

基因调控

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000217

SLC22A3 基因 intron7 对基因转录的负性调控作用研究

封雪¹, 柳青¹, 雷寒², 丁艳辉¹

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

【摘要】目的:探讨人 SLC22A3 基因 intron7 序列及其 SNPrs2048327 (A/G) 位点对基因转录的调控作用。**方法:**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 hSLC22A3 intron7, 克隆入荧光素酶报告基因载体 pGL3-Basic 和 pGL3-Promoter, 得到重组质粒 pGL3-Basic-SLCi7wt, pGL3-Promoter-SLCi7wt 和 pGL3-Promoter-SLCi7mut; 重组质粒与内参质粒 pRL-SV40 共转染入人胚肾细胞 HEK293T, 24 h 后检测荧光素酶活性。**结果:**野生型重组质粒 pGL3-Basic-SLCi7wt 荧光素酶活性与 pGL3-Basic 无统计学差异 ($P=0.986$); 野生型重组质粒 pGL3-Promoter-SLCi7wt 荧光素酶活性 (3.514 ± 0.096) 相较于 pGL3-Promoter (6.286 ± 0.370) 降低 ($P=0.000$); 突变型重组质粒 pGL3-Promoter-SLCi7mut 荧光素酶活性 (2.089 ± 0.332) 相对于 pGL3-Promoter 亦有所下降 ($P=0.000$), 且较野生型重组质粒 pGL3-Promoter-SLCi7wt 下调 ($P=0.000$)。**结论:**人 SLC22A3 基因 intron7 序列具有负性调节活性, 能下调荧光素酶报告基因的表达水平; 定位于该序列上的 SNP rs2048327 (A/G) 位点 A→G 的改变, 可能增强该内含子所具有的负性调节作用。

【关键词】冠心病; SLC22A3 基因; 内含子; 启动子活性; 负性调节活性

【中图分类号】R541.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-01-22

Negative regulation role of SLC22A3 gene intron7 in gene transcription

Feng Xue¹, Liu Qing¹, Lei Han², Ding Yanhui¹

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

【Abstract】Objective: To explore the regulatory effect of the human SLC22A3 gene intron7 and SNPrs2048327 (A/G) on gene transcription. **Methods:** The hSLC22A3 intron7, amplified from the bacterial artificial chromosome (BAC) including whole human SLC22A3 gene, was cloned into pGL3-Basic and pGL3-Promoter respectively to construct the recombinant plasmid pGL3-Basic-SLCi7wt, pGL3-Promoter-SLCi7wt and pGL3-Promoter-SLCi7mut. The recombinants with internal reference plasmid pRL-SV40 were co-transfected into HEK293T cells, then the luciferase activity was detected. **Results:** There was no significant difference in luciferase activity between pGL3-Basic-SLCi7wt and pGL3-Basic ($P=0.986$). Luciferase activity of pGL3-Basic-SLCi7wt was lower than that of pGL3-Promoter ((3.514 ± 0.096) vs. (6.286 ± 0.370) ; $P=0.000$). Luciferase activity of pGL3-Promoter-SLCi7mut was lower than that of pGL3-Promoter and pGL3-Promoter-SLCi7wt ($P=0.000$). **Conclusions:** The human SLC22A3 gene intron7 has negative regulatory activity, which could significantly down-regulate the expression of luciferase reporter gene. The mutation (A→G) of SNPrs2048327 (A/G) located in the hSLC22A3 intron7 may enhance the negative regulatory activity of this intron.

【Key words】 coronary atherosclerotic heart disease; SLC22A3 gene; intron; promoter activity; negative regulatory activity

冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary atherosclerotic heart disease, CAD) 简称冠心病, 是世界范围内致残和致死的首要原因之一^[1]。目前, 我国 CAD

死亡率城市为 86.34/10 万, 农村为 69.24/10 万^[2]。作为一种多基因遗传性疾病, 遗传因素在 CAD 发病中起重要作用^[3]。2005 年以来, 多个与之相关的易感基因、遗传变异被相继报道^[4-7]。2009 年, Trégouët 等^[8]发现位于人类 6 号染色体 q26~q27 区域的基因簇 SLC22A3-LPAL2-LPA 对 CAD 的发生具有强易感性, 且定位于 SLC22A3 基因 intron7 上的 SNP rs2048327 (A/G) 位点与 CAD 发病密切相关。

