

痛泻要方调节T淋巴细胞亚群改善慢性应激下大肠癌免疫微环境的机制

杨懿¹, 胡艳娥¹, 蒋义芳¹, 陈宁宁¹, 严然^{1,2}, 祝捷^{1,2}, 由凤鸣^{1,2*}

(1. 成都中医药大学附属医院, 代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室, 成都 610075;

2. 成都中医药大学肿瘤研究所, 成都 610072)

[摘要] 目的:探讨痛泻要方对慢性应激下小鼠大肠癌免疫微环境的影响及可能的作用机制。方法:取SPF级BABL/C雄性小鼠40只,随机分成正常组、应激组、痛泻要方组(13.65 g·kg⁻¹)、痛泻要方应激组(13.65 g·kg⁻¹),每组10只。采用慢性束缚应激方法构建应激性小鼠模型,应激7 d后治疗组给予痛泻要方灌胃,在第14天通过强迫游泳实验和悬尾实验检测痛泻要方对应激后小鼠的行为学改变情况,同时对各组小鼠进行大肠癌皮下瘤种植。观察痛泻要方对小鼠体质量、肿瘤体积的影响;末次给药后,收集小鼠血清、瘤体样本。用免疫组化、流式细胞术检测瘤体内T淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺及CD4⁺/CD8⁺)含量变化;用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠外周血中皮质酮(CORT)、血清白细胞介素(IL)-2、 γ 干扰素(IFN- γ)、IL-6和IL-10含量;并用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠核转录因子- κ B(NF- κ B)抑制蛋白(I κ B)激酶 α/β (IKK α/β)、NF- κ B抑制蛋白 α (I κ B α)、NF- κ B p65、磷酸化(p)-NF- κ B p65蛋白表达。结果:与正常组比较,应激组小鼠瘤体体积增大($P<0.05$);CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺数量下降($P<0.05$, $P<0.01$);CD8⁺数量有上升趋势;辅助性T细胞1(Th1)细胞因子IFN- γ 含量降低($P<0.05$);辅助性T细胞2(Th2)细胞因子IL-10含量升高($P<0.05$);CORT含量升高($P<0.05$);p-NF- κ B p65、NF- κ B p65蛋白表达升高,但差异无统计学意义;IKK α/β 蛋白表达升高($P<0.05$);I κ B α 蛋白表达明显下降($P<0.05$)。与正常组比较,痛泻要方组瘤体生长速度下降,但差异无统计学意义;CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺数量显著上升($P<0.01$);CD8⁺数量下降($P<0.05$);Th1细胞因子IL-2、IFN- γ 含量升高($P<0.05$);Th2细胞因子IL-6、IL-10含量降低($P<0.05$);CORT含量降低,但差异无统计学意义;p-NF- κ B p65蛋白表达下降,但差异无统计学意义;NF- κ B p65、IKK α/β 蛋白表达明显下降($P<0.05$);I κ B α 蛋白表达显著升高($P<0.01$)。与应激组比较,痛泻要方应激组瘤体生长速度下降,但差异无统计学意义;CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺数量上升($P<0.01$);CD8⁺数量下降($P<0.05$);Th1细胞因子IL-2、IFN- γ 含量升高($P<0.05$);Th2细胞因子IL-6、IL-10含量降低($P<0.05$);CORT含量降低($P<0.05$);p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、IKK α/β 蛋白表达明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),I κ B α 蛋白表达显著升高($P<0.01$)。结论:痛泻要方可延缓慢性应激下大肠癌生长,有效改善大肠癌免疫微环境的恶化,其作用机制可能与抑制NF- κ B信号通路,调节T淋巴细胞亚群功能,从而抑制促炎因子分泌有关。

[关键词] 大肠癌;慢性应激;免疫微环境;T淋巴细胞亚群;痛泻要方;核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)12-0046-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230122

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221121.1152.003.html>

[网络出版日期] 2022-11-21 20:01:47

Tongxie Yaofang Regulates T Lymphocyte Subsets to Improve Immune Microenvironment of Colorectal Cancer Under Chronic Stress

YANG Yi¹, HU Yane¹, JIANG Yifang¹, CHEN Ningning¹, YAN Ran^{1,2}, ZHU Jie^{1,2}, YOU Fengming^{1,2*}

(1. Traditional Chinese Medicine (TCM) Regulating Metabolic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China;

[收稿日期] 2022-06-08

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82074315);四川省科技厅项目(2021043)

[第一作者] 杨懿,在读硕士,从事中医肿瘤病证治法与方药研究,E-mail:871228103@qq.com

[通信作者] * 由凤鸣,博士生导师,教授,主任医师,从事中医药防治肿瘤病证的基础与临床研究,E-mail: youfengming@cduetcm.edu.cn

