

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]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 670-674.

Wang DD, Yang LF, Zhao DM, et al. Progress in research into transmissible spongiform encephalopathies using *Drosophila* models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 670-674.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.015

传染性海绵状脑病果蝇模型研究进展

王冬冬,杨利峰*,赵德明,周向梅

(中国农业大学动物医学院,北京 100193)

【摘要】 传染性海绵状脑病又称朊病毒疾病,是一组能感染人类和动物的致死性传染病,目前普遍认为是由细胞型朊蛋白(PrP^C)发生错误折叠后形成的致病型朊蛋白(PrP^{Sc})所引起。PrP^{Sc}的生物检测通常是将试验材料接种到哺乳类实验动物的脑组织或腹腔,在动物表现明显症状时实施安乐死,整个过程繁琐且耗时,也越来越容易引起伦理争论。果蝇是低等无脊椎动物,具有易饲养、生命周期短及繁殖能力强等诸多优点,通过基因改造等技术可表现哺乳动物海绵状脑病的一些病理学特征。本文综述已发表的文献,概述了传染性海绵状脑病果蝇模型的构建方法,以促进果蝇模型的应用,减少和替代部分高等实验动物使用。

【关键词】 传染性海绵状脑病;朊病毒;果蝇;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0670-05

Progress in research into transmissible spongiform encephalopathies using *Drosophila* models

WANG Dongdong, YANG Lifeng*, ZHAO Deming, ZHOU Xiangmei

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Corresponding author: YANG Lifeng. E-mail: yanglf@cau.edu.cn

【Abstract】 Transmissible spongiform encephalopathies, or prion diseases, are a group of fatal neurodegenerative illnesses that affect humans and other mammalian species. All forms of prion disease are associated with misfolding of the host-encoded prion protein, PrP^C, into one of several pathogenic isoforms, collectively termed PrP^{Sc}. The current bioassays for prions typically involve intracerebral or peripheral inoculation of test material into an experimental host and subsequent euthanasia when clinical signs of terminal prion disease become evident. Consequently, bioassays of prion infectivity invertebrate species are cumbersome, time-consuming, expensive, and increasingly open to ethical dispute because the test animals are subjected to terminal neurodegenerative disease. Here, we discuss the development of a *Drosophila*-based prion bioassay, a highly sensitive and rapid invertebrate *in vivo* assay that efficiently identifies mammalian prions and permits the reduction and replacement of sentient experimental animals. This article provides an overview of the methodology involved in the model and discusses the experimental data that describe its viability and usefulness in place of more sentient species.

【Keywords】 transmissible spongiform encephalopathy (TSE); prion; *Drosophila*; animal model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目] 国家自然科学基金(31972641)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(31972641).

[作者简介] 王冬冬(1990—),男,博士,研究方向:动物传染性海绵状脑病的研究。Email: B20203050401@cau.edu.cn

[通信作者] 杨利峰,女,博士,教授,博士生导师,研究方向:兽医病理学的教学与研究工作。Email: yanglf@cau.edu.cn

传染性海绵状脑病 (transmissible spongiform encephalopathies, TSEs), 又称朊蛋白/朊病毒疾病 (prion diseases, PrD) 是一组能够感染人和动物的慢性、致死性、神经退行性传染病^[1-2]。致病型朊蛋白 (scrapie prion protein, PrP^{Sc}) 是 TSEs 的致病因子, 俗称朊病毒, 由细胞型朊蛋白 (cellular prion protein, PrP^C) 错误折叠形成^[3]。在哺乳动物中, PrP^C 是高度保守的朊蛋白基因 (PRNP) 编码的一种糖蛋白, 可能在神经系统、T 细胞信号转导及核酸代谢等方面发挥一定作用; PrP^{Sc} 富含 β 折叠, 可抵抗蛋白酶水解, 有很强的聚合倾向, 最终聚合成淀粉样斑块造成大脑海绵状退化变性。目前 PrP^C 转化为 PrP^{Sc} 的机制并不明确, 成核-多聚化模型 (nucleation-polymerization model) 和再折叠模型 (refolding model) 是描述转化机制的两种假说^[1]。

果蝇 (*Drosophila*) 属于果蝇科果蝇属, 是一类无脊椎动物。黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 是果蝇的一种, 其遗传背景清晰、生命周期短、繁殖速度快且饲养成本低, 已广泛用于生命科学研究^[4]。果蝇基因组不含 PRNP, 是 TSEs 疾病研究的理想模型^[5]。本文综述前人利用转基因果蝇对 TSEs 疾病的研究, 以引起研究者的兴趣, 促进果蝇模型的应用, 减少和部分替代哺乳类实验动物的使用。

