

人 SDCT2 β 3'-非翻译区基因表达负调控 序列对 mRNA 稳定性的影响*

白雪源** 陈香美** 傅博 汪杨

(中国人民解放军总医院暨军医进修学院, 解放军肾脏病研究所, 北京 100853)

摘要 为探索人高亲和力钠离子依赖性二羧酸转运蛋白基因(high affinity sodium-dependent dicarboxylate transporter, SDCT2) 3'端非翻译区是否在基因表达调控中起作用, 首先通过生物信息学分析发现, 在 SDCT2 β mRNA 的 3'端非翻译区内存在 585 nt 的 AU 富含区(AU-rich region, AUR), 其中包括 3 个 AU 富含元件(AU-rich element, ARE), 然后将 SDCT2 β 的 AU 富含区 DNA 片段插入报告基因 GFP 表达载体 pcDNA-GFP 的下游, 构建 pcDNA-GFP-AUR 表达载体并转染 HEK293、HKC 和 LLC-PK1 细胞系, 用 Western blot 和流式细胞仪检测细胞中 GFP 的表达水平. 结果显示, SDCT2 β 的 AU 富含区序列可显著降低 GFP 的表达水平 ($P < 0.01$). 利用放线菌素 D 阻断 RNA 转录后, 每隔 2 h 从稳定转染的 HEK293 细胞中提取总 RNA, 用 RNA 印迹分析 GFP mRNA 的稳定性. 结果显示 GFP-AUR mRNA 较 GFP mRNA 不稳定. 这些结果提示, 在 SDCT2 β 3'非翻译区的 AU 富含区内存在基因表达负调控区, 该区可降低 mRNA 的稳定性、促进 mRNA 的降解, 从而在转录后水平调控基因的表达.

关键词 二羧酸转运蛋白, 3'非翻译区, 转录后调控, mRNA 稳定性

学科分类号 Q493.8, Q735

钠离子依赖性二羧酸转运蛋白(SDCT)是一类负责三羧酸循环中间代谢产物转运和重吸收的有机阴离子转运蛋白家族, 是调控能量代谢的一类关键性膜蛋白质. 根据对底物亲和力的不同, 可将其分为低亲和力转运蛋白(SDCT1)和高亲和力转运蛋白(SDCT2)^[1]. 前者主要表达于小肠和肾小管上皮细胞的管腔侧膜, 负责从食物和原尿中重吸收三羧酸循环中间产物. 后者主要在肾组织表达^[2, 3], 但在肝、脑、胎盘等能量代谢活跃的重要器官也表达.

目前对于 SDCT2 在体内的生理功能及其表达调控的机理并不清楚. 在前期研究中, 我们已经克隆出了其全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: AY072810)^[4], 并发现人 SDCT2 基因通过选择性转录终止机理可以转录出 2 种不同的 mRNA 变异体 (即 SDCT2 α 和 SDCT2 β), 两者具有相同的 5'端非翻译区(5' -untranslated region, 5'-UTR)和开放阅读框(ORF), 但它们的 3'-UTR 长度不同, SDCT2 β 的 3'-UTR(长 2 198 nt)比 SDCT2 α (长 1 613 nt)多出了 585 nt 的序列^[5]. 在进行序列分析时发现在这

585 nt 序列中, 靠近 3'端区的序列含有丰富的 adenylate-uridylylate (AU) 碱基, 属于 AU 富含区 (AU-rich region, AUR), 而且其中存在 3 个 AU 丰富元件(AU-rich element, ARE)(图 1). 由于一些基因 mRNA 3'端的 AU 富含区序列可通过调控 mRNA 的降解而在转录后水平(post-transcriptional level)调控基因的表达水平, 为阐明 SDCT2 β 的 AUR 是否在基因表达调控中发挥作用, 将 SDCT2 β 3'-UTR 的 AUR DNA 片段插入报告基因绿色荧光蛋白(GFP)的 3'端非翻译区, 观察 AUR 对 GFP mRNA 稳定性的影响, 以阐明 SDCT2 β 基因表达调控的机制.

* 国家重点基础研究发展计划项目(973)(2007CB507400), 国家自然科学基金项目(30070288, 30270505)和国家自然科学基金创新研究群体基金项目(30121005).

