



线粒体 DNA 释放激活 cGAS-STING 通路 在肺纤维化中的机制

聂佳磊

(江苏海洋大学药学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 为探究线粒体 DNA (mtDNA) 释放介导 cGAS-STING 通路活化在特发性肺纤维化 (IPF) 中的作用及分子机制, 本研究以博来霉素小鼠模型与 MLE-12 肺泡上皮细胞为研究对象, 采用病理染色、透射电镜、荧光定量 PCR、蛋白免疫印迹及酶联免疫吸附法等技术, 观察线粒体损伤、mtDNA 胞质泄漏、cGAS-STING 通路活化及下游炎症与纤维化指标变化, 并通过通路抑制剂 H-151 进行干预验证。结果显示, IPF 模型中肺泡上皮线粒体明显损伤, mtDNA 大量释放至胞质并显著激活 cGAS-STING 通路, 促进炎症因子释放与胶原沉积; 抑制 STING 可有效缓解线粒体损伤、阻断炎症纤维化级联反应。提示 mtDNA-cGAS-STING 轴是 IPF 重要驱动通路, 可作为抗肺纤维化药物研发的潜在靶点。

关键词: 特发性肺纤维化; 线粒体 DNA; cGAS-STING; 药物靶点

收稿日期: 2026 年 1 月 9 日

中图分类号: R967

通讯作者: 聂佳磊 江苏海洋大学药学院

Mechanism of mitochondrial DNA release activating CGAs sting pathway in pulmonary fibrosis

Nie Jialei

(School of pharmacy, Jiangsu ocean university, Lianyungang, Jiangsu 222005)

Abstract: In order to explore the role and molecular mechanism of mitochondrial DNA (mtDNA) release mediated activation of CGAs sting pathway in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), the bleomycin mouse model and mle-12 alveolar epithelial cells were used to observe mitochondrial damage, mtDNA cytoplasmic leakage, activation of CGAs sting pathway and changes of downstream inflammation and fibrosis indicators by pathological staining, transmission electron microscopy, fluorescent quantitative PCR, Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay, and the intervention was verified by pathway inhibitor h-151. The results showed that in IPF model, the mitochondria of alveolar epithelium were significantly damaged, and a large amount of mtDNA was released into the cytoplasm, which significantly activated the CGAs sting pathway and promoted the release of inflammatory factors and collagen deposition; Inhibition of sting can effectively alleviate mitochondrial damage and block the inflammatory fibrosis cascade. It is suggested that mtDNA CGAs sting axis is an important driving pathway of IPF, and can be used as a potential target for the development of anti pulmonary fibrosis drugs.

Key words: Idiopathic pulmonary fibrosis; Mitochondrial DNA; cGAS-STING ; Drug targets

1 引言

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis,



IPF), 是一种慢性间质性肺疾病, 患者群体大多为中老年人群、同时该病的病程进展迅速, 并且预后极差, 临床以进行性呼吸困难、弥散功能下降与肺间质弥漫纤维化为主要特征, 患者确诊后中位生存期仅 2 ~ 3 年, 5 年生存率低于多数恶性肿瘤, 被称为类肿瘤性肺病^[1]。长期以来, IPF 机制研究多围绕慢性炎症、氧化应激与转化生长因子- β /Smad 通路展开, 以此开发的尼达尼布、吡非尼酮等药物仅能延缓肺功能下降, 无法逆转纤维化进程, 且存在明显不良反应, 临床应用受限^[2]。

随着免疫代谢与分子医学研究的深入, 研究者逐渐认识到 IPF 的核心启动环节为肺泡上皮细胞反复损伤与异常修复, 而线粒体功能紊乱是连接早期损伤与后续炎症放大、基质沉积的关键枢纽。线粒体拥有独立于核基因组的环状双链 DNA, 因其缺乏组蛋白保护与完善的修复系统, 在氧化应激、外源性毒素刺激下极易发生结构损伤并向胞质释放^[3]。释放至胞质的线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 富含未甲基化 CpG 序列, 具有强免疫原性, 可作为内源性损伤相关分子模式激活胞质固有免疫通路。

