

心脏疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002022

冠心病相关 SLC22A3 基因中新发现负性调控序列的性质与功能鉴定

何佳静¹, 夏云¹, 丁艳辉²

(重庆医科大学附属第一医院 1. 检验科; 2. 临床研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:拟对课题组前期发现的冠心病相关 SLC22A3 基因 intron7 区域中的 2 段 DNA 负性调控序列的性质及功能进行研究,以明确其为沉默子还是绝缘子。**方法:**利用生物信息学分析 2 段负性调控序列在所培养细胞系中的脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 的敏感性,并以包含人 SLC22A3 基因全长序列的细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)为模板,PCR 扩增 2 段负性调控序列,以 pGL3-Control 作为工具载体,将 2 段序列克隆入报告基因 Luciferase(LUC)的启动子与增强子之间以及增强子的下游,构建 4 组重组质粒,并以 pGL3-Control 质粒作为空白对照,与内参质粒 pRL-SV40 共转染人胚肾细胞 HEK293T,24 h 后检测荧光素酶活性。**结果:**2 段负性调控序列均位于 DNase I 超敏位点,明确了其为顺式调控元件的性质。4 组重组质粒 pGL3-con-SLCi7-447X、pGL3-con-SLCi7-447S、pGL3-con-SLCi7-460X 及 pGL3-con-SLCi7-460S 荧光素酶活性分别为 2.353 ± 0.323 、 3.046 ± 0.415 、 3.016 ± 0.119 、 3.833 ± 0.282 ,相较于空白对照 pGL3-Control(7.423 ± 0.230),荧光素酶活性均明显降低($P < 0.05$)。**结论:**SLC22A3 基因的 intron7 区域中存在 2 个负性调控元件,其负性调控作用不受位置的影响发挥沉默子调控功能,为进一步对冠心病相关 SLC22A3 基因的表达调控研究提供了理论依据。

【关键词】冠心病; SLC22A3 基因; 绝缘子; 沉默子; DNase I 超敏位点

【中图分类号】R541.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-01-13

Properties and function of newly discovered negative regulatory sequences in coronary heart disease-related SLC22A3 gene

He Jiajing¹, Xia Yun¹, Ding Yanhui²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Clinical Research Center, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the properties and function of two negative regulatory DNA sequences in intron 7 of the coronary heart disease-related SLC22A3 gene, and to determine if they are silencers or insulators. **Methods:** The DNase I sensitivity of the two negative regulatory sequences in the cultured cell lines was analyzed using bioinformatics. A bacterial artificial chromosome library containing the full-length human SLC22A3 gene was used as a template to amplify the two negative regulatory sequences by PCR. Using pGL3-Control as a vector, the two sequences were inserted between the promoter and the enhancer and the downstream of the enhancer of luciferase reporter gene to construct four recombinant plasmids. These plasmids were co-transfected together with the internal control plasmid pRL-SV40 into HEK293T cells. pGL3-Control was used as a blank control. The luciferase activity was determined in 24 hours. **Results:** The two negative regulatory sequences were both located in the DNase I hypersensitive sites, suggesting that they were both cis-regulatory elements. The four recombinant plasmids, pGL3-con-SLCi7-447X, pGL3-con-SLCi7-447S, pGL3-con-SLCi7-460X, and pGL3-con-SLCi7-460S, had significantly lower luciferase activities than the blank control (2.353 ± 0.323 , 3.046 ± 0.415 , 3.016 ± 0.119 , 3.833 ± 0.282 vs. 7.423 ± 0.230 , $P < 0.05$). **Conclusion:** Two negative regulatory elements are identified in intron 7 of the SLC22A3 gene. They act as silencers and their negative regulatory function is independent of their positions.

作者简介: 何佳静, Email: 459733381@qq.com,

研究方向: 分子遗传学。

通信作者: 夏云, Email: xiayun12cn@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81170189)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190327.0937.006.html>

(2019-03-27)

This study provides a theoretical basis for further research on regulation of expression of the coronary heart disease-related SLC22A3 gene.

