

有机磷酸酯诱发的迟发性神经病靶标酯酶的老化机制

常平安^{1,2*}, 伍一军²

(1. 重庆邮电学院生物信息学院, 重庆 400065, 2. 中国科学院动物研究所分子毒理学实验室, 北京 100080)

摘要:神经病靶标酯酶的老化被认为是有机磷酸酯诱发迟发性神经病的必需步骤。老化的本质是酶分子中的丝氨酸活性位点共价结合的磷酸基脱烷基化,使得酶不可能再复活,但其过程不同于乙酰胆碱酯酶的老化过程,并受有机磷酸酯的构型和纯度的影响。近来研究表明,不同的有机磷酸酯对其老化的机制不一样,存在着可逆的质子丢失和侧链基团的分子内转移两条途径,并推测 Asp¹⁰⁴⁴和 Asp¹⁰⁰⁴可能是侧链基团转移的结合位点,然而神经病靶标酯酶的老化机制的完全阐明还需要进一步的分子实验证据。

关键词:酯酶类;衰老;有机磷化合物;神经病

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2005)06-0462-04

有机磷酸酯类化合物(organophosphorus compounds, OP)种类很多,用途广泛,如农业生产上的农药、工业上的添加剂和医学上的有机磷治疗药剂,以及军事上的有机磷神经毒剂等。由于大多数 OP 的毒性较大,它们的持续广泛使用已经给生态环境和人类健康造成严重危害,环保机构和环境毒理学家对此都非常关注。已知接触 OP 可使人及敏感动物产生两种主要的毒性反应:一种是由于抑制乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)引起的急性中毒;另一种则是迟发性中毒,即因一次或多次重复接触某些 OP 引发的迟发性神经毒性,现通称为有机磷酸酯诱发的迟发性神经病(organophosphate-induced delayed neuropathy, OPIDN),其主要特征是在接触 OP 后 7~14 d 或更长时间出现感觉异常、肌肉疼痛、衰弱、无力、麻痹,甚至瘫痪的症状^[1]。虽然有关 OPIDN 的研究已开展数十年,但是其发生机制至今仍未清楚。以 Johnson^[1,2]为代表提出的“神经病靶标酯酶(neuropathy target esterase, NTE)的抑制和老化是 OPIDN 发生的必需步骤”的假说得到了最为广泛的认同,但是 NTE 的发生机制尚未完全清楚。近年来由于 NTE 的化学本质、结构和功能的逐一揭示,NTE 的老化机制也取得了一定进展,总结这些研究进展无疑将丰富酶学相关理论,也为进一步阐明 OPIDN 的发生机制奠定基础。

收稿日期: 2005-03-16 接受日期: 2005-06-29

基金项目:重庆邮电学院博士启动基金资助项目(A2005-13);国家自然科学基金资助项目(3014005)

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

* 联系作者 E-mail: changpingan@yahoo.com.cn Tel: (023) 62461249

1 NTE 老化机制假说的提出

1969 年,Johnson 通过同位素标记实验发现,在鸡脑匀浆液中存在一种具有酯酶活性的蛋白能够选择性地被 OP 抑制,即诱发迟发性神经毒性的 OP 能抑制该酶的活性,而不诱发迟发性神经毒性的 OP 则不抑制该酶的活性。Johnson 将此酶命名为神经毒性酯酶(neurotoxic esterase, NTE),后通称为神经病靶标酯酶,neuropathy target esterase, NTE)^[3]。然而,不是所有能共价抑制 NTE 的化合物都具有神经毒性。Johnson 发现,亚磷酸酯、磺酸酯、氨基甲酸酯的化合物虽然能够抑制 NTE,但不能诱发 OPIDN 的发生。因此,Johnson^[4]推测诱发迟发性神经毒性的 OP 在抑制 NTE(NTE 被磷酸化)后,还需要进行下一步的所谓“老化(aging)”反应,使酶不能复活。

