

猪 *StAR* 基因启动子区克隆及其转录活性研究

胡慧艳¹, 贾青^{1,2,3*}, 侯胜奎¹, 刘津¹, 张婧¹, 张伟峰⁴, 锡建中¹

(1. 河北农业大学 动物科技学院, 保定 071000; 2. 国家北方山区农业工程技术研究中心, 保定 071000;

3. 河北省山区农业工程技术研究中心, 保定 071000; 4. 河北工程大学 生命科学与食品工程学院, 邯郸 056038)

摘要: 旨在通过分析猪 *StAR* 基因启动子活性区域, 探究猪 *StAR* 基因的转录调控机制, 从育种学角度为提高猪繁殖力提供新思路。本研究根据 Ensembl 数据库已公布的猪 *StAR* 基因的 5' 侧翼区序列, 利用在线预测软件对该基因启动子区序列信息进行分析, 以大白猪基因组 DNA 为模板, 利用特异性引物, 进行 PCR 扩增、测序, 进而构建启动子区不同缺失片段的 pGL3-*StAR* 双荧光素酶表达载体, 转染 293T 细胞并进行活性检测。结果显示, *StAR* 基因 5' 侧翼区不含有典型的 TATA-box 和 CpG 岛; 成功克隆了 10 个含有不同长度的启动子片段, 并构建了各片段与表达载体的重组质粒; 转染 293T 细胞后经双荧光素酶活性检测发现, 大白猪 *StAR* 基因 5' 侧翼区存在着核心启动子, 其中 -196~+127 bp 这一区域活性值最高, 且显著高于其他缺失片段 ($P < 0.01$), 表明在 +127~-196 bp 的区域内存在重要的正调控因素, 外显子 1 对启动子活性起重要的调控作用。-41~-196 bp 为核心启动子区域, 该区域存在着关键的正调控元件, 包含 GATA2、GATA4、SP1、ZNF263、Hoxa9、KLF16 和 ZNF740 转录因子结合位点。本试验通过对 *StAR* 基因进行生物信息学分析, 并结合不同长度启动子片段双报告基因活性检测, 证实了 *StAR* 基因的 5' 侧翼区序列具有启动子转录活性。初步确定了该基因的启动子区域, 找到了启动子的核心区域和主要调控区域, 为进一步研究 *StAR* 基因转录调控机制提供理论依据。

关键词: *StAR* 基因; 启动子; 荧光素酶活性; 报告基因

中图分类号: S828.2; Q785

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)07-1524-09

Cloning and Transcriptional Activity of Swine *StAR* Gene Promoter

HU Hui-yan¹, JIA Qing^{1,2,3*}, HOU Sheng-kui¹, LIU Jin¹,

ZHANG Jing¹, ZHANG Wei-feng⁴, XI Jian-zhong¹

(1. College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China; 2. National Engineering Research Center for Agriculture in Northern Mountainous Areas, Baoding 071000, China; 3. Engineering Research Center for Agriculture in Hebei Mountainous Areas, Baoding 071000, China; 4. College of Life Sciences and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China)

Abstract: The research was designed to analyze the activity region in the promoter of *StAR* gene, and to explore the mechanism of expression regulation of *StAR* gene, thus provide new ideas for improving the fertility of the pigs from the perspective of breeding. The sequence of the promoter activity region was analyzed by online tools based on the 5'-flanking sequence of swine *StAR* gene published by Ensembl database. The specific primer was designed and the PCR was used to amplify the gene promoter sequence based on the reference genomic sequence of the pigs, pGL3-*StAR* promoter luciferase reporter gene vectors were constructed and transfected into 293T cells, the relative luciferase activity was measured by dual luciferase assay system. The results showed

收稿日期: 2017-11-17

基金项目: 河北省现代农业产业技术体系专项 (HBCT2013070202)

作者简介: 胡慧艳 (1989-), 女, 河北石家庄人, 博士生, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: huihuiyan315@163.com

* 通信作者: 贾青, 教授, 博士, 博导, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: jiaqing@hebau.edu.cn

that the 5'-flanking sequence of swine *StAR* gene didn't contain the typical TATA-box and CpG island. Ten promoter fragments with different lengths were obtained and luciferase reporter gene vectors were constructed, and then to analyze their transcriptional activity through transfected into 293T cells, respectively. The core promoter region of *StAR* gene was located in the 5'-flanking sequence of swine *StAR* gene, among them, -196+127 bp region had the highest activity value, which was significantly higher than other deletion fragments ($P < 0.01$), suggested that the region of +127-196 bp existed an important positive regulatory element. The exon 1 played a critical role in regulating the activity of the promoter. -41-196 bp as the core promoter region, contained a primary positive regulatory element, in which there were a number of transcription factor binding sites, including GATA2, GATA4, SP1, ZNF263, Hoxa9, KLF16 and ZNF740. Bioinformatics analysis of *StAR* gene and detection of dual reporter gene activity with different length promoter fragments confirmed that 5'-flanking sequence of swine *StAR* had promoter transcriptional activity. The promoter region of the gene had been preliminarily identified, the promoter region and the main regulatory region were found, which provided a theoretical basis for further study of *StAR* gene transcriptional regulation mechanism.

