

蛋白质感染颗粒与二价铜离子

李 宁 秦浚川*

(南京大学医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

摘要 蛋白质感染颗粒 (PrP) 的错误折叠被认为是引起一些神经退化性疾病的主因, 但其正常构象 (PrP^C) 的功能却一直不为人所知. 近年来研究发现, 在正常细胞中, 尤其是脑细胞中, 细胞膜 PrP^C 可通过内吞作用进入细胞质而将 Cu²⁺ 载运至 SOD1, 从而参与调节 SOD1 的活性及细胞铜代谢. 另有研究表明, Cu²⁺ 对于 PrP^{Sc} (错误构象) 的蛋白水解酶 K 抗性的恢复及不同“病株”的形成也有很重要的作用.

关键词 二价铜离子 (Cu²⁺), 蛋白质感染颗粒 (PrP), PrP^C, PrP^{Sc}

学科分类号 Q71

已有越来越多证据支持 1982 年由 Prusiner 等^[1] 提出的蛋白质感染颗粒 (proteinaceous infectious particle, prion) 假说, 即正常的细胞膜糖蛋白 PrP^C (cellular prion protein) 仅通过错误折叠改变构象成非正常蛋白 PrP^{Sc} (Sc 代表 scrapie), 从而引起 PrP^{Sc} 的积聚, 最终导致神经元的积聚 β -淀粉样变性, 是一系列神经退化性疾病, 如羊搔痒症 (scrapie for sheep)、牛海绵状脑病 (bovine spongiform encephalopathy, BSE) 和人克雅氏病 (Creutzfeldt-Jacob diseases, CJD) 等的主因. 但 PrP^C 的正常生理功能却一直不为人所知. 近几年来, 研究发现, PrP^C 与 Cu²⁺ 关系密切. 在正常细胞中, 尤其是脑细胞中, PrP^C 很可能具有 Cu²⁺ 膜载运蛋白功能, 且将 Cu²⁺ 载运至 Cu/Zn 超氧化物歧化酶 (SOD1), 从而参与调节 SOD1 的活性和细胞的铜代谢. 另有研究表明, Cu²⁺ 对于 PrP^{Sc} 的辅助复性及不同“病株”的形成也有很重要的作用.

1 PrP^C 的 Cu²⁺ 膜载运蛋白功能

很早已发现, PrP^C 通过 C 端的糖基化磷酸肌醇 (glycosyl phosphatidylinositol, GPI) “锚定”在细胞膜上, 但与其他 GPI “锚定”蛋白不同, PrP^C 可通过网格蛋白 (clathrin) 通道“内吞”入细胞质; 在细胞质中, 一部分 PrP^C 被蛋白水解酶切去 N 端一段, 另一部分完整的 PrP^C 则返回细胞膜. 这一现象在神经元细胞、神经皮质细胞及成纤维细胞瘤中均有发现^[2]. 那么, 此循环有何生理意义? 实验研究表明, PrP^C 很可能具有 Cu²⁺ 膜载运蛋白功能.

PrP^C 由 231 个氨基酸组成 (鼠 PrP, 其他属种与此差别不大, 在构象上基本无差别), 是一个具有两个糖基化位点的糖蛋白. PrP (1~22) 为信号肽, PrP (125~231) 是 PrP^C 的核心区域, 由 3 个 α 螺旋和 2 个 β 折叠构成. PrP (23~124) 则非常柔性, 无一定构象. 其中 PrP (51~91) 是非常保守的富含 Gly 的区域, 包括序列 (PHGGGWGQ)₄ (PrP (61~91)) 和缺少 His 残基的类似序列 (PQGGGWGQ) (PrP (51~59))^[3,4]. 早在 1992 年, Sulkowski^[5] 即发现 PrP (51~91) 具有与过渡金属离子结合的功能. 不久, Pan 等^[6] 报告, 含 Cu²⁺ 的亲和层析柱对于提纯 PrP^C 是有效的. 后来进一步证实, PrP (51~91) 可与 Cu²⁺ 特异性结合 (PrP (51~91) : Cu²⁺ = 1:4), 亲和常数 K_d 约为 5~10 μ mol/L (pH 7.4 左右). 其亲和性与 pH 值有关, 在 pH 6 以下显著下降. PrP^C 也可与 Cu²⁺ 特异性结合 (PrP (51~91) : Cu²⁺ = 1:5), K_d 约为 14 μ mol/L (中性条件)^[7]. 圆二色性法显示, 结合 Cu²⁺ 后, PrP (23~124) 的构象发生了显著变化. 可见光吸收光谱、可见圆二色性谱和电子自旋共振法 (ESR) 结果提示, Cu²⁺ 与 3 个 N 配体和 1 个氧配体形成平面 (square planar) 结构. 质子核磁共振波谱进一步指出, 每个重复序列中的 His 残基可能是 Cu²⁺ 的结合位点. 根据以上结果, Viles 等^[4] 提出了 Cu²⁺ 与 PrP (51~91) 结合的模式图 (图 1). Morrillas 等

