

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.22.002

人 PINK1-shRNA 载体的构建及对神经母细胞瘤细胞线粒体的影响*

许明阳 王淑艳 马浩洁 刘燕 于雪 冯婧 郭振宇 张淑静[△] 胡京红[△]

(北京中医药大学中医学院 北京 102488)

摘要 目的: 构建筛选人源靶向特异 PINK1-shRNA 敲减质粒, 转染神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞并验证该质粒转染后对 PINK1 基因的敲减效率, 观察对细胞线粒体形态的影响。**方法:** 构建两对人源 PINK1-shRNA 序列 (编号分别为 PINK1-shRNA-39 和 PINK1-shRNA-42), 将这 2 对干扰序列连接在载体上形成重组载体, 经测序验证后, 将空载体和两对敲减质粒分别转染 SH-SY5Y 细胞, 获得基因敲减的细胞模型, 用 CCK-8 法检测细胞的存活率, 用荧光定量 PCR 方法确定 PINK1 基因的敲减效率, 用蛋白质免疫印迹法验证细胞内 PINK1 的表达水平是否发生改变, 用激光共聚焦显微镜观察线粒体的形态是否发生了改变。**结果:** 我们提取的质粒, 经测序结果显示, 质粒载体构建成功; 转染细胞后, CCK-8 法检测细胞存活率发生了降低, 与正常组比较, PINK1-shRNA-39 和 PINK1-shRNA-42 敲减质粒组, 细胞的存活率分别降低了 13.7% ($P < 0.05$) 和 14.1% ($P < 0.05$); 荧光定量 PCR 结果显示, 与正常组相比, PINK1-shRNA-39 组和 PINK1-shRNA-42 组敲减质粒转染的细胞内 PINK1 基因的表达分别降低了 24.1% ($P < 0.01$) 和 36.7% ($P < 0.01$); 蛋白质印迹法结果显示, 与正常组相比, 两对质粒分别转染细胞后, PINK1-shRNA-39 和 PINK1-shRNA-42 敲减质粒转染的细胞内 PINK1 蛋白的表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), PINK1-shRNA-42 敲减质粒转染的细胞内 PINK1 蛋白的表达水平有效降低更明显; 与正常组比较, 激光共聚焦显微镜观察到基因敲减两组细胞的线粒体部分发生断裂, 碎片较多, 基因敲减两组的线粒体的形态因子显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论:** 成功构建了人源的 PINK1 基因敲减的质粒, 并将敲减的质粒成功转染至 SH-SY5Y 细胞中, 细胞内 PINK1 基因的 mRNA 和蛋白的表达水平降低, 且细胞线粒体的形态发生了改变。

关键词: PINK1 基因 shRNA 质粒; SH-SY5Y 细胞; 线粒体功能障碍; 帕金森病

中图分类号: Q95-3; Q78; R742.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)22-4207-06

Construction of Human PINK1-shRNA Vector and Its Effect on Mitochondria of Neuroblastoma Cell*

XU Ming-yang, WANG Shu-yan, MA Hao-jie, LIU Yan, YU Xue, FENG Jing, GUO Zhen-yu, ZHANG Shu-jing[△], HU Jing-hong[△]

(School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 102488, China)

ABSTRACT Objective: To construct and screen the human targeting specific PINK1-shRNA knockdown plasmid, transfect SH-SY5Y cells and verify the knockdown efficiency of PINK1 gene after transfection, and observe the effect on the morphology of cell mitochondria. **Methods:** Two pairs of human PINK1-shRNA sequences (numbered PINK1-shRNA-39 and PINK1-shRNA-42) were constructed, and the two pairs of interference sequences were connected to the vector to form a recombinant vector. After sequencing, the empty vector and two pairs of knockdown plasmids were transfected into SH-SY5Y cells, respectively, and the cell model of gene knock-down was obtained. The cell survival rate was detected by CCK-8 method, and the knockout efficiency of PINK1 gene was determined by fluorescence quantitative PCR. Western blotting was used to verify whether the expression level of PINK1 in cells changed, and laser confocal microscope was used to observe whether the morphology of mitochondria changed. **Results:** The sequencing results of the plasmid we extracted showed that the plasmid vector was successfully constructed. After transfection, the cell survival rate was decreased by CCK8 assay. Compared with the normal group, the cell survival rate of PINK1-shRNA-39 and PINK1-shRNA-42 knockdown plasmids groups decreased by 13.7 % ($P < 0.05$) and 14.1 % ($P < 0.05$), respectively. The results of fluorescence quantitative PCR showed that compared with the normal group, the expression of PINK1 gene in the cells transfected with PINK1-shRNA-39 and PINK1-shRNA-42 knockdown plasmids decreased by 24.1 % ($P < 0.01$) and 36.7 % ($P < 0.01$), respectively. The results of Western blotting showed that compared with the normal group, the expression level of PINK1 protein in the cells transfected with PINK1-shRNA39 and PINK1-shRNA-42 knockdown plasmid decreased significantly after the two pairs of plasmids were transfected respectively, and the expression level of PINK1 protein in the cells transfected with PINK1-shRNA-42 knockdown plasmid was more significantly lower than that in the normal

