

· 论 著 ·

单唾液酸神经节苷脂对 2, 5-己二酮诱导的 PC12 细胞凋亡的影响

孟祥平¹, 杨国成^{1*}, 刘少平², 孙凌聪³, 刘莉¹, 高兴华¹, 汤贝贝¹

(1. 武汉大学医学院生物化学与分子生物学系, 湖北 武汉 430071; 2. 武汉大学中南医院 湖北 武汉 430071; 3. 武汉生物制品研究所, 湖北 武汉 430060)

摘要: 目的 研究单唾液酸神经节苷脂 (GM1) 对 2, 5-己二酮 (2, 5-HD) 诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用, 并探讨其作用机制。方法 以 PC12 细胞为神经元的细胞模型, 2, 5-HD、GM1 及磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3-K) 抑制剂 LY294002 单独或联合处理细胞, MTT 法检测细胞存活率, Giemsa 染色法观察细胞形态, 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 断裂, 流式细胞术 (FCM) 检测细胞凋亡率, 免疫印迹检测蛋白激酶 B (Akt) 和磷酸化-Akt (P-Akt) 蛋白的表达。结果 GM1 可以有效地改善凋亡引起的细胞形态学改变, 提高细胞存活率 ($P < 0.05$), 最高可提高 36.35%; 降低 DNA 断裂程度, 减少凋亡率 ($P < 0.001$), 最明显可降低 69.36%。GM1 能够促进 Akt 磷酸化, LY294002 可以阻断这种作用。结论 GM1 对 2, 5-HD 诱导的 PC12 细胞凋亡有保护作用。该保护作用可能是通过启动 PI3-K 信号通路, 激活 Akt 及其下游信号而产生的。

关键词: 神经节苷脂; 2, 5-己二酮; PC12 细胞; 凋亡; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 蛋白激酶 B

中图分类号: R135.1; R994.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)02-0065-05

Effect of GM1 on apoptosis of PC12 cells induced by 2, 5-HD

MENG Xiang-ping¹, YANG Guo-cheng^{1*}, LIU Shao-ping², SUN Ling-cong³, LIU Li¹, GAO Xing-hua¹, TANG Bei-bei¹

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2. Medical Research Center of Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 3. Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan 430060, China)

Abstract Objective To study the protective effect of monosialoganglioside (GM1) on apoptosis of PC12 cells induced by 2, 5-Hexanedione (2, 5-HD) and the potential mechanism involved. **Method** As the experimental model of neurons PC12 cells were exposed to different concentrations of 2, 5-HD with or without GM1 and LY294002 (inhibitor of PI3-K). Cell viability was determined by MTT assay; morphological changes were observed by Giemsa method; DNA fragment was observed with agarose gel electrophoresis; apoptotic ratio of PC12 cells was determined by flow cytometry (FCM); expressions of Akt and P-Akt were detected by immunoblotting. **Result** GM1 can significantly ameliorate the morphological changes of PC12 cells induced by 2, 5-HD, increase the cell viability ($P < 0.05$, increased about 36.35% almost), meanwhile, DNA fragments and apoptotic ratio decreased ($P < 0.001$, decreased nearly 69.36%). Immunoblotting showed that GM1 could increase the expression of phospho-Akt, which might be blocked by LY294002. **Conclusion** GM1 shows protective effect on apoptosis of PC12 cells induced by 2, 5-HD, which may related to the activation of PI3-K/Akt pathway and its downriver events.

Key words: Monosialoganglioside (GM1); 2, 5-Hexanedione; PC12; Apoptosis; PI3-K; Protein kinase B

正己烷作为一种有机溶剂, 在我国仍广泛应用于制鞋、印刷等多个行业。长期接触低浓度正己烷而缺乏有效防护的业者, 可发生正己烷中毒。研究表明正己烷中毒主要是其代谢产物 2, 5-己二酮 (2, 5-Hexanedione, 2, 5-HD) 所致^[1], 临床上主要表现为慢性多发性感觉运动型周围神经病。长时间接触正己烷与帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 也有明显联系^[2]。不同因素引起的帕金森病最终都会出现黑质致密部多巴胺能神经元的凋亡^[3], 并有研究表明, 2, 5-HD 可直接诱导神经以及非神经系统细胞出现凋亡^[4, 5]。因

