

乳及乳制品中朊蛋白及其安全性研究进展

管 峰¹ 石国庆² 赵 进¹ 杨利国³

(1. 中国计量学院生命科学学院, 杭州 310018; 2. 新疆生产建设兵团绵羊繁育生物技术重点实验室, 石河子 832000; 3. 华中农业大学农业动物遗传育种与繁殖教育部重点试验室, 武汉 430070)

摘 要: 朊蛋白(prion proteins, PrP)是近年来确认的引起人畜共患病的新型蛋白质类传染源,其在乳及乳制品中的存在直接关系到乳产品安全和人类健康。本文对朊蛋白生物学特点、乳及乳制品中朊蛋白的来源和含量以及安全性进行了综述,以便为乳制品加工和安全评价提供参考。

关键词: 朊蛋白;乳;乳制品;安全性

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2010)05-1177-04

朊蛋白(prion proteins, PrP)是近年来确认的引起人畜共患病的一种蛋白质,该蛋白质具有自我复制和传播能力,尤其在英国“疯牛病”事件以后,对PrP的研究受到世界各国的重视。PrP空间结构的转变是可传播性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathic, TSE)的根源,该病导致患病动物大脑中大量神经细胞死亡并出现海绵状空泡化且具有一定传染性。反刍动物乳及加工后的乳制品中存在PrP,因此其潜在威胁备受人们的重视并对此开展了许多研究。

本文从PrP的基本特征、生理功能、乳及乳制品中PrP的来源和含量以及安全性评价等方面进行简述,以便为乳品安全和乳用动物的育种研究提供理论参考。

1 PrP特征及相关疾病

PrP是一类小分子疏水性糖蛋白,在理化性质上与普通蛋白质存在较大差别。PrP对化学试剂与生化试剂等表现出强抗性,对诸多物理因素如80~100℃高温均有相当的耐受能力^[1]。PrP是由动物单一PrP基因(prion protein gene, PRNP)编码的大小约250个氨基酸的蛋白质,在神经系统高度表达,在非神经系统少量或微量表达,且在不同物种中高度保守,DNA和氨基酸序列的相似性分别达到90%和95%以上^[2]。人类和小鼠的PRNP分别定位于20号和2号染色体^[3],绵羊和牛PRNP均定

位于13号染色体^[4-5]。

细胞PrP(PrP^C)因空间结构转变成为致病PrP(PrP^{Sc})而导致PrP疾病,但这种结构转变机制尚不完全清楚。细胞PrP对生物体的生理作用尚不完全清楚,推测在神经元营养与功能维持、保护活性氧诱导的DNA损伤、细胞信号转导和Cu²⁺、Ca²⁺代谢等方面具有重要功能^[6-7]。有研究认为,TSE发病是因为细胞PrP正常神经保护作用丧失,大脑中细胞PrP严重减少所致^[8]。研究证明,在PRNP敲除小鼠大脑部位蛋白质氧化和脂质过氧化水平显著升高,加上此时缺乏抗氧化酶的大脑环境还要承受较强的氧化作用(吸入氧的20%),因此易于发生氧化损伤;反之证明,抗氧化能力强的细胞系都具有较高的细胞PrP表达水平,高表达的细胞PrP可以修复氧化应激造成的DNA损伤,减少神经变性疾病发生^[9-10]。

PrP疾病是一类神经退行性疾病的总称,主要包括羊的痒病(scrapie)、牛海绵状脑病(BSE,即“疯牛病”)、人库鲁氏病(Kuru)、克雅氏病(CJD)、格斯特曼综合症(GSS)、家族致死性失眠综合症(FFI)和新型克雅氏病(vCJD)等。流行病学研究认为,TSE的传播与来自感染的动物源性物质尤其与BSE感染的肉骨粉等材料有关,也是人类新型克雅氏病的潜在致病源^[11]。

2 乳及乳制品中PrP的含量

乳及乳制品是人类摄入蛋白质的重要来源之

收稿日期:2010-03-17

基金项目:国家自然科学基金(C120103);“863”科技计划资助项目(2008AA101011)

作者简介:管 峰(1977—),男,山东菏泽人,博士,副教授,硕士生导师,研究方向为动物分子育种。E-mail: jlguanfeng@yahoo.com.cn

一,与人类的生活关系极为密切。乳及乳制品中 PrP 的安全性直接关系到人类的健康,甚至生命安全。因此,对乳及乳制品中 PrP 的检测也就随之成为人们研究的热点。鉴于 PrP 在血液组织中的存在,推测可能在乳中存在来自血细胞或者乳腺上皮细胞的 PrP。但是,由于技术的限制,乳中高含量的总蛋白(约 40 mg/L)和大量脂类物质(约 35 mg/L)的存在限制了原有的生化方法对 PrP 进行有效的检测,只能在血细胞成分中检测到细胞 PrP 和病变 PrP 的存在,直到 2006 年尚不能对乳中 PrP 进行定性检测^[12]。

