

· 临床研究 ·

儿童STING基因启动子区序列多态性分析

王艳艳, 郇银芳, 张莉, 王晓花*

南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)儿科, 江苏 南京 210006

[摘要] 目的:分析儿童外周血干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)启动子-436~+267区域序列变化。方法:采用PCR产物直接测序的方法,对48例儿童的STING基因启动子区进行序列分析,构建重组报告质粒pGL-3/STING(TT)和pGL-3/STING(CC),转染人类胚胎肾(human embryonic kidney, HEK)293T细胞,检测其荧光素酶活性,计算相对活性单位(the relative luciferase activity unit, RLU)。结果:发现STING基因启动子区的1个新的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点(-401)T/C;该位点TT、TC、CC这3种基因型的频率分布分别为45.8%、37.5%、16.7%;经酶切、测序鉴定,成功构建了含有该位点的STING启动子序列(-436~+267)的表达质粒pGL-3/STING(TT)和pGL-3/STING(CC)。与pGL-3/STING(TT)质粒比较,pGL-3/STING(CC)启动子的RLU明显降低。结论:STING基因(-401)T/C是一个新的SNP,该SNP可降低STING基因启动子的活性,进而可能影响基因的转录调控,影响机体对疾病的易感性。

[关键词] STING基因;启动子;多态性;易感性

[中图分类号] R392.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)10-1449-04

doi:10.7655/NYDXBNS20191008

Sequence polymorphism of the promoter region of STING gene in children

Wang Yanyan, Li Yinfang, Zhang Li, Wang Xiaohua*

Department of Pediatrics, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing First Hospital, Nanjing 210006, China

[Abstract] **Objective:** To explore the sequence variation of the promoter region (-436~+267) on stimulator of interferon genes (STING) of children. **Methods:** The sequences of the promoter region of 48 children were amplified by PCR and then sequenced. The luciferase reporter plasmid pGL-3/STING(TT) and pGL-3/STING(CC) were constructed to transfect human embryonic kidney (HEK)-293T cells, and then the luciferase gene expression was detected and the relative luciferase activity unit (RLU) was calculated. **Results:** A new single nucleotide polymorphism (SNP) T/C (-401) in STING promoter region was identified. The frequencies of genotype TT, TC, and CC were 45.8%, 37.5%, and 16.7% respectively. Restriction endonuclease analysis and DNA sequencing verified the successful construction of the plasmid pGL-3/STING(TT) and pGL-3/STING(CC) including the SNP. Compared with plasmid pGL-3/STING(TT), pGL-3/STING(CC) exhibited a weaker promoter activity. **Conclusion:** T/C (-401) in STING promoter region is a new SNP. The genotype of this new SNP may reduce the activity of STING promoter, and consequently affect the transcription and expression of STING gene, and affect the body's susceptibility to disease.

[Key words] STING gene; promoter; polymorphism; susceptibility

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(10): 1449-1452]

抗病毒固有免疫反应是机体抵抗病毒感染的
第一道防线,在宿主防御病原体入侵过程中起着至
关重要的作用。它通过模式识别受体(pattern rec-

ognition receptor, PRR)识别相关病原体的分子模式
检测入侵微生物,进一步激活I型干扰素(interferon, IFN)和促炎细胞因子的表达^[1]。干扰素基因刺
激因子(stimulator of interferon genes, STING)是一种
内质网膜蛋白,越来越多的研究表明其在参与宿主
抗病毒固有免疫反应的过程中起着至关重要的作

[基金项目] 国家重点研发项目(W2016EWJS03)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xhwang_80@163.com

用^[2]。作为免疫和炎症反应中的一个重要信号分子,STING 不仅特异性介导由 5'-3p dsRNA 诱导的 RIG-I 信号通路,几乎参与了所有由胞内 B 型 dsDNA 模式识别受体介导的 IFN- β 通路,而且还作为模式识别受体介导由细菌环二核苷酸 c-di-GMP 和 c-di-AMP 诱导的 IFN 的表达,从而参与宿主对以 DNA 致病的病原菌的防御^[3]。另外,STING 还能通过活化的 STAT6 来介导趋化因子的产生,从而招募免疫细胞抵御病毒感染的感染^[4]。值得注意的是,STING 还可以识别自身异常的 DNA,引起某些自身免疫疾病^[5]。

