

基于网络药理学和体外实验的白藜芦醇抗横纹肌肉瘤作用机制研究

杨彦博

湖北职业技术学院, 湖北 孝感 432000

摘要: **目的** 基于网络药理学和体外实验探讨白藜芦醇抗横纹肌肉瘤的分子作用机制。**方法** 综合运用网络药理学、分子对接及分子动力学模拟筛选并验证白藜芦醇抗横纹肌肉瘤的核心靶点; 使用基因表达综合数据库 (GEO) 数据集对核心靶点进行差异表达、生存分析和基因集富集分析 (GSEA) 通路富集分析。体外培养人横纹肌肉瘤 A-204 和 RD 细胞株, 采用 MTT 法、流式细胞术检测不同浓度白藜芦醇对细胞活力和凋亡的影响, Western blotting 检测肿瘤蛋白 53 (p53) 及其磷酸化形式 (p-p53) 的表达水平。**结果** 网络药理学分析显示, 肿瘤抑制因子 p53 (TP53)、蛋白激酶 B1 (Akt1)、信号转导及转录激活因子 3 (STAT3)、连环蛋白 β -1 (CTNNB1)、转录因子 Jun (JUN) 为核心靶点, 分子对接及动力学模拟表明白藜芦醇与 TP53 结合稳定; 转录组分析显示, TP53 在横纹肌肉瘤组织中异常表达且与患者生存预后相关, 同时 p53 信号通路显著富集。体外实验表明, 白藜芦醇呈剂量相关性抑制横纹肌肉瘤细胞增殖并诱导凋亡; Western blotting 结果显示白藜芦醇未改变总 p53 蛋白水平, 但显著上调 p-p53 表达 ($P < 0.01$ 、 0.001)。**结论** 白藜芦醇主要通过激活 p53 磷酸化发挥抗横纹肌肉瘤作用, 为横纹肌肉瘤的新型治疗策略提供实验依据。

关键词: 白藜芦醇; 横纹肌肉瘤; 网络药理学; 肿瘤抑制因子 p53; 蛋白激酶 B1; 信号转导及转录激活因子 3; 连环蛋白 β -1; 转录因子 Jun; p53 磷酸化;

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2026)08-2212-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.08.005

Mechanism of resveratrol against rhabdomyosarcoma based on network pharmacology and *in vitro* experiments

YANG Yanbo

Hubei Polytechnic Institute, Xiaogan 432000, China

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of resveratrol in resisting rhabdomyosarcoma based on network pharmacology and *in vitro* experiments. **Methods** Network pharmacology, molecular docking, and molecular dynamics simulation were comprehensively employed to screen and validate the core targets of resveratrol against rhabdomyosarcoma. Based on GEO datasets, differential expression, survival analysis, and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) pathway enrichment were performed on the core targets. Human RMS A-204 and RD cell lines were cultured *in vitro*. MTT assay and flow cytometry were used to detect the effects of different concentrations of resveratrol on cell viability and apoptosis. Western blotting was used to detect the expression levels of Tumor protein 53 (p53) and its phosphorylated form (p-p53). **Results** Network pharmacology analysis revealed that tumor suppressor factor p53 (TP53), protein kinase B1 (Akt1), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), catenin β -1 (CTNNB1), and transcription factor Jun (JUN) were the core targets. Molecular docking and kinetic simulation indicated that resveratrol bound stably to TP53. Transcriptome analysis showed that TP53 was abnormally expressed in rhabdomyosarcoma tissues and was related to the patient's survival prognosis. *In vitro* experiments demonstrated that resveratrol inhibited the proliferation of rhabdomyosarcoma cells in a dose-dependent manner and induced apoptosis. Western blotting results showed that resveratrol did not change the total p53 protein level, but significantly upregulated p-p53 expression ($P < 0.01$, 0.001). **Conclusion** Resveratrol exerts its anti-rhabdomyosarcoma effect mainly by activating p53 phosphorylation, providing an experimental basis for novel therapeutic strategies for rhabdomyosarcoma.

Key words: resveratrol; rhabdomyosarcoma; network pharmacology; TP53; Akt1; STAT3; CTNNB1; JUN; p53 phosphorylation

收稿日期: 2026-05-29

基金项目: 孝感市自然科学计划项目 (XGKJ2025010021)

作者简介: 杨彦博, 男, 助教, 硕士, 主要从事肿瘤学研究。E-mail: 2358279057@qq.com

横纹肌肉瘤是儿童和青少年最常见的软组织肉瘤,占儿童期实体瘤的 5%~8%,其特点为侵袭性强、易早期复发转移,预后较差^[1-2]。相较于其他亚型的儿童实体肿瘤,复发或转移性横纹肌肉瘤的现有治疗手段仍以传统放化疗为主,疗效有限且药物不良反应较大^[3]。现有研究表明中药小分子在临床应用方面展现出耐受性好、安全性高的优势^[4],因此基于当前横纹肌肉瘤领域的治疗困境,寻找具备高效低毒的抗横纹肌肉瘤生物活性物质迫在眉睫。白藜芦醇是一种源自虎杖、葡萄等植物的天然多酚类化合物,具有抗氧化、抗炎、保护心血管和调节代谢等潜在作用^[5-7]。近年来,白藜芦醇的抗肿瘤活性也逐渐被揭示^[8-9],部分研究表明白藜芦醇能抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖,促进细胞凋亡,但其确切分子作用中枢尚未完全阐明^[10-11]。白藜芦醇具有多靶点、多通路的药理作用特点^[12],传统单一靶点的研究难以系统揭示其药理机制。网络药理学作为一门整合系统生物学与药理学的新兴学科,能通过构建“药物-靶点-疾病”网络,从整体层面预测活性成分的关键靶点和信号通路,为阐明中药小分子复杂作用机制提供有效策略^[13-14]。基于此,本研究拟运用网络药理学方法筛选白藜芦醇抗横纹肌肉瘤的核心靶点,并结合转录组分析与体外实验验证其分子机制,以期为横纹肌肉瘤的临床治疗提供新的理论依据。

1 网络药理学研究

1.1 获取白藜芦醇作用靶点

分别在 HERB 2.0 数据库 (<http://47.92.70.12/>)、ETCM 2.0 数据库 (<http://www.tcmip.cn/ETCM2/front/#/>)、Super Pred 数据库 (<https://prediction.charite.de/index.php>)、Drug Bank 数据库 (<https://go.drugbank.com/>) 检索“resveratrol”得到白藜芦醇的作用靶点。在 Swiss Target Prediction 数据库 (<https://swisstargetprediction.ch/>) 检索白藜芦醇的“SMILES”,并设置筛选条件为“probability>0”得到作用靶点,在 BATMAN-TCM 2.0 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/#/home>) 检索白藜芦醇的“PubChem CID: 445154”,并设置筛选条件为“score cutoff=0.86、 $P_{adj}=0.05$ ”得到作用靶点,最后通过 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 将得到的所有靶点名称转化为人的标准基因名称。

1.2 获取横纹肌肉瘤疾病靶点

分别在 GeneCards 数据库 ([\[cards.org/\]\(https://www.gene\)\)、DisGeNET 数据库 \(<https://disgenet.com/>\)、TTD 数据库 \(<https://ttd.idrblab.cn/>\)、OMIM 数据库 \(<https://www.omim.org/>\) 检索“rhabdomyosarcoma”得到横纹肌肉瘤疾病靶点,然后进行筛选整合。其中 GeneCards 数据库筛选条件设置为“category: protein coding, relevance score \$\geq 1.753\ 782\ 749\$ \(平均值\)”。](https://www.gene</p></div><div data-bbox=)

