

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research茶黄素通过调控 AEG - 1 介导 NLRP3/
Caspase - 1 信号通路改善溃疡性结肠炎
肠上皮细胞炎症反应的机制研究Research of the mechanism of theaflavin improving the inflammatory response of
intestinal epithelial cells in ulcerative colitis by regulating the AEG - 1 - mediated
NLRP3/Caspase - 1 signaling pathway

童景飞, 饶春晖

(杭州市中医院 肛肠科, 浙江 杭州 310007)

TONG Jing - fei, RAO Chun - hui

(Anorectal Department, Hangzhou
Hospital of Traditional Chinese Medicine,
Hangzhou 310007, Zhejiang Province,
China)基金项目: 浙江省中医药科技计划基金资助项
目(2023ZL112)作者简介: 童景飞(1983 -), 男, 主治医师,
主要从事溃疡性结肠炎方面的工作
和研究

通信作者: 童景飞

MP: 18857114686

E - mail: 18857114686@163.com

摘要:目的 探讨茶黄素通过调控星形细胞上调基因 1(AEG - 1)介导 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)/半胱天冬蛋白酶 - 1(Caspase - 1)信号通路改善溃疡性结肠炎(UC)肠上皮细胞炎症反应的机制。**方法** 将 NCM460 细胞分为空白组(NCM460 细胞常规培养, 不进行任何干预处理)、模型组(给予 NCM460 细胞 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 脂多糖处理 24 h)、实验组(给予 NCM460 细胞 $64\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茶黄素和 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 脂多糖处理 24 h)、pcDNA3.1 - NC 组(NCM460 细胞转染 pcDNA3.1 - NC 质粒后, 给予 $64\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茶黄素和 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 脂多糖处理 24 h)、pcDNA3.1 - AEG - 1 组(NCM460 细胞转染 pcDNA3.1 - AEG - 1 质粒后, 给予 $64\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茶黄素和 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 脂多糖处理 24 h)。用细胞计数试剂盒 8 法、Transwell 及细胞划痕实验检测细胞活力、侵袭及迁移能力, 用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应检测 AEG - 1、屏障损伤相关蛋白的 mRNA 水平, 用蛋白免疫印迹法检测 AEG - 1、凋亡、屏障损伤及 NLRP3/Caspase - 1 信号通路相关蛋白表达, 用酶联免疫吸附法检测炎症因子含量。**结果** 空白组、模型组和实验组的细胞迁移率分别为 $(78.85 \pm 13.47)\%$ 、 $(19.32 \pm 3.15)\%$ 和 $(54.97 \pm 9.03)\%$ 。空白组、模型组、实验组、pcDNA3.1 - NC 组、pcDNA3.1 - AEG - 1 组的白细胞介素 - 6(IL - 6)水平分别为 (0.49 ± 0.07) 、 (1.36 ± 0.21) 、 (0.64 ± 0.09) 、 (0.68 ± 0.10) 和 $(1.21 \pm 0.18)\text{ pg} \cdot \text{L}^{-1}$, 凋亡率分别为 $(8.26 \pm 1.47)\%$ 、 $(27.09 \pm 4.62)\%$ 、 $(14.51 \pm 2.18)\%$ 、 $(16.75 \pm 2.83)\%$ 和 $(22.68 \pm 3.56)\%$, B 淋巴细胞瘤 - 2(Bcl - 2)蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 0.39 ± 0.07 、 0.71 ± 0.12 、 0.67 ± 0.09 和 0.54 ± 0.08 , Bcl - 2 相关 X(Bax)蛋白的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.19 、 6.45 ± 1.12 、 3.90 ± 0.64 、 3.79 ± 0.58 和 6.07 ± 0.96 , AEG - 1 mRNA 分别为 1.00 ± 0.13 、 4.35 ± 0.76 、 1.92 ± 0.33 、 2.08 ± 0.32 和 3.26 ± 0.57 , AEG - 1 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 4.82 ± 0.79 、 2.07 ± 0.34 、 2.25 ± 0.36 和 3.94 ± 0.71 , 紧密连接蛋白 - 1(ZO - 1)的 mRNA 分别为 1.00 ± 0.15 、 0.37 ± 0.06 、 0.76 ± 0.13 、 0.79 ± 0.14 和 0.51 ± 0.09 , 闭合蛋白(Occludin)的 mRNA 分别为 1.00 ± 0.16 、 0.29 ± 0.05 、 0.58 ± 0.10 、 0.52 ± 0.09 和 0.37 ± 0.06 , NLRP3 的蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.19 、 6.58 ± 1.06 、 2.71 ± 0.43 、 2.59 ± 0.42 和 5.16 ± 0.94 , Cleaved Caspase - 1 的蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 5.26 ± 0.93 、 3.42 ± 0.59 、 3.65 ± 0.64 和 5.09 ± 0.87 。上述指标, 模型组与空白组、实验组比较, pcDNA3.1 - NC 组与 pcDNA3.1 - AEG - 1 组比较, 在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.001$)。**结论** 茶黄素可改善 LPS 诱导 UC 肠上皮细胞的炎症反应和抑制细胞凋亡, 对上皮屏障功能具有保护作用, 其机制可能与下调 AEG - 1 表达抑制 NLRP3/Caspase - 1 信号通路有关。

