网络出版时间:2022 - 04 - 19 13:51 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220415.1512.008.html

Eya1 基因过表达对 MES23.5 细胞凋亡的影响

秦登利,高 锦

摘要 **目的** 构建眼发育缺失 1(Eya1)基因慢病毒载体,并探讨过表达 Eya1 对 6-羟基多巴胺(6-OHDA)诱导的鼠多巴胺能神经元细胞 MES23.5 凋亡的影响。**方法** 构建过表达 Eya1 基因的慢病毒,并感染 MES23.5 细胞,筛选稳定表达 Eya1 的细胞株;6-OHDA 药物处理诱导 MES23.5 多巴胺能细胞损伤模型,分为对照组、空载体组、过表达 Eya1 组;采用 CCK-8 法检测细胞活力、细胞凋亡 Hoechst 染色(Hoechst 33258)和 Western blot 检测过表达 Eya1 对细胞凋亡的影响。**结果** 酶切电泳显示目的基因重组至慢病毒载体,测序结果表明构建的 Eya1 基因过表达载体与 Eya1 基因编码序列完全一致;CCK-8 显示 6-OHDA 药物处理后过表达 Eya1 组的细胞活力水平高于对照组($P<0.05$);Hoechst 33258 染色显示过表达 Eya1 组的细胞核浓缩聚集水平低于对照组;且过表达 Eya1 组中 Bcl-2 蛋白的表达高于对照组($P<0.05$),Bax 蛋白的表达低于对照组($P<0.05$)。**结论** 成功构建了过表达 Eya1 的 MES23.5 细胞株,Eya1 通过调控 Bcl-2、Bax 蛋白表达,从而拮抗 6-OHDA 诱导的 MES23.5 多巴胺能细胞的凋亡。

关键词 Eya1;慢病毒载体;MES23.5 细胞;稳转细胞株;凋亡

中图分类号 R 742.5

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2022)05 - 0714 - 06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2022.05.008

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经系统退行性疾病[1]。PD 发生的主要病理学特征为黑质致密部多巴胺能神经元变性死亡[2]。虽然目前临床上的药物可以暂时减缓 PD 的运动症状,但却不能阻止多巴胺能神经细胞的渐进性死亡[3]。眼发育缺失 1(eye absent 1, Eya1)是 Eya 家族中的一员,是一种转录激活因子[4]。Eya 家族成员主要由两个结构域构成,即氨基端和羧基端结构域[5]。研究显示 Eya1 不仅在发育中,在肿瘤及神经相关疾病中均发挥着重要的作用[6]。Eya1 可修复大肠肿瘤细胞中断裂的 DNA,进而拮抗细胞凋亡的作用[7]。在损伤早期的多巴胺能神经细胞中,Eya1 通过转录因子 Six2 促进胶质细胞系神经营养因子的表达而保护损伤的细胞[8]。然而,Eya1 保护受损多巴胺能神经细胞的具体机制尚未阐明。

该研究构建了携带 Eya1 基因的慢病毒表达质粒,筛选了稳定高表达 Eya1 的细胞株,并通过 CCK-8、Hoechst 33258 染色和 Western blot 方法检测过表达 Eya1 对细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 *主要试剂* 大鼠 DA 能神经细胞系 MES23.5 细胞购自中国科学院细胞库(上海);HEK 293 细胞购自美国 ATCC 公司;Lipofectamine 2000 购自天津 Invitrongen 公司;ApaL I 和 Xho I 等限制性内切酶购自美国 NEB 公司;Eya1 Polyclonal Antibody(货号:22658-1-AP、稀释比1∶500)、Bcl-2 Polyclonal Antibody(货号:12789-1-AP、稀释比1∶2 000)及 Bax Polyclonal Antibody(货号:50599-2-lg、稀释比1∶5 000)均购自武汉三鹰 Proteintech 公司,细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(货号:KGA317)购自南京凯基公司;Hoechst 33258 染色试剂盒(货号:C0003)购自上海碧云天公司;6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)药物(货号:HY-B1081A)购自上海 MCE 公司。

1.2 方法

1.2.1 *细胞培养* 将 MES23.5 细胞和 HEK 293 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中,于 37 ℃、5% CO_2、95% 湿度的培养箱内培养,当细胞培养生长到 90% 融合度左右时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,选择处于对数生长期良好的细胞用于实验。

