

Seipin 敲低对内质网应激通路诱导细胞凋亡的影响*

吕菊^{1,2}, 谢鹏^{1,2}, 任真奎^{1,2,3}, 胡玉梅^{1,2}, 张春林⁴, 吴昌学^{1,2}, 焦玲^{5**}, 禹文峰^{1,2**}

(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: 探讨 Seipin 敲低对肾上腺嗜铬细胞瘤(PC12)细胞凋亡的影响及其相关机制, 初步探索 Seipin 敲低在帕金森病(PD)模型中的可能调控机制。方法: 对细胞给予不同浓度的 6-羟多巴胺(6-OHDA, 0、25、50、75、100 及 125 $\mu\text{mol/L}$) 处理, 用 CCK8 法检测细胞活性筛选 6-OHDA 最佳造模浓度; 选取阴性对照细胞和 Seipin 敲低细胞分别用 6-OHDA 诱导体外 PD 模型作为阴性模型组和 Seipin 模型组, 同时设阴性正常组和 Seipin 正常组; 4 组细胞培养 18 h 时, 采用蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测内质网应激(ERS)蛋白(GRP78 和 CHOP)和凋亡相关蛋白 Bax 水平。结果: CCK8 法检测细胞活性, 6-OHDA 最适作用浓度为 75 $\mu\text{mol/L}$; Western blot 结果显示, 与阴性正常组比较, 阴性模型组、Seipin 模型组 GRP78、CHOP 及 Bax 蛋白水平明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而与阴性模型组相比, Seipin 模型组 GRP78、CHOP 及 Bax 蛋白水平明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 敲低 Seipin 诱导细胞凋亡可能涉及 ERS 蛋白的增加, 敲低 Seipin 后导致 6-OHDA 诱导的细胞凋亡更加严重。

[关键词] 羟多巴胺; PC12 细胞; 帕金森病; 细胞凋亡; 内质网应激; Seipin 蛋白

[中图分类号] R742.5; R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2020)03-0255-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.03.002

Effect of Seipin Knockdown on Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress Pathway

LV Jv^{1,2}, XIE Peng^{1,2}, REN Zhenkui^{1,2,3}, HU Yumei^{1,2}, ZHANG Chunlin⁴,
WU Changxue^{1,2}, JIAO Ling⁵, YU Wenfeng^{1,2}

(1. Key Laboratory of Molecular Biology of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Education Ministry Key Laboratory of Endemic and Minority Diseases of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Laboratory, People's Hospital of Southwest Guizhou Autonomous Prefecture, Xingyi 562400, Guizhou, China; 4. College of Basic Medical, 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 investigate the effect of Seipin knockdown on apoptosis of PC12 cells and its related mechanisms, and to explore the possible regulatory mechanism of seipin knockdown in Parkinson's disease (PD) model. **Methods:** PC12 cells were treated with different concentrations of 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 0, 25, 50, 75, 100, and 125 $\mu\text{mol/L}$), and the cell viability was measured by CCK8 to select the optimal concentration of 6-OHDA. The control cells and Seipin-knockdown cells were used to induce PD model in vitro with 6-OHDA as the negative model group and seipin model group respectively, while the negative normal group and Seipin normal group also set up. The cells of 4 groups were cultured for 18 h, Western blot were used to detect the levels of endoplasmic reticulum stress proteins (GRP78 and CHOP) and apoptosis-related protein-Bax. **Results:** The

*[基金项目] 国家自然科学基金(81360199); 黔科中引地[(2019)4008]; 贵州省卫生健康委科学技术基金(gzwjkj2019-1-039); 黔西南州科技局基金(2019-1-10)

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

optimal concentration of 6-OHDA was 75 $\mu\text{mol/L}$ by CCK8. Western blot results showed that the levels of GRP78, CHOP and Bax proteins in the negative model group and the Seipin model group increased significantly ($P < 0.05$) compared to the negative normal group. The levels of GRP78, CHOP and Bax proteins in the Seipin model group were significantly increased ($P < 0.05$) compared to the negative model group. **Conclusion:** The apoptosis induced by knockdown of seipin may involve the increase of endoplasmic reticulum stress. Knockdown of Seipin leads to more serious apoptosis induced by 6-OHDA.

