

MC4R 与 *Leptin*、MC3R 和 CCKAR 基因的互作研究

张冬杰 汪 亮 刘 娣

(黑龙江省农业科学院 畜牧研究所 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 为了研究 4 个与采食量相关功能基因可能存在的互作关系,采用基因重组的方法构建了黑素皮质激素受体-4(*MC4R*) 基因的真核表达载体,采用脂质体法将该表达载体转染入成纤维细胞,瞬时转染 24 h 后,采用 Real-time PCR 的方法检测和分析了 *Leptin*、黑素皮质激素受体-3(*MC3R*) 和猪缩胆囊素受体(*CCKAR*) 基因 mRNA 的表达变化情况。结果表明,在成纤维细胞中,过表达 *MC4R* 基因后,*Leptin*、*MC3R* 和 *CCKAR* 基因的 mRNA 水平均无显著变化。据此推测,*MC4R* 基因与其他 3 个基因虽都参与调节动物的采食量,但很可能是通过不同的调控路径来发挥功能的。

关键词: 猪;成纤维细胞;*MC4R*; Real-time PCR; 过表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)03-0072-03

The Interaction of *MC4R* with *Leptin*, *MC3R* and *CCKAR* Genes

ZHANG Dong-jie, WANG Liang, LIU Di

(Institute of Animal Husbandry, Heilongjiang Academy of
Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: To study the potential relationships among the four genes associated with intake, recombinant method was used to build a Melanocortin receptor-4 (*MC4R*) gene eukaryotic expression vector. The expression vector was transfected into fibroblasts by liposome method. Transient transfection after 24 h, Real-time PCR method was used to detect and analyze *Leptin*, *MC3R* and *CCKAR* mRNA expression changes. The results showed that, in fibroblasts, overexpression of *MC4R* gene, *Leptin*, *MC3R* and *CCKAR* mRNA levels were not significantly changed. Presumed that although these four genes are all involved in the regulation of animal feed intake, but they are likely to be regulated by a different pathway.

Key words: Pig; Fibroblasts; *MC4R*; Real-time PCR; Overexpression

动物采食量的高低直接影响到动物的生产效率和饲料利用率。采食量太低,不利于动物发挥最佳生产性能;相反,如果采食量太高,动物不能完全消化吸收,不仅造成饲料浪费,还容易引起营养代谢性疾病。适宜的采食量是获得最大生产效率的前提,也是动物健康生长的保障,但是采食量的调控是体内非常复杂的调控系统之一,了解采食量的调控机理对于改进饲养条件、提高品种选育速度以及增加养殖效益等尤为重要。本试验选择了 4 个与猪的采食量密切相关的功能基因进行了研究。

黑素皮质激素受体-4(Melanocortin-4 Receptor, *MC4R*) 基因属于 G-蛋白偶联受体超家族的成员,在体重、能量稳态和采食量的调控中发挥重要的作用。猪的 *MC4R* 基因第 7 跨膜结构功能域的一个高度保

守区的 G894A 突变导致 Asn 298 Asp 错义突变,与猪的背膘厚、生长速率和采食量呈显著关联^[1]。*Leptin* 是肥胖基因(*ob* 基因)的产物,由脂肪细胞分泌,它与动物的采食量、代谢调控及繁殖有关^[2]。*MC3R* 与 *MC4R* 同属于 G 蛋白偶联受体的一个亚家族,主要在中枢神经系统(CNS)中发现,众多的研究表明,*MC3R* 基因与维持能量的稳态有关^[3],可能与不依赖胰岛素肥胖的候选基因受体有关,对调节采食行为有重要的作用^[4]。猪缩胆囊素受体(Cholecystokinin A receptor, *CCKAR*) 属于 G 蛋白偶联受体的超家族成员,主要分布于外周组织,兴奋时引起胰液及胆汁分泌,胆囊收缩和抑制胃排空。在动物采食量、饱度以及肥胖方面起调节控制作用^[5]。本研究以 *MC4R* 基因为目的基因,在成纤维细胞中研究

