

# Seipin 敲低大鼠 PC12 细胞株的构建和对细胞凋亡的影响\*

吕菊<sup>1,2</sup>, 胡玉梅<sup>1,2</sup>, 任真奎<sup>1,2,3</sup>, 谢鹏<sup>1,2</sup>, 张春林<sup>4</sup>, 焦玲<sup>5\*\*</sup>, 禹文峰<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 地方病与少数民族疾病教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 黔西南州人民医院 检验科, 贵州 兴义 562400; 4. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025; 5. 贵州医科大学附院 神经内科, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 构建大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(PC12)细胞的先天性脂肪代谢障碍 2 型(BSCL2/Seipin)敲低细胞株,探讨 Seipin 敲低后对细胞凋亡的影响。方法: 将 PC12 细胞分为空白感染组和助感染组(加助感染试剂 HitansG),采用不同慢病毒感染复数(MOI)感染细胞进行病毒预感染试验筛选助感染试剂和合适的 MOI;依据上述感染条件,用阴性对照病毒和 Seipin-shRNA 目的病毒感染 PC12 细胞作为阴性对照组和 Seipin 敲低组,同时设置正常组(正常 PC12 细胞),采用蛋白质免疫印迹法检测 Seipin 蛋白的表达;将阴性对照组与 Seipin 敲低组细胞用脱氧核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)细胞凋亡染色法和 Hoechst 33258 染色法检测细胞凋亡情况。结果: 慢病毒 MOI = 100 时感染效果最强,助感染试剂能增加感染效率;与正常组相比,Seipin 敲低组 Seipin 蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ );与阴性对照组相比,TUNEL 染色结果显示 Seipin 敲低组发红荧光细胞明显增加,Hoechst 染色结果显示 Seipin 敲低组细胞的细胞核致密浓染或碎块状致密浓染程度明显增多。结论: 成功构建大鼠 PC12 Seipin 敲低细胞,下调 Seipin 蛋白表达会增加细胞凋亡。

**[关键词]** 细胞凋亡; 帕金森病; PC12 细胞; 神经变性疾病; Seipin 蛋白; 基因干扰

**[中图分类号]** R742.5;R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2020)03-0249-06

**DOI:**10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.03.001

## Construction of Rat PC12-Seipin Knockdown Cell Line and its Effect on Apoptosis

LV Jv<sup>1,2</sup>, HU Yumei<sup>1,2</sup>, REN Zhenkui<sup>1,2,3</sup>, XIE Peng<sup>1,2</sup>, ZHANG Chunlin<sup>4</sup>, JIAO Ling<sup>5</sup>, YU Wenfeng<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Molecular Biology of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Education Ministry Key Laboratory of Endemic and Minority Diseases, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Laboratory, People's Hospital of Southwest Guizhou Autonomous Prefecture, Xingyi 562400, Guizhou, China; 4. Basic Medical College, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 5. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct rat Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy2 (PC12-BSCL2/Seipin) knockdown cell line and investigate the effect of Seipin knockdown on apoptosis. **Methods:** Pheochromocytoma cells 12 (PC12 cells) were divided into the blank infection group and HitansG group (add HitansG agent), and received infection with different lentivirus MOI for virus pre-infection test to screen HitansG reagent and appropriate MOI. According to the infection conditions, PC12 cells received infection with negative control virus and Seipin-shRNA virus, and the control group (normal PC12 cells) was set at the same time. The level of Seipin protein was detected by Western blot. Cells

\*[基金项目] 国家自然科学基金(81360199); 教育部科学技术研究项目(2013032A); 贵州省国际科技合作计划项目[黔科合外 G 字(2013)7026]; 贵州省创新计划项目[黔教合协同创新中心(2014)06]; 贵州省教育厅项目(2015 年贵州省普通高等学校地方病和少数民族疾病防控创新团队); 贵州省科技厅计划课题[黔科合重大专项字(2014)6008]; 贵州省教育厅项目[黔教合外 G 字(2013)63]

