doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.03.002

Parkin 基因过表达质粒和细胞模型的构建 *

马浩洁[1] 冯琬迪[1] 盖 聪[1] 强天遥[1] 张淑静[2] 胡京红[2] 高誉珊[2]
毛颖秋[3] 郭振宇[1] 孙红梅[1△]

（1 北京中医药大学中医学院解剖教研室 北京 100029；2 北京中医药大学中医学院科研中心 北京 100029；
3 北京中医药大学中医药研究院 北京 100029）

摘要 目的：构建 *Parkin* 基因过表达质粒并转染 SH-SY5Y 细胞，为进一步研究帕金森病的发病机制及中药的作用环节奠定基础。**方法：**首先构建 *Parkin* 基因过表达质粒，采用脂质体转导技术，将 *Parkin* 过表达质粒应用 Lipo3000 转染 SH-SY5Y 细胞。荧光显微镜观察细胞绿色荧光蛋白的表达；RT-PCR 检测其 Parkin mRNA 的表达；Western Blot 技术检测其 *Parkin* 蛋白的表达。**结果：**转染组可观测到较多的绿色荧光蛋白表达；*Parkin* 过表达细胞 *Parkin* mRNA 和蛋白的表达均显著提高（P＜0.01）。**结论：**通过脂质体转导技术，应用 Lipo3000 可将 *Parkin* 过表达质粒成功转染入 SH-SY5Y 细胞，转染的基因和蛋白表达均较高，提示此法可成功构建 *Parkin* 基因过表达的细胞模型。

关键词：帕金森病；*Parkin*；SH-SY5Y 细胞；质粒；转染
中图分类号：R-33；Q78；R742.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2018）03-407-06

Construction of *Parkin* Overexpression Plasmid and the Cell Model*

MA Hao-jie[1], FENG Wan-di[1], GAI Cong[1], QIANG Tian-yao[1], ZHANG Shu-jing[2], HU Jing-hong[2], GAO Yu-shan[2], MAO Ying-qiu[3], GUO Zhen-yu[1], SUN Hong-mei[1△]

(1 Department of Anatomy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China;
2 Department of scientific research center, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China;
3 Chinese traditional medicine research institute, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China)

ABSTRACT Objective: Construct *Parkin* overexpression plasmid and transfect into human neuroblastoma SH-SY5Y cells, with the aim of laying a foundation for studying the pathogenesis of Parkinson's disease and the role of traditional Chinese medicine. **Methods:** Firstly, construct *Parkin* overexpression plasmid. Using liposome transduction technology, the *Parkin* overexpression plasmid was transfected into SH-SY5Y cells by lipo3000. The green fluorescent protein was observed by fluorescence microscopy; RT-PCR technique was used to detect the expression of *Parkin* at mRNA level; Western-blot technique was used to detect the expression of *Parkin* at protein level. **Results:** More expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) was observed in the transfected group; the mRNA and protein expression of *Parkin* was significantly increased after transfection with *Parkin* overexpression plasmid (P<0.01). **Conclusions:** Using liposome transduction technology, the *Parkin* overexpression plasmid was successfully transfected into SH-SY5Y cells by lipo3000, the mRNA and protein expression of *Parkin* was significantly increased. A cell model of Parkin gene overexpression was successfully established.

Key words: Parkinson's disease; Parkin; SH-SY5Y cell; Plasmid; Transfect
Chinese Library Classification (CLC): R-33; Q78; R742.5 Document code: A
Article ID: 1673-6273(2018)03-407-06

前言

帕金森病(Parkinson's disease，PD)，是一种以中脑黑质多巴胺能神经元变性、丢失为主要病变的慢性神经退行性疾病[1]。目前其发病机制尚不明确，研究发现遗传、环境和老龄化等因素均与 PD 的发病相关。迄今为止，已经命名并确定与 PD 相关的易感基因有 18 个，其中 *Parkin* 作为重要的 PD 相关基因越来越被关注和重视。故本实验将设计 *Parkin* 过表达质粒并转染 SH-SY5Y 细胞，拟构建 *Parkin* 基因过表达的细胞模型，从 *Parkin* 基因的调控角度进一步探讨中药合方对 PD 细胞模型线粒体质量影响的分子机制，为临床应用中药合方治疗 PD 提供科学和实验依据，为中药复方进一步利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂

人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞株购自上海吉凯基因

* 基金项目：国家自然科学基金项目（81573773）；北京中医药大学自主课题（2015-JYB-JSMS017）
作者简介：马浩洁（1990-），女，硕士研究生，主要从事中医药防治脑病机制研究，电话：18810265833，E-mail：mahaojie2015093@163.com
△ 通讯作者：孙红梅，女，博士生导师，教授，主要从事中医药防治脑病机制研究，电话：13621116395，E-mail：hm-sun@163.com
（收稿日期：2017-09-25 接受日期：2017-10-18）

化学技术有限公司；*Parkin* 质粒由上海吉凯基因科技有限公司构建，同时提供阴性对照菌液及质粒；DMEM 高糖培养基、澳洲来源胎牛血清、青霉素 - 链霉素溶液(100X)、胰酶细胞消化液、Lipofectamine® 3000 转染试剂、TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司；PBS 购自美国 HyClone 公司；硫酸卡那霉素购自瑞士 Genebio 公司；QIAGEN 质粒大提试剂盒购自美国 QIAGEN 公司；逆转录试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司；THUNDERBIRD qPCR 定量检测试剂购自日本 TOYOBO 公司；预染蛋白 Marker 购自美国 Thermo 公司；BCA 蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司；Parkin Antibody 购自美国 Abcam 公司；Peroxidase Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 购自中杉金桥公司；Beta Actin Antibody 购自美国 Proteintech 公司；30 % 丙烯酰胺 - 双丙烯酰胺、分离胶缓冲液(含有 SDS)，浓缩缓冲液(含有 SDS)、电泳缓冲液、电转缓冲液、蛋白电泳上样缓冲液、脱脂奶粉、TBST、ECL 超敏发光液均购自北京普利莱技术有限公司；25 cm^2 细胞培养瓶、细胞培养板、离心管购自美国 Corning 公司。

