

• 论著 •

调控 cGAS/STING 通路对油酸致急性肺损伤小鼠的保护机制

弥亮钰 丁文艳 杨莹莹 王芊霖 陈翔宇 谭紫琪 张小雨 郑敏 苏龙翔 隆云

中国医学科学院北京协和医院重症医学科, 北京 100730

通信作者: 隆云, Email: ly_icu@aliyun.com

【摘要】 目的 探讨环鸟苷酸-腺苷酸合酶/干扰素基因刺激因子(cGAS/STING)通路在油酸致小鼠急性肺损伤(ALI)中的作用机制。**方法** 按随机数字表法将雄性野生型 C57BL/6J 小鼠分为正常对照组、ALI 模型组及 5、50、500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 抑制剂预处理组,每组 10 只。经小鼠尾静脉注射 7 mL/kg 油酸构建 ALI 模型;正常对照组不予任何干预处理。抑制剂预处理组分别于制模前 1 h 腹腔注射相应剂量 cGAS 抑制剂 RU.521。各组于制模后 24 h 取血并处死小鼠,苏木素-伊红(HE)染色后,光镜下观察肺组织病理学改变并进行病理学评分;采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测肺组织 cGAS、STING、磷酸化 TANK 结合激酶 1(p-TBK1)、磷酸化干扰素调节因子 3(p-IRF3)、磷酸化核转录因子- κB p65(p-NF- κB p65)的蛋白表达;采用免疫组化法镜下观察肺组织 STING、p-NF- κB 阳性表达;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 β -干扰素(IFN- β)水平。**结果** 与正常对照组比较,ALI 模型组小鼠肺组织可见明显局灶性肺泡增厚,肺泡内出血,肺毛细血管充血,肺间质及肺泡中性粒细胞浸润,病理学评分显著升高(分: 10.33 ± 0.58 比 1.33 ± 0.58 , $P < 0.05$);肺组织 cGAS、STING、p-TBK1、p-IRF3、p-NF- κB p65 蛋白表达均显著升高[cGAS 蛋白(cGAS/ β -actin): 1.24 ± 0.02 比 0.56 ± 0.02 , STING 蛋白(STING/ β -actin): 1.27 ± 0.01 比 0.55 ± 0.01 , p-TBK1 蛋白(p-TBK1/ β -actin): 1.34 ± 0.03 比 0.22 ± 0.01 , p-IRF3 蛋白(p-IRF3/ β -actin): 1.23 ± 0.02 比 0.36 ± 0.01 , p-NF- κB p65 蛋白(p-NF- κB p65/ β -actin): 1.30 ± 0.02 比 0.53 ± 0.02 , 均 $P < 0.05$],肺组织 STING、p-NF- κB 阳性表达显著增加[STING(A 值): 0.51 ± 0.03 比 0.30 ± 0.07 , p-NF- κB (A 值): 0.57 ± 0.05 比 0.31 ± 0.03 , 均 $P < 0.05$];血清 IFN- β 水平显著升高(ng/L: 256.02 ± 3.84 比 64.15 ± 1.17 , $P < 0.05$)。给予 cGAS 抑制剂预处理后,肺泡结构完整性恢复,炎症细胞浸润减少,出血面积缩小,病理学评分呈剂量依赖性下降,肺组织 cGAS、STING、p-TBK1、p-IRF3、p-NF- κB p65 蛋白表达亦随抑制剂剂量升高呈逐渐下降趋势,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组与 ALI 模型组比较差异均有统计学意义[病理学评分(分): 2.67 ± 0.58 比 10.33 ± 0.58 , cGAS 蛋白(cGAS/ β -actin): 0.56 ± 0.03 比 1.24 ± 0.02 , STING 蛋白(STING/ β -actin): 0.67 ± 0.03 比 1.27 ± 0.01 , p-TBK1 蛋白(p-TBK1/ β -actin): 0.28 ± 0.01 比 1.34 ± 0.03 , p-IRF3 蛋白(p-IRF3/ β -actin): 0.32 ± 0.01 比 1.23 ± 0.02 , p-NF- κB p65 蛋白(p-NF- κB p65/ β -actin): 0.63 ± 0.01 比 1.30 ± 0.02 , 均 $P < 0.05$];与 ALI 模型组比较,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组肺组织 STING、p-NF- κB 阳性表达显著减少[STING(A 值): 0.40 ± 0.01 比 0.51 ± 0.03 , p-NF- κB (A 值): 0.43 ± 0.02 比 0.57 ± 0.05 , 均 $P < 0.05$],血清 IFN- β 水平显著下降(ng/L: 150.03 ± 6.19 比 256.02 ± 3.84 , $P < 0.05$)。**结论** cGAS/STING 通路在油酸致 ALI 小鼠中被激活,加重了炎症反应及肺损伤;RU.521 可抑制 cGAS,从而下调该通路蛋白及细胞因子表达,对肺组织起到保护作用。

