

钩枝藤总生物碱对非小细胞肺癌细胞系表达谱及免疫微环境的影响

李中玉^{1,2,3}, 赵一燃^{1,2,3}, 门磊^{1,2,3}, 弓晓杰^{1,2,3}, 李珂珂^{1,2,3*}

1. 大连民族大学生命科学院, 辽宁 大连 116600

2. 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 辽宁 大连 116600

3. 辽宁省民族药功效成分开发与应用重点实验室, 辽宁 大连 116600

摘要:目的 研究钩枝藤总生物碱对非小细胞肺癌细胞系表达谱的影响, 筛选出差异常表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 并对功能基因进行分析和挖掘, 以期对钩枝藤抗肺癌的分子机制提供理论依据。方法 将非小细胞肺癌 NCI-H1975 细胞分为对照组和钩枝藤总生物碱处理组, 使用 RNA-Seq 技术开展全转录组测序, 获取 DEGs; 对 DEGs 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析; 筛选差异基因核心模块并分析其影响功能, 进一步分析关键基因对非小细胞肺癌生存期的影响; 通过分析钩枝藤总生物碱对非小细胞肺癌免疫细胞肿瘤浸润的情况, 确定关键基因表达与免疫浸润水平的相关性。结果 对照组和药物组共检测到 2976 个 DEGs, 其中药物组 664 个 DEGs 上调, 2312 个 DEGs 下调。钩枝藤总生物碱对铁死亡、氧化磷酸化、线粒体、溶酶体、细胞间连接、核苷酸结合寡聚化结构域 (nucleotide binding oligomerization domain, NOD) 样受体等介导的信号通路产生重要影响。在 DEGs 核心模块中, 白细胞介素 11 (interleukin 11, *IL11*) 的高表达可显著影响非小细胞肺癌患者的生存期, 是非小细胞肺癌患者不良预后的关键因素之一; 角形四肽重复干扰素诱导蛋白 3 (interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3, *IFIT3*)、白细胞介素 7 受体 (interleukin 7 receptor, *IL7R*)、2',5'-寡腺苷酸合成酶 2 (2',5'-oligoadenylate synthetase 2, *OAS2*)、S-腺苷甲硫氨酸基结构域蛋白 2 (radical S-adenosyl methionine domain containing 2, *RSAD2*)、受体转运蛋白 4 (receptor transporter protein 4, *RTP4*)、不育 α 基序结构域 9 样 (sterile alpha motif domain containing 9-like gene, *SAMD9L*)、X 染色体连锁凋亡抑制蛋白相关因子 1 (X-linked inhibitor of apoptosis associated factor 1, *XAF1*) 的表达水平影响了非小细胞肺癌组织的纯度和免疫细胞浸润的类型, 可能改变非小细胞肺癌的免疫微环境。结论 钩枝藤总生物碱能够影响非小细胞肺癌细胞的转录谱, 具有潜在的抗非小细胞肺癌活性作用。

关键词: 钩枝藤; 非小细胞肺癌; 生物碱; 转录组测序; 免疫浸润

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)17-5417-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.17.018

Effect of total alkaloids of *Ancistrocladus tectorius* on expression profiles and immune microenvironment of non-small cell lung cancer cell lines

LI Zhong-yu^{1,2,3}, ZHAO Yi-ran^{1,2,3}, MEN Lei^{1,2,3}, GONG Xiao-jie^{1,2,3}, LI Ke-ke^{1,2,3}

1. College of Life Sciences, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China

2. Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization, Ministry of Education, Dalian 116600, China

3. Key Laboratory of Development and Application of Functional Components of Ethnic Medicines, Province of Liaoning, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of total alkaloids of *Ancistrocladus tectorius* on expression profile of non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines, screen out differentially expressed genes (DEGs) for analysis and mining the functional genes, in order to provide a theoretical basis for exploring the molecular mechanism of total alkaloids of *A. tectorius* anti-lung cancer. **Methods** NCI-H1975 cells of NSCLC were treated with total alkaloids of *A. tectorius*. RNA-Seq technology was used to perform whole transcriptome sequencing to obtain DEGs. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment

收稿日期: 2022-04-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173913); 国家自然科学基金资助项目 (82104532); 2020 年国家民委中青年英才项目

作者简介: 李中玉, 博士, 讲师, 研究方向为微流控器官芯片与天然药物的研究开发。Tel: (0411)87188637 E-mail: lizhongyu2019@yeah.net

*通信作者: 李珂珂, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药及天然药物的药效物质基础及作用机制研究。E-mail: like905219@163.com

analysis for DEGs were performed. Key modules of differential genes were screened and their functions were analyzed, the impact of key genes on the survival of NSCLC were further analyzed. By analyzing of total alkaloids of *A. tectorius* on NSCLC immune infiltration, correlation of key gene expression and immune infiltration level were determined. **Results** Transcriptome sequencing showed that total 2976 DEGs were identified of which 664 were up-regulated and 2312 were down-regulated in NCI-H1975 cells treated with total alkaloids of *A. tectorius*. Total alkaloids of *A. tectorius* had an important impact on signaling pathways mediated by ferroptosis, oxidative phosphorylation, mitochondria, lysosomes, gap junctions, nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptors. In the hub module, high expression of interleukin 11 (*IL11*) could reduce the overall survival rate of NSCLC, and was one of the poor prognostic factors of NSCLC patients; Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (*IFIT3*), interleukin 7 receptor (*IL7R*), 2',5'-oligoadenylate synthetase 2 (*OAS2*), radical *S*-adenosyl methionine domain containing 2 (*RSAD2*), receptor transporter protein 4 (*RTP4*), sterile alpha motif domain containing 9-like gene (*SAMD9L*) and X-linked inhibitor of apoptosis associated factor 1 (*XAF1*) expression levels could affect the purity of NSCLC tissue and type of immune cell infiltration, which may alter the immune microenvironment of NSCLC. **Conclusion** Total alkaloids of *A. tectorius* could affect the transcriptional profile of NSCLC cells and have potential anti-NSCLC activity.

