

NK1R与5-HT1AR双重过表达SK-MEL-2稳转细胞株的构建

马裕添, 彭 赞, 尚 靖*, 岳芸芸*

中国药科大学中药学院, 江苏 南京

收稿日期: 2026年5月20日; 录用日期: 2026年7月20日; 发布日期: 2026年7月30日

摘 要

目的: 构建神经激肽-1受体(NK1R)与5-羟色胺1A受体(5-HT1AR)双重过表达的SK-MEL-2稳转细胞株, 为色素性疾病的研究提供体外模型。方法: 采用聚合酶链式反应扩增目的基因, 将两种目的基因分别插入空载体GL215 pcSLenti-EF1-Puro-CMV-MCS-HA-WPRE和H5297 pLenti-CMV-EGFP-3xFLAG-PGK-BSR-WPRE中, 构建 pcSLenti-EF1-Puro-CMV-HTR1A-linker-mcherry-HA-WPRE 和 pLenti-CMV-TACR1-linker-EGFP-3xFLAG-PGK-BSR-WPRE慢病毒载体。采用慢病毒感染SK-MEL-2细胞, 并通过嘌呤霉素和杀稻瘟菌素筛选稳转株。利用荧光显微观察验证受体表达水平及膜定位特征。结果: 成功获得NK1R、5-HT1AR单过表达及双重过表达SK-MEL-2稳转细胞株。荧光显微观察显示单过表达细胞红色或绿色荧光清晰, 双重过表达细胞红色和绿色荧光均有表达且两荧光通道图像合并后呈黄色荧光, 阳性率 $\geq 90\%$, 且受体主要定位于细胞膜。结论: 成功建立了NK1R与5-HT1AR的单过表达和双重过表达的SK-MEL-2稳转细胞模型, 为色素性疾病机制研究和药物筛选提供了稳定可靠的体外平台。

关键词

NK1R, 5-HT1AR, 稳转细胞株, 慢病毒载体, 蛋白质二聚体

Construction of NK1R and 5-HT1AR Dual-Overexpressing SK-MEL-2 Stable Cell Lines

Yutian Ma, Zan Peng, Jing Shang*, Yunyun Yue*

School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: May 20, 2026; accepted: July 20, 2026; published: July 30, 2026

*通讯作者。

文章引用: 马裕添, 彭赞, 尚靖, 岳芸芸. NK1R与5-HT1AR双重过表达SK-MEL-2稳转细胞株的构建[J]. 生物医学, 2026, 16(4): 804-809. DOI: 10.12677/hjbm.2026.164082

Abstract

Objective: This paper aims to construct SK-MEL-2 stable cell lines with dual overexpression of neurokinin-1 receptor (NK1R) and 5-hydroxytryptamine 1A receptor (5-HT1AR), thereby providing a receptor-defined in vitro model for mechanistic studies of pigmentary disorders. **Methods:** The target genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and inserted into the lentiviral vectors GL215 pcSLenti-EF1-Puro-CMV-MCS-HA-WPRE and H5297 pLenti-CMV-EGFP-3xFLAG-PGK-BSR-WPRE, respectively, to construct pcSLenti-EF1-Puro-CMV-HTR1A-linker-mCherry-HA-WPRE and pLenti-CMV-TACR1-linker-EGFP-3xFLAG-PGK-BSR-WPRE lentiviral packaging plasmids. Lentiviruses were packaged in 293T cells and used to infect SK-MEL-2 cells. Single-overexpressing and dual-overexpressing stable cell lines were obtained through puromycin and blasticidin selection. The expression level and membrane localization of the receptors were verified by fluorescence microscopy. **Results:** SK-MEL-2 stable cell lines with single overexpression of NK1R or 5-HT1AR, as well as dual overexpression of NK1R and 5-HT1AR, were successfully established. Fluorescence microscopy showed clear red or green fluorescence in single-overexpressing cells, while yellow fluorescence was observed in the merged images of dual-overexpressing cells. The positive rate was $\geq 90\%$, and the receptors were mainly localized on the cell membrane. **Conclusion:** SK-MEL-2 stable cell models with single and dual overexpression of NK1R and 5-HT1AR were successfully established. These models provide a stable and reliable in vitro platform for mechanistic studies of pigmentary disorders and drug screening.