【关键词】 急性肺损伤; 环鸟苷酸-腺苷酸合酶; 干扰素基因刺激因子**基金项目:**国家自然科学基金(82372181);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2023-I2M-2-002)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250104-00012

Protective mechanism of modulating cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase/stimulator of interferon gene pathway in oleic acid-induced acute lung injury in mice

Mi Liangyu, Ding Wenyan, Yang Yingying, Wang Qianlin, Chen Xiangyu, Tan Ziqi, Zhang Xiaoyu, Zheng Min, Su Longxiang, Long Yun

Department of Critical Care Medicine, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China

Corresponding author: Long Yun, Email: ly_icu@aliyun.com

【Abstract】 Objective To investigate the role and mechanism of the cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase/stimulator of interferon gene (cGAS/STING) pathway in oleic acid-induced acute lung injury (ALI) in mice. **Methods** Male wild-type C57BL/6J mice were randomly divided into five groups (each $n = 10$): normal control group, ALI model group, and 5, 50, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ inhibitor pretreatment groups. The ALI model was established by tail vein injection of oleic acid (7 mL/kg), while the normal control group received no intervention. The inhibitor pretreatment groups were intraperitoneally injected with the corresponding doses of cGAS inhibitor RU.521 respectively 1 hour before modeling. At 24 hours post-modeling, blood was collected, and mice were sacrificed. Lung tissue pathological changes were observed under light microscopy after hematoxylin-eosin (HE)

staining, and pathological scores were assessed. Western blotting was used to detect the protein expressions of cGAS, STING, phosphorylated TANK-binding kinase 1 (p-TBK1), phosphorylated interferon regulatory factor 3 (p-IRF3), and phosphorylated nuclear factor- κ B p65 (p-NF- κ B p65) in lung tissue. Immunohistochemistry was performed to observe STING and p-NF- κ B positive expressions in lung tissue. Serum interferon- β (IFN- β) levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with the normal control group, the ALI model group exhibited significant focal alveolar thickening, intra-alveolar hemorrhage, pulmonary capillary congestion, and neutrophil infiltration in the pulmonary interstitium and alveoli, along with markedly increased pathological scores (10.33 ± 0.58 vs. 1.33 ± 0.58 , $P < 0.05$). Protein expressions of cGAS, STING, p-TBK1, p-IRF3, and p-NF- κ B p65 in lung tissue significantly increased [cGAS protein (cGAS/ β -actin): 1.24 ± 0.02 vs. 0.56 ± 0.02 , STING protein (STING/ β -actin): 1.27 ± 0.01 vs. 0.55 ± 0.01 , p-TBK1 protein (p-TBK1/ β -actin): 1.34 ± 0.03 vs. 0.22 ± 0.01 , p-IRF3 protein (p-IRF3/ β -actin): 1.23 ± 0.02 vs. 0.36 ± 0.01 , p-NF- κ B p65 protein (p-NF- κ B p65/ β -actin): 1.30 ± 0.02 vs. 0.53 ± 0.02 , all $P < 0.05$], positive expressions of STING and p-NF- κ B in lung tissue were significantly elevated [STING (A value): 0.51 ± 0.03 vs. 0.30 ± 0.07 , p-NF- κ B (A value): 0.57 ± 0.05 vs. 0.31 ± 0.03 , both $P < 0.05$], and serum IFN- β levels were also significantly higher (ng/L: 256.02 ± 3.84 vs. 64.15 ± 1.17 , $P < 0.05$). The cGAS inhibitor pretreatment groups showed restored alveolar structural integrity, reduced inflammatory cell infiltration, and decreased hemorrhage area, along with dose-dependent lower pathological scores as well as the protein expressions of cGAS, STING, p-TBK1, p-IRF3 and p-NF- κ B p65 in lung tissue, with significant differences between the 500 μ g/kg inhibitor group and ALI model group [pathological score: 2.67 ± 0.58 vs. 10.33 ± 0.58 , cGAS protein (cGAS/ β -actin): 0.56 ± 0.03 vs. 1.24 ± 0.02 , STING protein (STING/ β -actin): 0.67 ± 0.03 vs. 1.27 ± 0.01 , p-TBK1 protein (p-TBK1/ β -actin): 0.28 ± 0.01 vs. 1.34 ± 0.03 , p-IRF3 protein (p-IRF3/ β -actin): 0.32 ± 0.01 vs. 1.23 ± 0.02 , p-NF- κ B p65 protein (p-NF- κ B p65/ β -actin): 0.63 ± 0.01 vs. 1.30 ± 0.02 , all $P < 0.05$]. Compared with the ALI model group, positive expressions of STING and p-NF- κ B in lung tissue were significantly reduced in the 500 μ g/kg inhibitor group [STING (A value): 0.40 ± 0.01 vs. 0.51 ± 0.03 , p-NF- κ B (A value): 0.43 ± 0.02 vs. 0.57 ± 0.05 , both $P < 0.05$], and serum IFN- β levels were also markedly reduced (ng/L: 150.03 ± 6.19 vs. 256.02 ± 3.84 , $P < 0.05$). **Conclusions** The cGAS/STING pathway is activated in oleic acid-induced ALI, leading to exacerbated inflammatory responses and increased lung damage. RU.521 can inhibit cGAS, thereby down-regulating the expression of pathway proteins and cytokines, and providing protection to lung tissue.