Key words: *Ancistrocladus tectorius* (Lour.) Merr.; non-small cell lung cancer; alkaloids; RNA-Seq; immune infiltration

癌症已成为全球范围内主要的公共卫生问题，据预测，未来 20 年内全球癌症负担将继续增加^[1]。我国肺癌的发病率与死亡率均居前列^[2-3]，其中非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占肺癌病例的 85%^[4]。化疗药在 NSCLC 的治疗中发挥了重要作用，但由于耐药及不良反应等问题，依然没有取得令人满意的治疗效果^[5]。化疗药作为治疗 NSCLC 的有效手段，医疗需求巨大，国内外药物学家研制新型抗 NSCLC 药物的潮流方兴未艾，是 NSCLC 治疗领域的研究热点和重要发展方向。

钩枝藤属植物在全世界共有约 20 种，我国仅分布 1 种，即钩枝藤 *Ancistrocladus tectorius* (Lour.) Merr.，生长于海南岛。钩枝藤在我国的药用历史悠久，是海南黎族人民的常用药物之一^[6]。据《黎族药志》记载，钩枝藤具有软坚散结、消炎、止泻、行气等功效，民间常用于治疗疟疾、寄生虫感染等疾病^[7]。现代药理学研究表明，钩枝藤具有抗肿瘤活性。早在 1981 年，我国学者已研究发现，钩枝藤总生物碱对大鼠 W256 肉瘤、小鼠 S180 肉瘤和艾氏腹水瘤有抑制作用^[8]，并且其生物碱类单体化合物对人胃癌 SGC-7721 细胞、人肝癌 BEL-7402 细胞及人白血病 K562 细胞具有生长抑制活性^[9-10]。近年来，Bringmann 等^[11-12]、Seupel 等^[13]研究显示，钩枝藤中的生物碱类化合物对人急性淋巴白血病 CCRF-CEM 细胞及其耐药细胞 CEM/ADR5000 具有较强的细胞毒活性。本课题组前期研究发现，钩枝藤提取物在体外对人白血病 HL-60 细胞、人非小细胞肺癌 A549 细胞、人肝癌 SMMC-7721 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞和人结肠癌 SW480 细胞均具

有较强的抑制活性，特别是可以选择性地抑制肺癌细胞增殖，对 NSCLC 细胞 NCI-H1975 的敏感性最强^[14]。以上研究表明钩枝藤具有一定的抗癌活性，在作为抗肿瘤或辅助治疗药物方面具有较大潜力。本研究通过全转录组测序技术，系统研究钩枝藤总生物碱对 NSCLC 细胞表达谱的影响，旨在全面分析钩枝藤总生物碱对 NSCLC 细胞关键生物学功能及免疫微环境产生的潜在影响，为进一步揭示钩枝藤总生物碱抗 NSCLC 的可能机制提供新的切入点，也为钩枝藤应用于 NSCLC 治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

人非小细胞肺癌 NCI-H1975 细胞购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。

1.2 药材

钩枝藤采自海南省乐东县，经大连民族大学弓晓杰教授鉴定为钩枝藤科钩枝藤属植物钩枝藤 *A. tectorius* (Lour.) Merr. 的枝叶。

1.3 药品与试剂

胎牛血清 (批号 10270106)、RPMI 1640 完全培养基 (批号 12633012) 购自美国 Gibco 公司; Trizol 试剂 (批号 10296010) 购自美国 Invitrogen 公司; Qubit RNA 试剂 (批号 Q32852) 购自美国 Life Technologies 公司; NEBNext Ultra RNA 库制备试剂盒 (批号 E7765S) 购自美国 New England Biolabs 公司。

1.4 仪器

N1001 型旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); Alpha 1-4 LDplus 型冷冻干燥机 (德国 Martin Christ 公司); Steri-Cycle 型 CO₂ 细胞培养箱 (美国

Thermo Fisher Scientific 公司); Qubit® 3.0 型 Qubit 荧光定量仪(美国 Life Technologies 公司); Novaseq 6000 型测序仪(美国 Illumina 公司)。

2 方法

2.1 钩枝藤总生物碱的制备

取新鲜干燥的钩枝藤枝叶,用 95%乙醇回流提取,浓缩所得浸膏用 2%盐酸溶解,滤过,将滤液用环己烷萃取后分得酸水层药液,在酸水层中加入二氯甲烷萃取,氨水调 pH 至 10,分离得到二氯甲烷层药液,将其减压浓缩至膏状,再冷冻干燥,得到棕黄色粉末,即为钩枝藤总生物碱。采用酸性染料比色法,以溴甲酚绿为酸性染料,通过测定条件优化及方法学考察,计算得到钩枝藤总生物碱中生物碱的质量分数为 52.6%。

2.2 细胞培养

NCI-H1975 细胞复苏后,接种于细胞培养瓶中,加入含 10%胎牛血清和 1%双抗的 RPMI 1640 完全培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱培养。隔天更换新鲜培养基,2~3 d 传代 1 次。传代时 PBS 润洗,胰酶消化,用完全培养基终止消化,制成细胞悬液,计数后接种培养。取处于对数生长期的 NCI-H1975 细胞用于后续实验。

2.3 药物处理

根据本课题组前期预实验,确定以接近钩枝藤总生物碱对 NCI-H1975 细胞的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)=77.2 μg/mL 为给药质量浓度。将 NCI-H1975 细胞接种于 6 孔板中,每孔 2×10⁵ 个,培养 12 h。取钩枝藤总生物碱,用 RPMI 1640 完全培养基溶解使其终质量浓度为 80 μg/mL,将含药培养基加入给药组细胞中,对照组加入等量不含药培养基,继续培养 48 h,收集用于下一步实验。

2.4 转录组测序

加入 TRI 试剂提取细胞总 RNA,使用 Qubit 荧光定量仪测定 RNA 纯度和浓度,通过电泳跑胶确定样本总量和质量满足建库要求。进行 RNA 测序文库构建,通过 PCR 富集得到 cDNA 文库。为了提高测序准确性,减少测序过程中的风险,测序前用定量 PCR 进行文库质检,测定文库样品的浓度和片段大小分布,检测文库质量满足要求,确定合适的上机混合测序方案。文库质检要求为主峰 300~600 bp,有效浓度≥10 nmol/L。使用 Illumina Novaseq 6000 型测序仪进行上机测序。Illumina 文库上机测

序前进行桥式 PCR 扩增反应,文库测序时的状态其实是扩增后的状态,而以 Illumina 文库两侧接头引物做 qPCR,其扩增后的产物状态和文库测序时的状态是最接近的。

2.5 差异基因的筛选

将测序得到的转录组原始数据进行预处理,得到干净序列,使用短序列比对软件进行序列比对,利用比对结果文件进行转录本构建,通过 Cufflinks 程序计算各个基因的表达量用于后续分析。通过 DESeq2 算法进行差异表达基因(differential expression genes, DEGs)的筛选分析,筛选条件为 |log₂(fold change)|>2 和校正后 P<0.05;使用 R 包“ggplot2”绘制聚类图和火山图。

2.6 基因本体(gene ontology, GO)功能与京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析

基于基因注释数据库,检测差异基因显著通路。使用 R 包“clusterProfiler”和“enrichplot”进行 DEGs 的 GO 功能及 KEGG 通路富集分析, P<0.05 认为差异具有统计学意义。

