



PC12细胞SLC6A4基因沉默稳转细胞系的建立及SLC6A4基因沉默对缺氧PC12细胞凋亡的影响

张冬梅, 高迎春, 何蕾, 陈克明, 李文斌, 王荣, 马慧萍

Establishment of SLC6A4 gene silencing stable cell line in PC12 cells and the effect of SLC6A4 gene silencing on apoptosis of hypoxia PC12 cells

ZHANG Dongmei, GAO Yingchun, HE Lei, CHEN Keming, LI Wenbin, WANG Rong, MA Huiping

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202205093>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

活性多肽GRGDS对氧糖剥夺诱导PC12细胞损伤的保护作用及其机制研究

Protective effect and mechanism of active peptide GRGDS on PC12 cells damage by oxygen-glucose deprivation

药学实践与服务. 2021, 39(4): 317-321, 330 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202007053

麻黄碱对PC12细胞内BDNF、PSD95和synapsin1表达水平的影响

Effects of ephedrine on the expression levels of BDNF, PSD95 and synapsin1 in PC12 cells

药学实践与服务. 2021, 39(6): 529-533 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202104014

4个黄芪异黄酮类化合物对PC 12细胞分化的影响

The effect of four compounds of astragalus isoflavones on the differentiation of PC 12 cells

药学实践与服务. 2020, 38(3): 232-236 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202001045

敲减MCCC2对前列腺癌细胞系DU145增殖、迁移和凋亡的影响

Effects of MCCC2 knockdown on proliferation, migration and apoptosis of DU145 prostate cancer cells

药学实践与服务. 2021, 39(3): 215-220 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202104020

海绵来源的smenospongine诱导乳腺癌MCF7细胞凋亡机制研究

Effect of marine sponge-derived smenospongine on apoptosis in breast cancer MCF7 cells

药学实践与服务. 2018, 36(5): 399-402,421 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.05.004

泽漆抑制三阴乳腺癌MDA-MB-231细胞及其凋亡机制研究

Inhibitory effect of *Euphorbia helioscopia* on human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells and its possible mechanism of apoptosis

药学实践与服务. 2017, 35(4): 337-340,358 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.012



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 高原缺氧损伤机制与防护专题 ·

PC12 细胞 SLC6A4 基因沉默稳转细胞系的建立及 SLC6A4 基因沉默对缺氧 PC12 细胞凋亡的影响

张冬梅, 高迎春, 何 蕾, 陈克明, 李文斌, 王 荣, 马慧萍 (中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院药剂科, 甘肃 兰州 730050)

[摘要] 目的 构建 SLC6A4 基因 RNA 干扰(RNAi)-短发夹 RNA(shRNA)慢病毒表达载体, 建立慢病毒介导沉默 SLC6A4 基因的 PC12 细胞稳转细胞系, 检测 SLC6A4 基因沉默对缺氧诱导的细胞凋亡的影响。方法 设计合成 3 条针对 SLC6A4 基因的 shRNA 干扰序列, 构建于慢病毒载体质粒 GV248 中, 在 293T 细胞中共转染进行慢病毒包装。转染大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤 PC12 细胞, 荧光显微镜观察 GFP 荧光, 筛选最佳 shRNA 干扰序列, 应用嘌呤霉素筛选出稳定转染的细胞株。应用 RT-PCR 方法检测 SLC6A4 基因的表达, Western blot 方法检测蛋白 5-HTT 的表达变化, 流式细胞术检测沉默 SLC6A4 基因对缺氧诱导的 PC12 细胞凋亡的影响。结果 成功构建 SLC6A4-shRNA 慢病毒载体并转染 PC12 细胞, 与正常对照组及干扰对照组比较, 干扰组细胞内 SLC6A4 基因和蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$), 证实慢病毒载体能够有效沉默 SLC6A4 基因, 沉默 SLC6A4 基因可以逆转缺氧诱导的细胞凋亡。结论 通过 shRNA 慢病毒载体途径可有效沉默 PC12 细胞 SLC6A4 基因, 沉默 SLC6A4 基因可以逆转缺氧诱导的细胞凋亡。

[关键词] 慢病毒载体; shRNA; RNA 干扰; SLC6A4; 细胞凋亡

[中图分类号] R587.2

[文献标志码] A

[文章编号] 2097-2024(2022)05-0389-06

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202205093

Establishment of SLC6A4 gene silencing stable cell line in PC12 cells and the effect of SLC6A4 gene silencing on apoptosis of hypoxia PC12 cells

