

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2026.09.007
文章编号: 1005-8982 (2026) 09-0041-08

实验研究·论著

基于GRP78-ATF6通路探讨沉默SAT1对顺铂诱导耳蜗毛细胞损伤的影响*

侯小娟, 蒋慧, 刘静, 丁伟, 吴梅

(新疆维吾尔自治区人民医院 耳鼻喉诊疗中心, 新疆 乌鲁木齐 830001)

摘要: **目的** 探究精胺/亚精胺N[1]-乙酰基转移酶(SAT1)在顺铂诱导小鼠来源的永生听觉毛细胞样细胞系(HEI-OC1)内质网应激中的作用机制,探讨SAT1对顺铂诱导耳蜗毛细胞损伤的影响。**方法** 将HEI-OC1细胞系按siNC、siSAT1、siNC+顺铂(30 μmol/L)、siSAT1+顺铂(30 μmol/L)分组,通过转染靶向SAT1的siRNA并联合顺铂处理,采用CCK-8法检测各组0、24、48、72 h细胞增殖活力;采用流式细胞术和透射电镜分析细胞凋亡率与超微结构变化;采用Western blotting法检测内质网应激标志物(IRE1α、XBP1s、GRP78、ATF6)及凋亡蛋白Caspase-12的表达。**结果** 4种SAT1-siRNA转染细胞24 h后均能沉默SAT1基因的表达,其中siSAT1-740组SAT1-siRNA的表达最低($P < 0.05$),因此选用siSAT1-740进行后续实验(表述为siSAT1)。Western blotting结果表明,siNC组的SAT1蛋白表达水平高于siSAT1组($P < 0.05$)。CCK-8实验结果表明,敲低SAT1能够显著缓解顺铂对HEI-OC1细胞的增殖抑制作用($P < 0.05$)。流式细胞术与透射电镜检测表明,敲低SAT1不仅能显著降低顺铂诱导的细胞早期、晚期及总凋亡率($P < 0.05$),还能从形态上明显改善染色质固缩与核碎裂等凋亡特征。Western blotting结果表明,各组细胞SAT1、IRE1α、XBP1s、GRP78、ATF6、Caspase-12蛋白表达比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);在顺铂诱导的内质网应激条件下,沉默SAT1能够上调GRP78蛋白的表达($P < 0.05$);下调IRE1α、XBP1s、ATF6、Caspase-12的表达($P < 0.05$)。**结论** 沉默SAT1基因后可能通过调控GRP78/ATF6通路,拮抗顺铂导致的细胞损伤,为药物性耳毒性的防治提供了潜在新靶点。

关键词: 精胺/亚精胺N[1]-乙酰基转移酶;内质网应激;GRP78/ATF6信号轴;药物性耳毒性

中图分类号: R764.3

文献标识码: A

Investigating the effect of silencing SAT1 on cisplatin-induced damage to cochlear hair cells based on the GRP78-ATF6 pathway*

Hou Xiao-juan, Jiang Hui, Liu Jing, Ding Wei, Wu Mei

(Department of Otolaryngology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 830001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 (SAT1) in cisplatin-induced endoplasmic reticulum stress in mouse-derived immortalized auditory hair cell-like HEI-OC1 cells, and to define the impact of SAT1 on cisplatin-induced damage to cochlear hair cells. **Methods** HEI-OC1 cells were divided into four groups: siRNA negative control group (siNC), SAT1 gene silencing group (siSAT1), negative control with cisplatin treatment group (siNC + DDP), and SAT1 gene silencing with cisplatin treatment group

收稿日期: 2025-09-19

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金青年科学基金(2023D01C226);新疆维吾尔自治区人民医院院内项目(20240201)
[通信作者] 吴梅, E-mail: 576537345@qq.com

(siSAT1 + DDP). The cells were transfected with SAT1-targeting siRNA and subsequently treated with cisplatin. Cell proliferation from 0 to 72 h was assessed using the CCK-8 assay; apoptosis and ultrastructural changes were analyzed by flow cytometry and transmission electron microscopy; endoplasmic reticulum stress markers (IRE1 α , XBP1s, GRP78, ATF6) and apoptotic protein Caspase-12 were detected by Western blotting. **Results** All four SAT1-siRNA treatments effectively silenced SAT1 gene expression 24 hours post-transfection, with the most pronounced reduction observed in the siSAT1-740 group ($P < 0.05$). Consequently, the siSAT1-740 group was selected for subsequent experiments. Western blotting results showed that the protein expression level of SAT1 in the siNC group was significantly higher than that in the siSAT1 group ($P < 0.05$). Flow cytometry and transmission electron microscopy revealed that SAT1 knockdown not only significantly reduced DDP-induced early, late, and total apoptosis rates ($P < 0.05$), but also markedly improved apoptotic features such as chromatin condensation and nuclear fragmentation in morphological terms. Western blotting results indicate that the expression levels of SAT1, IRE1 α , XBP1s, GRP78, Caspase-12, and ATF6 proteins exhibited statistically significant differences ($P < 0.05$) across different treatment groups. Under DDP-induced endoplasmic reticulum stress conditions, silencing SAT1 upregulates GRP78 protein expression ($P < 0.05$) while downregulating IRE1 α , ATF6, Caspase-12 and XBP1s expression ($P < 0.05$). **Conclusion** The study revealed that silencing the SAT1 gene may counteract cisplatin-induced cellular damage by regulating the GRP78/ATF6 pathway, thus identifying SAT1 as a potential novel therapeutic target for preventing and treating drug-induced ototoxicity. CCK-8 assays demonstrated that SAT1 knockdown significantly alleviated the proliferation-inhibitory effect of DDP on HEI-OC1 cells ($P < 0.05$).

