DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.10.006

·基础研究·

茜草素对结直肠癌小鼠模型肠道菌群结构及ILC3/IL-22/GDNF通路的影响

刘睿[a],周涛[b],赵立群[c],李万元[a](齐齐哈尔医学院附属第一医院,a.普外二科,b.普外一科,c.影像科,黑龙江 齐齐哈尔 161041)

[摘 要] **目的**:探讨茜草素对结直肠癌(CRC)小鼠模型肠道菌群结构及3型固有淋巴样细胞/白细胞介素22/胶质细胞源性神经营养因子(ILC3/IL-22/GDNF)相关指标的影响。**方法**:将40只BALB/c小鼠随机分为对照组、模型组、低剂量茜草素组、高剂量茜草素组和美沙拉秦组,每组8只。采用1,2-二甲基肼(DMH)联合葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导构建CRC小鼠模型。检测各组小鼠结肠长度、结肠指数、肿瘤负荷及肿瘤体积;采用H-E染色观察结肠组织病理变化;采用16S rRNA高通量测序分析肠道菌群组成及多样性;采用流式细胞术检测结肠组织IL-22$^+$ILC3细胞比例;采用ELISA检测结肠组织IL-22水平;采用Western blotting法检测结肠组织GDNF蛋白表达水平。**结果**:与对照组相比,模型组小鼠的结肠长度及Chao1、Sobs、ACE、Shannon和Simpson指数显著降低($P<0.05$),结肠指数、IL-22$^+$ILC3细胞比例、IL-22水平和GDNF蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。与模型组相比,低、高剂量茜草素组小鼠的结肠长度及上述5项α多样性指数显著升高($P<0.05$),结肠指数、肿瘤负荷、肿瘤体积、IL-22$^+$ILC3细胞比例、IL-22水平和GDNF蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。此外,茜草素干预可改变CRC模型小鼠肠道菌群组成,提高厚壁菌门、阿克曼菌科、毛螺菌科、瘤胃球菌属和双歧杆菌属等菌群相对丰度,降低拟杆菌门、梭杆菌门、肠球菌科、肠球菌属及梭杆菌属等菌群相对丰度($P<0.05$)。**结论**:茜草素可改善DMH/DSS诱导CRC小鼠的肠道菌群结构,调节肠道免疫微环境,其抗CRC作用可能与ILC3/IL-22/GDNF相关指标变化有关。

[关键词] 结直肠癌;茜草素;肠道菌群;3型固有淋巴样细胞;白细胞介素22;胶质细胞源性神经营养因子
[中图分类号] R737.31;R730.2 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2026)10-1070-08

Effects of alizarin on gut microbiota structure and the ILC3/IL-22/GDNF pathway in a mouse model of colorectal cancer

Liu Rui[a], Zhou Tao[b], Zhao Liqun[c], Li Wanyuan[a] (a. Second Department of General Surgery, b. First Department of General Surgery, c. Department of Radiology, The First Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161041, Heilongjiang, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of alizarin on gut microbiota structure and the group 3 innate lymphoid cell/interleukin-22/glial cell-derived neurotrophic factor (ILC3/IL-22/GDNF) pathway-related indicators in a mouse model of colorectal cancer (CRC). **Methods:** Forty BALB/c mice were randomly divided into five groups (n = 8 per group): control group, model group, low-dose alizarin group, high-dose alizarin group, and mesalazine group. The CRC mouse model was established using 1,2-dimethylhydrazine (DMH) combined with dextran sulfate sodium (DSS). Colon length, colon index, tumor burden, and tumor volume were measured. Histopathological changes in colon tissues were evaluated by hematoxylin-eosin (H-E) staining. Gut microbiota composition and diversity were analyzed using 16S rRNA high-throughput sequencing. The proportion of IL-22$^+$ILC3 cells in colon tissues was determined by flow cytometry. IL-22 levels were measured by ELISA, and GDNF protein expression was detected by Western blotting. **Results:** Compared with the control group, the model group showed significantly decreased colon length and Chao1, Sobs, ACE, Shannon, and Simpson indices($P<0.05$), accompanied by increased colon index, proportion of IL-22$^+$ILC3 cells, IL-22 levels, and GDNF protein expression ($P<0.05$). Compared with the model group, low-and high-dose alizarin treatment increased colon length and the above five α-diversity indices ($P<0.05$), while reducing colon index, tumor burden, tumor volume, proportion of IL-22$^+$ILC3 cells, IL-22 levels, and GDNF expression ($P<0.05$). Furthermore, alizarin treatment altered gut microbiota composition by increasing the relative abundance of Firmicutes, Akkermansiaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcus, and Bifidobacterium, while decreasing the

[基金项目] 齐齐哈尔市科技计划联合引导项目(LSFGG-2025101)
[作者简介] 刘睿(1982—),男,博士,副主任医师
[通信作者] 刘睿(扫码获取作者通信方式)

relative abundance of Bacteroidetes, Fusobacteriota, Enterococcaceae, Enterococcus, and Fusobacterium ($P < 0.05$). **Conclusion:** Alizarin can improve the intestinal microbiota structure of DMH/DSS-induced CRC mice and regulate the intestinal immune microenvironment. Its anti-CRC effects may be associated with changes in ILC3/IL-22/GDNF-related indicators.

