

## 生血丸对甲醛致小鼠细胞损伤的影响

阎山林<sup>1\*</sup>, 张晓乐<sup>2</sup>, 王光普<sup>1</sup>, 严苏纯<sup>1</sup>

1. 天津医科大学总医院, 天津 300052

2. 天津市武清区人民医院, 天津 301700

**摘要:** **目的** 探讨生血丸对甲醛致小鼠肺、肝、脾、骨髓细胞及外周血淋巴细胞损伤的预防与修复作用及机制。**方法** 将小鼠随机分5组: 对照组、生血丸预防给药组(预防组)、生血丸治疗给药组(治疗组)、模型1组(对应治疗组)、模型2组(对应预防组)。ELISA法检测肺、肝、脾组织中羟自由基、超氧阴离子自由基、鸟氨酸脱羧酶(ODC)的活性。高倍镜下观察骨髓细胞及外周血淋巴细胞的微核率。**结果** 2个模型组小鼠肺、肝、脾组织内羟自由基、超氧阴离子自由基、ODC活性比对照组显著增加, 骨髓细胞及外周血淋巴细胞的微核率显著增加( $P<0.05$ ); 生血丸预防组及治疗组小鼠的肺、肝、脾组织中羟自由基、超氧阴离子及ODC的活性与对应模型组比较显著降低( $P<0.05$ ), 外周血淋巴细胞的微核率显著降低( $P<0.05$ )。**结论** 生血丸能有效预防和改善小鼠肺、肝、脾、骨髓细胞及外周血淋巴细胞由于甲醛造成的损伤。

**关键词:** 生血丸; 甲醛; 羟自由基; 超氧阴离子; 鸟氨酸脱羧酶; 微核率

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)13-1899-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.13.017

## Effects of Shengxue Pills on formaldehyde-induced cell damage in mice

YAN Shan-lin<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-le<sup>2</sup>, WANG Guang-pu<sup>1</sup>, YAN Su-chun<sup>1</sup>

1. General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

2. Wuqing District People's Hospital, Tianjin 301700, China

**Abstract: Objective** To explore the prophylactic and curative effects of Shengxue Pills on formaldehyde-induced cell damage of lung, liver, spleen, bone marrow, and peripheral blood lymphocytes in mice and the mechanisms. **Methods** The mice were randomly divided into five groups: control, Shengxue Pill prophylaxis, Shengxue Pill therapy, and two model groups. ELISA was used to detect hydroxyl radicals, superoxide anion radical, and ornithine decarboxylase (ODC) activities in the lung, liver, and spleen cells. Bone marrow cells and peripheral blood lymphocyte micronucleus rate were observed with high power lens. **Results** Hydroxyl radicals, superoxide anion radicals, and ODS activities in the cells of the organs in mice were investigated, and the number of bone marrow cells and peripheral blood lymphocyte micronucleus rate in mice in the prophylactic and therapeutic groups were significantly greater than those in the model groups, respectively as well as in the normal group. **Conclusion** Shengxue Pills could prevent and cure the formaldehyde-induced cell damages of the lung, liver, spleen, bone marrow, and peripheral blood lymphocytes of mice.

**Key words:** Shengxue Pills; formaldehyde; hydroxyl radicals; superoxide anions; ornithine decarboxylase; micronucleus rate

甲醛是一种无色、有强烈刺激性的气体, 易溶于水、醇和醚。甲醛室温时极易挥发, 可经呼吸道吸收, 对人体有一定致癌性。有研究显示 0.1 mmol/L 甲醛可促进 HT-29 人癌细胞株增殖, 并减少细胞凋亡<sup>[1]</sup>。另有研究表明, 接触甲醛工人的呼吸道对病原体感染的抵抗力明显减低, 易反复发作为上呼吸道感染性炎症, 而且每次的持续时间均较长<sup>[2]</sup>。还有研究发现, 甲醛能致鼠大脑额前叶皮