环鸟苷酸-腺苷酸合成酶-干扰素基因刺激因子 (cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes, cGAS-STING) 是胞质 DNA 的核心识别通路, 早期研究集中于抗病毒与肿瘤免疫, 近年研究证实其在肝、肾、肺等多器官纤维化中异常活化, 且主要由 mtDNA 激活^[4]。在肺组织中, 肺泡 II 型上皮细胞代谢旺盛、线粒体含量高, 是致纤维化因素的首要靶细胞, 其 mtDNA 泄漏被认为是启动肺部无菌性炎症的关键事件。但目前将线粒体损伤、mtDNA 释放、cGAS-STING 活化与 IPF 进展串联为完整级联通路的系统性研究仍较少, 从药学角度开展的靶点可行性分析更为有限。

基于此, 本研究从体内外模型系统探讨 mtDNA 释放对 cGAS-STING 通路的激活效应及其在 IPF 中的驱动作用, 并通过特异性抑制剂反向验证, 明确该通路的干预价值, 为抗纤维化新药靶点发现提供实验依据与理论支撑。

2 材料与方法

2.1 实验材料

本次实验选取 6 ~ 8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄

性小鼠开展动物实验, MLE-12 小鼠肺泡 II 型上皮细胞由本实验室常规传代与保存。主要试剂包括博来霉素、cGAS-STING 通路抑制剂 H-151、线粒体膜电位检测试剂盒、胞质 DNA 提取试剂盒、逆转录与荧光定量 PCR 试剂盒、Western Blot 相关试剂及白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒等, 均为分析纯级别。主要仪器包括透射电子显微镜、激光共聚焦显微镜、荧光定量 PCR 仪、蛋白电泳转印系统、高速冷冻离心机及多功能酶标仪等。

2.2 动物实验与分组

实验动物相关操作均符合国际实验动物伦理与福利规范, 将小鼠随机划分为空白对照组、博来霉素模型组与 STING 抑制剂干预组。采用气管滴注法对模型组与干预组小鼠进行 IPF 造模处理, 干预组在造模期间接受 H-151 腹腔注射干预, 对照组给予等量生理盐水作为对照, 常规饲养 21 d 后完成取材工作, 收集肺组织、血清及肺泡灌洗液样本。取少量肺组织行 4% 多聚甲醛固定与石蜡包埋切片, 其余组织经液氮快速冷冻后, 置于 -80 °C 冰箱低温保存备用。

2.3 细胞培养与处理

MLE-12 细胞置于适宜条件下常规培养, 实验分为正常对照组、氧化应激损伤组、外源性 mtDNA 转染组、抑制剂预处理组。采用过氧化氢构建氧化应激损伤模型, 通过脂质体转染外源性 mtDNA 模拟胞质 mtDNA 累积, 抑制剂组细胞在造模处理前先采用 H-151 进行预处理, 待培养周期结束后, 收集细胞沉淀与培养上清, 分别开展相关基因、蛋白及炎症因子的检测分析。

2.4 检测指标与方法

将肺组织制成石蜡切片后, 分别进行 HE 染色与 Masson 三色染色, 在光镜下观察病理形态与胶原纤维沉积情况; 利用透射电镜观察线粒体的超微结构变化, 通过 JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位水平; 提取胞质中的 DNA, 采用荧光定量 PCR 检测 mtDNA 的相对拷贝数; 通过实时荧光定量 PCR 与 Western Blot 分别检测 cGAS、STING、TBK1、p-IRF3、 α -SMA、Col-I 的基因与蛋白表达水平; 使用 ELISA 试剂盒检测血清及细胞上清液中 IL-6、



TNF- α 的含量。所有实验均重复 3 次以上, 采用 SPSS 软件进行单因素方差分析, 当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 特发性肺纤维化动物模型构建结果

