

SENP3对不同程度氧化应激的感受和应答

储慧玲 闫琼宇 刘科家 易静 杨洁*

(上海交通大学医学院生物化学与分子细胞生物学系, 上海肿瘤微环境和炎症重点实验室, 上海 200025)

摘要 细胞在受到内源、外源的氧化物刺激时均能启动应答机制, 改变蛋白质的量、定位和活性来抵抗应激。作者前期的研究发现, SUMO特异蛋白酶SENP3(Sentrin/SUMO specific protease 3)可以感受一定程度的氧化应激而发生量的累积, 从而影响一系列转录因子的SUMO化修饰状态和特异基因表达, 发挥应答应激的功能, 但在不同程度氧化应激时SENP3是否有不同的感受和应答机制并不清楚。该研究应用不同剂量H₂O₂模拟不同程度氧化应激, 探讨SENP3的量、定位改变和对抗氧化蛋白表达的影响。结果显示, 轻度氧化应激即可造成SENP3量的增加, 但无H₂O₂剂量相关关系, 而不同程度氧化应激均可引起SENP3从核仁向核质的移位, 且随H₂O₂剂量增加而增加。在氧化应激引起的过氧化物氧还蛋白4(peroxiredoxin 4, Prx4)、超氧化物歧化酶1(superoxide dismutase 1, SOD1)及过氧化氢酶(catalase, CAT)表达上调中, SENP3介导了这种表达改变, 且有H₂O₂剂量相关性。该研究一方面发现了SENP3感受不同程度氧化应激的两种机制, 另一方面也发现了SENP3介导抗氧化应答的功能, 提示SENP3在细胞精细的应激应答机制中扮演了重要角色, 具有一定的生理和病理意义。

关键词 SENP3; 氧化应激; 抗氧化酶; 基因表达

The Responses of SENP3 to Different Extents of Oxidative Stress

Chu Huiling, Yan Qiongyu, Liu Kejia, Yi Jing, Yang Jie*

(Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Inflammation, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract In response to oxidation stress, proteins would alter their quantity, localization and activity to prevent from oxidative damage. Our previous study already discovered that SENP3 (Sentrin/SUMO specific protease 3) sensed certain extent of oxidative stress via inhibiting degradation and then giving rise to alteration of sumoylation of transcription factors, by which tumor obtained potential of proliferation and migration. However, how SENP3 senses and makes responses to distinct extents of oxidative stress are unclear. In the present study, we treated tumor cells with different doses of hydrogen peroxide (H₂O₂) to mimic different extent of oxidative stress and therefore detected the quantity and localization of SENP3 and further analyzed the changes of antioxidants expression affected by SENP3. The results showed that SENP3 exhibited quick accumulation under low level of H₂O₂ and other levels of H₂O₂ in a dose independent manner. Notably, SENP3 also translocated from nucleolus to nucleoplasm upon H₂O₂ in dose dependent manner. Moreover, SENP3 mediated upregulation of antioxidants, peroxiredoxin 4 (Prx4), superoxide dismutase 1 (SOD1) and catalase (CAT) under different extents of oxidative stress. Taken together, SENP3

收稿日期: 2015-03-21 接受日期: 2015-04-28

上海市浦江人才计划(批准号: 2013D024)、国家自然科学基金重点项目(批准号: 31230037)和科技部973子项目(批准号: 2013CB910902)资助的课题

*通讯作者: Tel: 021-63846590, E-mail: yangjieyj@shsmu.edu.cn

Received: March 21, 2015 Accepted: April 28, 2015

This work was supported by Shanghai Pujiang Program (Grant No.2013D024), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31230037) and the National Basic Research Program of China (973 Program) (Grant No.2013CB910902)

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

网络出版时间: 2015-07-06 13:57

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150706.1357.002.html>

senses oxidative stress to be endowed with quantity regulation as well as localization regulation and then makes responses via gene expression regulation of specific antioxidants, indicating that SENP3 plays a critical role in elaborate redox maintenance and possesses physiology and pathology implications.

Keywords SENP3; oxidative stress; antioxidants; gene expression

正常情况下, 细胞内存在适中的活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平, 其中过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)浓度约为0.1 mmol/L^[1], 但外源氧化物、紫外照射、药物、电离辐射及DNA损伤等都会造成细胞内ROS的升高^[2]。当ROS升高时, 细胞处于氧化应激(oxidative stress)状态, 而不同程度的氧化应激可能引发不同的信号转导途径和效应, 即不同的应答反应, 包括细胞因子TNF- α 和IL-1 β 表达升高、ROS清除酶活性增强或表达上调、重要蛋白质的活性改变等, 最终导致细胞功能改变、对再应激的预适应(precondition)、细胞增殖、或相反的增殖阻滞、细胞死亡等^[1,3-5]。根据最终造成细胞增殖、凋亡或坏死的不同命运, 氧化应激的程度可大致分为轻度、中度和重度^[6]。另外, 在体外培养的肿瘤细胞上, H_2O_2 作用的浓度也可大致区分为<0.2 mmol/L、0.2~1 mmol/L和>1~2 mmol/L, 来模拟不同的氧化应激程度^[1,6]。

