

芥菜提取物调节结肠癌小鼠肠道菌群及信号通路 Wnt/JNK和NF- κ B p65/COX-2

田艳^{1,2}, 杜海平², 陈兰艳³, 赵玲艳¹, 徐月炬², 赵翊滢², 邓放明^{1*}

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128) (2. 广西科技大学广西柳州螺蛳粉工程技术研究中心, 广西柳州 545006) (3. 重庆市秀山县人民医院, 重庆 409900)

摘要: 探讨芥菜硫代葡萄糖苷 (Glucosinolate, GSL) 提取物对结肠癌的恢复作用。紫外法检测芥菜总 GSL, 氧化偶氮甲烷联合葡聚糖硫酸钠诱导 Balb/c 小鼠建立结肠炎性相关的结肠癌模型, 小鼠分为对照组、模型组和芥菜 GSL 提取物低、高剂量组, 样品干预 9 周后, 分析炎症因子水平以及 NF- κ B p65/COX-2 和 Wnt/JNK 信号通路的表达, 通过 16S rRNA 高通量测序分析肠道菌群。结果显示, 芥菜总 GSL 含量高达 127.11 μ mol/g。与模型组比较, 芥菜 GSL 提取物高剂量组小鼠体质量和结肠长度分别增加了 42.11% 和 20.37% ($P < 0.05$), 结肠肿瘤个数显著减少 ($P < 0.05$), 结肠组织中 IL-6、TNF- α 和 IL-17 表达水平分别降低了 46.88%、70.22%、20.43%, IFN- γ 表达水平升高了 98.55%, NF- κ B p65、COX-2、Wnt 和 JNK 的蛋白表达分别降低了 60.91%、15.57%、63.31%、96.58% ($P < 0.05$); 芥菜 GSL 提取物组显著回调了 *Bacteroides*、*Turicibacter*、*Ruminococcaceae UCG-014*、*Ruminiclostridium_5*、*Akkermansia*、*norank f Clostridiales vadinBB60 group*、*Prevotellaceae UCG-001* 和 *Blautia* 等菌的丰度, 恢复了肠道微生物的平衡状态。综上, 芥菜 GSL 提取物通过改善结肠癌小鼠病理状态、调节炎症因子、信号通路和肠道微生物, 展现辅助治疗结肠癌的潜力。

关键词: 芥菜硫代葡萄糖苷提取物; 结肠癌; 肠道菌群; Wnt/JNK 信号通路; NF- κ B p65/COX-2 信号通路

文章编号: 1673-9078(2025)03-1-11

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.0224

Mustard Leaf Extract Regulates Gut Microbiota and Wnt/JNK and NF- κ B p65/COX-2 Signaling Pathways in A Mouse Colon Cancer Model

TIAN Yan^{1,2}, DU Haiping², CHEN Lanyan³, ZHAO Lingyan¹, XU Yueju², ZHAO Yiyong, DENG Fangming^{1*}

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(2. Guangxi Liuzhou Luosifen Engineering Technology Research Center, Guangxi University of Science and Technology,

Liuzhou 545006, China) (3. Xiushan County People's Hospital of Chongqing, Chongqing 409900, China)

Abstract: The therapeutic effects of mustard leaf extract, glucosinolate (GSL), on colon cancer were investigated. Total GSL content in mustard leaf was quantified using UV spectrophotometry. A colon cancer model associated with colitis

引文格式:

田艳,杜海平,陈兰艳,等.芥菜提取物调节结肠癌小鼠肠道菌群及信号通路Wnt/JNK和NF- κ B p65/COX-2[J].现代食品科技,2025,41(3):1-11.

TIAN Yan, DU Haiping, CHEN Lanyan, et al. Mustard leaf extract regulates gut microbiota and Wnt/JNK and NF- κ B p65/COX-2 signaling pathways in a mouse colon cancer model [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 1-11.

收稿日期: 2024-02-27

基金项目: 湖南自然科学基金面上项目 (2021JJ30315); 广西自然科学基金项目 (2023JJB130297)

作者简介: 田艳 (1988-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 植物功能性成分, E-mail: tianyan0329@126.com

通讯作者: 邓放明 (1962-), 博士, 教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: fmdenghnau@sina.com

was developed in Balb/c mice using azoxymethane and dextran sulfate sodium. The mice were divided into control, model, and low/high-dose mustard leaf GSL groups. After a 9-week trial, inflammatory cytokine levels and NF- κ B p65/COX-2 and Wnt/JNK signaling pathway activities were analyzed. The gut microbiota was examined through high-throughput sequencing of 16S rRNA. Total GSL content in mustard leaf reached 127.11 μ mol/g. Compared with the model group, the high-dose mustard leaf GSL group showed significant respective increases in weight and colon length (42.11% and 20.37%, respectively ($P < 0.05$)), a significant reduction in the number of colon tumors ($P < 0.05$), decreases in IL-6, TNF- α , and IL-17 expression in colon tissue by 46.88%, 70.22%, and 20.43% respectively, a 98.55% increase in IFN- γ expression, and significant decreases in NF- κ B p65, COX-2, Wnt, and JNK protein expression by 60.91%, 15.57%, 63.31%, and 96.58%, respectively ($P < 0.05$). The abundances of *Bacteroides*, *Turicibacter*, *Ruminococcaceae* UCG-014, *Ruminiclostridium_5*, *Akkermansia*, *norank f Clostridiales vadinBB60 group*, *Prevotellaceae* UCG-001, and *Blautia* were significantly altered by mustard leaf GSL, resulting in a restoration of a healthy microbial balance in the gut. In summary, leaf mustard GSL is a potential adjuvant therapy for colon cancer, as evidenced by its capacity to alleviate pathological conditions and modulate inflammatory cytokines, signaling pathways, and gut microbiota in mouse models of colon cancer.

Key words: mustard leaf glucosinolate extract; colon cancer; gut microbiota; Wnt/JNK signaling pathway; NF- κ B p65/COX-2 signaling pathway

根据世界卫生组织统计, 结肠癌是全球第三大常见癌症, 其发病率和死亡率逐年上升^[1]。近年来, 研究发现肠道菌群失衡和信号通路异常在结肠癌的发生、发展和转移中起着重要作用^[2]。因此, 寻找一种能够调节肠道菌群和信号通路的天然食物或者药物具有重要的研究意义。

大叶芥菜使用广泛^[3], 其所含的硫代葡萄糖苷 (Glucosinolate, GSL) 具有抗氧化、抗炎和抗肿瘤等生物活性^[4]。近年来, GSL 在癌症治疗领域的研究逐渐受到关注^[5]。前期研究^[6]发现芥菜中富含 GSL, 通过高效液相色谱-电喷雾质谱联用 (High-performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole-time-of-flight Mass Spectrometry, HPLC-Q-TOF-MS) 技术从芥菜提取物中鉴定出 21 种 GSL。同时还发现, 芥菜 GSL 提取物通过诱导细胞周期蛋白 B (Cyclin B)、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 和细胞周期蛋白 E (Cyclin E) 基因的下调, 以及细胞凋亡基因, 如半胱天冬蛋白酶-3 (Caspase-3, CASP3) 和裂解型半胱天冬蛋白酶-3 (Cleaved Caspase-3, c-CASP3) 的上调使人结肠癌细胞凋亡, 表明芥菜 GSL 提取物在预防结肠癌方面有较大潜力^[6], 但关于芥菜 GSL 提取物对结肠癌小鼠肠道菌群及相关信号通路的影响的研究尚不充分。

