

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.11.014

论著·实验研究

先天性失氯性腹泻相关 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 突变体细胞模型的建立及其作用机制的初步研究

张妮妮 郭宏伟 林燕 张薇 张伟 王宝西 江逊

(空军军医大学/第四军医大学唐都医院儿科, 陕西 西安 710038)

[摘要] **目的** 建立先天性失氯性腹泻 (CCD) 相关 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 突变体细胞模型并初步研究其生物学功能。**方法** 根据 GenBank 中 SLC26A3 基因序列, 设计特异性识别 SLC26A3 基因 392 位点的上下游单导 RNA (sgRNA), 与酶切后的 pSpCas9-puro 载体混合构建真核重组表达质粒 (pSpCas9-SLC26A3)。将重组质粒和供体 DNA 模板单链 DNA 寡核苷酸 (ssODN) 共转染至 Caco-2 细胞, 采用 Taqman 基因型分析和 Sanger 测序鉴定 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 在 Caco-2 细胞中的表达。以野生型 Caco-2 细胞为正常对照组, 以成功表达 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 的 Caco-2 细胞为 P131R 组, 两组细胞分别经 100 ng/mL TNF- α 诱导并命名为 TNF- α 组和 TNF- α +P131R 组, 通过电-细胞-基质阻抗传感 (ECIS) 分析检测上述 4 组肠上皮细胞单层屏障功能的变化; 通过 Western blot 检测正常对照组和 P131R 组细胞 SLC26A3 蛋白的表达变化。**结果** 成功构建了真核重组表达质粒 (pSpCas9-SLC26A3)。Taqman 基因型分析和 Sanger 测序均验证 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 表达的 Caco-2 细胞模型构建成功。ECIS 分析显示: 与正常对照组相比, P131R 组肠上皮细胞单层通透性明显增加 ($P<0.05$); 同时 P131R 组细胞经 TNF- α 诱导后的细胞膜通透性增加更为显著 ($P<0.05$)。Western blot 结果显示: 与正常对照组相比, P131R 组细胞 SLC26A3 蛋白的相对表达水平显著降低 ($P=0.001$)。**结论** SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 可引起 SLC26A3 蛋白表达下降, 从而增加肠上皮细胞单层通透性, 引起相关腹泻的发生。
[中国当代儿科杂志, 2019, 21(11): 1131-1137]

[关键词] 先天性失氯性腹泻; SLC26A3 基因; 单核苷酸多态性; 肠上皮细胞

Establishment of a congenital chloride diarrhea-associated SLC26A3 c.392C>G (p.P131R) polymorphism-expressing cell model and a preliminary analysis of its mechanism of action

ZHANG Ni-Ni, GUO Hong-Wei, LIN Yan, ZHANG Wei, ZHANG Wei, WANG Bao-Xi, JIANG Xun. Department of Pediatrics, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University/The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China (Jiang X, Email: jiangx@fmmu.edu.cn)

Abstract: Objective To establish a congenital chloride diarrhea (CCD)-associated SLC26A3 c.392C>G (p.P131R) polymorphism-expressing cell model, and to investigate its biological function. **Methods** The sequence of the SLC26A3 gene in GenBank was used to design the upstream and downstream single-guide RNA (sgRNA) that could specifically recognize the 392 locus of the SLC26A3 gene, and the sgRNA was mixed with the pSpCas9-puro vector after enzyme digestion to construct an eukaryotic recombinant expression plasmid (pSpCas9-SLC26A3). Caco-2 cells were transfected with the recombinant plasmid and synthesized single-stranded DNA oligonucleotides (ssODNs), and Taqman genotyping assay and Sanger sequencing were used to identify the expression of SLC26A3 c.392C>G (p.P131R) in Caco-2 cells. Wild-type Caco-2 cells were selected as normal control group and the Caco-2 cells with successful expression of SLC26A3 c.392C>G (p.P131R) was selected as P131R group. Both groups were treated with 100 ng/mL tumor necrosis factor- α (TNF- α), and then the normal control group was named as TNF- α group, and the P131R group was named as TNF- α +P131R group. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) assay was used to evaluate the