【Key words】 Acute lung injury; Cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase; Stimulator of interferon gene

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82372181); Chinese Academy of Medical Sciences Medical and Health Science and Technology Innovation Project (2023-I2M-2-002)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250104-00012

急性肺损伤 / 急性呼吸窘迫综合征 (acute lung injury/acute respiratory distress syndrome, ALI/ARDS) 是由直接或间接致病因素引起的以肺泡上皮细胞和肺微血管内皮细胞损伤为主要病理特征的临床综合征,其特征性表现为弥漫性肺间质及肺泡水肿、透明膜形成,最终导致急性呼吸功能衰竭。该疾病具有发病机制复杂、临床诊断缺乏特异性指标、预后不良等特点^[1]。ALI 病理过程涉及多种关键效应细胞的募集与活化,通过释放大量炎症细胞因子、趋化因子、活性氧自由基等介质,激活核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、信号转导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 等多条信号转导途径,进而引发过度的炎症反应,并导致肺组织损伤^[2-5]。

在哺乳动物细胞中,胞质 DNA 作为一种危险信号分子,可通过激活先天性免疫应答触发炎症反应。近年来发现,环鸟苷酸-腺苷酸合酶 (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase,

cGAS) 是一种胞质 DNA 识别受体,静息状态下为非活化状态。外源性 DNA 或线粒体 DNA 等双链 DNA 进入胞质后,可以与 cGAS 结合并激活干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon gene, STING),启动 TANK 结合激酶 1-干扰素调节因子 3 (TANK-binding kinase 1-interferon regulatory factor 3, TBK1-IRF3) 信号级联反应,促进 I 型干扰素 (interferon- I , IFN- I) 和促炎细胞因子产生^[6-8]。研究表明, cGAS-STING 信号通路在维持机体免疫防御功能的同时,其过度激活可能导致病理性炎症反应,参与多种自身免疫性疾病的发生发展^[9-11]。RU.521 作为一种高效选择性 cGAS 抑制剂,可特异性阻断 cGAS 介导的干扰素表达上调^[12]。近年来关于 cGAS/STING 通路的研究逐渐增多,但其在 ALI 中的作用研究较少。

本研究拟通过小鼠尾静脉注射油酸建立 ALI 模型,系统观察肺组织及细胞中 cGAS/STING 信号通路的活化特征及其在肺损伤进程中的作用机制,并通过 cGAS 特异性抑制剂 RU.521 深入探讨调控该信号通路对 ALI 的潜在保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物: SPF 级雄性野生型 C57BL/6J 小鼠, 6~8 周龄, 体质量 15~20 g, 购自北京斯贝福生物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK(京)2019-0010, 在北京协和医院动物实验中心饲养, 温度 21~25℃, 湿度 55%~65%, 12 h/d 照明, 自由正常饮水、进食, 适应性饲养 1 周。

1.2 动物分组及处理: 将小鼠按随机数字表法分为正常对照组、ALI 模型组及 5、50、500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 抑制剂预处理组, 每组 10 只。经小鼠尾静脉注射 7 mL/kg 油酸制备 ALI 模型; 正常对照组小鼠不给予任何干预处理。抑制剂预处理组小鼠分别于制模前 1 h 腹腔注射相应剂量 cGAS 抑制剂 RU.521, 根据病理和蛋白定量分析结果选择最佳抑制剂剂量进行后续实验。

1.3 伦理学: 本研究中所有操作符合动物伦理学标准, 并经中国医学科学院北京协和医院伦理委员会审议和批准(审批号: XHDW-2024-76)。

1.4 检测指标及方法: 制模后 24 h 麻醉小鼠, 取眼球血置于小离心管中, 静置后离心取血清; 然后开胸取肺组织, 置于 4% 多聚甲醛中固定或置于干冰中用于后续实验。

1.4.1 肺组织病理学观察: 将厚度为 3 mm 的肺组织样本置于组织包埋模具中, 加入 4% 多聚甲醛固定液, 4℃固定 24 h; 用流水冲洗后转移到 75% 乙醇中; 依次浸泡在不同浓度乙醇中脱水, 经过二甲苯处理后, 用石蜡包埋; 切片后, 将组织片放置在载玻片上, 并在 65℃烤箱中烤片 1 h。染色过程包括以下步骤: 组织片在二甲苯中脱蜡, 依次在无水乙醇和 95% 乙醇中浸泡; 用蒸馏水冲洗后, 苏木素染色; 自来水冲洗后, 用 1% 盐酸乙醇分化, 再用 1% 氨水返蓝; 用 0.5% 伊红染料染色, 自来水冲洗。组织片在不同浓度乙醇中分化, 并通过二甲苯进行透明处理后, 用中性树胶封片。光镜下观察并进行病理学评分。肺组织病理学评估由专业病理医师用双盲法进行, 依据标准病理学评分系统对肺泡腔出血、炎症细胞浸润、肺泡壁增厚、透明膜形成等指标进行分析。