关键词: 茶黄素; 星形细胞上调基因 1; NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3; 半胱天冬蛋白酶 - 1; 溃疡性结肠炎; 肠上皮细胞; 炎症

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.08.014

中图分类号:R285.5 文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2026)08-1137-07

Abstract: Objective To explore the mechanism of theaflavin improving the inflammatory response of intestinal epithelial cells in ulcerative colitis (UC) through regulating NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) / Caspase-1 signaling pathway mediated by astrocyte elevated gene 1 (AEG-1). **Methods** NCM460 cells were divided into control group (conventional culture of NCM460 cells without any intervention treatment), model group (treated with $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ lipopolysaccharide in NCM460 cells for 24 hours), experimental group (treated with $64 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ theaflavin and $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ lipopolysaccharide in NCM460 cells for 24 h), pcDNA3.1-NC group (after NCM460 cells were transfected with the pcDNA3.1-NC plasmid, treated with $64 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ theaflavin and $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ lipopolysaccharide for 24 h) and pcDNA3.1-AEG-1 group (after NCM460 cells were transfected with the pcDNA3.1-AEG-1 plasmid, treated with $64 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ theaflavin and $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ lipopolysaccharide for 24 h). Cell viability was detected by cell counting kit-8 method, cell invasion ability was detected by Transwell assay, cell migration ability was detected by cell scratch assay, and mRNA levels of AEG-1 and barrier damage-related proteins were detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. Western blotting was used to detect the expressions of AEG-1, apoptosis, barrier injury and NLRP3/Caspase-1 signaling pathway-related proteins and enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the contents of inflammatory factors. **Results** The cell migration rate of the control group, model group, experimental group were $(78.85 \pm 13.47)\%$, $(19.32 \pm 3.15)\%$ and $(54.97 \pm 9.03)\%$, respectively. The levels of interleukin-6 (IL-6) in the control group, model group, experimental group, pcDNA3.1-NC group and pcDNA3.1-AEG-1 group were (0.49 ± 0.07) , (1.36 ± 0.21) , (0.64 ± 0.09) , (0.68 ± 0.10) and $(1.21 \pm 0.18) \text{ pg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the apoptosis rates were $(8.26 \pm 1.47)\%$, $(27.09 \pm 4.62)\%$, $(14.51 \pm 2.18)\%$, $(16.75 \pm 2.83)\%$ and $(22.68 \pm 3.56)\%$, respectively; the relative expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein were 1.00 ± 0.16 , 0.39 ± 0.07 , 0.71 ± 0.12 , 0.67 ± 0.09 and 0.54 ± 0.08 , respectively; the relative expression levels of Bcl-2-associated X (Bax) protein were 1.00 ± 0.19 , 6.45 ± 1.12 , 3.90 ± 0.64 , 3.79 ± 0.58 and 6.07 ± 0.96 , respectively; the mRNA levels of AEG-1 were 1.00 ± 0.13 , 4.35 ± 0.76 , 1.92 ± 0.33 , 2.08 ± 0.32 and 3.26 ± 0.57 , respectively; the relative expression levels of AEG-1 protein were 1.00 ± 0.17 , 4.82 ± 0.79 , 2.07 ± 0.34 , 2.25 ± 0.36 and 3.94 ± 0.71 , respectively; the mRNA levels of Zonula Occludens-1 (ZO-1) were 1.00 ± 0.15 , 0.37 ± 0.06 , 0.76 ± 0.13 , 0.79 ± 0.14 and 0.51 ± 0.09 , respectively, while the mRNA levels of Occludin were 1.00 ± 0.16 , 0.29 ± 0.05 , 0.58 ± 0.10 , 0.52 ± 0.09 and 0.37 ± 0.06 , respectively; the relative protein expression levels of NLRP3 were 1.00 ± 0.19 , 6.58 ± 1.06 , 2.71 ± 0.43 , 2.59 ± 0.42 and 5.16 ± 0.94 , respectively; the relative protein expression levels of cleaved caspase-1 were 1.00 ± 0.16 , 5.26 ± 0.93 , 3.42 ± 0.59 , 3.65 ± 0.64 and 5.09 ± 0.87 , respectively. When comparing the model group with the control group and the experimental group, and the pcDNA3.1-NC group with the pcDNA3.1-AEG-1 group, the differences in the above indicators were all statistically significant ($P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** Theaflavin can improve the inflammatory response of LPS-induced UC intestinal epithelial cells and inhibit cell apoptosis, and has a protective effect on epithelial barrier function. The mechanism may be related to the down-regulation of AEG-1 expression and the inhibition of the NLRP3/Caspase-1 signaling pathway.