[Key words] colorectal cancer (CRC); alizarin; gut microbiota; group 3 innate lymphoid cell (ILC3); interleukin-22 (IL-22); glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(10): 1070-1077. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.10.006]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球第三大常见恶性肿瘤,也是第二大肿瘤死亡原因[1]。遗传、免疫、环境、饮食习惯及生活方式等因素,均可能与CRC的发生和发展相关[2]。越来越多的研究[3-4]表明,CRC发病率与肠道菌群失调密切相关,部分肠道致病菌不仅可通过改变肿瘤微环境、形成生物膜参与肿瘤发生,还能干扰胆汁酸、氨基酸及短链脂肪酸代谢,进而推动CRC发展。此外,肠道菌群也被证实对局部和全身的抗肿瘤免疫具有关键调控作用[5]。3型固有淋巴样细胞(group 3 innate lymphoid cell, ILC3)是肠道组织中的核心免疫调节细胞,可通过协调免疫应答、炎症反应和微生物耐受维持肠道稳态。一旦ILC3功能失调,将破坏肠道稳态、诱发肠道炎症,进而促进CRC发生[6]。在CRC微环境中,ILC3被异常激活后,会通过过度分泌其核心效应因子IL-22[7]促进下游胶质细胞源性神经营养因子(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF)表达[8]。GDNF作为重排转染期间(rearranged during transfection, RET)原癌基因编码的受体酪氨酸激酶的配体,能促进肠上皮细胞增殖和存活,进而推动CRC的发生与发展[9]。基于上述机制,靶向ILC3/IL-22/GDNF轴可能成为抑制CRC进展的潜在策略。茜草素(1,2-二羟基蒽醌)是一种红色媒染染料,最初从茜草植物(Rubia tinctorum L.)根中提取,已在宫颈癌、前列腺癌和CRC模型中显示抗肿瘤活性[10-11],可通过调控炎症相关通路,调节淀粉样前体蛋白/早老素1(amyloid precursor protein/presenilin 1, APP/PS1)小鼠肠道菌群[12]。然而,茜草素能否通过调控ILC3/IL-22/GDNF轴及肠道菌群在CRC中发挥作用,目前尚未见明确报道。基于此,本研究拟采用1,2-二甲基肼/葡聚糖硫酸钠(1, 2-dimethylhydrazine/dextran sulfate sodium, DMH/DSS)诱导的CRC小鼠模型,探究茜草素对CRC小鼠模型肠道菌群结构的影响,并初步分析该药物效应是否与ILC3/IL-22/GDNF通路存在潜在关联。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

40只6周龄BALB/c小鼠,雌雄各半,体质量为20～22 g,购自黑龙江中医药大学[生产许可证号:SCXK(黑)2023-001]。所有小鼠均饲养于本院清洁级动物房内,饲养环境条件为:12 h/12 h明暗交替照明,环境温度维持在20～24 ℃,相对湿度控制在53%～57%。在正式实验开始前,所有动物均接受为期7 d的适应性饲养,期间自由获取标准饲料和饮用水。动物实验流程符合我院动物伦理委员会伦理要求(审批号:2025026001)。

茜草素(纯度:98.65%)(货号:72-48-0)购自成都蒲菲德生物技术有限公司,DSS(货号:SH5479)和H-E染色试剂盒(货号:C0105S)购自上海碧云天生物公司,美沙拉秦肠溶片(国药准字:H20103359)购自黑龙江天宏药业股份有限公司,粪便基因组DNA提取试剂盒(货号:DP328-02)购自北京天根生化科技公司,台盼蓝染液(货号:C0040)购自北京索莱宝生物公司,gentleMACS C管(货号:130-093-236)购自德国Miltenyi Biotec公司,小鼠结肠固有层组织解离试剂盒(货号:abs50270-25T)购自上海爱必信生物公司,抗小鼠CD16/32 Fc受体阻断抗体(货号:553141)、Fixable Viability Dye(货号:564997)、BD Cytofix/Cytoperm固定破膜试剂盒(货号:554714)、CD3-FITC(货号:553062)、CD19-FITC(货号:553785)、CD11b-FITC(货号:557686)、CD11c-FITC(货号:557400)、Gr-1-FITC(货号:553128)、CD45(货号:564279)、CD90.2(货号:553000)、IL-22(货号:568088)和维甲酸受体相关孤儿受体γt(retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t, RORγt)(货号:562607)流式检测抗体购自美国BD Biosciences公司,IL-22 ELISA试剂盒(货号:abs04087)购自上海爱必信生物科技有限公司,DMH(货号:D161802)、佛波醇12-十四酸酯13-乙酸酯(PMA,货号:P1585)、离子霉素(货号:I0634)、布雷菲德菌素A(Brefeldin A,货号:B5936)购自美国Sigma-Aldrich公司,GDNF抗体(货号:96166T)和GAPDH抗体(货号:2118T)购自美国CST公司。

1.2 动物分组及茜草素干预

适应性饲养期间,如小鼠出现明显精神萎靡、体质量异常下降或活动性疾病,则不纳入后续实验。适应性饲养结束后,对所有小鼠进行编号。采用随机数字表法将40只小鼠分为5组:对照组、模型组、低剂量茜草素组、高剂量茜草素组和美沙拉秦组,每

组8只（雌鼠4只、雄鼠4只）。分组前记录各小鼠体质量，以性别及初始体质量作为分层因素，分组后比较并确认各组初始体质量具有可比性。为减少观察偏倚，样本采集后采用编码方式隐藏组别信息，标本检测、结果读取及数据分析由不参与动物分组和给药的实验人员完成，在完成数据记录后统一揭盲。

除对照组外，其余各组采用DMH与DSS联合诱导法[13]建立CRC小鼠模型。具体流程为：将DMH溶于生理盐水，并以碳酸氢钠溶液调节其pH = 6.5。除对照组腹腔注射等体积生理盐水外，其余各组动物均按20 mg/kg的剂量接受DMH腹腔注射，每周一、周四各注射1次。同时，其余各组动物自由饮用含3% DSS（质量浓度为30 g/L）的水溶液，持续2周，随后普通饮水恢复1周，而对照组则正常饮水。此DMH与DSS联合处理过程定义为一个造模循环，共进行3个循环。

