

# 黄芩苷调控 TUG1/PTBP1/NLRP3 分子网络抑制巨噬细胞焦亡治疗溃疡性结肠炎的机制

李克亚, 肖金银, 罗雯鹏, 陆文洪, 贺荔枝, 潘 燎, 赵建政, 成思宇, 肖俐敏, 王军文, 王真权\*  
湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005

**摘要:**目的 探讨黄芩苷调控牛磺酸上调基因 1 (taurine up-regulated gene 1, TUG1)/多嘧啶束结合蛋白 1 (polypyrimidine tract binding protein 1, PTBP1)/核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 分子网络抑制巨噬细胞焦亡治疗溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的作用机制。方法 利用葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium salt, DSS) 诱导构建 UC 小鼠模型, 将小鼠随机分为对照组、模型组、美沙拉嗪 (600 mg/kg) 组和黄芩苷低、中、高剂量 (25、50、100 mg/kg) 组, 连续 ig 给药处理 7 d, 观察小鼠日常活动变化, 苏木素-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色和透射电镜观察结肠组织的结构变化, 生化检测血清中髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性。通过脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) + 三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 诱导 THP-1 细胞分化构建 UC 体外模型, 将其随机分为对照组、模型组、美沙拉嗪 (100  $\mu$ mol/L) 组、黄芩苷不同剂量组。酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清和细胞中白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-18 表达; 流式检测结肠组织和细胞中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1) 表达; Western blotting 检测结肠组织和细胞中 PTBP1、NLRP3、凋亡相关颗粒样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、Caspase-1、GSDMD 蛋白 C 端片段 (gasdermin D-C, GSDMD-C)、GSDMD-N 蛋白表达; 逆转录实时定量聚合酶链式反应 (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测 *TUG1*、*PTBP1*、*NLRP3* 表达。RNA pull-down 和 RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RNA immunoprecipitation, RIP) 验证 *TUG1* 与 *PTBP1* 的相互作用; 挽救实验进一步验证 TUG1-PTBP1 在 UC 中调控巨噬细胞焦亡的作用。**结果** 体内外研究表明, 与模型组比较, 黄芩苷能够显著降低 UC 小鼠的疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分 ( $P < 0.001$ ), 抑制结肠缩短, 减轻结肠病理损伤, 降低 IL-1 $\beta$ 、IL-18、MPO、Caspase-1 表达 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 降低结肠组织和细胞中焦亡相关指标的表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 其中以高剂量黄芩苷效果最为明显。此外, 黄芩苷通过降低 TUG1 的表达, 影响 PTBP1 与 TUG1 的结合, 进而抑制 NLRP3 炎症体的活化, 从而抑制巨噬细胞焦亡。**结论** 黄芩苷能够有效缓解 UC, 可能与调控 TUG1/PTBP1/NLRP3 分子网络抑制巨噬细胞焦亡有关。

**关键词:** 黄芩苷; 溃疡性结肠炎; 巨噬细胞; 焦亡; TUG1/PTBP1/NLRP3 分子网络

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)05-1667-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.05.017

## Mechanism of baicalin modulation of TUG1/PTBP1/NLRP3 molecular network to inhibit macrophage pyroptosis in treatment of ulcerative colitis

LI Keya, XIAO Jinyin, LUO Wenpeng, LU Wenhong, HE Lizhi, PAN Liao, ZHAO Jianzheng, CHENG Siyu, XIAO Limin, WANG Junwen, WANG Zhenquan

The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of action of baicalin in regulating the taurine up-regulated gene 1 (TUG1)/polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1)/nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) molecular network to inhibit macrophage pyroptosis for the treatment of ulcerative colitis (UC). **Methods** UC mouse model was constructed using dextran sulfate sodium salt (DSS) induction, and the mice were randomly divided into control group,

收稿日期: 2024-10-23

基金项目: 2022 年度湖南省自然科学基金青年基金项目 (2022JJ40325); 湖南省第一批中医药学科带头人 (神农学者) (2100601); 中医药人才培养重点学科 (中医肛肠病学) (2023-01-16-006-011)

作者简介: 李克亚, 博士, 副主任医师, 主要从事中医药防治肛肠疾病研究。E-mail: 240539983@qq.com

\*通信作者: 王真权, 博士, 主任医师, 主要从事中医肛肠科学研究。E-mail: wangzhenquan123456@163.com

model group, mesalazine (600 mg/kg) group, and baicalin low, medium, and high dosage (25, 50, and 100 mg/kg) groups, and treated with baicalin administered by consecutive gavage for 7 d, and the changes in the daily activities of mice were observed, and the structural changes in colonic tissues were observed by hematoxylin eosin (HE) staining and transmission electron microscopy, and biochemical detection was performed on the activity of myeloperoxidase (MPO) in serum. An *in vitro* model of UC was constructed by lipopolysaccharide (LPS) + adenosine triphosphate (ATP)-induced THP-1 cell differentiation, and the mice were randomly divided into control, model, mesalazine (100  $\mu$ mol/L), and baicalin intervention groups with different doses. The expression of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-18 in serum and cells was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the expression of cystein-aspartate protease-1 (Caspase-1) in colon tissues and cells was detected by flow cytometry; the expression of PTBP1, NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), Caspase-1, gasdermin D-C (GSDMD-C), GSDMD-N protein in colon tissues and cells was detected by Western blotting; reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect *TUG1*, *PTBP1*, *NLRP3* expression. RNA pull-down and RNA immunoprecipitation (RIP) were used to verify the interaction between *TUG1* and *PTBP1*; rescue experiments were used to further validate the effect of *TUG1*-*PTBP1* in UC to regulate macrophage pyroptosis. **Results** *In vitro* and *in vivo* studies showed that baicalin significantly reduced disease activity index (DAI) ( $P < 0.001$ ), inhibited colonic shortening, attenuated colonic pathological injury, decreased the expression of IL-1 $\beta$ , IL-18, MPO and Caspase-1 ( $P < 0.01$ , 0.001), and decreased the expression of pyroptosis-related indexes in colonic tissues and cells in UC mice compared with the model group ( $P < 0.05$ , 0.01, 0.001), and the effect of baicalin was most obvious at high doses. In addition, baicalin inhibited macrophage pyroptosis by decreasing the expression of *TUG1* and affecting the binding of *PTBP1* to *TUG1*, which in turn inhibited the activation of NLRP3 inflammasome. **Conclusion** Baicalin can effectively alleviate UC, which may be related to the inhibition of macrophage pyroptosis by regulating the *TUG1*/*PTBP1*/*NLRP3* molecular network.

**Key words:** baicalin; ulcerative colitis; macrophage; pyroptosis; *TUG1*/*PTBP1*/*NLRP3* molecular network

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种以肠道慢性炎症为特征的自身免疫疾病, 其病理生理机制复杂多样, 涉及免疫系统失调、微生物群改变及肠道屏障功能障碍等多重因素<sup>[1-2]</sup>。UC 的主要特征是结肠和直肠黏膜反复发生溃疡, 迁延难愈<sup>[3]</sup>。目前, UC 的治疗主要依赖于氨基水杨酸类药物、激素和免疫抑制剂等, 然而这些药物常伴有明显的不良反应, 并且治疗后的复发率较高<sup>[4]</sup>。因此, 寻找新的治疗策略和分子靶点对于改善或治疗 UC 至关重要。

黄芩苷是一种从黄芩中提取而来的黄酮类化合物, 是黄芩的主要活性成分<sup>[5-6]</sup>。由于其显著的抗炎、抗氧化和免疫调节特性, 黄芩苷近年来在炎症性疾病的治疗研究中备受关注<sup>[7-8]</sup>。研究表明, 黄芩苷能够抑制小鼠单核细胞中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体的活化, 从而抑制巨噬细胞焦亡<sup>[9]</sup>。巨噬细胞作为重要的免疫细胞, 在 UC 的发病过程中扮演着关键角色。尤其是巨噬细胞焦亡, 一种依赖于炎症小体的程序性细胞死亡形式, 已被公认为调控慢性炎症反应的关键机制之一<sup>[10-11]</sup>。在 UC 患者的肠道组织中, 巨噬细胞焦亡显著增加, 而过度的巨噬细胞焦亡可导致肠道组织进一步损伤, 加重肠道炎症。这些发

现为理解 UC 的病理过程提供了新的视角, 因此, 针对巨噬细胞焦亡的干预策略, 可能为 UC 的治疗开辟新的途径。

牛磺酸上调基因 1 (taurine up-regulated gene 1, *TUG1*) 是一种长链非编码 RNA, 能够通过多种蛋白质和 RNA 分子相互作用, 调节基因表达和细胞功能, 从而在炎症反应及疾病进展中发挥重要的调控作用<sup>[12-14]</sup>。在 UC 中, *TUG1* 通常呈低表达状态, 能够通过靶向下游信号通路, 抑制白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-8 和 IL-1 $\beta$  等炎症因子的产生<sup>[15]</sup>。此外, 研究表明, 过表达 *TUG1* 可以有效缓解由 NLRP3 介导的心肌细胞焦亡<sup>[16]</sup>。NLRP3 作为炎症体复合物的关键组成部分, 其活化可引发炎症介质的释放, 如 IL-1 $\beta$  和 IL-18, 在调控炎症反应和细胞焦亡中发挥至关重要的作用<sup>[17]</sup>。多嘧啶束结合蛋白 1 (polypyrimidine tract binding protein 1, *PTBP1*) 是一种广泛表达的 RNA 结合蛋白, 在 RNA 剪接、稳定、转运和翻译等多种 RNA 代谢过程中发挥重要作用, 使其在细胞的基因表达调控网络中占据重要地位<sup>[18]</sup>。课题组前期通过在线生物信息学工具 starBase 预测发现, *PTBP1* 与 *TUG1* 及 *NLRP3* 之间存在潜在的结合关系, 提示 *TUG1*/*PTBP1*/*NLRP3* 分子网络可能是黄芩苷治疗

UC 的作用机制之一。这一发现为进一步探讨黄芩苷在 UC 治疗中的分子机制提供了新的视角。据此,本研究通过体内外研究揭示了黄芩苷调控 TUG1/PTBP1/NLRP3 信号通路对巨噬细胞焦亡的干预作用,从而阐明其在治疗 UC 中的作用机制。这一研究为黄芩苷在临床治疗中的应用提供了重要的理论依据。