ZHANG Dongmei, GAO Yingchun, HE Lei, CHEN Keming, LI Wenbin, WANG Rong, MA Huiping (Department of Pharmacy, the 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of the PLA, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective** To construct SLC6A4-shRNA lentiviral vector, establish PC12 cells stable transformation cell line, and detect the effect of SLC6A4 gene silencing on hypoxia induced PC12 cells apoptosis. **Methods** Three specific targets sequence of SLC6A4 were designed and short hairpin RNA was synthesized, and then were recombined into shRNA expression vector GV248 plasmid, with non-homology shRNA sequence as negative control. The connection products were switched to competent cells. After identification and sequencing, the vectors were co-transfected with the auxiliary vectors into 293T cells in order to produce recombinant shRNA lentiviral particles. Then, PC12 cells were infected with the recombinant lentiviral and screened by puromycin. The PC12 cells were divided into two groups: lentiviral negative control group (NC-shRNA) and SLC6A4-silenced group (SLC6A4-shRNA). The expression of SLC6A4 mRNA was detected by real-time fluorescence quantitative and the 5-HTT protein level was assayed by Western blot, The effect of SLC6A4 gene silencing on hypoxia induced apoptosis was detected by flow cytometry. **Results** The SLC6A4-shRNA lentiviral expression vector was constructed and the recombinant lentiviral particles by packaging the 293T cells were obtained, the stably infected PC12 cells were established after filtering. Compared with negative control group, the expression level of SLC6A4 gene and 5-HTT protein in SLC6A4-shRNA group was suppressed notably ($P < 0.01$). It was confirmed that lentiviral vector could effectively silence SLC6A4 gene in PC12 cells and SLC6A4 gene silencing could decrease apoptosis rate of PC12 cells under hypoxia condition. **Conclusion** The SLC6A4 gene of PC12 cells could be effectively silenced by shRNA lentivirus vector, which could reverse hypoxia induced apoptosis.

[Key words] lentivirus; shRNA; RNA interference; SLC6A4; apoptosis

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81571847); 军队后勤科研计划项目面上项目 (CWH17J010); 军队卫勤保障能力创新与生成专项计划 (21WQ045)

[作者简介] 张冬梅, 硕士, 主管药师, 研究方向: 高原缺氧损伤机制及新药研发, Email: 835935150@qq.com

[通信作者] 王 荣, 主任药师, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 高原缺氧损伤机制及药代动力学研究, Email: wangrong-69@163.com; 马慧萍, 主任药师, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 高原缺氧损伤机制及新药研发, Email: mahuiping2022@aliyun.com

低压低氧、低温和强紫外线辐射是高原环境的主要特点,脑组织以有氧代谢为主,由于其耗氧量大、贮氧量少、代谢率高的特点,是对缺氧最为敏感的器官,高原缺氧时神经细胞首先出现能量代谢障碍,导致神经细胞的损伤甚至死亡,细胞凋亡是缺氧导致神经细胞损伤的重要机制。5-羟色胺转运体(5-HTT)是由 SLC6A4 基因编码的一种钠依赖的单胺转运蛋白,在大脑神经元、肺动脉平滑肌细胞、血小板等体细胞中均有表达,主要功能是将细胞外的 5-HT 再摄取至细胞内发挥生理作用^[1]。5-HT 作为活性氧化物自身具有细胞毒性,浓度过高则可产生大量的内源性氧化物导致线粒体途径的细胞凋亡^[2],前期研究表明,缺氧可以诱导 PC12 细胞凋亡、5-HTT 表达升高,给予一定剂量的 5-HTT 抑制剂盐酸氟西汀后可以降低 PC12 细胞 5-HTT 表达和凋亡,从而保护缺氧诱导的 PC12 细胞损伤^[3-4],另有研究表明,高原缺氧会导致肺组织中 5-HTT 表达升高,机制与细胞凋亡有关^[5-6],为了论证 5-HTT 的表达变化在缺氧神经细胞中的作用,我们利用 RNA 干扰(RNAi)的方法构建靶向 SLC6A4 基因的短发夹 RNA (shRNA)重组慢病毒质粒表达载体,建立 PC12 细胞 SLC6A4 基因干扰的稳定表达细胞株,抑制 PC12 细胞中 SLC6A4 基因表达以及 5-HTT 蛋白的表达,测定缺氧情况下沉默 SLC6A4 基因对细胞凋亡的影响,以期高原神经损伤相关疾病的研究提供理论依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

RNA 干扰(RNAi)重组慢病毒载体 GV248、病毒包装辅助质粒(pHelper1.0 和 pHelper2.0 载体)、人胚肾上皮细胞系 293T 细胞、大肠杆菌 DH5 α 、DNA oligo、鉴定引物(R&F)及 DNA 测序(上海吉凯基因化学技术有限公司);大鼠嗜铬瘤 PC12 细胞