2. Cancer Institute, Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

[Abstract] Objective: To explore the effect of Tongxie Yaofang on the immune microenvironment of colorectal cancer in mice under chronic stress and the underlying mechanism. **Method:** A total of 40 male SPF BABL/C mice were randomized into normal group, stress group, Tongxie Yaofang group ($13.65 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and Tongxie Yaofang-stress group ($13.65 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 10 in each group. Chronic restraint stress was induced in mice and administration (*ig*) of Tongxie Yaofang began after 7 days of stress. On the 14th day, forced swim and tail suspension tests were used to examine the behavioral changes of mice after stress and the subcutaneous colorectal tumor was implanted in each group of mice. The effect of this prescription on the body mass and tumor volume of mice was observed. After the last administration, mouse serum and tumor samples were collected. The content of T lymphocytes (CD3^+ , CD4^+ , CD8^+ , and $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$) in tumor was detected by immunohistochemistry and flow cytometry and levels of corticosterone (CORT) in peripheral blood, and interleukin (IL)-2, interferon- γ (IFN- γ), IL-6, and IL-10 in the serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein expression of inhibitor of nuclear factor- κB ($\text{I}\kappa\text{B}$) kinase α/β ($\text{IKK}\alpha/\beta$), nuclear factor- κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) α ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$), $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65, and phosphorylated (p)- $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65 was measured by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the stress group had large tumor volume ($P<0.05$), low content of CD3^+ , CD4^+ , and $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ ($P<0.05$, $P<0.01$), high content of CD8^+ , low content of T helper 1 (Th1)-secreted IFN- γ ($P<0.05$), high content of T helper 2 (Th2)-secreted IL-10 ($P<0.05$) and CORT ($P<0.05$), high protein expression of p- $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65, and $\text{IKK}\alpha/\beta$ ($P<0.05$), and low protein expression of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ($P<0.05$). Compared with the normal group, the Tongxie Yaofang group showed slow tumor growth, high content of CD3^+ , CD4^+ , and $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ ($P<0.01$), low content of CD8^+ ($P<0.05$), high content of Th1-secreted IL-2 and IFN- γ ($P<0.05$), low content of Th2-secreted IL-6 and IL-10 ($P<0.05$), low content of CORT, low protein expression of p- $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65, and $\text{IKK}\alpha/\beta$ ($P<0.05$), and high protein expression of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ($P<0.01$). Tongxie Yaofang-stress group demonstrated slower tumor growth, higher content of CD3^+ , CD4^+ , and $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ ($P<0.01$), smaller content of CD8^+ ($P<0.05$), higher content of IL-2 and IFN- γ ($P<0.05$), lower content of IL-6, IL-10 ($P<0.05$), and CORT ($P<0.05$), lower protein expression of p- $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65, and $\text{IKK}\alpha/\beta$ ($P<0.05$, $P<0.01$), and higher protein expression of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ($P<0.01$) than the stress group. **Conclusion:** Tongxie Yaofang can delay the growth of colorectal cancer under chronic stress and alleviate the deterioration of the immune microenvironment, possibly by inhibiting $\text{NF-}\kappa\text{B}$ signaling pathway, regulating the function of T lymphocyte subsets, and thus suppressing the secretion of pro-inflammatory factors.

[Keywords] colorectal cancer; chronic stress; immune microenvironment; T lymphocyte subsets; Tongxie Yaofang; nuclear factor- κB p65 ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) signaling pathway

越来越多的研究表明慢性应激是大肠癌发生的重要启动因素,与其导致机体促炎细胞因子增加、免疫功能受损和激素水平失衡等有关^[1]。脑-肠轴(BGA)是神经系统和胃肠道之间进行双向信号沟通的调节系统,其调节应激反应的过程涉及神经通路、免疫机制和内分泌机制^[2]。慢性压力刺激使神经-内分泌-免疫系统异常,增强大肠癌细胞的癌基因表达能力^[3]。同时下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)的激活已被证明是慢性应激下引起肿瘤免疫微环境改变的关键环节^[4],他们释放的应激激素不

仅会降低免疫细胞的数量和活性,还会抑制细胞毒性T淋巴细胞(CTL)介导的免疫反应^[5],降低抗肿瘤免疫反应,从而促进大肠癌的发生。

痛泻要方出自《丹溪心法》,是“抑木扶土”代表方,由白术、白芍、陈皮、防风组成,具有疏肝健脾、祛湿止泻之功效,其所治“木郁土虚证”病机递衍与现代医学“脑肠轴”的脑肠互动学说相契合^[6]。研究表明,痛泻要方可修复肠易激综合征(IBS)、溃疡性结肠炎(UC)等肠道疾病免疫平衡及黏膜屏障功能^[7-10]。网络药理学显示,痛泻要方主要活性成分

汉黄芩素、山柰酚、 β -谷甾醇与关键靶点环加氧酶2 (PTGS2)、环加氧酶1 (PTGS1)、雌激素受体基因1 (ESR1)结合可能是其发挥抗结肠癌作用的重要机制之一^[11-12]。由此,从免疫学角度说明了痛泻要方的潜在抗炎抑癌效应。但痛泻要方对慢性应激下大肠癌的效应和机制未见报道,故本研究将重点关注大肠癌相关免疫微环境的复杂性和多样性,通过慢性应激束缚及皮下大肠癌种植,构建应激性大肠癌小鼠模型,探讨痛泻要方对应激性大肠癌小鼠体内T淋巴细胞亚群的调节作用及大肠癌免疫微环境的影响作用和潜在机制,为痛泻要方阻延结肠癌发生进一步提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 选取 SPF 级鼠龄 6~8 周、体质量 (20±2)g 的雄性 BALB/C 小鼠 40 只,购自成都达硕公司,生产合格证号 SCXK(川)2020-030。在成都中医药大学中医内科学动物实验室进行饲养,光照节律 12 h:12 h,常规饲料及饮用水喂饲,实验室环境温度恒定在 20~25 °C,湿度在 50%~55%。本实验由成都中医药大学实验动物伦理委员会审核批准,伦理备案号 2022-15。

1.2 细胞株及细胞培养 CT26(小鼠大肠癌细胞)购自中国科学院上海细胞库,编号 TCM37。将细胞置于完全培养基(90% 1640 培养基+10% 胎牛血清+1% 青-链霉素)的恒温培养箱(37 °C、5% CO₂)中培养。待细胞密度为 80% 后进行消化传代,传至 3 代后,制成 1×10⁴ 个/μL 细胞悬液备用。

