

三邻甲苯基磷酸酯毒性作用研究进展

肖双 综述,龙鼎新 审核

(南华大学公共卫生学院,湖南 衡阳 421001)

摘要: 三邻甲苯基磷酸酯(TOCP)属有机磷酸酯类化合物,剧毒,具有多器官毒性,主要表现在神经系统、睾丸、肝脏和免疫系统;其中以神经系统为主要靶组织,以产生迟发性神经毒性(OPIDN)为特征,造成机体永久性损伤。TOCP中毒没有特效药治疗,禁用和限量为主要预防措施。全面了解TOCP毒性作用,有助于对机制的进一步研究,为临床治疗TOCP中毒患者提供参考,对其他有机磷毒物研究有重要借鉴意义。

关键词: 三邻甲苯基磷酸酯; 迟发性神经毒性; 钙; 神经靶酯酶

中图分类号:R136.32 **文献标识码:**A

三邻甲苯基磷酸酯(tri-*o*-cresyl phosphate, TOCP)是一种有机磷酸酯类化合物,是磷酸三甲苯酯(TCP)中邻位、间位和对位三种同分异构体的一种,TOCP是这三种同分异构体中神经毒性最强的化合物^[1]。二十世纪工业发展时期,由于人们对有机磷类化合物的毒性认识不深,有机磷类化合物作为阻燃剂、润滑剂、增塑剂、杀虫剂等而被广泛应用于工业、军事、农业等各个领域,造成有机磷类化合物的严重污染,TOCP中毒事件在欧美各地爆发。上个世纪九十年代,中国因为食品被TOCP污染而发生多起中毒事件。上个世纪因为多起TOCP中毒事件而引起社会的广泛关注,随着人们对毒物认识的不断加深而被禁止使用。二十一世纪,经济快速发展之际,TOCP以另一种方式重新进入人们的视线中,飞机燃油排放物和润滑剂中含有TOCP污染机舱,引起乘客和乘务人员出现神经中毒症状——航空中毒症候群。TOCP进入机体经微粒体酶细胞色素P450作用生成代谢活化产物进一步产生毒性。TOCP最主要的毒性是神经毒性,其中以迟发性神经毒性(OPIDN)为主要特征,但其具体机制并未阐明。TOCP进入机体后主要分布于脑、脊髓和坐骨

神经,而其代谢产物主要分布在肝脏、肾脏和肺组织中^[2]。在早期,对鸡进行TOCP染毒,Itoh^[3]发现脑、脊髓、坐骨神经、肾脏、心、肺、脾脏、消化系统均出现病理学改变,肝脏出现轻微的充血;“JAKE”事件中,部分男性出现性功能损害^[4]。由此可见,TOCP具有多种毒性作用,近年来对TOCP各种毒性的研究及相关机制的探索也逐渐受到重视。本文就TOCP的各种毒性研究展开综述。

1 神经系统毒性

人体暴露于TOCP引起毒效应最先观察到的是神经系统症状,而TOCP的神经系统毒性分为急性毒性、慢性毒性、迟发型神经毒性。

1.1 急性毒性

TOCP的急性中毒比较少见,是一次性大剂量暴露TOCP数小时后由于TOCP的抗胆碱能作用而出现的胆碱样中毒症状如:肌肉高度紧张、反射亢进、阵挛、锥体束反射明显受损及永久性上体位运动神经综合征等^[4],症状在两天内消失。乙酰胆碱酯酶是一种包含调控结构域和催化结构域的丝氨酸酯酶,TOCP不可逆地共价结合催化结构域中的丝氨酸羟基从而抑制乙酰胆碱酯酶的水解活性;乙酰胆碱是存在突触小体中的一种神经递质,经刺激释放入突触间隙中并刺激突触后膜产生兴奋,而被TOCP磷酸化的乙酰胆碱酯酶无法及时水解乙酰胆碱,乙酰胆碱酯酶抑制率达到70%以上时,乙酰胆碱开始出现聚集,并持续性刺激突触后膜,从而出现

收稿日期:2013-09-10

基金项目:国家自然科学基金项目(81172712);湖南省自然科学基金项目(11JJ6078);湖南省教育厅优秀青年基金项目(09B087);南华大学博士启动基金项目(2010XQD19)。

作者简介:肖双,硕士研究生,研究方向:神经毒理学, E-mail: shuang9x@163.com. 通讯作者龙鼎新,博士、教授,硕士生导师,研究方向:神经毒理学, E-mail: dxlong99@163.com.

