铜离子促进 PrP 形成细胞毒性聚集

吴 頔[1]，张文韬[1]，罗 侃[1]，王文晞[1]，黄力勤[1]，
陈 锐[1]，黄 涛[1]，肖庚富[1,2]

（1. 武汉大学生命科学学院现代病毒学研究中心，病毒学国家重点实验室，武汉 430072；
2. 中国科学院武汉病毒研究所，病毒学国家重点实验室，武汉 430071）

摘要：研究证明生理酸性条件下铜离子在细胞型朊蛋白（cellular prion protein，PrP）的聚集过程中起到关键作用。经过孵育后，PrP 形成聚集沉淀，圆二色光谱（circular dichroism，CD）以及外源荧光结果显示铜离子促进了 PrP 二级结构的转变。静态光散射结果证明 PrP 形成聚集。四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法（MTT）实验显示，该条件下孵育得到的 PrP 聚集产物对神经母细胞瘤细胞 SK-N-SH 具有毒性。以上结果表明：铜离子能够促进 PrP 形成具有神经细胞毒性的聚集，这一研究为揭示 PrP 疾病过程中铜离子所起到的作用提供了一些有益的线索。

关键词：微生物学；朊病毒；铜离子；生理酸性环境；聚集；细胞毒性
中图分类号：Q936 **文献标识码**：A **文章编号**：1674-2850(2011)03-0435-6

Copper ions promote neurotoxic aggregation of PrP

WU Di[1], ZHANG Wentao[1], LUO Kan[1], WANG Wenxi[1], HUANG Liqin[1],
CHEN Rui[1], HUANG Tao[1], XIAO Gengfu[1,2]

(1. *State Key Laboratory of Virology, Modern Virology Research Centre, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan* 430072, *China*;
2. *State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430071, *China*)

Abstract: It was indicated that Cu^{2+} was a vital factor involved in the aggregation of cellular prion protein (PrP). Cu^{2+} triggered structural conversion revealed by circular dichroism (CD) spectra and fluorescence measurement. Scattering results confirmed the aggregation of PrP. MTT assay demonstrated that PrP aggretates induced significant damage of SK-N-SH cells. It was indicated that at physiological acidic environment Cu^{2+} promoted the aggregation of PrP, which were cytotoxic to neuron cells. And these researches may offer some clues for Cu^{2+} in prion diseases.

Key words: microbiology; prion; copper ion; physiological acidic environment; aggregation; cytotoxicity

0 引言

传染性海绵状脑病（transmissible spongiform enciphalophathies，TSE）是一类引起人和动物中枢神经组织退化的疾病，包括人的震颤病（kuru）、克雅氏病（Ceutzfledt Jakob disease，CJD）以及动物的疯牛病（bovine spongiform encephalopaty，BSE）、羊瘙痒病（scrapie）等。目前，对于朊病毒疾病比较公认的致病机制是细胞型朊蛋白（PrP^C）构象发生转变，形成富含 β 折叠片层结构并具有蛋白酶抗性的感染型朊蛋白（PrP^{Sc}）聚集。在某些朊病毒病中，不正常的蛋白质颗粒在到达脑部之后会使正常的可溶性朊蛋白 PrP^C 转变成致病性的 PrP^{Sc}，这些致病性的蛋白会在细胞和组织中传播扩散。错误折叠或者聚集的朊蛋白在大脑特定部位的沉积导致朊病毒病的发生[1~3]。

基金项目：高等学校博士学科点专项科研基金（20060486025）
作者简介：吴頔（1983—），男，博士，主要研究方向：医学病毒学
通信联系人：肖庚富，研究员，主要研究方向：医学病毒学. E-mail：xiaogf@wh.iov.cn

目前已知体内离子动态平衡相关的功能可能与 PrP^C 有关，PrP 作为一种铜离子结合蛋白已经得到证明。同时，在 PrP 疾病中，铜离子也是一个重要的辅助因子，它能够影响朊病毒疾病的发病过程。一方面，铜能够延迟朊病毒疾病的发病，在被瘙痒病感染的神经母细胞瘤细胞中减少 PrP^{Sc} 的聚集[4]。另一方面，有研究表明用螯合剂除去铜离子后能够延迟朊病毒疾病的发病[5]。此外，铜能够帮助部分变性的 PrP^{Sc} 恢复其感染性和蛋白酶 K 抗性[6]。到目前为止，关于铜离子在朊病毒疾病发病过程中的作用仍然存在争论。

