

基于微生物组学和代谢组学探究乌梅丸调复胆汁酸平衡阻延结肠炎癌转化的机制

李雪珂^{1,2}, 罗斯敏¹, 蹇若凡¹, 王钧冬¹, 由凤鸣^{1,3}, 付西^{1,2*}, 蒋义芳^{1*}

1. 成都中医药大学附属医院 代谢与慢病中医药防治四川省重点实验室, 四川 成都 610075

2. 成都中医药大学 肿瘤学教研室, 四川 成都 610075

3. 成都中医药大学 肿瘤研究所, 四川 成都 610075

摘要: **目的** 运用微生物组学、代谢组学探究乌梅丸延缓结肠炎癌转化的作用机制。**方法** 采用偶氮甲烷 (azoxymethane, AOM) /葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 构建结肠炎癌转化动物模型, 将 32 只 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组和乌梅丸低、高剂量 (11.18、22.36 g/kg) 组。通过肠道内窥镜观察、大体标本评估和苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色评价结肠肿瘤进展与组织病理学变化; ELISA 检测血清中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 以及血清与粪便中总胆汁酸 (total bile acids, TBA)、胆酸 (cholic acid, CA)、脱氧胆酸 (deoxycholic acid, DCA)、石胆酸 (lithocholic acid, LCA) 水平; 16S rRNA 基因测序技术检测肠道微生物多样性及物种丰度; 非靶向代谢组学技术评估代谢物丰度; qRT-PCR 法验证裂解梭菌 (*Clostridium scindens*, *C. scindens*)、海氏梭菌 (*Clostridium hylemonae*, *C. hylemonae*)、洪氏梭菌 (*Clostridium hiranonis*, *C. hiranonis*) 以及辅酶 A 转移酶编码基因 *BaiF* 表达。**结果** 与模型组比较, 乌梅丸干预能够阻延结肠炎癌转化, 且乌梅丸低剂量的疗效更佳。低剂量的乌梅丸可显著减少结肠肿瘤数量 ($P < 0.001$), 降低结肠炎症评分与肿瘤病理学评分 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低血清 IL-6、TNF- α 水平 ($P < 0.01$ 、 0.001)。微生物组学结果显示, 乌梅丸可改善肠道菌群结构, 减少梭菌属 *Clostridium* 等机会致病菌丰度, 同时增加乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、罗氏菌属 *Roseburia* 等益生菌丰度。非靶向代谢组学结果表明, 乌梅丸低剂量组与模型组之间存在 82 种差异代谢物, 显著富集于次级胆汁酸代谢通路。乌梅丸可显著降低血清及粪便中 TBA、CA 及 DCA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。qRT-PCR 结果进一步证实乌梅丸可抑制 *C. scindens* 和 *C. hylemonae* 等参与 DCA 合成的细菌 ($P < 0.05$), 并导致 *BaiF* 基因表达水平降低 ($P < 0.001$)。**结论** 乌梅丸可通过调复肠道菌群介导的胆汁酸稳态, 降低 *C. scindens* 等细菌丰度及其脱羧基化功能, 减少 DCA 的生成, 从而缓解结肠炎症并延缓炎癌转化进程。

关键词: 结肠癌; 乌梅丸; 胆汁酸; 肠道菌群; 裂解梭菌 *Clostridium scindens*; 海氏梭菌 *Clostridium hylemonae*; 盐酸黄柏碱; 盐酸黄连碱; 盐酸小檗碱

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)10-3848-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.10.015

Mechanism of Wumei Pill in delaying delays colitis-to-cancer transition and regulating bile acid balance based on microbiomics and metabolomics

LI Xueke^{1,2}, LUO Simin¹, JIAN Ruofan¹, WANG Jundong¹, YOU Fengming^{1,3}, FU Xi^{1,2}, JIANG Yifang¹

1. TCM Prevention and Treatment of Metabolic and Chronic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610075, China

2. Oncology Teaching and Research Department, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

3. Cancer Institute, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Wumei Pill (乌梅丸) in delaying the transformation of colitis cancer using microbiome and metabolomics. **Methods** A colitis cancer transformation animal model was constructed using azoxymethane

收稿日期: 2025-12-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82505494); 委校联合创新基金项目 (WXLH202403144)

作者简介: 李雪珂, 博士, 助理研究员, 主要从事中西医结合防治结肠癌的基础研究。E-mail: cathylixk@whu.edu.cn

*通信作者: 付西, 博士, 讲师, 主要从事中医药防治肿瘤病证的基础研究。E-mail: fuxi884853@163.com

蒋义芳, 博士, 主治医师, 主要从事中医药防治肿瘤病证的基础与临床研究。E-mail: 361639144@qq.com

(AOM)/dextran sulfate sodium (DSS). A total of 32 C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group, and Wumei Pill low-, high-dose (11.18, 22.36 g/kg) groups. Colonic tumor progression and histopathological changes were evaluated by intestinal endoscopic observation, macroscopic specimen assessment and hematoxylin-eosin (HE) staining. Levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum, and levels of total bile acids (TBA), cholic acid (CA), deoxycholic acid (DCA), lithocholic acid (LCA) in serum and in feces were measured by ELISA. 16S rRNA sequencing technology was used to analyze gut microbial diversity and species abundance. The abundance of metabolites was assessed by non-targeted metabolomics analysis. qRT-PCR was used to verify the expression changes of *Clostridium scindens* (*C. scindens*), *Clostridium hylemonae* (*C. hylemonae*), *Clostridium hiranonis* (*C. hiranonis*) and the coenzyme A transferase encoding gene *BaiF*. **Results** Compared with model group, the intervention of Wumei Pill could delay the transformation of colitis cancer, and the therapeutic effect was better at low dose of Wumei Pill. Low dose Wumei Pill could significantly reduce the number of colon tumors ($P < 0.001$), lower colitis and tumor pathology scores ($P < 0.05, 0.01$), and lower levels of IL-6 and TNF- α in serum ($P < 0.01, 0.001$). The microbiological results showed that Wumei Pill could improve the structure of intestinal microbiota, reduce the abundance of opportunistic pathogenic bacteria such as *Clostridium*, and increase the abundance of probiotics such as *Lactobacillus* and *Roseburia*. The non-targeted metabolomics results showed that there were 82 differential metabolites between Wumei Pill low-dose group and model group, significantly enriched in secondary bile acid metabolism pathway. Wumei Pill could significantly reduce the levels of TBA, CA, and DCA in serum and feces ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). qRT-PCR results further confirmed that Wumei Pill could inhibit bacteria involved in DCA synthesis such as *C. scindens* and *C. hylemonae* ($P < 0.05$), and lead to a decrease in *BaiF* gene expression level ($P < 0.001$). **Conclusion** Wumei Pill could alleviate colitis and delay the progression of inflammatory cancer by modulating the bile acid homeostasis mediated by gut microbiota, reducing the abundance and dehydroxylation function of bacteria such as *C. scindens*, and decreasing the production of DCA.

Key words: colitis cancer; Wumei Pill; bile acid; gut microbiota; *Clostridium scindens*; *Clostridium hylemonae*; phellodendrine chloride; coptisine hydrochloride; berberine hydrochloride

结肠癌是一种常见的恶性肿瘤，其发病率位居全球第3，癌症相关死亡率则位居全球第2^[1]。近年来，我国结肠癌的发病率呈现上升趋势，一个重要原因是肠道慢性炎症患者不断增加^[2]。炎性微环境可通过激活核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、Wnt/ β -catenin^[3-4]等信号通路，促进细胞增殖、分化，加速结肠癌恶性演进。因此，结肠炎癌转化的机制受到研究者的广泛关注。

肠道微生物群与宿主之间的相互作用在结肠炎癌转化中发挥重要作用^[5]。肠道微生物的群落结构与优势物种变化可以影响机体新陈代谢并促进炎症性肠病、结肠炎相关结肠癌 (colitis-associated colorectal cancer, CAC) 等疾病进展^[6]。近年来研究显示，肠道微生物可通过分解产生脂肪酸、胆汁酸及氨基酸等大量代谢产物，影响结肠癌演进过程^[7]。例如，短链脂肪酸 (short-chain fatty acid, SCFAs) 是肠道微生物群产生的主要代谢物之一，包括醋酸、丙酸和丁酸等，能抑制结肠癌细胞生长、诱导细胞凋亡^[8]。次级胆汁酸是肠道微生物产生的另一类重要代谢产物，包括脱氧胆酸 (deoxycholic acid, DCA)，其可通过调节 Wnt/ β -catenin 诱导结肠肿瘤细胞干性、抑制 CD8⁺ T 细胞免疫应答^[9-11]。

