

MAPK/NF-κB pathways[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6673967.

[25] Türeyen K, Vemuganti R, Bowen K K, *et al.* EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain[J]. *Neurosurgery*, 2005, 57 (6): 1254-1263.

[26] Sun D, Bullock M R, Altememi N, *et al.* The effect of epidermal growth factor in the injured brain after trauma in rats[J]. *J Neurotrauma*, 2010, 27(5): 923-938.

[27] 陈 炜, 朱小敏, 胡跃强, 等. 益肺宣肺降浊方通过 EGFR 调节 PI3K/Akt-MAPK/Erk 通路改善血管性痴呆大鼠的记忆[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(8): 46-50; 269.

[28] Cortvrindt C, Speeckaert R, Moerman A, *et al.* The role of interleukin-17A in the pathogenesis of kidney diseases[J]. *Pathology*, 2017, 49(3): 247-258.

[29] Liu Q P, Pan P, Ling Z Z, *et al.* Acupuncture regulates the Th17/Treg balance and improves cognitive deficits in a rat model of vascular dementia[J]. *Heliyon*, 2023, 9(2): e13346.

## 小艾飞蜜膏对 MFC 胃癌荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫微环境的影响

管玉龙, 耿若愚, 马 冲, 赵 耀, 胡君萍\*, 米仁沙·牙库甫\*  
(新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830017)

**摘要:** **目的** 研究小艾飞蜜膏对 MFC 胃癌荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫微环境的影响。**方法** 将 40 只 BALB/c 小鼠随机分为正常组、模型组、5-FU 组 (25 mg/kg) 和小艾飞蜜膏低、高剂量组 (1.35、2.70 g/kg), 每组 8 只, 除正常组外, 其余各组均建立 MFC 胃癌皮下荷瘤小鼠模型, 连续给药 9 d。给药结束后采集样本, 计算抑瘤率和脏器系数; HE 染色法观察肿瘤形态学变化; ELISA 法检测血清 IFN-γ、IL-2、IL-1β、TGF-β1 水平; 流式细胞术检测脾脏组织 T 淋巴细胞亚群变化; 转录组测序技术检测肿瘤组织差异表达基因; Cytoscape 3.10.2 软件筛选关键基因; qPCR 验证关键基因 mRNA 表达。**结果** 与模型组比较, 小艾飞蜜膏高剂量组小鼠肿瘤质量、脾脏和肾脏指数降低 ( $P<0.05$ ), 肿瘤组织坏死区域增多; 小艾飞蜜膏各剂量组小鼠血清 IL-2 水平升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), IFN-γ、IL-1β、TGF-β1 水平降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 脾脏组织 CD4<sup>+</sup>T 细胞比例、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 细胞比值升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), CD8<sup>+</sup>T 细胞、Treg 细胞、Th17 细胞比例均降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。转录组测序筛选得到差异表达基因共 110 个, Cytoscape 3.10.2 软件筛选得到 *Adgre1*、*Serpinb2*、*Cxcr1*、*Cxcr2*、*DLL4*、*Serpina1b*、*Mcpt4*、*Tnfsf15*、*IL13ra2*、*Pdpn* 这 10 个关键基因。关键基因 mRNA 表达与转录组测序趋势相同, 与模型组比较, 小艾飞蜜膏高剂量组肿瘤组织 *Adgre1*、*Serpinb2*、*Cxcr1*、*Cxcr2*、*DLL4*、*Serpina1b*、*Mcpt4*、*Tnfsf15*、*IL13ra2*、*Pdpn* mRNA 表达均降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论** 小艾飞蜜膏对 MFC 胃癌荷瘤小鼠肿瘤生长有抑制作用, 其抗肿瘤机制可能与提高荷瘤小鼠机体免疫功能, 改善肿瘤免疫抑制微环境, 抑制肿瘤细胞增殖有关。

**关键词:** 小艾飞蜜膏; 胃癌; 肿瘤生长; 免疫微环境; T 淋巴细胞; 转录组学

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** B      **文章编号:** 1001-1528(2025)03-0976-09

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.03.044

胃癌是全世界第五大常见癌症, 也是我国癌症致死的主要原因之一<sup>[1]</sup>。现阶段胃癌的治疗策略主要包括手术、放疗、化疗以及靶向治疗等疗法, 但存在术后易复发、放化疗毒副作用大、耐药以及靶向治疗成本昂贵等弊端, 而中医药治疗胃癌具有不良反应少、成本低等特点, 并通过多成分、多途径、多靶点的综合调控作用, 能明显提高胃癌患者的生活质量和延长患者的生存期, 成为临床研究胃

癌的热点<sup>[2]</sup>。小艾飞蜜膏是新疆维吾尔自治区维吾尔医医院长期使用的院内制剂, 由金钱白花蛇、高良姜、荜茇、胡椒、干姜共 5 味药组成, 临床应用时将复方中各味药材共研细粉, 加以炼蜜制成膏剂服用, 用于治疗消化道和生殖系统的肿瘤、炎症、漏症、顽固性疮疡、气结性恶疮等, 疗效显著<sup>[3]</sup>。课题组前期研究证实, 小艾飞蜜膏能抑制 MFC 胃癌

**收稿日期:** 2024-08-14

**基金项目:** 国家自然科学基金地区基金项目 (81460616); 新疆少数民族科技人才特殊培养计划 (2022D03017); 新疆天然药物有效成分与药物释放技术重点实验室 (XJDX1713)

**作者简介:** 管玉龙 (2000—), 男, 硕士生, 从事天然药物研究与开发研究。E-mail: 1103036314@qq.com

\* **通信作者:** 胡君萍 (1971—), 女, 博士, 教授, 从事天然药物研究与开发研究。E-mail: hjp\_yxy@163.com

米仁沙·牙库甫 (1980—) 女, 博士, 副教授, 从事天然药物研究与开发研究。E-mail: 1498514164@qq.com

荷瘤小鼠肿瘤的生长,并对荷瘤小鼠机体免疫有所调节<sup>[4]</sup>。本研究以此为背景,采用转录组学方法对荷瘤小鼠肿瘤微环境的影响展开研究,进一步阐明小艾飞蜜膏抗胃癌的免疫调节作用,并为小艾飞蜜膏的临床应用和成果转化提供科学依据。

## 1 材料

1.1 动物与细胞株 40 只 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠,体重(20±2) g,4~6 周龄,购自并饲养于新疆医科大学动物实验中心[实验动物生产许可证号 SCXK(新)2023-0001,实验动物使用许可证号 SYXK(新)2023-0004],饲养环境温度(22±2)℃、相对湿度 50%~70%、光暗交替循环 12 h/12 h,本动物实验获得新疆医科大学医学实验动物中心动物伦理委员会批准(批准号 IACUC-20211016-35)。小鼠胃癌细胞 MFC(货号 CL-0156)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 试剂与药物 小艾飞蜜膏(批号 20220706)购自新疆维吾尔自治区维吾尔医医院;5-氟尿嘧啶(5-FU,批号 252366,美国 MCE 公司)。胎牛血清(批号 WXB2091V,美国 Sigma 公司);RPMI-1640 培养基、PCR 反转录试剂盒(批号 GA23070052478、MPC2311007,武汉赛维尔生物科技有限公司);红细胞裂解液(货号 LYS01,杭州联科生物科技股份有限公司);IL-2、IL-1β、IFN-γ、TGF-β1 ELISA 试剂盒(批号 1201869115、116191071113、9719831026、22919821108,武汉博士德生物工程有限公司);小鼠 CD45(APC-Cy7 标记)、CD3(FITC 标记)、CD4(BV421 标记)、CD8(PerCP-Cy5.5 标记)、CD25(PE 标记)、Foxp3(Alexa Fluor 标记)、IL-17A(BV605 标记)抗体(批号 3264235、3272378、3188444、3254772、3034258、3265681、3186605,美国 BD 公司);高纯度 RNA 提取试剂盒(批号 R40815,北京金式金生物技术股份有限公司)。

