



(-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸酯 (EGCG) 双重靶向 TBK1 与 JAK-STAT1 通路抑制 I 型 干扰素介导的炎症反应*

李 靛¹⁾ 盛奇欢¹⁾ 刘 欢^{1,2)} 阳文豪¹⁾ 师佳林¹⁾ 孙英杰¹⁾ 敬 瑞¹⁾ 麦伟华¹⁾
李智敏^{3)**} 谢晓丽^{1)**}

⁽¹⁾ 昆明理工大学医学院, 衰老与肿瘤分子遗传学实验室, 昆明 650501;

⁽²⁾ 广州科厉生物科技有限公司, 科厉干细胞生物学实验室, 广州 511431; ⁽³⁾ 云南省农业科学院药用植物研究所, 昆明 650200)

摘要 **目的** I型干扰素 (IFN-I) 信号通路是抗病毒天然免疫应答的核心通路, 其持续或过度活化与干扰素病、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病的发病相关。现阶段以 Janus 激酶 (JAK) 抑制剂为代表的靶向策略主要作用于 IFN-I 下游信号转导, 对上游 IFN-I 生成的直接调控有限。传统药用植物余甘子 (*Phyllanthus emblica* L.) 可用于炎症性疾病的治疗, 但其调控 IFN-I 通路的活性成分及分子机制尚未阐明。本研究旨在鉴定余甘子的抗炎活性成分, 并阐明其在巨噬细胞中作用于 IFN-I 通路的机制。**方法** 基于中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 与 DrugBank 数据库, 采用网络药理学方法筛选余甘子活性成分及候选靶点, 并通过分子对接评估候选成分与 IFN-I 通路蛋白 (TANK 结合激酶 1 (TBK1)、干扰素调节因子 3 (IRF3)、信号转导与转录激活因子 1 (STAT1)) 的结合, 以 BX795 和 GSK8612 为参照 TBK1 抑制剂。同时在人单核细胞白血病细胞 (THP-1) 分化巨噬细胞与骨髓来源巨噬细胞 (BMDM) 中进行实验: 经转染聚肌胞苷酸 (poly (I : C))、聚脱氧腺苷-胸苷酸 (poly (dA : dT)) 或脂多糖 (LPS) 刺激激活上游信号, 经外源 IFN- β 激活下游信号, 并构建 siRNA 介导的 3'-核酸修复外切酶 1 (TREX1) 沉默模型以模拟内源核酸驱动的干扰素病。采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测 IFN- β 1 及干扰素刺激基因 (ISGs) 表达, 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测蛋白磷酸化, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 IFN- β 分泌; 采用细胞热位移分析 (CETSA) 和药物亲和反应靶点稳定性分析 (DARTS) 探究 (-)-表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 与 IRF3 的相互作用。**结果** 网络药理学分析提示 EGCG 为余甘子中候选的 IFN-I 抑制性成分, 预测其可结合 TBK1、IRF3 与 STAT1。分子对接显示, EGCG 与 TBK1、IRF3、STAT1 的结合能分别为 -9.2、-7.2、-8.2 kcal/mol, 其对 TBK1 的亲合力与参照抑制剂 BX795 (-5.7 kcal/mol) 和 GSK8612 (-6.4 kcal/mol) 相当。在 THP-1 巨噬细胞与 BMDM 中, EGCG 均可抑制 poly (I : C)、poly (dA : dT) 及 LPS 刺激下 IFN- β 1 与 ISG 的 mRNA 表达。EGCG 降低 TBK1 与 IRF3 的磷酸化, 但不影响上游感受器环磷酸鸟苷-腺苷合成酶 (cGAS) 和视黄酸诱导基因蛋白 I (RIG-I) 的水平, 并浓度依赖性地降低 IFN- β 分泌。CETSA 与 DARTS 结果显示, EGCG 未增强 IRF3 的热稳定性或蛋白酶抗性, 提示其对 IRF3 的作用为间接性。在 IFN- β 刺激后, 延长 EGCG 处理可时间依赖性地降低 STAT1 磷酸化, 而干扰素调节因子 9 (IRF9) 无明显变化, 并部分减弱 ISG 转录; 该作用并非单调性的浓度依赖, 其中趋化因子配体 10 (CXCL10) 的抑制最为稳定。在 TREX1 沉默细胞中, EGCG 可降低升高的 ISG15、ISG56 和 CXCL10 的 mRNA 水平。**结论** EGCG 通过同时抑制 TBK1-IRF3 依赖的 IFN- β 生成与 JAK-STAT1 介导的下游转录, 抑制 IFN-I 应答。上述体外结果为余甘子在传统医学中的抗炎应用提供了机制依据, 并提示 EGCG 可作为候选化合物在干扰素驱动的自身免疫病模型中进一步评估。

关键词 余甘子, (-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸酯 (EGCG), I型干扰素, 干扰素病

中图分类号 Q2

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0111

CSTR: 32369.14.pibb.20260111

I型干扰素 (type I interferon, IFN-I) 是宿主先天免疫抗病毒应答的重要组成部分, 但其信号的异常增强或持续激活与多种自身免疫性疾病 (如系统性红斑狼疮、Aicardi-Goutières 综合征) 的发生发展密切相关^[1-3]。其潜在致病机制之一为正反馈

* 云南省基础研究专项 (202201AT070289) 和云南省兴滇人才支持计划 (XDYC-QNRC-2023-0124) 资助。

** 通讯联系人。

李智敏 Tel: 15825298075, E-mail: 393891300@qq.com

谢晓丽 Tel: 18487257807, E-mail: 398704089@qq.com

收稿日期: 2026-03-03, 接受日期: 2026-06-17

放大效应：IFN-I可诱导干扰素刺激基因(interferon-stimulated genes, ISGs)广泛表达，而部分ISGs产物可进一步促进IFN-I产生或增强其信号转导，持续放大炎症反应并可能导致组织损伤^[4]。现有针对该通路的治疗策略(如Janus激酶(Janus kinase, JAK)抑制剂)多侧重抑制下游信号转导，虽可在一定程度上降低通路活性，但对上游IFN-I产生的直接控制相对有限，此外，此类干预可能伴随广谱免疫抑制相关的不良反应(包括感染风险增加)^[5-6]。因此，开发能够同时抑制IFN-I产生及其下游信号转导，且具有更佳安全性特征的免疫调节剂，是该领域的重要科学问题与临床需求。

IFN-I的产生与信号转导主要由两条相互关联的激酶通路介导。在上游，环磷酸鸟苷-腺苷合成酶-干扰素基因刺激蛋白(cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes, cGAS-STING)通路或视黄酸诱导基因蛋白I(retinoic acid-inducible gene I, RIG-I)等模式识别受体的激活后，信号汇聚至关键激酶TANK结合激酶1(TANK-binding kinase 1, TBK1)^[7-8]，TBK1通过磷酸化干扰素调节因子3(IFN regulatory factor 3, IRF3)启动IFN-I转录。在下游，IFN-I与I型干扰素受体(interferon-alpha/beta receptor, IFNAR)结合后激活JAK家族激酶(主要为AK1与酪氨酸激酶2(tyrosine kinase 2, TYK2)^[9-11]，进而促使信号转导与转录激活因子1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)磷酸化并驱动ISGs表达^[12-14]。因此，TBK1与JAKs构成了连接IFN-I产生及响应两个环节的关键激酶节点，也被认为是具有转化潜力的药物靶点。然而，现有药物研发多集中于单一靶点的高选择性抑制剂，以单一分子同时调控上述两个不同信号节点，在理论设计与化学实现上均存在较高难度，相关研究仍相对有限。多靶点药物设计需精准平衡对TBK1与JAKs的结合活性，以避免单一靶点过度抑制可能导致的信号通路失衡，同时需克服两者活性口袋结构差异带来的分子适配难题，从而进一步增加了研发难度^[15-17]。鉴于此，天然产物来源化合物因其结构多样性与多靶点调控潜力，可能为发现此类分子提供新的研究路径。

传统药用植物余甘子(*Phyllanthus emblica* L.)在阿育吠陀(Ayurveda, 印度传统医学体系)与中医药等传统医学体系中被用于炎症相关疾病的干

预^[18]。现代药理学研究报道其具有一定的抗炎活性，并提示其活性可能与所含多酚类成分相关^[19]。然而，其关键活性单体、直接作用靶点及在IFN-I通路中的调控方式仍缺乏系统阐明，限制了其机制导向的深入研究及在干扰素相关疾病中的应用。因此，对余甘子开展活性成分追踪鉴定，并解析其对IFN-I通路的调控机制，具有明确的科学意义。

本研究对余甘子活性成分及其作用机制进行了系统分析，鉴定出(-)-表没食子儿茶素-3-没食子酸酯((-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG)为其关键活性分子，并解析其对IFN-I通路的双环节调控机制。EGCG可通过作用于上游TBK1-IRF3轴抑制IFN-I的转录启动，同时抑制下游JAK-STAT1级联反应，降低细胞对IFN-I刺激的转录响应。此外，本研究在模拟人类干扰素病的细胞模型中对上述抑制作用进行了验证。本研究结果为余甘子的传统应用提供了机制层面的依据，并为IFN-I驱动自身免疫性疾病多靶点候选药物的研发提供了研究线索。

