

# *DJ-1*<sup>L166P</sup> 与 *DJ-1*<sup>M261</sup> 基因对 NIH3T3 细胞增殖和凋亡的比较

张梅英<sup>1</sup>, 任萍萍<sup>1</sup>, 徐影琪<sup>1</sup>, 王 惟<sup>1</sup>, 赵 越<sup>1</sup>, 杨 蕙<sup>1</sup>,  
于 萌<sup>1</sup>, 郭晓冲<sup>1</sup>, 秦 英<sup>1</sup>, 郑志红<sup>1,2</sup>

(1 中国医科大学实验动物部 辽宁省转基因动物研究重点实验室, 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 在细胞学水平比较 *DJ-1*<sup>L166P</sup>、*DJ-1*<sup>M261</sup>、*DJ-1*<sup>L166P</sup> 基因对 NIH 3T3 细胞增殖速率与凋亡的关系, 为建立转基因动物模型及帕金森疾病发病机制研究奠定基础。方法 分别将 pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*、pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*<sup>L166P</sup> 和 pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*<sup>M261</sup> 重组质粒脂质体方法转染 NIH 3T3 细胞, 500 μg/ml G418 压力筛选稳定克隆, 对 3 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 Annexin V-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*、pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*<sup>L166P</sup> 和 pcDNA3.1/myc-His-*DJ-1*<sup>M261</sup> 重组质粒转染 NIH 3T3 细胞经 G418 筛选后, PCR 方法检测分别获得 1 个、4 个、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, Caspase-3 RNA 水平检测 *DJ-1*<sup>L166P</sup> 和 *DJ-1*<sup>M261</sup> 组表达高于正常 NIH 3T3 细胞组, 而 *DJ-1* 组 caspase-3 转录水平相对最低, MTT 实验结果初步证明转染 *DJ-1*<sup>L166P</sup> 和 *DJ-1*<sup>M261</sup> 基因的 NIH3T3 阳性细胞组细胞增殖速率均低于 *DJ-1* 组和正常 NIH 3T3 细胞组 ( $P < 0.05$ ), 转染 *DJ-1* 基因的 NIH 3T3 阳性细胞增殖速率与正常 NIH 3T3 细胞相比无明显差别; 细胞凋亡检测表明转染 *DJ-1*<sup>L166P</sup> 和 *DJ-1*<sup>M261</sup> 基因的 NIH3T3 阳性细胞凋亡率均高于正常 NIH 3T3 细胞, 转染 *DJ-1* 基因的 NIH 3T3 阳性细胞凋亡率低于正常 NIH 3T3 细胞 ( $P < 0.05$ )。结论 *DJ-1*<sup>L166P</sup> 和 *DJ-1*<sup>M261</sup> 基因突变均降低 NIH 3T3 细胞增殖速率, *DJ-1*<sup>L166P</sup> 和 *DJ-1*<sup>M261</sup> 基因突变更易导致 NIH 3T3 细胞的凋亡, *DJ-1*<sup>L166P</sup> 和 *DJ-1*<sup>M261</sup> 基因突变对 NIH 3T3 细胞增殖速率和细胞凋亡影响是相似的。

**【关键词】** *DJ-1*; NIH3T3 细胞; 帕金森; 凋亡

**【中图分类号】** R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)04-0010-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.04.003

## Comparison of the Proliferation and Apoptosis of NIH 3T3 cells Treated with *DJ-1*<sup>L166P</sup> or *DJ-1*<sup>M261</sup>

ZHANG Mei-ying<sup>1</sup>, REN Ping-ping<sup>1</sup>, XU Ying-qi<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, ZHAO Yue<sup>1</sup>,  
YANG Wei<sup>1</sup>, YU Meng<sup>1</sup>, GUO Xiao-chong<sup>1</sup>, QIN Ying<sup>1</sup>, ZHENG Zhi-hong<sup>1,2</sup>