细胞核内部可分为核仁(nucleolus)和核质(nucleoplasm)两个区域, 且核仁被发现具有应激感受(cellular stress sensor)的功能^[7]。应激时, 核仁蛋白质移位至核质, 一方面核仁结构异常、功能下降, 另一方面移位至核质的蛋白质也触发新的应答反应, 其中研究较多的蛋白质包括ARF、核糖体蛋白质RPL11、RPL5、RPL23和RPS7移位至核质后对p53稳定性的显著影响^[8-10]。研究组一直关注核仁蛋白质SENP3(SUMO specific protease 3), 我们发现, 在一定程度氧化应激时, SENP3在核质内迅速增加, 但主要机制为SENP3的氧化修饰对泛素化降解的抑制^[11-14]。目前, 对SENP3在不同程度氧化应激时是否有不同程度的增加且是否也有移位均不清楚, 本研究即探讨这两种感受氧化应激的可能机制。

SENP3是介导去SUMO化修饰(de-sumolytion modification)的酶家族成员之一, 主要催化底物蛋白质去除SUMO2/3(small ubiquitin-like modifier protein 2/3)修饰, 而SUMO化修饰和去SUMO修饰可调节蛋白质的活性和定位, 尤其是细胞核内的转录因子, 因而在调控细胞活动中扮演重要角色^[13-14]。在细胞静

息时, 定位于核仁的SENP3通过调节核仁蛋白质的SUMO2/3修饰, 参与rRNA的加工和核糖体的生物合成^[15-16]。而在氧化应激时, SENP3在核质内大量增加, 介导了转录因子FOXC2、转录共激活因子p300的去SUMO化修饰和活性调节, 提示SENP3应答氧化应激的分子机制可能为通过调控转录因子广泛地或特异地影响基因表达^[11,13-14]。由于抗氧化蛋白质的表达在氧化应激应答中的重要角色, 本研究也探讨SENP3是否影响抗氧化蛋白的表达及与应激程度的关系。

本研究在细胞水平以不同浓度 H_2O_2 模拟不同程度氧化应激, 通过探讨SENP3的量、定位和对抗氧化蛋白表达的影响, 发现SENP3的应激感受和应答机制, 从而了解精细的细胞应激调控。

1 材料与方法

1.1 材料

HeLa细胞(American Type Culture Collection, ATCC)、siRNA技术敲低SENP3的HeLa细胞株(sh-SENP3, 本实验室构建); DMEM(Hyclone公司)、特级胎牛血清(Gibco公司)、PBS(Dycent Bio公司)、0.25% Trypsin-EDTA(Gibco公司)。抗体主要有: anti-Tubulin(Abcam公司)、anti-SENP3(Cell Signaling Technology公司)、蛋白免疫印迹二抗(Jackson公司)、荧光标记二抗(AlexaFluor[®] 488 Goat anti-Rabbit, Life Technology公司)。药物主要有: 过氧化氢(Hydrogen peroxide, H_2O_2 , Sigma公司)和N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC, Sigma公司)。实时定量PCR相关试剂有: AMV Reverse Transcriptase(Promega公司)、Fast Start SYBR-Green/Rox(Roche公司)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。实验仪器主要有: CO₂细胞培养箱(Thermo公司)、高速冷冻离心机(Allegra X-22R, Beckman Coulter公司)、超微量分光光度计(Nanodrop 2000, Thermo公司)、实时荧光定量PCR仪(ABI-7500 Fast, Applied Biosystems公司)、激光共聚焦显微镜(LSM 710, Carl Zeiss公司)、高温煮样器(QBD2, Grant公司)、超声破碎仪(VCX130,

Sonics公司)和化学发光成像系统(Image Quant LAS 4000 mini, GE公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于培养箱中无菌培养。细胞达90%汇合度时进行传代。

1.2.2 双氢乙啶(dihydroethidium, DHE)检测细胞ROS水平 DHE是常用的ROS探针,可用于活细胞及组织切片染色。DHE可进入活细胞,在ROS的作用下脱氢生成氧化乙啶。氧化乙啶因与核酸结合产生红色荧光,荧光强度即可代表细胞ROS的水平。

预先将13 mm盖玻片置于无水乙醇中浸泡过夜,取出晾干后放在24孔板中。以 2×10^5 的密度将HeLa细胞接种于孔内。 H_2O_2 处理细胞后立刻更换新鲜培养基并加入10 $\mu\text{mol/L}$ DHE, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育0.5 h后, PBS快速洗涤1遍。准备载玻片并滴加甘油,取出24孔板内的盖玻片,将有细胞面扣放在甘油上用指甲油封片。玻片立即在激光共聚焦显微镜下观察拍摄,通过ZEN2010和ImageJ对图像进行处理并输出。

1.2.3 蛋白质免疫印迹(Western blot) 收取并裂解细胞,蛋白质样品经高温变性后运用超微量分光光度计(Nanodrop 2000)定量。样品按每孔200 μg 上样, SDS-PAGE电泳,转移至PVDF膜,封闭1 h后孵育一抗。anti-Tubulin按0.5 $\mu\text{g/mL}$, anti-SEN3按1:1 000稀释,4 $^\circ\text{C}$ 过夜。次日, TBST漂洗3次后孵育二抗,山羊抗兔抗体和山羊抗鼠抗体均按1:5 000稀释,37 $^\circ\text{C}$ 孵育1 h。TBST再漂洗,辣根过氧化酶底物显色(ECL, Promega),化学发光成像仪检测并输出图片, ImageJ软件测量蛋白条带灰度值。

