

# 苯中毒骨髓损伤的特征

吕玲<sup>1</sup>, 林国为<sup>1</sup>, 邹和建<sup>1</sup>, 王小钦<sup>1</sup>, Liming Bao<sup>2</sup>, Richard D Irons<sup>3</sup>

(1. 复旦大学上海医学院华山医院, 上海 200040; 2. 美国儿童医学中心; 3. 美国科罗拉多大学健康医学中心)

**摘要:** 目的 对 23 例苯中毒病人的周围血及骨髓进行分析, 探讨苯中毒骨髓损伤的特征和机制。方法 23 例住院苯中毒患者, 平均离岗及诊断苯中毒时间 2.7 年; 21 例为慢性轻度苯中毒, 2 例为慢性重度苯中毒 (苯中毒再生障碍性贫血); 男 8 例, 女 15 例, 平均年龄 (45.5±7.8) 岁。按统一调查表询问职业史、毒物接触史、药物接触史、造血系统疾病史以及肿瘤史; 实验室检查包括: 血常规、骨髓常规以及骨髓活检、荧光原位杂交技术 (FISH)、流式细胞仪和 TCR 受体基因重排分析。结果 (1) 23 例苯中毒病人中, 血常规检查 6 例正常、系减少 1 例、一系或二系减少 16 例 (其中 14 例淋巴细胞数减少)。血中大颗粒淋巴细胞 (LGL) 百分比增加 (平均 29.6%,  $n=22$ )。 (2) 23 例苯中毒病人骨髓检查均示有一系或二系发育不全, 骨髓损害的特征包括: 显著的红系病态造血, 嗜酸细胞发育不良, 中性粒细胞前体细胞中异常的胞浆颗粒, 嗜血细胞生成, 髓质退化及骨髓增生低下。 (3) T 细胞受体 (TCR) 可变区基因重排 (14/23),  $CD4^+/CD8^+$  比例减低 ( $0.77\pm0.48$ ,  $n=23$ )。 (4) 未发现研究对象染色体结构异常。结论 与 MDS 各亚型常见的骨髓表现不同, 慢性苯中毒骨髓损伤的特征是: 显著的红系病态造血, 嗜酸细胞发育不良, 中性粒细胞前体细胞中异常的胞浆颗粒, 嗜血细胞生成, 髓质退化及骨髓增生低下; 脱离苯接触若干年后, 骨髓的这些损害仍持续存在。

**关键词:** 慢性苯中毒; 骨髓发育不良; 特征和机制

中图分类号: R135.12 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)01-0017-03

## Study on bone marrow dysplasia in chronic benzene poisoning

LV Ling<sup>1</sup>, LIN Guo-wei<sup>1</sup>, ZOU He-jian<sup>1</sup>, WANG Xiao-qin<sup>1</sup>, Liming Bao<sup>2</sup>, Richard D Irons<sup>3</sup>

(1. Huashan Hospital, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200040, China; 2. Division of Human Genetics, University of Cincinnati, Children's Hospital Medical Center, USA; 3. Health Medical Center, Colorado University, USA)

**Abstract Objective** To study the feature of bone marrow damage during chronic benzene poisoning. **Method** The objects were 23 hospitalized benzene poisoning patients. 21 were diagnosed as chronic mild benzene poisoning and two were chronic severe benzene poisoning. Their average time of leaving benzene work was 2.7 years; 8 cases were male among them; the average age was (45.5±7.8) years. According to the standard questionnaire, the occupational exposure, medications history in nearest 5 years, hematological diseases and tumors history, the exposure to benzene and other poisons etc. were investigated. The laboratory examination including routine peripheral blood examination, bone marrow routine examination, and bone marrow biopsy, flow cytometry and T cell receptor (TCR) gene rearrangement analysis. **Result** The results showed that (1) The blood routine examination showed that among 23 chronic benzene poisoning patients, 6 cases had normal CBC (complete blood cell count), 14 cases had lymphocytopenia, and the other 17 cases showed pancytopenia or cytopenia in two lines of hematocytes. Meanwhile, there was some increase of the LGL (large Granular Lymphocytes, mean=29.6%,  $n=22$ ) in peripheral blood. (2) The bone marrow examination showed that all the 23 patients showed myelodysplasia in one or two lines hematocytes. The distinguishing features in this kind of bone marrow damage included: dyserythropoiesis, eosinophilic dysplasia, abnormal cytoplasmic granulation of neutrophilic precursors, hemaphagocytosis, stromal degeneration and bone marrow hypoplasia. (3) Rearrangement of TCR (T cell receptor) gene segments (14/23), and reduction in the ratio of  $CD4^+/CD8^+$  lymphocytes in bone marrow ( $0.77\pm0.48$ ,  $n=23$ ). (4) No abnormal chromosome structure in the patients was found. **Conclusion** The results showed that the manifestations of bone marrow damage in benzene poisoned patients such as obvious dyserythropoiesis, eosinophilic dysplasia etc. which were quite different from the common MDS and might exist for years after stopping exposure to benzene.

