

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.02.0128

论著

应用 CRISPR/Cas9 技术敲除 *SLC5A8* 基因对黑色素瘤的影响

董玥湘¹, 刘岩², 靳小石³, 刘雅涵³, 谢天皓³, 矫政涛³

(1.河北大学临床医学院, 保定 071000; 2.邢台市人民医院急诊科, 邢台 054000; 3.河北大学附属医院普通外科, 保定 071000)

摘要 目的: 采用 CRISPR/Cas9 技术研究 *SLC5A8* 基因对肿瘤细胞的影响。方法: 通过 CRISPR/Cas9 技术建立 *SLC5A8* 基因敲除模型, 将 C57 小鼠分为两组各 4 只, 分别为敲除 *SLC5A8* 基因负瘤鼠实验组(KO 组)和普通负瘤鼠对照组(WT 组)。对比两组的肿瘤时间-生长曲线、肿瘤体积、肿瘤重量及病理学改变。结果: 与 WT 组相比, KO 组黑色素瘤生长速度更快, 肿瘤体积显著增大($t=7.845, P<0.01$)。KO 组肿瘤重量较 WT 组显著增加($t=3.804, P<0.01$)。KO 组小鼠肿瘤细胞表现出更深层次的异型性, 细胞密度不均, 结构复杂、形态多样, 且存在大量炎细胞浸润。结论: 敲除 *SLC5A8* 基因影响了 C57 负瘤鼠黑色素瘤细胞的发展, *SLC5A8* 基因是黑色素瘤进展过程中的负调控因子。

关键词 CRISPR/Cas9; *SLC5A8* 基因; 黑色素瘤

中图分类号 R73-3

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)02-0128-04

Effect of knockdown of *SLC5A8* gene on melanoma by applying CRISPR/Cas9 technology

DONG Yuexiang¹, LIU Yan², JIN Xiaoshi³, LIU Yahan³, XIE Tianhao³, JIAO Zhengwei³

(1. Hebei University School of Clinical Medicine, Baoding 071000, China; 2. Departement of Emergency Emergency, Xingtai Pepole's Hospital, Xingtai 054000, China; 3. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of the *SLC5A8* gene on tumor cells using CRISPR/Cas9 technology. **Methods:** A CRISPR/Cas9-induced *SLC5A8* gene knockout model was created. Eight C57 mice were divided into the knockout group (KO group) with the *SLC5A8* gene knocked out in tumor-bearing mice, and the wild-type control group (WT group), with 4 mice in each group. Tumor growth curves, tumor volume, tumor weight, and pathological changes were compared between the two groups. **Results:** Compared to the WT group, the KO group showed an accelerated melanoma growth rate, a marked increase in tumor volume ($t=7.845, P<0.01$). Compared with the WT group, the tumor weight significantly increased in mice within the KO group ($t=3.804, P<0.01$). Tumor cells in KO group showed deeper cellular atypia, uneven cell density, complex and diverse morphology, and abundant infiltration of inflammatory cells. **Conclusion:** Knocking out the *SLC5A8* gene affects the development of melanoma cells in C57 tumor-bearing mice, and the *SLC5A8* gene functions as a negative regulator in the progression of melanoma.

Key words CRISPR/Cas9; *SLC5A8* gene; melanoma

随着肿瘤发病率不断上升, 肿瘤治疗已成为医学领域的研究热点。在肿瘤治疗过程中, 探索关键基因的作用具有重要意义。溶质载体基因家族 5A, 成员 8 (*SLC5A8*) 基因编码 Na⁺ 耦联的短链脂肪酸 (SCFAs) 高亲和转运蛋白, 可将乳酸、丙酮酸、乙酸、丙酸、戊酸、丁酸和单羧酸制剂 (如二氯乙酸、烟酸、水杨酸) 转运到细胞内^[1]。 *SLC5A8* 基因与人体多种组织器官的肿瘤发生和发展密切相关, 其在人体多种组织中表达, 并在结肠癌、乳腺癌、胃癌等多种肿瘤表达沉默。目前关于 *SLC5A8* 基因对肿瘤细胞增殖情况和肿瘤形态学变化影响的研究较为有限。因此,