\*\*通信作者 E-mail:jiaoling5151@sina.com; wenfengyu2013@126.com

of the negative control group and Seipin knockdown group was stained by TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) and Hoechst 33258 to detect apoptosis. **Results:** The transfection efficiency of lentivirus was the best in  $MOI = 100$ , and the HitansG increased the transfection efficiency. Compared with the controls, the level of Seipin protein in the Seipin knockdown group was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Compared with the negative controls, the apoptosis results of TUNEL staining showed a significant increase in red fluorescent apoptotic cells in the Seipin knockdown group, and the Hoechst 33258 staining showed condensed bright nuclei apoptotic cells in the Seipin knockdown group. **Conclusion:** PC12 Seipin knockdown cells are successfully constructed, and down-regulation of Seipin protein can increase apoptosis.

[**Key words**] apoptosis; parkinson disease (PD); PC12 cells; neurodegenerative disease; seipin protein; RNA interference

帕金森病 (parkinson disease, PD) 的病理特征是中枢和外周特定神经元群的神经退行性病变和残存的多巴胺 (dopamine, DA) 能神经元内出现的嗜酸性小体 - 路易小体 (lewy body, LB), 主要发生在黑质致密部<sup>[1]</sup>。PD 的发病机制主要是纹状体 DA 的缺失使患者控制肌肉的能力受到限制; 纹状体 DA 含量的降低使胆碱能系统的功能发生障碍, 这是产生 PD 各种运动症状的生化基础<sup>[2]</sup>。PD 目前仍是临床难以治愈的神经退行性疾病, DA 替代治疗只能在最初给药时缓解病人症状<sup>[3]</sup>, 因此寻找新的 PD 机制是可能根治疾病的方法。2001 年, Magre 等<sup>[4]</sup>首次在人类患者 11 号染色体上发现一种名为 Berardinelli-Seip 先天性脂肪代谢障碍 2 型 (berardinelli-seip congenital lipodystrophy 2, *BSCL2/Seipin*) 新基因的突变, 该基因的突变起初被认为与脂肪代谢障碍有关。*BSCL2* 基因编码的 Seipin 蛋白是一种位于内质网的跨膜蛋白, 该蛋白在脂肪组织和中枢神经系统中高表达<sup>[5-6]</sup>, 因此 Seipin 的功能研究也主要集中在这两种组织病变中。近年研究发现 *Seipin* 基因突变与多种运动神经元疾病存在一些联系, 如脑内 Seipin 的功能异常与运动性神经病和 Silver 综合征有关, 小鼠神经元丢失 Seipin 会导致焦虑和抑郁等<sup>[7-11]</sup>。这些研究结果提示 Seipin 异常可能是导致多种神经退行性疾病的重要因素。目前已有研究表明, Seipin 突变能引起内质网应激蛋白 CHOP 的增加, 进而诱发细胞凋亡的发生<sup>[12]</sup>。因此, 本实验主要研究对大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 (pheochromocytoma cells 12, PC12) 细胞中 *Seipin* 基因进行干扰, 观察 Seipin 缺陷后引起的细胞生物学变化, 为进一步研究帕金森疾病中神经元的凋亡机制提供新的方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、主要试剂及仪器

**1.1.1 材料** PC12 细胞 (中国科学院上海细胞库), Seipin shRNA 慢病毒、阴性对照慢病毒及慢病毒载体 GV248 (上海吉凯基因生物公司), RNAi 靶序列为 ACGCTCGGTGATGCTTCATTA, 阴性对照靶序列为 TTCTCCGAACGTGTCACGT。