(美国模式培养物集存库, ATCC); 二甲基亚砜(DMSO)(美国 Sigma 公司); DMEM 培养基、0.25% Trypsin-EDTA 胰酶(1 \times)、胎牛血清、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、0.25% 胰酶消化液(美国 Gibco 公司); CCK-8 试剂盒(日本同仁公司); FITC 标记 Annexin V/PI 凋亡试剂盒(美国 BD 公司); EST-10-02 氧浓度测定仪(美国 ESTESNROS 公司); 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); 三气培养箱(德国 Memmert 公司); SW-CJ-2FD 超净工作台(中国杭州净化工作设备厂); SpectraMaxi3 全自动荧光酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); 流式细胞仪(美国艾森公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

将 PC12 细胞培养于 F12-K 培养基中,其中含有 15% 马血清、2.5% 的胎牛血清以及 1% 双抗(100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素)。293T 培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 1% 双抗的 DMEM 培养基中,两种细胞均置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中常规培养,缺氧培养采用 1%O₂ 模拟缺氧环境。

1.2.2 携带表达 SLC6A4-shRNA 慢病毒干扰载体的构建

根据 Genbank SLC6A4 基因转录本(NM_013034),利用软件设计 3 条针对 SLC6A4 基因干扰靶序列(表 1),3 条 DNA oligo 分别包含有 21 个碱基正义链、6 个核苷酸序列的 loop 环和互补 21 个碱基的反义链,在 5'端分别加上限制性核酸内切酶 Age I 和 EcoR I 的酶切位点,在 3'端加入 RNA poly III 聚合酶转录终止信号 TTTTT,反义链 5'加入终止信号互补序列。同时,以一段无关序列作为阴性对照(NC,即干扰对照组)。将 DNA oligo 复性后配对产生双链,通过其两端所含酶切位点采用 T₄ 连接酶与酶切后的慢病毒载体 GV248 在 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,构建 3 种目的基因的重组慢病毒质粒及对照质

表 1 SLC6A4-shRNA 干扰序列

名称	序列
SLC6A4-shRNA-GV248-1F	5'-CCG GTA GCC AAA TAT CCA ATG GGT ACT CGA GTA CCC ATT GGA TAT TTG GCT ATT TTT G-3'
SLC6A4-shRNA-GV248-1R	5'-AAT TCA AAA ATA GCC AAA TAT CCA ATG GGT ACT CGA GTA CCC ATT GGA TAT TTG GCT ATT TTT G-3'
SLC6A4-shRNA-GV248-2F	5'-CCG GTG GCA ACT GCA CCA ACT ACT TCT CGA GAA GTA GTT GGT GCA GTT GCC ATT TTT G-3'
SLC6A4-shRNA-GV248-2R	5'-AAT TCA AAA ATG GCA ACT GCA CCA ACT ACT TCT CGA GAA GTA GTT GGT GCA GTT GCC ATT TTT G-3'
SLC6A4-shRNA-GV248-3F	5'-CCG GAC CCA ACT GGC AGA AAC TCT TCT CGA GAA GAG TTT CTG CCA GTT GGG TTT TTT G-3'
SLC6A4-shRNA-GV248-3R	5'-CCG GAC CCA ACT GGC AGA AAC TCT TCT CGA GAA GAG TTT CTG CCA GTT GGG TTT TTT G-3'

粒 (SLC6A4-shRNA-GV248-1、SLC6A4-shRNA-GV248-2、SLC6A4-shRNA-GV248-3 和 NC-shRNA-GV248), 转入准备好的感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 挑取阳性克隆, GV248 通用引物进行 PCR 电泳及测序鉴定。由上海吉凯基因化学技术有限公司构建和包装。

1.2.3 shControl、shSLC6A4 慢病毒的包装与滴度测定

重组慢病毒质粒 (SLC6A4-shRNA-GV248-1、SLC6A4-shRNA-GV248-2、SLC6A4-shRNA-GV248-3 和 NC-shRNA-GV248) 与辅助质粒 (pHelper 1.0 载体质粒、pHelper 2.0 载体质粒) 重组慢病毒质粒 (SLC6A4-shRNA-GV248-1、SLC6A4-shRNA-GV248-2、SLC6A4-shRNA-GV248-3 和 NC-shRNA-GV248) 与辅助质粒 (pHelper 1.0 载体质粒、pHelper 2.0 载体质粒), 当 293T 的细胞密度达到 80% 左右, 3 个重组慢病毒质粒和空慢病毒载体分别与辅助包装载体质粒进行转染实验, 用 Lipofectamine TM 2000 共转染, 培养 6 h, 更换为完全培养基培养, 荧光显微镜下观察细胞形态和 GFP 表达, 48 h 后收集上清液, 20 000 r/min 超速离心 3 h 并浓缩病毒, 最后包装产生慢病毒, 即含有 3 条 SLC6A4 基因序列的慢病毒 EGFP-shSLC6A4-1、EGFP-shSLC6A4-2、EGFP-shSLC6A4-3。4 $^{\circ}\text{C}$, 1 500 r/min 离心 5 min, 吸取上清液, 再用 0.45 μm 滤器过滤, 离心浓缩, 得到重组慢病毒, 测定病毒滴度后, 分装在 -80°C 冰箱保存。

