

· 基础研究 ·

## cGAS-STING 通路介导酸性去氧胆酸诱导人正常食管上皮细胞炎症的机制研究

张丹萍, 苏鑫, 朱宏\*

南京医科大学第一附属医院消化内科, 江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:探讨酸性去氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)诱导人正常食管上皮细胞(human esophageal epithelial cell, HEEC)线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)损伤及释放与环鸟苷酸-腺苷酸合酶-干扰素基因刺激蛋白(cyclic GMP-AMP synthase-stimulation of interferon gene, cGAS-STING)通路在食管上皮炎症发生发展中的关联。方法:将HEEC分为对照组和酸性DCA处理组。CCK-8法检测细胞存活率;荧光显微镜及流式细胞术检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)、线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mtROS)及线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)的变化;化学发光法检测三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)水平;透射电镜观察线粒体超微结构改变;RT-qPCR检测mtDNA拷贝数变化;Western blot检测 $\gamma$ H2AX、cGAS、STING、p-NF- $\kappa$ B p65及NF- $\kappa$ B p65的蛋白表达水平;RT-qPCR检测炎症因子白细胞介素(interleukin, IL)-6及IL-1 $\beta$ 的mRNA表达水平。结果:酸性DCA处理后细胞存活率呈剂量-时间依赖性降低;细胞内ROS及mtROS产生增多,同时MMP降低,ATP含量减少;与对照组相比,酸性DCA处理后 $\gamma$ H2AX的表达水平升高;mtDNA释放入胞质,mtDNA拷贝数减少;cGAS、STING和p-NF- $\kappa$ B p65表达升高;炎症因子IL-6及IL-1 $\beta$ 表达升高;cGAS抑制剂RU.521预处理抑制了cGAS、STING的表达水平及部分抑制了p-NF- $\kappa$ B p65的表达水平,炎症因子IL-6及IL-1 $\beta$ 水平降低。结论:体外实验表明,酸性DCA诱导HEEC线粒体功能障碍,mtDNA损伤及释放,介导HEEC炎症反应,其机制可能与cGAS-STING通路的激活有关。

**[关键词]** 反流性食管炎;线粒体DNA;cGAS-STING通路

**[中图分类号]** R571

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2023)07-909-08

**doi:**10.7655/NYDXBNS20230703

## Mechanism of cGAS - STING pathway mediating acidic deoxycholic acid inducing inflammation of human esophageal epithelial cell

ZHANG Danping, SU Xin, ZHU Hong\*

Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the relationship between acidic deoxycholic acid induced mitochondrial DNA (mtDNA) damage and release of human esophageal epithelial cells and cGAS-STING pathway in the development of esophageal epithelial cell inflammation. **Methods:** HEECs were divided into control group and acidic deoxycholic acid treatment group. The viability of cells was measured by CCK-8 assay. Changes of reactive oxygen species, mitochondrial reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential were detected by fluorescence microscope and flow cytometry. ATP was detected by the luminometer. The ultrastructure of mitochondria was observed by transmission electron microscope. The mtDNA copy number was evaluated by qPCR. The expressions of  $\gamma$ H2AX, cGAS, STING, p-NF- $\kappa$ B p65 and NF- $\kappa$ B p65 were detected by Western blotting. The mRNA expressions of inflammatory cytokines IL-6 and IL-1 $\beta$  were detected by qPCR. **Results:** CCK-8 assay showed that the viability of cells treated with acidic deoxycholic acid decreased in a dose-time dependent manner. The production of intracellular ROS and mtROS increased, while MMP and ATP decreased. Compared with the control group, the expression of  $\gamma$ H2AX increased after acidic deoxycholic acid, mtDNA released into the cytoplasm, mtDNA copy number reduced, the expressions of cGAS, STING and p-NF- $\kappa$ B p65 were increased, and the expressions of inflammatory cytokines IL-6 and IL-1 $\beta$  were elevated. After pretreatment with cGAS inhibitor RU.521, the expression

**[基金项目]** 江苏省高层次人才“六个一”科研项目(LGY2016010)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhuhong@1059@126.com

levels of cGAS and STING were inhibited and the expression of p-NF- $\kappa$ B p65 was partially inhibited, and the levels of inflammatory cytokines IL-6 and IL-1 $\beta$  were decreased. **Conclusion:** The *in vitro* experiments have shown that acidic deoxycholic acid can induce mitochondrial dysfunction, mitochondrial DNA damage and release, and mediate HEEC inflammation. The mechanism may be related to the activation of cGAS-STING pathway.

