

# 苯中毒再生障碍性贫血患者骨髓细胞免疫功能及 Fas、CD34 抗原变化

张丽, 罗文达, 郭群依, 任昌明

(台州医院血液科, 浙江 台州 317000)

**摘要:** 目的 探讨细胞免疫功能、Fas 和 CD34 抗原与苯中毒再生障碍性贫血发生、发展及转归的关系。方法 用流式细胞仪检测 24 例苯中毒再障 (BPAA) 和 16 例无苯制剂接触史的再障 (AA) 患者治疗前后骨髓单个核细胞 Fas、CD34 的表达率和 T 细胞亚群变化。结果 苯中毒再生障碍性贫血和再障患者骨髓单个核细胞 Fas 表达率显著增高 ( $P < 0.001$ ), CD34 阳性率明显降低 ( $P < 0.001$ );  $CD3^+CD8^+$  T 淋巴细胞明显升高 ( $P < 0.05$ ),  $CD4^+/CD8^+$  比值明显降低 ( $P < 0.001$ ); 治疗缓解后 Fas、CD34 阳性率、 $CD3^+CD8^+$  T 淋巴细胞和  $CD4^+/CD8^+$  比值趋于正常 ( $P > 0.05$ )。但在 AA 组 Fas、CD34 阳性率和  $CD4^+/CD8^+$  比值较正常对照组差异仍有显著性。两组再障患者之间比较差异无显著性。结论 细胞免疫功能紊乱、Fas 抗原的异常表达和  $CD34^+$  干/祖细胞损伤, 可能与苯中毒再生障碍性贫血病理发病机制有关, 用环孢霉素 A 治疗可能有效。

**关键词:** 再生障碍性贫血; 苯中毒; 细胞免疫; Fas 抗原; CD34 抗原

中图分类号: R135.12 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)02-0082-03

## Alteration of Fas and CD34 antigen expression and cellular immune function in patients with aplastic anemia caused by benzene poisoning

ZHANG Li, LUO Wen-da, GUO Qun-yi, REN Chang-ming

(Department of Hematology, Taizhou Hospital, Taizhou 317000, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the relationship of the expression of Fas and CD34 antigen and cellular immune function with occurrence, progress, prognosis, outcome and pathological mechanism of benzene poisoning aplastic anemia (BPAA). **Method** The expression rates of Fas and CD34 antigen in marrow mononuclear cells (MNC) and changes in T-lymphocyte subsets were determined by flow cytometry in 24 patients with BPAA and 16 with AA unexposed to benzene before and after therapy, as well as in 15 healthy controls. **Result** The expression rate of Fas antigen was significantly higher in patients with BPAA and AA than that in controls ( $P < 0.05$ ), whereas that of CD34 antigen was significantly lower ( $P < 0.001$ ). Counts of  $CD3^+$  and  $CD8^+$  T-cells increased significantly in patients with BPAA and AA ( $P < 0.05$ ), with a significantly decreasing ratio of  $CD4^+/CD8^+$  ( $P < 0.001$ ), compared with those in healthy controls. After remission with therapy, the expression rates of Fas and CD34 antigen, counts of  $CD3^+$  and  $CD8^+$  and ratio of  $CD4^+/CD8^+$  were restored to normal in patients with BPAA ( $P > 0.05$ ), whereas the expression rates of Fas and CD34 antigen and ratio of  $CD4^+/CD8^+$  in patients with AA still differed significantly from healthy controls. There was no significant difference in those indicators between patients with BPAA and with AA. **Conclusion** Disturbance of cellular immune function, abnormal expression of Fas antigen and damage in  $CD34^+$  stem/progenitor cells presumably related to pathological mechanism of BPAA. Cyclosporine A may be effective in therapy of BPAA.