1.2.2 *携带 Eya1 基因的载体的构建* 利用 NCBI 数据库下载 Eya1 基因序列(Gene ID:NM_001 310 459.1),利用引物设计软件,设计一对 Eya1 基因特异性的 PCR 引物,正向引物为 5′-GC-

2022 - 03 - 08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81901299);江苏省自然科学基金青年基金项目(编号:BK20170255)

作者单位:徐州医科大学生命科学学院,徐州 221000

作者简介:秦登利,女,硕士研究生;

高 锦,女,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:100002007023@xzhmu.edu.cn

CAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCACCATGGAAATGCAGGATCCTAAACCAGCC-3′,反向引物为 5′-TACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCCAGGTACTCTAATTCCAAGGCATG-3′,引物由上海生工有限公司合成。

PCR 扩增目的基因 Eya1,并使其两端带上 Gibson(Gibson Assembly)反应重叠区域。在核酸外切酶、DNA 聚合酶和 DNA 连接酶的共同作用下发生 Gibson 反应,将目的基因连接到入门载体,构建 pDown-mEya1 入门载体。将 Gibson 反应产物转化到感受态细胞 DH5α 后,将平板 37 ℃倒置培养过夜,随后挑取菌落,PCR 反应鉴定阳性克隆,DNA 测序 mEya1 区域,确认序列正确的克隆。然后,将携带 attL4-EFIA-attR1 序列的 pUp-EF1A、携带 attL1-mEya1-attL2 序列的 pDown-mEya1 和携带 attR4-Chl-ccdB-attR2 序列的慢病毒终载体 pLV. Des2d. C/mCherry:T2A:Puro LR 反应(reaction of an attL substrate with an attR substrate),EF1A 启动子、mEya1/Flag 按顺序正确插入到终载体上,经过转化挑菌、酶切鉴定得到正确的 mEya1 过表达慢病毒终载体(plv-mCherry:T2A:Puro-EF1A > mEya1/Flag),过表达的 Eya1 转录本:[NM_001 310 459. 1]。

1.2.3 *携带 Eya1 基因的慢病毒颗粒的包装及病毒滴度测定* 培养 HEK 293 细胞,待细胞汇合度达到 80% ~90%时,替换成无抗生素的完全培养基。加入质粒 DNA 混合物(15 μg 转移载体和 20 μg 的包装混合物)和脂质体2 000。转染后 48 ~72 h,收集病毒上清液,4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min,用 0.45 μm 滤膜进一步过滤病毒上清液。将 200 μl 病毒浓缩液加入至离心管,上层加入 1.5 ml 的 20% 蔗糖溶液,平衡后12 000 r/min 离心 2 h。离心去上清液,收集沉淀病毒颗粒,每管沉淀用 200 μl Hank′s平衡盐溶液重悬,测定病毒滴度。48 ~72 h 后荧光显微镜下观察荧光表达情况。选取荧光率在 1% ~20% 的孔进行滴度计算。

1.2.4 *筛选稳定表达 Eya1 基因的 MES23.5 细胞* 取对数生长期的 MES23.5 细胞按照每孔 5×10^4 个细胞接种到 6 孔板内,待细胞生长到 50% ~60% 融合度时感染病毒,分为对照组(未感染慢病毒的细胞)、空载体组(感染携带荧光蛋白但不携带 Eya1 基因的慢病毒)和慢病毒感染组(感染携带 Eya1 基因及荧光蛋白基因的重组慢病毒)。根据预实验得到的最佳感染细胞的感染复数在培养基中加入 MOI =10 的病毒量,同时加入感染试剂 Polybrene(最终浓度应为 5 μg/ml)提高感染效率。混匀后置于细胞培养箱培养;12 h 后更换新的培养基;48 h 后荧光显微镜下观察感染效率,并加入嘌呤霉素(预实验测定的最佳药物筛选浓度为 8 μg/ml)筛选出感染成功的细胞进行实验。

1.2.5 *MES23.5 细胞损伤模型的制备* 本课题组前期研究显示,100 μmol/L 6-OHDA 溶液加入多巴胺能神经细胞 2 h,细胞生存率约为 53%,所以选择此浓度和时间用于后续实验。待细胞生长密度到 90% 左右时,加入 100 μmol/L 6-OHDA 溶液,对照组加入含抗坏血酸的 0.9% 氯化钠溶液,在加入 6-OHDA 2 h 后收集细胞,进行 MES23.5 细胞凋亡的检测,以及采用 Western blot 检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达变化。

