

# PrP 的胞内运输与朊病毒病

王小凡 韩俊 高建梅 万言珍 李锋 董小平\*

(中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所朊病毒室, 北京 100052)

**摘要** 朊病毒病, 即传染性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathies, TSEs), 是一类致死性的神经退行性疾病, 存在散发性、感染性和遗传性3种形式。在朊病毒病的病理过程中, 细胞正常朊蛋白 PrP<sup>C</sup> (cellular PrP) 转化为异常构象的 PrP<sup>Sc</sup> (scrapie PrP) 是至关重要的, 但是朊病毒的增殖如何导致神经元凋亡仍不清楚。PrP<sup>C</sup> 的胞内运输在朊病毒病中发挥重要作用, 朊病毒感染后 PrP<sup>C</sup> 转化为 PrP<sup>Sc</sup>, 及遗传性朊病毒病中 PrP 突变可能影响 PrP 的生物合成、亚细胞定位及转运过程, 通过干扰 PrP<sup>C</sup> 的正常功能或产生毒性中间体而导致神经系统病变。现对近年来关于 PrP 胞内运输在朊病毒病中的作用进行综述。

**关键词** 朊病毒病; 转化; 胞内运输

朊病毒病又称传染性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathies, TSEs), 是一类人畜共患的致死性神经退行性疾病, 包括人类的 CJD、GSS、FFI 等疾病, 牛的海绵状脑病(BSE)、羊的瘙痒病(scrapie)等<sup>[1]</sup>。朊病毒病的病理改变特征为海绵样改变、神经元丢失和神经胶质细胞增生。1982年, Prusiner 教授提出“蛋白质唯一”的假设, 认为引起感染性和神经退行性变的因子是 PrP<sup>C</sup> 的致病形式 PrP<sup>Sc</sup>, 但是朊病毒的增殖如何导致神经元凋亡仍不清楚<sup>[2]</sup>。有证据表明 PrP<sup>Sc</sup> 不具有直接的神经毒性, 朊病毒病可能由 PrP<sup>C</sup> 转化为 PrP<sup>Sc</sup> 后失去正常的生理功能<sup>[3]</sup>, 或是 PrP<sup>C</sup> 转化为 PrP<sup>Sc</sup> 过程中具有某种毒性作用所致, Aguzzi 等<sup>[4]</sup>认为转化过程本身具有神经毒性。近年来有研究显示 PrP 的胞内运输在朊病毒病中可能发挥重要的作用<sup>[5]</sup>。

## 1 PrP 的胞内运输

大部分 PrP<sup>C</sup> 通过糖基化磷脂酰肌醇(GPI)锚定在细胞膜的膜窖(又称细胞膜穴样内陷, caveolae)中<sup>[6]</sup>, 膜窖是目前研究的比较清楚的一种脂筏(lipid raft)样结构<sup>[7]</sup>。PrP<sup>C</sup> 在细胞内定位于高尔基体中, 病理性突变 PrP 在质膜上的分布减少, 部分滞留于细胞内。

PrP<sup>C</sup> 通过分泌途径进行生物合成, 在粗面内质网合成, 通过高尔基体转运至细胞质膜表面, 然后持续在质膜和内吞小体之间进行循环, PrP<sup>C</sup> 内吞后其中有 1%~5% 被蛋白酶降解并被排出细胞, 但大

部分又回到细胞膜表面进行循环, Rab 家族(Ras-related GTP binding proteins)可能参与 PrP 的胞内运输过程, Rab6a 可以促使 PrP 从高尔基体逆向转运到内质网, Rab4 则参与 PrP 向细胞膜的转运。对于 PrP<sup>C</sup> 内吞的机制仍有争议, 一些证据表明 PrP<sup>C</sup> 与其他 GPI 锚定蛋白类似, 通过膜窖进行内吞<sup>[8]</sup>。但是很多研究证明 PrP<sup>C</sup> 由笼形蛋白(clathrin)介导内吞<sup>[9]</sup>, Magalhaes 等<sup>[10]</sup>利用共聚焦显微镜研究 GFP-PrP<sup>C</sup> 在 SN56 细胞内的胞内运输过程, 证明 PrP<sup>C</sup> 通过笼形蛋白介导内吞, 进入含有 Rab5 的内体(endosome)或高尔基体中。PrP<sup>C</sup> 缺少可以直接与衔接蛋白(adaptor protein)及笼形蛋白作用的胞浆区, 可能存在一种跨膜蛋白作为 PrP<sup>C</sup> 受体, 其胞外区结合 PrP<sup>C</sup> N 端, 其胞浆结构域携带包被小窝(clathrin-coated pit)<sup>[11]</sup>定位信号介导内吞。PrP<sup>C</sup> 可以与数种蛋白质相互作用, 如分子量为 37/67 kDa 的 laminin 蛋白可能作为受体介导 PrP<sup>C</sup> 内吞, 但仍未得到确证。不同的内吞途径可能决定 PrP<sup>C</sup> 的不同命运, 如发生触发反应, 信号反应, 或被降解。Harris<sup>[12]</sup>认为, 虽然 PrP 位于不包含笼形蛋白的脂筏中, 但是在内吞时 PrP 可以离开脂筏进入包被小窝, 通过包被小窝介导的途径内吞。具体见图 1<sup>[13]</sup>。

