论著

文章编号:1000-5404(2007)01-0032-04

人MCHR2真核表达载体的构建及稳定转染CHO细胞系的建立

袁成福,杨俊霞,魏丽丽,石 华,陈 济,宋方洲 (重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,教育部临床检验诊断学重点实验室,重庆 400016)

提 要:目的 构建人MCHR2真核表达载体,转染CHO细胞,建立稳定转染的CHO细胞系。**方法** 采用PCR方法,以人胎脑cDNA文库为模板扩增人MCHR2基因的全长cDNA编码区序列,利用DNA重组技术将其定向插入到真核表达载体pcDNA3.1(+),经酶切和测序鉴定后,用脂质体转染法转染CHO细胞,通过G418筛选,建立稳定转染的CHO细胞系,用RT-PCR、Western blot及免疫荧光法检测MCHR2的表达。**结果** 成功构建了pcDNA3.1(+)/MCHR2真核表达载体,并建立了稳定转染的CHO细胞系,成功地表达目的基因。**结论** 真核表达载体成功构建和稳定转染CHO细胞系的建立为进一步研究MCHR2的功能奠定良好的实验基础。

关键词: MCHR2;真核表达载体;稳定转染的CHO细胞系;基因表达

中图法分类号: R338.2; R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

Construction of eukaryotic expression vector of human MCHR2 and establishment of its stable transfected CHO cell line

YUAN Cheng-fu, YANG Jun-xia, WEI Li-li, SHI Hua, CHEN Ji, SONG Fang-zhou (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct eukaryotic expression vector of human melanin-concentrating hormone receptor 2 (MCHR2) and transfect CHO cells to establish stable CHO cell line. Methods The full-length MCHR2 cDNA fragment was amplified by PCR from the human fetal brain cDNA library and was inserted into eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+), after the identification by digestion and sequencing on the recombinant eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)/MCHR2, the recombinant was transfected into CHO cell by lipofectamine™2000. After screening culture by G418, stable transfected CHO cell line was established, and the transcription and expression of MCHR2 were identified by RT-PCR, Western blotting and immunofluorescence. Results The eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)/MCHR2 was constructed successfully. The stable transfected CHO cell line was established. The MCHR2 protein was expressed successfully. Conclusion The construction of the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)/MCHR2 and the establishment of stable transfected CHO cell line provide solid foundation for further experimental studies on the function of MCHR2.

Key words: MCHR2; eukaryotic expression vector; stable transfected CHO cell line; gene expression

肥胖是现代社会中常见的营养障碍性疾病,其发病率在发达国家和发展中国家逐年上升,已成为一个全球性的健康问题。肥胖不仅是导致心脑血管疾病、糖尿病、高血压、高脂血症等疾病的高危因素,并且还带来许多社会问题和心理问题。多年来研究表明肥胖的发生与下丘脑对摄食的神经内分泌调控密切相关。近年来继神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)、刺鼠相关蛋白(agouti related protein, AgRP)、增食欲素(orexin, ORX)之后,又一个增强食欲的神经肽——黑色素浓集激素(melanin concentration hormone, MCH)进入人们的视野,随着研究的逐步深入相继发现了MCH的2个受体亚型——MCHR1和MCHR2,从而为肥胖的防治提供了新的靶点。

基金项目: 国家自然科学基金(30671008)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30671008)

作者简介: 袁成福(1976-),男,湖北省十堰市人,硕士研究生,讲师,主要从事基因诊断与基因治疗方面的研究,现在湖北民族学院医学院生物化学教研室,恩施 445000。电话:(023)68485991,E-mail:yuancf46@163.com

通讯作者: 宋方洲,电话:(023)68485958,E-mail:fzsongcq@163.com

收稿日期: 2006-08-31;**修回日期:** 2006-10-10

本实验将人 MCHR2 基因的全长 cDNA 克隆到 pcDNA3.1(+)质粒的 CMV 启动子的下游，从而获得了一个能在真核细胞中组成性表达人 MCHR2 蛋白的 pcDNA3.1(+)/MCHR2 表达载体。将该载体转染 CHO 细胞并筛选组成性高表达人 MCHR2 的细胞系，从而建立了一个 MCHR2 基因高表达的 CHO 细胞模型，为 mcHR2 基因的功能研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　主要材料和试剂