1.3 筛选白藜芦醇抗横纹肌肉瘤的潜在作用靶点

利用 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 将上述得到的白藜芦醇作用靶点和横纹肌肉瘤疾病靶点绘制韦恩图,得到交集靶点。将交集靶点上传至 STRING 数据库 (<https://string-db.org>),organisms 选择“homo sapiens”,required score 选择“highest confidence”,以 TSV 格式文件输出交集靶点互作网络并导入 Cytoscape (3.10.2) 软件,使用 CytoNCA 插件对互作网络进行拓扑学分析,将筛选条件设置为度(degree)值、介数中心值、紧密中心值均大于 3 者平均数,获得白藜芦醇抗横纹肌肉瘤的潜在作用靶点。

1.4 构建白藜芦醇抗横纹肌肉瘤的靶点蛋白相互(PPI)网络

将潜在作用靶点上传至 STRING 数据库,得到的结果以 TSV 格式文件输出并导入 Cytoscape,使用 CytoNCA 进行拓扑学分析,依据 degree 值调节各个节点的形状大小和颜色深浅,绘制 PPI 网络图。

1.5 潜在作用靶点功能富集分析

将白藜芦醇抗横纹肌肉瘤潜在作用靶点上传至 DAVID 数据库 (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>) 进行基因本体论(GO)与京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,种属选择“homo sapiens”,分析结果基于 P 值进行排序。选择 GO 功能注释中生物学过程(BP)、细胞学组分(CC)、分子生物学功能(MF)的各前 10 条条目和 KEGG 通路富集中的前 20 条通路进行可视化。

1.6 分子对接

在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载白藜芦醇 3D 结构的 sdf 格式文件,通过 OpenBabel 3.1.1 转换成 pdb 格式文件。在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载靶点蛋白的 pdb 格式文件,使用 PyMOL 进行去水和去配体处理。运行 AutoDockTools 1.5.7 对受体蛋白和配体白藜芦醇进行加氢等前处理并转化为 pdbqt 格式文件,随后寻找活性口袋并运行 AutoDock Vina 对受体和配

体进行对接,最后使用 PyMOL 对结果进行可视化。

1.7 核心靶点的差异表达分析

从 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载包含人类横纹肌肉瘤组织与正常肌肉组织在内的高通量测序表达谱数据集 GSE108022。数据在 R 语言环境下使用 limma 包进行差异表达分析,ggplot2 包展示分析结果,并利用 ggsignif 包标注统计显著性。

1.8 核心靶点的生存分析

从 R2 基因组学分析平台 (<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) 下载数据集 “Tumor Rhabdomyosarcoma-Williamson-101-MAS5.0-u133p2” (E-TABM-1202)。数据在 R 语言环境下,使用 survival 包进行 Kaplan-Meier 生存分析,依据靶点的表达水平,使用最佳截断值将患者分为高、低表达两组,并通过 Log-rank 检验比较组间生存差异。

1.9 基因集富集分析

从 GEO 数据库获取 GSE141690 数据集。在 R 语言环境下,利用 clusterProfiler 包进行基因集富集分析。以 MSigDB 数据库中的 KEGG 通路基因集作为参考背景,根据差异表达分析所得的基因表达变化倍数对全部基因进行排序。采用 Benjamini-Hochberg 法进行多重检验校正,以校正后 $P < 0.05$ 且错误发现率 (FDR) < 0.05 作为筛选标准,判定显著富集的信号通路,使用 ggplot2 包进行可视化。

1.10 分子动力学模拟

使用 GROMACS 2025.3 软件包进行,蛋白-配体复合物置于周期性边界立方盒,采用 AMBER14SB 力场和 TIP3P 水模型溶剂化,添加 NaCl 至生理浓度 150 mmol/L。配体先经 ORCA 6.0 程序在气相 B97-3c 水平下完全几何优化,再以 B3LYP-D3/def2-TZVP 做单点能计算,随后用 Multiwfn 基于分子静电势推导 RESP 电荷,由 Sobotop 生成小分子拓扑文件。体系经 500 步共轭梯度能量最小化后,依次执行 100 ps 限制性动力学 (步长 1 fs) 和 100 ns 成品模拟 (步长 2 fs)。温度通过 V-rescale 方法维持于 298.15 K,压力通过 C-rescale 方法维持于 1.0 bar。氢键以 LINCS 约束,长程静电用 PME 方法处理 (截断 1.0 nm),范德华作用用 Verlet 截断方案 (截断 1.0 nm),并启用能量与压力色散校正。模拟分析内容包括蛋白主链 C α 的 (RMSD)、回旋半径 (Rg)、残基 (RMSF)、溶剂可及表面积 (SASA) 及蛋白-配体间氢键数目。结合

自由能采用 MM-PBSA 方法计算并进行逐残基自由能分解以识别热点残基;同时基于 RMSD 和 Rg 构建 2D/3D 自由能地貌图。

2 体外实验研究

2.1 材料与仪器

A-204 人横纹肌肉瘤细胞和 RD 人恶性胚胎横纹肌肉瘤细胞均购自上海中乔新舟生物科技有限公司;白藜芦醇 (质量分数 99.95%, 批号 561510) 购自美国 MedChemexpress 生物科技有限公司;胎牛血清 (批号 20110119ZQS)、青霉素-链霉素混合溶液 (批号 PS3421146)、DMEM 高糖基础培养基 (货号 ZQ-100)、AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (货号 CSP061) 均购自上海中乔新舟生物科技有限公司;高效 RIPA 裂解液 (货号 R0010)、苯甲磺酰氟 (货号 P0100)、蛋白酶抑制剂 (活性 3.5 EPU/mg, 货号 A8260)、蛋白磷酸酶抑制剂混合物 (货号 P1260)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号 PC0020) 均购自北京索莱宝科技有限公司;PageRuler™ Plus 预染蛋白分子量标准 (批号 3485261)、Pierce™ SDS-PAGE 样品制备试剂盒 (批号 3214023)、SuperSignal™ West Pico PLUS 化学发光底物 (批号 3405538) 均购自赛默飞世尔科技有限公司; β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (稀释比例 1:2 000, 货号 66009-1-Ig), 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠二抗 (稀释比例 1:10 000, 货号 SA00001-1); 肿瘤蛋白 53 (p53) 抗体 (稀释比例 1:2 000, 货号 10442-1-AP), HRP 标记的山羊抗兔二抗 (稀释比例 1:10 000, 货号 SA00001-2); 磷酸化 p53 (p-p53, 位点 Ser15) (稀释比例 1:500, 货号 28961-1-AP) HRP 标记的山羊抗兔二抗 (稀释比例 1:5 000, 货号 SA00001-2) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

Forma™ 3 系列水套式 CO₂ 培养箱 (赛默飞世尔科技有限公司)、iMark 吸收光酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)、BD Accuri™ C6 (美国 BD Biosciences 公司)、PowerPac™ 通用电泳仪及转膜系统 (美国 Bio-Rad 公司)、ChemiDoc MP 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)、Centrifuge 542 离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 细胞培养 将 A-204 和 RD 细胞培养于含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的培养液中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中。待细胞处于对数生长期时进行给药处理,空白组不做药物处理。