[收稿日期] 2019-05-09; [接受日期] 2019-09-30

[作者简介] 张妮妮, 女, 硕士, 住院医师。

[通信作者] 江逊, 女, 主任医师。Email: jiangx@fmmu.edu.cn。

change in the monolayer barrier function of intestinal epithelial cells in the above four groups, and Western blot was used to measure the change in the expression of SLC26A3 protein in the normal control group and the P131R group. **Results** The eukaryotic recombinant expression plasmid (pSpCas9-SLC26A3) was successfully constructed. Both Taqman genotyping assay and Sanger sequencing confirmed the successful establishment of the Caco-2 cell model of SLC26A3 c.392C>G (p.P131R) expression. ECIS assay showed that compared with the normal control group, the P131R group had a significant increase in the monolayer permeability of intestinal epithelial cells ($P<0.05$), and at the same time, the P131R group had a significantly greater increase in cell membrane permeability after the induction with 100 ng/mL TNF- α ($P<0.05$). Western blot showed that compared with the normal control group, the P131R group had a significant reduction in the expression of SLC26A3 protein ($P=0.001$). **Conclusions** SLC26A3 c.392C>G (p.P131R) can reduce the expression of SLC26A3 protein, increase the monolayer permeability of intestinal epithelial cells, and thus lead to diarrhea. [Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(11): 1131-1137]

Key words: Congenital chloride diarrhea; SLC26A3 gene; Single nucleotide polymorphism; Intestinal epithelial cell

规律成簇间隔短回文重复 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 是细菌和古生菌细胞保护自身不受病毒侵害的防御系统。当微生物遭到病毒入侵时, CRISPR RNA 通过互补配对结合到病毒基因组, 通过核酸酶 Cas 特异性地切割病毒 DNA, 以实现自我保护^[1-2]。CRISPR/Cas9 系统已经成为成熟高效、简单方便的基因编辑技术, 广泛应用于人、鼠、斑马鱼、细菌、果蝇、酵母、线虫和农作物细胞的基因编辑^[3]。

基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 是人类最常见的基因突变类型, 其中一些 SNPs 已被证实与人类疾病直接相关^[4-6]。而先天性失氯性腹泻 (congenital chloride diarrhea, CCD) 或炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 相关性腹泻患者中均存在 SLC26A3 基因的异常^[7-9]。其中, SNP rs386833481 是引起 CCD 发生的一个重要突变体, 该 SNP 编码一个错义突变, 将 SLC26A3 基因 392 位点的 DNA 碱基从胞嘧啶 (cytosine, C) 变为鸟嘌呤 (guanine, G), 从而使 SLC26A3 蛋白 131 位点的氨基酸从脯氨酸 (proline, P) 变为精氨酸 (arginine, R)^[10]。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 突变体细胞模型, 同时利用电-细胞-基质阻抗传感 (electric-cell-substrate impedance sensing, ECIS) 分析和 Western blot 法检测相对于野生型 (WT) 细胞, 该 SNP 对细胞单层通透性的影响及其潜在作用机制, 从而为进一步揭示 SLC26A3 SNPs 的生物学功能及相关腹泻发生机制和治疗奠定基础, 同时也为 CRISPR/Cas9 基因编辑工具的应用开拓新的领域。

1 材料与方法

1.1 材料

人结直肠腺癌上皮细胞 Caco-2 (HTB-37TM, 美国模式培养物集存库) 和 Top10 *E.coli* 菌株 (本科室保存); 质粒 pSpCas9n(BB)-2A-Puro(PX462) V2.0 (#62987, 美国 Addgene 公司); 连接酶 T7、限制性内切酶 BbsI 和 PlasmidSafe 核酸外切酶 (美国 NEB 公司); 细胞基因组 DNA 提取试剂盒 (德国 Qiagen 公司); 质粒提取试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), 胎牛血清、青霉素-链霉素双抗、非必需氨基酸、谷氨酰胺、0.25% 胰酶-EDTA、EMEM 培养基及培养瓶 (75 cm²)、6 孔板 (美国 Gibco 公司); 氨苄霉素、嘌呤霉素 (美国 Sigma 公司); sgRNA 和 ssODN 序列合成委托美国 IDT 公司; rs386833481 的 TaqMan 荧光标记探针、BCA 定量试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司); TNF- α (美国 R&D Systems 公司); 小鼠源 SLC26A3 单克隆抗体 (GTK34204, 美国 GeneTex 公司); 兔源 GAPDH 多克隆抗体 (SC-25778, 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)。

