

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000742

SLC22A3 基因负性调控元件的定位

黄 博¹, 柳 青¹, 雷家伊², 丁艳辉¹, 封 雪³, 雷 寒²

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

3. 附属大学城医院检验科, 重庆 401331)

【摘要】目的:拟寻找和确定人第 6 号染色体 q26-q27 区域的 SLC22A3 基因 intron7 序列中具有重要负性调控功能的核心调控元件的具体序列位置。**方法:**用基因重组的方法, 分别构建 intron7 截短型野生重组质粒, 分段查找该负性调控元件的具体序列位置。以包含人 SLC22A3 基因全长序列的细菌人工染色体为模板, PCR 扩增所需截短型片段, 分别插入荧光素酶报告基因载体 pGL3-Promoter, 将重组质粒与内参质粒 pRL-SV40 以 50:1 的比例共转染 HEK293T 细胞, 24 h 后检测荧光素酶活性(luciferase activity), 通过对比重组质粒和 pGL3-Promoter 荧光素酶活性, 判断插入片段是否具有调控作用, 并对发现的元件进行转录因子结合位点预测。**结果:**截短型野生重组质粒 pGL3-pro-SLCi7-NO6, pGL3-pro-SLCi7-NO10, pGL3-pro-SLCi7-NO6.2, pGL3-pro-SLCi7-NO6.3, pGL3-pro-SLCi7-NO10.2, pGL3-pro-SLCi7-NO6.21, pGL3-pro-SLCi7-NO10.22 各组荧光素酶活性较 pGL3-Promoter 组降低 ($P < 0.05$); 而截短型野生重组质粒 pGL3-pro-SLCi7-NO6.21-300 bp ($P > 0.05$) 和 pGL3-pro-SLCi7-NO10.22-300 bp ($P > 0.05$) 组荧光素酶活性较 pGL3-Promoter 组无统计学差异。**结论:**人类第 6 号染色体 q26-q27 区域的 SLC22A3 基因 intron7 序列中存在 2 个负性调控元件, 为今后进一步对 SLC22A3 基因表达调控方面的研究提供了理论依据。

【关键词】冠心病; SLC22A3 基因; 负性调控元件; 荧光素酶活性**【中图分类号】**R541.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2015-04-16

Identification of negative regulatory element in SLC22A3 gene

Huang Bo¹, Liu Qing¹, Lei Jiayan², Ding Yanhui¹, Feng Xue³, Lei Han²

(1. Department of Clinical Research Center; 2. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 3. Department of Laboratory Medicine, The University-Town Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To research and identify the specific sequence position of the key negative regulatory element in intron7 of SLC22A3 gene on chromosome 6q26-q27. **Methods:** Wild type truncated plasmids of intron7 were constructed by gene recombination to stepwise locate the specific sequence position of this negative regulatory element. Specific truncated gene fragments were amplified by four stages using bacterial artificial chromosome (including human SLC22A3 gene) as templates, and were inserted into luciferase report vector to construct recombinant plasmids respectively. Recombinant plasmids and internal reference plasmids were co-transfected into HEK293T cells with ratio of 50:1, and the luciferase activity was detected after 24 h to determine which inserted fragment showed regulatory effect on gene expression; transcription factor binding sites were predicted in element. **Results:** The luciferase activities of recombinant plasmids of pGL3-pro-SLCi7-NO6, pGL3-pro-SLCi7-NO10, pGL3-pro-SLCi7-NO6.2, pGL3-pro-SLCi7-NO6.3, pGL3-pro-SLCi7-NO10.2, pGL3-pro-SLCi7-NO6.21, pGL3-pro-SLCi7-NO10.22 were decreased compared with those of pGL3-Promoter ($P < 0.05$); but there was no significant difference in luciferase activity between pGL3-pro-SLCi7-NO6.21-300 bp ($P > 0.05$), pGL3-pro-SLCi7-NO10.22-300 bp ($P > 0.05$) and pGL3-Promoter. **Conclusion:** The results demonstrated that intron7 of SLC22A3 gene on chromosome 6q26-q27 contains two negative regulatory elements, which might provide theoretical basis for further studies at protein level.

