

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00896

稳定、高效表达人 MCHR2 的 SHG-44 细胞系的建立

张 琴,卜友泉,易发平,袁成福,袁 飞,宋方洲*
重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室,重庆 400016

[摘要] 目的:构建黑色素浓集激素受体 2(MCHR2)真核表达载体 pcDNA3.1(+)-MCHR2,转染 SHG-44 细胞,建立稳定、高效表达人 MCHR2 的 SHG-44 细胞系。方法:PCR 法从人胎脑 cDNA 文库扩增 MCHR2 全长 cDNA 片段。用基因重组方法将其克隆到 pcDNA3.1(+),构建真核表达载体 pcDNA3.1(+)-MCHR2,并用 Lipofectamine™ 转染到 SHG-44 细胞,通过 G418 筛选,建立稳定表达 MCHR2 的 SHG-44 细胞系,用 RT-PCR、Western 印迹及免疫荧光法检测 MCHR2 的表达。结果:扩增出 MCHR2 的全长 cDNA;成功构建 pcDNA3.1(+)-MCHR2;RT-PCR、Western 印迹及免疫荧光法检测到 MCHR2 的表达,提示成功建立了稳定、高表达 MCHR2 的 SHG-44 细胞株。结论:MCHR2-SHG-44 细胞株的建立为进一步研究 MCHR2 的功能奠定了良好的实验基础。

[关键词] MCHR2;真核表达载体;稳定转染的 SHG-44 细胞系;基因表达

[中图分类号] R 338.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)08-0896-04

Establishment of SHG-44 cell line stably and highly expressing MCHR2

ZHANG Qin, BU You-quan, YI Fa-ping, YUAN Cheng-fu, YUAN Fei, SONG Fang-zhou*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[ABSTRACT] **Objective:** To construct a eukaryotic expressing vector harboring human melanin-concentrating hormone receptor 2 (MCHR2) and to establish a SHG-44 cell line stably and highly expressing MCHR2. **Methods:** The full-length MCHR2 cDNA fragment was amplified from the human fetal brain cDNA library by PCR and was cloned into pcDNA3.1(+) to construct eukaryotic vector pcDNA3.1(+)/MCHR2; the latter was then transduced into SHG-44 cells by Lipofectamine™. After screening culture by G418, SHG-44 cells stably expressing MCHR2 were established. The transcription and expression of MCHR2 was identified by RT-PCR, Western blotting and immunofluorescence. **Results:** The full-length MCHR2 cDNA fragment was amplified and the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)/MCHR2 was successfully constructed. The expression of MCHR2 was found positive by RT-PCR, Western blotting and immunofluorescence, indicating that the SHG-44 cell line stably and highly expressing MCHR2 was successfully established. **Conclusion:** The successful establishment of MCHR2-SHG-44 cell line provides a solid foundation for further study on MCHR2 function.

[KEY WORDS] MCHR2; eukaryotic expression vector; stable transfected SHG-44 cell line; gene expression

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(8): 896-899]

肥胖是一种营养代谢性疾病,其发病率在全世界逐年上升,已经成为一个全球性的健康问题。新近发现的下丘脑肽黑色素浓集激素(melanin-concentrating hormone, MCH)能调节能量代谢,增进食欲,与肥胖关系密切。目前的研究已发现 MCH 有 2 个受体亚型——MCHR1 和 MCHR2,从而为肥胖的防治提供了新的靶点。

国外对 MCHR1 的研究较多,其与肥胖的关系也相当明确,而关于 MCHR2 的研究较少,对其功能也不明确。MCHR1 和 MCHR2 主要位于中枢神经系统,目前还很少用神经胶质瘤细胞对 MCHR2 进行研究。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,从而获得了能在真核细胞中组成性表达人

[收稿日期] 2008-03-22 **[接受日期]** 2008-04-24

[基金项目] 国家自然科学基金(30671008);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2007BA5012);国家外专局项目(20075000019)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30671008), Natural Science Foundation Project of Chongqing(CSTC2007BA5012) and State Administration of Foreign Expert Affair Foundation Project(20075000019)。

[作者简介] 张 琴,博士。E-mail:zg801128@sohu.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel:023-68485991, E-mail:fzsongcq@163.com

