

## 综述与专论

## Prion 疾病和 “protein only” 假说\*

周筠梅\*\*

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要** Prion 病是指一类由蛋白质错误折叠导致的具有传染性的疾病。人类的纹状体脊髓变性病、库鲁病、脑软化病, 和致死的家族性失眠症以及动物的羊瘙痒病和牛海绵状脑炎即疯牛病, 都是致死性的神经退行性疾病, 它们都属于传染性海绵状脑炎, 统称 Prion 病。PrP<sup>C</sup> 是 Prion 蛋白在细胞内的正常形式, PrP<sup>Sc</sup> 是其致病形式。根据 “protein only” 假说, PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 的转化是致病的关键步骤。简要介绍了 PrP 蛋白的结构特征、PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 转化的可能机制、影响 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 转化的重要因素和 PrP 在细胞内的生物学过程等方面的研究进展, 讨论了 Prion 疾病的诊断和治疗方法。

**关键词** prion 疾病, 蛋白质错误折叠, protein only 假说  
**学科分类号** Q55

蛋白质是一切生命活动的执行者, 只有当具有完整一级结构的多肽链或蛋白质折叠成正确的三维结构才能发挥正常的生物功能。如果这些生物大分子的折叠在体内发生了故障, 形成了错误的空间结构, 不但将丧失其生物功能, 甚至还会引起疾病<sup>[1]</sup>。近年来蛋白质错误折叠与疾病关系的研究引起了科学家的高度重视, 取得了令人瞩目的进展。至今已发现二十余种蛋白质的错误折叠与疾病相关, 例如与老年痴呆病相关的 A $\beta$  和 tau 蛋白; 与帕金森氏病相关的  $\alpha$ -synuclein 等。在蛋白质错误折叠导致的疾病中多数是神经退行性的疾病, 与基因突变或老化相关, 有的并不具有明显的传染性, 如老年痴呆症、帕金森氏病等。而一类传染性海绵状脑炎病 (transmissible spongiform encephalopathies, TSEs), 极具传染性。人类的纹状体脊髓变性病 (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD), 库鲁病 (kuru), 脑软化病 (Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome, GSS), 和致死的家族性失眠症 (fatal familial insomnia, FFI) 以及动物的羊瘙痒病 (scrapie) 和牛海绵状脑炎 (bovine spongiform encephalopathy, BSE) 即疯牛病 (mad cow disease), 都是致死性的神经退行性疾病, 它们都属于传染性海绵状脑炎 (表 1)。其共同特征是在病患的中枢神经系统中存在神经空泡形成和异常的抗蛋白酶解的 Prion 蛋白聚集, 极具传染性, 死亡率很高<sup>[2,3]</sup>。在酵母和真菌中也存在类 Prion 蛋白 (Ure2, Sup35 等), 具有形成聚合和淀粉样纤维的趋势, 但它的存在对宿主细

胞没有明显的毒害, 甚至这些类 Prion 蛋白在抵抗外界胁迫中起一定的作用。由于比较容易获得足够量的、对人具传染性的蛋白质, 酵母类 Prion 蛋白已被用于研究 Prion 疾病的致病机理和传染规律的研究<sup>[4,5]</sup>。

长期以来, Prion 疾病到底是如何引起的是个不解之谜。曾认为是由一种慢病毒 (slow virus) 或称为 “Vireno” 引起的, 直到 20 世纪 80 年代, Prusiner 成功地从病脑中分离纯化出使羊感染痒病的蛋白质病原, 才开始认识引起 Prion 疾病的蛋白质本质, 并提出了 protein-only 假说, Prusiner 因此获得 1997 年诺贝尔生理及医学奖。Prion——蛋白质感染颗粒 (proteinaceous infectious particles, PrP) 是一种糖蛋白, 虽然功能尚不十分清楚, 但可在神经元和胶质细胞表面找到。由 Prion 引起的疾病传染过程中没有细菌、真菌、病毒和类病毒的参与, 因而提出了此类疾病仅由蛋白质传染的假说 (the protein-only hypothesis)<sup>[6]</sup>, 而且在实验中确实得到了许多证据, 表明在此类疾病的感染过程中没有核酸的参与<sup>[7,8]</sup>。由于 protein-only 假说是超出传统观念的划时代的新思想, 尚缺乏足够的直接实验证据, 此类疾病仅由蛋白质传染的假说一直受到

\* 中国科学院创新经费资助项目 (KSCX2-SW214-3)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 010-64889859, E-mail: zhoujm@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2003-11-12, 接受日期: 2004-01-18

Table 1 The characteristics and symptoms of transmissible spongiform encephalopathies, TSEs  
表 1 一些传染性海绵状脑炎的特征和症状

疾病名称	特征和症状
人纹状体脊髓变性病 (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)	致死性神经疾病, 临床特征是快速进行性的痴呆, 肌阵挛, 丧失运动能力, 表现出视觉的或小脑的症状, 锥体的/锥体外束外的症状. 有三种不同的形式: 散发性的 CJD 占病例总数的 85%, 在世界范围内分布, 没有可辨认的相同致病原因; 医原性的 CJD, 约占 5%, 是由医疗过程偶然引起的, 比如污染的神外科器械, 尸体的硬脑脊膜移植, 或尸体来源的垂体激素治疗; 家族性的 CJD 占总数的 10%, 与 PrP 基因 (PRNP) 的突变密切相关, 已发现病人的 PrP 基因在 200 位的 Gly 突变成 Lys.
脑软化病 (Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome, GSS)	一种极为罕见的常染色体遗传病, 与 PRNP 基因的突变有关 (已发现 102 位 Leu 突变成 Pro). GSS 的特征是慢性进行性共济失调, 末期痴呆和较长的临床持续时间 (2~10 年).
致死的家族性失眠症 (Fatal familial insomnia, FFI)	遗传性疾病, 特征是睡眠紊乱, 表现出丘脑损伤引起的营养体和病灶的神经学症状. 临床表型依赖于 PRNP 基因 D178N 的点突变和第 129 密码子是甲硫氨酸.
人纹状体脊髓变性病的新变种 (new variant Creutzfeldt-Jakob disease, nvCJD)	一种新发现的人类传染性海绵状脑炎, 与食用或使用 BSE 污染的食物或制剂有关系. 这种疾病几乎唯一地影响年轻的成年人 (平均年龄 27 岁), 临床特征是进行性的神经紊乱和精神错乱所导致的共济失调, 痴呆和不自主的运动, 不会出现典型 CJD 病的脑电图 (EEG). 脑磁共振成像 (MRI) 显示出后部丘脑核双侧具有高强度影像. PrP <sup>Sc</sup> 在扁桃体出现. 神经病理学显示在大脑中有明显的海绵状变化, 充斥着大量的血色斑块.
羊瘙痒病 (Scrapie)	世界范围内自然发生在绵羊和山羊上的传染性神经疾病, 两个世纪以前已经有记载.
慢性衰退疾病 (Chronic wasting disease, CWD)	一种致死的脑衰退疾病, 1980 年开始在美国的圈养和散养的鹿中发现.
牛海绵状脑炎 (Bovine spongiform encephalopathy, BSE)	1986 年首次发现于英国, 此后在那里有超过 180 000 头牛感染了此病. BSE 也开始在其他欧洲国家和非欧洲国家出现.

各方面的挑战. Jolly 和 Walkley 等提出了溶酶体假说, 认为 TSEs 是溶酶体障碍病<sup>[9]</sup>. 最近 Zhu<sup>[10]</sup> 又提出人和动物的海绵状脑病可能实际上是自免疫病的新理论. 虽然对 Prion 疾病的成因有许多不同的看法, 但近年来通过体内、体外的研究认识了 Prion 蛋白的性质和可能的传播途径, 也发现了许多影响 prion 形成和扩增的因素, 到目前为止多数结果支持 protein-only 假说.

