

# 蛋白酶体亚基 $\beta 6$ 通过抑制 JAK2/STAT3 通路促进肾损伤的研究

刘尊伟<sup>1\*</sup>, 杨沂璐<sup>2</sup>, 李杨<sup>1</sup>, 张静<sup>1</sup>, 丁晨光<sup>1</sup>

(1. 西安交通大学第一附属医院 肾移植科, 陕西 西安 710061; 2. 西安交通大学第一附属医院 麻醉手术部, 陕西 西安 710061)

**摘要:** 目的 探究蛋白酶体亚基  $\beta 6$  (recombinant proteasome subunit beta type 6, *PSMB6*) 在急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 中的作用机制。方法 建立氧-糖剥夺/恢复 (oxygen-glucose deprivation/recovery, OGD/R) HK-2 细胞损伤模型后, 分别采用  $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  *PSMB6* 干扰载体 (*PSMB6* short hairpin RNA, sh-*PSMB6*) 和  $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  *PSMB6* 过表达载体 pcDNA-*PSMB6* 转染细胞, 以及转染 pcDNA-*PSMB6* 载体的同时添加  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  JAK2/STAT3 信号通路激活剂 Butyramide 或  $2 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  内质网应激抑制剂 4-PBA, 细胞培养 48 h 后检测 *PSMB6* 的表达水平、HK-2 细胞的活力、凋亡率以及内质网应激和 JAK2/STAT3 信号通路的变化。建立缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 小鼠 AKI 模型后, 将  $500 \mu\text{L}$  *PSMB6* 慢病毒干扰载体通过尾静脉注射到小鼠体内, 并检测 *PSMB6* 的表达水平以及小鼠 AKI 情况。结果 OGD/R 诱导的 HK-2 细胞中 *PSMB6* 表达上调, 干扰 *PSMB6* 改善了 OGD/R 诱导的 HK-2 细胞活力的降低, 并抑制细胞凋亡和内质网应激。此外, *PSMB6* 显著抑制了 JAK2/STAT3 信号通路, Butyramide 和 4-PBA 的使用消除了 *PSMB6* 造成的 HK-2 细胞活力的降低和凋亡的增加。AKI 模型小鼠肾组织中 *PSMB6* 表达上调, 干扰 *PSMB6* 缓解了 I/R 模型小鼠的 AKI。结论 *PSMB6* 可能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路来促进细胞凋亡和内质网应激进而加重 AKI。

**关键词:** 急性肾损伤; 蛋白酶体亚基  $\beta 6$ ; JAK2/STAT3 信号通路; 凋亡; 内质网应激

**中图分类号:** R 364.5 **文献标志码:** A

**引用本文:** 刘尊伟, 杨沂璐, 李杨, 等. 蛋白酶体亚基  $\beta 6$  通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路促进肾损伤的研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2026, 43 (4): 345-353.

**Cite this article as:** LIU Zunwei, YANG Yijun, LI Yang, et al. Recombinant proteasome subunit beta type 6 promotes renal injury by inhibiting the JAK2/STAT3 pathway [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2026, 43 (4): 345-353.

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是导致慢性肾脏疾病发生的主要原因之一<sup>[1]</sup>, 研究显示, 住院患者 AKI 发病率为 7% ~ 18%, 危重患者的 AKI 发病率高达 30% ~ 70%<sup>[2]</sup>。肾缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤是导致 AKI 发生的主要原因, 其可通过诱导肾小管细胞死亡引起肾小管的结构和功能损伤<sup>[3-5]</sup>。肾 I/R 损伤涉及多种复杂机制, 如细胞凋亡、内质网应激和氧化应激等<sup>[6-8]</sup>。尽管已有研究报道了 I/R 损伤的机制, 但其具体致病机制尚未完全阐明。内质网应激被证明是肾 I/R 损伤的关键环节之一, 据报道抑制内质网应激可减轻后肾 I/R 损伤<sup>[9-10]</sup>。现有文献提示, 蛋白酶体亚基  $\beta 6$  (recombinant proteasome subunit beta type 6, *PSMB6*) 可作为 AKI 发生的关键基因<sup>[11]</sup>, 该基因属 26S 蛋白酶体亚基家族成员, 并且 26S 蛋白酶体可参与内质网应激<sup>[12]</sup>。此外, 最新研究证明, *PSMB6* 与 STAT3

相关, 而 JAK2/STAT3 信号通路能够减轻炎症和抑制细胞凋亡<sup>[13-15]</sup>。然而, *PSMB6* 是否通过调节 JAK2/STAT3 信号通路来影响 AKI 过程中的内质网应激尚不清楚。因此, 本研究作者旨在探究 *PSMB6* 调节 AKI 的作用机制。

## 1 仪器与材料

厌氧培养箱 (英国 Ruskin Technology 公司), TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (日本 TaKaRa 公司), 多功能酶标仪 Synergy H1 (美国 Agilent 科技有限公司), 流式细胞仪 (美国 Thermo Fisher 公司), 台式低温高速离心机 (日本 Kubota 公司), 细胞培养箱 (上海力申科学仪器公司)。

Lipofectamine 2000 试剂、TRIzol 试剂、蛋白质提取试剂盒、BCA TM 蛋白质测定试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司), H&E 染色试剂盒 (上海翌圣生物科技有限公司), PrimeScript<sup>™</sup> RT rea-

gent 试剂盒(日本 TaKaRa 公司),化学发光试剂盒(德国 Merck 公司),JAK2/STAT3 信号通路激活剂 Butyramide、内质网应激抑制剂 4-PBA、CCK-8 试剂盒(美国 Med Chem Express 公司),V-FITC/PI 染色试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司),肌酐(creatinine, Cr)试剂盒(英国 Abcam 公司),尿素氮(Urea nitrogen, BUN)试剂盒(北京普利莱基因公司), anti-*PSMB6* (ab150392)、anti- $\beta$ -actin (ab8226)、anti-GRP78 (ab108615)、anti-CHOP(ab194533)、anti-Caspase-12(ab62484)、anti-*p*-EIF2 $\alpha$  (ab32157)、anti-ATF4 (ab270980)、anti-PERK (ab229912)、anti-*p*-JAK2 (ab32101)、anti-*p*-STAT3 (ab267373)、anti-IgG (ab6721)(英国 Abcam 公司),基因过表达载体(pcDNA-*PSMB6*)和对照载体(pcDNA 3.1)(南京金斯瑞生物科技有限公司),*PSMB6* 的干扰载体(*PSMB6* short hairpin RNA, sh-*PSMB6*)和阴性对照(sh-NC)、慢病毒干扰载体 sh-*PSMB6*(上海汉恒生物公司)。

