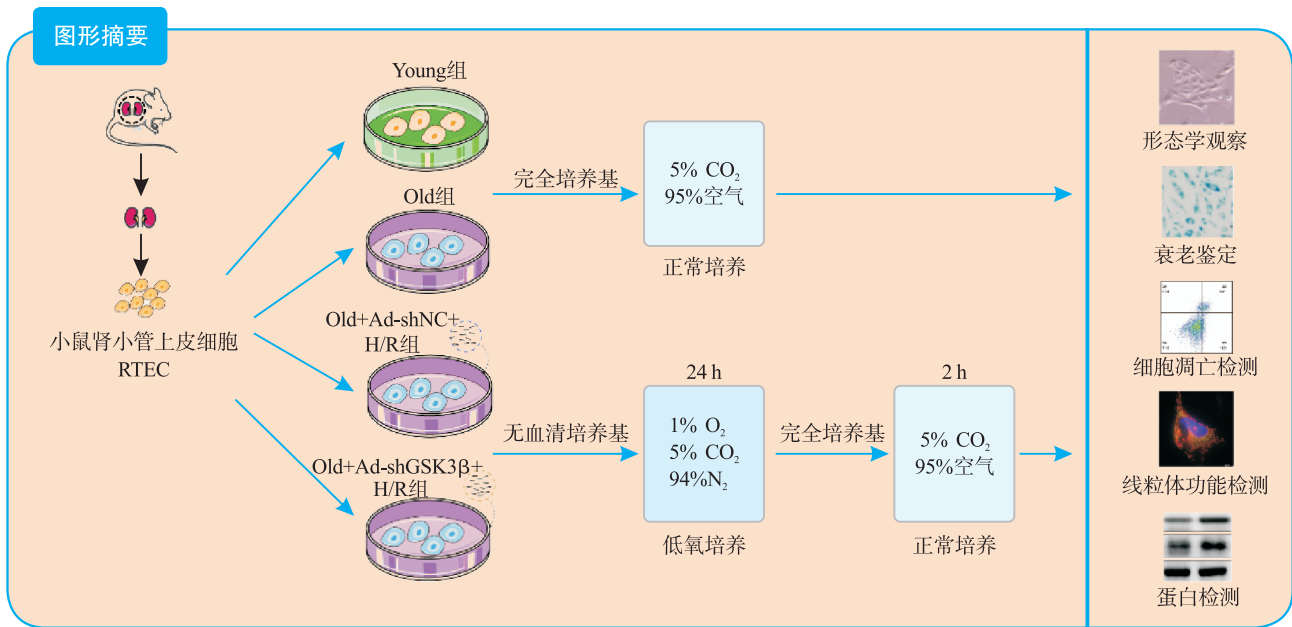


· 论著 ·

下调 GSK3 β 通过抑制 ITPR1-GRP75-VDAC1 复合体功能减轻衰老肾小管上皮细胞缺氧/复氧损伤

倪海强 顾世琦 彭宣 宫念樵



【摘要】 目的 探讨糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β) 对衰老小鼠原代肾小管上皮细胞 (RTEC) 缺氧/复氧 (H/R) 损伤的影响及其调控机制。**方法** 将 RTEC 分成为 Young 组即正常生长的年轻 RTEC、Old 组即使用 Etoposide 诱导的衰老 RTEC、Old+Ad-shNC+H/R 组即使用 Etoposide 诱导衰老再转染腺病毒阴性对照 (Ad-shNC) 后进行 H/R 处理, Old+Ad-shGSK3 β +H/R 组即使用 Etoposide 诱导衰老后再转染靶向沉默 GSK3 β 的短发夹 RNA 腺病毒 (Ad-shGSK3 β) 后进行 H/R 处理。采用流式细胞术检测各组细胞凋亡水平和线粒体活性氧水平, 采用免疫荧光染色法检测各组钙离子水平, 采用蛋白质印迹法检测各组 GSK3 β 、线粒体相关的内质网膜 (MAM) 相关蛋白肌醇 1,4,5-三磷酸受体 1 (ITPR1)、电压依赖性阴离子通道 1 (VDAC1)、葡萄糖调节蛋白 75 (GRP75) 表达及磷酸化水平, 采用免疫共沉淀分析 GSK3 β 与 MAM 相关蛋白的相互作用。**结果** 与 Young 组比较, Old 组细胞凋亡水平、线粒体活性氧水平及线粒体钙离子水平均较高; 与 Old 组比较, Old+Ad-shNC+H/R 组细胞凋亡水平、线粒体活性氧水平及线粒体钙离子水平均较高; 与 Old+Ad-shNC+H/R 组比较, Old+Ad-shGSK3 β +H/R 组细胞凋亡水平、线粒体活性氧水平及线粒体钙离子水平均较低, 差异均有统计学意义

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2024018

基金项目: 国家自然科学基金 (82170772、82370759); 湖北陈孝平科技发展基金会青年科学专项基金 (CXPJH122001-2210)

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院器官移植研究所 器官移植教育部重点实验室 国家卫生健康委员会器官移植重点实验室 中国医学科学院器官移植重点实验室

作者简介: 倪海强 (ORCID 0000-0002-6010-603X), 博士研究生, 研究方向为肾脏缺血-再灌注损伤, Email: nhq6248@126.com

通信作者: 宫念樵 (ORCID 0000-0001-7634-1440), 博士, 主任医师, 研究方向为器官移植、移植免疫、干细胞治疗和器官老化,

Email: nqgong@tjh.tjmu.edu.cn

(均为 $P < 0.05$)。与 Young 组比较, Old 组 ITPR1、GRP75 和 GSK3 β 总蛋白表达增多, ITPR1 和 GRP75 磷酸化水平升高, 而 VDAC1 总蛋白和磷酸化水平均下降; 与 Old 组比较, Old+Ad-shNC+H/R 组 GSK3 β 蛋白表达不变, ITPR1 和 GRP75 总蛋白和磷酸化水平升高, VDAC1 总蛋白表达不变, 磷酸化水平增高; 与 Old+Ad-shNC+H/R 组比较, Old+Ad-shGSK3 β +H/R 组 GSK3 β 蛋白表达减少, ITPR1、GRP75 和 VDAC1 总蛋白表达不变, 磷酸化水平均下降。免疫共沉淀结果显示, GSK3 β 能够与 ITPR1、GRP75 和 VDAC1 蛋白发生相互作用。**结论** GSK3 β 在衰老 RTEC 中表达升高, 抑制 GSK3 β 表达能够降低 ITPR1-GRP75-VDAC1 复合体磷酸化水平, 限制线粒体钙离子超负荷, 保护线粒体功能, 减少再灌注时细胞损伤。

