

☆ XXXX ☆

基于 cGAS-STING 信号通路介导的巨噬细胞极化 探讨电针对小鼠急性胃黏膜损伤的影响

徐元波¹, 王婧吉², 高秋瑾¹, 徐馨月¹, 贺若楠¹, 杨 骏³

(¹安徽中医药大学第一临床医学院, 合肥 230031; ²安徽中医药大学, 合肥 230031; ³安徽中医药大学第一附属医院, 合肥 230031)

【摘要】 目的:观察电针通过环磷酸鸟苷-腺苷合成酶(cGAS)-干扰素基因刺激因子(STING)信号通路调节巨噬细胞极化对急性胃黏膜损伤(AGMI)小鼠的影响。方法:将30只C57BL/6小鼠随机分为正常组、模型组和电针组,除正常组外,剩余小鼠以无水乙醇灌胃构建AGMI模型。电针组小鼠给予“中脘”“足三里”电针治疗,30 min/次,1次/d,共5天。采用Guth胃黏膜损伤评分法对小鼠的胃黏膜损伤进行评估;HE染色和PAS染色观察小鼠胃黏膜组织病理变化;Western blot检测小鼠胃组织闭合小环蛋白1(ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)、cGAS、STING、磷酸化STING(p-STING)、磷酸化干扰素调节因子3(p-IRF3)、磷酸化TANK结合激酶1(p-TBK1)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、分化簇86(CD86)、精氨酸酶1(Arg-1)、分化簇206(CD206)的蛋白表达水平;流式细胞术分析小鼠胃组织M1、M2型巨噬细胞比例;反转录定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测小鼠胃组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、转化生长因子- β (TGF- β)mRNA表达水平;免疫荧光检测iNOS、CD206荧光强度。结果:与正常组相比,模型组小鼠胃黏膜损伤指数升高($P < 0.01$),胃黏膜上皮坏死、腺体紊乱、黏液层破坏。模型组小鼠胃组织ZO-1、Occludin蛋白表达显著降低($P < 0.01$),M1型巨噬细胞增多、M2型巨噬细胞减少,TNF- α 、IL-6的mRNA水平升高($P < 0.01$),IL-10、TGF- β 的mRNA水平降低($P < 0.01$),cGAS-STING通路相关蛋白及iNOS、CD86上调($P < 0.01$),Arg-1、CD206下调($P < 0.01$)。与模型组比较,电针组上述指标均显著改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),病理损伤减轻,黏液层较完整。结论:电针可减轻胃黏膜炎性反应,改善AGMI,其作用机制可能与抑制cGAS-STING信号通路介导的巨噬细胞极化有关。

【关键词】 电针;急性胃黏膜损伤;cGAS-STING信号通路;巨噬细胞极化;炎症因子

Effect of electroacupuncture on acute gastric mucosal injury in mice by regulating macrophage polarization mediated by the cGAS-STING signaling pathway

XU Yuan-bo¹, WANG Jing-ji², GAO Qiu-jin¹, XU Xin-yue¹, HE Ruo-nan¹, YANG Jun³ (¹The First School of Clinical Medicine of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China; ²Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031; ³The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of electroacupuncture on mice with acute gastric mucosal injury (AGMI) by regulating macrophage polarization through the cyclic guanosine monophosphate-adenosine synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING) signaling pathway. **Methods** Thirty C57BL/6 mice were randomly divided into the normal group, model group, and electroacupuncture group. Except for the normal group, the remaining mice were intragastrically administered with absolute ethanol to establish the AGMI model. Mice in the electroacupuncture group were treated with electroacupuncture at "Zhongwan (CV12)" and "Zusanli (ST36)" for 30 minutes once a day for 5 consecutive days. The Guth gastric mucosal injury scoring method was used to evaluate gastric mucosal injury. HE staining and PAS staining were performed to observe the pathological changes of gastric

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251161-录用-网络首发

引用格式:徐元波,王婧吉,高秋瑾,等.基于cGAS-STING信号通路介导的巨噬细胞极化探讨电针对小鼠急性胃黏膜损伤的影响[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-13.

项目来源:安徽省中医药科技攻关专项项目(No.202303a07020002);全国名中医杨骏传承工作室项目(No.皖中医药发展秘[2022]19号)

通信作者:杨骏,E-mail:yangjunacup@126.com

mucosal tissue. Western blot was used to detect the protein expression levels of zonula occludens-1 (ZO-1), Occludin, cGAS, STING, phosphorylated STING (p-STING), phosphorylated interferon regulatory factor 3 (p-IRF3), phosphorylated TANK-binding kinase 1 (p-TBK1), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cluster of differentiation 86 (CD86), arginase-1 (Arg-1), and cluster of differentiation 206 (CD206) in gastric tissue. Flow cytometry was used to analyze the proportions of M1 and M2 macrophages in gastric tissue. Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the mRNA expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), and transforming growth factor- β (TGF- β) in gastric tissue. Immunofluorescence was used to detect the fluorescence intensity of iNOS and CD206. **Results** Compared with the normal group, the model group showed an increased gastric mucosal injury index ($P<0.01$), with epithelial necrosis, glandular disorder, and mucus layer destruction in the gastric mucosa. In the model group, the protein expression levels of ZO-1 and Occludin in gastric tissue were significantly decreased ($P<0.01$); the number of M1 macrophages increased while M2 macrophages decreased; the mRNA levels of TNF- α and IL-6 were increased ($P<0.01$), while the mRNA levels of IL-10 and TGF- β were decreased ($P<0.01$); the proteins related to the cGAS-STING pathway, as well as iNOS and CD86, were upregulated ($P<0.01$), while Arg-1 and CD206 were downregulated ($P<0.01$). Compared with the model group, all the above indicators in the electroacupuncture group were significantly improved ($P<0.05$ or $P<0.01$), with reduced pathological damage and a relatively intact mucus layer. **Conclusion** Electroacupuncture can alleviate gastric mucosal inflammation and improve AGMI, and its mechanism may be related to inhibiting macrophage polarization mediated by the cGAS-STING signaling pathway.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Acute gastric mucosal injury; cGAS-STING signaling pathway; Macrophage polarization; Inflammatory factors

胃的独特解剖位置与功能特性,致使胃黏膜易受外界刺激引发急性胃黏膜损伤(acute gastric mucosal injury, AGMI),该问题影响全球5%~10%人群,且起病急骤,易快速进展为急性糜烂、急性出血,还可能增加后续胃溃疡及胃癌的发病风险^[1-2]。其发病机制较为复杂,核心在于防御因素与侵袭因素失衡,其中过量饮酒是诱发AGMI的重要急性诱因,与胃黏膜上皮细胞凋亡、炎性因子过量表达及氧化应激增强密切相关,最终引发急性黏膜损伤^[3]。临床上质子泵抑制剂和胃黏膜保护剂是常用来治疗胃黏膜损伤的药物,短期内可缓解炎性反应与损伤,但存在不良反应多、复发率高、愈合时间长及疗效持续时间短等问题,难以从根本上调控AGMI的急性修复机制,且对急性重症损伤的干预效果有限^[4]。因此,寻找安全高效的治疗方法,明确其作用机制,具有重要临床意义。

研究证实,电针能够有效减轻胃黏膜炎性反应、促进受损黏膜修复,在降低复发率、减少不良反应方面具有独特优势,然而其改善急性胃黏膜损伤的具体分子机制尚不明确^[5]。巨噬细胞是分布于全身组织的固有免疫细胞,其具有高度可塑性,可根据局部微环境信号极化为不同功能表型,其中分泌促炎因子如白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的M1型巨噬细胞,加剧黏膜上皮细胞凋亡与炎性浸润,

