



朊病毒(侵染性蛋白质)的发现

田波

(中国科学院微生物研究所)

一、引言

羊瘙痒病* 的病原是经过近两个世纪的研究未能解决的一个谜。曾作过各种可能的解释,但都没得到证实。发现类病毒后,有人研究其类病毒病因的可能性(Diener, 1979)。最近,美国加州大学旧金山分校动物病毒学家 Prusiner 发现羊瘙痒病是蛋白质侵染引起的疾病^[1],并称谓“Prion”(Protein infection 的缩写)或“Virino”,我们暂译为朊病毒。这一发现使生物学家感到震惊,因为它与现行的“生物中心法则”——即 DNA→RNA→蛋白质的依赖关系——背道而驰。在生物学理论上十分重要;在实践上有可能解决许多疑难疾病的病原问题,引起了广泛的兴趣和关注。

二、蛋白质侵染性的初步证据

羊瘙痒病可传染给小鼠、仓鼠和猴子等动物。多以仓鼠作为实验模型。从羊或仓鼠脑制备的所谓瘙痒因子,能侵染羊、仓鼠等实验动物。利用这一体系研究了瘙痒因子对能区分蛋白质和核酸的许多试剂的反应。包括蛋白酶和核酸酶、化学修饰剂、变性剂、去污剂等。

蛋白酶K处理可使提取的瘙痒因子的侵染性降低。失活的程度取决于酶的浓度和消化的时间以及消化的温度。当存在 1MKCl 时,以 100 μg/ml 蛋白酶K在 60℃ 下消化瘙痒因子时,其侵染性滴度在 10⁴ ID₅₀ 单位/ml 以下。胰蛋白酶也能使瘙痒因子失活。核糖核酸酶 A 和脱氧核糖核酸酶 I 100 μg/ml 的浓度经过 2 小时的消化仍不能引致瘙痒因子的失活

另一个证明瘙痒因子具有蛋白质性质的证据是氨基酸化学修饰剂对侵染性的抑制作用。10mM 碳酸二乙酯(Et₂PC)可显著降低其滴度;20mM 时几乎可完全使瘙痒因子失活。而核酸

修饰剂,如羟胺(NH₂OH),对其侵染性却没有影响。

许多蛋白质的变性剂能引起瘙痒因子的失活。3 M 尿素处理 3 小时,使其侵染性不可逆的失活。饱和的苯酚可使瘙痒因子完全丧失活性。硫氰酸盐处理也破坏侵染性,0.4M KSCN 使侵染性降低 97% 以上。NaSCN, LiSCN 和硫氰酸胍盐的破坏率达 99% 以上。但硫氰酸盐引起的失活是可逆的,当用透析除去 SCN⁻ 离子后,侵染性又恢复了。

离子型去污剂 SDS 显著降低瘙痒因子的侵染性。其失活作用是高度协同的,因为 1% SDS 引起 90% 以上的侵染性丧失,但低于 0.5% 时不引起侵染性的变化。非离子型去污剂,如三通 x-100, Ncridet P-40, 均不引起侵染性的显著变化。这些特性都反应出瘙痒因子

表 1 朊病毒和类病毒稳定性的比较^[2]

处 理	浓 度	PSTV	瘙痒因子
RNA 酶 A	0.1—100 μg/ml	+	-
DNA 酶	100 μg/ml	-	-
蛋白酶 K.	100 μg/ml	-	+
胰蛋白酶	100 μg/ml	-	+
碳酸二乙酯	10—20 mM	[-]	+
羟胺	0.1—0.5 M	+	-
补骨脂素	10—500 μg/ml	+	-
苯酚	饱和	-	+
SDS	1—10%	-	+
锌离子	2 mM	+	-
尿素	3—8 M	-	+
碱	pH 10	[-]	+
KSCN	1 M	-	+

注:“-”代表无变化;[-]代表微小变化;“+”代表失活。

* 瘙痒病是绵羊和山羊的一种中枢神经系统退化性紊乱疾病。表现毛脱落、皮肤瘙痒,失去平衡和四肢麻痹等症。

的蛋白质性质。

为了更好的比较核酸侵染性和蛋白质侵染性对上述试剂反应的不同,Diener 和 Prusiner^[2]对比了痒痒因子和马铃薯纺锤形块茎类病毒(PSTV)的差别(表 1)。

