

突变型NDUFS7质粒的构建及其对神经细胞的影响

沈杰, 查倩, 高向东, 陈松*

(中国药科大学生命科学与技术学院 江苏省生物药物成药性研究重点实验室, 南京 211198)

摘要 为了研究NDUFS7基因突变对神经元的影响,通过构建pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP突变质粒,并将其转入分化后SH-SY5Y细胞。采用MTT法检测转染突变质粒对多巴胺能神经细胞活力的影响;Annexin V-FITC/PI双染结合流式细胞术检测转染突变质粒对细胞凋亡情况的影响;Western blot法检测转染突变质粒后细胞内凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2表达水平的变化;采用JC-1探针检测转染突变质粒对分化后SH-SY5Y细胞内线粒体膜电位的影响及抗氧化剂Trolox的干预作用;最后PI/Hoechst双染检测Trolox对转染突变质粒的分化后SH-SY5Y细胞凋亡情况的干预作用。结果显示,多巴胺能神经细胞内线粒体复合体I亚基突变能够导致神经细胞活力下降,凋亡增多,而抗氧化剂能够缓解转染突变质粒导致的线粒体膜电位异常和细胞凋亡,提示转染NDUFS7基因突变质粒能通过引起多巴胺能神经细胞内线粒体功能异常从而导致细胞凋亡。

关键词 NDUFS7;多巴胺能神经元;细胞凋亡;线粒体膜电位

中图分类号 Q78;Q421 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)05-0599-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200512

引用本文 沈杰,查倩,高向东,等.突变型NDUFS7质粒的构建及其对神经细胞的影响[J].中国药科大学学报,2020,51(5):599–606.

Cite this article as: SHEN Jie, ZHA Qian, GAO Xiangdong, et al. Construction of mutant NDUFS7 plasmid and its effects on neural cells[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(5): 599–606.

Construction of mutant NDUFS7 plasmid and its effects on neural cells

SHEN Jie, ZHA Qian, GAO Xiangdong, CHEN Song*

Jiangsu Key Laboratory of Druggability of Biopharmaceuticals, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract To investigate the effects of NDUFS7 gene mutation on neurons, the mutant plasmid of pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP was constructed and transfected into differentiated SH-SY5Y cells. The effect of transfection of mutant plasmid on the viability of dopaminergic neural cells was detected by MTT assay. The effect of transfection of mutant plasmid on apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI staining followed by flow cytometry assay. The changes in the expression levels of apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2 in cells after transfection of mutant plasmid were detected by Western blot. The effects of transfection of mutant plasmid on the mitochondrial membrane potential in differentiated SH-SY5Y cells and the intervention effect of antioxidant Trolox were examined using JC-1 fluorescent probe. The intervention effect of Trolox on the apoptosis of differentiated SH-SY5Y cells transfected with mutant plasmid was detected by PI/Hoechst staining. The results showed that the subunit mutation of mitochondrial complex I in dopaminergic neurons could lead to decreased neuronal viability and increased apoptosis, while antioxidants could alleviate the abnormal mitochondrial membrane potential and apoptosis caused by transfection of mutant plasmids, suggesting that transfection of mutant plasmid of NDUFS7 gene could lead to apoptosis by causing abnormal mitochondrial function in dopaminergic neurons.

Key words NDUFS7; dopaminergic neurons; cell apoptosis; mitochondrial membrane potential

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81673435, No. 81872850)

收稿日期 2020-04-04 *通信作者 Tel:025-86185396 E-mail: chens@cpiu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81673435, No. 81872850)

线粒体是细胞内有氧呼吸的主要场所,参与了细胞代谢、信号传导、氧化应激等多种重要胞内活动^[1-2]。呼吸链在线粒体中发挥着重要作用,线粒体复合体 I 是呼吸链中结构最复杂、包含亚基最多的多蛋白复合体,由 45 种细胞核和线粒体基因编码的蛋白装配而成,相对分子质量约 1 000 kD^[3-4],它能够把 NADH 中的电子通过黄素单核苷酸传递给辅酶 Q,并将质子传递出线粒体内膜进而产生能量^[5-6],为生命体的生命活动提供必要的能量,参与调控细胞生长、信号转导和细胞凋亡等生命活动,在细胞能量代谢中发挥着重要作用^[7-8]。