Key words: theaflavin; astrocytes upregulate gene 1; NOD-like receptor thermal protein domain-associated protein 3; caspase-1; ulcerative colitis; intestinal epithelial cells; inflammation

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病变局限在肠道黏膜层及黏膜下层的慢性、持续性、非特异性免疫性肠病,长期不受控制的 UC 可能会导致结

直肠癌,目前仍缺乏特效药物,因此,从多角度探索 UC 的病理机制,发现新的药物作用靶点是当前探索的主要方向^[1-2]。越来越多的研究发现,天然产物及

其衍生物对 UC 的疗效确切,其中茶黄素作为天然特征性多酚产物,具有抗氧化剂、抗炎、抗病毒及预防骨质疏松等生理作用^[3-4]。近年来研究发现,人类星形细胞上调基因 1 (astrocyte elevated gene 1, AEG-1) 在中枢神经变性、肿瘤、炎症等多种病理过程中发挥重要作用,可参与多种信号通路的活化进而改变细胞的生物学行为;NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 信号通路参与固有免疫的活化过程,被认为与 UC 肠道免疫炎症损伤密切相关^[5-6]。但茶黄素对 UC 肠上皮细胞损伤的影响,及是否涉及 AEG-1、NLRP3/Caspase-1 通路的机制尚不清楚。基于此,本研究以脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导的 UC 肠上皮细胞 NCM460 为模型,探讨茶黄素对其的影响及潜在机制,以期为临床应用提供参考。

材料与方法

1 材料

细胞 人结肠上皮细胞 NCM460,购自湖北武汉尚恩生物技术有限公司。

药品与试剂 茶黄素 (theaflavin),规格:每瓶 10 mg,纯度:≥95.0% (HPLC 法),批号:81090、LPS,规格:每瓶 1 mg,纯度:<1% 蛋白质 (Lowry 法),批号:0000370464,均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;Triton X-100、逆转录试剂盒、细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8)、Transwell 小室,均购自上海碧云天生物技术有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、AEG-1、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、紧密连接蛋白-1 (zonula occluden-1, ZO-1)、闭合蛋白 (Occludin)、NLRP3 和剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cleaved caspase-1) 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白 G 抗体,均购自英国 Abcam 公司;原位末端转移酶标记技术 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 检测试剂盒,购自北京索莱宝科技有限公司;白细胞介素 (interleukin, IL)-6、IL-1β、IL-18 和肿瘤坏死因子-α (tumour necrosis factor-α, TNF-α) 酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒,购自上海酶联生物科技有限公司。

仪器 Nikon Eclipse Ti-SR 荧光显微镜,日本尼康公司产品;QuanStudio 6 荧光定量聚合酶链反应仪,美国 Thermo 公司产品;Infinite 200PRO 酶标仪,瑞士 Tecan 公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞分组与给药

取对数生长期的 NCM460 细胞,分为空白组 (NCM460 细胞常规培养,不进行任何干预处理)、模型组 (给予 NCM460 细胞 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 处理 24 h)、实验组 [给予 NCM460 细胞 $64 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茶黄素 (茶黄素浓度为预实验筛选出的一个最优作用浓度) 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 处理 24 h]、pcDNA3.1-NC 组 (NCM460 细胞转染 pcDNA3.1-NC 质粒后,给予 $64 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茶黄素和 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 处理 24 h)、pcDNA3.1-AEG-1 组 (NCM460 细胞转染 pcDNA3.1-AEG-1 质粒后,给予 $64 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茶黄素和 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 处理 24 h)。

2.2 CCK-8 法检测细胞活力^[7]

将细胞悬液稀释成 5×10^4 后,接种于 96 孔板,每孔 100 μL 。细胞贴壁生长 24 h 后,弃去培养基,给予不同浓度 LPS (0 、 0.1 、 0.5 、 1.0 、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理。培养箱内培养细胞 24 h 后吸弃 LPS,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗 3 遍后每孔加入新鲜无血清培养基 100 μL 和 CCK-8 溶液 10 μL ,将 96 孔板放于培养箱孵育 1.5 h,酶标仪 450 nm 波长处测定每孔吸光度值。

2.3 Transwell 法检测细胞侵袭能力^[7]

将细胞接种到铺有基质胶的 Transwell 小室上室中,避光孵育 24 h,0.5% 结晶紫染色后拍照并计数。

2.4 细胞划痕实验法检测细胞迁移能力^[7]

收集各组细胞,用移液器吸头划痕, PBS 冲洗脱落细胞,加入无血清培养液继续培养,在 0 h 和 48 h 时进行拍照,观察细胞迁移情况。

2.5 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 AEG-1、屏障损伤相关蛋白的 mRNA 水平^[8]

用 TRIzol 试剂从细胞中分离总 RNA 并鉴定其纯度及完整性,将总 RNA 反转录为互补 DNA,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物序列如下, AEG-1: 上游 5' - AAATAGCCAGCCTATCAAGACTC - 3', 下游 5' - TTCAGACTTGGTCTGTGAAGGAG - 3'; ZO-1: 上游 5' - TACCTCTTGAGCCTTGAAGT - 3', 下游 5' - CGTGCTGATGTGCCATA-