【Key words】 coronary artery disease; SLC22A3 gene; insulator; silencer; DNase I hypersensitive site

冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary artery disease, CAD)简称冠心病。2012 年以来,中国居民冠心病死亡率呈上升趋势,且今后 10 年的患病人数仍将快速增长,其所带来的高致残率和高病死率在消耗国家公共资源的同时也阻碍着人们生活品质的提高^[1-4]。CAD 是一种遗传与环境因素共同引起的复杂性疾病,有许多未知基因或分子参与其中,形成错综复杂的调控网络。因此,探索 CAD 发生发展过程中发挥重要作用的调控分子和关键靶点,从而为其预防、诊疗提供理论依据具有重要作用。SLC22A3 是溶质载体超级家族的成员,位于 6p25.3。它编码有机阳离子转运蛋白 3(organic cation transporter 3, OCT3),通过介导其释放和摄取来调节细胞内组胺水平。组胺作为一种强烈的炎症介质,与动脉粥样硬化斑块的形成息息相关。本课题组前期发现 SLC22A3 基因 SNP rs2048327(A/G)位点与我国西南地区汉族人群 CAD 的发生具有相关性^[5]。在此基础上,本课题组还发现了 SLC22A3 基因 intron7 序列具有负性调控作用,继而在此区域成功定位了 2 段长度约 400 bp 的 DNA 负性调控序列,NO6.21 (NC_018917.2, 161124039 至 161124453)及 NO10.22 (NC_018917.2, 161126045 至 161126434)^[6-7]。目前国内外尚未有 2 段负性调控序列性质及相关功能的研究。顺式作用元件是存在于基因旁侧序列中能影响基因表达的序列,在真核基因功能作用的发挥中扮演重要角色,其中具有负性调控作用的有绝缘子和沉默子,两者通过与特异的转录调节因子结合,促使局部的染色质结构改变,从而抑制基因的表达^[8-9]。DNase I 超敏感位点(DNase I hypersensitive sites, DHSs)是对 DNase I 高度敏感的活性染色质区域。近年来的研究发现染色质对 DNase I 的敏感性与基因转录有关,进而可以影响真核基因的表达^[10]。目前, DHSs 的定位已经成为准确识别染色质上基因调控元件的有效方法。探究课题组前期发现的 2 段负性调控序列是否位于 DHSs,能进一步验证其调控元件的性质。具备增强子阻断活性的绝缘子元件仅在其位于启动子与增强子之间时,才具备阻断活性,即增强子阻断(enhancer blocking),而沉默子的负性调控作用不受位置的限制。据此,本研究拟在前期研究的基础上,对 SLC22A3 基因 intron7 区域存在的 2 段负性调控序列的性质与功能进行鉴定,以明确其为沉默子还是绝缘子。

1 材料与方法

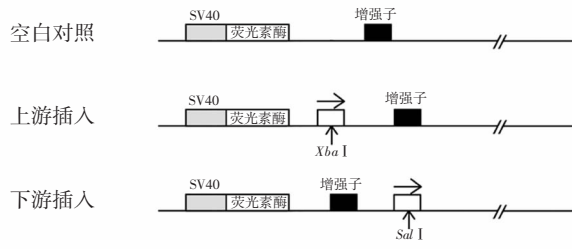
1.1 材料

含有人 SLC22A3 基因全长序列的细菌人工染色体 BAC (中国科学院);PCR 引物(上海生工);2 × TaqMaster Mix (北京世纪康为);PCR 产物纯化试剂盒(上海生工);琼脂糖试剂(法国 Biowest 公司);限制性内切酶 *Xba* I (宝日医公司),限制性内切酶 *Xho* I、*Hind* III、*Sal* I,限制性外切酶 Exonuclease III (*Exo* III)及相应的缓冲液(美国 Thermo Scientific 公司);质粒 pGL3-Control、pRL-SV40(美国 Promega 公司);大肠杆菌 DH5 α 、氨苄青霉素、质粒小提试剂盒(上海生工);人胚肾细胞 HEK293T(本实验室保存);DMEM 高糖培养液(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶(上海生工);胎牛血清(德国 PAN 公司);脂质体 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司);双荧光素酶检测试剂盒(美国 Promega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 负性调控序列的 DNase I 敏感性分析 用 Lifter 工具将 2 段目的序列转为 hg19 格式,从 ENCODE 计划(Encyclopedia of DNA Elements)数据库中下载 HEK293T 细胞系中 2 段目的序列及其上下游 100 bp 的 DNase I-seq 数据,运用 BigWigToBedGraph 软件提取信号值,探究目的序列是否处于 DNase I 超敏位点。