1.2.6 *CCK-8 试验检测 MES23.5 细胞活力* 取对数期生长的细胞,用胰蛋白酶消化成单细胞悬液,将 MES23.5 细胞以每孔 8×10^3 个的密度接种在 96 孔板中,每组均设置 6 个复孔;24 h 培养细胞贴壁后,对照组加抗坏血酸处理 2 h,给予空载体组和过表达 Eya1 组加药处理 2 h 后,将培养基吸出,每孔加入 100 μl 培养基和 10 μl CCK-8 试剂,混匀后置于细胞培养箱孵育 2 h。用酶标仪在波长 450 nm 处测定各孔吸光度值。

1.2.7 *Hoechst 33258 染色* 细胞发生凋亡时,染色质会发生固缩。Hoechst 33258 对细胞进行染色后,在荧光显微镜下观察,正常细胞核呈正常的蓝色,而凋亡的细胞核会呈致密浓染或呈碎片状致密浓染。将细胞接种到 24 孔板中(5×10^4 细胞/孔),当细胞融合度为 80% 左右时,对照组加入抗坏血酸处理 2 h,实验组加入 100 μmol/L 6-OHDA 处理 2 h,吸尽培养液,加入 150 μl 固定液,固定 10 min 后,用 PBS 洗 3 遍,加入 150 μl Hoechst 33258 染液,染色 5 min,去染色液,用 PBS 洗 2 遍,吸尽液体,滴一滴抗荧光淬灭液于载玻片上,盖上有细胞的盖玻片,荧光显微镜下观察细胞核形态变化。

1.2.8 *Western blot 检测 Eya1、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平* 取对数期生长的细胞,收集病毒感染细胞和 6-OHDA 处理后的细胞及对照组细胞,用预冷的 RIPA 裂解液提取总蛋白,12 000 r/min 离心 30 min,取上清用 BCA(bicinchoninic acid)法测定蛋白浓度,按 1∶4 的体积比在蛋白样品中加入 5 × SDS 上样缓冲液,95 ℃煮沸变性 10 min。取 60 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离目的蛋白,并转移至 NC 膜,使用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 2 h,加一抗 4 ℃

孵育过夜，washing buffer 洗涤条带 3 次，每次 10 min，室温二抗避光孵育 2 h，再用 washing buffer 洗涤条带 3 次后用 Odyssey CLX 红外激光成像系统扫描条带。以 β-actin 为内参，使用 Image J 分析条带灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件及 GraphPad Prism 9 进行统计分析和绘制图表，正态分布资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。所有的实验都是独立重复 3 次。

2 结果

2.1 携带 Eya1 基因的慢病毒重组表达质粒的构建及鉴定 PCR 扩增的目的片段 Eya1 经 Gibson 和 LR 反应后连接于慢病毒终载体，利用 SnapGene 软件进行酶切分析，可知使用 ApaL I 和 Xho I 连接的载体进行双酶切后，可以分别产生 1 085、2 295、2 891、1 246、3 648 bp 的 5 条 DNA 条带（图 1A）。酶切后琼脂糖凝胶电泳结果显示有 5 条清晰的条带，与预测的一致，其中2 295处所在的条带包含目的基因 Eya1（图 1B）。测序结果经 DNA 分析比对与预期完全一致（图 2）。以上结果表明携带 Eya1 的重组表达载体构建成功。

2.2 携带 Eya1 基因的慢病毒的包装及病毒滴度测定 将 Eya1 表达质粒转染至 HEK293 细胞中，培养 48 h 后收集细胞培养上清液，通过荧光计数法进行滴度测定。病毒滴度 = 荧光细胞数 × 稀释倍数 × 1 000，结果显示上清液中的病毒滴度为 2.61×10^8（TU/ml）。