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

**【基金项目】** 辽宁省科技计划项目, 项目编号: 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 explore the relationship between DJ-1, DJ-1<sup>M261</sup>, DJ-1<sup>L166P</sup> with the cell proliferation and apoptosis of NIH 3T3 cells at cellular level, and provide a basis for the construction of a transgenic animal model of Parkinson's disease and further study on the pathogenesis of this disease. **Methods** Recombinant plasmids pcDNA3.1/myc-His-DJ-1, pcDNA3.1/myc-His-DJ-1<sup>L166P</sup> and pcDNA3.1/myc-His-DJ-1<sup>M261</sup> were transfected into NIH 3T3 cells, respectively, using lipofectamine. The cells were screened with G418 at a dose of 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Stable clones were identified on the DNA, RNA and protein levels. MTT assay and annexin V-FITC kit were used to detect the viability and apoptosis of those stable cell clones. **Results** After the G418-screening of NIH 3T3 cells transfected with recombinant plasmids pcDNA3.1/myc-His-DJ-1, pcDNA3.1/myc-His-DJ-1<sup>L166P</sup> or pcDNA3.1/myc-His-DJ-1<sup>M261</sup>, one, four and three positive clones were obtained, respectively, by PCR detection. RT-PCR and Western blot detected the expression of DJ-1-His in the positive clones. NIH 3T3 cells transfected with DJ-1<sup>L166P</sup> and DJ-1<sup>M261</sup> had a higher expression of caspase-3 mRNA than normal NIH 3T3 cells, while NIH3T3 cells transfected with DJ-1 had a lower expression. MTT assay showed that NIH 3T3 positive cells transfected with DJ-1<sup>L166P</sup> and DJ-1<sup>M261</sup> had a lower proliferation rate than that of normal NIH3T3 cells ( $P < 0.05$ ), while the NIH 3T3 positive cells carrying DJ-1 gene did not show significant difference compared with the normal NIH 3T3 cells. Apoptosis test indicated that the apoptosis rates of DJ-1<sup>L166P</sup> and DJ-1<sup>M261</sup> transfected cells were higher than that of normal NIH 3T3 cells, however the apoptosis rate of the DJ-1-transfected cells was significantly lower than that of normal NIH 3T3 cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** DJ-1<sup>L166P</sup> and DJ-1<sup>M261</sup> mutations reduce the proliferation of NIH 3T3 cells. DJ-1<sup>L166P</sup> and DJ-1<sup>M261</sup> mutations also enhance apoptosis in NIH 3T3 cells. Their effects on NIH 3T3 cell proliferation and apoptosis are similar.

**【Key words】** DJ-1; NIH 3T3 cells; Parkinson's disease; Apoptosis

帕金森氏病(Parkinson's Disease, PD)属于神经系统退行性病变性疾病,65岁以上人群的患病率约为2%,主要症状主要表现为运动迟缓、静止震颤、步态不稳、肢体僵硬等,严重影响老年人的健康和生活质量。DJ-1是帕金森病相关基因之一,其蛋白广泛表达于肝脏、睾丸、肾脏、骨骼肌、大脑等组织中,以二聚体形式发挥生理功能<sup>[1,2]</sup>,如细胞周期的调节、精子成熟和受精、基因转录调控、参与细胞氧化应激反应等<sup>[3-6]</sup>,存在多个突变位点,如L166P、M261、R98Q、A104T和D149A等,现已知DJ-1第166位氨基酸亮氨酸替代脯氨酸的错义纯合突变(L166P)被认为是引起早发型帕金森病的主要原因,此外,M261纯合突变也可以引起早发型常染色体隐性遗传PD<sup>[7,8]</sup>,但是,由L166P和M261位点突变引发的帕金森发病机制仍不完全清楚。

为此,我们构建pcDNA3.1/myc-His-DJ-1、pcDNA3.1/myc-His-DJ-1<sup>M261</sup><sup>[9]</sup>和pcDNA3.1/myc-His-DJ-1<sup>L166P</sup><sup>[10]</sup>重组表达载体,将其转染NIH 3T3细胞,筛选稳定表达细胞株,并在稳定表达DJ-1、DJ-1<sup>L166P</sup>及DJ-1<sup>M261</sup>的NIH 3T3细胞进行了DJ-1、DJ-1<sup>L166P</sup>及DJ-1<sup>M261</sup>对NIH 3T3细胞增殖、细胞凋亡影响的比较研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