1.3 仪器 FC 全自动酶标仪、SorvallST 16R 离心机、荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);明澈-D24UV 纯水仪(美国 Millipore 公司);RM2016 病理切片机、DM300 正置荧光显微镜(德国 Leica 公司);电子分析天平(美国 Bio-Rad 公司);LSRFortessa 流式细胞分析仪(美国 BD 公司)。

## 2 方法

2.1 MFC 细胞混悬液制备 MFC 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37℃、含有 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养至对数生长期,待细胞密度达 80% 时,用加入 0.25% 胰酶消化 3 min,加入培养基终止消化后,用 PBS 缓冲液吹打成单个悬浮细胞,调整细胞密度为 1×10<sup>7</sup>/mL。

2.2 造模、分组与给药 取 32 只 BALB/c 小鼠,右侧腋下备皮,经 75% 乙醇消毒后,接种 0.2 mL MFC 细胞悬液(1×10<sup>7</sup>/mL),建立 MFC 胃癌荷瘤小鼠模型。将胃癌荷瘤小鼠随机分为模型组、5-FU 组和小艾飞蜜膏低、高剂量组,每组 8 只,另取 8 只未接种 MFC 细胞的小鼠为正常组。造模后 5~6 d 于右腋下肉眼可见肿节,即为造模成功,

第 7 天给药。根据小艾飞蜜膏临床用量计算出小鼠等效剂量即低剂量为 1.35 g/kg,高剂量设为低剂量的 2 倍为 2.70 g/kg。造模成功后,小艾飞蜜膏低、高剂量组小鼠灌胃给予 1.35、2.70 g/kg 小艾飞蜜膏,每天 1 次;正常组和模型组小鼠灌胃给予等体积生理盐水,每天 1 次;5-FU 组小鼠隔天腹腔注射 25 mg/kg 5-FU,连续给药 9 d,第 10 天麻醉后处死。

### 2.3 指标检测

2.3.1 样本采集及测定 以戊巴比妥钠麻醉小鼠后,摘眼球取血约 1 mL,室温放置 1 h 后,4℃、3 000 r/min 离心 20 min,分离得到血清。摘取心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、胸腺、肿瘤组织,计算脏器系数,计算公式为脏器指数=脏器质量/体质量。剥离取出肿瘤并称重,记录各组肿瘤质量并计抑瘤率,计算公式为抑瘤率=[(模型组肿瘤质量-给药组肿瘤质量)/模型组肿瘤质量]×100%。

2.3.2 HE 染色法观察肿瘤组织形态变化 每组随机取 3 只小鼠肿瘤组织经 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,脱蜡,苏木精、伊红染色,脱水封片后,于光学显微镜下观察各组小鼠肿瘤组织形态变化。

2.3.3 ELISA 法检测血清 IFN-γ、IL-2、IL-1β、TGF-β1 水平 采集的血清按照 ELISA 说明书检测 IFN-γ、IL-2、IL-1β、TGF-β1 水平。

2.3.4 流式细胞术检测脾脏组织 T 淋巴细胞亚群变化 取各组小鼠脾脏,PBS 冲洗,用载玻片的磨砂面将脾脏从边缘磨碎,将研磨液通过 200 目尼龙网过滤,离心后弃上清,加入 2 mL 红细胞裂解液,冰上裂解 10 min,终止裂解后 PBS 清洗,并调整细胞浓度为 2×10<sup>6</sup>/mL,转移至流式管中,按照说明书步骤加入相应的封闭液、刺激剂、破膜剂及抗体进行孵育,重悬细胞并上机检测 CD45、CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、IL-17A 指标变化,用 Flowjo 分析软件对数据进行分析。

### 2.4 RNA-seq 转录组学测序分析

2.4.1 转录组测序 从模型组和小艾飞蜜膏高剂量组中每组随机选取 4 个肿瘤块样本,提取总 RNA 进行测序,RNA 样品检测合格后,用带有 Oligo(dT)的磁珠富集 mRNA,加入 fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段,以 mRNA 为模板,用六碱基随机引物合成一链 cDNA,加入缓冲液、dNTPs 和 DNA polymerase I 和 RNase H 合成二链 cDNA,利用 AMPure XP beads 纯化双链 cDNA。纯化的双链 cDNA 先进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头,再用 AMPure XP beads 进行片段大小选择,最后进行 PCR 扩增,并用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物,得到最终的文库。文库构建完成后,先使用 Qubit 2.0 进行初步定量,稀释文库,使用 Agilent 2100 对文库的插入片段大小进行检测,插入片段符合预期后,使用 qPCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量,以保证文库质量。文库检测合格后,按照有效浓度及目标下机数据量的需求将不同文库 pooling 至 flowcell, cBOT 成簇后使用 Illumina 高通量测序平台(HiSeq/MiSeq)

进行测序。总 RNA 的提取、检测及转录组测序由上海欧易  
生物医学科技有限公司完成。

2.4.2 差异基因筛选及生信分析 将样品中的差异基因进行  
分析,以“log2| (FoldChange) | >2, *P* 值<0.05”为  
筛选条件筛选差异表达基因 (DEGs),对 DEGs 进行聚类  
热图及火山图分析总 DEGs 的分布情况、差异大小及差异  
显著性等信息;并对 DEGs 进行 GO 富集分析,对其功能进行  
描述,利用 KEGG 数据库对 DEGs 进行分析,筛选转录  
显著差异基因富集的信号通路。将差异表达基因上传至  
STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>),下载 TSV  
格式结果导入 Cytoscape 3.10.2 软件中绘制 PPI 网络图及筛  
选关键差异表达基因。

2.4.3 RT-qPCR 法验证关键差异表达基因 剥离小鼠肿瘤  
组织,PBS 清洗表面血迹,液氮速冻,置于-80℃冰箱保  
存。取各组肿瘤组织约 50 mg,加液氮研磨,按照 RNA 提  
取试剂盒说明书步骤提取总 RNA,根据反转录试剂盒说明  
书进行反转录获取 cDNA,将目的基因和内参进行 PCR 扩  
增。以 *GAPDH* 为内参,采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算各组关键差异表  
达基因的 mRNA 表达,每组样品重复检测 3 次。所有引物  
均来自 NCBI 官网,由新疆有康生物科技有限公司合成,  
引物序列见表 1。