此抑制 2, 5-HD 诱导的神经元凋亡是正己烷中毒的一种有效治疗措施。

单唾液酸神经节苷脂 (monosialoganglioside, GM1) 是神经系统必不可少的神经营养物质, 动物和临床实验表明 GM1 对于中枢神经系统以及外周神经系统损伤具有一定的保护、修复作用^[6, 7]。故推测 GM1 可应用于治疗正己烷中毒引起的外周神经损伤以及由正己烷中毒引起的帕金森病。本研究建立 2, 5-HD 诱导的 PC12 细胞凋亡模型, 探讨 GM1 的保护作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

2, 5-HD (Sigma 公司), GM1 购自 TRB Pharma S.A 公

收稿日期: 2005-09-30; 修回日期: 2006-01-09

作者简介: 孟祥平 (1979-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事神经生化方面的研究。

*通讯作者: 杨国成, 教授, 联系电话: 027-87331907

司,LY294002 购自 Promega 公司,兔抗鼠单克隆 Akt 抗体、兔抗鼠单克隆磷酸化 Akt 抗体(Ser473)购自 Cell Signaling 公司。酶联免疫检测仪(华东电子管厂),XSZD 倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂),Bio-1D 型凝胶成像系统(法国 VL),EPICS ALTRA-II型流式细胞仪(美国 Beckman),电泳槽、电泳仪、电转印槽(美国 Bio-Rad)。

1.2 细胞培养及处理

高分化 PC12 细胞(购自中科院上海细胞生物所)常规培养,选取指数生长期细胞以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度,分别接种于 96 孔板($100 \mu\text{l}/\text{孔}$)作 MTT 检测和 24 孔板($800 \mu\text{l}/\text{孔}$)作形态学观察;以 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度,接种于 60 mm 培养皿($3 \text{ ml}/\text{皿}$),作琼脂糖凝胶电泳、流式细胞仪和免疫印迹检测。接种的细胞常规培养 24 h 后随机分组如下:(1)正常对照组,于正常培养液(含 10%胎牛血清、5%马血清、10 000 U/L 青霉素及 10 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 链霉素的 RPMI 1640 培养基)培养;(2)HD 组,以 5、10、20、30 和 40 mmol/L 2,5-HD 处理 48 h;(3)GM1+HD 组,以 25、50、75、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ GM1 预处理细胞 24 h 后加入 20 mmol/L 2,5-HD 继续共培养 48 h;(4)GM1 组,以 25、50、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ GM1 处理细胞 30 min;(5)LY294002+GM1 组,以 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ LY294002 处理细胞 5 min 后,再以 25、50、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ GM1 处理细胞 30 min。各处理组均为含血清的 RPMI 1640 培养液。

1.3 MTT 法检测细胞存活率

细胞如前述分组处理毕,每孔加入 5 g/L MTT 20 μl , 37℃ 孵育 4 h,弃上清,每孔加入 DMSO 100 μl , 37℃ 孵育 30 min,酶联免疫检测仪测 570 nm 吸光度,细胞存活率=处理组 A_{570} /对照组 $A_{570} \times 100\%$ 。

1.4 Giemsa 染色观察细胞形态

如前述处理细胞后,弃培养液,室温晾干,无水甲醇固定 5 min, Giemsa 染液染色 10 min,流水冲洗后干燥,置倒置显微镜下观察细胞形态并照相。

1.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳

收集处理好的细胞,4℃ 1 000 r/min 离心 10 min,去上清,加入 20 μl 细胞裂解液(20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris, pH 8.0, 0.8% SDS), 10 μl RNase 酶(10 g/L), 37℃ 水浴 90 min,加入 10 μl 蛋白酶 K(20 g/L), 55℃ 水浴过夜后,取 20 μl 样品加入适量上样缓冲液,经 2% 琼脂糖凝胶电泳(电压 40 V)10 h, EB 染色后,凝胶成像系统观察并照相。

1.6 FCM 检测细胞凋亡率

收集处理好的细胞,70%乙醇 4℃ 固定 24 h, 1 000 r/min 离心 10 min,弃乙醇, PBS 洗 2 次,加入

200 μl 的 RNase 酶(0.5 g/L), 37℃ 水浴 30 min,再加入 800 μl 的碘化丙锭染液(100 mg/L PI, 9 g/L NaCl, 1% Triton X-100(V/V)), 4℃ 避光放置 30 min 后流式细胞仪检测。