* 基金项目: 中央高校基本科研业务费自主选题(2019-XJ-SYJJ-010; 2015-JYB-JSMS019)

作者简介: 许明阳(1994-), 女, 助理实验师, 主要研究方向: 中药新药研发, E-mail: xumingyang_bucm@163.com

[△] 通讯作者: 张淑静, 女, 高级实验师, 主要研究方向: 细胞培养与细胞生物学技术研究, E-mail: zhangshujing_bucm@163.com;

胡京红, 女, 高级实验师, 主要研究方向: 细胞培养与细胞生物学技术研究, E-mail: hujhbj@163.com

(收稿日期: 2020-03-27 接受日期: 2020-04-22)

group. Compared with the normal group, the mitochondrial part of the cells in the gene knockout group was broken and more fragments were observed by laser confocal microscope, the mitochondrial morphology factors of the two knockdown groups were significantly reduced, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion:** The human PINK1 gene knockdown plasmid was constructed successfully, and the knockdown plasmid was successfully transfected into SH-SY5Y cells, and the mRNA and protein expression levels of PINK1 gene in SH-SY5Y cells were decreased, and the morphology of mitochondria changed.

Key words: PINK1 gene shRNA plasmid; SH-SY5Y cells; Mitochondrial dysfunction; Parkinson's disease

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; Q78; R742.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)22-4207-06

前言

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种神经退行性疾病,其临床症状与黑质致密部中多巴胺能神经元的丧失有关。有研究表明,氧化应激、线粒体功能缺陷、蛋白过量表达和聚集、炎症等在黑质多巴胺能神经元变性死亡中均参与了致病过程,但究竟这些因素是如何被介导以致引起上述变化并最终影响多巴胺神经元的生存状态仍不清楚^[1-3]。

目前已确定的与 PD 相关易感基因有 PINK1、Parkin、DJ-1、alpha-synuclein 等^[4-7],其中 PINK1 是帕金森病发病的关键基因之一,PINK1 具有明确的激酶结构域和线粒体靶向序列,突变后可引起线粒体形态及功能异常,引起隐性遗传性帕金森病的发生,PINK1 基因的敲除会导致受损蛋白质稳态异常,线粒体功能受损^[8,9],PINK1 在线粒体质量控制中起着至关重要的作用,可以通过调节 PINK1 的表达来改善线粒体功能是一种有效对抗 PD 的神经保护策略,但这些功能异常产生的详细的分子生物学机制仍有待进一步阐明。因此,本实验我们构建 PINK1 基因敲减的质粒,通过转染 SH-SY5Y 细胞,构建 PINK1 敲减的 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞,建立帕金森病的

细胞模型,观察细胞模型内线粒体形态的变化。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Lipofectamine® 3000 脂质体购置上海英俊公司;SH-SY5Y 细胞购自上海吉凯基因有限公司;LB 培养基购置北京鼎国昌盛有限公司,DMEM 培养基(hyclone)、胎牛血清(Gibco)、Opti-MEM (Invitrogen)、CCK-8 试剂盒购置上海碧云天生物技术有限公司;胰蛋白酶(Invitrogen),质粒大提试剂盒购置美国 Qiagen 公司,质粒测序(北京鼎国昌盛有限公司)。TRIzol 试剂购自上海英俊公司,反转录试剂盒购自赛默飞,Power SYBR® Green PCR Master Mix 购自 ABI 公司,引物设计应用 Primer 5 软件设计,由上海英俊公司合成,组织蛋白裂解缓冲液、电泳缓冲液,电转缓冲液等试剂购置北京普利莱基因技术有限公司,兔源抗 PINK1 抗体、内参以及二抗购自武汉 Proteintech 公司;MitoTracker® Red CMXRos (MTR) 购置美国 Life technologies 公司,其他试剂均为进口或国产分析纯。

引物设计与合成:应用 Primer5 软件设计 PINK1 及内参基因 ACTIN 的引物,交由上海英俊公司北京合成部合成(附表1)。

表 1 验证 PINK1 mRNA 敲减效率用引物以及内参序列

Table 1 Primers' sequences used to verify PINK1 mRNA knockout efficiency

Primer Name	Primer Sequence	Temperature
PINK1-F	GGCTTGGCAAATGGAAGAAC	60℃
PINK1-R	CTCAGTCCAGCCTCATCTACTA	
ACTIN-F	CGGCTACAGCTTCACCACCA	60℃
ACTIN-R	CGGGCAGCTCGTAGCTCTTC	

Note: PINK1-F and PINK1-R are the upstream and downstream primers for verifying the PINK1 mRNA knockdown efficiency, while ACTIN-F and ACTIN-R are upstream and downstream primers for internal reference genes.

