DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0160
文章编号 1671-8852(2025)03-0298-04

cGAS-STING信号通路参与耳蜗毛细胞衰老

孙 颖 贺祖宏 陈 雄
武汉大学中南医院耳鼻咽喉头颈外科 武汉 湖北 430071

摘要 目的：探讨环化鸟苷酸-腺苷酸合成酶（cGAS）-干扰素刺激基因（STING）信号通路在衰老耳蜗毛细胞中的作用机制。方法：使用*D*-半乳糖（*D*-gal）诱导OC-1细胞衰老，采用不同浓度的*D*-gal处理OC-1细胞72 h，然后用CCK-8法检测细胞活力变化。将OC-1细胞分为对照（Control）组和*D*-gal组，β-半乳糖苷酶染色法检测是否成功建立细胞衰老模型。之后，流式细胞术检测线粒体活性氧（ROS）和线粒体膜电位水平，免疫荧光观察线粒体DNA（mtDNA）泄漏情况，Western Blot检测cGAS、STING、TANK结合激酶1（TBK1）、p-TBK1、核转录因子（NF）-κB p65亚基及p-p65表达水平。结果：使用不同浓度*D*-gal刺激OC-1细胞72 h后发现，当*D*-gal浓度高于10 mg•mL^{-1}时细胞活力逐渐下降（$P<0.001$），随后选择15 mg•mL^{-1}作为后续实验中*D*-gal组的处理浓度。与Control组相比，*D*-gal组细胞明显蓝染，线粒体ROS水平升高（$P<0.01$），线粒体膜电位降低（$P<0.01$），细胞中存在mtDNA泄漏。此外，相比Control组，*D*-gal组细胞cGAS和STING蛋白表达水平上调（$P<0.05$），p-TBK1/TBK1和p-p65/p65比值增加（$P<0.05$）。结论：cGAS-STING通路可能通过mtDNA易位而激活，进而参与老年性聋的发展进程。

关键词 cGAS-STING；老年性聋；线粒体DNA
中图分类号 R764.3
文献标识码 A
开放科学（资源服务）标识码（OSID）：

cGAS-STING signal pathway participates in cochlear hair cell senescence

SUN Ying, HE Zuhong, CHEN Xiong
Dept. of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the mechanism of the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING) signaling pathway in aging cochlear hair cells. **Methods:** Cochlear hair cells OC-1 were induced to senescence using *D*-galactose (*D*-gal). OC-1 cells were treated with different concentrations of *D*-gal for 72 h, then the cell viability was assessed by using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. After OC-1 cells were divided into the Control and *D*-gal groups, the β-galactosidase staining was adopted to verify the successful establishment of the cellular senescence model. Subsequently, flow cytometry was utilized to assess mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential levels, immunofluorescence was employed to observe mitochondrial DNA (mtDNA) leakage, and Western Blot was conducted to detect the expression levels of cGAS, STING, TANK-binding kinase 1 (TBK1), phosphorylated TBK1 (p-TBK1), nuclear factor (NF)-κB p65 subunit, and phosphorylated p65. **Results:** After treating OC-1 cells with various concentrations

课题来源：国家自然科学基金面上项目（编号：82271183）
作者简介：孙颖，女，1998—，医学硕士生，主要从事耳聋的基础研究，E-mail：sunyingweichi@163.com
通信作者：陈雄，男，1968—，医学博士，主任医师，主要从事耳鼻咽喉头颈外科疾病的基础和临床研究，E-mail：zn_chenxiong@whu.edu.cn

of *D*-gal for 72 hours, the CCK-8 assay results showed a gradual decline in cell viability when the concentration of *D*-gal exceeded 10 mg·mL^{-1} ($P<0.001$). Therefore, 15 mg·mL^{-1} was chosen as the treatment concentration of the *D*-gal group in the subsequent experiments. Compared with the cells in the control group, cells in the *D*-gal group displayed prominent blue staining, elevated mitochondrial ROS levels ($P<0.01$), decreased mitochondrial membrane potential ($P<0.01$), and mtDNA leakage. Furthermore, the expression levels of cGAS and STING proteins were upregulated in the *D*-gal group ($P<0.05$), with increased ratios of p-TBK1/TBK1 and p-p65/p65 ($P<0.05$). **Conclusion:** The cGAS-STING pathway may be activated through mtDNA translocation, thereby participating in the development process of age-related hearing loss.