Keywords: spermidine/spermin1-acetyltransferase 1; endoplasmic reticulum stress; GRP78/ATF6 signalling axis; drug-induced ototoxicity

顺铂作为临床广泛应用的抗肿瘤药物,其治疗价值显著,但多种毒性反应严重制约了临床应用,尤其是耳毒性、肾毒性和神经毒性等^[1]。其中,顺铂所致耳毒性的病理生理机制以内耳毛细胞氧化损伤与凋亡为主^[2],临床多表现为双侧、进行性、不可逆的高频感觉神经性听力下降,常伴发耳鸣,部分患者可出现眩晕症状^[3-4]。顺铂的耳毒性作用主要靶向耳蜗内的感觉上皮及神经结构,包括毛细胞、血管纹和螺旋神经节神经元^[5-7]。其中,外毛细胞的特异性损伤与丢失最为显著^[8],目前被认为是顺铂耳毒性发生的关键病理基础。临床数据显示,高达 80% 的顺铂治疗患者会出现药物相关性听力损失^[9]。这种听力损伤具有永久性特征,不仅对患者的生理功能造成损害,还会对其心理健康及社会适应能力产生长期显著的负面影响。尽管生理盐水联合利尿剂疗法已被证实能有效预防肾毒性,但在顺铂所致耳毒性的防治领域,目前仍缺乏突破性进展^[10]。

研究表明,顺铂肾毒性与多胺分解代谢的异常激活密切相关。在顺铂诱导的急性肾损伤模型中,多胺分解代谢的关键限速酶——精胺/亚精胺 N[1]-乙酰基转移酶(spermidine/spermine N1-acetyltransferase, SAT1)和精胺氧化酶(spermine

oxidase, SMOX)的表达水平均显著上调,基因敲除 SAT1/SMOX 或药物中和其代谢产生的过氧化氢(H₂O₂)与氨基丙醛,均能有效减轻肾损伤,提示该通路是顺铂毒性的关键介质;在机制上,SAT1驱动的多胺分解代谢增强会触发内质网应激反应,表现为 eIF2 α 磷酸化及免疫球蛋白重链结合蛋白(BiP)、CCAAT/增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein)同源蛋白 CHOP 等标志物上调,并最终激活半胱天冬酶-3(cysteine-containing aspartate-specific protease-3, Caspase-3)依赖性凋亡通路^[11]。因此,SAT1 成为干预顺铂肾毒性的一个有潜力的分子靶点。顺铂通过增强多胺分解代谢及其毒性产物诱导内质网应激反应,介导肾小管细胞凋亡,在急性肾损伤发病中起到关键作用。本研究前期实验通过高通量测序发现 SAT1 在顺铂处理的 HEI-OC1 细胞中高表达,可能在顺铂诱导的毛细胞损伤中发挥重要作用^[12]。因此,为探讨 SAT1 在顺铂诱导的内质网应激中的作用,本研究采用 RNA 干扰技术,通过向小鼠来源的永生听觉毛细胞样细胞系(House Ear Institute-Organ of Corti 1, HEI-OC1)转染靶向 SAT1 基因的特异性小干扰 RNA,以敲低其表达,进而观察其对内质网应激相关指标的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

siRNA 购自苏州吉玛基因股份有限公司, DMEM 高糖基础培养基、优级胎牛血清、青霉素-链霉素溶液(双抗, 100×)、胰酶细胞消化液(0.25% 胰酶, 含 EDTA, 不含酚红)、磷酸盐缓冲液(1×PBS)均购自旗赛生物科技(武汉)有限公司, Opti-MEM®I (1X)+GlutaMAX™-1、lipofectamine 2000 均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司, HEI-OC1 细胞系购自赛百慷生物技术有限公司。