表 1 引物序列

| 基因                              | 引物序列                               |
|---------------------------------|------------------------------------|
| <i>PDPN</i>                     | 正向 5'-ACCGTGCCAGTGTGTTCTG-3'       |
|                                 | 反向 5'-AGCAACCTGTGGTTGTTATTTTGT-3'  |
| <i>Mcpt4</i>                    | 正向 5'-CTTCTGACTTTATCAAGCCGGG-3'    |
|                                 | 反向 5'-CACTCCAGTTCGCCCCC-3'         |
| <i>IL13ra2</i>                  | 正向 5'-TGGTCTGCTCTTGAAACCTGG-3'     |
|                                 | 反向 5'-GCTGGAGGTAATCAGCACACTG-3'    |
| <i>DLIA</i>                     | 正向 5'-GCGGCAGACAAATGACCAAATGAC-3'  |
|                                 | 反向 5'-CAACAGCTCTCAGTCCTTGATGG-3'   |
| <i>CXCR2</i>                    | 正向 5'-ATGCCCTCTATTCTGCCAGAT-3'     |
|                                 | 反向 5'-GTGCTCCGTTGTATAAGATGAC-3'    |
| <i>CXCR1</i>                    | 正向 5'-TCTGGACTAATCCTGAGGCTG-3'     |
|                                 | 反向 5'-GCCTGTTGGTTATTGGAAGCTCTC-3'  |
| <i>Adgre1</i>                   | 正向 5'-CCTGCTGTGCTGCTGCTGTCA-3'     |
|                                 | 反向 5'-GCCGTCTGGTTGTCAGTCTTGT-3'    |
| <i>TNF<math>\gamma</math>15</i> | 正向 5'-TTAGCACCCCTCCTAATGGCTGGG-3'  |
|                                 | 反向 5'-ACTTGCTGTGCTGAAGGCTCAG-3'    |
| <i>Serpina1b</i>                | 正向 5'-AGAAGGTTAGTCCAGATCCATATCC-3' |
|                                 | 反向 5'-GGGCATAGACATAGGAACGGC-3'     |
| <i>Serpinb2</i>                 | 正向 5'-ATTTCTGTGTGTACGCCGC-3'       |
|                                 | 反向 5'-CCAGCACCGAGGAGAACTAT-3'      |
| <i>GAPDH</i>                    | 正向 5'-AGTGCGGTGTAACGGATTG-3'       |
|                                 | 反向 5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'       |

2.5 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理,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,多重  
比较采用 LSD-*t* 检验,基因表达比较采用独立样本 *t* 检验  
(双尾法)。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 小艾飞蜜膏对 MFC 胃癌荷瘤小鼠肿瘤生长抑制率的

影响 给药 9 d 后,与模型组比较,5-FU 组和小艾飞蜜膏  
高剂量组肿瘤质量降低 (*P*<0.05),5-FU 组和小艾飞蜜膏  
低、高剂量组小鼠肿瘤抑制率分别为 55.3%、38.8%、  
47.9%,见图 1、表 2。

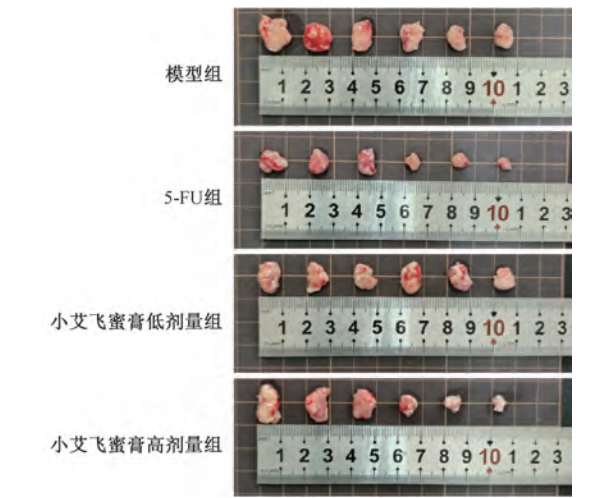


图 1 各组小鼠肿瘤大小比较

表 2 各组小鼠肿瘤生长抑制率比较 ( $\bar{x}\pm s$ , *n*=8)

| 组别        | 肿瘤质量/g        | 抑瘤率/% |
|-----------|---------------|-------|
| 模型组       | 0.307±0.184   | —     |
| 5-FU 组    | 0.137±0.091 * | 55.3  |
| 小艾飞蜜膏低剂量组 | 0.188±0.090   | 38.8  |
| 小艾飞蜜膏高剂量组 | 0.160±0.077 * | 47.9  |

注:与模型组比较,\**P*<0.05。

3.2 小艾飞蜜膏对 MFC 胃癌荷瘤小鼠体质量和脏器指数  
的影响 与正常组比较,模型组小鼠体质量、肝脏指数降  
低 (*P*<0.05),脾脏、肾脏、肺指数均升高 (*P*<0.05, *P*<  
0.01);与模型组比较,5-FU 组小鼠体质量、肝脏指数、  
脾脏指数、胸腺指数降低 (*P*<0.05, *P*<0.01),小艾飞蜜  
膏低剂量组脾脏指数降低 (*P*<0.05),高剂量组脾脏指数、  
肾脏指数降低 (*P*<0.05),见图 2。结果表明,肿瘤会对小  
鼠体质量和脏器产生不同程度的影响,5-FU 对体质量和脏  
器影响严重,且对免疫器官有抑制作用,而小艾飞蜜膏无  
明显不良反应。

3.3 小艾飞蜜膏对 MFC 胃癌荷瘤小鼠肿瘤组织病理变化  
的影响 模型组小鼠肿瘤组织中肿瘤细胞密度较高,细胞  
形态规则、排列均一,未见明显肿瘤坏死灶;5-FU 组及小  
艾飞蜜膏各剂量组肿瘤细胞密度降低,分布不均,核大,  
色深,形状差异明显,呈不同程度肿瘤坏死灶,见图 3。

3.4 小艾飞蜜膏对 MFC 胃癌荷瘤小鼠血清 IFN- $\gamma$ 、IL-2、  
IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1 水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠  
血清 IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1 水平升高 (*P*<0.01),IL-2 水  
平降低 (*P*<0.01);与模型组比较,5-FU 组小鼠血清 IFN-  
 $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 1 水平降低 (*P*<0.01),小艾飞蜜膏各剂量组小  
鼠血清 IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1 水平降低 (*P*<0.01),IL-2  
水平升高 (*P*<0.05, *P*<0.01),见图 4。

