三叉苦总黄酮对裸鼠大肠癌移植瘤的抑制作用及机制Δ

刘　义[1,2*]，安祯祥[1,3#]，何远利[1,3]，高　英[1]，何秀义[1]（1.贵州中医药大学第一临床医学院，贵阳　550001；2.毕节医学高等专科学校，贵州 毕节　551700；3.贵州中医药大学第一附属医院消化内科，贵阳　550001）

中图分类号　R965；R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）05-0542-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.05.06

摘　要　目的　研究三叉苦总黄酮对裸鼠大肠癌移植瘤生长的抑制作用及机制。**方法**　采用裸鼠右侧腋窝皮下注射0.2 mL大肠癌细胞LoVo的方法构建大肠癌移植瘤模型。将造模成功的裸鼠分为模型组、5-氟尿嘧啶组（阳性对照，10 mg/kg）和三叉苦总黄酮高、低剂量组（25、12.5 mg/kg），另设不造模的正常组（含0.3%羧甲基纤维素钠的生理盐水），每组6只。各组裸鼠腹腔注射相应药液/溶剂，连续给药21 d。末次给药后，检测裸鼠移植瘤抑制率、肝/脾脏指数及血清中肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素6（IL-6）水平；观察裸鼠肿瘤组织病理形态学变化；采用免疫组化法检测裸鼠肿瘤组织中Toll样受体4（TLR4）、核因子κB亚基p65（NF-κB p65）蛋白表达水平；采用Western blot法检测裸鼠肿瘤组织中TLR4、髓样分化因子88（MyD88）、TNF受体相关蛋白6（TRAF6）、白细胞介素1受体关联激酶1（IRAK-1）、NF-κB p65、胱天蛋白酶3（caspase-3）蛋白表达水平。**结果**　与模型组比较，三叉苦总黄酮高剂量组裸鼠瘤重（抑瘤率为36.91%）、肝/脾脏指数和血清中TNF-α、IL-6水平以及肿瘤组织中TLR4、MyD88、TRAF6、IRAK-1、NF-κB p65蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），肿瘤组织中caspase-3蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$）；肿瘤细胞皱缩变形，核固缩、碎裂现象增多。**结论**　三叉苦总黄酮可抑制裸鼠大肠癌移植瘤生长，其作用机制可能与减轻炎症反应，抑制TLR4/MyD88/NF-κB信号通路活性，促进大肠癌细胞凋亡有关。

关键词　三叉苦总黄酮；大肠癌；炎症；Toll样受体4/髓样分化因子88/核因子κB信号通路；细胞凋亡

Inhibitory effect and mechanism of total flavonoids from *Melicope pteleifolia* on transplanted tumor of colorectal cancer in nude mice

LIU Yi[1,2], AN Zhenxiang[1,3], HE Yuanli[1,3], GAO Ying[1], HE Xiuyi[1]（1. First Clinical Medical College, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China; 2. Bijie Medical College, Guizhou Bijie 551700, China; 3. Dept. of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the inhibitory effect and mechanism of total flavonoids from *Melicope pteleifolia* (TF-MPL) on transplanted tumor of colorectal cancer in nude mice. **METHODS** The transplanted tumor model of colorectal cancer was induced by injecting 0.2 mL colorectal cancer cell LoVo subcutaneously via the right armpit of nude mice. After successful modeling, nude mice were randomly divided into model group, 5-fluorouracil group (positive control, 10 mg/kg), TF-MPL high-dose and low-dose groups (25, 12.5 mg/kg); a normal group (normal saline containing 0.3% carboxymethyl cellulose sodium) without modeling was additionally set up, with 6 mice in each group. Each group was intraperitoneally injected with the corresponding drug solution/solvent for 21 consecutive days. The inhibitory rate of the transplanted tumor, liver and spleen index, and the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) in serum were detected after the last medication; the morphological changes of tumor tissue were observed; immunohistochemical staining was used to detect protein expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor-κB subunit p65 (NF-κB p65) in tumor tissue of nude mice. Western blot assay was used to detect protein expressions of TLR4, myeloid differentiation factor 88 (MyD88), TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK-1), NF-κB p65 and caspase-3 in tumor tissue of nude mice. **RESULTS** Compared with the model group, TF-MPL high-dose group showed a significant decrease in tumor weight (inhibitory rate of 36.91%), liver and spleen index, serum levels of TNF-α and IL-6 and protein expressions of TLR4, MyD88, TRAF6, IRAK-1 and NF-κB p65 ($P<0.05$ or $P<0.01$); the expression of caspase-3 protein was increased significantly ($P<0.05$), and more tumor cell shrinkage and deformation, nuclear pyknosis and fragmentation were observed. **CONCLUSIONS** TF-MPL can significantly inhibit the growth

