

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.16.001

• 基础研究 •

Chk2 在 Bmi1 缺失所致的肾脏早衰和纤维化中的作用和机制研究*

陆劲红 王 晶 杨翠翠 王 婵 孙伟伟[△] 苗登顺[△]

(南京医科大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学系 骨与干细胞研究中心 江苏 南京 211100)

摘要 目的:探究细胞周期检测点激酶 2 (cell-cycle checkpoint kinase 2, Chk2) 在 B 淋巴瘤 Mo-MLV 插入区 1 (B cell-specific MLV integration site-1, Bmi1) 缺失所致的肾脏早衰和纤维化中的作用及可能的机制。**方法:**取 5 周龄 WT、Bmi1^{-/-}、Chk2^{-/-}、Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-} 小鼠肾脏, 采用 HE 染色观察肾脏结构变化, 采用免疫荧光和 Masson 染色观察肾脏纤维化情况, 采用衰老相关 β 半乳糖苷酶 (Senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal) 染色观察肾脏衰老情况, 采用免疫组化染色和 western blot 观察肾脏超氧化物歧化酶 1 (Superoxide Dismutase 1, SOD1)、超氧化物歧化酶 2 (Superoxide Dismutase 2, SOD2) 表达水平和定位。从 5 周龄 WT、Bmi1^{-/-}、Chk2^{-/-}、Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-} 小鼠肾脏皮质中萃取和分离原代肾小管上皮细胞, 采用免疫荧光和 western blot 检测其 SOD1、SOD2 表达水平。**结果:**与 WT 小鼠肾脏组织相比, Bmi1^{-/-} 小鼠肾脏组织表现为体积变小、肾脏皮质厚度减少、肾小球数量减少, β -gal 活性增加, SOD1 和 SOD2 水平降低; 与 Bmi1^{-/-} 小鼠肾脏相比, Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-} 小鼠肾脏体积增大、肾脏皮质厚度增加, 肾小球数量增多, β -gal 活性降低, SOD1 和 SOD2 水平增加。与 WT 小鼠肾脏皮质原代肾小管上皮细胞相比, Bmi1^{-/-} 小鼠肾脏皮质原代肾小管上皮细胞中 SOD1 和 SOD2 水平; 与 Bmi1^{-/-} 小鼠肾脏皮质原代肾小管上皮细胞相比, Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-} 小鼠肾脏皮质原代肾小管上皮细胞中抗氧化指标 SOD1 和 SOD2 增加。**结论:**Chk2 通过抑制肾小管上皮细胞的抗氧化能力促进 Bmi1 缺失所致的肾脏早衰和纤维化。

关键词: Bmi1; Chk2; 肾脏早衰; 肾纤维化; 抗氧化**中图分类号:** Q38; Q591.2; R322.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2023)16-3001-07

Effect of Chk2 on Bmi1 Deficiency-induced Premature Renal Failure and Fibrosis*

LU Jin-hong, WANG Jing, YANG Cui-cui, WANG Chan, SUN Wei-wei[△], MIAO Deng-shun[△]

(Department of Anatomy, Histology and Embryology, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211100, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and possible mechanism of cell-cycle checkpoint kinase 2 (Chk2) on premature renal aging and fibrosis caused by B cell-specific MLV integration site-1 (Bmi1) deletion. **Methods:** 5-week-old WT, Bmi1^{-/-}, Chk2^{-/-}, Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-} mouse kidneys were taken, and the structural changes of the kidney were observed by HE staining, renal fibrosis was observed by immunofluorescence and Masson staining, renal aging by Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) staining, and the expression level and localization of renal Superoxide Dismutase 1 (SOD1) and Superoxide Dismutase 2 (SOD2) were observed by immunohistochemical staining and western blot. Primary tubular epithelial cells were extracted and isolated from the renal cortex of 5-week-old WT, Bmi1^{-/-}, Chk2^{-/-}, and Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-}, and the expression levels of SOD1 and SOD2 were tested by immunofluorescence and western blot. **Results:** Compared with WT mouse kidney tissue, Bmi1^{-/-} mouse kidney tissue showed smaller volume, decreased renal cortex thickness, decreased glomerular number, increased β -gal activity, and decreased levels of SOD1 and SOD2. Compared with Bmi1^{-/-} mouse kidneys, Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-} mice had an increase in kidney size, renal cortical thickness, glomerular number, decreased β -gal activity, and increased levels of SOD1 and SOD2. Compared with WT mouse renal cortical primary tubular epithelial cells, the levels of SOD1 and SOD2 in Bmi1^{-/-} mouse renal cortical primary tubular epithelial cells were reduced. Compared with Bmi1^{-/-} mouse renal cortical primary tubular epithelial cells, the levels of SOD1 and SOD2 were increased in Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-} mouse kidney cortical primary tubular epithelial cells. **Conclusions:** Chk2 improves premature renal aging and fibrosis due to Bmi1 deficiency by inhibiting antioxidant capacity of tubular epithelial cells.

Key words: Bmi1; Chk2; Kidney aging; Kidney fibrosis; Antioxidant**Chinese Library Classification(CLC):** Q38; Q591.2; R322.61 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2023)16-3001-07

* 基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81730066); 江苏省研究生创新计划项目(KYCX20_1381)

作者简介: 陆劲红(1996-), 女, 硕士, 主要研究方向: Bmi1 缺失引起的肾脏早衰和纤维化, E-mail: 2693408289@qq.com

[△] 通讯作者: 苗登顺, 男, 博士生导师, 教授, 主要研究方向: 衰老相关疾病, E-mail: dsmaio@njmu.edu.cn;

孙伟伟, 女, 副教授, 主要研究方向: 骨肉瘤, E-mail: 34491072@qq.com

(收稿日期: 2023-03-02 接受日期: 2023-03-25)

前言

慢性肾脏病(Chronic Kidney Diseases, CKD)表现出早衰综合征的特点,包括衰老的典型特征,如炎症、氧化应激增加等^[1,2]。在临床肾损伤晚期患者、甚至 GFR 正常的蛋白尿患者中观察到肾脏衰老加剧进展,提示细胞衰老是 CKD 的早期事件。多种类型的 CKD 细胞中,肾小管上皮细胞可观察到明显的早衰表型^[3]。