NDUFS7 (NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7) 是由细胞核内基因编码,人类 NDUFS7 基因定位于 19 号染色体,编码的蛋白质参与构成线粒体呼吸链复合体 I,相对分子质量约为 20 kD,是复合体 I 疏水亚基的重要组成部分^[9-11]。线粒体复合体 I 功能障碍可导致细胞功能发生障碍并退化凋亡,多种神经毒素例如 MPTP 和鱼藤酮等已经被证明能够抑制线粒体复合体 I 的活性从而导致多巴胺能神经元的退化^[12-13],线粒体功能发生障碍时,可能诱发细胞内线粒体膜电位水平异常从而导致细胞死亡。此外有研究证明神经退行性疾病也与复合体 I 中亚基突变有着密切联系^[11,14]。NDUFS7 基因作为线粒体复合体 I 的重要组成部分,其突变可能导致多巴胺能神经元的退化。课题组前期基于线虫模型发现了线粒体复合体 I 亚基 NDUFS7(线虫 NDUF7 同源)突变导致多巴胺能神经元退化^[15],但其对于人源多巴胺能神经细胞的影响仍需进一步验证。

本研究通过构建 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒,转染分化后 SH-SY5Y 细胞,考察转染 NDUFS7 基因突变质粒对多巴胺能神经细胞活力、凋亡情况以及细胞内 Bax、Bcl-2 蛋白表达量的影响,同时采用抗氧化剂进行干预,明确转染 NDUFS7 基因突变质粒后可能通过影响线粒体正常功能导致多巴胺能神经细胞凋亡。

1 材料

1.1 试剂

DMEM 高糖培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司); DNA Marker(日本 TaKaRa 公司); Lipofectamine 3000 转染试剂、蛋白预染 Marker、蛋白酶

和磷酸酶抑制剂(美国 Thermo 公司); Bax、Bcl-2 抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG(美国 Cell Signaling Technology 公司); β -actin 抗体(中国 Abclonal 公司); 胰蛋白酶(美国 Sigma 公司); MTT、氨苄青霉素、链霉素、牛血清白蛋白(中国 Biosharp 公司); PVDF 膜、ECL 试剂盒(美国 Millipore 公司); BCA 蛋白浓度检测试剂盒、RIPA 细胞裂解液、一抗稀释液、Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒、Hoechst 33342、碘化丙啶(propidium iodide, PI)(中国碧云天生物技术研究); 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

高速冷冻离心机、全波长酶标仪、NanoDrop 2000C 微量分光光度计(美国 Thermo 公司); 倒置相差显微镜、倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司); TDZ5-WS 台式离心机(湘仪离心机仪器有限公司); 电泳仪、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); 化学发光成像系统(上海天能科技有限公司); 流式细胞仪(美国 Becton-Dickinson 公司)。

1.3 菌株和细胞

TOP10 菌株、神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞株购自美国菌种保藏中心(ATCC)。

2 方法

2.1 细胞培养及其诱导分化

SH-SY5Y 细胞于含 10% 胎牛血清, 1×10^5 IU/L 氨苄青霉素, 100 mg/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中 37 °C 培养。3 d 后, 取生长状态良好的细胞按 1:3 进行传代, 于含有终浓度为 10 μ mol/L 反式维甲酸的 DMEM 高糖培养基中分化, 连续分化 6 d, 每 2 d 换液一次, 第 7 天进行后续实验。

2.2 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 质粒的构建

将人源 NDUFS7 基因 208 位谷氨酰胺密码子突变为终止密码子, 与 pcDNA3.1(+) 质粒连接构建 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒, 转化至 TOP10 菌株中, 使用 LB 培养基对含有突变基因质粒的 TOP10 菌株进行扩增, 接种于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜, 挑取阳性单克隆, 于 LB 液体培养基中扩增并制成甘油菌保存。

2.3 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 质粒的鉴定

将含有 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 质粒的 TOP10 菌株接种于 LB 液体培养基中,37℃培养至 A 为 2.0~3.0,使用无内毒素质粒小提中量试剂盒提取质粒。使用 *EcoR* I、*Xba* I 对质粒进行双酶切后制样,取样品溶液 10 μL 于 1.0% 琼脂糖凝胶中上样,90 V,30 min 电泳,凝胶成像仪成像并拍照。

2.4 MTT 法检测转染 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒对细胞活力的影响

实验分为空白对照组、pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒转染组。收集生长状态良好的分化后 SH-SY5Y 细胞,以每毫升 5×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,在含 5% CO₂ 细胞培养箱中 37℃培养过夜。待细胞汇合度达到 80% 左右,更换无血清 opti-MEM 培养基,2 h 后进行细胞转染。按每孔 Lipofectamine 3000 0.15 μL、P3000 0.2 μL、DNA 0.1 μg 进行 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 质粒的转染,共同孵育 5 h 后将培养基换为含 1% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基。培养 48 h 后,MTT 法检测各实验组细胞活力:每孔加入 MTT 溶液 10 μL,于含 5% CO₂ 细胞培养箱中 37℃孵育 4 h 后吸出上清液,加入 DMSO 150 μL 并置于酶标板振荡器上 500 r/min 振荡 10 min,以 570 nm 检测波长,630 nm 参比波长于酶标仪中检测各孔吸收度。

