网络出版时间:2023 - 09 - 19 17:44:42 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230918.1411.010

SENP-1 在慢性间歇性低氧诱导大鼠心肌损伤中的作用

贾远航,谭小武,陈 林,涂容芳,周 芳

摘要 **目的** 探讨小泛素样修饰(SUMO)特异性蛋白酶1(SENP-1)对慢性间歇性低氧(CIH)诱导大鼠心肌损伤的影响及机制。**方法** 将32只雄性SD大鼠分为对照组、CIH组、阴性对照腺相关病毒干预(AAV-shNC)组和SENP-1 shRNA腺相关病毒干预(AAV-shSENP-1)组,每组8只。CIH诱导6周后,进行超声心动图检查;ELISA检测血清中肌钙蛋白I(cTNI)、肌酸激酶MB同工酶(CKMB)、肌红蛋白(Mb)、乳酸脱氢酶(LDH)和心肌组织中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、白细胞介素(IL)-1β、IL-6和肿瘤坏死因子α(TNF-α)水平;HE染色观察心肌组织病理变化;DCFH-DA荧光探针标记法检测心肌组织活性氧(ROS)水平;试剂盒法检测心肌组织中低氧诱导因子-1α(HIF-1α)蛋白SUMO化水平;qRT-PCR和Western blot法检测心肌组织SENP-1和HIF-1α mRNA及蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较,CIH组大鼠心肌组织病理损伤严重,左心室舒张阶段末期内径(LVEDD)、左心室收缩阶段末期内径(LVESD)及血清cTNI、CKMB、Mb和LDH水平均升高($P<0.05$),心肌组织中ROS、MDA、IL-1β、IL-6、TNF-α水平及SENP-1和HIF-1α mRNA及蛋白表达水平升高($P<0.05$),而左心室射血分数(LVEF)、左心室短轴缩短率(LVFS)及血清GSH和SOD水平降低($P<0.05$),心肌组织HIF-1α蛋白SUMO化水平降低($P<0.05$)。与CIH组比较,AAV-shSENP-1组大鼠心肌组织病理损伤减轻,LVEDD、LVESD及血清cTNI、CKMB、Mb和LDH水平降低($P<0.05$),心肌组织中ROS、MDA、IL-1β、IL-6、TNF-α水平及SENP-1和HIF-1α mRNA和蛋白表达水平降低($P<0.05$),LVEF、LVFS和血清GSH、SOD水平升高($P<0.05$),心肌组织HIF-1α蛋白SUMO化水平升高($P<0.05$)。**结论** 抑制SENP-1表达可减轻CIH诱导的大鼠心肌炎症和氧化应激水平,改善心肌损伤和心功能障碍,其作用机制可能与提高HIF-1α SUMO化水平,进而抑制HIF-1α表达有关。

关键词 慢性间歇性低氧;小泛素样修饰特异性蛋白酶1;心肌损伤;低氧诱导因子-1α

中图分类号 R 766

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2023)10 - 1666 - 07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.10.010

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome,OSAHS)是一类常见的睡眠相关呼吸障碍疾病[1]。慢性间歇性低氧(chronic intermittent hypoxia,CIH)是OSAHS导致心血管疾病的主要诱因,其可诱导机体产生氧化应激、炎症反应及激活低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1,HIF-1)[2]。HIF-1是治疗和预防心血管疾病的潜在靶点[3]。小泛素样修饰(small ubiquitin-like modifier,SUMO)是一种可逆的蛋白质翻译后修饰形式,参与DNA损伤、免疫应答、细胞凋亡等过程的调控[4]。SUMO特异性蛋白酶1(SUMO-specific protease-1,SENP-1)是一种重要的去SUMO化酶,参与调控SUMO化和去SUMO化之间的平衡[5]。研究[6]表明,低氧可通过增强SENP-1对HIF-1α蛋白的去SUMO化作用,进而增加HIF-1α的稳定性和转录活性。故推测,抑制SENP-1介导的HIF-1α蛋白去SUMO化,降低HIF-1α水平,可能对CIH诱导损伤具有一定的保护作用。因此,该研究拟采用CIH诱导大鼠模拟OSAHS模型,探讨下调SENP-1表达是否会通过调节HIF-1α表达,改善CIH诱导的大鼠心肌损伤,旨在为CIH相关心脏疾病的治疗提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 32只SPF级雄性SD大鼠,8周龄,体质量(300 ± 20)g,购自武汉云克隆动物有限公司,动物生产许可证号:SYXK(鄂)2018-0069。在SPF级环境中适应性喂养1周,饲养条件:温度20 ~ 25 ℃,湿度55% ~ 60%,24 h昼夜循环光照,自由饮水摄食。

1.1.2 主要试剂与仪器 SENP-1 shRNA腺相关病毒(adeno-associated virus shSENP-1,AAV-shSENP-

2023 - 05 - 21 接收

基金项目:湖南省卫生健康委科研课题基金(编号:202203024555)

