

www.pibb.ac.cn



全长朊粒蛋白淀粉样纤维引发细胞毒性的 机制研究^{*}

王利强¹⁾ 袁菡烨¹⁾ 陶 菁¹⁾ 郝苗苗²⁾ 陈 杰¹⁾ 朱海丽²⁾ 梁 毅^{1)**} (¹⁾ 细胞稳态湖北省重点实验室,武汉大学生命科学学院,武汉大学泰康生命医学中心,武汉 430072; ²⁾ 湖北科技学院基础医学院, 咸宁 437100)

摘要 目的 朊病毒病 (prion disease) 是一类由朊粒蛋白 (PrP) 发生错误折叠、聚集形成致病性的 PrPse 导致的具有高致 死率的神经退行性疾病。本文在细胞和动物水平开展了 PrP 纤维诱导内源 PrP 聚集和毒性机制的研究。方法 通过超速离 心结合蛋白质免疫印迹实验检测 PrP 聚集;通过氧化压力实验,使用 Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡;运用细胞超薄切片技术检测细胞线粒体形态;在动物水平,分离新生小鼠的前额叶,进行横断切片培养,在脑片上接种 PrP纤维。结果 PrP 纤维种子可以诱导内源 PrP 聚集,PrP 纤维可以诱导细胞内氧化压力升高 和细胞凋亡,PrP 纤维可以引起线粒体损伤,PrP 纤维可以诱导小鼠前额叶内源 PrP 聚集。结论 本文在细胞 和动物水平证实体外组装的 PrP 淀粉样纤维具有细胞毒性和潜在的感染性。

关键词 朊病毒病, 朊粒蛋白, PrP纤维, 蛋白质错误折叠, 聚集 中图分类号 Q2, Q5, Q7 **DOI:** 10.1

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0164

朊病毒病(prion disease),又被称为传染性海 绵状脑病(TSEs),是一类由朊粒蛋白(PrP)在 神经细胞中发生错误折叠、聚集成具有致病能力的 PrP^{se}诱发的致死性神经退行性疾病。此疾病可在 多种哺乳动物之间传播,病死率很高。人类患有朊 病毒病的临床症状常常表现为运动功能障碍、痴呆 和脑淀粉样病变等^[14]。1997年诺贝尔生理或医学 奖得主 Stanley B. Prusiner 最先描述了朊病毒 (prions),即蛋白质感染因子^[1-2]。常见的朊病毒病 包括在牛群中传播的疯牛病(bovine spongiform encephalopathy, BSE)、羊的瘙痒病(Scrapie)以 及人类之间少量存在的克雅氏病(Creatzfeldt-Jakob disease, CJD)等^[1-8]。该疾病的潜伏期很 长,一般可达到数十年,发病周期很短,病人一旦 发病,往往在一年内死亡。

尽管朊病毒病是一种罕见的神经退行性疾病, 但由于它独有的生物学特征及其种间传播的性质, 一直是近年来研究的热点^[3,9]。朊病毒是一类可以 自我复制、具有感染性的蛋白质聚集体,其可在大 脑中积累沉淀,影响中枢神经系统的正常功能,其 病变特征包括神经元丢失、脑中海绵状变形及神经 胶质细胞病变等^[10]。朊病毒病的发病机制主要是 细胞型朊粒蛋白(PrP^c)发生构象重排,形成具有 致病能力的PrP^{se},PrP^{se}可以与PrP^c发生相互作用, 紧密结合在一起,诱导PrP^c发生构象转化,从而导 致蛋白质错误折叠和聚集的级联反应,这些特征是 朊病毒在宿主间传播的基础^[1-2, 4, 11]。

近年来,随着冷冻电镜(cryo-EM)技术的发展,科学家们已逐步揭示了朊病毒的致病构象转化机制^[12-13]。本实验室和中国科学院生物与化学交 叉研究中心刘聪教授实验室合作,利用 cryo-EM 的 方法解析了全长人野生型朊病毒淀粉样纤维及其家 族遗传型朊病毒病病理突变体 E196K 的淀粉样纤

^{*} 国家自然科学基金(32271326, 32071212, 32201040)和中国博 士后科学基金(2021TQ0252, 2021M700103)资助项目。 ** 通讯联系人。

Tel: 027-68754902, E-mail: liangyi@whu.edu.cn

收稿日期: 2023-04-20, 接受日期: 2023-04-27

维结构^[12-13],发现两种纤维都是由两根原纤维丝以 左手螺旋的方式相互缠绕而成,野生型PrP纤维通 过两对盐桥发生相互作用紧密结合在一起,PrPC 端氨基酸170~229组成PrP纤维核心的6个β折叠结 构^[12],而E196K两股原纤维通过4对盐桥发生相 互作用,形成一个长的既亲水又疏水的原纤维界 面,纤维核心由其C端氨基酸175~217组成,包含 5个β折叠结构^[13]。

体外形成的淀粉样纤维和PrP^{se}具有相似特征, 如主要具有β折叠结构,并且具有蛋白酶K抗性 等^[1417]。用体外形成的淀粉样原纤维注入到过表达 人PrP的转基因小鼠活体脑组织中,经过长时间的 孵育后,小鼠出现具有朊病毒病特征的神经变性, 表明其具有潜在的致病能力^[18-20],但是,体外形成 PrP淀粉样纤维致病的分子机制仍不是很清楚。因 此,本文利用生物化学和细胞生物学方法在细胞和 动物水平揭示了体外组装的PrP淀粉样纤维的细胞 毒性和潜在的感染机制。