1.2 HEI-OC1 细胞的培养与 siSAT1 转染

首先进行 HEI-OC1 细胞复苏, 培养基为 DMEM 高糖基础培养基加 10% 胎牛血清加 1% 青霉素-链霉素溶液。从液氮取出细胞快速放入 37 °C 水浴溶解, 转移至含 5 mL 培养基离心管, 1 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清液, 再用完全培养基悬浮细胞接种培养。当细胞密度达 80% 时传代, 弃去培养基, PBS 清洗, 加 1 mL 胰蛋白酶消化 1 min, 弃胰酶加完全培养基吹打成单细胞悬液, 按 1:4 比例传代培养。细胞转染时, 取对数生长期细胞以 5×10^5 个/孔细胞密度接种于 6 孔板培养过夜, 转染前 2 h 换无血清 DMEM 培养基。用 100 μ L 无血清 Opti-MEM 稀释 10 μ L siRNA (20 μ mol), 并用枪头轻轻混匀, 取 5 μ L 的 Lipofectamine™ 2000 稀释在 100 μ L Opti-MEM 中, 室温下分别静置 5 min, 混合 Lipofectamine™ 2000 和 siRNA 的稀释液, 轻轻混匀并在室温下静置 20 min, 每孔加 200 μ L 混合液, 6 h 后换正常培养基继续培养。针对小鼠 SAT1 基因, 设计并合成了 4 条靶向不同编码区的小干扰 RNA, 分别命名为 siSAT1-282、siSAT1-481、siSAT1-550 和 siSAT1-740。同时, 使用非靶向阴性对照 siRNA 作为对照 (siNC)。按照转染步骤对以上 5 组分别转染, 培养 24 h 后进行高效 siRNA 片段的筛选及验证。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应筛选靶向 SAT1 的高效 siRNA 片段

采用 TRIzol 法分别提取 siNC、siSAT1-282、siSAT1-481、siSAT1-550、siSAT1-740 细胞 RNA, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 SAT1 基因表达, 筛选靶向 SAT1 的高效 siRNA 片段。操作步骤: 向细胞加 1 mL TRIzol 试剂吹打裂解 10 min,

加 200 μ L 氯仿混匀静置 5 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后小心吸取上层无色水相 (400 ~ 500 μ L), 加入等体积的异丙醇, 静置 10 min, 再次离心后弃上清, 沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次, 室温空气干燥后溶于 20 μ L DEPC 水, 检测吸光度值评估纯度与浓度, 合格 RNA 于 -80 °C 保存。逆转录反应分两步, 先经 4×g DNA wiper Mix 处理去除基因组 DNA, 再用 5×HiScript II Select qRT SuperMix II 完成逆转录。qRT-PCR 反应体系: 2.0 μ L cDNA、各 0.2 μ L 正反向引物、5.0 μ L SYBR Green Master Mix 及 2.6 μ L H₂O, PCR 反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 60 s, 共 40 个循环。最后采集熔解曲线。设 3 复孔, cDNA 稀释 8 倍。所用引物为 Mus SAT1 片段, 内参基因所用引物为 Mus GAPDH 片段。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 SAT1 基因的相对表达量, 所用引物序列见表 1。siRNA 相关序列见表 2。经筛选, 选用 siSAT1-740 (后文表述为 siSAT1) 进行后续实验。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列	扩增片段长度/bp
Mus SAT1	正向: 5'-AATCTAAGCCAGGTTGCC-3'	140
	反向: 5'-TTGAAGAGCCTCCATCCC-3'	
Mus GAPDH	正向: 5'-ATGGGTGTGAACCACGAGA-3'	229
	反向: 5'-CAGGGATGATGTTCTGGGCA-3'	

表 2 siRNA 序列

siRNA 序列名称	序列	序列长度/nt
siNC	正向: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'	19
	反向: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA-3'	19
siSAT1-282	正向: 5'-GGCUAAAUUUAAAGAUCCGU-3'	19
	反向: 5'-ACGGAUCUUAAAUUUAGCC-3'	19
siSAT1-481	正向: 5'-GGACAUAGCAUUGUUGGU-3'	19
	反向: 5'-ACCCAACAAUGCUAUGUCC-3'	19
siSAT1-550	正向: 5'-CUUGAAGACUUCUUCGUGA-3'	19
	反向: 5'-UCACGAAGAAGUCUUCUUC-3'	19
siSAT1-740	正向: 5'-GGAGGCUCUUCUUCUUC-3'	19
	反向: 5'-UCAAUUCUUGAAGAGCCUCC-3'	19

1.4 Western blotting 验证靶向 SAT1 的高效 siRNA 片段

采用 Western blotting 检测高效 siRNA 片段转染

的细胞中 SAT1 蛋白表达以验证 siRNA 沉默效果,以 GAPDH 为内参蛋白。操作步骤:使用含 PMSF 和钼酸钠的 RIPA 裂解液于冰上提取细胞总蛋白;经 BCA 法定量后,蛋白质样品进行变性、SDS-PAGE 电泳分离,并湿转至 PVDF 膜;随后,用 5% 脱脂牛奶封闭,先后与特异性一抗(4 °C 孵育过夜)及 HRP 标记的二抗(室温孵育)结合;最后,采用 ECL 化学发光试剂进行显影,利用凝胶成像系统采集条带图像,并通过 Image-Pro Plus (IPP) 软件分析目标蛋白的相对灰度值。