1 材料与方法

1.1 主要药物

将5 mg 80%余甘子醇提物干粉(云南省农科院药用植物研究所提供)溶于1 ml无菌生理盐水，配制成5 g/L储存液，使用时以培养基稀释至所需工作浓度。将50 mg EGCG(MERCK, E4143, Germany)溶于10.91 ml的无菌生理盐水，配制成10 mmol/L EGCG储存液，使用时以培养基稀释。以150 μ l的优化型极限必需培养基(optimal minimum essential medium, Opti-MEM)(Gibco, 31985070, America)分别稀释聚肌胞苷酸(polyinosinic-polycytidylic acid, poly(I:C))(Invivogen, tlr1-pic, France)/聚脱氧腺苷-胸苷酸(polydeoxyadenylic-thymidylic acid, poly(dA:dT))(Invivogen, tlr1-patn, France)和Lipo 2000转染试剂(Invitrogen, 11668-019, France)(核酸与Lipo 2000体积比1:2)，终浓度为1 mg/L。将20 μ g IFN- β (Sino Biological, 50708-MCCH/10704-HNAS, China)溶于80 μ l无菌生理盐水配置储存液，使用时以培养基稀释至工作浓度2 μ g/L。各药物按指定剂量给药并维持相应处理时间(功能实验通常为24 h，转录组学实验通常为2 h或4 h)。

1.2 动物

C57BL/6雄性小鼠购自南京模式动物研究所，饲养于昆明理工大学实验动物中心。所有动物实验

方案经昆明理工大学实验动物伦理委员会审查批准 (PZWH (滇) K2023-0064)。

1.3 网络药理学分析

1.3.1 余甘子活性化合物的筛选及靶点预测

从 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Genecard 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 及 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 检索炎症相关靶点, 取 3 个数据库并集并去除重复项。从 TCMSP (<https://www.tcmsp-e.com/>)、Drugbank 数据库 (<https://go.drugbank.com/>) 以 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$ 为筛选标准, 获取余甘子活性成分及其靶点, 并通过 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 统一转换为基因标识 (gene symbol)。

1.3.2 药物-炎症靶点可视化网络构建

利用 Venny2.1 在线工具绘制余甘子活性靶点与炎症相关靶点 Venn 图^[20], 取交集基因, 导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络。结果导入 cytoscapeV3.7.2 软件进行网络可视化分析。

1.3.3 分子对接分析

从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载 EGCG 的三维结构数据文件 (structure data file, SDF) 格式, 经 Open Babel 转化为蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB) 格式, 从 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 获得 TBK1、IRF3、STAT1 蛋白的晶体结构 (PDB 格式)。使用 PyMOL 去除蛋白质中的水分子及原有配体, 使用 AutoDock Tools-1.5.7 软件对蛋白质进行加氢、计算电荷并转化成带部分电荷与原子类型的 PDB 格式 (Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T), PDBQT) 格式, 定义对接盒子后生成配置文件 (configuration, config), 使用 AutoDock Vina 执行对接, 选取结合能最低的构象进行可视化。为客观评估 EGCG 的结合亲和力, 以经典 TBK1 抑制剂 BX795^[21] 和 GSK8612^[22] 为阳性对照, 按相同流程进行分子对接分析。

1.4 细胞培养

人单核细胞白血病细胞 (Tohoku hospital pediatrics-1, THP-1) 细胞及小鼠骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow derived macrophages, BMDM) 细胞 (国家实验细胞资源共享服务平台) 在 37°C、5% CO₂ 条件下培养于含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (昆明云科生物, FS301-02,

China) 和 1% 双抗的杜氏改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) (Gibco, C11995500BT, USA)^[23]。所有细胞均放于本实验室液氮中, 定期检测支原体, 使用前培养时间不超过 6 个月或传代次数不超过 20 代。

1.5 BMDM 的制备

收集状态良好的 L929 细胞 (6×10^5 /瓶), 以 DMEM 培养基补充到 80 ml, 于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养至第 8 天, 用 0.22 μ m 滤头过滤收集条件培养上清。取 2 月龄 C57 BL/6 小鼠 (同批次小鼠年龄差不超过 1 周), 解剖取后肢骨髓细胞, 以含 30% L929 条件培养上清的 DMEM 培养基重悬至 1×10^6 /L, 每 2~3 d 换一次液, 第 7 天细胞形态呈不规则圆形时, 即完成 BMDM 分化诱导。

1.6 细胞刺激实验

1.6.1 LPS 刺激实验

将脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) (Sigma, L2880, Germany) 以培养基稀释至 100 μ g/L, 按 2 ml/孔加入 6 孔板刺激 1 h, 随后更换含相应药物的培养基处理指定时间, 收取蛋白质和 RNA 用于后续实验。

1.6.2 poly (I : C) 和 poly (dA : dT) 转染刺激实验

以 150 μ l Opti-MEM 分别稀释 poly (I : C) / poly (dA : dT) (终浓度 1 mg/L) 及 Lipo 2000 转染试剂 (核酸: Lipo 2000 体积比 1 : 2), 室温静置 2 min 后混合孵育 25~30 min。在 6 孔板中加入 1 ml Opti-MEM, 加入上述混合液后补足至 2 ml, 于 37°C、5% CO₂ 培养箱中转染 4 h。弃去转染培养基, 更换含相应药物的培养基处理指定时间后收取蛋白和 RNA。

1.6.3 IFN- β 刺激实验

将 IFN- β 储存液以培养基稀释至 2 μ g/L, 按 2 ml/孔加入 6 孔板, 于 37°C、5% CO₂ 培养箱中刺激 2 h。随后直接加入相应的药物处理 2 h 或 24 h, 收取蛋白质和 RNA。

1.7 逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

以 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 5596018, France) 提取细胞总 RNA, 使用 Hifair® III 第一链 cDNA 合成试剂盒 (翌圣生物, 11141, China) 逆转录合成 cDNA, 进行定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 检测。目的基因引物序列 (人: ISG56、ISG15、

IFN β 、趋化因子配体 10 (C-X-C motif chemokine ligand 10, *CXCL10*)、*IFN α* ; 鼠: *Cxcl10*、2'-5'-寡腺苷酸合成酶 1 (2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, *Oas1*)、*Isg15*、*Isg56*、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *Tnfa*) (鼠)、*IFN- β* (鼠)、*IFN- α*) 依据 NCBI 基因库序列, 使用 Primer5.0 设计, 由擎科生物合成^[24]; 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) 为内参基因。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算相对 mRNA 表达量, 结果以 *GAPDH* 进行标准化。引物序列如下: *ISG56* (人): forward 5'-GTGCTTGAA-GTGGACCCTGA-3', reverse 5'-CCTGCCTTAGG-GGAAGCAAA-3'; *ISG15* (人): forward 5'-GCG-CAGATCACCCAGAAGAT-3', reverse 5'-GTTTCGT-CGCATTTGTCCACC-3'; *IFN- β* (人): forward 5'-ATGACCAACAAGTGTCTCCTCC-3', reverse 5'-GGAATCCAAGCAAGTTGTAGCTC-3'; *CXCL10* (人): forward 5'-GTGGCATTCAAGGAGTACC-TC-3', reverse 5'-TGATGGCCTTCGATTCTGGA-TT-3'; *IFN- α* (人): forward 5'-AACTCCCCTGA-TGAATGCGG-3', reverse 5'-CTGCTCTGACAAC-CTCCCAG-3'; *Cxcl10* (鼠): forward 5'-GAAGC-TTGAAATCATCCCTGC-3', reverse 5'-ACGCTTT-CATTAAATTCTTGATGG-3'; *Oas1* (鼠): forward 5'-AGACCATCACTGTCACCGTTG-3', reverse 5'-GGAGGCTCTTCAGCTTCGTC-3'; *ISG15* (鼠): forward 5'-GGTGTCCGTGACTAACTCCAT-3', reverse 5'-TGGAAAGGGTAAGACCGTCCT-3'; *ISG56* (鼠): forward 5'-ATCGCGTAGACAAAGC-TCTTC-3', reverse 5'-GTTTCGGGATGTCCTCAG-TTG-3'; *Tnfa* (鼠): forward 5'-CTGAACCTTCGG-GGTGATCGG-3', reverse 5'-GGCTTGTCACCTCG-AATTTTGAGA-3'; *IFN- β* (鼠): forward 5'-TGG-GTGGAATGAGACTATTGTTG-3', reverse 5'-CTC-CCACGTCAATCTTTCCTC-3'; *IFN- α -all* (鼠): forward 5'-TCTGATGCAGCAGGTGGG-3', reverse 5'-AGGGCTCTCCAGACTTCTGCTCTG-3'; *GAPDH*: forward 5'-GTCTTACCACCATGGAGAAGGC-3', reverse 5'-TTGTTGTCATGGATGACCTTGGCC-3'。

1.8 蛋白质印迹法 (Western blot, WB)

细胞以 RIPA 裂解液 (碧云天, P0013B, China) 裂解, BCA 蛋白定量试剂盒 (TIANGEN, PA115-02, China) 测定蛋白质浓度。蛋白质经 SDS-PAGE 分离后转印至 PVDF 膜 (Cytiva,