## 1 材料

### 1.1 动物和细胞株

40 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,体质量(20±2)g,8 周龄,购自湖北贝恩特生物科技有限公司,许可证编号 SYXK(鄂)2021-0119。动物于室温(25.0±0.5)℃、相对湿度(55±5)%、自然光照/黑暗循环的环境下饲养。本动物实验已获得湖南中医药大学第二附属医院伦理委员会批准[IACUC(准)-BNT-2023-004]。

人 THP-1 细胞株(批号 23021104)购自上海赛百慷生物技术股份有限公司。

### 1.2 药品与试剂

黄芩苷(批号 150197,质量分数 98.92%)、美沙拉嗪(批号 152027,质量分数 99.82%)、硫酸葡聚糖钠盐(dextran sulfate sodium salt, DSS,批号 16282,质量分数 99.20%)、佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA,批号 18739,质量分数 99.80%)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS,批号 11056,质量分数 99.20%)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP,批号 22176,质量分数 99.00%)均购自美国 MCE 公司;髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)试剂盒(批号 A044-1-1)购自南京建成生物工程研究所;免疫组化试剂盒(批号 K1HC-5)购自武汉三鹰生物技术有限公司;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cystein-aspartate protease-1, Caspase-1)试剂盒(批号 9161)购自美国 immunochemistry 公司;RNA pull down 试剂盒(批号 20164)购自美国 Thermo 公司;RNA 结合蛋白免疫沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)试剂盒(批号 RIP-12RXN)购自德国 Sigma 公司;IL-1β、IL-18 ELISA 试剂盒均购自中国 Elabscience 公司;NLRP3 抗体(批号 19771-1-AP)、凋亡相关颗粒样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)抗体(批号 10500-1-AP)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号

60004-1-Ig)均购自美国 proteintech 公司;pro-Caspase-1 抗体(批号 ab179515)、GSDMD 蛋白 C 端片段(gasdermin D-C, GSDMD-C)抗体(批号 ab255603)、GSDMD-N 抗体(批号 ab215203)均购自英国 abcam 公司;Caspase-1 抑制剂(Ac-YVAD-cmk,批号 16990,质量分数 98.94%)购自美国 MCE 公司;cleaved-Caspase-1 抗体(批号 AF4022)购自美国 Affinity 公司;HRP 标记的羊抗兔二抗(批号 111-035-003)、HRP 标记的羊抗鼠二抗(批号 115-035-003)均购自美国 Jackson 公司;RIPA 裂解液(批号 220013)购自上海碧云天生物技术有限公司;Trizol 提取试剂盒(批号 230004002)购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.3 仪器

HT7800/HT7700 型透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司);IX71 型显微镜(日本 Olympus 公司);5702R 型低速离心机(德国 Eppendorf 公司);HSC-2015L 型高速冷冻离心机(宁波新芝生物科技股份有限公司);CytoFLEX S 型分析型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);Cellometer mini 型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);ChemiDoc™XRS<sup>+</sup>凝胶成像系统(美国 Bio-rad 公司);JY92-IIN 型超声破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);QuantStudio 12K 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);JY300 型水平电泳仪、JY02S 型紫外分析仪(北京君意东方电泳设备有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组、造模与给药

40 只小鼠适应性喂养 7 d 后,随机分为对照组(8 只)和模型组(32 只),模型组小鼠连续 ig 7 d 3% DSS 溶液以诱导 UC 模型,对照组则 ig 等体积生理盐水。造模 7 d 后,每组各取 2 只小鼠,iv 3% 戊巴比妥钠(100 μL)安乐死后,根据疾病活动指数(disease activity index, DAI)和病理组织学评分确定 UC 模型是否成功<sup>[19]</sup>。造模成功后,模型组小鼠随机分为模型组、美沙拉嗪(600 mg/kg)组和黄芩苷低、中、高剂量(25、50、100 mg/kg)组<sup>[20]</sup>,每组 6 只。给药组小鼠 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水,1 次/d,连续 7 d。

### 2.2 样本采集和处理

给药 7 d 后,所有小鼠 iv 3% 戊巴比妥钠(100 μL)安乐死。固定小鼠,常规消毒,剪去腹部被毛,经小鼠腹部正中中线剖开腹部,腹主动脉

取血, 3 500 r/min 离心 15 min 后, 取血清, 于-80 °C 保存。取结肠样本时, 肉眼观察结肠外观形态、是否存在肠黏连, 分离结肠, 测量回盲部至直肠的总长度。取结肠病变明显处约 2 cm 的结肠组织, 用生理盐水清除肠内容物后, 一分为二, 一段用 4% 多聚甲醛固定、常规脱水, 包埋切片, 另一段用专用的电镜固定液进行固定, 备用后续透射电镜检测。其余部分沿肠系膜剖开, 并快速用冰生理盐水冲洗后, 存放于 2 mL 冻存管后, 置于-80 °C 冰箱, 备用。

### 2.3 DAI 评分

通过结合给药期间小鼠体质量下降百分比、大便性状及大便隐血情况进行评分<sup>[21]</sup>。

体质量下降百分比 = 1 - 当日体质量 / 第 1 天体质量

DAI = 体质量下降百分比 + 大便性状 + 大便潜血

### 2.4 HE 染色

将小鼠结肠固定在 4% 多聚甲醛溶液中, 脱水后包埋于石蜡中, 经过脱蜡、梯度乙醇浸泡、苏木素染色、分化、反蓝、伊红染色、乙醇脱水、透明化、封片, 用光学显微镜观察小鼠结肠组织 HE 染色拍照。

### 2.5 透射电镜观察

用 2.5% 戊二醛固定组织块, 使用新配制的 1% 锇酸避光室温固定 2 h。用相关试剂脱水和浸泡, 在 37 °C 过夜, 然后在 60 °C 烘烤 48 h。将嵌入块体切割成 60~80 nm 的超薄薄片。铅、铀染色后, 在透射电镜下观察并采集图像分析。

### 2.6 免疫组化检测

将石蜡包埋好的结肠切片固定后, 使用 5% BSA 室温封闭 30 min, F4/80 一抗 4 °C 过夜, 然后采用 DAKO EnVision 检测试剂盒检测结肠组织中 F4/80 含量。在显微镜下采集图像分析。

### 2.7 血清 MPO 活性检测

分别取各组小鼠血清, 根据 MPO 试剂盒说明书进行操作, 测定样本吸光度 (A) 值, 检测 MPO 活力。

### 2.8 ELISA 检测

4 °C 冰箱解冻样本, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 检测血清和细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平。

### 2.9 Western blotting 检测结肠组织 PTBP1、NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1、GSDMD-C、GSDMD-N、pro-Caspase-1 蛋白表达

取结肠组织剪碎、研磨, 使用 RIPA 缓冲液裂解小鼠结肠组织, 提取蛋白。用 BCA 法检测蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 5% 牛血清白蛋白 (bovine

albumin, BSA) 室温封闭 2 h, 分别加入一抗, 4 °C 孵育过夜, 次日加入二抗室温孵育 1 h, 使用凝胶成像系统分析系统显影, 通过 Image-J 软件分析蛋白相对表达量。

### 2.10 RT-qPCR 检测结肠组织 TUG1、NLRP3、PTBP1 mRNA 表达水平

取 100 mg 小鼠结肠组织, 加入 1 mL Trizol 试剂, 用匀浆器研磨成浆, 移至无 RNase 的 1.5 mL EP 管中, 裂解 10 min。按照 Trizol 试剂说明书进行后续步骤, 包括加入氯仿分相、异丙醇沉淀、75% 乙醇清洗等, 最终获得 RNA 沉淀。按照 Trizol 试剂说明书进行后续操作, 采用试剂盒合成 cDNA 后用 PCR 仪扩增 cDNA, 以 GAPDH 为内参, 计算 TUG1、NLRP3、PTBP1 mRNA 相对表达, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

序列名称	序列 (5'-3')
TUG1	F: GTCTGGTAGGGCGAAGGAG R: GTCTGGTAGGGCGAAGGAG
PTBP1	F: TCTAAGTTTGGCACCGTCCT R: TGAGACTGGTGAGCTTGAG
NLRP3	F: CCATCAATGCTGCTTCGACA R: CCATCAATGCTGCTTCGACA
GAPDH	F: TGTTTCCCTCGTCCCGTAGA R: GATGGCAACAATCTCCACTTTG

### 2.11 细胞模型的建立

实验所用的细胞均处于对数生长期。通过 100 nmol/L PMA 处理 3 h, 诱导 THP-1 细胞为巨噬细胞 (THP-1-Ms)<sup>[22]</sup>。以 THP-1-Ms 为研究对象, 以 1  $\mu$ g/mL LPS 处理 3 h, 5  $\mu$ mol/L ATP 处理 1 h, 建立 UC 体外模型<sup>[23]</sup>。通过 ELISA 检测 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平变化, 并与 Caspase-1 抑制剂 (80  $\mu$ mol/L) 组比较, 判别模型是否造模成功。

### 2.12 流式细胞术检测

按照 Caspase-1 焦亡试剂盒说明书步骤执行操作, 收集细胞, 1 mL PBS 洗涤细胞 2 次, 4 °C、离心 5 min, 用培养基以 30:1 比例稀释 FLICA 储存液 (FLICA 探针 + 50  $\mu$ L DMSO + 200  $\mu$ L PBS), 将稀释后的 FLICA 加入细胞中, 避光、室温反应 60 min, 洗涤细胞, 加入 5  $\mu$ L PI, 混匀后置于冰上, 使用流式细胞仪检测巨噬细胞中 Caspase-1 水平。

### 2.13 CCK-8 检测细胞活性

吸去 THP-1 细胞培养液, 加入 200  $\mu$ L PBS 洗

涤3次,随后加入200 μL胰酶消化1~3 min,终止消化后吹打分散细胞,细胞悬液1 000 r/min离心5 min。重悬细胞,台盼蓝进行计数,以 $1 \times 10^4$ 个/孔细胞密度接种于96孔板,每孔100 μL细胞悬液。设空白组(不含细胞),将细胞分为对照组、不同浓度黄芩苷(10、20、50 μmol/L)组和美沙拉嗪(100 μmol/L)组,分别处理THP-1-Ms细胞48 h,进行CCK-8检测,酶标仪测定450 nm处A值,计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.14 RT-qPCR检测细胞TUG1、NLRP3、PTBP1 mRNA表达水平