已有数据显示，PrP 结构特性和折叠途径受到环境 pH 值的影响。酸性条件能够诱使 PrP 表面疏水结构的暴露[7]。在体外实验中，酸性条件下去垢剂能够使 PrP 由天然的 α 螺旋结构向 β 折叠结构转变；低 pH 值和去垢剂能够促进来源于人脑的 PrP^C 转变为 PrP^{Sc} 样结构[8]。结果提示：PrP 细胞转运的内吞途径中酸性细胞器，如早期内体、晚期内体可能是 PrP 结构发生变化的关键场所。

研究揭示了铜离子在 PrP 错误折叠以及形成聚集过程中的作用，证明在生理酸性条件下，铜离子能够促进 PrP 的结构转变，并且形成具有细胞毒性的聚集。这一研究对进一步理解朊病毒疾病的病理过程以及铜离子在朊病毒疾病中的作用具有重要意义。

1 方法与材料

1.1 PrP 表达质粒构建

以人基因组 DNA 为模板，通过聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）手段扩增出野生型人 PrP（90－231）基因片段。PCR 产物通过 *NdeI* 和 *Xho* 酶切位点连接到表达载体 pET30a（＋）.

上游引物：5′-CCAAGTTCATATGGGTCAAGGAGGTGGCAC-3′；

下游引物：5′-TAAGAGCTCGAGGCTCGATCCTCTCTGG-3′.

1.2 朊蛋白的表达与纯化

利用亲和层析柱上复性的方法对目的蛋白进行纯化。首先，将构建好的表达质粒转化到 *E. coli* BL21（DE3）中，将菌接种于 1 L 2×YT 培养基，加入 50 mg/L 卡那霉素于 37℃摇床中培养至细菌 OD 值达到 1.0. 然后加入 1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）诱导细菌表达外源蛋白。诱导 6 h 后，4 000 r/min，15 min 离心收集细菌。菌体重悬于 20 mmol/L Tris/HCl（pH＝8.0），150 mmol/L NaCl，0.1 mmol/L 苯甲基硫磺酰氧（PMSF）和 1 g/L lysozyme 溶液中，进行超声破碎。破碎后的样品 12 000 r/min，20 min 离心收集沉淀，经 1% Triton X－100，2 mol/L NaCl 和 2 mol/L urea 溶液洗涤后包含体蛋白溶解于 20 mmol/L Tris/HCl（pH＝8.0），6 mol/L Gdn-HCl 和 10 mmol/L 2-mercaptoethanol溶液中。样品过镍柱后，带有 His 标签的目的蛋白 PrP（90-231）结合于层析柱上，流动相中 Gdn-HCl 浓度逐渐降低至零，从而使 PrP 蛋白复性。最后用 50 mmol/L，pH＝4.0 的醋酸缓冲液将目的蛋白 PrP 洗脱下来。

1.3 PrP 聚集

终浓度 0.3 g/L 的 PrP（90-231）与终浓度为 20 μmol/L 铜离子 65℃条件下共同孵育 2 h. 反应缓冲液为 80 mmol/L 磷酸缓冲体系，pH 值为 6.0. 以不加铜离子的反应体系作为对照。

1.4 圆二色光谱测定

经 2 h 孵育后，样品进行圆二色光谱扫描测定 PrP 二级结构的变化。波长范围：190～250 nm；Data pitch：1 nm；Speed：100 nm/min；Response：2 s；Width：2 nm；样品池厚度：0.1 cm.

1.5 ANS 外源荧光测定

样品孵育过程中，每 10 min 取样检测外源荧光染料荧光值。10 μmol/L bis-ANS 与稀释后终浓度为 0.5 μmol/L 经 2 h 孵育后的 PrP 室温混合 15 min 后酶标仪检测荧光。激发波长：385 nm；发射波长：475 nm；激发光狭缝：10 nm；发射光狭缝：10 nm.

1.6 静态光散射测 PrP 聚集

样品孵育过程中，每 15 min 取样稀释 50 倍后检测其 360 nm 处光散射值。检测狭缝：10 nm.

