

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00349

B 细胞淋巴瘤因子 6 高表达对大鼠肝细胞凋亡的抑制作用

潘传涌¹, 杨生生¹, 傅海龙², 缪明永^{1*}, 焦炳华^{1*}

1. 第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433
2. 第二军医大学长征医院麻醉科, 上海 200003

[摘要] **目的** 克隆大鼠 B 细胞淋巴瘤因子 6(B-cell lymphoma 6, Bcl6) 基因, 构建绿色荧光蛋白融合表达载体 pEGFP-Bcl6, 初步探讨大鼠 Bcl6 转录因子在大鼠肝细胞中的生物学作用。**方法** 首先提取大鼠肝脏总 RNA, 经反转录和巢式 PCR 扩增 Bcl6 编码区的 CDS 序列后, 通过基因重组的方法构建 pEGFP-Bcl6 重组质粒并鉴定; 然后利用脂质体转染法将重组质粒转入大鼠肝细胞 BRL-3A 中, 利用实时定量 PCR 和蛋白质印迹法检测其表达; 最后应用流式细胞术分析转染融合表达质粒后肝细胞的凋亡, 采用 MTT 法检测肝细胞的增殖情况。**结果** PCR 法和测序法鉴定重组质粒 pEGFP-Bcl6 构建成功, 实时定量 PCR 法和蛋白质印迹法鉴定重组质粒瞬时转染成功, 流式细胞术证实 Bcl6 具有抑制肝细胞凋亡的作用, MTT 法证实 Bcl6 具有促进肝细胞增殖的作用。**结论** 成功克隆了大鼠 Bcl6 基因, 构建了 Bcl6 绿色荧光蛋白表达载体, 在大鼠肝细胞中初步证明 Bcl6 具有促进肝细胞增殖和抑制凋亡的作用。

[关键词] 肝细胞; Bcl6; 细胞增殖; 细胞凋亡

[中图分类号] R 349.52 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)04-0349-06

Up-regulation of B-cell lymphoma 6 expression suppresses apoptosis of rat liver cells

PAN Chuan-yong¹, YANG Sheng-sheng¹, FU Hai-long², MIAO Ming-yong^{1*}, JIAO Bing-hua^{1*}

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To clone the gene of B-cell lymphoma 6 (Bcl6), construct a green fluorescent expression vector carrying rat Bcl6 gene, and to evaluate its roles in rat liver cells. **Methods** Total liver RNA was isolated from rat liver samples and cDNA was synthesized by reverse transcription; the coding sequence of Bcl6 gene was obtained by nested PCR. pEGFP-Bcl6 fusion expression vector was constructed by recombination technique and confirmed by sequencing. Then the recombinant vectors were transfected into rat liver cell line BRL-3A by lipofectamine; the expression levels of Bcl6 mRNA and protein were determined by real-time PCR and Western blotting analysis, respectively. Finally, the apoptosis of BRL-3A cells transfected with recombinant vector was analyzed by flow cytometry and cell proliferation was examined by MTT assay. **Results** The recombinant vector pEGFP-Bcl6 was successfully constructed as determined by PCR and sequencing, and was effectively delivered to BRL-3A cells by transient transfection as confirmed by PCR and Western blotting analysis. Result of flow cytometry proved that Bcl6 up-regulation suppressed apoptosis of rat liver cells and MTT assay found that Bcl6 up-regulation promoted proliferation of liver cells. **Conclusion** We have successfully cloned rat Bcl6 gene and constructed its green fluorescent expression vector. Our results initially prove that Bcl6 may inhibit cell apoptosis and promote cell proliferation in rat liver cells.

[Key words] hepatocytes; Bcl6; cell proliferation; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(4): 349-354]

人类 B 细胞淋巴瘤因子 6(B-cell lymphoma 6, Bcl6) 基因编码一个转录抑制因子, 介导细胞的异常增殖、存活、分化阻滞以及基因组的不稳定性^[1]。研

究发现 Bcl6 转录因子主要通过抑制超过 500 种与细胞周期调控、基因转录、DNA 损伤的感受、蛋白质的泛素化以及染色质结构相关的靶基因来发挥生物学

[收稿日期] 2012-01-10 **[接受日期]** 2012-03-19

[基金项目] 上海市科委重点基金项目(10JC1417400)。Supported by Key Basic Program of Shanghai Science and Technology Committee (10JC1417400)。

