

苯接触对肿瘤坏死因子活性的影响

徐海燕 胡迪生 潘建平

摘要 目的 探讨接苯后机体内肿瘤坏死因子 (TNF) 活性水平的变化特点及 TNF 与毒效应之间的可能联系。方法 对染苯小鼠和苯接触组、苯中毒组人群的 TNF 活性及白细胞进行了测定和计数。结果 (1) 染毒组小鼠白细胞水平明显低于对照组 ($P < 0.05$), 而 TNF 活性明显高于对照组 ($P < 0.05$); (2) 苯中毒组人群血清 TNF 活性明显高于对照组 ($P < 0.05$); (3) 苯中毒组、苯接触组人群血清 TNF 活性与白细胞水平存在负相关, 相关系数为 -0.4198 , $P = 0.006$ 。结论 长期慢性接触苯, TNF 可能作为负调控因素在苯致造血抑制的过程中起重要作用。

关键词 苯 肿瘤坏死因子 白细胞水平

A Study on the Effects of Exposure to Benzene on the Activity of Tumor Necrosis Factor Xu Haiyan, Hu Disheng, Pan Jianping. School of Public Health, Zhejiang Medical University. Hangzhou 310031

Abstract Objective To study the features of change in activity level of tumor necrosis factor (TNF) in the body after exposure to benzene and the relationship between TNF and toxic effects. **Methods** Activity of TNF was determined and white cells were counted in mice and persons exposed to benzene and patients with benzene poisoning. **Results** (1) White cell count in exposed mice was significantly lower than that in controls ($P < 0.05$), but serum activity of TNF was significantly higher ($P < 0.05$) in the former; (2) Serum activity of TNF in the patients with benzene poisoning was significantly higher than that in controls; (3) Serum activity of TNF in patients with benzene and persons exposed to benzene correlated negatively with white cell count, with a coefficient of correlation of -0.4198 ($P = 0.006$). **Conclusion** TNF, as a down regulator, may play an important role in inhibition of hematopoiesis caused by benzene after long-term exposure to it.

Key words Benzene, Tumor necrosis factor, White cell count

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 是影响造血功能的主要因子之一, 对造血生长具有抑制作用^[1]。已有报告指出, 再障与白血病患者外周血 TNF 增高^[2-4]。苯可以导致再障或白血病, 本研究试图通过对接苯后动物和人群 TNF 活性改变的观察, 探讨接苯后机体内 TNF 活性水平的变化特点, 以期能从新的角度解释苯中毒的机理

1 对象与方法

1.1 动物实验部分

- 1.1.1 动物 雄性 Balb/c 小鼠, 一级, 体重 20~25g, 浙江医科大学实验动物中心提供。
- 1.1.2 试剂与细胞株 RPM I Medium 1640 (powder, 含 L-谷氨酰胺, GIBCOBR 公司生产) 小牛血清 (杭州四季青家畜配种站提供), 用前 56℃×30 分钟灭活。胰酶 (DIFCO 公司进口, 上海化学试剂公司分装), 二甲基亚砜、放线菌素 D (Act-D)、Concanavalin A (ConA) 均为 Sigma 公司产品。L929 细胞株 (本校免疫学教研室提供)。

- 1.1.3 TNF 的诱生 小鼠随机分为两组, 每组 10 只。一组腹腔注射苯 (500mg/kg, q.d); 另

作者单位: 310031 杭州 浙江医科大学公共卫生学院 (徐海燕、胡迪生), 免疫学教研室 (潘建平)

一组注射同量花生油,共5天。第6天颈椎脱臼法处死小鼠,摘眼球取血作白细胞计数。无菌操作取出脾脏,经120目孔径的细胞筛制成脾细胞悬液,调整细胞浓度至 $\times 10^7$ cells/ml在24孔细胞培养板上,每孔加2ml脾细胞悬液和 $20\mu\text{l}$ 1mg/ml的ConA, 37°C , 5% CO_2 (二氧化碳培养箱,HIRASAWA WORKS,型号WJ-12FMGF NO. W-2093) 条件下培养,48小时收上清液冻存,供TNF活性测定。

