

## 多肽 PrP106-126 对培养神经细胞朊蛋白基因表达的影响\*

宁章勇<sup>1,2</sup>, 赵德明<sup>2\*\*</sup>, 杨建民<sup>2</sup>, 周向梅<sup>2</sup>, 于博<sup>1</sup>,

孔小明<sup>1</sup>, 尹晓敏<sup>2</sup>

(1. 华南农业大学兽医学院 广东广州 510642; 2. 中国农业大学国家动物传染性海绵状脑病实验室 北京 100094)

### The Impact of PrP106-126 on Prion Gene Expression of Cultured Neurons

NING Zhang-yong<sup>1,2</sup>, ZHAO De-ming<sup>2\*\*</sup>, YANG Jian-min<sup>2</sup>, ZHOU Xiang-mei<sup>2</sup>, YU Bo<sup>1</sup>

KONG Xiao-ming<sup>1</sup>, YIN Xiao-min<sup>2</sup>

(1. College of veterinary medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. National Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies Laboratory, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** The polypeptide fragment PrP106-126 of the cellular prion protein was utilized to construct the model of cultured cortical neurons and cerebellar granule cells. The model was used to study the viability of neurons and PrP gene expression. The results showed that the viability of cortical neurons and its PrP gene expression decreased significantly after incubation with PrP106-126, compared with that of the SCR-treated group and the control group. Similar results were obtained for treated cerebellar granule cells but with different extent and time phases. These findings provided relevant base-line data for understanding the function of the prion protein in diseases and for further studies of molecular pathogenesis of TSE.

**Key words:** Prion Peptide 106-126; Cultured Neurons; Prion protein; Gene expression

**摘要:** 神经细胞是传染性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathies, TSEs)的重要靶细胞, PrP106-126 是研究 TSEs 致病机理的理想工具, 对 PrP106-126 作用的培养神经细胞模型进行研究, 有利于了解朊蛋白的功能和探讨 TSEs 的分子致病机制。本研究利用 PrP106-126 构建了大脑皮质和小脑颗粒神经元作用模型, 对神经细胞的存活和朊蛋白基因的表达进行了研究。结果表明: PrP106-126 作用于培养神经细胞导致其存活率的显著下降; 大脑皮质神经元经 PrP 106-126 处理后, 与 SCR 处理组 and 对照组相比, 基因表达的量明显下降, 处理后的小脑颗粒神经元也有类似的情况出现, 两者之间下降的幅度和时间不同。我们的研究结果为研究朊蛋白在 TSEs 发生中的作用和深入了解 TSE 的分子致病机制提供了基础数据。

**关键词:** PrP106-126; 培养神经细胞; 朊蛋白; 基因表达

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)06-0609-05

传染性海绵状脑病 (Transmissible spongiform encephalopathies, TSEs) 是一类动物和人的神经退行性疾病, 包括疯牛病 (Bovine spongiform encephalopathy, BSE)、羊痒病 (Scrapie)、人类克雅氏病 (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD) 等多种疾病<sup>[1]</sup>。TSEs 的病变主要发生在中枢神经系统内, 以神经元空泡化、胶质细胞增生和致病性朊蛋白 (Scrapie formed prion protein, PrP<sup>Sc</sup>) 蓄积为特征。TSEs 发生的关键环节是机体正常编码的细胞型朊蛋白 (Cellular prion protein, PrP<sup>C</sup>) 发生构象的变化而形

成致病性的朊蛋白, PrP<sup>Sc</sup> 在中枢神经系统聚集并发挥生物学反应, 推动 TSEs 的进一步发展。目前, 主要通过研究 PrP<sup>Sc</sup> 在活体细胞或模型细胞上导致细胞功能变化和丧失的分子生态来探讨 TSEs 的致病机理<sup>[2,3]</sup>。