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建、提取与测序 通过 PUBMED 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>),查询人源 PINK1 基因的基因编号(NM_032409),交由上海吉凯基因公司构建 EGFP-PINK1 敲减质粒和空载质粒。我们将构建的质粒转染感受态细菌中,移取适量菌液,用无菌涂布棒轻轻地涂布在含有氨苄霉素的 LB 固体培养基上,在电热恒温培养箱中正置 5-10 min 后再倒置培养 15 h,然后挑选单个菌落接种于 LB 液体培养基中,放置 37℃摇床上,220 rpm 恒温振荡培养 15 h,按照 Qiagen 质粒大提试剂盒的实验步骤提取质粒,将提取的质粒交由北京鼎国昌盛公司对其进行测序鉴定。

1.2.2 SH-SY5Y 细胞培养、实验分组 解冻 SH-SY5Y 细胞

株,培养至细胞密度达到 90%时,即可进行传代培养。待培养的 SH-SY5Y 细胞达到对数生长期时,用胰蛋白酶消化制成细胞悬液,将细胞约为 6×10^4 接种于 6 cm 培养皿,37℃、5%的 CO₂ 培养箱,待细胞融合度达到约 70%,用 Lipofectamine® 3000 脂质体将质粒转染 SH-SY5Y 细胞。感染后继续培养 24 h 后,更换培养基,感染 3 天后用倒置荧光显微镜观察细胞转染效果。本实验分为四组,正常组(不做处理)、空载体组(转染空载体)、PINK1-shRNA-39 敲减组(转染 PINK1-shRNA-39 敲减质粒)和 PINK1-shRNA-42 敲减组(转染 PINK1-shRNA-42 敲减质粒);每组细胞分别做 3 个复孔,当荧光率大于 60%时,即可以进行后续实验,收集细胞用于 PINK1 基因的 RNA 和蛋白表达量的检测实验,以及使用激光共聚焦显微镜观察线粒体的

形态。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞的存活率 严格按照碧云天试剂盒步骤操作:实验分为四个组,正常组不做处理,其余各组分别转染空载体或敲减质粒后,37℃、5%的CO₂培养箱培养24 h后检测,设置空白组(没有细胞)加入100 μL DMEM 培养液,其余各组加入10 μL的CCK-8溶液+90 μL DMEM 培养液,37℃、5%的CO₂培养箱中培养1 h后,用酶标仪450 nm测定吸光度(OD值)。计算细胞相对存活率(RSR, Relative Survival Rate)=(实验组 OD-空白组 OD)/(正常组 OD-空白组 OD)×100%。

1.2.4 q-RT-PCR 检测 SH-SY5Y 细胞中 PINK1 基因 mRNA 的表达水平 敲减质粒感染 SH-SY5Y 细胞后72小时,待质粒的作用进入下游,细胞个数为1×10⁶个,应用 Trizol 裂解液裂解细胞提取总 RNA。人的 PINK1 和 ACTIN 的引物由上海生工合成,见附表1。实时荧光定量 PCR 的反应体系为20 μL:其中上、下游引物(浓度10 μM)各为0.4 μL,反转录 cDNA 样品2 μL(原液10倍稀释)、Power SYBR® Green PCR Master Mix 10 μL、ddH₂O 7.2 μL,荧光定量 PCR 反应条件如下:95℃预变性10 min;40个扩增循环:95℃变性5 s,60℃退火30 s,并读取荧光数值;随后进行溶解曲线的扩增,反应条件如下:95℃,15 s,60℃,1 min,并读取荧光数值,95℃,15 s结束。应用软件实时读取的 Ct 值,计算每个样本的ΔCt 值(Ct 目的基因-Ct 内参),每个样本的ΔΔCt 值(ΔCt 处理组-ΔCt 对照组),并计算样品的相对表达量(RQ, Relative Qualification)=2^{-ΔΔCt} 值,并对实验结果进行统计学分析。

