

轻度氧化应激下 SENP3 延缓 p53 介导的细胞衰老

孙祖俊 易 静 王毓美*

(上海交通大学医学院细胞生物学教研室, 教育部细胞分化与凋亡重点实验室, 上海 200025)

摘要 P53 是抑癌基因。P53 基因突变或失活都使其丧失抑癌作用。有关 p53 基因突变的研究较多, 但对 p53 失活尤其是一些具有野生型 p53 的肿瘤中 p53 为何未行使其抑癌作用而导致发生肿瘤的仍不清楚。人们推测蛋白质水平上 p53 的功能性灭活可能是 p53 表达正常却导致肿瘤形成的原因。本研究发现, 轻度氧化应激使表达的 SENP3 迅速累积, 其从核仁移位至核质, 抑制了 p53 的转录活性, 从而延缓了依赖 p53 的细胞衰老。因此, 我们认为轻度氧化应激下 SENP3 的过量表达导致了 p53 的失活, 该研究为进一步阐明 p53 失活的原因提供了依据。

关键词 轻度氧化应激; SENP3; p53 的转录活性; 衰老

氧化应激(oxidative stress)是指外源或内源性的以超氧离子、过氧化氢等氧自由基形式存在的活性氧(reactive oxygen species, ROS)超过细胞抗氧化能力的抗衡, 而发生对细胞信号转导系统的全面影响, 或进而发生对核酸、蛋白质和脂质等大分子的影响^[1]。P53 是细胞内的重要转录因子, 在被细胞压力激活后 p53 具有多种功能, 其中部分功能源于其转录活性。P53 的主要功能包括调控细胞周期、DNA 修复、血管形成或抑制、细胞的衰老及凋亡等。研究发现, p53 具有极为丰富的翻译后加工与修饰过程, 如泛素化、磷酸化、乙酰化、糖基化、类泛素化等, 这些修饰是调节 p53 活性与稳定性的重要机制^[2]。

近年来新发现的小泛素样修饰物 (small ubiquitin-like modifier, SUMO) 是一种广泛存在的翻译后修饰形式, 与泛素样修饰不同的是 SUMO 化修饰主要影响蛋白质的定位、活性以及蛋白质的相互作用, 而不影响蛋白质的稳定性, 蛋白质经修饰后并不会被降解。SUMO 家族包括 SUMO-1、SUMO-2 和 SUMO-3, SUMO-2、SUMO-3 与 SUMO-1 仅有 46% 的序列同源性, 但前两者的序列同源性达 96%, 通常写为 SUMO-2/3^[3]。大多数 SUMO-1 与其底物结合, 而 SUMO-2/3 绝大部分却以未结合的形式存在, 当细胞遭遇各种应激时 SUMO-2/3 能够快速与其底物结合行使其 SUMO 化修饰^[4,5]。目前发现有 100 多种蛋白质如转录因子、信号分子、核被膜蛋白以及细胞膜蛋白等都可以被 SUMO 化修饰, 这些蛋白质多为转录因子及其“共激活(coactivator)”或“共抑制者(corepressor)”^[6-9]。

然而细胞内相应地也存在一系列引发去 SUMO 化(desumoylation)的蛋白酶类, 称为 SUMO 特异的蛋

白酶(sumo/sentrin specific proteases, SENPs)。SUMO 化修饰受到 SENPs 的逆向调控, 发生去 SUMO 化修饰, 形成 SUMO/de-SUMO 的动态平衡, 共同影响蛋白质的功能。SENPs 属于腺病毒蛋白酶家族, 可作用于 SUMO 化的蛋白质, 使 SUMO 被水解去除^[10,11]。在哺乳动物中, SENPs 存在 6 种蛋白酶, 即 SENP1、SENP2、SENP3、SENP5、SENP6、SENP7^[12], 其中 SENP3、SENP5 的共同之处在于特异地对抗 SUMO-2/3, 使其被水解去除^[13]。