Johnson 提出其老化反应的具体步骤是 NTE 活性被抑制(磷酸化)后,结合在 NTE 活性位点上的 OP 的侧链(R)基团(通常是烷基基团)脱离下来,留下一个带负电的取代基团连接在酶的活性位点上,使得 NTE 带上负电荷,同时脱离的侧链基团结合到 NTE 活性位点附近的氨基酸(通称 Z 位点)上(图 1,途径 2)。这里所说的“老化”是从酶的活性变化角度提出来的,与酶学研究中的“老化”的含义基本一致,实质上是指抑制后的酶不再发生逆转复活的一种反应。因此,老化后的 NTE 不能再被恢复活性,即使是利用亲核复活剂如氟化钾也不能恢复其活性(氟化钾能恢复磷酸化后没有被老化的 NTE 的活性)。因此,OPIDN 的发生条件是在给药早期 1~2 d 内,NTE 活性被 OP 抑制(磷酸化)达 70% 以上,并且抑制后的 NTE 发生“老化”反应。如果 OP 仅仅对 NTE 发生抑制(磷酸化)反应,而不发生老化反应,则在后期不会诱导迟发性神经毒性的发生,例如:苯基二戊基亚磷酸酯(phenyl dipentyl phosphinate)这类 OP 就只能抑制 NTE 而不能使其老化,也就不产生迟发性神经毒性。Johnson^[1]进一步推测老化后的 NTE 很可能改变了该蛋白质的特性或者改变了其反应环境而诱发 OPIDN。

2 NTE 的老化过程的特殊性

虽然已经发现一些酯酶,包括 AChE 和丁酰胆碱酯酶(butyrylcholinesterase),在被 OP 抑制后都可以发生老化反应,但是 NTE 和 AChE 老化反应至少在以下 4 个方面是不同的:① AChE 的老化是单分子亲核取代反应历程(S_N1),而 NTE 的老化过程属于双分子亲核取代反应历程(S_N2)^[1];② AChE 的老化过程中 OP 的侧链基团脱离后进入反应溶液中,而 NTE 的老化,是侧链基团脱离后结合到 NTE 的其他氨基酸位点上,是分子内的转移过程。至少某些 OP,如二异丙基氟

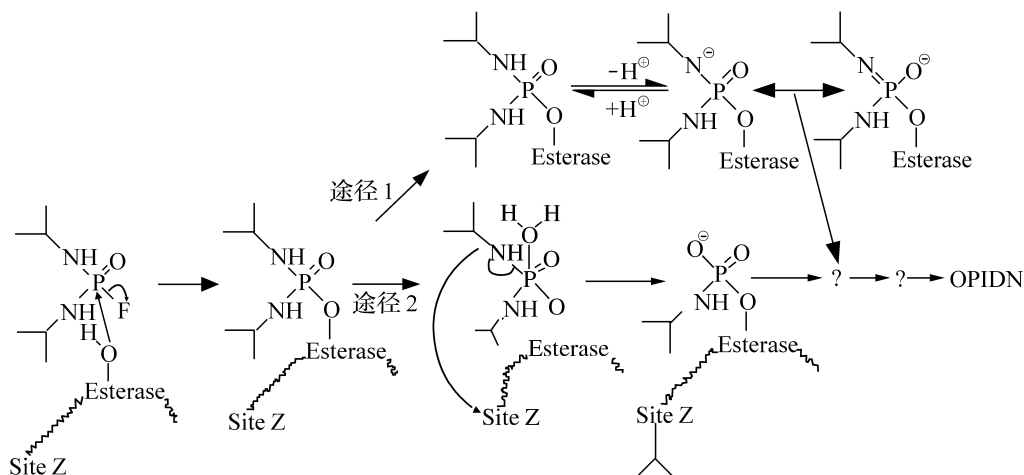


图1 神经病靶酯酶老化的发生途径和过程(根据文献[5],有所改动)