收稿日期: 2012-03-24

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08006-003); 现代农业产业技术体系(CARS-36)

作者简介: 张冬杰(1980-),女,黑龙江桦南人,副研究员,博士,主要从事猪分子遗传育种研究。

通讯作者: 刘 娣(1963-),女,吉林长春人,教授,博士,主要从事猪遗传育种及家畜生物技术研究。

了过表达 *MC4R* 基因后 *Leptin*、*MC3R* 和 *CCKAR* 基因 mRNA 的表达变化情况。

1 材料和方法

1.1 试验材料

猪的成纤维细胞购自北京构思特生物公司,反转录试剂盒(High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits)和荧光染料(SYBR® Green PCR Master Mix)均购自北京欧比特公司,荧光定量 PCR 使用美国生产的 Stratagene Mx3000p PCR 仪,DNA 浓度测定使用德国 Eppendorf 公司生产的 Biophotometer 紫外分光光度计。

1.2 试验方法

1.2.1 *PMD18-T-MC4R* 克隆测序载体的构建 根据 GenBank 上已登录的猪的 *MC4R* 基因序列设计引物,用以扩增猪的 *MC4R* 基因的完整 CDS 区。所设计引物序列如下: MC4RF: 5'-CC AAGCTT ATG AACTCAACCCATCACCA-3'; MC4RR: 5'-CG GGATCC TTAATATCTGCTAGACAAATCACA-3'。M1 的 5'端引入 *Hind* III 酶切位点(用方框标出),M2 的 5'端引入 *Bam*H I 酶切位点(用方框标出)。PCR 反应扩增出目的条带后,将目的条带回收并与 T 载体连接构建成为 *pMD18-T-MC4R* 中间载体,转化入大肠杆菌 DH5 α 后,培养 12 h,挑取阳性菌落,扩增并抽提质粒 DNA,限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切鉴定,并送交北京华大公司测序。

1.2.2 *pcDNA3.1-MC4R* 真核表达载体的构建 将 *pcDNA3.1(+)* 空载体和测序正确的 *pMD18-T-MC4R* 阳性质粒同时分别用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切过夜,1% 琼脂糖凝胶电泳,将 *MC4R* 基因片段和 *pcDNA3.1* 线性化载体回收,使用 T4 连接酶,按照 3:1(V/V) 的比例,16℃ 过夜连接,构建成为表达质粒 *pcDNA3.1-MC4R*。将连接产物转化入大肠杆菌 DH5 α 后,培养 12 h,挑取阳性菌落,扩增并抽提质粒 DNA,限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切鉴定,并送交北京华大公司测序。

1.2.3 成纤维细胞的培养与转染 成纤维细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM/HIGH GLUCOSE(1 \times) 培养基中培养。转染前,将所培养细胞按照大约 4×10^5 细胞/孔传代于 24 孔板,待细胞生长汇合至 70% ~ 90% 时,即可进行下一步的转染试验。使用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂(Invitrogen),严格按照说明书操作流程,将 *pcDNA3.1-MC4R* 真核表达质粒转染入成纤维细胞。其中,表达质粒与脂质体的比例为 0.8 μ g 质粒:2 μ L 脂质体,最后用 50 μ L 血清作终浓

度稀释,转染 24 h 后收集细胞,提取细胞 RNA。

1.2.4 细胞 RNA 的提取与反转录 细胞培养结束后,3 000 ~ 4 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,使用冷 PBS 清洗细胞 2 次,然后使用 Trizol 试剂按照常规法进行细胞的 RNA 提取,将提取到的 RNA 用灭活的 DEPC 水溶解,测 OD 值, -70℃ 保存。cDNA 的获得:使用 ABI 公司生产的反转录试剂盒将所保存的 RNA 反转录成 cDNA。