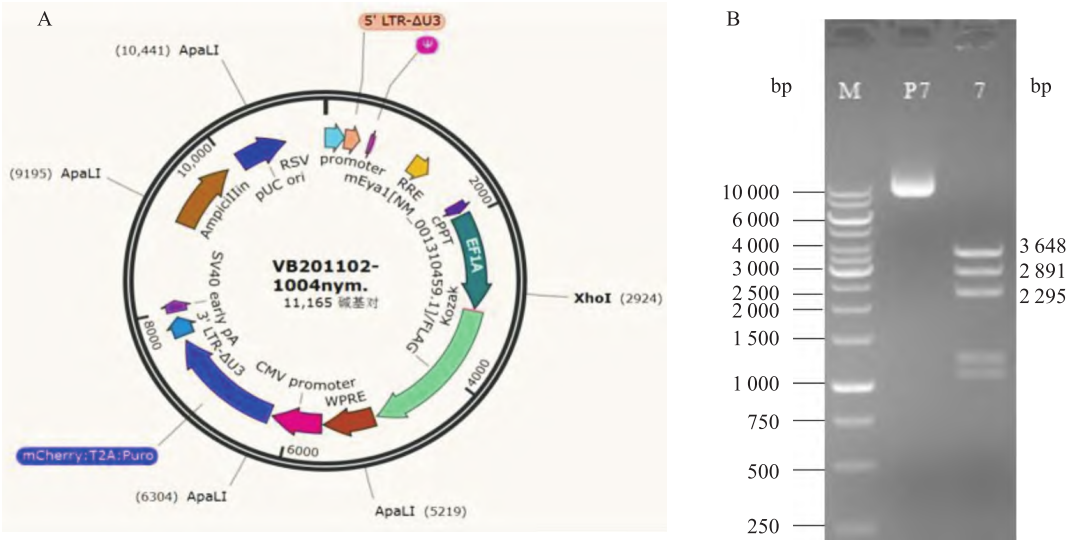

图 1 构建的重组慢病毒质粒酶切后琼脂糖凝胶电泳分析

A：重组慢病毒质粒；B：琼脂糖凝胶电泳分析；M：DNA marker；P7：未转染质粒；7：重组慢病毒质粒

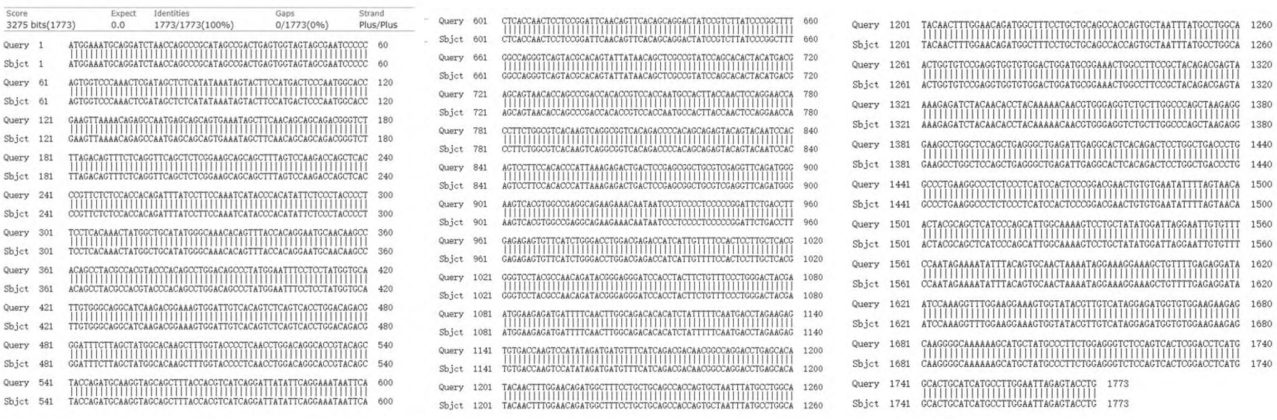

图 2 DNA 测序图谱及基因序列比对

将慢病毒包装的 Eya1 颗粒按照预实验的感染复数 MOI = 10 感染到 MES23.5 细胞中，48 h 后能明显观察到大量 mCherry 红色荧光(图 3)，感染效率达 80%。经嘌呤霉素药物筛选后得到稳定表达目的基因的细胞株，即 Eya1 MES23.5 细胞株。

