

钒作业工人的氧化应激水平研究*

魏腾达¹, 李顺品², 刘云兴², 谭春萍³, 李娟², 张祖辉⁴, 兰亚佳¹, 张勤^{1△}

1. 四川大学华西公共卫生学院 环境卫生与职业医学系(成都 610041);

2. 攀枝花市第二人民医院 职业病科(攀枝花 617068); 3. 攀枝花市第二人民医院 检验科(攀枝花 617068);

4. 四川大学华西基础医学与法医学院 生物化学与分子生物学教研室(成都 610041)

【摘要】 目的 评价钒暴露作业工人外周血氧化应激水平,为研究钒对神经系统的影响机制提供人群资料。**方法** 采用整群抽样的方法纳入 86 例接钒工人,65 例对照工人。自制问卷收集人口学基本信息及职业暴露资料,试剂盒法检测目标人群外周血清样本中的氧化应激水平[超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),诱导型一氧化氮合酶(iNOS)]。比较接钒工人和对照工人血清氧化应激水平的差异。**结果** 接钒工人血清中 MDA 含量高于对照工人($P<0.05$),总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性低于对照工人($P<0.05$),其中锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)活性降低明显($P<0.05$),而铜锌超氧化物歧化酶(CuZn-SOD)活性无明显变化($P>0.05$)。接钒工人和未接钒工人血清中的 iNOS 活性比较接近,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 钒暴露可能会影响作业工人的脂质过氧化,显著降低机体的抗氧化水平。目前尚不能确定钒与活性氮损伤之间的关系。

【关键词】 钒及其化合物 氧化应激

Oxidative Stress Level of Vanadium-exposed Workers WEI Teng-da¹, LI Shun-pin², LIU Yun-xing², TAN Chun-ping³, LI Juan², ZHANG Zu-hui⁴, LAN Ya-jia¹, ZHANG Qin^{1△}. 1. Department of Environment Health and Occupational Medicine, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Occupational Medicine, the Second People's Hospital of Panzhihua, Panzhihua 617068, China; 3. Department of Laboratory Medicine, the Second People's Hospital of Panzhihua, Panzhihua 617068, China; 4. Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: zhang_q@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To determine the oxidative stress level in peripheral blood of vanadium-exposed workers, as an indication of population health effect of vanadium on human neurobehavioral system. **Methods** 86 vanadium-exposed workers and 65 non-exposed workers were recruited by cluster sampling. A questionnaire was administered to collect demographic and occupational exposure information. Serum activity of superoxide dismutase (SOD), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and malonaldehyde (MDA) contents were detected by kit assay. The differences in oxidative stress level between vanadium-exposed and non-exposed workers were compared. **Results** Vanadium-exposed workers had higher levels of MDA contents than the controls. The total superoxide dismutase(T-SOD)activity in vanadium-exposed workers was significantly lower than that in the controls, which was associated with lowered levels of manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) activity. No changes in serum levels of cupro-zinc superoxide dismutase (CuZn-SOD) was found in vanadium-exposed workers. No difference in iNOS activity was found between vanadium-exposed workers and controls. **Conclusion** Vanadium exposure increases free radical production in serum and reduces antioxidant capacity. But the relationship between vanadium exposure and iNOS damage remains uncertain.

【Key words】 Vanadium compound Oxidative stress

钒工业的快速发展和能源材料的大量消耗,使钒污染的水平日益增加,对钒作业工人及普通人群

均构成健康威胁^[1]。神经系统对毒物所致的损伤十分敏感,当人群暴露于一定剂量的有害物质后,在机体尚未出现明显的症状体征和生化指标改变前,就可监测到神经行为功能的损害。所以加强对钒作业工人神经行为损害及其机制的研究有利于更早更好的保护钒作业工人健康。

* 攀枝花市主要职业病防治相关技术服务及分子遗传标志物检测分析项目(No. 11H1219)资助

△ 通讯作者, E-mail: zhang_q@scu.edu.cn

Olopade 等^[2]的研究表明,腹腔注射钒五价化合物的成年鼠部分脑区域出现特殊髓鞘染色和脂质过氧化,提示成年鼠的神经系统髓鞘为钒五价化合物导致脂质过氧化的选择性靶位点。Avila-Costa 等^[3]发现,染钒小鼠与对照组相比海马和小脑处铜锌超氧化物歧化酶(CuZn-SOD)、还原型谷胱甘肽与氧化型谷胱甘肽的比值(GSH/GSSG)明显下降,提示钒可能导致小脑和海马的氧化损伤。Beatriz^[4]和 Sandra 等^[5]的研究发现,钒对神经系统的影响可能与神经组织细胞的氧化损伤有关。上述研究均表明钒可造成神经系统损伤,但相关人群资料匮乏。因此,本次研究旨在通过评价钒暴露作业工人的氧化应激水平,为钒及其化合物对神经系统的影响及其致病机制提供人群资料。