随着蛋白质检测技术的发展,应用免疫组化、免疫沉淀、蛋白质杂交和 ELISA(酶联免疫吸附)等综合方法,证明在反刍动物乳和乳腺细胞中 PrP 的表达具有种类特异性,其含量在牛、绵羊和山羊的乳腺、脱脂乳、乳清蛋白以及乳酪中存在差异,PrP 相对含量最高的是乳酪,且乳中 PrP 具有和近似神经组织中 PrP 全长的序列和结构特征^[13-14]。对山羊乳的研究证明,乳中 PrP 相对神经组织 PrP 电泳迁移率增加^[14]。蛋白质杂交研究表明,山羊和绵羊乳中所有 PrP 均含有分子量 12 ku 的组分,且这一分子量缩短的 PrP 在山羊乳清蛋白中是优势蛋白质^[13]。

Franscini 等^[12]通过一种特异性吸附剂结合并浓缩细胞 PrP 和病变 PrP 的方法,分别对 10 mL 牛乳、绵羊乳、山羊乳和人乳中的 PrP 进行杂交检测,在牛乳中检测到 3 个亚型,分子量分别为 34、30 和 27 ku,并分别对应双糖基化、单糖基化和非糖基化 PrP。最小的非糖基化 PrP 的分子量高于重组牛 PrP 分子量(26 ku),这是因为天然 PrP 带有一个糖基化磷脂酰基醇锚定位点。绵羊乳、山羊乳和人乳中 PrP 总量差异很大,但基本分子量分布和牛乳相似。对乳中 PrP 定量研究表明,PrP 在鲜牛乳中的总含量为 200 pg/mL,鲜绵羊乳和山羊乳中 PrP 含量分别约为 1 ng/mL 和 40 pg/mL,人乳中则少于 10 pg/mL。PrP 在绵羊乳、牛乳、山羊乳和人乳中的含量比约为 100:20:4:1。在经过巴氏消毒和超高温消毒加工后的牛乳中仍能很清楚的检测到 PrP 的存在,含量和山羊乳相当,而绵羊乳在稀释 4 倍后含量仍为山羊乳的 10 多倍^[12]。

3 乳及乳制品中 PrP 的来源

一般来说,健康乳用动物如奶牛所产的正常乳

中都含有一定数量的体细胞,但是一般均低于 2×10^5 个/mL,这是动物乳腺自身免疫的需要^[15]。这些细胞多是来自白细胞,包括巨噬细胞、嗜中性白细胞和淋巴细胞(约占 98%),其他则来自于乳腺组织脱落的上皮细胞^[12,16]。当动物受到外界或自身因素影响,乳腺感染后由于白细胞的吞噬作用会引起乳中细胞数量增加。一般来说,乳中 PrP 的来源有以下几种途径:乳腺上皮细胞的胞外分泌;乳球蛋白的分泌;血清和间质细胞蛋白质的跨膜作用和血浆成分以及粒细胞的分泌作用^[14]。最新研究显示牛乳腺细胞中 PrP 在乳腺上皮细胞选择定位,主要分布于分泌活性较高的基底细胞表面^[17]。乳腺细胞中乳球蛋白的分泌模式是 PrP 进入乳中的主要途径^[12]。

由于 PrP 特殊的物理和化学性质,乳制品的加工一般不会影响乳中 PrP 的结构,但多数因为稀释而使含量降低。市售的全脂乳、半脱脂乳和脱脂乳均有 PrP 存在,但含量比鲜乳有所下降,儿童配方奶粉中 PrP 含量很低甚至在目前的检测限度以下^[14]。