1.7 免疫印迹

参考文献[7],处理的细胞以预冷 PBS 洗 3 次,加入裂解缓冲液(200 $\mu\text{l}/10^6$ 细胞),冰浴 20 min, 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清,测定蛋白含量,调整浓度一致后以 7.5% SDS-PAGE 电泳,每孔上样 30 μg 。样品分离后转印至 NC 膜。转印后 NC 膜置于含 5% BSA 的 TBS-T 缓冲液中室温封闭 1 h, TBS-T 漂洗,加入一抗(1:1 000), 4℃ 孵育过夜, TBS-T 漂洗,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000)室温孵育 1 h, TBS-T 漂洗后 NBT 显色,凝胶成像系统扫描分析灰度值。

1.8 统计学分析

每个实验至少重复 3 次,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据用 SPSS11.2 软件的单因素方差分析和相关分析进行统计学处理,取 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 MTT 法检测细胞存活率

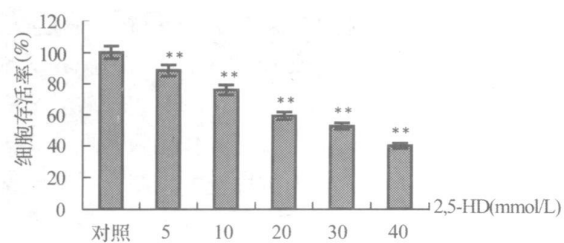
HD 处理组细胞存活率明显低于正常对照组($P < 0.001$),且存活率随着 2,5-HD 浓度升高而下降($r = -0.994$, $P < 0.001$),见图 1。GM1+HD 组与 HD 组相比,细胞存活率升高($P < 0.05$),以 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ GM1 组的细胞存活率最高($P < 0.01$),见图 2。

2.2 细胞形态学变化

Giemsa 染色后相差显微镜下可见:正常对照组细胞密度较大,胞体多呈梭形或多边形,有较长突起;核多为圆形,大而饱满。2,5-HD 处理组细胞密度降低,胞体变小,呈圆形或近圆形,突起变短或消失,可见凋亡小体,核固缩,染色质边聚,呈半圆形、新月形或肾形。且随着处理浓度升高,细胞形态改变更加明显,出现较多细胞碎片。GM1 预处理细胞,细胞长出长短不等突起,细胞形态较 HD 组完整,死亡细胞、细胞碎片减少,上述改变以 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ GM1 组最明显。见图 3。

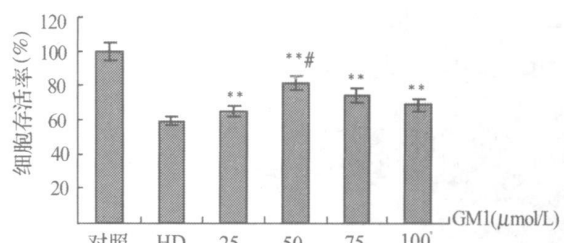
2.3 DNA 琼脂糖凝胶电泳

正常对照组仅见离加样孔不远的基因组 DNA 条带。HD 处理组 DNA 出现片段化,是凋亡典型的生化特征,电泳图上可见呈阶梯状的 DNA 断裂条带,且随着 2,5-HD 浓度升高,断裂条带更加明显。GM1+HD 组和 HD 组比较, DNA 断裂条带减少,说明 GM1 可以抑制 2,5-HD 诱导的 DNA 片段化的发生。见图 4。



