文章编号:1000-5404(2007)11-1003-03

论著

2型大麻受体的克隆及真核表达体系的构建

王颖莹[1],陈纯海[2],裴莉萍[2],张 伟[2], Norbert E. Kaminski[3] (第三军医大学:[1]西南医院检验科,[2]军事预防医学院劳动卫生学教研室,重庆 400038;[3]美国密西根州立大学药理与毒理系,东兰辛 48824)

提 要:目的 克隆人2型大麻受体(hCB2)基因,并构建相应的稳定表达细胞株。**方法** 利用人T淋巴细胞株HPB-ALL的总RNA,以RT-PCR及酶切、连接等分子生物学方法克隆hCB2基因于质粒载体pFlag-CMV-3内,以HEK293细胞构建稳定表达细胞株,以Western blot方法利用蛋白标记Flag的单克隆抗体(Anti-Flag)和CB2多克隆抗体(Anti-CB2)同时检测质粒的表达。**结果** 酶切及测序结果表明hCB2基因克隆成功,Western blot检测结果表明Anti-Flag和Anti-CB2都能检测Flag-hCB2蛋白。**结论** 成功克隆hCB2基因,并获得稳定表达细胞株,同时证实Anti-CB2多克隆抗体有效。

关键词:2型大麻受体;基因克隆;真核表达
中图法分类号:R392.2;R394-33 **文献标识码**:A

Clone and eukaryotic expression of human cannabinoid receptor 2 gene

WANG Ying-ying[1], CHEN Chun-hai[2], PEI Li-ping[2], ZHANG Wei[2], Norbert E. Kaminski[3] ([1]Department of Clinical Laboratory, Southwest Hospital, [2]Department of Occupational Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; [3]Department of Pharmacology and Toxicology, Michigan State University, East Lansing 48824, USA)

Abstract: **Objective** To clone human cannabinoid receptor 2 gene and establish stable cell line which constantly expresses hCB2 protein. **Methods** Full length of hCB2 cDNA was obtained by RT-PCR with total RNA isolated from human T cell line HPB-ALL, and then constructed into plasmid vector pFlag-CMV-3. The stable cell line was established with HEK293 cells. The expression of Flag-CB2 was analyzed by Western blotting with monoclonal Anti-Flag and multiclonal Anti-CB2. **Results** pFLag-hCB2 was confirmed containing proper hCB2 gene with diagnostic digestion and sequencing, and the expression products were detected by Anti-Flag and Anti-CB2 parallelly. **Conclusion** Gene of hCB2 has been cloned and constantly expressed in HEK293 cells. The multiclonal Anti-CB2 is proved efficient in detecting CB2 protein epitope.

Key words: CB2; gene cloning; eukaryotic expression

大麻是一种有悠久种植历史的植物。在近代,其应用一直受到争议。一方面它被称为"软性毒品",但另一方面它又具有相当的药用价值[1]。目前世界上已有部分国家批准在临床应用大麻类物质制备的药品[2],更多的相关研究也正在进行之中。

大麻类物质的生物作用基础是大麻受体。这是一类以天然、人工合成或内源性大麻类物质为配体的膜受体。迄今已发现两个亚型:即1型大麻受体(cannabinoid receptor 1,CB1)[3]和2型大麻受体(cannabinoid receptor 2,CB2)[4]。其中,CB2主要分布在外周器官,尤其以免疫系统为主,大麻对免疫系统的抑制作用推测即通过CB2介导。为进一步研究CB2在大麻类物质生物效应机制中的地位和作用,我们克隆并表达了人CB2基因。

1 材料与方法

1.1 材料

人源T淋巴细胞株HPB-ALL由Dr. J. A. Ledbetter(Pacific Northwest Research Institute)惠赠;哺乳动物细胞表达质粒pFlag-CMV-3及其阳性对照质粒pFlag-BAP,单克隆抗体Anti-

基金项目:第三军医大学科研基金(XG200550,XG200554),总后115国际合作项目(06H024,06H028)
Supported by the Research Fund of Third Military Medical University (XG200500, XG200554) and the 115 International Cooperation Program of General Logistic Department (06H024,06H028)

作者简介:王颖莹(1973-),女,北京市人,博士,讲师,主要从事毒理免疫学方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754429,E-mail: wyyri@hotmail.com

