

A53T α -synuclein 抑制 SH-SY5Y 细胞 2 型 囊泡单胺转运体的表达

满建梅, 郭军堂, 张代娟, 陈安琪

(潍坊医学院临床医学院, 潍坊 261053)

【摘要】 目的 研究稳定表达 A53T α -synuclein 对神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞中 2 型囊泡单胺转运体 (VMAT2) 蛋白表达的影响。**方法** 构建 A53T α -synuclein 真核表达载体, 用脂质体 lipofectamineTM2000 转染 SH-SY5Y 细胞, 经 G418 筛选获得稳定转染单克隆细胞株; 分别采用 Western blotting 及 DCFH-DA 染色检测细胞系 A53T α -synuclein 过表达对 VMAT2 蛋白的表达及细胞内活性氧类物质 (ROS) 水平的影响。**结果** Western blotting 结果显示 VMAT2 的表达在稳定表达 A53T α -synuclein 的细胞系中明显降低。DCFH-DA 染色结果显示稳定表达 A53T α -synuclein 细胞系内 DCF signal (507.3 ± 7.1) 较对照组 (410.7 ± 10.5) 明显增多 ($P < 0.05$)。**结论** A53T α -synuclein 能够通过抑制 VMAT2 的表达, 增加细胞内的 ROS 水平, 在帕金森病的发病过程中发挥重要作用。

【关键词】 帕金森氏病; A53T α -synuclein; VMAT2

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0066-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.010

A53T α -synuclein decreases the expression of type 2 vesicular monoamine transporter in neuroblastoma SH-SY5Y cells

MAN Jian-mei, GUO Jun-tang, ZHANG Dai-juan, CHEN An-qi

(School of Clinical Medicine, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of A53T α -synuclein on the expression of type 2 vesicular monoamine transporter (VMAT2) in neuroblastoma SH-SY5Y cells stably expressing A53T α -synuclein. **Methods** A53T α -synuclein eukaryotic plasmid was constructed by transfection of the SH-SY5Y cells using LipofectamineTM2000, and a stable transfected monoclonal cell line was selected by G418. Western blotting and DCFH-DA staining were used to detect the effect of A53T α -synuclein overexpression on the expression of VMAT2 protein and level of reactive oxygen species (ROS). **Results** Western blotting showed that compared with the control group, the expression of VMAT2 protein was significantly decreased, and DCFH-DA staining showed that DCF signal was significantly increased (507.3 ± 7.1) than that in the cell line stably expressing A53T α -synuclein (410.7 ± 10.5) ($P < 0.05$). **Conclusions** A53T α -synuclein can increase the intracellular ROS level by inhibiting the expression of VMAT2, thereby playing an important role in the pathogenesis of Parkinson's disease.

【Key words】 Parkinson's disease; A53T α -synuclein; VMAT2

[基金项目] 山东省自然科学基金(ZR2011HM014); 山东省自然科学基金(ZR2015HL126)。

[作者简介] 满建梅(1989-), 女, 硕士研究生, 专业: 病理学与病理生理学。Email: 1192746984@qq.com。

[通讯作者] 陈安琪(1981-), 女。Email: chen安琪_1981@163.com。

帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)的主要病理特征是黑质多巴胺能神经元的选择性变性及 Lewy body (LB) 的形成, α -synuclein 是 LB 的重要成分^[1]。A53T α -synuclein 是人们在常染色体显性家族 PD 患者中发现的突变体^[2], 与 PD 的发病密切相关, 但具体机制还不清楚。研究发现 A53T α -synuclein 可与 VMAT2 在体外发生特异性分子间相互作用^[3], 提示 A53T α -synuclein 参与了多巴胺(DA)的代谢调节过程, 在 PD 的多巴胺神经元选择性变性过程中发挥作用。本研究目的是建立稳定表达 A53T α -synuclein 的细胞系, 并研究其对 VMAT2 蛋白表达的影响, 为研究 PD 的发病机制提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞购自中国医学科学院基础所细胞中心; 携带 A53T α -synuclein 的 T 载体及 β -半乳糖苷酶的 pcDNA3.0-LacZ 真核细胞表达载体为本室保存; Lipofectamine™ 2000 购自 Gibco BRL; 山羊抗人 VMAT2 多克隆抗体、小鼠抗人 α -synuclein 多克隆抗体、小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自 Santa Cruz; 辣根酶(HRP)标记 IgG 购自中杉金桥; XhoI、HindIII、T₄ DNA 连接酶、高保真 Pyrobest DNA 聚合酶购自大连宝生物; 2'-7'-二氯荧光素双醋酸盐 (DCFH-DA)、X-gal 购自 Sigma; G418 购自 Amersco; PCR 引物由上海博亚公司合成。

