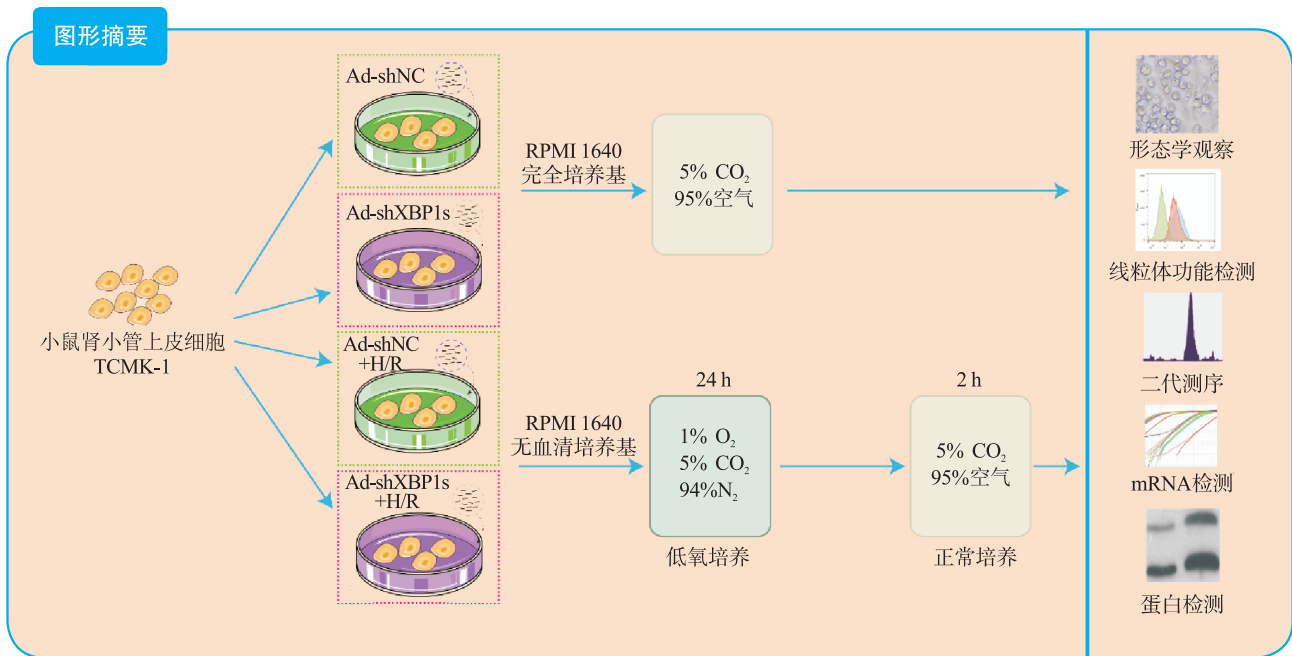


下调 XBP1s 通过抑制 ITPR 介导的线粒体功能障碍改善肾小管上皮细胞缺氧/复氧损伤

倪海强 彭宣 顾世琦 宫念樵



【摘要】 目的 探讨剪接型 X 盒结合蛋白 1 (XBP1s) 对小鼠肾小管上皮细胞缺氧/复氧 (H/R) 损伤的影响及其作用机制。方法 将小鼠肾小管上皮细胞分为腺病毒阴性对照组 (Ad-shNC 组)、靶向沉默 XBP1s 腺病毒组 (Ad-shXBP1s 组)、Ad-shNC+H/R 组、Ad-shXBP1s+H/R 组。检测各组细胞凋亡水平、线粒体活性氧水平、线粒体膜电位及线粒体钙离子水平。使用染色质免疫共沉淀测序 (ChIP-seq) 分析 XBP1s 调控肌醇 1,4,5-三磷酸受体 (ITPR) 家族的结合位点。检测各组 XBP1s 和 ITPR 家族信使 RNA (mRNA) 和蛋白表达水平。结果 与 Ad-shNC 组比较, Ad-shNC+H/R 组细胞凋亡水平更高, 线粒体活性氧水平升高, 线粒体膜电位降低, 线粒体钙离子水平升高; 与 Ad-shNC+H/R 组比较, Ad-shXBP1s+H/R 组细胞凋亡水平较低, 线粒体活性氧水平下降, 线粒体膜电位升高, 线粒体钙离子水平降低 (均为 $P < 0.05$)。与 Ad-shNC 组比较, Ad-shXBP1s 组 XBP1s、ITPR1、ITPR2 和 ITPR3 mRNA 和蛋白相对表达量降低 (均为 $P < 0.05$)。与 Ad-shNC 组相比, Ad-shNC+H/R 组 XBP1s、ITPR1、ITPR2 和 ITPR3 蛋白相对表达量升高; 与 Ad-shNC+H/R 组相比, Ad-shXBP1s+H/R 组 XBP1s、ITPR1、ITPR2 和 ITPR3 蛋白相对表达量下降 (均为 $P < 0.05$)。ChIP-seq 结果显示, XBP1s 能够结合 ITPR1 的启动子和外显子、ITPR2 外显子和 ITPR3 外显子。结论 XBP1s 可能通过直接调控 ITPR 转录和翻译而影响线粒体相关的

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023198

基金项目: 国家自然科学基金 (82170772); 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, 研究方向为肾缺血-再灌注损伤, Email: nhq6248@126.com

通信作者: 宫念樵 (ORCID 0000-0001-7634-1440), 教授, 主任医师, 研究方向为器官移植, Email: nqgong@tjh.tjmu.edu.cn

