



pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M26I}重组载体构建 及其对 NIH3T3 细胞增殖和凋亡研究

张梅英¹, 徐影琪¹, 王 惟¹, 赵 越¹, 杨 葳¹, 于 萌¹,
郭晓冲¹, 秦 英¹, 郑志红^{1, 2}

(1. 中国医科大学实验动物部, 沈阳 110001;
2. 中国医科大学病理学与病理生理学研究室, 沈阳 110001)

【摘要】 目的 构建 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 和 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M26I} 重组表达载体, 为研究 DJ-1^{M26I} 突变与细胞增殖、凋亡的关系及建立转基因动物模型奠定基础。方法 采用突变试剂盒将 DJ-1 蛋白第 26 位氨基酸进行突变, 分别构建 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 和 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M26I} 重组表达载体, 并采用脂质体介导的方法分别将其转染入 NIH3T3 细胞, 500 μg/mL G418 压力筛选稳定克隆, 对 2 种转染细胞在 DNA 水平、RNA 水平和蛋白质水平进行鉴定, 采用 MTT 染色方法和 AnnexinV-FITC 试剂盒进行转染阳性克隆细胞的细胞活力与细胞凋亡检测。结果 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 和 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M26I} 重组质粒转染 NIH3T3 细胞经 G418 筛选后, PCR 方法检测分别获得 1 个和 3 个阳性细胞克隆, RT-PCR 及 western blot 方法进行 DJ-1-His 基因表达检测, 结果均证明外源插入基因的表达, MTT 实验结果初步证明转染 DJ-1^{M26I} 基因的 NIH3T3 阳性细胞组细胞增殖速率低于正常 NIH3T3 细胞组 ($P < 0.05$), 转染 DJ-1 基因的 NIH3T3 阳性细胞组细胞增殖速率与正常 NIH3T3 细胞相比无明显差别; 细胞凋亡检测表明转染 DJ-1^{M26I} 基因的 NIH3T3 阳性细胞组细胞凋亡率高于正常 NIH3T3 细胞, 转染 DJ-1 基因的 NIH3T3 阳性细胞组细胞凋亡率低于正常 NIH3T3 细胞 ($P < 0.05$)。结论 成功构建 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 和 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M26I} 重组表达载体, 成功筛选出稳定表达 DJ-1 及 DJ-1^{M26I} 的 NIH3T3 细胞。DJ-1^{M26I} 基因突变更易导致 NIH3T3 细胞的凋亡。

【关键词】 DJ-1; NIH3T3 细胞; 帕金森; 凋亡

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)01-0028-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.001.002

Construction of Expression Vector pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M26I} and Study of its Impaction on Cell Proliferation and Apoptosis in NIH3T3 Cells

ZHANG Mei-ying¹, XU Ying-qi¹, WANG Wei¹, ZHAO Yue¹, YANG Wei¹, YU Meng¹,
GUO Xiao-chong¹, QIN Ying¹, ZHENG Zhi-hong^{1, 2}

(1. Laboratory Animal Center, China Medical University, Shenyang 110001, China;
2. Department of Pathology and Pathophysiology Research, China Medical University 110001, China)