1.2.2 构建 pGL3-Control 系列重组质粒 所需构建的重组质粒关键区域如图 1 所示,为了保证目的片段插入方向,载体的构建采用同源重组的方法,将上、下游引物的 5' 端分别加入工具酶(上游选用 *Xba* I,下游选用 *Sal* I)及该酶切位点前后约 15 个碱基的载体序列作为同源臂(表 1)。以含有人 SLC22A3 基因全长序列的 BAC 为模板,PCR 扩增 2 段负性调控序列,产物分别为 SLCi7-447-X、SLCi7-447-S、SLCi7-460-X 及 SLCi7-460-S。PCR 反应体系:总共 50 μ L,模板 2 μ L,上下游引物各 1 μ L,10 × Buffer 5 μ L,2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L,Trans Taq HiFi DNA Polymerase(5 U/ μ L) 0.5 μ L,ddH₂O 36.5 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。所获产物经 1%琼脂糖凝胶电泳(110 V,25 min),确认为所需片段后,利用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收。质粒 pGL3-Control 分别用 *Xba* I 及 *Sal* I 酶切试剂盒纯化回收得到线性质粒 pGL3-Control-X 及 pGL3-Control-S。pGL3-Control-X 分别与 SLCi7-447-X、SLCi7-460-X,pGL3-Control-S 分别与 SLCi7-447-S、SLCi7-460-S 在 *Exo* III 外切酶的作用下,在冰上进行同源重组 60 min。利用 DH5 α 大肠杆菌感受态进行同源重组产物的转化,并行氨苄青霉素(ampicillin, Amp)抗性筛选;提取质粒,进行酶切鉴定后送测序获得重组质粒 pGL3-con-SLCi7-447X、pGL3-con-SLCi7-447S、pGL3-con-SLCi7-460X 及 pGL3-con-SLCi7-460S。



注:空白方块为插入序列;空白对照为 pGL3-Control 质粒

图 1 重组质粒构建示意图

表 1 插入片段引物序列

插入片段	引物序列 (5'→3')	产物长度 (bp)
SLCi7-447-X	F:GATCGCCGTGTAATTACATTTCGCTTAGTGGT	447
	R:CCGCCCGACTCTAGAACCAAAATTCACAAC	
SLCi7-447-S	F:TCCACAGCGGATCCGACATTTCGCTTAGTGGT	447
	R:AAGGGCATCGGTCGAAACCAAAATTCACAAC	
SLCi7-460-X	F:GATCGCCGTGTAATTCATACCTGTCTGCCATC	460
	R:CCGCCCGACTCTAGTGAGGTGGCCATAGACAT	
SLCi7-460-S	F:TCCACAGCGGATCCGCCATACCTGTCTGCCATC	460
	R:AAGGGCATCGGTCGATGAGGTGGCCATAGACAT	

注:下划线所示部分为同源臂;SLCi7-447-X、SLCi7-460-X 同源臂针对经 Xba I 线性化的 pGL3-Control 质粒;SLCi7-447-S、SLCi7-460-S 同源臂针对经 Sal I 线性化的 pGL3-Control 质粒

1.2.3 转染细胞 人胚肾 HEK293T 细胞在 5%CO₂、37 °C 恒温培养箱中,用含有 10%胎牛血清的高糖培养液 DMEM 进行传代培养。使用 0.05%胰蛋白酶消化细胞均匀铺于 24 孔板(1×10⁵ 个/孔)后继续培养 24 h,当细胞密度达 80%时,进行瞬时转染(待转质粒为 4 组重组质粒及空白对照 pGL3-Control 质粒并加入内质质粒 pRL-SV40)。详细转染步骤参照 Lipofectamine 2000 Reagent 说明书。每次每质粒设置 3 个复孔,进行 3 次独立重复实验。