1 PrP 转基因果蝇构建技术的发展

PrP^{Sc} 与病毒和细菌等传统病原体不同, 因其缺乏核酸为基础的基因组, 不能利用 PCR 等核酸检测方法确定病原。蛋白质错误折叠循环扩增技术 (PMCA) 和实时振荡诱导转换技术 (RT-QuIC) 可以在体外灵敏检测 PrP^{Sc}, 但无法检测其感染性^[6-8]。通过接种哺乳类实验动物进行生物测定是目前检测 PrP^{Sc} 感染性的可靠方法, 但整个测定过程繁琐、耗时、昂贵, 并因动物生命晚期患有神经退行性疾病而越来越容易引起伦理争论^[9-10]。果蝇遗传背景清晰简单, 易于遗传修饰, 利用分子生物学等技术可产生具有组织特异性的转基因表达, 其神经系统相对简单, 但具有一定的完整性和复杂性, 可以完成多种复杂行为, 常用于学习记忆、神经退行性疾病等神经科学研究^[11-12]。通过不断探索和发展果蝇转基因技术, PrP 转基因果蝇已初步应用于 TSEs 的研究, 见表 1。

1.1 基于 P 转座子构建 PrP 转基因果蝇

P 转座子 (P-element) 是果蝇中诱发杂种不育

的转座子, 研究者根据其特性已设计不同载体, 用于基因中断、染色体工程、基因标签和基因表达/抑制等方面的研究^[13]。Raeber 等^[14]利用 P 转座子介导法将叙利亚仓鼠朊蛋白 (SHaPrP) 基因导入果蝇胚系, 在热休克启动子 Hsp70 控制下诱导表达 SHaPrP, 开启了应用果蝇进行 TSEs 疾病研究的先河, 遗憾的是没有产成具有 TSEs 疾病表型的果蝇。后来 Fernandez 等针对上述果蝇未形成 TSEs 疾病表型开展研究, 详见 2.3。

1.2 基于 UAS/GAL4 系统构建转基因果蝇

UAS/GAL4 系统原是存在于酵母中的基因表达调控系统, Brand 等^[15]最先将 UAS/GAL4 系统应用于果蝇。Deleault 等^[16]利用 UAS/GAL 系统将野生型或携带致病突变体 PG14 (14 个八重复序列) 的小鼠朊蛋白 (MoPrP) 基因导入果蝇胚系, 获得了具有 PrP^{Sc} 的高转化率的转基因果蝇, 但没有神经退化表现。Gavin 等^[17]利用 UAS/GAL4 系统获得了在胆碱能神经元特异性表达野生型和突变型 (P101L) MoPrP 的转基因果蝇, 也是第一个具有神经退行性表型和构象变化的成功模型。

1.3 基于 ϕ C31 整合酶系统构建转基因果蝇

Groth 等^[18]将噬菌体 ϕ C31 整合酶系统应用于转基因果蝇的构建, 该系统可介导其 attB 和 attP 识别位点之间的单向位点特异性重组。Murali 等^[19]利用 ϕ C31 整合酶系统将野生型和突变体 (P101L) MoPrP 基因插入同一个 attP 位点, 排除了插入于不同基因区域的影响。野生型 MoPrP 与突变体 (P101L) 转基因的表达水平相当, 但 P101L 在胆碱能神经元的表达能导致细胞表面形成更大的点状沉积物, P101L 转基因果蝇的运动和电生理缺陷都比野生型 MoPrP 转基因果蝇严重。

2 PrP 转基因果蝇应用进展

果蝇已广泛应用于阿尔兹海默症、帕金森病等神经退行性疾病研究, 并获得了相当多的专业知识。因此, 应用 PrP 转基因果蝇研究哺乳动物 TSEs 疾病无明显障碍。

2.1 SHaPrP 转基因果蝇中 PrP 的构象变化

Fernandez 等^[20]构建了 SHaPrP 转基因果蝇, 分析了野生型 PrP 在其体内的动态变化: 在幼龄果蝇中, PrP 表现出正常 PrP^C 的特性; 在老年果蝇中, PrP 错误折叠, 获得 PrP^{Sc} 的生化 and 结构特性, 并诱导脑神经元海绵状变性。由于这种 PrP 构象对蛋白