10600023, China), 以 5% 脱脂牛奶或牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) (Sigma, B2064, France) 封闭, 分别与下列一抗在 4℃ 下孵育过夜: cGAS (CST, #83623, 1 : 500)、RIG-I (ABclonal, A13407, 1 : 1 000)、TBK1 (CST, #3504, 1 : 1 000)、p-TBK1 (CST, #5483, 1 : 1 000)、IRF3 (CST, #4302 1 : 1 000)、p-IRF3 (CST, #4947, 1 : 1 000)、p-STAT1 (CST, #9167, 1 : 1 000)、STAT1 (CST, #14994, 1 : 1 000)、IRF9 (Proteintech, 14167-1-AP, 1 : 1 000)、磷酸化核因子- κ B 抑制蛋白 α (phosphorylated Inhibitor of nuclear factor kappa B alpha, p-IK β) (Wanleibio, WL02495, 1 : 1 000)、IK β (Wanleibio, WL01936, 1 : 1 000)、含 TIR 结构域的诱导 β 干扰素接头蛋白 (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , TRIF) (ABclonal, A1155, 1 : 1 500)、肿瘤坏死因子受体相关因子 3 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 3, TRAF3) (Wanleibio, WL04574, 1 : 1 000)、纽蛋白/黏着斑蛋白 (Vinculin) (Bioss, bsm-54148R, 1 : 1 000)。随后与相应二抗在室温下孵育 2 h, 使用增强化学发光法显影。使用 ImageJ 软件进行灰度密度分析^[25]。

1.9 酶联免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

收集细胞培养的上清, 采用 Human IFN- β Valukine™ ELISA 试剂盒 (NOVUS, VAL137, USA) 检测 IFN- β 蛋白分泌量^[25]。

1.10 小干扰 RNA (siRNA) 转染技术

将 siRNA (10 μ l) 与 Lip 2000 (siRNA: Lip 2000 体积比 1 : 2) 分别稀释于 100 μ l Opti-MEM 中, 室温静置 2 min 后混合, 室温孵育 20 min。将混合液加入 6 孔板, Opti-MEM 补足至 2 ml, 转染 6 h 后换用含 10% FBS 的正常培养基继续培养 24~48 h。3'-核酸修复外切酶 1 (three-prime repair exonuclease 1, *TREX1*) siRNA (人): forward 5'-CCAAGACCATCTGCTGTCA-3', reverse 5'-AC-AATGGTGACCGCTACGA-3' (锐博生物)。

1.11 细胞热位移测定 (cellular thermal shift assay, CETSA)

将 THP-1 来源巨噬细胞以含 250 μ mol/L EGCG 或等体积二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (溶剂对照) 的培养基处理 1 h 后, 消化收集并重悬于磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)

中, 等量分装至PCR管中。将细胞悬液于梯度温度 (48、50、52、54、56℃) 下加热3 min, 随即置于室温冷却3 min, 经3次冻融循环裂解细胞后, 以20 000g、4℃离心20 min, 收集上清 (可溶性蛋白组分)。以BCA法定量可溶性蛋白质浓度, 进行Western blot检测IRF3蛋白水平。

1.12 药物亲和响应靶标稳定性分析 (drug affinity responsive target stability, DARTS)

采用不加蛋白酶抑制剂的温和非变性裂解液裂解THP-1细胞提取总蛋白质后, 测定并调整蛋白质浓度至2~5 g/L。将蛋白质样品分为对照组与实验组, 实验组加入终浓度50 μmol/L EGCG, 对照组加入等体积DMSO, 室温孵育30~60 min。设置蛋白酶与蛋白质量比梯度1:400、1:200、1:100, 室温限制性酶解10~30 min。酶解结束后立即加入上样缓冲液煮沸终止反应, 最后通过Western blot检测IRF3蛋白的抗蛋白酶水解稳定性。

1.13 数据分析

数据以平均值±标准差 (mean±SD) 表示, 采

用SPSS 20.0软件进行统计学分析, 组间差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 多重比较采用最小显著差数法 (least significant difference, LSD)。**P*<0.05、***P*<0.01、****P*<0.001、*****P*<0.000 1、为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 余甘子抑制IFN-I反应的活性成分追踪及EGCG的确定

为评估传统药用植物余甘子对IFN-I通路的调控作用, 本研究首先检测其提取物对巨噬细胞IFN-I应答的影响。结果显示, 余甘子提取物可剂量依赖性抑制病毒RNA模拟物poly (I:C) 诱导的THP-1巨噬细胞*IFN-β1* mRNA表达 (图1)。基于上述结果, 进一步开展活性成分筛选。网络药理学分析显示, 余甘子主要成分之一EGCG可能与IFN-I通路关键节点TBK1和STAT1具有潜在相互作用 (表1)。

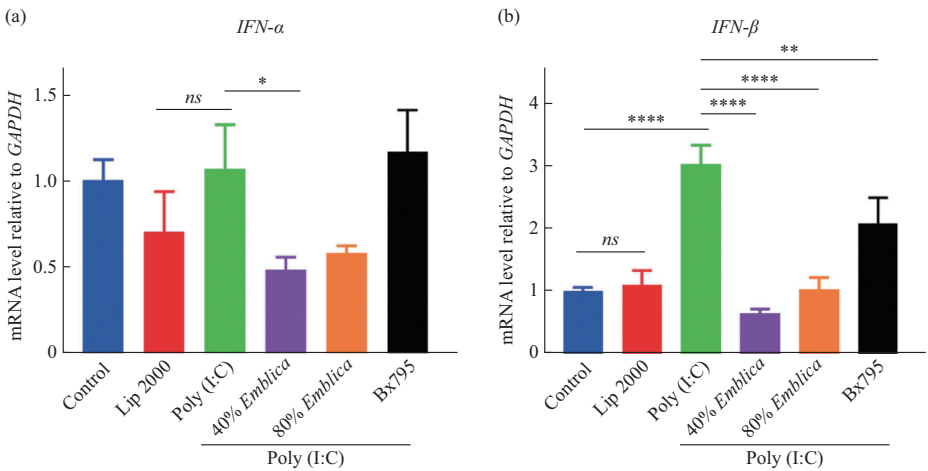


Fig. 1 Alcohol extract of *Phyllanthus emblica* inhibits poly (I:C)-induced IFN-I pathway in macrophages
(a) THP-1 cells were co-treated with *Phyllanthus emblica* extract and poly (I:C) for 20 h, mRNA expression of IFN-I (IFN-α (a) and IFN-β (b)) was detected by RT-PCR. Data were from one single experiment representative of three independent experiments. **P*<0.05, ***P*<0.01, *****P*<0.000 1. *ns*: no significant difference. *n*≥3.

Table 1 IFN-I pathway-related molecular targets identified from *Phyllanthus emblica* components in the DrugBank database

Compound	IFN-I-related molecular targets
Kaempferol	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta
	Serine/threonine-protein kinase TBK1
	Interferon regulatory factor 3
	Signal transducer and activator of transcription 3
(-)-epigallocatechin-3-gallate	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta
	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta
	Interferon regulatory factor 1
Quercetin	

为验证上述预测,检测纯品 EGCG 的生物学效应。结果表明,EGCG 可降低 poly (I : C) 诱导的 *IFN- β* 及 *ISG15* mRNA 表达水平 (图 2),提示 EGCG 为余甘子中与 IFN-I 应答抑制相关的关键活性成分。进一步的分子对接分析显示,EGCG 与上游激酶 TBK1 (结合能 -9.2 kcal/mol)、IRF3

(-7.2 kcal/mol) 及下游 STAT1 (-8.2 kcal/mol) 的激酶结构域均具有较高的预测结合亲和力 (图 3a~c),提示其可能同时作用于上、下游信号节点。以经典 TBK1 抑制剂 BX795 (-5.7 kcal/mol) 和 GSK8612 (-6.4 kcal/mol) 为参照,EGCG 与 TBK1 的理论结合亲和力与已知抑制剂相当 (图 3d, e)。

