- [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-13Rα2-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 ICsn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,1006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@

胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 是一种具有高度 侵略性的中枢神经系统原发性肿瘤<sup>[1]</sup>,5年内的存活比例 不到5%<sup>[2]</sup>。由于 GBM 具有显著的异质性,肿瘤细胞具有 较高的 DNA 修复活性,导致 GBM 患者普遍对放疗和化疗 产生耐药性,因此治疗效果不容乐观<sup>[3]</sup>。

中药已被普遍认为是开发抗肿瘤药物的宝贵资源[4]。 拟黑多刺蚁 Polyrhachis vicina Roger, 俗称黑蚂蚁, 是一种 传统的动物药,在《本草纲目》中记载为"玄驹"。拟黑 多刺蚁主要分布于我国广西、广东等地,具有改善风湿、 调节免疫等功效,已有双蚁祛湿通络胶囊、蚂蚁双参通痹 丸等产品上市,均为其传统功效产品,而对拟黑多刺蚁的 现代药理研究还有待进一步拓宽。在前期研究中, 拟黑多 刺蚁石油醚提取物被证实主要由饱和脂肪酸和不饱和脂肪 酸组成,为拟黑多刺蚁活性组分<sup>[5-7]</sup>,多项研究报道其具 有抗肿瘤活性<sup>[8-9]</sup>。拟黑多刺蚁活性组分对脑缺血和抑郁 等脑部疾病具有改善作用[10-12],表明其可以有效通过血 脑屏障。但拟黑多刺蚁对 GBM 的作用尚无报道。本研究 将通过体外实验探讨拟黑多刺蚁活性组分是否抑制 GBM 细胞的生长,并通过转录测序分析和分子对接寻找活性化 合物和靶点,进一步探讨拟黑多刺蚁活性组分抑制 GBM 生长的分子机制, 以期为拟黑多刺蚁的临床应用提供实验 依据。

## 1 材料

 1.1 细胞株 人脑胶质瘤 T98G 细胞(批号 L860407022115),购自武汉普诺赛生命科技有限公司,经 过STR检测,细胞株中未发现人类细胞交叉污染。

1.2 试剂与药物 干燥的拟黑多刺蚁(批号 20220211) 购自广西南宁臻远生物科技有限公司,由广西壮族自治区 中医药研究院黄云峰副研究员鉴定为拟黑多刺蚁 Polyrhachis vicina Roger; 阳性药替莫唑胺 (temozolomide, TMZ, 批号 LRAD1234, 美国 Sigma 公司)。胎牛血清 [批 号 T220906H501, 赛业 (广州) 生物科技有限公司]; DMEM 培养基(批号 6124197, 美国 Gbico 公司); 0.25% 胰酶、青霉素-链霉素、结晶紫染色液(批号 240004006、 20231104、240001001,北京索莱宝科技有限公司); Transwell 小室 (批号 19622042, 美国 Corning 公司); RNA 提取试剂盒 [批号 ANE1859A, 宝日医生物技术 (北京) 有限公司];细胞增殖与活性检测(CCK8)试剂盒、DNA 损伤检测试剂盒、RNA 逆转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒 (批号 B3270DAA、081023231010、7E782J3、7E821A4,南 京诺唯赞生物科技股份有限公司)。

 1.3 仪器 MCO-18AIC 培养箱(日本松下公司); AC2-4S1 生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); SynergyH1 多功能 酶标仪(美国 BioTek 公司); DMi8 荧光倒置显微镜(德国 徕卡公司); Verity 96-well Thernal cycler PCR 仪(美国赛默 飞世尔科技公司); LightCycler 480 II 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞典 Roche 公司); Agilent2100 生物分析仪(美国安捷伦 公司); Novaseq6000 基因测序仪(美国 Illumina 公司)。

## 2 方法

2.1 提取物制备 参考文献 [8-9, 13-14] 报道,取干燥的拟黑多刺蚁粉碎,称取 1.0 kg,用 95% 乙醇浸泡,水浴回流提取 3 次,合并后浓缩回流液,经石油醚萃取,收集上层液体,浓缩,得到 56.23 g浓缩膏。取 4.5 g浓缩膏与100 mL 2.0% 吐温 80 混合乳化,得到拟黑多刺蚁活性组分 母液。每 1 mL 拟黑多刺蚁活性组分含有 0.80 g 拟黑多刺蚁生药,即质量浓度为 0.8 g/mL,分装后于-20 ℃冰箱保存。通过气相色谱-质谱联用技术的分析,显示拟黑多刺蚁活性组分中含有十七烷、肉豆蔻酸、棕榈油酸、棕榈酸、十六碳烯酸异构体、8,11-十八碳二烯酸、顺式-13-十八碳烯酸、反油酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十烷酸、胆甾-3,5-二烯、二十八烷、豆甾-3,5-二烯、三十一烷<sup>[9]</sup>。