SLC22A3 基因是溶质转运体超家族 (superfamily of solute carriers, SLC) 的重要成员, 定位于人类 6 号

作者介绍: 封雪, Email: 38339905@qq.com,

研究方向: 分子遗传学。

通信作者: 柳青, Email: qingliu5566@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81170189); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (编号: 20115503110006); 重庆市卫生局医学科学技术研究资助项目 (编号: 2010-2-118); 重庆市渝中区科研计划资助项目 (编号: 20110302)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000217.html>

染色体 6q25.3 上,全长 135.47 kb,包含 11 个外显子和 10 个内含子^[9-10]。SLC22A3 编码阳离子转运蛋白 3(organic cation transporter 3,OCT3),广泛分布于心脏、血管平滑肌、脑、肾脏、肝脏、胎盘、子宫、前列腺等组织^[11-15];介导小分子阳离子的生电转运,参与细胞对阳离子物质的吸收与清除;在药物(二甲双胍)的吸收与分布、神经递质(多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素)的神经元外转运、生物胺(儿茶酚胺、组胺)的失活、有毒物质(MPP⁺)的清除等过程中发挥重要作用^[12-13,16-17]。作为机体内重要的阳离子转运体,SLC22A3 基因及其多态性被广泛研究,多集中于恶性肿瘤领域,主要见于其与癌症发生的关联性以及对抗癌药物化学敏感性、细胞毒性的调节等方面^[15,18-19],作为 CAD 易感基因被提出尚属首次。本课题组前期研究亦证实了 SLC22A3 基因及其 SNP rs2048327(A/G)位点与我国西南地区汉族人群 CAD 的发病密切相关^[20],但关于此位点及其所在内含子序列对基因转录的影响尚未可知;故本课题以人 SLC22A3 基因 intron7 为研究对象,探讨该内含子序列及其 SNP rs2048327(A/G)位点对基因转录的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚肾细胞 HEK293T、大肠杆菌 DH5 α (感受态)由重庆医科大学分子肾脏病学实验室惠赠;细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome,BAC)CH17-421M3(包含人 SLC22A3 基因全长序列)购自中科院;质粒 pGL3-Basic、pGL3-Promoter、pGL3-Control、pRL-SV40 购自 Promega 公司;PCR 引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成;DM 2000 Plus DNA Marker、2X Taq MasterMix 购自北京康为世纪生物技术有限公司;TransStart FastPfu DNA Polymerase 及相应缓冲液购自北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶 *Dpn* I、*Xho* I、*Hind* III,限制性外切酶 Exonuclease III (*Exo* III)及相应缓冲液购自 Fermentas 公司;质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回

收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;Lipofectamine 2000 Reagent 购自 invitrogen 公司;双荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司;高糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶购自 HyClone 公司;胎牛血清购自 GIBCO 公司;其余试剂均为进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 SLC22A3 基因 intron7 全长序列的 PCR 扩增及纯化 根据人 SLC22A3 基因序列 (GenBank, Accession Number: NC_000006)设计引物(序列见表 1)。利用美国生物信息中心 NCBI 的 Blast 软件检验其扩增特异性后交由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。以含人 SLC22A3 基因全长序列的 BAC (CH17-421M3)为模板,用上述 2 对引物分别扩增 SLC22A3 基因 intron7,产物分别为 SLCi7-5567(5 567 bp)和 SLCi7-5573(5 573 bp)。PCR 反应体系:模板 BAC(CH17-421M3) 8 μ l,TransStart FastPfu DNA Polymerase (2.5 U/ μ l) 1.2 μ l, FastPfu Buffer (5 X) 12 μ l,上下游引物各 2.4 μ l,dNTP (10 mmol/L) 1.6 μ l,MgCl₂ (25 mmol/L) 9.6 μ l,加水至 60 μ l。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 2 min;95 $^{\circ}$ C 20 s,66 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 3 min,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 7 min。产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收。

1.2.2 构建野生型 SLC22A3 基因 intron7 重组质粒 用 *Hind* III 酶切 pGL3-Basic 质粒,*Xho* I 酶切 pGL3-Promoter 质粒;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收线性化质粒。在 *Exo* III 作用下,线性化 pGL3-Basic 与 SLCi7-5567,线性化 pGL3-Promoter 与 SLCi7-5573 分别按摩尔比 2:1 于冰上同源重组 1 h。同源重组产物转化感受态 DH5 α 大肠杆菌,行氨苄青霉素 (ampicillin,Amp)抗性筛选;用质粒小提试剂盒提取质粒,行 *Hind* III 酶切鉴定并测序验证,获得野生型重组质粒 pGL3-Basic-SLCi7wt 和 pGL3-Promoter-SLCi7wt。

