

# 三邻甲苯基磷酸酯的神经毒性研究进展

江 岚<sup>1,2</sup>, 龙鼎新<sup>2</sup>

(1. 湖南环境生物职业技术学院, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学公共卫生学院)

**摘 要:** 三邻甲苯基磷酸酯(TOCP)是众多有机磷酸酯类化合物代表之一,有多器官毒性作用主要表现在对动物生殖毒性、免疫毒性和神经毒性。本文主要综述了 TOCP 分子理化特性、TOCP 神经毒性作用的研究,并从骨架蛋白含量改变、氧化应激、细胞凋亡与细胞自噬等方面对 TOCP 神经毒性作用机制进行了综述。

**关键词:** 三邻甲苯基磷酸酯(TOCP); 神经毒性; 有机磷酸酯类化合物诱发的迟发性神经毒性(OPIDN)

**中图分类号:**R136.32 **文献标识码:**A

## 1 TOCP 分子理化特性与用途

三邻甲苯基磷酸酯(tri-ortho-cresyl phosphate, TOCP)属于三甲苯磷酸酯的邻、对及间位3种异构体中的一种,三邻甲苯基磷酸酯的分子式为 $C_{21}H_{21}O_4P$ ,分子量为368.36。分子结构数据如下:摩尔折射率为102.14,摩尔体积为 $306.6 \text{ m}^3/\text{mol}$ ,等张比容(90.2 K)为793.2,表面张力为 $44.7 \text{ dyne/cm}$ ,极化率( $10 \sim 24 \text{ cm}^3$ )为40.49。其分子结构如下(图1)。

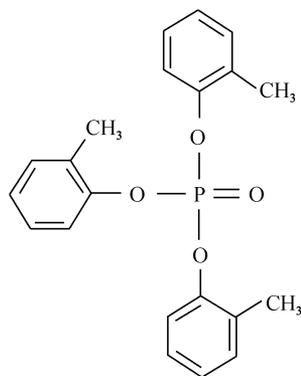


图1 三邻甲苯基磷酸酯结构式

常温下,TOCP 是无味、微黄透明的液体。不溶于水,能溶于醇、醚、苯等有机溶剂。由于具有化学与热稳定性,可用作增塑剂,阻燃剂、软化剂使用,常

用于塑料、橡胶、涂料及合成纤维等工业,也可作为机油添加剂与汽油中铅的净化剂等<sup>[1-2]</sup>。因此,TOCP 在工业上及日常生活中 TOCP 用途极为广泛。

## 2 TOCP 的神经毒性作用

关于 TOCP 的神经毒性,目前有三种不同的毒性结局:(1)抑制胆碱酯酶而诱发急性中毒;(2)短期或长期多次接触 TOCP 可以引起神经退行性综合症;(3)一次或多次接触 TOCP 引起的迟发性神经毒性(organophosphoms ester-induced delayed neurotoxicity,简称 OPIDN)<sup>[2]</sup>。迟发性神经毒性是 TOCP 的神经毒性中最为常见的症状。早在 20 世纪 30 年代,美国有上万人因饮用污染了 TOCP 的牙买加姜汁酒发生瘫痪;随后南非和摩洛哥、斯里兰卡和印度等其他国家也出现因食用 TOCP 污染食用油而导致人群瘫痪的中毒事件<sup>[3]</sup>。我国自 20 世纪 90 年代初以来,在北京、西安和深圳等地也相继发生多起因食用污染 TOCP 面粉和食用油而导致同类事件<sup>[4]</sup>。由于 TOCP 能诱发迟发性神经毒素,造成以肢体远端运动障碍功能为主的周围神经脱髓鞘病变。该病可持续数十年,严重者能导致终生残疾,危害十分严重,人们对其的重视度逐渐提高。

## 3 TOCP 神经毒性作用机制

**3.1 骨架蛋白含量改变** TOCP 处理后鸡大脑组织中神经丝含量变化比微管与微丝蛋白大,该变化

收稿日期:2016-09-17;修回日期:2017-07-28

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)。

\* 通讯作者,E-mail:dxlong99@163.com.

可能与 OPIDN 有关。研究表明, TOCP 处理之后, 鸡的脊髓神经细胞膜上的 $[^3\text{H}]$ DFP (diisopropyl-fluorophosphate) 结合量降低<sup>[5]</sup>, 而各段脊髓神经细胞膜之间 $[^3\text{H}]$ DFP 的结合量变化不大。推测 TOCP 先结合脊髓神经细胞膜上的特异性蛋白, 由于特异性蛋白和 $[^3\text{H}]$ DFP 之间存在竞争, 使 $[^3\text{H}]$ DFP 的结合受到抑制。随着 TOCP 处理后时间的增加, 结合受体代谢了 TOCP, 从而结合受体的量变小, 使 $[^3\text{H}]$ DFP 结合到空余的受体上, 使 $[^3\text{H}]$ DFP 的结合量升高。TOCP 和 DFP 都具有迟发性神经毒性, 因此, 脊髓神经细胞膜上的特异性位置可能与 OPIDN 相关。还发现, TOCP 能致受试成年鸡细胞周期蛋白依赖性激酶 5 (cyclin-dependent kinase5, CDK5) 异常磷酸化增强<sup>[6]</sup>。已知 CDK5 异常激活及其磷酸化与神经退行性疾病的发生密切相关, CDK5 与其它一些激酶一起共同对多种细胞骨架蛋白磷酸化, 在神经轴突生长过程中调节骨架蛋白之间的相互作用<sup>[7-8]</sup>, TOCP 处理的实验鸡的中枢及外周神经轴突中确实有磷酸化骨架蛋白的异常聚集。细胞骨架蛋白磷酸化增强导致细胞骨架成分的降解, 既而引起顺行性轴浆运输加速, 最终导致降解后的细胞骨架成分在轴突末梢部位的聚集<sup>[9]</sup>。TOCP 处理成年鸡产生 OPIDN, 脊髓组织中 NFs 含量紊乱, 预先用 PMSF 处理可阻断 OPIDN, 并可显著抑制脊髓 NFs 含量的紊乱<sup>[10]</sup>。

