DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2017.06.010

食品中甲醛的细胞毒性及基因表达影响

刘　华

(广州工商学院,广东 广州 510000)

摘要:为了探讨食品中甲醛的细胞毒作用,检测不同浓度下甲醛对细胞生长的抑制情况,并运用基因芯片技术检测甲醛对淋巴细胞基因表达的影响,筛选并分析与甲醛毒性和致癌性相关的差异表达基因。作者进行 MTT 实验,绘制淋巴细胞的细胞生长曲线及细胞形态观察,然后用 5×10^{-5} mol/L 甲醛处理人外周血淋巴细胞 24 h,提取实验组和对照组细胞 mRNA,经逆转录和标记后与人类全基因组芯片(约 35 000 个点)杂交,芯片扫描后提取并处理数据,筛选出甲醛诱导显著改变的基因,并进行生物信息学分析。发现甲醛与淋巴细胞增殖存在的剂量-效应关系,验证了甲醛对淋巴细胞的细胞毒作用;共筛选出显著上调基因 211 个,显著下调基因 113 个,分别参与氧化应激、细胞凋亡、核酸代谢、细胞周期调控、肿瘤生成、肿瘤抑制等途径,推断出 OXR1、MLH1、TP53 等基因表达的改变可作为甲醛毒性和致癌性的遗传学基础。本研究获得的数据为进一步阐明甲醛的毒性和致癌机理,检测食品中甲醛暴露的早期生物学标志提供了理论依据,证明了基因芯片技术在食品毒理学研究中的可行性和优越性,为建立新的有毒物质暴露的检测和研究方法提供了实验依据。

关键词:甲醛;细胞毒性;细胞生长曲线;基因表达

中图分类号:TS 201　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1673—1689(2017)06—0625—10

Research of Cytotoxicity and Gene Expression by Formaldehyde in the Food

LIU Hua

(Guangzhou College of Technology and Business, Guangzhou 510000, China)

Abstract: To investigate the cytotoxic effects of formaldehyde in the food, we detect different concentrations of formaldehyde on the inhibition of cell growth, and use microarray technology to detect the influence of lymphocyte gene expression by formaldehyde in order to screen and analyze the differentially expressed genes related to toxicity and carcinogenicity of formaldehyde. By making MTT experiments, the cytotoxicity of formaldehyde was verified by comparing lymphocytes' growth curve and morphology. Peripheral blood lymphocytes were treated with 5×10^{5} mol/L formaldehyde for 24 h.The total RNA from cells of the subjects of the treated group and the control group were isolated, then they were reversely transcribed and labeled with fluorescence dyes, and finally hybridized with human whole genome microarray (about 35 000 spots). Microarray data was

收稿日期:2015-08-11

基金项目:广东省教育科研"十二五"规划 2013 年度研究项目(2013JK313)。

作者简介:刘　华(1982—),女,河南洛阳人,理学硕士,讲师,主要从事食品营养检测及质量控制方面的研究。E-mail:annylh2008@126.com

引用本文:刘华. 食品中甲醛的细胞毒性及基因表达影响[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(06):625-634.

extracted after microarray scanning, and differentially expressed genes induced by formaldehyde were screened and analyzed by bioinformatics. In MTT experiments, human peripheral blood lymphocytes were treated with various doses of formaldehyde. The dose-effect relationship was also observed after treatment with high doses. 211 up-regulated and 113 down-regulated genes were screened after scanning and data extracting. Genes which significantly altered were represented by several categories, including oxidative stress, DNA repair, apoptosis, nucleic acid metabolism, cell cycle, oncogenesis, tumor suppression and so on. The result suggested the differential expression of these genes of OXR1, MLH1, TP53 may be the genetic basis of formaldehyde toxicity and carcinogenicity. The study provided theoretical evidence for elucidating the toxic and carcinogenic mechanism, detecting of the biomarker for formaldehyde exposure, and preventing the formaldehyde poisoning. It also verified the microarray technique is the feasible and advantageous in food toxicological research. It provides an experimental basis for the establishment of new methods to detect and study exposure of toxic substances.

Keywords: formaldehyde, cytotoxicity, human peripheral blood lymphocyte, gene expression

甲醛是一种常见的化学物质，广泛存在于人类生产和生活的各个领域。食物是甲醛的主要来源之一，食物中的甲醛一部分是食用的生物体中固有的，正常情况下人每天通过食品摄入 1.5~14 mg 的甲醛，这一部分甲醛对人体健康的影响不大[1]。另一部分甲醛在食物的加工中形成，甲醛能够防腐和凝固蛋白质，经甲醛浸泡过的水产品色泽鲜艳、不易腐坏。因此，在水产品的运输、保存及售卖时，商家经常用甲醛次硫酸氢钠（$NaHSO_2$-CH_2O-$2H_2O$，俗称吊白块）处理水产品，造成水产品中的甲醛含量远远高于正常水平。啤酒的制造和储存过程中会生成絮状沉淀物，让酒变得浑浊。对此，厂家往往使用甲醛作为稳定剂来消除沉淀物。荷兰食品检测部门曾对 162 种产品包括软饮料、含酒精饮料、肉及肉制品等所含有的甲醛含量进行测定，结果发现，53%的产品甲醛质量分数超过 1 mg/kg，20%的产品超过 2 mg/kg，有 15 种肉及肉制品中的甲醛含量超过 10 mg/kg。国内一些学者调查发现，在水产品中甲醛质量分数高达 2 854 mg/kg，水发产品高达 4 250 mg/kg[2-3]。甲醛问题成为全球公共卫生关注的焦点，并被列入国家食品安全战略研究的重点。

