

- [6] Schwartz B S, Lee B K, Lee G S, et al. Associations of blood lead, dimercaptosuccinic acid, chelatable lead and tibial lead with polymorphisms in the vitamin D receptor and δ -amino levulinic acid dehydratase genes [J]. *Environ Health Perspect* 2000; 108 (10): 949-954.
- [7] 苏素花, 江世强. 铅的生物标志物研究进展 [J]. *广西预防医学*, 2004; 10 (1): 54-56.
- [8] Silbergeld E K. Mechanisms of lead neurotoxicity or looking beyond the lamp post [J]. *FASEB J* 1992; 6 (13): 3201-3206.
- [9] Goldstein G W. Evidence that lead acts as a calcium substitute in second messenger metabolism [J]. *Neurotoxicology* 1993; Summer Fall; 14 (2-3): 97-101.
- [10] Ustula C B, Mark A P. A review of chronic lead intoxication: an unrecognized cause of chronic kidney disease [J]. *Am J Med Sci* 2004; 327 (6): 341-347.
- [11] Legman-Adham M. Renal effects of environmental and occupational lead exposure [J]. *Environ Health Perspect* 1997; 105 (9): 928-939.
- [12] Kim R, Romitsky A, Sparrow D, et al. A longitudinal study of low-level lead exposure and impairment of renal function [J]. *JAMA* 1996; 275 (15): 1177-1181.
- [13] Alison L J. Adverse drug reactions to poison antidotes: Part 2 [J]. *Adverse Drug Reaction Bulletin* 2004; 229: 1-4.
- [14] 王世俊. 铅中毒的解毒疗法 [J]. *中国医刊*, 2000; 35 (7): 18-20.
- [15] Bonde J P, Joffe M, Apostoli P, et al. Sperm count and chromatin structure in men exposed to inorganic lead: lowest adverse effect levels [J]. *Occup Environ Med* 2002; 59 (4): 234-242.
- [16] Apostoli P, Kiss P, Pomu S, et al. Male reproductive toxicity of lead in animals and humans [J]. *Occup Environ Med* 1998; 55 (6): 364-374.
- [17] 胡青帆, 李翎. 铅中毒检测指标的临床应用及相关性分析 [J]. *化工劳动保护*, 2001; 22 (2): 55-57.
- [18] Besunder J B, Super D M, Anderson R L. Comparison of dimercaptosuccinic acid and calcium disodium ethylenediaminetetraacetic acid versus dimercaptopropionol and ethylenediaminetetraacetic acid in children with lead poisoning [J]. *J Pediatr* 1997; 130 (6): 966-971.
- [19] Flora S J, Bhattacharya R, Vijayaraghavan R. Combined therapeutic potential of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid and calcium disodium edetate on the mobilization and distribution of lead in experimental lead intoxication in rats [J]. *Fundam Appl Toxicol* 1995; 25 (2): 233-240.
- [20] Tandon S K, Singh S, Prasad S, et al. Mobilization of lead by calcium versenate and dimercaptosuccinate in the rat [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998; 25 (9): 686-692.
- [21] 周锦英, 段志, 邓俊向, 等. 不同剂量依地酸钠钙治疗慢性铅中毒临床观察 [J]. *职业卫生与应急救援*, 2002; 20 (3): 159-160.

神经靶酯酶与迟发神经病变机制关系的研究

李秀菊, 闫永建*

(山东省职业卫生与职业病防治研究院, 山东 济南 250002)