[**Key words**] hydroxydopamine; pc12 cells; parkinson's disease (PD); endoplasmic reticulum stress; apoptosis; seipin protein

帕金森病 (parkinson disease, PD) 是影响中老年人生活质量的神经退行性疾病, 震颤、肌张力增高及运动迟缓是 PD 的主要临床特征, 黑质多巴胺 (dopamine, DA) 能神经元病变死亡和残存的嗜酸性小体 - 路易小体 (lewy body, LB) 是其主要病理特征^[1]。研究发现, PD 与 Seipin 这一新蛋白相关, 但具体机制不明确, 探索 Seipin 在 PD 中的具体机制可为防治 PD 及延缓其进展提供新的治疗方案。Seipin 是内质网膜蛋白, 最初被认为是先天性全身性脂肪代谢障碍 2 型疾病 (congenital generalized lipodystrophy type 2, CGL2) 的基因编码的蛋白^[2], 与脂肪细胞分化、脂肪分解及脂滴大小的形成相关^[3]。正常情况下, Seipin 在人脑的某些区域 (脊髓、额叶皮质, 以及与能量平衡调节有关的区域) 中高度表达^[4]; 研究已经表明, Seipin 在神经退行性疾病中发挥作用^[5-7]。提示 Seipin 可能与神经疾病有一定关系, 但是参与这些功能的确切信号和分子机制不完全清楚。由于 Seipin 蛋白位于内质网中, 发生突变的 Seipin 可激活细胞未折叠蛋白反应途径并诱导内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 介导的细胞凋亡^[8]。因此, 推测 Seipin 和这些疾病的发生与 ERS 介导的细胞死亡密切相关; 而 ERS 在 PD 的发生发展中具有重要作用, 当神经元发生损伤会引起 ERS 所致的细胞凋亡^[9]。6-羟多巴胺 (6-Hydroxydopamine hydrobromide, 6-OHDA) 是构建 PD 模型的经典药物, PC12 是经典的 PD 模型细胞^[9]。本研究采用实验室前期构建好的 Seipin 敲低 PC12 细胞, 研究 Seipin 敲低对细胞凋亡的影响和可能涉及的机制及其对 6-OHDA 诱导的 PD 模型的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

Seipin 敲低细胞和阴性对照细胞由实验室前

期在 PC12 细胞中用 Seipin-shRNA 目的病毒和阴性对照病毒构建的稳定株; DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶及双抗 (青霉素和链霉素) 购自美国 Gibco, 6-OHDA 购于美国 Sigma 公司, 兔抗 GRP78、CHOP、Bax、兔二抗、鼠二抗和裂解液均购自美国 CST 公司, 鼠抗 β -actin 抗体购自中国爱必信生物科技有限公司, CCK8 试剂盒购自日本东仁公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和 CCK8 法筛选 6-OHDA 最适浓度 PC12 细胞使用含有胎牛血清 (10%) 和双抗 (1%) 的 DMEM 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养, 等细胞密度长至 70% 左右时, 消化并接种细胞用于后续实验。根据实验室前期实验使用的方法筛选 6-OHDA 最适浓度^[10]。待细胞长至 80% 左右时, 用胰酶消化细胞并将细胞按 1×10^7 个/L 接种至 96 孔板中培养, 待细胞密度达到 70% ~ 80% 时, 对细胞给予不同浓度的 6-OHDA (0、25、50、75、100 及 125 $\mu\text{mol/L}$) 处理; 0 $\mu\text{mol/L}$ 即不加 6-OHDA 处理的正常对照组, 每个组 6 个复孔, 每个组加入对应浓度 6-OHDA 的无血清培养基培养 18 h 后, 用无血清培养基稀释的 10% CCK8 试剂孵育 1 h; 用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度值, 导出并分析数据, 选定最适的 6-OHDA 造模浓度。

1.2.2 造模与实验分组 前期研究已证明正常 PC12 细胞与阴性对照细胞无统计学差异, 所以本研究将阴性对照细胞作为对照细胞, 分别将阴性对照细胞和 Seipin 敲低细胞再分为正常组和 PD 模型组, 即正常组的阴性对照细胞和 Seipin 敲低细胞仅给予无血清培养基培养, PD 模型组阴性对照细胞和 Seipin 敲低细胞用含 75 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA 的无血清培养基培养, 处理 18 h; 实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 将提取的蛋白样品与适量的 5 \times Buffer 混匀, 沸水煮沸 5 ~ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却备用; 用 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳 40 mA, 用 PVDF