1.2.4 荧光素酶活性检测 转染 24 h 后,参照双荧光素酶检测试剂盒说明书获取细胞裂解液;取 20 μL 细胞裂解上清液与 100 μL 荧光素酶分析试剂(luciferase assay reagent II ,LAR II)混匀,立即使用 GloMax 20/20 发光检测仪检测荧光信号 RLUS1 (pGL3 系列质粒携带的萤火虫荧光素酶激发底物所释放的荧光信号);加入 100 μL 终止液,混匀后立即检测荧光信号 RLUS2(内参照质粒 pRL-SV40 携带的海肾荧光素酶激发底物所释放的荧光信号),各组质粒转染细胞后的荧光素酶活性以 RLUS1/RLUS2 的比值表示,以消除组间转染效果差异的影响。

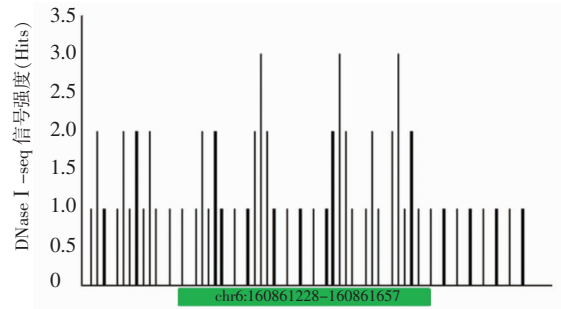
1.3 统计学处理

采用 SPSS 25.0 统计软件分析数据,荧光素酶活性用 3 次独立实验的均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析,组间差异使用 LSD-t 方法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

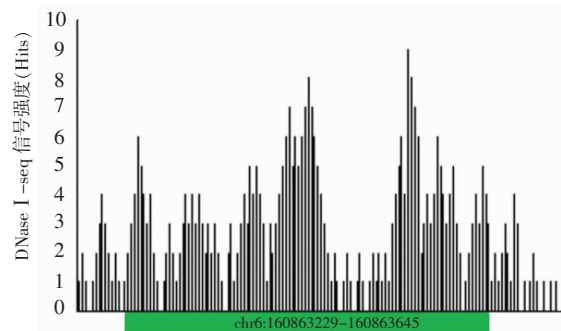
2.1 DNase I 敏感性分析

冠心病相关 SLC22A3 基因 intron7 区域的 2 段负性调控序列 NO6.21、NO10.22 如图 2、图 3 所示,均位于 DNase I 超敏位点。明确其顺式调控元件的性质。顺式调控元件中,具备负性调控作用的有绝缘子及沉默子,因此本研究设计了调控元件的功能鉴定试验。



注:X 轴表示 NO6.21 上下游各延伸 100 bp 的基因片段(填充区域为 NO6.21 片段),Y 轴表示 DNase I-seq 信号强度

图 2 NO6.21 的 DNase I 敏感性分析



注:X 轴表示 NO10.22 上下游各延伸 100 bp 的基因片段(填充区域为 NO10.22 片段),Y 轴表示 DNase I-seq 信号强度

图 3 NO10.22 的 DNase I 敏感性分析

2.2 重组质粒的构建

PCR 扩增 2 段目的序列所得产物 SLCi7-447-X、SLCi7-447-S、SLCi7-460-X、SLCi7-460-S 通过 1%琼脂糖凝胶电泳后得到 447 bp、447 bp、460 bp、460 bp 4 个条带(图 4);纯化回收后,分别克隆入 pGL3-Control 质粒;重组质粒 pGL3-con-SLCi7-447X、pGL3-con-SLCi7-447S 经 Hind III 酶切后行 1%琼脂糖凝胶电泳,分别得到 1 750 bp、3 578 bp 2 个条带及 2 264 bp、3 164 bp 2 个条带,与理论预测相一致(图 5);pGL3-Control 与重组质粒 pGL3-con-SLCi7-460X、pGL3-con-SLCi7-460S 经 Hind III、Xho I 双酶切,pGL3-Control 与重组质粒的区别在于酶切产物多出了插入的 430 bp 片段,结果与理论相符(图 5);经酶切鉴定正确的质粒送测序验证,提示 4 组重组质粒成功构建(表 2)。