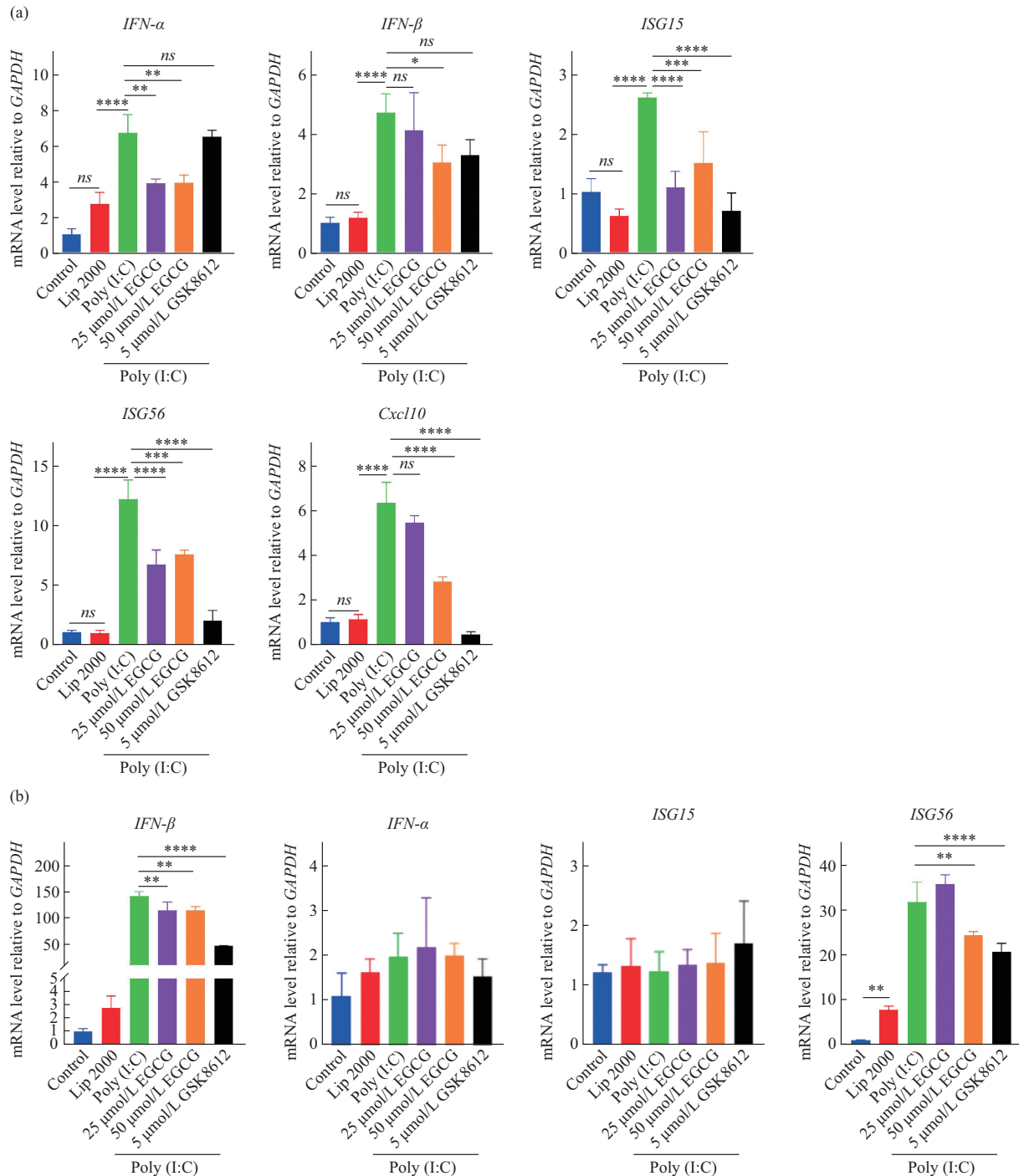


Fig. 2 EGCG is an active immunomodulatory component of *Phyllanthus emblica* targeting the IFN-I pathway

THP-1 cells (a) and BMDM (b) were transfected with poly (I:C) for 4 h, followed by EGCG treatment for 20 h. The mRNA expression of *IFN-I* and *ISGs* was detected by RT-PCR. Data were from one single experiment representative of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. ns: no significant difference. $n \geq 3$.

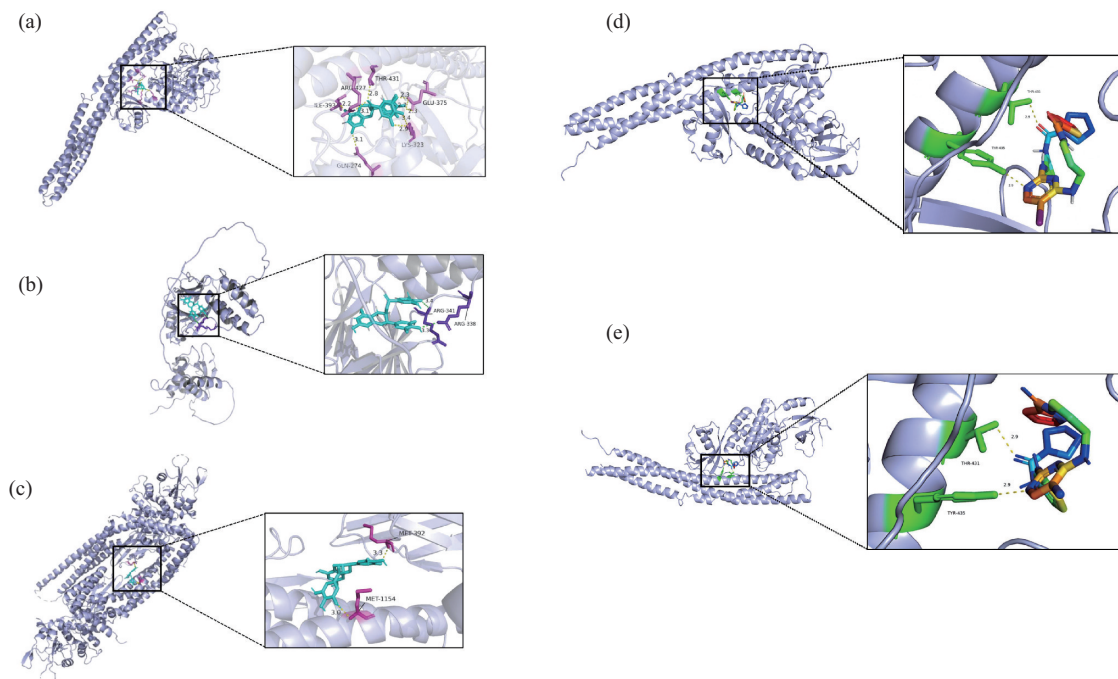


Fig. 3 Molecular docking of EGCG with TBK1, IRF3 and STAT1

(a) Docking conformation of EGCG with TBK1, binding energy: -9.2 kcal/mol. (b) Docking conformation of EGCG with IRF3, binding energy: -7.2 kcal/mol. (c) Docking conformation of EGCG with STAT1, binding energy: -8.2 kcal/mol. (d) Docking conformation of reference compound BX795 with TBK1, binding energy: -5.7 kcal/mol. (e) Docking conformation of reference compound GSK8612 with TBK1, binding energy: -6.4 kcal/mol.

2.2 EGCG通过调控TBK1-IRF3轴抑制IFN-I的产生

为评估EGCG对上游IFN-I产生的抑制, 采用多种可汇聚至TBK1-IRF3轴的先天免疫刺激物处理巨噬细胞, 包括poly (I : C)、胞质DNA模拟物poly (dA : dT) 及细菌脂多糖 (LPS)。基因表达分析结果显示, 在上述不同刺激条件下, EGCG均可抑制代表性ISGs mRNA的表达 (图2a, 4a, 4b), 提示其作用位点可能位于多条上游通路的共同下游汇聚节点。

进一步检测TBK1及其底物IRF3的磷酸化水平。结果表明, EGCG显著抑制由poly (I : C) 或poly (dA : dT) 诱导的TBK1与IRF3磷酸化水平的升高 (图4c~e)。同时, 利用CETSA和DARTS技术检测EGCG与IRF3的相互作用。结果显示, EGCG并未增强IRF3的热稳定性和蛋白酶抗性 (图4f, g), 提示二者并未有直接结合。ELISA定量结果进一步显示, 细胞培养上清中IFN- β 蛋白分

泌量呈剂量依赖性降低 (图4h)。上述结果表明, EGCG可通过抑制TBK1-IRF3轴的激活降低上游IFN-I的产生。

2.3 EGCG抑制JAK-STAT1级联反应, 降低细胞对IFN-I的应答

基于网络药理学提示EGCG可能作用于STAT1, 本节以IFN- β 刺激THP-1细胞建立JAK-STAT通路激活模型。首先优化刺激条件, 以2~50 μ g/L IFN- β 分别处理2 h或4 h。结果 (图5a) 显示, 各浓度IFN- β 作用2 h均可有效诱导STAT1磷酸化, 且各浓度间差异较小; 处理4 h后p-STAT1维持激活状态, IRF9各组间无显著差异。后续实验选用2 μ g/L IFN- β 。

以2 μ g/L IFN- β 刺激2 h后, 加入不同浓度EGCG或阳性对照GSK8612分别处理1 h、2 h或18 h。结果显示, IFN- β 刺激可显著上调p-STAT1水平, EGCG或GSK8612处理1 h或2 h对p-STAT1及IRF9无明显影响, 处理18 h后, EGCG呈浓度