研究发现 TOCP 中毒可改变鸡神经组织中的微管相关蛋白 2 (microtubulin-associated protein 2, MAP-2) 含量, 可能与其迟发性神经毒性相关。MAP-2 是成熟神经元树突的主要标志之一, 已知微管是神经元细胞骨架的主要成分, 在神经元正常结构和功能的维持中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。TOCP 处理是否直接损伤培养鸡少突胶质细胞, TOCP 对少突胶质细胞有直接作用, 能使其突起变性损伤, 胞体出现空泡样变; 推测少突胶质细胞损伤可能和 OPIDN 发病机制有关<sup>[12]</sup>。

**3.2 氧化应激** 研究表明, 有机磷化合物能诱导机体氧化应激, 生成活性氧, 发生抗氧化反应<sup>[13-14]</sup>。TOCP 作为一种有机磷酸酯类化合物, 也能造成成年鸡神经组织出现脂质过氧化导致氧化应激。抗氧化系统失衡、脂质过氧化可能为 TOCP 引起 OPIDN 的一个重要机制。TOCP 引起母鸡 OPIDN 中抗氧化系统和凋亡相关蛋白改变, 随时间推移 TOCP 使母鸡神经组织与血清的脂质过氧化物增加, 损伤其抗

氧化防御系统; TOCP 对坐骨神经影响较早、较敏感, 坐骨神经脂质过氧化增强和抗氧化能力降低与其传导功能降低显著相关。随着时间的推移, 成年鸡中枢神经组织中大脑与脊髓中 Cyt-c 蛋白的表达增加。体外实验证明, TOCP 对人成神经瘤细胞 SH-SY5Y 存在着氧化损伤, 氧化应激产生的活性氧可以引起蛋白质的氧化损伤和错误折叠, 导致细胞内蛋白结构的变化。为了防止过氧化修饰蛋白以及其它受损蛋白在细胞内集聚而产生细胞毒性, 细胞会启动其保护机制—增加或加速异常蛋白的水解。研究表明, 蛋白酶解系统在细胞对毒物或环境应激的应答等方面具有重要作用<sup>[15]</sup>。研究表明高浓度 TOCP 能显著增加泛素化蛋白的集聚, 并呈现较明显的剂量效应关系。提示较高浓度的 TOCP 可致泛素蛋白酶体途径的阻断或抑制。

**3.3 细胞凋亡与细胞自噬** 有研究表明, TOCP 诱发成年母鸡迟发性神经毒性过程中出现腰髓前角神经元细胞凋亡的现象, 而且神经元凋亡发生在迟发性神经毒性症状出现之前, 提示细胞凋亡可能在迟发性神经病发病机制中起重要作用<sup>[16]</sup>。Mou DL 等<sup>[17]</sup>发现 TOCP 诱发的 OPIDN 中母鸡的脊髓神经元的损伤, 电镜观察染毒第 5 天出现神经元的凋亡, 均提示凋亡可能涉及 OPIDN 的发展。一些体外实验发现, TOCP 可明显影响 SH-SY5Y 细胞的存活, 并且具有浓度及时间效应关系, 显示 TOCP 能导致细胞死亡, 但经流式细胞仪检测, TOCP 处理的 SH-SY5Y 细胞在其细胞周期直方图上并未出现典型的亚二倍体凋亡峰, 另外, 凋亡促进基因 P53 在 mRNA 水平和蛋白水平均未见表达增强<sup>[18]</sup>。以上结果提示 TOCP 诱导的细胞死亡并非凋亡, 有可能是程序性细胞死亡的另一形式—自噬性细胞死亡。

自噬 (autophagy) 是近年来新发现的程序性细胞死亡方式, 称为 II 型程序性细胞死亡。自噬与人类多种神经退行性疾病有关, 如在帕金森病、阿尔茨海默病和亨廷顿病等神经退行性疾病中可发现自噬体的积聚<sup>[19]</sup>。维持生理水平的自噬对神经细胞的健康和功能的发挥至关重要; 而自噬的紊乱 (自噬缺失或过度) 则可导致神经突起的退行性病变及神经细胞死亡。本文作者发现 TOCP 可导致 SH-SY5Y 细胞自噬性死亡, 并且 TOCP 处理浓度与自噬发生呈正相关, TOCP 导致骨架蛋白的降解方式包括自噬。在 TOCP 诱发成年鸡的 OPIDN 中, 脊髓、坐骨神经的自噬相关蛋白 LC3 的表达呈时间效应