2.2 细胞培养 T98G 细胞在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养环境下, 使用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培 养基进行培养。

2.3 CCK8 法检测细胞毒性 将 T98G 细胞接种于 96 孔板中,每孔约含 8 000 个细胞,培养 24 h 后,加入不同质量浓度(0、0.5、1、2、4、8、16、32 mg/mL) 拟黑多刺蚁活性组分处理,继续培养 24 h 后,弃上清液,并加入含有10% CCK8 检测液的无血清培养基,培养 1 h 后,使用多功能酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值。采用 SPSS 25.0 统计软件计算出药物 IC<sub>50</sub>值。

2.4 克隆形成实验 将T98G细胞接种于24孔板中,每孔 约含300个细胞,加入拟黑多刺蚁活性组分1、2 mg/mL、 2.0% 吐温80(对照组)和TMZ(200 μmol/L)处理细胞, 2 d 后更换新的培养基,1周后停止培养。去除培养基, PBS 清洗,甲醇固定,0.01% 结晶紫染色15 min,最后用 PBS 冲洗并拍照以计数。

2.5 Transwell 迁移实验 将 Transwell 小室放置入 24 孔板 内,并在下室加入含有 10% 血清的 DMEM 培养基 600 μL, 上室加入不含血清的细胞悬浮液 (2×10<sup>6</sup>/mL) 200 μL,分 別加入 2.0% 吐温 80、拟黑多刺蚁活性组分 1、2 mg/mL 和 TMZ 200 μmol/L,处理 24 h 后,吸弃小室内的培养基,将 小室浸没在甲醇中固定,用 0.01% 结晶紫染色 15 min,用 PBS 洗涤 3 次,于显微镜下观察,随机选取 6 个视野拍摄 照片,并使用 ImageJ 软件计算迁移率。

2.6 DNA 损伤检测 取对数生长期的 T98G 细胞, 接种于 6 孔板,设置对照组(2.0% 吐温 80)、拟黑多刺蚁活性组 分低、高剂量组(1、2 mg/mL)和 TMZ 组(200 μmol/L), 加药处理 24 h 后吸去培养基, PBS 洗涤,按照说明书操作 步骤,加入固定液固定 15 min。依次进行免疫染色封闭液 封闭、γ-H<sub>2</sub>AX 兔单抗孵育、抗兔 488 孵育、DAPI 染色、 封片。于荧光显微镜下观察,随机选取 6 个视野拍照,并 使用 ImageJ 软件进行半定量分析。

2.7 RT-qPCR 法检测细胞 RAD50、MRE11、F3、TLR4、 LY96 mRNA 表达 取对数生长期的 T98G 细胞, 接种于 6 孔板,设置对照组(2.0% 吐温 80)、拟黑多刺蚁活性组分低、高剂量组(1、2 mg/mL)和 TMZ 组(200 μmol/L),加药处理24 h后收集细胞,用 TRIzol 试剂提取细胞中的总RNA,使用逆转录试剂盒合成 cDNA,使用 PCR 扩增试剂盒进行 PCR 扩增。引物由生工生物(上海)股份有限公司合成,序列见表1。

表1 引物序列

基因	引物序列(5'→3')
RAD50	正向 5'-TACTGGAGATTTCCCTCCTGG-3'
	反向 5'-AGACTGACCTTTTCACCATGC-3'
MRE11	正向 5'-ATGCAGTCAGAGGAAATGATACG-3'
	反向 5'-CAGGCCGATCACCCATACAAT-3'
F3	正向 5'-CCCAAACCCGTCAATCAAGTC-3'
	反向 5'-CCAAGTACGTCTGCTTCACAT-3'
TLR4	正向 5'-AGACCTGTCCCTGAACCCTAT-3'
	反向 5'-CGATGGACTTCTAAACCAGCCA-3'
<i>LY</i> 96	正向 5'-GAAGCAGTATTGGGTCTGCAA-3'
	反向 5'-TTGGAAGATTCATGGTGTTGACA-3'
$\beta$ -actin	正向 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'
	反向 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'

