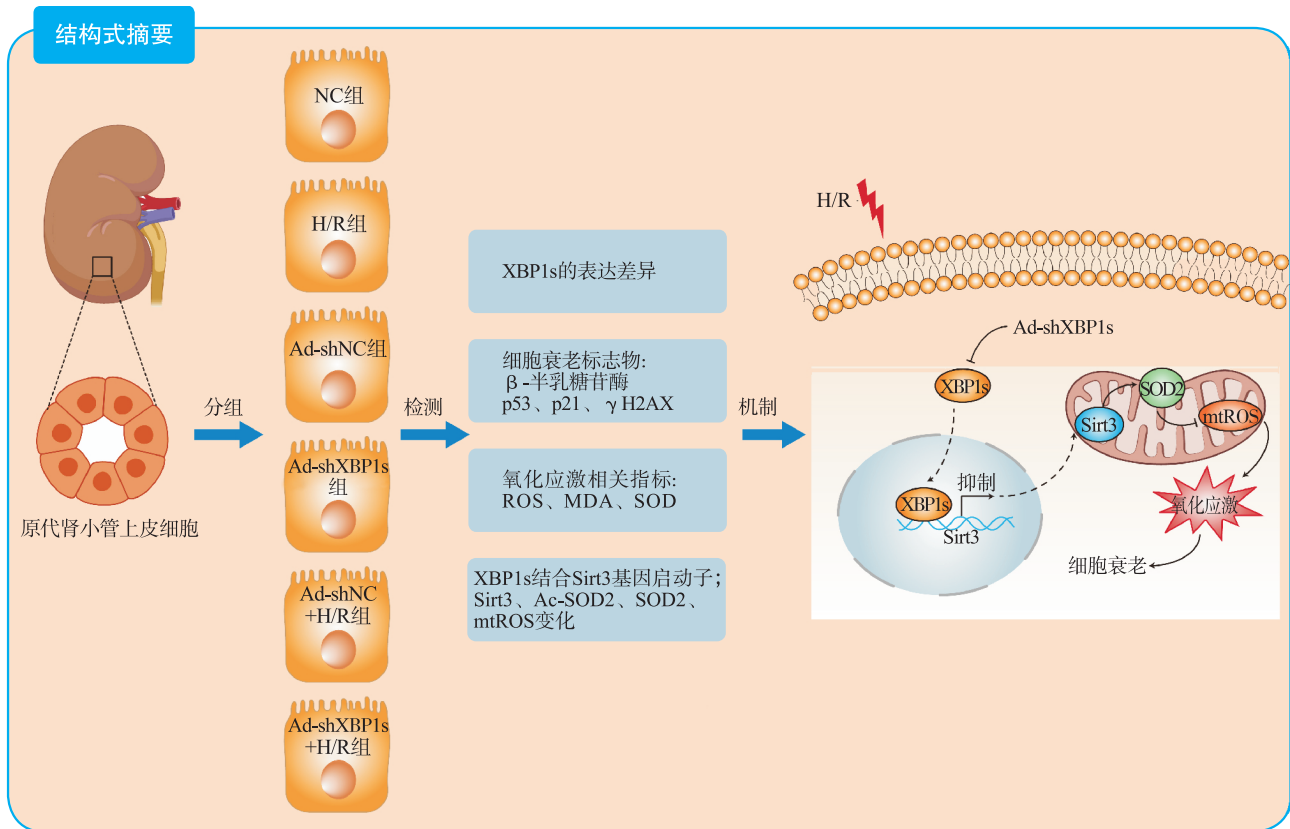


下调 XBP1s 通过 Sirt3/SOD2/mtROS 轴减轻缺氧/复氧诱导的肾小管上皮细胞衰老

彭宣 倪海强 顾世琦 宫念樵



【摘要】 目的 探讨剪接型 X-盒结合蛋白 1 (XBP1s) 在缺氧/复氧 (H/R) 诱导的原代肾小管上皮细胞衰老中的作用及机制。**方法** 将原代肾小管上皮细胞分为空白对照组 (NC 组)、H/R 组、空载腺病毒阴性对照组 (Ad-shNC 组)、靶向沉默 XBP1s 腺病毒组 (Ad-shXBP1s 组)、空载腺病毒+H/R 处理组 (Ad-shNC+H/R 组)、靶向沉默 XBP1s 腺病毒+H/R 处理组 (Ad-shXBP1s+H/R 组)。检测 NC 组、H/R 组、Ad-shNC 组、Ad-shXBP1s 组 XBP1s 的表达情况。检测 Ad-shNC 组、Ad-shNC+H/R 组、Ad-shXBP1s+H/R 组 β-半乳糖苷酶染色情况, 细胞衰老标志物 p53、p21、γH2AX 表达情况, 氧化应激相关指标活性氧 (ROS)、丙二醛 (MDA) 和超

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023186

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: 彭宣 (ORCID 0000-0001-6766-8185), 硕士研究生, 研究方向为肾移植、缺血-再灌注损伤, Email: pengxuanzp@163.com

通信作者: 宫念樵 (ORCID 0000-0001-7634-1440), 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为器官移植、移植免疫、干细胞治疗, Email: nqgong@tjh.tjmu.edu.cn

