

小泛素样修饰物蛋白酶 3 调控小鼠 肺泡 II 型上皮细胞自噬

朱慧琴¹, 邹嫣琼², 杨洁², 易静¹, 杨洁¹

(1. 上海交通大学医学院生物化学与分子细胞生物学系, 上海 200025;

2. 上海交通大学医学院基础医学公共技术平台, 上海 200025)

[摘要] 目的 探讨小泛素样修饰物 (small ubiquitin-like modifier, SUMO) 特异性蛋白酶 3 (SUMO-specific protease 3, SENP3) 对小鼠肺组织细胞自噬的调控作用及分子机制。方法 应用免疫荧光技术检测 SENP3 在肺组织细胞中的定位; 对 SENP3 基因野生型 C57BL/6J 小鼠 (SENP3^{+/+}) 和 SENP3 基因敲除杂合子小鼠 (SENP3^{+/-}) 进行饥饿处理, 诱导细胞自噬; 应用免疫印迹法评估细胞自噬水平; 应用电子显微镜观察和免疫荧光技术分析发生自噬的细胞类型; 应用免疫共沉淀方法检测自噬相关分子卷曲螺旋状 Myosin 样 Bcl-2 相互作用蛋白 1 (coiled-coil myosin-like Bcl-2-interacting protein 1, BECN1) 的 SUMO 化修饰。结果 SENP3 在肺泡 II 型上皮细胞中高表达。小鼠经饥饿处理后, 肺泡 II 型上皮细胞出现自噬现象, 且 SENP3^{+/-} 小鼠较 SENP3^{+/+} 小鼠更明显。同时, 肺组织样品中 BECN1 的 SUMO2/3 化修饰被 SENP3 去除。结论 SENP3 抑制饥饿应激时小鼠肺泡 II 型上皮细胞的自噬, 并可对细胞自噬程度进行精细调控。

[关键词] 小泛素样修饰物蛋白酶 3; 自噬; 肺泡 II 型上皮细胞; 小鼠

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)04-0270-09

细胞自噬 (autophagy) 是细胞内高度保守的生命活动现象之一, 是细胞适应环境变化、维持内环境稳定的重要机制^[1]。因自噬程度与应激时细胞是否能够适应而生存或适应不良而死亡的命运有关, 故自噬程度的调控对细胞乃至机体均有重要意义。细胞自噬程度的控制主要通过基因转录、转录后和翻译后水平上调自噬相关蛋白的表达量和相互作用而实现^[2-4], 其中可逆的蛋

白质翻译后修饰能够快速调控自噬相关信号转导蛋白, 因而是重要的自噬调控方式。目前研究已发现, 磷酸化、泛素化和乙酰化修饰在自噬中具有重要作用, 但小泛素样修饰物 (small ubiquitin-like modifier, SUMO) 化修饰在动物体内是否存在调控作用的相关研究报道较少^[5]。

与泛素化修饰类似, SUMO 与底物蛋白质的赖氨酸共价连接的过程被称为 SUMO 化修饰 (SUMOylation), SUMO 特异性蛋白酶 (SUMO-specific protease, SENP) 家族则介导可逆的去 SUMO 化修饰 (de-SUMOylation), 共同影响蛋白质的结构、定位及活性^[6-8]。本研究组长期关注 SENP 家族的 SENP3, 发现其在细胞应激应答中具有重要功能^[9-13]; 研究还发现, 在体外培养细胞和小鼠体内经典的营养缺乏或饥饿应激可以诱导肝细胞自噬, 且自噬相关重要蛋白质卷曲螺

[收稿日期] 2019-12-31

[基金项目] 国家自然科学基金(31771522); 上海市自然科学基金(16ZR1418400)

[作者简介] 朱慧琴(1980—), 女, 实验师, 研究方向: 蛋白质翻译后修饰。E-mail: zhuhuiqin21@yeah.net

[通信作者] 杨洁(1973—), 女, 教授, 博士, 研究方向: 蛋白质翻译后修饰、细胞应激与疾病。
E-mail: yangjiey@shsmu.edu.cn

旋状 Myosin 样 Bcl-2 相互作用蛋白 1 (coiled-coil myosin-like Bcl-2-interacting protein 1, BECN1) 发生了 SUMO 化修饰, 而小鼠肝细胞中 *SENP3* 基因被特异性敲除后 SUMO 化修饰程度增强并导致自噬水平升高, 提示自噬发生时 *SENP3* 介导了 BECN1 的去 SUMO 化修饰, 并且对自噬程度进行精细调控^[14]。然而, 在其他组织中 *SENP3* 是否具有调控自噬的功能, 底物蛋白质是什么, 目前均不清楚。一些研究初步表明, 自噬参与调节肺的炎症反应, 影响肺损伤的程度^[15-16]。但因为动物在体水平的自噬不易被检测, 调控自噬的研究也很少, 故目前对静息时肺组织是否存在自噬, 以及饥饿等生理刺激时自噬是否发生, 肺的上皮细胞、内皮细胞、间质细胞和炎症细胞中哪种细胞类型发生自噬, *SENP3* 是否调控自噬程度等, 这些问题均少见报道。