研究表明，甲醛对人体健康产生多种危害，包括对皮肤粘膜、免疫系统、生殖系统、内分泌系统等的刺激、致敏和致毒，并可导致多种人类肿瘤[4-5]。因此，甲醛的毒理学研究日渐受到人们的重视，但目前相关研究主要停留在细胞和染色体水平，甲醛对基因表达影响规律的研究尚不清楚。基因芯片具有高通量、高平行性、检测快速、灵敏度高、样本用量少等优点，能够在一次实验中检测整个基因组的表达情况，被广泛应用于包括毒理基因组学在内的各个生命科学领域[6]。

作者以人外周血淋巴细胞为研究对象，探讨了食品中摄入甲醛对人体产生的细胞毒作用，并运用基因芯片技术检测甲醛对淋巴细胞基因表达的影响，筛选出与甲醛毒性和致癌性相关的差异表达基因并进行聚类研究。

1 材料与方法

1.1 材料

甲醛：分析纯，由广州化学试剂厂提供；正常人外周血淋巴细胞：从白云区第一人民医院检验科 20 个正常人的血液中提取；10%小牛血清的 PRMI-1640，淋巴细胞分离液：均由作者所在实验室提供。RNeasy RNA 纯化试剂盒：Qiagen 公司提供；Agilent 低 RNA 荧光线性扩增试剂盒：Agilent 公司提供；人类全基因组芯片：美国西北大学基因芯片中心实验室制备，一共有 34 995 个基因。

1.2 主要仪器

芯片扫描仪为 GenePix 4100A：AXON 公司的产品；图像分析软件：AXON 公司的 GenePix Pro 6.0 软件；DU530：Beckman 公司产品。

1.3　淋巴细胞制备

选取淋巴细胞为实验对象，淋巴细胞体外转化代表着细胞免疫功能，以此测定淋巴细胞体外增值反应是研究细胞免疫功能的重要手段和指标。用加有 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养基配置单个细胞悬液。血球计数器计数后，调整细胞浓度至 10^6 个/mL 左右。MTT 实验确定药物处理浓度，处理组加入终浓度为 5×10^{-5} mol/L 的甲醛，对照组正常培养；分别在 0~72 h 间每 12 小时对细胞进行台酚蓝染色记数，绘制细胞生长曲线。对照组每孔加入细胞悬液 1 mL/孔，培养液 950 μL/孔，无菌水 5 μL/孔，3 个复孔，置于细胞培养箱 37 ℃、5%CO_2 条件下培养 24 h，搜集细胞。

1.4　探针的制备

采用 RNeasy RNA 纯化试剂盒分别提取和纯化实验组和对照组 RNA，并用 DU530 检测 RNA 浓度。然后利用 Agilent 低 RNA 荧光线性扩增试剂盒对纯化后的 RNA 进行逆转录标记。该试剂盒中含有逆转录酶(MM LV-RT)、T7RNA 聚合酶和随机引物(Oligo dT-promoter primer)。首先对提取的 RNA 经逆转录成 cDNA，然后运用碱基互补原理，以第二链 cDNA 为模板合成 cRNA，同时进行荧光标记，其中实验组标记为 Cy5，对照组标记 Cy3。

1.5　芯片杂交与洗片

将标记好的两组样品高温变性后，在实验组中加入无菌蒸馏水至 175 μL，再加入 50 μL 对照组，加 2×杂交缓冲液至 450 μL。将混合液加到芯片在杂交炉中杂交 16 h，取出洗片。

1.6　芯片扫描与分析

将干燥后的芯片采用 AXON 公司的 GenePix 4100A 扫描仪中扫描，利用 GenePix Pro 6.0 软件提取扫描结果，采用总荧光强度标准化(TIN)进行标准化。用筛选后的数据计算标准化因子

$$NF=\frac{\text{芯片上所有有效基因 Cy5 荧光值的对数平均值}}{\text{所有有效基因 Cy3 荧光值的对数平均值}}$$

将所有基因的荧光值用 NF 进行校正，得到 Cy5′=Cy5/NF，Cy3′=Cy3。计算经数据标准化校正后的两组荧光强度的比值 Ratio，Ratio′=Cy5′/ Cy3′。以 Log_2(Ratio′)>1 或 Log_2(Ratio′)<-1 作为基因差异表达的标准。

2　实验结果

2.1　MTT 实验结果

为了检测不同浓度下甲醛对细胞生长的抑制情况，并为进一步的芯片实验选取合适的药物处理浓度，我们进行了终浓度为 10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7} mol/L 甲醛处理 24 h 的 MTT 实验。实验结果见图1。

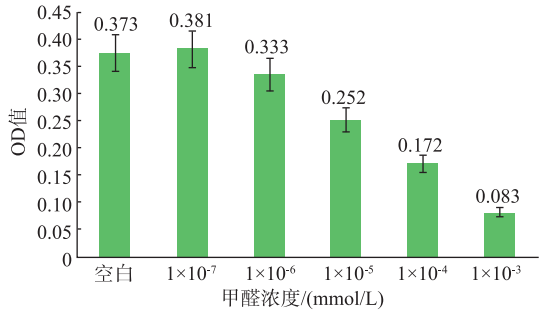


图 1　甲醛处理淋巴细胞的 MTT 实验结果($\bar{x}\pm sd$, n=3)

Fig. 1　MTT test result of lymphocytes treated with formaldehyde($\bar{x}\pm sd$, n=3)

MTT 实验结果显示，当甲醛作用浓度为 10^{-7} mol/L 时，培养液中人外周血淋巴细胞的密度比对照组要高；当作用浓度大于或等于 10^{-6} mol/L 时，细胞的密度比对照组要低；而且细胞密度随甲醛浓度的升高而降低，当浓度为 10^{-3} mol/L 时，细胞的密度已经远远低于对照组。说明低浓度的甲醛对细胞具有增殖效应，而高浓度的甲醛对人外周血淋巴细胞有毒性作用，毒性作用在实验浓度范围内存在剂量-效应关系。Tyihak[7]等人曾报道，在体外培养的结肠癌细胞和人上皮细胞经 0.1~10 mmol/L 甲醛处理后，在低浓度下细胞的数目增多而高浓度下细胞的数目减少，推断可能是低浓度的甲醛能够抑制细胞的正常凋亡并诱导其恶性增殖，而高浓度的甲醛能破坏细胞正常的生理功能，造成细胞死亡。这一报道和本研究结果是相符的。