1 材料与方法

1.1 PrP纯化

编码全长人源PrP(23~231)的质粒是中国科 学院武汉病毒研究所肖庚富博士赠送。利用载体 pET-30a(+) 表达PrP 23~231 序列,将载体转化到 大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞 (Novagen, Merck, Darmstadt, Germany) 中进行培养, 用终浓度为 1 mmol/L的 IPTG 溶液诱导 PrP 表达, 收集菌体, 用裂解缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 0.1% TritonX-100, pH 7.4) 裂解菌体并进行超声破碎,将裂解液在 17 000g条件下离心 30 min, 弃上清, 收集包涵体 沉淀,将包涵体用缓冲液1(10 mmol/L Tris-HCl, 0.5% Triton X-100, pH 7.4)、缓冲液2 (10 mmol/L Tris-HCl, 2 mol/L NaCl, pH 7.4)、缓冲液 3 (10 mmol/L Tris-HCl, 2 mol/L Urea, pH 7.4) 依次 洗涤,并使用包涵体溶解液(10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L Na₂HPO₄ \cdot 12H₂O, 8 mol/L Urea, pH 7.4) 溶解包涵体。使用 Ni-Sepharose 纯化,获 得纯度较高PrP蛋白,将PrP蛋白在蛋白质复性缓 冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L Urea, pH 8.0) 中透析过夜, 然后采用高效液相色谱C4柱 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 纯化, 可获得高纯度 PrP蛋白^[12, 16, 21]。将重组的PrP在5 mmol/L Tris-HCl缓冲液 (pH 7.4) 中透析,浓缩后于-80℃保 存。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)和质谱分析证实,纯化的人源PrP纯 度较高,且具有完整的二硫键。使用 NanoDrop One 微体积紫外可见分光光度计 (Thermo Scientific, Waltham, MA)测其在280 nm处的吸光 度,根据蛋白质组成计算的摩尔消光系数 (2.535) (http://web.expasy.org/protparam/)来计算获得人 PrP 的浓度。

1.2 PrP纤维种子的制备

将120 µmol/L 全长重组人源 PrP 在含有 2 mol/L 盐酸胍 (GdnHCl) 和 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 中孵育,在 37°C 下 180 r/min 振荡 9~11 h,收集 PrP 原纤维。使用细胞破碎仪低功率条件超声使纤维片段化形成种子,超声5 s 停5 s,超声 5 min。然后将纤维在 5 mmol/L NaAc 缓冲液 (pH 5.0) 中透析去除盐酸胍。使用 NanoDrop OneC 微体积紫外可见分光光度计测量其在 280 nm 处的吸光度,然后根据 PrP 组成计算的摩尔消光系数 (2.535) (http://web.expasy.org/protparam/) 来测 定 PrP 原纤维的浓度。

1.3 透射电镜观察PrP纤维形态

将 10 μl 的 PrP 纤维样品(~13 μmol/L) 滴在铜 网上, 孵育 30 s, 用滤纸吸走, 再用H₂O洗涤 10 s。 然后用 2%(w/v) 醋酸铀酰染色 30 s, 在 25°C 的空 气中干燥。负染样品使用 JEM-1400 Plus 透射电子 显微镜(JEOL, 东京, 日本)进行观察。

1.4 细胞培养和转染

HEK-293T 细胞、 RK13 细胞和 SH-SY5Y 细胞使用 Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Invitrogen, Mulgrave, VIC, Australia) 培养基培养,在培养基中添加10%(v/v)胎牛血 清(Gibco)、100 U/ml链霉素和100 U/ml青霉素。 然后将细胞放入含5% CO₂的37℃细胞培养箱培 养。利用慢病毒载体表达系统(pHAGE-puro)构 建稳定表达带FLAG标签的全长人PrP的HEK-293T 细胞系和稳定表达全长人 PrP 的 SH-SY5Y 细胞系。 将目标cDNA片段插入慢病毒载体,将含有目标 cDNA、pVSVG和p976的质粒用Lipofectamine[®]2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 按2:1:1的比例包 装在HEK-293T细胞中。脂质体与DNA的比例为 2:1。转染48h后, 收获并过滤病毒, 用包装好的 慢病毒分别感染HEK-293T和SH-SY5Y细胞2次, 每次感染12h,间隔12h。为了建立稳定的细胞 系,用嘌呤霉素筛选过表达细胞。蛋白质免疫印迹

(Western blot) 检测各蛋白质的表达情况。

1.5 MTT实验

将稳定表达带 FLAG 标签的全长人 PrP 的 HEK-293T 细胞接种在96孔板中。培养24 h后,将 PrP 纤维种子(溶解于 pH 5.0 的 5 mmol/L NaAc 缓 冲液中,母液浓度为100 µmol/L)以终浓度为 0.01、0.1、1、10 µmol/L的浓度加入培养基中培养 48 h。将 MTT 原液(5 g/L)用 PBS 稀释后加入孔 中孵育4 h,直至细胞内形成甲酰胺。MTT 终浓度 为0.5 g/L。最后,用二甲亚砜溶解深蓝色甲醛晶 体,然后使用 Thermo Multiskan MK3 微孔板阅读 器(Thermo Scientific, Waltham, MA)测量其在 492 nm处的吸光度。细胞活力用含有 PrP 纤维处理 过的样品吸光度除以 5 mmol/L NaAc 缓冲液 (pH 5.0)处理过的样品吸光度得到的百分比表示。 其最终数据用 5 次独立实验所得值的平均值±SD (标准差)表示。