探究该基因是否能成为肿瘤治疗的靶标具有重要意义。小鼠黑色素瘤皮下移植瘤模型是一种常用的实验方法, 该模型具有瘤体生长速度快、成瘤率高、模型稳定、操作简单等优点, 能够模拟人类肿瘤的生长过程, 可以更好地观察和研究肿瘤发展过程中的变化。CRISPR/Cas 基因编辑技术是一种高效的基因编辑技术, 具有简单、精准等特点, 已被广泛应用于动、植物的基因编辑研究。本研究选择黑色素瘤作为研究对象, 通过 CRISPR/Cas9 技术探究 *SLC5A8* 基因缺失对黑色素瘤发展的后果, 为肿瘤和黑色素瘤的治疗提供新的思路和方法。

1 材料方法

1.1 实验材料 C57 基因敲除小鼠和普通 C57 小鼠由北京维通达生物技术有限公司提供技术支持 [许可证号: SCX(京)2019-00002]。雌性, 8~12 周龄,

基金项目 河北省重点研发计划 (21377773D)

作者简介 董玥湘 (1998-), 女, 硕士在读, 研究方向: 外科学; 董玥湘和刘岩为共同第一作者; 通信作者: 靳小石, E-mail: doctorjinxiaoshi@126.com。

体重 18~22 g 的小鼠被用于实验,饲养于河北大学 SPF 级别医学综合实验中心,在动物设施小鼠实验单元的特殊无病原体条件下繁殖。C57 小鼠黑色素瘤 B16 细胞由河北大学附属医院中心实验室冻存于 -80°C 冰箱。RPMI Medium 1640 basic(1x)购自赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司,PBS(0.01 mmol/L,pH=7.4)购自碧云天生物技术有限公司。试剂包括胰蛋白酶消化液(0.25%)、二甲苯、梯度乙醇、石蜡、10%甲醛,仪器包括显微镜、高速冷冻离心机。

1.2 实验方法

1.2.1 采用 CRISPR/Cas9 技术构建 SLC5A8 基因敲除模型并鉴定 设计 gRNAC57BL/6 小鼠的 SLC5A8 基因敲除环节、CRISPR/Cas9 技术由北京维通达生物技术有限公司完成[许可证编号:SCXK(京)2019-0002]。通过 CRISPR/Cas9 技术,设计 SLC5A8-gRNA1(GTCTCGGACAAGCCTAGACT),SLC5A8-gRNA2(GGGAGGCTCTCGCACTATCC),进行卵细胞显微注射,构建基因敲除型小鼠显微注射当天进行胚胎移植,移植后 21 d 小鼠出生,经过剪尾鉴定和 PCR 筛选,得到纯和基因型小鼠。在室温为 $21\sim 25^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 40%~60%,12 h/12 h 昼夜光照条件下饲养 7 周后用于实验。

1.2.2 实验分组及 C57 负瘤鼠模型建立 分别取 7 周龄的雌性 SLC5A8 基因敲除型 C57 小鼠(KO 组)及普通负瘤鼠 C5 小鼠(WT 组)各 4 只。将黑色素瘤 B16 细胞复苏后进行细胞传代,用台盼蓝检测肿瘤细胞的数目并将细胞浓度调整至 $5\times 10^6/\text{mL}$,将 KO 组和 WT 组小鼠依次取出七氟烷吸入麻醉,脱毛酒精消毒后在背部皮肤上种植 0.2 mL 的 $5\times 10^6/\text{mL}$ 的悬液,种植后约 10 d 后,小鼠的背部皮下会出现直径约 2~5 mm,形状不规则,移动性尚可,界限清楚的黑色质硬结节,视为建立模型成功。

1.2.3 绘制 C57 负瘤鼠肿瘤时间-生长曲线 对 KO 组和 WT 组小鼠进行规律的监测,观察它们的活动情况和肿瘤的生长情况。以皮下结节直径超过 0.5 cm 为成瘤标准,并使用游标卡尺每 3 天测量肿瘤的长(L)和短径(W),并拍照记录。通过公式 $0.5\times L\times W^2$ 计算肿瘤的体积(TV),并绘制时间-生长曲线。在动物模型构建后 33 d(当肿瘤长径+短径 ≤ 3 cm 时),剥离 C57 小鼠的肿瘤组织,测量其大小并称重。