**1.1.2 主要试剂与仪器** Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 培养基 (美国 Gibco 公司), 0.25% Trypsin-EDTA (美国 Thermo Fisher 公司), Penicillin Streptomycin 双抗 (美国 Life Technologies 公司), Protease Inhibitor Cocktail、Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail、裂解液及苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) (美国 CST 公司), 兔多克隆抗体 BSCL2/Seipin (美国 Abcam 公司), 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、中性树脂、Hoechst 凋亡染色试剂及 TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) 细胞凋亡检测试剂盒 (中国碧云天生物科技公司); 倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司), 曝光仪 (美国 Gene 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 PC12 细胞的培养与种板** PC12 细胞使用含有 10% 胎牛血清和双抗 (青霉素和链霉素) 的 DMEM 培养基于 5%  $CO_2$  的 37 °C 培养箱中培养, 待细胞密度到达 70% ~ 80% 时, 弃旧培养液, 无菌 PBS 缓冲液加入漂洗, 吸去 PBS 缓冲液; 0.3 mL 胰酶消化细胞加入培养基终止消化, 巴氏吸管吹打贴壁细胞, 将所有的液体转入新的无菌 15 mL Epp 管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃液, 加入 3 mL 培养

基重悬细胞并计数;制备 30 个/L 细胞悬液 3 mL,取 100  $\mu$ L/孔加入 96 孔板用于慢病毒预感染实验,取 500  $\mu$ L/孔加入 48 孔板用于慢病毒正式感染。

**1.2.2 慢病毒预感染实验** 为了确定 PC12 细胞合适的感染复数(multiple of infection, MOI)及是否需要助感染试剂,按照不同培养条件将实验分为空白感染组(未加助感染剂)及助感染组(加助感染试剂 HitansG),用不同 MOI 值的病毒感染细胞;DMEM 培养基将 shRNA 慢病毒颗粒依次稀释成病毒滴度为  $1 \times 10^5$  TU/L (MOI = 100),  $1 \times 10^4$  TU/L (MOI = 10) 及  $1 \times 10^3$  TU/L (MOI = 1),待细胞生长至 20% ~ 30%,换掉旧培养基,加入培养基 100  $\mu$ L/组,对应病毒滴度的慢病毒试剂 90  $\mu$ L 和助感染试剂 10  $\mu$ L,混匀,继续培养;感染细胞 10 h 时吸走培养基,加入正常 DMEM 培养基,继续培养;细胞感染 48 ~ 72 h,荧光显微镜观察病毒感染的荧光强度,当荧光强度达 80%、且细胞生长正常组所对应的感染条件和 MOI 值即为 PC12 细胞合适的最佳感染条件,记录此时接种的细胞量、感染时的总体积、感染后换液的时间及细胞的 MOI 值。

**1.2.3 Seipin 蛋白表达水平** 采用 Western blot 检测,依据上述获得的感染条件,用阴性对照病毒和 Seipin-shRNA 目的病毒感染 PC12 细胞,分别作为阴性对照组与 Seipin 敲低组,同时设置正常组(正常 PC12 细胞);待细胞密度 90% 时用已配好的裂解液提取细胞总蛋白,与适量  $5 \times$  Buffer 混匀,沸水煮沸变性蛋白,12% SDS-PAGE 凝胶电泳(40 mA),用 PVDF 膜作为转膜滤纸冰浴转膜,200 mA、2 h;5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗涤 2

次、5 min/次;膜用一抗孵育过夜, TBST 洗涤 3 次、5 min/次;对应二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次、10 min/次;曝光仪获取图像,并用 Image J 计算蛋白条带灰度值。

**1.2.4 细胞凋亡** 采用 TUNEL 和 Hoechst 染色试剂盒检测,将阴性对照组与 Seipin 敲低组细胞种于 12 孔板,待细胞密度达到 60% ~ 70% 时,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,5 min/次;4% 多聚甲醛固定细胞 20 min,含 0.3% Triton X-100 的 PBS 室温孵育 5 min, PBS 洗涤细胞 3 次,分别用于 TUNEL 和 Hoechst 染色。前者系加入配好的 TUNEL 检测液 37  $^{\circ}$ C 孵育 60 min, PBS 洗涤细胞, DAPI 封片,倒置荧光显微镜下观察细胞染上红光的情况;后者系加入 0.5 mL Hoechst 33258 染色液染色 5 min, PBS 洗涤细胞,中性树脂封片,镜下观察细胞核出现致密浓染的程度。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析,采用均数  $\pm$  标准( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒预感染效果