儿童是容易引发感染性疾病的一个群体,阐明其 STING 基因表达调控的机制,对进一步揭示 STING 上游的固有免疫信号通路及防治病毒感染性疾病具有重要意义。启动子在基因表达调控方面起十分关键的作用,启动子单个核苷酸的变异可引起转录因子结合位点的改变,进而影响基因的表达,并最终影响生物体的性状。已有研究将 STING 基因核心启动子界定在 -124~+1,且已证实此区间存在调控 STING 基因转录表达的转录因子 CREB、c-Myc 的转录结合位点^[6]。本研究在此基础上,对儿童 STING 基因启动子 -436~+267 区域进行突变分析,并对其在 HEK-293T 细胞中的启动活性进行评价,现对研究结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

基因组 DNA 抽提试剂盒、小量胶回收试剂盒 (Omega 公司,美国);rTaq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶 (大连 TaKaRa 公司);转染试剂 LipofectamineTM 2000 (Invitrogen 公司,美国);双荧光素酶分析试剂 (Promega 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 样品的采集

血液样品取自 48 例正常体检儿童,年龄 4~10 岁,男 25 例,女 23 例,均体健。每位受试者抽取外周抗凝血 3 mL,用基因组 DNA 抽提试剂盒抽提基因组 DNA,-70 °C 保存备用。本研究经医院伦理委员会批准,所有受试者监护人知情同意。

1.2.2 PCR 扩增

通过 Primer Premier 5.0 软件设计引物,扩增 STING 基因启动子区 -436~+267 的 DNA 序列。上游引物 (F): 5'-TGGAGTGCAGTGGCCTAATCTCT-3'; 下游引物 (R): 5'-AGCCTCCATTGCCCTTTG-3' (由上海英俊生物有限公司合成)。PCR 反应体系

为: 10 \times buffer (含 Mg²⁺) 2 μ L, 上游引物 0.5 μ L, 下游引物 0.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 0.4 μ L, rTaq DNA 聚合酶 0.2 μ L, 基因组 DNA 模板 0.2 μ L, 加双蒸水至 20 μ L, 在 PCR 仪上进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 95 °C 变性 5 min; 然后以 95 °C 20 s、58 °C 30 s、72 °C 2 min 为 1 个循环, 共进行 34 次循环; 最后以 72 °C 延伸 8 min。PCR 结束后, 将 PCR 的扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳实验, 再用凝胶成像系统检测条带情况。

1.2.3 PCR 产物测序及序列分析

将有目的条带的 PCR 产物直接送上海英俊生物有限公司测序, 测序反应所用的引物同 PCR 反应引物。测序结果用 DNASTAR 软件中的 EditSeq、SeqMan II 程序分析, 以 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中 STING 基因标准序列为参考, 进行序列比对分析。

1.2.4 重组报告质粒的构建

通过 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对 PCR 引物, 上下游引物分别引入 *Kpn* I 和 *Bgl* II 限制性内切酶位点。上游引物 5'-CGGGGTACCTGGAGTGCAGTGGCCTAATCTCT-3' (下划线部分为 *Kpn* I 酶切位点), 下游引物 5'-GGAAGATCTAGCCTCATTCCATTGCCCTTTG-3' (下划线部分为 *Bgl* II 酶切位点), 在上海 Invitrogen 公司合成。分别以含或不含 STING 启动子单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点 (CC、TT) 的人全血 DNA 为模板, PCR 扩增 STING 启动子 -436~+267 区域的 703 bp 序列。琼脂糖凝胶电泳 PCR 扩增产物, 小量胶回收试剂盒回收 DNA。限制性内切酶 *Kpn* I、*Bgl* II 双酶切 PCR 产物和 pGL-3 基本载体, T4 DNA 连接酶连接, 构建成荧光素酶报告基因重组质粒 pGL-3/STING (CC) 和 pGL-3/STING (TT)。采用 *Kpn* I 和 *Bgl* II 双酶切和核酸序列测序对重组质粒进行鉴定。

1.2.5 质粒转染和荧光素酶活性测定

采用 LipofectamineTM 2000 试剂进行 HEK-293T 细胞的转染, 操作按照试剂盒说明书进行。于 48 孔板共转染报告质粒与内参质粒 pRL-TK, 48 h 后收集细胞。实验同时设转染 pGL-3 基本载体和 pGL-3 control 阳性载体作为对照。用双荧光素酶分析试剂在 ModulusTM Luminometer 仪器 (TURNER Biosystems 公司, 美国) 上进行荧光素酶活性检测。计算报告质粒与内参的荧光素酶活性比值, 即相对荧光素酶活性 (relative luciferase activity unit, RLU)。具体步骤参照仪器及试剂说明书。