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体构建: 合成正义引物 cttcataagcttcgacagtgtgtg(含 HindIII 内切酶位点)和反义引物 taagatctcgaggaaactgggagcaag(含 XhoI 内切酶位点), 以携带 A53T α -synuclein 的 T 载体为模板进行 PCR 反应。条件: 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 25 个循环。回收的 PCR 产物与 pcDNA3.0 分别用 HindIII 和 XhoI 酶切。酶切产物纯化后加入 T₄ 连接酶 4℃ 连接过夜后转化 DH 5 α 感受态大肠杆菌, 挑取单菌落小量扩增, 提取质粒, 用 HindIII 和 XhoI 酶切鉴定并进行测序, 测序正确的克隆命名为 pcDNA3.0-A53T。

1.2.2 细胞培养及转染: 将 SH-SY5Y 接种于高糖 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清, 100 IU/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素)中, 37℃, 5% CO₂ 培养; 取对数生长期细胞接种到 24 孔板内, 当细胞密度达到

50% ~ 80% 时, 按照脂质体 Lipofectamine™ 2000 (Gibco BRL) 说明书进行转染。24 h 后加入抗生素含 G418 的完全培养基进行持续筛选, 两周后挑选单克隆进行扩大培养并继续保持筛选压力到 2 个月以上。稳定表达 A53T α -synuclein 的细胞系为实验组, 稳定表达 β -半乳糖苷酶的细胞系为对照组。

1.2.3 β -半乳糖苷酶活性检测: 培养细胞 72 h 后, 用冰冷的 PBS 洗涤细胞两次, 10% 甲醛固定液室温固定 5 min。PBS 洗涤两次后加入 X-gal 染色液(1g/L), 37℃ 孵育 12 h。显微镜下观察, 蓝染细胞为表达 β -半乳糖苷酶阳性细胞。

1.2.4 Western blotting 检测蛋白表达: 胰酶消化细胞后, 1 000 g 离心 10 min, PBS 洗 3 次后, 弃上清液, 加入 1/5 体积的 6 $\times$ SDS 蛋白质上样缓冲液, 混匀后 100℃ 煮沸 10 min 进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 蛋白转移到 PVDF 膜后, 用 TBST 稀释的 5% 脱脂奶粉室温摇动封闭 1 h, 一抗(VMAT2 抗体 1:500, α -synuclein 抗体 1:500, β -actin 抗体 1:500)室温孵育 4 h, 1:5 000 二抗室温孵育 1 h, ECL 化学发光与曝光。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平: 培养细胞 24 h 后, 用胰酶进行消化; 将细胞重新悬浮于预冷的无血清培养基中, 加入 DCFH-DA(10 μ mol/L), 孵育 20 min 后, 离心收集细胞, PBS 重新洗涤细胞 3 次, 最后重新悬浮于 500 μ L PBS, 流式细胞仪(E6155, BD FACS Calibur)中检测荧光强度, 每次 10 000 个, 重复 3 次, 记录平均 DCF signal。

1.2.6 统计学方法: 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。统计学方法采用 *t* 检验。

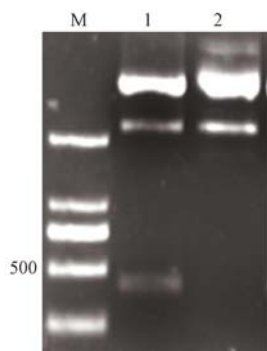
2 结果

2.1 pcDNA3.0-A53T 真核表达载体的鉴定

Hind III 和 XhoI 双酶切 pcDNA3.0 和 pcDNA3.0-A53T, 酶切产物电泳可见 1 泳道有 500 bp 左右大小的条带, 与预期结果一致(见图 1)。DNA 测序结果与 Genbank 报道的序列一致。