空白对照组小鼠肺组织解剖结构完整, 肺泡壁平滑规整, 肺泡腔形态正常, 未见明显炎症浸润与间质增生, 肺泡间隔厚度均一, 具备健康肺组织的典型形态特征。与对照组相比, 博来霉素造模后的小鼠肺组织外观苍白、质地偏韧, 大体可见局灶性实变区, 组织损伤较为明显。HE 染色可见模型组肺泡结构塌陷断裂, 肺泡间隔广泛增厚, 间质内大量炎性细胞浸润, 部分肺泡腔闭塞融合, 正常组织结构破坏显著。Masson 染色显示, 模型组肺组织间质与肺泡壁处胶原纤维大量沉积, 蓝染区域明显扩大且排列紊乱, 提示博来霉素可成功诱导小鼠肺组织形成特征性间质纤维化改变, 与 IPF 核心病理表现一致。荧光定量 PCR 及蛋白免疫印迹结果表明, 模型组肺组织中 α -SMA 与 Col- I 的基因转录和蛋白表达均显著升高, 上述分子可反映成纤维细胞活化及基质沉积水平, 其高表达说明模型小鼠肺内纤维化进程显著激活。综合病理与分子检测结果证实, 本研究构建的博来霉素诱导 IPF 小鼠模型稳定性强、病理特征典型, 可满足后续线粒体损伤、mtDNA 释放及 cGAS-STING 通路相关机制研究的使用要求。

3.2 肺纤维化模型中线粒体损伤与 mtDNA 释放变化

在特发性肺纤维化模型进程中, 肺泡上皮细胞线粒体结构与功能均出现特征性、不可逆性的病

理损伤。透射电子显微镜下观察可见, 空白对照组小鼠肺泡上皮细胞内线粒体形态规整, 嵴结构密集清晰、排列有序, 基质密度均匀, 膜结构完整连续, 无肿胀、空泡等异常形态; 而模型组小鼠肺泡上皮细胞线粒体出现显著的超微结构损伤, 主要表现为线粒体体积异常肿胀, 形态由正常的短棒状转变为圆形或不规则状, 线粒体嵴出现大面积断裂、溶解甚至完全消失, 基质出现明显空泡化变性, 部分线粒体外膜与内膜完整性破坏, 出现破裂、缺损等结构损毁表现, 线粒体整体结构稳定性显著下降, 提示氧化应激与博来霉素毒性已对线粒体造成严重的结构性破坏。线粒体膜电位检测结果显示, 模型组细胞线粒体红绿荧光比值较空白对照组出现极显著降低, JC-1 荧光探针聚集量显著减少, 单体形态比例大幅上升, 直接反映线粒体跨膜电位发生明显崩解, 线粒体呼吸链功能受阻, 能量代谢与离子稳态调控功能出现严重障碍, 是线粒体功能衰竭的典型表现。胞质 DNA 提取与荧光定量 PCR 检测结果显示, 模型组小鼠肺组织胞质组分中 mtDNA 的相对拷贝数较空白对照组升高数倍, 差异具有显著统计学意义 (如表 3-1), 说明在 IPF 病理进程中, 受损线粒体膜通透性转换孔异常开放, 膜完整性丧失, 大量 mtDNA 从线粒体基质泄漏至胞质中, 且胞质内 mtDNA 的累积量与肺组织病理损伤程度、胶原沉积面积、炎症浸润水平呈现明显的正相关关系, 随着纤维化进程的加重, mtDNA 泄漏量持续上升, 证实 mtDNA 胞质释放是 IPF 发生发展过程中持续存在的关键上游病理事件。

