

朊病毒病治疗方法的研究进展

李书翔, 安丽萍, 梁德娟, 王凯旋, 赵建国*

海南大学生命科学学院, 海口 570228

摘要: 朊病毒是一种由体内正常朊蛋白转化形成的传染性蛋白质, 朊病毒病是由朊病毒引发的致命性神经退行性疾病。目前临床虽然尚无治疗朊病毒病的方法, 但是大量的研究者已从多个角度进行研究, 并取得了一定进展。对近期有关传统化学药物、基因治疗方法、免疫学治疗方法和同源朊蛋白的朊病毒病治疗方法进行了综述, 并重点分析了新型靶向细胞内信号通路药物以及有潜在利用价值的线粒体相关朊病毒胞内作用信号通路, 旨在为朊病毒新的研究方向提供理论依据, 从而促进朊病毒病治疗方法应用于临床。

关键词: 朊病毒病; 朊蛋白; 基因治疗; 免疫治疗

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2021.0156

中图分类号: R373 文献标志码: A

Research Progress on the Treatment of Prion Disease

LI Shuxiang, AN Liping, LIANG Dejuan, WANG Kaixuan, ZHAO Jianguo*

School of Life Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract: Prions are infectious proteins formed by normal prion proteins in vivo, and prion diseases are a class of fatal neurodegenerative diseases triggered by prions. At present, although there is no clinical method to treat prion disease, a large number of researchers have studied from many angles and made some progress. This article provided a brief illustration of recent prion disease treatment options related to traditional chemical drugs, gene therapy, immunotherapy and homologous prion proteins, with an emphasis on novel drugs that target intracellular signaling pathways as well as intracellular signaling pathways of mitochondria associated with prion proteins with potential utility. This paper aimed to provide a theoretical basis for the new research direction of prion, in order to promote the clinical application of prion treatment methods.

Key words: prion disease; prion proteins; signaling pathway; gene therapy; immunotherapy

朊病毒病(prion disease)是由体内正常朊蛋白(cellular prion protein, PrPC)在一定的条件下构象改变而错误折叠形成的一种具有抗蛋白酶水解特性的致病型羊痒病朊蛋白(pathogenic scrapie prion protein isoform, PrPSc)。PrPSc主要通过沉积于人与动物的中枢神经细胞内而引发多种具有高度传染性致死性的中枢神经系统疾病, 包括人库鲁病、人克雅氏症、致死性家族型失眠症、疯牛病、羊瘙痒症等, 不仅影响畜牧业产业发展, 而且威胁人类的生命安全。世界卫生组织曾预言, 到2040年, 包括朊病毒病在内的神经退行性

疾病的发病率将上升至第2位, 仅次于癌症^[1]。目前, 临床上尚无有效防治朊病毒病的方法, 基于此, 本文对目前朊病毒病治疗方法进行简要综述, 旨在为临床防治朊病毒病提供参考依据。

1 传统化学药物

自1982年发现PrPSc起, 人类即开始探寻治疗朊病毒病的方法, 首先对直接抑制PrPSc的化学药物进行了筛选。早期研究指出多糖类化合物、杂环类化合物和抗生素等均能在一定程度上

收稿日期: 2021-09-22; 接受日期: 2021-11-12

基金项目: 海南省重点研发计划项目(ZDYF2019092)。

联系方式: 李书翔 E-mail: 2060709772@qq.com; * 通信作者 赵建国 E-mail: 973878018@qq.com

抑制 PrPSc 增殖^[1]。近年来,有研究者发现黄芩素^[2]、桦褐孔菌乙醇粗提物^[3]及白藜芦醇^[4-5]均有抑制 PrPSc 的作用;同时,一些中药提取物,如淫羊藿提取物^[6]、钩藤提取物^[7]也有抑制 PrPSc 的作用。但由于动物体内复杂的生理生化条件、血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的阻挡,不同种类的朊病毒株、药物本身造成的不良反应使得以上药物很大一部分仅停留在体外药效试验阶段,难以进入临床试验;而且大多数最新发现的化学物质抑制 PrPSc 的原理尚不明确,如黄芩素和桦褐孔菌乙醇粗提物的抗朊病毒作用仅通过推测认为与细胞凋亡和抗氧化活性有关^[2-3],中药提取物则由于其复杂的成分使得原理探究的过程更加困难,因而仅有少数药物可以在动物模型试验中继续发挥作用,上述物质中仅有白藜芦醇在动物模型中进行了用药试验并发现其作用于脑源性神经生长因子上游通路^[4]。有研究认为,仅消除 PrPSc 聚集体不会消除 PrPc 的神经毒性^[8],因此,通过筛选抗朊病毒化学物质来获得朊病毒病治疗药物具有不确定性。值得注意的是,最新发现的一系列关于 PrPSc 的作用机制和信号通路,为朊病毒病药物筛选提供了潜在靶点,并为化学药物指明了新方向。

