

白藜芦醇治疗非小细胞肺癌机制的网络药理学分析及实验验证

董杨逗, 钮宇恒, 张羽, 霍如婕, 刘清华, 田新瑞

Exploring the Mechanism of Action of Resveratrol in the Treatment of Non-small Cell Lung Cancer Based on Network Pharmacology and Experimental Validation

DONG Yangdou, NIU Yuheng, ZHANG Yu, HUO Rujie, LIU Qinghua, and TIAN Xinrui

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030048>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于网络药理学分析咖啡酰奎宁酸类化合物治疗II型糖尿病的作用机制

Mechanism of Caffeoylquinic Acids in the Treatment of Type II Diabetes Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(14): 16-24 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010111>

基于网络药理学分析金钗石斛治疗神经系统疾病的药效物质基础及作用机制

Analysis of the Pharmacodynamic Material Basis and Mechanism of Dendrobium Nobile in the Treatment of Nervous System Diseases Using Integrative Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(13): 1-10 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110140>

基于网络药理学探讨桦褐孔菌降血糖功效成分及作用机制

Action Mechanism of *Inonotus obliquus* in the Treatment of Diabetes and the Material Basis of Pharmacodynamics Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(22): 18-29 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040268>

基于网络药理学与分子对接技术探讨益肝草凉茶解酒保肝的作用机制

Mechanism of Relieving Alcohol and Protecting Liver of Yigancao Herbal Tea Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

食品工业科技. 2021, 42(8): 8-18 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070092>

基于网络药理学探讨预知子抗抑郁的作用机制

Mechanism of Anti-depression Mechanism of Akebiae Fructus Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(14): 8-15 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110295>

藻蓝蛋白对非小细胞肺癌H1299生长、迁移和凋亡的功能影响

Functional Research of Phycocyanin on the Proliferation, Migration and Apoptosis of Non-small Cell Lung Cancer H1299 Cells

食品工业科技. 2019, 40(12): 278-284 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.12.045>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

董杨逗, 钮宇恒, 张羽, 等. 白藜芦醇治疗非小细胞肺癌机制的网络药理学分析及实验验证 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(1): 28–36.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030048

DONG Yangdou, NIU Yuheng, ZHANG Yu, et al. Exploring the Mechanism of Action of Resveratrol in the Treatment of Non-small Cell Lung Cancer Based on Network Pharmacology and Experimental Validation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(1): 28–36. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030048

· 未来食品 ·

白藜芦醇治疗非小细胞肺癌机制的网络药理学分析及实验验证

董杨逗¹, 钮宇恒², 张羽¹, 霍如婕³, 刘清华¹, 田新瑞^{3,*}

(1. 山西医科大学基础医学院, 山西太原 030001;

2. 山西医科大学第一临床医学院, 山西太原 030001;

3. 山西医科大学第二医院, 山西太原 030000)

摘要: 目的: 采用网络药理学和分子对接技术识别分析白藜芦醇抗非小细胞肺癌 (NSCLC) 的潜在靶点和作用机制, 并结合临床数据以及分子生物学实验进行初步验证。方法: 通过 Swiss Target Prediction 数据库和 Target net 数据库筛选白藜芦醇靶点, 通过数据库 Genecards、OMIM、TTD 收集 NSCLC 靶点, 利用 Venny 2.1.0 平台获得药物和疾病靶点的交集; 应用 Cytoscape 3.7.2 软件与 String 数据库生成靶标蛋白互作网络 (PPI), 并进行拓扑分析; 利用 Metascape 数据库对交集靶标进行基因本体 (GO) 功能富集与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 得到交集靶标的基因图谱; 利用 Autodock Vina 软件对排名前三位的核心靶基因与白藜芦醇进行分子对接验证; 通过癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库获得临床病例样本, 分析相关靶基因在 NSCLC 患者 (n=1017) 和健康人群 (n=627) 的表达情况; 细胞水平采用 Western Blot 检测不同浓度 (30、50 $\mu\text{mol/L}$) 白藜芦醇对人肺腺癌 A549 细胞 SRC、EGFR 及 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达的影响。结果: 筛选得到的潜在靶点共有 40 个, 经过拓扑分析得到关键靶点 8 个, 其中 EGFR、SRC、ESR1 等靶点与 NSCLC 密切相关; 白藜芦醇抗 NSCLC 主要涉及肿瘤蛋白多糖、雌激素信号通路、PI3K/AKT 等多条信号通路; 分子对接显示, 白藜芦醇与关键靶点具有稳定的结合能力; 临床样本结果显示, 靶基因 EGFR、SRC、ESR1、HSP90AA1 以及 MMP9 的表达在 NSCLC 中上调; TNF、CDC42 以及 RELA 的表达在 NSCLC 中下调; 细胞实验结果表明, 白藜芦醇药物干预以剂量依赖的方式抑制了人肺腺癌 A549 细胞中 SRC、EGFR、p-PI3K 和 p-AKT 的蛋白表达。结论: 揭示了白藜芦醇在治疗 NSCLC 的过程中涉及多个作用靶点及多条信号通路, 明确了白藜芦醇可通过抑制 PI3K/AKT 信号通路发挥其抗癌效应。

