

张静怡,邓永宁,张萌,等. *Sirt3* 基因 RNA 干扰慢病毒载体及稳定表达的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株的构建 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 1-8.

Zhang JY, Deng YN, Zhang M, et al. RNA interference of *Sirt3* in human neuroblastoma SH-SY5Y cell [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 1-8.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.001

# *Sirt3* 基因 RNA 干扰慢病毒载体及稳定表达的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株的构建

张静怡<sup>1</sup>, 邓永宁<sup>2</sup>, 张萌<sup>2</sup>, 屈秋民<sup>2\*</sup>

(1.河南省人民医院老年医学科,郑州大学人民医院,郑州 450003;

2.西安交通大学第一医院神经内科,西安 710061)

**【摘要】** 目的 构建 *Sirt3* 基因 RNA 干扰慢病毒载体,建立 *Sirt3* 基因稳定干扰的人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞株。方法 从 Genbank 中检索到 *Sirt3* 基因序列,根据此序列设计 *Sirt3* 基因的 4 条 siRNA 干序列和 1 条阴性对照序列,将它们分别与含绿色荧光蛋白(GFP)编码基因的线性化慢病毒载体连接,获得 4 种重组慢病毒质粒。将 4 种重组的干扰病毒质粒分别与慢病毒包装质粒共转染 293T 细胞,测定病毒滴度。将 4 种构建的慢病毒载体感染 SH-SY5Y 细胞,采用 Real-time PCR 和 Western blot 检测 *Sirt3* 的沉默效果,筛选出最有效干扰 *Sirt3* 基因表达组。结果 测序证实成功构建了 4 种 *Sirt3* 基因 RNA 干扰慢病毒载体,病毒滴度分别为:LV-SIRT3-RNAi-1  $8 \times 10^8$  TU/mL、LV-SIRT3-RNAi-2  $3 \times 10^8$  TU/mL、LV-SIRT3-RNAi-3  $8 \times 10^8$  TU/mL、LV-SIRT3-RNAi-4  $8 \times 10^8$  TU/mL。与空白对照组(CON)和阴性对照组(NC)相比,LV-Sirt3-RNAi-3 组 mRNA 表达水平及蛋白表达水平显著下降( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ )。结论 成功构建 *Sirt3* 基因 RNA 干扰慢病毒载体,并筛选出最佳干扰序列组,获得稳定沉默 *Sirt3* 表达的 SH-SY5Y 细胞株,为后续研究 *Sirt3* 在帕金森病细胞模型中的作用奠定了基础。

**【关键词】** *Sirt3* 基因;RNA 干扰;慢病毒载体;帕金森病;人神经母细胞瘤细胞

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)12-0001-08

## RNA interference of *Sirt3* in human neuroblastoma SH-SY5Y cell

ZHANG Jingyi<sup>1</sup>, DENG Yongning<sup>2</sup>, ZHANG Meng<sup>2</sup>, QU Qiumin<sup>2\*</sup>

(1. Department of Geriatrics, Henan Provincial People's Hospital, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China.

2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiao Tong University, Xi'an 710061)

**【Abstract】 Objective** To construct a lentiviral vector for RNA interference of the *Sirt3* gene and to establish a *Sirt3* knockdown human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. **Methods** According to the *Sirt3* nucleotide sequence archived in the GenBank database, four siRNAs targeting *Sirt3* and one negative control were designed, and cloned into a linear vector containing the green fluorescent protein (GFP) gene to produce four recombinant lentivirus plasmids. The recombinant plasmids and helper plasmids were transfected into 293T cells, and the titer of the virus was determined. SH-SY5Y cells were infected with the constructed lentivirus, and the silencing effect on *Sirt3* was accessed by real-time PCR

**【基金项目】**国家自然科学基金青年基金项目(81801122)。

**【作者简介】**张静怡(1988—),女,硕士,主治医师,研究方向:帕金森、痴呆。E-mail: zhjy98@126.com

**【通信作者】**屈秋民(1964—),男,博士生导师,主任医师,研究方向:帕金森、痴呆。E-mail: quqiumin@126.com

and Western blot. The lentivirus-infected cells were screened for the most significant *Sirt3* knockdown. **Results** Recombinant lentiviral vectors expressing siRNAs targeting *Sirt3* were successfully constructed and confirmed by DNA sequencing. The viral titers of the recombinant lentivirus were as follows: LV-SIRT3-RNAi-1  $8 \times 10^8$  TU/mL, LV-SIRT3-RNAi-2  $3 \times 10^8$  TU/mL, LV-SIRT3-RNAi-3  $8 \times 10^8$  TU/mL, and LV-SIRT3-RNAi-4  $8 \times 10^8$  TU/mL. The levels of *Sirt3* mRNA and SIRT3 protein in the LV-Sirt3-RNAi-3 group were significantly less than those in the negative control group and the blank control group ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusions** A lentivirus vector for RNA interference of *Sirt3* was successfully constructed and SH-SY5Y cell lines with *Sirt3* gene knockdown were selected, which will be useful for future research of *Sirt3* function in Parkinson's disease cell models.