Key Words　cGAS-STING; Age-Related Hearing Loss; Mitochondrial DNA

老年性聋是指进行性、双侧对称性的、与年龄相关的感音神经性听力损失，由耳蜗毛细胞及听觉神经的功能退化引起。该病虽不直接危及生命，但会影响老年人与外界交流，导致抑郁和认知能力下降，容易使老年人出现心理健康问题。慢性炎症是衰老相关损伤与退行性疾病的主要驱动因素，与老年性聋的疾病进展有关[1]。目前，对于炎症与老年性聋的探究尚处于初级阶段，炎症在老年性聋中的具体机制尚未得到充分阐明。环化鸟苷酸-腺苷酸合成酶（cyclic GMP-AMP synthase，cGAS）是细胞质 DNA 识别受体，可以激活干扰素刺激基因（stimulator of interferon genes，STING）依赖的信号通路从而启动下游一系列炎症反应[2]。GULEN 等[3]发现 cGAS-STING 通路是介导衰老过程中慢性炎症和组织功能减退的关键通路。研究[4]表明，cGAS-STING 通路的不必要激活会促进组织损伤，从而参与多种退行性疾病的发生发展，但该通路与老年性聋的关系尚不清楚。因此，本研究初步探究 cGAS-STING 轴与衰老毛细胞的关系，以期为防治老年性聋提供新思路。

1　材料与方法

1.1　主要试剂　Cell counting kit-8（CCK-8）试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司，衰老相关 β-半乳糖苷酶（senescence-associated β-galactosidase，SA-β-Gal）染色试剂盒购于武汉亚科因生物技术有限公司，*D*-半乳糖（*D*-Galactose，*D*-gal）购于美国 Sigma 公司，线粒体活性氧（reactive oxygen species，ROS）Mito-SOX 染料、四甲基罗丹明甲基酯（tetramethylrhodamine, methyl ester，TMRM）线粒体膜电位指示剂购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司，兔源一抗 cGAS、TANK-结合激酶 1（TANK-binding kinase 1，TBK1）、p-TBK1、核转录因子-κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）p65 亚基以及 p-p65 均购于美国 Cell Signaling Technology 公司，兔源一抗 STING 购于美国 Abcam 公司，兔源一抗 β-actin 和 TOM20 购于武汉三鹰生物技术有限公司，鼠源一抗 dsDNA 购于德国 Progen 公司，辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的羊抗兔二抗购自武汉安特捷生物技术有限公司，Alexa Fluor 偶联 488 和 594 荧光二抗购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2　细胞培养　OC-1 细胞系是一种常用的永生化耳蜗毛细胞系[5]。OC-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清（Sigma）的高糖 DMEM 培养基（Thermo Fisher Scientific）中，并置于 37 ℃、5%CO_2 的细胞培养箱中。当细胞的汇合度达 80% 左右时，用 0.25% 胰蛋白酶（Thermo Fisher Scientific）消化细胞，收集后进行传代培养。

1.3　流式细胞术分析　当细胞经过不同的干预后，收集细胞，用预冷的 PBS 洗涤细胞并离心，以备用于流式细胞术检测线粒体 ROS 和线粒体膜电位水平。根据试剂说明书，把 Mito-SOX 染料加入需检测线粒体 ROS 的细胞样本，随后将样本放入细胞培养箱中避光孵育 15 min；把 TMRM 染料加入需检测线粒体膜电位的细胞样本，随后将样本放入细胞培养箱中避光孵育 30 min。孵育结束后，尽快使用流式细胞仪检测。