PrP106-126 (Prion protein peptide 106-126, PrP 106-126) 是细胞型朊蛋白的一个多肽片段, 位于朊蛋白的 N-端, 当发生 TSEs 时, 在活体细胞上都可以检测到这一多肽的存在<sup>[3]</sup>。但是在正常细胞内不能检测到 PrP106-126, 因为 PrP<sup>C</sup> 在代谢过程中的酶

收稿日期: 2006-05-24, 修回日期: 2006-09-06

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (30500371; 30571399); 北京市科委基金 (2004100040691-7)

作者简介: 宁章勇 (1978-), 男, 山东莘县籍, 讲师, 博士, 主要从事兽医病理学研究。E-mail: ningzhyong@126.com, Tel: 020-85280238

\*\* 通讯作者: 赵德明 (1958-), 男, 山东菏泽籍, 教授, 博导, 博士, 主要从事动物传染性海绵状脑病研究。

Corresponding author. Tel: 010-62732975, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

切位点是 AA<sub>110-111</sub> 处<sup>[2]</sup>。PrP106-126 富含  $\beta$ -折叠成分并可以自发形成淀粉样纤维,具有蛋白酶 K 抵抗力,因此该肽在某些物理和化学性质上与 PrP<sup>Sc</sup> 非常相似<sup>[3,6]</sup>。研究表明 PrP106-126 具有明显的 PrP<sup>Sc</sup> 样生物学作用并且参与了淀粉样变的形成<sup>[4,5]</sup>。由于 PrP<sup>Sc</sup> 的不溶性,所以不能直接利用 PrP<sup>Sc</sup> 作用于细胞模型,PrP106-126 作为 PrP<sup>Sc</sup> 的最佳替代,是体外模拟 TSEs 发病的理想工具。

PrP<sup>Sc</sup> 的神经毒性作用和传染性必须依赖于内源性 PrP<sup>C</sup> 的表达<sup>[6,7]</sup>,PrP106-126 作用时,内源性 PrP<sup>C</sup> 的表达在该模型中的功能是当前急需探讨的问题之一,对探索 TSEs 的发生机制具有重要的意义。我们利用实时荧光定量 RT-PCR 的方法,对由 PrP106-126 构建的培养神经细胞模型进行了朊病毒基因表达相对定量的研究,为阐释 TSEs 的分子致病机理提供了基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和多肽

SD 大鼠 (SPF) 由中国科学院遗传与发育所实验动物中心提供;PrP106-126 为牛细胞型朊蛋白的一个多肽片段,氨基酸序列为:KTNMKHMAGA AAAGAVVGLG 和 PrP106-126 SCR(Scramble Prion Protein 106-126, PrP106-126 SCR)是同 PrP106-126 具有相同氨基酸序列,但是氨基酸的顺序是随机排列的多肽,氨基酸的序列为:AGKALMG AGHGANAT KVMVGA 由美国 Omega Bio-tech 公司合成。多肽以 10mM 浓度溶于无菌三蒸水中,储存于 -86℃,备用。

### 1.2 主要试剂和仪器

TRIZOL RNA 提取试剂盒、DMEM/F12 细胞培养基 (Gibco 公司)、RT 试剂盒、DEPC、E.Z.N.A<sup>®</sup> Gel Extraction Kit 和 RNASEOUT<sup>®</sup> Ribonuclease (Pro mega 公司)、SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Kit (FINNZ-YMES 公司)、MTT (TaKaRa 公司)、胰蛋白酶、Ara-C、多聚左旋赖氨酸和 NSE 单克隆抗体 (Sigma 公司)、PTC-150 型 PCR 仪、OPTICON 2 型实时荧光定量 PCR 仪 (MJ Research 公司)、紫外 III 分光光度计 (BioPhotometer 公司)、CO<sub>2</sub> 培养箱 (85A 型, Forma 公司),倒置显微镜 (BX50 型,日本电子公司)。