感受态DH5 $\alpha$  (*E. coli*)、pcDNA3.1/myc-His质

粒、pTZ57R/DJ-1质粒<sup>[11]</sup>、NIH 3T3细胞均为本室保存,DMEM为Hyclone产品,G418、脂质体(Lipofectamine 2000)、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,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蛋白一抗为美国abcam公司抗体(ab15149),Annexin V-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 NIH 3T3细胞培养与转染:NIH 3T3细胞使用含有10%胎牛血清的DMEM培养基常规培养,采用Lipofectamin 2000脂质体将pcDNA3.1/myc-His-DJ-1、pcDNA3.1/myc-His-DJ-1<sup>L166P</sup>和pcDNA3.1/myc-His-DJ-1<sup>M261</sup>质粒分别转染NIH3T3细胞,按照试剂盒说明书进行操作。选用500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的G418进行筛选,每3d换液1次,约15d后可见细胞呈克隆状生长,各挑取细胞克隆接种于96孔板中进行扩增培养。

1.2.2 阳性克隆细胞PCR检测:酚氯仿法提取各克隆细胞基因组DNA,PCR检测上游引物:5'-GTGGAATTCTACAGGCTTGTA-3',下游引物(含His标签序列):5'-ATGGTGATGGTGATGATGAC-

3', 反应条件: 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 59℃ 1 min, 72℃ 1 min, 32 个循环, 72℃ 10 min, 扩增片段大小为 682 bp, 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.3 阳性克隆细胞 RT-PCR 检测: 采用 Axygen RNA 提取试剂盒提取每组各 1 株阳性克隆细胞和正常 NIH 3T3 细胞总 RNA, 反转录为 cDNA, PCR 检测实验同上; 并以 GAPDH 为内参, GAPDH 上游引物: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; 下游引物: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3', 反应条件为 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min, 扩增片段大小为 452 bp, 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.4 阳性克隆细胞 caspase-3、DJ-1 (人) 基因转录水平检测: 采用 Axygen RNA 提取试剂盒提取每组各 1 株阳性克隆细胞和正常 NIH3T3 细胞总 RNA, 反转录为 cDNA, caspase-3 引物 P1: 5'-ACTGGAATGTCATCTCGCTCTG-3', P2: 5'-CTTCTGGCAAGCCATCTCCT-3', DJ-1 (人) 引物 P1: 5'-GGTGC AGGCTTGTAACATATAAC -3', P2: 5'-CTAGTC TTTAAGAACAAGTGGAGCC-3', 反应条件均为 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 32 个循环; 72℃ 10 min, caspase-3 目的片段大小为 384 bp, DJ-1 (人) 目的片段大小为 600 bp, 并以 GAPDH 为内参, 引物及 PCR 反应条件同上, 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.5 阳性克隆细胞 Western blot 法表达检测: 分别提取每组阳性克隆细胞与正常 NIH 3T3 细胞总蛋白, 取总蛋白 30 μg/孔上样, His 一抗 (鼠源性 1:100) 4℃ 孵育过夜, 二抗 (1:1500) 室温孵育膜 2 h, ECL 显色, 本实验以 β-actin 为实验内对照, 实验重复三次。

1.2.6 MTT 法检测细胞活力: 分别在 96 孔板接种 DJ-1、DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup> 组阳性克隆细胞和正常 NIH 3T3 细胞各 5 000 个/孔, 每孔培养基为含有 10% 胎牛血清的 DMEM 100 μL, 每实验组细胞接种 5 个复孔, 于 24、48、72、96 h 加入 20 μL MTT, 37℃ 恒温 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 4 h 后, 弃上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 充分振荡 10 min 后于酶标仪 (λ = 570 nm) 测定 A 值。实验重复 3 次。

1.2.7 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡情况: 分别接种 DJ-1、DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup> 阳性克隆和正常 NIH3T3 于 6 孔板中, 然后各收集 5 × 10<sup>5</sup> 个, 按照 annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明书进行操作,

流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.8 统计学分析: 采用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计分析, 所有实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验进行均数比较。

## 2 结果

### 2.1 阳性克隆细胞 PCR 检测结果

将 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1<sup>L166P</sup>、pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 和 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1<sup>M261</sup> 三种重组质粒分别转染 NIH3T3 细胞后, 经 500 μg/mL 的 G418 筛选、PCR 鉴定, DJ-1 组、DJ-1<sup>M261</sup> 组、DJ-1<sup>L166P</sup> 组分别获得 1、3、4 个阳性细胞克隆, 检测结果见图 1。