【基金项目】 辽宁省科技计划项目(No. 2009408001-1)。

【作者简介】 张梅英(1965-), 女, 副教授, 长期从事人类疾病转基因动物研究。E-mail: zhmeiying@163.com。

【通讯作者】 郑志红, 教授, 长期从事人类遗传疾病转基因动物研究。E-mail: zhihongzheng@163.com。

【Abstract】 Objective To construct the recombinant expression vectors of pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 and pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M261}, and provide a basis for further study on the relationship of DJ-1^{M261} mutation and cell proliferation and apoptosis and establish transgenic animal model. **Methods** Using site-directed mutagenesis kit to make the 26th amino acid mutated, constructed pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 and pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M261} recombinant expression vectors. And then transfected them into NIH3T3 cells respectively using lipofectamine. Cells were selected with G418 at the level of 500 μg/ml. Stable clones were identified on the DNA, RNA and protein levels. Using MTT assay and AnnexinV-FITC kit to detect the stable cloned cells' viability and apoptosis level. **Results** NIH3T3 cells transfected with recombinant plasmid pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 or pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M261} screened by G418. We obtained 1 and 3 positive clones of pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 and pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M261} transfected cells by PCR detected. The results of RT-PCR and western blot also showed the expression of DJ-1-His in pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 and pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M261} transfected cells. MTT assay demonstrated the NIH3T3 positive cells transfected with DJ-1^{M261} had the lower proliferation rate than normal NIH3T3 cells ($p < 0.05$). NIH3T3 positive cells carrying the DJ-1 genes showed no significant difference compared with the normal cells NIH3T3 cells. Apoptosis test indicated that the apoptosis rate of DJ-1^{M261} transfected cells was higher than normal NIH3T3 cells, however the apoptosis rate of the DJ-1 transfected cells was lower than normal NIH3T3 cells ($p < 0.05$). **Conclusions** Recombinant expression vectors pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 and pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M261} have constructed successfully. The NIH3T3 cells with stable expression of DJ-1 and DJ-1^{M261} have been constructed successfully. DJ-1^{M261} mutation can result in the apoptosis of NIH3T3 cells easily.

【Key words】 DJ-1; NIH3T3 cell; Parkinson's disease; Apoptosis

DJ-1 基因是近年来发现的又一个与帕金森病 (parkinson's disease, PD) 相关的基因, DJ-1 蛋白广泛表达于人体各种组织, 并以二聚体形式参与细胞多种生命活动: 如细胞周期的调节, 精子成熟和受精, 控制基因转录、调节 mRNA 稳定性和参与细胞氧化应激反应等^[1-4], 现已知 DJ-1 基因存在多种突变位点, 包括 L166P、M26I、R98Q、A104T 和 D149A 等, 研究表明 L166P、M26I 纯合突变可以引起早发型常染色体隐性遗传 PD^[5,6], 但是其发病机制并不完全清楚。

为此, 我们拟构建 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 和 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M261} 重组表达载体, 将其转入 NIH3T3 细胞, 筛选稳定表达细胞株, 进一步在稳定表达 DJ-1 及 DJ-1^{M261} 的 NIH3T3 细胞中研究 DJ-1 及 DJ-1^{M261} 基因表达及其对细胞增殖、凋亡影响。

1 材料和方法

1.1 材料

感受态 DH5α (*E. coli*)、pcDNA3.1/myc-His 质粒、pTZ57R/DJ-1 质粒^[7]、NIH3T3 细胞均为本室保存, DMEM 为 Hyclone 产品, G418、脂质体 (Lipofectamine 2000)、TRIzol、引物合成均为 Invitrogen 公司产品, RNA 提取试剂盒为 AXYGEN 产品、胎牛血清为郑州佰安生物工程有限公司产品, Quickchange kit II 突变试剂盒为 stratagen 公司产品, 凝胶回收试剂盒、Taq 酶等购自宝生物(大连)

有限公司, 反转录试剂盒为 Promega 公司产品, His 标签蛋白抗体为美国 abcam 公司抗体 (ab15149), AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒为凯基生物产品, 酶标仪为瑞士 TECAN 公司 Infinite M200 Pro 型, 流式细胞仪为美国 BD 公司 FACS calibur 型。

1.2 方法

1.2.1 重组表达质粒的构建

根据 DJ-1 基因序列和突变试剂盒说明书要求, 应用 Primer 5 软件设计突变引物, 对 pTZ57R/DJ-1 质粒中 DJ-1 基因进行 DJ-1^{M261} 位点突变, 引物 P1: 5'-CTGTAGATGTCATCAGGCGAGCTGGGATTAAGGTC-3', P2 为: 5'-GACCTTAATCCCAGCTCGCCTGATGACATCTACAG-3', 经测序验证突变序列。将 pTZ57R/DJ-1 和 pTZ57R/DJ-1^{M261} 质粒应用 *Eco*RI 和 *Xba*I 限制性内切酶酶切后纯化、回收 DJ-1 和 DJ-1^{M261} 目的片段, 同时应用 *Eco*RI 和 *Xba*I 酶切 pcDNA3.1/myc-His 载体, 将酶切纯化回收的 DJ-1、DJ-1^{M261} 目的片段与 pcDNA3.1/myc-His 连接、转化、菌液扩增, 提取重组质粒进行双酶切鉴定和测序鉴定。