### 1.3 小脑颗粒神经元和大脑皮质神经元的体外培养、纯化和鉴定

小脑颗粒神经元按照本实验室建立的方法进行培养、纯化和鉴定<sup>[8]</sup>。简述如下:取 6 日龄幼鼠小脑,制备初细胞悬液。按照密度为  $5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ ,接种到预先涂有多聚左旋赖氨酸的 35mm 培养皿

中。培养 48 h 后,加入 10 $\mu\text{mol/L}$  的 Ara-C 抑制胶质细胞的生长,以后每 2-3d 半量换液一次。采用 NSE 单克隆抗体进行细胞免疫化学鉴定。大脑皮质神经元的体外培养和鉴定过程同小脑颗粒神经元相似,实验动物为 16 胚龄的鼠胎,培养部位为大脑皮质。

### 1.4 试验分组

将这两种细胞分别在体外培养成熟后,每种细胞分为三组,即:正常对照组、PrP106-126 SCR 处理组和 PrP106-126 处理组。PrP106-126 和 SCR 的作用浓度均为 50 $\mu\text{mol/L}$ ,细胞培养 15d 后,每周加入 5mM 葡萄糖以维持细胞的生长。分别在处理后的 1d、3d、7d、11d、17d 和 21d 进行朊蛋白基因表达的测定,在处理后的 3d、7d、10d、13d 和 17d 进行细胞存活率的测定,在每个检测项目的测定时间点,每种细胞每组分别取 3 个样品进行测定。

### 1.5 MTT 比色法细胞存活分析

培养的神细胞经 PrP106-126 和 SCR 处理后,用 MTT 比色法进行细胞的存活分析。

### 1.6 RNA 的制备及 RT-PCR

利用 RNA-Solve Reagent 试剂盒提取培养神经细胞的总 RNA,用无 RNase 的 DNase I 去除其中的 DNA 污染,电泳检测 RNA 的完整性。-86℃ 保存 RNA 样品备用,逆转录采用 RT 试剂盒进行。反应体系 (40 $\mu\text{L}$ ) 中加入 2 $\mu\text{g}$ RNA,参照说明书加入 oligo(dT)和 AMV 逆转录酶启动逆转录反应,65℃ 变性 5 min,加入 10U 的 RT 酶,37℃ 1h,70℃ 15 min 合成 cDNA。

利用 cDNA 进行 PrP 基因片断扩增,引物按照 GenBank 登录号 NM\_012631 进行设计, P<sub>1</sub> 为 5'-TGGCTACATGTTGGGGAGTG-3', P<sub>2</sub> 为 5'-ATCATCTTCACGTCGGTCTC-3', 预期扩增片断大小为 223bp;管家基因  $\beta$ -actin 片断扩增引物按照 GenBank 登录号 NM\_031144 进行设计, P<sub>1</sub> 为 5'-ACT GGCATT GTGATGGACTC -3', P<sub>2</sub> 为 5'-AGGAAGG AAGGCTG GAAGAG-3', 预期扩增片断大小为 302bp。25 $\mu\text{L}$  反应体系中含 10 $\times$ buffer 2.5 $\mu\text{L}$ 、dNTPs 2 $\mu\text{L}$ 、P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> (20 $\mu\text{mol/L}$ ) 分别为 0.5 $\mu\text{L}$  (每个片断均单独扩增)、Ex Taq 酶 0.2 $\mu\text{L}$ 、cDNA 2 $\mu\text{L}$ 、灭菌三蒸水 17.3 $\mu\text{L}$ 。反应条件为:94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s、50℃ 退火 30s、72℃ 延伸 40s,共 36 个循环;72℃ 延伸 8min。扩增产物电泳后染色、观察。E.Z.N.A Gel<sup>®</sup> Extraction kit 纯化 PCR 产物、测序,获得的序列采用 DNASTAR 分析软件进行序列分析和比较。