酶仍然敏感,果蝇不会自发产生朊蛋白/朊病毒(prion),因此,Fernandez-Funez 认为在果蝇中研究 PrP 是相对安全的^[5]。

2.2 MoPrP/SHaPrP/RaPrP 在转基因果蝇中的构象动力学差异

Fernandez 等^[21]构建了第一个表达兔朊蛋白(RaPrP)的转基因果蝇模型,并比较了与 MoPrP 和 ShaPrP 在构象动力学和诱导神经毒性等方面的差异:HaPrP 可以诱导产生海绵状神经退行性变化,并形成高度聚集似羊痒病(scrapie)的错误折叠蛋白;RaPrP 不诱导产生海绵状病理变化,也不会聚集形成错误折叠蛋白;MoPrP 介于上述两者之间,诱导了轻微的神经过行性变化,并积累了少量的似羊痒病的错误折叠蛋白。

2.3 Hsp70 与 PrP 的构象调控

Fernandez 等^[20]在 SHaPrP 转基因果蝇的脑神

经元中过表达 PrP 和 Hsp70,发现 Hsp70 直接与膜结构域中的 PrP 相互作用,可以防止异常蛋白积累和神经元丢失,解释了 Raeber 等^[14]在 1995 年的研究中没能产生 TSEs 表型果蝇的原因。

2.4 PrP 位点突变与致病性的影响

Park 等^[22]通过构建含有人/仓鼠 3F4 表位的 MoPrP^{3F4}转基因果蝇,发现 MoPrP^{3F4}可能是通过引起的氧化和自噬信号改变,增强了多聚谷氨酰胺毒性,造成了果蝇眼部病变。

Thackray 等^[23]构建了绵羊朊蛋白(OvPrP)转基因果蝇,幼虫暴露于羊痒病脑匀浆可加速 OvPrP 的表达,在成年果蝇中表现为运动能力显著降低。通过比较,A¹³⁶R¹⁵⁴Q¹⁷¹(ARQ) PrP 转基因果蝇的寿命不受 OvPrP 的影响,而 V¹³⁶R¹⁵⁴Q¹⁷¹(VRQ) PrP 转基因果蝇的运动活性不受 OvPrP 的影响,这些表型的差异可能是 OvPrP 基因型差异造成^[24]。

表 1 果蝇转基因方法比较

Table 1 Comparison of transgenic methods for *Drosophila*

转基因方法 Transgenic method	方法原理 Principle of the method	方法特点 Characteristics of the method	应用于 TSEs 研究示例 Example of application in TSE research
P 转座子 P-element	通过转座酶,基因片段能在果蝇染色体中进行转移 Through transposase, gene fragments can be transferred in <i>Drosophila</i> chromosomes	果蝇本身的一种转座子,整合进入基因组的基因片段大小受限制,基因插入位置具有随机性 As a transposon of <i>Drosophila</i> , the size of gene fragment integrated into the genome is limited, and the insertion position of gene is random	将 SHaPrP 基因导入果蝇胚系并表达,但未产生 TSEs 疾病表型 ^[14] SHaPrP gene was introduced into <i>Drosophila</i> embryos and expressed, but did not produce TSE disease phenotype
UAS/GAL4 系统 UAS/GAL4 system	Gal4 蛋白可特异性连接到 UAS 序列上,进而引起连接在 UAS 下游的基因被激活表达 Gal4 protein can be specifically linked to the UAS sequence, resulting in the activation and expression of genes linked downstream of UAS	源于酵母中的基因表达调控系统,选用不同的 Gal4 启动子可实现目的基因在不用组织的特异表达 Derived from the gene expression regulation system in yeast, the specific expression of the target gene in tissues can be achieved by selecting different Gal4 promoters.	将 MoPrP 基因导入果蝇胚系,基因在胆碱能神经元中特异表达,产生了具有渐进性退化表型和 PrP 构象变化 ^[17] MoPrP gene was introduced into <i>Drosophila</i> embryos, and the gene was specifically expressed in cholinergic neurons, resulting in progressive degeneration phenotype and PrP conformation change
φC31 整合酶系统 φC31 integrase system	介导 attB 和 attP 识别位点之间的单向位点特异性重组 Integrase can catalysis the homologous recombination between the site attB and the site attP	源于噬菌体,可将转基因结构整合到特定位点,其介导的基因片段大于 P 转座子 Derived from bacteriophage, the transgenic structure can be integrated into a specific site, and the gene fragment mediated is larger than P-element	建立了两种 MoPrP 基因果蝇模型,两种基因在同一位点表达,排除插入于不同基因区域的影响 ^[19] Two <i>Drosophila</i> models of MoPrP gene were established which genes were expressed at the same site, excluding the effect of insertion in different gene regions
CRISPR/Cas9 基因编辑技术 CRISPR/Cas9 genome editing system	在 sgRNA 的引导下,Cas9 蛋白到达靶标区域进行基因编辑 Under the guidance of sgRNA, Cas9 protein reaches the target region for gene editing	源于细菌和古细菌免疫系统,可实现基因的敲入和敲除 Derived from the immune system of bacteria and archaea, gene knock-in and knock-out can be realized.	暂无 None for the time being

