

论著·基础研究

MeCP2、TH 蛋白在正常 SH-SY5Y 细胞和帕金森病细胞模型中的表达及其意义研究

潘 燕

(湖北省十堰市东风总医院神经内科 3 病区,湖北十堰 442000)

摘要:目的 探讨 MeCP2、TH 蛋白在正常 SH-SY5Y 细胞和帕金森病细胞模型中的表达及其意义。方法 实验分为 3 组:空白对照组,未转染;模型对照组;pEGFP-N1-MeCP2 组,转染液加入重组 pEGFP-N1-MeCP2 质粒。除空白对照组外,其余二组均加入 6-羟多巴胺(6-OHDA) 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理 24 h。用 CCK-8 法、流式细胞仪检测正常 SH-SY5Y 细胞、上调 MeCP2 表达的 SH-SY5Y 细胞在 6-OHDA 诱导下细胞活性及细胞凋亡的变化;免疫荧光技术和 Western blot 法检测各组 SH-SY5Y 细胞中 MeCP2 蛋白、TH 蛋白表达的变化。结果 CCK-8 法检测及流式细胞仪 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞、上调 MeCP2 的 SH-SY5Y 细胞中细胞存活和凋亡情况发现,模型对照组与 pEGFP-N1-MeCP2 组、空白对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。双重免疫荧光检测 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞中的 MeCP2、TH 表达情况发现,模型对照组,6-OHDA(50.0 $\mu\text{mol/L}$) 诱导 24 h,MeCP2 和 TH 的蛋白表达显著下降($P < 0.05$)。Western blot 检测上调 MeCP2 表达后,6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞中的 MeCP2、TH 表达情况发现,pEGFP-N1-MeCP2 组上调组和空白对照组中 MeCP2、TH 蛋白表达与模型对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结论 转染 pEGFP-N1-MeCP2 重组质粒可抑制 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡,提高 TH 的表达,提高细胞存活率。

关键词:帕金森病; MeCP2; TH 蛋白; SH-SY5Y 细胞; 6-OHDA

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.05.004

中图法分类号:R741;R392.1

文章编号:1673-4130(2018)05-0526-04

文献标识码:A

Expression and significance of MeCP2 and TH protein in normal SH-SY5Y cells and Parkinson's disease cell model

PAN Yan

(The Third Area of Neurology Department, Dongfeng General Hospital of Shiyan, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of TH and MeCP2 protein in normal SH-SY5Y cells and Parkinson's disease cell model. **Methods** The experiment was divided into 3 groups: blank control group, non transfection; model control group; pEGFP-N1-MeCP2 group, transfection solution added to the recombinant pEGFP-N1-MeCP2 plasmid. In addition to the blank group, the remaining two groups were added 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA treatment for 24 hours. CCK-8 assay and flow cytometry were used to detect cell activity and apoptosis in normal SH-SY5Y cells and the SH-SY5Y cell with up-regulation of MeCP2 induced by 6-OHDA. Immunofluorescence and Western blot analysis were used to detect the changes of MeCP2 protein and TH protein expression in each group of SH-SY5Y cells. **Results** As for the cell survival and apoptosis of SH-SY5Y cells detected by CCK-8 assay and induced 6-OHDA of flow cytometry and SH-SY5Y cells with up-regulation of MeCP2 in model control group, compared to those in pEGFP-N1-MeCP2 group and the blank control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression of MeCP2 and TH in SH-SY5Y induced 6-OHDA cells was detected by double immunofluorescence, it was found that in model control group, with 6-OHDA (50.0 $\mu\text{mol/L}$) inducing for 24 hours, and the expression of MeCP2 and TH decreased significantly ($P < 0.05$). After Western blot was used to detect the up-regulation of MeCP2 expression, in 6-OHDA induced SH-SY5Y cells of MeCP2 and TH expression, the expression of MeCP2 and TH protein in pEGFP-N1-MeCP2 group and blank control group was statistically different from that in model control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The transfection of pEGFP-N1-MeCP2 recombinant plasmid could inhibit the apoptosis of SH-SY5Y cells induced by 6-OHDA, improve the expression of TH and in-

作者简介:潘燕,女,主治医师,主要从事脑血管病、帕金森病、头痛方面的研究。

本文引用格式:潘燕. MeCP2、TH 蛋白在正常 SH-SY5Y 细胞和帕金森病细胞模型中的表达及其意义研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(5): 526-529.

crease the cell survival rate.