** 通讯联系人. Tel: 010-66937011

白雪源. E-mail: baixy@301hospital.com.cn

陈香美. E-mail: xmchen@public.bte.net.cn

收稿日期: 2007-12-07, 接受日期: 2008-02-21

1 材料与方法

1.1 试剂

DNA 限制性内切酶购自 Roche 公司(德国); DMEM 培养基、G418 及脂质体 Lipofectamin 2000 为 Gibco BRL 公司产品(美国); DNA 回收试剂盒购自 QIAGEN 公司.

1.2 质粒与细胞

报告基因表达载体 pcDNA-GFP 来自加拿大 Montreal 大学 Deng-Fu Guo 教授. 大肠杆菌 DH5 α 、人胚肾细胞 HEK293、人肾小管上皮细胞 HKC 和猪肾小管上皮细胞 LLC-PK1 均为本室保存.

1.3 人 SDCT2 转录本 3'-UTR 的生物信息学分析

利用 DNASTar 软件(DNASTAR, INC)对 SDCT2 α mRNA 和 SDCT2 β mRNA 的 3'-UTR 进行碱基组成分析. 利用 UTRblast 分析软件搜索基因非翻译区数据库并进行同源性分析(<http://bighost.Area.ba.cnr.it/BIG/UTRHome/>)^[6].

1.4 SDCT2 β mRNA 3'-UTR AU 富含区的克隆与测序

用酚氯仿法抽取人 HKC 细胞基因组 DNA, 方法参考《分子克隆》, 以基因组 DNA 为模板, 利用 PCR 扩增 SDCT2 β 3'-UTR 的 AU 富含区(命名为 AUR)片段. 扩增 SDCT2 β AUR 的上游引物是 5' CTC GAG AGA TGA TTT GCCTTT CTG AAC 3', 下游引物是 5' GGG CCC CCC AAT AAA TGT TTA TTG AAT G 3', 在上下游引物序列的 5' 端分别引入 *Xho* I 和 *Apa* I 限制性内切酶位点, 预计 PCR 产物长度为 585 bp. PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min 后进入循环: 94 $^{\circ}$ C 50 s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环. 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外分析 PCR 结果. 将 PCR 产物利用玻璃奶试剂盒回收后克隆至 pGEM-T 载体中, 得到重组载体 pGEM-AUR, 然后用 T7 和 SP6 引物两端测序证实.

1.5 表达载体的构建

取 pGEM-AUR 用 *Xho* I 和 *Apa* I 内切酶消化得到 AUR 片段, 然后将其插入至同样消化的 GFP 真核表达载体 pcDNA-GFP 中得到 pcDNA-GFP-AUR.

1.6 pcDNA-GFP-AUR 在 HEK293 细胞内的瞬时表达

利用转染试剂 Lipofectamine 2000 在 6 孔板内

将 pcDNA-GFP 和 pcDNA-GFP-AUR 转染到人 HEK293 细胞, 具体方法参照试剂说明书进行. 转染 48 h 后提取蛋白质用 GFP 单抗进行 Western blot 以分析 GFP 的表达水平, 以 β -actin 作为蛋白质电泳上样内对照.

1.7 稳定表达细胞株的筛选

利用 Lipofectamine 2000 在 6 孔板内将 pcDNA-GFP 和 pcDNA-GFP-AUR 分别转染 HEK293、HKC 及 LLC-PK1 细胞系. 转染 48 h 后将细胞 1:10 稀释并加入不同浓度的 G418 (400~1 000 mg/L) 进行筛选, 持续筛选约 2 周后获得稳定整合的细胞克隆, 用流式细胞仪检测细胞内 GFP 的平均荧光强度.

1.8 Northern Blot 分析 HEK293 细胞内 GFP 基因 mRNA 的稳定情况

在 35 cm² 培养瓶内接种稳定表达 GFP 和 GFP-AUR 的 HEK293 细胞 1 \times 10⁶ 各 7 瓶. 待细胞生长密度达 80%~90% 时加入放线菌素 D (actinomycin D, 5 mg/L) 以阻断 RNA 的转录, 并在 0、2、4、6、9、12 h 时提取细胞总 RNA 进行 Northern blot 分析. 以 pcDNA-GFP 为模板, 利用 SP6 RNA 聚合酶通过体外转录标记全长 GFP RNA 探针, 并以 *Eco*R I 酶切后的 pBluescript-GAPDH 为模板, 利用 T7 RNA 聚合酶经体外转录标记 400 nt 长的 GAPDH RNA 探针. 探针的标记, 效率测定及 Northern blot 皆参照说明书进行.