1.6 Western blot检测细胞内PrP聚集

稳定表达带FLAG标签的全长人PrP的HEK-293T细胞培养1d后,加入1~10 µmol/L PrP 原纤维 种子(溶解于pH 5.0 的5 mmol/L NaAc缓冲液中, 母液浓度为100 µmol/L) 孵育2 d。收集 HEK-293T 细胞,在含有1% Triton X-100、50 mmol/L Tris、 150 mmol/L NaCl、1 mmol/L 苯甲磺酰氟和蛋白酶 抑制剂的裂解缓冲液 (pH 7.6) 中重悬细胞半小 时。将细胞裂解液10000g离心10min。留出一半 上清,另一半上清与1%十二烷基肌氨酸钠 (Sarkosyl)在37℃下孵育半小时。然后将混合物 在150 000g下超离心半小时,并用PBS (pH 7.4) 洗涤沉淀一次。将 Sarkosyl 不溶性蛋白在 SDS-PAGE上样缓冲液中煮沸15 min,另一半上清作为 总蛋白质样品,也在SDS-PAGE上样缓冲液中煮沸 15 min。样品用 12.5% SDS-PAGE 分离, 然后进行 Western blot。用抗FLAG单克隆抗体对这些细胞的 Sarkosyl 不溶性 PrP 聚集体进行检测,并用抗 FLAG 和抗 β -actin 抗体对细胞裂解液进行检测。使 用BCA蛋白质定量试剂盒(Beyotime)将细胞裂 解液进行定量。为了计算 Sarkosyl 不溶性 PrP 的数 量,使用 ImageJ 软件(NIH, Bethesda, MD)确 定 PrP 条带的密度,进而计算 Sarkosyl 不溶性 PrP 聚集体占总蛋白质的比例。Sarkosyl不溶性实验由 3次独立实验获得的平均值±SD表示。

1.7 Western blot检测小鼠前额叶组织中PrP聚集 选取7~14 d的新生小鼠,断颈处死,放入75%

乙醇中浸泡消毒,迅速分离全脑。在预冷的培养基 中分离前额叶,使用 McIlwain 组织切片机将分离 的前额叶进行横断切片,厚度固定为400 µm,将 切好脑片置于Millicell-Cell Culture Inserts 微孔膜上 (0.4 µm, Millipore), 放入6孔板中, 然后加入1 ml 包含2% B27、98% Neurobasal-A Medium (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) 以及100 U/ml青 霉素和 100 mg/L 链霉素 (Gibco (Thermo scientific), Rockford, IL, USA) 的培养基, 脑片 不需要其他处理,2d后,更换新鲜培养基。向脑 片上接种10 µl、1 µmol/L PrP 纤维种子(溶解于 pH 5.0 的 5 mmol/L NaAc 缓冲液中),继续培养 5 d。取出脑切片, 在含有 1% Triton X-100、 50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L 苯甲 磺酰氟和蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液(pH 7.6)中 重悬细胞半小时,使用超声进一步破碎细胞。 10 000g的转速进行离心10 min处理,将裂解液的 上清小心用移液枪吸出保留,组织中不溶性沉淀遗 弃。在上清中取出150 µl 用于测定内源 PrP 表达 量,剩余细胞裂解液加入终浓度为1% Sarkosyl, 室温静置30 min,在4℃下10 000 g的转速进行离 心10 min, 收集上清。将上清在4℃下150 000 g条 件下超速离心30 min,吸去上清,将沉淀用PBS重 悬,在4℃下150000g再次离心30min。沉淀中含 有 PrP 聚集体,用 60 µl SDS-PAGE 上样缓冲液重 悬。在预留的细胞裂解液中加入 5×SDS-PAGE上 样缓冲液,和重悬的沉淀一起煮沸10min,用于后 续实验。配置12.5%的SDS-PAGE变性胶,利用电 泳分离蛋白质样品。使用抗 8H4 抗体 (Sigma-Aldrich) 探测小鼠前额叶中 Sarkosyl 不溶性 PrP 蛋 白。之后的转膜、封闭、孵育抗体等步骤和1.6 相同。

1.8 原子力显微镜(AFM)观察PrP淀粉样纤维的形态

取10 µl 人野生型 PrP 纤维样品滴入云母片表 面上孵育2 min,然后用10 µl 纯净水冲洗3次以去 除未结合的原纤维,并在室温下干燥。采用AFM (Bruker)的 scanassist 模式在空气中对云母表面的 原纤维进行探测。测量采用 SCANASYST-AIR 探 针。以1 Hz 的扫描速率获得固定分辨率(256×256 数 据 点)的 AFM 图 像,并使用 NanoScope Analysis 2.0软件(Bruker)进行分析。

1.9 线粒体超薄切片

选取没有内源 PrP 表达的 RK13 细胞研究 PrP

纤维对线粒体形态结构的影响,将构建的稳定表达 外源 PrP 的 RK13 细胞平铺在 6 孔板中培养 1 d,然 后加入 0 或 10 μmol/L 野生型 PrP 纤维种子(溶解于 pH 5.0 的 5 mmol/L NaAc 缓冲液中,母液浓度为 100 μmol/L)共同培养 3 d,用加入含有 5 mmol/L NaAc 缓冲液(pH 5.0)的细胞作为阴性对照。在 用含 3% 多聚甲醛和 1.5% 戊二醛的 PBS(pH 7.4) 溶液固定后,收获细胞,用 1% 锇酸冰浴固定 1 h, 然后将样品在分级丙酮中脱水,并包埋在 812 树脂 中。使用 Leica Ultracut S 显微镜制备细胞超薄切 片,并用 2% 醋酸铀和柠檬酸铅进行阴性染色。使 用 JEM-1400 Plus 透射电子显微镜(JEOL)观察细 胞超薄切片中线粒体形状、线粒体嵴完整性以及是 否存在空泡化等。所有实验均通过生物重复实验进 一步证实。

1.10 细胞氧化压力实验

稳定表达全长人PrP的SH-SY5Y细胞在6孔板 中培养1d,然后加入终浓度为10 µmol/L PrP纤维 种子(溶解于 pH 5.0 的 5 mmol/L NaAc 缓冲液中, 母液浓度为100 µmol/L) 孵育2d,利用活性氧 (ROS)检测试剂盒(碧云天,南通,中国)检测 细胞ROS水平。具体过程如下:用PBS洗涤细胞2 次,将ROS试剂盒中DCFH-DA探针用培养基稀 释,比例为1:2000,然后加入到细胞中,放于细 胞培养箱中静置20 min。吸去含有 ROS 探针的上 清,在细胞中加入培养基,进行短暂孵育,用移液 枪吸走,重复该步骤3次。在细胞中加入胰酶消 化,用灭菌的PBS将细胞进行重悬处理,使用低转 速1000g离心收集在离心管底部的细胞沉淀。在 EPICS XL-MCL流式细胞仪(Beckman Coulter)上 使用 EXPO32 MultiComp 软件 (Beckman Coulter) 测定含有 ROS 的细胞总数 (~10 000) 的百分比 (ROS水平)。以用5 mmol/L NaAc缓冲液 (pH 5.0) 孵育的稳定表达全长人 PrP 的 SH-SY5Y 细胞为对 照。ROS水平表示为3个独立实验所得值的平均值 $\pm SD_{\circ}$