1.1.4 TNF活性测定 取96孔微量平底细胞培养板,每孔加待测样本 $50\mu\text{l}$,每个样本3个复孔,空白对照孔加培养液;再加入 $4\mu\text{g}$ /ml的Act-D $50\mu\text{l}$ 调L929细胞浓度至 4×10^5 cells/ml,待测孔与空白对照孔各加细胞悬液 $100\mu\text{l}$,置 37°C 、5% CO_2 孵育24小时,弃上清液,固定、染色、脱色后在酶联免疫检测仪(型号DG-3022A,国营华东电子管厂生产)上读取OD值,检测波长为570nm。以L929细胞的杀伤率表示TNF的生物学活性。TNF活性(%) = (对照OD值 - 样本OD值) / 对照OD值 $\times 100$ 。

1.2 人群调查部分

1.2.1 研究对象 以杭州市郊某厂直接接触苯的油漆、喷漆工人38名(其中男26名,女12名)为接触组,平均年龄32.8(20~48)岁,平均工龄7.3(2~28)年。依据《职业性苯中毒诊断标准及处理原则》(GB3230-82),以接触苯后3次复查白细胞均低于4000的接苯工人9名(男3名,女6名)作中毒组,平均年龄33.2(23~42)岁。以非苯作业工人12名(男7名,女5名)作对照组,平均年龄31.9(21~45)岁。各组对象均已排除肝病患者和有近期(1周内)感染史者。

1.2.2 TNF活性测定 无菌采静脉血3ml,吸取血清, $56^\circ\text{C} \times 30$ 分钟灭活,冻存待测TNF活性。方法同前。

1.3 实验数据处理

采用 t 检验,方差分析(F)和直线相关分析,在486微机上SPSS for win下进行。

2 结果

2.1 苯染毒小鼠脾细胞TNF活性及白细胞水平

表1 苯染毒小鼠TNF活性及白细胞水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TNF活性 (%)	白细胞水平 ($\times 10^9$ /L)
对照组	10	22.7 $\pm$ 8.31	6.860 $\pm$ 1.693
染毒组	10	37.26 $\pm$ 7.94	4.810 $\pm$ 2.422

* $P < 0.05$

如表1所示,染毒组小鼠脾细胞TNF活性明显高于对照组,而白细胞水平明显低于对照组。小鼠脾细胞TNF活性与白细胞水平的相关分析表明:小鼠脾细胞TNF活性与白细胞水平之间似存在一定的负相关趋势,相关系数为-0.2368,但统计学检验无显著性意义($P = 0.345$)。

2.2 苯中毒与苯接触工人血清TNF活性与白细胞水平

表2 苯中毒与苯接触工人血清TNF活性与白细胞水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血清TNF活性 (%)	白细胞水平 ($\times 10^9$ /L)
对照组	12	30.80 $\pm$ 15.45	5.733 $\pm$ 1.012
接触组	38	39.80 $\pm$ 13.15	5.592 $\pm$ 1.312
中毒组	9	49.76 $\pm$ 10.45	3.455 $\pm$ 0.403

* 与对照组比较 $P < 0.05$

对照组、接触组与苯中毒组血清TNF的活性差异,存在逐渐升高的趋势($F = 5.2476$, $P < 0.01$)。以Student-Newman-Keuls检验进行单因素方差分析,两两比较,中毒组TNF活性较对照组显著升高($P < 0.05$),而接触组与对照组差异无显著意义($P > 0.05$)。苯接触组和苯中毒组血清TNF活性与白细胞水平的相关分析表明,血清TNF活性与白细胞水平存在负相关,相关系数为-0.4189, $P = 0.006$ 。

3 讨论

3.1 接苯对机体内TNF活性水平的影响

动物实验研究结果表明:小鼠经腹腔注射染苯后,脾细胞TNF诱生活性明显高于对照

组。与文献报道染苯小鼠骨髓成熟白细胞体外诱生 TNF α 活性显著增加的研究结果一致^[5]。接苯工人外周血血清 TNF活性的分析结果也显示: 接苯工人血清 TNF活性存在上升趋势, 白细胞水平低下的中毒组作业工人血清 TNF活性较对照组显著增高。表明机体长期接触苯, 可以导致体内 TNF活性增高。TNF的生物学活性具有双重性, 适量时有免疫调节作用, 异常增高时可引起机体的不良反应。苯接触造成体内 TNF活性增高的原因, 可能与长期慢性的刺激干扰免疫系统有关, 致敏体内分泌 TNF细胞, 主要为单核-巨噬细胞, 使机体持续释放 TNF, 导致血循环中 TNF活性增高^[5]。另有不少学者证实, 苯的某些体内代谢产物可引起体内超氧阴离子浓度增高^[6]。据 Chaudhri 和 Clark 报道^[7], 活性氧基可刺激 TNF的释放。故可认为, 长期接触苯, 导致体内活性氧基产生增多, 可刺激 TNF的释放, 可能是引起体内 TNF水平增高的因素之一。