1.5 CCK-8 法检测各组 HEI-OC1 细胞活力

取处于对数生长期、生长状态良好的 HEI-OC1 细胞,以 3×10^3 个/孔细胞密度接种于细胞培养 96 孔板,37 °C、5% 二氧化碳(CO₂)培养箱中培养过夜。按 siNC、siSAT1、siNC+ 顺铂(30 μmol/L)、siSAT1+ 顺铂(30 μmol/L) 分组分别转染 siRNA,添加顺铂,37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 0、24、48、72 h;每孔加入 15 μL 的 CCK-8 溶液,37 °C、5% CO₂ 培养箱内避光孵育 2 h;用酶标仪在 450 nm 波长处测量各孔的吸光度值。

1.6 流式细胞术检测各组 HEI-OC1 细胞凋亡率

取处于对数生长期、生长状态良好的 HEI-OC1 细胞,以 5×10^5 个/孔细胞密度接种于细胞培养 6 孔板,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。按 siNC、siSAT1、siNC+ 顺铂(30 μmol/L)、siSAT1+ 顺铂(30 μmol/L) 分组分别转染 siRNA,添加顺铂,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。采用 Annexin V-FITC/PI 双染法,通过流式细胞术定量检测细胞凋亡率。简要步骤如下:收集各组细胞,使用 Binding Buffer 重悬后,依次加入 Annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI)染色,室温避光孵育,于 1 h 内上机检测。凋亡细胞比率通过流式细胞仪配套软件分析获得,其中 Annexin V⁺/PI⁻ 细胞计为早期凋亡细胞,Annexin V⁺/PI⁺ 细胞计为晚期凋亡/坏死细胞。

1.7 透射电镜观察各组 HEI-OC1 细胞染色质和细胞核结构

为探究 SAT1 沉默与顺铂对 HEI-OC1 细胞超微结构(特别是染色质与细胞核)的影响,按 siNC、siSAT1、siNC+ 顺铂(30 μmol/L)、siSAT1+ 顺铂(30 μmol/L) 分组分别转染 siRNA,添加顺铂,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。按以下流程制备透射电

镜样品:细胞用 4 °C 预冷的 2.5% 戊二醛固定 1~2 h,离心成团,将细胞团块置于新鲜 2.5% 戊二醛中,4 °C 固定过夜;使用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗,1% 的锇酸 0.1 mol/L 磷酸缓冲液室温固定 2 h,再用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗。样本经梯度乙醇脱水后,依次用丙酮/812 包埋剂混合液与纯 812 包埋剂进行渗透与包埋,并于 60 °C 下聚合 48 h。最后,制备 60~80 nm 超薄切片,经铀铅双染后室温干燥过夜,于透射电子显微镜下观察。

1.8 Western blotting 检测各组 HEI-OC1 细胞内质网应激标志物和凋亡标志物表达

为探究 SAT1 沉默与顺铂处理对 HEI-OC1 细胞内质网应激与凋亡的影响,采用 Western blotting 检测内质网应激标志物[肌醇需求酶 1α(inositol-requiring enzyme 1α, IRE1α)、剪接型 X 盒结合蛋白(1 spliced x-box binding protein 1, XBP1s)、葡萄糖调节蛋白 78(glucose-regulated protein 78, GRP78)、激活转录因子 6(activating transcription factor 6, ATF6)]及半胱天冬酶-12(cysteine-containing aspartate-specific protease-3, Caspase-12) 的蛋白表达。按 siNC、siSAT1、siNC+ 顺铂(30 μmol/L)、siSAT1+ 顺铂(30 μmol/L) 分组分别转染 siRNA,添加顺铂,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。Western blotting 操作流程同 1.4。

1.9 统计学方法

数据分析采用 Graph Pad 9.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析,进一步两两比较,采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SAT1 siRNA 的筛选及验证

siNC、siSAT1-282、siSAT1-481、siSAT1-550、siSAT1-740 细胞 SAT1-siRNA 的相对表达量分别为(1.016 ± 0.217)、(0.391 ± 0.048)、(0.490 ± 0.103)、(0.301 ± 0.052)、(0.204 ± 0.041),各组比较,经方差分析,差异有统计学意义(*F* = 23.480, *P* = 0.000)。与 siNC 相比,4 种 SAT1-siRNA 转染细胞 24 h 后均能沉默 SAT1 基因的表达,其中,siSAT1-740 表达水平最低,沉默效果最好,因此选用 siSAT1-740(后文表

述为 siSAT1)进行后续实验。

Western blotting 结果显示, siNC 组与 siSAT1 组的 SAT1 蛋白表达分别为 (1.000 ± 0.057) 和 (0.227 ± 0.024) , 两组比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 14.960, P = 0.000$), siNC 组的 SAT1 蛋白表达高于 siSAT1 组。以上结果提示 siSAT1 转染成功。