1.2 细胞培养

Caco-2 细胞用含有 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、2 mmol/L 谷氨酰胺和 100 μ g/mL 青霉素-链霉素双抗的 EMEM 培养基培养, 并置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱^[11]。

1.3 单导 RNA 的设计

利用 CRISPR 在线工具 (<http://crispr.mit.edu/>), 根据 CRISPR/Cas9 靶点设计原则生成特异性识别 SLC26A3 基因 392 位点的上下游单导 RNA

(single guide RNA, sgRNA) 序列^[3]。将 SLC26A3 基因序列提交至网站, 并获得相应的备选序列, 在正义链 5' 端添加 CACCG, 反义链 5' 端添加 AAAC。本研究为 Caco-2 细胞系设计了两个位于

SNP 侧翼的 sgRNA (sgRNA1、sgRNA2) 和一个独特的供体 DNA 模板单链 DNA 寡核苷酸 (ssODN)。每个 sgRNA 又包括一个正义链和反义链用于克隆, 引物序列见表 1。

表 1 sgRNA 克隆的引物序列

引物名称	引物序列 (5' → 3')
sgRNA1	正义链: CACCGAATTAACAGTGGGTGAATCG 反义链: AAACCGATTACCCACTGTTAATT
sgRNA2	正义链: CACCGCCGATTCTGAGTATGATGGT 反义链: AAACACCATCATACTCAGAATCCGG
ssODN	正义链: GAAACTGCTCCTGAAACTGCTAGTCCCACCATCATACTCAGAATCCGAA 反义链: ACGGACCTAATTAACAGTGGGTGAATCGTCTCAGTATATGCCTCTCTAAAGCAC

1.4 重组真核表达质粒 pSpCas9-SLC26A3 的构建

将 pSpCas9n(BB)-2A-Puro(PX462)V2.0 质粒经 BbsI 酶切形成的 pSpCas9-puro 载体与退火后的 sgRNA 混合, 在 T7 DNA 连接酶作用下, 以 37 °C 5 min → 23 °C 5 min 的条件作用 6 个循环, 经 PlasmidSafe 核酸外切酶处理后, 将连接产物 pSpCas9-SLC26A3 转化至 Top10 *E.coli* 感受态细胞中 (由 0.1 mol/L 的 CaCl₂ 制备而成), 用氨苄霉素抗性筛选已成功导入 pSpCas9-SLC26A3 的感受态细胞, 测序鉴定^[12]。

1.5 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 表达细胞的筛选

当 Caco-2 细胞密度达到 70% 时, 与抗性筛选后的感受态细胞共培养, 同时加入 ssODN, 并转染 GFP 监测转染效率。因重组质粒 pSpCas9-SLC26A3 含有嘌呤霉素抗性, 能够使 Caco-2 细胞在嘌呤霉素筛选时存活^[3], 因此重组质粒转染 Caco-2 细胞 48 h 后, 加入嘌呤霉素至终浓度为 1.0 μg/mL, 72 h 后筛选已成功导入 pSpCas9-SLC26A3 的 Caco-2 活细胞至 6 孔板, 继续扩增培养。

1.6 提取细胞基因组 DNA 并对目标片段进行 Taqman 基因型分析及 Sanger 测序

将空载体质粒 pSpCas9-puro 转染到 Caco-2 细胞中, 同时在嘌呤霉素进行抗性筛选重组质粒转染细胞前后, 各挑取 3 个孔的 Caco-2 细胞进行扩增培养。分别收集 2 × 10⁶ 个细胞, 按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书, 提取基因组 DNA (genome DNA, gDNA)。Taqman 荧光标记探针靶向标记的 rs386833481 SNP 用于 ViiA7 序列检测系统中 DNA 的扩增。采用 dH₂O 代替 DNA 作为阴性对照, 以