【关键词】 糖原合成酶激酶 3 β ; 肾移植; 中老年供者; 缺血-再灌注损伤; 线粒体损伤; 衰老; 线粒体相关的内质网膜; 钙超载; 凋亡

【中图分类号】 R617, R692 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2024) 03-0011-09

Down-regulating GSK3 β alleviates hypoxia/reoxygenation-induced injury of senescent renal tubular epithelial cells by inhibiting the function of ITPR1-GRP75-VDAC1 complex

Ni Haiqiang, Gu Shiqi, Peng Xuan, Gong Nianqiao. Institute of Organ Transplantation, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Key Laboratory of Organ Transplantation of Ministry of Education, Key Laboratory of Organ Transplantation of National Health Commission of China, Key Laboratory of Organ Transplantation of Chinese Academy of Medical Sciences, Wuhan 430030, China
Corresponding author: Gong Nianqiao, Email: nqgong@tjh.tjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) on hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced injury of senescent renal tubular epithelial cell (RTEC) in aged mice and its regulatory mechanism. **Methods** RTEC were divided into the Young group (young RTEC with normal growth), Old group (aged RTEC induced by Etoposide), Old+Ad-shNC+H/R group [aged RTEC induced by Etoposide and then transfected with adenovirus negative control (Ad-shNC) for H/R treatment], and Old+Ad-shGSK3 β +H/R group (aged RTEC induced by Etoposide and then transfected with short-hairpin RNA-expressing adenovirus with targeted silencing GSK3 β for H/R treatment), respectively. Apoptosis level and mitochondrial reactive oxygen species level were detected by flow cytometry. Calcium ion level was determined by immunofluorescence staining. The expression and phosphorylation levels of GSK3 β , mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM)-related proteins of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor1 (ITPR1), voltage dependent anion-selective channel 1(VDAC1) and glucose-regulated protein 75 (GRP75) were detected by Western blot. The interaction between GSK3 β and MAM-related proteins was analyzed by immunoprecipitation. **Results** Compared with the Young group, the apoptosis, mitochondrial reactive oxygen species and mitochondrial calcium ion levels were higher in the Old group. Compared with the Old group, the apoptosis, mitochondrial reactive oxygen species and mitochondrial calcium ion levels were higher in the Old+Ad-shNC+H/R group. Compared with the Old+Ad-shNC+H/R group, the apoptosis, mitochondrial reactive oxygen species and mitochondrial calcium ion levels were lower in the Old+Ad-shGSK3 β +H/R group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). Compared with the Young group, the expression levels of ITPR1, GRP75 and GSK3 β proteins were up-regulated, the phosphorylation levels of ITPR1 and GRP75 were increased, whereas the total protein and phosphorylation levels of VDAC1 were decreased in the Old group. Compared with the Old group, the expression level of GSK3 β protein was unchanged, the total protein and phosphorylation levels of ITPR1 and GRP75 were increased, the expression level of total VDAC1 protein remained unchanged and the phosphorylation level was increased in the Old+Ad-shNC+H/R group. Compared with the Old+Ad-shNC+H/R group, the expression level of GSK3 β protein was decreased, the expression levels of total ITPR1, GRP75 and VDAC1 proteins were unchanged, whereas the phosphorylation levels were decreased in the Old+Ad-shGSK3 β +H/R group. Immunoprecipitation showed that GSK3 β could interact with ITPR1, GRP75 and VDAC1 proteins. **Conclusions** The expression level of GSK3 β is up-regulated in senescent RTEC. Down-regulating GSK3 β expression may reduce the phosphorylation level of ITPR1-GRP75-VDAC1 complex, constrain the overload of mitochondrial calcium ion, protect mitochondrial function and mitigate cell damage during reperfusion.

【Key words】 Glycogen synthase kinase 3 β ; Kidney transplantation; Middle aged and elderly donor; Ischemia-reperfusion injury; Mitochondrial damage; Senescence; Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane; Calcium overload; Apoptosis

器官短缺已成为阻碍器官移植领域发展的瓶颈问题。为缓解供需矛盾,中老年供者来源的供肾在临床肾移植中的占比逐渐增加^[1-2]。相较年轻供者,中老年供者的肾脏对缺血-再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)的耐受性较差,移植肾功能延迟恢复发生率更高^[3],移植肾 5 年存活率明显降低^[4-6]。衰老过程中肾脏细胞超微结构出现内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)和线粒体功能障碍^[7-9],而供肾在获取和移植过程中无法避免 IRI,这将诱发肾脏发生过度的 ERS 和线粒体失功^[10]。在衰老基础上发生 IRI 将导致损伤叠加,加速中老年供肾失功^[11]。

钙离子是细胞内的第二信使,储存于内质网,主要通过内质网膜上的配体门控通道肌醇 1,4,5-三磷酸受体(inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, ITPR)释放^[12],经线粒体外膜上的电压依赖性阴离子通道(voltage dependent anion-selective channel, VDAC)转运至线粒体内,葡萄糖调节蛋白 75(glucose-regulated protein 75, GRP75)将 ITPR 与 VDAC 连接,形成 ITPR-GRP75-VDAC 复合体,在线粒体相关的内质网膜(mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane, MAM)结构上介导钙离子转运^[13-14]。适量的钙离子释放能够促进线粒体三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)产生,但过量释放会导致钙超载触发内源性凋亡程序^[15]。糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)与多种肾脏疾病有关,在肾脏中其含量与年龄呈正相关^[16]。本课题组前期研究已经证实小鼠肾脏 IRI 模型中抑制 GSK3 β 活性能够减轻线粒体损伤,改善肾脏功能^[17],但是在衰老细胞中 GSK3 β 是否能够直接影响 MAM 组成尚不清楚。因此,本研究拟探讨在缺氧复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)模型中,抑制 GSK3 β 对衰老小鼠原代肾小管上皮细胞(renal tubule epithelial cell, RTEC) MAM 相关蛋白和线粒体功能的影响及可能的调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