Key words: Parkinson's disease; MeCP2; TH protein; SH-SY5Y cells; 6-OHDA

帕金森病是一种常见于老年人的黑质及黑质-纹状体通路变性所致的锥体外系疾病。MeCP2 最先出现于发育早的神经元内,如 Cajal-Retzius 细胞,其次在皮层深部如丘脑、下丘脑的神经元,最后出现于皮层浅部神经元,神经胶质细胞基本不表达 MeCP2。在神经元发育成熟以后,MeCP2 的表达量则维持在一个相对稳定的水平,提示 MeCP2 在神经元的发育、成熟及分化过程中起到重要的作用。研究发现,MeCP2 在神经元中既是一种多功能蛋白,也是一种重要的转录调控基因,因此,MeCP2 基因及其靶基因逐渐成为人们研究的热点^[1]。MeCP2 在调控神经元退行性病变、凋亡方面发挥着重要作用,能否通过调节 MeCP2 的表达,保护多巴胺能神经元,抑制其凋亡,并调节酪氨酸羟化酶的表达,以促进多巴胺的分泌,发挥治疗帕金森病的作用,为治疗帕金森病寻找新的切入点,本文进行了相应研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源及培养条件 人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞株购自美国 America Type Culture Collection(ATCC)细胞库,所需的培养基为 10%新生牛血清的 DMEM 培养基,内加青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μg/mL,置于 5% CO₂、饱和湿度、37 °C 恒温培养箱内培养。

1.1.2 主要试剂 6-OHDA、二甲基亚砜(DMSO)、一抗 MeCP2 大鼠抗人抗单克隆抗体购自美国 Sigma 公司;CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo Kumamoto 公司;Western blot 检测试剂盒购自上海晶美生物公司;ECL 发光试剂盒购自 Thermo 公司;Oligo(dT)18 购自北京生工生物;Annexin V-PE/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;蛋白提取试剂盒购自江苏碧云天;丽春红购自美国 Amresco 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 基因转染及分组 A 管:于 100 μL 无 FBS 的 DMEM 中加入 2 μg 纯化的 DNA;B 管:于 100 μL 无 FBS 的 DMEM 中加入 10 μL 的 lipofectamine。将 A 管和 B 管轻轻混合后室温静置 45 min,其间用 DMEM 洗涤细胞 2 次,在 800 μL 无 FBS 的混匀后轻轻加入细胞表面,37 °C,15 min。其间用于无 FBS 的 DMEM 洗涤待转染 DMEM 中加入 DNA-lipofectamine 混合物,5% CO₂ 培养 3~6 h,3 mL 完全培养液更换转染液,培养过夜。实验分为 3 组:空白对照组(未转染)、模型对照组、pEGFP-N1-MeCP2 组(转染液加入重组 pEGFP-N1-MeCP2 质粒)。除空白对照组外,其余 2 组均加入 50.0 μmol/L 6-羟多巴胺(6-OHDA)处理 24 h。

1.2.2 CCK-8 法检测上调 MeCP2 的 SH-SY5Y 细胞 6-OHDA 诱导后的细胞存活率 细胞消化后通过计数板计数,将细胞悬液的细胞密度调整为 2×10⁵ 个/mL,然后接种于 96 孔培养板中,每孔加 100 μL,共 4 块培养板,分别编号。实验步骤严格按照试剂盒说明书进行,培养 24 h 细胞贴壁后,分别加入终浓度为 12.5、25.0、50.0、100.0 μmol/L 的 6-OHDA 培养液 150 μL,同时设置空白对照组,随时镜下观察并照相。