关键词: 白藜芦醇, 非小细胞肺癌, 网络药理学, 癌症基因组图谱, PI3K/AKT 信号通路

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)01-0028-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030048

本文网刊:



Exploring the Mechanism of Action of Resveratrol in the Treatment of Non-small Cell Lung Cancer Based on Network Pharmacology and Experimental Validation

DONG Yangdou¹, NIU Yuheng², ZHANG Yu¹, HUO Rujie³, LIU Qinghua¹, TIAN Xinrui^{3,*}

(1. Basic Medical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. First Clinical School of Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

3. Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China)

Abstract: Objective: To explore the potential therapeutic targets and mechanisms of resveratrol in the treatment of non-

收稿日期: 2023-03-06

基金项目: 山西省基础研究计划项目 (202203021211029)。

作者简介: 董杨逗 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 呼吸系统疾病, E-mail: dong15870880638@163.com。

* 通信作者: 田新瑞 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 支气管哮喘的基础与临床, E-mail: tianxr@126.com。

small cell lung cancer (NSCLC), a comprehensive study was conducted incorporating network pharmacology, molecular docking methods, and experimental validation. Methods: The targets of resveratrol were searched on Swiss Target Prediction database and Target net database. NSCLC targets were gathered from Genecards, OMIM, TTD databases. The intersection of drug targets and disease targets was obtained using Venny 2.1.0 platform. Next, Cytoscape 3.7.2 software was applied along with the String database to generate target protein interaction networks (PPI) and perform topological analysis. GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis of intersecting targets were conducted using the Metascape database, resulting in gene maps of the intersecting targets. Molecular docking studies were performed for the top three ranked core targets and resveratrol using Autodock Vina software. Clinical case samples were obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database to analyze the expression of relevant targets in NSCLC patients (n=1017) and healthy controls (n=627). The effects of different concentrations (30 and 50 $\mu\text{mol/L}$) of resveratrol on the protein expression of SRC, EGFR and PI3K/AKT signaling pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells were examined using Western Blot at the cellular level. Results: Total of 40 potential targets were screened out, followed by obtaining 8 key targets after topological analysis. These keys targets, including *EGFR*, *SRC*, and *ESR1* were closely associated with NSCLC. The treatment of NSCLC with resveratrol primarily involved multiple signaling pathways, such as tumor proteoglycans, estrogen signaling and PI3K/AKT. Molecular docking results demonstrated that resveratrol had a good binding ability with the target protein. Clinical sample results revealed that the expression of *EGFR*, *SRC*, *ESR1*, *HSP90AA1*, and *MMP9* was upregulated, while the expression of *TNF*, *CDC42*, and *RELA* was downregulated in NSCLC patients. Cellular experiments indicated that resveratrol could inhibit the protein expression of SRC, EGFR, p-PI3K, and p-AKT in human lung adenocarcinoma A549 cells in a dose-dependent manner. Conclusion: This study demonstrates that resveratrol involves multiple targets and signaling pathways in the treatment of NSCLC, and clarifies that resveratrol could exert its anti-cancer effects by inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: resveratrol; non-small cell lung cancer; network pharmacology; the cancer genome atlas; PI3K/AKT signaling pathway