1.4　细胞 CCK-8 检测　将细胞以 5×10^3/孔的密度接种到 96 孔板，待细胞密度至 80% 左右，给予每组细胞不同的干预。待细胞完成处理后，弃去孔内培养基，每孔加入 100 μL 配置好的 CCK-8 溶液（CCK-8 试剂与培养基的比例为 1∶9），在细胞培养箱中避光孵育 1 h。使用酶标仪测量每孔在 450 nm 波长下的吸光度值。

1.5 β-半乳糖苷酶染色 根据试剂盒说明书进行操作。在6孔板中培养细胞,进行干预:将培养液吸除后,使用PBS对细胞进行洗涤,随后向每孔添加1 mL固定缓冲液(试剂盒自带),并在室温下固定15 min。去除固定液后,再次用PBS洗涤细胞。弃PBS,向每孔添加1 mL染色工作液,并使用保鲜膜密封孔板,以避免蒸发。之后,将孔板放置于37 ℃电热鼓风干燥箱中过夜孵育。随后,利用光学显微镜观察细胞,统计蓝色细胞(即衰老细胞)与总细胞数量,以此计算表达β-半乳糖苷酶的细胞(衰老细胞)所占的百分比。

1.6 Western Blot检测 取各组OC-1细胞,弃去培养基并用PBS充分洗涤后加入蛋白裂解液,用细胞刮刀刮取样本并转至离心管,超声裂解,离心后取上清,用BCA法测定蛋白浓度。分别取15 μg样品与蛋白上样缓冲液涡旋混匀并煮沸。蛋白样品通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离,再用湿转法转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜上。膜用5%脱脂牛奶于室温下封闭1 h后,与一抗在4 ℃下孵育过夜。之后,用TBST洗膜3次,将膜用二抗在室温下孵育1 h。随后用TBST洗膜3次,用ECL化学发光法检测蛋白丰度,用β-actin的灰度值进行标准化以计算蛋白相对表达量。

1.7 免疫荧光检测 将OC-1细胞接种到无菌的细胞爬片上,待细胞生长至适宜的密度时进行干预。干预结束后,用4%的多聚甲醛溶液在室温下固定样本10 min。用磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffer saline,PBS)清洗3次爬片后,使用含有0.5% Triton X-100的PBS溶液室温孵育10 min。随后,PBS洗片,用10%的驴血清在室温下封闭1 h。PBS再次洗涤。与抗TOM20抗体和抗dsDNA抗体在4 ℃下过夜孵育。次日,拿出爬片,PBS洗涤后,使用DAPI染料和与一抗种属相匹配的荧光标记的二抗在4 ℃下过夜孵育。PBS洗涤后,用抗荧光淬灭剂封片,使用共聚焦显微镜拍照观察。

1.8 统计学分析 数据分析采用Microsoft Excel和GraphPad Prism 9.3.1软件进行。实验结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)的形式表示。两组间均值比较采用t检验,3组及3组间均值比较采用单因素方差分析。当$P<0.05$时,认为差异有统计学意义。每项实验至少进行了3次独立重复以确保结果的可靠性。

2 结果

2.1 *D*-gal构建OC-1细胞的衰老模型 我们使用*D*-gal诱导OC-1细胞衰老。分别使用0.2,0.5,1,2,5,10,15,20,30,40,50 mg·mL^{-1}的*D*-gal处理OC-1细胞72 h;然后用CCK-8法检测细胞活力。结果显示,随着*D*-gal浓度升高,OC-1细胞的细胞活力逐渐下降(图1A)。参考既往文献[6],我们选择15 mg·mL^{-1} *D*-gal作为后续处理OC-1细胞的实验条件。β-半乳糖苷酶染色结果显示,*D*-gal组的蓝染细胞明显多于Control组细胞(图1B、1C,$P<0.001$),这说明衰老OC-1细胞模型构建成功。