1.2.4 镜下观察肿瘤组织 HE 染色切片 首先将标本在 10%中性福尔马林中固定 12 h 左右。然后,进行脱水处理,包括常温下 75%乙醇 2 h、85%乙醇 2 h、95%乙醇 1 h、100%无水乙醇梯度脱水。接下来进行透明处理,使用常温下二甲苯透明 1.5 h。然后进行浸蜡处理,组织浸入软蜡 2 h、浸入软蜡 40 min、硬蜡

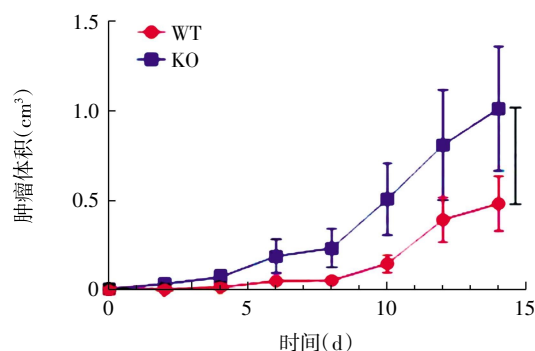
140 min、硬蜡 1 h。接着进行包埋,将熔化的石蜡倒入包埋框,然后将组织块放入,室温下待石蜡凝固。对包埋的组织块进行修整,用切片机将其切成 $4\sim 7\text{ }\mu\text{m}$ 的石蜡片。最后进行 HE 染色,包括石蜡切片 85°C 下恒温烘烤 15 min,并在二甲苯 I 和二甲苯 II 下各脱蜡 5 min;在 100%无水乙醇、95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇梯度乙醇和蒸馏水下各水化 2 min;苏木精染色 7 min,蒸水摇床洗 5 min;1%盐酸乙醇液分化 20 s,自来水洗 10 min;1%伊红染色 1 min,蒸水洗 3 次;常温下 75%、85%、95%、100%的梯度乙醇脱水,二甲苯透明 6 min;最后使用中性树胶封固,常温静置 6 h。最终使用 200 倍光镜观察切片结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行制图及统计分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示;两组间均数比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 SLC5A8 基因对负瘤鼠肿瘤体积的影响

2.1.1 C57 负瘤鼠肿瘤体积时间-生长曲线 观察到 KO 组中有 2 只小鼠腹部出现皮下结节,而 WT 组中有 1 只小鼠出现皮下结节。最晚出现皮下结节的是 WT 组,出现在第 15 天。所有的皮下结节均符合成瘤的标准,成瘤率达到 100%。肿瘤体积数据如图 1 所示。与 WT 组相比,KO 组的肿瘤体积显著增大($t=7.845,P<0.01$)(表 1)。



注:** $P<0.01$;KO 组:敲除 SLC5A8 基因负瘤鼠实验组;WT 组:普通负瘤鼠对照组

图 1 KO 组和 WT 组肿瘤的时间-生长曲线

Fig. 1 Time-growth curves of tumors in the KO and WT groups

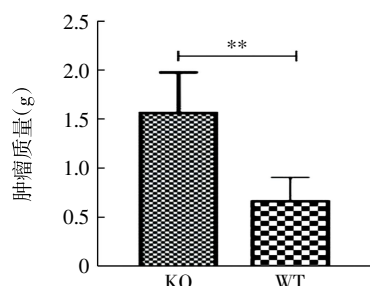
表 1 第 15 天时 KO 组和 WT 组肿瘤体积比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Comparison of tumor volume results of the KO and WT group on the 15 th day($\bar{x}\pm s$)

