

*BCL3*基因敲除对线粒体呼吸作用及ATP合成的影响

李莉¹ 张艺博¹ 张林波³ 汤友静⁴ 陈逸飞¹ 关丫丫¹ 牛玉娜^{1,2*}

(¹新乡医学院医学检验学院, 新乡 453003; ²河南省免疫与靶向药物重点实验室, 新乡 453003;

³新乡医学院第三附属医院, 新乡 453003; ⁴新乡医学院第一附属医院, 新乡 453100)

摘要 B淋巴细胞瘤/白血病因子3(B cell CLL/lymphoma 3, BCL3)是一个转录辅调节因子, 通过结合转录因子对基因表达起激活或抑制作用, 维持细胞存活, 但其机制尚不清楚。该研究采用CRISPR/Cas9技术建立*BCL3*基因敲除的人宫颈癌HeLa细胞, 实时荧光定量PCR和Western blot验证敲除情况。使用特异性荧光探针法、萤火虫荧光素酶法、活细胞能量代谢动态分析法等技术手段检测*BCL3*基因敲除(*BCL3*-KO)对细胞内活性氧类(reactive oxygen species, ROS)水平、线粒体膜电位、线粒体呼吸作用以及ATP生成的影响。结果发现, *BCL3*-KO细胞内的相对ROS水平上升约50%, 采用转染的方式恢复细胞内表达*BCL3*基因则可抑制ROS水平的上升; 与野生型HeLa细胞相比, *BCL3*-KO细胞的线粒体膜电位明显降低($P<0.001$); *BCL3*敲除不影响细胞基础有氧呼吸速率, 但引起碳酰氰4-(三氟甲氧基)苯胺[carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, FCCP]诱导的最大(极限)呼吸速率显著上升($P<0.001$); 相比野生型细胞, *BCL3*-KO细胞中的ATP的浓度下降40%。该研究揭示了*BCL3*对线粒体功能的调控作用, 可能是其维护癌细胞存活的原因之一。

关键词 B淋巴细胞瘤/白血病因子3; 基因敲除; CRISPR/Cas9; 线粒体; 呼吸作用

Effects of *BCL3* Gene Knockout on Mitochondrial Respiration and ATP Synthesis

Li Li¹, Zhang Yibo¹, Zhang Linbo³, Tang Youjing⁴, Chen Yifei¹, Guan Yaya¹, Niu Yuna^{1,2*}

(¹Department of Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; ²Henan Key Laboratory of Immunology and Targeted Drugs, Xinxiang 453003, China; ³Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China;

⁴First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453100, China)

Abstract B-cell CLL/lymphoma 3 (BCL3), which acts as transcription coregulator by activating or suppressing gene expression via binding transcription factors, is required for cancer cell survival, but the underlying mechanism is not yet fully known. To investigate the roles of BCL3 in mitochondria function, *BCL3* knockout human cervical carcinoma HeLa cells (*BCL3*-KO cells) were generated by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to validate gene knockout. Using the cell lines, DCFH-DA and JC-1 staining method was performed to test ROS production and mitochondria membrane potential (MMP), respectively. Cellular energy metabolism was studied using Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer, and ATP production was also measured. In contrast to wild type HeLa cells, the relative level of ROS was decreased by nearly 50% in *BCL3*-KO cells; however the decline could be reversed by overexpression of BCL3. Deficiency of BCL3 led to a significant loss of MMP and a reduction in ATP production

收稿日期: 2017-10-28 接受日期: 2018-01-15

国家自然科学基金(批准号: 81701554)和河南省自然科学基金(批准号: 162300410213)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0373-3029977, E-mail: niuyuna@126.com

Received: October 28, 2017 Accepted: January 15, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81701554) and the Natural Science Foundation of Henan Province (Grant No.162300410213)

*Corresponding author. Tel: +86-373-3029977, E-mail: niuyuna@126.com

网络出版时间: 2018-04-16 11:54:36

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180416.1154.008.html>

($P < 0.001$), which could be indication of mitochondrial dysfunction. Furthermore, BCL3 knockdown did not affect the rate of basic cellular aerobic respiration, but caused an obvious rise in the rate of carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP)-induced cellular aerobic respiration ($P < 0.001$). ATP concentration in BCL3-KO cells was decreased about 40% compared with that of in wild type HeLa cells. Taken together, our results revealed a novel role for BCL3 in regulation of mitochondrial function, which might be one of the reasons for BCL3 to maintain cancer cell survival.

Keywords BCL3; knockout; CRISPR/Cas9; mitochondria; respiration

线粒体是真核细胞重要的细胞器,在能量代谢、生物合成和信号转导等方面发挥核心调控作用。作为细胞的“能量发电站”,线粒体的一个重要功能就是产生能量分子ATP。此外,线粒体还能产生活性氧类(reactive oxygen species, ROS)、还原性小分子和代谢产物,在细胞对应激的适应性反应中发挥至关重要的作用^[1]。在癌症发生过程中,细胞内部的促癌因素(如肿瘤相关的信号通路的激活、原癌基因的异常表达)往往靶向线粒体功能,影响ROS产生、代谢,致使细胞过度增殖,逃避死亡,最终形成肿瘤^[2-3]。在肿瘤发展及治疗过程中,肿瘤细胞要面对不断改变的内外微环境带来的应激压力,需要线粒体接受处理应激信号,调整肿瘤细胞对应激反应,线粒体成为肿瘤的“帮凶”。由此可见,线粒体对于癌细胞的生长与存活发挥了至关重要的作用。因此,准确理解肿瘤生成过程中线粒体的功能和作用机制,消除线粒体的“帮凶”作用,对癌症治疗有着重要意义。