本研究利用基因敲除杂合子 (*SENP3*^{+/-}) 小鼠, 比较饥饿后肺组织细胞自噬水平, 以期认识和发现在体水平的自噬以及 *SENP3* 对自噬的调节作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SENP3 基因敲除杂合子 (*SENP3*^{+/-}) 小鼠由上海交通大学基础医学院生物化学与分子细胞生物学系程金科教授惠赠。*SENP3* 野生型 (*SENP3*^{+/+}) 即背景品系 SPF 级 C57BL/6J 小鼠购自上海灵畅生物科技有限公司 [SCXK (沪) 2018-0003], 饲养于 SPF 级环境 [SYXK (沪) 2018-0027]。本实验经上海交通大学医学院动物福利伦理委员会批准 (编号为 A-2019-041)。

1.2 主要试剂与仪器

抗 *SENP3* 抗体、抗微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, LC3) 抗体、抗 SUMO2/3 抗体、抗 BECN1 抗体和 IgG 抗体均购自美国 CST 公司; 抗 β -actin 抗体、氯喹及 N-乙基马来酰胺 (N-ethylmaleimide, NEM) 均购自美国 Sigma 公司; 抗表面活性物质相关蛋白 C (surfactant protein C, SP-C) 抗体购自英国 Abcam 公司; 辣根过

氧化物酶标记的二抗购自美国 Jackson ImmunoResearch 公司; 荧光标记二抗购自美国 Invitrogen 公司; 放射免疫沉淀法 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 蛋白裂解液购自美国 Thermo Fisher 公司。

蛋白质免疫印迹 (Immunoblotting) 装置购自美国 Bio-Rad 公司; 透射电子显微镜购自日本 Hitachi 公司; 激光扫描共聚焦显微镜购自德国 Zeiss 公司。

1.3 建立小鼠自噬诱导及干预模型

8 周龄雄性 *SENP3*^{+/+} 小鼠 16 只和 *SENP3*^{+/-} 小鼠 16 只, 分别随机分为对照组、饥饿组、溶酶体抑制剂氯喹组和饥饿合并氯喹组。对照组为正常饮食; 饥饿组小鼠禁食 40 h, 不断水^[14, 17]; 氯喹组为腹腔注射氯喹 (60 mg/kg); 饥饿合并氯喹处理组为饥饿处理前 2 h 腹腔注射氯喹 (60 mg/kg), 间隔 20 h 再注射 1 次, 饥饿时间为 40 h。氯喹可抑制溶酶体功能, 用来区分自噬的发生或溶酶体降解功能的异常, 从而评估自噬流。上述处理结束后以脊椎脱臼法处死小鼠, 取双侧肺组织, 将肺叶剪开, 部分切为小块, 分别置于液氮和固定剂中, 准备用于蛋白质检测、免疫组织化学染色和电子显微镜观察。

1.4 免疫荧光技术检测小鼠肺组织细胞中 *SENP3* 的定位及细胞自噬

取肺组织, 用质量分数为 4% 的多聚甲醛溶液固定, 30% 蔗糖溶液脱水, 冰冻切片包埋剂 (optimal cutting temperature compound, OCT) 包埋, 冷冻切片机切片, 厚度为 5 μ m。封闭 1 h, 加入抗 *SENP3* 抗体 (工作液体积稀释比例为 1:100) 以及抗 SP-C 抗体 (稀释比例为 1:200), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 然后加入荧光标记二抗 (稀释比例为 1:1000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。漂洗后用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (稀释比例为 1:2000) 对比染色, 抗淬灭剂封固, 激光扫描共聚焦显微镜下拍摄, 通过 ZEN 图像成像软件输出图片。

应用 LC3 免疫荧光染色法检测细胞自噬, 肺组织冰冻切片用 LC3 抗体 (稀释比例为 1:100) 孵育, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 其他步骤同前。LC3-I 弥散

分布于细胞质,而 LC3- II 形成后分布于自噬小体膜或自噬溶酶体膜,呈现为斑点状 (dots),故以点状 LC3 的出现指示自噬的发生。

1.5 免疫印迹法检测小鼠肺组织中相关蛋白表达水平和细胞自噬水平

取 0.1 g 肺组织,加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 蛋白裂解液,研磨并超声提取肺组织蛋白,并用 BCA 试剂盒检测蛋白质浓度。按每孔 20 μ g 上样,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,并转移至聚偏二氟乙烯膜,脱脂奶粉封闭 1 h。分别加入抗 SENP3、LC3、BECN1 和 SUMO2/3 抗体(稀释比例为 1:1 000),以及抗 β -actin 抗体(稀释比例为 1:5 000),孵育过夜,再加入二抗(稀释比例为 1:5 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,试剂盒显影,化学发光成像仪检测并输出图片。

因细胞自噬时 LC3- I 与磷脂酰乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamine, PE) 结合后转变为 LC3- II,故应用抗 LC3 抗体进行免疫印迹可检测细胞自噬。LC3- I 转化为 LC3- II 提示细胞自噬启动,LC3- II 的量反映自噬水平。