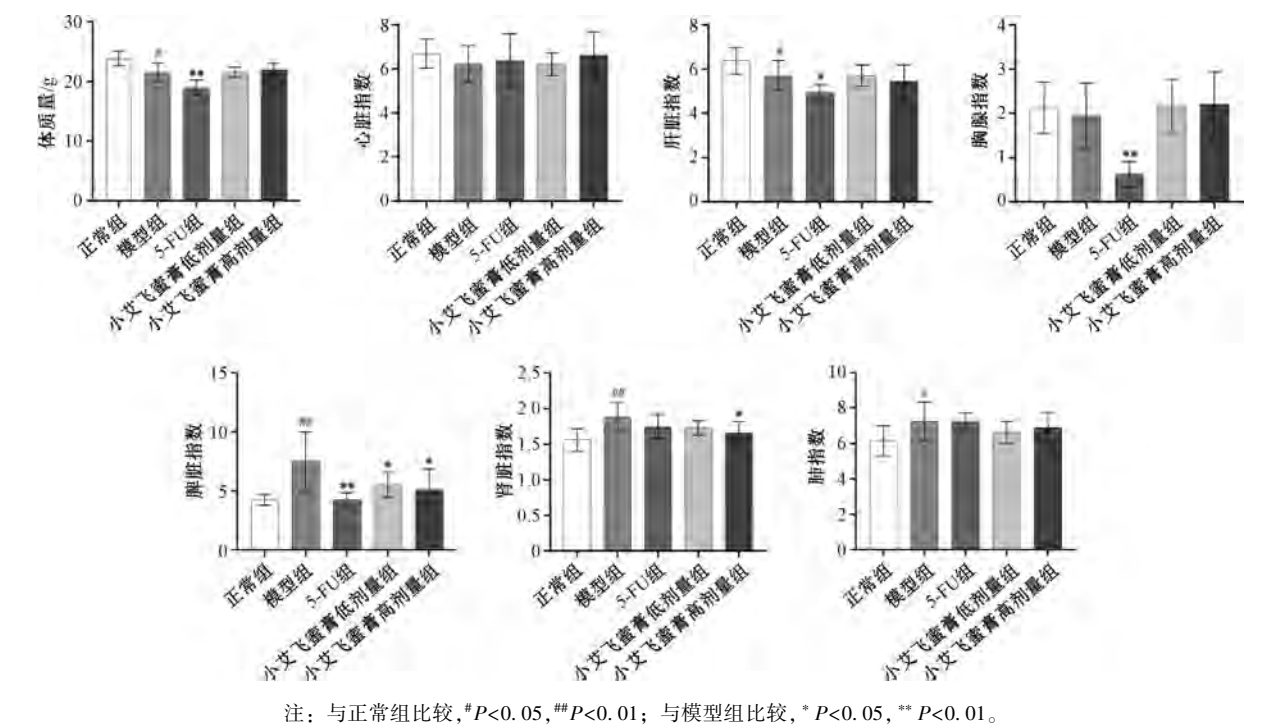


图 2 各组小鼠体质量和脏器指数比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

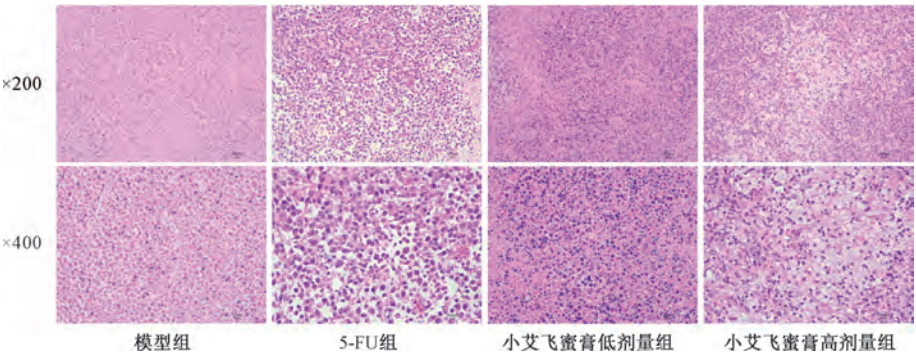


图 3 各组小鼠肿瘤组织病理形态变化 (HE 染色)

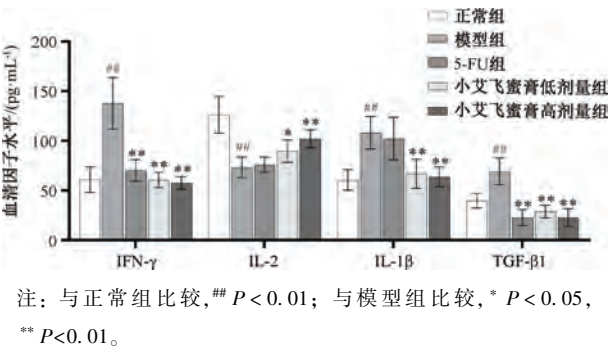


图 4 各组小鼠血清 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1 水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

3.5 小艾飞蜜膏对 MFC 胃癌荷瘤小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群变化的影响 与正常组比较，模型组 CD4<sup>+</sup>T 细胞比例、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 细胞比值降低 ( $P<0.05$ )，CD8<sup>+</sup>T 细胞、Treg 细胞、Th17 细胞比例升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )；与模型组比较，5-FU 组 CD4<sup>+</sup>T 细胞比例升高 ( $P<0.05$ )，Th17 细

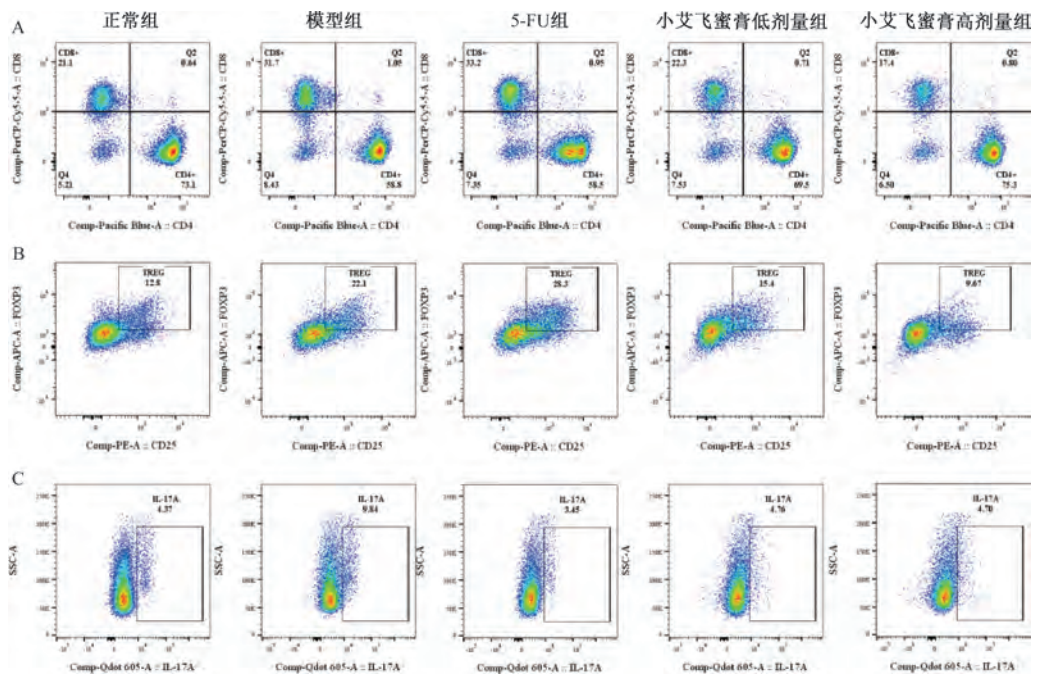
胞比例降低 ( $P<0.01$ )，小艾飞蜜膏各剂量组 CD4<sup>+</sup>T 细胞比例、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 细胞比值升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )，CD8<sup>+</sup>T 细胞、Treg 细胞、Th17 细胞比例降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )，见图 5~6。

3.6 转录组学测序分析

3.6.1 差异表达基因筛选 为了评估样本组间差异及组内重复情况，本研究首先对各个样本的测序结果进行了主成分分析 (PCA) 和样本 sample to sample 聚类分析，见图 7。结果显示，模型组中各样本与小艾飞蜜膏高剂量组中各样本比较相对分散，表明组间独立性和组内重复性相对较好。

