

302-308

第12卷第4期
1997年12月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol. 12 No. 4
Dec. 1997

3284(3) 维普资讯 http://www.cnki.net

朊病毒的研究进展

王学田波

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

Research Advances on Prion

Wang Xue Tian Bo

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

关键词 朊病毒, 氨基酸序列, α -螺旋, β -折叠

Key words Prion, Amino acid sequence, α -Helix, β -Sheet

动物病毒; 研究进展;

八十年代以来, 英国已报道有 17 万多头牛染上疯牛病^[1]。其原因被认为是由于牛饲料中添加了羊和牛的肉和骨粉, 使羊的搔痒病 (Scrapie) 病原传染给牛, 使之发生牛海绵脑病 (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE), 俗称疯牛病。并且已确诊有 12 个人因食用病牛肉受到传染而发病^[1], 这在欧洲引起了极大的震惊和恐慌。现在认为这种病症是由朊病毒 (Prion) 引起的。

1 朊病毒的发现

羊搔痒症的病因困扰了人们约两个世纪。本世纪初 M. Fadyian 提出该病是由寄生虫引起的。1939 年 Cuille 等^[2]发现搔痒因子能够传染其它动物, 并且用滤膜过滤后仍具有传染性, 因而他提出该因子是一种病毒。另外, 50 年代在新几内亚高原原始部落发现有人类震颤病 (Kuru), 并证明是由于该部落噬尸脑的宗教仪式而使该病在本部落人群中传播。60 年代将 Kuru 脑组织滤液在猩猩和各种猴类成功地连续传代, 证实了 Kuru 与羊搔痒症、人克亚氏病 (Creutzfeldt - Jacob Disease, CJD) 和人吉斯曼 - 斯召斯列综合症 (GSS) 等属于同一种病原。Alper 及其同事 (1967)^[3]发现紫外线与电离辐射处理后, 搔痒因子仍具有传染性, 因而有人提出该病原与植物类病毒 (Viroid) 相似, 只有裸露的核酸^[4], 后来经研究证明这种说法是不正确的^[5]。1997 年 Gajdusek^[6]认为它是一种“非常规”病毒, 但他并没有描述其结构与普通的病毒有什么不同。

到了 80 年代, 人们成功地将搔痒因子传染给仓鼠, 从仓鼠脑组织中分离并部分纯化出病原, 发现用修饰和分解蛋白的试剂处理后能使其传染性丧失, 而对核酸抑制剂具有抵抗性。因此, 在 1982 年 Prusiner^[7]用 Prion (或 Vivino) 这一词代表该因子, 田波^[8]将其翻译为朊病毒, 意思是说它是一种蛋白质传染粒子 (Proteinaceous infectious particle), 以示与病毒和类病毒的不同。这一假说认为具有传染性的朊病毒粒子其结构是: (1) 蛋白质外壳, 其内部只有很少量的多核苷酸; 或者, (2) 只有蛋白质而没有核苷酸。后者是说多肽的合成没有核酸模板, 而是细胞

收稿日期: 1997-07-02, 修回日期: 1997-08-19

内蛋白质转录后修饰而形成的,现在越来越多的证据支持后一假说。

朊病毒能在人和动物中引起具有传染性的海绵脑病或白质脑病(见表1),其共同特征是致死性中枢神经系统的慢性退化性疾病;病理学上的特点是大脑皮层的神经原细胞退化、空泡形成、死亡,被星状细胞取而代之,因而形成海绵状态,大脑皮层(灰质)变薄而白质相对明显,即海绵脑病或白质脑病。临床上相应地出现痴呆、共济失调和震颤等症状。