从上述实验所提供的各种迹象说明痒痒因子含有为侵染性所必需的蛋白质成分,而不是核酸。但由于这些实验所用的样品尚未提纯,只能认为是一些初步证据。

三、羊痒痒朊病毒的提纯

已研究出大量提纯羊痒痒朊病毒的方法^[3]。其主要步骤是:用 10^7 ID₅₀ 单位的痒痒因子脑内注射断奶的仓鼠(LVG/LAK)。接种后 75 天,当表现明显的临床症状时,杀死仓鼠取其脑。制成匀浆液,加入三通 x-100 和脱氧胆酸钠,再经过小球菌核酸酶在 4℃ 下消化 12 小时,再用蛋白酶 K 消化 8 小时(此处理不会破坏朊病毒,因在粗提液中朊病毒抵抗蛋白酶的水解)。消化物被依次加入 2% 三通 x-100, 0.8% SDS 和 6% 蔗糖,再经蔗糖梯度离心即可提纯朊病毒的分部。

从不连续蔗糖梯度的蛋白质含量和感染性的测定中(图 1),可看到一个高的感染性峰与一小的蛋白质峰相符合。提纯部分的比侵染性(ID₅₀ 单位/mg 蛋白质)较匀浆液高 3,000 倍。有 95% 的侵染性分布在这一分部中。SDS 聚丙烯酰胺电泳分析证明,在此分部中只含有一个主要的蛋白质成分(PrP),其浓度达 40—80 μg/ml。

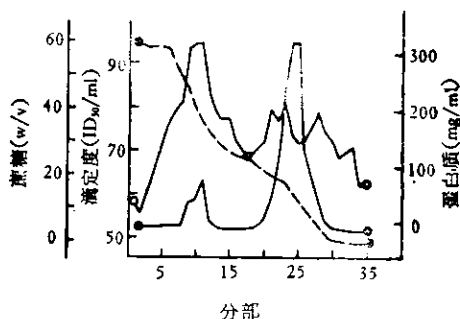


图 1 在区带转头上蔗糖梯度离心提纯痒痒因子
●.....●蔗糖 ○——○感染性 ●——●蛋白质含量

用上述方法提纯朊病毒的比感染性、提纯

倍数和回收率如表 2 所示。F₂ 样品在电镜下呈杆状结构,直径 25nm,长 100—200nm。

表 2 由仓鼠脑中提纯朊病毒的效果

分部	比侵染性 (ID ₅₀ 单位/mg 蛋白)	提纯倍数	回收 (%)
匀浆液	3.5×10^7		
S ₁	5.1×10^7	1.5	75
P ₁	5.9×10^7	1.7	12
P ₂	9.9×10^8	28	7.1
F ₁	1.4×10^{10}	410	6.2

所提取的 F₂ 经酚抽提,并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳不能测出 RNA 或 DNA 的存在,但在蛋白质电泳中有明显的电泳带。

四、羊痒痒朊病毒的性质

1. 分子量:所提纯的羊痒痒 PrP 在三种不同浓度的(13%, 15% 和 5—20% 线性梯度)聚丙烯酰胺凝胶电泳中测定分子量为 27,000 至 30,000。它是构成朊病毒的基本单位。PrP 本身具有侵染性,由 3 个 PrP 分子构成的所谓“朊病毒单体”(Prion monomer)是有高度侵染性的。

2. 结构:PrP 分子聚合成杆状颗粒,即电子显微镜下看到的直径 25nm,长 100 至 200 nm 的杆。大部分杆长 125 至 150nm。这种杆不单独存在,总是排列成丛,其大小和形状不一,有的丛含有多达 100 个杆。根据其大小测知约由 1,000 个 PrP 组成。各种朊病毒结构的关系如表 3 所示。

表 3 PrP 朊病毒单体、杆和杆丛的关系

	变性 PrP	朊病毒单体	朊病毒杆	杆丛
分子量	$10^{4.5}$	$< 10^5$	$\sim 10^1$	$\sim 10^3$
PrP 分子	1	≤ 3	$\sim 10^3$	$\sim 10^1$
侵染性	-	+	+	+

根据电离辐射、分子筛层析和速度区带沉降测定,朊病毒的最小的单体可能具有低到 50,000 的分子量。最近用提纯的朊病毒悬浮在磺基甜菜碱 3.14 中,可通过阻截分子量 100,000 滤膜,但能被阻截分子量 30,000 以下的滤膜挡住。可见侵染性的朊病毒的单体含有 3 个或少