ATA-3'; *Occludin*; 上游 5' - TGCATGTTCCGACCAATGC-3'; 下游 5' - AAGCCACTTCCTCCATAAGG-3'; *GAPDH*: 上游 5' - ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 下游 5' - TCCACCACCCTTTGCTGTA-3'。

2.6 蛋白免疫印迹 (western blotting, WB) 法检测 AEG-1、凋亡、屏障损伤及 NLRP3/Caspase-1 信号通路相关蛋白表达^[9]

使用裂解缓冲液从细胞中提取总蛋白, 4℃下以 12 000 rpm 离心 15 min, 并收集上清液, 二喹啉甲酸法测定蛋白浓度。之后依次电泳、分离蛋白及转膜, 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h, 洗膜 3 次后, 加入 GAPDH、AEG-1、Bcl-2、Bax、ZO-1、Occludin、NLRP3 和 Caspase-1 一抗 4℃孵育过夜后, 洗膜除去一抗, 再加入辣根过氧化物酶标记二抗, 室温孵育 2 h。显影定量分析, 计算目的蛋白相对表达水平。

2.7 ELISA 实验检测 NCM460 细胞中炎症因子含量^[10]

收集细胞并离心取上清, 按照试剂盒说明书要求检测 IL-6、IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 的含量。

2.8 TUNEL 染色检测细胞凋亡率^[11]

在无血清培养基中培养 48 h 后, 用预冷的 PBS 重悬细胞至每毫升 1×10^6 , 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 用 1 mL 预热的 PBS 洗涤细胞, 5% 多聚甲醛固定, 加入 1% Triton X-100 液, PBS 漂洗, 加入 TUNEL 染色液, 室温下避光孵育 30 min, PBS 漂洗后, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染核并封片, 显微镜下观察并计算凋亡率。

3 统计学处理

用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间用单因素方差分析, 2 组间比较采用最小显著性差异 t 检验 (least significance difference t -test, LSD- t)。

结 果

1 不同浓度 LPS 对 NCM460 细胞活力的影响

0、0.1、0.5、1.0、2.0 mg $\cdot$ L⁻¹ LPS 处理 24 h 后 NCM460 细胞活力分别为 (100.00 $\pm$ 2.62)%、(89.93 $\pm$ 13.85)%、(78.47 $\pm$ 12.19)%、(57.81 $\pm$ 8.34)% 和 (35.69 $\pm$ 6.76)%。与 0 mg $\cdot$ L⁻¹ 相比, 0.1 mg $\cdot$ L⁻¹ LPS 处理 24 h 后 NCM460 细胞活力无显著变化 ($P > 0.05$), 0.5、1.0、2.0 mg $\cdot$ L⁻¹ LPS 处理 24 h 后 NCM460 细胞活力均显著降低 ($P < 0.001$)。其中 IC₅₀ 值为 1.287 mg $\cdot$ L⁻¹, 因此后续实验均选取 1.0 mg $\cdot$ L⁻¹ 的 LPS 浓度处理 NCM460 细胞。

2 茶黄素对 LPS 作用下 NCM460 细胞侵袭和迁移的影响

与空白组相比, 模型组 NCM460 细胞的侵袭数目显著减少, 迁移率显著降低 (均 $P < 0.001$); 与模型组相比, 实验组 NCM460 细胞的侵袭数目显著增多, 迁移率显著升高 (均 $P < 0.001$), 见表 1。

3 茶黄素对 LPS 作用下 NCM460 细胞中 AEG-1 表达的影响

与空白组相比, 模型组 NCM460 细胞中 AEG-1 mRNA 和蛋白相对表达水平显著升高 (均 $P < 0.001$); 与模型组相比, 实验组 NCM460 细胞中 AEG-1 mRNA 和蛋白相对表达水平显著降低 (均 $P < 0.001$); 与实验组相比, pcDNA3.1-NC 组 NCM460 细胞中 AEG-1 mRNA 和蛋白相对表达水平在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); 与 pcDNA3.1-NC 组相比, pcDNA3.1-AEG-1 组 NCM460 细胞中 AEG-1 mRNA 和蛋白相对表达水平显著升高 (均 $P < 0.001$), 见表 2。

4 茶黄素调控 AEG-1 对 LPS 作用下 NCM460 细胞炎症反应的影响

与空白组相比, 模型组 NCM460 细胞中 IL-6、IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 的含量均显著升高 (均 $P < 0.001$); 与模型组相比, 实验组 NCM460 细胞中 IL-6、IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 的含量显著降低 (均 $P < 0.001$); 与实验组相比, pcDNA3.1-NC 组 NCM460 细胞中 IL-6、IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 的含量无显著变化 (均 $P > 0.05$); 与 pcDNA3.1-NC 组相比, pcDNA3.1-AEG-1 组 NCM460 细胞中 IL-6、IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 的含量显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 见表 3。