表1 目前已知的人和动物朊病毒病

Table 1 Prion diseases of human and animals which are known now

物种 Species	朊病毒病 Prion diseases	致病 PrP 名称 Abnormal PrP term
人 Human	震颤病或库鲁(Kuru)	HuPrP ^{Sc}
	传染性病毒痴呆病(Presenile Dementia); 又称早老性痴呆病(Presenile Dementia)	HuPrP ^{Sc}
	吉斯特曼-斯波斯列综合症(Gerstmann-Straussler Syndrome)	HuPrP ^{Sc}
	致死性家族失眠病(Fatal Familial Insomnia, FFI)	HuPrP ^{Sc}
动物 Animals	绵羊搔痒病(Scrapie of Sheep)	ShePrP ^{Sc}
	山羊搔痒病(Scrapie of Goats)	ShePrP ^{Sc}
	鹿慢性消耗病(Chronic Wasting Disease of Mule Deer, CWD)	MDcPrP ^{Sc}
	牛海绵脑病(Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE)	BevPrP ^{Sc}
	猫海绵脑病(Feline Spongiform Encephalopathy, FSE)	FePrP ^{Sc}
	传染性雪貂白质脑病(Transmissible Mink Encephalopathy, TME)	MkPrP ^{Sc}

2 朊病毒蛋白的一级结构

自从提出朊病毒是引起海绵脑病的病原以后,人们对朊病毒进行了广泛深入的研究。用蛋白酶对搔痒因子进行有限地水解后,剩下的核心是分子量为27~30 kD的蛋白质,被称为朊病毒蛋白(Prion protein, PrP)^[9]。许多证据^[9,10]表明 PrP₂₇₋₃₀是引起羊搔痒症所必需的成分,它可以用生物化学的方法与搔痒因子共纯化,其浓度与传染能力正相关;PrP₂₇₋₃₀的分解动力学与传染性相同;亲和层析纯化的 PrP₂₇₋₃₀具有传染性;用中和抗体中和 PrP₂₇₋₃₀其传染性消失^[11]。把纯化后的 PrP₂₇₋₃₀进行氨基末端的氨基酸序列分析,其序列为 MWSDWGLC。用该序列推测出的寡核苷酸作为探针,与来源于宿主细胞的 cDNA 进行杂交,发现 PrP 是由染色体基因编码的,而不是来自搔痒因子中的核酸^[12]。同时还注意到无论感染搔痒因子与否,其宿主中的 PrP mRNA 水平无变化,说明 PrP 是细胞组成型基因表达的产物。该蛋白的分子量为33~35 kD,约由250个氨基酸组成,其N-和C-末端分别有22和23信号序列,成熟的蛋白约有209个氨基酸,其中含有两个二硫键和两个糖基化位点(见图1)^[12,13]。

3 朊病毒高级结构与生物功能

比较正常细胞所表达的 PrP(PrP^C)和具有传染性的 PrP(PrP^{Sc})时显示二者的一级结构相同,共价键也无变化,但不同物种间的 PrP 氨基酸序列是不一致的^[14](图1)。用光谱学技术研究表明,PrP^C具有40%的 α -螺旋(α -helix),没有 β -折叠(β -sheet);而具有传染性的 PrP^{Sc}具有较高水平的 β -折叠(43%)(图2)^[15]。多个 β -折叠使之溶解度降低,抗蛋白酶水解能力增强。

	1	15	30	
人	MANL--GCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKP-GGWNTGGSRYPGQGSP			
猩猩	-----			
牛	-VKSHI	-S-I-----M	-V-----G	
羊	-VKSHI	-S-I-----M	-V-----G	
大鼠	-----Y-L-A	-----T-CT	-V-----	
小鼠	-----Y-L-A	-----TM-T	-V-----	
仓鼠	-----SY-L-A	-----T	-V-----	
	45	60	75	
人	GGNRYPPQGGGGWGQPHGGGGWGQ-----PHGGGGWGQPHGGGGWGQ			
猩猩	-----			
牛	-----PHGGGGWGQ-----			
羊	-----			
大鼠	-----S	-----T		
小鼠	-----	-----T	-----S	-----S
仓鼠	-----	-----T		
	90	105	H-1	120
人	PHGG-GWGQGGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLG			
猩猩	-----			
牛	-----G	-----G	-----V	
羊	-----G	-----S	-----V	
大鼠	-----S	-----N	-----L	-----V
小鼠	-----	-----N	-----L	-----V
仓鼠	-----	-----N	-----V	
	H-2	135	150	165
人	GYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMDEYSNQ			
猩猩	-----			
牛	-----L		-----V	-----Q
羊	-----L	-----N	-----Y	-----V
大鼠	-----ML	-----N	-----W	-----Y
小鼠	-----M	-----N	-----W	-----Y
仓鼠	-----ML	-----N	-----W	-----N
	180	H-3	195	H-4
人	NNFVHDCVNITIKOHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVROMCITOV			
猩猩	-----			
牛	-----V	-----E	-----	-----I
羊	-----V	-----	-----	-----I
大鼠	-----	-----	-----	-----V
小鼠	-----	-----	-----	-----V
仓鼠	-----	-----	-----	-----V
	225	240	250	
人	ERESQAYYQ--RGSSMVLFSPPVILLISFLIFLIVG			
猩猩	-----			
牛	-----Q	-----A	-----VI	-----264
羊	-----Q	-----A	-----VI	-----256
大鼠	-----QK	-----DGR	-----A	-----254
小鼠	-----QF	-----DGR	-----S	-----T
仓鼠	-----QF	-----DGR	-----A	-----254