于3个的 PrP 分子。而杆状聚合体可能含有多到 10^5 个 PrP 分子。所测定的 ID_{50} 单位介于 10 和 100 个杆之间。

3. 朊病毒具有嗜刚果红的双折射：提纯的朊病毒用刚果红染色，在光学显微镜下看到许多无定形的结构，大小为 $1-20 \mu m$ 。这些结构具有红的颜色，说明它们能结合刚果红染料。这是在明视野显微镜下看到的，如果在交叉偏振镜下观察则显示绿色和双折射。这种染色特性与人脾中分离的淀粉状蛋白相似。由未接种的和用健康脑提取物接种的仓鼠的相应提纯物不表现嗜刚果红的绿色双折射。朊病毒的这种结构特性非常像提纯的淀粉状蛋白。这种形态学的相似性可能反应出它们在结构上的共同性质。

4. 变性：在存在 1—2% SDS 的情况下，把提纯的朊病毒煮沸 2 分钟，便引起侵染性的降低和杆的消失(表 4)。PrP 的天然构形对蛋白酶的消化有抵抗力，但变性后变得敏感。可能天然的 PrP 聚合成杆状颗粒对 PrP 抵抗蛋白酶的消化起作用。在 SDS 中煮沸后变性的杆使刚果红染色后失去绿色双折射。使朊病毒复性的企图尚未成功。

表 4 高度提纯的天然和变性的朊病毒、PrP 和杆状结构

	测定方法	天然的	变性的
朊病毒	生物测定	$\sim 10^{10} ID_{50}/ml$	$< 10^4 ID_{50}/ml$
PrP	凝胶电泳	抵抗蛋白酶	对蛋白酶敏感
杆	电镜	许多	很少或没有
结合刚果红	偏光显微镜	绿色双折射	很低或没有

5. 其他理化性质

a 疏水性：朊病毒结合到苯基琼脂糖上后，不能被 $8.5M$ 乙二醇洗脱下来，但可用乙二醇和非离子型去污剂的混合物洗脱下来。这说明朊病毒具有疏水性质。

b 朊病毒对紫外线的抗性：表 5 列出了朊病毒和许多其他小侵染因子对 $254 nm$ 紫外线照射致死 63% 侵染性所需的剂量。朊病毒对紫外线的耐受性比噬菌体 T_2 高 10,000 倍，比

表 5 紫外线照射对一些小的感染因子的纯化

	$D_{37}(J/m^2)^*$
噬菌体 T_2	4
噬菌体 S_{13}	20
噬菌体 $\phi X174$	20
洛氏肉瘤病毒	150
多瘤病毒	240
福氏白血病病毒	500
鼠白血病病毒	1,400
马铃薯纺锤形块茎类病毒	5,000
羊瘙痒朊病毒	42,000

* D_{37} 是使 37% 侵染性保留的照射剂量

PSTV 高 10 倍

6. 羊瘙痒朊病毒无免疫反应：用高度提纯的羊瘙痒朊病毒免疫家兔，以间接免疫荧光或酶联免疫吸附实验场检测不出抗体的存在。由 BALB/C 小鼠制备的纯化 T 和 B 细胞，被羊瘙痒侵染和对照 T 和 B 细胞的分生反应没有不同。

五、可能由朊病毒引起的其他疾病

羊瘙痒因子曾被归为“慢病毒”，都是危害中枢神经系统 (CNS) 的疾病。包括人的震颤 (Kuru) 病和克-雅氏 (C-JD) 病。

克-雅氏病是一种进行性早老性痴呆病，含有一种可转移的致病因子，它在许多方面都与瘙痒因子相似。将 CJD 患者的脑组织中的可转移因子接种山羊，4 年后发展为神经系统紊乱，其表现无论在临床上还是在神经病理学上都不能与天然瘙痒病相区别。CJD 还能侵染猴

