

# 车前草多糖调控 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号通路和肠道菌群抑制小鼠结肠炎相关结直肠癌的作用研究<sup>△</sup>

唐冉\*, 李明\*(安徽中医药大学第一附属医院肛肠诊疗中心, 合肥 230031)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)21-2662-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.21.08



**摘要 目的** 研究车前草多糖(PLP)对小鼠结肠炎相关结直肠癌(CAC)的抑制作用及机制。**方法** 将小鼠随机分为对照组, 模型组, PLP低、中、高剂量组(100、200、400 mg/kg), 阳性对照组(柳氮磺吡啶, 455 mg/kg), 每组8只。除对照组外, 其余各组采用氯化偶氮甲烷+葡聚糖硫酸钠诱导小鼠CAC模型。造模同时, 各组小鼠灌胃相应药液, 每天1次, 连续12周。末次给药后, 检测小鼠疾病活动指数(DAI)评分、结肠长度、肿瘤数, 观察结肠组织病理学形态, 检测血清中炎症因子[白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-6、干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )]含量, 检测结肠组织中TNF- $\alpha$ /核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路相关蛋白[NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ )、NF- $\kappa$ B诱导激酶(NIK)、肿瘤坏死因子受体1(TNFR1)、肿瘤坏死因子受体相关因子2(TRAF2)]表达水平。另外, 收集小鼠粪便, 通过16S rRNA高通量测序分析肠道菌群结构的变化。**结果** 与模型组比较, PLP各剂量组小鼠DAI评分、肿瘤数和血清中IL-1 $\beta$ 、IL-6(低剂量组除外)、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 含量以及结肠组织中NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白磷酸化水平和NIK、TNFR1、TRAF2(低剂量组除外)蛋白表达水平均显著降低/减少( $P<0.05$ ), 结肠长度显著延长( $P<0.05$ ); 结肠组织可见正常腺体结构, 炎症细胞浸润程度减轻, 且未发现腺癌形成。肠道菌群分析结果显示, 与模型组比较, PLP高剂量组厚壁菌门、梭杆菌门、巨单胞菌属相对丰度均显著降低( $P<0.05$ ), 拟杆菌属、阿克曼氏菌属相对丰度以及Shannon、Chao1指数均显著升高( $P<0.05$ ); PLP调控肠道菌群功能的相关通路主要包括TNF信号通路、Toll样受体信号通路和炎症性肠病信号通路等。**结论** PLP可能通过抑制TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B信号通路活性、调控肠道菌群, 发挥抗CAC作用。

**关键词** 车前草多糖; 结直肠癌; TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B信号通路; 肠道菌群

## Study on the inhibitory effects of polysaccharide from *Plantago depressa* on colitis-associated colorectal cancer in mice by regulating TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway and intestinal flora

TANG Ran, LI Ming (Colorectal Diagnosis and Treatment Center, the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

**ABSTRACT OBJECTIVE** To study the inhibitory effects of polysaccharide from *Plantago depressa* (PLP) on colitis-associated colorectal cancer (CAC) in mice and its mechanism. **METHODS** The mice were randomly divided into control group, model group, PLP low-, medium- and high-dose groups (100, 200, 400 mg/kg), positive control group (sulfasalazine, 455 mg/kg), with 8 mice in each group. Except for control group, the remaining groups utilized azomethane oxide + dextran sulfate sodium to induce CAC model. At the same time, mice in each group were administered the corresponding medicinal solution via gavage once daily for 12 consecutive weeks. After the last medication, disease activity index (DAI), colon length and tumor number were detected; the histopathological morphology of the colon tissue was observed. The levels of inflammatory cytokines [interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )] in the serum were measured. Additionally, the expression levels of proteins related to the TNF- $\alpha$ /nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway [NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B inhibitor protein  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ), NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK), tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1), and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2)] in the colon tissue were detected. In addition, the feces of mice were collected to analyze the changes in intestinal flora composition by 16S rRNA high-throughput sequencing. **RESULTS** Compared with model group, DAI score, tumor number, serum levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 (except for PLP low-dose group), IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , as well as phosphorylation levels of I $\kappa$ B $\alpha$  and NF- $\kappa$ B p65 and protein expressions of NIK, TNFR1 and TRAF2 (except for PLP low-dose group) in colon tissue, were all decreased significantly ( $P<0.05$ ); the colon length was significantly increased ( $P<0.05$ ). The colon tissue exhibited normal glandular structures, with a reduced degree of inflammatory cell infiltration, and no adenocarcinoma formation was observed. The results of gut microbiota analysis revealed that, compared with model group, the relative abundances of