进一步扩大急性损伤范围;而M2型巨噬细胞分泌白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等抗炎及修复因子,抑制过度炎性反应并促进黏膜上皮再生,是AGMI修复的关键效应细胞^[6],环磷酸鸟苷-腺苷合成酶(cyclic guanosine monophosphate adenosine synthase, cGAS)-干扰素基因刺激因子(interferon gene stimulating factor, STING)信号通路是胞质内关键的核酸感知通路,胞质中的双链DNA激活cGAS, cGAS催化生成环鸟苷酸-腺苷酸单磷酸(cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate, cGAMP), cGAMP结合STING,诱导STING构象改变并激活下游信号,促进I型干扰素等因子分泌,该通路可通过影响巨噬细胞极化,参与炎性反应调控与损伤修复过程^[7]。目前电针改善AGMI的机制研究尚未涉及cGAS-STING通路,与巨噬细胞极化的关联。因此,本研究针对该空白展开探讨,采用无水乙醇灌胃复制AGMI模型,从cGAS-STING信号通路介导的胃组织巨噬细胞极化角度探讨电针治疗胃黏膜损伤的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

30只SPF级8周龄雄性C57BL/6小鼠,体质量20~25 g,购自于江苏集萃药康生物科技股份有限

公司,生产许可证号:SCXK(苏)2023-0009,由安徽中医药大学动物实验中心饲养。饲养条件:室温22~25℃,湿度45%~60%,光照每12h交替1次,小鼠自由饮水、摄食。适应性喂养1周后将小鼠随机分为正常组、模型组、电针组各10只。本实验由安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号:AHUCM-2025046),实验过程严格遵守国家科学技术部2006年颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》及相关动物实验伦理规范^[8]。

1.2 主要试剂及仪器

无水乙醇、4%多聚甲醛、二甲苯、中性树胶(上海苏懿),苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、过碘酸-雪夫(PAS)染色试剂盒(珠海贝索),Cy3标记山羊抗兔IgG抗体、RIPA裂解液、PBS、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(江苏白鲨),抗荧光淬灭封片液、DAPI(上海碧云天),BSA(北京索莱宝),PVDF膜(美国Millipore),过氧化物酶封闭液、EDTA修复液、 β -actin抗体、山羊抗小鼠IgG抗体、山羊抗兔IgG抗体(北京中杉金桥),闭合小环蛋白1(zonula occludens-1,ZO-1)抗体、磷酸化干扰素调节因子3(phosphorylated interferon regulatory factor 3,p-IRF3)抗体、精氨酸酶1(arginase-1,Arg-1)抗体(杭州华安),FITC标记山羊抗兔IgG抗体、Occludin抗体、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)抗体(江苏亲科),分化簇86(cluster of differentiation 86,CD86)抗体(成都正能),分化簇206(cluster of differentiation 206,CD206)抗体(武汉三鹰),cGAS抗体、磷酸化TANK结合激酶1(phosphorylated TANK-binding kinase 1,p-TBK1)抗体(合肥善本),STING抗体、p-STING抗体(美国CST),PE标记的抗小鼠CD80抗体(美国Biolegend),抗小鼠F4/80抗体,别藻蓝蛋白(联科生物),FITC的抗小鼠CD206抗体、细胞内固定/通透缓冲液试剂盒(武汉伊莱瑞特),PCR引物合成(上海生工)。

中研太和一次性无菌针灸针(0.16 mm \times 7 mm)、韩氏穴位神经刺激仪HSYL-200A(南京济生)、电泳仪、转膜仪(上海天能),流式细胞仪(美国Agilent),荧光定量PCR仪(美国ABI),高速冷冻离心机(安徽嘉文),超微量分光光度计(南京五义),组织脱水机、包埋机、烤片机(湖北亚光),切片机(美国Leica),显微镜(日本Olympus)。

1.3 造模方法

采用无水乙醇灌胃法制备小鼠AGMI模型^[9]:

造模前所有小鼠禁食不禁水24h,模型组和电针组小鼠按10 μ L/g剂量(如20 g小鼠给予0.2 mL)灌胃无水乙醇中;正常对照组小鼠则按相同剂量灌胃0.9%氯化钠溶液。造模24h后从各组随机选取1只进行模型验证。造模成功的标准为肉眼观察胃黏膜不连续糜烂或点状溃疡,病理检测可见有炎性细胞浸润、上皮细胞坏死等。

1.4 干预方式

电针组小鼠固定后,用0.16 mm \times 7 mm一次性无菌针灸针,直刺“中脘”和双侧“足三里”,同时在每个穴位旁1 mm的非穴位处刺入一根相同规格的辅助针,将穴位针与辅助针连接于韩氏穴位神经刺激仪HSYL-200A输出端,频率为10 Hz,电流强度0.5 mA左右,持续时间30 min,1次/d,共5 d。对照组、模型组仅给予同等固定,不做干预。穴位定位参照《实验动物常用穴位名称与定位》^[10]。“足三里”为小鼠膝关节后外侧,在腓骨小头下约2 mm处。“中脘”为小鼠脐与剑突尖端连线中点。

1.5 观察指标及检测方法

胃黏膜损伤指数:测定前小鼠禁食不禁水12 h,腹腔注射1%戊巴比妥钠溶液(50 mg/kg)麻醉后,打开腹腔分离胃部,用0.9%氯化钠溶液(26~28℃)轻轻冲洗胃内容物,沿胃大弯剪开胃壁并平铺于滤纸上。参考Guth胃黏膜损伤评分法^[11],斑点糜烂计1分,糜烂长度 \leq 1 mm计2分,糜烂长度 $>$ 1~2 mm计3分,糜烂长度 $>$ 2~3 mm计4分,糜烂长度 $>$ 3 mm计5分;损伤宽度 $>$ 1 mm,分值加倍。

HE染色和PAS染色观察小鼠胃黏膜病理损伤:小鼠处死后迅速剥离胃组织,4%多聚甲醛固定 \rightarrow 乙醇梯度脱水 \rightarrow 二甲苯透明 \rightarrow 石蜡包埋,石蜡切片机切5 μ m厚切片,进行脱蜡、水化处理备用。HE染色:按试剂盒操作染色后封片,光学显微镜下(200 \times 、400 \times 倍镜)观察:胃黏膜组织完整性、上皮细胞脱落情况、黏膜下层充血水肿程度及炎性细胞浸润情况。PAS染色:同批处理切片按试剂盒操作染色后封片,镜下(200 \times 、400 \times 倍镜)观察胃黏膜上皮细胞。

流式细胞术检测M1/M2型巨噬细胞比例:干预结束后,取各组小鼠胃新鲜组织,加入0.5 mL PBS研磨后以1000 r/min离心5 min,取100 μ L上清,获取单细胞悬液;按说明书加入CD80、F4/80抗体,室温避光孵育30 min,随后加入1 mL含5% FBS的PBS以300 \times g离心5 min弃上清;用200 μ L含5% FBS的PBS重悬细胞,加入200 μ L Fixation

buffer 混匀后室温固定 1 h, 再加入 1 mL 1× Permeabilization Buffer 以 600×g 离心 5 min 弃上清; 接着用 100 μL 1× Permeabilization Buffer 重悬细胞沉淀, 按说明书加入 CD206 抗体, 涡旋 1~2 s 后室温避光孵育 30 min, 之后加入 1 mL 含 5% FBS 的 PBS 以 600×g 离心 5 min 弃上清, 最后用适量 PBS 重悬细胞, 经 200 目滤网过滤后上机检测。用 NovoExpress 软件对流式细胞图像进行分析, 作图。

反转录定量聚合酶链式反应 (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检查胃黏膜组织 TNF-α、IL-6、IL-10、TGF-β 的 mRNA 表达水平: 随机取每组 6 只小鼠液氮保存的胃黏膜样本 (每样本称取约 50mg), 使用