乌梅丸出自《伤寒论》，为“平调寒热”经典方

剂，具有酸苦甘辛并用、寒热同调之配伍特点^[12]。临床研究证实，该方在防治结肠炎、结肠癌等消化系统疾病中疗效显著^[13-15]，已被纳入溃疡性结肠炎的中医诊疗指南中^[16]。相关研究表明，乌梅丸不仅可促进肿瘤相关巨噬细胞极化、增加 CD8⁺ T 细胞浸润进而重塑结肠肿瘤免疫微环境^[17-21]，还可调节溃疡性结肠炎动物模型的肠道菌群，降低梭状芽孢杆菌丰度，进而延缓结肠癌进展^[22]。此外，乌梅丸阻延 CAC 动物模型的炎癌转化过程中，还调控了 L-肉碱和 L-棕榈酰肉碱等脂代谢途径^[22-24]。鉴于肠道菌群及其代谢产物在结肠炎癌转化中的关键作用，乌梅丸能否通过调控二者阻延结肠炎癌转化，成为新的研究切入点。因此，本研究拟整合微生物组学与代谢组学方法，明确乌梅丸对结肠炎癌转化的干预效应，并进一步聚焦肠道微生物及其代谢产物，深入探索乌梅丸效应发挥的分子机制，为中医药防治结肠癌提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

32 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠，6~8 周龄，体质量 (20 \pm 2) g，购自斯贝福实验动物科技有限公司，动物生产许可证号 SCXK (京) 2024-0001。动物饲养于成都中医药大学 SPF 级实验动物中心，

使用许可证号 SYXK (川) 2024-0049。饲养环境建立 12 h 的明暗循环, 温度 (23 ± 1) °C, 相对湿度 (50 ± 5) %, 动物自由进食饮水。动物实验经成都中医药大学附属医院动物伦理委员会批准 (批准号 2024DL-015)。

1.2 药材

乌梅 (批号 2508171)、当归 (批号 25050104)、桂枝 (批号 250604-12)、人参 (批号 250629-11)、干姜 (批号 25060104)、制附子 (批号 250522-11)、花椒 (批号 24060101)、细辛 (批号 250825-11)、黄连 (批号 250530-11)、黄柏 (批号 240518-21) 中药饮片均购自成都中医药大学附属医院, 经成都中医药大学附属医院程媛主任中药师分别鉴定为蔷薇科植物梅 *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. 的干燥近成熟果实、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝、五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎、姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎、毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品、芸香科植物花椒 *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. 的干燥成熟果实、马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 的干燥根和根茎、毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎、芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮。

1.3 药品与试剂

偶氮甲烷 (azoxymethane, AOM, 批号 0000329056) 购自美国 Sigma 公司; 葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS, 批号 J0730E) 购自大连美仑生物技术有限公司; 异氟烷 (批号 2025050501) 购自深圳瑞沃德生命科技股份有限公司; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒 (批号 2503003) 购自北京索莱宝科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 检测试剂盒 (批号 E2503102) 购自上海源桔生物科技有限公司; 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 检测试剂盒 (批号 E20250704) 购自上海博研生物科技有限公司; 总胆汁酸 (total bile acids, TBA) 检测试剂盒 (批号 WK0682HZX7875) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; DCA 检测试剂盒 (批号 43173373) 购自武汉科鹿生物科技有限公司; 胆酸 (cholic acid, CA) 检测试剂盒 (批号 202601)、

石胆酸 (lithocholic acid, LCA) 检测试剂盒 (批号 202601) 购自上海梵态生物科技有限公司; 基因组 DNA 提取试剂盒 (批号 B0723C) 购自北京天根生化科技有限公司; qRT-PCR 引物由上海擎科生物科技有限公司合成; SYBR qPCR Super Mix plus (批号 05285501) 购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司; 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水 (批号 25089349) 购自北京兰杰柯科技有限公司; 对照品盐酸黄柏碱 (批号 533719, 质量分数 >99%) 购自上海皓元生物医药科技有限公司; 对照品盐酸小檗碱 (批号 C1416873, 质量分数 >99%)、盐酸黄连碱 (批号 C14178352, 质量分数 >99%) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.4 仪器

Vanquish 超高效液相色谱联用 Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); EC-120 型多功能动物内窥镜 (珠海泰科医疗科技有限公司); TAIJI-IE 型小动物麻醉机 (深圳瑞沃德生命科技股份有限公司); RM2135 型石蜡切片机 (德国 Leica 公司); JY-BMB 型石蜡包埋机 (湖北锦源医疗科技有限公司); SQS-12P 型数字病理扫描仪器 (深圳生强科技有限公司); SC-L1 型组织解离仪 (成都导胜生物技术有限公司); 5404 型高速台式冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); TECAN Infinite E Plex 型多功能酶标检测仪 (瑞士 Tecan 公司); FQD-96A 型实时荧光定量 PCR 分析仪 (杭州博日科技有限公司)。

2 方法

2.1 乌梅丸水煎液的制备

乌梅丸组方与剂量参考《全国中医药行业高等教育十四五规划教材 方剂学 新世纪第 3 版》: 乌梅 30 g, 当归 6 g, 桂枝 6 g, 人参 6 g, 干姜 9 g, 制附子 6 g, 花椒 5 g, 细辛 3 g, 黄连 9 g, 黄柏 6 g。按比例将中药饮片混合并浸泡在 10 倍纯净水中, 煎煮 1 h 后, 滤过; 药渣再加入 8 倍纯净水煎煮 1 h, 滤过; 合并 2 次滤液, 浓缩后冻干, 干燥条件下保存。经检测, 乌梅丸水煎液中盐酸黄柏碱质量分数为 0.37 mg/g (不低于 0.14 mg/g)、盐酸黄连碱质量分数为 1.70 mg/g (不低于 1.6 mg/g)、盐酸小檗碱质量分数为 6.51 mg/g (不低于 6.5 mg/g), 均符合《中国药典》2025 年版一部中乌梅丸含量检测标准。

2.2 动物分组、造模与给药

小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组、模

型组和乌梅丸低、高剂量(11.18、22.36 g/kg, 分别为临床等效剂量的1、2倍)组, 每组8只。采用经典的AOM/DSS方法构建CAC模型^[25-26], 小鼠单次ip AOM(10 mg/kg), 对照组ip等体积的无菌生理盐水; AOM注射1周后, 将饮用水更换为2% DSS溶液, 自由饮用1周。1周后更换为正常无菌水, 自由饮用2周。“DSS溶液饮水1周+无菌水饮水2周”过程重复3个周期。自第2个周期开始, 各给药组ig相应药物(10 mL/kg), 对照组和模型组ig等体积的生理盐水, 1次/d, 连续给药6周。

2.3 肠道内窥镜观察结肠炎症表现及肿瘤生长情况

操作前小鼠禁食1 d, 麻醉后进行灌肠排便。打开小动物内窥镜的摄像系统及光源, 肠道内窥镜前端用75%乙醇消毒2~3次, 无菌石蜡油润滑并

缓慢导入小鼠肛门, 打开小动物呼吸机间断充气, 待肠管充盈后缓慢导入肠镜进行观察。炎症表现一般为黏膜充血、黏膜水肿等, 肿瘤生长情况则以肿瘤数量及相对大小作为初步判断指标。

2.4 HE染色观察结肠组织病理变化

取新鲜结肠组织, 用生理盐水冲洗干净后, 剪成小段, 放入4%多聚甲醛溶液中固定。经脱水透明、浸蜡包埋、切片、脱蜡后进行染色。将切片放入苏木素染液中染色3~8 min, 自来水流水冲洗后, 用1%盐酸乙醇分化15 s, 自来水流水冲洗10 min返蓝。将切片放入0.5%伊红乙醇溶液中染色, 经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后, 滴中性树胶, 盖上盖玻片进行封固。待树胶略干后, 在显微镜下观察各组结肠组织的炎症和肿瘤病理变化, 并请病理学专家进行盲法阅片与病理评分^[27-28], 评分标准见表1。

表1 小鼠结肠HE染色病理评分标准

Table 1 Pathological scoring criteria of HE staining in colon of mice

评分	炎症严重程度			肿瘤病理学	
	白细胞浸润模式	白细胞浸润程度	浸润性白细胞数量	病变严重程度分类	组织学类型
1	淋巴聚集增加	浸润于黏膜层	少量	上皮内瘤变(核上浮不超过上皮总高度的3/4)	高分化腺癌(>95%导管形成)
2	隐窝炎(肠隐窝上皮内中性粒细胞)	浸润至黏膜下层	中等	黏膜内癌(腺体结构破坏, 共有腺壁和筛状结构, 未穿透黏膜肌层)	中分化腺癌(50%~95%导管形成)
3	隐窝脓肿(中性粒细胞聚集于隐窝腔内, 有时可见隐窝破裂)	全层浸润	较多	管状腺癌(肿瘤细胞穿透黏膜肌层)	低分化腺癌(<50%导管形成)
4	—	—	—	—	未分化癌

2.5 ELISA检测血清中炎症因子水平

麻醉小鼠后将其固定, 用镊子迅速摘取眼球, 采集外周血。静置1 h后, 4 °C、3 000 r/min离心10 min, 收集血清, 按照ELISA试剂盒说明书检测IL-6、TNF- α 水平。