【Key words】 coronary heart artery; SLC22A3 gene; negative regulatory element; luciferase activity

作者介绍: 黄 博, Email: 175315700@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)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150805.1556.022.html>

(2015-08-05)

冠状动脉粥样硬化性心脏病是冠状动脉血管发生动脉粥样硬化病变而引起血管腔狭窄或阻塞,造成心肌缺血、缺氧或坏死而导致的心脏病,常常被称为“冠心病”^[1-2]。美国国立卫生研究所原所属心、肺、血液病研究所的数据显示,心血管疾病已经严重危害美国人的身体健康。在我国该病也比较多见且近年来呈上升趋势^[3-6]。众所周知,冠心病是 1 种多基因遗传性复杂疾病,尽管既往许多学者对此进行了大量的研究,也涉及到许多基因,但仍未明确与冠心病发生的相关基因。2009 年在 Nature genetic 上发表的冠心病全基因组单倍型关联研究,采用基因芯片技术完成了 8 999 个冠心病患者和 10 263 个健康对照者调查,结果表明 6 号染色体 q26-q27 区域的 SLC22A3-LPAL2-LPA 单倍型对冠心病的发生具有强易感性,这一单倍体包括定位在 SLC22A3 基因上的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)rs2048327(A/G), L-PAL2 基因上的 SNP rs3127599(A/G), LPA 基因上的 SNP rs7767084(C/T) 和 SNP rs10755578(C/G),但却并未进一步阐述这其中的分子致病机制^[7]。LPA 基因,编码载脂蛋白- α ,是脂蛋白- α 的主要成分,是已知的通过脂质代谢途径影响冠心病发生发展的重要危险因素^[8-10]。SLC22A3 基因包含 10 个内含子和 11 个外显子,编码阳离子转运蛋白 3(organic cation transporter 3, OCT3),广泛分布于血管平滑肌细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、神经系统、肝脏和肾脏等组织,Sandra 等在 20 世纪 90 年代末首次完成该基因的克隆^[11-13]。目前,关于 SLC22A3 基因在冠心病的发生机制方面的研究报道较少,在国内尚无 SLC22A3 基因与冠心病发生机制方面的相关报道^[14-17]。故从分子水平探讨 SLC22A3 基因与冠心病的发病机制具有重要的意义。本课题组前期研究成果已发现 SLC22A3 基因 SNP rs2048327(A/G)位点与我国西南地区汉族人群冠心病的相关性^[18],并通过双荧光素酶报告基因系统研究掌握该 SNP 位点所在的 intron7 对基因转录具有负性调控作用^[19]。在此基础上,本实验通过双荧光素酶报告基因检测系统,通过 PCR,缺失构建载体等方法^[20-22],对 SLC22A3 基因的 intron7 进行全面解析,力图寻找发现新的调控元件,并对其进行准确定位,为今后进一步深入研究 SLC22A3 基因介导的冠心病的发生发展提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

包含人 SLC22A3 基因序列的细菌人工染色体(中科院);PCR 引物(invitrogen 公司);高保真酶 Trans Taq DNA polymerase High Fidelity 及其缓冲液(北京全式金生物);2 $\times$ Taq MasterMix(北京世纪康为);PCR 产物纯化试剂盒(上海生工)。pGL3-Promoter, pGL3-Control, pRL-SV40 (Promega 公司);Xho I 限制性内切酶和 Mlu I 限制性内切酶, T4 DNA Ligase 及相应的 buffer(Thermo Fermentas 公司);大肠杆菌 DH5 α (上海生工),质粒小提试剂盒(上海生工)。人胚肾细胞 HEK293T (重庆医科大学肝病研究所惠赠);高糖 DMEM, 胰酶, 胎牛血清(Hyclone);Lipofectamine 2000 Reagent(invitrogen 公司);Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System(Promega 公司);LB 培养基(上海生工);琼脂糖试剂(北京恒奥生物)。