5 茶黄素调控 AEG-1 对 LPS 作用下 NCM460 细胞凋亡的影响

与空白组相比, 模型组 NCM460 细胞的凋亡率、

表 1 各组 NCM460 细胞侵袭能力与细胞迁移率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the invasion ability and cell migration rate of NCM460 cells in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Cell invasion	Cell migration
		number (pieces)	rate (%)
Control	8	74.93 $\pm$ 11.68	78.85 $\pm$ 13.47
Model	8	21.57 $\pm$ 3.81 ***	19.32 $\pm$ 3.15 ***
Experimental	8	57.29 $\pm$ 8.45 $\Delta\Delta\Delta$	54.97 $\pm$ 9.03 $\Delta\Delta\Delta$

Control group: Normal feeding; Model group: Treat NCM460 cells with 1 mg $\cdot$ L⁻¹ lipopolysaccharides (LPS) for 24 hours; Experimental group: NCM460 cells were treated with 64 μ mol $\cdot$ L⁻¹ teaflavins and 1 mg $\cdot$ L⁻¹ LPS for 24 hours; Compared with the control group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

Bax 蛋白相对表达水平均显著升高, Bcl-2 蛋白相对表达水平显著降低(均 $P < 0.001$); 与模型组相比, 实验组 NCM460 细胞的凋亡率、Bax 蛋白相对表达水平均显著降低, Bcl-2 蛋白相对表达水平显著升高(均 $P < 0.001$); 与实验组相比, pcDNA3.1-NC 组 NCM460 细胞的凋亡率、Bax 及 Bcl-2 蛋白相对表达水平在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$); 与 pcDNA3.1-NC 组相比, pcDNA3.1-AEG-1 组 NCM460 细胞的凋亡率、Bax 蛋白相对表达水平均显著升高, Bcl-2 蛋白相对表达水平显著降低($P < 0.01, P < 0.001$), 见表 4。

6 茶黄素调控 AEG-1 对 LPS 作用下 NCM460 细胞屏障损伤的影响

与空白组相比, 模型组 NCM460 细胞中 ZO-1 和 Occludin mRNA 和蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.001$); 与模型组相比, 实验组 NCM460 细胞中 ZO-1 和 Occludin mRNA 和蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$); 与实验组相比, pcDNA3.1-NC

表 2 各组 NCM460 细胞中星形细胞上调基因 1 (AEG-1) mRNA 和蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of astrocyte elevated gene 1 (AEG-1) mRNA and protein levels in NCM460 cells of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	AEG-1 mRNA	AEG-1 protein
Control	8	1.00 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.17
Model	8	4.35 $\pm$ 0.76 ***	4.82 $\pm$ 0.79 ***
Experimental	8	1.92 $\pm$ 0.33 $\Delta\Delta\Delta$	2.07 $\pm$ 0.34 $\Delta\Delta\Delta$
pcDNA3.1-NC	8	2.08 $\pm$ 0.32	2.25 $\pm$ 0.36
pcDNA3.1-AEG-1	8	3.26 $\pm$ 0.57 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	3.94 $\pm$ 0.71 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$

pcDNA3.1-NC group: After transfection of NCM460 cells with the pcDNA3.1-NC plasmid, the cells were treated with 64 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ teaflavins and 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS for 24 hours; pcDNA3.1-AEG-1 group: After transfection of NCM460 cells with the pcDNA3.1-AEG-1 plasmid, the cells were treated with 64 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ teaflavins and 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS for 24 hours; Compared with the control group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; Compared with the pcDNA3.1-NC group, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$.

表 3 各组 NCM460 细胞中炎症因子含量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the contents of inflammatory factors in NCM460 cells of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	IL-6 (pg $\cdot$ L $^{-1}$)	IL-1 β (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	IL-18 (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	TNF- α (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)
Control	0.49 $\pm$ 0.07	46.94 $\pm$ 7.52	58.76 $\pm$ 9.18	82.58 $\pm$ 13.64
Model	1.36 $\pm$ 0.21 ***	128.51 $\pm$ 19.78 ***	165.98 $\pm$ 25.44 ***	213.74 $\pm$ 37.95 ***
Experimental	0.64 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta\Delta$	72.29 $\pm$ 13.84 $\Delta\Delta\Delta$	96.35 $\pm$ 17.62 $\Delta\Delta\Delta$	138.81 $\pm$ 21.37 $\Delta\Delta\Delta$
pcDNA3.1-NC	0.68 $\pm$ 0.10	79.85 $\pm$ 12.16	91.51 $\pm$ 16.83	141.29 $\pm$ 19.58
pcDNA3.1-AEG-1	1.21 $\pm$ 0.18 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	104.67 $\pm$ 15.39 $\blacktriangle\blacktriangle$	143.82 $\pm$ 18.56 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	185.46 $\pm$ 33.82 $\blacktriangle\blacktriangle$

IL-6: Interleukin-6; TNF- α : Tumour necrosis factor- α . Compared with the control group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; Compared with the pcDNA3.1-NC group, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$.