内质网在朊病毒病的病理机制中具有重要意义。PrP 在内质网膜上形成不同的拓扑结构, 在 PrP

收稿日期: 2004-11-22 接受日期: 2005-03-08

\* 通讯作者。Tel: 010-83534616, Fax: 010-83534616, E-mail: dongxp238@sina.com

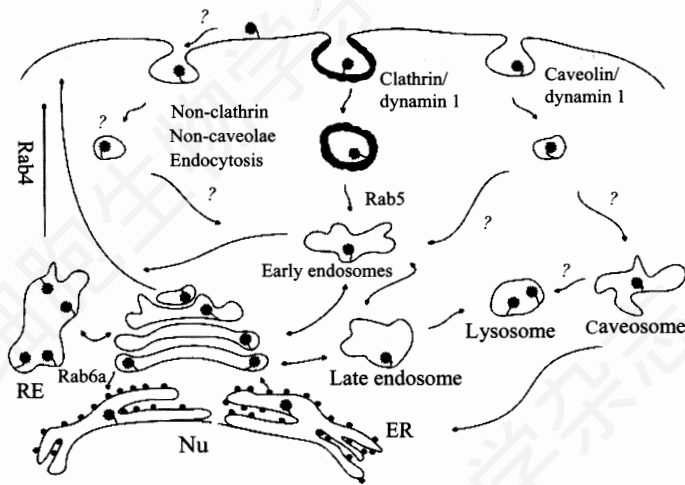


图1 PrP<sup>C</sup>的胞内运输过程<sup>[13]</sup>

PrP<sup>C</sup>生物合成途径从内质网，高尔基体和运输小泡运输到质膜，然后通过笼形蛋白、窖蛋白或其他途径介导内吞，内吞后的PrP<sup>C</sup>大部分回到细胞膜表面，在质膜和内吞小体之间进行循环。

的生物合成中存在内质网参与的逆向转运<sup>[14]</sup>，发生错误折叠的PrP由内质网逆向转运至细胞质被蛋白酶体降解<sup>[15]</sup>，高尔基体内的PrP也可能逆向转运至内质网，这些逆向转运过程可能在致病机制中发挥作用。病理性突变PrP如E200K、P102L、D178N、F197及插入9个八肽重复区的突变体的胞内运输过程发生改变，可能参与了遗传性朊病毒病的病理过程。

PrP转化的起始步骤可能发生在细胞膜的脂筏或内吞循环过程中<sup>[9]</sup>，有证据表明脂筏参与转化作用，体外试验发现含有PrP<sup>Sc</sup>的微粒体与含有PrP<sup>C</sup>的脂筏融合时发生了转化反应<sup>[6]</sup>。Beranger等<sup>[16]</sup>认为诱导转化需要PrP的细胞膜定位、内吞过程及逆向转运到内质网，阻断任何途径都可抑制PrP<sup>Sc</sup>形成。遗传性朊病毒病中突变PrP可以发生自发的转化，在培养细胞中，突变PrP在分泌途径早期(内质网中)即发生错误折叠，然后蛋白质开始聚集，至一定程度时获得PK(proteinase K)抗性<sup>[17]</sup>。

## 2 PrP在内质网膜上的拓扑结构

PrP在内质网合成时形成三类拓扑结构(图2)。(1)完全转形式(fully translocated form)——SecPrP，最后被运输到细胞膜表面，大部分PrP<sup>C</sup>采取这种结构形式；(2)跨膜形式(transmembrane form)——N<sup>tm</sup>PrP及C<sup>tm</sup>PrP，其N端分别朝向内质网腔及细胞质，通过高度保守的疏水区(aa 111~134)穿过脂双层；(3)胞浆形式(cytosolic form)——cyPrP，有证据表明，C<sup>tm</sup>PrP与cyPrP形式具有神经毒性。