2.6 5R 16S rRNA基因测序

称取粪便样品进行微生物组总DNA提取, 采用Qubit对DNA进行定量。采用Illumina NovaSeq 6000测序平台、PE150测序模式的双端测序, 检测V2、V3、V5、V6、V8 5个可变区的序列。使用fqtrim(v0.9.7)对reads进行质控, 采用Short Multiple Regions Framework(SMURF)整合5个可变区序列, 通过最大期望算法重建16S rDNA片段, 基于Greengenes2修正后的数据库进行物种分类学注释。以提取空白(无菌水替代样本)和PCR空白(无菌水为模板)为阴性对照, 默认采用流行度阈值法(即 $\geq 30\%$ 的阴性对照中检出的物种定义为污染菌), 移除样本中的污染信号。使用QIIME2计算

Chao1指数, 评估样本内物种丰富度; 通过Shannon、Chao1指数评估菌群的 α 多样性; 通过bray curtis距离矩阵评估不同组间 β 多样性, 并通过主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)展示组间的群落结构差异, 采用ANOSIM检验组间差异显著性。基于线性判别效应量分析(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)进行差异分析并绘制进化分支图。

2.7 非靶向代谢组学检测

2.7.1 样品处理 称取粪便样品, 加入500 μ L预冷的80%甲醇水溶液, 经研磨仪匀浆后, 于-20 °C静置30 min。4 °C、20 000 $\times g$ 离心10 min, 取上清液再次离心5 min, 取上清液用于上机分析。

2.7.2 色谱条件 Acquity UPLC HSS T3色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m), 柱温40 °C; 流动相为含5 mmol/L乙酸铵和乙酸的水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱, 正离子模式0~3.0 min, 0~20% B; 3~4.5 min, 20%~35% B; 4.5~5.0 min, 35%~100% B; 5.0~6.3 min, 100% B。负离子模式0~

1.5 min, 0~5% B; 1.5~2.0 min, 5%~10% B; 2~4.5 min, 10%~30% B; 4.5~5.0 min, 30%~100% B; 5.0~6.3 min, 100% B。体积流量 0.35 mL/min; 进样量 4 μ L。

2.7.3 质谱条件 采用电喷雾离子源, 在正、负离子模式下分别采集数据。鞘气体积流量 50 arb; 脱溶剂气体积流量 13 arb; 脱溶剂温度 425 $^{\circ}$ C; 毛细管温度 325 $^{\circ}$ C; 喷雾电压 \pm 3 500 V; 碰撞能 20、40、60 eV。扫描模式为全扫描与数据依赖采集 (DDA), 一级扫描分辨率为 70 000, 二级扫描分辨率为 17 500。

2.7.4 数据处理 原始数据经 XCMS 软件进行峰提取、保留时间校正和峰对齐, 生成包含峰强度、保留时间和质荷比 (m/z) 的三维数据矩阵。代谢物通过将精确相对分子质量 (质量偏差 $<1 \times 10^{-5}$) 与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、人类代谢数据库 (human metabolome database, HMDB) 及实验室自建数据库进行匹配来注释; 差异代谢物分析采用组间差异倍数 (fold change, FC) 衡量代谢物的差异倍数, 并对代谢物丰度值进行 \log_2 对数转换使数据符合正态分布, 进行 t 检验筛选差异代谢物 (同时满足 $FC \geq 1.2$ 或 ≤ 0.83 , $P < 0.05$); 基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) 以 Signal2Noise 为标准对代谢物进行排序, 对特定代谢物集进行打分, 得到富集分数 (enrichment score, ES)。

2.8 比色法检测血清及粪便中 TBA 水平

取粪便样本, 加入 PBS, 匀浆后 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清。按照试剂盒说明书检测血清和粪便中 TBA 水平。

2.9 ELISA 检测初级、次级胆汁酸水平

按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清和粪便中 CA、DCA、LCA 水平。

2.10 粪便基因组 DNA 提取

称取 200 mg 粪便样本, 加入特定缓冲液 (SA, SC)、蛋白酶 K, 经组织研磨仪充分匀浆后, 于 70 $^{\circ}$ C 孵育以裂解。随后, 加入 RNase A 降解 RNA, 并通过添加缓冲液 SH 沉淀杂质。裂解液经高速离心后, 转移上清液并与结合缓冲液 GFA 混合。混合液转移至吸附柱 CR2 中, 通过离心使 DNA 与硅胶膜特异性结合。依次使用缓冲液 GD 和漂洗液 PW 洗涤吸附柱, 以去除蛋白质、盐类等杂质。最后, 经充分晾干去除残留乙醇, 使用低 pH 值洗脱缓冲液 TB 将

高质量基因组 DNA 从膜上洗脱下来, 用于 DNA 浓度检测及后续分析。

2.11 qRT-PCR 检测 3 种梭菌及 *BaiF* 基因表达

将所有粪便样本的 DNA 质量浓度统一稀释至 2 ng/ μ L。配制 20 μ L 反应体系, 加入足量的除模板 cDNA 外的引物、SYBR Green qPCR Super Mix plus、DEPC 水等, 充分混匀, 各取 19 μ L 分配到 PCR 专用 96 孔板中; 各取 1 μ L 模板 cDNA 分配到 PCR 专用 96 孔板中, 用光学透明膜密封孔板。4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 1 min, 确保所有液体沉于管底且无气泡残留。设置 60 个循环进行 PCR 扩增。分别检测粪便样本中产 DCA 的常见梭菌及辅酶 A 转移酶编码基因 *BaiF* 表达。相关梭菌包括裂解梭菌 (*Clostridium scindens*, *C. scindens*)、海氏梭菌 (*Clostridium hylemonae*, *C. hylemonae*) 和洪氏梭菌 (*Clostridium hiranonis*, *C. hiranonis*)。引物序列见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')	碱基数
16S	F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20
	R: CTGCTGCSYCCCGTAG	16
<i>C. scindens</i>	F: TGACGGTACYNRKAGGAAGCC	23
	R: ACTACGGTTRAGCCGTAGCCTTT	23
<i>C. hylemonae</i>	F: AAGAGATTAGCTTGCTAAGATCAG	24
	R: TCTACCATGCGGTACTGAGGT	21
<i>C. hiranonis</i>	F: AGTAAGCTCCTGATACTGTCT	21
	R: AGGGAAAGAGGAGAGATTAGTC	22
<i>BaiF</i>	F: TTCAGYTTCTACACCTG	17
	R: GGTTRTCCATRCCGAACAGCG	21

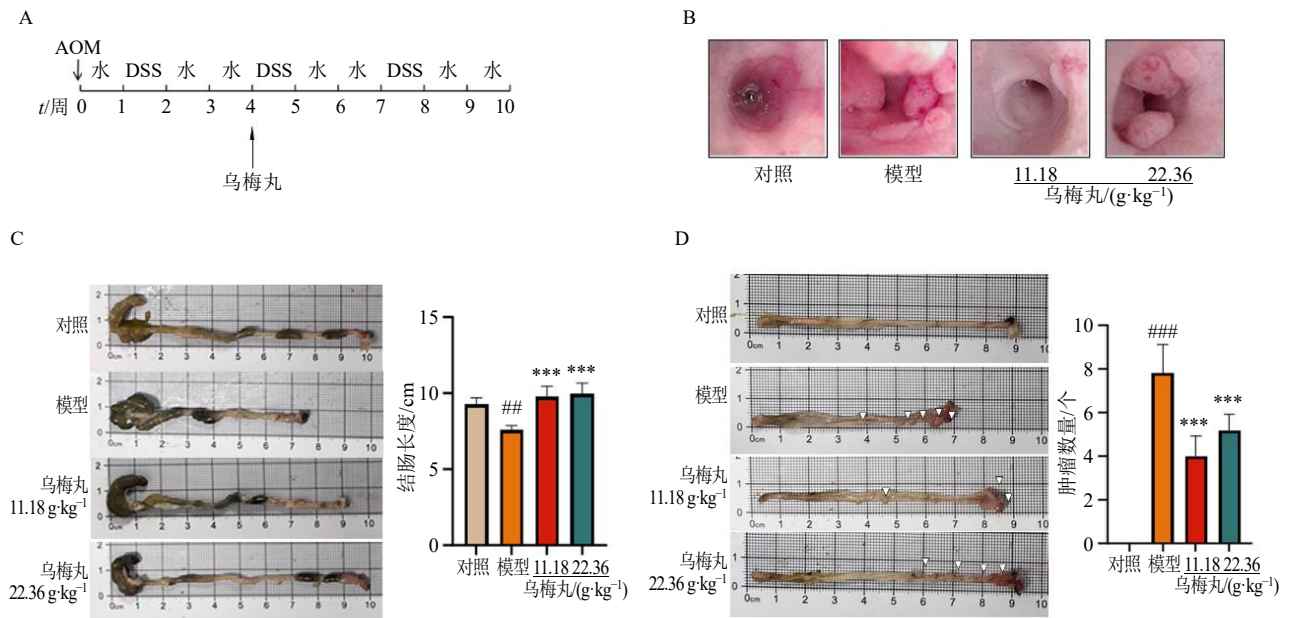
2.12 统计学分析

使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件对数据进行统计处理。对于计量资料, 采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差 (one-way ANOVA) 分析。