1.2 仪器

二氧化碳培养箱(日本 SANYO)，高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司)，倒置式荧光显微镜(Nikon TE2000，日本)，超净工作台(北京昌平长城空气净化工程公司)，Safire2 全波长荧光酶标仪(瑞士 TEcan 公司)，紫外分光光度仪(美国 Bio-Rad 公司)，SANYO 超低温冰箱（日本 SANYO)，ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)，SANYO SIM-F124 制冰机(日本 SANYO)，SZ-96 自动纯水蒸馏器（上海亚荣生化仪器厂)，Western blot 电泳槽和电转槽（美国 BIO-RAD 公司)，WH861 旋涡混合器(江苏太仓鹿河生化仪器厂)，TS-1 型摇床(江苏海门市麒麟医用仪器厂)，移液器(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 方法

1.3.1 质粒构建、转化、扩增、提取及鉴定 带有绿色荧光蛋白(GFP)标记的 *Parkin* 过表达质粒(人)的构建：利用限制性内切酶消化获得线性化载体，PCR 扩增制备 *Parkin* 基因片段，所用扩增引物需在其 5' 端添加同源重组序列，使用该引物扩增 *Parkin* 基因片段，扩增产物 5' 和 3' 最末端的序列分别与线性化载体两末端序列完全一致。以线性化载体和 *Parkin* 基因扩增产物配制反应体系，进行重组反应，实现体外环化。

对重组产物进行转化扩增：配置 LB 肉汤培养基及含 AGAR 的培养液，并接种阴性对照菌液和 *Parkin* 过表达菌液，于培养皿中并倒置于 37 ℃培养箱中孵育 16 h 左右；然后各挑取一个独立的、圆形且大小适中的菌落，接种于 5 mL 含抗生素的 LB 培养液中，37 ℃，250 rpm，摇菌 10 h；从两种 5 mL 的菌液中各取 1 mL 分别加入至 LB 培养液中，37 ℃，250 rpm，摇菌 14 h。扩增结束后按照 QIAGEN 质粒大提试剂盒指南对质粒进行提取。提取的 *Parkin* 过表达质粒和阴性对照质粒，由北京鼎国公司进行测序，配置质粒测序反应体系，测序使用的引物如下：

名称 Name	序列 Sequences
CMV-F(519-539)：	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
IRES-SEQR(732-713)：	5'-CGGGCAGCTCGTAGCTCTTC -3'

经 PCR 循环条件反应后将测序产物纯化、电泳后，我们将测序结果与目的基因序列进行比对分析。

1.3.2 质粒转染及观察

1.3.2.1 细胞培养 用 25 cm^2 细胞透气培养瓶，含有 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 完全培养基培养 SH-SY5Y 细胞，培养条件为：37 ℃、5% CO_2、95 % 空气条件。每 1～2 天进行换液，细胞长至 80 %～90 % 时传代：① 用吸管吸出旧的培养基，PBS 清洗 2 次，每次 5 mL，每瓶加入 0.5 mL 胰酶，消化 30～60 s，显微镜下观察大部分细胞收缩、变圆，有少许细胞开始掉落时，立即用吸管吸出胰酶，加入 5 mL 培养基吹打终止消化，使细胞从瓶壁上全部脱落，悬浮在培养基中；② 将细胞悬液转移至 15 mL 离心管中，4 ℃，1000 rpm，离心 5 min；③ 弃上清，新鲜培养液重悬细胞并轻轻混匀，根据细胞生长密度选择传代瓶数。一周传代 2～3 次。细胞冻存时，冻存液成分：70% 培养基，20% 胎牛血清，10% DMSO；冻存密度为 1～2× 10^6 个 / 管，液氮保存。

1.3.2.2 实验分组 实验分为三组(1)正常对照组(C)：正常培养 SH-SY5Y 细胞；(2)阴性对照组(NC)：SH-SY5Y 细胞转染阴性对照质粒；(3)*Parkin* 过表达组（PC)：SH-SY5Y 细胞转染 *Parkin* 过表达质粒。

1.3.2.3 转染 细胞铺板 24 h 后，按照 Lipofectamine® 3000 说明书用其进行转染。转染 48 h 后，荧光显微镜下观察其 GFP 的表达情况及统计其转染效率。

1.3.3 实时荧光定量 PCR (RT-PCR)检测 EGFP-Parkin mRNA 的表达水平

1.3.3.1 提取 RNA 及将 RNA 逆转录为 cDNA 实验分组及处理同 2.2，TRIzol 提取细胞后每管加入 200 μL 氯仿，离心 15 min 后吸取 400 μL 上层水相至新的管中；每管加入 400 μL 异丙醇，离心 10 min，弃上清；加入 1 mL 75 %的乙醇悬浮沉淀后离心 5 min，弃上清后晾置并加入 50 μL DEPC 水，吹打混匀，稀释后用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度。各组取 2 μg RNA 与 1 μL 的 Oligo(dT)及 DEPC 水混合均匀，放置于逆转录仪中变性，65 ℃，5 min；配制反应混合物(每管：5× Reaction Buffer:4 μl, RiboLock RNase Inhibitor: 1 μL, 10nM dNTP Mix: 2 μL, RevetAid M-Mulv RT: 1 μL)每管加入 8 μL 混合物；置于逆转录仪中反应，反应条件为 42 ℃，60 min→70 ℃，5 min→4 ℃，-20 ℃保存备用。