收稿日期:2007-03-07;修回日期:2007-04-01

Flag(M2)购自美国 Sigma 公司;多克隆抗体 Anti-CB2 购自美国 Cayman 公司;293 细胞株购自美国 ATCC;HRP 标记二抗购自美国 Amersham Biosciences 公司;限制性内切酶均购自美国 New England Biolabs 公司;RT-PCR 所需酶、T_4 DNA 连接酶、Lipofectamine2000 均购自美国 Invitrogen 公司;XL-2 Blue 超级感受态细菌购自美国 Stratagene 公司;细胞培养试剂购自美国 Gibco 公司;其余试剂如无特殊说明,均购自美国 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计合成 依据 GenBank 中人 CB2 基因 NM_001841,以引物设计软件 MacVector 设计引物,并根据需要突变相应核苷酸得到酶切位点,最后的引物序列如下:上游引物 P1:5′-GAATCTGAAGGCCAAGCTTATGGAGGAATGCTGGGTG-3′(含 *Hind* Ⅲ位点),下游引物 P2:5′-AAGAAGAGAGTGCCAGGATCCCTCTCTCTCTTCCAG-3′(含 *Bam*H Ⅰ位点)。

1.2.2 pFlag-hCB2 的构建 以 Tri-Reagent 提取 HPB-ALL 细胞总 RNA,逆转录反应得到 cDNA;以引物 P1、P2 及高保真 DNA 聚合酶 HF-2,利用 PCR 反应扩增 hCB2 片段,反应条件如下:94 ℃,4 min→(94 ℃,30 s →58 ℃,30 s→72 ℃,1 min)×40 循环→72 ℃,5 min;纯化 PCR 产物,以 *Hind* Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ酶切并纯化;同时以 *Hind* Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ酶切质粒 pFlag-CMV-3 并纯化;以 T_4 DNA 连接酶将 hCB2 片段和线性化的质粒载体连接,筛选出阳性克隆。

1.2.3 pFlag-hCB2 的测序鉴定 根据质粒 pFlag-CMV-3 的序列设计上、下游测序引物如下,上游引物:5′- AATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGAC-3′,下游引物:5′- AACTTGCCCCTTGCTCCATACCAC-3′;引物合成及质粒测序均由美国密西根州立大学基因技术中心完成。

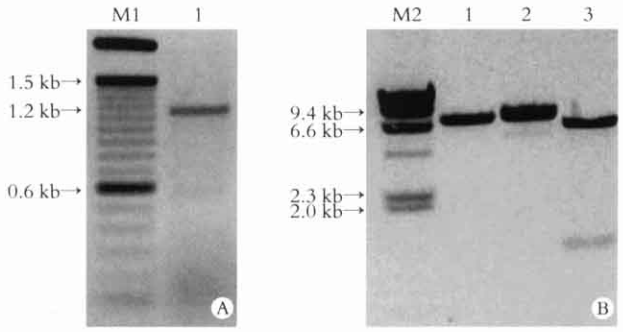
1.2.4 pFlag-hCB2 的表达 以脂质体转染试剂 Lipofectamine2000,按试剂说明书要求,将 pFlag-hCB2 及对照质粒 pFlag-BAP 转染进入 HEK293 细胞,48 h 后收获细胞并以 RIPA 缓冲液制备蛋白样本,以 Western blot 方法进行检测,其步骤简述如下:蛋白样品于 55 ℃变性15 min,PAGE 电泳后转膜,以含 4% 脱脂牛奶和 1% BSA 的 0.15% TBST 封闭 3 h;与 Anti-Flag 或 Anti-CB2 结合 1 h,与二抗结合 30 min,以增强化学发光法(ECL)检测结果。

1.2.5 稳定表达细胞株的筛选及鉴定 以 Lipofectamine2000 将 pFlag-hCB2 转染 293 细胞;48 h 后,以 0.25% 胰酶消化细胞,并重悬于含 0.81% 甲基纤维素、1 mg/ml G418 的 DMEM 完全培养液中;4 d 后挑出孤立生长的细胞团单独培养于含 1 mg/ml G418 的 DMEM 完全培养液中;当细胞生长达到一定数目,取部分细胞制备蛋白标本,重复步骤 1.2.4,以 Western blot 检测 Flag-hCB2 的表达;取阳性克隆扩增、保存。

2 结果

2.1 质粒 pFlag-hCB2 的克隆及鉴定

以人 T 淋巴细胞株 HPB-ALL 的总 RNA 进行 RT-PCR,所得 hCB2 扩增产物的特异性较好,片段长度与预期一致,见图 1A;将该条带核酸纯化、酶切并连接进入质粒载体 pFlag-CMV-3 后,所得目标质粒 pFlag-hCB2 经 *Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ酶切鉴定后,其分子量与预期一致,见图 1B;目标质粒经测序鉴定后,其所含 hCB2 序列与 GenBank 中的相应序列(NM_001841)同源性为 100%。