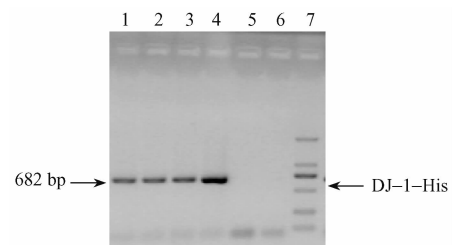


图 1 部分转染阳性克隆细胞 PCR 检测电泳结果  
1-3: 分别为 DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup> 组、DJ-1 组阳性克隆细胞; 4: 阳性对照; 5: 正常 NIH3T3 细胞; 6: 空白对照; 7: marker 2000

Fig. 1 Electrophoretic results of PCR products of positive transfected cell clones

1-3: Positive transfected cell clones of the groups of DJ-1<sup>L166P</sup>, DJ-1<sup>M261</sup> and DJ-1; 4: Positive control; 5: Normal NIH 3T3 cells; 6: Control; 7: Marker 2000

### 2.2 DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup> 和 DJ-1 组阳性克隆细胞株 RNA 水平表达鉴定结果

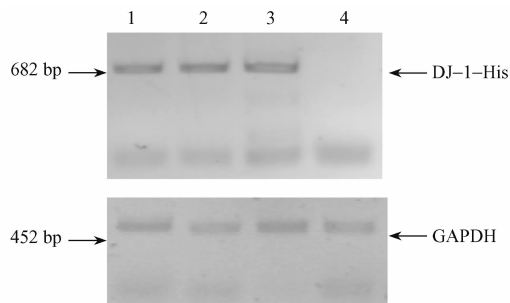
提取 DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup> 和 DJ-1 阳性克隆细胞株总 RNA, 反转录为 cDNA, RT-PCR 扩增结果见图 2。DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup> 和 DJ-1 组质粒转染均能扩增到特异条带, 正常 NIH3T3 细胞则未见特异条带。

### 2.3 Caspase-3 和 DJ-1 (人) mRNA 检测结果

用 caspase-3 和 DJ-1 (人) mRNA 特异引物对 DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup>、DJ-1 转染阳性克隆细胞组及正常 NIH3T3 细胞进行 RT-PCR 检测, 检测结果见图 3, 从实验结果可见人 DJ-1 mRNA 在三种转染细胞中均见目的条带, 而正常 NIH3T3 细胞组未见目的条带; Caspase-3 基因电泳结果中 DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup> 条带亮度高于 NIH3T3 细胞组, DJ-1 组未见目的条带。

### 2.4 DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup> 和 DJ-1 组阳性克隆细胞株蛋白表达检测结果

Western blot 实验检测 DJ-1-His 融合蛋白在

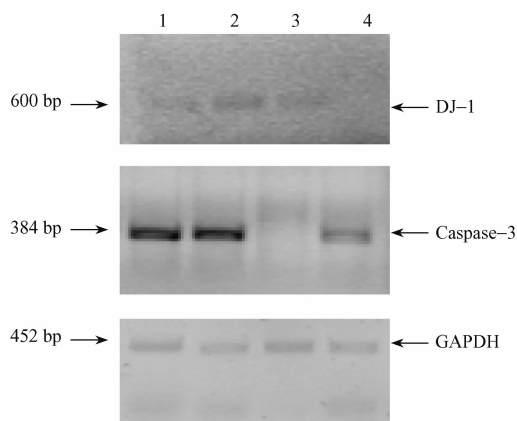


**图 2** DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup>和 DJ-1 组<sup>N</sup> NIH3T3 阳性克隆细胞株 RT-PCR 实验结果

1-3: DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup>和 DJ-1 组 NIH3T3 阳性克隆细胞; 4: 正常 NIH3T3 细胞

**Fig. 2** RT-PCR results of DJ-1<sup>L166P</sup>, DJ-1<sup>M261</sup> and DJ-1 positive clone NIH 3T3 cells

Note: 1 - 3: Positive cell clones of group of DJ-1<sup>M261</sup>, DJ-1<sup>L166P</sup> and DJ-1; 4: Normal NIH 3T3 cells



**图 3** DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup>和 DJ-1 组<sup>N</sup> NIH3T3 阳性克隆细胞株 caspase-3 基因 RT-PCR 实验结果