1.6 透射电子显微镜观察小鼠肺组织自噬情况

肺组织置于 2.5% 戊二醛固定液中,4 $^{\circ}$ C 固定 48 h,1% 锇酸固定 2 h,梯度乙醇溶液脱水后环氧丙烷置换,812 包埋剂浸透,60 $^{\circ}$ C 烘箱

聚合 48 h。超薄切片机切 90 nm 厚度的肺组织切片,柠檬酸铅染色,透射电子显微镜下观察肺组织自噬细胞形态。

1.7 免疫共沉淀技术检测小鼠肺组织中 BECN1 的 SUMO 化修饰

取 0.1 g 肺组织,加入含有蛋白酶抑制剂和 NEM 的 RIPA 蛋白裂解液 1 mL,研磨并超声,14 000 $\times g$,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min 后吸取上清蛋白样品。留取 60 μ L 样品作为对照,其余样品中加入抗 BECN1 抗体,4 $^{\circ}$ C 旋转过夜。加入 40 μ L Protein A/G 琼脂糖珠子,4 $^{\circ}$ C 旋转过夜,漂洗后加 50 μ L 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 变性后进行免疫印迹法检测。

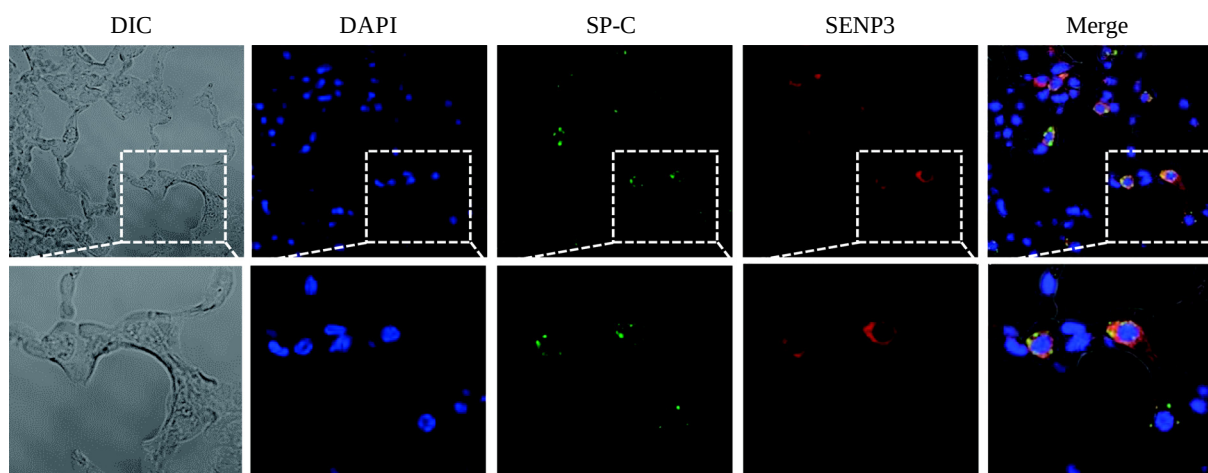
1.8 统计学分析

使用 GraphPad Prism 软件进行数据分析。各实验均独立重复 3 次,每次每组实验小鼠为同窝出生,每组 2~6 只(对照组略少于实验组),结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肺组织细胞中 SENP3 的定位

小鼠肺组织切片在微分干涉相差显微镜下观察(图 1)显示,肺泡 I 型上皮细胞扁平,围



DIC 为微分干涉相差显微镜观察结果,DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(衬染细胞核),SP-C 为肺泡表面活性蛋白 C(标记为绿色荧光),SENP3 为小泛素样修饰物特异性蛋白酶 3(标记为红色荧光),Merge 为 DAPI、SP-C 和 SENP3 抗体荧光标记的混合结果。上图比例尺为 10 μ m,下图比例尺为 5 μ m。