MCHR2 蛋白的 pcDNA3.1(+)/MCHR2 表达载体。将该载体转染神经胶质瘤细胞 SHG-44 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 SHG-44 细胞系,为 MCHR2 的功能研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂 人胎脑 cDNA 文库购自 Clontech 公司。菌株 *E. coli* DH5 α , 质粒 pcDNA3.1(+)和 SHG-44 细胞由本教研室保存。RT-PCR 试剂盒购自 TOYOBO 公司;高保真 *Taq* DNA 多聚酶 mixture, PCR mixture 购自东盛公司,高效 T_4 DNA 连接酶、限制性内切酶(*Hind* III, *Bam* H I)等工具酶均购于 TaKaRa 公司;凝胶回收试剂盒购自 Biotech 公司,质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;脂质体 LipofectamineTM 2000 为 Invitrogen 公司产品;G418 购自 Amresco 公司;总 RNA 抽提液 TRIzol 购自北京鼎国公司;MCHR2 的抗体购自 Santa Cruz 公司,HRP 标记的马抗羊 IgG 和 FITC 标记的兔抗羊 IgG 购自北京鼎国公司。膜蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物。所需引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 人 MCHR2 cDNA 的扩增 以人胎脑 cDNA 文库为模板,采用 PCR 的方法扩增人 MCHR2 cDNA 的编码区,全长为 1 023 bp。上游引物:5'-ccc aag ctt GCC ATG AAT CCA TTT CAT GC-3';下游引物:5'-cgc gga tcc CTA AAA GTG TGA TTT CAG AGT G-3'。其中分别在上游和下游引物的 5' 端加上了 *Hind* III 和 *Bam* H I 酶切位点和 3 个保护碱基,并且在起始密码前添加了 Kozak 序列(GCC)。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s \rightarrow 30 个循环);72 $^{\circ}$ C 继续延伸 5 min。电泳初步鉴定 PCR 产物并用试剂盒纯化 PCR 产物。

1.3 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的构建 将上述 PCR 产物和 pcDNA3.1(+)质粒分别用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切,用高效 T_4 DNA 连接酶连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态,氨苄西林筛选培养,挑取阳性克隆扩增后提取质粒进行 PCR 和 DNA 测序鉴定。其构建的质粒如图 1。

1.4 稳定转染人 MCHR2 的 SHG-44 细胞系的建立 参照 LipofectamineTM 2000 操作说明书将重组表达载体 pcDNA3.1(+)/MCHR2 转染到 SHG-44 细胞。同时设转染空质粒 pcDNA3.1(+)的 SHG-44 细胞对照。转染 48 h 后,在含有 400 μ g/ml

G418 的选择性培养基中加压筛选 6 d,用胰蛋白酶将细胞消化并制备成单细胞悬液,接种到 10 cm^2 培养皿,培养 10 d 后,在显微镜下挑选单克隆,获得具有抗生素抗性的阳性细胞克隆,扩增培养 3 代后即 为稳定表达人 MCHR2 的 SHG-44 细胞系,命名为 MCHR2-SHG-44 细胞。

图 1 pcDNA3.1(+)/MCHR2 图谱

Fig 1 Map of pcDNA3.1(+)/MCHR2 construction

1.5 RT-PCR 检测细胞 MCHR2 表达 提取 MCHR2-SHG-44 细胞及对照细胞总 RNA,按照 TOYOBO 说明书进行 cDNA 第一链的合成,以逆转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 反应。MCHR2 上下游引物分别是 p1:5'-TGC AAT CCC AGT GTA CCA AA-3', p2:5'-CCC ACA TAG AAG GCC AGT GT-3',反应产物长度为 152 bp;内参照 β -actin 上下游引物分别是 p1:5'-ACG AGA CCA CCT TCA ACT CCA TC-3', p2:5'-TAG AAG CAT TTG CGG TGG ACG A-3',扩增片段大小为 304 bp。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,再 94 $^{\circ}$ C 15 s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 15 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 20 s(30 个循环),最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。以 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,比较细胞 mRNA 水平表达差异。

1.6 Western 印迹检测 SHG-44 细胞 MCHR2 表达 收集 2×10^7 转染细胞,按膜蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白,取 30 μ g 处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 并电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温振荡封闭 1 h, MCHR2 抗体(质量浓度 1 μ g/ml)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,HRP 标记的二抗(200 ng/ml)室温孵育 2 h,化学发光法检测目的蛋白,选用 β -actin 为内参照。