1.3.3.2 PCR 反应检测 EGFP-Parkin mRNA 表达水平 用 DEPC 水将 cDNA 稀释 10 倍；分别配制 *Parkin* 和 β-actin 引物的反应体系(见下表 2)，先加入引物反应混合液，每孔 18 μL，再加入稀释的 cDNA，每孔 2 μL，置于实时荧光定量 PCR 仪内进行检测。采用 Livak ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 法分析 *Parkin* 的相对表达量：$\Delta CT = CT_{Parkin} - CT_{\beta\text{-actin}}$，$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{实验组} - \Delta CT_{对照组}$，相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta CT}$。

(1)*Parkin* 及 β-actin 引物序列如下：

Name	Sequences
β-actin sense primer：	5'-CGGCTACAGCTTCACCACCA -3'
β-actin reverse primer：	5'-CGGGCAGCTCGTAGCTCTTC -3'
Parkin sense primer：	5'-CTGGAAGTCCAGCAGGTAGAT -3'
Parkin reverse primer：	5'-TCATCCCAGCAAGATGGACC -3'

(2)*Parkin* 和 β-actin 引物的每孔反应体系如下：

Solution	Volume(μL)
DEPC	6.8
Power	10
Sense primer	0.4
Reverse primer	0.4
Calibrator	0.4

(3)RT-PCR 运行条件为：95 ℃ 15 s, 61 ℃ 30 s, 72 ℃ 4 min 40 个循环

1.3.4 Western Blot 检测 *Parkin* 蛋白的表达水平

1.3.4.1 蛋白提取、定量及变性　按 BCA 蛋白定量试剂盒提取蛋白并检测蛋白浓度。提取的蛋白样品加入 5× loading buffer 和 RIPA 蛋白裂解液进行定量配平，并将配平的蛋白样品置于 100 ℃沸水浴中煮 5 min。

1.3.4.2 免疫印迹　配胶、灌胶：配制 10 mL 10 %的分离胶和 5 mL 5 %的浓缩胶，先后灌入，先配分离胶，再配制浓缩胶，然后插入 10 孔梳子，待浓缩胶凝固后，将梳子拔出，置于电泳槽中；开始上样每孔 30 μg，20 μL，上样后 100 V 电压，电泳约 120 min。电泳结束后，转膜，制作"三明治"夹板并将其放入电转槽中并加满电转液；电转槽置于冰上开始电转，100 V 电压，电转 80 min。电转后将膜取出，室温下置于摇床上封闭 1 h。一抗孵育：用一抗稀释液将一抗稀释至适当浓度(1∶1000)；室温下，摇床上孵育 1 h 后，置于 4 ℃冰箱里孵育过夜。二抗孵育：摇床上用 TBST 将膜漂洗 15 min× 3 次。用 0.5 %脱脂牛奶 -TBST 溶液稀释二抗至适当的浓度(1∶1000)置于摇床上慢速摇动孵育 1 h；将膜取出，置于摇床上用 TBST 漂洗 15 min× 3 次。曝片、洗片并将图片进行扫描，采用 Quantity One-4.6.2 软件进行分析。

1.4 统计方法

实验数据采用均值± 标准差($\bar{x}$± s)表示，应用 SPSS20.0 统计软件中的单因素方差分析(One-way ANOVA)对数据进行处理，以 P<0.05 时，差异具有统计学意义，P<0.01 时差异性显著。

2 结果

2.1 质粒构建、转化、提取及测序结果

构建的 EGFP-Parkin(NM-004562)过表达质粒其结构见图 1，转化、扩增和提取，所提取质粒的浓度如表 1。

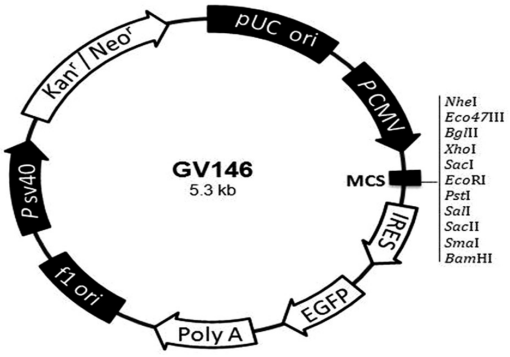

图 1 构建的 *Parkin* 过表达质粒载体结构图

Fig.1 The structure of *Parkin* overexpression plasmid

GV146：载体编号；CMV-MCS-IRES-EGFP-SV40-Neomycin：元件顺序；EGFP：荧光标记；Kanr：青霉素抗性；MCS：多克隆位点(*Parkin*)。

GV146: the carrier number; CMV-MCS-IRES-EGFP-SV40-Neomycin: component order; EGFP: fluorescent marker; Kan^r: penicillin resistance; MCS: multiple cloning site(*Parkin*).