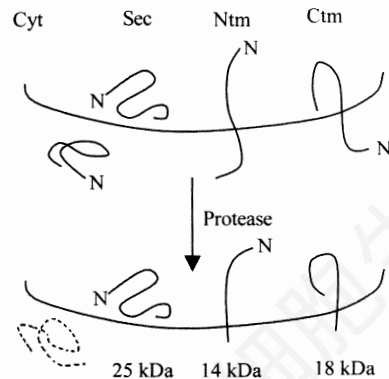


图2 PrP在内质网膜上的拓扑结构<sup>[18]</sup>

Cyt、Sec、Ntm、Ctm分别表示cyPrP(cyt)、SecPrP、N<sup>tm</sup>PrP、C<sup>tm</sup>PrP，膜上方为内质网腔，PK消化后，产生蛋白酶保护片断(内质网腔内)，SecPrP保留全长25 kDa，N<sup>tm</sup>PrP的N端片断约为14 kDa，C<sup>tm</sup>PrP的C端片断约为18 kDa，利用位点特异性抗PrP单抗可以鉴定不同的PrP片断。

### 2.1 PrP拓扑结构的形成机制

PrP的拓扑结构是在共翻译转运进入内质网的过程中形成的<sup>[19]</sup>，信号肽与跨膜区决定PrP的拓扑结构。信号肽通过决定N端的定位(细胞质/内质网腔)而改变C<sup>tm</sup>PrP的合成比例；跨膜区则通过决定膜的整合效率而改变N<sup>tm</sup>PrP及C<sup>tm</sup>PrP的合成比例<sup>[20]</sup>。PrP C端序列(aa 231~254)也可以作为内质网转运信号，在C<sup>tm</sup>PrP的形成中发挥作用。此外，内质网中的Sec61(转位子的主要成分)<sup>[21]</sup>、TRAM(translocating chain-associated protein)、SRP(signal recognition particle)受体及TRAP(translocon-associated

protein)复合体等在识别信号肽及转运起始中都有重要作用<sup>[22]</sup>。

正常细胞中存在少量的跨膜形式及胞浆形式的 PrP, Mironov 等<sup>[23]</sup>利用电镜进行超微定量分析,发现在海马、大脑皮质等部位,部分 PrP 存在于胞浆中; PrP<sup>C</sup> 在内质网进行生物合成时会产生少量的 N<sup>tm</sup>PrP 及 C<sup>tm</sup>PrP (少于总量的 10%)。在细胞模型中和转基因动物中表达病理性突变 PrP, 其拓扑结构合成比例发生改变, C<sup>tm</sup>PrP 和 / 或 cyPrP 含量升高,可能与朊病毒病的神经退行性变的机制有关。

## 2.2 C<sup>tm</sup>PrP 的神经毒性机制

携带遗传性 A117V 突变 PrP 的转基因鼠出现神经退行性变症状, 其脑中高表达 C<sup>tm</sup>PrP, 但是没有 PrP<sup>Sc</sup> 聚集。表达 GSS 相关性突变 P102L 的细胞模型中 C<sup>tm</sup>PrP 表达增多并在细胞膜上聚集, 细胞对朊病毒的敏感性增加<sup>[24]</sup>。小鼠染毒后神经细胞中 PrP<sup>Sc</sup> 与 C<sup>tm</sup>PrP 的含量都增多, 表明 PrP<sup>Sc</sup> 可能诱导 C<sup>tm</sup>PrP 形成, 产生神经毒性。因此 C<sup>tm</sup>PrP 可以由 PrP 突变体直接诱导产生, 也可由 PrP<sup>Sc</sup> 间接诱导产生。C<sup>tm</sup>PrP 可能是遗传性及感染性朊病毒病中共同的致病中间体。

C<sup>tm</sup>PrP 的致病步骤可能是, 首先因为 PrP 突变(如跨膜区及其附近区域的突变)等原因, 内质网内 C<sup>tm</sup>PrP 合成增多, 新合成的 C<sup>tm</sup>PrP 未能被快速降解, 而是逃逸出内质网, 以未知原因导致神经退行性变。神经毒性多肽 PrP106~126 可促使细胞内 PrP<sup>C</sup> 聚集<sup>[25]</sup>, 导致细胞膜表面 C<sup>tm</sup>PrP 增多, C<sup>tm</sup>PrP 可能作为朊病毒病的毒性中间体, 或作为一种新型受体与未知配体反应, 产生神经毒性。