1.2.4 重组慢病毒感染 PC12 细胞获得稳定转染细胞株

将对数生长期的 PC12 细胞于感染前 24 h 接种于 6 孔板中, 接种体积为 2 ml/孔, 细胞数目同为 5×10^4 个/ml。用病毒原液感染状态较好的 PC12 细胞, 实验设 SLC6A4 干扰组 (ShSLC6A4-1/ShSLC6A4-2/ShSLC6A4-3), 空载体组 (VECTOR)。按预实验确定的感染复数 (MOI) 感染细胞 (MOI=100), 加入 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的转染增敏剂凝聚胺。12 h 后更换为完全培养基, 72 h 后用倒置荧光显微镜观察绿色荧光即绿色荧光蛋白 (GFP) 表达情况, 用含 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 嘌呤霉素的新鲜培养基替换病毒感染液。待 WT 组细胞被嘌呤霉素全部杀死后, 将 SLC6A4 干扰组存活下来的细胞转移至 6 孔板, 继续用含嘌呤霉素的培养基培养, 直至细胞密度达 70% 时, 用含嘌呤霉素的培养基持续培养, 选取生长状态良好的阳性克隆孔逐级扩大培养, 获得敲减 SLC6A4 基因 PC12 细胞稳定细胞株。

1.2.5 RT-PCR 法检测目的基因 SLC6A4 基因的表达量

总 RNA 的提取及其质量和浓度的测定: 按照 TaKaRa 基因提取试剂盒说明书提取基因。使用 Biowave II + 紫外仪测定 RNA 的浓度。反转录反应: 将提取的总 RNA 反转录为 cDNA 后, 以 cDNA 为模板实时荧光定量, 将样品放入 -80°C 冰箱保存。RT 反应液反应体系: (RT-PCR 引物的合成 F, 5'-ACTAGCTGCACGAACTCCTGGAA-3' 和 R, 5'-AGACTGGTGGATCTGCAGGACA-3'), 由宝生物有限公司设计合成大鼠 mRNA 序列, Real-time RT-PCR 反应稀释引物, 配制 PCR 反应液, 将 cDNA 和 PCR 反应液加入八连管后, 置于实时荧光定量 PCR 仪中反应, 2 h 后可得扩增和溶解曲线、目的基因的 Ct 值。RT-PCR 反应条件: 第一步: 95°C 、30 s, 第二步: 95°C 、5 s; 60°C 、31 s; 40 个循环。对 PCR 阳性克隆片段测序, 并在 GenBank 数据库中将测序出的结果进行 Blast 比对。

1.2.6 Western Blot 检测慢病毒转染后目的蛋白 5-HTT 的表达

干扰对照组 (转染 NC-shRNA)、干扰组 (转染 SLC6A4-shRNA)。对数生长期生长状态良好的 3 组细胞, 培养 24 h, 收集各组细胞, PBS 洗涤 2 次, 离心, 弃上清液, 加入 100 μl 预冷的 RIPA 细胞裂解液, 置冰上 30 min, 4°C 、 $12\ 000 \times g$ 离心 15 min, 取上清液并进行蛋白定量 (BCA 法), 加上样缓冲液煮沸 10 min, 离心后取 50 μg 蛋白样品进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 蛋白半干转移至 PVDF 膜, 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液室温封闭 1 h, 加入大鼠 SLC6A4 的 I 抗, 4°C 孵育过夜。应用 TBST 反复洗膜 3 次, 加入 II 抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 将胶片拍照后用凝胶图像处理系统分析, 实验重复 3 次。

1.2.7 流式细胞术测定细胞凋亡

将 PC12 细胞干扰对照组 (转染 NC-shRNA)、干扰组 (转染 SLC6A4-shRNA-2) 分为两组, 将对数生长期的各组细胞分别以 10^5 的密度接种于 6 孔板中, 24 h 后, 更换培养液。将 NC-shRNA 组和 SLC6A4-shRNA 组细胞分为正常条件和缺氧条件培养, 正常组: 置于 37°C 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中常规培养; 缺氧组: 将培养皿置于缺氧小室中, 混合气体 (体积分数 94% N_2 +体积分数 5% CO_2 +体积分数 1% O_2) 置换其中的空气, 之后将装置放入 37°C 的培养箱中缺氧培养。24 h 后用 4°C 预冷的 PBS 洗 2 次, 去掉残余培养基, 用不含 EDTA 的