[Key words] reflux esophagitis; mtDNA; cGAS-STING pathway

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(07):909-916]

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是上消化道的慢性疾病,其发病率逐年升高<sup>[1]</sup>。反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)是胃食管反流病的常见类型之一,盐酸及胆汁酸等反流物质的长期刺激会导致食管远端的炎症反应,并随着反流时程的延长进展至 Barrett 食管甚至食管腺癌<sup>[2]</sup>。既往研究发现,暴露于酸性胆盐的食管上皮细胞炎症因子分泌显著增加<sup>[3]</sup>。然而,盐酸及胆汁酸诱导食管上皮炎症的确切机制尚未完全阐明,深入探讨介导食管上皮炎症的具体机制能为 RE 的治疗提供新的理论依据。

线粒体是内源性活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成的主要部位,大量 ROS 诱导的氧化应激会导致线粒体功能障碍。作为线粒体遗传物质存在的线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 靠近呼吸链且缺乏保护性组蛋白,因此极易受到 ROS 的攻击,导致 mtDNA 损伤并从线粒体释放到胞质中<sup>[4]</sup>。作为线粒体损伤相关分子模式(mitochondrial damage-associated molecular pattern, mtDAMP), mtDNA 可以通过结合模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)激活固有免疫系统<sup>[5-6]</sup>。

环鸟苷酸-腺苷酸合酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)作为 PRR 之一是胞质 DNA 感受器,能识别并结合胞质双链 DNA,催化 ATP 和 GTP 转化为环二核苷酸 cGAMP,其作为第二信使结合并激活干扰素基因刺激蛋白(stimulator of interferon gene, STING),随后 STING 招募并激活 TANK 结合激酶 1(TANK binding kinase 1, TBK1) 和 I $\kappa$ B 激酶(I $\kappa$ B kinase, IKK),这些激酶磷酸化并激活干扰素调节因子 3(interferon regulatory factor 3, IRF3) 和核因子  $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B),促进 I 型干扰素及其他细胞因子的表达。cGAS-STING 通路参与炎症性疾病、神经退行性疾病及肿瘤等多种疾病进程<sup>[7-9]</sup>。本研究拟探讨酸性 DCA 诱导食管上皮炎症过程中,mtDNA 损伤及释放与 cGAS-STING 通路之间的联系,为酸性胆盐反流引起慢性食管炎症的

发病机制提供新的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人正常食管上皮细胞系(HEEC)购自美国 ATCC。去氧胆酸(deoxycholic acid, DCA, MedChemExpress 公司,美国),CCK-8 试剂盒(APEX-BIO 公司,美国),ROS 检测试剂盒、线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)检测试剂盒及 ATP 检测试剂盒(上海碧云天科技公司),线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mtROS) Mitosox 荧光探针(Invitrogen 公司,美国),细胞基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技公司),HiScript<sup>®</sup> II Q RT SuperMix 和 ChamQ SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞公司);cGAS 抗体及  $\gamma$ H2AX 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国),STING 抗体和 TOMM20 抗体(Abcam 公司,美国),p-NF- $\kappa$ B p65 抗体和 NF- $\kappa$ B p65 抗体(上海 Abmart 公司),抗 DNA 抗体(Progen 抗体,德国), $\beta$ -actin 抗体(北京博奥森生物公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养和处理

使用含 20% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 的培养箱中培养。当细胞生长至融合度达 80% 左右时传代并进行后续实验。酸性 DCA 溶液的配制如下:酸性培养基用 36%~38% 的浓盐酸在 DMEM 培养基中滴定至 pH=5,在此酸性培养基中加入一定量的 DCA 贮备液配成含不同浓度 DCA 的酸性培养基,充分混匀后即为酸性 DCA 溶液。对照组即为不含 DCA 的中性培养基,即 DMEM 培养基<sup>[3]</sup>。

#### 1.2.2 CCK-8 实验检测细胞活性

HEEC 接种于 96 孔板,1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/孔,贴壁生长 24 h,酸性 DCA 组设置 50、100、200、300  $\mu$ mol/L 4 个浓度及 2、4、6、8 h 4 个时间点,同时设置对照组及空白组,CCK-8 试剂盒测定细胞存活率,细胞存活率=[(实验孔吸光度-空白孔吸光度)/(对照孔吸光度-

空白孔吸光度)] $\times 100\%$ 。

### 1.2.3 流式细胞术检测 ROS、mtROS 和 MMP

将处于对数生长期且生长状态良好的细胞接种于6孔板,待细胞贴壁后给药处理,PBS润洗后胰酶消化离心,将探针稀释在特定溶液中孵育一定时间,孵育结束后离心并清洗,上机检测。

### 1.2.4 荧光显微镜检测 ROS、mtROS 和 MMP

将处于对数生长期且生长状态良好的细胞接种于6孔板,待细胞贴壁后给药处理,PBS润洗后加入荧光探针孵育,孵育结束后吸弃并清洗,荧光显微镜采集图像。

### 1.2.5 ATP 检测

将处于对数生长期且生长状态良好的细胞接种于6孔板,待细胞贴壁后给药处理,使用ATP检测试剂盒进行检测,配制不同浓度梯度的ATP标准溶液,绘制标准曲线,将ATP检测工作液加入样品和标准品中,使用光度计检测相对光单位(relative light unit,RLU)值。BCA法检测蛋白浓度,ATP含量=ATP浓度/蛋白浓度。