通过 MTT 实验计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率}(\%)=1-\frac{\text{处理组平均吸光度值}}{\text{对照组平均吸光度值}}$$

细胞抑制率结果见表 1。作者选取了 IC_{50} 时的甲醛浓度，即 5×10^{-5} mol/L 作为本研究基因芯片实验的药物处理浓度。

表 1　不同甲醛浓度对淋巴细胞的生长抑制率

Table 1　Inhibition rate of lymphocytes treated by FA

甲醛浓度/(mol/L)	抑制率/%
空白	—
10^{-7}	—
10^{-6}	10.72
10^{-5}	32.44
10^{-4}	53.89
10^{-3}	77.75

2.2　细胞生长曲线

为了检验甲醛对人外周血淋巴细胞生长的影响，绘制了细胞在常规培养(对照组)下及加入终浓度为 5×10^{-5} mol/L 的甲醛(处理组)后的生长曲线。

从图 2 可以看出，对照组细胞在 12~24 h 左右进入对数生长期，在 60~72 h 左右进入生长停滞期。与对照组相比，处理组的细胞生长期滞后，生长速度也远远低于对照组，说明甲醛对淋巴细胞的有明显的生长抑制作用。

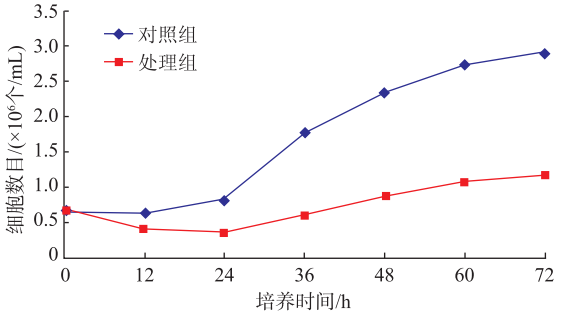


图 2　人外周血淋巴细胞生长曲线

Fig. 2　Growth Curve of Human peripheral blood lymphocytes

2.3　甲醛作用 24 h 后的细胞形态

处理组采用浓度为 5×10^{-5} mol/L 的甲醛作用 24 h 后，在 100 倍光学显微镜下观察细胞形态。

如图 3 所示，对照组细胞生长良好，细胞形态完整，圆形透亮，膜界完整，无胞膜突起。而处理组细胞形态不完整，整体轮廓较模糊，胞膜变形，有细胞碎片出现，细胞呈死亡状态。

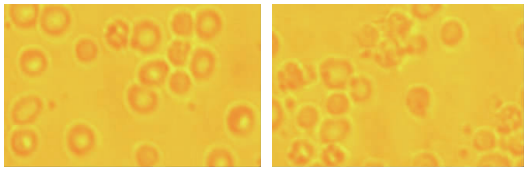


图 3　淋巴细胞的细胞形态(100×)

Fig. 3　Morphous of lymphocytes(100×)

2.4　总 RNA 甲醛变性凝胶电泳

提取淋巴细胞的总 RNA，在 Beckman 公司的 DU530 生化分析仪上检测，对照组 RNA 质量浓度为 2 237.6 μg/mL，OD_{260}/OD_{280}=1.90；处理组 RNA 质量浓度为 2 037.9 μg/mL，OD_{260}/OD_{280}=1.96。取 5 μg 总 RNA 进行甲醛变性凝胶电泳，电泳检测见图 4。图 4 清晰显示 28S、18S 和 5.8S 的三条带，在三条带外无杂带或弥漫性拖尾，28S RNA 带的亮度约是 18S 的两倍，说明提取的总 RNA 较为完整，无明显降解，且无 DNA 污染。

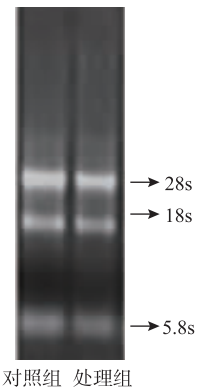


图 4　对照组和处理组细胞总 RNA 电泳结果

Fig. 4　Electrophoresis of total RNA from control and test groups

2.5　芯片杂交结果

样品和芯片杂交后，通过 GenePix 4100A 生物芯片扫描仪扫描芯片上的荧光图像。一个理想的基因芯片实验，杂交结果图像需具有以下性质：

1)芯片上每一个杂交点呈规则的圆形，形态和尺寸大小相同，杂交点间没有重叠现象，圆心整齐地分布于一个网格上。

2)杂交点信号明显，图像背景低，均匀无印迹，无灰尘、溶液中沉渣等引起的噪声信号。

从本次实验的杂交图上可以看到：芯片上的点探针点大小一致，分布规则、整齐，杂交图像背景较低，基本符合理想的杂交结果要求，杂交效果较好。

GenePix Pro 软件用红色和绿色分别表示 Cy5 和 Cy3 信号，扫描获得 Cy5 和 Cy3 信号的两张图，重合后得到芯片扫描叠加图，用绿–黄–红代表 Ratio 值的变化，绿色表示 Cy3 信号强于 Cy5 信号，基因表示下调，红色反之表示上调，黄色表示基因表达量基本相当。