收集培养的细胞,用PBS清洗,去除残留培养基。每孔加入1 mL Trizol试剂,使用移液器轻轻吹打混匀,确保细胞完全裂解。将细胞裂解液转移至无RNA酶污染的1.5 mL EP管中,静置室温裂解10 min。其余操作同“2.10”项下方法,引物序列见表2。

表2 引物序列

Table 2 Primer sequences

序列名称	序列(5'-3')
NLRP3	F: TTCGGAGATTGTGGTTGGG R: AGGGCGTTGTCACCTCAGGT
PTBP1	F: GGGCAGAACATCTACAACG R: GCATACGGAGAGGCTGAGAT
TUG1	F: GTCTGGTAGGGCGAAGGAAC R: CCGAGTTCTGCGTACGAGAA
GAPDH	F: TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG R: TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT

### 2.15 Western blotting检测细胞中PTBP1、NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1、GSDMD-C、GSDMD-N、pro-Caspase-1蛋白表达

收集培养的细胞,用PBS清洗,使用RIPA缓冲液裂解,提取蛋白。其余操作同“2.9”项下方法。

### 2.16 过表达质粒的构建

pcDNA3.1-PTBP1、pcDNA3.1-TUG1质粒由江苏塞索飞生物科技有限公司合成,以RT-qPCR和Western blotting检测相关基因的表达以验证其过表达的效果。

### 2.17 RNA干扰

TUG1 siRNA由苏州吉玛基因公司合成。针对TUG1设计合成3对siRNA干扰序列,通过RT-qPCR法检测TUG1的表达变化,以检测其干扰效果,选取最佳siRNA用于后续实验。siRNA序列见表3。

表3 siRNA序列

Table 3 siRNA sequences

序列名称	序列(5'-3')
NC siRNA	F: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT R: ACGUGACACGUUCGGAGAATT
TUG1-414	F: GUUGGUUGUGGGAAUUCUATT R: UAGAAAUCCACAACCAACTT
TUG1-207	F: GUUUGCGAUUCGACGAGGATT R: UCCUCGUCGAAUCGCAAACCTT
TUG1-49	F: CGUGCGGAUCGACGAGCGATT R: UCGCUCGAUCGACCGCACGTT

### 2.18 RNA pull-down实验

培养THP-1-Ms细胞并添加LPS(1 μg/mL)和ATP(5 μmol/L)处理24 h,随后转染PTBP1质粒,再培养24 h。收集并用PBS清洗细胞,加入裂解液,在4 °C下裂解1~2 h后离心,收集上清并贮存于-80 °C。准备磁珠,与探针混合,在4 °C下孵育过夜。洗涤磁珠后,加入Binding Buffer、RNase抑制剂和细胞裂解物,继续在4 °C下孵育过夜。洗涤磁珠,再加入Loading buffer,100 °C加热10 min。离心后收集上清作为RNA pull-down产物,使用Western blotting检测PTBP1蛋白表达。

### 2.19 RNA免疫沉淀

加入特异性抗体与蛋白质A/G磁珠,孵育以形成免疫复合物。磁珠捕获RNA-蛋白质复合物,洗涤去除未结合的物质。洗脱RNA并进行RT-qPCR检测lncRNA TUG1水平。

### 2.20 统计学分析

采用SPSS 25.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较使用独立样本t检验。对于多组间比较,若满足方差齐性,采用单因素方差分析,并使用LSD法进行多重比较;若方差不齐,则采用非参数秩和检验。计数资料使用完全随机设计的多样本比较秩和检验。利用GraphPad Prism 6.0软件绘图。

## 3 结果

### 3.1 动物实验

**3.1.1 黄芩苷对UC小鼠DAI评分的影响** 实验期间,对照组小鼠反应灵活,进食正常,无腹泻及血便,大便呈球形或条形,未出现异常情况;而模型组小鼠自模型构建后均出现不同程度的厌食、懒动、体质量下降、大便隐血或血便。经过药物干预后,黄芩苷各剂量组和美沙拉嗪组小鼠的上述症状均有不同程度的改善,其中黄芩苷高剂量组与美沙拉嗪

组小鼠症状改善最为明显。如表4所示, 末次给药结束后, 与对照组比较, 模型组小鼠的DAI评分显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 黄芩苷各剂量

组和美沙拉嗪组小鼠 DAI 评分显著降低 ( $P < 0.001$ ), 其中以高剂量黄芩苷与美沙拉嗪的治疗效果最为显著 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。

表4 黄芩苷对 UC 小鼠 DAI 评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effects of baicalin on DAI score in UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	给药1 d	给药7 d
对照	—	0.228 ± 0.472	0.167 ± 0.408
模型	—	10.604 ± 1.073 <sup>***</sup>	10.000 ± 0.894 <sup>***</sup>
黄芩苷	25	8.402 ± 1.094 <sup>###</sup>	6.500 ± 0.837 <sup>###</sup>
	50	8.807 ± 1.303 <sup>###</sup>	5.833 ± 0.753 <sup>###</sup>
	100	7.408 ± 1.140 <sup>###</sup>	3.500 ± 1.643 <sup>###▲</sup>
美沙拉嗪	600	7.603 ± 1.342 <sup>###</sup>	2.667 ± 1.211 <sup>###▲▲</sup>

与对照组比较: <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与黄芩苷 25 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ 。

<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs model group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$  vs 25 mg·kg<sup>-1</sup> baicalin group.

**3.1.2 黄芩苷对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响**  
如图1所示, 对照组小鼠结肠组织结构清晰正常, 上皮完整连续, 黏膜层、黏膜下层及固有层无充血水肿及断裂分离, 腺样体、隐窝排列整齐, 腺上皮细胞大小如常, 间质分布均匀。模型组小鼠结肠黏膜水肿、溃疡形成, 腺样体层数增多、隐窝结构大面积缺失且排列紊乱。与模型组比较, 黄芩苷低、中剂量组病理上无显著缓解, 而黄芩苷高剂量组上皮细胞增生增加, 炎症细胞浸润减少, 结肠炎症显

著缓解。

如图2所示, 对照组小鼠结肠黏膜上皮表面微绒毛完整, 排列整齐, 上皮细胞连接紧密, 细胞间隙未见增宽。模型组小鼠结肠黏膜上皮细胞绒毛脱落, 腺上皮细胞间连接疏松, 细胞间隙增宽, 高倍镜下可见细胞肿胀膨大, 呈卵圆或椭圆形, 细胞器膜出现空隙, 细胞质呈现空泡状, 线粒体肿胀, 模糊, 内质网扩张溶解。黄芩苷低、中剂量组小鼠结肠黏膜上皮细胞绒毛仍有脱落, 腺上皮细胞间连

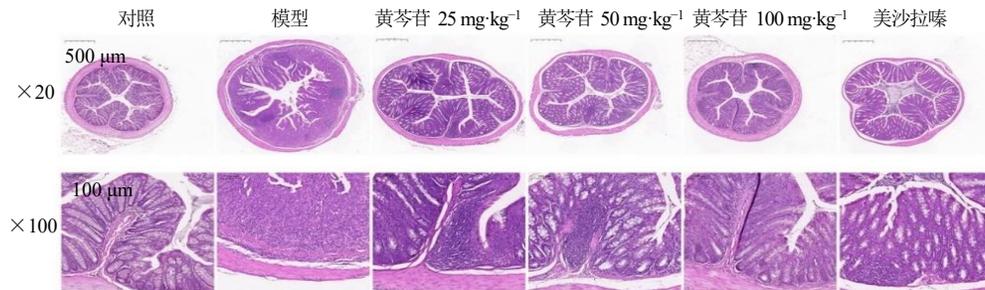


图1 黄芩苷对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响

Fig. 1 Effects of baicalin on histopathological changes in colon tissue of UC mice

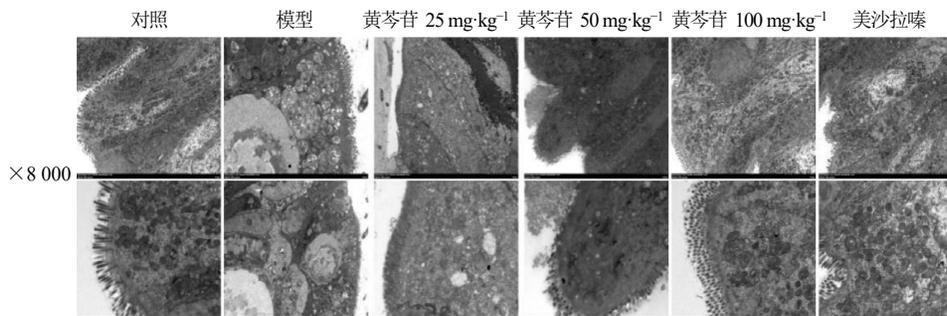


图2 黄芩苷对 UC 小鼠结肠组织结构的影响

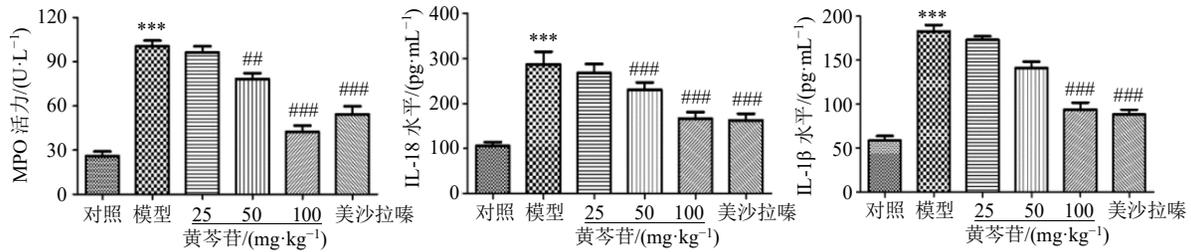
Fig. 2 Effect of baicalin on colon tissue structure in UC mice

