

[文章编号] 1007-3949(2003)11-06-0509-03

•实验研究•

载脂蛋白 C_Ⅱ基因启动子区-190 T[→]A 突变对其转录的影响陈春华¹, 曹英林¹, 胡维诚²

(山东大学医学院 1. 免疫学教研室, 2. 病理学教研室; 山东省济南市 250012)

[关键词] 分子生物学; 载脂蛋白 C_Ⅱ启动子突变对转录的影响; 定点诱变; 脂质体转染; 荧光素酶; 载脂蛋白 C_Ⅱ 启动子

[摘要] 为探讨载脂蛋白 C_Ⅱ基因启动子区-190 bp 处的碱基突变(T[→]A)对载脂蛋白 C_Ⅱ基因转录的影响, 及其与血浆载脂蛋白 C_Ⅱ浓度降低的关系。通过定点诱变技术构建带有-190 bp 处 T[→]A 突变的载脂蛋白 C_Ⅱ启动子的荧光素酶表达载体 pGL3; 应用脂质体介导的基因转染技术, 将带有正常的载脂蛋白 C_Ⅱ启动子的表达质粒和构建的突变质粒分别与内参照质粒 pRL-TK 共转染 HepG2 细胞, 瞬时表达; 利用双荧光素酶测试系统检测荧光素酶活性。结果发现, 带有启动子区-190 T[→]A 突变的载脂蛋白 C_Ⅱ启动子的荧光素酶表达活性比正常的载脂蛋白 C_Ⅱ启动子的表达活性低 18.56%。结果提示, 载脂蛋白 C_Ⅱ基因启动子区-190 bp 处的碱基由 T 突变为 A 降低了载脂蛋白 C_Ⅱ启动子的转录活性。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Apolipoprotein C_Ⅱ promoter DNA T[→]A Mutation at Position -190 Affects on the Transcription of the Apolipoprotein C_Ⅱ GeneCHEN Chuan-Hua¹, CAO Ying-Lin¹, and HU Wei-Cheng²

(1. Institute of Immunology; 2. Institute of Pathophysiology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Liposome transfection; Luciferase; Apolipoprotein C_Ⅱ; Promoter; Mutation; Transcriptional Activity

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of apolipoprotein C_Ⅱ promoter T[→]A mutation at position -190 on the transcription of the apolipoprotein C_Ⅱ gene and its relationship to the decrease of apolipoprotein C_Ⅱ concentration in plasma. **Methods** Firstly, the expression vector pGL3 with -190 T[→]A mutant promoter was constructed using site-directed mutagenesis; Secondly, the expression vector pGL3 with mutant promoter and normal promoter respectively was cotransfected with pRL-TK as an internal control into HepG2 cells by liposome-mediated methods, and expressed transiently. Thirdly, Both firefly luciferase activity driven by normal/mutant apolipoprotein C_Ⅱ promoter from pGL3 and renilla luciferase activity driven by TK promoter from pRL-TK were measured by dual luciferase reporter assay system. **Results** The results showed that the T[→]A mutation at position -190 in apolipoprotein C_Ⅱ promoter caused a decrease of 18.96% in luciferase activity compared with the normal apolipoprotein C_Ⅱ promoter. **Conclusions** The T[→]A mutation of -190 base in apolipoprotein C_Ⅱ promoter region could decrease transcription activity of apolipoprotein C_Ⅱ promoter.

载脂蛋白 C_Ⅱ是由 79 个氨基酸组成的单一多肽链^[1,2], 是乳糜微粒、极低密度脂蛋白和高密度脂蛋白的结构蛋白之一。载脂蛋白 C_Ⅱ作为脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL) 的激活因子, 在脂蛋白的代谢中起着关键性的作用^[3]。本课题组曾报道一个家族性载脂蛋白 C_Ⅱ缺乏症家系, 家系成员 DNA 序列分析显示载脂蛋白 C_Ⅱ启动子-190 bp 处的碱

基由 T 突变为 A。为证实载脂蛋白 C_Ⅱ启动子-190 处的碱基突变导致血浆载脂蛋白 C_Ⅱ的缺乏, 而引起高甘油三酯血症的假说, 本文构建了带有此突变的载脂蛋白 C_Ⅱ启动子的荧光素酶表达载体, 通过检测其荧光素酶活性来研究此位点的突变是否影响了载脂蛋白 C_Ⅱ启动子的转录活性。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pGL3-载脂蛋白 C_Ⅱ由希腊克利特岛大学医学院 Dimitris Kardassis 教授惠赠, 其中含有正常载脂蛋白 C_Ⅱ启动子基因片段(-545/+18); 质粒 DNA 小量提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; 定点诱变试剂盒购自美国 Stratagene 公司。脂质体转染