氧化物歧化酶 (SOD) 水平。采用染色质免疫共沉淀验证 XBP1s 转录调控沉默信息调节因子 3 (Sirt3), 检测下调 XBP1s 后 Sirt3 及下游 SOD2 表达, 采用流式细胞术检测线粒体活性氧簇 (mtROS)。**结果** 与 NC 组比较, H/R 组 XBP1s 表达增多; 与 Ad-shNC 组比较, Ad-shXBP1s 组 XBP1s 表达减少 (均为 $P<0.001$)。与 Ad-shNC 组比较, Ad-shNC+H/R 组 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数增加, p53、p21、 γ H2AX 表达增多, ROS、MDA、mtROS 水平升高, SOD 活性下降, Sirt3 表达量降低, Ac-SOD2/SOD2 比值升高; 与 Ad-shNC+H/R 组相比, Ad-shXBP1s+H/R 组 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数减少, p53、p21、 γ H2AX 表达减少, ROS、MDA、mtROS 水平下降, SOD 活性升高, Sirt3 表达量升高, Ac-SOD2/SOD2 比值下降 (均为 $P<0.05$)。**结论** 下调 XBP1s 可减轻 H/R 诱导的原代肾小管上皮细胞衰老, 可能是通过 Sirt3/SOD2/mtROS 信号轴发挥作用。

【关键词】 肾移植; 缺血-再灌注损伤; 剪接型 X 盒结合蛋白 1; 细胞衰老; 氧化应激; 沉默信息调节因子 3; 线粒体活性氧簇; 超氧化物歧化酶

【中图分类号】 R617, R692 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2024) 01-0007-09

Down-regulation of XBP1s alleviates the senescence of renal tubular epithelial cells induced by hypoxia/reoxygenation through Sirt3/SOD2/mtROS signaling pathway Peng Xuan, Ni Haiqiang, Gu Shiqi, 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 investigate the role and mechanism of spliced X-box binding protein 1 (XBP1s) in the senescence of primary renal tubular epithelial cells induced by hypoxia/reoxygenation (H/R). **Methods** Primary renal tubular epithelial cells were divided into the normal control group (NC group), H/R group, empty adenovirus negative control group (Ad-shNC group), targeted silencing XBP1s adenovirus group (Ad-shXBP1s group), empty adenovirus+H/R treatment group (Ad-shNC+H/R group) and targeted silencing XBP1s adenovirus+H/R treatment group (Ad-shXBP1s + H/R group), respectively. The expression levels of XBP1s in the NC, H/R, Ad-shNC and Ad-shXBP1s groups were measured. The number of cells stained with β -galactosidase, the expression levels of cell aging markers including p53, p21 and γ H2AX, and the levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were determined in the Ad-shNC, Ad-shNC+H/R and Ad-shXBP1s+H/R groups. Chromatin immunoprecipitation was employed to verify Sirtuin 3 (Sirt3) of XBP1s transcription regulation, and the expression levels of Sirt3 and downstream SOD2 after down-regulation of XBP1s were detected. Mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) were detected by flow cytometry. **Results** Compared with the NC group, the expression level of XBP1s was up-regulated in the H/R group. Compared with the Ad-shNC group, the expression level of XBP1s was down-regulated in the Ad-shXBP1s group (both $P<0.001$). Compared with the Ad-shNC group, the number of cells stained with β -galactosidase was increased, the expression levels of p53, p21 and γ H2AX were up-regulated, the levels of ROS, MDA and mtROS were increased, the SOD activity was decreased, the expression level of Sirt3 was down-regulated, and the ratio of Ac-SOD2/SOD2 was increased in the Ad-shNC+H/R group. Compared with the Ad-shNC+H/R group, the number of cells stained with β -galactosidase was decreased, the expression levels of p53, p21 and γ H2AX were down-regulated, the levels of ROS, MDA and mtROS were decreased, the SOD activity was increased, the expression level of Sirt3 was up-regulated and the ratio of Ac-SOD2/SOD2 was decreased in the Ad-shXBP1s+H/R group (all $P<0.05$). **Conclusions** Down-regulation of XBP1s may ameliorate the senescence of primary renal tubular epithelial cells induced by H/R, which probably plays a role through the Sirt3/SOD2/mtROS signaling pathway.

【Key words】 Kidney transplantation; Ischemia-reperfusion injury; Spliced X-box binding protein 1; Cell senescence; Oxidative stress; Sirtuin 3; Mitochondrial reactive oxygen species; Superoxide dismutase

肾移植术后可发生急性肾损伤和移植肾功能延迟恢复, 而缺血-再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 是其发生的重要因素^[1-3]。近年研究表明, IRI 过程中由于线粒体失功产生的大量活性氧簇

(reactive oxygen species, ROS) 能诱导细胞衰老^[4]。衰老的肾小管上皮细胞一方面由于细胞周期阻滞而停止增殖, 另一方面由于衰老相关分泌表型促进炎症和纤维化, 加速急性肾损伤向慢性肾病进展^[5-6]。因此, 探索细胞衰老发生的分子机制及寻求干预策略, 具有重要意义。

IRI 过程中会发生严重的内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS), ERS 主要由肌醇需求激酶 1 (inositol-requiring enzyme 1, IRE1)、转录激活因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6)、蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 介导^[7-8]。其中, 非剪接型 X-盒结合蛋白 1 (unspliced X-box binding protein 1, XBP1u) 被激活的 IRE1 剪接一个内含子重编码生成剪接型 X-盒结合蛋白 1 (spliced X-box binding protein 1, XBP1s), 而 XBP1s 作为转录因子能通过调控一系列下游 ERS 相关蛋白调节内质网稳态^[9-10]。笔者团队前期研究表明下调 XBP1s 能减少 IRI 过程中 ROS 产生^[11], 但下调 XBP1s 能否减轻 ROS 诱导的细胞衰老及其可能机制尚不清楚。研究报道, 沉默信息调节因子 3 (sirtuin 3, Sirt3) 作为最重要的线粒体去乙酰化酶, 通过使超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 2 去乙酰化, 增强 SOD2 活性, 从而抑制线粒体 ROS (mitochondrial ROS, mtROS) 产生^[12-13], Sirt3/SOD2/mtROS 信号轴在 IRI 过程中调控氧化应激及细胞衰老至关重要^[14-15]。本研究通过建立体外缺氧-复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 模型, 探讨 XBP1s 调控 Sirt3/SOD2/mtROS 信号轴对 H/R 诱导的细胞衰老影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