2.5 Annexin V-FITC/PI 双染结合流式细胞术检测转染 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒对细胞凋亡情况的影响

实验分组同“2.4”项。收集生长状态良好的分化后 SH-SY5Y 细胞,以每毫升 5×10^4 个细胞的密度接种于 6 孔板中,每孔 1 000 μL,在含 5% CO₂ 的细胞培养箱中 37℃培养过夜。待细胞汇合度达到 80% 左右,更换无血清 opti-MEM 培养基,2 h 后进行细胞转染。每孔 Lipofectamine 3000 3.75 μL、P3000 5 μL、DNA 2.5 μg 进行 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 质粒的转染,共同孵育 5 h 后将培养基换为含 1% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基。培养 48 h 后,Annexin V-FITC/PI 双染结合流式细胞术检测各实验组中细胞凋亡情况。具体步骤为:将细胞培养液吸至 EP 管中,PBS 洗涤细胞一

次,加入适量 0.25% 胰酶消化液消化细胞,室温孵育 1 min;加入收集的细胞培养液,把细胞轻轻吹打下来,转移至 EP 管中,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,收集细胞,用 PBS 轻轻重悬细胞并计数;取 10 万个重悬细胞,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 Annexin V-FITC 结合液 195 μL 重悬细胞;加入 Annexin V-FITC 溶液 5 μL 混匀,再加入 PI 溶液 10 μL 混匀;室温避光孵育 20 min,置于冰浴中,流式细胞仪检测各组细胞荧光值。

2.6 Western blot 检测转染 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒对细胞内 Bax、Bcl-2 蛋白表达量的影响

实验分组同“2.4”项。按照“2.5”项中的实验方法进行分化后 SH-SY5Y 细胞铺板和 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒的转染。培养 48 h 后,提取细胞内总蛋白,Western blot 检测各实验组中 Bax、Bcl-2 蛋白水平变化。具体步骤为:PBS 洗涤细胞 3 次后置于冰上,每孔中加入 RIPA 细胞裂解液(按 1:100 加入蛋白酶、磷酸酶抑制剂混合液)100 μL;使用细胞刮刀将细胞刮下并转移至 EP 管中,置于冰上保存;使用涡旋仪充分振荡裂解,每 3 min 1 次,共 30 min;置于高速冷冻离心机中,4℃、12 000 r/min 离心 10 min 收集上清液即为细胞内蛋白溶液。制样后进行 SDS-PAGE 电泳,使用半干法将蛋白转印至 PVDF 膜上,3% 脱脂奶粉封闭 1 h,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;一抗 4℃孵育过夜,TBST 洗涤 5 次,每次 5 min;二抗室温孵育 2 h,TBST 洗涤 5 次,每次 5 min,ECL 显色成像并拍照。

2.7 JC-1 探针检测抗氧化剂 Trolox 及转染 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒对分化后 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的影响

实验分为空白对照组、pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒转染组、pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP+Trolox 转染后给药干预组。按照“2.5”项下方法进行细胞铺板和突变质粒转染并在换液时使用终浓度为 10 μmol/L 的抗氧化剂 Trolox 进行给药干预。细胞培养 48 h 后,JC-1 探针检测各实验组中细胞内线粒体膜电位水平变化情况。具体步骤为:取适量 JC-1(200×)探针,按每 50 μL 探针加入超纯水 8 mL 的比例进行稀释,剧烈涡旋使之混匀,再加入 JC-1

染色缓冲液(5×) 2 mL充分混匀;吸去细胞培养液,使用PBS洗涤1次,每孔加入细胞培养基1 mL,再加入JC-1染色工作液1 mL,充分混匀,于37℃细胞培养箱中孵育20 min;吸去JC-1染色工作液,使用JC-1染色缓冲液(1×)洗涤2次,每孔加入无血清培养基2 mL,使用倒置荧光显微镜进行观察拍照。