[收稿日期] 2003-06-02 [修回日期] 2003-11-10

[基金项目] 国家自然科学基金(30070354)资助

[作者简介] 陈春华, 女, 1975 年 10 月出生, 河南省三门峡市人, 硕士研究生, 研究方向为基因突变与高脂血症的发病机制的研究。E-mail: dongning1017@yahoo.com.cn。曹英林, 男, 1948 年 2 月出生, 山东省济南市人, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为肿瘤免疫。胡维诚, 男, 1945 年 6 月出生, 山东省济宁市人, 博士研究生导师, 主要研究方向为动脉粥样硬化发病机制的实验研究和家族性高脂血症的基因突变研究。1997 年获政府特殊津贴。

试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; 双荧光素酶报告系统试剂盒购自美国 Promega 公司; 质粒 pGL3-Basic 和质粒 pRL-TK 由山东大学医学院生物化学教研室提供; 质粒 pGL3-control 购自 Promega 公司。

1.2 定点诱变

利用定点诱变试剂盒对载脂蛋白 C ①启动子-190 处的碱基进行突变, 以插入有正常载脂蛋白 C ①启动子的质粒 pGL3-载脂蛋白 C ①为模板, 设计一对带有预期突变的完全互补的引物: 引物 1: 5' GAATTCTCAGAGTGAGGGA* TCCCTGTCACITGAG3', 引物 2: 5' CTCAAGTGACAGGGAT* CCCTCACT CT-GAGAATTC 3', 共 34 个碱基(带星号的为预期突变碱基)。反应体系 50 μ L, 含 10 $\times$ 反应缓冲液 5 μ L, 质粒 DNA 模板 10 ng, 引物 1 和引物 2 各 125 μ g, dNTP mixture 1 μ L (10 mmol/L), Pfu DNA 聚合酶 1 μ L (2.5 Mu/L)。扩增条件: 首先 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 68 $^{\circ}$ C 延伸 12 min, 共 12 个循环。PCR 扩增出带有缺刻的突变质粒。用限制性内切酶 Dpn I 1 μ L (10 Mu/L), 37 $^{\circ}$ C 消化亲本 DNA 模板 1 h, 转化入 XL1-Blue 超感受态细胞中修复缺刻, 进而筛选出阳性重组子。

1.3 DNA 测序

对突变质粒进行正、反向测序, 正向测序引物为 pGL3-basic 的 Rvprimer 3: CTAGCAAAATAGCTGGTCC; 反向测序引物为 pGL3-basic 的 GLprimer 2: CTT-TATGTTTTTGGCGTCTTCCA; 各测一个反应。

1.4 细胞培养

HepG2 肝癌细胞由济南市传染病医院中心实验室惠赠。采用 DMEM 培养基(含 10% 小牛血清、青霉素 100 ku/L 和链霉素 100 mg/L), 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下进行培养及传代。

1.5 瞬时转染

转染前 16~20 h, 用 0.25% 胰蛋白酶消化 HepG2 细胞, 接种于 24 孔板(Costar), 1 $\times$ 10⁵/孔, 待细胞生长至 80%~90% 汇合时即可转染。转染方法按试剂盒说明操作。以 pGL3-basic 为阴性对照, 以 pGL3-control 为阳性对照, 利用 pRL-TK 质粒作为内参照, 分别将插入有正常载脂蛋白 C ①启动子的 pGL3 质粒、构建的突变 pGL3 质粒、pGL3-basic 和 pGL3-control 质粒各 0.4 μ g 与 16 ng pRL-TK 共转染入 HepG2 细胞。每次试验每一种质粒设 3 个复孔, 同一转染试验至少重复三次。

1.6 荧光素酶活性的测定

转染 48 h 后, 用细胞裂解液 PLB 裂解细胞; 在与荧光测试仪配套的加样管中加入 100 μ L Lucif-

erase Assay Reagent (LAR), 吸取 20 μ L 细胞裂解液上清与之混匀, 尽快放入荧光测试仪, 读取样品中 pGL3 携带的萤火虫荧光素酶激发底物所释放荧光的数值(数值 M₁)。读数完毕后, 在同一加样管中加入 100 μ L Stop & GloTM Reagent 混匀, 放入荧光测试仪中读取该样品中内参照质粒 pRL-TK 携带的海肾荧光素酶激发底物所释放荧光的数值(数值 M₂)。每一样品的数值 M₁/M₂ 即为该质粒转染细胞所得的荧光素酶的相对活性。