1.2.4 免疫荧光(immunofluorescence) 预先将13 mm盖玻片置于无水乙醇中浸泡过夜,取出晾干后放在24孔板中。以 2×10^5 的密度将HeLa细胞接种于孔内,处理后用新鲜的4%多聚甲醛固定,经过通透处理和1% BSA封闭后,孵育抗SEN3抗体,1:300,4 $^\circ\text{C}$ 过夜。次日用预冷的PBS漂洗3次,孵育荧光标记二抗(AlexaFluor[®] 488 Goat anti-Rabbit),1:300,37 $^\circ\text{C}$ 孵育1 h。漂洗后DAPI复染,甘油封片,激光共聚焦显微镜下拍摄。通过ZEN2010及ImageJ软件分析相对荧光强度,输出图片与数据。

1.2.5 实时定量PCR(Real-time PCR) 利用Trizol提取法以及AMV逆转录体系,抽提RNA并逆转录得到cDNA。设计并订购引物,如表1所示。通过

表1 Real-time PCR的引物序列
Table 1 Primers for Real-time PCR

名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>Prx1</i>	F: TGT GTT CTT CTT TTA CCC TCT TGA C R: GTA TTG ACC CAT GCT AGA TGA CAG
<i>Prx2</i>	F: CGA GCA TGG GGA AGT TTG TC R: TTT CCT GGG TCA GCA TAG GG
<i>Prx4</i>	F: TGT GGG TAG ATC AGT GGA TGA G R: CAG CTG GAT CTG GGA TTA TTG
<i>Grx1</i>	F: CAC TGC ATC CGC CTA TAC AA R: TCG ATA TCA CAG CCA CCA AAC
<i>SOD1</i>	F: GTG CAG GGC ATC ATC AAT TTC R: CCA ACA TGC CTC TCT TCA TCC
<i>CAT</i>	F: TAG CCT TCG ACC CAA GCA AC R: GGA GCA CCA CCC TGA TTG TC
<i>GAPDH</i>	F: CTC CTC CAC ATC CCT TCC R: CCG CAC GTT CAA GAA CAG AGA

Real-time PCR检测靶基因表达,实验步骤根据Fast Start SYBR-Green/Rox试剂盒说明书进行。运用7500 Software软件输出数据,最终相对模板量以热图显示。

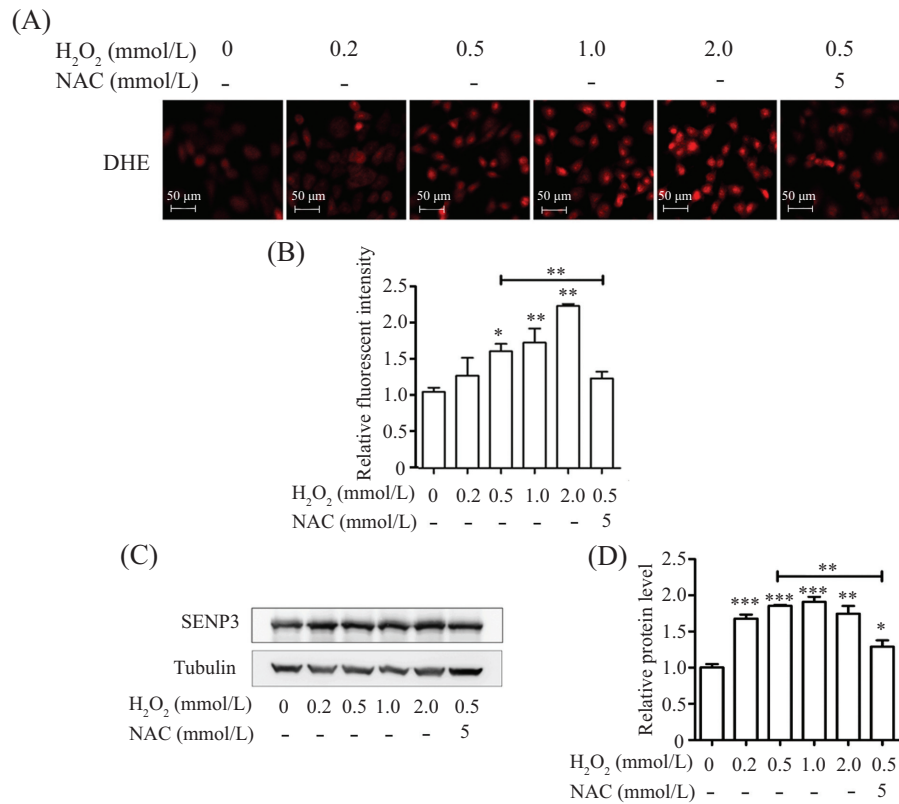
目的基因为:过氧化物氧还蛋白家族(peroxidoredoxins, *Prxs*)、谷氧还蛋白1(glutaredoxin 1, *Grx1*),过氧化氢酶(catalase, *CAT*),超氧化物歧化酶1(superoxide dismutase 1, *SOD1*)。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)为内对照。

1.2.6 统计方法 应用Excel及GraphPad Prism 5软件对荧光强度或蛋白条带灰度值进行统计学分析,数据表示为平均值 \pm 标准误(mean \pm SEM),组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 不同程度氧化应激对SEN3蛋白表达量的影响

用不同剂量 H_2O_2 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mmol/L分别处理HeLa细胞1 h, DHE染色检测细胞氧化还原状态改变,同时应用免疫印迹方法检测SEN3蛋白量的快速变化,探讨SEN3的量是否随不同氧化应激程度而发生不同改变。结果显示,随着 H_2O_2 浓度的增加, DHE的荧光强度逐渐增加;抗氧化物NAC预孵育后, H_2O_2 引起的荧光强度变化消失,与未加 H_2O_2 相似,提示 H_2O_2 确实造成细胞内ROS增加,细胞发生