作者单位:南华大学衡阳医学院附属第二医院呼吸与危重症医学科,衡阳 421001

作者简介:贾远航,男,主治医师;

周 芳,女,主治医师,责任作者,E-mail:932659965@qq.com

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1)及其阴性对照 AAV-shNC(滴度 1×10^{12} vg/ml)购自汉恒生物科技(上海)有限公司;心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I,cTNI)、肌酸激酶 MB 同工酶(creatine kinase MB isoenzyme,CKMB)、肌红蛋白(myoglobin,Mb)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutases,SOD)、谷胱甘肽(glutathione,GSH)、白细胞介素(interleukin,IL)-1β、IL-6、肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;活性氧(reactive oxygen species,ROS)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;反转录试剂盒、qRT-PCR 荧光定量试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;核蛋白提取试剂盒、SUMO 化定量检测试剂盒购自美国 Epigentek 公司;兔抗大鼠 SENP-1 抗体和 GAPDH 抗体均购自英国 Abcam 公司;小鼠抗大鼠 HIF-1α 抗体购自美国 R&D Systems 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 将 32 只 SD 大鼠随机分为 4 组:对照组、CIH 组、阴性对照腺相关病毒干预(AAV-shNC)组和 SENP-1 shRNA 腺相关病毒干预(AAV-shSENP-1)组,每组 8 只。除对照组外,其他组大鼠均进行 CIH 诱导法建立 OSAHS 模型[7]:将大鼠置于自制有机玻璃低氧舱内,每天 8 h 循环充入空气和氮气,每一循环时间为 8 min:前 4 min 充入氮气,使舱内最低氧浓度达 6%~8%,维持 1 min,继而排出舱内空气 2 min,使舱内氧气浓度逐渐恢复至 21%,大鼠平均最低动脉血氧饱和度为 60%~75%,维持 1 min。对照组大鼠不做任何干预,常规饲养。AAV-shNC 组和 AAV-shSENP-1 组大鼠分别在 CIH 诱导 1 周后从尾静脉注射 5×10^{11} vg AAV-shNC 或 AAV-shSENP-1。CIH 诱导 6 周后结束实验,对各组大鼠进行检测。

1.2.2 超声心动图检查 采用 3% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射大鼠后,胸前区脱毛,固定四肢,行超声心动图检查,导出超声参数:左心室舒张阶段末期内径(left ventricular end diastolic diameter,LVEDD)、左心室收缩阶段末期内径(left ventricular end systolic dimension,LVESD)、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF)和左心室短轴缩短率(left ventricular fraction shortening,LVFS)。

1.2.3 ELISA 检测血清及心肌组织相关指标水平 采集各组大鼠静脉血,离心分离获得血清样本。取各组大鼠心肌组织,剪碎后匀浆,离心分离获得组织匀浆上清液。根据 ELISA 试剂盒说明书操作,分别检测血清中 cTNI、CKMB、Mb、LDH 和心肌组织中 MDA、SOD、GSH、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平。

1.2.4 HE 染色观察心肌组织 取各组大鼠心肌组织,4% 多聚甲醛固定 48 h,石蜡包埋、切片。依次行苏木精、伊红染色,脱蜡至水,封片后于光学显微镜下观察组织病理情况。

1.2.5 DCFH-DA 荧光探针标记法检测心肌组织 ROS 水平 取各组大鼠新鲜心肌组织,制备冰冻切片。根据 ROS 检测试剂盒说明书操作,加入 DCFH-DA 荧光探针,避光室温孵育 30 min。PBS 洗涤后,加入 DAPI 染核,避光室温孵育 10 min。封片后于荧光显微镜下观察。

1.2.6 qRT-PCR 检测心肌组织 SENP-1 和 HIF-1α mRNA 水平 取各组大鼠心肌组织,匀浆并提取总 RNA,采用反转录试剂盒合成 cDNA,再以 cDNA 模板进行 qRT-PCR 扩增。SENP-1 上游引物:5′-TGCAGTGCTTGATTCCGTAG-3′,下游引物:5′-TTCTTTGTCCAGCGTTTCAC-3′。HIF-1α 上游引物:5′-TGTGGATAGCGATATGGTCAA-3′,下游引物:5′-CTCTTTCC TGCTCTGTCTGGT-3′。内参 β-actin 上游引物:5′-CCCGCGAGTACAACCTTCTT-3′,下游引物:5′-AGGGTCAGGATGCCTCTCTT-3′。反应条件为 95 ℃预变性 5 min,然后共循环 40 次:95 ℃变性 15 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s。以 β-actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 SENP-1 和 HIF-1α mRNA 相对表达量。

1.2.7 SUMO 化水平检测 取各组大鼠心肌组织,匀浆后提取核蛋白,BCA 定量后,采用 SUMO 化定量检测试剂盒测定。加入 HIF-1α 抗体,室温孵育 2 h,封闭液室温封闭 45 min。加入 SUMO 分析缓冲液,每孔加入 10 μg 核蛋白室温孵育 1 h。加入显色剂显色 5 min,酶标板测各孔于 450 nm 处的吸光度值,以对照组测值为 1,计算其他组 HIF-1α 蛋白 SUMO 化相对值。