2.8 Hoechst/PI双染检测抗氧化剂Trolox对转染pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP突变质粒的分化后SH-SY5Y细胞凋亡情况的干预作用

实验分组同“2.7”项。按照“2.5”项下方法进行细胞铺板和突变质粒转染并在换液时使用终浓度为10 μmol/L抗氧化剂Trolox进行给药干预。细胞培养48 h后,PI/Hoechst双染进一步检测各实验组中细胞凋亡情况。具体步骤为:弃去6孔板中培养基,使用PBS洗涤细胞2次,每孔加入含有终浓度为7 mmol/L Hoechst 33342的DMEM高糖培养基1 000 μL于37℃培养箱中孵育25 min;PBS洗涤细胞2次,每孔加入含有终浓度为2 mmol/L PI的DMEM高糖培养基1 000 μL,室温下避光孵育

15 min;染色完成后,PBS洗涤3次,荧光显微镜观察并拍照。

2.9 统计分析

实验数据采用GraphPad Prism 8.0统计软件进行处理,各项指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示,来源于至少3次独立实验,以One-way ANOVA检验进行组间比较, $P < 0.05$ 时表明差异有统计学意义。

3 结果

3.1 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP突变质粒的构建和鉴定

构建pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP突变质粒,采用EcoR I、Xba I双酶切,琼脂糖凝胶电泳验证质粒正确性。结果如图1所示,条带2中出现大小约为650 bp(NDUFS7突变基因条带)和5 400 bp的两个条带,说明质粒构建基本正确。进一步测序验证,结果与预期构建的序列完全一致,表明已成功构建pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP突变质粒。

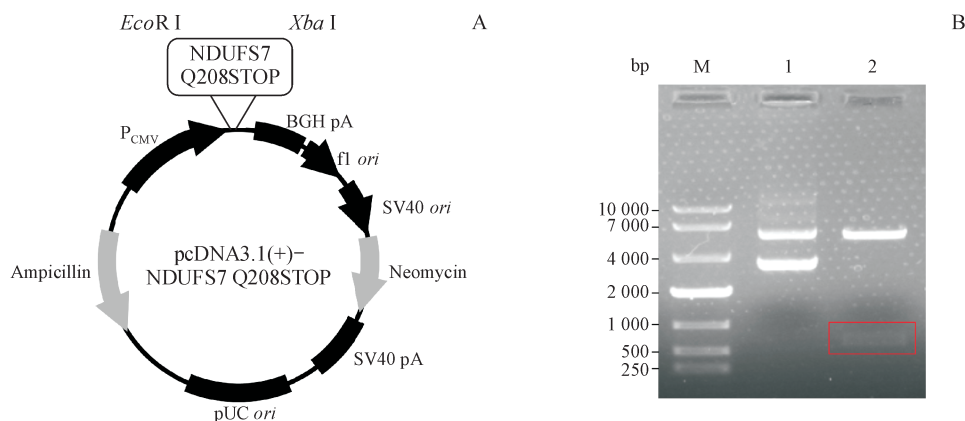


Figure 1 Plasmid profile(A) and the agarose gel electrophoresis of enzyme digested plasmids(B)

Line M:Marker;Line 1:pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP;Line 2:pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP digested by EcoR I and Xba I

3.2 转染pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP突变质粒对神经细胞活力的影响

转染pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP突变质粒48 h后,MTT法检测各实验组神经细胞活力。结果如图2所示,与转染pcDNA3.1(+)实验组相比,转染突变质粒实验组细胞活力显著降低,说明转染NDUFS7突变质粒会导致分化后SH-SY5Y细胞活力下降。

3.3 Annexin V-FITC/PI双染结合流式细胞术检测转染pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP突变质粒对细胞凋亡水平的影响

转染pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP突变质粒48 h后,采用Annexin V-FITC/PI双染结合流式细胞术检测各实验组细胞凋亡水平的变化。结果如图3所示,与转染pcDNA3.1(+)实验组相比,转染突变质粒实验组神经细胞凋亡比例显著上

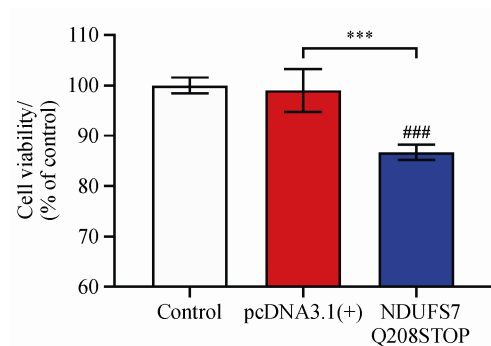


Figure 2 Cell viability after transfection with pcDNA3. 1(+)-NDUFS7 Q208STOP mutant plasmid in differentiated SH-SY5Y cells was analyzed by the MTT assay ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs pcDNA3. 1(+) group