最新研究发现对 SENPs 某些亚家族的抑制能够快速均一地诱导细胞衰老, 引起大量 SUMO 化的 PML 核体在胞核内聚集, 当 p53 信号通路失活时, 由于 SENPs 被抑制而引起的细胞衰老显著减弱^[14]。本研究将探讨轻度氧化应激下 SENP3 对 p53 转录活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与细胞株 Renilla、p21-Luc、FLAG-p53、RGS-SENP3、RGS-SENP3 mutant (C532S, 去 SUMO-2/3 化位点突变)、RFP-SENP3 (带红色荧光, 自己构建)这些质粒均构建在 pcDNA3 载体上。HEK293T 细胞、HeLa 细胞、NIH3T3 细胞均由本室冻存。

1.1.2 试剂 SENP3 兔抗血清由美国 MD Anderson

收稿日期: 2009-02-25 接受日期: 2009-05-05

上海市自然科学基金资助项目(No.08ZR1412300)

* 通讯作者。Tel: 021-63846590-776422, E-mail: jywangym@

shsmu.edu.cn

癌症中心的程金科教授提供。Anti-RGS、Anti-FLAG、Anti-actin购自Sigma公司。二抗抗兔、鼠抗体购自Santa Cruz公司。衰老试剂盒购自Biovision公司。DTT购自Sigma公司。Trizol购自Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫印迹分析 HEK293T细胞种植在12孔板上,当细胞铺满底面积的80%~90%时,处理组加入浓度为10 mmol/L的DTT作用1 h后再加入不同浓度的过氧化氢处理1 h,然后弃去培养液,PBS漂洗2次,吸净PBS后加入1×上样缓冲液60 μl,待细胞充分裂解后转移至1.5 ml离心管中,1 ml微量注射器反复吹吸10次,95 °C变性5 min,样品用标准的免疫印迹检测蛋白的表达水平。

1.2.2 荧光显色 HeLa细胞转染RFP-SENP3培养34 h后处理组加入10 mmol/L DTT温育1 h,然后用0.5 mmol/L过氧化氢再处理1 h,弃去培养液后用PBS漂洗2次,多聚甲醛固定10 min,再用PBS漂洗2次,每次5 min,封片,荧光显微镜下观察拍照,镜下随机观测几个视野,计数200个转染有RFP-SENP3红色荧光的细胞,统计各种处理后SENP3在细胞核中定位于核仁的百分比。

1.2.3 荧光素酶报告基因的检测 荧光素酶报告基因的启动子为p53特异识别的序列,故荧光素酶的表达强度反映转录因子激活并促进转录的能力。体外培养的HEK293T细胞种植在24孔板上,待细胞铺满底面积的70%时用脂质体(Lipofectamine 2000)转染p53的荧光素酶报告基因p21-Luc质粒(100 ng/孔),同时用Renilla质粒(10 ng/孔)共转染作为内参照,消除转染对转录因子活性的影响,检测时加入荧光素酶及Renilla底物,定量产物荧光素及Renilla的强度。相对荧光素酶活性(relative luciferase activity, RLA)为荧光素酶活性与Renilla活性的比值,反映转录因子促转录的活性。实验每次做2个复孔取平均值,独立重复3次。

1.2.4 RT-PCR检测 NIH3T3细胞种植在6孔板上,待细胞铺满底面积的70%时用脂质体(Lipofectamine 2000)转染相应质粒24 h后,用Trizol溶解培养细胞,小心避免RNA酶污染,提取细胞内总RNA。紫外分光光度计定量后,PCR检测转录。

逆转录反应(RT):取1 μg总RNA,0.2 μg六聚体随机引物,20 U RNase抑制剂,70 °C变性5 min,立即置冰浴,再加入2 μl 10 mmol/L的dNTP,4 μl 5×逆转录酶缓冲液,200 U M-MuLV逆转录酶,总体积20 μl,42 °C反应1 h,95 °C 5 min终止反应后进行PCR反应。

