

## 低浓度苯和甲醛经呼吸道联合染毒对小鼠雌性生殖毒性的影响

邹丽君<sup>1</sup>, 高艳芳<sup>1</sup>, 贺印旒<sup>2</sup>, 张娟<sup>1</sup>, 胡恭华<sup>1</sup>

1. 赣南医学院基础医学院, 江西 赣州 341000;

2. 邵阳学院生物遗传教研室, 湖南 邵阳 422000)

**摘要:**目的 探讨低浓度苯和甲醛经呼吸道联合静式染毒对卵泡发育期的雌性ICR小鼠的生殖毒性的影响,为职业场所苯和甲醛联合暴露的预防与控制提供实验参考和科学依据。方法 采用(3<sup>2</sup>)的析因设计进行随机分组,苯和甲醛各三个剂量水平分别为:0 mg/m<sup>3</sup>、12 mg/m<sup>3</sup>、60 mg/m<sup>3</sup>和0 mg/m<sup>3</sup>、2 mg/m<sup>3</sup>、10 mg/m<sup>3</sup>,组合为9个不同剂量组,每组12只,呼吸道静式染毒,连续染毒14 d,2 h/d(中间间隔1 h)。染毒期间观察雌鼠的一般情况并每周称量体重,染毒结束时每组筛选6只动情期的雌鼠麻醉后采血分离血清测定卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH),分离重要脏器计算脏器系数,制备10%子宫匀浆测定子宫组织超氧化物歧化酶(SOD)活力和丙二醛(MDA)含量,剩余雌鼠与雄鼠按2:1进行持续3 d的合笼交配,3 d后继续分笼饲养至雌鼠产下仔鼠,观察雌鼠的生育力及胎仔的发育毒性。结果 ①苯不同剂量组雌鼠的体重变化不同,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),苯和甲醛对体重的增长有交互作用( $P < 0.05$ );②苯不同剂量组的脾脏系数差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),甲醛不同剂量组的脾脏系数、肾脏系数、卵巢系数差异有统计学意义;③苯不同剂量组和甲醛不同剂量组的子宫组织SOD活力差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),甲醛不同剂量组的子宫组织MDA含量差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),苯和甲醛联合染毒对雌鼠子宫组织MDA含量有交互作用( $P < 0.05$ );④苯和甲醛联合染毒对雌鼠血清FSH有交互作用( $P < 0.05$ );⑤甲醛不同剂量组的产仔数、活仔数、活仔重、4 d存活指数及4 d活仔重的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),苯和甲醛联合染毒对4 d存活指数、4 d活仔重有交互作用( $P < 0.05$ )。结论 ①低浓度苯(12 mg/m<sup>3</sup>、60 mg/m<sup>3</sup>)或甲醛(2 mg/m<sup>3</sup>、10 mg/m<sup>3</sup>)单独暴露对卵泡发育期ICR小鼠具有全身毒作用及生殖毒性,且甲醛的生殖毒性更显著;②低浓度苯(12 mg/m<sup>3</sup>、60 mg/m<sup>3</sup>)和甲醛(2 mg/m<sup>3</sup>、10 mg/m<sup>3</sup>)联合暴露对卵泡发育期ICR小鼠导致的全身毒作用及生殖毒性有交互作用,交互作用具体类型有待进一步研究。

**关键词:**苯;甲醛;联合染毒;小鼠;卵泡期;生殖毒性

中图分类号:R114 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2020)01-0011-07

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.01.003

### Effects of joint exposure to low concentration benzene and formaldehyde via respiratory tract on female mice reproductive toxicity

Zou Lijun<sup>1</sup>, Gao Yanfang<sup>1</sup>, He Yinni<sup>2</sup>, Zhang Juan<sup>1</sup>, Hu Gonghu<sup>1</sup>

(1. School of Basic Medicine, Gannan Medical College, Ganzhou 341000, Jiangxi, China;