1.1.1 实验材料 用于提取原代肾小管上皮细胞的健康无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 C57BL/6 雄性小鼠 (6~8 周龄) 购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。小鼠饲养在华中科技大学同济医学院附属同济医院 SPF 级动物中心, 饲养环境为 22 °C, 55% 湿度和 12 h 昼夜循环。所有动物实验均经同济医院实验动物福利与伦理委员会批准 (批号: TJH-202207003), 并遵守中华人民共和国科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 试剂 EpiCM-a 培养基购自美国 ScienCell 公

司, 胎牛血清购自上海翌圣生物科技股份有限公司; 总 RNA 提取试剂购自上海飞捷生物技术有限公司, 逆转录试剂盒购自日本 Takara 公司, 腺病毒由上海和元生物技术股份有限公司合成, 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物由武汉奥科鼎盛生物科技股份有限公司合成; Sirt3、p53、p21、 γ H2AX、SOD2、 β -actin、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔二抗、染色质免疫沉淀试剂盒购于武汉爱博泰克生物技术有限公司, XBP1s 抗体购自美国 CST 生物公司、Ac-SOD2 抗体购于英国 Abcam 公司; RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ROS 检测试剂盒、SOD 活性检测试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒、细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司; 线粒体超氧化物指示剂 mitoSOX 购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原代肾小管上皮细胞提取和培养 选用 6~8 周 C57BL/6 雄性小鼠, 在无菌条件下取出肾脏, 剥离肾包膜后, 剪碎肾皮质组织, 再使用组织分离器打碎肾脏, 加入胶原酶/复合酶和 DNA 酶消化获得单细胞悬液。用 70 μ m 滤器过滤, 滤液经离心、洗涤、裂红后, 用 EpiCM-a 完全培养基重悬细胞, 转至细胞培养瓶内, 置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养, 48 h 后, 可见部分细胞贴壁并换液, 后续每隔 2~3 d 更换培养基, 并根据细胞生长情况进行传代。

1.2.2 细胞分组与转染 将细胞随机分为空白对照组 (NC 组)、H/R 组、转染空载腺病毒的阴性对照组 (Ad-shNC 组)、转染靶向沉默 XBP1s 的腺病毒组 (Ad-shXBP1s 组)、转染空载腺病毒+H/R 处理组 (Ad-shNC+H/R 组)、转染靶向沉默 XBP1s 的腺病毒+H/R 处理组 (Ad-shXBP1s+H/R 组)。以感染复数 50 为参考进行原代细胞转染, 48 h 后即可检测转染效率和干扰效果, XBP1s 干扰序列为 5'-CAGCGCAGACTGCTCGAGATAGAAA-3'。

1.2.3 建立 H/R 模型 参考前期研究者经验建立 H/R 模型^[16], 将培养基更换为预先缺氧的无血清培养基, 然后将细胞置于含有 5% CO₂、1% O₂、94% N₂ 的 37 °C 三气培养箱中培养 24 h 进行缺氧, 缺氧结束后更换为正常完全培养基, 并移至常氧培养箱继续培养 2 h 进行复氧。整个过程常氧组予以正常完全培养

基培养,并于常氧培养箱中培养。

1.2.4 β -半乳糖苷酶染色 弃除 12 孔板中的细胞培养液,用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 1 次,然后每孔加入 500 μ L β -半乳糖苷酶染色固定液,室温下固定 15 min。再弃除固定液,用 PBS 洗涤 3 次,每次 3 min。最后每孔加入 500 μ L 含有 X-Gal 的染色工作液,于 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日于普通光学显微镜下观察。

1.2.5 蛋白质印迹法检测蛋白表达 使用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,然后进行蛋白定量。经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜,室温用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。洗膜后加入相应一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜后加入二抗室温孵育 1 h,洗膜后进行显影。

1.2.6 ROS 水平测定 用 DCFH-DA 荧光探针检测细胞内的 ROS 水平。用无血清培养基按 1 : 1 000 将 DCFH-DA 稀释成终浓度为 10 μ mol/L 的工作液。培养细胞结束后,弃除培养基,用 PBS 洗 3 遍,加入适当体积工作液充分覆盖细胞。于细胞培养箱内避光孵育 20 min 后,用无血清细胞培养基洗涤 3 次。在荧光显微镜下随机选取不同视野拍照观察。

1.2.7 MDA 和 SOD 检测 细胞培养结束后,用 SOD 活性检测试剂盒、MDA 检测试剂盒按照说明书分别检测 SOD 活性及 MDA 含量。

1.2.8 染色质免疫共沉淀检测 XBP1s 与 Sirt3 结合 将细胞与 1% 甲醛交联,然后裂解,用蛋白 A/G 磁性琼脂糖将提取液预清除,4 $^{\circ}$ C 下过夜。接着用抗

XBP1s 或抗 IgG 抗体进行免疫沉淀后,按说明书洗涤蛋白质复合物。洗涤之后解除蛋白质/DNA 复合物之间的交联,然后纯化 DNA 进行染色质免疫共沉淀-测序 (chromatin immunoprecipitation followed by sequencing, ChIP-seq) 与定量聚合酶链反应 (chromatin immunoprecipitation followed by quantitative polymerase chain reaction, ChIP-qPCR) 分析。根据 Sirt3 基因启动子上预测的 XBP1s 结合的 motif 所设计引物 1-5 的序列见表 1。