1.2.3 构建突变型 SLC22A3 基因 intron7 重组质粒 根据 SLC22A3 基因 SNPrs2048327(A/G)位点及其侧翼序列设计定点诱变引物(序列见表 2),交由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。以野生型重组质粒 pGL3-Promoter-SLCi7wt 为模板,用 TransStart FastPfu DNA Polymerase 行 SNPrs2048327 (A/G)位点 A $\rightarrow$ G 的定点诱变。反应体系:模板野生型重组质粒 200 ng,TransStart FastPfu DNA Polymerase (2.5 U/ μ l) 0.5 μ l, FastPfu Buffer (5 X) 6 μ l,上下游引物各 1.2 μ l,dNTP (10 mmol/L) 0.8 μ l,MgCl₂ (25 mmol/L) 4.8 μ l,加水至 30 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 4 min;95 $^{\circ}$ C 20 s,55 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 5 min,循环 12 次;72 $^{\circ}$ C 10 min。诱变产物经 *Dpn* I 消化去除野生型质粒模板

表 1 人 SLC22A3 基因 intron7 引物
Tab.1 Primers of hSLC22A3 gene intron7

引物名称	引物序列 (5' $\rightarrow$ 3')	产物名称	产物长度
hSLC22A3-5567	F:TCTGCGATCTAAGTACCAGAAGGTAATCTTACCCC R:CCGGAATGCCAAGCTCCATGCTATTCTGCAAACAC	SLCi7-5567	5 567 bp
hSLC22A3-5573	F:CGTGCTAGCCCGGGCTTCTTACCAGAAGGTAATCTTAC R:GATCGCAGATCTCGACCATGCTATTCTGCAAACAC	SLCi7-5573	5 573 bp

注:下划线所示部分为同源臂;hSLC22A3-5567 同源臂针对经 *Hind* III 线性化的 pGL3-Basic 质粒,hSLC22A3-5573 同源臂针对经 *Xho* I 线性化的 pGL3-Promoter 质粒

后,转化感受态 DH5 α 大肠杆菌;经 Amp 抗性筛选,用质粒小提试剂盒提取质粒,行 *Hind* III 酶切鉴定并测序验证,获得突变型重组质粒 pGL3-Promoter-SLCi7mut。

表 2 SNPrs2048327(A/G)位点定点诱变引物

Tab.2 Site-directed mutagenesis primers of SNPrs2048327

(A/G)

引物名称	引物序列(5' $\rightarrow$ 3')
hSLC22A3-mut	F: AAGAACCGTTTGTGAGCCTGAGCAGCCAC R: AATGTAGTGGCTGCTCAGGCTCAACAAACG

注:下划线所示碱基为 SNPrs2048327(A/G)位点

1.2.4 细胞转染 HEK293T 细胞用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基,在 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 条件下传代培养。转染前 24 h,按 1×10^5 个/孔将细胞均匀铺于 24 孔细胞培养板中,待细胞长至 80%融合时进行瞬时转染。具体方法:500 ng 待转染质粒与 15 ng 内参质粒 pRL-SV40 用 50 μ l 无血清高糖 DMEM 培养基稀释;1.5 μ l Lipofectamine 2000 用 50 μ l 无血清高糖 DMEM 培养基稀释;质粒混合物与脂质体稀释液混匀,静置 20 min;DNA-脂质体复合物缓慢加入 24 孔板中,轻柔混匀,37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 条件下继续培养。每种质粒设 3 个复孔,进行 3 次独立重复实验。

1.2.5 荧光素酶活性检测 转染 24 h 后,按双荧光素酶检测试剂盒说明书操作;每孔细胞用 100 μ l $1 \times$ 细胞裂解液室温下裂解 15 min;取 20 μ l 细胞裂解上清液与 100 μ l Luciferase Assay Reagent II (LAR II)混匀,用 GloMax 20/20 发光检测仪检测 pGL3 质粒携带的萤火虫荧光素酶激发底物所释放的荧光信号(RLUS1);加入 100 μ l 终止液(Stop&GloTM Reagent)轻柔混匀后,检测内参质粒 pRL-SV40 携带的海肾荧光素酶激发底物所释放的荧光信号(RLUS2)。以萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值 RLUS1/RLUS2 表示待测质粒的荧光素酶活性。

1.3 统计学分析

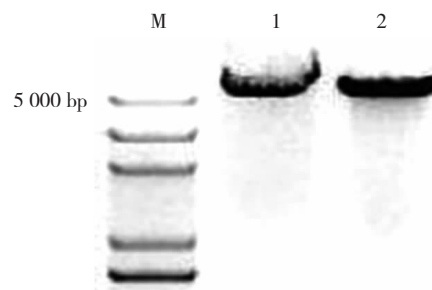
采用 SPSS 17.0 软件处理数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 法进行,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 野生型、突变型 SLC22A3 基因 intron7 重组质粒的构建

