

# 有机磷酸酯引起的迟发性神经病的“强化”机理

常平安, 伍一军\*

(中国科学院动物研究所分子毒理学实验室, 北京 100080)

**摘要:** 某些酯酶抑制剂可以强化创伤和中毒引起的轴突病, 这可以从临床症状和组织病理学上加以证实。有机磷酸酯诱导的迟发性神经病是研究轴突病强化机制的良好模型, 有机磷酸酯诱导的迟发性神经病的强化可能与神经系统的修复机理有关。强化剂的靶标位点还未清楚, 但不是神经病靶标酯酶, 而可能与一种类似于神经病靶标酯酶的特殊酯酶有关。

**关键词:** 有机磷化合物; 神经病; 有机磷酸酯诱导的迟发性神经病

**中图分类号:** R994.7

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-3002(2002)04-0316-05

有机磷酸酯 (organophosphates, OP) 用途广泛, 常作为农业上的杀虫剂、除草剂和工业上的润滑剂、阻燃剂以及医学上的治疗药物等。OP 可使人和其他敏感动物产生两种神经中毒病症: 一种是 OP 抑制乙酰胆碱酯酶活性引发的急性神经毒性; 另一种是一些 OP (包括磷酸酯、磷酯和磷酸酰胺化物等) 引起的迟发性神经病症, 称之为有机磷酸酯引起的迟发性神经病 (organophosphate-induced delayed neuropathy, OPIDN)<sup>[1]</sup>。

如果在用 OP 处理动物之前, 给予某些酯酶抑制剂, 诸如: 磺酰卤化物, 氨基甲酸酯和硫代氨基甲酸酯等就可以避免 OPIDN 的发生, 这称之为 OPIDN 的“保护” (protection) 作用<sup>[2]</sup>; 相反, 如果颠倒给药顺

序, 则会促进 OPIDN 的发生, 这称之为 OPIDN 的“强化” (potentiation or promotion) 作用<sup>[3,4]</sup>。这些酯酶抑制剂 (亦称“强化剂”) 不仅可以强化 OPIDN, 而且可以强化 2,5-己二酮引起的多发性神经病<sup>[5]</sup> 和创伤引起的轴突损伤<sup>[6]</sup>, 然而, 若用这些强化剂单独处理动物并不引起神经轴突病。

## 1 OPIDN 作为轴突病“强化”研究的实验模型

OPIDN 的特征是: 有 1~3 周的潜伏期, 症状表现为运动失调、下肢麻痹, 甚至瘫痪。根据 OPIDN 的症状的轻重, 可以将其细分为 8 个等级; 组织病理学上则表现为脊髓和外周神经 (如坐骨神经) 的轴突髓鞘变性、脱落<sup>[1]</sup>, 并且, 外周有髓神经纤维的降解程度与用强化剂作用后所产生的临床症状的轻重是一致的<sup>[7]</sup>。因此可以从临床症状和组织病理两个方面量化病变程度和观察保护与强化作用的效果。鉴于一定的强化剂不仅可以强化 OPIDN, 而且可以强化其他原因引起的轴突病变, 并且它们在强化过程中的临床与病理表现相似, 因此可以考虑以 OPIDN 作为研究轴突病“强化”机理的实验模型。

OPIDN 的发生与体内一种被称为神经病靶标酯酶 (neuropathy target esterase, NTE) 的丝氨酸酯酶的抑制 (磷酸化) 和“老化” (aging) 有关, 通常认为 OP 对 NTE 的抑制和随后发生的 NTE 的老化是 OPIDN 的必需起始步骤<sup>[1]</sup>。“老化”的本质是 NTE 发生磷酸化后其 OP 部分的烷基断开, 留下一个带负电的取代基团并与酶的活性位点相连接<sup>[1]</sup>。强化剂的保护机理可能是, 强化剂进入机体后预先占领神经毒性 OP 与 NTE 的结合位点进而使得 NTE 不能发生老化反应<sup>[8]</sup>。

## 2 OPIDN 的强化特征

所谓“强化作用”就是在给予能使 NTE 抑制和老化的阈下剂量的神经毒剂后, 再给予一定剂量的

收稿日期: 2002-01-08 接受日期: 2002-04-12

基金项目: 国家自然科学基金 (39970127); 中国科学院生物技术特别支持项目 (STZ98-2-13)

作者简介: 常平安 (1975-), 男, 广西人, 理学博士生, 研究方向: 神经毒理学; 伍一军 (1963-), 男, 安徽人, 研究员, 研究方向: 神经毒理学。