2. Department of Biological Genetics, Shaoyang University, Shaoyang 422000, Hunan, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of joint static poisoning of low concentration benzene (BZ) and formaldehyde (FA) via respiratory tract on reproductive toxicity of female ICR mice at follicular phase, and to provide experimental reference and scientific basis for the prevention and control of combined exposure to benzene and formaldehyde in occupational sites. **Methods** The factorial design of (3<sup>2</sup>) was used for random grouping. The three dose of benzene and formaldehyde were 0 mg/m<sup>3</sup>, 12 mg/m<sup>3</sup>, 60 mg/m<sup>3</sup> and 0 mg/m<sup>3</sup>, 2 mg/m<sup>3</sup>, 10 mg/m<sup>3</sup>, respectively. The mice were exposed to benzene and formaldehyde via respiratory tract for 14 days, 2 hours per day (with 1-hour interval in the middle). During the exposure period, the general situation of female mice was observed and the body weight was measured weekly. At the end of the exposure period, 6 mice in estrus phase were selected from each group, anesthetized and blood was collected to determine follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) in serum. The important organs were separated and the organ coefficient was calculated. The 10% uterine homogenate was used to determine the activity of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in uterine tissue. The remaining female mice were mated with male mice at a ratio of 2:1 for a continuous 3-day co-housing period, and then housed separately until the female mice gave birth to offspring. The fertility and developmental toxicity of the offspring were observed. **Results** ① The body weight change of female mice in different dose groups of benzene was different, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). There was an interaction between benzene and formaldehyde on body weight gain ( $P < 0.05$ ). ② The spleen coefficient of female mice in different dose groups of benzene was different, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The spleen coefficient, kidney coefficient, and ovary coefficient of female mice in different dose groups of formaldehyde were different, and the difference was statistically significant. ③ The SOD activity of uterine tissue of female mice in different dose groups of benzene and formaldehyde was different, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The MDA content of uterine tissue of female mice in different dose groups of formaldehyde was different, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). There was an interaction between benzene and formaldehyde on the MDA content of uterine tissue of female mice ( $P < 0.05$ ). ④ There was an interaction between benzene and formaldehyde on the serum FSH of female mice ( $P < 0.05$ ). ⑤ The number of offspring, number of live offspring, live offspring weight, 4-day survival index, and 4-day live offspring weight of female mice in different dose groups of formaldehyde were different, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). There was an interaction between benzene and formaldehyde on the 4-day survival index and 4-day live offspring weight of female mice ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** ① Low concentration benzene (12 mg/m<sup>3</sup>, 60 mg/m<sup>3</sup>) or formaldehyde (2 mg/m<sup>3</sup>, 10 mg/m<sup>3</sup>) alone exposure to follicular phase ICR mice has systemic toxicity and reproductive toxicity, and the reproductive toxicity of formaldehyde is more significant. ② Low concentration benzene (12 mg/m<sup>3</sup>, 60 mg/m<sup>3</sup>) and formaldehyde (2 mg/m<sup>3</sup>, 10 mg/m<sup>3</sup>) combined exposure to follicular phase ICR mice leads to systemic toxicity and reproductive toxicity with interaction, and the specific type of interaction needs further study.

基金项目:江西省科技厅青年科学基金项目(20142BAB215014);赣南医学院创新团队项目(TD201801)

第一作者简介:邹丽君(1979-),女,硕士,讲师,研究方向:毒理学研究,E-mail:369403406@qq.com

通讯作者简介:胡恭华(1972-),男,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:毒理学研究,E-mail:hgh921401@163.com

$\text{m}^3$ ,  $2 \text{ mg}/\text{m}^3$ ,  $10 \text{ mg}/\text{m}^3$ , respectively, which were combined into 9 different dose groups, 12 mice in each group. The static poisoning via respiratory tract was conducted for the mice for 14 consecutive days, 2 hours per day (with 1 hour interval). During the poisoning period, the female rats condition were observed and weighed weekly. At the end of the poisoning, blood samples were collected from 6 female rats in each group after anesthesia and serum samples were separated to measure follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH). The vital organs were separated to calculate the viscera coefficient, and 10% uterine homogenate was prepared for measuring superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in uterine tissues. The remaining females and males were mated according to the proportion of 2 : 1 in a cage for 3 days. After 3 days, the females were kept in separate cages until they gave birth to offspring. The fertility of female mice and the developmental toxicity of their fetuses were observed.

**Results** ①The weight change of female mice in different dose BZ group was different, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). BZ and FA had an interactive effect on weight gain ( $P < 0.05$ ). ②The differences of spleen coefficients among different dose BZ groups were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The differences in spleen coefficient, kidney coefficient and ovary coefficient among different dose FA groups were statistically significant. ③There were significant differences in SOD activity between the different dose BZ groups and the different dose FA groups ( $P < 0.05$ ). There were statistically significant differences in MDA content in uterine tissues among different dose FA groups ( $P < 0.05$ ). The combined exposure to BZ and FA had an interactive effect on MDA content in the uterine tissues of female mice ( $P < 0.05$ ). ④The combined exposure to BZ and FA had an interactive effect on female serum FSH ( $P < 0.05$ ). ⑤There were statistically significant differences in litter size, live litter size, live litter weight, 4-day survival index and 4-day live litter weight among different dose FA groups ( $P < 0.05$ ), combined exposure to benzene and formaldehyde had an interactive effect on 4-day survival index and 4-day live litter weight ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** ①Exposure to low concentrations of BZ ( $12 \text{ mg}/\text{m}^3$ ,  $60 \text{ mg}/\text{m}^3$ ) and FA ( $2 \text{ mg}/\text{m}^3$ ,  $10 \text{ mg}/\text{m}^3$ ) alone has systemic toxicity and reproductive toxicity for ICR mice at follicular phase, and the reproductive toxicity of FA is more significant. ②Combined exposure to low concentrations of BZ ( $12 \text{ mg}/\text{m}^3$ ,  $60 \text{ mg}/\text{m}^3$ ) or FA ( $2 \text{ mg}/\text{m}^3$ ,  $10 \text{ mg}/\text{m}^3$ ) has an interactive effect on systemic toxicity and reproductive toxicity of ICR mice at follicular phase, and the specific type of interaction needed to be further studied.