Δ**基金项目**　国家中医药管理局第五批全国中医临床优秀人才研修项目（No.国中医药人教函〔2022〕1号）；贵州中医药大学中医脾胃病科技创新人才团队建设项目（No.贵中医TD合字〔2022〕005号）；贵州中医药大学国家自然科学基金后补助项目（No.2019YFL171250206）

*　**第一作者**　硕士研究生。研究方向：中医药防治脾胃疾病的基础及临床研究。E-mail：hayidaly@163.com

#　**通信作者**　主任医师，教授，博士生导师，博士。研究方向：中西医结合防治消化系统疾病的基础及临床研究。E-mail：407206115@qq.com

of transplanted tumor of colorectal cancer in nude mice, the mechanism of which may be associated with reducing inflammatory response, inhibiting TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway, and promoting apoptosis in colorectal cancer cells.
KEYWORDS total flavonoids from *Melicope pteleifolia*; colorectal cancer; inflammation; TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway; cell apoptosis

大肠癌（colorectal cancer，CRC）是消化系统最常见的恶性肿瘤之一，我国CRC发病率呈逐年上升趋势[1]。研究发现，慢性炎症是CRC发展的关键因素，对CRC的诱发和恶化具有重要影响[2]。Toll样受体/髓样分化因子88/核因子κB（Toll-like receptors/myeloid differentiation factor 88/nuclear factor-κB，TLRs/MyD88/NF-κB）信号通路的异常激活可引发持续性的炎症，从而刺激机体释放炎症介质和细胞因子，诱发CRC[3]。

目前，CRC主要是采用手术、放化疗、靶向治疗及免疫治疗等进行干预，但是这些治疗手段具有不良反应大、药物特异性低、容易发生炎症等缺点[4]。中医药在肿瘤综合治疗中具有减毒增效作用[5]，可改善患者临床症状、延长患者生存期，是肿瘤药物治疗的重要选择。三叉苦又称为三丫苦等，为芸香科吴茱萸属植物三叉苦*Melicope pteleifolia*（champ.ex Benth.）T.G.Hartley的干燥茎，主要分布于广东、广西、贵州和云南等区域，具有清热解毒、行气止痛的功效，是银菊感冒片、三九胃泰等中成药的组方药物之一，主要化学成分为黄酮、生物碱等[6]，具有抗肿瘤、抑菌、抗炎、镇痛、抗脓毒症等药理作用[7]。相关研究发现，三叉苦粗提取物对乳腺癌细胞（HCC1937、MDA-MB-231）、结肠癌细胞（HCT116）以及肝癌细胞（HepG2）等均有抑制作用[8]，但其是否可抑制CRC尚不明确，且具体有效成分为何也仍需进一步探究。研究发现，黄酮类化合物抗肿瘤作用突出，其可与NF-κB结合，抑制NF-κB活性，从而达到抑制肿瘤细胞增殖的作用[9]。为此，本研究基于TLRs/MyD88/NF-κB信号通路，以三叉苦总黄酮为研究对象，探讨其对裸鼠CRC移植瘤的抑制作用及机制，以期为三叉苦抗肿瘤的临床应用和药物开发提供参考依据。

1 材料

1.1 主要仪器

UV-6000PC型紫外-可见分光光度计购自上海元析仪器有限公司；AUW-220D型万分之一电子天平购自美国Costar公司；DM1000型生物显微镜购自德国Leica公司；ZS-2型酶标仪购自北京新风机电技术公司；4600SF型凝胶成像仪购自上海天能生命科学有限公司；Mini Trans-Blot型蛋白转印系统购自美国Bio-Rad公司；CX23型光学显微镜购自济南博坤科学仪器有限公司；RS-25S型超声波细胞粉碎机购自宁波荣顺科技仪器厂。

1.2 主要药品和试剂

三叉苦药材购自贵阳市中药批发市场，经贵州中医药大学第一附属医院药剂科罗君教授鉴定为芸香科吴茱萸属植物三叉苦*M. pteleifolia*（champ.ex Benth.）T.G.Hartley的干燥茎；5-氟尿嘧啶（5-fluorouracil，5-FU）注射液（批号2202171，规格10 mL/支）购自天津金耀药业有限公司；羧甲基纤维素钠（CMC-Na，批号C8620）购自北京索莱宝科技有限公司；高糖DMEM细胞培养基（批号C11995500BT）购自美国Gibco公司；胎牛血清（批号22060043）购自以色列BI公司；白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号分别为EMC004、EMC102a）均购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司；化学发光检测试剂盒、RIPA裂解液（批号分别为30330、01408）均购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司；兔源胱天蛋白酶3（caspase-3，批号10008229）购自美国Proteintech公司；兔源TNF受体相关蛋白6（TNF receptor-associated factor 6，TRAF6）、NF-κB亚基p65（NF-κB p65）抗体和鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体（批号分别为GR1006236-2、GR3422076-12、GR3316865-24）均购自英国Abcam公司；兔源白细胞介素1受体关联激酶1（interleukin-1 receptor associated kinase 1，IRAK-1）、TLR4抗体（批号分别为20230310、20230310）均购自北京兰杰柯科技有限公司；兔源MyD88抗体（批号51f3612）购自美国Affnity公司；苏木素染液（批号G1005-1）购自湖北赛维尔生物科技有限公司；免疫组化检测试剂盒（批号CW2069）购自康为世纪生物科技股份有限公司。