**[Keywords]** *Sirt3*; RNA interference; lentivirus vector; Parkinson's disease; human neuroblastoma cells

随着全球人口老龄化,衰老问题日益突出,寻找衰老相关疾病的治疗靶点成为研究的热点。Sirtuin 家族是一种线粒体 NAD 依赖的去乙酰化酶,越来越多的研究发现 Sirtuin 家族七个成员 (*Sirt1-Sirt7*) 与衰老相关疾病密切相关<sup>[1-2]</sup>。*Sirt3* 主要位于线粒体内,研究发现它通过改善线粒体功能、减轻氧化应激、增加三磷酸腺苷(ATP)生成、抑制凋亡等机制,在衰老相关的神经退行性疾病中发挥神经保护作用<sup>[3-5]</sup>。帕金森病作为第二大神经退行性疾病,严重影响了患者的生活质量并且威胁着患者的生命,给社会增加了沉重的经济负担。帕金森病的发病机制包括线粒体功能障碍、氧化应激等<sup>[6]</sup>,所以 *Sirt3* 在其中的作用研究受到关注。本实验利用基因干扰 RNAi (RNA interference) 技术,拟构建含有 RNAi 片段的慢病毒载体,抑制人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞中 *Sirt3* 基因的表达。人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞具有多巴胺能神经元的特性,是帕金森病体外细胞模型中常用的细胞。实验拟构建稳定沉默 *Sirt3* 基因表达的细胞株,为后续研究 *Sirt3* 在帕金森病细胞模型中的作用提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验细胞

人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 购买于美国 ATCC; 293T 细胞购自中科院上海细胞生物学研究所。

### 1.2 主要试剂与仪器

GV248 载体、pHelper 1.0 载体、pHelper 2.0 载体购自上海吉凯基因技术有限公司; PCR 用试剂 primer (R&F)、dsDNA oligo 均购自上海吉凯基因技术有限公司; 质粒提取试剂盒购自 QIAGEN 公司; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen; SYBR Real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; RNA 提取试剂盒购

自飞捷生物公司; 胎牛血清、胰蛋白酶、细胞培养基均购自 Hyclone, USA; Western blot 制胶试剂盒购自西安先锋生物科技有限公司;  $\beta$ -actin 鼠抗单克隆抗体及 HRP 标记山羊抗兔 IgG (sc-2005) 购买于 Santa Cruz, USA; *Sirt3* 兔抗多克隆抗体购买于 Abcams, UK; 二氧化碳培养箱 (Thermo Election, USA); 高速台式离心机 (上海市安亭科学仪器厂); PCR 仪 (Applied Biosystems); 生物安全柜 (上海力申科学仪器有限公司); 荧光显微镜 (Nikon, Tokyo, Japan)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 RNAi 慢病毒载体的制备

##### (1) siRNA 的设计合成

利用 RNAi 设计软件按照 RNA 干扰序列设计原则,设计合成 4 条针对人 *Sirt3* 基因 (GenBank: NM\_004612) 的 siRNA 干扰序列和 1 条阴性对照序列, 4 条 siRNA 序列分别为: SIRT3-RNAi-1: 5'-ACCTGCACAGTCTGCCAAA-3'; SIRT3-RNAi-2: 5'-GGCTCTACACGCAGAACAT-3'; SIRT3-RNAi-3: 5'-CAACGTCACACTACTTT-3'; SIRT3-RNAi-4: 5'-GGGTGCTTCAAGTGTGTT-3'。阴性对照序列: 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。序列由吉凯基因技术有限公司合成。同时,用 BLAST 同源性分析确认 4 对干扰片段的特异性。

##### (2) RNAi 慢病毒载体的构建

根据以上设计的靶序列,首先合成含各干扰序列及阴性对照的单链 DNA oligo (见表 1), 然后退火配对产生双链 DNA, 再通过 T4 连接酶将 DNA 片段与经过 AgeI 和 EcoRI 双酶切后的 GV248 线性化载体 (hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin) 在适当的缓冲液中进行连接; 将连接产物转入制备好的细菌感受态细胞, PCR 鉴定阳性重组子, 利用质粒试剂盒提取质粒, 然后送 DNA 测序分析进行验证。

表 1 Oligo 序列  
Table 1 Oligo sequence

Oligo 名称 Oligo name	5'	STEM	Loop	STEM	3'
RNAi-1-a	CCGG	CCACCTGCACAGTCTGCCAAA	CTCGAG	TTTGGCAGACTGTGCAGGTGG	TTTTTG
RNAi-1-b	AATTCAAAA	CCACCTGCACAGTCTGCCAAA	CTCGAG	TTTGGCAGACTGTGCAGGTGG	
RNAi-2-a	CCGG	GCGGCTCTACACGCAGAACAT	CTCGAG	ATGTTCTGCGTGTAGAGCCGC	TTTTTG
RNAi-2-b	AATTCAAAA	GCGGCTCTACACGCAGAACAT	CTCGAG	ATGTTCTGCGTGTAGAGCCGC	
RNAi-3-a	CCGG	CCCAACGTCACTCACTACTTT	CTCGAG	AAAGTACTGAGTGACGTTGGG	TTTTTG
RNAi-3-b	AATTCAAAA	CCCAACGTCACTCACTACTTT	CTCGAG	AAAGTACTGAGTGACGTTGGG	
RNAi-4-a	CCGG	GTGGGTGCTTCAAGTGTGT	CTCGAG	AACAACACTTGAAGCACCCAC	TTTTTG
RNAi-4-b	AATTCAAAA	GTGGGTGCTTCAAGTGTGT	CTCGAG	AACAACACTTGAAGCACCCAC	
NC-a	CCGG	TTCTCCGAACGTGTCAAGT	TTCAAGAGA	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	TTTTTG
NC-b	AATTCAAAA	TTCTCCGAACGTGTCAAGT	AAGTTCTCT	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	