2.8 转录组测序分析 取对数生长期的 T98G 细胞,设置 对照组和给药组(拟黑多刺蚁活性组分2mg/mL),培养 24 h 后收集细胞,提取细胞总 RNA。使用 Agilent2100 生物 分析仪评估 RNA 质量,并使用无 RNase 琼脂糖凝胶电泳进 行检测。提取总 RNA 后, 用 Oligo (dT) 珠富集真核细胞 mRNA。纯化后的双链 cDNA 片段经末端修复、添加 A 碱 基并与 Illumina 测序适配器连接。连接反应用 AMPure XP Beads (1.0X) 纯化, 并进行 PCR 扩增。所得到的 cDNA 文库由广州基迪奥生物科技有限公司使用 Novaseq6000 基 因测序仪测序。获得原始值后经过质控、过滤,使用软件 进行比对。评估测序质量合格后进行基因表达分析。根据 分析结果筛选出样品间差异表达基因。对差异基因进行基 因本体论 (geneontology, GO) 功能富集分析 (https:// www.geneontology.org)和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 信号通路 富集分析 (https://www.genome.jp/kegg/pathway. html) 。

2.9 生物信息学分析 拟黑多刺蚁活性组分化学成分靶标
 从 TCMSP (https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php)<sup>[15]</sup>,
 SwissTargetPrediction (http://swisstargetprediction.ch)<sup>[16]</sup>,

和 TCMIP v2.0 (http://www.tcmip.cn)<sup>[17]</sup>数据库获取。 胶质瘤易感基因来源于 Malacards 人类疾病数据库 (https://www.malacards.org)<sup>[18]</sup>。韦恩图通过 Bioinformatics & Evolutionary Genomics 网站(https:// bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn)作图得到。 通过 GEPIA2 网站(http://gepia2.cancer-pku.cn/# index)<sup>[19]</sup>分析 GBM TCGA 数据库、TCGA 正常组织数据和 GTEx 数据库,获取基因在正常脑组织和胶质母细胞瘤组织 中的表达情况。通过 String 平台(https://cn.string-db. org)<sup>[20]</sup>进行蛋白相互作用分析。

2.10 分子对接 成分的分子结构来自 PubChem 数据库 (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov),蛋白质结构来自 PDB 数据库 (https://www.rcsb.org),利用 AutoDock 工 具,通过移除水分子并加入氢元素来构建蛋白质的结构。最后,运用 AutoDock 4.2 软件进行分子对接的模拟,并使 用 PyMoL 对结果进行分析<sup>[21]</sup>。

2.11 统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件进行处理,数据 以(x±s)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两 两比较采用 t 检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

#### 3 结果

3.1 不同质量浓度拟黑多刺蚁活性组分对 T98G 细胞存活 率的影响 如表 2 所示,随着给药质量浓度增加,T98G 细 胞存活率逐渐降低,黑多刺蚁活性组分作用 T98G 细胞24 h 的 IC<sub>50</sub>值为 4.57 mg/mL。故后续实验设置拟黑多刺蚁活性 组分低剂量组为 1 mg/mL,高剂量组为 2 mg/mL。

表 2 不同质量浓度拟黑多刺蚁活性组分对 T989G 细胞存 活率的影响 (x±s, n=3)

组别	质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	细胞存活率/%
对照组	—	$100.00 \pm 2.00$
拟黑多刺蚁活性组分组	0.5	88.85±1.94
	1	73.52±3.20
	2	64.32±2.00
	4	59.36±3.20
	8	33.20±4.95
	16	24.85±1.81
	32	20.42±0.65

3.2 拟黑多刺蚁活性组分对 T98G 细胞克隆形成的影响 如图1、表3所示,与对照组比较,拟黑多刺蚁活性 组分各剂量组和 TMZ 组 T98G 细胞集落数减少 (P<0.05, P<0.01),表明拟黑多刺蚁活性组分能抑制 T98G 细胞的 增殖。



注: A 为对照组, B~C 分别为拟黑多刺蚁活性组分低、高剂量组, D 为 TMZ 组。 图 1 拟黑多刺蚁活性组分对 T98G 细胞克隆形成能力的影响

# 表 3 拟黑多刺蚁活性组分对 T98G 细胞克隆形成的影响

$(\overline{x}\pm s,$	n=3
-----------------------	-----

组别	克隆形成数目/个
对照组	171.67±16.04
拟黑多刺蚁活性组分低剂量组	125.33±11.06*
拟黑多刺蚁活性组分高剂量组	54. 33±5. 69 **
TMZ 组	101. 67±7. 51 **