表 1 提取质粒的浓度

Table 1 The concentration of the extract plasmid

Plasmid	Concentration(μg/μL)
Parkin Overexpression	1.292
Negative Control	1.184

北京鼎国公司对其进行测序，我们将测序的结果与目的基因 *Parkin* 序列与所提供的对比如下：

AGCAATAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGAT-CCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCGCCACCA-TGATAGTGTTTGTCAGGTTCAACTCCAGCCATGGTTTCC-CAGTGGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCA-AGGAGGTGGTTGCTAAGCGACAGGGGGTTCCGGCTGAC-CAGTTGCGTGTGATTTTCGCAGGGAAGGAGCTGAGGAA-TGACTGGACTGTGCAGAATTGTGACCTGGATCAGCAGA-GCATTGTTCACATTGTGCAGAGACCGTGGAGAAAAGGTC AAGAAATGAATGCAACTGGAGGCGACGACCCCAGAAAC GCGGCGGGAGGCTGTGAGCGGGAGCCCCAGAGCTTGAC-TCGGGTGGACCTCAGCAGCTCAGTCCTCCCAGGAGACTC TGTGGGGCTGGCTGTCATTCTGCACACTGACAGCAGGAA GGACTCACCACCAGCTGGAAGTCCAGCAGGTAGATCAA-TCTACAACAGCTTTTATGTGTATTGCAAAGGCCCCTGTC-AAAGAGTGCAGCCGGGAAAACTCAGGGTACAGTGCAGC AcCTGCAGGCAGGCAACGCTCACCTTGACCCAGGGTCCA TCTTGCTGGGATGATGTTTTAATTCCAAACCGGATGAGT GGTGAATGCCAATCCCCACACTGCCCTGGGACTAGTGC-AGAATTTTTCTTTAAATGTGGAGCACACCCCACCTCTGA-CAAGGAAACATCAGTAGCTTTGCACCTGATCGCAACAA-ATAGTCGGAACATCACTTGCATTACGTGCACAGACGTCA-GGAGCCCCGTCCTGGTTTTCCAGTGCAACTCCCGCCACG-TGATTTGCTTAGACTGTTTCCACTTATACTGTGTGACAA-GACTCAATGATCGGCAGTTTGTTCACGACCCTCAACTTG-GCTACTCCCTGCCTTGTGTGGCTGGCTGTCCCAACTCCT-TGATTAAAGAGCTCCATCACTTCAGGATTCTGGGAGAA-GAGCAGTACAACCGGTACCAGCAGTATGGTGCAGAGGA-GT GTGTCCTGCAGATGGGGGGCGTGTTATGC CCCC GCC-CTGGCTGTGGAGCGGGGCTGCTGCCGGAGCCTGACCAG-AGGAAAGTCACCTGCGAAGGGGGCAATGGCCTGGGCTG-TGGGTTTGCCTTCTGCCGGGAATGTAAAGAAGCGTACC-ATGAAGGGGAGTGCAGTGCCGTATTTGAAGCCTCAGGA-ACAACTACTCAGGCCTACAGAGTCGATGAAAGAGCCGC-CGAGCAGGCTCGTTGGGAAGCAGCCTCCAAAGAAACCA-TCAAGAAAACCACCAAGCCCTGTCCCCGCTGCCA GTAC-

CAGTGGAAAAAAATGGAGGCTGCATGCACATGAAGTG T-CCGCAGCCCCAGTGCAGGCTCGAGTGGTGCTGGAACTGT GGCTGCGAGTGGAACCGCGTCTGCATGGGGGACCACTG-GTTCGACGTGTAGCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGCA-GTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCGCCCCTCTCC

比对结果说明:所测得 *Parkin* 过表达质粒序列与所提供的对比序列完全一致。

2.2 转染后荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达及转染效率的测定

荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光蛋白(GFP)的表达。结果显示,阴性对照组和 *Parkin* 过表达组细胞内可观察到较多的绿色荧光蛋白表达,而正常组细胞没有观察到,提示质粒成功转染至细胞内。结果见图 2。