组别	n	肿瘤体积(cm^3)
KO 组	4	1.015 ± 0.135
WT 组	4	0.485 ± 0.056
t		7.845
P		0.000

2.1.2 两组小鼠瘤重比较 剥离的肿瘤组织的长径和短径之和均不超过 3 cm。KO 组和 WT 组的肿

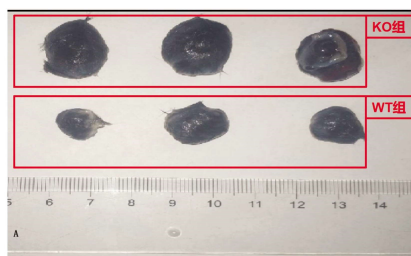
瘤质量对比如图2。与WT组相比,KO组的肿瘤质量显著增加($t=3.804, P<0.01$)。图3为KO组和WT组负瘤鼠剥离的肿瘤标本对比。



注:** $P<0.01$;KO组:敲除 *SLC5A8* 基因负瘤鼠实验组;WT组:普通负瘤鼠对照组

图2 KO组和WT组的肿瘤质量对比图

Fig.2 Comparison of tumor weights in the KO group and WT group

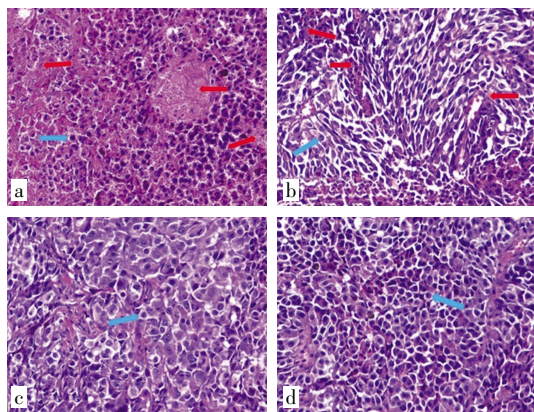


注:KO组:敲除 *SLC5A8* 基因负瘤鼠实验组;WT组:普通负瘤鼠对照组

图3 KO组和WT组负瘤鼠剥离肿瘤对比图

Fig.3 Comparative graph of tumor dissociation between KO group and WT group

2.2 *SLC5A8* 基因对 C57 负瘤鼠肿瘤组织形态的影响 图4a、b显示KO组肿瘤细胞呈现异型性,细胞密度深浅不均。肿瘤细胞的结构复杂,排列紊乱,形态多样且大小不一。肿瘤组织中存在大量炎细胞浸润。部分肿瘤细胞核染色质浓缩,染色加深,部分肿瘤细胞核则出现碎裂或消失,形成坏死区。还有一部分肿瘤细胞具有较大的体积,大小不一,胞浆丰富,并可见病理性核分裂像。图4c、d显示,与KO



注:a、b为KO组的组织切片,蓝色箭头所指为黑色素瘤肿瘤细胞,红色箭头为肿瘤坏死组织;c、d为WT组的组织切片,蓝色箭头为黑色素瘤肿瘤细胞

图4 肿瘤组织标本 HE 染色(200×)

Fig.4 HE staining of tumor tissue specimens(200×)

组相比,WT组的肿瘤细胞结构更为紧密,排列较为规整。肿瘤细胞形态饱满,但大小欠均匀。瘤细胞呈扁豆状、牛眼状或蜂巢状排列,并可见病理性核分裂像。细胞多呈多角形、椭圆形或纺锤体形态。

3 讨论

在肿瘤治疗中,化疗、靶向治疗和免疫治疗已成为广泛应用的治疗方法,并在一定程度上延长了患者的生存期。尽管这些治疗方法已经取得了一定的成功,但仍有许多患者对这些治疗方法的反应不佳。这种差异的原因之一在于肿瘤的遗传特征,它会导致不同的临床反应^[2]。因此,发展个体化的肿瘤治疗方案成为当务之急^[3]。聚集规则间隔短回文重复序列(CRISPR/Cas9)相关核酸酶是一种用于快速进行基因操作的技术。该技术已成功应用于研究基因功能以及其在肿瘤中的作用^[4]。CRISPR/Cas9不仅在细胞培养模型中展现了准确有效的基因编辑能力,而且在人类也具备这一潜力,成为潜在的强大肿瘤治疗工具^[5]。本研究通过利用CRISPR/Cas9技术建立*SLC5A8*基因敲除模型,精确地敲除该基因,并深入研究其功能和作用机制,为肿瘤治疗策略提供重要参考。部分不同的基因靶点已经被确定并证明对肿瘤有效,但仍有更多的基因靶点值得被探索。