人胎脑 cDNA 文库购自 Clontech 公司。菌株 *E. coli* DH5α，质粒 pcDNA3.1(+)和 CHO 细胞由本教研室保存。RT-PCR 试剂盒购自 Toyobo 公司；*Taq* DNA 多聚酶，T_4 DNA 连接酶，限制性内切酶(*Eco*RⅠ，*Xho*Ⅰ)等工具酶均购于 TaKaRa 公司；凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司；脂质体 Lipofectamine™2000 为 Invitrogen 公司产品；G418 购自 Amresco 公司；总 RNA 抽提液 Tripure 购自 Roche 公司；MCHR2 的抗体购自 Santa Cruz 公司，HRP 标记的兔抗羊 IgG 和 FITC 标记的兔抗羊 IgG 购自北京鼎国公司。

1.2　技术路线与方法

1.2.1　引物设计　　上游引物：5′-CCGGAATTCACCATGAATCCATTTCATGCATCTTG-3′；下游引物：5′-CCG CTCGAGCTAAAAGTGTGATTTCAGAGTGT-3′。其中分别在上游和下游引物的5′端加上了 *Eco*RⅠ和 *Xho*Ⅰ酶切位点和 3 个保护碱基(CCG)，并且在起始密码前添加了 Kozak 序列(ACC)，引物由 TaKaRa 公司合成。

1.2.2　人 MCHR2 cDNA 的扩增　　以人胎脑 cDNA 文库为模板，采用 PCR 的方式扩增人 MCHR2 cDNA 的编码区，全长为 1 023 bp。PCR 50 μl 反应体系中加入 cDNA 模板 2 μl，10×PCR 缓冲 5 μl，$MgCl_2$ 3 μl，dNTP(2.5 mmol/L) 4 μl，上下游引物(20 μmol/L)各 1 μl，*Taq* DNA 多聚酶 0.5 μl，H_2O 补足至 50 μl，反应条件为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃ 60 s→57 ℃退火 40 s→72 ℃延伸 70 s(35 个循环)；72 ℃ 继续延伸 10 min。电泳初步鉴定 PCR 产物。

1.2.3　人 MCHR2 真核表达载体的构建　　将上述 PCR 产物和 pcDNA3.1(+)质粒分别用限制性内切酶 *Eco*RⅠ和 *Xho*Ⅰ双酶切后，1% 琼脂糖凝胶电泳分离、胶回收纯化，经 T_4 DNA 连接酶过夜连接后转化 *E. coli* DH5α 感受态，氨苄青霉素筛选培养，挑取阳性克隆扩增后提取质粒进行酶切和 DNA 测序鉴定。

1.2.4　建立稳定转染人 MCHR2 的 CHO 细胞系　　CHO 细胞在含 10% 小牛血清的 DMEM/F-12 培养基中，于 37 ℃、5% CO_2 的饱和湿度下培养。待细胞融合至 70% ~80% 时按照 Lipofectamine™ 2000 操作说明书进行空质粒 pcDNA3.1(+)和重组表达载体 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的转染。转染 48 h 后，用胰蛋白酶消化细胞，在含有 G418(900 μg/ml)的选择性培养基中加压筛选 6 周，获得具有抗生素抗性的阳性细胞克隆，扩增培养即为稳定表达人 MCHR2 的 CHO 细胞系，命名为 CHO-MCHR2 细胞。