结肠癌进展受免疫应答与促/抗炎因子调节, 如白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、干扰素- γ (Interferon-gamma, IFN- γ) 等, 它们通过调控细胞增殖、凋亡影响肿瘤形成^[7]。值得注意的是, 肿瘤发生与发展中的信号通路异常也被认为是癌症的一

个重要特征^[8]。Wnt 信号通路在细胞增殖、分化和迁移中发挥重要作用, 而其异常激活与多种癌症的发生和进展密切相关^[9]。研究表明, 氨基末端激酶 (Jun N-terminal Kinases, JNKs) 的过度活化与炎症性肠病的发病有关, 而 JNKs 的抑制则可以减轻结肠炎的严重程度^[10]。核因子 κ B p65 (Nuclear Factor Kappa B p65, NF- κ B p65)/ 环氧合酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 信号通路在调控炎症反应、细胞增殖和凋亡等生物过程中具有关键作用, 而这些过程在结肠癌的发生和发展中具有重要意义^[11]。此外, 结肠癌的发生与肠道菌群失衡密切相关。肠道菌群对肠道稳态、营养吸收、免疫调节至关重要, 其失衡可能引发肠炎、炎症性疾病和结肠癌^[12]。因此, 研究肠道菌群及其相关通路在结肠癌发生中的作用及其调控方法具有重要意义。本研究采用氧化偶氮甲烷 (Azoxymethane, AOM) 联合葡聚糖硫酸钠 (Dextran Sulfate Sodium, DSS) 诱导 Balb/c 小鼠建立结肠炎性相关的结肠癌小鼠模型, 以探究 GSL 提取物对结肠癌的作用结果, 以此种方式诱发的结肠癌是与结肠炎相关的癌症, 与人类长期慢性肠道炎症而导致的结肠癌相似^[7]。通过检测体征指数、小鼠结肠组织以及血清中肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)、IFN- γ 、IL-6、白细胞介素-17 (Interleukin-17, IL-17) 的变化, 基于 Illumina Miseq 平台对小鼠肠道菌群进行分析, 以及通过 Wnt/JNK、NF- κ B p65/COX-2 信号通路分析, 揭示芥菜 GSL 预防结肠癌的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

芥菜：湖南省华容县芥菜基地。

AOM（分析纯），美国 Fisher Scientific 公司；DSS（分析纯）、TNF- α 、IL-6、IL-17、IFN- γ 试剂盒，江苏酶免实业有限公司；异硫氰酸胍、巯基乙醇、无水乙醇（分析纯）、RNA 清洗浓缩缓冲液（RNA Wash Concentrate, RWC）、焦碳酸二乙酯（Diethyl Pyrocarbonate, DEPC）、磷酸甘油醛 3-脱氢酶（Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase, GAPDH）、芥子酶，美国 Sigma-Aldrich 公司；GeneJET Genomic DNA Purification Kit、AxyPrep DNA Gel Extraction Kit，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂（分子生物学级），德国 Merck Millipore 公司；考马斯亮蓝、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺（Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE）（分析纯）、蛋白质分子量标准品、琼脂糖凝胶、FastPfu 聚合酶，上海宏原生物科技有限公司；引物，苏州金唯智生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Alpha 1-2 LDplus 冷冻干燥仪，德国克里斯特公司；Micro 5417R 高速冷冻离心机，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；1645050 型电泳仪，美国伯乐公司；Hei-VAP G3 560-01302-00 旋转蒸发仪，德国海道夫公司；CB 系列 CO₂ 培养箱，德国宾得公司；DNA Engine 2 Opticon 定量实时聚合酶链反应（Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR）仪，美国 MJ Research 公司；TS100 倒置显微镜，日本尼康公司；Odyssey CLx 红外成像系统，美国利克生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品处理

田间收割新鲜的芥菜，清除表面的泥土，自然晾干、剁碎、混合均匀。真空冷冻干燥处理后，使用高速中药粉碎机将其粉碎，粉末须通过 60 目的筛孔。将筛好的粉末装入袋中进行密封，存放在 -80 °C 的超低温冰箱中备用。

1.3.2 总 GSL 的提取纯化及测定

提取总 GSL 的方法基于参考文献^[6]进行了调整。

1.0 g 干燥样本与 50 mL 的体积分数 70% 乙醇溶液混合，放入 250 mL 的锥形瓶中，在 70 °C 的水浴中加热提取 30 min。随后进行离心，以分离上层清液。对残留的沉淀再用 30 mL 体积分数 70% 乙醇溶液进行两次提取，将重复 3 次得到的上清液合并，经过旋转蒸发浓缩至 5 mL 左右。纯化采用酸性氧化铝为填料的柱层析技术，湿负荷法逐次添加样品，每次添加量为 1 mL。利用 0.1 mol/L 的硝酸钾溶液洗脱，收集洗脱液，并通过旋转蒸发浓缩到 5~10 mL，最后采用冷冻干燥法获得粉末状样品。

总 GSL 的含量通过紫外光谱法按照 SN/T 1868-2007《进出口油菜籽及其制品中硫苷总量测定标准》进行测定。实验步骤简述如下：称取粉末状样品 0.1 g 溶解于 100 mL 蒸馏水中。吸取 5 mL 加入至活化的二乙氨基乙基（Diethylaminoethyl, DEAE）Sephadex A-25 离子交换柱中，加入 5 mL 0.02 mol/L 的醋酸钠溶液清洗柱子，以去除未结合的物质。向柱中加入 1.0 mL 的芥子酶溶液（50 mg/mL），37 °C 条件下水浴 1 h。然后用 3 mL 的超纯水将化合物从色谱柱中洗脱三次，收集至 10.0 mL 的容量瓶中，加入 2.0 mL 的酚-钨酸溶液混合，定容至 10 mL。从容量瓶中吸取 1.0 mL 的溶液置于试管中，加入 3.0 mL 的葡萄糖显色溶液，37 °C 条件下水浴 30 min，冷却至室温，使用紫外分光光度计在 505 nm 波长下测定其吸光度。根据标准葡萄糖含量和吸光度生成标准曲线。通过定量分析总 GSL 的含量，其结果计算公式如下所示。

$$W = \frac{X \times 100}{m \times V} \quad (1)$$

式中：

W ——样品中硫代葡萄糖苷总量， $\mu\text{mol/g}$ ；

X ——由标准曲线算得测定溶液中的葡萄糖量， $\mu\text{mol/g}$ ；

m ——样品质量，g；

V ——用于上柱样品提取液的体积，mL。

1.3.3 动物分组与模型建立

采用雄性 Balb/c 小鼠 40 只，体质量 20 ± 2 g，来源于湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [许可证号 SCXK (湘) 2016-0002，无特定病原体 (Specific Pathogen Free, SPF) 级]。实验前 1 周进行适应性饲养，条件为：自由进食与饮水、温度 20 ± 2 °C、湿度 45%~55%、12 h 光照周期。随机分为对照组、模型组、低剂量组和高剂量组，每组 10 只。第 1 天，除对

