

大气污染对学龄前儿童 DNA 损伤的影响

徐东成¹，邹拓谜¹，陆世杰²，宋娜娜²，朱燕²

1. 湖南广益实验中学，湖南 长沙 410014 2. 中南大学湘雅医学院医学检验系，湖南 长沙 410013

摘要： **目的** 探讨大气污染对学龄前儿童DNA损伤的影响。 **方法** 分别于2014年11月30日和2015年6月30日在长沙市和海口市收集学龄前儿童口腔颊细胞进行微核试验，分析其微核率。并与空气质量指数（AQI）进行相关性分析。 **结果** 长沙市2014年11月（冬季）和2015年6月（夏季）空气质量指数（AQI）分别为 98.4 ± 55.3 和 51.6 ± 12.1 ，差异有统计学意义（ $t=2.711$ ， $P<0.01$ ）。海口市的AQI分别为 40.8 ± 13.6 和 25.1 ± 12.8 ，差异有统计学意义（ $t=2.153$ ， $P<0.05$ ）。长沙市夏季和冬季AQI均高于海口市，差异有统计学意义（ $t=2.276$ ， $P<0.05$ ； $t=2.903$ ， $P<0.01$ ）。长沙市学龄前儿童冬季和夏季微核试验的微核率（%）分别为 2.91 ± 1.98 和 1.85 ± 1.52 ，差异有统计学意义（ $t=2.305$ ， $P<0.05$ ）；海口市学龄前儿童冬季和夏季微核试验的微核率（%）分别为 1.92 ± 0.74 和 1.71 ± 1.33 ，差异无统计学意义（ $t=1.356$ ， $P>0.05$ ）；长沙市学龄前儿童冬季和夏季的微核试验的微核率均高于海口市，但是仅在冬季的差异具有统计学意义（ $t=2.107$ ， $P<0.05$ ）。口腔颊细胞微核试验微核率与大气污染程度AQI呈正相关（ $r=0.811$ ， $P=0.000$ ）。 **结论** 不同地区、同一地区不同季节，学龄前儿童的微核率存在差异，大气污染可能是造成学龄前儿童DNA损伤主要原因。

关键词： 大气污染；学龄前儿童；口腔颊细胞；微核试验

Effect of ambient air pollution on DNA damage of preschool children

XU Dong-cheng¹, ZOU Tuo-mi¹, LU Shi-jie², Song Na-na², ZHU Yan²

1.Hunan Guangyi Experimental Middle School, Changsha, Hunan 410014 2.Department of Clinical Laboratory, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan 410013

Abstract: Objective To study the effect of ambient air pollution on DNA damage of preschool children. **Methods** Buccal epithelial cells of fifty preschool children in Changsha and Haikou were collected in November 30, 2014 and June 30, 2015, respectively. Buccal micronucleus assay

基金项目：国家自然科学基金（No. 81273002）

通讯作者：朱燕，博士，讲师。研究方向：DNA损伤与修复。

was used to determine the micronucleus frequency and analyze the correlation between air quality index (AQI) and micronucleus frequency. **Results** The air quality index (AQI) of Changsha in winter and summer were 98.4 ± 55.3 and 51.6 ± 12.1 , respectively. The differences had statistical significance ($t=2.711, P<0.01$). In Haikou, the air quality index (AQI) of Changsha in winter and summer were 40.8 ± 13.6 and 25.1 ± 12.8 , respectively. There were statistically significant differences between winter and summer ($t=2.153, P<0.05$). The micronucleus frequencies (%) of preschool children in Changsha in winter and summer were 2.91 ± 1.98 and 1.85 ± 1.52 , respectively. The differences between them existed statistical significance ($t=2.305, P<0.05$). In Haikou, the micronucleus frequencies (%) of preschool children in winter and summer were 1.92 ± 0.74 and 1.71 ± 1.33 , respectively. However, no statistical difference was found between winter and summer ($t=1.356, P>0.05$). The micronucleus frequencies both winter and summer in Changsha were higher than that in Haikou, while statistical differences were only found in winter. The micronucleus frequencies (%) of preschool children were positively correlated with the AQI ($r=0.811, P=0.000$). **Conclusions** This study showed a high micronucleus frequency in preschool children living in a town with heavy air pollution in winter and summer, higher than usually found among preschool children living in areas with low or medium-high levels of air pollution. It was suggested that air pollution might be the main cause of DNA damage of preschool children.