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率高于结肠癌、乳腺癌和前列腺癌,在所有恶性肿瘤中排名第一^[1-2]。依照组织病理学特征,可分为小细胞肺癌(Small cell lung cancer, SCLC)与非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)。NSCLC 为肺癌发病率最高的分型之一, 占有肺癌病例的 80%~85%^[3]。根据组织学类型, NSCLC 主要分为鳞状细胞癌、腺癌、大细胞癌,每种类型的癌细胞通过不同的方式生长和扩散^[4]。可用于肺癌的治疗包括手术、放疗、化疗、免疫调节治疗和分子靶向治疗^[1]。以化疗为基础的方案仍然是治疗的首选选择。然而,化疗对晚期 NSCLC 患者仍然不够有效,5 年生存率仅为 15%,中位生存期为 10~12 个月^[5]。因此,需要进一步探索 NSCLC 发生发展的机制,为 NSCLC 治疗寻找新的靶点。

白藜芦醇是一种天然的多酚类植物抗毒素,它广泛存在于葡萄皮,葡萄酒,浆果,坚果等物质中^[6]。相关研究证实,白藜芦醇具备诸多生理和药理活性,如抗氧化、抗炎、保护心脏和抗癌属性^[7]。白藜芦醇的抗癌特性已在几种不同类型的癌症中得到证实,包括乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌等^[6-8]。Wang 等^[9]发现在 NSCLC 原位大鼠模型中,白藜芦醇通过抑制 STAT3/HIF-1 α /VEGF 通路抑制肿瘤进展。另一项研究报道了白藜芦醇通过调控 p53、Bax、Bcl-2 和 caspase-3 的表达来抑制人肺腺癌 A549 细胞的增殖并诱导凋亡^[10]。这些研究为检测白藜芦醇与 NSCLC 之间的关系提供了线索,但白藜芦醇对肺癌发挥抑制

作用的潜在靶点和分子机制仍未完全清楚。

网络药理学是以系统生物学理论为基础,针对特定分子靶标进行药物分子模拟及设计的新兴学科,通过对靶点网络的综合分析,发掘药物作用的潜在信号通路,明确药物疗效的作用机理^[11]。分子对接技术是利用计算机高精度对接模拟,基于分子模型模拟配体-靶标相互结合^[12]。本研究应用网络药理学方法和分子对接技术进行靶标预测,分析白藜芦醇抑制 NSCLC 的可能作用机制,运用临床病例验证及细胞实验进一步评估,提高结果的可靠性。为后续研究及临床应用提供一定参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人肺腺癌 A549 细胞 上海细胞库;白藜芦醇(分子质量 228.24 g/mol,纯度>99.99%)、脱脂牛奶粉末 MCE 公司;青-链霉素溶液、0.25% 胰酶细胞消化液、聚偏二氟乙烯膜(PVDF) 上海碧云天公司;胎牛血清(FBS)、DMEM 细胞培养基 美国赛默飞公司;PBS 缓冲液、PMSF 蛋白酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂 生工生物工程公司;预染蛋白 Marker、BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液、5 $\times$ 上样缓冲液(5 $\times$ loading Buffer)、TBST 缓冲液、聚丙烯酰胺凝胶快速配置试剂盒(SDS-PAGE)、ECL 化学发光液 武汉博士德公司;Anti-GAPDH 抗体、Anti-SRC 抗体、Anti-EGFR 抗体、Anti-p-PI3K 抗体、Anti-p-AKT 抗体、HRP 标记羊抗兔 IgG 武汉 ABclonal 公司。

CKX41 倒置显微镜 日本 Olympus 公司; Midi 40 细胞培养箱 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Mini-PROTEAN® Tetra Cell 垂直电泳仪、Trans-Blot SD 半干电转膜仪、ChemiDoc™ Imaging System WB 全自动化学发光成像仪 上海伯乐公司。

1.2 实验方法

1.2.1 白藜芦醇靶点的筛选 通过数据库 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 得到化合物白藜芦醇化学结构, 并保存对应 Canonical SMILES 号。此外, 通过结合 Swiss Target Prediction (swisstargetprediction.ch) 和 Target net 数据库 (targetnet.scbdd.com) 得到白藜芦醇的潜在作用靶点。