Key words: *StAR* gene; promoter; luciferase activity; reporter gene

繁殖力对母猪来说是一个至关重要的经济因素,因而提高猪繁殖力是养猪业需要解决的关键性问题。众多研究显示,类固醇激素合成能力的强弱是影响繁殖力的一个重要因素^[1]。近年来研究发现,类固醇合成的快速调节机制对于调节动物的生殖活动必不可少,卵泡发育与类固醇激素的合成与分泌密切相关。类固醇合成快速调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, *StAR*)作为胆固醇由线粒体外膜向内膜转运的桥梁,参与了类固醇激素的合成,该蛋白由 *StAR* 基因所编码。在雌性动物卵巢中,排卵、卵泡的生长与闭锁,以及成熟卵泡内细胞的分化等一系列生理过程均受到类固醇激素的调控。相关研究显示,排卵前卵泡分泌的主要类固醇激素是雌激素,在排卵后,低密度脂蛋白通过上调类固醇合成关键基因 *StAR* 和 P450 的表达量来调控其孕酮合成水平^[2],并促使卵泡由分泌雌激素转变为大量分泌孕酮^[1, 3],若降低 *StAR* 基因的表达水平则可致使卵巢孕酮合成水平下降,此时配种后受孕率明显下降,可见在哺乳动物中,*StAR* 基因是调控类固醇激素合成的一个关键因素,然而该基因的表达也受到多种因素的影响,如胰岛素、LH、FSH 等激素^[4-6]和 IGF1、TGF- β 多种生长因子^[7]以及转录因子^[8]等多种方式。此外,在表观遗传修饰方面相关研究还发现,大鼠颗粒细胞向黄体细胞分化过程中 *StAR* 基因启动子区会发生组蛋白修饰^[9-10];很多转录因子如 cAMP response ele-

ment-binding protein (CREB)、GATA4、CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) 参与了大鼠 *StAR* 启动子的调控^[11-12]。然而,猪 *StAR* 基因的调控机制目前尚未见报道。

为了解猪 *StAR* 基因表达的调控机制,本研究分析了猪 *StAR* 基因 5'非翻译区和启动子区,测定 *StAR* 基因的 5'侧翼区序列的转录活性,筛选出该基因启动子转录调控区域,探索其可能的调控机制,为进一步揭示猪 *StAR* 基因的转录调控机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肾上皮细胞系(293T)由本实验室保存;pGL3-Basic、pRL-TK 载体、T4DNA Ligase、双荧光素酶报告基因检测试剂盒均购自 Promega 公司;TailGen DNA Kit 购自康为世纪公司;SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、SanPrep 柱式质粒小量抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;无内毒素质粒大提试剂盒购自北京天根公司;转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自 IVGN 公司;限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 均购自 TaKaRa 公司;Trans5 α 感受态细胞、Trans Taq-T DNA 聚合酶、TransSerumTM HQ Fetal Bovine Serum 等均购自于北京 TransGen 生物技术有限公司;Hyclone DMEM/ HIGH GLUCOSE 培养基购自 Thermo 公

司;DL5000 DNA Marker 购自北京博奥龙免疫技术有限公司;0.25%胰蛋白酶(Trypsin-EDTA)、Opti-MEM 培养基购自 Gibco 公司;引物合成和测序均由北京华大科技公司完成。

1.2 方法

1.2.1 猪 *StAR* 基因 5' 侧翼区序列分析及引物设计 检索并下载猪 *StAR* 基因(Ensembl 数据库: ENSSSCG00000034942)的参考序列,通过基因启动子在线预测分析软件 MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 预测

CpG 岛;通过在线软件:AliBaba2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>)、JASPAR 数据库(<http://jaspar.binf.ku.dk/>)预测转录因子结合位点。根据 pGL3-Basic 质粒的多克隆位点信息,以 *StAR* 基因 5' UTR 上游序列约 2 000 bp 为模板,利用 Primer Premier 5.0 软件设计扩增包含 *StAR* 基因启动子区片段的特异引物,分别在上、下游引物 5' 端引入限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 的酶切位点及其对应的保护碱基,构建载体片段的引物序列详见表 1。