1.2 方法

1.2.1 构建重组野生质粒 针对 SLC22A3 基因 intron7 采用截短法分析(图 1),将截短型质粒的构建分为了 4 个阶段,为了确保不遗漏重要调控元件,每阶段 PCR 产物之间都有重叠序列,各个阶段引物序列(表 1)。以含有 SLC22A3 基因全长的人工细菌染色体为模板,进行目的基因扩增,50 μ l 反应体系:模板 3 μ l,上下游引物共(10 nmol/ μ l)4 μ l, HIFI DNA Taq polymerase(5 U/ μ l)1 μ l, buffer(10 $\times$)5 μ l, dNTP(10 mmol/L)3 μ l, ddH₂O 34 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 2 min;95 $^{\circ}$ C 30 s, Tm 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 次;72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳(110 V, 20 min)判断特异性,后采用 PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 产物。将纯化的 PCR 产物及 pGL3-Promoter 同时进行限制性内切酶 Xho I 和 Mlu I 双酶切,酶切产物纯化后,将纯化的 pGL3-Promoter 与 PCR 双酶切产物按 8:1(摩尔比)的比例配制连接体系 10 μ l,通过 T4 DNA Ligase 室温连接 3 h,将连接产物转化入 50 μ l DH5 α (感受态);进而经抗性筛选和酶切鉴定后送测序(上海英隼 invitrogen)。

1.2.2 重组质粒转染细胞 以含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基于 5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 293T 细胞。将 293T 细胞以 60%的细胞密度均匀接种到 24 孔板中,12 h 后行重组质粒 500 ng 与 10 ng 海参荧光素酶质粒 pRL-sv40 质粒共转染 293T 细胞,以 pRL-sv40 作为内参质粒;并以 500 ng pGL3-Promoter 与 10 ng pRL-sv40 实验组作为阴性对照, pGL3-control 是在 pGL3-Promoter 质粒的荧光素酶基因的多聚 A 尾下游插入了 sv-40 增强子序列,会加强荧光素酶活性的表达,故作者以 500 ng pGL3-control 与 10 ng pRL-sv40 实验组作为阳性对照^[19]。转染步骤:用 DMEM 稀释重组质粒及内参质粒和 Lipofectamine,充分混匀室温放置 20 min,缓缓加入到 24 孔板中,详细操作请参照 Lipofectamine 说明书。

1.2.3 荧光素酶活性检测 转染后 24 h 收集细胞裂解液:吸弃 24 孔板中的细胞培养液,每孔中加 200 μ l PBS 液洗 2

次,向每孔中加入 100 μ l 的细胞裂解液 (PLB),室温轻轻摇晃裂解 20 min;5 000 r/min 离心 2 min 取上清液。按照 Promega luciferase assay 操作说明书,用 GloMax 20/20 发光检测仪分别检测萤火虫荧光素活性和海肾荧光素活性。为了消除组间转染效果差异的影响,以萤火虫荧光素酶活性 (RLus1)与海肾荧光素酶活性 (RLus2)的比 (Ratio=RLus1/RLus2)来表示各重组质粒表达荧光素酶活性。荧光素酶活性检测分为 3 次独立实验,为了消除 3 次独立实验间的随机差异,设定 pGL3-promoter 荧光素酶活性为 100%,其余各组重组质粒荧光素酶活性与 pGL3-promoter 组相比的结果即为相

对荧光素酶活性 (重组质粒荧光素酶活性/pGL3-promoter 荧光素酶活性)。

1.2.4 转录因子结合位点预测 运用 JASPAR 数据库 (www.Jaspar.genereg.com) 对发现的 2 个负性元件进行转录因子结合位点预测。

1.3 统计学分析

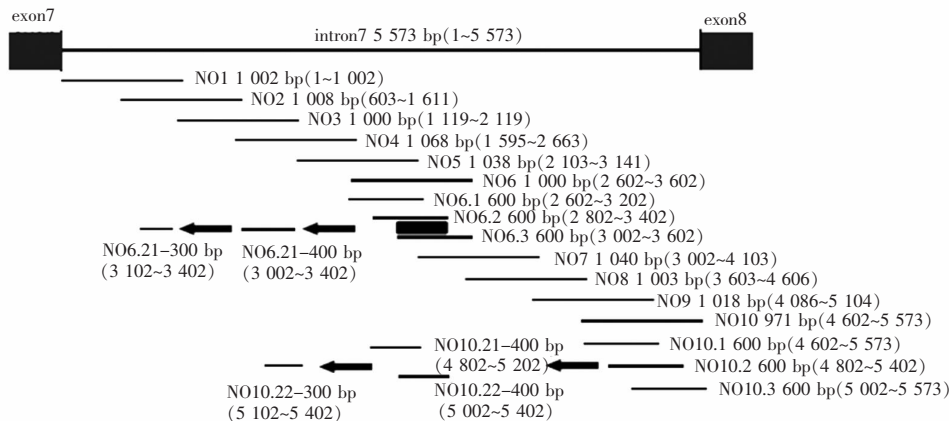
本实验均采用统计软件 SPSS 19.0 分析数据,荧光素酶活性值以 3 次独立实验的均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异检验采用单因素方差分析 SNK- q 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