### 1.2.6 细胞免疫荧光

将处于对数生长期且生长状态良好的细胞接种于共聚焦小皿,待细胞贴壁后给药处理,4%多聚甲醛室温固定20 min,0.1% Triton X-100室温破膜15 min,5% BSA-PBS室温封闭2 h,一抗4℃孵育过夜,隔日二抗避光室温孵育1 h,DAPI室温复染10 min,抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下采集图像。

### 1.2.7 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)

TRIzol法提取细胞总RNA,紫外分光光度计测定RNA浓度及纯度,按照逆转录试剂说明合成cDNA,以cDNA为模板进行RT-qPCR扩增。IL-1 $\beta$ 上游引物:5'-AGCTACGAATCTCCGACCAC-3',下游引物:5'-CGTTATCCCATGTGTGCAAGAA-3';IL-6上游引物:5'-ACTCACCTTTCAGAACGAATGG-3',下游引物:5'-CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG-3';以GAPDH为内参,上游引物:5'-ACCATCTTCCAGGAGCGAG-3',下游引物:5'-GATGGCATGGACTGTGGTCA-3'。RT-qPCR反应条件:预变性95℃30 s;40次循环反应95℃变性10 s,60℃退火30 s;95℃变性15 s,60℃退火60 s,95℃变性15 s。以GAPDH作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因mRNA相对表达量。

### 1.2.8 mtDNA 拷贝数测定

将处于对数生长期且生长状态良好的细胞接种于6孔板,待细胞贴壁后给药处理,按照细胞基

因组DNA提取试剂盒说明书进行DNA提取,紫外分光光度计测定DNA浓度及纯度,以基因组DNA为模板进行RT-qPCR扩增,mtDNA拷贝数的检测以细胞核DNA作为参照,B2M基因代表细胞核DNA,ND1及ND2基因代表mtDNA。ND1上游引物:5'-CTCTTCGTCTGATCCGTCCT-3',下游引物:5'-TGAGGTTGCGGTCTGTTAGT-3';ND2上游引物:5'-GTAGACAGTCCCACCCTCAC-3',下游引物:5'-TTGATCCCGTTTCGTGCAAG-3';B2M上游引物:5'-CCAGCAGCGAATGGAAAGTCAA-3',下游引物:5'-TCTCTCTCCATTCTTCAGTAAGTCAACT-3'。

### 1.2.9 Western blot

RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度并确定上样量,SDS-PAGE凝胶进行电泳,电泳结束后冰浴转膜,5%脱脂奶粉溶液室温封闭1 h,一抗4℃孵育过夜,隔日二抗室温孵育1 h,ECL化学发光显影。

### 1.3 统计学方法

所有数据均使用GraphPad Prism8软件进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析,事后比较采用Tukey检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