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 The informations of primer used in this study

引物编号(位置/bp) Primers No. (position)	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature	片段长度/bp Fragments size
pGL3-1 (-1 939/-103)	F: GGGGTACCTGTTACAATACTGATGGACCTG R: CCCAAGCTTGCCAAGGATAGAGGGATT	65	1 837
pGL3-2 (-1 311/-103)	F: GGGGTACCGAGCCGTGAGTTTGTCT R: CCCAAGCTTGCCAAGGATAGAGGGATT	65	1 209
pGL3-3 (-470/-103)	F: GGGGTACCCAGATTCAAGCCGCAGTC R: CCCAAGCTTGCCAAGGATAGAGGGATT	65	377
pGL3-4 (-196/-103)	F: GGGGTACCAGCCTCCTTACTCCTTTCTA R: CCCAAGCTTGCCAAGGATAGAGGGATT	65	94
pGL3-5 (-1 939/+127)	F: GGGGTACCTGTTACAATACTGATGGACCTG R: CCCAAGCTTGGAGCATTGTTTCTGGTAG	65	2 066
pGL3-6 (-1 311/+127)	F: GGGGTACCGAGCCGTGAGTTTGTCTT R: CCCAAGCTTGGAGCATTGTTTCTGGTAG	65	1 438
pGL3-7 (-470/+127)	F: GGGGTACCCAGATTCAAGCCGCAGTC R: CCCAAGCTTGGAGCATTGTTTCTGGTAG	65	597
pGL3-8 (-196/+127)	F: GGGGTACCAGCCTCCTTACTCCTTTCTA R: CCCAAGCTTGGAGCATTGTTTCTGGTAG	65	323
pGL3-9 (-41/+127)	F: GGGGTACCCTGGAGGCATTTAAGACG R: CCCAAGCTTGGAGCATTGTTTCTGGTAG	64	168
pGL3-10 (-120/-17)	F: GGGGTACCAATCCCTCTATCCTTGGC R: CCCAAGCTTTCTTGCCTTAAATGCC	64	104

下划线表示限制性内切酶的酶切位点

The restriction enzyme digestion sites are underlined

1.2.2 猪 *StAR* 基因 5' 侧翼区的克隆 提取大白猪耳组织基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,采用 PCR 方法,利用表 1 中引物扩增猪 *StAR* 基因启动子区片段,PCR 反应体系:10×buffer 2.5 μL,

Trans Taq-T DNA 聚合酶(5 U·μL⁻¹) 0.7 μL, 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs 2.0 μL, 上、下游引物(10 pmol·μL⁻¹)各 1.0 μL,各模板 DNA 1.0 μL,加 ddH₂O 至 25.0 μL;PCR 反应条件:94 °C 预变性

5 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 34 个循环; 72 °C 延伸 10 min。StAR-1 ~ StAR-4 为首次缺失片段, StAR-5 ~ StAR-10 为二次缺失片段。

1.2.3 pGL3-*StAR* 启动子不同长度片段重组载体的构建 将测序正确的上述 10 个 PCR 产物及其 pGL3-Basic 质粒分别利用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 进行双酶切, 凝胶回收酶切产物后, 采用 T4 连接酶分别将 10 个片段与 pGL3-Basic 连接, 连接产物转化至感受态细胞, 经菌液 PCR 鉴定, 阳性克隆者测序, 并进行质粒双酶切, 分别命名为 pGL3-1939/-103、pGL3-1311/-103、pGL3-470/-103、pGL3-196/-103、pGL3-1939/+127、pGL3-1311/+127、pGL3-470/+127、pGL3-196/+127、pGL3-41/+127、pGL3-120/-17。

1.2.4 细胞培养、转染及活性检测 将 293T 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中进行培养。在转染前 1 d, 将生长状态良好的细胞接种于不含抗生素的 24 孔板中, 待细胞融合度达 80% ~ 90% 时, 分别将重组报告基因质粒、内参质粒 pRL-TK 与转染试剂

