

## RNA 干扰沉默 MKK7 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

赖露颖,张庆国,李 乐,赵 伟,雷洪伊,姜 珊,张 婧,徐世元\*

(南方医科大学珠江医院麻醉科,广东 广州 510282)

**[摘要]** 目的:探讨 RNA 干扰沉默丝裂原激活的蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MKK7)基因对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响。方法:设计并合成针对 MKK7 的小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)3 条(MKK7siRNA-1、MKK7siRNA-2、MKK7siRNA-3)及与 MKK7 基因无同源性的带有红色荧光的阴性对照 siRNA (negative control siRNA),在 lipofectamine 2000 介导下转染 SH-SY5Y 细胞,荧光显微镜下观察转染效果,RT-PCR 观察 MKK7 mRNA 表达及 Western blot 检测 MKK7 蛋白的表达,进而筛选出转染效果好的 MKK7siRNA, CCK-8 检测各组细胞活力, Hoechst 33258 检测各组细胞凋亡染色,流式细胞仪检测细胞凋亡率,Western blot 检测 p-JNK、凋亡蛋白 cleaved caspase-3 的变化。结果:① MKK7siRNA-3 组的 MKK7 mRNA 表达最低, MKK7 蛋白表达最低;②与空白对照组(control group)比较, MKK7siRNA-3 组的细胞活力无统计学差异, p-JNK、cleaved caspase-3 水平降低,凋亡率降低。结论:RNA 干扰沉默 MKK7 可通过下调 JNK 磷酸化进而抑制 SH-SY5Y 细胞的凋亡。

**[关键词]** SH-SY5Y 细胞; RNA 干扰; MKK7; 凋亡

**[中图分类号]** RR329.25

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)05-656-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20150511

## Effects of the RNA interference silencing MKK7 on SH-SY5Y cells apoptosis

Lai Luying, Zhang Qingguo, Li Le, Zhao Wei, Lei Hongyi, Jiang Shan, Zhang Jing, Xu Shiyuan\*

(Department of Anesthesiology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China)

**[Abstract]** **Objective:** To discuss the effects of RNA interference silencing MKK7 on SH SY5Y cells apoptosis. **Methods:** Three articles MKK7 siRNA (MKK7siRNA-1, MKK7siRNA-2 and MKK7siRNA-3) were designed and synthesized, the negative control siRNA with red fluorescence, which had no homology to the MKK7 gene, was transfected into SH SY5Y cells with the lipofectamine 2000 and the transfection effect was tested using fluorescence microscope, the MKK7 was detected by RT-PCR and Western blot, then were screened MKK7siRNAs. After the MKK7siRNAs were transfected into SH-SY5Y cells, the cell vitality was detected using CCK-8, and the apoptosis rate was tested by Hoechst 33258 dyeing and flow cytometry instrument, the expression of p-JNK and the cleaved caspase-3 protein was detected by western blot. **Results:** ① MKK7siRNA-3 has lowest MKK7 mRNA and protein expression; ② compared with the control group, MKK7siRNA-3 group has no statistical difference in cell viability, lower p-JNK and cleaved caspase-3 expression and apoptosis rate. **Conclusion:** The RNA interference silencing MKK7 can down-regulate the JNK phosphorylation, which further inhibit the SH SY5Y cell apoptosis.

**[Key words]** SH-SY5Y cells; RNA interference; MKK7; screening; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05): 656-661]

丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)家族是丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,在所有的真核细胞中都可以表达,可被不同的细胞外刺激激活,如细胞因子、神经递质、激素、细

胞应激及细胞黏附因子等,它包括氨基末端激酶(JNK)、细胞外信号调节激酶(ERK)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)3 大家族,共同调节细胞生长、分化、应激、炎症反应、凋亡等多种细胞生理及病理过程<sup>[1]</sup>。MAPK 磷酸化依赖上游的 6 种 MKKs,但每种 MKKs 又有特定的磷酸化底物<sup>[2]</sup>,MKK4 及 MKK7 是 JNK 的上游激活物<sup>[3]</sup>。众所周知,SH-SY5Y 细胞是研究神经系统疾病发病机制的最常用细胞

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81271390)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: xushiyuan355@163.com