1.2.2 DNA 转染阳性细胞克隆筛选及其鉴定

1.2.2.1 细胞转染及阳性细胞克隆筛选: 采用脂质体方法将 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 和 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M261} 质粒分别转染 NIH3T3 细胞, 按照 Lipofectamin 2000 试剂盒说明书进行操作。选用 500 μg/mL 的 G418 进行筛选^[3], 每 3 d 换液一次,

的 DNA 序列 atg 突变为 atc, 即氨基酸由蛋氨酸突变为异亮氨酸, 经测序验证, 结果显示与预期相符(图 1)。重组质粒经 *EcoRI* 和 *Xba I* 双酶切鉴定结果如图 2 所示, 酶切后片段大小分别为 5458 bp、718 bp, 表明 pcDNA3.1/myc-His 中已插入片段 *DJ-1*^{M261} 或 *DJ-1* 的 DNA 片段, pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1* 及 pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*^{M261} 重组表达载体构建成功。

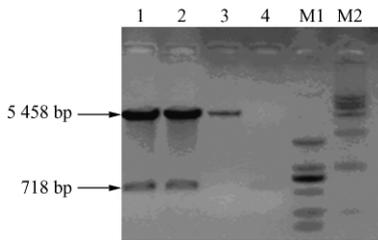


图 2 pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1* 及 pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*^{M261} 重组表达载体 *EcoRI* 和 *Xba I* 双酶切鉴定结果

Fig. 2 pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1* and pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*^{M261} restriction enzyme digestion results with *EcoRI* and *Xba I*

注: 1. pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*^{M261} 质粒;

2. pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1* 质粒; 3. pcDNA3.1/myc-His 载体 *EcoRI* 和 *Xba I* 双酶切片段;

4. 插入基因片段; M1. Marker DL2000; M2. Marker DL15000

Note: Lane 1: pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*^{M261}; Lane 2: pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*; Lane 3: pcDNA3.1/myc-His; Lane 4: the DNA fragment insert into the vector; M1: DNA molecular weight marker (DL2000); M2: DNA molecular weight marker (DL15000)

2.2 稳定转染 *DJ-1* 和 *DJ-1*^{M261} 目的基因的 NIH3T3 阳性克隆细胞株 PCR 鉴定

应用脂质体分别转染 pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1* 及 pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*^{M261} 入 NIH3T3 细胞, 经 G418 筛选后各挑取 54 和 78 个克隆接种于 96 孔板, 细胞扩增后提取 96 孔板中细胞基因组 DNA, 经 PCR 鉴定, 分别获得 1 个稳定转染 *DJ-1* 和 3 个稳定转染 *DJ-1*^{M261} (编号为 M4、M6、M19) 的阳性克隆, PCR 结果见图 3、4。

2.3 稳定转染 *DJ-1* 和 *DJ-1*^{M261} 的 NIH3T3 阳性克隆细胞株 RNA 水平表达鉴定

提取 M19 号 *DJ-1*^{M261} 和 *DJ-1* 阳性克隆细胞株总 RNA, 反转录为 cDNA, 应用特异引物进行扩增, RT-PCR 扩增结果见图 5、6。pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1* 和 pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*^{M261} 质粒转染组均能扩增到特异条带, 正常 NIH3T3 细胞则未见特异条带。

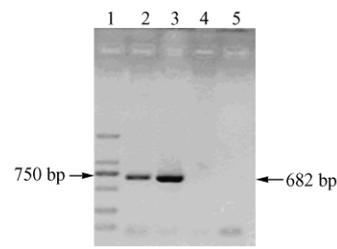


图 3 *DJ-1* 转染 NIH3T3 细胞组 PCR 鉴定电泳检测结果

Fig. 3 Detection of *DJ-1* in *DJ-1* transfected NIH3T3 cells with PCR

注: 1. Marker DL 2000; 2. *DJ-1* 转染组阳性克隆细胞株;

3. 阳性对照; 4. 阴性对照 (正常 NIH3T3 细胞);