1.2.8 Western blot 检测心肌组织中 SENP-1 和 HIF-1α 蛋白表达水平 取各组大鼠心肌组织,匀浆并提取总蛋白,定量后经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。加入一抗(SENP-1 和 HIF-1α 稀释比为 1∶1 000、GAPDH 稀释比为 1∶2 000)于 4 ℃下孵育过夜。加入二抗,室温孵育 1 h。加入化学发光试剂,显影曝光,分析蛋白条带灰度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行统计

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，所有数据均符合正态分布，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心功能指标变化 与对照组比较，CIH 组大鼠 LVEDD 和 LVESD 升高（$t = -16.690$，$P < 0.05$；$t = -13.682$，$P < 0.05$），而 LVEF 和 LVFS 降低（$t = 6.035$，$P < 0.05$；$t = 8.773$，$P < 0.05$）。与 CIH 组比较，AAV-shSENP-1 组大鼠 LVEDD 和 LVESD 均降低（$t = 5.477$，$P < 0.05$；$t = 5.519$，$P < 0.05$），LVEF 和 LVFS 升高（$t = -3.406$，$P < 0.05$；$t = -6.327$，$P < 0.05$）。见表 1。

2.2 各组大鼠心肌损伤变化 对照组大鼠心肌组织结构正常，心肌纤维排列紧密，心肌细胞形态正常。CIH 组和 AAV-shNC 组大鼠心肌纤维排列紊乱，部分纤维出现溶解断裂，细胞形态异常，部分细胞核固缩深染。AAV-shSENP-1 组大鼠心肌纤维排列紊乱、断裂情况得到改善。见图 1。

2.3 各组大鼠血清 cTNI、CKMB、Mb 和 LDH 水平变化 与对照组比较，CIH 组大鼠血清中心肌损伤指标 cTNI、CKMB、Mb 和 LDH 升高（$t = -18.123$，$P < 0.05$；$t = -36.267$，$P < 0.05$；$t = -24.651$，$P < 0.05$；$t = -29.351$，$P < 0.05$）。与 CIH 组比较，AAV-shSENP-1 组 cTNI、CKMB、Mb 和 LDH 水平降低（$t = 6.011$，$P < 0.05$；$t = 12.529$，$P < 0.05$；$t = 8.436$，$P < 0.05$；$t = 10.431$，$P < 0.05$）。见表 2。

2.4 各组大鼠氧化应激和炎症水平变化 与对照组比较，CIH 组大鼠心肌组织 DCFH-DA 探针荧光强度较高，即 ROS 水平升高；与 CIH 组比较，AAV-shSENP-1 组大鼠心肌组织 DCFH-DA 探针荧光强度减弱，即 ROS 水平降低（图 2）。与对照组比较，CIH 组大鼠心肌组织中 MDA、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量升高（$t = -14.921$，$P < 0.05$；$t = -37.497$，$P < 0.05$；$t = -41.421$，$P < 0.05$；$t = -15.313$，$P < 0.05$），GSH 含量和 SOD 活性降低（$t = 10.265$，$P < 0.05$；$t = 17.947$，$P < 0.05$）。与 CIH 组比较，AAV-shSENP-1 组大鼠心肌组织中 MDA、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量降低（$t = 6.633$，$P < 0.05$；$t = 9.616$，$P < 0.05$；$t = 8.109$，$P < 0.05$；$t = 7.371$，$P < 0.05$），GSH 含量和 SOD 活性升高（$t = -4.161$，$P < 0.05$；$t = -11.498$，$P < 0.05$）。见表 3。

表 1 各组大鼠 LVEDD、LVESD、LVEF 及 LVFS 水平比较（$n = 8$，$\bar{x} \pm s$）

组别	LVEDD（mm）	LVESD（mm）	LVEF（%）	LVFS（%）
对照	4.85 ± 0.34	3.97 ± 0.42	80.26 ± 5.20	67.22 ± 4.66
CIH	7.24 ± 0.21*	6.78 ± 0.40*	62.23 ± 6.69*	44.96 ± 5.45*
AAV-shNC	7.08 ± 0.39	6.88 ± 0.43	63.49 ± 5.99	47.53 ± 3.31
AAV-shSENP-1	5.73 ± 0.75#	5.21 ± 0.70#	72.02 ± 4.63#	58.78 ± 2.90#