膜作为转模滤纸冰浴转模,200 mA 2 h;5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,TBST 洗涤 2 次,5 min/次;将一抗 GRP 78(1:1 000,CST,USA),CHOP(1:1 000,CST,USA),Bax(1:1 000,CST,USA)和 β -actin(1:1 000,absin,中国)4 $^{\circ}\text{C}$ 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。用曝光仪获取 GRP 78、CHOP、Bax 和 β -actin 的图像结果,ImageJ 计算蛋白条带灰度值,总蛋白以 β -actin 为内部参照进行统计和分析。

1.3 统计学分析

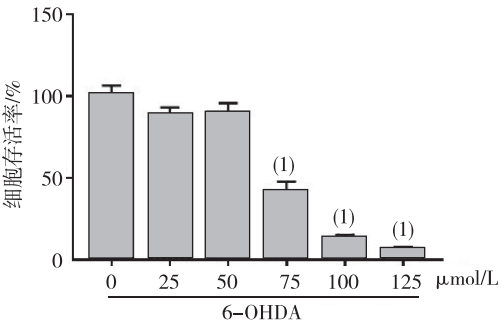
统计学处理使用 SPSS 22.0 软件完成,采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示,多组比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 6-OHDA 的最适浓度

CCK8 结果显示,不同浓度 6-OHDA 处理细胞 18 h 后,细胞存活率呈浓度依赖性降低(图 1)。当 6-OHDA 浓度为 75 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率为 50% 左右;在 6-OHDA 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 125 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率逐渐降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。因此选择 75 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-OHDA 浓度

作为观察浓度。



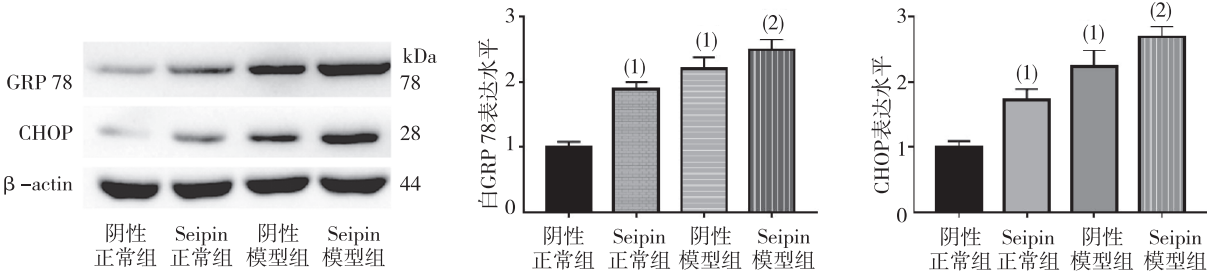
注:⁽¹⁾与 0 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA 组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 不同浓度 6-OHDA 处理的 PC12 细胞存活率

Fig. 1 The effect of 6-OHDA on cell viability of PC12 cells

2.2 细胞 ERS 蛋白 GRP 78 和 CHOP 水平

Western blot 结果显示,与阴性正常组比较,阴性模型组、Seipin 模型组应激蛋白 GRP 78 和 CHOP 明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);而与阴性模型组相比,Seipin 模型组 GRP 78 和 CHOP 蛋白水平明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。提示 Seipin 敲低后应激蛋白 GRP 78 和 CHOP 可明显增加。



注:⁽¹⁾与阴性正常组比较, $P < 0.05$;⁽²⁾与阴性模型组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 各组细胞 GRP 78 和 CHOP 表达水平

Fig. 2 The protein expression level of GRP 78 and CHOP in each group of cells

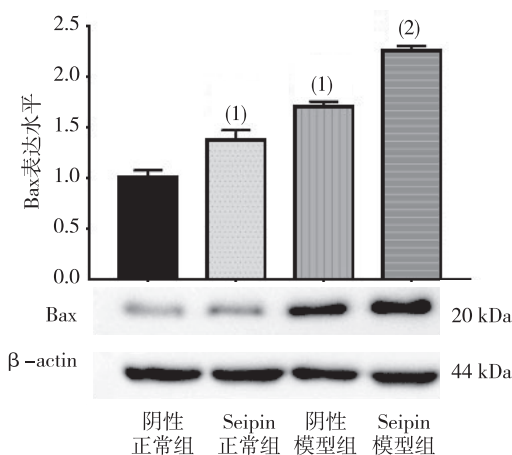
2.3 细胞促凋亡蛋白 Bax 水平

Western blot 结果显示,与阴性正常组比较,阴性模型组、Seipin 模型组促凋亡蛋白 Bax 明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);而与阴性模型组相比,Seipin 模型组 Bax 蛋白水平明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。提示 Seipin 敲低后促凋亡蛋白 Bax 明显增加。