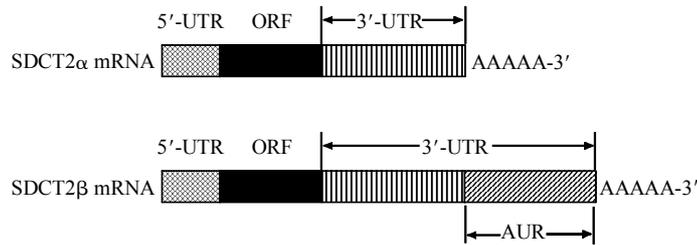
1.9 数据统计分析

采用 SAS 统计软件包进行 χ^2 及 students *t* 检测.

2 结 果

2.1 人 SDCT2 mRNA 生物信息学分析结果

利用 UTRblast 软件搜索基因 UTR 数据库, 发现在人 SDCT2 β mRNA 3'-UTR 内靠近 3' 端存在一个 AU 富含区(AUR), 见图 1, 并发现在该区内有 3 个 AU 富含元件(AU-rich element, ARE), 见图 1 中 AUR 的下划线序列. 但是, 在 SDCT2 α 的 3'-UTR 并没有发现类似的 AU 富含区. 已发现一些基因 3'-UTR 内的 AU 富含区尤其是 ARE 及高度同源区常在基因表达调控中起作用^[7], 因此本结果提示 SDCT2 β 3'-UTR 内的 AU 富含区可能具有调控基因表达水平的功能.



UUUUCUUUAUUUACUUCUUCUCCUCUAGAAUAUAAAAUUUAUGAAAAUACAAAUGUUAUUUUUUUUUAC
 UGCUGUAACUCCAGUCCUAGAACAAAUUCCAGCACAUAGCAAGUGUUCAGUAAAUAUUUGCUGCUU
 GAAUCUGCUCAGAAUAACAAGAAAGCCAUCUCUCCUCUGAUCUGGGGUCUGUUUUGUUCAUAC
 UUUGUUCACUCCUUCUCCAAUUUAUUCAUUCAAUAAACAUUUAUUUGGGAACCTG

Fig. 1 Schematic diagram of SDCT2α and SDCT2β transcripts and the sequence of AU-rich region (AUR) within SDCT2β 3'-UTR

5'-UTR: 5'-untranslated region; ORF: open reading frame; 3'-UTR: 3'-untranslated region; AUR: AU-rich region. AU-rich elements (AREs) were underlined; Poly (A) signal was boxed.

2.2 人 SDCT2β 3'-UTR AUR 序列的克隆

以人基因组 DNA 为模板, 利用 PCR 技术扩增获得 585 bp 的 SDCT2β 的 AU 富含区序列(命名为 AUR), 将 PCR 产物回收后插入 pGEM-T 载体中得到 pGEM-AUR, 经测序证实其序列与我们以前报道的序列一致.

2.3 报告基因 GFP 重组质粒的构建

将 pGEM-AUR 用 *Xho* I + *Apa* I 双切得到 AUR 片段, 然后将其定向亚克隆至同样双切的 GFP 真核表达载体 pcDNA-GFP 中 GFP 基因的下流, 得到重组载体 pcDNA-GFP-AUR. 重组质粒经酶切鉴定大小正确(图 2), 并进一步通过测序证实(测序结果未显示).

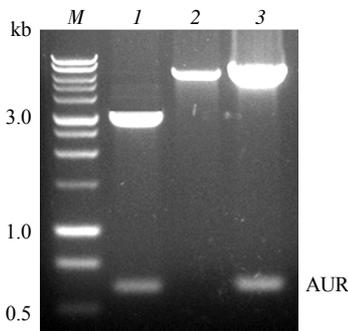


Fig. 2 Restriction digestion of recombinant plasmid pcDNA-GFP-AUR

M: 1 kb DNA marker; 1: pGEM-AUR; 2: pcDNA-GFP; 3: pcDNA-GFP-AUR.