1.11 流式细胞术检测细胞凋亡实验

稳定表达全长人PrP的SH-SY5Y细胞在6孔板 中培养1d,然后加入终浓度为10µmol/LPrP纤维 种子(溶解于pH 5.0的5 mmol/LNaAc缓冲液中, 母液浓度为100µmol/L)孵育2d。使用Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(Beyotime)染色后 流式细胞术检测凋亡细胞。用2.5g/L胰蛋白酶 (Promega, Madison, WI) 消化后收获细胞,在4°C 下用PBS洗涤,并用185 μ l的结合缓冲液重悬。然 后将样品与5 μ l的Annexin V-FITC 和10 μ l的PI在 4°C的黑暗中孵育10 min。使用EPICS XL-MCL流 式细胞仪 (Beckman Coulter, Fullerton, CA)分 析Annexin V的结合,收集~2×10⁴个细胞,计算凋 亡细胞的百分比。以用5 mmol/L NaAc 缓冲液 (pH 5.0) 孵育的稳定表达全长人 PrP 的 SH-SY5Y 细胞为对照。凋亡细胞百分比用3次独立实验的平 均值±SD表示。

1.12 数据分析

实验数据均以平均值±SD表示, P值采用 Student's t检验确定。P<0.05为具有显著性差异。 以下标准贯穿全文: *P<0.05, **P<0.01, ***P< 0.001。

2 实验结果

2.1 PrP纤维对内源PrP聚集的影响

将全长人野生型 PrP 与含有 2 mol/L 盐酸胍的 20 mmol/L Tris-HCl缓冲液 (pH 7.4)中共同孵育, 放入在 37°C摇床中振荡 9~11 h,获得平台期的 PrP 淀粉样纤维。利用透射电子显微镜观察发现 PrP 形 成的淀粉样纤维无明显分叉和聚集现象,纤维长而 直(图 1a)。进一步利用 AFM 轻敲模式检测了人野 生型 PrP 淀粉样纤维的结构,从图中可以明显看出 PrP 形成了均一性和分散性较好的纤维样聚集体 (图 2)。图 2b 是 2a 中方框区域局部放大图像,从 中可以看到大部分纤维都是以左手螺旋的方式缠绕 生长,纤维长而直,并未有分叉现象,这种特征和 利用透射电子显微镜观察的结果相吻合。

为了研究 PrP 淀粉样纤维的致病机制,本文构 建了稳定表达含有 FLAG 标签的 PrP HEK-293T 细 胞系,通过 MTT 实验检测了外源加入 PrP 纤维对 稳定表达 PrP 的 HEK-293T 细胞活力的影响。加入 0.01~10 μmol/L PrP 纤维处理后的细胞活性与对照 细胞的活性比值依次为 94.54%、93.87%、89.32% 和 66.02% (图 1b)。通过显著性定量分析发现,在 0.1 μmol/L 和 1 μmol/L PrP 纤维处理条件下,细胞 活性与对照组相比降低约 10%,而 10 μmol/L PrP 纤维处理使得细胞活力降低约 30%,表明 PrP 纤维 可以降低细胞活力,且其影响具有浓度依赖效应, 即浓度越高引起的细胞毒性越强(图 1b)。接着, 用变性剂 Sarkosyl溶解细胞中的 PrP 单体和寡聚体,



Fig. 1 PrP fibrils are cytotoxic, and transmissible to induce the misfolding of endogenous PrP^c in cells and in the frontal cortices of infant mice

(a) A negative-staining TEM image of amyloid fibrils from full-length human PrP^C. (b) Cytotoxicity of PrP fibril seeds to HEK-293T cells stably expressing FLAG-tagged full-length human PrP^C assessed by the MTT assay. (b, c) Cells were treated with indicated concentrations of PrP fibril seeds for 2 d. (b) Cell viability data were normalized to cells treated with 5 mmol/L NaAc buffer (pH 5.0) (gray bar), and are expressed as mean±S.D. of the values obtained in five independent experiments. 0.01, 0.1, 1, and 10 µmol/L PrP fibril seeds, P=0.17, 0.016, 0.015, and 0.000 023, respectively. (c) The sarkosyl-insoluble pellets from HEK-293T cells stably expressing FLAG-tagged full-length human PrP^C were probed using anti-FLAG antibody, and the cell lysates were probed using the anti-FLAG and anti-β-actin antibodies, respectively. (d) The sarkosyl-insoluble pellets from the frontal cortices of 18 infant mice were probed using anti-8H4 antibody, and the frontal cortice lysates were probed using the anti-8H4 and anti-β-actin antibodies, respectively. Slices were seeded with 1 µmol/L PrP fibril seeds for 5 d. The diglycosylated, monoglycosylated, and unglycosylated PrP bands are referred to as "di", "mono", and "un", respectively, and are annotated in (c) and (d). (e) The normalized amount of insoluble PrP aggregates in HEK-293T cells stably expressing PrP^C was calculated as the ratio of the density of insoluble PrP aggregate bands to the total density of all PrP bands in cell lysates. HEK-293T cells stably expressing PrP^C incubated with 5 mmol/L NaAc buffer (pH 5.0) were used as the control. (e, f) The normalized amounts of insoluble PrP aggregates are expressed as mean±S. D. (with error bars) of values obtained in three independent experiments. (e) 1 and 10 µmol/L PrP fibril seeds, P=0.29 and 0.001 3, respectively. (f) The normalized amount of insoluble PrP aggregates in those frontal cortices was calculated as the ratio of the density of insoluble PrP aggregate bands to the total density of all PrP bands in frontal cortice lysates. The frontal cortices incubated with 5 mmol/L NaAc buffer (pH 5.0) were used as the control. 1 µmol/L PrP^C, P=0.17; 1 µmol/L PrP fibril seeds, P=0.018. Statistical analyses were performed using the Student's t test. Values of P<0.05 indicate statistically significant differences. The following notation is used throughout: *P<0.05, **P<0.01, and ***P<0.001 relative to controls.