3 结果

3.1 乌梅丸对 CAC 小鼠结肠肿瘤生长的影响

结肠炎癌转化模型构建及乌梅丸干预过程示意图见图 1-A。第 10 周通过肠道内窥镜观察到, 与模型组比较, 乌梅丸低、高剂量组结肠黏膜充血、黏膜水肿程度较轻, 且镜下所见肿瘤数量较少 (图 1-B)。结肠大体结果 (图 1-C) 显示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠长度显著缩短 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 乌梅丸低、高剂量组结肠长度显著增加 ($P < 0.001$)。对结肠进行平剖并统计各组小鼠的结肠肿瘤数量, 如图 1-D 所示, 与模型组比较, 乌梅丸低、高剂量组肿瘤数量显著减少 ($P < 0.001$)。



A-结肠炎癌转化模型构建及乌梅丸干预示意图; B-肠道内窥镜结果; C-结肠大体结果; D-结肠肿瘤剖割结果; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。

A-schematic diagram of colitis-cancer transformation modeling and intervention with Wumei Pill; B-representative images of intestines under intestinal endoscopy; C-gross images of colon; D-representative images of colon tumors; * $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

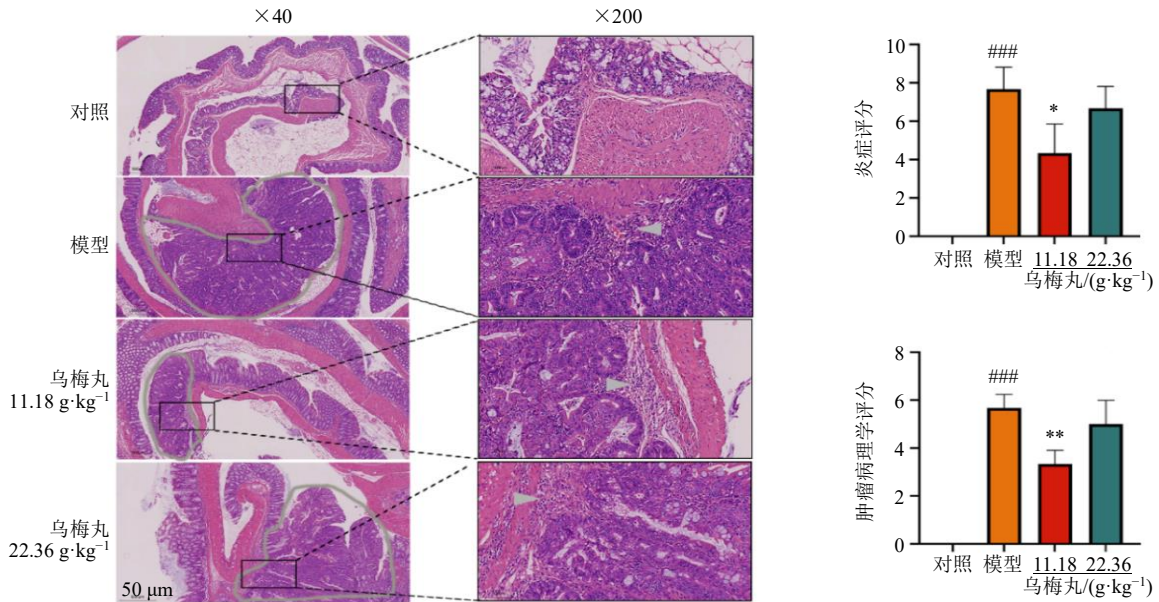
图1 乌梅丸对CAC小鼠结肠肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of Wumei Pill on growth of colon tumors in CAC mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.2 乌梅丸对CAC小鼠结肠组织病理变化的影响

如图2所示, 对照组小鼠结肠黏膜结构完整, 隐窝排列规整, 未见明显的病理学改变。与对照组

比较, 模型组小鼠结肠组织呈现出典型的炎症性损伤与肿瘤性病变特征, 包括大量炎性细胞浸润以及显著的腺瘤样结构形成。与模型组比较, 乌梅丸低、



灰色区域内表示腺瘤样结构, 灰色三角形表示炎性浸润。

Gray circles indicate crypt damage, and gray triangles indicate inflammatory infiltration.

图2 乌梅丸对CAC小鼠结肠组织病理变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Effect of Wumei Pill on pathological changes of colon tissues in CAC mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

高剂量组小鼠结肠组织的炎性细胞浸润程度明显减轻,腺瘤样结构数量减少、尺寸缩小。病理评分结果表明,低剂量的乌梅丸可以显著降低结肠炎症评分与肿瘤病理学评分 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.3 乌梅丸对CAC小鼠血清中炎症因子水平的影响

如图3所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中IL-6和TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,乌梅丸低剂量组小鼠血清中IL-6和TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001),乌梅丸高剂量组小鼠血清中IL-6水平显著降低 ($P < 0.05$)。综合考虑乌梅丸低剂量(临床等效剂量)组在改善结肠组织病理损伤以及抑制系统性炎症方面展现出最佳效果,后续选择此剂量作为最佳干预剂量进行机制研究。

3.4 乌梅丸对CAC小鼠肠道菌群的影响

3.4.1 乌梅丸对肠道菌群多样性的影响

物种累积曲线(图4-A)显示,随着测序深度增加,代表物种丰富度的Chao1指数趋于稳定,表明实验测序深度充足。通过Chao1指数、Shannon指数评估肠

道菌群的 α 多样性(图4-B),结果显示,模型组、乌梅丸低剂量组、乌梅丸高剂量组肠道菌群的 α 多样性差异均不具有统计学意义。随后评估肠道菌群的 β 多样性,PCoA结果(图4-C)表明,各组样本在坐标空间中呈现出清晰的分离趋势,组间差异具有统计学意义($R = 0.901$, $P < 0.01$),提示各组肠道菌群的 β 多样性存在显著差异。

3.4.2 乌梅丸对肠道菌群结构的影响

通过对各组群落结构进行分析,分别绘制属水平和种水平上的相对丰度排序前30的菌群堆叠柱状图。如图5-A所示,在属水平上,动丝菌属*Kineothrix*、邓肯氏菌属*Duncaniella*在对照组中的相对丰度较高,*Amulumruptor*在模型组中丰度较高,乳杆菌属*Lactobacillus*在乌梅丸低剂量组中丰度较高。如图5-B所示,在种水平上,动丝菌*Kineothrix unclassified*、迪博氏邓肯氏菌*Duncaniella dubosii*在对照组中丰度较高,*Amulumruptor caecigallinarius*在模型组中丰度较高,约翰逊氏乳杆菌*Lactobacillus johnsonii*在乌梅丸低剂量组中丰度较高。

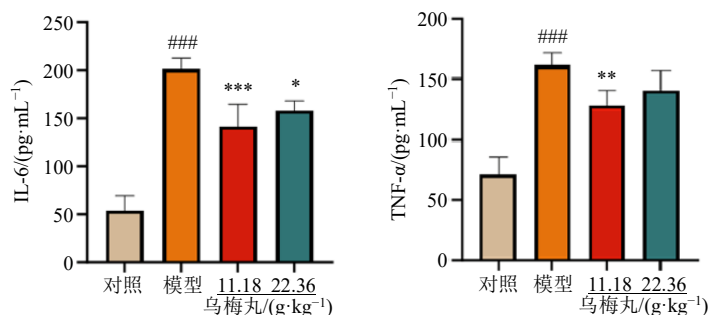
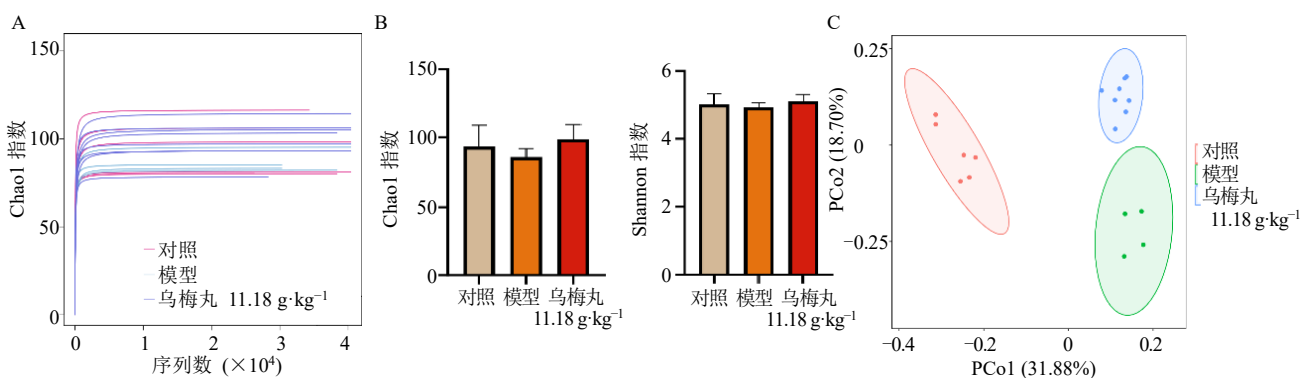


图3 乌梅丸对CAC小鼠血清中炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 3 Effect of Wumei Pill on levels of inflammatory factors in serum of CAC mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



A-物种累积曲线; B- α 多样性; C-PCoA图。

A-species accumulation curve; B- α -diversity; C-PCoA plot.