[作者简介] 潘传涌, 博士生。E-mail: pcyong@126.com

* 通信作者(Corresponding authors)。Tel: 021-81870970-8006, E-mail: miaomy@163.com; Tel: 021-65493936, E-mail: jiaobh@live.cn

效应^[2],除了在弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)中过度表达外,它在骨质疏松症的破骨细胞分化等过程中也发挥着重要作用^[3]。绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是20世纪90年代中期发展起来的一种荧光报告分子,相对分子质量小,易与其他目的基因形成融合基因,对细胞无毒副作用,而且其化学性质稳定、使用方便,可以在活体细胞中跟踪观察,所以连接有GFP的载体pEGFP-N1在分子生物学中被广泛应用。而Bcl6转录因子在进化上高度保守,人类与大鼠的Bcl6氨基酸序列有95%同源。鉴于Bcl6转录因子具有广泛的生物学作用且在肝脏组织中的确切作用尚不明确,本研究构建了以GFP为报告基因的重组表达质粒pEGFP-Bcl6,初步探讨了其对大鼠肝细胞的生物学作用,为进一步研究Bcl6的作用机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 TRIzol 试剂、Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司;反转录试剂盒购自 Fermentas 公司;PCR 产物纯化、质粒抽提试剂盒购自 Axygen 公司;无内毒素质粒抽提试剂盒为 Omega 公司产品;T₄ DNA 连接酶、*Ex Taq* 酶、pMD18-T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *Hind* III、*Sac* II 购自 NEB 公司;SYBR qPCR Mix 购自 Toyobo 公司;Bcl6(C-19)抗体购自 Santa Cruz 公司;Actin(5A7)抗体购自 Abmart 公司;HRP 标记羊抗兔二抗购自 Sigma 公司;羊抗鼠二抗购自 BioMart 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司;DMEM 高糖培养液购自 HyClone 公司;MTT 细胞增殖检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术公司。引物的合成和序列测定由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.1.2 细胞、质粒与菌株 大鼠正常肝细胞株 BRL-3A 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, DH5 α 感受态细胞、pEGFP-N1 质粒由本教研室保存。

1.2 细胞培养 BRL-3A 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,每 2 d 换液 1 次,视生长情况进行适当传代。

1.3 细胞总 RNA 的提取 用 TRIzol 消化抽提细胞总 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测完整性,核酸蛋白测定仪(BioPhotometer plus, Eppendorf 公司)测定 D_{260}/D_{280} 。使用的 RNA 标本凝胶电泳显示完整, D_{260}/D_{280} 在 1.8~2.1 范围内,符合下一步实验的要

求。

1.4 Bcl6 基因目的片段的获取

1.4.1 反转录法获取目的基因 cDNA 序列 按试剂盒建议的方法用 1.0 μ g 总 RNA 进行反转录合成第一链 cDNA。反应体系如下:总 RNA 1.0 μ g, oligo(dT)₁₈ (100 μ mol/L) 1 μ l, 5 \times 反应缓冲液 4 μ l, RNA 酶抑制剂 (20 U/ μ l) 1 μ l, 10 mmol/L dNTP Mix 2 μ l, 反转录酶 (200 U/ μ l) 1 μ l, DEPC 水补至 20 μ l; 反应条件:将总反应液 42 $^{\circ}$ C 水浴 60 min, 再 70 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 灭活反转录酶后加入 80 μ l 的双蒸水稀释 5 倍, -20 $^{\circ}$ C 保存用于后续 PCR 反应。

1.4.2 PCR 反应扩增包含目的片段全长 CDS 序列 参照大鼠 Bcl6 基因的 mRNA 序列 (NM_001107084) 设计外引物 Bcl6-F156、Bcl6-R2336 (表 1), 扩增包含目的片段全长 CDS 序列的第 156~2 336 位碱基, 产物序列长为 2 181 bp。PCR 反应体系: 2.5 μ l 模板 cDNA、0.15 μ l TaKaRa *Ex Taq* 酶 (5 U/ μ l)、2.5 μ l 10 \times *Ex Taq* 缓冲液、2 μ l dNTP Mix (各 2.5 mmol/L)、20 μ mol/L 的上、下游引物各 0.5 μ l, 加入去离子水至总体积 25 μ l。采用以下反应条件进行扩增: 94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 变性 35 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 75 s, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 补充延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 5 min。同时设立用超纯水代替模板 DNA 的阴性对照。