已知基因型的 WT Caco-2 细胞 DNA 样品作为阳性对照^[13]。

提取阳性对照和嘌呤霉素抗性筛选后 Caco-2 细胞的 gDNA, 通过 PCR 法扩增目的基因, SLC26A3 上游引物: 5'-ACCCTCACCTCTCGTCATC-3', 下游引物: 5'-TGCTGGGATTACAGGCGTGAG-3', 片段长度 440 bp, 引物的设计与合成由美国 Integrated DNA Technologies 公司完成。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的 DNA 基因, 进行 Sanger 测序。

Taqman 基因型分析检测的是正义链上的序列, Sanger 测序检测的是反义链上的序列。

1.7 ECIS 分析检测细胞单层通透性

利用 ECIS (美国 Applied Biophysics 公司) 分析检测细胞单层屏障功能, 也称跨上皮电阻 (transepithelial electric resistance, TEER)^[14]。实验分为正常对照组、P131R 组、TNF-α 组和 P131R+TNF-α 组。正常对照组为 WT Caco-2 细胞, P131R 组为 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 表达的 Caco-2 细胞。两组细胞分别接种到用 10 mmol/L 半胱氨酸和纤维连接蛋白 (20 μg) 预处理过的每孔含有 40 个金电极 (8W10E+ 电极板, 美国 Applied Biophysics 公司) 的阵列室中。当 32000 Hz 频率下的电容达到 10 nF 时, 表明细胞单层形成紧密连接。然后将细胞饥饿 2 h, TNF-α 组和 P131R+TNF-α 组分别在 WT Caco-2 细胞和 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 表达的 Caco-2 细胞上用 100 ng/mL TNF-α^[15] 处理 2.5 h。记录单层细胞的 TEER 值, 最终结果数据通过随时间变化的标准化电阻呈现。实验独立重复 3 次。

1.8 Western blot 法检测 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 表达细胞中 SLC26A3 蛋白的表达变化

实验分为正常对照组和 P131R 组，正常对照组为 WT Caco-2 细胞，P131R 组为 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 表达的 Caco-2 细胞。细胞裂解液作用于两组 Caco-2 细胞，在冰上操作并收集到 1.5 mL 的离心管中，以 13000 r/min 的速度在 4℃ 离心机中离心 10 min。通过 BCA 定量蛋白质浓度，将 30 μg 蛋白通过 SDS-PAGE 电泳，湿法电转移至 PVDF 膜，5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。分别加入 SLC26A3 一抗 (1:1000)、GAPDH 一抗 (1:2000)，于 4℃ 摇床上过夜，再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或山羊抗小鼠二抗 (1:5000，美国 Santa Cruz 公司)，室温孵育 1 h，再用 TBST 缓冲液洗涤 3 次，每次 15 min，加入发光试剂显色。利用 Fluorchem M 成像仪 (美国 ProteinSimple 公司) 进行成像，利用 AlphaVIEW SA 软件进行量化。以 GAPDH 为内参，以目的条带与内参条带的灰度比值作为该蛋白的相对表达量。实验独立重复 4 次。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 24.0 统计软件对数据进行统计学分

析，计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两组间比较采用两独立样本 *t* 检验；多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组表达载体 pSpCas9-SLC26A3 的构建与鉴定

将每个 sgRNA 的正义和反义寡核苷酸经退火后插入到表达 Cas9/gRNA 支架的 pSpCas9n(BB)-2A-Puro(PX462)V2.0 质粒 BbsI 位点，连接产物 pSpCas9-SLC26A3 转化到 Top10 *E.coli* 感受态细胞中，涂于含氨苄霉素的平板上，挑取单克隆细胞进行测序，选取连接正确的载体。在 Addgene 官网上选取 pSpCas9n(BB)-2A-Puro(PX462)V2.0 质粒 BbsI 剪切位点筛选克隆的测序引物：5'-GACTATCATATGCTTACCGT-3' (Lot: 14868230)。正确连接的重组载体测序结果表明，54~73 位碱基是 sgRNA 的插入序列，见图 1。