1.3 细胞株

人CRC细胞LoVo购自浙江美森细胞科技有限公司。采用含1%双抗和10%胎牛血清的高糖DMEM细胞培养基在37 ℃、5%CO_2条件下培养LoVo细胞，选取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.4 实验动物

本研究所用动物为SPF级雄性Balb/c-nu裸鼠，共30只，体重（20±2）g，4～5周龄，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，实验动物生产许可证号为SCXK（京）-2019-0010。裸鼠饲养在贵州中医药大学动物中心SPF级动物房内，饲养期间自由饮食。所有动物实验操作均符合贵州中医药大学动物实验福利伦理审查委员会标准，实验动物伦理号为20220095。

2 方法

2.1 三叉苦总黄酮的制备

参考文献方法进行制备[10—11]：将1.1 kg三叉苦粉碎过60目筛，精确称取药粉样品适量，采用石油醚按料液比1∶10（g/mL）在65 ℃下回流1 h，用蒸馏水洗脱2次；过滤，取滤渣，按料液比1∶30（g/mL）加入50%乙醇，在

80 ℃下回流2 h，提取2次；合并提取液，冷却至室温，以4 000 r/min离心10 min。移取上清液至100 mL容量瓶中，以50%乙醇定容后，采用旋转蒸发仪浓缩至无醇味，再洗脱纯化2次，将纯化后的样品浓缩蒸干，即得三叉苦总黄酮粉末，得率为0.011%。

2.2 动物造模、分组与给药

将Balb/c-nu裸鼠适应性喂养1周后，在裸鼠右侧腋窝皮下注射0.2 mL LoVo细胞悬液（细胞密度为1×10^7个/mL），当裸鼠皮下移植瘤体积达0.5 mm^3时，表明造模成功。将造模成功的裸鼠随机分为模型组、5-FU组（阳性对照，10 mg/kg，剂量参考文献[12]设置）和三叉苦总黄酮高、低剂量组（25、12.5 mg/kg，剂量根据预实验结果设置），每组6只；另设不造模的正常组（6只，皮下注射0.2 mL基础培养基）。所有药物均采用含0.3%CMC-Na的生理盐水进行配制。正常组和模型组裸鼠腹腔注射含0.3% CMC-Na的生理盐水；三叉苦总黄酮高、低剂量组裸鼠腹腔注射相应药液，每天1次；5-FU组裸鼠腹腔注射相应药液，隔天1次；连续给药21 d。给药期间观察裸鼠的一般情况。

2.3 取材和裸鼠移植瘤抑制率、肝/脾脏指数的检测

末次给药后次日，称定裸鼠体重，采用眼球摘除法取血，分离血清，保存至－80 ℃冰箱备用；采用颈椎脱臼法处死裸鼠，剥离肿瘤组织、肝脏组织、脾脏组织，观察并称重，然后计算肝/脾脏指数[肝/脾脏指数＝裸鼠肝脏/脾脏质量（g）/裸鼠体重（g）×100%]、抑瘤率[抑瘤率＝（模型组平均瘤重－给药组平均瘤重）/模型组平均瘤重×100%]。将肿瘤组织冻存于－80 ℃冰箱中备用。