**Key words:** benzene; formaldehyde; combined poisoning; mice; follicular phase; reproductive toxicity

苯和甲醛作为常见的工业原料在各行各业中应用广泛,成为典型的职业环境污染物和室内空气污染物<sup>[1]</sup>,引发的健康问题也成为国内外学者的研究热点。苯和甲醛均是人类确认的致癌物,两种毒物共同暴露可导致造血系统、神经系统、生殖系统等多种健康损害<sup>[2-4]</sup>。其中雌性生殖功能损害涉及亲子两代、毒作用表现更复杂,尤其低浓度苯和甲醛于卵泡发育期的联合暴露导致对雌性小鼠的生殖功能损害的研究较少。本文拟通过对卵泡发育期 ICR 小鼠进行低浓度苯和甲醛的联合暴露来探讨苯和甲醛的雌性生殖毒性,为苯和甲醛的生殖毒性评价提供参考线索和实验基础。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物 SPF 级雌性 ICR 小鼠 108 只,平均体重  $26.56 \text{ g}$ ,SPF 级雄性 ICR 小鼠 27 只,平均体重  $28.75 \text{ g}$ [购自湖南斯克景达实验有限公司,生产许可

证号:SCXK(湘)2016-0002,使用许可证编号 SYXK(赣)2018-0004]。屏障环境饲养和染毒,温度为  $18^\circ\text{C} \sim 24^\circ\text{C}$ ,湿度为  $40\% \sim 60\%$ 。

1.2 仪器和试剂 55 L 静式染毒柜(实验室自制,塑料材质、可密封、透明),Sorvall ST 8R 型高速冷冻式离心机(美国 Thermo Fisher),EON-EPOCH 酶标仪(美国 Biotek),ZXDP-R2800 电热恒温培养箱(上海智城),玻璃匀浆器;苯(分析纯,国药集团),37%甲醛水溶液(分析纯,国药集团),0.01 M PBS 缓存液,SOD 和 MDA 试剂盒(南京建成),FSH 和 LH 酶联免疫试剂盒(武汉华美)。

## 1.3 实验方法

1.3.1 分组和染毒 将 108 只 SPF 级雌性 ICR 小鼠采用两个因素、三个剂量水平( $3^2$ )的析因设计进行随机分组,苯和甲醛各三个剂量水平分别为: $0 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、

12 mg/m<sup>3</sup>、60 mg/m<sup>3</sup> 和 0 mg/m<sup>3</sup>、2 mg/m<sup>3</sup>、10 mg/m<sup>3</sup>，共有 9 个不同染毒组，每组 12 只。呼吸道静式染毒，于雌鼠卵泡发育期连续染毒 14 d，2 h/d(中间间隔 1 h)。染毒期间禁食禁水，其余时间自由饮水摄食，每 7 d 测量一次体重。染毒第 13 d、14 d 清晨连续 2 d 采用普通光学显微镜观察雌鼠阴道分泌物的方法判定雌鼠的动情周期，筛选动情期的雌鼠于染毒结束处死并采集生物标本进行指标检测，每组满足 6 只，剩余雌鼠与雄鼠按 2:1 的比例进行持续 3 d 的合笼交配再分笼饲养至雌鼠产下仔鼠、喂养 4 d 后处理全部动物。

1.3.2 雌鼠体重的称量 经呼吸道 14 d 染毒期间每 7 d 测量一次体重，后续继续交配并产仔的雌鼠每 7 d 测量一次体重。

1.3.3 雌鼠动情周期的判定 染毒第 13 d、14 d 清晨 7:00 对所有染毒雌鼠进行阴道分泌物涂片检查以判定动情周期，第 13 d 筛选动情前期动物，筛选标准为镜下有核上皮细胞占多、少量自细胞和角质化上皮细胞，第 14 d 筛选动情期动物，筛选标准为镜下大量角质化上皮细胞、典型样本呈落叶状。通过连续 2 d 对雌鼠动情周期的判定以保证染毒结束时处死的雌鼠均同步在动情期，雌鼠性激素水平具有可比性，每组满足 6 只。

1.3.4 雌鼠脏器系数的计算 染毒结束时筛选动情期的雌鼠采血后处死并解剖分离心、肝、脾、肾、子宫、卵巢，小心剪除结缔组织后于 PBS 缓冲液冲洗血污，滤纸吸干后快速在电子天平上称量并记录。

1.3.5 雌鼠子宫组织超氧化物歧化酶(SOD)活力和丙二醛(MDA)含量测定 染毒结束时将筛选动情期的雌鼠处死，解剖分离子宫，称量约 0.1 g 子宫组织与 PBS 缓冲液按 1:9 用玻璃匀浆器制备 10% 子宫匀浆，10 min 3000 r/min 离心，取上清液按照南京建成试剂盒的说明书测定和计算子宫组织 SOD 活力和 MDA 含量。

1.3.6 雌鼠血清卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)含量测定 染毒结束时筛选动情期雌鼠进行 10% 水合氯醛麻醉后摘眼球取血，5 min 2000 r/min 离心分离血清，按照武汉华美酶联免疫试剂盒的说明书测定和计算 FSH 和 LH 含量。

1.3.7 母鼠生育力及胎仔发育毒性判定 观察交配行为及妊娠结局(产仔数、活仔数，每窝平均体重)，计算生育指数、妊娠指数、活产指数和 4 d 存活指数。生育指数=(与雄鼠交配受孕的雌鼠数/与雄鼠同笼的雌鼠数)×100%，妊娠指数=(正常分娩雌鼠数/妊娠的雌鼠数)×100%，活产指数=(活产胎仔数/胎仔总数)×100%，4 d 存活指数=(哺乳 4 d 存活仔鼠数/活产胎仔总数)×100%。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 对数据进行整理与分析，计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示，采用完全随机(3<sup>2</sup>)析因设计的方差分析进行统计分析；计数资料以百分比表示，以  $\alpha=0.05$  为检验水准。