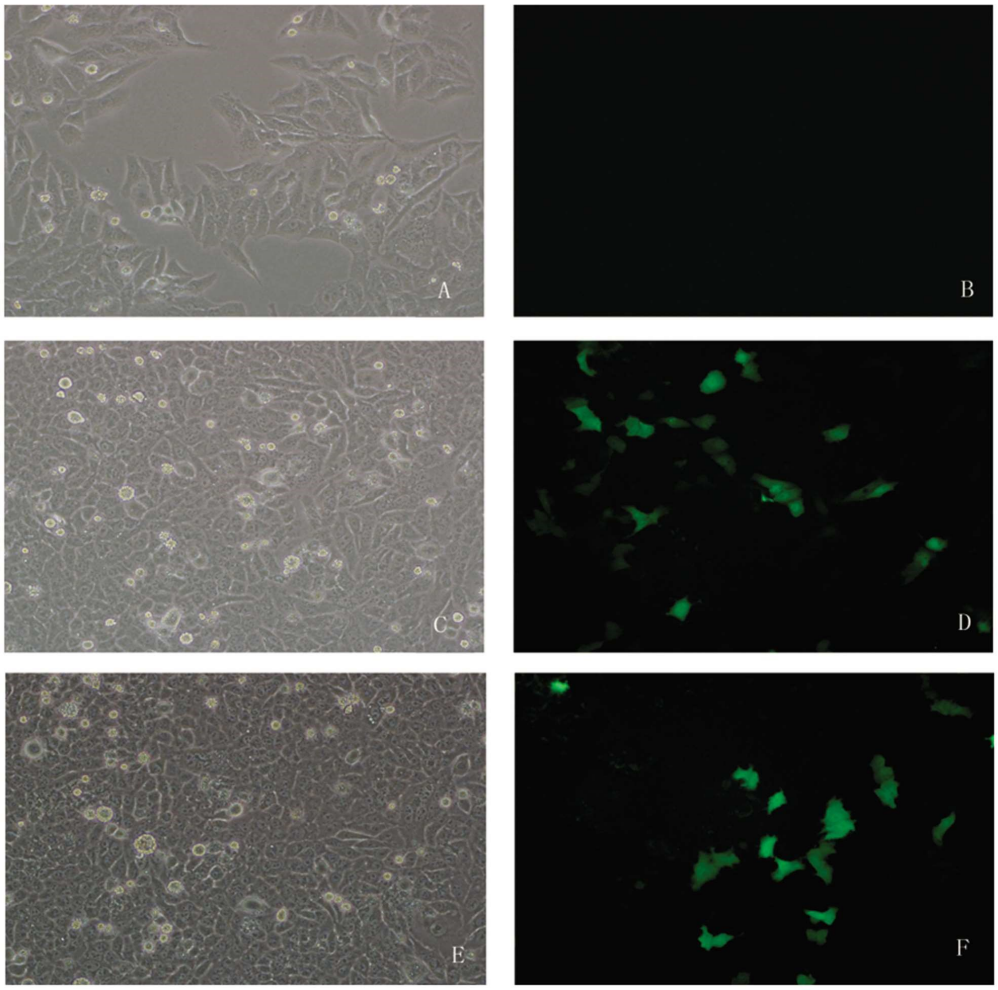

图 2 A:正常对照组(明场);B:正常对照组(暗场);C:阴性对照组(明场);D:阴性对照组(暗场);E:*Parkin* 过表达组(明场);F:*Parkin* 过表达组(暗场)

Fig. 2 A:Normal control(bright field); B: Normal control(dark field); C:Negative control(bright field); D:Negative control(dark field); E:*Parkin* overexpression(bright field); F: *Parkin* overexpression(dark field)

对明场及暗场荧光细胞计数,得:转染效率 = 暗场荧光细胞个数 / 明场细胞个数。结果见表 2。

表 2 质粒的转染效率

Table 2 The transfection efficiency of plasmid

Groups	The transfection efficiency (%)
Normal Control	0
Negative Control	36.41
Parkin Overexpression	34.71

2.3 转染后 SH-SY5Y 细胞内 Parkin mRNA 表达情况

荧光定量 PCR(RT-PCR)结果显示,Parkin 过表达质粒转染后,正常对照组与阴性对照组的 Parkin mRNA 水平没有明显差异(P>0.05);而与正常对照组和阴性对照组相比,Parkin 对照组的 *Parkin* mRNA 表达量有明显提高(P<0.01),结果表 3 和图 3。

另外,RT-PCR 的溶解曲线(Melt Curve)分析结果显示,*Parkin* 扩增产物的特异性良好,40 个扩增循环中没有引物二聚体的产生,溶解峰为 79.16 ℃。

表 3 *Parkin* 的相对表达量($\bar{x}\pm$ s; n=3)

Table 3 The relative expression of *Parkin* at mRNA level($\bar{x}\pm$ s;n=3)

Groups	The relative expression of *Parkin* ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Normal Control	1.79± 1.26
Negative Control	3.40± 3.02
Parkin Overexpression	356659.84± 38524.17**##

Note: Compared to the normal control group, **P<0.01; Compared to the negative control group, ##P<0.01.