1 对象和方法

1.1 研究对象

采用整群抽样的方法抽取某钒制品厂工人和某化工厂工人作为研究对象,本研究共纳入 128 例接钒工人,128 例对照工人。纳入标准:接钒组为从事钒制品生产(包括原料、焙烧、浸出、成品、沉淀、废水)的作业工人,工龄半年以上,民族为汉族。对照组为无接钒职业史,从事与接钒组劳动强度类似,环境噪声相当的作业工人,工龄半年以上,民族为汉族。排除标准:两组均排除患有神经系统相关疾病、精神疾病、色盲、色弱等对神经行为功能测试有影响的疾病。所有问卷调查信息及生物样本采集均符合伦理学要求,获得受试者知情同意。

1.2 问卷调查

根据研究目的,在当地工会的配合下,采用自行设计的作业工人基本情况和生活习惯调查表,按照相同的方法及标准,由经过统一培训的调查员进行面对面问卷调查。调查内容包括年龄、性别、民族、婚姻、文化程度、总工龄、主要接害因素、职业和岗位的变动情况、吸烟、饮酒情况等。

1.3 血样采集及氧化应激指标检测

通过常规健康体检收集研究人群的血样,先以 1 000 r/min 离心 10 min,取血清 1 mL,−20 ℃ 保存。按照试剂说明书检测血清中丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、CuZn-SOD、锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)水平,试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。MDA 采用 TBA 法,T-SOD 采用羟胺法,CuZn-SOD、Mn-SOD 和 iNOS 采用比色法。吸光度检测采用 721 可

见分光光度仪(上海天呈科技有限公司)。每个样本均设 3 个平行样。

1.4 统计学方法

根据资料性质,组间一般情况的分布差异采用卡方检验,组间指标的均数比较采用方差分析,进一步调整协变量后采用协方差分析。 $\alpha_{\text{双侧}}=0.05$ 。

2 结果

2.1 调查对象的基本情况

实际研究对象共计 151 例(部分研究对象由于血清样品运输过程中丢失或保存操作不慎而未纳入),其中接钒组 86 例,对照组 65 例。调查结果显示接钒组平均年龄(39.3 ± 6.9)岁,对照组(37.4 ± 8.0)岁,差异无统计学意义($P>0.05$)。接钒组的平均工龄为(13.9 ± 9.6)年,对照组为(15.9 ± 7.7)年,差异无统计学意义($P>0.05$)。性别、文化程度、吸烟情况的组间分布差异亦无统计学意义($P>0.05$)。但接钒组饮酒比例高于对照组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 血清检测中调查对象一般情况[例数(%)]
Table 1 Characteristics of participants [case (%)]

	Exposed (n=86)	Control (n=65)	χ^2	P
Gender			1.893	0.169
Female	34 (39.5)	33 (50.8)		
Male	52 (60.5)	32 (49.2)		
Level of education *			3.274	0.195
Primary	15 (17.4)	5 (7.7)		
Intermediate	59 (68.6)	48 (73.8)		
Advanced	12 (14.0)	12 (18.5)		
Smoking			0.078	0.780
No smoking	48 (60.8)	38 (58.5)		
Smoking	31 (39.2)	27 (41.5)		
Drinking			4.241	0.039
No drinking	29 (36.7)	35 (53.8)		
Drinking	50 (63.3)	30 (46.2)		

* Primary: Illiterate, primary school; Intermediate: Junior high school, high school; Advanced: College graduate or above

2.2 血清氧化应激水平检测

接钒组血清中 MDA 浓度高于对照组($P<0.05$);T-SOD 活性低于对照组($P<0.05$),其中 Mn-SOD 活性低于对照组($P<0.05$),CuZn-SOD 活性的组间差异无统计学意义($P>0.05$)。两组血清中 iNOS 活性差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

调整年龄、性别、文化程度、吸烟、饮酒及接钒工龄等因素,对 MDA、T-SOD、CuZn-SOD、Mn-SOD、iNOS 分别进行协方差分析发现:接钒组工人血清中 MDA 浓度高于对照组($F=35.265,P=0.000$),

T-SOD 活性较对照组低($F=6.835, P=0.010$);两组的 CuZn-SOD 活性较接近($F=2.554, P=0.112$),但接钒组 Mn-SOD 活性较对照组低($F=16.713, P=0.000$)。两组的 iNOS 活性较接近($F=0.030, P=0.863$)。

表 2 调查对象的氧化损伤结果 ($\bar{x}\pm s$)