升,说明转染 *NDUFS7* 基因突变质粒能够导致多巴胺能神经细胞的凋亡。

3.4 转染 pcDNA3. 1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒对神经细胞内 Bax、Bcl-2 蛋白表达量的影响

转染 pcDNA3. 1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒 48 h 后,采用 Western blot 检测各实验组细胞内 Bax、Bcl-2 表达量的变化。结果如图 4 所示,与对照组相比,转染突变质粒后,分化后 SH-SY5Y 细胞中促凋亡蛋白 Bax 表达量和抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达量的比值显著上升,说明转染 *NDUFS7* 基因突变质粒后可以通过诱导多巴胺能神经细胞中凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 的改变,对多巴胺能神经细胞的凋亡起到促进作用。

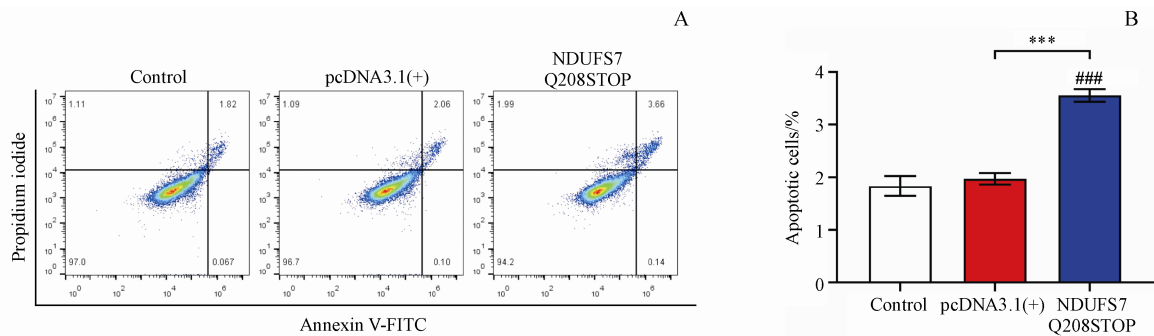


Figure 3 The cell apoptosis level after transfection with pcDNA3. 1(+)-NDUFS7 Q208STOP mutant plasmid in differentiated SH-SY5Y cells for 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
A:Analysis of the proportion of apoptotic cells in differentiated SH-SY5Y cells by flow cytometry;B:Quantification of apoptotic cell proportion
$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs pcDNA3. 1(+) group

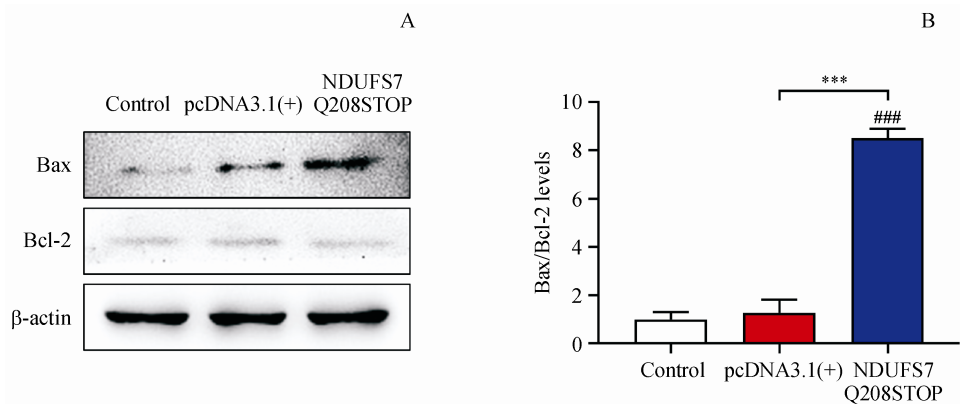


Figure 4 Effects of transfection with pcDNA3. 1(+)-NDUFS7 Q208STOP mutant plasmid on the levels of Bax and Bcl-2 in differentiated SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
A:Detection of Bax and Bcl-2 by Western blot;B:Quantitative analysis of Bax/Bcl-2
$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs pcDNA3. 1(+) group

3.5 抗氧化剂 Trolox 及转染 pcDNA3. 1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒对分化后 SH-SY5Y

细胞线粒体膜电位的影响
转染 pcDNA3. 1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变

质粒并在换液时使用终浓度为 $10\ \mu\text{mol/L}$ 的 Trolox 进行给药干预, 孵育 48 h 后, 采用 JC-1 探针检测分化后 SH-SY5Y 细胞内线粒体膜电位水平。结果如图 5 所示, 与对照组相比, 转染 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒后绿色荧光增强, 说