3 讨论

PD 是一种常见的神经退行性疾病,以往的研

究多集中在神经元病变死亡,lewy body^[11-12] 和 α -突触核蛋白病理学^[13-14]。脑内 DA 能神经元逐渐病变死亡,使患者控制肌肉的能力越来越受到限制,当黑质中 DA 能神经元丢失 50% 以上,纹状体内 DA 含量减少至 80% 以上,临床上才会表现出 PD 的运动症状,主要表现为静止性震颤、肌强直、运动迟缓和姿势反射障碍^[12];PD 除了运动症状之外,还伴有一些非运动症状,许多非运动性症状是由路易小体中主要成分 α -突触核蛋白的错误折叠和广泛分布所引起的^[13],但是基于这些病理机制的治疗手段没有取得重大进展^[15]。PD 研究的宗



注: ⁽¹⁾ 与阴性正常组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与阴性模型组比较, $P < 0.05$ 。

图3 各组细胞 Bax 表达水平

Fig.3 The effect of 6-OHDA and Seipin knockdown on the protein expression level of Bax

旨在寻找有效地能缓解或阻止神经元病变死亡的药物或治疗手段。PD 的病因和发病机制至今还很复杂,可能的假说是内质网应激过度活化、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;其中 ERS 在 PD 病发病过程起着重要作用^[9];ERS 是指细胞内质网功能紊乱导致未折叠蛋白与异常蛋白大量聚集,导致内质网稳态的失衡;当细胞本身不能应对这些异常时,就会过度活化 ERS 介导细胞凋亡。近年来,研究发现 Seipin 蛋白与细胞 ERS 功能密切相关,在神经系统中起着重要的作用,其在帕金森病的发病机制研究中越来越显示着重要意义,Seipin 的探讨也成为目前众多科学研究的一个新方向^[5]。

Seipin 蛋白是内质网膜上的跨膜蛋白,目前预测其有 2 个跨膜结构域,过去的研究表明 Seipin 蛋白在脂质稳态和维持脂滴形态中起保护作用,Seipin 蛋白的缺乏会损害脂肪细胞稳态并导致脂肪代谢障碍^[16-17],随着研究地深入,发现 Seipin 在大脑中也高度表达,Seipin 发生异常会使神经受累,表明 Seipin 在脑神经元中可能具有重要的功能^[18-19]。研究发现,Seipin 是神经元疾病的关键调节分子^[20-24]。Seipin 可能调控 ERS 在相关运动神经元的发病机制中起重要作用,研究发现突变的 Seipin 增加了内质网应激蛋白 GRP78 和 CHOP 的增加,并诱导了细胞的凋亡^[8],Seipin 的 N88S/

S90L 位点突变和 Seipin 敲除小鼠也表现出轻度的 ERS^[25]。为探讨 Seipin 蛋白表达降低后在 6-OHDA 诱导的 PD 细胞模型中对细胞凋亡的影响,本研究采用阴性对照细胞与 Seipin 敲低细胞对其进行 6-OHDA 造模。CCK8 结果显示,不同浓度 6-OHDA 处理细胞 18 h 后,细胞存活率呈浓度依赖性降低,当 6-OHDA 浓度为 75 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率为 50% 左右 ($P < 0.05$),6-OHDA 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 125 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率逐渐降低,根据细胞损伤程度适中的原则,因为过度的细胞损伤会造成不可逆损伤,后续实验以浓度为 75 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-OHDA 作为 PD 造模浓度。Western blot 结果显示,与阴性正常组相比,Seipin 敲低后应激蛋白 GRP78 和 CHOP 增加,促凋亡蛋白 Bax 增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);加 6-OHDA 处理后,与阴性正常组相比,阴性模型组 GRP78 和 CHOP 蛋白明显增加 ($P < 0.05$),与阴性模型组相比,Seipin 模型组 GRP78 和 CHOP 蛋白水平明显增加,Bax 蛋白水平明显增加 ($P < 0.05$),说明 Seipin 蛋白敲低后能诱导 ERS,在同样经过 6-OHDA 处理后,敲低 Seipin 后 ERS 蛋白与促凋亡蛋白明显增加,表明 Seipin 蛋白可能是维持 ERS 正常功能的重要分子,当细胞经过 6-OHDA 处理,细胞产生过度的 ERS 进而介导细胞凋亡,如果细胞缺乏 Seipin 蛋白的调控,会导致更加严重的 ERS 进而介导的细胞凋亡更加严重。这些结果表明,在 PD 模型中 Seipin 敲低可能与 ERS 诱导的细胞凋亡密切相关。