株,而神经退行性疾病中神经元的凋亡与 JNK 的激活密切相关,对 MKK7/JNK 通路而言,较多的研究集中在其对胚胎的神经及肝脏的发育影响,关于其在神经凋亡方面的作用研究较少。本研究通过考察 3 对 MKK7siRNA 对细胞内 MKK7 基因表达的影响,筛选鉴定出使 MKK7 基因沉默的 siRNA 片段,探讨 RNA 干扰沉默 MKK7 基因对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响,为进一步研究 MKK7 在神经退行性病变的作用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

SH-SY5Y 细胞株(中国科学院上海生命科学研究院细胞中心)。

DMEM/F12 培养基、胎牛血清 (Gibco 公司,美

国);Lipofectamine2000 转染试剂、Opti-MEM (Invitrogen 公司,美国);MKK7、p-JNK、cleaved caspase-3 和  $\beta$ -actin 一抗 (Abcam 公司,英国);CCK-8 (同仁公司,日本);Hochest 33258 试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基公司);HRP 标记的羊抗兔二抗、HRP 标记的羊抗鼠二抗(北京博奥森公司);RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司,日本);MKK7siRNA 由广州锐博公司设计并合成,MKK7 引物及内参(广州 JETWAY 公司)。

从 GenBank 中查出人 MKK7 基因序列为 Gene ID5609,设计 3 个 siRNA 序列(分别命名为 MKK7siRNA-1、MKK7siRNA-2、MKK7siRNA-3),由广州锐博公司合成,序列经 BLAST 查询,排除与其他基因同源。同时合成含有荧光标记的 negative siRNA 序列。序列如表 1 所示。

表 1 MKK7siRNA 基因序列  
Table 1 MKK7siRNA sequences

基因	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')
MKK7siRNA-1	GGAAGAGACCAAAGUAUAAAdTdT	UUAUACUUUGGUCUCUCCdTdT
MKK7siRNA-2	GCAUUGAUUGACCAGAAAdTdT	UUCUGGUCAAUCUCAAGATdTdT
MKK7siRNA-3	CCUACAUCGUGCAGUGCUUdTdT	AAGCACUGCACGAUGUAGGdTdT

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

培养 15 周的 SH-SY5Y 细胞培养于 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,于 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 细胞孵箱中培养。

#### 1.2.2 siRNA 转染

转染前 1 d,接种适当数量的细胞至 6 孔细胞培养板中,每孔中加入不含抗生素的培养基,使转染时的细胞密度能够达到 30%~50%;①稀释 siRNA:用 50  $\mu$ L 不含血清培养基 Opti-MEM I 稀释 1.25  $\mu$ L 20  $\mu$ mol 的 siRNA 储存液,轻轻混匀,室温孵育 5 min;②稀释 lipofactamine 2000:用 50  $\mu$ L 不含血清培养基 Opti-MEM I 稀释 1  $\mu$ L lipofactamine 2000,轻轻混匀并室温孵育 5 min;③将两者轻轻混匀,室温孵育 20 min。加入含有细胞的 400  $\mu$ L 培养基的培养孔中,轻轻混匀;将培养板置于 37℃的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后,更换新鲜培养基。设未转染组为空白对照组,转染negative siRNA、MKK7siRNA-1、MKK7siRNA-2、MKK7siRNA-3 组分别为阴性对照组, MKK7siRNA-1 组、MKK7siRNA-2 组、MKK7siRNA-3 组。

#### 1.2.3 MKK7siRNA 各组 MKK7 的表达

提取各组细胞 RNA 后,将 RNA 反转成 cDNA

后,按照试剂说明书配好反应体系,上机进行荧光定量 PCR 扩增和检测。反应体系为 25  $\mu$ L 总体系, MKK7 引物:MKK7-up:5'-TCATCACCAACACGGACGTCTTCA-3';MKK7-down:5' -TTCAGGTACAGCGCCTTCACA-3'

定量的方法以 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>(Ct 代表循环阈值)表示基因的表达量,计算公式为  $\Delta\Delta$ Ct=[Ct<sub>(待测组目标基因)</sub>-Ct<sub>( $\beta$ -actin)</sub>]-[Ct<sub>(对照组目标基因)</sub>-Ct<sub>( $\beta$ -actin)</sub>]