Bmi1 是转录抑制因子 Polycomb 家族的成员,参与调控细胞周期和干细胞自我更新等^[4]。Bmi1 抑制 p16/Rb 和 p53/p21 通路,调节线粒体功能和氧化还原平衡^[5]。与应激诱导早衰模型中典型组织学和功能特征相一致,Bmi1 缺失小鼠表现为活性氧(ROS)的持续积累进而导致氧化应激、DNA 损伤以诱导细胞衰老^[6]。

Chk2 是 DNA 损伤反应的关键组成部分。在 DNA 损伤的情况下,Chk2 作为信号转导激酶被激活并磷酸化多种下游靶蛋白诱导细胞反应,如细胞周期停滞、细胞衰老、衰老相关分泌表型(senescence associated secretory phenotype, SASP)、细胞凋亡、DNA 修复等^[7]。既往研究表明 Bmi1 缺失会导致肾脏中 DNA 损伤增加、Chk2 过度激活、肾脏早衰和纤维化^[8]。因此,为了明确 Chk2 在 Bmi1 缺失小鼠的肾脏早衰和纤维化中的潜在作用,我们构建了 WT、Bmi1^{-/-}、Chk2^{-/-}、Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-} 小鼠,以明确 Chk2 在 Bmi1 缺失所致小鼠的肾脏早衰和纤维化及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司,货号:11320033);胎牛血清(美国 Gibco 公司,货号:16140089);青霉素和链霉素(美国 Gibco 公司,货号:10378016);胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,货号:25200072);collagenase D(德国 Roche 公司,货号:11088858001);Masson 染色试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:D026-1-3);细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:C0602);戊巴比妥钠(上海国药集团化学试剂有限公司,货号:1054026); α -SMA 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:67735-1-Ig);SOD1 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号:65778);SOD2 抗体(美国 Novus Biologicals 公司,货号:NB100-1992); β -actin 抗体(美国 Sigma Aldrich 公司,货号:A2228);Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody(美国 Thermo Fisher 公司,货号:A11001);Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody(美国 Bioworld 公司,货号:BS10029);DAPI(美国 Sigma Aldrich 公司,货号:D9542)。

1.1.2 仪器 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);高压蒸汽灭菌锅(日本 SEISAKUSYO 公司);荧光、光学显微镜(德国 Leica 公司);石蜡包埋机(德国 Leica 公司);石蜡切片机(德国 Leica 公司);组织匀浆仪(上海净信实业发展有限公司);化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物 本研究中 Bmi1^{-/-} 小鼠由荷兰肿瘤研究所 Anton Berns 教授提供,Chk2^{-/-} 小鼠由日本国立研究所老年医学研究系 Noboru Motoyama 教授提供。将基因型分别为 Chk2^{-/-}

和 Bmi1^{-/-} 的 5 周龄小鼠配笼,得到基因型为 Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-} 的子代小鼠。将基因型为 Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-} 的雌雄小鼠配笼,得到同窝基因型分别为 WT、Bmi1^{-/-}、Chk2^{-/-} 和 Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-} 的小鼠,饲养至 5 周龄取材,雌雄不限。本研究中小鼠的饲养、管理及实验均严格遵守南京医科大学实验动物管理规范并经南京医科大学动物实验伦理委员会审核(许可号:IACUC-1802007)。

1.2.2 标本采集 将 5 周龄小鼠用 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉后,取左侧肾脏冻存于 -80 °C,用于提取组织蛋白;将右侧肾脏用 4%多聚甲醛固定后进行脱水、石蜡包埋,制作肾脏石蜡切片。

1.2.3 原代肾小管上皮细胞分离和培养 将 5 周龄小鼠用 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)麻醉后,用 75%酒精浸泡 10 min,转移至超净台中,用高压灭菌的剪刀剪开腹腔取出肾脏,剥去肾脏包膜,剪取肾脏皮质部分,加入 3 mg/mL 胶原酶 D,剪碎组织块至 1 cm³,37 °C 消化 20 min,40 μ m 细胞筛网过滤以去除肾小球,PBS 清洗 3 次,用 DMEM/F12 培养基(含 10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素)培养至 48 h 换液,此后每 2 天换液 1 次。

1.2.4 HE 染色 将肾脏石蜡切片常规脱蜡水化后,用苏木素染 1 min,1%盐酸酒精提拉 3 次,流水冲洗,伊红染色 10 s,脱水透明,树脂凝胶封片。

1.2.5 Masson 染色 使用 Masson 染色试剂盒,按照制造商说明书(南京建成生物工程研究所,中国,南京)进行操作。

1.2.6 免疫荧光 将肾脏石蜡切片常规脱蜡水化后,用柠檬酸盐缓冲液煮沸热修复 20 min(细胞用 4%多聚甲醛室温固定 20 min),0.3% Triton 通透 15 min,10%羊血清室温封闭 1 h,滴加适量一抗 α -SMA(1:800)、SOD1(1:500)、SOD2(1:500),4 °C 孵育过夜,第二天洗掉残余一抗,孵育荧光二抗,DAPI 复染 10 min,50%甘油封片,荧光显微镜下观察及拍摄。

1.2.7 免疫组化 将肾脏石蜡切片常规脱蜡水化后,用柠檬酸盐缓冲液煮沸热修复 20 min,3% H₂O₂ 孵育 20 min 以阻断内源性的过氧化物酶,10%羊血清室温下封闭 1 h,滴加适量一抗 SOD1(1:500)、SOD2(1:500),4 °C 孵育过夜,第二天洗掉残余一抗,按照制造商说明书(基因科技股份有限公司,中国)进行后续的二抗孵育、免疫显色,苏木素复染 1 min,1%盐酸酒精提拉 3 次,流水冲洗,脱水透明,树脂凝胶封片。

1.2.8 Western blot 将肾脏组织按照 1:20 的质量/体积比加入 RIPA,剪碎组织块,每管加 2 粒钢珠,匀浆 60 s $\times$ 3 次,摇床摇同时置于冰上裂解 30 min,4 °C 13000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,并按比例加入 5 $\times$ loading buffer,金属浴 100 °C 煮 10 min 使蛋白质变性。用 10% SDS-PAGE 胶,每孔上样量为 10 μ L,120 V 恒压电泳 2 h,280 mA 恒流转膜 1.5 h,将蛋白湿转至硝酸纤维素膜上,用 5%脱脂奶粉(PBST 溶解)室温封闭 2 h,使用 SOD1(1:500)、SOD2(1:500)、 β -actin(1:16000)的一抗,4 °C 孵育过夜,PBST 洗掉残余一抗,加入相应二抗,置于摇床孵育 1 h,PBST 洗掉残余二抗,均匀地滴加 ECL 发光显色液,使用自动成像仪曝光,获得显影图像并保存。