4 乳及乳制品中 PrP 的安全性

有关乳及乳制品的安全性研究始于 20 世纪 60 年代,多年来由于一直未能在染病动物乳中找到传播因子的存在,研究人员因此认为乳及乳制品都是安全的^[18]。在早期研究中,Vetrugno 等^[19]用“疯牛病”奶牛所产的乳以口服(每只每天 30 mL)、颅内注射(每只每天 0.02 mL)或者腹腔注射(每只每天 0.10 mL)方式给小鼠,经过 2 年的观察未发现任何临床症状和神经损伤,通过饲喂小鼠含有病变 PrP 的牛乳,也未发现牛乳传播的证据^[14]。另外,在人类饮用牛乳的跟踪调查中也没有观察到感染人的现象,因此认为牛乳以及相关乳制品不具有感染性^[20]。此外,世界上所有权威机构都投入精力对此进行了研究,包括世界卫生组织、国际兽医组织、欧盟委员会、英国海绵状脑病咨询委员会和美国农业部,研究人员也一致认为牛乳是安全的,美国甚至没有禁止从“疯牛病”疫区进口乳制品^[21]。与此相反的是,羊瘙痒病却广泛传播,在这种情况下研究人员又不得不怀疑同时患有乳腺炎的患病羊的乳是否会造造成污染^[22]。这一时期,“疯牛病”传播并导致人类感染新型克雅氏病的证据伴随着乳中 PrP 的发现再次向人们敲响了乳及乳制品安全性的警钟^[23-24]。

最近的几年里,生物检测新技术在 PrP 的安全性检测中得到广泛应用,在取得重要突破的同时

也成为生物安全领域一个新的研究热点。近期研究发现,PrP可以在患痒病绵羊的乳腺中自我复制,这就意味着羊乳有可能是TSE的传染源,后来的试验也证实了这一点。Konold等^[25]对18只痒病易感基因型羔羊口服患病绵羊的乳,在死亡的羔羊回肠组织中发现了病变PrP,但没有临床表现;7个月后试验组15只羔羊检测病变PrP全部呈阳性,对照组14只羔羊为阴性,但2组羔羊混合饲养后对照组中部分羔羊发病。这一研究不但证明痒病可以由乳传播,而且可以在羊群中水平和垂直传播。

类似的研究证明,食用患病或隐性感染山羊的初乳和常乳可以使小鼠感染羊的痒病,但感染小鼠的乳不具有二次感染力^[12]。由此研究者认为不但动物体内的细胞PrP可以转变为致病PrP,而且体内进入乳中的PrP也会发生这种空间结构的转变^[12],至此全面肯定了患TSE病动物的乳及乳制品不但是PrP的重要来源而且能传播此病。在乳及乳制品的感染成分中,尤其以细胞碎片、酪蛋白乳清和乳酪的感染力较强,而初乳和常乳的感染滴度都比较低^[18]。值得关注的是,种间传播屏障的存在会降低乳的传播风险^[18]。在传播方式上,人工喂养比哺乳方式感染痒病的风险要低^[26]。

5 结 语

据统计,世界乳品年产量约5亿t,占人类摄入蛋白质的13%。这些乳品大多是均质化处理并采取巴氏消毒或者超高温灭菌,但这并不能破坏其中的朊蛋白。如果患有乳房炎等疾病的动物血-乳屏障遭到破坏,则乳中PrP含量增加,此时病变PrP积聚在乳腺管淋巴细胞中并能自我复制,从而残留在乳中,大大增加了乳的安全隐患^[22]。尽管如此,人类还是在不断探索中通过检疫等有效手段预防了类似“疯牛病”的传播。但同时,乳中PrP的安全性也不容忽视,对乳和乳制品及其安全性的研究使我们在乳品安全方面受到启示:一方面,在加工过程中可以用现代生物技术检测、调控或分离乳中的细胞甚至低丰度的特定蛋白质^[27-28];另一方面,在加强动物检疫的同时可以选育牛羊等乳用动物的抗病能力^[7,29],从源头上为人类提供更安全的乳。

参考文献:

- [1] TAYLOR J P, HARDY J, FISCHBECK K H. Tox-ic proteins in neurodegenerative disease[J]. *Science*, 2002, 296(5575):1991-1995.
- [2] LEE I Y, WESTAWAY D, SMIT A F, et al. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species[J]. *Genome Research*, 1998, 8(10):1022-1037.
- [3] SPARKES R S, SIMON M, COHN V H, et al. Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1986, 83(19):7358-7362.
- [4] IANNUZZI L, DI MEO G P, PERUCATTI A, et al. Comparative FISH mapping in river buffalo and sheep chromosomes: assignment of forty autosomal type I loci from sixteen human chromosomes[J]. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 2001, 94(1/2):43-48.
- [5] CHOI S H, KIM I C, KIM D S, et al. Comparative genomic organization of the human and bovine PRNP locus[J]. *Genomics*, 2006, 7(5):598-607.
- [6] WATT N T, ROUTLEDGE M N, WILD C P, et al. Cellular prion protein protects against reactive oxygen species induced DNA damage[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, 43(6):959-967.
- [7] 管峰, 潘磊, 石国庆, 等. 绵羊 PRNP 遗传多样性与抗病育种研究进展[J]. *遗传*, 2009, 31(2):137-141.
- [8] HETZ C, MAUNDRELL K, SOTO C. Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2003(9):237-243.
- [9] BROWN D R, SCHMIDT B, KRETZSCHMAR H A. Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC12 cells[J]. *International Society of Developmental Neuroscience*, 1997, 15:961-972.
- [10] WONG B S, LIU T, LI R, et al. Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2001, 76:565-572.
- [11] CONCEPCION G P, DAVID M P, PADLAN E A. Why don't humans get scrapie from eating sheep? A possible explanation based on secondary structure predictions [J]. *Medical Hypotheses*, 2005, 64:919-924.
- [12] FRANSCINI N, GEDAILY A E, MATTHEY U, et al. Prion protein in milk[J]. *PLoS One*, 2006, 71:1-7.
- [13] DIDIER A, GEBERT R, DIETRICH R, et al. Cellu-