2.7 蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建与分析

通过 STRING 数据库(<http://string-db.org>)构建网络,通过 Cytoscape 程序开展进一步分析。选择包含做多节点数的基因集,对模块进行排序,确定排序最前为关键模块,进一步对关键模块中基因进行 KEGG 通路及 GO 功能富集分析。PPI 分析时,置信度为 0.4,隐藏所有孤立的蛋白,无限制词,使用 MCODE 插件确定 PPI 网络中的核心模块(degree cutoff=2, node score cutoff=0.2, k-core=2, max.depth=100),前 3 个模块得分分别为 9.727、7.429、5。

2.8 关键 DEGs 的预后分析

通过 TCGA 数据库的测序数据对人群中 DEGs 的情况进行分析,使用 GEPIA 中的预后分析模块验证非小细胞肺癌预后与关键基因表达的相关性,评估关键基因对预后的影响, P<0.05 认为差异存在统计学意义。

2.9 关键 DEGs 影响免疫细胞浸润的分析

使用 TIMER 数据库进行 Spearman 相关性计算,分析与预后相关的 DEGs 与免疫细胞(B 细胞、中性粒细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、巨噬细胞和树突状细胞)浸润之间的相关性;相关条件为

相关系数绝对值 ≥ 0.3 ，+/-分别表示正/负相关性， $P < 0.05$ 认为差异存在统计学意义。

3 结果

3.1 NCI-H1975 细胞表达谱分析

对实验数据进行筛选滤过处理，除去低质量的测序结果，共得到 30 031 个基因。首先利用 t 检验，分析得到各个 P 值以及倍数变化 (fold change) 值，对倍数变化值进行 \log_2 转化，然后将 P 值进行 $-\lg$ 转化。由于 P 值越小越显著，所以进行 $-\lg$ 的转化后，转化值越大其差异就越显著。以必须满足 $|\log_2(\text{fold change})| > 2$ 和校正后 $P < 0.05$ ，即当以上 2 种条件同时符合的情况交集出的基因群为显著性高并且稳定的 DEGs。通过表达量差异分析，发现

经钩枝藤总生物碱处理后转录组表达水平有明显差异，火山图直接反映 DEGs 分布情况，蓝色为下调，红色为上调 (图 1-A)。统计约 10% 的基因表达发生了改变，共计 2976 个 DEGs。DEGs 中表达下调基因明显多于表达上调基因，其中 2312 个下调，664 个上调。

为反映药物影响的 DEGs 情况，对不同表达模式的基因通过基因表达聚类热图显示 (图 1-B)。结果显示，给药组 NCI-H1975 细胞表达谱与对照组差异明显，并能够聚类，显示 2 组表达谱具有异质性，直观可见给予钩枝藤总生物碱后影响细胞内基因的差异变化情况。表明钩枝藤总生物碱对 NCI-H1975 细胞的表达谱有显著影响。

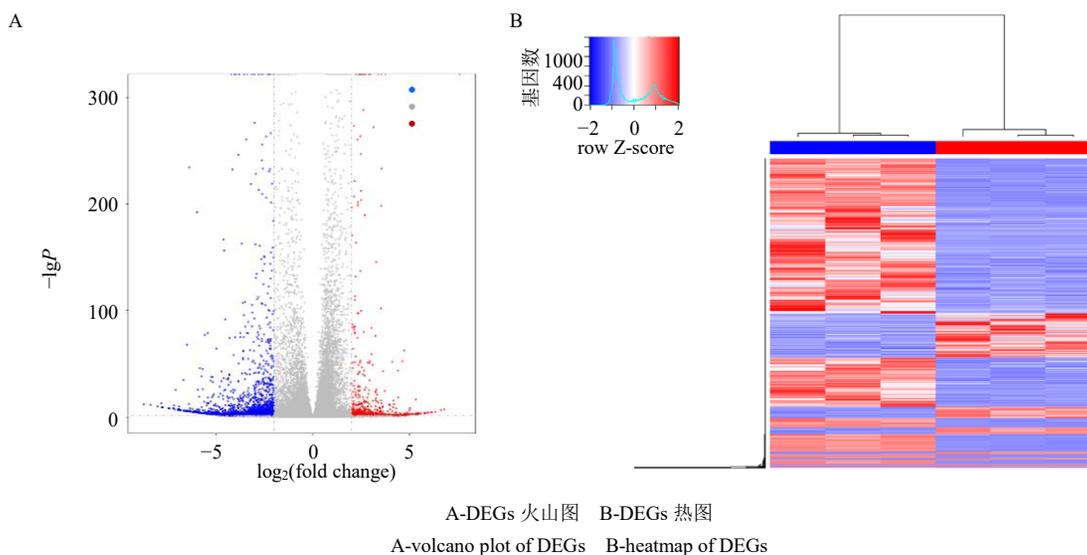


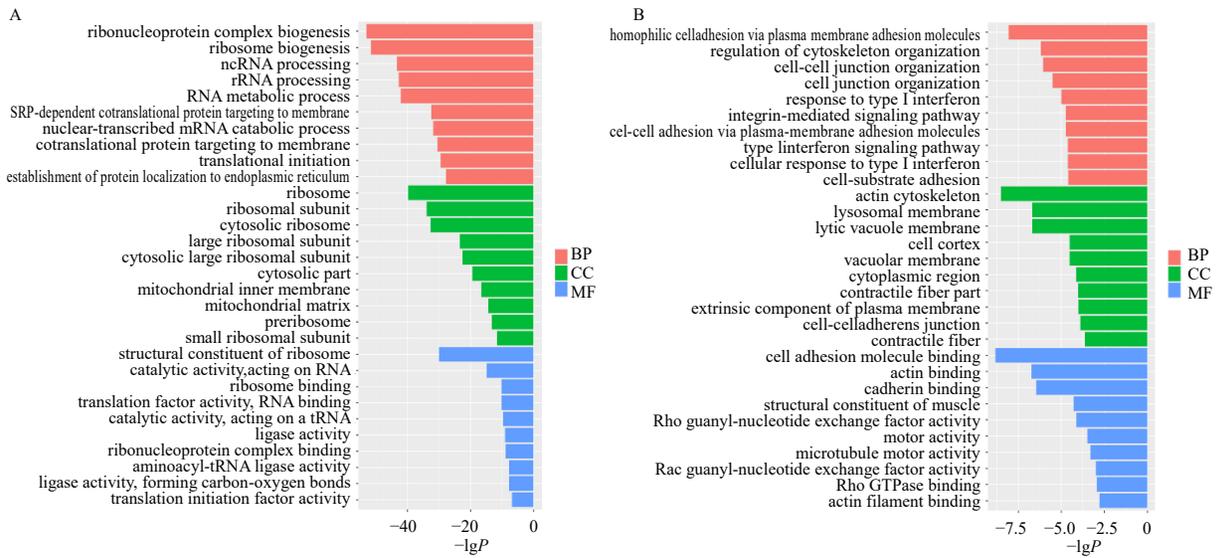
图 1 钩枝藤总生物碱对 NCI-H1975 细胞表达谱的影响

Fig. 1 Effect of total alkaloids of *A. tectorius* on expression profile of NCI-H1975 cells