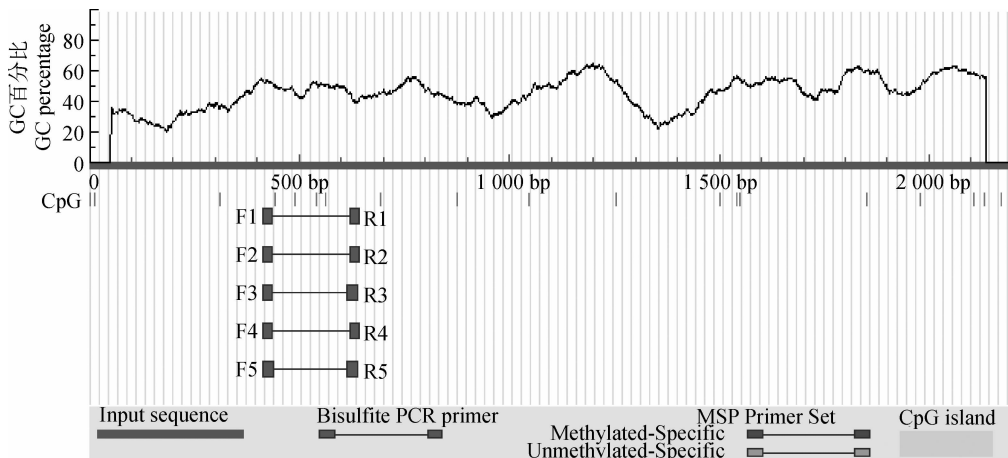
Lipofectamine™ 2000 加入至 Opti-MEM 培养基中, 并将其混合物转染至 293T 细胞, 培养 48 h 后裂解细胞, 利用双荧光素酶报告基因检测试剂盒, 采用化学发光仪 (Promega) 测定荧光素酶活性, 试验重复 3 次及以上, 每次 3 个平行。

1.2.5 统计分析 对各组试验至少重复 3 次, 利用单因素方差分析检验不同片段酶活性的差异性, Duncan's 检验法进行多重比较, 数据均采用“平均值 ± 标准差”表示。数据利用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 *StAR* 基因 5' 侧翼区序列分析

利用启动子分析软件对猪 *StAR* 基因 5' 侧翼区序列特征信号进行了分析, 结果显示, 该序列不具有真核生物启动子典型的 TATA-box, 此外在该启动子区域还发现可能存在 GATA2、GATA4、SP1、ZNF263、Hoxa9、KLF16、ZNF740 等多种转录因子结合位点。一般认为 CpG 岛大于 100 bp, 且 GC 含量大于 50%^[13], 本试验利用 MethPrimer 软件预测发现, 目的基因 *StAR* 启动子不存在 CpG 岛 (图 1)。



F1~F5. 亚硫酸盐 PCR 上游引物; R1~R5. 亚硫酸盐 PCR 下游引物
F1-F5. Bisulfite PCR left primers; R1-R5. Bisulfite PCR right primers

图 1 CpG 岛预测结果

Fig. 1 CpG island prediction results

2.2 猪 *StAR* 基因启动子缺失片段的扩增

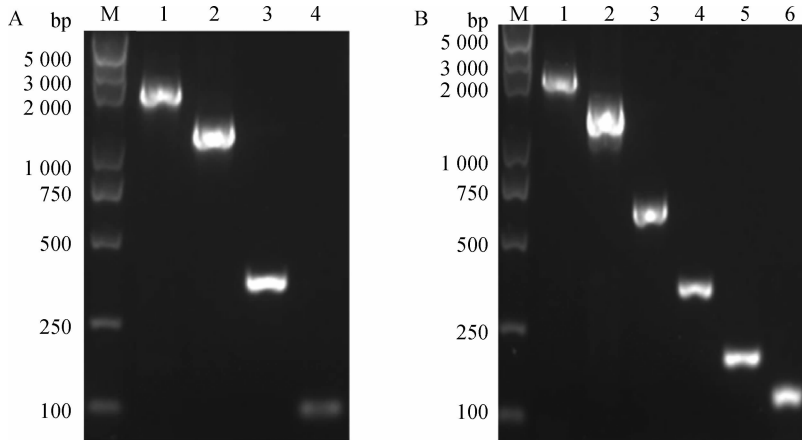
通过 PCR 扩增得到猪 *StAR* 基因启动子 5' 端 10 个不同片段, PCR 产物分别经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。如图 2 所示, 扩增出的不同长度片段与预期片段大小相一致 (图 2)。

2.3 猪 *StAR* 基因启动子不同长度片段重组表达载体的构建

分别将 *StAR* 基因启动子系列片段 (pGL3-1 ~ pGL3-10) 和 pGL3-Basic 进行双酶切, 酶切产物经凝胶回收后构建不同长度的 *StAR* 基因启动子重组