\* 联系作者 Tel: (010)62620177,

E-mail: wuyj@panda.ioz.ac.cn

强化剂,便能促进 OPIDN 的发生,且增加其严重性的一种现象。强化引起的临床症状和单独给予神经毒剂导致的症状是一致的,在组织病理上也不存在明显差别,因为二者引起的神经系统损伤部位是相同的<sup>[8~10]</sup>,只是强化作用提高了轴突损伤的发生率<sup>[9]</sup>。

在以成年鸡为实验动物的研究中发现, NTE 至少被抑制 70% 以上才会发生 OPIDN。当用苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)强化时, NTE 只要预先被抑制 40% 就可以引发 OPIDN<sup>[4]</sup>。在用神经毒剂二异丙基氟磷酸酯(diisopropyl fluorophosphate, DFP)处理 12 d 以后,用 PMSF 进行强化也可见增强效应。药物代谢相互作用的原因可以被排除,因为 DFP 和 PMSF 的清除速率都很快<sup>[4]</sup>。虽然所有的强化剂都是 NTE 的抑制剂,但 NTE 不是强化剂的靶标。事实上,在 NTE 几乎被完全抑制后,强化作用依然会发生<sup>[11~13]</sup>。

强化剂并不影响由 NTE 抑制所引发的病变过程。无论是在成年鸡<sup>[14]</sup>还是在小鸡<sup>[5]</sup>,在临床症状出现之前,神经轴突的逆向运输会被抑制。小鸡对 OPIDN 的抵抗力相应较强,只有在 NTE 被抑制 90% 后才会引起 OPIDN,症状的恢复根据受损的程度需要 3~7 周<sup>[15]</sup>。在 PMSF 强化的由二丁基二氯乙烯磷酸酯(di-*n*-butyl dichlorovinyl phosphate, DBDCVP)诱发的小鸡轻微的 OPIDN 实验中,尽管临床症状更为严重,轴突的逆向运输并没有受到进一步的影响<sup>[5]</sup>。此外,虽然需要更长的临床恢复时间,但轴突的逆向运输在症状完全恢复前已经恢复到正常水平。因此,强化机理可能不同于单纯的原始损伤症状加重<sup>[5,12]</sup>。

在 PMSF 强化 DFP 引起的 OPIDN 实验中,发现坐骨神经匀浆经离心后所得到的沉淀中神经纤维蛋白表达增强,相反,上清部分的神经纤维蛋白表达则下降,提示神经纤维参与了强化过程<sup>[16]</sup>。在用 DFP 单独处理动物诱发 OPIDN 时,会引起脊髓中神经纤维蛋白重链亚基的 mRNA 的表达增加<sup>[17]</sup>。而在保护作用下,脊髓中神经纤维蛋白三种亚基的 mRNA 的表达均没有明显改变;在强化作用下,神经纤维蛋白三种亚基的 mRNA 的表达明显下降,而在大脑中只有轻链亚基的 mRNA 的表达下降<sup>[18]</sup>。进一步在蛋白质水平上研究表明,DFP 单独处理动物诱发 OPIDN 时,脊髓中的神经纤维蛋白的重链亚基的表达增强,中链亚基无明显变化,而轻链亚基的表达下

降。在保护作用下,脊髓中的神经纤维蛋白的表达没有改变;在强化作用下,却表现出神经纤维蛋白的重链亚基的表达下降和中链亚基与轻链亚基的表达反而增强的趋势<sup>[19]</sup>。这些结果提示,神经纤维蛋白参与了 OPIDN 的发生过程和强化过程,而保护作用则是由于强化剂阻止了神经纤维蛋白表达水平的变化,但强化作用的机理与神经毒剂单独诱发 OPIDN 的机理显然不同。

### 3 强化作用机理分析

无论是从 NTE 的抑制,还是轴突的逆向运输以及神经纤维 mRNA 和蛋白质表达等方面分析,强化的发生机理都不同于神经毒剂单独诱发 OPIDN 的机理。更多的事实表明,强化的发生可能与神经系统的修复功能相关,这是因为:

(1)强化作用是非特异性的。例如:PMSF 可以强化不同原因引起的轴突病,除了 OPIDN 外,还可以强化由 2,5-己二酮诱导的多发性神经病<sup>[5]</sup>,以及创伤引起的轴突损伤<sup>[6]</sup>。中毒引起的轴突病的强化效果以临床症状和组织损伤加重为特点,而创伤性轴突损伤的强化效果以损伤的延迟恢复为特征,因为后者轴突损伤已达最大程度,难以再被进一步“强化”<sup>[6]</sup>。