胆碱样急性毒性症状^[1]。

1.2 慢性毒性

航空中毒症候群属于低剂量暴露 TOCP 而引起的慢性毒性,同样以抗胆碱能症状为主。TOCP 经肝脏微粒体中的细胞色素 P450 氧化和催化血清白蛋白环化生成代谢产物 CDBP, CDBP 不可逆地抑制人体的丁酰胆碱酯酶和乙酰胆碱酯酶,丁酰胆碱酯酶同样属于丝氨酸水解酶家族,其机制与乙酰胆碱老化机制相同^[5]。

1.3 迟发性神经毒性

迟发性神经毒性(OPIDN)是人和特定种属暴露于 TOCP 后出现的最主要的神经系统症状。OPIDN 是机体摄入毒物后 1~3 周内出现的一系列神经症状,以远端轴突末端病变为主要特征的不可逆性退行性神经病变,主要症状是周围神经和脊髓束的上行支和下行支的远端部位出现功能丧失和共济失调。主要出现的组织病理学改变有:脊髓和坐骨神经的轴突肿胀、降解,髓磷脂呈片段降解,继发性脱髓鞘渐进性增加,呈 Wallerian 样变性,轴突远端病变较重,伴随胶质细胞增殖,坐骨神经中滑面内质网、空泡和管状物质增加,有髓神经元轴突中出现神经丝和神经微管的中度聚集等。然 TOCP 诱发 OPIDN 的具体机制并不清楚,成为研究 TOCP 的热点问题,不同的学说和新的机制也在不断的被探索与发现。

神经病靶酯酶(NTE)“老化”机制被公认为是有机磷迟发性神经毒性发生的前提条件。有机磷类物质是 NTE 的底物类似物,能磷酸化 NTE 上丝氨酸的羟基,磷酸化的 NTE 随着时间进程进一步发生老化,即使烷基或芳基迅速被去除形成带负电的亲核物质,致使 NTE 的活性不可逆^[6]。而 NTE 活性受到抑制只发生在暴露毒物后的 72 h 之内,之后 NTE 的活性逐渐恢复,而 OPIDN 产生症状一般是第 1~3 周, NTE 被抑制到症状出现这一过程中, NTE 起什么样的作用?

NTE 调控磷脂的代谢,对轴突的维持和神经细胞的生长起关键作用。TOCP 损伤轴突的物质获得被认为是轴突变性的重要原因,神经细胞需要依赖内质网和微导管的物质运输维持轴突的功能和生长, NTE 具有磷脂酶 B 和溶血磷脂酶活性, nte 基因敲除证明神经元内质网分泌功能受到损伤^[7],可见 TOCP 可能通过抑制 NTE 活性影响内质网的分泌功能导致轴突的变性。OPIDN 轴突变性出现的典型

的形态学改变是肿胀, nte 基因敲除小鼠的脊髓远端出现轴突的降解,随后肿胀,轴突内出现空泡、肿胀、小泡和细胞骨架蛋白聚集等神经变性样特征^[7]。同时也有实验表明, NTE 缺陷型神经细胞延迟神经元突起生长,且突起长度比对照组短^[8]。犹太人和欧洲人出现的一种遗传性痉挛性截瘫和 OPIDN 一样是属于肢体运动神经病,是由于 NTE 催化区发生突变而造成 NTE 失活^[9]。这些都证明 NTE 对神经元轴突生长和维持起重要作用, NTE 如何调节和维持神经细胞轴突的具体过程是 TOCP 产生 OPIDN 的一个关键机制。