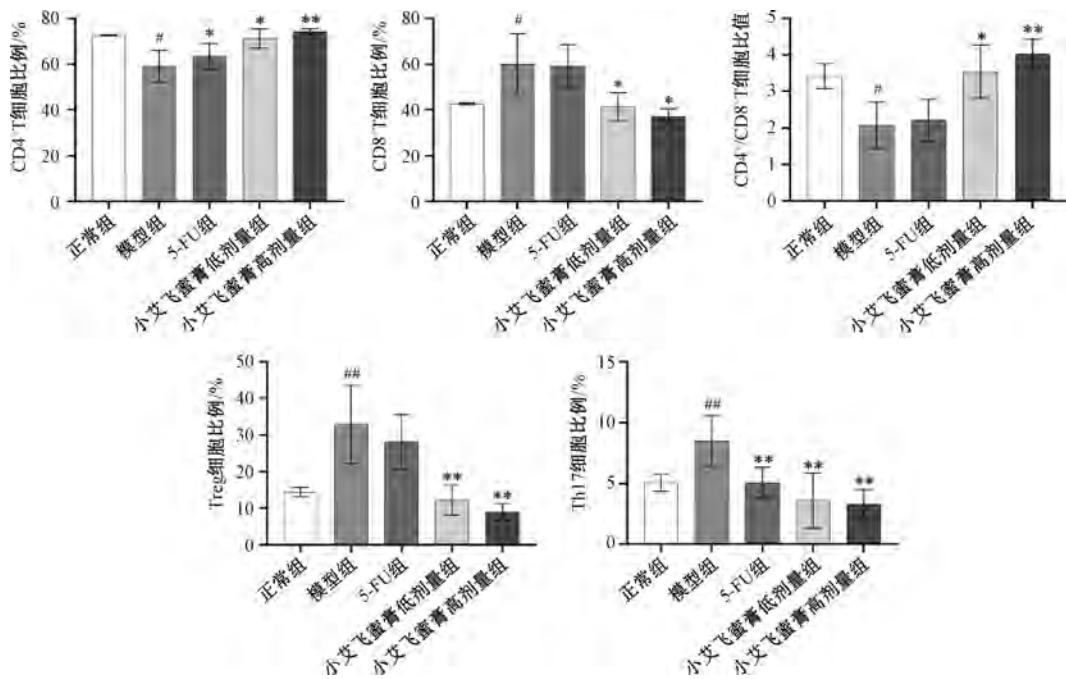
DEGs 火山图显示，与模型组比较，小艾飞蜜膏组 DEGs 共有 110 个，其中上调基因 34 个，下调基因 76 个；对 2 组 DEGs 进行聚类分析，发现模型组和小艾飞蜜膏组之间存在较为明显的差异，见图 8。

3.6.2 转录组差异表达基因的 GO 功能分析 对 DEGs 按照生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 进



注：A 为 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞，B 为 Treg 细胞，C 为 Th17 细胞。

图 5 各组小鼠 T 淋巴细胞亚群变化

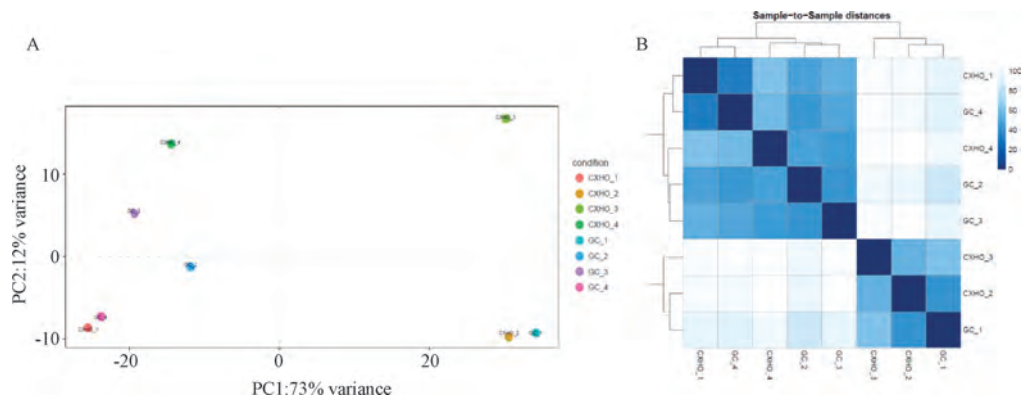


注：与正常组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与模型组比较，\* $P<0.05$ ，\*\* $P<0.01$ 。

图 6 各组小鼠 T 淋巴细胞亚群变化 ( $\bar{x}\pm s$ ， $n=4$ )

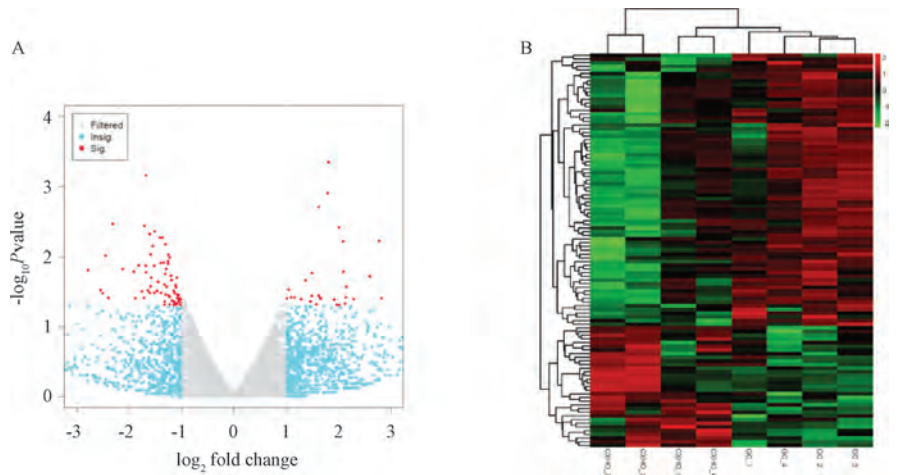
行 GO 分类挑选，每个 GO 分类中挑选  $P$  值最小即富集最显著的前 10 个 GO 条目进行展示，见图 9。结果显示，BP 主要涉及髓系树突状细胞活化、细胞表面受体信号通路、炎症反应、趋化作用、免疫应答等；CC 主要涉及胞外区、细胞外间隙、囊泡、质膜外侧、颗粒分泌等；MF 主要与酪氨酸蛋白激酶活性、细胞因子活性、G-蛋白偶联受体活性、电压门控离子通道活性、GTP 结合等有关。

3.6.3 转录组差异表达基因的 KEGG 富集分析 DEGs 进行 KEGG 富集分析，筛选对应基因数目大于 2 的条目，按照每个条目对应的 $-\log_{10}P$ value 由大到小排序，前 20 条以气泡图呈现，见图 10。结果显示，DEGs 主要涉及乳腺癌、癌症信号通路、帕金森病、蛋白质的消化和吸收、补体与凝血级联信号通路、血管平滑肌收缩、神经活性配体受体互作、磷脂酶 D 信号通路、细胞因子受体相互作用。



注：A 为 PCA 分析，B 为 sample to sample 聚类分析。GC1、GC2、GC3、GC4 为模型组样本，CXHO1、CXHO2、CXHO3、CXHO4 为小艾飞蜜膏高剂量组样本。