Fig. 2 High–resolution AFM images of PrP fibrils (a) AFM image of amyloid fibrils from full-length human PrP^{C} . (b) An 8-fold enlarged image from (a), showing two protofibrils intertwined into a left-handed helix, with a fibril full width of (27.6±1.3) nm (*n*=8) and a helical pitch of (159.9±4.4) nm (*n*=8).

通过超速离心分离细胞中Sarkosyl不溶性聚集体, 进一步使用Western blot定量检测了各PrP纤维处理 条件下细胞中聚集体的含量,发现在HEK-293T细 胞中,1µmol/L PrP纤维处理条件下 PrP聚集体相 对含量和不加 PrP纤维处理则使得细胞内 PrP聚集体显 著增多(图1c)。通过显著性分析发现,10µmol/L PrP纤维处理条件下形成的 PrP聚集体相对含量为 对照组的2.7倍(图1e)。这些实验表明,PrP纤维 具有和 PrP^{se}类似的性质,引起细胞毒性,同时诱 导内源 PrP发生错误折叠,形成聚集体。

2.2 PrP纤维对小鼠前额叶内源PrP聚集的影响

在细胞水平,实验表明PrP纤维具有和PrP^{sc}类 似的性质,可以诱导细胞内PrP发生错误折叠,形 成聚集体,那么在更复杂的脑组织中PrP纤维是否 会诱导内源PrP聚集?研究发现,使用variant CJD 病人的PrP^{sc}感染小鼠过程中,PrP^{sc}在小鼠前额叶 皮层中会有大量积聚^[22],因此本文选择分离新生 小鼠前额叶皮层进行研究。

使用去垢剂 Sarkosyl溶解前额叶中的 PrP 单体和寡聚体,通过超速离心分离细胞中 Sarkosyl不溶性聚集体,进一步使用 Western blot 定量检测前额叶细胞中 PrP 聚集体的含量。发现在前额叶皮层中,1 µmol/L PrP^c处理条件下 PrP 聚集体相对含量与对照组相比无明显差异,而1 µmol/L PrP 纤维处

理则使得前额叶皮层中 PrP 聚集体显著增多 (图1d),通过显著性分析发现,1 μmol/L PrP纤维 处理条件下形成的 PrP 聚集体相对含量为对照组的 1.4倍(图1f, *P*=0.018),这表明 PrP纤维可以诱导 小鼠前额叶皮层中内源 PrP 的聚集。

2.3 PrP纤维对细胞内氧化压力和细胞凋亡的影响

研究表明,蛋白质在细胞中发生错误折叠、聚 集会引起线粒体中氧化压力的升高,进而影响细胞 功能使其紊乱,引起神经元死亡^[23-25]。那么外源加 入PrP纤维是否会引起细胞内氧化压力升高呢?本 文利用DCFH-DA活性氧检测试剂盒检测了PrP纤 维对细胞内氧化压力水平的影响,DCFH-DA是一 种ROS探针,在细胞内被分解为DCFH,进而可以 与细胞中的活性氧反应产生具有荧光的DCF。

选用稳定表达外源人 PrP 的 SH-SY5Y 细胞进 行氧化压力测定, SH-SY5Y 细胞是神经母瘤细胞, 其神经细胞的特征使实验结果更可信。在细胞中加 入终浓度为 10 µmol/L PrP 纤维处理细胞 48 h (图 3b),对照组加入等体积的 5 mmol/L NaAc (pH 5.0)(图 3a),利用流式细胞技术检测细胞内 氧化压力。发现 PrP 纤维处理的实验组和 5 mmol/L NaAc (pH 5.0)处理的对照组相比,细胞内氧化 压力值从 2.12% (图 3a)上升至 64.46% (图 3b), 细胞内氧化压力显著升高 (*P*=0.000 41)(图 3c)。 这些结果表明, PrP 纤维可能是通过诱导细胞内源 PrP 发生聚集,进一步诱导引起的细胞内氧化压力 升高。

本文的实验结果证实,PrP 纤维可以诱导细胞 内较高氧化压力水平,过高的 ROS 对细胞造成的 损伤可能会通过诱导细胞凋亡水平来反映,因此, 进一步检测了 PrP 纤维对稳定表达外源人 PrP 的 SH-SY5Y 细胞凋亡水平的影响。在 SH-SY5Y 稳转 细胞中加入终浓度为10 µmol/L PrP 纤维处理 48 h 后,细胞早期凋亡、晚期凋亡和总凋亡水平依次为 2.96%、10.00% 和 12.96% (图 3e),相较于 5 mmol/L NaAc (pH 5.0)处理的对照组细胞(分 别为 3.20%、2.34% 和 5.54%)(图 3d),其晚期凋 亡水平显著升高(*P*=0.000 13)(图 3f)。



Fig. 3 PrP fibrils induce severe ROS production (*P*=0.000 41) and late apoptosis (*P*=0.000 13) in cells stably expressing PrP^c

SH-SY5Y neuroblastoma cells stably expressing full-length human PrPC were cultured for 1 d and then incubated with 10 μ mol/L PrP fibril seeds (b, e) or 5 mmol/L NaAc buffer at pH 5.0 (a, d) for 2 d. (a, b) The percentage of cells with ROS was determined by flow cytometry using the ROS probe DCFH-DA. (d, e) The percentage of apoptotic cells was also determined by flow cytometry, and the four quadrants distinguished by annexin V-FITC/PI staining represent viable cells (Lower left quadrant, R4), early apoptotic cells (Lower right quadrant, R5), late apoptotic cells (Upper right quadrant, R3), and operation-damaged cells (Upper left quadrant, R2). The percentages of ROS cells (c) and apoptotic cells (f) are as mean \pm S.D. (with error bars) of values obtained in three independent experiments. SH-SY5Y cells stably expressing full-length PrPC incubated with 5 mmol/L NaAc buffer (pH 5.0) were used as controls. Statistical analyses were performed using the Student's *t* test. Values of *P*<0.05 indicate statistically significant differences. The following notation is used throughout: **P*<0.05, ***P*<0.01, and ****P*<0.001 relative to control.