表 1 4 个阶段重组质粒的引物序列

Tab.1 Primer sequence of recombinant plasmids of four stages

重组质粒名称	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
pGL3-pro-SLCi7-N01	ACGCGT TTCTTACCAGAAGGTAA	CTCGAG CTCTGCTTCCTTCTGGC
pGL3-pro-SLCi7-N02	ACGCGT CGTGAAGACTCAAATGT	CTCGAG GATTCTAGACTCCCAGC
pGL3-pro-SLCi7-N03	ACGCGT TGTGAAGTAGAGCAAG	CTCGAG AGGGAGCTACAGTTGTA
pGL3-pro-SLCi7-N04	ACGCGT CTGGGAGTCTAGAATCA	CTCGAG ACTCAAGGGAGGATCGT
pGL3-pro-SLCi7-N05	ACGCGT GAGATGAAGTCTTCTGT	CTCGAG TTAAGATACATGAACTC
pGL3-pro-SLCi7-N06	ACGCGT GAATACATTTCAAATCC	CTCGAG GTCCAGTATCAAACATAT
pGL3-pro-SLCi7-N07	ACGCGT AAGTCGTCTTCTTGAAC	CTCGAG GGAGTGAGACTAGGT
pGL3-pro-SLCi7-N08	ACGCGT TCTACTGCTTGAAAAAG	CTCGAG GGGTTCCTTTATATCC
pGL3-pro-SLCi7-N09	ACGCGT TACCTAGTCTCCACTCC	CTCGAG TTCCTCACGTGAGCTGA
pGL3-pro-SLCi7-N010	ACGCGT AATGAAAGGCACATGAA	CTCGAG CCATGCTATTCTCGAA
pGL3-pro-SLCi7-N06.1	ACGCGT GAATACATTTCAAATCC	CTCGAG GGATCATCTACTCTGAG
pGL3-pro-SLCi7-N06.2	ACGCGT CAGCTCTAAAATAGTCT	CTCGAG AGCAATGACAAAAACC
pGL3-pro-SLCi7-N06.3	ACGCGT TGTCTGCCATCTTTAATT	CTCGAG TCCAGTATCAAACATATAC
pGL3-pro-SLCi7-N010.1	ACGCGT AAAGGCACATGAACAC	CTCGAG TTGAGCCACCACGTTCC
pGL3-pro-SLCi7-N010.2	ACGCGT ATATAGAATGTTTGCCA	CTCGAG ACAATGAAACTAGATG
pGL3-pro-SLCi7-N010.3	ACGCGT CCTTAGTGCTAACACAC	CTCGAG CATGCTATTCTGCAAA
pGL3-pro-SLCi7-N06.21	ACGCGT TGTCTGCCATCTTTAATT	CTCGAG CCATAGACATCTTTTGG
pGL3-pro-SLCi7-N010.21	ACGCGT AATATAGAATGTTTGCCA	CTCGAG GTCATGCCTTTGAGCCA
pGL3-pro-SLCi7-N010.22	ACGCGT GTGCTAACACACAGAAT	CTCGAG ACAATGAAACTAGATGA
pGL3-pro-SLCi7-N06.21-300 bp	ACGCGT GTCTGCCATCTTTAATT	CTCGAG GTGGATTGCTCAAGC
pGL3-pro-SLCi7-N010.22-300 bp	ACGCGT GCTGGGAACGGCTATTC	CTCGAG AACAATGAAACTAGAT