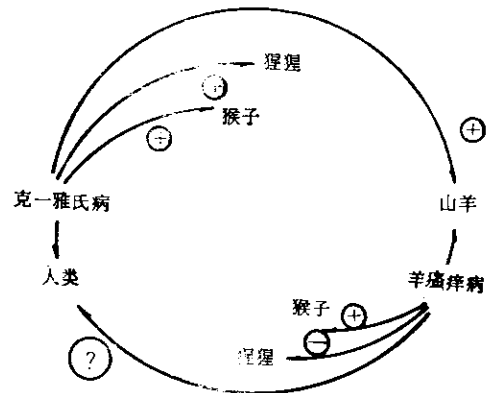


图 2 人类克-雅氏病和羊瘙痒病之间的实验关系

于和黑猩猩。但羊瘙痒因子能感染猴子，不能感染黑猩猩。企图把羊瘙痒和 CJD 在流行病学上连系起来的实验都失败了，目前还没有直接的证据证明羊瘙痒因子能引起人类发病。其关系如图 2 所示。

震颤病是一种慢性家族传播性中枢神经系统疾病，它不像 CJD 那样广泛分布，仅发现于新几内亚岛的山区。用口服震颤病因子的方法，可使少数猴子发展成类似震颤病的疾病，但用吃病人脑组织的方法未能使黑猩猩发病。

要证明震颤病和克-雅氏病与羊瘙痒病的关系，尚需由这两种病组织中分离蛋白质致病因子，这方面的实验正在开始。

羊瘙痒朊病毒聚合成淀粉状蛋白的特性也发生于其他 CNS 疾病中，如鹿慢性萎缩病和 Alzheimer 病等。它们是否也与朊病毒有关，是今后要研究的课题。

有人还推测人类慢性退化性紊乱疾病，像早老性痴呆、多发性硬化症、肌萎缩性脊髓侧索硬化症，帕金森氏病，糖尿病，风湿性关节炎和红斑狼疮等也可能是由朊病毒引起的。

六、关于朊病毒的复制机理

关于朊病毒的复制机理是一个很吸引人的问题。如果朊病毒确实不含有核酸，那么它一定是以一种以前从未发现的机理进行复制的。

Prusiner (1982) 提出了各种可能的解释。第一种可能性是朊病毒含有一种被保护起来的核酸。它为朊病毒蛋白质编码；或激活为朊病毒编码的寄主基因进行转录，从而合成朊病毒。为了研究朊病毒中是否隐蔽着核酸，曾用能侵入病毒外壳内与基因组起光化反应并阻止病毒复制的补骨脂素 (Psoralens) 研究了对朊病毒的作用。比钝化病毒高 500 倍的 5 种补骨脂素均不能钝化由仓鼠脑中提取的羊瘙痒朊病毒。H³ 标记的补骨脂素也不能与朊病毒形成光化产物。这一证据说明朊病毒中不大可能含有作为其基因组的核酸。

第二种可能性是朊病毒确实不含有核酸，那么合成朊病毒所需的信息必然是存在于寄主

细胞中或朊病毒本身。如果在寄主细胞中存在为朊病毒的编码的基因，那么这种基因一定是受到高度调节，不容易被激活的，而且存在于从鼠到人的各种哺乳动物细胞中。朊病毒的作用在于激活为其编码的细胞基因。

另一种可能是朊病毒为自己编码。这种假说与分子生物学中的“中心法则”相违背。非主流的复制有两种可能性可导致朊病毒的合成。如图 4 所示，一为通过逆转译过程产生为朊病毒编码的 RNA 或 DNA(在后者的情况下还需要逆转录)必须存在逆转译酶，甚至还要有逆转录酶(即图 3 中 A 假设)。二为蛋白质指导下的蛋白质合成，即蛋白质本身可作为遗传信息(即图 3 中 B 假设)。

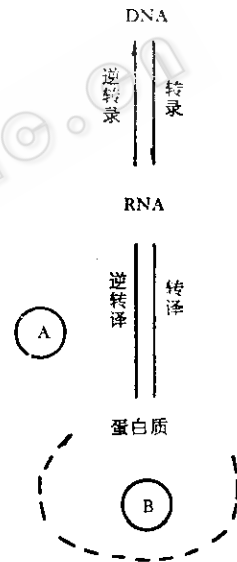


图 3 朊病毒两种非主流式复制的假设

综上所述，可以看到朊病毒的研究无论在生物学的基本理论，还是实践方面都有很重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Prusiner, S. B.: *Science*, **216**: 136—144, 1982.
- [2] Diener, T. O. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 5220—5224, 1982.
- [3] Prusiner, S. B. et al.: *Biochemistry*, **21**: 6940—6952, 1982.