2.4 PrP纤维对线粒体损伤的影响

蛋白质在细胞中的异常聚集会引起细胞中氧化 压力应激反应,导致大量的氧自由基产生,会造成 细胞中线粒体的损伤诱发一系列疾病的发生^[26]。 已经发现PrP纤维可以诱导细胞内PrP发生错误折 叠形成聚集体,同时诱导氧化压力增强,那么其对 线粒体形态结构是否会有影响?使用超薄切片技术 结合透射电子显微镜观察检测了PrP纤维引起的线 粒体损伤。实验结果表明,对照组人野生型PrP稳转RK13细胞中(图4a,b),大部分线粒体呈现管状或球形,线粒体嵴较完整(白色箭头标注)。而当用10μmol/L PrP纤维处理细胞后(图4c,d),线粒体损伤水平较对照组明显增多(图4e),形成多种形态,线粒体内的嵴发生断裂,且排列错乱,逐步出现空泡化现象(黄色箭头标注)(图4c,d)。





(a–d) RK13 cells stably expressing full-length human PrP^{C} were cultured for 1 d and then incubated with 10 µmol/L PrP fibril seeds (c, d) or 5 mmol/L NaAc buffer at pH 5.0 (a, b) for 2 d. The enlarged regions (b) and (d) show 6-fold enlarged images from (a) and (c), respectively, and display the detailed structures of mitochondria in RK13 cells. Nuclei are highlighted using black arrows (a and c). The morphology of normal mitochondria in RK13 cells incubated with NaAc buffer (b), which are highlighted by white arrows, was tubular or round. PrP fibril treatment caused severe mitochondrial impairment in RK13 cells expressing PrP^{C} (d). Most of the mitochondria in the cells (56%) became swollen and vacuolized, which is highlighted by yellow arrows. Samples were negatively stained using 2% uranyl acetate and lead citrate. (e) Quantification of TEM images performed on biological replicates show that PrP fibrils induce severe mitochondrial damage in cells stably expressing PrP^{C} . The relative number of mitochondria (normal/total) (open red circles shown in scatter plots) is expressed as mean±*S*.*D*. (with error bars) of values obtained in three biological replicates. About 20 cells were counted in each group. PrP fibrils, *P*=0.000 000 24. RK13 cells stably expressing full-length human PrP^{C} treated without PrP fibrils were used as a control. A significantly lower number of normal mitochondria was observed in PrP fibril-treated cells than did in control cells treated by NaAc buffer ((0.560±0.119) for PrP^{C} +PrP fibrils *versus* (0.846±0.050) for PrP^{C} +NaAc buffer). Statistical analyses were performed using the Student's *t* test. Values of *P*<0.05 indicate statistically significant differences. *****P*<0.000 1 relative to control.

3 讨 论

蛋白质错误折叠引起的神经退行性疾病一直是 近几十年的研究热点,但是对于体内相关样本的采 集和研究一直存在着各种各样的制约因素,对于朊 病毒病,由于PrP^{sc}高度传染性,使得研究其致病 机制和解析其三维结构的危险系数大大增加,因此 在体外模拟 PrP 的聚集过程,研究 PrP 纤维的致病 机制是十分有必要的。诺贝尔奖得主 Prusiner 教授 课题组进行了一系列研究,发现在过表达PrP的转 基因小鼠脑组织中接种 PrP 纤维, 在经过长时间的 孵育后,转基因小鼠会表现出朊病毒病相关的神经 退行性症状^[18-20]。不同之处为病理条件下的PrP^{sc} 比体外形成 PrP 纤维具有更强的致病性^[34]。在前 期的研究中,利用Cryo-EM的方法,本课题组解 析了高分辨率PrP纤维的三维结构,揭示了PrP^c发 生错误折叠聚集形成PrP纤维过程中其构象的转化 分子机制,在这个过程中PrP^cC端的α2和α3发生 构象重新折叠,形成6个β折叠结构,分子内的二 硫键(Cys179和Cys214之间)可以稳定 PrP 纤维 结构形态^[12]。那么体外组装形成的 PrP 纤维是否可 以诱导内源 PrP 聚集?是否具有细胞毒性?这些问 题都值得探索。因此,本文进一步深入到细胞水平 和动物水平研究 PrP 纤维对细胞内源 PrP 积聚的影 响,揭示 PrP 纤维诱导内源 PrP 积聚和毒性的机制。

首先,利用超速离心结合 Western blot 实验研究 PrP 纤维对内源 PrP 聚集能力的影响, 朊病毒假 说认为, PrP^{se}可以作为模板诱导细胞型 PrP^c发生错 误折叠,形成 PrP^{se [1-2, 4, 11]}。实验选用稳定表达含 Flag标签的人野生型 PrP HEK-293T 细胞进行研究, 发现 10 µmol/L PrP 纤维处理都使得细胞内 PrP 聚集体显著增多, PrP 聚集体相对含量为对照组的 3 倍 左右,表明 PrP 纤维具有和 PrP^{se}类似的性质,可以 诱导内源 PrP 发生错误折叠,形成聚集体。