照组外, 其余组腹腔注射 10 mg/kg AOM, 并在第 2、5、8 周分别提供质量分数 3% DSS 水诱导结肠癌。从第 8 天起, 低、高剂量组分别饲喂含质量分数 1% 和 10% 芥菜 GSL 提取物食物; 模型组和对照组维持正常饲料。记录体质量, 第 10 周末通过脱颈椎处死, 收集生物样本。实验获湖南斯莱克景达动物福利伦理委员会批准 (SJA19014)。

1.3.4 小鼠结肠组织中细胞因子检测

参照试剂盒说明书采用 ELISA 的方法检测 TNF- α 、IL-6、IL-17、IFN- γ 的表达水平。

1.3.5 qRT-PCR法检测结肠组织中NF- κ B p65、COX-2、Wnt、JNK mRNA的表达水平

在冰浴中将 20 mg 结肠组织搅碎, 并加入 500 μ L 异硫氰酸胍溶液及 10 μ L 巯基乙醇。混合物均质化后, 在 4 $^{\circ}$ C、13 200 \times g 条件下离心 10 min, 分离上清。上清液转移到 DNA 富集管, 在 4 $^{\circ}$ C 下离心 2 min 去除 DNA。取上清, 加入适量无水乙醇, 混合后转移到 RNA 富集管, 在 4 $^{\circ}$ C 下离心 2 min 分离 RNA 沉淀与蛋白质。将沉淀的 RNA 重新悬浮于少量去离子水或缓冲液中, 加入 RNA 清洗浓缩缓冲液清洗 2 次, 清洗后的 RNA 中加入 30 μ L DEPC 水 (质量分数 0.1%, 不含 RNA 酶), 在 4 $^{\circ}$ C、13 200 \times g 下离心 5 min, 收集纯化的 RNA。

引物如表 1 所示, 选定 GAPDH 作为内参基因进行标准化。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行目标基因 mRNA 的相对定量计算, 重复 3 次试验。

1.3.6 蛋白质印迹法检测结肠组织中NF- κ B p65、COX-2、Wnt、JNK蛋白表达水平

20 mg 结肠样本绞碎, 用裂解液 (组成比例为 50:1:1:1 的 2 \times Radio-Immunoprecipitation Assay 缓冲液、100 \times 蛋白酶抑制剂、100 \times 磷酸酶抑制剂 I 和 100 \times 磷酸酶抑制剂 II) 提取细胞蛋白质。考马斯亮蓝法检测蛋白含量, 混合等体积的 5 \times 上样缓冲液,

并在 95 $^{\circ}$ C 处理 10 min 以变性蛋白, 样品 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

制作质量分数为 12% SDS-PAGE 凝胶, 并设立电泳系统。加载 5 μ L 样品及蛋白质分子量标准品进行电泳, 使用 160 V 电压运行 45 min。电泳完成后, 将凝胶中的蛋白转移到膜上, 设置 100 V 电压持续 1 h 45 min 的转移。完成膜封闭及一、二抗体孵育后, 采用红外成像系统进行检测。

1.3.7 肠道菌群多样性分析方法

DNA 提取与纯化: 采用试剂盒 GeneJET Genomic DNA Purification Kit 提取小鼠粪便样品中总 DNA, 质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, NanoDrop 2000 检测 DNA 浓度和纯度。

PCR 扩增及产物定量和均一化: 对 V3-V4 可变区使用 338F 和 806R 引物进行 PCR 扩增。引物信息如表 2 所示。PCR 扩增反应体系如表 3 所示。扩增过程包括 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 27 个循环 (包括 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s), 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min。

高通量测序: 收集 PCR 产物并使用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 进行纯化, 使用 Tris-HCl 洗脱后, 进行质量分数为 2% 琼脂糖电泳检测和 QuantiFluorTM-ST 荧光定量检测。最后, 由上海美吉生物医药科技有限公司协助使用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台测序、分析。

1.4 数据处理

所有数据均采用 SPSS 19.0 进行统计分析和处理。计量数据采用均值 \pm 标准偏差 (Standard Deviation, SD) 的形式表示, 两组之间的均值差异采用 *t* 检验来进行评估。四组间的均值差异采用单因素方差分析 (Analysis of Variance, ANOVA) 和 Duncan 检验进行分析。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	上游引物	下游引物
NF- κ B p65	5'-GCTTTGCAAACCTGGGAATA-3'	5'-TCCGCCTTCTGCTGTAGAT-3'
COX-2	5'-ACGCTTCTCCCTGAAGCCGTAC-3'	5'-GTAGAGGGCTTTCAATTCTGCAGCC-3'
Wnt	5'-GGAAGACCATGTGGACCTGT-3'	5'-GGATTAGGGCTTCCTCTTGG-3'
JNK	5'-GCTGGAGAGGCTGCCAAGGTTT-3'	5'-AGGTCCCGCTGTTGCTGGTGGTGA-3'

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence	
引物名称	序列 (5'-3')
338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

表 3 PCR扩增反应体系

Table 3 PCR Amplification reaction system	
试剂	添加量/ μL
5 \times FastPfu 缓冲液	4
2.5 mmol/L dNTPs	2
5 $\mu\text{mol/L}$ 引物	0.8
FastPfu 聚合酶	0.4
DNA 模板	10
加 ddH ₂ O 至	20

2 结果与讨论

2.1 芥菜GSL提取物对小鼠体质量、结肠长度、肿瘤个数及结肠组织病理形态的影响

新鲜芥菜的冻干粉用乙醇提取、纯化、浓缩和冻干后得到大叶芥菜 GSL 提取物，经检测和分析，其总 GSL 含量高达 127.11 $\mu\text{mol/g}$ 。与研究结果^[6]比较，无显著性差异 ($P < 0.05$)，通过 HPLC-Q-TOF-MS 技术从新鲜芥菜提取物中鉴定出 21 种 GSL，包括 2-丙烯基 GSL、5-己烯基 GSL、4-甲基硫代丁基 GSL、3-丁烯基 GSL 和 4-甲氧基-3-吡啶甲基 GSL 等^[6]。