有机磷农药可致迟发性神经病 (organophosphate induced delayed neuropathy, OPIDN)。OPIDN的主要特征是有机磷中毒后, 经过 2~60 d 的潜伏期发病, 症状表现为感觉障碍、运动失调、下肢麻痹甚至瘫痪。组织病理学可见脊髓和外周神经的轴突脱髓鞘变性。OPIDN 的早期报道, 源于 1930 年的“姜汁麻痹”事件, 南美上万人饮用混有三甲基苯基磷酸酯的姜汁, 数日后出现了上述症状。后来欧洲、印度等地又出现了多种有机磷杀虫剂如敌敌畏、马拉硫磷、对硫磷诱发迟发神经毒性的报道。Johnson 等人在 60 年代首先提出了迟发性神经毒性与分布在神经组织的神经靶酯酶 (neuropathy target esterase, NTE) 的活性受到抑制和老化有关。近年来, 人们开始从细胞分子生物学水平研究靶酯酶的结构、生理特性与迟发性神经病的关系, 本文就有关研究进展作一介绍。

1 神经靶酯酶 (NTE) 结构及生理功能

人 NTE 为一单链蛋白质, 聚集在内质网胞质面^[1], 从 cDNA 序列推测是一由 1327 个氨基酸组成的单链蛋白质, 分子质量约为 146 kD。其 N 端为调控区, C 端为酯酶活性催化

区, 内含有 727~1216 氨基酸序列组成的 NTE 酯酶域 (NTE esterase domain, NESD)。它是疏水多肽的重组体, 有酯酶的活性, 能与有机磷和体内某些信号分子特异性结合, 通过调节细胞内磷脂酰胆碱的变化介导一条特殊的信号通路, 催化磷脂酰胆碱脱酰基, 生成甘油磷酰胆碱和脂肪酸^[2]。NTE 磷脂复合物的消化作用表明, NESD 新生成时可能随机包含在局部的脂质体腔或外部介质中, 大量的 NESD 在稀酸或稀碱条件下从 NESD 复合物中释放出来, 催化水解几种膜脂质, 机制类似于蛋白激酶 A 亚单位的调节。因此, 推测 NTE 实质上是一种具有催化活性的磷脂酶, 在调节细胞膜的形成和细胞周期等方面发挥重要作用^[3]。

神经靶酯酶对胚胎中枢神经系统的发育和血管形成起重要作用; 同时, 对于有丝分裂后细胞如胎盘次级细胞的存活也是必须的。动物试验表明, 去除小鼠的 NTE 基因, 海马、丘脑、小脑出现神经病理学改变^[4], 表现为网状系统的异常聚集、内质网分裂崩解、胞体内有液化空泡形成。精卵结合后在原肠胚形成时因血管细胞异常堆积供血障碍可致胚胎死亡。人胎儿脑内 cDNA 文库对与 NTE 作用的蛋白质不易监测, 但 COS 细胞免疫沉淀分析证实, 酵母菌中 Φ_2 及其类似亚单位能连到 NTE 的 C 羧基末端, 去除 Φ_2 , 降低 NTE 的活性, 但不影响其表达。NTE 的活性下调, 可由 G 蛋白信号传

收稿日期: 2007-06-18 修回日期: 2007-10-08

基金项目: 山东省科技攻关计划 (编号: 2005GG03151)

*. 通讯作者, E-mail: yy182003@163.com

导通路影响因素、百日咳毒素等引起, 这些发现表明 P_2 在维持 NIE活性中起重要作用^[5]。

2 NIE与 OPDN

磷脂酰胆碱是真核细胞主要的磷脂, 起稳定膜稳态的作用。有机磷化合物进入体内与 NIE的活性丝氨酸部分共价结合, 催化磷脂酰胆碱脱酰基, 磷脂酰胆碱代谢异常, 该酶失去原有的生理作用, 破坏了膜磷脂稳态内环境和内质网的功能, 包括轴浆的运输和神经胶质轴突的代谢交换, 以致轴突远端支持功能降低, 神经细胞易于受损凋亡, 神经系统出现渐进性的蜕化变性, 从而在有机磷中毒 2~3 周后表现出迟发性神经毒作用的一些临床症状^[6]。动物试验表明果蝇的神经元和神经胶质细胞膜稳定均依赖瑞士硬干酪蛋白 (SWS) 复合体的适量表达, SWS催化作用过表达会引起细胞膜内结构异常和细胞凋亡^[7], 因为果蝇 SWS与人 NIE有 39% 的同源系列, 推测人 NIE在体内也发挥类似作用。