Trizol 提取组织的总 RNA, RNA 定量仪测定 RNA 浓度及纯度。采用 All-in-One First-Strand Synthesis Master Mix 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。配制荧光定量 PCR 反应体系 (Taq SYBR Green qPCR Premix 10.0 μL, Forward Primer 0.4 μL, Reverse Primer 0.4 μL, cDNA 3 μL, RNase Free water 6.2 μL, 总体积 20 μL)。在 PCR 仪上进行扩增: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火延伸 30s, 共 40 个循环。融解曲线分析: 60 °C 升至 95 °C, 每 15s 升温 0.3 °C。以 β-actin 为内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 TNF-α、IL-6、IL-10、TGF-β 的 mRNA 相对表达量。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Gene	产物长度/bp	上游(5'→3')	下游(5'→3')
β-actin	120	AGTGTGACGTTGACATCCGT	TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA
TNF-α	96	CTCATGCACCACCATCAAGG	ACCTGACCACTCTCCCTTTG
IL-6	98	GGAGCCCACCAAGAACGATA	ACCAGCATCAGTCCCAAGAA
IL-10	174	GCCGGGAAGACAATAACTGC	CTTGGAACCCAAGTAACCC
TGF-β1	162	CGCAACAACGCCATCTATGA	TTCCACATGTTGCTCCACAC

注: TNF-α 为肿瘤坏死因子 α, IL-6 为白细胞介素-6, IL-10 为白细胞介素-10, TGF-β 为转化生长因子-β。

Western blot 法检测小鼠胃组织中 ZO-1、Occludin、iNOS、CD86、Arg-1、CD206、cGAS、STING、p-STING、p-IRF3、p-TBK1 蛋白表达: 提取各组小鼠胃组织总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。进行 SDS-PAGE 电泳、转膜, 牛奶室温封闭 1h, 弃去封闭液, 加入 ZO-1、Occludin、iNOS、CD86、Arg-1、CD206、cGAS、STING、p-STING、p-IRF3、p-TBK1、β-actin 一抗 (稀释比例均为 1:1 000), 4 °C 摇床孵育过夜。次日用 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入稀释好的山羊抗兔/抗小鼠 IgG 二抗 (根据一抗种属选择, 稀释比例 1:20 000), 室温摇床孵育 30 min; 再次用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 滴加 ECL 化学发光显色液, 通过化学发光成像系统采集蛋白条带图像。以目的蛋白与内参 β-actin 蛋白条带灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

免疫荧光检测胃黏膜 iNOS、CD206 荧光强度: 取每组 3 只小鼠 4% 多聚甲醛固定的胃黏膜样本, 脱水、透明后石蜡包埋, 切 5 μm 厚切片; 脱蜡复水后 PBS 洗 3 次 (每次 5 min)。滴加 5% 牛血清蛋白室温封闭 30min, 弃液后分别加 iNOS 一抗 (1:100)、

CD206 一抗 (1:200), 4 °C 湿盒孵育过夜。次日 PBS 洗 3 次 (每次 5 min), 加对应荧光二抗 (1:100) 室温避光孵 50 min; PBS 洗 3 次后 DAPI 染 10 min, 再 PBS 洗 3 次, 抗荧光衰减封片; 荧光显微镜拍片后用 Image J 软件分析。

1.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism10.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间差异比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 若 ANOVA 分析结果显示组间存在统计学差异 ($P < 0.05$), 则进一步采用 LSD-t 检验进行两两比较 (适用于方差齐性数据); 若方差不齐, 则采用 Tamhane's T2 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

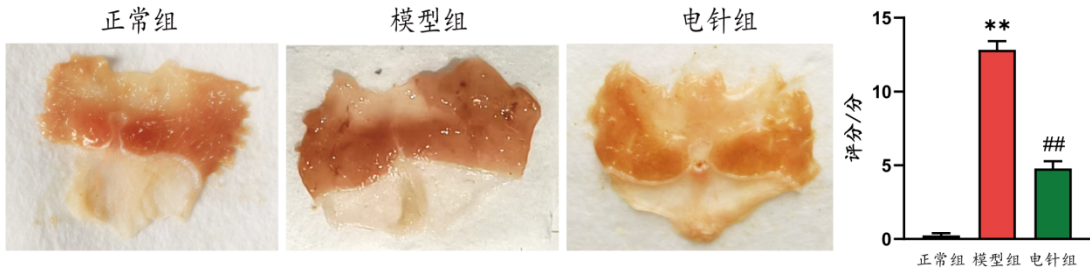
2 结果

2.1 各组小鼠胃黏膜损伤指数评分比较

肉眼下可见正常组胃黏膜表面光滑平整, 无充血、水肿、糜烂及出血点; 模型组可见弥漫性水肿明显, 大量点状或片状出血灶; 电针组出血点数量明

显减少,仅散在少量点状出血,无明显片状出血。与空白组比较,模型组小鼠胃黏膜损伤指数升高(P

<0.01);与模型组比较,电针组小鼠胃黏膜损伤指数降低($P<0.01$)。见图1。



注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

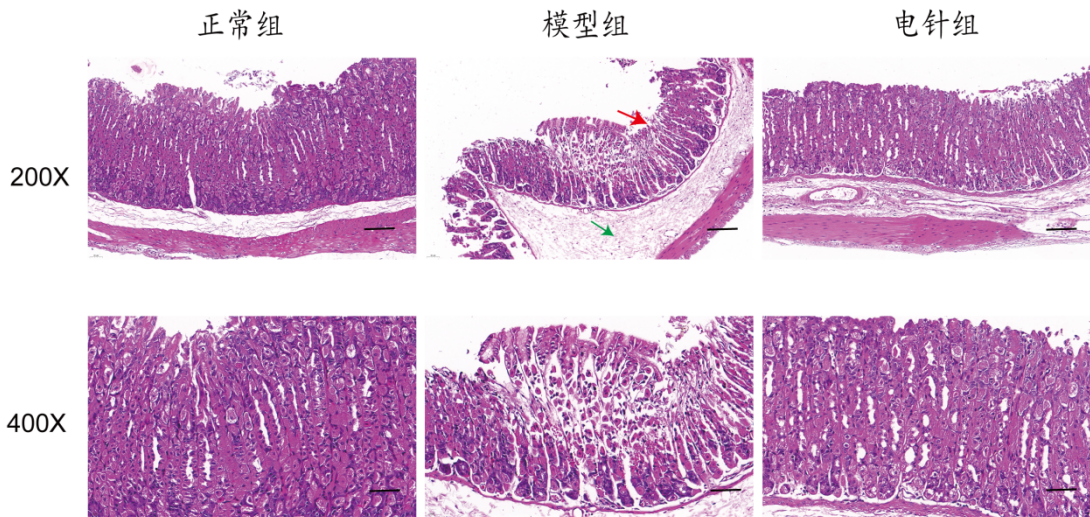
图1 各组小鼠胃黏膜损伤指数评分的比较($\bar{x}\pm s$,10只鼠/组)

Fig.1 Comparison of gastric mucosal injury index scores in mice of each group ($\bar{x}\pm s$, 10 mice/group)

2.2 各组小鼠HE染色胃组织病理形态比较

HE染色结果显示,正常组胃组织整体结构基本正常:胃小凹结构清晰,无黏膜上皮细胞脱落坏死;组织间质血管无明显充血扩张;无明显炎性细胞浸润;黏膜层腺体丰富,腺体无明显肿胀。模型组胃组织整体结构异常:存在较多黏膜上皮细胞坏死,细胞核出现固缩、溶解甚至消失的情况;黏膜层

有大面积充血;可见少量炎性细胞浸润。电针组胃组织整体结构轻度异常,损伤情况较模型组明显改善:胃小凹结构较清晰,无黏膜上皮细胞脱落坏死;组织间质血管无明显充血扩张,黏膜层无大面积充血;无明显炎性细胞浸润;黏膜层腺体丰富,无腺体明显肿胀,仅见少量腺上皮疏松水肿。见图2。