### 1.7 实时荧光定量 RT-PCR

基因表达的测定采用 DNA Engine Opticon<sup>™</sup>2 荧

光检测系统和 DyNAmo SYBR Green qPCR 试剂盒。25μL 反应体系中含有 12.5μL DyNAmo SYBR Green qPCR mix, 0.5μL 20pmol 引物, 2μL cDNA 模板(<10 ng/μL)。反应条件为: UNG 酶 50°C 孵育 2min, 94°C 预变性 10 min。94°C DNA 变性 20 sec, 引物在 50°C 退火 30 sec, 72°C 延伸 30 sec, 36 个循环, 72°C 后延伸 10 min。熔解曲线的制作条件为 65°C~95°C, 每 0.2°C 停留 1 sec。

基因表达定量的方法采用相对标准曲线法, 内源性管家基因 β-actin 标准化目的基因, 目的基因和管家基因都绘制标准曲线。纯化的 DNA 片断克隆后, 按 10 到 10<sup>4</sup> 倍比稀释, 由 Opticon Monitor 2 软件产生最佳荧光基线和标准曲线。目的基因和 β-actin 基因的拷贝数分别根据产生的 Ct 值从各自的标准曲线获得。取 3 次重复的平均值, 用目的基因的拷贝数除以 β-actin 的拷贝数作为靶基因的相对表达量。

1.8 数据统计

每个样品重复三次, 由 Opticon analysis software (version 2.01) 荧光分析软件自动进行测定。同一细胞不同处理组和不同细胞同一时间点的 PrP 基因表达的比较由 SPSS10.0 医学分析软件进行 T-检验, P<0.05 即为差异显著。

2 结果

2.1 PrP106-126 对培养神经元存活的影响

培养成熟的大脑皮质神经元纯度大于 99%, 小脑颗粒神经元纯度大于 98%。大脑皮质神经元对照组神经纤维网密集, 胞体丰满、折光率高, 细胞突起粗大; SCR 处理组和正常对照组相似; PrP106-126 处理组, 细胞消瘦、折光率低, 突起纤细, 神经纤维网网孔扩大, 呈现泡性液化(图 1A、B、C)。小脑颗粒神经元经 PrP106-126 处理后, 呈现和大脑皮质神经元类似的情形(图 1D、E、F)。大脑皮质神经元和小脑颗粒神经元经 50μM 的 PrP106-126 处理后的存活率见表 1。