△基金项目 安徽省自然科学基金项目(No.2408085MH227)

\*第一作者 副主任中医师, 硕士。研究方向: 中医药防治肛肠病。  
E-mail: Ryantang0715@163.com

#通信作者 主任中医师, 博士生导师, 硕士。研究方向: 肛肠疾病、肠道菌群移植、结直肠肿瘤、炎症性肠病。E-mail: aming009@sohu.com

Firmicutes, Fusobacteria, and *Megamonas* in the PLP high-dose group were significantly decreased ( $P<0.05$ ) , while the relative abundances of *Bacteradetes* and *Akkermansia*, as well as the Shannon and Chao1 indices, were significantly increased ( $P<0.05$ ). The relevant pathways through which PLP regulated intestinal flora function primarily included the TNF signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, and inflammatory bowel disease signaling pathway, among others. **CONCLUSIONS** PLP can exert inhibitory effects on CAC by inhibiting TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway, and regulating intestinal flora.

**KEYWORDS** polysaccharide from *Plantago depressa*; colon cancer; TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway; intestinal flora

结直肠癌是一种消化系统恶性疾病,溃疡性结肠炎及克罗恩病等炎症性肠病的长期、慢性持续性刺激易导致结直肠发生癌变,即结肠炎相关结直肠癌(colitis-associated colorectal cancer, CAC)<sup>[1]</sup>。因此,控制早期结直肠炎症的发展是防治CAC的手段之一。研究发现,促炎因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )诱导的核因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)信号通路在肿瘤的发展进程中具有重要意义,其可通过调控炎症和免疫机制促进肿瘤发生<sup>[2]</sup>。肠道菌群对肠道稳态、营养吸收、免疫调节至关重要,其失衡可能引发结肠炎甚至结直肠癌<sup>[3]</sup>。由此可知,调控TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B信号通路和肠道菌群可能是治疗CAC的重要策略。

美沙拉嗪、柳氮磺吡啶等水杨酸制剂是目前临床治疗炎症性肠病的常用药物,然而这类制剂对CAC的治疗效果有限;另外,常规的手术、放疗等治疗方案也易出现严重不良反应<sup>[4]</sup>。因此,开发治疗CAC的药物具有重要意义。车前草是车前科植物车前 *Plantago asiatica* L. 或平车前 *Plantago depressa* Willd. 的干燥全草,具有清热解毒、利尿消肿、凉血止血等功效。研究发现,车前草多糖(plantain polysaccharide, PLP)具有抗肿瘤作用,能够增强机体免疫力,提高抗病能力<sup>[5]</sup>。基于此,本研究拟通过建立CAC小鼠模型,从调控TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B信号通路和肠道菌群角度出发,探究PLP对小鼠CAC的影响,以期为CAC的精准防治提供新的治疗策略。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

Eclipse Ti-s型倒置荧光显微镜购自日本Nikon公司;VARIOSLAN FLASH 3001型多功能酶标分析仪购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;BG-gdsAUTO130型电泳仪购自北京六一生物科技有限公司。

### 1.2 主要试剂

PLP由本课题组自制(得率为1.81%,纯度>97%);柳氮磺吡啶肠溶片(批号09201119,规格0.25 g)购自上海信谊天平药业有限公司;白细胞介素1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号CSB-E08054m)购自武汉华美生物工程有限公司;QIAamp DNA Stool Mini Kit试剂盒(批号51604)购自杭州沃森生物技术有限公司;IL-6 ELISA试剂盒(批号abs520004)购自爱必信(上海)生物科技有限公司;γ干

扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒(批号分别为JLC-Y6466、JLC-JK126)均购自上海晶抗生物工程有限公司;氧化偶氮甲烷(azomethane oxide, AOM;批号25843-45-2)购自北京北实纵横科技发展有限公司;葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS;批号60316ES)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;兔抗NF- $\kappa$ B p65、磷酸化NF- $\kappa$ B p65(p-NF- $\kappa$ B p65)、NF- $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ (NF- $\kappa$ B inhibitor protein  $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ )、NF- $\kappa$ B诱导激酶(NF- $\kappa$ B inducing kinase, NIK)抗体和鼠抗磷酸化I $\kappa$ B $\alpha$ (p-I $\kappa$ B $\alpha$ )、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、肿瘤坏死因子受体1(tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)、肿瘤坏死因子受体相关因子2(tumor necrosis factor receptor-associated factor 2, TRAF2)抗体(批号分别为51-0500、MA5-15160、MA5-53362、PA5-110932、MA5-16154、MA1-140、33-0100、MA5-41186)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)、HRP标记的兔抗小鼠IgG(批号分别为ab6721、ab6728)均购自英国Abcam公司。