Prion 曾被译为朊病毒, 但考虑到其实际指的是一类具有传染性的蛋白质而不是病毒; 而且命名 Prion 时, 是取 Proteinaceous 和 infectious 两个词的词头, 突出了蛋白质和传染性. 因此建议将 Prion 译为蛋白传染子, 能体现出它的蛋白质本质和蛋白质本身具有传染性的特点, 又不会误认为是一种病毒. Wickner 等最近建议将 Prion 的概念延伸到一切能自我活化, 能在个体间传播的蛋白质<sup>[11]</sup>. 当然, 为了方便并与国际接轨, 直呼 Prion 更加简明.

Prion 疾病的传播途径仍不十分清楚, 一般只在种内传播, 如羊的瘙痒病在两个世纪前就已经有

记载, 却未见直接传染给人和牧羊狗. 人类之间这类疾病的传染则一般是由于直接摄入患病的组织, 与非洲个别地区落后的食人仪式有关, 如库鲁病. 最可怕的是近年来疯牛病开始威胁人类, 出现了人畜间的传播. 自 1987 年英国爆发疯牛病以来, 发现了可能与食用感染了疯牛病的牛制品有关的人的变异型克雅氏症 (vCJD), 据统计自 1995 年以来, 在欧洲已有 120 多人死于由 Prion 导致的疾病. 因此, 人们对疯牛病十分警惕, 各国都极力封杀出现疯牛病地区的牛制品, 尽一切努力阻断此病的传染和传播. 长期以来疯牛病在欧洲肆虐, 不幸的是 2003 年末, 美国出现了第一例疯牛病, 使美国失去了“疯牛病安全地区”的地位, 接踵而来的大量宰杀和来自世界各国的贸易限制不仅将使美国蒙受巨大的经济损失, Prion 可能成为“生物恐怖剂”引起人们的心理恐慌. 最近的一些迹象表明, 这类疾病的传染不仅与直接摄食感染的组织密切相关, 也可能通过输入被 Prion 污染的人生长激素或组织移植发生转移<sup>[12]</sup>. 2003 年英国出现了第一例可能

是由于输血传染的变异型克雅氏症 (vCJD), 输血可能导致疯牛病引起英国卫生部和血液检查机关的高度重视, 迫切需要建立监测血液中这类疾病传染源的方法.

Prion 疾病威胁人畜的生命, 与经济发展息息相关, 各国政府和科学家都非常重视与此类疾病相关的工作, 近年来在引起 Prion 疾病的蛋白质结构解析、致病机理、传染机制、治疗药物的筛选等方面都取得了令人瞩目的进展. 研究的面涉及很广, 本文将重点介绍有关 Prion 致病蛋白质的一些研究进展.

## 1 Prion 蛋白的结构与功能

### 1.1 PrP<sup>C</sup> 和 PrP<sup>Sc</sup>

PrP<sup>C</sup> 是蛋白传染子 PrP 在细胞内的正常形式 (cellular prion), 在人和动物体内的几乎所有组织中, 特别是脑中都有表达, 其确切的生理功能尚不清楚. 由于它定位在细胞表面, 可能与细胞粘附和识别、配体摄取、或跨膜信号传递有关. 内源性的 PrP 基因受损伤的小鼠没有表现出明显的发育或解剖学的缺陷, 但是曾观察到其海马有电生理和结构的异常、小脑的浦野氏细胞丧失、生理节律和睡眠改变、以及学习和记忆有变化等. PrP<sup>C</sup> 是易于被蛋白酶水解的可溶于弱变性剂的膜蛋白, 光谱学研究表明其二级结构以  $\alpha$  螺旋为主 (含 3%  $\beta$  折叠和 42%  $\alpha$  螺旋).

PrP<sup>Sc</sup> 是蛋白传染子 PrP 的致病形式 (scrapie-associated prion), PrP<sup>Sc</sup> 与 PrP<sup>C</sup> 的化学结构完全相同, 只是构象不同 (PrP<sup>Sc</sup> 中  $\beta$  折叠结构增至 43%,  $\alpha$  螺旋结构减至 30%). PrP<sup>Sc</sup> 易于聚合、有抗蛋白酶水解的核, 不溶于变性剂. PrP<sup>Sc</sup> 通过诱导 PrP<sup>C</sup> 构象的改变传染疾病, 引起蛋白质淀粉样变性<sup>[13]</sup>, 可导致神经元进行性退化变性、胶质细胞增生及细胞内 PrP<sup>Sc</sup> 的自身积累, 并伴随严重的痴呆等. Prusiner 等<sup>[8]</sup> 首先发现羊瘙痒病的传染因子能耐受破坏细菌、真菌的处理, 耐高温, 而且使用破坏核酸的处理, 如核酸酶、补骨脂素、紫外线照射等, 都不能减弱疾病的传染. 但是, 如果用蛋白质变性剂处理传染因子, 传染力则会大大降低. 若将患病动物的脑液直接注射到正常动物的脑中, 就能使其患病, 而 PrP 基因被敲除的鼠却不能被感染疾病<sup>[14]</sup>, 证明 PrP<sup>Sc</sup> 是由 PrP<sup>C</sup> 转化而来. 即只有在 PrP<sup>C</sup> 存在时, 注入病脑中的 PrP<sup>Sc</sup> 才能诱导 PrP<sup>C</sup> 转

化成 PrP<sup>Sc</sup>, PrP<sup>Sc</sup> 的不断积累导致疾病的发生.

PrP<sup>Sc</sup> 只在传染性海绵状脑炎中形成, 因此它的出现是 Prion 疾病的特异性标志事件, PrP<sup>Sc</sup> 是这类疾病的标志物<sup>[6]</sup>. 用 TSEs 中的传染物质感染啮齿类动物后, 通常在病兆出现之前的几个星期内就可以在在中枢神经系统中检测到 PrP<sup>Sc</sup>, 而且 PrP<sup>Sc</sup> 的水平会随疾病的加重而继续升高, 直至动物死亡. 因此, PrP<sup>Sc</sup> 水平的升高与传染性的提高是一致的, 是监测疾病发生、发展的指标. 由于家族性和散发性 TSEs 患者中枢神经系统以外的组织和体液中 (如: 尿液、血液、脑脊髓液) 含有的 PrP<sup>Sc</sup> 浓度非常低, 所以需要建立灵敏的检测方法, 用于检测组织和体液中的 PrP<sup>Sc</sup> 含量, 以在病兆出现之前确定是否患病<sup>[3]</sup>. 因此 PrP<sup>Sc</sup> 成为研究 Prion 疾病传播机制、临床诊断和药物筛选的重要靶蛋白.

### 1.2 PrP<sup>C</sup> 的结构

人的 PrP 基因 *Prnp* 位于 20 号染色体的短臂上. 正常的或者说是细胞型的 PrP<sup>C</sup> 是在中枢神经系统和淋巴组织以及神经肌肉接触处表达的<sup>[15]</sup>. 哺乳动物的 PrP 基因编码一个由大约 250 个氨基酸组成的蛋白质, 形成几个独立的结构域, 包括 N 端信号肽, 5 个富含脯氨酸和甘氨酸的八肽重复序列, 1 个高度保守的中部疏水区, 和 1 个含有糖磷脂酰肌醇锚 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 插入信号的 C 端疏水区 (图 1). 它是一个细胞表面的糖基化蛋白, 由 GPI 锚固定在细胞膜上<sup>[16,17]</sup>.