1.3 药物及试剂 痛泻要方按《丹溪心法》原文用量转换^[13],方药组成:炒白术 36 g、白芍 24 g、炒陈皮 18 g、防风 12 g,中药颗粒购自四川新绿色药业公司,批号分别为 21070080、21030052、20070178、21100201,按成人与小鼠等效剂量比值换算成含生药 13.65 g·kg⁻¹^[14]。1640 培养基(上海源培生物科技股份有限公司,批号 L210KJ);青-链霉素、胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 15140122、10099141C);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0010S);小鼠皮质酮(CORT)、血清白细胞介素(IL)-2、 γ 干扰素(IFN- γ)、IL-6 和 IL-10 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为 ML037564、ML002295、ML027464、ML002293、ML002285);PAGE 凝胶快速制备试剂盒、蛋白预染 Marker、ECL 化学发光试剂(上海雅酶生物医药科技有限公司,批号分别为 PG113、

WJ103、SQ202);兔抗 CD3、CD4、CD8(德国 Abcam 公司,批号分别为 ab135372、ab183685、ab217344),兔抗核转录因子- κ B(NF- κ B)抑制蛋白(I κ B)激酶 α/β (IKK α/β)、I κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)、NF- κ B p65、磷酸化(p)-NF- κ B p65、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、兔二抗(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 AF1480、AF6393、AF1417、AF2194、AF5204、AF1234)。

1.4 仪器 SVE-6A1 型超净工作台(新加坡 ESCO 公司);ChampGel™ 型化学发光成像分析系统(北京赛智创业科技有限公司);BIOBASE 型酶联免疫分析仪(山东博科生物产业有限公司);CytoFLEX 型流式细胞分析仪(美国贝克曼库尔特有限公司);1X71 型荧光倒置显微镜(日本 Olmipus 公司);371 型恒温恒湿细胞培养箱(美国 Thermo 公司);Trans-blot SD 型转膜仪、Power Pac HV 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药 将 40 只 BALB/C 小鼠适应性喂养 1 周后,随机分组为正常组、应激组、痛泻要方组、痛泻要方应激组。除正常组、痛泻要方组小鼠不予慢性应激束缚,其余两组均以慢性束缚应激方法造模,将小鼠诱导进入不含食物和水的 50 mL 离心管内,其中管内小鼠不能自由活动、转身和过度挤压,每天束缚 8 h,持续束缚 35 d。在慢性束缚后第 7 天,通过小鼠强迫游泳及悬尾实验评价造模是否成功^[15];造模成功后痛泻要方组、痛泻要方应激组小鼠开始予痛泻要方(13.65 g·kg⁻¹)灌胃,正常组、应激组小鼠予生理盐水灌胃;给药体积均为 10 mL·kg⁻¹,每日 1 次,持续 28 d,干预期间根据小鼠体质量调整给药量。在慢性束缚后第 14 天,各组小鼠用 CT26 单细胞悬液进行右腋皮下瘤种植。第 35 天末次给药后,各组小鼠禁食过夜,次日予以解剖,收集小鼠血清及瘤体组织等用于实验后续检测。

2.2 取材 实验结束后,将各组小鼠麻醉后摘除眼球取血,分离血清至 1.5 mL 离心管中,-80 °C 冰箱保存。再从小鼠皮下剥离肿瘤组织,用预冷生理盐水冲洗干净,对半切开后,将一部分肿瘤组织放入冻存管中置液氮内速冻后放入-80 °C 冰箱保存,另一部分瘤块放入 4% 多聚甲醛固定液中固定。

2.3 指标检测

2.3.1 小鼠体质量、瘤体体积和抑瘤率评价 每 7 d 称量小鼠体质量,第 35 天取材后,用游标卡尺记录

皮下移植瘤的长径和短径,计算肿瘤体积(v)及抑瘤率;计算公式 $v=(a \times b^2)/2$,其中 a 为最大表面直径, b 为最小表面直径;肿瘤抑瘤率 $= (1 - \text{用药组平均肿瘤体积} / \text{正常组平均肿瘤体积}) \times 100\%$ 。

2.3.2 行为学检测 ①强迫游泳实验:将小鼠置于充满水至30 cm的高度并保持在25 °C的玻璃缸中,强迫小鼠游泳6 min,并记录最后4 min的不动时间。不动时间被认为是小鼠漂浮在水中而没有挣扎或仅表现出轻微的移动以使其头部保持在水面上的时间。②悬尾实验:将小鼠尾部距末端约2 cm处用胶带固定,使其倒吊于距地面25~60 cm的横杆上,悬挂6 min,最后4 min内记录不动时间。分析时仅有前肢但没有后肢介入的小动作可判断为不动;因惯性产生的摆动可判断为不动。在慢性束缚应激的第1、14、35天检测。

2.3.3 免疫组化检测小鼠瘤体内CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺表达水平 取小鼠瘤体石蜡切片,脱蜡水化后在高温下进行抗原修复,然后在湿盒内进行孵育,滴加阻断内源性过氧化物酶室温孵育10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,加入一抗兔CD3、CD4、CD8(1:200),室温下温育1 h,PBS洗涤后将切片与二抗(1:1 000)温育20 min,用DAB溶液显色,PBS冲洗,苏木素复染后再加盐酸乙醇脱水分化,用中性树脂胶封片,光学显微镜观察。

2.3.4 流式细胞术检测小鼠瘤体内CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺表达水平 取小鼠肿瘤组织检测,将瘤体研磨至匀浆,制备成单细胞悬液,根据试剂盒说明书进行染色,使用流式细胞仪检测目的基因荧光值。

2.3.5 ELISA检测血清CORT、IL-2、IFN- γ 、IL-6和IL-10含量 各组小鼠予眼球取血后室温凝固后,收

集上清;按照试剂盒说明书操作,先加入稀释后的待测样品,再加入酶标试剂,封板后置37 °C温育1 h,去液洗涤后加入显色剂避光显色15 min,用酶标仪测吸光度 A 。