2.2 沉默 SAT1 对顺铂诱导的 HEI-OC1 细胞增殖的影响

siNC 组、siSAT1 组、siNC+顺铂组、siSAT1+顺铂组 0、24、48、72 h 的细胞吸光度值比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的细胞吸光度值比较, 差异有统计学意义 ($F = 2\ 988.000, P = 0.000$); ②4 组细胞的吸光度值比较, 差异有统计学意义 ($F = 669.100, P = 0.000$); ③4 组细胞吸光

度变化趋势比较, 差异有统计学意义 ($F = 188.700, P = 0.000$)。见图 1 和表 3。

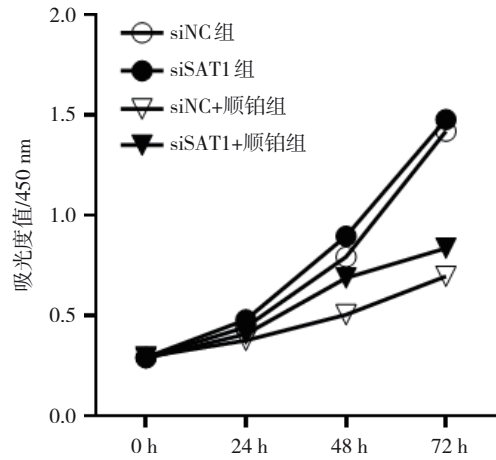


图 1 各组细胞不同时间点的细胞增殖情况

表 3 各组细胞不同时间点的吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
siNC 组	0.289 ± 0.012	0.442 ± 0.032	0.793 ± 0.028	1.420 ± 0.034
siSAT1 组	0.290 ± 0.025	0.479 ± 0.027	0.895 ± 0.029	1.478 ± 0.017
siNC+顺铂组	0.293 ± 0.012	0.376 ± 0.031	0.505 ± 0.030	0.696 ± 0.033
siSAT1+顺铂组	0.288 ± 0.021	0.407 ± 0.034	0.688 ± 0.026	0.836 ± 0.043

2.3 沉默 SAT1 对顺铂诱导的 HEI-OC1 细胞凋亡的影响

流式细胞术结果显示, siNC 组、siSAT1 组、siNC+顺铂组、siSAT1+顺铂组细胞早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 与 siNC 组比较, siSAT1 组细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 siNC 组比较, siNC+顺铂组细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率及

总凋亡率均升高 ($P < 0.05$); 与 siNC+顺铂组比较, siSAT1+顺铂组细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率均降低 ($P < 0.05$); 与 siSAT1 组比较, siSAT1+顺铂组细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率均升高 ($P < 0.05$)。见图 2 和表 4。

2.4 沉默 SAT1 对顺铂诱导的 HEI-OC1 细胞超微结构的影响

透射电镜结果显示, 与 siNC 组相比, siSAT1 组细胞形态无显著差异。而 siNC+顺铂组细胞表现出

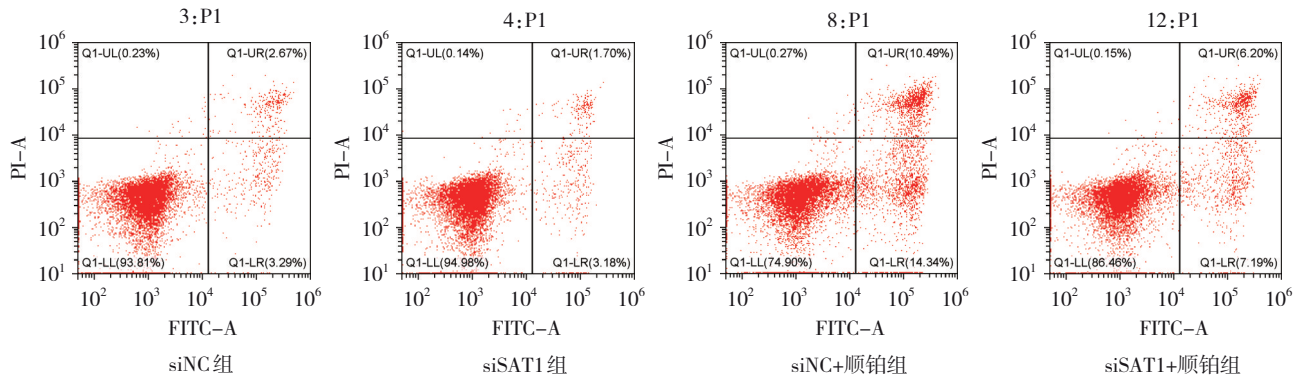
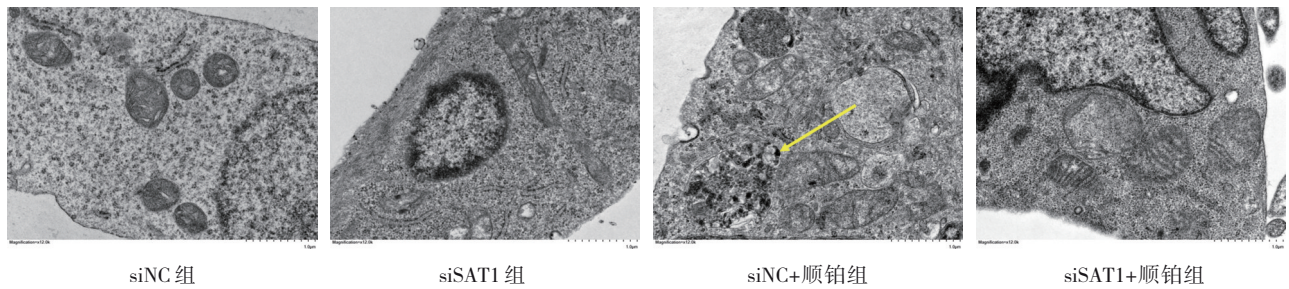