癌细胞内的线粒体并非一直处于静止状态,而是在各种应激状态(癌细胞转化与增殖、过氧化物刺激、代谢模式的转变和化疗等)下不断进行“融合-分裂-融合-再分裂”的动态变化,在这个过程中涉及线粒体的生成与降解^[4]。大部分位于线粒体内的蛋白质由核基因组编码,线粒体基因组则主要编码与氧化呼吸链有关的蛋白质。在控制线粒体动力学方面,核基因起主导作用^[5],这就决定了调控核基因转录的蛋白在此过程中发挥至关重要的作用。研究发现,多个转录因子或转录辅助调节因子参与线粒体动态的调控,如核呼吸因子(nuclear respiratory factors, NRFs)、p53、甲状腺激素受体T3与糖皮质激素受体(两者为核受体)、信号传导及转录激活因子3(signal transducers and activators of transcription 3, Stat3)以及叉头转录因子(fork head transcription factor O, Foxo)家族等^[6-8]。

B细胞淋巴瘤/白血病因子3(B-cell CLL/lymphoma

3, BCL3)基因最初发现于B细胞淋巴白血病,被认为是一种潜在的促癌基因,其异常表达与B淋巴细胞慢性白血病及多种实体瘤有关^[9-12]。在胞质中, BCL3被糖原合成酶3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)催化而发生组成型磷酸化,磷酸化BCL3转移入核。BCL3本身不与DNA结合,其在核内的作用分为两种情况:(1)与p50或p52同二聚体形成复合体,同p65/p50异二聚体竞争DNA上的 κ B位点,对核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)靶基因的转录起着抑制或激活的双重调控作用^[13-16];(2)作为转录辅助因子通过蛋白质与蛋白质的相互作用,桥连其他转录因子与转录调节因子参与基因转录的激活或抑制,如与转录共激活因子Tip60结合激活基因的转录,而与对转录有负调控作用的组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)结合则抑制了基因的转录^[17]。研究发现, BCL3调控p53和Stat3的转录激活作用,而二者与线粒体动态密切相关^[11-12,18]。这促使我们猜测, BCL3可能通过调节它们来影响线粒体的动态与功能。为此,我们应用CRISPR/Cas技术制备BCL3基因敲除HeLa细胞,采取细胞和分子生物学技术,检测BCL3对线粒体膜电位、线粒体呼吸以及ROS、ATP生成的影响,并研究其对线粒体功能影响的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

DMEM培养基、胎牛血清和胰蛋白酶-EDTA (Trypsin-EDTA)购自BI公司。特异性荧光探针DCFH-DA和JC-1、ATP检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。Trizol和Lipofactamine™ 2000购自Life Technology公司。逆转录试剂盒和SYBR定量试剂购自TOYOBO公司。其他常规试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

HeLa细胞使用DMEM培养,培养基中含10%胎

牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素,细胞放在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。

1.3 *BCL3*基因敲除HeLa细胞的构建

1.3.1 构建CRISPR/Cas9介导的*BCL3*敲除载体 针对人*BCL3*基因第二外显子设计了两个CRISPR/Cas9作用的靶位点,分别位于第二外显子的5'和3'末端,合成两对寡聚核苷酸用于sgRNA的构建,(1)gRNA: ccg gTG TAG GCA GGT TCA CCA G和aaa cCT GGT GAA CCT GCC TAC A; (2)gRNA2: ccg gGT CTC CGT CCT CAT CTG CAC和aaa cGT GCA GAT GAG GAC GGA GAC。合成的寡聚核苷酸稀释成浓度为100 μ mol/L的溶液,退火后形成双链,下划线上的碱基形成黏性末端,连入pU6-gRNA表达载体(新乡医学院梁银明博士惠赠),转化、挑选单克隆菌落。通过菌液PCR和测序鉴定连入片段是否正确,选择正确的克隆,扩大培养,制备无内毒素质粒用于转染。

1.3.2 筛选 转染前一天,1.2 $\times$ 10⁵个HeLa细胞接种于24孔培养板中,接种2孔,其中1孔细胞用于转染而另1孔细胞作为对照(不转染)。含有嘌呤霉素(puromycin)抗性基因的Cas9表达质粒(新乡医学院梁银明博士惠赠)和两个sgRNA质粒按照0.4 μ g:0.3 μ g:0.3 μ g的比例进行转染。转染24 h后,在转染孔和对照孔中分别添加嘌呤霉素进行筛选,嘌呤霉素终浓度为600 ng/mL,加药4天后,对照孔中细胞完全死亡,此时将转染孔中嘌呤霉素浓度减半即300 ng/mL继续培养。3天后,使用胰酶消化,培养基重悬细胞,计数,配制细胞悬液,浓度为0.5~0.6个细胞/mL,接种于96孔培养板中,100 μ L/孔。培养板四周的孔不接种细胞,加入PBS,防止培养液的挥发,置CO₂培养箱培养10~15天后,可见单克隆形成。镜下观察,挑选仅有一个细胞克隆的孔,在盖子上做好标记,消化这些细胞克隆,将其转移至24孔培养板中,长成单层进行敲除鉴定。

1.3.3 鉴定 (1)Sanger测序。收集单克隆细胞,使用One Step Mouse Genotyping Kit(诺唯赞)裂解细胞,裂解液直接用于PCR。在sgRNA靶点的两侧设计PCR引物,上游引物序列为:5'-CCT GAG GAC CCT GTA TGG GA-3',下游引物序列为:5'-CTG TGT TAT GGA CGG CTG GT-3'。纯化后的PCR产物连在T载体上,常规测序检测突变。(2)Western blot。收集单克隆细胞,每株单克隆的细胞数不少于2 $\times$ 10⁵个,加入RIPA缓冲液裂解,100 $^{\circ}$ C煮沸10 min,12 000 r/min离心5 min,上清即为总蛋白。10% SDS-PAGE胶分

离蛋白,300 mA转至PVDF膜。5%脱脂牛奶常温封闭1 h,*BCL3*抗体(Proteintech公司,1:1 000)和内参GAPDH抗体(Abcam公司,1:10 000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜;TBST洗膜3次,每次10 min。室温下孵育二抗1 h, TBST洗膜3次,每次10 min。ECL化学发光检测显影,凝胶成像系统拍照。