1.2.9 SA- β -gal 染色 将新鲜取材的组织用 4%多聚甲醛室温固定 20 min,PBS 清洗,然后浸泡在新鲜配制的 β -半乳糖苷酶染色液中,放入 37 °C 烘箱孵育 4 h,PBS 清洗,继续放在 4%

多聚甲醛中室温固定至 24 h, 接下来进行梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、石蜡切片, 37 °C 烘干过夜, 将石蜡切片进行常规脱蜡水化, 滴加核固红染色液染色 2 min, 快速脱水, 二甲苯透明, 50 % 甘油封片。

1.3 统计学分析

利用 Graph Pad Prism 8.0 软件进行数据分析和作图。各组测得的数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 通过 t 检验或单因素方差分析进行数据比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肾脏结构的变化

通过 HE 染色观察各组小鼠肾脏结构变化, 结果显示: 与 WT 小鼠肾脏相比, $Bmi1^{-/-}$ 小鼠肾脏体积变小、皮质厚度减少 ($P < 0.001$)、肾小球数量减少 ($P < 0.05$); 与 $Bmi1^{-/-}$ 小鼠肾脏相比, $Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-}$ 小鼠肾脏体积增大、皮质厚度增加 ($P < 0.001$)、肾小球数量增加 ($P < 0.01$)。见图 1。这些结果表明 Chk2 敲除能够改善 $Bmi1$ 缺失所致的肾脏结构变化。

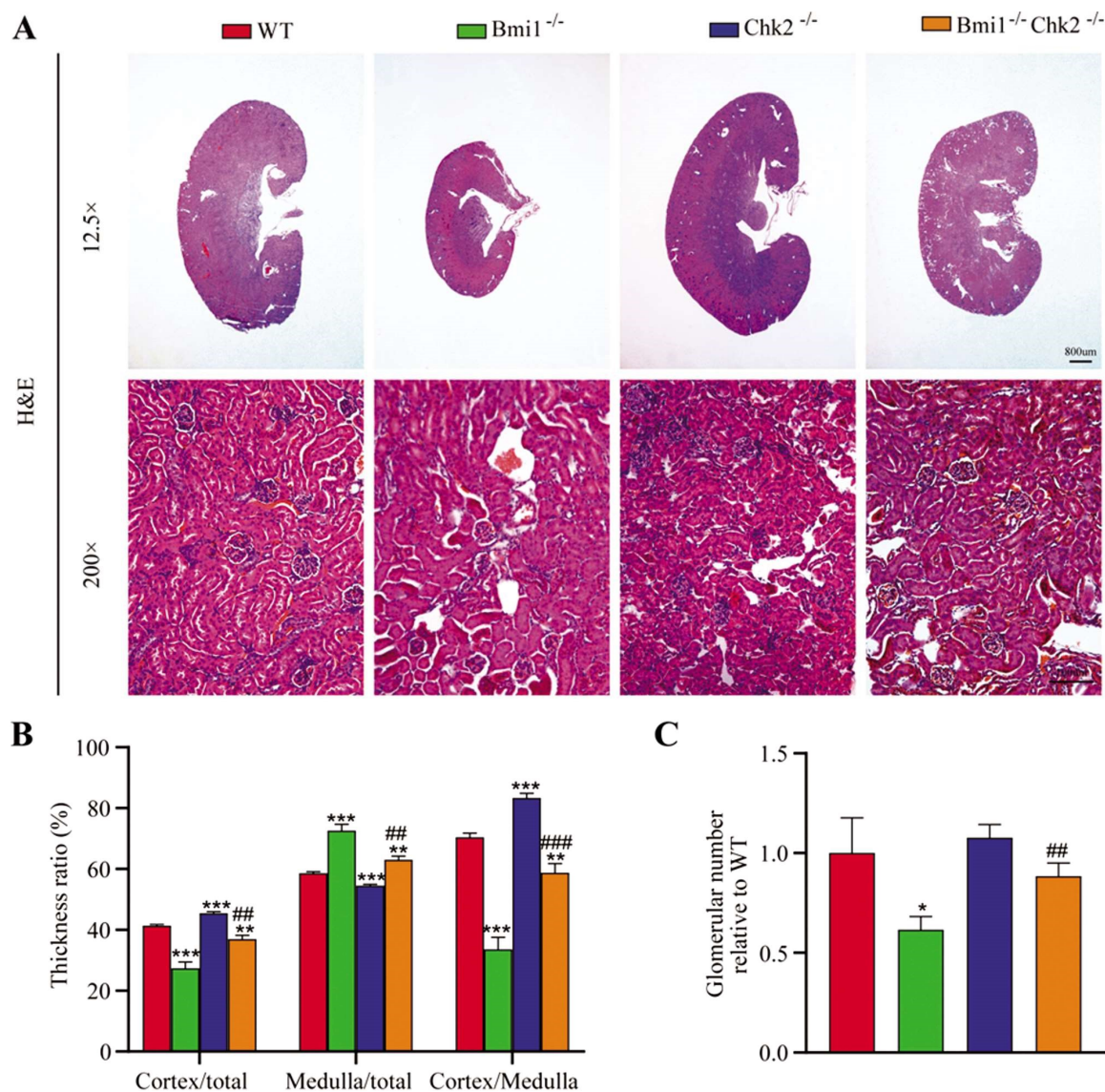


图 1 各组小鼠肾脏结构的变化

Fig.1 Changes in kidney structure in each group of mice

Note: Compared with WT group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; compared with $Bmi1^{-/-}$ group, # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

2.2 各组小鼠肾脏纤维化水平的变化

通过 Masson 染色和免疫荧光观察肾脏纤维化水平, 结果显示: 与 WT 小鼠肾脏相比, $Bmi1^{-/-}$ 小鼠肾脏皮质和髓质中胶原纤维显著增加 ($P < 0.001$)、间质成纤维细胞标志物 α -SMA 阳性面积显著增多 ($P < 0.001$); 与 $Bmi1^{-/-}$ 小鼠肾脏相比, $Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-}$ 小鼠肾脏皮质和髓质中胶原纤维则显著减少 ($P < 0.001$)、间质成纤维细胞标志物 α -SMA 阳性面积也减少 ($P < 0.001$), 见图 2。这些结果表明 Chk2 敲除能够改善 $Bmi1$ 缺