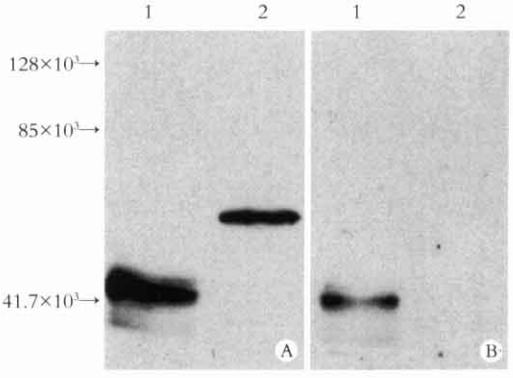


A:以 hCB2 克隆引物进行 RT-PCR 所得产物的电泳结果 M1:100 bp DNA 分子量标记;1:hCB2 的 PCR 产物(约 1.2 kb);B:目标质粒 pFlag-hCB2(约 8.6 kb)的酶切鉴定结果 M2:λDNA/*Hind* Ⅲ DNA 分子量标记;1:*Bam*H Ⅰ酶切;2:*Hind* Ⅲ酶切;3:*Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切

图 1 质粒 pFlag-hCB2 的克隆及鉴定

2.2 pFlag-hCB2 的蛋白表达及鉴定

以全细胞蛋白样品进行 Western blot 检测的结果见图 2,其中图 2A 所用的一抗为 Anti-Flag,图 2B 所用的一抗为 Anti-CB2。图 2A 中 Anti-Flag 的阳性对照 Flag-BAP 条带的蛋白相对分子质量约为 60×10^3,与说明书一致,说明 Anti-Flag 有效;而 Anti-CB2 所检测到的 Flag-hCB2 条带与 Anti-Flag 所检测到的一致,蛋白相对分子质量约为 43×10^3,说明目标条带即是 Flag-hCB2 蛋白。

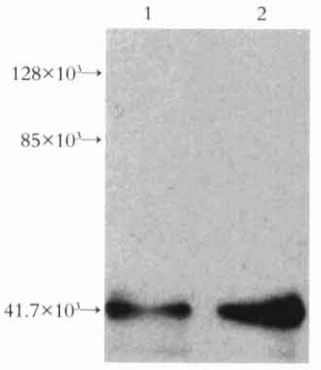


A:Anti-Flag 检测的结果;B:Anti-CB2 检测的结果
1:pFlag-hCB2 转染的 HEK293 细胞;2:Flag 阳性参照质粒 pFlag-BAP 转染的 HEK293 细胞

图 2 pFlag-hCB2 蛋白表达的 Western blot 检测结果

2.3 稳定表达细胞株的鉴定

以 G418 筛选出稳定细胞株后,制备全细胞蛋白样品进行 Western blot 检测,结果表明稳定细胞株表达 Flag-hCB2(图 3);但在相同的蛋白上样量条件下,稳定细胞株 Flag-hCB2 的蛋白表达量远低于暂时性转染时细胞的表达量。



1：pFlag-hCB2 稳定转染的 HEK293 细胞；2：pFlag-hCB2 暂时性转染的 HEK293 细胞

图 3　pFlag-hCB2 在 HEK293 细胞中的稳定表达和暂时性表达

3　讨论

自 1990 年 CB1 受体被鉴定出来后[3]，Munro 等[4]于 1993 年从 HL-60 细胞株中鉴定了 CB2。这两种受体的序列同源性约为 44%，在结构上具有相当的相似之处，都有由 7 次跨膜所形成的 3 个亲脂性区域；配体结合能力也很相似，几乎都能与所有大麻类物质结合。