C57BL/6 小鼠均购买于北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于湖北省武汉市蔡甸区同济医院科研大楼实验动物中心(无特定病原体级饲养环境,22℃恒温,压差 25 Pa,55%相对湿度,12 h 昼夜规律循

环),所有动物实验均经华中科技大学同济医学院附属同济医院机构动物护理和使用委员会批准(批准号:TJH-202207003),并遵循中国国家科学技术委员会《实验动物管理条例》和《实验动物饲养管理和使用指南》的要求开展相关实验。

上皮细胞专用培养基 EpiCM-a 完全培养基购自美国 ScienCell 公司,胶原酶/中性蛋白酶购自美国罗氏公司, DNase I 购自中国 Biosharp 公司, GSK3 β 干扰腺病毒由上海和元生物公司合成, Etoposide、小鼠 IgG 和细胞衰老相关- β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal)染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,细胞凋亡检测试剂盒购自杭州联科生物技术有限公司, MitoSOX Red 探针和 MitoTracker[®] Green 探针购自美国 Thermo Scientific 公司,线粒体钙离子荧光染料 Rhod-2 AM 购自上海翌圣生物科技股份有限公司, GSK3 β 抗体、VDAC1 抗体和 GRP75 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, ITPR1 抗体、pan Phospho-Serine/Threonine 抗体和 β -actin 抗体购自武汉爱博泰克生物技术有限公司, Phospho-ITPR1 (Ser1756) 抗体购自美国 Affinity 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠 RTEC 提取和培养 选用 5~6 周雄性小鼠,无菌环境下取出肾脏,剥离肾包膜,切碎组织,使用组织分离器打碎肾脏,通过胶原酶/中性蛋白酶和 DNA 酶消化获得单细胞悬液,在 70 μ m 滤网中过滤,悬浮液以 300 \times g 离心 3 min。密度梯度后收集肾小管细胞, EpiCM-a 完全培养基重悬细胞,转至细胞培养瓶内,置于培养箱培养,每 3 d 换液并观察细胞生长情况。

1.2.2 缺氧/复氧模型 RTEC 生长融合率达 80%~90% 时,更换为无血清培养基,转移至三气缺氧箱中模拟缺氧(1% O₂、5% CO₂、94% N₂),常氧组细胞继续维持正常培养。缺氧 24 h 后,4 组细胞全部更换新鲜完全培养基,置于常氧培养箱中培养 2 h 模拟复氧。

1.2.3 小鼠 RTEC 衰老模型 在细胞培养基中加入 Etoposide (终浓度 10 μ mol/L) 后继续培养 7 d,诱导衰老模型。

1.2.4 细胞转染 诱导细胞衰老后进行腺病毒转染(感染复数 50),48 h 后即可检测基因调控效果。小鼠 GSK3 β 的干扰序列为 5'-CCACTCAAGAACTGTCAAGTA-3'。

1.2.5 实验分组 Young组即正常生长的年轻RTEC, Old组即使用Etoposide诱导的衰老RTEC, Old+Ad-shNC+H/R组使用Etoposide诱导衰老后再转染腺病毒阴性对照(Ad-shNC)后进行H/R处理, Old+Ad-shGSK3 β +H/R组使用Etoposide诱导衰老后再转染靶向沉默GSK3 β 的短发夹RNA腺病毒(Ad-shGSK3 β)后进行H/R处理。

1.2.6 SA- β -gal染色 使用SA- β -gal染色试剂盒检测衰老细胞, 弃去细胞培养基后用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)清洗3遍, 加入1 mL染色固定液室温固定15 min, 弃去固定液后用PBS清洗3次, 加入1 mL染色工作液, 用保鲜膜封住培养板后37 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日弃去染色液后用PBS清洗3次, 使用光学显微镜进行观察、拍摄, 衰老细胞被染为蓝色。

1.2.7 蛋白质印迹法 用IP裂解液提取细胞总蛋白。4 $^{\circ}$ C低温离心15 min后收集蛋白上清, 检测试剂盒定量蛋白浓度, 将适量蛋白样品和上样缓冲液混合后煮沸5 min变性蛋白质, 进行电泳分离样品。冰浴条件下以恒定电流200 mA完成转印, 室温下用含5%牛血清白蛋白的封闭液封闭60 min。加入相应一抗(p53、p21、p16、GSK3 β 、ITPR1、p-ITPR1、GRP75、VDAC1、 β -actin)4 $^{\circ}$ C慢速摇床孵育过夜, 次日充分洗涤后加入二抗, 室温孵育60 min, 然后洗涤、显影和采集图片。

1.2.8 细胞凋亡的检测 通过Annexin V与碘化丙啶(propidium iodide, PI)双染法评估凋亡水平。收集所有细胞后离心弃上清, 缓冲液重悬洗涤后加入Annexin V和PI染色工作液, 避光孵育5 min后进行流式细胞术检测。

1.2.9 线粒体活性氧的检测 使用MitoSOX Red探针检测线粒体活性氧水平。将细胞与5 μ mol/L染色工作液混合后置于37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中避光孵育30 min, 收集细胞后进行流式细胞术检测。

1.2.10 线粒体钙离子的检测 使用线粒体探针MitoTracker[®] Green和线粒体钙离子荧光探针Rhod-2AM对线粒体和钙离子进行标记, 根据说明书进行染色孵育后, 通过荧光显微镜观察、拍摄和成像。

1.2.11 免疫共沉淀 使用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的IP裂解缓冲液裂解细胞后低温离心收集上清,