1.7 MTT 法检测细胞存活率

人神经母细胞瘤细胞 SK-N-SH（中国典型培养物保藏中心，CCTCC）培养于 Minimum Essential Medium（Hyclone，USA），10%胎牛血清（Gibco，USA）培养基中，37℃，5% CO_2 培养。然后以大约每孔 8 000 个细胞的密度铺于 96 孔板中，加入 200 μL 新鲜培养基。24 h 候换液，加入 150 μL 培养基以及 50 μL PrP 孵育产物以及对照缓冲液。24 h 后进行 MTT 检测。MTT 溶于磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）中作为母液，其浓度为 5.5 g/L，10 μL 母液加入到各细胞培养孔中。4 h 后除去培养基，MTT 还原生成的 formazan 结晶溶解于二甲亚砜，酶标仪检测其 570 nm 处光密度 OD 值。

2 结果与分析

2.1 PrP（90-231）纯化与复性

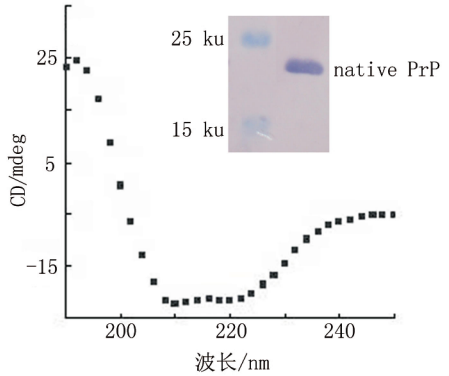
PrP（90-231）蛋白分子量大小约为 16 ku，通过大肠杆菌表达后纯化，Western blotting 实验证实得到了纯度较高的目的蛋白，如图 1 所示。

天然的 PrP^C 是一种富含 α 螺旋结构的蛋白质。为检测柱上复性效果，对复性后得到的 PrP 进行了 CD 检测，如图 1 所示。CD 光谱显示重组 PrP 出现了 α 螺旋结构特征峰，即在 208 nm 和 222 nm 处出现双负峰。这一结果证明得到的 PrP 复性后正确折叠，形成了天然构象。

2.2 铜离子促进 PrP 二级结构转变

实验设定了 65℃的孵育条件。这一温度被认为是 PrP 羧基端球状结构域的 Tm，该温度能够提供一个部分变性的实验条件从而加速 PrP 构象转变的过程[9]。同时模拟生理条件的 20 μmol/L 铜离子加入到孵育体系当中。实验选取的弱酸性环境（pH=6.0）是为了模拟体内内吞途径中内体的酸性环境。已有研究认为内吞途径中的相关细胞器就是 PrP^C 向 PrP^{Sc} 转变的地方[10~11]。为研究铜离子在此实验条件下对 PrP 二级结构的影响，首先在 pH=6.0，65℃孵育条件下检测 PrP 的远紫外圆二色光谱。

经过 2 h 之后，含有铜离子孵育体系中的 PrP 所显示出的圆二色光谱在 218 nm 附近出现负峰，这说明有大量的 β 片层结构产生。而在没有铜离子参与的对照组中，其圆二色光谱没有发生太大改变，如图 2 所示。这些结果说明铜离子能够显著地促进 PrP 结构的改变。



注：Western blotting 显示为 PrP 多克隆抗体抗 PrP（90～231）结果；CD 光谱显示 PrP 复性后二级结构

图 1 PrP 的纯化与复性

Fig. 1 Purification and refolding of PrP

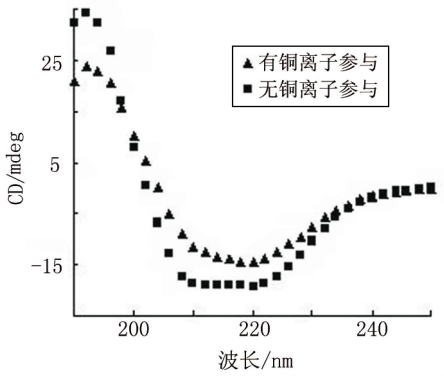


图 2 圆二色光谱监测 PrP 二级结构的改变

Fig. 2 CD spectrum of PrP secondary structure conversion

为进一步研究 PrP 结构的变化，利用荧光染料进行检测。Bis-ANS 是一种对环境非常敏感的荧光染料，它非常容易和因结构发生改变而暴露出疏水表面的蛋白质结构变化中间态结合，而不容易与天