2.2 稳定表达 β -半乳糖苷酶细胞系的鉴定

真核表达载体 pCMVSYN-A53T 没有 β -半乳糖苷酶基因, 在细胞中无法产生 β -半乳糖苷酶, 无法作用于 X-gal 中的吡啶环而显蓝色。相反, 稳定转染 β -半乳糖苷酶基因的细胞系能够产生 β -半乳糖苷酶, 细胞则有明显的蓝染, 提示 β -半乳糖苷酶在细胞系中稳定表达。如图 2 所示。

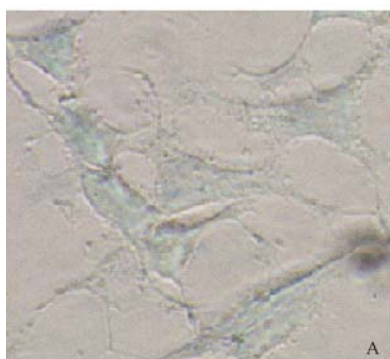


M: DNA marker; 1: pcDNA3.0-A53T; 2: pcDNA3.0

图1 pcDNA3.0-A53T 真核表达载体的酶切鉴定

M: DNA marker; Lane 1: pcDNA3.0-A53T; Lane 2: pcDNA3.0.

Fig. 1 Identification of eukaryotic expression vector pcDNA3.0-A53T

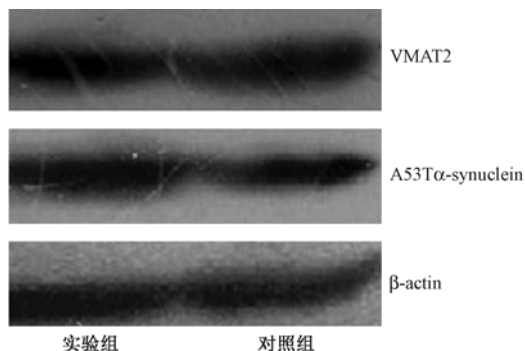


注: A: 稳定表达 β-半乳糖苷酶细胞系; B: 稳定表达 A53Tα-synuclein 细胞系

图2 X-gal 染色检测 β-半乳糖苷酶的表达

Note. A: Cells stably expressing β-galactosidase; B: Cells stably expressing A53T α-synuclein.

Fig. 2 The detection of β-galactosidase by X-gal staining



注: 实验组: 稳定表达 A53Tα-synuclein 细胞系;
对照组: 稳定表达 β-半乳糖苷酶细胞系

图3 Western blotting 检测 A53T α-synuclein 及 VMAT2 的表达

Note. Experimental group: Cells stably expressing A53T α-synuclein. Control group: Cells stably expressing β-galactosidase.

Fig. 3 Expression of A53T α-synuclein and VMAT2 detected by Western blotting

2.3 Western blotting 结果

Western blotting 结果显示,在 SH-SY5Y 细胞中有野生型 α-synuclein 蛋白的表达,但 α-synuclein 蛋白的表达量在稳定转染 A53T α-synuclein 的细胞系中(实验组)较稳定表达 β-半乳糖苷酶细胞系(对照组)明显增多,提示细胞系中有 A53T α-synuclein 的过表达,而 VMAT2 在实验组中的表达量较实验组明显降低。如图 3 所示。

2.4 细胞内 ROS 水平的变化

如图 4 所示,稳定表达 A53T α-synuclein 细胞系的 DCF signal (507.3 ± 7.1) 较稳定表达 β-半乳糖苷酶细胞系 (410.7 ± 10.5) 明显增高 ($P < 0.05$),提示 A53Tα-synuclein 过表达能够明显增加细胞 ROS 的产生。