1 - 3: DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup>和 DJ-1 组 NIH3T3 阳性克隆细胞; 4: 正常 NIH3T3 细胞

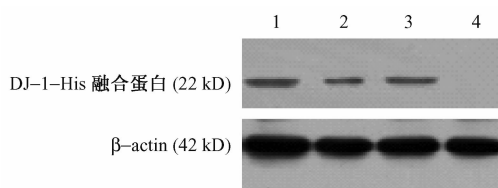
**Fig. 3** RT-PCR results of DJ-1<sup>L166P</sup>, DJ-1<sup>M261</sup> and DJ-1 positive clone NIH 3T3 cells

Note: 1 - 3: positive cell clones of the groups of DJ-1<sup>L166P</sup>, DJ-1<sup>M261</sup> and DJ-1; 4: Normal NIH 3T3 cells

pcDNA3.1/myc-His-DJ-1 和 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1<sup>M261</sup> 稳定转染 NIH 3T3 细胞中的表达, 结果如图 4 所示, 由图可见 DJ-1-His 融合蛋白(约 22 kD)在 DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup> 和 DJ-1 组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<sup>L166P</sup>、DJ-1 和 DJ-1<sup>M261</sup> 阳性克隆细胞株细胞活力检测

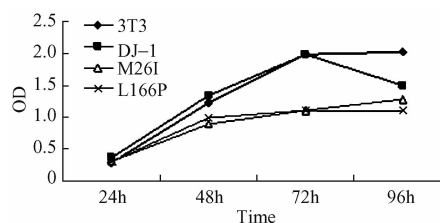
DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup>、DJ-1 阳性克隆和正常 NIH3T3 细胞分别接种 96 孔板, 24、48、72、96 h 后



**图 4** DJ-1-His 融合蛋白 Western blot 检测实验结果 1 - 3: DJ-1<sup>L166P</sup>、DJ-1<sup>M261</sup>和 DJ-1 组阳性克隆 NIH3T3 细胞; 4: 正常 NIH3T3 细胞

**Fig. 4** Western blot results of DJ-1<sup>L166P</sup>, DJ-1<sup>M261</sup> and DJ-1 positive clone NIH3T3 cells

Note: 1 - 3: Positive cell clones of the groups of DJ-1<sup>L166P</sup>, DJ-1<sup>M261</sup> and DJ-1; 4: Normal NIH 3T3 cells



**图 5** DJ-1、DJ-1<sup>M261</sup>、DJ-1<sup>L166P</sup> 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. 5** Cell proliferation conditions of the DJ-1 positive clone, DJ-1<sup>M261</sup> positive clone, DJ-1<sup>L166P</sup> positive clone and normal NIH 3T3 cells at different times

MTT 法检测细胞生长状态见图 5, 从图中可见 DJ-1<sup>L166P</sup> 和 DJ-1<sup>M261</sup> 阳性细胞克隆增殖速率相似, 均明显低于正常 NIH 3T3 细胞和 DJ-1 组 ( $P < 0.05$ ), DJ-1 阳性细胞克隆生长速度与正常 NIH 3T3 细胞无显著差别。

### 2.6 细胞凋亡检测

应用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 DJ-1 组、DJ-1<sup>M261</sup> 组和正常 NIH3T3 组细胞凋亡情况, DJ-1<sup>L166P</sup> 和 DJ-1<sup>M261</sup> 组凋亡检测均值分别为 14.91 和 14.48 相对较高, 是 DJ-1 组的 2 倍, 统计学分析表明 DJ-1<sup>L166P</sup> 和 DJ-1<sup>M261</sup> 组与 DJ-1 组相比差异有显著性 ( $P < 0.05$ ); 正常 NIH 3T3 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 NIH 3T3 组与 DJ-1 组二者间差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

### 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 kDa, 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<sup>[1, 12]</sup>。

研究表明 DJ-1<sup>L166P</sup> (Leu166Pro) 和 DJ-1<sup>M26I</sup> (Met 26Ile) 纯合突变均可以引起早发型常染色体隐性遗传 PD<sup>[1, 12]</sup>, 但是 DJ-1 突变后致病的机制仍未完全阐明。DJ-1 蛋白以二聚体的形式存在并发挥其生理功能, 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-蛋白酶体系降解<sup>[13]</sup>; 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<sup>[7, 14]</sup>。