2.4 裸鼠血清中TNF-α、IL-6水平的检测

采用ELISA法进行检测。取“2.3”项下各组裸鼠的血清样品适量，根据试剂盒说明书方法操作，检测裸鼠血清中TNF-α、IL-6水平。

2.5 裸鼠肿瘤组织的病理形态学观察

取“2.3”项下肿瘤组织，以4%多聚甲醛溶液固定，经脱水、包埋、切片等处理后，进行常规HE染色，然后采用显微镜观察肿瘤组织的病理形态学变化，并拍照。

2.6 裸鼠肿瘤组织中TLR4、NF-κB p65蛋白表达水平的检测

采用免疫组化法进行检测。取“2.3”项下每组3只裸鼠的肿瘤组织，经二甲苯、乙醇脱水后，进行石蜡包埋、切片；将切片浸入0.01 mmol/L柠檬酸盐缓冲液中修复5 min，滴加内源性过氧化物酶封闭液孵育20 min，再滴加山羊血清室温孵育20 min，然后加入TLR4（稀释度1∶100）、NF-κB p65（稀释度1∶2 000）一抗，4 ℃孵育过夜；次日，加入相应二抗（稀释度1∶200），再进行DAB显色，以蒸馏水洗涤后，加入苏木素复染，经脱水、透明、中性树胶封片后进行镜检，以棕黄色为阳性染色。采用Image J软件分析阳性染色区域的光密度值，以此表示蛋白的表达水平。

2.7 裸鼠肿瘤组织中TLR4/MyD88/NF-κB信号通路相关蛋白和caspase-3蛋白的表达水平检测

采用Western blot法进行检测。取“2.3”项下每组3只裸鼠的肿瘤组织，解冻后剪取适量，经裂解后抽提总蛋白。将蛋白变性处理后，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，再转移至PVDF膜；以5%脱脂奶粉封闭，加入TLR4（稀释度1∶500）、MyD88（稀释度1∶1 000）、TRAF6（稀释度1∶4 000）、IRAK-1（稀释度1∶1 000）、NF-κB p65（稀释度1∶10 000）、caspase-3（稀释度1∶1 000）、GAPDH（稀释度1∶5 000）一抗，4 ℃孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释度1∶2 000），室温孵育1 h；以洗液漂洗3次后，按化学发光试剂盒说明书操作，采用凝胶成像仪进行显影和拍照，并用Image J软件进行分析。以目的蛋白与内参蛋白（GAPDH）条带的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 26.0软件对实验数据进行分析和处理。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 裸鼠一般情况观察结果

正常组裸鼠在实验过程中精神良好，饮食量和饮水量正常，未见明显不良反应。造模的裸鼠皮下注入LoVo细胞后，在第3天出现黄豆大小的肿瘤结节；且与正常组裸鼠比较，造模组裸鼠的饮食量和饮水量减少，体重减轻，肛门潮湿，大便清晰，有腹泻等情况。

3.2 裸鼠移植瘤抑制率和肝/脾脏指数的检测结果

与正常组比较，模型组裸鼠的脾脏指数、肝脏指数均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，5-FU组、三叉苦总黄酮高剂量组裸鼠的瘤重和肝脏指数均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），三叉苦总黄酮高、低剂量组裸鼠的脾脏指数均显著降低（$P<0.05$）。5-FU组和三叉苦总黄酮高、低剂量组裸鼠的抑瘤率分别为55.14%、36.91%和15.89%。结果见图1、表1。

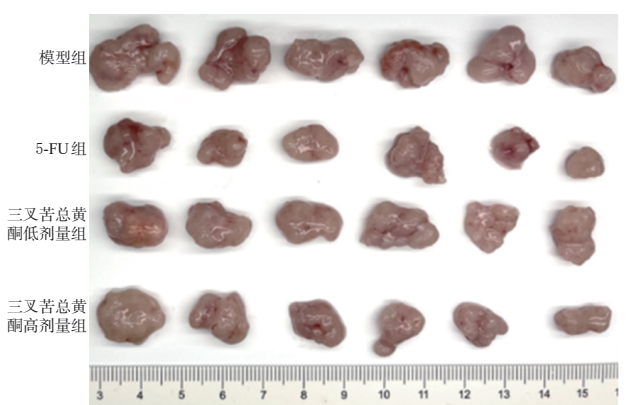


图1 各组裸鼠的移植瘤肉眼观察图

表1　三叉苦总黄酮对裸鼠瘤重和肝/脾脏指数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	瘤重/g	脾脏指数/%	肝脏指数/%
正常组		0.84±0.18	7.64±0.72
模型组	1.08±0.24	1.60±0.35[a]	12.02±1.10[a]
5-FU组	0.58±0.32[b]	1.59±0.39	9.02±1.38[c]
三叉苦总黄酮低剂量组	0.90±0.18	1.12±0.09[b]	11.35±1.43
三叉苦总黄酮高剂量组	0.77±0.25[b]	1.09±0.10[b]	10.23±0.81[c]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$。

3.3　裸鼠血清中TNF-α、IL-6水平的检测结果

与正常组比较，模型组裸鼠血清中TNF-α、IL-6水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，5-FU组和三叉苦总黄酮高剂量组裸鼠血清中TNF-α、IL-6水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表2。

表2　三叉苦总黄酮对裸鼠血清中TNF-α、IL-6水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，pg/mL）