1.2.5　指标检测

1.2.5.1　RT-PCR 检测 MCHR2 转录水平的表达　　收集 CHO 空质粒转染细胞以及 CHO-MCHR2 转染细胞，按 Trizol 试剂说明书抽提细胞总 RNA，取 1 μg 进行反转录。反转录 20 μl 体系中加入总 RNA2 μl，随机引物 1 μl，5×RT 缓冲液 4 μl，dNTP(10 mmol/L) 2 μl，RNAase 抑制剂(10 U/μl)1 μl，MMLV 逆转录酶 1 μl，H_2O 补足至 20 μl，混匀，30 ℃ 10 min，42 ℃ 20 min，99 ℃ 5 min 终止反应。以 GAPDH(450 bp)为内参进行 PCR 反应。在 25 μl 反应体系中加入 cDNA 模板 5 μl，10×PCR 缓冲液 2.5 μl，$MgCl_2$ 1.5 μl，dNTP(2.5 mmol/L) 1.0 μl，上下游引物(20 μmol/L)各 0.5 μl，*Taq* DNA 多聚酶 0.25 μl，H_2O 补足至 25 μl，反应条件为：94 ℃ 预变性 5 min；94 ℃ 60 s；56℃ 退火 50 s；72 ℃延伸 70 s，30 个循环；72 ℃ 继续延伸 7 min。取等体积 RT-PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳并照像。

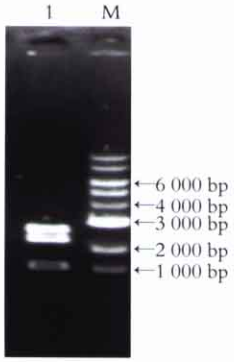
1.2.5.2　Western blot 检测 MCHR2 翻译水平的表达　　收集转染细胞，裂解后取 20 μg 处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并电转移至 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉室温振荡封闭 1 h，与 1∶200 稀释后的一抗 4 ℃孵育过夜，PBST 洗膜 3 次，每次 10 min，然后与 1∶5 000 稀释后的 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h，PBST 洗膜 3 次，每次 10 min，DAB 显色，检测目的蛋白。

1.2.5.3　免疫荧光检查　　将转然 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的 CHO-MCHR2 细胞以 1×10^5 密度种植在 6 孔板中，同时用未转染 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的 CHO 细胞作对照，24 h 细胞贴壁后用 PBS 缓冲液冲洗 3 次。以新鲜配制的 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min，5% 兔血清封闭 1 h，PBS 缓冲液冲洗后，山羊抗人 MCHR2 为一抗(4 μg/ml)，4 ℃湿盒中孵育过夜，PBS 缓冲液冲洗后用 FITC 标记的兔抗山羊 IgG 二抗(4 μg/ml)闭光孵育 2 h，封片后用激光扫描共聚焦显微镜观察 MCHR2 在细胞内的表达情况。

2　结果

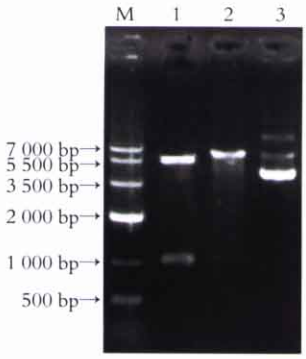
2.1　真核表达载体 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的鉴定

pcDNA3.1(+)/MCHR2 质粒的酶切鉴定结果见图 1、2。pcDNA3.1(+)/MCHR2 重组质粒经 *Hinc*Ⅱ单酶切后理论上可切出 234、1 472、2 185、2 536 bp 大小的 4 个片断，在图 1 中 1 泳道 pcDNA3.1(+)/MCHR2 重组质粒经 *Hinc*Ⅱ单酶切后在 1 000 bp及 2 000 bp 之间有一条带，其大小约 1 472 bp，在 2 000 bp及 3 000 bp 之间有 2 条条带，其大小约2 185 bp及 2 536 bp，与理论相符。pcDNA3.1(+)/MCHR2 重组质粒经限制性内切酶 *Eco*RⅠ和 *Xho*Ⅰ双酶切后见约 1 023 bp 大小的清晰条带，与 MCHR2 基因大小相符。见图 2 中 1 泳道所示，2 泳道为 *Eco*RⅠ单酶切，线性化的质粒与预期大小相符，3 泳道为未酶切质粒。以 pcDNA3.1(+)质粒载体多克隆位点上的通用引物(PBGFP 和 BGH 方向)进行双向测序鉴定，结果表明 pcDNA3.1(+)/MCHR2 重组质粒插入片段的序列与 GeneBank 中 AY562946 报道的 MCHR2 cDNA 序列完全一致，表明人 MCHR2 的真核表达载体构建成功。将其命名为 pcDNA3.1(+)/MCHR2。