接较紧密，细胞间隙增宽程度减轻。黄芩苷高剂量组和美沙拉嗪组小鼠结肠黏膜上皮微绒毛排列整齐，大小一致，腺上皮间相互连接紧密，内质网及线粒体等亚细胞结构未见明显形态改变。

**3.1.3 黄芩苷对 UC 小鼠血清中细胞焦亡关键炎症因子的影响** 如图 3 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中 MPO 活性、IL-1 $\beta$  和 IL-18 的表达显著升高 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较，黄芩苷中、高剂

量组和美沙拉嗪组小鼠血清中 MPO 活性和 IL-18 的表达显著降低 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )，同时，黄芩苷高剂量组和美沙拉嗪组小鼠血清中 IL-1 $\beta$  的表达也显著降低，其中以高剂量黄芩苷和美沙拉嗪的抑制效果最为明显。

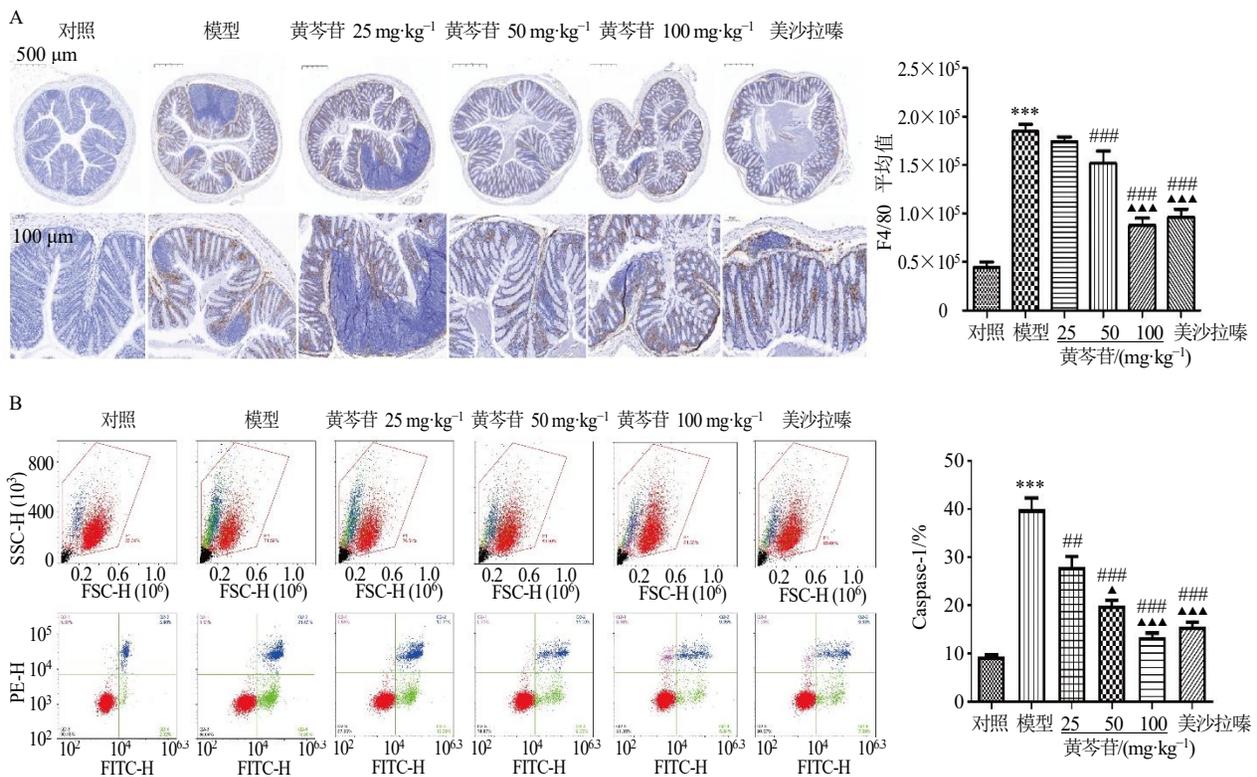
**3.1.4 黄芩苷对 UC 小鼠结肠中巨噬细胞标志物和 Caspase-1 活性的影响** 如图 4-A 所示，F4/80 作为小鼠巨噬细胞的标志物，在结肠组织中的表达情况



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。  
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group

图 3 黄芩苷对 UC 小鼠血清中 MPO、IL-1 $\beta$  和 IL-18 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effects of baicalin on MPO, IL-1 $\beta$ , IL-18 expression in serum of UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ; 与黄芩苷 25 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较: ▲ $P < 0.05$  ▲▲ $P < 0.01$  ▲▲▲ $P < 0.001$ , 下图同。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group; ▲ $P < 0.05$  ▲▲ $P < 0.01$  ▲▲▲ $P < 0.001$  vs 25 mg·kg<sup>-1</sup> baicalin group, same as below figures.

图 4 黄芩苷对 UC 小鼠结肠中 F4/80 (A) 和巨噬细胞中 Caspase-1 活性 (B) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

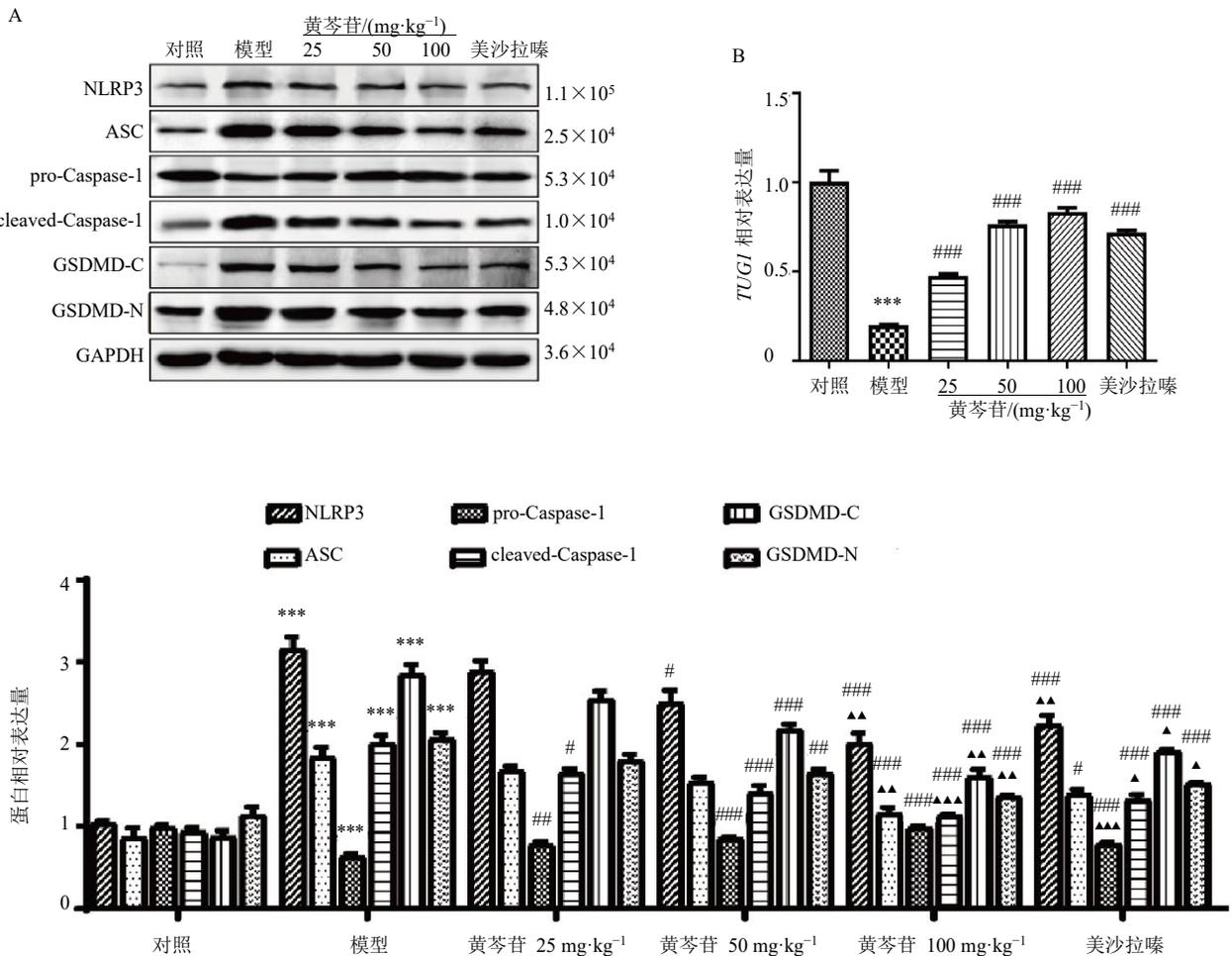
Fig. 4 Effect of baicalin on F4/80 expression (A) in colon and Caspase-1 activity (B) in macrophages of UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

揭示了巨噬细胞的激活状态<sup>[24]</sup>。与对照组比较,模型组小鼠结肠中 F4/80 表达显著升高 ( $P < 0.001$ ),表明 UC 小鼠结肠组织中存在明显的巨噬细胞激活现象。与模型组比较,黄芩苷中、高剂量组和美沙拉嗪组小鼠结肠中 F4/80 表达显著降低 ( $P < 0.001$ ),表明巨噬细胞激活受到明显抑制。如图 4-B 所示,与对照组比较,模型组小鼠巨噬细胞中 Caspase-1 活性显著升高 ( $P < 0.001$ ),表明 UC 小鼠的巨噬细胞发生了明显的焦亡现象。与模型组比较,经给药治疗后,小鼠巨噬细胞中 Caspase-1 活性显著降低 ( $P < 0.01、0.001$ ),表明黄芩苷对 UC 小鼠的巨噬细胞焦亡具有显著的抑制作用,尤其是在黄芩苷高剂量组和美沙拉嗪组中,抑制效果最为明显。

### 3.1.5 黄芩苷对 UC 小鼠结肠中焦亡相关蛋白和

TUG1 表达的影响 如图 5-A 所示,与对照组比较,模型组小鼠结肠中 NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1、GSDMD-C、GSDMD-N 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.001$ ), pro-Caspase-1 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ );与模型组比较,黄芩苷低、中、高剂量组和美沙拉嗪组小鼠结肠中 NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1、GSDMD-C、GSDMD-N 蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.05、0.01、0.001$ ), pro-Caspase-1 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.01、0.001$ )。

如图 5-B 所示,与对照组比较,模型组小鼠结肠中 TUG1 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ );与模型组比较,黄芩苷低、中、高剂量组和美沙拉嗪组小鼠结肠中 TUG1 mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.001$ )。



A-黄芩苷对 UC 小鼠结肠中焦亡相关蛋白表达的影响; B-黄芩苷对 UC 小鼠结肠中 TUG1 表达的影响。

A-effects of baicalin on expression of pyroptosis-related proteins in colon of UC mice; B-effect of baicalin on expression of TUG1 in colon of UC mice.