1.4 qRT-PCR(Real-time quantitative reverse transcription PCR)检测

采用Trizol试剂(Invitrogen公司)提取细胞的总RNA,经琼脂糖凝胶电泳和Nanodrop仪器检测确定RNA的纯度与浓度。取1 μ g使用逆转录试剂盒(TOYOBO公司)合成cDNA,使用SYBR Green Realtime PCR master mix进行PCR扩增,肿瘤坏死因子alpha(tumor necrosis factor alpha, *TNF α*)引物为:5'-CCG TCT CCT ACC AGA CCA AGG-3'和5'-CTG GAA GAC CCC TCC CAG ATA G-3';分泌型白细胞肽酶抑制剂(secretory leukocyte peptidase inhibitor, *SLPI*)正反向引物序列分别为:5'-CCT GGA TCC TGT TGA CAC CC-3'和5'-ACA GGG GAA ACG CAG GAT TT-3',内参*GAPDH*的正反向引物序列分别为:5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3'和5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3'。每个样品设置4个复孔,取平均Ct值,根据2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算待测基因mRNA相对水平。

1.5 细胞内ROS水平的测定

本研究采用DCFH-DA法检测细胞内的ROS相对含量。使用无血清的DMEM培养基稀释DCFH-DA,使其终浓度为10 μ mol/L。PBS清洗细胞,吸弃上清,加入DCFH-DA稀释液覆盖细胞,37 $^{\circ}$ C培养箱内孵育20 min,用无血清的DMEM清洗细胞3次,充分去除未进入细胞内的DCFH-DA,收集细胞。使用Guava流式细胞仪488 nm激发波长检测荧光强度,平均荧光信号强度代表相对ROS含量。每个细胞设置4个复孔,取平均值。

1.6 线粒体功能的检测

细胞代谢呼吸动态分析仪(XF24 Extracellular Flux analyzer, Seahorse Bioscience, Billerica, MA, 美国)可以在微孔板上同时检测活细胞的氧消耗率(oxygen consumption rate, OCR)和细胞外酸化率(extracellular acidification rate, ECAR)等代谢指标,进而解析线粒体功能。

1.6.1 细胞代谢呼吸动态分析 按照XF24 Extra-

cellular Flux analyzer说明书检测细胞氧耗量,以检测线粒体的呼吸功能。检测前一天,将细胞接种于Seahorse生物能量代谢检测仪的24孔培养板中, 5×10^4 个细胞/孔,每株细胞设6个复孔,培养过夜。Sensor Cartridge检测板每孔中加入1 mL水化液(XF24 Seahorse assay溶液), 37°C 放置过夜。检测当天,把3种药物寡霉素(oligomycin)、FCCP和鱼藤酮(rotenone)加入Sensor Cartridge检测板,寡霉素评估线粒体ATP生成,FCCP评估线粒体最大呼吸能力,鱼藤酮抑制线粒体的电子传递。

1.6.2 细胞内ATP含量测定 实验前将HeLa细胞以 1.2×10^5 个细胞/孔的密度接种于24孔培养板上,每株细胞设置6个复孔。培养24 h后吸弃培养基,每孔加入ATP裂解液裂解细胞,12 000 r/min离心5 min,收集上清,使用ATP检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)进行检测。依据标准曲线计算每孔细胞内

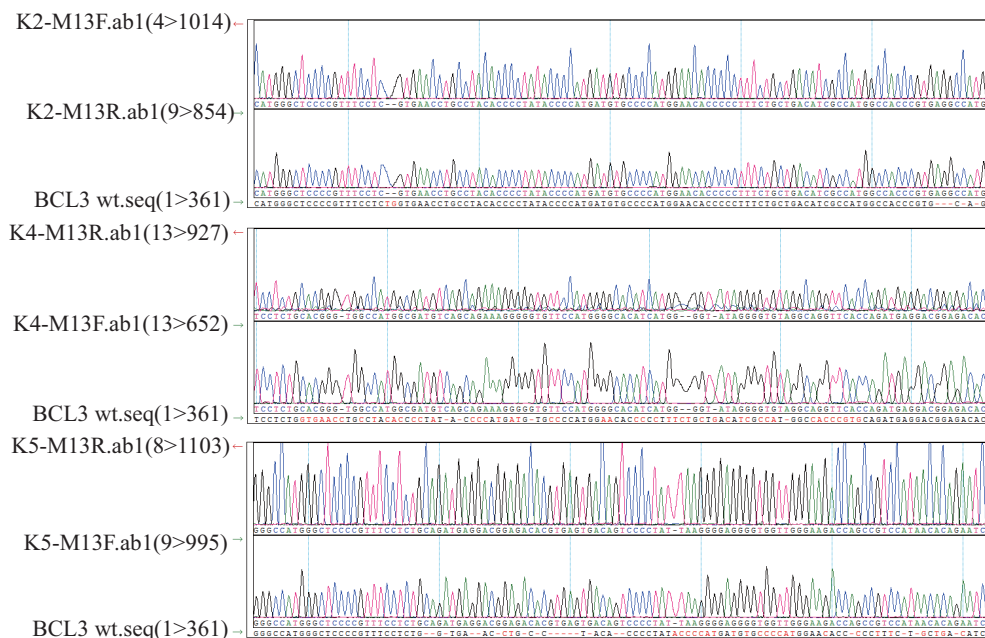
ATP的浓度。

2 结果

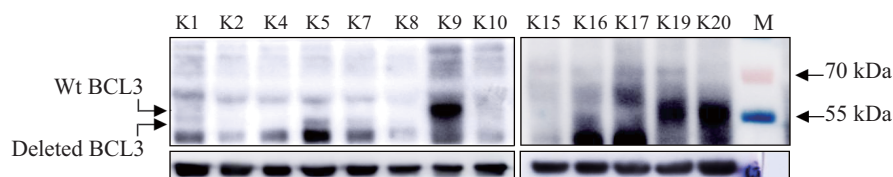
2.1 成功建立BCL3敲除的HeLa细胞

CRISPR/Cas9系统是通过在特异的位点造成DNA断裂,然后依赖于细胞的DNA修复机制插入或者删除一个或者多个碱基来实现精确的基因组编辑。本研究采用了针对同一个外显子的两个sgRNA与携带Cas9质粒共转染的策略,筛选出24株克隆细胞系。经测序和Western blot验证,18株发生了碱基突变或片段缺失(18/24),其中6株细胞系发生BCL3基因阅读框移码,翻译提前终止,导致该蛋白质功能丧失(6/24);12株细胞系虽然出现了片段缺失(两个sgRNA靶点之间的DNA片段),但并未引起阅读框移码(12/24),产生一种中间序列缺失的突变蛋白,该突变蛋白大小约45 kDa(图1)。根据挑选时的先后顺序