Keywords

NK1R, 5-HT1AR, Stable Cell Line, Lentiviral Vector, Protein Dimer

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

色素性疾病通常伴随黑色素细胞功能异常及黑色素合成失调, 对皮肤稳态和健康产生显著影响[1]。然而, 缺乏色素代谢性疾病的体外筛选模型, 限制了其机制研究。G 蛋白偶联受体(G Protein-Coupled Receptor, GPCR)在细胞外信号传导中起核心作用[2], 其异源二聚体或复合体可调控受体定位及信号特异性[3]。

NK1R 为 P 物质(Substance P, SP)的主要受体, 参与神经炎症及皮肤生理调控[4] [5]; 5-HT1AR 为血清素受体亚型之一, 参与神经内分泌及应激相关信号[6] [7]。已有研究表明, 两者可以形成二聚体, 在黑色素生成和皮肤稳态中可能存在协同作用[7]-[9]。SK-MEL-2 细胞来源于人黑色素瘤[10], 适合作为建立受体定义稳转株的体外平台。本研究旨在通过慢病毒载体构建 NK1R、5-HT1AR 单过表达及双重过表达稳转株, 为色素性疾病机制及药物筛选提供可重复、稳定的实验平台。

2. 材料与方法

2.1. 细胞株与培养

SK-MEL-2 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 培养于含 10%胎牛血清(FBS)和 1%青霉素/链霉素的 DMEM 中, 37℃、5% CO₂ 恒温培养, 取对数生长期细胞进行实验。

2.2. 质粒构建与验证

HTR1A-mCherry 慢病毒表达载体: 将 HTR1A ORF (来源于 NCBI NM_000609) 与 mCherry 同框融合, 通过 EcoRI/XbaI 位点克隆至 pcSLenti 慢病毒表达载体, 重组质粒经双酶切鉴定及 Sanger 测序验证。连接序列使用 GGGGS×3 linker, 保证融合蛋白柔性及功能完整。

NK1R-EGFP 慢病毒表达载体: 将 TACR1 ORF (来源于 NCBI NM_001058) 与 EGFP 同框融合, 通过 XhoI/EcoRI 位点克隆至 pLenti 慢病毒表达载体, 重组质粒经双酶切鉴定及 Sanger 测序验证。连接序列同样 GGGGS×3 linker。

2.3. 质粒转化和慢病毒包装

取 100 μL 感受态 DH5 α 置于冰上, 加入 0.5~2 μL 待转化质粒, 冰上静置 15~30 min。置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 立即置于冰上 2~3 min。随后加入 500~700 μL LB 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 rpm 振荡 40~60 min。取 50~80 μL 转化液涂布在含抗生素 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。使用标准钙磷酸盐法将载体与包装质粒共转染至 293T 细胞。72 h 收集上清液, 经 0.45 μm 滤膜过滤后浓缩。病毒滴度通过 qPCR 定量法测定, 最终滴度为 NK1R 慢病毒载体 4.3×10^8 TU/mL, 5-HT1AR 慢病毒载体 4.9×10^8 TU/mL。

2.4. 细胞感染与稳转株筛选

使用已构建的两种慢病毒载体感染 SK-MEL-2 细胞, 感染复数: NK1R 慢病毒载体为 20, 5-HT1AR 慢病毒载体为 40。72 h 后加入 1 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素和 5 $\mu\text{g/mL}$ 杀稻瘟菌素筛选, 筛选周期为 2 周, 期间每 2~3 天更换培养基一次直至获得荧光表达稳定、阳性率 $\geq 90\%$ 的稳转株。