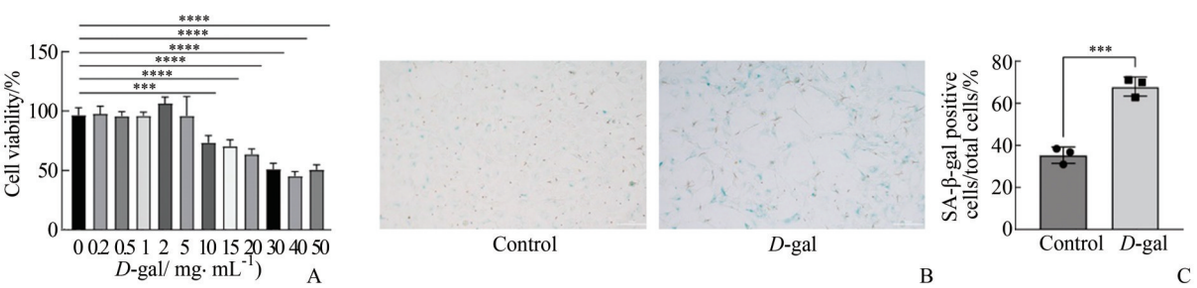


图1 *D*-gal诱导OC-1细胞衰老

A. CCK-8法检测各组OC-1细胞活力;B. 各组OC-1细胞β-半乳糖苷酶染色结果(×400,比例尺=100 μm);C. 各组β-半乳糖苷酶阳性细胞统计图。其他浓度*D*-gal组与Control组或0 mg·mL^{-1} *D*-gal组相比,$^{***}P<0.001$,$^{****}P<0.000\,1$

2.2 衰老OC-1细胞的线粒体稳态被破坏并伴有mtDNA泄漏 Mito-SOX流式结果显示,*D*-gal处理OC-1细胞后,与Control组相比,OC-1细胞中的线粒体ROS水平明显增加(图2A,$P<0.01$)。TMRM流式结果显示,*D*-gal组OC-1细胞的线粒体膜电位水平相比Control组明显下降(图2B,$P<0.01$)。为了判断衰老OC-1细胞中是否存在mtDNA泄漏的情况,我们使用Anti-TOM20抗体标记线粒体,Anti-dsDNA抗体标记DNA,然后通过共聚焦显微镜进行观察。结果显示,对照组细胞中,除细胞核之外的绿色荧光基本与红色荧光共定位,而*D*-gal细胞中,红色荧光代表的线粒体之外可见

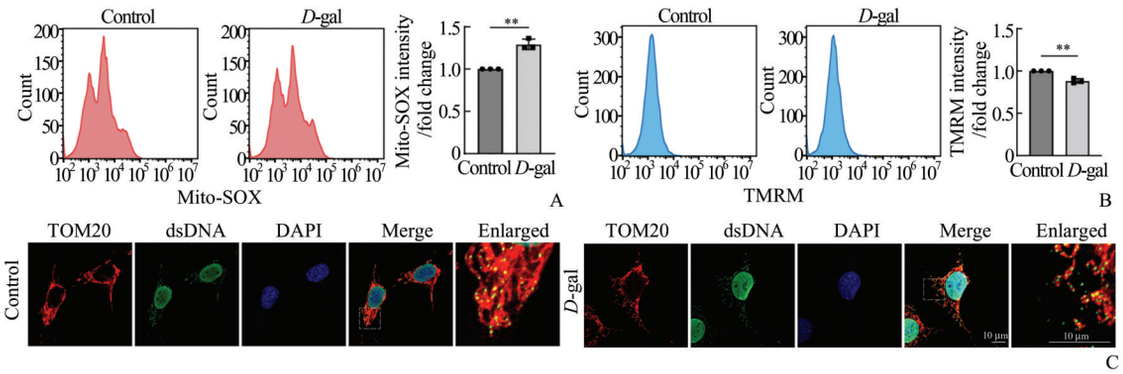


图 2　衰老 OC-1 细胞的线粒体稳态被破坏并伴有 mtDNA 泄漏

A. 各组线粒体 ROS 水平及其统计分析；B. 各组 OC-1 线粒体膜电位水平及统计分析；C. 各组 OC-1 细胞 mtDNA 泄漏的情况（×630，比例尺＝10 μm）。与 Control 组相比，$^{**}P<0.01$

明显点状绿色荧光标记，说明衰老的 OC-1 细胞中，线粒体 DNA 易位到细胞质中（图 2C）。

2.3　衰老 OC-1 细胞中 cGAS-STING 通路表达上调　Western Blot 结果显示，与 Control 组相比，*D*-gal 组 cGAS、STING 蛋白表达升高，此外 p-TBK1/TBK1 和 p-p65/p65 的比值均增大（图 3A～3C）。这些结果表明，cGAS-STING 信号通路在衰老的耳蜗毛细胞中被激活，该通路可能是参与老年性聋的作用通路。