图 7 PCA 分析和 sample to sample 热图分析



注：A 为 DEGs 火山图，B 为聚类分析图。

图 8 DEGs 火山图和聚类分析图

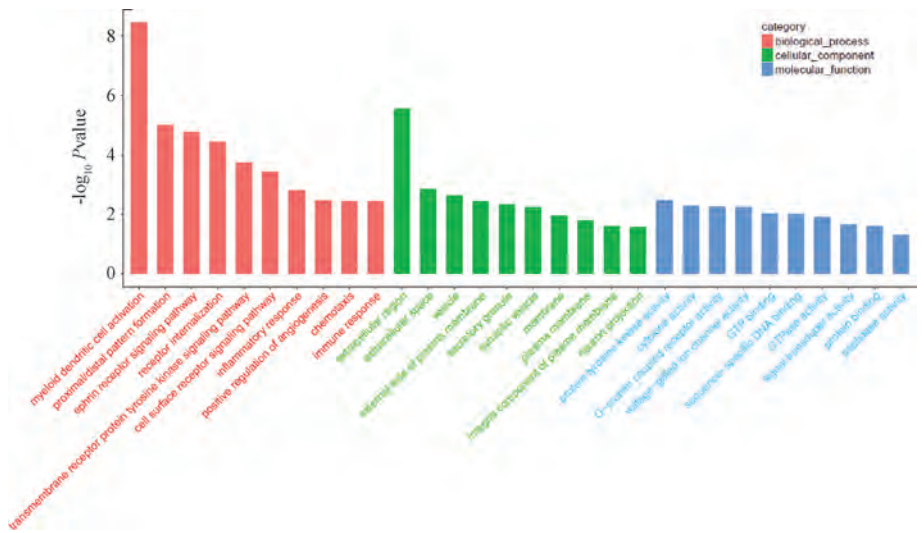


图 9 GO 功能富集分析

3.6.4 关键差异表达基因筛选 通过 Cytoscape 3.10.2 软件绘制 PPI 网络图，见图 11，使用 cytoHubba 插件按照 MCC 算法筛选出排名前十的关键基因，见图 12，分别是

*Adgre1*、*Serpinb2*、*Cxcr1*、*Cxcr2*、*DLIA*、*Serpina1b*、*Mcpt4*、*Tnfsf15*、*IL13ra2*、*Pdpm*，详见表 3。

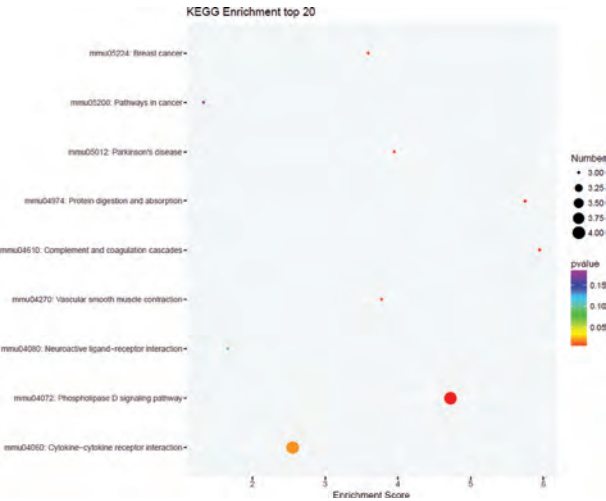


图 10 KEGG 富集分析结果

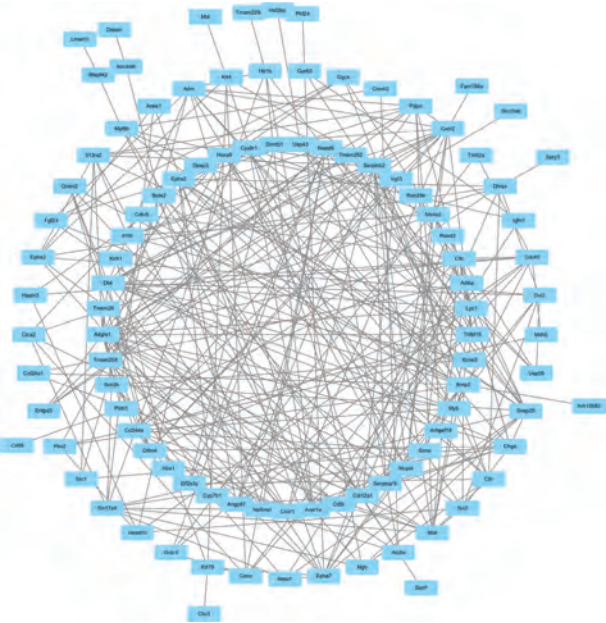
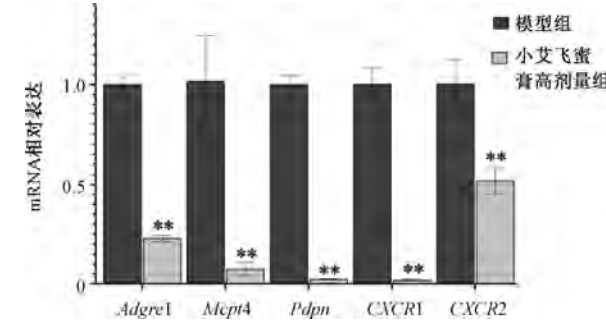


图 11 差异表达基因 PPI 网络图



注：与模型组比较，\*  $P<0.05$ ，\*\*  $P<0.01$ 。

图 13 差异表达基因 mRNA 表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

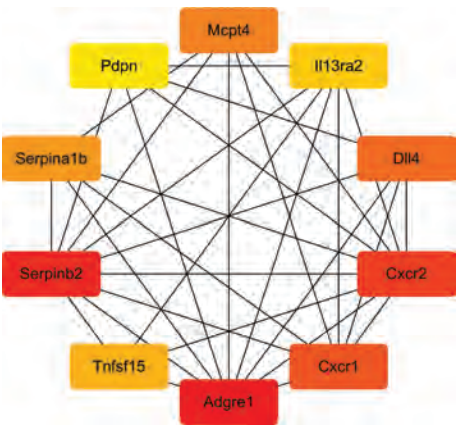
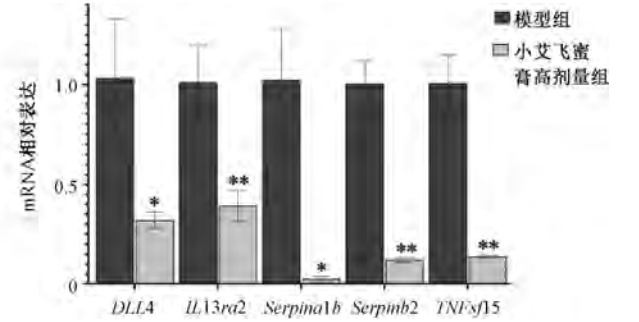


图 12 关键差异表达基因网络图（前 10 位）

表 3 关键差异表达基因信息（前 10 位）

| 名称               | 表达情况 | 差异倍数       | P 值       |
|------------------|------|------------|-----------|
| <i>Adgre1</i>    | 降低   | -1.076 896 | 0.039 190 |
| <i>Serpinb2</i>  | 降低   | -1.126 288 | 0.032 874 |
| <i>Cxcr2</i>     | 降低   | -1.304 469 | 0.006 622 |
| <i>Cxcr1</i>     | 降低   | -2.123 603 | 0.014 889 |
| <i>DL14</i>      | 降低   | -1.258 948 | 0.011 518 |
| <i>Serpina1b</i> | 降低   | -1.112 425 | 0.025 298 |
| <i>Mcpt4</i>     | 降低   | -1.173 753 | 0.041 688 |
| <i>Tnfsf15</i>   | 降低   | -1.546 751 | 0.007 045 |
| <i>IL13ra2</i>   | 降低   | -1.189 964 | 0.021 398 |
| <i>Pdpn</i>      | 降低   | -1.907 530 | 0.016 276 |