组别	IL-6	TNF-α
正常组	16.00±0.35	15.40±0.52
模型组	25.30±2.71[a]	22.85±1.27[a]
5-FU组	19.53±0.62[b]	17.56±0.36[b]
三叉苦总黄酮低剂量组	23.57±0.52	22.29±2.52
三叉苦总黄酮高剂量组	19.24±1.74[b]	19.86±0.76[c]

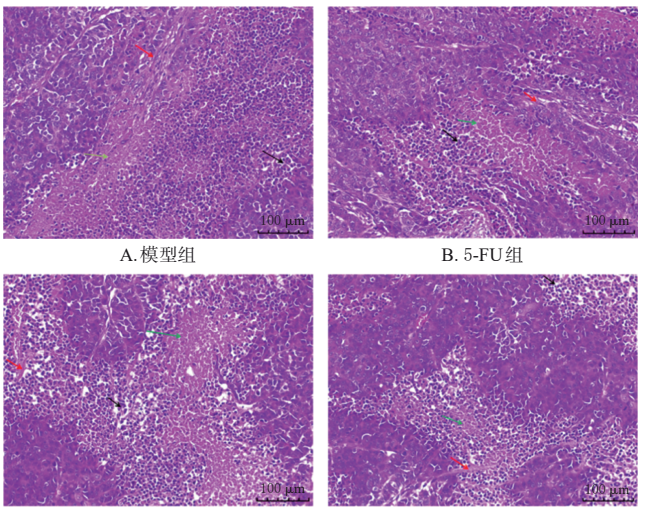
a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$。

3.4　裸鼠肿瘤组织的病理形态学观察结果

模型组裸鼠肿瘤坏死区域细胞密度大，细胞核分裂现象较多，排列无序，细胞核碎裂溶解较少。与模型组相比，各给药组裸鼠肿瘤细胞皱缩变形，核固缩、碎裂现象增多，其中三叉苦总黄酮高剂量组和5-FU组细胞核碎裂现象更明显。结果见图2。

3.5　裸鼠肿瘤组织中TLR4、NF-κB p65蛋白表达的检测结果

与模型组比较，各给药组裸鼠肿瘤组织中TLR4、NF-κB p65蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图3、表3。



A. 模型组　B. 5-FU组

C. 三叉苦总黄酮低剂量组　D. 三叉苦总黄酮高剂量组

注：红色箭头所指为增生结缔组织；黑色箭头所指为肿瘤细胞崩解、核固缩；绿色箭头所指为肿瘤细胞核碎裂溶解。

图2　各组裸鼠肿瘤组织病理形态学观察的显微图（HE染色）

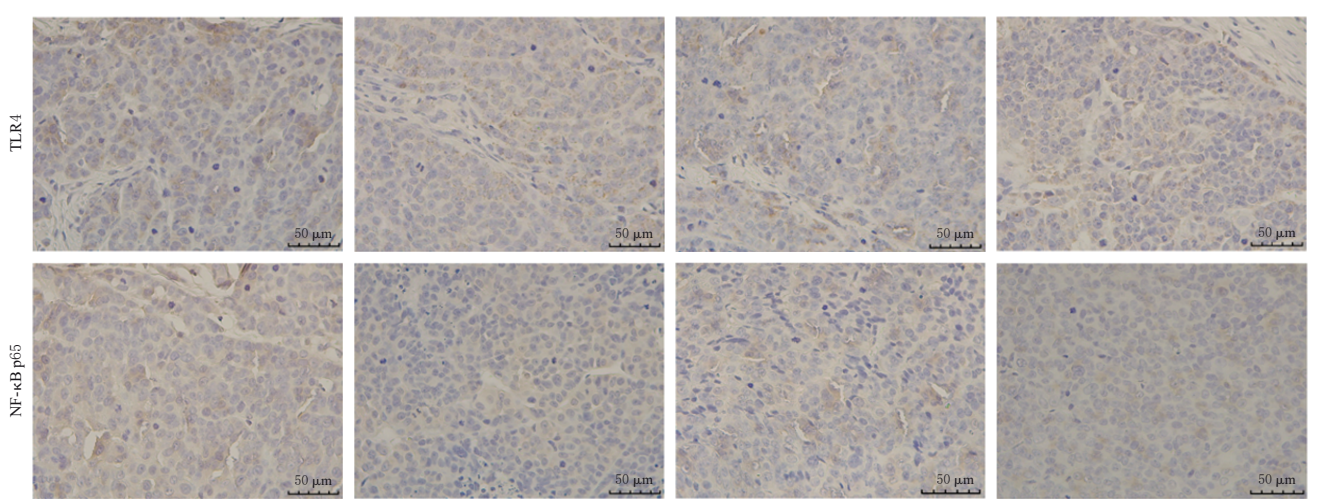
表3　三叉苦总黄酮对裸鼠肿瘤组织中TLR4、NF-κB p65蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	TLR4	NF-κB p65
模型组	0.338±0.019	0.360±0.018
5-FU组	0.140±0.008[a]	0.156±0.009[a]
三叉苦总黄酮低剂量组	0.295±0.016[b]	0.241±0.009[a]
三叉苦总黄酮高剂量组	0.194±0.012[a]	0.194±0.010[a]

a：与模型组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.6　裸鼠肿瘤组织中TLR4/MyD88/NF-κB信号通路相关蛋白和caspase-3蛋白表达的检测结果