OP通过磷酸化 NIE的丝氨酸羟基而抑制 NIE活性, 在以成年鸡为实验动物的研究中发现, NIE活性被抑制 70% 以上才会发生 OPDN。最近研究表明, 不同的有机磷酸酯对其老化的机制不一样, 且受 pH 值的调节, 在酸性条件或碱性条件下发生老化, 但至少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 Asp^{204} 和 Asp^{206} 可能是侧链基团转移的结合位点^[8]。Johnson 提出 NIE活性被抑制 (磷酸化) 后, 结合在 NIE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 NIE带上负电荷, 同时脱离的侧链基团结合到 NIE活性位点附近的氨基酸 (通称 Z 位点) 上。这里所说的“老化”是与酶学研究中的“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。

如果在用 OP 处理动物之前, 给予某些酯酶抑制剂, 如硫代氨基甲酸酯等就可以避免 OPDN 的发生, 这称之为 OPDN 的“保护”作用, 作用机理可能是“抢先占领”学说, 即酯酶抑制剂抢先占领有机磷与 NIE的作用位点, 避免了 NIE后续的老化过程, 保护 NIE不受伤害^[9]。相反, 如果先给予能使 NIE抑制和老化的神经毒剂, 再给予一定剂量的强化剂, 便能促进 OPDN 的发生, 且增加其严重程度。强化剂并不影响由 NIE抑制所引发的病变过程, 作用位点可能不是 NIE但可以抑制 NIE的活性, 因此强化剂的作用靶标酶很可能是具有与 NIE相似性质的酶, 其发生机制不同于神经毒剂单独诱发的神经轴突病的机制, 某些与 NIE不同的酯酶可能在其中起重要作用。进一步研究这些酶的结构、性质与功能, 将有助于阐明 OPDN 强化机理。

3 NIE的研究技术

3.1 动物模型

早期的研究工作表明, 多种试验动物都对 OPDN 敏感, 但哺乳动物所表现的症状和组织学损伤变异较大, 在母鸡和猫观察到的效果与人很相似^[10], 由于鸡有易饲养、敏感性好、便宜等优点, 所以一直是研究 OPDN 最常用的动物模型。

3.2 RNA 干扰 (RNA Interference, RNAi) 技术

即利用真核细胞表达载体, 对其结构加以改造, 构建在真核细胞中表达 NIE 双链 RNA 的稳定表达载体, 该载体能特异性的抑制外源性和内源性 NIE 的表达, 引发同源 RNA 的沉默, 从而为研究 NIE 的生物学功能开辟了一条新的道路^[11]。

3.3 培养细胞

除动物模型外, 培养细胞由于具有简便、快速、经济等特点, 因而以培养细胞为模型模拟体内试验开展 OPDN 研究, 从细胞角度研究 OPDN 的发生机制, 紧紧围绕 OPs 对细胞 NIE 的影响和对细胞轴突的作用展开, 便成为探索 OPDN 发生机制的另一可行的途径^[12]。

应用细胞培养系统作为 OPDN 的预测试验开始于 70 年代中期, 80 年代少有报道。到了 90 年代, 由于研究的不断深入, 使得培养细胞成为体外预测 OPs 是否引起迟发性神经毒性的有效模型。Henschler 等用大鼠脑神经胶质瘤细胞 C-6 和小鼠脑成神经瘤细胞 N-18 进行研究, 结果与体内试验检测 OPs 是否具有神经毒性结果相一致^[13], 如 NIE 的磷酸化和老化, 抑制诱导分化过程中轴突的生长和延伸, 抑制轴突神经丝重链 (NF-H) 的表达, 降低细胞微管 α 亚单位的表达水平, 诱导起保护作用的热休克蛋白的表达等。牛、猪的嗜铬细胞的动态活性与组织匀浆中的特性一致, 经原代培养有很好的生存力和稳定性, 国外学者认为最适于神经毒性机制的研究^[14]。但该方法也存在不足, 由于机体和细胞对药物的代谢差异, 信号传导的整体与局部差异, 因此, 体外实验为体内试验提供借鉴参考, 结果必须经过体内试验验证。