本研究通过将 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1、pcDNA3.1/myc-His-DJ-1<sup>M26I</sup> 和 pcDNA3.1/myc-His-DJ-1<sup>L166P</sup> 重组质粒脂质体法转染 NIH3T3 细胞, G418 筛选后分别获得 DJ-1、DJ-1<sup>L166P</sup> 和 DJ-1<sup>M26I</sup> 稳定表达的阳性克隆细胞株, 经 RT-PCR 和 Western blot 实验证明 DJ-1、DJ-1<sup>L166P</sup> 和 DJ-1<sup>M26I</sup> 稳定表达细胞株构建成功, 并应用 MTT 法检测初步证明, DJ-1<sup>L166P</sup> 和 DJ-1<sup>M26I</sup> 组细胞生长速度相似, 增殖速率明显低于正常 NIH3T3 细胞组与 DJ-1 组, 统计学分析证明存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。凋亡实验检测结果表明正常 NIH3T3 细胞组与 DJ-1 组、DJ-1 组与 DJ-1<sup>L166P</sup> 和 DJ-1<sup>M26I</sup> 组细胞凋亡率均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 在转录水平凋亡相关因子 caspase-3 检测实验中, 结果显示 DJ-1<sup>L166P</sup> 和 DJ-1<sup>M26I</sup> 组表达量高于正常 NIH 3T3 细胞组, DJ-1 组未见 caspase-3 目的条带, 而 DJ-1 (人) mRNA 检测 DJ-1、DJ-1<sup>L166P</sup> 和 DJ-1<sup>M26I</sup> 均有目的条带, 表达量相近, caspase-3 检测结果与凋亡实验预期相符。从实验结果分析表明 DJ-1<sup>L166P</sup> 和 DJ-1<sup>M26I</sup> 组克隆细胞携带的外源基因对 NIH 3T3 细胞的生物学特性均产生了一定的影响, M26I 突变与 L166P 位点突变对 NIH 3T3 细胞增殖速率和细胞凋亡的影响是相似的, M26I 突变与 L166P 位点突变均降低 NIH 3T3 细胞增殖速率, 并且均有 NIH3T3 细胞凋亡的作用。推测 M26I 突变 DJ-1 蛋白功能的改变与 L166P 位点突变所引起的 DJ-1 蛋白功能的改变可能具有一定的相似之处, 同时实验结果也证实 M26I 突变与 L166P 突变的 DJ-1 的功能与正常 DJ-1 基因存在

一定的差别, 其详细机制有待于作进一步的研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 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.
- [ 2 ] Abeliovich A, Flint Beal M. Parkinsonism genes: culprits and clues [J]. *J Neurochem*. 2006, 99(4):1062 - 1072.
- [ 3 ] Bonifati V, Oostra tA, 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.
- [ 4 ] Cookson MR. Pathways to parkinsonism [J]. *Neuron*, 2003, 37(1): 7 - 10.
- [ 5 ] 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.
- [ 6 ] Le Naonr F, Misek 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.
- [ 7 ] 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(5604):256 - 259.
- [ 8 ] 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.
- [ 9 ] 张梅英, 徐影琪, 王惟等. pcDNA3.1/myc-His-DJ-1<sup>M26I</sup> 重组载体构建及其对 NIH3T3 细胞增殖和凋亡研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(1):29 - 34.
- [ 10 ] 张梅英, 吴红联, 蒯美娜, 等. 突变 DJ-1 转基因小鼠模型的建立 [J]. *中国医科大学学报*. 2009, 38(11):820-823.
- [ 11 ] 张梅英, 蒯美娜, 杨葳, 等. 转染 DJ-1 和 DJ-1<sup>L166P</sup> 基因的 NIH3T3 细胞中 tau 基因表达的研究 [J]. *实验动物与比较医学*, 2008, 28(6):361 - 366.
- [ 12 ] 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.
- [ 13 ] 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.
- [ 14 ] Moore DJ, Zhang L, Dawson TM, et al. A missense mutation (L166P) in DJ-1, linked to familial Parkinson's disease, confers reduced protein stability and impairs homo-oligomerization [J]. *J Neurochem*, 2003, 87, 1558 - 1567.

[ 修回日期 ] 2012-01-17