注:红色箭头示上皮细胞脱落坏死,绿色箭头示水肿,上图标尺=50 μm ,下图标尺=20 μm 。

图2 各组小鼠胃组织形态比较(HE染色)

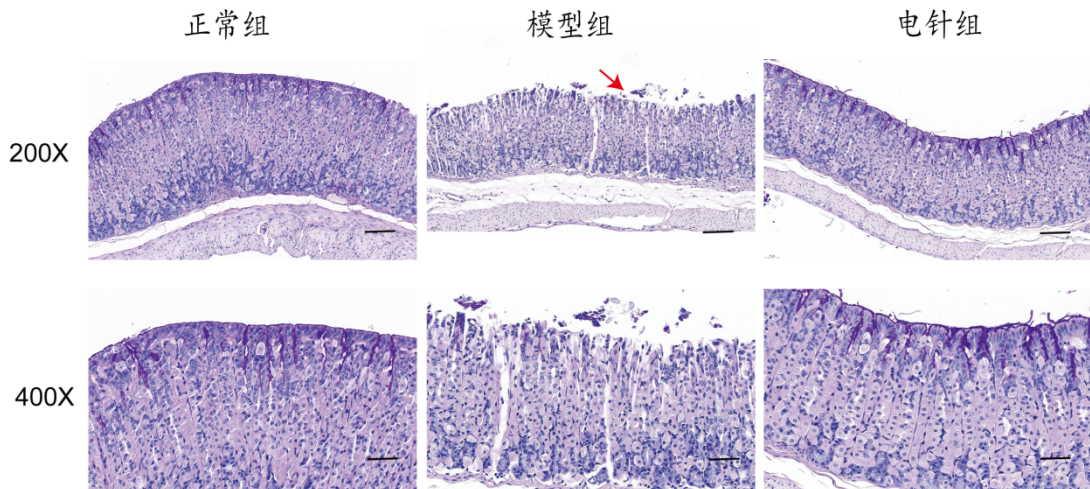
Fig.2 Comparison of gastric tissue morphology in mice of each group (HE staining)

2.3 各组小鼠PAS染色胃组织黏液分泌比较

胃黏膜表面的保护性胃黏液,主要成分糖蛋白经PAS染色呈紫红色。正常组小鼠胃黏膜PAS染色可见不间断的紫红色黏液层,均匀分布于黏膜表

面;模型组小鼠因胃黏膜上皮细胞大量脱落、胃黏膜结构严重破坏,PAS染色下无法观察到紫红色黏液层;电针组小鼠胃黏膜结构基本完整,无明显上皮细胞大量脱落,PAS染色可见连续的紫红色黏液

层,分布均匀。见图3。



注:红色箭头示上皮细胞脱落坏死,上图标尺=50 μm,下图标尺=20 μm。

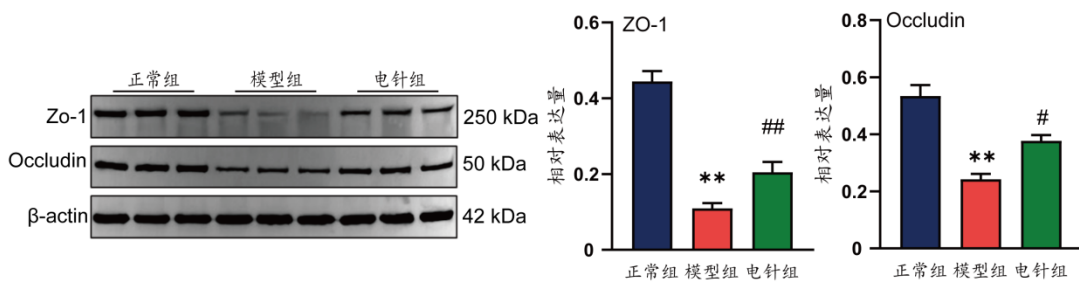
图3 各组小鼠胃组织黏液分泌比较(PAS染色)

Fig. 3 Comparison of mucus secretion in gastric tissue of mice in each group (PAS staining)

2.4 各组小鼠胃组织屏障功能ZO-1、Occludin蛋白相对表达量比较

ZO-1和Occludin蛋白是胃黏膜上皮紧密连接的核心结构蛋白,其表达水平直接反映胃黏膜屏障完整性。Westernblot检测结果显示,与正常组比

较,模型组小鼠胃组织ZO-1、Occludin蛋白相对表达量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,电针组ZO-1、Occludin蛋白相对表达量显著升高($P < 0.01$)。见图4。



注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$ 。

图4 各组小鼠胃组织屏障功能ZO-1、Occludin蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

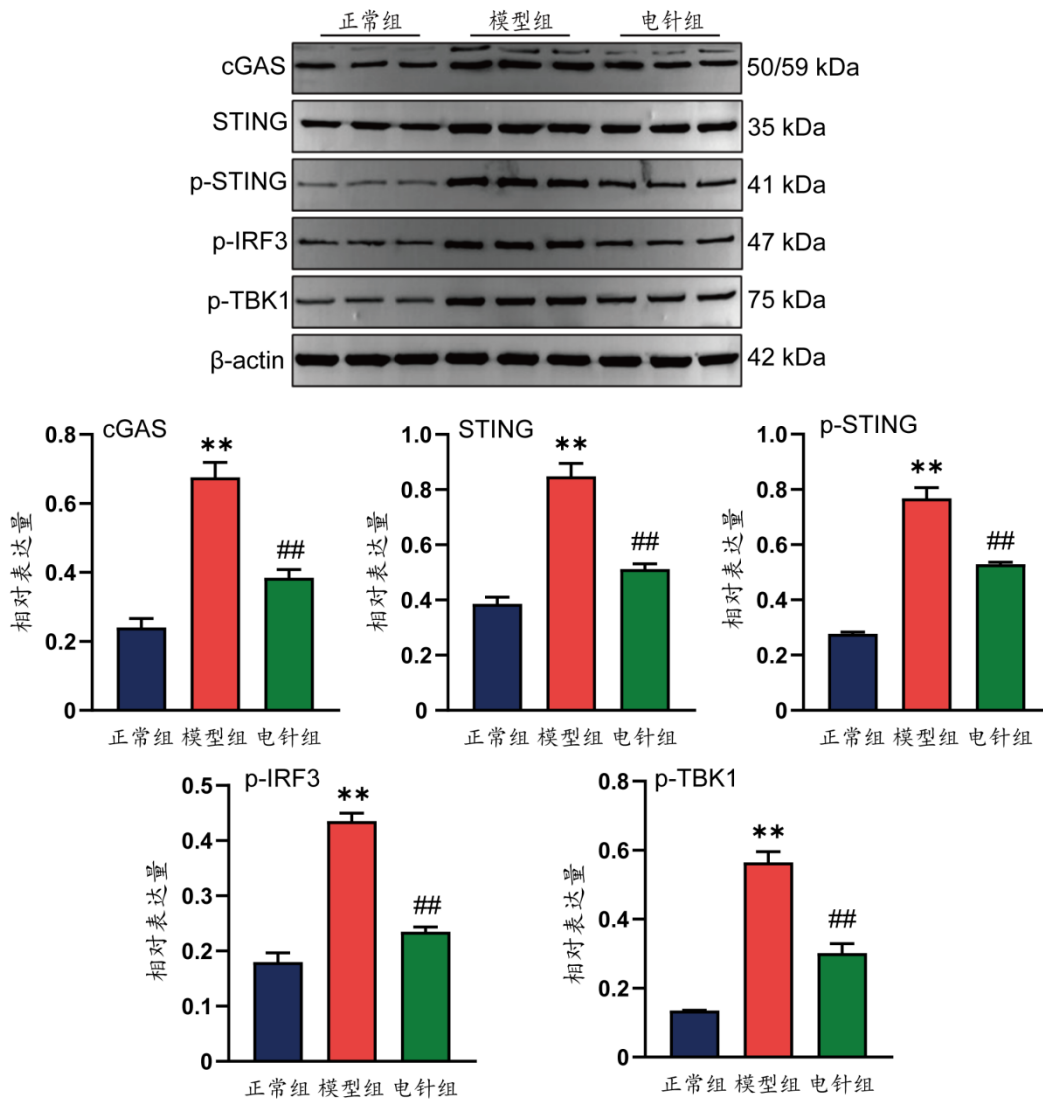
Fig. 4 Comparison of relative expression levels of ZO-1 and Occludin proteins related to gastric tissue barrier function in mice of each group ($\bar{x} \pm s$, 3 mice/group)