内质网膜结构功能, 下调 XBP1s 能够抑制 ITPR 表达, 改善线粒体损伤。

【关键词】 器官移植; 缺血-再灌注损伤; 剪接型 X 盒结合蛋白 1; 肌醇 1,4,5-三磷酸受体; 线粒体损伤; 内质网应激; 线粒体相关的内质网膜; 钙超载

【中图分类号】 R617, R692 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-7445 (2024) 02-0009-09

Down-regulating XBP1s alleviates hypoxia/reoxygenation injury of renal tubular epithelial cells by inhibiting ITPR-mediated mitochondrial dysfunction

Ni Haiqiang, Peng Xuan, 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 evaluate the effect of spliced X-box binding protein 1 (XBP1s) on hypoxia/reoxygenation (H/R) injury of mouse renal tubular epithelial cells and unravel underlying mechanism. **Methods** Mouse renal tubular epithelial cells were divided into adenovirus negative control group (Ad-shNC group), targeted silencing XBP1s adenovirus group (Ad-shXBP1s group), Ad-shNC+H/R group and Ad-shXBP1s+H/R group. The apoptosis level, mitochondrial reactive oxygen activity, mitochondrial membrane potential and mitochondrial calcium ion level were detected in each group. Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-seq) was employed to analyze the binding sites of XBP1s in regulating the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (ITPR) family. The expression levels of XBP1s and ITPR family messenger RNA (mRNA) and protein were determined in each group. **Results** Compared with the Ad-shNC group, the apoptosis level was higher, mitochondrial reactive oxygen species level was increased, mitochondrial membrane potential was decreased and mitochondrial calcium ion level was elevated in the Ad-shNC+H/R group. Compared with the Ad-shNC+H/R group, the apoptosis level was lower, mitochondrial reactive oxygen species level was decreased, mitochondrial membrane potential was elevated, and mitochondrial calcium ion level was decreased in the Ad-shXBP1s+H/R group (all $P<0.05$). Compared with the Ad-shNC group, relative expression levels of XBP1s, ITPR1, ITPR2 and ITPR3 mRNAs and proteins were down-regulated in the Ad-shXBP1s group (all $P<0.05$). Compared with the Ad-shNC group, relative expression levels of XBP1s, ITPR1, ITPR2 and ITPR3 proteins were up-regulated in the Ad-shNC+H/R group. Compared with the Ad-shNC+H/R group, relative expression levels of XBP1s, ITPR1, ITPR2 and ITPR3 were down-regulated in the Ad-shXBP1s+H/R group (all $P<0.05$). ChIP-seq results showed that XBP1s could bind to the promoter and exon of ITPR1, the exon of ITPR2, and the exon of ITPR3. **Conclusions** XBP1s may affect mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane structure and function by directly regulating ITPR transcription and translation. Down-regulating XBP1s may inhibit ITPR expression and mitigate mitochondrial damage.

【Key words】 Organ transplantation; Ischemia-reperfusion injury; Spliced X-box binding protein 1; Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor; Mitochondrial damage; Endoplasmic reticulum stress; Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane; Calcium overload

肾脏缺血-再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 是器官移植、心脏手术和其他大手术后的严重并发症^[1-2]。手术过程中肾脏血供不足, 恢复灌注时伴有复氧, 这对肾脏造成难以避免的损害^[3-4]。肾脏 IRI 的机制包括线粒体功能障碍、内质网应激、细胞凋亡和氧化应激^[5]。其中, 线粒体功能障碍和内质网应激起着重要作用^[6]。越来越多的证据表明, 内质网和线粒体功能在生理和病理上高度相关^[7], 线粒体是双层膜细胞器, 与内质网的特定结构形成密切的

物理接触, 即线粒体相关的内质网膜 (mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane, MAM), 在线粒体损伤、内质网应激、脂质稳态和细胞死亡中起重要作用^[8-9]。钙离子是重要的胞内第二信使, 内质网是细胞内钙离子储存结构, 内质网对钙离子的释放主要通过膜上的肌醇 1,4,5-三磷酸受体 (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, ITPR) 实现^[10]。线粒体钙摄取主要由线粒体外膜上的电压依赖性阴离子通道 (voltage dependent anion-selective channel,

VDAC) 介导, ITPR 通过葡萄糖调节蛋白 75 (glucose-regulated protein 75, GRP75) 与 VDAC 连接, 形成 ITPR-GRP75-VDAC 复合体, 在 MAM 上调钙离子自内质网向线粒体的转运^[11-13]。适当的钙离子释放激活线粒体氧化磷酸化活性, 促进三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 产生, 但持续过量的释放导致钙超载和线粒体通透性转换孔道开放, 启动内源性凋亡程序^[14]。本课题组前期研究证实内质网应激相关蛋白剪接型 X 盒结合蛋白 1 (spliced X-box binding protein 1, XBP1s) 能够通过调控炎症小体在 MAM 上的聚集影响线粒体功能^[15], 但 XBP1s 是否能够直接调控 MAM 组成尚不清楚。因此, 本研究拟探讨在缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 模型下, XBP1s 对小鼠肾小管上皮细胞 TCMK-1 线粒体功能和 MAM 相关蛋白 ITPR 表达的影响及可能的调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小鼠肾小管上皮细胞 (TCMK-1) 购自美国细胞培养物收藏中心, RPMI 1640 细胞培养基、线粒体活性氧探针 MitoSOX Red、线粒体探针 MitoTracker Deep Red 和 MitoTracker Green 购自美国 Thermo Scientific 公司, 线粒体钙离子荧光探针 Rhod-2 AM 购自上海翌圣生物科技股份有限公司, 细胞凋亡检测试剂盒购自杭州联科生物技术有限公司, IP 裂解液和 BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, RNA 抽提试剂盒购自上海飞捷有限公司, 染色质免疫共沉淀-测序 (chromatin immunoprecipitation followed by sequencing, ChIP-seq) 试剂盒和 XBP1s 抗体购自美国 CST 公司, ITPR1 抗体、ITPR3 抗体、 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、逆转录试剂盒和荧光定量试剂盒购自武汉爱博泰克生物科技有限公司, ITPR2 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物由武汉奥科鼎盛公司合成, XBP1s 干扰腺病毒由上海和元生物公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 TCMK-1 生长在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。细胞生长到 80%~90% 融合率时进行传代。将细胞分成 4 组: 转染腺病毒阴性对照组