50 只 10 周龄雄性 C57BL/6 小鼠(体质量: 22 ~ 23 g)(动物生产许可证号: SCXK(陕)2023-002)购买于西安交通大学实验动物中心,饲养于标准动物实验室。将小鼠安置在(25 ± 2)℃、相对湿度为 50% 的特定无病原体环境条件下,12 h 的光照周期,并自由取水取食。人近端小管上皮(HK-2, GDC0152)细胞购自中国典型培养物保藏中心。动物实验经西安交通大学附属医院伦理委员会批准,动物伦理号为 XTUAE2023-2235。

## 2 方法

### 2.1 HK-2 细胞培养和氧-糖剥夺/恢复(oxygen-glucose deprivation/recovery, OGD/R) HK-2 细胞损伤模型的构建

(1)HK-2 细胞培养:将 HK-2 细胞在含有质量分数 10% 胎牛血清和质量分数 1% 青霉素/链霉素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基中,并置于 37℃、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱中培养。(2)OGD/R HK-2 细胞损伤模型构建:将 HK-2 细胞培养于不含葡萄糖和血清的 DMEM,并置于 37℃、体积分数为 95% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的厌氧培养箱缺氧室中培养 1、2、4 h。缺氧发生后,将细胞置于 37℃、体积分数为 95% 空气和 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中分别培养 12 h。对照细胞在正常条件下培养。

### 2.2 细胞转染和分组试验

将 HK-2 细胞接种在六孔板中并培养至细胞融合度达到 80%。采用 Lipofectamine 2000 试剂将 pcDNA-*PSMB6*、sh-*PSMB6* 及其空白对照 pcDNA3.1 转染至 HK-2 细胞并置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h,收集细胞用于随后的体外实验。HK-2 细胞被随机分为 7 组:对照(Control)组、氧-糖剥夺/恢复(OGD/R)组、氧-糖剥夺/恢复+空载体(OGD/R + sh-NC)组、氧-糖剥夺/恢复+*PSMB6* 干扰(OGD/R + sh-*PSMB6*)组、*PSMB6* 过表达(pcDNA-*PSMB6*)组、*PSMB6* 过表达+丁基酰胺(pcDNA-*PSMB6* + Butyramide)组和 *PSMB6* 过表达+4-苯基丁酸(pcDNA-*PSMB6* + 4-PBA)组,每组 3 次重复,所有 pcDNA-*PSMB6*、sh-*PSMB6* 及其阴性对照的质量浓度均为 1.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Butyramide 和 4-PBA 浓度分别为 3  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 2.3 实时定量 PCR 试验

使用 TRIzol 试剂提取细胞和肾组织的总 RNA,并使用 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit 进行逆转录以获得 cDNA。随后使用 TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 进行实时定量 PCR,具体方法如下:在 95℃ 下 10 min;35 个循环,95℃ 下 15 s,60℃ 下 20 s,72℃ 下 15 s。 $\beta$ -actin 作为内参,相对表达量计算公式为  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。引物序列如下:*PSMB6*:正向引物:5'-TAC CTA CCG GGA AGG CAT GA-3',反向引物:5'-AGC GAG AGC TGT GGA TAA AAG A-3'; $\beta$ -actin:正向引物:5'-TCG TGC GTG ACA TTA AGG AG-3';反向引物:5'-GTC AGG CAG CTC GTA GCT CT-3'。

### 2.4 蛋白质印迹法(Western blotting)试验

根据制造商说明书,使用蛋白质提取试剂盒,从 HK-2 细胞和小鼠肾组织中分别提取总蛋白。使用 BCA TM 蛋白质测定试剂盒检测总蛋白质水平。在 220 V 电压下通过质量分数 10% SDS-PAGE 分离等量的蛋白质,并转移到聚偏二氟乙烯膜上。用质量分数 5% 脱脂奶粉封闭膜 2 h。随后,将膜与一级抗体:anti-*PSMB6*、anti-GRP78、anti-CHOP、anti-Caspase-12、anti-PERK、anti-EIF2 $\alpha$ 、anti-ATF4、anti-JAK2 和 anti-STAT3 在 4℃ 下孵育过夜。接着与二级抗体 IgG 于室温条件下孵育 2 h,使用增强的化学发光试剂盒检测蛋白质的表达情况并拍照记录。

### 2.5 细胞活力检测试验

使用 CCK-8 试剂盒检测 HK-2 细胞活力。将 HK-2 细胞以每孔  $5 \times 10^3$  个细胞的浓度接种到 96 孔

板中,分别培养 0、24、48、72 h,随后在培养基中添加 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂,并于 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 2 h。使用酶标仪在波长 450 nm 处测定的吸光度值来评估细胞活力。

## 2.6 流式细胞术检测细胞凋亡试验

使用膜联蛋白 V-FITC/PI 染色试剂盒检测细胞凋亡水平。使用胰蛋白酶处理转染后的细胞,用冷 PBS 洗涤 2 次。然后加入 5  $\mu\text{L}$  膜联蛋白 V-FITC 和 10  $\mu\text{L}$  PI。采用流式细胞仪检测细胞凋亡水平。

## 2.7 I/R 小鼠 AKI 模型构建及实验分组

通过腹腔内注射质量分数 1% 戊巴比妥钠 (50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 麻醉小鼠,并放置恒温台上使核心体温保持在 37  $^{\circ}\text{C}$  左右。随后,通过微血管夹闭肾动脉 30 min 诱导肾 I/R,然后再灌注 24 h。假手术 (Sham) 组在不夹闭肾动脉的情况下对小鼠进行腹部切开。实验所有流程均符合《实验动物护理和使用指南》。手术 24 h 后采集肾脏和血清进行后续的组织学和血清分析,小鼠被随机分为 3 组:Sham 组、I/R 组和 I/R + sh-*PSMB6* 组,每组 5 只小鼠。实验采用尾静脉注射的方法将 sh-*PSMB6* 慢病毒注射到小鼠体内。