2.5 各组小鼠胃组织cGAS-STING通路相关分子蛋白相对表达量比较

Westernblot检测结果显示,与正常组比较,模型组小鼠胃组织cGAS、STING、p-STING、p-IRF3、p-TBK1蛋白相对表达量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,电针组小鼠胃组织cGAS、STING、p-STING、p-IRF3、p-TBK1蛋白相对表达量显著降低($P < 0.01$)。见图5。

2.6 各组小鼠胃黏膜组织中M1/M2型巨噬细胞表达的比较

流式细胞术检测结果显示,与正常组比较,模型组小鼠胃黏膜组织M1型巨噬细胞占比显著升高($P < 0.01$),M2型巨噬细胞占比明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,电针组小鼠胃黏膜组织M1型巨噬细胞占比显著降低($P < 0.01$),M2型巨噬细胞占比显著升高($P < 0.01$)。见图6。



注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

图5 各组小鼠胃组织cGAS、STING、p-STING、p-IRF3、p-TBK1蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of relative expression levels of cGAS, STING, p-STING, p-IRF3, and p-TBK1 proteins in gastric tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, 3 mice/group)

2.7 各组小鼠胃组织iNOS、CD206免疫荧光阳性表达比较

免疫荧光结果显示,与正常组比较,模型组iNOS阳性表达增加($P < 0.01$),CD206阳性表达减少($P < 0.01$);与模型组比较,电针组iNOS阳性表达减少($P < 0.01$),CD206阳性表达增加($P < 0.01$)。见图7、图8。

2.8 各组小鼠胃组织iNOS、CD86、Arg-1、CD206的蛋白相对表达量比较

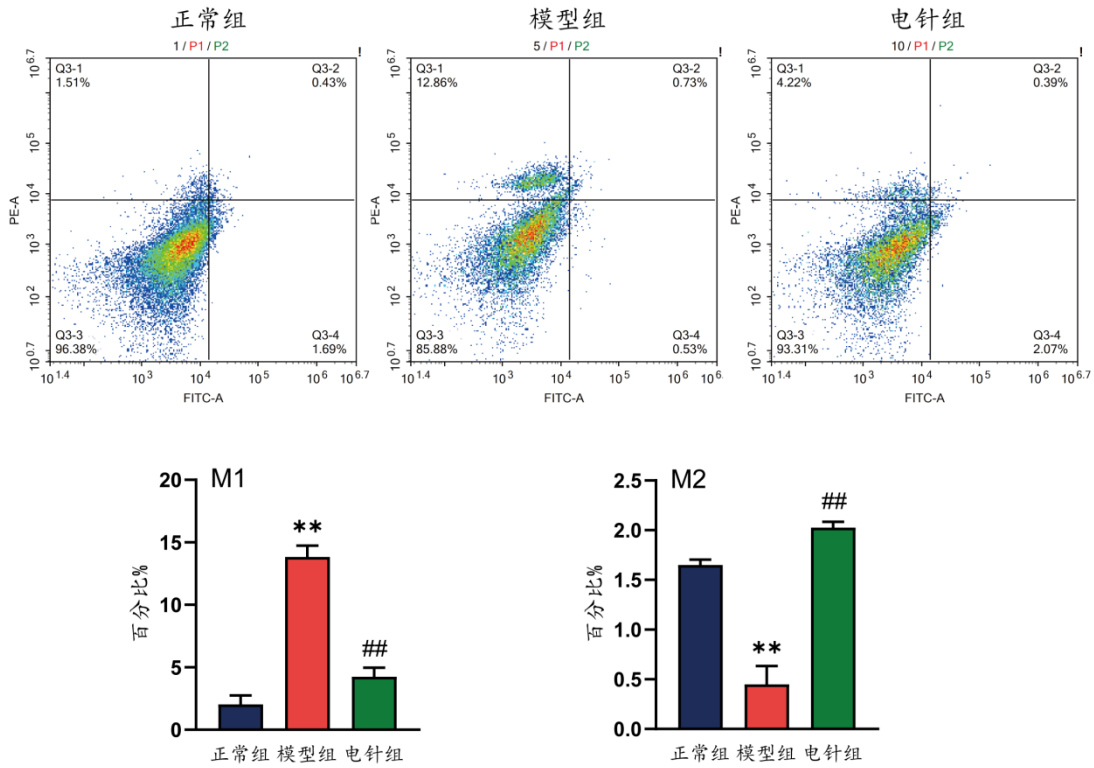
Westernblot检测结果显示,与正常组比较,模型组小鼠胃组织iNOS、CD86蛋白相对表达量显著升高($P < 0.01$),Arg-1、CD206蛋白相对表达量显

著降低($P < 0.01$);与模型组比较,电针组小鼠胃组织iNOS、CD86蛋白相对表达量显著降低($P < 0.01, P < 0.05$),Arg-1、CD206蛋白相对表达量显著升高($P < 0.01$)。见图9。

2.9 各组小鼠胃组织炎性因子TNF- α 、IL-6、TGF- β 、IL-10的mRNA表达比较

RT-qPCR检查胃黏膜组织TNF- α 、IL-6、TGF- β 、IL-10的mRNA结果显示,与正常组比较,模型组胃组织TNF- α 、IL-6的mRNA含量显著升高($P < 0.01$),TGF- β 、IL-10的mRNA含量显著下降;与模型组比较,电针组胃组织TNF- α 、IL-6的mRNA含量显著下降($P < 0.01$),TGF- β 、IL-10的mRNA含

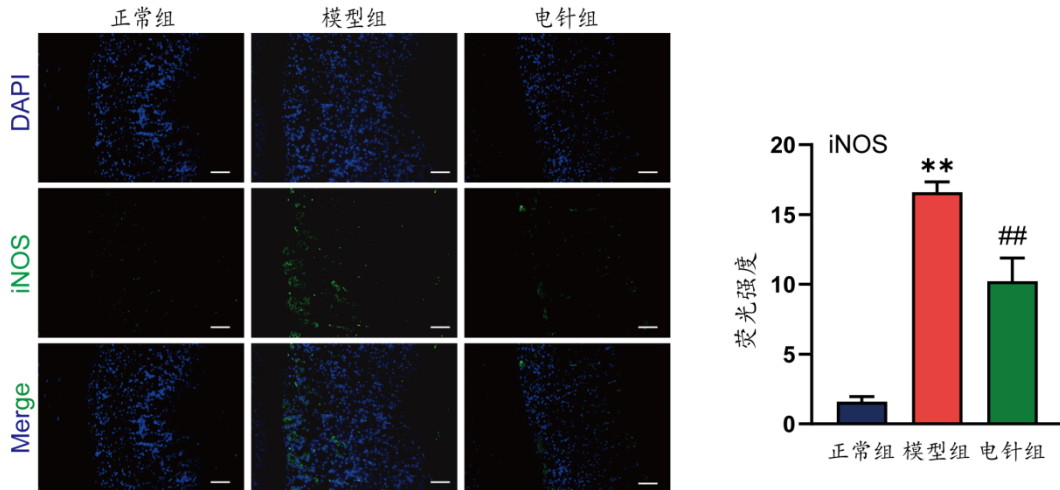
量显著升高($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 10。