测定试剂盒定量蛋白浓度, 留取适量上清加入上样缓冲液100 $^{\circ}$ C煮沸5 min作为Input组。蛋白与特异性一抗或者IgG于4 $^{\circ}$ C下孵育过夜, 再加入蛋白A/G琼脂糖珠继续4 $^{\circ}$ C孵育过夜。充分洗涤、离心弃上清后加入上样缓冲液100 $^{\circ}$ C煮沸5 min作为IP组或者IgG组, 分析确定结合蛋白。

1.3 研究内容

分析下调GSK3 β 对H/R诱导的衰老RTEC凋亡水平、线粒体活性氧水平、线粒体钙离子水平的影响。检测下调GSK3 β 对MAM相关蛋白磷酸化水平的影响及与MAM相关蛋白的相互作用。

1.4 统计学方法

采用PRISM 6软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差表示, 两组间比较采用Student's *t*检验。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠RTEC提取和培养

光学显微镜可见分离出的典型肾小管节段, 培养2~3 d后可见RTEC贴壁并快速生长, 形态呈三角形或者长梭形, 细胞质伸展, 核突出易见, 细胞间紧密衔接, 呈铺路石样排列, 符合RTEC特征(图1)。

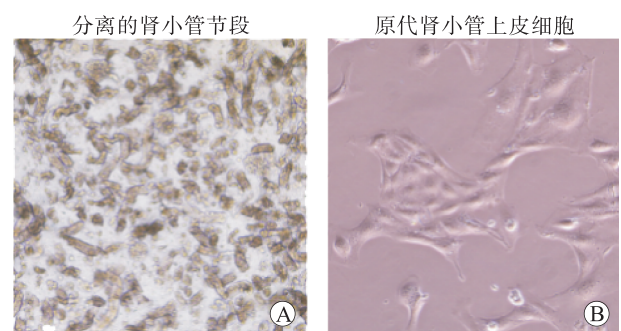


图1 小鼠RTEC形态学特征($\times 100$)

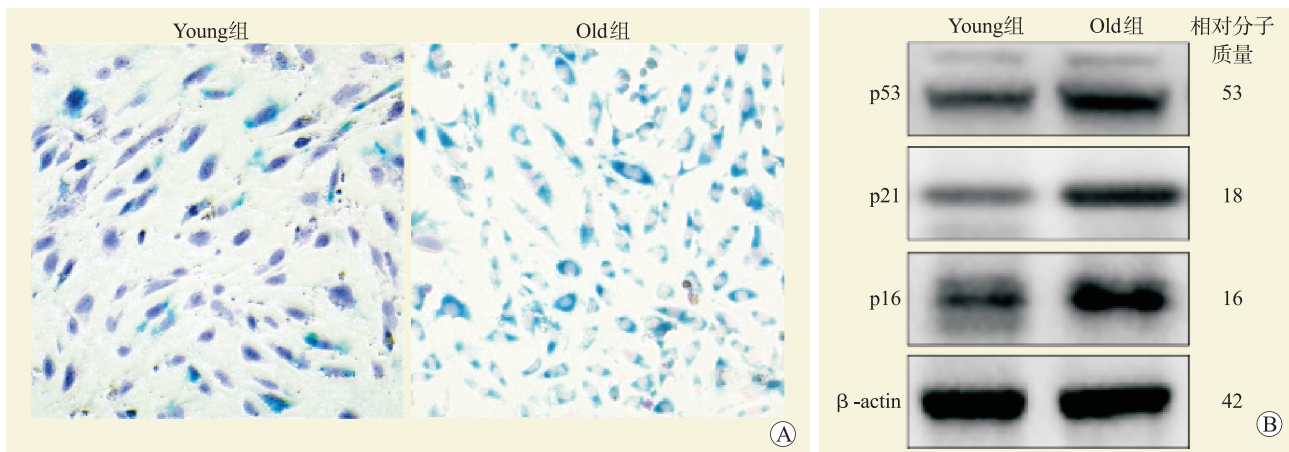
Figure 1 Morphological characteristics of RTEC of mice

2.2 RTEC衰老模型鉴定

SA- β -gal染色结果显示, 与Young组比较, Old组衰老细胞增多(图2A)。蛋白质印迹法结果显示, 与Young组比较, Old组p53、p21和p16蛋白表达增多(图2B)。

2.3 下调GSK3 β 能够抑制H/R诱导的衰老RTEC凋亡水平

流式细胞术结果显示, 与Young组比较, Old组



注：A 图为 SA-β-gal 染色（×100）；B 图为蛋白质印迹法。

图 2 衰老细胞鉴定

Figure 2 Identification of senescent cells

细胞凋亡水平较高；与 Old 组比较，Old+Ad-shNC+H/R 组凋亡水平较高；与 Old+Ad-shNC+H/R 组比较，Old+Ad-shGSK3β+H/R 组细胞凋亡水平较低，差异均有统计学意义（均为 $P < 0.05$ ，图 3）。