药物干预自实验第1周（造模启动当日）开始同步实施。由于茜草素水溶性有限，采用0.5%羧甲基纤维素钠（sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na）生理盐水溶液作为混悬剂配制茜草素药液：称取茜草素粉末混悬于0.5% CMC-Na生理盐水中，充分涡旋混匀制成均匀混悬液；低、高剂量茜草素组分别每日灌胃10 mg/kg、40 mg/kg[12]，各组灌胃给药体积统一为10 mL/kg；美沙拉秦肠溶片去除包衣后研碎成粉末，同样采用0.5% CMC-Na生理盐水混悬配制，美沙拉秦组则每日灌胃美沙拉秦300 mg/kg[14]，给药体积10 mL/kg；对照组和模型组同期每日灌胃等体积的0.5% CMC-Na生理盐水载体，以保证各组灌胃及载体条件一致。药物干预持续至第9周末取材前。

1.3　结肠长度、结肠指数及肿瘤负荷检测

造模第9周末，采用颈椎脱臼法处死小鼠，随后解剖并分离其结肠组织。小心使用镊子去除附着在结肠外壁的结缔组织，清除肠腔内容物，并用4 ℃预冷的生理盐水冲洗干净。接着测量结肠长度并称取其湿重，按以下公式计算结肠指数：结肠指数 =（结肠湿重/小鼠体质量）× 100%。随后，沿纵轴剖开结肠，观察并记录肿瘤结节数量，以评估肿瘤负荷；同时使用游标卡尺测量每个肿瘤结节的长径（L）和短径（W），并根据公式计算各结节的体积（V）：$V = L \times W^2/2$。各结节体积之和即为总肿瘤体积。

1.4　H-E染色观察结肠组织病理变化

取约2～3 cm长的结肠远端组织，置于4%多聚甲醛溶液中固定48 h。随后将组织取出，在流水下充分冲洗，并转移至包埋盒内。接着，依次经过脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片及H-E染色等步骤，制成结肠组织切片。最后，在光学显微镜下（× 200）进行组织学观察。

1.5　16S rRNA测序分析肠道菌群组成

第9周末小鼠解剖取材前，于无菌条件下收集各组小鼠新鲜粪便，粪便样本采集完成后立即投入液氮速冻，30 min内转移至−80 ℃超低温冰箱保存待DNA提取。提取粪便总DNA，并送至诺禾致源进行16S rRNA基因扩增、文库构建和高通量测序。测序平台为Illumina MiSeq平台，采用PE250双端读长测序。采用特异性引物341F（CCTAYGGGRBGCASCAG）和806R（GGACTACNNGGGTATCTAAT）扩增细菌16S rRNA基因的V3-V4区。原始测序数据经QIIME2（v2019.4.0）进行质控分析，包括接头/引物序列去除、低质量序列过滤、双端序列拼接、去噪及嵌合体去除，获得扩增子序列变体（amplicon sequence variant, ASV）表。去噪采用Deblur算法，序列截短长度设为404 bp。物种注释采用VSEARCH方法，并基于Greengenes 16S rRNA参考数据库（版本：gg_13_8；相似性阈值：99%）进行分类注释。

基于ASV表计算α多样性指数，包括Chao1、Sobs、ACE、Shannon、Simpson和Coverage指数。α多样性各指数均调用QIIME2软件内置qiime diversity alpha系列函数计算。其中，Simpson指数采用（$1-\sum p_i^2$）公式计算，本研究结果中数值越高，肠道菌群群落多样性越高。所有样本在计算多样性指数前按测序深度30 000 reads/sample进行抽平标准化处理。

β多样性分析基于加权UniFrac距离进行，采用主坐标分析（principal coordinates analysis, PCoA）展示组间群落结构差异。组间差异采用QIIME2中“qiime diversity beta-group-significance”模块进行置换多元方差分析（permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA）。门、科、属水平关键菌群相对丰度差异采用Wilcoxon秩和检验进行两两比较，并采用Benjamini-Hochberg法进行多重检验校正。

1.6　流式细胞术检测结肠组织IL-22$^+$ILC3细胞比例

将各组小鼠结肠组织转移至装有预热酶混合液的C管中，置于gentleMACS组织解离仪上运行程序“37C_MultiT_1”进行消化。消化后的细胞悬液经100 μm滤网过滤，在室温下以300 × g离心5 min，收集细胞沉淀，并用适量PBS缓冲液重悬，获得结肠固有层单细胞悬液。经台盼蓝染色检测，细胞活率大于85%，调整细胞浓度为1×10^9个/L备用。随后，向单细胞悬液中加入PMA（50 ng/mL）、离子霉素（1 μg/mL）及蛋白转运抑制剂布雷菲德菌素A（Brefeldin A，10 μg/mL），于37℃、5% CO_2条件下培养5 h，促进胞内IL-22细胞因子富集。刺激结束后离心收集细胞，先加入抗小鼠CD16/32 Fc受体阻断抗体（工作浓度1μg/10^6个细胞）

冰上结合10 min封闭Fc受体；随后加入可固定化活死染料Fixable Viability Dye，冰上避光反应15min完成活死细胞标记，随后进行表面标志物CD45、Lin及CD90.2的染色。其中，Lin（谱系阴性）组合标志物包含CD3、CD19、CD11b、CD11c、Gr-1，用于排除T细胞、B细胞和髓系细胞。接着，使用流式专用固定破膜剂处理细胞，洗涤透膜后，冰上避光反应30 min，进行细胞内转录因子RORγt和细胞因子IL-22的染色。所有样本均在流式细胞仪上采集数据，并通过FlowJo v10.10.0软件进行分析。设定IL-22$^+$ILC3的设门策略为：CD45$^+$Lin$^-$CD90.2$^+$RORγt$^+$IL-22$^+$，计算IL-22$^+$ILC3细胞占CD45$^+$结肠固有层淋巴细胞的比例。