1.2.3 流式细胞仪(Annexin-V/PI 双染色法)检测上调 MeCP2 的 SH-SY5Y 细胞 6-OHDA 诱导后的细胞凋亡情况 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,消化后通过计数板计数,将细胞悬液的细胞密度调整为 2×10⁵ 个/mL,然后接种于 50 mL 培养瓶中,分组,每组 3 瓶分别编号。培养 24 h 细胞贴壁后,转染 48 h 后再分别加入终浓度为 50.0 μmol/L 的 6-OHDA 培养液处理 24 h,设置空白对照组,随时镜下观察并照相,于 24 h 后收集各组细胞。其余步骤严格按照试剂盒说明书进行检测。

1.2.4 双重免疫荧光检测 将处理好的细胞爬片在 6 孔板里,用 0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)浸洗 3 次,每次 3~5 min,然后用 4%多聚甲醛固定 0.5 h。具体步骤严格按照试剂盒说明书进行,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 Western blot 检测上调 MeCP2 的 SH-SY5Y 细胞 6-OHDA 诱导后的细胞蛋白表达(MeCP2、TH)情况 将 SH-SY5Y 细胞利用无血清培养基清洗 3 遍,尽可能去除 6 孔板中残存的血清,将得到的转染混合物加入到培养孔中,轻轻来回晃动培养板,使转染混合物均匀分布于培养孔内,将培养板置于 37 °C 温箱中,每隔 1 h 轻轻来回晃动细胞培养板,6 h 后吸去转染复合物,用无血清 DMEM 洗 1 遍后,加入 2 mL 含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养。48~72 h 后收集细胞,提取蛋白。具体实验步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理 运用 SPSS15.0 统计软件进行分析,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 法检测 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞、上调 MeCP2 的 SH-SY5Y 细胞的存活情况 采用 CCK-8 法检测发现,与 pEGFP-N1-MeCP2 组相比,模型对照组 6 h 细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$),与空白对照组相比,模型对照组 12 h 和 24 h 细胞凋亡率均显著降低($P < 0.01$);pEGFP-N1-MeCP2 组与空白对照组各时间点细胞凋亡率差异均无统计学意义。

($P > 0.05$), 见表 1。

2.2 流式细胞仪检测 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞、上调 MeCP2 的 SH-SY5Y 细胞的凋亡情况 流式细胞仪检测发现, 空白对照组、模型对照组、pEGFP-

N1-MeCP2 组的细胞存活率分别为 $(2.52 \pm 0.47)\%$ 、 $(49.98 \pm 3.26)\%$ 、 $(0.98 \pm 0.07)\%$, 模型对照组显著高于空白对照组和 pEGFP-N1-MeCP2 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 CCK-8 法检测 3 组细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

| 组别 | 3 h | 6 h | 12 h | 24 h |
|------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| 空白对照组 | 0.987 ± 0.089 | 1.128 ± 0.062 | 1.162 ± 0.078 | 1.189 ± 0.079 |
| 模型对照组 | 0.949 ± 0.072 | 0.908 ± 0.062* | 0.716 ± 0.071# | 0.715 ± 0.072# |
| pEGFP-N1-MeCP2 组 | 0.989 ± 0.076 | 1.135 ± 0.068 | 1.182 ± 0.078 | 1.168 ± 0.072 |

注: 与 pEGFP-N1-MeCP2 组相比, * $P < 0.05$; 与空白对照组相比, # $P < 0.01$

2.3 双重免疫荧光检测 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞中的 MeCP2、TH 表达情况 pEGFP-N1-MeCP2 组 6-OHDA ($50.0 \mu\text{mol/L}$) 诱导 24 h, MeCP2 和 TH 蛋白表达均未下降, 与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型对照组细胞经 6-OHDA ($50.0 \mu\text{mol/L}$) 诱导 24 h, MeCP2 和 TH 蛋白表达水平显著下降, 见图 1。

MeCP2 组中 MeCP2、TH 蛋白表达与空白对照组相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2、图 2。