1：pcDNA3.1(+)/MCHR2 重组质粒经 *Hinc* Ⅱ 单酶切；M：标准 1 kb DNA Ladder

图1 pcDNA3.1(+)/MCHR2 质粒的 *Hinc* Ⅱ 单酶切鉴定电泳图



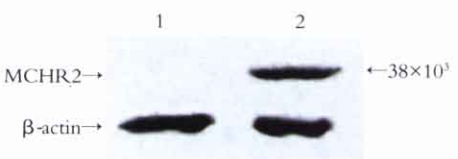
M：标准Ⅳ；1：*Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切；2：*Eco*R Ⅰ 单酶切；3：未酶切

图2 pcDNA3.1(+)/MCHR2 质粒的酶切鉴定电泳图

2.2 指标检测

2.2.1 CHO 细胞克隆中 MCHR2 mRNA 的表达 结果表明稳定转染 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的细胞所提 RNA 能扩增出代表 MCHR2 基因(1 023 bp)及内参 GAPDH 基因(450 bp)的条带，而稳定转染 pcDNA3.1(+)空质粒的细胞所提 RNA 仅能扩增出代表内参 GAPDH 基因的 450 bp 条带，说明 MCHR2 基因在稳定转染 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的 CHO 细胞中 mRNA 水平上得到了表达。

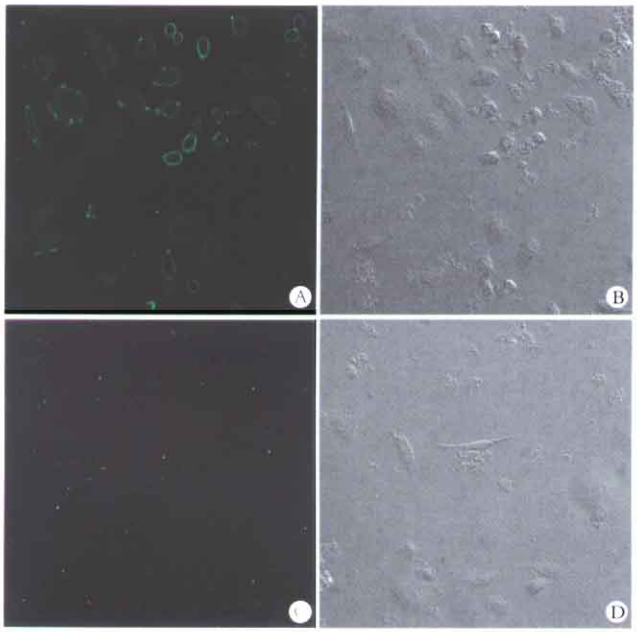
2.2.2 CHO 细胞克隆中 MCHR2 蛋白的表达 Western blot 检测结果如图3所示，稳定转染 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的细胞检测到 MCHR2 在蛋白水平的表达，而对照的空质粒转染后的细胞则没有相应的条带，表明所构建的真核表达载体已在真核细胞 CHO 内表达。



1：转染 pcDNA3.1(+)的细胞；2：转染 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的细胞

图3 MCHR2 基因蛋白水平的 Western blot 分析结果

2.2.3 免疫荧光检测 在稳定转染 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的 CHO-MCHR2 细胞中可以清楚看到荧光表达(图4A)，而对照的未转染 CHO 细胞则没有相应的荧光表达(图4C)，CHO 细胞形态清晰可见。表明所构建的真核表达载体已在真核细胞 CHO 内表达。