2 靶向胞内信号通路药物

2.1 靶向内质网应激反应相关通路

目前针对细胞内质网中蛋白质错误折叠、未折叠蛋白聚集以及钙离子平衡紊乱的常见措施为上调未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)。UPR 功能包括在内质网功能失调诱发错误折叠的蛋白质累积或钙离子浓度异常时,关闭翻译系统以减少错误折叠蛋白在内质网内的堆积,并在内质网严重受损时诱导促凋亡蛋白表达。UPR 主要的传感器包括 RNA 样内质网蛋白激酶(protein kinase RNA-like ER kinase, PERK), PERK 可以通过磷酸化真核转录起始因子 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α , eIF2 α)下调蛋白质的翻译。当细胞受到 PrPSc 感染时,胞内钙离子稳态遭到破坏,进而导致内质网稳态的破坏和 UPR 的激活。有研究显示,被 PrPSc 感染的小鼠体内细胞的 PERK 持续激活,同时, eIF2 α 表现出磷酸化作用,进而使蛋白质翻译下调,最终的

结果是蛋白质合成量急剧减少导致突触功能衰竭、神经元死亡和其他神经退行性病变^[9]。

有研究发现,对朊病毒病小鼠使用小分子药物 GSK2606414 抑制 PERK 可以恢复重要蛋白的合成,并阻止神经退行性病变,但全面抑制 UPR 也会导致胰腺损伤^[10]。因此,该研究团队进一步探索使用综合应激反应抑制剂(integrated stress response inhibitor, ISRIB)恢复重要蛋白合成,ISRIB 通过阻止 eIF2 α 介导的翻译抑制,在保留了一些必要的 UPR 的同时逆转了蛋白质合成的减少,使朊病毒病小鼠的整体蛋白质合成率达到对照组的 70%,并且未发现胰腺毒性反应^[10]。有研究者筛选出的盐酸曲唑酮和二苯甲酰甲烷均能够部分抑制 eIF2 磷酸化和 UPR 激活,并且均不存在胰腺毒性,同时,还表现出更好的药代动力学特性。经过盐酸曲唑酮和二苯甲酰甲烷治疗的朊病毒病小鼠未出现明显的神经系统临床症状,同时生存期也显著延长^[11]。在以 UPR 为基础的另一种治疗思路中,研究人员证实了胍那苄衍生物 sephin 1 可以选择性结合并抑制应激诱导的蛋白磷酸酶 1 调节亚基 15A 复合物,因此,该药物可以通过延长 eIF2 α 磷酸化时间,一定程度上抑制 UPR 导致的促凋亡蛋白(如 CHOP)的表达,以此起到对细胞的保护作用。该方法已经在小鼠肌肉萎缩性侧索硬化症模型中成功抑制了神经退行性病变^[12],表明该方法具有应用潜力。

2.2 靶向自噬反应

自噬作用是普遍发生于真核细胞溶酶体内的一种细胞行为,其可以降解胞内各类折叠错误或有毒性的蛋白,因此,在细胞的生命周期中扮演重要角色。目前,已有研究显示,PrPSc 感染的细胞中,自噬小体数增多,自噬流活化,而在被阻断自噬过程感染 PrPSc 的细胞中,PrPSc 含量显著上升^[13],这初步揭示了真核细胞的自噬作用与 PrPSc 感染之间的关系,提示研究人员可以从调控细胞自噬入手寻找缓解或治疗朊病毒病的药物。

在细胞自噬调控信号通路中,雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是最有效、最直接的相关信号通路。mTOR 是一种高分子量丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可以磷酸化自噬启动因子未配位的 51 样激酶 1/人类自噬相关蛋白 1、人类自噬相关蛋白 13 等自噬相关因子,使其失活从而抑制细胞自噬,因而 mTOR 的降解被认为