2.2.2 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期横纹肌肉瘤细胞,以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板,置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中贴壁过夜。次日弃去旧培养基,实验组加入含不同浓度 (25、50、100、150、200 $\mu\text{mol/L}$) 白藜芦醇的完全培养基,对照组加入含等体积溶剂 (DMSO) 的培养基,每组设 3 个复孔,继续培养 24 h。培养结束后,每孔加入 20 μL MTT 溶液, 37°C 培养箱避光孵育 4 h。孵育结束后吸弃上清,每孔加入 150 μL DMSO,室温振荡 10 min 充分溶解甲臢结晶。空白组为不含细胞的培养基对照。用酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔吸光度 (A) 值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的横纹肌肉瘤细胞接种于 6 孔板,贴壁过夜后分别给予含有 50、100、150 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇的完全培养基处理细胞 24 h,同时设阴性对照组 (DMSO)。处理结束后,用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,预冷 PBS 洗涤 2 次,离心弃上清。按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书,加入 100 μL $1 \times$ Binding Buffer 重悬细胞,先后加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,轻轻混匀,室温避光孵育 15 min。补加 400 μL $1 \times$ Binding Buffer,混匀后立即上流式细胞仪检测。FITC 和 PI 荧光分别通过 FL1 和 FL2 通道采集,每管收集 1×10^4 个细胞。使用 FlowJo 软件分析数据,绘制 Annexin V/PI 双参数散点图,区分活细胞、早期凋亡细胞及晚期凋亡/坏死细胞,凋亡率为早期与晚期凋亡比例之和。

2.2.4 Western blotting 检测蛋白表达 收集 DMSO 和 50、100、150 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理 48 h 后的 A-204 和 RD 细胞加入含蛋白酶及磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上孵育裂解 30 min 后。于 4°C , $12\,000 \times g$ 条件下离心 10 min。采用 BCA 法检测蛋白浓度,蛋白定量后与 $5 \times$ 上样缓冲液混合并加热变性。经 SDS-PAGE 电泳分离后将蛋白转移至 PVDF 膜,以 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入对应一抗 4°C 孵育过夜,次日与 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h,经 TBST 洗膜后,使用 ECL 化学发光液显影,通过 Bio-Rad 凝胶成像系统观察并采集图像。

2.3 数据处理

各体外实验均独立重复至少 3 次,结果 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。统计分析使用

GraphPad Prism 软件完成。

3 网络药理学结果

3.1 白藜芦醇作用靶点及横纹肌肉瘤疾病靶点

利用 HERB 2.0、ETCM 2.0、Super Pred、Drug Bank、Swiss Target Prediction、BATMAN-TCM 2.0 数据库筛选合并共得到 647 个白藜芦醇作用靶点。通过 Gene Cards、DisGeNET、TTD、OMIM 数据库筛选合并共得到 5 183 个横纹肌肉瘤相关疾病靶点。

3.2 白藜芦醇抗横纹肌肉瘤的潜在作用靶点

将上述白藜芦醇靶点和横纹肌肉瘤疾病靶点进行交集分析,通过 Venny 2.1.0 绘制韦恩图,见图 1,共获得 322 个交集靶点。

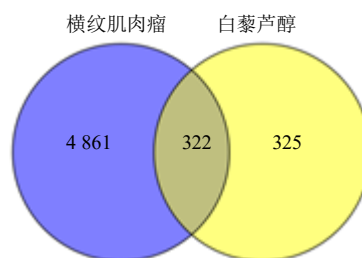


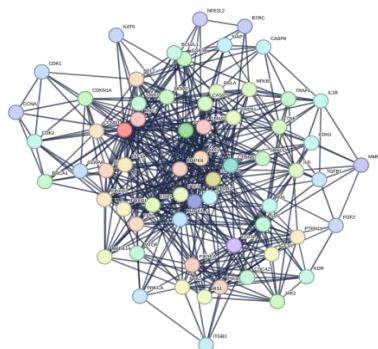
图 1 白藜芦醇 - 横纹肌肉瘤疾病靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of resveratrol - rhabdomyosarcoma disease target

3.3 核心靶点筛选及拓扑学分析

为探究靶点间的相互作用关系,将交集靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 网络。该网络包含 1 396 条相互作用边,平均节点度为 8.67,平均局部聚类系数为 0.445,富集分析 $P < 1.0 \times 10^{-16}$,表明交集靶点集合在 PPI 层面具有显著的生物学相关性。为进一步挖掘关键节点,将 PPI 网络导入 Cytoscape 软件,利用 CytoNCA 插件进行拓扑学分析,以 degree 值、介数中心值和紧密中心值均大于平均数 (degree=10.152 727 27,介数中心值=499.803 638 4,紧密中心值=0.074 986 835) 为筛选条件,筛选出 64 个关键靶点,并基于此重新构建了包含 467 条相互作用边的 PPI 网络,见图 2A。该网络平均节点度为 14.6,平均局部聚类系数为 0.473,富集分析 $P < 1.0 \times 10^{-16}$ 。根据 degree 值大小调节节点的颜色深浅和形状大小,绘制白藜芦醇抗横纹肌肉瘤作用靶点的 PPI 网络可视化图,见图 2B。根据 degree 值进行排序,排名前 5 位的核心靶点分别为肿瘤抑制因子 p53 (TP53)、蛋白激酶 B1 (Akt1)、信号转导及转录激活因子 3 (STAT3)、连环蛋白 β -1 (CTNNB1)、转录因子 Jun (JUN),见表 1。

A



B

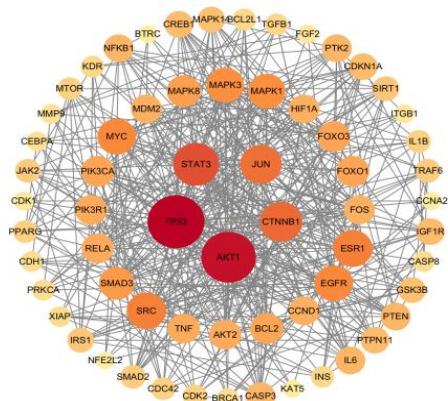


图 2 白藜芦醇抗横纹肌肉瘤的 PPI 网络图 (A) 及可视化图 (B)

Fig. 2 PPI network of targets of resveratrol against rhabdomyosarcoma (A) and visual diagram (B)

表 1 排名前 5 位靶点的筛选数据

Table 1 Degree values of the top five targets

排名	靶点名称	degree 值	介数中心值	紧密中心值
1	TP53	40.0	14 546.307 0	0.084 281 76
2	Akt1	38.0	7 719.622 6	0.083 894 67
3	STAT3	30.0	3 663.269 0	0.083 005 15
4	CTNNB1	27.0	3 712.242 7	0.082 679 54
5	JUN	26.0	4 404.808 0	0.082 879 61

3.4 靶点 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 数据库进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析。GO 分析结果如图 3 所示，在 BP 层面，靶点基因主要富集于细胞凋亡的负调控、微小 RNA (miRNA) 转录的正调控及磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号转导的正调控等条目；在 CC 层面，主要涉及细胞核与核质；在 MF 层面，主要涉及相同蛋白结合、酶结合及蛋白激酶结合。KEGG 通路富集分析如图 4 所示，靶点基因显著富集于癌症通路、PI3K/Akt 信号通路以及叉头盒 O (FoxO) 信号通路，这与 GO 分析中发现的 PI3K/Akt 信号转导正调控结果相互印证。