质神经细胞凋亡, 谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化物歧化酶浓度降低, 丙二醛浓度升高<sup>[3]</sup>。吸入一定浓度的甲醛对小鼠生殖细胞和体细胞具有致遗传毒性作用<sup>[4-5]</sup>。本实验通过观察生血丸对人工模拟甲醛环境中小鼠肺、肝、脾细胞中羟自由基、超氧阴离子自由基、鸟氨酸脱羧酶(ODC)以及骨髓嗜多染红细胞和外周血淋巴细胞微核率的影响, 探讨生血丸对甲醛致细胞损伤的预防与修复

收稿日期: 2014-02-27

\*通信作者 阎山林(1963—), 男, 主管药师, 本科, 主要研究方向为中药应用与不良反应。Tel: 13821422793 E-mail: yanshanlin2012@aliyun.com

作用及其机制<sup>[6]</sup>。

## 1 材料

### 1.1 动物

中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供雄性 BaIB/C 小鼠 150 只, 体质量 (20±2) g, 8~12 周龄, 许可证号 SCXK-(军) 2010-011。

### 1.2 主要材料和试剂

生血丸冻干粉: 天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂提供, 批号 K006。快速姬姆萨染液, 批号 20101109; 羟自由基检测试剂盒, 批号 20110224; 超氧阴离子检测试剂盒, 批号 20110303; 均为南京建成科技有限公司。类标准胎牛血清: 100 mL, 中美合资兰州民海生工程有限公司, 批号 20100921; 肝素钠注射液: 2 mL, 1.25 万单位, 长春高士达生化药业(集团)股份有限公司, 批号 20100502; 甲醛: 分析纯, 天津化工厂; ODC ELISA 试剂盒: 华北制药金坦生物科技股份有限公司, 批号 E03O0007。

### 1.3 主要仪器和设备

BX51 Olympus 倒置相差显微镜, 日本 Olympus 公司; ST-360 酶标仪, 上海科华实验系统有限公司; 3K-30 高速低温离心机, 美国 Sigma 公司; BP61 型电子分析天平, 德国 Sartorius; YSSN-1 型恒温恒湿环境模拟光催化反应舱, 南开大学环境系研制。

## 2 方法

### 2.1 实验分组

采用随机数字法将 150 只小鼠随机分为 5 组, 每组 30 只小鼠, 具体分组如下: 对照组, 模型 1 组(与治疗组对照), 治疗组, 模型 2 组(与预防组对照), 预防组。

### 2.2 造模与给药

小鼠适应性饲养 1 周后开始 ig 给药。对照组: 普食, 正常饮水 80 d; 模型 1 组: 暴露于甲醛环境舱 1 h/d, 40 d 后, 改正常食水 40 d; 治疗组: 暴露于甲醛环境舱 1 h/d, 40 d 后, 开始 ig 生血丸 2.5 g/kg, 正常食水; 模型 2 组: 正常食水 40 d 后, 开始暴露于甲醛环境舱 1 h/d, 40 d; 预防组: ig 生血丸 2.5 g/kg, 正常食水 40 d 后, 开始暴露于甲醛环境舱 1 h/d, 40 d。其中, 生血丸剂量为 2.5 g/kg (相当于临床人用剂量的 5 倍)<sup>[7]</sup>, 其均按 30 mL/kg 给药; 环境舱内甲醛染毒剂量为 1.29 mg/m<sup>3</sup>, 每日将小鼠放入环境舱内, 吸取甲醛 0.19 mL<sup>[4]</sup>放入

舱内的挥发容器内, 封闭舱门, 开启小风扇混匀气体, 1 h/d, 连续 40 d。

### 2.3 小鼠肺、肝、脾细胞自由基检测

实验末, 将小鼠颈椎脱臼处死后, 取肺、肝、脾脏组织 0.05 g。加 0.95 mL 的生理盐水制成 5% 组织匀浆, 按羟自由基、超氧阴离子自由基、ODC 检测试剂盒说明书操作, 以吸光度(A)值表示各样本中羟自由基、超氧阴离子自由基和 ODC 水平。