然蛋白或无规则结构蛋白质结合[12]。当 ANS 与蛋白质暴露出的疏水结构域结合后其荧光强度会显著增加。很明显，在实验中，与铜离子共同孵育的实验组在 2 h 的孵育过程中 ANS 的荧光强度较起始强度增强了 3 倍左右，而对照组的荧光变化不大，如图 3 所示。这一结果也与圆二色光谱结果相吻合。

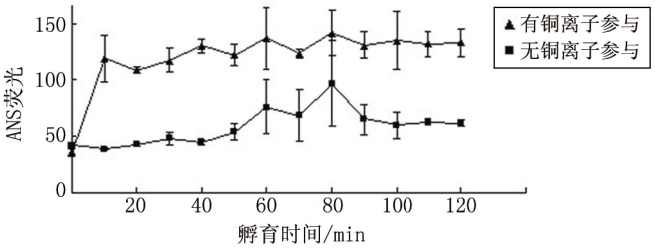


图 3　Bis-ANS 荧光检测 PrP 结构变化。
Fig. 3　Bis-ANS fluorescence of PrP structure conversion

2.3　PrP 的聚集

在孵育过程中发现，在铜离子存在的情况下实验体系中出现了肉眼可见的白色沉淀。对样品进行紫外光谱扫描时，会在 360 nm 波长处产生散射峰，依据散射峰的峰值可以判断 PrP 经过孵育后的聚集情况。

如图 4a 所示，经过孵育后，含有铜离子样品中的光散射值有较为明显的增长。说明在该条件下，溶液中形成了 PrP 聚集。此外，还发现在孵育的前 30 min 内增长速度较快，说明溶液中 PrP 迅速发生聚集。而在不含铜离子的对照组实验中，没有看到明显光散射值的变化，说明没有明显的 PrP 聚集形成。反应之后，将样品进行简单离心，检测上清中蛋白质浓度，发现在有铜离子共同孵育的样品上清溶液中蛋白质浓度不到对照样品的 10%（如图 4b 所示）。以上结果说明，铜离子在生理弱酸性条件下促进 PrP 形成不溶的聚集体。

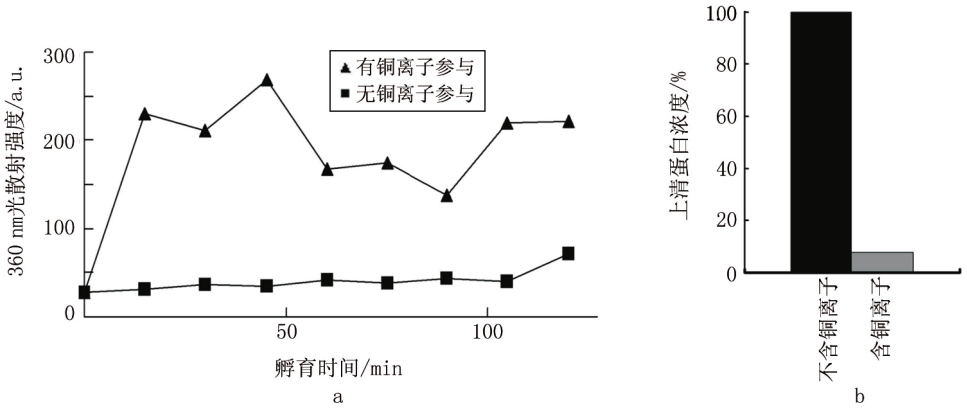


图 4　光散射检测 PrP 聚集
Fig. 4　Scattering of PrP aggregation
a—PrP 聚集情况；b—上清液中蛋白浓度比例
a-PrP aggregation; b-Protein content proportion in supernate

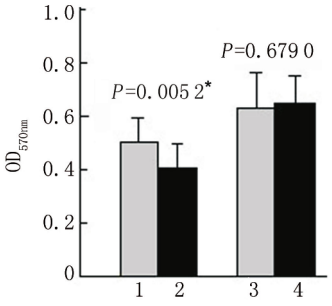
2.4　PrP 聚集体的细胞毒性

在 pH=6.0 条件下加入铜离子的实验组以及未加铜离子的对照组经 2 h 孵育后所得到的孵育产物都加入到 SK-N-SH 细胞培养中，进行各种 PrP 孵育产物对神经细胞毒性效果检测。细胞暴露于各孵育产物 24 h 后进行 MTT 细胞存活率检测。为减小不同孵育缓冲液对细胞存活率的影响，将各种不含 PrP 的缓冲液也加入到细胞培养中作为对照。并且每组样品和缓冲液对照之间做 t 检验，以确定 PrP 的孵育产物是否真正对细胞产生影响。