关系,随着染毒时间的延长,OPIDN 症状越明显,蛋白表达增多,说明自噬与 OP 导致的 OPIDN 存在密切的联系。TOCP 染毒造成成年鸡脊髓和胫神经里面的 beclin-1 含量明显降低,但是 u-calpain 含量增加显著。经过 PMSF 预处理在将 TOCP 造成的 OPIDN 的同时,可以显著抑制 TOCP 引起的 beclin 降低和 u-calpain 含量的升高,推断 TOCP 是神经元中的自噬调节机制<sup>[20]</sup>。

## 4 展 望

随着科学技术的高速发展,TOCP 方面的研究也逐渐从形态表现、生理生化性状向分子生物学发展,其神经毒性机制也日益深化。而关于其解毒机制方面的研究却少见报道,相信这方面会成为将来的研究热点。TOCP 神经毒性研究属于一项综合性的系统课题,涉及医药学、病理学、毒理学、动物学、分子生物学等诸多学科,需要多学科的专家进行整合研究,因此,多学科的交叉融合或许是将来的一个研究方向。

### 参考文献:

- [1] Craig PH, Barth ML. Evaluation of the hazards of industrial exposure to tricresyl phosphate; a review and interpretation of the literature [J]. *J Toxicol*, 1999, 2 (11) :281-300.
- [2] Winder C, Balouet JC. The toxicity of commercial jet oils [J]. *Environ Res*, 2002, 89(2) :146-164.
- [3] Nanda, Tapaswi PK. Biochemical, neuropathological and behavioral studies in hens induced by acute exposure of tri-ortho-cresyl phosphate [J]. *Int J Neurosci*, 1995, 82 (3-4) :243-254.
- [4] 王秀芹,谭琳,陈匙生,等.亚急性磷酸三邻甲苯酯中毒 10 例临床分析[J].*中国职业医学*, 2003,30(3) :68-69.
- [5] Guhekin F. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro)[J]. *Arch Toxicol*, 2014, 74:533.
- [6] Wang YP, Mou DL, Song JF, et al. Aberrant activation of CDK5 is involved in the pathogenesis of OPIND[J]. *Neurochem*, 2006, 99(1) :186-197.
- [7] Smith DS, Tsai LH. Cdk5 Behind the wheel: a role in trafficking and transport [J]. *Trends Cell Biol*, 2002, 12, 28-36.
- [8] Cruz JC, Tseng HC, Goldman JA, et al. Aberrant CDK5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neuro brillary tangles [J]. *Neuron*, 2003, 40, 471-483.
- [9] Abou-Donia MB, Lapadula DM. Mechanisms of organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity [J]. *Toxicol*, 1990, 40:405-440.
- [10] Gupta R C. Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor-induced status epilepticus; protection by antioxidants [J]. *Neurotoxicology*, 2016, 22:271-282.
- [11] 韩晓英,程东,赵秀兰,等. TOCP 诱发 OPIDN 后鸡神经组织 MAP-2 的变化 [J]. *毒理学杂志*, 2005, 19(1) :23-25.
- [12] 吴守芝,曹荣,宋俊峰. 磷酸三邻甲苯酯诱导少突胶质细胞空泡样变及突起变性损伤 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2007, 11(5) :267-270.
- [13] Hou WY, Lng DX, Wu YJ. The homeostasis of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in nervous tissues of mice was not disrupted after administration of tri-ortho-cresyl phosphate [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 109 (2) :276-285.
- [14] 龙鼎新,伍一军,蒋伟. TOCP 对人成神经瘤细胞 SH-SY5Y 的氧化损伤作用 [J]. *中南医学科学杂志*, 2011, 39(3) :266-269.
- [15] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system [J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67:425-479.
- [16] 宋福永,寇蕊蕊,韩晓英,等. 三邻甲苯磷酸酯诱导的母鸡神经组织中 beclin 和 u-calpain 的变化 [J]. *中国科技论文在线*, 2012, 1-6.
- [17] 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-ortho-cresyl phosphate [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2007, 24(1) :67-71.
- [18] Long DX, Wu YJ. Growth inhibition and induction of G (1) phase cell cycle arrest in neuroblastoma SH-SY5Y cell by tri-ortho-cresyl phosphate [J]. *Toxicol. Lett*, 2008, 181(1) :47-52.
- [19] Liu Z, Lenardo MJ. Reactive oxygen species regulate autophagy through redox-sensitive proteases [J]. *Dev Cell*, 2015, 12(4) :484-485.
- [20] Damodaran TV, Abdel-Rahman A, Elsourady MH, et al. Differential alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA in the central nervous system of hens treated with diisopropylphosphorofluoridate (DFP) [J]. *Neurochem Int*, 2015, 40(4) :371-379.

(本文编辑:蒋湘莲)