3.6.5 关键差异表达基因表达验证 为验证 RNA-seq 测序数据的准确性，将“3.6.4”项下筛选得到的前 10 位关键差异表达基因进行验证，结果见图 13。与模型组比较，小艾飞蜜膏高剂量组肿瘤组织 *Adgre1*、*Serpinb2*、*Cxcr1*、*Cxcr2*、*DL14*、*Serpina1b*、*Mcpt4*、*Tnfsf15*、*IL13ra2*、*Pdpn* mRNA 表达降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )，表达趋势与 RNA-seq 结果一致，证明测序结果真实可靠。结果表明，小艾飞蜜膏可以通过下调荷瘤小鼠肿瘤组织中以上关键基因的表达来调控肿瘤微环境的变化。



4 讨论

免疫器官的脏器指数是衡量机体免疫功能的指标之一，胸腺是 T 淋巴细胞成熟、增殖和分化的主要场所，脾脏是发生免疫应答的主要场所，两者能初步反映机体的免疫功

能水平<sup>[5]</sup>。本实验结果显示，小艾飞蜜膏和 5-FU 对胃癌均有一定的抑制作用；5-FU 对小鼠体质量和脏器有严重影响，尤其对胸腺有严重的抑制作用，而小艾飞蜜膏并未产生明显毒性。模型组脾脏增大，表明荷瘤小鼠脾脏进入了

负免疫调节阶段<sup>[6]</sup>，提示模型组小鼠的免疫功能受到抑制；小艾飞蜜膏组脾脏指数降低，但后续流式细胞术检测 T 细胞亚群并未受到影响。CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T 细胞是主要的 T 淋巴细胞亚群，两者的比值能直接反映机体免疫力的水平<sup>[7]</sup>。Treg 是主要以 CD25 和 Foxp3 为细胞表型特征的一类具有免疫抑制作用的 T 细胞<sup>[8]</sup>，主要在肿瘤组织的缺氧区域聚集，具有分泌 TGF-β1 等免疫抑制细胞因子、激活肿瘤细胞的免疫耐受和帮助肿瘤细胞免疫逃逸的作用<sup>[9]</sup>。Th17 细胞是主要以 IL-17A 为细胞表型特征的 T 细胞亚群，在胃癌中 Th17 细胞可以通过介导炎症反应来刺激血管的生成，促进肿瘤细胞的生长、浸润和转移，并且 IL-1β 和 TGF-β1 会使 Th17 细胞数量增加，加剧肿瘤微环境的炎症反应，促进肿瘤生长<sup>[10]</sup>。本实验结果显示，小艾飞蜜膏可以提高机体的 CD4<sup>+</sup>T 细胞比例与 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 细胞比值，降低 CD8<sup>+</sup>T 细胞、Treg 细胞、Th17 细胞比例，通过调节机体免疫功能，抑制肿瘤细胞的免疫逃逸和炎症反应而发挥抗肿瘤作用。

转录组学可以通过检测基因表达变化来研究疾病的发生和发展过程，揭示其功能和潜在的分子机制<sup>[11]</sup>。本研究通过转录组学探讨小艾飞蜜膏对胃癌发展过程中基因表达的影响，通过富集分析得到的关键差异表达基因有 *Adgre1*、*Serpib2*、*Cxcr2*、*Cxcr1*、*DLL4*、*Serpina1b*、*Mcpt4*、*Tnfsf15*、*IL13ra2*、*Pdpm*，小艾飞蜜膏通过下调这些基因的表达，发挥抗肿瘤作用。*Adgre1* 是一种在肿瘤组织中异常表达的巨噬细胞标志物，其表达的下调可能减少肿瘤相关巨噬细胞的促肿瘤活性，改善免疫微环境<sup>[12]</sup>。*DLL4* 在多种癌症中作为致癌基因，其表达降低可能抑制 Notch1 信号通路，从而减少胃癌细胞的转移和血管生成<sup>[13]</sup>。PDPN 作为一种新兴的癌症生物标志物和治疗靶点，可以被 IL-1β 和 TGF-β1 诱导产生，并在癌症相关成纤维细胞和炎症巨噬细胞上高度表达，PDPN 的抑制可能减少肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和炎症反应，进而抑制肿瘤进展<sup>[14]</sup>。此外，小艾飞蜜膏对 *Mcpt4* 的调节作用可能抑制肥大细胞介导的促炎反应，减缓胃癌的发展<sup>[15-16]</sup>。*IL13ra2* 是 IL-13 的高亲和力膜受体，在多种实体瘤中过表达，*IL13ra2* 的下调可能减弱肿瘤细胞的增殖和侵袭能力<sup>[17]</sup>。*CXCR1* 和 *CXCR2* 都属于趋化因子超家族，小艾飞蜜膏可能通过降低 *CXCR1* 和 *CXCR2* 的表达来减少肿瘤细胞干性及其增殖和转移，同时影响肿瘤免疫微环境<sup>[18-19]</sup>，还可能影响 *CXCR2*，让其在 Treg 募集和肿瘤免疫逃逸中的作用受到抑制，同时提高肿瘤对化疗的敏感性<sup>[20]</sup>。已有研究表明，*TNFSF15* 在不同的肿瘤类型中发挥不同作用，在胃癌中，*TNFSF15* 的表达降低可能与改善胃癌患者的预后相关<sup>[21-22]</sup>。*Serpina1b*、*Serpib2* 属于丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族成员，*Serpina1b* 和 *Serpib2* 的下调可能与肿瘤的发展、转移和预后改善有关<sup>[23-24]</sup>。以上研究表明，小艾飞蜜膏可能通过综合调控关键基因的表达，对肿瘤免疫微环境和细胞信号传导途径产生积极影响，从而改善肿瘤免疫抑制微环境，发挥其抗肿瘤作用。

综上所述，小艾飞蜜膏对 MFC 胃癌荷瘤小鼠肿瘤生

长有抑制作用，其抗肿瘤机制可能与提高荷瘤小鼠机体免疫功能，改善肿瘤免疫抑制微环境，抑制肿瘤细胞增殖有关，本研究可为小艾飞蜜膏的临床应用提供一定的科研基础。

参考文献：

[ 1 ] 姚一菲，孙可欣，郑荣寿.《2022 全球癌症统计报告》解读：中国与全球对比[J]. 中国普外基础与临床杂志，2024，31(7)：769-780.

[ 2 ] Zhong Y L, Wang P Q, Hao D L, *et al.* Traditional chinese medicine for transformation of gastric precancerous lesions to gastric cancer; A critical review[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2023, 15(1): 36-54.

[ 3 ] 米仁沙·牙库甫，热娜·卡斯木，帕丽达·阿不力孜，等. 复方小艾飞蜜膏抗炎作用研究[J]. 中药药理与临床，2014，30(2)：166-168.

[ 4 ] 米仁沙·牙库甫. 复方小艾飞蜜膏抑制胃癌药效物质基础研究[D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2014.