## 2 结果

2.1 苯和甲醛联合染毒 14 d 雌鼠体重变化情况 苯不同剂量组雌鼠体重增长不同，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，甲醛不同剂量组的体重增长呈现剂量越高增长越缓慢趋势，但差异无统计学意义，苯和甲醛联合染毒对雌鼠的体重增长有交互作用，有统计学意义( $P < 0.05$ )，表现为低剂量联合组体重增长较少( $G_6$  组平均体重增长为 1.68 g)，高剂量联合组体重增长较多( $G_9$  组平均体重增长为 2.95 g)。合笼交配产仔的孕鼠因受孕时间有先后，受孕后的体重变化无法同步，组间和组内的体重变化虽有记录但缺乏可比性。见表 1、表 2。

表 1 苯和甲醛联合染毒 14 d 雌鼠体重变化情况

组别	剂量/(mg·m <sup>-3</sup> )		初始体重/g	终点体重/g	体重增长/g
	苯	甲醛			
G <sub>1</sub>	0	0	26.44±1.11	29.52±1.32	3.07±1.09
G <sub>2</sub>	12	0	26.61±1.38	28.00±0.87	1.40±1.04
G <sub>3</sub>	60	0	26.43±1.38	27.96±1.23	1.52±1.10
G <sub>4</sub>	0	2	26.42±1.34	29.42±1.19	2.99±1.12
G <sub>5</sub>	0	10	26.40±1.27	28.57±1.41	2.17±0.99
G <sub>6</sub>	12	2	26.88±1.47	28.56±1.87	1.68±1.26
G <sub>7</sub>	60	2	26.90±1.56	28.39±1.08	1.50±1.25
G <sub>8</sub>	12	10	27.01±1.71	27.89±1.49	0.88±0.83
G <sub>9</sub>	60	10	26.70±1.68	29.69±1.41	2.95±1.23

注：①各组雌鼠数 12 只；②表内初始体重、终点体重和体重增长值均用( $\bar{x} \pm s$ )表示

表 2 各组雌鼠体重变化方差分析结果

影响因素	体重增长	
	F	P
苯	7.706	0.001
甲醛	0.605	0.549
苯联合甲醛	4.034	0.005

2.2 苯和甲醛联合染毒 14 d 对雌鼠脏器系数的影响 各处理组的心脏系数、肝脏系数、子宫系数的差异无统计学意义，无主效应及交互作用；苯不同剂量组和甲醛不同剂量组的脾脏系数的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，无交互作用；苯不同剂量组的肾脏系数、卵巢系数的差异无统计学意义，甲醛不同剂量组的肾脏系数、卵巢系数差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，无交互作用。见表 3、表 4

表 3 苯和甲醛联合染毒 14 d 对雌鼠脏器系数的影响

组别	剂量/(mg·m <sup>-3</sup> )		心脏系数/%	肝脏系数/%	脾脏系数/%	肾脏系数/%	子宫系数/%	卵巢系数/%
	苯	甲醛						
G <sub>1</sub>	0	0	0.465±0.025	4.923±0.721	0.320±0.049	1.129±0.076	0.511±0.081	0.062±0.013
G <sub>2</sub>	12	0	0.522±0.044	5.124±0.769	0.477±0.096	1.208±0.052	0.416±0.189	0.083±0.041
G <sub>3</sub>	60	0	0.487±0.039	5.031±0.912	0.338±0.093	1.181±0.095	0.403±0.265	0.064±0.022
G <sub>4</sub>	0	2	0.498±0.028	4.839±0.906	0.334±0.073	1.109±0.104	0.362±0.108	0.064±0.018
G <sub>5</sub>	0	10	0.514±0.069	5.099±1.057	0.331±0.036	1.234±0.151	0.334±0.122	0.055±0.015
G <sub>6</sub>	12	2	0.446±0.033	4.974±1.057	0.337±0.068	1.107±0.092	0.435±0.151	0.065±0.019
G <sub>7</sub>	60	2	0.496±0.099	3.918±1.228	0.294±0.091	1.047±0.062	0.396±0.164	0.058±0.021
G <sub>8</sub>	12	10	0.454±0.033	4.975±1.041	0.329±0.065	1.141±0.041	0.597±0.234	0.053±0.025
G <sub>9</sub>	60	10	0.481±0.051	4.958±1.091	0.312±0.076	1.130±0.111	0.350±0.117	0.042±0.017

注:①各组雌鼠数 6 只;②表内各脏器系数均用( $\bar{x}\pm s$ )表示

表 4 各组雌鼠脏器系数方差分析结果

影响因素	心脏系数		肝脏系数		脾脏系数		肾脏系数		子宫系数		卵巢系数	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
苯	0.577	0.566	0.760	0.474	4.325	0.019	0.835	0.440	1.672	0.199	1.683	0.197
甲醛	0.212	0.810	1.168	0.321	3.313	0.046	4.689	0.014	0.314	0.732	3.500	0.039
苯联合甲醛	2.267	0.077	0.635	0.640	2.211	0.083	1.431	0.240	1.665	0.175	0.457	0.767