由于 PrP<sup>C</sup> 与质膜通过 GPI 锚连接, 所以 PrP<sup>C</sup> 可能在细胞表面信号传递或细胞粘连中起作用. 已经发现, 分子质量为 37 ku 的层粘连蛋白 (laminin) 受体能与 PrP<sup>C</sup> 结合; 而且有证据表明 PrP<sup>C</sup> 可能是一种信号转导蛋白, 其信号传递功能主要发生在神经元的轴突<sup>[17,18]</sup>.

最近发现在鼠基因组中 *Prnp* 基因的下游, 有一个新基因 *Pmd*, 编码一个由 179 个氨基酸组成的蛋白质, 被命名为 Dpl (“downstream of the *Prnp* locus” or “doppel”)<sup>[19]</sup>. 它与人的 PrP<sup>C</sup> 同源, 很象是 N 端截短的人 PrP<sup>C</sup> (图 2). Dpl 的 NMR 结构与 PrP<sup>C</sup> 相似, 也含有 3 个  $\alpha$  螺旋和 2 个短的  $\beta$  片层<sup>[20]</sup>. 过量表达 Dpl 会引起鼠小脑细胞程序性死亡和共济失调, 而 PrP<sup>C</sup> 在中枢神经系统表达可以抑制 Dpl-依赖的共济失调<sup>[21]</sup>. 因此, 研究 Dpl 与 PrP<sup>C</sup> 的相互作用将有助于揭示 PrP<sup>C</sup> 的生理功能和致病机理.

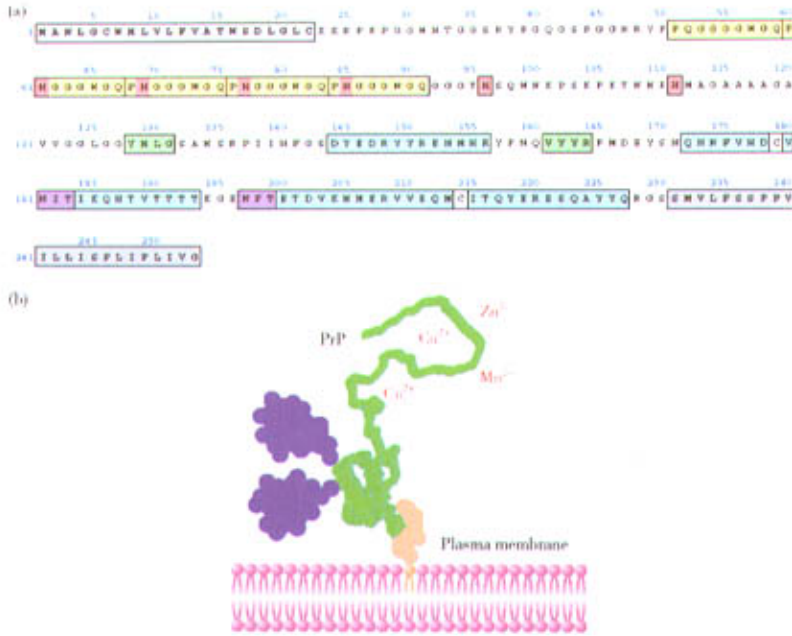


Fig. 1 Schematic illustration of human PrP

图 1 人 PrP 的示意图<sup>[16]</sup>

(a) 人 PrP 的氨基酸序列。PrP 分子的 N 端和 C 端各含有一个信号肽 (灰框表示, 1~23 和 231~253 位)。在生物合成过程中, 信号肽被剪切, 并在 230 位丝氨酸连接 GPI 锚。重复区域 (黄框, 51~91 位) 由 1 个九肽序列 (PQGGGGWGQ) 和 4 个八肽 (PHGGGWGQ) 的重复序列组成。此区域的组氨酸残基 (红框) 被认为是结合金属离子, 特别是铜离子的主要位点。96 位和 111 位的组氨酸也可能是结合铜离子的高亲和性位点。111 位以后是 PrP 的主要酶切位点。NMR 研究表明 PrP N 端 (23~120 位) 没有结构, 而在 C 端出现两个 β 片层 (B1 和 B2, 绿框), 和 3 个 α 螺旋 (A1, A2 和 A3, 蓝框)。每分子含有两个 N-糖基化位点 (紫红框) 和两个半胱氨酸残基 (白框) 连接成的二硫键。(b) PrP 多肽链 (绿色) 由 GPI 锚 (棕色) 定位在质膜上。分子的 N 端结合金属离子, C 端为连接两个 N-多糖 (紫色) 的球状结构。

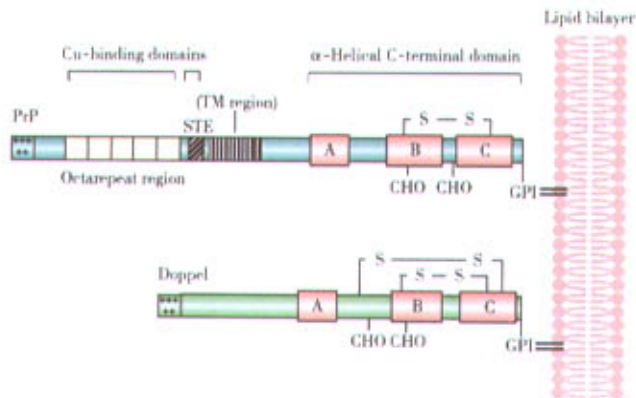


Fig. 2 The structure of cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) and doxyl (Dpl)

图 2 PrP<sup>C</sup> 和 Dpl 的结构比较<sup>[21]</sup>

A, B, C 分别表示 C 端的三段 α 螺旋。TM: 跨膜区; STE: 转移终止因子区, 它参与形成 PrP<sup>C</sup> 的跨膜区; + + +: 一簇碱性残基; CHO: Asn-连接的多糖位置; S-S: 二硫键; GPI: 糖磷脂酰肌醇锚。

### 1.3 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 的转化

TSEs 疾病起始于正常的 PrP<sup>C</sup> 发生错误折叠, 形成富含  $\beta$  片层的、抗蛋白酶水解的 PrP<sup>Sc</sup>. 错误折叠的 PrP<sup>Sc</sup> 有很强的聚合倾向, 先形成淀粉样的小纤维, 成为形成淀粉样斑块的前体, 进一步聚合

形成淀粉样斑块, 最后发展为可被临床诊断的大脑海绵状退化变性病症 (图 3). PrP<sup>Sc</sup> 的出现是病变的开始, 因此它成为 TSEs 疾病的标志性事件. 研究 PrP<sup>Sc</sup> 的形成机制成为探索病因和寻找治疗方法的重要方面.

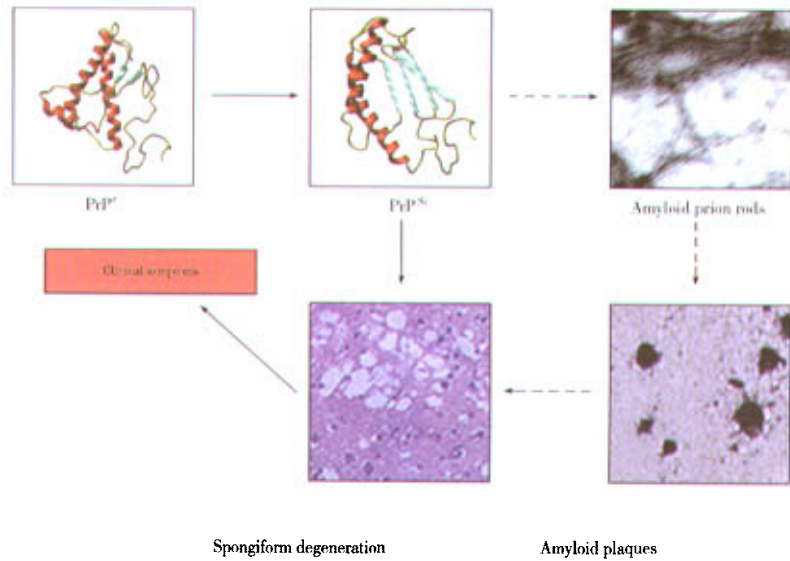


Fig. 3 A model for progression of TSEs pathogenesis

图 3 TSEs 疾病的致病过程<sup>[13]</sup>

图中 PrP<sup>C</sup> 和 PrP<sup>Sc</sup> 的结构是计算模型.