#### 1.2.4 Western blot 检测

提取各组的细胞蛋白并用 BCA 法定量,行 SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜上,1%BAS 封闭液封闭 1 h,1:1 000 一抗 4℃孵育过夜,1:1 000 二抗孵育过夜,ECL 化学发光剂观察结果,采用quantity one 图像分析软件分析蛋白条带的光密度值。试验重复 3 次。MKK7、p-JNK、cleaved caspase-3 蛋白表达水平以 MKK7p-JNK、cleaved caspase-3 和  $\beta$ -actin 条带灰度值比值表示。每组细胞重复 3 遍。

#### 1.2.5 Hoechst 33258 染色

细胞以 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/孔的密度种植于 6 孔板中,细胞贴壁后,挑选沉默效果最好的 MKK7siRNA 转染 24 h 后,用 Buffer A 洗 2 遍,胰酶消化收集细胞后,以 4%的甲醛固定 10 min,再用 Buffer A 洗 2 遍后,以 Hoechst 33258 避光孵育 15 min,在 340 nm 的

紫外光激发下,用荧光显微镜观察细胞凋亡的形态学变化和荧光情况。

### 1.2.6 Annexin V-FITC 法检测细胞凋亡

细胞分组后,以不含 EDTA 的 0.25%胰蛋白酶消化细胞,用 PBS 洗涤 3 遍,收集细胞后,用 500  $\mu$ L binding buffer 重悬细胞。然后在每管细胞加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC,避光孵育 5 min 后,再加入 5  $\mu$ L 碘化丙啶,避光室温下再孵育 10 min 后用 FCM 检测。激发波长 488 nm,发射波长 530 nm。Q2 代表晚期凋亡,Q4 代表早期凋亡,凋亡率=Q2+Q4,每组实验至少重复 3 次。

### 1.2.7 CCK-8 检测细胞活力

以每孔约 5 000 个细胞接种到 96 孔培养板中,设置空白对照组和阴性对照组,以沉默效果最好的 MKK7siRNA 转染 24 h 后。每孔加入 CCK-8 溶液 10  $\mu$ L,继续孵育 4 h,波长 570 nm 下测定各孔吸光度值。以只加培养基不含细胞的孔为空白孔,以空白孔调零。以未用 siRNA 处理的空白对照组细胞活力为 100%,结果取 3 个复孔均值,实验重复 3 次。各组细胞活力值=实验组吸光度值/对照组吸光度值 $\times$ 100%。

### 1.3 统计学方法

计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 13.0 统计软件分析。多组比较采用完全随机单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

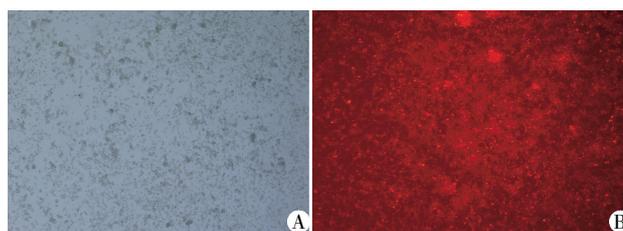
## 2 结果

### 2.1 正常培养 SH-SY5Y 细胞及 siRNA 转染后 SH-SY5Y 细胞

倒置显微镜下 SH-SY5Y 细胞呈现不规则状,贴壁生长,伸出较短突触,有少许树突状突起,细胞生长状态良好。以带有红色荧光基团的 negative siRNA 进行转染,24 h 后荧光显微镜下观察(图 1),可见细胞呈现红色荧光,证明 siRNA 可成功转染入 SH-SY5Y 细胞。

### 2.2 MKK7mRNA 表达

细胞分别经过 negative siRNA 与 3 种 MKK7siRNA 转染后,以未转染组为空白对照组,设其 MKK7 表达量为 100%,筛选出沉默效果确切的 MKK7siRNA。MKK7siRNA-1、MKK7siRNA-2、MKK7siRNA-3 的 MKK7mRNA 的表达量分别为  $27.73 \pm 1.00$ 、 $17.57 \pm 2.81$ 、 $0.63 \pm 0.01$ ,各组之间 MKK7mRNA 表达量有统计学差异( $F=1 499.05, P < 0.001$ );多重比较时,与空白对照组相比,MKK7siRNA-1 组、MKK7siRNA-2