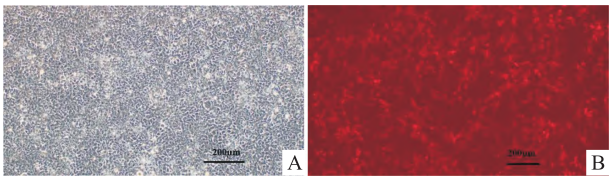

图 3　Eya1 慢病毒感染 MES23.5 细胞　×20

A：明场显微镜下；B：荧光显微镜下

2.3　稳定表达 Eya1 基因的 MES23.5 细胞中 Eya1 蛋白水平的鉴定　收集培养的 Eya1 MES23.5 细胞株，Western blot 方法鉴定细胞中 Eya1 蛋白的表达。结果显示，过表达 Eya1 组中 Eya1 蛋白表达水平明显高于空载体组和对照组($F = 11.82$，$P < 0.05$)，见图 4。以上结果进一步表明，成功筛选出稳定表达 Eya1 的 MES23.5 细胞。

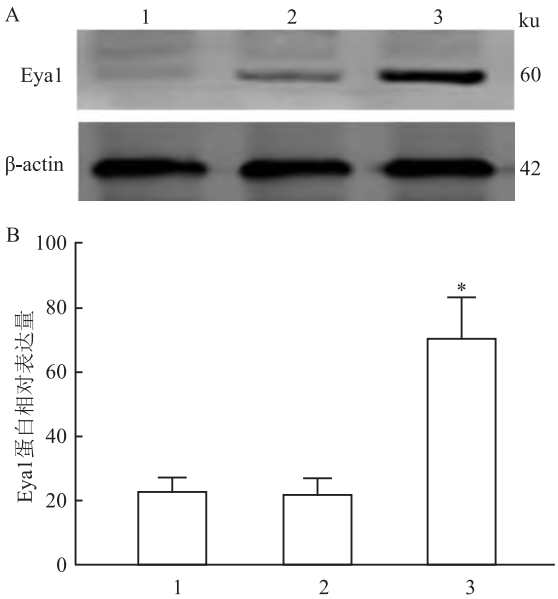

图 4　Western blot 检测 MES23.5 细胞中 Eya1 蛋白表达水平

A：Western blot 检测 Eya1 基因的表达；B：各组 Eya1 蛋白灰度值统计图；1：对照组；2：空载体组；3：过表达 Eya1 组；与空载体组比较：$^{*}P < 0.05$

2.4　过表达 Eya1 对 6-OHDA 诱导的 MES23.5 细胞活力的影响　用 CCK-8 试验检测了药物处理后 MES23.5 细胞的活力变化并进行了形态学观察。结果显示，过表达 Eya1 组细胞活力明显高于空载组($F = 9.159$，$P < 0.05$)，而对照组之间差异无统计学意义(图 5)。显微镜下观察显示，对照组细胞形态正常，胞体和突起均匀附着；加药处理后细胞形态异常，胞体变小且皱缩，过表达 Eya1 组细胞胞体变小和皱缩明显减轻(图 6)。以上结果表明过表达 Eya1 保护了药物处理对 MES23.5 细胞的损伤作用。

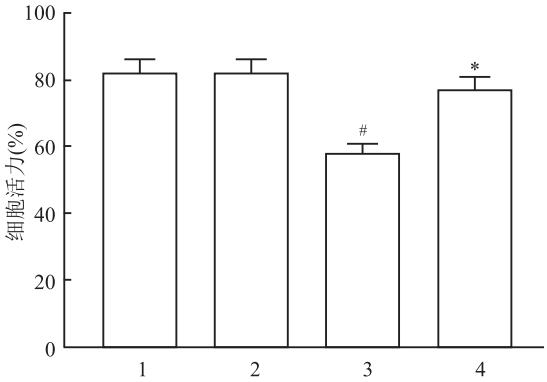

图 5　CCK-8 检测各组细胞的活力

1：对照组；2：空载体组；3：6-OHDA 处理的空载体组；4：6-OHDA 处理的过表达 Eya1 组；与 6-OHDA 处理的空载体组比较：$^{*}P < 0.05$；与对照组比较：$^{\#}P < 0.05$