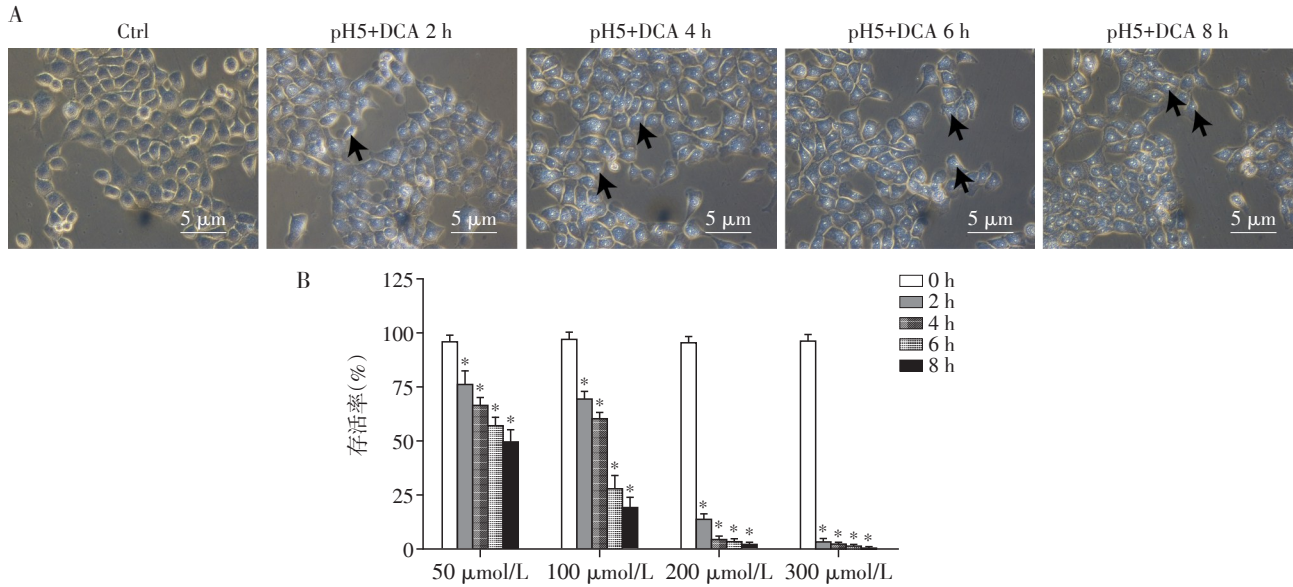
## 2 结果

### 2.1 酸性DCA对HEEC细胞形态和存活率的影响

倒置显微镜下观察酸性DCA(100  $\mu\text{mol/L}$ )处理前后HEEC形态变化,对照组中,细胞贴壁生长且状态良好,形态饱满。随着药物作用时间的延长,细胞逐渐皱缩,空泡增多(图1A)。为了探究酸性DCA对HEEC存活率的影响,将不同浓度酸性DCA溶液处理细胞2、4、6、8 h,CCK-8法检测细胞存活率,结果如图1B所示,HEEC的存活率随着浓度的增加及暴露时间的延长而降低,呈浓度-时间依赖性。当干预浓度为200  $\mu\text{mol/L}$ 及300  $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率极显著降低。当干预浓度为50  $\mu\text{mol/L}$ 及100  $\mu\text{mol/L}$ 时,与对照组相比,细胞存活率下降,且差异具有统计学意义( $P < 0.001$ ),依据既往研究<sup>[10-11]</sup>,本研究中选择100  $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验的干预浓度。

### 2.2 酸性DCA诱导HEEC线粒体功能障碍

用酸性DCA(100  $\mu\text{mol/L}$ )处理HEEC 2 h后,荧光显微镜及流式细胞仪检测细胞内ROS、mtROS和MMP水平。如图2A~F所示,与对照组相比,酸性DCA处理后细胞内ROS及mtROS水平显著升高,



A: 酸性DCA对HEEC形态的影响;黑色箭头表示细胞空泡,标尺为5 μm( $\times 200$ );B: 酸性DCA对HEEC存活率的影响;与对照(0 h)组比较, $P < 0.001$ ( $n=6$ )。

图1 酸性DCA处理后HEEC存活率及形态变化

Figure 1 Viability and morphological changes of HEEC treated with acidic deoxycholic acid

MMP显著降低。用酸性DCA(100 μmol/L)处理HEEC 4 h后,如图2G所示,与对照组相比,酸性DCA刺激后细胞ATP水平降低。运用透射电镜观察线粒体超微结构,如图H所示,对照组线粒体结构完整,轮廓清晰,线粒体嵴排列有序,基质均匀;酸性DCA处理后线粒体外形肿胀,线粒体嵴排列紊乱,稀疏,线粒体出现空泡化。上述结果表明,酸性DCA诱导HEEC线粒体形态改变及功能障碍。

### 2.3 酸性DCA导致HEEC DNA双链断裂及mtDNA拷贝数减少及释放

用酸性DCA(100 μmol/L)处理HEEC 4 h后,荧光显微镜下观察γH2AX阳性细胞,结果如图3A所示,与对照组相比,酸性DCA处理后γH2AX阳性细胞数显著增加。Western blot结果如图3B所示,γH2AX蛋白表达水平高于对照组。为了验证酸性DCA处理后mtDNA是否从线粒体释放到胞质中,RT-qPCR检测mtRNA基因ND-1、ND-2相对细胞核DNA基因B2M的表达水平,结果显示,酸性DCA处理后mtDNA拷贝数显著降低(图3C)。进一步用荧光显微镜观察了线粒体与DNA共定位情况,如图3D所示,对照组中,mtDNA位于线粒体内部,酸性DCA处理后mtDNA从线粒体释放到胞质中。上述结果表明,酸性DCA诱导HEEC双链DNA断裂,导致DNA损伤,mtDNA释放至胞质中。