3. 2 TNF活性与白细胞水平

有文献报道^[2], 再障患者外周血淋巴细胞, 单个核细胞培养上清液 TNF α 自发水平及诱生水平均高于正常人, 且 TNF α 水平与血小板数呈负相关, TNF α 较高的病人趋于血色素及中性粒细胞较低; 对再障血清 TNF活性测定的结果也表明: 再障, 尤其是免疫介导型再障 TNF血清水平明显高于正常对照^[7], 提示 TNF在再障的发生与发展过程中可能具有一定的病理意义。苯致外周血白细胞减少一般发生在苯致再障之前。本研究人群样本的分析表明: TNF水平较高的人群趋于白细胞计数较低, 人群血清 TNF活性与白细胞水平存在负相关 ($P < 0.05$)。提示 TNF活性的增高可能是导致白细胞减少的因素之一, 也即 TNF可能参与苯的毒作用过程。

本研究对人群血清 TNF的检测是自然水平的检测, 而动物则是脾细胞诱生的 TNF活性检测, 两者均表现为增高, 且人群血清 TNF的自然水平与人外周血白细胞计数之间存在

负相关关系 ($r = -0.4198$)。小鼠脾细胞 TNF诱生活性与白细胞计数间的负相关缺乏统计学意义, 可能与实际动物数偏少有关, 也可能提示 TNF的自然水平更能确切地反映 TNF对造血的抑制程度。

3. 3 TNF负调控造血的可能机制

TNF是主要由激活的单核-巨噬细胞产生的多活性细胞因子, 是一类造血负调控因子^[1]。TNF α 抑制野生型 (TNFR55+ / +) 小鼠骨髓初级造血干细胞的增殖^[8], 并能直接抑制干细胞因子刺激下的 CD34⁺造血祖细胞的增殖^[9], 充分提示 TNF是造血的重要负调控因子。体外实验还表明, TNF既可诱导细胞坏死, 又可诱导细胞凋亡, 如成熟 T细胞的凋亡^[10]。长期接苯后, 体内 TNF活性增高, 是否也可能导致血细胞的凋亡增多, 表现出苯的毒性, 有待于进一步探索。

综上所述, TNF在苯致造血抑制的病理过程中可能起重要作用, 但其确切机制有待进一步的研究。

4 参考文献

- Schwarzmeier JD, et al. The role of cytokines in haematopoiesis. Eur J Haematol Suppl, 1996, 60: 69
- Shinohara K, et al. Increased production of tumor necrosis factor α by peripheral blood mononuclear cells in the patients with aplastic anemia. Am J Hematol, 1991, 37 (1): 75
- 庞健男, 等. 再生障碍性贫血患者血清肿瘤坏死因子活性的变化. 中华血液学杂志, 1992, 13 (5): 225
- 罗云萍, 等. 急性白血病患者白细胞介素6和肿瘤坏死因子水平改变及意义. 中华内科杂志, 1993, 32 (2): 85
- MacEachern L, et al. Increased production of tumor necrosis factor α by bone marrow leukocytes following benzene treatment of mice. Toxicol Appl Pharmacol 1992, 113 (2): 260
- Subramanyma W, et al. Potential role of free radicals in benzene induced myelotoxicity and leukemia. Free Radical Biology Med, 1991, 11: 495
- Chaudhri G and Clark IA. Reactive oxygen species facilitate the in vitro and in vivo lipopolysaccharide-induced release of tumor necrosis factor. J Immunol, 1989, 143 (4): 1290
- Zhang Y, et al. Tumor necrosis (下转 226页)