2.4 pcDNA-GFP-AUR 在 HEK293 细胞内的瞬时表达

将 pcDNA-GFP 和 pcDNA-GFP-AUR 分别经脂

质体介导转染 HEK293 细胞, 48 h 后提取蛋白质进行 Western blot 分析, 结果显示, pcDNA-GFP-AUR 转染细胞中 GFP 蛋白的表达水平明显比 pcDNA-GFP 的 GFP 蛋白表达水平低(图 3), 表明, SDCT2β 的 AU 富含区序列(AUR)可以明显抑制 GFP 基因的表达.

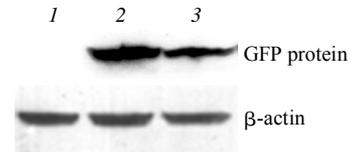


Fig. 3 Western blot analysis of expression level of GFP protein in HEK293 cells

1: The untransfected cells; 2: The cells transfected with pcDNA-GFP; 3: The cells transfected with pcDNA-GFP-AUR.

2.5 SDCT2β 3'-UTR 中的 AU 富含区可明显降低 GFP 基因的表达水平

为了排除转染效率对 GFP 表达水平的影响, 将 pcDNA-GFP-AUR 和 pcDNA-GFP 经脂质体介导分别转染 HEK293、HKC 和 LLC-PK1 细胞, 48 h 后用 G418 筛选, 约 2 周后获得稳定表达 GFP 的细胞克隆并用流式细胞仪检测 GFP 的平均荧光强度. 结果在 3 种细胞内, pcDNA-GFP-AUR 介导的 GFP 表达与 pcDNA-GFP 相比平均荧光强度明显降低, 其中在 HEK293 和 LLC-PK1 细胞内荧光强度降低 51%, 在 HKC 中降低 52.5%(图 4). 说明在 SDCT2β mRNA 3'-UTR 中的 AU 富含区(AUR)含有负调控序列, 可明显降低报告基因 GFP 的表达水平.

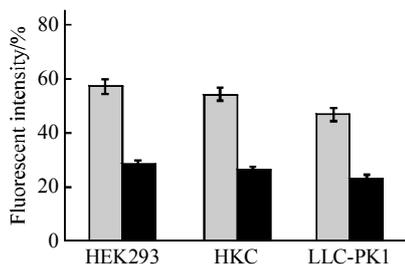


Fig. 4 Effect of AUR of SDCT2β on GFP expression level in different cell lines by flow cytometry analysis

Mean values of multiple experiments are displayed with error bars. $P < 0.01$. □: GFP; ■: GFP-AUR.

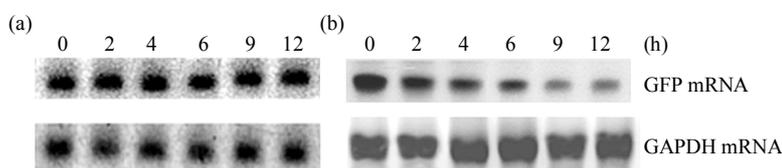


Fig. 5 Analysis of the stability of GFP mRNA by Northern blot

The AU-rich region of SDCT2β 3'-UTR accelerates the decay of GFP mRNA after the HEK293 cells treated with actinomycin D (5 mg/L). (a) The cells transfected with pcDNA-GFP. (b) The cells transfected with pcDNA-GFP-AUR.

3 讨 论

越来越多的研究表明, 真核基因 mRNA 3'端非翻译区(3'-UTR)在基因表达调控中发挥重要作用, 3'-UTR 可以调控 mRNA 的核质转运、mRNA 的稳定性以及 mRNA 的翻译效率, 目前对真核 mRNA 3'-UTR 已建立了专门的数据库 UTR^[8]. 一些基因 mRNA 3'-UTR 内的 AU 富含区(AUR)可通过影响 mRNA 的稳定性来调控基因的表达水平, 如在 IL-6 和 COX-2 基因的 3'-UTR 内都发现存在控制 mRNA 稳定性的 AU 富含元件(ARE)^[9, 10]. 在正常情况下, ARE 可通过与相应的反式因子(如 RNA 结合蛋白 AUF1)结合加速 mRNA 的降解, 使基因处于低表达水平^[9]. 但在特殊的病理或外界刺激的情况下, 另外一些 RNA 结合蛋白(如 HuR)可通过与 ARE 结合而起到抑制 mRNA 降解、稳定 mRNA 的作用, 从而使基因表达水平增高^[11].