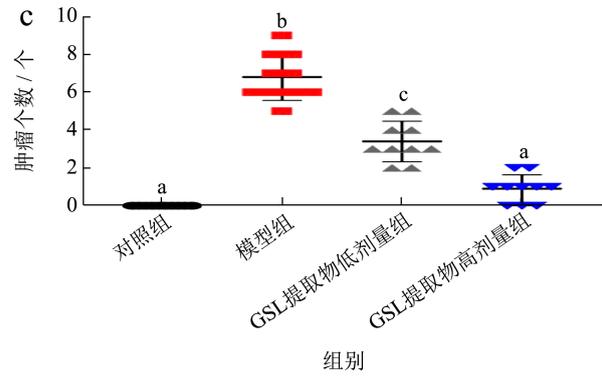
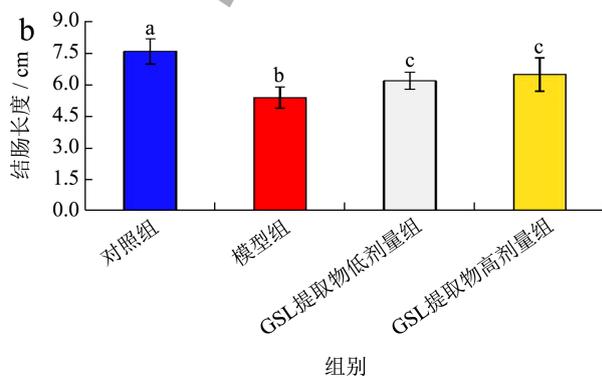
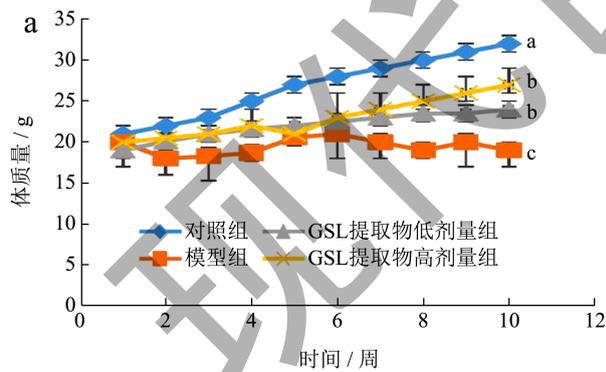


图 1 芥菜 GSL 提取物对小鼠体质量、肿瘤个数及结肠组织的影响

Fig.1 Effects of leaf mustard glucosinolates extract on body weight, tumor number, and colon tissue in mice

注：* 小鼠体质量、结肠长度为平均值， $n=10$ 。不同的平均值经 LSD 检验，不同的字母 a-c 表示数据具有统计学意义上的显著差异性 ($P < 0.05$)。

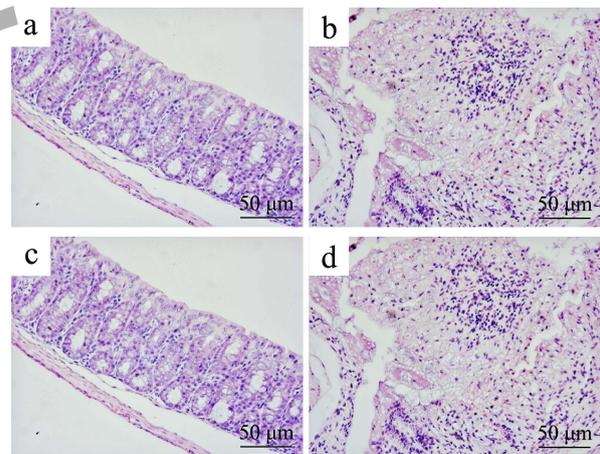


图 2 结肠组织 HE 染色形态学观察 (50 \times)

Fig.2 Morphological observation of colon tissue stained by HE staining (50 \times)

注：a 为正常组，b 为模型组，c 为 GSL 提取物低剂量组，d 为 GSL 提取物高剂量组。

芥菜 GSL 提取物对 Balb/c 小鼠体征影响如图 1a、1b、1d 所示，于第 10 周，与模型组比较，对照组小鼠体质量增加了 68.42%，结肠长度增加了 40.74% ($P < 0.05$)，与模型组比较，芥菜 GSL

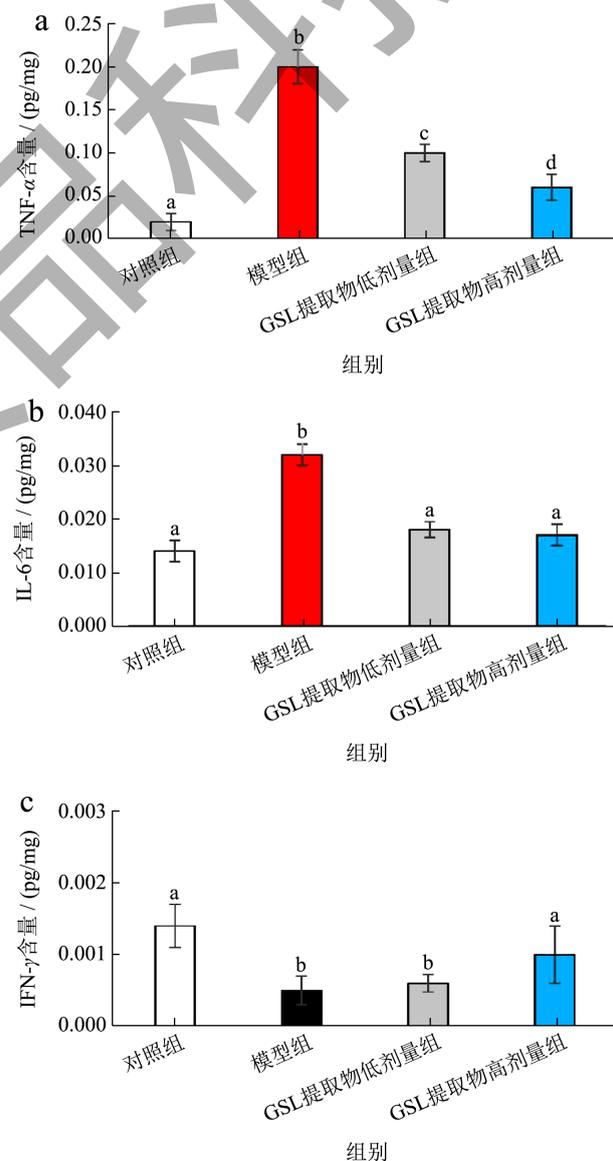
提取物高剂量组小鼠体质量增加了 42.11%，结肠长度增加了 20.37% ($P < 0.05$)；与模型组比较，芥菜 GSL 提取物处理组结肠癌小鼠的肿瘤个数显著减少 ($P < 0.05$) (见图 1c)。表明 AOM 联合 DSS 诱导 Balb/c 小鼠结肠癌后，严重影响小鼠的正常生长，而芥菜 GSL 提取物处理组均能降低结肠癌小鼠体质量降低和结肠长度缩短的程度，且呈现量效正向关系；如图 2 所示，除对照组外，各组小鼠都观察到炎性细胞侵袭。模型组表现出结肠黏膜上皮细胞的变性、坏死和剥落，以及严重的炎症细胞侵袭和异常结构。低剂量组的小鼠结肠黏膜呈现轻微的炎症，黏膜固有层有少量炎症细胞侵袭；而高剂量组的小鼠结肠黏膜保持较好的形态，未观察到炎症细胞侵袭。表明芥菜 GSL 提取物对结肠癌小鼠结肠炎症有一定的康复效果，且芥菜 GSL 提取物高剂量组的效果更好。结肠癌与结肠炎之间存在密切联系，长期的炎症可增加结肠癌风险^[13,14]。以上研究结果显示，芥菜 GSL 提取物可能通过减轻炎症进而降低结肠癌风险。