### 1.3 实验动物

本研究所用SPF级雄性BALB/c小鼠由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供,动物生产许可证号为SCXK(浙)2024-0004。小鼠饲养于安徽中医药大学动物实验中心,自由饮食和摄水,环境温度为20~25℃、湿度为45%~55%。本研究已经通过安徽中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准,动物伦理编号为AZYFY-2025-2012。

## 2 方法

### 2.1 造模、分组与给药

实验前,所有动物适应性饲养7 d,然后随机分为对照组,模型组,PLP低、中、高剂量组,阳性对照组(柳氮磺吡啶),每组8只。除对照组外,其余各组参考文献[5]的方法建立CAC模型小鼠,具体方法如下:小鼠一次性腹腔注射诱变剂AOM(10 mg/kg),正常饮食、饮水1周后,替换成2.5%DSS连续饮用1周(每2天更换1次新鲜的2.5%DSS),再恢复正常饮水2周,以此为1个DSS周期;共进行3个DSS周期(共12周)循环。从饮用DSS的第一天开始进行药物干预,根据课题组前期研究基础及相关文献<sup>[6]</sup>,PLP低、中、高剂量组小鼠分别灌胃100、200、400 mg/kg的PLP;阳性对照组小鼠灌胃455 mg/kg

的柳氮磺吡啶;对照组及模型组小鼠灌胃等体积生理盐水,每天1次,直至建模完成。第9周时,除对照组外,其余各组分别取2只小鼠进行解剖,若小鼠结肠中肿瘤数量 $\geq 10$ 个,且肿瘤直径 $\geq 1$  mm,则表示CAC模型构建成功<sup>[7]</sup>。最后,造模小鼠均造模成功,各组均取6只小鼠进行后续实验。

## 2.2 疾病活动指数、结肠长度、肿瘤数检测及样本收集

末次给药后,监测小鼠的体重、粪便、便血等情况,参考Shichijo等<sup>[8]</sup>的经典评分方法,从体重变化、粪便稠度、粪便隐血度3个方面计算小鼠的疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分。DAI评分为上述3个方面评分的平均值,具体标准如下——(1)体重评分:体重减轻 $<1\%$ ,记0分;体重减轻 $1\% \sim <5\%$ ,记1分;体重减轻 $5\% \sim <10\%$ ,记2分;体重减轻 $10\% \sim <15\%$ ,记3分;体重减轻 $\geq 15\%$ ,记4分。(2)粪便稠度评分:正常,记0分;便稀,记2分;明显腹泻,记4分。(3)粪便隐血度评分:无隐血,记0分;隐血阳性,记2分;明显出血,记4分。

末次给药2 h后麻醉小鼠,眼球取血,血样常温静置30 min,低温离心10 min,取上清液,于 $-80^{\circ}\text{C}$ 条件下保存待测。采血完成后,各组小鼠以颈椎脱臼法处死,分离其结肠并测量结肠长度,然后统计肿瘤数量;收集各组带有肿瘤的结肠组织备用(对照组取正常的结肠组织即可)。另外,于实验前和处死小鼠前收集其粪便,置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

## 2.3 结肠组织病理学形态的观察

取“2.2”项下各组小鼠的结肠组织适量,以4%多聚甲醛固定,经石蜡包埋、切片后,以二甲苯脱蜡,采用苏木精、伊红染液分别染色,经二甲苯透明、中性树脂封片后,采用显微镜观察小鼠结肠组织的病理学形态。

## 2.4 血清中炎症因子含量的检测

取“2.2”项下血清样品,按照ELISA试剂盒说明书方法操作,检测各组小鼠血清中IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 含量。

## 2.5 结肠组织中TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B信号通路相关蛋白表达水平检测

取“2.2”项下每组3只小鼠结肠组织适量,加入裂解液裂解,以提取总蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度后,将蛋白进行变性处理,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜后,以5%牛血清白蛋白封闭1 h;加入NF- $\kappa$ B p65(稀释度为1:3 000),p-NF- $\kappa$ B p65(稀释度为1:2 000),I $\kappa$ B $\alpha$ (稀释度为1:3 000),p-I $\kappa$ B $\alpha$ (稀释度为1:3 000), $\beta$ -actin(稀释度为1:10 000)、NIK(稀释度为1:1 000)、TNFR1(稀释度为1:1 000)和TRAF2(稀释度为1:1 000)一抗于 $4^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;以TBST洗膜后加入相应IgG二抗(稀释度分别为1:3 000、1:10 000)室温孵育30 min;以TBST再次洗膜,经ECL发光试剂显影后,采用

