

神经病靶标酯酶相关性运动神经元疾病

常新荣¹, 龙鼎新², 常平安³

(1. 柳钢医院神经内科, 广西 柳州 545002; 2. 南华大学公共卫生学院;
3. 重庆邮电大学生物信息学院)

摘要: 神经病靶标酯酶(NTE)作为有机磷酸酯的靶标是在有机磷酸酯诱导的迟发性神经毒性(OPIDN)中被发现的,然而近年发现 NTE 基因的突变与一种运动神经元疾病(MND)的发生相关。本文就 NTE、NTE 突变引起的 MND 以及 NTE 突变引起 MND 的机制等方面进行了综述。

关键词: 神经病靶标酯酶; 运动神经元疾病; 基因突变

中图分类号: R744.8 **文献标识码:** A

运动神经元疾病(motor neuron disease, MND)是一类进行性的运动神经元损伤的神经疾病。对于大多数 MND 患者,其病因并不清楚,因此查找出病因,是为治疗提供依据非常重要的步骤。遗传分析方法,包括基因组范围的连锁扫描和 MND 家族的精细遗传图谱分析是鉴定特定 MND 相关基因位点的常用方法,这些基因位点很可能会成为遗传筛选和治疗的靶位。同时,一些环境因子,特别是神经毒性物质的接触通常也会诱发神经毒性和导致 MND。本文就由有机磷酸酯诱导的迟发性神经毒性(organophosphate-induced delayed neurotoxicity, OPIDN)中有有机磷酸酯的靶标—神经病靶标酯酶(neuropathy target esterase, NTE)突变引起的 MND(NTE-MND)的相关研究进行了综述。

1 有机磷酸酯诱导的迟发性神经毒性

已知接触有机磷酸酯化合物(organophosphorus compound, OP)可使人及敏感动物产生两种主要的毒性反应:一种是急性中毒,其发生机理为 OP 抑制乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE),致使乙酰胆碱在突触体内大量积累,过量积累的乙酰胆碱导致神经信号传导阻滞而引发急性毒性;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(OPIDN),又称有机磷酸酯诱发的迟发性神经病,其主要特征是在接触 OP 后 7~14 天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]。除此之外,有些 OP 急性中毒后易出现中间综合症(intermediate syndrome, IMS),通常是在中毒后 1 天至 4 天出现以肌无力、呼吸困难等为特征的症状,死亡率较高,其机理尚不很清楚^[2]。

在 OPIDN 的发生过程中,NTE 被认为是 OP 的主要靶标。OPIDN 产生的必要条件是 NTE 活性被 OP 抑制且达到或超过临界水平;而充分条件是抑制后还要发生老化,即抑制后的 NTE 不再被水解复活^[1]。

2 神经病靶标酯酶

尽管 NTE 在 40 多年前被认为是 OPIDN 发生过程中 OP 的靶位,但是对 NTE 的深入认识是从人 NTE 的 cDNA 序列克隆开始的。人 NTE 是一个由 1 327 个氨基酸组成的单链蛋白质,分子量约为 146 kDa。蛋白质结构域和跨膜序列分析发现:人 NTE 的 N 端含有一个跨膜结构域,N 端调节区具有 3 个环核苷酸结合结构域(cyclic nucleotide binding domain),C 端催化区包括一个 patatin 结构域。具有 OP 敏感性和戊酸苯酯水解活性的重组多肽至少含有 727~1 216 氨基酸序列,这一重组多肽被称为 NTE 酯酶区域(NTE esterase domain, NEST)。定点突变研究表明 Asp⁹⁶⁰、Ser⁹⁶⁶和 Asp¹⁰⁸⁶对其催化活性

收稿日期:2012-04-16

基金项目:重庆市自然科学基金项目(CSTC 2010BB5410)。

通讯作者:常平安,电话:023-62461884, E-mail: changpingan@yahoo.com.cn.