### 1.4 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 转化的可能机制

尽管人们认识到 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 转化是疾病发生和发展的关键, PrP<sup>Sc</sup> 具有“自我复制”的能力, 但机制仍不清楚. 至今已提出 3 种假说来描述 PrP<sup>C</sup> 转化为 PrP<sup>Sc</sup> 的机制: a. 再折叠模型 (refolding model)<sup>[22,23]</sup>. 假设 PrP<sup>C</sup> 发生去折叠达到一定程度, 然后在 PrP<sup>Sc</sup> 的直接或间接影响下发生重折叠, 形成折叠异常的致病结构 PrP<sup>Sc</sup>. b. 成核-多聚化模型 (nucleation-polymerization model)<sup>[24]</sup>. 假设 PrP<sup>C</sup> 和 PrP<sup>Sc</sup> 处于热力学平衡, 而 PrP<sup>Sc</sup> 单体不稳定, 聚集在一起后变得稳定. PrP<sup>Sc</sup> 聚集体通过结合 PrP<sup>Sc</sup> 单体促进 PrP<sup>C</sup> 的转化, 使平衡向生成致病型构象的方向移动. 在成核-多聚化模型中具有传染性的物质是 PrP<sup>Sc</sup> 的多聚体, 限速步骤是形成作为种子进一步稳定 PrP<sup>Sc</sup> 的核, 因此称为成核-多聚化模型. c. 模板辅助转化模型 (template-assisted conversion model)<sup>[8]</sup>. 假设 PrP<sup>Sc</sup> 在热力学上比 PrP<sup>C</sup> 更稳定, 但 PrP<sup>C</sup> 转变为 PrP<sup>Sc</sup> 时要克服能障. 在没

有 PrP<sup>Sc</sup> 存在时, PrP<sup>C</sup> 转变成 PrP<sup>Sc</sup> 的速度很慢; 在 PrP<sup>Sc</sup> 存在时, 它与 PrP<sup>C</sup> 的结合降低了转变所需的

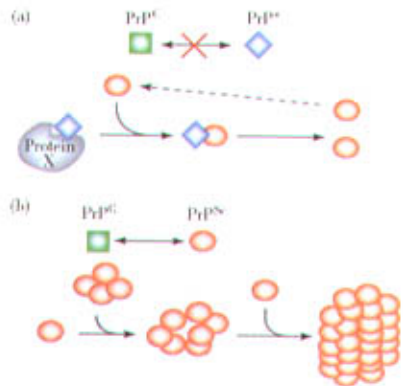


Fig. 4 Theoretical models for PrP<sup>C</sup> to PrP<sup>Sc</sup> conversion

图 4 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 转化的理论模型<sup>[13]</sup>

(a) 模板辅助转化模型; (b) 成核-多聚化模型

活化能,使 PrP<sup>Sc</sup> 迅速增长. 有研究结果显示,可能存在一种瞬时的构象中间体 PrP\* 与 PrP<sup>C</sup> 处于平衡中,与一种未知蛋白 (protein X) 作用后,PrP\* 就能够与 PrP<sup>Sc</sup> 形成异源二聚体. 这一异源二聚体自发转化形成 PrP<sup>Sc</sup> 同源二聚体,含有一个原来的、作为模板的 PrP<sup>Sc</sup> 分子和一个新形成的 PrP<sup>Sc</sup> 分子. 同源二聚体进一步解离,形成两个模板,各自诱导进一步的转化,使 PrP<sup>Sc</sup> 的浓度以指数方式增长 (图 4). 目前,比较多的研究小组认为后两种模型更适合描述 PrP<sup>C</sup> 与 PrP<sup>Sc</sup> 之间的转化,但尚不能确定哪一个更符合体内发生的真实情况<sup>[2,25,26]</sup>.

## 2 PrP 在细胞内的生物学过程

上述研究结果都清楚地表明,改变 PrP 的折叠状态与致死性的神经退行性的紊乱密切相关,PrP 在 Prion 疾病传染中起关键的作用. 但是,在细胞

内如何引起此构象变化的? 神经毒性物质到底是什么? 要阐明这些问题,需进一步深入研究在细胞内 PrP 的形成和代谢过程.

如同其他细胞表面蛋白一样,当 PrP 在膜结合的核糖体上被合成后,进入内质网,经切除信号肽、N-糖基化、形成二硫键和糖脂锚等翻译后的加工过程,PrP 折叠并成熟,被释放到细胞质中. 在其被进一步分泌到细胞表面之前,以细胞质 PrP (cyPrP) 存在并受到细胞内的质量控制系统的调控,图 5 为假设的在体内从蛋白质合成到成熟的这一过程<sup>[27]</sup>. cyPrP 可能是许多细胞内过程的核心,延长它在细胞质环境中的存在时间明显增加了 PrP 的错误折叠和聚合的趋势,因此 cyPrP 将可能是导致 PrP 自身聚合、发生构象变化形成 PrP<sup>Sc</sup> 细胞死亡等事件的元凶. 但这些事件到底是否发生? 是如何发生的? 后果又如何? 这些问题尚需进一步研究.

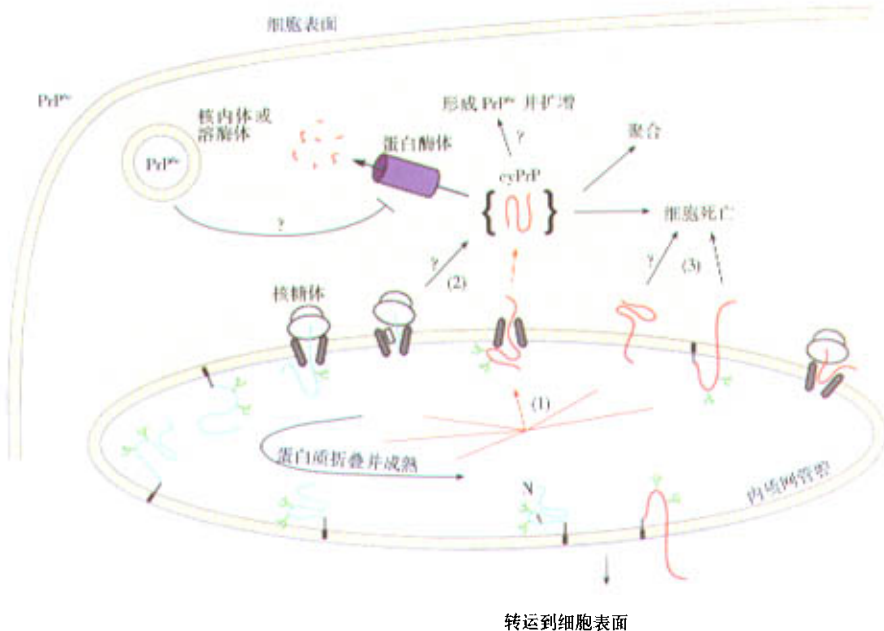


Fig. 5 The speculated model for cyPrP as the center of prion diseases

图 5 假设以细胞质 PrP 为 prion 疾病核心的模型

在此模型中显示多数新合成的 Prion 蛋白被转移进入内质网管腔,经翻译后的修饰 (糖基化等) 正确折叠并被分泌到细胞表面. 但少数 PrP 可能被反向转移到细胞质中成为 cyPrP. 正常情况下, cyPrP 只能在细胞质中短暂停留,很快被蛋白酶体降解而清除. 但若 cyPrP 在细胞质内存活时间延长并积累就可能引起 cyPrP 自身聚合、形成 PrP<sup>Sc</sup> 并扩增等与引起 Prion 疾病有关的过程.