Image J软件分析条带灰度值,以目标蛋白与内参蛋白( $\beta$ -actin)的灰度值比值表示目标蛋白的表达水平,以p-NF- $\kappa$ B p65与NF- $\kappa$ B p65、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 与I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白的表达水平比值表示NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白的磷酸化水平。

## 2.6 肠道菌群分析

取“2.2”项下对照组、模型组、PLP高剂量组和阳性对照组小鼠的粪便样品各6份,采用QIAamp DNA Stool Mini Kit试剂盒提取DNA;采用16S rRNA引物(338F:5'-ACTCCTACGGAGGCAGCAG-3',806R:5'-GGA-CTACHVGGGTWTCTAAT-3')进行扩增,通过聚合酶链式反应产物进行文库构建,通过 Illumina HiSeq 2500平台测序,结合文献智库信息进行组间操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)分析,并根据OTU对菌群结构多样性(包括 $\alpha$ 、 $\beta$ 多样性)进行分析,然后对比京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)数据库,采用PICRUSt2软件预测PLP改变肠道菌群功能所涉及的相关通路。

## 2.7 统计学方法

采用SPSS 25.0软件和GraphPad Prism 7.0软件对数据进行统计分析。满足正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不满足正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析,事后两两比较采用Tukey's检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 小鼠DAI、结肠长度和肿瘤数检测结果

与对照组比较,模型组小鼠DAI评分、肿瘤数均显著升高/增加( $P<0.05$ ),结肠长度显著缩短( $P<0.05$ )。与模型组比较,各药物组小鼠DAI评分、肿瘤数均显著降低/减少( $P<0.05$ ),结肠长度均显著延长( $P<0.05$ )。结果见表1。

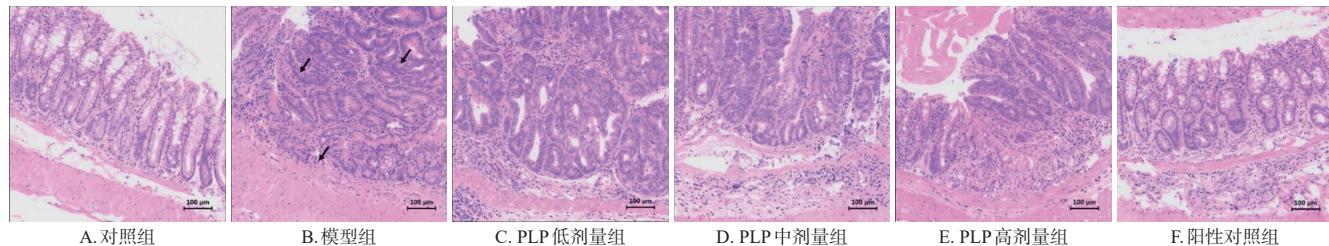
表1 各组小鼠DAI、结肠长度和肿瘤数比较( $\bar{x} \pm s$ ,  
 $n=6$ )

组别	DAI评分/分	结肠长度/cm	肿瘤数/个
对照组	0	$8.73 \pm 0.92$	0
模型组	$4.80 \pm 0.45^a$	$4.11 \pm 0.32^a$	$9.62 \pm 1.14^a$
PLP低剂量组	$3.20 \pm 0.84^b$	$5.98 \pm 0.50^b$	$7.47 \pm 1.07^b$
PLP中剂量组	$2.80 \pm 0.84^b$	$6.11 \pm 0.55^b$	$5.29 \pm 0.88^b$
PLP高剂量组	$2.60 \pm 0.55^b$	$6.83 \pm 0.94^b$	$3.23 \pm 0.58^b$
阳性对照组	$2.00 \pm 0.71^b$	$7.06 \pm 0.68^b$	$2.72 \pm 0.51^b$

a:与对照组比较, $P<0.05$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

### 3.2 小鼠结肠组织病理学形态观察结果

对照组小鼠结肠固有腺体完整、排列整齐,黏膜及黏膜下层无糜烂、溃疡及炎症细胞浸润。模型组小鼠结肠组织肠壁结构破坏严重,杯状细胞丢失,细胞排列混乱,出现大量炎症细胞浸润,腺体受损同时伴腺癌形成。各药物组小鼠结肠组织可见正常腺体结构,炎症细胞浸润程度相较于模型组有所减轻,虽然存在不同级别的腺瘤,但未发现腺癌形成。结果见图1。