SDCT2 基因主要在肝、肾、脑、胎盘等重要生命器官中表达, 目前其生理功能尚不清楚. 由于转运的底物为三羧酸循环中间代谢产物, 故推测其在机体的能量代谢过程中可能发挥重要作用. 对低等生物果蝇和线虫中的 SDCT 样基因的研究显示, SDCT 与衰老及长寿的调控有关, 可能是一类新的

2.6 SDCT2β 的 AUR 可加速 GFP mRNA 的降解

为了观察 SDCT2β AUR 对报告基因 GFP mRNA 稳定性的影响, 利用放线菌素 D 阻断 HEK293 细胞中的 mRNA 转录, 然后在不同时间提取细胞总 RNA 进行 Northern blot 分析, 观察 GFP mRNA 的降解情况. 结果显示, SDCT2β 3'-UTR 中 AUR 序列的存在可加速 GFP mRNA 的降解, 而无 AUR 序列的 GFP mRNA 则相对较稳定(图 5). 说明 SDCT2β 的 AU 富含区(AUR)可能是在转录后水平, 即通过加速 GFP mRNA 的降解, 而抑制 GFP 基因的表达. 这提示 SDCT2β 3'-UTR-AUR 中存在基因表达的负调控元件.

长寿基因(longevity gene). 前期研究发现, 在老年人肾组织中 SDCT2 的表达水平明显增加, 将人 SDCT2 基因转染到二倍体细胞系 WI-38 内过表达可加快其衰老进程^[12], 因此阐明其表达调控的机制具有重要的意义. 我们发现 SDCT2 基因可通过选择性转录终止机理产生 2 种转录产物 SDCT2α 和 SDCT2β, 两者均具有较长的 3'端非翻译区. 通过生物信息学软件分析, 表明 SDCT2β 在靠近 3'端第 2 个 poly (A) 位点附近有约 585 nt 的 AU 富含区. 为了探索是否 AU 富含区序列与 SDCT2β 的基因表达调控有关, 将这个 AU 富含区片段插入报告基因 GFP 的下游. 结果与对照组相比, AU 富含区可使 GFP 基因的表达水平受到明显抑制. 由于在报告基因表达载体中 5'端启动子及 GFP 序列完全相同, 可以排除两者表达水平的差异是在转录水平, 因此 SDCT2β 3'端非翻译区内的 AU 富含区可能通过与反式因子结合, 从而在转录后水平抑制了报告基因的表达. 关于哪些 RNA 结合蛋白与 AUR 相互作用, 则有待于进一步的研究确定. 利用放线菌素 D 阻断 RNA 合成后, Northern blot 显示 GFP mRNA 的稳定性明显高于 GFP-AUR mRNA, 说明 SDCT2β AU 富含区序列可加速 GFP mRNA 的降解. 总之, 本试验证明 SDCT2β 基因表达可能存

在转录后调控(post-transcriptional regulation)机制, 且其转录后的调控是通过其 3'端 UTR 内的 AU 富含区实现的. 因为 SDCT2 β 的 3'端 AU 富含区序列可在一定程度上加速 mRNA 的降解、明显抑制报告基因的表达, 因此该区可能为基因表达的负调控区.