2.3 调控元件的功能鉴定

为检测 2 个调控元件的负性调控作用是否受到位置的局限,实验所用载体的报告基因为荧光素酶报告基因,受

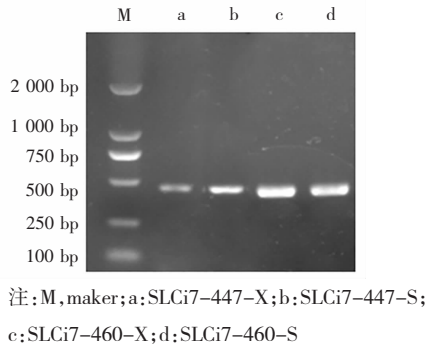


图 4 插入片段 PCR 扩增产物

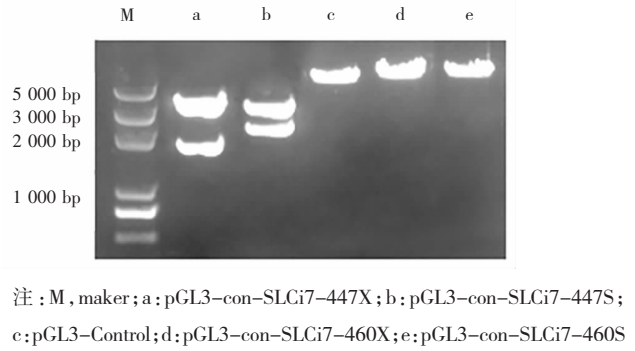


图 5 重组质粒酶切鉴定

表 2 重组质粒测序结果与理论一致

质粒名称	理论序列	测序结果	
pGL3-con-SLCi7-447X	理论序列 1	GATCGCCGTGTAATTACATTTGCCTTA	27
	测序序列 1920	GATCGCCGTGTAATTACATTTGCCTTA	1946
	理论序列 28	GTGGTAACACACAGAATAGATGTCCCTTCCAAA GATCCTGGTCTCAAAGCTTGCTCCA	87
	测序序列 1947	GTGGTAACACACAGAATAGATGTCCCTTCCAAA GATCCTGGTCTCAAAGCTTGCTCCA	2006
	理论序列 88	...	387
	测序序列 2007	...	2306
	理论序列 388	TTAATATTAGCTATCATCTAGTTTCATTTGTTGTT GAAATTTGGTTCTAGAGTCGGGGCGG	447
	测序序列 2307	TTAATATTAGCTATCATCTAGTTTCATTTGTTGTT GAAATTTGGTTCTAGAGTCGGGGCGG	2366
pGL3-con-SLCi7-447S	理论序列 1	TCCACAGCGGATCCGACATTTGCCTTA	27
	测序序列 2434	TCCACAGCGGATCCGACATTTGCCTTA	2460
	理论序列 28	GTGGTAACACACAGAATAGATGTCCCTTCCAAAAGATCCTGGTCTCAAAGCTTGCTCCA	87
	测序序列 2461	GTGGTAACACACAGAATAGATGTCCCTTCCAAAAGATCCTGGTCTCAAAGCTTGCTCCA	2520
	理论序列 88	...	387
	测序序列 2521	...	2820
	理论序列 388	AAAATATTAGCTATCATCTAGTTTCATTTGTTGTTG GAAATTTGGTTTCGACCGATGCCCTT	447
	测序序列 2821	AAAATATTAGCTATCATCTAGTTTCATTTGTTGTTG GAAATTTGGTTTCGACCGATGCCCTT	2880
pGL3-con-SLCi7-460X	理论序列 1	GATCGCCGTGTAATTCATACCTGCTGCCATCTTTAATT	40
	测序序列 1920	GATCGCCGTGTAATTCATACCTGCTGCCATCTTTAATT	1959
	理论序列 41	GAGTTTATTTAGGATGACCACAAACCTAGCAGTTTGGATAAGTCGTCTTCTTGAAGTGG	100
	测序序列 1960	GAGTTTATTTAGGATGACCACAAACCTAGCAGTTTGGATAAGTCGTCTTCTTGAAGTGG	2019
	理论序列 101	...	400
	测序序列 2020	...	2319
	理论序列 401	TGTGGTTTTTGTCAATTGCTACCAAAAAGATGTCTATG GCCACCTCACTAGAGTCGGGGCGG	460
	测序序列 2320	TGTGGTTTTTGTCAATTGCTACCAAAAAGATGTCTATG GCCACCTCACTAGAGTCGGGGCGG	2379
pGL3-con-SLCi7-460S	理论序列 1	TCCACAGCGGATCCGCCATACCTGCTGCCATCTTTAATT	40
	测序序列 2434	TCCACAGCGGATCCGCCATACCTGCTGCCATCTTTAATT	2473
	理论序列 41	TGAGTTTATTTAGGATGACCACAAACCTAGCAGTTTGGATAAGTCGTCTTCTTGAAGTGG	100
	测序序列 2474	TGAGTTTATTTAGGATGACCACAAACCTAGCAGTTTGGATAAGTCGTCTTCTTGAAGTGG	2533
	理论序列 101	...	400
	测序序列 2534	...	2833
	理论序列 401	TGTGGTTTTTGTCAATTGCTACCAAAAAGATGTCTATG GCCACCTCACTAGAGTCGGGGCGG	460
	测序序列 2834	TGTGGTTTTTGTCAATTGCTACCAAAAAGATGTCTATG GCCACCTCACTAGAGTCGGGGCGG	2893