1.2.2 NSCLC 的靶点筛选 通过数据库 Genecards (<https://www.genecards.org>) 和数据库 OMIM (<https://www.omim.org>) 以及数据库 TTD (db.idrblab.net), 对 NSCLC 潜在靶点进行筛选。

1.2.3 药物-疾病-靶点网络分析 将数据库预测的白藜芦醇的靶点和 NSCLC 的靶点上传到 Venny 2.1.0 平台 (bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny), 获取药物的靶点和疾病的靶点交集, 绘制白藜芦醇与 NSCLC 的交集靶点 Venny 图。

1.2.4 PPI 网络构建与分析 将筛选出的白藜芦醇与 NSCLC 共有靶点, 导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org>), 种属定义为“Homo sapiens”进行分析, 构建药物靶蛋白和疾病靶蛋白 PPI 网络, 其最低阈值取中等“medium confidence”得到靶蛋白相互作用的核心网络关系。导入 Cytoscape 3.7.2 软件包, 进一步绘制药靶蛋白和疾病靶蛋白相互作用网络图。对网络的拓扑参数进行软件分析和计算, 得到各个靶点的度值 (degree) 和介数 (betweenness centrality, BC) 等, 直观显示排名前十名的靶标蛋白^[1]。

1.2.5 GO 和 KEGG 富集分析 为了解释药物靶点对基因功能的影响, 将以上选取的白藜芦醇和 NSCLC 共有靶点引入 Metascape 数据库 (<https://metascape.org>) 中, 与 R 语言结合, 获得对应的 GO 和 KEGG 通路富集结果。

1.2.6 分子对接 选取白藜芦醇和 NSCLC 互作蛋白 PPI 网络中度值排名前三位的关键靶点, 实现了白藜芦醇与靶蛋白的分子对接, 通过进一步在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 检索获取白藜芦醇的 3D 结构式。在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org>) 将关键靶点 PDB 格式进行下载, EGFR、SRC、ESR1 等靶蛋白 PDB 编号分别为 6z4b、1o4k 以及 2r6y。用 Pymol 软件处理去水和配体, 保存^[6]。利用 Autodock Vina 和 Pymol 软件将 3 个关键靶点与白藜芦醇进行分子对接。

1.2.7 癌症基因组图谱分析临床数据 从癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库获得 NSCLC 病人 (样本数为 1017 例) 和健康人群 (样本数为 627 例) 的临床信息,

使用 R 软件 v4.0.3 对筛选出的八个核心靶基因进行统计分析, 两组样本显著性通过 Wilcoxon 检验, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

1.2.8 细胞培养及干预 将 A549 细胞悬液接种于培养皿, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。实验分为空白对照组和白藜芦醇药物干预组。待细胞处于对数生长期时进行给药处理, 空白对照组不做药物处理, 药物干预组分别使用浓度为 30、50 μmol/L 的白藜芦醇干预。

1.2.9 Western Blot 检测蛋白表达 收集各组细胞加入增强型 RIPA 裂解液冰上孵育 45 min, 将裂解液在 12000 g、4 °C 下离心 10 min 提取蛋白。蛋白浓度使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测。将总蛋白与上样缓冲液混合, 进行 SDS-PAGE 电泳, 凝胶常规处理后, 将蛋白转移到 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入合适浓度的 GAPDH (内参), SRC、EGFR、p-PI3K、p-AKT 一抗 4 °C 孵育过夜, 与抗兔辣根过氧化物酶偶联抗体在室温下孵育 1 h, 孵育后常规洗膜处理, ECL 化学发光显影, 使用 Bio-Rad 凝胶成像系统观察蛋白表达。Image J 软件对目的条带进行统计分析, 蛋白相对表达水平 = 目的条带灰度值 / GAPDH 条带灰度值。

1.3 数据处理

数据处理使用 GraphPad Prism 8 统计软件分析, 数据检测至少重复 3 次, 以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。组间比较采用方差分析, 方差齐性时, 用 one-way ANOVA 检验, 两两比较则用 LSD-*t* 检验; 方差不齐时, 采用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 白藜芦醇药物靶点及非小细胞肺癌疾病靶点的获取