1.7 ELISA检测结肠组织中IL-22水平

取各组小鼠结肠组织制备匀浆上清液，依ELISA试剂盒说明书操作：梯度稀释标准品，与样本一同加入至微孔板，37 ℃结合90 min，经洗板后依次加入生物素化抗体（反应60 min）、链霉亲和素-HRP（反应30 min）及TMB显色底物（反应15 min）。最后使用酶标仪于450 nm波长下测定各孔的光密度（*D*）值，依据标准曲线计算出样本中IL-22浓度（ng/mL）。

1.8 Western blotting法检测结肠组织中GDNF蛋白表达

取各组小鼠结肠组织，用预冷的裂解缓冲液提取总蛋白。将75 μg蛋白经SDS-PAGE分离后转移至PVDF膜，经3% BSA封闭后，于4 ℃条件下与GDNF抗体（1∶1 000稀释）和GAPDH抗体（1∶500稀释）共同结合过夜。随后用TBST洗涤膜，并在室温下与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗（1∶5 000稀释）结合1 h。采用增强型化学发光检测试剂盒进行显影，使用全自动多色荧光/化学发光成像系统采集信号，并通过系统配套的AlphaView软件对条带进行灰度值分析。其中，GDNF蛋白相对表达量以GDNF/GAPDH灰度值表示。

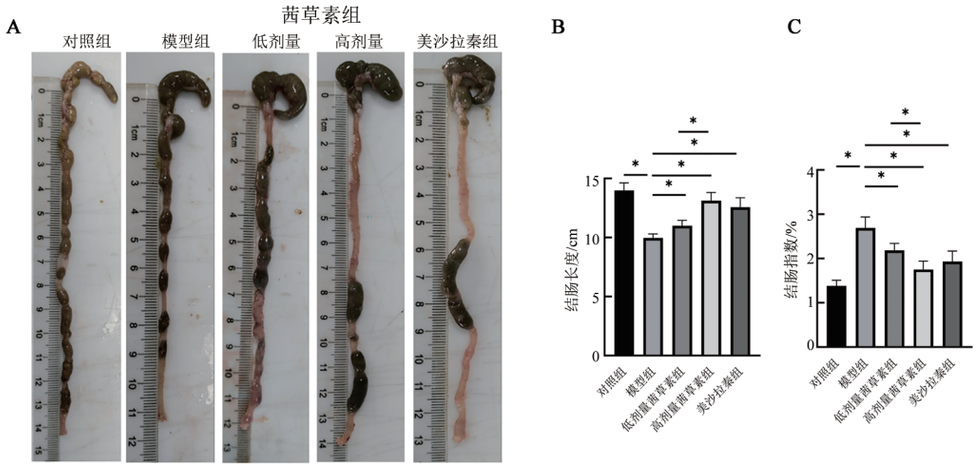
1.9 统计学处理

动物实验各组均为8只，每只小鼠样本作为1个独立生物学重复。采用SPSS 23.0软件进行数据分析，计量数据均以$\bar{x} \pm s$表示。多组样本均数比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），组间差异进一步通过SNK-q检验确定。以$P < 0.05$或$P < 0.01$表示差异具有统计学意义。

2 结　果

2.1 茜草素显著改善CRC小鼠结肠长度和结肠指数

各组小鼠结肠长度及结肠指数检测结果（图1）显示，与对照组相比，模型组小鼠结肠长度显著缩短、结肠指数显著升高（$P < 0.05$）；与模型组相比，低、高剂量茜草素组及美沙拉秦组小鼠结肠长度均显著增加、结肠指数均显著降低（$P < 0.05$）；与低剂量茜草素组相比，高剂量茜草素组小鼠结肠长度进一步增加、结肠指数进一步降低（$P < 0.05$）。



A：各组小鼠结肠代表性图片；B：各组小鼠结肠长度的统计分析；C：各组小鼠结肠指数的统计分析。*$P < 0.05$

图1 各组小鼠结肠长度和结肠指数的统计分析

2.2 茜草素显著降低CRC小鼠肿瘤负荷和肿瘤体积

各组小鼠肿瘤负荷和肿瘤体积比较结果（图2）显示，与模型组相比，低、高剂量茜草素组及美沙拉秦组小鼠的肿瘤负荷和肿瘤体积均显著降低（$P < 0.05$）；与低剂量茜草素组相比，高剂量茜草素组小鼠的肿瘤负荷和肿瘤体积进一步降低（$P < 0.05$）。

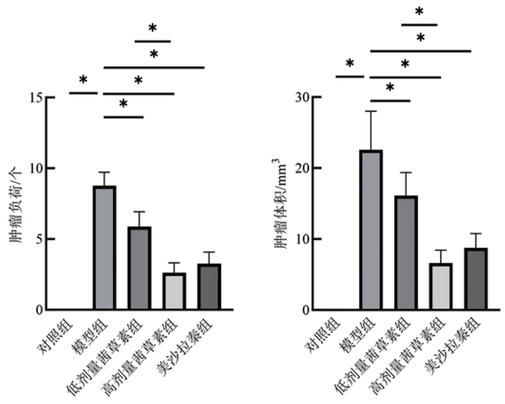
2.3 茜草素改善CRC小鼠结肠组织病理变化

H-E染色结果（图3）显示，对照组小鼠结肠组织腺体结构完整，未观察到明显病理改变。模型组小鼠结肠可见隐窝结构高度紊乱扭曲、杯状细胞数目减少，大量炎症细胞浸润黏膜层，上皮组织异常增生，细胞排列紊乱、核异型性明显。经低剂量茜草素、高剂