是感染 PrPSc 的细胞中自噬活化的主要原因^[13]。已有研究证实,雷帕霉素通过结合 mTOR 而在一定程度上促进自噬,提高细胞清除 PrPSc 的能力,且感染 PrPSc 的实验小鼠在接受雷帕霉素治疗后发病时间延迟,症状严重程度减轻,生存期也延长近 10%^[14]。但在临床实践中,雷帕霉素对 mTOR 的抑制效果仍具有局限性,主要是由于 mTOR 被抑制后负反馈调节激活了位于其上游的蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT),进而使 mTOR 被活化。有研究者使用 mTOR 和 ATK 的双重抑制剂发现,对 mTOR 通路具有良好的抑制效果^[15-16];富脯氨酸 AKT 底物 40 (protein-rich AKT substrate of 40-kDa, PRAS40)既是 AKT 底物,而且还可以抑制 mTOR,转染 HA-PRAS40 的细胞经细胞朊病毒蛋白残基 106-126 处理后,与转染空白载体的对照组相比,凋亡标识蛋白水平约下降 50%^[17]。以上研究不仅提示 PRAS40 在抑制 mTOR 过度活化以保护细胞免受 PrPSc 侵袭引起的凋亡中起作用,而且还为抑制 mTOR,促进细胞自噬清除 PrPSc 提供了新的方案。有研究者还发现,阿司咪唑和伊马替尼这 2 种已经上市的药物也可以促进溶酶体自噬,从而提高 PrPSc 的清除效率^[18-19]。此外,他克莫司和锂也可以通过诱导 PrPSc 感染细胞中的自噬反应来提高 PrPSc 的清除效率^[18,20]。值得注意的是,锂元素还可以特异性缓解毒性多肽对抑制元件沉默性转录因子的抑制作用,并恢复由抑制元件沉默性转录因子干扰引起的下游靶蛋白表达紊乱^[21],这些机制可能会为感染 PrPSc 的神经细胞提供保护作用,但关于细胞自噬如何缓解包括朊病毒病在内的一系列神经退行性疾病的具体机制尚未完全明确^[22],因此,此类以溶酶体自噬反应为基础药物的进一步筛选、改良还需相关基础研究的继续推进。

2.3 靶向线粒体损伤

线粒体作为真核生物细胞内重要的细胞器,其与胞内的许多生理、病理过程相关,如线粒体在氧化磷酸化、钙离子稳态、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 清除与程序性细胞死亡中均起主导作用^[23]。而 PrPSc 的感染可以导致不同程度的线粒体功能异常^[24]。当内质网在 PrPSc 影响下稳态受到破坏后,胞质中钙离子浓度失调导致线粒体膜电位丧失,同时,呼吸功能受到抑制,这可能产生大量导致氧化应激的 ROS,氧化应激又可进一

步使线粒体损伤,导致其形态异常、膜功能损伤和功能障碍^[25],如在朊病毒株 ME7 感染的小鼠模型中,线粒体分裂和融合的相关蛋白表达模式均发生了变化^[26],最终激活线粒体介导的凋亡途径。线粒体介导的凋亡途径主要与 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2) 蛋白家族有关,其中 Bcl 相关 X 蛋白 (Bcl-associated X protein, Bax) 可以直接插入线粒体膜,引起细胞色素 C 释放进入细胞质与凋亡活化因子相结合,促进半胱天冬酶的产生并启动一系列的级联反应,引发细胞凋亡。当大量神经元细胞凋亡时,患者会表现出一系列临床症状并最终死亡。此外,线粒体的功能障碍可能还是中枢神经突触细胞变性的潜在机制^[27]。

以上机制为研究者提供了一种寻找朊病毒病治疗药物的思路,即可通过使用靶向线粒体损伤药物降低 ROS 水平,保护线粒体,或者阻止由线粒体介导的凋亡过程,从而保护患者神经元。通过筛选,研究人员发现 MitoQ 和积雪草酸 2 种线粒体靶向抗氧化剂,均在被 PrPSc 感染的细胞系中发挥重要作用,从而降低了 ROS 水平,缓解了线粒体的氧化应激损伤,修复了线粒体功能,使 PrPSc 感染细胞的存活率上升了约 1 倍^[23]。另外一项研究则发现,利用胰岛素样生长因子-1 预处理细胞后,再利用细胞朊病毒蛋白残基 106-126 则无法诱导 Bax 易位和细胞色素 C 的释放。表明胰岛素样生长因子-1 可以通过阻断 Bax 易位来防止 PrPSc 诱导的神经元细胞死亡,同时,研究人员还发现胰岛素样生长因子-1 可以通过抑制线粒体功能障碍来减弱 ROS 的产生^[28]。