1.7 免疫荧光检查 将 SHG-44 MCHR2 细胞及对照细胞以 5×10^4 /ml 密度种植在 24 孔板中,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 15 min,5% 兔血清封闭 1

h,用羊抗人 MCHR2 一抗 4℃湿盒中孵育过夜, FITC 标记的兔抗羊 IgG 室温避光孵育 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 人 MCHR2 cDNA 的扩增 以人胎脑 cDNA 文库为模板进行 PCR 扩增出的人 MCHR2 cDNA 见图 2,大小与预期相符。

图 2 MCHR2 cDNA 的扩增

Fig 2 Amplification of MCHR2 cDNA

M: DL2000;1:MCHR2 cDNA

2.2 真核表达载体 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的鉴定 质粒重组后挑选 6 个单克隆进行 PCR 鉴定,结果在 152 bp 处均有条带,与预期结果一致(图 3)。测序结果与 GenBank 中 NM-001040179 的 MCHR2 cDNA 序列完全一致,说明表达载体构建成功。

图 3 pcDNA3.1(+)/MCHR2 PCR 鉴定结果

Fig 3 Identification of pcDNA3.1(+)/MCHR2 by PCR

1-6:PCR product;M:Marker

2.3 SHG-44 细胞克隆中 MCHR2 mRNA 水平的表达 RT-PCR 结果如图 4 所示:稳定转染 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的 SHG-44 细胞其总 RNA 经 RT-PCR 能扩增出代表 MCHR2 基因(152 bp)及内参 β -actin 基因(304 bp)的条带,而稳定转染 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的 SHG-44 细胞仅能扩增出代表内参 β -actin 基因(304 bp)条带,说明在 mRNA 水平

上,MCHR2 基因在 MCHR2-SHG-44 细胞中得到了较高表达。

图 4 RT-PCR 分析结果

Fig 4 The result of RT-PCR

1,3:Cells transfected pcDNA3.1(+)/MCHR2;2,4:Cells transfected pcDNA3.1(+);M:Marker

2.4 SHG-44 细胞克隆中 MCHR2 蛋白水平的表达 Western 印迹检测结果如图 5 所示:稳定转染 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的细胞能检测到 MCHR2 的表达,而对照细胞则没有相应的条带,表明在蛋白水平上,MCHR2 基因在 MCHR2-SHG-44 细胞中得到了较高表达。

图 5 MCHR2 基因蛋白水平的 Western 印迹分析结果

Fig 5 Western blotting analysis of MCHR2 protein expression

1:Cells transfected pcDNA3.1(+); 2:Cells transfected pcDNA3.1(+)/MCHR2

2.5 免疫荧光结果 在稳定转染 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的 SHG-44 细胞中可以清楚看到细胞膜上有荧光表达(图 6A),而对照细胞只有很微弱的荧光表达(图 6B)。表明 MCHR2 在稳定细胞株中定位正确,稳定细胞株 MCHR2-SHG-44 构建成功。

图 6 免疫荧光分析 MCHR2-SHG-44 细胞(A)和对照组细胞(B)

Fig 6 MCHR2-SHG-44(A) and control(B) cells analyzed by cell immunofluorescence

3 讨论

MCH 与肥胖的关系非常密切^[1]。目前已经克隆出 2 种 MCH 受体: MCHR1 和 MCHR2。MCHR1 与 MCHR2 分别由 353 和 340 个氨基酸残基组成,都是有 7 个跨膜 α 螺旋的 G 蛋白偶联受体超家族(GPCRs) I 类成员。MCHR1 主要分布于大脑皮质、海马、丘脑、中脑、脑桥及下丘脑的腹内侧核、背内侧核和弓状核,可在啮齿类及多种高等动物体内表达。MCHR2 主要分布于大脑皮质、海马、下丘脑,不能在啮齿动物体内表达,目前发现 MCHR2 只在人、恒河猴、犬、野猪、白鼬中有表达^[2-3]。2 种受体的分布区域都与摄食中枢、能量代谢及情绪调节有关。动物模型证实 MCHR1 与肥胖、焦虑及抑郁密切相关^[4],MCHR1 基因敲除的小鼠瘦弱,活动增加,另外,这些受体敲除小鼠摄食增加,代谢改变,并对饮食所致的肥胖有抵制作用^[4]。Wermter 等^[5]对人 MCHR1 基因 SNPs 研究发现它可能与青少年肥胖有关。目前有很多关于 MCHR1 拮抗剂研究,这些拮抗剂有望用于肥胖治疗^[6-7]。对于 MCHR2 的研究,由于受动物模型的局限,进展相当缓慢。Meyre 等^[8]发现 MCHR2 可能是引起儿童肥胖的候选基因之一,这为 MCHR2 的功能研究提供了有利的方向。但 Ghossaini 等^[9]对人 MCHR2 基因 SNPs 研究后未能证实它与肥胖的关系,因此 MCHR2 基因的功能还有待进一步研究。