**Key words:** Chronic benzene poisoning; Bone marrow dysplasia; Characteristics and mechanism

以往文献报道, 慢性苯中毒较早出现的是周围血白细胞减少, 血红蛋白减少在重度苯中毒时才出

现<sup>[1]</sup>。慢性苯中毒骨髓损害的表现 为中性粒细胞胞浆中毒颗粒、空泡, 双核型早、中、晚幼粒细胞、核分叶过多、核浆发育不平衡; 双核型早、中、晚幼红细胞, 部分幼红细胞见 H-J 小体, 脱核障碍及嗜碱性点彩, 成熟红细胞大小不一, 巨幼红细胞<sup>[1]</sup>。细胞遗传学改变是发生苯中毒的重要机制<sup>[2~4]</sup>。实际工作中发

收稿日期: 2006-06-06; 修回日期: 2006-10-16

作者简介: 吕玲 (1964-), 女, 在读博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 苯中毒白血病。

现部分苯中毒工人的骨髓有发育异常,但其周围血象正常;部分苯中毒工人无细胞遗传学改变。因此为了进一步掌握苯中毒造血系统损害的特征及机制,特作本研究工作,现报告如下。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

23例苯中毒患者,平均离岗及诊断苯中毒时间2.7年,21例最初诊断为慢性轻度苯中毒,2例最初诊断为慢性重度苯中毒(苯中毒再生障碍性贫血),男8例、女15例,平均年龄( $45.5 \pm 7.8$ )岁,分别为橡胶厂、石油化工厂、药厂以及制鞋厂操作工和油漆工,工龄6~22年,平均13.9年。所有病例都除外恶性肿瘤史、药物史及其他有毒物质引起的血液改变等。

### 1.2 方法

1.2.1 制订统一调查表,培训专人负责调查登记,询问职业史,苯中毒发病前5年内的用药史(氯霉素、磺胺药、苯妥英钠、秋水仙碱、丙硫氧嘧啶、抗结核药、磺酰胺类降糖药D860、氯喹、环磷酰胺),肿瘤史,一年内房屋装修史,发病前苯、有机磷、有机氯及放射线接触史,电离辐射接触史。

1.2.2 血常规检查,包括血红蛋白含量,红细胞计数、白细胞计数及其分类、血小板计数。用Wright-Giemsa染色观察大颗粒淋巴细胞(large granular lymphocytes LGL)。骨髓常规检查,有核细胞计数、粒红比值、各系细胞分类和形态观察。骨髓活检项目包括造血组织含量、粒红比例、细胞形态。

1.2.3 FISH方法 骨髓细胞培养24~72 h,按标准技术制备染色体、G带分析和探针杂交。荧光显微镜(Olympus Optical, Tokyo)下进行观察并用Power Gene Macprobe成像系统(Applied Imaging International, Newcastle, UK)拍照和分析。IgH重排阳性:大于3%的间期细胞出现IgH重排信号。

1.2.4 流式细胞仪分析 骨髓穿刺液结合带荧光的单克隆抗体,单克隆抗体包括抗CD45、抗CD4、抗CD8、抗CD3(Beckman Coulter, Hialeah, FL; Immunotech, Miami FL)。用双激光流式细胞仪(FC-500, Beckman Coulter)对结合单克隆抗体的骨髓细胞进行多参数分析(CXP, Beckman Coulter 软件)。

1.2.5 TCR基因重排 采用Biomed-2试剂盒(InV... San Diego, CA),根据试剂盒的操作步骤来鉴别T细胞群的克隆与寡克隆表达。采用多引物PCR方法,分别用一种、二种、三种PCR反应混合液分析TCR $\beta$ 、TCR $\gamma$ 、TCR $\delta$ 基因。

1.2.6 调查组在上述厂家测定各接苯岗位个体接苯

空气浓度(三个班制)、区域接苯空气浓度,连续测定1~2周。用3M3500和3M3520有机荧光监测器采集接苯工人呼吸区域的个体样本,用碳管法收集20 min区域接苯空气浓度(200 ml/min,共20 min)。1~2周内共收集到954个个体样本和977个区域样本。样本用CS<sub>2</sub>解吸附,5 d内进行分析,得到接苯岗位的日平均苯空气浓度,结合工龄、每天工作时间推算长时间接苯平均浓度(Long Time Average, LTA),得到17个接苯工人的LTA值(165~990 mg/m<sup>3</sup>)。