- vibration syndrome due to chain saw operation. In Okada A, Taylor W, Dupuis H, eds. Hand-arm vibration. Kanasawa Kyoei Press Co, 1990. 117~ 120.
- 3 Bovenzi M, Franzinelli A, Scattoni L, et al. Hand-arm vibration syndrome among travertine workers, a follow up study. *Occup & Environ Med*, 1994, 361~ 365
- 4 王林,摘.脱离振动作业后振动病的变化.铁道劳动卫生通讯, 1981, 7 (3): 84~ 85.
- 5 Hashigie A, Yasuda N, Ohara, H. A retrospective cohort study of vibration disease among Japanese industrial workers. In Okada A, Taylor W, Dupuis H, eds. Hand-arm vibration. Kanasawa Kyoei Press Co, 1990. 289~ 291
- 6 Hayward RA, Griffin M J. Measures of vibrotactile sensitivity in persons exposed to hand-arm vibration. *Scan J Work Environ Health*, 1986, 12 423~ 427
- 7 高松 诚,振动病的诊断与治疗.东京: 南江堂, 1977. 67
- 8 Olsen N, Nielsen SL. Vasoconstrictor response to cold in forestry workers a respective study. *Br J Ind Med*, 1988, 45 39~ 42
- 9 Futatsuka M, Ueno T, Kitano T. Follow up study of vibration induced white finger in chain saw operator. *Br J Ind Med*, 1985, 42 267~ 271
- 10 Pyykkö I, Korhonen OS, Farkkila M A, et al. A longitudinal study of the vibration syndrome in Finnish forestry workers. In Brammer AJ, Taylor W, eds. Vibration effects on the hand and arm in industry. New York: John Wiley and Sons, 1982 211~ 215
- 11 Pyykkö I, Korhonen OS, Farkkila MA, et al. Vibration syndrome among forest workers a follow up from 1972 to 1983. *Scan J work Environ Health*, 1986, 12 307~ 312
- 12 Koskimies K, Pyykkö I, Starek J, et al. Vibration syndrome among Finnish forest workers between 1972 to 1990. *Int Occup Environ Health*, 1992, 64 251~ 256
- 13 Petersen R, Andersen M, Mikkelsen S, et al. Prognosis of vibration induced white finger a follow up study. *Occup & Environ Med*, 1995, 52 110~ 115
- 14 Futatsuka M, Sakurail T. A case-control study on the prognosis of vibration syndrome. In *Arch Occup Environ Health*, 1986, 58 113~ 120
- 15 同1. 169~ 172
- 16 Stewart AM, Goda DF. Vibration syndrome. *Br J Ind Med*, 1970, 27 19~ 27
- 17 Ekenvall L, Carlsson A. Vibration whitefinger a follow up study. *Br J Ind Med*, 1987, 44 476~ 478
- 18 Brammer AJ. Relations between vibration exposure and the development of the vibration syndrome. In Brammer AJ, Taylor W, eds. Vibration effects on the hand and arm in industry. New York John Wiley and Sons, 1982. 283 ~ 290
- 19 Izmero NF. Clinical and hygienic aspects of vibration disease and its prophylaxis due to hand-arm vibration. In Okada A, Taylor W, Dupuis H, eds. Hand-arm vibration. Kanasawa Kyoei Press Co, 1990. 299~ 300
- 20 Kivekas J, Riihimäki H, Husman, et al. Seven-year follow up of white finger syndromes and radiographic wrist findings in lumber jacks and reference. *Scan J Work Environ Health*, 1994, 20 101~ 106
- 21 Pelmeur PL, Taylor W, Pearson JCG. Raynaud's phenomenon in grinders. In Taylor W, Pelmeur PL, eds. Vibration white finger in industry. London. Academic Press 1975. 21~ 30
- 22 Ekenvall L, Lindblad LE. Vibrationsutlösta Raynaud-fenomen och nikotinkonsumtion-en preliminär rapport. *Opuscula medica*, 1985, 30 28~ 31
- 23 Nasu Y, Ishida K. Follow-up study of patients with vibration syndrome in Japan. *Scan J Work Environ Health*, 1986, 12 313~ 319
- 24 Matoba T, Kusumoto H, Mea H, et al. A follow-up study of 164 patients with vibration disease after their discharge by questionnaires. *Jap J Ind Health*, 1977, 19 75 ~ 79

(收稿: 1997-10-15)

(上接20页) factor (TNF) is a physiologic regulator of hematopoietic progenitor cells increase of early hematopoietic progenitor cells in TNF receptor p55-deficient mice in vivo and potent inhibition of progenitor cell proliferation by TNF alpha in vitro. *Blood*, 1995, 86 (8): 2930

- 9 Rusten LS, et al. Tumor necrosis factor (TNF) -

alpha directly inhibits human erythropoiesis in vitro role of p55 and p75 TNF receptors. *Blood*, 1995, 85 (4): 989

- 10 Zheng LX, et al. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Letters to Nature* 1995, 377 348

(收稿: 1997-12-22 修回: 1998-04-01)