### 1.3.2 慢病毒载体的包装与滴度测定

#### (1) 慢病毒载体的包装

将重组慢病毒质粒、pHelper 1.0 载体、pHelper 2.0 载体与 Opti-MEM 混合均匀进行稀释,同时也将 Lipofectamine 2000 试剂稀释,然后将二者进行混合,转移至 293T 细胞的培养液中;转染 8 h 后弃掉含有转染液的培养基,PBS 液洗后加入 10% 血清继续培养 48 h。收集转染后 48 h 的 293T 细胞上清液,于 4℃,4000 r/min 离心 10 min,除去细胞碎片,以 0.45 μm 滤器过滤离心后收集病毒液。

#### (2) 慢病毒载体的滴度测定

将 293T 细胞铺板;准备 8 个无菌的 Ep 管,在每个管中加入 90 μL 的无血清培养基。然后取待测定的病毒原液 10 μL 加入到第一个管中混匀,再从中取 10 μL 加到第二个管中,继续相同的操作直到最后一管进行稀释。将细胞孔中的培养基吸去 90 μL 丢弃,然后加入等量稀释好的病毒溶液放入培养箱培养。24 h 后加入完全培养基继续培养。4 d 后观察荧光表达情况,病毒的滴度等于带有荧光的细胞数除以病毒原液量。

### 1.3.3 慢病毒感染 SH-SY5Y 细胞

复苏 SH-SY5Y 细胞,将细胞分为六组:空白对照组(CON)为不加入病毒液而仅仅加入普通培养基的细胞,阴性对照组(NC)是感染阴性对照病毒的细胞、LV-Sirt3-RNAi-1 组、LV-Sirt3-RNAi-2 组、LV-Sirt3-RNAi-3 组、LV-Sirt3-RNAi-4 组是分别感染了 LV-Sirt3-RNAi-1、LV-Sirt3-RNAi-2、LV-Sirt3-RNAi-3、LV-Sirt3-RNAi-4 慢病毒的细胞。将细胞铺于六孔板中进行培养,提前进行慢病毒转染的预实验确定好 MOI 值,从而据此计算加入病毒液的量。感染 3 d 后在荧光显微镜下观察细胞内荧光表达情况,若 80% 细胞均表达荧光则表明慢病毒感染成功。

### 1.3.4 Real-time PCR

收集以上 6 组 SH-SY5Y 细胞,按照 RNA 提取试剂盒操作流程提取总 RNA,并测定 RNA 浓度。将提取的 RNA 与试剂盒中的试剂配成反应液,按照 37℃、15 min,85℃、5 s,4℃ 反应条件进行反转录反应,然后将反转录液按照操作流程进行 Real-time PCR 反应。Sirt3 引物:上游引物:5'-TCCTCCTTCC TAGCATCACA-3',下游引物 5'-ATCATAACACC GCACTCCA-3',以 GAPDH 为内参,上游引物为:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游引物为:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 Sirt3 RNA 表达水平。

### 1.3.5 Western blot

收集以上 6 组细胞,配取裂解液裂解细胞提取蛋白,然后用 BCA 法测定蛋白浓度;按照 Western blot 说明书、根据目的蛋白分子量制胶,然后在胶中加入蛋白液上样,进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后将蛋白转移到 PVDF 膜上。将 PVDF 膜放在 PBST 缓冲液中漂洗后立即用 5% 脱脂牛奶的封闭 2 h,然后用一抗(Sirt3、内参 β-actin)、二抗进行孵育。PBS 液充分洗膜后发光成像。

### 1.3.6 确定嘌呤霉素筛选最佳浓度及获得稳定表达细胞株

将 SH-SY5Y 细胞铺板培养 24 h,吸取各孔中的细胞培养基,依次加入嘌呤霉素浓度为 0、2、4、6、8、10 μg/μL 的新鲜无血清的培养基。每天在镜下观察细胞生长状况,3~5 d 后能够使几乎所有细胞死亡的最小嘌呤霉素浓度即为最佳浓度。应用慢病毒感染后的 SH-SY5Y 细胞中加入确定浓度的嘌呤霉素培养基继续培养可以得到稳定表达细胞株。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计软件录入和分析数据。实

验均重复三次,得到的计量资料以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,计量资料间进行比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 干扰 Sirt3 表达的 siRNA 成功插入慢病毒载体

对重组干扰慢病毒阳性克隆进行 DNA 测序,结果显示:插入的针对 Sirt3 基因的 siRNA 核苷酸序列

正确,即构建的干扰 Sirt3 基因表达的 4 种 siRNA 重组慢病毒干扰载体的 DNA 序列与设计的序列完全相符,结果表明成功构建了 4 个沉默 Sirt3 基因的慢病毒载体。(见图 1、2、3、4)