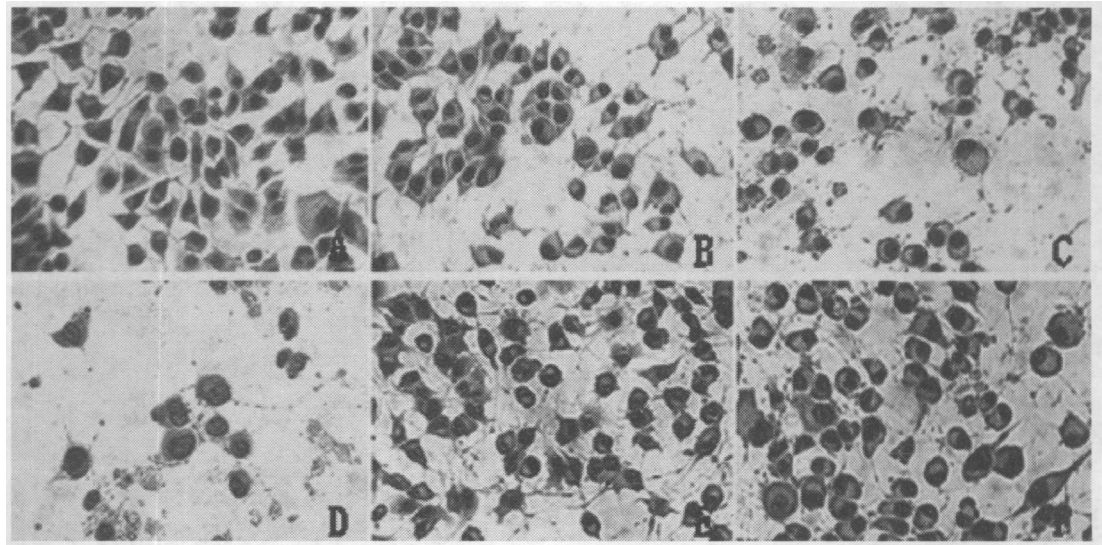
与对照组比较, ** $P<0.001$

图 1 2,5-HD 对 PC12 细胞存活率的影响



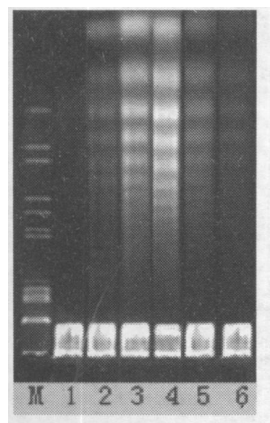
与 20 mmol/L 2,5-HD 组比较, ** $P<0.001$; 与 25、75、100 $\mu\text{mol/L}$ GM1 组比较 # $P<0.01$

图 2 GM1 对 2,5-HD 染毒 PC12 细胞存活率的影响



A: 对照; B~D: 10、20、40 mmol/L 2,5-HD; E、F: 25、50 $\mu\text{mol/L}$ GM1

图 3 细胞形态变化 (×400)



M: marker; 1: 对照; 2~4: 10、20、40 mmol/L 2,5-HD;
5、6: 25、50 $\mu\text{mol/L}$ GM1+20 mmol/L 2,5-HD

图 4 DNA 琼脂糖凝胶电泳

2.4 FCM 检测细胞凋亡率

表 1 显示, 2,5-HD 处理组在 G1 峰之前出现明显的“亚 G1 峰”, 此为典型的凋亡峰。除 5 mmol/L 2,5-HD 组外, 2,5-HD 处理组凋亡率均高于对照组 ($P<0.001$); 并且 2,5-HD 浓度升高, 凋亡率升高 ($r=0.968$, $P<0.001$)。GM1 预处理细胞, 与 HD 组

相比细胞凋亡率下降 ($P<0.001$), 以 50 $\mu\text{mol/L}$ GM1 组凋亡率减低最明显 ($P<0.001$)。

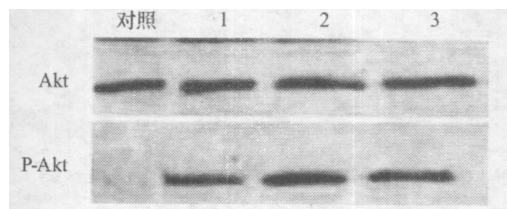
表 1 PC12 细胞凋亡率 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$) %		
组别	剂量	凋亡率
对照组		1.78±0.12
HD 组	5	2.56±0.25
	10	10.00±1.23 *
	20	33.78±3.34 *
	30	36.21±3.12 *
	40	48.46±3.59 *
GM1($\mu\text{mol/L}$)+HD(20 mmol/L)组	25	20.67±1.68 #
	50	10.35±0.97 #▲
	75	22.04±2.03 #
	100	26.57±3.24 #

与对照组比, * $P<0.001$; 与 20mmol/L HD 组比 # $P<0.001$; 与 25、75、100 $\mu\text{mol/L}$ GM1+HD 组比, ▲ $P<0.001$