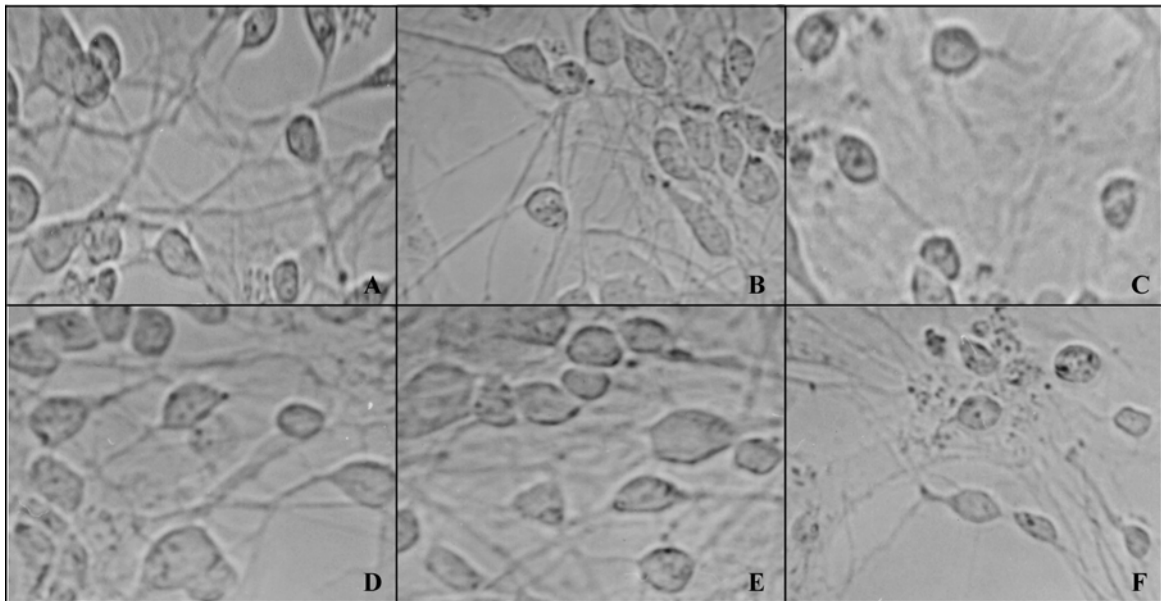


图 1 培养的大脑皮质神经元、小脑颗粒神经元经 SCR 和 PrP106-126 处理 17 d 后的形态学变化

Fig.1 Morphological changes of the cultured cortical neuronal cells, cerebellar granule cells treated by SCR and PrP106-126 after 17 days. A: The control cortical neuronal cell cultures showed a dense neurite network and isolated refringent cell bodies; B: Cultures treated by SCR showed similar to the control; C: PrP106-126 induced rarefaction of neurite network and vacuolation of neurites. The effects of PrP 106-126 and SCR on the cultured cerebellar granule cells were similar to that of cultured cortical neuronal cells as showed by figure 1D, E and F.

表 1 PrP106-126 和 SCR 对培养神经元存活率的影响  
Table 1 Effect of PrP106-126 and SCR on viability of the cultured neuronal cells

Cell types		Viability (%)	(Experimental group/the control × 100%)			
			7days	10days	13days	17days
cortical neuronal cells	PrP106-126	75% ± 5% <sup>#</sup>	60.1% ± 6% <sup>#</sup>	54% ± 3% <sup>#</sup>	48% ± 6% <sup>#</sup>	
	SCR	98.6% ± 6%	97.1% ± 7%	95.4% ± 11%	93.0% ± 9%	
cerebellar granule cells	PrP106-126	87.4% ± 12% <sup>#</sup>	64.2% ± 13% <sup>#</sup>	55.3% ± 14% <sup>#</sup>	49.1% ± 12% <sup>#</sup>	
	SCR	97.2% ± 7%	96.3% ± 6%	94.4% ± 5%	92.0% ± 6%	

Note:<sup>#</sup>p < 0.05 versus respective control values

## 2.2 细胞总 RNA 提取和目的基因片段的扩增

提取的总 RNA 紫外分光  $A_{260}/A_{280}$  为 1.8-2.0 之间, 电泳结果表明 RNA 分子保持完整。扩增后, 获得 223bp 的朊蛋白基因片段和 302bp 的  $\beta$ -actin 基因片段 (图 2)。序列测定分析表明, 获得的目的条带同原始序列的同源性为 100%。

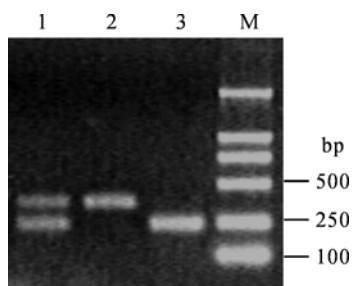


图 2 目的片段 PCR 扩增的凝胶电泳

Fig.2 Photographs of representative gels

M: marker (DL2000); 1, Production of fragment of prion gene and  $\beta$ -actin gene amplification in one tube; 2, Fragment of prion gene; 3, Fragment of  $\beta$ -actin.