[ 5 ] 罗 静，冯伟勋，余泽兵，等. 地榆皂苷 II 对 MFC 胃癌荷瘤小鼠的抗肿瘤作用及机制[J]. 时珍国医国药，2022，33(4)：774-777.

[ 6 ] Jiang W, Li Y, Zhang S, *et al.* Association between cellular immune response and spleen weight in mice with hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2021, 22(2)：625.

[ 7 ] 杨玉萍，段永强，白 敏，等. 基于 ERK 介导 C-Myc/PD-L1 协同作用探讨参芪抑瘤方联合顺铂对 H22 肝癌荷瘤小鼠的抑瘤机制[J]. 中国免疫学杂志，2024，40(3)：586-591.

[ 8 ] 张金萍，葛基春，李强明，等. 霍山石斛多糖对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用[J]. 现代食品科技，2023，39(7)：7-15.

[ 9 ] 周红见，柯 超，蒋 斌，等. IGF-2 通过调控 Treg/Th17 免疫平衡促进小鼠结肠癌细胞移植瘤生长[J]. 免疫学杂志，2023，39(3)：255-261.

[ 10 ] 尹嘉琪，黎丽群，谢 胜. 中药通过调节 Th17/Treg 平衡干预胃癌的研究进展[J]. 中国药房，2024，35(3)：379-384.

[ 11 ] Hong M, Tao S, Zhang L, *et al.* RNA sequencing: New technologies and applications in cancer research[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1)：166.

[ 12 ] Akter R, Kim K, Kwon H Y, *et al.* EMR1/ADGRE1 expression in cancer cells upregulated by tumor-associated macrophages is related to poor prognosis in colorectal cancer[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(12)：3121.

[ 13 ] Xiu M X, Liu Y M, Kuang B H. The role of dlls in cancer: A novel therapeutic target[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 3881-3901.

[ 14 ] Tian Y, Chen X, Wang X, *et al.* Podoplanin promotes the carcinogenicity of gastric cancer by activating ezrin and mediating the crosstalk between tumour cells and cancer-associated fibroblasts[J]. *Exp Physiol*, 2023, 108(5)：740-751.

[ 15 ] Pejler G. Novel insight into the *in vivo* function of mast cell chymase: Lessons from knockouts and inhibitors[J]. *J Innate Immun*, 2020, 12(5)：357-372.

[16] Sammarco G, Varricchi G, Ferraro V, *et al.* Mast cells, angiogenesis and lymphangiogenesis in human gastric cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2106.

[17] Knudson K M, Hwang S, McCann M S, *et al.* Recent advances in IL-13R $\alpha$ 2-directed cancer immunotherapy[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 878365.

[18] Molczyk C, Singh R K. CXCR1: A cancer stem cell marker and therapeutic target in solid tumors[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(2): 576.

[19] Cheng Y, Mo F, Li Q, *et al.* Targeting CXCR2 inhibits the progression of lung cancer and promotes therapeutic effect of cisplatin[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 62.

[20] Cheng Y, Ma X L, Wei Y Q, *et al.* Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019, 1871(2): 289-312.

[21] Gao Y, Wang Y, Wang X, *et al.* TNF-like ligand 1A is associated with progression and prognosis of human gastric cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 7715-7723.

[22] Niu W, Liu Q, Huo X, *et al.* TL1A promotes metastasis and EMT process of colorectal cancer[J]. *Heliyon*, 2024, 10(2): e24392.

[23] 彭契六, 朱春玲, 张 磊, 等. SERPINA1 在肝癌组织的表达及临床意义[J]. *重庆医学*, 2023, 52(1): 77-82.

[24] Piao Y J, Kim H S, Han W, *et al.* Transcriptome analysis of SerpinB2-deficient breast tumors provides insight into deciphering SerpinB2-mediated roles in breast cancer progression[J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 479.

# 基于转录组测序探讨拟黑多刺蚁活性组分对胶质母细胞瘤 T98G 细胞生长的抑制作用

谢佳秀<sup>1</sup>, 梁金行<sup>2</sup>, 何俊慧<sup>1</sup>, 李 懿<sup>1</sup>, 周容妃<sup>2</sup>, 周桂丽<sup>2</sup>, 韦冬梅<sup>1</sup>, 刘丽敏<sup>2</sup>, 韦桂宁<sup>1</sup>, 李冬梅<sup>1\*</sup>

(1. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西壮族自治区中医药研究院, 广西南宁 530022; 2. 广西医科大学, 广西南宁 530021)

**摘要:** **目的** 基于转录组测序探究拟黑多刺蚁活性组分对胶质母细胞瘤 T98G 细胞生长的抑制作用。**方法** 采用 CCK8 法检测不同质量浓度拟黑多刺蚁活性组分干预 24 h 对 T98G 细胞活力的影响; 克隆形成实验、Transwell 实验、DNA 损伤检测实验和 RT-qPCR 实验检测拟黑多刺蚁活性组分对 T98G 细胞的增殖、迁移、DNA 损伤和修复能力的影响。拟黑多刺蚁活性组分处理 T98G 细胞后进行转录组测序, 通过生物信息学分析获得拟黑多刺蚁的活性成分及关键靶基因, RT-qPCR 检测相关基因 mRNA 表达。**结果** 拟黑多刺蚁活性组分作用 T98G 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 4.57 mg/mL。与对照组比较, 给药组克隆形成数目和迁移率降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), T98G 细胞 DNA 损伤增加 ( $P<0.01$ ), DNA 损伤修复基因 *RAD50*、*MRE11* 表达降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。转录组测序分析显示, 与对照组比较, 给药组有 363 个基因表达上调, 1 006 个基因表达下调。GO 富集分析显示, 差异基因主要参与细胞过程、代谢、免疫等反应调控。KEGG 分析显示, 差异基因主要参与 Toll 样受体信号通路、Nod 样受体信号通路。生物信息学分析显示, 拟黑多刺蚁活性组分抗胶质瘤的关键靶基因是 *F3*、*TLR4* 和 *LY96*。RT-qPCR 验证实验显示, 拟黑多刺蚁活性组分能降低 *F3*、*TLR4*、*LY96* mRNA 表达 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论** 拟黑多刺蚁活性组分可抑制胶质母细胞瘤 T98G 细胞的增殖、迁移能力, 诱导 DNA 损伤并抑制 DNA 损伤修复途径, 其机制可能与抑制 F3 以及抑制 Toll 样受体信号通路有关。

**关键词:** 拟黑多刺蚁; 胶质母细胞瘤; DNA 损伤修复; 转录组测序; 组织因子 (F3); Toll 样受体

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** B      **文章编号:** 1001-1528(2025)03-0984-09

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2025.03.045

收稿日期: 2024-07-29

基金项目: 国家自然科学基金 (82460788); 广西自然科学基金项目 (2021GXNSFBA220024); 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD22035055); 广西中医药重点学科建设项目 (GZXK-Z-20-75)

作者简介: 谢佳秀 (1995—), 硕士, 女 (壮族), 助理研究员, 从事中药抗肿瘤药理研究。Tel: 15678879282, E-mail: xiejiaxiu@gicmp.ac.cn

\* 通信作者: 李冬梅 (1990—), 硕士, 女, 副研究员, 从事中药抗肿瘤药理研究。Tel: 18076562295, E-mail: ldm\_juemingzi@126.com