2002年,Rodriguez等^[6]在甲状腺中发现并鉴定了一个编码蛋白与钠/碘协同运载体有46%氨基酸序列相似性的基因,该基因被命名为*SLC5A8*,并定位于人类染色体12q13-23。*SLC5A8*基因作为钠耦联运载体对短链脂肪酸、乳酸和烟酸发挥功能,大量表达于结肠、回肠、肾、甲状腺和脑组织,而且在诸多肿瘤组织中表达沉默^[7-9]。其表达水平下调或缺失,提示其可能是肿瘤抑制基因。既往研究已经证实,*SLC5A8*基因的沉默机制主要涉及其外显子1区域存在广泛的CpG岛甲基化^[10]。目前的研究表明,*SLC5A8*作为一种潜在的肿瘤抑制基因,其表达产物需要丁酸、丙酸等底物。这些底物可以通过调节组蛋白乙酰化的作用,上调促凋亡基因,从而调控细胞增殖并诱导细胞凋亡。如果该基因的表达是肿瘤发生、发展的重要机制,将为肿瘤治疗提供新的基因靶点,对肿瘤的分子生物学治疗有重要意义。皮肤黑色素瘤是一种高度异质性肿瘤和致命的皮肤癌,是由能够驱动转化的突变的连续积累造成的,导致后期疾病进展^[11]。癌基因靶向药物和免疫检查点抑制剂在提高黑色素瘤患者的总体生存率方面取得了一定成功,但相关的毒性和耐药性仍是亟待解决的问题。基因治疗是一种新的治疗方法,该方法可以提高目前可用的黑色素瘤疗法的疗效,从而改善患者的预后^[12]。目前已经确定了几种基因治

疗靶点,并已证明对黑色素瘤细胞有效^[13]。

在本研究中,成功应用CRISPR/Cas9基因编辑技术,敲除了C57小鼠的SLC5A8基因序列,消除了其对应的溶质体转运蛋白表达。通过对比敲除SLC5A8基因的负黑色素瘤鼠和野生型负黑色素瘤鼠肿瘤细胞发展情况,发现该基因的敲除与黑色素瘤细胞增殖密切相关。根据实验结果所示,SLC5A8基因的敲除导致KO组黑色素瘤的肿瘤体积和质量较WT组显著增加。表明SLC5A8基因能够一定程度上抑制肿瘤细胞的生长和增殖,从而延缓肿瘤的生长。肉眼观察两组黑色素瘤肿瘤组织,KO组与WT组相比肿瘤组织体积有所增大,肿瘤内部中心可见液态坏死黑色素瘤组织。在HE染色后,KO组黑色素瘤肿瘤细胞镜下呈现不同程度的异型性,细胞密度深浅不均,肿瘤细胞结构复杂,排列紊乱,大小不一,且有部分肿瘤细胞核染色质致密浓缩、染色加深、核碎裂和消失形成坏死区,以及部分肿瘤细胞胞浆丰富,可见病理性核分裂像。WT组的黑色素瘤肿瘤细胞结构紧密,排列较规整,细胞形态饱满、大小欠均匀,多呈多角形、椭圆形或纺锤体形,可见病理性核分裂像。该结果可表明,敲除SLC5A8基因可能解除了黑色素瘤肿瘤细胞生长和增殖的某种限制,导致生长和增殖明显加快,同时形成大量坏死区。SLC5A8在黑色素瘤可能扮演着一个重要的负调节因子的角色。

本研究初步探究了SLC5A8在黑色素瘤发展中的作用,并显示其能够抑制黑色素瘤的生长,然而,仍需要进一步的研究更深入地揭示SLC5A8是通过何种机制抑制肿瘤细胞的增殖。例如,该基因是否通过影响肿瘤细胞的自噬、凋亡、泛凋亡和铁死亡等过程实现对肿瘤增殖的负调控作用。关于SLC5A8基因在肿瘤抑制中的作用机制,目前仅有少部分研究提供了相关证据。有研究表明,SLC5A8通过介导Wnt信号通路调控宫颈癌细胞的生物学行为。通过SLC5A8的过表达,可以抑制Wnt信号通路的激活,增加肿瘤细胞的凋亡率,降低肿瘤细胞的增殖活性^[15]。刘岩^[16]发现SLC5A8基因可能通过影响肿瘤的免疫微环境来实现对肿瘤的抑制作用。在本研究中笔者仅采用了小鼠黑色素瘤模型,因此该结果的适用性存在一定的限制。未来的研究可以进一步探究SLC5A8在其他类型肿瘤中的作用机制以及开发基于SLC5A8的肿瘤治疗策略。