注: 与对照组比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01。

3.3 拟黑多刺蚁活性组分对 T98G 迁移能力的影响 如图 2、表4 所示,与对照组比较,拟黑多刺蚁活性组分各剂量

组和 TMZ 组可抑制 T98G 细胞穿过 Transwell 小室膜,细胞 迁移率降低 (P<0.05, P<0.01)。

表 4 拟黑多刺蚊活性组分对 T98G 细胞迁移形成的影响 (x±s, n=3)

组别	细胞迁移率/%
对照组	27. 14±1. 68
拟黑多刺蚁活性组分低剂量组	19. 43±0. 93 **
拟黑多刺蚁活性组分高剂量组	17. 44±0. 22 **
TMZ 组	20. 81±1. 49 *

注: 与对照组比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01。



注: A 为对照组, B~C 分别为拟黑多刺蚁活性组分低、高剂量组, D 为 TMZ 组。 图 2 拟黑多刺蚁活性组分对 T98G 细胞迁移的影响 (×100)

3.4 拟黑多刺蚁活性组分对 T98G 细胞 DNA 损伤及修复的 影响 与对照组比较, 拟黑多刺蚁活性组分高剂量组和 TMZ 组 T98G 细胞 γ-H2AX 表达升高 (P<0.01),表明拟黑 多刺蚁活性组分诱导 T98G 细胞 DNA 损伤,见图 3、表 5。 此外,如表 6 所示,拟黑多刺蚁活性组分高剂量组 T98G 细 胞同源 修复因子 *RAD50、MRE11* mRNA 表达降低 (P< 0.01),低剂量组 *MRE11* mRNA 表达升高 (P<0.01),而 TMZ 组 T98G 细胞 *RAD50、MRE11* mRNA 表达升高 (P< 0.01),表明 TMZ 激活 T98G 细胞中的 DNA 损伤修复使 T98G 细胞对 TMZ 的敏感性降低,而拟黑多刺蚁活性组分 可以抑制 DNA 损伤修复途径,提示拟黑多刺蚁活性组分可 以降低胶质瘤细胞的耐药性。

#### 表 5 拟黑多刺蚁活性组分对 T98G 细胞 γ-H<sub>2</sub>AX 表达的影

响 ( $\overline{x} \pm s$ , n=3)

组别	平均光密度比值
对照组	3.87±1.5
拟黑多刺蚁活性组分低剂量组	6.11±0.68
拟黑多刺蚁活性组分高剂量组	21.68±4.48**
TMZ 组	14.49±1.61**

注: 与对照组比较,\*\* P<0.01。

表 6 拟黑多刺蚁活性组分对 T98G 细胞 RAD50、MRE11 mRNA 表达的影响 (*x̄*±s, n=3)

组别	RAD50	MRE11
对照组	1.00±0.03	1.00±0.03
拟黑多刺蚁活性组分低剂量组	$0.94 \pm 0.05$	0.84±0.03 **
拟黑多刺蚁活性组分高剂量组	0.83±0.01 **	0.67±0.11**
TMZ 组	1.34±0.06**	1.72±0.10**

注: 与对照组比较,\*\* P<0.01。

3.5 差异表达基因筛选 根据显著差异表达基因筛选条件 | log2Ratio | ≥1.0, 且 P<0.05,筛选出对照组和给药组 共有 1 369 个差异基因,其中在给药组中有 363 个基因表达



注: A 为对照组, B~C 分别为拟黑多刺蚁活性组分低、高剂 量组, D 为 TMZ 组。

## 图 3 各组 T98G 细胞 γ-H<sub>2</sub>AX 荧光染色 (×200)

上调,有1006个基因表达下调,见图4A。筛选的差异表达基因,进行聚类分析,并绘制热图及火山图,组内表达相似的基因聚类后出现在同一簇中,见图4B~4C。

3.6 差异基因 GO 动能分析和 KEGG 富集分析 针对 1 369 个差异表达的基因进行 GO 功能的注释、分类和统计分析。 这些基因在生物学过程中表现出显著富集,涉及到细胞过 程、生物调节、代谢过程、对刺激的反应、发育、信号传 递、定位、免疫和运动相关。在细胞组分上,这些富集基 因主要与细胞解剖实体和蛋白质复合物相关;而在分子功 能方面,这些显著富集的基因类型主要包括结合、催化活 性、分子功能调节、转录调节等方面,见图 5。



图 4 差异表达基因筛选与聚类



图 5 差异基因 GO 功能分析

对1369个差异表达基因进行 KEGG 信号通路富集分析,选取富集度最高的前20个条目进行分类统计。结果显示,差异基因中参与的通路主要有Toll 样受体信号通路、Nod 样受体信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、FOX 信号通路等,见图6。