非常关键,然而 NTE 的 Patatin 结构域建模推测 NTE 的活性位点氨基酸为 Ser⁹⁶⁶ 和 Asp¹⁰⁸⁶ [3]。

通过体外表达 NEST 研究推测 NTE 可能是一种溶血磷脂酶(lysophospholipase),利用 NTE 基因敲除的小鼠研究证明了 NTE 具有非常强的溶血磷脂酶活性。在酵母中和哺乳细胞中则进一步发现 NTE 催化经 CDP-胆碱途径合成的卵磷脂的脱酰基作用。NTE 的果蝇同源蛋白多孔硬干酪蛋白(swiss cheese protein,SWS)的突变体和脑缺失 NTE 的小鼠体内的卵磷脂水平都会升高,证实了 NTE 调节机体内的卵磷脂稳态。因此,NTE 实质上是一种催化 CDP-胆碱途径生成的卵磷脂的磷脂酶 B,并具有强烈的溶血磷脂酶活性,调节细胞内磷脂代谢[4]。

NTE 的生理功能与其组织细胞的分布密切相关。具有高度特异性活力的 NTE 主要存在于脑中,而脊髓和外周神经含量则相对较少。在果蝇中发现 NTE 的同源蛋白 SWS 不仅存在于神经细胞,而且存在于大脑特定的神经胶质细胞中。NTE 通过其 N 端跨膜结构域定位于内质网膜上,其余大部分位于细胞的细胞质中[3]。

NTE 基因敲除的纯合体小鼠胚胎不能正常发育,在第 9 天就会出现胚胎畸形死亡,说明 NTE 为胚胎发育所必需。分析胚胎致死的原因发现,NTE 的缺失主要是影响了胎盘发育和血管的生成。脑特异性缺失 NTE 的小鼠,胚胎发育正常,但表现出神经退行性症状。NTE 缺失导致的神经退行性症状主要是由于在神经系统中大量形成空泡和神经元的缺少所致。在果蝇中,SWS 基因的突变体表现出年龄相关的神经退行性症状,并且在中枢神经系统中发生细胞凋亡和神经胶质细胞多层包被神经细胞的现象。尽管 NTE 不是小鼠胚胎干细胞神经分化中神经突的发生和延长所必需的,但对神经突的起始发生有一定的影响。因此,NTE/SWS 在胚胎发育和神经系统发育中扮演着重要的角色[3]。

3 NTE 突变引起的运动神经元疾病

近年通过对两个运动神经元疾病家族的基因组范围的连锁分析,发现了一种由于 NTE 突变引起的常染色体隐性遗传的 MND[5]。由于 NTE 的突变在 2 个不相关的家族病人中发现,并且这些突变发生在 NTE 的催化结构区的编码序列中,因此认为这种运动神经元疾病是 NTE 突变特异性的,称作 NTE

相关性运动神经元疾病(NTE-related motor neuron disease,NTE-MND)[5]。NTE-MND 患者在从童年开始就表现出不明显的进行性下肢痉挛无力,随后逐渐发展成上下肢末端肌肉萎缩[5]。核磁共振分成像表明脊髓,尤其是胸段脊髓萎缩;电生理检查结果与影响上下肢的运动神经元轴突病一致[6]。NTE-MND 不仅与 OPIDN 相似,病理特征都显示上下位运动神经元损伤,还与其它 MND 类似,如与 Troyer 综合症的不同之处仅在于 Troyer 综合症患者变身为身材矮小和认知障碍。与典型的肌萎缩性侧索硬化相比,NTE-MND 并不表现出早发、对称和进展缓慢[6]。从分类角度 Troyer 综合症属于痉挛性截瘫(hereditary spastic paraplegia,HSP),由于与 HSP20 即 Troyer 综合症相似,因此 NTE-MND 在疾病分类也称为 HSP39[5]。