Thackray 等^[25] 还通过 RNA-Seq 转录组测序对 OvPrP 转基因果蝇进行分析,发现细胞周期活动异常、蛋白质合成抑制和线粒体功能改变,这与哺乳动物感染 TSEs 疾病相类似。

PrP 的第 159 位天冬氨酸位点(D159)是在犬类动物中发现的特殊氨基酸位点,能保护犬类动物免受 TSEs 感染^[26]。Sandez 等^[27] 在 MoPrP 转基因果蝇上进行了 N159D 突变,证实了单一位点 D159 的替换足以防止 PrP 构象变化和致病性产生。

2.5 OvPrP 转基因果蝇的传染性

Thackray 等^[28] 证明,OvPrP 转基因果蝇可以表现出哺乳动物 PrP^{Sc} 抗蛋白酶 K(PK) 的显著特征。小鼠接种了成年转基因果蝇脑匀浆后,最终可表现 TSEs 症状;转基因果蝇幼虫暴露于成年转基因果蝇脑匀浆,该幼虫在成年时也表现出等同于暴露于羊痒病脑匀浆的症状^[29]。

3 结语

果蝇具有易饲养、生命周期短、繁殖能力强等诸多优点,已成为生命科学领域重要的模式生物,与之相关的研究也多次获得诺贝尔奖。基于 P 转座子、UAS/GAL4 系统以及 φ C31 整合酶系统等技术的优化、联合和改进,PrP 转基因果蝇构建的效率和准确性得到巨大提升。表达哺乳动物 PrP 的转基因果蝇模型在揭示 PrP 生理学功能方面得到初步应用,推动了 TSEs 疾病的研究进程。近些年,CRISPR/Cas9 基因编辑技术快速发展,已在果蝇上得到利用,可实现简便、特异、高效、经济的基因编辑,但未见文献报道用于 TSEs 疾病研究。展望未来,将果蝇 CRISPR/Cas9 基因编辑技术应用于 PrP 转基因模型构建,将积极推进 TSEs 疾病的致病机制及防控探究,并减少或替代部分哺乳类实验动物的使用,符合实验动物福利伦理及 3R 原则。

参 考 文 献(References)

- [1] 赵德明. 传染性海绵状脑病 [M]. 北京: 中国农业大学出版社; 2012.
- Zhao DM. Transmissible spongiform encephalopathies [M]. Beijing: China Agricultural University Press; 2012.
- [2] Zhang X, Zhao D, Wu W, et al. Melatonin regulates mitochondrial dynamics and alleviates neuron damage in prion diseases [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(11): 11139–11151.
- [3] Wu W, Zhao D, Shah SZA, et al. OPA1 overexpression ameliorates mitochondrial cristae remodeling, mitochondrial dysfunction, and neuronal apoptosis in prion diseases [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(10): 710.
- [4] 刘志勇. 果蝇作为学习记忆实验动物模型的研究回顾 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(2): 108–111.
- Liu ZY. Review on learning and memory model of *Drosophila* [J]. Chin J Comp Med, 2005, 15(2): 108–111.
- [5] Fernandez FP, Sanchez GJ, Rincon LDE. *Drosophila* models of prionopathies: insight into prion protein function, transmission, and neurotoxicity [J]. Curr Opin Genet Dev, 2017, 44: 141–148.
- [6] Cheng K, Vendramelli R, Sloan A, et al. Endpoint quaking-induced conversion: a sensitive, specific, and high-throughput method for antemortem diagnosis of creutzfeldt-jacob disease [J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(7): 1751–1754.
- [7] Yoshioka M, Matsuura Y, Okada H, et al. Rapid assessment of bovine spongiform encephalopathy prion inactivation by heat treatment in yellow grease produced in the industrial manufacturing process of meat and bone meals [J]. BMC Vet Res, 2013, 9: 134.
- [8] Thackray AM, Andréoletti O, Bujdoso R. The use of PrP transgenic *Drosophila* to replace and reduce vertebrate hosts in the bioassay of mammalian prion infectivity [J]. F1000Res, 2018, 7: 595.
- [9] Ascari LM, Rocha SC, Goncalves PB, et al. Challenges and advances in antemortem diagnosis of human transmissible spongiform encephalopathies [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 585896.
- [10] Kramm C, Soto P, Nichols TA, et al. Chronic wasting disease (CWD) prion detection in blood from pre-symptomatic white-tailed deer harboring PRNP polymorphic variants [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 19763.
- [11] 唐润东, 宋思远, 吴薇. 饮食中糖分控制对雌黑腹果蝇寿命和中肠干细胞的影响 [J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(2): 118–123.
- Tang RD, Song SY, Wu W. Effect of sugar concentration control on the longevity and the mid-gut stem cells of female *Drosophila melanogaster* [J]. Lab Anim Comp Med, 2019, 39(2): 118–123.
- [12] 杨文静, 赵勇. 实验动物在神经科学领域中的应用 [J]. 实验动物科学, 2016, 33(3): 37–45.
- Yang WJ, Zhao Y. Application of laboratory animals in neuroscience [J]. Lab Anim Sci, 2016, 33(3): 37–45.
- [13] Bachmann A, Knust E. The use of P-element transposons to generate transgenic flies [J]. Methods Mol Biol, 2008, 420: 61–77.
- [14] Raeber AJ, Muramoto T, Kornberg TB, et al. Expression and targeting of Syrian hamster prion protein induced by heat shock in transgenic *Drosophila melanogaster* [J]. Mech Dev, 1995, 51(2–3): 317–327.
- [15] Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes [J]. Development, 1993, 118(2): 401–415.
- [16] Deleault NR, Dolph PJ, Feany MB, et al. Post-transcriptional