## 2.8 血清尿素氮和血清肌酐检测

取小鼠血液 2 mL 离心后取上清,吸取 0.02 mL 置于离心管中,使用 BUN 和 Cr 试剂盒并按照制造

商说明检测小鼠血清尿素氮含量和肌酐含量。

## 2.9 苏木精/伊红 (hematoxylin/eosin, H&E) 染色

小鼠肾脏取出后置于质量分数 10% 福尔马林溶液中固定,经梯度酒精脱水,二甲苯透明后进行石蜡包埋,半自动切片机切成 5  $\mu\text{m}$  组织薄片。随后,对组织薄片进行常规脱蜡、梯度乙醇水化、苏木精染液染色 10 min 以及质量分数 1% 伊红染液染色 1 min,去离子水清洗后梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶固封,采用光学显微镜观察组织病变并拍照。

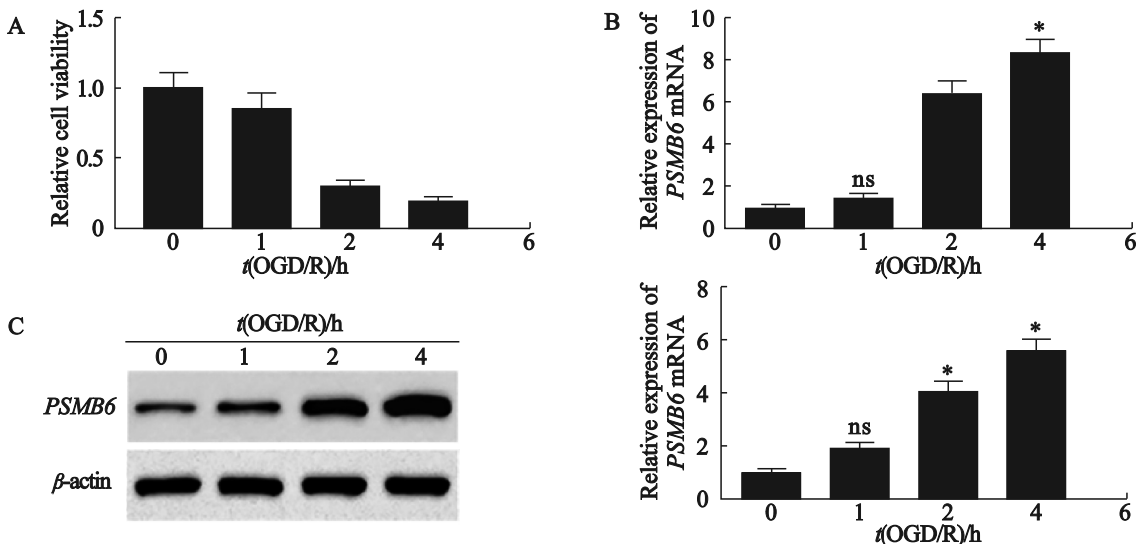
## 2.10 统计分析

使用 SPSS 22.0 进行数据分析。显著性差异分析采用 *t* 检验和单向方差分析。数据表示为平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )。  $P < 0.05$  被定义为具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 *PSMB6* 在 OGD/R 诱导的 HK-2 细胞中上调

CCK8 结果表明,OGD/R 处理抑制 HK-2 细胞活力,且随着 OGD 时间的增加细胞活力逐渐减弱 (图 1A, 均  $P < 0.05$ )。实时定量 PCR 和 Western blotting 结果显示,OGD/R 处理的 HK-2 中 *PSMB6* 上调,且随 OGD 时间的增加 *PSMB6* 的表达逐渐增强 (图 1B 和 1C, 均  $P < 0.05$ )。由于在 OGD 2 h 之后对细胞造成的影响变化较为缓慢,因此,在后续实验中,本研究选择 OGD 2 h 进行实验。



A—HT-2 cell viability assessed by CCK-8 assay under different OGD/R durations; B—RT-qPCR analysis of *PSMB6* mRNA expression level in HK-2 cells; C—Western blotting analysis of *PSMB6* protein expression level in HK-2 cells; \*— $P < 0.05$ , Compared with the 0 h; ns—Not significant.

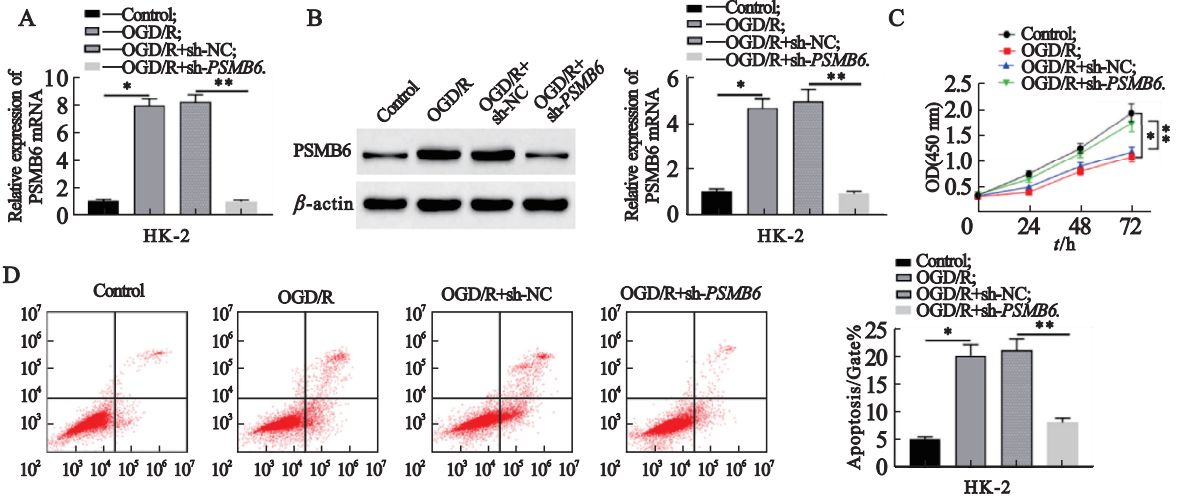
Fig. 1 Upregulation of *PSMB6* in HK-2 cells induced by OGD/R