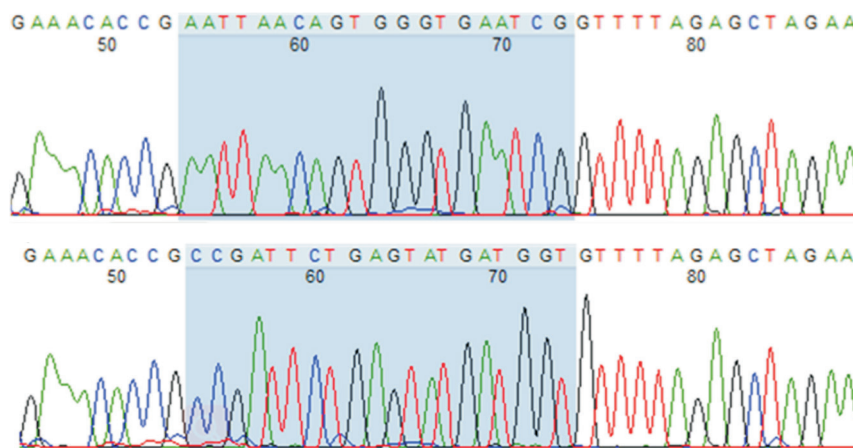


图1 pSpCas9-SLC26A3载体的测序结果 上图和下图的54~73位碱基分别是sgRNA1和sgRNA2的插入序列(蓝色背景区域所示)。

2.2 Taqman 基因型分析结果

成功获得 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) SNP 纯合子表达 (CC 型) 的 Caco-2 细胞；阳性对照的基因型与空载体对照基因型一致，均为 GG 型；嘌呤霉素抗性筛选 Caco-2 细胞前检测到 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R)SNP 杂合子表达 (CG 型)；阴

性对照未检测到基因型。见表 2。

2.3 Sanger 测序结果

嘌呤霉素抗性筛选后的 Caco-2 细胞目的基因序列与拟编辑为 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 的序列吻合，进一步证实了 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 的基因编辑成功，见图 2。

表 2 Taqman 基因型分析结果

样品种类	等位基因 1 Delta Rn	等位基因 2 Delta Rn	质量 (%)	基因型	基因型分析
阴性对照	0.041	0.091	100	未检测到	未检测到
阳性对照	0.114	2.141	97.86187	等位基因 2 纯合体	GG
阳性对照	0.101	2.202	97.86187	等位基因 2 纯合体	GG
阳性对照	0.065	2.228	97.86187	等位基因 2 纯合体	GG
空载体对照	0.112	2.438	97.86187	等位基因 2 纯合体	GG
空载体对照	0.072	2.128	97.86187	等位基因 2 纯合体	GG
空载体对照	0.071	2.211	97.86187	等位基因 2 纯合体	GG
筛选前的 SNP	1.391	1.951	97.86187	等位基因 1/2 杂合体	CG
筛选前的 SNP	1.281	2.089	97.86187	等位基因 1/2 杂合体	CG
筛选前的 SNP	1.206	1.939	97.86187	等位基因 1/2 杂合体	CG
嘌呤霉素筛选后的 SNP	2.033	0.305	97.86187	等位基因 1 纯合体	CC
嘌呤霉素筛选后的 SNP	2.096	0.325	97.86187	等位基因 1 纯合体	CC
嘌呤霉素筛选后的 SNP	2.110	0.174	97.86187	等位基因 1 纯合体	CC

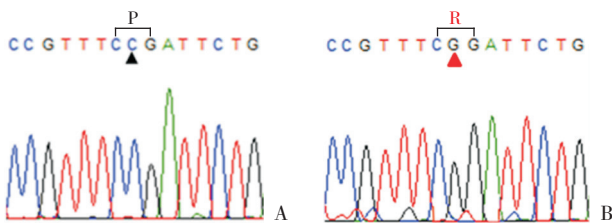


图 2 目的序列的测序结果 A: 阳性对照细胞的测序结果; B: 嘌呤霉素抗性筛选后的 Caco-2 细胞的测序结果。箭头所示为突变位点。[P] 脯氨酸; [R] 精氨酸。