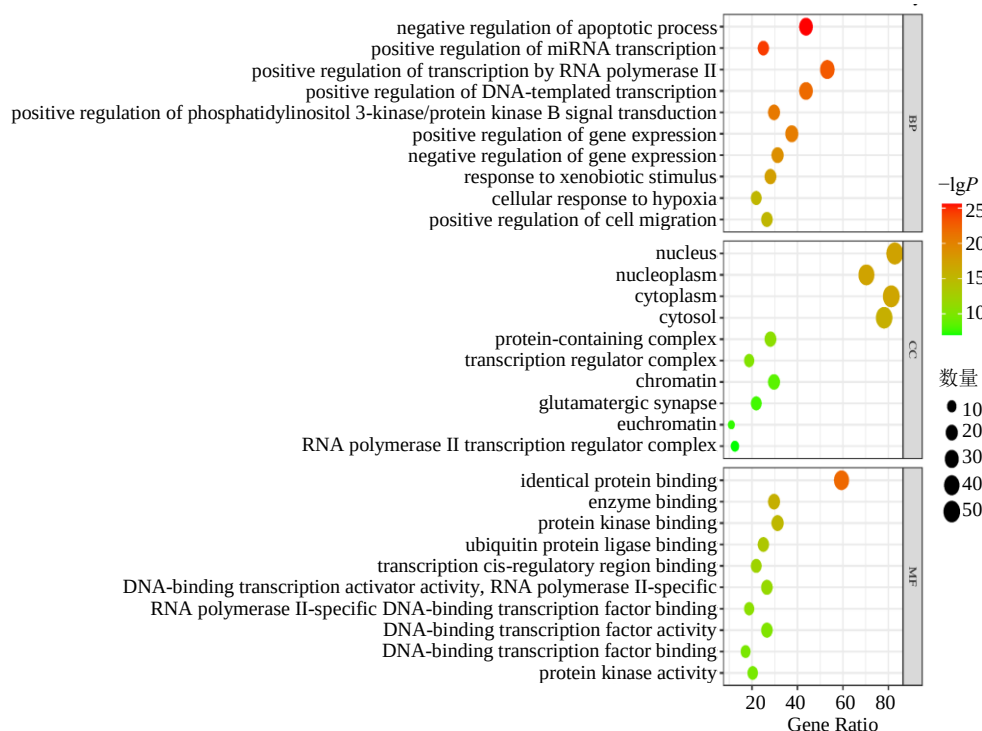


图 3 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis

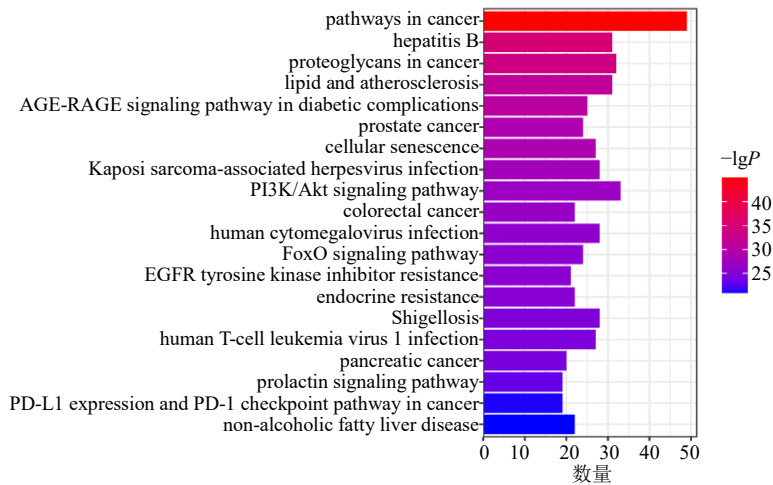


图 4 KEGG 富集分析
Fig. 4 KEGG enrichment analysis

3.5 分子对接分析

为验证核心靶点与白藜芦醇的结合能力，采用 AutoDock Vina 对排名前 5 位的核心靶蛋白与白藜芦醇进行分子对接。对接结果如表 2 所示，白藜芦醇和 TP53、Akt1、STAT3、CTNNB1 结合自由能均低于−5 kcal/mol（1 cal=4.2 J），表明具有稳定的结合模式，其中与 Akt1 和 STAT3 的结合能可达−6.8 kcal/mol，与 TP53 的结合能为−6.2 kcal/mol。可视化的对接结果见图 5，白藜芦醇通过氢键与靶蛋白特定氨基酸残基（如 TP53 的 PHE-113、Akt1 的 GLU-49 等）发生相互作用。

表 2 白藜芦醇与各核心靶点之间的分子对接数据
Table 2 Molecular docking data between resveratrol and core targets

靶点	PDB ID	结合能/(kcal·mol ⁻¹)	氢键相互作用
TP53	1TSR	−6.2	PHE-113
Akt1	1H10	−6.8	GLU-49
STAT3	5AX3	−6.8	ALA-43、GLN-96、ASP-102、LYS-105
CTNNB1	11G3J	−6.0	GLN-530
JUN	1JUN	−4.9	ARG-279、LYS-283、LYS-288、GLN-290

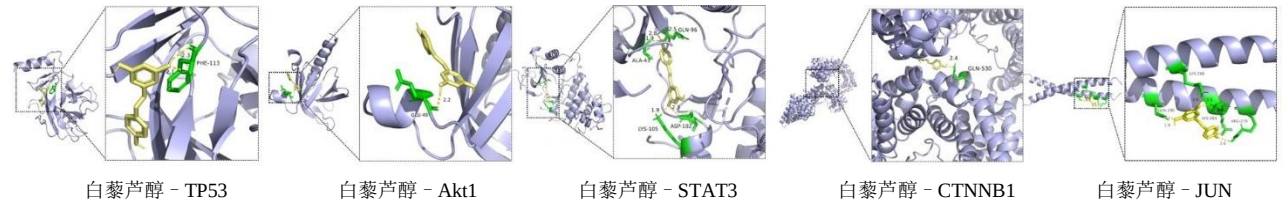


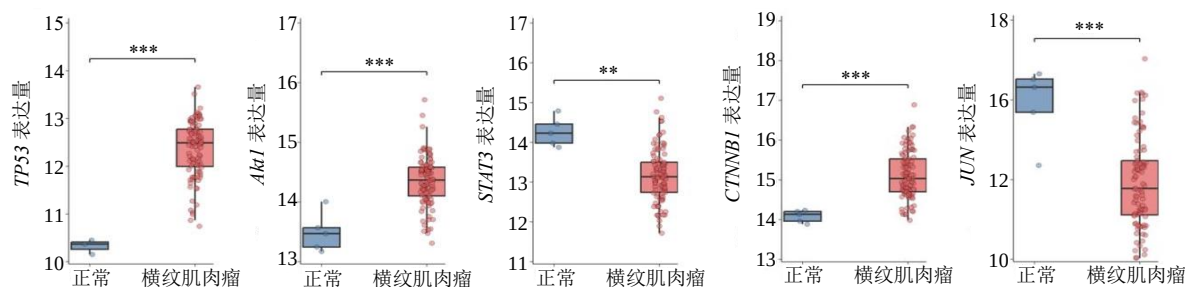
图 5 前 5 位核心靶点和白藜芦醇分子对接可视化结果
Fig. 5 Molecular docking visualization of the top five core targets and resveratrol

3.6 核心靶点在横纹肌肉瘤组织中的差异表达

分子对接结果表明，白藜芦醇与 TP53 等核心靶点之间具有稳定的结合构象，为探索这些能被结合的潜在靶点在横纹肌肉瘤临床病理过程中是否存在驱动作用，本研究基于 GEO 数据集 GSE108022 进行分析。结果表明，与正常组织相比，横纹肌肉瘤组织中 TP53、Akt1、CTNNB1 的表达水平均显著上调，而 STAT3、JUN 的表达水平显著下调（ $P<0.01$ 、 0.001 ），见图 6。提示这些靶点在横纹肌肉瘤的病理过程中具有潜在的驱动作用。

3.7 核心靶点在横纹肌肉瘤组织中的生存分析

本研究基于数据集 E-TABM-1202，采用 Kaplan-Meier 法评估核心靶点表达水平与患者生存期的关联。结果表明，TP53 和 Akt1 高表达患者的生存期显著长于低表达患者，而 STAT3 和 CTNNB1 高表达患者的生存周期则显著缩短，见图 7。JUN 的表达水平高低与横纹肌肉瘤患者的生存周期无显著统计学相关性。值得注意的是，GEO 转录组分析显示 TP53 表达在横纹肌肉瘤组织中表达上调，而生存分析则提示其高表达与较好的患者预后相



与正常组织比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs normal tissue.