图 2 各组细胞凋亡的流式细胞图

表 4 各组 HEI-OC1 细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
siNC 组	0.300 ± 0.044	2.573 ± 0.186	5.763 ± 0.624
siSAT1 组	2.780 ± 0.395	1.987 ± 0.417	4.767 ± 0.541
siNC+顺铂组	13.977 ± 0.686	10.720 ± 0.650	24.697 ± 1.273
siSAT1+顺铂组	7.337 ± 0.862	6.360 ± 0.569	13.697 ± 1.420
F 值	201.600	196.000	231.400
P 值	0.000	0.000	0.000

明显的凋亡形态特征,包括染色质固缩、细胞核皱缩变形、染色质凝聚成块状并分布不均,同时伴有显著的核碎裂现象及细胞质空泡化等损伤。在 siSAT1+顺铂组中,细胞染色质固缩程度明显减轻,染色质分布相对均匀,核碎裂现象大幅减少,细胞核形态较为完整,仅见轻微皱缩,细胞质空泡化等损伤也得到明显改善。见图 3。



黄色箭头代表核碎裂现象。

图 3 各组细胞超微结构电镜图 (透射电镜 × 12 000, 1.0 μm)

2.5 沉默 SAT1 对顺铂诱导的 HEI-OC1 细胞内质网应激标志物及凋亡蛋白表达水平的影响

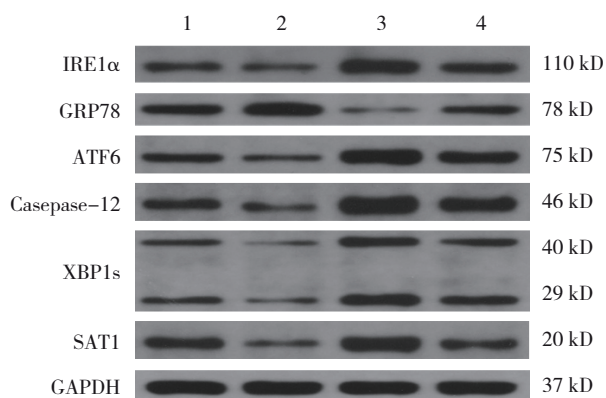
Western blotting 检测结果显示, siNC 组、siSAT1 组、siNC+顺铂组、siSAT1+顺铂组的 SAT1、IRE1α、XBP1s、GRP78、ATF6、Casepase-12 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, siSAT1 组的 GRP78 蛋白相对表达量高于 siNC 组 ($P < 0.05$),而 siSAT1 组的 IRE1α、XBP1s、ATF6、Casepase-12 蛋白相对表达量均低于 siNC 组 ($P < 0.05$); siNC+顺铂组的 GRP78 蛋白相对表达量低于 siNC 组 ($P < 0.05$),而 siNC+顺铂组的 IRE1α、XBP1s、ATF6、Casepase-12 蛋白相对表达量均高于 siNC 组 ($P < 0.05$); siSAT1+顺铂组的

GRP78 蛋白相对表达量高于 siNC+顺铂组 ($P < 0.05$),而 siSAT1+顺铂组的 IRE1α、XBP1s、ATF6、Casepase-12 蛋白相对表达量均低于 siNC+顺铂组 ($P < 0.05$); siSAT1+顺铂组的 GRP78 蛋白相对表达量低于 siSAT1 组 ($P < 0.05$),而 siSAT1+顺铂组的 IRE1α、XBP1s、ATF6、Casepase-12 蛋白相对表达量均高于 siSAT1 组 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 4。

上述结果表明,在顺铂诱导的内质网应激条件下,沉默 SAT1 能够上调 GRP78 的表达,同时抑制 IRE1α-XBP1s 和 ATF6 信号通路及其下游凋亡相关蛋白 Caspase-12 的激活,提示 SAT1 沉默可能通过调控 GRP78/ATF6 信号轴减轻内质网应激及细胞凋亡。