### 2.2 慢病毒载体成功转染进 293T 细胞

重组慢病毒质粒与 2 种包装质粒共转染 293T 细胞,转染后第 2 天在倒置荧光显微镜下观察,可以看到细胞内发出绿色荧光(见图 5),收集浓缩病毒液测定病毒滴度,根据荧光细胞数计算病毒的滴度

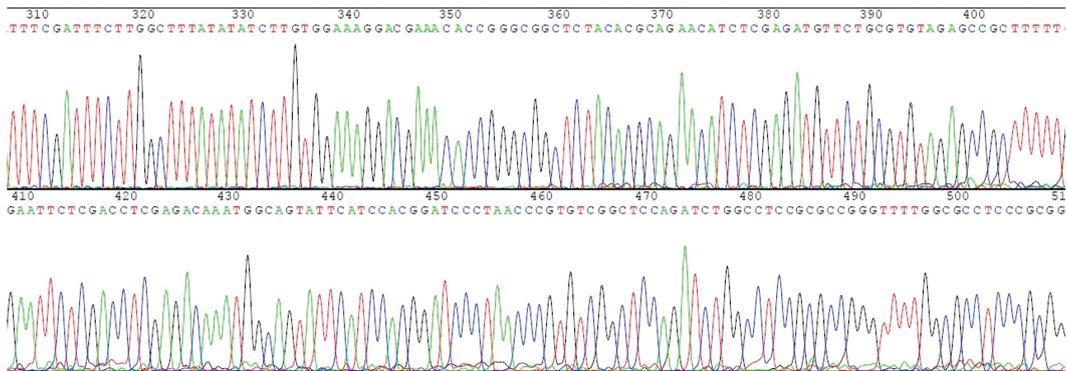


图 1 SIRT3-RNAi-1 慢病毒载体测序结果

Figure 1 Sequencing result of SIRT3-RNAi-1 lentiviral vector

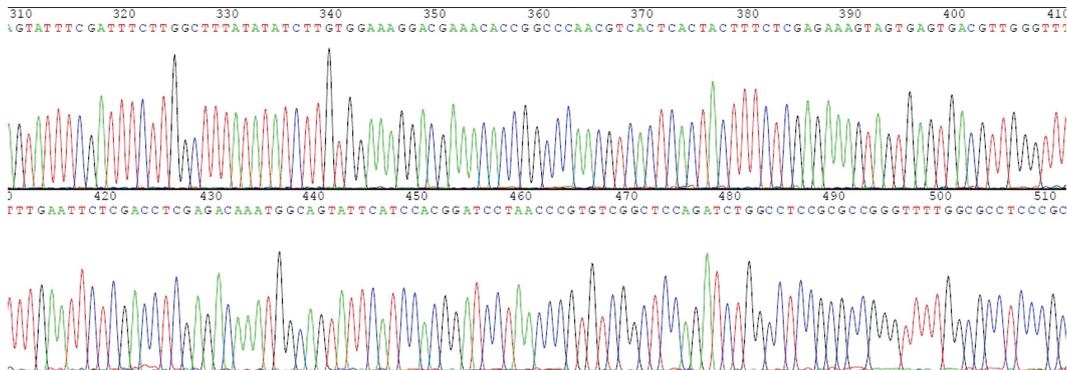


图 2 SIRT3-RNAi-2 慢病毒载体测序结果

Figure 2 Sequencing result of SIRT3-RNAi-2 lentiviral vector

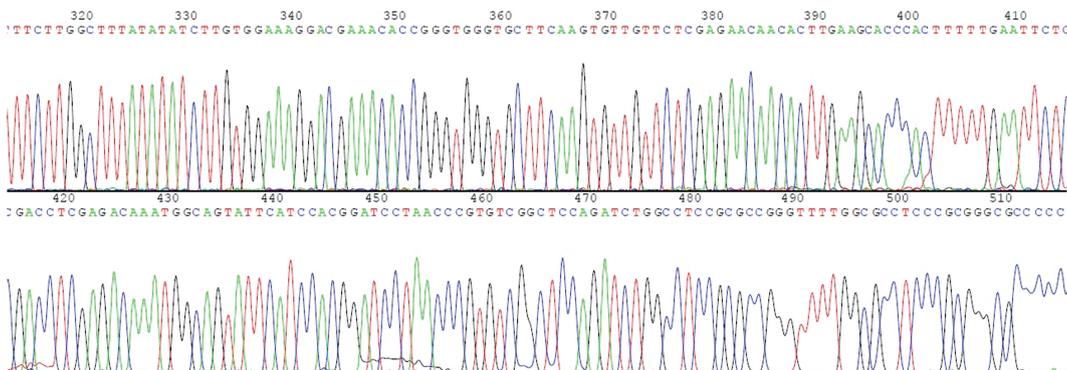


图 3 SIRT3-RNAi-3 慢病毒载体测序结果

Figure 3 Sequencing result of SIRT3-RNAi-3 lentiviral vector

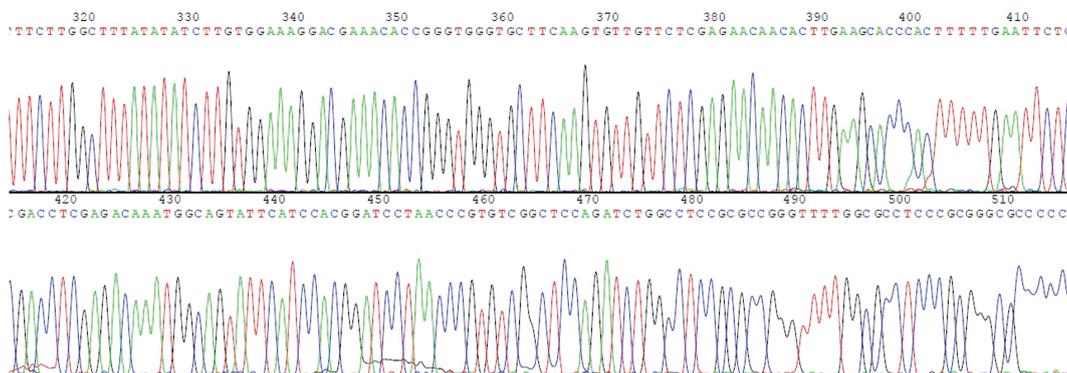


图 4 SIRT3-RNAi-4 慢病毒载体测序结果

Figure 4 Sequencing result of SIRT3-RNAi-4 lentiviral vector

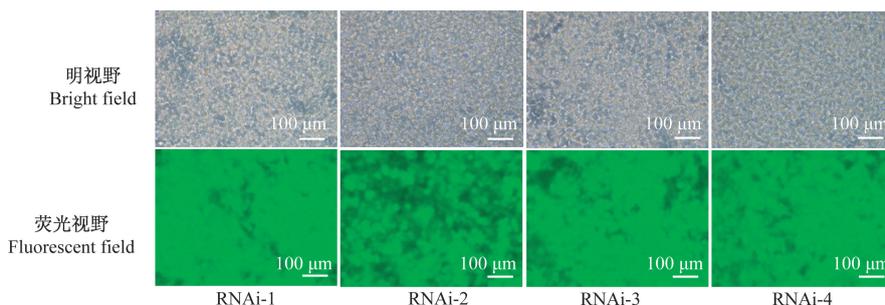


图 5 慢病毒载体共转染 293T 细胞 24 h

Figure 5 Lentiviral vectors were co-transfected into the 293T cells for 24 h

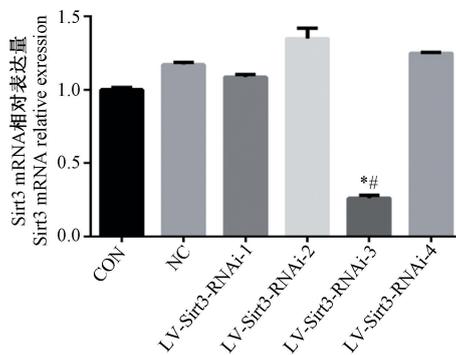
为: LV-SIRT3-RNAi-1  $8 \times 10^8$  TU/mL、LV-SIRT3-RNAi-2  $3 \times 10^8$  TU/mL、LV-SIRT3-RNAi-3  $8 \times 10^8$  TU/mL、LV-SIRT3-RNAi-4  $8 \times 10^8$  TU/mL。这表明慢病毒载体成功转染进 293T 细胞,成功包装的慢病毒载体可以用于后续的研究。