从 PubChem 中检索化合物白藜芦醇的 Canonical SMILES 号, 通过 Swiss Target Prediction 数据库和 Target net 数据库检索获取到预测靶点一共 174 个。应用 Genecards、OMIM、TTD 这三个数据库进行疾病靶点的筛选, 得到 652 个 NSCLC 相关靶点。

2.2 PPI 网络分析及关键靶点筛选

预测得到的白藜芦醇靶点与 NSCLC 相关靶点交集共 40 个, 如图 1 所示。将 40 个靶点上传至 STRING 数据库, 得到靶点之间的 PPI 网络, 不同颜色的边代表不同类型, 边的粗细代表关联分值大小, 节点即为靶点, 如图 2 所示。将度值从大到小排序, 前五位的有 EGFR、SRC、ESR1、HSP90AA1、TNF; 介数越大的靶点在药物作用过程中越关键, 其排名前 5 位的靶点分别为 ESR1、MMP9、CDC42、TNF、RELA, 如表 1 所示。整合度值和介数前 5 位的靶点, 去除重复, 得到以下基因 EGFR、SRC、ESR1、HSP90AA1、TNF、MMP9、CDC42、RELA 为主要关

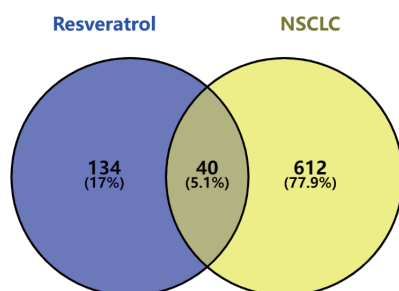


图 1 白藜芦醇-非小细胞肺癌疾病靶点韦恩图

Fig.1 Venn diagram of resveratrol-NSCLC disease target

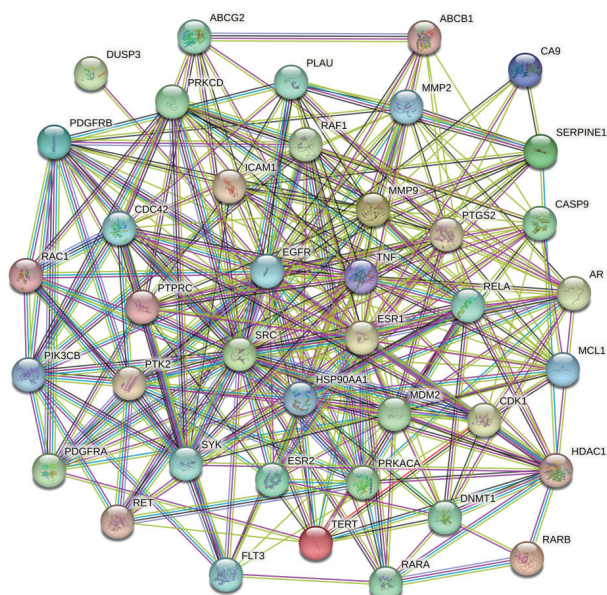


图 2 白藜芦醇治疗非小细胞肺癌的蛋白互作网络分析图

Fig.2 PPI network at intersection targets of resveratrol and NSCLC

表 1 白藜芦醇治疗非小细胞肺癌疾病前 10 个关键靶点

Table 1 Top 10 key targets of resveratrol for non-small cell lung cancer disease

排名	靶点	度值	介数
1	<i>EGFR</i>	36	0.00124992
2	<i>SRC</i>	35	0.000946
3	<i>ESR1</i>	32	0.155644281
4	<i>HSP90AA1</i>	28	0.004130466
5	<i>TNF</i>	27	0.045638836
6	<i>MDM2</i>	22	0.018748213
7	<i>MMP9</i>	22	0.092457286
8	<i>PTGS2</i>	21	0.015035819
9	<i>RELA</i>	20	0.036363867
10	<i>CDC42</i>	19	0.076126149

键靶点。预测其可能为白藜芦醇作用的关键靶标。

2.3 GO 与 KEGG 富集分析

将筛选出的 40 个靶标基因于 Metascape 数据库做 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析包括三种, 分别是生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)以及细胞组分(cellular component, CC)。利用 R 语言可视化处理排序在前 10 位具有显著性差异的基因富集结果, 如图 3 所示。BP 研究结果表明交集基因集中于