图1 部分物种 PrP 的氨基酸序列(引自 H. M. Schatzl 等^[14])

Fig 1 Amino acid sequences of PrPs in some species (From H. M. Schatzl *et al*^[14])

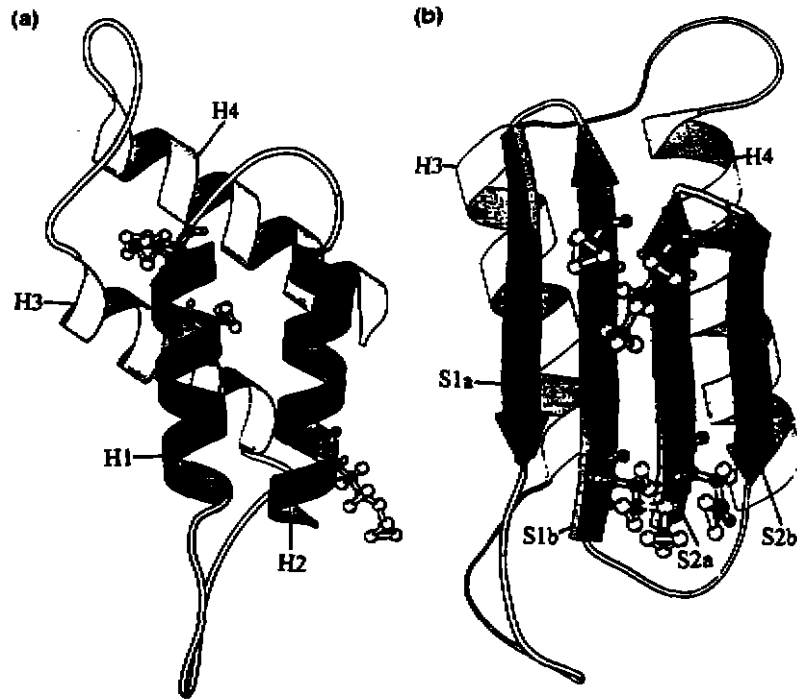


图2 PrPs的三级结构模型(引自 Z. Huang 等^[15])

(a) PrP^c 的三维结构, H1、H2、H3 和 H4 分别为 α -螺旋 1-4

(b) PrP^{sc} 的三维结构, S1a 和 S1b 相当于 PrP^c 中的 H1; S2a 和 S2b 相当于 H2; H3 和 H4 不变。

Fig 2 Plausible models for the tertiary structures of PrPs(From Z. Fuang *et al*^[15])

(a) Three-dimensional structure of PrP^c. H1, H2, H3 and H4 is α -helix 1-4, respectively;

(b) Three-dimensional structure of PrP^{sc}. S1a and S1b correspond to the helix 1 in PrP^c, while S2a and S2b correspond to the helix 2; Helix 3 and 4 in this model remain unchanged from the PrP^c model.