图4 乌梅丸对CAC小鼠肠道菌群多样性的影响

Fig. 4 Effect of Wumei Pill on diversity of gut microbiota in CAC mice

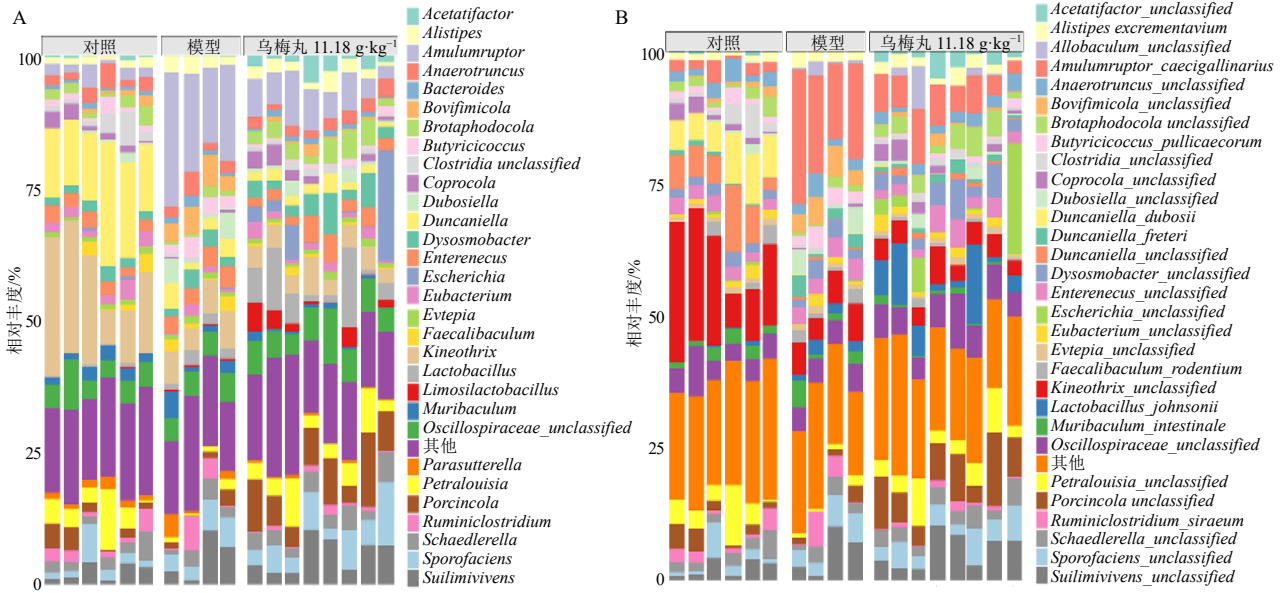
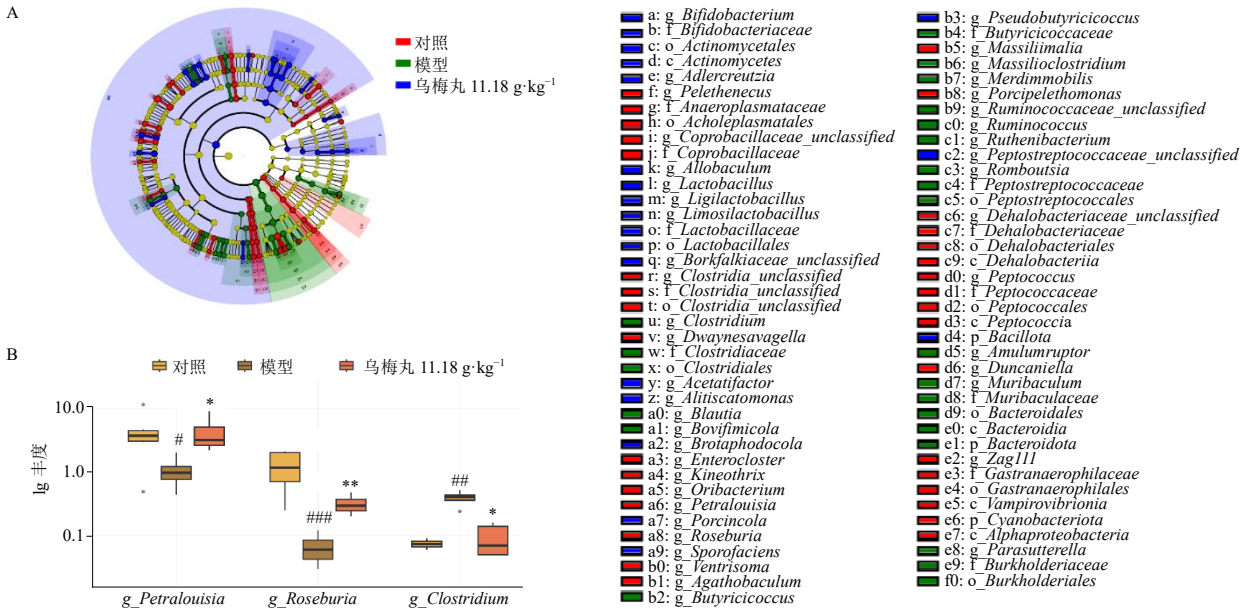


图 5 乌梅丸对 CAC 小鼠在属 (A)、种 (B) 水平上的肠道菌群结构的影响

Fig. 5 Effect of Wumei Pill on community structure of gut microbiota at genus (A) and species (B) levels in CAC mice

3.4.3 乌梅丸对肠道菌群中关键物种的影响 为进一步识别各组间具有显著差异的物种,基于 LEfSe 分析绘制进化分支图 (图 6-A),结果显示,对照组的特征性优势菌群为罗氏菌属,模型组则以梭菌属 *Clostridium* 的显著富集为特征,而乌梅丸低剂量组的菌群结构得以重塑,乳酸杆菌属 *Lactobacillus* 成为优势菌群。为增强结果的稳健性、降低单一分析方

法带来的潜在偏差,进一步采用 Wilcoxon 秩和检验对特定功能菌属进行组间差异比较,如图 6-B 所示,与模型组比较,乌梅丸低剂量组益生菌 *Roseburia* 的丰度显著升高,该属的核心代谢产物包括具有抗炎、维护肠道屏障功能的 SCFAs;同时,乌梅丸低剂量组中机会致病菌 *Clostridium* 的丰度显著降低,该属可代谢产生次级胆汁酸、破坏肠道屏障。



A-物种进化分支图; B-物种相对丰度箱线图。

A-species evolutionary dendrogram; B-box plot of species relative abundance.

图 6 乌梅丸对 CAC 小鼠肠道菌群中关键物种的影响

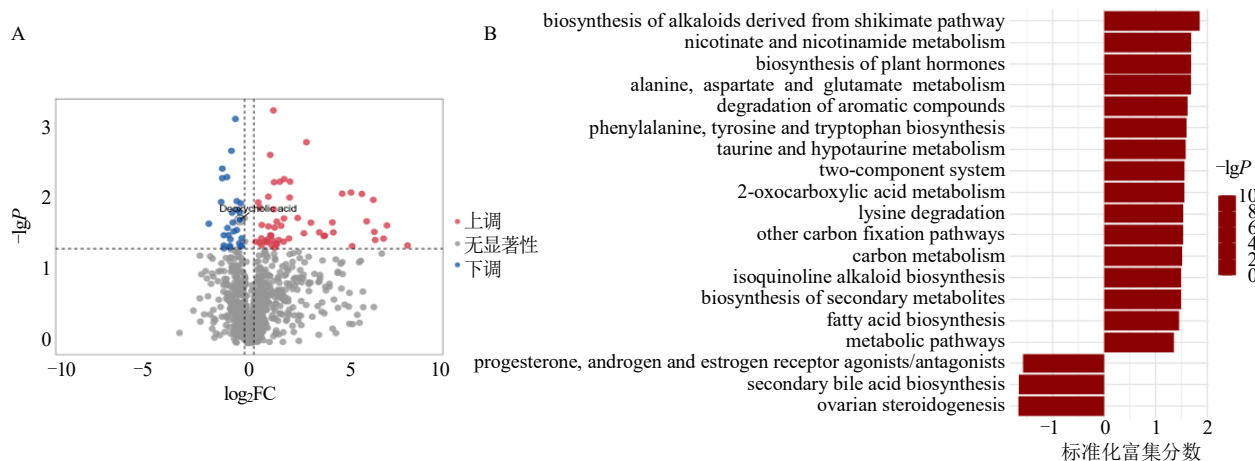
Fig. 6 Effect of Wumei Pill on key species of gut microbiota in CAC mice