量茜草素及美沙拉秦干预后，CRC模型小鼠结肠组织病理损伤得到缓解，可见杯状细胞数量有所恢复，隐窝排列趋于规整，上皮异常增生程度减轻，黏膜层炎症细胞浸润减少。

2.4　茜草素显著调节CRC小鼠肠道菌群结构

基于加权UniFrac距离的PCoA分析结果（图4）显示，各组小鼠肠道菌群群落结构呈现不同程度的分离趋势。PCoA1和PCoA2分别解释群落结构变异21.7%和11.7%，累计解释率为33.4%。对照组主要分布于排序图右下区域，与模型组样本明显分离，提示模型建立后小鼠肠道菌群整体结构发生改变。与模型组相比，不同剂量茜草素干预后样本的分布位置发生不同程度偏移。其中，低剂量茜草素组与美沙拉秦组的分布区域存在较大重叠，而高剂量茜草素组主要分布于PCoA1正向区域，并与模型组呈现较明显的分离趋势。PERMANOVA分析显示，各组间肠道菌群整体结构差异具有统计学意义（pseudo-F = 4.27，R^2 = 0.328，P < 0.001），表明各处理组间肠道菌群整体结构存在差异。



*P < 0.05

图2　各组小鼠肿瘤负荷和肿瘤体积的比较

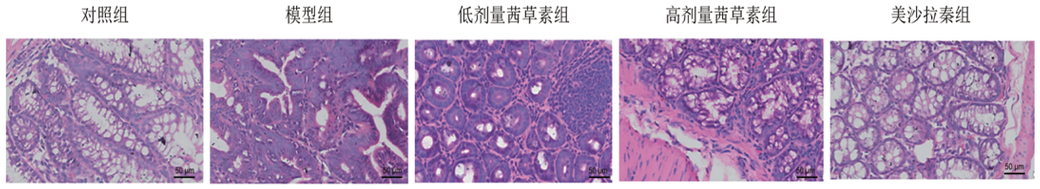
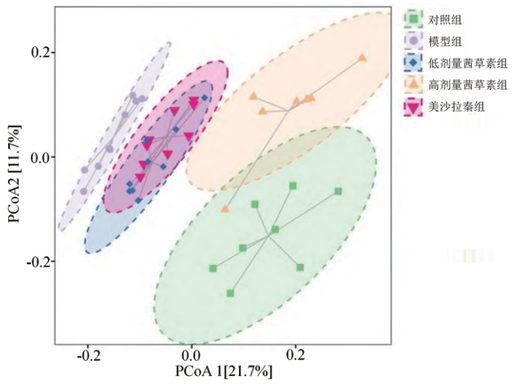


图3　各组小鼠结肠组织H-E染色结果（× 200）



图中椭圆为95%置信椭圆，用于展示各组样本群落分布范围

图4　各组小鼠肠道菌群PCoA分析结果

2.5　茜草素显著提高CRC小鼠肠道菌群α多样性

小鼠肠道菌群的α多样性分析（表1）显示，与对照组相比，模型组小鼠的Chao1、Sobs、ACE、Shannon和Simpson指数显著降低（P < 0.05）；与模型组相比，不同剂量茜草素组小鼠的Chao1、Sobs、ACE、Shannon和Simpson指数均显著增加（P < 0.05）；与低剂量茜草素组相比，高剂量茜草素组小鼠的Chao1、Sobs、ACE、Shannon和Simpson指数显著增加（P < 0.05）；与模型组相比，美沙拉秦组小鼠的Chao1、Sobs、ACE、Shannon和Simpson指数显著增加（P < 0.05）。Coverage指数组间差异无统计学意义（P = 0.184）。

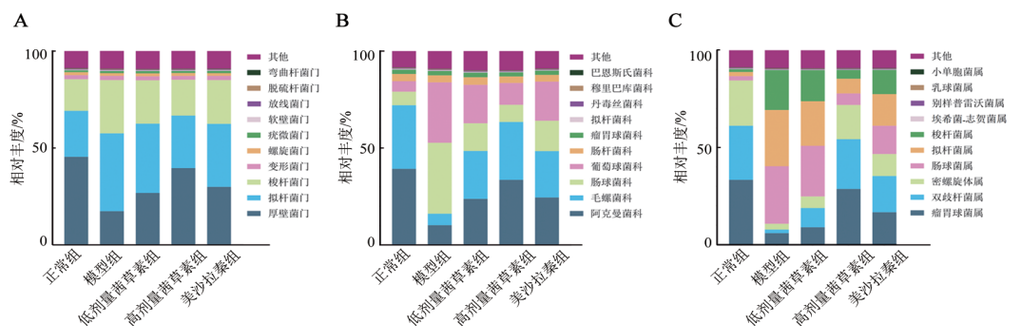
2.6　茜草素显著改善CRC小鼠肠道菌群组成

Wilcoxon秩和检验评估小鼠肠道菌群结构差异结果（图5）显示，在门水平上，厚壁菌门、拟杆菌门、梭杆菌门为优势门，累积相对丰度80%以上。与对照组相比，模型组的厚壁菌门丰度显著降低，拟杆菌门和梭杆菌门丰度显著增加（P < 0.05）；与模型组相比，低剂量茜草素组、高剂量茜草素组和美沙拉秦组的厚壁菌门丰度显著增加，拟杆菌门和梭杆菌门丰度显著降低（P < 0.05）。在科水平上，与对照组相比，模型组的阿克曼菌科和毛螺菌科丰度显著降低，肠球菌科和葡萄球菌科丰度显著增加（P < 0.05）；与模型组相比，低剂量茜草素组、高剂量茜草素组和美沙拉秦组的阿克曼菌科和毛螺菌科丰度显著增加，肠球菌科和葡萄球菌科丰度显著降低（P < 0.05）。在属水平上，与对照组相比，模型组的瘤胃球菌属、双歧杆菌属、密螺旋体属丰度显著降低，肠球菌属、拟杆菌属、梭杆菌属丰度显著增加（P < 0.05）；与模型组相比，低剂量茜草素组、高剂量茜草素组和美沙拉秦组的瘤胃球菌属、双歧杆菌属、密螺旋体属丰度显著增加，肠球菌属、拟杆菌属、梭杆菌属丰度显著降低（P < 0.05）。