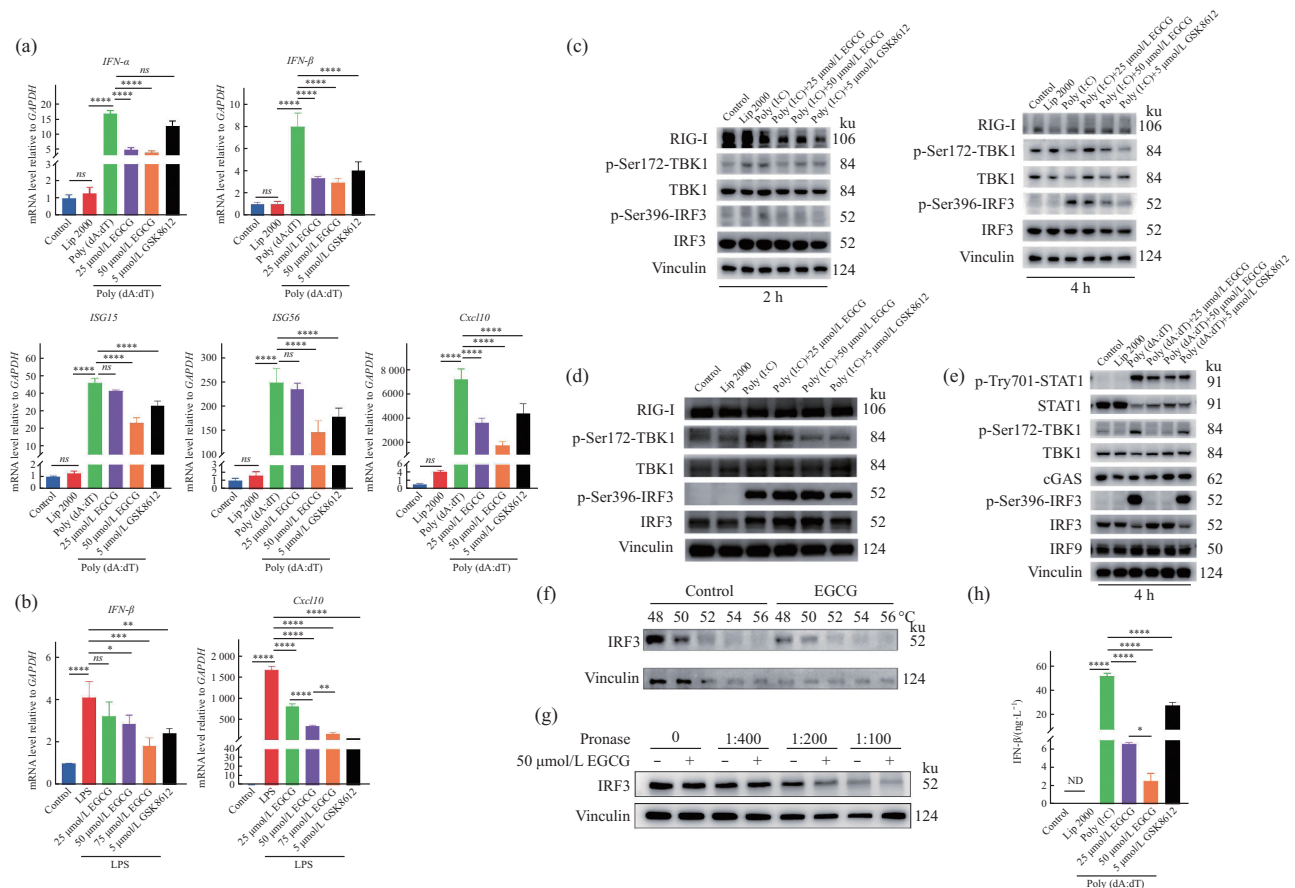


Fig. 4 EGCG inhibits IFN-I production by targeting the TBK1-IRF3 signaling axis

(a) THP-1 cells were transfected with poly(dA:dT) for 4 h, followed by EGCG treatment for 20 h. The mRNA expression of *IFN-I* and *ISGs* was detected by RT-PCR. (b) THP-1 cells were stimulated with LPS for 1 h, followed by EGCG treatment for 20 h. Expression of *IFN-β* and *CXCL10* was detected by RT-PCR. (c) THP-1 cells were transfected with poly(I:C) for 4 h, followed by EGCG treatment for 2 h or 4 h. IFN-I pathway protein expression was detected by Western blot. (d) BMDM were transfected with poly(I:C) for 4 h, followed by EGCG treatment for 2 h. IFN-I pathway protein expression was detected by Western blot. (e) Cells were transfected with poly(dA:dT) for 4 h and then treated with EGCG for 4 h. The expression of IFN-I pathway proteins was detected by Western blot. Data were from one single experiment representative of three independent experiments. (f) After THP-1 cells were treated with 250 μmol/L EGCG for 20 h, the changes in intracellular target protein thermostability were evaluated by cellular thermal shift assay. (g) THP-1 cell lysates were pre-treated with control or 50 μmol/L EGCG, followed by limited digestion using pronase serially diluted at ratios of 1:400, 1:200, and 1:100. The levels of residual IRF3 protein were detected by Western blot. (h) THP-1 cells were transfected with poly(dA:dT) for 4 h, followed by EGCG treatment for 20 h. IFN-β secretion in cell supernatants was quantified by ELISA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. ns: no significant difference. $n \geq 3$.

依赖性降低 p-STAT1 水平, IRF9 仍未见明显变化 (图 5b)。

为评估下游转录响应, 细胞经 IFN-β 刺激 2 h 后加入 EGCG 处理 6 h, 检测 *ISGs* mRNA 水平。结果显示 (图 5c), IFN-β 显著上调 *ISGs* mRNA 的表达。与 IFN-β 组相比, EGCG 在部分浓度下可抑制 *ISGs* 转录, 25 μmol/L 轻度降低 *ISG15*, 50 μmol/L

与 75 μmol/L 降低 *OAS1*, 25 μmol/L 与 50 μmol/L 降低 *ISG56*, *CXCL10* 呈浓度依赖性降低。EGCG 对上述 *ISGs* 的抑制作用整体未呈单调的剂量依赖关系, 其中对 *CXCL10* 的抑制作用呈单调性。上述结果提示, EGCG 可在 IFN-β 刺激条件下部分抑制 JAK-STAT 介导的下游 *ISGs* 表达, 其中对 *CXCL10* 的抑制效应相对稳定。

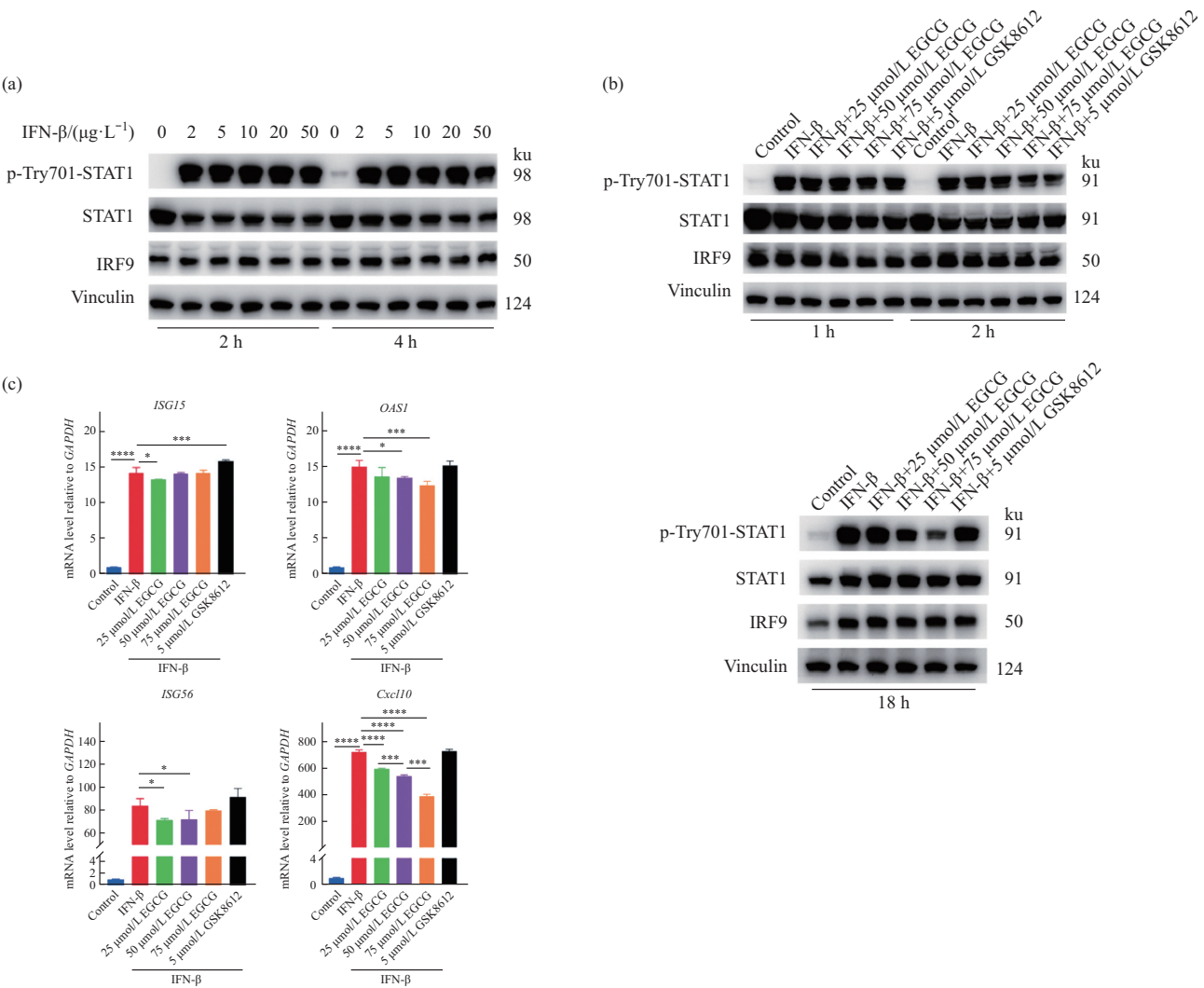


Fig. 5 EGCG suppresses JAK-STAT1-mediated IFN-I signaling response

(a) THP-1 cells were treated with IFN-β at indicated concentrations for 2 h or 4 h. JAK-STAT pathway protein expression was detected by Western blot. (b) THP-1 cells were stimulated with IFN-β for 2 h, followed by EGCG or GSK8612 treatment for 1 h, 2 h, or 18 h. JAK-STAT pathway protein expression was detected by Western blot. (c) THP-1 cells were stimulated with IFN-β for 2 h, followed by EGCG treatment for 20 h. The mRNA expression of ISGs was detected by RT-PCR. Data were from one single experiment representative of three independent experiments. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. ns: no significant difference. $n \geq 3$.