### 2.4 小鼠外周血淋巴细胞微核率检测

实验末, 经小鼠眼后静脉丛使用毛细管采血针采血, 涂片, 待干后, 甲醛固定 1 min, 使用快速姬姆萨染色液染色。染色后, 油镜下(10×100)观察。每个样本镜下随机选择胞浆完整的淋巴细胞 1 000 个, 出现小于主核 1/3、染色与主核基本一致, 有完全与主核分开的小核的细胞为 1 个微核细胞, 计算微核细胞比例。

### 2.5 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率检测

实验末, 小鼠颈椎脱臼法处死后, 取双侧股骨, 剔除骨上的肌肉组织, 剪去两头, 暴露骨髓腔, 用 6 号针头吸取胎牛血清冲出骨髓, 离心, 弃上清液用 0.5 mL 胎牛血清吹打将沉淀悬浮起来后涂片, 自然干燥后甲醛固定 1 min, 快速姬姆萨染色。油镜下(10×100)观察, 每个样本镜下随机选择胞浆完整的嗜多染红细胞 1 000 个。出现小于主核 1/3、染色与主核基本一致, 有完全与主核分开的小核的细胞为 1 个微核细胞, 计算微核细胞比例。

### 2.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析, 计数资料比较采用 *t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 对甲醛染毒小鼠肺组织中羟自由基、超氧阴离子及 ODC 的影响

表 1 显示: 模型 1、2 组的小鼠肺组织中超氧阴离子、羟自由基比对照组有显著增加 ( $P < 0.05$ ), 生血丸预防组及治疗组小鼠的肺组织中羟自由基、超氧阴离子分别与各自模型组相比有显著差异 ( $P < 0.05$ )。模型 1、2 组的肺组织中 ODC 均比对照组显著增加 ( $P < 0.05$ ); 生血丸预防组及治疗组小鼠肺组织中 ODC 明显低于各自模型组 ( $P < 0.05$ ); 治疗组与预防组之间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 1 生血丸对甲醛染毒小鼠肺组织中羟自由基、超氧阴离子、ODC 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

Table 1 Effects of Shengxue Pills on activities of hydroxyl radical, superoxide anion, and ODC in lung tissue of formaldehyde-infected mice ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	羟自由基 (A 值)	超氧阴离子 (A 值)	ODC (A 值)
对照	—	0.117±0.011	0.173±0.009	0.094±0.011
模型 1	—	0.166±0.039*	0.242±0.073*	0.165±0.035*
治疗	2.5	0.129±0.020 <sup>▲</sup>	0.186±0.039 <sup>▲</sup>	0.126±0.027 <sup>▲</sup>
模型 2	—	0.161±0.012*	0.235±0.030*	0.196±0.021*
预防	2.5	0.126±0.015 <sup>△</sup>	0.175±0.020 <sup>△</sup>	0.143±0.033 <sup>△</sup>

与对照组比较: \**P*<0.05; 与模型 1 组比较: <sup>▲</sup>*P*<0.05; 与模型 2 组比较: <sup>△</sup>*P*<0.05, 下表同

\**P*<0.05 vs control group; <sup>▲</sup>*P*<0.05 vs model group 1; <sup>△</sup>*P*<0.05 vs model group 2, same as blow

### 3.2 对甲醛染毒小鼠肝组织中羟自由基、超氧阴离子及 ODC 的影响

表 2 显示: 模型 1、2 组的小鼠肝组织中超氧阴离子、羟自由基比对照组有显著增加 (*P*<0.05), 生血丸预防组及治疗组小鼠的肝组织中羟自由基、超氧阴离子分别与各自模型组相比有显著差异 (*P*<0.05)。模型 1、2 组的小鼠肝组织中 ODC 均比对照组显著增加 (*P*<0.05); 生血丸预防组及治疗组小鼠肝组织中 ODC 明显低于各自模型组 (*P*<0.05)。治疗组与预防组之间无显著差异 (*P*>0.05)。