	Exposed (<i>n</i> =86)	Control (<i>n</i> =65)	<i>F</i>	<i>P</i>
MDA (nmol/mL)	9.34±4.58	5.75±3.40	28.27	0.000
T-SOD (U/mL)	71.46±16.27	79.01±19.60	7.01	0.009
CuZn-SOD (U/mL)	32.94±16.39	29.75±15.73	1.52	0.220
Mn-SOD (U/mL)	38.52±17.03	49.26±17.71	14.87	0.000
iNOS (U/mL)	19.93±3.67	19.60±3.95	0.29	0.593

3 讨论

作为过渡金属,五价钒可通过氧化还原反应变为四价钒,这一过程涉及到细胞内谷胱甘肽等还原物质的消耗以及活性氧(ROS)的产生^[6,7]。多个动物模型研究^[8-10]已提示,钒暴露可影响 ROS 相关的氧化损伤指标,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽巯基转移酶(GST)的活性以及 MDA 的含量等,但目前仍缺乏人群流行病学证据。本研究以钒暴露职业人群作为调查对象,检测外周血氧化损伤相关指标发现:与对照组相比,钒暴露人群 MDA 含量及 SOD 活性均发生改变。

MDA 是自由基攻击多不饱和脂肪酸的产物,属于脂氢过氧化物,MDA 的升高标志脂质过氧化损伤的存在。孙素玲等^[11,12]研究发现,Wistar 大鼠经口给药,随着偏钒酸铵浓度增加,大鼠肝线粒体及血清中 MDA 含量均增加。Sasi 等^[13]研究发现,随着钒酸钠浓度的增加,大鼠大脑神经组织脂质过氧化水平可显著增加,并激发过氧化反应同时伴随脂肪酸的减少。尽管在哺乳期幼鼠大脑海马组织中 MDA 水平未见显著增加,但在海马区域可见与氧化应激有关的热休克蛋白 HSP70 活性增加^[14]。本次研究发现接钒工人血清 MDA 含量明显高于对照组水平,几乎是对照组的两倍,结果提示钒暴露可能会影响机体脂质过氧化水平。

SOD 是一种重要的自由基清除酶,可直接清除超氧自由基,防止氧化应激引起的神经细胞损伤^[15]。人体中 SOD 主要为 CuZn-SOD 和 Mn-SOD。其中 Mn-SOD 被认为是诱导型的,是线粒体中 ROS 的主要清道夫,而线粒体是细胞 ROS 产生的主要部位,因此 Mn-SOD 在体内外抗氧化损伤中具有重要意义,其表达水平对细胞氧化还原状态至

关重要^[16]。本次研究关注 T-SOD、CuZn-SOD 和 Mn-SOD,发现接钒组血清中的 T-SOD 活性明显低于对照组,并且这种活性下降主要体现在 Mn-SOD 活性的下降上,与 CuZn-SOD 的改变关系不大。Fischer Gunther 等^[17]利用钒酸钠单独染毒 Ehrlich 腹水癌小鼠,SOD 活性未见改变,但在抗坏血酸共同作用下,SOD 活性增加 2~3 倍。而孙素玲等^[11,12]研究发现,Wistar 大鼠经口给药,随着偏钒酸铵浓度增加,大鼠肝线粒体及血清中 SOD 活性均下降。易浪波等^[18]也发现,钒酸钠静态换水暴露法染毒日本青鳉,较低浓度钒酸钠可使其肝脏 SOD 活力升高,而高浓度可使其活力降低。上述结果提示 SOD 活性改变与钒的浓度有关,同时结合 Cuesta 等和 Aschner 等^[19,20]的研究发现通过免疫组化染色染钒大鼠脑组织中 CuZn-SOD 改变不明显的实验结果,可以推测针对性的影响 Mn-SOD 的活性可能是钒影响机体的抗氧化水平的一个重要方面。

一直以来有部分学者认为活性氮(RNS)也可能在钒所致的脂质过氧化中起作用,如 Chen 等^[7]就曾在脑组织中发现钒可通过激活核转录因子- κ B(NF- κ B)来诱导 iNOS 的生成,致使产生过多的 NO。虽然生理情况下,NO 是重要的突触介质,与突触可塑性、谷氨酰胺的释放调节、激素分泌以及神经肽调节有密切关系,但是如果生成过量,会导致 RNS 的产生,造成脑部损害^[21]。本次研究中两组的 iNOS 活性差异无统计学意义($P>0.05$),即接钒组和对照组工人血清中 iNOS 活性较接近。关于 RNS 在钒氧化应激的地位和作用还需要进一步研究。

部分研究对象由于血清样品运输过程中丢失或保存操作不慎而未纳入研究,使研究对象未达到设计样本量,这是本次研究较大的不足之处,后续研究中将严格控制样本质量,保证研究样本量。另外,SOD 活性改变与钒的浓度有关,但由于条件限制,钒浓度大小与 SOD 活性改变的具体对应关系未做深入研究,后续拟对此做进一步研究。

综上可知,血清中 MDA 含量的升高和 Mn-SOD 活性的下降是钒作业工人氧化应激的重要特点。提示钒暴露可能会导致作业工人出现脂质过氧化,并降低机体的抗氧化水平。目前还不能明确钒与 RNS 损伤之间的关系。

参 考 文 献

1 崔 鹏,张 勤,兰亚佳.钒及其化合物的神经行为毒性研究

进展. 毒理学杂志, 2013; 27(1): 64-67.