### 2.3 LV-Sirt3-RNAi-3 显著抑制 *Sirt3* mRNA 表达

慢病毒感染人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞,实验分为六组。Real-time PCR 方法检测六组 SH-SY5Y 细胞中 *Sirt3* mRNA 表达量分别是: CON ( $1.0854 \pm 0.0944$ ), NC ( $1.1706 \pm 0.0167$ ), LV-Sirt3-RNAi-1 组 ( $1.0875 \pm 0.0156$ ), LV-Sirt3-RNAi-2 组 ( $1.3492 \pm 0.0697$ ), LV-Sirt3-RNAi-3 组 ( $0.2630 \pm 0.0184$ ), LV-Sirt3-RNAi-4 组 ( $1.2490 \pm 0.0049$ )。统计学分析显示, LV-Sirt3-RNAi-3 组的 SH-SY5Y 细胞中 *Sirt3* mRNA 表达量显著低于空白对照组和阴性对照组,差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。(见图 6)

### 2.4 LV-Sirt3-RNAi-3 显著抑制 *Sirt3* 蛋白表达

六组 SH-SY5Y 细胞中 *Sirt3* 蛋白表达量分别是: CON 组 ( $0.4038 \pm 0.0355$ ), NC 组 ( $0.4638 \pm 0.0411$ ), LV-Sirt3-RNAi-1 组 ( $0.4533 \pm 0.0750$ ), LV-Sirt3-RNAi-2 组 ( $0.5491 \pm 0.0683$ ), LV-Sirt3-RNAi-3 组 ( $0.1633 \pm 0.0132$ ), LV-Sirt3-RNAi-4 组 ( $0.5167 \pm 0.0416$ )。统计学分析结果提示 LV-Sirt3-RNAi-3 组



注: CON 组代表没有感染病毒的 SH-SY5Y 细胞内 *Sirt3* mRNA 表达量,其余五组依次代表 SH-SY5Y 细胞感染阴性对照病毒 (NC)、LV-Sirt3-RNAi-1、LV-Sirt3-RNAi-2、LV-Sirt3-RNAi-3、LV-Sirt3-RNAi-4 慢病毒后细胞内 *Sirt3* mRNA 的表达量。与空白对照组 (CON) 相比,  $* P < 0.001$ ; 与阴性对照组相比,  $\# P < 0.001$ 。