表1　各组小鼠肠道菌群α多样性指数的比较（$n=8, \bar{x}\pm s$）

组别	Chao1指数	Sobs指数	ACE指数	Shannon指数	Simpson指数	Coverage指数
对照组	890.04 ± 29.25	611.67 ± 32.45	689.79 ± 40.01	4.89 ± 0.12	0.961 ± 0.007	1.000 ± 0.002
模型组	742.19 ± 42.46*	419.48 ± 26.71*	475.62 ± 32.67*	4.01 ± 0.09*	0.920 ± 0.005*	0.999 ± 0.002
低剂量茜草素组	811.32 ± 39.08▲	480.54 ± 36.49▲	565.48 ± 29.96▲	4.28 ± 0.10▲	0.930 ± 0.006▲	0.998 ± 0.001
高剂量茜草素组	876.24 ± 40.30▲△	566.62 ± 35.55▲△	653.09 ± 38.79▲△	4.69 ± 0.18▲△	0.949 ± 0.010▲△	0.999 ± 0.002
美沙拉秦组	845.06 ± 45.61▲	521.07 ± 33.97▲	619.75 ± 36.44▲	4.53 ± 0.13▲	0.933 ± 0.008▲	1.000 ± 0.002
F	17.725	40.320	43.653	58.142	38.730	1.647
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.184

与对照组相比，*$P<0.05$；与模型组相比，▲$P<0.05$；与低剂量茜草素组相比，△$P<0.05$。



A：门水平；B：科水平；C：属水平。

图5　各组小鼠粪便菌群组成

2.7　茜草素降低CRC小鼠IL-22⁺ILC3细胞比例、IL-22水平及GDNF蛋白表达水平

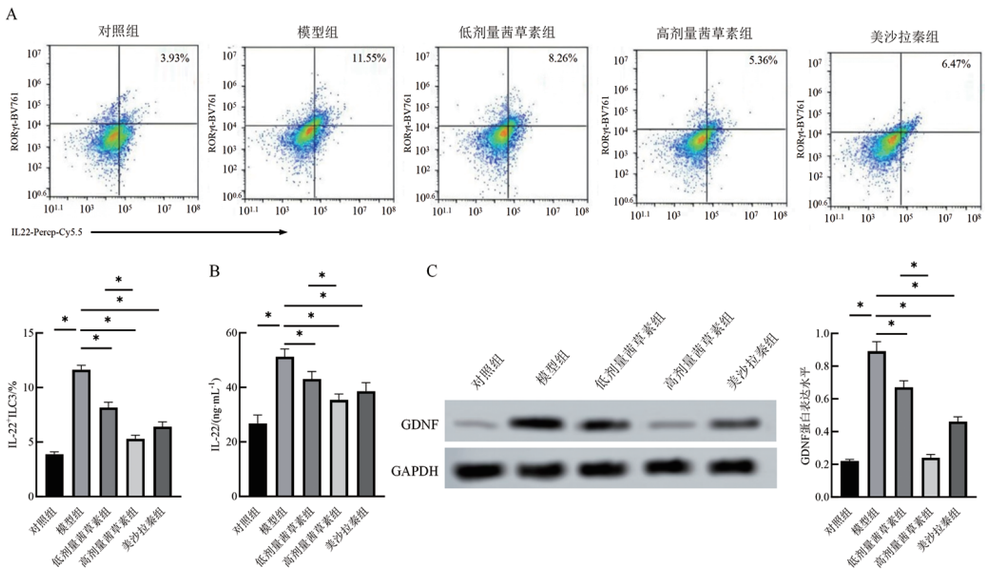
流式细胞术、ELISA和Western blotting结果（图6）显示，与对照组相比，模型组小鼠的IL-22⁺ILC3细胞比例、IL-22水平和GDNF蛋白表达水平显著增加（$P<0.05$）；与模型组相比，低剂量茜草素组和高剂量茜草素组小鼠的IL-22⁺ILC3细胞比例、IL-22水平和GDNF蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）；与低剂量茜草素组相比，高剂量茜草素组小鼠的IL-22⁺ILC3细胞比例、IL-22水平和GDNF蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）；与模型组相比，美沙拉秦组小鼠的IL-22⁺ILC3细胞比例、IL-22水平和GDNF蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。

3　讨　论

目前，CRC的临床治疗以手术、放化疗及免疫治疗为主，部分患者仍面临治疗相关不良反应、肿瘤复发与转移等难题。中药及其活性成分具有多靶点、多环节调控的特点，为CRC辅助干预提供了新的研究思路[15]。茜草是我国应用历史悠久的传统中药，最早记载于《神农本草经》，具有凉血、活血、化瘀、通经等功效。茜草素是从茜草中提取的蒽醌类化合物，具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、止血及抗菌等多种药理活性。已有研究[11,16-17]报道，茜草素可抑制胰腺癌细胞增殖、诱导凋亡，也可阻滞结肠癌细胞周期进程，提示其具有潜在抗CRC活性，但具体作用机制尚不明确。

DMH/DSS联合诱导的小鼠模型是常用的实验性CRC模型，其病理改变及肿瘤发生过程与人类CRC具有一定相似性[18]。因此，本研究采用该模型评价茜草素的体内效应。结果显示，模型小鼠结肠缩短、结肠指数升高并形成明显肿瘤结节；茜草素干预可缓解结肠损伤，降低结肠指数、肿瘤负荷与肿瘤体积，说明茜草素能够抑制DMH/DSS诱导的结肠肿瘤发生与生长，为其抗CRC作用提供了体内实验依据。