MCHR1 与 MCHR2 主要表达于中枢神经系统,而目前国外对 MCH 受体的研究主要是采用 HEK293、CHO 及 COS-7 等细胞。Fry 等^[10]研究发现神经瘤细胞株 IMR32 能表达 MCHR1 基因,从而为 MCHR1 基因的研究提供了细胞模型。但目前还没有在神经瘤细胞或神经胶质瘤细胞中研究 MCHR2 基因的相关报道。SHG-44 细胞是一种神经胶质瘤细胞,它来源于人的大脑皮质,与 MCHR2 的表达部位一致,所以选用该细胞株对 MCHR2 进行研究更符合 MCHR2 存在的环境。同时,前期工作中通过 RT-PCR 证实 SHG-44 细胞中本身表达 MCHR2 基因,只是表达量较低,PCR 反应需要 40 个循环才能扩增出来。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,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 SHG-44 细胞,通过 G418 筛选成功地建立了一个在基因组 DNA 中稳定整合有 pcDNA3.1(+)/MCHR2 的

SHG-44 细胞克隆,将该细胞克隆扩增后提取总 RNA 和蛋白,并利用 RT-PCR、Western 印迹和免疫荧光法检测到 MCHR2 基因在 mRNA 和蛋白水平均有表达。该细胞系可稳定传 20 代。

综上所述,本研究建立了在基因组 DNA 中稳定整合有 pcDNA3.1(+)/MCHR2 载体的 SHG-44 细胞系,为 MCHR2 基因的功能研究提供了一个很好的细胞模型,也为研究 MCHR2 作用的下游靶基因和揭示 MCHR2 的功能提供了有利的工具。

[参考文献]

- [1] Segal-Lieberman G, Bradley R L, Kokkotou E, Carlson M, Trombly D J, Wang X, et al. Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 10085-10090.
- [2] Wang S, Behan J, O'Neill K, Weig B, Fried S, Laz T, et al. Identification and pharmacological characterization of a novel human melanin-concentrating hormone receptor, MCHR-2 [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 34664-34670.
- [3] An S Z, Cutler G, Zhao J G, Huang S G, Tian H, Li W, et al. Identification and characterization of a melanin-concentrating hormone receptor [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 7576-7581.
- [4] Marsh D J, Weingarh D T, Novi D E, Chen H Y, Trumbaue M E, Chen A S, et al. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 3240-3245.
- [5] Wermter A K, Reichwald K, Büch T, Geller F, Platzer C, Huse K, et al. Mutation analysis of the MCHR1 gene in human obesity [J]. Eur J Endocrinol, 2005, 152: 851-862.
- [6] Rivera G, Bocanegra-García V, Galiano S, Cirauqui N, Ceras J, Pérez S, et al. Melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonists: a new perspective for the pharmacologic treatment of obesity [J]. Curr Med Chem, 2008, 15: 1025-1043.
- [7] De Vita R J. Aminoquinoline melanin-concentrating hormone 1-receptor (MCH1-R) antagonists [J]. Curr Top Med Chem, 2007, 7: 1433-1439.
- [8] Meyre D, Lecoer C, Delplague J, Francke S, Vatin V, Durand E, et al. A genome-wide scan for childhood obesity-associated traits in french families shows significant linkage on chromosome 6q22. 31-q23. 2 [J]. Diabetes, 2004, 53: 803-811.
- [9] Ghossaini M, Vatin V, Lecoer C, Abkevich V, Younus A, Samson C, et al. Genetic study of the melanin-concentrating hormone receptor 2 (MCHR2) in childhood and adulthood severe obesity [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92: 4403-4409.
- [10] Fry D, Dayton B, Brodjian S, Ogiela C, Sidorowicz H, Frost L J, et al. Characterization of a neuronal cell line expressing native human melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) [J]. Intern J Biochem Cell Biol, 2006, 38: 1290-1299.

[本文编辑] 尹 茶