3.5 乌梅丸对CAC小鼠肠道代谢组的影响

本研究发现乌梅丸可调复结肠炎癌转化中肠道菌群失衡,进一步通过非靶向代谢组学探究乌梅丸效应发挥与哪些代谢产物以及代谢途径有关。结果显示,模型组与乌梅丸低剂量组之间存在82种具有显著差异的代谢物,其中,DCA(次级胆汁酸的一种)在乌梅丸低剂量组显著下调(图7-A)。GSEA结果显示,与模型组相比,乌梅丸低剂量组中次级胆汁酸生物合成过程被显著抑制(图7-B)。由此推测次级胆汁酸代谢是乌梅丸阻延结肠炎癌转化的关键效应途径。

3.6 乌梅丸对CAC小鼠胆汁酸代谢水平的影响

为进一步明确乌梅丸对于胆汁酸代谢的调控效应,分别检测了血清与粪便中TBA、关键的初级胆汁酸CA以及2种次级胆汁酸DCA、LCA的水平。如图8所示,与对照组比较,模型组小鼠血清和粪便中TBA、CA、DCA、LCA水平均显著升高($P < 0.05, 0.001$);与模型组比较,乌梅丸低剂量组小鼠血清和粪便中TBA、CA、DCA水平均显著降低($P < 0.05, 0.01, 0.001$),血清和粪便中LCA水平呈降低趋势。



A-差异代谢物火山图; B-GSEA 条形图。

A-volcano plot of differential metabolites; B-GSEA bar chart.

图7 乌梅丸对CAC小鼠肠道代谢组的影响

Fig. 7 Effect of Wumei Pill on gut metabolome in CAC mice

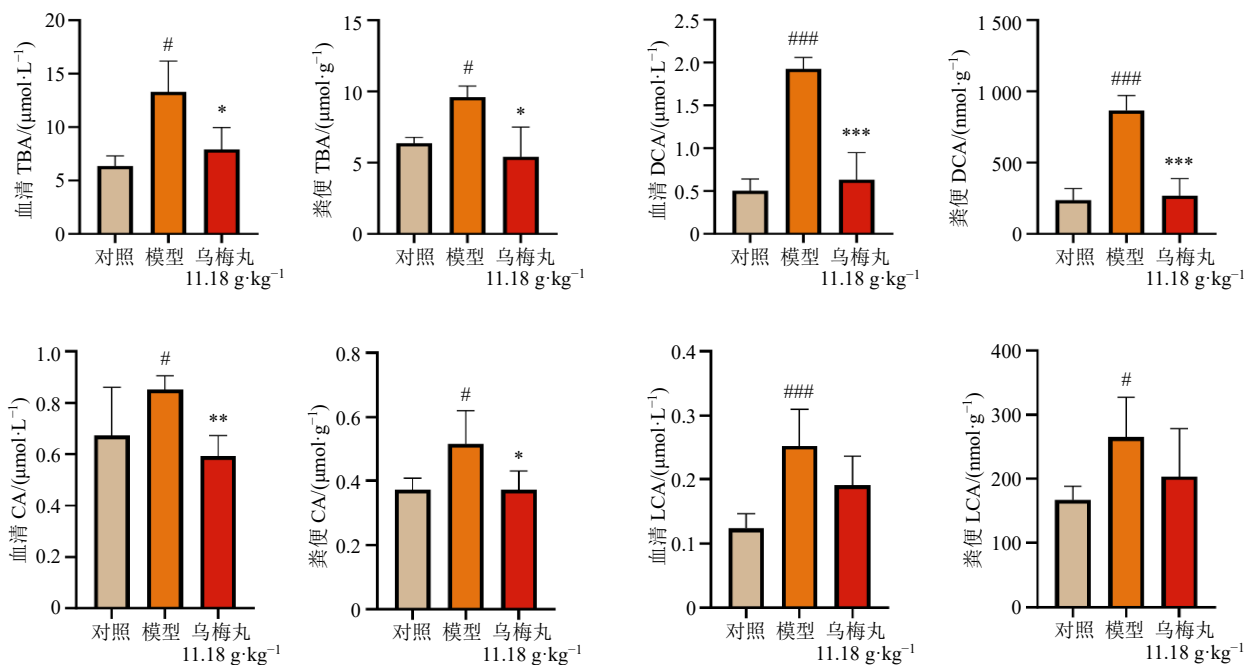


图8 乌梅丸对CAC小鼠胆汁酸代谢水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Effect of Wumei Pill on metabolomic level of bile acid in CAC mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.7 乌梅丸对 CAC 小鼠 3 种梭菌表达的影响

在明确梭菌以及 DCA 在乌梅丸调复肠道菌群进而阻延炎癌转化中的重要作用后,通过 qRT-PCR 对参与次级胆汁酸代谢的 3 种梭菌 (*C. scindens*、*C. hylemonae*、*C. hiranonis*) 表达进行分析,如图 9

所示,与对照组比较,模型组小鼠 *C. scindens*、*C. hylemonae* 和 *C. hiranonis* 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001);与模型组比较,乌梅丸低剂量组 *C. scindens*、*C. hylemonae* 表达水平显著降低 ($P < 0.05$),*C. hiranonis* 表达水平呈下降趋势。

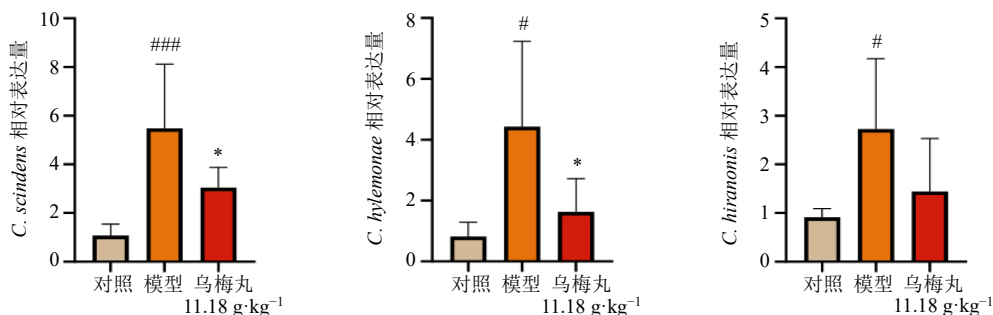


图 9 乌梅丸对 CAC 小鼠 3 种梭菌表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 9 Effect of Wumei Pill on expressions of three species of *Clostridium* in CAC mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.8 乌梅丸对 CAC 小鼠肠道菌群中 *BaiF* 基因表达的影响

为进一步明确乌梅丸调控 *C. scindens* 及 DCA 合成的作用位点,通过 qRT-PCR 检测 *C. scindens* 与 *C. hylemonae* 执行 7 α -脱羟基化的关键酶即辅酶 A (coenzyme A, CoA) 转移酶的编码基因 *BaiF* 的表达。如图 10 所示,与对照组比较,模型组 *BaiF* 基因表达水平显著升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,乌梅丸低剂量组 *BaiF* 基因表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。

癌转化动物模型,通过肠道内窥镜观察、大体标本评估和 HE 染色等评价结肠肿瘤进展与组织病理学变化。结果显示,低、高剂量乌梅丸干预均可阻延结肠炎癌转化,且乌梅丸低剂量(临床等效剂量)组的疗效更佳。低剂量乌梅丸可缓解肠道黏膜充血及水肿现象,恢复结肠长度,减少结肠肿瘤数量,降低结肠炎症评分与肿瘤病理学评分,同时,低剂量乌梅丸还可降低血清中 IL-6、TNF- α 等炎症因子水平。确证乌梅丸能够显著抑制结肠炎癌转化后,为进一步探究其效应发挥的分子机制奠定了基础。

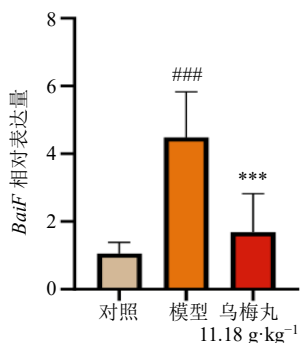


图 10 乌梅丸对 CAC 小鼠肠道菌群中 *BaiF* 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 10 Effect of Wumei Pill on expression of *BaiF* gene of gut microbiota in CAC mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