A: DHE探针检测细胞ROS水平; B: 相对荧光强度变化的统计学分析。相对荧光强度为处理组平均荧光强度相对未处理组的比值, 平均荧光强度为同组多个细胞荧光强度的均数。各组细胞数: 未处理组, $n=26$; 0.2 mmol/L H₂O₂组, $n=34$; 0.5 mmol/L H₂O₂组, $n=37$; 1.0 mmol/L H₂O₂组, $n=36$; 2.0 mmol/L H₂O₂组, $n=31$; H₂O₂+NAC组, $n=24$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与未处理组的比较或指示的两组间比较; C: 免疫印迹检测 SENP3蛋白量; D: SENP3蛋白量的统计学分析。相对蛋白量为处理组与未处理组的比值, 数据表示为均数±标准误。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.005$, 与未处理组比较, 或指示的两组间比较。

A: cellular ROS level probed by DHE; B: fluorescence intensity analysis of DHE probes. Relative intensity is the ratio of average intensity of all cells in treated group to untreated group and data are presented as mean±SEM. Cell number: untreated group, $n=26$; 0.2 mmol/L H₂O₂ group, $n=34$; 0.5 mmol/L H₂O₂ group, $n=37$; 1.0 mmol/L H₂O₂ group, $n=36$; 2.0 mmol/L H₂O₂ group, $n=31$; H₂O₂+NAC, $n=24$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs untreated group; C: SENP3 level detected by Western blot. D: the analysis of SENP3 level. The relative SENP3 level is the ratio of treated group to untreated group. Data are presented as mean±SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.005$ vs untreated group, or between indicated groups.

图1 不同程度氧化应激时SENP3蛋白量的变化

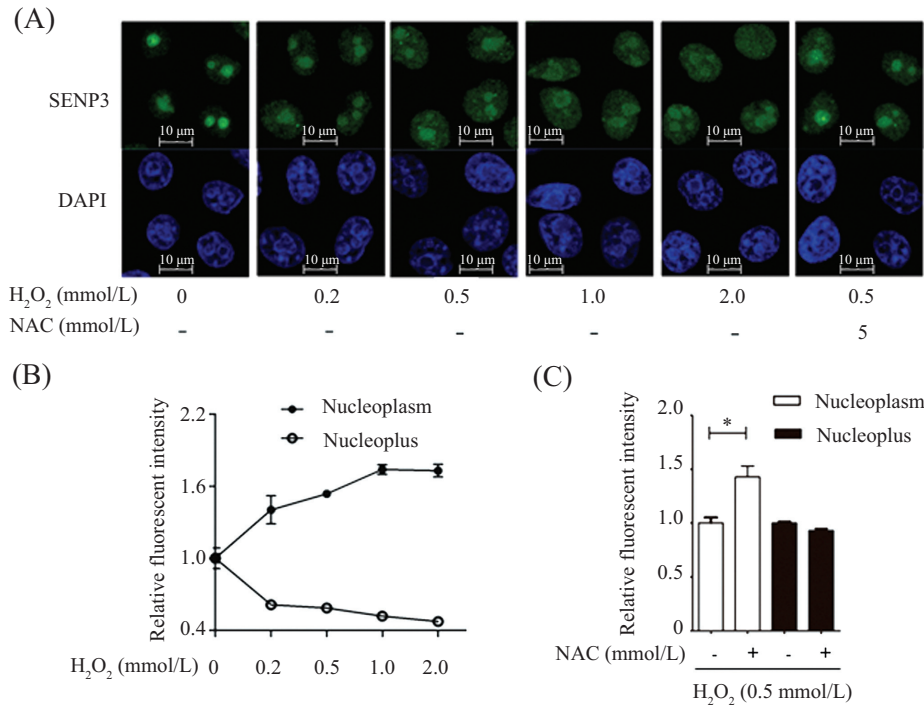
Fig.1 Changes of SENP3 protein level under the different extents of oxidative stress

了氧化应激(图1A和图1B)。在0.5 mmol/L H₂O₂处理时, SENP3蛋白量增加到1.8倍, 但抗氧化物NAC预孵育可以阻止这种增加, 有无NAC处理之间的差异有统计学意义(图1C和图1D), 说明SENP3的蛋白量变化确由氧化应激引起。在不同程度氧化应激时, SENP3蛋白量的变化则显示: 0.2 mmol/L H₂O₂作用时增加到1.7倍, 但随H₂O₂剂量的增加, SENP3的量维持在1.8~2.0倍, 不同剂量H₂O₂处理间无统计学差异(图1C和图1D)。上述结果提示, SENP3应答氧化应激时, 蛋白量增加的改变较为敏感, 轻度氧化应激短时间内即可引起改变, 但无氧化应激程度的相关性。

2.2 不同程度氧化应激对SENP3定位的影响

用梯度浓度H₂O₂处理HeLa细胞1 h, 免疫荧光

检测SENP3的定位改变。通过分别分析细胞核的两个区域——核仁和核质中SENP3的量, 尤其是核仁中SENP3量的减少, 揭示SENP3是否有核仁向核质移位的改变。结果显示, 随H₂O₂剂量增加造成的氧化应激程度加重, SENP3在核仁中逐渐减少, 而在核质中也相应逐渐增加(图2A)。分析上述两个区域中SENP3的相对荧光强度, 随H₂O₂从0.2增加到0.5, 1.0, 2.0 mmol/L, 核仁中SENP3的下降分别为0.39倍、0.42倍、0.48倍、0.53倍, 而核质中SENP3的增加分别为0.40倍、0.53倍、0.73倍、0.74倍, 表现出氧化应激程度的相关性(图2B)。H₂O₂处理细胞前用NAC预孵育, H₂O₂引起的SENP3重分布不再发生(图2A和图2C)。这些结果提示, SENP3在应答不同程度氧化应激时, 除了能够通过快速增加的蛋白量, 还可以通过逐渐增加的