荧光图结果显示,PC12 细胞在 MOI = 1 时无感染效果,助感染组与空白感染组相比感染效果无明显差异;MOI = 10 时有较低感染效果,助感染组与空白感染组相比感染效果无明显差异;MOI = 100 时感染效果最强,助感染组 PC12 细胞感染效果高于空白感染组,见图 1。

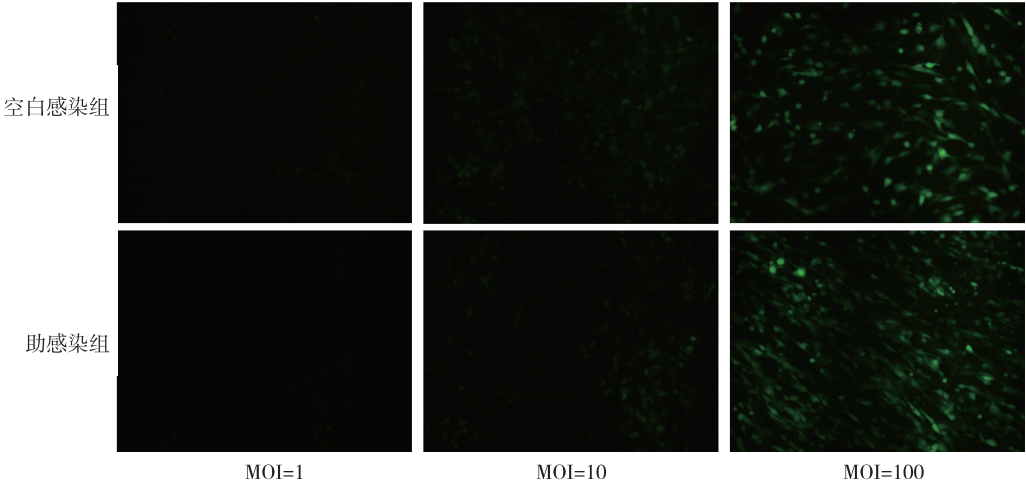


图 1 2 组 PC12 细胞的病毒感染效果(200  $\times$ )

Fig. 1 Transfection efficiency of PC12 cells in the two groups(200  $\times$ )

2.2 Seipin 蛋白敲低效果

Western blot 结果显示,与正常组相比,Seipin 敲低组 Seipin 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但阴性对照组 Seipin 蛋白表达水平差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 2。

