

分类号 R722.1

密级 公 开

UDC 601

编号 10299Z1613067

硕 士 学 位 论 文

SENP1 在肺发育过程中的作用及其对 AECII分化的影响

**SENP1 has an important role in lung development and
influences the differentiation of AECII**

作者姓名: 万雪晴

指导教师: 卢红艳

小组成员: 吕进泉

申请学位: 硕士学位

学科专业: 儿科学

论文提交日期: 2019年04月27日

论文答辩日期: 2019年05月28日

学位授予单位: 江苏大学

学位授予日期:

答辩委员会主席: 陈筱青

评阅人:

独创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已注明引用的内容以外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果，也不包含为获得江苏大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：万雪晴

2019年5月30日

学位论文版权使用授权书

江苏大学、中国科学技术信息研究所、国家图书馆、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社有权保留本人所送交学位论文的复印件和电子文档，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致，允许论文被查阅和借阅，同时授权中国科学技术信息研究所将本论文编入《中国学位论文全文数据库》并向社会提供查询，授权中国学术期刊（光盘版）电子杂志社将本论文编入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》并向社会提供查询。论文的公布（包括刊登）授权江苏大学研究生院办理。

本学位论文属于不保密 。

学位论文作者签名：万雪晴
2019年5月30日

指导教师签名：卢红艳
2019年5月30日

摘要

目的

通过检测 SUMO 特异性蛋白酶 1 (SUMO-specific proteases 1, SENP1)、小泛素样修饰蛋白 (small ubiquitin-related modifier-1, SUMO1) 在肺发育过程中的表达变化, 明确 SENP1、SUMO1 参与调控肺发育, 再进一步通过体外培养 II 型肺泡上皮细胞 (AECII), 研究 AECII 分化过程中 SENP1 表达变化, 和抑制 SENP1 对细胞生长及分化的影响, 来探讨 SENP1 在肺发育过程中的作用。

方法

实验分为两部分: 第一部分, 根据大鼠肺发育的不同阶段, 于生后 1 d、4 d、7 d、14 d 处死新生大鼠取肺组织, 通过 HE 染色法观察不同时期肺的形态结构变化, 用 RT-qPCR、Western blot 检测 SUMO1 和 SENP1 mRNA 及蛋白在肺发育不同时期的表达变化。第二部分, 体外培养 AECII 时, 通过加入维甲酸 (Retinoic acid, RA) 促进细胞分化, 并使用细胞免疫荧光法和 Western bolt 检测肺表面活性蛋白 C (Surfactant Protein C, SP-C)、水通道蛋白 5 (aquaporin, AQP5) 表达变化, 证明 RA 促分化的作用; 进一步在 RA 促进 AECII 分化的基础上, 通过 siRNA 转染法抑制 SENP1 表达, 检测 SP-C、AQP5 及 SUMO1 表达变化, 研究抑制 SENP1 对细胞分化的影响; 同时通过 CCK-8 和流式细胞术检测抑制 SENP1 对 AECII 增殖、凋亡的影响。

结果

(1) 生后 14 d 内, SUMO1 mRNA 稳定表达 ($P>0.05$), 生后 4 d 肺组织中游离 SUMO1 蛋白表达较生后 1 d 及 7 d 均明显升高 ($P<0.05$)。进一步检测不同状态 SUMO1 蛋白的表达发现, 生后 4 d、14 d, 肺组织 SUMO1 总蛋白表达无明显变化, 游离 SUMO1 表达减少, SUMO1 结合蛋白表达增加 ($P<0.05$)。而 SENP1 蛋白及 mRNA 表达变化与游离 SUMO1 变化趋势一致 ($P<0.05$)。

(2) 免疫荧光及 Western bolt 检测 RA 对 AECII 分化的影响。免疫荧光结果显示, 与同时间点对照组相比较, 均表现为 RA 组 SP-C 表达比例降低, AQP5 表达比例升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。Western bolt 结果示, 与对照组相比, 培养 24 h 和 72 h 时, RA 组 SP-C 蛋白表达减少, 48 h 时 SP-C 蛋白表达增多, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 各时间点与对照组相比, RA 组 AQP5 表达增多,

差异有统计学意义 ($P<0.05$)；各时间点 RA 组 SENPI 表达均较对照组增加，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

(3) 进一步在 RA 促分化的基础上抑制 SENPI 表达，与 RA+si-NS 组相比，SP-C 蛋白在培养 24 h 和 48 h 时表达增加，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；各时间点 RA+si-SENPI 组 AQP5 蛋白表达均较 RA+si-NS 组降低，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；培养 48 h 时检测抑制 SENPI 对蛋白 SUMO 化的影响，随着 SENPI 表达被抑制，SUMO1 结合蛋白(conjugated SUMO1)表达增多，游离 SUMO1 (free SUMO1)表达减少，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

(4) 利用 siRNA 转染抑制 SENPI，发现各时间点 si-SENPI 组细胞增殖水平均较 si-NS 组降低，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。各时间点 siRNA 抑制 SENPI 表达后，si-SENPI 组细胞凋亡率均较 si-NS 组升高，差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

结论

(1) SENPI 在大鼠肺发育的过程中动态表达，且与游离 SUMO1 表达趋势一致，说明 SENPI 可能通过影响蛋白 SUMO 化修饰参与肺发育。

(2) 体外培养 AECII 发现 SENPI 在细胞分化过程中表达增加，进一步验证抑制 SENPI 对细胞分化的影响，发现 SENPI 表达降低可使 AECII 分化受抑，同时 SUMO1 结合蛋白表达明显增多，表明 SENPI 可能通过调控蛋白 SUMO 化修饰影响 AECII 分化。

(3) SENPI 通过参与 AECII 分化、增殖、凋亡在肺发育过程中起作用。

关键词 肺发育，SUMO 化特异性蛋白酶，SUMO 化修饰，大鼠，II 型肺泡上皮细胞

Abstract

Objective

In order to investigate the function of SENP1, the expressive levels of SENP1 and SUMO1 are assessed during lung development process of rats. At the same time, AECII cells are transfected with SENP1-targeting small interfering RNA. And the proliferation, apoptosis and differentiated function of AECII cells was subsequently evaluated.

Methods

According to the histological stage of rats' lung development, neonatal rats were sacrificed at 1 d, 4 d, 7 d, 14 d. HE staining was used to observe the lung morphologic appearance. RT-qPCR was used to detect the mRNA expressions of SUMO1 and SENP1 at each time-point. Western bolt was used to detect the protein expression. In this work, AECII were cultured in vitro and Retinoic acid (RA) was used to promote differentiation. The differentiated efficiency of RA was examined by immunofluorescence and Western bolt. To investigate the suppressive impact of SENP1 on differentiation, cells were divided into two groups, one was transfected with a SENP1 siRNA as the experimental group and the other was transfected with NS siRNA with RA added as the control group. The suppressive influence of SENP1 with RA added was detected by RT-qPCR and western blot analysis. Protein and gene expressive levels of SP-C and AQP5 were measured to analyze the effects on differentiation. The protein expressive levels of the conjugated SUMO1 were also detected. At the same time, with SENP1 suppressed, CCK-8 was used to analyze cell proliferation and flow cytometry was used to analyze cell apoptosis.

Results

(1) The results of the RT- qPCR experiments indicated that SUMO1 mRNA was not significantly changed during lung development from P1 to P4 ($P>0.05$). Free SUMO1 was increased at day 4 compared with day 1, was visibly decreased at day 7 compared with day 4, and was expressed at a similar level until day 14 ($P<0.05$). At western blot analysis, free SUMO1 and bands of higher molecular mass

corresponding to SUMOylated proteins were detected. This test results indicate that naturally existing free SUMO1 at day 14 exhibited a sharp decrease compared with day 4 ($P<0.05$), while no significant change was observed in total IV SUMO1. The results demonstrated an increase in SENP1 mRNA at P4 compared with P1 ($P<0.05$), which was decreased at P7 and was maintained a steady level from P7 to P14. The protein levels of SENP1 exhibited a similar trend with gene expression during lung development.

(2) The expressions of SP-C and AQP5 were first measured by immunofluorescence. These results demonstrated that the decrease in SP-C was accompanied by an increase in AQP5. The expression levels of SP-C, AQP5 and SENP1 were then detected by using western blot analysis. The expression of SP-C was decreased at 24 h and 72 h following treatment with RA. However, it was increased at 48h, which may have been caused by cell proliferation. RA enhanced the expressions of AQP5 at 24 h, 48 h and 72 h compared with untreated cells. The expression of SENP1 in the RA group was increased compared with the control group at 24 h, 48 h and 72 h ($P<0.05$).

(3) Compared to the control group, the inhibition of SENP1 decreased the protein level of AQP5 expression at 24, 48 and 72 h. The protein expression of SP-C was increased at 24 and 48 h, but decreased at 72 h ($P<0.05$). The decrease of SP-C may have been caused by growth inhibition. The conjugated SUMO1 was increased by si-SENP1 and free SUMO1 was decreased ($P<0.05$).

(4) Cell proliferation was reduced in the si-SENP1 groups as compared with si-NS ($P<0.05$). And the percentage of cells apoptosis in si-SENP1 groups were higher compared with the si-NS group ($P<0.05$).

Conclusion

(1) SENP1 shows a dynamic expression pattern in lung development, which may indicates it participates in the progress by influencing the post-translational modifications SUMOlation.

(2) The experiments demonstrated that RA promoted the differentiation of AECII. Taken together, these results suggest that SENP1 may participate in the

differentiation of AECII. To further prove this result, we find that inhibition of SENP1 expression interferes with deSUMOylation and hinders the differentiation of AECII. SENP1 take part in the differentiation of AECII by impairs the expression of conjugated SUMO1.

(3) SENP1 is a key factor involved in normal lung development. It affects the proliferation and differentiation status of AECII cells.

Key words lung development, SUMO-specific proteases, SUMOylation, rat, Alveolar type II Epithelial Cell

目录

摘要.....	I
常用缩略词对照表.....	VIII
前言.....	1
研究背景.....	1
主要研究内容.....	2
技术路线图.....	3
第一部分 SUMO1、SENP1 在新生大鼠肺发育过程中的表达及其意义.....	4
1 实验动物和材料.....	4
1.1 实验动物.....	4
1.2 实验仪器.....	4
1.3 实验主要试剂.....	5
1.4 实验主要溶液成分及配制.....	5
2 实验方法.....	7
2.1 实验分组.....	7
2.2 标本采集与处理.....	7
2.3 肺组织形态观察.....	7
2.4 RT-qPCR 检测肺组织 SUMO1、SENP1 mRNA 表达.....	8
2.5 Western blot 检测肺组织 SUMO1、SENP1 蛋白表达.....	9
3 统计学分析.....	11
4 实验结果.....	11
4.1 肺组织形态观察.....	11
4.2 RT-qPCR 检测肺组织 SUMO1、SENP1 mRNA 表达.....	11
4.3 Western blot 检测肺组织各时间点 SUMO1、SENP1 蛋白表达.....	12
5 讨论.....	14
第二部分 抑制 SENP1 对 AECII 分化、增殖及凋亡的影响.....	16
1 实验材料.....	16
1.1 实验细胞.....	16
1.2 实验仪器.....	16

1.3 实验试剂及主要试剂配制.....	16
2 实验方法.....	16
2.1 AECII培养.....	16
2.2 AECII实验分组.....	18
2.3 免疫荧光检测 RA 促 AECII分化时 SP-C、AQP5 表达.....	18
2.4 Western bolt 检测 RA 促 AECII分化时 SP-C、AQP5、SENP1 蛋白表达.....	19
2.5 RT-qPCR 检测 si-RNA 转染 AECII抑制 SENP1 表达.....	19
2.6 Western blot 检测抑制 SENP1 对 AECII分化及蛋白 SUMO 化的影响....	20
2.7 RT-qPCR 检测抑制 SENP1 对 SP-C、AQP5 mRNA 表达的影响.....	20
2.8 CCK-8 检测抑制 SENP1 对 AECII增殖影响.....	21
2.9 流式细胞术检测抑制 SENP1 对 AECII凋亡的影响.....	21
3 统计学分析.....	21
4 实验结果.....	22
4.1 免疫荧光检测 RA 促 AECII分化时细胞 SP-C、AQP5 表达变化.....	22
4.2 Western bolt 检测 RA 促 AECII分化时 SP-C、AQP5、SENP1 蛋白表达.....	22
4.3 RT-qPCR 检测 siRNA 转染 AECII抑制 SENP1 mRNA 表达.....	23
4.4 Western blot 检测抑制 SENP1 对 AECII分化及蛋白 SUMO 化的影响....	23
4.5 RT-qPCR 检测抑制 SENP1 对 SP-C、AQP5 mRNA 表达的影响.....	25
4.6 抑制 SENP1 影响 AECII细胞增殖.....	25
4.7 抑制 SENP1 促进 AECII细胞凋亡.....	26
5 讨论.....	28
第三部分 结论.....	30
参考文献.....	31
综述.....	35
致谢.....	49
攻读学位期间发表文章.....	50

常用缩略词中英文对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
SENPI	SUMO specific proteases	SUMO 特异性蛋白酶
SUMO	small ubiquitin-related modifier	小泛素样修饰蛋白
AECII	Alveolar type II Epithelial Cell	II型肺泡上皮细胞
AECI	Alveolar type I Epithelial Cell	I型肺泡上皮细胞
SP-C	Surfactant Protein C	肺表面活性蛋白 C
AQP5	aquaporin	水通道蛋白 5
HE	hematoxylin-eosin	苏木素-伊红
RA	Retinoic acid	维甲酸
E1	SUMO-activating enzyme	SUMO 活化酶
E2	SUMO-conjugating enzyme	SUMO 结合酶
E3	SUMO-transporting enzyme	SUMO 连接酶
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor-1 α	缺氧诱导因子-1 α
BPD	Bronchopulmonary dysplasia	支气管肺发育不良
BCA	bicinchoninic acid	二辛丁酸法
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PVDF	polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺电泳
APS	Ammonium Persulfate	过硫酸胺
OD	Optical density	吸光密度
ROS	reactive oxygen species	活性氧簇
MEF	myocyte-specific enhancer factor	肌细胞特异性增强因子
AR	androgen receptor	雄性激素受体
CBX	polycomb chromobox	多核染色体
PIA	protein inhibitor of activated	活化蛋白抑制剂
WWOX	WW domain containing oxidoreductase	含 WW 结构域的氧化还原酶
ERK	extracellular signal-regulated kinase	细胞外信号调节激酶
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
NF	the nuclear factor	核因子
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase	环 GMP-AMP 合成酶
STING	stimulator of interferon genes	干扰素基因刺激剂
HSV	herpes simplex virus	单纯疱疹病毒

前言

研究背景

哺乳动物肺发育是一个高度保守、调控精细的过程，起源于前肠腹侧内胚层。首先形成肺原基，生长出的上皮组织经过反复分支，逐渐形成各级气管，直至形成肺泡，并伴随着细胞分化为不同类型和细胞增殖逐渐减少^[1]。肺泡作为气体交换的基本单位，形成于肺发育晚期^[2]。肺泡上皮细胞分为I型肺泡上皮细胞(AECI)和II型肺泡上皮细胞(AECII)两种类型，其中，AECII作为肺泡上皮干细胞，在肺发育及肺的损伤修复过程中可向AECI转化^[3-5]。肺发育的这一时期，需要高度协调的调节作用，肺泡化过程中任何轻微发育紊乱均可导致肺发育不良或肺部疾病^[6]。

小泛素样修饰蛋白(small ubiquitin-related modifier-1, SUMO1)是一种重要的蛋白质翻译后修饰，参与了生物正常的生长发育和细胞生长等多个生理过程^[7]。在哺乳动物体内，主要有SUMO1、SUMO2、SUMO3这几个亚型。SUMO2、SUMO3常因为序列的高度同源性写作SUMO2/3。生理状态下SUMO1通常以蛋白结合的形式存在体内^[8]，而SUMO2/3常以游离形式存在，但在应急状态时可与目的蛋白快速结合，完成蛋白SUMO化^[9]。蛋白SUMO化修饰是一动态可逆过程，SUMO分子首先通过活化(E1)、结合(E2/Ubc9)、连接(E3)等步骤与目的蛋白相结合，蛋白去SUMO化过程则由SENPs调控。作为SUMO特异性蛋白酶，SENPs除了去SUMO化作用，还可催化SUMO前体成熟，促进蛋白SUMO化修饰。因此，SENPs对SUMO化循环的维持至关重要。在人和老鼠体内，目前发现的SENPs亚型包括SEN1-8。其中关于SEN1的研究最多，SEN1通过参与包括转录调控、细胞增殖和分化、生长发育在内的多个生理过程，在生物正常生长发育过程中发挥重要作用^[10-12]。目前研究表明，无论蛋白SUMO化或去SUMO化过程的异常均可导致胚胎期致死、染色体缺陷、细胞核形态异常和各种疾病的发生^[13, 14]。例如，Ubc9基因缺失的小鼠在胚胎早期即死亡^[15]，而SEN1基因突变的小鼠检测到SUMO1结合蛋白明显升高，并在胚胎期发现胎盘表型缺陷^[16]。这两个研究均进一步证明SEN1和SUMO1对正常生长发育必不可少。

在呼吸系统，已有研究表明，CCAAT增强子结合蛋白(the

CCAAT/enhancer-binding protein α , C/EBP α) 可能通过参与肺表面活性剂的合成调节肺发育成熟过程, 而 SUMO1 修饰的 C/EBP α 可能对肺发育起调控作用^[17]。此外在缺氧性肺动脉高压的发展过程中, SENP1 可增强肺动脉平滑肌细胞增殖能力^[18], SUMO1 通过参与 HIF-1 α 的 SUMO 化在这一疾病发生发展过程中起作用^[19]。在肺内皮细胞, 缺氧通过 SENP1 和精氨酸转录调节酶 2 来诱导 Kruppel 样因子 15 的 SUMO1 修饰, 从而促进肺损伤^[20]。同时 SENP1 可能参与肺癌形成, 研究表明在肺癌组织中 SENP1 表达增加, 也能通过对 SENP1 表达的调节来影响肺癌细胞的增殖^[21]。