2.5. 表达验证

荧光显微镜观察 GFP 和 mCherry 标记受体的表达及膜定位。记录荧光强度及阳性细胞比例。

3. 结果

3.1. 重组载体构建

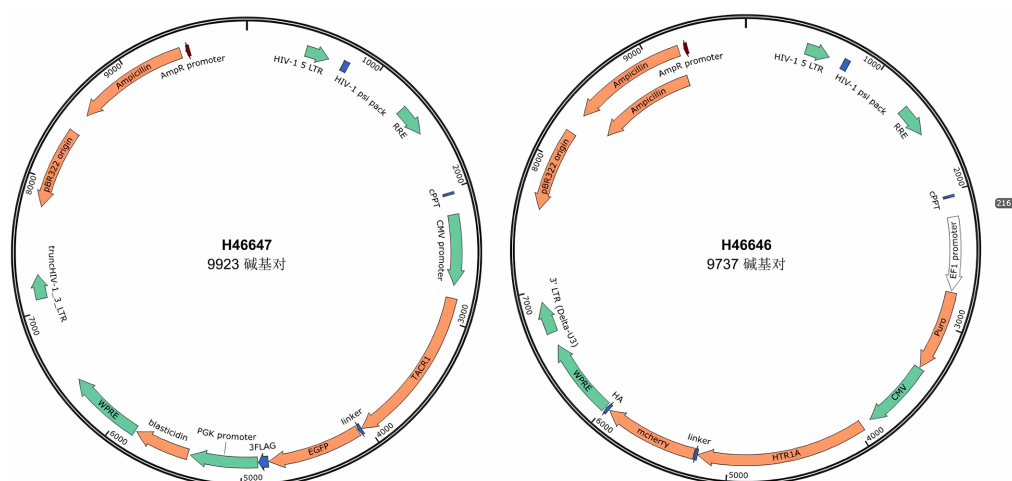


Figure 1. Plasmid maps of the fusion-type lentiviral constructs. Left: pcSLenti-EF1-Puro-CMV-HTR1A-linker-mCherry-HA-WPRE vector; right: pLenti-CMV-TACR1-linker-EGFP-3×FLAG-PGK-BSR-WPRE vector

图 1. 融合型慢病毒目的载体图谱。左: pcSLenti-EF1-Puro-CMV-HTR1A-linker-mCherry-HA-WPRE 载体图谱; 右: pLenti-CMV-TACR1-linker-EGFP-3×FLAG-PGK-BSR-WPRE 载体图谱

测序结果显示, HTR1A-linker-mCherry 与 TACR1-linker-EGFP 序列正确插入载体(图 1), 为后续慢病毒包装和感染提供基础。载体设计通过 linker 连接目标蛋白与荧光标签, 有利于后续膜定位观察。

3.2. NK1R 与 5-HT1AR 单过表达稳转株

SK-MEL-2 细胞分别感染 NK1R 与 5-HT1AR 慢病毒载体并经过两周的嘌呤霉素和杀稻瘟菌素筛选后, 荧光显微镜下可明显观察到红色荧光(图 2(a))和绿色荧光(图 2(b)), 证明 NK1R 过表达的 SK-MEL-2 细胞、5-HT1AR 过表达的 SK-MEL-2 细胞均已构建成功。

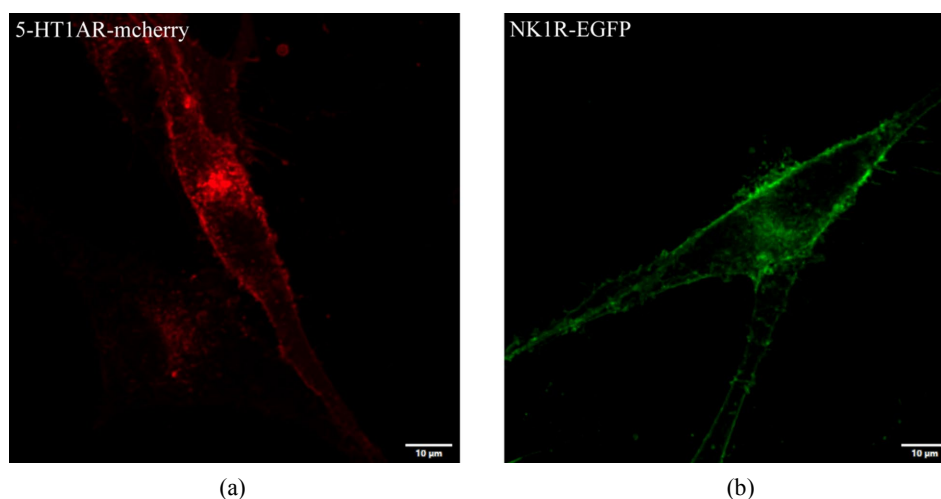


Figure 2. Fluorescence expression in single-receptor-overexpressing SK-MEL-2 cells after infection with fusion-type lentiviral vectors. (a) 5-HT1AR labeled with red fluorescence; (b) NK1R labeled with green fluorescence