为了验证 PrP^{sc}是否来自 PrP^c, Prusiner 及其同事^[16]用 PrP 的合成肽诱导能表达 PrP^c 的细胞,结果使该细胞获得传染性瘙痒症的特性。另外,将 PrP^c 的 cDNA 在大肠杆菌中大量表达,在还原条件下纯化时得到了具有丰富 β -折叠的 PrP,与从瘙痒症中提取出来的 PrP^{sc}相似^[17]。在研究转基因小鼠表达外源 PrP 时发现,在新的 PrP^{sc}产生过程中,PrP^c与 PrP^{sc}形成复合体。根据以上实验结果,他们推测羊瘙痒病细胞中的 PrP^{sc}来自细胞的 PrP^c^[15,17]。在检测 33 个物种的 PrP 时发现,该蛋白的 4 个 α -螺旋区域具有 19% 的氨基酸变异,特别是在 129 位有氨基酸替换(Met \rightarrow Val)时易受 PrP^{sc}感染,所以认为 PrP 在形成二级结构过程中,该区域很容易发生 α -螺旋转变为 β -折叠^[14]。从图 2 中可看出, H1 和 H2 区域内的 α -螺旋可以分别转换为两个 β -折叠^[15]。这说明 PrP^{sc}的形成是翻译后的加工过程,而不是蛋白内共价键的修饰。鉴于 Prusiner 对朊病毒之研究所作出的贡献,他荣获 1997 年诺贝尔医学奖。

PrP 是在神经细胞和胚胎早期细胞中表达并在内质网中合成,然后被转运到细胞表面的一种糖蛋白^[18]。PrP^c 可通过细胞膜再进入细胞内部,在细胞中富含胆固醇非酸性的腔隔内转

变为 PrP^{sc} 或者被部分降解, PrP^{sc} 的积累导致空泡形成, 而 PrP^c 也只有在该空泡形成区被降解^[19]。但由于现在还不清楚 PrP^c 在细胞体内的确切作用, 许多人认为它在细胞的兴奋性及突触的传递中起重要作用, 而有些报道则是否定的^[20], 因而也就不知道 PrP^c 的致病性是由于 PrP^c 抗分解的积累, 还是 PrP^c 转变为 PrP^{sc}, 而使 PrP^c 缺乏引起的。

关于 PrP^c 如何转变为 PrP^{sc} 现在仍然是个谜。有人认为 PrP^c 与 PrP^c 结合形成复合体, 然后这个二聚体形成两个分子的 PrP^{sc}^[21], 还有报道说这种转化是通过没有形成构型的中间体, 该中间体在变性条件下形成 PrP^{sc}, 或者是在伴侣蛋白的作用下形成 PrP^{sc}^[22]。

4 朊病毒的基因及其遗传

在大多数哺乳动物和鸟类中, PrP 基因是一个完整的开放阅读框架, 无内含子^[23]。仓鼠 PrP 基因是由两个外显子组成的, 而小鼠和羊的基因含有 3 个外显子。在人的细胞中该基因定位在第 20 号染色体的短臂上, 在小鼠中则位于 2 号染色体的同源区域^[14]。杂交实验表明纯化的朊病毒成分中如果有核酸的话, 每 ID₅₀ 单位只能有小于 0.002 PrP 基因序列^[12], 这就排除了核酸是 PrP^{sc} 朊病毒粒子中的成分的可能性。这一特性也使得朊病毒与携带细胞原癌基因的逆转录病毒, 和需要用预先感染辅助病毒的植物细胞来提供病毒蛋白的卫星病毒, 是完全不同的。

尽管 PrP mRNA 在成年动物大脑中组成型表达, 但在发育过程中却严加调控。在脑中隔中 PrP mRNA 表达水平和胆碱乙酰化酶是同步增加的, 而在脑的其它区域, PrP 基因只在幼龄期表达^[20]。原位杂交结果表明在神经元中 PrP mRNA 的表达量最高。现在已报道有 23 个物种的 23 类 PrP mRNA 序列, 不同物种间的 mRNA 序列是不相同的^[14], 即使是同一物种不同个体间的 PrP 氨基酸序列也存在有差别, 例如正常人与 CJD 和 GSS 患者中的 PrP 序列就不完全相同, 正常人 PrP 基因(野生型基因)中密码子 171 位突变(Met→Ser)和 219 位突变(Glu→Lys)时, 其基因型为纯合子的人易患 CJD; 在 GSS 患者中发现密码子 102(Pro→Leu)、117(Ala→Val)、198(Phe→Ser)和 217(Gln→Arg)发生点突变^[24]。这可能是由于 PrP 中氨基酸的改变使 α-螺旋更容易转变为 β-折叠。基因突变是可遗传的, 所以 CJD 等朊病毒病是有家系特异性的。另外, 用患有搔痒症的绵羊脑提取物感染山羊后发现, 山羊个体间发病的潜伏期差异很大(1~3 年), 表现出随机发病, 而许多个体终生不发病^[25]。这说明宿主对 PrP^{sc} 的相容性受遗传背景差异的影响。