磷酸酯(di-isopropylphosphorofluoridate, DFP)引发的 NTE 的老化反应是如此进行已得到了实验验证^[6,7];③ 含有多个分支烷基侧链基团的 OP 对 AChE 的老化比 NTE 快得多,而对于分支少的 OP 对 NTE 的老化则比 AChE 快得多^[8];④ 老化后结果不一样:如果 OP 中毒后发生 AChE 的老化反应,阿托品和肟类化合物抗 OP 中毒的功效则主要取决于阿托品的抗蕈毒碱作用,以及 AChE 老化和复活的相对速率^[9],而 NTE 如果被抑制超过 70% 后发生老化反应,则会诱导迟发性神经病的发生^[1]。这些明显的不同之处与 NTE 和 AChE 的结构差异密切相关。

3 影响 NTE 老化的因素

OP 往往具有立体化学结构特异性,并且存在着纯度上的差异。OP 的结构特异性和纯度会影响其对人和动物的毒性。有报道证实,OP 的立体结构和纯度对 NTE 的老化和 OPIDN 的发生的影响存在着一定的差异性^[10]。如:L(-)-乙基 4-硝基苯基膦酸酯(ethyl 4-nitrophenyl phosphonate)能抑制和老化 NTE,诱导迟发性神经毒性的发生,而 D(+)-型则不能^[11];相反,D(+)-甲胺磷(methamidophos)能抑制和老化 NTE 引起迟发性神经病,而 L(-)-甲胺磷则不能老化 NTE^[12],难以诱发迟发性神经毒性。工业上生产的甲胺磷对 NTE 的抑制和老化程度远远大于分析纯的甲胺磷或分离纯化的甲胺磷光学异构体^[13],这表明甲胺磷的不纯有助于 OPIDN 的发生。不同构型的 OP 对 NTE 的影响(抑制和老化程度)不一样,这除了与其自身的构型不同有关外,还很可能与 NTE 的活性位点及 OP 侧链脱离基团(R)结合的氨基酸位点(Z)密切相关。

4 NTE 的酶学本质和功能

为了阐明 OPIDN 的发生机制,必须从分子水平研究 NTE 的功能和 NTE 的老化机制。在人脑 NTE 的 cDNA 序列克隆

的基础上^[14],通过将不同的 NTE 肽段进行重组表达,发现具有 OP 敏感性和戊酸苯酯水解活性的重组多肽至少含有 727 ~ 1216 氨基酸序列,这一重组多肽被称为 NTE 酯酶结构域(NTE esterase domain, NEST)。通过对 NEST 的突变研究表明,NTE 活性中心的氨基酸为 Ser⁹⁶⁶, Asp⁹⁶⁰, Asp¹⁰⁸⁶^[15],这与丝氨酸蛋白酶通常以 Ser, His, Asp 或 Glu 作为活性中心的氨基酸有所不同。OP 是通过与 Ser⁹⁶⁶ 的羟基(-OH)结合磷酸化 NTE,抑制其活性。进一步研究发现,NEST 能水解膜酯,并且对溶血卵磷脂的催化反应最为迅速,推测溶血卵磷脂可能是其生理底物^[16]。结合 NTE 基因敲除小鼠的体内实验和 OP 对 NTE 抑制的体外实验,证明小鼠脑内 NTE 具有溶血磷脂酶的活性,溶血卵磷脂很可能是其生理底物^[17]。根据对酵母中与 NTE 类似的蛋白 YML059c 的研究结果分析,进一步证实哺乳动物细胞内 NTE 催化的反应是磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine)即卵磷脂的脱酰基过程,生成甘油磷胆碱(glycerophosphocholine)和脂肪酸^[18]。因此,NTE 实质上是一种具有磷脂酶 B 催化活性的磷脂酶。通过调节细胞内的卵磷脂的变化,NTE 介导着一条特殊的信号通路,在调节细胞膜的状态和细胞周期等方面起着重要的作用^[19]。