(2)强化作用可能涉及正常的神经轴突。在创伤引起轴突损伤发生前给予 PMSF 也可以产生强化效果(以神经损伤的延迟恢复为特征)<sup>[6]</sup>。此外,在给予 DBDCVP 前 6 d,给予一般的强化剂对 OPIDN 起保护作用,然而,如给予强化剂 KBR-2822 [phosphorothioic acid *O*-(2-chloro-2, 3, 3-trifluorocyclobutyl) *O*-ethyl *S*-propyl ester] 反而促进 OPIDN 的发生<sup>[11]</sup>。

(3)强化效果在未成年动物中相对不明显。事实上,未成年动物神经系统的修复功能比成年动物更强,例如:小鸡和幼鼠比成年鸡和成年鼠更不容易诱发 OPIDN,但与它们之间的药物代谢差异无关<sup>[5,15,20]</sup>。PMSF 在小鸡中强化 OPIDN 的最小剂量( $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )远远高于成年鸡的强化剂量( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )<sup>[15]</sup>,这可能与神经系统的修复功能随着年龄增长逐渐减弱有关。

以上研究结果提示,强化的发生机理与神经系统的修复功能相关。诱导 OPIDN 的 OP 可以引起培养细胞的凋亡,预先用 PMSF 处理细胞可以减弱细胞

胞的凋亡程度<sup>[21]</sup>,这提示 OP 诱导的 OPIDN 在开始阶段可能与诱发细胞凋亡有关,而服用 OP 之前给予 PMSF 所起的保护作用与 PMSF 减弱细胞凋亡之间有一定联系<sup>[21]</sup>。因此推测,在给予有机磷酸酯后,强化剂也可能通过调节细胞凋亡的发生引发强化作用。

#### 4 强化剂的作用靶标位点

虽然不同的强化剂都是酯酶抑制剂,都可以抑制 NTE 的活性,但是强化的发生与 NTE 的抑制并不相关,因此 NTE 并不是强化剂的作用位点。有研究者希望找到一种对 PMSF 敏感的非 NTE 酯酶,采用氟丙胺磷(mipafox)或 DFP 抑制大脑和坐骨神经匀浆液中的 NTE 后,发现剩余的水解戊酸苯酯的酯酶活力大都一致,其中有一种酶对 PMSF 敏感,但这种酶活性的抑制程度和 OPIDN 的强化作用也不相关<sup>[22]</sup>。

强化剂的作用位点虽然不是 NTE,但强化剂都可以抑制 NTE 的活性,因此强化剂的作用靶标酶很可能具有与 NTE 相似的性质,如对对氧磷(paraoxon)不太敏感,但对氟丙胺磷敏感。NTE 的活力测定是以对氧磷( $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 20 min, pH 8.0, 不抑制 NTE)和氟丙胺磷( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 20 min, pH 8.0, 抑制 NTE)分别存在时对戊酸苯酯水解的差异来表示的。用  $0 \sim 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氟丙胺磷滴定对对氧磷( $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )不敏感的能水解戊酸苯酯的酯酶,发现两种对氟丙胺磷敏感的酯酶<sup>[23]</sup>:一种是 NTE,氟丙胺磷半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )为  $7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;另一种对高浓度的氟丙胺磷敏感(氟丙胺磷  $\text{IC}_{50}$  为  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),该酶被称为 M200。随后的实验表明,M200 在体内和体外均能被强化剂抑制,并且被高浓度的神经毒性 OP 所抑制,而这种浓度远远高于诱导 OPIDN 发生时抑制 NTE 所需的 OP 浓度<sup>[23]</sup>。最近发现,环草丹(molinate)对 DBDCVP 诱导的神经病的强化伴随着 50% 以上的 M200 被抑制<sup>[24]</sup>。此外,在外周神经的轴浆中也发现了一种与这种酶活性相类似的酶,并且两者的氟丙胺磷的  $\text{IC}_{50}$  相近( $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[25]</sup>,推测其可能为强化剂(如 PMSF)的作用靶标<sup>[26]</sup>。

尽管已经发现了一些与强化作用可能相关的靶标酶,但这些酶的性质和功能还未完全清楚,它们在强化过程中所起的作用还需要进一步阐明。

#### 5 结语

创伤和中毒引起的轴突病可以被某些酯酶抑制剂所强化,但其发生机制还未清楚,显然与神经毒剂单独诱发的神经轴突病的机理不同,很可能与神经系统的修复功能有关,某些与 NTE 不同的酯酶可能在其中起着重要作用。进一步研究这些酶的性质与功能及其与神经轴突病强化的相关性,将有助于 OPIDN 强化机理的进一步阐明。

