

朊病毒蛋白样作用的  $\beta$  淀粉样蛋白

尹文超 综述 曹云鹏 审校

中国医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110001

**摘要:**  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 在阿尔茨海默病 (AD) 的发病中所起的作用至今尚不完全清楚。近年来的几项研究, 提出  $A\beta$  可能与朊病毒蛋白类似, 可以在脑组织中传播。首先,  $A\beta$  在物理化学性质及增值方式方面都与朊病毒蛋白类似。其次, 通过外周途径或脑内注射的方式向动物模型注射外源性  $A\beta$  后, 均可引起脑内  $A\beta$  沉积。最后细胞水平的实验直接证明了  $A\beta$  可以在细胞之间传递。

**关键词:** 阿尔茨海默病;  $\beta$  淀粉样蛋白; 朊病毒蛋白; 传播

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2016.02.016

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是引起痴呆的最常见的原因之一, 目前全世界有超过 3500 万人患 AD, 至 2050 年, 患 AD 的人数将超过 1.15 亿人<sup>[1]</sup>。AD 的主要临床表现是进行性的记忆损害、痴呆和认知功能障碍<sup>[2]</sup>。AD 的主要病理表现为细胞外  $\beta$  淀粉样斑块 (amyloid- $\beta$  plaques,  $A\beta$  斑) 沉积和细胞内神经元纤维缠结, 其中  $A\beta$  斑是由淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 裂解形成的  $\beta$  淀粉样蛋白 (amyloid- $\beta$  protein,  $A\beta$ ) 聚合形成, 目前认为  $A\beta$  在 AD 的发病过程中起主导作用, 最新的研究发现  $A\beta$  导致 AD 的机制可能和朊病毒蛋白类似。

## 1 朊病毒蛋白与 $A\beta$ 的相似点

朊病毒蛋白 (prion protein, PrP) 是一种具有传染性的蛋白, 其引起传递性的神经系统变性病, 包括克-雅氏病、库鲁病、格斯特曼-施特劳斯纳综合征、致死性家族性失眠症等。朊病毒蛋白有两种异构体, 一种是具有生理作用的 PrP (PrP<sup>c</sup>), 一种是可以引起上述疾病的具有病理作用的 PrP (PrP<sup>sc</sup>), 两者只有空间构象不同。PrP<sup>c</sup> 只有  $\alpha$  螺旋结构, 而 PrP<sup>sc</sup> 有多个  $\beta$  折叠结构, PrP<sup>sc</sup> 溶解度低, 可抵抗蛋白酶的水解作用。增殖方式方面, 人体内朊病毒蛋白的增殖可能是 PrP<sup>sc</sup> 分子与 PrP<sup>c</sup> 分子结合, 使 PrP<sup>c</sup> 分子变为结构异常的 PrP<sup>sc</sup> 分子, 异常

的 PrP<sup>sc</sup> 分子再去感染 PrP<sup>c</sup> 分子, 周而复始, 从而导致脑组织的破坏。

最近的研究表明  $A\beta$  可能与朊病毒蛋白类似。 $A\beta$  是一种小分子蛋白, 可以引起阿尔茨海默病。 $A\beta$  也有两种异构体, 即生理作用分子和病理作用分子, 生理作用分子为  $\alpha$  螺旋结构, 而病理作用分子的  $\beta$  折叠结构增加, 且病理作用分子溶解度降低, 可抵抗蛋白酶的作用, 近期研究显示,  $A\beta$  的增殖也可能与朊病毒蛋白类似。

## 2 外源性 $A\beta$ 脑内注射后, 可引起脑组织 $A\beta$ 沉积

### 2.1 小鼠模型的研究

目前有多项研究显示  $A\beta$  会像朊病毒蛋白那样在脑组织中传播。Meyer-Luehmann 等<sup>[3]</sup> 将含有大量  $A\beta$  斑的脑组织匀浆, 取自 AD 患者或 APP23 (表达突变的 APP 基因) 转基因小鼠, 注射入还未产生  $A\beta$  斑的 APP23 转基因小鼠脑内海马区, 四个月后将两者均引起 APP23 转基因小鼠脑内海马区的  $A\beta$  沉积。将正常老年人的脑组织匀浆注射入 APP23 转基因小鼠脑内, 没有或只有少量的  $A\beta$  沉积, 这与供者 (正常老年人) 的脑组织病理改变一致。将不含有  $A\beta$  斑的脑组织匀浆 (2 月龄 APP23 转基因小鼠或年老的野生型小鼠) 或 PBS 注射入 APP23 转基因小鼠脑内, 不能引起  $A\beta$  沉积。将含有大量  $A\beta$  斑的 APP23 转基因小鼠脑组织匀浆注射入野