表 1 PCR 引物

Tab 1 PCR primers

Primer	Sequence (5'-3')
Bcl6-F662	TCG AGG TCG TGA GGT TGT
Bcl6-R779	CGG ATA AGA GGC TGG TGG
Bcl6-F156	TTT GGA CTG TGA AGC AAG GC
Bcl6-R2336	AAA GAG TCA ACA CTC CAT GCT TC
Bcl6-F192	ACC CAA GCT T <u>GC CAC C</u> AT GGC CTC ACC GGC TGA CAG
Bcl6-R2312	TCC <u>CCG CGG</u> GCA GGC TTT GGG GAG CTC C
ACTB-F18	CAC CCG CGA GTA CAA CCT TC
ACTB-R224	CCC ATA CCC ACC ATC ACA CC

The restriction enzyme sites are underlined, and the Kozak sequences are boxed

1.4.3 PCR 产物的纯化 PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,切取包含目的片段的凝胶,按照胶回收试剂盒操作说明书进行胶回收,用核酸蛋白测定仪测定产物浓度。

1.4.4 PCR 产物的 T 载体实验 参照 pMD18-T 载体试剂盒操作说明,取上述纯化的 0.1 pmol PCR 产物与 0.03 pmol pMD18-T 载体进行连接,再将

10 μl 连接产物转化至 100 μl 的 DH5 α 感受态细胞中,用含有 X-Gal、IPTG、氨苄青霉素的 LB 琼脂平板培养,筛选白色菌落,使用 PCR 法初步鉴定插入片段大小,再将初步确定正确的阳性克隆进行测序确认,质粒命名为 pMD18-Bcl6。

1.4.5 质粒的抽提 挑取阳性克隆接种于含抗生素的 LB 培养液中 180 转/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜,待 D_{600} 达到约 0.6 时,取 2 ml 菌液参照质粒提取说明书提取质粒并测定其浓度。

1.4.6 PCR 反应扩增目的片段 CDS 的序列 参照大鼠 Bcl6 基因的 mRNA 序列设计内引物 Bcl6-F192 和 Bcl6-R2 312 (表 1),并在前向引物的 5' 端加上 HindIII 酶切位点(下划线部分)和酶切位点保护性碱基以及 Kozak 序列(框线部分)以提高转录起始的效率;反向引物则将 Bcl6 的终止密码子删除并使其阅读框与下游的 EGFP 基因一致,并在其 5' 端引入 SacII 酶切位点(下划线部分)和保护性碱基。以 pMD18-Bcl6 质粒为模板,Bcl6-F192 和 Bcl6-R2312 为引物扩增包含目的片段 CDS 序列的第 192~2312 位碱基。反应体系及反应条件同上,PCR 产物总长度为 2146 bp。PCR 反应结束后,产物进行琼脂糖凝胶电泳、胶回收纯化后测定产物的浓度。

1.5 重组载体 pEGFP-Bcl6 的构建 纯化的上述 PCR 产物和 pEGFP-N1 质粒用 HindIII 和 SacII 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收纯化酶切产物。目的片段与质粒 DNA 按 3:1(摩尔比)的比例混合进行连接反应,加 1 μl T₄ DNA 连接酶,总反应体积 20 μl ,16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。

1.6 重组载体 pEGFP-Bcl6 的筛选与鉴定 连接产物转化宿主菌 DH5 α 感受态细胞,涂布于含有卡那霉素的 LB 琼脂平板。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,挑取阳性克隆接种于含有 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 卡那霉素的 LB 培养液中,振荡培养过夜。菌液离心、集菌、弃上清液,提取重组质粒 DNA,用 HindIII 单酶切以及 HindIII 和 SacII 双酶切,1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定重组质粒和目的片段大小,并用 PCR 法对重组子进行复筛鉴定,最后采用 Sanger 双脱氧链终止法测定目的基因的 DNA 序列。

1.7 重组载体 pEGFP-Bcl6 转染 BRL-3A 细胞 将对数生长期的 BRL-3A 细胞用胰酶消化、吹打均匀。以 2.0×10^5 个/孔铺于 6 孔板,待细胞汇合度达 50%~70% 时,转染用无内毒素质粒提取试剂盒提取的 pEGFP-Bcl6 重组质粒,同时做 pEGFP-N1 质粒和正常不转染对照组。参照 Lipofectamine 2000 转染操作方法,转染前每孔用 2.5 ml Opti-MEM 无血清培养液换液,再以每孔 4.0 μg pEGFP-