(A)



(B)

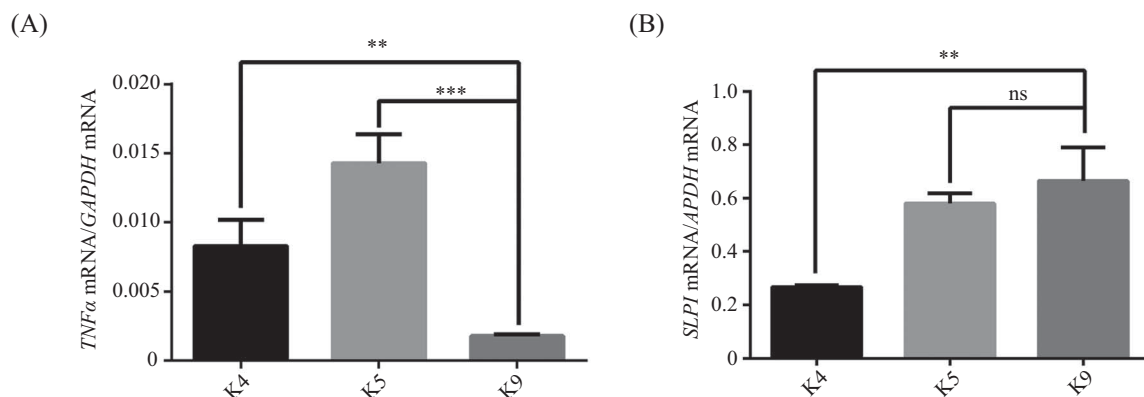


A: Sanger测序鉴定BCL3敲除的单克隆细胞系; B: Western blot鉴定BCL3敲除的单克隆细胞系。

A: Sanger sequencing was performed to confirm BCL3 knockout cell lines; B: Western blot was used to confirm BCL3 knockout cell lines.

图1 使用CRISPR/Cas9技术建立BCL3敲除细胞

Fig.1 Knockout of BCL3 by CRISPR/Ca9 mediated genome editing

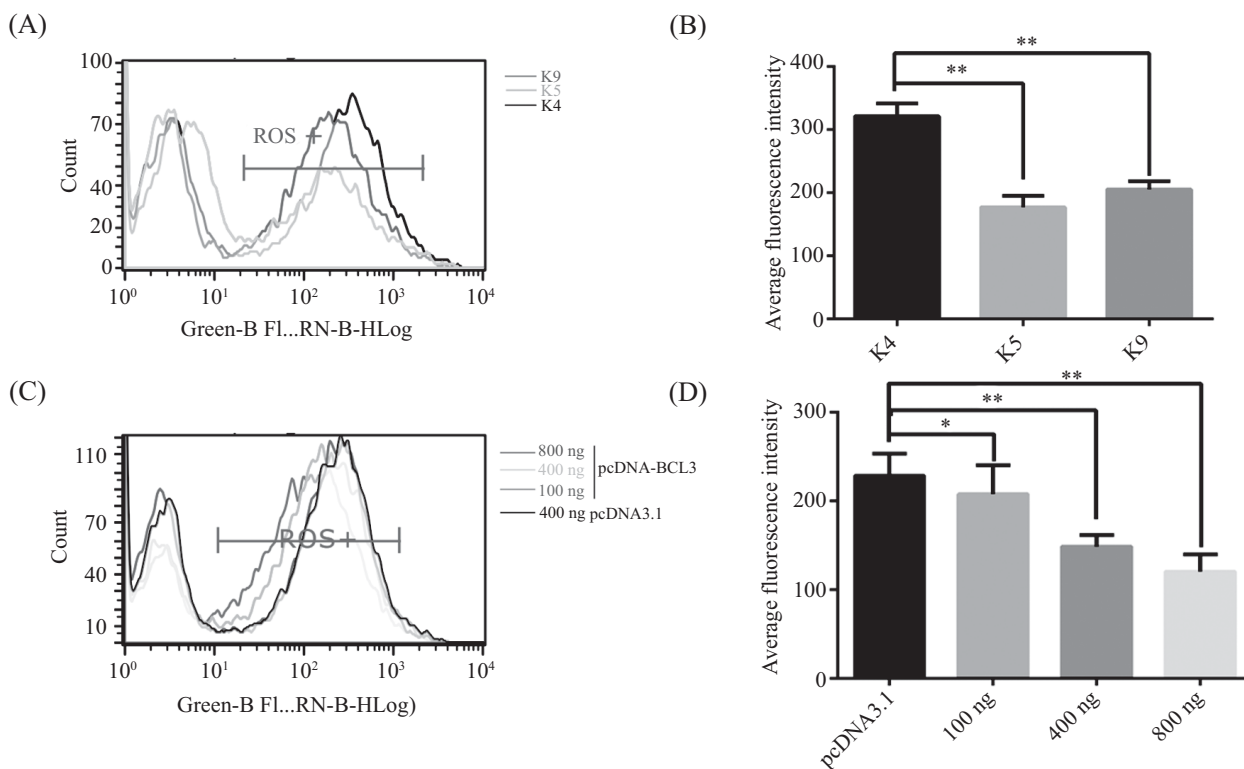


A: 3种细胞系中*TNFα*基因的相对表达量; B: 3种细胞系中*SLPI*基因的相对表达量。ns: 无显著性差异。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: relative levels of *TNFα* in three cell lines; B: relative levels of *SLPI* in three cell lines. ns: no significant difference. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图2 敲除*BCL3*对下游基因表达的影响