2.3 苯和甲醛联合染毒 14 d 对雌鼠子宫组织 SOD 活力和 MDA 含量的影响 苯不同剂量组和甲醛不同剂量组的子宫组织 SOD 活力的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),无交互作用;甲醛不同剂量组的子宫组织 MDA 含量的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),苯和甲醛联合染毒对雌鼠子宫组织 MDA 含量有交互作用,有统计学意义( $P < 0.05$ ),表现为低剂量联合组升高较少(G<sub>6</sub>组平均 MDA 含量为 6.50 nmol/mg prot),高剂量联合组升高较多(G<sub>9</sub>组平均 MDA 含量为 7.79 nmol/mg prot),但均低于高剂量甲醛组(G<sub>5</sub>组平均 MDA 含量为 9.04 nmol/mg prot)。见表 5、表 6。

表 5 苯和甲醛联合染毒 14 d 对雌鼠子宫组织 SOD 活力和 MDA 含量的影响

组别	剂量/(mg·m <sup>-3</sup> )		SOD/(U·mg prot <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mg prot <sup>-1</sup> )
	苯	甲醛		
G <sub>1</sub>	0	0	0.66±0.14	3.49±1.23
G <sub>2</sub>	12	0	0.48±0.04	4.94±1.29
G <sub>3</sub>	60	0	0.53±0.13	4.69±0.89
G <sub>4</sub>	0	2	0.45±0.10	5.69±1.48
G <sub>5</sub>	0	10	0.48±0.11	9.04±1.21
G <sub>6</sub>	12	2	0.39±0.09	6.50±2.09
G <sub>7</sub>	60	2	0.37±0.08	4.45±1.53
G <sub>8</sub>	12	10	0.46±0.10	7.47±2.22
G <sub>9</sub>	60	10	0.44±0.09	7.79±2.92

注:①各组雌鼠数 6 只;②表内 SOD 和 MDA 值用( $\bar{x}\pm s$ )表示

2.4 苯和甲醛联合染毒 14 d 对雌鼠血清 FSH 和 LH 的影响 苯和甲醛单独染毒对雌鼠血清 FSH 无主效

应,苯和甲醛联合染毒对雌鼠血清 FSH 有交互作用,有统计学意义( $P < 0.05$ ),表现为低剂量联合组升高较多(G<sub>6</sub>组平均 FSH 为 64.52 mIU/ml),高剂量联合组升高较少(G<sub>9</sub>组平均 FSH 为 54.85 mIU/ml)。各处理组的 LH 差异无统计学意义,无主效应及交互作用。见表 7、表 8。

表 6 各组雌鼠子宫组织 SOD 活力和 MDA 含量方差分析结果

影响因素	SOD		MDA	
	F	P	F	P
苯	5.477	0.008	1.719	0.184
甲醛	6.699	0.003	8.768	0.001
苯联合甲醛	0.616	0.654	3.974	0.011

表 7 苯和甲醛联合染毒 14 d 对雌鼠血清 FSH 和 LH 的影响

组别	剂量/(mg·m <sup>-3</sup> )		FSH/(mIU·ml <sup>-1</sup> )	LH/(mIU·ml <sup>-1</sup> )
	苯	甲醛		
G <sub>1</sub>	0	0	51.34±2.89	143.04±4.23
G <sub>2</sub>	12	0	66.39±6.29	125.57±6.05
G <sub>3</sub>	60	0	56.91±9.13	137.22±9.89
G <sub>4</sub>	0	2	56.08±3.97	136.83±5.00
G <sub>5</sub>	0	10	56.65±5.90	136.46±7.18
G <sub>6</sub>	12	2	64.52±9.94	129.52±9.09
G <sub>7</sub>	60	2	50.33±3.73	144.67±5.85
G <sub>8</sub>	12	10	53.17±5.66	140.79±8.25
G <sub>9</sub>	60	10	54.85±7.05	138.62±9.92

注:①各组雌鼠数 6 只;②表内 FSH 和 LH 用( $\bar{x}\pm s$ )表示

表 8 各组雌鼠血清 FSH 和 LH 方差分析结果

影响因素	FSH		LH	
	F	P	F	P
苯	2.599	0.088	1.769	0.185
甲醛	1.420	0.255	1.158	0.325
苯联合甲醛	2.763	0.042	2.515	0.058

2.6 苯和甲醛联合染毒 14 d 对雌鼠生育力和胎仔发育的影响 苯和甲醛单独染毒时低剂量组的生育指数均低于高剂量组,而低剂量组的妊娠指数均高于高剂量组,苯和甲醛低剂量联合组的生育指数高、妊娠指数低,高剂量联合组的生育指数低、妊娠指数高;苯不同剂量组的产仔数、活仔数、活仔重、4 d 存活指数及 4 d 活仔重差异无统计学意义,甲醛不同剂量组的产仔数、活仔数、活仔重、4 d 存活指数及 4 d 活仔重差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),苯和甲醛联合染毒的 14 d 存活指数、4 d 活仔重有交互作用,有统计学意义( $P <$

0.05),表现为低剂量联合组降低( $G_6$  组平均 4 d 存活指数为 93.60% 及 4 d 活仔平均重为 2.33 g),高剂量联合组升高( $G_9$  组平均 4 d 存活指数为 100.00% 及 4 d 活仔平均重为 2.61 g)。见表 9、表 10、表 11。