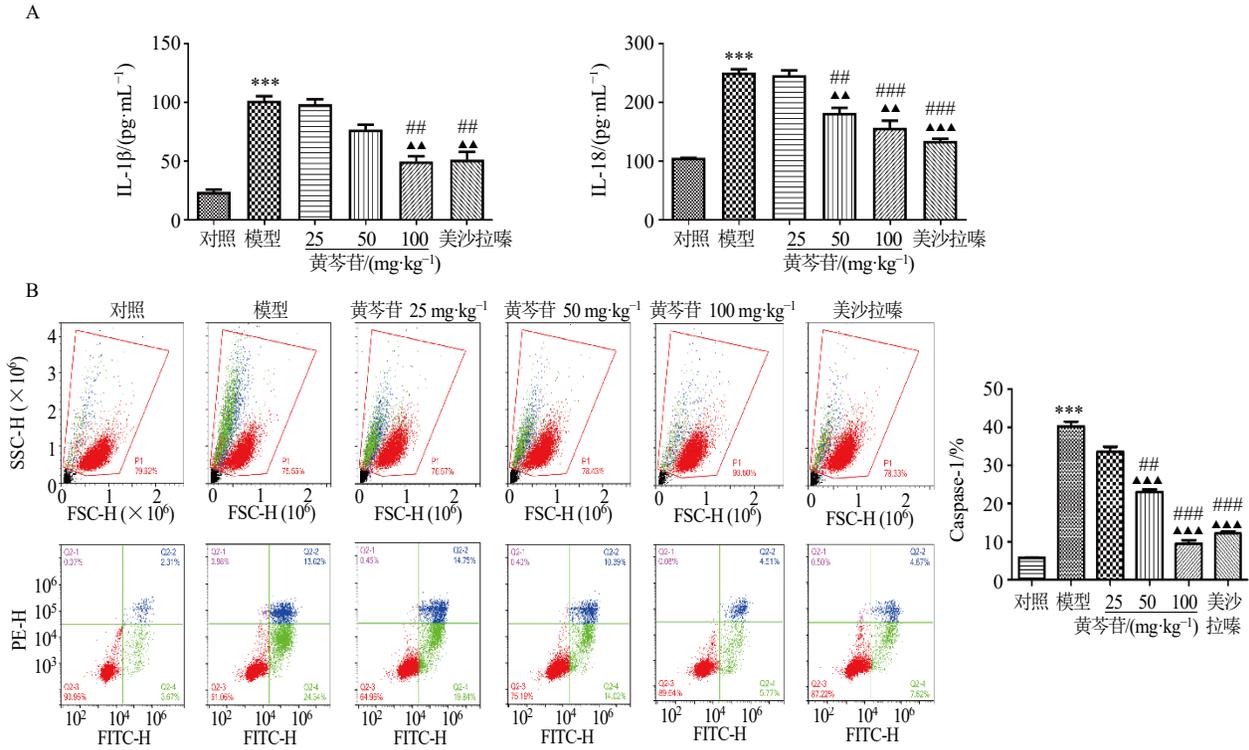
图 5 黄芩苷对 UC 小鼠结肠中焦亡相关蛋白及 TUG1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effects of baicalin on expression of pyroptosis-related proteins and TUG1 mRNA in colon of UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.2 细胞实验

**3.2.1 黄芩苷对巨噬细胞中细胞焦亡关键炎症因子和 Caspase-1 活性的影响** 如图 6-A 所示, 与对照组比较, 模型组细胞中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 黄芩苷高剂

量组和美沙拉嗪组细胞中 IL-1 $\beta$  表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 同时黄芩苷中、高剂量组和美沙拉嗪组细胞中 IL-18 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ 、0.001), 其中以高剂量黄芩苷和美沙拉嗪的抑制效果最为明显。如图 6-B 所示, 与对照组比较, 模型组细



A-黄芩苷对巨噬细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 表达的影响; B-黄芩苷对巨噬细胞中 Caspase-1 活性的影响。

A-effects of baicalin on IL-1 $\beta$ , IL-18 expression in macrophages; B-effect of baicalin on caspase-1 activity in macrophages.

图 6 黄芩苷对巨噬细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 表达和 Caspase-1 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Effects of baicalin on IL-1 $\beta$ , IL-18 expression and caspase-1 activity in macrophages ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

胞中 Caspase-1 活性显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 黄芩苷低、中、高剂量组和美沙拉嗪组细胞中 Caspase-1 活性显著降低 ( $P < 0.001$ ), 尤其是在黄芩苷高剂量组和美沙拉嗪组中, 抑制效果最为明显。

**3.2.2 黄芩苷对巨噬细胞中 TUG1、PTBP1、NLRP3 mRNA 表达的影响** 如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组细胞中 TUG1 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ), PTBP1 和 NLRP3 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 黄芩苷高剂量组和美沙拉嗪组细胞中 TUG1 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ), 黄芩苷中、高剂量组和美沙拉嗪组细胞中 PTBP1 和 NLRP3 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), 其中以黄芩苷高剂量组和美沙拉嗪组最为明显。

**3.2.3 黄芩苷对巨噬细胞中 TUG1/PTBP1/NLRP3 信号通路相关蛋白表达的影响** 如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组细胞中 PTBP1、NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1、GSDMD-C、GSDMD-N 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.001$ ), pro-Caspase-1 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 黄芩苷低、中、高剂量组和美沙拉嗪组细胞中 PTBP1、NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1、GSDMD-C、GSDMD-N 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), pro-Caspase-1 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ 、0.001)。

**3.2.4 UC 中 TUG1 与 PTBP1 的直接相互作用** 如图 9-A 所示, RNA pull down 检测结果表明 PTBP1 与 TUG1 之间存在直接相互作用关系。如图 9-B 所示, 利用 RIP 进一步验证 PTBP1 与 TUG1 之间的

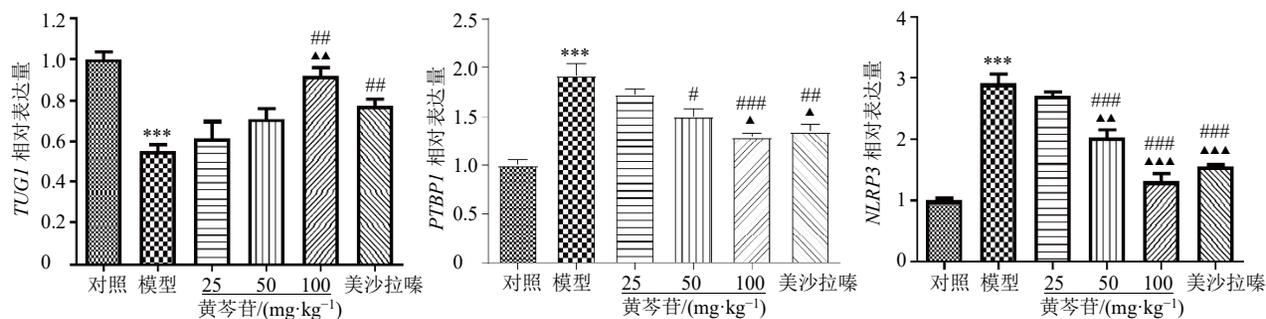


图7 黄芩苷对巨噬细胞中 *TUG1*、*PTBP1*、*NLRP3* mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Effects of baicalin on expression of *TUG1*, *PTBP1* and *NLRP3* mRNA in macrophages ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

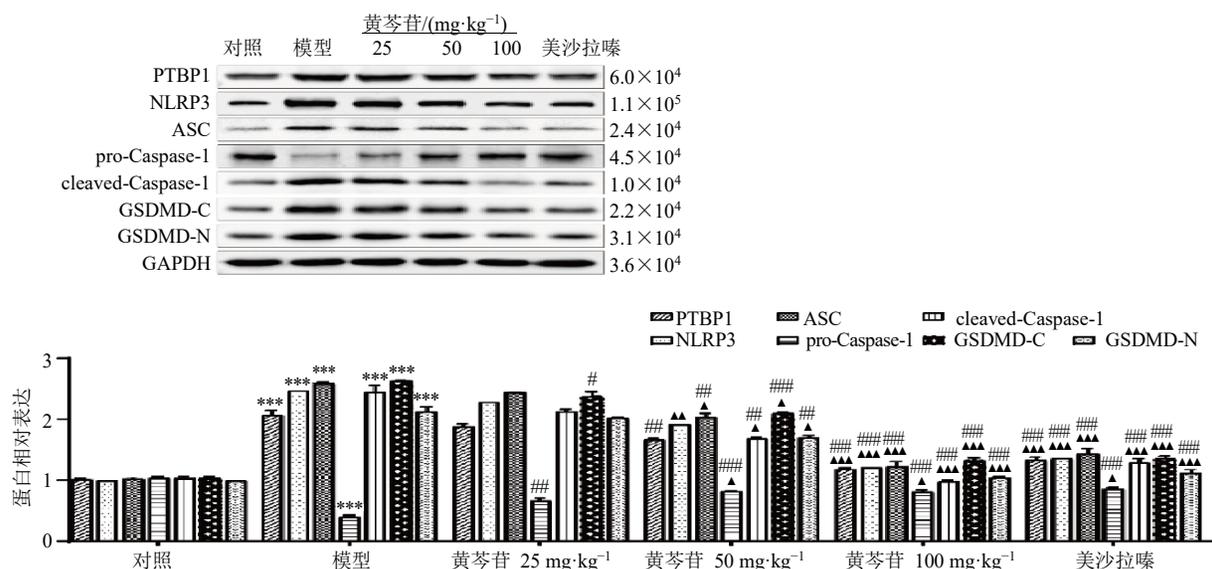
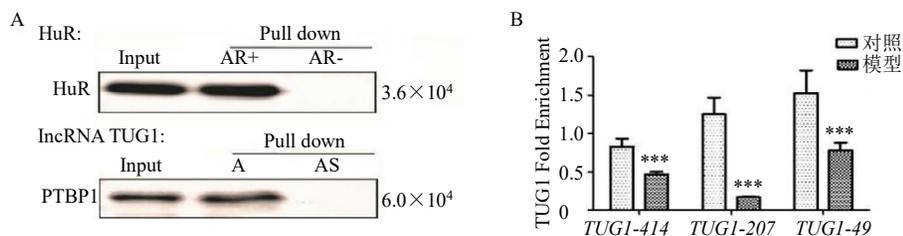