3.2 DEGs 功能分析

差异基因功能富集分析是通过不同的数据库对基因功能进行归类，对差异基因的生物途径进行注释及分类并进行统计学分析，以进一步寻找药物的主要作用靶点。通过 GO 功能分析，确定 DEGs 在细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP) 3 个层面上的影响。分别将所有上调及下调的 DEGs 作为前景基因，进行差异基因分析的所有基因为背景基因，进行 GO 功能富集。GO 功能富集结果 $P < 0.05$ ，被定义为差异基因在给定基因集中显著富集的 GO 条目和通路。在此分析中，对 P 值取负对数 ($-\lg P$)， P 值越小， $-\lg P$ 越大，富集程度越大，该 GO 条目越有意义，进一步按照 P

值进行排序，表达上调组和下调组各取前 10 进行展示 (图 2)。结果显示，在 MF 层面表达上调的 DEGs 影响了核糖结合、RNA 催化活性、连接酶活性等；表达下调的 DEGs 影响了微管运动、细胞黏附分子结合、肌动蛋白结合、钙黏蛋白结合等。在 CC 层面表达上调的 DEGs 影响了核糖体与线粒体等，表达下调的 DEGs 影响了肌动蛋白细胞骨架、溶酶体、收缩纤维、细胞-细胞黏附连接、胞质区等。在 BP 层面表达上调的 DEGs 影响了细胞对核糖体生物合成、rRNA 加工与代谢的作用等；表达下调的 DEGs 影响了细胞骨架组织的调控、细胞连接、整合素及干扰素介导的信号传导等。这些表达水平改变最显著的相关基因，与影响 NSCLC 细胞的增殖、凋亡和侵袭转移高度相关。



A-上调 DEGs 的 GO 功能富集分析 B-下调 DEGs 的 GO 功能富集分析
A-GO function enrichment analysis of up-regulated DEGs B-GO function enrichment analysis of down-regulated DEGs

图 2 DEGs 的 GO 功能富集分析

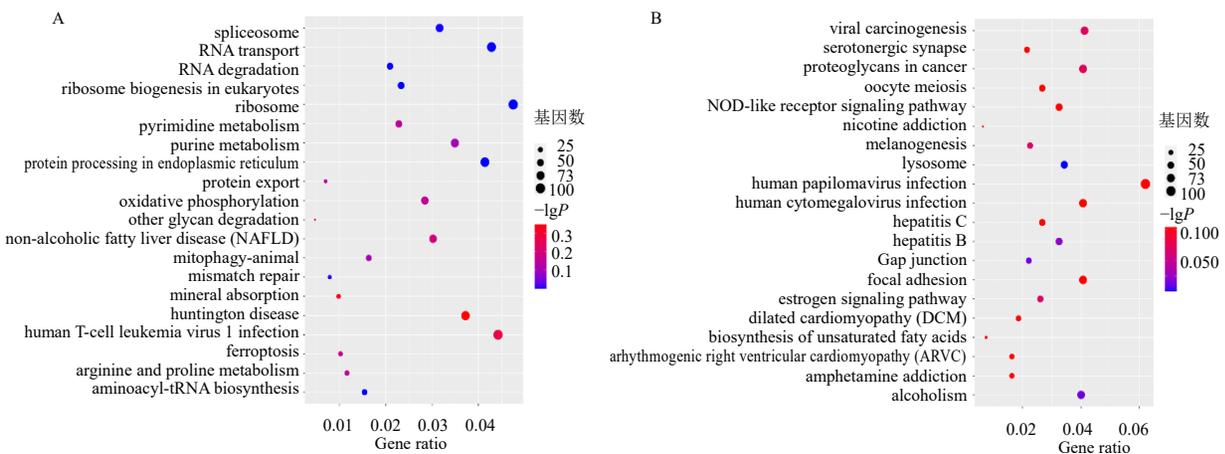
Fig. 2 GO function enrichment analysis of DEGs

3.3 DEGs 信号通路分析

KEGG 通路富集分析是东京大学和京都大学共同研制的数据库,可查询通路,进一步寻找活性成分作用靶点显著富集的体内通路^[15]。体内不同基因通过相互作用行使复杂的生物学功能,进行信号通路分析可确定 DEGs 参与的主要信号转导和生化代谢途径。分别将所有上调及下调的 DEGs 作为前景基因,进行差异基因分析的所有基因为背景基因,分别对 DEGs 表达上调组和表达下调组进行 KEGG 通路分析(图 3),通路富集 $P < 0.05$ 。结果显示,表达上调的 DEGs 主要影响了铁死亡、氧化磷酸化、

线粒体自噬、错配修复、RNA 转运与降解、聚糖降解等途径;表达下调的 DEGs 主要影响了病毒致癌、蛋白聚糖、溶酶体、细胞间隙连接、NOD 样受体介导的信号通路等。

以上结果表明,使用钩枝藤总生物碱处理 NCI-H1975 细胞后,与细胞的增殖、凋亡和侵袭密切相关的铁死亡、氧化磷酸化、线粒体自噬、溶酶体、细胞间隙连接、NOD 样受体介导的信号通路等受到显著影响。提示钩枝藤总生物碱可能通过作用于这些通路影响了 NCI-H1975 细胞的增殖和凋亡,并有潜力抑制肿瘤侵袭转移。



A-上调 DEGs 的 KEGG 通路分析 B-下调 DEGs 的 KEGG 通路分析
A-KEGG pathway analysis of up-regulated DEGs B-KEGG pathway analysis of down-regulated DEGs

图 3 上调与下调 DEGs 的 KEGG 通路分析 (前 10)

Fig. 3 KEGG pathway analysis of up-regulated and down-regulated DEGs (top 10)