## 2.3 朊蛋白基因表达的相对定量

表 2 培养神经细胞朊蛋白基因的相对表达水平

Table 2 The relative transcript levels of prion genes in the cultured neurons

Time after treated (days)	Control group (n=3) Mean±SEM	SCR group (n=3) Mean±SEM	PrP106-126 group (n=3) Mean±SEM
Cortical neuronal cells			
1	1.00±0.26	1.08±0.12	0.85±0.11
3	1.00±0.26	1.10±0.23	0.42±0.12*
7	1.00±0.27	0.99±0.18	0.31±0.06**
11	1.00±0.28	1.06±0.31	0.58±0.07
17	1.00±0.16	1.07±0.14	0.64±0.13
21	1.00±0.21	1.01±0.18	0.70±0.10
Cerebellar granule cells			
1	1.00±0.21	0.98±0.10	0.91±0.11
3	1.00±0.24	1.04±0.17	0.84±0.13
7	1.00±0.26	1.09±0.21	0.79±0.16
11	1.00±0.28	0.98±0.11	0.49±0.08*
17	1.00±0.22	0.99±0.13	0.30±0.09**
21	1.00±0.15	1.02±0.14	0.51±0.14

Note: \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus respective control values.

## 3 讨论

### 3.1 PrP106-126 对神经细胞朊蛋白基因表达的影响

在传染性海绵状脑病的发生、发展过程中, 神经元退行性病变的机理仍然不清楚。PrP106-126 对培养神经元的毒性作用已经得到了广泛的研究<sup>[9]</sup>, 但 PrP106-126 作用于神经元时朊蛋白基因表达的相对定量, 目前研究的较少。本研究表明 PrP106-126 可以引起培养神经细胞朊蛋白基因表达水平的显著下降且与神经细胞的死亡无关, 这就证明了

同一样品在同一实时荧光反应中, 结果的差异在 2% 以内, 同一样品在多次反应的定量结果差异在 4% 以内。在本研究中, 两种培养神经细胞朊病毒基因的表达都与管家基因相比, 样品设置 3 次重复, 相对定量的结果见表 2。大脑皮质神经元, 经 PrP106-126 作用 3d 后, 朊病毒基因的表达与对照相比下降显著 ( $P < 0.05$ ); 随着时间的推移, 这种基因表达下降的趋势更加明显, 处理后 7d, 朊病毒基因的表达与正常对照相比, 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。11d 后, 基因表达的量虽然略有回升, 但是仍然明显低于对照组。小脑颗粒神经元的基因表达情况与大脑皮质神经元相似, 在处理后的 11 d 前, 基因表达的量下降, 但是差异不显著。处理后 17 d, 基因表达的量与对照组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ )。除了上述每种细胞与正常对照和 SCR 处理组之间的基因表达比较, 我们还进行了小脑颗粒神经元和大脑皮质神经元之间的比较, 两者基因表达之间的差异不明显 ( $P > 0.05$ ) (资料未显示)。

PrP106-126 的神经毒性依赖于 PrP<sup>C</sup> 的表达, Nicole 等人<sup>[7]</sup>和 Chabry<sup>[10]</sup>的研究结果也证明了这一点。Gu<sup>[11]</sup>等研究表明 PrP106-126 长时间的作用于成神经瘤细胞时, 引起了细胞 PrP<sup>C</sup> 生物合成减少, 本研究采用原代培养的神经细胞, 也证明了这一点。

### 3.2 朊蛋白基因表达改变的生物学效应

Chiarini<sup>[12]</sup>和 Zanata<sup>[13]</sup>的研究表明在体外神经瘤细胞模型中朊蛋白可以激发细胞产生重要的神经保护信号。我们认为, PrP106-126 的神经毒性作用可能是由于改变了介导细胞重要生理功能的朊蛋白基因表达水平而引起的, 可能的作用途径是