Bcl6 重组质粒、10 μl Lipofectamine 2000 转染,4~6 h 后换为正常含血清培养液继续培养,48 h 后收集细胞进行后续实验。

1.8 实时 PCR 检测 Bcl6 mRNA 的表达 于 Bcl6 mRNA 序列的 CDS 区设计用于实时 PCR 的引物 Bcl6-F662 和 Bcl6-R779 以及内参照 β -actin 的引物 ACTB-F18、ACTB-R224 (表 1);反转录 1 μg 总 RNA 后,参照 SYBR qPCR Mix 操作说明书进行 PCR 扩增,以 β -actin 为内参照,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 Bcl6 的相对表达量。

1.9 蛋白质免疫印迹法检测 Bcl6 蛋白的表达 BRL-3A 细胞转染 pEGFP-Bcl6 质粒 48 h 后,用 PBS 清洗细胞,RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白,用 BCA 法进行蛋白定量, β -actin 为内参照,以 50 μg 的量上样进行蛋白质免疫印迹分析检测蛋白质的相对表达水平。

1.10 流式细胞术检测 BRL-3A 细胞凋亡 用不含 EDTA 的胰酶消化收集转染重组质粒的 BRL-3A 细胞,PBS 洗涤 2 次,加入 500 μl 的结合缓冲液悬浮细胞,再加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 染色液,避光反应 15 min 后用流式细胞仪(MASCQuant,德国美天旆生物技术公司)检测,实验重复 3 次。

1.11 MTT 法检测 BRL-3A 细胞增殖 将转染重组质粒 24 h 后的 BRL-3A 细胞铺于 96 孔板(500 个/孔),铺板后 24、48、72、96、120 h 分别加入 20 μl 的 MTT 溶液,继续孵育 4 h 后弃去上清液,每孔加入 150 μl DMSO 溶液,10 min 后于 570 nm 波长处测定光密度值以检测细胞的增殖情况。

1.12 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增产物相对分子质量的鉴定 由于依据大鼠 Bcl6 转录因子编码区 CDS 序列的起始序列和终止序列设计的引物易出现引物二聚体且退火温度相差较大($>4^{\circ}\text{C}$),致使通过直接 PCR 扩增完整编码区片段较为困难,本实验通过 2 次 PCR 扩增,即先设计外引物扩增得到包含目的片段的 PCR 产物,克隆到 T 载体后,再以此载体为模板进行第二次扩增,以这种 T 载体为模板大大简化了 PCR 反应的底物复杂度,使扩增 PCR 引物条件较差的片段成为可能。本实验以 BRL-3A 细胞总 RNA 经 RT-PCR 第一轮扩增后,行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,在 2181 bp 处出现特异性扩增条带(图 1 中条带 1~4)。再以包含此片段的 pMD18-Bcl6 质粒为模板

进行第二轮扩增后,在 2 146 bp 处出现特异性扩增条带(图 1 中条带 5、6)。

2.2 质粒 pEGFP-N1 和重组质粒 pEGFP-Bcl6 的鉴定 提取的 pEGFP-N1 质粒(图 2 中条带 1、2) DNA 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,未见任何降解及蛋白质、RNA 污染。重组质粒 pEGFP-Bcl6 经 *Hind* III 或 *Sac* II 单酶切为 6 839 bp 的单一片段(图 2 中条带 4),经 *Hind* III 和 *Sac* II 双酶切,得到 4 706 bp 和 2 133 bp 的 2 个片段(图 2 中条带 3)。由于质粒 pEGFP-N1 本身大小为 4 733 bp, Bcl6 基因 CDS 序列长为 2 121 bp,酶切结果说明 Bcl6 基因与 pEGFP-N1 正确重组。进一步用 CMV-fwd-primer、EGFP-N-primer 对重组质粒测序,结果显示重组质粒 pEGFP-Bcl6 中插入序列长 2 121 bp,与 GenBank 公布的大鼠 Bcl6 基因的 mRNA 序列完全一致,且方向正确。