其次,利用 MTT、流式细胞技术和细胞超薄 切片等方法研究了 PrP 纤维诱导的细胞内氧化压 力、细胞凋亡水平和线粒体损伤的影响。选用了 RK13 细胞、SH-SY5Y 细胞和 HEK-293T 细胞进行 PrP纤维引起的细胞毒性方面的研究发现,PrP纤维可以诱导SH-SY5Y稳转细胞中氧化压力升高; 通过流式细胞检测技术检测凋亡实验发现,PrP纤维可以诱导细胞发生晚期凋亡;通过细胞超薄切片结合透射电子显微镜观察发现,PrP纤维可以引起细胞中线粒体形态结构的异常,空泡化严重,这可能会进一步导致细胞功能体系异常,引起代谢功能紊乱。这些实验结果表明,PrP纤维可以通过诱导内源PrP的聚集,引起细胞内氧化压力的升高和线粒体损伤,同时PrP纤维还可以诱发细胞凋亡的产生。但是,对于PrP纤维诱导细胞氧压升高和凋亡的机制仍不清楚。

最后,在动物水平研究了PrP纤维对前额叶皮 层内源PrP聚集的影响。朊病毒病的病理特征为脑 组织出现海绵样病变,其主要发病部位会随着疾病 的不同而发生改变,如对于CJD、格斯特曼氏综合 征 (Gerstmann-Sträussler-Scheinker, GSS) 病和人 的库鲁病 (Kuru), PrP^{sc}主要位于海马和大脑皮 层,相比之下,致死性家族性失眠(fatal familial insomnia, FFI) 中 PrP^{sc}主要集中在丘脑^[3]。研究 人员用人源的Kuru和vCJD疾病的PrPse去感染稳定 表达人野生型 PrP 的小鼠,发现 PrP^{sc}在前额叶皮 层、海马组织的丘脑中有大量沉积^[22]。因此,本 实验选择分离新生小鼠前额叶作为研究对象,因为 新生小鼠的神经元尚未完全分化,较敏感,相对容 易被感染。将新生小鼠前额叶皮层进行横断切片, 接种 PrP 纤维进行培养,通过超速离心结合 Western blot 实验发现, PrP 纤维可以诱导新生小鼠 前额叶中内源 PrP 的聚集,具有类似于 PrP^{sc}的 性质。

研究表明, PrP^c主要定位于细胞膜上,细胞膜上的 PrP^c可以通过其 N端的柔性区域 KKRPKP 与低密度脂蛋白受体相关蛋白1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1, LPR1)发生相互作用,通过内吞途径进入胞质^[27-28]。体外重组的 PrP 纤维和 PrP^{se}的 N端柔性区域 KKRPKP 具有和 PrP^c相似的特征,都可以通过其 N端的柔性序列 KKRPKP 与 LPR1 发生相互作用,诱导细胞发生内吞,进入细胞质^[12-13, 29-32]。本文中,体外组装的人源 PrP 纤维结构表明,其 N端的 KKRPKP 处于无序结构游离在纤维表面^[12],因此接种在脑片上的PrP 纤维和接种于细胞中的 PrP 纤维种子都可以通过内吞作用进入细胞内,进而诱导内源 PrP 发生聚集,引起细胞毒性。

本文的研究结果从细胞和动物两个层面证明了 PrP 纤维可以诱导内源 PrP 的聚集。根据这些实验 结果,本文提出了一种 PrP 纤维致病机制的模型: PrP 纤维通过与细胞内源 PrP 相互作用,诱发细胞 内 PrP 发生错误折叠,形成聚集体,PrP 纤维聚集 体可以诱导细胞内氧化压力升高和细胞凋亡,同时 引起线粒体损伤,这会进一步诱发细胞代谢功能紊 乱,引发一系列朊病毒病相关临床症状(图5)。





A hypothetical model shows how PrP fibril seeds (red bricks) enter into mammalian cells through endocytosis, accompanied by PrP^{C} (PDB 1QLX) (shown in ribbon representation), are transmissible to induce the misfolding of nascent PrP^{C} (blue ropes) into PrP fibrils (blue bricks), and exhibit cytotoxicity to mammalian cells. More importantly, PrP fibril seeds elevate ROS production *via* aggravating mitochondrial stress resulting from PrP aggregation.

4 结 论

本文在细胞和动物水平证实体外组装的PrP淀粉样纤维具有细胞毒性和潜在的感染性。这些淀粉样纤维不仅可以在细胞水平诱导PrP发生错误折叠,还可以诱导新生小鼠前额叶内源PrP发生错误折叠。

参考文献

- Prusiner S B. Prions. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(23): 13363-13383
- [2] Prusiner S B. Molecular biology and pathogenesis of prion

diseases. Trends Biochem Sci, 1996, 21(12): 482-487

- [3] Scheckel C, Aguzzi A. Prions, prionoids and protein misfolding disorders. Nat Rev Genet, 2018, 19(7): 405-418
- [4] Diaz-Espinoza R, Soto C. High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. Nat Struct Mol Biol, 2012, 19(4): 370-377
- [5] Prusiner S B. A unifying role for prions in neurodegenerative diseases. Science, 2012, 336(6088): 1511-1513
- [6] Kim M O, Takada L T, Wong K, et al. Genetic PrP prion diseases. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(5): a033134
- [7] Soto C. Prion hypothesis: the end of the controversy?. Trends Biochem Sci, 2011, 36(3): 151-158
- [8] Pan K M, Baldwin M, Nguyen J, et al. Conversion of α-helices into β-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(23): 10962-10966
- [9] Aguzzi A, Cecco E D. Shifts and drifts in prion science. Science, 2020, 370(6512): 32-34
- Budka H. Neuropathology of prion diseases. Br Med Bull, 2003, 66: 121-130
- [11] Soto C, Estrada L, Castilla J. Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. Trends Biochem Sci, 2003, 31(3): 150-155
- [12] Wang L Q, Zhao K, Yuan H Y, et al. Cryo-EM structure of an amyloid fibril formed by full-length human prion protein. Nat Struct Mol Biol, 2020, 27(6): 598-602
- [13] Wang L Q, Zhao K, Yuan H Y, et al. Genetic prion disease-related mutation E196K displays a novel amyloid fibril structure revealed by cryo-EM. Sci Adv, 2021, 7(37): eabg9676
- [14] Bocharova O V, Breydo L, Parfenov A S, et al. In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP^{Sc}. J Mol Biol, 2005, 346(2): 645-659
- [15] Tattum M H, Cohen-Krausz S, Thumanu K, et al. Elongated oligomers assemble into mammalian PrP amyloid fibrils. J Mol Biol, 357(3): 975-985
- [16] Zhou Z, Yan X, Pan K. *et al*. Fibril formation of the rabbit/human/ bovine prion proteins. Biophys J, 2011, **101**(6): 1483-1492
- [17] Pan K, Yi C W, Chen J, et al. Zinc significantly changes the aggregation pathway and the conformation of aggregates of human prion protein. Biochim Biophys Acta, 2015, 1854(8): 907-918
- [18] Legname G, Baskakov I V, Nguyen H O, et al. Synthetic mammalian prions. Science, 305(5684): 673-676