调控细胞凋亡信号通路(regulation of apoptotic signaling pathway)、细胞凋亡信号通路负调节(negative regulation of apoptotic signaling pathway)、激酶活性正调节(positive regulation of kinase activity)等生物过程。CC 的富集结果显示交集基因主要分布在薄膜筏(membrane raft)、膜微域(membrane microdomain)、局部粘连(focal adhesion)等细胞部位。MF 富集结果表明交集基因参与调控蛋白酪氨酸激酶活性(protein tyrosine kinase activity)、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性(protein serine/threonine/tyrosine kinase activity)、转录辅助因子结合(transcription coactivator binding)等分子功能发挥治疗非小细胞肺癌的作用。

在 Metascape 数据库进行 KEGG 通路富集分析共获得 131 条 KEGG 条目, 取前 10 个主要通路进行数据处理后, 得到 KEGG 通路分析气泡图, 纵坐标代表靶标基因主要参与的信号通路, 如图 4 所示。结果显示, 白藜芦醇治疗 NSCLC 的相关信号通路有肿瘤蛋白多糖通路(proteoglycans in cancer)、内分泌抵抗通路(endocrine resistance)、雌激素信号通路(estrogen signaling pathway)、人巨细胞病毒感染通路(human cytomegalovirus infection)、PI3K-AKT (PI3K-Akt signaling pathway)等多条信号通路。

2.4 分子对接分析

为了进一步评估白藜芦醇与关键靶标之间的结合能力, 提高靶标网络的准确性, 利用 Autodock Vina 对排名前三位核心靶点和白藜芦醇做分子对接分析, 对接过程中设置参数, 调整 X-Y-Z 坐标和网格大小, 找到灵活对接的最佳对接条件, 并记录受体和配体的对接位置。分子对接结果的分析是指结合能, 结合能小于 0, 说明受体分子与配体分子能自发结合且产生相互作用, 结合能越小, 说明化合物所需的自由能越少, 对接能力越强, 对接后分子的稳定性越高^[6,11]。对接结果表明, 白藜芦醇和三个核心靶蛋白结合自由能均在 -5 kcal/mol 以下, 表明结合高度稳定, 具有对接意义, 如表 2 所示。最后, 使用 Pymol 软件可视化分析和观察白藜芦醇和靶标的对接结果, 结果显示白藜芦醇通过可见的氢键相互作用与其蛋白质靶标结合, 靶点的疏水口袋也被白藜芦醇药物所占据, 如图 5 所示。

2.5 核心靶基因在 NSCLC 中的表达水平

为探究核心靶基因的表达水平与 NSCLC 发生发展的关系, 利用癌症基因组图谱(TCGA)数据库获得基因表达数据以及 NSCLC 患者(n=1017)和正常健康人群(n=627)临床数据集, 通过筛选、提取并分析靶基因在 TCGA 数据库中 NSCLC 患者及健康对照人群中的表达数据, 结果表明与健康人群相比, 核心靶基因 *EGFR*、*SRC*、*ESR1*、*HSP90AA1* 以及 *MMP9* 的表达在 NSCLC 病人中显著上调, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 而 *TNF*、*CDC42* 以及 *RELA*