SV40 启动子及增强子的启动及调控。将 2 个调控元件克隆至 pGL3-Control 载体后,瞬时转染人肾肾 HEK293T 细胞,24 h 后检测荧光素酶活性。若插入的 2 个调控元件为增强子阻断绝缘子,仅在插入位点为增强子与启动子之间时,降低报告基因 LUC 的表达,表现为荧光素酶活性减低,而当插入位点

为增强子下游时则不会降低报告基因 LUC 的表达,表现为荧光素酶活性与空白对照无差异;若插入的 2 个调控元件为沉默子,在 2 个插入位点均能发挥负性调控作用。实验设置空白对照 pGL3-Control,并与内参质粒 pRL-SV40 共转染。结果显示(表 3、表 4、图 6),4 组重组质粒 pGL3-con-SLCi7-447X

表 3 各组质粒荧光素酶活性

质粒	样本量	荧光素酶活性
pGL3-Control	3	7.423 ± 0.230
pGL3-con-SLCi7-447X	3	2.353 ± 0.323
pGL3-con-SLCi7-447S	3	3.046 ± 0.415
pGL3-con-SLCi7-460X	3	3.016 ± 0.119
pGL3-con-SLCi7-460S	3	3.833 ± 0.282

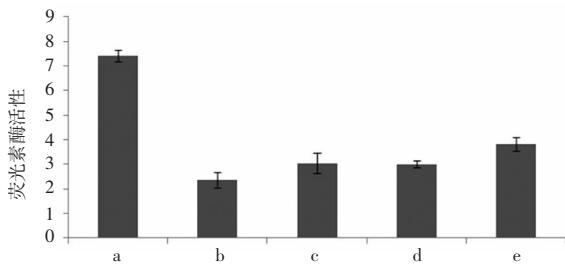
注: $F=107.000, P=0.000$

表 4 各质粒组荧光素酶活性的比较 (P 值)

组别	pGL3-Control	pGL3-con-SLCi7-447X	pGL3-con-SLCi7-447S	pGL3-con-SLCi7-460X	pGL3-con-SLCi7-460S
pGL3-Control	-	0.000	0.000	0.000	0.000
pGL3-con-SLCi7-447X	0.000	-	0.017	0.021	0.000
pGL3-con-SLCi7-447S	0.000	0.017	-	0.907	0.009
pGL3-con-SLCi7-460X	0.000	0.021	0.907	-	0.007
pGL3-con-SLCi7-460S	0.000	0.000	0.009	0.007	-

注: -, 无对应结果

(2.353 ± 0.323)、pGL3-con-SLCi7-447S(3.046 ± 0.415)、pGL3-con-SLCi7-460X(3.016 ± 0.119)、pGL3-con-SLCi7-460S(3.833 ± 0.282)相较于空白对照 pGL3-Control(7.423 ± 0.230), 荧光素酶活性均明显降低 ($P < 0.05$), 说明 2 个调控元件不仅是在位于启动子与增强子之间时才具备负性调控能力, 其负性调控作用不受位置的限制, 发挥沉默子调控功能。