综上所述,笔者研究发现证实了SLC5A8基因影响肿瘤的发展,下调SLC5A8基因在肿瘤细胞中

的表达,对肿瘤细胞的致瘤性有影响。也许通过使用像CRISPR技术这样的基因工程,可以提高新的选择性肿瘤治疗药物的成功率。

参考文献:

- [1] THANGARAJU M, GOPAL E, MARTIN P M, et al. SLC5A8 triggers tumor cell apoptosis through pyruvate-dependent inhibition of histone deacetylases[J]. Cancer Res, 2006, 66(24): 11560–11564.
- [2] GARRAWAY L A. Genomics-driven oncology: framework for an emerging paradigm[J]. J Clin Oncol, 2013, 31(15): 1806–1814.
- [3] VERMA M. Personalized medicine and cancer[J]. J Pers Med, 2012, 2(1): 1–14.
- [4] GUERNET A, GRUMOLATO L. CRISPR/Cas9 editing of the genome for cancer modeling[J]. Methods, 2017, 121: 130–137.
- [5] MARTINEZ-LAGE M, PUIG-SERRA P, MENENDEZ P, et al. CRISPR/Cas9 for cancer therapy: hopes and challenges[J]. Biomedicine, 2018, 6(4): 105.
- [6] RODRIGUEZ A M, PERRON B, LACROIX L, et al. Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes[J]. J Clin Endocr Metab, 2002, 87(7): 3500–3503.
- [7] ELANGO VAN S, PATHANIA R, RAMACHANDRAN S, et al. Molecular mechanism of SLC5A8 inactivation in breast cancer[J]. Mol Cell Biol, 2013, 33(19): 3920–3935.
- [8] THANGARAJU M, CRESCI G, ITAGAKI S, et al. Sodium-coupled transport of the short chain fatty acid butyrate by SLC5A8 and its relevance to colon cancer[J]. J Gastrointest Surg, 2008, 12: 1773–1782.
- [9] GUPTA N, MARTIN P M, PRASAD P D, et al. SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter[J]. Life Sci, 2006, 78(21): 2419–2425.
- [10] PARK J Y, KIM D, YANG M, et al. Gene silencing of SLC5A8 identified by genome-wide methylation profiling in lung cancer[J]. Lung Cancer, 2013, 79(3): 198–204.
- [11] SHAIN A H, YEH I, KOVALYSHYN I, et al. The genetic evolution of melanoma from precursor lesions[J]. N Engl J Med, 2015, 373(20): 1926–1936.
- [12] MENEZES M E, TALUKDAR S, WECHMAN S L, et al. Prospects of gene therapy to treat melanoma[J]. Adv Cancer Res, 2018, 138: 213–237.
- [13] VIOLA J R, RAFAEL D F, WAGNER E, et al. Gene therapy for advanced melanoma: selective targeting and therapeutic nucleic acids[J]. J Drug Deliv, 2013; 2013: 897348.
- [14] ANBAZHAGAN A N, PRIYAMVADA S, KUMAR A, et al. miR-29a, b, and c regulate SLC5A8 expression in intestinal epithelial cells[J]. AM J PHYSIOL-GASTR L, 2021, 321(2): G223–G231.
- [15] ZHANG X M, MENG Q H, KONG F F, et al. SLC5A8 regulates the biological behaviors of cervical cancer cells through mediating the Wnt signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol, 2020, 24(9): 4679–4686.
- [16] 刘岩. 基于CRISPR/Cas9基因编辑技术探讨SLC5A8基因对黑色素瘤微环境细胞免疫功能的影响[D]. 河北大学, 2020.

(2023-06-26 收稿)