图8 黄芩苷对巨噬细胞中 *PTBP1*、*NLRP3*、*ASC*、*pro-Caspase-1*、*cleaved-Caspase-1*、*GSDMD-C*、*GSDMD-N* 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Effects of baicalin on protein expression of *PTBP1*, *NLRP3*, *ASC*, *pro-Caspase-1*, *cleaved-Caspase-1*, *GSDMD-C*, *GSDMD-N* in macrophages ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



A-RNA pull down 实验; B-RNA 结合蛋白免疫沉淀; 与对照组比较:  $***P < 0.001$ 。

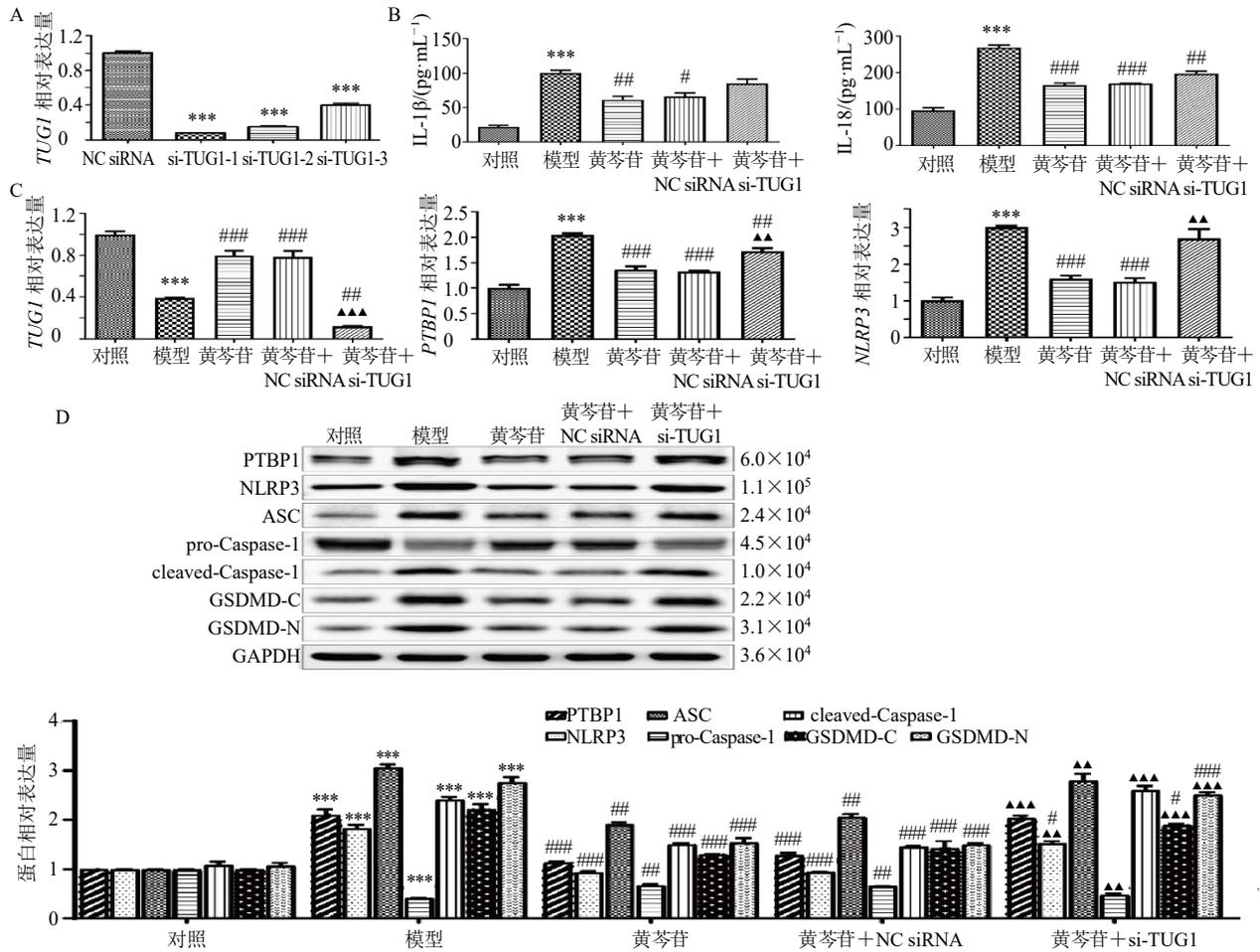
A-RNA pull down; B-RIP;  $***P < 0.001$  vs control group.

图9 *TUG1* 与 *PTBP1* 的互作验证 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 9 Validation of interactions between *TUG1* and *PTBP1* ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

相互作用关系, 结果显示 UC 组中 *TUG1* 富集度较对照组显著降低 ( $P < 0.05$ ), 这表明在 THP-1-Ms 细胞中, *PTBP1* 能特异性结合靶标 RNA-*TUG1*, 且 UC 进程中 *TUG1* 和 *PTBP1* 蛋白结合度下降。

**3.2.5 *TUG1* 低表达对 *PTBP1*/*NLRP3* 信号通路和细胞焦亡的影响** 由于黄芩苷 50  $\mu\text{mol/L}$  在 UC 体外模型中治疗效果最为显著。因此, 后续实验选择此剂量进行研究。如图 10-A 所示, 采用 RNA 干扰



A-*TUG1* 低表达细胞株的建立, 与 NC siRNA 组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; B-*TUG1* 低表达对巨噬细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 表达的影响; C-*TUG1* 低表达对巨噬细胞中 *PTBP1* 和 *NLRP3* mRNA 表达的影响; D-*TUG1* 低表达对巨噬细胞中 *PTBP1*、*NLRP3*、ASC、pro-Caspase-1、cleaved-Caspase-1、GSDMD-C、GSDMD-N 蛋白表达的影响; 与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ; 与黄芩苷组比较: ▲ $P < 0.01$  ▲▲ $P < 0.001$ 。

A-establishment of cell lines with low expression of *TUG1*, \*\*\* $P < 0.001$  vs NC siRNA group; B-effect of low *TUG1* expression on IL-1 $\beta$ , IL-18 expression in macrophages; C-effect of low *TUG1* expression on *PTBP1* and *NLRP3* mRNA in macrophages; D-effect of low *TUG1* expression on *PTBP1*, *NLRP3*, ASC, pro-Caspase-1, cleaved-Caspase-1, GSDMD-C, GSDMD-N protein expression in macrophages; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.0001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group; ▲ $P < 0.01$  ▲▲ $P < 0.0001$  vs baicalin group.

图 10 *TUG1* 低表达对 *PTBP1*/*NLRP3* 信号通路和细胞焦亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 10 Effects of low *TUG1* expression on *PTBP1*/*NLRP3* signaling pathway and cell pyroptosis ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

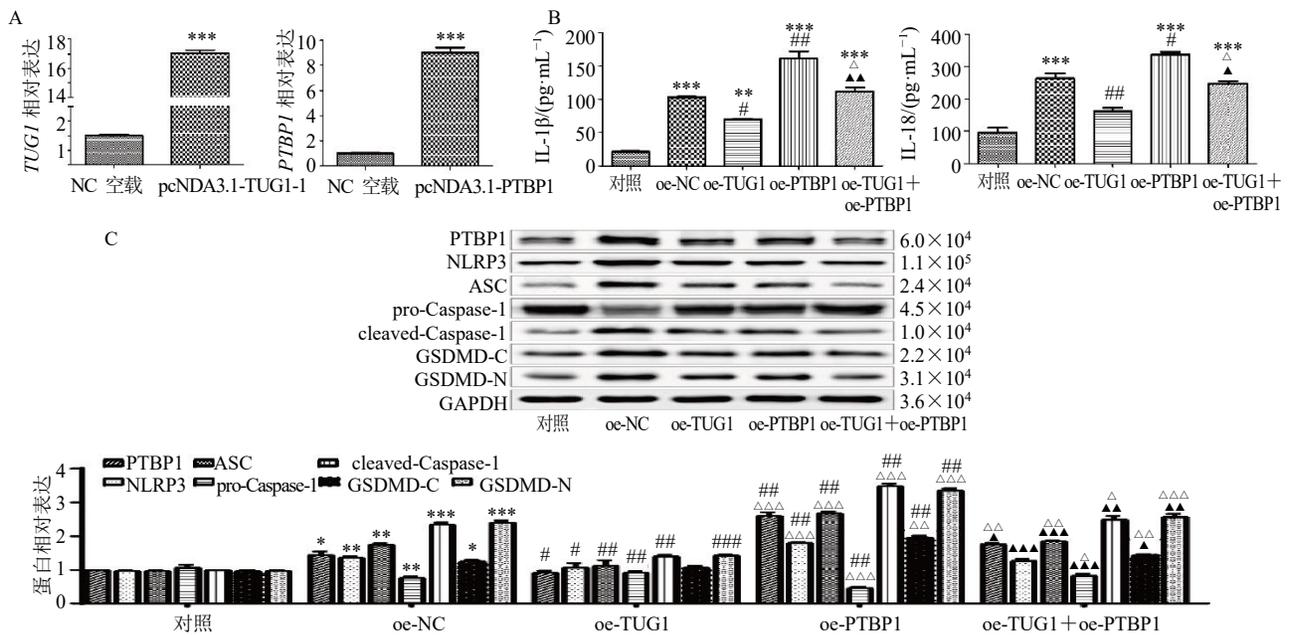
技术低表达目的基因 *TUG1* 以建立低表达 *TUG1* 细胞株, 通过 RT-qPCR 检测 *si-TUG1* 和阴性对照 (NCsiRNA) 的干扰效果, 结果显示, 在候选的 siRNA 中 *si-TUG1-1* 的干扰效果最显著, 因此被用于后续实验。如图 10-B 所示, ELISA 检测结果表明, 与对照组比较, 模型组中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 黄芩苷组、黄芩苷 + NC si-RNA 组中 IL-1 $\beta$  表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01), 黄芩苷组、黄芩苷 + NC si-RNA 组、黄芩苷 + *si-TUG1* 组中 IL-18 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ 、