图 5 用甲醛处理组（Cy5 标记）和对照组(Cy3

标记)后的芯片杂交图。

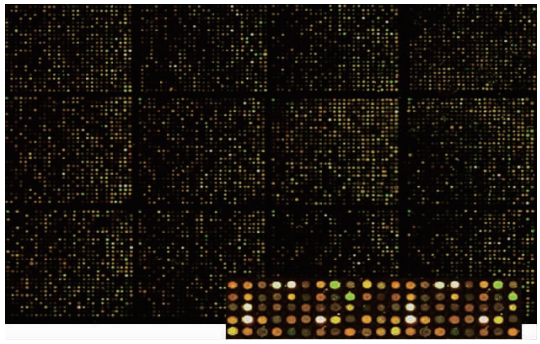


图 5　芯片杂交后的双色叠加图

Fig. 5　Two-color photos of microarray's hybridization result

2.6　杂交结果分析

扫描后的基因芯片通过 GenePix Pro 6.0 软件提取每个探针点的数据，每个点的 Cy5 和 Cy3 的前景荧光强度值(中值)分别记为 R_f 和 G_f，相应的背景荧光强度(中值)分别记为 R_b 和 G_b，背景修正后的荧光强度(中值)记做 R、G，其中 $R=R_f-R_b$，$G=G_f-G_b$。我们采用 GenePix 软件中的数据处理功能和 Excel、SPSS 等软件共同对进行数据的筛选和标准化处理。

数据的筛选是去掉由于系统和随机误差所造成的无效数据点。根据 GenePix Pro 软件的使用说明和其他参考文献，探针点中：1)荧光值中值等于 65 535(Value=65 535)的点；2)像素饱和度超过 30%(%Sat>30%)的点；3)像素中值与平均值的比值大于 10 或者小于 0.1 (Median/Mean<0.1 或 Median/Mean>10)的点被去除，剩余的 34 729 个基因被用于下一步的标准化。

总荧光强度标准化(TIN)是现在最常用数据标准化方法之一。这种方法基于以下假设，即从统计学意义上来说，当获得的基因数据量足够大时，只有相对少数的基因表达发生了显著变化，并且上调的基因和下调的基因数量上是相同的，因此，同一芯片上的两种信号之和应该相等。根据这一原理，计算芯片上的所得到的上万个数据的平均信号强度，并将其比值作为标准化因子(NF)用于信号值的校正，能够使信号值重新分布，平衡各个基因在量纲和信道等方面的差异，减少系统变异所产生的误差，使数据更具有可靠性和可比性。本研究中我们就采用这种方法进行数据的标准化，标准化相关公式如下。

$$NF=\frac{\sum_{i=1}^{N}R_i}{\sum_{i=1}^{N}G_i}$$

R_i 为探针点 i 的 Cy5 荧光强度中值，G_i 为探针点的 Cy3 荧光强度中值，计算获得 NF 值后，按一下公式获得标准化后的 R_i'、G_i'及 $Ratio'_i$。

$$R_i'=R_i/NF$$

$$G_i'=G_i$$

$$Ratio'=\frac{R_i'}{G_i'}$$

本研究采用国内外基因芯片实验的常用标准 Ratio′=2 和 Ratio′=0.5 作为差异基因的筛选标准，Ratio′值大于 2 或小于 0.5 的点被认为是有显著表达差异的基因，以 G_i'和 R_i'为横纵坐标绘制杂交信号散点图，见图 6。图中每个点的斜率代表该点的 Ratio′值。直接用 Ratio′值处理上调和下调的基因不是很直观，且以往的研究结果证明，经对数转换后的数据更接近于正态分布，便于进行更有效的显著性检验，因此在数据处理中我们将 Ratio′值进行对数转换。对数转换后，当 Ratio′=1/2 时，$\log_2$(Ratio′)=−1；Ratio′=1 时；$\log_2$(Ratio′)=0，Ratio′=2 时，$\log_2$(Ratio′)=1。我们以对数总亮度 $A=1/2\ \log_2(R_i'\times G_i')$为横坐标和对数差异表达率 $M=\log_2(Ratio_i')$为纵坐标绘制 M–A 图，见图 7。图中数据点呈水平彗星状分布，主要分布于[−1，1]之间，说明实验的数据较为合理，纵坐标[−1，1]区域外的探针点所对应基因为进一步分析的差异表达基因。

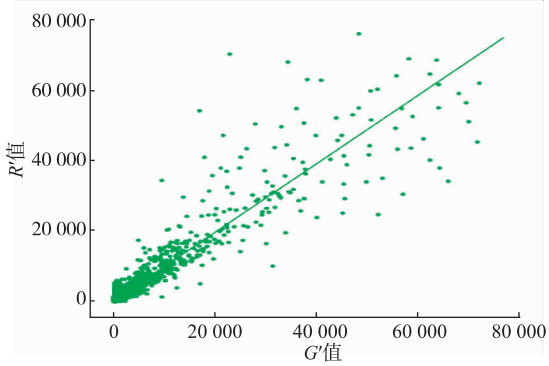


图 6　基因芯片杂交信号的散点图

Fig. 6　Scatter plots of hybridizing signals on microarray

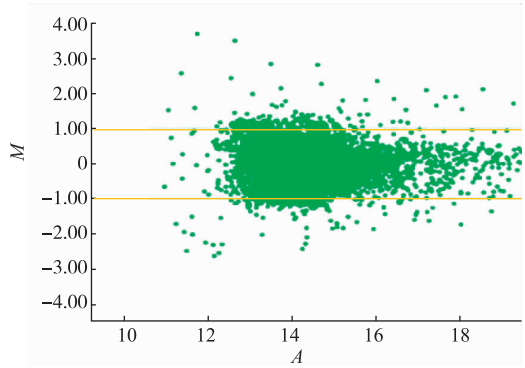


图 7　*M–A* 散点图

Fig. 7　*M–A* figure

所得数据采用在线工具 PANTHER 进行分类，分类后的结果表明，差异基因主要与 DNA 修复、细胞凋亡、核酸代谢、细胞周期调节、肿瘤生成、肿瘤抑制和其他代谢等途径相关。我们借助美国国立生物技术信息中心 NCBI 数据库中的生物学信息，对以上途径中的一些特征基因进行了进一步数据挖掘，试图寻找甲醛改变这些基因表达造成的细胞正常生理功能的变化，差异表达的基因分类见表 2。