Fig.2 Knockout of *BCL3* affected the expression of its downstream genes



A: 流式细胞术检测K4、K5和K9细胞系(DCFH-DA荧光染料标记)中相对ROS含量(直方图); B: K4、K5和K9细胞系中DCFH平均荧光信号强度; C: 过表达pcDNA-BCL3及对照质粒pcDNA3.1对K4细胞系中相对ROS含量的影响(直方图); D: C实验中各组细胞的平均荧光信号强度。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: relative levels of ROS in DCFH-DA-labeled K4, K5 and K9 cell lines measured by FCM (histogram); B: mean fluorescence intensity (MFI) of DCFH-DA labeled K4, K5 and K9 cell lines; C: overexpression of pcDNA-BCL3 and pcDNA3.1 plasmids affected the relative level of ROS in K4 cells; D: MFI of cells in each group in C experiment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 *BCL3*对细胞内ROS产生的影响

Fig.3 *BCL3* affected the ROS production in cells

给单克隆细胞系进行编号, 分别命名为K1、K2……K20, 其中K4、K17为移码突变致使翻译提前终止导致*BCL3*功能敲除的阳性细胞株, K5是第二外显子缺

失但未引起移码突变的功能部分丧失细胞株, 而K9和K20是没有发生突变的细胞株, 以下研究均使用此5种细胞株进行。

2.2 *BCL3*敲除后对下游基因的表达影响

*BCL3*是一种辅助转录的调节因子,通过与转录因子结合激活或抑制基因的转录。肿瘤坏死因子(*TNF α*)和*SLPI*是*BCL3*的下游调控基因,前者的转录受*BCL3*抑制,后者的转录则被*BCL3*激活。如图2所示,在K4和K5细胞中*TNF α* mRNA上调,显著高于K9细胞(图2A);在K4细胞中*SLPI* mRNA水平明显低于K5和K9细胞(图2B)。K4细胞中*BCL3*蛋白功能完全丧失,因此在K4细胞中*BCL3*的负调控基因*TNF α* ,使其表达上升;同时*BCL3*的正调控基因*SLPI*,使其表达下降,与预期相符。有趣的是,与K9(*BCL3*没有发生突变)相比K5细胞的*TNF α* 表达上调而*SLPI*表达不变。我们推测其原因为, K5细胞中*BCL3*缺失的片段对于*BCL3*蛋白质介导的*TNF α* 转录抑制作用是不可或缺的,即当该片段存在时使*BCL3*抑制了*TNF α* 基因的转录,而当该片段不存在时, *BCL3*失去了对*TNF α* 转录的负调控作用,但该片段在*BCL3*介导的

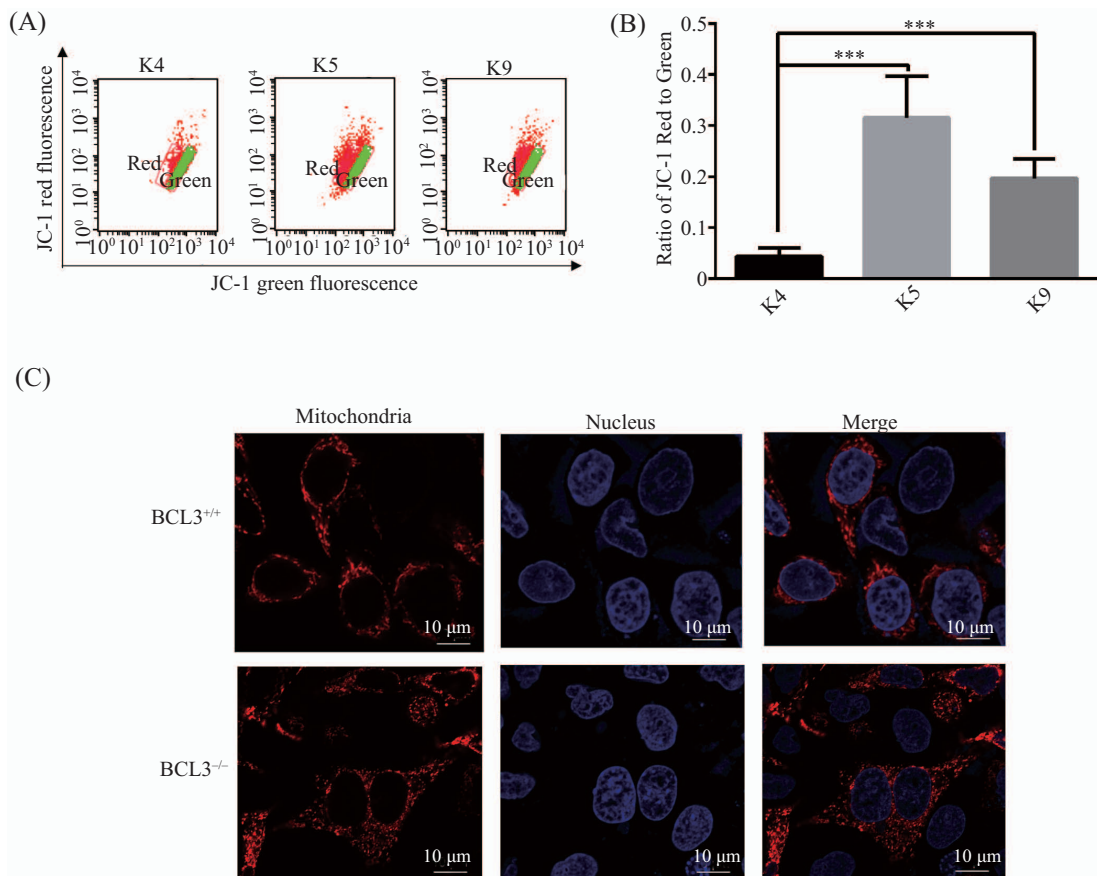
*SLPI*基因转录中不是必需的。

2.3 *BCL3*敲除细胞中ROS水平上升

线粒体功能或电子呼吸链受损时会直接导致细胞中ROS水平升高^[19],因此检测细胞内ROS水平变化可在一定程度上评价线粒体的状况。本研究采用荧光物质DCFH-DA特异性标记细胞内ROS,结合流式细胞术分析ROS水平的变化。由图3A和图3B可见, K4细胞中的平均荧光强度高于K5和K9细胞,分别高出约50%和40%;当采用过表达的方式恢复细胞内*BCL3*, ROS水平受到抑制,随着转染的*BCL3*质粒量的增加, ROS水平受到的抑制程度加大。以上结果说明, *BCL3*影响细胞内活性氧的水平,提示*BCL3*可能参与调控线粒体的功能。