失所致的肾脏纤维化。

2.3 肾脏皮质和髓质中衰老指标 β -gal 活性变化

通过 SA- β -gal 染色观察肾脏衰老情况, 结果显示: 与 WT 小鼠肾脏相比, $Bmi1^{-/-}$ 小鼠肾脏皮质中 β -gal 活性显著升高 ($P < 0.001$), 而髓质无明显变化; 与 $Bmi1^{-/-}$ 小鼠肾脏相比, $Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-}$ 小鼠肾脏皮质中 β -gal 活性显著降低 ($P < 0.001$), 髓质同样无明显变化, 见图 3。这些结果表明 Chk2 敲除能够改善 $Bmi1$ 缺失所致的肾脏早衰。

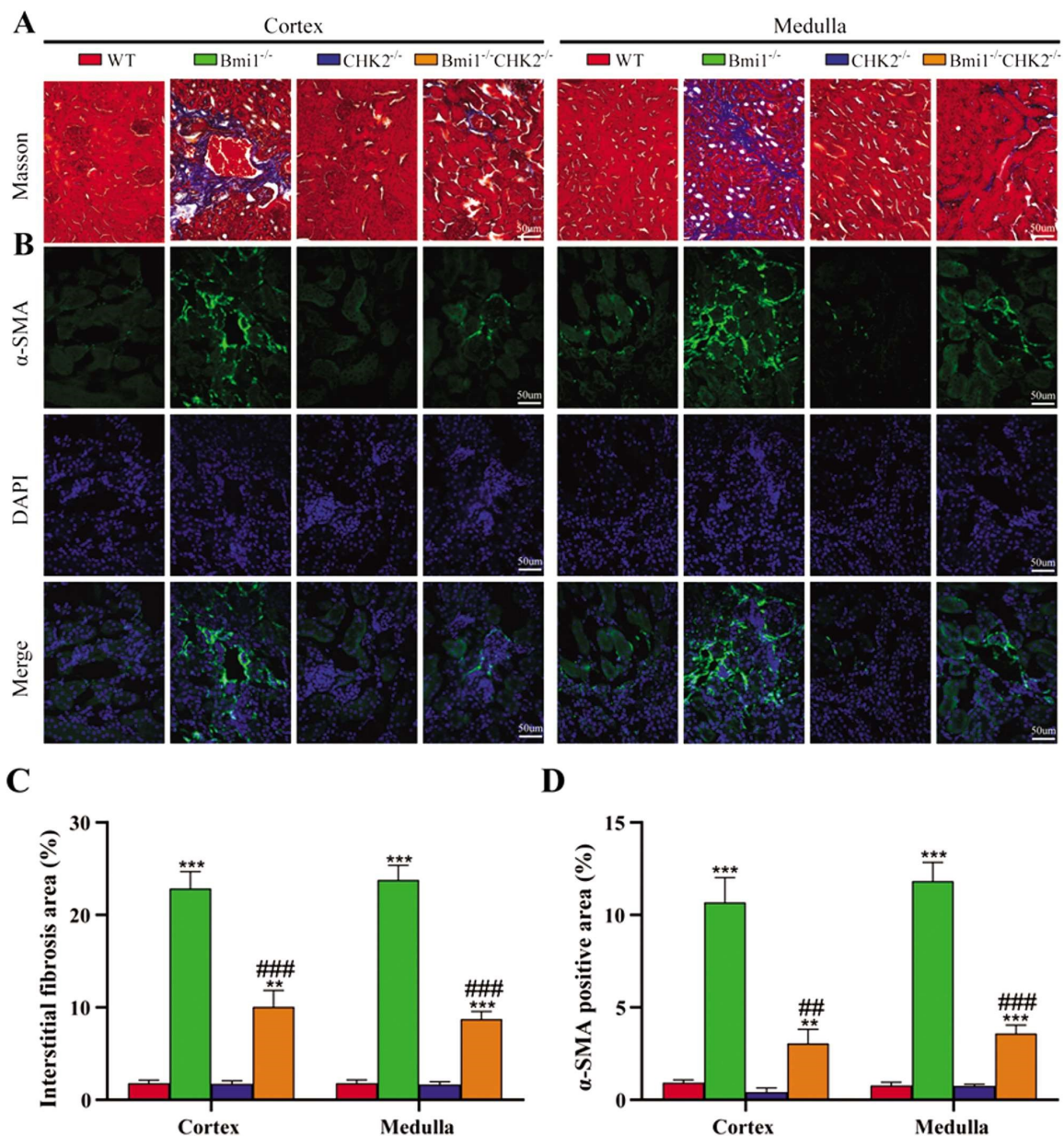


图2 各组小鼠肾脏纤维化水平的变化

Fig.2 Changes in renal fibrosis levels in mice in each group

Note: Compared with WT group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; compared with Bmi1^{-/-} group, # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

2.4 肾脏皮质中抗氧化酶指标(SOD1、SOD2)含量测定

为了进一步观察肾脏皮质中抗氧化能力的变化,通过免疫组化染色和 western blot 实验检测抗氧化酶指标 SOD1、SOD2 的水平,发现 SOD1、SOD2 主要定位于肾脏皮质肾小管;与 WT 小鼠肾脏相比,Bmi1^{-/-} 小鼠肾脏皮质中 SOD1、SOD2 的蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$);与 Bmi1^{-/-} 小鼠肾脏相比,Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-} 小鼠肾脏皮质中 SOD1、SOD2 的蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.001$),见图 4。这些结果表明 Chk2 敲除能够通过提高抗氧化能力改善 Bmi1 缺失所致的肾脏早衰和纤维化。

2.5 肾脏皮质原代肾小管上皮细胞中 SOD1、SOD2 的表达

为了进一步观察肾脏皮质肾小管上皮细胞抗氧化能力的变化,通过提取和分离小鼠肾脏皮质原代肾小管上皮细胞,对其进行免疫细胞荧光染色和 western blot 实验,发现 Bmi1^{-/-} 肾小管上皮细胞 SOD1、SOD2 水平较 WT 相比显著降低 ($P < 0.001$),而 Bmi1^{-/-}Chk2^{-/-} 肾小管上皮细胞 SOD1、SOD2 水平较