3 结　语

通过不同浓度甲醛的 MTT 实验，证明了甲醛在

表 2　甲醛作用淋巴细胞后表达改变的部分基因

Table 2　Some differential expression genes of lymphocytes treated with FA

基因名	标识符	描述	比率
氧化应激			
OXR1	NM_181354	氧化应激抗性因子 1	↑ 5.42
SCARA3	NM_016240	A3 类“清道夫”受体，编码巨噬细胞清道夫受体类蛋白	↑ 4.27
GPX3	NM_002084	谷胱甘肽过氧化物酶 3	↑ 2.96
DUSP5	NM_004419	双特异性磷酸酶 5	↓ 0.34
DNA 修复			
MLH1	NM_000249	mutL 同源基因 1，2 型非息肉结肠癌	↑ 4.96
CRY1	NM_004075	隐花色素 1(类光裂合酶)	↑ 4.22
CSNK1G1	NM_022048	酪蛋白激酶 Ⅰγ1 亚型	↑ 3.97
细胞凋亡			
TEC	NM_003215	Tec 蛋白酪氨酸激酶	↑ 5.16
SHC1	NM_003029	SHC(包含 Src 同源区 2)转化蛋白 1	↑ 3.47
CIITA	NM_000246	Class Ⅱ，主要组织相容性复合物，反式作用子	↓ 0.48
SSX2	NM_003147	滑膜肉瘤 X 断裂点 2 基因，编码 SSX 断裂点蛋白	↓ 0.45
核酸代谢			
HNRPF	NM_004966	不均一核糖核酸核内核糖核蛋白 F	↑ 5.98
HOXB4	NM_024015	包含同源结构域的转录因子家族成员	↑ 3.13
RECQL	NM_002907	依赖 ATP 的 DNA 螺旋酶，与核转运蛋白 α 相互作用	↑ 3.08
SLC35C2	NM_015945	溶质载体蛋白 35 家族成员 C2	↑ 2.76
细胞周期			
CNNA1	NM_003914	细胞周期调节蛋白 A1	↑4.02
HTLF	NM_002158	人 T 细胞白血病病毒增强子	↑ 3.87
TP53	NM_000546	肿瘤基因 TP53，作为转录因子参与细胞周期调节、DNA 修复和凋亡等途径	↑ 3.57
FOXM1	NM_021953	forkhead box M1，HFN–3/fork head/winged–helix 转录因子家族成员	↑ 2.95
肿瘤生成			
BCL2	NM_000633	B 细胞慢性淋巴性白血病/淋巴瘤 2	↑ 4.52
RET	NM_020630	ret 原癌基因，粘钙蛋白超家族成员	↑ 4.33
MYC	NM_002467	V–myc 髓细胞瘤病毒致瘤同源基因	↑ 4.23
SKP2	NM_005983	S 期激酶相关蛋白 2，泛激素 E3 连接酶复合物的组成部分	↑ 4.13
MET	NM_000245	met 致癌因子	↑ 3.98
TNFRSF10B	NM_003842	肿瘤坏死因子超家族成员 10b	↓ 0.34
肿瘤抑制			
ING1	NM_005537	生长家族抑制因子成员 1	↑ 2.99
LOX	NM_002317	赖氨酰氧化酶	↑ 2.85
RB1	NM_000321	遗传性眼癌致癌因子 1，RB 基因家族成员	↓ 0.35
BRCA1	NM_007294	乳腺癌基因 1	↓ 0.26
BAX	NM_004324	BCL2–联合 X 蛋白	↓ 0.23

低浓度下对细胞具有促进增殖作用，而在高浓度下具有抑制生长作用，这种作用具有存在剂量-效应关系，确定甲醛作用浓度为 5×10^{-5} mol/L，通过细胞生长曲线的绘制和细胞形态的观察，进一步验证了甲醛的细胞毒性作用；采用美国西北大学人类全基因组芯片对甲醛处理组与对照组细胞的基因表达情况进行比较，共发现上调基因 211 个，下调基因 113 个。运用 ABI Panther 数据库分类，发现这些基因主要与氧化应激、细胞凋亡、核酸代谢、细胞周期调控、肿瘤生成、肿瘤抑制等途径相关。

3.1　氧化应激途径

氧化应激是生物体内强氧化剂和抗氧化剂的平衡被破坏导致的潜在伤害，是导致细胞损伤的主要原因之一。甲醛是一种亲电子剂，进入生物体后，发生类似 Fenton 反应的化学反应，产生羟自由基等强氧化基团，自由基可以直接作用于生物体的遗传物质，引起 DNA 链断裂、核糖氧化、碱基的修饰和 DPX 等。为了保持遗传的稳定性，生物体通过启动某些保护机制抵抗氧化应激对生物体的损伤，修复遗传物质。在本实验中，淋巴细胞在甲醛的诱导下，与氧化应激相关的部分基因表达发生了明显的改变。

OXR1 是近年来发现的与氧化应激和 DNA 修复相关的基因，该基因在真核生物中高度保守，基因所编译的核仁蛋白能够保护和修复由于外源化合物或紫外线等造成的氧化损伤。Elliott[8]等人在研究中发现，人 HeLa 细胞和酵母的 *OXR1* 基因都能为氧化应激及热应激所诱导，保护生物体免受氧化应激的损伤。在本实验中该基因的表达显著上调，说明甲醛的氧化作用可能激活了淋巴细胞对氧化应激的自我保护机制。

SCARA3 是另一个在氧化保护中起重要作用的基因，该基因在氧化应激的条件下被激活，编码巨噬细胞清道夫受体类似蛋白质，清除体内的活性氧族(ROS)，防止生物体受到氧化损伤。实验结果表明，该基因的正常表达能保护细胞免受氧化伤害，而低表达可能导致细胞遗传物质的氧化损伤，诱发细胞癌变。本实验中该基因的上调推测是因为甲醛的强氧化性造成的。