2.4 *BCL3*敲除细胞的线粒体形态及膜电位的变化

使用特异性荧光探针JC-1标记细胞,膜电位高时JC-1呈红色,膜电位低时JC-1呈绿色,因此根据红色细胞亚群比率与绿色细胞亚群比率之间的比值



A: 流式细胞术检测K4、K5和K9细胞系(JC-1荧光染料标记)中线粒体膜电位; B: 红光细胞群比率与绿光细胞群比率之间的比值; C: 使用共聚焦荧光显微镜观察线粒体形态。*** $P < 0.001$ 。

A: detection of mitochondrial membrane potential of K4, K5 and K5 cells stained with JC-1; B: the ratio of red and green fluorescence cells; C: mitochondria morphology was visualized by fluorescence microscopy. *** $P < 0.001$.

图4 *BCL3*敲除后线粒体膜电位和线粒体形态的变化

Fig.4 Changes in mitochondrial membrane potential and mitochondrial morphology after *BCL3* knockout

(红/绿值)可用于评估细胞群总体线粒体膜电位的高低。由图4所示,在*BCL3*敲除的K4细胞中,红色细胞亚群比例低于K5和K9细胞(图4A和图4B),其红/绿值也显著低于K5和K9细胞,即*BCL3*敲除导致细胞膜电位降低。

线粒体形态是高度动态变化的,通过融合与分裂,线粒体形成椭圆形、长管状甚至网络状。在生长活跃或代谢旺盛等能量需求大的细胞中,线粒体往往融合形成网络状以便更高效率的行使生物学功能^[20-21]。当线粒体发生损伤时,线粒体偏向于分裂,即线粒体形态由网络状转化为片段化^[22]。为了观察*BCL3*敲除后对线粒体形态的影响,我们在细胞中转染dsRed2-mito质粒,其表达产物为线粒体锚定信号肽-RFP(red fluorescent protein)融合蛋白,使用共聚焦荧光显微镜观察线粒体的形态变化。由图4C可以

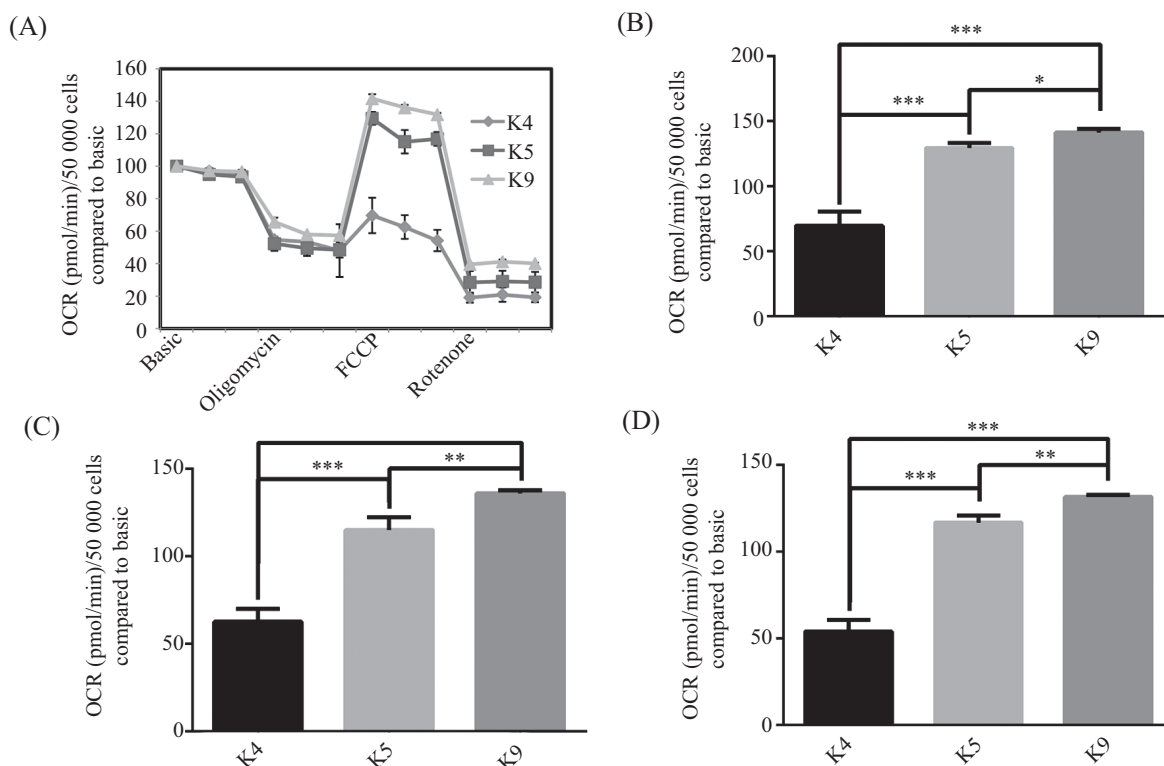
看出,野生型HeLa细胞中的线粒体以管状和网络状为主,而*BCL3*敲除细胞的线粒体发生片段化,主要以斑点状(椭圆形)形态存在。以上结果说明,*BCL3*影响线粒体的膜电位和线粒体的形态结构。

2.5 *BCL3*敲除对线粒体呼吸功能的影响

使用细胞代谢呼吸动态分析仪检测*BCL3*对能量代谢的影响,结果显示,与K5、K9细胞相比,K4细胞的基础有氧呼吸速率虽然没有明显变化,但K4细胞的FCCP诱导的极限呼吸速率(图5A)低于K5、K9,约40%。在FCCP诱导的3个测量时间点上均为统计学差异显著(图5B、图5C和图5D)。该结果表明,*BCL3*参与线粒体的能量代谢,且可能与应激状态下能量生成及细胞稳态有关。