4 讨论

本研究运用微生物组学和代谢组学,探究了乌梅丸调复胆汁酸平衡阻延结肠炎癌转化的分子机制。首先通过经典的 AOM/DSS 诱导法构建结肠炎

近年来,肠道菌群及其代谢产物已被证实可在结肠炎癌转化过程中发挥重要作用^[6-11,29]。一方面,以 *Roseburia* 为代表的产 SCFAs 的益生菌能够通过发酵膳食纤维产生丁酸,增强紧密连接蛋白表达,进而改善肠道上皮屏障完整性、抑制炎症及肿瘤生长,不过这些益生菌在结肠炎癌转化过程中常呈现耗竭趋势^[30-31]。另一方面, *Clostridium* 作为一个功能多样的菌属,该属中许多菌种可通过产生细菌毒素^[32]或氨基酸代谢^[33]、胆汁酸代谢^[11]等途径,破坏肠道黏膜屏障、诱导炎症反应,进而促进结肠干细胞的增殖与侵袭能力。本研究微生物组学结果显示,在结肠炎癌转化过程中,小鼠肠道菌群呈现典型的“益生菌减少、致病菌富集”现象,例如,产丁酸的 *Roseburia* 丰度显著下降,而 *Clostridium* 丰度异常升高。这一特征与基于结肠癌患者肠道菌群的检测结果一致^[34],表明本研究所采用的动物模

型具有良好的临床病理相关性。既往研究显示,乌梅丸可调节溃疡性结肠炎及结肠癌患者的肠道菌群^[19,30,32],提示其具有调控肠道菌群延缓结肠炎癌转化的潜力。本研究结果也表明,乌梅丸可有效改善肠道菌群的紊乱状态,并在一定程度上提高群落多样性。同时,乌梅丸干预显著增加了益生菌 *Lactobacillus*、*Roseburia* 丰度,同时抑制机会致病菌 *Clostridium* 的过度生长,从而重建有利于抗肿瘤的肠道微生态平衡。

为进一步探究乌梅丸调控肠道菌群是否导致了关键代谢产物变化,本研究采用非靶向代谢组学技术鉴定了小鼠粪便代谢物谱。结果显示,在乌梅丸低剂量组与模型组之间共鉴定出了 82 种差异代谢物,差异代谢途径主要富集在次级胆汁酸生物合成途径,该途径中差异最显著的代谢物则是 DCA。胆汁酸的合成、分泌、代谢和重吸收等的动态平衡维持了胆汁酸稳态。其合成主要以胆固醇为原料,经肝细胞 7 α -羟化酶 (cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1) 等转化为初级胆汁酸如 CA,随后流向十二指肠和回肠,一部分在回肠末端被重吸收;另一部分则流向结肠并被其中微生物代谢为次级胆汁酸如 DCA 和 LCA^[35]。

作为人类体内最丰富的次级胆汁酸之一,DCA 早在 1977 年就被报道其含量在结肠癌患者的粪便中升高^[36]。近年来,权威研究也显示结肠炎、结肠癌患者的肠道中普遍存在胆汁酸稳态失衡现象,炎症性肠病患者的肠腔内胆汁酸含量升高,而高浓度的胆汁酸及其次级代谢产物会加剧肠道炎症反应,促进包括结肠癌在内的一系列消化道肿瘤进展^[37-40]。此外,结肠癌患者的血清及结肠中 DCA 水平显著高于健康人群,导致 TNF- α 、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 等细胞因子分泌被抑制,削弱抗肿瘤免疫应答^[41]; DCA 还可通过诱导血管生成和上皮-间质转化,加速结肠癌的远端转移^[41-42]。这些研究提示,胆汁酸代谢异常贯穿结肠炎癌演进全程。鉴于胆汁酸稳态在结肠炎癌转化过程中的重要作用,本研究分别检测了血清与粪便中的 TBA、关键的初级胆汁酸 CA 以及 2 种次级胆汁酸 DCA、LCA 水平。结果显示,不论是在血清或是粪便样本中,乌梅丸干预都能导致 TBA、CA 及 DCA 水平显著降低,而 LCA 水平仅呈现降低趋势,组间差异不具有显著性。因此,结肠炎癌转化过程中肠道 DCA 水平显著上升,而乌梅丸干预显著降低了 DCA 水平,表

明乌梅丸通过调控次级胆汁酸合成通路抑制了 DCA 的生成。

研究表明,胆汁酸代谢是肠道微生物参与宿主消化、吸收及免疫防御的重要途径之一^[40]。流入结肠的初级胆汁酸首先经过一些肠道菌群(如拟杆菌属 *Bacteroides*、*Clostridium*、*Lactobacillus*) 分泌的胆汁盐水解酶 (bile salt hydrolase, BSH) 催化为 CA,再由 *Clostridium*、真杆菌属 *Eubacterium* 等具有 CYP7A1 活性的肠道菌进一步将 CA 经 7 α -脱羟基作用转化为 DCA^[43-44]。*Clostridium* 中的 *C. scindens*、*C. hylemonae* 与 *C. hiranonis* 都可参与 CA 的 7 α -脱羟基化过程,其中, *C. scindens* 是目前发现的催化 CA 的 7 α -脱羟基化效率最高的菌株^[44-45]。同时, *C. scindens* 可破坏胆汁酸稳态,导致 DCA 在肠道过度堆积进而抑制 CD8⁺ T 细胞免疫应答,促进结肠肿瘤细胞免疫逃逸^[11]。因此,本研究采用 qRT-PCR 对参与次级胆汁酸代谢的 3 种 *Clostridium* 表达进行定量检测。结果显示,结肠炎癌转化中 *C. scindens* 和 *C. hylemonae* 过度增殖,乌梅丸干预可显著抑制这种现象,说明乌梅丸可能通过抑制 2 种关键梭菌的生长、进而抑制其将 CA 代谢为 DCA,缓解 DCA 在结肠部位的过度堆积。本研究结果还表明 *C. hylemonae* 同样占据 7 α -脱羟基化的关键生态位,与之前的报道一致^[45]。此外, *C. hylemonae* 还曾被报道可作为结肠癌的预后标志物^[46]。

结肠中 CA 转化为 DCA 是一个多步酶促反应过程,在 7 α -脱羟基作用之前,还需要 CoA 转移酶完成游离 CA 的 CoA 酯活化,生成 CYP7A1 可识别的底物,这是 7 α -脱羟基反应的必要前提^[47]。CoA 转移酶作为这一过程的必要酶,由相应梭菌的 *BaiF* 基因所编码^[48]。有研究发现在 *BaiF* 基因高丰度的粪便样本中,产 DCA 的菌株丰度也显著增加^[11]。因此,本研究检测了 *BaiF* 基因的表达。结果显示,结肠炎癌转化中 *BaiF* 基因表达水平也显著上升,乌梅丸干预则可降低 *BaiF* 基因表达水平,说明乌梅丸确可调复肠道梭菌介导的胆汁酸代谢。

综上,本研究采用微生物组学与代谢组学相结合的方法,从“菌群-代谢”角度揭示了乌梅丸通过下调 *C. scindens* 和 *C. hylemonae* 等具有 7 α -脱羟基化能力的肠道梭菌生长,降低了 *BaiF* 基因编码的 CoA 转移酶表达,调节以 DCA 合成为核心的胆汁酸稳态,进而发挥阻延结肠炎癌转化的作用。然而,当前研究仍存在一定的局限性。一方面,本研究仅