#### 6 参考文献:

- [1] Glynn P. Neural development and neurodegeneration: two faces of neuropathy target esterase [J]. *Prog Neurobiol*, 2000, **61**(1):61-74.
- [2] Johnson MK. Organophosphates and delayed neuropathy - is NTE alive and well [J]? *Toxicol Appl Pharmacol*, 1990, **102**(3):385-399.
- [3] Pope CN, Padilla S. Potentiation of organophosphorus-induced delayed neurotoxicity by phenylmethylsulfonyl fluoride [J]. *J Toxicol Environ Health*, 1990, **31**(4):261-273.
- [4] Lotti M, Caroldi S, Capodicasa E, Moretto A. Promotion of organophosphate-induced delayed polyneuropathy by phenylmethanesulfonyl fluoride [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1991, **108**(2):234-241.
- [5] Moretto A, Bertolazzi M, Capodicasa E, Peraica M, Richardson RJ, Scapellato ML, et al. Phenylmethanesulfonyl fluoride elicits and intensifies the clinical expression of neuropathic insults [J]. *Arch Toxicol*, 1992, **66**(1):67-72.
- [6] Moretto A, Capodicasa E, Peraica M, Lotti M. Phenylmethanesulfonyl fluoride delays the recovery from crush of peripheral nerves in hens [J]. *Chem Biol Interact*, 1993, **87**(1-3):457-462.
- [7] Massicotte C, Inzana KD, Ehrich M, Jortner BS. Neuropathologic effects of phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)-induced promotion and protection in organophosphorus ester-induced delayed neuropathy (OPIDN) in hens [J]. *Neurotoxicology*, 1999, **20**(5):749-759.
- [8] Pope CN, Tanaka D Jr, Padilla S. The role of neurotoxic esterase (NTE) in the prevention and potentiation of organophosphorus-induced delayed neurotoxicity (OPIDN) [J]. *Chem Biol Interact*, 1993, **87**(1-3):395-406.
- [9] Pope CN, Chapman ML, Tanaka D Jr, Padilla S. Phenylmethylsulfonyl fluoride alters sensitivity to organophosphorus-induced delayed neurotoxicity in developing animals [J].