肠道微生态失衡与CRC的发生发展密切相关，其可能通过影响肠黏膜屏障、局部炎症反应、免疫调节及微生物代谢等途径参与肿瘤进程[2,19-20]。既往研究指出，瘤胃球菌属与宿主肠道健康和疾病状态之间存在菌株及生态位依赖的复杂关联[21]，双歧杆菌属可通过调节肠道菌群组成和免疫功能抑制CRC发展[22]，肠球菌属[23-24]、部分拟杆菌[25]及具核梭杆菌[26]与CRC风险升高、免疫抑制及肿瘤转移相关。本研究通过PCoA及α多样性分析发现，CRC模型小鼠肠道菌群整体结构及群落多样性发生明显改变，茜草素干预后上述变化得到一定程度改善。同时，茜草素干预伴随多种菌群相对丰度变化，其中，瘤胃球菌属、双歧杆菌属等相对丰度升高，肠球菌属、拟杆菌属和梭杆菌属等相对丰度降低。结合既往关于茜草素调节肠道菌群的研究，本研究结果提示，茜草素的抗CRC作用可能与调节特定菌群组成及改善肠道微



A：流式细胞术检测结肠组织IL-22$^+$ILC3细胞比例；B：各组小鼠结肠组织IL-22水平；C：Western blotting法检测GDNF蛋白表达水平。$^*P < 0.05$。

图6　茜草素对CRC小鼠IL-22$^+$ILC3细胞比例、IL-22水平和GDNF蛋白表达的影响

生态有关，但尚不能据此确定特定菌群变化与抗肿瘤效应之间的直接因果关系。

ILC3是黏膜免疫稳态的关键细胞，主要通过分泌IL-22参与肠道炎症与肿瘤微环境调控[7,27]。已有研究[8]提示，肠道菌群扰动可通过ILC3/IL-22信号影响GDNF表达。GDNF作为肠神经系统发育过程中的关键信号分子[28]，其过度激活可导致肠神经系统发育异常，进而引发远端结肠无神经节细胞症和肠道神经节细胞瘤等病变[29-30]，其下游RET信号不仅参与肠神经系统发育，还可调控结肠癌细胞增殖与迁移[9]。上述线索提示，肠道菌群-ILC3/IL-22-GDNF轴可能参与CRC进展，但该调控网络在CRC中的功能证据仍十分有限。基于茜草素的菌群调节作用[12]及茜草相关化合物的抗炎、免疫调节活性[31]，本研究进一步检测了该通路相关指标。结果显示，CRC模型小鼠结肠组织IL-22$^+$ILC3细胞比例、IL-22水平及GDNF蛋白表达显著上调，茜草素干预可同步降低上述指标。

综上所述，茜草素可显著改善CRC小鼠模型的肠道菌群结构，调节肠道免疫微环境，进而抑制肿瘤进展；其保护效应可能与ILC3/IL-22/GDNF相关指标的变化有关，但本研究尚未开展RET及其下游磷酸化检测、通路阻断/救援及菌群移植实验，尚不能明确三者之间的直接因果关系。此外，本研究动物实验每组样本量为8只，样本量有限，且仅进行体内动物实验，缺少细胞水平验证。后续研究可进一步扩大样本量，结合体外细胞实验、RET及下游磷酸化检测、通路阻断-拯救实验及菌群移植实验，进一步阐明茜草素的完整作用机制，为临床应用提供更加充分的实验依据。

[参考文献]

[1] Sung H, Filho A M, Laversanne M, et al. Global cancer statistics 2024: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 34 cancers in 186 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2026, 76(4): e70090. DOI: 10.3322/caac.70090.

[2] Song Y C, Wang X C, Lu X H, et al. Exposure to microcystin-LR promotes the progression of colitis-associated colorectal cancer by inducing barrier disruption and gut microbiota dysbiosis[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2024, 282: 116750. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.116750.

[3] Gomaa E Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2020, 113(12): 2019-2040. DOI: 10.1007/s10482-020-01474-7.

[4] Liu Y J, Zhang Q, Lu L, et al. Huang-Qin decoction alleviates deoxycholic acid-induced colorectal cancer in mice by regulating gut microbiota[J]. J Ethnopharmacol, 2025, 346: 119715. DOI: 10.1016/j.jep.2025.119715.

[5] Hanus M, Parada-Venegas D, Landskron G, et al. Immune system, microbiota, and microbial metabolites: the unresolved triad in colorectal cancer microenvironment[J]. Front Immunol, 2021, 12: 612826. DOI: 10.3389/fimmu.2021.612826.

[6] Drommi F, Calabró A, Vento G, et al. Crosstalk between ILC3s and microbiota: implications for colon cancer development and treatment with immune check point inhibitors[J]. Cancers, 2023, 15 (11): 2893. DOI: 10.3390/cancers15112893.

[7] Zhu Y N, Shi T, Lu X, et al. Fungal-induced glycolysis in macrophages promotes colon cancer by enhancing innate lymphoid cell secretion of IL-22[J]. EMBO J, 2021, 40(11): e105320. DOI: 10.15252/embj.2020105320.

[8] 徐伟立, 齐晓杨, 李萌, 等. 便秘患儿肠道菌群改变调控先天免疫淋巴细胞3、白细胞介素-22、胶质源性神经营养因子表达影响肠神经发育机制[J]. 中华实验外科杂志, 2025, 42(4): 720-726. DOI: 10.3760/cma.j.cn421213-20240903-00684.

[9] Zhong F, Zhang W, Cao Y, et al. LncRNA NEAT1 promotes colorectal cancer cell proliferation and migration *via* regulating glial cell-derived neurotrophic factor by sponging miR-196a-5p[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018, 50(12): 1190-1199. DOI: 10.1093/abbs/gmy130.