PCR反应:取2 μl RT产物cDNA,加入2 μl 10×Taq酶缓冲液,上、下游引物(10 mmol/L)各1 μl,2 μl 2 mmol/L dNTP,0.5 μl 1 U/μl Taq DNA聚合酶,ddH₂O补足体积20 μl。PCR扩增条件:95 °C,5 min;94 °C,20 s;55 °C,30 min;72 °C,1 min,共25个循环,然后72 °C延伸10 min。PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶电泳中分离。P21上游引物:5'-ATGTCCA-ATCCTGGTGATGT-3',下游引物:5'-TCAGGGTTTT-CTCTTGCAGA-3'。以G3PDH基因片段作为内参照。G3PDH上游引物:5'-ACCACAGTCCATGC-CATCAC-3',下游引物:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。

1.2.5 细胞衰老的检测 NIH3T3细胞转染相应的质粒后培养72 h,用PBS洗3次,每次5 min,多聚甲醛固定20 min,检测β-半乳糖苷酶的活性,详细操作按照衰老相关试剂盒的说明书。衰老细胞大而扁平,胞浆被染成蓝色,镜下随机观测几个视野,计数600个细胞,统计衰老细胞所占百分比。

1.2.6 统计学处理 采用SPSS10.0统计软件作t检验分析P值,P<0.05为有显著性差异。

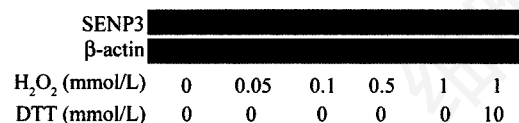
2 结果

2.1 轻度的氧化应激诱导 SENP3 的稳定性增强

用一系列低浓度的过氧化氢处理HEK293-T细胞后发现SENP3含量随过氧化氢浓度的升高而明显增加,且SENP3含量的增加可被还原剂DTT所逆转(图1),表明SENP3是一个氧化应激敏感分子,SENP3的增加是由过氧化氢引起的。

2.2 轻度氧化应激改变了 SENP3 在细胞中的定位

已有研究表明^[13],SENP3在细胞内定位于核仁,而其相应的底物SUMO存在整个核质中,SENP3要行使其去SUMO化的功能必须从核仁移位至核质,那么SENP3是否可以从核仁转移至核质从而执行其相应的功能呢?荧光显色实验发现,在静息状态下,SENP3位于核仁,而当细胞用低浓度过氧化氢处理后统计结果显示高达90%以上的SENP3从核仁转移至核质,且这种转移能被还原剂DTT所逆转(图2)。上述实验结果表明轻度氧化应激改变了SENP3在细胞



	SENP3					
	β-actin					
H ₂ O ₂ (mmol/L)	0	0.05	0.1	0.5	1	1
DTT (mmol/L)	0	0	0	0	0	10

Fig.1 SENP3 expression in cells by mild oxidative stress

中的定位, 使 SENP3 从核仁移位至核质并可能对其底物行使去 SUMO 化修饰的功能。

2.3 SENP3 抑制 p53 的转录活性

HEK293T 细胞转染相应质粒以及 *p21-Luc* 报告基因。36~48 h 后检测报告基因的活性, 结果显示

内源性的 *p53* 转录活性很低, 转入 *p53* 质粒后 *p53* 转录活性增强, 当转入 SUMO-3 后 *p53* 转录活性迅速增强, 而当转入 SENP3 后 *p53* 转录活性明显被抑制, 而转入 SENP3-M 则部分取消了 SENP3 对 *p53* 转录活性的抑制作用(图 3)。上述实验结果表明 SENP3 抑制了 *p53* 的转录活性。