5. 空白对照

Note: Lane 1: DNA molecular weight marker (DL2000);

Lane 2: the positive cells with *DJ-1* transfection;

Lane 3: positive control; Lane 4: negative control;

Lane 5: blank control

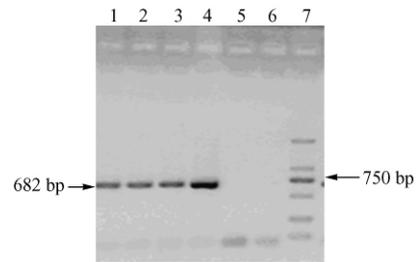


图 4 *DJ-1*^{M261} 转染 NIH3T3 细胞组 PCR 鉴定电泳检测结果

Fig. 4 Detection of *DJ-1* in *DJ-1*^{M261} transfected NIH3T3 cells with PCR

注: 1-3. M4、M6、M19 阳性克隆细胞株; 4. 阳性对照;

5. 阴性对照 (正常 NIH3T3 细胞); 6. 空白对照; 7. Marker DL 2000

Note: Lane 1-3. positive clones named M4\M6\M19;

Lane 4. positive control; Lane 5. negative

control (normal NIH3T3 cells); Lane 6. blank control;

Lane 7. DNA molecular weight marker (DL2000)

2.4 *DJ-1* 和 *DJ-1*^{M261} NIH3T3 阳性克隆细胞株蛋白表达鉴定

Western blot 实验检测 *DJ-1*-His 融合蛋白在 pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1* 和 pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*^{M261} 稳定转染 NIH3T3 细胞中的表达, 结果如图 7 所示, 由图可见 *DJ-1*-His 融合蛋白 (约 22×10^3) 在 pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1* 和 pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*^{M261} 稳定转染细胞中均有阳性表达, 而正常 NIH3T3 细胞未见目的条带。

2.5 *DJ-1* 和 *DJ-1*^{M261} 阳性克隆细胞株细胞活力检测

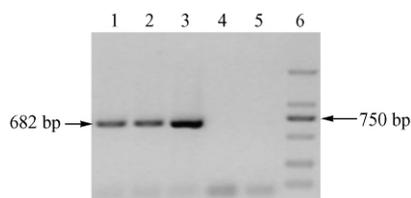


图 5 DJ-1 和 DJ-1^{M261} NIH3T3 阳性克隆细胞株 DJ-1 表达结果

Fig. 5 Expression of DJ-1 in DJ-1 and DJ-1^{M261} positive clone cells

注: 1. DJ-1 组阳性克隆细胞; 2. M19 号 DJ-1^{M261} 阳性克隆细胞; 3. 阳性对照; 4. 阴性对照 (正常 NIH3T3 细胞); 5. 空白对照; 6. Marker DL2000

Note: Lane 1. DJ-1 positive clone cells; Lane 2. DJ-1^{M261} positive clone cells named M19; Lane 3. positive control; Lane 4. negative control (normal NIH3T3 cells); Lane 5. blank control; Lane 6. DNA molecular weight marker (DL2000)

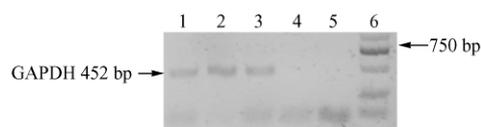


图 6 DJ-1 和 DJ-1^{M261} NIH3T3 阳性克隆细胞株 GAPDH 表达结果

Fig. 6 Expression of GAPDH in DJ-1 and DJ-1^{M261} positive clone cells

注: 1. DJ-1 组阳性克隆细胞; 2. M19 号 DJ-1^{M261} 阳性克隆细胞; 3. 阴性对照 (正常 NIH3T3 细胞); 4. RNA 反转实验空白对照; 5. PCR 实验空白对照; 6. Marker DL2000

Note: Lane 1. DJ-1 positive clone cells; Lane 2. DJ-1^{M261} positive clone cells named M19; Lane 3. negative control (normal NIH3T3 cells); Lane 4. blank control of RNA reverse transcription; Lane 5. blank control of PCR reaction; Lane 6. DNA molecular weight marker (DL2000)