1.3 统计学方法

采用SPSS13.0软件进行统计学分析。定量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用 t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

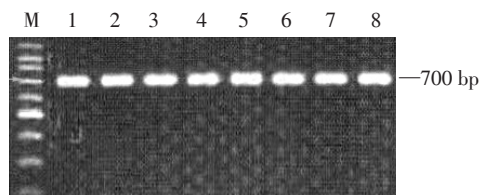
2 结果

2.1 PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测

经1%琼脂糖凝胶电泳, 所有扩增产物大小均与预期片段大小(703 bp)符合, 且特异性好(图1)。

2.2 测序结果分析

为了增加测序的可靠性, 对PCR产物进行正、反双向测序, 共获得48例样本的启动子区序列。通过DNASTAR软件进行序列比对分析, 在-401位点发现1处T→C改变。除野生TT型外, 还存在杂合性改变TC型及纯合性改变CC型(图2)。该处SNP



M: DNA maker; 1~8: PCR扩增产物。

图1 部分儿童STING基因启动子区PCR扩增产物

Figure 1 PCR products of STING promoter region of parts of children

TT、TC、CC这3种基因型的频率分别为45.8%(22/48)、37.5%(18/48)、16.7%(8/48), T等位基因和C等位基因频率分别为64.5%和35.5%。

2.3 含STING启动子-436~+267区域的重组报告质粒的构建和鉴定

以限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bgl* II 对重组质粒

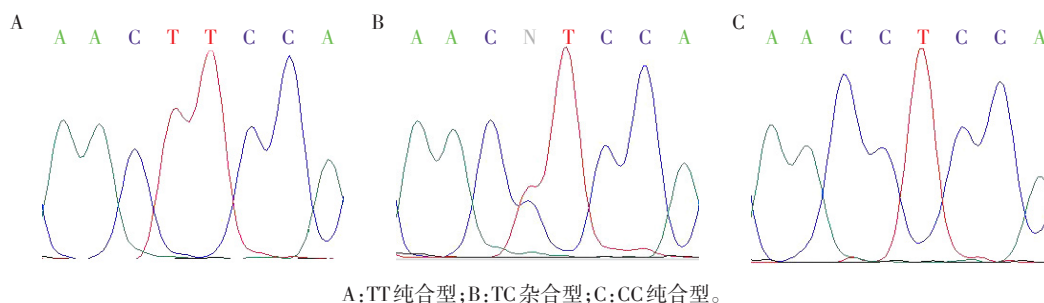
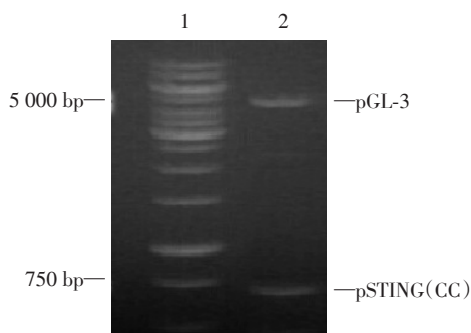


图2 STING基因启动子区PCR扩增产物测序结果

Figure 2 Sequencing results of PCR products of STING promoter region

pGL-3/STING(CC)进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳结果见STING启动子-436~+267区域的703 bp的条带(图3)。进一步将pGL-3/STING(CC)质粒测序结果进行比对, 其同源为100%。同样方法对重组质粒pGL-3/STING(TT)进行构建和鉴定。



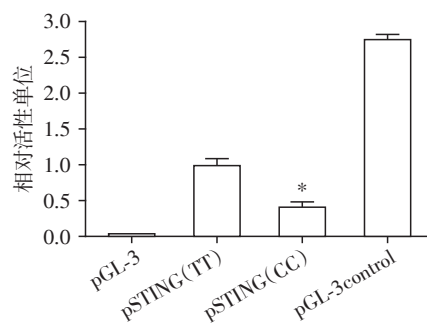
1: DNA marker; 2: pGL-3/STING(CC)的 *Kpn* I 和 *Bgl* II 双酶切产物。