2.2 芥菜GSL提取物对结肠癌小鼠的炎症因子水平的影响

研究显示，TNF- α 能激活免疫细胞，在肠炎和结肠癌进程中促进炎症并可能促使肿瘤通过影响细胞凋亡或生长形成^[13]。IL-6 在结肠炎和结肠癌中，水平通常会升高，这被认为可能增加疾病的严重程度。此外，IL-6 还可能通过增加细胞生长和抑制细胞凋亡，从而促进肿瘤的形成和发展^[14]。IL-17 是由 T 细胞分泌的一种细胞因子，对于肠炎和结肠癌的发病机制起着关键的作用。研究显示，IL-17 可以增强免疫反应，进一步增加炎症。此外，IL-17 还可以刺激细胞的增殖和存活，这可能会促进肿瘤的形成和发展^[15]。IFN- γ 是一种重要的抗病毒和免疫调节因子。在肠炎和结肠癌中，IFN- γ 通常发挥着抑制作用。IFN- γ 可以刺激免疫细胞，增加抗肿瘤的免疫反应^[16]。

各组小鼠结肠组织中炎症因子的检测结果如图 3 所示，与模型组比较，对照组中小鼠结肠组织 IL-6、TNF- α 和 IL-17 表达水平分别降低了 56.25%、90.13%、40.35% ($P < 0.05$)，IFN- γ 表达水平升高了 183.12% ($P < 0.05$)；与模型组比较，芥菜 GSL 提取物高剂量组结肠组织 IL-6、TNF- α 和 IL-17 表达水平分别降低了 46.88%、70.22%、20.43%，

IFN- γ 表达水平升高了 98.55% ($P < 0.05$)；与模型组比较，芥菜 GSL 提取物低剂量组中的上述指标均出现明显逆转趋势，但部分未达显著性差异。杨晓丽等^[17]研究了辣木籽蛋白酶解物改善小鼠肠道黏膜炎的作用，结果显示，与模型组比较，提取物组小肠组织中 IL-6 和 TNF- α 含量分别降低 11.23% 和 5.17%，本研究芥菜 GSL 提取物高剂量组数据分别增大了 35.65% 和 65.05%；He 等^[18]研究了鹿皮多糖的抗结肠癌活性，与模型组比较，鹿皮多糖能有效降低结肠组织中 TNF- α 、IL-6、IL-17 水平，与本研究中炎症因子的变化趋势一致，以上结果说明芥菜 GSL 提取物能在一定程度上调整炎症因子的分泌，继而改善结肠黏膜组织的损伤。



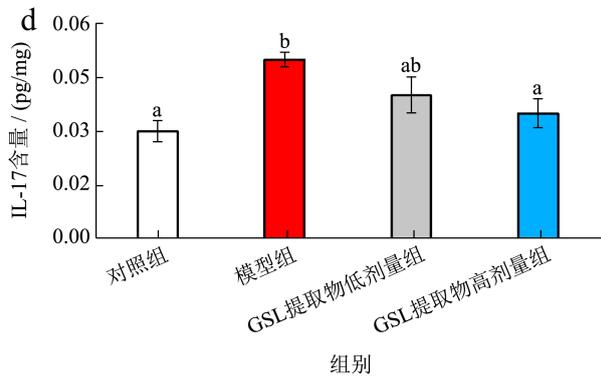


图3 各组小鼠结肠组织中炎症因子的含量

Fig.3 Inflammatory factors in colon tissues of mice in each group

注：不同的平均值经LSD检验，不同的字母a~c表示数据具有统计学意义上的显著差异性 ($P < 0.05$)。下同。

2.3 小鼠结肠组织中NF- κ B p65/COX-2、Wnt/JNK的mRNA和蛋白的表达情况

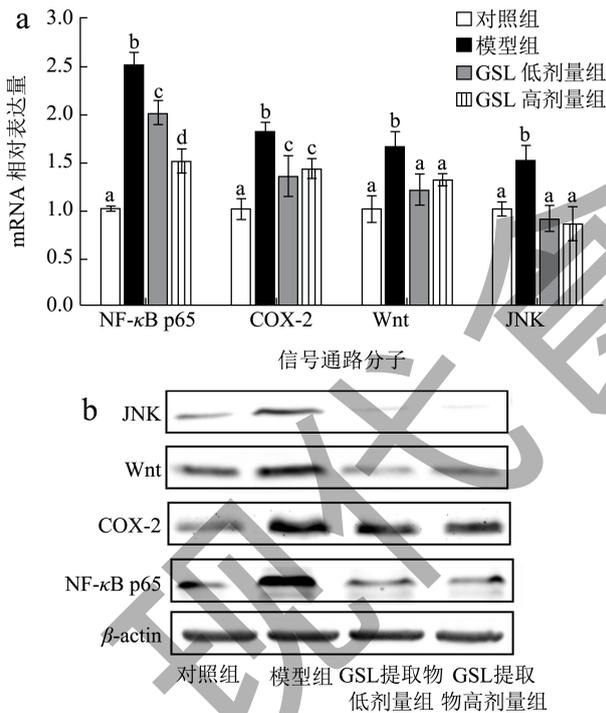


图4 各组小鼠结肠组织中Wnt、JNK、NF- κ B p65、COX-2的mRNA和蛋白表达

Fig.4 Wnt, JNK, NF- κ B p65, COX-2 mRNA and protein expression in colon tissues of mice in each group

NF- κ B p65/COX-2 通路在结肠炎中发挥关键作用。NF- κ B 是激发炎症因子产生的主要调控因子之一，而 COX-2 的产物 PGE2 也是重要的炎症介质。因此，这两者的过度活化可导致持续性炎症反应，进而引起结肠炎。长期结肠炎是导致结肠癌的关键因素，NF- κ B p65/COX-2 路径不仅通过促炎

作用推动肿瘤生成，还通过影响细胞增长与存活基因表达加速癌症进展，对结肠癌形成和发展至关重要^[19]。同样，Wnt 和 JNK 通路在炎症和癌症进程中扮演重要角色，在结肠炎和结肠癌中 Wnt 和 JNK 的激活可能会加重炎症反应，并促进肿瘤的发生和发展^[20]。