2.4 下调 GSK3β 能够减少 H/R 诱导的衰老 RTEC 线粒体活性氧水平

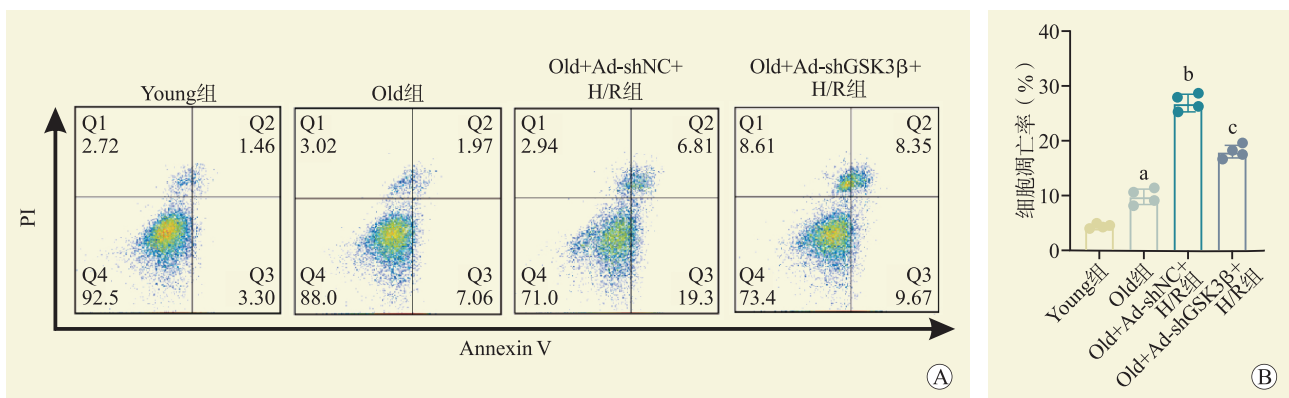
流式细胞术结果显示，与 Young 组比较，Old 组细胞线粒体活性氧水平较高；与 Old 组比较，Old+Ad-shNC+H/R 组细胞线粒体活性氧水平较高；与 Old+Ad-shNC+H/R 组比较，Old+Ad-shGSK3β+H/R 组细胞线粒体活性氧水平较低，差异均有统计学意义（均为 $P < 0.05$ ，图 4）。

2.5 下调 GSK3β 能够减少 H/R 诱导的衰老 RTEC 线粒体钙超载

免疫荧光染色结果显示，Old 组细胞线粒体钙离子较 Young 组增多；Old+Ad-shNC+H/R 组线粒体钙离子较 Old 组增多；Old+Ad-shGSK3β+H/R 组细胞线粒体钙离子较 Old+Ad-shNC+H/R 组减少（图 5）。

2.6 下调 GSK3β 能够抑制 MAM 相关蛋白磷酸化水平

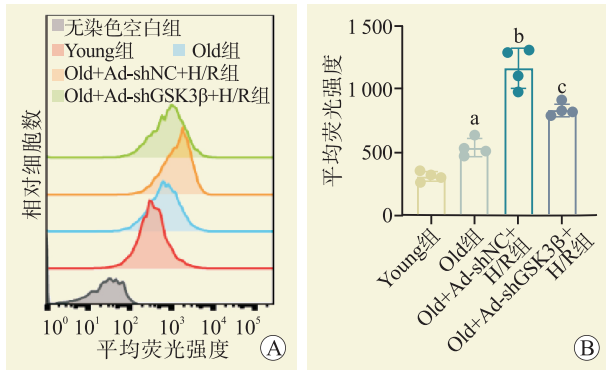
蛋白质印迹法结果显示，Old 组 ITPR1、GRP75 和 GSK3β 总蛋白表达较 Young 组增多，ITPR1 和 GRP75 磷酸化水平升高，而 VDAC1 总蛋白和磷酸化水平均下降；与 Old 组比较，Old+Ad-



注：A 图为流式细胞术检测各组细胞凋亡水平；B 图为各组细胞凋亡率分析。与 Young 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 Old 组比较，^b $P < 0.05$ ；与 Old+Ad-shNC+H/R 组比较，^c $P < 0.05$ 。

图 3 各组细胞凋亡水平

Figure 3 Apoptosis levels of cells in each group



注：A 图为流式细胞术分析线粒体活性氧水平；B 图为各组线粒体活性氧水平分析。与 Young 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 Old 组比较，^b $P < 0.05$ ；与 Old+Ad-shNC+H/R 组比较，^c $P < 0.05$ 。

图 4 各组线粒体活性氧水平

Figure 4 Mitochondrial reactive oxygen species levels in each group

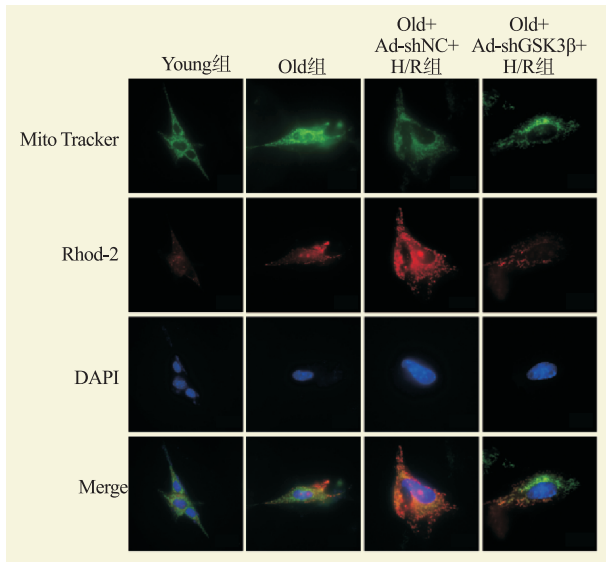


图 5 各组线粒体钙离子水平 (免疫荧光, ×600)

Figure 5 Mitochondrial calcium levels in each group

shNC+H/R 组 GSK3β 蛋白水平不变，ITPR1 和 GRP75 总蛋白和磷酸化水平升高，而 VDAC1 总蛋白表达不变，磷酸化水平增高；与 Old+Ad-shNC+H/R 组比较，Old+Ad-shGSK3β+H/R 组 GSK3β 蛋白表达减少，ITPR1、GRP75 和 VDAC1 总蛋白表达不变，磷酸化水平均下降 (图 6)。

2.7 GSK3β 能够与 MAM 相关蛋白相互作用

免疫共沉淀结果提示 Input 组有目的蛋白条带，IgG 组无目的蛋白条带，而 GSK3β 能够与 ITPR1、GRP75 和 VDAC1 免疫共沉淀 (图 7)。