1.2.7 STATA7.0统计软件进行相关分析(计量资料采用参数分析,非计量资料采用非参数分析)。

## 2 结果

### 2.1 周围血常规检查

23例苯中毒病人的周围血三系减少1例,一系或二系减少16例,其中14例淋巴细胞数减少,周围血象正常范围6例。22例LGL>20%,平均29.6%。

### 2.2 骨髓细胞增生程度、骨髓活检

骨髓增生低下17例(骨髓细胞成分占活检组织的比例<40%),骨髓增生正常4例(其比例40%~60%),骨髓增生活跃2例(其比例>60%)。

### 2.3 骨髓象粒细胞占有核细胞百分率(%)

骨髓象粒系检查发现4例病人杆状粒细胞数量增加,1例病人分叶核细胞数量增加,4例病人分叶核细胞数量减少,1例病人晚幼粒减少,而原幼粒细胞及早幼粒细胞数量均在正常范围。

### 2.4 骨髓象幼红细胞、淋巴细胞占有核细胞百分率(%)

10例病人中幼红细胞数量增加,1例病人晚幼红细胞数增加,2例病人晚幼红细胞数减少;4例病人淋巴细胞数减少。

### 2.5 骨髓形态学改变

23例患者都有骨髓一系或一系以上的发育异常。根据发育异常细胞占各系细胞的百分比对发育异常程度分级:+,10%~50%;++,50%~70%;+++,>70%。发现红系有显著发育异常,23例有20例发育异常(8例+++),1例发育正常,2例因细胞少无法鉴别;粒系有17例发育异常(12例+++);发现中性粒细胞前体细胞中异常的胞浆颗粒,5例发育正常,1例因细胞少无法鉴别;巨核系5例发育异常(2例+++),1例发育正常,17例因细胞少无法鉴别。发现22例嗜酸前体细胞发育异常(9例+++),6例病人噬血细胞显著增多;2例中等程度增多,8例轻度增多,7例未发现噬血细胞。23例患者中有1例同时出现红系、粒系、巨核系和嗜酸前体

细胞严重发育异常并且噬血细胞显著增多; 另 1 例同时出现红系、粒系和巨核系严重发育异常合并噬血细胞显著增多。

## 2.6 细胞遗传学改变

没有发现染色体结构异常的病例。

## 2.7 免疫指标

流式细胞仪和 TCR 受体基因重排分析发现  $CD4^+/CD8^+$  比例在正常范围的低限 ( $0.77 \pm 0.48$ ,  $n=23$ , 正常范围  $0.70 \sim 2.56^{[13]}$ ), 4 例 TCR $\beta$  基因重排, 4 例 TCR $\beta$  合并 TCR $\delta$  基因重排, 6 例 TCR $\delta$  基因重排。这些结果说明 T 细胞免疫反应参与了苯中毒的发生。未发现免疫指标  $CD4^+/CD8^+$  比例和骨髓发育异常程度以及苯暴露浓度之间的显著相关 ( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

MDS 是一组异质性克隆性造血干细胞疾病。大多数病例骨髓显著增生, 骨髓病态造血, 通常表现为同时或先后出现红系、粒系和巨核细胞发育异常, 根据不同的表现可分为不同亚型<sup>[5]</sup>。本研究发现, 与常见的 MDS 各亚型骨髓发育异常不同的是苯中毒骨髓发育不良表现为显著的红系发育异常, 嗜酸粒细胞前体细胞发育异常, 中性粒细胞前体细胞中异常的胞浆颗粒, 合并有显著的噬血细胞生成, 髓质退化及骨髓增生低下, 脱离苯接触数年后, 这些发育异常仍持续存在。