2.4 EGCG抑制TREX1缺陷细胞中的IFN-I过度激活

TREX1 突变与多种I型干扰素病相关, *TREX1* 功能缺陷模型可模拟IFN-I通路的内源性异常激活。本研究在THP-1细胞中以siRNA敲低*TREX1*, 敲低后给予EGCG处理24 h, 检测ISGs mRNA水

平。结果(图6)显示, 与阴性对照(negative control, NC)组相比, si-*TREX1*组ISG15、ISG56及CXCL10 mRNA水平均显著升高; 与si-*TREX1*组相比, EGCG处理可显著降低上述基因的表达水平。上述结果表明, EGCG可以减弱TREX1缺陷相关的IFN-I通路过度激活所致的炎症表型。

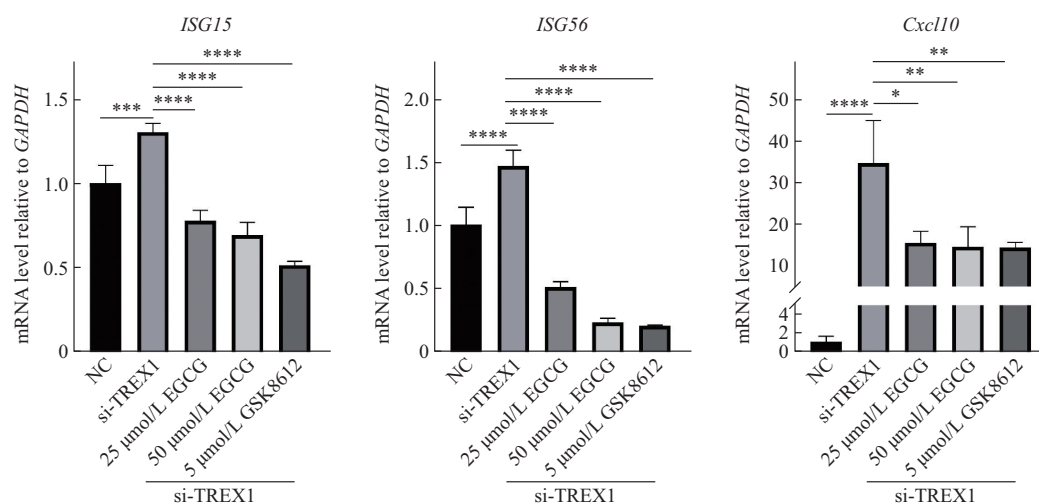


Fig. 6 EGCG attenuates IFN-I pathway over activation in TREX1-deficient cells

THP-1 cells were transfected with si-TREX1 for 24 h, followed by EGCG treatment for 24 h. The mRNA expression of ISGs was detected by RT-PCR. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. ns: no significant difference. $n \geq 3$.

3 讨 论

余甘子果实长期用于炎症相关疾病的传统干预, 现代研究亦提示其具有抗氧化、抗炎等药理活性, 其效应可能与所含多酚类化合物(如类黄酮、没食子酸等)相关^[26]。然而, 余甘子及其活性成分对IFN-I相关炎症的调控作用与分子机制仍缺乏系统阐明。鉴于IFN-I信号在多种自身免疫性疾病及干扰素病中的病理意义, 本研究以THP-1来源巨噬细胞为主要实验体系, 采用poly(I:C)、poly(dA:dT)及LPS等刺激建立体外模型, 评估余甘子提取物及其候选活性成分EGCG对IFN-I通路的影响。

在通路上游层面, 余甘子醇提取物可下调poly(I:C)诱导的IFN- β 1 mRNA表达, 并抑制IRF3活化, 在LPS诱导条件下亦可降低IRF3磷酸化水平。进一步的靶点分析显示, 余甘子提取物可抑制TBK1磷酸化, 而对上游接头蛋白水平无明显影响, 提示其可能主要作用于TBK1-IRF3轴从而抑制IFN-I产生。不同醇提取物间效应存在差异, 提示其成分组成可能影响抑制强度, 仍需进一步解析成分谱与效应的对应关系。

为明确关键活性成分, 结合网络药理学分析将EGCG作为候选分子开展验证。网络药理学提示EGCG与IFN-I通路相关分子(TBK1、IRF3、STAT1)存在潜在关联, 且既往研究亦将EGCG纳入余甘子质量标志物候选^[27]。在本研究中,

EGCG在多种刺激条件下均可降低IFN- α /IFN- β 1的mRNA水平, 并下调部分ISGs表达, 在蛋白质水平, EGCG可降低p-TBK1及p-IRF3, 而对cGAS、RIG-I等上游蛋白质水平无明显影响, 提示其作用环节更接近TBK1-IRF3汇聚节点。TBK1在先天免疫稳态与炎症调控中具有关键地位, EGCG与TBK1/IRF3相互作用的分子基础及其对不同免疫功能输出的影响有待进一步研究。

在通路下游层面, IFN- β 刺激可激活JAK-STAT通路并上调ISGs表达。EGCG在较短处理时间内对STAT1及IRF9活化影响有限, 延长处理时间(18 h)后可降低p-STAT1水平。在转录层面, EGCG对部分ISGs的抑制效应总体较弱且不呈一致的剂量依赖关系, 其中对CXCL10的抑制最为稳定。上述结果提示, EGCG可在一定条件下调节IFN-I下游转录响应, 其时间依赖性与基因选择性有待更完整的STAT家族成员(如STAT2、STAT3)范围内进一步验证。既往研究报道EGCG可降低STAT1的磷酸化水平^[28-29], 与本研究结果一致。

在靶点结合验证层面, 由于TBK1对Hsp90伴侣复合体的高度依赖性, 在无外源配体稳定保护的热梯度处理条件下, TBK1构象易发生不可逆变性与疏水聚集, 致使离心后上清中可溶性蛋白质不足以形成可检测的熔解曲线^[30]。因此本研究以CETSA和DARTS实验在活细胞水平探究了EGCG是否与IRF3直接结合, 但结果显示EGCG并未增强IRF3的热稳定性和蛋白酶抗性, 表明EGCG对

IRF3的抑制是间接作用。后续研究将通过表面等离子体共振等体外生物物理手段进一步确认EGCG与TBK1的直接结合。

TREX1突变与多种I型干扰素病相关^[31], 本研究在TREX1敲低的THP-1细胞中观察到ISG15、ISG56及CXCL10 mRNA表达升高, EGCG处理可降低上述基因表达水平, 提示EGCG可在该细胞模型中减弱TREX1缺陷相关的IFN-I通路激活表型。

既往研究报道EGCG可抑制NF- κ B相关炎症反应^[32]。在本研究条件下, EGCG对I κ B α 磷酸化及总蛋白质水平无明显影响。Lakshmi等^[33]的研究表明, EGCG对NF- κ B p65的调控可能并非通过影响其磷酸化或核转位水平, 而是通过共价修饰方式直接干扰已活化p65与靶DNA的结合, 这与本研究观察到的I κ B α 磷酸化不受影响的结果相一致。由于本研究体系未系统检测p65磷酸化及核转位, 尚难以对本模型中EGCG对NF- κ B轴的整体作用作出全面判断, 后续研究将进行系统评估。

本研究以THP-1来源巨噬细胞和原代BMDM为主要实验体系, 系统阐明了EGCG在IFN-I信号通路中的双重调控机制。IFN-I相关炎症的发生涉及多种免疫细胞类型的协同参与, EGCG的免疫调节效应亦不局限于巨噬细胞。在树突状细胞(dendritic cell, DC)方面, EGCG可阻断已分化DC的终末成熟过程, 下调CD83、CD80、CD11c及主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) II类分子等抗原呈递关键分子的表达, 并抑制未成熟DC的抗原内吞能力, 经EGCG处理的成熟DC还可诱导大量IL-10分泌, 同时其对异体T细胞的刺激活性受到抑制^[34]。此外, EGCG可抑制IFN- γ 刺激的小鼠骨髓来源DC中STAT1的激活及其与IRF-1启动子的结合, 并减少环氧化酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)介导的前列腺素E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)生成^[35], 提示其在DC中可能存在与本研究体系类似的STAT1通路抑制机制。近期综述进一步报道, EGCG可促进DC成熟与肿瘤抗原负载, 增强细胞毒性淋巴细胞的抗肿瘤免疫应答^[36], 提示EGCG对DC功能的影响具有情境依赖性, 其在炎症性自身免疫与肿瘤免疫两种微环境中的调控方向有待进一步阐明。在T细胞方面, EGCG在生理相关浓度(2.5~10 μ mol/L)下可通过损伤IL-2/IL-2R信号转导, 剂量依赖性地抑制T细胞增殖和细

胞周期进展^[37]。此外, EGCG可显著抑制人原代T细胞中IL-2、IL-4、IFN- γ 及TNF- α 等促炎细胞因子的分泌, 其机制涉及激活蛋白1(activator protein-1, AP-1)转录因子的失活^[38], 这与本研究中EGCG通过JAK-STAT1轴抑制IFN- β 下游信号响应的发现在效应端具有一定的互补性。因此, EGCG对IFN-I相关炎症的干预可能涵盖巨噬细胞、DC及T细胞多层面, 本研究在巨噬细胞中揭示的TBK1-IRF3与JAK-STAT1双重抑制机制是否在其他细胞类型中以类似方式运作, 有待后续在相关细胞类型及体内模型中进一步验证。