PrPSc 相关的线粒体信号通路可能作为药物筛选的潜在靶点,其中磷酸酶及张力蛋白同源物诱导的激酶 1 (PTEN-induced kinase 1, PINK1) 和 Parkin 这两种调节线粒体自噬活性的线粒体蛋白受到了临床的广泛关注。在线粒体自噬中,激活的 PINK1 通过磷酸化多泛素链修饰受损线粒体上的线粒体膜蛋白,进而招募 Parkin 并引发一系列下游反应降解受损的线粒体。有研究在感染 PrPSc 的小鼠脑组织切片中观察到 PINK1 和 Parkin 的异常上调,同时,抑制受 PrPSc 感染的细胞系中 PINK1 或 Parkin 的表达可以缓解线粒体自噬^[29],表明 PrPSc 感染细胞中,诱发神经元坏死现象的线粒体自噬行为与 PINK1/Parkin 通路相关。有学

者研究了线粒体发动蛋白样蛋白1(dynamin-like protein 1, DLP1)介导的线粒体分裂过程。通常情况下, DLP1存在于细胞质中, 被线粒体膜上受体样分子招募以调节线粒体分裂复合物。研究发现, 朊病毒病仓鼠模型中, DLP1调节的线粒体碎裂导致神经元活性降低、凋亡及突触可塑性改变, 而抑制DLP1表达可以抑制细胞朊病毒蛋白残基106-126处理后细胞线粒体碎裂的现象^[30]。值得注意的是, 在该项研究中, 研究人员抑制DLP1时使用了RNA干扰技术, 探明了潜在的DLP1相关治疗措施。以上研究结果表明, 靶向线粒体损伤药物在缓解PrPSc感染方面具有巨大潜力, 但进一步的动物模型实验以及更多种类的靶向线粒体损伤药物的筛选还有待更深入地开展研究, 相关药物短时间内尚难以进入实际应用阶段。

3 基因治疗

3.1 RNA干扰

已有研究显示, 敲除朊蛋白基因(prion protein gene, *PRNP*)或*PRNP*表达量降低的动物可以有效抵抗朊病毒病, 然而考虑到伦理、生物安全、临床可行性等问题, 降低*PRNP*表达量是比敲除*PRNP*更佳的基因治疗方法。

RNA干扰是近年来发现的一种序列特异的转录后基因沉默现象, 其通过双链RNA启动, 可导致具有同源序列mRNA的降解, 进而快速、有效地减少目的基因表达, 是一项很有潜力的基因治疗技术。为研究其对*PRNP*基因表达的作用效果, 研究人员设计了针对牛*PRNP*外显子区域的干扰序列, 将其转染至胎牛成纤维细胞, 结果显示, 筛选的阳性细胞对*PRNP*的抑制率可达78%^[31]。有研究者设计了针对PrPSc在细胞内复制和聚集必需蛋白, 即37 kD/67 kD层粘连蛋白受体前体(laminin receptor precursor, LRP)的特异性小分子干扰RNA(small interference RNA, siRNA)。目前已在体外试验证明LRP为PrPSc在细胞内复制和聚集所必需的蛋白^[1], 在细胞实验中对其施以下调、抑制等措施成功降低了PrPSc水平。动物模型实验中, 向小鼠脑内皮质区注射LRPsiRNA后15 d内, 37 kD/67 kD层粘连蛋白受体水平分别降低62%和82%, 将LRPsiRNA注射到海马区后, 小鼠脑内LRP和PrPSc水平分别降

低36%和41%, 且朊病毒病潜伏期显著延长^[32]。以上研究结果进一步验证了RNA干扰技术抑制朊病毒基因表达的可操作性, 并展现出RNA干扰技术治疗朊病毒病靶点的多样性。

3.2 反义寡核苷酸

除RNA干扰外, 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)因具有高度特异性的基因表达阻断作用而被广泛应用于研究与治疗遗传相关疾病中。Raymond等^[33]设计了几种与小鼠PRNP mRNA互补的ASO, 从感染前15天开始, 每2~3个月向小鼠进行注射, 2种不同的ASO分别使小鼠感染PrPSc后存活时间延长了81%和98%, 感染后4个月单次注射使存活率上升了55%, 并延迟了临床症状发作时间。更换ASO种类后, 在感染PrPSc 2.5个月后每3个月施加1次大剂量治疗能够使小鼠存活时间增加约3倍, 在接近临床症状发作时, 进行干预使存活时间提高了19%。ASO药代动力学和安全性研究表明, 每1~4个月1次的治疗对人和其他灵长类动物均是无害的。有研究者还发现, ASO疗效对于不同的朊病毒株存在差异, 提示未来可能需要根据患者的疾病发展阶段和所感染毒株调整治疗方案^[34]。以上研究证明ASO与PrPc mRNA靶向性结合, 并通过脑室注射实现ASO在中枢神经系统中的广泛分布, 提示通过以上途径可解决朊病毒治疗中的给药难题。未来可拓展ASO技术的靶点范围, 进而发展为治疗朊病毒病的潜在方法。