1.2.9 实时荧光定量聚合酶链反应检测 mRNA 表达 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测细胞中 XBP1s、Sirt3 表达水平。提取细胞总 RNA,测定浓度后配成反应体系,用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA,再进行扩增。以 β -actin 作为内参基因,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。引物序列见表 1。

1.2.10 流式细胞术检测 mtROS 将线粒体超氧化物指示剂 MitoSOX 溶于二甲基亚砷中,制成 5 mmol/L 的储存液,再用含钙、镁的 Hank's 平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS) 稀释成浓度为 1 μ mol/L 的工作液。弃除培养基后,加入适量工作液覆盖细胞,于培养箱中孵育 30 min,最后用 HBSS 洗涤 3 次,胰酶消化后收集细胞进行流式细胞仪分析。

1.3 研究内容

检测 NC 组、H/R 组、Ad-shNC 组、Ad-

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

名称	正义链 (5'-3')	反义链 (5'-3')
XBP1s	AAGAACACGCTTGGGAATGG	CTGCACCTGCTGCGGAC
Sirt3	ATCCCGGACTTCAGATCCCC	CAACATGAAAAAGGGCTTGGG
β -actin	AGGCCAACCGTGAAAGATG	TGGCGTGAGGGAGAGCATAG
引物1	TGGTGACTTATCTACGTCTGCT	ATCACTTTGTGCCACGGACT
引物2	CATCGTCTGAGCTGTCTGGTA	TGTGGGACTGAGGGCTTTTGT
引物3	CAGCGTCAACTCCCCTCT	AAGGCTGAAGGCATCCGTTTC
引物4	CCTGACCCTCCGGACTGAT	TTGTTCCAGCTCTCTGCAAT
引物5	ACTAAGCAGTCAGAACCGGC	GTTACCTTGACGACCGCAAC

shXBP1s 组 XBP1s 信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 和蛋白表达情况, 验证沉默效率及 H/R 对细胞 XBP1s 表达的影响。检测 Ad-shNC 组、Ad-shNC+H/R 组、Ad-shXBP1s+H/R 组 β -半乳糖苷酶染色情况, 细胞衰老标志物 p53、p21、 γ H2AX 表达情况, ROS、MDA 和 SOD 水平。验证 XBP1s 转录调控 Sirt3, 检测下调 XBP1s 后 Sirt3 及下游 SOD2 表达, 并检测 mtROS。

1.4 统计学方法

实验数据用软件 GraphPad Prism 9.0 进行统计分析, 数据符合正态分布以均数 \pm 标准差表示, 采用独立样本 *t* 检验或单因素方差分析进行比较分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H/R 处理原代肾小管上皮细胞后 XBP1s 表达上升

与 NC 组比较, H/R 组 XBP1s mRNA 相对表达量升高 ($P < 0.001$, 图 1A), XBP1s 蛋白表达增多 (图 1B)。与 Ad-shNC 组比较, Ad-shXBP1s 组 XBP1s mRNA 相对表达量下降 ($P < 0.001$, 图 1C), XBP1s 蛋白表达减少 (图 1D)。

2.2 下调 XBP1s 减轻 H/R 诱导的肾小管上皮细胞衰老

与 Ad-shNC 组相比, Ad-shNC+H/R 组 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数增加, 衰老标志蛋白 p53、p21、 γ H2AX 表达增多; 与 Ad-shNC+H/R 组比较, Ad-shXBP1s+H/R 组 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数减少, p53、p21、 γ H2AX 表达减少 (图 2)。

2.3 下调 XBP1s 减轻 H/R 诱发的氧化应激

与 Ad-shNC 组比较, Ad-shNC+H/R 组 ROS、

MDA 水平较高, SOD 活性下降; 与 Ad-shNC+H/R 组比较, Ad-shXBP1s+H/R 组 ROS、MDA 水平较低, SOD 活性升高 (均为 $P < 0.05$, 图 3)。

2.4 XBP1s 调控 Sirt3/SOD2/mtROS 通路

通过 ChIP-seq 筛选出 XBP1s 转录调控的且与细胞衰老和氧化应激密切相关的分子 Sirt3, XBP1s 可能与 Sirt3 基因启动子区域结合 (图 4A)。ChIP-qPCR 证明 XBP1s 与 Sirt3 基因启动子序列中的引物 5 对应的扩增序列结合, 与 IgG 组相比, XBP1s 组富集倍率增高 ($P < 0.01$, 图 4B)。

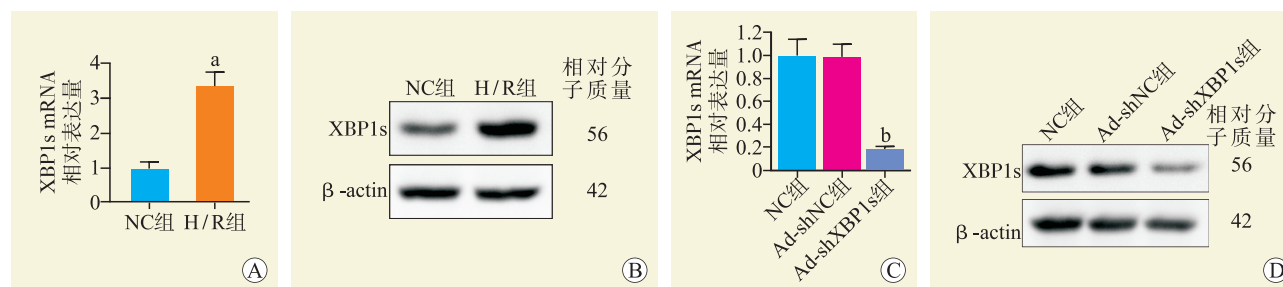
RT-qPCR 结果显示, Ad-shNC+H/R 组 Sirt3 mRNA 相对表达量较 Ad-shNC 组下降, Ad-shXBP1s+H/R 组 Sirt3 mRNA 相对表达量较 Ad-shNC+H/R 组升高 (均为 $P < 0.01$, 图 4C)。