1.4.2 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测肺组织 cGAS、STING、磷酸化 TBK1 (phosphorylated TBK1, p-TBK1)、磷酸化 IRF3 (phosphorylated IRF3, p-IRF3)、磷酸化 NF- κ B p65 (phosphorylated NF- κ B p65, p-NF- κ B p65) 蛋白表达: 通过组织研磨仪在 -20℃下预冷并研磨肺组织, 用含有蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和苯甲基磺酰氟的 RIPA 裂解液进行蛋白

提取; 4℃下 12 000 r/min (离心半径为 90 mm) 离心 15 min, 收集上清液, 进行蛋白浓度测定; 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 将蛋白转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 并进行封闭处理。之后进行抗原抗体反应, 包括一抗和二抗的孵育, 以及 Tris 缓冲盐溶液的漂洗。最后, 使用化学发光法进行显影, 并利用 Image J 软件进行图像分析, 计算目的蛋白与内参蛋白 β -肌动蛋白 (β -actin) 条带的灰度值比值。

1.4.3 免疫组化法测定肺组织 STING、p-NF- κ B 阳性表达: 将石蜡切片依次通过二甲苯和无水乙醇脱蜡至水, 然后进行抗原修复, 用柠檬酸抗原修复缓冲液在微波炉中加热至沸腾后高火修复 10 min; 用 3% 过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶, 室温避光孵育 25 min 后, 用磷酸盐缓冲液洗涤; 切片在 3% 牛血清白蛋白中封闭 30 min, 然后滴加一抗, 4℃冰箱孵育过夜。次日, 用磷酸盐缓冲液洗涤切片后, 滴加二抗, 室温孵育 50 min; 3,3'-二氨基联苯胺显色后, 用苏木素复染细胞核, 并用 1% 盐酸乙醇分化, 最后用氨水返蓝并用流水冲洗。脱水封片前, 切片经梯度乙醇和二甲苯脱水透明后晾干, 并用中性树胶封片。染色结果通过显微镜观察并拍照, 最后用 Image J 软件分析免疫组化照片, 比较各组蛋白表达情况。

1.4.4 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清 IFN- β 水平: 将试剂盒放置至室温; 稀释浓缩洗涤液, 配制不同浓度标准品工作液, 同时配制生物素化抗体和酶结合物工作液; 在酶标板上加入标准品和待测样品, 37℃孵育 90 min; 加入生物素化抗体工作液, 孵育 1 h; 洗涤板后, 加入酶结合物工作液, 孵育 30 min; 洗涤板后, 加入底物溶液, 37℃避光孵育 15 min, 然后加入终止液终止反应。使用酶标仪在 450 nm 波长下测量吸光度 (A) 值, 根据标准曲线分析 IFN- β 水平。

1.5 统计学方法: 利用 GraphPad Prism 9.0 软件制图及完成统计学分析。计量资料符合正态分布, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Tukey 法。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 肺组织病理学评估 (图 1~2): HE 染色显示, 与正常对照组相比, ALI 模型组小鼠肺组织呈现典型病理学改变, 包括: 局灶性肺泡间隔增厚, 毛细血