注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

图 6 各组小鼠胃黏膜组织中 M1/M2 型巨噬细胞表达的比较($\bar{x} \pm s, 3$ 只鼠/组)

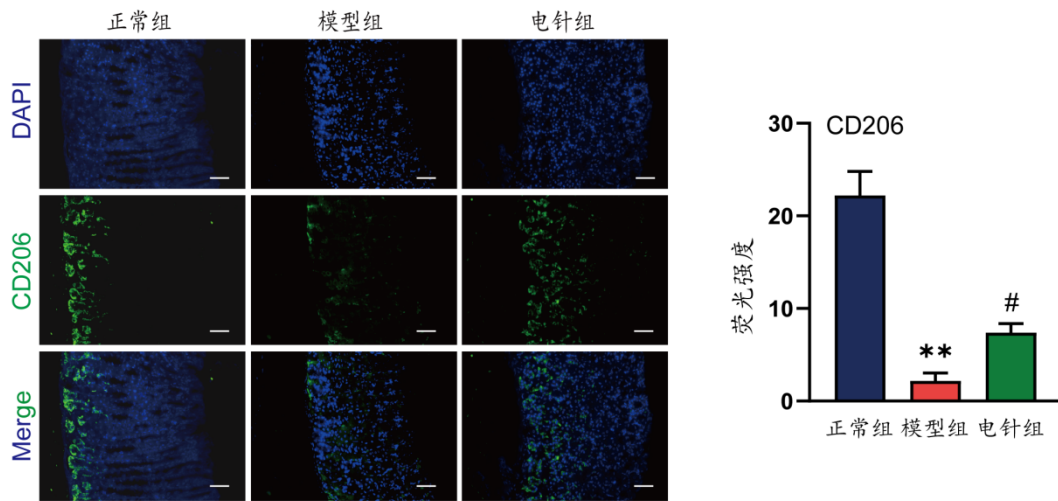
Fig. 6 Comparison of the expression of M1/M2 type macrophages in gastric mucosal tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, 3$ mice/group)



注:标尺=50 μm ,与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

图 7 各组小鼠胃组织 iNOS 免疫荧光阳性表达比较($\bar{x} \pm s, 3$ 只鼠/组)

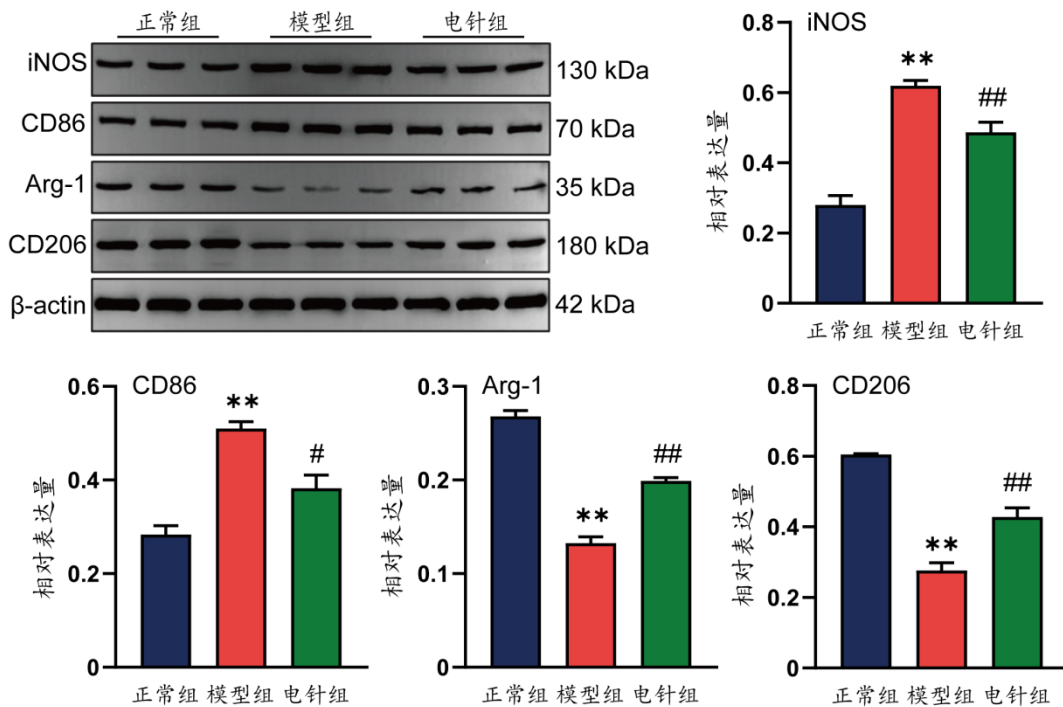
Fig. 7 Comparison of iNOS immunofluorescent positive expression in gastric tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, 3$ mice/group)



注:标尺=50 μm,与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。

图8 各组小鼠胃组织CD206免疫荧光阳性表达比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of CD206 immunofluorescent positive expression in gastric tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, 3 mice/group)



注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

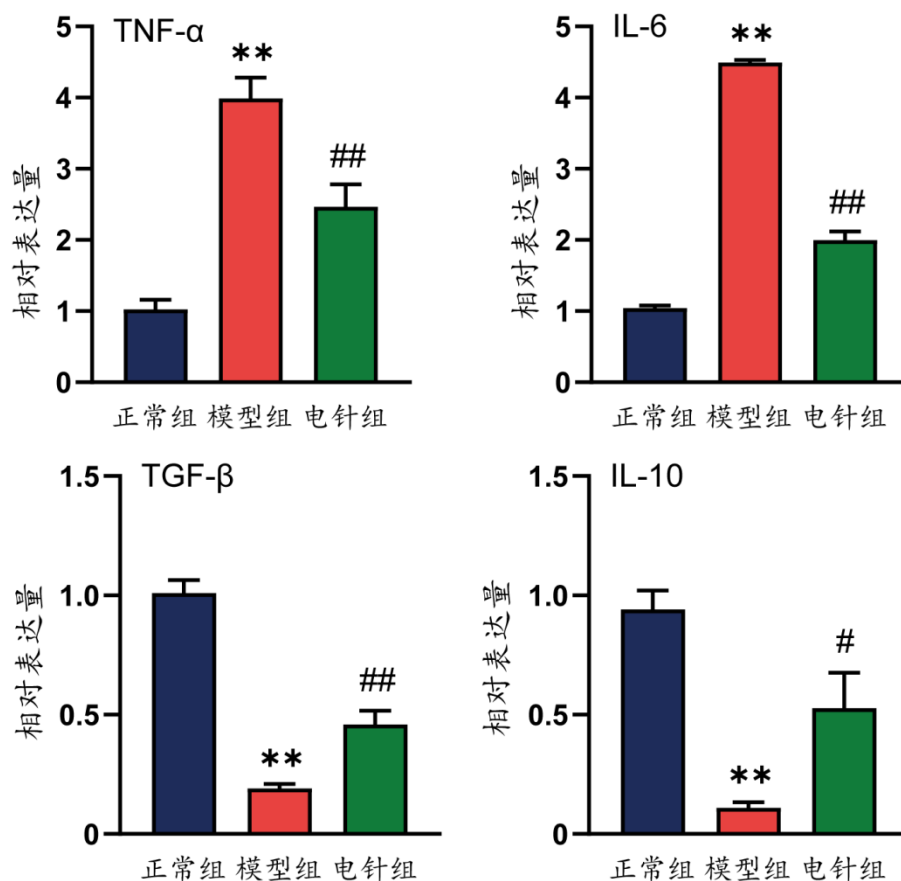
图9 各组小鼠胃组织iNOS、CD86、Arg-1、CD206蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 9 Comparison of relative expression levels of iNOS, CD86, Arg-1, and CD206 proteins in gastric tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, 3 mice/group)