3.4 PPI 网络和关键模块分析

PPI 网络是从生物化学、信号转导和遗传网络的角度来可视化构建药物和疾病相关蛋白分子之间的相关性，能更好地理解基因编码的蛋白直接或间接的参与细胞的生物学功能。设置节点的大小代表度值 (degree)，节点越大，表示其度值越大，最终获得 PPI 网络图。DEGs 的 PPI 网络通过 STRING 数据库构建并进行分析，通过 MCODE 确定 PPI 网络中的前 3 个模块 (图 4)，将排序第 1 的模块为核心模块。核心模块 1 包含 23 个节点和 107 条边，所含基因包括白细胞介素 11 (interleukin 11, *IL11*)、2',5'-寡腺苷酸合成酶 2 (2',5'-oligoadenylate synthetase 2, *OAS2*)、白细胞介素 7 受体 (interleukin 7 receptor, *IL7R*)、骨髓细胞瘤病毒癌基因同源物 (myelocytomatosis viral oncogene homolog, *MYC*)、X 染色体连锁凋亡抑制蛋白相关因子 1 (X-linked inhibitor of apoptosis associated factor 1, *XAF1*)、肿瘤坏死因子超家族成员 10 (tumor necrosis factor superfamily 10, *TNFSF10*)、睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor, *CNTF*)、无翅型 MMTV 整合位点家族 3A (wingless-type MMTV integration site family, member 3A, *WNT3A*)、细胞因子受体样因子 2 (cytokine receptor-like factor 2, *CRLF2*)、激

酶插入域受体 (kinase insert domain receptor, *KDR*)、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, *LIF*)、SRY 相关高迁移率族盒蛋白转录因子 2 (sry-related high-mobility-group box-containing 2, *SOX2*)、受体转运蛋白 4 (receptor transporter protein 4, *RTP4*)、角形四肽重复干扰素诱导蛋白 3 (interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3, *IFIT3*)、成纤维细胞生长因子 8 (fibroblast growth factor 8, *FGF8*)、不育 α 基序结构域 9 样 (sterile alpha motif domain containing 9-like gene, *SAMD9L*)、骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, *BMP2*)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, *EGF*)、*IFIT2*、*IL6*、促红细胞生成素 (erythropoietin, *EPO*)、*RSAD2*、*FGF19* 等。

通过对核心模块中基因进行分析，包括 KEGG 通路和 GO 功能富集分析，显示核心模块 1 中基因可影响细胞因子受体相互作用、Janus 激酶 (Janus kinase, JAK) / 信号转导和激活转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 及叉头框蛋白 O (forkhead box protein O, FOXO) 相关信号通路 (图 5-A)，同时还可影响 I 型干扰素信号通路及 STAT 受体信号通路等的调节功能 (图 5-B)。

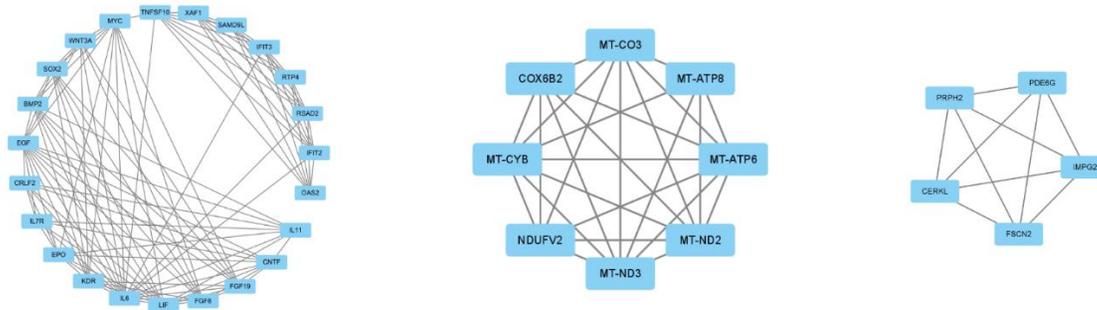


图 4 PPI 网络分析

Fig. 4 PPI networks analysis

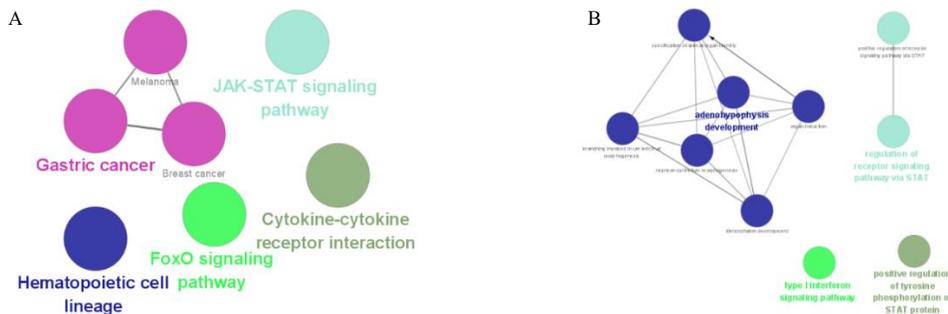


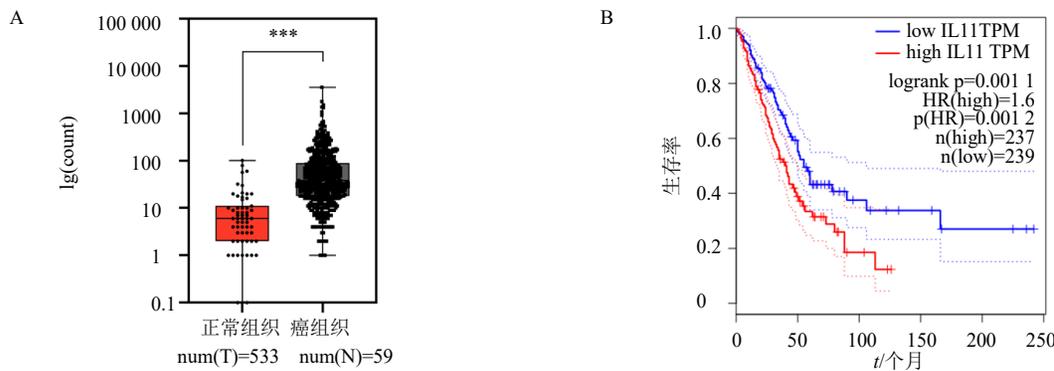
图 5 核心模块基因的 KEGG 通路 (A) 和 GO 功能 (B) 富集分析

Fig. 5 KEGG pathway (A) and GO function (B) enrichment analysis of key mode genes

3.5 关键基因对 NSCLC 预后和免疫细胞浸润的影响

肿瘤浸润是指肿瘤细胞分裂增生进入到周围的组织间隙、淋巴瘤血管内，并破坏周围的组织，对 NSCLC 治疗和患者预后具有重要影响。首先研究核心模块中关键基因对 NSCLC 预后的影响，发现 *IL11* 基因在 NSCLC 中的表达水平明显高于肺正常组织的表达水平，且 *IL11* 基因的高表达与 NSCLC 不良预后相关（图 6）。进一步通过 TIMER 2.0 分析 6 种免疫细胞浸润的情况，以确定相关基因表达与免疫细胞浸润之间的相关性。如表 1 所示，*IFIT2* 与中性粒细胞、*CD4*⁺ T 细胞、巨噬细胞、树突状细胞浸