3.7 拟黑多刺蚁活性组分抗胶质瘤的靶基因筛选 根据前 期研究结果,拟黑多刺蚁活性组分主要含有15种化学成 分<sup>[9]</sup>。从 SwissTargetPrediction、TCMSP和TCMIP v2.0数据 库中获取了拟黑多刺蚁活性组分所有鉴定成分的靶标,删 除重复靶标和非人类靶标,最终得到447个靶标。从 Malacards人类疾病数据库中获取了5651个胶质瘤风险基 因。将拟黑多刺蚁活性组分成分潜在靶标、胶质瘤风险基 988 因和转录组测序差异表达基因作交集,筛选得到 24 个靶基因,见图 7。根据测序结果,与对照组比较,给药组有 17 个基因表达下调,7 个基因表达上调,见表 7。

利用 GEPIA 网站分析 GBM TCGA 数据库、TCGA 正常 组织数据和 GTEx 数据库,即可获取上述基因在正常脑组织 和 GBM 组织中的表达情况。符合在给药组中表达上调,在 GBM 组织中低表达的基因是醛脱氢酶 1 家族成员 A3 (aldehyde dehydrogenase 1 family member A3, *ALDH*1A3);在 给药组中表达下调,在 GBM 组织中高表达的基因是内皮素 受体 A 型 (endothelin receptor type A, *EDNRA*)、组织因子 (tissue factor, *TF*,基因名为 *F*3)、介导体复合物亚基 1 (mediator complex subunit 1, *MED*1)、淋巴细胞抗原 96



图 6 差异基因 KEGG 信号通路富集分析



图 7 拟黑多刺蚁活性组分化学成分靶基因、胶 质瘤风险基因和差异表达基因交集韦恩图 (lymphocyte antigen 96, LY96)、Toll 样受体4 (Toll-like receptor 4, TLR4),见图 8。

利用 String 平台进行蛋白相互作用分析,选择人类蛋白 作为研究对象,设定最低相互作用阈值为中等,其余值不 做调整,获取蛋白互作网络图,见图 9。PPI 图显示,TLR4 与 F3、TLR4 与 LY96 存在蛋白相互作用,TLR4 和 LY96 为 Toll 样受体信号通路成员。

3.8 分子对接 拟黑多刺蚁活性组分中靶向 F3 的化学成 分为棕榈油酸 (palmitoleic acid, PubChem CID 号 445638)、 花生四烯酸 (arachidonic acid, PubChem CID 号 444899)和 二十碳五烯酸 (icosapent, PubChem CID 号 446284); 靶向 TLR4 的化学成分为棕榈油酸、反油酸 (elaidic acid, PubChem CID 号 637517)和棕榈酸 (palmitic acid, PubChem CID 号 985); 靶向 LY96 的化学成分为棕榈油酸、 棕榈酸和反油酸。为了进一步探究拟黑多刺蚁活性组分的

基因名	log2FC	FDR	基因名	log2FC	FDR	
ADAMTS5	-2.6804	1. 240×10 <sup>-4</sup>	PTGFR	-1.333 0	8.803×10 <sup>-3</sup>	
CHRM1	-8.364 9	1.249×10 <sup>-2</sup>	RGS4	-2.935 4	$1.962 \times 10^{-4}$	
EDNRA	-3.812 2	$3.550 \times 10^{-9}$	SREBF1	-1.203 5	$1.315 \times 10^{-3}$	
F3	-1.478 1	3. $290 \times 10^{-7}$	TLR4	-1.3597	3. $077 \times 10^{-3}$	
GLI3	-1.178 4	1.810×10 <sup>-7</sup>	TRPA1	-1.641 9	2. $781 \times 10^{-4}$	
HPGD	-2.3177	4. 370×10 <sup>-9</sup>	ADRB2	2.102 6	9.080×10 <sup>-8</sup>	
LY96	-1.055 6	$3.650 \times 10^{-3}$	ALDH1A3	1.088 9	3. $280 \times 10^{-8}$	
MED1	-1.092 5	3. $382 \times 10^{-2}$	CRABP2	1.381 2	1. $108 \times 10^{-2}$	
MMP3	-1.234 4	2. $278 \times 10^{-4}$	HSPA5	1.765 2	6. 790×10 <sup>-8</sup>	
NCOA1	-1.0397	4. 770×10 <sup>-2</sup>	JUN	1.1419	1. $120 \times 10^{-5}$	
PDE4D	-1.880 1	2. 410×10 <sup>-5</sup>	PVR	1.078 3	$1.314 \times 10^{-4}$	
PLA2G4C	-1.449 0	3. $190 \times 10^{-5}$	TERT	1.8136	$1.771 \times 10^{-3}$	