注:箭头所指为腺癌形成部位。

图1 各组小鼠结肠组织病理学形态显微图(HE染色)

### 3.3 各组小鼠血清中炎症因子含量检测结果

与对照组比较,模型组小鼠血清中IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 含量均显著升高( $P<0.05$ );与模型组比较,各药物组小鼠血清中上述指标水平(PLP低剂量组IL-6水平除外)均显著降低( $P<0.05$ )。结果见表2。

表2 各组小鼠血清炎症因子含量比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ , ng/mL)

组别	IL-1 $\beta$	IL-6	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$
对照组	45.15±9.69	20.14±1.77	51.78±6.77	33.46±10.66
模型组	134.87±22.57 <sup>a</sup>	54.00±1.24 <sup>a</sup>	130.92±6.05 <sup>a</sup>	117.22±11.17 <sup>a</sup>
PLP低剂量组	94.50±13.50 <sup>b</sup>	48.50±1.38	93.10±4.21 <sup>b</sup>	76.58±10.73 <sup>b</sup>
PLP中剂量组	81.03±10.87 <sup>b</sup>	35.08±1.68 <sup>b</sup>	79.64±10.44 <sup>b</sup>	70.18±10.11 <sup>b</sup>
PLP高剂量组	67.90±17.41 <sup>b</sup>	29.00±1.24 <sup>b</sup>	71.88±4.21 <sup>b</sup>	61.26±4.59 <sup>b</sup>
阳性对照组	61.87±16.55 <sup>b</sup>	24.58±1.52 <sup>b</sup>	61.78±6.77 <sup>b</sup>	51.06±4.38 <sup>b</sup>

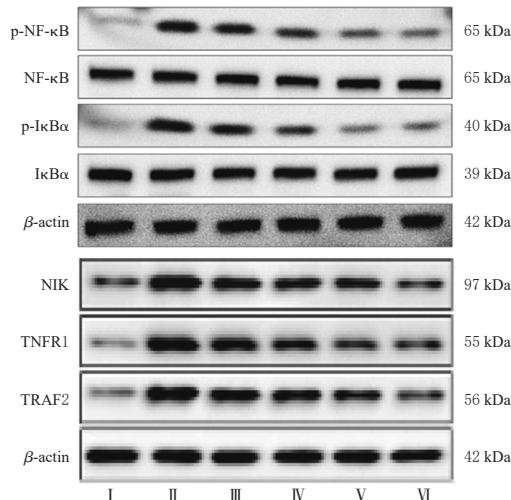
a:与对照组比较, $P<0.05$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

### 3.4 各组小鼠结肠组织中TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B信号通路相关蛋白表达水平检测结果

与对照组比较,模型组小鼠结肠组织中NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白磷酸化水平和NIK、TNFR1、TRAF2蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ );与模型组比较,各药物组上述蛋白磷酸化水平和表达水平(PLP低剂量组TRAF2蛋白表达水平除外)均显著降低( $P<0.05$ )。结果见图2和表3。

### 3.5 肠道菌群分析结果

在门水平上,与对照组比较,模型组厚壁菌门(Firmicutes)和梭杆菌门(Fusobacteria)相对丰度均显著升高( $P<0.05$ ),疣微菌门(Verrucomicrobia)和拟杆菌门(Bacteroidetes)相对丰度均显著降低( $P<0.05$ );与模型组比较,PLP高剂量组和阳性对照组厚壁菌门和梭杆菌门相对丰度均显著降低( $P<0.05$ )。在属水平上,与对照组比较,模型组埃希氏菌属(*Escherichia*)和巨单胞菌属(*Megamonas*)相对丰度均显著升高( $P<0.05$ ),阿克曼氏菌属(*Akkermansia*)相对丰度显著降低( $P<0.05$ );与模型组比较,PLP高剂量组和阳性对照组拟杆菌属(*Bacteroidetes*)和阿克曼氏菌属相对丰度均显著升高,巨单胞菌属和埃希氏菌属相对丰度显著降低( $P<0.05$ )。结果见图3。



I :对照组; II :模型组; III :PLP 低剂量组; IV :PLP 中剂量组; V :PLP 高剂量组; VI :阳性对照组。

图2 各组小鼠结肠组织中TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B信号通路相关蛋白表达的电泳图