组 NCM460 细胞中 ZO-1 和 Occludin mRNA 和蛋白水平在统计学上差异无统计学意义(均 $P > 0.05$); 与 pcDNA3.1-NC 组相比, pcDNA3.1-AEG-1 组 NCM460 细胞中 ZO-1 和 Occludin mRNA 和蛋白相对表达水平均显著降低($P < 0.01, P < 0.001$), 见表 5。

7 茶黄素调控 AEG-1 对 LPS 作用下 NCM460 细胞中 NLRP3/Caspase-1 信号通路的影响

与空白组相比, 模型组 NCM460 细胞中 NLRP3 和 Cleaved Caspase-1 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$); 与模型组相比, 实验组 NCM460 细胞中 NLRP3 和 Cleaved Caspase-1 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.001$); 与实验组相比, pcDNA3.1-NC 组 NCM460 细胞中 NLRP3 和 Cleaved Caspase-1 蛋白相对表达水平在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$); 与 pcDNA3.1-NC 组相比, pcDNA3.1-AEG-1 组 NCM460 细胞中 NLRP3 和 Cleaved Caspase-1 蛋白相对表达水平均显著升高($P < 0.01, P < 0.001$), 见表 6 和图 1。

表 6 各组 NCM460 细胞中 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 信号通路相关蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Comparison of NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3)/Caspase-1 signaling pathway-related protein levels in each group of NCM460 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	NLRP3 protein	Cleaved Caspase-1 protein
Control	1.00 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.16
Model	6.58 $\pm$ 1.06 ***	5.26 $\pm$ 0.93 ***
Experimental	2.71 $\pm$ 0.43 $\Delta\Delta\Delta$	3.42 $\pm$ 0.59 $\Delta\Delta\Delta$
pcDNA3.1-NC	2.59 $\pm$ 0.42	3.65 $\pm$ 0.64
pcDNA3.1-AEG-1	5.16 $\pm$ 0.94 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	5.09 $\pm$ 0.87 $\blacktriangle\blacktriangle$

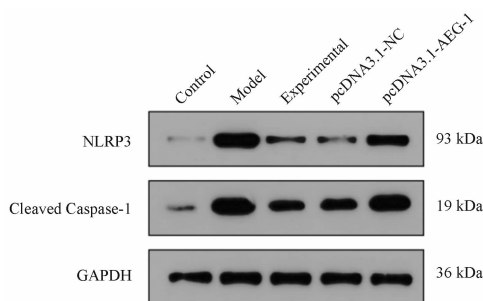
Compared with the control group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; Compared with the pcDNA3.1-NC group, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$.

表4 各组 NCM460 细胞凋亡率、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X (Bax) 蛋白水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)**Table 4** Comparison of apoptosis rates, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax) Bcl-2 and Bax protein levels of NCM460 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Group	Cell apoptosis rate(%)	Bcl-2 protein	Bax protein
Control	8.26 ± 1.47	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.19
Model	27.09 ± 4.62***	0.39 ± 0.07***	6.45 ± 1.12***
Experimental	14.51 ± 2.18 $\Delta\Delta\Delta$	0.71 ± 0.12 $\Delta\Delta\Delta$	3.90 ± 0.64 $\Delta\Delta\Delta$
pcDNA3.1-NC	16.75 ± 2.83	0.67 ± 0.09	3.79 ± 0.58
pcDNA3.1-AEG-1	22.68 ± 3.56 $\Delta\Delta$	0.54 ± 0.08 $\Delta\Delta$	6.07 ± 0.96 $\Delta\Delta\Delta$

Compared with the control group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; Compared with the pcDNA3.1-NC group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.**表5** 各组 NCM460 细胞中紧密连接蛋白-1 (ZO-1)、闭合蛋白 mRNA 和蛋白水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)**Table 5** Comparison of Zonula occluden-1 (ZO-1), Occludin mRNA and protein levels in NCM460 cells of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	ZO-1 mRNA	Occludin mRNA	ZO-1 protein	Occludin protein
Control	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.21
Model	0.37 ± 0.06***	0.29 ± 0.05***	0.35 ± 0.06***	0.09 ± 0.03***
Experimental	0.76 ± 0.13 $\Delta\Delta\Delta$	0.58 ± 0.10 $\Delta\Delta\Delta$	0.91 ± 0.16 $\Delta\Delta\Delta$	0.54 ± 0.09 $\Delta\Delta\Delta$
pcDNA3.1-NC	0.79 ± 0.14	0.52 ± 0.09	0.87 ± 0.15	0.46 ± 0.08
pcDNA3.1-AEG-1	0.51 ± 0.09 $\Delta\Delta\Delta$	0.37 ± 0.06 $\Delta\Delta$	0.63 ± 0.12 $\Delta\Delta$	0.12 ± 0.03 $\Delta\Delta\Delta$