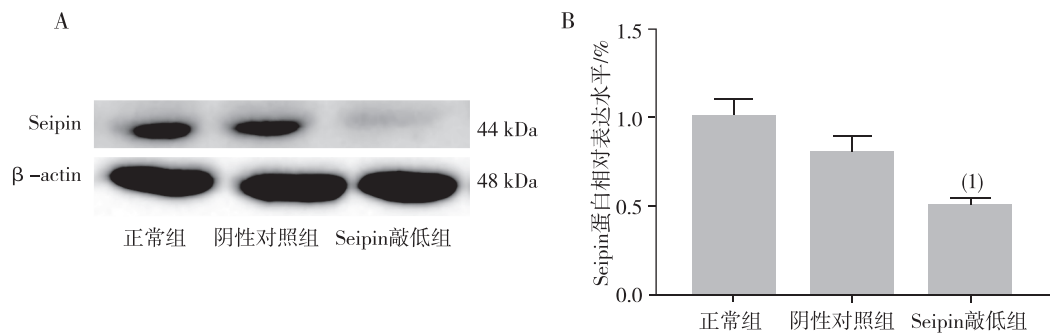
2.3 TUNEL 凋亡染色

TUNEL 染色后结果显示,与阴性对照组相比,

Seipin 敲低组红色荧光的凋亡细胞明显增加,见图 3。

2.4 Hoechst 凋亡染色

Hoechst 染色结果显示,与阴性对照组相比,Seipin 敲低组细胞的细胞核致密浓染或碎块状致密浓染程度明显增多,见图 4。



注:A 为 Western blot 目的条带,B 为 Seipin 蛋白灰度条图;<sup>(1)</sup>与正常组比较, $P<0.05$ 。

图 2 各组 PC12 细胞 Seipin 蛋白表达

Fig. 2 The expression of Seipin in PC12 cells of the different groups

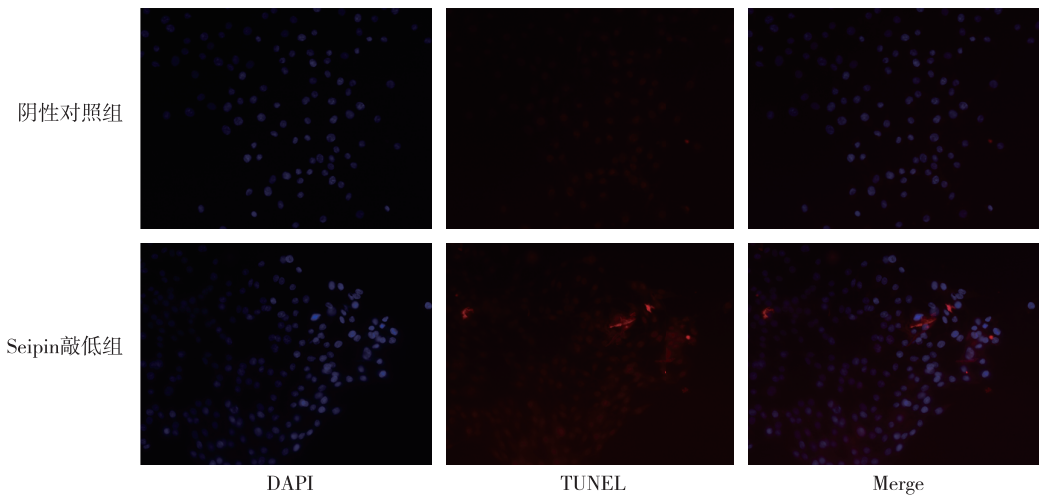


图 3 TUNEL 法检测 PC12 细胞凋亡(200 × )

Fig. 3 TUNEL assay for apoptosis in PC12 cells(200 × )

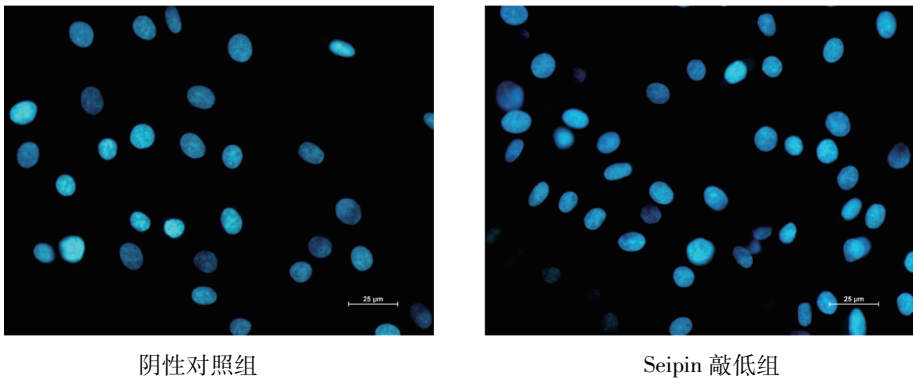


图 4 Hoechst 法检测 PC12 细胞凋亡(200 × )

Fig. 4 Hoechst assay for apoptosis in PC12 cells(200 × )