润水平呈正相关；*IFIT3* 与中性粒细胞、*CD8*⁺ T 细胞、树突状细胞浸润水平呈正相关；*IL7R* 与 NSCLC 细胞纯度呈负相关，与 6 种免疫细胞浸润水平均呈正相关；*OAS2* 与中性粒细胞、*CD4*⁺ T 细胞、树突状细胞浸润水平呈正相关；*RSAD2* 与中性粒细胞、树突状细胞浸润水平呈正相关；*RTP4* 与 *CD4*⁺ T 细胞、中性粒细胞、树突状细胞浸润水平呈正相关；*SAMD9L* 与 NSCLC 细胞纯度呈负相关，与 B 细胞、中性粒细胞、*CD4*⁺ T 细胞、*CD8*⁺ T 细胞、树突状细胞浸润水平呈正相关；*XAF1* 与 NSCLC 细胞纯度呈负相关，与中性粒细胞、*CD4*⁺ T 细胞、树突状细胞浸润水平呈正相关。



A-*IL11* 基因在 NSCLC 癌组织中的表达情况箱线图 B-*IL11* 基因表达对 NSCLC 预后的影响 ****P*<0.001
A-box plots of *IL11* gene expression in NSCLC cancer tissues B-effect of *IL11* gene expression on prognosis of NSCLC ****P*<0.001

图 6 *IL11* 基因在 NSCLC 癌组织中的表达及对预后的影响

Fig. 6 Expression of *IL11* gene in NSCLC cancer tissues and its influence on prognosis

表 1 关键基因与免疫细胞浸润之间的相关性分析

Table 1 Analysis of correlation between key genes and immune infiltration

基因	NSCLC 细胞纯度		B 细胞		CD8 ⁺ T 细胞		CD4 ⁺ T 细胞	
	相关系数	<i>P</i> 值	相关系数	<i>P</i> 值	相关系数	<i>P</i> 值	相关系数	<i>P</i> 值
<i>IFIT2</i>	-0.254	1.00 × 10 ⁻⁸	0.147	1.22 × 10 ⁻³	0.291	5.44 × 10 ⁻¹¹	0.333	5.05 × 10 ⁻¹⁴
<i>IFIT3</i>	-0.284	1.29 × 10 ⁻¹⁰	0.098	3.18 × 10 ⁻²	0.324	2.11 × 10 ⁻¹³	0.265	8.37 × 10 ⁻⁹
<i>IL7R</i>	-0.462	1.96 × 10 ⁻²⁷	0.374	1.65 × 10 ⁻¹⁷	0.528	2.29 × 10 ⁻³⁶	0.409	5.64 × 10 ⁻²¹
<i>OAS2</i>	-0.287	8.26 × 10 ⁻¹¹	0.106	2.01 × 10 ⁻²	0.251	1.84 × 10 ⁻⁸	0.336	3.19 × 10 ⁻¹⁴
<i>RSAD2</i>	-0.273	7.08 × 10 ⁻¹⁰	0.097	3.37 × 10 ⁻²	0.202	6.68 × 10 ⁻⁶	0.282	2.63 × 10 ⁻¹⁰
<i>RTP4</i>	-0.286	9.14 × 10 ⁻¹¹	0.275	7.34 × 10 ⁻¹⁰	0.262	4.08 × 10 ⁻⁹	0.378	7.50 × 10 ⁻¹⁸
<i>SAMD9L</i>	-0.396	5.49 × 10 ⁻²⁰	0.316	1.11 × 10 ⁻¹²	0.865	8.82 × 10 ⁻¹⁷	0.503	1.91 × 10 ⁻³²
<i>XAF1</i>	-0.366	4.23 × 10 ⁻¹⁷	0.282	2.63 × 10 ⁻¹⁰	0.181	6.11 × 10 ⁻⁵	0.540	4.68 × 10 ⁻³⁸
基因	巨噬细胞		中性粒细胞		树突状细胞			
	相关系数	<i>P</i> 值	相关系数	<i>P</i> 值	相关系数	<i>P</i> 值		
<i>IFIT2</i>	0.311	2.64 × 10 ⁻¹²	0.497	1.62 × 10 ⁻³¹	0.549	8.66 × 10 ⁻⁴⁰		
<i>IFIT3</i>	0.232	2.48 × 10 ⁻⁷	0.499	9.40 × 10 ⁻³²	0.503	1.18 × 10 ⁻⁵²		
<i>IL7R</i>	0.483	9.24 × 10 ⁻³⁰	0.658	5.49 × 10 ⁻⁶¹	0.646	6.87 × 10 ⁻⁵⁹		
<i>OAS2</i>	0.206	4.65 × 10 ⁻⁶	0.459	1.44 × 10 ⁻²⁶	0.436	4.42 × 10 ⁻²⁴		
<i>RSAD2</i>	0.224	6.59 × 10 ⁻⁷	0.434	1.25 × 10 ⁻²³	0.448	1.65 × 10 ⁻²⁵		
<i>RTP4</i>	0.094	3.90 × 10 ⁻²	0.417	8.72 × 10 ⁻²²	0.434	8.48 × 10 ⁻²⁴		
<i>SAMD9L</i>	0.270	1.61 × 10 ⁻⁹	0.622	4.29 × 10 ⁻⁵⁸	0.622	1.54 × 10 ⁻⁵³		
<i>XAF1</i>	0.132	3.68 × 10 ⁻³	0.443	1.40 × 10 ⁻²⁴	0.431	1.53 × 10 ⁻²³		

4 讨论

目前,治疗 NSCLC 药物的机制研究大部分仅针对少数几个基因、蛋白的比较分析,对免疫微环境影响的探索也比较局限,一般仅在通路水平上进行探讨,因此提供的信息较为单一,难以系统全面地认识相关基因的表达状况^[16]。大量的研究表明,基因和蛋白质较少单独起作用,它们往往通过复杂的网络交互作用共同影响生物系统的功能,这些功能高度相关的基因构成基因群^[17]。转录组研究能够全面地反映基因表达谱,从基因功能以及基因结构的整体水平揭示体内生物学的特定过程与疾病发生发展过程中的可能分子机制^[18]。研究药物对特定细胞系表达谱的影响可以为药物开发提供更为详实的理论依据^[19]。钩枝藤具有潜在的抗肿瘤活性,具有开发成 NSCLC 治疗药物的潜力,但其分子机制尚不明确。本研究采用二代测序技术,深入挖掘分析了钩枝藤总生物碱处理 NSCLC 细胞系的转录组学数据。研究发现,钩枝藤总生物碱能够改变 NCI-H1975 细胞的表达谱,其中 2312 个基因下调,664 个基因上调。通过转录组数据分析基因表达水平的变化,反映表型的差异。对于表达量高且差异很大的基因,或者共有的差异基因,都将是后续研究中重点关注的对象。进一步通过 KEGG 通路和 GO 功能富集分析,确定这些 DEGs 影响了铁死亡、氧化磷酸化、线粒体自噬、错配修复、RNA 转运与降解、聚糖降解、病毒致癌、蛋白聚糖、溶酶体、细胞间隙连接、NOD 样受体介导的信号通路等,表明钩枝藤总生物碱可能影响 NCI-H1975 细胞的增殖、凋亡和侵袭。已有研究证实钩枝藤对胃癌细胞、肝癌细胞及白血病细胞均具有一定的抑制增殖及促进凋亡作用^[9-10]。这些差异基因显著富集的通路,是反映药物发挥重要作用的关键通路,目前这些基因与钩枝藤在 NSCLC 发生发展中的相互关系鲜有相关研究报告,可以在后续实验研究中直接对这些通路展开分析和讨论。