图 6 核心靶点在横纹肌肉瘤组织中的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of core targets in patients with rhabdomyosarcoma

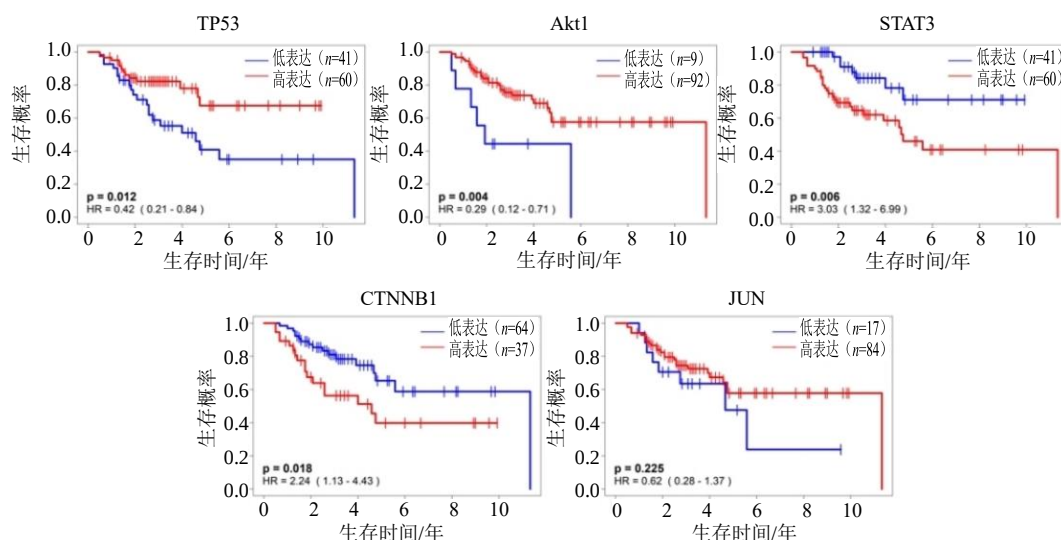


图 7 核心靶点在横纹肌肉瘤患者中的生存分析

Fig. 7 Survival analysis of core targets in patients with rhabdomyosarcoma

关。这一结果看似矛盾,但符合横纹肌肉瘤中 p53 信号通路的生物学特性。研究表明,横纹肌肉瘤中 TP53 基因的突变频率相对较低, p53 蛋白多维持野生型状态^[2],其缺失会增强肿瘤的转移能力^[15]。此背景下,肿瘤组织内 TP53 表达水平的升高,并非意味着原有抑癌功能的丧失^[16],而是肿瘤细胞在面对恶性增殖压力时产生的代偿性应激反应^[17],由于野生型 p53 仍保留下游转录调控活性,这种代偿性高表达能够有效启动凋亡信号通路,进而限制肿瘤的恶性进展^[18]。对于 Akt1 而言,文献证实其磷酸化激活形式 (p-Akt1) 能够增强横纹肌肉瘤的恶性程度^[19],因此上述差异表达和生存分析结果提示,横纹肌肉瘤组织内可能存在高表达 Akt1 负反馈调节^[20],使其上游激活信号功能受损,导致 Akt1 的磷酸化激活受阻,高总 Akt1 丰度未转化为促癌表

型。对于 STAT3 而言,其在横纹肌肉瘤组织中存在持续激活现象^[21],且其磷酸化形式 (p-STAT3) 被证实能增强横纹肌肉瘤细胞的存活能力^[22]。因此 STAT3 的基础 mRNA 水平整体低于正常组织,但在患者个体层面,一旦 STAT3 表达水平相对较高,其伴随的磷酸化激活状态亦可能随之增强,从而驱动肿瘤恶性进展。

3.8 核心通路的 GSEA 富集分析

为从转录组层面分析横纹肌肉瘤组织中的关键信号通路,本研究基于 GSE141690 数据集对横纹肌肉瘤与正常组织间的差异表达基因进行基因富集分析。如图 8 所示,相较于正常组织,横纹肌肉瘤组织中“p53 信号通路”“细胞周期”“DNA 复制”等通路呈现正向富集。该结果从转录组数据层面进一步佐证 p53 信号通路在横纹肌肉瘤中的活

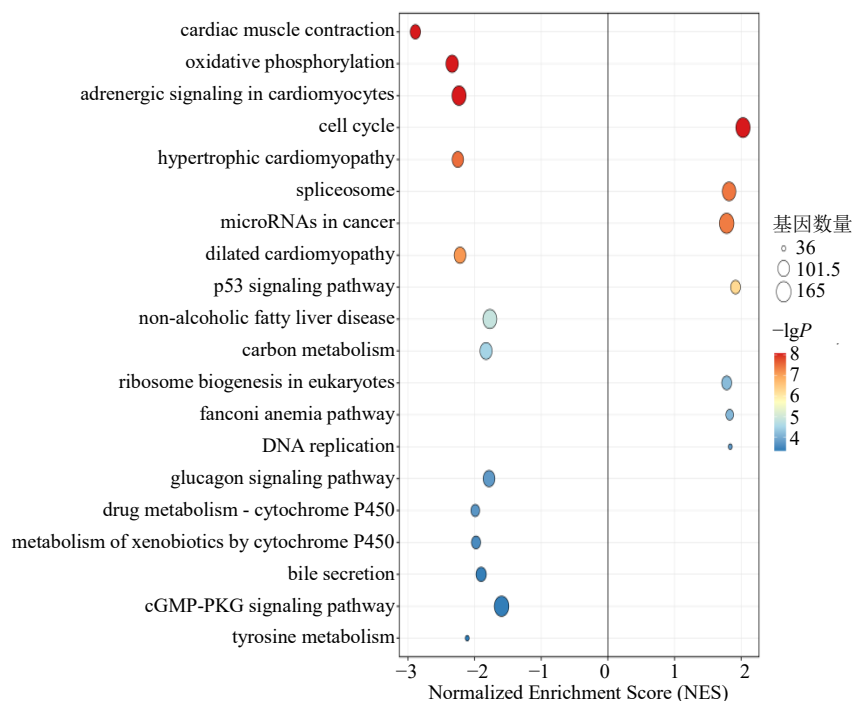


图 8 横纹肌肉瘤组织中关键信号通路的 GSEA 富集分析

Fig. 8 GSEA enrichment analysis of key signaling pathways in rhabdomyosarcoma tissues

跃性，与前期网络药理学将 TP53 定为核心靶点的预测结果相符。

3.9 TP53 - 白藜芦醇复合物的分子动力学模拟

鉴于 TP53 在 PPI 网络中的核心地位及良好的分子对接亲和力，对 TP53 - 白藜芦醇复合物进行 100 ns 的分子动力学模拟，见图 9。结果表明，复合物体系在 70 ns 后达到平衡，RMSF 值相对较低表明复合物结合稳定。复合物体系的 SASA 与 Rg 在运动过程中波动较小，表明复合物整体结构的稳定性。动力学过程中的白藜芦醇与 TP53 之间的氢键数量，在大多数情况下有 1~2 个，表明二者具有