图 1 免疫荧光技术显示小鼠肺组织中 SENP3 的定位

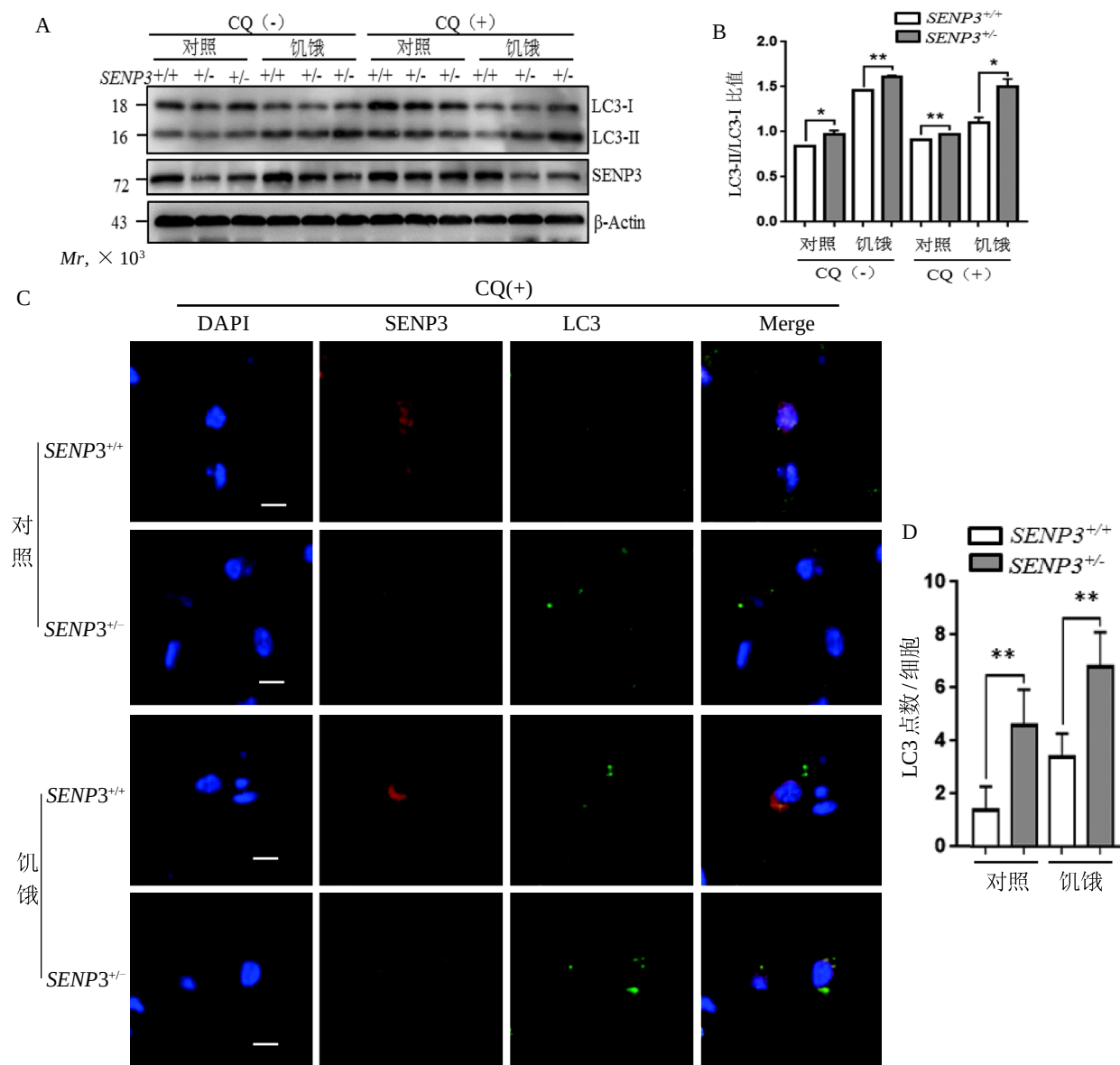
Figure 1 Localization of SENP3 in mouse lung by immunofluorescence

成肺泡壁；II型上皮细胞分布于I型上皮细胞之间，呈立方形，细胞核为圆形，突向肺泡腔内。肺泡II型上皮细胞以特异性表达的SP-C进行标记。免疫荧光检测结果显示，SEN3主要定位于SP-C阳性细胞，且以细胞质定位为主，提示

SEN3主要表达于肺泡II型上皮细胞的细胞质中。

2.2 饥饿后 $SEN3^{+/+}$ 和 $SEN3^{+/-}$ 小鼠肺组织细胞的自噬

小鼠肺组织的免疫印迹法检测结果（图2）显示， $SEN3^{+/-}$ 小鼠的SEN3水平较 $SEN3^{+/+}$ 小



A: 免疫印迹检测 LC3- I 和 LC3- II 的量。B: 柱状图显示 LC3- I 和 LC3- II 灰度的比值。C: 免疫荧光技术观察点状 LC3。D: 柱状图显示每个肺泡 II 型上皮细胞中点状 LC3 的数量。与对照比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ， $n = 3$ ；C 图标尺为 5 μm 。CQ 为氯喹 (chloroquine)，DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (衬染细胞核)，SEN3 为小泛素样修饰物特异性蛋白酶 3 (标记为红色荧光)，LC3 为微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3，Merge 为 DAPI、LC3 和 SEN3 抗体荧光标记的混合结果。 $SEN3^{+/-}$ 为 $SEN3$ 基因敲除杂合子小鼠， $SEN3^{+/+}$ 为 $SEN3$ 野生型即背景品系 SPF 级 C57BL/6J 小鼠。

图 2 免疫印迹法 (A 和 B) 和免疫荧光技术 (C 和 D) 检测 $SEN3^{+/+}$ 小鼠和 $SEN3^{+/-}$ 小鼠肺组织中自噬相关蛋白 LC3- I 和 LC3- II 的量

Figure 2 Autophagy level in $SEN3^{+/+}$ and $SEN3^{+/-}$ mouse lung tissues by immunoblotting (A-B) and immunofluorescence (C-D)