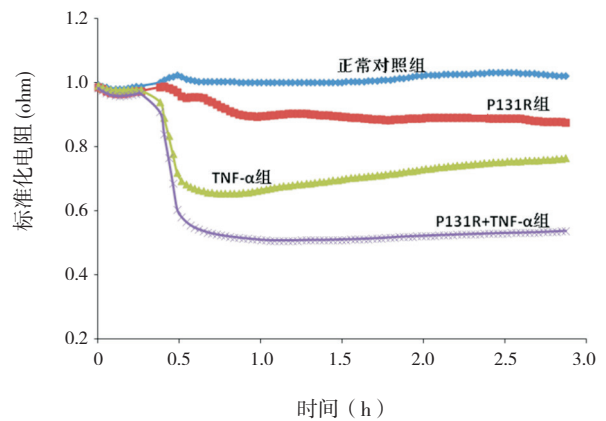


图 3 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 对肠上皮细胞单层通透性的影响

2.4 ECIS 分析肠上皮细胞单层通透性

鉴于肠黏膜屏障功能障碍是各种腹泻发生的直接原因, 因此本课题组利用 ECIS 分析检测了 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) SNP 对 Caco-2 肠上皮细胞单层通透性的影响。结果发现: 正常对照组、P131R 组、TNF- α 组和 P131R+TNF- α 组肠上皮细胞单层通透性比较差异有统计学意义 ($n=3$, $F=705.580$, $P<0.001$)。与正常对照组肠上皮细胞 (0.996 ± 0.014) 相比, P131R 组细胞单层通透性 (0.901 ± 0.010) 明显增加 ($P=0.0002$)。同时, 与 TNF- α 组 (0.672 ± 0.225) 相比, P131R+TNF- α 组肠上皮细胞单层通透性 (0.513 ± 0.006) 明显增加 ($P<0.001$), 提示 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 细胞对 TNF- α 诱导的细胞膜通透性的增加更为敏感。见图 3。

2.5 Western blot 检测 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 表达细胞中 SLC26A3 蛋白的表达情况

为了明确 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 细胞单层通透性增加的潜在机制, 本课题组利用 Western blot 对 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 表达细胞中 SLC26A3 的蛋白水平进行了检测。结果发现, 与正常对照组肠上皮细胞 SLC26A3 蛋白相对表达水平 (0.974 ± 0.098) 相比, SLC26A3 蛋白在 P131R 组细胞中的相对表达水平 (0.460 ± 0.150) 显著下降 ($n=4$, $t=5.744$, $P=0.001$), 见图 4。

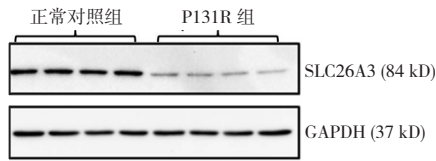


图 4 Western blot 检测正常对照组和 P131R 组细胞中 SLC26A3 蛋白的表达情况 P131R 组 SLC26A3 蛋白表达水平低于正常对照组, 每组平行样本数为 4。

3 讨论

CRISPR/Cas9 基因编辑系统被广泛应用于生物学及医学各领域, 包括基因表达与表观遗传学调控, 遗传物质的动态可视化, 动物(细胞)模型的建立, 基因疗法的探索等^[3,16]。在 gRNA 引导下, Cas9 核酸酶靶向特定 DNA 序列并诱发 DNA 双链断裂(double strand break, DSB)。DSB 可由两种内源性的修复机制修复, 即易于出错的非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组介导的修复(homology-directed repair, HDR), 从而实现基因敲除、敲入和染色体转为等编辑^[3,17]。在易出错的 NHEJ 过程中, DSB 末端由内源性 DNA 修复机制处理并重新连接, 这可能导致连接位点的随机突变。在基因的编码区域内发生插入/删除突变引起移码和过早终止密码子的发生, 从而导致基因敲除。在 HDR 过程中, 需要提供质粒或 ssODN 形式的修复模板, 该途径具有高保真度和精确编辑的特点。DNA 的单链剪切也可以诱导 HDR。在本研究中, 通过提供 ssODN 的修复模板, 最终实现了 HDR 修复, 从而避免了插入/删除等随机突变的发生。