与对照组比较：* $P < 0.05$；与 CIH 组比较：# $P < 0.05$

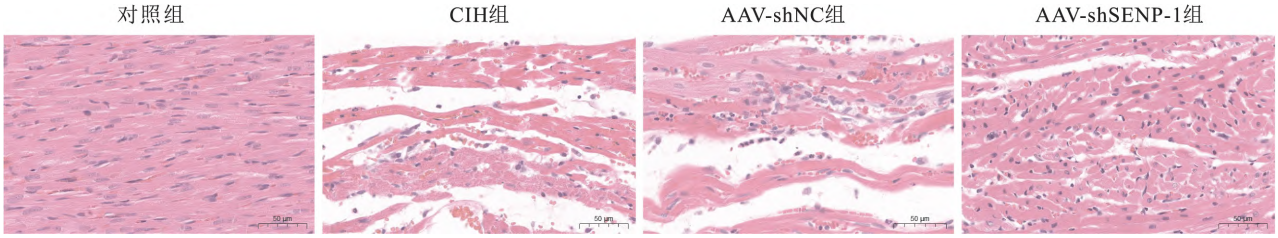

图 1 大鼠心肌组织的 HE 染色图 ×200

表 2 各组大鼠血清 cTNI、CKMB、Mb 和 LDH 水平比较（$n = 8$，$\bar{x} \pm s$）

组别	cTNI（ng/ml）	CKMB（U/L）	Mb（U/L）	LDH（U/L）
对照	1.27 ± 0.23	962.22 ± 53.83	52.16 ± 7.78	1 174.27 ± 66.13
CIH	6.45 ± 0.77*	2 269.13 ± 65.55*	183.06 ± 12.85*	2 486.80 ± 107.82*
AAV-shNC	6.92 ± 0.62	2 260.54 ± 92.67	173.96 ± 8.78	2 438.38 ± 111.74
AAV-shSENP-1	4.25 ± 0.69#	1 722.64 ± 87.92#	117.35 ± 17.89#	1 884.39 ± 122.71#

与对照组比较：* $P < 0.05$；与 CIH 组比较：# $P < 0.05$

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表3 各组大鼠 MDA、SOD、GSH、IL-1β、IL-6 和 TNF-β 水平比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	MDA(μmol/g)	SOD(U/mg)	GSH(μmol/g)	IL-1β(ng/ml)	IL-6(ng/ml)	TNF-α(ng/ml)
对照	3.88±0.52	183.73±11.25	49.80±3.38	35.14±3.14	26.46±2.27	13.41±2.36
CIH	9.69±0.97*	89.94±9.58*	31.79±3.63*	187.31±11.04*	294.48±18.16*	52.54±6.85*
AAV-shNC	10.06±1.37	92.64±7.97	30.94±5.15	185.62±17.93	298.01±15.64	56.99±8.37
AAV-shSENP-1	6.25±1.08#	144.91±9.54#	40.08±4.31#	113.49±18.70#	228.11±14.36#	32.03±3.93#