### 3.3 对甲醛染毒小鼠脾组织中羟自由基、超氧阴离子及 ODC 的影响

表 3 显示: 模型 1、2 组的小鼠脾组织中超氧阴

离子、羟自由基比对照组显著增加 (*P*<0.05), 生血丸预防组及治疗组小鼠脾组织中羟自由基、超氧阴离子分别与各自模型组相比有显著差异 (*P*<0.05)。模型 1、2 组的小鼠脾组织中 ODC 均比对照组显著增加 (*P*<0.05); 生血丸预防组及治疗组 ODC 明显低于各自模型组 (*P*<0.05); 治疗组与预防组之间无显著差异 (*P*>0.05)。

### 3.4 对甲醛染毒小鼠外周血淋巴细胞微核率、骨髓细胞微核率的影响

表 4 显示: 甲醛染毒后模型 1、2 组的小鼠外周血淋巴细胞微核率与骨髓细胞嗜多染红细胞均比对照组显著增加 (*P*<0.05); 分别与各自模型组相比, 生血丸预防组及治疗组微核率的表达明显低于相应

表 2 生血丸对甲醛染毒小鼠肝组织中羟自由基、超氧阴离子、ODC 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

Table 2 Effects of Shengxue Pills on activities of hydroxyl radical, superoxide anions, and ODC in liver tissue of formaldehyde-infected mice ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	羟自由基 (A 值)	超氧阴离子 (A 值)	ODC (A 值)
对照	—	0.215±0.025	0.221±0.015	0.372±0.024
模型 1	—	0.313±0.091*	0.309±0.020*	0.539±0.010*
治疗	2.5	0.216±0.037 <sup>▲</sup>	0.236±0.046 <sup>▲</sup>	0.374±0.041 <sup>▲</sup>
模型 2	—	0.319±0.077*	0.315±0.042*	0.545±0.042*
预防	2.5	0.223±0.063 <sup>△</sup>	0.240±0.026 <sup>△</sup>	0.421±0.033 <sup>△</sup>

表 3 生血丸对甲醛染毒小鼠脾组织中羟自由基、超氧阴离子、ODC 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

Table 3 Effects of Shengxue Pills on activities of hydroxyl radical, superoxide anions, and ODC in spleen tissue of formaldehyde-infected mice ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	羟自由基 (A 值)	超氧阴离子 (A 值)	ODC (A 值)
对照	—	0.079±0.031	0.102±0.009	0.136±0.021
模型 1	—	0.220±0.047*	0.279±0.027*	0.243±0.017*
治疗	2.5	0.139±0.071 <sup>▲</sup>	0.211±0.032 <sup>▲</sup>	0.132±0.003 <sup>▲</sup>
模型 2	—	0.149±0.025*	0.268±0.025*	0.232±0.051*
预防	2.5	0.113±0.041 <sup>△</sup>	0.202±0.041 <sup>△</sup>	0.146±0.033 <sup>△</sup>

表4 各组小鼠外周血淋巴细胞微核率、骨髓细胞微核率的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

Table 4 Comparison on micronucleus rate of lymphocytes in peripheral blood and of bone marrow cells of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

组别	剂量 / (g·kg <sup>-1</sup> )	微核率 / %	
		外周血淋巴细胞	骨髓嗜多染红细胞
对照	—	1.99 ± 0.320	1.90 ± 0.510
模型 1	—	5.75 ± 1.422*	3.92 ± 0.980*
治疗	2.5	3.12 ± 1.020 <sup>▲</sup>	1.81 ± 0.518 <sup>▲</sup>
模型 2	—	6.38 ± 2.002*	4.28 ± 1.632*
预防	2.5	3.67 ± 1.414 <sup>△</sup>	2.19 ± 0.766 <sup>△</sup>