Ma 和 Linquest 等<sup>[28,29]</sup> 将 Prion 的生物学研究与蛋白质代谢和细胞内的质量控制系统联系起来,

强调蛋白酶体对细胞质 PrP (cyPrP) 的作用. 他们发现,如果强制 PrP 在转基因小鼠细胞质内过量

表达,使 PrP 在细胞质中积累时,能导致神经毒性和神经退行性症状,并且 cyPrP 的毒性只在神经原中表现.在心脏和骨骼肌中过量表达 cyPrP 并不引起病症.在培养的细胞中,也观察到过量表达 cyPrP 只在神经突触细胞系中诱导细胞凋亡,在非神经细胞中无此影响.这个结果与已观察到的 Prion 疾病的病兆多出现在神经元附近一致.应用抑制剂抑制蛋白酶体的活性,导致 cyPrP 在细胞内的积累增加.尽管对 PrP 向 PrP<sup>Sc</sup> 的转化是在细胞内还是在细胞表面发生的有着不同的看法<sup>[30]</sup>,但是这些研究证明蛋白酶体具有保护细胞、抑制细胞毒性蛋白质积累的作用.因此,Prion 疾病的治疗与 PrP 在体内的代谢和运输密切相关.病理学和药物学的研究不仅要考虑 PrP<sup>C</sup> 和 PrP<sup>Sc</sup> 两者性质的差异和相互转化,还要注意与体内代谢和运输系统的联系,为这类疾病的检测和治疗提出了新的思路.此外,此研究暗示了增加蛋白酶体的活性,将有利于迅速清除细胞内错误折叠的蛋白质,减少它们在细胞内的积累,防止进一步引起病兆,这可能对治疗由于蛋白质错误折叠引起的疾病具有普遍意义.

### 3 影响 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 转化的重要因素

尽管由 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 的转化是导致 Prion 疾病的核心事件,但若在细胞内 PrP 蛋白的表达、拓扑结构、折叠状态和在细胞内的转运等过程出现异常,都可能会导致疾病的发生.下面列举几种影响 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 转化的因素.

#### 3.1 氨基酸组成

一系列对人 PrP<sup>C</sup> 蛋白的缺失突变的研究为阐明 PrP 蛋白中哪些残基与 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 转化相关奠定了基础. Muramoto 等<sup>[31]</sup>发现删去 PrP<sup>C</sup> 蛋白 N 端残基 23 ~ 88 和中间结构域中 141 ~ 147 都不影响 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 转化,而删除 95 ~ 107, 108 ~ 121 或是 122 ~ 140 却完全抑制此构象的转变,暗示这些残基与构象转变密切相关. Kuwata 等<sup>[32]</sup>进一步将范围缩小,发现人工合成的 PrP<sup>106-126</sup> 肽能够聚集在一起形成淀粉样纤维,引起神经细胞程序性死亡,诱导增生和培养的神经营养细胞肥厚. PrP<sup>106-126</sup> 肽可能成为非常理想的研究淀粉样纤维形成和由 PrP<sup>Sc</sup> 介导的细胞死亡的化合物.

在研究 Tg 鼠中 prion 传播和神经退行性变化所需步骤时发现, PrP<sup>30-140</sup> 可能是 PrP<sup>C</sup> 和 PrP<sup>Sc</sup> 相互作用位点,在构象转变过程中起非常重要的作用<sup>[33]</sup>.

成熟鼠的 PrP 蛋白含有 208 个氨基酸残基,

Supattapone 等<sup>[34]</sup>曾报道截短的由 106 个氨基酸残基组成的 PrP<sup>106</sup> 分子能在转基因鼠中形成具传染性的小 PrP (miniprion). 随后,他们进一步应用缺失突变的方法将 PrP<sup>106</sup> 截短,发现只含 61 个残基的 PrP<sup>61</sup> (其中保留了糖基化位点和能插入脂的锚结构),在成神经细胞瘤中能自发形成抗蛋白酶解的构象.在转基因鼠中,少量表达 PrP<sup>61</sup> 就引起共济失调而死亡.神经病理实验表明,在神经的树突或细胞体内积累抗蛋白酶解的 PrP<sup>61</sup> 能引起细胞凋亡<sup>[35]</sup>. PrP<sup>61</sup> 可用于研究 PrP 分子转变成抗蛋白酶解的构象并变成神经毒性的机制.

#### 3.2 糖基化影响 PrP 蛋白的折叠和拓扑结构

人的 PrP 蛋白在 Asn181 (loop 区) 和 Asn197 ( $\alpha$  螺旋区) 位有 2 个可能的糖基化位点,由于蛋白质翻译后加工程度的不同,通常有单糖基化、二糖基化和非糖基化的异构体存在.由于 N-糖链比较长,又颇具运动性,可以有效屏蔽 PrP 分子间的作用面,因此糖基化可以保护蛋白质较大的表面免被蛋白酶水解,防止非专一性的蛋白质-蛋白质相互作用等.糖基化影响抗原决定簇的存在和对抗体的可接近性,正常的糖基化可以避免许多非专一性的过程.而异常的糖基化是引起形成 PrP<sup>Sc</sup> 的原因之一.已发现新的变异 CJD 与 PrP<sup>Sc</sup> 二糖基化异构体相关,而在偶发性的 CJD 中, PrP<sup>Sc</sup> 主要是单糖基化的.研究表明糖基化作用可能是通过改变 PrP 蛋白 C 端的构象来调节 PrP<sup>C</sup> 和 PrP<sup>Sc</sup> 之间的作用<sup>[31]</sup>.

#### 3.3 微量金属离子的影响

已知过渡金属铜、铁、锰与老化和退行性疾病相关的氧化损伤和炎症密切相关,但机制尚不清楚,可能与过氧化、产生自由基和与含金属酶结合等过程相关.过渡金属铜离子能以很高的亲和性与 PrP 蛋白结合,这种结合可以明显改变后者的生化性质.纯化的 PrP<sup>C</sup> 能通过它的八肽重复序列结合铜离子<sup>[36,37]</sup>,而缺失 PrP 基因的小鼠则表现出膜结合的铜离子数量减少和铜-锌超氧化物歧化酶的活力降低<sup>[38]</sup>.铜离子对细胞内 PrP<sup>C</sup> 流通的影响支持了 PrP<sup>C</sup> 可能是细胞从外环境摄取铜离子的内吞受体的假说<sup>[39,40]</sup>.