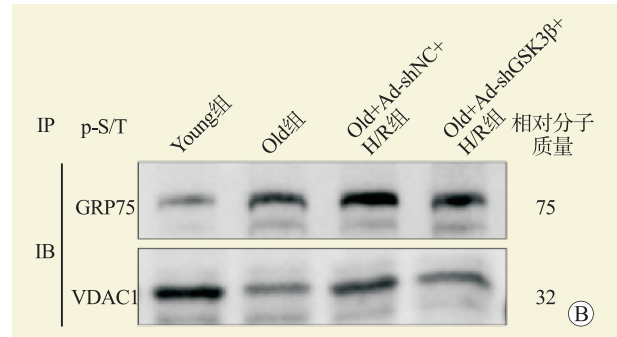
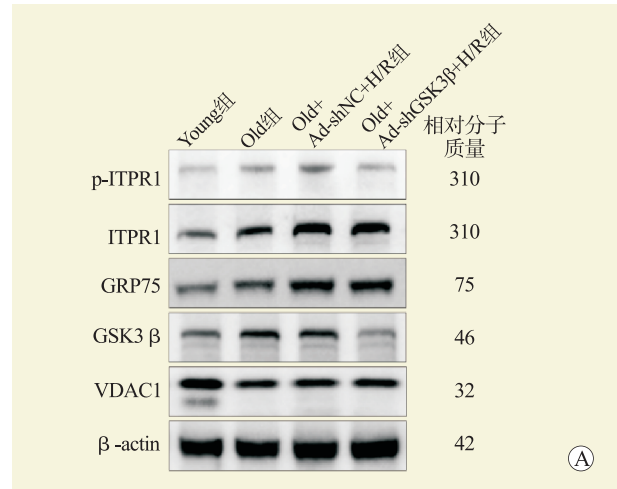


图 6 各组 GSK3β 和 MAM 相关蛋白表达水平

Figure 6 The expression levels of GSK3β and MAM-associated proteins in each group

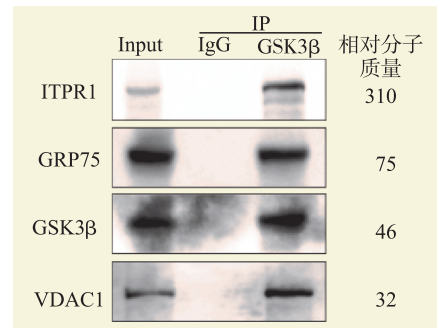


图 7 GSK3β 与 MAM 相关蛋白免疫共沉淀

Figure 7 Co-immunoprecipitation of GSK3β and MAM-associated proteins

3 讨论

肾移植术后的肾脏修复受多种病理生理因素的影响，包括缺血时间、排斥反应和供者年龄等^[18-19]。随着全球预期寿命的不断延长，临床医师将面临更多的衰老供肾带来的挑战，老年患者急性肾损伤后的肾功能明显更差，这种再生潜力的下降是衰老过程的标志，可能是由细胞衰老引起的^[20]。GSK3β 是一种保

守的、广泛表达的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，能够调节多种关键病理生理过程，包括糖代谢、炎症、胚胎发育、组织损伤、修复和再生^[21-22]。近年来的研究发现，GSK3 β 在衰老肾脏中发挥重要作用^[23]，除肾小球外，在人类衰老肾皮质的肾小管中也检测到GSK3 β 的表达增加，在小鼠中，GSK3 β 的表达和活性同样随着年龄的增长在皮质肾小管中增加，靶向肾小管中GSK3 β 调节，可能会保留肾脏祖细胞，促进细胞再生，从而减轻肾脏衰老^[16]。本研究通过建立衰老原代 RTEC H/R 模型，发现衰老和 H/R 可引起GSK3 β 和ITPR1-GRP75-VDAC1复合体活化，导致线粒体钙离子超载和活性氧产生增多，而下调GSK3 β 能够抑制ITPR1、GRP75和VDAC1磷酸化水平，改善线粒体损伤，其可能机制是GSK3 β 能够与MAM相关蛋白发生相互作用，改变其磷酸化水平，进而影响MAM功能。

衰老会导致线粒体功能下降，氧化还原功能受损，使得老年患者对IRI更敏感^[24-25]。研究表明在缺血期间衰老心脏中GSK3 β 活性增高，抑制GSK3 β 可改善线粒体功能，保护受损心脏^[26-27]。越来越多的研究证实GSK3 β 的靶向治疗在急性肾损伤中具有保护作用^[28]。GSK3 β 已被证明在调节各种肾细胞的损伤中发挥关键作用^[29]，参与多种肾脏疾病的发病机制，例如肾小球疾病、急性肾损伤、糖尿病肾病和慢性肾病^[30-33]。Fang等^[16]发现衰老信号的关键介质p16和p53含有GSK3 β 共识基序，能够与GSK3 β 发生相互作用，使用GSK3 β 特异性抑制剂靶向GSK3 β 可减少小鼠的衰老信号传导并延缓肾脏衰老。这种表达基线差异可能使得衰老肾脏经历IRI时更容易受到GSK3 β 的调控，从而变得更为脆弱，这或许能够尝试解答为何老年患者对IRI更为敏感。笔者团队前期研究结果表明抑制GSK3 β 活性能够减轻肾脏IRI小鼠线粒体损伤，促进肾脏修复^[17]。但是目前对于GSK3 β 在衰老肾脏IRI中的作用研究甚少，本研究构建的衰老原代 RTEC H/R 模型尚不足以模拟体内环境，仍需动物实验进一步论证。

肾小管尤其是近端部分，是肾脏功能的主力军，因其在重吸收过程中需要依靠线粒体消耗大量能量，在衰老过程中，能量需求高的细胞容易积累氧化损伤^[20]。MAM作为线粒体和内质网之间通讯的桥梁，能够作为衰老细胞中活性氧合成的调节剂和氧化损伤的靶标^[34]。研究表明，近端 RTEC 主要表达ITPR1^[35]，通