3 讨论

PD 又叫震颤性麻痹,随着年龄的增长,发病率呈逐年上升,给家庭和社会都带来很大的经济负担,老年人的生活质量也受到了影响,在临床诊断上表现为 DA 能神经元的退行性丢失以及神经元内出现的 LB,其治疗局限于预防对症治疗,不能有效地阻断疾病的进展<sup>[2]</sup>。PD 的病因和发病机制十分复杂,至今未明,可能是氧化应激过度、线粒体功能障碍、蛋白质错误折叠和聚集等多种机制,最终通过多种级联反应导致 DA 能神经元变性死亡;而历年来的研究表明内质网应激在 PD 发病过程起着重要作用<sup>[3]</sup>。*Seipin/BSCL2* 于 2001 年首次被确定为 *BSCL2* 的致病基因<sup>[4]</sup>,存在于内质网的完整膜上,目前预测其有 2 个跨膜结构域,一个是腔内环,另一个是胞质内氨基和羧基末端<sup>[5]</sup>;Seipin 对脂肪形成起着重要作用,其功能缺陷可以严重损害脂肪细胞稳态,并导致脂肪代谢障碍<sup>[13]</sup>。现在有研究显示 Seipin 缺陷也有潜在的神经受累<sup>[14-17]</sup>,如 PD、Alzheimer Disease 及 Celia's Encephalopathy 等疾病中<sup>[18-20]</sup>。因此,Seipin 可能是一种调节神经元疾病的关键分子,在神经退行性疾病中 Seipin 的生物学功能研究是该类疾病研究的新方向。

为探讨 Seipin 蛋白表达降低后对细胞凋亡的影响,本研究采用神经退行性疾病模型细胞 PC12,用基因干扰技术下调其 Seipin 蛋白的表达。预感染试验结果显示,PC12 细胞在 MOI = 1 时无感染效果,助感染组与空白感染组相比感染效果无明显差异;MOI = 10 时有较低感染效果,助感染组与空白感染组相比感染效果无明显差异;MOI = 100 时感染效果最强,助感染组 PC12 细胞感染效果高于空白感染组,提示 PC12 细胞用 MOI = 100 计算病毒量来感染,助感染试剂能增加感染效率。Western blot 结果显示,与正常组相比,Seipin 敲低组 Seipin 蛋白水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),阴性对照组 Seipin 蛋白水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),提示成功构建 Seipin 敲低细胞,阴性对照细胞与正常细胞无差异。TUNEL 染色后荧光图结果表明,与阴性对照组相比,Seipin 敲低组显示红色荧光的凋亡细胞明显增加,说明 Seipin 敲低后细胞发生凋亡的水平增加。Hoechst 染色结果显示,与阴性对照组相比,Seipin 敲低组细胞的细胞核致密浓染或碎块状致密浓染程度明显增多,

正常细胞的细胞核经染色后会呈淡蓝色,凋亡细胞的细胞核会呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染,颜色有些发白<sup>[21]</sup>,说明 Seipin 蛋白敲低后细胞凋亡增加。以往研究显示细胞中 Seipin 发生突变会导致内质网中错误折叠的蛋白质聚集,从而引发内质网应激,最终导致错误折叠蛋白反应和细胞死亡<sup>[22]</sup>;体内实验结果也表明,小鼠敲除 Seipin 后,随着年龄的增长,运动发生明显障碍且有运动神经元的丢失<sup>[23]</sup>。这些实验结果表明 Seipin 的缺乏可以导致细胞维持正常的生物学功能受到影响,从引起细胞凋亡的发生。

综上所述,本研究成功构建大鼠 PC12 Seipin 敲低细胞,下调 Seipin 蛋白会增加细胞凋亡。

4 参考文献

[1] FAHN S. Medical treatment of Parkinson's disease[J]. Journal of Neurology, 1998, 245(11): 15-24.

[2] DAUER W, PRZEDBORSKI S. Parkinson's disease: mechanisms and models[J]. Neuron, 2003, 39(6): 889-909.

[3] 董丽华,胡国华,王育珊,等. 多巴胺受体激动剂治疗中晚期帕金森病的临床研究[J]. 实用老年医学, 2007, 6(21): 422-423.

[4] MAGRE J, DELEPINE M, KHALILOUF E, et al. Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13[J]. Nature Genetics, 2001, 28(4): 365-370.

[5] LUNDIN C, NORDSTROM R, WANGER K, et al. Membrane topology of the human Seipin protein[J]. FEBS Lett, 2006, 580(9): 2281-2284.

[6] SZYMANSKI K M, BINNS D, RENE B, et al. The lipodystrophy protein Seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(52): 20890-20895.