胰酶消化, 室温下 $1\ 500\times g$ 离心 10 min, 弃去培养基, 收集细胞; 用 $4\ ^\circ\text{C}$ 预冷的 $1\times\text{PBS}$ 洗涤细胞 2 次, $150\times g$ 离心 5 min, 去上清液, 收集细胞; 加入 $1\times$ 结合缓冲液 $300\ \mu\text{l}$ 悬浮细胞, 调整浓度约 1×10^6 个细胞/ml; 每 $100\ \mu\text{l}$ 细胞悬液加入 $5\ \mu\text{l}$ Annexin V-FITC 混匀, 室温避光孵育 15 min; 上机检测前 5 min, 加入 $5\ \mu\text{l}$ PI 染色; 补加 $400\ \mu\text{l}$ $1\times$ 结合缓冲液轻轻混匀; 将细胞转入流式管中, 应用流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 SLC6A4-shRNA 慢病毒表达载体的构建

GV248 与含特定 RNAi 靶序列的 DNA oligo 经酶切后连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取重组阳性克隆进行测序鉴定, 结果显示阳性克隆测序(图 1) 显示含有正确的 RNAi 靶序列, 表明 shRNA 片段已定向插入慢病毒载体质粒。重组 shRNA 慢病毒载体与慢病毒包装体系混合后感染 293T 细胞, 293T 细胞生长状态良好, 呈圆形, 大小均匀, 排列致密整齐, 荧光显微镜下观察感染细胞呈明显 GFP 绿色荧光, 感染率超过 90%(图 2)。

2.2 重组慢病毒感染 PC12 细胞及干扰效果的检测

经预实验筛选得到各组的最佳 MOI 值, 当 NC-shRNA 的 MOI 值为 100、SLC6A4-shRNA-1 的 MOI 值为 100、SLC6A4-shRNA-2 的 MOI 值为 20

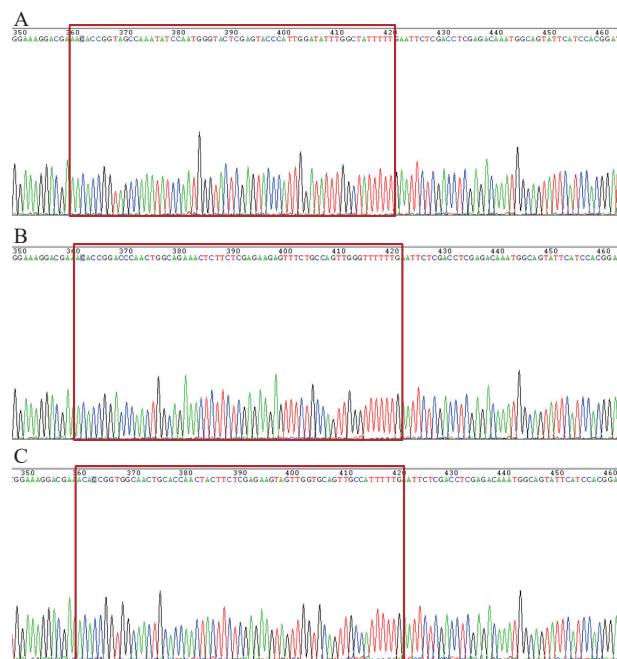


图 1 重组慢病毒质粒 SLC6A4-shRNA-GV248 测序

SLC6A4-shRNA-1: TAGCCAAATATCCAATGGGTASLC6A4-shRNA-2: TGGCAACTGCACCAACTACTTSLC6A4-shRNA-3: ACCCAACTGGCAGAAACTCTT

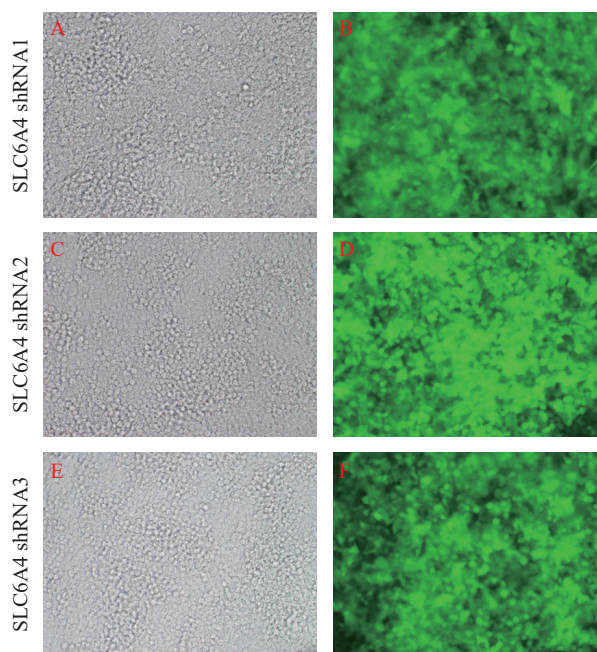


图 2 荧光显微镜观察重组慢病毒感染 293T 细胞 GFP 表达 ($\times 200$)