参 考 文 献

- 1 Pajor A M. Molecular properties of the SLC13 family of carboxylate and sulphate transporters. *Pflugers Arch*, 2006, **451** (5): 597~605
- 2 白雪源, 侯 凯, 陈香美, 等. 人 SDCT2 蛋白亚细胞定位信号分析. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31**(10): 881~886
Bai X Y, Hou K, Chen X M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31**(10): 881~886
- 3 Bai X, Chen X, Feng Z, *et al.* Identification of basolateral membrane targeting signal of human sodium-dependent dicarboxylate transporter 3. *J Cell Physiol*, 2006, **206** (3): 821~830
- 4 白雪源, 陈香美, 邱 强. 人肾脏高亲和力和钠离子依赖性二羧酸转运蛋白基因的克隆和生物信息学分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, **18** (4): 404~410
Bai X Y, Chen X M, Qiu Q. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2002, **18** (4): 404~410
- 5 白雪源, 陈香美, 侯 凯, 等. 人 SDCT2 基因的两种不同转录产物选择性转录机理分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, **20** (5): 615~622
Bai X Y, Chen X M, Hou K, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2004, **20** (5): 615~622
- 6 Mignone F, Grillo G, Licciulli F, *et al.* UTRdb and UTRsite: a collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33** (Database issue): D141~146
- 7 Wang W, Martindale J L, Yang X, *et al.* Increased stability of the p16 mRNA with replicative senescence. *EMBO Reports*, 2005, **6** (2): 158~164
- 8 Pesole G, Liuni S, Grillo G, *et al.* UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30** (1): 335~340
- 9 Paschoud S, Dogar A M, Kuntz C, *et al.* Destabilization of interleukin-6 mRNA requires a putative RNA stem-loop structure, an AU-rich element, and the RNA-binding protein AUF1. *Mol Cell Biol*, 2006, **26** (22): 8228~8241
- 10 Lee H K, Jeong S. Beta-Catenin stabilizes cyclooxygenase-2 mRNA by interacting with AU-rich elements of 3' -UTR. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(19): 5705~5714
- 11 Lim S J, Kim H J, Kim J Y, *et al.* Expression of HuR is associated with increased cyclooxygenase-2 expression in uterine cervical carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*, 2007, **26** (3): 229~234
- 12 Chen X, Cao D, Wang J, *et al.* Effects of human Na⁺/dicarboxylate cotransporter 3 on the replicative senescence of human embryonic lung diploid fibroblasts. *J Gerontol A Biol*, 2005, **60** (6): 709~714

Effect of A Negative Regulation Sequence of Gene Expression Within The 3'-UTR of Human SDCT2 β on mRNA Stability*

BAI Xue-Yuan**, CHEN Xiang-Mei**, FU Bo, WANG Yang

(Chinese PLA Institute of Nephrology, Chinese PLA General Hospital & Military Medical Postgraduate College, Beijing 100853, China)

Abstract To explore whether the 3'-untranslated region (3'-UTR) of human high-affinity sodium-dependent dicarboxylate transporter (hSDCT2) plays a role in the regulation of gene expression, sequence characteristics of the 3'-UTR was analyzed using bioinformatics. The results found that within the 3'-UTR of SDCT2 β mRNA there is an AU-rich region (AUR) of 585 nt, which contains three AU-rich elements (ARE). The AUR fragment was inserted into the 3'-UTR of GFP reporter gene within a expression vector pcDNA-GFP; and a pcDNA-GFP-AUR recombinant vector was constructed and transfected into HEK293, HKC and LLC-PK1 cell lines. The expression level of intracellular GFP was determined by Western blot and flow cytometry. The results showed that the AUR of SDCT2 β could significantly reduce the expression level of GFP in the pcDNA-GFP-AUR- transfected cells ($P < 0.01$). After blockade of RNA transcription with actinomycin D, total RNA was extracted from stably transfected HEK293 cells with an interval of 2 h, and the stability of GFP-AUR and GFP mRNAs was analyzed by Northern blot. The results indicated that the stability of GFP-AUR mRNA is less than that of GFP mRNA. These results suggest that within the AU-rich region of 3'-UTR of SDCT2 β mRNA there is a negative regulation region which

can decrease the stability of mRNA, accelerate the degradation of GFP mRNA and may play a negative regulation role for gene expression at post-transcriptional level.

Key words dicarboxylate transporter, 3'-untranslated region, post-transcriptional regulation, mRNA stability

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2007CB507400), The National Natural Science Foundation of China (30070288, 30270505) and Creative Research Group Fund of The National Natural Science Foundation of China (30121005).

**Corresponding author. Tel: 86-10-66937011

BAI Xue-Yuan. E-mail: baixy@301hospital.com.cn

CHEN Xiang-Mei. E-mail: xmchen@public.bte.net.cn

Received: December 7, 2007 Accepted: February 21, 2008