4 免疫治疗

通过主动免疫途径、被动免疫途径防治各类疾病一直以来都在动物医学和人类公共卫生健康事业中占据重要地位, 因而研究者对于PrPSc外源抗体与疫苗进行了深入的研究。目前已有多种PrPc单克隆抗体被成功制备, 同时, 一些单链抗体和骆驼PrPc抗体还表现出了可穿过血脑屏障的良好扩散性^[35-36]。此外, 在抗体的结合位点方面, 有研究证明, 针对非整联蛋白37 kD/67 kD层粘连蛋白受体、淋巴毒素 β 受体等与PrPSc作用相关蛋白的抗体同样可以抑制朊病毒病的发展^[1,37]。在主动免疫途径中, 突破机体对PrPc的免疫耐受是研发疫苗的关键步骤, 而一系列实验通过施加免疫佐剂^[38]、修饰抗原肽^[39]、制备PrPc

二聚体^[40-41]可能引发机体针对 PrPc 的免疫反应。

但通过主动免疫和被动免疫治疗朊病毒病仍面临一些问题,如实验中产生的抗体大多数难以穿过血脑屏障,从而使得免疫治疗在出现临床症状后无法发挥效果,而对于尚未出现症状的朊病毒疾病早期阶段,提早发现极为困难,部分有望穿过血脑屏障的小分子抗体又面临半衰期过短、效果不佳等问题,这二者间的矛盾目前难以调和,即使未来通过脑室内注射进行治疗也很难实现大分子抗体在脑内的广泛分布。此外,单克隆抗体在进入大脑后还可通过引起 PrPc 的交联作用诱发细胞凋亡,相关实验中注射 IgGD13 和 IgGP 的小鼠中分别有 80% 和 70% 的个体表现出海马区域神经元死亡^[42],因此,利用抗体抑制或预防 PrPSc 感染时必须十分谨慎,这也可能是近期被动免疫方法治疗朊病毒病进展较缓慢的原因;并且朊病毒病免疫疗法面临抗体特异性的问题,尤其是对于朊病毒病疫苗,其优势为机体产生的抗体能在暴露后及早清除潜在病原体以预防当前不可治愈的中枢神经系统感染,因而抗体需要高效地识别并结合 PrPSc,否则摄入食物中携带的 PrPc 将消耗大量抗体,降低体液中抗体浓度,削弱疫苗对 PrPSc 的防御作用。有研究者已逐步发现 PrPc 二聚体^[40]、PrPc 淀粉样蛋白^[43]、非致病性的抗蛋白酶 K 重组 PrPc 低聚体^[44]等与 PrPSc 有更多相似表位的免疫原,利用免疫原刺激机体产生特异性更强的抗体,有望在未来推动朊病毒病疫苗的研发。

5 异源朊蛋白

PrPSc 的形成严重依赖自身与宿主细胞 PrPc 之间序列的同源性,异源朊蛋白(heterologous prion proteins, HetPrP)的存在通常被认为可以抑制该过程。HetPrP 对 PrPSc 形成的干扰效果早已在胞外实验及细胞实验中被证实,但直到近几年,研究人员才在体内观察到重组仓鼠朊蛋白对羊瘙痒病小鼠适应株的抑制效果,实验中施用高剂量 HetPrP 延缓和减轻了小鼠临床症状的发作时间,并延长了生存时间。此外,当在感染后 452 天终止研究时,高剂量治疗组中 50% 的小鼠未表现出临床症状,分析原因为 HetPrP 与 PrPSc 结合形成了无活性复合物,或是直接抑制了 PrPSc 体内转化过程^[45]。但 HetPrP 的递送方案还需进一步研

究,该实验通过脑室内注射将药物直接送达病变区域,但与 ASO 不同, HetPrP 在大脑中可能难以充分接触 PrPSc。此外,更有效的 HetPrP 序列也有待进一步开发。