2.3.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测IKK、I κ B α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65蛋白表达 取各组小鼠瘤体组织加入RIPA裂解液打碎研磨,BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,用PAGE凝胶快速制备试剂盒配置分离胶和浓缩胶,每孔上样10 μ L先以80 V电泳,待蛋白进入分离胶后调电压至120 V,接近凝胶底部时停止电泳。然后以恒流250 mA运行90 min,将目标蛋白转移至PVDF膜。取膜,放入脱脂牛奶中封闭30 min,分别放入一抗兔IKK、I κ B α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、GAPDH(1:1 000),4 °C孵育过夜。次日用TBST冲洗,放入二抗(1:5 000)中室温孵育2 h,洗膜,全自动化学发光图像分析系统显影,分析目标条带灰度值。

2.3.7 统计学方法 应用SPSS 22.0版本进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较采用单因素方差分析,组间比较采用最小显著性差异法(LSD)检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠体质量变化的影响 慢性束缚应激造模前,正常组与造模各组小鼠体质量无明显变化,差异无统计学意义;在第7天,与正常组比较,应激组和痛泻要方应激组小鼠体质量显著减轻($P < 0.01$)。在第35天,与正常组比较,应激组体质量有所下降,痛泻要方组体质量有所增加,但差异无统计学意义;与应激组比较,痛泻要方应激组体质量明显增加($P < 0.05$)。见表1。

表1 痛泻要方对小鼠体质量变化的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Tongxie Yaofang on weight change of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 体质量/g | | | | | |
|---------|-------------------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------------|
| | | 第1天 | 第7天 | 第14天 | 第21天 | 第28天 | 第35天 |
| 正常组 | | 24.55 \pm 0.35 | 24.92 \pm 0.51 | 25.17 \pm 0.64 | 25.80 \pm 1.05 | 25.15 \pm 0.78 | 25.05 \pm 0.74 |
| 应激组 | | 24.13 \pm 1.14 | 22.23 \pm 0.52 ²⁾ | 23.80 \pm 1.62 | 24.09 \pm 0.88 | 23.65 \pm 1.10 | 23.33 \pm 1.23 |
| 痛泻要方组 | 13.65 | 24.55 \pm 0.74 | 25.15 \pm 1.26 | 25.95 \pm 1.35 | 26.98 \pm 0.68 | 26.72 \pm 1.02 | 27.13 \pm 0.66 |
| 痛泻要方应激组 | 13.65 | 24.88 \pm 0.89 | 22.62 \pm 0.58 ²⁾ | 24.59 \pm 0.64 | 25.24 \pm 0.60 | 25.55 \pm 1.12 | 25.85 \pm 1.04 ³⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与应激组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2-表8同)

3.2 对小鼠肿瘤体积和抑瘤率的影响 与正常组比较,应激组瘤体体积明显增大,瘤重明显增加($P < 0.05$);痛泻要方组的瘤体体积减小,但差异无统计学意义。与应激组比较,痛泻要方应激组瘤体体积

减小,但差异无统计学意义。见表2。

3.3 行为学检测结果

3.3.1 对小鼠强迫游泳实验漂浮时间的影响 与正常组比较,慢性应激造模时间越长,应激组小鼠

表2 痛泻要方对小鼠瘤体质量和抑瘤率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Tongxie Yaofang on tumor weight and tumor inhibition rate in mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 肿瘤体积/mm ³ | 瘤重/g | 抑瘤率/% |
|---------|-----------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 正常组 | | 833.36±106.54 | 0.95±0.13 | 0.00±12.78 |
| 应激组 | | 1 097.73±87.57 ¹⁾ | 1.51±0.26 ¹⁾ | -34.82±14.62 ¹⁾ |
| 痛泻要方组 | 13.65 | 648.87±60.45 | 0.74±0.13 | 21.58±6.86 |
| 痛泻要方应激组 | 13.65 | 868.90±99.04 | 0.99±0.21 | 20.06±11.53 |

不动时间显著增加($P<0.01$);痛泻要方组小鼠不动时间减小,但差异无统计学意义。与应激组比较,痛泻要方给药时间越长,痛泻要方应激组小鼠不动时间明显减小($P<0.05$)。见表3。

表3 痛泻要方对小鼠强迫游泳实验不动时间的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Tongxie Yaofang on immobility time of forced swimming test in mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 第1天 | 第14天 | 第35天 |
|---------|-----------------------|-------------|----------------------------|----------------------------|
| 正常组 | | 54.97±14.77 | 56.99±8.37 | 57.71±8.03 |
| 应激组 | | 56.14±8.76 | 117.55±18.10 ¹⁾ | 137.76±16.69 ²⁾ |
| 痛泻要方组 | 13.65 | 57.36±7.02 | 56.09±10.02 | 55.70±12.73 |
| 痛泻要方应激组 | 13.65 | 54.65±12.75 | 92.67±21.44 | 98.96±9.46 ³⁾ |

3.3.2 对小鼠悬尾实验不动时间的影响 与正常组比较,慢性应激造模时间越长,应激组小鼠悬尾不动时间显著增加($P<0.01$);痛泻要方组小鼠不动时间减小,但差异无统计学意义。与应激组比较,痛泻要方给药时间越长,痛泻要方应激组小鼠不动时间明显减小($P<0.05$)。见表4。

表4 痛泻要方对小鼠悬尾实验不动时间的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Tongxie Yaofang on immobility time of tail suspension test in mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 第1天 | 第14天 | 第35天 |
|---------|-----------------------|-------------|----------------------------|----------------------------|
| 正常组 | | 81.02±12.83 | 80.67±10.34 | 83.56±9.26 |
| 应激组 | | 78.33±15.52 | 161.17±21.22 ²⁾ | 168.16±26.82 ²⁾ |
| 痛泻要方组 | 13.65 | 80.98±9.97 | 77.81±7.03 | 76.82±8.73 |
| 痛泻要方应激组 | 13.65 | 83.00±12.25 | 133.32±17.42 | 113.30±7.59 ³⁾ |