A: 倒置显微镜下正常 SH-SY5Y 细胞图像 ( $\times 40$ ); B: negative siRNA 干扰后的 SH-SY5Y 细胞在荧光显微镜下图像 ( $\times 40$ )。

图 1 negative siRNA 转染 SH-SY5Y 细胞的效率

Figure 1 Efficiency of SH-SY5Y transfection with negative siRNA 组、siRNA-MKK7-3 组转染后的 MKK7mRNA 表达量均有统计学差异 ( $P \leq 0.001$ ),其中 MKK7siRNA-3 的 mRNA 表达量最低为  $0.63 \pm 0.01$ (表 2)。

表 2 各组细胞 MKK7 mRNA 表达量

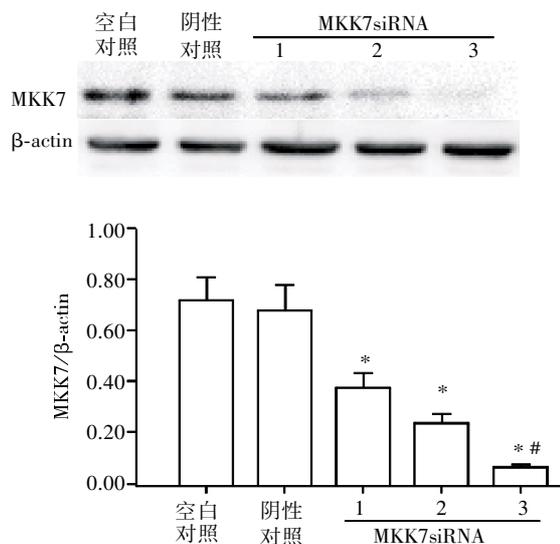
Table 2 The expression of MKK7mRNA ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

分组	mRNA 表达量
空白对照	100.00 $\pm$ 0.00
阴性对照	96.80 $\pm$ 3.57
MKK7siRNA-1	27.73 $\pm$ 1.00*
MKK7siRNA-2	17.57 $\pm$ 2.81*
MKK7siRNA-3	0.63 $\pm$ 0.01**

与空白对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与 MKK7siRNA-2、MKK7siRNA-1 相比,\*\* $P < 0.05$ 。

### 2.3 Western blot 检测 MKK7 蛋白表达

与空白对照组相比,MKK7siRNA-1、MKK7siRNA-2、MKK7siRNA-3 转染后的 MKK7 蛋白的表达量都降低( $P < 0.001$ ),其中 MKK7siRNA-3 转染后的 MKK7 蛋白表达量最低 ( $0.07 \pm 0.01$ , 图 2),与 RT-PCR 结果一致。



与空白对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与 MKK7siRNA-2、MKK7siRNA-1 相比,\*\* $P < 0.05$ 。

图 2 Western blot 检测 MKK7 蛋白的表达

Figure 2 Detection of the expression of MKK7 protein by Western blot

### 2.4 CCK-8 检测细胞活力

经过沉默效果最好的 MKK7siRNA-3 转染后, 阴性对照组 (97.65 ± 1.18)% 和 MKK7siRNA-3 组 (97.57 ± 1.12)% 的细胞活力稍下降, 但无统计学差异 ( $P = 0.99$ , 图 3)。