明细胞内线粒体膜电位降低, 而抗氧化剂 Trolox 给药干预后, 出现较强的红色荧光, 说明 Trolox 可缓解转染突变质粒导致的细胞内线粒体膜电位异常。结果表明 NDUFS7 突变质粒导致的神经细胞异常可被抗氧化剂 Trolox 缓解。

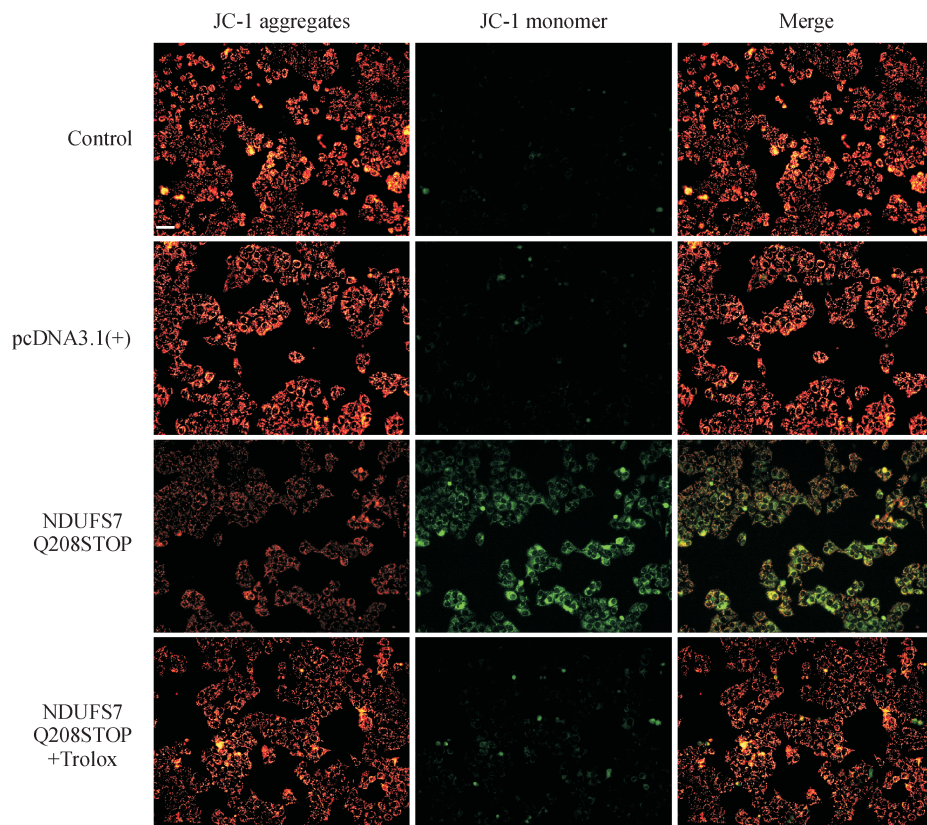


Figure 5 Effects of Trolox and transfection with pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP mutant plasmid on the mitochondrial membrane potential in differentiated SH-SY5Y cells

Scale bar: 50 μm

3.6 抗氧化剂 Trolox 对转染 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒的分化后 SH-SY5Y 细胞凋亡情况的干预作用

转染 pcDNA3.1(+)-NDUFS7 Q208STOP 突变质粒并在换液时使用 Trolox 进行给药干预, 孵育 48 h 后, 采用 PI/Hoechst 双染法检测各组细胞凋亡情况并使用荧光显微镜观察进行拍照。结果如图 6 所示, 与空白对照组相比, 转染突变质粒后凋亡细胞数量明显增多, 而使用 Trolox 给药干预后凋亡细胞数量显著降低, 说明抗氧化剂 Trolox 能够改善转染突变质粒后导致的多巴胺能神经细胞凋亡。

4 讨论

多巴胺能神经元是以多巴胺作为神经递质的神经元, 人类大脑中约有 40 万个多巴胺能神经元。多巴胺能神经元参与调节机体对环境的反应, 对机体运动能力、认知能力都发挥着重要作用^[16]。多巴胺能神经元与大脑学习能力密不可分^[17], 而且多种神经退行性疾病的发生发展与多巴胺能神经元之间有着密切的联系^[18-19], 其中帕金森病的主要病理特征即为中脑黑质多巴胺能神经元损伤导致的纹状体多巴胺严重缺失^[20]。线粒体功能障碍是多巴胺能神经元退化凋亡的重要原因之一, 与线粒体功能相关的多个蛋白(如 LRRK2、ATP13A2

