

载脂蛋白 M 基因启动子区域 -778C→T 置换对其表达的影响

黄健¹, 黄韻祝¹, 张姝², 王锦支¹

(贵阳医学院 1. 附属医院生化科, 2. 临床检验教研室, 贵州省贵阳市 550004)

[关键词] 载脂蛋白 M 基因; 启动子; 基因表达调控

[摘要] **目的** 构建含载脂蛋白 M(ApoM)基因启动子区的荧光素酶报告基因的真核表达载体,探讨 ApoM 基因启动子区域 -778C→T 置换对 ApoM 表达的影响。**方法** 采用 PCR 法扩增人染色体中含 ApoM 基因 -1316 bp 至 +73 bp 的 DNA 片段,筛选出含 ApoM -778TT 基因型(-778 bp 无变异)及 ApoM -778CT/CC 基因型(-778bp 变异)的 DNA 片段,构建含以上两个基因片段的 PGL3 重组载体。并采用阳离子脂质体转染法将携带萤火虫荧光素酶报告基因的重组质粒转染 HepG2 细胞,经 48 h 培养,检测荧光素酶活性,以反映 ApoM 的表达水平。**结果** 荧光素酶报告基因活性显示,ApoM -778C 基因型携带者引起荧光素酶相对活性明显低于 ApoM -778T 基因型者。**结论** ApoM 基因启动子 -778C→T 对 ApoM 转录活性起抑制作用,它可能是影响 ApoM 基因表达的重要因素。

[中图分类号] Q343

[文献标识码] A

The Effect of C→T Substitution in ApoM Promoter -778 bp Region on Human Apolipoprotein M Expression

HUANG Jian, HUANG Yun-Zhu, ZHANG Shu, and WANG Jin-Zhi

(Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein M Gene; Promoter; Gene Modulation

[ABSTRACT] **Aim** To construct PGL3-ApoM luciferase reporter vector containing ApoM gene regulation area, and to investigate the effect of C→T substitution in ApoM promoter -778 bp region on ApoM gene expression. **Methods**

Human chromosome DNA fragments containing ApoM gene were amplified by PCR, and the DNA fragments consisting of ApoM TT and CC genotypes were separately selected, then PGL3 vector including above two different DNA fragments was constructed. Recombinant vector were cotransfected into HepG2 cells by using cationic liposome method. Cells were cultured for 48 h, activity of firefly luciferase was measured.

Results Relative activity of luciferase for ApoM CC genotype was significantly lower than that for TT genotype.

Conclusion -778 bp C→T substitution in ApoM gene may inhibit ApoM gene transcription. It may be the important factor of the ApoM gene expression.

流行病学调查和临床研究显示,基因多态性是决定人体对应激易感性与耐受性、临床表型多样性及药物治疗反应差异性的重要因素^[1]。因此,研究发现与疾病易感性相关的基因具有重要意义。人类载脂蛋白 M (apolipoprotein M, ApoM) 是由 Xu 等^[2]1999 年在提取富含甘油三酯的脂蛋白时发现的一种分子量约 26 kDa 的蛋白质。血浆中的 ApoM 主要存在于高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 颗粒中,被认为是 HDL 的一个重要组成成分。Christoffersen 等^[3]在人类血浆 ApoM 的分离中发

现,含有 ApoM 的 HDL 亚群与缺乏 ApoM 的 HDL 相比,前者能更有效地防止低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 的氧化和促进胆固醇逆向转运。由于 ApoM 对维持体内恒定的血脂水平起重要作用,故其基因变异可能导致血浆中这些脂蛋白数量和性质的变化,从而引发某些病理改变。我们通过 PCR 扩增法获得含 ApoM 启动子 -778 bp 变异的 CT/CC 型 DNA 片段,及无变异的 TT 型 DNA 片段,将这些 DNA 片段进行克隆重组构建了多个携带荧光素酶报告基因的 pGL3-ApoM 真核表达质粒,旨在

[收稿日期] 2011-06-27

[基金项目] 贵州省卫生厅优秀医学青年科技人才专项基金[G2008-12 号]和贵阳市科技局大学生创业基金(T2008-15-24)