研究表明，CB1 主要分布于神经中枢，是大麻类物质产生神经、精神效应的物质基础；而 CB2 则主要分布于免疫系统，尤其以脾脏最高，其生理功能也与免疫系统功能有密切联系，主要呈现出抑制效应。如大麻天然组分中最有效的 Δ^9-THC 被证实对体液免疫功能和细胞免疫功能都具有抑制效应，表现在 Δ^9-THC 处理可显著抑制军团菌感染的 BALB/c 小鼠体内 T 细胞增殖，使 IFN-γ 和 IL-12 分泌减少，而 IL-4 分泌增加，导致 Th1/Th2 平衡往 Th2 方向移动，同时，IgG2a 抗体合成减少，最终使机体抵抗细菌感染能力下降[5]；另外，Δ^9-THC 处理可上调 IL-10 和 TGF-β 的合成，促进 BALB/c 小鼠体内移植肿瘤的生长[6]；以上结果在体外实验中也得到验证[7]。除此以外，内源性大麻物质 Anandamide（AEA）被证实在微摩尔浓度级别可抑制 B 细胞的分化，以及 T 细胞的功能，如 IL-2 分泌、对Ⅱ类 MHC 抗原的识别能力等[8]。

但也有研究者认为，现有研究所用大麻类物质的浓度大多远高于生理浓度（大麻吸食者血液内的浓度），而在较低浓度下，大麻类物质的生理效应还有待探讨。如 Derocq 等[9]发现纳摩浓度的大麻类物质对 B 细胞的生长有促进效应；而 Jan 等[10]发现 Cannabinol（CBN）对 T 细胞的调节效应与 T 细胞的活化状态有关。

在作用机制方面，CB2 是典型的 G 蛋白偶联受体，它既可以通过 $G\alpha_{i/o}$ 起作用，也可以通过 $G_{\beta\gamma}$ 起作用；其影响的信号通路较多，已知的包括：①抑制腺苷酸环化酶（AC）的活性，降低细胞内 cAMP 的浓度，该途径可被白喉毒素所抑制。②调节离子通道，包括调节蛋白激酶 A（PKA）控制的离子通道、激活 K^+ 通道、抑制电压门控 L、N、P 和 Q 型 Ca^{2+} 通道。③调节细胞内游离 Ca^{2+} 代谢。④调节局部黏附激酶（FAK）、MAPK 和 PI3K 等激酶信号途径。⑤调控即早基因的表达和蛋白合成。⑥调节一氧化氮合酶活性等。

有鉴于此，本研究克隆了人 CB2 受体，构建了稳定表达细胞株，并利用蛋白标记 Flag 的单克隆抗体和 CB2 多克隆抗体对质粒 pFlag-hCB2 的表达进行了平行检测，一方面证实 HEK293 细胞株能有效表达 CB2 受体，另一方面验证了 CB2 抗体（属多克隆抗体）的能效，为进一步研究各种大麻类物质与 CB2 受体相互作用提供了实验基础及细胞模型。

参考文献：

[1] Grotenhermen F. Pharmacology of cannabinoids[J]. Neuro Endocrinol Lett, 2004, 25(1-2): 14-23.

[2] 夏　红，时颖华. 加拿大批准大麻用于医疗[J]. 药物不良反应杂志，2002，(4)：275.

[3] Matsuda L A, Lolait S J, Brownstein M J, *et al*. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA[J]. Nature, 1990, 346(6284): 561-564.

[4] Munro S, Thomas K L, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids[J]. Nature, 1993, 365(6441): 61-65.

[5] Klein T W, Newton C A, Nakachi N, *et al*. Delta 9-tetrahydrocannabinol treatment suppresses immunity and early IFN-gamma, IL-12, and IL-12 receptor beta 2 responses to Legionella pneumophila infection [J]. J Immunol, 2000, 164(12): 6461-6466.

[6] Zhu L X, Sharma S, Stolina M, *et al*. Delta-9-tetrahydrocannabinol inhibits antitumor immunity by a CB2 receptor-mediated, cytokine-dependent pathway[J]. J Immunol, 2000, 165(1): 373-380.

[7] Roth M D, Baldwin G C, Tashkin D P. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on human immune function and host defense[J]. Chem Phys Lipids, 2002, 121(1-2): 229-239.

[8] Kaplan B L, Ouyang Y, Herring A, *et al*. Inhibition of leukocyte function and interleukin-2 gene expression by 2-methylarachidonyl-(2'-fluoroethyl)amide, a stable congener of the endogenous cannabinoid receptor ligand anandamide[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 205(2): 107-115.

[9] Derocq J M, Segui M, Marchand J, *et al*. Cannabinoids enhance human B-cell growth at low nanomolar concentrations[J]. FEBS Lett, 1995, 369(2-3): 177-182.

[10] Jan T R, Kaminski N E. Role of mitogen-activated protein kinases in the differential regulation of interleukin-2 by cannabinol[J]. J Leukoc Biol, 2001, 69(5): 841-849.

（编辑　邓强庭）