蛋白质印迹结果显示, Ad-shNC+H/R 组 Sirt3 蛋白表达较 Ad-shNC 组减少, Ad-shXBP1s+H/R 组 Sirt3 蛋白表达较 Ad-shNC+H/R 组增多 (图 4D)。与 Ad-shNC 组比较, Ad-shNC+H/R 组 Ac-SOD2/SOD2 比值升高; 与 Ad-shNC+H/R 组比较, Ad-shXBP1s+H/R 组 Ac-SOD2/SOD2 比值下降 (均为 $P < 0.01$, 图 4D、E)。

流式细胞术结果显示, Ad-shNC+H/R 组 mtROS 产生较 Ad-shNC 组增多, Ad-shXBP1s+H/R 组 mtROS 产生较 Ad-shNC+H/R 组减少 (均为 $P < 0.01$, 图 4F、G)。

3 讨论

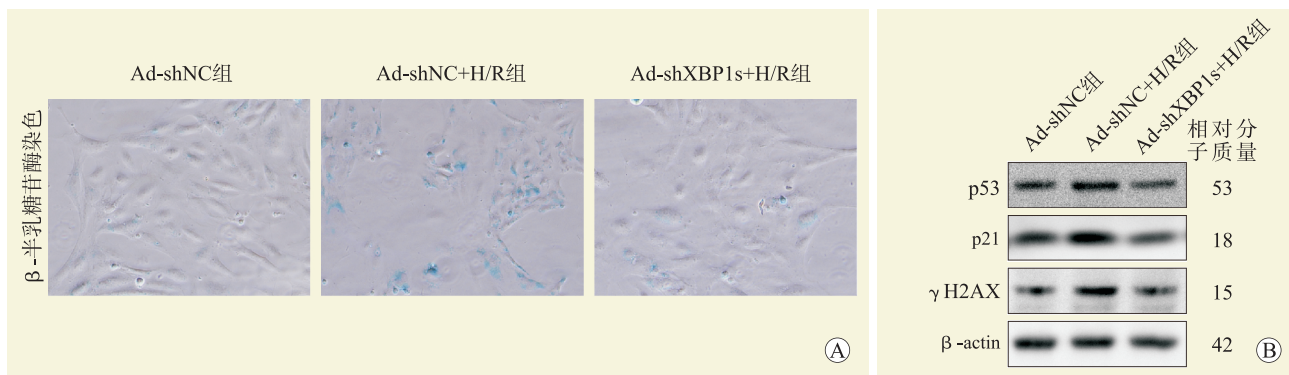
近年来, 细胞衰老在 IRI 中的作用越来越受到关注^[3,17-19], 研究表明, 在小鼠单侧肾 IRI 模型中, 诱导衰老肾小管上皮细胞凋亡能减轻肾纤维化^[20]。故探索



注: A、C 图为各组 XBP1s mRNA 相对表达量; B、D 图为蛋白质印迹法检测各组 XBP1s 蛋白表达。与 NC 组相比, ^a $P < 0.001$; 与 Ad-shNC 组比较, ^b $P < 0.001$ 。

图 1 H/R 对肾小管上皮细胞 XBP1s 表达的影响

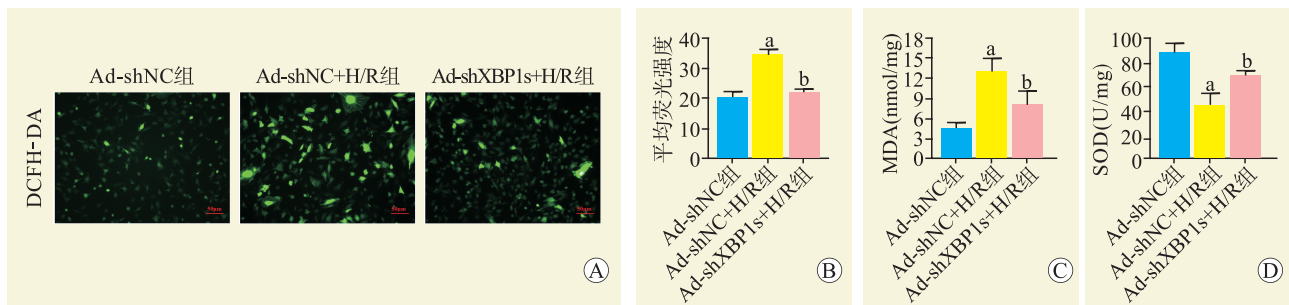
Figure 1 The effect of H/R on XBP1s expression in renal tubular epithelial cells



注：A 图为检测各组 β -半乳糖苷酶阳性细胞数 ($\times 200$)；B 图为蛋白质印迹法检测各组 p53、p21、 γ H2AX 蛋白表达。

图 2 下调 XBP1s 减轻 H/R 诱导的细胞衰老

Figure 2 Downregulation of XBP1s mitigates cell senescence induced by H/R



注：A 图为用 DCFH-DA 荧光探针检测各组 ROS 水平（免疫荧光， $\times 200$ ）；B 图为各组 ROS 荧光强度统计结果；C 图为各组 MDA 含量检测结果；D 图为各组 SOD 活性检测结果。与 Ad-shNC 组比较，^a $P < 0.01$ ；与 Ad-shNC+H/R 组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 3 下调 XBP1s 减轻 H/R 诱发的氧化应激