图 2. 慢病毒感染 SK-MEL-2 细胞后荧光表达情况。(a) 携带红色荧光的 5-HT1AR; (B) 携带绿色荧光的 NK1R

3.3. NK1R 与 5-HT1AR 双过表达稳转株

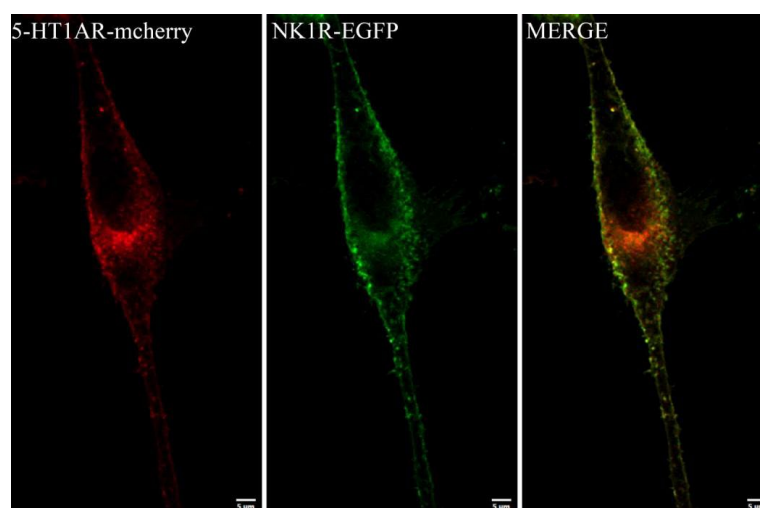


Figure 3. Fluorescent expression of NK1R/5-HT1AR dual receptor overexpression cell lines constructed using a fusion lentiviral system. (Left: 5-HT1AR labeled with red fluorescence; Middle: NK1R labeled with green fluorescence; Right: merged image of the red and green fluorescence channels)

图 3. 融合型慢病毒构建 NK1R/5-HT1AR 双受体过表达细胞系的荧光表达情况(左: 携带红色荧光的 5-HT1AR; 中: 携带绿色荧光的 NK1R; 右: 红色荧光通道和绿色荧光通道融合图)

SK-MEL-2 细胞同时感染 NK1R 与 5-HT1AR 慢病毒载体并经过两周的嘌呤霉素和杀稻瘟菌素筛选后, 荧光显微镜下可同时观察到红色荧光和绿色荧光, 合并图中可见细胞呈双阳性的黄色荧光, 提示双受体共定位良好(图 3)。结果提示 NK1R 和 5-HT1AR 双受体过表达的 SK-MEL-2 细胞构建成功。

4. 讨论

本研究通过慢病毒融合载体策略成功构建了 NK1R 与 5-HT1AR 双重过表达的 SK-MEL-2 稳转株[11]。据目前已检索文献, 相关双受体稳转模型报道较少。以往国内外相关研究多集中于单一 GPCR 受体的过表达或短期转染模型, 相对缺乏稳定且可长期维持双受体表达的体外研究模型。本研究所建立的双受体共表达模型, 初步实现了两种 GPCR 在同一细胞中的稳定表达及膜定位, 可为后续开展受体共定位、受体互作及相关信号通路研究提供实验基础[8]。

实验结果显示, 单受体及双受体稳转株均具有高阳性率($\geq 90\%$), 且受体主要定位于细胞膜, 提示该模型具备进一步开展受体表达及定位研究的条件。但本研究尚未进一步通过分子互作实验验证二者是否存在直接相互作用, 因此, 有关 NK1R 与 5-HT1AR 潜在互作关系及其功能意义仍需后续实验进一步证实。

本模型具有一定的后续应用潜力, 特别是在受体功能研究、信号通路分析及候选化合物作用评价方面。已有研究提示 NK1R 和 5-HT1AR 在黑色素生成、神经炎症及皮肤稳态调控中均发挥重要作用[4][7]-[9], 但本研究尚未直接检测双受体共表达对黑色素生成或相关功能指标的影响。因此, 本研究构建的双受体稳转株可作为后续探索两种受体协同作用、信号转导特征及药物作用机制的体外模型, 而其是否适用于高通量药物筛选或靶向验证仍需进一步通过功能实验和筛选体系验证[2][3][8]。

未来工作可进一步利用该模型探索双受体信号通路的动态变化、受体互作机制及其对黑色素生成的调控效应[3], 同时可开展化合物筛选和功能验证实验, 为靶向色素性疾病的药物研发提供前期实验依据和候选化合物评价参考。综上所述, 本研究构建的双 GPCR 稳转株为 NK1R 与 5-HT1AR 双受体共表达研究提供了较为稳定的体外实验工具, 也为后续机制研究及潜在药物作用评价奠定了实验基础。