表 5 各组 SAT1、IRE1α、XBP1s、GRP78、ATF6、Casepase-12 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SAT1	IRE1α	XBP1s	GRP78	ATF6	Casepase-12
siNC 组	1.000 ± 0.122	1.000 ± 0.103	1.000 ± 0.101	1.000 ± 0.145	1.000 ± 0.027	1.000 ± 0.157
siSAT1 组	0.258 ± 0.112	0.523 ± 0.085	0.543 ± 0.102	1.301 ± 0.134	0.387 ± 0.146	0.413 ± 0.035
siNC+顺铂组	1.610 ± 0.200	2.055 ± 0.130	2.365 ± 0.322	0.260 ± 0.048	2.217 ± 0.251	2.111 ± 0.133
siSAT1+顺铂组	0.585 ± 0.118	1.470 ± 0.154	1.492 ± 0.101	0.617 ± 0.072	1.438 ± 0.120	1.451 ± 0.092
F 值	65.260	77.740	54.530	48.330	57.360	102.300
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



1: siNC组; 2: siSAT1组; 3: siNC+顺铂组; 4: siSAT1+顺铂组。

图4 各组细胞内质网应激及凋亡标志物蛋白表达条带图

3 讨论

顺铂是一种广泛用于治疗多种类型癌症的高效抗肿瘤药物,但其使用可能伴随耳毒性副作用,增加患者听力受损的风险^[7]。研究表明,顺铂首先影响耳蜗的外毛细胞,随后可能波及内毛细胞,且损伤程度会随着治疗剂量或时间的增加而加剧,影响范围从耳蜗的基底膜向顶端扩展^[13-14]。此外,顺铂能够促进耳蜗毛细胞的自噬过程,诱导与复制相关的DNA损伤,进而触发细胞凋亡^[15]。凋亡是细胞应对损伤的主动程序性死亡过程,顺铂诱导的细胞凋亡是其发挥细胞毒性的重要途径^[6]。本研究中,单独沉默SAT1对细胞凋亡无显著影响,但在顺铂干预下,沉默SAT1可显著降低细胞早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率,透射电镜下的超微结构变化(如染色质固缩减轻、核碎裂减少)进一步证实了这一结论。提示,SAT1在生理状态下对细胞凋亡的基础调控作用较弱,但其在顺铂诱导的应激条件下可被激活,成为促进凋亡的关键分子,而沉默SAT1能特异性阻断这一过程,从而减轻顺铂诱导的细胞凋亡。

研究表明,SAT1的激活和细胞内多胺分解代谢的增强,导致真核翻译起始因子2 α 的磷酸化水平上升,并促进了内质网应激反应相关蛋白—结合免疫球蛋白BiP/GRP78和CHOP/GADD153的表达。这些内质网应激反应标志物的上调与Caspase-3的激活并行,表明多胺代谢的调节可能通过影响内质网应激反应和细胞凋亡途径发挥作用^[11]。内质网是细胞内的重要细胞器,主要负责蛋白质的合成、加工、运输,并维持细胞内钙离子的平衡^[17]。然而,内质网的

功能可能因多种因素而受到干扰,引发内质网应激^[18]。在这种应激状态下,GRP78、IRE1和ATF6作为关键的调节因子,发挥着至关重要的作用。当内质网应激发生时,GRP78能够与IRE1和ATF6分离,并与未正确折叠的蛋白质结合,进而激活相关的信号转导途径。IRE1能够激活凋亡信号调节激酶,而ATF6则在高尔基体中被蛋白酶切割,进而调控促凋亡蛋白的表达^[19]。其中,GRP78/ATF6通路是内质网应激的关键信号轴,其过度激活可通过IRE1 α 、PERK等分子介导凋亡^[20]。

本研究在HEI-OC1中证实,沉默SAT1能够通过调控内质网应激反应关键分子,从而拮抗顺铂的细胞毒性。沉默SAT1后,GRP78表达显著上调,而促凋亡通路分子IRE1 α 、XBP1s、ATF6及Caspase-12的表达则受到抑制。基于此,推测SAT1沉默可能通过激活GRP78/ATF6轴,抑制内质网应激的过度激活,进而发挥细胞保护作用。然而,本研究对机制的解释仍停留在相关性层面,存在以下关键不足:首先,观察到GRP78与ATF6等分子的协同变化,但并未阐明SAT1如何直接或间接地调控GRP78/ATF6轴。有研究表明,在多胺分解代谢中,SAT1的活化会导致毒性产物(H_2O_2 /氨基丙醛)的积累,这些产物本身就是内质网应激反应的强大诱导剂^[11]。因此,本研究推测SAT1可能通过代谢产物(H_2O_2 /氨基丙醛)作为上游信号,进而调控GRP78的表达并影响ATF6等通路的活化。其次,内质网应激反应诱导的凋亡通常由CHOP/GADD153分子主导。前期研究已证实,SAT1诱导的多胺代谢增强可显著上调CHOP并激活Caspase-3^[11]。本研究检测到了Caspase-12的下降,却忽略了对核心促凋亡分子CHOP的探讨。这使得本研究提出的“抑制内质网应激向凋亡转化”的结论不够完整,无法确定SAT1的沉默是否同时抑制了CHOP依赖的经典凋亡通路。