4 结语

有机磷农药中毒后遗留的 OPDN 是一种少见的神经毒性症状, 分子生物学和各项技术的发展为进一步研究 NIE 生理结构、功能奠定了基础, 有助于对这类神经毒剂本质的理解^[15], 从而为临床预防和治疗提供科学依据。

参考文献:

- [1] 赵秀兰, 韩晓英, 于丽华, 等. 甲胺磷诱发母鸡迟发性神经毒性模型研究 [J]. 山东大学学报, 2004, 42 (4): 398-400
- [2] Atkins J, Luthjens L H, Ham M L, et al. Monomers of the catalytic domain of human neuropathy target esterase are active in the presence of phospholipid [J]. Biochem, 2002, 361 (1): 119-123
- [3] Akassoglou K, Malesier B, Tessarollo L. Brain specific deletion of neuropathy target esterase swiss cheese results in neurodegeneration [J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101 (14): 5075-5080
- [4] Quistad G B, Barlov C, Winrow C J, et al. Evidence that mouse brain neuropathy target esterase is a phospholipase [J]. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100 (13): 7983-7987
- [5] Zaccaro Q, Dinsdale D, Meacock P A, et al. Neuropathy target esterase and its yeast homologue degrade phosphatidylcholine to glycerol phosphocholine in living cells [J]. Biochem, 2004, 279 (23): 24024-24033
- [6] Kropp T J, Richardson R J. Aging of mipafox inhibited human acetylcholinesterase proceeds by displacement of both isopropylamine groups to yield a phosphate adduct [J]. Chem Res Toxicol, 2006, 19 (2): 334-339
- [7] Glynn P. A mechanism for organophosphate induced delayed neuropathy

thy [J]. Toxicol Lett 2006 162 (1): 94-97

[8] Moretto A, Niccolli A, Lotti M. Peripheral nerve esterases and the promotion of organophosphate-induced neuropathy in hens [J]. Chem Biol Interact 2005 15: 157-158

[9] 常平安, 伍一军. 有机磷酸酯诱发的迟发性神经靶标酯酶的老化机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2005 19 (6): 462-465

[10] Romero D, Quesada E, Sgorb M A, et al. Comparison of cholinergic cells from several animal sources for their use as an in vitro model to study the mechanism of organophosphorous toxicity [J]. Toxicol Lett 2006 165 (3): 221-229

[11] 常平安, 陈瑞, 李薇, 等. 人神经靶标酯酶 RNA 表达载体

的构建及其对哺乳动物细胞中 NTE 表达的抑制 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006 24 (1): 27-30

[12] 周丽. 有机磷化合物诱导的迟发神经毒性研究概况及进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 2001 28 (6): 146

[13] Glynn P. NIE: one target protein for different toxic syndromes with distinct mechanisms [J]. Anal Biochem 2003 23 (8): 742-745

[14] Glynn P. Neural development and neurodegeneration: two faces of neuropathy target esterase [J]. Prog Neurobiol 2000 61: 61-74

[15] 吴强. 有机磷化合物中毒 M 受体及信号系统传导研究 [J]. 国外医学卫生学分册 2000 27: 274-277.