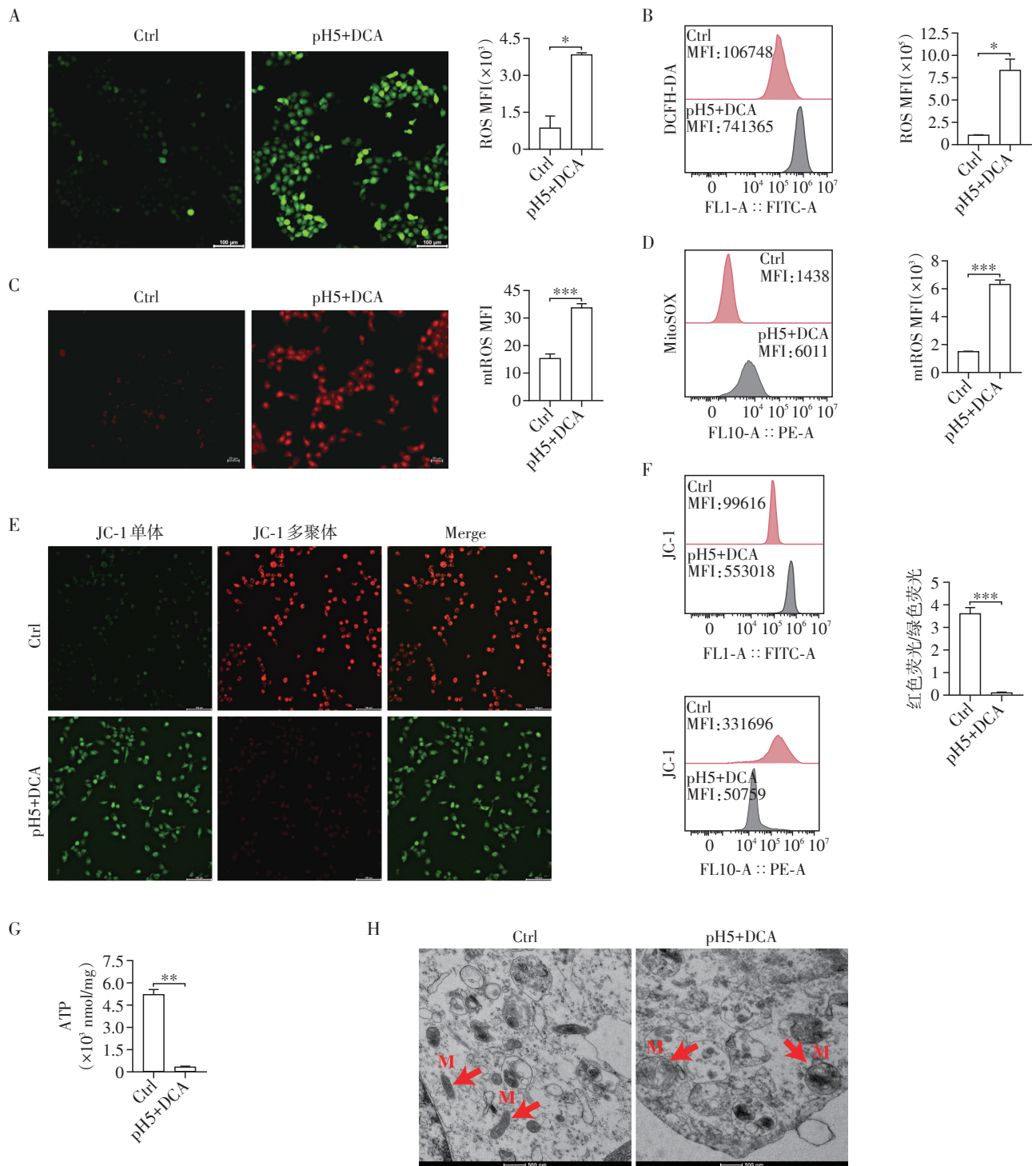
### 2.4 酸性DCA激活cGAS-STING信号通路

用酸性DCA(100 μmol/L)处理HEEC 4 h后,与对照组相比,酸性DCA组cGAS、STING及p-NF-κB p65蛋白表达增加,RT-qPCR结果显示炎症因子IL-6及IL-1β表达水平增加(图4A、B)。cGAS抑制剂RU.521预处理抑制了酸性DCA诱导的cGAS、STING及p-NF-κB p65表达水平的升高,同时炎症因子IL-6及IL-1β表达水平降低(图4C、D)。

## 3 讨论

GERD是全球最常见的慢性疾病之一,具有死亡率低但发病率高的特点,RE是GERD常见的类型之一<sup>[1]</sup>。研究表明,酸性胆盐刺激食管上皮细胞分泌IL-8及IL-1β等细胞因子<sup>[3]</sup>,MAPK、PKC及PKA等信号通路介导了这一过程<sup>[10-11]</sup>。本研究采用酸性DCA刺激人正常食管上皮细胞的方法初步模拟RE的发生发展过程,探讨mtDNA损伤及释放与cGAS-STING通路在食管上皮炎症中的关联。结果表明,酸性DCA诱导线粒体功能障碍,进一步导致mtDNA双链断裂及释放,激活cGAS-STING通路,促进下游炎症因子的分泌。

近年来,线粒体在疾病发生发展中的作用备受关注。内源性ROS主要在线粒体呼吸链上产生,在正常机体内,ROS的产生和清除受到严格控制,当体内氧化和抗氧化系统处于失衡状态时,ROS的清