过GRP75与线粒体外膜蛋白VDAC1连接组成复合体，并将线粒体与内质网偶联形成MAM，介导钙离子转移^[36]。GSK3 β 被证实能够作为ITPR1-GRP75-VDAC1复合体的一部分存在于MAM中，参与细胞钙离子转运的调控。Gomez等^[37]在心肌H/R模型中发现位于MAM上的GSK3 β 介导钙离子从内质网转移到线粒体，再灌注时抑制GSK3 β 能够影响ITPR1丝氨酸位点磷酸化，限制ITPR1通道打开，减少胞质和线粒体钙离子超载，从而保护心脏。此外GSK3 β 也能通过磷酸化VDAC丝氨酸位点，加速线粒体钙摄取，抑制GSK3 β 活化能够逆转这一过程^[38-39]。有趣的是，近期Thoudam等^[40]研究发现丙酮酸脱氢酶激酶4作为一种丝氨酸/苏氨酸激酶，能够通过磷酸化GRP75调节MAM的形成。本研究结果证实实在RTEC中，GSK3 β 作为丝氨酸/苏氨酸激酶一员，除了能够与ITPR1和VDAC1相互作用，还能通过与GRP75结合并改变其磷酸化水平进而影响MAM功能，但是其具体修饰类型和位点尚不清楚，仍需后续实验深入验证。

综上所述，本研究通过构建衰老 RTEC 的 H/R 模型，发现GSK3 β 在衰老 RTEC 中表达升高，抑制GSK3 β 表达能够通过降低ITPR1-GRP75-VDAC1复合体磷酸化水平，限制线粒体钙离子超负荷，保护线粒体功能，减少再灌注时细胞损伤，这些研究结果能够为了解肾脏细胞衰老的分子机制和保护衰老肾脏IRI提供有效的靶点。

参考文献:

- [1] YU S, LONG JJ, YU Y, et al. Survival benefit of accepting kidneys from older donation after cardiac death donors[J]. *Am J Transplant*, 2021, 21(3): 1138-1146. DOI: 10.1111/ajt.16198.
- [2] 郭莉萍, 张曙伟. 老年活体供肾移植现状与研究进展[J]. *现代实用医学*, 2022, 34(11): 1403-1405. DOI: 10.3969/j.issn.1671-0800.2022.11.002.
- [3] 潘佳善, 苏涌, 朱道方, 等. 公民逝世捐献与活体捐献肾移植的近期临床效果[J]. *实用医学杂志*, 2022, 38(2): 184-189. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2022.02.011.
- [4] SUMMERS DM, WATSON CJ, PETTIGREW GJ, et al. Current status and research progress of elderly living donor kidney transplantation[J]. *Mod Pract Med*, 2022, 34(11): 1403-1405. DOI: 10.3969/j.issn.1671-0800.2022.11.002.
- [5] PAN JS, SU Y, ZHU DF, et al. Clinical effects of deceased vs living donor on kidney transplantation[J]. *J Pract Med*, 2022, 38(2): 184-189. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2022.02.011.

- Kidney donation after circulatory death (DCD): state of the art[J]. *Kidney Int*, 2015, 88(2): 241-249. DOI: 10.1038/ki.2015.88.
- [5] PÉREZ-SÁEZ MJ, MONTERO N, REDONDO-PACHÓN D, et al. Strategies for an expanded use of kidneys from elderly donors[J]. *Transplantation*, 2017, 101(4): 727-745. DOI: 10.1097/TP.0000000000001635.
- [6] PRUETT TL, VECE GR, CARRICO RJ, et al. US deceased kidney transplantation: estimated GFR, donor age and KDPI association with graft survival[J]. *EClinicalMedicine*, 2021, 37: 100980. DOI: 10.1016/j.eclinm.2021.100980.
- [7] REX N, MELK A, SCHMITT R. Cellular senescence and kidney aging[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2023, 137(24): 1805-1821. DOI: 10.1042/CS20230140.
- [8] DONATE-CORREA J, MARTÍN-CARRO B, CANNATA-ANDÍA JB, et al. Klotho, oxidative stress, and mitochondrial damage in kidney disease[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(2): 239. DOI: 10.3390/antiox12020239.
- [9] CHAUDHARY MR, CHAUDHARY S, SHARMA Y, et al. Aging, oxidative stress and degenerative diseases: mechanisms, complications and emerging therapeutic strategies[J]. *Biogerontology*, 2023, 24(5): 609-662. DOI: 10.1007/s10522-023-10050-1.
- [10] DENG LC, ALINEJAD T, BELLUSCI S, et al. Fibroblast growth factors in the management of acute kidney injury following ischemia-reperfusion[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 426. DOI: 10.3389/fphar.2020.00426.
- [11] TANG C, DONG Z. Mitochondria in kidney injury: when the power plant fails[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(7): 1869-1872. DOI: 10.1681/ASN.2015111277.
- [12] FUJII S, USHIODA R, NAGATA K. Redox states in the endoplasmic reticulum directly regulate the activity of calcium channel, inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(22): e2216857120. DOI: 10.1073/pnas.2216857120.
- [13] YUAN M, GONG M, HE J, et al. IP3R1/GRP75/VDAC1 complex mediates endoplasmic reticulum stress-mitochondrial oxidative stress in diabetic atrial remodeling[J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102289. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102289.
- [14] ZIEGLER DV, VINDRIEUX D, GOEHRIG D, et al. Calcium channel ITPR2 and mitochondria-ER contacts promote cellular senescence and aging[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 720. DOI: 10.1038/s41467-021-20993-z.
- [15] MORCIANO G, GIORGI C, BONORA M, et al. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 78: 142-153. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.08.015.
- [16] FANG Y, CHEN B, LIU Z, et al. Age-related GSK3 β overexpression drives podocyte senescence and glomerular aging[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(4): e141848. DOI: 10.1172/JCI141848.
- [17] KUANG BC, WANG ZH, HOU SH, et al. Methyl eugenol protects the kidney from oxidative damage in mice by blocking the Nrf2 nuclear export signal through activation of the AMPK/GSK3 β axis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(2): 367-380. DOI: 10.1038/s41401-022-00942-2.
- [18] COELLO I, MARTÍNEZ AI, PERAIRE M, et al. Effect of ischemia times and donor and recipient features on Maastricht category III kidney transplant outcomes[J]. *Arch Esp Urol*, 2022, 75(7): 612-617. DOI: 10.56434/j.arch.esp.urol.2022750788.
- [19] LIM WH, OOI E, PILMORE HL, et al. Interactions between donor age and 12-month estimated glomerular filtration rate on allograft and patient outcomes after kidney transplantation[J]. *Transpl Int*, 2022, 35: 10199. DOI: 10.3389/ti.2022.10199.
- [20] SCHMITT R, MELK A. Molecular mechanisms of renal aging[J]. *Kidney Int*, 2017, 92(3): 569-579. DOI: 10.1016/j.kint.2017.02.036.
- [21] MAROSI M, ARMAN P, ACETO G, et al. Glycogen synthase kinase 3: ion channels, plasticity, and diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4413. DOI: 10.3390/ijms23084413.
- [22] 许艳玲, 赵玉珠, 付裕, 等. 青蒿琥酯通过 PI3K/GSK-3 β 通路对 1 型糖尿病小鼠胰岛素抵抗的改善作用研究[J]. *天津中医药*, 2022, 39(8): 1077-1081. DOI: 10.11656/j.issn.1672-1519.2022.08.23.
- XU YL, ZHAO YZ, FU Y, et al. Effect of artesunate on insulin resistance in type 1 diabetic mouse through PI3K/GSK-3 β pathway[J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*, 2022, 39(8): 1077-1081. DOI: 10.11656/j.issn.1672-1519.2022.08.23.
- [23] KREIDBERG JA, SCHUMACHER VA. GSK3 β and the aging kidney[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(4): e155885. DOI: 10.1172/JCI155885.
- [24] 信强, 崔碧红, 苏秀兰, 等. 缺血再灌注对老年心脏的损伤机制及研究进展[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2023, 45(1): 101-105.
- XIN Q, CUI BH, SU XL, et al. Mechanism and research progress of ischemia-reperfusion injury in elderly heart[J]. *J Inner Mongolia Med Univ*, 2023, 45(1): 101-105.
- [25] CHEN Q, SONG Y, YANG N, et al. Aging deteriorated liver ischemia and reperfusion injury by suppressing Tribble's proteins 1 mediated macrophage polarization[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(6): 14519-14533. DOI: 10.1080/21655979.2022.2090218.
- [26] KOSTYAK JC, HUNTER JC, KORZICK DH. Acute PKCdelta inhibition limits ischaemia-reperfusion injury in the aged rat heart: role of GSK-3beta[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70(2): 325-334. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.02.009.
- [27] KORZICK DH, KOSTYAK JC, HUNTER JC, et al. Local delivery of PKCepsilon-activating peptide mimics ischemic preconditioning in aged hearts through GSK-3beta but not F1-ATPase inactivation[J]. *Am J Physiol*