以包含人 SLC22A3 基因全长序列的 BAC(CH17-421M3) 为模板,PCR 扩增 SLC22A3 基因 intron7;产物 SLCi7-5567 和 SLCi7-5573 经 1%琼脂糖凝胶电泳,分别得到 5 567 bp 和 5 573 bp 2 条带(图 1);纯化回收后,SLCi7-5567 克隆入 pGL3-Basic 质粒,构成 pGL3-Basic-SLCi7wt;SLCi7-5573 克隆入 pGL3-Promoter 质粒,构成 pGL3-Promoter-SLCi7wt;重组质粒经 *Hind* III 酶切鉴定后行 1%琼脂糖凝胶电泳,pGL3-Basic-SLCi7wt 酶切后得到 1 905、2 580、5 900 bp 3 条带,pGL3-Promoter-SLCi7wt 酶切后得到 727、1 805、2 580 bp 和

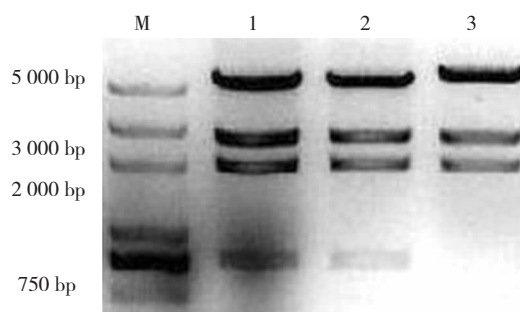
5 471 bp 4 条带,与理论预测一致(图 2);酶切鉴定正确的质粒经测序验证,结果与 GenBank 中提供的序列一致(表3),提示野生型重组质粒构建成功。对野生型重组质粒行 PCR 定点诱变,经 *Hind* III 酶切鉴定(图 2)及测序验证(图 3),结果提示突变型重组质粒 pGL3-Promoter-SLCi7mut 构建成功。



M. marker; 1. SLCi7-5573; 2. SLCi7-5567

图 1 SLC22A3 基因 intron7 PCR 产物

Fig.1 PCR products of SLC22A3 gene intron7

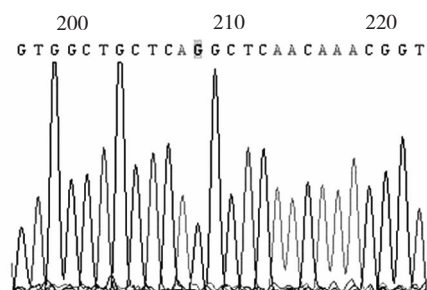


M. marker; 1. pGL3-Promoter-SLCi7wt;

2. pGL3-Promoter-SLCi7mut; 3. pGL3-Basic-SLCi7wt

图 2 重组质粒 *Hind* III 酶切鉴定

Fig.2 Products of recombinant plasmid digested with *Hind* III



灰化碱基为 SLC22A3 基因 SNPrs2048327(A/G)位点

图 3 重组质粒 pGL3-Promoter-SLCi7mut 测序结果与理论预期一致

Fig.3 Partial sequencing of pGL3-Promoter-SLCi7mut matched with the expectation

2.2 荧光素酶活性检测

野生型重组质粒 pGL3-Basic-SLCi7wt 与内参质粒 pRL-SV40 瞬时共转染 HEK293T 细胞,以 pGL3-Basic 为阴性对照,pGL3-Promoter 为阳性对照;转染 24 h 后检测荧光素酶活