Figure 3 Downregulation of XBP1s alleviates oxidative stress induced by H/R

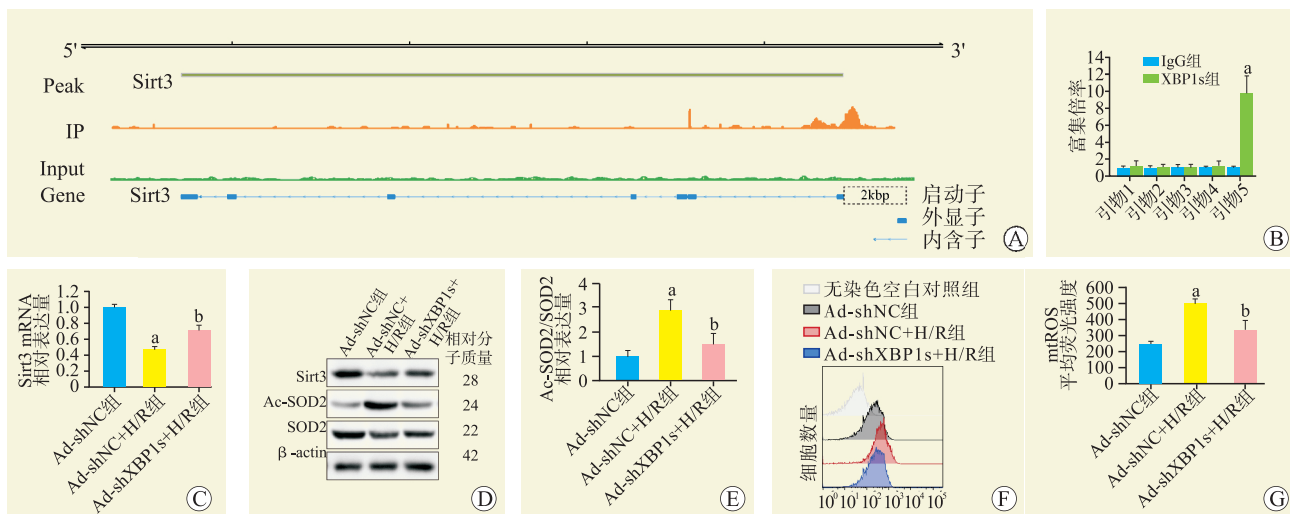
细胞衰老发生机制从而开发新型干预策略至关重要。

笔者团队前期发现下调 XBP1s 能减少 H/R 后 mtROS 的产生及 p53 表达^[11,21]，但尚不清楚 XBP1s 能否调控 ROS 诱导的细胞衰老。有研究报道，线粒体相关的 Sirt3 可减少 SOD2 乙酰化程度，增强 SOD2 活性，抑制 mtROS 产生^[22-24]。本研究采用原代肾小管上皮细胞建立 H/R 模型，证明下调 XBP1s 能减轻 H/R 诱导的细胞衰老，其机制可能是减少了 XBP1s 对 Sirt3 的转录抑制，使 Sirt3 表达上调，促进 SOD2 的去乙酰化水平，从而增强 SOD2 活性，抑制 mtROS 产生，减轻氧化应激。

研究表明 H/R 可通过氧化应激使细胞过早发生衰老^[4,16,25-26]。为探讨 XBP1s 对 H/R 诱导的细胞衰老的影响，本研究通过腺病毒靶向沉默 XBP1s，结果显示下调 XBP1s 减少了衰老细胞，同时抑制了氧化应激水平。然而，XBP1 与细胞衰老的关系尚存争议。在自然衰老小鼠中，过表达 XBP1 能防止甚至恢复认

知功能衰退，保持突触传递的完整性并减少衰老细胞的自然积累^[27]。在结肠癌中，XBP1u 可通过增强 p53 泛素化负向调控与细胞衰老密切相关的 p53/p21 轴^[28]。由此可见，XBP1 与细胞衰老的关系需放在具体疾病模型、组织细胞类型及衰老类型中探讨。

本研究通过 ChIP-seq 筛选 XBP1s 转录调控的下游分子并通过 ChIP-qPCR 验证其与启动子序列的结合，Sirt3 作为 Sirtuins 家族中最重要的线粒体去乙酰化酶^[29-30]，可通过位于线粒体的抗衰老分子 SOD2 起到抗氧化应激作用，并且 Sirt3 可以直接结合 SOD2 使其去乙酰化^[14,31-35]。本研究结果证明 XBP1s 可对 Sirt3 起到转录抑制作用，下调 XBP1s 减少其对 Sirt3 的转录抑制，促进 SOD2 去乙酰化，从而增强其抗氧化应激活性。近年研究表明，Sirt3/SOD2/mtROS 通路除了在氧化应激和细胞衰老中起作用，在炎症、自噬性细胞死亡、铁死亡、线粒体稳态中也起到重要调控作用^[12,36-38]。这为拓宽 XBP1s 的调控作用提供了



注：A 图为 ChIP-seq 峰图；B 图为 ChIP-qPCR 结果，与 IgG 组比较，^a*P*<0.01；C 图为各组 Sirt3 mRNA 相对表达量；D 图为蛋白质印迹法检测各组 Sirt3、Ac-SOD2、SOD2 蛋白表达；E 图为各组 Ac-SOD2/SOD2 蛋白相对表达量；F 图为流式细胞术分析 mtROS 变化；G 图为各组 mtROS 荧光强度分析结果。与 Ad-shNC 组比较，^a*P*<0.01，与 Ad-shNC+H/R 组比较，^b*P*<0.01。

图 4 下调 XBP1s 对 Sirt3/SOD2/mtROS 信号轴的影响

Figure 4 The impact of downregulating XBP1s on the Sirt3/SOD2/mtROS signaling axis

可能的探索路径。

综上所述，本研究通过构建肾小管上皮细胞 H/R 模型，证实下调 XBP1s 可减轻细胞衰老，其可能是通过 Sirt3/SOD2/mtROS 信号轴发挥作用。这一研究结果可能为延缓急性肾损伤向慢性肾病进展提供新的理论基础和研究方向。但本研究未探索上调 XBP1s 后产生的效应，且细胞实验不能完全模拟体内病理生理过程，缺乏临床标本数据加以验证，后续仍需要进一步探索。

参考文献:

[1] PONTICELLI C, REGGIANI F, MORONI G. Delayed graft function in kidney transplant: risk factors, consequences and prevention strategies[J]. *J Pers Med*, 2022, 12(10): 1557. DOI: 10.3390/jpm12101557.