GPX3 所编码的谷胱甘肽氧化酶 3 是还原型谷胱甘肽还原 ROS 过程中的重要酶类，在保护细胞免受氧化损伤中起着重要的作用。多种研究结果表明，还原型谷胱甘肽是甲醛解毒过程中的重要物质。如乔琰[9]等人在实验中发现，甲醛能够造成小鼠的脑、心、肝、肺、肾 5 种器官中还原型谷胱甘肽含量的明显下降。在本实验中，*GPX3* 基因的表达发生了明显上调，推测可能是因为甲醛的氧化应激，淋巴细胞通过激活该基因的表达加快还原型谷胱甘肽还原甲基氧化作用产生的氧自由基，保护细胞免受氧化损伤。该基因可以作为甲醛暴露的早期生物标志之一。

3.2　DNA 修复途径

DNA 修复是细胞对环境应激的另一种反应，在 DNA 受损伤后，生物体通过启动 DNA 修复途径，恢复正常的核苷酸顺序，维持生物体的正常生命活动。被甲醛诱导后的淋巴细胞表达发生改变的基因还有一些与 DNA 修复相关。

MGMT 基因是 DNA 修复基因的一种，编码的 O^6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶，通过将 DNA 中 O^6-mG 的甲基转移到自身的半胱氨酸残基上，从而修复被甲基化的碱基。正常机体中一定水平的 *MGMT* 表达可以抑制基因突变的发生和原癌基因的活化，是机体抵抗烷化剂损伤的主要因素，而高水平的 DNA 损伤是诱导 *MGMT* 活化的一个启动因素，生物通过这一途径增强机体对 DNA 损伤的修复能力。如果该基因突变或被甲基化而不能正常表达，将导致 DNA 复制前 O^6-mG 不能被修复，产生 G:C→A:T 突变，诱发细胞的癌变。据国内外报导，在多种原发性肿瘤中都发现了该基因沉默的迹象[10-11]。本实验中淋巴细胞在甲醛的诱导下该基因的表达降低，表明甲醛的致癌性可能与 *MGMT* 的表达下降有关。

3.3　细胞周期调控途径

细胞周期调控细胞的生长、分裂和死亡，它在相关基因的控制下，依据一定的规则和节奏运行，保证细胞对内外环境的正确反应，适时高保真地进行复制和分裂，任何细微的破坏将导致细胞周期异常，导致细胞死亡或者癌变。

TP53 基因是细胞周期中监控复制的保真性的重要基因，该基因编码核蛋白 p53，在细胞是否通过限制点由静止期进入复制起至关重要的调控作用。p53 蛋白是一个 DNA 结合蛋白质，具有 DNA 结合区、寡聚化区和转录激活区，它的四聚体通过结合下游抑制细胞生长和侵袭的基因结合，激活这些基

因的表达，从而抑制肿瘤的发生和发展。当 DNA 或染色体受到损伤时，该蛋白质通过阻止细胞进入 S 期，保证受损伤的 DNA 或染色体有时间得以修复，若损伤严重时，p53 蛋白能转录激活 *BAX*、*FAS*、*AIP1*、*NOXA* 和 *APAF-1* 等基因，触发凋亡机制以去除损伤的细胞[12]。据统计，有 50%左右的人类各种肿瘤发生与 *TP53* 基因的突变有关。除血液系统外，*TP53* 基因的变异还能导致其他器官的肿瘤，包括乳腺癌、胆囊癌[13-14]。在本研究中，我们检测到了 *TP53* 基因的表达发生了显著上调，推测是因为甲醛对淋巴细胞 DNA 的破坏激活了 *TP53* 基因的表达，以修复损伤的基因和诱导癌变基因的凋亡。

CCNA1 是细胞周期调节蛋白质中的成员之一，在生物进化过程中高度保守。该基因在细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)的调节中起着重要的作用，它通过与 CDK2 或 CDC（细胞分裂相关基因)2 结合，启动细胞从 G1 期到 S 期转化，当该基因表达过表达时，导致细胞的增殖失控，诱发肿瘤[15]。Ji[16]等人发现，cyclin A1-缺陷型小鼠体内获得的胚胎成纤维细胞的增殖能力受到了损害，而 cyclin A1-/- 缺陷型的小鼠的脾淋巴细胞增殖速度也小于其野生型。一系列实验表明，*CNNA1* 基因的过表达能加速细胞的增殖，诱发肿瘤的形成[17-18]。本研究中，*CCNA1* 的表达上调，预示了甲醛具有扰乱细胞正常周期而致癌的作用。

3.4 原癌基因

在本实验中，发现淋巴细胞在甲醛诱导后，一些原癌基因的表达发生了改变，提示甲醛可能对生物体具有致癌作用。

BCL2（B 细胞淋巴瘤/白血病-2）基因是位于 18q21 上的一个细胞原癌基因，当该基因移位到 14q32 位点时，与位于 5'端的 *IGH* 基因整合形成头尾结构，引发 *BCL2* 基因的超表达。*BCL2* 基因在不同的细胞类型中参与不同的细胞凋亡途径，抑制细胞的凋亡，诱发细胞的恶性增殖。*BCL2* 致癌作用的研究早期集中于血液和免疫系统，在慢性淋巴细胞白血病、急性 B 细胞白血病、急性粒细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、弥漫型大细胞瘤、高度恶性细胞瘤、霍杰金氏病等免疫系统肿瘤中，均有 *BCL2* 基因的易位和高表达发生。而近期越来越多的研究表明，其他类型的人类肿瘤，如乳腺癌、肺癌、kaposis 肉瘤、膀胱癌、甲状腺癌、软组织肉瘤等，也与 *BCL2* 的过表达有关[19-20]。本实验中检测到了该基因的上调，可能与甲醛的致癌性相关。