· 事故调查 ·

一起急性砷化氢中毒事故调查

管万伟, 李晓堂, 夏光伟

(葫芦岛市安全生产监督管理局职业卫生监督检查所, 辽宁 葫芦岛 125000)

2007年5月23日某冶炼厂发生一起急性砷化氢中毒事故, 从23日15:30至27日8:00先后有12人出现中毒症状, 其中1人死亡。

1 事故经过

2007年5月23日15:30某冶炼厂检修车间一名值班人员出现身体不适, 腰痛、恶心、呕吐, 尿呈酱油色, 由工友送至医院。次日3:00至8:00 5名同车间和1名三车间工人先后出现相似症状, 送至医院。之后, 又陆续有5名同车间职工出现腰痛等症状, 分别于25、26、27日送至医院。24日13:00 相关部门接到报告后立即到达该冶炼厂, 对事故展开调查。

2 临床表现

12名中毒患者的共同临床表现主要为血尿、腰痛, 一部分人出现巩膜、皮肤黄染。5月29日将2名中毒患者的生物样本送至北京市朝阳区医院进行检验, 付某(已死亡)血砷为0.079 mg/L, 杨某血砷为0.042 mg/L, 尿砷为0.693 mg/L (尿砷正常参考值为0.04~0.10 mg/L)。中毒患者临床表现与砷化氢中毒临床表现相符, 医院参考生物检验结果, 确定此次12人中毒为急性砷化氢中毒。

3 流行病学调查分析

此次中毒12人中有检修车间11人、三车间1人。此12人均于22日17:00~25日8:00期间在变电所值班室停留过(停留时间2~24 h), 而未到过变电所值班室或在值班室仅短暂停留的人员未出现中毒症状。此12人无近期共同进餐史, 排除食物中毒的可能。

4 现场勘察及检测结果

4.1 现场勘察 变电所位于冶炼厂三车间对面, 由变压器室

和值班室两部分组成。变压器室与值班室之间有三道门和一个通风管道, 门未关闭, 通风管道的引风机未开启。变压器室内有地沟, 地沟一端位于变压器下面, 另一端位于墙体下部百叶窗通风口处, 变压器室通过此百叶窗通风口与室外相通。变电所与室外相通的门、窗户均关闭。在变电所外, 一堆约8吨硬锌物料将百叶窗通风口堵塞。

4.2 检测结果 5月25日采集物料堆处表面和中间部位的硬锌物料样品, 检测硬锌物料中砷含量, 结果分别为0.29%和1.34%。5月28日、29日、31日, 分别对此次中毒事故发生地点及位于变电所西北角50米远处的对照点——更衣室进行空气中砷化氢浓度监测, 结果见表1。

表1 砷化氢监测结果 mg/m³

采样时间	变电所室外百叶窗	值班室	更衣室
28日	0.05	0.04	<0.03
29日	0.05	0.04	<0.03
31日	0.04	0.03	<0.03

注: 砷化氢检验采用原子荧光光谱法 (GBZ/T160.31-2004) 作业场所空气中砷化氢最高容许浓度为0.03 mg/m³ (GBZ2-2002)。

5 事故原因分析及控制措施

22日、23日为连续阴雨天气, 气压低、偏南风、风速小。变电所西南方向是硫酸厂, 其排放的二氧化硫、三氧化硫与雨水发生化学反应生成亚硫酸和硫酸, 以酸雨形式沉降下来。酸雨与硬锌物料中的砷化物发生化学反应生成砷化氢。产生的砷化氢经百叶窗扩散到变压器室内, 并通过门和通风管道逐渐弥散到值班室。由于变电所与室外相通的门窗均关闭, 造成室内砷化氢浓度逐渐升高, 导致室内职工发生砷化氢中毒。

25日8:00起, 有关部门封锁了变电所, 禁止职工在值班室内值班及逗留, 并要求企业彻底清除变电所外侧堆放的硬锌物料。

6 防治对策

企业应加强危害物品及堆放场所设定的管理, 做到危害物品的合理存放, 使有害作业与无害作业分开, 杜绝类似事故的发生; 加强职工职业卫生安全培训, 增强职工中毒的识别能力和自我防护意识, 一旦发生中毒事故, 可及时准确向医疗部门提供有关信息, 以便医疗部门及早制定合理有效的治疗方案, 将健康损害降到最低。