但是目前关于 SENP1 在正常肺发育过程中是否起作用知之甚少。本研究通过检测肺发育过程中 SENP1 和 SUMO1 表达变化, 证明 SENP1 参与肺发育。进一步进行体外实验, 在 RA 促进 AECII 分化基础上, siRNA 转染 AECII, 使细胞 SENP1 基因表达受抑, 再检测 SP-C、AQP5、SUMO1 和 SENP1 等相关蛋白的表达, 及抑制 SENP1 对 AECII 增殖和凋亡的影响, 来探讨 SENP1 在肺发育过程中的作用, 为深入研究肺发育的调控机制提供理论支持。

主要研究内容

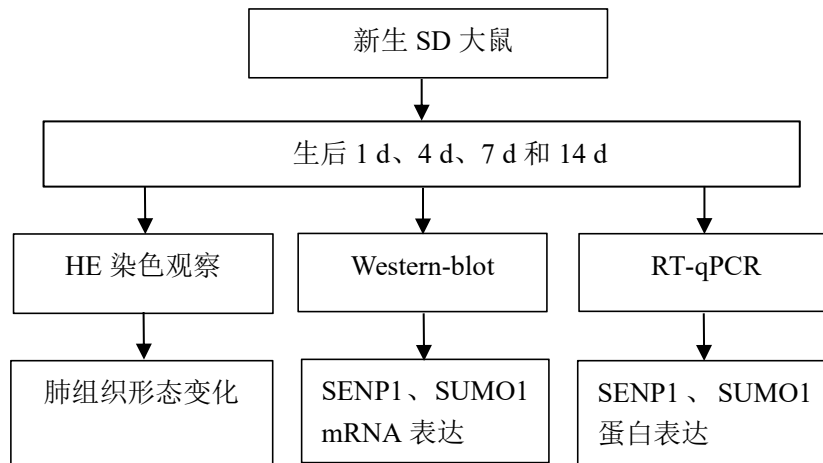
(1) 取生后 1 d、4 d、7 d、14 d 大鼠肺组织, 提取总蛋白和 mRNA, 用于检测肺发育过程中, SENP1 和 SUMO1 表达变化。

(2) 通过 RA 促进 AECII 分化, 培养 24 h、48 h、72 h 后, 运用免疫荧光和 Western blot 分别检测 SP-C、AQP5、SUMO1 和 SENP1 在细胞分化过程中的变化, 探究 SENP1 是否参与 AECII 的分化。

(3) siRNA 转染 AECII, 在 RA 促分化的基础上, 通过 Western blot 检测 SP-C、AQP5 等相关蛋白表达变化, 研究抑制 SENP1 对细胞分化的影响; 同时采用 CCK-8 试剂盒检测抑制 SENP1 对 AECII 增殖的影响, Annexin V/PI 流式细胞术检测抑制 SENP1 对 AECII 凋亡的影响。

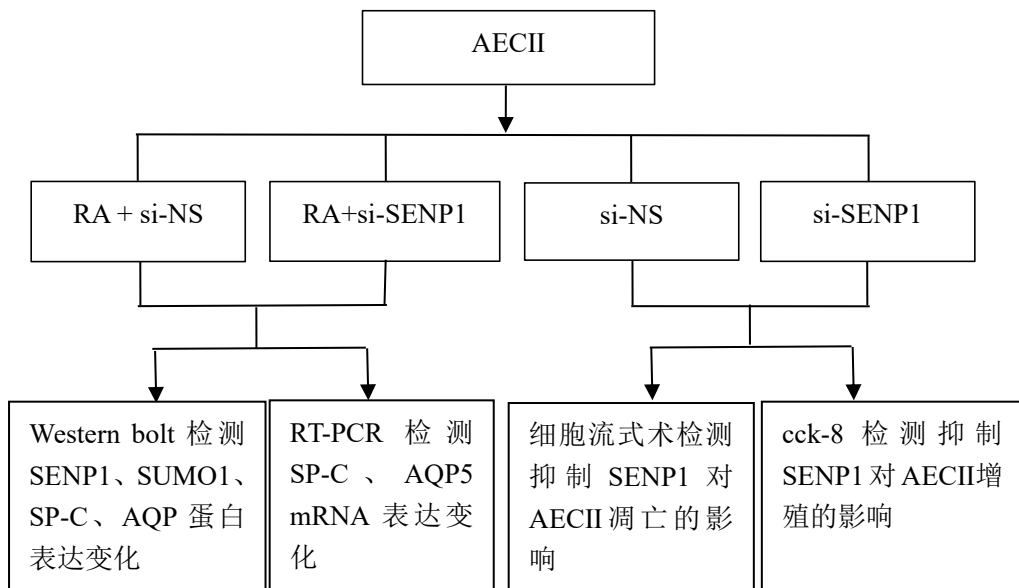
技术路线图

第一部分：



SENP1 及 SUMO1 在大鼠肺发育过程中的动态表达及意义

第二部分：



抑制 SENP1 对 AECII 分化、增殖及凋亡的影响

第一部分 SUMO1、SENK1 在新生大鼠肺发育过程中的表达及其意义

1 实验动物和材料

1.1 实验动物

32 只清洁级、SPF 级健康新生 SD (Sprague-Dawley) 大鼠，体重 6.2 ± 0.3 g，实验大鼠均由江苏大学动物实验中心提供，实验方案已通过江苏大学医学院实验动物伦理审查。许可证号：SYXK（苏）2013-0036。

1.2 实验仪器

仪器名称	购买公司
手术刀、止血钳、手术剪等手术器械	江苏志威医疗器械公司
超纯水分离器	青岛 FLOM 公司
电子分析天平	中国 Sartorius 公司
光学显微镜	日本 Olympus 公司
组织脱水机	Leica 公司
病理包埋机	常州派斯杰公司
石蜡切片机	Leica 公司
脱色摇床	金坛医疗仪器厂
高压灭菌锅	山东博科科学仪器公司
制冰机	常熟雪科电器公司
高速冷冻离心机	德国 Eppendorf 公司
漩涡振荡器	金坛医疗仪器厂
低温冰箱（-20℃）	中国海尔集团有限公司
凝胶成像及分析系统	美国 Gene 公司
低速离心机	中国白洋医疗器械公司
蛋白电泳转移装置	美国 Bio-Rad 公司
多功能酶标仪	美国 Bioteck 公司
各型号移液枪	德国 Eppendorf 公司
核酸浓度测定仪	美国 Bio-Rad 公司
实时定量 PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
低温冰箱（-80℃）	日本 Panasonic 公司
紫外分光光度计	德国 Beckman 公司

1.3 实验主要试剂

试剂名称	购买公司
苏木素、伊红	碧云天生物技术（上海）公司
BCA 蛋白定量试剂盒	碧云天生物技术（上海）公司
RIPA 裂解液	北京康为世纪公司
NP40 裂解液	碧云天生物技术（上海）公司
PMSF 溶液	碧云天生物技术（上海）公司
蛋白酶抑制剂	生工生物工程（上海）股份有限
5×loading buffer	北京康为世纪公司
8%~16%梯度胶	南京金斯瑞生物科技有限公司
MOPS 电泳缓冲液	南京金斯瑞生物科技有限公司
SDS-PAGE 凝胶配胶试剂盒	北京康为世纪公司
APS	碧云天生物技术（上海）公司
电泳用 Marker	美国 Thermo 公司
一抗稀释液	上海碧云天生物技术公司
SENP1 多克隆抗体	美国 Sigma 公司
SUMO1 多克隆抗体	美国 CST 公司
鼠来源β-actin 单克隆抗体	美国 CST 公司
HRP 标记的山羊抗兔 IgG	康为世纪生物科技有限公司
HRP 标记的山羊抗鼠 IgG	南京福麦斯生物公司
胎牛血清（FBS）	Multicell 公司
Trizol 试剂	美国英杰生命技术有限公司
SYBR Premix Ex Taq	宝生物工程有限公司
逆转录试剂盒	宝日医生物技术有限公司

1.4 实验主要溶液成分及配制

PBS 缓冲液配制：取容量 1 L 的烧杯，倒入 800 ml 双蒸水，再称取 8.00 g 氯化钠，0.20 g 氯化钾，3.58 g 十二水磷酸氢化钠，0.27 g 磷酸氢化钾依次加入烧杯中，室温下磁力搅拌，至烧杯内溶质完全溶解且无肉眼可见颗粒后，倒入量筒内，加适量双蒸水至液面最低处与 1000 ml 刻度处齐平，定容为 1 L，封住量筒口后上下颠倒混合均匀，并分装入玻璃瓶，高压蒸汽消毒处理后放冰箱 4℃保存备用。

4%多聚甲醛配制：称取 4.00 g 多聚甲醛固体，倒入容量 100 ml 的小烧杯中，

倒入 PBS 缓冲液至 90 ml 后，置于可加热的搅拌器上，设定温度为 60°C，边加热边搅拌，并缓慢滴加 1.0 mol/L 的氢氧化钠溶液，直到溶液变澄清溶质完全溶解后，倒入 100 ml 的量筒中，再慢慢加入 PBS 缓冲液，至快到 100 ml 时改用滴管慢慢滴加，小心定容至 100 ml，混匀后放入 4°C 冰箱保存，以备使用。

10% APS 液配制：将 -20°C 保存的 APS 粉末取出，分析天平上称取 0.50 g，加入准备好的盛有 5 ml 双蒸水的试管中，置于振荡器上充分震荡使 APS 完全溶解并混匀后，放入冰箱 -20°C 保存，并定期更换，每次使用时间不要超过两周。

5×电泳液配制：准备好装有 800 ml 双蒸水的烧杯，分别称量 94.00 g 甘氨酸、15.15 g Tris 碱和 5.00 g SDS，倒入双蒸水中，置于磁力搅拌器上，室温下充分搅拌至溶质完全溶解，且无肉眼可见颗粒后，倒入量筒中，加适量双蒸水定容至液面与 1000 ml 刻度处齐平，上下颠倒混匀后放入 4°C 冰箱保存备用。使用时需稀释五倍，变成 1×电泳液。**1×电泳液配制方法：**1 L 量筒中倒入 200 ml 如前配置好的 5×电泳液，再加入 800 ml 双蒸水至 1000 ml（即 5×电泳液和双蒸水量取体积 1:4），封口后上下颠倒混匀，即可得蛋白电泳所需的 1×电泳液。

10×转膜液配制：准备好装有 800 mL 双蒸水的烧杯，将称取好的 30.28 g 甘氨酸和 144.00 g Tris 碱依次倒入，室温下充分搅拌，直至溶液变澄清溶质完全溶解后，倒入量筒中定容至 1 L，保存于 4°C 冰箱中备用。使用时配置成 1×转膜液：取上述配置好的 10×转膜液 100 mL，加入甲醇溶液 200 ml，再加双蒸水定容至 1 L 后混匀，所得即为 1×转膜液。

10×TBS 溶液配制：准备装有 800 mL 双蒸水的烧杯，称取 80.00 g 氯化钠、30.00 g Tris 碱和 2.00 g 氯化钾依次倒入，室温下搅拌至完全溶解，溶液变澄清且无肉眼可见颗粒后，插入酸碱测定仪，慢慢滴加氯化氢溶液，边滴加边搅拌，使 PH 调至 7.4 后，倒入量筒中，加适量双蒸水定容至 1 L，放置于 4°C 冰箱内保存备用。

1×TBST 溶液配制：用 1 L 量筒量取上述配制好的 10×TBS 100 ml，再加入 900 ml 双蒸水（即 10×TBS 溶液与双蒸水体积比为 1:9），用剪口的枪头吸取 1 ml Tween20 加入量筒内，注意多次吹打使黏附于枪头壁上的 Tween20 完全进入，混匀后置于 4°C 冰箱保存，以备需要时使用。

封闭液配制：根据需要量用电子分析天平称取脱脂奶粉(g)，倒入装有 TBST

溶液(ml)的试管中, 比列为 1:20, 置于摇床上至奶粉充分溶解, 使其配制成浓度为 5%脱脂奶粉, 即可后续用于 Western bolt 封闭。

2 实验方法

2.1 实验分组

实验动物及分组: 取 SPF 级清洁级新生 SD 大鼠 32 只, 体重 6.2 ± 0.3 g, 随机分为 4 组, 分别为生后 1 d、4 d、7 d、14 d 组, 每组 8 只, 与 1 只代母鼠同笼饲养。饲养条件为温度 21-25°C, 相对湿度维持在 45%-55%, 昼夜规律照明, 母鼠给予足够饲料和饮水。

2.2 标本采集与处理

各组分别于生后 1 d、4 d、7 d、14 d, 腹腔注射 10%水合氯醛 ($2\sim 3$ ml/kg) 麻醉后用脱颈法处死, 并将四肢和头于解剖台上固定好, 用经高压消毒过的手术剪打开胸腔, 暴露肺部直到上端气管处, 用无齿镊小心分离气管周围肌肉及筋膜, 然后通过注射器将 4°C预冷的 PBS 经颈部气管注入, 多次灌洗肺组织, 至两肺清洗干净, 冲洗出的 PBS 无明显血色, 且两肺呈苍白色后, 轻轻用镊子小心离断固定气管及肺隔的韧带, 然后将心、肺、气管等组组织一同取出置于 4°C PBS 中, 小心分离出肺组织, 去除多余筋膜, 并用 PBS 反复冲洗。每只新生鼠将左肺上叶完整取出, 放入 4%多聚甲醛中固定, 4°C冰箱内过夜后 (约 12 h) 石蜡包埋, 常规制备 3 μ m 肺组织切片 (组织的包埋、切片等过程委托江苏大学附属医院病理科完成), HE 染色后用于肺组织形态的观察。左下肺和右肺叶置于干净的 1.5 ml EP 管中, 放入 -80°C冰箱保存, 需要时用于后续 Western blot 和 RT-qPCR 等实验。

2.3 肺组织形态观察

每组肺组织切片 (每组随机抽取 3 片) 标本按以下步骤进行 HE 染色:

- (1) 制备好的组织切片, 在烘干机内烘干后, 依次放入三份二甲苯中, 每次脱蜡 5 min (注意将切片上的组织完全浸入);
- (2) 脱蜡后的切片, 再依次放入准备好的梯度酒精中, 酒精溶度依次为 100%、100%、95%、95%、80%, 每个酒精瓶中浸泡 1 min, 使组织完成至水;
- (3) 用 PBS 溶液冲洗 5 min \times 2 次后, 放入准备好的苏木素染液中, 定时浸润 3 min, 着色后置于流水下冲洗 5 min 去除多余的染液;

- (4) 为使胞核、胞质中过多染料被脱去，放入盐酸酒精中约 2 s 后，置于自来水下冲洗 2 min，最后放入约 50°C 水中 5 min 使细胞核变蓝。
- (5) 将准备好的伊红染液滴于肺组织上，约 2 min 后放于自来水下冲洗 5 min，以防过染；
- (6) 依次经 85%、95%、100% 的梯度酒精各 5 min 使组织脱水，再经二甲苯两瓶（各 5 min）使切片透明；
- (7) 擦去已透明好的切片周围多余的二甲苯，迅速将中性树胶滴于肺组织上，用于封片，待树胶凝固后可置于镜下观察并拍照，或暂将切片放入 4°C 冰箱保存，以防树胶融化；
- (8) 显微镜下设定不同倍数进行多次拍照并保存，蓝色为细胞核，红色为纤维组织和胞浆。

2.4 RT-qPCR 检测肺组织 SUMO1、SENPI mRNA 表达

组织总 RNA 提取：

- (1) 称取肺组织 100 mg 置于经高压蒸汽灭菌的研钵中，移液枪吸取 1 ml Trizol 打入研钵中，然后倒入液氮使 Trizol 冻结后用研棒充分研磨，使组织碎裂，直至变成细小沙状颗粒后，室温下静置直至固态液氮完全融解；
- (2) 将研钵中的液体用移液枪吸尽，加入经消毒过的无 RNA 酶的 EP 管中，并于冰上静置 2 min，使核蛋白复合体彻底分离；
- (3) 在上述 EP 管中加入 0.2 ml 氯仿（氯仿/Trizol 1:5），盖好盖后手中上下剧烈摇晃约 15 s，使氯仿与 Trizol 完全混合，冰上静置 2 min，随后放入温度已降至 4°C 的离心机中，设置转速为 12000 rpm/min 离心 15 min，取出后可见管内液体分为三层，上层为无色水相，中间层为蛋白，下层为 DNA，需提取的 RNA 存在于上层无色水相中；
- (4) 用移液枪将分离出的上层水相转至新的 EP 管中，根据吸出的液体量加入等体积的异丙醇，为防止 RNA 断裂混匀时轻轻上下颠倒，然后放入 -20°C 冰箱内静置 20 min，再次放入设定温度达 4°C 的离心机中，以 12000 rpm/min 转速离心 10 min，可见白色沉淀附着于管底的一侧，即为 RNA；
- (5) 弃掉上述离心后的上清液，将 0.75 ml 75% 乙醇和 0.25 ml DEPC 水混合物（比例 3:1）加入 EP 管中，用移液枪轻轻吹打，洗涤白色 RNA 沉淀，再放