Key words: Ambient air pollution; Preschool children; Buccal epithelial cells; Micronucleus assay

大气污染造成严重的健康的问题，WHO的报告指出，2012年全球归因于大气污染暴露的死亡人数约有370万^[1]。目前我国大气污染的主要污染物是PM2.5^[2]。PM2.5是指空气动力学当量直径 $\leq 2.5\mu\text{m}$ 的细颗粒物。由于其直径小，可进入肺泡，对人体的危害最大。PM2.5对健康的影响可分为短期和长期二种类型：短期影响主要表现为高浓度的PM2.5引起机体急性反应，如肺功能抑制、气管刺激、炎症反应、氧化应激、血凝改变等；长期影响则表现为加剧糖尿病、心血管病等代谢性疾病和肺癌等肿瘤发生的升高^[3]。研究表明，PM2.5对每个人的健康危害不一样，即人群中存在对PM2.5敏感的个体。一般认为，儿童、老年

人、慢性心肺疾病、糖尿病、肥胖患者对大气污染更敏感^[4,5]。因此，研究大气污染对儿童，特别是学龄前儿童的影响具有重要意义。

大气中的多环芳烃，镉、铬、镍等重金属均是重要的致癌物质，这些物质可引起机体的氧化应激，进而导致DNA的损伤^[6]。研究显示，儿童在大气污染暴露越早，DNA损伤越严重，今后发生慢性疾病（包括癌症）的危险性越高^[7,8]。DNA损伤严重程度的生物标志物很多，常用的包括彗星试验、微核试验、8-OHdG加合物等方法^[9,10]。本研究选用微核试验采用收集口颊细胞的方法对大气污染程度相差较大的长沙市区和海口市冬季和夏季DNA损伤进行研究，观察大气污染对学龄前儿童DNA损伤的影响。

1 对象与方法

1.1 对象 在长沙市某幼儿园和海口市某幼儿园分别选取年龄在5岁左右，男女性别比1:1的学龄前健康儿童各50位，统一在2014年11月30日采集口颊细胞，之后再在2015年6月30日采集同一儿童的口颊细胞。由于收集标本中口颊细胞数量偏少的原因，长沙市冬季有4位儿童，海口市冬季有2位、夏季有3位儿童不能进行口颊细胞微核试验。

1.2 AQI的数据来源 空气质量采用中国标准的空气质量指数（AQI），主要污染物为细颗粒物、可吸入颗粒物、二氧化硫、二氧化氮、臭氧、一氧化碳等六项。空气污染指数划分为0~50、51~100、101~150、151~200、201~300和大于300六档，对应于空气质量的六个级别，指数越大，级别越高，说明污染越严重，对人体健康的影响也越明显。用2014年11月和2015年6月的AQI分别代表长沙市和海口市冬季和夏季空气质量，AQI的数据来源于中国环境监测总站网站（www.cnemc.cn）。

1.3 方法

1.2.1 口颊细胞的收集：首先，用清水漱口3次以去除唾液和食物残渣等。接着用牙间隙刷轻刷口腔两侧颊部粘膜，然后将带有口颊细胞的牙间隙刷置于含有10ml PBS缓冲液的离心管中。在缓冲液中反复荡洗牙间隙刷，使粘附在牙间隙刷上的口颊细胞释放至缓冲液中，然后在2000r/min离心10 min去除上清液。再