表3 各组小鼠结肠组织中TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B信号通路相关蛋白表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65	p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$	NIK/ $\beta$ -actin	TNFR1/ $\beta$ -actin	TRAF2/ $\beta$ -actin
对照组	0.98 ± 0.01	0.92 ± 0.05	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.07
模型组	3.71 ± 0.08 <sup>a</sup>	4.03 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.63 ± 0.10 <sup>a</sup>	6.66 ± 0.47 <sup>a</sup>	4.28 ± 0.33 <sup>a</sup>
PLP低剂量组	3.07 ± 0.09 <sup>b</sup>	3.21 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.01 ± 0.08 <sup>b</sup>	5.65 ± 0.36 <sup>b</sup>	3.82 ± 0.27
PLP中剂量组	2.83 ± 0.01 <sup>b</sup>	2.46 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.76 ± 0.03 <sup>b</sup>	4.37 ± 0.16 <sup>b</sup>	3.29 ± 0.14 <sup>b</sup>
PLP高剂量组	1.77 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.32 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.74 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.74 ± 0.18 <sup>b</sup>	2.92 ± 0.15 <sup>b</sup>
阳性对照组	1.53 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.33 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.25 ± 0.04 <sup>b</sup>	3.60 ± 0.08 <sup>b</sup>	2.01 ± 0.05 <sup>b</sup>

a:与对照组比较, $P<0.05$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

### 3.5.2 $\alpha$ 、 $\beta$ 多样性分析结果

与对照组比较,模型组Shannon、Chao1指数均显著降低( $P<0.05$ ),肠道菌群结构发生明显变化;与模型组比较,PLP高剂量组和阳性对照组Shannon、Chao1指数均显著升高( $P<0.05$ ),肠道菌群结构逐渐恢复,与对照组差异逐渐减小。结果见图4。

### 3.5.3 PLP调控肠道菌群功能相关通路的预测结果

结合KEGG数据库,预测PLP调控肠道菌群功能的相关通路主要包括TNF信号通路(TNF signaling pathway)、Toll样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)和炎症性肠病信号通路(inflammatory bowel disease)等。结果见图5。

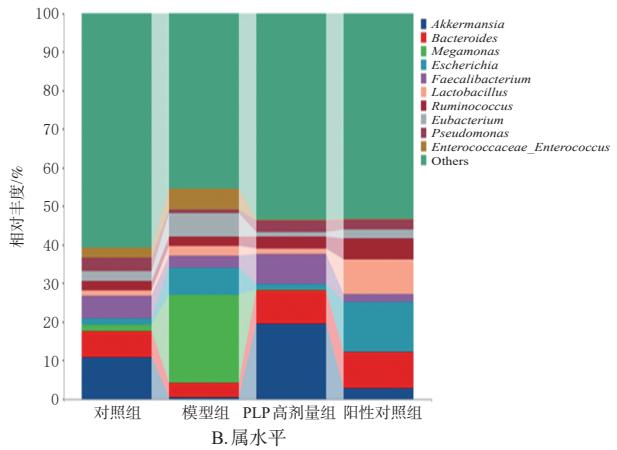
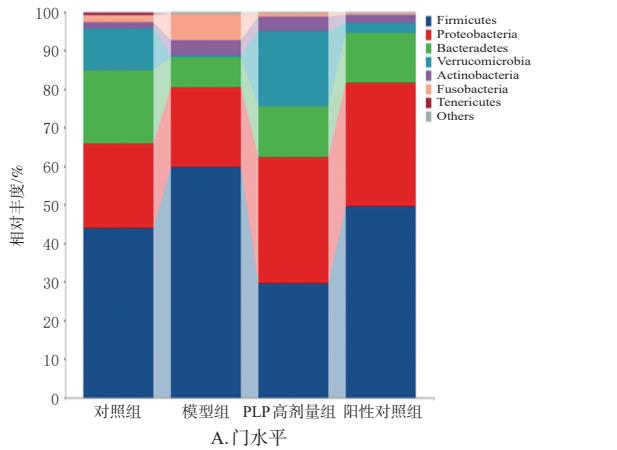
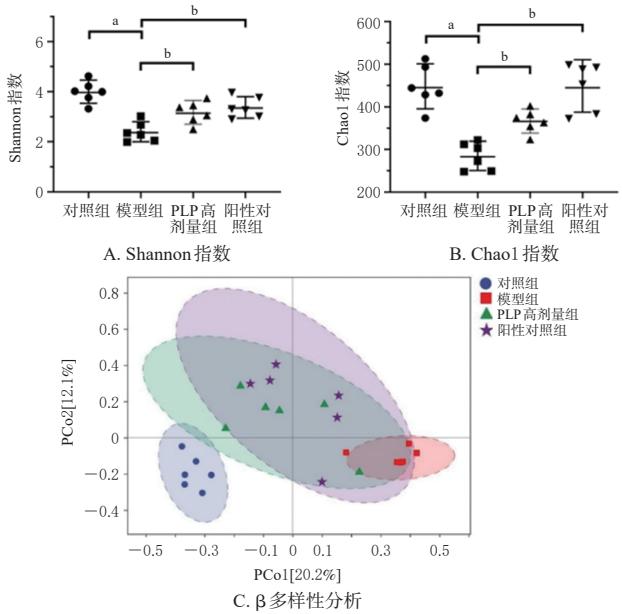