2.5 PI3-K/Akt 的表达水平以及 LY294002 对 Akt 磷酸化的影响

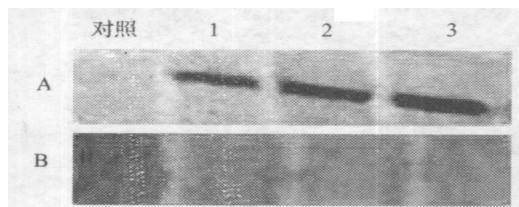
GM1 组细胞总 Akt 水平和正常对照组基本相同, 但 Akt 的磷酸化水平随着 GM1 浓度升高而增加, 正常对照组 P-Akt 基本上不表达 (图 5)。以 PI3-K 抑制剂 LY294002 预处理细胞后, 再以 GM1 处理, P-Akt

基本上未表达,提示PI3-K抑制剂有效地阻断了GM1诱导的Akt磷酸化(图6)。



1~3: 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ GM1

图5 GM1对Akt和P-Akt表达影响



1~3: 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ GM1; A: No LY294002

B: Cells pretreated with 50 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 for 5 min

图6 LY294002对GM1诱导P-Akt表达的影响

3 讨论

细胞凋亡是不同的内外环境刺激,激发凋亡信号传导,激活细胞死亡基因而导致的一种主动性细胞死亡过程。凋亡在包括帕金森病在内的许多神经系统疾病中发挥重要的作用。研究表明,以低浓度2,5-HD处理小鼠背根神经节细胞,细胞出现凋亡^[4];在非神经系统中也观察到2,5-HD诱导凋亡的作用^[5]。表明在正己烷中毒过程中凋亡同样发挥作用,故本研究建立了2,5-HD诱导的PC12细胞凋亡模型。PC12细胞具有神经分泌细胞的性质,分化的PC12细胞具有神经突起的表现,常作为神经元的细胞模型。实验结果显示,2,5-HD可以诱导细胞凋亡。其中20 mmol/L 2,5-HD作用48 h后细胞形态上表现出明显凋亡特征,可见凋亡小体,核固缩;DNA电泳呈“阶梯状”;细胞存活率为59.40%,凋亡率为33.78%,具有显著性,选择该条件应用于后续研究。

GM1是维持神经元存活、生长、分化和功能所必需的神经营养物质,动物和临床实验表明GM1对于中枢神经系统以及外周神经系统损伤,包括脑血管疾病,糖尿病、酒精性、尿毒性神经病具有一定的保护、修复作用,并且对于中枢神经系统退行性疾病,包括帕金森病、老年性痴呆等都具有一定的改进生化指标、改善症状、延缓疾病进展,保护神经元的作用。但尚无其治疗正己烷中毒性周围神经病的临床及体外实验报告。本实验研究了GM1对于2,5-HD诱导PC12凋亡的保护作用。结果显示,GM1对2,5-HD诱

导的PC12凋亡有明显的抑制作用,提高了细胞存活率,降低了凋亡率,50 $\mu\text{mol/L}$ GM1组的细胞存活率为81.02%,凋亡率为10.35%,与HD组比较差异有显著性;且50 $\mu\text{mol/L}$ GM1的保护作用最为明显,细胞存活率最高,100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组的细胞存活率较50 $\mu\text{mol/L}$ 组反而下降。Bo Rum Ryu认为GM1只在凋亡显著的情况下表现出保护作用,对激烈损伤引起的坏死反而有害^[9]。故我们推测GM1高于50 $\mu\text{mol/L}$ 后保护作用趋于下降这可能是中毒过程中既出现了凋亡、又出现了坏死,浓度高于50 $\mu\text{mol/L}$ 时GM1对凋亡的保护作用达到饱和,从而表现出对坏死的促进作用,细胞生存率下降,因而GM1的用量不可过大。