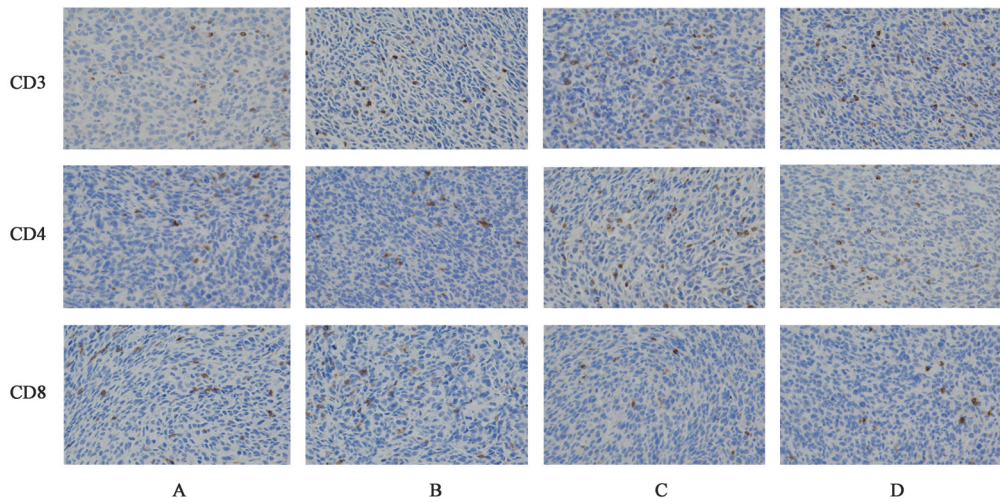
3.4 对小鼠瘤体中CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺表达水平的影响 免疫组化显示,与正常组比较,应激组小鼠瘤体内CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺下降($P<0.05, P<0.01$),CD8⁺阳性细胞数量上升,但差异无统计学意义;痛泻要方组小鼠瘤体内CD3⁺阳性细胞、CD4⁺阳性细胞、CD4⁺/CD8⁺上升($P<0.01$),CD8⁺阳性细胞数量明显下降($P<0.05$);与应激组比较,痛泻要方应激组小鼠瘤体内CD3⁺阳性细胞、CD4⁺阳性细胞、CD4⁺/CD8⁺上升($P<0.01$),CD8⁺阳性细胞数量下降($P<0.05$)。见表5、图1。

表5 痛泻要方对小鼠瘤体中CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺阳性细胞率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of Tongxie Yaofang on ratio of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ positive cells in tumor of mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | CD3 ⁺ /% | CD4 ⁺ /% | CD8 ⁺ /% | CD4 ⁺ /CD8 ⁺ |
|---------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| 正常组 | | 3.91±0.74 | 2.58±0.30 | 3.34±0.10 | 0.78±0.11 |
| 应激组 | | 2.50±0.34 ¹⁾ | 1.13±0.26 ²⁾ | 4.04±0.48 | 0.28±0.05 ²⁾ |
| 痛泻要方组 | 13.65 | 5.96±0.27 ²⁾ | 4.52±0.37 ²⁾ | 2.29±0.12 ¹⁾ | 1.97±0.06 ²⁾ |
| 痛泻要方应激组 | 13.65 | 4.52±0.37 ⁴⁾ | 3.26±0.20 ⁴⁾ | 2.59±0.20 ³⁾ | 1.26±0.05 ⁴⁾ |

流式细胞结果显示,与正常组比较,应激组小鼠瘤体内CD3⁺阳性细胞数量下降,但差异无统计学意义,CD4⁺阳性细胞、CD4⁺/CD8⁺显著下降($P<0.01$),CD8⁺阳性细胞数量显著上升($P<0.01$);痛泻要方组小鼠瘤体内CD3⁺阳性细胞、CD4⁺阳性细胞、CD4⁺/CD8⁺显著上升($P<0.01$),CD8⁺阳性细胞数量



注:A.正常组;B.应激组;C.痛泻要方组;D.痛泻要方应激组(图2同)

图1 痛泻要方对小鼠瘤体中CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺表达水平的影响(免疫组化,×400)

Fig. 1 Effect of Tongxie Yaofang on expression level of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ in mouse tumor (IHC, ×400)

显著下降($P<0.01$);与应激组比较,痛泻要方应激组小鼠瘤体内CD3⁺阳性细胞、CD4⁺阳性细胞、CD4⁺/CD8⁺明显上升($P<0.05$, $P<0.01$),CD8⁺阳性细胞数量明显下降($P<0.05$)。见表6。

表6 痛泻要方对小鼠瘤体中CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺阳性细胞占比的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 6 Effect of Tongxie Yaofang on percentage of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ positive cells in tumor of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | CD3 ⁺ /% | CD4 ⁺ /% | CD8 ⁺ /% | CD4 ⁺ /CD8 ⁺ |
|---------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| 正常组 | | 1.04±0.16 | 38.18±0.73 | 44.59±0.84 | 0.86±0.03 |
| 应激组 | | 0.77±0.10 | 22.75±0.91 ²⁾ | 56.29±1.36 ²⁾ | 0.40±0.02 ²⁾ |
| 痛泻要方组 | 13.65 | 2.46±0.33 ²⁾ | 54.98±1.98 ²⁾ | 29.84±0.73 ²⁾ | 1.80±0.11 ²⁾ |
| 痛泻要方应激组 | 13.65 | 1.45±0.23 ³⁾ | 49.49±2.08 ⁴⁾ | 33.17±2.46 ⁴⁾ | 1.50±0.10 ⁴⁾ |

3.5 对小鼠血清内CORT、IL-2、IFN- γ 、IL-6和IL-10含量的影响 与正常组比较,应激组小鼠血清内Th1细胞因子IL-2含量降低,差异无统计学意义;IFN- γ 含量降低($P<0.05$);Th2细胞因子IL-6含量升高,差异无统计学意义;IL-10、CORT含量明显升高($P<0.05$)。痛泻要方组小鼠血清Th1细胞因子IL-2