- lar prion protein in mammary gland and milk fractions of domestic ruminants[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 369(3):841-844.
- [14] MADDISON B C, WHITELAM G C, GOUGH K C. Cellular prion protein in ovine milk[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 353(1):195-199.
- [15] 朱连英, 丛枫桦, 李成会. 不同脱脂和染色方法对生鲜牛奶体细胞测定的影响[J]. *中国乳品工业*, 2008, 36(10):33-35.
- [16] 程文健, 叶兴乾, 唐平, 等. 快速检测牛奶中体细胞数方法的改进[J]. *中国食品学报*, 2007, 7(2):114-118.
- [17] DIDIER A, DIETRICH R, STEFFL M, et al. Cellular prion protein in the mammary gland is selectively expressed in active lactocytes[J]. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2006, 54:1255-1261.
- [18] LACROUX C, SIMON S, BENESTAD S L, et al. Prions in milk from ewes incubating natural scrapie[J]. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(12): e1000238. doi: 10.1371/journal.ppat.1000238.
- [19] VETRUGNO V. Safety of milk and milk derivatives in relation to BSE: the lactoferrin example[J]. *Bio-Metals*, 2004, 17(3):353-356.
- [20] 庄丽萍, 陶利明, 王志亮. 传染性海绵状脑病组织感染性研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(11):1078-1082.
- [21] BRADLEY R. BSE risks for humans consuming beef and beef products: how any risks are managed?[J]. *Veterinary Research Communications*, 2003(1):15-23.
- [22] LIGIOS C, SIGURDSON C J, SANTUCCIU C, et al. PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis[J]. *Nature Medicine*, 2005(11):1137-1138.
- [23] COLLINGE J, SIDLE K C, MEADS J, et al. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD[J]. *Nature*, 1996, 383:685-690.
- [24] BRUCE M E, WILL R G, IRONSIDE J W, et al. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent[J]. *Nature*, 1997, 389:498-501.
- [25] KONOLD T, MOORE S J, BELLWORTHY S J, et al. Evidence of scrapie transmission via milk[J]. *BMC Veterinary Research*, 2008(4):1-10.
- [26] ELSEN J M, AMIGUES Y, SCHELCHER F, et al. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov[J]. *Archives of Virology*, 1999, 144:431-445.
- [27] 程广龙, 江喜春, 赵辉玲, 等. 牛奶中高体细胞数的危害及调控措施[J]. *畜牧与饲料科学*, 2009, 30(4):65-66.
- [28] 吴伟宗, 王晓秋, 王军军. 母乳蛋白质组研究进展[J]. *动物营养学报*, 2009, 21(6):809-815.
- [29] 管峰, 潘磊, 石国庆, 等. 牛朊蛋白基因多样性与抗病性研究进展[J]. *草食家畜*, 2008(2):7-10.

Prion Proteins and Their Safety in Milk and Milk Products

GUAN Feng¹ SHI Guoqing² ZHAO Jin¹ YANG Ligu³

(1. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 2. The Key Laboratory of Sheep Breeding and Reproduction Biotechnology in Xinjiang Production and Construction Group, Shihezi 832000, China; 3. Key Laboratory of Agriculture Animal Heredity, Breeding and Reproduction, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Prion proteins were regarded as newly sources of infection that resulted in zoonosis. The safety of prion proteins in milk and milk products has a directly relationship with milk safety and human health. In this paper, the biological character, source and content of prion proteins in milk and milk products and their safety were reviewed. The aim of this paper is to provide reference to the milk processing and safety evaluation. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(5):1177-1180]

Key words: prion proteins; milk; milk products; safety