与对照组比较:* $P<0.05$;与 CIH 组比较:# $P<0.05$

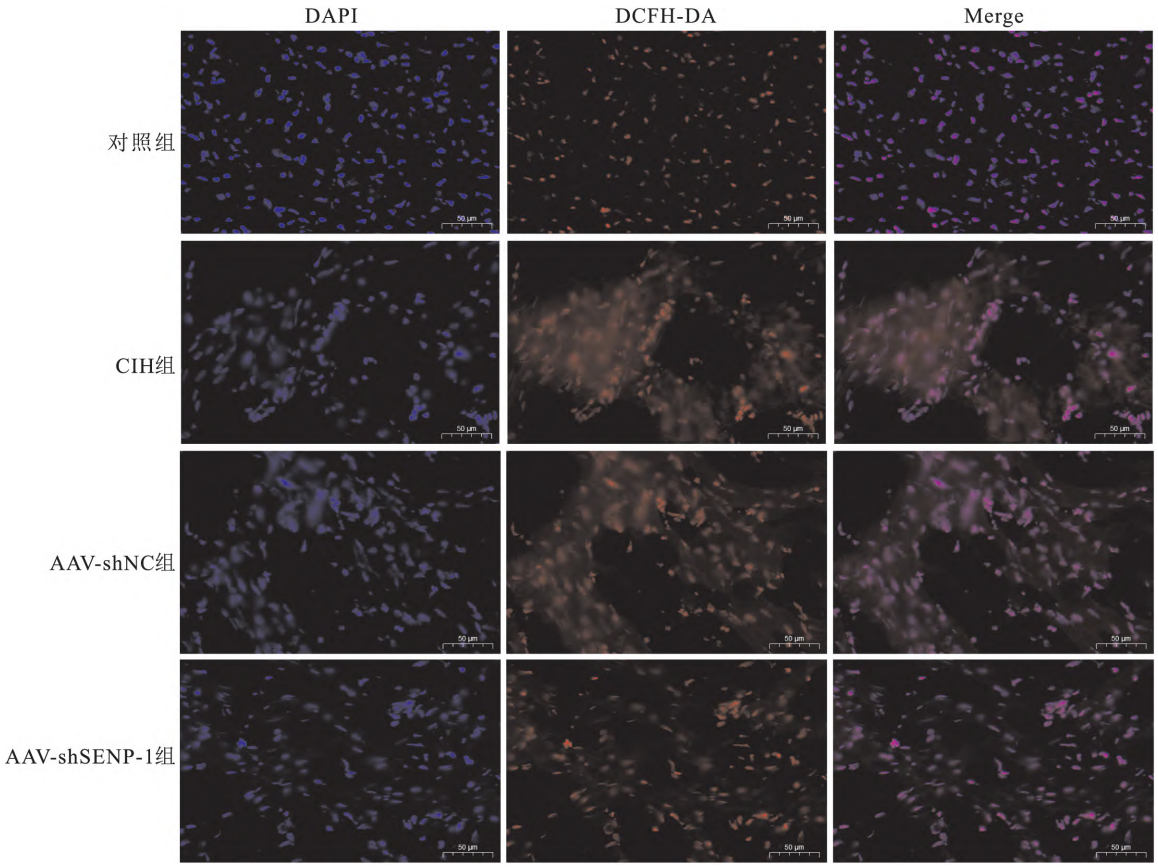

图2 DCFH-DA 荧光探针标记法检测大鼠心肌组织 ROS 水平 ×200

2.5 各组大鼠心肌组织 SENP-1 和 HIF-1α 水平变化 与对照组比较,CIH 组大鼠心肌组织中 SENP-1 和 HIF-1α mRNA 及蛋白表达水平均升高($t=-18.564$, $P<0.05$; $t=-20.255$, $P<0.05$; $t=-16.836$, $P<0.05$; $t=-11.882$, $P<0.05$),HIF-1α 蛋白 SUMO 化水平降低($t=8.945$, $P<0.05$)。与 CIH 组比较,AAV-shSENP-1 组 SENP-1 和 HIF-1α mRNA 及蛋白表达水平降低($t=13.451$, $P<0.05$; $t=8.610$, $P<0.05$; $t=4.650$, $P<0.05$; $t=2.863$, $P<0.05$),HIF-1α 蛋白 SUMO 化水平升高($t=-5.480$, $P<0.05$)。见图3。

3 讨论

CIH 暴露可导致心脏收缩功能障碍和心脏重构[8]。在本研究中,CIH 暴露大鼠的心脏收缩功能下降,LVEDD 和 LVESD 均高于对照组大鼠,与其他研究结果一致[9],且血清中心肌损伤标志物 cTNI、CKMB、MYO 和 LDH 显著升高,提示 CIH 暴露影响大鼠心功能,造成心肌损伤。研究[9]发现 CIH 诱导后的大鼠心肌组织中 SOD 活性和 GSH 含量降低,MDA 水平升高。Wang et al[10] 研究结果显示,在 CIH 小鼠心肌组织中,SOD 活性降低,MDA、IL-1β、IL-6、TNF-α 和 HIF-1α 水平均显著升高,该研究认为 CIH 主要通过诱导氧化应激和炎症引起小鼠心肌损伤。在本研究结果中,CIH 大鼠心肌组织 SOD 和 GSH 水平降低,MDA、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量升高,心肌组织病理损伤严重,ROS 水平升高,即呈现出严重的氧化应激和炎症反应。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