ZO-1: Zonula occluden-1. Compared with the control group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; Compared with the pcDNA3.1-NC group, $\Delta\Delta P < 0.001$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.**图1** 蛋白质印迹实验检测各组 NCM460 细胞中 NLRP3/Caspase-1 信号通路相关蛋白的表达水平**Figure 1** The expression levels of NLRP3/Caspase-1 signaling pathway-related proteins in NCM460 cells of each group detected by Western blot experiment

讨 论

UC 属于慢性炎症性肠病,病程长、易复发、难以治愈,同时存在诱发结肠癌风险,其死亡率和癌变率高于其他类型结肠炎,LPS 作为肠道炎症反应的有效激活剂,可通过脱落或细菌裂解从细菌细胞壁释放出来而影响肠道上皮细胞功能,寻找抗 LPS 的有效天然产物以治疗肠道疾病并减轻患者痛苦成为当前研究的热点^[12]。茶黄素是红茶中存在的主要活性多酚,具有显著的抗炎效果,已引起越来越多的关注^[13]。研究表明,茶黄素预处理能显著减轻小鼠肠道缺血/

再灌注诱导的损伤,减轻炎症和细胞凋亡,同时促进自噬和增强抗氧化活性,其保护作用可能与磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路的激活密切相关^[14]。另有研究指出,茶黄素可通过调控 *miR-190* 表达,改善 LPS 诱导的结肠上皮细胞炎症因子 IL-6、IL-1 β 表达,从而发挥对结肠上皮细胞的炎症损伤的保护作用^[15]。AEG-1 可作为重要的原癌基因,在多种肿瘤的发生发展及神经进行性疾病中起重要作用。相关研究报道,在神经元中,下调 AEG-1 可降低肌萎缩性脊髓侧索硬化症体内外模型中运动神经元的活力,以及帕金森患者中黑质多巴胺能神经元凋亡^[16]。本研究采用 LPS 诱导的 NCM460 细胞建立 UC 体外肠上皮细胞炎症模型,随着 LPS 浓度的升高,NCM460 细胞的活力逐渐降低,给予茶黄素处理后,NCM460 细胞的侵袭及迁移能力显著增强,同时能下调 AEG-1 表达,表明茶黄素在对抗 LPS 诱导的 UC 炎症反应方面具有良好的潜力,其治疗作用与调节 AEG-1 基因的能力有关。

既往研究表明,结肠内异常亢进的炎症反应及肠上皮屏障功能障碍与 UC 的发生发展密切相关,其中 LPS 会诱导促炎症细胞因子 (TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等) 异常升高并最终引起炎症,其诱导的肠道组织损伤伴随着凋亡细胞的增加,Bcl-2 和 Bax 属于 Bcl-2 基因家族,具有促凋亡功能或抗凋亡功能,ZO-1、Occludin 等蛋白参与肠道上皮屏障的紧密结构组成,

能有效避免致病性抗原引发的肠道炎症反应^[17-18]。NLRP3/Caspase-1 信号通路与炎症性肠道疾病发展关系密切,在机体内各种因素的刺激下,激活的 NLRP3 炎症小体及 Caspase-1 处理白细胞介素 1 β 前体和白细胞介素 18 前体导致成熟细胞炎症因子的大量急剧释放,加重 UC 的病理进程^[19-20]。本实验数据表明,LPS 刺激可显著增加 NCM460 细胞凋亡率和炎症因子含量,上调 Bax 及 NLRP3 和 Caspase-1 通路蛋白的表达,下调 Bcl-2、屏障功能蛋白 ZO-1、Occludin 及的表达,而茶黄素则抵消了这些 LPS 诱导的效果,转染 AEG-1 可逆转茶黄素对 NCM460 细胞的影响,表明茶黄素可能靶向 AEG-1 进而影响 NLRP3/Caspase-1 通路的激活,发挥对 LPS 损伤结肠上皮细胞的治疗作用。PARK 等研究表明^[21],茶黄素可激活 AMPK 信号通路上调 Caco-2 细胞中紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达,从而增强肠道屏障功能,这与本研究结果相似。XING 等^[22]研究发现黄茶提取物可通过抑制 TLR4/NF- κ B/NLRP3 炎症小体通路改善 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎,降低 IL-1 β 、IL-6 等炎症因子水平,这与本研究中茶黄素对 NLRP3/Caspase-1 信号通路及炎症因子的抑制作用结果相似。

本研究提示:茶黄素可改善 LPS 诱导 UC 肠上皮细胞的炎症反应和抑制细胞凋亡,对上皮屏障功能具有保护作用,其机制可能与下调 AEG-1 表达抑制 NLRP3/Caspase-1 信号通路有关。本研究基于体外细胞实验,缺乏动物模型验证,未来可开展动物实验验证,并结合基因敲除或互作技术阐明 AEG-1 调控炎症小体活化的直接靶点。