图 1 *PSMB6* 在 OGD/R 诱导的 HK-2 细胞中上调

### 3.2 敲低 *PSMB6* 促进 HK-2 细胞的活力并抑制

本文作者研究了 *PSMB6* 在 OGD/R 诱导的 HK-2 细胞中的作用机制。结果表明,敲低 *PSMB6* 显著抑制了 OGD/R 诱导的 HK-2 细胞中 *PSMB6* mRNA 和蛋白的表达水平(图 2A 和 2B, 均  $P < 0.05$ )。与 Control 组相比,经 OGD/R 处

理后, HK-2 细胞活力显著降低而凋亡水平显著升高,而敲低 *PSMB6* 则消除了 OGD/R 造成的 HK-2 细胞活力的降低和细胞凋亡水平的升高(图 2C 和 2D, 均  $P < 0.05$ )。可见, *PSMB6* 抑制了 HK-2 细胞活力并促进了细胞凋亡。



A—RT-qPCR analysis of *PSMB6* mRNA expression levels; B—Western blotting analysis of *PSMB6* protein expression levels; C—HK-2 cell viability assessed by CCK-8 assay; D—Flow cytometry analysis of HK-2 cell apoptosis level; \*— $P < 0.05$ , compared with control; \*\*— $P < 0.05$ , compared with OGD/R + sh-NC.

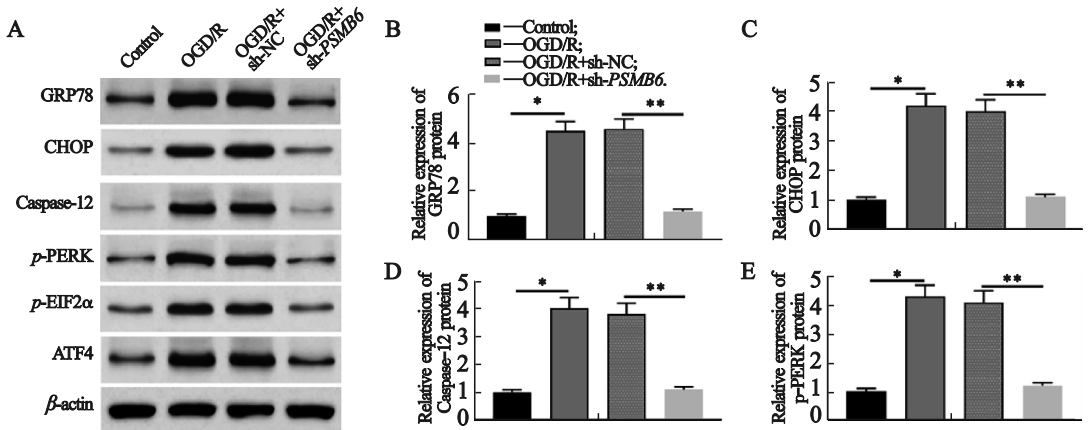
**Fig. 2 Knock down of *PSMB6* promotes the proliferation of HK-2 cells and inhibits apoptosis**

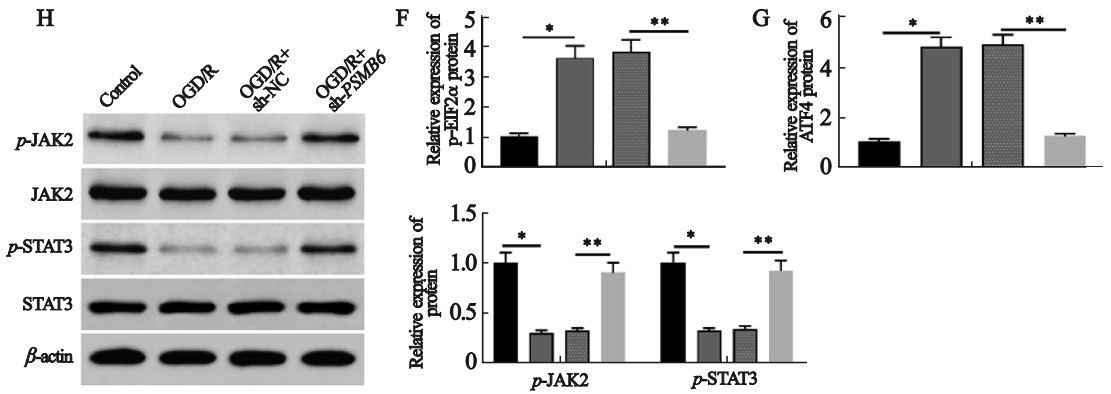
**图 2 敲低 *PSMB6* 促进 HK-2 细胞的增殖并抑制凋亡**

### 3.3 干扰 *PSMB6* 抑制了 OGD/R 诱导的 HK-2 细胞的内质网应激并激活 JAK2/STAT3 信号通路

为了探究 *PSMB6* 是否通过调节 JAK2/STAT3 信号通路来影响 AKI, 本文作者对 HK-2 细胞进行了以下分组: Control 组、OGD/R 组、OGD/R + sh-NC 组和 OGD/R + sh-*PSMB6* 组。Western blotting 结果表明, OGD/R 诱导 HK-2 细胞后, 内质网应激被激活, 而敲低 *PSMB6* 则减弱了 OGD/R 造成的内质网

应激的促进作用(图 3 A ~ G, 均  $P < 0.05$ )。此外, 本研究探究了 *PSMB6* 对 JAK2/STAT3 信号通路的影响。结果发现, OGD/R 处理 HK-2 细胞后, 显著抑制了 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平, 而敲低 *PSMB6* 则消除了 OGD/R 处理对 JAK2 和 STAT3 磷酸化水平的抑制作用(图 3H, 均  $P < 0.05$ )。由此可见, *PSMB6* 促进了内质网应激并抑制了 JAK2/STAT3 信号通路。





A-G—Western blotting analysis of endoplasmic reticulum stress-related proteins expression levels; H—Western blotting analysis of JAK2/STAT3 signaling pathway related proteins expression levels; \*— $P < 0.05$ , Compared with control; \*\*— $P < 0.05$ , Compared with OGD/R + sh-NC.