1.2.5 WB 检测 SH-SY5Y 细胞中 PINK1 蛋白的表达 提取细胞的总蛋白,用 BCA 法蛋白定量试剂盒测定蛋白的浓度。每个组取等量的蛋白进行凝胶电泳,120 v,90 min;转膜用80 v,70 min,5%脱脂奶粉室温封闭1 h。用0.5%的牛奶/TBST 稀释一抗(1:1000),室温孵育1 h,4℃摇床过夜。第二天,室温孵育二抗1 h,TBST 洗3次,10 min/次,化学发光显影,用美国 Azure 超灵敏多功能成像系统分析条带,并得出灰度值。蛋白相对表达量(RPE, Relative Protein Expression)=目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

1.2.6 共聚焦显微镜观察活细胞的形态,并用软件分析线粒体的形态因子 细胞处理同前面操作,预热无抗生素的培养基和 PBS,配制含 MitoTracker® Red CMXRos(MTR)的无抗生素培养基,浓度为100 nM。吸出旧培养基,加入含 MTR 的培养基,孵育15 min。PBS 洗2次,加入新鲜的 PBS,使用共聚焦显微镜观察每个实验分组的细胞,并选取六个视野进行拍照(物镜60×,发射波长603 nm,激发波长559 nm),应用 ImageJ (Version 1.48, NIH) 根据图像特征对原始图像进行去背景、锐化和二值化处理,分析线粒体形态参数,形态因子(FF, Form factor)=周长²/(4π×面积)。

1.3 统计学分析

应用软件 ImageJ 对激光共聚焦图像进行分析;应用软件 SPSS 17.0 统计分析所有实验数据,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间差异比较采用方差分析和非参数检验(Mann-Whitney, Kruskal-Wallis), $P < 0.05$ 差异具有统计学意义,每项实验至少三次生物学重复。

2 结果

2.1 提取质粒测序结果

DNA 测序结果显示,我们构建的质粒序列与设计的 shRNA 质粒序列完全一致,提示构建的质粒载体成功,见图1。

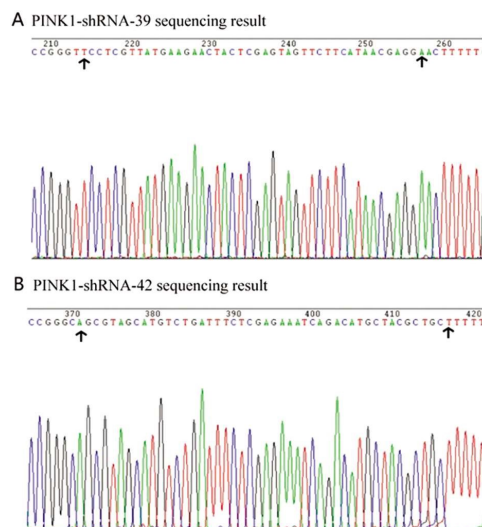


图1 PINK1-shRNA 测序结果

Fig.1 PINK1-shRNA sequencing results

A: PINK1-shRNA-39 的测序结果 B: PINK1-shRNA-42 的测序结果
A: PINK1-shRNA-39 sequencing result B: PINK1-shRNA-42 sequencing result

2.2 细胞培养状态与质粒转染效率观察

细胞正常培养状态下,细胞形态结构正常、完整;质粒转染细胞后,通过倒置荧光显微镜观察 SH-SY5Y 细胞内绿色荧光蛋白(GFP)的表达,结果显示,正常组细胞内未观测荧光蛋白的表达,空载体组和两个基因敲减组细胞内有较多的绿色荧光蛋白表达,见图2。

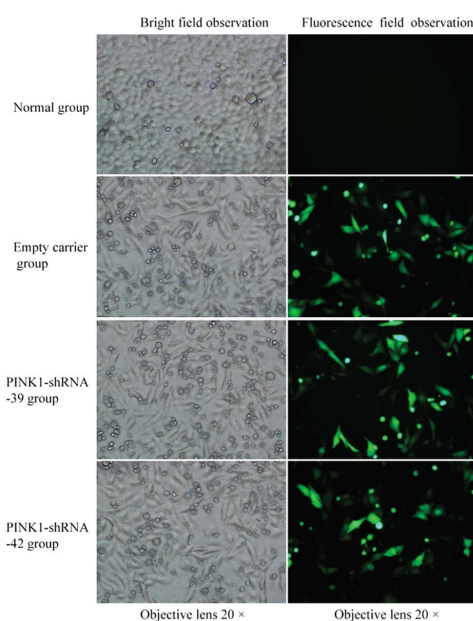


图2 SH-SY5Y 细胞的培养状态观测(物镜20×)

Fig.2 Observation of the culture state of the SH-SY5Y cells
(Objective 20×)