[2] GRANATA S, VOTRICO V, SPADACCINO F, et al. Oxidative stress and ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: focus on ferroptosis, mitophagy and new antioxidants[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(4): 769. DOI: 10.3390/antiox11040769.

[3] 李晓凤, 张国欣, 杨开银, 等. 核因子 E2 相关因子 2 在肾缺血-再灌注损伤中的作用[J]. *器官移植*, 2023, 14(5): 656-661. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023124.

LI XF, ZHANG GX, YANG KY, et al. Effect of nuclear factor E2-related factor 2 on renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Organ Transplant*, 2023, 14(5): 656-661. DOI:

10.3969/j.issn.1674-7445.2023124.

[4] CHEN C, ZHENG M, HOU H, et al. Cellular senescence in ischemia/reperfusion injury[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 420. DOI: 10.1038/s41420-022-01205-z.

[5] DOCHERTY MH, O'SULLIVAN ED, BONVENTRE JV, et al. Cellular senescence in the kidney[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2019, 30(5): 726-736. DOI: 10.1681/ASN.2018121251.

[6] 郑博文, 刘华亭, 范晓阳, 等. 肾小管上皮细胞损伤促进肾纤维化的研究进展[J]. *中国医药科学*, 2023, 13(7): 54-57. DOI: 10.3969/j.issn.2095-0616.2023.07.015.

ZHENG BW, LIU HT, FAN XY, et al. Research progress of renal tubular epithelial cells injury in promoting renal fibrosis[J]. *China Med Pharm*, 2023, 13(7): 54-57. DOI: 10.3969/j.issn.2095-0616.2023.07.015.

[7] YAN M, SHU S, GUO C, et al. Endoplasmic reticulum stress in ischemic and nephrotoxic acute kidney injury[J]. *Ann Med*, 2018, 50(5): 381-390. DOI: 10.1080/07853890.2018.1489142.

[8] 王立堃, 李桃, 徐芬芬. 未折叠蛋白响应的激活机制[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2023, 50(5): 877-891. DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0137.

WANG LK, LI T, XU FF, et al. The mechanism of the unfolded protein response activation[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2023, 50(5): 877-891. DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0137.

- [9] CHEN Y, BRANDIZZI F. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor[J]. *Trends Cell Biol*, 2013, 23(11): 547-555. DOI: 10.1016/j.tcb.2013.06.005.
- [10] PARK SM, KANG TI, SO JS. Roles of XBP1s in transcriptional regulation of target genes[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(7): 791. DOI: 10.3390/biomedicines9070791.
- [11] NI H, OU Z, WANG Y, et al. XBP1 modulates endoplasmic reticulum and mitochondria crosstalk via regulating NLRP3 in renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 69. DOI: 10.1038/s41420-023-01360-x.
- [12] GAO J, FENG Z, WANG X, et al. Sirt3/SOD2 maintains osteoblast differentiation and bone formation by regulating mitochondrial stress[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(2): 229-240. DOI: 10.1038/cdd.2017.144.
- [13] TAO R, VASSILOPOULOS A, PARISIADOU L, et al. Regulation of MnSOD enzymatic activity by Sirt3 connects the mitochondrial acetylome signaling networks to aging and carcinogenesis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(10): 1646-1654. DOI: 10.1089/ars.2013.5482.
- [14] QIU X, BROWN K, HIRSCHHEY MD, et al. Calorie restriction reduces oxidative stress by Sirt3-mediated SOD2 activation[J]. *Cell Metab*, 2010, 12(6): 662-667. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.11.015.
- [15] ZHU M, HE J, XU Y, et al. AMPK activation coupling SENP1-Sirt3 axis protects against acute kidney injury[J]. *Mol Ther*, 2023, 31(10): 3052-3066. DOI: 10.1016/j.ymthe.2023.08.014.
- [16] ELEFThERIADIS T, PISSAS G, FILIPPIDIS G, et al. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in renal tubular epithelial cells senescence under anoxia or reoxygenation[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(10): 1522. DOI: 10.3390/biom11101522.
- [17] LUO C, ZHOU S, ZHOU Z, et al. Wnt9a promotes renal fibrosis by accelerating cellular senescence in tubular epithelial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29(4): 1238-1256. DOI: 10.1681/ASN.2017050574.
- [18] VALENTIJN FA, KNOPPERT SN, MARQUEZ-EXPOSITO L, et al. Cellular communication network 2 (connective tissue growth factor) aggravates acute DNA damage and subsequent DNA damage response-senescence-fibrosis following kidney ischemia reperfusion injury[J]. *Kidney Int*, 2022, 102(6): 1305-1319. DOI: 10.1016/j.kint.2022.06.030.
- [19] CHEN J, LU H, WANG X, et al. VNN1 contributes to the acute kidney injury-chronic kidney disease transition by promoting cellular senescence via affecting RB1 expression[J]. *FASEB J*, 2022, 36(9): e22472. DOI: 10.1096/fj.202200496RR.
- [20] LI C, SHEN Y, HUANG L, et al. Senolytic therapy ameliorates renal fibrosis postacute kidney injury by alleviating renal senescence[J]. *FASEB J*, 2021, 35(1): e21229. DOI: 10.1096/fj.202001855RR.
- [21] ZHANG J, ZHANG J, NI H, et al. Downregulation of XBP1 protects kidney against ischemia-reperfusion injury via suppressing HRD1-mediated NRF2 ubiquitylation[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 44. DOI: 10.1038/s41420-021-00425-z.
- [22] ZHANG J, XIANG H, LIU J, et al. Mitochondrial sirtuin 3: new emerging biological function and therapeutic target[J]. *Theranostics*, 2020, 10(18): 8315-8342. DOI: 10.7150/thno.45922.
- [23] WANG D, CAO L, ZHOU X, et al. Mitigation of honokiol on fluoride-induced mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and cognitive deficits through activating AMPK/PGC-1 α /Sirt3[J]. *J Hazard Mater*, 2022, 437: 129381. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.129381.
- [24] XIAO L, FANG Z, WANG Q, et al. Curcumin ameliorates age-induced tight junction impaired in porcine sertoli cells by inactivating the NLRP3 inflammasome through the AMPK/Sirt3/SOD2/mitROS signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2023: 1708251. DOI: 10.1155/2023/1708251.
- [25] ELEFThERIADIS T, PISSAS G, GOLFINOPOULOS S, et al. Inhibition of malate dehydrogenase-2 protects renal tubular epithelial cells from anoxia-reoxygenation-induced death or senescence[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(10): 1415. DOI: 10.3390/biom12101415.
- [26] QIN Z, WANG H, DOU Q, et al. Protective effect of fluoxetine against oxidative stress induced by renal ischemia-reperfusion injury via the regulation of miR-450b-5p/Nrf2 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, DOI: 10.18632/aging.204289[Epub ahead of print].
- [27] CABRAL-MIRANDA F, TAMBURINI G, MARTINEZ G, et al. Unfolded protein response IRE1/XBP1 signaling is required for healthy mammalian brain aging[J]. *EMBO J*, 2022, 41(22): e111952. DOI: 10.15252/embj.2022111952.
- [28] HUANG C, WU S, JI H, et al. Identification of XBP1-u as a novel regulator of the MDM2/p53 axis using an shRNA library[J]. *Sci Adv*, 2017, 3(10): e1701383. DOI: 10.1126/sciadv.1701383.
- [29] WU QJ, ZHANG TN, CHEN HH, et al. The sirtuin family in health and disease[J]. *Signal Transduct Target*