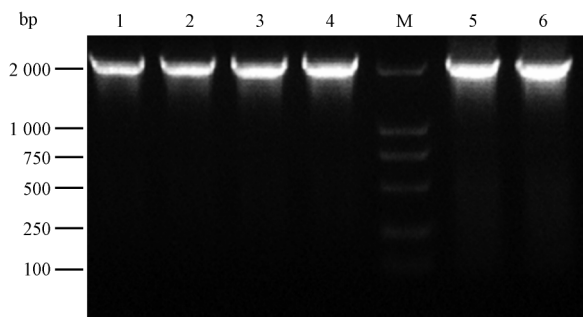


图 1 目的片段 PCR 产物电泳图

Fig 1 Electrophoresis of PCR product of target fragments

1-4: First round PCR products; 5, 6: Second round PCR products; M: Marker

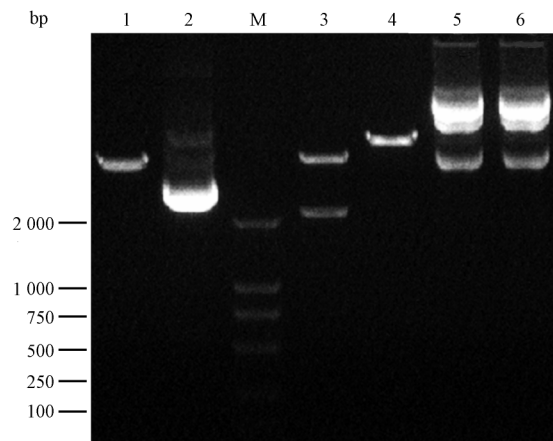


图 2 质粒 pEGFP-N1 和重组质粒 pEGFP-Bcl6 的酶切鉴定

Fig 2 Electrophoresis analysis of restriction digestion of plasmid pEGFP-N1 and recombinant plasmid pEGFP-Bcl6

1: pEGFP-N1 vector was digested with *Hind* III; 2: pEGFP-N1 vector; M: DL2000 DNA marker; 3: pEGFP-Bcl6 vector was digested with *Hind* III/*Sac* II; 4: pEGFP-Bcl6 vector was digested with *Hind* III; 5, 6: pEGFP-Bcl6 vector

2.3 Bcl6 在 BRL-3A 细胞中的表达 BRL-3A 细胞转染重组质粒 48 h 后,经实时 PCR 及蛋白质免疫印迹法检测,与 pEGFP-N1 转染组相比,转染 pEGFP-Bcl6 组的 mRNA 表达水平与蛋白表达水平升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$,图 3)。

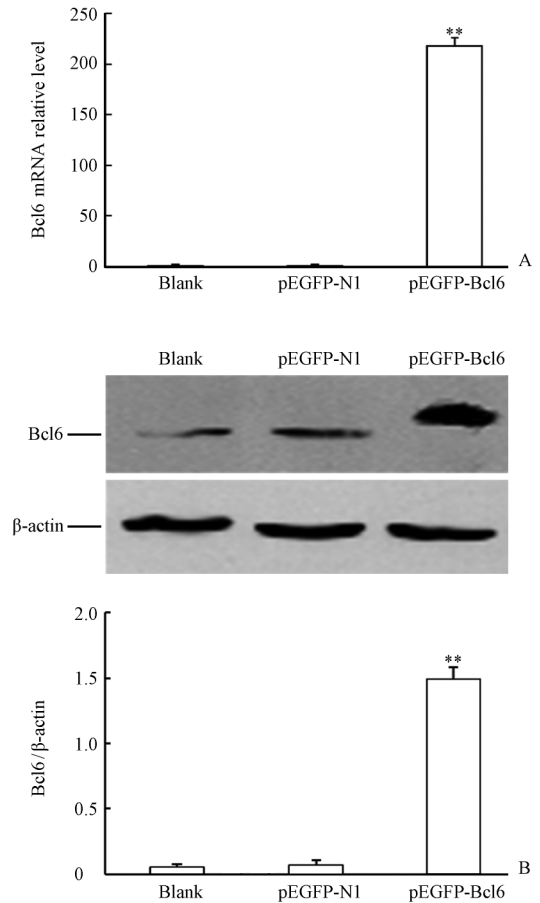


图 3 转染重组质粒 pEGFP-Bcl6 后 Bcl6 的表达

Fig 3 Bcl6 expression after transfection with recombinant plasmid pEGFP-Bcl6

A: Expression of Bcl6 mRNA (real-time PCR); B: Expression of Bcl6 protein (Western blotting). ** $P < 0.01$ vs pEGFP-N1 group; $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