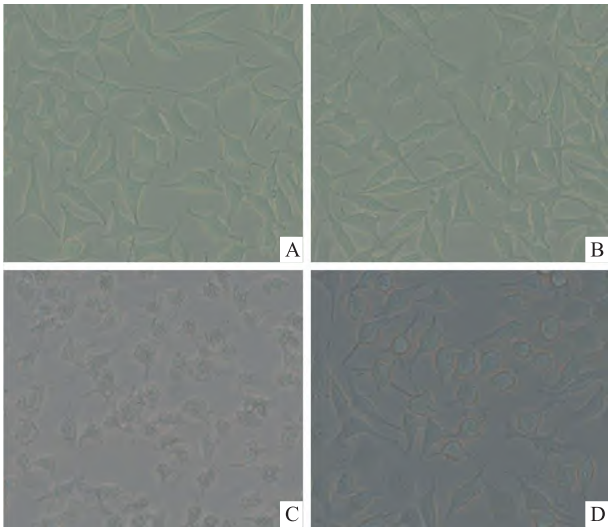

图 6　显微镜下 MES23.5 细胞形态的观察　×20

A：对照组；B：空载体组；C：6-OHDA 处理的空载体组；D：6-OHDA 处理的过表达 Eya1 组

2.5　过表达 Eya1 对 6-OHDA 诱导的 MES23.5 细胞凋亡的影响　Hoechst 33258 染色观测了药物处理后 MES23.5 细胞核的形态学变化。结果显示，荧光显微镜下观察到未加药物处理组的细胞核呈现均匀淡蓝色，细胞核大小一致，形状均匀(图 7A、B)。6-OHDA 药物处理后，空载体组细胞核发生固缩，变小，且出现凋亡小体，细胞核呈现浓染致密的荧光(图 7C)；过表达 Eya1 组细胞核中凋亡小体与空载

体组相比明显减少。以上结果表明过表达 Eya1 可降低 6-OHDA 诱导的 MES23.5 细胞的凋亡。

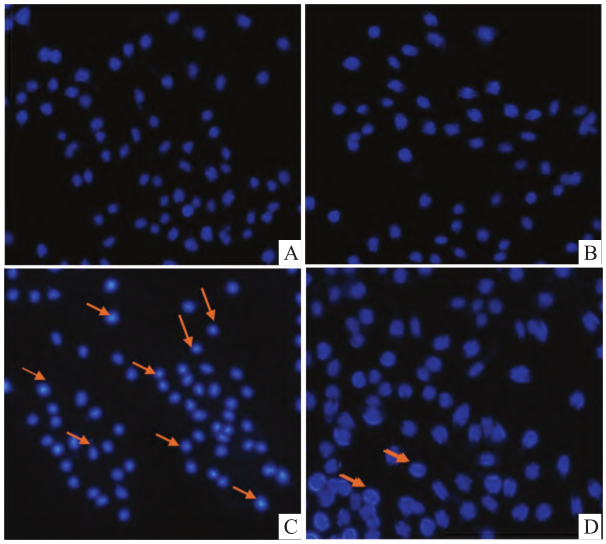

图 7 Hoechst 33258 染色观察细胞的凋亡情况 ×20

A:对照组;B:空载体组;C:6-OHDA 处理的空载体组;D:6-OHDA 处理的过表达 Eya1 组;箭头:为部分凋亡细胞

2.6 过表达 Eya1 对 6-OHDA 诱导的 MES23.5 细胞中凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响 Western blot 方法检测细胞中促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,结果显示,未加药物处理组中 Bcl-2 和 Bax 表达差异没有统计学意义;6-OHDA 诱导细胞损伤后,Eya1 过表达组 Bax 表达明显低于空载体组($F=11.89$,$P<0.05$),而 Bcl-2 的表达明显高于对照组($F=27.83$,$P<0.05$)(图 8)。说明过表达 Eya1 增强了 MES23.5 细胞的抗凋亡作用。

3 讨论

在各种病毒载体中,慢病毒载体具有将外源基因有效整合到宿主染色体上,因而可以持久性表达,同时,慢病毒载体还具有安全性高的特点[9]。本研究利用慢病毒载体建立稳定高表达 Eya1 的细胞株,为研究 Eya1 基因在多巴胺能神经细胞中的生物学功能奠定基础。

本研究将构建的 Eya1 过表达的稳定感染的 MES23.5 细胞株及其空载体对照组细胞株给予 6-OHDA 处理 2 h,构建 DA 能神经细胞的损伤模型。研究结果显示,6-OHDA 作用 2 h 时 MES23.5 细胞的活性降低了约 50%,故选择 6-OHDA 作用 2 h,便于观察 Eya1 过表达对损伤的细胞是否具有保护作用。CCK-8 检测结果显示,过表达 Eya1 组的细胞活力明显高于空载体对照组,这说明 Eya1 对损伤的 MES23.5 细胞具有保护作用。Hoechst 33258 染色结果表明 Eya1 是通过拮抗细胞凋亡的作用发挥了对细胞的保护作用。