综上所述,未来研究需在以下方面深入探索:一,直接检测SAT1沉默后细胞内多胺代谢产物的动态变化,明确其是否为GRP78/ATF6通路的上游触发信号;二,系统分析CHOP等关键分子的表达,以完整描绘SAT1调控内质网应激反应凋亡的通路,才能为SAT1作为干预靶点提供坚实且清晰的分子机制依据。

参 考 文 献 :

- [1] CRONA D J, FASO A, NISHIJIMA T F, et al. A systematic review of strategies to prevent cisplatin-induced nephrotoxicity[J]. *Oncologist*, 2017, 22(5): 609-619.
- [2] SLATTERY E L, WARCHOL M E. Cisplatin ototoxicity blocks sensory regeneration in the avian inner ear[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(9): 3473-3481.
- [3] RYBAK L P, MUKHERJEA D, RAMKUMAR V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention[J]. *Semin Hear*, 2019, 40(2): 197-204.
- [4] ESFAHANI MONFARED Z, KHOSRAVI A, SAFAVI NAINI A, et al. Analysis of cisplatin-induced ototoxicity risk factors in Iranian patients with solid tumors: a cohort, prospective and single institute study[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017, 18(3): 753-758.
- [5] GAO D M, YU H, LI B, et al. Cisplatin toxicology: the role of pro-inflammatory cytokines and GABA transporters in cochlear spiral ganglion[J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(45): 4820-4826.
- [6] DING D L, ZHANG J H, JIANG H Y, et al. Some ototoxic drugs destroy cochlear support cells before damaging sensory hair cells[J]. *Neurotox Res*, 2020, 37(3): 743-752.
- [7] PAKEN J, GOVENDER C D, PILLAY M, et al. A review of cisplatin-associated ototoxicity[J]. *Semin Hear*, 2019, 40(2): 108-121.
- [8] WANG X L, ZHOU Y Y, WANG D L, et al. Cisplatin-induced ototoxicity: from signaling network to therapeutic targets[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 157: 114045.
- [9] THOMAS A J, HAILEY D W, STAWICKI T M, et al. Functional mechanotransduction is required for cisplatin-induced hair cell death in the zebrafish lateral line[J]. *J Neurosci*, 2013, 33(10): 4405-4414.
- [10] KARASAWA T, STEYGER P S. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity[J]. *Toxicol Lett*, 2015, 237(3): 219-227.
- [11] ZAHEDI K, BARONE S, DESTEFANO-SHIELDS C, et al. Activation of endoplasmic reticulum stress response by enhanced polyamine catabolism is important in the mediation of cisplatin-induced acute kidney injury[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0184570.
- [12] 侯小娟, 刘静, 丁伟, 等. 顺铂诱导小鼠耳蜗毛细胞损伤差异表达基因和信号通路富集分析[J]. *现代医学研究(香港)*, 2025, (6): 42-48.
- [13] 赵宇亮, 李熙星. 顺铂耳毒性机制及耳保护策略研究进展[J]. *中华耳科学杂志*, 2021, 19(1): 167-171.
- [14] XU F L, CHENG Y J, YAN W Y. Up-regulation of autophagy and apoptosis of cochlear hair cells in mouse models for deafness[J]. *Arch Med Sci*, 2021, 17(2): 535-541.
- [15] DAMSMA G E, ALT A, BRUECKNER F, et al. Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(12): 1127-1133.
- [16] 孙盟, 查鑫宇, 牟能燕, 等. 基于线粒体自噬-凋亡途径探讨人参皂苷 Rh4 拮抗顺铂致肠黏膜屏障功能损伤的作用机制[J]. *中草药*, 2025, 56(10): 3535-3546.
- [17] MOHAMMED THANGAMEERAN S I, TSAI S T, HUNG H Y, et al. A role for endoplasmic reticulum stress in intracerebral hemorrhage[J]. *Cells*, 2020, 9(3): 750.
- [18] ITOH T, HATANO R, HORIMOTO Y, et al. IL-26 mediates epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor resistance through endoplasmic reticulum stress signaling pathway in triple-negative breast cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6): 520.
- [19] GELEN V, SENGUL E, YILDIRIM S, et al. The role of GRP78/ATF6/IRE1 and caspase-3/Bax/Bcl2 signaling pathways in the protective effects of gallic acid against cadmium-induced liver damage in rats[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2023, 26(11): 1326-1333.
- [20] MARKOULI M, STREPKOS D, PAPAVALASSIOLIOU A G, et al. Targeting of endoplasmic reticulum (ER) stress in gliomas[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 157: 104823.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 侯小娟, 蒋慧, 刘静, 等. 基于 GRP78-ATF6 通路探讨沉默 SAT1 对顺铂诱导耳蜗毛细胞损伤的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2026, 36(9): 41-48.

Cite this article as: HOU X J, JIANG H, LIU J, et al. Investigating the effect of silencing SAT1 on cisplatin-induced damage to cochlear hair cells based on the GRP78-ATF6 pathway[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2026, 36(9): 41-48.