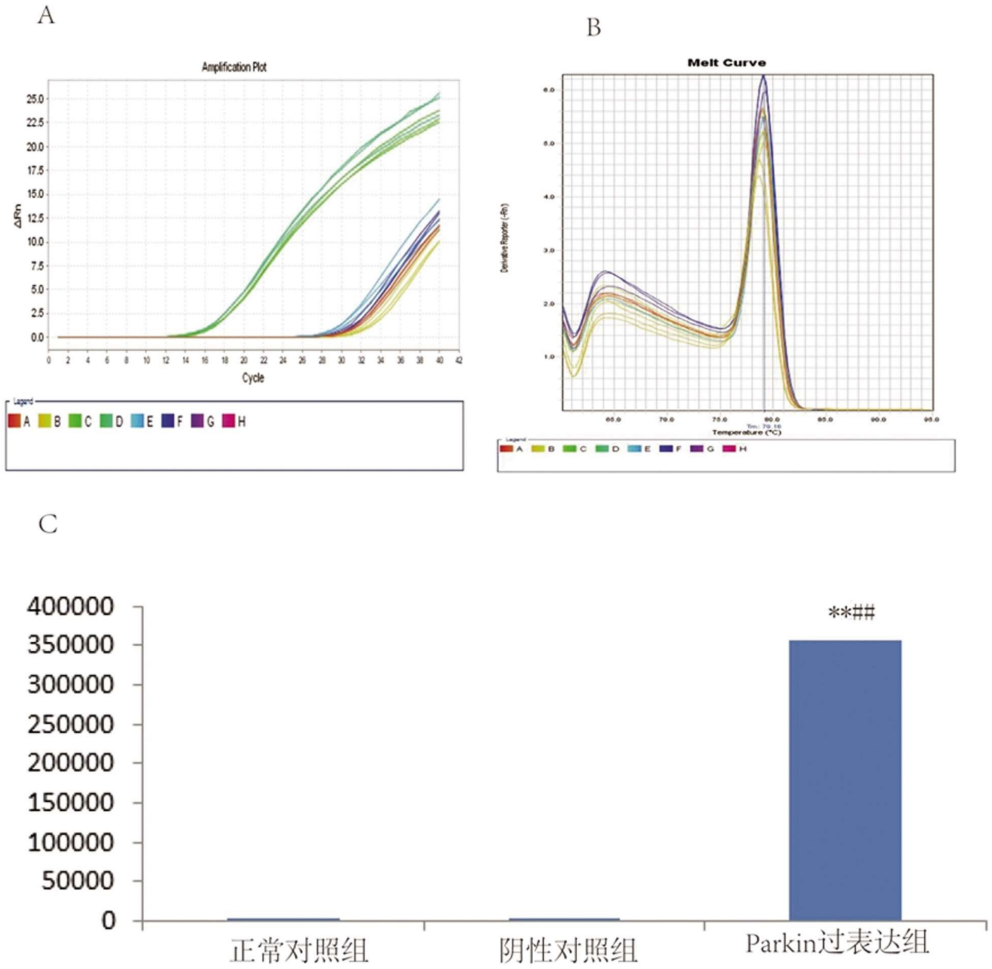

图 3 *Parkin* 过表达质粒转染后 SH-SY5Y 细胞 Parkin mRNA 的相对表达情况

Fig.3 The relative expression of *Parkin* at mRNA level in the transfection of SH-SY5Y cells A:RT-PCR 的扩增曲线 B:溶解曲线 C:采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析各组 *Parkin* mRNA 的相对表达量,与正常对照组比较,*P<0.05;与阴性对照组比较,#P<0.05

A: The amplification curve of RT-PCR B: Melt curve C: The relative expression of Parkin at mRNA level, Compared with the normal control, *P<0.05; Compared with the negative control , #P<0.05

2.4 Western Blot 法检测转染后 SH-SY5Y 细胞内 *Parkin* 蛋白的表达水平

Western Blot 结果显示，正常对照组与阴性对照组的 *Parkin* 蛋白表达水平没有明显差异（P>0.05）;*Parkin* 过表达组的 *Parkin* 蛋白水平较正常对照组和阴性对照组有显著提高（P<0.01）,提高了约 60 %。结果见表 4 和图 4。

表 4 Parkin 蛋白的相对表达水平($\bar{x}\pm$ s; n=3)

Table 4 The relative expression of Parkin at protein level($\bar{x}\pm$ s; n=3)

Group	The relative transcript level of Parkin
Normal Control	0.72± 0.18
Negative Control	0.72± 0.17
Parkin Overexpression	1.79± 0.30**##

Note: Compared to the normal control group, ** P<0.01; Compared to the negative control group, ##P<0.01.

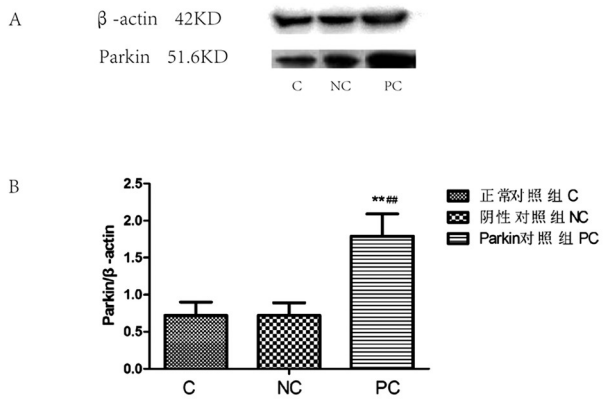

图 4 *Parkin* 过表达质粒转染后 SH-SY5Y 细胞内 Parkin 蛋白的相对表达情况:与正常对照组比较,**P<0.01;与阴性对照组比较,##P<0.01

Fig.4 The relative expression of *Parkin* at protein level in the transfection of SH-SY5Y cells: Compared with the normal control, **P<0.01; Compared with the negative control, ##P<0.01

3 讨论

Parkin 基因,又称 PARK2,最早是由 Matsumine 等人[2]于 1997 年研究日本 13 个常染色体隐性遗传性青少年型 PD 家系时发现的。后研究发现 *Parkin* 作为帕金森病的遗传易感基因之一,其突变和蛋白功能缺陷可导致 PD[3-6]。*Parkin* 蛋白属于 E3

泛素连接酶(ubiquitin-proteasome, Ub)的环指结构家族[7],主要功能区为 RING1-IBR-RING2 环,作为细胞内重要的监视系统,能及时地清除或降解细胞内发生错误折叠或功能异常的蛋白质,从而维持细胞内稳态,起到保护细胞的作用[8]。早期的研究发现,*Parkin* 蛋白在中脑的黑质和蓝斑处的神经元表达丰富,而帕金森病人黑质的 *Parkin* 含量明显降低,提示 *Parkin* 可能在这些区域的神经元中发挥重要作用[9,10]。此外,研究发现,*Parkin* 在维持线粒体质量方面发挥着重要的作用[11]。可以与线粒体DNA 直接结合,并激发线粒体自我修复过程[12]。*Parkin* 突变患者线粒体的功能和形态严重受损;*Parkin* 基因敲除可出现了线粒体形态的异常和功能紊乱[13-15]。因此,*Parkin* 成为目前帕金森病研究热点之一。对 *Parkin* 的进一步研究,尤其是对它的作用方式和功能的研究,在有助于阐明帕金森病的发病机制的同时,也为临床新治疗靶点的发现提供实验依据。人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞系是一种分化程度较低的肿瘤细胞,繁殖快,其细胞形态、生理和生化特性与多巴胺神经元相似,被广泛应用于神经系统疾病发病机制和药物作用机制方面的研究。故本实验选此细胞, 旨在构建 *Parkin* 基因过表达的细胞模型,为进一步研究 *Parkin* 基因在帕金森病中的作用奠定基础。