0.001); 与黄芩苷组比较, 黄芩苷 + *si-TUG1* 组巨噬细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 表达水平升高, 但均不具有统计学意义。如图 10-C 所示, 与对照组比较, 模型组中 *PTBP1* 和 *NLRP3* mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ), *TUG1* 表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 黄芩苷组、黄芩苷 + NC si-RNA 组中 *NLRP3* mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ), 黄芩苷组、黄芩苷 + NC si-RNA 组、黄芩苷 + *si-TUG1* 组中 *PTBP1* mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ 、0.001), 黄芩苷组、黄芩苷 + NC si-RNA 组中 *NLRP3*

mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ); 与黄芩苷组比较, 黄芩苷+si-TUG1 组巨噬细胞中 *PTBP1* 和 *NLRP3* mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。如图 10-D 所示, 与对照组比较, 模型组巨噬细胞中 *PTBP1*、*NLRP3*、*ASC*、cleaved-Caspase-1、*GSDMD-C*、*GSDMD-N* 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ), *pro-Caspase-1* 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 黄芩苷组、黄芩苷+NC 组巨噬细胞中 *PTBP1*、*NLRP3*、*ASC*、cleaved-Caspase-1、*GSDMD-C*、*GSDMD-N* 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ), *pro-Caspase-1* 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ), 黄芩苷+si-TUG1 组巨噬细胞中 *NLRP3*、*GSDMD-C*、*GSDMD-N* 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ ); 与黄芩苷组比较, 黄芩苷+si-TUG1 组巨噬细胞中 *PTBP1*、*NLRP3*、*ASC*、cleaved-Caspase-1、*GSDMD-C*、*GSDMD-N* 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ 、

$0.001$ ), *pro-Caspase-1* 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。

**3.2.6 过表达 TUG1/PTBP1 对 TUG1/PTBP1/NLRP3 信号通路和巨噬细胞焦亡的影响** 如图 11-A 所示, 分别构建了 TUG1、PTBP1 的过表达质粒, 利用 RT-qPCR 检测 TUG1、PTBP1 的过表达效果, 结果显示, 与 NC 空载组比较, pcDNA3.1-TUG1 组的 TUG1、PTBP1 表达明显升高 ( $P < 0.001$ ), 表明 TUG1、PTBP1 过表达质粒成功构建。如图 11-B 所示, 与 oe-NC 组比较, oe-TUG1 组巨噬细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 表明过表达 TUG1 可抑制巨噬细胞焦亡; 与 oe-NC 组比较, oe-PTBP1 组巨噬细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 表明过表达 PTBP1 可加重巨噬细胞焦亡; 与 oe-TUG1 组比较, oe-TUG1+oe-PTBP1 组巨噬细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 oe-PTBP1 组比较, oe-TUG1+



A-过表达 TUG1/PTBP1 细胞株的建立, 与 oe-NC 组比较: \*\*\* $P < 0.001$ ; B-过表达 TUG1/PTBP1 对巨噬细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 表达的影响; C-过表达 TUG1/PTBP1 对 TUG1/PTBP1/NLRP3 信号轴及焦亡蛋白水平的影响; 与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 oe-NC 组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ; 与 oe-TUG1 组比较:  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$   $\Delta\Delta\Delta P < 0.0001$ ; 与 oe-PTBP1 组比较:  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$   $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

A-establishment of cell lines with overexpression of TUG1/PTBP1, \*\*\* $P < 0.001$  vs oe-NC group; B-effect of TUG1/PTBP1 overexpression on IL-1 $\beta$ , IL-18 expression in macrophages; C-effect of TUG1/PTBP1 overexpression on TUG1/PTBP1/NLRP3 signaling axis and pyroptosis protein levels; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs oe-NC group;  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$   $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$  vs oe-TUG1 group;  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$   $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$  vs oe-PTBP1 group.

图 11 过表达 TUG1/PTBP1 对 TUG1/PTBP1/NLRP3 信号通路和巨噬细胞焦亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 11 Effects of overexpression of TUG1/PTBP1 on TUG1/PTBP1/NLRP3 signaling pathway and pyroptosis in macrophages ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

oe-PTBP1 组巨噬细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 表明过表达 PTBP1 逆转了 TUG1 对 UC 巨噬细胞焦亡的抑制作用。如图 11-C 所示, 与 oe-NC 组比较, oe-TUG1 组巨噬细胞中 PTBP1、NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1、GSDMD-C、GSDMD-N 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), pro-Caspase-1 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ), 表明过表达 TUG1 可抑制巨噬细胞焦亡; oe-PTBP1 组巨噬细胞中 PTBP1、NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1、GSDMD-C、GSDMD-N 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), pro-Caspase-1 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ), 表明过表达 PTBP1 可促进巨噬细胞焦亡; 与 oe-TUG1 组比较, oe-TUG1+oe-PTBP1 组巨噬细胞中 PTBP1、ASC、cleaved-Caspase-1、GSDMD-C、GSDMD-N 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), pro-Caspase-1 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 表明过表达 PTBP1 逆转了 TUG1 对 UC 巨噬细胞焦亡的抑制作用。以上结果表明, TUG1/PTBP1/NLRP3 信号通路是调控巨噬细胞焦亡的作用通路。

#### 4 讨论

本研究通过体内外实验, 系统地探讨了黄芩苷对 UC 中巨噬细胞焦亡的影响及其分子机制。体内实验结果表明, 黄芩苷能够显著改善由 DSS 诱导的 UC 小鼠模型的症状, 降低结肠组织损伤, 并减少焦亡相关指标的表达。这些结果表明, 黄芩苷可能通过直接或间接的方式抑制巨噬细胞焦亡, 从而减轻 UC 的炎症反应。在体外实验中, 黄芩苷同样显示出对 LPS/ATP 诱导的 THP-1 巨噬细胞焦亡的抑制作用。通过检测焦亡相关蛋白的活性和表达水平, 进一步证实了黄芩苷对巨噬细胞焦亡的抑制作用。此外, 黄芩苷通过降低 TUG1 的表达, 影响了 PTBP1 与 TUG1 的结合, 进而抑制了 NLRP3 炎症小体的活化。这一发现揭示了黄芩苷抑制巨噬细胞焦亡的分子机制, 为 UC 的治疗提供了新的分子靶点。

根据 UC 的临床表现和发病特点, 中医多将其归属于“痢疾”“肠癖”等范畴。唐秀娟等<sup>[25]</sup>认为 UC 主要由脏腑湿热郁滞, 气血失和所致, 可以健脾清热活血类经方来“调和气血”, 恢复人体阴阳平和。吕永慧等<sup>[26]</sup>采用系统聚类法发现 UC 活动期以大肠湿热证、肝郁脾虚证、血瘀络结证为主。结合前人研究和临床经验, 本研究认为, “湿热瘀”是

UC 的首要证候, 中医治疗应以清热燥湿为主, 行气止痛, 化瘀止血为辅。黄芩作为一种中药材, 最早记载于《神农本草经》, 具有清热燥湿、泻火解毒、消炎消食的作用<sup>[27]</sup>被广泛应用于治疗多种疾病, 如黄疸、肠炎腹泻、闭经、恶性疮疡等<sup>[28]</sup>。黄芩苷作为黄芩中的主要活性成分, 其清热燥湿、泻火解毒的作用与中医治疗 UC 的原则相吻合。在 UC 的治疗中, 黄芩苷不仅有抗炎效果, 还通过抗氧化应激、保护肠粘膜屏障和调节肠道菌群等多种机制, 缓解了 UC 的进程<sup>[29-30]</sup>。本研究发现高剂量黄芩苷在改善 UC 小鼠的结肠炎症状方面表现出与美沙拉嗪相当的效果, 提示黄芩苷可能作为一种潜在的替代或补充治疗手段。美沙拉嗪是一种常用于治疗炎症性肠病的药物<sup>[31]</sup>, 但考虑到美沙拉嗪的长期使用可能带来的挑战, 例如可能会增加患者的经济负担和副作用, 探索黄芩苷与其他药物的协同作用<sup>[32]</sup>, 可能会发现更为有效的治疗组合, 提高治疗效果。

细胞焦亡是一种程序性细胞死亡方式, 它在炎症反应中起着重要作用, 特别是在对抗感染的过程中。在 UC 中, 细胞焦亡可能与肠上皮细胞的异常死亡有关, 这可能导致肠屏障功能的破坏, 并引发炎症反应, 其中 IL-1 $\beta$  被认为是 UC 中关键的焦亡相关生物标志物<sup>[33]</sup>, 也有报道细胞焦亡在 UC 中的作用可能与炎症小体的激活有关, 特别是 NLRP3 炎症小体<sup>[34]</sup>。此外, 细胞焦亡与细胞凋亡不同, 它通常与高炎症状态相关, 并且可能在病原体感染时发生。在 UC 中, 细胞焦亡可能与肠黏膜中的 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的产生增加有关, 这些细胞因子的成熟形式是由 Caspase-1 激活的。本研究强调了细胞焦亡在 UC 病理过程中的重要性, 特别是在炎症反应的激活和维持中。然而, 细胞焦亡在 UC 中的具体作用机制仍在研究之中, 进一步的研究可能有助于开发新的治疗策略。