2.3 细胞存活率的检测结果

CCK-8 法检测细胞存活率结果显示, 与正常组比较, PINK1-shRNA-39 和 PINK1-shRNA-42 敲减质粒转染细胞后, 细胞内的存活率分别降低了 13.7 % ($P<0.05$) 和 14.1 % ($P<0.05$); 空载体组与正常组比较, 表达水平变化没有明显的差异。结果见表 2 和图 3。

表 2 细胞相对存活($\bar{x} \pm s$; N=3)
Table 2 Relative cells survival ($\bar{x} \pm s$; N=3)

Groups(N=3)	Relative survival rate($\bar{x} \pm s$)
Normal group	1.000 $\pm$ 0.0523
Empty carrier group	0.930 $\pm$ 0.0554
PINK1-shRNA-39 group	0.863 $\pm$ 0.0684*
PINK1-shRNA-42 group	0.858 $\pm$ 0.0937*

Note: Compared with the normal control group, * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

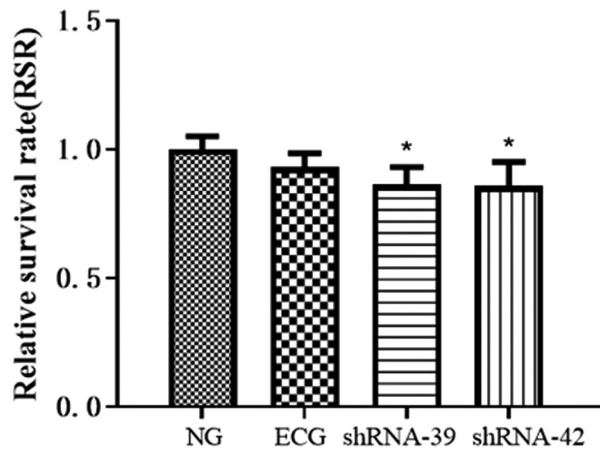


图 3 各组细胞相对存活率

Fig.3 Relative survival rate of cells in each group

Note: NG: Normal group; ECG: Empty carrier group; shRNA-39: PINK1-shRNA-39 group; shRNA-42: PINK1-shRNA-42 group.

2.4 转染 SH-SY5Y 细胞后 PINK1 基因的 mRNA 表达情况

荧光定量 PCR 结果显示, 与正常组比较, PINK1-shRNA-39 组和 PINK1-shRNA-42 组敲减质粒转染细胞后, 细胞内 PINK1 基因的表达分别降低了 24.1 % ($P<0.01$) 和 36.7 % ($P<0.01$); 空载体组与正常组比较, 表达水平变化没有明显的差异。结果见表 3 和图 4。

表 3 PINK1 基因的相对表达量($\bar{x} \pm s$; N=3)

Table 3 The relative expression of PINK1 genes ($\bar{x} \pm s$; N=3)

Groups(N=3)	Relative expression($\bar{x} \pm s$)
Normal group	1.031 $\pm$ 0.1429
Empty carrier group	0.970 $\pm$ 0.1213
PINK1-shRNA-39 group	0.783 $\pm$ 0.1094**
PINK1-shRNA-42 group	0.653 $\pm$ 0.0533**

Note: Compared with the normal control group, * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

2.5 蛋白免疫印迹法检测转染后 SH-SY5Y 细胞内 PINK1 蛋白的表达水平

化学发光显影, 超灵敏多功能成像系统 Western Blot 实验的结果如 5A; 用成像系统分析 WB 实验的灰度值, 结果显示, 与正常组相比, PINK1-shRNA-39 组和 PINK1-shRNA-42 组细胞内 PINK1 蛋白的表达降低 ($P<0.01$), 空载体组 PINK1 蛋白的表达, 未有显著降低, 结果见图 5B。

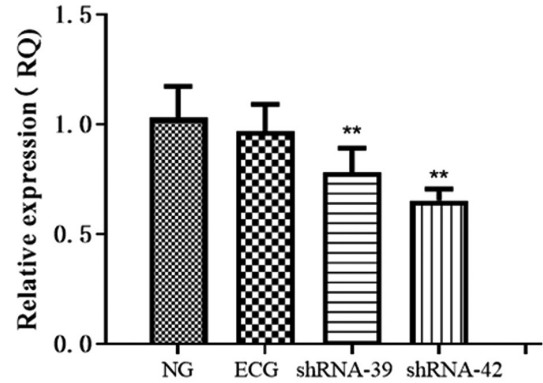
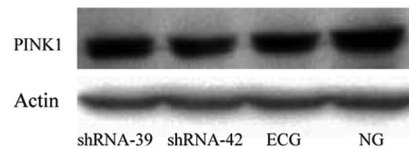


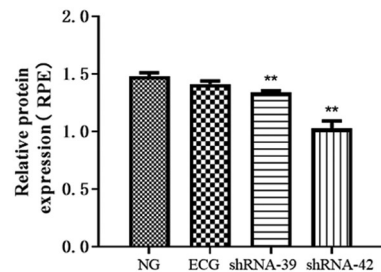
图 4 PINK1 基因 mRNA 在 SH-SY5Y 细胞中的相对表达情况

Fig.4 The relative expression of PINK1 mRNA in SH-SY5Y cells

Note: NG: normal group; ECG: Empty carrier group; shRNA-39: PINK1-shRNA-39 group; shRNA-42: PINK1-shRNA-42 group.