基因转染技术是将纯化的含有靶基因的质粒 DNA 送入细胞内,并在细胞内表达。转染的方法有很多,根据不同的细胞,贴壁或悬浮等可选用不同的方法,主要有物理介导、化学介导和生物介导三类途径。由于物理介导途径和化学介导中的磷酸钙法实验条件控制较严、难度较大,病毒法的前期准备较复杂,常常对细胞类型有很强的选择性,而且可能对细胞有较大的影响,在一般实验室中很难普及。因此本实验采用脂质体法进行瞬时转染,适用性广,重复性好[16,17]。本研究选用 Lipofectamine® 3000 转染试剂,通过脂质体包裹 DNA 转导技术将 *Parkin* 过表达质粒转染入 SH-SY5Y 细胞。带正电的阳离子脂质体作为体内外输送载体的工具,可与带负电的 DNA 结合,形成 DNA- 阳离子脂质体复合物,从而吸附到带负电的细胞膜表面,经过内吞作用被导入细胞中,转导细胞相对无害,重复性较好。转染完成之后,通过荧光显微镜观察细胞绿色荧光蛋白表达情况,明、暗场细胞计数对比其转染效率,实时荧光 PCR 和 Western Blot 技术检测 *Parkin* mRNA 和蛋白的表达水平, 从而对转染的效果进行鉴定。实验结果显示,转染的两组细胞可观测到较多的绿色荧光蛋白表达,而正常组细胞没有检测到荧光蛋白;另外,正常对照组和阴性对照组在 *Parkin* 的 mRNA 和蛋白水平的表达均没有明显差异($P>0.05$);而与正常对照组和阴性对照组相比,转染 *Parkin* 过表达质粒后,SH-SY5Y 细胞内的 *Parkin*mRNA 和蛋白的表达都显著提高($P<0.05$),提示 *Parkin* 过表达质粒转染 SH-SY5Y 细胞成功, 表明此法可成功构建 *Parkin* 过表达细胞模型,为进一步的实验奠定了基础。

本课题组近年来致力于从线粒体基因及相关基因调控的角度探求中医药防治帕金森病的作用环节,已成功构建神经毒素 1- 甲基 -4- 苯基吡啶(MPP+) 诱导的 PD 细胞模型和 DJ-1 基因过表达 PD 细胞模型,并探讨了中药复方的作用机制[18-20]。和本实验成功构建了 *Parkin* 基因过表达细胞模型,为本课题组进一步探索 *Parkin* 在 PD 的发病中对线粒体形态和功能的影响,以及中医药防治 PD 的分子机制提供了可靠的实验基础。

参 考 文 献(References)

[1] Xiong P, Chen X, Zhang N. Advance in studies on pathological mechanism of Parkinson's disease and traditional Chinese medicine experiments in prevention and treatment of Parkinson's disease [J]. Chin J Chin Mater Med, 2012, 37(5): 686-691

[2] Matsumine H, Shimoda MS, et al. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27[J]. Am J Hum Genet, 1997, 60(3): 588-596

[3] Delamarre A, Meissner WG. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease [J]. Presse Med, 2017, 46 (2): 175-181

[4] Walden H, Muqit MM. Ubiquitin and Parkinson's disease through the looking glass of genetics[J]. Biochem J, 2017, 474(9): 1439-1451

[5] Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease[J]. Neuron, 2015, 85(2): 257-273

[6] Marjan S, Guennadi Kozlov, Kalle Gehring. Parkin structure and function[J]. FEBS Journal, 2015, 282(2015): 2076-2088

[7] Ziviani E, Tao RN, Whitworth AJ. Drosophila parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin [J]. Proc-Natl. Acad Sci USA, 2010, 107: 5018-5023

[8] Chakraborty J, Basso V, Ziviani E. Post translational modification of Parkin[J]. Biol Direct, 2017, 12(1): 1-11

[9] Dalfo E, Portero OV, Ayala V, et al. Evidence of oxidative stress in the neocortex in incidental Lewy body disease [J]. J Neu ropathol Exp Neurol, 2015, 64: 816-830

[10] Ham SJ, Lee SY, Song S, et al. Interaction between RING1 (R1) and the Ubiquitin-like (UBL) Domains Is Critical for the Regulation of Parkin Activity[J]. J Biol Chem, 2016, 291(4): 1803-1816

[11] Rüb C, Wilkening A, Voos W. Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system[J]. Cell Tissue Res, 2017, 367(1): 111-123

[12] Rothfuss O, Fischer H, Hasegawa T, et al. Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair [J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(20): 3832-3850

[13] Pacelli C, De Rasmoa D, Signorile A, et al. Mitochondrial defect and PGC-1α dysfunction in parkin-associated familial Parkinson's disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812: 1041-1053

[14] Greene JC, Whitworth AJ, Andrews LA. Genetic and genomic studies of Drosophila parkin mutants implicate oxidative stress and innate immune responses the proapoptotic function of Bax [J]. Hum Mol Genet, 2005, 14: 799-811

[15] Müftüglu M, Elibol B, Dalm Inodot. Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations [J]. Mov Disord, 2003, 19(5): 544-548