本研究存在以下几方面局限性。第一, 目前证据主要来自体外细胞模型, 以THP-1来源巨噬细胞为主。虽引入了原代BMDM和TREX1敲低模型以扩展实验体系, 但EGCG在不同细胞背景下的效应差异有待系统比较。第二, EGCG与TBK1、IRF3、STAT1的直接结合尚未在纯化蛋白质水平以表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)等生物物理手段的确证, 现有CETSA与分子对接数据属于细胞水平或计算层面证据, 结合模式与动力学参数有待精确测定。第三, 本研究尚未开展体内动物模型验证, 在MRL/lpr(murphy roths large/lymphoproliferation)红斑狼疮小鼠模型或TREX1缺陷小鼠中评估EGCG的体内药效及组织炎症改善情况, 是全面评估其治疗潜力的必要环节, 将作为后续研究的重点方向。第四, EGCG的生物利用度与体内稳定性对其临床转化具有重要影响, 相关药代动力学特征与递送策略优化亦需在后续研究中予以考虑。

4 结 论

本研究以THP-1来源巨噬细胞和原代BMDM为实验体系, 评估了余甘子提取物及其活性成分EGCG对IFN-Is相关通路的调控作用。结果表明, 余甘子醇提物和EGCG均能抑制IFN-Is的产生。机制研究显示, EGCG可通过抑制TBK1-IRF3轴减少上游IFN- β 的产生, 同时通过抑制JAK-STAT1通路降低细胞对IFN-I的下游转录响应, 在TREX1缺陷干扰素病细胞模型中亦可减弱IFN-I通路的持续激活。上述结果提示, EGCG通过双重靶向IFN-I通路的产生与响应两个环节发挥免疫调节作用, 为其作为IFN-I驱动炎症性疾病潜在干预候选物提供了体外实验依据。

参 考 文 献

- [1] Jiang J, Zhao M, Chang C, *et al.* Type I interferons in the pathogenesis and treatment of autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2020, **59**(2): 248-272
- [2] Withers S E, Rowlands C F, Tapia V S, *et al.* Characterization of a mutant *samhd1* zebrafish model implicates dysregulation of cholesterol biosynthesis in Aicardi-Goutières syndrome. *Front Immunol*, 2023, **14**: 1100967
- [3] Naesens L, Nemegeer J, Roelens F, *et al.* Mutations in RNU7-1 weaken secondary RNA structure, induce MCP-1 and CXCL10 in CSF, and result in aicardi-goutières syndrome with severe end-organ involvement. *J Clin Immunol*, 2022, **42**(5): 962-974
- [4] Sun M Y, Cao L B, Wan Q L, *et al.* Lumpy skin disease virus protein LSDV122 impairs IFN-I receptor complex formation to evade host innate immunity. *PLoS Pathog*, 2026, **22**(1): e1013871
- [5] Covert L T, Prinz J A, Swain-Lenz D, *et al.* Genetic changes from type I interferons and JAK inhibitors: clues to drivers of juvenile dermatomyositis. *Rheumatology: Oxford*, 2024, **63**(SI2): SI240-SI248
- [6] Van Eyndhoven L C, Chouri E, Matos C I, *et al.* Unraveling IFN-I response dynamics and TNF crosstalk in the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Front Immunol*, 2024, **15**: 1322814
- [7] Zhao B, Du F, Xu P, *et al.* A conserved PLPLRT/SD motif of STING mediates the recruitment and activation of TBK1. *Nature*, 2019, **569**(7758): 718-722
- [8] Nickenig M, Mangan M S J, Lee H E, *et al.* Cutting edge: sting induces ACLY activation and metabolic adaptations in human macrophages through TBK1. *J Immunol*, 2024, **212**(1): 7-11
- [9] Han L, Zhuang M W, Deng J, *et al.* SARS-CoV-2 ORF9b antagonizes type I and III interferons by targeting multiple components of the RIG-I/MDA-5-MAVS, TLR3-TRIF, and cGAS-STING signaling pathways. *J Med Virol*, 2021, **93**(9): 5376-5389
- [10] Shinde O, Li P. The molecular mechanism of dsDNA sensing through the cGAS-STING pathway. *Adv Immunol*. 2024, **162**: 1-21
- [11] Babadei O, Strobl B, Müller M, *et al.* Transcriptional control of interferon-stimulated genes. *J Biol Chem*, 2024, **300**(10): 107771
- [12] Liu X, Chen H, Ye G, *et al.* African swine fever virus pB318L, a trans-geranylgeranyl-diphosphate synthase, negatively regulates cGAS-STING and IFNAR-JAK-STAT signaling pathways. *PLoS Pathog*, 2024, **20**(4): e1012136
- [13] Kessler N, Viehmann S F, Krollmann C, *et al.* Monocyte-derived macrophages aggravate pulmonary vasculitis via cGAS-STING/IFN-mediated nucleic acid sensing. *J Exp Med*, 2022, **219**(10): e20220759
- [14] Swaraj S, Tripathi S. Interference without interferon: interferon-independent induction of interferon-stimulated genes and its role in cellular innate immunity. *mBio*, 2024, **15**(10): e0258224
- [15] Revach O Y, Liu S, Jenkins R W. Targeting TANK-binding kinase 1 (TBK1) in cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, **24**(11): 1065-1078
- [16] Tu D, Zhu Z, Zhou A Y, *et al.* Structure and ubiquitination-dependent activation of TANK-binding kinase 1. *Cell Rep*, 2013, **3**(3): 747-758
- [17] Larabi A, Devos J M, Ng S L, *et al.* Crystal structure and mechanism of activation of TANK-binding kinase 1. *Cell Rep*, 2013, **3**(3): 734-746
- [18] Middha S K, Goyal A K, Lokesh P, *et al.* Toxicological evaluation of emblica officinalis fruit extract and its anti-inflammatory and free radical scavenging properties. *Pharmacogn Mag*, 2015, **11**(Suppl 3):S427-S433
- [19] Muthuraman A, Sood S, Singla S K. The antiinflammatory potential of phenolic compounds from *Emblica officinalis* L. in rat. *Inflammopharmacology*, 2011, **19**(6): 327-334
- [20] Chen X, An H, Wu D, *et al.* Research progress of selective brain cooling methods in the prehospital care for stroke patients: a narrative review. *Brain Circ*, 2023, **9**(1): 16-20
- [21] Tauber P A, Kratzer B, Schatzlmaier P, *et al.* The small molecule inhibitor BX-795 uncouples IL-2 production from inhibition of Th2 inflammation and induces CD4⁺ T cells resembling iTreg. *Front Immunol*, 2023, **14**: 1094694
- [22] Thomson D W, Poeckel D, Zinn N, *et al.* Discovery of GSK8612, a highly selective and potent TBK1 inhibitor. *ACS Med Chem Lett*, 2019, **10**(5): 780-785
- [23] Wu W, Xu L, Mu D, *et al.* Ethanol extracts of *Cinnamomum migao* H. W. Li attenuates neuroinflammation in cerebral ischemia-reperfusion injury via regulating TLR4-PI3K-Akt-NF-κB pathways. *J Ethnopharmacol*, 2025, **339**: 119150
- [24] Gao H, Zhang H, Hu Y, *et al.* *De novo* transcriptome assembly and metabolomic analysis of three tissue types in *Cinnamomum cassia*. *Chin Herb Med*, 2023, **15**(2): 310-316
- [25] He D, Liu Q, Mi Y, *et al.* *De novo* generation and identification of novel compounds with drug efficacy based on machine learning. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, **11**(11): e2307245
- [26] Li W, Zhang X, Chen R, *et al.* HPLC fingerprint analysis of *Phyllanthus emblica* ethanol extract and their antioxidant and anti-inflammatory properties. *J Ethnopharmacol*, 2020, **254**: 112740
- [27] 陈静梅, 郝二伟, 杜正彩, 等. 基于化学成分、药理作用和网络药理学的余甘子质量标志物(Q-Marker)预测分析. *中草药*, 2022, **53**(5): 1570-1586
- [28] Chen J M, Hao E W, Du Z C, *et al.* *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, **53**(5): 1570-1586
- [29] Menegazzi M, Tedeschi E, Dussin D, *et al.* Anti-interferon gamma action of epigallocatechin-3-gallate mediated by specific inhibition of STAT1 activation. *FASEB J*, 2001, **15**(7): 1309-1311
- [30] Ravindran Menon D, Li Y, Yamauchi T, *et al.* EGCG inhibits tumor growth in melanoma by targeting JAK-STAT signaling and its downstream PD-L1/PD-L2-PD1 axis in tumors and enhancing cytotoxic T-cell responses. *Pharmaceuticals*, 2021, **14**(11): 1081
- [31] Yang K, Shi H, Qi R, *et al.* Hsp90 regulates activation of interferon regulatory factor 3 and TBK-1 stabilization in Sendai virus-infected cells. *Mol Biol Cell*, 2006, **17**(3): 1461-1471