#### 3.4 RNA 分子促进 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 的转化

发展体外监测 PrP 扩增的技术,可以帮助人们从生物化学的角度研究 Prion 传播的机制和影响 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 转化的因素. Kocisko 等<sup>[41]</sup>首先应用放射性标记的、纯化的 PrP 分子转化技术,成功再现了许多与 Prion 在体内传播的相关性质.但是此



法灵敏度太低, 只有在 PrP<sup>Sc</sup> 的量高于 PrP<sup>C</sup> 50 倍时, 才能开始诱导 PrP<sup>Sc</sup> 的形成; 随后 Saborio 和 Soto 等<sup>[42]</sup> 发展了称为蛋白质错误折叠循环放大的方法 (protein misfolding cyclic amplification, PMCA), 在 SDS 存在下, 经重复超声处理, 可以有效地扩增仓鼠脑匀浆液中的 PrP<sup>Sc</sup> (图6). 这一技术不仅使检测

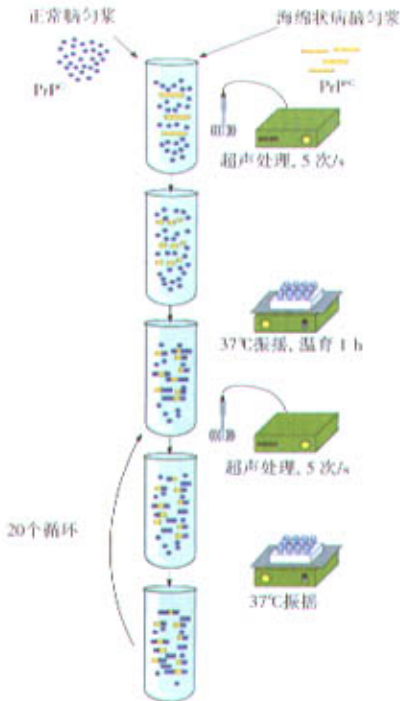


Fig. 6 Method of cyclic amplification of protein misfolding<sup>[3]</sup>

图6 蛋白质错误折叠循环放大法示意图<sup>[3]</sup>

PrP<sup>Sc</sup> 的灵敏度提高了 10 ~ 100 倍, 而且大大提高了基于 PrP<sup>Sc</sup> 含量来鉴定 TSEs 疾病的可能性, 这种鉴定 TSEs 疾病的概念, 使在体外研究 Prion 疾病的机制成为可能. Lucassen 等<sup>[43]</sup> 考虑超声处理和 SDS 的存在都可能使细胞内的蛋白质因子变性而改变正常的生化反应, 进一步对 Saborio 等的方法进行改进, 发展了灵敏的、非变性的 PMCA 法. 应用此技术研究了 Prion 诱导的蛋白质构象变化的机制, 发现 PrP<sup>Sc</sup> 的体外扩增存在菌种专一性, 而且是时间、温度和 pH 依赖的. 加入金属螯合剂 EDTA 和 EGTA 都不影响 PrP<sup>Sc</sup> 的扩增, 说明此过程并不需要二价阳离子; 巯基试剂 NEM、PHMB 和 mersalyl

acid, 能抑制体外的扩增, 说明从 PrP 向 PrP<sup>Sc</sup> 的构象转化需要含自由巯基, 符合二硫键交换假说, 首次证明了具有反应活性的化学基团在从 PrP 向 PrP<sup>Sc</sup> 的构象转化过程中起着关键的作用<sup>[44]</sup>. 最近 Deleault 等<sup>[45]</sup> 应用改进的 PMCA 法, 研究了能抵抗蛋白酶水解的类 PrP<sup>Sc</sup> 蛋白 PrPres 的扩增过程, 出乎意料地发现特定的 RNA 分子能加速仓鼠 Sc237 PrPres 蛋白的扩增, 深入的研究表明, 只有单链 RNA 有此作用, 而双链 RNA, DNA-RNA 杂合物及 DNA 均不影响 PrPres 的扩增. 如果此体外 PrPres 扩增方法研究的结果能够代表体内 PrP<sup>Sc</sup> 形成的模型的话, 作者的研究结果进一步阐明了特定的 RNA 分子是 PrP<sup>Sc</sup> 形成的细胞因子, RNA 的存在加速了由 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 的转化, 并不是没有 RNA 的参与就不能完成此转化. 因此, 此结果发现了 RNA 能促进 PrP<sup>Sc</sup> 的转化, 却未动摇 protein-only 假说, PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 的转化仍是基本的、自发的过程.

#### 4 Prion 疾病的诊断和治疗

##### 4.1 诊断

对 Prion 疾病的准确诊断, 开始只能在病人死后, 在病脑中确认出致病的 PrP<sup>Sc</sup> 构象形式的存在. 现在已经建立了诊断偶发性和变异的 CJD 病的临床指标, 具有很高的灵敏度和专一性. 基于免疫化学方法测定 PrP<sup>Sc</sup> 形成的几种临床诊断试剂盒已经面市, 但灵敏度较低, 准确性也不够. 探索新的方法旨在提高对 PrP<sup>Sc</sup> 临床诊断的灵敏度和专一性, 目的是能在疾病症状出现前进行检测, 即对已受感染但仍未发病的个体进行先期检测. 由于 PrP 和 PrP<sup>Sc</sup> 的构象不同, 抗原决定簇就会不同, 将免疫学方法结合蛋白质印迹 (Western blot) 和酶联免疫吸附测定法 (ELISA), 大大提高了检测的灵敏度. 已建立的能在疾病症状出现前进行检测的方法见表 2<sup>[3]</sup>. 最灵敏的方法可以达到监测 10<sup>-12</sup> g/ml PrP<sup>Sc</sup>, 甚至可以区分不同类型的 BSEs 病. 已经可以通过监测扁桃体活组织中 PrP<sup>Sc</sup> 的量, 来诊断羊的海绵状脑病, 最近此法也用于监测变异的 CJD, 但此法不适用于人的 CJD 病和疯牛病.

##### 4.2 治疗

一直以来, Prion 疾病被认为是不治之症, 对 CJD 病患的治疗是十分有限的, 只能尽量减轻症状, 如使用类 L-多巴胺改善运动障碍等. 而最近免疫学和药物学研究的新成果为治疗 Prion 疾病带来了曙光. 在细胞水平和转基因鼠中都已证实, 几种



anti-PrP<sup>C</sup> 抗体可以有效地阻止 Prion 疾病的发展<sup>[46]</sup>, 其中, 抗体 Fab D18<sup>[47]</sup> 和 6H4<sup>[48]</sup> 识别哺乳动物 PrP 位于 132 ~ 156 残基的抗原决定簇, 这一区域可能就是 Prion 复制的关键靶位点. 某些用于治疗疟疾和精神病的药物, 因为能够通过血脑屏障, 已经成为治疗 Prion 疾病的候选药物<sup>[49]</sup>. 但最近报道的治疗效果表明, 使用奎那西丁 (Guinacrine) 只能缓解 CJD 患者早期的临床症状而根本不能最终治愈; 止痛药 flupirtine 可使 CJD 患者

的认知退化过程放慢, 但未见延长存活时间. 因此作者提出不能对应用奎那西丁类药物治疗 CJD 病抱有太大的希望, 呼唤科学家们积极寻找新的治疗药物<sup>[50]</sup>. Prusine 及其同事计划在今后几年中筛选出几千种 Guinacrine 类似物争取获得能用于治疗的衍生物. 总之, 如果 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 的转化确实是这类疾病致病的关键, 稳定 PrP 的结构, 使其不易向 PrP<sup>Sc</sup> 转化, 和降低 PrP<sup>Sc</sup> 的稳定性, 使其不能在细胞内堆积引起病兆, 是寻找有效治疗药物的总体思路.