表 3 重组质粒测序结果与理论预期一致

Tab.3 Partial sequencing of recombinant plasmid matched with the expectation

pGL3-Basic-SLCi7wt	pGL3-Promoter-SLCi7wt
理论序列 1 GGTACCGAGCTCTTACGCGT 20	理论序列 1 GGTACCGAGCTCTTACGCGTGCTA 24
测序结果 1 TCTCTATCGATAGGTACCGAGCTCTTACGCGT 32	测序结果 1 CTTTCTCTATCGATAGGTACCGAGCTCTTACGCGTGCTA 39
理论序列 21 GCTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTAACT 52	理论序列 25 GCGCGGGCTTCTTACCAGAAGGTAATCTTACCCACATC 63
测序结果 33 GCTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTAACT 64	测序结果 40 GCGCGGGCTTCTTACCAGAAGGTAATCTTACCCACATC 78
理论序列 53 ACCAGAAGTAATCTTACCCACATCTGTTT 84	理论序列 64 TGTTTGGCAGCCAAAGGACTTGAAAACACCTAAATCCAC 102
测序结果 65 ACCAGAAGTAATCTTACCCACATCTGTTT 96	测序结果 79 TGTTTGGCAGCCAAAGGACTTGAAAACACCTAAATCCAC 117
理论序列 85 GCAGCCAAAGGACTTGAAAACACCTAAATCCA 116	理论序列 103 AATCAAGTATAGGAGCCACTTGTCTTACGAAATGTGC 141
测序结果 97 GCAGCCAAAGGACTTGAAAACACCTAAATCCA 128	测序结果 118 AATCAAGTATAGGAGCCACTTGTCTTACGAAATGTGC 156
理论序列 117 CAATCAAGTATAGGAGCCACTTGTCTTAGG 148	理论序列 142 AATGGAATCACAGCTCTTTCGTGATGTCACTCCATTTTCT 180
测序结果 129 CAATCAAGTATAGGAGCCACTTGTCTTAGG 160	测序结果 157 AATGGAATCACAGCTCTTTCGTGATGTCACTCCATTTTCT 195
理论序列 149 AAATGTGAATGGAATCACAGCTCTTTCGTGAT 180	理论序列 181 5537
测序结果 161 AAATGTGAATGGAATCACAGCTCTTTCGTGAT 192	测序结果 196 634
理论序列 181 GTCACCTCCATTTTCTGCTTAATCAGCATAAAA 212	理论序列 5538 AAATGTTAATGAAATCAGACCCCTAACTCCTCCCTTCA 5576
测序结果 193 GTCACCTCCATTTTCTGCTTAATCAGCATAAAA 224	测序结果 635 AAATGTTAATGAAATCAGACCCCTAACTCCTCCCTTCA 673
理论序列 213 5520	理论序列 5577 AACTTTCTGTGTTTGCAGGAATAGCATGGTCGAGATCTG 5615
测序结果 225 812	测序结果 674 AACTTTCTGTGTTTGCAGGAATAGCATGGTCGAGATCTG 712
理论序列 5521 GCCACTAAGCAAATACTTTTGTGTTCTG 5550	理论序列 5616 CGATCTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCC 5654
测序结果 813 GCCACTAAGCAAATACTTTTGTGTTCTG 842	测序结果 713 CGATCTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCC 751
理论序列 5551 TAAATGTTAATGAAATCAGACCCCTAACT 5580	理论序列 5655 CCTAATCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTC 5693
测序结果 843 TAAATGTTAATGAAATCAGACCCCTAACT 872	测序结果 752 CCTAATCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTC 790
理论序列 5581 CCTCCCTTTCAAACCTTTCTGTGTTTGCAGG 5610	理论序列 5694 CGCCCATTTCTCGCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTAT 5732
测序结果 873 CCTCCCTTTCAAACCTTTCTGTGTTTGCAGG 902	测序结果 791 CGCCCATTTCTCGCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTAT 829
理论序列 5611 AATAGCATGGAGCTTGGCATTCCGGTACTG 5640	理论序列 5733 TTATGCAGAGGCCGAGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATT 5771
测序结果 903 AATAGCATGGAGCTTGGCATTCCGGTACT 930	测序结果 830 TTATGCAGAGGCCGAGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATT 868

注:...,省略号

性,结果显示(表 4、5,图 4):重组质粒 pGL3-Basic-SLCi7wt 荧光素酶活性与阴性对照 pGL3-Basic 无统计学差异 ($P=0.986$),提示 SLC22A3 基因 intron7 序列不具有启动子活性。

表 4 pGL3-Basic 重组质粒转染 HEK293T 细胞后的
荧光素酶活性Tab.4 Luciferase activities of HEK293T cells transfected with
pGL3-Basic recombinant plasmids

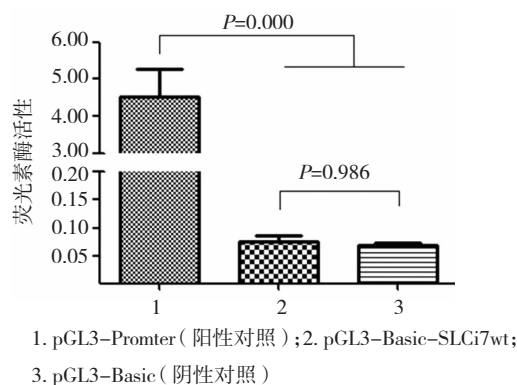
组别	样本量 (n)	荧光素酶活性 ($\bar{x} \pm s$)	统计结果
pGL3-Promoter	3	4.539 ± 0.721	$F=115.0$ $P=0.000$
pGL3-Basic	3	0.070 ± 0.003	
pGL3-Basic-SLCi7wt	3	0.07620 ± 0.01066	