表 3-1 胞质 DNA 提取与荧光定量 PCR 检测结果

组别	线粒体膜电位(红绿荧光比值)	胞质 mtDNA 相对拷贝数	线粒体嵴完整率(%)	线粒体外膜破损率(%)
空白对照组	3.82 ± 0.31	1.00 ± 0.12	92.5 ± 3.2	4.8 ± 1.5
博来霉素模型组	1.27 ± 0.25 Δ	8.63 ± 0.79 Δ	35.7 ± 4.6 Δ	68.3 ± 5.9 Δ
抑制剂干预组	2.95 ± 0.28 Δ #	3.12 ± 0.45 Δ #	76.2 ± 3.8 Δ #	23.5 ± 3.1 Δ #

3.3 肺纤维化进程中 cGAS-STING 通路的活化情况

为明确 mtDNA 泄漏后下游固有免疫通路的激活状态, 本研究对 cGAS-STING 通路核心分子及其下游信号、炎症与纤维化效应分子进行了系统

检测。在体内模型中, 模型组小鼠肺组织 cGAS、STING 的 mRNA 表达量与蛋白表达水平较空白对照组均呈现显著上调, 下游关键激酶 TBK1 与转录因子 IRF3 的总蛋白表达无明显变化, 但磷酸化水平 (p-TBK1/TBK1、p-IRF3/IRF3) 出现极显著升

高,表明 cGAS-STING 通路在 IPF 模型中未出现总蛋白上调主导的激活,而是以磷酸化级联活化为核心模式,通路处于持续、高强度的过度激活状态。在体外细胞实验中,采用过氧化氢诱导 MLE-12 肺泡 II 型上皮细胞氧化应激损伤后,细胞内同样出现 mtDNA 泄漏增加、cGAS 与 STING 表达升高、TBK1-IRF3 磷酸化水平上升的趋势,与体内模型结果高度一致,证实 cGAS-STING 通路激活是体内外 IPF 模型中共有的核心分子事件。随着 cGAS-STING 通路的过度活化,下游炎症相关因子转录与分泌水平出现显著升高,模型组小鼠血清、肺泡

灌洗液及细胞培养上清中 IL-6、TNF- α 的含量均较对照组极显著上升(如表 3-2),上述促炎因子的大量释放可进一步招募循环免疫细胞向肺组织浸润,放大局部无菌性炎症反应,形成持续且难以消退的慢性炎症微环境。在炎症信号的持续刺激下,肺成纤维细胞被持续激活, α -SMA、Col-I、纤连蛋白等纤维化标志分子的合成与分泌持续增加,细胞外基质大量沉积并难以降解,最终推动肺组织从单纯的炎症损伤逐步向不可逆的纤维化重塑方向发展,形成“mtDNA 释放-通路激活-炎症放大-纤维化进展”的正向病理循环。

表 3-2 肺纤维化进程中 cGAS-STING 通路的活化情况

组别	cGAS 蛋白相对表达	STING 蛋白相对表达	p-TBK1/TBK1 比值	IL-6(pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	Col- I 蛋白相对表达
空白对照组	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.09	0.21 \pm 0.04	23.5 \pm 3.6	18.7 \pm 2.9	1.00 \pm 0.13
博来霉素模型组	3.72 \pm 0.35 Δ	4.15 \pm 0.42 Δ	0.89 \pm 0.08 Δ	156.8 \pm 12.4 Δ	112.3 \pm 9.7 Δ	5.83 \pm 0.51 Δ
抑制剂干预组	1.86 \pm 0.22 Δ #	2.03 \pm 0.25 Δ #	0.43 \pm 0.06 Δ #	68.4 \pm 7.2 Δ #	52.6 \pm 6.3 Δ #	2.75 \pm 0.32 Δ #