1.2.5 Real-time PCR 反应 在成纤维细胞中,*MC4R* 基因瞬时过表达之后,*Leptin*、*MC3R* 和 *CCKAR* 基因在 mRNA 水平上的表达变化情况采用 Real-time PCR 的方法进行检测,使用 *GAPDH* 作为看家基因,检测用引物序列如下: MC4RF: 5'-TTTCGATTGCAGTGGACAGGTAT-3', MC4RR: 5'-ATGGTGAAGAACACGGTTATGAG-3' (GenBank 登录号 NM_214173); *Leptin*F: 5'-GCAGTCTGTCTCCTCCAAA-3', *Leptin*R: 5'-GGTTCTCCAGGTCATTCG-3' (GenBank 登录号 NM_213840); MC3RF: 5'-CACTCGCCCATGTACCTCTTCCTC-3', MC3RR: 5'-GCAGATCATGGAGTCCAAGACGTTG-3' (GenBank 登录号 NM_001123137); CCKARF: 5'-ACTGTGCTGATTGCGAACAAGAGG-3', CCKARR: 5'-CAGACGGCACTCCAA AGATGAA-3' (GenBank 登录号 XM_003356886); *GAPDH*F: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTGAACG-3', *GAPDH*R: 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGTG-3' (GenBank 登录号 NM_001206359)。

反应体系:上、下游引物各 0.8 μ L, Mix 10 μ L, 模板 0.8 μ L, H₂O 7.6 μ L, 共计 20 μ L。反应程序如下:95℃ 10 min, 95℃ 30 s, 60℃ 1 min, 40 个循环, 循环终止, 加熔解曲线。每个目的基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示, 其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因})_{\text{实验组}} - (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因})_{\text{对照组}}$ 。使用 SPSS 软件进行 *T* 检验。

1.2.6 ELISA 检测 转染 24 h 后,离心收集细胞,使用裂解液将细胞破碎后,严格按照猪黑素皮质素受体酶联免疫检测试剂盒的说明书操作,同时将细胞培养时的上清液也分别收集进行检测,最后通过标准曲线法计算细胞和上清中 *MC4R* 蛋白表达量。

2 结果与分析

2.1 *pcDNA3.1-MC4R* 真核表达载体双酶切鉴定

将所构建的 *pcDNA3.1-MC4R* 真核表达载体使用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切后,酶切结果见图 1,切下片段长约 1 000 bp,结合克隆测序结果,表明 *pcDNA3.1-MC4R* 真核表达载体构建成功。

2.2 ELISA 检测结果

MC4R 在转染 24 h 后细胞和上清中的表达水平见图 2。由图 2 可知 瞬时转染后 MC4R 蛋白水平与对照组相比 在上清液和细胞中的表达水平均显著升高 而且细胞中的表达水平要略高于上液清中的。

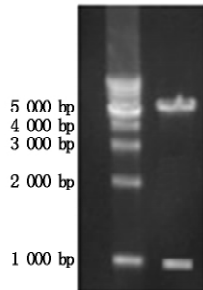
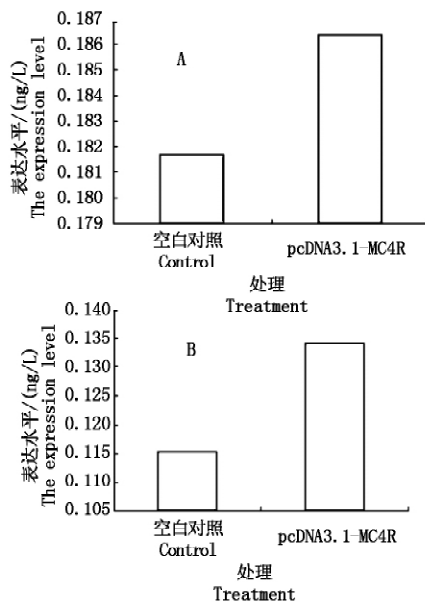