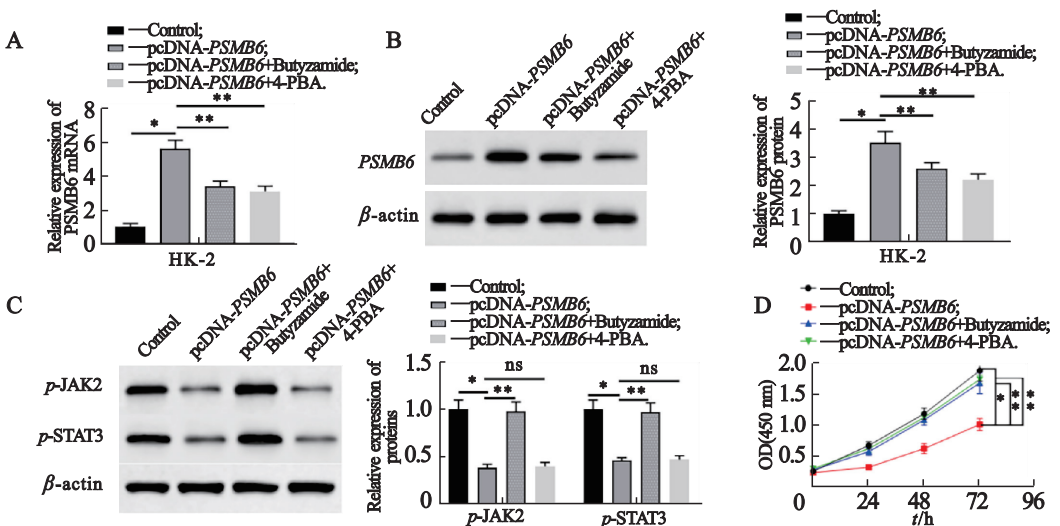
**Fig. 3 Interference with PSMB6 inhibits OGD/R induced endoplasmic reticulum stress in HK-2 cells and activates the JAK2/STAT3 signaling pathway**

图 3 干扰 PSMB6 抑制了 OGD/R 诱导的 HK-2 细胞的内质网应激并激活 JAK2/STAT3 信号通路

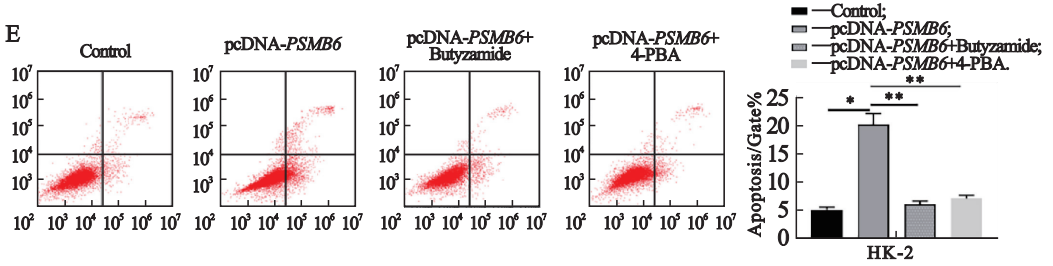
**3.4 PSMB6 通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路来抑制 OGD/R 诱导的 HK-2 细胞的活力并促进凋亡和内质网应激**

为了进一步分析 PSMB6 影响 AKI 的机制, 本文作者基于 JAK2/STAT3 信号通路研究了 HK-2 细胞功能的变化。实时定量 PCR 和 Western blotting 实验结果表明, 过表达 PSMB6 显著促进了 PSMB6 mRNA 和蛋白的表达水平, 而过表达 PSMB6 的同时添加 JAK2/STAT3 信号通路激活剂 Butyramide 或内质网应激抑制剂 4-PBA 则轻微减弱了过表达 PSMB6 造成的 PSMB6 mRNA 和蛋白水平的促进作用(图 4A 和 4B, 均  $P < 0.05$ )。此外, 过表达 PSMB6 抑制了 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平, Butyramide 则抵消了

PSMB6 对 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平的抑制作用(图 4C, 均  $P < 0.05$ ), 而 4-PBA 对 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平仅有轻微影响(图 4C,  $P > 0.05$ )。PSMB6 过表达降低了 HK-2 细胞活力并增加了细胞凋亡水平, Butyramide 处理和 4-PBA 处理则抵消了 PSMB6 对 HK-2 细胞活力的抑制作用和对细胞凋亡的促进作用(图 4D 和 4E, 均  $P < 0.05$ )。最后的 Western blotting 结果表明, 过表达 PSMB6 显著促进了内质网应激, 而过表达 PSMB6 的同时添加 Butyramide 或 4-PBA 则减弱了过表达 PSMB6 对内质网应激的促进作用(图 5, 均  $P < 0.05$ )。综上, PSMB6 可能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路抑制 HK-2 细胞活力并促进细胞凋亡和内质网应激。