5A



5B

图 5 PINK1 蛋白在 SH-SY5Y 细胞中的表达情况

Fig.5 Expression of PINK1 protein in SH-SY5Y cells

A: The results of Western Blot experiment of supersensitive multi-function imaging system

B: Analysis of grayscale value of WB experiment with imaging system

Note: NG: Normal group; ECG: Empty carrier group; shRNA-39: PINK1-shRNA-39 group; shRNA-42: PINK1-shRNA-42 group.

2.6 激光共聚焦显微镜观察线粒体的形态, 用软件分析线粒体的形态因子

用 MitoTracker® Red CMXRos(MTR)探针标记线粒体后, 在激光共聚焦显微镜下, 观察线粒体的形态, 正常组和空载体组的 SH-SY5Y 细胞形态饱满, 细胞数量较多, 细胞核较清晰, PINK1-shRNA-39 和 PINK1-shRNA-42 基因敲减组的细胞死亡增加, 荧光强度减弱, 提示线粒体断裂, 碎片较多, 见图 6。应用 ImageJ 软件分析线粒体形态参数, 统计结果显示, 与正常组相比, 基因敲减两组的线粒体的形态因子显著降低 ($P<0.01$), 见图 7。

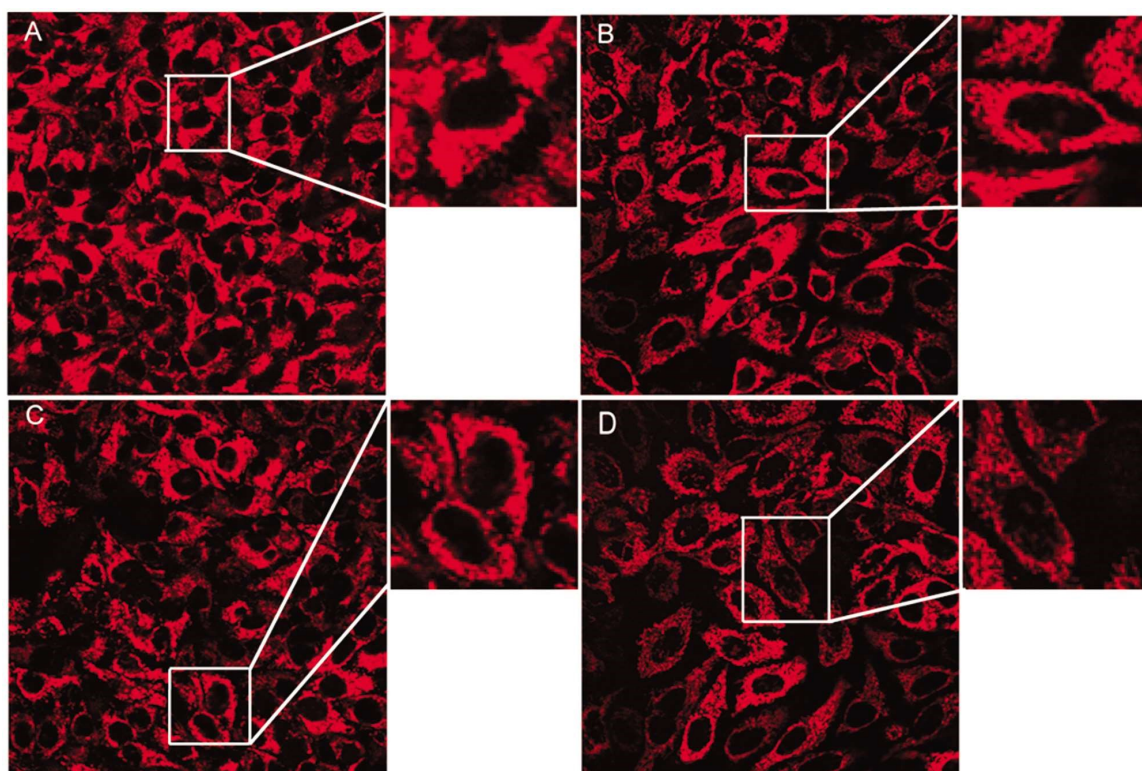


图6 激光共聚焦观测线粒体的形态(物镜 $60\times$,发射波长603 nm,激发波长559 nm)