细胞凋亡的主要途径有死亡受体途径和以线粒体为主的内源性凋亡,线粒体信号通路在调节细胞凋亡中起着重要的作用。线粒体凋亡途径上 Bcl-2 蛋白家族作为参与细胞凋亡的核心家族,对凋亡的调控意义尤为突出[10]。在 Bcl-2 蛋白家族中 Bcl-2 是起主要作用的抗凋亡蛋白,有证据表明 Bcl-2 家族蛋白的功能与多巴胺能神经元的发育密切相关,Bax 是重要的促凋亡蛋白。正常情况下,脑组织神经细胞处于抗凋亡与促凋亡相对平衡状态。Bcl-2 高表达状态是为了阻止细胞凋亡,起到一种生理性神经自我保护作用,而 Bax 高表达状态则是促进了细胞凋亡,起到一种病理学破坏作用[11-12]。本研究在应用 Hoechst 33258 法检测细胞凋亡的基础上,同步应用 Western blot 方法对 Bcl-2 和 Bax 蛋白进行检测,进一步证实了 Eya1 在损伤的细胞中具有拮抗细胞凋亡的作用,结果显示过表达 Eya1 组的 Bcl-2 表达明显高于空载体组,Bax 蛋白表达明显低于空载体组。然而,本研究中课题组发现一个现象,即 6-OHDA 处理后的空载体组中Bcl-2的蛋白表达水平

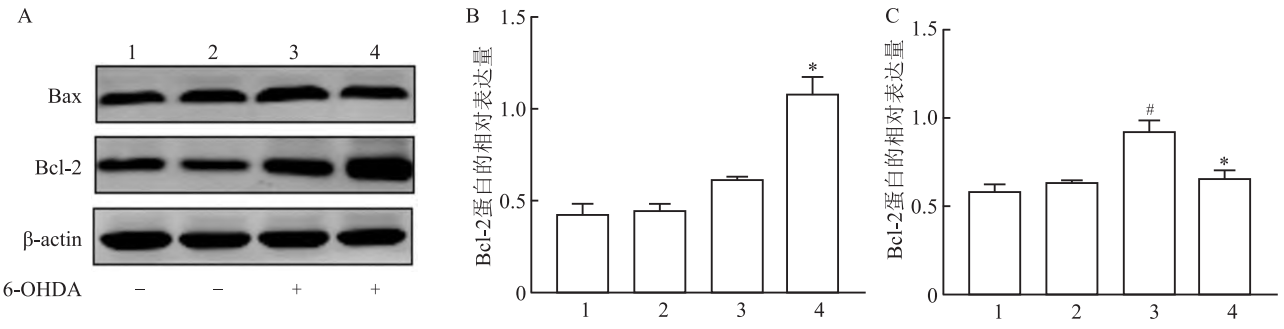

图 8 Western blot 检测各组 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达

A:Western blot 检测各组 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 B:每组 Bcl-2 蛋白表达水平统计图;C:每组 Bax 蛋白表达水平统计图;1:对照组;2:空载体组;3:6-OHDA 处理的空载体组;4:6-OHDA 处理的过表达 Eya1 组;与对照组比较:$^{\#}P<0.05$;与 6-OHDA 处理的空载体组比较:$^{*}P<0.05$

与对照组相比增高,而不是降低。造成这种现象的原因可能为受损早期的细胞启动自身的应激性保护机制,调用自身抗凋亡系统来抵抗药物造成的损伤。这也与本课题组前期研究[8]结果相一致,即在 6-OHDA 作用 1 ~ 3 h 时,Eya1 表达一过性增高,以保护受损的多巴胺能神经细胞。

综上所述,该研究构建了 Eya1 过表达的慢病毒表达载体及 Eya1 稳定表达的 MES23.5 细胞株,表明过表达 Eya1 通过调控 Bcl-2、Bax 表达,拮抗 6-OHDA 诱导的 MES23.5 多巴胺能神经细胞的凋亡。该研究为课题组进一步开展 Eya1 基因在帕金森病中的功能和作用机制研究奠定了重要基础。

参考文献

[1] Zhang Z, Chen S D. Autonomic dysfunctions in Parkinson's disease: prevalence, clinical characteristics, potential diagnostic markers, and treatment [J]. Parkinsons Dis, 2020, 2020: 8740732.