本研究通过 PPI 网络构建和分析,发现核心模块中关键基因 *IL11* 的高表达是 NSCLC 预后不良因素,这与前期研究相符^[20-21],说明钩枝藤总生物碱具有改善 NSCLC 预后的潜力。*IL11* 可介导纤维炎症性疾病^[22],*IL11* 突变导致的 *IL11* 信号丢失可预防肺纤维化,这与肌成纤维细胞中自分泌的 *IL11* 活性降低有关^[23-26],提示 *IL11* 能够作为肺纤维化治疗的潜在靶标。*IL11* 还能对子宫内膜癌细胞的黏附和

迁移产生重要影响^[27],并能促进结肠炎进一步发展成结肠癌^[28]。*IL11* 的高表达也有利于增强 STAT3,促进胃癌的发展^[29]。也有研究证实,*IL11/IL6-STAT3* 和上皮间质转化/E 盒结合锌指蛋白 1 的信号协同通过 S100 蛋白表达的差异调节,驱动胰腺癌细胞的侵袭^[30]。当前 *IL11* 在 NSCLC 中研究尚较少,有深入探索的价值。

对核心模块关键基因进行 KEGG 通路和 GO 功能富集分析,发现 JAK/STAT、I 型干扰素、FOXO 等相关信号通路受到了影响。JAK/STAT 通路是胞外细胞因子启动受体介导的信号转导核心,诱导癌症和炎症中关键介质的表达,参与细胞的分化、增殖、凋亡及炎症等多个生理过程^[31];I 型干扰素通过多种信号通路抑制细胞增殖、诱导分化、调节免疫系统和抑制血管生成,可以在肺癌治疗中调节肿瘤细胞的生长活力及转移性侵袭^[32-33];FOXO 转录因子参与多种信号转导,影响细胞的增殖、凋亡等过程,可作为治疗癌症药物的靶点^[34]。本研究发现其核心调控网络主要参与细胞的凋亡、炎症和免疫信号通路,处于 PPI 网络中的 *IL11* 等关键基因可能是其重要的药效靶点。这从一定程度上说明钩枝藤总生物碱抗 NSCLC 的机制可能与这些通路密切相关,提示钩枝藤总生物碱可能通过参与多条信号通路来调控肿瘤的发生发展,后续将完善实验,并针对这些基因进行表达水平分析和功能分析,为发现新的 NSCLC 治疗靶点提供理论基础。

肿瘤组织不只包含肿瘤细胞,还含有基质细胞、成纤维细胞、免疫细胞等其他不同类型的细胞,这些细胞整体构成了肿瘤的微环境。不同的免疫细胞在肿瘤发生过程中发挥不同的作用,而不同肿瘤的免疫细胞组成也各有特点,所以分析药物对免疫细胞浸润的影响,对于研究药物的肿瘤治疗作用具有重要的指导意义。本研究发现核心模块 1 中的 *IFIT2*、*IFIT3*、*IL7R*、*OAS2*、*RSAD2*、*RTP4*、*SAMD9L*、*XAF1* 对 NSCLC 肿瘤组织肿瘤纯度和浸润免疫细胞类型均有影响。*CD4⁺* T 细胞在肿瘤免疫响应和肿瘤治疗中可以发挥多方面的作用,在肿瘤免疫治疗领域得到了充分认可,可以用来控制肿瘤进展和预防患者复发^[35]。中性粒细胞可以参与协调先天性和适应性免疫反应,介导促肿瘤和抗肿瘤反应,在癌症生物学及癌症预后中具有重要意义^[36]。树突状细胞用于摄取肿瘤抗原和启动不同亚群的抗原特异性 T 细胞,能够启动从头的抗肿瘤反应^[37]。这些结果

表明,钩枝藤总生物碱处理后可能改变了NSCLC所处的免疫微环境,进而影响NSCLC的发展进程并改善预后。这些核心模块中的关键基因不仅参与了肿瘤的发生发展,还可能参与了钩枝藤总生物碱改变NSCLC免疫微环境的过程。但其具体的调控机制有待进一步探索,值得在以后的研究中继续探讨。