- [31] Hasan M, Koch J, Rakheja D, *et al.* Trex1 regulates lysosomal biogenesis and interferon-independent activation of antiviral genes. *Nat Immunol*, 2013, **14**(1): 61-71
- [32] Mokra D, Joskova M, Mokry J. Therapeutic effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in relation to molecular pathways controlling inflammation, oxidative stress, and apoptosis. *Int J Mol Sci*, 2022, **24**(1): 340
- [33] Lakshmi S P, Reddy A T, Kodidhela L D, *et al.* The tea catechin epigallocatechin gallate inhibits NF- κ B-mediated transcriptional activation by covalent modification. *Arch Biochem Biophys*, 2020, **695**: 108620
- [34] Yoneyama S, Kawai K, Tsuno N H, *et al.* Epigallocatechin gallate affects human dendritic cell differentiation and maturation. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, **121**(1): 209-214
- [35] Jeong Y I, Jung I D, Lee J S, *et al.* (-)-Epigallocatechin gallate suppresses indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in murine dendritic cells: evidences for the COX-2 and STAT1 as potential targets. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **354**(4): 1004-1009
- [36] Li D, Cao D, Sun Y, *et al.* The roles of epigallocatechin gallate in the tumor microenvironment, metabolic reprogramming, and immunotherapy. *Front Immunol*, 2024, **15**: 1331641
- [37] Wu D, Guo Z, Ren Z, *et al.* Green tea EGCG suppresses T cell proliferation through impairment of IL-2/IL-2 receptor signaling. *Free Radic Biol Med*, 2009, **47**(5): 636-643
- [38] Huang S C, Kao Y H, Shih S F, *et al.* Epigallocatechin-3-gallate exhibits immunomodulatory effects in human primary T cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, **550**: 70-76

Dual Targeting of TBK1 and JAK–STAT1 Pathways by (–)-epigallocatechin–3–gallate Suppresses Type I Interferon–driven Inflammation*

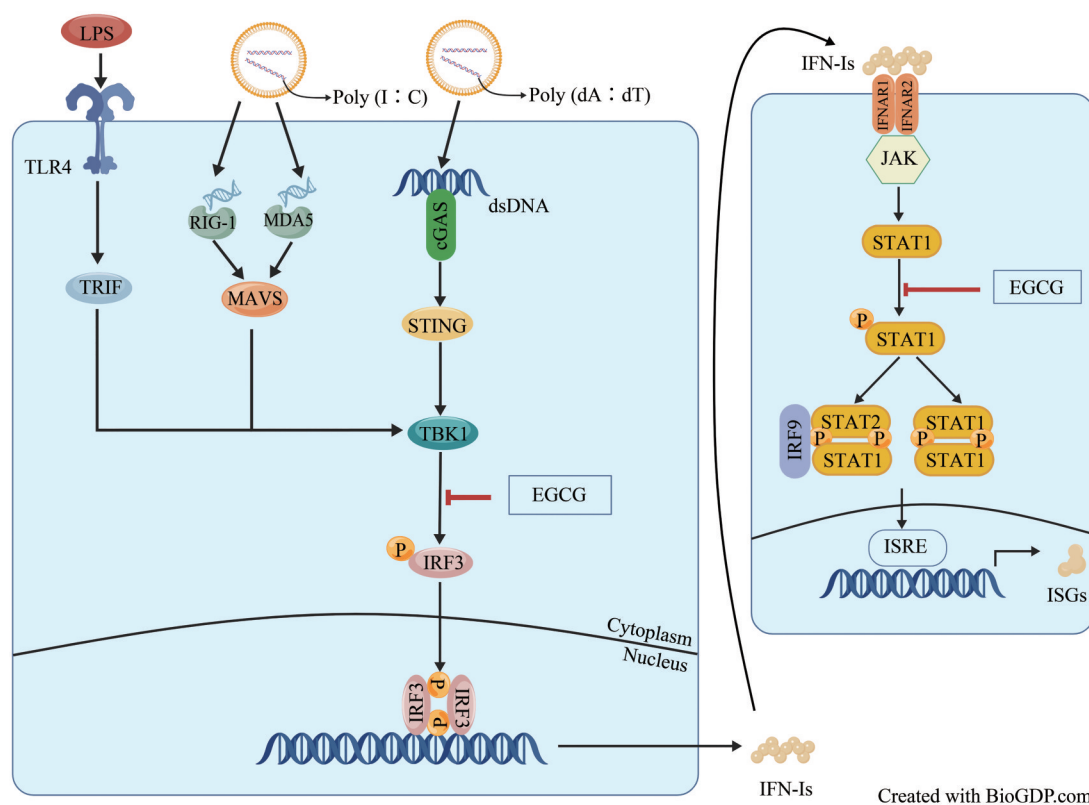
LI Liang¹⁾, SHENG Qi-Huan¹⁾, LIU Huan^{1,2)}, YANG Wen-Hao¹⁾, SHI Jia-Lin¹⁾, SUN Ying-Jie¹⁾, JING Rui¹⁾, MAI Wei-Hua¹⁾, LI Zhi-Min³⁾**, XIE Xiao-Li¹⁾**

¹⁾Laboratory of Molecular Genetics of Aging & Tumor, Medicine School, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650501, China;

²⁾Keli Stem Cell Biology Laboratory, Guangzhou Keli Biotechnology Co., Ltd, Guangzhou 511431, China;

³⁾Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650200, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Type I interferon (IFN-I) signaling is essential for antiviral innate immunity, yet its sustained or excessive activation contributes to the pathogenesis of several autoimmune diseases and interferonopathies, such as systemic lupus erythematosus and Aicardi-Goutières syndrome. Current strategies

* This work was supported by grants from Yunnan Fundamental Research Project (202201AT070289) and the Xingdian Talents Support Program of Yunnan Province (XDYC-QNRC-2023-0124).

** Corresponding author.

LI Zhi-Min. Tel: 86-15825298075, E-mail: 393891300@qq.com

XIE Xiao-Li. Tel: 86-18487257807, E-mail: 398704089@qq.com

Received: March 3, 2026 Accepted: June 17, 2026

targeting this pathway, exemplified by JAK inhibitors, act mainly on downstream signal transduction and provide limited direct control over upstream IFN-I production, while also carrying the risk of broad immunosuppression. *Phyllanthus emblica* L. has long been used in traditional medicine for inflammatory disorders, but the bioactive constituent responsible for its regulation of IFN-I signaling and the underlying molecular mechanism have not been clearly defined. This study aimed to identify the active anti-inflammatory component of *P. emblica* and to characterize its mechanism of action on the IFN-I pathway in macrophages. **Methods** Active components of *P. emblica* and their candidate targets were screened by network pharmacology using the TCMSP and DrugBank databases (oral bioavailability $\geq$ 30%, drug-likeness $\geq$ 0.18) and intersected with inflammation-related genes retrieved from public databases. The predicted interaction between EGCG and IFN-I pathway proteins (TBK1, IRF3, STAT1) was evaluated by molecular docking, with BX795 and GSK8612 used as reference TBK1 inhibitors. Mechanistic experiments were performed in THP-1-derived macrophages and primary bone marrow-derived macrophages (BMDM). Upstream signaling was activated by transfection of the nucleic acid analogs poly (I : C) and poly(dA : dT) or by lipopolysaccharide (LPS) stimulation, whereas downstream signaling was activated by exogenous IFN- β . An siRNA-mediated TREX1 knockdown model was used to mimic endogenous nucleic acid-driven interferonopathy. Expression of IFN- β 1 and interferon-stimulated genes (ISGs) was measured by RT-qPCR, protein phosphorylation by Western blot, and IFN- β secretion by ELISA. Cellular thermal shift assay (CETSA) and drug affinity responsive target stability (DARTS) were used to probe the interaction between EGCG and IRF3. **Results** Network pharmacology identified (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as a candidate IFN-I-suppressive constituent of *P. emblica*, with predicted binding to TBK1, IRF3, and STAT1. Molecular docking yielded binding energies of -9.2, -7.2, and -8.2 kcal/mol for TBK1, IRF3, and STAT1, respectively, indicating an affinity for TBK1 comparable to that of the reference inhibitors BX795 (-5.7 kcal/mol) and GSK8612 (-6.4 kcal/mol). EGCG suppressed IFN- β 1 and ISG mRNA expression under poly (I : C), poly (dA : dT), and LPS stimulation in both THP-1 macrophages and BMDM. At the protein level, EGCG reduced the phosphorylation of TBK1 and IRF3 without affecting the levels of the upstream sensors cGAS and RIG-I, and lowered IFN- β secretion in a concentration-dependent manner. CETSA and DARTS showed that EGCG did not enhance the thermal stability or protease resistance of IRF3, indicating that its effect on IRF3 is indirect. Following IFN- β stimulation, prolonged EGCG treatment reduced STAT1 phosphorylation in a time-dependent manner without an apparent change in IRF9, and partially attenuated ISG transcription; this effect was not monotonically concentration-dependent, and CXCL10 showed the most consistent suppression. In TREX1-knockdown cells, the elevated mRNA levels of *ISG15*, *ISG56*, and *CXCL10* were reduced by EGCG. **Conclusion** EGCG suppresses IFN-I responses by concurrently inhibiting TBK1-IRF3-dependent IFN- β production and JAK-STAT1-mediated downstream transcription. These *in vitro* findings provide a mechanistic basis for the anti-inflammatory use of *P. emblica* in traditional medicine and identify EGCG as a candidate for further evaluation in interferon-driven autoimmune disease models.

Key words *Phyllanthus emblica*, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), type I interferon, interferonopathy

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0111

CSTR: 32369.14.pibb.20260111