[作者简介] 黄健,硕士研究生,检验师,研究方向为血脂生化。通讯作者黄韻祝,教授,研究方向为血脂生化, E-mail 为 31712463@qq.com。

通过体外实验进一步探讨这个位点的基因变异对 ApoM 表达调控及生物学活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

pGL3-basic 质粒、荧光素酶报告基因试剂盒、阳离子脂质体转染试剂盒为 Promega 公司产品;TaqDNA 聚合酶、T4 连接酶、DH5α 为 Taraka 公司产品;Rsa I、Hind III、Xho I 内切酶为 NEB 公司产品;蛋白酶 K 为 Sigma 公司产品。

1.2 PCR 扩增 ApoM 基因启动子区 DNA 片段

根据目的 DNA 片段和表达载体 pGL3-Basic 载体的结构特点及实验设计需要,扩增片段从 -1316 bp 位至 +73 bp 区域。应用核酸序列分析软件 Premier5.0 设计引物,于 PCR 上、下游引物分别引入 Hind III 和 Xho I 酶切位点。并加相应的保护碱基。上下游引物分别为 5'-GCCTCGAGTACCTCCTACTCGGGAATCA-3' 和 5'-GGAAGCTTCTGCTGCTCTGTGTGCCTTA-3',PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 1 min,66℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。

1.3 PCR 产物回收及鉴定

将 PCR 产物用 Rsa I 酶进行酶切鉴定,筛选出 ApoM -778TT 基因型(-778 bp 无变异)及 ApoM -778CT/CC 基因型(-778 bp 变异)的 DNA 片段。PCR 产物回收试剂盒回收 PCR 产物,将回收产物用 T4DNA 连接酶与 PMD19-T 载体相连,转导感受态 DH5α 菌株,通过蓝白斑筛选后,将阳性克隆送去测序。

1.4 pGL3-ApoM 重组质粒构建

用 Hind III 和 Xho I 酶对含有不同基因型的目的 DNA 片段正向 pMD19-T 重组质粒进行双酶切,切下一段长 1389 bp 的 ApoM 片段,将此 DNA 片段插入 pGL3-basic 表达载体的用 Hind III 和 Xho I 多克隆位点,以 T4DNA 连接酶进行连接,转导感受态 DH5α 菌株,获得重组质粒。进行酶切鉴定挑选正向插入的质粒进行测序。

1.5 pGL3-ApoM 重组质粒转染 HepG2 细胞

HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液进行细胞培养,以 6×10^5 细胞/孔的密度铺细胞于 12 孔板上,待细胞生长至 80% 汇合时进行转染。根据阳离子脂质体转染试剂盒上的操作说明,将不同基因型的重组质粒转染 HepG2 细胞(转染试剂盒为 Transfast Transfection Reagent, Promega 公司)。

1.6 荧光素酶检测

细胞经转染后培养 48 h 裂解细胞,收集细胞裂解液,用荧光素酶检测试剂盒及其推荐的操作步骤进行荧光素酶检测,用荧光光度计检测荧光值。

1.7 统计学处理

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 重组质粒酶切鉴定

用 PCR 法扩增两个重组质粒中 ApoM 启动子基因片段(1389 bp),将菌落 PCR 初步鉴定成功的质粒用 Hind III 和 Xho I 双酶切,结果表明,双酶切后变成两段,其中一段为目的片断,约为 1389 bp,另一段为剩余 pGL3 载体骨架(图 1)。

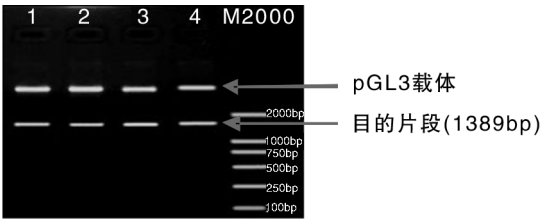


图 1. 重组质粒酶切鉴定图谱 1、2、3、4 均是同一基因型的重组质粒。

Figure 1. The results of enzyme digestion of plasmid

2.2 重组质粒的测序结果

将上一步双酶切阳性质粒进行测序验证,结果发现所构建的质粒载体经测序后,连接片段序列及方向正确,与原始序列比较,未发现碱基缺失或突变。pGL3-T 和 pGL3-C 两种载体仅仅在 -778 位点上存在单核苷酸的差异(图 2)。

2.3 各重组质粒中荧光素酶报告基因的相对活性

转染后 48 h 用荧光光度计测各转染质粒的荧光素酶活性,结果可见 pGL3 - 778C 荧光素酶活性显著低于 pGL3 - 778T ($P < 0.05$; 表 1)。