图 1 双酶切鉴定结果

Fig. 1 The result of double digestion restriction enzyme



A. MC4R 蛋白在成纤维细胞中的表达;
B. MC4R 蛋白在成纤维上清液中的表达

A. The expression level of MC4R protein in fibroblasts;
B. The expression level of MC4R protein in supernatant.

图 2 MC4R 蛋白在成纤维细胞和上清液中的表达水平

Fig. 2 The expression level of MC4R protein in fibroblasts and supernatant

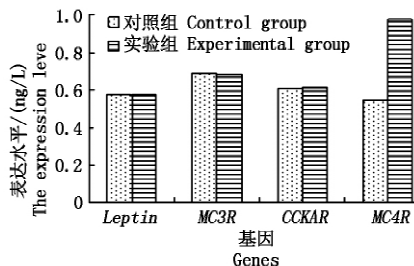


图 3 MC4R、Leptin、MC3R 和 CCKAR 基因的表达

Fig. 3 Expression level of MC4R, Leptin, MC3R and CCKAR genes

2.3 MC4R 基因过表达后其他基因的表达变化情况

在猪的成纤维细胞中过表达 MC4R 基因后 在 mRNA 水平上检测到 MC4R 基因的转录水平出现了

显著的提高($P < 0.05$) 而其他目的基因的表达水平均没有发生显著变化。具体检测结果如图 3 所示。

3 讨论

采食量是衡量动物摄入营养物质数量的尺度, 动物采食的营养物质只有满足了维持需要后, 多摄入的部分才能用于生产。动物的采食量存在短期调节和长期调节, 短期调节控制着每次采食的开始和终止。因为短期调节方式的存在, 动物不会出现完全禁食, 也不会出现无休止的摄食; 长期调节是指下丘脑对能量贮存的调节, 由于采食量长期调节机制的存在, 动物能够长期维持能量平衡。短期调节信号与长期调节信号均需中枢神经系统进行整合。关于动物采食量生理调节因子的研究在禽类上较为深入^[6], 其中 CCKAR 在禽类上为短期调节因子, Leptin 为长期调节因子, α -促黑激素(α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH) 为参与采食量调节的神经肽。

本研究所选择的 Leptin、MC3R、MC4R 和 CCKAR 均为参与调节采食量的生理因子, 但将其中的 MC4R 基因超表达后, 其余 3 个基因的表达水平均未发生显著变化, 据此推测, MC4R 基因与其他 3 个基因可能通过不同的调控途径对猪的采食量进行调节; MC4R 基因与其他 3 个基因之间可能不存在直接或间接的作用关系。但有报道称, 瘦素能增强后脑对短期饱感信号-胃肠肽胆囊收缩素(CCK)-的感应, 瘦素的存在使 CCK 能够正常激活孤束核(NTS)神经元, NTS 是后脑接受和加工饱感信号的主要地方。CCK 与瘦素的功能密切相关, 它们相互作用调控动物的采食量和能量代谢^[7], 而 CCK 需要与其受体(CCKAR 或 CCKBR) 结合才能发挥作用, 所以 CCKAR 和 Leptin 之间可能存在一定的互作关系。

参考文献:

- [1] 韩雪蕾, 杨华威, 王维民, 等. 猪 IGF2、MC4R、JHDM1A 及 TEF1 多基因标记遗传效应研究[J]. 中国农业科学 2011, 44(8): 1694-1701.
- [2] 许梓荣, 赵国芬, 郑家茂. Leptin 生物学功能的研究进展及其应用前景[J]. 动物营养学报 2001, 13(1): 1-5.
- [3] 王彦, 苏毅, 刘益平等. 鸡 MC3R 基因多态性及其与屠体和肉质性状的相关性[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(10): 1027-1031.
- [4] Levine A S. From melanoma to obesity: the many roles of the melanocortins[J]. Trends in Endocrinol Metab 2001, 12(1): 41-42.
- [5] 谭岳华, 黄生强. CCK、CCKAR 对动物采食量影响的研究进展[J]. 国外畜牧学-猪与禽 2008, 28(5): 69-71.
- [6] 黄金秀, 吕林, 张亿一, 等. 禽类采食量生理调节因子的研究进展[J]. 动物营养学报 2006, 18(增刊): 353-360.
- [7] 桑军亮, 田科雄. 瘦素调节动物采食量及能量代谢的研究进展[J]. 饲料与畜牧 2011(2): 15-18.