- Ther, 2022, 7(1): 402. DOI: 10.1038/s41392-022-01257-8.
- [30] 白玉杰, 王建辉, 吴东颖. 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和 Sirtuins 在衰老和疾病中的作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2022, 38(10): 1294-1303. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2022.04.1562.
- BAI YJ, WANG JH, WU DY. Roles of NAD⁺ and sirtuins in aging and disease[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2022, 38(10): 1294-1303. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2022.04.1562.
- [31] SUNG JY, KIM SG, KANG YJ, et al. Metformin mitigates stress-induced premature senescence by upregulating AMPK α at Ser485 phosphorylation induced Sirt3 expression and inactivating mitochondrial oxidants[J]. Mech Ageing Dev, 2022, 206: 111708. DOI: 10.1016/j.mad.2022.111708.
- [32] MIAO HH, LIU Q, WANG N, et al. The effect of Sirt3/Ac-SOD2 mediated oxidative stress and HCN1 channel activity on anesthesia/surgery induced anxiety-like behavior in mice[J]. Front Med (Lausanne), 2022, 9: 783931. DOI: 10.3389/fmed.2022.783931.
- [33] 刘恋, 夏中元, 李冰玉, 等. Sirt3 过表达对高糖小鼠海马神经元缺氧复氧损伤的影响: 与 SOD2 的关系[J]. 中华麻醉学杂志, 2021, 41(5): 621-624. DOI: 10.3760/cma.j.cn131073.20210312.00526.
- LIU L, XIA ZY, LI BY, et al. Effect of Sirt3 overexpression on hypoxia-reoxygenation injury to hippocampal neurons of mice exposed to high glucose: relationship with SOD2[J]. Chin J Anesthesiol, 2021, 41(5): 621-624. DOI: 10.3760/cma.j.cn131073.20210312.00526.
- [34] MA LL, KONG FJ, DONG Z, et al. Hypertrophic preconditioning attenuates myocardial ischaemia-reperfusion injury by modulating Sirt3-SOD2-mROS-dependent autophagy[J]. Cell Prolif, 2021, 54(7): e13051. DOI: 10.1111/cpr.13051.
- [35] NING L, RUI X, GUORUI L, et al. A novel mechanism for the protection against acute lung injury by melatonin: mitochondrial quality control of lung epithelial cells is preserved through Sirt3-dependent deacetylation of SOD2[J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(12): 610. DOI: 10.1007/s00018-022-04628-0.
- [36] CHEN ML, ZHU XH, RAN L, et al. Trimethylamine-N-oxide induces vascular inflammation by activating the NLRP3 inflammasome through the Sirt3-SOD2-mtROS signaling pathway[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(9): e006347. DOI: 10.1161/JAHA.117.006347.
- [37] PI H, XU S, REITER RJ, et al. Sirt3-SOD2-mROS-dependent autophagy in cadmium-induced hepatotoxicity and salvage by melatonin[J]. Autophagy, 2015, 11(7): 1037-1051. DOI: 10.1080/15548627.2015.1052208.
- [38] LI Q, LIAO J, CHEN W, et al. NAC alleviative ferroptosis in diabetic nephropathy via maintaining mitochondrial redox homeostasis through activating Sirt3-SOD2/Gpx4 pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2022, 187: 158-170. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.05.024.

(收稿日期: 2023-09-20)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)