(Ad-shNC 组)、转染靶向沉默 XBP1s 腺病毒组 (Ad-shXBP1s 组)、转染 Ad-shNC 后进行 H/R 处理组 (Ad-shNC+H/R 组)、转染 Ad-shXBP1s 后进行 H/R 处理组 (Ad-shXBP1s+H/R 组)。

1.2.2 H/R 模型建立 细胞培养融合率达 80%~90% 时更换无血清培养基后于三气缺氧箱中继续培养 (1% O₂、5% CO₂、94% N₂) 24 h 模拟缺氧条件, 常氧细胞则在标准条件下保持培养。缺氧 24 h 后, 缺氧细胞和常氧细胞均更换新鲜培养基, 在常规细胞培养箱中继续培养 2 h。

1.2.3 细胞转染 细胞融合率达 70%~80% 时进行 XBP1s 干扰腺病毒转染, 以感染复数 50 为参考转染细胞, 48 h 后即可检测转染效率和基因调控效果。小鼠 XBP1s 干扰序列为 5'-CAGCGCAGACTGCTCGAG ATAGAAA-3'。

1.2.4 实时定量聚合酶链反应 使用 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA, 通过逆转录试剂盒逆转录为互补 DNA (complementary DNA, cDNA)。使用 SYBR Green 预混料配置成相应体系进行扩增。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'→3')
XBP1s	正义链 AAGAACACGCTTG GGAATGG
	反义链 CTGCACCTGCTGCGGAC
ITPR1	正义链 CTCTGTATGCGGAGGGATCTAC
	反义链 CAGGATACTTAGCTATGAGGCG
ITPR2	正义链 CTCCTCTACATTGGGGACATC
	反义链 GGGATACTTAGCTATGAGACGG
ITPR3	正义链 CGACCTCATCAAGGCTCTCC
	反义链 TCCCCATCTCGTTGTTCTGC
β -actin	正义链 AGGCCAACCGTGAAAGATG
	反义链 TGGCGTGAGGGAGAGCATAG

1.2.5 蛋白质印迹法 提取细胞中总蛋白样品, BCA 蛋白测定试剂盒对蛋白浓度进行定量。凝胶电泳后进行转膜, 室温下用 5% 脱脂奶粉封闭液封闭 60 min。洗涤后孵育相应一抗 4 °C 过夜, 次日洗膜后加入二抗在室温下孵育 60 min, 然后进行清洗、显影和图片采集。

1.2.6 细胞凋亡检测 通过 Annexin V /碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 双染法检测细胞凋亡水平。收集细胞离心后弃上液,用缓冲液洗涤,按照说明书加入一定比例的异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) -Annexin V 和 PI 溶液,避光孵育后使用流式细胞术检测。

1.2.7 线粒体膜电位检测 线粒体膜电位通过流式细胞术测量,使用 MitoTracker Deep Red 和 MitoTracker Green 染色, MitoTracker Deep Red 的积累取决于膜电位,膜电位越高荧光信号越强,而 MitoTracker Green 在线粒体中的定位并不受线粒体膜电位的影响。因此,细胞群右移表明线粒体肿胀,膜电位下降。

1.2.8 线粒体活性氧检测 使用 MitoSOX Red 探针测量线粒体活性氧。将细胞与探针在 37 °C 细胞培养箱中孵育 30 min 后使用流式细胞术检测。

1.2.9 线粒体钙离子检测 使用线粒体钙离子荧光探针 Rhod-2AM 对线粒体钙离子进行标记,根据说明书进行孵育后,通过多功能酶标仪检测荧光强度,激发波长 530/25 nm,发射波长 590/35 nm。

1.2.10 ChIP-seq 细胞与 1% 甲醛交联后裂解,超声处理使 DNA 片段化,用抗 XBP1s 或抗 IgG 抗体免疫沉淀,加入蛋白 A/G 磁珠 4 °C 过夜,按说明书要求洗涤蛋白质复合物。洗涤后纯化 DNA 再进行二代测序。

1.3 研究内容

检测各组细胞凋亡水平、线粒体活性氧活性、线粒体膜电位及线粒体钙离子水平。使用 ChIP-seq 分析 XBP1s 调控 ITPR 家族的结合位点,检测各组 XBP1s 和 ITPR 家族信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 和蛋白表达水平。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料采用均数±标准差表示,采用 Student's *t* 检验分析两组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H/R 模型构建