质粒,经菌液 PCR 鉴定,为阳性克隆者进行测序和质粒双酶切。重组质粒双酶切结果显示,各重组质粒均产生 pGL3-Basic 载体片段及各自相应的片段

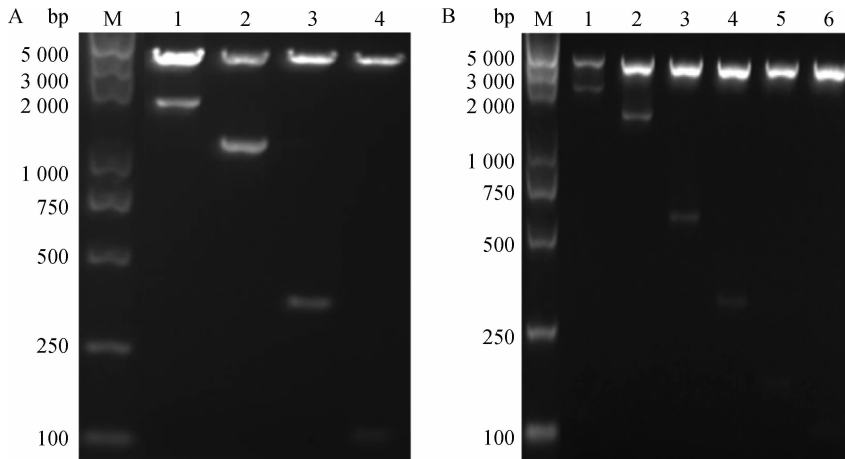
(图 3);测序结果与数据库中猪的 *StAR* 基因 5'端序列相一致。因而,猪 *StAR* 基因启动子缺失片段的荧光素酶报告基因载体构建成功。



M. DNA 相对分子质量标准;1~4. pGL3-1~pGL3-4 不同长度扩增片段(A);1~6. pGL3-5~pGL3-10 不同长度扩增片段(B)
M. DL5000 DNA marker; 1-4. Different length of amplified fragments of pGL3-1-pGL3-4(A); 1-6. Different length of amplified fragments of pGL3-5-pGL3-10(B)

图 2 猪 *StAR* 基因启动子不同长度片段 PCR 扩增产物凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electropherogram of PCR products of the fragments with different length in swine *StAR* promoter



M. DNA 相对分子质量标准;1~4. pGL3-1~pGL3-4 片段酶切鉴定(A);1~6. pGL3-5~pGL3-10 片段酶切鉴定(B)
M. DL5000 DNA marker; 1-4. Enzyme digestion of pGL3-1-pGL3-4 fragments(A); 1-6. Enzyme digestion of pGL3-5-pGL3-10 fragments(B)

图 3 pGL3-*StAR* 重组质粒酶切产物凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel electropherogram of pGL3-*StAR* by enzyme digestion

2.4 猪 *StAR* 基因启动子不同片段活性分析

将 pEGFPN1 质粒转染至 293T 细胞,转染 6 h 后观察细胞生长状态良好,继续培养至 48 h 后,荧光显微镜下检测转染效率,如图 4 所示,经过计算超过 70% 以上的细胞中可以观察到绿色荧光信号。以 pGL3-Basic 质粒作为阴性对照,将上述所构建的 4 个重组质粒分别与 pRL-TK 共转染至 293T 细胞,继续培养 48 h 后利用双荧光素酶报告基因检测试剂

盒测定萤火虫荧光素酶和内对照海肾荧光素酶荧光值,由图 5A 可知,所构建重组质粒 pGL3-1939/-103、pGL3-1311/-103、pGL3-470/-103、pGL3-196/-103 的荧光素酶活性与 pGL3-Basic 对照组相比均差异不显著($P>0.05$),说明猪 *StAR* 基因 -1939~-103 bp (以转录起始位点为+1)区域不具有转录活性。

进而构建 pGL3-1939/+127、pGL3-1311/+127、pGL3-470/+127、pGL3-196/+127 并转染 293T 细胞

后检测其荧光值,由图 5B 可知,与先前构建的 4 个片段重组质粒相比,片段 -1 311~+127、-470~+127、-196~+127、-120~-17 活性极显著增加 ($P<0.01$),其中片段 -196~+127 bp 活性值最高,且极显著高于其他缺失片段 ($P<0.01$),表明 -103~+127 bp 这一区域存在正调控元件。进一步将 -196~+127 截短为 -41~+127,构建 pGL3-41/+127 重组质粒并转染细胞后检测其荧光值,结果显示,该区域不存在转录活性,说明 -41~-196 bp 存在正调控元件,进而构建 pGL3-120/-17 重组质粒,结果显示,该区域存在转录活性,进一步证明 -41~-196 bp 这一区域存在着重要的正调控元件。