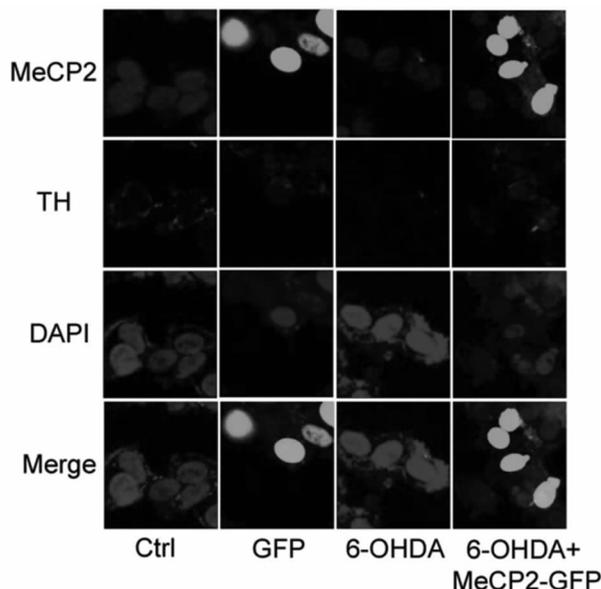


图 1 双重免疫荧光检测 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞中的 MeCP2、TH 表达情况 ($\times 200$)

表 2 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞 MeCP2、TH 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

| 指标 | 空白对照组 | 模型对照组 | pEGFP-N1-MeCP2 组 |
|-------|---------------|------------------|------------------|
| MeCP2 | 0.962 ± 0.072 | 0.314 ± 0.032* # | 0.902 ± 0.076 |
| TH | 0.512 ± 0.062 | 0.203 ± 0.054* # | 0.528 ± 0.049 |

注: 检测数据为灰度值与内参之比; 与 pEGFP-N1-MeCP2 组相比, * $P < 0.01$; 与空白对照组相比, # $P < 0.01$

2.4 Western blot 检测上调 MeCP2 表达后, 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞中的 MeCP2、TH 表达情况 SH-SY5Y 细胞转染上调质粒 pEGFP-N1-MeCP2, 然后用 6-OHDA 诱导 24 h, MeCP2 和 TH 蛋白表达水平均未下降, pEGFP-N1-MeCP2 组和空白对照组中 MeCP2、TH 蛋白表达水平与模型对照组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); pEGFP-N1-

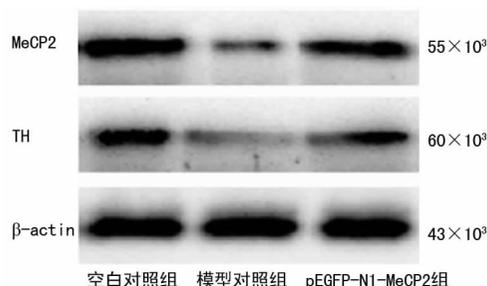


图 2 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞 MeCP2、TH 表达情况

3 讨论

MeCP2 在调控神经元退变、凋亡方面发挥着重要作用。随着年龄的增长, MeCP2 在脑组织中的表达大幅减少^[1-3], 神经元的功能逐渐下降, 但机制不明。在低氧和兴奋性毒性诱导干预的小脑颗粒神经元中, MeCP2 功能下降。完全 MeCP2 基因敲除小脑颗粒神经元早于野生型发生死亡; 在缺少 MeCP2 蛋白表达的 CGC 细胞与野生型相比, 神经元死亡明显较多, 其过程是缺少 MeCP2 蛋白引起线粒体功能紊乱, 线粒体释放 Caspase 和 AIF, 从而启动神经元凋亡。无 MeCP2 表达的小鼠脑组织中 Uqcrc1 过表达, Uqcrc1 可以显著增加线粒体呼吸容量, 减少呼吸效率, 过表达的 Uqcrc1 可导致 N2A 细胞 (小鼠神经元细胞) 线粒体呼吸功能的异常。体内实验显示, MeCP2 与 Uqcrc1 的启动子区结合, 无 MeCP2 表达的小鼠, Uqcrc1 表达增高并导致神经学上的症状。