6 展望

朊病毒病作为一种致命的神经退行性疾病,死亡率极高,近 40 年来,为攻克这一难题,朊病毒病的检测方法、动物模型也均在逐步发展。目前检测朊病毒病的金标准仍是对患者或患病动物的脑组织进行活检^[46],但对朊病毒病特征性标志物 PrPSc 的检测方法也在不断进步,特别是近年来实时震动诱导转化法和连续蛋白质错误折叠循环扩增法的应用大大提升了对微量 PrPSc 的检测精度,使得从包括血液和皮肤在内的各类组织与体液中发现 PrPSc 感染的早期证据成为可能^[47]。此外,通过免疫学方法对朊病毒病替代生物标志物的检测、脑电图以及生物学成像也被用于朊病毒病的临床诊断中^[48]。朊病毒病的动物模型长期以来以啮齿类动物为主,如小鼠、仓鼠、田鼠均有应用^[49]。在最新的研究中发现果蝇有望通过基因改造技术表现哺乳动物朊病毒病的某些病理学特征^[50],若新型的无脊椎动物模型能够成功建立,将大大提高实验可操作性,降低实验成本,促进对 PrPSc 和朊病毒病的研究。

但在寻找朊病毒病治疗方法的过程中,传统化学药物的筛选大多仍停留在细胞实验上。究其原因,对于 PrPSc 及其致病机理了解不够充分,因而部分学者致力于 PrPSc 作用机制和神经退行性病变调控因素的研究。目前一些影响朊病毒病致病过程的调控因子和信号通路引起了人们广泛的关注,如核转录因子- κ B^[51]、钙调蛋白^[52]、抑制元件沉默性转录因子^[21]、典型 Wnt/ β -catenin 信号通路等^[53],为寻找朊病毒病的治疗方法带来了新的思路 and 希望;另外,不同朊病毒病治疗方案的联用效果也有待进一步研究,沉积的 PrPSc 对中枢神经系统的影响是多方面的,也是阶段性的,作用机制不同的药物可以产生良好的互补效应,提升治疗效果,目前他克莫司和米诺环素的联合使用已被证实能够在病程的不同阶段通过多种通路减轻神经元和突触失调,提高小鼠的存活率^[54],而且在未来的研究中,一旦研发出能投入实际应用的基

因治疗、免疫治疗等方法,针对何种靶点的药物更适合联合使用也需要进一步探索。未来随着对PrPSc致病分子机制不断了解及已有药物的深入发掘,必将开发出能够投入临床使用的朊病毒病治疗方法。