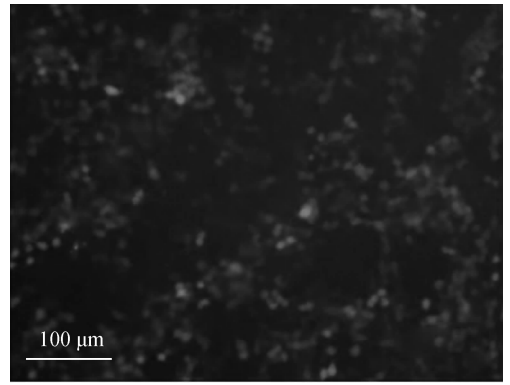
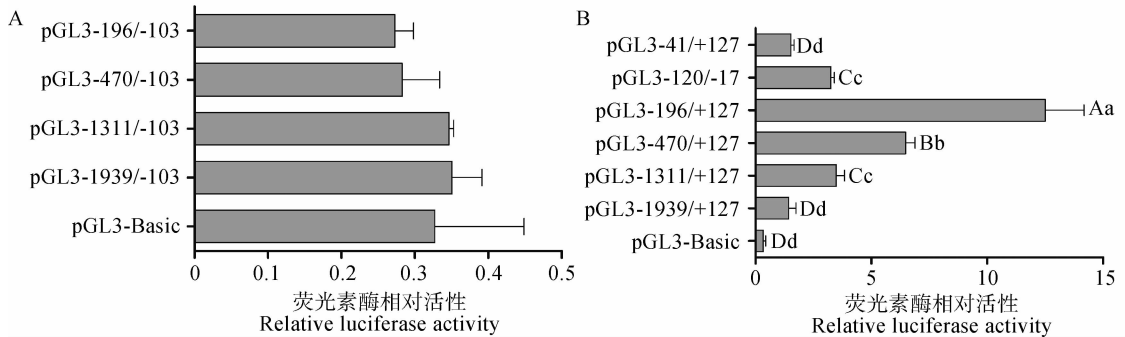


图 4 转染后的 293T 细胞
Fig. 4 The 293T cells after transfection



各重组质粒荧光素酶活性相比,相同小写字母标注者为差异不显著 ($P>0.05$),不同小写字母标注者为差异显著 ($P<0.05$),不同大写字母标注者为差异极显著 ($P<0.01$)

Bars with the same small letter mean no significant difference ($P>0.05$), bars with the different small letters mean significant difference ($P<0.05$), bars with different capital letters mean extremely significant difference ($P<0.01$) among different luciferase activity of recombinant vectors

图 5 重组质粒 pGL3-*StAR* 转染 293T 细胞的活性分析

Fig. 5 Activity analysis of recombinant vectors pGL3-*StAR* in 293T cells

3 讨论

类固醇激素合成急性调节蛋白 (*StAR*) 位于相关细胞的线粒体膜上,且具有高度的组织特异性,参与类固醇激素的合成,调节胆固醇从线粒体外膜向线粒体内膜的转运,是肾上腺皮质和生殖腺类固醇生成细胞中合成类固醇激素所需的物质^[14]。*StAR* 基因在转录及翻译水平上受多种促激素和细胞因子的调控,进而影响着机体类固醇激素的合成^[15-17]。在人类中,*StAR* 基因突变可致使其蛋白失去功能,肾上腺和性腺类固醇合成受阻,从而引起一种常染色体隐性遗传病即先天性脂肪肾功能增生综合征;在小鼠上,*StAR* 基因在肾上腺、睾丸、卵巢组织中特异性表达,缺失该基因的小鼠发育会受阻,寿命会

缩短^[18]。卵巢作为雌性动物重要的生殖器官,其功能主要是产生卵细胞以及分泌类固醇激素。研究者在极端高、低产仔数的约克夏母猪卵巢转录组测序中发现了 *StAR* 基因在高产组高表达的现象,经筛选分析将该基因作为猪繁殖力和产仔数相关的候选基因^[19]。在猪上,*StAR* 基因的调控机制和信号通路尚未研究清楚。因此,本试验对猪 *StAR* 启动子区转录活性进行了研究。

基于生物信息学方法对猪 *StAR* 基因 5'端序列进行分析,结果发现,猪 *StAR* 基因 5'端序列不存在典型的顺式元件 TATA-box,事实上 TATA-box 是构成真核生物典型的核启动子元件之一,但 TATA-box 也并不总是存在于一个基本的启动子区域^[20]。为了研究 *StAR* 基因启动子转录活性及其调控机