NTE 通过其 N 端的跨膜区域使其在神经细胞和非神经细胞中都被定位于内质网膜上^[20,21],然而其 C 端的催化活性区段也能与内质网膜相互作用,结合在膜上^[20]。因此,作者推测 NTE 作为一种膜蛋白被 OP 抑制和老化后,OP 的侧链基团 R 与 Z 位点的结合可能阻碍着 NTE 与内质网膜的相互作用,影响其内质网膜上的定位进而影响其活性和功能。NTE 基因敲除实验证明 NTE 是胚胎发育所必需的^[22,23],进一步研究胚胎致死的原因发现,NTE 的敲除影响了胎盘发育和血管生成^[23]。因此,如果在怀孕早期长时间接触神经毒性的 OP,抑制和老化 NTE,使 NTE 活性不能恢复,将可能导致胎儿死亡^[23]。NTE 的缺失会影响胚胎干细胞神经分化早期轴突的发生^[24],条件型特异敲除脑 NTE 的小鼠表现出神经退行性症状^[21]。这些结果提示,NTE 在神经系统发育中起

着非常重要的作用, NTE 被抑制和老化永久失活后, 必然会对神经系统发育造成重要影响。

5 NTE 老化机制的新发现

通过对 NTE 活性位点的揭示, NTE 被 OP 抑制的分子机制已逐渐清楚。NTE 的克隆无疑为研究 NTE 老化的分子机制提供了新的线索和可能。研究表明, 原核表达的 NEST 与 OP 的反应特性和组织中的 NTE 与 OP 的反应特性非常相似, 并且通过 [³H] 标记的二异丙基氟磷酸 (DFP) 与 NEST 的结合和酶解同位素测定分析, 发现 DFP 对 NEST 的老化反应发生的位点位于 Ala⁹⁵⁵ 之后, 并且 Asp¹⁰⁴⁴ 很可能是 DFP 的侧链结合的一个位点, 然而还可能存在着其他位点, 其中 Asp¹⁰⁰⁴ 很可能是另一位点^[15]。最近通过质谱分析证明 DFP 在抑制 NEST 后, DFP 的侧链基团异丙基确实是在 DFP 结合 Ser⁹⁶⁶ 后发生了脱落后的分子内转移^[5]。然而这些结果都是在原核生物中表达 NEST 后得出的, 还需要进一步研究证实。

虽然 Johnson 提出的 NTE 老化机制得到了广泛的认同, 但是不同的 OP 是否存在着不同的 NTE 老化机制呢? 氟丙胺磷 (mipafox) 抑制和老化 NTE 的酶学动力学分析中发现, 在酸性条件下, 氟化钾处理能够复活已经被老化的 NTE^[25], 而且这个重活化的过程只在酸性条件下 (如 pH = 5.2) 老化发生, 而在碱性情况下 (如 pH = 8.0) 不发生^[26], 因此氟丙胺磷抑制和老化 NTE 的过程是可逆的, 而不能简单的用侧链基团的分子内转移的机制进行解释。最近用原核表达的 NEST 为研究对象, 发现氟丙胺磷在抑制 NEST 后, 没有发生侧链基团的分子内转移的老化过程, 而是去质子使 NTE 带上负电荷发生老化反应 (图 1, 途径 1)^[5]。并且这种去质子的过程是可逆的, 受 pH 值的调节, 在酸性条件下 (如 pH = 5.2) 老化不发生, 而在碱性情况下 (如 pH = 8.0) 立即发生完全的老化反应^[5]。NTE 的老化机制, 对于不同的 OP 可能存在着不同的发生途径, 至少经典的侧链基团转移和新发现的去质子是其中的两条途径。

