不同接苯时间苯中毒患者胸腺近期输出功能变化

李萡[1,2]，李扬秋[1]，杨力建[1]，陈少华[1]，刘薇薇[3]，陈嘉榆[3]

(1. 暨南大学医学院血液病研究所，广东 广州 510632；2. 第四军医大学预防医学系毒理学教研室，陕西 西安 710032；3. 广州市第十二人民医院，广东 广州 510620)

摘要：为分析职业性苯中毒工人外周血单个核细胞中T细胞受体删除DNA环（TRECs）的含量，了解苯中毒工人胸腺近期输出功能变化，采用实时荧光定量聚合酶链反应（real time PCR）和TaqMan方法检测苯中毒和健康人外周血单个核细胞中TRECs的含量。结果显示，TRECs含量苯中毒观察对象2.97±1.31、轻度苯中毒1.73±1.11、中度苯中毒2.28±1.44、重度苯中毒1.91±1.95，各组患者每1 000个外周血单个核细胞中TRECs含量均明显低于健康组7.39±6.83（$P<0.05$），轻度和重度苯中毒组TRECs含量显著低于苯中毒观察对象组（$P<0.05$）。重度苯中毒组接苯时间>3的工人TRECs含量显著低于接苯时间≤3年者，苯中毒观察对象组接苯时间>5年的工人TRECs含量显著低于≤5年者（$P<0.05$）。提示苯中毒患者胸腺近期输出功能低下。

关键词：苯；胸腺输出功能；实时荧光定量聚合酶链反应；T细胞受体删除DNA环（TRECs）

中图分类号：R135.12 文献标识码：A 文章编号：1002－221X(2007)02－0105－03

The change of recent thymic output function among patients exposed to benzene for varied periods

LI Bo[1,2], LI Yang-qiu[1], YANG Li-jian[1], CHEN Shao-hua[1], LIU Wei-wei[3], CHEN Jia-yu[3]

(1. *Institute of Hematology, Medical College, Jinan University, Guangzhou* 510632, *China*; 2. *Department of Toxicology, Faculty of Preventive Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an* 710032, *China*; 3. *Guangzhou* 12*th* *Municipal People's Hospital, Guangzhou* 510620, *China*)

Abstract: To analyze the content of T cell receptor excision DNA circles (TRECs) within peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), thereby to evaluate the recent thymic output function in patients exposed to benzene. Quantitative detection of TRECs in DNA of PBMCs was preformed by real time PCR using TaqMan technique in patients with benzene poisoning and normal individual. The result showed that the level of TRECs in dubitable benzene-poisoned 2.97±1.31, chronic mild benzene-poisoned 1.73±1.11, chronic middling benzene-poisoned 2.28±1.44 and chronic severely benzene-poisoned 1.91±1.95 decreased significantly compared with that of in normal individuals ($P<0.05$). The level of TRECs among patients for exposed to benzene more than 3 years in chronic severely benzene-poisoned was decreased significantly compared with that of among patients for exposed to benzene less than 3 years ($P<0.05$). The level of TRECs among patients for exposed to benzene more than 5 years in dubitable benzene-poisoned groups was decreased significantly compared with that of among patients for exposed to benzene less than 5 years ($P<0.05$). The results indicated that the recent thymic output function was decreased in patients with benzene poisoning. Low dose exposure to benzene might cause cellular immunity disorder.

Key words: Benzene; Thymic output function; Real time PCR; T cells receptor excision DNA circles (TRECs)

慢性苯中毒是一种常见的职业病，苯中毒可造成造血系统损伤和恶性改变，国际癌症研究中心已将苯确定为人类致癌物。研究表明，苯作用于T细胞影响细胞免疫功能[1]，本研究通过了解T细胞增殖能力的潜能，即胸腺在近期输出的初始T细胞的数量探讨接苯后机体细胞免疫功能变化。

1 对象与方法

1.1 对象

收集接苯患者外周血标本100例，健康体检者外周血标本27例，所有标本均由广州市第十二人民医院提供。依据《职业性苯中毒诊断标准》（GBZ68－2002），由广州市职业病防治中心职业病诊断小组将接苯患者诊断为苯中毒观察对象30例、轻度苯中毒23例、中度苯中毒12例和重度苯中毒35例（全血细胞减少2例、再生障碍性贫血5例、骨髓异常增生综合征1例、急性白血病2例）。苯中毒患者工作车间空气苯浓度1.72～37.8 mg/m^3。