制,本试验采用构建启动子缺失片段的方法^[21-22],通过构建萤火虫荧光素酶重组载体,转染至 293T 细胞,利用双荧光素酶检测系统对构建的不同长度启动子区片段进行活性检测。结果显示,猪 *StAR* 基因的启动子区域 -196~-127 bp 活性值最高。采用 JASPAR 的在线程序 MatInspector 功能来预测潜在的转录因子结合位点,在猪 *StAR* 启动子的 -196~-41 bp 区域存在转录因子 GATA4、GATA6、SF-1、SP1、ZNF263、ZNF740、ATF4 的结合位点。研究报道表明,GATA4 在类固醇生成、性别分化等方面具有重要的作用,GATA4 和 GATA6 在肾上腺和性腺中高表达^[23]。在哺乳动物卵巢组织中的作用主要是由 cAMP 通过 PKA 途径增加 GATA4 磷酸化水平,进而调节 GATA 依赖性靶基因的表达,如类固醇合成关键基因 *StAR* 和 *Cyp17* 等对卵泡发育有重要作用的靶基因^[24];研究还发现,*StAR* 基因在猪发情周期的各个阶段也均有表达^[4],该基因启动子区 GATA4 结合区序列缺失会影响 FSH 诱导的 *StAR* 启动子的活性^[25-26]。做为 GATA 家族的另一成员,GATA6 不仅可以调节心、肺组织中相关基因的表达,对组织的正常发育也起到了重要作用,而且在生殖腺中被认为是 *StAR* 基因的正向调控因子^[27-28]。类固醇合成因子-1 (SF-1) 与 *StAR* 基因之间的相互作用已通过体外试验证明:在尼古丁处理的 NCI-H295A 细胞中,SF-1 在 *StAR* 基因表达量降低时,类固醇合成水平也随着降低^[29],可见转录因子 SF-1 也是激活 *StAR* 的潜在正调控因子。对于 ZNF 转录因子,目前在植物中只是作为顺式作用元件在代谢物生物合成中起重要作用^[30-31];在动物中,基于 ZNF 与 *StAR* 基因的调控关系,将来可以直接采用电泳迁移率变动分析 (EMSA) 和染色质免疫沉淀等方法来进一步研究 ZNF 的调节功能。

4 结 论

本试验通过对 *StAR* 基因进行生物信息学分析,构建猪 *StAR* 基因启动子区不同长度片段的重组载体,并利用双报告基因报告系统检测其活性,证实了 *StAR* 基因的 5' 侧翼区序列具有启动子活性。初步确定了猪 *StAR* 基因的启动子区域,找到了该基因启动子的核心区域和主要调控区域,为进一步研究猪 *StAR* 基因转录调控机制提供理论依据。

参考文献 (References):

- [1] 张金友. 溶酶体参与 LDL 促牛颗粒细胞 *StAR* 基因表达和孕酮合成的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
ZHANG J Y. Lysosomes are involved in induction of steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*) gene expression and progesterone synthesis through low density lipoprotein in cultured bovine granulosa cells [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [2] REYLAND M E, EVANS R M, WHITE E K. Lipoproteins regulate expression of the steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*) in mouse adrenocortical cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(47): 36637-36644.
- [3] MAMLUK R, GREBER Y, MEIDAN R. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid expression for steroidogenic factor-1, steroidogenic acute regulatory protein, and cytochrome P450 side-chain cleavage in bovine luteal cells [J]. *Biol Reprod*, 1999, 60(3): 628-634.
- [4] SEKAR N, LAVOIE H A, VELDHUIS J D. Concerted regulation of steroidogenic acute regulatory gene expression by luteinizing hormone and insulin (or insulin-like growth factor I) in primary cultures of porcine granulosa-luteal cells [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(11): 3983-3992.
- [5] SEKAR N, GARMEY J C, VELDHUIS J D. Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells: Joint amplification of pivotal sterol-regulatory genes encoding the low-density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (*StAR*) protein and cytochrome P450 side-chain cleavage (*P450scc*) enzyme [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 159(1-2): 25-35.
- [6] LUO W X, GUMEN A, HAUGHIAN J M, et al. The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle [J]. *Biol Reprod*, 2011, 84(2): 369-378.
- [7] FANG L L, CHANG H M, CHENG J C, et al. TGF- β downregulates *StAR* expression and decreases progesterone production through Smad3 and ERK1/2 signaling pathways in human granulosa cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(11): E2234-E2243.
- [8] HUI Y Y, LAVOIE H A. GATA4 reduction enhances 3', 5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-stimulated steroidogenic acute regulatory protein messenger ribo-