6 展望

随着 NTE 的化学本质、结构和功能被一一揭示, NTE 老化的途径不断有新的发现, 但其老化的分子机制则尚未被完全证实。究竟存在着几个 Z 位点, 它们的具体位置如何, 每个 Z 位点结合侧链基团的百分比例多大, 这些问题都还需要进一步的实验研究来解决。NTE 老化机制的研究, 不仅有助于阐明 NTE 自身的结构和功能, 而且对于与 NTE 类似的蛋白结构和功能的了解也可以提供有益借鉴, 因为 NTE 是一类新的磷脂酶, 在酵母、果蝇、小鼠及人类中都存在^[14]。另外, 也为进一步揭示 OP 的其他毒性的机制和作用靶标提供有用的参考, 因为 OP 还可作用于其他的溶血卵磷脂酶^[27]。这些都将进一步丰富酶学老化机制及相关理论。

7 参考文献:

- [1] Johnson MK. Symposium introduction: retrospect and prospects for neuropathy target esterase (NTE) and the delayed polyneuropathy (OPIDP) induced by some organophosphorus esters[J]. *Chem Biol Interact*, 1993, **87**(1-3):339-346.
- [2] Glynn P. NTE: one target protein for different toxic syndromes with distinct mechanisms[J]? *Bioessays*, 2003, **25**(8):742-745.
- [3] Johnson MK. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase[J]. *Biochem J*, 1969, **114**(4):711-717.
- [4] Johnson MK. The primary biochemical lesion leading to the delayed neurotoxic effects of some organophosphorus esters[J]. *J Neurochem*, 1974, **23**(4):785-789.
- [5] Kropp TJ, Glynn P, Richardson RJ. The mipafox-inhibited catalytic domain of human neuropathy target esterase ages by reversible proton loss[J]. *Biochemistry*, 2004, **43**(12):3716-3722.
- [6] Williams DG, Johnson MK. Gel-electrophoretic identification of hen brain neurotoxic esterase, labelled with tritiated di-isopropyl phosphorofluoridate[J]. *Biochem J*, 1981, **199**(2):323-333.
- [7] Williams DG. Intramolecular group transfer is a characteristic of neurotoxic esterase and is independent of the tissue source of the enzyme. A comparison of the aging behaviour of di-isopropyl phosphorofluoridate-labelled proteins in brain, spinal cord, liver, kidney and spleen from hen and in human placenta[J]. *Biochem J*, 1983, **209**(3):817-829.
- [8] Jokanovic M, Stepanovic RM, Maksimovic M, Kosanovic M, Stojiljkovic MP. Modification of the rate of aging of diisopropylfluorophosphate-inhibited neuropathy target esterase of hen brain[J]. *Toxicol Lett*, 1998, **95**(2):93-101.
- [9] Van Dongen CJ, Elskamp RM, DeJong LP. Influence of atropine upon reactivation and aging of rat and human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by soman[J]. *Biochem Pharmacol*, 1987, **36**(7):1161-1169.
- [10] Battershill JM, Edwards PM, Johnson MK. Toxicological assessment of isomeric pesticides: a strategy for testing of chiral organophosphorus (OP) compounds for delayed polyneuropathy in a regulatory setting[J]. *Food Chem Toxicol*, 2004, **42**(8):1279-1285.
- [11] Johnson MK, Read DJ. The influence of chirality on the delayed neuropathic potential of some organophosphorus esters: neuropathic and prophylactic effects of stereoisomeric esters of ethyl phenylphosphonic acid (EPN oxon and EPN) correlate with quantities of aged and unaged neuropathy target esterase *in vivo*[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1987, **90**(1):103-115.
- [12] Bertolazzi M, Caroldi S, Moretto A, Lotti M. Interaction of methamidophos with hen and human acetylcholinesterase and neuropathy target esterase[J]. *Arch Toxicol*, 1991, **65**(7):580-585.
- [13] Kellner T, Sanborn J, Wilson B. *In vitro* and *in vivo* assessment of the effect of impurities and chirality on methamidophos-induced neuropathy target esterase aging[J]. *Toxicol Sci*, 2000, **54**(2):408-415.
- [14] Lush MJ, Li Y, Read DJ, Willis AC, Glynn P. Neuropathy target esterase and a homologous *Drosophila* neurodegeneration-associated mutant protein contain a novel domain conserved from bacteria to man[J]. *Biochem J*, 1998, **332**(Pt 1):1-4.
- [15] Atkins J, Glynn P. Membrane association of and critical residues in the catalytic domain of human neuropathy target esterase[J]. *J Biol*