良好的氢键相互作用。2D 与 3D 吉布斯自由能地貌图显示存在明显的能量低谷（深蓝色区域），为体系的热力学稳态构象。综合以上证据，白藜芦醇与 TP53 之间具备结构稳定的结合模式。

4 细胞实验结果

4.1 白藜芦醇对横纹肌肉瘤细胞活性的影响

结果显示，白藜芦醇（25、50、100、150、200 $\mu\text{mol/L}$ ）显著降低 A-204、RD 细胞存活率（ $P < 0.05$ 、0.001），见图 10，表明白藜芦醇在体外对横纹肌肉瘤细胞具有直接杀伤效应，后续研究选取中剂量范围（50、100、150 $\mu\text{mol/L}$ ）进行细胞实验。

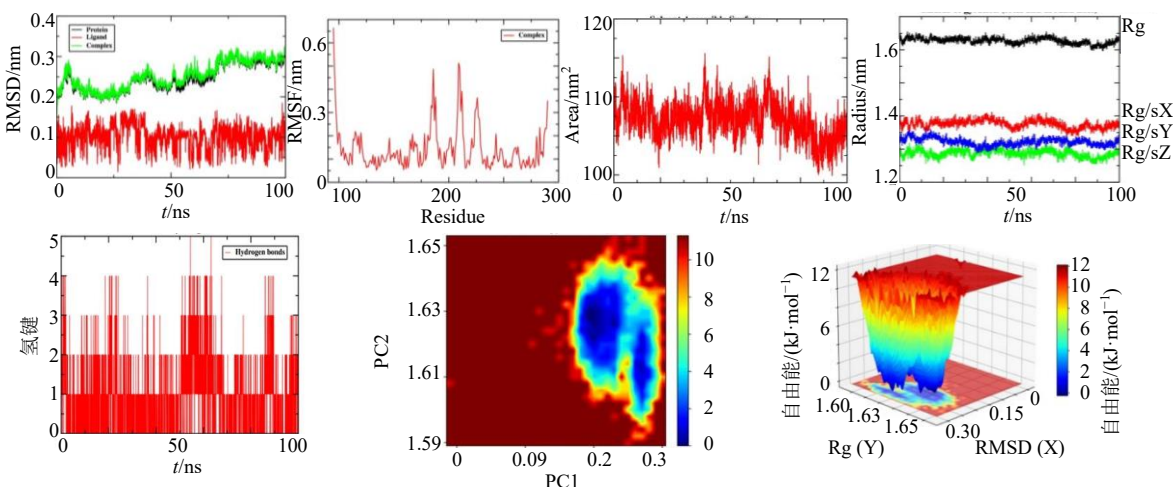
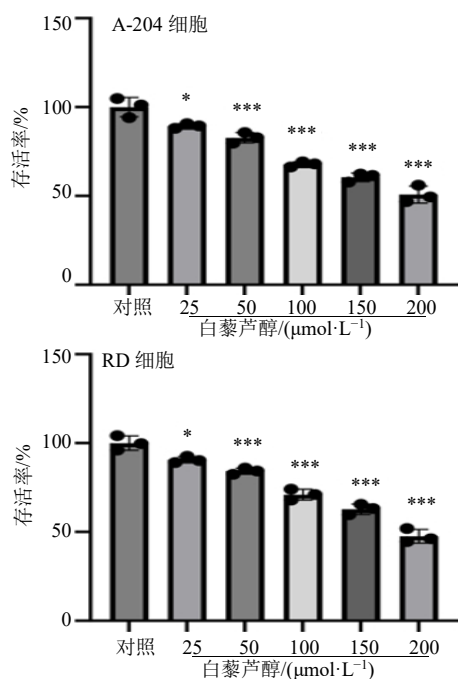


图 9 TP53 和白藜芦醇随时间的分子动力学模拟

Fig. 9 Molecular dynamics simulation of TP53 and resveratrol over time



与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$.
* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 10 白藜芦醇对横纹肌肉瘤细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 10 Effect of resveratrol on the survival rate of rhabdomyosarcoma cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4.2 白藜芦醇对人横纹肌肉瘤细胞凋亡的影响

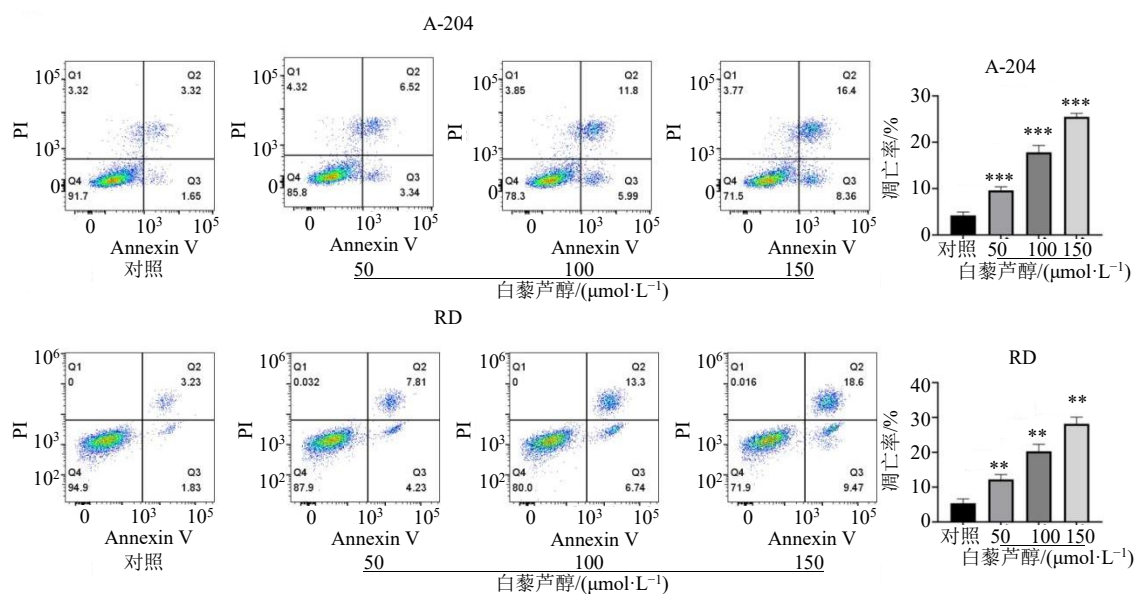
结果表明, 白藜芦醇 (50、100、150 $\mu\text{mol/L}$) 组在 A-204、RD 细胞中 Annexin V/PI 双染检测出的早期、晚期凋亡细胞及细胞总凋亡率均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 见图 11, 提示白藜芦醇可能通过促进细胞凋亡发挥抗横纹肌肉瘤作用。

4.3 白藜芦醇对横纹肌肉瘤细胞蛋白表达水平的影响

结果表明, 白藜芦醇处理后, p53 蛋白的表达水平未发生明显改变, 但其活性形式 p-p53 的表达显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001), 见图 12。该结果提示白藜芦醇的药理作用并不依赖于增加 p53 蛋白数量, 而是通过促进 p53 的磷酸化激活来发挥其抗横纹肌肉瘤效应。

5 讨论

横纹肌肉瘤是儿童及青少年常见的恶性肿瘤, 尽管综合治疗手段不断进步, 但其高危患者的 5 年总生存率仍低于 30%^[23]。在当前横纹肌肉瘤的综合治疗体系中, 以长春新碱为代表的化疗方案依然是控制肿瘤进展的主要手段^[24]。然而, 肿瘤对化疗药物产生的获得性耐药, 以及药物自身所带来的剂量限制性毒性, 已成为制约横纹肌肉瘤临床疗效的瓶颈^[25-26]。在此背景下, 从传统中药及药食同源植物