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81371227)

收稿日期: 2015-12-14; 修回日期: 2016-04-05

作者简介: 尹文超 (1987-), 女, 硕士在读, 主要从事 Alzheimer 病的研究。E-mail: 060711yinwenchao@163.com。

通讯作者: 曹云鹏 (1963-), 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事 Alzheimer 病的研究。E-mail: cypcmu@163.com。

生型小鼠脑内同样不能引起 A $\beta$  沉积。以上现象说明, A $\beta$  沉积需要外源性 A $\beta$  的注入和内源性 A $\beta$  的产生两个条件。而 APP 转基因小鼠脑内提取的 A $\beta$  斑同 AD 患者脑内提取的 A $\beta$  斑作用相同, 则排除了物种的因素<sup>[3]</sup>。使用免疫方法除去脑组织匀浆中的 A $\beta$  或者使用甲酸破坏 A $\beta$  的三级结构, 不能引起注射小鼠脑内的 A $\beta$  沉积, 说明脑内 A $\beta$  沉积可能是错误折叠的 A $\beta$  (即病理作用分子) 引起的<sup>[3]</sup>。以上均提示 A $\beta$  的作用可能与朊病毒蛋白类似。

朊病毒蛋白病可以通过被少量朊病毒蛋白污染的钢制外科手术器械传播。Eisele 等<sup>[4]</sup>发现, 将被 A $\beta$  污染的不锈钢丝植入 APP23 转基因小鼠脑内, 可引起小鼠脑内 A $\beta$  沉积, 将不锈钢丝置于 PBS 溶液中在 95℃ 的条件下加热 10 min 后再植入, 不能阻止 A $\beta$  的沉积, 而将不锈钢丝通过等离子灭菌后植入, 才可以阻止 A $\beta$  沉积。这更加提示 A $\beta$  可能与朊病毒蛋白类似。

有研究发现, A $\beta$  沉积的过程具有时间依赖性。R1.40APP (表达突变的 APP 基因) 转基因小鼠研究期间 (3 ~ 15 月龄) 的基础 APP 表达量和脑内 A $\beta$  的量没有显著性差异。向不同月龄 (3 月龄和 9 月龄) R1.40APP 转基因小鼠脑内注射含有 A $\beta$  的转基因小鼠脑组织匀浆, 6 个月后进行分析, 发现两者脑内 A $\beta$  的沉积量相似。而向相同月龄 (3 月龄) R1.40APP 转基因小鼠脑内注射含有 A $\beta$  的转基因小鼠脑组织匀浆, 分别观察 6 个月和 12 个月的时间, 发现观察期为 12 个月的小鼠脑内有大量的 A $\beta$  斑沉积, 是观察期为 6 个月的小鼠脑内沉积量的 6 倍左右, 这说明脑内 A $\beta$  的沉积与外源性 A $\beta$  存在的时间有关, 而与宿主首次感染的年龄无关<sup>[5]</sup>。在 A $\beta$  的沉积过程方面, A $\beta$  首先在注射部位附近沉积, 随着时间的延长, A $\beta$  斑的数量逐渐增加<sup>[6]</sup>, 并向临近的脑组织区域播散, Ye 等<sup>[7]</sup>认为这种播散可能是通过神经元之间的通路实现的, 如定向扩散或轴突运输。以上说明引起 A $\beta$  沉积的过程是具有时间依赖性的, 并且 A $\beta$  的沉积是由注射部位向远隔部位播散的, 但这并不能区别是 A $\beta$  “真正”的播散, 还是注射物本身自注射部位向邻近组织浓度相关的梯度扩散。Kane 等<sup>[8]</sup>向转基因小鼠脑内注射外源性 A $\beta$ , 于注射 5 天、2 周、4 周后分别进行检测, 均未发现脑组织内 A $\beta$  沉积, 而 5 个月后进行检测, 发现大量 A $\beta$  沉积, 说明之后引