Bmi1^{-/-} 相比则显著增加 ($P < 0.001$),见图 5。这些结果进一步提示 Chk2 敲除可能通过提高肾脏皮质肾小管上皮细胞的抗氧化能力改善 Bmi1 缺失所致的肾脏早衰和纤维化。

3 讨论

肾纤维化是所有 CKD 的常见病理改变,表现为活化肌成纤维细胞的积累、细胞外基质的过度沉积、肾小管上皮再生失败、微血管稀疏和无菌性炎症^[8]。目前,CKD 患病率正在升高,尤其是 65 岁以上的老年人在发生急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 和随后进行性 CKD 的风险显著升高^[8]。CKD 进展期间的间质纤维化水平随着年龄的增长明显加重。随着 CKD 的进展,肾功能进行性丧失,而肾小管间质纤维化的程度是反映肾脏生存的最佳预测指标^[9]。但目前对于 CKD 及肾纤维化仍然没有安全且有效的治疗方法^[9,11-13]。

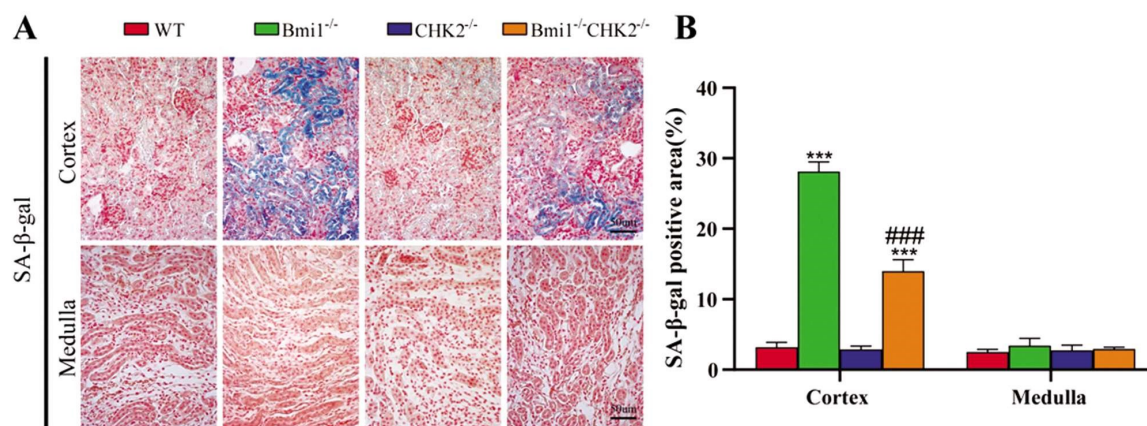


图3 肾脏皮质和髓质中衰老指标 β-gal 活性变化

Fig. 3 Changes in the activity of β-gal activity of markers of aging in the renal cortex and medulla

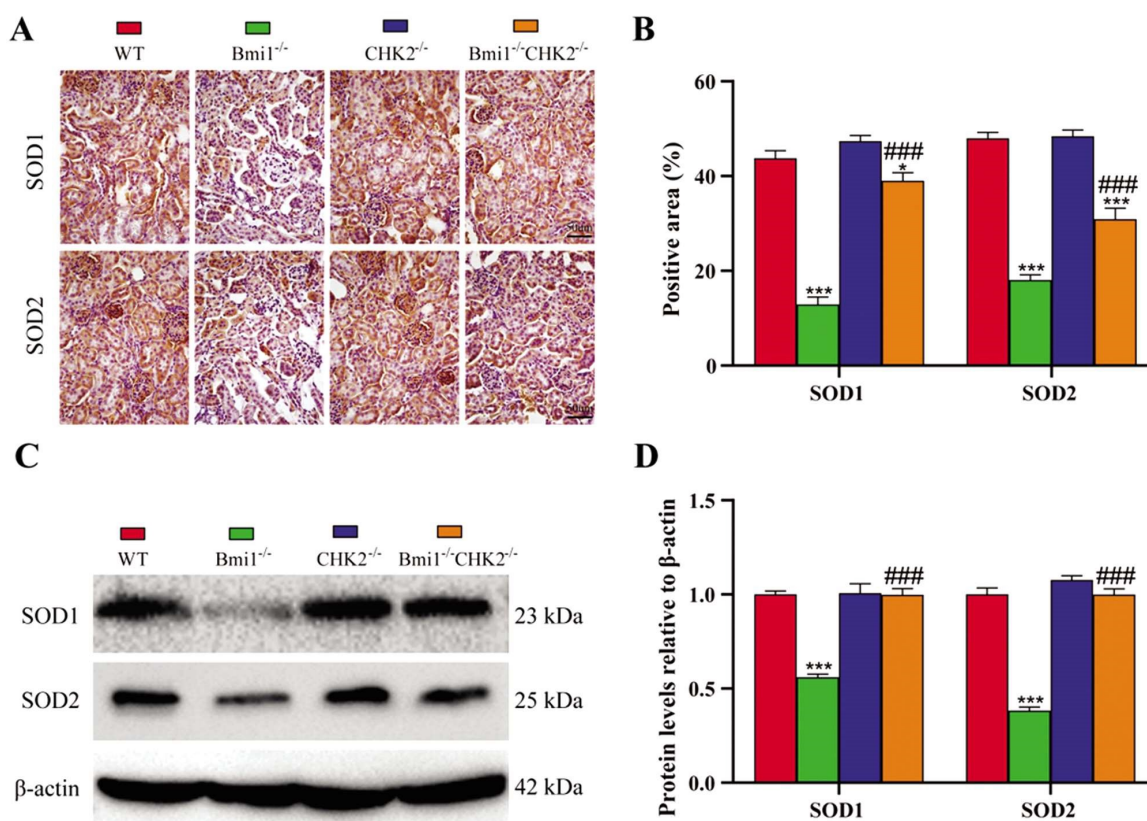
Note: Compared with WT group, *** $P < 0.001$; compared with Bmi1^{-/-} group, ### $P < 0.001$.

图4 肾脏皮质中抗氧化酶指标(SOD1、SOD2)含量测定

Fig.4 Determination of antioxidant enzyme indexes (SOD1, SOD2) in renal cortex

Note: Compared with WT group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; compared with Bmi1^{-/-} group, ### $P < 0.001$.