与模型组比较，5-FU组和三叉苦总黄酮高剂量组裸鼠肿瘤组织中TLR4、MyD88、TRAF6、IRAK-1、NF-κB p65蛋白表达水平均显著降低（$P<0.01$），caspase-3蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$）；三叉苦总黄酮低剂量组肿瘤组织中TRAF6、MyD88、IRAK-1蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图4、表4。



模型组　5-FU组　三叉苦总黄酮低剂量组　三叉苦总黄酮高剂量组

图3　各组裸鼠肿瘤组织中TLR4、NF-κB p65蛋白表达的免疫组化图

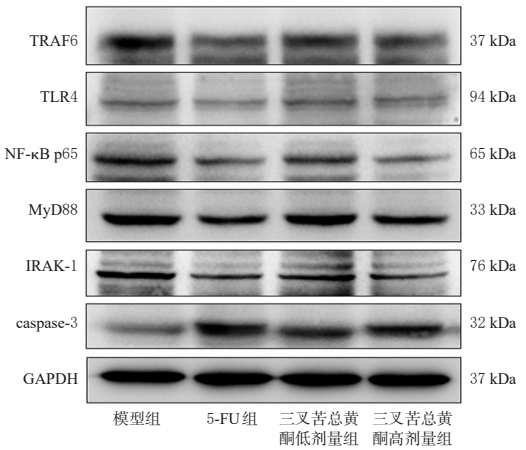


图4　各组裸鼠肿瘤组织中TLR4/MyD88/NF-κB信号通路相关蛋白和caspase-3蛋白表达的电泳图

表4　三叉苦总黄酮对裸鼠肿瘤组织中TLR4/MyD88/NF-κB信号通路相关蛋白和caspase-3蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	TRAF6/GAPDH	TLR4/GAPDH	NF-κB p65/GAPDH	MyD88/GAPDH	IRAK-1/GAPDH	caspase-3/GAPDH
模型组	0.503±0.005	0.239±0.012	0.174±0.010	0.513±0.024	0.349±0.010	0.121±0.019
5-FU组	0.157±0.009[a]	0.137±0.006[a]	0.061±0.006[a]	0.154±0.016[a]	0.086±0.010[a]	0.576±0.026[a]
三叉苦总黄酮低剂量组	0.247±0.005[a]	0.224±0.010	0.148±0.220	0.439±0.009[b]	0.220±0.014[a]	0.197±0.014
三叉苦总黄酮高剂量组	0.190±0.008[a]	0.131±0.006[a]	0.075±0.008[a]	0.224±0.020[a]	0.106±0.005[a]	0.338±0.036[a]

a：与模型组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

4　讨论

CRC归属中医学“癥瘕”“积聚”“肠风”“肠积”“脏毒”等范畴，正虚、痰浊、血瘀、癌毒是其核心病机[13]。随着中医药的发展，我国现多采用中西医联合治疗结直肠癌，中医药对于CRC早期和术后患者具有明显优势[14]，其通过扶正祛邪、益气健脾等方法可改善CRC患者生存质量，并延长患者生存期[15]。三叉苦是药食两用的中药，具有镇痛、抗肿瘤、抗炎等药理作用，是治疗癌症的潜在药物[16]。本研究结果发现，经三叉苦总黄酮干预后，裸鼠瘤重、肝脏指数和脾脏指数均降低，这表明三叉苦总黄酮可抑制裸鼠CRC移植瘤生长，并改善其肝脾肿大。

相关研究发现，肿瘤细胞表面广泛存在TLRs，其是治疗肿瘤的潜在作用靶点[17]。TLR4在CRC组织和细胞中均有表达，可以调控CRC细胞的黏附性和肝转移，进而影响CRC细胞的增殖、侵袭和迁移[18]。当机体受到刺激时，NF-κB p50/NF-κB p65形成的二聚体从与NF-κB抑制蛋白所形成的无活性复合物中解离出来，进入细胞核，诱导如TNF-α、IL-6、血管内皮生长因子等多种炎症因子生成，促进肿瘤细胞生成、增殖[19]。本研究发现，经三叉苦总黄酮干预后，裸鼠肿瘤组织中TLR4、NF-κB p65蛋白表达水平均显著降低，这表明三叉苦总黄酮抑制裸鼠CRC移植瘤生长的原因可能与下调TLR4、NF-κB p65蛋白表达和减少TNF-α、IL-6的释放有关。