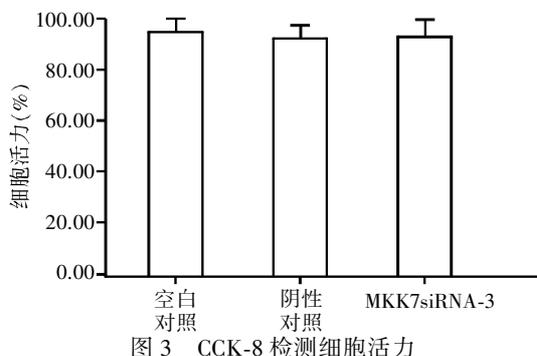


Figure 3 Detection of cell viability by CCK-8

### 2.5 细胞凋亡

细胞凋亡的形态学变化为核染色质凝集, 以及 DNA 片段的形成, 导致细胞核形状的改变。在凋亡的细胞中, 荧光探针结合在高度聚集的 DNA 分子上从而显现出强蓝色荧光, 正常细胞表现出淡蓝色的荧光。培养 15 周的 SH-SY5Y 细胞, 部分细胞核高度凝集显现出强蓝色荧光(图 4 红), 当 SH-SY5Y 细胞转染 MKK7siRNA-3 后, 强蓝色荧光细胞数目可减少(图 4)。流式细胞仪检测凋亡细胞时, 得出一致的结果, 空白对照组、阴性对照组的凋亡率分别为 (9.53 ± 0.35)%、(9.33 ± 0.72)%, 当 MKK7siRNA-3 转染入细胞后, Q2+Q4 凋亡细胞百分比减少为 (3.80 ± 0.10)%, 与阴性对照组相比, 有统计学差异 ( $P < 0.001$ , 图 5A)。cleaved caspase-3 蛋白的表达中, 各组蛋白表达分别为 0.96 ± 0.02、0.96 ± 0.01、0.34 ± 0.01, 与空白对照组相比, MKK7siRNA-3 组 cleaved caspase-3 蛋白密度降低 ( $P < 0.001$ , 图 5B)。

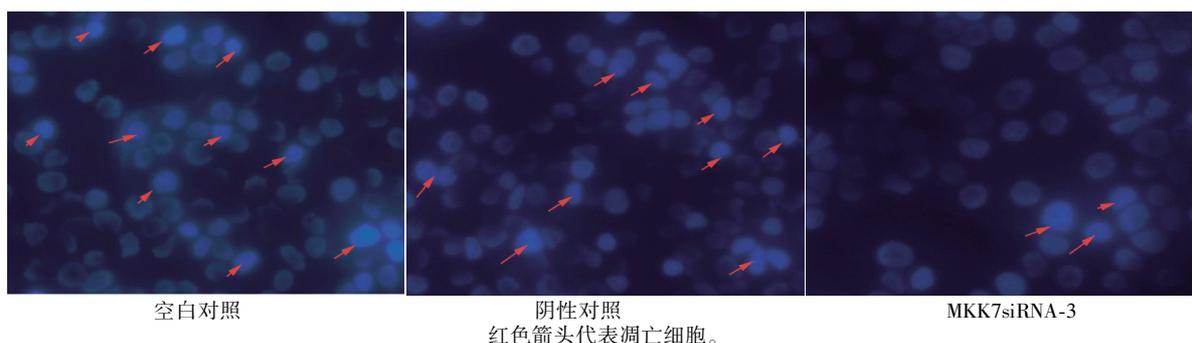
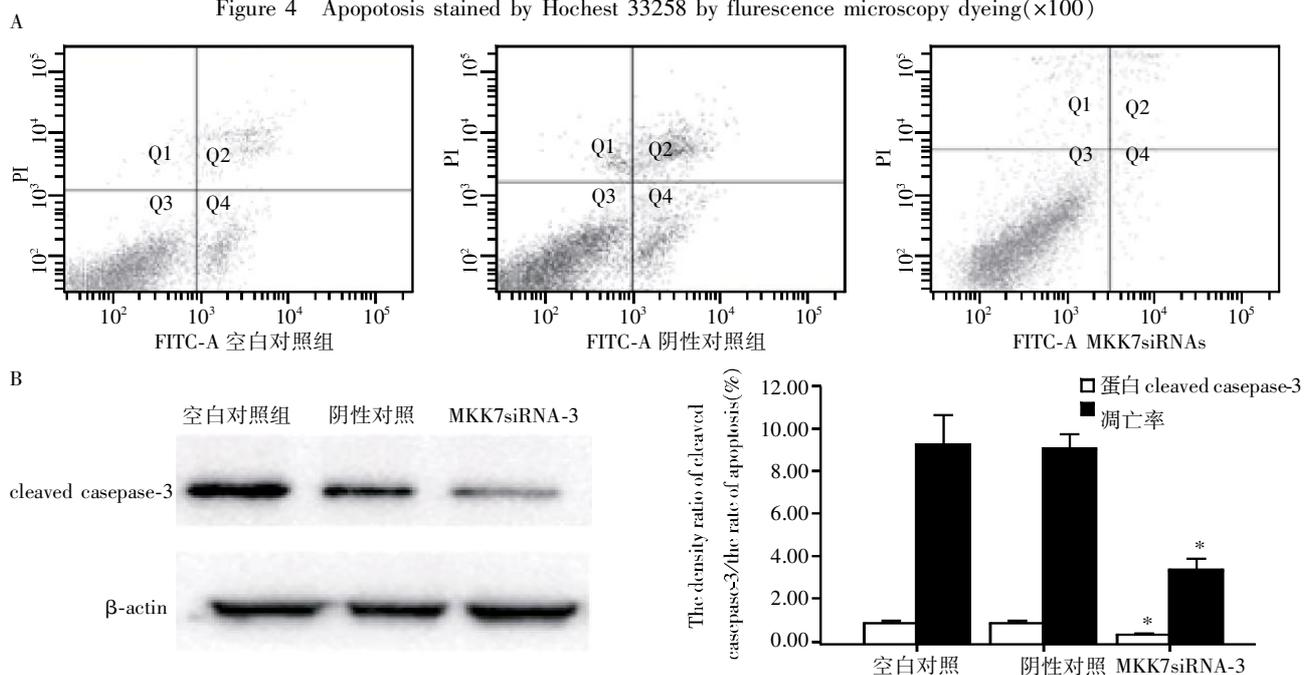