细胞衰老是肾纤维化进展的关键原因^[14-16]。目前已在几种CKD模型中发现了衰老细胞且主要位于肾小管上皮细胞^[17,18]。肾小管上皮细胞是肾实质的主要成分,通常位于损伤的中心,肾小管上皮细胞在各种损伤下由于适应不良修复容易早衰从而导致肾纤维化^[19-21]。细胞衰老的特征是永久性细胞周期停滞、细胞质中衰老相关 β-gal 活性增强、衰老相关蛋白 p16INK4a 和 p21 相关的信号通路激活^[22]。细胞衰老可由许多细胞应激触发,包括线粒体功能障碍、炎症、DNA 损伤、氧化应激和异常表观遗传修饰等,每一种都是 CKD 的共同特征^[17]。衰老的肾小管上皮细胞可以分泌复杂的促纤维化因子混合物,称为衰老相关

分泌表型(SASP),以促进纤维化^[23,24]。此外,它在细胞周期停滞期间还经历部分(epithelial mesenchymal transition, EMT)--这些细胞能够同时表达上皮和间充质细胞的标志物,并与其基底膜保持联系。这种部分 EMT 足以导致肾小管功能损伤,触发细胞周期停滞并促进关键纤维化细胞因子的释放,进而导致间质性肌成纤维细胞积累和肾实质功能受损^[25-27]。

线粒体作为活性氧的主要来源,其与细胞衰老密切相关。线粒体损伤是各种肾脏疾病发病机制的关键机制之一^[28],其通过产生过量活性氧和干扰能量代谢加剧肾小管上皮细胞衰老^[8]。衰老的肾小管上皮细胞内线粒体氧化磷酸化增加,过氧化

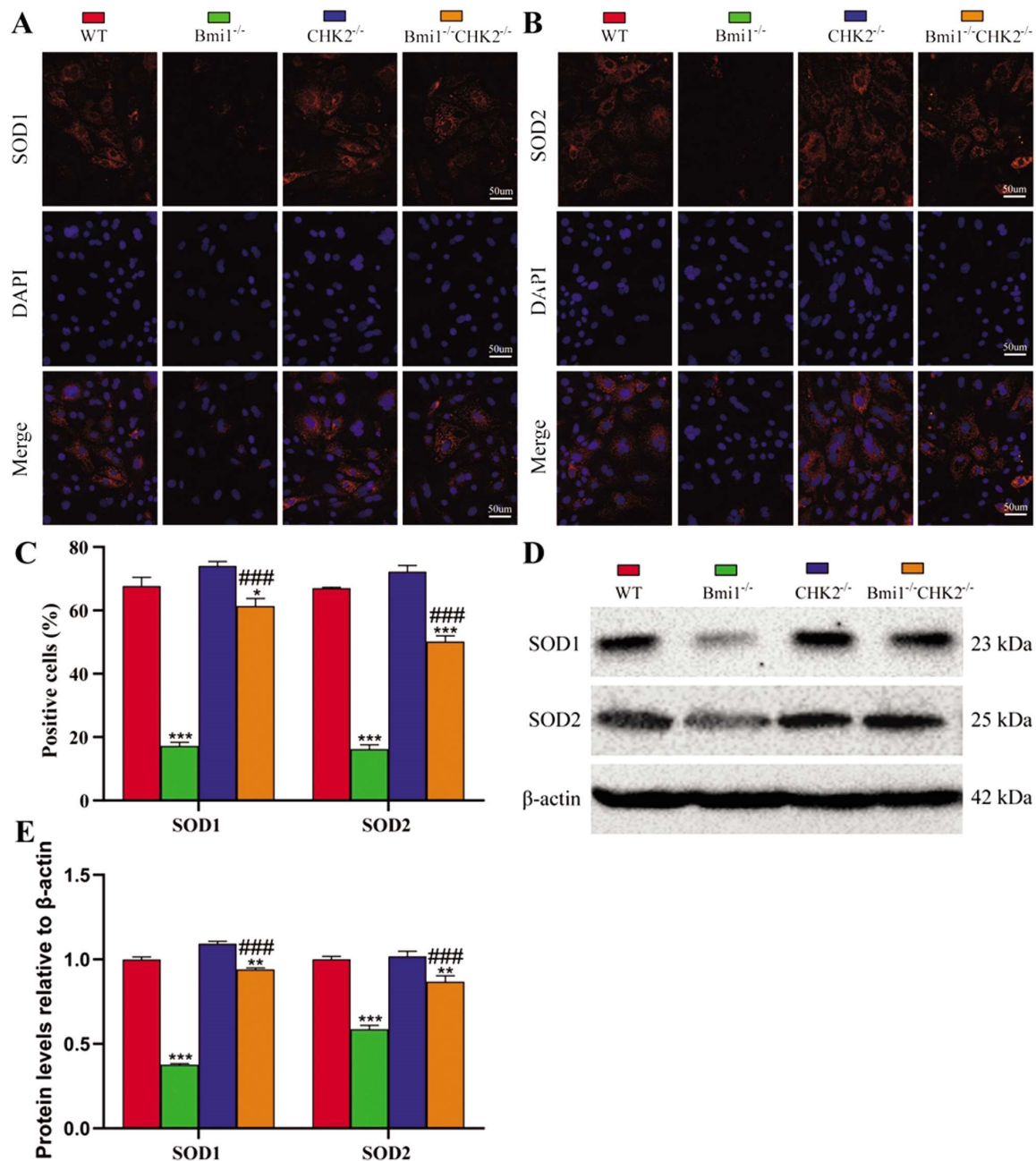


图 5 肾脏皮质原代肾小管上皮细胞中 SOD1、SOD2 表达测定

Fig.5 Determination of SOD1, SOD2 expression in the primary tubular epithelial cells of the renal cortex

Note: Compared with WT group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; compared with Bmi1^{-/-} group, #### $P < 0.001$.

氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽还原酶水平降低,导致衰老肾脏的抗氧化能力进一步降低^[29]。因此,及时清除活性氧、增强细胞的抗氧化能力被认为预防肾脏纤维化和 CKD 的有希望的策略^[30-32]。

Polycomb 蛋白家族成员 Bmi1 通过表观遗传机制抑制 p16/Rb 和 p53/p21 信号通路,并在调节线粒体功能和氧化还原平衡中发挥重要的作用^[5,33]。既往研究表明 Bmi1 缺失小鼠表现为线粒体功能障碍、ROS 水平显著增多、DNA 损伤反应激活,并出现骨质疏松、肺纤维化、肾纤维化、皮肤老化、雄性不育和雌性不孕等多种早衰表型^[5,6,33-36]。而 Bmi1 过表达则可抑制氧化应激和 DNA 损伤,减少衰老和 SASP^[4]。因此,我们将 Bmi1 缺失小鼠作为衰老及氧化应激模型,以研究 Bmi1 缺失引起的肾脏衰老和纤维化的机制。

在 Bmi1 缺失的小鼠肾脏中,细胞氧化应激增加,DNA 损伤反应激活,Chk2 及其活化状态的 p-Chk2(Thr68)显著增加,肾脏早衰和纤维化表型明显^[5]。细胞周期检查点激酶 Chk2 是参与 DNA 损伤反应途径的关键蛋白质,在苏氨酸 68 位点被 ATM 磷酸化,诱导其二聚化和活化,从而进一步调节下游蛋白,参与 DNA 损伤反应,包括 DNA 修复,细胞周期调节,细胞凋亡和 p53 信号通路^[7]。通过组织学染色观察,我们发现 Bmi1 缺失会导致肾脏体积变小、皮质变薄、肾小球数量减少、间质胶原纤维积累增多、间质成纤维细胞数量增多,肾纤维化表型明显,肾皮质肾小管中 β 半乳糖苷酶活性增加,SOD1、SOD2 蛋白表达水平降低。这些结果表明 Bmi1 缺失导致肾小管早衰和抗氧化能力减弱,而 Chk2 敲除能够提高 Bmi1 缺失小鼠皮质肾小管中 SOD1、SOD2 表达水平,改善肾脏早衰和纤维化表

型。进一步提取和分离原代肾小管上皮细胞,通过免疫荧光及 western blot 发现 Chk2 敲除能够显著纠正 Bmi1 缺失小鼠肾皮质中肾小管上皮细胞的抗氧化指标 SOD1、SOD2 的表达水平。这些结果表明 Chk2 敲除通过增强肾小管上皮细胞的抗氧化能力,改善 Bmi1 缺失引起的肾脏早衰和纤维化。

总之,本结果初步证实通过抑制 Chk2 改善细胞抗氧化能力可以缓解肾衰老和纤维化,这为 CKD 和肾纤维化的治疗提供了新的方法和实验依据。但本研究对于 Chk2 调控细胞抗氧化能力的具体分子机制尚未做深入探讨,后续我们将通过对肾脏皮质原代肾小管上皮细胞进行转录组测序以找到相应的靶标进行更深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Chou YH, Chen YM. Aging and Renal Disease: Old Questions for New Challenges[J]. Aging Dis, 2021, 12(2): 515-528
- [2] Ebert T, Neytchev O, Witas A, et al. Inflammation and Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease and Dialysis Patients [J]. Antioxid Redox Signal, 2021, 35(17): 1426-1448
- [3] Rayego-Mateos S, Marquez-Expósito L, Rodrigues-Diez R, et al. Molecular Mechanisms of Kidney Injury and Repair[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1542
- [4] Chen G, Zhang Y, Yu S, et al. Bmi1 Overexpression in Mesenchymal Stem Cells Exerts Antiaging and Antiosteoporosis Effects by Inactivating p16/p19 Signaling and Inhibiting Oxidative Stress [J]. Stem Cells, 2019, 37(9): 1200-1211
- [5] Jin J, Tao J, Gu X, et al. P16 (INK4a) Deletion Ameliorated Renal Tubulointerstitial Injury in a Stress-induced Premature Senescence Model of Bmi-1 Deficiency[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 7502
- [6] Li J, Liu M, Liang S, et al. Repression of the Antioxidant Pyrroloquinoline Quinone in Skin Aging Induced by Bmi-1 Deficiency[J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 1732438
- [7] Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond [J]. J Mol Cell Biol, 2014, 6(6): 442-457
- [8] Korolchuk VI, Miwa S, Carroll B, et al. Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? [J]. EBioMedicine, 2017, 21: 7-13
- [9] Deelman L, Sharma K. Mechanisms of kidney fibrosis and the role of antifibrotic therapies [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009, 18(1): 85-90
- [10] Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2020, 395(10225): 709-733
- [11] Liu M, Liu L, Bai M, et al. Hypoxia-induced activation of Twist/miR-214/E-cadherin axis promotes renal tubular epithelial cell mesenchymal transition and renal fibrosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(3): 2324-2330
- [12] Perretta-Tejedor N, Muñoz-Félix JM, Düwel A, et al. Cardiotrophin-1 opposes renal fibrosis in mice: Potential prevention of chronic kidney disease [J]. Acta Physiol (Oxf), 2019, 226(2): e13247
- [13] Zhang X, Chen Q, Zhang L, et al. Tubule-specific protein nanocages potentiate targeted renal fibrosis therapy [J]. J Nanobiotechnology, 2021, 19(1): 156
- [14] Schmitt R, Melk A. New insights on molecular mechanisms of renal aging[J]. Am J Transplant, 2012, 12(11): 2892-2900
- [15] Djudjaj S, Boor P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis[J]. Mol Aspects Med, 2019, 65: 16-36
- [16] Mylonas KJ, O'Sullivan ED, Humphries D, et al. Cellular senescence inhibits renal regeneration after injury in mice, with senolytic treatment promoting repair [J]. Sci Transl Med, 2021, 13 (594): eabb0203
- [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
- [18] Docherty MH, O'Sullivan ED, Bonventre JV, et al. Cellular Senescence in the Kidney [J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30 (5): 726-736
- [19] Liu BC, Tang TT, Lv LL, et al. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease[J]. Kidney Int, 2018, 93(3): 568-579
- [20] Chen K, Dai H, Yuan J, et al. Optineurin-mediated mitophagy protects renal tubular epithelial cells against accelerated senescence in diabetic nephropathy[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 105
- [21] Ferenbach DA, Bonventre JV. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD [J]. Nat Rev Nephrol, 2015, 11(5): 264-276
- [22] Liu T, Yang Q, Zhang X, et al. Quercetin alleviates kidney fibrosis by reducing renal tubular epithelial cell senescence through the SIRT1/PINK1/mitophagy axis[J]. Life Sci, 2020, 257: 118116
- [23] Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward[J]. Cell, 2019, 179(4): 813-827
- [24] Lu W, Ren S, Dong W, et al. Albumin-induced premature senescence in human renal proximal tubular cells and its relationship with intercellular fibrosis[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2022, 54(7): 893-903
- [25] Grande MT, Sánchez-Laorden B, López-Blau C, et al. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease [J]. Nat Med, 2015, 21(9): 989-997
- [26] Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis[J]. Nat Med, 2015, 21(9): 998-1009
- [27] Hu L, Ding M, He W. Emerging Therapeutic Strategies for Attenuating Tubular EMT and Kidney Fibrosis by Targeting Wnt/ β -Catenin Signaling[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 830340
- [28] Doke T, Susztak K. The multifaceted role of kidney tubule mitochondrial dysfunction in kidney disease development [J]. Trends Cell Biol, 2022, 32(10): 841-853
- [29] Yan J, Jiang J, He L, et al. Mitochondrial superoxide/hydrogen peroxide: An emerging therapeutic target for metabolic diseases[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 152: 33-42
- [30] Jin L, Yu B, Armando I, et al. Mitochondrial DNA-Mediated Inflammation in Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 9985603
- [31] Zhao M, Wang Y, Li L, et al. Mitochondrial ROS promote mitochondrial dysfunction and inflammation in ischemic acute kidney injury by disrupting TFAM-mediated mtDNA maintenance [J]. Theranostics, 2021, 11(4): 1845-1863