注:上游引物 5' 端加入 ACGCGT 为 *Mlu* I 的酶切序列,下游引物 5' 端加入 CTCGAG 序列为 *Xho* I 的酶切序列



注:图中加粗的线代表荧光素酶活性有下调作用的截短片

图 1 截短型重组质粒的分析策略

Fig.1 Truncated analysis strategy of recombination plasmids

2 结果

2.1 截短型野生型重组质粒构建整体策略

成功构建共 21 个重组野生质粒,各阶段截短型重组质粒的构建具体分析策略(图 1)。

2.2 所有截短型重组质粒的酶切鉴定和测序结果

所有的截短型重组质粒都行限制性内切酶 *Xho* I 和 *Mlu* I 的双酶切 3 h,在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳(110 V,20 min)鉴定结果(图 2),酶切电泳结果为 2 条带,分别为 5 010 bp 的 pGL3-promoter 空载和各阶段插入片段。所有片段大小与理论序列一致。由于测序结果过多,文章未列出。

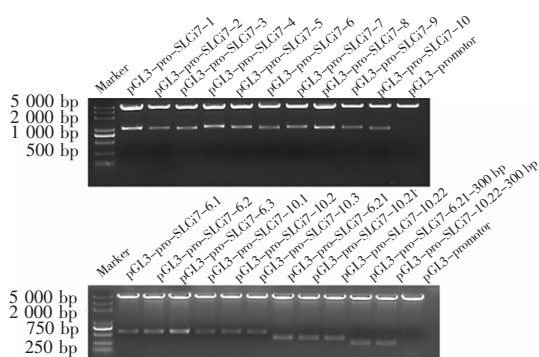
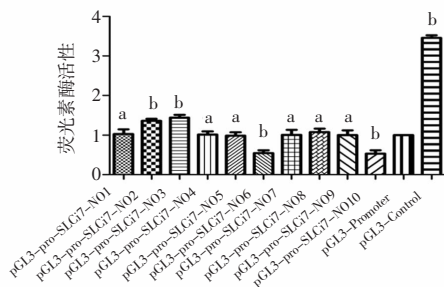


图 2 所有重组质粒 *Xho* I 和 *Mlu* I 双酶切鉴定

Fig.2 All products of recombinant plasmid digested with *Xho* I and *Mlu* I

2.3 截短型重组质粒荧光素酶活性的检测

第 1 阶段将 intron7 分为 10 段(图 1),每段重叠 500 bp,成功构建编号为 pGL3-pro-SLCi7-NO1-10 的 10 个截短型重组质粒;转染 24 h 后,检测荧光素酶活性;结果发现 pGL3-pro-SLCi7-NO6 (0.544 ± 0.074) 和 pGL3-pro-SLCi7-NO10 (0.532 ± 0.085) 重组质粒转染组与 pGL3-promoter (1.000 ± 0.000) 空载转染组比较荧光素酶活性值降低(图 3),差异有统计学意义($P < 0.05$)。



a. 与 pGL3-Promoter 组比较 $P > 0.05$; b. 与 pGL3-Promoter 组比较 $P < 0.05$

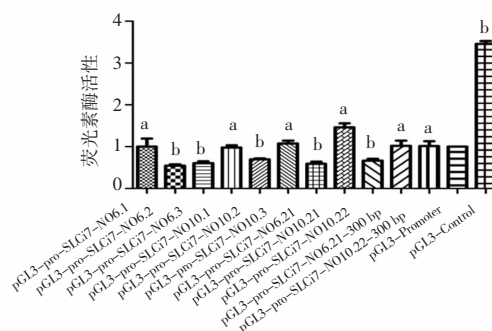
图 3 重组质粒 NO1~NO10 3 次独立实验荧光素酶活性 ($\bar{x} \pm s$)

Fig.3 Luciferase activity of three independent experiments of recombinant plasmids NO1~NO10 ($\bar{x} \pm s$)

第 2 阶段将上阶段发现下调作用的 NO6 和 NO10 重组质粒的插入片段各分为 3 段(图 1),每段重叠 400 bp,成功构建编号为 pGL3-pro-SLCi7-NO6.1-6.3 及 pGL3-pro-SLCi7-NO10.1-10.3 的 6 个截短型重组质粒;转染细胞 24 h 后,检测荧光素酶活性值发现 pGL3-pro-SLCi7-NO10.2 (0.696 ± 0.021) 和 pGL3-pro-SLCi7-NO6.2 (0.546 ± 0.029) 和 pGL3-pro-SLCi7-NO6.3 (0.606 ± 0.041) 重组质粒转染组与 pGL3-promoter (1.000 ± 0.000) 空载转染组比较荧光素酶活性值降低(图 4),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