图 4 荧光显微镜下观察 Hoechst 33258 染色 (×100)

Figure 4 Apoptosis stained by Hoechst 33258 by fluorescence microscopy dyeing (×100)



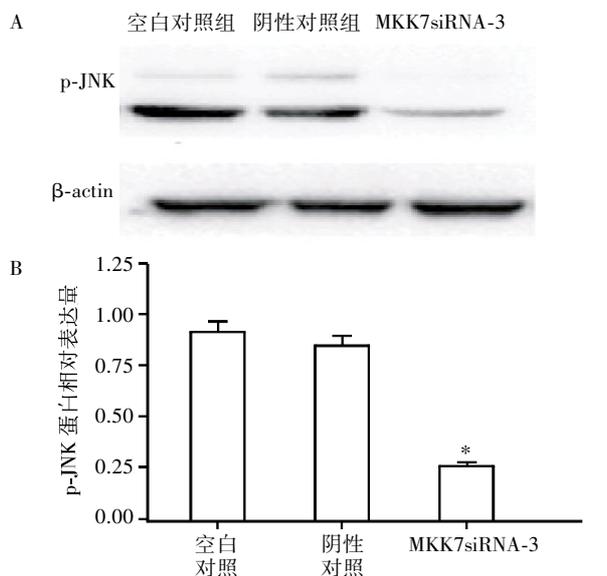
A: 流式细胞仪检测细胞凋亡率; B: Western bolt 检测 cleaved caspase-3 表达, 与空白对照组相比, \* $P < 0.05$ 。

图 5 细胞凋亡率和 cleaved caspase-3 蛋白

Figure 5 The apoptosis rate and the expression of cleaved caspase-3 protein

## 2.6 p-JNK 蛋白的表达

p-JNK 蛋白的表达中, 各组蛋白表达分别为  $0.98 \pm 0.10$ 、 $0.92 \pm 0.10$ 、 $0.29 \pm 0.02$ , 与空白对照组相比, MKK7siRNA-3 组 p-JNK 蛋白密度降低 ( $P < 0.001$ , 图 6)。