## 2.3 CyPrP 的神经毒性机制

在 PrP 的加工和转运过程中, 部分 PrP 发生错误折叠, 由细胞质量控制体系识别并逆向转运到细胞质中被蛋白酶体降解。当蛋白酶体的功能受损, 或者错误折叠的 PrP 过多滞留于内质网, 超过蛋白酶体的降解能力限度, cyPrP 就会聚集产生毒性作用。Ma 等<sup>[26]</sup>利用蛋白酶体抑制剂诱导 cyPrP 聚集, 发现少量的 cyPrP 即具有神经毒性<sup>[27]</sup>。

在遗传性朊病毒病中, 突变增加了 PrP 的错误折叠; 在感染性朊病毒病中, PrP<sup>Sc</sup> 可能干扰内源性 PrP<sup>C</sup> 的折叠和胞内运输, 产生错误折叠蛋白; PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 转化时, 构象发生变化, 错误折叠的 PrP 可能采取 cyPrP 形式。CyPrP 可能通过转导细胞凋亡信号、与细胞内的功能蛋白质相互作用、转运

到细胞核导致细胞病变, 或延长与内质网膜相连时间产生细胞毒性<sup>[28]</sup>。

Mironov 等<sup>[23]</sup>发现部分神经元中 PrP<sup>C</sup> 主要分布于胞浆中, 认为 cyPrP 可能在某些类型的神经元细胞中无毒性, 这与 Roucou 等<sup>[29]</sup>的研究相符, 在人原代神经元细胞中, cyPrP 不产生毒性作用, 反而可以保护细胞免于 Bax 介导的细胞凋亡, cyPrP 的毒性作用可能与细胞类型有关。

值得注意的是, C<sup>tm</sup>PrP 与 cyPrP 形式不是截然分开的, 二者可能有联系, C<sup>tm</sup>PrP 的逆向转运可能会产生 cyPrP, 具有信号肽的 cyPrP 可降低细胞活力, 而病理性 C<sup>tm</sup>PrP 也含有信号肽。

## 3 内质网在朊病毒病中的作用

内质网通过内质网相关降解(ER-associated degradation, ERAD)及内质网应激反应(ER stress response)途径在 PrP 的代谢和胞内运输中发挥重要的作用, 可能与朊病毒病的病理机制相关。

### 3.1 内质网相关降解

内质网的质量控制体系的重要功能是通过内质网相关降解途径使错误折叠或不成熟蛋白质降解, 从而保证了蛋白质合成的高质量, 防止分泌蛋白的聚集, 该过程依赖于泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)<sup>[30]</sup>。在内质网的生物合成中, 错误折叠的 PrP 滞留在内质网/前高尔基体中, 经内质网的逆向转运, 由 Sec61 介导将蛋白质转运到细胞质, 进行泛素化修饰, 然后被 26 S 的蛋白酶体降解。PrP 拓扑结构比例失常可能导致朊病毒病, 在正常情况下, C<sup>tm</sup>PrP 产生后可能通过内质网相关降解机制快速降解, 而在衰老和应激等情况下, 蛋白酶体功能降低, C<sup>tm</sup>PrP 从内质网逃逸, 发挥其神经毒性。所以, 内质网的降解功能很重要, 这个体系效率降低可能造成具有潜在毒性的错误折叠蛋白聚集, 导致细胞病变。

### 3.2 内质网应激反应

在生理或病理状态下, 当内质网中的蛋白质负载与内质网的处理能力发生失衡时, 即发生内质网应激<sup>[31,32]</sup>。内质网应激反应包含 3 个方面: (1)内质网分子伴侣转录水平升高, 分泌途径的容量增加; (2)细胞内蛋白质合成减少, 以降低内质网中的负载; (3)内质网应激反应激活 caspase-12, 触发内质网特异性的级联反应, 导致细胞凋亡, 可能参与神经退行性疾病中的病理性凋亡作用, Bim 蛋白及

Bcl-2 家族成员 Bax、Bak 参与激活 caspase-12<sup>[33]</sup>。

Ivanova等<sup>[34]</sup>利用光学和电子显微镜技术研究突变 PrP 的胞内运输过程,发现突变体(如 Q217R)在细胞内的定位发生改变,滞留在内质网中。PrP 可在内质网中获得 PIPLC(磷酸肌醇脂酶 C)抗性作为滞留信号,而野生型 PrP 一般定位于高尔基体。此外,PrP 还可能通过 Rab6a 控制的途径从高尔基体逆向转运至内质网。PrP 在内质网中滞留可引发内质网应激反应,诱导细胞凋亡,可能是朊病毒病的一个重要的发病机制。