**Key words:** Aplastic anemia; Benzene poisoning; Cellular immune; Fas antigen; CD34 antigen

近年来, 苯中毒引起的再生障碍性贫血 (benzene poisoning aplastic anemia, BPAA) 似有增多趋势, 但对其具体的发病机制尚不明确, 国内各单位报道的治疗方法及疗效也各不相同。本文对 24 例 BPAA 患者和 16 例无苯制剂接触史的再障 (AA) 患者进行了 Fas 抗原、CD34 抗原和 T 细胞亚群测定及临床观察, 以

探讨其变化在 BPAA 的发生、发展中的作用及其临床意义, 进一步考证环孢霉素 A 治疗 BPAA 的可行性。

### 1 对象与方法

#### 1.1 病例

所有患者系 2001 年 6 月~2003 年 9 月我院住院及门诊病人。24 例 BPAA 患者均为私营鞋厂工人, 有 3 个月~8 年不等的含苯胶水接触史, 经我市职业病诊断组根据 GB3230-1997《职业性苯中毒的诊断标准》确诊为重度苯中毒 (再生障碍性贫血), 其中男

收稿日期: 2004-04-08; 修回日期: 2004-07-08

作者简介: 张丽 (1972-), 女, 主治医师, 硕士, 主要从事血液病和肿瘤的临床研究。

性 11 例, 女性 13 例, 平均年龄 (34±8) 岁 (26~48 岁), 急性再障 5 例, 慢性再障 19 例。同期的 16 例 AA 患者中, 无苯制剂接触史, 男性 6 例, 女性 10 例, 平均年龄 (29±9) 岁 (17~61 岁), 急性再障 4 例, 慢性再障 12 例。另取同一时期年龄和性别相仿的 15 例正常人作对照, 其中男性 8 例, 女性 7 例。诊断及疗效标准参照《血液病诊断及疗效标准》<sup>[1]</sup>。

### 1.2 治疗方法

BPAA 组治疗: (1) 新赛斯平 (环孢霉素 A) 胶囊 3~5 mg/(kg·d), p.o.; (2) 十一酸睾丸素 0.5 g 肌内注射, 半个月 1 次; (3) 左旋咪唑片 50 mg, tid, 服 3 d 停 4 d, p.o.; (4) 强力宁 100 ml 静脉滴注, 每日 1 次, 早期应用; (5) 支持治疗。AA 组治疗方法同 BPAA 组治疗 (1)、(2)、(3)、(5)。

### 1.3 标本处理

取肝素抗凝骨髓标本 5 ml, 用淋巴细胞分离液 (Ficoll-Hypaque) 分离单个核细胞 (MNC), PBS 缓冲液漂洗, 计数, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^6$ /ml, 供流式细胞仪进行分析。

### 1.4 试剂和仪器

FITC-CD4、CD8、CD95 (抗 Fas 单抗)、CD34 及 PE-CD3, FITC-IG1、PE-IG 购自美国 BD 公司, 流式细胞仪 (美国 BD 公司 FACS Calibur<sup>TM</sup>)。

### 1.5 检测方法

采用直接免疫荧光法。每管加入 MNC 悬液 200  $\mu$ l, 加入 FITC-CD4、CD8、PE-CD3、CD95、CD34 及同型阴性对照单克隆抗体各 20  $\mu$ l, 室温下避光反应 20 min, PBS 缓冲液冲洗 2 次, 除去未结合的荧光抗体, 1% 多聚甲醛固定, 上机分析。流式细胞仪检测: 上机前先以标准荧光微球调整仪器, 使变异系数稳定在 2%, 上机后收集 2 万个细胞, 荧光强度对数放大, 光散数据存软盘, 测试结束后应用 CellQuest 软件分析数据。

表 2 BPAA 患者和对照组细胞免疫功能的比较 ( $\bar{x} \pm s$ ) %

组别	时间	n	CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
BPAA 组	治疗前	24	68.65±8.82	32.71±4.10	41.62±4.76 $\Delta$	0.74±0.21 $\Delta\Delta$
	治疗缓解后	16	60.23±10.01	36.50±4.25	29.86±2.60	1.36±0.18
AA 组	治疗前	16	63.54±9.63	34.28±6.84	39.46±4.31 $\Delta$	0.98±0.26 $\Delta\Delta$
	治疗缓解后	7	62.72±8.33	36.41±5.76	30.87±3.62	1.24±0.23 $\Delta$
正常对照组		15	62.12±8.65	39.98±5.46	27.43±3.49	1.48±0.26

与对照组相比较  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.001$

### 2.3 疗效与转归

24 例 BPAA 患者中, 除 1 例死于严重的感染外, 16 例缓解, 7 例明显改善, 有效率为 95.8%; 随访至今, 1 例入院前应用地塞米松治疗者出院后发生股骨

CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞分别定义为 CD4<sup>+</sup>T 辅助淋巴细胞(Th)和 CD8<sup>+</sup>T 抑制淋巴细胞(Ts)。

### 1.6 统计学分析

数据以均数±标准差表示, 采用计量资料两样本比较 *t* 检验及相关分析。

## 2 结果

### 2.1 BPAA 患者治疗前后 MNC Fas、CD34 抗原的阳性表达

如表 1 所示, BPAA 和 AA 患者治疗前 Fas 阳性表达率显著高于对照组 ( $P < 0.001$ ), 而 CD34 阳性表达率明显低于对照组 ( $P < 0.001$ ), BPAA 和 AA 之间比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。治疗缓解后, AA 组患者 Fas 表达有所下降, CD34 阳性率较前恢复, 但与正常对照组相比较, 差异仍有显著性 ( $P < 0.05$ ); BPAA 组患者 Fas、CD34 阳性率明显恢复, 与对照组相比较, 差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。两组 Fas 表达与 CD34 阳性率呈负相关。

表 1 BPAA 患者和对照组 MNC Fas、CD34 的阳性率比较 ( $\bar{x} \pm s$ ) %

组别	时间	n	Fas	CD34
BPAA 组	治疗前	24	68.08±14.62 $\Delta\Delta$	0.52±0.23 $\Delta\Delta$
	治疗缓解后	16	39.25±10.74	1.24±0.56
AA 组	治疗前	16	62.25±5.41 $\Delta\Delta$	0.59±0.18 $\Delta\Delta$
	治疗缓解后	7	47.32±4.76 $\Delta$	1.02±0.38 $\Delta$
正常对照组		15	36.36±11.69	1.46±0.48

与对照组相比较  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.001$

### 2.2 BPAA 患者 MNC 免疫功能的检测

如表 2 所示, 与对照组相比较, BPAA 和 AA 患者 CD3<sup>+</sup>值几乎无变化; CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>(Th)轻度降低, 但无统计学意义; CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>(Ts)明显升高 ( $P < 0.05$ ), CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>(Th/Ts)比值明显降低, 差异有显著性 ( $P < 0.001$ ); 治疗缓解后 BPAA 组 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值基本恢复正常 ( $P > 0.05$ ), 但 AA 组 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>与正常对照组比较, 差异仍有显著性 ( $P < 0.05$ )。

头无菌性坏死, 其余患者生活良好。16 例 AA 患者中, 1 例急性再障死于严重感染, 1 例急性再障死于颅内出血, 2 例转为慢性再障; 随访中 7 例缓解, 4 例明显改善, 3 例无效, 有效率 68.8%。

### 3 讨论

体外研究发现,原发性AA和获得性AA患者活化的T细胞能分泌INF- $\gamma$ 、IL-2和TNF- $\alpha$ 等造血负调节因子,它们能诱导CD34<sup>+</sup>细胞Fas抗原的表达,可通过Fas抗原介导的CD34<sup>+</sup>干细胞的凋亡机制来抑制造血,并发现在此类患者体内存在自体CD34<sup>+</sup>反应性、自身主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)限制性T细胞克隆。这些研究结果均提示Fas介导的凋亡途径以及免疫介导的造血破坏在其发病中起重要作用<sup>[2,3]</sup>。BPAA也是一种获得性AA,但对其具体的发病机制目前尚未完全明确,对于免疫抑制剂(如环孢霉素A)治疗BPAA目前存在截然不同的争议<sup>[4,5]</sup>。

我们在临床和研究中发现,BPAA和AA患者骨髓单个核细胞的Fas表达增高,CD34阳性表达率明显下降,随着治疗后病情的缓解,AA组患者较治疗前有所恢复,但与正常对照组相比差异仍有显著性,而BPAA组患者Fas、CD34的表达率基本恢复正常,但在两组患者之间差异无显著性。两组患者的Fas表达与CD34阳性率呈负性相关。本次结果表明Fas/FasL介导的CD34<sup>+</sup>干/祖细胞凋亡可能同样参与了BPAA的发病过程,但与AA不同,这种干/祖细胞损伤在BPAA患者中可能持续时间短暂,当得到及时、有效的治疗后,能较快的恢复。