本研究采用流式细胞仪通过 Annexin-V/PI 双染法观察了 SH-SY5Y 细胞转染上调质粒 pEGFP-N1-MeCP2 抑制 SH-SY5Y 细胞凋亡。Annexin-V 是检测细胞凋亡的敏感探针, 它与带负电荷的磷脂表面, 尤其是与磷脂酰丝氨酸有较高的结合特异性, 而很少与其他的磷脂结合。通过流式细胞仪, 用 Annexin-V/PI 双染法可鉴别发生在凋亡早期的细胞表面的变化。本研究发现, 转染 pEGFP-N1-MeCP2 后的 SH-SY5Y 细胞再经 6-OHDA 诱导, 经流式细胞仪检测, 证明 pEGFP-N1-MeCP2 上调 MeCP2 在 SH-SY5Y 细胞中的表达, 确实能抑制 6-OHDA 诱导的 SH-

SY5Y 细胞凋亡。

既然证实了 pEGFP-N1-MeCP2 上调 MeCP2 在 SH-SY5Y 细胞中的表达能抑制 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡,随后的实验进一步通过双重免疫荧光和 Western blot 检测了 SH-SY5Y 细胞中 MeCP2、TH 蛋白表达水平的变化。在帕金森病细胞模型中发现,6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞中,双重免疫荧光和 Western blot 检测均显示,MeCP2、TH 蛋白表达水平均降低;上调 MeCP2 表达,TH 表达亦增加,且 SH-SY5Y 细胞凋亡减少。有研究显示,TH 基因启动子上有一个 MeCP2 结合位点,TH 基因可能被 MeCP2 调节^[4];MeCP2 可以作为一些基因的激活剂,也是其他一些基因的转录抑制剂,是目前发现的第一个与 TH 基因启动子结合并调控 TH 的基因^[5]。BDNF 基因也是一个被 MeCP2 调节的基因,在脑中调节 TH 阳性神经元的生存^[6]。BDNF 蛋白是一种生长因子,在维持 Ca²⁺ 稳态,突触可塑性,神经再生,神经元的成熟和生存中扮演着重要的角色,在神经功能方面,如学习、记忆和一些神经系统疾病中也发挥着重要作用^[6]。有研究报道,在肾上腺髓质和交感神经元中,缺乏 MeCP2 导致 BDNF 的转录调节失常,最终结果是导致 TH 的减少^[7-8]。在培养的神经元中,MeCP2 与 BDNF 启动子Ⅲ相结合,抑制脑源性神经营养因子的转录。MeCP2 突变小鼠的大脑与野生型小鼠相比,BDNF 蛋白的表达下降了 70%。本研究显示,上调 MeCP2 在 SH-SY5Y 中的表达明显抑制 6-OHDA 对 SH-SY5Y 细胞的毒性作用,并提高 TH 蛋白在 SH-SY5Y 细胞中的表达。

本研究结果显示,6-OHDA 处理后,MeCP2 蛋白表达显著下降,TH 蛋白在 SH-SY5Y 细胞中的表达亦下降。TH 蛋白减少的机制可能是因为 MeCP2 与 TH 和 TPH2 启动子结合从而调节其表达^[9]。以往研究结果^[9]结合本研究实验数据表明,MeCP2 调节某些基因的表达,参与多巴胺的合成。此外,预处理上调 MeCP2 蛋白在 SH-SY5Y 细胞中的表达,几乎可以抑制 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡,保护 SH-SY5Y 细胞。本研究结果表明了一种新的理论,MeCP2 在 SH-SY5Y 细胞中发挥保护作用。这些结果表明,在 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡中,通过上调 MeCP2 蛋白在 SH-SY5Y 细胞中的表达,MeCP2 可能通过抑制 Caspase 和凋亡诱导因子(AIF)依赖的细胞凋亡机制^[10]。近年来,MeCP2 中 Ser 80、Ser 229 和 Ser 421 的磷酸化,导致大脑中 MeCP2 蛋白的功能沉默^[11-14]。亦有研究证实,同源结构域相互作用蛋白激酶 2(HIPK2)与 MeCP2 结合,导致 Ser 80 磷酸化,在体外、体内调节细胞的增殖和凋亡,HIPK2 基因敲除的小鼠大脑中存在神经功能缺损^[14]。MeCP2 在 SH-SY5Y 细胞中的作用,在 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡,如何发挥调节