#### 4 小结

研究 PrP 胞内运输的特点及朊病毒病中 PrP 胞内运输的改变对于探寻朊病毒病的分子病理机制具有重要意义,也可以为朊病毒病的治疗策略提供线索<sup>[35]</sup>,通过干扰 PrP 的胞内转运抑制 PrP<sup>Sc</sup> 的形成,如苏拉明能够阻止 PrP 的细胞膜定位,非律平及发动蛋白突变体能抑制 PrP 的内吞、促进 PrP 从细胞膜释放,从而发挥一定的抗朊病毒活性。关于 PrP 胞内转运的研究现已取得了不小的进展,但是仍存在很多矛盾和未解决的问题,需要进一步明确 PrP 胞内运输在朊病毒病致病机制中的作用。

#### 参考文献 (References)

[1] Prusiner SB. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 13363

- [2] Castilla J *et al. Curr Mol Med*, 2004, **4**: 397  
 [3] Roucou X *et al. J Mol Med*, 2005, **83**: 3  
 [4] Aguzzi A *et al. Science*, 2003, **302**: 814  
 [5] Hachiy NS *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **327**: 894  
 [6] Baron GS *et al. EMBO J*, 2002, **21**: 1031  
 [7] Pike LJ. *Biochem J*, 2004, **378**: 281  
 [8] Peters PJ *et al. J Cell Biol*, 2003, **162**: 703  
 [9] Sunyach C *et al. EMBO J*, 2003, **22**: 3591  
 [10] Magalhaes AC *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 33311  
 [11] McMahon HT *et al. Curr Opin Cell Biol*, 2004, **16**: 379  
 [12] Harris DA. *Br Med Bull*, 2003, **66**: 71  
 [13] Prado MA *et al. J Neurochem*, 2004, **88**: 769  
 [14] Barbero P *et al. J Cell Biol*, 2002, **156**: 511  
 [15] Cardinale A *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 685  
 [16] Beranger F *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 38972  
 [17] Gauczynski S *et al. J Cell Sci*, 2002, **115**: 4025  
 [18] Kim SJ *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 26132  
 [19] Kim SJ *et al. Mol Biol Cell*, 2002, **13**: 3775  
 [20] Heinrich SU *et al. Cell*, 2000, **102**: 233  
 [21] Kanuka H *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 11723  
 [22] Fons RD *et al. J Cell Biol*, 2003, **160**: 529  
 [23] Mironov A Jr *et al. J Neurosci*, 2003, **23**: 7183  
 [24] Mishra RS *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 24554  
 [25] Gu Y *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 2275  
 [26] Ma J *et al. Science*, 2002, **298**: 1785  
 [27] Ma J *et al. Science*, 2002, **298**: 1781  
 [28] Heller U *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 36139  
 [29] Roucou X *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 40877  
 [30] Taylor JP *et al. Science*, 2002, **296**: 1991  
 [31] Rutishauser J *et al. Swiss Med Wkly*, 2002, **132**: 211  
 [32] Schroder M *et al. Mutat Res*, 2005, **569**: 29  
 [33] Scorrano L *et al. Science*, 2003, **300**: 135  
 [34] Ivanova L *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 42409  
 [35] Aguzzi A *et al. J Clin Invest*, 2004, **114**: 153

## The Role of Intracellular Trafficking of PrP in Prion Diseases

Xiao-Fan Wang, Jun Han, Jian-Mei Gao, Yan-Zhen Wan, Feng Li, Xiao-Ping Dong\*

(Prion Laboratory, National Institute for Viral Disease Control and Prevention,  
Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China)

**Abstract** Prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are a group of fatal neurodegenerative disorders that can appear in sporadic, heritable and transmissible forms. The fundamental pathogenic mechanism of prion diseases involves the post-translational conversion of PrP<sup>C</sup> into its infectious isoform PrP<sup>Sc</sup>, but it remains still unclear that how prion propagation leads to apoptosis of neuronal cells. Recently more evidences show that the intracellular trafficking of PrP<sup>C</sup> may play roles in the pathogenesis of TSE. The conversion processes of PrP<sup>C</sup> to PrP<sup>Sc</sup> in acquired or heritable prion diseases affect biosynthesis, intracellular localization and transport of cellular PrP, leading to neurodegeneration through perturbing normal function of PrP<sup>C</sup> or generating neurotoxic species. Possible relationship between the intracellular trafficking of PrP and molecular pathologic mechanism of prion diseases were discussed in this review.

**Key words** prion diseases; conversion; intracellular trafficking

Received: November 22, 2004 Accepted: March 8, 2005

\*Corresponding author. Tel: 86-10-83534616, Fax: 86-10-83534616, E-mail: dongxp238@sina.com