[2] Fanning S, Selkoe D, Dettmer U. Parkinson's disease: proteinopathy or lipidopathy? [J]. NPJ Parkinsons Dis,2020,6:3.

[3] Jahanshahi M, Rothwell J C. Inhibitory dysfunction contributes to some of the motor and non-motor symptoms of movement disorders and psychiatric disorders[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,2017,372(1718):20160198.

[4] Zhou H, Zhang L, Vartuli R L, et al. The Eya phosphatase: its unique role in cancer[J]. Int J Biochem Cell Biol,2018,96:165 -70.

[5] Blevins M A, Towers C G, Patrick A N, et al. The SIX1-EYA transcriptional complex as a therapeutic target in cancer[J]. Expert Opin Ther Targets,2015,19(2):213 -25.

[6] Sun Y, Kaneko S, Li X K, et al. The PI3K/Akt signal hyperactivates Eya1 *via* the SUMOylation pathway[J]. Oncogene, 2015, 34(19): 2527 -37.

[7] Cai S, Cheng X, Liu Y, et al. EYA1 promotes tumor angiogenesis by activating the PI3K pathway in colorectal cancer[J]. Exp Cell Res,2018,367(1):37 -46.

[8] Gao J, Kang X Y, Sun S, et al. MES23.5 DA immortalized neuroblastoma cells self-protect against early injury by overexpressing glial cell - derived neurotrophic factor *via* Akt1/Eya1/Six2 signaling[J]. J Mol Neurosci,2020,70(3):328 -39.

[9] 王 坤, 朱甜甜, 李毓雯, 等. c-met 慢病毒载体的构建及稳定转染骨髓间充质干细胞[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(4): 597 -601.

[10] Song C, Han Y, Luo H, et al. HOXA10 induces BCL2 expression, inhibits apoptosis, and promotes cell proliferation in gastric cancer[J]. Cancer Med,2019 ,8(12):5651 -61.

[11] Khanzadeh T, Hagh M F, Talebi M, et al. Investigation of BAX and BCL2 expression and apoptosis in a resveratrol-and prednisolone-treated human T-ALL cell line, CCRF-CEM[J]. Blood Res, 2018,53(1):53 -60.

[12] Maes M E, Schlamp C L, Nickells R W. BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells[J]. Prog Retin Eye Res,2017,57:1 -25.

The effect of Eya1 gene overexpression on apoptosis of MES23.5 cells

Qin Dengli, Gao Jin

(*College of Life Sciences*, *Xuzhou Medical University*, *Xuzhou* 221000)

Abstract ***Objective*** Eya1 gene lentiviral vectors were constructed, and the effects of overexpression of eye absent 1(Eya1) on 6-OHDA-induced apoptosis of MES23.5 dopaminergic cells were investigated. ***Methods*** Lentivirus overexpression of Eya1 gene was constructed and infected MES23.5 cells, then stable Eya1-expression cell lines were screened. MES23.5 dopaminergic cell injury model induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) was divided into control group, empty vector group and overexpression Eya1 group. Cell counting kit-8(CCK-8), Hoechst staining kit(Hoechst 33258) and Western blot were used to detect the effect of overexpression of Eya1 on apoptosis. ***Results*** Enzyme electrophoresis showed that the target gene was recombined into lentivirus vector. Sequencing results showed that Eya1 gene overexpression vector was identical with the Eya1 gene coding sequence. CCK-8 showed that the cell viability of Eya1 overexpressed group was higher than that of control group ($P<0.05$). Hoechst 33258 showed that the concentration and aggregation level of Eya1 overexpression group was lower than that of control group. The expression of Bcl-2 protein in the overexpression Eya1 group was higher than that in the control group ($P<0.05$), while that of Bax protein was lower than that of the control. ***Conclusion*** The MES23.5 cell line overexpressing of Eya1 was successfully constructed. Eya1 antagonizes the apoptosis of MES23.5 dopaminergic cells induced by 6-OHDA by regulating the expression of Bcl-2 and Bax proteins.

Key words Eya1; lentiviral vector; MES23.5 cells; stable cell line; apoptosis