图3 各组小鼠肠道菌群的群落结构分析结果



a:与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b:与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

图4 各组小鼠肠道菌群 $\alpha$ 、 $\beta$ 多样性分析比较

## 4 讨论

CAC的发生风险较高,其治疗包括手术、化疗和放疗等方案,但治疗过程中往往出现严重的不良反应<sup>[9-10]</sup>,因此迫切需要探索新的治疗药物和方案。车前草中的多糖类成分主要由D-葡萄糖酸、D-半乳糖、L-阿拉伯糖

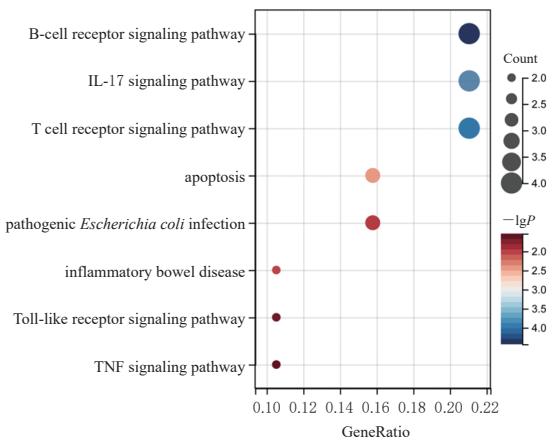


图5 PLP 调控肠道菌群功能相关通路的预测结果

等组成,研究发现,PLP具有天然靶向性,与需要借助化学修饰(如叶酸偶联)实现靶向作用的壳聚糖相比,PLP的果胶结构无须改造即可具备菌群响应性,其PLP-II组分含HG型/RG-I果胶域,可被结肠厌氧菌(如拟杆菌)特异性酶解,实现结肠定位释放(释放率>67%)<sup>[11]</sup>。基于此,本研究拟探讨PLP对小鼠CAC的影响作用和机制。

研究发现,CAC与炎症反应有着密切的相关性<sup>[12]</sup>。本研究对小鼠血清中多种炎症因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )进行检测后发现,上述炎症因子在模型小鼠血清中含量升高,而经PLP干预后,上述炎症因子含量均降低。TNF- $\alpha$ 介导的NF- $\kappa$ B信号通路是结直肠癌发展过程中最经典的信号通路之一,TNF- $\alpha$ 在上游可激活NF- $\kappa$ B,进而导致促炎因子表达<sup>[13]</sup>。NIK、TNFR1和TRAF2是NF- $\kappa$ B信号通路中的3个关键分子,其中TNFR1是主要的信号接收器,在结合配体TNF- $\alpha$ 后,其主要负责激活NF- $\kappa$ B通路;在此过程中,TNFR1还会招募TRAF2等蛋白形成复合物;TRAF2作为关键的E3泛素连接酶,可催化K63泛素化,进而激活I $\kappa$ B $\alpha$ 激酶复合物,最终导致NF- $\kappa$ B入核以启动炎症相关基因的表达<sup>[13]</sup>。本研究结果发现,经PLP干预后,模型小鼠结肠组织中NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白磷酸化水平和NIK、TNFR1、TRAF2蛋白表达水平均降低,提示PLP可能通过抑制TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B信号通路活性发挥抗CAC的作用。

近年来研究发现,肠道菌群及其代谢产物参与了肠道的慢性炎症、肠上皮细胞损伤及不典型增生,对结直肠癌的发生具有重要意义<sup>[14]</sup>。有报道称,结直肠癌小鼠肠道中厚壁菌门相对丰度升高,这对诱导肠道肿瘤生长具有重要意义<sup>[15]</sup>。在肿瘤恶变的成癌过程中,埃希氏菌具有重要的促进作用,有研究表明,通过粪菌移植方式抑制埃希氏菌活性后,癌症恶病质得到了改善<sup>[16]</sup>。此外,既往研究还显示,结直肠癌模型小鼠的肠道中巨单胞菌的相对丰度升高<sup>[17]</sup>,这提示巨单胞菌可能发挥着促