表 5 pGL3-Basic 组各质粒荧光素酶活性两两比较结果

Tab.5 Pairwise comparison results of luciferase activities of
plasmids in the pGL3-Basic group

组别	pGL3-Promoter	pGL3-Basic	pGL3-Basic-SLCi7wt
pGL3-Promoter	-	$P=0.000$	$P=0.000$
pGL3-Basic	$P=0.000$	-	$P=0.986$
pGL3-Basic-SLCi7wt	$P=0.000$	$P=0.986$	-

注:-,无对应结果

图 4 pGL3-Basic 重组质粒荧光素酶活性 ($\bar{x} \pm s$)Fig.4 Luciferase activities of HEK293T cells transfected with
pGL3-Basic recombinant plasmids ($\bar{x} \pm s$)

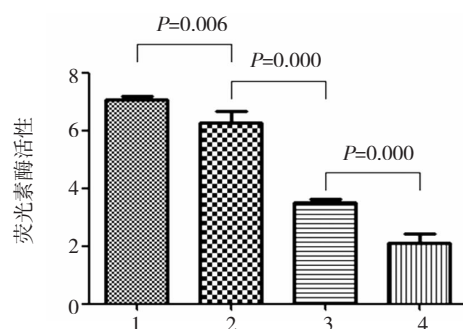
野生型重组质粒 pGL3-Promoter-SLCi7wt 和突变型重组质粒 pGL3-Promoter-SLCi7mut 分别与内参质粒 pRL-SV40 瞬时共转染 HEK293T 细胞,以 pGL3-Promoter 为阴性对照, pGL3-Control 为阳性对照;转染 24 h 后检测荧光素酶活性,结果显示(表 6、7,图 5):野生型重组质粒 pGL3-Promoter-SLCi7wt 荧光素酶活性(3.514 ± 0.096)相较于 pGL3-Promoter (6.286 ± 0.370)降低 ($P=0.000$),提示 SLC22A3 基因 intron7

序列具有负性调节活性。突变型重组质粒 pGL3-Promoter-SLCi7mut 荧光素酶活性 (2.089 ± 0.332) 相对于 pGL3-Promoter 亦有所下降 ($P=0.000$), 且较野生型重组质粒 pGL3-Promoter-SLCi7wt 下调 ($P=0.000$), 提示 SLC22A3 基因 SNP rs2048327 (A/G) 位点 A→G 的改变, 可能增强 SLC22A3 基因 intron7 序列的负性调节作用。

表 6 pGL3-Promoter 重组质粒转染 HEK293T 细胞后的
荧光素酶活性

Tab.6 Luciferase activities of HEK293T cells transfected with
pGL3-Promoter recombinant plasmids

组别	样本量 (n)	荧光素酶活性 ($\bar{x} \pm s$)	统计结果
pGL3-Control	3	7.077 ± 0.114	$F=243.6$ $P=0.000$
pGL3-Promoter	3	6.286 ± 0.370	
pGL3-Promoter-SLCi7wt	3	3.514 ± 0.096	
pGL3-Promoter-SLCi7mut	3	2.089 ± 0.332	



1. pGL3-Control (阳性对照); 2. pGL3-Promoter (阴性对照);
3. pGL3-Promoter-SLCi7wt; 4. pGL3-Promoter-SLCi7mut

图 5 pGL3-Promoter 重组质粒荧光素酶活性 ($\bar{x} \pm s$)

Fig.5 Luciferase activities of HEK293T cells transfected with
pGL3-Promoter recombinant plasmids ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

CAD 是一种严重危害人类生命健康的常见复杂疾病, 对其易感基因及遗传变异的研究具有重要意义。本课题在前期研究基础上^[20], 以 CAD 易感基因人类 SLC22A3 基因 intron7 为研究对象, 选用荧光素酶报告基因载体 pGL3-Basic 和 pGL3-Promoter, 构建了包含野生型、突变型 SLC22A3 基因 intron7 全