[7] CHEN W, YECHOOR V K, CHANG B H, et al. The human lipodystrophy gene product Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2/Seipin plays a key role in adipocyte differentiation[J]. Endocrinology, 2009, 150(10): 4552-4561.

[8] WINDPASSINGER C, AUERGRUMBACH M, IROBI J, et al. Heterozygous missense mutations in *BSCL2* are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome[J]. Nature Genetics, 2004, 36(3): 271-276.

- [9] ZHOU L, YIN J, WANG C, et al. Lack of Seipin in neurons results in anxiety- and depression-like behaviors via down regulation of PPAR $\gamma$ ? [J]. Human Molecular Genetics, 2014, 23(15):4094–4102.
- [10] GUILLEN N E, SANCHEZ I S, DOMINGO J R, et al. A new Seipin-associated neurodegenerative syndrome[J]. Journal Medical Genetics, 2013, 50(6): 401–409.
- [11] POISSON A, CHATRON N, LABALME A, et al. Regressive autism spectrum disorder expands the phenotype of BSCL2/Seipin-associated neurodegeneration[J]. Biological Psychiatry, 2019, 85(4): 17–19.
- [12] ITO D, SUZUKI N. Seipin/BSCL2-related motor neuron disease: Seipinopathy is a novel conformational disease associated with endoplasmic reticulum stress[J]. Rinsho Shinkeigaku, 2007, 47(6): 329–335.
- [13] DOLLET L, MAGRE J, CARIOU B, et al. Function of Seipin; new insights from BV2/Seipin knockout mouse models[J]. Biochimie, 2014, 96: 166–172.
- [14] ITO D, SUZUKI N. Molecular pathogenesis of Seipin/BSCL2-related motor neuron diseases [J]. Annals of Neurology, 2007, 61(3): 237–250.
- [15] WEI S, SOH S L, QIU W, et al. Seipin regulates excitatory synaptic transmission in cortical neurons[J]. Journal of Neurochemistry, 2013, 124(4): 478–489.
- [16] WEI S, SOH S L, XIA J, et al. Motor neuropathy-associated mutation impairs Seipin functions in neurotransmission[J]. Journal of Neurochemistry, 2014, 129(2): 328–338.
- [17] GARFIED A S, CHAN W S, DENNIS R J, et al. Neuro-anatomical characterisation of the expression of the lipodystrophy and motor-neuropathy gene *BSCL2* in adult mouse brain[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45790.
- [18] LICKER V, TURCK N, KOVARI E, et al. Proteomic analysis of human substantia nigra identifies novel candidates involved in Parkinson's disease pathogenesis[J]. Proteomics, 2014, 14(6): 784–794.
- [19] QIAN Y, YIN J, HONG J, et al. Neuronal Seipin knockout facilitates A $\beta$ -induced neuroinflammation and neurotoxicity via reduction of PPAR $\gamma$  in hippocampus of mouse [J]. Journal of Neuroinflammation, 2016, 13(1): 145.
- [20] RUIZRIQUELME A, SANCHEZ-IGLESIAS S, RABANO A, et al. Larger aggregates of mutant *Seipin* in Celia's Encephalopathy, a new protein misfolding neurodegenerative disease [J]. Neurobiology of Disease, 2015, 83: 44–53.
- [21] ZHANG X, GE Y L, ZHANG S P, et al. Downregulation of KDR expression induces apoptosis in breast cancer cells[J]. Cellular and Molecular Biology Letters, 2014, 19(4): 527–541.
- [22] YAGI T, ITO D, NIHEI Y, et al. N88S *Seipin* mutant transgenic mice develop features of Seipinopathy/BSCL2-related motor neuron disease via endoplasmic reticulum stress[J]. Human Molecular Genetics, 2011, 20(19): 3831–3840.
- [23] WANG L, HONG J, WU Y, et al. Seipin deficiency in mice causes loss of dopaminergic neurons via aggregation and phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein and neuroinflammation[J]. Cell Death & Disease, 2018, 9(5): 440.

(2020-01-10 收稿, 2020-02-15 修回)

中文编辑: 严征; 英文编辑: 丁廷森