表 1. 不同重组质粒荧光素酶相对活性 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1. Analysis of relative activity of luciferase in different reporter vectors

分 组	荧光素酶活性
pGL3-basic	3.64 ± 0.89
pGL3-control	1688.86 ± 45.35
pGL3 - 778C	460.91 ± 12.58
pGL3 - 778T	2549.87 ± 63.50 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与 pGL3 - 778C 比较。

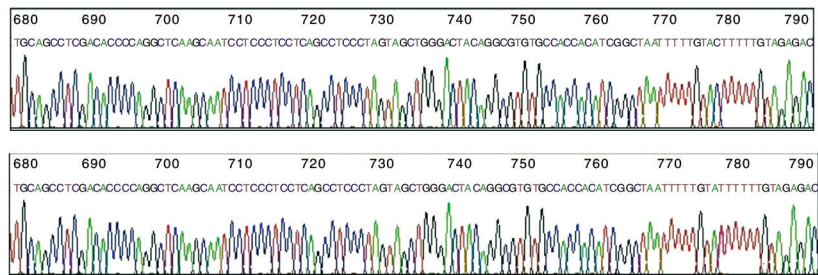


图 2. ApoM - 778C(上图)和 ApoM - 778T(下图)基因启动子多态性区域 DNA 测序图(部分)
Figure 2. The part of DNA sequences of the polymorphic region (C nucleotide (above) and T nucleotide (below) at -778) in proximal promoter region of the ApoM gene

3 讨 论

载脂蛋白 M(ApoM)是新近发现的一种主要与 HDL 相关的载脂蛋白,对 HDL 的代谢起重要作用,它通过对前 β -HDL 调节,将胆固醇从外周细胞逆向转运至肝脏,从而降低动脉粥样硬化的发病率^[4]。ApoM 基因转录起始点上游启动子部位存在转录调控元件,此区域 DNA 序列的变化可影响 ApoM 的水平,从而使 HDL 的血浆浓度发生改变。近年来,ApoM 基因启动子多态性与心血管疾病的相关研究已引起广泛关注。许伟伟等^[5]研究发现 ApoM 基因 -855T>C 多态性与中国人冠心病相关联。本实验室对冠心病患者 ApoM 基因 -778C→T 变异及基因多态性与疾病的相关性进行研究^[6],发现 -778 位点携带 C 等位基因能够增加罹患冠心病的风险,携带 C 等位基因的人群血中 HDL 浓度明显低于携带 T 等位基因的人群。

本研究中我们观察到,pGL3 - 778C 荧光素酶活性明显低于 pGL3 - 778T 者,说明 ApoM - 778C→T 变异可能影响了 ApoM 基因转录,而引起血浆 HDL 水平降低。这些结果提示可能是 T 和 C 等位基因结合的转录因子不同,或是与转录因子的结合力不同所致。然而,基因的表达并不仅由顺式调控序列本身决定,它是由顺式作用元件与反式调控因

子相互作用决定的。因此,T - 778C 与转录因子之间的相互作用仍然有待于进一步的实验验证,即采用凝胶迁移率实验(EMSA)来确定 T - 778C 所结合的转录因子,深入阐明该位点调控 ApoM 基因转录活性的根本机制。

[参考文献]

[1] 胡培丽,岳秉飞. 单核苷酸多态性的研究进展[J]. 实验动物科学与管理, 2006, 23(1): 36-38.

[2] Xu N, Dahl back B. A novel human apolipoprotein(apoM) [J]. J BiolChem,1999, 274(44): 31 286-290.

[3] Christoffersen C, Nielsen LB, Olof Axler, et al. Isolation and characterization of human apolipoprotein M - containing lipoproteins[J]. J Lipid Res, 2006, 47: 1 833-843.

[4] Zhang B, Bai H, Liu R, et al. Serum high-density lipoprotein-cholesterol levels modify the association between plasma levels of oxidatively modified low-density lipoprotein and coronary artery disease in men [J]. Metabolism, 2004, 53: 423-429.

[5] 许伟伟,汤轶波,朱含章,等. 载脂蛋白 M 基因启动子区 -855T>C 多态性与冠心病的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(7): 546.

[6] 黄健,张姝,黄韻祝,等. 贵州汉族人群载脂蛋白 M 启动子基因 T - 778C 多态性与冠心病的相关性研究[J]. 贵阳医学院学报, 2009, 3(3): 297-299.

(此文编辑 许雪梅)