5 朊病毒病传染的种间障碍

不同物种间的 PrP 序列不尽相同(如图 1), 在 PrP 的 N 末端(1~90)差异为 38%, C 末端(221~253)为 36%, PrP₂₇₋₃₀(29~231)为 24%, 由于 PrP 的这种变异使该种疾病的传播可能存在着种间障碍。为了验证这种假设, Prusiner 等(1990)^[21]将地鼠的 PrP 基因转入小鼠中, 使小鼠细胞内既能表达地鼠的 PrP, 又能表达小鼠本身的 PrP, 二者的 PrP 中第 16 位氨基酸不同。当注入地鼠 PrP 时, 小鼠表达地鼠的 PrP 而不表达自身的 PrP, 但注入小鼠 PrP 时, 小鼠只表达本身的 PrP, 这说明在地鼠和小鼠之间存在着种间障碍, 可以通过表达病原的 PrP 消除。为了进一步证明这个实验结果, 将人中枢神经系统中的病原感染小鼠, 小鼠不发病, 因二者的 PrP 在 28~254 之间相差 9 个氨基酸; 如果人的 PrP 基因转入小鼠并表达人的 PrP, 再感染人的 PrP 时小鼠就肯定发病, 而不是随机的^[26]。以后又将人的 PrP 注入猿和猴子脑中, 经过一段潜伏期后可使之随机发病^[14]。这些都表明, 朊病毒蛋白通过不同的潜伏期可以在种间

随机地传播, PrP 在新宿主的再合成取决于宿主本身的 PrP 基因序列, 而与接种物中的 PrP 分子无关。同时也充分说明, 朊病毒蛋白质内部不含有编码的核酸。还有实验表明, 将患疯牛病的牛脑组织提取物注入小鼠、牛、羊和猪的大脑中, 可使它们随机地发病, 这显示牛细胞中优先繁殖单一“朊病毒株”^[27]。随后又证明, 疯牛病也能传染给土拨鼠和猴^[28]。在英国和法国发现十几个人患有非典型的 CJD, 可能是牛传染给人的^[2]。

通过以往的物种间传播朊病毒病时发现, PrP 中 90~130 之间的氨基酸序列与发病有相关性^[14], 如果这段序列相同或接近时就能在物种间传播并发病, 猴的第 112 位发生 Met→Val 转换时易于传染上人的 CJD^[22]。对其它蛋白结构的研究阐明, 在 β -折叠中 Met 与 Met 和 Val 与 Val 相邻较为普遍, 而 Met 与 Val 相邻则极为少见^[29]。就是说物种间传播朊病毒并引发病取决于 PrP 氨基酸序列的相似性, 当外来的 PrP^{sc}与同型的内源 PrP^c相互作用时, 能使 PrP^c 更有效地转换为 PrP^{sc}^[22]。同一种类中的不同个体间由于等位基因的变异而出现发病的差别, 表现出发病的随机性。还有报道说, PrP 中 108、112 和 129 以及 133 位氨基酸的差异是引起种间传播障碍的重要因素^[15], 这可能是因为这四个位点处于 H1 和 H2 区域内(见图 1), 它们的变化与否影响着 H1 和 H2 α -螺旋是否能够转变为 β -折叠(如图 2)。由于牛的 PrP 中第 112 位氨基酸与其它物种, 如鼠、羊、仓鼠的 PrP 中的氨基酸相同, 并在 90~130 之间序列的差异较少, 所以将疯牛病传染给这些物种的概率大于 80%^[27, 30, 31]。

6 小结

虽然现在还不清楚朊病毒的致病机理, 但其病原是朊病毒蛋白已被大多数人所接受, 它不同于已知的微生物、病毒和类病毒。该蛋白基因在动物的神经细胞中组成型表达。在人的 PrP 基因中有 19 个不同位点突变能够引起遗传性的朊病毒病。虽然 PrP 在不同物种间能够传播并能发病, 但个体间的潜伏期及发病与否存在着很大的差异, 表现出很强的随机性, 这主要取决于宿主内的基因所表达的 PrP 氨基酸序列的差别。