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 11 白藜芦醇对横纹肌肉瘤细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 11 Effect of resveratrol on apoptosis of rhabdomyosarcoma cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

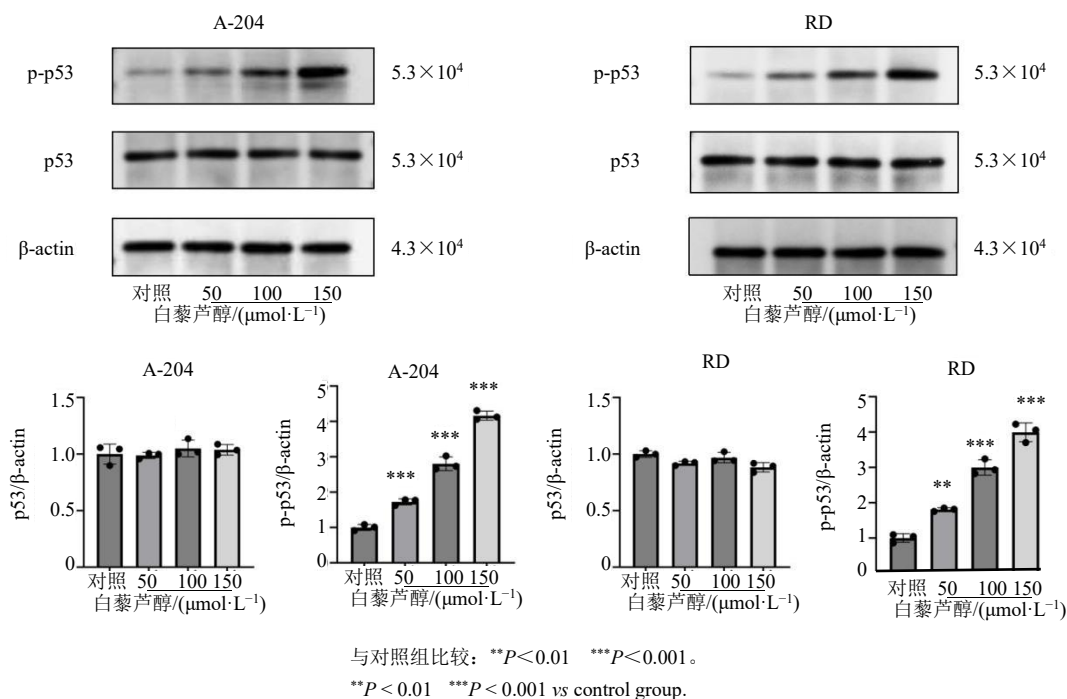


图 12 白藜芦醇对横纹肌肉瘤细胞中 p-p53 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 12 Effect of resveratrol on the expression of p-p53 protein in rhabdomyosarcoma cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

中筛选具有广谱抗肿瘤潜力的天然活性成分，展现出优势^[27]。白藜芦醇作为虎杖、葡萄等植物中的天然多酚类化合物，因其良好的安全性特征而备受关注。现有研究已表明，白藜芦醇在肝癌、肺癌及乳腺癌等多种实体瘤中具备高效杀伤作用，这提示其具备作为横纹肌肉瘤治疗方案的应用前景^[28-30]。基于此，本研究立足于白藜芦醇抗横纹肌肉瘤的分子机制探索，运用“网络药理学预测 - 分子模拟与转录组挖掘 - 体外实验验证”的整合策略，阐明其作用的靶点枢纽。

通过构建“白藜芦醇 - 横纹肌肉瘤”的靶点互作网络，并基于拓扑学参数进行排序，发现 TP53 在 PPI 网络中排名靠前。分子对接及动力学模拟显示白藜芦醇与 TP53 蛋白之间表现出稳定的结合构象，且在整个模拟周期内保持良好的氢键网络与结构稳定性。此外，基于转录组数据集的分析进一步揭示 TP53 在横纹肌肉瘤中的临床病理相关性。随后的体外实验发现白藜芦醇处理并不显著改变横纹肌肉瘤细胞中总 p53 蛋白的表达量，却呈剂量相关性地上调其磷酸化活性形式 (p-p53) 的水平。该结果提示白藜芦醇抗横纹肌肉瘤的机制可能侧重于激活 p53 的翻译后修饰，使其从“非活性状态”转化为“活性状态”。p53 丝氨酸位点的磷酸化修饰能够改变蛋白构象，削弱其与负调控因子 MDM2 的

结合，从而促进有活性转录复合物的形成并启动下游凋亡信号^[18]。有研究表明，横纹肌肉瘤中 p53 信号通路的部分失活与肿瘤恶性进展相关^[31]。本研究的 GSEA 分析也提示 p53 通路在横纹肌肉瘤组织中处于富集状态，这表明白藜芦醇通过激活而非单纯增加 p53 的方式可能是一种更高效的药理作用。

尽管本研究证实了白藜芦醇通过靶向激活 p53 发挥抗横纹肌肉瘤效应，但仍存在部分局限。首先，网络药理学不仅揭示 TP53 的核心地位，同时也筛选出 Akt1 和 STAT3 等核心靶点，且富集分析也显示白藜芦醇的作用关联于 PI3K/Akt 和 FoxO 等信号通路。部分研究已经揭示 Akt1 和 STAT3 在横纹肌肉瘤进展中发挥作用^[32-33]，白藜芦醇也可通过调控这些靶点在其他类型肿瘤中发挥杀伤作用^[34-35]，甚至还有研究发现白藜芦醇在胃癌中可通过调控 Akt1/p53 分子轴发挥药理作用^[36]，但上述靶点在白藜芦醇抗横纹肌肉瘤过程中的确切作用，以及在肿瘤进程中是否与 p53 通路存在协同或串扰作用，目前尚未被探讨。其次，关于 p53 作为核心分子中枢的推论，目前主要建立在结构生物学及功能学的推理链条上，尚缺乏在横纹肌肉瘤细胞中进行干预的挽救实验。因此，当前结论尚不能完全排除存在其他平行通路的可能性，后续仍需通过基因操作手段来反向确证 p53 信号轴。此外，本研究目前局限于

细胞层面,白藜芦醇本身存在口服生物利用度低等药代动力学短板^[8],用药方案在体内异种移植瘤模型中的实际抑瘤效果、安全性评估,均有待通过实验进行探索。再者,部分研究还揭示白藜芦醇与诸如姜黄素等小分子联用时可增强其药效^[37-38],但在横纹肌肉瘤中是否存在类似的协同作用还有待研究。针对上述局限,未来可在构建稳定敲除细胞株进行机制反向确证的基础上,并同步拓展对 Akt1、STAT3 等靶点的探索;此外,还可尝试采用纳米载药系统等手段提升白藜芦醇的靶向递送效率^[39],并借助体内药效学实验,为白藜芦醇作为横纹肌肉瘤治疗方案的临床转化提供更精准的数据支撑。