- 入 4°C 离心机，7500 rpm/min 转速下离心 5 min；
- (6) 离心后，尽可能吸弃离心管内液体，将洗涤后的 RNA 沉淀至于超净台内，干燥沉淀，再加入适量 DEPC 水（约 50-150 μ l）重悬 RNA 沉淀，反复轻轻吹打混匀；
- (7) 将所得 RNA 样本，置于紫外分光光度计中，按操作说明书测量样本 RNA 浓度和纯度，为避免反复冻存导致 RNA 溶度降低，检测合格后用 200 μ l 的小 EP 管分装，并放入 -80 °C 冰箱保存备用，每次取用前均需重新测量 RNA 浓度和纯度。
- (8) 提取好的 RNA 用于后续实验，按照逆转录试剂盒说明书步骤进行操作，经去除基因组 DNA、逆转录反应等步骤，将 RNA 逆转录为 cDNA，并以此 cDNA 为模板，根据扩增反应实验步骤依次加入试剂，放入扩增仪进行反应，反应条件设定为：95°C 变性 30 s，95°C 5 s，60°C 30 s，共 40 个循环。相关引物序列如下：

基因	引物序列
SUMO1	上游：5'-AAGTTATTGGACAGGACAGCA-3'
	下游：5'-CATTCCCAGTTCTTTTGGAG-3'
SENP1	上游：5'-CGCCAGATTGAAGAGCAGA-3'
	下游：5'-AGAGGAACACGAAGGTGGAG-3'
β -actin	上游：5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3'
	下游：5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAAA-3'

2.5 Western blot 检测肺组织 SUMO1、SENP1 蛋白表达

- (1) 样本肺组织准备：将组织标本从 -80°C 冰箱内取出，置于冰上解冻后，放入冰箱内预冷至 4°C 的 PBS 中小心清洗干净，每组样本称取肺组织 20 mg，用经高压蒸汽消毒的手术剪尽量剪成最小的组织碎块，放入置于冰上的匀浆器内备用；
- (2) 蛋白裂解液制备及组织总蛋白提取：组织中的 SUMO1 总蛋白（total SUMO1）以游离 SUMO1（free SUMO1）和 SUMO1 结合蛋白（conjugated SUMO1）两种形式存在。Sharma 等人研究证明^[22]，4% SDS 可使 SENPs 变性失活，保持提取物中 SUMO1 不与其修饰的蛋白分离，肺组织中游离 SUMO1 和 SUMO1 结合蛋白均可被检测；1% NP40 不能使 SENPs 失活，提取物中 SUMO1 与其修饰的蛋白因 SENP1 的 SUMO 化作用完全分离，检测到的肺组织中 free SUMO1 即为组织 SUMO1 总蛋白表达量。分别用制备

好的加有蛋白酶抑制剂及 PMSF 的 4% SDS 和 1% NP40 组织裂解液，提取各组中肺组织总蛋白，用 Western bolt 方法检测肺组织中游离 SUMO1、SUMO1 结合蛋白和 SUMO1 总蛋白的表达变化；同时制备加有蛋白酶抑制剂和 PMSF 的 RAPI 裂解液提取各组肺组织中的总蛋白，用于检测样本中 SENPI 蛋白表达变化。充分匀浆至不见组织碎块后，移入 EP 管中，放入预先设置好温度的 4°C 离心机，以 12000 g 离心 15 min 使不能溶解的组织纤维等物质沉淀，留取上清移入新的 EP 管内。适量上清液取出用于蛋白浓度测定，按照 BCA 试剂盒的说明书上的步骤进行操作。剩余的上清液则按 4:1 的比例加入 5×Loading Buffer 上样缓冲液，100°C 沸水中煮 8 min，然后置于冰上冷却后放入 -20°C 冰箱待需要时取用；

(3) BCA 试剂盒测定蛋白浓度：严格按照试剂盒说明书步骤，用 PBS 稀释 BSA 制备 BSA 标准品；然后按照说明书，将试剂盒内 BCA 的 A 液和 B 液按比例 50:1 混合均匀，并根据样本量计算所需的 BCA 工作液；将制备好的 BSA 标准品与提取的样品蛋白上清液各 25 μl 加入 96 孔板内，加样过程中需小心，注意避免气泡的产生，并且每个样品同时设定 3 个副孔；再在每孔内加入配制好的 BCA 工作液 200 μl，操作过程中注意避光，移液器轻轻吹打混匀后，放入 37 °C 温箱内孵育 30 min，取出使温度降至室温，再放入酶标仪内，设置在波长 540 nm 的条件下检测，根据 OD 值和绘制的标准曲线计算蛋白浓度；

(4) 蛋白分离电泳：冰箱内取出的蛋白样本放置冰上溶解，振荡器上充分震荡后快速离心，准备好电泳槽，双蒸水冲洗干净，用于蛋白分离，将分离胶安装好，检测无漏液后电泳槽内倒满 1×电泳缓冲液，按每个泳道内依次加入各组样品蛋白 10 μl，并在一侧加入 4 μl Marker 用于标记分子量，调定好电压后进行电泳，直至 Marker 标记条带充分分离；

(5) 转膜：根据需检测的目的蛋白剪取合适数量大小的 PVDF 膜放入甲醛中激活，将电泳完成后的胶体取出，根据 Marker 标记的分子量，切除周围多余部分，从下往上依次摆好负电极板、多孔垫片、滤纸、切好的胶块、剪好的 PVDF 膜、多孔垫片、滤纸，最后覆盖上正电极板，放置每层后注意及时用玻璃棒挤压，排出各夹层间的气泡，以防影响蛋白转移至膜上，PVDF

膜在胶上放置的位置根据目标蛋白分子量及蛋白 Marker 标记值决定,放置好后小心合上转膜夹,对好正负极后扣紧,注意不要滑动 PVDF 膜与胶块的位置,放入电泳槽,夹板两侧各放一袋生物冰袋,将转膜液加满电泳槽内,放于 4°C 冰箱内,以防转膜过程中温度太高影响蛋白质性质,设定使用 350 mA 恒定电流转膜 1.5-2 h;

- (6) 封闭: 转膜结束后,将转有 Marker 和目标蛋白的 PVDF 膜取出,浸入配好的 5% 封闭液中,放入预热至 37°C 摇床上,低速摇晃 2 h 以封闭完全。
- (7) 抗体孵育: 封闭好的 PVDF 膜放入倒有 TBST 溶液的清洗盒中,常温下摇床上 5 min 洗 3 次,洗去多余的封闭液,加入用一抗稀释液配置好的 SUMO1 (1:1000)、SENP1 (1:1000) 抗体,放入 4°C 冰箱,摇床上低速孵育 12 h 后,放入 TBST 溶液 15 min/次洗三次,再将膜放入相应二抗 (1:5000) 中,37°C 摇床内孵育 1 h,于 TBST 溶液中 15 min/次洗三次;
- (8) 蛋白显影和成像分析: 孵育好抗体的 PVDF 膜, TBST 中清洗后,置于滤纸上吸除多余的洗液,放入凝胶成像分析仪内,将配制好的曝光液适量均匀涂抹于 PVDF 膜上,暗室内曝光并获取图像,使用 LANE-ID Analyzer 软件分析图片,获取蛋白质半定量测定数据,以 β -actin 为内参,计算出各目的蛋白的相对表达量。

3 统计学方法

分析使用 SPSS 17.0 软件,计量资料用均值 \pm 标准差表示。多组间的样本均数比较采用单因素方差分析,两组间样本均数比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

4 实验结果

4.1 肺组织形态观察

HE 染色检测肺组织形态: 生后 1 d, 可见结构不规则的原始肺泡; 生后 4 d, 肺泡分隔增多, 数量增加, 嵴突开始向肺泡腔内生长; 生后 7 d, 肺泡逐渐成熟, 间隔变薄, 大小渐均匀; 生后 14 d, 所见肺泡大小均一, 肺泡间隔菲薄, 成熟肺泡为肺组织结构基本单位。见图 1.1。

4.2 RT-qPCR 检测肺组织 SUMO1、SENP1 mRNA 表达

PCR 检测肺组织 SUMO1、SENP1 mRNA 表达: 以 1 d 为对照组, 生后 1 d、

4 d、7 d、14 d 大鼠肺组织 SUMO1 mRNA 相对表达量分别为 1、 0.88 ± 0.26 、 1.16 ± 0.55 、 1.07 ± 0.40 ，差异无统计学意义($P > 0.05$)。生后 14 d 内大鼠肺组织 SENP1 mRNA 表达先升后降，4 d 较 1 d 表达升高并达最高水平，7 d 较 4 d 表达明显降低，其生后 1 d、4 d、7 d、14 d mRNA 相对表达值分别为 1、 2.36 ± 0.46 、 0.73 ± 0.15 、 0.68 ± 0.10 ，差异有统计学意义($P < 0.05$)；7 d、14 d 维持在一稳定水平，差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1.2。

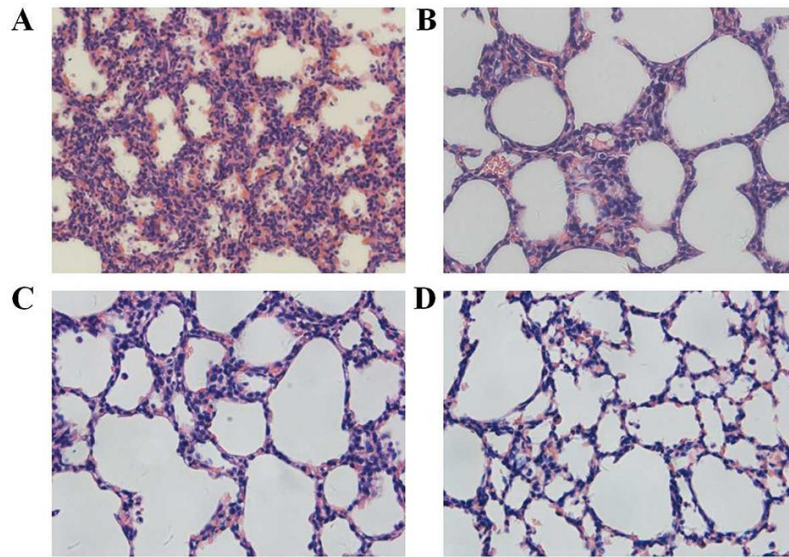


图 1.1 HE 染色观察肺发育不同时期形态变化 ($\times 400$)

A: 生后 1 d B: 生后 4 d C: 生后 7 d D: 生后 14 d

Figure 1.1 Histology of transverse sections of isolated lungs from several stages of development. (HE, $\times 400$)

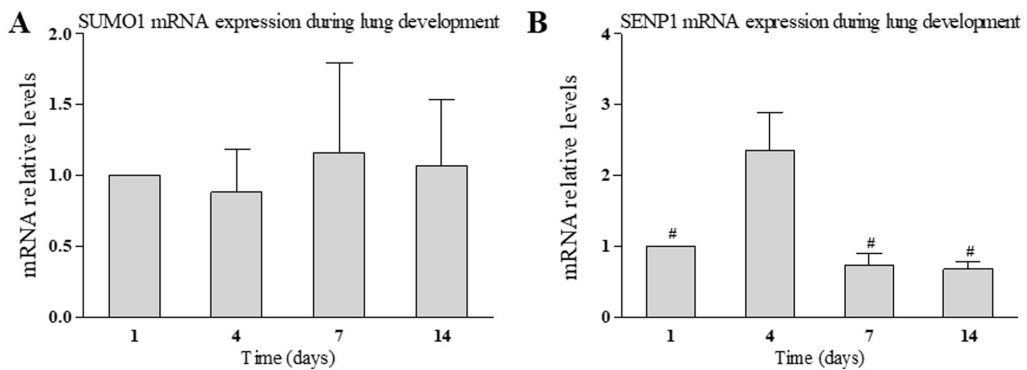


图 1.2 各组肺组织 SUMO1、SENP1 mRNA 表达变化

Fig1.2 Expression level of SUMO1 and SENP1 mRNA during lung development

注: # $P < 0.05$ vs 4 d.

4.3 Western blot 检测肺组织各时间点 SUMO1、SENP1 蛋白表达

肺发育 14 d 与 4 d 相比，游离 SUMO1 表达明显减少，SUMO1 结合蛋白表达明显增多，差异有统计学意义($P < 0.05$)，SUMO1 总蛋白表达无明显变化，差

异无统计学意义($P>0.05$)。产后 4 d 游离 SUMO1 表达明显高于 1 d、7 d, 差异有统计学意义($P<0.05$), 并于 7 d、14 d 维持在一稳定水平, 差异无统计学意义($P>0.05$)。SENPI 蛋白表达趋势与游离 SUMO1 一致。见图 1.3、1.4。

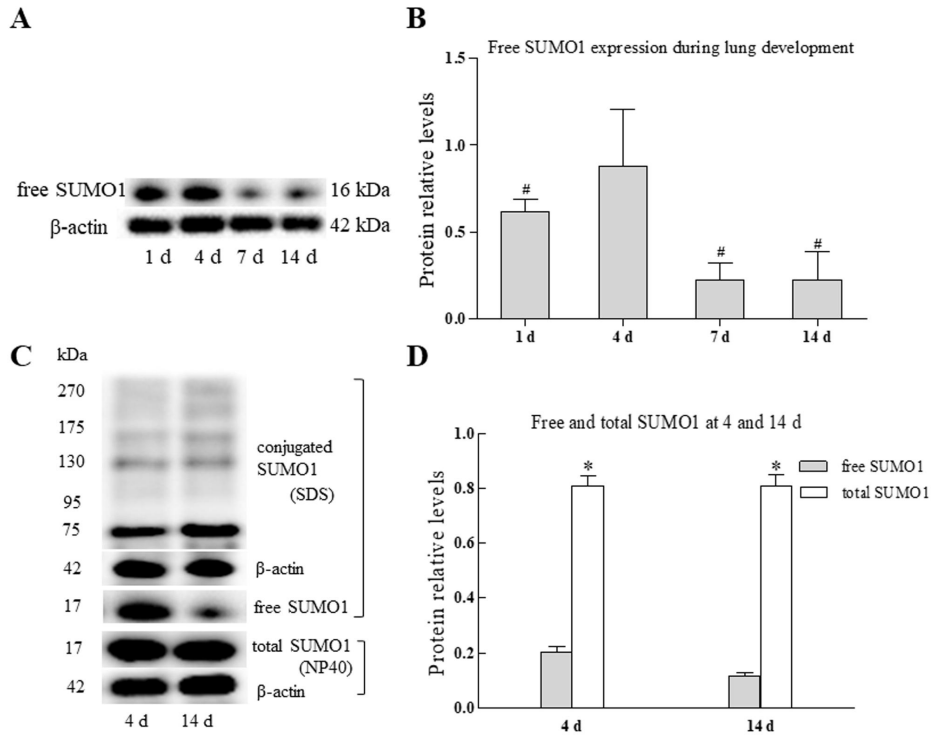


图 1.3 A、B:各组大鼠肺组织中游离 SUMO1 蛋白表达变化 C、D:产后 4 d、14 d 肺组织 SUMO1 蛋白表达变化

Fig1.3 A、B:The protein expression levels of the naturally existing free SUMO1 in lung tissue. C、D:The protein expression levels of SUMO1 in lung tissue.

注: free SUMO1:游离 SUMO1; conjugated SUMO1:结合 SUMO1; total SUMO1:SUMO1 总蛋白; # $P<0.05$ vs 4 d; * $P<0.05$ vs free SUMO1。

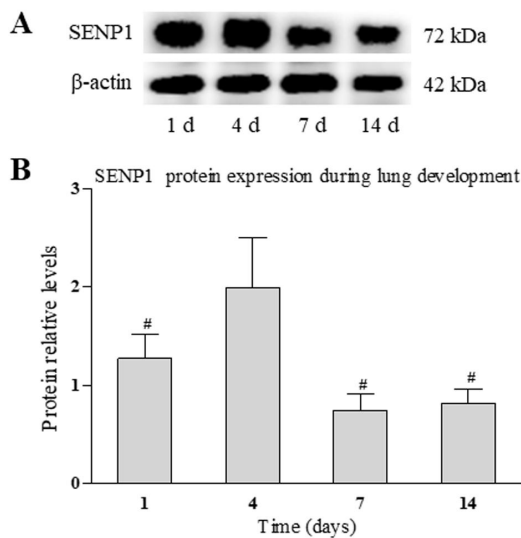


图 1.4 A:各组大鼠肺组织中 SENPI 蛋白表达变化

Fig1.4 A:The protein expression levels of SENPI in lung tissue.