A: 免疫荧光检测SENP3在核仁与核质中的定位; B: SENP3在核仁和核质区域的相对荧光强度变化与统计学分析。相对荧光强度为处理组平均荧光强度相对未处理组的比值,核仁和核质区域的平均荧光强度为同组多个细胞该区域荧光强度的均数。各组细胞数:未处理组, $n=21$; 0.2 mmol/L H₂O₂组, $n=24$; 0.5 mmol/L H₂O₂组, $n=17$; 1.0 mmol/L H₂O₂组, $n=24$; 2.0 mmol/L H₂O₂组, $n=27$; C: SENP3的相对荧光强度变化与统计学分析。比较有无NAC预孵育对H₂O₂处理造成的SENP3定位改变的影响,数据表示为均数±标准误。细胞数:0.5 mmol/L H₂O₂组, $n=17$; H₂O₂+NAC组, $n=24$ 。* $P<0.05$ 。

A: SENP3 localization in nucleolus and nucleoplasm by immunofluorescence; B: fluorescence intensity analysis of nucleolar and nucleoplasmic SENP3. Relative intensity is the ratio of average intensity of all cells in treated group to untreated group and data are presented as mean±SEM. Cell number: untreated group, $n=21$; 0.2 mmol/L H₂O₂ group, $n=24$; 0.5 mmol/L H₂O₂ group, $n=17$; 1.0 mmol/L H₂O₂ group, $n=24$; 2.0 mmol/L H₂O₂ group, $n=27$; C: fluorescence intensity analysis of SENP3 in nucleolus and nucleoplasm. The comparison of the relative fluorescent intensity of SENP3 between at present and at absent of antioxidant NAC. Cell number: 0.5 mmol/L H₂O₂ group, $n=17$; H₂O₂+NAC, $n=24$. * $P<0.05$.

图2 不同程度氧化应激时SENP3定位的变化

Fig.2 Alterations of the SENP3 localization under the different extents of oxidative stress

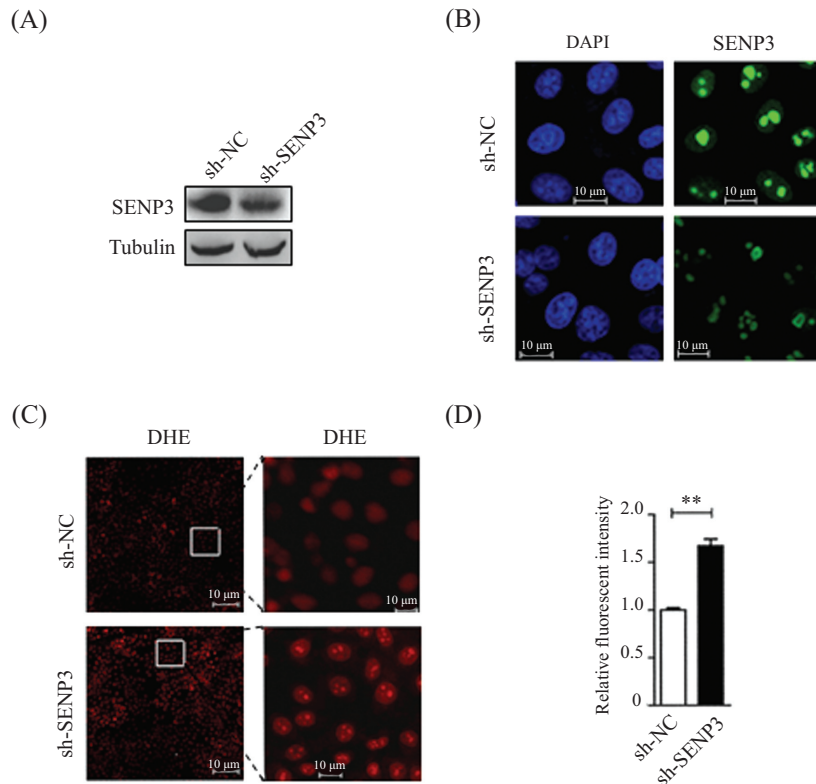
核质移位,最终使核质内的蛋白量增加而发挥功能。

2.3 SENP3参与细胞氧化还原状态的调控

既然SENP3能够感受氧化应激发生量和定位的改变,我们考察SENP3是否能够抵抗氧化应激。应用SENP3稳定敲除的HeLa细胞,检测其对细胞氧化还原状态的影响。免疫印迹和免疫荧光技术验证SENP3的敲除效率约为50%,核仁中明显减少(图3A和图3B)。在这些低SENP3的细胞内,ROS探针DHE的荧光强度都明显增强,核仁内的增强尤为明显,视野中所有细胞的平均荧光强度增加了0.64倍(图3C和图3D)。提示SENP3可能参与调控细胞的氧化还原平衡,对维持核仁的还原状态尤为重要。