2.4 SENP3 延缓了依赖 p53 的细胞衰老

已有报道称 SUMO-2/3 修饰的 *p53* 能促进其靶基因的表达, 引起细胞衰老等的应答, 且这种修饰在早衰应激应答中起重要作用^[15]。SUMO 化的 *p53* 促进了细胞的衰老, 那么 SENP3 是否影响依赖 *p53* 的细胞

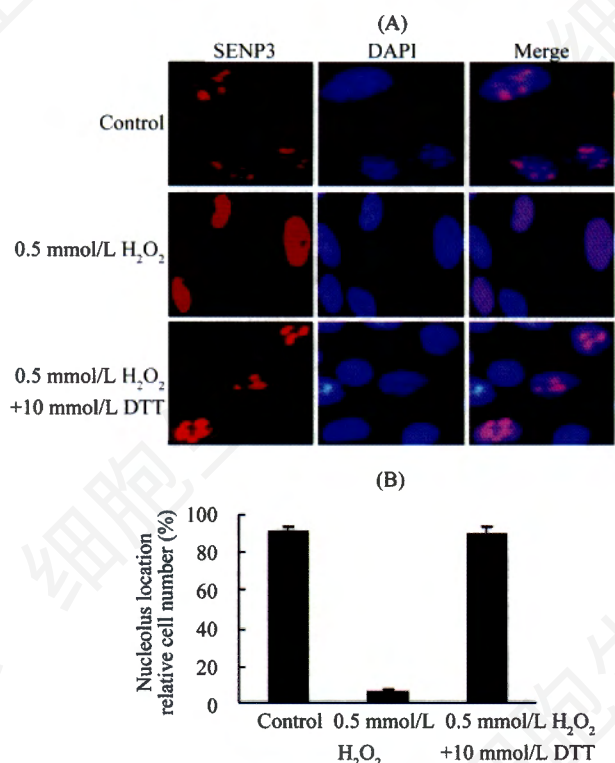


Fig.2 Alteration of SENP3 localization under mild oxidative stress

A: location of SENP3 in HeLa cells (400×); B: statistical results of SENP3 located at nucleolus.

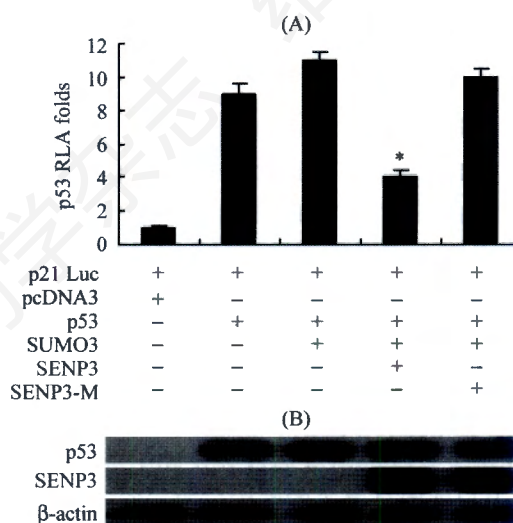


Fig.3 Transcriptional activity of *p53* was repressed by SENP3

A: transcriptional activity of *p53*; B: protein level of *p53*, SENP3 and β -actin. * $P < 0.05$, compared with column 3.