2.4 Bcl6 对 BRL-3A 细胞凋亡的影响 BRL-3A 细胞转染重组质粒 48 h 后,流式细胞仪检测发现转染 pEGFP-Bcl6 质粒组 [(5.40 ± 0.46)%] 与 pEGFP-N1 组 [(13.28 ± 1.12)%] 相比,凋亡细胞数 (Annexin V 染色阳性细胞) 比例减少 ($P < 0.01$,图 4)。

2.5 Bcl6 对 BRL-3A 细胞增殖的影响 BRL-3A 细胞在转染重组质粒 pEGFP-Bcl6 后,与转染空质粒 pEGFP-N1 组相比较,在 72、96、120 h 细胞增殖增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 5)。

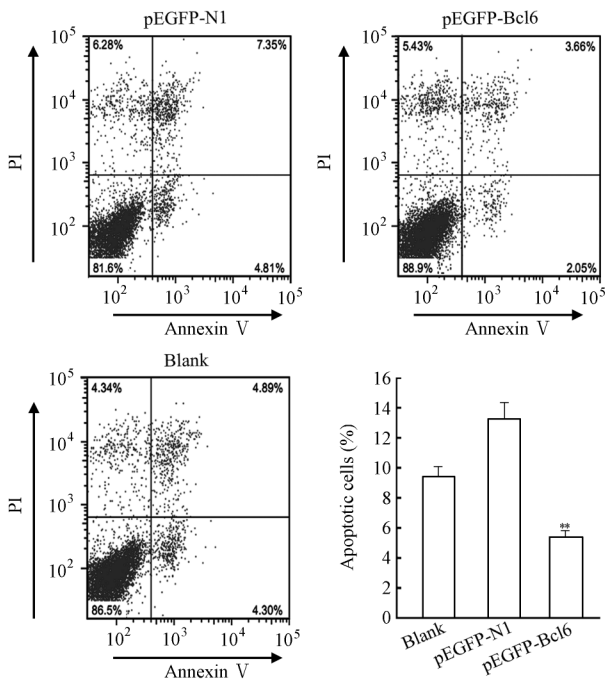


图 4 转染重组质粒 pEGFP-Bcl6 后 BRL-3A 细胞的凋亡
 Fig 4 Apoptosis analysis of BRL-3A cells
 after transfection with recombinant plasmid pEGFP-Bcl6

** $P < 0.01$ vs pEGFP-N1 group; $n = 3, \bar{x} \pm s$

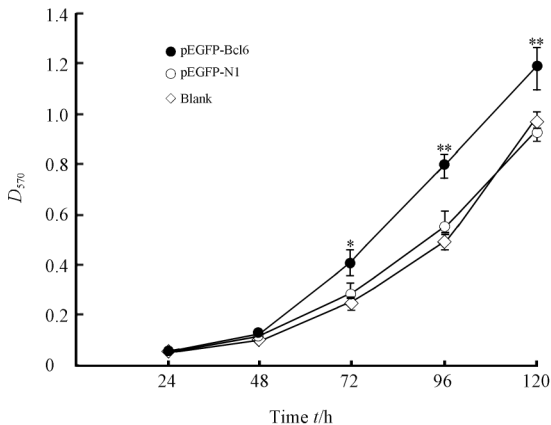


图 5 转染重组质粒 pEGFP-Bcl6 后 BRL-3A 细胞的增殖
 Fig 5 Proliferation analysis of BRL-3A cells
 after transfection with recombinant plasmid pEGFP-Bcl6

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs pEGFP-N1 group; $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

人类 Bcl6 基因位于 3q27 位点上, 又称为 BCL5、LAZ3、ZBTB27、ZNF51 基因, 首先在伴有 3q27 转位的 DLBCL 中发现, 编码一个由 706 个氨基酸组成的 POZ(锌指蛋白)。在正常淋巴组织中 Bcl6 蛋白主要表达于生发中心(GC)-B 细胞和 CD4⁺ T 细胞, 促进淋巴细胞分化、控制 GC 的形成以及 T 细胞依赖的抗原反应^[4]。目前在人类的研究