3 讨论

AGMI的临床表现为胃黏膜浅表性溃疡、糜烂或者出血,属中医学“胃脘痛”范畴,多因饮食不节

(如饮酒过度)等损伤胃腑,导致气机逆乱,气血瘀滞,胃络失于濡养,进而引发黏膜屏障破坏^[12]。基于“不通则痛,不荣则痛”理论,治疗当以调畅气机、活



注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$ 。

图10 各组小鼠胃组织炎症因子TNF- α 、IL-6、TGF- β 、IL-10的mRNA表达比较($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 10 Comparison of mRNA expression of inflammatory factors TNF- α , IL-6, TGF- β , and IL-10 in gastric tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, 6 mice/group)

血通络、补益脾胃为原则^[13]。足三里为足阳明胃经合穴,能调理脾胃、补中益气;中脘为胃之募穴,亦是胃经的交会穴,可和胃健脾、调畅中焦气机,二穴相配,治疗胃病临床应用广泛,疗效确切^[14]。乙醇滥用作为全球性公共卫生问题,不仅损害多器官组织,更是引发胃黏膜损伤及溃疡的主要因素^[15, 16]。本研究以无水乙醇灌胃构建AGMI模型,采用“足三里”“中脘”干预,探究电针干预对cGAS-STING信号通路和巨噬细胞极化的影响。结果显示模型组小鼠胃黏膜损伤指数显著升高,胃黏膜上皮细胞坏死、黏液层缺失及紧密连接蛋白ZO-1、Occludin表达下调。采用电针“足三里”“中脘”干预后,上述病理改变显著改善。

炎症反应是乙醇诱导胃黏膜损伤的关键机制^[17],其特征为促炎细胞因子(如TNF- α 、IL-6)水平显著升高^[18]。巨噬细胞作为连接先天免疫与组织修复的核心效应细胞,其M1/M2极化状态直接调控

炎症反应进程:M1型巨噬细胞通过分泌TNF- α 、IL-6等促炎因子加剧黏膜损伤,而M2型巨噬细胞则通过释放IL-10、TGF- β 等抗炎因子促进组织修复^[19, 20]。近年来研究证实,乙醇刺激下活化的巨噬细胞向M1型极化倾斜,促炎因子会破坏胃黏膜屏障,形成“炎症反应-损伤”的恶性循环^[21-23]。本研究中,模型组胃黏膜组织呈现典型的极化失衡特征:M1型巨噬细胞(标志物iNOS、CD86)数量显著增多,伴随TNF- α 、IL-6等促炎因子过量表达;而M2型巨噬细胞(标志物Arg-1、CD206)比例减少,IL-10、TGF- β 等抗炎因子分泌不足。电针干预后,免疫荧光与流式细胞术检测显示,M1型极化标志物表达下调、M2型标志物表达上调,且细胞因子谱向抗炎方向逆转,证实电针可通过重塑巨噬细胞M1/M2极化平衡,阻断促炎因子介导的黏膜损伤路径。

cGAS-STING通路作为先天免疫识别异常DNA的核心枢纽^[24-26],乙醇可通过代谢产物乙醛的

基因毒性破坏胃上皮细胞 DNA 完整性,或增加线粒体膜通透性诱导线粒体 DNA(mtDNA)泄漏,进而激活 cGAS-STING 信号通路^[27]。已有研究在肠缺血模型中证实,电针通过抑制 STING 及 IRF3、TBK1 磷酸化缓解肠黏膜炎性反应^[28]。另有研究则明确,cGAS-STING 通路激活可通过 NF- κ B/IRF3 通路上调促炎因子、抑制 AKT/mTOR 通路阻断 M2 转录,最终驱动巨噬细胞向 M1 型极化^[29-31]。本研究结果显示,电针干预可抑制 cGAS-STING 信号通路的激活,降低 cGAS、STING、p-STING、p-TBK1、p-IRF3 蛋白, TNF- α 、IL-1 β mRNA 的表达,升高 IL-10、TGF- β mRNA 的表达,说明电针可抑制 cGAS-STING 信号通路的激活以减轻急性胃黏膜损伤。

现有研究中,电针调控巨噬细胞极化的效应已在多种炎性反应性疾病中得到证实,如通过调节巨噬细胞 M1/M2 表型转换缓解结肠炎、心肌缺血等病变,但该调控机制在胃黏膜损伤领域尚未见报道^[32-33]。同样,电针对 cGAS-STING 信号通路的调控作用,也仅在脑损伤、带状疱疹神经痛等非胃黏膜疾病中被观察到,而针对 AGMI 这一特定病症,目前尚无研究探索电针与 cGAS-STING 通路的潜在关联^[34-35]。更为关键的是,将电针干预、cGAS-STING 信号通路与巨噬细胞极化三者作为完整的机制链条,系统探讨其在 AGMI 治疗中的协同作用,目前国内外均无相关研究报道,该领域仍处于研究空白状态。本研究首次将这一机制链引入 AGMI 研究,既填补了电针调控巨噬细胞极化、cGAS-STING 通路在 AGMI 治疗中的研究空白,也为三者协同作用的创新机制提供了首个实验证据,同时为“足三里”“中脘”穴配伍治疗 AGMI 的临床应用,从分子机制层面补充了全新的理论支撑。同时,本研究仍存在局限性:一是仅设电针单一干预组,未纳入阳性药物对照组,难以充分凸显电针的独特治疗价值;二是未采用 cGAS-STING 通路抑制剂或基因沉默技术,仅能推测电针与通路的关联性,未能完全证实因果关系。后续需增设“模型+抑制剂组”“电针+抑制剂组”,通过对比通路活性、巨噬细胞极化比例及黏膜损伤指标,强化机制论证的严谨性,为电针改善 AGMI 的临床应用提供更充分的理论依据。

综上所述,在 AGMI 发生过程中,cGAS-STING 信号通路被激活,进而诱导巨噬细胞 M1/M2 极化失衡,加剧炎性反应与胃黏膜损伤。电针

干预“足三里”“中脘”穴可显著改善 AGMI 小鼠胃黏膜损伤,具体表现为胃黏膜损伤评分降低,胃小凹结构较清晰、黏液层完整性提升,黏膜层充血及炎性细胞浸润减轻,黏膜上皮细胞脱落坏死减少;其可能机制与抑制 cGAS-STING 信号通路激活、下调通路相关分子表达,进而重塑巨噬细胞 M1/M2 极化平衡有关。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] JOSHI D C, JOSHI N, KUMAR A, et al. Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications for peptic ulcer management: a comprehensive review[J]. *Horm Metab Res*, 2024, 56(9): 615-624.
- [2] LANAS A, CHAN F K L. Peptic ulcer disease[J]. *Lancet*, 2017, 390(10094): 613-624.
- [3] WANG F, YUAN C, DENG R, et al. Multi-omics analysis reveals the pre-protective mechanism of *Dendrobium flexicaule* polysaccharide against alcohol-induced gastric mucosal injury[J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 291: 139191.
- [4] LIU J W, WU J N, WANG R, et al. ANKRD22 drives rapid proliferation of Lgr5(+) cells and acts as a promising therapeutic target in gastric mucosal injury[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 12(4): 1433-1455.
- [5] 张新美. 电针膻穴治疗胃溃疡的疗效及对血清 HSP70、TNF- α 、IL-6 水平的影响[J]. *四川中医*, 2020, 38(6): 185-188.
ZHANG X M. Effect of electro-acupuncture at acupoints on gastric ulcer and its influence on levels of serum HSP70, TNF- α and IL-6 (in Chinese)[J]. *Journal of Sichuan of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 38(6): 185-188.
- [6] BAI X, GUO Y R, ZHAO Z M, et al. Macrophage polarization in cancer and beyond: from inflammatory signaling pathways to potential therapeutic strategies[J]. *Cancer Lett*, 2025, 625: 217772.
- [7] ZHANG B, XU P B, ABLASSER A. Regulation of the cGAS-STING pathway[J]. *Annu Rev Immunol*, 2025, 43(1): 667-692.
- [8] 针刺研究编辑部.《针刺研究》实验动物福利伦理审查清单[J]. *针刺研究*, 2024, 49(02): 220.
Editorial Board of Acupuncture Research. List of ethical reviews for experimental animal welfare in *Acupuncture Research* (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(02): 220.
- [9] JOHNSON A C, GREENWOOD-VAN MEERVELD B. Critical evaluation of animal models of gastrointestinal disorders[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, 239: 289-317.
- [10] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第 3 部分: 小鼠[J]. *针刺研究*, 2021, 46(5): 445-446.
China Association of Acupuncture-Moxibustion. Names and location of commonly used acupoints in experimental animals Part 3: Mice (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2021,