DJ-1、DJ-1^{M261} 阳性克隆和正常 NIH3T3 细胞接种 96 孔板 24h、48h、72h、96h 后 MTT 法检测细胞生长状态 (见图 8), 从图中可见 M19 号 DJ-1^{M261} 阳性细胞克隆生长速度明显低于正常 NIH3T3 细胞和 DJ-1 组 ($P < 0.05$), DJ-1 阳性细胞克隆生长速度与正常 NIH3T3 细胞无显著差别。

2.6 DJ-1 和 DJ-1^{M261} 阳性克隆细胞株细胞凋亡检测

应用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 DJ-1 组、DJ-1^{M261} 组和正常 NIH3T3 组细胞凋亡情况, DJ-1^{M261} 组凋亡检测均值相比最高, 为 14.48, 是 DJ-1 组的 2 倍, 统计学分析表明两组间有显著性差异 ($P <$

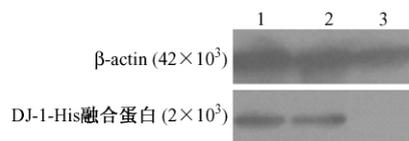


图 7 Western blot 检测 DJ-1-His 融合蛋白实验结果

Fig. 7 Results of DJ-1-His fusion proteins detection with western blot

注: 1. 稳定转染 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 阳性克隆细胞; 2. 稳定转染 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M261} 阳性克隆细胞; 3. 正常 NIH3T3 细胞

Note: Lane 1. positive clone with pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 stable expression; Lane 2. positive clone with pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M261} stable expression; Lane 3. Normal NIH3T3 cells.

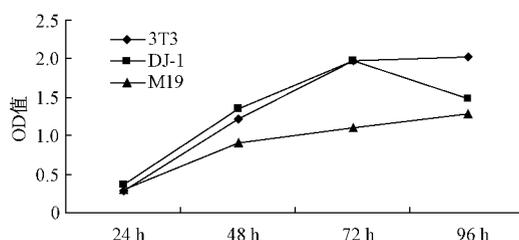


图 8 DJ-1、DJ-1^{M261} 阳性克隆细胞及正常 NIH3T3 细胞不同时间细胞增殖情况 ($\lambda = 570\text{nm}$)

Fig. 8 Cell proliferation conditions of DJ-1 positive clone, DJ-1^{M261} positive clone and normal NIH3T3 cell at different times

0.05); 正常 NIH3T3 组凋亡检测均值为 9.63, 凋亡值检测较高于 DJ-1 组 (7.16), 但是统计学分析 NIH3T3 组与 DJ-1 组二者间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

人类 DJ-1 (PARK7) 基因位于 1p36, 含有 8 个外显子, 其中前两个外显子是非编码序列, 而且可以交替结合 ($1^{A/B}$), 公开的阅读框编码一个含有 189 个氨基酸的蛋白质, 分子量约 20×10^3 , DJ-1 基因在核苷酸水平上高度保守。DJ-1 蛋白在体外以二聚体的形式存在并发挥功能^[8,9], 是 DJ-1/ThiJ/PfpI 超家族的成员之一, 拥有 ThiJ 结构域, 类似 I 型谷氨酰胺酰基转移酶 (GAT)^[10]。

研究表明 DJ-1^{L166P} (Leu166Pro) 和 DJ-1^{M261} (Met 261Ile) 纯合突变均可以引起早发型常染色体隐性遗传 PD^[8,9], 但是 DJ-1 突变后致病的机制还知之甚少。DJ-1 蛋白以二聚体的形式存在, 其 N 端螺旋与两个 C 端螺旋共同构成一个疏水区, 从而参与蛋白

的二聚化,这一结构可能对蛋白的功能起重要作用,而 L166P 突变位于 C 末端,破坏了该处的结构域,使 DJ-1 蛋白失去稳定性,丧失形成二聚体的能力,而易通过泛素-蛋白酶体系统降解^[10];26 位氨基酸空间位置上邻近 L166 位点,该处突变可能降低 DJ-1 蛋白的稳定性,进而推测 M26I 突变可能也像 L166P 突变一样也影响到 DJ-1 蛋白的二聚化^[5,11],目前 DJ-1 蛋白的功能尚不清楚。