* 通讯联系人.

Tel: 025-3592396-805, E-mail: jcqin@nju.edu.cn

收稿日期: 2000-12-04, 接受日期: 2001-01-20

发现^[8], PrP^C与细胞膜结合以后, 其N端的PrP (23~124)并非柔性, 而具有特定构象, 从而使细胞膜上PrP^C与Cu²⁺的亲合力更高. 以上结果充分说明, PrP^C在细胞膜上能够与Cu²⁺特异性结合, 并具有特定的亲和常数.

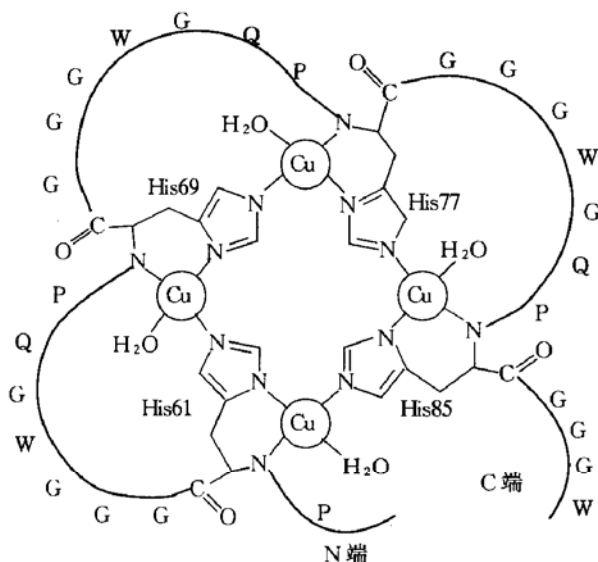


Fig. 1 Binding motif of Cu²⁺ and PrP (51~91)

图1 Cu²⁺和PrP (51~91)结合的模式图

用缺陷PrP基因的Prnp^{0/0}鼠进行研究的结果使Brown等^[9]认为, PrP^C很可能是细胞膜上主要的Cu²⁺结合蛋白. 全反射X射线荧光法 (total reflection X-ray fluorescence, TXRF) 测量野生型鼠脑细胞膜的Cu²⁺含量为 (20.1 ± 1.4) μg/g, 而相应的Prnp^{0/0}鼠则为 (1.3 ± 0.05) μg/g, 显著降低. 这一现象在突触小体和内吞体 (endosome) 中同样存在. 与此同时, Prnp^{0/0}鼠血清中Cu²⁺含量相对野生型显著升高, 而血清中主要Cu²⁺结合蛋白血浆铜蓝蛋白 (ceruloplasmin) 含量却无显著变化. 原子吸收光谱法也得到了相似的结果. 磷脂酰肌醇磷酸酶C (phosphatidylinositol-specific phospholipase C, PI-PLC) 可以切除GPI“锚”而使PrP^C与细胞膜分离, 用PI-PLC处理野生型鼠脑细胞后, TXRF测量显示细胞膜Cu²⁺含量显著降低; 但对于Prnp^{0/0}鼠脑细胞无影响.