A、C、E. 普通显微镜观察; B、D、F. 荧光显微镜观察; A、B. 转染 SLC6A4-shRNA-1; C、D. 转染 SLC6A4-shRNA-2; E、F. 转染 SLC6A4-shRNA-3

和 SLC6A4-shRNA-3 的 MOI 值为 50 时各组 PC12 细胞转染效率高且细胞状态良好, 荧光显微镜下可见 4 组细胞 GFP 阳性表达, 感染率约为 80% 以上。如图 3 所示, 应用荧光显微镜观察重组慢病毒的 GFP 绿色荧光, 与 SLC6A4-shRNA-1 和 SLC6A4-shRNA-3 相比, SLC6A4-shRNA-2 感染的 PC12 细胞较其余两组大小均匀, 排列致密整齐, 荧光显微镜下观察感染细胞 GFP 绿色荧光更为明显, 细胞状态良好。

通过 RT-PCR 验证各组细胞 SLC6A4 基因表达情况, 如图 4 所示, 与正常对照组和干扰对照组比较, 慢病毒转染组 mRNA 表达量均显著降低, 其中, SLC6A4-shRNA-1 转染组与 SLC6A4-shRNA-3 转染组 SERT 的 mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.05$); SLC6A4-shRNA-2 转染组 SLC6A4 的 mRNA 表达量极显著降低 ($P < 0.01$)。因此, SLC6A4-shRNA-2 可显著干扰 SLC6A4 基因的表达, 在 3 个干扰靶序列中, 干扰效率最佳, 在后续实验应用 SLC6A4-shRNA-2 进一步研究。经嘌呤霉素压力筛选, 获得稳定转染细胞株后, Western blot 检测目的蛋白 5-HTT 表达见图 5, 干扰组(转染 SLC6A4-shRNA-2) 细胞内 5-HTT 蛋白条带明显减弱 ($P < 0.01$), 抑制率在 80% 以上, 表明稳定转染 SLC6A4-shRNA 和 NC-shRNA 的 PC12 细胞成功建立。

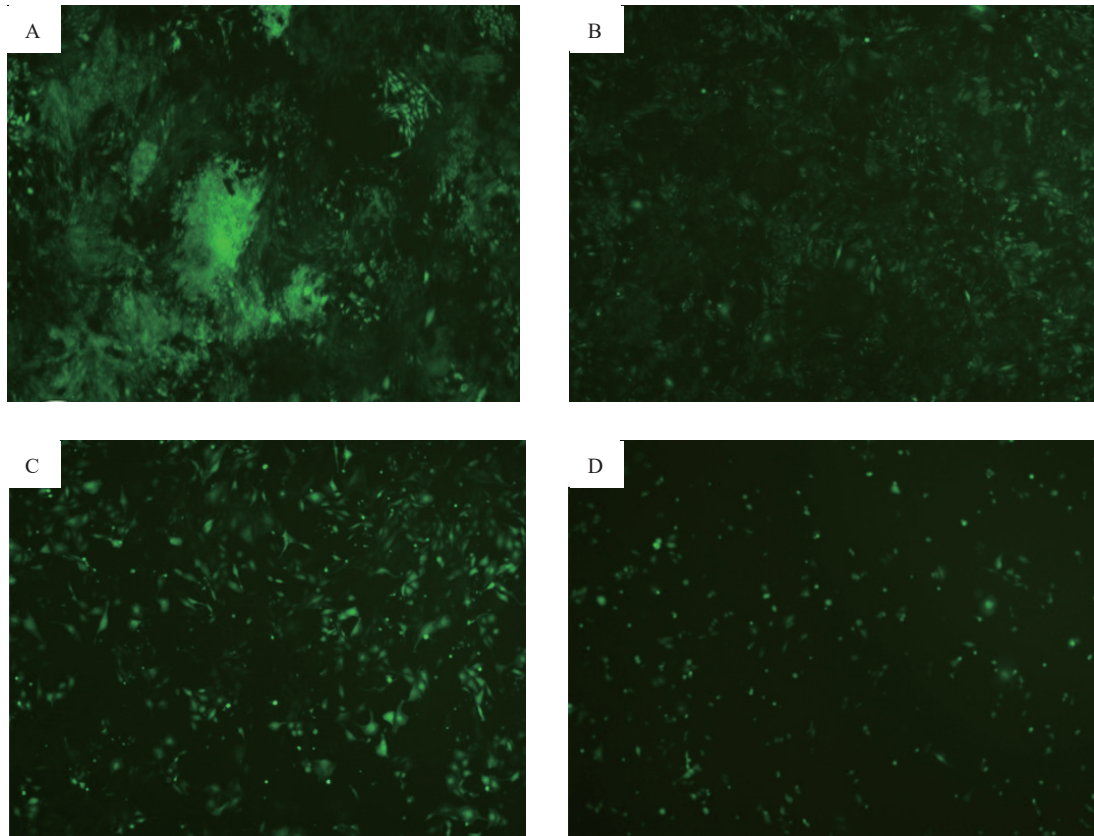


图3 荧光显微镜观察重组慢病毒感染PC12细胞GFP表达($\times 200$)