光学显微镜检测结果显示,相比于常氧组细胞,H/R 组细胞死亡增多,表现为细胞肿胀变圆,折光性增强,细胞脱落增多(图 1)。

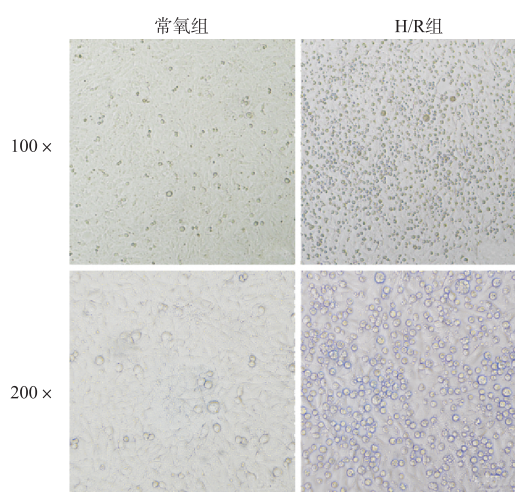


图 1 各组细胞形态学变化 ($\times 100, \times 200$)

Figure 1 Cell morphological changes in each group

2.2 下调 XBP1s 对细胞凋亡的影响

常氧状态下, Ad-shNC 组和 Ad-shXBP1s 组细胞凋亡少,两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2)。与 Ad-shNC 组比较, Ad-shNC+H/R 组细胞凋亡水平较高;与 Ad-shNC+H/R 组比较, Ad-shXBP1s+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 2)。

2.3 下调 XBP1s 对线粒体活性氧的影响

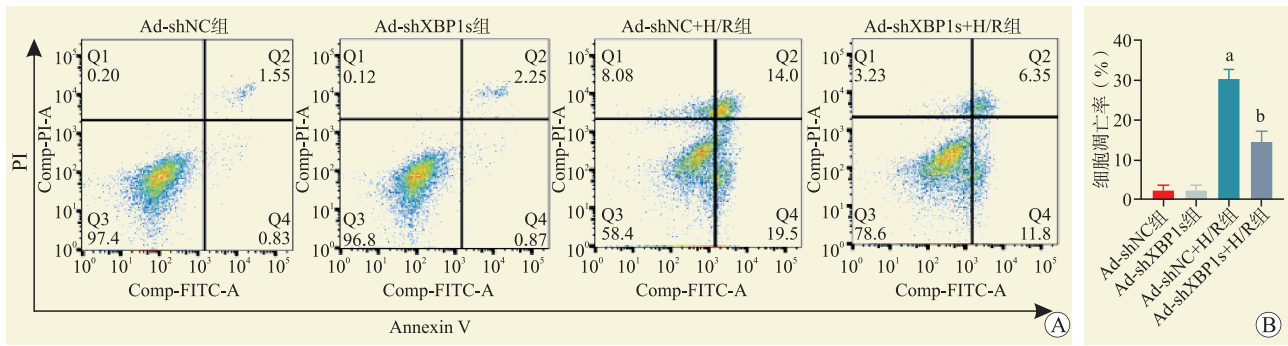
常氧状态下, Ad-shNC 组和 Ad-shXBP1s 组细胞线粒体活性氧水平低,两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 3);与 Ad-shNC 组比较, Ad-shNC+H/R 组线粒体活性氧水平升高;与 Ad-shNC+H/R 组比较, Ad-shXBP1s+H/R 组线粒体活性氧水平下降,差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$, 图 3)。

2.4 下调 XBP1s 对线粒体膜电位的影响

常氧状态下, Ad-shNC 组和 Ad-shXBP1s 组细胞线粒体膜电位水平高,两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 4)。与 Ad-shNC 组比较, Ad-shNC+H/R 组线粒体膜电位降低;与 Ad-shNC+H/R 组比较, Ad-shXBP1s+H/R 组线粒体膜电位升高,差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$, 图 4)。

2.5 下调 XBP1s 对线粒体钙超载的影响

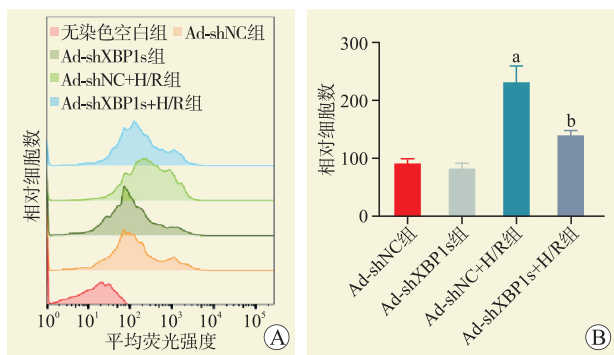
常氧状态下, Ad-shNC 组和 Ad-shXBP1s 组细胞线粒体钙离子水平低,两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 5)。与 Ad-shNC 组比较, Ad-shNC+H/R 组线粒体钙离子水平升高;与 Ad-shNC+H/R 组比较, Ad-shXBP1s+H/R 组线粒体钙离子水平下降,差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$, 图 5)。



注：与 Ad-shNC 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 Ad-shNC+H/R 组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 2 各组细胞凋亡水平

Figure 2 Apoptosis levels of cells in each group



注：与 Ad-shNC 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 Ad-shNC+H/R 组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 3 各组细胞线粒体活性氧水平

Figure 3 Mitochondrial reactive oxygen species levels of cells in each group

2.6 XBP1s 对 ITPR 家族蛋白调控的机制

ChIP-seq 结果显示，与 Input 组相比，IP 组 XBP1s 能够结合 ITPR1 的启动子和外显子、ITPR2 外显子和 ITPR3 外显子（图 6）。