Fig.6 A Laser Confocal observation of Mitochondrial Morphology

(Objective $60\times$, emission wavelength 603 nm, excitation wavelength 559 nm)

A 正常组 B 空载体组 C PINK1-shRNA-39 组 D PINK1-shRNA-42 组

A: Normal group B: Empty vector group C: PINK1-shRNA-39 group D: PINK1-shRNA-42 group

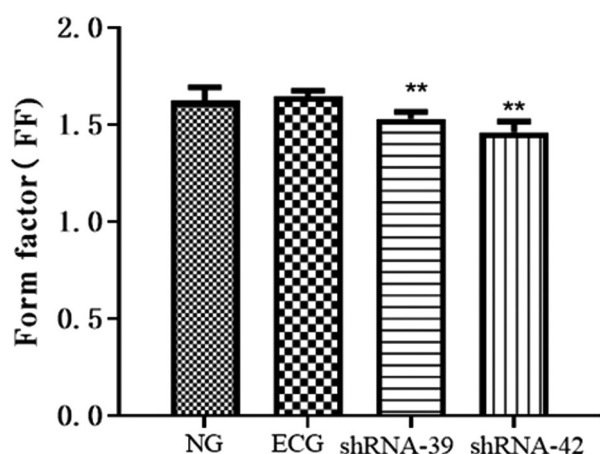


图7 ImageJ 软件分析各组细胞线粒体形态因子

Fig. 7 Analysis of mitochondrial morphological factors of cells in each group by ImageJ software

Note: NG: Normal group; ECG: Empty carrier group; shRNA-39: PINK1-shRNA-39 group; shRNA-42: PINK1-shRNA-42 group.

3 讨论

目前对帕金森病的治疗主要以药物治疗为主,中医药在治疗帕金森病过程中,根据每个人体质辨证论治、随证加减,因此中西医结合治疗帕金森病有巨大的发展空间^[10,11],有实验研究表明,中药三七的有效成分三七总皂苷对于治疗 PD 具有一定疗效^[12],温胆益脑汤联合多巴丝肼能在一定程度上改善 PD 患

者的认知能力和日常的生活能力^[13],中医药防治 PD 的机制研究^[14-16]表明,临床治疗 PD 的有效方剂大补阴丸对 MPTP 诱导的 PD 小鼠行为学有明显改善作用,对黑质中多巴胺能神经元数量、线粒体形态、线粒体酶复合物活性等均有保护作用。最近有研究表明,中药复方大补阴丸和牵正散可通过维持线粒体动态平衡和改善 MPP⁺ 诱导的线粒体损伤来保护神经元^[17]。

本研究旨在构建 PINK1 基因敲除的帕金森病的细胞模型,通过脂质体将 PINK1 基因敲减质粒转染入 SH-SY5Y 细胞中,培养 24 h 后,通过荧光倒置显微镜观察细胞内绿色荧光蛋白的表达情况,实验结果显示,转染了空载体和敲减质粒的细胞内,观测到较多的绿色荧光蛋白表达,提示质粒成功转染至细胞内,CCK-8 法结果显示,转染了敲减质粒的细胞的存活率相对正常组降低,提示细胞存在一定程度的凋亡;实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 技术检测 PINK1 基因的 mRNA 和蛋白的表达水平,正常对照组和阴性对照组细胞内 PINK1 基因的 mRNA 和蛋白水平的表达均没有明显差异,而转染了 PINK1 敲减质粒的两组细胞,SH-SY5Y 细胞内的 PINK1 基因的 RNA 和蛋白的表达都降低了,提示 PINK1 基因敲减细胞模型构建成功;另外,我们采用激光共聚焦显微镜观察,并统计分析可知,PINK1 表达减少导致线粒体形态发生改变,从而导致细胞死亡数量的增加。这些结果验证了以前对 PINK1^[18-21]功能的研究,并强调了 PINK1 在维持健康细胞和线粒体功能方面的重要作用,在突变导致 PINK1 蛋白功能下降的情况下,受损的线粒体会积聚,最终可能导致神经细胞死亡。综上所述,本研究成功构建了 PINK1 基因 shRNA 质粒载体,建立了 PINK1 基

因敲减的 SH-SY5Y 细胞模型,证明了 PINK1 基因的有效缺失导致线粒体的形态发生改变,为进一步研究 PINK1 基因与帕金森病提供依据。

参 考 文 献(References)