表 7 拟黑多刺蚁活性组分抗胶质瘤靶基因测序结果

注: log2FC 表示 2 个分组间的差异倍数对数值, log2FC>1 表示表达量上调, log2FC<1 表示表达量下调; FDR 为经过 BH 校正后的 P 值。



注: 红色为肿瘤组织, 灰色为正常组织。与正常组织比较,\*P<0.05。

## 图 8 TCGA 数据库中 ALDH1A3、EDNRA、F3、MED1、LY96、TLR4 在 GBM 组织和正常组织中的表达情况



图 9 蛋白-蛋白相互作用网络图

主要化学成分与关键靶点之间的相互作用,对以上蛋白和 小分子化合物进行分子对接,对接结合能<-1.2 kcal/mol (-5 kJ/mol) 被认为是稳定的。对接结果如表 8 显示,最

稳定的前3位对接分别是棕榈油酸与F3、花生四烯酸与 F3、二十碳五烯酸与F3,对接模式图见图10。以上结果表 明,F3可能是拟黑多刺蚁活性组分抗胶质瘤的关键靶点。

#### 表 8 化合物与蛋白质的分子对接情况

小分子化合物	蛋白	结合能/(kcal·mol <sup>-1</sup> )
棕榈油酸	F3	-5.6
棕榈油酸	TLR4	-3.7
棕榈油酸	LY96	-4.5
花生四烯酸	F3	-6.3
二十碳五烯酸	F3	-6.1
反油酸	TLR4	-4.5
反油酸	LY96	-4.3
棕榈酸	TLR4	-3.6
棕榈酸	LY96	-4.3



图 10 分子对接模式图

二十碳五烯酸与F3

3.9 RT-qPCR 验证拟黑多刺蚁活性组分对 F3、TLR4、 LY96 mRNA 表达的影响 如表 9 所示,与对照组比较,拟 黑多刺蚁活性组分各剂量组 F3、TLR4、LY96 mRNA 表达均 降低 (P<0.05, P<0.01)。

表 9	拟黑多刺蚁活性组分对 F3、	TLR4、	LY96 mRNA	表达的影响	$(\overline{x}\pm s,$	n=3)
-----	----------------	-------	-----------	-------	-----------------------	------

组别	F3	TLR4	<i>LY</i> 96
对照组	1.00±0.14	$1.00\pm0.01$	$1.00\pm 0.03$
拟黑多刺蚁活性组分低剂量组	0.63±0.07 *	0. 57±0. 05 *	0. 76±0. 08 *
拟黑多刺蚁活性组分高剂量组	0.54±0.06 **	0.642±0.12**	0. 73±0. 05 **

注: 与对照组比较, \* P<0.05, \*\* P<0.01。

#### 4 讨论

脑胶质瘤是侵袭性最强的恶性脑肿瘤,几乎只能通过 放射线和 TMZ 化疗来治疗。在临床中,对脑胶质瘤术后多 采用放化疗辅以中药调理,积极有效预防复发。中药治疗 的脑部恶性肿瘤的主要原则是解郁、通络、软坚、排毒。 拟黑多刺蚁归于肝、肾经,主治补肾益精、通经活络,解 毒消肿,主肾虚头昏耳鸣,失眠多梦,中风偏瘫等。本研 究结果显示,拟黑多刺蚁活性组分可以抑制脑胶质瘤 T98G 细胞的增殖和迁移能力,为拟黑多刺蚁治疗脑胶质瘤提供 实验依据。

DNA 损伤修复是 TMZ 耐药的重要机制。人体细胞对 DSBs 主要有非同源末端连接和同源重组修复途径<sup>[22]</sup>,同 源重组是 DSBs 最重要和最精确的修复方式<sup>[23]</sup>,关键因子 *MRE*11、*RAD50* 和 *RAD51* 参 与胶质瘤的化疗耐药<sup>[24]</sup>。 *MRE*11-*RAD50* 促进 DSBs 修复,激活下游通路组分,以及 ATP 依赖性地切除 DSB 上的 5'-端链来促进 DNA 双链断裂 修复<sup>[25]</sup>。本实验结果显示,拟黑多刺蚁活性组分诱导 T98G 细胞 DNA 损伤,并抑制 *MRE*11、*RAD50* mRNA 表达, 提示拟黑多刺蚁活性组分可以通过抑制 DNA 损伤修复降低 CBM 细胞的耐药性。