本研究应用转录组测序技术对我国独特的民族药物钩枝藤抗NSCLC的分子机制进行探索,获取了一些与钩枝藤抗NSCLC相关的潜在生物标志物和可能作用途径,为进一步研究钩枝藤抗NSCLC作用机制的实验研究和临床研究提供思路和线索。从转录组学数据分析发现,钩枝藤总生物碱能够显著改变NCI-H1975细胞的表达谱,对NCI-H1975细胞的铁死亡、氧化磷酸化、线粒体自噬等与癌症进展关联密切的信号通路产生了重要影响,同时还影响了NSCLC的免疫微环境。本研究已在NSCLC细胞转录组水平上对钩枝藤总生物碱的影响进行了研究,未来需要进行更深层次的研究,如进一步分析蛋白质水平的表达差异,结合蛋白质组学进行探索,系统的分析钩枝藤总生物碱对NSCLC细胞生物功能和免疫微环境的影响,将有助于进一步揭示钩枝藤抗NSCLC的活性作用,并提供新的防治靶点及策略。综上所述,钩枝藤具有潜在的抗NSCLC活性作用,本研究为后续深入挖掘钩枝藤抗NSCLC的分子机制和靶点,进一步开发高效低毒的创新药物提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Global Burden of Disease 2019 Cancer Collaboration, Kocarnik J M, Compton K, *et al.* Cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life years for 29 cancer groups from 2010 to 2019: A systematic analysis for the global burden of disease study 2019 [J]. *JAMA Oncol*, 2022, 8(3): 420-444.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] Feng R M, Zong Y N, Cao S M, *et al.* Current cancer situation in China: Good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J]. *Cancer Commun*, 2019, 39(1): 22.
- [4] Hirsch F R, Scagliotti G V, Mulshine J L, *et al.* Lung cancer: Current therapies and new targeted treatments [J]. *Lancet*, 2017, 389(10066): 299-311.
- [5] Ramalingam S S, Novello S, Guclu S Z, *et al.* Veliparib in combination with platinum-based chemotherapy for first-line treatment of advanced squamous cell lung cancer: A randomized, multicenter phase III study [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(32): 3633-3644.
- [6] 中国科学院华南植物研究所. 海南植物志 (第一卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1964: 515-516.
- [7] 戴好富. 黎族药志 (第一册) [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2008: 124-125.
- [8] 陈政雄, 王保德, 秦国伟, 等. 钩枝藤中生物碱的分离和鉴定 [J]. *药学学报*, 1981, 16(7): 519-523.
- [9] 苏志恒. 钩枝藤化学成分的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [10] 蔡彩虹. 钩枝藤枝条的生物活性成分研究 [D]. 海口: 海南大学, 2013.
- [11] Bringmann G, Seupel R, Feineis D, *et al.* Ancistectorine D, a naphthylisoquinoline alkaloid with antiprotozoal and antileukemic activities, and further 5,8'- and 7,1'-linked metabolites from the Chinese liana *Ancistrocladus tectorius* [J]. *Fitoterapia*, 2016, 115: 1-8.
- [12] Bringmann G, Seupel R, Feineis D, *et al.* Antileukemic ancistrobenomine B and related 5,1'-coupled naphthylisoquinoline alkaloids from the Chinese liana *Ancistrocladus tectorius* [J]. *Fitoterapia*, 2017, 121: 76-85.
- [13] Seupel R, Hemberger Y, Feineis D, *et al.* Ancistrocyclinones A and B, unprecedented pentacyclic N, C-coupled naphthylisoquinoline alkaloids, from the Chinese liana *Ancistrocladus tectorius* [J]. *Org Biomol Chem*, 2018, 16(9): 1581-1590.
- [14] 陈静, 李珂珂, 弓晓杰. 钩枝藤抗肿瘤有效部位的制备及活性筛选 [J]. *大连民族大学学报*, 2020, 22(5): 396-399.
- [15] 罗雪菲, 王伟, 赵晓芳, 等. 基于网络药理学探讨桃莲绞复方增强全成分肿瘤细胞疫苗抗结直肠癌作用分子机制 [J]. *中草药*, 2021, 52(2): 459-468.
- [16] Shen Y L, Cai H J, Ma S J, *et al.* Telocinobufagin has antitumor effects in non-small-cell lung cancer by inhibiting STAT3 signaling [J]. *J Nat Prod*, 2022, 85(4): 765-775.
- [17] 宋敏, 刘涛, 巩彦龙, 等. 活血定眩胶囊对小鼠脑微血管内皮细胞 bEnd.3 基因表达谱的影响及生物信息学分析 [J]. *中草药*, 2017, 48(8): 1617-1623.
- [18] Koeppel F, Bobard A, Lefebvre C, *et al.* Added value of whole-exome and transcriptome sequencing for clinical molecular screenings of advanced cancer patients with solid tumors [J]. *Cancer J*, 2018, 24(4): 153-162.
- [19] 杨照环, 胡文倩, 贾祯贤, 等. 根皮苷对食管癌细胞系表达谱的影响 [J]. *中草药*, 2021, 52(23): 7236-7243.

- [20] 柳雅慧. IL-11 促进 NSCLC 进展并与患者不良预后相关 [D]. 天津: 天津医科大学, 2018.
- [21] Zhao M, Liu Y H, Liu R, *et al.* Upregulation of IL-11, an IL-6 family cytokine, promotes tumor progression and correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(6): 2213-2224.
- [22] Cook S A, Schafer S. Hiding in plain sight: Interleukin-11 emerges as a master regulator of fibrosis, tissue integrity, and stromal inflammation [J]. *Annu Rev Med*, 2020, 71: 263-276.
- [23] Ng B, Widjaja A A, Viswanathan S, *et al.* Similarities and differences between IL11 and IL11RA1 knockout mice for lung fibro-inflammation, fertility and craniosynostosis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 14088.
- [24] Dong J R, Viswanathan S, Adami E, *et al.* Hepatocyte-specific IL11 *cis*-signaling drives lipotoxicity and underlies the transition from NAFLD to NASH [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 66.
- [25] Schafer S, Viswanathan S, Widjaja A A, *et al.* IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis [J]. *Nature*, 2017, 552(7683): 110-115.
- [26] Kortekaas R K, Burgess J K, van Orsoy R, *et al.* Therapeutic targeting of IL-11 for chronic lung disease [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2021, 42(5): 354-366.
- [27] Lay V, Yap J, Sonderegger S, *et al.* Interleukin 11 regulates endometrial cancer cell adhesion and migration via STAT3 [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(2): 759-764.
- [28] Wang H, Wang D H, Yang X, *et al.* Colitis-induced IL11 promotes colon carcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2021, 42(4): 557-569.
- [29] Zhou R J, Wu Z B, Deng X X, *et al.* The long non-coding RNA OLC8 enhances gastric cancer by interaction with IL-11 [J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(8): e22962.
- [30] Al-Ismaeel Q, Neal C P, Al-Mahmoodi H, *et al.* ZEB1 and IL-6/11-STAT3 signalling cooperate to define invasive potential of pancreatic cancer cells via differential regulation of the expression of S100 proteins [J]. *Br J Cancer*, 2019, 121(1): 65-75.
- [31] Hu X Y, Li J, Fu M R, *et al.* The JAK/STAT signaling pathway: From bench to clinic [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 402.
- [32] Bai M, Li W, Yu N Z, *et al.* The crosstalk between β -catenin signaling and type I, type II and type III interferons in lung cancer cells [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(6): 2788-2797.
- [33] Galani V, Kastamoulas M, Varouktsi A, *et al.* IFN γ -signaling effects on lung cancer: An up-to-date pathways-specific review [J]. *Clin Exp Med*, 2017, 17(3): 281-289.
- [34] Calissi G, Lam E W F, Link W. Therapeutic strategies targeting FOXO transcription factors [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(1): 21-38.
- [35] Ben Khelil M, Godet Y, Abdeljaoued S, *et al.* Harnessing antitumor CD4⁺ T cells for cancer immunotherapy [J]. *Cancers*, 2022, 14(1): 260.
- [36] Carnevale S, Ghasemi S, Rigatelli A, *et al.* The complexity of neutrophils in health and disease: Focus on cancer [J]. *Semin Immunol*, 2020, 48: 101409.
- [37] Le Gall C M, Weiden J, Eggermont L J, *et al.* Dendritic cells in cancer immunotherapy [J]. *Nat Mater*, 2018, 17(6): 474-475.

[责任编辑 李亚楠]