作用尚需要进一步研究证实。

总之,本实验表明,6-OHDA 诱导的多巴胺能神经元中,MeCP2 的表达下降,细胞凋亡增加;上调 MeCP2 在多巴胺能神经元中的表达,可显著抑制 6-OHDA 诱导的多巴胺能神经元凋亡,发挥保护作用。MeCP2 蛋白可保护多巴胺能神经元,抑制其凋亡并提高 TH 在多巴胺能神经元中的表达,MeCP2 有可能成为治疗帕金森病的新靶点。

参考文献

- [1] 陈吕安,谢腾,陈治军,等.上调人 X 连锁甲基化 CpG 结合蛋白 2 抑制 6-羟基多巴胺诱导神经母细胞瘤细胞凋亡的研究[J].中华实验外科杂志,2014,31(6):1282-1285.
- [2] 赵君,秦雨晨,李兴强,等.凋亡相关基因 bax 与 Th 蛋白在帕金森病大鼠黑质和纹状体细胞中的表达[J].实用医学杂志,2008,24(10):1690-1692.
- [3] 彭云云,黄成,马陶陶,等.pEGFP-C2-MeCP2 重组质粒的构建和表达[J].安徽医科大学学报,2014(9):1193-1197.
- [4] 杨文旭,潘虹.siRNA 沉默 Cdk15 对原代皮质神经元 Mecp2 及其下游靶基因表达的影响[J].基础医学与临床,2015,35(7):884-888.
- [5] 韩洪瀛,钟智勇,甘照宇,等.甲基化 CpG 结合蛋白-2 基因多态性与女性精神分裂症患者的关联性研究[J].中华行为医学与脑科学杂志,2014,23(1):29-32.
- [6] 王淑秀,常海敏,朱丰霞,等.人参皂苷 Rg1 对帕金森病小鼠黑质多巴胺能神经元凋亡及 EphB1、TH、P-c-Jun 蛋白表达的影响[J].郑州大学学报(医学版),2015,50(2):176-180.
- [7] 石冲,张国彬,张宇新,等.磷酸化 ERK1/2 对帕金森病模型小鼠黑质半胱氨酸蛋白酶-3 表达的影响[J].中国老年学杂志,2015,35(24):7046-7048.
- [8] 鲁玲玲,贾焕珍,杨慧,等.PINK1 对酪氨酸羟化酶的表达调控[J].山西医科大学学报,2015,46(11):1088-1092.
- [9] 许文年.左旋多巴对帕金森病大鼠海马区酪氨酸羟化酶及 α -突触核蛋白表达的影响[J].中国老年学杂志,2016,36(7):1556-1558.
- [10] 谢腾,罗勇,陈治军,等.人 X 连锁甲基化 CpG 结合蛋白 2 在帕金森病细胞模型中的表达及意义[J].中华实验外科杂志,2014,31(5):1033-1035.
- [11] 倪晶晶,王俊波,孟香红,等.脂质体介导的 VEGF 质粒对成年大鼠脑缺血再灌注后大脑皮质内 P-MeCP2 表达的影响[J].解剖科学进展,2012,18(4):352-356.
- [12] 郭玲玲,段凤英,邱小华,等.人 MeCP2 基因 shRNA 真核表达质粒的构建及鉴定[J].实用肿瘤杂志,2008,23(3):229-233.
- [13] 郝春艳,卢瑶,麻宏伟,等.孤独症患者甲基化 CpG 结合蛋白 2 基因突变研究[J].中国实用儿科杂志,2008,23(3):184-186.
- [14] 张智敏,白洁.酪氨酸羟化酶和帕金森病相关研究进展[J].中国老年学杂志,2016,36(9):2280-2282.