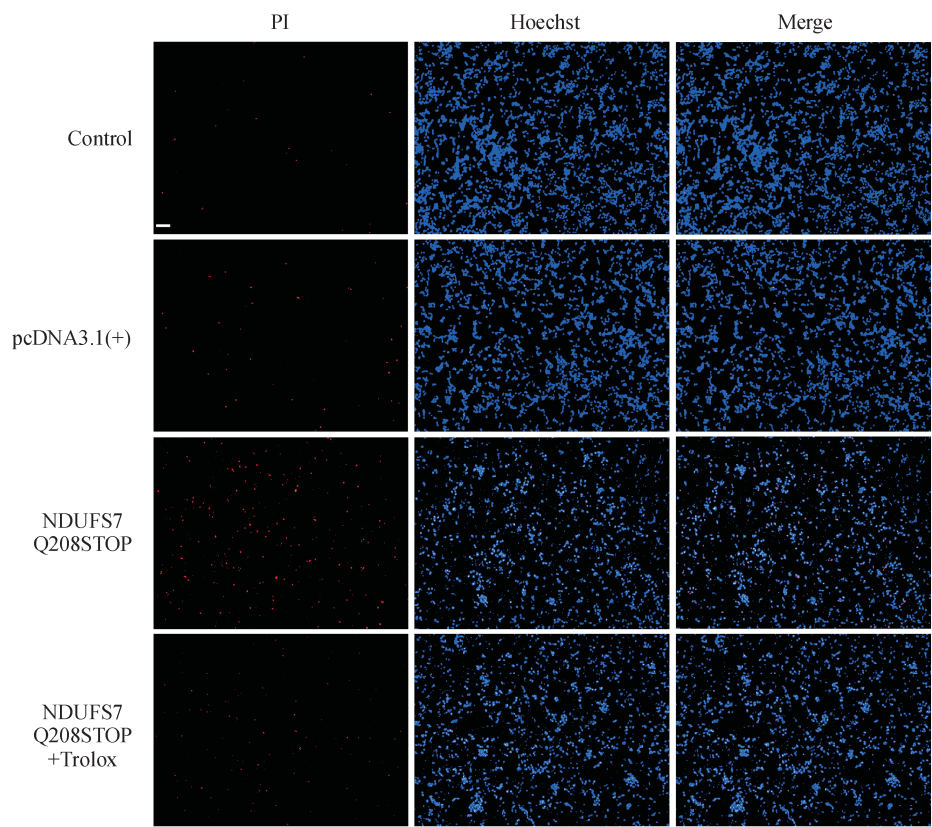


Figure 6 Effects of Trolox and transfection with pcDNA3. 1(+)-NDUFS7 Q208STOP mutant plasmid on apoptosis in differentiated SH-SY5Y cells
Scar bar:200 μ m

等)与帕金森病有着显著的关联^[21]。线粒体复合体 I 是线粒体呼吸链的关键成分之一,复合体 I 中亚基的突变与 PD、Leigh 综合征等神经退行性疾病有着密切联系^[22]。例如 Leigh 综合征与线粒体复合体 I 中 23 个基因的突变有关,包括 *NDUFS1*、*NDUFS2*、*NDUFS8* 等^[23]。本课题组前期报道了线虫中 *NDUF7* 基因突变能够引起多巴胺能神经元特异性退化^[15],进一步于本研究中证明了在哺乳动物细胞中 *NDUFS7*(线虫 *NDUF7* 同源)基因突变与多巴胺能神经元凋亡之间的联系,并且揭示突变型 *NDUFS7* 质粒可能是通过诱导神经细胞线粒体功能异常进而促进细胞凋亡。

本研究设计并构建 pcDNA3. 1 (+) -*NDUFS7* Q208STOP 突变质粒,转染分化后 SH-SY5Y 细胞,进而影响线粒体复合体 I 的正常功能,证明了哺乳动物多巴胺能神经细胞内转染 *NDUFS7* 基因突变质粒后能够导致细胞凋亡。同时,本研究揭示了抗氧化剂给药干预后能够改善转染突变质粒导致的神经细胞线粒体膜电位异常,从而降低细胞

凋亡水平。以上实验结果说明转染 *NDUFS7* 基因突变质粒后,通过引起细胞内线粒体功能异常导致多巴胺能神经元凋亡,证明了突变型 *NDUFS7* 质粒导致多巴胺能神经元凋亡的作用及机制,为与多巴胺能神经元退化凋亡相关的疾病和药物研究提供新的思路和理论依据。

参 考 文 献

[1] Chandel NS. Evolution of mitochondria as signaling organelles [J]. *Cell Metab*, 2015, **22**(2): 204–206.