1.2 实验方法

1.2.1 外周血单个核细胞分离和DNA提取 收集外周血标本肝素抗凝血，按常规方法分离单个核细胞核提取DNA。

1.2.2 引物设计 从TCR δ基因组序列（ACCESSION AE000661）中于δRec基因片段的下游设计一下游引物（T1）和在ΨJα的上游设计一上游引物（T2）[3]，引物的方向恰好与一般的PCR引物相反，由于在δRec和ΨJα的两个基因片段删除重组形成一环行DNA，其方向正好与原方向相反，只有当形成DNA环时，才能扩增到PCR产物，此为检测T细胞受体删除DNA环（TRECs）形成的方法。并在该扩增片段中间设一荧光素标记探针（T3）；选择RAG2基因作为细胞定量对照：

收稿日期：2006－09－06；修回日期：2006－11－30

基金项目：国家教育部科技重点项目（教技司[2001]235号01091）；广州市科委科技攻关项目（2001-Z-037-01-3）；血液病学国务院侨办重点学科基金

作者简介：李萡（1973－），女，在站博士后，讲师，研究方向：卫生毒理免疫学。

分别在RAG2基因组序列（ACCESSION M94633）中设计一对引物（R1和R2）及一荧光素标记探针（R1），见表1[2]。

表1　用于TaqMan的各引物和探针的序列及作用位置

引物和探针	序列	作用	位置
T1	5′-GCTGAACTTATTGCAACTCGTGAG	扩增TRECs的下游引物	140298～140275 bp，位于δRec基因片段下游104 bp处
T2	5′-AACAGCCTTTGGGACACACTATCG	扩增TRECs的上游引物	228986～229007 bp，位于ΨJα基因片段下游258 bp处
T3	5′-6FAM-CCACATCCCTTTCAAC CATGCTGACACCTCXT-TAMRA	TRECs的探针	229213～229242 bp
R1	5′-GCAACATGGGAAATGGAACTG	扩增RAG2的下游引物	2160～2180 bp
R2	5′-GCTGTCAAATTCATCATCACCATC	扩增RAG2的上游引物	2404～2381 bp
R3	5′-6FAM-CCCCTGGATCTTCTGTTGAT GTTTGACTGTTTGTGA-TAMRA	RAG2的探针	2286～2321 bp

1.2.3　TRECs-RAG2标准品制备　为定量检测样品中信号结合T细胞受体删除DNA环含量，需构建标准品。利用两对引物分别扩增所需的RAG2和TRECs的基因片段，并经序列分析证实其序列后，利用TOPO TA Cloning Kit将RAG2基因克隆到TOPO TA载体的T-A接受位置，然后将TRECs基因克隆到EcoR限制位置上，测序确认RAG2和TRECs两个片段转入形成重组载体，选择菌株克隆增殖，挑取阳性菌落培养、提取质粒DNA并纯化，环形质粒DNA线性化，紫外分光光度计检测核酸含量，根据检测结果，将标准品DNA浓度分别调整为10^7、10^6、10^5、10^4、10^3、10^2、10拷贝/2μl等7组。

1.2.4　实时定量PCR（real-time PCR）　每一标本分别进行2次RAG2和TRECs的检测，总反应体积50μl，其中含100 ng样本DNA或标准品，0.5 μmol/L各引物，0.2 mmol/L dNTP，1.25 U Platimum Tqa聚合酶，0.1 μmol/L的6FAM TAMRA探针和PCR缓冲液（含4.5 mmol/L $MgCl_2$）。在95℃ 5 min变性后进行45循环扩增，每一循环包括95℃ 30s和67℃ 1 min。所有的样品提取DNA后，按紫外分光光度法检测DNA纯度和含量，根据实时定量PCR中RAG2的拷贝数确定检测样品中的细胞数。首先，根据所检测样本中RAG2的拷贝数（每个细胞含2个RAG2拷贝）确定所检测样本中所含的细胞数，然后，同一样本中将所检测到的TRECs拷贝数除以RAG2拷贝数，再乘以2，则为每个细胞中所含的TRECs拷贝数。每一标本分别进行2次RAG2和TRECs的检测。一般以1 000个细胞中所含的TRECs拷贝数表示结果。计算公式：$n = 2 \times 1000 \times$［TRECs（1）＋TRECs（2）］/［RAG2（1）＋RAG2（2）］。

1.3　统计学方法

采用SPSS11.0统计软件进行相关统计分析。

2　结果

分别检测健康人和苯观察对象、苯中毒等5组受检者每1 000个外周血单个核细胞中TRECs含量，结果见表2。检测中发现苯中毒患者间TRECs含量差异较大，但苯中毒各组TRECs含量与健康组相比，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。轻度和重度苯中毒组TRECs含量显著低于苯中毒观察对象组（$P<0.05$）。