综上所述,敲低 Seipin 诱导细胞凋亡可能涉及 ERS 通路的增加,敲低 Seipin 后导致 6-OHDA 诱导的细胞凋亡更加严重。在未来的研究中仍需要更进一步体内实验来阐明 Seipin 参与介导的神经元损伤的详细机制。

4 参考文献

- [1] SVEINBJORNSDOTTIR S. The clinical symptoms of parkinson's disease[J]. Journal of Neurochemistry, 2016, 139(1): 318-324.
- [2] CUI X, WANG Y H, TANG Y, et al. Seipin ablation in mice results in severe generalized lipodystrophy[J]. Human Molecular Genetics, 2011, 20(15): 3022-3030.
- [3] ITO D, FUJISAE T, HIDA H, et al. Characterization of Seipin/BSCL2, a protein associated with spastic paraplegia 17[J]. Neurobiology of Disease, 2008, 31(2): 266-277.

- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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[J]. *Human Molecular Genetics*, 2014, 23(15): 4094 – 4102.
- [7] WANG L, HONG J, WU Y, et al. Seipin deficiency in mice causes loss of dopaminergic neurons via aggregation and phosphorylation of α -synuclein and neuroinflammation[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(5): 440.
- [8] 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.
- [9] RYU E J, HARDING H P, ANGELASTRO J M, et al. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease[J]. *Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2002, 22(24): 10690 – 10698.
- [10] 李成朋, 韩飞, 董智慧, 等. α -硫辛酸对 6-羟多巴胺诱导 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. *贵州医科大学学报*, 2018, 43(3): 264 – 268.
- [11] JELLINGER K A. A critical reappraisal of current staging of Lewy-related pathology in human brain[J]. *Acta Neuropathologica*, 2008, 116(1): 1 – 16.
- [12] DONAGHY P C, FIRBANK M J, THMAS A J, et al. Clinical and imaging correlates of amyloid deposition in dementia with Lewy bodies [J]. *Movement Disord*, 2018, 33(7): 1130 – 1138.
- [13] XILOURI M, BREKK, OEYTEIN R, et al. Autophagy and alpha-synuclein: relevance to parkinson's disease and related synucleopathies[J]. *Movement Disord*, 2016, 3(2): 178 – 192.
- [14] GEORGE S, BRUNDIN P. Immunotherapy in parkinson's disease: micromanaging alpha-synuclein aggregation[J]. *Journal of Parkinson's Disease*, 2015, 5(3): 413 – 424.
- [15] ZHANG H, YE N, ZOU S L, et al. Identification of N-propylnoraporphin-11-yl 5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanoate as a new anti-Parkinson's agent possessing a dopamine D2 and serotonin 5-HT1A dual-agonist profile[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 54(13): 4324 – 4338.
- [16] LUNDIN C, NORDSTROM R, Wanger K, et al. Membrane topology of the human Seipin protein[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(9): 2281 – 2284.
- [17] DOLLET L, MAGRE J, CARIOU B, et al. Function of Seipin: new insights from Bsc12/Seipin knockout mouse models[J]. *Biochimie*, 2014, 96:166 – 172.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] WINDPASSINGER C, AUER-GRUMBACH 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.
- [21] GARFIED A S, CHAN W S, DENNIS R J, et al. Neuroanatomical characterisation of the expression of the lipodystrophy and motor-neuropathy gene Bsc12 in adult mouse brain[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45790.
- [22] QIAN Y, YIN J, HONG J, et al. Neuronal Seipin knockout facilitates A β -induced neuroinflammation and neurotoxicity via reduction of PPAR γ in hippocampus of mouse [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 145.
- [23] RUIZ-RIQUELME A, SANCHEZ-IGLESIAS S, RABANO A, et al. Larger aggregates of mutant Seipin in celiac's encephalopathy, a new protein misfolding neurodegenerative disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 83: 44 – 53.
- [24] GUILLEN-NAVARRO E, SANCHEZ-IGLESIAS S, DOMINGO-JIMENEZ R, et al. A new Seipin-associated neurodegenerative syndrome[J]. *Journal Medical Genetics*, 2013, 50(6): 401 – 409.
- [25] GUO J, QIU W, SOH S L, et al. Motor neuron degeneration in a mouse model of Seipinopathy[J]. *Cell Death & Disease*, 2013, 4: e535.

(2020-01-10 收稿, 2020-02-28 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 张启芳