通过遗传分析发现:(1)在具有血缘关系的家族中,发病个体 NTE 基因编码序列 cDNA 第 3 034 位的腺嘌呤突变为鸟嘌呤,并且为纯合型,因此 NTE 的 1012 位氨基酸由蛋氨酸突变为缬氨酸(M1012V)。(2)在不具有血缘关系的家族中 NTE 基因编码序列 cDNA 存在着 2 个突变:一是 NTE cDNA 2 669 位的鸟嘌呤突变为腺嘌呤,为杂合型突变,使得 NTE890 位的氨基酸由精氨酸突变为组氨酸(R890H);二是在 2 946 和 2 947 位之间插入了 CAGC 4 个碱基(c2946_2947InsCAGC),导致开放阅读框移码,NTE 编码序列提前终止,仅编码 1 019 个氨基酸,且从 983 ~ 1 019 氨基酸发生突变[5]。由于突变发生在 NTE 的催化结构区的编码序列中,因此突变的 NTE 可能影响其酶学特性。通过构建 M1012V 和 R890H 的 NEST 表达质粒,体外表达分析发现 M1012V 和 R890H 的 NEST 突变体的 NTE 活性下降,有机磷酸酯的抑制常数和老化动力学等酶学性质发生改变[7]。进一步通过对 NTE-MND 患者的成纤维细胞的 NTE 酶学性质研究,表明 M1012V 纯合型、R890H 杂合型和 c2946_2947InsCAGC 混合个体的成纤维细胞的 NTE 活性下降,并且 M1012V 纯合突变体的抑制常数升高;然而在表现出症状的 c2946_2947InsCAGC 杂合型个体的成纤维细胞的 NTE 活性也下降[8]。这一方面证实了体外 NTE 突变改变其催化活性,但同时提示仅降低 NTE 活性并不足以引起 MND,如 NTE 插入突变个体。

4 NTE-MND 的发生机制

虽然 NTE-MND 发生机制尚不清楚,但是 NTE-MND 与 OPIDN、Troyer 综合症和肌萎缩性侧索硬化等在症状上具有一定的相似性,因此它们可能存在共同的发生机理。

虽然 OPIDN 的发生机理尚不完全清楚,但是目前 NTE 在 OPIDN 发生中的作用得到了普遍认可。OP 通过磷酸化 NTE 活性中心的 Ser⁹⁶⁶抑制 NTE,继而通过磷酸化 NTE 的 OP 部分的侧链基断开,或者 OP 基团的去质子反应,留下一个带负电的取代基团连接到酶的活性位点上,发生所谓的“老化”反应,使 NTE 不再恢复活性,是 OPIDN 发生的前提条件^[9]。NTE 在 OPIDN 发生中的作用已经得到 NTE 基因敲除小鼠实验的支持。脑特异性 NTE 敲除的小鼠,表现出神经退行性病症,在 4~5 月间也会发生进行性性轴突的退行性病变和四肢瘫痪的症状,这些症状与 OPIDN 具有一定的相似性^[10]。利用基因敲除小鼠,发现 OP 确实通过作用 NTE 引发与 OPIDN 类似的远端轴突损伤^[11]。

从 NTE 在磷脂代谢和膜结构中的作用,以及神经细胞结构与物质运送特点的角度,似乎可以将 NTE 与 OPIDN 联系起来^[12]。在神经细胞中,NTE 产生抑制必将破坏内质网的膜脂稳态和产生内质网压力,而神经轴突中所有物质的快速运输都是通过内质网进行的,因此这个过程不可避免地遭受扰乱。此外,神经胶质细胞中,NTE 的抑制也将扰乱膜磷脂代谢,破坏神经胶质细胞和神经细胞之间正常的相互作用,对于体型较大的动物由神经细胞体提供的物质到达神经细胞的长轴突末端需要数天的时间,因此长神经末端成为由此紊乱引发的最易受损的部位^[13]。因此在 OPIDN 发生过程中,首先 NTE 被 OP 抑制后,引起神经系统中(包括神经元和神经胶质细胞)磷脂稳态和内质网功能破坏,进而影响轴突物质运输以及神经元和神经胶质细胞的相互作用,最后导致远端轴突发生退变^[12-13]。由于 NTE 具有溶血磷脂酶的活性以及 OP 对组织磷脂代谢的影响,因此特定部位(脊髓)的磷脂代谢和信号通路的改变也在引发迟发性毒性中起着一定作用。NTE-MND 与 OPIDN 都是由于 NTE 的改变引起的神经病变,而且非常相似性,因此,NTE-MND 也极有可能具有与 OPIDN 相同的发生机理。