根据检测标本年龄分布特征，将健康组和不同程度苯中毒组以30岁为界分2组比较TRECs含量：健康人≤30岁组TRECs为9.17±7.64，＞30岁组为4.21±5.78，除中度苯中毒＞30岁组外，苯中毒各组患者TRECs水平均显著低于同年龄的健康者（$P<0.05$）；随中毒程度加重，TRECs含量大体呈下降趋势，按年龄分组比较发现健康组和重度苯中毒组内TRECs含量差异有统计学意义（$P<0.05$）。按性别分组比较TRECs含量各组内不同性别间差异无统计学意义。苯中毒各组患者TRECs水平均显著低于同性别组健康人（$P<0.05$）。

以接苯时间2年为界，苯中毒各组内不同接苯时间TRECs含量差异无统计学意义；接苯时间≤2年苯中毒各组间TRECs含量差异亦无统计学意义；接苯时间＞2年轻度和重度苯中毒组TRECs含量显著低于观察对象组（$P<0.05$）。以接苯时间3年为界，重度苯中毒患者接苯时间＞3年组TRECs含量显著低于≤3年组，其余中毒各组内不同接苯时间TRECs含量无统计学意义。以接苯时间5年为界，苯观察对象组接苯时间＞5年组TRECs含量显著低于≤5年组（$P<0.05$），但是在中度苯中毒组接苯时间＞5年组TRECs含量显著高于≤5年组（$P<0.05$），其余中毒各组内不同接苯时间TRECs含量无统计学意义；接苯时间≤5年苯中毒各组TRECs含量均显著低于观察对象组（$P<0.05$）；接苯时间＞5年的观察对象、轻度和重度苯中毒组TRECs含量显著低于中度苯中毒组（$P<0.05$）。

表2　健康组和苯中毒各组TRECs含量（$\bar{x} \pm sd$）

组别	例数	TRECs/1000 PBMC
健康组	27	7.39±6.83
苯中毒观察对象组	30	2.97±1.31 *
轻度苯中毒	23	1.73±1.11 *△
中度苯中毒	12	2.28±1.44 *
重度苯中毒	35	1.91±1.95 *△

与健康组比，* $P<0.05$；与苯中毒观察对象组比，△ $P<0.05$

3　讨论

苯中毒导致造血系统损伤和恶性改变的主要机制可能是损伤细胞染色体DNA，诱导基因突变[2,3]；抑制淋巴细胞增殖，损伤机体的免疫功能，使监测和清除异常或癌变细胞的能力减弱。但在苯致血液恶性病的患者中，肿瘤相关基因突变的发现率并不高。苯进入机体可产生多种生物学效应，其中包括作用于机体的免疫系统，影响T细胞功能[4]。T细胞是机体最重要的免疫细胞，执行细胞免疫功能。T细胞受损后机体清除异常细胞能力下降，最终会导致肿瘤的发生。由此推测是否接苯后T细胞功能受损与苯中毒造成的血液恶性病变有一定关系。

随着对T细胞亚群、亚家族认识的深入，仅凭以往的检测指标（T细胞增殖、CD_4^+/CD_8^+比值等）不能很好的反映苯

对T细胞功能的影响程度。近期的研究表明，通过胸腺在近期输出的初始（naive）T细胞的数量来表示胸腺的增殖能力，它代表了T细胞增殖能力的潜能，能真正明确机体T细胞的增殖能力。1998年Douek等提出了利用定量检测TRECs来推算naive细胞的输出数量[5]。

本研究率先将目前国际上分析T细胞免疫功能和潜力的指标TRECs应用于对苯中毒患者细胞免疫功能的分析中。通过对苯中毒患者和健康人外周血单个核细胞中TRECs的定量检测，提供了苯中毒患者外周血单个核细胞中TRECs含量基本资料。结果显示，从苯中毒观察对象到重度苯中毒患者，TRECs含量明显低于正常水平。由于TRECs代表的是naive T细胞水平，提示在苯中毒患者中胸腺输出功能已经发生改变，TRECs的降低表明T细胞增殖能力将会随之降低。

研究对TRECs分析结果显示，随年龄增加，胸腺输出功能逐渐降低[6]。本研究中健康组≤30岁年龄段TRECs水平显著高于>30岁者，表明随着年龄的增加，胸腺输出功能逐渐降低。苯中毒各组≤30岁者TRECs水平高于>30岁组（除中度苯中毒），表明在大多数苯中毒患者中胸腺输出功能仍符合随年龄递减的规律。苯中毒各组TRECs水平显著低于健康组同一年龄段，说明在排除年龄因素的影响后苯中毒患者TRECs水平仍较健康人低。由于中度苯中毒>30岁年龄段仅3例，单从3例进行分析欠妥，尚需积累更多的样本资料。