图 6 各组慢病毒感染 SH-SY5Y 细胞后 *Sirt3* mRNA 的表达

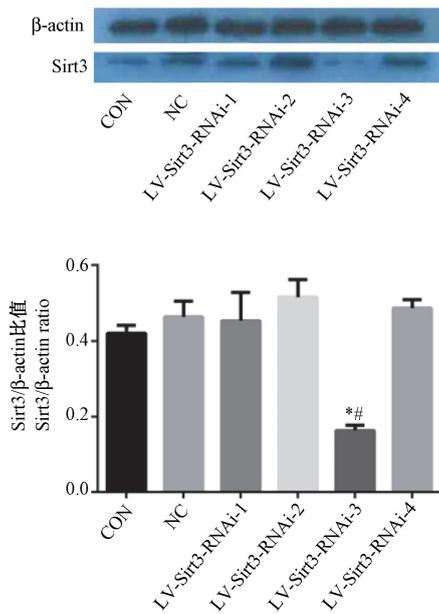
Note. CON group bar shows *Sirt3* mRNA expression in SH-SY5Y cells untreated with lentivirus, the other five groups of bars show *Sirt3* mRNA expression in SH-SY5Y cells infected by negative control lentivirus, LV-Sirt3-RNAi-1, LV-Sirt3-RNAi-2, LV-Sirt3-RNAi-3, LV-Sirt3-RNAi-4 lentivirus. Compared with CON group,  $* P < 0.001$ . Compared with NC group,  $\# P < 0.001$ .

Figure 6 *Sirt3* mRNA expression in different cells infected by corresponding lentivirus

的 SH-SY5Y 细胞中 Sirt3 蛋白表达量显著低于空白对照组和阴性对照组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。(见图 7)

## 2.5 LV-Sirt3-RNAi-3 转染 SH-SY5Y 细胞稳定表达绿色荧光

加入嘌呤霉素培养基培养后获得稳定表达株通过嘌呤霉素浓度确定实验,  $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  含有嘌呤霉素培养基为最佳浓度。在 LV-Sirt3-RNAi-3 组细胞中加入嘌呤霉素培养基培养后获得稳定表达株。在荧光显微镜下观察, 通过可见光视野与荧光视野



注: 左图为 Western blot 代表图,  $\beta$ -actin 为内参; 右图为 Sirt3 的相对表达量, CON 组代表没有感染病毒的 SH-SY5Y 细胞内 Sirt3 蛋白表达量, 其余五组依次代表 SH-SY5Y 细胞感染阴性对照病毒 (NC)、LV-Sirt3-RNAi-1、LV-Sirt3-RNAi-2、LV-Sirt3-RNAi-3、LV-Sirt3-RNAi-4 慢病毒后细胞内 Sirt3 蛋白的表达量。与空白对照组 (CON) 相比,  $*P < 0.001$ ; 与阴性对照组相比,  $\#P < 0.001$ 。

图 7 各组慢病毒感染 SH-SY5Y 细胞后 Sirt3 蛋白表达

Note. Left graph shows Western blot images,  $\beta$ -actin was used as a loading control. Right bar graph shows relative expression of Sirt3. CON group bar shows Sirt3 protein expression in SH-SY5Y cells untreated with lentivirus, the other five groups of bars show Sirt3 protein expression in SH-SY5Y cells infected by negative control lentivirus, LV-Sirt3-RNAi-1, LV-Sirt3-RNAi-2, LV-Sirt3-RNAi-3, LV-Sirt3-RNAi-4 lentivirus. Compared with CON group,  $*P < 0.001$ . Compared with NC group,  $\#P < 0.001$ .

Figure 7 Sirt3 protein expression in different cells infected by corresponding lentivirus

对比, 可见 90% 以上细胞均可见绿色荧光。(见图 8)

## 3 讨论

Sirt3 基因定位在 11 号染色体 (11p15.5) 上, 主要存在于肾、心脏、脑、棕色脂肪等代谢活跃的组织中<sup>[7]</sup>。早期对 Sirt3 基因多态性研究发现, Sirt3 基因外显子 3 上 G447T 碱基颠换与老年男性长寿有着紧密联系<sup>[8]</sup>。也有研究发现通过节食 (热量限制) 延缓动物衰老进程的机制可能是激活了 Sirt3<sup>[9]</sup>。后来的大量针对 Sirt3 的生物功能研究, 证实了 Sirt3 作为一种去乙酰化酶, 可以通过去乙酰化长链乙酰脱氢酶 (LCAD)、AceCS2 (acetyl-CoAsynthetase II) 酶、异柠檬酸脱氢酶 2 (IDH2) 等调控细胞内的能量代谢平衡<sup>[10]</sup>, Sirt3 还通过去乙酰化 MnSOD、SOD2 等并增加其活性从而减少氧化应激损伤<sup>[11]</sup>, 此外 Sirt3 可以减少活性氧介导的线粒体 DNA 损伤<sup>[12]</sup>。这些研究让人们意识到 Sirt3 在衰老、肿瘤等疾病中的潜在作用<sup>[13]</sup>。近年来, Sirt3 在神经退行性疾病如阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症等疾病的研究中, 均证实了 Sirt3 的神经保护作用<sup>[14-16]</sup>。帕金森病是老年人常见的神经系统疾病, 以中脑黑质多巴胺能神经元的变性坏死及残存的神经元内出现路易小体为主要病理特点<sup>[17]</sup>。目前对帕金森病的发病机制研究认为, 主要是线粒体功能障碍、氧化应激损伤增加、 $\alpha$ -Synuclein 蛋白的异常沉积以及三者之间的相关影响<sup>[18-20]</sup>。在 MPTP 诱导的帕金森病小鼠模型中发现, 中脑组织 Sirt3 的表达量减少, 且 Sirt3 的减少