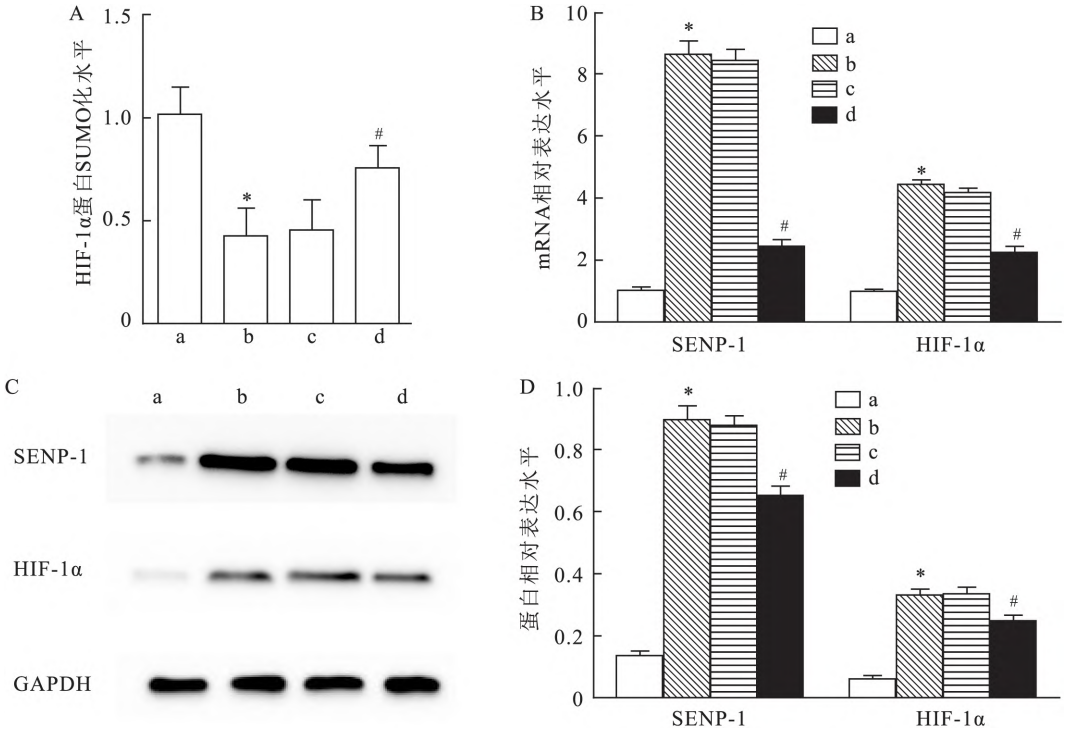

图3 各组大鼠 SENP-1、HIF-1α mRNA 及蛋白表达水平和 HIF-1α SUMO 化水平比较

A: 各组 HIF-1α 蛋白 SUMO 化水平比较; B: 各组 SENP-1 和 HIF-1α mRNA 相对表达水平比较; C: Western blot 检测 SENP-1 和 HIF-1α 蛋白表达水平; D: 各组 ENP-1 和 HIF-1α 蛋白相对表达水平比较; a: 对照组; b: CIH 组; c: AAV-shNC 组; d: AAV-shSENP-1 组; 与对照组比较: $^{*}P<0.05$; 与 CIH 组比较: $^{\#}P<0.05$

SUMO 广泛存在于真核细胞中,蛋白质 SUMO 化在维持细胞在应激状态下的动态平衡中起着至关重要的作用,SUMO 化和去 SUMO 化对多种细胞生物过程有重大影响[11]。去 SUMO 化过程由 SENPs 家族调节,将前 SUMO 激活为 SUMO,并从翻译后修饰的蛋白质中去除 SUMO[12]。HIF-1α 是 SUMO 化修饰的底物蛋白之一,在低氧情况下,SENP-1 通过对 HIF-1α 蛋白去 SUMO 化,对 HIF-1α 的稳定性和活性发挥正反馈作用[13]。临床研究[14]表明,OSAHS 患者的器官、组织和循环血液中 HIF-1 的表达上调。CIH 是 HIF-1 的有效激活剂,当 HIF-1 被激活后,可导致 ROS 水平升高[15]。低氧可促进 SENP-1 和 HIF-1α 的表达,下调 SENP-1 可抑制 HIF-1α 的表达和血管生成能力,下调 HIF-1α 可抑制 SENP-1 的表达和血管生成能力[16],即 SENP-1 和 HIF-1α 之间相互调节。Liu et al[17]研究表明,当抑制 SENP-1 表达时,可降低心肌细胞氧化应激,减少线粒体损伤,抑制心室重构,最终改善心力衰竭小鼠的心功能。Tang et al[18]研究结果显示,降低 HIF-1α 可抑制低氧诱导的心肌组织损伤,而过表达 HIF-1α 会逆转这一现象。综合上述报道,抑制 SENP-1 表达,提高 HIF-1α 蛋白 SUMO 化水平,调控 HIF-1α 稳定性和激活,可能对 CIH 诱导大鼠的心肌损伤具有一定的保护作用。

在本研究中,CIH 诱导大鼠的心肌组织中 SENP-1 和 HIF-1α 表达水平升高,HIF-1α SUMO 化水平降低,而当干扰 SENP-1 表达后,HIF-1α 表达水平降低,HIF-1α 蛋白 SUMO 化水平升高,大鼠心功能得到改善,心肌损伤标志物水平降低,心肌组织病理损伤减轻,且促炎细胞因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量减少,ROS、MDA 水平降低,SOD 和 GSH 水平升高,提示抑制 CIH 诱导大鼠 SENP-1 表达,可减轻心肌炎症和氧化应激水平,缓解心肌损伤和心功能障碍,其作用机制可能与提高 HIF-1α SUMO 化水平,进而抑制 HIF-1α 表达有关。本研究结果可为 CIH 所致 OSAHS 的临床治疗提供数据资料,以 SENP-1 抑制剂为导向的治疗策略可能具有一定潜在价值,值得进一步深度探讨。

参考文献

[1] Chen C Y, Hsu P Y, Hsiao C C, et al. Epigenetics: a potential mechanism involved in the pathogenesis of various adverse conse-

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

quences of obstructive sleep apnea [J]. Int J Mol Sci,2019,20(12):2937.

[2] Moulin S,Arnaud C,Bouyon S,et al. Curcumin prevents chronic intermittent hypoxia-induced myocardial injury [J]. Ther Adv Chronic Dis,2020,11:2040622320922104.

[3] Liu M X,Galli G,Wang Y L,et al. Novel therapeutic targets for hypoxia-related cardiovascular diseases: the role of HIF-1 [J]. Front Physiol,2020,11:774.

[4] Han Z J,Feng Y H,Gu B H,et al. The post-translational modification,SUMO ylation,and cancer (review) [J]. Int J Oncol,2018,52(4):1081-94.