- Neurotoxicology*, 1992, **13**(2):355 – 364.
- [10] Randall JC, Yano BL, Richardson RJ. Potentiation of organophosphorus compound-induced delayed neurotoxicity (OPIDN) in the central and peripheral nervous system of the adult hen: distribution of axonal lesions[J]. *J Toxicol Environ Health*, 1997, **51**(6):571 – 590.
- [11] Moretto A, Bertolazzi M, Lotti M. The phosphorothioic acid *O*-(2-chloro-2, 3, 3-trifluorocyclobutyl) *O*-ethyl *S*-propyl ester exacerbates organophosphate polyneuropathy without inhibition of neuropathy target esterase[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994, **129**(1):133 – 137.
- [12] Lotti M, Moretto A, Bertolazzi M, Peraica M, Fioroni F. Organophosphate polyneuropathy and neuropathy target esterase: studies with methamidophos and its resolved optical isomers[J]. *Arch Toxicol*, 1995, **69**(5):330 – 336.
- [13] Harp P, Tanaka D Jr, Pope CN. Potentiation of organophosphorus-induced delayed neurotoxicity following phenyl saligenin phosphate exposures in 2-, 5-, and 8-week-old chickens[J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1997, **37**(1):64 – 70.
- [14] Moretto A, Lotti M, Sabri MI, Spencer PS. Progressive deficit of retrograde axonal transport is associated with the pathogenesis of di-*n*-butyl dichlorvos axonopathy[J]. *J Neurochem*, 1987, **49**(5):1515 – 1522.
- [15] Peraica M, Capodicasa E, Moretto A, Lotti M. Organophosphate polyneuropathy in chicks[J]. *Biochem Pharmacol*, 1993, **45**(1):131 – 135.
- [16] Xie K, Gupta RP, Abou-Donia MB. Alteration in cytoskeletal protein levels in sciatic nerve on post-treatment of diisopropyl phosphorofluoridate (DFP)-treated hen with phenylmethylsulfonyl fluoride[J]. *Neurochem Res*, 2001, **26**(3):235 – 243.
- [17] Gupta RP, Lin WW, Abou-Donia MB. Enhanced mRNA expression of neurofilament subunits in the brain and spinal cord of diisopropyl phosphorofluoridate-treated hens[J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, **57**(11):1245 – 1251.
- [18] Xie K, Gupta RP, Abou-Donia MB. Effect of prevention and potentiation of diisopropyl phosphorofluoridate (DFP)-induced delayed neurotoxicity on the mRNA expression of neurofilament subunits in hen central nervous system[J]. *Biochem Cell Biol*, 2001, **79**(2):207 – 217.
- [19] Xie K, Gupta RP, Abou-Donia MB. Protein levels of neurofilament subunits in the hen central nervous system following prevention and potentiation of diisopropyl phosphorofluoridate (DFP)-induced delayed neurotoxicity[J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, **63**(1):11 – 19.
- [20] Moretto A, Capodicasa E, Lotti M. Clinical expression of organophosphate-induced delayed polyneuropathy in rats[J]. *Toxicol Lett*, 1992, **63**(1):97 – 102.
- [21] Carlson K, Jortner BS, Ehrlich M. Organophosphorus compound-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, **168**(2):102 – 113.
- [22] Milatovic D, Moretto A, Osman KA, Lotti M. Phenyl valerate esterases other than neuropathy target esterase and the promotion of organophosphate polyneuropathy[J]. *Chem Res Toxicol*, 1997, **10**(9):1045 – 1048.
- [23] Moretto A. Promoters and promotion of axonopathies[J]. *Toxicol Lett*, 2000, **112 – 113**:17 – 21.
- [24] Moretto A, Gardiman G, Panfilo S, Colle MA, Lock EA, Lotti M. Effects of *S*-ethyl hexahydro-1*H*-azepine-1-carbothioate (molinate) on di-*n*-butyl dichlorovinyl phosphate (DBDCVP) neuropathy[J]. *Toxicol Sci*, 2001, **62**(2):274 – 279.
- [25] Cespedes MV, Escudero MA, Barril J, Sogorb MA, Vicedo JL, Vilanova E. Discrimination of carboxylesterases of chicken neural tissue by inhibition with a neuropathic, non-neuropathic organophosphorus compounds and neuropathy promoter[J]. *Chem Biol Interact*, 1997, **106**(3):191 – 200.
- [26] Vilanova E, Escudero MA, Barril J. NTE soluble isoforms: new perspectives for targets of neuropathy inducers and promoters[J]. *Chem Biol Interact*, 1999, **119 – 120**:525 – 540.

## Potential mechanism of organophosphate-induced delayed neuropathy

CHANG Ping-An, WU Yi-Jun

(Laboratory of Molecular Toxicology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** Certain esterase inhibitors potentiate the axonopathy induced by toxic agents or trauma. Organophosphate-induced delayed neuropathy may serve as a model for studies of the potentiation of axonopathy. Potentiation is believed to interfere with repair process of the nervous system. The target of potentiation remains unclear so far; however, it is not the neuropathy target esterase, which is a putative target of organophosphate-induced delayed neuropathy, but another esterase

that is similar to neuropathy target esterase may be involved in the mechanism of potentiation.

**Key words:** organophosphorus compounds; neuropathies; organophosphate-induced delayed neuropathy

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China (39970127); and Life Science Special Fund of Chinese Academy of Sciences Supported by the Ministry of Finance (STZ98-2-13)

(本文编辑 董立春)

## 欢迎订阅 2003 年《中国药理学与毒理学杂志》

《中国药理学与毒理学杂志》为中国药理学会、中国毒理学会和军事医学科学院共同主办的学术期刊,国内外公开发行人。本刊主要刊登实验药理学与实验毒理学各分支学科的研究论著、专题评述、综述、短讯和新技术方法的创建。本刊为中国科技论文统计源期刊,被国内外多家检索期刊收录。

读者对象主要为从事药理学、毒理学、药学、医学和生物基础科学研究的工作者。

本刊为双月刊,双月 25 日出版,每期 80 页,以 5 号字排版,用 70 克铜版纸印刷,国内每期定价 12.00 元,全年定价 72.00 元。国内邮发代号 82-140,全国各地邮局均可订阅。国外邮发代号 BM-1051,由中国国际图书贸易总公司(北京市 399 信箱)经办。

编辑部地址:北京市太平路 27 号 邮政编码:100850 电话:(010)68276743,(010)66931617

E-mail: CJPT@nic.bmi.ac.cn