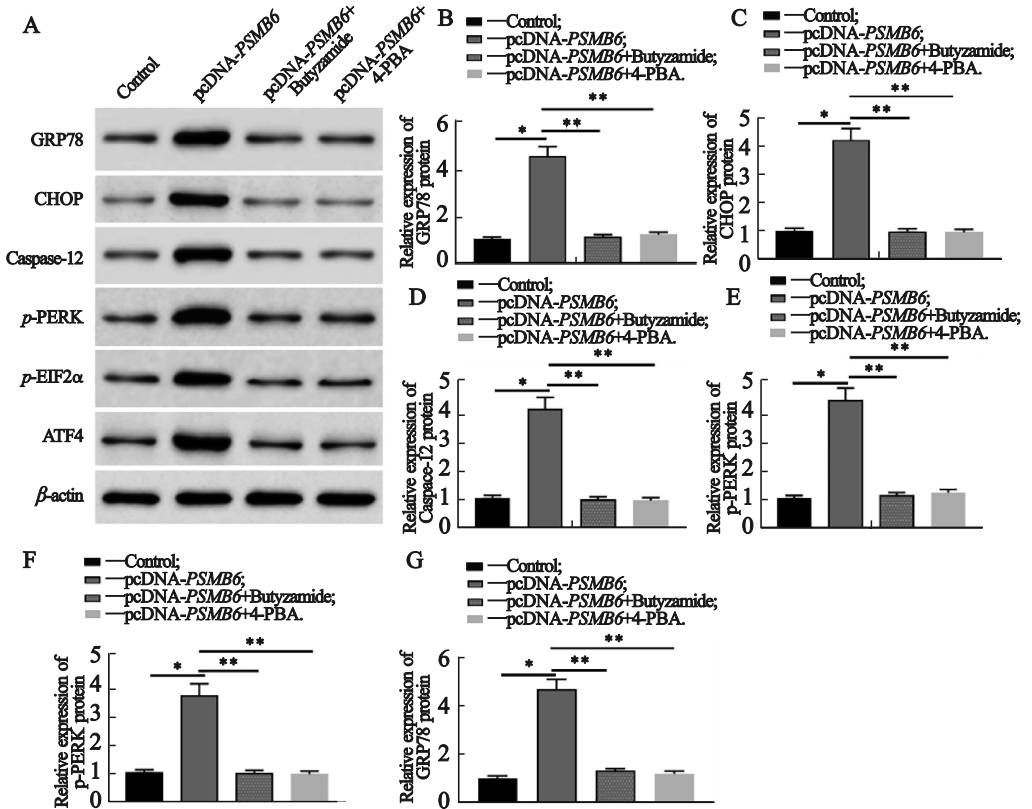
**A** Relative expression of PSMB6 mRNA in HK-2 cells. **B** Western blotting and bar graph showing relative expression of PSMB6 protein. **C** Western blotting and bar graph showing relative expression of p-JAK2 and p-STAT3. **D** Line graph showing cell viability (OD<sub>450 nm</sub>) over 96 hours. Legend for all panels: Control (black), pcDNA-PSMB6 (grey), pcDNA-PSMB6+Butyramide (hatched), pcDNA-PSMB6+4-PBA (white). Statistical significance: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , ns = not significant.



A—RT-qPCR analysis of *PSMB6* mRNA expression in HK-2 cells; B—Western blotting analysis of *PSMB6* protein expression levels; C—Western blotting analysis of JAK2/STAT3 signaling pathway related protein expression levels; D—HT-2 cells viability assessed by CCK-8 assay; E—Flow cytometry analysis of apoptosis level; \*— $P < 0.05$ , Compared with control; \*\*— $P < 0.05$ , Compared with pcDNA-*PSMB6*; ns—Not significant.

**Fig. 4** *PSMB6* inhibits the proliferation of HK-2 cells induced by OGD/R and promotes apoptosis by inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway

图4 *PSMB6* 通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路来抑制 OGD/R 诱导的 HK-2 细胞的增殖并促进凋亡



A-G—Western blotting analysis of endoplasmic reticulum stress-related proteins expression levels; \*— $P < 0.05$ , Compared with control; \*\*— $P < 0.05$ , Compared with pcDNA-*PSMB6*.

**Fig. 5** *PSMB6* promotes endoplasmic reticulum stress in HK-2 cells induced by OGD/R by inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway

图5 *PSMB6* 通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路来促进 OGD/R 诱导的 HK-2 细胞的内质网应激

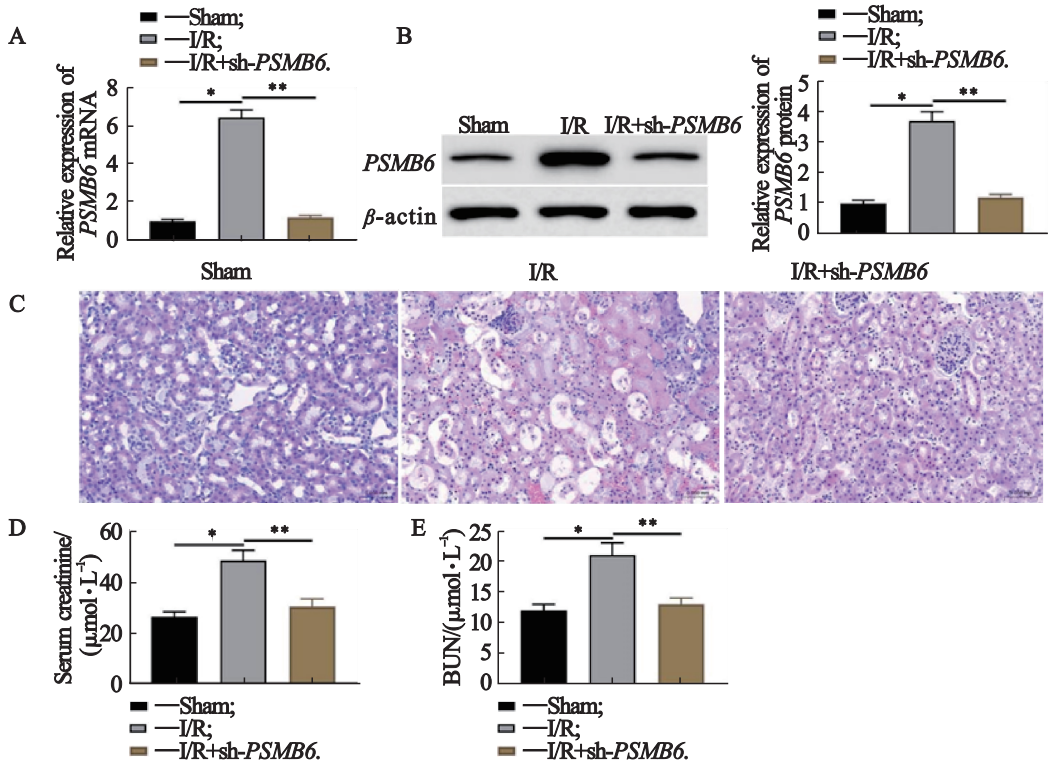
### 3.5 干扰 *PSMB6* 后缓解了 I/R 模型小鼠的 AKI

小鼠体内实验与细胞实验结果一致,小鼠经 I/R 损伤后,肾组织中 *PSMB6* 上调,而干扰 *PSMB6* 则抑制了 I/R 模型小鼠肾组织中 *PSMB6*