起 A $\beta$  沉积的免疫反应不是由注射物本身所引起的。

随后有一项针对朊病毒蛋白样的 A $\beta$  作用机制的研究, 其研究纳入了 2 种不同转基因小鼠, 即 APP23 和 APP/PS1 (表达人突变的 APP 基因和 PS1 基因) 转基因小鼠。APP23 转基因小鼠过表达 A $\beta$ 40, 其 A $\beta$  斑为弥散型和细丝状, 而 APP/PS1 小鼠过表达 A $\beta$ 42, 其 A $\beta$  斑为紧密型和小点状。将 APP23 转基因小鼠脑组织匀浆注射入 APP/PS1 转基因小鼠脑内, 产生细丝状 (APP23 转基因小鼠 A $\beta$  斑类型) 和小点状 (APP/PS1 转基因小鼠 A $\beta$  斑类型) 的混合型斑块<sup>[3,9]</sup>。这说明注入外源性 A $\beta$  后所形成的 A $\beta$  斑类型是由供者和宿主 A $\beta$  类型共同决定的, 外源性 A $\beta$  注入后并非是加速 APP 转基因鼠原有的 A $\beta$  沉积 (若是如此, 形成的 A $\beta$  斑类型应和宿主相同), 而是类似于朊病毒蛋白样的作用, 促进更多的病理作用的 A $\beta$  形成 (包括供者和宿主)。

上述研究提示 A $\beta$  有可能与朊病毒蛋白类似, 但朊病毒蛋白可感染非转基因鼠, 而外源性 A $\beta$  注入所引起的脑内 A $\beta$  斑沉积则要求其宿主为 APP 转基因小鼠。且人类 AD 患者大多为散发型, 没有基因突变, 所以上述结论推广至人类需要十分慎重。Watts 等<sup>[10]</sup>将表达堤岸田鼠 PrP (BVPPr) 的患病转基因鼠脑组织匀浆注射入 BVPPr 转基因鼠脑内, 其大约 35 d 发病, 注射入野生型小鼠脑内后大约需要 185 d 发病, 野生型小鼠的发病时间明显长于转基因小鼠。而总体来说, 朊病毒蛋白病的发病过程较快, AD 的发病则是一个缓慢的过程。小鼠研究中, 外源性 A $\beta$  注入后, APP 转基因小鼠发病需要 4 个月的时间, 若推论至野生型小鼠, 其需要的发病时间可能长达 1 ~ 2 年, 而这种推论正确与否需要更多、观察时间更长的实验来证明。

多项证据均支持 AD 的发生是由错误折叠的 A $\beta$  导致的, 而没有外源性错误折叠的 A $\beta$  的注入, APP 转基因鼠同样会产生 AD 的症状, 甚至没有基因突变的人也会患 AD, 这可能是由于其接触了环境中外源性的致病分子, 或者是体内某些生物过程的始动错误 (如转录和翻译过程的错误) 及组织的损伤 (如脑组织的创伤和亚临床卒中) 所引起的。如果没有朊病毒蛋白样的传播, 上述方式产生的错误折叠的蛋白质只会短暂性的存在, 而不会长期存在并导致疾病的发生<sup>[11]</sup>。

## 2.2 其他动物模型的研究

外源性 A $\beta$  脑内注射后也会引起 APP 转基因大鼠脑内 A $\beta$  沉积,但却需要近 10 个月的时间<sup>[12]</sup>。类似的研究在灵长类动物也已经开始。早在 1993 年,BAKER 等<sup>[13,14]</sup>将含有 A $\beta$  斑的 AD 患者脑组织匀浆注射入 1~2 岁大的狨猴脑内,在长达 6~7 年之后才发现脑内 A $\beta$  斑的沉积,而年龄匹配的同窝生的狨猴没有 A $\beta$  斑的沉积。随后此种现象被 Ridley 等证实<sup>[15]</sup>。

动物模型与人类疾病之间有着不同的时间过程,小鼠模型注射外源性 A $\beta$  后几个月甚至几周就发病,大鼠需要 10 个月左右发病,狨猴需要几年的时间,而 AD 患者在出现 A $\beta$  斑后需要几十年才发病,这种不一致性质疑了动物模型的正确性及动物模型的结果是否可以应用于人类疾病的解释。然而也有许多因素可以解释这种差异,首先,动物的大脑比人类的大脑要小很多,那么 A $\beta$  在动物的大脑中聚集并从脑组织的一个区域传播到另一个区域的时间就要少很多,从小鼠到大鼠再到狨猴所需要的时间逐渐延长,也符合此种解释。其次,这种传递机制在 APP 转基因动物中最为明显,说明这种聚集及传递机制可能与 A $\beta$  的浓度有关,这就不难解释为何人类疾病的发病过程相对更长了<sup>[16]</sup>。