注: # $P<0.05$ vs 4 d。

5 讨论

与人肺发育过程相似，大鼠肺发育分期也可划分为胚胎期、假腺体期、小管期、囊泡期、肺泡期。生后 1-4 d 大鼠处于肺发育的囊泡期，4-14 d 处于肺泡期，与此相对应的胎儿肺孕 36 周左右时也处于这一时期^[23]。因此，我们取生后 14 天以内的新生大鼠的肺组织来检测 SUMO1、SENPI 表达变化，并探究其与肺发育的关系。

SENPIs 介导蛋白去 SUMO 化，与 SUMO 化一起维持蛋白 SUMO 化与去 SUMO 化动态平衡，SUMO 化循环维持对正常生长发育必不可少。Juarez 等发现，多能干细胞可向神经细胞分化，这一过程中，游离 SUMO1 表达增多的同时，SUMO1 结合蛋白表达减少，但 SUMO1 总蛋白表达量保存不变，进一步使 SUMO1 过表达发现，SUMO1 表达增多可抑制这一分化过程，结果表明蛋白 SUMO1 修饰的动态平衡对促进这一细胞的分化必不可少^[24]。支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是一种严重呼吸系统疾病，多见于早产儿，与正常新生儿相比较，BPD 患儿外周血中，检测其单核细胞 SUMO1 蛋白，发现其中游离 SUMO1 表达增多，而去乙酰化酶 (SIRT1) 及 SUMO 化 SIRT1 表达明显减少，表明 SIRT1 SUMO 化程度的改变与 BPD 发生有关^[25]。关于蛋白 SUMO 化修饰在正常肺发育中变化，以及是否存在动态平衡目前尚无研究。本研究检测生后 14 d 内大鼠肺组织中 SENPI 和 SUMO1 表达变化，结果发现，肺发育过程中游离 SUMO1 表达动态变化，而 SUMO1 mRNA 表达维持的一定范围内，无明显差异。为进一步解释这一现象，生后 4 d 和 14 d 作为游离 SUMO1 表达差异最明显的两个时间点，被选用来研究肺发育不同时间点，SUMO1 蛋白在肺内的存在形式，分别用 SDS 和 NP40 提取肺组织总蛋白，Western blot 结果显示，与 4 d 相比，14 d 时游离 SUMO1 表达减少，SUMO1 结合蛋白表达增加，而 SUMO1 总蛋白表达无明显变化。表明在正常大鼠生后 14 d 内的肺发育过程中，SUMO1 总蛋白表达稳定，游离 SUMO1 的表达与蛋白 SUMO 化程度相关联，蛋白 SUMO1 修饰化与去 SUMO1 化修饰在一动态平衡水平内维持。

过往研究认为，SENPI 在使蛋白去 SUMO 化修饰时对 SUMO 所有亚型均可起作用。最近 Sharma 等研究发现，SENPI 去 SUMO 化作用对 SUMO1 修饰效果最明显，但对 SUMO2/3 亚型的蛋白去修饰作用十分有限^[22]。Yuasa 等人，首先

使 Ca Ski 细胞内的 SUMO 蛋白表达增多，再使细胞中的 SUMO1 蛋白被 GFP 标记上荧光，同时将 SENP1 的结构催化域加入培养液中，发现催化域的加入可使被 GFP 标记的 SUMO1 明显减少，通过对荧光标记的蛋白去 SUMO 化，明确了 SENP1 去蛋白 SUMO1 修饰作用^[26]。关于 SENP1 在肺发育过程中是否起作用以及表达如何变化，尚无研究。我们继续检测 SENP1 在肺发育过程中的表达变化，研究发现，生后 14 d 内大鼠肺组织中，经过数据统计分析发现，SENP1 蛋白及 mRNA 变化趋势与游离 SUMO1 蛋白变化趋势相同，生后 4 d 时达表达高峰，生后 7-14 d 表达趋于稳定。结合肺组织形态学证据表明，4 d 是肺泡形成最明显的时期，在 7-14 d 时肺泡形态开始逐渐趋于稳定。由此推测，SENP1 调控着蛋白去 SUMO1 修饰来调节肺发育过程中蛋白 SUMO1 修饰与去 SUMO1 修饰的动态平衡。

综上所述，在正常生长发育过程中 SENP1 的作用必不可少。在肺发育过程中，SENP1 通过调控着蛋白的去 SUMO1 修饰，来调节蛋白 SUMO 化修饰的动态平衡，这平衡的维持可能对肺发育的正常发展至关重要。但在肺疾病发生的过程中以及肺的异常生长发育过程中是否存在 SENP1 及 SUMO1 的异常表达，或蛋白 SUMO 化平衡的失调还有待进一步的研究。随着深入的研究，有希望在各种肺损伤及异常发育等疾病预防和治疗中发展新思路。

第二部分 抑制 SENPI 对 AECII 分化、增殖及凋亡的影响

1 实验材料

1.1 实验细胞

人来源的II型肺泡上皮细胞（AECII，HUM-iCELL-a002），购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。

1.2 实验仪器

细胞培养板、培养皿、培养瓶	美国 Corning 公司
BD CANTO 10C 流式仪	美国 BD 公司
八连管、摇菌管、流式玻璃管等	美国 Thermo 公司

其余部分仪器设备同前。

1.3 实验试剂及主要试剂配制

QuickFreezing-M 细胞冻存液	博奥龙免疫公司
DME/F-12 培养基	Hyclone 公司
OPTI-MEM 培养基	Gibco 公司
胰蛋白酶	Invitrogen 公司
Lipofectamine2000、转染试剂	Invitrogen 公司
FITC 标记的 IgG 荧光二抗	Abbkine 公司
Dylight 594 标记 IgG 荧光二抗	abcam 公司
CCK-8 增殖试剂盒	Biosharp 公司
FITC AnnexinV/PI 细胞流式试剂盒	BD 公司

不含 EDTA 的胰酶：准备好 100 ml 经高压蒸汽灭菌的 PBS 溶液，倒入分析天平称量好的胰酶粉 2.5 g，充分混匀待胰酶完全融解后置于 4°C 冰箱备用；

1×Binding Buffer：取 10 ml 离心管倒入双蒸水 9 ml，再吸取试剂盒中 10×Binding Buffer 1 ml 加入，盖好盖后上下颠倒混匀，于 4°C 冰箱内保存备用；

其余部分试剂同前。

2 实验方法

2.1 AECII 培养

复苏:

(1)使用时将保存于液氮的 AECII 取出,与冻存管一同置于温度设置为 37°C 的恒温水浴锅中,轻轻摇晃至细胞混悬液完全融解后取出,用 75%酒精仔细喷洒外壁后,放入预先消毒好的超净台内;

(2)准备一个 10 ml 的离心管,加满完全培养基,将融解好的细胞混悬液移入离心管内,放入 4°C 离心机中,1000 g/min 离心,待细胞沉淀后取出,小心倒掉管内培养基,移液枪吸取 1 ml 培养基加入细胞沉淀中,轻轻吹打使细胞重悬,准备好装有培养基的培养皿,将上述细胞重悬液适量打入,为避免细胞团的产生,从不同部位注入细胞,并交叉法轻轻晃动培养皿,使细胞在培养基中尽量均匀分布;

(3)培养皿盖上做好标记,用胶条固定培养皿盖,放入 37°C 含 5% CO₂ 的培养箱中,待细胞贴壁后更换新的培养基。以后每日定期更换培养基,并注意观察 AECII 生长状态。

传代:

(1)将培养皿置于显微镜下,观察细胞生长状态,待细胞增长至覆盖培养皿底部 90%左右时,用移液枪吸掉原有培养基,并用经高压灭菌的 PBS 溶液清洗三遍;

(2)加入胰蛋白酶至皿底细胞被覆盖,并于显微镜下注意观察细胞形态,当细胞变为圆形时,加入与胰蛋白酶等量的培养基使细胞消化终止,随后轻轻吹打,使 AECII 不再贴壁,从培养皿上分离下来悬浮于培养基中;

(3)将上述细胞悬浮液移入经高压灭菌的离心管内,放入离心机中,以 1000 g/min 的速度离心 5 min 后倒掉上清,在离心管内的细胞沉淀中加入 1 ml 培养基,用移液枪轻轻吹打使细胞重悬,获得单细胞悬液;

(4)使用计数板进行计数,并据此计算需要吸取的悬液量,接种于新的培养皿中,用于后续实验,注意定期观察细胞情况。

冻存:

(1)待皿中细胞达 85%左右时,将生长状态良好的细胞用于冻存,移液枪吸尽皿内培养基,PBS 清洗三遍,加入胰蛋白酶进行消化,待细胞变圆不再贴壁后加含血清的培养基使消化终止,移液枪轻轻吹打使细胞与皿底分离,再将重悬

的细胞移入新的离心管内，放入离心机，以 1000 g/min 的速度离心 5 min；

(2) 离心后，倒掉培养基，加入冻存液轻轻吹打使细胞重悬，细胞终浓度控制于约 4×10^6 个/ml，随后分装入经高压蒸汽灭菌的冻存管内，置于 -80°C 冰箱冻存一天后转存入液氮；

注意：为避免细胞污染，细胞实验主要在超净台内进行，需超净台外操作时仍需注意无菌操作。

2.2 AECII 实验分组

显微镜下观察细胞生长状态，将生长良好的 AECII 接种至直径 6 cm 的培养皿中，培养约 12 h 至细胞贴壁后，更换一次培养基，每个培养皿内加入 2 ml 含 10% 胎牛血清的 DME/F-12 完全培养基。随机分为：空白对照组 (NC 组)、RA 组、si-NS 组、si-SENPI 组、RA + si-NS 组和 RA + si-SENPI 组。

2.3 免疫荧光检测 RA 促 AECII 分化时 SP-C、AQP5 表达

有研究表明 RA 可促进细胞分化^[27]。为了方便后续实验，我们研究首先证明适宜浓度 RA 对 AECII 分化的作用。

(1) 将 6×10^5 个细胞接种于 2 ml 含 $1 \mu\text{M}$ RA 的完全培养基中，随机分为对照组和 RA 组，分别培养 24 h、48 h、72 h 后，以 1×10^4 个细胞/孔的密度接种至已放置好爬片的 24 孔板中，用于后续细胞免疫荧光染色；

(2) 待细胞爬好片后，将皿中培养基移弃，加入 PBS 低速摇床上以 45 转/分的速度洗涤 $5 \text{ min} \times 3$ 次，加入 4% 多聚甲醛室温下静置 20 min，再次 PBS 清洗 $5 \text{ min} \times 3$ 次后，加入封闭液 3% 的 BSA， 37°C 温度暖箱内孵育 1 h，倒掉封闭液，PBS 洗涤 $5 \text{ min} \times 3$ 次；

(3) 将用 PBS 稀释后的 SP-C (1:200) 和 AQP5 (1:200) 一抗混合液加入至覆盖细胞，放入 4°C 冰箱孵育 12 h 后，置于 37°C 温箱内复温 30 min；

(4) PBS 洗涤 $5 \text{ min} \times 3$ 次后，吸尽多余的液体，滴加足量用 PBS 稀释的荧光二抗混合液（用 FITC 标记荧光二抗 1:200 用于检测 SP-C 和用 DyLight 594 标记的荧光二抗 1:200 用于检测 AQP5），放入避光盒内，室温下孵育 2 h 后，避光条件下，PBS 洗涤 3 遍；

(5) 加入 PBS 稀释的 DAPI (1:1,000) 室温下孵育 3 min，PBS 洗涤 3 遍；

(6) 取一块干净载玻片，滴上一滴封片剂后，将孵育好的细胞爬片取出小心置于封片剂上，放置时注意避免产生气泡；

(7) 将制作好的细胞爬片置于置于荧光显微镜下，暗室内注意避光拍照；

(8) 获得的图像使用 Image-Pro Plus III 进行分析，测量平均荧光强度值用于计算 SP-C、AQP5 表达比例（表达比例=目标蛋白荧光表达强度/SP-C 和 AQP5 总荧光表达强度）。

2.4 Western bolt 检测 RA 促 AECII 分化时 SP-C、AQP5、SENP1 蛋白表达

提取细胞总蛋白：

(1) 将培养皿取出，置于冰上，用移液枪吸取 4℃冰箱预冷的 PBS，加入培养皿中轻轻晃动以清洗细胞 3 遍，倒掉培养皿内 PBS 并用移液枪吸尽；

(2) 再在培养皿内加入混有 PMSF 和蛋白酶抑制剂的裂解液(RIPA 裂解液、4%SDS 或 NP40)，比例为裂解液:蛋白酶抑制剂:PMSF=100:1:1，每个培养皿内加入的裂解液混合物的量为 400 μ l；

(3) 将加有裂解液的培养皿置于冰上约 25 min，以使细胞裂解完全，裂解过程中可定期用刮棒使培养皿内细胞与皿底分离，与裂解液充分接触；

(4) 待裂解时间足够后，在冰上用刮棒将细胞推至皿内一侧，使裂解后的细胞易于被移液枪吸入，注意尽量吸尽皿内的细胞碎片和裂解液，并将其转移至干净的 EP 管内；

(5) 将装有裂解物的 EP 管放入预冷至 4℃的离心机中，以 12000 rpm/min 的转速离心 10 min 后取出，小心吸取上清液，分装至新的 EP 管中，并-20℃储存备用。

余主要实验步骤同前。

2.5 RT-qPCR 检测 si-RNA 转染 AECII 抑制 SENP1 表达

细胞分为 si-NS 组和 si-SENP1 组，每组细胞均在转染成功后继续培养 24 h、48 h、72 h 观察各组不同时间点转染效果。

(1) 以 Lipofectamine2000 为介质进行细胞瞬时转染。在转染前一天，将 1×10^6 个细胞接种于直径 6 cm 的培养皿内，根据 Lipofectamine2000 说明书，将各组细胞接种于 2 ml 无抗生素的 DME/F-12 完全培养基中，置于培养箱中培养，待细胞生长至密度达 30%左右时，更换培养基为 OPTI-MEM，继续培养 2 h；

(2) 配置稀释的 Lipofectamine2000: 取 200 μ l Opti-MEM 培养基于 EP 管内, 加入 4 μ l Lipofectamine2000 轻轻混匀后室温下静置, 孵育 5 min;

(3) 稀释 siRNA: 按说明书将 siRNA 用 OPTI-MEM 稀释至浓度为 50 nM 后分装备用 (避免反复冻存影响转染效果), 混匀后室温下静置 5 min;

(4) 将上述 Lipofectamine2000 稀释液和 siRNA 稀释液 (5 μ l/皿) 移入新的 EP 管, 混匀后室温静置 20 min, 加入各组细胞中;

(5) 再次将各组细胞放入 37°C 含 5% CO₂ 的培养箱培养, 待转染 6 h 后, 更换为 RPMI DME/F-12 完全培养继续培养 24 h、48 h、72 h 后收集各组细胞, 提取细胞 mRNA, 使用 RT-qPCR 检测转染效率 (主要实验步骤同前)。

2.6 Western blot 检测抑制 SENPI 对 AECII 分化及蛋白 SUMO 化的影响

AECII 细胞培养于含 RA 的 DME/F-12 培养基中, 随机分为 RA + si-NS 组和 RA + si-SENPI 组, 分别培养 24 h、48 h、72 h 后, 提取细胞总蛋白用于 Western-Blot 检测 SENPI、SUMO1、SP-C 和 AQP5 表达变化。主要实验步骤同前。

2.7 RT-qPCR 检测抑制 SENPI 对 SP-C、AQP5 mRNA 表达的影响

细胞总 RNA 的提取:

移液枪吸尽培养皿内培养基后, 用预冷的 PBS 清洗三遍后倒掉, 并用移液枪吸尽皿内剩余的 PBS 溶液; 将 1 ml Trizol 加入培养皿内, 用移液枪反复吹打皿底, 直至细胞完全脱落, 再将混有细胞的 Trizol 移入无 RNA 酶的 EP 管中, 室温下静置 5-10 min 后用于后续 RNA 的提取。

余主要实验步骤同前。

相关引物序列如下:

基因	引物序列
SENPI siRNA	上游: 5'-GCCUGACCAUACACGCAATT-3'
	下游: 5'-UUGCGUGUAAUGGUCAGGCTT-3'
NS siRNA	上游: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
	下游: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'
SP-C	上游: 5'-TTACCACTGCCACCTTCTCC-3'
	下游: 5'-TCAAGACTGGGGATGCTCTC-3'
AQP5	上游: 5'-ACTGGGTTTTCTGGGTAGGG-3'
	下游: 5'-GTGGTCAGCTCCATGGTCTT-3'
β -actin	上游: 5'-UGACCUCAACUACAUGGUUTT-3'
	下游: 5'-AACCAUGUAGUUGAGGUCATT-3'

2.8 CCK-8 检测抑制 SENP1 对 AECII 增殖影响

AECII 培养于 DME/F-12 培养基中, 随机分为 si-NS 组和 si-SENP1 组, 分别培养 24 h、48 h、72 h 后进行细胞计数, 以 5000 个细胞/孔接种于含 100 μ l 培养基的 96 孔板中, 再加入 10 μ l CCK-8 试剂, 同时需设置含等量培养基和 CCK-8 的空白对照组 (不含细胞), 加入 CCK-8 后操作过程中注意避光; 混匀后将 96 孔板置于 37°C 含 5% CO₂ 的培养箱内, 2 h 后取出, 放置室温下冷却后放入酶标仪中进行 OD 值测定, 检测设定的波长 450 nm。

2.9 流式细胞术检测抑制 SENP1 对 AECII 凋亡的影响

AECII 培养于 DME/F-12 培养基中, 随机分为 si-NS 组和 si-SENP1 组, 分别培养 24 h、48 h、72 h 后用于检测细胞凋亡。

(1) 移液枪吸掉培养皿内的培养基, 并用 PBS 溶液洗涤细胞 3 遍后, 吸净 PBS 溶液并加入无 EDTA 的胰蛋白酶, 细胞变圆时, 加含 FBS 的培养基终止消化, 轻轻吹打使细胞分离, 收集悬液放入离心机, 1000 g/min 离心 5 min;

(2) 倒掉上清液, 加入 PBS 溶液重悬细胞, 再次放入低速离心机中离心两次, 计数并收集 3×10^5 个细胞;

(3) 加入 $1 \times$ Binding Buffer 100 μ l, 轻轻吹打至细胞完全分离, 形成单个的细胞悬液, 避光环境下加入 Annexin V-FITC 溶液和 PI 溶液各 5 μ l, 充分混匀后置于室温下孵育 15 min;

(4) 再在上述混悬液中加入 $1 \times$ Binding Buffer 400 μ l, 充分混匀后于 1h 内放入 Accuri C6 流式仪中进行检测, 并用 FlowJo 7.6 分析结果。

3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料用均值 \pm 标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

4 实验结果

4.1 免疫荧光检测 RA 促 AECII 分化时细胞 SP-C、AQP5 表达变化

显微镜下观察细胞荧光免疫结果, 如图 2.1 示, 对照组与 RA 组均表现为 SP-C 表达比例逐渐减少, AQP5 表达比例逐渐增多, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 同时间点比较, 24 h、48 h、72 h 均表现为 RA 组 AQP5 表达比例较对照组高, SP-C 表达比例较对照组低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