A：荧光检测转染 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的 CHO-MCHR2 细胞；B：只用透射光检测转染 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的 CHO-MCHR2 细胞；C：荧光检测未转染 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的 CHO 对照细胞；D：只用透射光检测未转染 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的 CHO 对照细胞

图4 CHO 细胞的免疫荧光检查结果 (×400)

3 讨论

黑色素浓集激素(MCH)是19个氨基酸的环状肽，最先于硬骨鱼中发现，它的激活可导致黑色素沉着，因此得名。MCH 与许多生理功能有关，如感觉、应激反应和学习，但其主要在摄取食物及能量平衡方面发挥重要作用[1]，多个动物实验证实 MCH 是一种能够增加食欲的神经肽，在调节能量平衡中起重要作用。直接在脑室内、室旁核等急性注射 MCH 能引起食物摄入短暂增加[2]；脑室内慢性注射 MCH 会刺激大鼠及小鼠食物摄入增加，体质量增加，导致肥胖[3]；Ludwig 等[4]制造了过度表达 MCH 的转基因小鼠，发现小鼠摄食过多，具有高脂蛋白血症，高血糖和胰岛素抵抗特点。敲除小鼠 MCH 基因，可导致消瘦综合征(表现为小鼠摄食减少，代谢增加，体质量减轻)。由此可见 MCH 在调节体质量中起关键性作用。

对 MCH 受体(melanin-concentrating hormone receptor, MCHR)的研究起步较晚，直到1999年才找到

第 1 个人 MCH 受体(MCHR1)，即与生长抑素受体的跨膜区 40% 氨基酸序列同源的孤儿 G 蛋白偶联受体 SLC-1[5]，其基因定位于染色体 22q13.3，其编码区没有内含子，cDNA 全长 1 269 bp，最终的蛋白产物含 353 个氨基酸。Marsh 等[6]研究小组应用基因敲出技术研究了 MCHR1 的功能，发现 MCHR1 敲出小鼠体质量正常，体形瘦，脂肪含量低，血浆瘦素、胰岛素水平低于对照，并且进食高脂饮食不易诱发肥胖，提示 MCHR1 的功能可能是 MCH 调节能量平衡的中介，而 MCHR1 失活则有望减轻高脂饮食所诱导的肥胖。现人们已研制出 MCHR1 的拮抗剂以期望治疗肥胖症[7]。2001 年 Sailer 等[8]发现 MCH 的第 2 个受体亚型(MCHR2，又名 GPCR145)。该受体基因定位于染色体 6q16.2-6q21，有 5 个可编码的外显子，cDNA 全长 1 023 bp，编码具有 340 个氨基酸的蛋白质。MCHR1 和 MCHR2 均属于 G 蛋白偶联受体(GPCR)家族。

通过定量 RT-PCR、Northern 杂交及原位杂交技术证实，MCHR2 主要在大脑表达，尤其在下丘脑前部和外侧区以及腹内侧核区表达丰度高，表明 MCHR2 可能参与进食行为的调控。此外，据报道肥胖患者在第 6 号染色体长臂发生细胞遗传学改变，而 MCHR2 正好定位于染色体 6q，也提示 MCHR2 可能与肥胖的发生相关。肥胖是胰岛素抵抗与 2 型糖尿病的主要危险因子。为研究 MCHR 与糖尿病的关系，Bjursell 等[9]在瘦素(leptin)缺乏的小鼠中敲除 MCHR1 基因发现小鼠能增加胰岛素的敏感性，说明 MCHR1 在调节胰岛素敏感性中有重要作用。这一点与 Pereira-da-Silva 等[10]报道一致。同时在上述小鼠中敲除 MCHR1 基因能增加小鼠活动率，小鼠消瘦和脂肪量减少；而涉及非饱和脂肪生物合成的硬脂酰 CoA 去饱和酶-1(SCD-1)的 mRNA 却表达上调(这一点与 MCH 敲除小鼠能降低 SCD-1 基因表达相反)，表明敲除 MCHR1 的小鼠减少脂肪量，并非脂肪合成减少，可能与增加活动率有关。MCHR1 敲除小鼠能增加心率及体温，表明 MCHR1 能影响自主神经系统。研究表明在褐色脂肪组织中 MCHR1 敲除小鼠的生热作用依赖于线粒体内膜的解偶联蛋白-1(UCP-1)的解偶联作用。但 MCHR2 与糖尿病的关系包括它与胰岛素敏感性、SCD-1、UCP-1 的关系仍不清楚，因此需要对 MCHR2 基因功能及与肥胖和糖尿病等的关系作进一步的研究，而获得 MCHR2 基因高表达的细胞克隆则是进行上述研究的基础。