## 3 外源性 A $\beta$ 通过周围途径注射后,同样可以引起脑内 A $\beta$ 沉积

2009 年, Eisele 等<sup>[4]</sup>将含有 A $\beta$  的转基因小鼠脑组织匀浆或者正常小鼠的脑组织匀浆通过口服、静脉注射、眼内或者鼻内的途径接种给 2~5 月龄的 APP23 转基因小鼠,接种后 4~8 个月检测,不论脑组织匀浆注射物中是否含有 A $\beta$ ,或通过何种方式接种,接种小鼠脑内任何区域均无 A $\beta$  的沉积。一年后, Eisele 等<sup>[17]</sup>加大了腹腔注射的剂量,将含有 A $\beta$  的转基因小鼠脑组织匀浆分别通过腹腔注射和脑内注射的方式,注射入 2 月龄 APP23 转基因小鼠体内,4 个月后,脑内注射 A $\beta$  的小鼠脑内均有 A $\beta$  斑的形成,而此时腹腔注射的小鼠脑内没有 A $\beta$  斑的形成,延长 2~5 个月的观察时间发现,腹腔注射的小鼠脑内开始形成 A $\beta$  斑。而腹腔注射不含 A $\beta$  的脑组织匀浆或 PBS 的小鼠脑内没有 A $\beta$  斑。其中腹腔注射 A $\beta$  的剂量大约是脑内注射剂量的 1000 倍,然而却比脑内注射形成 A $\beta$  斑的时间长 2~5 个月,提示腹腔注射是一种低效途

径。APP23 转基因小鼠体内 APP 的表达仅限于神经系统,因此腹腔注射后小鼠脑内的 A $\beta$  斑是由于注射物质进入脑内而引起,而不是首先在注射部位即腹腔引起 A $\beta$  沉积后扩散到脑组织,并且实验过程中均未发现外周组织存在 A $\beta$  沉积,这也证明了 A $\beta$  沉积是由外源性 A $\beta$  注入后选择性的侵袭脑组织导致的,而并不是由外周组织逐步扩散至脑组织引起的。近期, Kozin 等<sup>[18]</sup>证明了静脉方式注射合成的异构化 A $\beta$  也会引起脑内 A $\beta$  沉积。

## 4 A $\beta$ 可以在细胞间传递

上述实验证明了,向 APP 转基因鼠脑内注射含有 A $\beta$  的脑组织提取物,可以导致小鼠脑内的 A $\beta$  沉积<sup>[3, 4, 8, 17, 19, 20]</sup>,说明 A $\beta$  可能具有“感染性”。然而这些研究并不能直接证明 A $\beta$  可以在神经元之间传递。Domert 等<sup>[21]</sup>将含有荧光标记 A $\beta$  的神经瘤细胞(SH-SY5Y)和使用增强绿色荧光蛋白标记的 SH-SY5Y 细胞共同培养 24~72 h,发现荧光标记的 A $\beta$  可以转移到使用增强绿色荧光蛋白标记的 SH-SY5Y 细胞中去,直接证明了 A $\beta$  会在细胞间传递。但是我们还需要更多的实验证明 A $\beta$  会在活体动物甚至人类脑内的神经元之间传递。

## 5 小结

目前越来越多的证据证明 A $\beta$  可能与朊病毒蛋白类似,这有利于 AD 病因的探究。然而较长的潜伏期是感染性朊病毒蛋白病的一个重要特征,其中库鲁病的潜伏期长达 40 年之久<sup>[22]</sup>,这使得对感染过程的追踪变得复杂而又困难,而在自然条件下,是否有一部分的 AD 患者因为朊病毒蛋白样的传输作用被感染,还需要进一步的研究。动物研究表明,接触外源性的 A $\beta$  对启动脑内 A $\beta$  的沉积起着至关重要的作用,而从感染至发病需要较长的时间,这提示我们对于 AD 的治疗应该从早期阶段开始,尽早中和或者清除外源性的 A $\beta$  可能成为治疗 AD 的一种重要方法,这也给我们今后的研究提供了参考。

## 参 考 文 献

- [1] Stefanova NA, Kozhevnikova OS, Vitovtov AO, et al. Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease. *Cell Cycle*, 2014, 13(6): 898-909.
- [2] Xiao X, Cali I, Yuan J, et al. Synthetic A $\beta$  peptides acquire prion-like properties in the brain. *Oncotarget*, 2014, 6(2): 642-650.