中发现 Bcl6 转录因子主要通过抑制与细胞周期调控、基因转录、DNA 损伤的感受、蛋白质的泛素化以及染色质结构相关的靶基因来发挥生物学效应, 受其直接调控的靶蛋白包括感受 DNA 破坏与检查点激活等重要调控通路的相关分子, 如共济失调毛细血管扩张症 Rad3 相关蛋白(ATR)、CHK1 检查点同源蛋白(CHEK1)、P53 蛋白和细胞周期蛋白依赖激酶抑制子 1A(CDKN1A)等^[5-7]。Bcl6 转录因子在进化上高度保守, 大鼠 Bcl6 基因位于 11q23 位点上, 编码 707 个氨基酸组成的转录因子, 人类与大鼠的 Bcl6 氨基酸序列都包含一个 N 端 BTB 结构域和 C 端锌指结构域, Bcl6 BTB 结构域可以与 SMRT、N-CoR 和 Bcl6 共同抑制因子(BCOR)相互作用而共同发挥基因抑制作用^[8-10], 据 Ohtsuka 等^[11]报道小鼠 CD4⁺ 和 CD8 α ⁺ 树突状细胞的成熟需要 Bcl6, Bcl6 同时也可以与 CD10 和人类 GC 相关淋巴瘤蛋白(HGAL)作为滤泡状淋巴瘤的标志物^[12]。在 Bcl6 本身的调控上, p300 组蛋白乙酰化酶可以乙酰化 Bcl6 的 RD2 结构域, 从而降低其对靶基因的抑制作用^[13], 而 miR-127 可以通过靶向抑制 Bcl6 的表达来发挥抑制肿瘤的作用^[14], 在 B 细胞非霍奇金淋巴瘤中发现 Bcl6 本身还可以通过它的 p53 反应元件受到 p53 的调节, 而这个反应元件在灵长类动物中高度保守, 在啮齿类动物中则不存在^[15], 这也形成了两类物种间表达调控的差异和复杂性。

来源于水母的 GFP 是一种天然荧光蛋白, 可在 450~490 nm 的蓝光激发下发出绿光, EGFP 是 GFP 的突变体, 荧光强度更强, 表达效率更高, 更适合作为报告基因用于研究基因的表达与调控、细胞分化、蛋白质的胞内定位及功能转换。Bcl6 的广泛表达意味着它在淋巴组织以外也可能发挥作用^[16]。人类和大鼠的 Bcl6 转录调控和作用机制大体上相似, 但也存在明显的种属差异, 为了更好地阐明 Bcl6 的作用机制, 我们构建了 Bcl6 的荧光蛋白融合表达载体, 因 Bcl6 基因编码区序列的特殊性, 我们采用了巢式 PCR 法成功克隆了 Bcl6 基因的 CDS 序列, 经鉴定序列完全正确。我们进一步转染了大鼠正常肝细胞, 经 RT-PCR 检测, 在转染 pEGFP-Bcl6 融合表达质粒后细胞内的 Bcl6 mRNA 表达升高达到 200 倍以上, 而用蛋白质免疫印迹法检测 Bcl6 蛋白的表达与对照组相比也上调, 证明我们用 RT-PCR