第 3 个阶段将荧光素酶活性下调的 NO10.2 重组质粒中的插入片段分为 2 段(图 1),重叠 200 bp,成功构建 2 个编号为 pGL3-pro-SLCi7-10.21 和 pGL3-pro-SLCi7-10.22 的截短型重组质粒。同时因第二阶段发现重组质粒 NO6.2 和 NO6.3 都有下调作用,且两者的插入片段存在 400 bp 的重叠(图 1)。故以重叠的 400 bp 为插入片段构建编号为 pGL3-pro-SLCi7-NO6.21 的截短型重组质粒;荧光素酶活性检测发现 pGL3-pro-SLCi7-NO10.22 (0.065 ± 0.045) 及 pGL3-pro-SLCi7-NO6.21 (0.592 ± 0.050) 的重组质粒转染组与 pGL3-promoter (1.000 ± 0.000) 空载转染组比较荧光素酶活性值降低(图 4),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

最后将第 3 阶段发现下调作用的 NO10.22 和 NO6.21 的重组质粒中的插入片段从 5' 端缩小 100 bp(图 1),构建 2 个编号为 pGL3-pro-SLCi7-NO10.22-300 bp 和 pGL3-pro-SLCi7-NO6.21-300 bp 截短型重组质粒,荧光素酶活性检测结果发现 2 个重组质粒 pGL3-pro-SLCi7-NO10.22-300 bp (1.015 ± 0.112) 和 pGL3-pro-SLCi7-NO6.21-300 bp (1.022 ± 0.123) 转染组与 pGL3-promoter (1.000 ± 0.000) 空载转染组比较荧光素酶活性值无下降(图 4),差异无统计学意义($P > 0.05$)。



a. 与 pGL3-Promoter 组比较 $P > 0.05$; b. 与 pGL3-Promoter 组比较 $P < 0.05$

图 4 第 2 阶段至第 4 阶段重组质粒 3 次独立实验荧光素酶活性 ($\bar{x} \pm s$)

Fig.4 Luciferase activity of three independent experiments of recombinant plasmids from second stage to fourth stage ($\bar{x} \pm s$)

2.4 转录因子结合位点预测

通过 JASPAR 数据库对 2 个负性调控原件转录因子结

合位点进行预测,发现 4 个得分较高(>11)的转录因子 NFATC2、FOXH1、ESRRA、ZEB1(图 5)。

NO6.21	1	CCTGCTCTGCCATCTTTAATTTCAGTTTATTTAGGATGACCAAACTAGCAGTTTGATAA	62
		NFATC2	
	63	GTGCTCTCTTGAACCTGGAAATCTGCTTCCACTTTTATTTCTTAATGAAAAGTGAG	124
	125	TTCAATGATCTTAATTAGACATTCTACTAGAAATTTCTCACTAACTTTATTTCAGAACTC	186
	187	AGAGTAGATGATCCATTGACGACATATAAAGTTTGTAAAGTCTGCTGCTCTTCTTCA	248
		FOXH1	
	249	GGAATTGAGGTATTATTCCTCAATCTCTAGTAGCTGACCAATCCACATTCAGAAGAAA	310
	311	ACATTTTCTTTGCTCTCAATGTAATTCATGGAAGACAATTTAGTTTCAGTACTCATTTTA	372
	373	AATTGGCCTCTGGTTTGTCTATGCTAGCAAAAAGATGCTCTATGG	417
NO10.22	1	GTGCTAACACACAGAAATAGATGCTCCCTTCAAGATGCTGCTCAAGCTTGCTGACT	62
		ESRRA	
	63	CTAGAAACCAAGCTCACTCACTGAGGAAGTCCAGCTGCTGCTGGAACGGCTATTGCTT	124
	125	GTGTCACCAACGCAAGGTATGACAGAAAGGACAGCTGGGCAACGCTGCGGAAGTGGT	186
	187	GCTCAAAGGATCACTGCAAACTACCACTGACAAAAAGCCAGTGTGCTTGGCTCTCTA	248
	249	GAGGTCAATGGCTGGAACAATGTCATGATGCTGCTGCTCAACAAAGGCTTCT	310
	311	GAATTGCTACTTCTATAATCAAGCTGCTCAGAAAGGATCTAGCGCTCAAAAATATAGCT	372
	373	ATCATCTAGTTTCATTTGTTG	392