和IFN- γ 含量升高($P<0.05$);Th2细胞因子IL-6、IL-10含量降低($P<0.05$);CORT含量降低,差异无统计学意义。与应激组比较,痛泻要方应激组小鼠血清内Th1细胞因子IL-2和IFN- γ 含量升高($P<0.05$);Th2细胞因子IL-6、IL-10含量降低($P<0.05$),CORT含量明显降低($P<0.05$)。见表7。

表7 痛泻要方对小鼠血清内CORT、IL-2、IFN- γ 、IL-6和IL-10含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 7 Effect of Tongxie Yaofang on CORT, IL-2, IFN- γ , IL-6 and IL-10 content of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | CORT | IL-2 | IFN- γ | IL-6 | IL-10 |
|---------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 正常组 | | 38.54±1.44 | 51.02±0.51 | 144.14±0.80 | 19.06±1.08 | 66.01±1.10 |
| 应激组 | | 43.01±0.92 ¹⁾ | 49.18±1.17 | 137.13±1.11 ¹⁾ | 20.90±0.72 | 68.02±0.44 ¹⁾ |
| 痛泻要方组 | 13.65 | 37.14±1.01 | 53.99±0.23 ¹⁾ | 150.17±2.28 ¹⁾ | 16.03±0.64 ¹⁾ | 64.13±0.31 ¹⁾ |
| 痛泻要方应激组 | 13.65 | 39.12±1.13 ³⁾ | 52.24±0.73 ³⁾ | 143.61±2.31 ³⁾ | 17.17±1.03 ³⁾ | 66.55±0.56 ³⁾ |

3.6 对各组小鼠瘤体机制通路的影响 与正常组比较,应激组小鼠瘤体内p-NF- κ B p65、NF- κ B p65蛋白表达升高,但差异无统计学意义;IKK α / β 蛋白表达明显升高($P<0.05$);I κ B α 蛋白明显表达下降($P<0.05$);痛泻要方组小鼠瘤体内p-NF- κ B p65蛋

白表达下降,但差异无统计学意义;NF- κ B p65、IKK α / β 蛋白表达明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$);I κ B α 蛋白表达显著升高($P<0.01$)。与应激组比较,痛泻要方应激组小鼠瘤体内p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、IKK α / β 蛋白表达明显下降($P<0.05$, $P<$

0.01); IκBα 蛋白表达显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 8、图 2。

表 8 痛泻要方对小鼠瘤体组织 NF-κB 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of diarrhea prescription on expression of NF-κB-related proteins in mouse tumor tissues ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | p-NF-κB/GAPDH | NF-κB/GAPDH | IKKα/β/GAPDH | IκBα/GAPDH |
|---------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 正常组 | | 0.96±0.26 | 0.67±0.14 | 1.19±0.13 | 0.93±0.20 |
| 应激组 | | 1.06±0.26 | 0.71±0.12 | 1.80±0.29 ¹⁾ | 0.41±0.04 ¹⁾ |
| 痛泻要方组 | 13.65 | 0.86±0.25 | 0.29±0.04 ¹⁾ | 0.66±0.16 ¹⁾ | 1.63±0.17 ²⁾ |
| 痛泻要方应激组 | 13.65 | 0.49±0.07 ³⁾ | 0.30±0.06 ³⁾ | 0.62±0.12 ⁴⁾ | 1.12±0.18 ⁴⁾ |

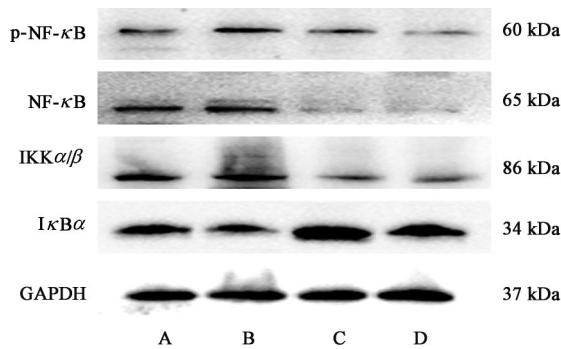


图 2 小鼠瘤体中 IKKα/β、IκBα、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of IKKα/β, IκBα, NF-κB p65, and p-NF-κB p65 in mouse tumors

4 讨论

中医学从“形气神一体”整体观的视角认识肿瘤病证,有“形”实邪凝结成瘤有赖于“气”化失常,并由精神心理因素——“神”所引发、推进。研究发现,肠道和大脑之间通过“脑肠轴”存在双向通信,精神压力可激活 HPA 持续释放应激激素,抑制免疫细胞的免疫应答功能,从而促进肿瘤的发展。情志应激属“神失调”能够引起肝气郁滞、肝郁脾虚等木郁土虚之证;而木郁土虚则使“气逆”导致 T 淋巴细胞亚群功能失调、炎性因子分泌异常等的免疫微环境功能紊乱,进而诱发“形变”大肠癌的发生发展。

痛泻要方最早出自《丹溪心法·卷二》,由白术、白芍、陈皮、防风组成,具有补脾揉肝,祛湿止泻之功效,是临床治疗炎症性肠病、肠易激综合征等疾病的代表方剂。方中以白术为君药,燥湿健脾而止泄泻;白芍为臣药,养血柔肝而缓急止痛;君臣相配,可“土中泻木”;陈皮为佐药,理气燥湿,醒脾和胃;防风为佐使药,又为脾经引经之药,辛能散肝,香能舒脾,风能胜湿。四药合用,能补脾胜湿、柔肝理气、痛泻自止。有研究显示,痛泻要方可显著修复肠易激综合征、溃疡性结肠炎等肠道疾病免疫平衡及黏膜屏障功能^[7-10]。现有研究通过对痛泻要方各组成进行化学成分及靶点筛选分析,发现主要包