的模型组 ( $P < 0.05$ )。

#### 4 讨论

甲醛是一种常见的空气污染物,有学者认为,甲醛能与蛋白中的氨基结合,生成甲酰化蛋白,推断甲醛可引起DNA突变;在美国职业卫生限值中把甲醛列为可疑人类致癌物即2A化合物。自由基又称游离基,具有强氧化性,一般情况下生命是离不开自由基活动的,但同时可损害机体的组织和细胞,进而引起慢性疾病及衰老效应。羟自由基能杀死红细胞,降解DNA细胞膜和多糖化合物,继而发生许多由它所致有害效应。超氧阴离子自由基在各种致病过程中是重要的介导因素,与癌症、机体炎症、组织过氧化、蛋白质交联变性、DNA损伤和细胞信号转导等都有直接的关系。ODC是多胺合成过程中第一个限速酶,多胺在细胞有丝分裂过程中起着重要作用,并与肿瘤的发生、发展密切相关。微核率是细胞损伤后染色体畸变断裂而形成的异常结构,细胞微核率反映细胞损伤及染色体畸变程度。生血丸方源于名老中医谢海洲教授临床验方,由鹿茸、黄柏、山药、白术、桑枝、白扁豆、稻芽、紫河车组成,具有补肾健脾、填精补髓之功效<sup>[8]</sup>。本

实验中甲醛染毒后小鼠肺、肝、脾组织内羟自由基、超氧阴离子、ODC均有显著增加( $P < 0.05$ )。而生血丸给药组显著降低( $P < 0.05$ )。给药组外周血淋巴细胞和骨髓细胞嗜多染红细胞微核率与模型组相比也有显著降低( $P < 0.05$ )。上述结果表明,生血丸采用中医补肾健脾法可有效预防和修复小鼠吸入甲醛气体后肺、肝、脾与外周血淋巴细胞、骨髓细胞的损伤,有预防和修复甲醛气体造成的细胞突变、染色体断裂作用,防止癌变。

#### 参考文献

- [1] Tyihak E, Bocsi J, Timar F, *et al.* Formaldehyde promotes and inhibits the proliferation of cultured tumor and endothelial cells [J]. *Cell Prolif*, 2001, 34(3): 135-141.
- [2] Lyapina M, Zhelezova G, Petrova E, *et al.* Flow cytometric determination of neutrophil respiratory burst activity in workers exposed to formaldehyde [J]. *Int Arch Occup Environ Health*, 2004, 77(5): 335-340.
- [3] Zarasiz I, Kus I, Akpolat N, *et al.* Protective effects of omega-3 essential fatty acids against formaldehyde-induced neuronal damage in prefrontal cortex of rats [J]. *Cell Biochem Funct*, 2006, 24(3): 237-244.
- [4] 童智敏, 朱士新, 施健, 等. 吸入甲醛对小鼠精子畸形率和骨髓细胞微核率的影响 [J]. *预防医学论坛*, 2006, 12(4): 391-393.
- [5] 付正英, 苏晓华, 魏本翠, 等. 不同浓度气态甲醛慢性染毒对小鼠卵泡发育影响的研究 [J]. *海南药学院学报*, 2012, 18(9): 1181-1184.
- [6] 严苏纯, 张晓乐, 王光普, 等. 生血丸对小鼠低剂量辐射损伤的预防与修复作用及机制 [J]. *中草药*, 2013, 44(5): 595-597.
- [7] 王光普, 荣子丹, 张晓乐, 等. 生血丸促进骨髓抑制小鼠造血功能的机制研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(6): 1162-1165.
- [8] 张晓乐, 王光普, 齐立聪, 等. 生血丸对低剂量敌百虫暴露小鼠肝、脾、骨髓细胞及外周血淋巴细胞的影响 [J]. *中医杂志*, 2013, 54(8): 691-693.