细胞内钙紊乱和钙相关蛋白酶活性增强这一机制是研究 TOCP 产生 OPIDN 的另一重要假说。钙离子是细胞内的第二信使,参与各种信号途径。在早期的动物实验和细胞实验证明 TOCP 能够引起细胞内钙离子紊乱^[10-12],发现 L 型钙离子通道参与细胞内钙离子紊乱^[10]。且有实验证明 TOCP 作用细胞,引起细胞内一系列钙相关蛋白酶如钙中性蛋白酶(calpain)^[13]、钙依赖性蛋白激酶 II(CaMK II)^[14]、ERK1/2^[15]、CDK5 等^[16]酶的活性增加。钙激活的蛋白酶能磷酸化神经细胞中的神经丝、微管蛋白及相关蛋白等,如:CaMK II 磷酸化 MAP-2、 α/β 微管蛋白^[17,14],被激活的 Erk1 和 Erk2 磷酸化 NF-H 和 NF-M 末端的 KSP 序列^[15]。磷酸化的蛋白或聚集或进入蛋白降解系统降解,聚集的磷酸化蛋白从而呈现组织病理学上的微管与微丝的中度聚集,而近年发现 calpain 蛋白酶增多与骨架蛋白降解密切相关^[18,13]。且越来越多的研究证明 TOCP 诱导自噬溶酶体降解途径增强,自噬抑制轴突的生长与维持^[19]。自噬溶酶体途径是细胞中蛋白酶降解系统,细胞内钙离子变化及 calpain 活性变化诱导自噬, TOCP 诱导 OPIDN 出现轴突退行性变性与自噬密切相关。自噬和凋亡与钙密切相关^[20-21]。TOCP 诱导自噬成为新兴的机制,但凋亡也频频被报道,线粒体凋亡途径参与 TOCP 诱导 OPIDN 病变^[22]。

2 生殖毒性

TOCP 具有生殖毒性,早期 Somkuti^[23-24]对 TOCP 雄性动物的生殖毒性展开了研究,睾丸与附睾均出现不同程度的不可逆性损伤:精子活率降低,数目下降,睾丸中神经毒性酯酶和非特异性酯酶活性被抑制,组织切片显示生精上皮细胞出现空泡和

损伤。近年来动物实验发现随着 TOCP 剂量的增加,精子生成发生障碍:曲精细管组织结构出现紊乱,生精上皮细胞破坏和萎缩,生精细胞的数目减少等,基因沉默证明 NTE 受抑制降低生精干细胞的增殖^[25]。NTE 的活性在神经毒性中研究较多,神经细胞中 NTE 活性受抑制成为 OPIDN 的前提条件,同样睾丸中 NTE 活性受到抑制在 TOCP 的生殖毒性起关键作用^[25]。生精上皮细胞中支持细胞间的紧密连接构成血睾屏障,为精子发生提供特定的环境,生精上皮细胞出现空泡和损伤,可见 TOCP 损伤血睾屏障,破坏精子发生的特定环境,影响精子生成。

3 肝脏毒性

肝脏是人体的代谢器官,同时也是含各种活性酶最多的器官,绝大部分外源物质都要经过肝脏的代谢排出体外,肝脏对外源化学物的解毒作用至关重要。TOCP 经吸收进入肝脏生成代谢产物,经粪和尿液排出体外,TOCP 诱发 OPIDN 动物模型中,Baron^[26] 研究中肝脏出现轻微的脂肪浸润,Itoh^[3] 发现肝脏出现轻微充血,且发现肝脏中各种酶出现升高或降低,反映 TOCP 能够损伤肝脏并引起肝细胞功能异常。

4 免疫毒性及其他

TOCP 是脂溶性物质,能经皮肤吸收进入机体产生过敏反应,从事含有 TCP 增塑剂行业的工人,皮肤出现过敏反应^[27]。早期也有研究报道 TOCP 能对免疫系统造成损伤^[28-29]。TOCP 及其代谢产物分别于各种组织器官中,Itoh 发现肾脏、心、肺、脾脏、消化系统同样出现病理学改变^[3],尽管相关方面的研究并未得到报道,但随着 OPIDN 研究的进行,TOCP 的毒性作用必将会被不断的揭露。