参 考 文 献

- [1] 张珠明,汪仁莉,赵德明. 朊病毒病治疗的研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2012, 48(3): 58-60.
- [2] 秦笙,彭健愉,柏彩英,等. 黄芩素对朊蛋白 PrP106-126 片段引起的神经毒性保护作用研究[J]. 中国医药导报, 2019, 16(34): 7-10, 181.
- [3] 杨微,陈志宝,陈操,等. 桦褐孔菌乙醇粗提物对朊病毒复制的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(7): 8-13, 7.
- [4] CHAO H, CAO C, JIA C, *et al.* The low levels of nerve growth factor and its upstream regulatory kinases in prion infection is reversed by resveratrol[J]. *Neurosci. Res.*, 2021, 162: 52-62..
- [5] 周冬花. 芷类对朊病毒体外复制的影响及作用机制研究[D]. 北京:中国疾病预防控制中心, 2019.
- [6] 李辉,卜祥龙,窦爽,等. 淫羊藿提取物对酵母朊病毒[PSI⁺]治愈的影响[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(5): 42-45.
- [7] 张艳,刘宴村,宋有涛. 钩藤提取物对感染朊病毒酵母模型的治疗作用[J]. 动物医学进展, 2015, 36(9): 84-87.
- [8] SOSHI K. Targeting the endoplasmic reticulum in prion disease treatment: breakthroughs and challenges[J]. *Res. Rep. Biochem.*, 2015, 2015(5): 31-38.
- [9] MALLUCCI G, DICKINSON A, LINEHAN J, *et al.* Depleting neuronal Prp in prion infection prevents disease and reverses spongiosis[J]. *Science*, 2003, 302(5646): 871-874.
- [10] HALLIDAY M, RADFORD H, SEKINE Y, *et al.* Partial restoration of protein synthesis rates by the small molecule ISRIB prevents neurodegeneration without pancreatic toxicity[J/OL]. *Cell Death Dis.*, 2015, 6(3): e1672[2020-11-12]. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.49>.
- [11] HALLIDAY M, HELOIS R, ZENTS K A M, *et al.* Repurposed drugs targeting eIF2 α -P-mediated translational repression prevent neurodegeneration in mice[J]. *Brain*, 2017, 140(6): 1768-1783.
- [12] DAS I, KRZYZOSIAK A, SCHNEIDER K, *et al.* Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit[J]. *Science*, 2015, 348(6231): 239-242.
- [13] 许尹. 自噬系统在朊病毒感染过程中的变化规律及机制研究[D]. 北京:中国疾病预防控制中心, 2013.
- [14] CORTES C J, QIN K, COOK J, *et al.* Rapamycin delays disease onset and prevents PrP plaque deposition in a mouse model of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease[J]. *J. Neurosci.*, 2012, 32(36): 12396-12405.
- [15] GRZMIL M, HEMMINGS B A. Overcoming resistance to rapalogs in gliomas by combinatory therapies[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, 1834(7): 1371-1380.
- [16] MI W, YE Q, LIU S, *et al.* AKT inhibition overcomes rapamycin resistance by enhancing the repressive function of PRAS40 on mTORC1/4E-BP1 axis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(16): 13962-13977.
- [17] 杨威. PRAS40 缓解神经毒性多肽诱导神经元凋亡机制的研究[D]. 北京:中国农业大学, 2017.
- [18] KARAPETYAN Y E, SFERRAZZA G F, ZHOU M, *et al.* Unique drug screening approach for prion diseases identifies tacrolimus and astemizole as antiprion agents[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110(17): 7044-7049.
- [19] YUN S W, ERTMER A, FLECHSIG E, *et al.* The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate delays prion neuroinvasion by inhibiting prion propagation in the periphery[J]. *J. Neurovirol.*, 2007, 13(4): 328-337.
- [20] HEISEKE A, AGUIB Y, RIEMER C, *et al.* Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy[J]. *J. Neurochem.*, 2009, 109(1): 25-34.
- [21] 宋志琦. REST 在朊病毒疾病模型中神经保护作用机制的研究[D]. 北京:中国农业大学, 2018.
- [22] 张腾龙,陈志宝,鞠传静,等. 朊病毒病治疗的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(1): 54-59.
- [23] 阿达莱提·买买提明,武月章,谢姆斯耶·吾拉音,等. 线粒体靶向抗氧化剂 Mitoquinone 和积雪草酸对朊病毒感染的神经细胞的治疗作用研究[J]. 病毒学报, 2019, 35(2): 247-254.
- [24] FARIS R, MOORE R A, WARD A, *et al.* Mitochondrial respiration is impaired during late stage hamster prion infection[J/OL]. *J. Virol.*, 2017, 91(18): e00524-17[2020-12-01]. <https://doi.org/10.1128/JVI.00524-17>.
- [25] 杨晓东,陈利娜,董小平,等. 线粒体功能异常与朊病毒病的关系[J]. 中国病毒病杂志, 2015(4): 313-316.
- [26] ANSOLEAGA B, GARCIA-ESPARCIA P, LLORENS F, *et al.* Altered mitochondria, protein synthesis machinery, and purine metabolism are molecular contributors to the pathogenesis of Creutzfeldt-Jakob disease[J]. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2016, 75(8): 755-769.
- [27] LEE D W, SOHN H O, LIM H B, *et al.* Alteration of free radical metabolism in the brain of mice infected with scrapie agent[J]. *Free Radic. Res.*, 1999, 30(6): 499-507.
- [28] PARK Y G, JEONG J K, MOON M H, *et al.* Insulin-like growth factor-1 protects against prion peptide-induced cell death in neuronal cells via inhibition of Bax translocation[J]. *Int. J. Mol. Med.*, 2012, 30(5): 1069-1074.
- [29] 高利萍. E200K 突变朊病毒病的疾病特征及朊病毒感染过程中线粒体自噬的研究[D]. 北京:中国疾病预防控制中心, 2020.
- [30] 李超斯. DLP1 调控线粒体动力学失衡在朊病毒疾病模型中的作用机制[D]. 北京:中国农业大学, 2018.
- [31] 程胖. 利用 RNAi 抑制牛胎儿成纤维细胞中 *prnp* 基因的表达[D]. 咸阳:西北农林科技大学, 2010.
- [32] PFLANZ H, VANA K, MITTEREGGER G, *et al.* Microinjection of lentiviral vectors expressing small interfering RNAs directed against laminin receptor precursor mRNA prolongs the pre-clinical phase in scrapie-infected mice[J]. *J. Gen. Virol.*, 2009, 90(Pt 1): 269-74.
- [33] RAYMOND G J, ZHAO H T, RACE B, *et al.* Antisense oligonucleotides extend survival of prion-infected mice[J/OL]. *JCI Insight*, 2019, 5(16): e131175[2021-02-05]. <https://doi.org/>