近两年, 哈佛大学 Komor 等^[18]的实验室创建了新的 Cas9 融合蛋白, 可作为“单碱基编辑器”。这些融合蛋白包含 dCas9 或 Cas9 切口酶及大鼠胞苷脱氨酶 APOBEC1, 它能将 C 转化为尿嘧啶(U), 而无需切割 DNA。之后, 通过 DNA 复制或修复, U 被转化成胸腺嘧啶(T)。这种碱基编辑策略有望治疗数百种遗传病。虽然 Komor 等^[18]的工作成果是激动人心的, 因为它不再需要 DNA 切割和修复, 但仍然有一些需要解决的问题。首先, 最明显的问题是酶, 我们不仅仅需要 C → T 或 G → 腺嘌呤(A)的酶, 还需要 G → C 或 T → A 的酶。第二个潜在的问题是编辑窗口小。为了达到最佳的编辑效果, 目标碱基应该在第 4~8 位。由于前

间隔序列邻近基序的要求限制了可靶定序列的数量, 利用其他的 Cas9 酶也许能扩展编辑范围。因此, 目前大部分研究中采取的仍然是 HDR 修复 DSB 的策略进行基因编辑。

SNPs 是人类最常见的遗传变异类型。大量研究发现: SLC26A3 基因 SNPs 在 CCD 的发生发展中起着关键作用^[6,19-20]。此外, 炎症动物模型和 IBD 相关性腹泻患者 SLC26A3 的表达下降^[8-9]。同时近期有文献报道, 克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)均与 SLC26A3 基因 SNPs 及其表达相关^[21-22]。因此, 我们认为 SLC26A3 功能缺陷或表达受损可能是该类患者发生腹泻的重要机制之一。在本研究中, 本课题组利用 CRISPR/Cas9 技术中 HDR 介导的 DSB 修复机制筛选 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 表达细胞过程中, 遇到的主要问题及解决方案:

(1) 重组真核表达质粒 pSpCas9-SLC26A3 构建时, 连接产物转化到 Top10 感受态细胞中, 涂于含氨苄霉素的平板后, 次日平板上并未长出可挑选克隆, 通过多次实践, 我们发现热休克的最优条件为 42 °C, 30 s, 在热休克改变细胞膜的流动性时, 目的 DNA 才能通过细胞表面的内陷高效进入 Top10 感受态细胞。(2) 实验中一开始用常规 0.5 μg/mL 嘌呤霉素抗性筛选时, Taqman 基因型分析结果均显示为杂合等位基因。因此我们检测了 Caco-2 细胞对嘌呤霉素的敏感性, 分别用终浓度为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 μg/mL 的嘌呤霉素处理 WT Caco-2 细胞 72 h 后, 结果发现 1.0、1.5、2.0 μg/mL 组的细胞全部凋亡, 而 0.5 μg/mL 组仍有三分之一细胞存活, 因此本研究将筛选 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 表达细胞的嘌呤霉素浓度调整为 1.0 μg/mL, 最终成功获得了纯合子基因的突变体细胞, 并进行了基因测序。此外, 最新研究表明: SLC26A3 可作为上皮屏障的组成部分与紧密连接蛋白 ZO-1 相互作用, SLC26A3 的下调或敲除可通过影响紧密连接蛋白的表达从而破坏上皮屏障, SLC26A3 的过表达可逆转紧密连接蛋白的变化^[22], 结合本研究中 ECIS 和 Western blot 的结果, 提示 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 可能通过降低 SLC26A3 蛋白的表达而导致肠上皮细胞通透性增加从而引起相关性腹泻的发生, 该发现仍需进一步的体外体内实验来证实。