3.4 抑制 cGAS-STING 通路对肺纤维化的干预效应

为进一步验证 cGAS-STING 通路在 mtDNA 驱动肺纤维化中的核心介导作用,本研究采用通路特异性抑制剂 H-151 对 STING 蛋白的活化进行靶向阻断,通过回救实验从反向验证通路功能。动物体内干预结果显示,经 H-151 腹腔注射干预后,IPF 小鼠肺组织大体形态与病理损伤程度均得到显著改善。分子水平检测结果显示,H-151 干预可显著下调肺组织中 STING 蛋白的活化水平,使 TBK1 与 IRF3 的磷酸化水平显著回落,cGAS-STING 通路的过度激活状态被有效逆转,同时下游 IL-6、TNF- α 等促炎因子的 mRNA 与蛋白表达水平均较模型组显著下降,炎症微环境得到有效控制。体外细胞实验结果显示,在氧化应激或外源性 mtDNA 转染诱导的细胞损伤模型中,H-151 预处理可显著抑制 cGAS-STING 通路活化,降低促炎因子与纤维化标志分子的高表达(如图 3-1),同时有效改善线粒体超微结构损伤,提升线粒体膜电位水平,减少 mtDNA 向胞质的持续泄漏,打破“线粒体损伤-mtDNA 释放-通路激活-进一步线粒体损伤”的恶性循环。综合体内外干预实验结果可以证实,cGAS-STING 通路是 mtDNA 泄漏后介导肺部慢性

炎症与纤维化进程的必需效应通路,阻断该通路的异常活化能够直接中断 mtDNA 驱动的炎症-纤维化级联反应,对肺组织损伤、线粒体功能紊乱及纤维化进展均具有显著的缓解与保护作用,从因果层面证实 mtDNA-cGAS-STING 轴是特发性肺纤维化发生发展的关键驱动通路。

4 讨论

IPF 是由多信号、多通路共同调控的复杂疾病,传统以炎症与 TGF- β /Smad 为核心的研究体系难以解释疾病早期启动、慢性炎症持续放大及临床药物疗效有限等关键问题。本研究从线粒体代谢紊乱与固有免疫异常激活的交叉角度,证实 mtDNA-cGAS-STING 轴是 IPF 发生发展的核心驱动通路,完善了 IPF 免疫代谢调控网络,为新型药物靶点挖掘提供了实验依据。

线粒体是细胞内氧化应激与能量代谢的核心细胞器,mtDNA 因缺乏组蛋白保护与高效修复系统,在博来霉素、活性氧等刺激下极易损伤泄漏^[5]。肺泡 II 型上皮细胞线粒体丰富、代谢活跃,是 mtDNA 泄漏的主要来源。本研究发现,纤维化早期即可出现线粒体结构与功能异常,mtDNA 释放显著早于明显炎症与胶原沉积,证明 mtDNA 泄漏是 IPF 的上游启动事件,而非纤维化继发改变。