检测了 *BaiF* 基因的表达变化, 但基因表达并不完全等于其功能活性, 导致乌梅丸调复肠道梭菌介导的胆汁酸代谢的证据不够充分。此外, CA 转化为 DCA 并不是仅由 CoA 转移酶决定的, 但受限于时间与经济成本, 未能对该过程所涉及所有酶的变化情况进行研究。另一方面, 本研究对乌梅丸调复胆汁酸稳态阻延结肠炎癌转化的分子机制探索尚不够深入。未来将进一步完善上述局限性, 结合特异性抑制剂及基因编辑方法, 深入探究乌梅丸阻延结肠炎癌转化的潜在治疗靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ding M L, Yan J B, Chao G Q, *et al.* Application of artificial intelligence in colorectal cancer screening by colonoscopy: Future prospects (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2023, 50(5): 199.
- [2] Le Berre C, Honap S, Peyrin-Biroulet L. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2023, 402(10401): 571-584.
- [3] Liu T, Zhang Y G, Gao F Y, *et al.* Mechanism of *Hedysari Radix Praeparata cum Melle* and *Curcumae Rhizoma* herb pair in colitis-associated colorectal cancer through the MAPK/NF- κ B signaling pathway: An investigation *in vivo* and *in vitro* [J]. *Front Chem*, 2025, 13: 1551722.
- [4] Tang F Y, Cao F Y, Lu C, *et al.* Dvl2 facilitates the coordination of NF- κ B and Wnt signaling to promote colitis-associated colorectal progression [J]. *Cancer Sci*, 2022, 113(2): 565-575.
- [5] Kaur H, Ali S A, Yan F. Interactions between the gut microbiota-derived functional factors and intestinal epithelial cells-implication in the microbiota-host mutualism [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1006081.
- [6] Yan S H, Chang J Y, Hao X H, *et al.* Berberine regulates short-chain fatty acid metabolism and alleviates the colitis-associated colorectal tumorigenesis through remodeling intestinal flora [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154217.
- [7] Jaiswal J, Srivastav A K, Kushwaha M, *et al.* Gut microbial metabolite 4-ethylphenylsulfate is selectively deleterious and anticancer to colon cancer cells [J]. *J Med Chem*, 2025, 68(10): 10425-10438.
- [8] Sun M M, Wu W, Liu Z J, *et al.* Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases [J]. *J Gastroenterol*, 2017, 52(1): 1-8.
- [9] 刘宇婧, 徐汉辰, 季光. 胆汁酸驱动消化道炎症癌转化及中医药防治策略 [J]. 中国科学基金, 2024, 38(3): 461-468.
- [10] Farhana L, Nangia-Makker P, Arbit E, *et al.* Bile acid: A potential inducer of colon cancer stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 181.
- [11] Cong J J, Liu P P, Han Z L, *et al.* Bile acids modified by the intestinal microbiota promote colorectal cancer growth by suppressing CD8⁺ T cell effector functions [J]. *Immunity*, 2024, 57(4): 876-889.e11.
- [12] 王双瑛, 杨子婧, 孟宇航, 等. 乌梅丸古今文献分析 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(14): 3956-3962.
- [13] 陈浩彬, 林才志. 乌梅丸治疗大肠相关性疾病的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(1): 250-257.
- [14] 李杰, 王紫薇, 邓菊, 等. 乌梅丸治疗结直肠癌可行性探讨 [J]. 世界中医药, 2023, 18(8): 1178-1182.
- [15] Song Y, Dunkin D, Dahan S, *et al.* Anti-inflammatory effects of the Chinese herbal formula FAHF-2 in experimental and human IBD [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(1): 144-153.
- [16] 中华中医药学会《溃疡性结肠炎中医诊疗指南》项目组. 溃疡性结肠炎中医诊疗指南 (2023) [J]. 中医杂志, 2024, 65(7): 763-768.
- [17] 陈念芝, 唐诗韵, 冯媛媛, 等. 乌梅丸通过促进肿瘤相关巨噬细胞 M1 极化抗转移性结直肠癌的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2026, 32(1): 92-100.
- [18] 赵冠宇, 辛蕊华, 仇正英, 等. 基于 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路研究乌梅丸对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮细胞焦亡的作用机制 [J]. 中草药, 2023, 54(24): 8086-8093.
- [19] 支景琳, 冯媛媛, 刘宁宁, 等. 乌梅丸激活 STING 促进 CD8⁺ T 细胞浸润活化抗结直肠癌的机制 [J]. 上海中医药杂志, 2025, 59(5): 1-7.
- [20] Lu Z H, Ding Y, Wang Y J, *et al.* Early administration of Wumei Wan inhibit myeloid-derived suppressor cells via PI3K/Akt pathway and amino acids metabolism to prevent colitis-associated colorectal cancer [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 333: 118260.
- [21] Zhang Y L, Yang M J, Yang S S, *et al.* Wumei Wan remodels the tumor immune microenvironment via the Ido1-KYN-AHR axis in AOM/DSS-induced colorectal cancer model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 353: 120371.
- [22] 赵冠宇, 辛蕊华, 仇正英, 等. 乌梅丸对溃疡性结肠炎小鼠炎症因子及肠道菌群的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(21): 2929-2937.
- [23] 卢志华, 蒋峰, 王雨吉, 等. 基于 STAT3/SREBP1 介导的脂质代谢探讨乌梅丸防治结肠炎相关结直肠癌作用机制 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(10): 4717-4722.
- [24] Cui H T, Jin Y T, Wang N, *et al.* Mechanic evaluation of Wu-Mei-Pill on colitis-associated colorectal cancer: An integrated transcriptomics, metabolomics, and experimental validation study [J]. *Phytomedicine*, 2024,

- 128: 155509.
- [25] Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, *et al.* A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(11): 965-973.
- [26] Thaker A I, Shaker A, Rao M S, *et al.* Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS) [J]. *JoVE*, 2012(67): 4100.
- [27] Meng S, Li Y J, Zang X Z, *et al.* Effect of TLR2 on the proliferation of inflammation-related colorectal cancer and sporadic colorectal cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 95.
- [28] Boivin G P, Washington K, Yang K, *et al.* Pathology of mouse models of intestinal cancer: Consensus report and recommendations [J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(3): 762-777.
- [29] 刘宏, 李佳, 林俊芝, 等. 植物精油及其活性成分防治结直肠癌作用机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(3): 956-965.
- [30] Karim M R, Iqbal S, Mohammad S, *et al.* Butyrate's (a short-chain fatty acid) microbial synthesis, absorption, and preventive roles against colorectal and lung cancer [J]. *Arch Microbiol*, 2024, 206(4): 137.
- [31] Kang X, Liu C G, Ni Y B, *et al.* 120 *Roseburia intestinalis* generated butyrate boosts anti-PD-1 efficacy in colorectal cancer by activating cytotoxic CD8⁺ T cells [J]. *Gastroenterology*, 2023, 164(6): S-19.
- [32] Nezhadi J, Lahouty M, Rezaee M A, *et al.* *Clostridium difficile* as a potent trigger of colorectal carcinogenesis [J]. *Discov Oncol*, 2025, 16(1): 910.
- [33] Ren Y M, Zhuang Z Y, Xie Y H, *et al.* BCAA-producing *Clostridium symbiosum* promotes colorectal tumorigenesis through the modulation of host cholesterol metabolism [J]. *Cell Host Microbe*, 2024, 32(9): 1519-1535.e7.
- [34] Karpiński T M, Ożarowski M, Stasiewicz M. Carcinogenic microbiota and its role in colorectal cancer development [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86: 420-430.
- [35] Ridlon J M, Gaskins H R. Another renaissance for bile acid gastrointestinal microbiology [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2024, 21(5): 348-364.
- [36] Reddy B S, Wynder E L. Metabolic epidemiology of colon cancer: Fecal bile acids and neutral sterols in colon cancer patients and patients with adenomatous polyps [J]. *Cancer*, 1977, 39(6): 2533-2539.
- [37] Gentry E C, Collins S L, Panitchpakdi M, *et al.* Reverse metabolomics for the discovery of chemical structures from humans [J]. *Nature*, 2024, 626(7998): 419-426.
- [38] Quinn R A, Melnik A V, Vrbanac A, *et al.* Global chemical effects of the microbiome include new bile-acid conjugations [J]. *Nature*, 2020, 579(7797): 123-129.
- [39] Collins S L, Stine J G, Bisanz J E, *et al.* Bile acids and the gut microbiota: Metabolic interactions and impacts on disease [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(4): 236-247.
- [40] Morgan R, Bayat Tork M A, Lin Z T, *et al.* High-fat diet driven post-operative colon cancer recurrence is dependent upon genetic susceptibility to deoxycholic acid [J]. *Cancer Lett*, 2025, 631: 217943.
- [41] Song X L, An Y P, Chen D F, *et al.* Microbial metabolite deoxycholic acid promotes vasculogenic mimicry formation in intestinal carcinogenesis [J]. *Cancer Sci*, 2022, 113(2): 459-477.
- [42] Won T H, Arifuzzaman M, Parkhurst C N, *et al.* Host metabolism balances microbial regulation of bile acid signalling [J]. *Nature*, 2025, 638(8049): 216-224.
- [43] Guzior D V, Okros M, Shivel M, *et al.* Bile salt hydrolase acyltransferase activity expands bile acid diversity [J]. *Nature*, 2024, 626(8000): 852-858.
- [44] Ridlon J M, Kang D J, Hylemon P B. Isolation and characterization of a bile acid inducible 7 α -dehydroxylating operon in *Clostridium hylemonae* TN271 [J]. *Anaerobe*, 2010, 16(2): 137-146.
- [45] Kitahara M, Sakamoto M, Benno Y. PCR detection method of *Clostridium scindens* and *C. hiranonis* in human fecal samples [J]. *Microbiol Immunol*, 2001, 45(3): 263-266.
- [46] Alhazmi A A, Alhamawi R M, Almisned R M, *et al.* Gut microbial and associated metabolite markers for colorectal cancer diagnosis [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(8): 2037.
- [47] Funabashi M, Grove T L, Wang M, *et al.* A metabolic pathway for bile acid dehydroxylation by the gut microbiome [J]. *Nature*, 2020, 582(7813): 566-570.
- [48] Ridlon J M, Hylemon P B. Identification and characterization of two bile acid coenzyme A transferases from *Clostridium scindens*, a bile acid 7 α -dehydroxylating intestinal bacterium [J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(1): 66-76.

[责任编辑 李亚楠]