[2] Roger AJ, Muñoz-Gómez SA, Kamikawa R. The origin and diversification of mitochondria [J]. *Curr Biol*, 2017, **27**(21): R1177–R1192.

[3] Walker JE. The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains [J]. *Q Rev Biophys*, 1992, **25**(3): 253–324.

[4] Wirth C, Brandt U, Hunte C, *et al*. Structure and function of mitochondrial complex I [J]. *Biochim Et Biophys Acta BBA-Bioenerg*, 2016, **1857**(7): 902–914.

[5] Smeitink J, Sengers R, Trijbels F, *et al*. Human NADH: ubiquinone oxidoreductase [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2001, **33**(3):

- 259-266.
- [6] Brandt U. Energy converting NADH: quinone oxidoreductase (complex I)[J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, **75**:69-92.
- [7] McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse[J]. *Curr Biol*, 2006, **16**(14):R551-R560.
- [8] Dudkina NV, Heinemeyer J, Sunderhaus S, et al. Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane [J]. *Trends Plant Sci*, 2006, **11**(5):232-240.
- [9] Triepels RH, van den Heuvel LP, Loeffen JL, et al. Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUFS7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I[J]. *Ann Neurol*, 1999, **45**(6):787-790.
- [10] Ma L, Zhang W, Tang JS, et al. No association between genetic polymorphisms of the NDUFS7 gene and schizophrenia in Han Chinese[J]. *Psychiatr Genet*, 2013, **23**(1):29-32.
- [11] Fiedoreczuk K, Sazanov LA. Mammalian mitochondrial complex I structure and disease-causing mutations[J]. *Trends Cell Biol*, 2018, **28**(10):835-867.
- [12] Nonnekes J, Post B, Tetrad JW, et al. MPTP-induced Parkinsonism: an historical case series[J]. *Lancet Neurol*, 2018, **17**(4):300-301.
- [13] Langston JW. The MPTP story [J]. *J Parkinsons Dis*, 2017, **7**(s1):S11-S19.
- [14] Blaza JN, Vinothkumar KR, Hirst J. Structure of the deactive state of mammalian respiratory complex I[J]. *Structure*, 2018, **26**(2):312-319.
- [15] Chen S, Luo S, Zhang Z, et al. VHL-1 inactivation and mitochondrial antioxidants rescue *C. elegans* dopaminergic neurodegeneration[J]. *Protein Cell*, 2019, **10**(8):610-614.
- [16] Schultz W. Multiple dopamine functions at different time courses [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2007, **30**:259-288.
- [17] Bayer HM, Glimcher PW. Midbrain dopamine neurons encode a quantitative reward prediction error signal [J]. *Neuron*, 2005, **47**(1):129-141.
- [18] Floresco SB, West AR, Ash B, et al. Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission[J]. *Nat Neurosci*, 2003, **6**(9):968-973.
- [19] Lautrup S, Sinclair DA, Mattson MP, et al. NAD⁺ in brain aging and neurodegenerative disorders[J]. *Cell Metab*, 2019, **30**(4):630-655.
- [20] Surmeier DJ, Obeso JA, Halliday GM. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2017, **18**(2):101-113.
- [21] Ruan LH, Wang YH, Zhang X, et al. Mitochondria-associated proteostasis[J]. *Annu Rev Biophys*, 2020, **49**:41-67.
- [22] Guo RY, Zong S, Wu M, et al. Architecture of human mitochondrial respiratory megacomplex I₂III₂IV₂ [J]. *Cell*, 2017, **170**(6):1247-1257.
- [23] Lake NJ, Compton AG, Rahman S, et al. Leigh syndrome: one disorder, more than 75 monogenic causes [J]. *Ann Neurol*, 2016, **79**(2):190-203.



中国药科大学学报

中国精品科技期刊 中国高校精品科技期刊
中国中文核心期刊 中国科学引文数据库核心期刊

传播医药科技创新研究成果的优秀媒体

药学前沿

提供药学领域的前沿信息 反映最新的药学研究进展

创新成果

展示医药科技最新成果 构建学术交流的平台

研究论文

科学研究原创论文 国家重大药学研究基金产出论文

邮发代号: 28-115, 欢迎订阅, 欢迎投稿!