对于GM1的神经保护机制,有观点认为,GM1插入细胞膜,并引起局部细胞膜成分改变,可促进酪氨酸激酶受体(Trk)二聚化及随之活化^[10];促进神经生长因子(NGF)活化TrkA受体;激活PI3-K和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),进一步活化C反应元件结合蛋白(CREB)^[11]。为了研究GM1对PC12细胞2,5-HD中毒的保护机制,检测了Akt和P-Akt的表达情况。结果显示GM1处理后Akt的表达水平基本不变,但促进了Akt磷酸化,提示Akt磷酸化可能在GM1保护中毒PC12细胞的过程中发挥作用。以PI3-K抑制剂LY294002预处理PC12细胞后再以GM1处理,则几乎检测不到P-Akt的表达,表明GM1可能通过活化PI3-K后再激活Akt,即通过激活PI3-K/Akt这条细胞信号通路来保护PC12细胞,减少细胞死亡。PI3-K在细胞存活信号中扮演一重要的角色,可被许多因子激活,引起Akt活化,抑制了促凋亡蛋白Bad、Caspase-9的活化,并诱导抗凋亡蛋白Bcl-xL、Bcl-2的表达,从而促进细胞存活^[12]。结合以往研究,我们推测GM1的保护作用机制可能通过活化Trk受体,激活了PI3-K/Akt通路及其下游抗凋亡信号表达,促进细胞存活。

参考文献:

- [1] Hernandez MV, Montoliu C, Monfort P, et al. Chronic exposure to 2,5-hexanedione impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in rat brain in vivo [J]. *Neurochem Int*, 2003, 42 (7): 525-533.
- [2] Vanacore N, Gasparini M, Brusa L, et al. A possible association between exposure to *n*-hexane and parkinsonism [J]. *Neurol Sci*, 2000, 21 (1): 49-52.
- [3] Vemes I, Steur EN, Reutelingspeger C, et al. Decrease concentration of annexin-V in parkinsonian cerebrospinal fluid: speculation on the underlying cause [J]. *Movement Disord*, 1999, 14 (6): 1008-1010.
- [4] Ogawa Y, Shimizu H, Kim SU. 2,5-Hexanedione induced apoptosis in cultured mouse DRG neurons [J]. *Int Arch Occup Environ Health*, 1996, 68 (6): 495-497.

- [5] Blanchard KT, Alard EK, Boekelheide K. Fate of germ cells in 2, 5-hexanedione-induced testicular injury. I. Apoptosis is the mechanism of germ cell death [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1996, 137 (2): 141-148.
- [6] David H. Growth factor and gangliosides as neuroprotective agents in excitotoxicity and ischemia [J]. General pharmacology, 1998, 30: 265-273.
- [7] Schneider JS, Sendek S, Daskalakis C et al. Stabilization of Parkinson's disease with long term use of GM1 ganglioside [J]. Society for Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary Planner, 2003, 29: 16.
- [8] Wu D C, Ingram A, Lahti J H, et al. Apoptotic release of histones from nucleosomes [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (14): 12001-12008.
- [9] Bo RR, Dennis WC, Dean MH. Attenuation of cortical neuronal apoptosis by gangliosides [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 290(2): 811-816.
- [10] Masashi N, Satoshi F, Keiko F. Overexpressed GM1 suppresses nerve growth factor (NGF) signals by modulating the intracellular localization of NGF receptors and membrane fluidity in PC12 cells [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (32): 33368-33378.
- [11] Jun SC, Jeong A K, Choun KJ. Activation of MAPK and CREB by GM1 induces survival of RGCs in the retina with axotomized nerve [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44 (4): 1747-1752.
- [12] Sandeep RD, Anne B, Michael EG. Cellular survival: A play in three Acts [J]. Genes Dev, 1999, 13 (22): 2925-2927.

·病例报告·

二溴氯丙烷作业女工宫颈上皮不典型增生 4 例

Cervical epithelial atypical hyperplasia in dibromochloropropane exposed female workers: Report of four cases

战波, 史懋功, 李友好

(烟台市职业病防治院, 山东 烟台 264025)

国内某氯碱厂于 1976 年 1 月开始生产二溴氯丙烷 (DBCP) 乳剂, 每年生产 500~700 t, 成品浓度为 80%~82%, 至 1982 年 7 月停产。期间接触 DBCP 女工 20 名, 均为操作工, 工作需要时常从事 DBCP 分装与包装作业。1981 年我们对 DBCP 生产车间各作业点进行了空气浓度测定, 成品包装处浓度最高, 为 20.00 mg/m³; 分装计量室次之, 为 7.26 mg/m³; 操作室、合成槽处均为 3.26 mg/m³。20 名女工入厂时一般健康检查均健康, 但无妇科检查资料; 其后 20 余年未作过健康检查。2000 年体检时发现宫颈上皮不典型增生 4 例, 而同期进入该厂不接触 DBCP 的 112 名女工中未发现该病变。现将 4 例宫颈上皮不典型增生报告如下。