- Chem*, 2000, **275**(32):24477–24483.
- [16] van Tienhoven M, Atkins J, Li Y, Glynn P. Human neuropathy target esterase catalyzes hydrolysis of membrane lipids [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(23):20942–20948.
- [17] Quistad GB, Barlow C, Winrow CJ, Sparks SE, Casida JE. Evidence that mouse brain neuropathy target esterase is a lysophospholipase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(13):7983–7987.
- [18] Zaccheo O, Dinsdale D, Meacock PA, Glynn P. Neuropathy target esterase and its yeast homologue degrade phosphatidylcholine to glycerophosphocholine in living cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, **279**(23):24024–24033.
- [19] Chang PA, Wu YJ. Characterization of neuropathy target esterase[J]. *Chem Life*(生命的化学), 2004, **24**(5):424–426.
- [20] Li Y, Dinsdale D, Glynn P. Protein domains, catalytic activity, and subcellular distribution of neuropathy target esterase in Mammalian cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(10):8820–8825.
- [21] Akassoglou K, Malester B, Xu J, Tessarollo L, Rosenbluth J, Chao MV. Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/swisscheese results in neurodegeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(14):5075–5080.
- [22] Winrow CJ, Hemming ML, Allen DM, Quistad GB, Casida JE, Barlow C. Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity[J]. *Nat Genet*, 2003, **33**(4):477–485.
- [23] Moser M, Li Y, Vaupel K, Kretschmar D, Kluge R, Glynn P, et al. Placental failure and impaired vasculogenesis result in embryonic lethality for neuropathy target esterase-deficient mice[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(4):1667–1679.
- [24] Li Z, Szurek PF, Jiang C, Pao A, Bundy B, Le WD, et al. Neuronal differentiation of NTE-deficient embryonic stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **330**(4):1103–1109.
- [25] Milatovic D, Johnson MK. Reactivation of phosphorodiamidated acetylcholinesterase and neuropathy target esterase by treatment of inhibited enzyme with potassium fluoride [J]. *Chem Biol Interact*, 1993, **87**(1–3):425–430.
- [26] Richardson RJ. Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorus compounds: a critical review of the literature[J]. *J Toxicol Environ Health*, 1995, **44**(2):135–165.
- [27] Quistad GB, Casida JE. Lysophospholipase inhibition by organophosphorus toxicants[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, **196**(3):319–326.

Mechanism of aging of organophosphate-induced delayed neuropathy target esterase

CHANG Ping-An^{1,2*}, WU Yi-Jun²

- (1. College of Bioinformatics, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China;
2. Laboratory of Molecular Toxicology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Aging of neuropathy target esterase (NTE) has been considered as an essential step for inducing organophosphate-induced delayed neuropathy. The essence of NTE aging is dealkylation of phosphoryl moiety which has covalently attached to the active site serine, the dealkylated phosphoryl group can not be readily detached from NTE and renders the inhibited enzyme intractable to reactivation. However, the mechanism of aging of NTE is different from that of acetylcholinesterase, and is affected by the stereochemistry and purity of organophosphates. Recent studies suggested that there be different pathway of NTE aging caused by different organophosphates, such as

reversible proton loss and intramolecular transferring of the side-group; the side-group was perhaps attached to Asp¹⁰⁴⁴ and Asp¹⁰⁰⁴. However, further molecular evidences are needed to reveal the mechanism of the aging of NTE.

Key words: esterases; aging; organophosphorus compounds; neuropathy

Foundation item: The project supported by Science Foundation of Chongqing University of Posts and Telecommunications for Ph.D. (A2005–13); and National Natural Science Foundation of China (3014005)

* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)