在较为低等的线虫中也发现了 PrP 基因, 说明可能在所有的动物都存在有 PrP 基因。除了 PrP^{sc}与 PrP^c 结合形成复合体外, 可能还有其它大分子与 PrP^c 结合, 使之转为 PrP^{sc}, 但这尚需进一步证明。彻底弄清楚朊病毒是怎样繁殖和使宿主发病的, 将有望在病毒学、分子生物学和遗传学中开辟一个新的研究领域, 进行深入探讨。

参 考 文 献

- 1 Anderson R M, Donnelly C A, Ferguson N M *et al.* Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*, 1996, 382: 779~788
- 2 Cuille J, Chelle R L. Experimental transmission of trembling to the goat. *C. R. Seances Acad Sci*, 1939, 208: 1058~1060
- 3 Alper T, Cramp W A, Haig D A *et al.* Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, 1967, 214: 764~766
- 4 Diener T O. Is the scrapie agent a viroid? *Nature*, 1972, 235: 218~219
- 5 Diener T O, McKinley M P, Prusiner S B. Viroids and prions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 5220~5224
- 6 Gajdusdk D C. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science*, 1977, 197: 943~960
- 7 Prusiner S B. Novel proteomaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, 216: 136~144
- 8 田波, 亚病毒——病毒学的一个新分支. *病毒学报*, 1985, 1: 190~196
- 9 McKinley M P, Bolton DC, Prusiner S B. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, 1983, 35: 57~62

- 10 Bolton D C, McKinley M P, Prusiner S B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, 1982, 218: 1309~1311
- 11 Gabizon R, McKinley M F, Groth D F *et al.* Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 6617~6621
- 12 Oesch B, Westaway D, Walehli M *et al.* A cellular gene encodes scrapie PrP₂₇₋₃₀ protein. *Cell*, 1985, 40: 735~746
- 13 Basler K, Oesch B, Scott M *et al.* Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, 1986, 46: 417~428
- 14 Schatzl H M, Costa M D, Taylor L *et al.* Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol*, 1995, 245: 362~374
- 15 Huang Z, Gabriel J M, Baldwin M A *et al.* Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 7139~7143
- 16 Butler D A, Scott M R D, Bochman J M *et al.* Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol*, 1988, 62: 1558~1564
- 17 Mehlhorn I, Groth D, Stockel J *et al.* High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry*, 1996, 35: 5528~5537
- 18 Caubey B, Raymond G J. The scrapie-associated form of PrP is made from cell surface precursor that is both protease and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem*, 1991, 266: 18217~18223
- 19 Taraboulos A, Scott M, Semenov A *et al.* Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol*, 1995, 129: 121~132
- 20 Collinge J, Whittington M A, Sidle K C L *et al.* Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, 1994, 28: 295~297
- 21 Prusiner S B, Scott M, Foster D *et al.* Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, 1990, 63: 673~684
- 22 Cohen F E, Pan K M, Huang Z *et al.* Structural clues to prion replication. *Science*, 1994, 264: 530~531
- 23 Gabriel J M, Oesch B, Kretzschmar H *et al.* Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 9097~9101
- 24 Prusiner S B. Genetic and infectious prion disease. *Arch Neurol*, 1993, 50: 1129~1153
- 25 Hadlow W J, Kennedy R C, Race R E. Natural infection of suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis*, 1982, 146: 657~664
- 26 Telling G C, Scott M, Foster D *et al.* Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expression chimeric human-mouse prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 9936~9940
- 27 Baker H F, Ridley R M, Wells G A H. Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset. *Vet Rec*, 1993, 132: 403~406
- 28 Lasmezas C I, Deslys J P, Demainy R *et al.* BSE transmission to macaques. *Nature*, 1996, 381: 743~744
- 29 Lifson S, Sander C. Composition, cooperativity and recognition in protein. In: Jaenicke R *et al.* ed, *Protein Folding*. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980. 289~314
- 30 Marsh R F, Bessen R A, Lehmann S *et al.* Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy. *J Gen Virol*, 1991, 72: 589~594
- 31 Brown F, Gibbs C J, Rodgers-Johnson P *et al.* Human spongiform encephalopathy: the national institutes of health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol*, 1994, 35: 513~529