[16] 卢莎,谭文杰,张玲,等. 脂质体转染法与电转染法在丙型肝炎病毒 RNA 转染人肝癌细胞中的应用效果比较 [J]. 山东医药, 2016, 56 (19): 15-18
Lu Sha, Tan Wen-jie, Zhang Ling, et al. The application effect of liposomes transfection and electrotransfer in HCC cells was compared [J]. Shandong Medical Journa, 2016, 56(19): 15-18

[17] Lu J, Xiang Y, Tao WY, et al. A novel strategy to develop a robust infectious hepatitis C virus cell culture system directly from a clinical isolate[J]. J Virol, 2014, 88(3): 1484-1491

(下转第 406 页)

hydrocarbon receptor controls cell-fate decisions in B cells [J]. J Exp Med, 2017, 214(1): 197-208

[11] Lea-Henry TN, Jiang SH. Simian immunodeficiency virus confounds T follicular helper T cells and the germinal centre [J]. Ann Transl Med, 2016, 4(24): 520

[12] Lee P, Zhu Z, Hachmann J, et al. Differing Requirements for MALT1 Function in Peripheral B Cell Survival and Differentiation [J]. J Immunol, 2017, 198(3): 1066-1080

[13] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex [J]. Science, 2005, 307(5712): 1098-1101

[14] Hresko RC, M Mueckler. mTOR. RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes [J]. J Biol Chem, 2005, 280(49): 40406-40416

[15] Lawlor MA, Mora A, Ashby PR, et al. Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice [J]. EMBO J, 2002, 21 (14): 3728-3738

[16] Kang JA, Jeong SP, Park D, et al. Transition from Heterotypic to Homotypic PDK1 Homodimerization Is Essential for TCR-Mediated NF-κB Activation[J]. J Immunol, 2013, 190(9): 4508-4515

[17] Venigalla RK, McGuire VA, Clarke R, et al. PDK1 regulates VDJ recombination, cell-cycle exit and survival during B-cell development [J]. EMBO J, 2013, 32(7): 1008-1022

[18] Baracho GV, Cato MH, Zhu Z, et al. PDK1 regulates B cell differentiation and homeostasis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(26): 573-578

[19] Yoshiko Matsuda, Masataka Haneda, Kenji Kadomatsu, et al. A proliferation-inducing ligand sustains the proliferation of human naïve ($CD27^-$) B cells and mediates their differentiation into long-lived plasma cells *in vitro* via transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor and B-cell mature antigen [J]. Cell Immunol, 2015, 295(2): 127-136

[20] Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B Cells, Antibodies, and More [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2016, 11(1): 137-154

[21] Durand J, Chiffoleau E. B cells with regulatory properties in transplantation tolerance[J]. World J Transplant, 2015, 5(4): 196-208

[22] Hinton HJ, Alessi DR, Cantrell DA. The serine kinase phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) regulates T cell development[J]. Nat Immunol, 2004, 5(5): 539-545

[23] Park SG, Long M, Kang JA, et al. The kinase PDK1 is essential for B-cell receptor mediated survival signaling[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55378

[24] Pérez-García A, Pérez-Durán P, Wossning T, et al. AID expressing epithelium is protected from oncogenic transformation by an NKG2D surveillance pathway[J]. EMBO Mol Med, 2015, 7(10):1327-1336

[25] Mattias ND Svensson, Karin ME. Anderssona, Caroline Wasén, et al. Murine germinal center B cells require functional Fms-like tyrosine kinase 3 signaling for IgG1 class-switch recombination [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(48): E6644-53

[26] Yasushi Hara, Yasuyuki Tashiro, Akikazu Murakami, et al. High affinity IgM^+ memory B cells are generated through a germinal center -dependent pathway[J]. Mol Immunol, 2015, 68(2 Pt C): 617-627

[27] Tarlinton DM, KG Smith. Dissecting affinity maturation: a model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centr[J]. e. Immunol Today, 2000, 21(9): 436-441

[28] Fransson S, Abel F, Kogner P, et al. Stage-dependent expression of PI3K/Akt pathway genes in neuroblastoma [J]. Int J Oncol, 2013, 42 (2): 609-616

[29] Yasuhiro Itoh. A balancing Akt: How to fine-tune neuronal migration speed[J]. Neurogenesis (Austin), 2016, 3(1): e1256854

（上接第 412 页）

[18] 马凌，孙红梅，龚小钢，等. 牵正散合大补阴丸对 MPP+ 诱导的 SH-SY5Y 细胞帕金森病模型线粒体的保护作用[J].世界中西医结合杂志, 2015, 10(4): 487-492

Ma Ling, Sun Hong-mei, Gong Xiao-gang, et al. Protective Effect of Dabuyin Wan plus Qianzheng San on Mitochondria in SH-SY5Y Cells in Parkinson's Disease Model[J]. The world's integrated western medicine journal, 2015, 10(4): 487-492

[19] Yi Zhang, Gong Xiao-gang, Wang Zhen-zhen, et al. Protective effects of DJ-1 medicated Akt phosphorylation on mitochondrial function are promoted by Da-Bu-Yin-Wan in 1-methyl-4-phenylpyridinium-treated human neuroblastoma SH-SY5Y cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 187: 83-93

[20] Yi Zhang, Gong Xiao-gang, Wang Zhen-zhen, et al. Overexpression of DJ-1/PARK7, the Parkinson's disease-related protein, improves mitochondrial function via Akt phosphorylation on threonine 308 in dopaminergic neuron-like cells[J]. European Journal of Neuroscience, 2016, 43(10): 1379-1388