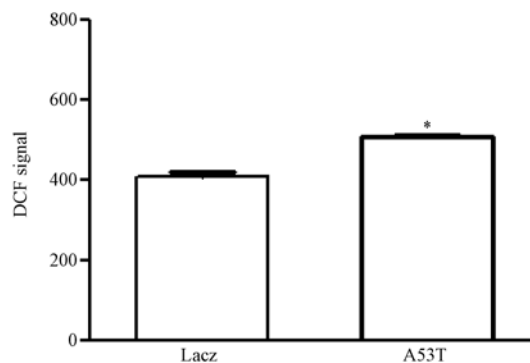


图4 细胞系内 ROS 水平的变化

Fig. 4 Changes of intracellular ROS level

3 讨论

α-Synuclein 是一种具有非 β-淀粉样结构(NAC)的可溶性蛋白质,主要分布于中枢神经系统突触前末梢和核周,在突触囊泡转运、神经递质的

释放及多巴胺的代谢过程中具有重要的调节作用^[4,5]。 α -Synuclein 蛋白正常、错误折叠及其寡聚化之间存在动态平衡,失衡后如出现大量错误折叠,会导致寡聚体及纤维体的形成。Peelaerts W 等^[6]认为纤维态是主要的毒性物质,它可引起进行性运动功能损害和细胞死亡,具体的机制尚不清楚。目前研究认为导致 PD 发病的重要因素可能与 DA 异常代谢产生的 ROS 有关,它能够引起神经元的氧化损害^[7]。细胞内的 DA,尤其是 DA 的代谢产物能够与 α -synuclein 相互作用,促进 α -synuclein 的异常聚集及纤维化,形成 LB 小体^[8]。生理条件下,多巴胺一旦在神经元中合成,立即可以通过 VMAT2 转运到突触囊泡中进行储存,否则中枢神经系统内的 DA 能够通过自身氧化和酶降解产生 ROS^[9]。

本研究通过 Western blotting 检测显示 A53T α -synuclein 在 SH-SY5Y 细胞系中稳定高效表达,为进一步研究 PD 发病机制提供了良好的细胞模型。在稳定表达 A53T α -synuclein 细胞系中的 VMAT2 表达水平明显低于对照组,提示其有抑制 VMAT2 蛋白表达的作用。为了进一步探讨 A53T α -synuclein 抑制 VMAT2 表达可能对细胞系产生的影响,我们通过 DCFH-DA 染色检测细胞内 ROS 水平的变化,结果显示 A53T α -synuclein 过表达能够明显的增加细胞内的 ROS 水平,这可能与抑制 VMAT2 的表达有密切的关系。据此,我们认为过表达的 A53T α -synuclein 作用于 VMAT2,下调其蛋白表达水平,打破了细胞内 DA 的平衡,致使细胞内 ROS 累积,

造成对细胞的损害。A53T α -synuclein 如何影响 VMAT2 基因的表达及具体功能有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies [J]. *Nature*, 1997, 388(6645): 839–840.
- [2] Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease [J]. *Science*, 1997, 276(5321): 2045–2047.
- [3] 陈安琪,王建英,牟青杰,等. A53T α -synuclein 与 II 型单胺囊泡转移体相互作用的鉴定[J]. *中国临床实用医学*, 2008 (7): 43–45.
- [4] Lashuel HA1, Overk CR, Oueslati A, et al. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(1): 38–48.
- [5] Venda LLI, Cragg SJ, Buchman VL, et al. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease [J]. *Trends Neurosci*, 2010, 33(12): 559–568.
- [6] Peelaerts W, Bousset L, Van der Perren A, et al. α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration [J]. *Nature*, 2015, 522(7556): 340–344.
- [7] Jenner P, Olanow CW. Understanding cell death in Parkinson's disease [J]. *Ann Neurol*, 1998, 44(3 Suppl 1): S72–84.
- [8] Follmer C, Romão L, Einsiedler CM, et al. Dopamine affects the stability, hydration, and packing of protofibrils and fibrils of the wild type and variants of α -synuclein [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(4): 472–482.
- [9] Parsons SM. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage [J]. *FASEB J*, 2000, 14(15): 2423–2434.

[修回日期]2016–03–09