1 病例介绍

【例 1】女, 51 岁, 从事 DBCP 生产 6 年 3 个月。头晕、头痛、失眠、乏力 20 余年, 阴道分泌物增多 3 年余。月经 16 $\frac{3-4}{30-35}$ 量多, 近 10 年月经间期逐渐延长至 50 余天。2000 年 6 月体检: 双肺呼吸音清, 无啰音。心率 63 次/min, 律齐。肝脾肋下未及。妇科检查示: 宫颈重 I 度糜烂, 以子宫颈管内糜烂为主, 接触性出血。宫颈涂片细胞学检查, 巴氏染色分级为 III 级细胞。宫颈活检示慢性宫颈炎伴鳞状上皮轻度不典型增生。

【例 2】女, 47 岁, 从事 DBCP 生产 6 年 2 个月。头晕、乏力、月经不调 20 余年, 阴道分泌物增多 4 年。月经期不定, 量多, 有血块, 痛经。双肺呼吸音清, 无啰音。心率 60 次/min, 律齐。肝脾肋下未及。2000 年 6 月妇科检查示: 宫颈 III 度糜烂, 以子宫颈管内糜烂为主, 接触性出血明显。宫颈涂片细胞学检查, 巴氏染色分级为 III 级细胞。宫颈活检示慢性宫颈炎伴鳞状上皮轻度不典型增生。

【例 3】女, 46 岁, 从事 DBCP 生产 6 年 6 个月。头晕、失

眠、乏力 20 余年, 阴道分泌物减少 3 年余。月经 16 $\frac{4-5}{30}$ 量中, 无痛经。双肺呼吸音清, 无啰音。心率 68 次/min, 律齐。肝脾肋下未及。2000 年 6 月妇科检查示: 宫颈肥大 I 度糜烂, 以子宫颈管内糜烂为主, 轻度接触性出血。宫颈涂片细胞学检查, 巴氏染色分级为 IV 级细胞。宫颈活检示慢性宫颈炎伴鳞状上皮中-重度不典型增生。

【例 4】女, 48 岁, 从事 DBCP 生产 6 年。头晕、乏力、睡眠障碍 20 余年, 阴道分泌物增多 5 年余。月经紊乱, 经期 15~70 d 不等, 量多少不定, 痛经, 近几年加重。2000 年 6 月体检: 双肺呼吸音清, 无啰音。心率 70 次/min, 律齐。肝脾肋下未及。妇科检查示宫颈 III 度糜烂, 以子宫颈管内糜烂为主, 接触性出血明显。宫颈涂片细胞学检查, 巴氏染色分级为 IV 级细胞。宫颈活检示慢性宫颈炎伴鳞状上皮重度不典型增生。

上述 4 例均经波姆光及抗炎对症治疗, 宫颈糜烂好转。分别于 2001 年 7 月、2002 年 9 月、2003 年 10 月复查宫颈涂片细胞学及宫颈活检, 较前无变化。

2 讨论

动物实验表明, DBCP 对哺乳动物有致突变性。宫颈上皮不典型增生又通称为癌前期的细胞改变, 包括除子宫颈原位癌及浸润癌以外的所有子宫颈鳞状上皮细胞和腺细胞的发育分化异常。最终能否发展为子宫颈癌, 需进一步追踪观察。2000~2004 年我们多次对 4 名女工进行垂体性腺激素放免测定, 每次结果基本相同, 显示黄体期雌激素下降, 卵泡刺激素及黄体生成素升高。职业卫生学调查显示, 20 名女工因常从事 DBCP 分装与包装作业, 其接毒时间从 3 个月至 6.5 年不等, 有 9 名女工接毒时间超过 4 年。本组病例接毒时间则在 6 年以上, 时隔 20 年后子宫颈上皮不典型增生的发生率达 20%, 出现如此高的发病率是否与 DBCP 有关, 因例数太少有待于进一步研究。