A. 干扰对照组(转染 NC-shRNA); B. 转染 SLC6A4-shRNA-1; C. 转染 SLC6A4-shRNA-2; D. 转染 SLC6A4-shRNA-3

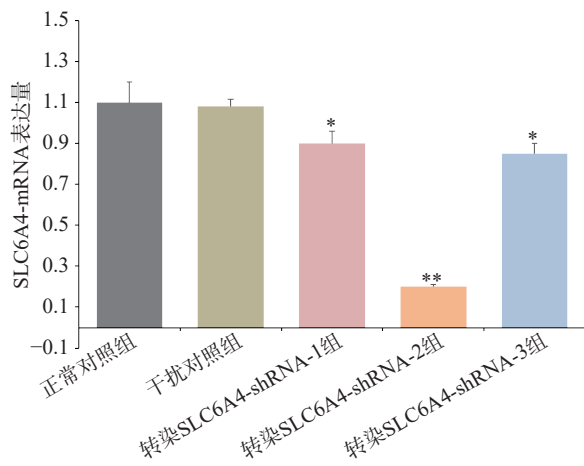


图4 各组 SLC6A4-mRNA 的表达

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与正常对照组比较

2.3 沉默 SLC6A4 基因对缺氧 PC12 细胞凋亡的影响

应用流式细胞仪检测 SLC6A4 沉默对缺氧 PC12 细胞凋亡的影响, 结果如图 6 所示, 干扰对照组 (NC-shRNA 组) 细胞凋亡率 (6.30 ± 0.51) 较低, 缺氧 24 h 后细胞凋亡率 (14.24 ± 0.55) 明显提高 ($P < 0.05$)。SLC6A4-shRNA 组凋亡率 (7.98 ± 0.12) 较 PC12 细胞组无明显差异, SLC6A4-shRNA 缺氧组与 NC-shRNA 缺氧组相比较显著下降 (9.10 ± 0.22 , $P < 0.05$)。说明正常条件下干扰 SLC6A4 基因对细胞凋亡无影响, 缺氧