用5ml PBS缓冲液悬浮细胞，2000r/min离心10 min去除上清液。

1.2.2 口颊细胞微核试验：将收集的口颊细胞涂片后自然干燥，用甲醇-乙酸（3:1）混合液固定15min，再进行Feuglen染色，涂片依次在室温1mol/L盐酸1min、56℃1mol/L盐酸10min、室温1mol/L盐酸1min，再在Schiff碱染液室温下作用90min。用1%偏重亚硫酸钾溶液洗3次，每次2min，最后用1%的亮绿染45s。细胞核染成红色，细胞浆染成绿色。每张涂片计数1000个细胞，观察微核存在的细胞数，即为其微核率（%）。

1.2.3 统计学分析 采用SPSS13.0统计软件进行统计分析，实验数据用（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，采用两独立样本 *t* 检验。单因素分析采用Pearson相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 长沙和海口大气夏季和冬季AQI分析 通过中国环境监测总站网站分别收集长沙市和海口市2014年11月和2015年6月AQI数据并进行分析（表1）。结果显示，长沙市夏季和冬季AQI均高于海口市，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）；而且不管是长沙市还是海口市其冬季AQI均高于夏季，差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

表1 长沙和海口夏季和冬季AQI

季节	长沙市AQI	海口市AQI	t值	p值
夏季（6月）	51.6±12.1	25.1±12.8	2.276	<0.05
冬季（11月）	98.4±55.3	40.8±13.6	2.903	<0.01
t值	2.711	2.153		
p值	<0.01	<0.05		

2.2 长沙和海口学龄前儿童夏季和冬季口颊细胞微核试验 对长沙市冬季46位、夏季50位，海口市冬季48位、夏季47位学龄前儿童的口颊细胞进行微核试验，结果显示，长沙市学龄前儿童冬季微核试验的微核率高于夏季，差异有统计学意义（ $t=2.305$ ， $P < 0.05$ ）；海口市学龄前儿童冬季微核试验的微核率也高于

夏季，但是差异无统计学意义（ $t=1.356$ ， $P>0.05$ ）；长沙市学龄前儿童冬季和夏季的微核试验的微核率均高于海口市，但是仅在冬季的差异具有统计学意义（ $t=2.107$ ， $P<0.05$ ）（表2）。

表2 长沙和海口学龄前儿童夏季和冬季口颊细胞微核试验微核率

地区	例数 (n)	口颊细胞微核试验微核率 (%)
长沙		
夏季 (6月)	50	1.85 ± 1.52 ^a
冬季 (11月)	46	2.91 ± 1.98 ^b
海口		
夏季 (6月)	47	1.71 ± 1.33 ^c
冬季 (11月)	48	1.92 ± 0.74 ^d

注：a与b比较，b与d比较差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）

2.3 口颊细胞微核试验微核率与大气污染程度AQI的Pearson分析 口颊细胞微核试验微核率与AQI做Pearson分析，结果显示：口颊细胞微核试验微核率与大气污染程度AQI呈正相关（ $r=0.811$ ， $P=0.000$ ）。

3 讨论

本研究重点观察学龄前儿童在不同AQI水平时，对口颊细胞微核试验微核率的影响。研究结果表明口颊细胞微核试验微核率与AQI呈正相关，说明空气污染可能对学龄前儿童的DNA损伤造成影响。

大量的流行病学研究探索了大气污染对人体健康的影响，结果表明，空气污染，特别是PM2.5等浓度的变化与人群疾病发病率、住院人数以及人群死亡率等存在相关性^[11]。但关于空气污染对儿童健康效应的研究相对较少。最近丁玲等采用meta分析，对大气颗粒物与儿童哮喘住院人数相关性进行研究，结果表明短期内PM2.5浓度的上升会导致儿童哮喘住院人数增加^[12]。空气污染对儿童