临床研究表明，CRC患者癌组织中MyD88的高表达与疾病恶化有关，可影响患者预后[20]。caspase-3是促进癌细胞凋亡的蛋白，在正常大肠组织中高表达，而在CRC组织中低表达，激活caspase-3活性可促进CRC细胞凋亡[21]。TRAF6是调控CRC细胞迁移和增殖的关键靶点，且CRC细胞中NF-κB异常活化可能与TRAF6表达有关[22]。另外，CRC细胞的增殖能力与IRAK-1的表达水平呈正相关[23]。本研究发现，经三叉苦总黄酮干预后，裸鼠肿瘤组织中TLR4、MyD88、TRAF6、IRAK-1、NF-κB p65蛋白表达水平降低，caspase-3蛋白表达水平升高，这表明三叉苦总黄酮可能是通过抑制TLR4/MyD88/NF-κB信号通路活性，促进CRC细胞凋亡，进而抑制裸鼠CRC移植瘤生长。

综上所述，三叉苦总黄酮可抑制裸鼠CRC移植瘤生长，其作用机制可能与减轻炎症反应，抑制TLR4/MyD88/NF-κB信号通路活性，促进CRC细胞凋亡有关。

参考文献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] 刘怡彤，孙洋. 结肠炎癌转化调控机制和化学干预的研究进展[J]. 药学学报，2022，57(5)：1273-1281.
LIU Y T, SUN Y. Advances in mechanisms for inflammation-associated colon carcinogenesis and chemoprevention [J]. Acta Pharm Sin, 2022, 57(5): 1273-1281.

[3] 张传凤，刘博，葛雨竹，等. 大黄牡丹汤对炎症相关性结直肠癌的治疗作用及对TLR4/MyD88/NF-κB p65信号通路的影响[J]. 中国免疫学杂志，2021，37(12)：1443-1448.
ZHANG C F, LIU B, GE Y Z, et al. Therapeutic effect of Dahuang mudan decoction on inflammation-related colorectal cancer and its influence on TLR4/MyD88/NF-κB p65 signaling pathway[J]. Chin J Immunol, 2021, 37(12): 1443-1448.

[4] HASSAN M R, SUAN M A, SOELAR S A, et al. Survival analysis and prognostic factors for colorectal cancer patients in Malaysia[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(7): 3575-3581.

[5] 宋忠军，朱晓青，何艳，等. 银杏黄酮苷元对多柔比星治疗肝癌的增效减毒作用[J]. 中国药房，2022，33(16)：1937-1942，1949.
SONG Z J, ZHU X Q, HE Y, et al. Effects of increasing efficacy and decreasing toxicity of ginkgo flavone aglycone on doxorubicin in the treatment of liver cancer[J]. China Pharm, 2022, 33(16): 1937-1942, 1949.

[6] 刘同祥，王绍辉，王勇，等. 三叉苦的研究进展[J]. 中草药，2016，47(22)：4103-4110.
LIU T X, WANG S H, WANG Y, et al. Research progress

in *Melicope pteleifolia*[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(22): 4103-4110.

[7] 程艳薇,南惠玲,林青华,等.民族药三叉苦化学成分、药理作用研究进展及质量标志物(Q-Marker)预测分析[J].药学研究,2023,42(8):605-614,626.
CHENG Y W, NAN H L, LIN Q H, et al. Research progressi on the chemical constituents, pharmacological, effects and the prediction and analysis of Q-Marker of *Melicope pteleifolia*[J]. Pharm Res, 2023, 42(8): 605-614,626.

[8] YAO Q, GAO Y, LAI C C, et al. The phytochemistry, pharmacology and applications of *Melicope pteleifolia*: a review[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 251: 112546.

[9] WU T, WANG G, CHEN W, et al. Co-inhibition of BET proteins and NF-κB as a potential therapy for colorectal cancer through synergistic inhibiting MYC and FOXMl expressions[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 315.

[10] 高英,师冰,颜宏,等.三丫苦茎总提取物及分段样品抗菌活性研究[J].云南中医学院学报,2017,40(3):28-32.
GAO Y, SHI B, YAN H, et al. Antibacterial properties of total extract and ethanol segments from stem of *Evodia lepta* (Spreng.) Merr. against common pathogenic bacteria [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med, 2017, 40(3): 28-32.