2.4 SENP3对氧化应激时抗氧化蛋白表达的影响
细胞静息时,SENP3能够参与氧化还原状态的维持,但机制不明,且在氧化物刺激后SENP3是否仍影响细胞氧化还原状态也不清楚,故本研究选取抗氧化

蛋白(antioxidants),检测它们在静息和氧化应激时表达的改变,同时探讨SENP3是否参与这种表达调控。抗氧化蛋白选取歧化超氧阴离子的SOD1、清除H₂O₂的CAT以及维持蛋白质还原状态的氧还蛋白家族Prx1、Prx2、Prx4和Grx1。结果显示,细胞静息状态时,敲除SENP3可明显下调这些基因的表达,下降30%~70%,差异均有统计学意义(图A和图4B),提示SENP3可能介导广泛的抗氧化蛋白的基因表达,维持细胞的氧化还原状态。用0.2 mmol/L H₂O₂处理HeLa细胞1.5 h,细胞处于轻度氧化应激,这些抗氧化蛋白基因的表达均有不同程度的上调,其中Prx4、CAT、SOD1的改变有统计学意义,提示它们可能是快速应答的抗氧化蛋白基因。但将细胞内的SENP3敲低(knockdown),这些基因表达不再能够上调,提示SENP3也特异地介导了应激应答基因的表达(图4A和图4B)。



A、B: 免疫印迹和免疫荧光检测SENP3敲除效率; C: DHE探针检测细胞ROS水平; D: DHE探针的相对荧光强度变化与统计学分析。相对荧光强度为低SENP3细胞与对照组细胞平均荧光强度的比值, 数据表示为均数±标准误。细胞数: sh-NC, n=28; sh-SENP3, n=23。 **P<0.01。

A,B: the efficiency of SENP3 knockdown detected by Western blot and immunofluorescence; C: ROS level probed by DHE; D: fluorescence intensity analysis of DHE probe. Relative intensity is the ratio of average intensity of sh-SENP3 cells to sh-NC cells and data are presented as mean±SEM. Cell number: sh-NC, n=28; sh-SENP3, n=23. **P<0.01.

图3 SENP3对细胞氧化还原状态的影响

Fig.3 The effect of SENP3 on the redox state

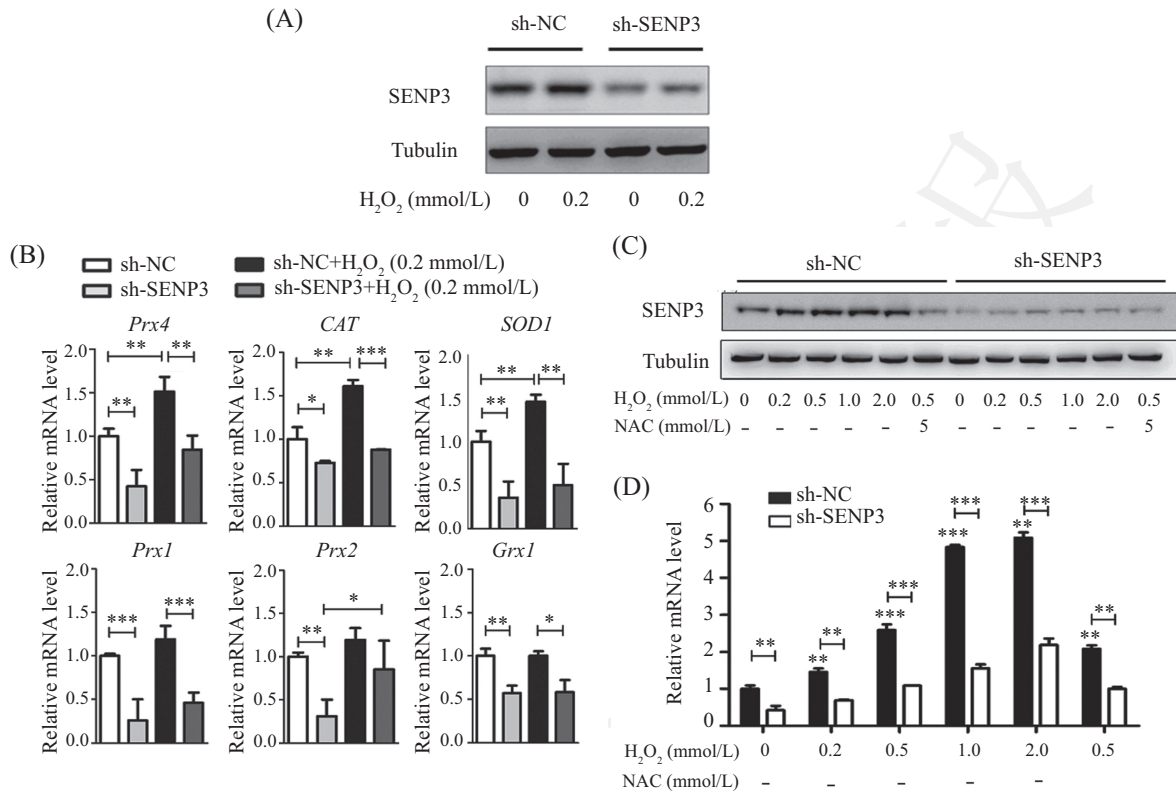
为进一步探讨不同程度氧化应激时抗氧化蛋白基因表达的上调及与SENP3的关系, 应用浓度梯度H₂O₂处理HeLa细胞。结果发现, *Prx4*的表达随H₂O₂剂量增加而逐渐增加, 从1.5倍到5.5倍, 与应激程度相关; 但敲低SENP3后, *Prx4*表达增加受到一定程度的抑制(图4C和图4D)。上述结果提示, SENP3能够应答不同程度氧化应激, 通过介导特异的抗氧化蛋白基因表达发挥抵抗应激的功能。