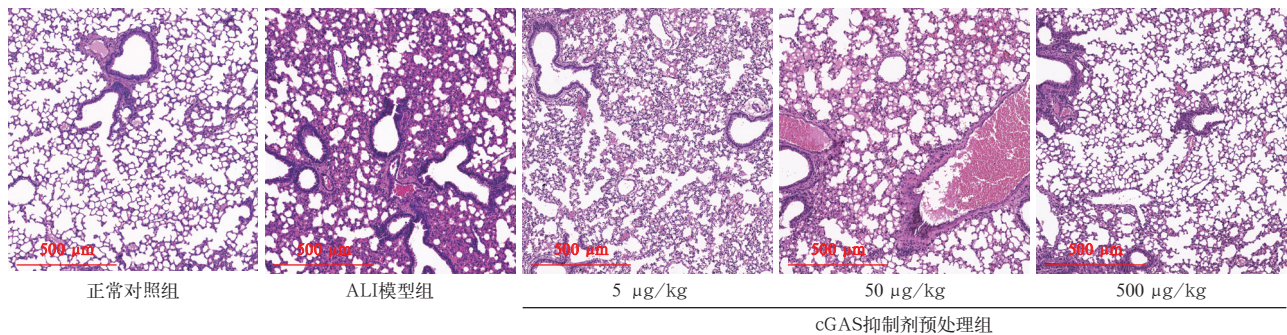


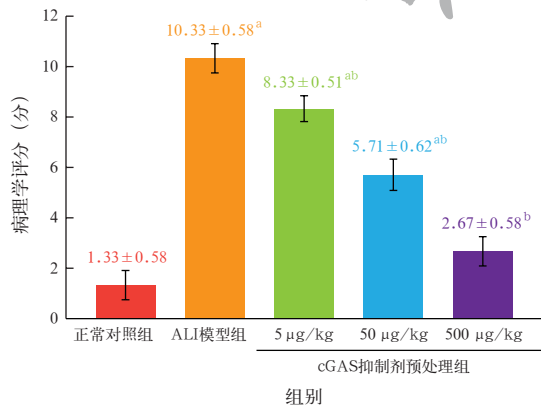
图 1 光镜下观察各组小鼠肺组织病理学改变 正常对照组肺泡结构清晰、间隔均匀,支气管及血管形态完整;急性肺损伤(ALI)模型组可见局灶性肺泡间隔增厚、毛细血管显著充血、肺泡腔内出血灶形成,肺间质和肺泡腔内有大量中性粒细胞浸润;5、50、500 μg/kg 环鸟苷酸-腺苷酸酶(cGAS)抑制剂预处理组病理学改变呈剂量依赖性改善,表现为肺泡结构完整性恢复、炎症细胞浸润减少及出血面积缩小 苏木素-伊红(HE)染色 中倍放大

表 1 各组小鼠肺组织 cGAS、STING、p-TBK1、p-IRF3、p-NF-κB p65 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	cGAS 蛋白 (cGAS/β-actin)	STING 蛋白 (STING/β-actin)	p-TBK1 蛋白 (p-TBK1/β-actin)	p-IRF3 蛋白 (p-IRF3/β-actin)	p-NF-κB p65 蛋白 (p-NF-κB p65/β-actin)
正常对照组	10	0.56±0.02	0.55±0.01	0.22±0.01	0.36±0.01	0.53±0.02
ALI 模型组	10	1.24±0.02 ^a	1.27±0.01 ^a	1.34±0.03 ^a	1.23±0.02 ^a	1.30±0.02 ^a
5 μg/kg cGAS 抑制剂预处理组	10	1.19±0.12 ^a	1.14±0.06 ^{ab}	0.63±0.03 ^{ab}	1.23±0.07 ^{ab}	1.29±0.06 ^{ab}
50 μg/kg cGAS 抑制剂预处理组	10	0.73±0.08 ^{ab}	0.78±0.01 ^{ab}	0.44±0.01 ^{ab}	0.98±0.01 ^{ab}	0.88±0.03 ^{ab}
500 μg/kg cGAS 抑制剂预处理组	10	0.56±0.03 ^b	0.67±0.03 ^{ab}	0.28±0.01 ^{ab}	0.32±0.01 ^{ab}	0.63±0.01 ^{ab}
F 值		80.58	330.80	1 962.00	580.00	402.70
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注: ALI 为急性肺损伤, cGAS 为环鸟苷酸-腺苷酸酶, STING 为干扰素基因刺激因子, p-TBK1 为磷酸化 TANK 结合激酶 1, p-IRF3 为磷酸化干扰素调节因子 3, p-NF-κB p65 为磷酸化核转录因子-κB p65, β-actin 为 β-肌动蛋白; 与正常对照组比较, ^a $P<0.05$; 与 ALI 模型组比较, ^b $P<0.05$

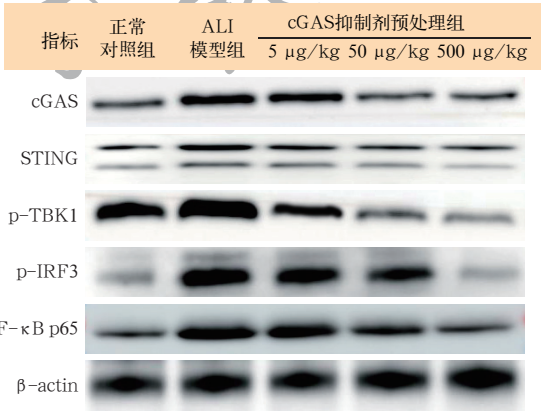
管显著充血,肺泡腔内出血灶形成,肺间质和肺泡腔内大量中性粒细胞浸润。经 cGAS 抑制剂 RU.521 预处理后,随着给药剂量递增,肺组织病理损伤程度呈剂量依赖性改善,表现为肺泡结构完整性恢复、炎症细胞浸润减少及出血面积缩小。定量分析显示,ALI 模型组小鼠肺组织病理学评分显著高于正常对照组($P<0.05$);经 cGAS 抑制剂 RU.521 预处理后,随着给药剂量递增,肺组织病理学评分呈剂量依赖性降低,差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。



注: ALI 为急性肺损伤, cGAS 为环鸟苷酸-腺苷酸酶; 与正常对照组比较, ^a $P<0.05$; 与 ALI 模型组比较, ^b $P<0.05$

图 2 各组小鼠肺组织病理学评分比较

2.2 肺组织 cGAS、STING、p-TBK1、p-IRF3、p-NF-κB p65 蛋白表达(表 1;图 3): 与正常对照组相比,ALI 模型组小鼠肺组织 cGAS、STING、p-TBK1、p-IRF3、p-NF-κB p65 蛋白表达水平显著上调(均 $P<0.05$);与 ALI 模型组比较,经 cGAS 抑制剂 RU.521 预处理后,随着给药剂量递增,上述通路蛋白表达呈剂量依赖性降低,差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。