Toll 样受体 (TLR) 是跨膜受体,在先天免疫反应中起 关键作用<sup>[26]</sup>,在中枢神经系统中可检测到各种 TLR 家族成 员<sup>[27]</sup>。TLR4 是 TLR 家族中的一员,配体附着后,TLR4 重 新定向结构域并二聚化,激活细胞内级联反应,并促进细 胞质信号传导。Kina 等<sup>[28]</sup>在胶质瘤的研究中证实了 TLR4/NF-κB 通路参与促进癌变。TLR4 过表达导致 GBM 患者 PD-L1 水平升高,并与不良预后相关<sup>[29]</sup>。此外, TLR4 表达的增加会导致 Wnt 信号转导,推动 GBM 的发 展,并限制细胞凋亡<sup>[27]</sup>。本研究结果发现,拟黑多刺蚁 活性组分抑制了 Toll 样受体信号通路的相关因子 *TLR*4 和 *LY*96 水平,提示其通过抑制 Toll 样受体信号通路抑制 GBM 的生长。

本研究蛋白互作预测显示 F3 与 TLR4 存在相互作用。 拟黑多刺蚁活性组分下调 T98G 细胞中 F3 的表达。F3 也称 为 CD142,在各种肿瘤类型(包括神经胶质瘤)中表达, 通常发挥促肿瘤作用<sup>[30-32]</sup>。Jeon 等<sup>[30]</sup>研究发现,F3 是 GBM 致癌衰老和治疗耐药性的关键驱动因素。分子对接结 果显示,F3 与拟黑多刺蚁中的活性成分棕榈油酸、花生四 烯酸和二十碳五烯酸的对接结果最稳定,提示拟黑多刺蚁 活性组分通过多成分作用于F3,并对其自身及关联蛋白产 生影响,但其相互调控机制尚不明确。 综上所述, 拟黑多刺蚁活性组分能抑制 T98G 细胞的增 殖和迁移能力, 诱导 T98G 细胞的 DNA 损伤, 其机制可能 与拟黑多刺蚁活性组分抑制 DNA 损伤修复途径有关。此 外,本研究结合转录测序、生物信息学和分子对接初步探 讨拟黑多刺蚁活性组分抗 GBM 的活性成分、直接靶点及其 可能作用机制。本研究还发现, 拟黑多刺蚁活性组分通过 多成分、多靶点、多途径作用于 F3 和 Toll 样受体信号通路 发挥抑制 GBM 细胞生长的作用。课题组后续将进一步深入 挖掘拟黑多刺蚁活性组分靶向 F3 改善胶质瘤细胞耐药的具 体分子机制。

## 参考文献:

- Yin J, Wang X, Ge X, et al. Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1 metabolizes temozolomide to activate AMPK for driving chemoresistance of glioblastomas[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 5913.
- [2] Li D M, Chen Q D, Wei G N, et al. Hypoxia-induced miR-137 inhibition increased glioblastoma multiforme growth and chemoresistance through LRP6[J]. Front Oncol, 2020, 10: 611699.
- [3] Ahluwalia M S, Ozair A, Drappatz J, et al. Evaluating the base excision repair inhibitor TRC102 and temozolomide for patients with recurrent glioblastoma in the phase 2 adult brain tumor consortium trial BERT[J]. Clin Cancer Res, 2024, 30(15): 3167-3178.
- [4] 韦 洁,李冬梅,何俊慧,等.香青藤提取物通过 Wnt/βcatenin 信号通路抑制胶质瘤 U87 细胞的间质转化[J].中国 免疫学杂志, 2023, 39(7):1431-1436.
- [5] Wei G, Su H, He F, et al. Antidepressant-like effect of active fraction of Polyrhachis vicina Roger in a rat depression model[J]. J Tradit Chin Med, 2018, 38(1): 12-21.
- [6] 韦桂宁,曾宪彪,牙启康,等. 拟黑多翅蚁抗痛风作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 205-208.
- [7] 张 欣,龙 倩,楚世峰,等. 拟黑多刺蚁石油醚部位对抑 郁大鼠神经炎症反应的抑制作用[J]. 药学学报, 2018, 53 (7): 1042-1047.
- [8] Li D M, Zhong M, Su Q B, et al. Active fraction of Polyrhachis vicina Rogers (AFPR) suppressed breast cancer growth and progression via regulating EGR1/lncRNA-NKILA/NF-κB axis[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 123: 109616.
- [9] Li D M, Zhu F C, Wei J, et al. The active fraction of Polyrhachis vicina Roger (AFPR) activates ERK to cause necroptosis in colorectal cancer[J]. J Ethnopharmacol, 2023,

312: 116454.