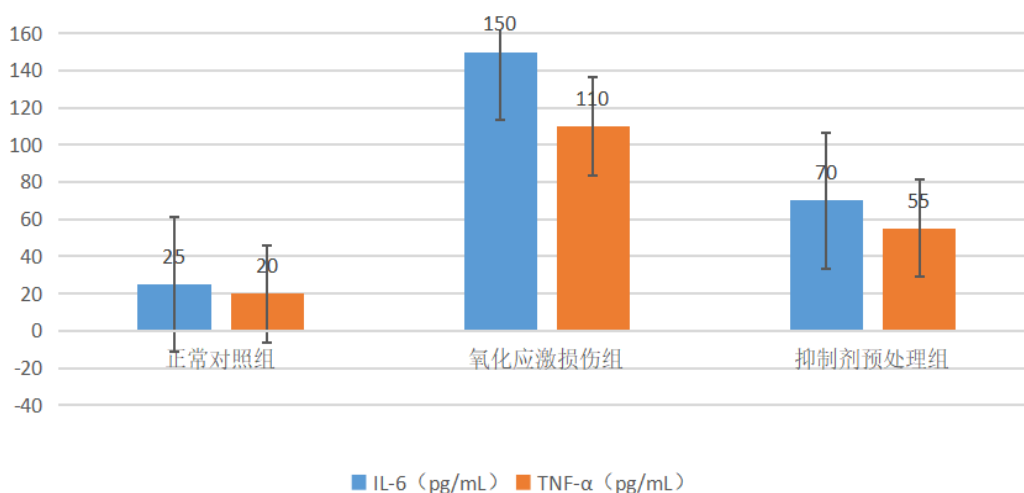


图 3-1 抑制 cGAS-STING 通路对肺纤维化的干预效应

mtDNA 进入胞质后可被 cGAS 特异性识别, 催化合成 cGAMP 并激活 STING, 通过 TBK1-IRF3/NF- κ B 轴启动下游炎症转录程序^[6]。本研究显示, cGAS-STING 活化程度与 mtDNA 释放量呈显著正相关, 过度激活的通路可引发持续无菌性炎症, 长期驱动成纤维细胞活化与基质沉积, 构成 IPF 进展的核心病理链条。使用 H-151 抑制 STING 可有效阻断上述级联反应, 同时改善线粒体稳态, 为通路靶向干预提供了直接实验支持。

从药学转化角度, mtDNA 可作为 IPF 无创诊断标志物, 外周血清游离 mtDNA 水平可反映疾病活动度, 联合现有标志物可提升早期诊断效能^[7]。cGAS-STING 通路靶点清晰、抑制剂成熟, 适合开展小分子筛选与天然药物活性评价, 结合海洋生物资源优势, 可进一步挖掘具有高选择性与低毒性的新型抗纤维化候选化合物。本研究尚未深入探讨线粒体自噬等上游调控机制, 也未开展人源临床样本验证, 后续可从上述方向进一步拓展, 为临床转化提供更完善的理论与实验支撑。

5 结论

IPF 进程中, 肺泡上皮细胞线粒体结构与功能受损, 导致 mtDNA 大量释放至胞质并持续激活 cGAS-STING 通路, 通过促进炎症因子释放、成纤维细胞活化与细胞外基质沉积, 形成“线粒体损伤 - mtDNA 泄漏 - 免疫激活 - 纤维化进展”的病理性级联循环。靶向抑制 cGAS-STING 通路可有效阻断 mtDNA 介导的炎症放大与纤维化进展, 减

轻肺组织病理损伤。mtDNA-cGAS-STING 信号轴是 IPF 的关键调控通路, 具备作为抗纤维化药物治疗靶点的潜在价值。

参考文献:

- [1] 李仲普, 谭光波, 胡学军. 补肺活血胶囊联合麦门冬汤治疗特发性肺纤维化的临床疗效 [J]. 世界复合医学 (中英文), 2025, 11 (07):11-15.
 - [2] 王沁, 宋德胤, 赵毅超. 特发性肺纤维化急性加重的影响因素及预测模型构建 [J]. 新乡医学院学报, 2025, 42 (12):998-1003.
 - [3] 唐宇, 杨旭丽, 杨强, 等. 桂枝茯苓丸调控 mtDNA/NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路抗肝纤维化的作用及机制 [J/OL]. 中国实验方剂学杂志, 1-11 [2026-02-01].
 - [4] 王强, 柴志欣, 邓玉露, 等. cGAS-STING 激动剂 cGAMP 可增强自然杀伤细胞抗胃癌效应 [J/OL]. 南方医科大学学报, 1-9 [2026-02-01].
 - [5] 刘洪文. 按压手法治疗骨骼肌慢性无菌性炎症的动力学参数优化及机制研究 [D]. 南方医科大学, 2025.
 - [6] 李晶晶, 努尔阿米娜·铁力瓦尔迪, 韩利梅, 等. PDRN 调控 cGAS-STING 信号通路改善急性肺栓塞大鼠肺损伤的机制研究 [J]. 西部医学, 2026, 38 (01):20-26.
 - [7] 黄伟业, 黄建江, 许洁. 含有外周血清游离 DNA 保存液的血细胞提取基因组 DNA 行 NGS 检测的可行性分析 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2025, 41 (09):1245-1248.
- 作者简介: 聂佳磊 (2004-), 女, 汉族, 江苏连云港人, 江苏海洋大学药学院本科在读学生, 主要研究方向为肺纤维化靶向药物研究。