注: ALI 为急性肺损伤, cGAS 为环鸟苷酸-腺苷酸酶, STING 为干扰素基因刺激因子, p-TBK1 为磷酸化 TANK 结合激酶 1, p-IRF3 为磷酸化干扰素调节因子 3, p-NF-κB p65 为磷酸化核转录因子-κB p65, β-actin 为 β-肌动蛋白

图 3 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组小鼠肺组织 cGAS、STING、p-TBK1、p-IRF3、p-NF-κB p65 蛋白表达

2.3 肺组织 STING、p-NF-κB 阳性表达(图 4;表 2):与正常对照组相比,ALI 模型组小鼠肺组织 STING 和 p-NF-κB 阳性表达均显著增加(均 $P<0.05$);给予 500 μg/kg cGAS 抑制剂 RU.521 预处理后,小鼠肺组织 STING 和 p-NF-κB 阳性表达均显著减少,与 ALI 模型组比较差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。

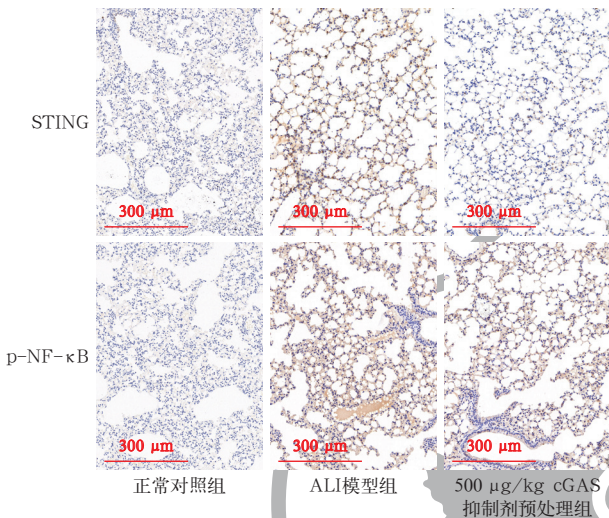


图 4 光镜下观察各组小鼠肺组织干扰素基因刺激因子(STING)和磷酸化核转录因子-κB(p-NF-κB)阳性表达。正常对照组肺组织 STING 和 p-NF-κB 仅有微弱表达;急性肺损伤(ALI)模型组肺组织 STING 和 p-NF-κB 表达较正常对照组增强;500 μg/kg 环鸟苷酸-腺苷酸合酶(cGAS)抑制剂预处理组肺组织 STING 和 p-NF-κB 表达较 ALI 模型组减弱。免疫组化染色,中倍放大

表 2 各组小鼠肺组织 STING、p-NF-κB 阳性表达及血清 IFN-β 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺组织阳性表达(A值)		血清 IFN-β (ng/L)
		STING	p-NF-κB	
正常对照组	10	0.30 ± 0.07	0.31 ± 0.03	64.15 ± 1.17
ALI 模型组	10	0.51 ± 0.03 ^a	0.57 ± 0.05 ^a	256.02 ± 3.84 ^a
500 μg/kg cGAS 抑制剂预处理组	10	0.40 ± 0.01 ^{ab}	0.43 ± 0.02 ^{ab}	150.03 ± 6.19 ^{ab}
F 值		310.31	300.52	1 528.00
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注:ALI 为急性肺损伤,cGAS 为环鸟苷酸-腺苷酸合酶,STING 为干扰素基因刺激因子,p-NF-κB 为磷酸化核转录因子-κB,IFN-β 为 β-干扰素;与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与 ALI 模型组比较,^b $P<0.05$

2.4 血清 IFN-β 水平(表 2):与正常对照组相比,ALI 模型组小鼠血清 IFN-β 水平显著升高($P<0.05$);500 μg/kg RU.521 预处理可以显著抑制油酸诱导的 IFN-β 水平升高,与 ALI 模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

ALI/ARDS 是由弥漫性肺部炎症和肺水肿导致的临床危重综合征,根据病因可分为肺源性和肺外源性两类^[13-14]。ARDS 具有高病死率的特征。国际多

中心研究数据显示,重症监护病房患者 ARDS 发病率为 10%,机械通气患者高达 23%,严重 ARDS 患者病死率可达 46%^[13]。值得注意的是,ARDS 幸存者常遗留认知功能障碍、抑郁障碍、创伤后应激障碍、持续性肌无力等长期并发症^[1, 15]。目前针对 ARDS 的临床治疗仍以支持疗法为主,包括保护性机械通气策略、限制性液体管理,对于严重低氧血症患者可采用俯卧位通气或体外膜肺氧合^[16]。鉴于现有治疗手段的局限性,深入阐明 ALI/ARDS 的病理生理机制对于开发新型靶向治疗具有重要意义。本研究证实,cGAS/STING 信号通路在油酸诱导的 ALI 小鼠模型中激活,特异性 cGAS 抑制剂 RU.521 可通过抑制该通路发挥肺保护作用。