[10] Trybus W, Trybus E, Król T. Alizarin induces a multidirectional mechanism of anti-cancer action in cervical cancer and prostate cancer cells[J]. Sci Rep, 2026, 16(1): 12843. DOI: 10.1038/s41598-026-43011-y.

[11] Kamei H, Koide T, Kojima T, et al. Inhibition of cell growth in culture by quinones[J]. Cancer Biother Radiopharm, 1998, 13(3): 185-188. DOI: 10.1089/cbr.1998.13.185.

[12] 边宇航, 宁天一, 王震红, 等. 茜草素对APP/PS1双转基因小鼠肠道菌群的干预作用及机制研究[J]. 中国预防兽医学报, 2024, 46(6): 584-592. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0589.202311015.

[13] 李忆东, 李婷婷, 赵珠峰, 等. 胡椒碱对DMH/DSS诱导实验性结肠癌变的影响及其机制[J]. 中国医师杂志, 2022, 24(10): 1493-1497, 1503. DOI: 10.3760/cma.j.cn431274-20210627-00695.

[14] 刘铭雨, 赵李娜, 李晶, 等. 五味子甲素对DMH/DSS诱导结直肠癌小鼠的治疗作用及机制[J]. 中医药信息, 2025, 42(6): 6-11, 17. DOI: 10.19656/j.cnki.1002-2406.20250602.

[15] Zou Y Q, Wang S L, Zhang H H, et al. The triangular relationship between traditional Chinese medicines, intestinal flora, and colorectal cancer[J]. Med Res Rev, 2024, 44(2): 539-567. DOI: 10.1002/med.21989.

[16] Xu Z H, Hou Y F, Zou C P, et al. Alizarin, a nature compound, inhibits the growth of pancreatic cancer cells by abrogating NF-κB activation[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(7): 2759-2774. DOI: 10.7150/ijbs.70567.

[17] De Araujo-Neto J H, Guedes A P M, Leite C M, et al. "Half-sandwich" ruthenium complexes with alizarin as anticancer agents: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Inorg Chem, 2023, 62(18): 6955-6969. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.3c00183.

[18] 曾沙, 王隽, 李萍, 等. 化学试剂诱导炎性结直肠癌动物模型的研究进展[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2024, 50(5): 534-543. DOI: 10.11920/xnmdzk.2024.05.008.

[19] Li J, Zhu Y Y, Chang Q, et al. Comparative analysis of microbiological profiles and antibiotic resistance genes in subjects with colorectal cancer and healthy individuals[J]. Pol J Microbiol, 2025, 74(1): 71-81. DOI: 10.33073/pjm-2025-006.

[20] Yan Y Z, Yang Y F, Ning C H, et al. Role of traditional Chinese medicine syndrome type, gut microbiome, and host immunity in predicting early and advanced stage colorectal cancer[J]. Integr Cancer Ther, 2023, 22: 15347354221144051. DOI: 10.1177/15347354221144051.

[21] Crost E H, Coletto E, Bell A, et al. Ruminococcus gnavus: friend or foe for human health[J]. FEMS Microbiol Rev, 2023, 47(2): fuad014. DOI: 10.1093/femsre/fuad014.

[22] Shang F J, Jiang X, Wang H B, et al. Bifidobacterium longum suppresses colorectal cancer through the modulation of intestinal microbes and immune function[J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1327464. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1327464.

[23] Elahi Z, Shariati A, Bostanghadiri N, et al. Association of Lactobacillus, Firmicutes, Bifidobacterium, Clostridium, and Enterococcus with colorectal cancer in Iranian patients[J]. Heliyon, 2023, 9(12): e22602. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e22602.

[24] Yang X J, Yan Y J, Wang F K, et al. Aspirin prevents colorectal cancer by regulating the abundance of Enterococcus cecorum and TIGIT^{+} Treg cells[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 13592. DOI: 10.1038/s41598-024-64447-0.

[25] Sun L L, Zhang Y, Cai J, et al. Bile salt hydrolase in non-enterotoxigenic Bacteroides potentiates colorectal cancer[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 755. DOI: 10.1038/s41467-023-36089-9.

[26] Xu C C, Fan L N, Lin Y F, et al. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal cancer metastasis through miR-1322/CCL20 axis and M2 polarization[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1980347. DOI: 10.1080/19490976.2021.1980347.

[27] Zhang Y X, Jing Y C, He J, et al. Bile acid receptor FXR promotes intestinal epithelial ferroptosis and subsequent ILC3 dysfunction in neonatal necrotizing enterocolitis[J]. Immunity, 2025, 58(3): 683-700.e10. DOI: 10.1016/j.immuni.2025.02.003.

[28] Takahashi M. RET receptor signaling: function in development, metabolic disease, and cancer[J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2022, 98(3): 112-125. DOI: 10.2183/pjab.98.008.

[29] Nagy N, Guyer R A, Hotta R, et al. RET overactivation leads to concurrent Hirschsprung disease and intestinal ganglioneuromas[J]. Development, 2020, 147(21): dev190900. DOI: 10.1242/dev.190900.

[30] Zhang C Z, Chen Y Z, Duan R Q, et al. Preconception maternal gut dysbiosis affects enteric nervous system development and disease susceptibility in offspring *via* the GPR41-GDNF/RET/SOX10 signaling pathway[J]. iMeta, 2025, 4(2): e70012. DOI: 10.1002/imt2.70012.

[31] Li X R, Hou R T, Ding H, et al. Mollugin ameliorates murine allergic airway inflammation by inhibiting Th2 response and M2 macrophage activation[J]. Eur J Pharmacol, 2023, 946: 175630. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.175630.

[收稿日期] 2026-04-19 [修回日期] 2026-07-13
[本文编辑] 陈怡宁