括柚皮素、芍药苷、黄芩素、欧前胡素等活性成分^[16]。实验证明,芍药苷可通过升高 Caco-2 细胞中 IκBα 的表达,发挥缓解 IBS 症状的作用并且能抑制结肠癌细胞的增殖迁移^[17-18];黄芩素促进了丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)磷酸化激活诱导结肠癌细胞凋亡^[19],还能通过来源于第 3 组固有淋巴细胞(ILC3s)的 IL-22 途径改善肠上皮屏障,从而改善溃疡性结肠炎^[20]。由此看出痛泻要方具有通过改善免疫微环境抵抗炎症及肿瘤发生的潜在机制。

一般情况下,机体处于应激状态的时候,会触发 HPA 释放大量的 CORT,从而促进肠道通透性,改变肠道黏膜免疫稳态并破坏肠道结构,促进大肠癌的发生发展^[21-22]。本研究构建慢性应激大肠癌小鼠模型,证实压力应激促使小鼠肿瘤瘤体明显增大,血清里 CORT 激素表达增高;从痛泻要方的干预结果可见,小鼠肿瘤瘤体减小,血清里 CORT 激素表达明显下降,提示痛泻要方可改善慢性应激状态,下调 CORT 的表达,从而抑制大肠癌生长。

T 淋巴细胞亚群是反映机体免疫功能的重要指标,CD3⁺代表整体免疫水平,CD4⁺通过释放多种细胞因子而杀伤肿瘤细胞,CD8⁺则具有细胞毒活性,能分泌多种细胞因子杀伤并诱导肿瘤细胞凋亡。而当 CD4⁺/CD8⁺失衡则细胞免疫功能被抑制,监视肿瘤细胞的作用下降或消失,从而引起肿瘤细胞增殖。Th1 和 Th2 是 T 淋巴细胞的功能型亚群,Th1 型细胞分泌 IL-2、IFN-γ 和 TNF-β 等因子,可增强 T 细胞介导的免疫反应。Th2 型细胞分泌 IL-4、IL-6、IL-10 等因子,主要抑制 T 细胞活化,介导体液免疫过程。在正常生理中,机体调节 Th1/Th2 使其维持免疫和体液的平衡状态。诸多研究证实,慢性应激会加剧大肠癌、肺癌、肝癌等多种类型肿瘤 Th1 向 Th2 转化的趋势,Th1 型细胞因子表达下降、Th2 型细胞因子表达上升,即 Th1/Th2 漂移^[23-25]。本研究发现,痛泻要方能上调结肠癌组织内 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺,下调 CD8⁺ 细胞数量;促

进 Th1 细胞分泌 IL-2、IFN- γ ，抑制 Th2 分泌产生 IL-6、IL-10。提示痛泻药方可改善大肠癌微环境中 T 淋巴细胞亚群的免疫功能，逆转 Th1/Th2 漂移，维持免疫和体液的平衡状态。

研究表明，NF- κ B 信号通路及其转录因子在炎症及大肠癌发展中起重要作用^[26-27]。NF- κ B 复合物是 p50 和 p65 (RelA) 的异二聚体，其中 NF- κ B 是机体内重要的核转录因子，p65 是抑制蛋白 I κ B 的结合部位。正常情况下，由于 I κ B α 的结合，NF- κ B 处于失活状态，当受外来信号刺激，IKK 就会被激活，使 I κ B 磷酸化降解，促进 NF- κ B 被活化进入细胞核内。NF- κ B 信号被激活会产生促炎介质，从而导致炎症的发生及免疫细胞的分化。若 NF- κ B 激活失调，则会发生慢性炎症、肿瘤和自身免疫性疾病等。NF- κ B 信号通路对 T 淋巴细胞分化及他们维持自身的外周免疫功能稳定性具有重要性，在 T 细胞中高表达的 I κ B 可以抑制 NF- κ B 激活以降低 T 淋巴细胞分化，减少促炎因子产生^[28-29]。本研究结果显示，在痛泻要方的干预下，肿瘤组织内 p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、IKK α/β 蛋白表达较正常组及应激组下降，而 I κ B α 蛋白表达升高，提示痛泻要方或可通过影响炎症信号通路 NF- κ B 的相关蛋白表达，从而调节 T 淋巴细胞免疫功能的稳定性。

综上所述，本研究证实痛泻要方能够抑制慢性应激下大肠癌小鼠肿瘤的生长，其潜在机制可能与 NF- κ B 信号通路的表达有关，进一步调节 T 淋巴细胞亚群功能，抑制炎症因子分泌，最终阻延大肠癌发生发展。T 淋巴细胞亚群仅只能作为肿瘤免疫微环境中的一个代表，痛泻要方调节大肠癌免疫微环境的作用效应是否同时影响其他免疫细胞，如巨噬细胞、NK 细胞、树突状细胞等。基于此，本课题组将进一步探索其对肿瘤微环境的干预效应和作用机制，以期能为痛泻要方阻延大肠癌的发生发展提供更多的实证依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] LIU X, ZHAO M, SUN X, et al. Autophagic flux unleashes GATA4-NF- κ B axis to promote antioxidant defense-dependent survival of colorectal cancer cells under chronic acidosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, doi: 10.1155/2021/8189485.

[2] DENG Y, ZHOU M, WANG J, et al. Involvement of the microbiota-gut-brain axis in chronic restraint stress: Disturbances of the kynurenine metabolic

pathway in both the gut and brain [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1):1-16.