Table 2 Methods for PrP<sup>Sc</sup> detection表 2 监测 PrP<sup>Sc</sup> 的技术方法

技术	操作原则	检测方法	检测极限
蛋白质印迹法 <sup>1)</sup> (Western blot)	在一个膜上进行 SDS 电泳, 与抗 PrP 专一性一抗和抗 HgG 酶联的二抗保温	化学发光	$10 \times 10^{-12}$ - $20 \times 10^{-12}$ mol/L
酶联免疫法 <sup>1)</sup> (ELISA)	将 PrP <sup>Sc</sup> 蛋白吸附到塑料孔中, 与抗 PrP 专一性一抗和抗 HgG 酶联的二抗保温	化学发光	$2 \times 10^{-12}$ mol/L
解离增强的镧系元素荧光免疫/构象依赖的免疫分析 <sup>1)</sup> (DELFI/CDI)	将 PrP <sup>Sc</sup> 蛋白吸附到塑料孔中, 与抗 PrP 专一性一抗和抗 HgG 酶联的二抗保温	荧光	$0.2 \times 10^{-12}$ - $2 \times 10^{-12}$ mol/L
共聚焦双色荧光相关谱 (FCS)	在 PrP 的尾部连接两个荧光抗体, 共聚焦显微镜能够检测到具有强荧光的 PrP <sup>Sc</sup> 聚集体	荧光	$2 \times 10^{-12}$ mol/L
多重紫外荧光光谱 (MUS)	检测构象特异的 PrP 分子内芳香氨基酸的荧光	荧光	$\sim 10^{-12}$ mol/L

<sup>1)</sup> 这些方法不能区分 PrP<sup>C</sup> 和 PrP<sup>Sc</sup>; 检测 PrP<sup>Sc</sup> 的量时需要将 PrP<sup>C</sup> 除去.

上面介绍的的研究结果无疑为 PrP<sup>Sc</sup> 蛋白是 Prion 疾病的原因提供了有利的证据, 支持 protein-only 假说, 虽然在这条道路上已取得了令人瞩目的进展. 但关键问题仍未完全解决, 特别是对 PrP<sup>Sc</sup> 蛋白是否致病的唯一因素? PrP<sup>Sc</sup> 蛋白的堆积是“因”还是“果”的问题上仍有分歧. 科学将随人们对客观事物认识的不断深化, 不断地从怀疑、肯定、到否定直至真正认识规律. 相信在不远的将来, 科学家将最终阐明 Prion 疾病的形成和传染机制, 帮助人类战胜这类疾病.

致谢 作者感谢 Perrett S 和朱笠博士对本文写作的帮助.

### 参 考 文 献

- 1 周筠梅, 蛋白质的错误折叠与疾病. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27 (6): 579 ~ 584  
ZHOU J M. Prog Biochem Biophys, 2000, 27 (6): 579 ~ 584
- 2 Prusiner S B. Prion diseases and the BSE crisis. Science, 1998, 278 (5336): 245 ~ 251

- 3 Ingrosso L, Vetrugno V, Cardone F, et al. Molecular diagnostics of transmissible spongiform encephalopathies. Trends Mol Med, 2002, 8: 273 ~ 280
- 4 Wickner R B. [URE3] as an altered URE2 protein; evidence for a prion analog in Saccharomyces cerevisial. Science, 1994, 264: 566 ~ 569
- 5 Sparrer H E, Santos A, Szoka F C J, et al. Evidence for the prion hypothesis; induction of the yeast [PSI +] factor by in vitro-converted Sup35 protein. Science, 2000, 289: 595 ~ 599
- 6 Prusiner S B. Prions. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13363 ~ 13383
- 7 Prusiner S B. Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. Trends Biochem Sci, 1996, 21: 482 ~ 487
- 8 Cohen F E, Prusiner S B. Pathologic conformations of prion proteins. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 793 ~ 819
- 9 Jolly R D, Walkley S U. Lysosomal storage diseases of animals; an essay in comparative pathology. Vet Pathol, 1997, 34 (6): 527 ~ 548
- 10 Zhu B T. Various human and animal spongiform encephalopathies are actually autoimmune diseases; a novel theory on the mechanism of pathogenesis. Medical Hypotheses and Research, 2004, 1: 29 ~ 52
- 11 Priola S A, Chesebro B, Caughey B. A view from the top prion diseases from 10, 000 feet. Science, 2003, 300: 917 ~ 919
- 12 Prusiner S B, Scott M R, DeArmond S J, et al. Prion protein biology. Cell, 1998, 93: 337 ~ 348
- 13 Soto C, Saborio G P. Prions; disease propagation and disease therapy by conformational transmission. Trends Mol Med, 2001, 7: 109 ~ 114

- 14 Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, *et al.* Mice devoid of PrP are resistant to Scrapie. *Cell*, 1993, **73**: 1339 ~ 1347
- 15 Harris D A. Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev*, 1999, **12**: 429 ~ 444
- 16 Lehmann S. Metal ions and prion diseases. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, **6**: 187 ~ 192
- 17 Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, *et al.* Signal transduction through prion protein. *Science*, 2000, **289**: 1925 ~ 1928
- 18 Hundt C, Peyrin J M, Haik S, *et al.* Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *EMBO J*, 2001, **20**: 5876 ~ 5886
- 19 Behrens A, Aguzzi A. Small is not beautiful; antagonizing functions for the prion protein PrP<sup>C</sup> and its homologue Dpl. *Trends Neurosci*, 2002, **25**: 150 ~ 154
- 20 Mo H, Moore R C, Cohen F E, *et al.* Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 2352 ~ 2357
- 21 Westaway D, Carlson G A. Mammalian prion proteins; enigma, variation and vaccination. *Trend Biochem Sci*, 2002, **27**: 301 ~ 307
- 22 Laurent M. Prion disease and the "protein only" hypothesis: a theoretical dynamic study. *Biochem J*, 1996, **318**: 35
- 23 Weissmann C, Enari M, Klohn P C, *et al.* Transmission of prions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 16378 ~ 16383
- 24 Harper J D, Lansbury P T. Jr Models of amyloid seeding in *Alzheimer's disease and scrapie; mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins.* *Annu Rev Biochem*, 1997, **66**: 385 ~ 407
- 25 Horiuchi M, Caughey B. Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. *Structure*, 1999, **7**: R231 ~ R240
- 26 Jackson G S, Clarke A R. Mammalian prion proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, **10**: 69 ~ 74
- 27 Hegde R S, Rane N S. Prion protein trafficking and the development of neurodegeneration. *Trends in Neuroscience*, 2003, **7**: 337 ~ 339
- 28 Ma J, Wollmann R, Linquist S. Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science*, 2002, **289**: 1781 ~ 1785
- 29 Ma J, Linquist S. Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP<sup>Sc</sup>-like conformation in the cytosol. *Science*, 2002, **289**: 1785 ~ 1788
- 30 Dimcheff D E, Portis J L, Caughey B. Prion proteins meet protein quality control. *Trends Cell Biol*, 2003, **13** (7): 337 ~ 340
- 31 Muramoto T, Scott M, Cohen F F, *et al.* Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 15457 ~ 15462
- 32 Kuwata K, Matumoto T, Cheng H, *et al.* NMR-detected hydrogen exchange and molecular dynamics simulations provide structural insight into fibril formation of prion protein fragment 106 ~ 126. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 14790 ~ 14795
- 33 DeArmond S J, Bouzamondo E. Fundamentals of prion biology and diseases. *Toxicology*, 2002, **181** ~ 182: 9 ~ 16
- 34 Supattapone S, Bosque P, Muramoto T, *et al.* Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell*, 1999, **96** (6): 869 ~ 878
- 35 Supattapone S, Bouzamondo E, Ball H L, *et al.* A protease-resistant 61-residue prion peptide causes neurodegeneration in transgenic mice. *Mol Cell Biol*, 2001, **21** (7): 2608 ~ 2616
- 36 Kramer M L, Kratzin H D, Schmidt B, *et al.* Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 16711 ~ 16719
- 37 Jackson G S, Murray I, Hosszu L L, *et al.* Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 8531 ~ 8535
- 38 Brown D R, Qin K, Herms J W, *et al.* The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature*, 1997, **390**: 684 ~ 687
- 39 Pauly P C, Harris D A. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 33107 ~ 33110
- 40 Sumudhu W, Perera S, Hooper N M. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr Biol*, 2001, **11**: 519 ~ 523
- 41 Kocisko D A, Priola S A, Raymond G J, *et al.* Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: A model for the scrapie species barrier. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 3923 ~ 3927
- 42 Soto C, Saborio G P, Anderes L. Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci*, 2002, **25**: 390 ~ 394
- 43 Lucassen R, Nishina K, Supattapone S. *In vitro* amplification of protease-resistant prion protein requires free sulfhydryl group. *Biochemistry*, 2003, **42**: 4127 ~ 4135
- 44 Welker E, Wedemeyer W J, Scheraga H A. A role for intermolecular disulfide bonds in prion diseases?. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (8): 4334 ~ 4336
- 45 Deleault N R, Lucassen R W, Supattapone S. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*, 2003, **425**: 717 ~ 720
- 46 Heppner F L, Musahl C, Arrighi I, *et al.* Prevention of scrapie by transgenic anti-prion protein immunization. *Science*, 2001, **294**: 178 ~ 182
- 47 Peretz D, Williamson R A, Kaneko K, *et al.* Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*, 2001, **412**: 739 ~ 743
- 48 Enari M, Flechsig E, Weissmann C. Scrapie prion protein accumulation by scapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 9295 ~ 9299
- 49 Korth C, May B C H, Cohen F E, *et al.* Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 9836 ~ 9841
- 50 Follette P. Prion disease treatment's early promise unravels. *Science*, 2003, **299**: 191 ~ 192