PrP106-126 和神经元细胞膜的相互作用<sup>[13]</sup>导致了细胞膜功能的改变, 这种改变使细胞核减少了某些蛋白质特别是定位于细胞膜上的蛋白质 (如朊蛋白) 的生物合成。由朊蛋白所介导的细胞信号转导对于细胞的增殖和死亡过程来说是至关重要的<sup>[15]</sup>, 朊蛋白量的下降会导致细胞重要生理功能的丧失, 研究表明 PrP106-126 可能是通过调节细胞型朊蛋白的表达水平以发挥神经毒性作用。Brown 的研究<sup>[16]</sup>表明铜发挥毒性作用是通过调节培养细胞朊病毒基因的表达水平来实现的, 证明了朊蛋白的细胞保护作用, 这与根据本实验结果的推论相一致。

在神经细胞发生损伤时内源性的朊蛋白可能是一种保护性分子或信号传导的关键介质, 朊蛋白表达水平下降可能是神经细胞死亡的启动信号, 朊蛋白基因表达的改变也许是 TSEs 发生时神经细胞的基本病理变化过程发生和发展的启动步骤。

## References

- [1] Liemann S, Glockshuber R. Transmissible spongiform encephalopathies [J]. *Biochem. Biophys Res Commun*, 1998, 250 (2): 187-193.
- [2] Supattapone S. Prion protein conversion in vitro [J]. *J Mol Med*, 2004, 82 (6): 348-356
- [3] Corsaro A, Thellung S, Villa V, *et al.* Prion protein fragment 106-126 induces a p38 MAP kinase-dependent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells independently from the amyloid fibril formation [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1010: 610-622.
- [4] Rymer D L, Good T A. The role of prion peptide structure and aggregation in toxicity and membrane binding [J]. *J Neurochem*, 2000, 75 (6): 2536-2545.
- [5] Ettaiche M, Pichot R, Vincent J P, *et al.* In vivo cytotoxicity of the prion protein fragment 106-126 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (47): 36487-36490.
- [6] Fioriti L, Quagliom E, Massignan T, *et al.* The neurotoxicity of prion protein (PrP) is dependent of the expression level of PrP and is not mediated by abnormal PrP species [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 28(1):165-176.
- [7] Nicole C K, Arthur K, Stefan D, *et al.* Sphingosine kinase-dependent migration of immature dendritic cells in response to neurotoxic prion protein fragment [J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(9): 5535-5539
- [8] Ning Z Y, Zhao D M, Yang J M, (宁章勇, 赵德明, 杨建民) *et al.* Material Preparation of Cerebellar Granule Neurons Cell Model [J]. *China J vet Sci (中国兽医学报)*, 2005, 25(4): 403-405
- [9] Thellung S, Florio T, Villa V, *et al.* Apoptotic cell death and impairment of L-type voltage-sensitive calcium channel activity in rat cerebellar granule cells treated with the prion protein fragment 106-126 [J]. *Neurobiol Dis*, 2000, 7(4): 299-309.
- [10] Chabry J, Ratsimanohatra C, Sponne I, *et al.* In vivo and in vitro neurotoxicity of the human prion protein (PrP) fragment P118-135 independently of PrP expression [J]. *J Neurosci*, 2003, 23: 462-469.
- [11] Gu Y, Fujioka H, Mishra R S, *et al.* Prion peptide 106-126 modulates the aggregation of cellular prion protein and induces the synthesis of potentially neurotoxic transmembrane PrP [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 2275-2286.
- [12] Chiarini L B, Freitas A R, Zanata S M, *et al.* Cellular prion protein transduces neuroprotective signals [J]. *EMBO J*, 2002, 21: 3317-3326.
- [13] Zanata S M, Lopes M H, Mercadante A F, *et al.* Stress-inducibile protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection [J]. *EMBO J*, 2002, 21:3307-3316.
- [14] Kawahara M, Kuroda Y, Arispe N, *et al.* Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (19): 14077-14083.
- [15] Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, *et al.* Signal transduction through prion protein [J]. *Science*, 2000, 289: 1925-1928.
- [16] Brown D R. Role of the prion protein in copper turnover in astrocytes [J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 15 (3): 534-543.