长序列的重组质粒, 分别转染人胚肾细胞 HEK293T, 24 h 后检测荧光素酶活性。研究结果表明人 SLC22A3 基因 intron7 序列无启动子活性, 但具有负性调节功能, 能显著下调荧光素酶报告基因表达水平; 由此推测, 该内含子序列包含负性调节元件, 能抑制目的基因的表达。此外, SLC22A3 基因 SNP rs2048327 (A/G) 位点 A→G 的改变, 进一步下调了荧光素酶报告基因的表达, 推测该多态性位点可能增强 intron7 的负性调节功能。本研究结果与前人针对 SLC22A3 基因 SNP rs2048327 (A/G) 位点能下调 OCT3 mRNA 表达水平的研究结论相互印证^[16,21]。

内含子已被证实能通过各种方式调节其宿主基因的表达水平^[22]。在许多基因的内含子尤其是 intron1 中均发现了转录调控元件, 包括启动子^[23]、增强子^[24-25]、沉默子^[26-27]等; 这些调控元件的存在使得内含子能在转录起始阶段对基因的表达进行正性或负性调节。其中, 负性调节元件是存在于 DNA 非编码序列中具有负性转录调节功能的特异 DNA 序列, 通过与特异蛋白因子的结合, 对基因转录起阻遏作用。体外鉴定、分析基因启动子和调控元件时, 常采用报告基因技术。报告基因是一类表达产物易于检测且易与内源性背景蛋白相区别的基因, 被广泛应用于对细胞信号转导及基因表达的监测; 将转录调控元件剪接到报告基因上, 该元件对基因表达的调控作用即可被直观地“报道”^[28]。本课题选用的 pGL3 系列质粒携带萤火虫荧光素酶报告基因, 其表达受上游启动子调控, 转染后荧光素酶活性的高低直接反映了启动子活性的强弱, 敏感性高, 线性范围宽, 是哺乳动物细胞中最常用的报告基因载体。本研究引入了 pRL-SV40 作为内参照质粒与重组质粒共转染细胞, 以 pGL3 质粒携带的萤火虫荧光素酶活性与 pRL-SV40 质粒携带的海肾荧光素酶活性的比值来表示待测质粒的荧光素酶活性, 有效消除了内在变化因素 (如细胞数目、细胞活力、转染效率和裂解效率等) 对检测结果的影响。

本研究明确了人 SLC22A3 基因 intron7 序列具有负性调节活性, 包含负性调节元件, 但该元件的具体序列及定位尚不可知。此外, 人 SLC22A3 基因 intron7 全长 5 543 bp, 具备了包含多个调节元件的

表 7 pGL3-Promoter 组各质粒荧光素酶活性两两比较结果

Tab.7 Pairwise comparison results of luciferase activities of plasmids in the pGL3-Promoter group

组别	pGL3-Control	pGL3-Promoter	pGL3-Promoter-SLCi7wt	pGL3-Promoter-SLCi7mut
pGL3-Control	-	$P=0.006$	$P=0.000$	$P=0.000$
pGL3-Promoter	$P=0.006$	-	$P=0.000$	$P=0.000$
pGL3-Promoter-SLCi7wt	$P=0.000$	$P=0.000$	-	$P=0.000$
pGL3-Promoter-SLCi7mut	$P=0.000$	$P=0.000$	$P=0.000$	-

注: -, 无对应结果

可能;该内含子片段的负性调节活性可能来自唯一的负性调节元件,也可能由多个顺式作用元件相互协同或拮抗产生;这一问题目前尚不能明确,需更加深入的研究来阐明,这亦是接下来关注的焦点。