A: Western blot 检测 p-JNK 蛋白表达; B: p-JNK 蛋白直方图, 与空白对照组相比, \* $P < 0.05$ 。

图 6 p-JNK 蛋白表达

Figure 6 The expression of p-JNK protein

## 3 讨论

RNA 干扰(RNA interfere, RNAi)是近几年发展起来的新技术, 是指一些小的双链 RNA(double stranded RNA, dsRNA) 特异性降解与其同源的 mRNA, 高效地阻断了体内特定基因表达的现象, 已被广泛应用于线虫和果蝇中基因功能的鉴定<sup>[4]</sup>。较长(约 500 bp)的 dsRNA 在线虫等低等生物中能够起到特异性干扰作用, 但在哺乳动物细胞中却行不通, 因长片断的双链 RNA 在哺乳动物细胞中可诱发强烈的抗病毒反应, 导致所有蛋白质翻译起始的抑制和细胞凋亡, 导致整体基因表达模式的改变, 而非特异的基因沉默反应<sup>[5]</sup>。后来人们发现长度为 21 bp 并且 3'端有两个碱基突出的 siRNA 可有效引起哺乳动物的基因沉默<sup>[6]</sup>。本实验中应用的 3 种 MKK7siRNA 都是长度在 18~21 bp 的 dsRNA, 保证其有较好的沉默效果。在体外 (*in vitro*) 将 siRNA 导入细胞有多种方法, 通常化学合成的 siRNA 可用电穿孔(electroporation)、显微注射和脂质体(lipofectamine)转染。采用 lipofectamine 转染法将 siRNA 导入 SH-SY5Y 细胞内, 能保证较好的转染

效果<sup>[7]</sup>。从图 1 中看出, 本研究保证了较好的转染效果, 然而 RNAi 实验的成功还需要能够有效下调目的基因表达的 siRNA 分子。本研究中所使用的 siRNA 是由专门从事 RNA 相关产品研发的 Ribobio 公司专业人员预先设计并合成的, 在实验中我们使用了阴性对照 siRNA, 有效地排除了同源基因沉默的干扰, 同时获得了能够高效下调 MKK7mRNA 表达和翻译的 MKK7siRNA-3, 为下一步采用 RNA 干扰技术确定 MKK7 在 SH-SY5Y 神经细胞凋亡的研究打下基础。

caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用, 其中 caspase-3 为关键的执行分子, 有研究证实在大脑神经细胞损伤中, caspase-3 蛋白是细胞凋亡的早期标志<sup>[8]</sup>, caspase-3 正常以酶原(32 000)的形式存在于胞浆中, 在凋亡的早期阶段, 它被激活, 活化的 caspase-3 由 2 个大亚基(17 000)和 2 个小亚基(12 000)组成, 裂解相应的胞浆核底物, 最终导致细胞凋亡<sup>[9]</sup>, 当大亚基或小亚基蛋白密度降低时, 表明 caspase-3 蛋白的激活被抑制, 如图 5 所示, 本研究选取大亚基作为 cleaved caspase-3 的标志, 当 MKK7siRNA 转染入细胞后, 其 caspase-3 的激活也受到抑制。

作为拟神经细胞模型, SH-SY5Y 细胞系广泛应用于神经系统疾病的发病机制和防治措施、神经退行性疾病的机制研究中<sup>[10]</sup>, SH-SY5Y 有神经瘤样细胞特征, 含有小而圆的胞体, 伸出较短的轴突, 有较少的胞质和树突样突起, 且呈簇状生长, 其形态可随着培养时间的延长而发生变化, 培养 20 周后细胞可逐渐出现上皮样细胞, 32 周和 44 周后, 上皮样细胞出现率分别为 1.9% 和 4.9%<sup>[11]</sup>。神经细胞凋亡是神经元退行性变疾病发生发展的重要机制, 而 SH-SY5Y 是研究神经元凋亡的最常用的细胞模型, 神经细胞的正常生长发育是凋亡诱导因素和凋亡抑制因素的存活信号转导通路相互平衡、共同作用的结果, 若某些因素影响神经元存活信号, 则触发了促凋亡级联反应, 引起细胞的程序化死亡, 甚至发生细胞凋亡。正常培养的 SH-SY5Y 细胞也可发生凋亡, 保证正常组织的动态平衡, 在 MKK7siRNA 有效转染细胞后, 发出深蓝色荧光的凋亡细胞数目减少, 在流式细胞仪检测细胞凋亡率时, 可发现 MKK7siRNA 不能完全抑制 SH-SY5Y 细胞的凋亡, 表明 MKK7 参与的通路并不是 SH-SY5Y 细胞凋亡的唯一机制, 但与空白对照组相比, 也有统计学差异, 表明了 MKK7siRNA 可抑制 SH-