曾有文献提出假设, 机体内外有毒物质对造血干细胞的生长和发育起免疫抑制作用, 从而导致 MDS 的发病<sup>[6]</sup>。近年来已有较多的证据证明免疫机制参与了 MDS 的发病。这些证据包括, MDS 病人  $CD4/CD8$  比例倒置, 循环  $\alpha$ -肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 水平升高<sup>[6]</sup>, TCR 受体基因重排<sup>[7-9]</sup> 以及环孢菌素等免疫抑制剂用于 MDS 治疗<sup>[9,10]</sup>。同样, 一系列文献证实异常的免疫调节参与了苯中毒的发病。1988 年 Pyatt 等证实苯的代谢物氢醌 (hydroquinone, HQ) 通过封锁核转录因子 (NF- $\kappa$ B) 的活性来抑制 T 淋巴细胞的功能<sup>[11]</sup>。2000 年 Pyatt 等又证实 HQ 和 NF- $\kappa$ B 协同作用抑制成熟 B 淋巴细胞功能<sup>[12]</sup>。2003 年 Patric 等证实 TNF- $\alpha$  协同 HQ 抑制 NF- $\kappa$ B 活性从而诱发造血干细胞的凋亡<sup>[13]</sup>。

$CD4^+$ 、 $CD8^+$  是 T 细胞表面与 T 细胞活化有关的分子,  $CD4^+/CD8^+$  比例在正常范围的下限, 提示自身免疫反应的发生。T 细胞表达抗原受体 (T cell receptor, TCR), 以此识别抗原和介导免疫应答。TCR 基因重排是 T 细胞分化成熟过程中必不可少的一个重要

环节<sup>[14]</sup>。研究发现 23 例苯中毒患者  $CD4^+/CD8^+$  比例在正常范围的下限, 14 例 TCR 基因重排, 表明苯中毒发病过程中发生了 T 细胞介导的自身免疫反应。同样, 外周血 LGL 及骨髓噬血细胞增加都反映了自身免疫反应的发生。本文 FISH 检查 23 例苯中毒病人都无染色体的结构异常, 提示苯中毒的发病中免疫异常可能先于染色体的结构异常, 因此免疫指标能先于染色体指标来监测苯中毒的发生。

## 参考文献:

- [1] 丁铎, 邹和建, 倪为民, 等. 苯作业工人周围血及骨髓常规检查的临床应用价值 [J]. 中国工业医学杂志, 1997, 10 (1): 7-11.
- [2] Yager J W, Eastmond D A, Robertson M L, et al. Characterization of micronuclei induced in human lymphocytes by benzene metabolites [J]. Cancer Res, 1990, 50: 393-399.
- [3] Erexson G L, Wilmer J L, Kligenman A P, et al. Sister chromatid exchange induction in human lymphocytes exposed to benzene and its metabolites in vitro [J]. Cancer Res, 1985, 45: 2471-2477.
- [4] Zhang L, Wang Y, Sheng N, et al. Benzene metabolites induce the loss and long arm deletion of chromosome 5 and 7 in human lymphocytes [J]. Leuk Res, 1998, 22 (2): 105-113.
- [5] 陈灏珠. 实用内科学 [M]. 第 12 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 2333.
- [6] Rosefeld C, List A. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies [J]. Leukemia, 2000, 14: 2-8.
- [7] Hamblin T J. Immunological abnormalities in myelodysplastic syndromes [J]. Semin Hematol, 1996, 33: 150-162.
- [8] Sauntharajah Y, Molldrem J L, Rivera M, et al. Coincident myelodysplastic syndrome and T-cell large granular lymphocytic disease: Clinical and pathophysiological features [J]. Br J Haematol, 2001, 112: 195-200.
- [9] Kook H, Zeng W, Guibin C, et al. Increased cytotoxic T cells with effector phenotype in aplastic anemia and myelodysplasia [J]. Exp Hematol, 2004, 29: 1270-1277.
- [10] Jonasova A, Neuwirtova R, Cernak J, et al. Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anaemias without hypoplastic bone marrow [J]. Br J Haematol, 1998, 100: 304-309.
- [11] Pyatt D W, Stillman W S, Irons R D. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, inhibits NF- $\kappa$ B in primary human  $CD4^+$  T lymphocytes [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1998, 149: 178-184.
- [12] Pyatt D W, Yang Y, Stillman W S, et al. Hydroquinone inhibits PMA-induced activation of NF- $\kappa$ B in primary human  $CD19^+$  B lymphocytes [J]. Cell Biology and Toxicology, 2000, 16: 41-51.
- [13] Patrick J, David W, Pyatt, et al. Inhibition of NF- $\kappa$ B by hydroquinone sensitizes human bone marrow progenitor cells to TNF- $\alpha$  induced apoptosis [J]. Toxicology, 2003, 187: 127-137.
- [14] 周光炎. 免疫学原理 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2000: 27.
- [15] Jiang W, Kang L, Lu H Z, et al. Normal values for  $CD4^+$  and  $CD8^+$  lymphocyte subsets in healthy Chinese adults from Shanghai [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11: 811-813.