如上所述, 正常细胞中PrP^C在细胞膜和细胞质之间循环^[2]. Pauly和Harris^[10]研究了Cu²⁺与这一过程的关系. 他们发现, 当胞外介质中Cu²⁺浓度达200 μmol/L及以上时, Cu²⁺可以显著地降低细胞膜上PrP^C的含量, 与此同时细胞质内PrP^C含量显著升高. Cu²⁺的作用是可逆的, 去除Cu²⁺

15 min后, 细胞膜PrP^C含量重新升高; 60 min后, 达到平衡. 值得注意的是, 虽然Cu²⁺能促进PrP^C内吞, 它对PrP^C的循环速度则基本无影响. 另外, 将PrP^C的N端25~91残基 (包括PrP (51~91)) 切除后, Cu²⁺的这一促进作用同样不再出现, 这一结果与PrP (51~91)在PrP^C与Cu²⁺结合中的重要作用完全一致.

2 Cu²⁺-PrP^C与SOD1

SOD1即Cu/Zn超氧化物歧化酶, 它催化氧自由基转变为O₂和H₂O₂, 从而与过氧化氢酶一起消除氧自由基对细胞的毒害作用^[11]. Brown和Besinger^[12]研究了不同PrP^C表达水平细胞中SOD1的活性. PrP^C表达水平的提高总伴随着SOD1活性水平的提高, 如Prnp^{0/0}鼠脑细胞中SOD1活性仅为野生型的50%; 但蛋白质印迹和RNA印迹分析显示SOD1的mRNA和蛋白质含量水平无显著差别. 用Cu²⁺的特异性螯合剂二乙基二硫氨酸 (diethyldithiocarbamate, DDC) 研究发现, DDC对PrP^C表达水平高的细胞中SOD1活性的抑制作用更大, 表明SOD1活性的差别源于其结合Cu²⁺的多少. 过量表达PrP^C的试验鼠对氧压力的抗性下降, 但谷胱甘肽过氧化氢酶的表达量却上升了, 其原因可能是SOD1活性的升高使H₂O₂的细胞含量相应升高, 从而刺激谷胱甘肽过氧化氢酶的表达. Prnp^{0/0}鼠神经元则具有较低的谷胱甘肽过氧化氢酶活性^[13]. 另外, Brown等^[14]将PC12细胞置于高Cu²⁺浓度的环境中生长, 产生PC12变体细胞. 变体细胞的PrP^C表达水平提高, SOD1活性水平提高, 对氧压力抗性增强.

用放射性同位素Cu⁶⁷做实验进一步表明, PrP^C表达水平与SOD1的放射性成正相关, 而PI-PLC处理可以显著地降低正常细胞内SOD1的放射性, 但对Prnp^{0/0}细胞无影响^[12]. 其他实验也证实, PrP^C对Cu²⁺的亲合力介于血清中的铜蛋白和SOD1之间^[9, 15]. 综上所述, 可以认为, PrP^C结合了血浆中Cu²⁺后, 通过内吞作用进入细胞质, 将Cu²⁺转运至SOD1, 从而参与调节SOD1活性及细胞铜代谢.

3 Cu²⁺和PrP^{Sc}

与此同时, 一些研究人员的实验结果揭示, Cu²⁺和PrP^{Sc}也有一定的关系. 已有研究发现^[16], 过渡金属元素离子, 特别是Cu²⁺, 能够促进β-淀

粉样蛋白的积聚. 在此基础上, McKenzie 等^[16]研究了 PrP^{Sc}的蛋白水解酶 K (PK) 抗性恢复过程与 Cu²⁺ 的关系. PK 抗性是 PrP^{Sc}不同于 PrP^C 的一个重要特征, 但用 GdnHCl (guanidine hydrochloride) 处理后, PrP^{Sc}会丧失 PK 抗性. 去除 GdnHCl 后, 在适当条件下, PrP^{Sc}又会缓慢复性 (恢复 PK 抗性). PK 抗性与 PrP^{Sc}的感染性直接相关. 研究发现, 对于已经复性的 PrP^{Sc}, Cu²⁺ 的加入毫无作用; 但在加入 10 mmol/L Cu²⁺ 后, 在正常条件下未能复性的 PrP^{Sc}则呈现出显著的 PK 抗性水平提高, 表明复性水平提高. Cu²⁺ 的加入不能改变实验鼠的病理学特征, 组织病理学研究也未发现差异. Qin 等^[17]也发现, 一定浓度 Cu²⁺ 能促进老化的 PrP^C 向 PrP^{Sc}的转变, 表现为构象的 β 折叠化和 PK 抗性水平的升高. 此结果揭示 Cu²⁺ 的非正常代谢很可能是有关 PrP 神经退化性疾病的重要致病因素之一.