- suppression of pathogenic prion protein expression in *Drosophila* neurons [J]. J Neurochem, 2003, 85(6): 1614–1623.
- [17] Gavin BA, Dolph MJ, Deleault NR, et al. Accelerated accumulation of misfolded prion protein and spongiform degeneration in a *Drosophila* model of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome [J]. J Neurosci, 2006, 26(48): 12408–12414.
- [18] Groth AC, Fish M, Nusse R, et al. Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31 [J]. Genetics, 2004, 166(4): 1775–1782.
- [19] Murali A, Maue RA, Dolph PJ. Reversible symptoms and clearance of mutant prion protein in an inducible model of a genetic prion disease in *Drosophila melanogaster* [J]. Neurobiol Dis, 2014, 67: 71–78.
- [20] Fernandez FP, Casas TS, Zhang Y, et al. *In vivo* generation of neurotoxic prion protein; role for hsp70 in accumulation of misfolded isoforms [J]. PLoS Genet, 2009, 5(6): e1000507.
- [21] Fernandez FP, Zhang Y, Casas TS, et al. Sequence-dependent prion protein misfolding and neurotoxicity [J]. J Biol Chem, 2010, 285(47): 36897–36908.
- [22] Park Y, Kim W, Kim AY, et al. Normal prion protein in *Drosophila* enhances the toxicity of pathogenic polyglutamine proteins and alters susceptibility to oxidative and autophagy signaling modulators [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(2): 638–645.
- [23] Thackray AM, Muhammad F, Zhang C, et al. Ovine PrP transgenic *Drosophila* show reduced locomotor activity and decreased survival [J]. Biochem J, 2012, 444(3): 487–495.
- [24] Thackray AM, Muhammad F, Zhang C, et al. Prion-induced toxicity in PrP transgenic *Drosophila* [J]. Exp Mol Pathol, 2012, 92(2): 194–201.
- [25] Thackray AM, Lam B, Shahira Binti Ab Razak A, et al. Transcriptional signature of prion-induced neurotoxicity in a *Drosophila* model of transmissible mammalian prion disease [J]. Biochem J, 2020, 477(4): 833–852.
- [26] Khan MQ, Sweeting B, Mulligan VK, et al. Prion disease susceptibility is affected by beta-structure folding propensity and local side-chain interactions in PrP [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(46): 19808–19813.
- [27] Sanchez GJ, Jensen K, Zhang Y, et al. A single amino acid (Asp159) from the dog prion protein suppresses the toxicity of the mouse prion protein in *Drosophila* [J]. Neurobiol Dis, 2016, 95: 204–209.
- [28] Thackray AM, Di Y, Zhang C, et al. Prion-induced and spontaneous formation of transmissible toxicity in PrP transgenic *Drosophila* [J]. Biochem J, 2014, 463(1): 31–40.
- [29] Thackray AM, Andreoletti O, Bujdoso R. Mammalian prion propagation in PrP transgenic *Drosophila* [J]. Brain, 2018, 141(9): 2700–2710.

[收稿日期] 2020-12-22