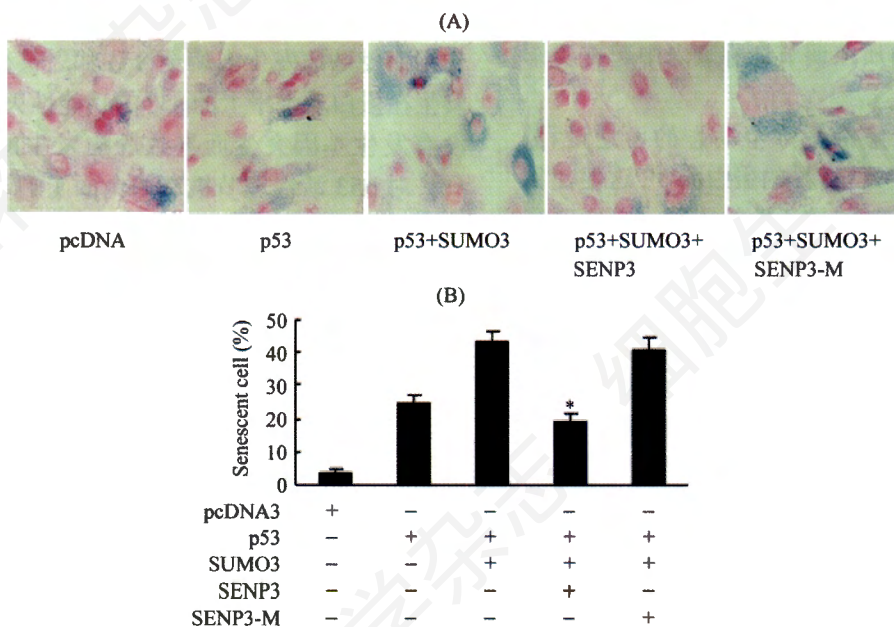


Fig.4 Cellular senescence of *p53* mediated were postponed by SENP3

A: the phenotype of senescent cells (400×); B: statistical results of senescent cells. * $P < 0.05$, compared with column 3.

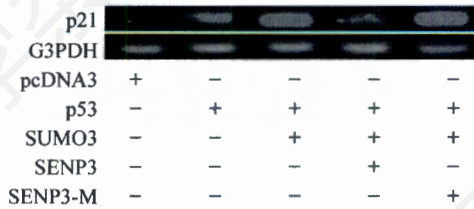


Fig.5 mRNA level of *p21* was down regulated by SENP3

衰老?通过对 β -半乳糖苷酶活性的检测发现,当转染 SENP3 后细胞衰老明显减弱,而 SENP3-M 却没有明显改变细胞的生长状况(图4),同时通过 RT-PCR 实验发现 p53 的靶基因 *p21* 的 mRNA 表达水平明显降低(图5),表明 SENP3 能够抑制依赖 p53 的细胞衰老。

3 讨论

最近研究发现 SUMO 化修饰在衰老中起重要作用。内源 E3 SUMO 化连接酶 PIAS1 的水平在复制衰老时增加,高度 SUMO 化的蛋白质水平也有所增加,并且在正常人成纤维细胞中过表达 PIAS1 能促进 SUMO 化诱导的衰老^[16]。另外增加特异靶基因 *RBPI* 或 *APA-1* 的 SUMO 化已被证明在调节衰老中起重要作用^[17,18]。最近研究表明 p53 能够被 SUMO 家族修饰, SUMO-1 能提高 p53 的转录活性^[19], SUMO-2/3 修饰后促进了 p53 的转录活性并使其靶基因表达水平升高,引起细胞衰老等的细胞应答,因而这种修饰在早衰应激应答中起重要作用^[15]。以上研究表明 SUMO 化对细胞正常生长是必需的,而影响 SUMO 化通路导致 SUMO 化蛋白质水平增加会引起衰老,另外衰老的细胞内有大量 SUMO 化蛋白质聚集,这进一步说明 SUMO 化的蛋白质在调节细胞衰老中起重要作用^[20]。

然而 SUMO 化修饰是一个动态的可逆过程, SENP3 是一个 SUMO-2/3 特异的蛋白酶^[13],这促使我们去探究 SENP3 对 p53 转录活性的影响。我们研究发现,在静息状态下 SENP3 定位于核仁,而在非常低的过氧化氢浓度作用下 SENP3 的蛋白质水平增加且快速稳定,并且其从核仁移位到核质,因此我们推测 SENP3 的量及定位的改变可能是为执行对靶基因的去 SUMO 化作用作准备,而 SUMO/de-SUMO 的平衡在轻度氧化应激下对调节细胞的生物学行为是必需的。SUMO-2/3 在细胞轻度应激时大量结合到 p53 等的底物蛋白上,这时 SENP3 含量的增加则产生了一个相反的作用力,以免 SUMO-2/3 结合蛋白底物过度发生,这为细胞提供了一个精确的平衡机制。最近也有研究表明, SENPs 家族其他成员可能作为氧化