鼠下降 (39.98 ± 2.32) % ($P < 0.01$), 提示杂合子小鼠也具有一定的敲减效率; 与对照组相比, 饥饿小鼠肺组织的 *SENP3* 水平有所升高 ($P < 0.01$, 图 2A)。在 *SENP3*^{+/+} 小鼠中, 未饥饿对照组肺组织中出现少量 LC3- II, 提示肺组织细胞有基础的自噬水平; 饥饿后 LC3- II 进一步增加, LC3- I 明显减少, 提示饥饿诱导后自噬增加 ($P < 0.01$, 图 2A)。关键的是, 与 *SENP3*^{+/+} 小鼠相比, *SENP3*^{+/-} 小鼠的 LC3- II 水平更高 ($P < 0.01$, 图 2A), 且 LC3- II / LC3- I 比例有所升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2B)。同时, 与未加溶酶体抑制剂氯喹组相比, 氯喹处理后 LC3- II / LC3- I 比例都相应升高, 且 *SENP3*^{+/-} 小鼠中升高最为明显, 说明 *SENP3* 的敲减加速了肺组织细胞自噬流。

因肺组织蛋白样品中检测出 LC3- II 的量只能反映整体水平的自噬程度, 故研究仍需分析发生自噬的细胞类型和程度。免疫荧光染色结果显示, 未饥饿时, *SENP3* 高表达的肺泡 II 型上皮细胞质中无明显的点状 LC3, 而 *SENP3*^{+/-} 小鼠中开始少量出现 (图 2C 和 2D); 饥饿 48 h 后, *SENP3*^{+/+} 小鼠组的点状 LC3 有所增加 ($P < 0.05$), 而 *SENP3*^{+/-} 小鼠组明显增多 ($P < 0.01$, 图 2C 和

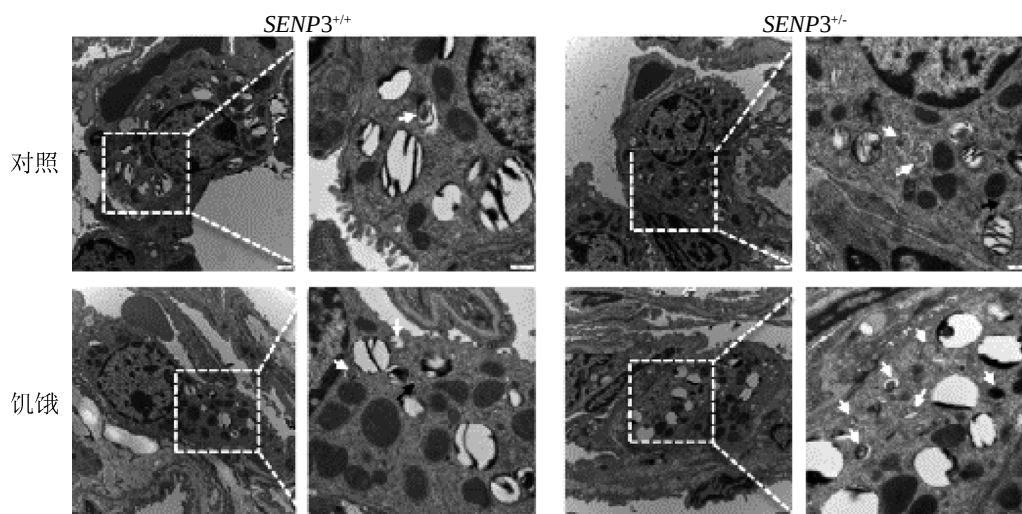
2D)。另外, *SENP3* 低表达的肺泡 I 型上皮细胞及其他细胞中无明显的点状 LC3 形成, 提示饥饿后自噬发生在肺泡 II 型上皮细胞, 且受到 *SENP3* 的抑制。

2.3 饥饿后 *SENP3*^{+/+} 小鼠和 *SENP3*^{+/-} 小鼠肺组织中发生自噬的细胞类型

透射电子显微镜下观察发现, *SENP3*^{+/+} 小鼠和 *SENP3*^{+/-} 小鼠肺组织结构正常。肺泡 II 型上皮细胞表面有短小的微绒毛, 细胞质中可见特征性的嗜钺性板层小体。饥饿组小鼠的 II 型上皮细胞中出现明显的自噬溶酶体结构, 内含已经消化的内容物或碎片, 而肺泡 I 型上皮中未见相关结构 (图 3), 提示饥饿主要诱导了肺泡 II 型上皮细胞的自噬。同时, *SENP3*^{+/-} 小鼠较 *SENP3*^{+/+} 小鼠 II 型上皮细胞中的自噬溶酶体数量更多 (图 3)。

2.4 *SENP3*^{+/+} 小鼠和 *SENP3*^{+/-} 小鼠肺组织中 BECN1 的 SUMO 化修饰

在肺组织样品中检测 BECN1 的 SUMO 化修饰, 结果显示 BECN1 的量未受到饥饿和 *SENP3* 基因敲除的影响, 但与 *SENP3*^{+/+} 相比, *SENP3*^{+/-} 小鼠中可检测到明显的 BECN1 的 SUMO2/3 修饰条带 (图 4 上图中泳道 2 与泳道 1 相比), 提示在野生型小鼠中 *SENP3* 去除了 BECN1 的 SUMO2/3 修饰。