5 展 望

TOCP 在上个世纪被广泛应用于工业和农业,但由于对其毒性的不断了解而被禁用;二十一世纪,经济飞速发展的时代,航空事业不断壮大,航空中毒症候群再次将 TOCP 拉上社会的焦点。对 TOCP 毒性的全面了解既是非常重要的问题同时也是亟待解决的问题。

目前针对 TOCP 毒物以预防为主,限制 TOCP 的含量或禁止使用。一旦中毒,没有有效的药物治疗,只能根据临床症状采取相应的临床措施。随着 TOCP 对 OPIDN 机制研究的不断深入,L-型钙通道阻断剂如:维拉帕米和尼莫地平能减缓 TOCP 引起的临床症状,NTE 活性抑制剂 PMSF 同样可作为潜在的药物治疗 TOCP 中毒。TOCP 毒性作用主要体现在神经系统、肝脏、睾丸和免疫系统,各系统与器官损伤程度不一,最先出现的临床症状在神经系统,同时也以神经系统症状最明显最严重。目前以神经系统和睾丸为主要研究靶器官,TOCP 诱发 OPIDN 不同机制的提出促进 TOCP 毒性作用的深入研究,为其他毒物的迟发型神经毒性或神经退行性病变等提供参考依据,不同器官系统毒性的研究有利于更进一步了解 TOCP 毒性,为 TOCP 毒性新机制的发现提供更有力证据,同时 TOCP 毒性具体机制的进一步阐明,促进相应药物的开发。对 TOCP 多毒性作用的全面了解,有利于临床治疗过程中对中毒者病情的全面把握及为患者的治疗提供参考价值,同时对其他有机磷毒物研究有重要借鉴意义。

参考文献:

- [1] Hargreaves AJ. Neurodegenerations induced by organophosphorous compounds[J]. *Adv Exp Med Biol*,2012,724:189-204.
- [2] Nomeir AA,Abou-Donia MB. Disposition of [¹⁴C]tri-o-cresyl phosphate and its metabolites in various tissues of the male cat following a single dermal application[J]. *Drug Metab Dispos*,1984,12(6):705-711.
- [3] Itoh H,Tadokoro M,Oikawa K. Studies on the delayed neurotoxicity of organophosphorus compounds-(I)[J]. *J Toxicol Sci*,1981,6(4):287-300.
- [4] Morgan JP,Penovich P. Jamaica ginger paralysis. Forty-seven-year follow-up[J]. *Arch Neurol*,1978,35(8):530-532.
- [5] Carletti E,Schopfer LM,Colletier JP,et al. Reaction of cresyl saligenin phosphate, the organophosphorus agent implicated in aerotoxic syndrome, with human cholinesterases: mechanistic studies employing kinetics, mass spectrometry, and X-ray structure analysis[J]. *Chem Res Toxicol*,2011,24(6):797-808.
- [6] Glynn P. Neuropathy target esterase[J]. *Biochem J*,1999,344:625-631.
- [7] 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.