SKP2 基因编码的蛋白质是人 F-box 蛋白家族中的一员，该蛋白质具有约 40 个氨基酸组成的 F-box 特征结构域，是组成 SCF 的亚单位，帮助 SCF 特异性识别底物。*SKP2* 的表达能够诱导某些周期蛋白质依赖性激酶抑制因子的降解，它的高表达和某些肿瘤的发生和侵袭性有关。如 Latres 等人研究发现，人淋巴瘤细胞中的 *SKP2* 的表达量上升会降低 p27 的表达水平，并与细胞的恶性转化直接相关。Yokoi 等在小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)组织中，也发现了 *SKP2* 基因的过度表达，而采用反义寡核苷酸使该基因表达下降可以诱导肺癌细胞的凋亡。以上实验结果都表明，*SKP2* 的高表达以及伴随的 *p27* 基因的低表达是肿瘤发生和侵袭中的重要事件[21-22]。本研究检测到了 *SKP2* 基因在甲醛诱导下表达量升高，说明甲醛可能通过影响 *SKP2* 基因诱导淋巴细胞恶性转化。

MYC 基因家族在 20 世纪 80 年代初就被鉴定为与肿瘤发生相关，是人类最早发现和开始研究的原癌基因家族之一，已知包括 *c-Myc*、*N-Myc*、*L-Myc*、*S-Myc* 和 *B-Myc* 五个基因。大量研究表明，在包括粒细胞和浆细胞白血病、乳腺癌、前列腺癌、恶性胶质瘤等多种肿瘤中，*MYC* 基因都存在扩增或过表达现象。Ponzielli[23]等人报道，通过沉默 *MYC* 基因的表达或者消除和灭活细胞内的 Myc 原癌蛋白，能够减缓细胞的增殖和恶性转化，诱导癌细胞的凋亡。本实验中甲醛诱导后的淋巴细胞中的 *MYC* 基因发生了上调，可以推测 *MYC* 基因的激活在甲醛诱导肿瘤发生中起重要作用。

3.5 抑癌基因

本研究检测到一些抑癌基因的表达下调，这些基因可能和与表达异常的原癌基因一起构成了甲醛致癌性的遗传学基础。

BAX 基因是调控细胞凋亡的重要基因，该基因所编码的 Bax 蛋白是 Bcl2 蛋白家族成员之一。*BAX* 基因与 *BCL2* 基因共同调节细胞的凋亡，*BCL2/BAX* 的表达比率决定细胞是接受或者拒绝凋亡信号，在细胞是否向恶性转化起关键的调节作用。Bax 蛋白的生理功能是促进细胞凋亡。Meijerink 等人报道，在包括急性白血病在内的血液系统恶性肿瘤细胞系中，都发现了 *BAX* 基因保守区域的突变[24]。本实

验中我们发现甲醛会导致 *BCL2* 基因的上调和 *BAX* 基因下调，使 *BCL2/BAX* 表达比率上升，可能是甲醛致癌的关键途径之一。

TNFRSF10B 编码肿瘤坏死因子受体超家族成员 10b，该基因能被肿瘤坏死因子相关调亡诱导配体激活，将传递凋亡信号传递给细胞内的衔接子（adaptor），衔接子与凋亡相关的酶结合后，激活 caspase 依赖的凋亡途径，诱导细胞凋亡。研究表明，含死亡结构域的衔接子 FADD 必须在该蛋白的诱导下才能诱导细胞凋亡。该基因的表达下调已经与多种肿瘤的发生相关，如 Rubio-Moscardo[25]等人研究发现，该基因在 B 细胞非霍奇金淋巴瘤中（B-NHL）参与 TRIAL（TNF-related apoptosis inducing ligand）诱导的凋亡途径，达到抑制肿瘤的作用，这种作用与该基因的表达量有关。在本实验中，淋巴细胞在甲醛诱导下 *TNFRSF10B* 基因的表达显著下调。

FHIT 基因编码的蛋白质是一个二腺苷酸三磷酸（Ap_3A）水解酶，催化 ATP 类似物 Ap_3A 水解为 ADP 和 AMP，Ap_3A 是 ATP 类似物，它的水平的升高能够增强细胞的生长信号传导、阻断增殖抑制途径或凋亡途径，导致肿瘤的产生。在肺癌、食管癌、胃癌、乳腺癌、白血病等肿瘤细胞中，都发现了 *FHIT* 基因缺失或甲基化而造成的表达异常，预示该基因可能是人体重要的抑癌基因。Dumon 等人通过将外源 *FHIT* 转导入胰腺癌细胞，发现外源 *FHIT* 基因的表达激活了两个重要的 caspase 蛋白酶级联反应，导致了细胞的凋亡[26-27]。在本研究中，检测到 *FHIT* 基因表达发生了显著下调，可以将其作为甲醛致癌的生物学标志之一。

综上所述，从基因芯片所获得的数据的分析来看，甲醛对人外周血淋巴细胞基因表达的影响主要表现在以下两个方面。一方面，甲醛可以启动细胞的氧化应激保护机制，激活一些氧化应激、DNA 修复、核酸代谢等相关途径，修复因氧化而损伤的遗传物质，维持细胞遗传的稳定性；另一方面，甲醛对多个原癌基因和抑癌基因的表达影响造成细胞周期的失控，这一影响导致细胞异常增殖，抑制细胞正常凋亡，诱发细胞癌变，表明甲醛致癌性存在其遗传学基础。

作者利用 NCBI 数据库中的信息对差异表达基因进行数据挖掘，深入研究了 OXR1、MLH1、TP53 等基因在甲醛作用下的表达变化对人外周血淋巴细胞可能存在的生理作用；证明了基因芯片在毒理学研究中的可行性和优越性，为建立新的有毒物质暴露的检测和研究方法提供了实验依据。