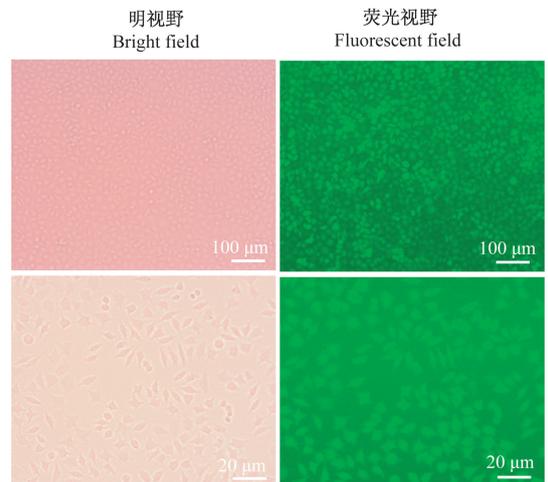


图 8 Sirt3 基因稳定干扰的 SH-SY5Y 细胞  
Figure 8 SH-SY5Y cells with stable Sirt3 gene silencing

加剧了黑质纹状体多巴胺能神经元的退化<sup>[21]</sup>。实验研究表明,褪黑激素通过上调 *Sirt3* 表达抵抗 PD 多巴胺能神经元损伤,作用机制与其抑制小胶质细胞激活减轻氧化应激和炎症损伤有关<sup>[22]</sup>。柴胡皂甙 d 对 MPP+诱导的 SH-SY5Y 细胞具有神经保护作用,且机制可能为上调 *Sirt3* 的表达水平<sup>[23]</sup>。另有研究发现嘌呤生物碱 Theacrine 通过激活线粒体 *Sirt3*,抑制 ROS 生成,最终抑制多巴胺能神经元的凋亡<sup>[24]</sup>。马振凯等作者实验中发现,姜黄素可降低 SH-SY5Y 细胞 ROS 水平,上调 *Sirt3* 表达<sup>[25]</sup>。以上结果提示,*Sirt3* 与 PD 发生具有一定的关系,但关于 *Sirt3* 在 PD 发展中具体作用分子机制的研究,还不够深入。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术,通过导入与靶基因 mRNA 序列具有同源性的双链 RNA,诱导同源靶基因 mRNA 的降解,从而沉默该基因表达<sup>[26]</sup>。慢病毒来源于人类免疫缺陷病毒 (HIV),能感染分裂期与非分裂期细胞,还具有可容纳较大基因片段、目的基因稳定持久表达、诱发宿主免疫反应率低等特点,因此慢病毒成为了携带干扰 RNA 的理想载体<sup>[27]</sup>。慢病毒载体介导的 RNAi 技术,将基因干扰技术与慢病毒结合起来,特异性抑制基因的表达,现在已被广泛应用于基因工程<sup>[28-29]</sup>。目前针对 *Sirt3* 基因干扰及过表达的慢病毒载体构建的已有报道,但 *Sirt3* 基因稳定干扰的人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞株建立的详细方法及验证未见报道。

本实验中我们首先利用 RNAi 设计软件按照 RNA 干扰序列设计原则,设计合成 4 条干扰序列及 1 个阴性对照序列,然后将其分别与慢病毒载体连接。通过对重组干扰慢病毒阳性克隆进行 DNA 测序,结果提示插入的 siRNA 核苷酸序列是正确的,表明我们成功构建了 4 个沉默 *Sirt3* 基因的慢病毒载体。然后将重组慢病毒质粒与包装质粒共转染 293T 细胞进行包装、测定滴度,从而获得了 *Sirt3* 基因干扰慢病毒载体。并将慢病毒载体感染 SH-SY5Y 细胞,利用 Real-time PCR 及 Western blot 方法检测了 *Sirt3* 的基因及蛋白表达情况,结果发现 LV-*Sirt3*-RNAi-3 慢病毒感染组细胞内的基因表达及蛋白表达量均显著下降,因此筛选出了有效干扰序列 LV-*Sirt3*-RNAi-3,再次说明我们成功构建了针对 *Sirt3* 基因的 RNA 干扰慢病毒载体,最终通过嘌呤霉素筛选获得稳定表达株。实验中,其它设计的干

扰载体并没有使 SH-SY5Y 细胞内 *Sirt3* 的表达明显减少,这与以往的文獻报道有差别。但我们的实验成功获得了稳定沉默 *Sirt3* 基因的 SH-SY5Y 细胞株,为后续进一步了解 *Sirt3* 基因的生物学特性以及探讨 *Sirt3* 引起的帕金森病细胞模型中的分子生物学变化,提供了有效的工具,具有重要的实验价值。