2.7 下调 XBP1s 对 ITPR 家族蛋白表达的影响

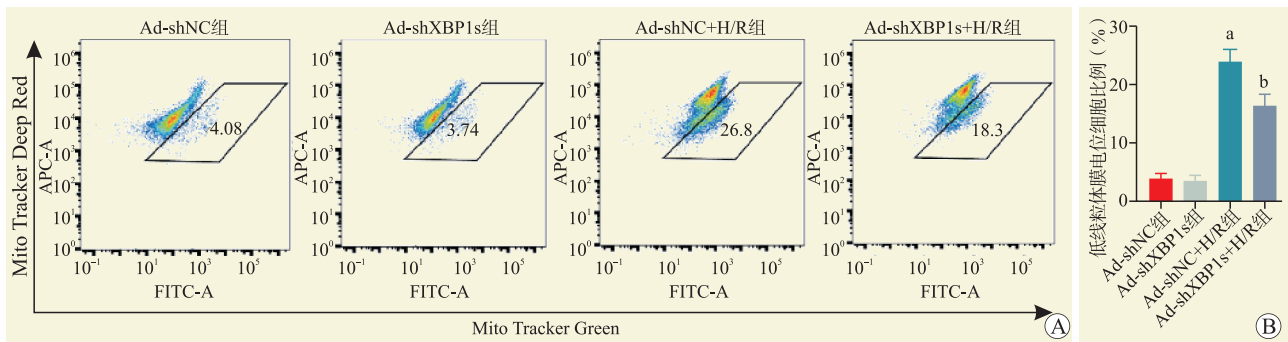
实时定量 PCR 结果显示，与 Ad-shNC 组比较，

Ad-shXBP1s 组 XBP1s、ITPR1、ITPR2 和 ITPR3 mRNA 相对表达量均降低，差异均有统计学意义（均为 $P < 0.05$ ，图 7A）。

蛋白质印迹法结果显示，与 Ad-shNC 组比较，Ad-shXBP1s 组 XBP1s、ITPR1、ITPR2 和 ITPR3 蛋白相对表达量均降低；与 Ad-shNC 组比较，Ad-shNC+H/R 组 XBP1s、ITPR1、ITPR2 和 ITPR3 蛋白相对表达量升高；与 Ad-shNC+H/R 组比较，Ad-shXBP1s+H/R 组 XBP1s、ITPR1、ITPR2 和 ITPR3 蛋白相对表达量降低，差异均有统计学意义（均为 $P < 0.05$ ，图 7B、C）。

3 讨论

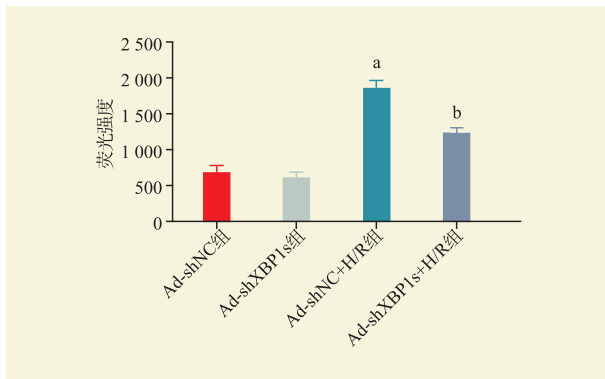
肾脏 IRI 可导致实质细胞内质网应激和线粒体失功，引起细胞凋亡或坏死^[16-17]，肾移植围手术期肾小管上皮细胞容易发生内外应激^[18]。内质网是维持蛋白质稳态的核心细胞器，内质网应激由三条通路（IRE1 α -XBP1s、ATF6、PERK/eIF2 α ）完成^[19]。其中，XBP1 作为调控细胞稳态主要的内质网应激相关



注：与 Ad-shNC 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 Ad-shNC+H/R 组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 4 各组细胞线粒体膜电位水平

Figure 4 Mitochondrial membrane potential levels of cells in each group



注：与 Ad-shNC 组比较，^a $P < 0.05$ ，与 Ad-shNC+H/R 组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 5 各组细胞线粒体钙离子水平