5. 结论

本研究通过慢病毒载体介导的基因转导方式, 成功构建了 NK1R、5-HT1AR 单过表达及 NK1R/5-HT1AR 双重过表达的 SK-MEL-2 稳转细胞株。荧光显微观察结果显示, 单过表达细胞中相应荧光信号清晰, 双重过表达细胞中红色与绿色荧光信号能同时被检测到, 合并图像显示双阳性表达特征, 且阳性细胞比例较高, 提示目标受体在 SK-MEL-2 细胞中实现了稳定表达。

该稳转细胞模型为进一步研究 NK1R 与 5-HT1AR 在黑色素生成、受体共表达及相关信号调控中的作用提供了较为稳定的体外实验平台。与瞬时转染模型相比, 本研究所构建的稳转株具有表达相对稳定、可重复性较好、便于后续功能实验开展等特点, 可为后续受体共定位分析、信号通路检测、受体互作验证及候选化合物作用评价提供实验基础。

需要指出的是, 本研究主要完成了受体双重过表达细胞模型的构建与初步表达验证, 尚未进一步检测受体互作的分子机制及其对黑色素生成相关功能指标的影响。后续研究可在此基础上结合 Western blot、免疫荧光共定位、免疫共沉淀、BRET/FRET 等受体互作分析及黑色素含量检测等方法, 进一步明确 NK1R 与 5-HT1AR 双受体共表达对色素代谢调控的具体作用机制, 并评估该模型在药物筛选和靶向验证研究中的潜在应用价值。

基金项目

NK1R/5-HT1AR 蛋白相互作用在白癜风发病机制中的角色及干预研究(国家自然科学基金, H3513, no.82274035)。

参考文献

- [1] D'Mello, S.A.N., Finlay, G.J., Baguley, B.C. and Askarian-Amiri, M.E. (2016) Signaling Pathways in Melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, Article No. 1144. <https://doi.org/10.3390/ijms17071144>
- [2] Zhang, M.Y., Chen, T., Lu, X., Lan, X.B., Chen, Z.Q. and Lu, S.Y. (2024) G Protein-Coupled Receptors (GPCRs): Advances in Structures, Mechanisms and Drug Discovery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **9**, Article No. 88. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01803-6>
- [3] Milligan, G. (2009) G Protein - Coupled Receptor Hetero - Dimerization: Contribution to Pharmacology and Function. *British Journal of Pharmacology*, **158**, 5-14. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00169.x>
- [4] Steinhoff, M.S., von Mentzer, B., Geppetti, P., Pothoulakis, C. and Bunnett, N.W. (2014) Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. *Physiological Reviews*, **94**, 265-301. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2013>
- [5] Harris, J.A., Faust, B., Gondin, A.B., Dämgen, M.A., Suomivuori, C., Veldhuis, N.A., *et al.* (2022) Selective G Protein Signaling Driven by Substance P-Neurokinin Receptor Dynamics. *Nature Chemical Biology*, **18**, 109-115. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00890-8>
- [6] Albert, P.R. and Vahid-Ansari, F. (2019) The 5-HT1A Receptor: Signaling to Behavior. *Biochimie*, **161**, 34-45. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.015>
- [7] Wu, H.L., Pang, S.L., Liu, Q.Z., Wang, Q., Cai, M.X. and Shang, J. (2014) 5-HT1A/1B Receptors as Targets for Optimizing Pigmentary Responses in C57BL/6 Mouse Skin to Stress. *PLOS ONE*, **9**, e89663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089663>
- [8] Wu, H.L., Zhao, Y.C., Huang, Q.L., Cai, M.X., Pan, Q., Fu, M.S., *et al.* (2018) NK1R/5 - HT1AR Interaction Is Related to the Regulation of Melanogenesis. *The FASEB Journal*, **32**, 3193-3214. <https://doi.org/10.1096/fj.201700564rr>
- [9] Ping, F.F., Shang, J., Zhou, J., Song, J. and Zhang, L. (2012) Activation of Neurokinin-1 Receptor by Substance P Inhibits Melanogenesis in B16-F10 Melanoma Cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **44**, 2342-2348. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.09.025>
- [10] Fogh, J. and Trempe, G.L. (1975) New Human Tumor Cell Lines. In: Fogh, J., Ed., *Human Tumor Cells in Vitro*, Springer, 115-159. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1647-4_5
- [11] Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., *et al.* (1996) *In Vivo* Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Science*, **272**, 263-267. <https://doi.org/10.1126/science.272.5259.263>