3 讨论

1996年, 类泛素蛋白修饰分子SUMO1的发现使人们发现了SUMO化修饰这种新的蛋白质翻译后修饰^[17]。十几年来, 随着诸多重要蛋白质底物的发现, SUMO化修饰已经成为细胞内主要的翻译后修饰方式之一。SUMO化修饰也同其他修饰一样, 同时存在逆向的去SUMO修饰, 因而SUMO化及去SUMO化修饰同时成为重要的细胞内调控方式^[18-20]。我们前期的研究发现, 去SUMO化蛋白酶SENP3在

氧化应激相关的炎症性肿瘤, 包括胃癌及肝癌中高表达; 也发现SENP3是SENP家族中对氧化应激最为敏感的成员, 通过快速增加核质内的量介导应激造成的肿瘤细胞增殖和转移改变^[11-12,14,21]。

本研究发现, SENP3能够快速的感觉氧化应激, 轻度氧化应激即可引起SENP3蛋白累积, 且很快达到峰值, 即便氧化程度增加, SENP3也没有进一步升高, 这与我们之前的报道一致^[11]。同时, 本研究也发现, 氧化应激程度增加可诱发SENP3定位的改变, 核仁中的分布持续减少, 而核质中持续增加, 故SENP3在核质中的增加机制既涉及泛素化降解抑制, 又涉及从核仁向核质的移位, 且两种感受方式与氧化应激程度相关。重要的科学问题是, SENP3以何种方式感受不同程度的氧化应激, 我们推测, 可能与SENP3的半胱氨酸位点上发生的氧化修饰有关。由于不同位点的半胱氨酸所处的空间位置不同, 在氧化应激时发生氧化修饰的敏感性可能会不同; 另外, 同一半胱氨酸位点在不同程度氧化应激时的氧化修饰方式



A: 免疫印迹检测SENP3敲除效率; B: 实时定量PCR检测抗氧化蛋白的基因表达。数据为3次独立实验结果, 表示为均数±标准误。相对mRNA是各组相对sh-NC细胞未处理组的比值。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$; C: 免疫印迹检测SENP3的蛋白量变化; D: 实时定量PCR检测Prx4的表达和统计学分析。数据为3个复孔的结果, 表示为均数±标准误。相对mRNA是各组相对sh-NC细胞未处理组的比值。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, 与未处理组比较, 或指示的两组间比较。

A: the efficiency of SENP3 knockdown detected by Western blot; B: antioxidants expression monitored by Real-time PCR. Data are from three independent experiments and presented as mean±SEM. Relative mRNA level is the ratio of every group to untreated sh-NC cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$; C: the protein level of SENP3 detected by Western blot; D: Prx4 expression monitored by Real-time PCR. Each group is made in triplicate. Data are presented as mean±SEM. Relative mRNA level is the ratio of every group to untreated sh-NC cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, treated group vs untreated group, or between indicated groups.

图4 不同程度氧化应激时, SENP3介导的抗氧化蛋白表达变化

Fig.4 Alterations of antioxidants expression mediated by SENP3 upon different extents of oxidative stress

也可能不同。在本组其他研究中已发现, 在轻度氧化应激时, 第243、274位半胱氨酸发生氧化, 并造成SENP3泛素化降解的减少, 从而导致蛋白量的快速增加^[11]。在SENP3的11个半胱氨酸中, 可能存在其他氧化修饰位点能够负责感受中等程度氧化应激而造成SENP3的移位。另外, 也不能排除存在不同的氧化修饰方式或程度: 谷胱甘肽化修饰(glutathionylation)、二硫键(disulfide bond)、次磺酸(sulfenic acid)、亚磺酸(sulfinic acid)或磺酸(sulfonic acid)。关于上述机制, 我们将在未来的研究中深入探讨。

研究同时发现, SENP3对抗氧化酶表达的复杂调控。细胞静息状态时, SENP3调节较多抗氧化酶的表达, 包括Prx家族、CAT、SOD1、Grx1等, 提示SENP3可能参与它们的基础转录调控。但当氧化应激时, Prx4、CAT、SOD1表达上调, 而其他抗氧化

蛋白变化不明显, 同时SENP3仍参与这种应激应答, 可能与SENP3的大量增加有关, 也与应激特异出现的转录因子成为它的去SUMO底物有关。在Prx家族, Prx4与Prx1、Prx2定位及转录调控不同。首先, Prx1、Prx2分布在细胞核和细胞质^[22-23], 而Prx4主要定位于细胞外基质、内质网、溶酶体与过氧化物酶体^[24-25]。第二, 研究已报道, 转录因子Nr2能够调控Prx1表达^[26], 成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor family, FGFs)信号途径也可以促进Prx1及Prx2的表达^[23], 但关于调控Prx4表达的转录因子, 报道则很少。本研究结果提示, 在氧化应激时, 它们的基因表达上调程度不同, 且SENP3负责了应激时的特异变化。研究需探索氧化应激特异的转录因子, 并发现它(们)被SENP3调控的SUMO化修饰。

目前, 本组及其他研究者已经报道了数种

SENP3的底物蛋白质,包括转录因子FOXC2、多种转录因子的辅因子p300、核糖体生物合成相关蛋白PELP1、LAS1L、应激应答蛋白p53、B23、核体蛋白PML及其他功能蛋白PARP1、Drp1,但上述底物与抗氧化酶的表达调控关系不显著^[14,16,21,27-30]。我们对能够结合Prx4启动子2 000 bp区域的转录因子进行预测,其中,Sp1有5个结合区域,高度提示了可能性,未来研究将对Sp1进行验证,以期发现其可能的抗氧化应答功能和SUMO化修饰调控。