综上所述,本研究首次建立了表达 CCD 相关基因 SLC26A3 c.392C>G(p.P131R) 多态性的细胞模型,同时发现该 SNP 通过降低 SLC26A3 蛋白的表达而增加细胞单层的通透性,从而为进一步深入研究相关腹泻的发生机制和治疗提供了更多的理论依据,也为 CRISPR/Cas9 基因编辑工具的应用开拓新的领域。

[参 考 文 献]

- [1] Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms[J]. *Ann Rev of Biophys*, 2017, 46(1): 505-529.
- [2] Erdmann V, Barciszewski J. From nucleic acids sequences to molecular medicine[M]. Berlin: Springer, 2012: 121-143.
- [3] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [4] Zhang W, He T, Wang Q, et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase-2 genetic variant rs708035 increases NF-κB activity through promoting TRAF6 ubiquitination[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(18): 12507-12519.
- [5] Heruth DP, Katherine S, Nini Z, et al. Genetic association of single nucleotide polymorphisms with acetaminophen-induced hepatotoxicity[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2018, 367(1): 95-100.
- [6] Katherine S, Heruth DP, Nini Z, et al. Identification of novel regulatory genes in APAP induced hepatocyte toxicity by a genome-wide CRISPR-Cas9 screen[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1396.
- [7] Matsunoshita N, Nozu K, Yoshikane M, et al. Congenital chloride diarrhea needs to be distinguished from Bartter and Gitelman syndrome[J]. *J Hum Genet*, 2018, 1(63): 887-892.
- [8] Chatterjee I, Kumar A, Castilla-Madrigal RM, et al. CDX2 upregulates SLC26A3 gene expression in intestinal epithelial cells[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 313(3): G256-G264.
- [9] Asano K, Matsushita T, Umeno J, et al. A genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for ulcerative colitis in the Japanese population[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(12): 1325-1329.
- [10] Wedenoja S, Pekansaari E, Höglund P, et al. Update on SLC26A3 mutations in congenital chloride diarrhea[J]. *Hum Mutat*, 2011, 32(7): 715-722.
- [11] Freedman JC, Hendricks MR, McClane BA, et al. The potential therapeutic agent mepacrine protects Caco-2 cells against *Clostridium perfringens* enterotoxin action[J]. *mSphere*, 2017, 2(4): pii: e00352-17.
- [12] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [13] Katherine S, Suman C, Dmitry G, et al. Identification of novel single nucleotide polymorphisms associated with acute respiratory distress syndrome by exome-seq[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111953.
- [14] Kho DT, Johnson RH, O'Carroll SJ, et al. Biosensor technology reveals the disruption of the endothelial barrier function and the subsequent death of blood brain barrier endothelial cells to sodium azide and its gaseous products[J]. *Biosensors (Basel)*, 2017, 7(4): pii: E41.
- [15] Ding X, Li D, Li M, et al. SLC26A3 (DRA) prevents TNF-α-induced barrier dysfunction and dextran sulfate sodium-induced acute colitis[J]. *Lab Invest*, 2018, 98(4): 462-476.
- [16] Ding Y, Li H, Chen LL, et al. Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 703.
- [17] Bernheim A, Calvo-Villamañán A, Basier C, et al. Inhibition of NHEJ repair by type II-A CRISPR-Cas systems in bacteria[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2094.
- [18] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [19] Bhardwaj S, Pandit D, Sinha A, et al. Congenital chloride diarrhea - novel mutation in SLC26A3 gene[J]. *Indian J Pediatr*, 2016, 83(8): 859-861.
- [20] Thiagarajah JR, Kamin DS, Acra S, et al. Advances in evaluation of chronic diarrhea in infants[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(8): 2045-2059.
- [21] 邵晓晓, 夏宣平, 曹曙光, 等. 溶质相关载体 26A3 基因多态性及其在结肠组织中的表达水平与克罗恩病的关系 [J]. *中华消化杂志*, 2017, 37(10): 684-691.
- [22] Shao XX, Lin DP, Sun L, et al. Association of ulcerative colitis with solute-linked carrier family 26 member A3 gene polymorphisms and its expression in colonic tissues in Chinese patients[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2018, 33(9): 1169-1172.

(本文编辑: 万静)