- [10] He J, Xie J, Zhou G, et al. Active fraction of Polyrhachis vicina Roger (AFPR) ameliorate depression induced inflammation response by FTO/miR-221-3p/SOCS1 axis[J]. J Inflamm Res, 2023, 16: 6329-6348.
- [11] Wei J, Xie J, He J, et al. Active fraction of Polyrhachis vicina (Roger) alleviated cerebral ischemia/reperfusion injury by targeting SIRT3-mediated mitophagy and angiogenesis[J]. Phytomedicine, 2023, 121: 155104.
- [12] He J, Han D, Jia C, et al. Integrating network pharmacology, molecular docking and pharmacological evaluation for exploring the Polyrhachis vicina Rogers in ameliorating depression[J]. Drug Des Devel Ther, 2023, 17: 717-735.
- [13] 韦 贤,李冬梅,何俊慧,等. 拟黑多刺蚁活性组分通过 miR-186-5p/Cx43 促进结直肠癌 SW116 细胞凋亡的作 用[J]. 中成药, 2022, 44(6): 1783-1791.
- [14] 刘吉成,韦桂宁,卢文杰,等.GC法测定拟黑多刺蚁中棕榈 酸和油酸的含量[J].药物分析杂志,2016,36(1):86-90.
- [15] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
- [16] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 (W1): W357-W364.
- [17] Xu H Y, Zhang Y Q, Liu Z M, et al. ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47 (D1): D976-D982.
- [18] Rappaport N, Nativ N, Stelzer G, et al. MalaCards: an integrated compendium for diseases and their annotation[J]. Database (Oxford), 2013, 2013: bat018.
- [19] Tang Z, Kang B, Li C, et al. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W556-W560.
- [20] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest[J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51(D1): D638-D646.
- [21] Ravindranath P A, Forli S, Goodsell D S, et al. AutoDockFR: advances in protein-ligand docking with explicitly specified

binding site flexibility[J]. PLoS Comput Biol, 2015, 11
(12): e1004586.

- [22] Jiang M, Jia K, Wang L, et al. Alterations of DNA damage response pathway: Biomarker and therapeutic strategy for cancer immunotherapy[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11 (10): 2983-2994.
- [23] Zhang C, Chen L, Peng D, et al. METTL3 and N6methyladenosine promote homologous recombination-mediated repair of DSBs by modulating DNA-RNA hybrid accumulation[J]. Mol Cell, 2020, 79(3): 425-442.
- [24] Dasika G K, Lin S C, Zhao S, et al. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis[J]. Oncogene, 1999, 18(55): 7883-7899.
- [25] Kissling V M, Reginato G, Bianco E, et al. Mre11-Rad50 oligomerization promotes DNA double-strand break repair[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 2374.
- [26] Moresco E M, Lavine D, Beutler B. Toll-like receptors [J]. Curr Biol, 2011, 21(13): R488-R493.
- [27] Litak J, Grochowski C, Litak J, et al. TLR-4 signaling vs. immune checkpoints, miRNAs molecules, cancer stem cells, and wingless-signaling interplay in glioblastoma multiformefuture perspectives [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3114.
- [28] Kina I, Sultuybek G K, Soydas T, et al. Variations in Toll-like receptor and nuclear factor-kappa B genes and the risk of glioma[J]. Br J Neurosurg, 2019, 33(2): 165-170.
- [29] Chaudhary D, Robinson S, Romero D L. Recent advances in the discovery of small molecule inhibitors of interleukin-1 receptorassociated kinase 4 (IRAK4) as a therapeutic target for inflammation and oncology disorders[J]. J Med Chem, 2015, 58 (1): 96-110.
- [30] Jeon H M, Kim J Y, Cho H J, et al. Tissue factor is a critical regulator of radiation therapy-induced glioblastoma remodeling[J]. Cancer Cell, 2023, 41(8): 1480-1497.
- [31] Xie X P, Laks D R, Sun D, et al. Quiescent human glioblastoma cancer stem cells drive tumor initiation, expansion, and recurrence following chemotherapy [J]. Dev Cell, 2022, 57 (1): 32-46.
- [32] Galmiche A, Rak J, Roumenina L T, et al. Coagulome and the tumor microenvironment: an actionable interplay[J]. Trends Cancer, 2022, 8(5): 369-383.