#### 参考文献:

- [1] Sun W, Liu C, Chen Q, et al. SIRT3: a new regulator of cardiovascular diseases [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 7293861.
- [2] Sosnowska B, Mazidi M, Penson P, et al. The sirtuin family members SIRT1, SIRT3 and SIRT6: Their role in vascular biology and atherogenesis [J]. Atherosclerosis, 2017, 265: 275-282.
- [3] Wu J, Zeng Z, Zhang W, et al. Emerging role of SIRT3 in mitochondrial dysfunction and cardiovascular diseases [J]. Free Radic Res, 2019, 53(2): 139-149.
- [4] Liu J, Li D, Zhang T, et al. SIRT3 protects hepatocytes from oxidative injury by enhancing ROS scavenging and mitochondrial integrity [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3158.
- [5] Anamika, Khanna A, Acharjee P, et al. Mitochondrial SIRT3 and neurodegenerative brain disorders [J]. J Chem Neuroanat, 2019, 95: 43-53.
- [6] Tönges L, Metzdorf J, Zella S. Parkinson's disease and neuroinflammation - cellular pathology, mechanisms and therapeutic options [J]. Fortschr Neurol Psychiatr, 2018, 86(1): S10-S20.
- [7] Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, et al. The role of sirtuins in antioxidant and redox signaling [J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 28(8): 643-661.
- [8] Bellizzi D, Rose G, Cavalcante P, et al. A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages [J]. Genomics, 2005, 85(2): 258-263.
- [9] Palacios OM, Carmona JJ, Michan S, et al. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle [J]. Aging (Albany NY), 2009, 1(9): 771-783.
- [10] Porter LC, Franczyk MP, Pietka T, et al. NAD(+)-dependent deacetylase SIRT3 in adipocytes is dispensable for maintaining normal adipose tissue mitochondrial function and whole body metabolism [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2018, 315(4): E520-E530.
- [11] Yi X, Guo W, Shi Q, et al. SIRT3-dependent mitochondrial dynamics remodeling contributes to oxidative stress-induced melanocyte degeneration in vitiligo [J]. Theranostics, 2019, 9(6): 1614-1633.
- [12] Wang T, Cao Y, Zheng Q, et al. SENP1-Sirt3 signaling controls mitochondrial protein acetylation and metabolism [J]. Mol Cell,

- 2019, 75(4): 823-834.
- [13] Ansari A, Rahman MS, Saha SK, et al. Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(1): 4-16.
- [14] Lee J, Kim Y, Liu T, et al. SIRT3 deregulation is linked to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Aging Cell*, 2018, 17(1): e12679.
- [15] Salvatori I, Valle C, Ferri A, et al. SIRT3 and mitochondrial metabolism in neurodegenerative diseases [J]. *Neurochem Int*, 2017, 109: 184-192.
- [16] Neo SH, Tang BL. Sirtuins as modifiers of Huntington's disease (HD) pathology [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2018, 154: 105-145.
- [17] Tarakad A, Jankovic J. Diagnosis and management of Parkinson's disease [J]. *Semin Neurol*, 2017, 37(2): 118-126.
- [18] Park JS, Davis RL and Sue CM. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: new mechanistic insights and therapeutic perspectives [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2018, 18(5): 21.
- [19] Puspita L, Chung SY, Shim JW. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease [J]. *Mol Brain*, 2017, 10(1): 53.
- [20] 罗海玉, 吴正存, 马开利. 基于  $\alpha$ -突触核蛋白原纤维的帕金森氏疾病模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(9): 103-108.
- [21] Liu L, Peritore C, Ginsberg J, et al. SIRT3 attenuates MPTP-induced nigrostriatal degeneration via enhancing mitochondrial antioxidant capacity [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(3): 600-608.
- [22] 蒋德旗, 徐兰程, 毛书慧, 等. SIRT3 介导褪黑激素保护帕金森病多巴胺能神经元的作用机制 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(1): 121-126.
- [23] 杨军. 柴胡皂甙 d 通过调节 SIRT3 对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞模型的神经保护作用 [D]. 武汉: 武汉大学, 2016.
- [24] 汪婷美. 嘌呤生物碱 Theacrine 通过 Sirt3 调控线粒体蛋白去乙酰化发挥多巴胺能神经元保护作用 and 机制研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2016.
- [25] 马振凯, 李梦楠, 白宏英. 姜黄素对 PD 模型细胞活性氧簇水平及沉默信息调控因子 3 表达的影响 [J]. *山东医药*, 2017, 57(40): 50-52.
- [26] Rosa C, Kuo YW, Wuriyangan H, et al. RNA interference mechanisms and applications in plant pathology [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2018, 56: 581-610.
- [27] 孟凡荣, 陈琛, 万海粟, 等. 慢病毒载体及其研究进展 [J]. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(12): 870-876.
- [28] 王琴, 付宇, 王平. 沉默 miRNA16 对肺结核模型小鼠免疫功能调控作用及其机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 86-91.
- [29] 刘宇, 陈恒伟, 温悦婷, 等. 基于 Tet-On 系统构建 Alb 启动子调控猪 uPA 转基因表达的慢病毒载体 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(5): 23-28.

[收稿日期] 2020-06-22