2.6 *BCL3*敲除细胞产生ATP能力下降

由图6可知,与K5和K9细胞相比K4细胞中ATP

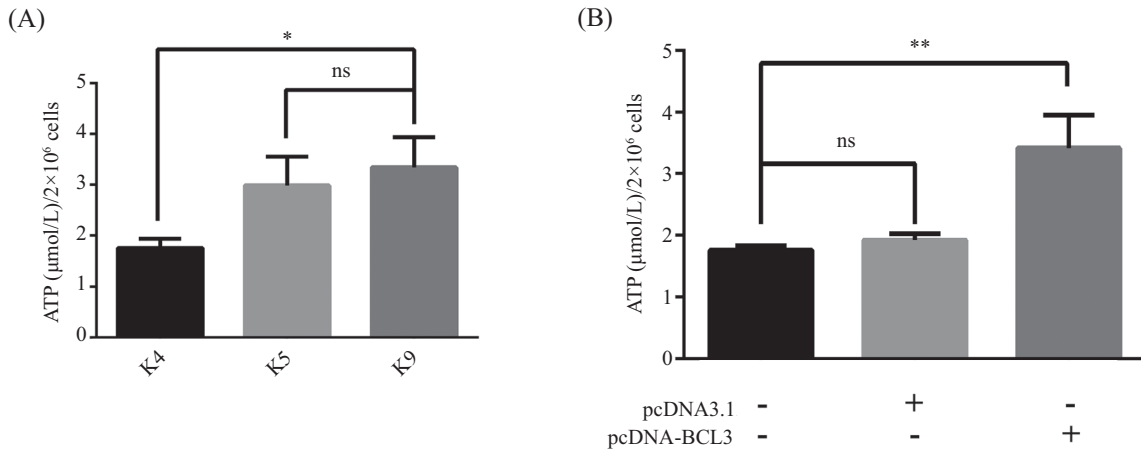


A: 使用细胞代谢呼吸动态分析仪检测K4、K5和K9细胞的有氧呼吸率(OCR); Y轴表示相对OCR值, X轴代表检测时间点上处理细胞所用的药物; 对于每个细胞系, 将未处理的细胞孔设为对照孔, 其相对OCR值设为100, 根据公式(药物处理细胞OCR/对照孔OCR值 $\times$ 100)计算药物处理细胞孔的相对OCR值。B~D: FCCP诱导的OCR增加代表“极限呼吸速率”, 在诱导期间于3个不同时间点测量OCR。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: the oxygen consumption rates (OCR) of K4, K5 and K9 cell lines were measured using the XF24 Extracellular Flux analyzer, respectively. Y axis represents the relative OCR value; X axis represented the drug used to deal with cells at the time points of detection. For each cell line, the relative OCR value of cells with non-treatment was set to be 100, the relative OCR value of cells with treatment was calculated by the following formula, the absolute OCR value with non-treatment/the absolute OCR value with drug treatment $\times$ 100. B-D: OCR values at three different time points during FCCP treatment, which represented the the maximal respiratory capacity. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图5 *BCL3*在能量代谢调节中的作用

Fig.5 The role of *BCL3* in energy metabolic regulation



A: 使用荧光素酶法检测K4、K5和K9细胞中ATP的浓度。B: 过表达pcDNA-BCL3及对照质粒pcDNA3.1对K4细胞中ATP浓度的影响。ns: 无显著性差异。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: ATP concentrations in K4, K5 and K9 were determined with firefly luciferase assay. B: the effect of overexpressed-pcDNA-BCL3 and pcDNA3.1 on the intracellular ATP concentration of K4. ns: no significant difference. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6 使用荧光素酶法测定细胞内ATP水平

Fig.6 ATP level in cells detected by firefly luciferase assay

的水平大幅下降(图6A), 在K4细胞中过表达BCL3则能升高ATP的水平。ATP是线粒体呼吸作用的产物, 这些数据说明, BCL3可通过调控线粒体呼吸作用影响ATP的生成。

3 讨论

线粒体曾被认为是一种静态的、产生ATP的细胞器, 现在人们已经意识到, 线粒体以复杂的线粒体网络形式存在于细胞中, 其大小与结构处于不断地动态变化中, 以满足细胞对不同环境的适应性。面对治疗所带来的毒性应激, 肿瘤细胞需要线粒体协助其适应这种环境并开启自我防御机制。增强药物外排、修复化疗引起的DNA损伤、抵抗凋亡并上调与肿瘤细胞生存有关的基因, 这一系列生命活动均需要大量的持续的能量供给, 因此线粒体在肿瘤发生和发展的过程中扮演了肿瘤的“帮凶”。研究促癌基因对线粒体功能的调控作用并解析作用机制能为肿瘤治疗提供思路与靶点。

我们课题组关注线粒体与疾病的关系, 本研究首先使用CRISPR/Cas9技术建立的BCL3敲除和第二外显子缺失突变的HeLa细胞, 为研究BCL3对线粒体功能的调控作用奠定基础。BCL3-KO细胞中的ROS水平显著上升, 线粒体膜电位下降, 氧化呼吸链功能受损, 同时产生ATP的能力也明显下降。这些结果证明了BCL3对于细胞维持正常线粒体功能具有重要作用。

人BCL3蛋白质含454个氨基酸, 根据功能将其氨基酸序列分为3个功能区域, N-端、C-端和中间的锚蛋白重复序列(ankyrin repeats)区域。根据序列相似性, BCL3自发现之初就被归为I κ B(inhibitor of NF- κ B)家族, 但与其他I κ B因子作用不同的是, BCL3具有转录激活结构域, 与转录因子(如NF- κ B、AP1)结合可激活或抑制相应基因的表达^[14,23-24]。由于第二外显子的缺失, K5细胞中N-端的功能遭到破坏, TNF α mRNA水平上调, 但是在线粒体功能(ROS和ATP的产生、线粒体膜电位以及线粒体呼吸链)方面, K4细胞受到的破坏极大而K5细胞仅受到略微影响。这说明, 该N-端片段虽然影响到了BCL3对NF- κ B的调控作用, 却对线粒体功能影响不大。