ALI/ARDS 的病理生理过程涉及复杂的级联反应,包括肺局部和全身性的炎症激活与失调。理想的抗炎治疗需要精确调控促炎与抗炎通路的动态平衡。虽然这些通路本是机体对抗感染或损伤的正常防御机制,但其过度激活将导致组织损伤。个体间肺部与全身炎症反应的差异及特定通路的激活程度不同,构成了 ARDS 临床和生物学异质性的基础^[17-18]。现有研究表明,ALI 涉及多条信号通路的异常激活,包括 TLR4/髓系分化初级反应蛋白质 88(myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88)/NF-κB 通路、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)通路、STAT3 通路、Janus 激酶(Janus kinase, JAK)/STAT 通路、TLR 系统等^[19-21]。值得注意的是,模式识别受体不仅能识别病原体相关分子模式,还可感知内源性损伤相关分子模式。胞质中出现异常 DNA 时,将触发先天性免疫应答^[8]。Song 等^[22]研究表明,胞质 DNA 可通过与 cGAS 结合,催化生成第二信使环鸟苷酸-腺苷酸,激活 STING-TBK1-IRF3 信号轴,诱导 IFN-Ⅰ和促炎细胞因子产生。尽管 cGAS/STING 通路在多种疾病中的作用已被广泛研究,但其在 ALI 中的机制尚未阐明。本研究基于线粒体 DNA 在氧化应激诱导肺损伤中的关键作用^[23],探讨了 cGAS/STING 通路在油酸诱导 ALI 模型中的调控机制。

油酸诱导 ALI 是国际公认的标准制模方法。经尾静脉注射油酸可通过多重机制诱发肺损伤:直接损伤肺微血管内皮细胞、诱导氧化应激反应、产生内皮素样效应等^[24-26]。研究表明,油酸不仅能增加血管通透性,还可抑制肺泡上皮钠通道,促进肺泡液体体积聚^[27]。本研究成功建立油酸诱导 ALI 小鼠模

型,并通过 cGAS 特异性抑制剂 RU.521 预处理,系统评估了通路蛋白表达、炎症指标及病理学改变。结果显示,油酸刺激可诱导细胞应激性死亡,释放内源性 DNA,激活 cGAS/STING 通路;Western blotting 表明,ALI 模型组小鼠肺组织 cGAS、STING、p-TBK1、p-IRF3 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达均显著上调,同时下游 IFN- β 水平显著升高;病理学观察显示,ALI 模型组呈现典型肺泡间隔增厚、毛细血管充血、肺泡内出血、中性粒细胞浸润等特征性改变。值得注意的是, RU.521 预处理可剂量依赖性地改善上述病理学变化,并显著降低通路蛋白表达水平。

综上,本研究证实:① cGAS/STING 通路在油酸诱导 ALI 中被显著激活;② cGAS 抑制剂 RU.521 可通过抑制 STING-TBK1-IRF3 信号轴发挥肺保护作用;③ 该保护作用与降低促炎因子水平和改善肺组织病理损伤密切相关。基于这些发现,建议未来研究着重于:① 探讨 cGAS/STING 通路在不同病因 ALI (感染性、创伤性、吸入性)中的特异性作用;② 开发高效特异的通路抑制剂;③ 阐明该通路与其他免疫信号网络的交互作用。这将为 ALI/ARDS 的精准治疗提供新的分子靶点和理论依据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 弥亮钰、丁文艳、杨莹莹:设计实验、起草文章;王芊霖、谭紫琪、郑敏:实施研究;陈翔宇、张小雨:采集分析数据;隆云、苏龙翔:总体统筹