如图 5 所示，在 pH=6.0 条件下，铜离子促进 PrP 形成的聚集对细胞产生了明显的毒性作用。与其对应的缓冲液相比，细胞存活率下降了约 20%，并且 t 检验显示二者差异极为显著（$P=0.005\ 2$）。然而在没有铜离子参与的对照样品与其对应的缓冲溶液相比，PrP 的孵育产物均没有表现出明显的细胞毒性，t 检验显示二者之间没有显著性差异（$P>0.05$）。以上结果显示在 pH=6.0 的条件下，由铜离子促进形成的 PrP 聚集体能够导致神经细胞的死亡。

3 结论与展望

朊病毒引起动物和人的可转移性神经退化疾病，如羊瘙痒症、疯牛病和人的朊病毒病等。这些疾病的共同病理特征是在动物或病人的脑组织中发现 PrP^{Sc} 的存在，并且形成淀粉样聚集(Amyloid)，造成神经元的丢失，形成海绵状空泡[13]。铜离子在 PrP 疾病中是一个重要的辅助因子，它能够影响到朊病毒疾病的发病过程，但关于铜离子在朊病毒疾病发病过程中的作用仍然存在争论[4~6]。研究结果证明在生理酸性条件下，铜离子确实能够引起 PrP 的结构向 β 片层结构转变，并促使天然的单体 PrP 形成具神经细胞毒性的不溶性聚集体，为铜离子加重朊病毒疾病的发病这一假说提供了一定的证据。动力学研究结果还显示：PrP 的聚集是一个较为快速的过程，在实验条件下的最初 30 min 内结构变化迅速，较快地聚集。



注：1—含铜离子孵育缓冲液；2—含铜离子 PrP 孵育产物；3—不含铜离子孵育缓冲液；4—不含铜离子 PrP 孵育产物；

图 5 MTT 法检测细胞在不同形态 PrP 影响下的存活率

Fig. 5 MTT assay of cell viability in PrPs with different forms

传统观点认为 PrP 氨基端八肽重复区域中的 4 个组氨酸残基是铜离子的主要结合位点[14]。最近的研究发现：另外的铜离子结合位点位于 PrP 的第 96 位和第 111 位的组氨酸残基上，并被称为铜离子结合的“第 5 位点”[15~17]。甚至第 96 位和第 111 位组氨酸残基的铜离子结合能力更加优先于传统观点认为的八肽重复区，而且该区域与诱导形成 β 片层结构十分相关[18]。实验选择了 PrP（90-231）作为实验材料，去掉了八肽重复区域而只留下了第 96 位和第 111 位组氨酸残基的铜离子结合位点。而且结果显示铜离子确实能够促使这一截短的 PrP 结构发生改变并形成聚集。这一结果也显示所谓的铜离子“第 5 结合位点”可能在 PrP 的结构转变中起到了非常重要的作用。

体内 PrP^{C} 或者 PrP^{Sc} 会被内吞，经过内体被部分或者全部运送到溶酶体降解[19]。而内体溶酶体系统（endosomal-lysosomal system，ELS）被认为在朊病毒疾病发病过程中起到关键作用[20~21]。实验选择 pH 值为 6.0 作为 PrP 的反应条件就是为了模拟细胞早期内体环境。通过实验结果，可以推测 PrP 代谢循环所必需经过的内体溶酶体系统提供的酸性环境可能影响了 PrP 正确折叠过程，而此时环境中过量的铜离子大大增加了由 PrP 引起的神经退行性疾病的发病风险。

实验证明了铜离子能够在生理酸性条件下促进 PrP 形成细胞毒性聚集。而这一过程的分子机理仍有待进一步的研究：首先，PrP 能够形成淀粉样纤维聚集以及寡聚体或者前纤维体等不同形态的聚集体，实验所得到的 PrP 聚集体是何种形态的聚集有待进一步确认；其次，体内环境极为复杂，还需大量测试铜离子在其他生理条件下对 PrP 的结构及聚集行为的影响才能更真实地反映铜离子在朊病毒疾病中所扮演的角色。

[参考文献] (References)

[1] DONNE D G, VILES J H, GROTH D, et al. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP (29-231): the N terminus is highly flexible[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94(25): 13452-13457.