注: a, pGL3-Control(空白对照); b, pGL3-con-SLCi7-447X; c, pGL3-con-SLCi7-447S; d, pGL3-con-SLCi7-460X; e, pGL3-con-SLCi7-460S

图 6 各质粒组荧光素酶活性

3 讨论

CAD 作为一种重要的心血管疾病, 是导致全球人口死亡的首要原因^[1], 其作为一种多基因遗传性复杂疾病, 遗传因素在其发病中占主要地位^[11], 因此 CAD 的遗传易感性在其病因学研究中颇受关注。本课题组前期发现了 CAD 相关 SLC22A3 基因 intron7 区域具有负性调控作用, 且利用基因突变能加强其负性调控作用, 并通过定位成功锁定了 2 段 400 bp

左右的序列。实时荧光定量 PCR 结果显示, 2 段负性调控序列能下调报告基因 mRNA 水平, 与蛋白水平的调控作用相一致, 说明 2 段序列的负性调控作用是通过调控转录过程发挥^[7-9], 提示 2 段序列可能为顺式作用元件。顺式作用元件中的绝缘子、沉默子均能下调基因的表达。因此, 本研究就 2 段序列的性质和功能进行了鉴定。根据 ENCODE 计划所提供的在人胚肾 HEK293T 细胞系中的 DNase I-seq 数据, 提取目的序列及其上下游序列的 DNase I 信号值。研究表明, 2 段序列均处于 DNase I 的超敏位点, 验证了其调控元件的性质。实验以具备启动子及增强子元件的 pGL3-Control 作为荧光素酶报告基因载体, 将 2 段目的序列分别克隆入报告基因的启动子与增强子之间以及增强子的下游, 转染人胚肾 HEK293T 细胞, 通过测定各重组质粒的荧光素酶活性来观察目的序列的负性调控作用是否受到位置的局限。研究结果显示, 目的序列的负性调控作用不受位置的限制, 在其位于启动子与增强子之间及增强子下游时均具备负性调控作用, 目的序列发挥沉默子调控功能, 实验结果与课题组前期发现相印证。

疾病的发生发展与基因的表达密不可分, 而真核基因的表达又受多因素、多层次的调控。调控元件是 DNA 调控序列中最为重要的组成部分, 操控着染色质上特定基因的转录和表达^[12-13]。基因组中顺式调控元件的鉴定对于深入理解基因表达的分子调控机制具有重要意义。本研究对 2 段目的序列

DNase I 的敏感性进行分析,明确了其为顺式调控元件的性质。DNase I 对染色质 DNA 的敏感性与该区域的表观遗传学特征密切相关,其超敏位点图谱是一项重要的表观遗传学标记^[14]。当该区域富集了活化表观遗传修饰时, DNase I 的敏感性增强,表明该区域的染色质处于开放状态。基因组处于活化状态的区域易与转录因子等调控蛋白结合,同时促进相同染色质的不同位置或不同染色质的调控元件之间相互作用,从而激活或抑制基因的表达。因此, DHSs 常用来指示染色质结构松散或致密的状态,从而定位真核基因的调控区域并预测绝缘子、沉默子等重要 DNA 顺式调控元件^[15-16]。本研究数据库为 DNA 元件百科全书,即 ENCODE 计划。该计划是由美国国立人类基因组研究院发起的跨国研究项目。该项目旨在解析人类基因组中所有功能性元件。它是人类基因组计划(Human Genome Project, HGP)完成之后又一重要的跨国基因组学研究项目^[17]。其使用新一代高通量技术,首次大范围绘制出了人类 DHSs 图谱,有利于更全面地理解人类基因组的调控作用机制^[18-19]。目前,对于绝缘子的研究较为深入,其作用机制也相对明确,绝缘子的增强子阻断特性已被基因治疗等转化医学领域研究运用^[20]。但对于沉默子元件的研究较少,仅有少数具备沉默基因表达功能的 DNA 调控元件被鉴定出来,对其染色质特征和作用机制所知更少^[21],这也是今后研究的重要方向。