- Presentation, Treatment, and Outcomes [J]. Clin Perinatol, 2022, 49(4): 955-964
- [17] Rumph J T, Stephens V R, Ameli S, et al. A Paternal Fish Oil Diet Preconception Modulates the Gut Microbiome and Attenuates Necrotizing Enterocolitis in Neonatal Mice [J]. Mar Drugs, 2022, 20(6)
- [18] Samara J, Moossavi S, Alshaikh B, et al. Supplementation with a probiotic mixture accelerates gut microbiome maturation and reduces intestinal inflammation in extremely preterm infants [J]. Cell Host Microbe, 2022, 30(5): 696-711 e5
- [19] Lewis A N, De La Cruz D, Wynn J L, et al. Evaluation of the Neonatal Sequential Organ Failure Assessment and Mortality Risk in Preterm Infants with Necrotizing Enterocolitis[J]. Neonatology, 2022, 119(3): 334-344
- [20] Li W, Tang J, Zhu Z, et al. Initial surgical treatment of necrotizing enterocolitis: a meta-analysis of peritoneal drainage versus laparotomy[J]. Eur J Pediatr, 2022, 181(7): 2593-2601
- [21] Lueschow S R, Boly T J, Frese S A, et al. Bifidobacterium longum Subspecies infantis Strain EVC001 Decreases Neonatal Murine Necrotizing Enterocolitis[J]. Nutrients, 2022, 14(3): 495
- [22] Martin C R. Definitions of necrotizing enterocolitis: What are we defining and is machine learning the answer? [J]. Pediatr Res, 2022, 91(3): 488-489
- [23] Morowitz M J, Katheria A C, Polin R A, et al. The NICU Antibiotics and Outcomes (NANO) trial: a randomized multicenter clinical trial assessing empiric antibiotics and clinical outcomes in newborn preterm infants[J]. Trials, 2022, 23(1): 428
- [24] Palleri E, Frimmel V, Fläring U, et al. Hyponatremia at the onset of necrotizing enterocolitis is associated with intestinal surgery and higher mortality[J]. Eur J Pediatr, 2022, 181(4): 1557-1565
- [25] Sowden M, Van Weissenbruch M M, Bulabula A N H, et al. Effect of a Multi-Strain Probiotic on the Incidence and Severity of Necrotizing Enterocolitis and Feeding Intolerances in Preterm Neonates [J]. Nutrients, 2022, 14(16): 113-119
- [26] Stokes V, Rajai A, Mukherjee D, et al. Transfusion-associated necrotizing enterocolitis (NEC) in extremely preterm infants: experience of a tertiary neonatal center in UK [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2022, 35(25): 5054-5059
- [27] Underwood M A. Bifidobacterium infantis, Necrotizing Enterocolitis, Death, and the Role of Parents in the Neonatal Intensive Care Unit[J]. J Pediatr, 2022, 244(4): 14-16
- [28] Vawter-Lee M, Natarajan N, Rang K, et al. Topiramate Is Safe for Refractory Neonatal Seizures: A Multicenter Retrospective Cohort Study of Necrotizing Enterocolitis Risk[J]. Pediatr Neurol, 2022, 129(13): 7-13
- [29] Yu W, Haque I, Venkatraman A, et al. SIGIRR Mutation in Human Necrotizing Enterocolitis (NEC) Disrupts STAT3-Dependent microRNA Expression in Neonatal Gut [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2022, 13(2): 425-440
- [30] 孙子梅, 林晓燕, 苏琴, 等. 西咪替丁对坏死性小肠结肠炎新生大鼠 CaMKIV/CREM 通路及肠上皮完整性的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 49-54

(上接第 3007 页)

- [32] Jin L, Yu B, Liu G, et al. Mitophagy induced by UMI-77 preserves mitochondrial fitness in renal tubular epithelial cells and alleviates renal fibrosis[J]. Faseb j, 2022, 36(6): e22342
- [33] Yin Y, Wang Q, Xie C, et al. Amniotic membrane mesenchymal stem cells-based therapy improves Bmi-1-deficient mandible osteoporosis through stimulating osteoblastic bone formation and inhibiting osteoclastic bone resorption[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2022, 16(6): 538-549
- [34] Dai X, Zhang Q, Yu Z, et al. Bmi1 Deficient Mice Exhibit Male Infertility[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(3): 358-368
- [35] Wang R, Xue X, Wang Y, et al. BMI1 Deficiency Results in Female Infertility by Activating p16/p19 Signaling and Increasing Oxidative Stress[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(4): 870-881
- [36] Chen H, Chen H, Liang J, et al. TGF- β 1/IL-11/MEK/ERK signaling mediates senescence-associated pulmonary fibrosis in a stress-induced premature senescence model of Bmi-1 deficiency [J]. Exp Mol Med, 2020, 52(1): 130-151