如图4、5所示，与模型组比较，对照组小鼠结肠组织NF- κ B p65、COX-2、Wnt 和 JNK 的 mRNA 的表达分别降低了 60%、44.44%、39.39%、33.33% ($P < 0.05$)，芥菜 GSL 提取物低剂量组小鼠结肠组织NF- κ B p65、COX-2、Wnt 和 JNK 的 mRNA 的表达分别降低了 20%、25%、27.27%、40% ($P < 0.05$)，芥菜 GSL 提取物高剂量组小鼠结肠组织NF- κ B p65、COX-2、Wnt 和 JNK 的 mRNA 的表达分别降低了 40%、21.11%、21.21%、43.33% ($P < 0.05$)。与模型组比较，对照组小鼠结肠组织NF- κ B p65、COX-2、Wnt 和 JNK 的蛋白表达分别降低了 66.53%、56.58%、41.62%、65.49% ($P < 0.05$)，芥菜 GSL 提取物低剂量组小鼠结肠组织NF- κ B p65、COX-2、Wnt 和 JNK 的蛋白表达分别降低了 59.79%、21.27%、71.23%、94.38% ($P < 0.05$)，芥菜 GSL 提取物高剂量组小鼠结肠组织NF- κ B p65、COX-2、Wnt 和 JNK 的蛋白表达分别降低了 60.91%、15.57%、63.31%、96.58% ($P < 0.05$)。

综上，模型组小鼠结肠组织NF- κ B p65、COX-2、Wnt 和 JNK 的 mRNA 和蛋白均出现过表达，芥菜 GSL 提取物对NF- κ B p65、COX-2、Wnt 和 JNK 的 mRNA 和蛋白具有明显回调作用 ($P < 0.05$)，这些结果表明，芥菜 GSL 提取物可以抑制NF- κ B p65/COX-2 和 Wnt/JNK 通路。这一发现与相关报道中冬凌草甲素通过阻断NF- κ B p65/COX-2^[21]和 Wnt/JNK^[22]通路抑制结肠癌细胞增殖的结果相吻合。

结合本文2.2中结果进一步分析表明，芥菜 GSL 提取物不仅调节了NF- κ B p65/COX-2 和 Wnt/JNK 通路，而且还调节了与炎症反应紧密相关的IL-6、IL-17、IFN- γ 和 TNF- α 等因子的表达。这些炎症因子的表达受到NF- κ B 等转录因子的调节，其中IL-17可以诱导COX-2、IL-6等炎症因子的表达，而TNF- α 和IFN- γ 则能激活或抑制NF- κ B 信号通路。此外，Wnt 和 JNK 通路的激活也可能间接或直接影响NF- κ B 的活性^[23]。以上表明，芥菜 GSL 提取物不仅通过抑制NF- κ B p65/COX-2 和 Wnt/JNK 通路的活性来调控结肠癌，还能通过影响与这些通路相关的炎症因子来发挥作用。

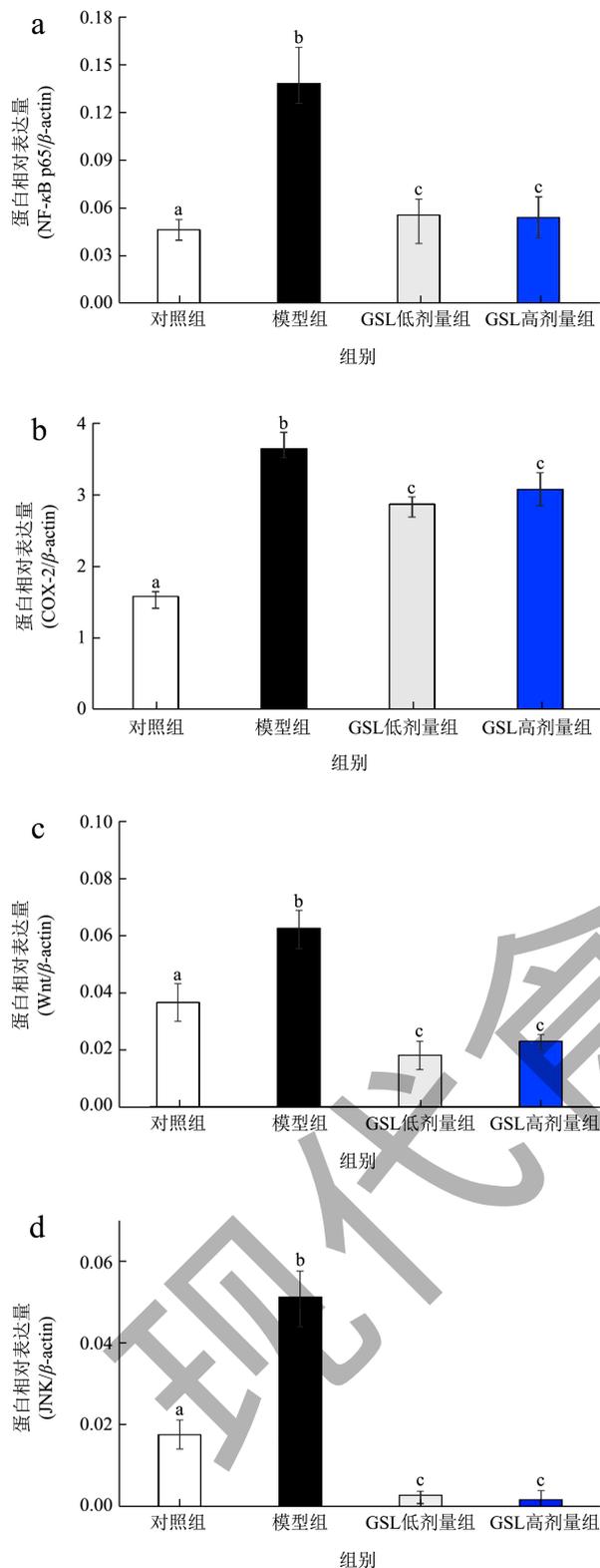


图 5 各组小鼠结肠组织中 Wnt、JNK、NF-κB p65、COX-2 的蛋白/β-actin 的相对表达

Fig.5 Relative expression of Wnt, JNK, NF-κB p65, COX-2 proteins/β-actin in colon tissues of different groups of mice

注：不同的平均值经 LSD 检验，不同的字母 a-c 表示数据具有统计学意义上的显著差异性 ($P < 0.05$)。

2.4 芥菜GSL提取物对结肠癌小鼠肠道中菌群多样性的影响

结肠癌和结肠炎小鼠肠道中的菌群变化是一个非常重要的研究领域。通常，健康的肠道微生物群落（菌群）与宿主维持一种相互有益的关系，而菌群失调与结肠癌和结肠炎等疾病密切相关。因此，本研究通过对 16S rRNA 基因的 V3-V4 可变区进行高通量测序，分析了芥菜 GSL 提取物对肠道微生物区系组成的影响。如图 6、7 所示，在属水平上，不同类群间的群落结构存在明显差异，对照组中拟杆菌 (*Bacteroides*)、图里菌属 (*Turicibacter*)、瘤胃球菌科 UCG-014 (*Ruminococcaceae UCG-014*)、瘤胃梭菌_5 (*Ruminiclostridium_5*)、阿克曼氏菌属 (*Akkermansia*)、无等级分类_梭菌目 vadinBB60 群 (*norank_f_Clostridiales_vadinBB60_group*)、普雷沃氏菌科 UCG-001 (*Prevotellaceae UCG-001*)、布劳氏菌属 (*Blautia*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 的菌群丰度显著高于模型组 ($P < 0.05$)，而在芥菜 GSL 提取物组中又得到了回调。