参考文献：

[1] JIN Hongguo，LIU Hualin，ZHANG Rui，et al. Review of analytical methods for determination of formaldehyde in food [J]. **Science and Technology of Food Industry**，2013（19）：373-377.（in Chinese）

[2] LIN Chaopeng，XU Xiaochun，ZHONG Ruimin，et al. Rapid determination of trace amounts of formaldehyde based on chromatic aberration in aquatic product logistics[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2009，28（6）：795-798.（in Chinese）

[3] YANG Yuhua，XI Zhuge，ZHAO Fuhuan. Research progress in formaldehyde pollution and human health [J]. **Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army**，2005，23（1）：68-71.（in Chinese）

[4] WANG X J，LI Y，LUO L，et al. Oxaliplatin activates the Keapl/Nrf2 antioxidant system conferring protection against the cytotoxicity of anticancer drugs[J]. **Free RadicBiol Med**，2014，70：68-77.

[5] ZHU Jieli，LV Aihua，ZHANG Rui，et al. Research progress in detection of formaldehyde in food [J]. **Jiangsu Agricultural Sciences**，2013，41（1）：280-282.（in Chinese）

[6] WANG Yanli，WANG Yuguang，LIANG Qiande，et al. using cDAN microarray to screen differently expressed genes in SH-SY5Y treated by veratridine[J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**，2013，29（5）：643-647.（in Chinese）

[7] TYIHAK E，BOCSI J，TIMAR F，et al. Formaldehyde promotes and inhibits the proliferation of cultured tumour and endothelial cells[J]. **Cell Proliferation**，2001，34（3）：135-141.

[8] ELLIOTT N A，VOLKERT M R. Stress induction and mitochondrial localization of Oxr1 proteins in yeast and humans [J]. **Molecular & Cellular Biology**，2004，24（8）：3180-3187.

[9] QIAO Yan，HE Hujun，NIU Dandan，et al. Effect of formaldehyde inhalationon glutathione level in various organs of mice [J].

Hubei Journal of Preventive Medicine, 2004, 15(5): 12-14. (in Chinese)

[10] LI X, ZHOU M, WANG X, et al. Quantitative determina-tion of high-temperature requirement protein A1 and its possible associated molecules during induced reparative dentin formation[J]. **Journal of Endodontics**, 2012, 38(6): 814-820.

[11] QIAN H, ZHAO Y, PENG Y, et al. Activation of cannabi-noid receptor CB2 regulates osteogenic and osteoclastogenic gene expression in human periodontal ligament cells[J]. **Journal of Periodontal Research**, 2010, 45(4): 504-511.

[12] SOUSSI T, LOZANO G. p53 mutation heterogeneity in cancer[J]. **Biochemical & Biophysical Research Communications**, 2005, 331(3): 834-842.

[13] OLIVIER M, LANGEROD A, CARRIERI P, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1 794 patients with breast cancer[J]. **Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, 2006, 12(4): 1157-1167.

[14] MORENO M, PIMENTEL F, GAZDAR A F, et al. TP53 abnormalities are frequent and early events in the sequential pathogenesis of gallbladder carcinoma[J]. **Ann Hepatol**, 2005, 4(3): 192-199.

[15] TODOROVA T A, JORDANOV S H, STANCHEVA G S, et al. Mutational status of CDKN2A and TP53 Genes in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. **Pathology & Oncology Research**, 2015, 21(2): 413-421.

[16] JI P, AGRAWAL S, DIEDERICHS S, et al. Cyclin A1, the alternative A-type cyclin, contributes to G1/S cell cycle progression in somatic cells[J]. **Oncogene**, 2005, 24(16): 2739-2744.

[17] PALLOCCA G, FABBRI M, SACCO M G, et al. miRNA expression profiling in a human stem cell-based model as a tool for developmental neurotoxicity testing[J]. **Cell Biology and Toxicology**, 2013, 29(4): 239-257.

[18] GIGLIO S, CIROMBELLA R, AMODEO R, et al. MicroRNA miR-24 promotes cell proliferation by targeting the CDKs inhibitors p27Kip1 and p16INK4a[J]. **Journal of Cellular Physiology**, 2013, 228(10): 2015-2023.

[19] CORY S, HUANG D C, ADAMS J M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis[J]. **Oncogene**, 2003, 22(53): 8590-8607.

[20] JIANG Y J, POLINA I, JIN J L, et al. FXR inhibits gankyrin in mouse livers and prevents development of liver cancer[J]. **Hepatology**, 2013, 57(3): 1098-1106.

[21] ZHANG J, YANG Y. Gankyrin plays an essential role in estrogen-driven and GPR30-mediated endometrial carcinoma cell proliferation via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. **Cancer Letters**, 2013, 339(2): 279-287.

[22] YOKOI S, YASUI K, IIZASA T, et al. Down-regulation of SKP2 induces apoptosis in lung-cancer cells[J]. **Cancer Science**, 2003, 94(4): 344-349.

[23] PONZIELLI R, KATZ S, BARSYTE L D, et al. Cancer therapeutics: targeting the dark side of Myc[J]. **European Journal of Cancer**, 2005, 41(16): 2485-2501.

[24] CORY S, ADAMS J M. Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Baxswitch[J]. **Cancer Cell**, 2005, 8(1): 5-6.

[25] RUBIO M F, BLESA D, MESTRE C, et al. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes[J]. **Blood**, 2005, 106(9): 3214-3222.

[26] DUMON K R, ISHII H, VECCHIONE A, et al. Fragile histidine triad expression delays tumor development and induces apoptosis in human pancreatic cancer[J]. **Cancer Research**, 2001, 61(12): 4827-4836.

[27] METE F, KILIC E, SOMAY A, et al. Effects of heat stress on endocrine functions &behaviour in the pre-pubertal rat[J]. **Indian Journal of Medical Research**, 2012, 135(2): 233-236.