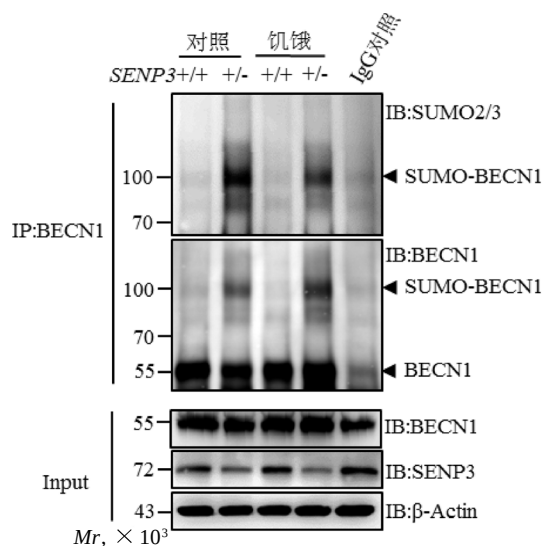


黑色箭头指示自噬小体, 白色箭头指示自噬溶酶体。图中每个细胞中均可见嗜钺性板层小体, 左图比例尺为 1 μm , 右图比例尺为 0.5 μm 。 *SENP3*^{+/-} 为 *SENP3* 基因敲除杂合子小鼠, *SENP3*^{+/+} 为 *SENP3* 野生型即背景品系 SPF 级 C57BL/6J 小鼠。

图 3 透射电子显微镜下观察 *SENP3*^{+/+} 小鼠和 *SENP3*^{+/-} 小鼠肺泡 II 型上皮细胞的自噬

Figure 3 Autophagy of alveolar type II epithelial cells in *SENP3*^{+/+} and *SENP3*^{+/-} mouse lung tissues under transmission electron microscopy

但在 *SEN3*^{+/-} 小鼠中, 与未饥饿的对照组相比, 饥饿后 BECN1 的 SUMO2/3 修饰是否增强, 结果尚不明确, SUMO2/3 抗体检测时显示为修饰减弱(图 4 上图中泳道 4 与泳道 2 相比), BECN1 抗体检测时显示为修饰增强(图 4 中图泳道 4 与泳道 2 相比)。



IP 为免疫共沉淀, Input 为未进行免疫共沉淀的细胞裂解液样品对照, SUMO-BECN1 指示小泛素样修饰物(SUMO)化修饰的 BECN1。

图 4 免疫共沉淀法检测 *SEN3*^{+/-} 和 *SEN3*^{+/+} 小鼠肺组织中 BECN1 的 SUMO2/3 修饰

Figure 4 SUMO2/3-modified BECN1 in *SEN3*^{+/-} and *SEN3*^{+/+} mouse lung tissues by co-immunoprecipitation

3 讨论

本研究初步在动物体内水平检测了肺组织细胞的基础自噬水平和饥饿诱导的自噬水平, 发现饥饿时自噬主要发生于肺泡 II 型上皮细胞。同时, 研究也观察到 *SEN3* 定位于肺泡 II 型上皮细胞的细胞质, 介导了重要的自噬相关蛋白 BECN1 的去 SUMO 化修饰, 并能够抑制饥饿诱导的自噬, 发挥自噬调控的作用。本研究结果一方面确认了 *SEN3* 可抑制肺组织细胞自噬, 并初步探讨了其作用机制, 另一方面也对在动物水平检测细胞自噬的方法进行了摸索, 使得研究者对在体自噬调控提高了认识。

目前在体或器官水平检测自噬流是自噬研究中较为困难的领域之一, 应用 LC3- II 的检测并不理想。研究者通常采用 LC3-GFP 转基因小鼠, 器官类型则集中在骨骼肌、脑、心脏和视网膜, 而肺较少^[18-19]。本研究也确实发现免疫印迹技术检测 LC3- II 的量以及免疫荧光技术检测 LC3 形成的点状结构均不明显, 较培养细胞更难检测。研究中预先给小鼠腹腔注射抑制剂氯喹, 一定程度上改善了 LC3- II 的检测结果, 提示该策略是研究在体自噬的可行方法。另外, 本研究也综合应用多种技术检测自噬水平, 可以在自噬的定量、细胞特异性及超微结构的水平上分别反映自噬的特征, 也是在体水平全面检测自噬的必要方法。

自噬水平的控制是自噬研究领域的一个重要问题, 也是研究者理解自噬在疾病发生和治疗中的角色的关键问题。在自噬的调控机制中, 有研究发现 SUMO 化修饰这种蛋白质翻译后修饰方式可能参与其中, 并证明 SUMO 能增强神经细胞和心肌细胞的自噬水平^[20-22], 但是去 SUMO 化修饰的蛋白酶在自噬过程中发挥负调控作用的相关研究报道较少。本实验室前期研究已发现, 小鼠肝脏中 BECN1 的 SUMO 化修饰促进自噬, 而 *SEN3* 通过对其去 SUMO 化修饰抑制自噬的发生^[14]。在小鼠睾丸组织中, 饥饿应激后自噬发生于支持细胞(Sertoli 细胞), *SEN3* 基因敲除杂合子小鼠中自噬增加^[23]。本研究在小鼠肺组织中继续探索, 发现饥饿后肺泡 II 型上皮细胞出现自噬, 而 *SEN3* 能抑制这种细胞的自噬, 提示 *SEN3* 抑制自噬的角色在各种组织中具有一定的普遍性。