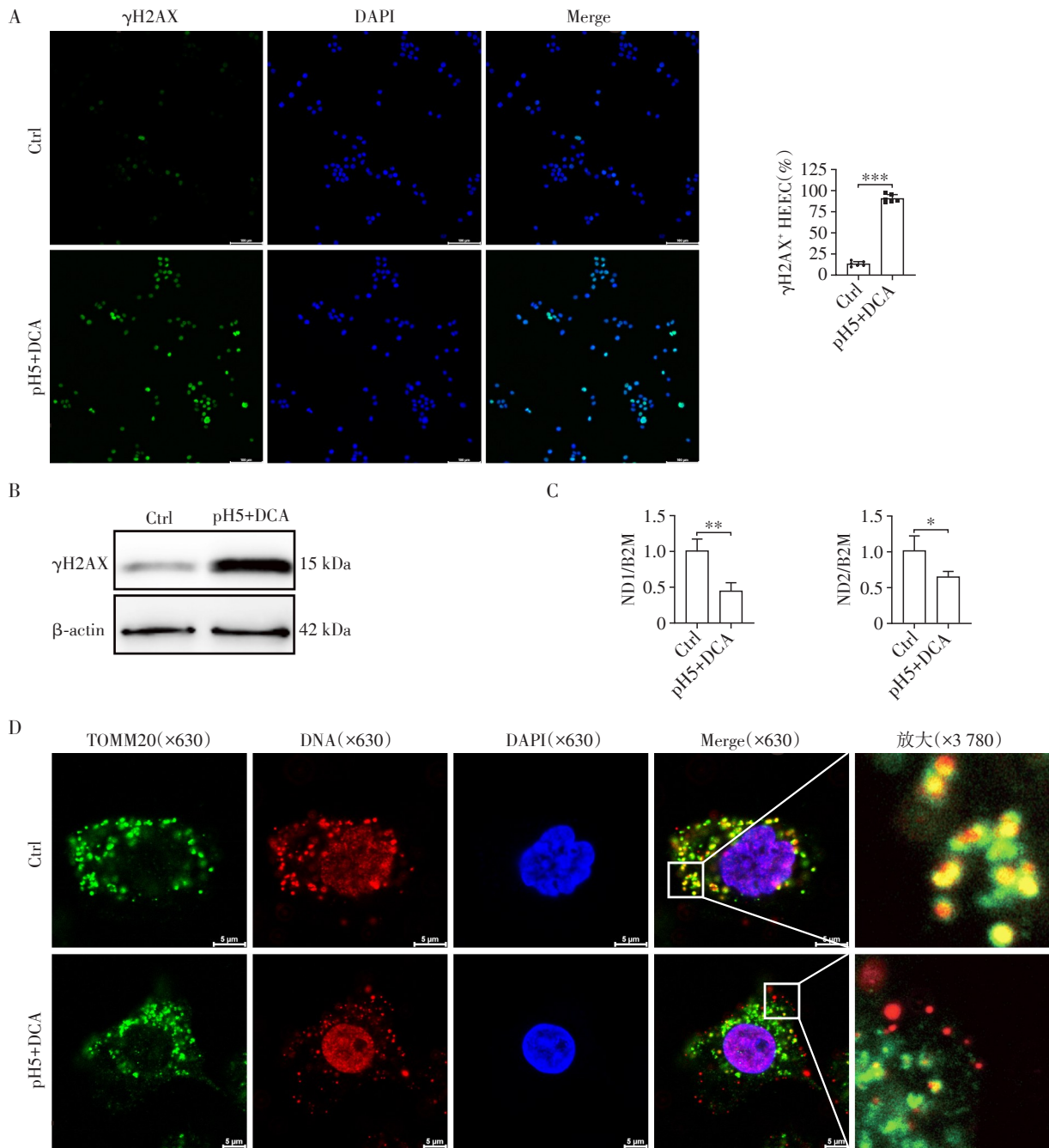
A: 荧光显微镜检测细胞内 ROS 水平(×200); B: 流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平; C: 荧光显微镜检测细胞内 mtROS 水平(×200); D: 流式细胞仪检测细胞内 mtROS 水平; E: 荧光显微镜检测 MMP 水平(×200); F: 流式细胞仪检测 MMP 水平; G: ATP 含量分析; H: 透射电镜观察线粒体(×8 600), M 及红色箭头代表线粒体。两组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ )。

图2 酸性DCA处理后对HEEC线粒体功能和结构的影响

Figure 2 Effects of acidic deoxycholic acid on mitochondrial function and structure of HECC

除受限从而在体内蓄积,导致细胞毒性及组织和机体损伤<sup>[12]</sup>。既往研究表明,酸性胆盐诱导 Barrett 食管上皮细胞线粒体氧化应激,在食管腺癌发展过程

中起重要作用<sup>[13]</sup>。本研究发现酸性 DCA 诱导 ROS 及 mtROS 产生增多, MMP 降低以及 ATP 生成减少,提示氧化应激的发生并进一步导致线粒体功



A: 荧光显微镜检测 $\gamma$ H2AX 表达水平( $\times 100$ ); B: Western blot 检测 $\gamma$ H2AX 表达水平; C: mtDNA 拷贝数变化; D: 线粒体及 DNA 共定位。两组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ )。