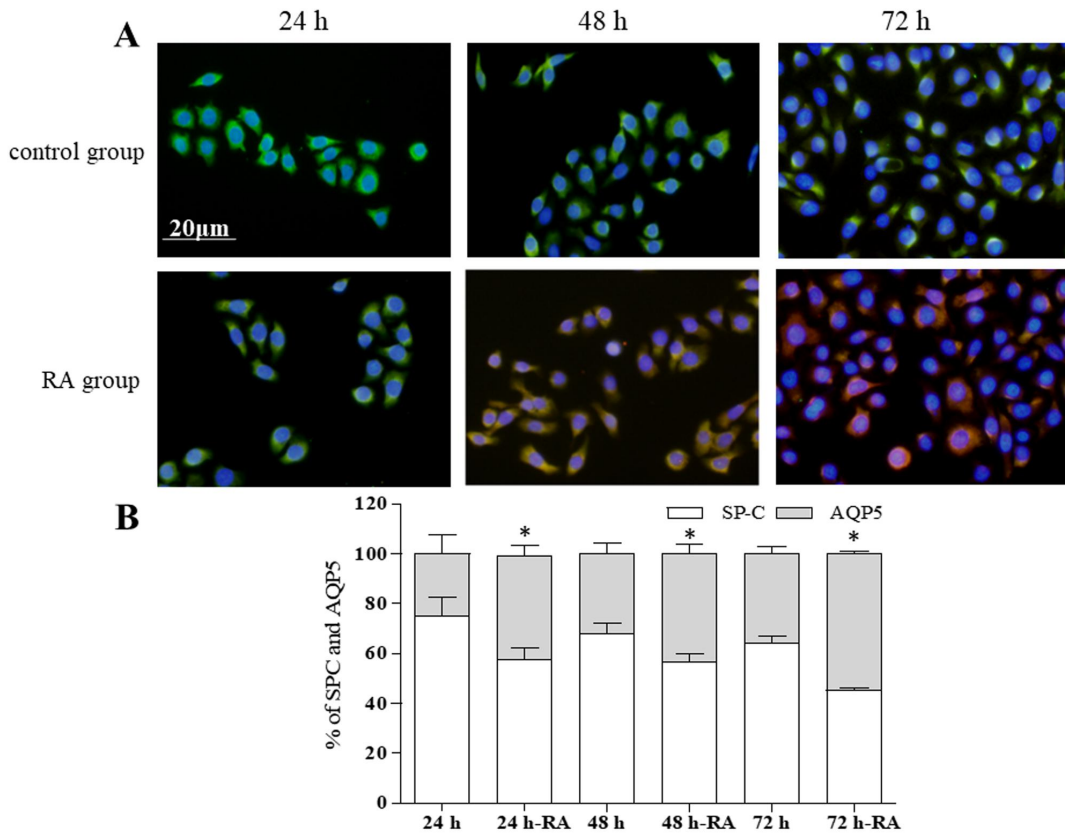


图 2.1 免疫荧光检测 SP-C、AQP5 表达：细胞核呈蓝色荧光，SP-C 呈绿色荧光，AQP5 呈红色荧光，图 A 为细胞核、SP-C、AQP5 荧光合成图片。图 B 为 SP-C、AQP5 表达比例（表达比例=目标蛋白荧光表达强度/SP-C 和 AQP5 总荧光表达强度）。培养 24 h、48 h、72 h 后，RA 组 AQP5 表达比例较对照组高，SP-C 表达比例较对照组低。（×400）

Figure 2.1 (A) AECII cells differentiating to AECI cells were detected by expression of the respective marker SP-C (green fluorescence) and AQP5 (red fluorescence). Nuclei were counterstained with DAPI (blue fluorescence). (B) Quantification of the percentage of SP-C and AQP5 as the proportion of AECII cells differentiating to AECI cells. The percentage of SP-C or AQP5 is the expression level of SP-C or AQP5/(SP-C+AQP5 expression level). (×400)

注： control group:对照组； RA group:RA 组； * $P<0.05$ vs 对照组。

4.2 Western bolt 检测 RA 促 AECII 分化时 SP-C、AQP5、SENPI 蛋白表达

Western bolting 检测 SP-C、AQP5 和 SENPI 蛋白表达变化。与对照组相比，培养 24 h 和 72 h 时，RA 组 SP-C 蛋白表达减少，48 h 时 SP-C 蛋白表达增多可能与细胞增殖有关，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；培养 24 h、48 h、72 h，与对照组相比，RA 组 AQP5 表达增多，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；随着培养时间延长，SENPI 蛋白表达在对照组及 RA 组均逐渐增多，差异有统计学意义 ($P<0.05$)，同时培养 24 h、48 h、72 h，RA 组 SENPI 表达均较对照组增加，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。如图 2.2。

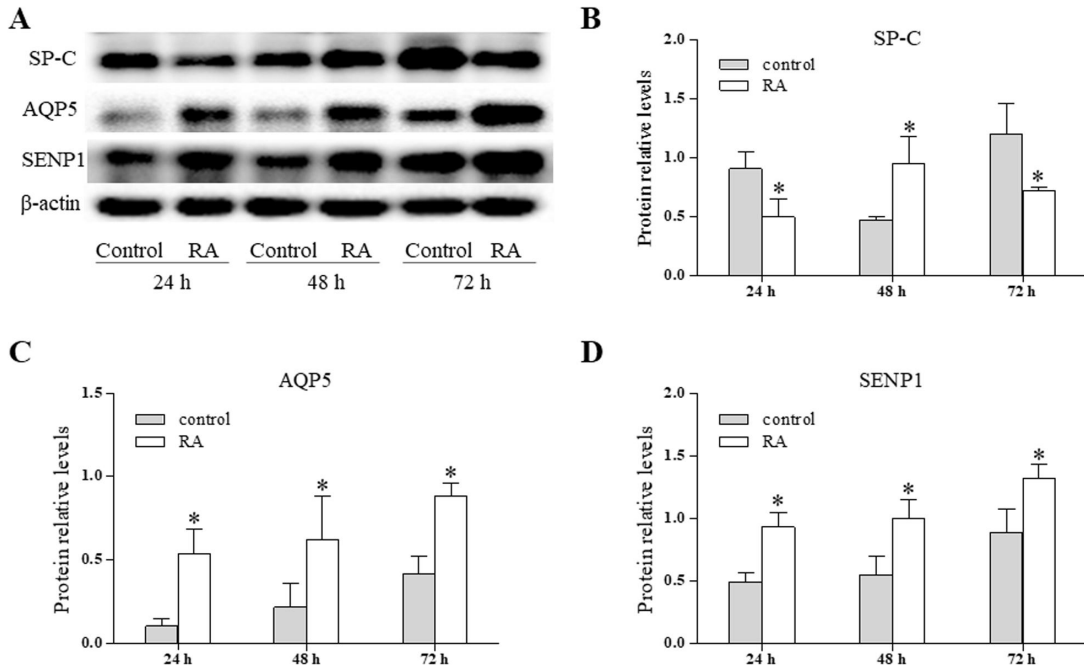


图 2.2 Western blot 检测 RA 促 AECII 分化时 SP-C、AQP5、SENP1 蛋白表达变化

Figure 2.2 Effect of RA on cell differentiation and SENP1 expression level.

注: control:对照组; RA:RA 组; * $P < 0.05$ vs 对照组。

4.3 RT-qPCR 检测 siRNA 转染 AECII 抑制 SENP1 mRNA 表达

通过 Lipofectamin2000 转染 siRNA 法转染 AECII，将 siRNA-SENP1 (si-SENP1) 及 siRNA-非特异性基因 (si-NS) 转入 AECII，转染 24 h、48 h、72 h 后提取细胞总 mRNA，用 RT-qPCR 检测 siRNA 转染 AECII 对 SENP1 mRNA 表达变化的影响。与 si-NS 组相比，si-SENP1 转染 24 h、48 h、72 h 后的 AECII 细胞 (si-SENP1 组) SENP1 mRNA 表达水平均明显降低 (各时间点 si-NS 组与 si-SENP1 组 SENP1 mRNA 相对表达量分别为 1.23 ± 0.06 vs. 0.22 ± 0.02 、 0.65 ± 0.14 vs. 0.07 ± 0.03 、 2.75 ± 0.18 vs. 1)，且 48 h 时抑制效果最明显，较 si-NS 组表达降低 8.8 倍，差异有统计学意义 (< 0.05)。如图 2.3 所示。

4.4 Western blot 检测抑制 SENP1 对 AECII 分化及蛋白 SUMO 化的影响

Western bolt 检测转染 24 h、48 h、72 h 后 RA+si-NS 组及 RA+si-SENP1 组 SENP1、SUMO1、SP-C 及 AQP5 蛋白表达变化。如图 2.4 A 和 B 示，各时间点与 RA+si-NS 组相比，RA+si-SENP1 组 SENP1 蛋白表达明显减少，与 mRNA 结果一致，48 h 时抑制效果最明显，较 RA+si-NS 组 SENP1 蛋白表达下降 3.2 倍，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；如图 2.4 A 和 C 示，与 RA+si-NS 组相比，SP-C 蛋白在培养 24 h 和 48 h 时表达增加，在 72 h 时表达减少可能与细胞生长受抑有

关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 如图 2.4 A 和 D 示, 各时间点 RA+si-SENPI 组 AQP5 蛋白表达均较 RA+si-NS 组降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 选择抑制效果最明显的 48 h 检测抑制 SENPI 对蛋白 SUMO 化的影响, 如图 2.4 E 示, 随着 SENPI 表达被抑制, SUMO1 结合蛋白(conjugated SUMO1)表达增多, 游离 SUMO1(free SUMO1)表达减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); SUMO1 总蛋白(total SUMO1)表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

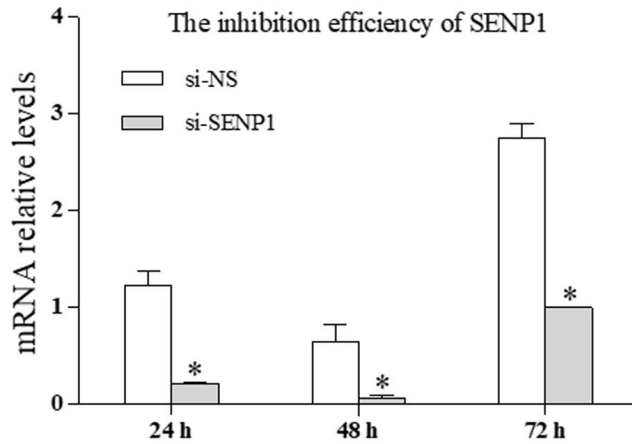


图 2.3 RT-qPCR 检测各组 AECII 细胞 SENPI mRNA 表达

Figure 2.3 Relative expression levels of the SENPI gene were determined by RT-qPCR.

注: * $P < 0.05$ vs si-NS 组。

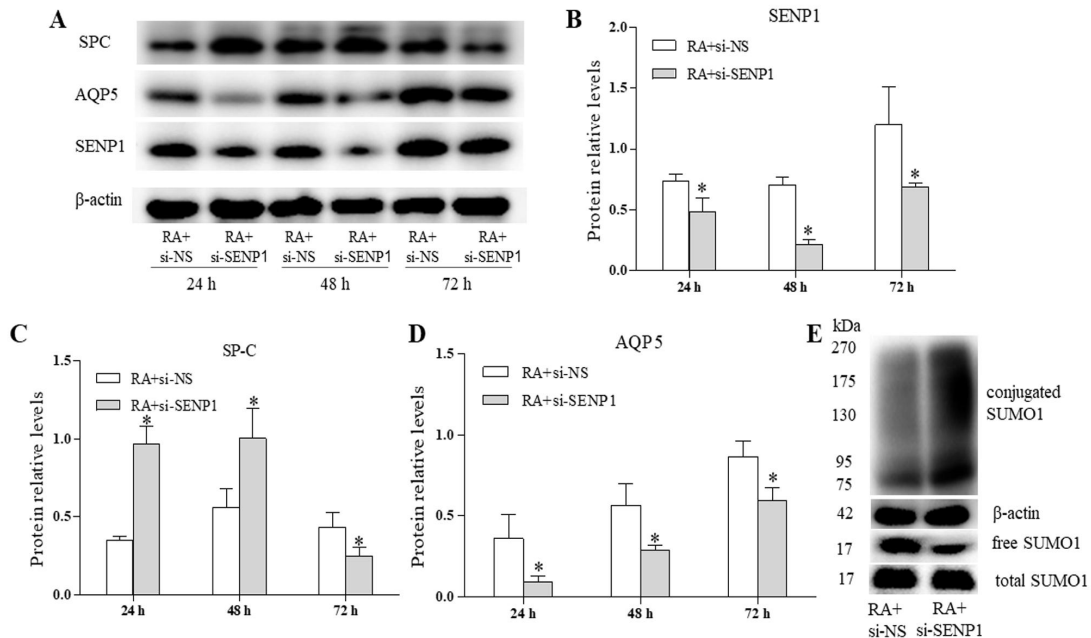


图 2.4 Western blot 检测各组细胞 SENPI、SUMO1、SP-C 及 AQP5 蛋白表达变化

Figure 2.4 Effect of RA on cell differentiation and SENPI expression level.

注: free SUMO1:游离 SUMO1; conjugated SUMO1:结合 SUMO1; total SUMO1:SUMO1 总蛋白; * $P < 0.05$ vs RA+si-NS 组。

4.5 RT-qPCR 检测抑制 SENP1 对 SP-C、AQP5 mRNA 表达的影响

为进一步验证抑制 SENP1 对 AECII 分化的影响，RT-qPCR 用于检测抑制 SENP1 对各组细胞 SP-C 及 AQP5 mRNA 表达的影响。与 RA+si-NS 组相比，SP-C mRNA 在培养 24 h 和 48 h 时表达增加，在 72 h 时表达减少，差异有统计学意义 ($P<0.05$)，见图 2.5 A、表 2.1；各时间点 RA+si-SENP1 组 AQP5 蛋白表达均较 RA+si-NS 组降低，差异有统计学意义 ($P<0.05$)，见图 2.5 B、表 2.1。结果显示，抑制 SENP1 时，SP-C、AQP5 mRNA 表达变化与蛋白表达变化趋势一致。

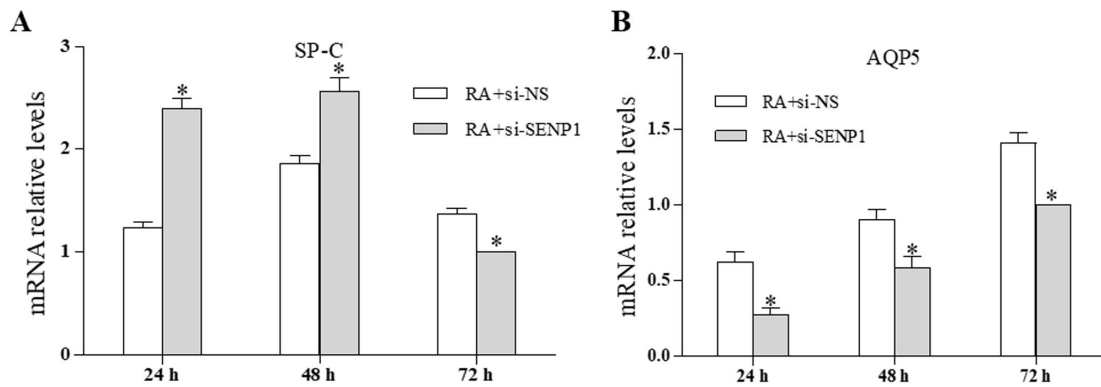


图 2.5 RT-qPCR 检测抑制 SENP1 对 SP-C(A)及 AQP5(B) mRNA 表达

Figure 2.5 Relative expression levels of (A) SP-C and (B) AQP5 mRNA were detected by RT-PCR.

注：* $P<0.05$ vs RA+si-NS 组。

表 2.1 抑制 SENP1 对 SP-C 及 AQP5 mRNA 表达的影响

Table 2.1 Effects of SENP1 inhibition on the differentiation of AECII cells

分组	SPC	AQP5
RA+si-NS 组 24 h	1.23±0.09	0.62±0.09
RA+si-SENP1 组 24 h	2.40±0.14*	0.27±0.06*
RA+si-NS 组 48 h	1.87±0.10	0.90±0.10
RA+si-SENP1 组 48 h	2.56±0.18*	0.59±0.10*
RA+si-NS 组 72 h	1.37±0.08	1.41±0.10
RA+si-SENP1 组 72 h	1	1

4.6 抑制 SENP1 影响 AECII 细胞增殖

CCK-8 用于检测 siRNA 转染 AECII 细胞 24 h、48 h、72 h 后对细胞增殖的影响。如图 2.6 示，si-SENP1 组 SENP1 抑制 24 h、48 h、72 h 后细胞增殖水平均较 si-NS 组降低，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

4.7 抑制 SENPI 促进 AECII 细胞凋亡

为了进一步验证抑制 SENPI 对 AECII 细胞增殖的影响，流式细胞术用于检测抑制 SENPI 对 AECII 细胞凋亡的影响。研究表明，与对细胞增殖影响结果一致，siRNA 抑制 SENPI 表达 24 h、48 h、72 h 后，si-SENPI 组细胞凋亡率均较 si-NS 组升高，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2.2，图 2.7。

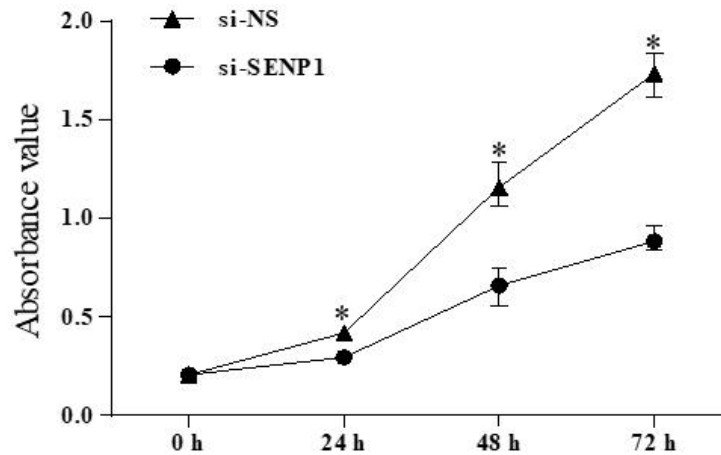


图 2.6 CCK-8 检测抑制 SENPI 对 AECII 细胞增殖的影响

Figure 2.6 Cell proliferation was analyzed using CCK-8 assay following transfection of AECII.