另外一个值得重视的发现由 Wadsworth 等^[18]做出. 他们先用 Cu²⁺ 的特异性螯合剂 EGTA 处理两种表型截然不同的 PrP^{Sc} “病株” Type 1 和 Type 2, 再用 PK 处理. 结果发现, 它们表现出了相同的表型. 因此, Cu²⁺ 可能在 Type 1 和 Type 2 的区分中起关键作用. 加上先前已存在的存在于各 PrP^{Sc} “病株” 间构象和糖基化结构的不同, 这一结果有助于更深入地研究 PrP^{Sc} 的不同 “病株” 之谜.

4 展 望

PrP 与 Cu²⁺ 关系的研究从一个角度阐释了 PrP^C 的正常功能乃至整个 Prion 理论, 对于细胞铜代谢的深入研究也有促进作用. 然而, Prion 理论本身也还处于激烈的争论之中^[11], 另有一些发现也对现有结果提出了质疑. Moore 等^[19]在鼠 PrP 基因 Prnp 的下游 16 kb 处发现了一个类 Prnp 基因 Prnd, 该基因编码的蛋白 Dpl (Doppel, 德语, 意为 “双”) 与 PrP 有 25% 的同源性, 并且在一些表现出病理特征的 Prnp^{0/0} 鼠脑细胞中过量表达. 因此有必要对所有用 Prnp^{0/0} 鼠做出的实验结果进行重新评估. Waggoner 等^[15]则得到了与 Brown 等^[9, 12]完全不同的结果. 他们发现, 脑细胞中 Cu²⁺ 含量和 SOD1 活性并未随 PrP^C 表达水平的变化而发生显著变化. Cu²⁺ 含量测量结果的不同可能源于测量方法的不同, Waggoner 等使用了诱导耦合等离子体质谱法 (inductively coupled plasma

mass spectrometry, ICP-MS), 相对于 Brown 等的 TXRF. SOD1 活性测量方法双方则类似, 所以对结果的不同还未有合理的解释. 至今 Waggoner 等的结果尚未得到其他实验室的证实, 但即使最终证明其正确, 其他实验结果依然足以说明 Cu²⁺ 和 PrP 的功能是密切相关的.

对于 Cu²⁺ 和 PrP 关系的进一步研究可能包括以下的问题: a. 与 Cu²⁺ 的结合是否是 PrP^C 内吞的真正原动力; b. 内吞后 PrP^C 经历了哪些过程; c. 是否还有其他调节 SOD1 活性的方式, 与 PrP^C 是否偶联; d. PrP^C 在整个细胞铜代谢中的地位及详细机制.

参 考 文 献

- 1 Prusiner S B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, **216** (9): 136~144
- 2 Shyng S L, Moulder K L, Lesko A, *et al.* The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. *J Biol Chem*, 1995, **270** (24): 14793~14800
- 3 Zahn R, Liu A Z, Luhrs T, *et al.* NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (1): 145~150
- 4 Viles J H, Cohen F E, Prusiner S B, *et al.* Copper binding to the prion protein: structure implication of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (5): 2042~2047
- 5 Sulkowski E. Spontaneous conversion of PrP^C to PrP^{Sc}. *FEBS Lett*, 1992, **307** (2): 129~130
- 6 Pan K M, Stahl N, Prusiner S B. Purification and properties of the cellular prion protein from syrian hamster brain. *Protein Sci*, 1992, **1** (10): 1343~1352
- 7 Whittal R M, Ball H L, Cohen F E, *et al.* Copper binding to octarepeat peptides of the prion protein monitored by mass spectrometry. *Protein Sci*, 2000, **9** (2): 332~343
- 8 Morrillas M, Swietnicki W, Gambetti P, *et al.* Membrane environment alters the conformational structure of the recombinant human prion protein. *J Biol Chem*, 1999, **274** (52): 36859~36865
- 9 Brown D R, Qin K F, Herms J W, *et al.* The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature*, 1997, **390** (6661): 684~687
- 10 Pauly P C, Harris D A. Copper stimulate endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem*, 1998, **273** (50): 33107~33110
- 11 Price D L, Sisodia S S, Borchelt D R. Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models. *Science*, 1998, **282** (5391): 1079~1083
- 12 Brown D R, Besinger A. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J*, 1998, **334** (SEP): 423~429
- 13 White A R, Collins S J, Maher F, *et al.* Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity. *Am J Pathol*, 1999, **155** (5): 1723~1730
- 14 Brown D R, Schmidt B, Kretzschmar H A. Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia. *J Neurochem*, 1998, **70** (4): 1686~1693