关于芥菜及其提取成分对肠道菌群影响的研究未见报道，Xu 等^[24]研究了花椰菜 GSL 提取物粉对高脂饲料喂养小鼠的脂质代谢和肠道菌群的影响，花椰菜 GSL 提取物粉干预后，*Bacteroidetes* 的丰度增加，与本研究中芥菜 GSL 提取物干预后 *Bacteroidetes* 的增长趋势一致，而花椰菜 GSL 提取物中和芥菜 GSL 提取物中都测出 2-丙烯基 GSL、4-甲基硫代丁基 GSL、3-丁烯基 GSL 等 GSL 成分；Verma 等^[25]研究印度炎症性肠病患者的肠道菌群发现，患者的 *Bifidobacterium* 数量与健康对照组相比显著下降，本研究模型组中，*Bifidobacterium* 和 *Akkermansia* 显著低于对照组，而在 GSL 高剂量组中得到显著回调 ($P < 0.05$)，这与本研究中 *Bifidobacterium* 的变化趋势一致。

Bacteroides 可以通过生产短链脂肪酸丁酸，丁酸进入宿主细胞后，调节炎症因子如 TNF-α 和 IL-6 等的生成，继而直接干预 NF-κB 路径。*Bifidobacterium*、*Turicibacter*、*Ruminococcaceae UCG-014* 和 *Ruminiclostridium_5* 可能通过调节免疫反应（如 TNF-α 和 IL-6 的表达）和维持肠道屏障功能来影响宿主健康^[26-28]。*Akkermansia* 已被广泛研究其对肠道屏障功能的积极作用，通过维持黏膜层的完整性来调节宿主的免疫反应和炎症反应^[29,30]。肠道菌群通过其代谢产物如丁酸直接与宿主细胞相互作用，或