注：* $P < 0.05$ vs si-NS 组。

表 2.2 抑制 SENPI 对 AECII 细胞凋亡率的影响

Table 2.2 Effects of SENPI inhibition on the cell apoptosis of AECII cells

分组	Q2 (%)	Q3 (%)	Q2+Q3 (%)
si-NS 组 24 h	4.14±0.42	4.57±0.40	8.71±0.30
si-SENPI 组 24 h	4.13±0.03	7.23±0.82*	11.36±0.83*
si-NS 组 48 h	5.18±0.63	7.32±0.83	12.50±1.25
si-SENPI 组 48 h	7.45±0.48*	12.83±1.27*	20.29±1.69*
si-NS 组 72 h	6.86±0.48	13.47±1.03	20.33±1.42
si-SENPI 组 72 h	8.64±0.59*	17.50±1.08*	26.14±1.50*

注：Q1:死亡细胞；Q2:晚期凋亡细胞；Q3:早期凋亡细胞；Q4:活细胞；* $P < 0.05$ vs 同时间点 si-NS 组。

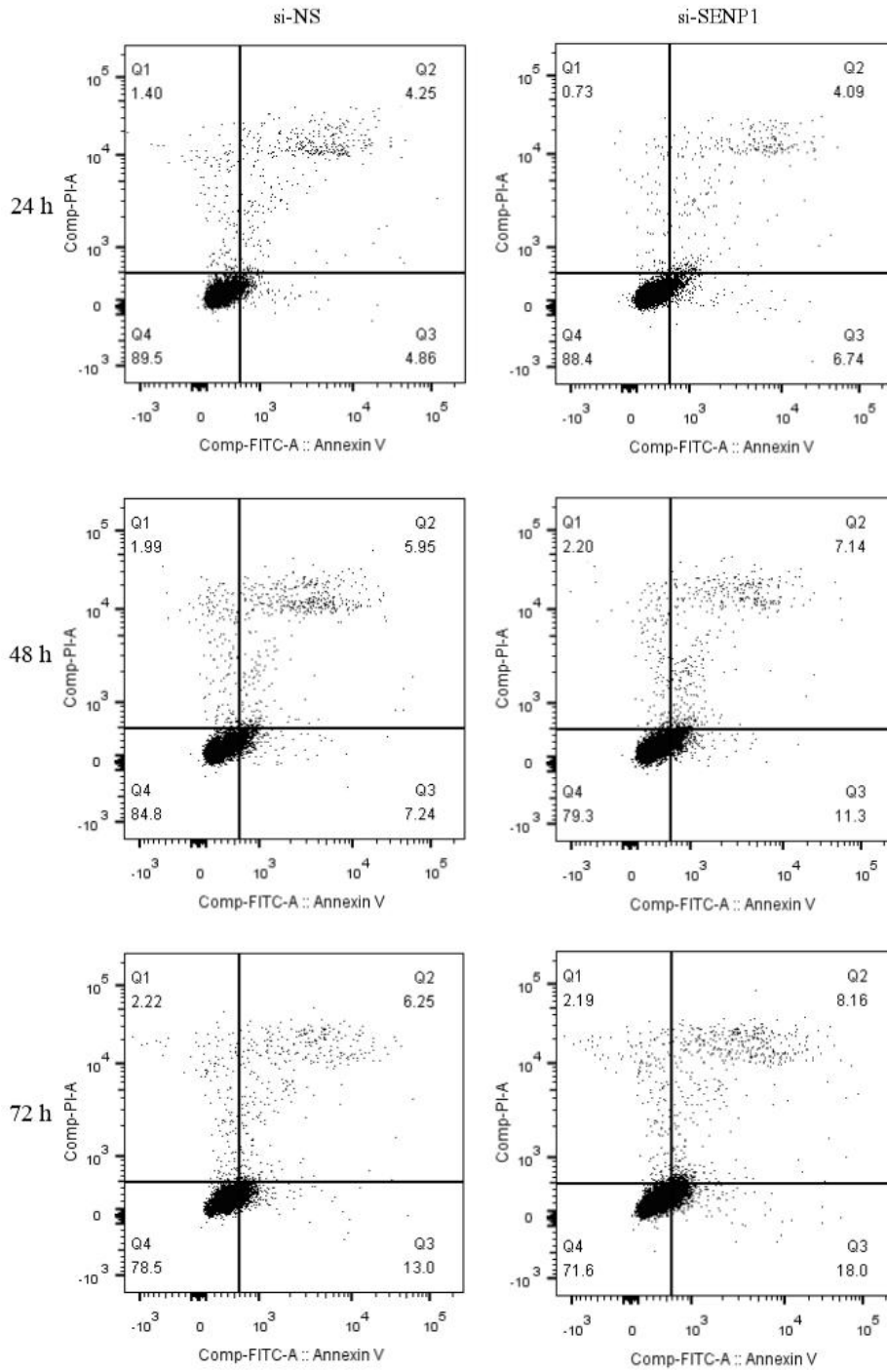


图 2.7 Annexin V/PI 流式细胞术检测抑制 SENP1 对 AECII 细胞凋亡的影响
Figure 2.7 Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry when SENP1 knocked down in AECII cells.

5 讨论

通过同位素追踪法将 $[^3\text{H}]$ 注射到孕鼠体内,然后检测胎鼠肺组织中该同位素表达情况,发现在肺的正常发育过程中,AECII可向AECI分化^[28]。既往关于生后14 d内大鼠肺发育研究发现,这一时期内SP-C表达减少的同时AQP5表达增加^[17,29]。SP-C是AECII的特异性标志蛋白,AQP5是AECI的特异性标志蛋白^[30,31]。这一研究结果说明,大鼠生后14 d内的肺发育过程中,伴随着AECII向AECI分化。进一步研究发现,生后14 d内大鼠肺组织中SENPI与游离SUMO1动态表达,而SUMO1 mRNA及总蛋白表达量基本维持在一稳定水平,说明SENPI可能通过调控蛋白SUMO化修饰的动态平衡,进一步影响AECII分化在肺发育的过程中发挥作用。为了证明这一猜测,通过体外培养AECII,RA促进其分化来研究SENPI在细胞分化过程中的作用。AECII作为肺泡上皮的干细胞^[3,5],参与肺泡上皮细胞的增殖与修复,一方面可在发育过程中向AECI分化,另一方面在组织受损时可通过有丝分裂增殖来维持AECII数量的正常^[32]。RA是维生素A的主要活性代谢产物。已有研究表明,RA参与调节肺的正常发育和成熟,促进细胞分化和肺泡的形成^[33,34]。本研究通过在AECII培养基中加入适量RA,通过细胞免疫荧光实验发现加入RA后,SP-C表达比例较对照组减少,AQP5表达比例较对照组增加,实验结果证明了RA对AECII分化的促进作用,与随后进行的Western bolt结果一致,同时检测SENPI蛋白表达发现,促进细胞分化的同时SENPI表达增加,说明SENPI参与调控了AECII分化。为了进一步验证SENPI对AECII分化的作用,在RA促AECII分化的基础上,通过siRNA转染抑制细胞SENPI基因表达,经Western bolt和RT-qPCR实验证明,与RA+si-NS组相比,RA+si-SENPI组中的AQP5表达减少,SP-C表达在转染后24 h和48 h时增多,但在72 h表达减少,考虑与细胞增长受抑制有关。同时检测抑制SENPI对蛋白SUMO化修饰的影响发现,与RA+si-NS组比较,抑制SENPI使得SUMO1结合蛋白表达明显增多。结合以往研究,SENPI7可在神经干细胞分化的过程中通过影响蛋白SUMO化修饰影响细胞分化^[24],且蛋白SUMO化修饰平衡的失调可导致肿瘤发生、DNA受损和细胞分化受抑制等多种表现^[10,14],我们考虑SENPI可能通过调控蛋白SUMO化影响AECII分化。为证明RA+si-SENPI组中72 h时SP-C表达减少是否与细胞生长受抑有关,我们继续研究抑制SENPI对AECII增

殖凋亡的影响，通过 CCK-8 测细胞增殖及流式细胞凋亡实验发现，抑制 SENP1 使 AECII 增殖减慢、细胞凋亡被促进，且细胞凋亡在 72 h 时增加最明显，与 RA+si-SENP1 组中 72 h 时 SP-C 表达减少相一致。最终结果表明，SENP1 通过参与 AECII 的分化、增殖及凋亡在肺发育过程中发挥作用，且这一作用可能通过调控蛋白 SUMO 化来实现。

综上所述，我们的研究发现，主要在肺发育的肺泡期，SENP1 通过调控蛋白 SUMO 化修饰的动态平衡来影响肺的正常发育。体外培养 AECII 发现，SENP1 参与细胞分化、增殖及凋亡，且这一作用可能通过调节蛋白的 SUMO 化修饰实现。由此可知，SENP1 对维持肺的正常发育必不可少。我们前期研究发现 SUMO 化的 C/EBP α 在肺发育过程中动态表达，且与肺表面活性物质分泌有关^[17]。尽管这一研究证明了 SUMO 化的 C/EBP α 参与调控肺发育和分化，但目前关于蛋白 SUMO 化尤其是其动态平衡对肺发育及分化的影响仍然十分有限，尚无证据表明是否存在某一特定蛋白的 SUMO 化修饰参与肺发育或分化，这些都有待进一步研究。

第三部分 结 论

(1) SENP1 在肺发育的过程中动态表达，与游离 SUMO1 表达趋势一致，说明 SENP1 可能通过调控蛋白 SUMO1 修饰的动态平衡影响肺发育。

(2) 在 RA 促 AECII 分化过程中，抑制 SENP1 可使蛋白 SUMO 化程度受影响，并 AECII 分化受抑制，说明 SENP1 可能通过调控蛋白 SUMO 化修饰影响 AECII 分化。

(3) SENP1 通过参与 AECII 分化、增殖、凋亡影响肺发育过程。

参考文献

- [1] Warburton D, Bellusci S. The molecular genetics of lung morphogenesis and injury repair [J]. *Paediatr Respir Rev* 5, 2004, (Suppl A): S283-S287.
- [2] Claudio N, Morty RE. MicroRNA in late lung development and bronchopulmonary dysplasia: The need to demonstrate causality [J]. *Mol Cell Pediatr*, 2016, 3: 19.
- [3] Barkauskas CE, Crouse MJ, Rackley CR, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung [J]. *Clin Invest*, 2013, 123: 3025-3036.
- [4] Adamson IY, Bowden DH. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration: A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen [J]. *Lab Invest*, 1974, 30: 35-42.
- [5] Adamson IY, Bowden DH. Derivation of type 1 epithelium from type 2 cells in the developing rat lung [J]. *Lab Invest*, 1975, 32: 736-745.
- [6] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013; 63: 11-30.
- [7] Lomelí H, Vázquez M. Emerging roles of the SUMO pathway in development [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68: 4045-4064.
- [8] Garcíadominguez M, Reyes JC. SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1789: 451-459.
- [9] Tempé D, Piechaczyk M, Bossis G. SUMO under stress [J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36: 874-878.
- [10] Kim JH, Baek SH. Emerging roles of desumoylating enzymes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792: 155-162.
- [11] Saho E, Takuya A, Hiroshi A, et al. The SUMO protease SENP1 is required for cohesion maintenance and mitotic arrest following spindle poison treatment [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 42: 310-316.
- [12] Chen CH, Chang CC, Lee TH, et al: SENP1 deSUMOylates and regulates Pin1 protein activity and cellular function [J]. *Cancer Res*, 2013, 73: 3951-3962.

- [13] Flotho A, Melchior F. Sumoylation: A regulatory protein modification in health and disease [J]. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82: 357-385.
- [14] Bawa-Khalfe T, Yeh ET. SUMO losing balance: SUMO proteases disrupt SUMO homeostasis to facilitate cancer development and progression [J]. *Genes Cancer*, 2010; 1: 748-752.
- [15] Nacerddine K, Lehembre F, Bhaumik M, et al. The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice [J]. *Dev Cell*, 2005, 9: 769-779.
- [16] Yamaguchi T, Sharma P, Athanasiou M, et al. Mutation of SENP1/SuPr-2 reveals an essential role for desumoylation in mouse development [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 5171-5182.
- [17] Chen YD, Liu JY, Lu YM, et al. Functional roles of C/EBP α and SUMO-modification in lung development [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40: 1037-1046.
- [18] Zhou F, Dai A, Fu D, et al. SENP-1 enhances hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells by regulating hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13: 3482-3490.
- [19] Jiang Y, Wang J, Tian H, et al. Increased SUMO-1 expression in response to hypoxia: Interaction with HIF-1 α in hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36: 271-281.
- [20] Pandey D, Nomura Y, Rossberg MC, et al. Hypoxia triggers SENP1 (senptrin-specific protease 1) modulation of KLF15 (Kruppel-like factor 15) and transcriptional regulation of Arg2 (Arginase 2) in pulmonary endothelium [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38: 913-926.
- [21] Wang RT, Zhi XY, Zhang Y, et al. Inhibition of SENP1 induces radiosensitization in lung cancer cells [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6: 1054-1058.
- [22] Sharma P, Yamada S, Lualdi M, et al. SENP1 is essential for desumoylating SUMO1-modified proteins but dispensable for SUMO2 and SUMO3 deconjugation in the mouse embryo [J]. *Cell Rep*, 2013, 3: 1640-1650.
- [23] Schittny JC. Development of the lung [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 367: 427-444.

- [24] Juarez-Vicente F, Luna-Pelaez N and Garcia-Dominguez M: The SUMO protease SENP7 is required for proper neuronal differentiation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863: 1490-1498.
- [25] Tan F, Dong W, Lei X, et al. Attenuated SUMOylation of sirtuin 1 in premature neonates with bronchopulmonary dysplasia [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17: 1283-1288.
- [26] Yuasa E, Saitoh H. In situ SUMOylation and DeSUMOylation assays: fluorescent methods to visualize SUMOylation and DeSUMOylation in permeabilized cells [J]. *Methods Mol Biol* 2016, 1475: 151-159.
- [27] Gao RW, Kong XY, Zhu XX, et al. Retinoic acid promotes primary fetal alveolar epithelial type II cell proliferation and differentiation to alveolar epithelial type I cells [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2015, 51: 479-487.
- [28] Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, et al. Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂ [J]. *Am J Pathol*, 1973, 70: 175-198.
- [29] Lu H, Chang L, Li W, et al. Effects of hyperoxia on the dynamic expression of Aquaporin5 in premature rats lung development [J]. *Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2007, 27: 318-312.
- [30] George UM, Ashna U, Kumar SS, et al. Effect of tobacco extract on surfactant synthesis and its reversal by retinoic acidrole of cell-cell interactions in vitro [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2013, 49: 260-269.
- [31] Nomura J, Horie I, Seto M, et al. Alltrans retinoic acid increases expression of aquaporin-5 and plasma membrane water permeability via transactivation of Sp1 in mouse lung epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351: 1048-1053.
- [32] Desai TJ, Brownfield DG, Krasnow MA. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer [J]. *Nature*, 2014, 507: 190-194.
- [33] Besnard V, Nabeyrat E, Henrion-Caude A, et al. Protective role of retinoic acid from antiproliferative action of TNF-alpha on lung epithelial cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282: L863-L871.

[34] Londhe VA, Maisonet TM, Lopez B, et al. Retinoic acid rescues alveolar hypoplasia in the calorierestricted developing rat lung [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48: 179-187.