参考文献 (References)

- 1 Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: A signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(3/4): 243-70.
- 2 Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408(6809): 239-47.
- 3 Gao L, Mann GE. Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: A double-edged sword in redox signalling. *Cardiovasc Res* 2009; 82(1): 9-20.
- 4 Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87(10): 840-4.
- 5 D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(10): 813-24.
- 6 Wang Y, Yang J, Yi J. Redox sensing by proteins: Oxidative modifications on cysteines and the consequent events. *Antioxid Redox Signal* 2012; 16(7): 649-57.
- 7 Matthews DA, Olson MO. What is new in the nucleolus?: Workshop on the nucleolus: New perspectives. *EMBO Rep* 2006; 7(9): 870-3.
- 8 Andersen JS, Lam YW, Leung AK, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI, *et al.* Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 2005; 433(7021): 77-83.
- 9 Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI. The nucleolus under stress. *Mol Cell* 2010; 40(2): 216-27.
- 10 Mayer C, Grummt I. Cellular stress and nucleolar function. *Cell Cycle* 2005; 4(8): 1036-8.
- 11 Yan S, Sun X, Xiang B, Cang H, Kang X, Chen Y, *et al.* Redox regulation of the stability of the SUMO protease SENP3 via interactions with CHIP and Hsp90. *EMBO J* 2010; 29(22): 3773-86.
- 12 Sun Z, Hu S, Luo Q, Ye D, Hu D, Chen F. Overexpression of SENP3 in oral squamous cell carcinoma and its association with differentiation. *Oncol Rep* 2013; 29(5): 1701-6.
- 13 Wang Y, Yang J, Yang K, Cang H, Huang XZ, Li H, *et al.* The biphasic redox sensing of SENP3 accounts for the HIF-1 transcriptional activity shift by oxidative stress. *Acta Pharmacol Sin* 2012; 33(7): 953-63.
- 14 Ren YH, Liu KJ, Wang M, Yu YN, Yang K, Chen Q, *et al.* DeSUMOylation of FOXC2 by SENP3 promotes the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells. *Oncotarget* 2014; 5(16): 7093-104.
- 15 Yun C, Wang Y, Mukhopadhyay D, Backlund P, Kolli N, Yergey A, *et al.* Nucleolar protein B23/nucleophosmin regulates the vertebrate SUMO pathway through SENP3 and SENP5 proteases. *J Cell Biol* 2008; 183(4): 589-95.
- 16 Castle CD, Cassimere EK, Denicourt C. LAS1L interacts with the mammalian Rix1 complex to regulate ribosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 2012; 23(4): 716-28.
- 17 Boddy MN, Howe K, Etkin LD, Solomon E, Freemont PS. PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* 1996; 13(5): 971-82.
- 18 Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: Different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 2004; 18(17): 2046-59.
- 19 Muller S, Ledl A, Schmidt D. SUMO: A regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene* 2004; 23(11): 1998-2008.
- 20 Dou H, Huang C, van Nguyen T, Lu L, Yeh ET. SUMOylation and de-SUMOylation in response to DNA damage. *FEBS Lett* 2011; 585(18): 2891-6.
- 21 Han Y, Huang C, Sun X, Xiang B, Wang M, Yeh ET, *et al.* SENP3-mediated de-conjugation of SUMO2/3 from promyelocytic leukemia is correlated with accelerated cell proliferation under mild oxidative stress. *J Biol Chem* 2010; 285(17): 12906-15.
- 22 Higuchi M, Kato T, Chen M, Yako H, Yoshida S, Kanno N, *et al.* Temporospatial gene expression of Prx1 and Prx2 is involved in morphogenesis of cranial placode-derived tissues through epithelio-mesenchymal interaction during rat embryogenesis. *Cell Tissue Res* 2013; 353(1): 27-40.
- 23 Doufexi AE, Mina M. Signaling pathways regulating the expression of Prx1 and Prx2 in the chick mandibular mesenchyme. *Dev Dyn* 2008; 237(11): 3115-27.
- 24 Wood ZA, Schroder E, Robin HJ, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 2003; 28(1): 32-40.
- 25 Fujii J, Ikeda Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep* 2002; 7(3): 123-30.
- 26 Zhang M, Hou M, Ge L, Miao C, Zhang J, Jing X, *et al.* Induction of peroxiredoxin 1 by hypoxia regulates heme oxygenase-1 via NF-kappaB in oral cancer. *PLoS One* 2014; 9(8): e105994.
- 27 Nishida T, Yamada Y. The nucleolar SUMO-specific protease SMT3IP1/SENP3 attenuates Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 406(2): 285-91.
- 28 Kuo ML, den Besten W, Thomas MC, Sherr CJ. Arf-induced turnover of the nucleolar nucleophosmin-associated SUMO-2/3 protease Senp3. *Cell Cycle* 2008; 7(21): 3378-87.
- 29 Messner S, Schuermann D, Altmeyer M, Kassner I, Schmidt D, Schar P, *et al.* Sumoylation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibits its acetylation and restrains transcriptional coactivator function. *FASEB J* 2009; 23(11): 3978-89.
- 30 Guo C, Hildick KL, Luo J, Dearden L, Wilkinson KA, Henley JM. SENP3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia. *EMBO J* 2013; 32(11): 1514-28.