在电子传递的过程中, 呼吸链漏出的电子与分子氧结合产生超氧阴离子, 是细胞内ROS的主要来源。正常情况下, ROS被体内的抗氧化物及时清除, 避免在胞内过多积累, 即ROS的产生与消除处于动态平衡中。当电子呼吸链出现异常或抗氧化系统发生障碍时该动态平衡被打破, 表现出胞内ROS水平上升^[25]。本研究发现, BCL3敲除上调了细胞内的ROS水平, 而恢复BCL3表达则下调BCL3-KO细胞中ROS水平。这些数据表明, BCL3通过某种机制调节ROS的产生或消除继而影响胞内的ROS水平。根据研究结果可知, BCL3对于细胞维持线粒体功能是必需的, 我们推测其作用机制可能有两种途径。(1) BCL3本身或其转录调控的产物直接影响了电子呼

吸链作用, 当*BCL3*缺失后, 导致了线粒体功能障碍; (2)*BCL3*不直接作用于线粒体, 其本身或转录产物是参与了细胞抗氧化功能, 当*BCL3*缺失后, 抗氧化功能不足不能及时清除ROS, 而过度积累的ROS破坏了线粒体, 致使线粒体功能障碍。*BCL3*对线粒体功能的影响需要进一步研究。

综上所述, *BCL3*对于细胞维持肿瘤细胞线粒体功能发挥重要作用, 敲除*BCL3*能极大程度地限制线粒体的功能, 因此, 调控*BCL3*可能作为靶向线粒体治疗肿瘤的有效策略。

参考文献 (References)

- Dhingra R, Kirshenbaum LA. Regulation of mitochondrial dynamics and cell fate. *Circ J* 2014; 78(4): 803-10.
- Loureiro R, Mesquita KA, Magalhaes-Novais S, Oliveira PJ, Vega-Naredo I. Mitochondrial biology in cancer stem cells. *Semin Cancer Biol* 2017; 47: 18-28.
- Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics in regulating the unique phenotypes of cancer and stem cells. *Cell Metab* 2017; 26(1): 39-48.
- Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and cancer. *Cell* 2016; 166(3): 555-66.
- Gray MW. The pre-endosymbiont hypothesis: a new perspective on the origin and evolution of mitochondria. *Cold Spring Harb Perspect Bio* 2014; doi: 10.1101/cshperspect.a016097.
- Kamp WM, Wang PY, Hwang PM. TP53 mutation, mitochondria and cancer. *Curr Opin Gene Dev* 2016; 38: 16-22.
- Meier JA, Lerner AC. Toward a new STATe: the role of STATs in mitochondrial function. *Semin Immunol* 2014; 26(1): 20-8.
- Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 2008; 88(2): 611-38.
- Kuo SH, Tsai HJ, Lin CW, Yeh KH, Lee HW, Wei MF, *et al.* The B-cell-activating factor signalling pathway is associated with *Helicobacter pylori* independence in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma without t(11;18)(q21;q21). *J Pathol* 2017; 241(3): 420-33.
- Alpatov R, Carstens B, Harding K, Jarrett C, Balakhani S, Lincoln J, *et al.* Rare double-hit with two translocations involving IGH both, with *BCL2* and *BCL3*, in a monoclonal B-cell lymphoma/leukemia. *Mol Cytogenet* 2015; 8: 101.
- Wu J, Li L, Jiang G, Zhan H, Wang N. B-cell CLL/lymphoma 3 promotes glioma cell proliferation and inhibits apoptosis through the oncogenic STAT3 pathway. *Int J Oncol* 2016; 49(6): 2471-9.
- Zhao H, Wang W, Zhao Q, Hu G, Deng K, Liu Y. *BCL3* exerts an oncogenic function by regulating STAT3 in human cervical cancer. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 6619-29.
- Hatada EN, Nieters A, Wulczyn FG, Naumann M, Meyer R, Nucifora G, *et al.* The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene *bcl-3* act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(6): 2489-93.
- Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K, *et al.* The oncoprotein *Bcl-3* directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 1993; 72(5): 729-39.
- Ohno H, Takimoto G, McKeithan TW. The candidate proto-oncogene *bcl-3* is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell* 1990; 60(6): 991-7.
- Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, Pfeifer A, Fassler R. *Cyld* inhibits tumor cell proliferation by blocking *Bcl-3*-dependent NF-kappaB signaling. *Cell* 2006; 125(4): 665-77.
- Chen CY, Lee DS, Yan YT, Shen CN, Hwang SM, Lee ST, *et al.* *Bcl3* bridges LIF-STAT3 to Oct4 signaling in the maintenance of naive pluripotency. *Stem Cells* 2015; 33(12): 3468-80.
- Kashatus D, Cogswell P, Baldwin AS. Expression of the *Bcl-3* proto-oncogene suppresses p53 activation. *Genes Dev* 2006; 20(2): 225-35.
- Murphy MP. Mitochondrial dysfunction indirectly elevates ROS production by the endoplasmic reticulum. *Cell Metab* 2013; 18(2): 145-6.
- Wai T, Langer T. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab* 2016; 27(2): 105-17.
- Schrepfer E, Scorrano L. Mitofusins, from mitochondria to metabolism. *Mol Cell* 2016; 61(5): 683-94.
- Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J* 2017; 36(13): 1811-36.
- Fujita T, Nolan GP, Liou HC, Scott ML, Baltimore D. The candidate proto-oncogene *bcl-3* encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev* 1993; 7(7B): 1354-63.
- Na SY, Choi JE, Kim HJ, Jhun BH, Lee YC, Lee JW. *Bcl3*, an IkappaB protein, stimulates activating protein-1 transactivation and cellular proliferation. *J Biol Chem* 1999; 274(40): 28491-6.
- Georgieva E, Ivanova D, Zhelev Z, Bakalova R, Gulubova M, Aoki I. Mitochondrial dysfunction and redox imbalance as a diagnostic marker of "free radical diseases". *Anticancer Res* 2017; 37(10): 5373-81.