综述

SUMO 特异性蛋白酶研究进展

摘要: 小泛素样修饰蛋白 (small ubiquitin-related modifier, SUMO) 是一种重要的蛋白质翻译后修饰, 最早发现于 20 世纪 90 年代初。蛋白 SUMO 化修饰是一动态可逆过程, 去 SUMO 化由 SUMO 特异性蛋白酶 (SUMO specific protease, SENPs) 介导。在蛋白 SUMO 化修饰的循环过程中, 除去 SUMO 化作用外, SENPs 还可促进 SUMO 前体成熟, 因此对蛋白 SUMO 化循环的维持至关重要。除此之外, SENPs 尚在多个重要的生理过程中发挥作用, SENPs 的异常表达常与疾病发生相关。SENPs 抑制剂有望在与 SENPs 表达异常疾病的治疗中发挥作用。本文就 SENPs 目前研究进展作一综述。

关键词: 小泛素样修饰蛋白 SUMO 特异性蛋白酶 SUMO 化 疾病 抑制剂

蛋白质的翻译后修饰参与蛋白的定位、降解及其功能调节。SUMOs 作为新发现的类泛素分子, 并不介导靶蛋白的降解, 而是以一种动态可逆的蛋白质的翻译后修饰, 并参与蛋白定位、功能调节等, 目前已被证明在多个生物过程中起作用^[1-4]。在无脊椎动物体内, SUMO 只有 Smt3 一个亚型, 在哺乳动物体内存在 SUMO1-4 四种亚型。SUMO2、3 常因为它们的高度同源性被写作 SUMO2/3^[5]。SUMO4 多表达于免疫系统, 且目前对其生理作用知之甚少^[6]。SUMO 蛋白通过去 SUMO 化修饰则通过 SUMO 特异性蛋白酶 (SENPs) 将 SUMO 蛋白从靶蛋白上移除实现, 同时在蛋白 SUMO 化过程中, SENPs 还可促进 SUMO 前体成熟, 促进蛋白 SUMO 化修饰^[7-8]。

1 SUMO 循环

SUMO 化作为一种重要的蛋白活性调控机制, 参与调节如 DNA 复制和损伤修复、细胞核转运、信号转导以及细胞增殖等多个细胞过程^[9-13]。蛋白 SUMO 化过程中, SUMO 蛋白通过一系列酶的联级反应, 与靶蛋白中的赖氨酸ε残基共价结合, 这一联级反应中包括激活酶 E1、结合酶 E2 和连接酶 E3。首先 SUMO 前体分子经 SUMO 特异性蛋白酶 (SENP) 切去 C 末端使其成熟后, 与 ATP 连接, 通过消耗 ATP 形成 SUMO-AMP 中间体介导, 与 SUMO 活化酶相连并活化, 活化后的 SUMO 转移至结合酶 E2(Ubc9), 通过与靶蛋白结合完成蛋白的 SUMO

化, 连接酶 E3 可识别特异性底物, 以促进某些底物 SUMO 化过程。当去 SUMO 化时, 则通过 SENPs 的去 SUMO 化作用使 SUMO 分子与靶蛋白分离, 重新进入循环。

2 SENPs 分型

在酵母菌中, 存在两种 Ulp1 和 Ulp2 两种 SENP 亚型。Ulp1 通过切除 Smt3 前体 C 端促进其成熟, 并对细胞周期的正常维持必不可少^[14]。另一亚型 Ulp2 也可将 Smt3 从底物蛋白上移除实现去 SUMO 化, 但不能催化 Smt3 前提成熟^[15]。在 Ulp2 基因缺失的菌株内 Smt3 结合物明显积累, 证明 Ulp2 在 Smt3 与蛋白结合过程中起作用^[16]。在哺乳动物体内, 存在六种 SENPs 亚型, 分别为 SENP1-3 和 SENP5-7, 它们定位与细胞不同部位, 并具有底物特异性, 催化不同底物的成熟及去 SUMO 化。这些亚型可以分为三组, SENP1、SENP2 对 SUMO1 和 SUMO2/3 有广泛的特异性, 参与其前提成熟及去 SUMO 化过程; SENP3 和 SENP5 对 SUMO2/3 作用较 SUMO1 大; 而 SENP6、SENP7 则主要作用于 SUMO-2/3, 且均参与催化 SUMO 前体成熟, 但对蛋白去 SUMO2/3 修饰的作用则十分有限^[17-19]。因此, 不同 SENPs 功能区别显著。促进 SUMO 前提成熟主要由 SENP1/2 完成, 且 SENP1/2 在对蛋白去 SUMO1 和 SUMO2/3 修饰的过程中也发挥重要作用。SENP3/5 主要作用于将 SUMO-2/3 单体从底物上移除, 而 SENP6/7 的作用则是编辑 SUMO-2/3 长链。鉴于 SENP 在细胞进程中的重要作用, SENP 蛋白本身也可能受到细胞的精密调控。目前关于这方面的研究还十分少见, 但一些 SENP 的调控机制已逐渐被发现。例如, 已有研究发现 SENP 可被 SUMO1 修饰, 但这一修饰有何作用尚无定论^[20]。SENP3 的活性通过调控其稳定性来控制。在细胞正常状态下 SENP3 可迅速被泛素-蛋白酶体系统所降解^[21]。ROS (reactive oxygen species, 活性氧簇) 则可提高 SENP3 稳定性并使 SENP3 由细胞核重新定位至核浆内。这一稳定性的提高促进了 SENP3 对 p300 蛋白的去 SUMO 化作用, p300 是转录因子 HIF-1 α 的辅激活蛋白^[21]。HIF-1 α 通过应激基因的转录反应参与调控许多细胞应激反应。由于 SUMO 化的 p300 可抑制与 HIF-1 α 共同激活作用, 这一应激反应则可诱导 SENP3 对 p300 的去 SUMO 化作用, 减轻抑制从而促进 HIF-1 α 应激基因参与的转录反应。

3 SENPs 与基因表达调控

蛋白的去 SUMO 化作用由 SENPs 介导, 其活性障碍常导致 SUMO 化的蛋白在体内堆积。SENPs 参与多个生理过程, 如基因转录、核质运输、细胞增殖和早期胚胎发育等^[22]。尽管 SENP 的分子作用机制仍不明确, 但 SENP 基因敲除或缺失的小鼠胚胎早期即死亡证明 SENP 对生物的正常生长发育必不可少^[23-24]。多个转录抑制的调节均与蛋白 SUMO 化相关^[25]。SENPs 对靶基因的转录活性具有正向调控作用, 可能与其对蛋白 SUMO 化的抑制或促进 SUMO 前体成熟的作用有关。SENP1 可参与维持 Elk-1 SUMO 化的动态平衡。抑制 SENP1 可抑制 Elk1 的转录活性, 并通过增加 TBL1-TBLR1 的 SUMO 化提高 Wnt 靶基因的活性^[26-27]。最近有研究表明 SENP1 可调控线粒体的生物合成, 并通过对 PGC-1a 去 SUMO 化来促进细胞的转录活性^[28]。MEF2 是一个在胚胎发育过程中起重要作用的转录因子^[29], SENP2 作为 MEF2A 转录活性的主要调控因子, 可将 SUMO 与蛋白分离从而提高 MEF 的转录活性^[30]。SENP2 通过影响蛋白 SUMO 化, 调控内皮细胞中 ERK5 的转录活性^[31]。除了对基因表达的直接调控外, 一些 SENPs 还可通过影响 DNA 的表观遗传修饰来参与对基因的调控。如 SENP2 基因缺陷导致 SUMO 化 PC2/CBX4 增多, 促进 H3K27ME3 的 SUMO 化, 进而使转录活性受抑并致实验动物胚胎期死亡^[24]。与之类似的是, SENP3 影响 RbBP5 的去 SUMO 化进而参与转录活性调节, SENP3 表达抑制减少了在 DLX3 基因上沉积的 Ash2L, 并影响了随后被 SET1/MLL 甲基化的 h3k4, 导致 DLX3 转录活性被抑制^[32]。鉴于目前这些研究成果, 未来进一步研究也将证明 SENPs 在表观遗传修饰中的作用并非多余。P53 作为已明确的抑癌基因, 通过对细胞损伤修复和凋亡的监测来预防基因突变, 防止非整倍体的产生^[33]。结合既往的研究发现, SENPs 对调节 p53 活性的具有重要意义。例如 SENP2-Mdm2-p53 通路可以很好的阐明这一点, SENP2 通过 p53/Mdm2 循环参与小鼠胚胎滋养层的发育。SENP2 也参与对 p53 活性的负性调控, SENP2 的缺失将明显扰乱蛋白 SUMO 化并通过减少 p53 的降解影响 Mdm2 的亚细胞定位。相反, 在 SENP2 基因缺失的细胞中再引入 SENP2 的表达可通过减少 Mdm2 的 SUMO 化减缓这一基因缺陷带来的影响, 使 p53 恢复至正常水平^[31, 34]。定位于核仁中的 SUMO 特异性蛋白酶 SMT3IP1/SENP3 被发现更积极的参与了 Mdm2-p53 通路的调控。SENP3 的过表达使 Mdm2 逐渐在细胞核类积累, 并通过与 p53 竞争 Mdm2 的结合位点使 p53 在细胞内稳定存在。

但 SENP3 对 p53 稳定性的影响并不是通过其去 SUMO 化作用实现^[35]。

4 SENPs 与细胞周期调节

最早在酿酒酵母的遗传数据中首先发现了蛋白 SUMO 化的一个关键功能，即可通过蛋白定时 SUMO 化与去 SUMO 化来调控细胞的增殖周期。且 SUMO 循环中的 E2 结合酶 Ubc9 或去 SUMO 化酶 Ulp1 失活均可使细胞周期在 G2/M 转变过程中受阻^[14, 36]。在哺乳动物细胞核内，SUMO2/3 被发现定位于着丝粒，而 SUMO1 在有丝分裂的纺锤体上和纺锤体中心区被检测到。细胞周期过程中，蛋白的 SUMO 化与去 SUMO 化快速变化，SUMO 化修饰高度动态变化，因此，在哺乳动物体内，SENP 也参与着细胞周期进展^[37, 38]。SENP1 基因敲除通过影响姐妹染色体中期的分离，进而延迟有丝分裂的进展^[37]。另一方面，SENP2 的过表达也可使微管运动蛋白 CENP-E 靶向动力缺陷，诱导细胞停滞于有丝分裂的前过渡期，进一步说明了蛋白 SUMO 化修饰与去 SUMO 化平衡的动态维持，对细胞进行正常有丝分裂的重要性^[38]。在 G2/M 细胞周期转换时，SENP5 从核仁内转移出，重新定位于线粒体的表面，从在有丝分裂过程使线粒体分裂过程加速^[39]。此外，SENP5 基因的缺失可导致双核细胞的产生，说明 SENP5 也参与了细胞的有丝分裂^[40]。培养细胞中 SENP6 基因的缺失，使细胞的内动粒组件或着丝点组织受损，导致染色体错位、染色体错配和有丝分裂不能正常进行。这一缺陷可能是影响了 SENP6 在细胞周期 S 期的功能，因此，已有研究提出通过 SENP6 拮抗 StUbl 通路，来保护内动粒蛋白使其避免在 S 期被降解^[6]。在细胞正常周期进程中，发现 SENP3 与 RanBP2 一起参与调控细胞周期蛋白 Borealin SUMO 化的动态平衡^[41]。细胞周期蛋白 Borealin 对许多生物过程如细胞分裂、染色体分离和纺锤体装配检查点都至关重要^[42]。在与转录因子 HIF-1 α 作用的过程中，SENP3 具有双相氧化还原感应功能，来调控底物蛋白 p300 的 SUMO 化作用，最终使 HIF-1 α 的转录活性被抑制^[43]。这一研究证明，SENP3 在活性氧的生产、肿瘤发生级治疗过程中起重要作用。基于以上研究，SENP 在调控细胞周期的过程中发挥作用，这一作用过程中是否存在特异性蛋白目前尚不清楚。但 SENPs 在生长发育、基因及蛋白调控等多个生物过程中的重要作用都表明在正常细胞周期中，SENP 发挥着极其重要的作用。

5 SENPs 与炎症信号通路和免疫应答反应

NF κ B 信号通路在炎症反应及细胞存活中起关键的调控作用。NEMO 酶作为 IKK 复合物的一部分，可以引起 NF κ B 通路的激活。在对 DNA 损伤反应的过程中，NEMO 被 SUMO1 修饰，而在对 LPS 引起的炎症反应中，NEMO 被 SUMO2/3 所修饰^[44]。经 SUMO 化修饰的 NEMO 促进 NF κ B 通路激活，去 SUMO 化则使 NF κ B 信号传导受抑制^[44]。SENP2 通过使 NEMO 去 SUMO1 修饰，来抑制 DNA 损伤后 NF κ B 通路的激活^[45]。SENP6 则通过对 NEMO 去 SUMO2/3 修饰，来减弱 attenuates the TLR 受体触发的炎症反应^[44]。在 SENP 6 基因敲除的小鼠体内发现，SENP6 基因的缺失使 NF κ B 介导的炎症反应增强，增加了小鼠受内毒素影响，患败血症的几率^[44]。在 NF κ B 通路中，NEMO 并不是 SENPs 作用的唯一靶细胞，许多 LPS 或 TLR 应答基因的转录激活过程中，起始时需要一个抑制步骤，涉及 SENP3 对核受体的去 SUMO 化作用，将核受体和共阻遏子的复合物从 NF κ B 通路靶基因的启动子上清除^[46]。在细胞质和细胞核的 NF κ B 信号通路过程中，NF κ B 的活性由 SENPs 的几个亚型通过协同作用或是组织特异性的相互作用协调控制。在小鼠的脂肪细胞中，SENP 1 介导的去 SUMO 化作用使炎症反应受限，而 SENP 1 基因敲除可以通过触发 NF κ B 通路的激活和促进炎症细胞的产生加重糖尿病的症状^[47]。另一方面，SENP1 和 SENP2 本身也可成为 NF κ B 通路作用的靶基因，说明在 SENPs 和 NF κ B 通路间存在着复杂的负反馈调节机制^[48]。最近的研究数据指出，SENPs 可通过调控 cGAS-STING 这一信号通路，在先天性免疫系统中发挥重要作用。cGAS-STING 信号通路参与识别被某些致病微生物感染的细胞的胞质 DNA，并通过 IRF3 触发相关炎症基因表达增加^[49]。SENP7 猜测可用于反转 cGAS 被抑制的 SUMO 化，来增强 cGAS-STING 通路被激活时的活性^[50]。SENP7 缺乏的小鼠表现出的 HSV-1 (herpes simplex virus, 单纯疱疹病毒) 易感性，和在激活 cGAS-STING 通路轴后表现出的基因表达形式受损也证明了这一猜想^[50]。

6 SENPs 与疾病发生

SENPs 通过维持蛋白 SUMO 化与去 SUMO 化的动态平衡在调控正常生物过程中起着重要的作用。通过敲除小鼠体内基因的研究发现，无论 SENP1 或 SENP2 的缺失均可导致小鼠于胚胎早期即死亡^[24, 51]。在某些疾病中，蛋白 SUMO 化与去 SUMO 化修饰的动态平衡状态常常因为 SENPs 表达变化被打破。已有研究表

明, SENPs 的几个亚型都参与了包括前列腺癌、甲状腺癌、大肠癌、胰腺癌、动脉粥样硬化和心脏疾病在内的多种疾病的发生发展^[51-57]。其中关于 SENPs 如何在前列腺癌的发生发展中起作用的研究最多。AR (androgen receptor, 雄性激素受体) 已被证明是在前列腺癌的发生发展中起重要作用的蛋白质。已有研究发现 SENP1 和 SENP2 参与调控 AR 蛋白的 SUMO 化修饰, 且 SENP1 的过表达可提高 AR 受体的转录活性^[58, 59]。在前列腺癌发展过程中, HIF-1 α 通过调控多种基因的表达来提高缺氧环境下组织的耐氧能力, 从而发挥至关重要的作用^[60, 61]。在不同的研究中发现 HIF-1 α 的 SUMO 化可产生不同的效果^[62-64]。CBX4 (Polycomb chromobox 4, 多核染色体 4) 和 RSUME (RWD-containing sumoylation enhancer, 蛋白 SUMO 化强化子 RWD) 通过在低氧环境下增强 HIF-1 α 转录活性来提高 HIF-1 α 的 SUMO 化程度^[64, 65]。除此之外, HIF-1 α 的稳定性和转录活性还可被调控, 通过被不同亚型 SUMO 修饰的 CBX4 和 PIAS γ (the protein inhibitor of activated STAT, 活化蛋白酶抑制剂)^[65]。同时 SENP1 在 HIF-1 α 的稳定性和对缺氧反应的调节过程中也发挥重要作用, SENP1 的缺乏可导致 SUMO 化的 HIF-1 α 增多, 促进与 SUMO 化修饰相关的 HIF-1 α 降解^[51]。另有 Bawa-Khalfe 等人的研究发现 HIF-1 α 和 SENP1 表达的高度相关性证明 SENP1 在前列腺癌的发展中发挥重要作用, 对前列腺癌和前列腺上皮内瘤样病变样本的研究发现, 超过一半以上病例中检测到 SENP1 表达增多^[52, 53]。Wang 等人检测了 150 多个人的前列腺癌样本发现, SENP1 甚至与前列腺癌的复发和侵袭性有关^[66]。此外, SENP1 还可通过增加 AR 受体活性和 c-Jun 介导的转录参与前列腺癌的发生^[67]。在大多数结肠癌组织中也发现了 SENP1 表达增加, 并通体内外实验过结肠癌细胞的证明了 SENP1 对结肠癌的调控作用。抑制裸鼠体内 SENP1 基因可抑制细胞生长, 而结肠癌细胞株中沉默 SENP1 基因也可抑制细胞集落的形成^[55]。在胰腺导管腺癌组织中也发现了 SENP1 表达较正常组织增高, 进一步用 siRNA 敲除 SENP1 基因发现胰腺导管腺癌细胞的生长可被抑制^[56]。尽管目前关于 SENP1 的研究最多, 但 SENP 其他亚型也可参与疾病发生。SENP2 与 MDM2 相结合并调控 MDM2 的 SUMO 化, 这对 SENP2 与抑癌基因 p53 的作用十分重要^[34, 68]。另一方面, SENP2 通过 WWOX (WW domain-containing oxidoreductase, 含有 WW 结构域的氧化还原酶) 调控 β 连环蛋白的稳定性, 并以此肝癌细胞的生长^[68, 69]。SENP2 还可调节

p53 和 ERK5 (extracellular signal-regulated kinase-5, 细胞外信号调节激酶-5) 的表达来促进动脉粥样硬化斑块的形成^[31]。有研究表明, 过表达 SENP2 可导致小鼠出现先天性心脏功能缺陷或导致心脏功能障碍^[57]。SENP5 的其他亚型, 尤其是 SENP3 和 SENP5 也可能应用于某些疾病的治疗, 因为在肺癌、前列腺癌、口腔鳞状细胞癌、结肠癌、骨肉瘤和卵巢癌中均可检测到他们的表达增加^[70-73]。Cashman 通过对一项多达 1363 名患者基因表达数据的统计发现, 乳腺癌患者的生存率与 SENP5 表达受抑制相关联。