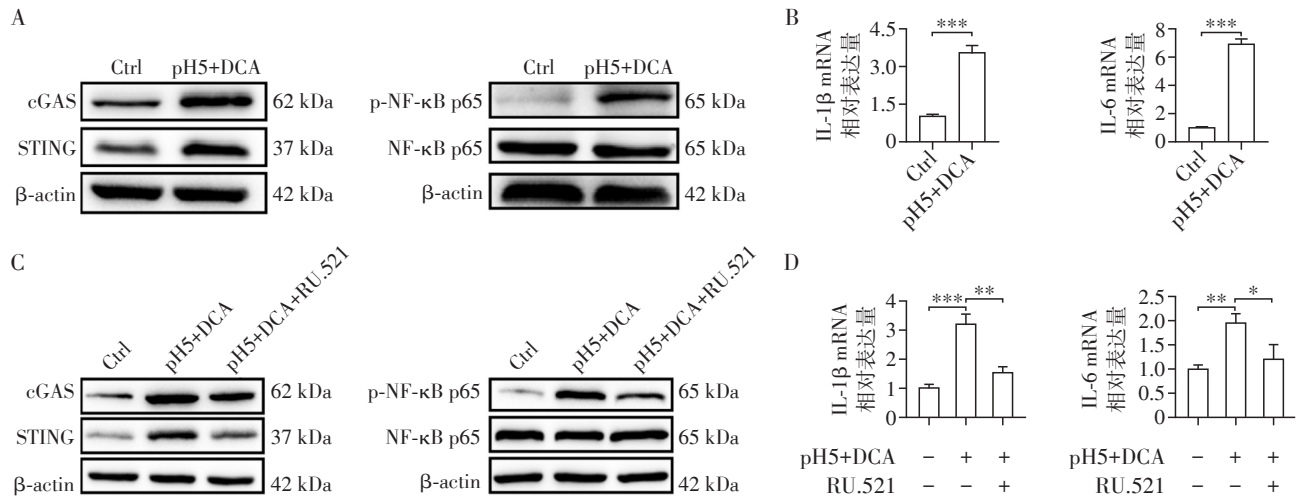
图3 酸性 DCA 处理对 HECC mtDNA 的影响

Figure 3 Effects of acidic deoxycholic acid on HECC mtDNA

能障碍。

DNA 损伤与各种疾病的发病机制相关, 导致细胞稳态失衡, 诱导炎症、细胞凋亡和衰老<sup>[14-15]</sup>。mtDNA 以环状双链 DNA 的形式存在, 对机体正常生命活动至关重要。由于 mtDNA 缺乏保护性组蛋白, 靠近 ROS 产生部位且修复能力有限, mtDNA 比核 DNA (nuclear DNA, nDNA) 更容易受到 ROS 的攻

击<sup>[16]</sup>。既往研究发现, 酸性胆盐在下咽癌癌变过程中诱导氧化应激和 DNA 损伤<sup>[17]</sup>。本研究发现酸性 DCA 诱导细胞氧化应激,  $\gamma$ H2AX 表达水平升高, 提示 ROS 攻击 DNA 并造成双链断裂。DNA 双链断裂 (DNA double strand break, DSB) 是最严重的损伤形式且难以完全修复, 当损伤持续发生时, 会引起大量异常 DNA 在细胞内蓄积<sup>[18]</sup>。



A: Western blot 检测酸性DCA处理后cGAS、STING、p-NF-κB p65蛋白表达水平; B: RT-qPCR 检测DCA处理后IL-6及IL-1β mRNA表达水平; C: Western blot 检测cGAS抑制剂RU.521预处理后cGAS、STING、p-NF-κB p65蛋白表达水平; D: RT-qPCR 检测cGAS抑制剂RU.521预处理后IL-6及IL-1β mRNA表达水平。两组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ )。

图4 酸性DCA刺激对cGAS-STING信号通路的影响

Figure 4 Effects of acidic deoxycholic acid on cGAS-STING signaling pathway

真核细胞DNA存在于细胞核与线粒体,病理情况下,高水平氧化应激可诱导线粒体功能障碍,增强线粒体通透性转变,导致DNA损伤并从线粒体泄漏到胞质中<sup>[19]</sup>。胞质双链DNA可作为DAMP被PRR之一的cGAS检测到。既往研究发现,化疗药伊利替康会引起DNA损伤和双链DNA释放,激活cGAS-STING通路从而导致肠黏膜炎<sup>[20]</sup>。本研究探讨了酸性DCA刺激后mtDNA拷贝数及线粒体与DNA的共定位,结果表明mtDNA拷贝数减少并从线粒体释放到胞质中,提示mtDNA损伤后从线粒体释放,进而激活了cGAS-STING通路。

NF-κB是促炎基因表达的关键调节器之一,诱导促炎细胞因子IL-1β、IL-6、IL-8及TNF-α的转录<sup>[21]</sup>。既往研究证明,盐酸通过激活NF-κB通路刺激人食管上皮细胞系(Het-1a)分泌炎症因子<sup>[11]</sup>。暴露于过量锰可通过激活cGAS-STING/NF-κB通路诱导神经炎症<sup>[22]</sup>。RU.521是应用广泛的cGAS抑制剂,可强效且选择性抑制人和鼠的cGAS酶活性和下游炎症发生<sup>[23]</sup>。RU.521能抑制小鼠脑静脉窦血栓模型中被激活的cGAS-STING/NF-κB通路以及下游炎症因子的分泌,改善神经功能障碍<sup>[24]</sup>。本研究发现,酸性DCA通过间接方式激活NF-κB通路,即cGAS-STING/NF-κB通路,并促进炎症因子IL-6及IL-1β的分泌,cGAS抑制剂RU.521处理后cGAS及STING的表达水平降低及p-NF-κB-p65表达水平被部分抑制,炎症因子IL-6及IL-1β分泌减少。上述