表 9 苯和甲醛联合染毒 14 d 对雌鼠生育力的影响

组别	剂量/( $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ )		交配 雌鼠 /只	受孕 雌鼠 /只	生育 指数 /%	正常分 娩雌鼠 /只	妊娠 指数 /%
	苯	甲醛					
$G_1$	0	0	6	6	100.00	6	100.00
$G_2$	12	0	6	3	50.00	3	100.00
$G_3$	60	0	6	6	100.00	4	66.67
$G_4$	0	2	6	4	66.67	4	100.00
$G_5$	0	10	6	6	100.00	4	66.67
$G_6$	12	2	6	6	100.00	5	83.33
$G_7$	60	2	6	4	66.67	3	75.00
$G_8$	12	10	6	3	50.00	3	100.00
$G_9$	60	10	6	4	66.67	4	100.00

表 10 苯和甲醛联合染毒 14 d 对胎仔发育的影响

组别	剂量/( $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ )		产仔数 /(个·窝 <sup>-1</sup> )	活仔数 /(个·窝 <sup>-1</sup> )	活仔重 /(克·个 <sup>-1</sup> )	4 d 存活指数 /%	4 d 活仔重 /(克·个 <sup>-1</sup> )
	苯	甲醛					
$G_1$	0	0	11.8±1.7	11.5±1.9	1.68±0.12	100.0±0.0	2.62±0.32
$G_2$	12	0	9.3±1.6	7.7±2.9	1.66±0.56	88.9±1.9	2.49±0.17
$G_3$	60	0	11.8±2.1	11.5±2.4	1.53±0.26	95.7±5.1	2.31±0.13
$G_4$	0	2	13.5±1.3	13.5±1.3	1.42±0.32	74.2±0.0	1.94±0.09
$G_5$	0	10	10.3±1.3	9.3±0.9	1.79±0.28	100.0±0.0	2.78±0.08
$G_6$	12	2	12.8±1.9	12.8±1.9	1.34±0.18	93.6±6.6	2.33±0.12
$G_7$	60	2	12.7±1.5	12.7±1.5	1.56±0.23	91.4±9.1	2.38±0.07
$G_8$	12	10	9.7±3.1	9.3±3.2	1.79±0.26	90.3±8.7	2.35±0.12
$G_9$	60	10	12.5±1.7	11.8±1.7	1.69±0.14	100.0±0.0	2.61±0.25

注:表内产仔数、活仔数、活仔重、4 d 存活指数和 4 d 活仔重用( $\bar{x} \pm s$ )表示

表 11 各组胎仔发育方差分析结果

影响因素	产仔数		活仔数		活仔重		4 d 存活指数		4 d 活仔重	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
苯	12.181	0.132	2.755	0.081	0.298	0.744	1.325	0.283	0.222	0.803
甲醛	4.412	0.022	7.087	0.003	17.728	<0.001	6.016	0.007	11.165	<0.001
苯联合甲醛	1.054	0.398	1.652	0.190	2.315	0.083	5.690	0.002	6.924	0.001

### 3 讨论

苯和甲醛作为人类确认的致癌物和致突变物,经常联合暴露于职业环境和室内环境,如化工行业中用于原料生产各类化工产品、作为溶剂和助剂用于喷漆印刷行业和家居装修材料等。职业流行病学调查显示职业环境苯暴露可导致女工月经紊乱,增加自然流产率,降低女性生育能力<sup>[5-6]</sup>,对新装修居室的人群进行流行病学调查也发现女性生殖功能损害与居室环境的苯和甲醛暴露相关<sup>[7]</sup>。随着国家职业卫生标准和环境

卫生标准的推广实施,职业环境和室内环境中苯和甲醛的暴露通常在较低的水平,在这种情况下,两者是否存在联合作用、其生殖损害呈现何种特征是一个新的命题。

本次研究采用两个因素、三个剂量水平( $3^2$ )的析因设计对卵泡发育期的 ICR 雌鼠进行单独染毒和联合染毒,苯和甲醛各三个剂量水平分别为:0  $\text{mg}/\text{m}^3$ 、12  $\text{mg}/\text{m}^3$ 、60  $\text{mg}/\text{m}^3$  和 0  $\text{mg}/\text{m}^3$ 、2  $\text{mg}/\text{m}^3$ 、10  $\text{mg}/\text{m}^3$ ,连续染毒 14 d,基本覆盖雌鼠 3 个动情周期,以确

保交配时排出的卵子都存在毒物暴露,染毒结束后每组筛选6只动情期的动物检测性激素等指标,每组其他雌鼠继续观察交配分娩产仔等生殖毒性终点。本研究的设计特点有:①依据职业环境和室内环境低浓度、联合暴露的情况,采用低浓度苯(12 mg/m<sup>3</sup>、60 mg/m<sup>3</sup>)和甲醛(2 mg/m<sup>3</sup>、10 mg/m<sup>3</sup>)联合暴露,分析两种毒物单独染毒的毒效应及联合染毒的毒效应,为职业和环境卫生评价提供参考;②与传统胚胎植入期、器官形成期染毒不同,本次研究选择卵泡发育期进行雌性动物染毒,染毒后即雌雄交配,毒物作用于卵细胞的发育过程,为育龄期女性生殖功能损害提供参考;③实验观察的终点涉及亲子两代,既有母鼠的系统毒性、生育力,又有胎仔的发育毒性,从亲子两代阐述毒物的生殖损害,为苯和甲醛的生殖毒性评价提供参考。