- nucleic acid and progesterone production in luteinized porcine granulosa cells[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(11):5557-5567.
- [9] YAMASHITA H, MURAYAMA C, TAKASUGI R, et al. BMP-4 suppresses progesterone production by inhibiting histone H3 acetylation of *StAR* in bovine granulosa cells *in vitro* [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 348(1-2):183-190.
- [10] LEE L, ASADA H, KIZUKA F, et al. Changes in histone modification and DNA methylation of the *StAR* and *Cyp19a1* promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(1):458-470.
- [11] MANNA P R, STOCOCO D M. Crosstalk of CREB and Fos/Jun on a single cis-element: Transcriptional repression of the steroidogenic acute regulatory protein gene[J]. *J Mol Endocrinol*, 2007, 39(4):261-277.
- [12] SILVERMAN E, YIVGI-OHANA N, SHER N, et al. Transcriptional activation of the steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*) gene: GATA-4 and CCAAT/enhancer-binding protein β confer synergistic responsiveness in hormone-treated rat granulosa and HEK293 cell models[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 252(1-2):92-101.
- [13] LI L C, DAHIYA R. MethPrimer: Designing primers for methylation PCRs[J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(11):1427-1431.
- [14] MILLER W L, AUCHUS R J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders[J]. *Endocr Rev*, 2011, 32(1):81-151.
- [15] STRICKLAND J, MCILMOIL S, WILLIAMS B J, et al. Interleukin-6 increases the expression of key proteins associated with steroidogenesis in human NCI-H295R adrenocortical cells[J]. *Steroids*, 2017, 119:1-17.
- [16] BAHAT A, PERLBERG S, MELAMED-BOOK N, et al. Transcriptional activation of *LON* gene by a new form of mitochondrial stress: A role for the nuclear respiratory factor 2 in *StAR* overload response (SOR) [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 408(7):62-72.
- [17] BAHAT A, PERLBERG S, MELAMED-BOOK N, et al. *StAR* enhances transcription of genes encoding the mitochondrial proteases involved in its own degradation[J]. *Mol Endocrinol*, 2014, 28(2):208-224.
- [18] ISHII T, HASEGAWA T, PAI C I, et al. The roles of circulating high-density lipoproteins and trophic hormones in the phenotype of knockout mice lacking the steroidogenic acute regulatory protein[J]. *Mol Endocrinol*, 2002, 16(10):2297-2309.
- [19] 黄龙. 基于卵巢 RNA 组学鉴定影响猪产仔数性状的候选基因及 microRNA [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2016.
- HUANG L. Identification of candidate genes and microRNAs affecting pig litter size by ovarian RNomics [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [20] GOODRICH J A, TJIAN R. Unexpected roles for core promoter recognition factors in cell-type-specific transcription and gene regulation[J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(8):549-558.
- [21] ZHAO X, MO D L, LI A N, et al. Characterization and transcriptional regulation analysis of the porcine *PAQR6* gene [J]. *DNA Cell Biol*, 2011, 30(11):947-954.
- [22] TAO H, MEI S Q, ZHANG X Y, et al. Transcription factor C/EBP β and 17 β -estradiol promote transcription of the porcine *p53* gene[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 47(2):76-82.
- [23] KETOLA I, RAHMAN N, TOPPARI J, et al. Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(3):1470-1480.
- [24] SILVERMAN E, EIMERL S, ORLY J. CCAAT enhancer-binding protein beta and GATA-4 binding regions within the promoter of the steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*) gene are required for transcription in rat ovarian cells[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(25):17987-17996.
- [25] TREMBLAY J J, HAMEL F, VIGER R S. Protein kinase A-dependent cooperation between GATA and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors regulates steroidogenic acute regulatory protein promoter activity[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(10):3935-3945.
- [26] LAVOIE H A, SINGH D, HUI Y Y. Concerted regulation of the porcine steroidogenic acute regulatory protein gene promoter activity by follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I in granulosa cells involves GATA-4 and CCAAT/Enhancer binding protein β [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(7):3122-3134.
- [27] ROBERT N M, TREMBLAY J J, VIGER R S. Friend of GATA (FOG)-1 and FOG-2 differentially repress

- the GATA-dependent activity of multiple gonadal promoters[J]. *Endocrinology*, 2002, 143 (10): 3963-3973.
- [28] 苟 华. GATA-6 过表达和干扰载体的构建及其对鹅颗粒细胞类固醇合成及相关基因的调控研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2015.
- GOU H. Construction of GATA-6 eukaryotic expression and shRNA interference vectors to characterize its role on steroidogenesis in goose granulosa cells [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [29] YAN Y E, LIU L, WANG J F, et al. Prenatal nicotinic exposure suppresses fetal adrenal steroidogenesis via steroidogenic factor 1 (SF-1) deacetylation[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 277(3): 231-241.
- [30] LAKSHMANAN M, MOHANTY B, LIM S H, et al. Metabolic and transcriptional regulatory mechanisms underlying the anoxic adaptation of rice coleoptile[J]. *AoB Plants*, 2014, 6: plu026.
- [31] MOHANTY B, LAKSHMANAN M, LIM S H, et al. Light-specific transcriptional regulation of the accumulation of carotenoids and phenolic compounds in rice leaves [J]. *Plant Signal Behav*, 2016, 11 (6): e1184808.

(编辑 郭云雁)