综上所述,本课题组前期发现的 2 段负性调控序列为顺式作用元件。其负性调控的作用位置不仅仅局限在启动子与增强子之间发挥沉默子调控功能。目前国内外尚未有其负性调控序列的相关报道,对其性质以及功能发挥的鉴定也属首次。本研究针对与 CAD 相关的 SLC22A3 基因的内含子调控区域进行分析鉴定,得到了 2 个新的沉默子元件,通过基因突变能加强其负性调控作用,进而可能影响 CAD 的患病风险,对深入研究 CAD 发生机制及临床防治提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等. 中国心血管病报告 2017 概要[J]. 中国循环杂志,2018,33(1):1-8.
[2] Drendel HM, Vatta M. Coronary artery disease; the magnificent fifty?[J]. Trends Cardiovasc Med, 2015, 25(3):179-180.

[3] Hamirani YS, Pandev S, Rivera JJ, et al. Markers of inflammation and coronary artery calcification; a systematic review[J]. Atherosclerosis, 2008, 201(1):1-7.
[4] Wang Q. Molecular genetics of coronary artery disease[J]. Curr Opin Cardiol, 2005, 20(3):182-188.
[5] 丁艳辉,柳青,雷寒. SLC22A3-LPAL2-LPA 基因单核苷酸多态性与冠心病关系研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(22):2394-2399.
[6] 封雪,柳青,雷寒,等. SLC22A3 基因 intron7 对基因转录的负性调控作用研究[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(5):651-656.
[7] 黄博,柳青,雷寒,等. SLC22A3 基因负性调控元件的定位[J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(9):1204-1209.
[8] Jones SJ. Prediction of genomic functional elements[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2006, 7(1):315-338.
[9] Ali T, Renkawitz R, Bartkuhn M. Insulators and domains of gene expression[J]. Curr Opin Genet Dev, 2016, 37:17-26.
[10] Natarajan A, Yardimci GG, Sheffield NC, et al. Predicting cell-type-specific gene expression from regions of open chromatin[J]. Genome Res, 2012, 22(9):1711-1722.
[11] Amani SB, Topol EJ. Emerging genomic applications in coronary artery disease[J]. JACC Cardiovasc Interv, 2011, 4(5):473-482.
[12] Downen JM, Bilodeau S, Orlando DA, et al. Multiple structural maintenance of chromosome complexes at transcriptional regulatory elements[J]. Stem Cell Rep, 2013, 1(5):371-378.
[13] Maston GA, Evans SK, Green MR. Transcriptional regulatory elements in the human genome[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2006, 7(1):29-59.
[14] Qiu Z, Li R, Zhang S, et al. Identification of regulatory DNA elements using genome-wide mapping of DNase I hypersensitive sites during tomato fruit development[J]. Mol Plant, 2016, 9(8):1168-1182.
[15] Cockerill PN. Structure and function of active chromatin and DNase I hypersensitive sites[J]. FEBS J, 2011, 278(13):2182-2210.
[16] Jiang T, Du F, Qin N, et al. Systematical analyses of variants in DNase I hypersensitive sites to identify hepatocellular carcinoma susceptibility loci in a Chinese population[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2017, 32(11):1887-1894.
[17] Siggens L, Ekwall K. Epigenetics, chromatin and genome organization; recent advances from the ENCODE project[J]. J Intern Med, 2014, 276(3):201-214.
[18] Tragante V, Moore JH, Asselbergs FW. The ENCODE project and perspectives on pathways[J]. Genet Epidemiol, 2014, 38(4):275-280.
[19] 卢一鸣,屈武斌,张成岗. 基于表观基因组学的 DNA 元件鉴定方法研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41(7):640-648.
[20] Yi Y, Noh MJ, Lee KH. Current advances in retroviral gene therapy[J]. Curr Gene Ther, 2011, 11(3):218-228.
[21] Song Q, Grene R, Heath LS, et al. Identification of regulatory modules in genome scale transcription regulatory networks[J]. BMC Syst Biol, 2017, 11(1):140.

(责任编辑:唐秋姗)