[2] JAMES T L, LIU H, ULYANOV N B, et al. Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94(19): 10086-10091.

[3] PRUSINER S B. Prions[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95(23): 13363-13383.

[4] HIJAZI N, SHAKED Y, ROSENMANN H, et al. Copper binding to PrP^{C} may inhibit prion disease propagation[J]. Brain

Res., 2003, 993(1-2): 192-200.

[5] SIGURDSSON E M, BROWN D R, ALIM M A, et al. Copper chelation delays the onset of prion disease[J]. J. Biol. Chem., 2003, 278(47): 46199-46202.

[6] MCKENZIE D, BARTZ J, MIRWALD J, et al. Reversibility of scrapie inactivation is enhanced by copper[J]. J. Biol. Chem., 1998, 273(40): 25545-25547.

[7] SWIETNICKI W, PETERSEN R, GAMBETTI P, et al. pH-dependent stability and conformation of the recombinant human prion protein PrP(90-231)[J]. J. Biol. Chem., 1997, 272(44): 27517-27520.

[8] ZOU W Q, CASHMAN N R. Acidic pH and detergents enhance in vitro conversion of human brain PrP^{C} to a PrP^{Sc}-like form[J]. J. Biol. Chem., 2002, 277(46): 43942-43947.

[9] MARTINS S M, FROSONI D J, MARTINEZ A M, et al. Formation of soluble oligomers and amyloid fibrils with physical properties of the scrapie isoform of the prion protein from the C-terminal domain of recombinant murine prion protein mPrP-(121-231)[J]. J. Biol. Chem., 2006, 281(36): 26121-26128.

[10] BORCHELT D R, TARABOULOS A, PRUSINER S B. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway[J]. J. Biol. Chem., 1992, 267(23): 16188-16199.

[11] CAUGHEY B, LANSBURY P T. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders[J]. Annu. Rev. Neurosci., 2003, 26: 267-298.

[12] YORK S S, LAWSON R C, WORAH D M. Binding of recrystallized and chromatographically purified 8-anilino-1-naphthalenesulfonate to *Escherichia coli* lac repressor[J]. Biochemistry, 1978, 17(21): 4480-4486.

[13] BROWN P, GIBBS C J, RODGERS-JOHNSON P, et al. Human spongiform encephalopathy: the national institutes of health series of 300 cases of experimentally transmitted disease[J]. Ann. Neurol., 1994, 35(5): 513-529.

[14] VILES J H, COHEN F E, PRUSINER S B, et al. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96(5): 2042-2047.

[15] BERTI F, GAGGELLI E, GUERRINI R, et al. Structural and dynamic aracterization of copper(II) binding of the human prion protein outside the octarepeat region[J]. Chemistry, 2007, 13(7): 1991-2001.

[16] KLEWPATINOND M, DAVIES P, BOWEN S, et al. Deconvoluting the Cu^{2+} binding modes of full-length prion protein[J]. J. Biol. Chem., 2008, 283(4): 1870-1881.

[17] OSZ K, NAGY Z, PAPPALARDO G, et al. Copper(II) interaction with prion peptide fragments encompassing histidine residues within and outside the octarepeat domain: speciation, stability constants and binding details[J]. Chemistry, 2007, 13(25): 7129-7143.

[18] JONES C E, ABDELRAHEIM S R, BROWN D R, et al. Preferential Cu^{2+} coordination by His96 and His111 induces beta-sheet formation in the unstructured amyloidogenic region of the prion protein[J]. J. Biol. Chem., 2004, 279(31): 32018-32027.

[19] CAMPANA V, SARNATARO D, ZURZOLO C. The highways and byways of prion protein trafficking[J]. Trends Cell Biol., 2005, 15(2): 102-111.

[20] CHIOVITTI K, CORSARO A, THELLUNG S, et al. Intracellular accumulation of a mild-denatured monomer of the human PrP fragment 90-231, as possible mechanism of its neurotoxic effects[J]. J. Neurochem., 2007, 103(6): 2597-2609.

[21] KOVÁCS G G, GELPI E, STRÖBEL T, et al. Involvement of the endosomal-lysosomal system correlates with regional pathology in Creutzfeldt-Jakob disease[J]. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 2007, 66(7): 628-636.