[5] Kumar A,Zhang K Y L. Advances in the development of SUMO specific protease (SENP) inhibitors [J]. Comput Struct Biotechnol J,2015,13:204-11.

[6] Cui C P,Wong C C L,Kai A K L,et al. SENP1 promotes hypoxia-induced cancer stemness by HIF-1α deSUMOylation and SENP1/HIF-1α positive feedback loop [J]. Gut,2017,66(12):2149-59.

[7] 温 雯,姚巧玲,陈玉岚,等. 瞬时受体电位通道C与阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征大鼠心脏和肾脏损害的关系 [J]. 浙江大学学报(医学版),2020,49(4):439-46.

[8] Xu X,Zhen P H,Yu F C,et al. Chronic intermittent hypoxia accelerates cardiac dysfunction and cardiac remodeling during cardiac pressure overload in mice and can be alleviated by PHD3 overexpression [J]. Front Cardiovasc Med,2022,9:974345.

[9] Zhao Y S,An J R,Yang S C,et al. Hydrogen and oxygen mixture to improve cardiac dysfunction and myocardial pathological changes induced by intermittent hypoxia in rats [J]. Oxid Med Cell Longev,2019,2019:7415212.

[10] Wang W Y,Gu H B,Li W H,et al. SRC-3 knockout attenuates myocardial injury induced by chronic intermittent hypoxia in mice [J]. Oxid Med Cell Longev,2021,2021:6372430.

[11] Kroonen J S,Vertegaal A C O. Targeting SUMO signaling to wrestle cancer [J]. Trends Cancer,2021,7(6):496-510.

[12] Brand M,Bommeli E B,Rutimann M,et al. Discovery of a dual SENP1 and SENP2 inhibitor [J]. Int J Mol Sci,2022,23(20):12085.

[13] Cheng J K,Kang X L,Zhang S,et al. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia [J]. Cell,2007,131(3):584-95.

[14] Gabryelska A,Turkiewicz S,Karuga F F,et al. Disruption of circadian rhythm genes in obstructive sleep apnea patients-possible mechanisms involved and clinical implication [J]. Int J Mol Sci,2022,23(2):709.

[15] Nanduri J,Wang N,Wang B L,et al. Lysine demethylase KDM6B regulates HIF-1α-mediated systemic and cellular responses to intermittent hypoxia [J]. Physiol Genomics,2021,53(9):385-94.

[16] Zhou J,Sun C. SENP1/HIF-1α axis works in angiogenesis of human dental pulp stem cells [J]. J Biochem Mol Toxicol,2020,34(3):e22436.

[17] Liu J,Li Y,Bian X Y,et al. Astragaloside IV alleviates heart failure by regulating SUMO-specific protease 1 [J]. Exp Ther Med,2021,22(4):1076.

[18] Tang X Y,Jiang H L,Lin P Y,et al. Insulin-like growth factor binding protein-1 regulates HIF-1α degradation to inhibit apoptosis in hypoxic cardiomyocytes [J]. Cell Death Discov,2021,7:242.

The role of SENP-1 in chronic intermittent hypoxia induced myocardial injury in rats

Jia Yuanhang,Tan Xiaowu,Chen Lin,Tu Rongfang,Zhou Fang

(*Dept of Respiratory and Critical Care Medicine,The Second Affiliated Hospital,Hengyang Medical School,University of South China,Hengyang* 421001)

Abstract ***Objective*** To investigate the effects and mechanism of small ubiquitin-like modifier (SUMO) specific proteinase-1 (SENP-1) on chronic intermittent hypoxia (CIH) induced myocardial injury in rats. ***Methods*** 32 male SD rats were randomly divided into: control group,CIH group,negative control adeno-associated virus intervention group (AAV-shNC) and SENP-1 shRNA adeno-associated virus intervention group (AAV-shSENP-1),with 8 rats in each group. After 6 weeks of CIH induction,echocardiography was performed. The levels of cardiac troponin I (cTNI),creatine kinase MB isoenzyme (CKMB),myoglobin (Mb),lactate dehydrogenase (LDH) in serum and malondialdehyde (MDA),uperoxide dismutases (SOD),glutathione (GSH),interleukin(IL)-1β,IL-6 and tumor necrosis factor-α(TNF-α) in myocardial tissue were detected by ELISA. The pathological changes of myocardial tissue was observed by HE staining. The reactive oxygen species (ROS) level in myocardial tissue was detected by DCFH-DA fluorescence probe labeling. The small ubiquitin-like modifier (SUMO) level of hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) protein in myocardial tissue was detected by kit. The mRNA and protein levels of SENP-1 and HIF-1α in myocardial tissue were detected by qRT-PCR and Western blot. ***Results*** Compared with the control group,the pathological damage of myocardial tissue in CIH group was serious,the levels of left ventricular end diastolic

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

网络出版时间:2023 - 06 - 19 10:48:55 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230918.1411.011

巨噬细胞特异性敲除 MST1 小鼠模型的构建

薛 茜[1],李鉴洋[2],高文茜[1],张玉侠[1]