- 46(5): 445-446.
- [11] GUTH P H, AURES D, PAULSEN G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine [J]. *Gastroenterology*, 1979, 76(1): 88-93.
- [12] 兰永利, 霍新慧, 李盼, 等. 针灸预处理对无水乙醇致急性胃黏膜损伤大鼠香草酸亚型1、降钙素基因相关肽蛋白表达的影响[J]. *环球中医药*, 2024, 17(2): 203-208.
- LAN Y L, HUO X H, LI P, et al. Effects of acupuncture pretreatment on TRPV1 and CGRP protein expression in rats with absolute ethanol-induced acute gastric mucosal injury (in Chinese)[J]. *Global Traditional Chinese Medicine*, 2024, 17(2): 203-208.
- [13] 章莹, 肖剑, 黄娜, 等. 刘燕平教授基于《黄帝内经》辨治胃脘痛经验[J]. *光明中医*, 2025, 40(13): 2764-2767.
- ZHANG Y, XIAO J, HUANG N, et al. Professor Liu Yanping's experience in treating epigastric pain based on Huangdi Neijing (in Chinese) [J]. *Guangming Journal of Chinese Medicine*, 2025, 40(13): 2764-2767.
- [14] 邢家铭, 盛雪燕, 张延菊, 等. 合募配穴理论在针灸治疗胃溃疡中的应用[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(2): 411-413.
- XING J M, SHENG X Y, ZHANG Y J, et al. Application of the theory of combination of acupuncture and moxibustion with acupoints in treating gastric ulcer (in Chinese) [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2016, 27(2): 411-413.
- [15] KAN J T, HOOD M, BURNS C, et al. A novel combination of wheat peptides and fucoidan attenuates ethanol-induced gastric mucosal damage through anti-oxidant, anti-inflammatory, and pro-survival mechanisms [J]. *Nutrients*, 2017, 9(9): 978.
- [16] LE DARÉ B, LAGENTE V, GICQUEL T. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects [J]. *Drug Metab Rev*, 2019, 51(4): 545-561.
- [17] PARK S, HAHM K B, OH T Y, et al. Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats [J]. *Dig Dis Sci*, 2004, 49(3): 384-394.
- [18] LIU R, HAO Y T, ZHU N, et al. The gastroprotective effect of small molecule oligopeptides isolated from walnut (*Juglans regia* L.) against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats [J]. *Nutrients*, 2020, 12(4): 1138.
- [19] MOSSER D M, EDWARDS J P. Exploring the full spectrum of macrophage activation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(12): 958-969.
- [20] MURRAY P J, ALLEN J E, BISWAS S K, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines [J]. *Immunity*, 2014, 41(1): 14-20.
- [21] WEI Y F, LI X, ZHAO M R, et al. *Helicobacter pylori* disrupts gastric mucosal homeostasis by stimulating macrophages to secrete CCL3 [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 263.
- [22] WEI Y F, XIE S A, ZHANG S T. Current research on the interaction between *Helicobacter pylori* and macrophages [J]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1): 497.
- [23] XIANG M, LI P P, YUE X F, et al. Dysregulated macrophage immunity in *Helicobacter pylori* infection: unveiling mechanistic insights and therapeutic implications [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1636768.
- [24] WANG L Z, BI S N, LI Z, et al. Napabucasin deactivates STAT3 and promotes mitoxantrone-mediated cGAS-STING activation for hepatocellular carcinoma chemo-immunotherapy [J]. *Biomaterials*, 2025, 313: 122766.
- [25] SUN L J, WU J X, DU F H, 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.
- [26] ZHANG Z Y, ZHANG C G. Regulation of cGAS-STING signalling and its diversity of cellular outcomes [J]. *Nat Rev Immunol*, 2025, 25(6): 425-444.
- [27] GARAYCOECHEA J I, CROSSAN G P, LANGEVIN F, et al. Alcohol and endogenous aldehydes damage chromosomes and mutate stem cells [J]. *Nature*, 2018, 553(7687): 171-177.
- [28] ZHU Y L, FANG C, CHEN S X, et al. Electroacupuncture improves intestinal ischemia/reperfusion injury via cGAS-STING pathway [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2025, 37(10): e70066.
- [29] RUI H Y, YU H X, CHI K, et al. ALDH2 deficiency augments atherosclerosis through the USP14-cGAS-dependent polarization of proinflammatory macrophages [J]. *Redox Biol*, 2024, 76: 103318.
- [30] SHEN X C, SUN C Y, CHENG Y P, et al. cGAS mediates inflammation by polarizing macrophages to M1 phenotype via the mTORC1 pathway [J]. *J Immunol*, 2023, 210(8): 1098-1107.
- [31] WANG Y M, ZHU Y L, CAO Y W, et al. The activation of cGAS-STING pathway offers novel therapeutic opportunities in cancers [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1579832.
- [32] 徐慧超, 武荣林, 蒋子文, 等. 电针调节巨噬细胞极化改善大鼠溃疡性结肠炎的机制研究 [J]. *针刺研究*, 2023, 48(10): 1033-1040.
- XU H C, WU R L, JIANG Z W, et al. Study on the mechanism of electroacupuncture regulating macrophage polarization to improve ulcerative colitis in rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(10): 1033-1040.
- [33] 杨文秀, 陈栎遥, 杨嘉丽, 等. 不同强度电针预处理对急性心肌梗死小鼠心功能及巨噬细胞极化的影响 [J]. *针刺研究*, 2022, 47(11): 955-961.
- YANG W X, CHEN L Y, YANG J L, et al. Effect of different electrical current intensities of electroacupuncture preconditioning on cardiac function and macrophage polarization in mice with acute myocardial ischemia (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2022, 47(11): 955-961.
- [34] 王亚敏, 吕转, 于浩冉, 等. 基于cGAS-STING信号通路介导的铁自噬探讨电针对大鼠中动脉闭塞大鼠学习记忆障碍

- 的影响[J]. 针刺研究, 2025, 50(11): 1238-1247.
- WANG Y M, LU Z, YU H R, et al. Exploring the effect of electroacupuncture on learning and memory impairment in rats with middle cerebral artery occlusion through ferritinophagy mediated by cGAS-STING signaling pathway (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(11): 1238-1247.
- [35] 辛欢, 邹璟, 乐薇. 电针通过cGAS-STING通路影响小胶质细胞介导的带状疱疹后神经痛[J]. *中国医科大学学报*, 2025, 54(3): 208-213, 218.
- XIN H, ZOU J, LE W. Electroacupuncture affects microglia-mediated postherpetic neuralgia *via* the cGAS-STING pathway (in Chinese) [J]. *Journal of China Medical University*, 2025, 54(3): 208-213, 218.

收稿日期:2025-10-27 修回日期:2025-11-12