- [ 3 ] Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, et al. Exogenous induction of cerebral  $\beta$ -amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science*, 2006, 313(5794): 1781-1784.
- [ 4 ] Eisele YS, Bolmont T, Heikenwalder M, et al. Induction of cerebral  $\beta$ -amyloidosis: intracerebral versus systemic A $\beta$  inoculation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(31): 12926-12931.
- [ 5 ] Hamaguchi T, Eisele YS, Varvel NH, et al. The presence of A $\beta$  seeds, and not age per se, is critical to the initiation of A $\beta$  deposition in the brain. *Acta Neuropathol*, 2012, 123(1): 31-37.
- [ 6 ] Stöhr J, Watts JC, Mensinger ZL, et al. Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta (A $\beta$ ) prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(27): 11025-11030.
- [ 7 ] Ye L, Hamaguchi T, Fritsch SK, et al. Progression of Seed-Induced A $\beta$  Deposition within the Limbic Connectome. *Brain Pathol*, 2015, 25(6): 743-752.
- [ 8 ] Kane MD, Lipinski WJ, Callahan MJ, et al. Evidence for seeding of beta-amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *J Neurosci*, 2000, 20(10): 3606-3611.
- [ 9 ] Yin RH, Tan L, Jiang T, et al. Prion-like Mechanisms in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*, 2014, 11(8): 755-764.
- [ 10 ] Watts JC, Giles K, Stöhr J, et al. Spontaneous generation of rapidly transmissible prions in transgenic mice expressing wild-type bank vole prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(9): 3498-3503.
- [ 11 ] Soto C. Transmissible proteins: expanding the prion heresy. *Cell*, 2012, 149(5): 968-977.
- [ 12 ] Rosen RF, Fritz JJ, Dooyema J, et al. Exogenous seeding of cerebral  $\beta$ -amyloid deposition in  $\beta$ APP-transgenic rats. *J Neurochem*, 2012, 120(5): 660-666.
- [ 13 ] Baker HF, Ridley RM, Duchen LW, et al. Evidence for the experimental transmission of cerebral beta-amyloidosis to primates. *Int J Exp Pathol*, 1993, 74(5): 441-454.
- [ 14 ] Baker HF, Ridley RM, Duchen LW, et al. Induction of  $\beta$  (A4)-amyloid in primates by injection of Alzheimer's disease brain homogenate. Comparison with transmission of spongiform encephalopathy. *Mol Neurobiol*, 1994, 8(1): 25-39.
- [ 15 ] Ridley RM, Baker HF, Windle CP, et al. Very long term studies of the seeding of  $\beta$ -amyloidosis in primates. *J Neural Transm (Vienna)*, 2006, 113(9): 1243-1251.
- [ 16 ] Guo JL, Lee VM. Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat Med*, 2014, 20(2): 130-138.
- [ 17 ] Eisele YS, Obermüller U, Heilbronner G, et al. Peripherally applied A $\beta$ -containing inoculates induce cerebral  $\beta$ -amyloidosis. *Science*, 2010, 330(6006): 980-982.
- [ 18 ] Kozin SA, Cheglakov IB, Ovsepyan AA, et al. Peripherally Applied Synthetic Peptide isoAsp7-A $\beta$  (1 - 42) Triggers Cerebral  $\beta$ -Amyloidosis. *Neurotox Res*, 2013, 24(3): 370-376.
- [ 19 ] Langer F, Eisele YS, Fritsch SK, et al. Soluble A $\beta$  seeds are potent inducers of cerebral  $\beta$ -amyloid deposition. *J Neurosci*, 2011, 31(41): 14488-14495.
- [ 20 ] Morales R, Bravo-Alegria J, Duran-Aniotz C, et al. Titration of biologically active amyloid -  $\beta$  seeds in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep*, 2015, 5: 9349.
- [ 21 ] Domert J, Rao SB, Agholme L, et al. Spreading of amyloid- $\beta$  peptides via neuritic cell-to-cell transfer is dependent on insufficient cellular clearance. *Neurobiol Dis*, 2014, 65: 82-92.
- [ 22 ] Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, et al. Kuru in the 21st century—an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet*, 2006, 367(9528): 2068-2074.