的表达水平(图 6A 和 6B,均  $P < 0.05$ )。H&E 染色显示,I/R 模型小鼠肾组织严重受损,表现在细胞结构完全破坏、间质水肿、炎症淋巴细胞浸润和肾小管刷状缘丧失;而 sh-*PSMB6* 则缓解了 I/R 造成的组织结构病变(图 6C)。与 Sham 组相比,

肾 I/R 损伤显著升高 Cr 和 BUN 水平, sh-*PSMB6* 有效降低了 I/R 模型小鼠血清中 Cr 和 BUN 水平

(图 6D 和 6E, 均  $P < 0.05$ )。以上结果表明干扰 *PSMB6* 能够缓解 I/R 模型小鼠的 AKI。



A—RT-qPCR analysis of *PSMB6* mRNA expression levels in mouse kidney tissue; B—Western blotting analysis of *PSMB6* protein expression levels in mouse kidney tissue; C—H&E staining analysis of AKI; D—E—Kits analysis of serum creatinine level and the urea level in the serum of mice; \*— $P < 0.05$ , Compared with sham; \*\*— $P < 0.05$ , Compared with I/R.

**Fig. 6 Interference with *PSMB6* alleviates AKI in I/R mice**

**图 6 干扰 *PSMB6* 后缓解了 I/R 模型小鼠的 AKI**

## 4 讨论

*PSMB6* 作为 20S 蛋白酶体亚基家族成员, 主要参与催化泛素蛋白的降解<sup>[16]</sup>。而泛素蛋白酶体系在调节细胞周期、应激和 DNA 修复等方面起着至关重要的作用<sup>[17]</sup>。有研究发现, *PSMB6* 在肾 I/R 损伤大鼠模型中上调<sup>[11]</sup>, 这与本研究 *PSMB6* 在肾 I/R 损伤小鼠模型中上调的结果一致。此外, 本研究也发现, *PSMB6* 能够抑制 HK-2 细胞的活力并促进细胞凋亡和内质网应激。

JAK2/STAT3 信号通路由细胞因子刺激激活, 并将生物信号传递到靶细胞进而调节细胞增殖、炎症和纤维化等<sup>[18]</sup>。JAK2/STAT3 信号通路在不同疾病中的作用存在争议, 一方面, JAK2/STAT3 信号通路的激活会促进炎症反应, 并加速组织的损伤<sup>[19]</sup>。相反, JAK2/STAT3 信号通路的激活也能够保护组织免受急性损伤; 如, NPNT 通过激活 EGFR/JAK2/STAT3 信号通路促进 HU-

VEC 的迁移和血管形成, 进而促进心肌梗死后的心脏修复<sup>[20]</sup>; 褪黑激素通过激活 JAK2/STAT3 途径影响自噬、炎症和氧化应激进而改善脑缺血再灌注损伤<sup>[21]</sup>。在 AKI 中, 有研究发现抑制 JAK2/STAT3 信号通路能改善 AKI<sup>[22]</sup>。相反, 也有研究发现促红细胞生成素通过激活 JAK2/STAT3 信号通路改善了细胞凋亡进而抑制 AKI<sup>[23]</sup>。本文作者发现, *PSMB6* 通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路促进 HK-2 细胞凋亡来加重 AKI, 这与先前研究结果“激活 JAK2/STAT3 信号通路能改善炎症反应”一致。

内质网应激是 AKI 的病理生理过程, 在 AKI 中发挥重要作用。研究发现, JAK2/STAT3 信号在这一过程中起关键作用。如, 恩格列净通过激活 JAK2/STAT3 信号减弱内质网应激来保护心脏细胞免受 I/R 损伤<sup>[24]</sup>; 低温氧合灌注通过激活 JAK2/STAT3 信号通路促进肝内质网应激和细胞凋亡来缓解 I/R 损伤<sup>[25]</sup>; 右美托咪定通过激活

JAK2/STAT3 信号通路来抑制细胞凋亡和内质网应激,从而防止 I/R 损伤<sup>[26]</sup>。本研究作者发现, *PSMB6* 通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路来促进 HK-2 细胞的凋亡和内质网应激进而加重 AKI。因此,探究 *PSMB6* 在肾 I/R 损伤中的作用机制可为 AKI 的治疗提供新方向。

综上所述,本研究作者发现 *PSMB6* 在肾 I/R 损伤模型中上调,且 *PSMB6* 通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路来激活内质网应激,从而加重了肾 I/R 损伤。这些发现可能为 *PSMB6* 对 AKI 的影响机制提供新的见解。