- 15 Waggoner D J, Drisaldi B, Bartnikas T B, *et al.* Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J Biol Chem*, 2000, **275** (11): 7455~ 7458
- 16 McKenzie D, Bartz J, Mirwald J, *et al.* Reversibility of scrapie inactivation is enhanced by copper. *J Biol Chem*, 1998, **273** (40): 25545~ 25547
- 17 Qin K F, Yang D S, Yang Y, *et al.* Copper (II) induced conformational changes and protease resistance in recombinant and cellular PrP. *J Biol Chem*, 2000, **275** (25): 19121~ 19131
- 18 Wadsworth A D-F, Hill A F, Joiner S, *et al.* Strain-specific prion protein conformation determined by metal ions. *Nature Cell Biol*, 1999, **1** (1): 55~ 59
- 19 Moore R C, Lee I Y, Silverman G L, *et al.* Ataxia in prion protein (PrP)^C-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein Doppel. *J Mol Biol*, 1999, **292** (4): 797 ~ 817

Prion and Cu²⁺

LI Ning, QIN Jun-Chuan*

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract Since Prusiner, suggested the prion hypothesis in 1982, a wealth of experiments have supported it to be true. However, the function of the cellular prion protein (PrP^C) remains unclear. But recently evidence is showing that PrP^C could specifically bind to Cu²⁺ and may transport Cu²⁺ to SOD1 by endocytosis from the plasma membrane via clathrin-coated pits so that taking part in copper metabolism. Moreover, other evidence also shows that Cu²⁺ could enhance the reversibility of denatured PrP^{Sc} and may determine the difference of some PrP^{Sc} strains.

Key words copper(Cu²⁺), PrP^C, PrP^{Sc}, prion

* Corresponding author. Tel: 86-25-3592396-805, E-mail: jqcin@nju.edu.cn

Received: December 4, 2000 Accepted: January 20, 2001

第2届全国中医药优秀科技期刊《安徽中医临床杂志》2002年征订

《安徽中医临床杂志》创刊于1988年,是国家科委和新闻出版署正式批准出版的中医综合性学术期刊,内容丰富,格调活泼,设有专家论坛、专题研究、专病证治、临床研究、名老中医之路、医学经验、临床报道、医案医话、病案讨论、病例报告、方药运用、学术探讨、歧黄论坛、新安医学研究、华佗学术研究、针灸推拿、中医护理、综述讲座、中医药研究进展、百家园等栏目。在2000年国家中医药管理局主办的第2届全国中医药优秀科技期刊评选中,荣获二等奖,为临床不可多得之良师益友,适宜各级中西医疗单位订阅,更适合广大中医、中西医结合临床医生个人订阅。本刊为双月刊,80页,国内统一刊号CN34-1132/R,国际标准刊号ISSN 1005-7331。国内订阅:全国各地邮局,邮发代号:26-131。国内定价:4.00元/册,全年24.00元。国外发行:中国国际图书贸易总公司(北京399信箱),国外代号:BM 6656,国外定价:4.00美元/册,全年24.00美元。您可以到当地邮局办理订阅,错过订阅时间者,也可以直接与本刊联系订阅。地址:合肥市大通路明光小区5幢,邮编:230011,电话:0551-4475775。