SEN3 调控自噬的分子机制与蛋白质的 SUMO2/3 修饰有关。本研究中肺组织与其他研究中的肝组织类似, BECN1 的 SUMO2/3 修饰能够被 *SEN3* 去除。在机制研究上, 人们已发现 BECN1 的 SUMO2/3 修饰易化了与紫外线抵抗相关基因(ultraviolet radiation resistance-associated gene, UVRAG)、磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚单位 3(phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3, PI3KC3, 又称为 VPS34)、自噬相关蛋白 14 样蛋白(autophagy-related protein 14-like protein, ATG14L)的相互作用, 增强了自噬起始核心复合物的活性。由于 HEK293T 细胞和肝细

胞中均存在该机制,提示这个分子机制可能也存在于肺泡Ⅱ型上皮细胞。但因其他研究在体外发现这个复合物中的VPS34可以被SUMO1修饰^[24],故后续研究需要探索肺组织细胞中VPS34是否作为SENP3的底物引起SUMO2/3修饰的逆转,以及是否参与自噬调控,以期进一步明确SENP3的作用机制。

虽然SENP3在体外培养细胞和机体中扮演重要角色,其基因敲除造成小鼠早期胚胎的死亡,但其在各种组织中的功能和定位均不明确。在体外培养的多种正常细胞和肿瘤细胞中,SENP3定位于细胞核,且集中于核仁,尤其是基因过度表达时更为显著^[25]。研究发现在肝细胞的细胞质中存在SENP3分布,并与BECN1相互作用介导其去SUMO化修饰^[14]。本研究免疫荧光检测结果显示SENP3定位于肺泡Ⅱ型上皮细胞的细胞质,与其他研究结果不同,在细胞核中几乎没有发现SENP3,故未来仍需用多种技术综合考察其定位,以全面了解其功能。

本研究探讨肺组织细胞的自噬及其调控,具有一定的意义。自噬的程度影响应激时的细胞命运,即可能促进细胞存活抑或造成细胞死亡,而细胞命运的不同与刺激类型、程度和细胞类型有关。在肺部疾病中,自噬是否发生,与疾病的关系如何,这些研究报道不多,但研究结果已初步显示了不同病原体诱导的自噬、发生自噬的细胞类型及对细胞的生物学意义。细菌、败血症及高氧诱导的急性肺损伤中,自噬发挥保护细胞和减少损伤的作用^[15]。但也有研究报道了与此相反的现象,肺泡Ⅱ型上皮细胞的自噬导致炎症因子分泌量增加、细胞死亡和功能障碍,造成急性肺损伤加重^[26-29]。H5N1流感患者中,肺泡Ⅱ型上皮细胞的过度自噬也导致急性呼吸窘迫综合征^[30-31],BECN1基因敲除或3-甲基腺嘌呤抑制自噬后发病率降低,故抑制自噬可能成为治疗H5N1感染的一个新策略^[31-32]。本研究发现SENP3在肺组织中能够发挥抑制细胞自噬的功能,故提高SENP3的量或增强其活性有望成为治疗急性肺损伤的一个新策略。

参考文献:

- [1] Mizushima N. Autophagy: process and function[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(22):2861-2873.
- [2] Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEBS Lett*, 1993, 333(1/2):169-174.
- [3] Parzych KR, Ariosa A, Mari M, et al. A newly characterized vacuolar serine carboxypeptidase, Atg42/Ybr139w, is required for normal vacuole function and the terminal steps of autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Mol Biol Cell*, 2018, 29(9):1089-1099.
- [4] Feng Y, Yao Z, Klionsky DJ. How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(6): 354-363.
- [5] Xie Y, Kang R, Sun X, et al. Posttranslational modification of autophagy-related proteins in macroautophagy[J]. *Autophagy*, 2015, 11(1):28-45.
- [6] Wilson VG. Introduction to SUMOylation[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 963:1-12.
- [7] Mukhopadhyay D, Dasso M. Modification in reverse: the SUMO proteases[J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(6): 286-295.
- [8] Yeh ET. SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(13):8223-8227.
- [9] Wang Y, Yang J, Yang K, et al. The biphasic redox sensing of SENP3 accounts for the HIF-1 transcriptional activity shift by oxidative stress[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(7):953-963.
- [10] Yan S, Sun X, Xiang B, et al. Redox regulation of the stability of the SUMO protease SENP3 via interactions with CHIP and Hsp90[J]. *EMBO J*, 2010, 29(22):3773-3786.
- [11] Yun C, Wang Y, Mukhopadhyay D, et al. Nucleolar protein B23/nucleophosmin regulates the vertebrate SUMO pathway through SENP3 and SENP5 proteases[J]. *J Cell Biol*, 2008, 183(4):589-595.
- [12] Anderson CA, Blackstone C. SUMO wrestling with Drp1 at mitochondria[J]. *EMBO J*, 2013, 32(11):1496-1498.
- [13] Ren YH, Liu KJ, Wang M, et al. De-SUMOylation of FOXC2 by SENP3 promotes the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(16):7093-7104.
- [14] Liu K, Guo C, Lao Y, et al. A fine-tuning mechanism underlying self-control for autophagy: deSUMOylation