- [3] PICIOCCHI A, GERMINARIO E A P, GARCIA ETXEBARRIA K, et al. Association of polygenic risk score and bacterial toxins at screening colonoscopy with colorectal cancer progression: A multicenter case-control study [J]. *Toxins (Basel)*, 2021, 16, 13 (8):569.
- [4] ZHANG L, PAN J, CHEN W, et al. Chronic stress-induced immune dysregulation in cancer: Implications for initiation, progression, metastasis, and treatment [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(5):1294-1307.
- [5] QIAO G, CHEN M, MOHAMMADPOUR H, et al. Chronic adrenergic stress contributes to metabolic dysfunction and an exhausted phenotype in T cells in the tumor microenvironment [J]. *Cancer Immunol Res*, 2021, 9(6):651-664.
- [6] 李夏, 王凤云, 吴皓萌, 等. 基于脑-肠互动功能探讨痛泻要方治疗腹泻性肠易激综合征机制的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(20):229-234.
- [7] 王栩芮, 傅文斌, 孙弋淇, 等. 痛泻要方缓解肝郁脾虚证腹泻型肠易激综合征患者内脏高敏的临床疗效 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(9):97-102.
- [8] 王文峰, 司会强, 方妹辉. 四君子汤合痛泻要方对感染后肠易激综合征肝郁脾虚证小鼠肠道免疫及黏膜屏障功能的影响 [J]. *天津中医药*, 2021, 38(11):1449-1455.
- [9] 张旭飞, 罗运凤, 高洁, 等. 痛泻要方对肝郁脾虚型溃疡性结肠炎大鼠脂质代谢及自噬的影响 [J]. *中成药*, 2022, 44(3):739-746.
- [10] 俞媛, 王卿华, 陈媛洁, 等. 痛泻要方对溃疡性结肠炎患者免疫功能及肠道黏膜屏障的调节作用 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2020, 28(11):858-862.
- [11] 闫思超, 潘国风. 基于网络药理学和分子对接分析痛泻要方治疗肠炎相关结直肠癌机制研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2022, 24(7):190-197.
- [12] 杨菱霞, 丁雯雯, 陆洁, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨痛泻要方治疗结直肠癌的作用机制 [J]. *海南医学院学报*, 2021, 27(19):1503-1512.
- [13] 郭军雄, 马丽, 康万荣, 等. 痛泻要方对肝郁脾虚型 D-IBS 大鼠结肠组织 p38 MAPK 信号通路相关蛋白及其靶基因表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(4):1-8.
- [14] 李夏. 基于内质网自噬研究痛泻要方对 IBS-D 肝郁脾虚证的作用机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [15] ZHANG Z, SHAO S, ZHANG Y, et al. Xiaoyaosan slows cancer progression and ameliorates gut dysbiosis

- in mice with chronic restraint stress and colorectal cancer xenografts [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110916.
- [16] 满姗姗, 刘海朝, 王丽, 等. 基于网络药理学痛泻要方对肠易激综合征和抑郁症异病同治作用机制分析[J]. *天津药学*, 2022, 34(3): 13-19.
- [17] 李祥鸿, 徐平湘, 葛贝康, 等. 芍药苷对肠易激综合征的作用及肠上皮细胞屏障功能的影响[J]. *国际药学研究杂志*, 2017, 44(10): 958-964.
- [18] 司晓丽, 韩玉梅, 王家敏, 等. 芍药苷对结肠癌SW480细胞增殖、侵袭、迁移的影响[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2019, 28(2): 127-133.
- [19] ARCINIEGA-MARTÍNEZ I M, RESÉNDIZ ALBOR A A, CÁRDENAS JARAMILLO L M, et al. CD4⁺/IL-4⁺ lymphocytes of the lamina propria and substance P promote colonic protection during acute stress [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(1): 63.
- [20] RUDAK P T, CHOI J, PARKINS K M, et al. Chronic stress physically spares but functionally impairs innate-like invariant T cells [J]. *Cell Rep*, 2021, 35(2): 108979.
- [21] SU M Q, ZHOU Y R, RAO X, et al. Baicalein induces the apoptosis of HCT116 human colon cancer cells via the upregulation of DEPP/Gadd45a and activation of MAPKs [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(2): 750-760.
- [22] LI Y Y, WANG X J, SU Y L, et al. Baicalein ameliorates ulcerative colitis by improving intestinal epithelial barrier via AhR/IL-22 pathway in ILC3s [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(6): 1495-1507.
- [23] SCHARPING N E, MENK A V, MORECI R S, et al. The tumor microenvironment represses T cell mitochondrial biogenesis to drive intratumoral T cell metabolic insufficiency and dysfunction [J]. *Immunity*, 2016, 45(2): 374-388.
- [24] YANG Z, LI Z, GUO Z, et al. Antitumor effect of fluoxetine on chronic stress-promoted lung cancer growth via suppressing kynurenine pathway and enhancing cellular immunity [J]. *Front Pharmacol*, 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.685898.
- [25] TAN S, ZHENG Z, LIU T, et al. Schisandrin B induced ROS-mediated autophagy and Th1/Th2 imbalance via selenoproteins in Hepa1-6 cells [J]. *Front Immunol*, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.857069.
- [26] ZHANG P, PAN Y, SUN J, et al. Aberrant expression of lncRNA CASC2 mediated the cell viability, apoptosis and autophagy of colon cancer cells by sponging miR-19a via NF- κ B signaling pathway [J]. *Int J Exp Pathol*, 2021, 102(3): 163-171.
- [27] KAWAGUCHI M, YAMAMOTO K, KATAOKA H, et al. Protease-activated receptor-2 accelerates intestinal tumor formation through activation of nuclear factor- κ B signaling and tumor angiogenesis in ApcMin⁺ mice [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(4): 1193-1202.
- [28] ZHANG T, MA C, ZHANG Z, et al. NF- κ B signaling in inflammation and cancer [J]. *Med Comm*, 2021, 2(4): 618-653.
- [29] LI Y, WANG H, ZHOU X, et al. Cell intrinsic role of NF- κ B-inducing kinase in regulating T cell-mediated immune and autoimmune responses [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep22115.

[责任编辑 张丰丰]