体重是反映机体系统毒性的重要指标,从染毒期间雌鼠体重变化的析因分析结果来看,苯不同剂量组雌鼠体重增长不同,差异有统计学意义,甲醛不同剂量组的体重增长无统计学意义,苯和甲醛联合染毒对雌鼠的体重增长有交互作用,表现为低剂量联合组体重增长较少,高剂量联合组体重增长较多,说明该剂量下的苯对小鼠体重的影响要高于甲醛,联合染毒时甲醛的暴露抵消了苯对体重的影响。动物脏器系数的改变为确定毒作用的靶器官提供线索。从实验结果来看,14 d短时间、低浓度的苯暴露对脾脏系数有一定影响,提示该剂量下的苯对造血系统有损害,而甲醛不同剂量组的脾脏、肾脏、卵巢系数的差异有统计学意义,提示卵巢可能是甲醛导致生殖损害的靶器官,结合中医方面的补肾养血方治疗卵巢储备功能下降的临床实践<sup>[8]</sup>及建立早发性卵巢功能不全肾虚血瘀证的实验动物模型<sup>[9]</sup>等相关文献,提示甲醛对小鼠生殖损害的作用机制可能涉及因肾脏、脾脏功能不全导致的卵巢储备功能下降,进而影响母鼠的生育力和胎仔的发育。

FSH和LH是反映卵巢储备的重要指标,若卵巢储备功能降低,FSH和FSH/LH比值会升高<sup>[10]</sup>,广西壮族绝经妇女雌激素受体- $\beta$ 基因多态性与促卵泡刺激素、黄体生成素和雌孕激素的研究也证实 $\alpha$ 基因组的促卵泡刺激素、黄体生成素明显下调,其临床预后较好<sup>[11]</sup>,提示促卵泡刺激素与雌性生殖功能负相关。从FSH的变化可以看出,苯和甲醛单独染毒对雌鼠血清FSH无主效应,苯和甲醛联合染毒对雌鼠血清FSH有交互作用,表现为低剂量联合组升高,高剂量联合组降低,说明联合染毒导致的毒效应不同与各毒物单独染毒,低剂量组毒效应高于高剂量组。结合胎仔的胚胎毒性来看,甲醛不同剂量组的产仔数、活仔数、活仔重、4 d存活指数及4 d活仔重不同,低剂量甲醛组低于高剂量甲醛组,苯和甲醛联合染毒时低剂量联合组的4 d存活指数及4 d活仔重也低于高剂量联合组。这一实验结果与李辉等<sup>[12]</sup>的研究类似,与高剂量甲醛

组相比,低剂量甲醛组的胚胎毒性更明显;低剂量联合时毒效应增大,高剂量联合时毒效应相互抵消,4 d存活指数和4 d活仔重都有回升。

SOD是抗氧化系统中重要的酶类,能特异地捕获体内生成的O<sub>2</sub><sup>-</sup>·,MDA是脂质过氧化的中间产物,是机体氧化损伤的标志物<sup>[13]</sup>,已有研究证实苯与甲醛单独染毒或联合染毒在多种器官中都能发现SOD活力和MDA含量的变化,并呈现剂量反应关系<sup>[14-15]</sup>。本组实验结果显示,苯单独染毒子宫组织SOD活力的差异有统计学意义;甲醛单独染毒子宫组织SOD活力和MDA含量的差异均有统计学意义,且MDA的变化呈剂量反应关系;苯和甲醛联合染毒对子宫组织MDA含量有交互作用,表现为低剂量联合组降低,高剂量联合组升高,但均低于高剂量甲醛组,说明联合染毒时苯的暴露对甲醛导致的MDA变化有一定抵消。

综上,低浓度苯(12 mg/m<sup>3</sup>、60 mg/m<sup>3</sup>)和甲醛(2 mg/m<sup>3</sup>、10 mg/m<sup>3</sup>)联合暴露对ICR小鼠的体重增长有影响,存在系统毒性,结合脏器系数的变化来看,可以推测该剂量下的暴露可导致卵巢等多种脏器的损伤。以往苯和甲醛生殖毒性研究多以雄性动物染毒或孕鼠胚胎植入期、器官形成期染毒,此次我们选择卵泡发育期的ICR雌鼠为实验对象进行呼吸道染毒,外推到人类即为育龄期的职业女工,多以呼吸道接触毒物,又不能享受孕期和哺乳期女工的劳动待遇,而实验结果显示苯和甲醛低浓度、短时间的联合暴露导致的雌性生殖损害既有主效应又有交互作用,提示目前苯与甲醛的职业接触限值对职业女工的生殖健康存在一定风险。从动物实验结果来看,甲醛的生殖损害更明显,多个指标在甲醛不同剂量组有差异,苯和甲醛联合染毒有交互作用,表现为低剂量联合组的毒效应要高于高剂量联合组,可能联合染毒时苯的暴露对甲醛的毒效应存在抵消,但考虑到样本量和实验的稳定性,其交互作用具体为拮抗还是协同作用有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 郭堂春. 职业卫生与职业医学[M]. 8版. 北京:人民卫生出版社,2017:273-275.
- [2] Chenxi Wei, Mouying Chen, Huihui You, et al. Formaldehyde and co-exposure with benzene induce compensation of bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in BALB/c mice during post-exposure period[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2017.
- [3] 邹学敏, 张英彪, 朱乐政, 等. 苯与甲醛联合染毒对小鼠睾丸及精子的损伤作用[J]. 中华全科医学, 2016, 14(6): 925-927, 972.
- [4] 刘晓丽, 原福胜, 张文珍, 等. 甲醛和苯单独及联合染毒对小鼠神经系统的毒性作用[J]. 环境与职业医学, 2010, 27(5): 298-300.