参考文献:

- [1] 肖贵梅,蔡向志,龙海洮,等. 白术内酯Ⅲ介导的肌动蛋白相关蛋白 2/3 抑制肠上皮间质转化以缓解溃疡性结肠炎的研究[J]. 世界中医药,2024,19(15):2237—2245.
- [2] 陈银泽,花威,徐刚. 黄芪多糖通过 miR-146a 介导 STAT3/RelA 通路改善溃疡性结肠炎的研究[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(24):3606—3610.
- [3] TAKEMOTO M, TAKEMOTO H. Synthesis of theaflavins and their functions[J]. *Molecules*,2018,23(4):918.
- [4] 王志远,赵亚飞,吴泽平,等. 茶黄素类化合物的氧化制备方法及其生物活性研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2025,16(3):83—93.
- [5] 周宁,马彩芬,李娟娟,等. AEG-1 基因敲除对幼年小鼠认知功能的影响[J]. 神经解剖学杂志,2023,39(2):157—164.
- [6] 高青,孙河,王丽媛,等. 基于 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路探讨通窍明目 IV 号方含药血清对 L-谷氨酸诱导 R28 细胞损伤的影响[J]. 中医杂志,2025,66(18):1925—1933.
- [7] 黄渝清,王佳梅,赖恒周,等. 基于 PARG/PARP1/NF- κ B 通路探究半夏泻心汤抑制结肠癌细胞恶性表型的机制[J]. 中国中药杂志,2025,50(2):496—506.
- [8] 罗陈,杨燕,令狐莉,等. 野马追倍半萜内酯对脂多糖诱导大鼠急性肺损伤的保护作用研究[J]. 重庆医科大学学报,2025,50(7):889—897.
- [9] 张志猛,袁道通,靳希民,等. 苍膝通痹胶囊调控 p38 MAPK/NLRP3/Caspase-1 通路介导膝关节骨性关节炎软骨细胞焦亡的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(22):61—68.
- [10] 顾思臻,薛艳,高阳,等. 青黛对溃疡性结肠炎肠上皮细胞炎症模型的抗炎机制研究[J]. 中药药理与临床,2021,37(6):67—71.
- [11] 柳娜,王嘉鸣,徐婕,等. 基于 NF- κ B 信号通路探讨湿生扁蕾乙酸乙酯提取物对 NCM460 细胞凋亡的影响[J]. 中成药,2024,46(10):3255—3262.
- [12] SUN G, LIU M, HAN H. Overexpression of microRNA-190 inhibits migration, invasion, epithelial—mesenchymal transition, and angiogenesis through suppression of protein kinase B—extracellular signal—regulated kinase signaling pathway via binding to stanniocalcin 2 in breast cancer[J]. *J Cell Physiol*,2019,234(10):17824—17838.
- [13] 郑艳超,於天,郑志刚,等. 茶黄素生物活性与开发应用的研究进展[J]. 中草药,2020,51(23):6095—6101.
- [14] 汪英杰. 茶黄素对小鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用及机制的研究[D]. 江西·南昌:南昌大学,2025.
- [15] 左灵妮,刘康,马晓勤,等. 茶黄素通过调控 miR-190 表达对 LPS 诱导的结肠上皮细胞炎症损伤的影响[J]. 中国免疫学杂志,2021,37(17):2087—2092.
- [16] LEEM E, KIM H J, CHOI M, et al. Upregulation of neuronal astrocyte elevated gene-1 protects nigral dopaminergic neurons *in vivo*[J]. *Cell Death Dis*,2018,9(5):449.
- [17] 黄静,廖艳花,莫昕莹,等. 紫云英苷调节肠道菌群缓解小鼠溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 中国药房,2025,36(14):1709—1716.
- [18] KUO W T, ODENWALD M A, TURNER J R, et al. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival[J]. *Ann N Y Acad Sci*,2022,1514(1):21—33.
- [19] 陈莉娟,李彦龙,杨维建,等. 基于 NLRP3/Caspase-1 通路探讨薏苡仁多糖对溃疡性结肠炎体外炎症模型的干预作用及机制[J]. 重庆医科大学学报,2023,48(11):1323—1330.
- [20] LU F, LAN Z, XIN Z, et al. Emerging insights into molecular mechanisms underlying pyroptosis and functions of inflammasomes in diseases[J]. *J Cell Physiol*,2020,235(4):3207—3221.
- [21] PARK H Y, KUNITAKE Y, HIRASAKI N, et al. Theaflavins enhance intestinal barrier of caco-2 Cell monolayers through the expression of AMP-activated protein kinase-mediated Occludin, Claudin-1, and ZO-1[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015, 79(1):130—137.
- [22] XING D, ZHENG T, CHEN X, et al. Yellow teas protect against DSS-induced ulcerative colitis by inhibiting TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome in mice[J]. *Foods*, 2024, 13(17):2843.

(本文编辑:崔兰卿 收稿日期 2026-01-12)