图 5 转录因子结合位点

Fig.5 Transcription factor binding sites

3 讨论

众所周知,冠心病是一种多基因遗传性复杂疾病,面对这一严重危害人类健康的疾病,世界各国的学者进行了长期大量的研究,涉及到许多基因,但仍未明确与冠心病发生密切相关的基因^[6]。2009 年 Nature genetic 的发现 SLC22A3-LPAL2-LPA 单倍型对冠心病的发生具有强易感性,揭示了 SLC22A3 的 SNP rs2048327(A/G)位点与冠心病的关系。LPA 基因与冠心病发生的密切关系已经得到多数学者的认同,但是关于 SLC22A3 与冠心病关系报道很少。SLC22A3 基因是溶质转运体超家族,编码的 OCT3 在体内分布广泛,主要介导有机阳离子的转运,已发现其与药物代谢和癌症的关系密切^[15-17]。

课题组前期做了 SLC22A3-LPAL2-LPA 单倍型与西南地区冠心病患者的关联性分析发现,SLC22A3 基因与我国西南地区汉族人群冠心病的发生密切相关,且 AG 基因型在冠心病组的出现频率明显高于对照组^[18];针对 SLC22A3-intron7 的 SNP rs2048327(A/G),又分别构建了重组野生型和突变型质粒,运用双荧光素酶报告基因系统研究发现 SLC22A3 基因 intron7 序列具有负性调节荧光素酶活性作用;并发现该序列上的 SNP rs2048327 位点 A→G 的突变,增强该内含子对荧光素酶活性的负性调控作用^[19]。但前期的实验尚不能明确 intron7 的负性调控作用是单因素所致还是多因素的综合作用结果,故通过不断的缺失 intron7 的序列,通过构

建一系列 pGL3-Promoter-intron7 的缺失重组质粒,不断缩小 intron7 的核心负性调控区域的序列,发现位于 intron7 中间部分及 SNP rs2048327 位点附近的 2 段 400 bp 左右大小的负性调控序列;本实验结果与本课题组前期关于 intron7 序列具有负性调节作用的研究结论相印证。

人类基因的正确表达不仅具有正性调控机制,也具有负性调控机制,在特定基因的表达调控中,转录水平的调控又是至关重要的环节,每一个基因的开启和关闭决定了编码蛋白表达量的多少,从而最终决定着细胞的正常代谢^[23]。内含子是位于人类基因编码区的特异性非编码序列,内含子参与了 mRNA 成熟的每一步,包括转录起始、转录的延伸、转录终止及 mRNA 的稳定性,内含子中包含很多调控元件,尤其是在 5'UTR 或者第一编码区附近的内含子序列。因此,内含子在基因的表达中起着十分重要的作用^[24]。本实验使用的荧光素酶报告载体 pGL3-prom-oter,具有完整的 SV40 启动子,其多克隆位点位于 SV40 启动子上游,将 intron7 相关的基因片段插入多克隆位点,不会影响下游荧光素酶基因的表达,在分析调控元件时广泛应用。双荧光素酶检测体系通过把海肾荧光素 pRL-sv40 质粒与荧光素酶表达重组质粒共转染 293T 细胞,以海肾荧光素酶活性消除不同组间的转染效率差异,从而使检测结果更加可靠,具有可比性。缺失扫描法则是研究调控元件较常用的方法,在 PCR 阶段,通过设计片段之间的重叠序列从而避免遗漏调控区的重要元件,从而最终达到精确定位^[25]。本研究锁定了 SLC22A3-intron7 的 2 个负性调控区域,但都是在荧光素酶基因的表达水平上实现的检测,其对 OCT3 蛋白表达的直接作用尚不清楚,需要加入功能试验和动物实验进一步深入研究;另外运用 JASPAR 数据库预测 NO6.21 和 NO10.22 两段序列的转录因子结合位点,预测发现两段序列中结合率较高的 4 个转录因子:NFATC2,FOXH1,ESRRA,ZEB1,这也是接下来的研究重点。

综上所述,本研究发现了位于 SLC22A3 基因 intron7 上 NO10.22 (NC_018917.2, 161126045 to 161126436), NO6.21 (NC_018917.2, 161124037 to 161124453) 2 个具有负性调控作用的序列并锁定了负性调控作用的核心区域的序列及位置,为从分子