Figure 5 Mitochondrial calcium levels of cells in each group

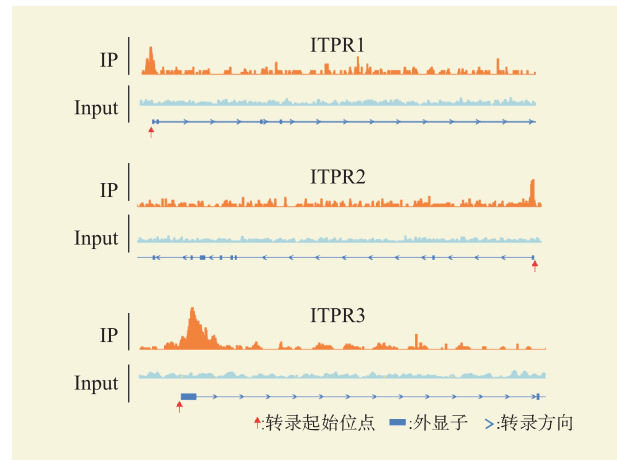
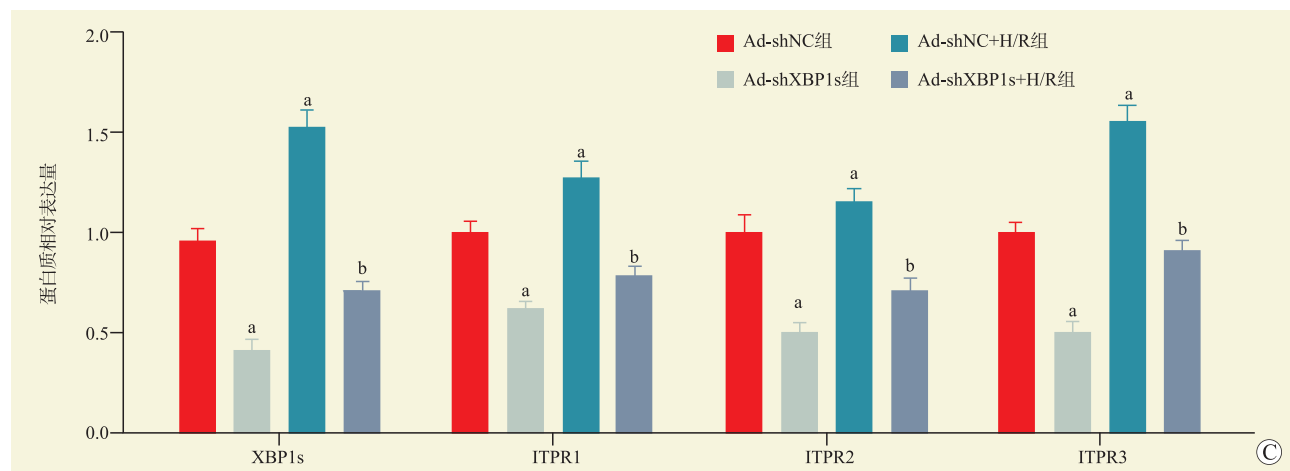
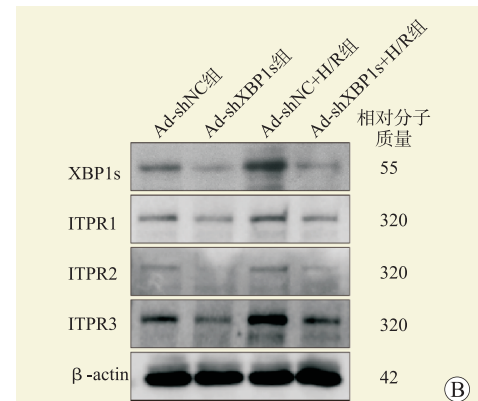
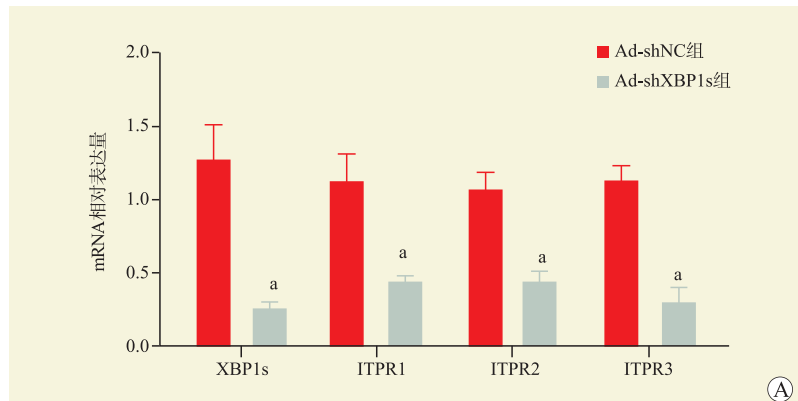


图 6 染色质免疫共沉淀测序峰图

Figure 6 Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing peak maps



注：A 图为各组 mRNA 表达水平；B、C 图为各组蛋白表达水平。与 Ad-shNC 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 Ad-shNC+H/R 组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 7 各组 XBP1s 和 ITPR 家族 mRNA 和蛋白表达水平

Figure 7 The mRNA and protein expression levels of XBP1s and ITPR family in each group

蛋白，被激活的 IRE1 α 剪接一个内含子重编码生成 XBP1s 后，通过蛋白质翻译、折叠、运输和降解来调控细胞功能^[20]。本课题组前期研究已证明下调

XBP1s 可以抑制内质网应激和线粒体损伤，保护肾小管上皮细胞，这和 MAM 功能密切相关^[15-16]，本研究中，H/R 可促进胞内 ITPR 家族表达增多，导致线粒

体活性氧升高, 钙离子超载和膜电位下降, 而下调 XBP1s 能够抑制 ITPR 蛋白产生, 改善线粒体损伤, 其可能机制是 XBP1s 调控 ITPR 蛋白表达, 调控内质网和线粒体之间的相互作用。

ITPR 是钙离子释放通道, 位于内质网膜上, 有 ITPR1、ITPR2 和 ITPR3 3 种亚型, 均参与 MAM 的形成^[21-24]。钙离子从内质网转移到线粒体是线粒体 ATP 产生和细胞存活所必需的, 然而, 过度摄取钙离子可能会引发线粒体功能障碍, 导致线粒体膜电位丧失, 引起 ATP 合成减少和线粒体活性氧产生增多^[25-26]。线粒体钙吸收主要通过 MAM 进行, Arruda 等^[27]发现 MAM 形成增加会导致线粒体钙离子超负荷; Chu 等^[28]发现 IRE1 α -XBP1 通路的激活可促进 ITPR1, GRP75 和 VDAC1 的表达和相互作用, 诱导 MAM 形成增加, 钙离子通过 MAM 从内质网转移到线粒体导致线粒体功能障碍, IRE1 α -XBP1 通路的抑制能够调节 MAM 的完整性和功能, 减轻 A β 25-35 处理的 SH-SY5Y 细胞中的线粒体功能障碍, 从而促进了神经保护。本研究结果证实了抑制 XBP1s 能够改善 H/R 所致的肾小管上皮细胞线粒体功能障碍, 这可能是通过直接调控 ITPR 家族表达从而影响 MAM 的功能。