- of BECN1 by SENP3[J]. *Autophagy*, 2019, 16(2):1-16.
- [15] Wang K, Chen Y, Zhang P, et al. Protective features of autophagy in pulmonary infection and inflammatory diseases[J]. *Cells*, 2019, 8(2):123.
- [16] Racanelli AC, Kikkers SA, Choi AMK, et al. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease[J]. *Autophagy*, 2018, 14(2):221-232.
- [17] Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, et al. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker[J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(3):1101-1111.
- [18] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)[J]. *Autophagy*, 2016, 12(1):1-222.
- [19] Lopez-Alonso I, Aguirre A, Gonzalez-Lopez A, et al. Impairment of autophagy decreases ventilator-induced lung injury by blockade of the NF-kappaB pathway[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 304(12):L844-L852.
- [20] Cho SJ, Yun SM, Jo C, et al. SUMO1 promotes A β production via the modulation of autophagy[J]. *Autophagy*, 2015, 11(1):100-112.
- [21] Gupta MK, McLendon PM, Gulick J, et al. UBC9-mediated sumoylation favorably impacts cardiac function in compromised hearts[J]. *Circ Res*, 2016, 118(12):1894-1905.
- [22] Gupta MK, Robbins J. Making the connections: Autophagy and post-translational modifications in cardiomyocytes [J]. *Autophagy*, 2016, 12(11):2252-2253.
- [23] 陶亚群, 朱慧琴, 潘艺青, 等. SUMO 特异肽酶 3 调控小鼠睾丸 Sertoli 细胞自噬[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2019, 39(7):706-713.
- [24] Naidu SR, Lakhter AJ, Androphy EJ. PIASy-mediated Tip60 sumoylation regulates p53-induced autophagy[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(14):2717-2728.
- [25] Han Y, Huang C, Sun X, et al. SENP3-mediated de-conjugation of SUMO2/3 from promyelocytic leukemia is correlated with accelerated cell proliferation under mild oxidative stress[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(17):12906-12915.
- [26] Mizumura K, Cloonan SM, Haspel JA, et al. The emerging importance of autophagy in pulmonary diseases[J]. *Chest*, 2012, 142(5):1289-1299.
- [27] Hu Y, Liu J, Wu YF, et al. mTOR and autophagy in regulation of acute lung injury: A review and perspective[J]. *Microbes Infect*, 2014, 16(9):727-734.
- [28] Tang PS, Mura M, Seth R, et al. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die?[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294(4):L632-L641.
- [29] Song L, Zhou F, Cheng L, et al. MicroRNA-34a suppresses autophagy in alveolar type II epithelial cells in acute lung injury by inhibiting FoxO3 expression[J]. *Inflammation*, 2017, 40(3):927-936.
- [30] Ma J, Sun Q, Mi R, et al. Avian influenza A virus H5N1 causes autophagy-mediated cell death through suppression of mTOR signaling[J]. *J Genet Genomics*, 2011, 38(11):533-537.
- [31] Sun Y, Li C, Shu Y, et al. Inhibition of autophagy ameliorates acute lung injury caused by avian influenza A H5N1 infection[J]. *Sci Signal*, 2012, 5(212):ra16.
- [32] Pan H, Zhang Y, Luo Z, et al. Autophagy mediates avian influenza H5N1 pseudotyped particle-induced lung inflammation through NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 306(2):L183-L195.

Small Ubiquitin-like Modifier Specific Protease 3 Regulates Autophagy in Mouse Alveolar Type II Epithelial Cells

ZHU Huiqin¹, ZOU Yanqiong², YANG Jie², YI Jing¹, YANG Jie¹

(1. Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2. Core Facility of Basic Medical Sciences, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective** To explore *in vivo* the role and molecular mechanism of small ubiquitin-like modifier (SUMO) specific protease 3 (SEN3) in regulating autophagy in mouse lung. **Methods** Immunofluorescence was performed to detect SEN3 localization in lung tissues. *SEN3*^{+/-} and *SEN3*^{+/+} mice were starved to induce autophagy. Immunoblotting was used to evaluate the overall autophagy level. Electron microscopy and immunofluorescence were used to detect autophagy, and to identify which type(s) of cells undergoing autophagy in mouse lung. Co-immunoprecipitation was used to detect the SUMOylation modification of autophagy-related molecule coiled-coil myosin-like Bcl-2-interacting protein 1 (BECN1). **Results** SEN3 was highly expressed in alveolar type II epithelial cells in lung tissues. After starvation, the mouse alveolar type II epithelial cells underwent autophagy, and *SEN3*^{+/-} mice was more pronounced than *SEN3*^{+/+} mice. SUMO2/3 modification of BECN1 in lung tissue samples was removed by SEN3. **Conclusion** SEN3 plays a role on regulating the degree of autophagy of mouse alveolar type II epithelial cells during starvation in fine-tuning manner.

[Key words] Small ubiquitin-like modifier specific protease 3; Autophagy; Alveolar type II epithelial cells; Mice