NTE 还可能通过其相互作用蛋白导致 MND。

果蝇的 NTE 同源蛋白 SWS 特异性地与 cAMP 激活蛋白激酶的 C3 催化亚基(PKA-C3)结合,SWS 结合 PKA-C3 使其定位于内质网膜,抑制其活性^[14]。超表达 PKA-C3 不仅导致神经退行性病变,而且增强 SWS 突变果蝇的神经退行性病变程度。因此干扰 SWS 对 PKA-C3 的调节,将导致神经退行性病变^[14]。因此 NTE 的突变,也可能通过影响其互作蛋白,如哺乳动物的 PKA-C3 同源蛋白,导致 MND。

NTE 作为内质网膜上的一种溶血磷脂酶,通过调节细胞膜的溶血卵磷脂含量,影响膜的流动性^[15]。此外,虽然 NTE 的突变引起其活性改变不一定足以导致 MND,但可能影响其正常折叠,产生内质网应激。目前已经发现多种遗传性 MND 与基因突变导致的蛋白质非正常折叠产生的内质网应激相关^[16-17]。因此 NTE-MND 还可能与突变的 NTE 的非正常折叠产生的内质网应激相关。剖析这些假设,将有助于了解 NTE-MND 的发病机制,提供治疗的可能性。

参考文献:

- [1] Jokanovi M, Kosanovi M, Brki D, et al. Organophosphate induced delayed polyneuropathy in man; an overview[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2011, 113(1): 7-10.
- [2] Abdollahi M, Karami-Mohajeri S. A comprehensive review on experimental and clinical findings in intermediate syndrome caused by organophosphate poisoning[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 258(3): 309-314.
- [3] Chang PA, Wu YJ. Neuropathy target esterase; an essential enzyme for neural development and axonal maintenance[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(5): 573-575.
- [4] Glynn P. Neuropathy target esterase and phospholipid deacylation[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1736(2): 87-93.
- [5] Rainier S, Bui M, Mark E, et al. Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease[J]. Am J Hum Genet, 2008, 82(3): 780-785.
- [6] Rainier S, Albers JW, Dyck PJ, et al. Motor neuron disease due to neuropathy target esterase gene mutation: clinical features of the index families[J]. Muscle Nerve, 2011, 43(1): 19-25.
- [7] Hein ND, Stuckey JA, Rainier SR, et al. Constructs of human neuropathy target esterase catalytic domain containing mutations related to motor neuron disease have altered enzymatic properties[J]. Toxicol Lett, 2010, 196(2): 67-73.

(下转第 634 页)

(上接第 626 页)

- [8] Hein ND, Rainier SR, Richardson RJ, et al. Motor neuron disease due to neuropathy target esterase mutation; enzyme analysis of fibroblasts from human subjects yields insights into pathogenesis[J]. *Toxicol Lett*, 2010, 199(1) : 1-5.
- [9] Chang PA, Wu YJ. Motor neuron diseases and neurotoxic substances: a possible link[J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 180(2) : 127-130.
- [10] Read DJ, Li Y, Chao MV, et al. Neuropathy target esterase is required for adult vertebrate axon maintenance [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(37) : 11594-11600.
- [11] Read DJ, Li Y, Chao MV, et al. Organophosphates induce distal axonal damage, but not brain oedema, by inactivating neuropathy target esterase [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 245(1) : 108-115.
- [12] Glynn P. A mechanism for organophosphate-induced delayed neuropathy[J]. *Toxicol Lett*, 2006, 162(1) : 94-97.
- [13] Glynn P. Axonal degeneration and neuropathy target esterase [J]. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2007, 58 (3) : 355-358.
- [14] Bettencourt da Cruz A, Wentzell J, Kretzschmar D. Swiss Cheese, a protein involved in progressive neurodegeneration, acts as a noncanonical regulatory subunit for PKA-C3 [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(43) : 10885-10892.
- [15] Greiner AJ, Richardson RJ, Worden RM, et al. Influence of lysophospholipid hydrolysis by the catalytic domain of neuropathy target esterase on the fluidity of bilayer lipid membranes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1798(8) : 1533-1539.
- [16] Yagi T, Ito D, Nihei Y, et al. N88S seipin mutant transgenic mice develop features of seipinopathy/BSCL2-related motor neuro disease via endoplasmic reticulum stress [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(19) : 3831-3840.
- [17] Doyle KM, Kennedy D, Gorman AM, et al. Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15 (10) : 2025-2039.