- [19] Colby D W, Wain R, Baskakov I V, et al. Protease-sensitive synthetic prions. PLoS Pathog, 2010, 6(1): e1000736
- [20] Colby D W, Giles K, Legname G, et al. Design and construction of diverse mammalian prion strains. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(48): 20417-20422
- Bocharova O V, Breydo L, Salnikov V V, *et al.* Copper(II) inhibits *in vitro* conversion of prion protein into amyloid fibrils. Biochemistry, 2005, 44(18): 6776-6787
- [22] Asante E A, Smidak M, Grimshaw A, et al. A naturally occurring variant of the human prion protein completely prevents prion disease. Nature, 2015, 522(7557): 478-481
- [23] Asuni AA, Guridi M, Sanchez S, et al. Antioxidant peroxiredoxin 6 protein rescues toxicity due to oxidative stress and cellular hypoxia in vitro, and at-tenuates prion-related pathology in vivo. Neurochem Int, 2015, 90: 152-156
- [24] Islam M. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. Neurol Res, 2017, 39(1), 73-82
- [25] Zanetti F, Carpi A, Menabo R, *et al.* The cellular prion protein counteracts cardiac oxidative stress. Cardiovasc Res, 2014, 104(1):93-102
- [26] Li C, Wang D, Wu W, et al. DLP1-dependent mitochondrial fragmentation and redistribution mediate prion-associated mitochondrial dysfunction and neuronal death. Aging Cell, 2018, 17(1): e12693
- [27] Sunyach C, Jen A, Deng J, et al. The mechanism of internalisation of GPI anchored prion protein. EMBO J, 2003, 22(14): 3591-3601
- [28] Parkyn C J, Vermeulen E G, Mootoosamy R C, et al. LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. J Cell Sci, 121(Pt 6): 773-783
- [29] Novitskaya V, Makarava N, Bellon A, *et al.* Probing the conformation of the prion protein within a single amyloid fibril using a novel immunoconformational assay. J Biol Chem, 2006, 281(22):15536-15545
- [30] Kraus A, Hoyt F, Schwartz C L, *et al.* High-resolution structure and strain comparison of infectious mammalian prions. Mol Cell, 2021, 81(21): 4540-4551
- [31] Hallinan G I, Ozcan K A, Hoq M R, et al. Cryo-EM structures of prion protein filaments from Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. Acta Neuropathol, 2022, 144(3):509-520
- [32] Jen A, Parkyn C J, Mootoosamy R C, *et al.* Neuronal low-density lipoprotein receptor-related protein 1 binds and endocytoses prion fibrils *via* receptor cluster 4. J Cell Sci, 2010, **123**(Pt 2): 246-255

Cytotoxic Amyloid Fibrils From Full–length Human PrP^c are Transmissible to Induce The Misfolding of Endogenous PrP^{c*}

WANG Li-Qiang¹, YUAN Han-Ye¹, TAO Jing¹, HAO Miao-Miao², CHEN Jie¹, ZHU Hai-Li², LIANG Yi^{1)**}

(¹⁾Hubei Key Laboratory of Cell Homeostasis, College of Life Sciences, TaiKang Center for Life and Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

²⁾School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Prion diseases are infectious, lethal neurodegenerative disorders principally caused by the conformational conversion of prion protein (PrP) from its cellular form (PrP^c) into a protease-resistant, aggregated form (PrP^{sc}) in humans and various vertebrate species. We have recently reported a cryo-EM structure of an amyloid fibril formed by full-length human PrP, which features a parallel in-register intermolecular β sheet architecture. However, it is unclear whether amyloid fibrils from full-length human PrP^c are cytotoxic and transmissible. Methods Sarkosyl-insoluble Western blotting and cell viability assays were used to detect PrP aggregation and cell viability, respectively. Oxidative stress detection and annexin V-FITC apoptosis detection assays were also used for the determination of ROS production and cell apoptosis, respectively. Results Human PrP fibrils are cytotoxic, and transmissible to induce the misfolding of endogenous PrP^c not only in cells but also in the frontal cortices of infant mice. The PrP fibrils also induce severe mitochondrial damage in cells stably expressing PrP^c. Importantly, the PrP fibrils elevate ROS production via aggravating mitochondrial stress resulting from PrP aggregation and induce severe late apoptosis in cells stably expressing PrP^c. Conclusion We demonstrate that PrP fibrils prepared *in vitro* are cytotoxicity and have pathogenic potential.

Key words prion disease, prion protein, PrP amyloid fibrils, protein misfolding, aggregation **DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0164

** Corresponding author.

- Tel: 86-27-68754902, E-mail: liangyi@whu.edu.cn
- Received: April 20, 2023 Accepted: April 27, 2023

^{*} This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32271326, 32071212, 32201040) and China Postdoctoral Science Foundation (2021TQ0252, 2021M700103).