结果表明NF-κB介导的cGAS依赖性炎症反应可能在酸性DCA诱导的食管上皮细胞炎症中起重要作用。

综上所述,本研究发现,酸性DCA诱导人正常食管上皮细胞线粒体功能障碍,进一步导致mtDNA损伤及释放,从而激活cGAS-STING通路,抑制cGAS的激活可部分抑制酸性DCA诱导的人正常食管上皮细胞炎症,提示针对cGAS的靶向干预有望成为临床治疗RE的新靶点。

[参考文献]

- [1] MARET-OUDA J, MARKAR S R, LAGERGREN J. Gastroesophageal reflux disease: a review [J]. JAMA, 2020, 324(24): 2536-2547
- [2] EUSEBI L H, TELESE A, CIROTA G G, et al. Effect of gastro esophageal reflux symptoms on the risk of Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2022, 37(8): 1507-1516
- [3] SOUZA R F, HUO X F, MITTAL V, et al. Gastroesophageal reflux might cause esophagitis through a cytokine-mediated mechanism rather than caustic acid injury [J]. Gastroenterology, 2009, 137(5): 1776-1784
- [4] KANG D, KIM S H, HAMASAKI N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions [J]. Mitochondrion, 2007, 7(1/2): 39-44
- [5] RILEY J S, TAIT S W. Mitochondrial DNA in inflammation and immunity [J]. EMBO Rep, 2020, 21(4): e49799
- [9] YU C H, DAVIDSON S, HARAPAS C R, et al. TDP-43

- triggers mitochondrial DNA release via mPTP to activate cGAS/STING in ALS[J]. *Cell*, 2020, 183(3): 636-649
- [10] SHAN J, OSHIMA T, FUKUI H, et al. Acidic deoxycholic acid and chenodeoxycholic acid induce interleukin-8 production through p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase A in a squamous epithelial model [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(5): 823-828
- [11] RAFIEE P, NELSON V M, MANLEY S, et al. Effect of curcumin on acidic pH-induced expression of IL-6 and IL-8 in human esophageal epithelial cells (HET-1A): role of PKC, MAPKs, and NF-kappaB [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(2): 388-398
- [12] MORI M P, PENJWEINI R, KNUTSON J R, et al. Mitochondria and oxygen homeostasis [J]. *Febs J*, 2022, 289(22): 6959-6968
- [13] DVORAK K, PAYNE C M, CHAVARRIA M, et al. Bile acids in combination with low pH induce oxidative stress and oxidative DNA damage: relevance to the pathogenesis of Barrett's oesophagus [J]. *Gut*, 2007, 56(6): 763-771
- [14] TIWARI V, WILSON D M. DNA damage and associated DNA repair defects in disease and premature aging [J]. *Am J Hum Genet*, 2019, 105(2): 237-257
- [15] BURDAK - ROTHKAMM S, MANSOUR W Y, ROTHKAMM K. DNA damage repair deficiency in prostate cancer [J]. *Trends Cancer*, 2020, 6(11): 974-984
- [16] FANG C J, WEI X W, WEI Y Q. Mitochondrial DNA in the regulation of innate immune responses [J]. *Protein Cell*, 2016, 7(1): 11-16
- [17] SASAKI C T, DOUKAS S G, DOUKAS P G, et al. Weakly acidic bile is a risk factor for hypopharyngeal carcinogenesis evidenced by DNA damage, antiapoptotic function, and premalignant dysplastic lesions *in vivo* [J]. *Cancers*, 2021, 13(4): 852
- [18] SIMOVIC M, ERNST A. Chromothripsis, DNA repair and checkpoints defects [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 123: 110-114
- [19] ZHAO M, WANG Y Z, 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
- [21] LI Q, VERMA I M. NF-kappaB regulation in the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(10): 725-734
- [22] WU J, CHEN H, GUO T, et al. Sesamol alleviates manganese-induced neuroinflammation and cognitive impairment via regulating the microglial cGAS-STING/NF-kappaB pathway [J]. *Environ Pollut*, 2022, 319: 120988
- [23] WISER C, KIM B, VINCENT J, et al. Small molecule inhibition of human cGAS reduces total cGAMP output and cytokine expression in cells [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 7604
- [24] DING R, LI H, LIU Y, et al. Activating cGAS-STING axis contributes to neuroinflammation in CVST mouse model and induces inflammasome activation and microglia pyroptosis [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 137

[收稿日期] 2023-01-19

(责任编辑:蒋莉)