结语

综上所述, SENPs 在众多生理病理条件如生物的正常生长发育、重要的细胞生物过程、应激性疾病及肿瘤的发生发展过程中都具有重要的调节作用。除了通过影响蛋白 SUMO 化程度起作用外, SENPs 也可直接参与通路调控、酶的活性调节等过程。而在疾病发展过程中的作用也为其成为疾病治疗的靶点提供理论支持。很多研究发现, SENPs 导致异常生长发育或疾病发生均与 SENPs 表达异常导致的蛋白 SUMO 化与去 SUMO 化平衡失调有关。由于 SENPs 在 SUMO 化循环中即可催化 SUMO 前体成熟促进蛋白 SUMO 化, 又可使 SUMO 与靶蛋白分离, 导致在不同的条件下抑制 SENPs 的表达, 出现既可使 SUMO 化的蛋白增加又可使其表达减少的情况。目前大部分已发表的关于 SENPs 对生长发育影响的研究, 主要通过过表达增加 SENP 各亚型的表达, 或通过 siRNA 介导其失活, 这并不能直接反映他们的生理功能, 也难以区分产生的影响由 SENPs 失活直接或是间接影响。目前的研究表明, 在多种癌细胞或组织中抑制 SENPs 的表达可能有助于癌症的治疗。因此近几年有不少研究致力于研制可识别 SENP 各种亚型的小分子抑制剂。然而, 目前研制的抑制剂基本上只能用于各种分子实验来研究 SENP 的各种生物学机制, 已鉴定的抑制剂几乎没有能用于治疗的。高度相似的生物学机制、结构特征以及分解后的化学成分, 都使得获得特异性识别 SENPs 亚型的抑制剂变得困难。但 SENPs 在基因转录、细胞周期调控和生长发育等过程中的重要作用, 都表明 SENPs 仍有可能在疾病的治疗过程中发挥重要作用。也许随着对其更深入的研究, 我们将有望见到 SENPs 在各种疾病的治疗中发挥重要作用。

参考文献

- [1] Finkbeiner E, Haindl M, Muller S. The SUMOsystem controls nucleolar partitioning of a novel mammalian ribosome biogenesis complex [J]. EMBO J, 2011, 30: 1067-1078.
- [2] Lomeli' H, Va'zquez M. Emerging roles of the SUMO pathway in development [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68: 4045-4064.
- [3] Bettermann K, Benesch M, Weis S, et al. SUMOylation in carcinogenesis [J]. Cancer Lett, 2012, 316: 113-125.
- [4] Sutinen P, Malinen M, Heikkinen S, et al. SUMOylation modulates the transcriptional activity of androgen receptor in a target gene and pathway selective manner [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42: 8310-8319.
- [5] Yang XJ, Chiang CM. Sumoylation in gene regulation, human disease, and therapeutic action [J]. F1000Prime Rep, 2013, 5, 45.
- [6] Mukhopadhyay D, Dasso M. Modification in reverse: the SUMO proteases [J]. Trends Biochem Sci, 2007, 32: 286-295.
- [7] Hwang EJ, Lee JM, Jeong J, et al. SUMOylation of RORalpha potentiates transcriptional activation function [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 378: 513-517.
- [8] Hickey CM, Wilson NR, Hochstrasser M. Function and regulation of SUMO proteases [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13: 755-766.
- [9] Zhao J. Sumoylation regulates diverse biological processes [J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64: 3017-33.
- [10] Tang Z, Hecker CM, Scheschonka A, et al. Protein interactions in the sumoylation cascade: lessons from X-ray structures [J]. FEBS J, 2008, 275: 3003-3015.
- [11] Sarge KD, Park-Sarge OK. Sumoylation and human disease pathogenesis [J]. Trends Biochem Sci 2009, 34: 200-205.
- [12] Yeh ET. SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes [J]. J Biol Chem, 2009, 284: 8223-8227.

- [13] Gareau JR, Lima CD. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 861-71.
- [14] Li SJ, Hochstrasser M. A new protease required for cell-cycle progression in yeast [J]. *Nature*, 1999, 398: 246-251.
- [15] Li SJ, Hochstrasser M. The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 2367-2377.
- [16] Bylebyl GR, Belichenko I, Johnson ES. The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast [J]. *Biol Chem*, 2003, 278: 44113-44120.
- [17] Zhang H, Saitoh H, Matunis M. Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 6498-6508.
- [18] 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: 15869-15877.
- [19] Shen LN, Geoffroy MC, Jaffray EG, et al. Characterization of SENP7, a SUMO-2/3-specific isopeptidase [J]. *Biochem*, 2009, 421: 223-230.
- [20] Bailey D, O'Hare P. Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1 [J]. *Biol Chem*, 2004, 279: 692-703.
- [21] Huang C, Han Y, Wang Y, et al. SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 de-SUMOylation [J]. *EMBO*, 2009, 28: 274-2762.
- [22] Lu H, Liu B, You S, et al. The activity-dependent stimuli increase SUMO modification in SHSY5Y cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009, 390: 872-876.
- [23] Yamaguchi T, Sharma P, Athanasiou M, et al. Mutation of SENP1/SuPr-2 reveals an essential role for desumoylation in mouse development [J]. *Mol Cell Biol*. 2005, 25: 5171-82.
- [24] Kang X, Qi Y, Zuo Y, et al. SUMO-specific protease 2 is essential for suppression of polycomb group proteins mediated gene silencing during embryonic development [J]. *Mol Cell*. 2010, 38: 191-201.

- [25] Lindberg MJ, Popko-Scibor AE, Hansson ML, et al. SUMO modification regulates the transcriptional activity of MAML1 [J]. *FASEB*, 2010, 24: 2396-2404.
- [26] Kaikkonen S, Makkonen H, Rytinki M, et al. SUMOylation can regulate the activity of ETS-like transcription factor 4 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799: 555-560.
- [27] Choi HK, Choi KC, Yoo JY, et al. Reversible SUMOylation of TBL1-TBLR1 regulates beta-catenin-mediated Wnt signaling [J]. *Mol Cell*, 2011, 43: 203-216.
- [28] Yu T, Huang C, Xia X, et al. SUMO-specific protease 1 regulates mitochondrial biogenesis through PGC-1 α [J]. *Biol Chem*, 2012, 287: 44464-44470.
- [29] Lu H, Liu B, You S, et al. SENP2 regulates MEF2A de-SUMOylation in an activity dependent manner [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40: 2485-2490.
- [30] Qi Y, Zuo Y, Yeh ET, et al. An essential role of small ubiquitin-like modifier (SUMO)-specific protease 2 in myostatin expression and myogenesis [J]. *Biol Chem*, 2014, 289: 3288-3293.
- [31] Heo KS, Chang E, Le NT, et al. De-SUMOylation enzyme of sentrin/SUMO-specific protease 2 regulates disturbed flow-induced SUMOylation of ERK5 and p53 that leads to endothelial dysfunction and atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2013, 112: 911-23.
- [32] Nayak A, Viale-Bouroncle S, Morszeck C, et al. The SUMO-specific isopeptidase SENP3 regulates MLL1/MLL2 methyltransferase complexes and controls osteogenic differentiation [J]. *Mol Cell*, 2014, 55: 47-58.
- [33] Andreou AM, Tavernarakis N. Roles for SUMO modification during senescence [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 694: 160-171.
- [34] Jiang M, Chiu SY, Hsu W. SUMO-specific protease 2 in Mdm2-mediated regulation of p53 [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18: 1005-1015.
- [35] Nishida T, Yamada Y. The nucleolar SUMO-specific protease SMT3IP1/SENP3 attenuates Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406: 285-291.
- [36] Seufert W, Futcher B, Jentsch S. Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins [J]. *Nature*, 1995, 373: 78-81.

- [37] Cubenas-Potts C, Goeres JD, Matunis MJ, et al. SENP1 and SENP2 affect spatial and temporal control of sumoylation in mitosis [J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24: 3483-3495.
- [38] Zhang XD, Goeres J, Zhang H, et al. SUMO-2/3 modification and binding regulate the association of CENP-E with kinetochores and progression through mitosis [J]. *Mol Cell*, 2008, 29: 729-741.
- [39] Zunino R, Braschi E, Xu L, et al. Translocation of SenP5 from the nucleoli to the mitochondria modulates DRP1-dependent fission during mitosis [J]. *Biol Chem*, 2009, 284: 17783-17795.
- [40] Di Bacco A, Ouyang J, Lee HY, et al. The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 4489-4498.
- [41] Klein UR, Haindl M, Nigg EA, et al. RanBP2 and SENP3 function in a mitotic SUMO2/3 conjugation-deconjugation cycle on Borealin [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20: 410-418.
- [42] Welburn JP, Vleugel M, Liu D, et al. Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface [J]. *Mol Cell*, 2010, 38: 383-392.
- [43] Wang Y, Yang J, Yang K, et al. The biphasic redox sensing of SENP3 accounts for the HIF-1 α transcriptional activity shift by oxidative stress [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33: 953-963.
- [44] Liu X, Chen W, Wang Q, et al. Negative regulation of TLR inflammatory signaling by the SUMO-deconjugating enzyme SENP6 [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9, e1003480.
- [45] Lee S, Park YY, Kim SH, et al. Human mitochondrial Fis1 links to cell cycle regulators at G2/M transition [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71: 711-725.
- [46] Huang W, Ghisletti S, Saijo K, et al. Coronin 2A mediates actin-dependent de-repression of inflammatory response genes [J]. *Nature*, 2011, 470: 414-418.
- [47] Shao L, Zhou H J, Zhang H, et al. SENP1-mediated NEMO deSUMOylation in adipocytes limits inflammatory responses and type-1 diabetes progression [J]. *Nat Commun*, 2015, 6, 8917.

- [48] Lee MH, Mabb AM, Gill GB, et al. NFKappaB induction of the SUMO protease SENP2: a negative feedback loop to attenuate cell survival response to genotoxic stress [J]. *Mol. Cell*, 2011, 43: 180-191.
- [49] Maringer K, Fernandez-Sesma A. Message in a bottle: lessons learned from antagonism of STING signalling during RNA virus infection. *Cytokine Growth Factor [J]. Rev*, 2014, 25: 669-679.
- [50] Cui Y, Yu H, Zheng X, Peng, et al. SENP7 potentiates cGAS activation by relieving SUMO-mediated inhibition of cytosolic DNA sensing [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13, e1006156.
- [51] Cheng J, Kang X, Zhang S, et al. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia [J]. *Cell*, 2007, 131: 584-595.
- [52] Bawa-Khalfe T, Cheng J, Lin SH, et al. SENP1 induces prostatic intraepithelial neoplasia through multiple mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 25859-66.
- [53] Cheng J, Bawa T, Lee P, et al. Role of desumoylation in the development of prostate cancer [J]. *Neoplasia*, 2006, 8: 667-76.
- [54] Jacques C, Baris O, Prunier-Mirebeau D, et al. Twostep differential expression analysis reveals a new set of genes involved in thyroid oncocytic tumors [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90: 2314-20.
- [55] Xu Y, Li J, Zuo Y, et al. SUMO-specific protease 1 regulates the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells with the upregulated expression of CDK inhibitors [J]. *Cancer Lett*, 2011, 309: 78-84.
- [56] Ma C, Wu B, Huang X, et al. SUMO-specific protease 1 regulates pancreatic cancer cell proliferation and invasion by targeting MMP-9 [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35: 12729-12735.
- [57] Kim EY, Chen L, Ma Y, et al. Enhanced desumoylation in murine hearts by overexpressed SENP2 leads to congenital heart defects and cardiac dysfunction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52: 638-649.
- [58] Kaikkonen S, Jaaskelainen T, Karvonen U, et al. SUMO-specific protease 1 (SENP1) reverses the hormone-augmented SUMOylation of androgen receptor and modulates gene responses in prostate cancer cells [J]. *Mol Endocrinol*, 2009, 23:

292-307.

[59] Cheng J, Wang D, Wang Z, et al. SENP1 enhances androgen receptor-dependent transcription through desumoylation of histone deacetylase 1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 6021-6028.

[60] Semenza GL. Angiogenesis ischemic and neoplastic disorders [J]. *Annu Rev Med*, 2003, 54: 17-28.

[61] Chan N, Milosevic M, Bristow RG. Tumor hypoxia, DNA repair and prostate cancer progression: new targets and new therapies [J]. *Future Oncol*, 2007, 3: 329-41.

[62] Bae SH, Jeong JW, Park JA, et al. Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324: 394-400.

[63] Berta MA, Mazure N, Hattab M, et al. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360: 646-52.

[64] Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, et al. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia [J]. *Cell*, 2007, 131: 309-23.

[65] Li J, Xu Y, Long XD, et al. Cbx4 governs HIF-1 α to potentiate angiogenesis of hepatocellular carcinoma by its SUMO E3 ligase activity [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25: 118-31.

[66] Wang Q, Xia N, Li T, et al. SUMO-specific protease 1 promotes prostate cancer progression and metastasis [J]. *Oncogene*, 2013, 32: 2493-8.

[67] Cheng J, Perkins ND, Yeh ET. Differential regulation of c-Jun-dependent transcription by SUMO-specific proteases [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 14492-8.

[68] Shen HJ, Zhu HY, Yang C, et al. SENP2 regulates hepatocellular carcinoma cell growth by modulating the stability of beta-catenin [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13: 3583-7.

[69] Jiang QF, Tian YW, Shen Q, et al. SENP2 regulated the stability of β -catenin through WWOX in hepatocellular carcinoma cell [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35: 9677-82.

[70] Han Y, Huang C, Sun X, et al. SENP3-mediated deconjugation of SUMO2/3

from promyelocytic leukemia is correlated with accelerated cell proliferation under mild oxidative stress [J]. Biol Chem, 2010, 285: 12906-15.

[71] Sun Z, Hu S, Luo Q, et al. Overexpression of SENP3 in oral squamous cell carcinoma and its association with differentiation [J]. Oncol Rep 2013, 29: 1701-6.

[72] Wang K, Zhang XC. Inhibition of SENP5 suppresses cell growth and promotes apoptosis in osteosarcoma cells [J]. Exp Ther Med, 2014, 7: 1691-5.

[73] Ding X, Sun J, Wang L, et al. Overexpression of SENP5 in oral squamous cell carcinoma and its association with differentiation [J]. Oncol Rep, 2008, 20: 1041-5.

致 谢

文章写到结尾，研究生学习也即将结束，在论文写作过程中，也回顾了自己在江苏大学学习的这三年，觉得自己收获很多，这些都得益于我身边的各位良师益友，在此想对陪伴在我身边的各位表示感谢。

首先最想感谢的是我的导师卢红艳教授，卢老师对工作认真负责，不论是论文指导或是临床教学，老师总是力求做到最好，常常牺牲自己的休息时间来帮助我们学习。论文从最开始的选题、实验构思、实验过程到文章撰写老师都参与指导，期间多次不厌其烦的修改，大到方案调整，小到格式修改都亲力亲为，正是有老师悉心的指导，文章才得以顺利完成。临床学习过程中，老师严谨的工作态度，对临床问题敏锐的洞察力及对患儿及家属感同身受的关心，都让我对医生这个神圣的职业有了更深刻的认识，将在未来一直指引着我的工作和学习。在此，再次向我的导师致以崇高的敬意和真挚的感谢。

感谢江苏大学附属医院儿科的吕进泉主任医师、王锁英主任医师、朱章华主任医师、王秋霞副主任医师、李玉勤副主任医师、欣悦副主任医师、常明副主任医生、卢隽滢医师、韦苇医师等各位带教老师在规培期间认真负责的教学指导，让我不断学习，更加坚定了作为医生的职责和使命。感谢实验室的王中群老师和邵晨老师费心的管理，为我们实验的顺利进行提供的良好研究条件，并为我们在实验中遇到困难时指点迷津。感谢国家自然科学基金（81370746，81741052）、江苏省自然科学基金（BK20161356）对本实验的支持。

感谢刘姜艳、卢衍敏、李波、仲威、万峰云、郝晓波、朱玥、王艳、黄艳娴、刘峻嵘、孙金玲、朱小芳、张玉梅等师兄师姐、同门朋友给我的帮助与关心，因为有你们的陪伴，让三年的生活更加精彩。

感谢我的父母及亲人默默的付出及对我学业的支持，是你们让我可以安心学习，并顺利完成学业。

感谢百忙之中抽空审阅本文，参与答辩及评审的各位专家教授。

再次衷心感谢三年来关心、帮助我的各位！

攻读硕士期间发表学术论文

- [1] Wan XQ, Cai JY, ZHU Y, et al. SENP1 has an important role in lung development and influences the differentiation of alveolar type 2 cells. *Int J Mol Med*. 2018 Oct; 40(4): 1037-1046.
- [2] 万雪晴, 卢红艳, 万峰云, 朱玥, 郝晓波, 鞠慧敏, 王秋霞。SUMO1 和 SENP1 在新生大鼠肺发育过程中的表达及其意义。基础医学与临床。
- [3] 万峰云, 卢红艳, 万雪晴, 郝晓波, 朱玥。Notch1/Hes1 信号调控 CCAAT/增强子结合蛋白 α 表达对高氧损伤肺泡II型上皮细胞增殖与分化的影响。中国组织工程研究。2018, 22(32): 5209-5214.
- [4] 万峰云, 卢红艳, 万雪晴, 朱玥, 郝晓波。Notch1/Hes1 信号调控 C/EBP α 表达对 AECII 细胞增殖与分化的影响[J]。中国病理生理杂志。2019; 35(03): 495-499.
- [5] 朱玥, 卢红艳, 郝晓波, 常明, 王秋霞, 万峰云, 万雪晴。SUMO 化修饰 C/EBP α 在高氧暴露所致支气管肺发育不良早产大鼠中的动态表达及作用。中国当代儿科杂志。2018, 20(05): 403-409.