(下转第21页)

综上所述,本研究结果证实二甲双胍能够加强紫杉醇对乳腺癌细胞的生长、迁移、侵袭的抑制作用,这为临床治疗乳腺癌的策略提供了参考。在今后的研究中,将探讨不同的乳腺癌细胞系对二甲双胍的敏感性,以及二甲双胍抑制乳腺癌的机制。

#### 参考文献:

- [1] 李甲,陈宝安. 抑制 P-糖蛋白转运体功能在逆转肿瘤多药耐药中的研究现状及进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2018,37(2): 345-350.
- [2] 徐英格. 临床用紫杉醇给药系统治疗癌症的网状 meta 分析[D]. 石家庄:河北科技大学,2018.
- [3] 杨宇. 二甲双胍与肿瘤研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2019,39(1): 142-145.
- [4] Verdura S, Cuyàs E, Martín-Castillo B, et al. Metformin as an archetype immuno-metabolic adjuvant for cancer immunotherapy [J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8 (10): e1633235.
- [5] Martisova A, Sommerova L, Kuricova K, et al. AGR2 silencing contributes to metformin-dependent sensitization of colorectal cancer cells to chemotherapy [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(5): 4964-4973.
- [6] 佟仲生. 美国临床肿瘤学会 HER2 阳性进展期乳腺癌系统治疗临床实践指南(2018)更新解读[J]. 临床外科杂志, 2019, 27(1): 17-20.
- [7] 徐绍辉,张志鹏,黄胜堂,等. 键合紫杉醇和姜黄素的金纳米棒的制备及体外抗肿瘤多药耐药研究[J]. 中国药房, 2018, 29(15): 2031-2036.
- [8] Podhorecka M, Ibanez B, Dmoszyńska A. Metformin - its potential anti-cancer and anti-aging effects [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2017, 71(0): 170-175.
- [9] Heckman-Stoddard BM, DeCensi A, Sahasrabudhe VV, et al. Repurposing metformin for the prevention of cancer and cancer recurrence [J]. *Diabetologia*, 2017, 60 (9): 1639-1647.
- [10] Mitsuhashi A, Habu Y, Kobayashi T, et al. Long-term outcomes of progestin plus metformin as a fertility-sparing treatment for atypical endometrial hyperplasia and endometrial cancer patients [J]. *J Gynecol Oncol*, 2019, 30(6): e90.
- [11] 姚琳琳. 二甲双胍对 PCOS 伴不孕症患者糖脂代谢、 $\beta$  胰岛细胞功能和卵巢功能的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2019, 41(2): 146-148, 155.
- [12] 谭业蕙,卢又瑛,崔星华. 二甲双胍联合瑞格列奈或阿卡波糖对 2 型糖尿病心血管病患者血脂、血糖、血浆黏度、BMI、hs-CRP 的影响分析[J]. 右江民族医学院学报, 2015, 37(3): 377-379.
- 收稿日期:2019-11-10;修回日期:2019-12-12
- (上接第 16 页)
- [5] 蒋汝刚,陈秀音. 苯对作业女工月经及生殖机能影响的调查[J]. 中国工业医学杂志, 2005, 18(4): 235-236.
- [6] 邢良红,邓小梅. 日照市某皮鞋厂苯作业女工月经及其生育情况的调查[J]. 预防医学论坛, 2007, 13(10): 923-924.
- [7] 吴成秋. 居室空气甲醛与苯污染的生殖和胚胎发育毒性及其作用机制研究[D]. 长沙:中南大学,2010.
- [8] 李善霞,何东云,张艳红,等. 补肾养血方治疗肾阴虚型卵巢储备功能下降的临床观察[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(2): 361-364.
- [9] 袁苑,陈燕霞,马堃,等. 探索建立雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全肾虚血瘀证的小鼠模型[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9): 1895-1903.
- [10] 彭国庆,钟才高,张琼,等. 甲醛对雌性大鼠卵巢储备功能的影响[J]. 癌变. 畸变. 突变, 2010, 22(1): 32-34.
- [11] 陈建海,李海,杨洁,等. 雌激素受体- $\beta$  基因多态性对广西壮族绝经后妇女促卵泡激素、黄体生成素和雌孕激素的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2018, 40(6): 529-532.
- [12] 李辉,郝连正,王志萍,等. 胚胎植入前期苯和甲醛联合染毒致小鼠胚胎毒性[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(3): 215-217.
- [13] 莫颂轶,余双全,张丽凤,等. 慢性铝暴露小鼠学习记忆与 SOD、GSH-Px 和 MDA 关系的研究[J]. 右江民族医学院学报, 2018, 40(4): 308-311.
- [14] 常君瑞,徐东群,董小艳,等. 板材市场从业人员血清脂质过氧化指标的观察[J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(12): 1066-1068.
- [15] 李崇磊,王凡,刘薇,等. 甲醛及苯系物混合暴露对小鼠肺脏的氧化损伤作用[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(1): 87-92.
- 收稿日期:2019-11-05;修回日期:2019-11-12