还原感受器和效应器,从而调节去 SUMO 化途径和细胞对氧化应激适应性反应^[21],这和我们的研究结果相一致。

另外我们发现轻度氧化应激能引起 SENP3 稳定性快速增加,并能被 DTT 逆转,表明 SENP3 是一个氧化应激敏感的分子。过表达 SENP3 能够抑制 p53 的转录活性,并对 p53 的靶基因 *p21* 的 mRNA 水平有明显的抑制作用,因此我们推测轻度氧化应激下 SENP3 通过抑制 p53 的转录活性来延缓细胞的衰老。P53 的功能主要是在细胞处于异常情况下对细胞周期进行负调控,即把细胞滞留在 G₁ 期或 G₂/M 期,不让细胞进入 S 期或不让其进行有丝分裂,以避免遗传信息的错误传递。这些异常情况主要是指 DNA 受到紫外线或 γ 辐射以及化学致癌剂的攻击或损伤,也包括细胞的正常生理过程受到化学或物理因素的干扰而导致的应激。在这些情况下, p53 半衰期明显延长,其转录活性大大提高。P53 作为一种重要的转录因子调控 150 多种基因的表达,同时又是一个肿瘤抑制基因,在细胞面对癌基因激活、DNA 损伤等应激信号时, p53 会发挥其转录激活功能,进而引起细胞周期阻滞、细胞凋亡或 DNA 损伤修复等应激反应,在肿瘤发生中发挥着重要作用。研究表明,在人类癌症中一半是由于 p53 基因发生突变引起的,还有将近 50% 是由于 p53 基因失活引起的^[22]。总之, p53 结构突变、p53 的失活、调节 p53 功能途径的破坏都会导致癌症的发生。目前有关 p53 基因突变的研究较多,突变的位点也较清楚,但对 p53 的失活尤其是一些具有野生型 p53 的肿瘤中 p53 为何未行使其抑癌作用而使肿瘤发生人们至今还知之甚少。人们推测发生在蛋白质水平上的 p53 的功能性灭活可能是 p53 没有发生基因突变而导致肿瘤发生的重要机制之一。对 p53 活性调节机制的全面了解不仅可以加深人类对肿瘤发生机制的认识,也可以帮助人们在 p53 调控途径中找到癌症治疗的新靶标。因此本研究结果能够有助于解释 p53 失活的原因,并为探讨细胞在面对应激时逃脱衰老最终形成肿瘤的具体机制提供一定的理论依据。

参考文献(References)

- [1] Finkle T. Oxidant signals and oxidative stress, *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(2): 247-254
- [2] Xiao G, Chicas A, Olivier M, et al. A DNA damage signal is required for p53 to activate gadd45, *Cancer Res*, 2000, 60(6): 1711-1719
- [3] Yeh ET, Gong L, Kamitani T. Ubiquitin-like proteins: new