摘要 **目的** 制备髓系(包括巨噬细胞和粒细胞)特异敲除哺乳动物不育系 20 样激酶 1(MST1)基因小鼠,为研究巨噬细胞 MST1 在临床相关疾病发生中的作用及机制提供动物模型。**方法** 利用 MST1 基因携带 loxP 位点的小鼠($Mst1^{flox/flox}$)和髓系细胞特异表达 LysM-Cre 小鼠杂交构建巨噬细胞特异性敲除 MST1 小鼠($Mst1^{flox/flox}$ LysM-Cre$^+$,即 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$);通过聚合酶链式反应(PCR)分别扩增 loxP 位点和 Cre 基因进行基因型鉴定;通过定量 PCR 以及免疫荧光验证 MST1 在巨噬细胞中的敲除效率;通过流式细胞术检测肝脏主要免疫细胞群。**结果** $Mst1^{flox/flox}$ LysM-Cre$^+$,即 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$为巨噬细胞特异性敲除 MST1 小鼠基因型;qPCR 和免疫荧光检测表明骨髓来源的巨噬细胞和腹腔巨噬细胞的 MST1 敲除效率达 70% 以上;流式检测表明敲除巨噬细胞 MST1 基因对小鼠肝脏的主要免疫细胞群无明显影响。**结论** 成功构建巨噬细胞特异敲除 MST1 小鼠模型,为进一步研究巨噬细胞 MST1 在临床相关疾病中的作用及机制奠定了基础。

关键词 哺乳动物不育系 20 样激酶 1; Cre-loxP; 巨噬细胞; 基因敲除小鼠; Hippo 通路

中图分类号 R 392.2

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2023)10 - 1672 - 06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.10.011

哺乳动物不育系 20 样激酶 1(mammalian sterile line 20-like kinase 1,MST1)是 Hippo 通路的关键激酶,在调控细胞增殖和分化过程中发挥着重要的作用[1]。在经典 Hippo 通路中,MST1 可以和萨尔瓦多家族同源物 1(salvador homolog 1,SAV1)相互作用,磷酸化激活下游的大肿瘤抑制基因 1/2(large tumor suppressor 1/2,LATS1/2),进而磷酸化 Yes 相关蛋白(Yes-associatedprotein,YAP)和有 PDZ 结合基序的转录辅激活物(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif,TAZ),二者磷酸化后与 14-3-3 蛋白结合滞留在胞质中,无法发挥转录共激活功能,从而抑制细胞增殖、促进细胞凋亡[2-3]。

此外,研究[4-5]表明,MST1 在单核/巨噬细胞中高表达,以 MST1 激酶为核心的非经典的 Hippo 通路对调控巨噬细胞参与的疾病免疫反应以及巨噬细胞表型和功能有着重要的影响。因此,该研究利用 Cre-loxP 系统构建巨噬细胞特异性敲除 MST1 小鼠

2023 - 05 - 22 接收

基金项目:炎症免疫性疾病安徽省实验室开放基金项目(编号:IMM-DL202105);安徽医科大学第一临床医学院临床医学(“5+3”一体化)早期接触科研项目(编号:2021-ZQKY-59)

作者单位:安徽医科大学[1]基础医学院病理生理学教研室、[2]第一临床医学院,合肥 230032

作者简介:薛 茜,女,硕士研究生;

张玉侠,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:zhangyuxia@ahmu.edu.cn

diameter (LVEDD), left ventricular end systolic dimension (LVESD) and serum cTNI, CKMB, Mb and LDH significantly increased ($P<0.05$), and the levels of ROS, MDA, IL-1β, IL-6, TNF-α and the mRNA and protein levels of SENP-1 and HIF-1α in myocardial tissue also significantly increased ($P<0.05$), while the levels of LVEF, LVFS, serum GSH and SOD significantly decreased ($P<0.05$), and the SUMOylates level of HIF-1α protein in myocardial tissue also significantly decreased ($P<0.05$). Compared with CIH group, AAV-shSENP-1 group had less myocardial pathological damage, the levels of LVEDD, LVESD and serum cTNI, CKMB, Mb and LDH significantly decreased ($P<0.05$), and the levels of ROS, MDA, IL-1β, IL-6, TNF-α and the mRNA and protein levels of SENP-1 and HIF-1α in myocardial tissue also significantly decreased ($P<0.05$), the levels of LVEF, LVFS, serum GSH and SOD significantly increased ($P<0.05$), and the SUMOylates level of HIF-1α protein in myocardial tissue also significantly decreased ($P<0.05$). ***Conclusion*** Inhibition of SENP-1 expression can alleviate CIH induced myocarditis and oxidative stress in rats, improve myocardial injury and cardiac dysfunction, and its mechanism may be related to the improvement of HIF-1α SUMOylates level, thus inhibiting HIF-1α expression.

Key words chronic intermittent hypoxia; small ubiquitin-like modifier-specific protease-1; myocardial injury; hypoxia inducible factor-1α

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net