法构建 GFP 标记的融合表达载体方法可行,能够表达带荧光标记的目的蛋白。通过 pEGFP-Bcl6 融合表达载体转染大鼠肝细胞的实验,我们发现 Bcl6 具有抑制大鼠肝细胞凋亡和促进其增殖的作用,Bcl6 的这种促进肝细胞增殖的生物学效应与在 B 细胞淋巴瘤中发现其可以通过抑制 p53、ATR、CDKN1A 等抑制性因子而发挥促进细胞增殖的生物学效应一致^[5],在 EB 病毒阴性的人 Burkitt 淋巴瘤细胞系 BJAB 细胞中也发现 Bcl6 可以通过靶向性抑制程序性细胞死亡 2 (PDCD2) 基因而发挥凋亡抑制的作用^[17],另外,Kurosu 等^[18]的研究认为在 B 细胞淋巴瘤细胞中 Bcl6 还可以通过抑制活性氧(ROS)的升高而发挥抑制化疗药物诱导的细胞凋亡。而 Yamochi 等^[19]发现通过慢病毒过表达 Bcl6 基因后,CV-1 和 HeLa 细胞阻滞于 G₁ 亚期和 G₂/M 期,并且可以通过 Bcl-2 和 Bcl-X_L 诱导细胞凋亡。Bcl6 对细胞凋亡的这种双向调控作用或许与其在不同的细胞和细胞在不同的条件下发挥作用有关,而我们的初步研究认为过表达 Bcl6 可以起到抑制大鼠肝细胞凋亡和促进其增殖的作用,而这种调节作用的机制有待于进一步深入探讨。本实验为进一步进行 Bcl6 的亚细胞定位、跟踪 Bcl6 在生理和病理过程中的表达情况以及其作用机制的研究奠定了基础。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Ye B H, Rao P, Chaganti R, Dalla-Favera R. Cloning of bcl-6, the locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-cell lymphoma[J]. *Cancer Res*, 1993, 53: 2732-2735.
- [2] Polo J M, Juszczynski P, Monti S, Cerchetti L, Ye K, Grealley J M, et al. Transcriptional signature with differential expression of BCL6 target genes accurately identifies BCL6-dependent diffuse large B cell lymphomas[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 3207-3212.
- [3] Miyauchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, Sakamoto A, Iwasaki R, Hoshi H, et al. The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis[J]. *J Exp Med*, 2010, 207: 751-762.
- [4] Flenghi L, Bihui H Y, Fizzotti M, Bigerna B, Cattoretto G, Venturi S, et al. A specific monoclonal antibody (PG-B6) detects expression of the BCL-6 protein in germinal center B cells[J]. *Am J Pathol*, 1995, 147: 405-411.
- [5] Ranunolo S M, Polo J M, Dierov J, Singer M, Kuo T, Grealley J, et al. Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8: 705-714.
- [6] Phan R T, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells[J]. *Nature*, 2004, 432: 635-639.
- [7] Phan R T, Saito M, Basso K, Niu H, Dalla-Favera R. BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6: 1054-1060.
- [8] Ahmad K F, Melnick A, Lax S, Bouchard D, Liu J, Kiang C L, et al. Mechanism of SMRT corepressor recruitment by the BCL6 BTB domain[J]. *Mol Cell*, 2003, 12: 1551-1564.
- [9] Huynh K D, Bardwell V J. The BCL-6 POZ domain and other POZ domains interact with the corepressors N-CoR and SMRT[J]. *Oncogene*, 1998, 17: 2473-2484.
- [10] Huynh K D, Fischle W, Verdin E, Bardwell V J. BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression[J]. *Genes Dev*, 2000, 14: 1810-1823.
- [11] Ohtsuka H, Sakamoto A, Pan J, Inage S, Horigome S, Ichii H, et al. Bcl6 is required for the development of mouse CD4⁺ and CD8 α ⁺ dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2011, 186: 255-263.
- [12] Goteri G, Lucarini G, Zizzi A, Costagliola A, Giantomassi F, Stramazzotti D, et al. Comparison of germinal center markers CD10, BCL6 and human germinal center-associated lymphoma (HGAL) in follicular lymphomas[J]. *Diagn Pathol*, 2011, 6: 97-104.
- [13] Bereshchenko O R, Gu W, Dalla-Favera R. Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6[J]. *Nat Genet*, 2002, 32: 606-613.
- [14] Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman J M, Chuang J C, Coetzee G A, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells[J]. *Cancer Cell*, 2006, 9: 435-443.
- [15] Margalit O, Amram H, Amariglio N, Simon A J, Shaklai S, Granot G, et al. BCL6 is regulated by p53 through a response element frequently disrupted in B-cell non-Hodgkin lymphoma[J]. *Blood*, 2006, 107: 1599-1607.
- [16] Bajalica-Lagercrantz S, Piehl F, Farnebo F, Larsson C, Lagercrantz J. Expression of the BCL6 gene in the pre- and postnatal mouse[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 247: 357-360.
- [17] Baron B W, Anastasi J, Thirman M J, Furukawa Y, Fears S, Kim D C, et al. The human programmed cell death-2 (PDCD2) gene is a target of BCL6 repression; implications for a role of BCL6 in the down-regulation of apoptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 2860-2865.
- [18] Kurosu T, Fukuda T, Miki T, Miura O. BCL6 overexpression prevents increase in reactive oxygen species and inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic reagents in B-cell lymphoma cells[J]. *Oncogene*, 2003, 22: 4459-4468.
- [19] Yamochi T, Kaneita Y, Akiyama T, Mori S, Moriyama M. Adenovirus-mediated high expression of BCL-6 in CV-1 cells induces apoptotic cell death accompanied by down-regulation of BCL-2 and BCL-X_L[J]. *Oncogene*, 1999, 18: 487-494.