- wines in new bottles, *Gene*, 2000, 248(1-2): 1-14
- [4] Saitoh H, Hinchey J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3, *J Biol Chem*, 2000, 275(9): 6252-6258
- [5] Manza LL, Codreanu SG, Stamer SL, *et al.* Global shifts in protein sumoylation in response to electrophile and oxidative stress, *Chem Res Toxicol*, 2004, 17(12): 1706-1715
- [6] Müller S, Ledl A, Schmidt D. SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity, *Oncogene*, 2004, 23(11): 1998-2008
- [7] Rajan S, Plant LD, Rabin ML, *et al.* Sumoylation silences the plasma membrane leak K⁺ channel K2P1, *Cell*, 2005, 121(1): 37-47
- [8] Cheng J, Wang D, Wang Z, *et al.* SENP1 enhances androgen receptor-dependent transcription through desumoylation of histone deacetylase 1, *Mol Cell Biol*, 2004, 24(13): 6021-6028
- [9] Yang SH, Jaffray E, Hay RT, *et al.* Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity, *Mol Cell*, 2003, 12(1): 63-74
- [10] Bailey D, O'Hare P. Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1, *J Biol Chem*, 2004, 279(1): 692-703
- [11] Best JL, Ganiatsas S, Agarwal S, *et al.* SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML, *Mol Cell*, 2002, 10(4): 843-855
- [12] Di Bacco A, Ouyang J, Lee HY, *et al.* The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division, *Mol Cell Biol*, 2006, 26(12): 4489-4498
- [13] Gong L, Yeh ET. Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3, *J Biol Chem*, 2006, 281(23): 15869-15877
- [14] Yates KE, Korbel GA, Shtutman MK, Korbel GA, *et al.* Repression of the SUMO-specific protease Senp1 induces p53-dependent premature senescence in normal human fibroblasts, *Aging Cell*, 2008, 7(5): 609-621
- [15] Li T, Santocypre R, Shen RF, *et al.* Expression of SUMO-2/3 induced senescence through p53- and pRB-mediated pathways, *J Biol Chem*, 2006, 281(47): 36221-36227
- [16] Bischof O, Schwamborn K, Martin N, *et al.* The E3 SUMO ligase PIASy is a regulator of cellular senescence and apoptosis, *Mol Cell*, 2006, 22(6): 783-794
- [17] Benanti JA, Williams DK, Robinson KL, *et al.* Induction of extracellular matrix-remodeling genes by the senescence-associated protein APA-1, *Mol Cell Biol*, 2002, 22(21): 7385-7397
- [18] Binda O, Roy JS, Branton PE. RBP1 family proteins exhibit SUMOylation-dependent transcriptional repression and induce cell growth inhibition reminiscent of senescence, *Mol Cell Biol*, 2006, 26(5): 1917-1931
- [19] Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, *et al.* Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1, *EMBO J*, 1999, 18(22): 6462-6471
- [20] Bischof O, Dejean A. SUMO is growing senescent, *Cell Cycle*, 2007, 6(6): 677-681
- [21] Tempé D, Piechazyk M, Bossis G. SUMO under stress, *Biochem Soc Trans*, 2008, 36(Pt 5): 874-878
- [22] Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, *et al.* Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation, *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(1): 141-146

SENP3 Postpones Cellular Senescence of P53-mediated Pathway under Mild Oxidative Stress

Zu-Jun Sun, Jing Yi, Yu-Mei Wang*

(Department of Cell Biology, Key Laboratory of the Education Ministry for Cell Differentiation and Apoptosis, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract The p53 tumor suppressor functions as a transcription factor which becomes activated upon a number of diverse stress stimuli including DNA damage, oncogene overexpression or metabolic limitations. Upon activation, p53 triggers growth arrest or apoptosis, which serves to eliminate heavily damaged cells. In 50% of human cancers, the gene encoding p53 is mutated. In the remaining cancers, however, p53 retains its wild-type status but its function is effectively inhibited, little is known the reason. We found that SENP3 protein level was enhanced under mild oxidative stress. Meanwhile, SENP3 dispersed from nucleolus to nuclearplasm. The transcriptional activity of p53 was repressed by overexpression of SENP3. The results showed that overexpression of SENP3 could result in inactivation of p53, and may postpone cell senescence in response to mild oxidative stress. This research will provide a new clew for explaining of p53 inactivation.

Key words mild oxidative stress; SENP3; p53 transactivation; cellular senescence

Received: February 25, 2009 Accepted: May 5, 2009

This work was supported by the Nature Science Foundation of Shanghai (No.08ZR1412300)

*Corresponding author. Tel: 86-21-63846590-776422, E-mail: jywangym@shsmu.edu.cn