## Prion Diseases and The "Protein only" Hypothesis\*

ZHOU Jun-Mei\*\*

(National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** Prion diseases are thought to arise through misfolding of the cellular protein PrP, which can exist in both cellular, PrP<sup>C</sup>, and pathological, PrP<sup>Sc</sup>, forms. According to the "protein only" hypothesis, disease results from infection with the misfolded prion form of the protein, or by inherited mutations in the PrP gene which apparently increase the propensity of the protein to misfold. The result is one of a number of devastating neurological diseases, which are inevitably fatal and are characterized by spongiform changes in the brain. Hence prion diseases are also

known as transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). New advances in prion research were reviewed focusing on the structural characteristics of the PrP protein. Putative mechanisms for the conversion between PrP<sup>C</sup> and PrP<sup>Sc</sup>, and the factors thought to influence this change, are described. Progress in determining the physiological function of the PrP protein and prospects for diagnosis and treatment are discussed.

**Key words** prion disease, protein misfolding, "protein only" hypothesis

\* This work was supported by a grant from The CAS Knowledge Innovation Grant (KSCX2-SW214-3).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-64889859, E-mail: zhoujm@sun5.ibp.ac.cn

Received: November 12, 2003 Accepted: January 18, 2004

知识与动态

## 一个新的 ATP 结合盒式转运蛋白

### ——乳腺癌耐受蛋白\*

袁建辉 贺智敏\*\*

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

ATP 结合盒式 (ATP binding cassette, ABC) 膜转运蛋白超家族因其具有供能 ATP 结合功能区而冠名。目前除渗透性糖蛋白 (permeability glycoprotein, P-gp) 和多药耐受相关蛋白 (multidrug resistance associated protein, MRPs) 外, 最近, 报道了一个新的 ATP 结合盒式膜转运蛋白超家族成员——乳腺癌耐受蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP)。因由 Doyle 等研究者于 1998 年首次从阿霉素加 P-gp 抑制剂维拉帕米诱导形成的乳腺癌耐药细胞株中运用 RNA 指纹技术克隆, 所以命名为乳腺癌耐受蛋白 (BCRP)。同一年, Allikmetz 等研究发现其因在胎盘中高度表达而命名为胎盘特异性的 ATP 结合盒式基因 (placenta-specific ATP-binding cassette gene, ABCP)。随后, Miyake 等又从高度耐受米托蒽醌的人类结肠癌细胞系 S1-M1-80 中克隆了此基因, 命名为米托蒽醌耐受相关基因 (mitoxantrone resistance-associated gene, MXR)。系统发育分析发现此基因是 ABC 超家族亚族 G 的第二个成员, 人类基因命名委员会又将此基因命名为 ABCG2。这一新的 ATP 结合盒式转运蛋白拥有 4 种表示方法, 即 BCRP/ABCP/MXR/ABCG2。

人类 BCRP 基因定位于 4q22 区域, 全长为 66 kb, 由 16 个外显子和 15 个内含子构成, 蛋白质产物由 655 个氨基酸残基组成, 与 P-gp 和 MRP 等膜转运蛋白具有羧基端 2 个 ATP 结合区和氨基端至少 12 个跨膜区的结构相比, 其氨基端具有一个 ATP 结合区, 羧基端具有 6 个跨膜区, 大小约为 P-gp 或 MRP 蛋白的一半, 所以又称其为 ABC 半转运蛋白。P-gp 和 MRP 转运功能的形成依赖于二个 ATP 结合区结构的完整性, 它是产生 ATP 酶活性的前提, 推测蛋白质空间结构中仅有一个 ATP 结合区的 BCRP 也需形成功能性二聚体的形式。Sugimoto 等从建立的表达人源 BCRP 的鼠成纤维细胞系 PA317 中研究证实了其从胞内转运出物质的功能依赖于同源二聚体的形成。也有推测, BCRP 功能的实

现可能与其分子伴侣的协助有关, 但迄今未见确切证据。

在人类正常组织表达谱分析中发现, BCRP 在多种组织中都存在表达, 其中在胎盘呈高度表达, 预示着其在表达的正常组织中能行使某些重要的生理功能。如在胎盘中高度表达的 BCRP 可能在维持胎盘屏障功能上起重要作用, 在脑血管内皮细胞中的表达可能与维持血脑屏障的功能有关, 而 BCRP 在细胞质膜、细胞内质网膜及胞内小囊泡膜上的定位研究提示, 其在药物的输出及药物在胞内小囊泡化起作用, 并可促进某些二相药物的代谢, 防止了药物对细胞的毒害。

肿瘤多药耐药性的机理研究揭示多种药物耐受膜转运蛋白参与了此作用, 其中研究较多的有 ABC 超家族成员 P-gp 和 MRPs。BCRP 最早是在乳腺癌耐药细胞系中克隆, 强烈提示其与肿瘤耐药的形成有着密不可分的关联。研究发现 BCRP 在多种肿瘤组织中存在 20% ~ 40% 的不同程度的表达, 且有些伴随有 P-gp、MRP 或 LRP (lung resistance protein, LRP) 的表达, 表达的多样性和复杂性产生了对抗肿瘤药物的耐受。同时, BCRP 所介导的肿瘤抗药种类与 P-gp、MRP 高表达所介导的抗性药物种类存在明显区别, 因相对于 P-gp 等介导的如顺铂、紫杉醇、长春花碱类等典型耐受药物仍然敏感, 所以 BCRP 介导的又称为非典型的多药耐受。研究肿瘤耐药机制的一个重要目的是寻找耐药形成的靶点, 筛选特异性的逆转剂, 提高临床化疗效果。作为一个新的 ABC 超家族膜转运蛋白成员, BCRP 日益成为临床肿瘤化疗耐受逆转的靶点之一。

\* 湖南省自然科学基金资助项目 (02jyy2052)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 0731-4805447, Fax: 0731-2355041

E-mail: Hezhimin2001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2003-07-02, 接受日期: 2003-08-28