水平探讨 SLC22A3 基因与冠心病的发病机制研究奠定了一定的理论基础,为临床冠心病防治提供了新的理论依据。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 陆在英,钟南山.内科学[M].7 版.北京:人民卫生出版社,2010:274.
- [3] Simon AS,Vijayakumar T.Molecular studies on coronary artery disease—a review[J].Indian J Clin Biochem,2013,28(3):215–226.
- [4] Li J,Zhang M,Loerbroks A,et al.Work stress and the risk of recurrent coronary heart disease events:A systematic review and meta-analysis[J].Int J Occup Med Environ Health,2014,27(6):1–12.
- [5] Drendel HM,Vatta M.Coronary artery disease:the magnificent fifty[J].Trends Cardiovasc Med,2014(14):205–209.
- [6] 丁艳辉.冠状动脉粥样硬化性心脏病易感基因的研究进展[J].心血管病学进展,2012,33(1):66–69.
- [7] 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.
- [8] Luke MM,Kane JP,Liu DM,et al.A polymorphism in the protease-like domain of apolipoprotein(a) is associated with severe coronary artery disease[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,2007,27(9):2030–2036.
- [9] Wu Z,Sheng H,Chen Y,et al.Copy number variation of the Lipoprotein(a) (LPA) gene is associated with coronary artery disease in a southern Han Chinese population[J].Int J Clin Exp Med,2014,7(10):3669–3677.
- [10] Song ZK,Wu HD,Cao HY,et al.The association between the LPA gene polymorphism and coronary artery disease in Chinese han population[J].Biomed Res Int,2014(2014):370670.
- [11] 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.
- [12] Shu Y.Research progress in the organic cation transporters[J].Journal of Central South University Medical sciences,2011,36(10):913–926.
- [13] Chen L,Hong C,Chen EC,et al.Genetic and Epigenetic Regulation of the Organic Cation Transporter 3,SLC22A3[J].Pharmacogenomics J,2013,13(2):110–120.
- [14] Lv X,Zhang Y,Rao S,et al.Lack of association between four SNPs in the SLC22A3–LPAL2–LPA gene cluster and coronary artery disease in a Chinese Han population;a case control study[J].Lipids Health Dis,2012(11):128.
- [15] 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.
- [16] Chen L,Pawlikowski B,Schlessinger A,et al.Role of organic cation transporter 3 (SLC22A3) and its missense variants in the pharmacologic action of metformin[J].Pharmacogenet Genomics,2010,20(11):687–699.
- [17] Yokoo S,Masuda S,Yonezawa A,et al.Significance of organic cation transporter 3 (SLC22A3) expression for the cytotoxic effect of oxaliplatin in colorectal cancer[J].Drug Metab Dispos,2008,36(11):2299–2306.
- [18] 丁艳辉,柳青,雷寒.SLC22A3–LPAL2–LPA 基因单核苷酸多态性与冠心病的关系研究[J].第三军医大学学报,2010,32(22):2394–2399.
- [19] 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.
- [20] Ha Choi J,Wah Yee S,Kim MJ,et al.Identification and characterization of novel polymorphisms in the basal promoter of the human transporter, MATE1[J].Pharmacogenet Genomics,2009,19(10):770–780.
- [21] Yee SW,Shima JE,Hesselson S,et al.Identification and characterization of proximal promoter polymorphisms in the human concentrative nucleoside transporter 2 (SLC28A2)[J].J Pharmacol Exp Ther,2009,328(3):699–707.
- [22] Yu Q,Shen XH,Li Y,et al.An Intron Mutation in the May Be Associated with a Transcriptional Regulation Defect in a Chinese Family with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia[J].PLoS One,2013,8(2):e58031.
- [23] 邓永键,王爽,郑林,等.LUNX 基因增强子的克隆及调控活性分析[J].南方医科大学学报,2010,30(9):2025–2029.
- [24] Chorev M,Carmel L.The function of introns[J].Front Genet,2012,3(3):55–69.
- [25] 吴莹.乙型肝炎病毒正链负性调节元件的鉴定与功能研究[D].重庆:重庆医科大学,2007.

(责任编辑:关蕴良)