- [8] Li Z, Szurek PF, Jiang C, et al. Neuronal differentiation of NTE-deficient embryonic stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(4): 1103-1109.
- [9] 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.
- [10] Wu YJ, Li M, Li YX, et al. Verapamil abolished the enhancement of protein phosphorylation of brainstem mitochondria and synaptosomes from the hens dosed with tri-o-cresyl phosphate[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2007, 24(1): 67-71.
- [11] Piao F, Yamauchi T, Ma N. The effect of Calcicicol as calcium tonic on delayed neurotoxicity induced by organophosphorus compounds[J]. *Toxicology Letters*, 2003, 143(1): 65-71.
- [12] Emerick GL, Peccinini RG, de Oliveira GH. Organophosphorus-induced delayed neuropathy: a simple and efficient therapeutic strategy [J]. *Toxicol Lett*, 2010, 192(2): 238-244.
- [13] Song F, Han X, Zeng T, et al. Changes in beclin-1 and micro-calpain expression in tri-ortho-cresyl phosphate-induced delayed neuropathy [J]. *Toxicology Letters*, 2012, 210(3): 276-284.
- [14] Suwita E, Lapadula DM, Abou-Donia MB. Calcium and calmodulin-enhanced in vitro phosphorylation of hen brain cold-stable microtubules and spinal cord neurofilament triplet proteins after a single oral dose of tri-o-cresyl phosphate[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83(16): 6174-6178.
- [15] Li BS, Veeranna, Grant P, et al. Calcium influx and membrane depolarization induce phosphorylation of neurofilament (NF-M) KSP repeats in PC12 cells[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, 70(1): 84-91.
- [16] Wang YP, Mou DL, Song JF, et al. Aberrant activation of CDK5 is involved in the pathogenesis of OPIDN [J]. *J Neurochem*, 2006, 99(1): 186-197.
- [17] Abou-Donia MB. The cytoskeleton as a target for organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity (OPIDN) [J]. *Chem Biol Interact*, 1993, 87(1-3): 383-393.
- [18] Song F, Yan Y, Zhao X, et al. Neurofilaments degradation as an early molecular event in tri-ortho-cresyl phosphate (TOCP) induced delayed neuropathy [J]. *Toxicology*, 2009, 258(2-3): 94-100.
- [19] Chen JX, Sun YJ, Wang P, et al. Induction of autophagy by TOCP in differentiated human neuroblastoma cells lead to degradation of cytoskeletal components and inhibition of neurite outgrowth[J]. *Toxicology*, 2013, 310: 92-97.
- [20] 陆薇薇, 齐永芬. 内质网应激和血管损伤性疾病[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(10): 939-944.
- [21] 李莹, 张泉, 三曾智. 氧化型高密度脂蛋白对细胞凋亡及细胞内钙离子浓度的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13(2): 186-188.
- [22] Zou C, Kou R, Gao Y, et al. Activation of mitochondria-mediated apoptotic pathway in tri-ortho-cresyl phosphate-induced delayed neuropathy[J]. *Neurochem Int*, 2013, 62(7): 965-972.
- [23] Somkuti SG, Lapadula DM, Chapin RE, et al. Testicular toxicity following oral administration of tri-o-cresyl phosphate (TOCP) in roosters [J]. *Toxicol Lett*, 1987, 37(3): 279-290.
- [24] Somkuti SG, Lapadula DM, Chapin RE, et al. Time course of the tri-o-cresyl phosphate-induced testicular lesion in F-344 rats: enzymatic, hormonal, and sperm parameter studies[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1987, 89(1): 64-72.
- [25] Chen JX, Xu LL, Mei JH, et al. Involvement of neuropathy target esterase in tri-ortho-cresyl phosphate-induced testicular spermatogenesis failure and growth inhibition of spermatogonial stem cells in mice[J]. *Toxicology Letters*, 2012, 211(1): 54-61.
- [26] Baron RL, Bennett DR, Casida JE. Neurotoxic syndrome produced in chickens by a cyclic phosphate metabolite of tri-o-cresyl phosphate--a clinical and pathological study [J]. *Br J Pharmacol Chemother*, 1962, 18: 465-474.
- [27] Norris P, Storrs FJ. Allergic contact dermatitis to adhesive bandages[J]. *Dermatol Clin*, 1990, 8(1): 147-152.
- [28] Foil LD, Chambers HW, Stinson RS, et al. Immunological aspects of tri-o-tolyl phosphate-induced delayed neurotoxicity in chickens [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1980, 56(2): 259-264.
- [29] Brinkerhoff CR, Sharma RP, Bourcier DR. The effects of tri-o-tolyl phosphate (TOTP) on the immune system of mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1981, 5(3): 368-376.

(此文编辑: 蒋湘莲)