综上所述,本研究发现人 SLC22A3 基因 intron7 序列含有负性调节元件,具有负性调节活性,且定位于该序列上的 SNP rs2048327(A/G)位点 A→G 的改变可能增强 intron7 的负性调节功能。本研究首次针对人类 SLC22A3 基因 intron7 序列对基因转录的调控作用进行了分析,为深入研究 SLC22A3 基因及其 SNP rs2048327(A/G)位点在 CAD 发生发展中的作用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030[J]. PLoS Med, 2006, 3(11): e442.
- [2] 卫生部心血管病防治研究中心. 中国心血管病报告 2012[M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 2013.
- [3] Wang Q. Molecular genetics of coronary artery disease[J]. Curr Opin Cardiol, 2005, 20(3): 182–188.
- [4] McPherson R, Pertsemlidis A, Kavazlar N, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease[J]. Science, 2007, 316(5830): 1488–1491.
- [5] Zhou L, Zhang X, He M, et al. Associations between single nucleotide Polymorphisms on chromosome 9P21 and risk of coronary heart disease in Chinese Han population[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(11): 2085–2089.
- [6] Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease[J]. N Engl J Med, 2007, 357(5): 443–453.
- [7] Erdmann J, Grosshennig A, Braund PS, et al. New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3[J]. Nat Genet, 2009, 41(3): 280–282.
- [8] Trégouët DA, König IR, Erdmann J, et al. Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease[J]. Nat Genet, 2009, 41(3): 283–285.
- [9] Verhaagh S, Schweifer N, Barlow DP, et al. Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (Slc22a3/SLC22A3) identifies a conserved cluster of three organic cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26–q27[J]. Genomics, 1999, 55(2): 209–218.
- [10] Kekuda R, Prasad PD, Wu X, et al. Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter(OCT3) most abundantly expressed in placenta[J]. J Biol Chem, 1998, 273(26): 15971–15979.
- [11] Solbach TF, Grube M, Fromm MF, et al. Organic cation transporter3: expression in failing and nonfailing human heart and functional characterization[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2011, 8(4): 409–417.
- [12] Chen L, Pawlikowski B, Schlessinger A, et al. Role of organic cation transporter3 (SLC22A3) and its missense variants in the pharmacologic action of metformin[J]. Pharmacogenomics, 2010, 20(11): 687–699.
- [13] Sakata T, Anzai N, Kimura T, et al. Functional analysis of human organic cation transporter OCT3(SLC22A3) polymorphisms[J]. J Pharmacol Sci, 2010, 113(3): 263–266.
- [14] Bottalico B, Noskova V, Pilka R, et al. The organic cation transporters (OCT1, OCT2, EMT) and the plasma membrane monoamine transporter(PMAT) show differential distribution and cyclic expression pattern in human endometrium and early pregnancy decidua[J]. Mol Reprod Dev, 2007, 74(10): 1303–1311.
- [15] Grisanzio C, Werner L, Takeda D, et al. Genetic and functional analyses implicate the NUDT11, HNF1B, and SLC22A3 genes in prostate cancer pathogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(28): 11252–11257.
- [16] Nies AT, Koepsell H, Winter S, et al. Expression of organic cation transporters OCT1(SLC22A1) and OCT3(SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver[J]. Hepatology, 2009, 50(4): 1227–1240.
- [17] Zhu P, Hata R, Ogasawara M, et al. Targeted disruption of organic cation transporter 3(Oct3) ameliorates ischemic brain damage through modulating histamine and regulatory T cells[J]. J Cereb Blood Flow & Metab, 2012, 32(10): 1897–1908.
- [18] Shnitsar V, Eckardt R, Gupta S, et al. Expression of human organic cation transporter 3 in kidney carcinoma Cell lines increases chemosensitivity to melphalan, irinotecan and vincristine[J]. Cancer Res, 2009, 69(4): 1494–501.
- [19] Cui R, Okada Y, Jang SG, et al. Common Variant in 6q26–q27 is associated with distal colon cancer in an Asian population[J]. Gut, 2011, 60(6): 799–805.
- [20] 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.
- [21] Hsu LA, Chang CJ, Teng MS, et al. CAG repeat Polymorphism of the MEF2A gene is not associated with the risk of coronary artery disease among Taiwanese[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2010, 16(3): 301–305.
- [22] Chorev M, Carmel L. The function of introns[J]. Front Genet, 2012, 3: 55.
- [23] Petit MM, Lindskog H, Larsson E, et al. Smooth muscle expression of lipoma preferred partner is mediated by an alternative intronic promoter that is regulated by serum response factor/myocardin[J]. Circ Res, 2008, 103(1): 61–69.
- [24] Bianchi M, Crinelli R, Giacomini E, et al. A potent enhancer element in the 5'-UTR intron is crucial for transcriptional regulation of the human ubiquitin C gene[J]. Gene, 2009, 448(1): 88–101.
- [25] Beaulieu E, Green L, Elsbey L, et al. Identification of a novel cell type-specific intronic enhancer of macrophage migration inhibitory factor(MIF) and its regulation by mithramycin[J]. Clin Exp Immunol, 2011, 163(2): 178–188.
- [26] Gaunitz F, Deichsel D, Heise K, et al. An intronic silencer element is responsible for specific zonal expression of glutamine synthetase in the rat liver[J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1225–1232.
- [27] Gaunitz F, Heise K, Gebhardt R. A silencer element in the first intron of the glutamine synthetase gene represses induction by glucocorticoids[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(1): 63–69.
- [28] Naylor LH. Reporter gene technology: the future looks bright[J]. Biochem Pharmacol, 1999, 58(5): 749–757.

(责任编辑: 冉明会)