SY5Y 细胞的凋亡。

MKK7 为 JNK 上游激活物有文献指出, MKK7 在大鼠胚胎的脑神经发育中起着重要作用, 当 MKK7 基因敲除后, 胚胎可死亡<sup>[12]</sup>; 也有研究表明在小鼠胚胎成纤维细胞中, MKK7/JNK 通路参与 G2/M 细胞周期的顺利进行及细胞的老化过程<sup>[13]</sup>; 同时, MKK7/JNK 通路在小鼠大脑发育中的神经细胞轴突生长及辐射迁移中发挥了重要作用<sup>[14]</sup>; 在神经毒性方面, 有文献报道细辛脑通过 MKK7/JNK 通路降低凋亡保护淀粉样蛋白诱导的 SH-SY5Y 细胞神经毒性<sup>[15]</sup>。总结前人的研究, MKK7 主要参与了细胞的分化、生长并对凋亡起到一定的保护作用, 但是本研究表明, 当 MKK7siRNA 转染入细胞后, 与对照组相比, 细胞活力无统计学差异, 凋亡率有一定程度的降低, 且 JNK 磷酸化水平, caspase-3 蛋白水解降低, 表明 MKK7siRNA 可在一定程度上抑制 SH-SY5Y 细胞的凋亡过程, 且此过程与 JNK 磷酸化有关系。本文通过 RT-PCR 和 Western blot 筛选出在 SH-SY5Y 细胞中沉默效果最好的 MKK7siRNA, 并且通过检测转染后细胞的凋亡率, 说明 MKK7/JNK 通路在 SH-SY5Y 细胞的凋亡中起着一定的作用, 其原因可能与细胞内线粒体产生的 ROS 可直接激活 ASK1/MKK, 进而依次激活 MAPK 级联放大引起凋亡有关<sup>[16]</sup>, MKK7 可能也参与其他 MAPK 通路, 如 P38 通路, 进而促进凋亡有关。报道指出 JNK 通路的激活表现为促凋亡和抑制凋亡的双重作用<sup>[17]</sup>, 本研究主要体现了 MKK7/JNK 的促凋亡作用, 但是因 MKK7 参与的通路并不是 SH-SY5Y 细胞凋亡的唯一通路, 所以通过 MKK7 等靶点对 SH-SY5Y 细胞的凋亡进行体内外干预调节, 还需要进一步的研究。

#### [参考文献]

[1] Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268 (20): 14553-14556

[2] Dérjard B, Raingeaud J, Barrett T, et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms [J]. *Science*, 1995, 267 (5198): 682-685

[3] Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81 (2): 807-869

[4] Paddison PJ, Silva JM, Conklin DS, et al. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals [J]. *Nature*, 2004, 428 (6981): 427-431

[5] Wong DK, Cheung AM, O'Rourke K, et al. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B [J]. *Ann Intern Med*, 1993, 119 (4): 312-323

[6] Yuen MF, Lai CL. Treatment of chronic hepatitis B [J]. *Lancet Infect Dis*, 2001, 1 (4): 232-241

[7] 林珍, 周德喜, 解丹, 等. 脂质体转染 TRPM7siRNA 对 Aβ25-35 诱导 SH-SY5Y 细胞分泌炎症因子的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29 (6): 1001-1978

[8] Olney JW, Young C, Wozniak DF, et al. Anesthesia-induced developmental neuroapoptosis. Does it happen in humans? [J]. *Anesthesiology*, 2004, 101: 273-275

[9] Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, et al, 1994. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE [J]. *Nature*, 1994, 371: 346-347

[10] Perez-Castro R, Patel S, Garavito-Aguilar ZV, et al, cytoxicity of local anesthetics in human neuronal cells [J] *Anesth Analg*, 2009, 108 (3): 997-1007

[11] Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1983, 71 (4): 741-7

[12] Nishina H, Wada T, Katada T. Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway [J]. *J Biochem*, 2004, 136 (2): 123-126

[13] Wada T, Joza N, Hai-ying M, et al. Penninger. MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6 (3): 215-225

[14] Tokiwa Y, Hiroshi K, Satoko A, et al. Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2011, 31 (46): 16872-16883

[15] Zou DJ, Wang G, Liu JC, et al. Beta-asarone attenuates beta-amyloid-induced apoptosis through the inhibition of the activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in SH-SY5Y cells [J]. *Pharmazie*, 2011, 66 (1): 44-51

[16] Susztak K, Raff AC, Schiffer M, et al. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2006, 55 (2): 225-233

[17] Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword [J]. *Cell Res*, 2005, 15 (1): 36-42

[收稿日期] 2014-09-27