Ts和Th/Ts比值可作为免疫调控的重要指标,Th和Ts亚群间的细微平衡是维持免疫内环境稳定的一个中心环节,这种免疫平衡的紊乱在再障的发病中起着重要的作用<sup>[3]</sup>。我们研究发现,与AA患者一样,

BPAA患者也存在CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞(Ts)显著升高,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>(Th/Ts)比值明显降低,治疗缓解后基本恢复正常,而且CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值接近正常的患者恢复较快。这说明BPAA患者同样存在Th和Ts平衡失调,由此可以推测免疫平衡紊乱在不同程度上参与了BPAA的病理发病过程。

环孢霉素A是一种免疫抑制剂,可抑制T细胞生成白细胞介素-2(IL-2),防止IL-2激活细胞毒性T细胞;并可阻断细胞内钙离子浓度的增加所引起的信号传递,干扰Fas/FasL凋亡途径的调控,对多数AA治疗有效。我们对所有BPAA患者均应用以新赛斯平为主的治疗,绝大部分患者病情得到不同程度的改善,较原发性AA预后为好,并未发现由此引起病情恶化。我们认为环孢霉素A同样适于BPAA患者的治疗,这与国内报道不全相符<sup>[4,5]</sup>,可能与本组样本数小有关,尚需建立区域性BPAA协作组,扩大样本量,随机化分组对照研究,以进一步临床证实。

#### 参考文献:

- [1] 张之南. 血液病诊断与疗效标准[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1998. 33-35.
- [2] 李黎, 林茂芳, 张洁. 再生障碍性贫血患者细胞免疫功能的观察[J]. 浙江医学, 1999, 21(6): 340-341.
- [3] 祁明芳. 获得性再生障碍性贫血的免疫发病机制研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 1998, 6(4): 249-252.
- [4] 陈彪生, 华明, 王秀芹, 等. 苯中毒致再生障碍性贫血13例分析[J]. 中国职业医学, 2002, 29(6): 34-35.
- [5] 李丽敏, 张健梅. 丙种球蛋白、粒细胞集落刺激因子、促红细胞生成素、地塞米松、雄激素联合治疗苯中毒临床研究[J]. 黑龙江医学, 2003, 27(4): 251-253.

(上接第81页)高呈明显因果关系。

从事电脑操作是一项静力作业,长时间地保持同一姿势并进行大量重复性操作,这种强迫紧张的体位一方面可造成精神紧张,另一方面会造成慢性肌肉骨骼的损伤<sup>[3]</sup>。本组被访者中发现常需要派发文件物品穿插行走的职员颈肩痛和腰背不适发生较少,提示除了有针对性地纠正不良工作姿势外,消除过度紧张操作是预防工作的一个重要方面,如采用反方向动作活动,提倡工间操等是行之有效的办法,有条件的设计符合人类工效学原则的办公室作业场所、用具及正确的作业方式,相信对预防与工作(电脑操作)相关疾患——反复性紧张性肌肉损伤有重要作用。

#### 参考文献:

- [1] 王蓂兰, 刚葆琪. 现代劳动卫生学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 32-37.

社, 1994. 32-37.

- [2] 香港职业安全健康局. 办公室工作环境和电脑操作员之职业健康[Z]. 1997. 6-7.
- [3] Okenburg, M. Musculoskeletal injuries occurring in word processing operators [A]. Adams and Stevenson (Eds). Ergonomics and Technological Change: Proceedings of the 21<sup>st</sup> Annual Conference of the Ergonomics Society Australia and New Zealand [C]. Sydney, Nov. 28-30, Victoria, Australia; Ergonomics Society of Australia and New Zealand, 1984. 137-143.
- [4] Bernard B, Sauter S L, Fine L J, et al. Psychosocial and work organization risk factors for cumulative trauma disorders in the hands and wrists of newspaper employees [J]. Scandinavian Journal of work Environment and Health, 1992, 18(2): 119-120.
- [5] 任道风. 特定职业和人群的职业医学[A]. 王莹, 顾祖维, 张胜年. 现代职业医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 605-608.