本研究以人胎脑 cDNA 文库为模板获得 MCHR2 基因 cDNA 编码区，并插入到 pcDNA3.1(+)载体的 CMV 启动子下面，从而成功构建了一个组成性表达人 MCHR2 蛋白的表达载体 pcDNA3.1(+)/MCHR2。将该载体转染到 CHO 细胞，通过 G418 筛选和基因组 DNA 的 PCR 分析等方法成功地建立了一个在基因组 DNA 中稳定整合有 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的 CHO 细胞克隆，将该细胞克隆的细胞扩增，然后提取总 RNA 和蛋白，并利用 RT-PCR、Western blotting 和免疫荧光法检测到 MCHR2 基因在 mRNA 和蛋白水平均有表达。综上所述，我们认为本研究成功地建立了一个在基因组 DNA 中稳定整合有 pcDNA3.1(+)/MCHR2 载体的 CHO 细胞系，在该细胞系中 MCHR2 基因得到了表达。它的建立为 MCHR2 基因的功能研究提供了一个细胞模型，关于 MCHR2 功能特性及它与肥胖的关系的研究，我们将作进一步研究。

参考文献：

[1] Pissios P, Maratos-Flier E. Melanin-concentrating hormone: from fish skin to skinny mammals[J]. Trends Endocrinol Metab, 2003, 14(5): 243 - 248.

[2] Abbott C R, Kennedy A R, Wren A M, *et al*. Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone[J]. Endocrinology, 2003, 144(9): 3943 - 3949.

[3] Ito M, Gomori A, Ishihara A, *et al*. Characterization of MCH-mediated obesity in mice[J]. Am J Physiol Endocrinol Metabol, 2003, 284(5): E940 - E945.

[4] Ludwig D S, Tritos N A, Mastaitis J W, *et al*. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance[J]. J Clin Invest, 2001, 107(3): 379 - 386.

[5] Saito Y, Nothacker H P, Wang Z, *et al*. Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor[J]. Nature, 1999, 400(6741): 265 - 269.

[6] Marsh D J, Weingarth D T, Novi D E, *et al*. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(5): 3240 - 3245.

[7] Mcbriar M D, Guzik H, Shapiro S, *et al*. Discovery of orally efficacious melanin-concentrating hormone receptor-1 antagonists as antiobesity agents. Synthesis, SAR, and biological evaluation of bicyclo[3.1.0]hexyl ureas [J]. J Med Chem, 2006, 49(7): 2294 - 2310.

[8] Sailer A W, Sano H, Zeng Z, *et al*. Identification and characterization of a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-2R[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(13): 7564 - 7569.

[9] Bjursell M, Gerdin A K, Ploj K, *et al*. Melanin-concentrating hormone receptor 1 deficiency increases insulin sensitivity in obese leptin-deficient mice without affecting body weight[J]. Diabetes, 2006, 55(3): 725 - 733.

[10] Pereira-Da -Silva M, De-Souza C T, Gasparetti A L, *et al*. Melanin-concentrating hormone induces insulin resistance through a mechanism independent of body weight gain[J]. J Endocrinol, 2005, 186(1): 193 - 201.

(编辑　栾　嘉)