2 Olopade JO, Fatola IO, Olopade FE. Vertical administration of vanadium through lactation induces behavioural and neuromorphological changes: protective role of vitamin E. Niger J Physiol Sci, 2011; 26(1): 55-60.

3 Avila-Costa R, Fortoul I, Niño-Cabrera G, *et al.* Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V₂O₅) promote memory deterioration. Neurotoxicology, 2006; 27(6): 1007-1012.

4 Beatriz GG, Eugenia BM, Dario QA. Vanadium (V) - induced neurotoxicity in the rat central nervous system: a histo-immunohistochemical study. Drug Chem Toxicol, 2005; 28(3): 329-344.

5 Sandra C, Christoffer T, Qing Z, *et al.* Mechanisms and modulation of neural cell damage induced by oxidative stress. Physiol Behav, 2007; 92(1-2): 87-92.

6 Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. Crit Rev Oncol Hematol, 2002; 42(3): 249-265.

7 Chen F, Demers LM, Vallyathan V, *et al.* Vanadate induction of NF-kappaB involves IkappaB kinase beta and SAPK /ERK kinase 1 in macrophages. J Biol Chem, 1999; 274(29): 20307-20312.

8 Garcia GB, Quiroga AD, Sturtz N, *et al.* Morphological alterations of central nervous system (CNS) myelin in vanadium (V)-exposed adult rats. Drug Chem Toxicol, 2004; 2(3): 281-293.

9 毛雪琴. 富钒鹰嘴豆芽对糖尿病大鼠糖脂代谢及学习记忆的影响. 济南: 山东大学医学院生理学研究所, 2008.

10 Haider SS, Abdel-Gayoum AA, El-Fakhri M. Effect of seleium on vanadium toxicity in different regions of rat brain. Hum Exp Toxicol, 1998; 17(1): 23-28.

11 孙素玲, 周建, 陈合邦等. 钒对大鼠肝线粒体微粒体抗氧化酶活力的影响. 环境与健康杂志, 2007; 24(5): 313-315.

12 孙素玲, 王三鑫, 从前禄. 钒对大鼠血清抗氧化酶活力的影响. 毒理学杂志, 2008; 22(2): 127-128.

13 Sasi MM, Haider SS, el-Fakhri M, *et al.* Microchromatographic analysis of lipids, protein, and occurrence of lipid peroxidation in various brain areas of vanadium exposed rats: a possible mechanism of vanadium neurotoxicity. Neurotoxicology, 1994; 15(2): 413-420.

14 Cuesta S, Proietto R, Garcia GB. Astrogliosis and HSP70 activation in neonate rats' brain exposed to sodium metavanadate through lactation. Neurotoxicol Teratol, 2013; 37: 57-62.

15 胡俊, 史树贵, 李露斯. 神经系统疾病与超氧化物歧化酶. 中国临床康复, 2005; 9(33): 130-132.

16 范晓丽. 职业性慢性锰中毒人群及染锰 PC12 细胞中 MnSOD 基因表达水平变化研究. 济南: 济南大学医学与生命科学学院, 2012.

17 Fischer Gunther TM, Kwiecinski Roberto M, Cristine Baron C, *et al.* Sodium orthovanadate associated with pharmacological doses of ascorbate causes an increased generation ROS in tumor cells that inhibits proliferation and triggers apoptosis. Biochem Biophys Res Commun, 2013; 430(3): 883-888.

18 易浪波, 马陶武, 彭清静. 钒酸钠对日本青鳉肝脏抗氧化酶活力的影响. 环境与健康杂志, 2012; 29(3): 225-228.

19 Cuesta S, Frances D, Garcia GB. ROS formation and antioxidant status in brain areas of rats exposed to sodium metavanadate. Neurotoxicol Teratol, 2011; 33(2): 297-302.

20 Aschner M, Levin D, Suno C. Gene-environment interactions: neuroderation in non-mammals and mammals. Neurotoxicology, 2010; 31(5): 582-588.

21 Bergendi L, Benes L, Duracková Z, *et al.* Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Sci, 1999; 65(18-19): 1865-1874.

(2015 - 02 - 02 收稿, 2015 - 06 - 23 修回)

编辑 余琳