本研究通过构建 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 和 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M26I} 重组表达载体,并在 NIH3T3 细胞中采用脂质体介导法分别转染 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 和 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1^{M26I} 两种质粒,G418 筛选后分别获得 DJ-1 和 DJ-1^{M26I} 稳定转染的阳性克隆细胞株,经 RT-PCR 和 western blot 实验验证 DJ-1 和 DJ-1^{M26I} 稳定表达细胞株构建成功,应用 MTT 法检测初步证明,DJ-1^{M26I} 组细胞生长速度明显低于正常 NIH3T3 细胞组与 DJ-1 组 ($P < 0.05$)。凋亡检测结果表明正常 NIH3T3 细胞组与 DJ-1 组、DJ-1 组与 DJ-1^{M26I} 组细胞凋亡率均有显著性差异 ($P < 0.05$),DJ-1^{M26I} 组与正常 NIH3T3 组相比二者间细胞凋亡率没有显著差异,但是 DJ-1^{M26I} 组凋亡检测平均值 (14.48) 高于正常 NIH3T3 组,使用 DJ-1^{M26I} 组早期培养冻存复苏后的相同克隆株细胞凋亡检测均值 (17.77) 较高于表 1 中 DJ-1^{M26I} 实验组,且早期冻存 DJ-1^{M26I} 细胞株传代周期长于 DJ-1^{M26I} 凋亡实验组细胞,推测随着细胞传代次数的增加,携带外源基因细胞的数量可能减少,这可能与阳性克隆细胞株的细胞纯度及其后期传代培养过程中培养基中未加筛选药物 G418 有一定关系。实验证明 M26I 突变 DJ-1 的功能与正常 DJ-1 基因有一定的差别,DJ-1^{M26I} 组克隆细胞携带的外源突变基因可能导致 DJ-1 蛋白功能的变化,从而对正常 NIH3T3 细胞的生物学特性有一定的影响。筛选获得的 DJ-1 与 DJ-1^{M26I} 稳定表达的阳性细胞株将作为深入研究的实验材料,为进一步研究 DJ-1^{M26I}

的致病机制奠定基础。

参考文献:

- [1] Bonifati V, Oostra BA, Heutink P. Linking DJ-1 to neurodegeneration offers novel insights for understanding the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *J Mol Med*, 2004, 82 (3): 163 - 174.
- [2] Cookson MR. Pathways to Parkinsonism [J]. *Neuron*, 2003, 37 (1): 7 - 10.
- [3] Taira T, Salto Y, Niki T, et al. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death [J]. *EMBO Rep*, 2004, 5(2): 213 - 218.
- [4] Le Naonr F, Misk DE, Klense MC, et al. Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as novel circulating tumor antigen in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res* 2001, 7(11): 3328 - 3335.
- [5] Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism [J]. *Science*. 2003; 299: 256 - 259.
- [6] Abou-sleima PM, Healy DG, Quinn N, et al. The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease [J]. *Ann Neurol*, 2003, 54(3): 283 - 286.
- [7] 张梅英, 简美娜, 杨葳等, 转染 DJ-1 和 DJ-1^{L166P} 基因的 NIH3T3 细胞中 tau 基因表达得研究 [J]. *实验动物与比较医学*. 2008, 28(6): 361 - 366.
- [8] Tao X, Tong L. Crystal structure of human DJ-1, a protein associated with early onset Parkinson's disease [J]. *J. Biol Chem*. 2003; 278(33): 31372 - 31379
- [9] Anderson PC, Daggett V. Molecular Basis for the Structural Instability of Human DJ-1 Induced by the L166P Mutation Associated with Parkinson's Disease [J]. *Biochemistry*. 2008; 47(36): 9380 - 9393.
- [10] Zhou W, Freed CR. DJ-1 up-regulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T alpha-synuclein toxicity [J]. *J Biol Chem*. 2005, 280(52): 43150 - 43158.
- [11] More DJ, Zhang L, Dowson TW, et al. A missense mutation (L166P) in DJ-1, linked to familial Parkinson's disease, confers reduced protein stability and impairs homo-oligomerization [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2003, 87, 1558 - 1567.

(修回日期) 2011-08-04