需要强调的是, 顺式调控元件是转录因子调控基因所必需的, 鉴定转录因子的全基因组结合靶标是研究转录因子调控机制的重要手段^[29-30], 预期较为理想的结果是转录因子结合靶基因的启动子。然而, 在大量的文献中经常会发现基于 ChIP-seq 发现的转录因子结合位点不仅仅出现在启动子区, 还会出现在外显子、内含子或基因间区等^[31-33], 但是大多数研究主要关注转录因子对于启动子区的调控^[34-37], 鲜有人将非启动子区作为研究对象。其实, 转录因子可以通过结合启动子来调节基因表达, 那它结合其他位置的顺式作用元件也可能调节基因表达^[38-40]。近年, Wei 等^[41]证实转录因子 OsDREB1C 可以结合靶基因的启动子或者外显子直接激活基因表达; Du 等^[42]发现转录因子 UB2、OBF1 和 OBF4 能够与基因间区相互作用调控基因表达。本研究测序结果证实 XBP1s 可能结合在 ITPR1 的启动子和外显子、ITPR2 外显子和 ITPR3 外显子, 虽然目前尚未有文献报道 XBP1s 能够通过结合外显子调控靶基因的表达, 但仍有必要深入验证, 本研究提示不应忽视 XBP1s 对于非启动子区的调控机制, 否则容易遗漏潜在的机制。这也是本研究的不足之处, 仍需后续进一步论证。

综上所述, 本研究通过建立 TCMK-1 的 H/R 模型, 确定了下调 XBP1s 能够抑制 ITPR 蛋白家族表达, 改善线粒体损伤; XBP1s 作为内质网应激的关键蛋白, 可能通过直接调控 ITPR 表达而影响 MAM 的功能, 这些发现为减轻肾 IRI 提供了新的研究方向。

参考文献:

- [1] THUILLIER R. Molecular frontiers in transplantation-induced ischemia-reperfusion injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3450. DOI: 10.3390/ijms24043450.
- [2] KELLUM JA, ROMAGNANI P, ASHUNTANTANG G, et al. Acute kidney injury[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 52. DOI: 10.1038/s41572-021-00284-z.
- [3] ZHANG J, WEI X, TANG Z, et al. Elucidating the molecular pathways and immune system transcriptome during ischemia-reperfusion injury in renal transplantation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 81: 106246. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106246.
- [4] DERY KJ, KUPIEC-WEGLINSKI JW. New insights into ischemia-reperfusion injury signaling pathways in organ transplantation[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2022, 27(5): 424-433. DOI: 10.1097/MOT.0000000000001005.
- [5] NIEUWENHUIJS-MOEKE GJ, PISCHKE SE, BERGER SP, et al. Ischemia and reperfusion injury in kidney transplantation: relevant mechanisms in injury and repair[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(1): 253. DOI: 10.3390/jcm9010253.
- [6] 叶芑, 程帆. 线粒体在肾脏缺血再灌注损伤中的作用与机制[J]. *医学综述*, 2022, 28(4): 643-648. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2022.04.004.
YE P, CHENG F. Role and mechanism of mitochondria in renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Med Recap*, 2022, 28(4): 643-648. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2022.04.004.
- [7] CHEN Q, KOVILAKATH A, ALLEGOOD J, et al. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction during aging: role of sphingolipids[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2023, 1868(10): 159366. DOI: 10.1016/j.bbalip.2023.159366.
- [8] 于露, 李永华. 线粒体相关内质网膜的生物学功能及其在相关疾病中作用的研究进展[J/CD]. *中华诊断学电子杂志*, 2022, 10(4): 284-288. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-655X.2022.04.014.
YU L, LI YH. Research progress on biological function of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes and its role in related diseases[J/CD]. *Chin J Diagn (Electr Edit)*, 2022, 10(4): 284-288. DOI:

- 10.3877/cma.j.issn.2095-655X.2022.04.014.
- [9] GAO P, YANG W, SUN L. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) and their prospective roles in kidney disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020: 3120539. DOI: 10.1155/2020/3120539.
- [10] WOLL KA, VAN PETEGEM F. Calcium-release channels: structure and function of IP3 receptors and ryanodine receptors[J]. *Physiol Rev*, 2022, 102(1): 209-268. DOI: 10.1152/physrev.00033.2020.
- [11] YUAN L, LIU Q, WANG Z, et al. EI24 tethers endoplasmic reticulum and mitochondria to regulate autophagy flux[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(8): 1591-1606. DOI: 10.1007/s00018-019-03236-9.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] LIU H, WANG L, WENG X, et al. Inhibition of Brd4 alleviates renal ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis and endoplasmic reticulum stress by blocking FoxO4-mediated oxidative stress[J]. *Redox Biol*, 2019, 24: 101195. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101195.
- [18] SMITH SF, HOSGOOD SA, NICHOLSON ML. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation: 3 key signaling pathways in tubular epithelial cells[J]. *Kidney Int*, 2019, 95(1): 50-56. DOI: 10.1016/j.kint.2018.10.009.
- [19] KUMAR V, MAITY S. ER Stress-sensor proteins and ER-mitochondrial crosstalk-signaling beyond (ER) stress response[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 173. DOI: 10.3390/biom11020173.
- [20] HUANG R, HUI Z, WEI S, et al. IRE1 signaling regulates chondrocyte apoptosis and death fate in the osteoarthritis[J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(1): 118-127. DOI: 10.1002/jcp.30537.
- [21] DE RIDDER I, KERKHOFS M, LEMOS FO, et al. The ER-mitochondria interface, where Ca²⁺ and cell death meet[J]. *Cell Calcium*, 2023, 112: 102743. DOI: 10.1016/j.ceca.2023.102743.
- [22] HULSURKAR MM, LAHIRI SK, KARCH J, et al. Targeting calcium-mediated inter-organellar crosstalk in cardiac diseases[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2022, 26(4): 303-317. DOI: 10.1080/14728222.2022.2067479.
- [23] BASSO V, MARCHESAN E, ZIVIANI E. A trio has turned into a quartet: DJ-1 interacts with the IP3R-GRP75-VDAC complex to control ER-mitochondria interaction[J]. *Cell Calcium*, 2020, 87: 102186. DOI: 10.1016/j.ceca.2020.102186.
- [24] 徐玉婷, 宋育林. 抑制 IP3R-Ca²⁺途径对乙酰氨基酚所致肝损伤及其线粒体内质网结构偶联的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(7): 1077-1081. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.003.
- XU WT, SONG YL. The effects of inhibition of the IP3R-Ca²⁺ pathway in APAP-induced liver injury and mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(7): 1077-1081. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.003.
- [25] PENNA E, ESPINO J, DE STEFANI D, et al. The MCU complex in cell death[J]. *Cell Calcium*, 2018, 69: 73-80. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.08.008.
- [26] 史喜德, 郭珊珊. MICU1 及其与相关疾病的作用机制[J]. *临床与病理杂志*, 2022, 42(7): 1737-1744. DOI: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.07.033.
- SHI XD, GUO SS. Mechanism of MICU1 and its related diseases[J]. *J Clin Pathol Res*, 2022, 42(7): 1737-1744. DOI: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.07.033.
- [27] ARRUDA AP, PERS BM, PARLAKGÜL G, et al. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity[J]. *Nat Med*, 2014, 20(12): 1427-1435. DOI: 10.1038/nm.3735.
- [28] CHU B, LI M, CAO X, et al. IRE1 α -XBP1 affects the mitochondrial function of A β 25-35-treated SH-SY5Y cells by regulating mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes[J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15:

614556. DOI: 10.3389/fncel.2021.614556.
- [29] HAJHEIDARI M, HUANG SC. Elucidating the biology of transcription factor-DNA interaction for accurate identification of cis-regulatory elements[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2022, 68: 102232. DOI: 10.1016/j.pbi.2022.102232.
- [30] INUKAI S, KOCK KH, BULYK ML. Transcription factor-DNA binding: beyond binding site motifs[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2017, 43: 110-119. DOI: 10.1016/j.gde.2017.02.007.
- [31] WANG P, SU J, WANG J, et al. NRF1 promotes primordial germ cell development, proliferation and survival[J]. *Cell Prolif*, 2024, 57(1): e13533. DOI: 10.1111/cpr.13533.
- [32] WANG Z, COBAN B, WU H, et al. GRHL2-controlled gene expression networks in luminal breast cancer[J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 15. DOI: 10.1186/s12964-022-01029-5.
- [33] ZHANG X, ZHANG C, QIAO M, et al. Depletion of BATF in CAR-T cells enhances antitumor activity by inducing resistance against exhaustion and formation of central memory cells[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(11): 1407-1422. DOI: 10.1016/j.ccell.2022.09.013.
- [34] 颜凤, 邱佳韵, 庄丽丽, 等. 转录因子 STAT1 对癌症相关基因 Gas6 的调控研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2023, 43(11): 1487-1493. DOI: 10.7655/NYDXBNS20231102.
- YAN F, QIU JY, ZHUANG LL, et al. The regulation of the transcription factor STAT1 to cancer-related gene Gas6[J]. *J Nanjing Med Univ(Nat Sci)*, 2023, 43(11): 1487-1493. DOI: 10.7655/NYDXBNS20231102.
- [35] 许晓亮, 刘辉, 武燃, 等. 缺氧诱导因子诱导转录因子 COUP-TF II 转录激活[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(21): 5298-5303. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2022.21.043.
- XU XL, LIU H, WU R, et al. Hypoxia inducible factor induces transcriptional activation of transcription factor COUP-TF II[J]. *Chin J Gerontol*, 2022, 42(21): 5298-5303. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2022.21.043.
- [36] HUA C, HUANG J, WANG T, et al. Bacterial transcription factors bind to coding regions and regulate internal cryptic promoters[J]. *mBio*, 2022, 13(5): e0164322. DOI: 10.1128/mbio.01643-22.
- [37] CHEN H, PUGH BF. What do transcription factors interact with?[J]. *J Mol Biol*, 2021, 433(14): 166883. DOI: 10.1016/j.jmb.2021.166883.
- [38] ANDREWS G, FAN K, PRATT HE, et al. Mammalian evolution of human cis-regulatory elements and transcription factor binding sites[J]. *Science*, 2023, 380(6643): eabn7930. DOI: 10.1126/science.abn7930.
- [39] KRIEGER G, LUPO O, WITTKOPP P, et al. Evolution of transcription factor binding through sequence variations and turnover of binding sites[J]. *Genome Res*, 2022, 32(6): 1099-1111. DOI: 10.1101/gr.276715.122.
- [40] GEORGAKOPOULOS-SOARES I, DENG C, AGARWAL V, et al. Transcription factor binding site orientation and order are major drivers of gene regulatory activity[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2333. DOI: 10.1038/s41467-023-37960-5.
- [41] WEI S, LI X, LU Z, et al. A transcriptional regulator that boosts grain yields and shortens the growth duration of rice[J]. *Science*, 2022, 377(6604): eabi8455. DOI: 10.1126/science.abi8455.
- [42] DU Y, LIU L, PENG Y, et al. UNBRANCHED3 expression and inflorescence development is mediated by UNBRANCHED2 and the distal enhancer, KRN4, in maize[J]. *PLoS Genet*, 2020, 16(4): e1008764. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008764.

(收稿日期: 2023-10-07)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)