参考文献

- [1] Griffiths MJD, McAuley DF, Perkins GD, et al. Guidelines on the management of acute respiratory distress syndrome [J]. *BMJ Open Respir Res*, 2019, 6 (1): e000420. DOI: 10.1136/bmjresp-2019-000420.
- [2] Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute respiratory distress syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377 (6): 562-572. DOI: 10.1056/NEJMra1608077.
- [3] Sweeney RM, McAuley DF. Acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet*, 2016, 388 (10058): 2416-2430. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00578-X. Erratum in: *Lancet*, 2016, 388 (10058): 2354. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32136-5.
- [4] 王艳雪, 杨洪娜, 李文玉, 等. 氯化钡预处理对急性呼吸窘迫综合征小鼠的肺保护作用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2023, 35 (3): 274-277. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20221020-00932.
- [5] 张怡人, 陈梦晓, 王毅, 等. SIRT1 调控 Nrf2/HO-1 信号通路对脓毒症诱导的急性肺损伤的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2023, 35 (3): 244-249. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220815-00745.
- [6] Zhou L, Zhang YF, Yang FH, et al. Mitochondrial DNA leakage induces odontoblast inflammation via the cGAS-STING pathway [J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19 (1): 58. DOI: 10.1186/s12964-021-00738-7.
- [7] Yan ML, Li Y, Luo QM, et al. Mitochondrial damage and activation of the cytosolic DNA sensor cGAS-STING pathway lead to cardiac pyroptosis and hypertrophy in diabetic cardiomyopathy mice [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8 (1): 258. DOI: 10.1038/s41420-022-01046-w.
- [8] O'Neill LA. DNA makes RNA makes innate immunity [J]. *Cell*, 2009, 138 (3): 428-430. DOI: 10.1016/j.cell.2009.07.021.
- [9] Zhou Z, Zhang XY, Lei XB, et al. Sensing of cytoplasmic chromatin by cGAS activates innate immune response in SARS-CoV-2 infection [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6 (1): 382. DOI: 10.1038/s41392-021-00800-3.
- [10] Zhao QL, Wei Y, Pandol SJ, et al. STING signaling promotes inflammation in experimental acute pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 2018, 154 (6): 1822-1835. e2. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.01.065.
- [11] Yong H, Wang S, Song FY. Activation of cGAS/STING pathway upon TDP-43-mediated mitochondrial injury may be involved in the pathogenesis of liver fibrosis [J]. *Liver Int*, 2021, 41 (8): 1969-1971. DOI: 10.1111/liv.14895.
- [12] 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. DOI: 10.1038/s41598-020-64348-y.
- [13] 张久之. 线粒体功能障碍及线粒体 DNA 释放在脓毒症相关性急性肺损伤中作用的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2024, 36 (1): 102-105. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230828-00702.
- [14] LUNG-SAFE Investigators and the ESICM Trials Group. Epidemiology and patterns of tracheostomy practice in patients with acute respiratory distress syndrome in ICUs across 50 countries [J]. *Crit Care*, 2018, 22 (1): 195. DOI: 10.1186/s13054-018-2126-6.
- [15] LUNG-SAFE Investigators, ESICM Trials Group. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries [J]. *JAMA*, 2016, 315 (8): 788-800. DOI: 10.1001/jama.2016.0291. Erratum in: *JAMA*, 2016, 316 (3): 350. DOI: 10.1001/jama.2016.6956. Erratum in: *JAMA*, 2016, 316 (3): 350. DOI: 10.1001/jama.2016.9558.
- [16] Menk M, Estenssoro E, Sahetya SK, et al. Current and evolving standards of care for patients with ARDS [J]. *Intensive Care Med*, 2020, 46 (12): 2157-2167. DOI: 10.1007/s00134-020-06299-6.
- [17] Gorman EA, O'Kane CM, McAuley DF. Acute respiratory distress syndrome in adults: diagnosis, outcomes, long-term sequelae, and management [J]. *Lancet*, 2022, 400 (10358): 1157-1170. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01439-8.
- [18] Bos LDJ, Ware LB. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes [J]. *Lancet*, 2022, 400 (10358): 1145-1156. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01485-4.
- [19] Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, et al. Acute respiratory distress syndrome [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5 (1): 18. DOI: 10.1038/s41572-019-0069-0.
- [20] Zhou SJ, Wang G, Zhang WB. Effect of TLR4/MyD88 signaling pathway on sepsis-associated acute respiratory distress syndrome in rats, via regulation of macrophage activation and inflammatory response [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15 (4): 3376-3384. DOI: 10.3892/etm.2018.5815.
- [21] Chen X, Xue X, Cai JQ, et al. Protective effect of taurine on sepsis-induced lung injury via inhibiting the p38/MAPK signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24 (3): 653. DOI: 10.3892/mmr.2021.12292.
- [22] Song X, Wang CT, Geng XH. MicroRNA-29a promotes apoptosis of monocytes by targeting STAT3 during sepsis [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14 (4): 13746-13753. DOI: 10.4238/2015.October.28.37.
- [23] Sun LJ, Wu JX, Du FH, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway [J]. *Science*, 2013, 339 (6121): 786-791. DOI: 10.1126/science.1232458.
- [24] Islam MN, Das SR, Emin MT, et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury [J]. *Nat Med*, 2012, 18 (5): 759-765. DOI: 10.1038/nm.2736.
- [25] McGuigan RM, Mullenix P, Norlund LL, et al. Acute lung injury using oleic acid in the laboratory rat: establishment of a working model and evidence against free radicals in the acute phase [J]. *Curr Surg*, 2003, 60 (4): 412-417. DOI: 10.1016/S0149-7944(02)00775-4.
- [26] Harvey KA, Walker CL, Xu ZD, et al. Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51 (12): 3470-3480. DOI: 10.1194/jlr.M010371.
- [27] Gremmels H, Bevers LM, Fledderus JO, et al. Oleic acid increases mitochondrial reactive oxygen species production and decreases endothelial nitric oxide synthase activity in cultured endothelial cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 751: 67-72. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.01.005.

(收稿日期: 2025-01-04)

(本文编辑: 保健媛 马英)