- [1] Edward Botsford, Jayan George, Ellen E Buckley. Parkinson's Disease and Metal Storage Disorders: A Systematic Review [J]. Brain Sci, 2018, 8(11): 194
- [2] Johnson ME, Stecher B, Labrie V, et al. Triggers, facilitators, and aggravators: redefining parkinson's disease pathogenesis [J]. Trends Neurosci, 2019, 42(1): 4-13
- [3] Kannarkat GT, Boss JM, Tansey MG. The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease [J]. J Parkinsons Dis, 2013, 3 (4): 493-514
- [4] Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease[J]. Neuron, 2015, 85(2): 257-273
- [5] David N Hauser, Christopher T Primiani, Mark R Cookson. The Effects of Variants in the Parkin, PINK1, and DJ-1 Genes along with Evidence for their Pathogenicity [J]. Curr Protein Pept Sci, 2017, 18 (7): 702-714
- [6] Barrenschee M, Zorenkov D, Böttner M, et al. Distinct pattern of enteric phospho-alpha-synuclein aggregates and gene expression profiles in patients with Parkinson's disease [J]. Acta Neuropathol Commun, 2017, 5(1): 1
- [7] Tyson T, Steiner JA, Brundin P. Sorting out release, uptake and processing of alpha-synuclein during prion-like spread of pathology[J]. J Neurochem, 2016, 139(Suppl 1): 275-289
- [8] Matheoud D, Cannon T, Voisin A, et al. Intestinal infection triggers Parkinson's disease-like symptoms in Pink1^{-/-} mice[J]. Nature, 2019, 571(7766): 565-569
- [9] Hauser DN, Primiani CT, Cookson MR, et al. The Effects of Variants in the Parkin, PINK1 and DJ-1 Genes along with Evidence for their Pathogenicity[J]. Curr Protein Pept Sci, 2017, 18(7): 702-714
- [10] Chuanhe Sun, Dandan Wang, Wenfei Jiang, et al. Quantitative Evaluation of Chinese Herb Medicine in the Treatment of Sialorrhea and Frequent Nighttime Urination in Patients with Parkinson's Disease[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 3045260
- [11] Min Li, Ming-Hui Yang, Yi Liu, et al. Analysis of clinical evaluation of response to treatment of Parkinson's disease with integrated Chinese and Western medicine therapy [J]. Chin J Integr Med, 2015, 21 (1): 17-21
- [12] 任静, 吴玉梅, 马丽, 等. 三七总皂苷微乳对帕金森模型小鼠行为学及纹状体多巴胺含量的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2018, 37 (3): 234-238
- [13] 戴军, 罗亚明, 曹雄彬, 等. 温胆益脑汤联合多巴丝肼对老年帕金森病人血清 YKL-40、IL-1 β 、BDNF 的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 19(6): 1269-1272
- [14] Yi Zhang, Hong MeiSun, Xin He, et al. Da-Bu-Yin-Wan and Qian-Zheng-San, two traditional Chinese herbal formulas, up-regulate the expression of mitochondrial subunit NADH dehydrogenase 1 synergistically in the mice model of Parkinson's disease [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 146(1): 363-371
- [15] Gong XG, Sun HM, Zhang Y, et al. Da-bu-yin-wan and qian-zheng-san to neuroprotect the mouse model of Parkinson's disease [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 729195
- [16] 冯婧, 孙红梅, 王媛媛, 等. 针刺舞蹈震颤控制区对帕金森病小鼠脑内黑质多巴胺神经元及 BDNF 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(1): 53-57
- [17] Gai C, Feng W D, Qiang T Y, et al. Mitochondrial Dynamics in the Parkinson's Disease Cell Model Induced by MPP⁺ [J]. Da-Bu-Yin-Wan and Qian-Zheng-San Ameliorate Mitochondrial Dynamics in the Parkinson's Disease Cell Model Induced by MPP [J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10: 372
- [18] Shireen A Sarraf, Dionisia P Sideris, Nikolaos Giagtzoglou, et al. PINK1/Parkin Influences Cell Cycle by Sequestering TBK1 at Damaged Mitochondria, Inhibiting Mitosis [J]. Cell Rep, 2019, 29 (1): 225-235.e5
- [19] Zoi Erpapazoglou, Olga Corti. The endoplasmic reticulum/mitochondria interface: a subcellular platform for the orchestration of the functions of the PINK1-Parkin pathway? [J]. Biochem Soc Trans, 2015, 43 (2): 297-301
- [20] Gian-Luca McLelland, Thomas Goiran, Wei Yi, et al. Mfn2 ubiquitination by PINK1/parkin gates the p97-dependent release of ER from mitochondria to drive mitophagy[J]. Elife, 2018, 7: e32866
- [21] Bin Xiao, Xiao Deng, Grace G Y, et al. Lim Superoxide drives progression of Parkin/PINK1-dependent mitophagy following translocation of Parkin to mitochondria[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3097