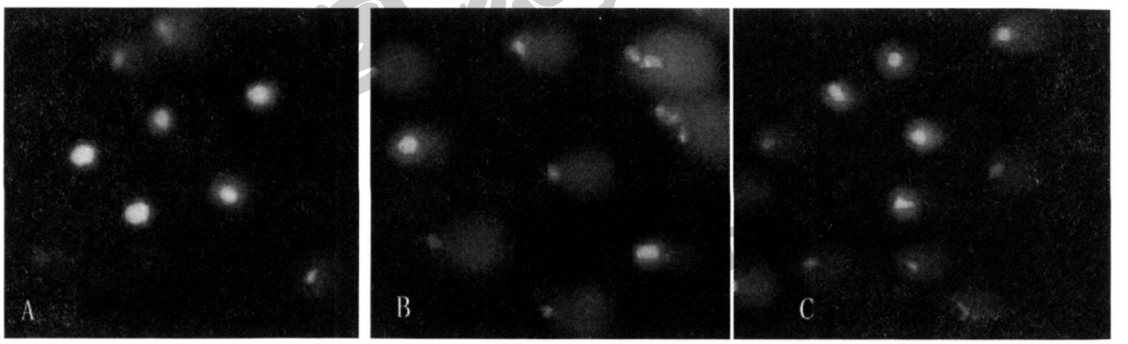
1.3 单细胞凝胶电泳 于载玻片上加第 1层 180 μL 1%的正常熔点琼脂糖,待其凝固后,37 ℃放置 4 h,然后铺上第 2层 75 μL 1.0%的低熔点琼脂糖;凝胶固化后铺第 3层 1.0%的低熔点琼脂糖 50 μL和细胞悬液 30 μL。参考文献[2]方法,进行单细胞凝胶电泳(25 V,300 mA,20 min)。取出载玻片浸入 0.4 mol/L Tris缓冲液(pH 7.5),中和 30 min,用溴化乙锭(20 mg/L)染色 5 min。24 h内用荧光显微镜观察拍照。用 CASP彗星分析软件分析彗星图片,每个处理组共观察 300个细胞。根据 DNA含量将 DNA损伤程度分为 5级[3]。

1.4 统计分析 采用 SPSS 11.0软件进行方差分析和 χ^2检验。

2 结 果

2.1 RAW 264.7细胞 DNA损伤彗星图(图 1) 空白对照组细胞核 DNA集中,呈圆形,无拖尾;80 μmol/L甲醛组细胞核 DNA分散,形成很长的彗星尾,160 μmol/L甲醛组细胞核 DNA有拖尾,但是大部分核物质比较集中,彗星尾没有 80 μmol/L甲醛组明显。

2.2 液态甲醛对 RAW 264.7细胞的损伤分级(表 1) 空白对照组细胞 DNA的迁移率和尾长分别为 4.3%和(9.7±4.3) μm;当甲醛浓度为 20,40,80,160 μmol/L时,细胞 DNA的迁移率和尾长分别为 33.0%,49.7%,82.3%,38.3%和(11.2±8.9),(22.6±18.5),(30.1±21.3),(18.9±17.5) μm。在一定范围内,随甲醛浓度升高细胞 DNA迁移率和尾长逐渐增加($P<0.05$)。



注:A:对照组;B:80 μmol/L甲醛组;C:160 μmol/L甲醛组。

图 1 甲醛对 RAW 264.7细胞 DNA的损伤彗星图像

表 1 甲醛对 RAW 264.7细胞 DNA损伤的影响

组别 (μmol/L)		各级损伤的细胞数(分级计数) 0级	1级	2级	3级	4级	迁移率 (%)	尾长 ($\bar{x}\pm s$, μm)
对照组		287	13	0	0	0	4.3	9.7±4.3
甲醛	20	201	45	31	13	0	33.0*	11.2±8.9*
	40	151	29	43	70	7	49.7*	22.6±18.5*
	80	53	48	105	64	30	82.3*	30.1±21.3*
	160	185	63	42	8	2	38.3*	18.9±17.5*
	320	281	18	1	0	0	6.3	9.3±5.5
H_2O_2		30	53	115	67	35	90.0*	32.1±14.5*

注:与对照组比较,* $P<0.05$。

3 讨 论

甲醛对 DNA损伤作用已被证实[4-6]。本实验表明,甲醛对 RAW 264.7细胞 DNA具有遗传性损伤作用,在一定范围内,随着甲醛浓度的增高,DNA的拖尾率和彗星尾长逐渐增高,呈现明显的剂量-反应关系。当甲醛达到 80 μmol/L时,拖尾率和尾长达到最高值,表明 DNA的断裂程度达到最高。但是当甲醛浓度达到 160 μmol/L或更高时,随着甲醛浓度的增高,其拖尾率和尾长反而下降;当甲醛浓度达到 320 μmol/L时,其拖尾率和尾长与对照组比较,差异无统计学意义,表明此时甲醛可能对细胞 DNA的损伤已不再以断裂为主,而主要引起细胞 DNA发生交联,由于交联的作用使核 DNA泳出受阻,而在核内集聚,不呈现彗星现象[7]。在较低剂量下,甲醛能所引起 RAW 264.7细胞 DNA损伤,且存在明显的剂量-效应关系,此时的损伤是以 DNA链断裂为主,而在高剂量作用下,甲醛对 RAW 264.7细胞的损伤可能是以 DNA-DNA或 DNA-蛋白交联为主。

参考文献

〔1〕 Salonen H, Pasanen AL, Lappalainen S, et al. Volatile organic compounds and formaldehyde as explaining factors for sensory irritation in office environments[J]. J Occup Environ Hyg, 2009, 6(4): 239-247.

〔2〕 汪垚,艾燕,彭光银,等.应用蚯蚓彗星实验检测环境甲醛的生态毒性[J].环境科学学报,2007,27(12):2032-2037.

〔3〕 余日安,陈学敏.镉对大鼠肝细胞 DNA损伤作用的研究[J].中国公共卫生学报,1998,17(2):106-107.

〔4〕 陆肇红,时锡金,周建华.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):1498-1500.

〔5〕 张美荣,周建华,时锡金.甲醛致 V79细胞 DNA交联作用的体外研究[J].中国公共卫生,2005,21(1):43-45.

〔6〕 董杰影,楼哲丰,郑重,等.用单细胞凝胶电泳技术检测甲醛对小鼠睾丸细胞的 DNA损伤[J].癌变·畸变·突变,2004,16(3):148-150.

〔7〕 杨丹凤,裘著革,张华山,等.典型醛类污染物单独及联合作用对小鼠脾淋巴细胞损伤的离体实验研究[J].卫生研究,2000,29(1):30-32.

收稿日期:2009-06-17 (解学魁编校)