图3 重组报告质粒的酶切鉴定

Figure 3 Restriction endonuclease analysis of recombinant reporter plasmid

2.4 STING(CC)启动子在HEK-293T细胞中的活性分析

转染pGL-3/STING(CC)质粒的细胞所测得的RLU较转染pGL-3/STING(TT)的细胞明显降低(图4)。



与pGL-3/STING(TT)比较, * $P < 0.01$ 。

图4 pGL-3/STING(TT)和pGL-3/STING(CC)在HEK-293T细胞中启动活性检测

Figure 4 Activity detection of plasmid pSTING(TT) and pSTING(CC) in HEK-293T cells

3 讨论

感染性疾病是临床上常见且多发的疾病之一,随着变异性病原体数量的增加,加之儿童年幼、自我控制意识和卫生意识较差,且自身免疫功能的发育不完全,自身抵抗力较弱,因此容易引发感染性疾病^[7]。STING作为抗病毒固有免疫反应中的一个重要蛋白分子,其结构和功能在人、猪、小鼠以及骆驼等物种中高度保守^[3,8-12]。近年来,很多研究已经证实,在由DNA病毒^[4]、RNA病毒^[13]、逆转录病毒^[14]、细菌^[15]和一些寄生虫病^[16]引起的固有免疫反应中,STING均起着非常重要的作用。

随着基因研究的迅猛发展,越来越多的学者着重从基因、遗传水平解释个体对疾病易感性的不同^[17]。在本研究中,在将STING基因核心启动子界定在-124~+1,且已证实此区间存在调控STING基因转录表达的转录因子CREB、c-Myc的转录结合位点的基础上^[6],我们对儿童STING基因启动子进行-436~+267区域的序列检测,结果在-401发现了1个未见报道的SNP:T→C,且该SNP可降低STING基因启动子的活性。STING基因(-401)T/C这个新的SNP基因型与儿童对疾病易感性的关系有待进一步研究,需要更大样本研究结果分析TC型和CC型是否为感染性疾病发生的易感因素之一。通过研究STING自身的转录调控机制,实现安全精确调控基因的表达,对于未来基因治疗和细胞治疗的广泛应用非常关键。

[参考文献]

- [1] Bowzard JB, Ranjan P, Sambhara S, et al. Antiviral defense: RIG-Ing the immune system to STING [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(1): 1-5
- [2] Gao D, Wu J, Wu YT, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses [J]. Science, 2013, 341(6148): 903-906
- [3] Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signaling [J]. Nature, 2008, 455(7213): 674-678
- [4] Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity [J]. Nature, 2009, 461(7265): 788-792
- [5] Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, et al. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(8): 2969-2974
- [6] Wang YY, Jin R, Zhou GP, et al. Mechanisms of transcriptional activation of the stimulator of interferon genes by transcription factors CREB and c-Myc [J]. Oncotarget, 2016, 7(51): 85049-85057
- [7] 柳颖, 林慧铭. 血清降钙素原、超敏C反应蛋白、白细胞计数在细菌性感染疾病中的诊断价值比较 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(14): 2016-2017
- [8] Zhong B, Yang Y, Li S, et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation [J]. Immunity, 2008, 29(4): 538-550
- [9] Sun W, Li Y, Chen L, et al. ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(2): 8653-8658
- [10] Jin L, Waterman PM, Jonscher KR, et al. MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(16): 5014-5026
- [11] Huang Z, Chen X, Zhang K, et al. Molecular cloning and functional characterization of Tibetan Porcine STING [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(1): 506-515
- [12] Premraj A, Aleyas AG, Nautiyal B, et al. Identification and isolation of stimulator of interferon genes (STING): an innate immune sensory and adaptor gene from camelids [J]. Int J Immunogenet, 2013, 40(5): 377-385
- [13] Nazmi A, Mukhopadhyay R, Dutta K, et al. STING mediates neuronal innate immune response following Japanese encephalitis virus infection [J]. Sci Rep, 2012, 2: 347
- [14] Sze A, Belgnaoui SM, Olagner D, et al. Host restriction factor SAMHD1 limits human T cell leukemia virus type 1 infection of monocytes via STING-mediated apoptosis [J]. Cell Host Microbe, 2013, 14(4): 422-434
- [15] Watson RO, Manzanillo PS, Cox JS. Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway [J]. Cell, 2012, 150(4): 803-815
- [16] Sharma S, DeOliveira RB, Kalantari P, et al. Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the Plasmodium falciparum genome [J]. Immunity, 2011, 35(2): 194-207
- [17] 肖献秋, 王适之, 田媛媛, 等. hMLH1-93G>A启动子多态性与胃癌发生风险的研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2010, 30(8): 1151-1155

[收稿日期] 2019-07-17