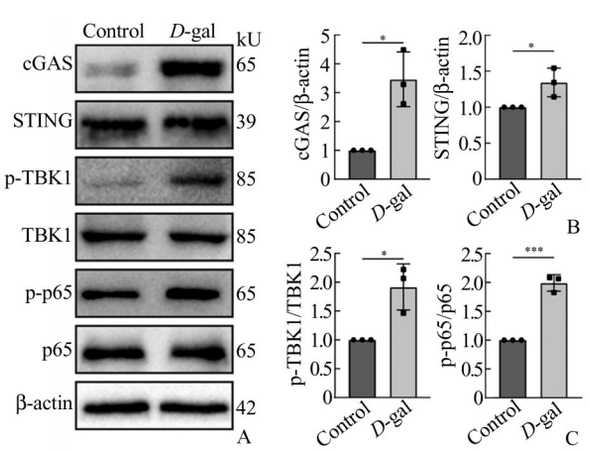


图 3　衰老 OC-1 细胞中 cGAS-STING 通路表达上调

A. 各组 OC-1 细胞 Western Blot 结果；B. 各组 OC-1 细胞 cGAS 和 STING 的蛋白表达水平；C. 各组 OC-1 细胞 p-TBK1/TBK1 和 p-p65/p65 蛋白表达水平的相对比值。与 Control 组相比，$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$

3　讨论

cGAS-STING 通路是经典天然免疫反应通路，在激活促炎基因转录中起到关键的作用。cGAS 识别胞质 DNA 并与之结合，催化 cGAMP 合成；cGAMP 作为第二信使，结合并激活位于内质网上的 STING 蛋白；之后，激活的 STING 转位到高尔基体，募集并磷酸化 TBK1，继而激活干扰素调节因子 3（interferon regulatory factor 3，IRF3）或 NF-κB，导致Ⅰ型干扰素和其他促炎细胞因子产生[7]。本研究发现，cGAS-STING 通路在 *D*-gal 诱导的衰老 OC-1 细胞中显著激活，这说明该通路参与了耳蜗毛细胞衰老的进程。

mtDNA 释放是衰老和各种神经退行性疾病中激活 cGAS-STING 通路的信号[8]。多种因素刺激可诱发线粒体应激，破坏线粒体稳态，进而导致胞质内 mtDNA 异常积累。有研究[9]在阿尔茨海默症模型小鼠中观察到大脑中 mtDNA 的释放，同时还伴随 cGAS-STING 通路的激活及显著的炎症反应。还有研究[10]发现，TDP-43 促使线粒体 DNA 释放，触发肌萎缩侧索硬化症模型中的炎症反应，此过程被胞质内的 cGAS-STING 通路所识别；而阻断 cGAS-STING 通路可减轻炎症和神经退行性变。本研究中，相比 Control 组，诱导衰老的 OC-1 细胞的线粒体 ROS 水平上调，而线粒体膜电位下降，说明线粒体稳态受到损伤。此外，我们还观察到 *D*-gal 组细胞的部分 mtDNA 易位到胞质，结合既往文献，我们认为这可能是激活老化 OC-1 细胞中 cGAS-STING 通路的信号。

综上所述，衰老的 OC-1 细胞中线粒体稳态受损，mtDNA 外泄，可能通过激活 cGAS-STING 通路进而参与老年性聋的发生发展。本研究揭示了可能参与老年性耳聋的新分子机制，为老年性聋的防治提供了新的理论基础。然而本研究仅在体外水平进行了初步验证。此外，研究尚未涉及可能的干预策略，如何有效地抑制 cGAS-STING 通路以减缓或预防老年性聋，这需要后续研究来进一步探索。

（下转第 391 页）