的长期影响更应受到重视，特别是它造成的DNA损伤，如果机体不能及时修复，它可能潜在的导致恶性肿瘤、糖尿病等发病率的上升^[7,8]。

微核（micronucleus, MCN）是由有丝分裂后期丧失着丝粒的染色体断片产生的，它游离于主核之外，大小只有主核的1/3以下。其主要为各种理化因子，如辐射、化学剂、药物等作用于分裂细胞所致。因此，微核试验是评价辐射损伤、化学诱变剂、新的药物和食品添加剂安全性能的重要方法。在临床上，对染色体疾病、癌症前期的诊断亦具意义。对人体进行微核试验常采用血液淋巴细胞、尿液等标本^[13]。自2009年Thomas P等建立了标准的口颊细胞微核试验的方法后，由于其具有标本来源方便、方法简单等优点，因而得到广泛应用^[14]。本研究中我们采用口颊细胞微核试验评价DNA损伤程度，学龄前儿童容易配合，而且没有任何损伤。研究结果也表明，空气污染程度与微核试验微核率呈正相关，说明空气污染是导致DNA损伤的重要因素，这与国外近期研究结果相一致^[7,8]。至于空气中何种成分是导致DNA损伤罪魁祸首，还需进一步研究证明。有研究报道，健康人群口颊细胞微核试验微核率为0.3~1.7^[15]。在本课题的研究中，即使是海口的夏季，其AQI相对较低，但其平均值还是高于上限1.7，说明我国空气污染形势严峻。

总之，空气污染确实对人体的DNA损伤造成影响，而且空气污染程度越高，DNA损伤越严重。由于机体存在DNA损伤的修复机制，因此，空气污染造成的DNA损伤是否必定产生疾病还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 石同幸, 杨轶戩, 蒋琴琴, 等. 广州市部分公共场所室内空气中 PM_{2.5} 成份及健康危害分析 [J]. 实用预防医学, 2014, 21 (12):1412-1415.
- [2] Lu F, Xu D, Cheng Y, et al. Systematic review and meta-analysis of the adverse health effects of ambient PM_{2.5} and PM₁₀ pollution in the Chinese population [J]. Environ Res, 2015, 136(1):196-204.
- [3] Lee BJ, Kim B, Lee K. Air pollution exposure and cardiovascular disease [J]. Toxicol Res. 2014, 30(2):71-75.

- [4] 陈仁杰, 阚海东. 雾霾污染与人体健康 [J]. 自然杂志, 2013, 35 (5) : 342-344.
- [5] 林宗伟, 于彦杰, 吴根容, 等. 广州市春季小学教学环境细颗粒物对学生呼吸系统影响的研究 [J]. 实用预防医学, 2014, 21 (3) :281-284.
- [6] Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution [J]. *Mutat Res*, 2005, 592(1-2):119-137.
- [7] Ceretti E, Feretti D, Viola GC, et al. DNA damage in buccal mucosa cells of pre-school children exposed to high levels of urban air pollutants [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e96524.
- [8] Demircigil GÇ, Erdem O, Gaga EO, et al. Cytogenetic biomonitoring of primary school children exposed to air pollutants: micronuclei analysis of buccal epithelial cells [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2014, 21(2):1197-1207.
- [9] Loft S, Høgh Danielsen P, Mikkelsen L, et al. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair [J]. *Biochem Soc Trans*. 2008, 36(Pt 5):1071-1076.
- [10] 邓爽, 徐克前. DNA 损伤检测技术 [J]. 生命的化学, 2013, 33 (6) : 700-705.
- [11] Dominici F, Peng RD, Bell ML, et al. Fine particulate air pollution and hospital admission for cardiovascular and respiratory diseases [J]. *JAMA*, 2006, 295(10):1127-1134.
- [12] 丁玲, 朱道娟, 彭东红. 大气颗粒物与儿童哮喘住院人数相关性的Meta 分析 [J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(2):129-135.
- [13] Nersesyan A, Kundi M, Fenech M, et al. Micronucleus assay with urine derived cells (UDC): a review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk [J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2014, 762:37-51.
- [14] Thomas P, Holland N, Bolognesi C, et al. Buccal micronucleus cytome assay [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(6):825-837.
- [15] Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, et al. The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors,

occupational exposures, health status, and assay protocol [J]. *Mutat Res*, 2011, 728(3):88-97.