综上所述,本研究证实了白藜芦醇通过激活 p53 磷酸化发挥抗横纹肌肉瘤作用,虽然白藜芦醇的体内生物利用度仍有待动物实验进一步探索,但本研究已为基于网络药理学解析白藜芦醇的抗横纹肌肉瘤机制提供新依据,也为优化横纹肌肉瘤临床治疗策略提供潜在思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Agaram N P. Evolving classification of rhabdomyosarcoma [J]. *Histopathology*, 2022, 80(1): 98-108.
- [2] Skapek S X, Ferrari A, Gupta A A, et al. Rhabdomyosarcoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 1.
- [3] Chen C, Dorado Garcia H, Scheer M, et al. Current and future treatment strategies for rhabdomyosarcoma [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1458.
- [4] 蔡雨萌, 张晓青, 王成志, 等. 中药小分子介导铁死亡在消化道肿瘤中的作用机制研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(11): 130-135.
- [5] Zhou D D, Luo M, Huang S Y, et al. Effects and mechanisms of resveratrol on aging and age-related diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9932218.
- [6] Meng T T, Xiao D F, Muhammed A, et al. Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol [J]. *Molecules*, 2021, 26(1): 229.
- [7] Breuss J M, Atanasov A G, Uhrin P. Resveratrol and its effects on the vascular system [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7): 1523.
- [8] Ren B, Kwah M X, Liu C, et al. Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives [J]. *Cancer Lett*, 2021, 515: 63-72.
- [9] 高娟, 李伟宏, 李秀芬, 等. pH 敏感/叶酸修饰白藜芦醇脂质体的制备、表征及对子宫内膜癌荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用 [J]. *中草药*, 2025, 56(20): 7368-7383.
- [10] Magalhães V D, Rogero S O, Cruz A S, et al. In vitro tests of resveratrol radiomodifying effect on rhabdomyosarcoma cells by comet assay [J]. *Toxicol In Vitro*, 2014, 28(8): 1436-1442.
- [11] Yang H, Yuan Y, Luo C, et al. Inhibitory effects of resveratrol on the human alveolar rhabdomyosarcoma cell line PLA-802 through inhibition of the TGF- β 1/Smad signaling pathway [J]. *Pharmacology*, 2016, 98(1-2): 35-41.
- [12] Radeva L, Yoncheva K. Resveratrol-A promising therapeutic agent with problematic properties [J]. *Pharmaceutics*, 2025, 17(1): 134.
- [13] Hopkins A L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [14] Zhao W B, Wang B Y, Li S, et al. Network pharmacology for traditional Chinese medicine in era of artificial intelligence artificial intelligence [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 558-560.
- [15] Ignatius M S, Hayes M N, Moore F E, et al. tp53 deficiency causes a wide tumor spectrum and increases embryonal rhabdomyosarcoma metastasis in zebrafish [J]. *Elife*, 2018, 7: e37202.
- [16] Chen J F, Baxi K, Lipsitt A E, et al. Defining function of wild-type and three patient-specific TP53 mutations in a zebrafish model of embryonal rhabdomyosarcoma [J]. *Elife*, 2023, 12: e68221.
- [17] Wang W H, Liu X, Liu H Q, et al. p53: From understanding its structure to advances in therapeutic targeting [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2026, 11(1): 121.
- [18] Liu Y Q, Su Z Y, Tavana O, et al. Understanding the complexity of p53 in a new era of tumor suppression [J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(6): 946-967.
- [19] Versari I, Salucci S, Bavelloni A, et al. The emerging role and clinical significance of PI3K-Akt-mTOR in rhabdomyosarcoma [J]. *Biomolecules*, 2025, 15(3): 334.
- [20] Rozengurt E, Soares H P, Sinnet-Smith J. Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple overactivation of compensatory pathways: An unintended consequence leading to drug resistance [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(11): 2477-2488.
- [21] Chen C L, Loy A, Cen L, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is involved in cell growth and survival of human rhabdomyosarcoma and osteosarcoma cells [J]. *BMC Cancer*, 2007, 7: 111.
- [22] Liu A G, Liu Y, Xu Z H, et al. Novel small molecule, XZH-5, inhibits constitutive and interleukin-6-induced STAT3 phosphorylation in human rhabdomyosarcoma cells [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(7): 1381-1387.

- [23] Hebron K E, Odeniyide P, Wei Y, *et al.* Biological advances and current challenges for pediatric rhabdomyosarcoma [J]. *Cancers*, 2026, 18(6): 888.
- [24] Turco G M, Oberoi S, Ladle B, *et al.* Towards directed therapy for fusion-positive rhabdomyosarcoma [J]. *Pharmacol Ther*, 2025, 276: 108931.
- [25] Yang Q Q, Wang Y Y, Corchete Sanchez L A, *et al.* The PIK3CA/AKT pathway drives therapy resistance in rhabdomyosarcoma [J]. *Nat Commun*, 2025, 17(1): 65.
- [26] Dakik L, Basbous M, Tamim H, *et al.* Vincristine-induced neurotoxicity in pediatric patients with rhabdomyosarcoma: A retrospective analysis of clinical features and outcome [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2022, 39(7): 644-649.
- [27] 鲁孟丽, 邱彤, 詹斯文, 等. 中药活性成分单用及联合化疗药物抗肿瘤研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2023, 43(4): 450-457.
- [28] Mirzaei S, Gholami M H, Zabolian A, *et al.* Resveratrol augments doxorubicin and cisplatin chemotherapy: A novel therapeutic strategy [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2023, 16(3): 280-306.
- [29] Kong F H, Zhang L F, Zhao X D, *et al.* Resveratrol augments paclitaxel sensitivity by modulating miR-671-5p/STOML2/PINK1/Parkin-mediated autophagy signaling in A549 cell [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2024, 38(1): e23557.
- [30] Gao Y, Yang Z Y, Bajpai A K, *et al.* Resveratrol enhances the antiliver cancer effect of cisplatin by targeting the cell membrane protein PLA2 [J]. *Front Oncol*, 2024, 14: 1453164.
- [31] Cam H, Griesmann H, Beitzinger M, *et al.* p53 family members in myogenic differentiation and rhabdomyosarcoma development [J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(4): 281-293.
- [32] Codenotti S, Sandrini L, Mandracchia D, *et al.* Statin-sensitive Akt1/Src/Caveolin-1 signaling enhances oxidative stress resistance in rhabdomyosarcoma [J]. *Cancers*, 2024, 16(5): 853.
- [33] Peng J, Huang H F, Huan Q C, *et al.* Adiponectin deficiency enhances anti-tumor Immunity of CD8+ T cells in rhabdomyosarcoma through inhibiting STAT3 activation [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 847088.
- [34] Li W P, Li C M, Ma L J, *et al.* Resveratrol inhibits viability and induces apoptosis in the small-cell lung cancer H446 cell line via the PI3K/Akt/c-Myc pathway [J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(5): 1821-1830.
- [35] Ullah A, Han C. Resveratrol and AG490 overcome glioblastoma cells' resistance to monotherapy by inhibiting JAK2/STAT3 signalling pathway [J]. *Cancers*, 2026, 18(5): 794.
- [36] Dong Q H, Zheng A X, Zhai H, *et al.* Resveratrol mediated the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells by modulating the PI3K/Akt/P53 signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 723: 150186.
- [37] Palliyage G H, Hussein N, Mimlitz M, *et al.* Novel curcumin-resveratrol solid nanoparticles synergistically inhibit proliferation of melanoma cells [J]. *Pharm Res*, 2021, 38(5): 851-871.
- [38] Chang W L, Yang K C, Peng J Y, *et al.* Parecoxib enhances resveratrol against human colorectal cancer cells through Akt and TXNDC5 inhibition and MAPK regulation [J]. *Nutrients*, 2024, 16(17): 3020.
- [39] 梅雨桐, 付雨晗, 佟大鹏, 等. 白藜芦醇纳米递送系统在肿瘤治疗中多元化释放策略的研究进展 [J]. *药学报*, 2026, 61(3): 767-777.

[责任编辑 高源]