[11] 罗桂花,林翠清,肖鸿华,等.响应面法优化三叉苦黄酮提取工艺及抗氧化活性分析[J].食品与药品,2022,24(1):1-6.
LUO G H, LIN C Q, XIAO L H, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Melicope pteleifolia* and evaluation of its antioxidant activity[J]. Food Drug, 2022, 24(1): 1-6.

[12] 吕长玲,杜华钰,周杰,等.美洲大蠊多肽PAP-2对Balb/c小鼠肝癌原位移植瘤免疫微环境的影响[J].中国临床药理学杂志,2023,39(7):994-998.
LYU C L, DU H Y, ZHOU J, et al. Effect of *Periplaneta* Americana polypeptide PAP-2 on the immune microenvironment of Balb/c mice with hepatocellular carcinoma in situ transplanted tumors[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(7): 994-998.

[13] 孔宪斌,杨振弢,彭莹莹,等.基于"虚、毒、瘀"浅谈结直肠癌的病机和治疗[J].环球中医药,2020,13(12):2081-2084.
KONG X B, YANG Z T, PENG Y Y, et al. Discussion on the pathogenesis and treatment of colorectal cancer based on "deficiency, toxicity and blood stasis" [J]. Glob Tradit Chin Med, 2020, 13(12): 2081-2084.

[14] 荣红国,于蔚洁,杜美皎,等.我国循证中医药领域研究热点与前沿分析[J].中国药房,2022,33(15):1876-1880.
RONG H G, YU W J, DU M J, et al. Analysis on research hotspots and frontier in domestic evidence-based traditional Chinese medicine[J]. China Pharm, 2022, 33(15): 1876-1880.

[15] 刘静,朱琰,范佳伟.及早中医药健脾治疗对大肠癌术后患者生存质量影响[J].辽宁中医药大学学报,2021,23(9):6-9.
LIU J, ZHU Y, FAN J W. Impact of quality of life in post-operation colorectal cancer patients receiving early treatment of tonifying spleen by traditional Chinese medicine [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2021, 23(9): 6-9.

[16] YEH D W, HUANG L R, CHEN Y W, et al. Interplay between inflammation and stemness in cancer cells: the role of Toll-like receptor signaling[J]. J Immunol Res, 2016, 2016: 4368101.

[17] HOLLDACK J. Toll-like receptors as therapeutic targets for cancer[J]. Drug Discov Today, 2014, 19(4): 379-382.

[18] ZHU G W, HUANG Q, HUANG Y J, et al. Lipopolysaccharide increases the release of VEGF-C that enhances cell motility and promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis through the TLR4-NF-κB/JNK pathways in colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(45): 73711-73724.

[19] GAO X J, XU F M, ZHANG H T, et al. PKCα-GSK-3β-NF-κB signaling pathway and the possible involvement of TRIM21 in TRAIL-induced apoptosis[J]. Biochem Cell Biol, 2016, 94(3): 256-264.

[20] 聂雪丽,聂春杰,买晓颖,等.EB病毒感染对结直肠癌患者癌组织TLR4/MyD88信号通路影响[J].中华医院感染学杂志,2021,31(23):3600-3603.
NIE X L, NIE C J, MAI X Y, et al. Effects of Epstein-Barr virus infection on TLR4/MyD88 signaling pathway in cancer tissues of patients with colorectal cancer[J]. Chin J Nosocomiol, 2021, 31(23): 3600-3603.

[21] 罗梦花,陈佩文,陈志红,等.半边旗二萜化合物5F对人结直肠癌细胞增殖、凋亡和自噬的影响[J].中南药学,2023,9(2):407-413.
LUO M H, CHEN P W, CHEN Z H, et al. Effect of 5F on the proliferation, apoptosis and autophagy of colorectal cancer cells[J]. Cent South Pharm, 2023, 9(2): 407-413.

[22] 何亚琴,苏进达,赵少辉,等.结直肠癌细胞中NF-κB活化与TRAF6、CCR5及PTEN/PI3K通路的关系及作用[J].中国普通外科杂志,2022,8(10):1363-1372.
HE Y Q, SU J D, ZHAO S H, et al. Association of NF-κB activation with TRAF6, CCR5 and PTEN/PI3K pathway and its role in colorectal cancer cells[J]. China J Gen Surg, 2022, 8(10): 1363-1372.

[23] 王娜.IRAK1激酶在结肠癌中作为西妥昔单抗协同作用靶标机制的研究[D].西安:第四军医大学,2017.
WANG N. Mechanism of IRAK1 kinase as a synergistic target of cetuximab in colon cancer[D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2017.

(收稿日期:2023-09-24 修回日期:2024-02-03)
(编辑:唐晓莲)