癌作用。本研究结果发现,在门水平上,模型小鼠肠道中厚壁菌门的相对丰度在PLP干预后明显降低;在属水平上,模型小鼠肠道中埃希氏菌、巨单胞菌的相对丰度在PLP干预后也明显降低。以上结果提示,PLP抗CAC的作用可能与调控肠道菌群有关。此外,本研究通过PICRUST2功能预测发现,PLP调控肠道菌群功能的相关通路主要包括TNF信号通路、Toll样受体信号通路等。其中,TNF信号通路可通过TNF受体介导NF- $\kappa$ B表达<sup>[13]</sup>,这提示PLP可能是通过抑制TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B信号通路活性,从而调控肠道菌群,进而发挥抗CAC的作用的。

综上所述,PLP具有抗CAC的作用,其作用机制可能与抑制TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B信号通路活性、调控肠道菌群有关。

## 参考文献

- [1] FABREGAS J C, RAMNARAIN B, GEORGE T J. Clinical updates for colon cancer care in 2022[J]. Clin Colorectal Cancer, 2022, 21(3):198-203.
- [2] 魏冬,韦军民,黄美雄,等. TK/GCV、CD/5-Fc双自杀基因系统治疗结肠癌的实验研究[J]. 消化外科, 2006, 5(6):466-470.
- [3] SAUS E, IRAOLA-GUZMÁN S, WILLIS J R, et al. Microbiome and colorectal cancer: roles in carcinogenesis and clinical potential[J]. Mol Aspects Med, 2019, 69: 93-106.
- [4] 魏强旭,熊劲松. 两种5-氨基水杨酸类药物治疗溃疡性结肠炎的效果比较[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2023, 29(5):846-849.
- [5] HUANG B, AN H L, GUI M X, et al. Qingjie fuzheng granule prevents colitis-associated colorectal cancer by inhibiting abnormal activation of NOD2/NF- $\kappa$ B signaling pathway mediated by gut microbiota disorder[J]. Chin Herb Med, 2025, 17(3):500-512.
- [6] 张力凡,朱俊义. 车前草多糖对高脂日粮饲喂小鼠脂代谢和氧化应激的影响[J]. 中国兽医杂志, 2023, 59(12): 129-134.
- [7] DE ROBERTIS M, MASSI E, POETA M L, et al. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: from pathways to diagnosis and therapy studies [J]. J Carcinog, 2011, 10:9.
- [8] SHICHIJO K, MATUU M, IKEDA Y, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental acute colitis[J]. Jpn J Pharmacol, 1998, 76:297.
- [9] DHIMAL T, FLEMING F J. Neoadjuvant immunotherapy in operable colon cancer: opportunities and challenges[J]. Ann Surg Oncol, 2025, 32(5):3049-3051.
- [10] PIAWAH S, VENOOK A P. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: a review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer[J]. Cancer, 2019, 125(23):4139-4147.
- [11] ZHANG J T, PAN W B, CUI J W, et al. Purified polysaccharides from *Plantago asiatica* L. preparation, characterization and immune-activating effects[J]. Int J Biol Macromol, 2025, 318:144771.
- [12] 杨利梅,张影茹,于浩,等. 蒜附子败酱散通过调控NF- $\kappa$ B信号通路对结肠炎癌转化模型小鼠结肠癌发生的影响[J]. 中成药, 2023, 45(12):4131-4136.
- [13] LIU B X, XIE Y, ZHANG J Y, et al. SERPINB5 promotes colorectal cancer invasion and migration by promoting EMT and angiogenesis via the TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 131:111759.
- [14] DRAPKINA O M, YAFAROVA A A, KABUROVA A N, et al. Targeting gut microbiota as a novel strategy for prevention and treatment of hypertension, atrial fibrillation and heart failure: current knowledge and future perspectives[J]. Biomedicines, 2022, 10(8):2019.
- [15] ZACKULAR J P, BAXTER N T, IVERSON K D, et al. The gut microbiome modulates colon tumorigenesis[J]. mBio, 2013, 4(6):e00692-13.
- [16] HERREMANS K M, RINER A N, CAMERON M E, et al. The microbiota and cancer CAChexia[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24):6267.
- [17] WANG C, LI W, WANG H, et al. *Saccharomyces boulardii* alleviates ulcerative colitis carcinogenesis in mice by reducing TNF- $\alpha$  and IL-6 levels and functions and by rebalancing intestinal microbiota[J]. BMC Microbiol, 2019, 19(1):246.

(收稿日期:2025-06-10 修回日期:2025-09-30)

(编辑:唐晓莲)