- Heart Circ Physiol, 2007, 293(4): H2056-H2063. DOI: 10.1152/ajpheart.00403.2007.
- [28] NELSON PJ, CANTLEY L. GSK3beta plays dirty in acute kidney injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(2): 199-200. DOI: 10.1681/ASN.2009121214.
- [29] ZHOU S, WANG P, QIAO Y, et al. Genetic and pharmacologic targeting of glycogen synthase kinase 3 β reinforces the Nrf2 antioxidant defense against podocytopathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(8): 2289-2308. DOI: 10.1681/ASN.2015050565.
- [30] SUN Y, FAN Y, WANG Z, et al. S100A16 promotes acute kidney injury by activating HRD1-induced ubiquitination and degradation of GSK3 β and CK1 α [J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(3): 184. DOI: 10.1007/s00018-022-04213-5.
- [31] GUO J, ZHENG W, LIU Y, et al. Long non-coding RNA DLX6-AS1 is the key mediator of glomerular podocyte injury and albuminuria in diabetic nephropathy by targeting the miR-346/GSK-3 β signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(2): 172. DOI: 10.1038/s41419-023-05695-2.
- [32] CHEN B, WANG P, LIANG X, et al. Permissive effect of GSK3 β on profibrogenic plasticity of renal tubular cells in progressive chronic kidney disease[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(5): 432. DOI: 10.1038/s41419-021-03709-5.
- [33] ZENG L, NG JK, FUNG WW, et al. Intrarenal and urinary glycogen synthase kinase-3 beta levels in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease[J]. Kidney Blood Press Res, 2023, 48(1): 241-248. DOI: 10.1159/000530210.
- [34] JANIKIEWICZ J, SZYMAŃSKI J, MALINSKA D, et al. Mitochondria-associated membranes in aging and senescence: structure, function, and dynamics[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 332. DOI: 10.1038/s41419-017-0105-5.
- [35] FUJIMOTO T, SHIRASAWA S. Identification of KRAP-expressing cells and the functional relevance of KRAP to the subcellular localization of IP3R in the stomach and kidney[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(6): 1287-1293. DOI: 10.3892/ijmm.2012.1126.
- [36] LIU Y, MA X, FUJIOKA H, et al. DJ-1 regulates the integrity and function of ER-mitochondria association through interaction with IP3R3-GRP75-VDAC1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(50): 25322-25328. DOI: 10.1073/pnas.1906565116.
- [37] GOMEZ L, THIEBAUT PA, PAILLARD M, et al. The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3 β during reperfusion injury[J]. Cell Death Differ, 2016, 23(2): 313-322. DOI: 10.1038/cdd.2015.101.
- [38] PASTORINO JG, HOEK JB, SHULGA N. Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity[J]. Cancer Res, 2005, 65(22): 10545-10554. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1925.
- [39] DAS S, WONG R, RAJAPAKSE N, et al. Glycogen synthase kinase 3 inhibition slows mitochondrial adenine nucleotide transport and regulates voltage-dependent anion channel phosphorylation[J]. Circ Res, 2008, 103(9): 983-991. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.178970.
- [40] THOUDAM T, CHANDA D, LEE JY, et al. Enhanced Ca²⁺-channeling complex formation at the ER-mitochondria interface underlies the pathogenesis of alcohol-associated liver disease[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 1703. DOI: 10.1038/s41467-023-37214-4.

(收稿日期: 2023-12-28)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)