者通过影响肠道黏膜下的免疫细胞，参与宿主的多种信号通路和分子机制。为深入理解肠道菌群如何通过代谢产物丁酸等介入信号通路和分子机制的具

体途径，需对这些代谢产物进行更进一步的测定与分析，以确认其在肠道菌群与信号通路及分子中的具体作用。

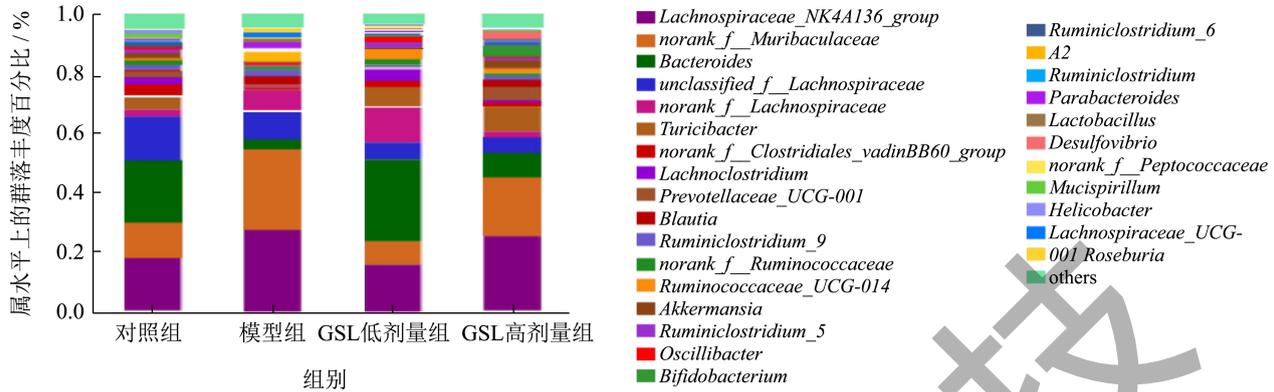


图 6 各组别所有样本在属水平下肠道菌群组成

Fig.6 The intestinal bacteria composition at Genus level of all samples

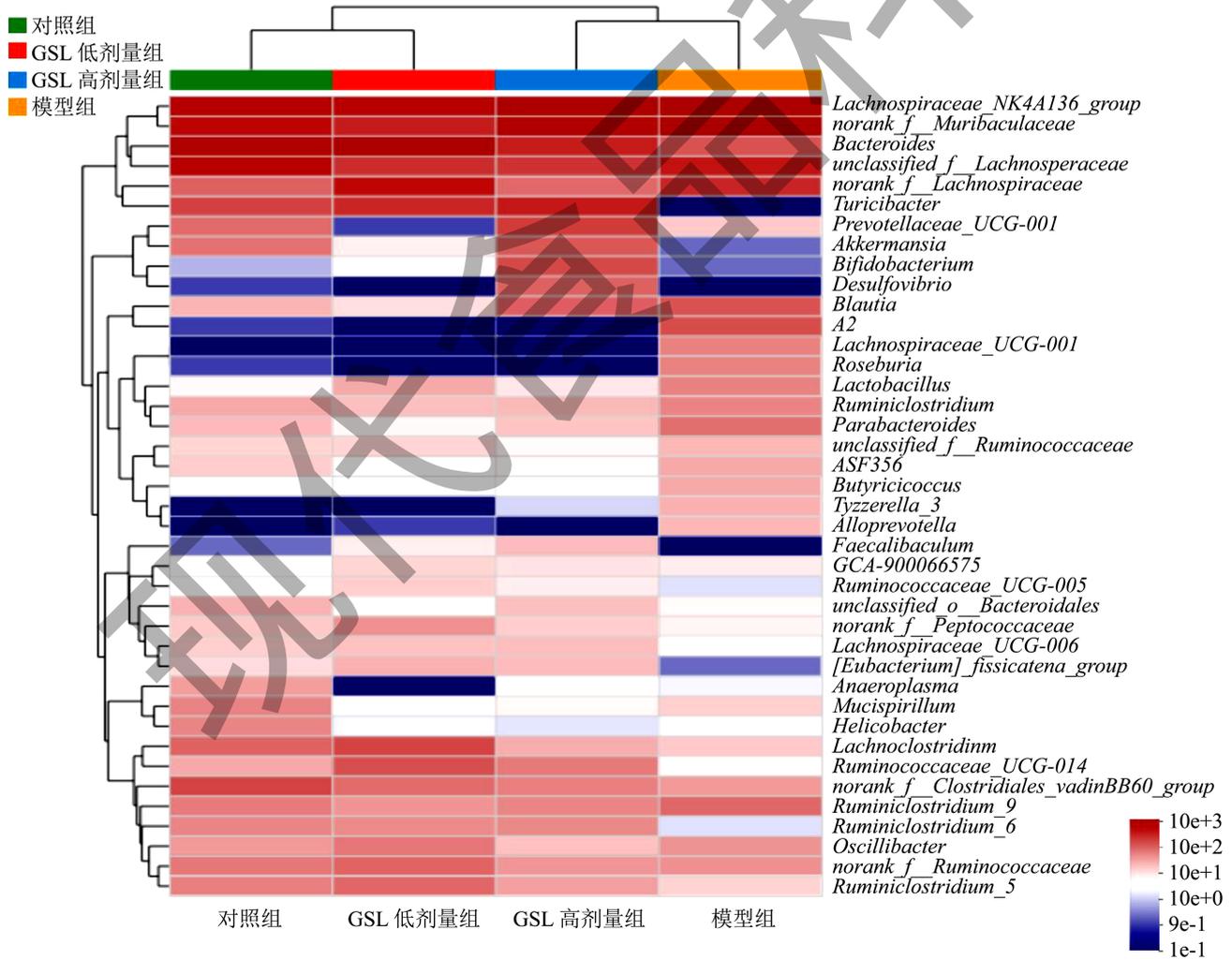


图 7 各组别所有样本在属水平下群落热图

Fig.7 The community heatmap at Genus level of all samples

3 结论

芥菜 GSL 作为一种天然活性成分, 具有潜在的抗结肠癌效果。本研究使用小鼠模型模拟结肠炎性相关的结肠癌, 进一步研究了芥菜 GSL 提取物的抗癌作用机制。实验结果显示, 芥菜 GSL 提取物可以改善结肠癌小鼠的体质量下降、结肠长度缩短和肿瘤数量增加的情况, 说明其具有明显的预防结肠癌的效果, 其作用机制涉及调节炎症因子 (TNF- α 、IL-6、IL-17、IFN- γ) 的水平、调控 NF- κ B p65/COX-2 和 Wnt/JNK 信号通路的表达以及恢复肠道菌群的平衡状态。这些发现为揭示芥菜 GSL 的抗癌机制和开发潜在的治疗方法提供了重要的科学依据。进一步研究包括对芥菜 GSL 进行更深入的分离和纯化, 以明确其活性成分与结构效应关系, 从而优化其抗癌活性。此外, 运用代谢组学和蛋白组学方法, 详细分析芥菜 GSL 提取物对肠道微环境的影响, 特别是其对代谢产物如短链脂肪酸和肠道菌群酶活性的调节作用, 以期进一步揭示芥菜 GSL 与宿主肠道微环境之间的相互作用机制, 为结肠癌的预防和治疗提供更全面的科学依据和新的治疗靶点。

参考文献

- [1] SMART N. Colon cancer care is changing and not before time [J]. *Colorectal Disease*, 2023, 25(3): 351.
- [2] GARRETT W S. The gut microbiota and colon cancer [J]. *Science*, 2019, 364(6446): 1133-1135.
- [3] JIANG L J, CAO Y, DENG Z Y, et al. Evaluation and comparison of physicochemical properties, volatile substances, and microbial communities of leaf mustard (*Brassica juncea* var. *multiceps*) under natural and inoculated fermentation [J]. *Journal of Food Science*, 2023, 88(8): 3255-3273.
- [4] 田艳, 邓放明, 卿志星, 等. 十字花科植物中硫代葡萄糖苷类物质的结构与功能研究进展 [J]. *食品科学*, 2020, 41(1): 292-303.
- [5] OROUJI N, ASL S K, TAGHIPOUR Z, et al. Glucosinolates in cancer prevention and treatment: experimental and clinical evidence [J]. *Medical Oncology*, 2023, 40(12): 344.
- [6] TIAN Y, DENG F M, ZHAO L Y, et al. Characterization of extractable components of fresh and fermented Huarong large-leaf mustard and their inhibitory effects on human colon cells [J]. *Food Bioscience*, 2021, 43: 1-10.
- [7] 王义山, 李洪义, 王雨纯, 等. 金葡素 SEC2 改构蛋白 2M-118 对 AOM-DSS 诱导小鼠结肠癌的干预作用 [J]. *海南热带海洋学院学报*, 2022, 29(5): 111-117.
- [8] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [9] ZHAN T, RINDTORFF N, BOUTROS M. Wnt signaling in cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36(11): 1461-1473.
- [10] CLEVERS H, NUSSE R. Wnt/ β -catenin signaling and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1192-1205.
- [11] HENNIE M J R, RENE H M T M, BJORN W H H, et al. Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer [J]. *BioMed Central Gastroenterology*, 2014, 14(1): 1-6.
- [12] SAUS E, IRAOLA-GUZMÁN S, WILLIS J R, et al. Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential [J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2019, 69: 93-106.
- [13] BALKWILL F. Tumour necrosis factor and cancer [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9(5): 361-371.
- [14] TANIGUCHI K, KARIN M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer [J]. *Seminars in Immunology*, 2014, 26(1): 54-74.
- [15] LEPPKES M, BECKER C, IVANOV I I, et al. ROR γ -expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(1): 257-267.
- [16] SCHRODER K, HERTZOG P J, RAVASI T, et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004, 75(2): 163-189.
- [17] 杨晓丽, 李丽, 杨静娟, 等. 辣木籽蛋白酶解物对小鼠肠道黏膜炎的改善作用 [J]. *现代食品科技*, 2024, 40(3): 1-9.
- [18] HE J W, YANG A H, ZHAO X, et al. Anti-colon cancer activity of water-soluble polysaccharides extracted from *Gloeostereum incarnatum* via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2021, 10(4): 460-470.
- [19] KARIN M, GRETEN F R. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5(10): 749-759.
- [20] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-999.
- [21] 刘娜, 李文强, 高成伟. 冬凌草甲素通过下调 NF- κ B p65/COX-2 表达抑制结肠癌 LoVo 细胞增殖 [J]. *山西医科大学学报*, 2017, 48(3): 251-255.
- [22] 潘琼. 抑制 Wnt/JNK 信号通路在逆转 P-糖蛋白调控的结肠癌多药耐药中的作用 [D]. 郑州: 郑州大学, 2015.

- [23] LAURINDO L F, SANTOS A R D O D, CARVALHO A C A D, et al. Phytochemicals and regulation of NF- κ B in inflammatory bowel diseases: an overview of *in vitro* and *in vivo* effects [J]. *Metabolites*, 2023, 13(1): 96.
- [24] XU X, DAI M, LAO F, et al. Effect of glucoraphanin from broccoli seeds on lipid levels and gut microbiota in high-fat diet-fed mice [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 68: 103858.
- [25] VERMA R, VERMA A K, AHUJA V, et al. Real-time analysis of mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease in India [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(11): 4279-4282.
- [26] LI D, LUO F J, GUO T Y, et al. Targeting NF- κ B pathway by dietary lignans in inflammation: expanding roles of gut microbiota and metabolites [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(22): 5967-5983.
- [27] TURRONI F, PEANO C, PASS D A, et al. Diversity of *bifidobacteria* within the infant gut microbiota [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): 36957.
- [28] LAGKOUVARDOS I, PUKALL R, ABT B, et al. The mouse intestinal bacterial collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota [J]. *Nature Microbiology*, 2016, 1(10): 16131.
- [29] RODRIGUES V F, ELIAS-OLIVEIRA J, PEREIRA Í S, et al. *Akkermansia muciniphila* and gut immune system: a good friendship that attenuates inflammatory bowel disease, obesity, and diabetes [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13(7): 1-6.
- [30] DERRIEN M, BELZER C, DE VOS W M. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 106: 171-181.

现代食品科技