2 结果

2.1 定点诱变

插入有正常载脂蛋白 C ①启动子的质粒 pGL3-载脂蛋白 C ①全长为 5 381 bp。PCR 扩增产物是带有缺刻的突变质粒。在 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳上显示相应的特异性条带, 即 5 381 bp(图 1, Figure 1)。

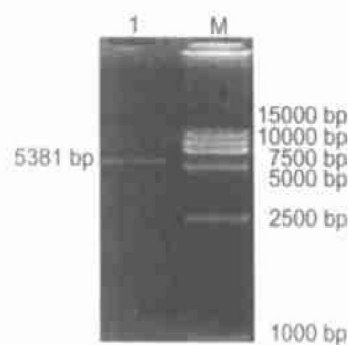


图 1. PCR 产物电泳结果 M: DNA 标准 (DL 15 000); 1: 突变质粒 pGL3-apo C ① (5 381 bp)。

Figure 1. Electrophoresis analysis of PCR products

2.2 DNA 测序

载脂蛋白 C ①启动子基因序列中只有-190 处的碱基由正常的 T 突变为 A(图 2, Figure 2)。

2.3 质粒在 HepG2 细胞中的表达

在 HepG2 细胞中, 突变的载脂蛋白 C ①启动子的荧光素酶表达活性比正常的载脂蛋白 C ①启动子的表达活性低 18.56%(图 3, Figure 3)。

3 讨论

严重的高甘油三酯血症有两个基本原因: LPL 缺乏和激活 LPL 的载脂蛋白 C ①缺乏, 二者均属于常染色体隐性遗传性疾病。临床表现基本一致: 空腹血浆乳糜微粒血症、高甘油三酯血症、肝脾肿大和反复发作的急性胰腺炎。与 LPL 缺乏症相比, 载脂蛋白 C ①缺乏症是一更为罕见的疾病。自 1978 年

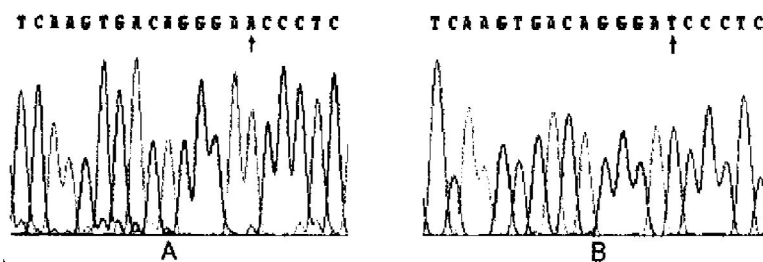


图 2. 载脂蛋白 C ϵ 启动子的 DNA 反向测序 A: 正常组; B: 突变组。

Figure 2. DNA reverse sequencing of apolipoprotein C ϵ promoter

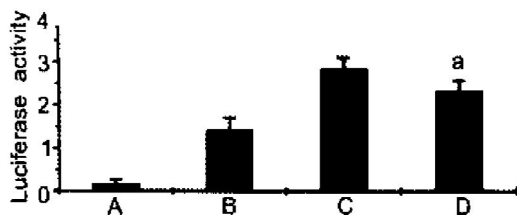


图 3. HepG2 细胞荧光素酶的相对表达活性 A: 阴性对照 pGL3-basic; B: 阳性对照 pGL3-control; C: 正常载脂蛋白 C ϵ 启动子的 pGL3 重组质粒; D: 突变载脂蛋白 C ϵ 启动子的 pGL3 重组质粒。
a: $P < 0.01$, 与正常载脂蛋白 C ϵ 启动子的 pGL3 重组质粒组相比。

Figure 3. Measurement of luciferase activities in HepG2 cells

Breckenridge 等^[3]首次报道第一例载脂蛋白 C ϵ 缺乏症以来,已在日本、英国、意大利、美国等地发现了数十例这种病人^[4]。到目前为止,未发现新的病例报告及相关研究文章。1995 年本课题组报告一个 30 天的新生儿具有上述相同的临床表现,并在出生后第 50 天因继发肺部感染死亡^[5,6]。在新生儿出现如此严重的高脂血症,推测一定存在遗传性致病因素。根据家系调查和临床实验室检查,推测患儿父母两个家系成员在载脂蛋白 C ϵ 基因存在着共同的突变。对患儿父母进行 DNA 序列分析发现,患儿父母载脂蛋白 C ϵ 基因第 1 外显子上游-190 位点各有一条链由正常的 T 突变为 A,患儿父母同为此突变的杂合子;同时有理由推测患儿可能为此突变的纯合子,此突变使载脂蛋白 C ϵ 基因不能正常转录,致使 LPL 活性缺乏,导致婴儿恶性高脂血症^[7]。