近年来, 研究表明黄芩苷在调控细胞焦亡方面也具有重要作用。在某些病理状态下, 如脓毒症和急性肺损伤, 细胞焦亡的过度激活可导致组织损伤和炎症加剧。黄芩苷通过调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 这一典型的炎症通路, 能够有效减轻小鼠急性肺损伤<sup>[35]</sup>。黄芩苷还被发现能够阻断巨噬细胞中涉及焦亡、细胞凋亡和坏死性凋亡信号通路<sup>[36]</sup>。以上研究黄芩苷通过多种机制调控细胞焦亡, 包括抑制炎症小体的活化、调节细胞死亡信号通路以及抗氧化等, 这些作用为其在治疗相关疾病提供了潜

在的应用价值。

在细胞焦亡的调控中, TUG1 可以通过影响 NLRP3 炎症小体的表达和活性来发挥作用。有报道 TUG1 可能通过与 miR-145a-5p 相互作用, 影响 NLRP3 炎症小体的激活, 进而影响细胞焦亡的过程<sup>[37]</sup>。PTBP1 在细胞焦亡中的作用可能与其能够结合并调控 NLRP3 mRNA 的稳定性有关。PTBP1 能够通过影响 NLRP3 mRNA 的剪接和稳定性, 进而影响 NLRP3 蛋白的表达水平, 参与细胞焦亡的调控。NLRP3 是炎症小体的关键组分, 当激活时, 它可以促进 Caspase-1 的活化, 导致细胞焦亡的发生。总的来说, TUG1/PTBP1/NLRP3 通路在细胞焦亡的调控中扮演着重要角色, 这些分子之间的相互作用和调控机制对于理解炎症性疾病的发生发展具有重要意义。

综上, 黄芩苷作为一种具有多靶点效应的天然化合物, 在 UC 的治疗中显示出巨大的潜力。本研究不仅证实了黄芩苷对 UC 的潜在治疗作用, 而且揭示了其通过干预 TUG1/PTBP1/NLRP3 分子网络抑制巨噬细胞焦亡的分子机制, 为 UC 的分子治疗策略提供了新的视角。然而, 本研究也存在一定的局限性, 需要在更多的细胞类型和动物模型中进一步验证。此外, 黄芩苷的药理作用可能涉及多个信号通路和分子靶点<sup>[38-40]</sup>, 未来的研究需要深入探讨这些复杂的调控网络。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Le Berre C, Honap S, Peyrin-Biroulet L. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2023, 402(10401): 571-584.
- [2] 陈琴, 张志云, 朱云婴, 等. 基于国家专利的中药复方治疗溃疡性结肠炎用药规律研究 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(1): 171-178.
- [3] Świrkosz G, Szczygieł A, Logoń K, et al. The role of the microbiome in the pathogenesis and treatment of ulcerative colitis—a literature review [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(12): 3144.
- [4] Jacob E M, Borah A, Pillai S C, et al. Inflammatory bowel disease: The emergence of new trends in lifestyle and nanomedicine as the modern tool for pharmacotherapy [J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(12): 2460.
- [5] 罗雅琴, 黄伟. 黄芩及其有效成分治疗溃疡性结肠炎机制研究进展 [J]. *山东科学*, 2024, 37(2): 20-28.
- [6] 王岚滔, 赵月华, 冯晓晨, 等. 黄芩苷防治结肠炎作用机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(4): 1076-1080.
- [7] 甘灿云, 陈海红, 杨海燕. 黄芩苷抗炎作用的研究进展 [J]. *中国当代医药*, 2023, 30(27): 23-29.
- [8] Jang J Y, Im E, Kim N D. Therapeutic potential of bioactive components from *Scutellaria baicalensis* Georgi in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: A review [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 1954.
- [9] 颜亮, 李陈广, 徐丽慧, 等. 黄芩苷对 NLRP3 炎症小体活化和细胞焦亡的抑制作用及其机制研究 [J]. *免疫学杂志*, 2018, 34(2): 93-100.
- [10] Lu F F, Lan Z X, Xin Z Q, et al. Emerging insights into molecular mechanisms underlying pyroptosis and functions of inflammasomes in diseases [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4): 3207-3221.
- [11] 赵冠宇, 辛蕊华, 仇正英, 等. 基于 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路研究乌梅丸对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮细胞焦亡的作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(24): 8086-8093.
- [12] 关李稳, 刘真义, 周真真, 等. 溃疡性结肠炎患者血清 LncRNA TUG1 和 miR-142-5p 表达与疾病活动度及预后的关系 [J]. *现代检验医学杂志*, 2023, 38(5): 70-74.
- [13] 龙琴, 肖小培, 方凯. LncRNA TUG1/miR-525-5p/NLRC5 在缺氧复氧大鼠心肌细胞中的作用机制研究 [J]. *解剖科学进展*, 2020, 26(3): 284-287.
- [14] 王璐, 张媛, 罗静, 等. lncRNA TUG1 在溃疡性结肠炎患儿血清中的表达及意义 [J]. *广东医学*, 2022, 43(12): 1557-1561.
- [15] Han J, Li Y W, Zhang B L, et al. lncRNA TUG1 regulates ulcerative colitis through miR-142-5p/SOCS1 axis [J]. *Microb Pathog*, 2020, 143: 104139.
- [16] Zhou Y, Li T, Chen Z Q, et al. Overexpression of lncRNA TUG1 alleviates NLRP3 inflammasome-mediated cardiomyocyte pyroptosis through targeting the miR-186-5p/XIAP axis in coronary microembolization-induced myocardial damage [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 637598.
- [17] 张雪芬, 孙玥, 张皖东. NLR3 通过抑制 STING 信号通路, 减轻类风湿关节炎患者巨噬细胞焦亡诱导的免疫炎症反应 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2024, 40(9): 818-825.
- [18] Georgilis A, Klotz S, Hanley C J, et al. PTBP1-mediated alternative splicing regulates the inflammatory secretome and the pro-tumorigenic effects of senescent cells [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(1): 85-102.
- [19] 李芳, 陈正君, 葛俊李, 等. PI3K/AKT 信号通路在党参干预溃疡性结肠炎中的差异基因表达 [J]. *中药药理与临床*, 2024, 40(1): 61-69.
- [20] Fang F, Xie Z P, Quan J Y, et al. Baicalin suppresses *Propionibacterium acnes*-induced skin inflammation by

- downregulating the NF- $\kappa$ B/MAPK signaling pathway and inhibiting activation of NLRP3 inflammasome [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2020, 53(12): e9949.
- [21] 董徐, 王富江, 鞠志赫, 等. 基于网络药理学和动物实验探究黄芩茎叶总黄酮对溃疡性结肠炎的治疗作用及机制 [J]. *中国现代应用药学*, 2024, 41(9): 1183-1191.
- [22] 柯畅, 王燕, 曹国胜, 等. 基于 GC-MS 的枳壳水煎液抑制 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化代谢组学研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(3): 1522-1527.
- [23] 刘慧玲, 吴传新, 龙贤梨, 等. LPS 与 ATP 共同诱导小鼠原代腹腔巨噬细胞焦亡模型的建立 [J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(10): 2028-2033.
- [24] 胥琴, 邓波, 李曼琳, 等. 人卵巢癌荷瘤裸鼠肿瘤微环境局部 F4/80 阳性巨噬细胞表达 Foxp3 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(8): 952-955.
- [25] 唐秀娟, 方健松, 马媛萍, 等. 从“气血失和”理论对经方治疗溃疡性结肠炎的探讨 [J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(4): 925-927.
- [26] 吕永慧, 丛龙玲. 溃疡性结肠炎中医证型分布研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(4): 450-454.
- [27] 刘晓龙, 李春燕, 陈奇剑, 等. 黄芩主要活性成分和药理作用研究进展 [J]. *新乡医学院学报*, 2023, 40(10): 979-985.
- [28] 叶茹, 徐立鹏, 仝小林. 黄芩临床用量研究 [J]. *中国临床医生*, 2014, 42(10): 84-86.
- [29] Zhang L, Miao C Y, Wang Z X, *et al.* Preparation and characterisation of baicalin magnesium and its protective effect in ulcerative colitis via gut microbiota-bile acid axis modulation [J]. *Phytomedicine*, 2024, 126: 155416.
- [30] Wang X, Xie L, Long J Y, *et al.* Therapeutic effect of baicalin on inflammatory bowel disease: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114749.
- [31] Nardone O M, Marasco G, Lopetuso L R, *et al.* Insights into mesalazine use in clinical practice of young gastroenterologists [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(5): 2005.
- [32] Xu B, Huang S W, Chen Y P, *et al.* Synergistic effect of combined treatment with baicalin and emodin on DSS-induced colitis in mouse [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(10): 5708-5719.
- [33] Chen K W, Shang S P, Yu S N, *et al.* Identification and exploration of pharmacological pyroptosis-related biomarkers of ulcerative colitis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 998470.
- [34] Liu Q, Zuo R, Wang K, *et al.* Oroxindin inhibits macrophage NLRP3 inflammasome activation in DSS-induced ulcerative colitis in mice via suppressing TXNIP-dependent NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(6): 771-781.
- [35] 兰悦嘉, 孟宪丽, 吴嘉思. 黄芩素调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路介导的焦亡减轻小鼠急性肺损伤作用 [J]. *中草药*, 2023, 54(20): 6694-6703.
- [36] You Y P, Yan L, Ke H Y, *et al.* Baicalin inhibits PANoptosis by blocking mitochondrial Z-DNA formation and ZBP1-PANoptosome assembly in macrophages [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2025, 46(2): 430-447.
- [37] Yao M L, Luo Y, Li H J, *et al.* LncRNA Tug1 contributes post-stroke NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis via miR-145a-5p/Tlr4 axis [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(11): 6701-6712.
- [38] Chen B, Dong X Q, Zhang J L, *et al.* Natural compounds target programmed cell death (PCD) signaling mechanism to treat ulcerative colitis: A review [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1333657.
- [39] 王玉洁, 林晨, 王一凤, 等. 基于网络药理学与实验研究探讨黄芩苷对 Hepa1-6 肝癌细胞凋亡的影响 [J]. *上海中医药杂志*, 2024, 58(7): 31-39.
- [40] 杨忆衡, 韩昌鹏. 黄芩通过调控细胞因子治疗溃疡性结肠炎的研究进展 [J]. *广西中医药大学学报*, 2022, 25(2): 58-60.

[责任编辑 罗 曦]