- 10.1172/jci.insight.131175.
- [34] MINIKEL E V, ZHAO H T, LE J, *et al.* Prion protein lowering is a disease-modifying therapy across prion disease stages, strains and endpoints[J]. *Nucl. Acids Res.*, 2020, 48(19): 10615-10631.
 - [35] WUERTZER C A, SULLIVAN M A, QIU X, *et al.* CNS delivery of vectored prion-specific single-chain antibodies delays disease onset[J]. *Mol. Ther.*, 2008, 16(3): 481-486.
 - [36] JONES D R, TAYLOR W R, BATE C, *et al.* A camelid anti-PrP antibody abrogates PrP replication in prion-permissive neuroblastoma cell lines[J/OL]. *PLoS ONE*, 2010, 5(3): e9804 [2020-12-11]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009804>.
 - [37] MONTRASIO F, FRIGG R, GLATZEL M, *et al.* Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells[J]. *Science*, 2000, 288(5469): 1257-1259.
 - [38] FERNANDEZ-BORGES N, BRUN A, WHITTON J L, *et al.* DNA vaccination can break immunological tolerance to PrP in wild-type mice and attenuates prion disease after intracerebral challenge[J]. *J. Virol.*, 2006, 80(20): 9970-9976.
 - [39] BACHY V, BALLERINI C, GOURDAIN P, *et al.* Mouse vaccination with dendritic cells loaded with prion protein peptides overcomes tolerance and delays scrapie[J]. *Gen. Virol.*, 2010, 91(Pt 3): 809-820.
 - [40] ABDELAZIZ D H, THAPA S, ABDULRAHMAN B, *et al.* Immunization of cervidized transgenic mice with multimeric deer prion protein induces self-antibodies that antagonize chronic wasting disease infectivity in vitro[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2017, 7(1): 10538 [2021-03-10]. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11235-8>.
 - [41] ABDELAZIZ D H, THAPA S, BRANDON J, *et al.* Recombinant prion protein vaccination of transgenic elk PrP mice and reindeer overcomes self-tolerance and protects mice against chronic wasting disease[J]. *Biol. Chem.*, 2018, 293(51): 19812-19822.
 - [42] SOLFOROSI L, CRIADO J R, MCGAVERN D B, *et al.* Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo[J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1514-1516.
 - [43] WANG F, WANG X, ORRÚ C D, *et al.* Self-propagating, protease-resistant, recombinant prion protein conformers with or without in vivo pathogenicity[J/OL]. *PLoS Pathog.*, 2017, 13(7): e1006491 [2021-04-10]. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006491>.
 - [44] LI Q, WANG F, XIAO X, *et al.* Structural attributes of mammalian prion infectivity: insights from studies with synthetic prions[J]. *J. Biol. Chem.*, 2018, 293(48): 18494-18503.
 - [45] SKINNER P J, KIM H O, DAMANI B, *et al.* Treatment of prion disease with heterologous prion proteins[J/OL]. *PLoS ONE*, 2015, 10(7): e0131993 [2021-04-22]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131993>.
 - [46] 刘怡芳,吕杰. 克雅病生物标本检测研究进展[J]. *职业与健康*, 2020, 36(5): 697-700.
 - [47] ERAÑA H, CHARCO J M, GONZÁLEZ-MIRANDA E, *et al.* Detection of pathognomonic biomarker PrP^{Sc} and the contribution of cell free-amplification techniques to the diagnosis of prion diseases[J/OL]. *Biomolecules*, 2020, 10(3): 469 [2021-04-30]. <https://doi.org/10.3390/biom10030469>.
 - [48] ASCARI L M, ROCHA S C, GONALVES P B, *et al.* Challenges and advances in antemortem diagnosis of human transmissible spongiform encephalopathies[J/OL]. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020, 8: 585896 [2021-04-30]. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.585896>.
 - [49] 秦川,张连峰. 常见和新发传染病动物模型[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2012: 178-179.
 - [50] 王冬冬,杨利峰,赵德明,等. 传染性海绵状脑病果蝇模型研究进展[J/OL]. *中国实验动物学报*, 2017: 1-5 [2021-10-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2986.Q.20210721.1032.014.html>.
 - [51] 马月,高利萍,肖康,等. 核转录因子-κB(p65)在羊瘙痒因子139A感染小鼠脑组织中变化的研究[J]. *疾病监测*, 2018, 33(1): 32-36.
 - [52] 张仁庆. 朊病毒病中CaM信号通路变化特点的研究[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2017.
 - [53] 孙静. 经典Wnt通路在朊病毒病中抑制及其机制研究[D]. 北京:中国疾病预防控制中心, 2016.
 - [54] SHAH S Z A. FK506与米诺环素联合用药对朊病毒感染金黄地鼠治疗作用研究[D]. 北京:中国农业大学, 2018.