载脂蛋白 C ϵ 基因定位于 19q13.2,与载脂蛋白 E、C iv 和 C ii 形成一个载脂蛋白基因丛(载脂蛋白 E/C iv /C ii)^[8]。载脂蛋白 C ϵ 基因表达的调节主要通过对启动子的调节来完成,在载脂蛋白 C ii 和 C ii 基因之间的 0.55 kb 区是一个细胞特异型强启动子,调控着载脂蛋白 C ϵ 基因的表达^[9]。载脂蛋白 C ϵ 启动子(-545/+18)分为五区: C ii A(-74/-44)、C ii B(-102/-81)、C ii C(-159/-116)、C

ii D(-288/-265)和 C ii E(-497/-462)。在 C ii B 和 C ii C 中包含两个激素反应元件,在载脂蛋白 C ϵ 基因调控和转录增强中起重要作用^[10]。

本实验结果显示,载脂蛋白 C ϵ 启动子-190 bp 处的碱基突变减弱了载脂蛋白 C ϵ 启动子的转录活性,影响了载脂蛋白 C ϵ 的合成。在真核细胞中,载脂蛋白 C ϵ 基因的表达是其本身的顺势作用元件与反式作用因子以及诸多调控因子相互作用的结果,载脂蛋白 C ϵ 启动子-190 处的单个碱基突变不能消除重要转录因子在相应反应元件上的结合位点,对载脂蛋白 C ϵ 启动子的调控不起决定性的作用,只能部分的影响载脂蛋白 C ϵ 启动子的转录活性。对于所发现的载脂蛋白 C ϵ 缺乏症家系的发病机制还需要进行进一步研究。

[参考文献]

- [1] Havel RJ, Shore VG, Shore B, Bier DM. Role of specific glycopeptides of human serum lipoproteins in the activation of lipoprotein lipase. *Circ Res*, 1970, **27** (4): 595-600
- [2] Hospattankar AV, Fairwell T, Ronan R, Brewer HB Jr. Amino acid sequence of human plasma apolipoprotein C ϵ from normal and hyperlipoproteinemic subjects. *J Biol Chem*, 1984, **259** (1): 318-322
- [3] Breckenridge WC, Little JA, Steiner G, Chow A, Poapst M. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C ϵ . *N Engl J Med*, 1978, **298** (23): 1265-273
- [4] Saku K, Cedres C, McDonald B, Hynd BA, Liu BW, Srivastava LS, Kashyap ML. C ϵ anapolipoproteinemia and severe hypertriglyceridemia. Report of a rare case with absence of C ϵ apolipoprotein isoforms and review of the literature. *Am J Med*, 1984, **77** (3): 457-462
- [5] 冯学斌,胡维诚,张士增,刘凤,李莉,朱玉琴. 婴儿恶性高脂血症(病例报告). *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3** (3): 256
- [6] 冯学斌,胡维诚,张士增,刘凤,李莉,刘玉梅,徐军. 婴儿恶性高脂血症及家系初步研究. *中华医学遗传学杂志*, 1995, **12** (6): 366-367
- [7] 田翠环,胡维诚,陈融,克丙申. 恶性高脂血症载脂蛋白 C ϵ 的基因分析. *前卫医药杂志*, 2000, **17** (3): 153-155
- [8] Allan CM, Walker D, Segrest JP, Taylor JM. Identification and characterization of a new human gene (APOC4) in the apolipoprotein E, C iv , and C ii gene locus. *Genomics*, 1995, **28** (2): 291-300
- [9] Vorgia P, Zannis VI, Kardassis D. A short proximal promoter and the distal hepatic control region 1 (HCR-1) contribute to the liver specificity of the human apolipoprotein C ii gene. *J Biol Chem*, 1998, **273** (7): 4188-199
- [10] Kardassis D, Sacharidou E, Zannis VI. Transactivation of the human apolipoprotein C ii promoter by orphan and ligand-dependent nuclear receptors. The regulatory element C ii C is a thyroid hormone response element. *J Biol Chem*, 1998, **273** (28): 17810-816

(此文编辑 文玉珊)