### 参考文献:

- [1] WANG D, WANG Y, ZOU X, et al. FOXO1 inhibition prevents renal ischemia-reperfusion injury via cAMP-response element binding protein/PPAR- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ -mediated mitochondrial biogenesis [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177 (2): 432–448.
- [2] WANG H, LAMBOURG E, GUTHRIE B, et al. Patient outcomes following AKI and AKD: a population-based cohort study [J]. *BMC Med*, 2022, 20(1): 229.
- [3] WANG X D, JIANG M, WANG X, et al. The role of the glucocorticoid receptor in renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Journal of Capital Medical University (首都医科大学学报)*, 2022, 43(2): 260–268.
- [4] TAO W H, SHAN X S, ZHANG J X, et al. Dexmedetomidine attenuates ferroptosis-mediated renal ischemia/reperfusion injury and inflammation by inhibiting ACSL4 via  $\alpha 2$ -AR [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 782466.
- [5] CHEN X J, ZHANG W, LIU R, et al. Protective effect of renal ischemia-reperfusion injury of Yunnan *Diaphragma Juglandis Fructus* in mice [J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学学报)*, 2024, 41(3): 343–350.
- [6] LIU C, CHEN K, WANG H, et al. Gastrin attenuates renal ischemia/reperfusion injury by a PI3K/AKT/Bad-mediated anti-apoptosis signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 540479.
- [7] ZHANG B, WAN S, LIU H, et al. Naringenin alleviates renal ischemia reperfusion injury by suppressing ER Stress-induced pyroptosis and apoptosis through activating Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 5992436.
- [8] ZHANG B H, LIU H, YUAN Y, et al. Knockdown of TRIM8 protects HK-2 cells against hypoxia/reoxygenation-induced injury by inhibiting oxidative stress-mediated apoptosis and pyroptosis via PI3K/AKT signal pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021(15): 4973–4983.
- [9] NIEUWENHUIJS-MOEKE G J, PISCHKE S E, BERGER S P, et al. Ischemia and reperfusion injury in kidney transplantation: relevant mechanisms in injury and repair [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(1): 253.
- [10] DENG F, ZHANG H, ZHOU W, et al. TRPA1 promotes cisplatin-induced acute kidney injury via regulating the endoplasmic reticulum stress-mitochondrial damage [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 695.
- [11] PAN Z, YANG Y, CAO R, et al. Identification and verification of potential biomarkers in renal ischemia-reperfusion injury by integrated bioinformatic analysis [J]. *Biomed Res Int*, 2023, 2023: 7629782.
- [12] SWATEK A, STASZCZAK M. Effect of ferulic acid, a phenolic inducer of fungal laccase, on 26S proteasome activities *in vitro* [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2463. Doi: 10.3390/ijms21072463.
- [13] YUAN C, YUAN M, LI W, et al. The STAT3 inhibitor stattic overcome bortezomib-resistance in multiple myeloma via decreasing *PSMB6* [J]. *Exp Cell Res*, 2023, 429(1): 113634.
- [14] ZHU H, WANG X, WANG X, et al. Curcumin attenuates inflammation and cell apoptosis through regulating NF- $\kappa$ B and JAK2/STAT3 signaling pathway against acute kidney injury [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(15): 1941–1951.
- [15] MAO K, GAO Y H, ZHOU S L, et al. High mobility group protein B1 exacerbates neuropathic pain by activating the JAK2/STAT3 axis [J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学学报)*, 2023, 40(5): 620–628.
- [16] XIAO W, CHENG J, ZHANG L, et al. Deficiency of *PSMB6* suppresses proteasome activity and promotes apoptosis in larval zebrafish brain [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2025, 755: 151574.
- [17] FERREIRA S, MENEZES R, TROUGAKOS I, et al. Modulation of the ubiquitin-proteasome system by circulating (poly) phenol-derived metabolites: implications for chronic diseases [J]. *J Nutr Biochem*, 2025, 140: 110127.
- [18] RAN S, REN Q, LI S. JAK2/STAT3 in role of arsenic-induced cell proliferation: a systematic review and meta-analysis [J]. *Rev Environ Health*, 2021, 37(3): 451–461.
- [19] WANG Y, KONG X Q, WU F, et al. SOCS1/JAK2/STAT3 axis regulates early brain injury induced by subarachnoid hemorrhage via inflammatory responses [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(12): 2453–2464.
- [20] ZHANG Y, WANG D, ZHAO Z, et al. Nephronectin promotes cardiac repair post myocardial infarction via activating EGFR/JAK2/STAT3 pathway [J]. *Int J Med Sci*, 2022, 19(5): 878–892.
- [21] YANG B, ZANG L E, CUI J W, et al. Melatonin plays a protective role by regulating miR-26a-5p-NRSF and JAK2-STAT3 pathway to improve autophagy, inflammation and oxidative stress of cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 3177–3188.
- [22] ZHAO X, ZHANG E, REN X, et al. Edaravone alleviates cell apoptosis and mitochondrial injury in ischemia-reperfusion-induced kidney injury via the JAK/STAT pathway [J]. *Biol Res*, 2020, 53(1): 28.
- [23] YANG J, ZHOU J, WANG X, et al. Erythropoietin attenuates experimental contrast-induced nephropathy: a role for the Janus kinase 2/Signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 634882.

- [24] ZHANG F, CAO X, ZHAO C, et al. Empagliflozin activates JAK2/STAT3 signaling and protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury under high glucose conditions[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2023, 55(1): 116–125.
- [25] YUE P, LYU X, YOU J, et al. Hypothermic oxygenated perfusion attenuates DCD liver ischemia-reperfusion injury by activating the JAK2/STAT3/HAX1 pathway to regulate endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1): 55.
- [26] CAI S, LIU Y, CHENG Y, et al. Dexmedetomidine protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury via multiple mechanisms[J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36(7): e24119.

## Recombinant proteasome subunit beta type 6 promotes renal injury by inhibiting the JAK2/STAT3 pathway

LIU Zunwei<sup>1\*</sup>, YANG Yijun<sup>2</sup>, LI Yang<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, DING Chenguang<sup>1</sup>

(1. Department of Renal Transplantation, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2. Department of Operation & Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of proteasome subunit beta type 6 (*PSMB6*) in acute kidney injury (AKI). **Methods** After the establishment of oxygen-glucose deprivation/recovery (OGD/R) HK-2 cell injury model, cells were transfected with  $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  *PSMB6* interference vector (*PSMB6* short hairpin RNA, sh-*PSMB6*) and  $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  *PSMB6* overexpression vector pcDNA-*PSMB6*, or transfected with pcDNA-*PSMB6* vector while adding  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  JAK2/STAT3 signaling pathway activator butyramide or  $2 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  endoplasmic reticulum stress inhibitor 4-PBA. After 48 h of cell culture, the expression level of *PSMB6*, the viability and apoptosis rate of HK-2 cells, and the changes of endoplasmic reticulum stress and JAK2/STAT3 signaling pathway were detected. After establishing the AKI model of ischemia/reperfusion (I/R) mice,  $500 \mu\text{L}$  *PSMB6* lentiviral interference vector was injected into mice through tail vein, and the expression level of *PSMB6* and AKI in mice were detected. **Results** The expression of *PSMB6* is upregulated in HK-2 cells induced by OGD/R. Interfering with *PSMB6* improved the decrease of HK-2 cells viability induced by OGD/R and inhibited apoptosis and endoplasmic reticulum stress. In addition, *PSMB6* significantly inhibits the JAK2/STAT3 signaling pathway, and the use of butyramide and 4-PBA eliminates the decrease in HK-2 cell viability and the increase in apoptosis caused by *PSMB6*. The expression of *PSMB6* is upregulated in renal tissue of AKI model mice, and interference with *PSMB6* alleviates AKI in I/R model mice. **Conclusion** *PSMB6* may promote apoptosis and endoplasmic reticulum stress by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway to aggravate AKI.

**Key words:** acute kidney injury; recombinant proteasome subunit beta type 6; JAK2/STAT3 signaling pathway; apoptosis; endoplasmic reticulum stress