本研究结果表明苯中毒各组男性和女性TRECs水平显著低于健康组同性别者，但苯中毒各组内性别之间差异无统计学意义。

对TRECs含量和工龄作相关性分析，发现两者相关系数为−0.41，$P=0.69$，尚不能认为两者之间的相关性有统计学意义。因此从目前结果还不能说明接苯时间与TRECs含量之间存在明显量效关系。但在以3年为界的重度苯中毒组，以5年为界的苯中毒观察对象组中接苯工人TRECs含量均有明显差异。中度苯中毒组2、3、5年接触时间TRECs含量出现上升的情况可能与中度苯中毒组中1例33岁、工龄8年患者的TRECs水平为5.75/1000 PBMCs的影响有关。该患者TRECs含量甚至高于健康组>30岁年龄段TRECs水平，其原因考虑可能与几个方面有关。首先患者的胸腺输出功能属于没有受到损伤的个别情况；其次，患者原胸腺输出功能基础水平较高，这在个别正常人中也可以发现类似情况。这也提示我们要真正掌握接苯后TRECs水平变化及其影响因素仍需积累更多的样本进行分析。

参考文献：

[1] 许东，陈小玉，李时恩，等．苯对作业工人免疫功能的影响[J]．河南医科大学学报，1994，29(3)：211-214.

[2] Stillman W S，Varella Garcia M，Irons R D．The benzene metabolite，droquinone，selectively induces 5q31-and-7 in human $CD_{34}^{+}CD_{19}^{-}$ bone marrow cells [J]．Exp Hematol，2000，28：169-176.

[3] Larson R A，Wang Y，Banerjee M，et al．Prevalence of the inactivating 609C－＞T polymorphism in the NAD(P)H：quinine oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia [J]．Blood，1999，94(2)：803-807.

[4] Lewis J G，Odom B，Adams D O．Toxic effects of benzene and benzene metabolites on mononuclear phagocytes [J]．Toxicol Appl Pharmacol，1988，92：246.

[5] Douek D C，McFarland R D，Keiser P H，et al．Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection [J]．Nature，1998，396(6712)：690-694.

[6] Hazenberg M D，Otto S A，Cohen Stuart J W，et al．Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection [J]．Nat Med，2000，6(9)：1036-1042.

口服米索前列醇不良反应32例分析

·短篇报道·

林萍，王剑峰，刘玉梅

（沈阳市第九人民医院，辽宁 沈阳 110024）

随着米索前列醇在妇产科领域的广泛应用，其不良反应的报道逐渐增多，现将我院收治观察的32例米索前列醇不良反应的临床资料分析如下。

1 临床资料

病例资料来源于我院计划生育门诊1997年8月～2006年10月自愿行药物流产的早期妊娠患者，年龄20～40岁，妊娠时间<49 d，无口服米索前列醇禁忌证。于第1、第2天晨起口服米非司酮(北京制药三厂生产)50mg、睡前口服25mg，第3天上午8时服米索前列醇600μg，服药前后2 h进食。分别于服用米索前列醇当日及第7、15、70天随诊，观察其不良反应。

2 不良反应

出现严重下腹疼痛12例，主要表现为自服用米索前列醇24h内剧烈下腹疼痛；人工流产综合征5例，表现为腹痛、恶心、呕吐、面色苍白、出冷汗、血压下降、心率缓慢，子宫内绒毛组织大片残留；卵巢囊性肿大4例，表现为服药前双侧卵巢正常，妊娠囊排出后7 d、15 d复查时B超提示卵巢囊性肿大，并于70 d内自然消失；过敏反应9例，其中过敏性休克1例；高热2例（于服用米索前列醇30min内）。

3 小结

米索前列醇为人工合成的前列腺素制剂，其药理作用为抗孕激素，致依赖黄体发育的胚胎死亡，诱发宫缩，促进宫颈成熟及胚胎排出。常见的不良反应为头晕、潮红、恶心、呕吐、阴道出血及过敏反应，亦有米索前列醇致畸的报道，可能其损伤第6、7颅神经核，造成新生儿肢体或运动障碍、面瘫等，也可导致新生儿颅骨和皮肤缺损。

米索前列醇的不良反应一般较轻，大多数不需特殊处理，但须注意警惕比较严重的不良反应，如过敏性休克、人工流产综合征等。因此米索前列醇必须在具备开展急诊刮宫术，输血、输液的医疗卫生单位使用，以便及时处理严重的不良反应。

收稿日期：2006－09－27