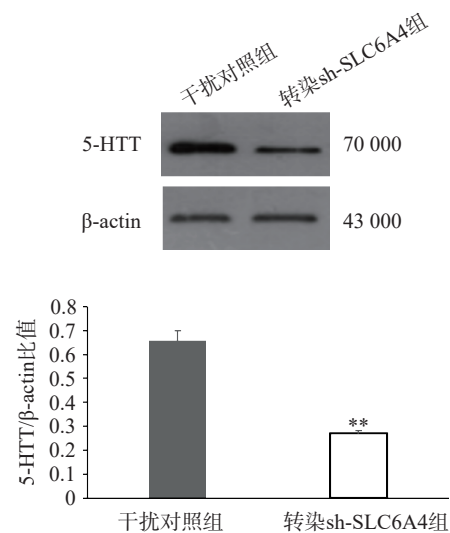


图5 沉默 SLC6A4 基因对 PC12 细胞 5-HTT 蛋白表达的影响

** $P < 0.01$, 与干扰对照组(转染 NC-shRNA)比较

后沉默 SLC6A4 基因的 PC12 细胞早期凋亡和晚期凋亡的比例均明显下降, 说明干扰 SLC6A4 基因可以抵抗缺氧诱导的 PC12 细胞凋亡。

3 讨论

慢病毒载体是在 HIV-1 的基础上发展起来的基因载体^[7], 是将外源性基因导入细胞最为有效的

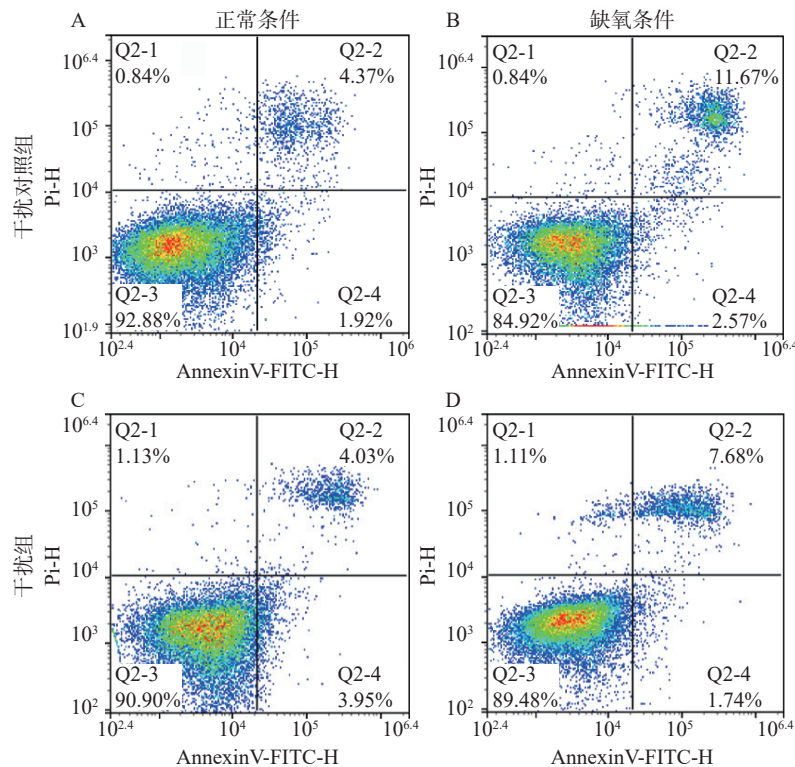


图6 沉默 SLC6A4 基因对缺氧 PC12 细胞凋亡的影响

A. 正常培养条件下干扰对照组(转染 NC-shRNA); B. 缺氧条件下干扰对照组;
C. 正常条件下干扰组(转染 SLC6A4-shRNA); D. 缺氧条件下干扰组(转染 SLC6A4-shRNA)

工具之一^[8-9]。本研究设计合成了 3 条 SLC6A4 的 shRNA 序列, 分别将其连接在表达 GFP 和嘌呤霉素 GV248 慢病毒载体上, 继而包装病毒并得到了高滴度的 SLC6A4 shRNA 靶向干扰的慢病毒载体。将其感染 PC12 细胞, 应用嘌呤霉素进行筛选, 成功建立了 SLC6A4 敲减的 PC12 细胞稳定转染细胞系, 目的是高效沉默 PC12 细胞的 SLC6A4 基因, 进而降低 5-HTT 的表达。之后进一步采用实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 检测 SLC6A4 mRNA 和 5-HTT 蛋白的相对表达量, 结果提示 SLC6A4 mRNA 和 5-HTT 的表达被有效抑制, 说明其能高效沉默 SLC6A4 基因。

神经元细胞凋亡是缺氧导致脑组织损伤发生机制中的一个重要环节, 其发生受多种促凋亡蛋白的调控, 细胞凋亡过程是细胞主动死亡的过程, 受到基因严格调控^[10]。细胞凋亡过程的异常在亨廷顿病、阿尔兹海默症、脑卒中、抑郁症等多种神经系统疾病的生理、病理过程起到关键作用。细胞在凋亡过程中会出现一系列形态学变化, 包括核固缩、核碎裂、凋亡小体形成以及 DNA 特征性片段化、新基因表达、某些生物大分子合成等生物化学变化等异常^[11-12]。5-HTT 是 5-HT 的专属转运蛋白, 是 5-HT 重摄取回神经细胞进行分解代谢的专

属载体, 5-HT 不仅介导脑的情绪的调节等多种神经生理、生化活动, 而且在调节脑血管的舒缩功能及血脑屏障 (BBB) 的通透性和稳定神经细胞内环境等多方面均起着极其重要的作用, 5-HTT 表达异常与多种疾病相关, 抗抑郁药氟西汀的作用靶点是 5-HTT^[13-14]。近年来研究发现, 5-HTT 与高原缺氧诱导的肺动脉高压以及高原脑水肿有一定的联系^[15], 课题组前期研究表明缺氧可诱导 PC12 凋亡而且氟西汀可逆转缺氧诱导的 PC12 细胞损伤^[4, 16], 在本研究中通过构建 SLC6A4 慢病毒表达载体并感染 PC12 细胞, 抑制 SLC6A4 的表达可以抑制缺氧诱导的 PC12 细胞凋亡, 与 5-HTT 抑制剂氟西汀逆转缺氧诱导的 PC12 细胞损伤的结果一致, 说明 5-HTT 可能是缺氧诱导的细胞凋亡损伤的重要调控靶点, 但尚有待进一步验证确定。

综上所述, 本研究通过构建慢病毒载体感染 PC12 细胞, 敲低 SLC6A4 基因, 建立 SLC6A4 基因干扰 PC12 细胞稳转细胞系, 通过检测其对缺氧状态下细胞凋亡情况发现 SLC6A4 基因的沉默可以逆转细胞凋亡, 为进一步探究 SLC6A4 基因及 5-HTT 蛋白的表达在缺氧致神经细胞损伤中的机制奠定了基础。

(下转第 463 页)