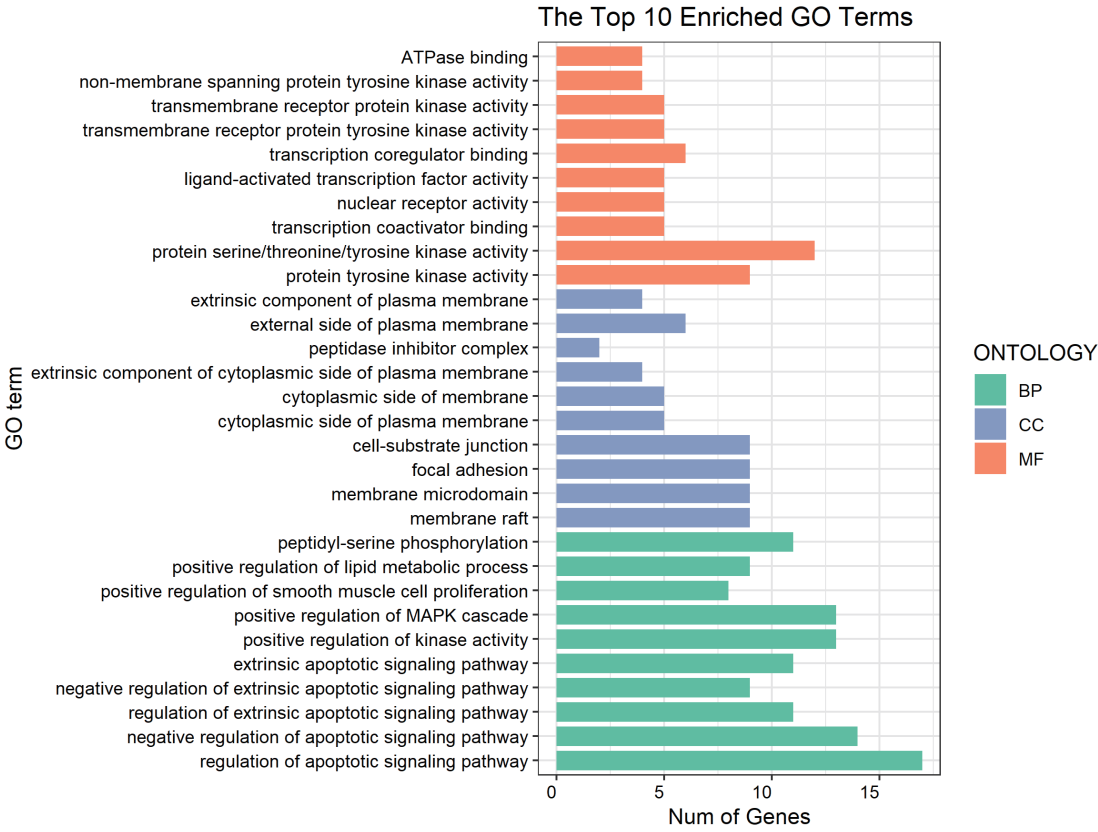


图 3 GO 富集分析结果

Fig.3 GO enrichment analysis results

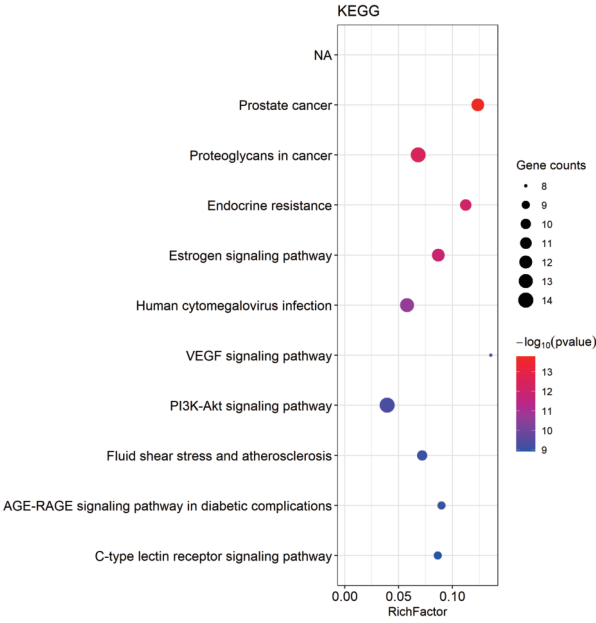


图 4 KEGG 富集分析结果

Fig.4 Results of KEGG enrichment analysis

表 2 对接参数及相应计算结果

Table 2 Docking parameters and corresponding calculation results

靶点	结合能(kcal/mol)	氢键相互作用	疏水作用
EGFR	-5.3	THR909, GLN982	LYS806, PHE910, ILE938, ILE981
SRC	-5.4	ARG34, GLU37, THR38, THR39, LYS62	HIS60
ESR1	-8.0	GLU353, ARG394, PHE425, HIS524	LEU387, LEU391, PHE404, ILE424, LEU428

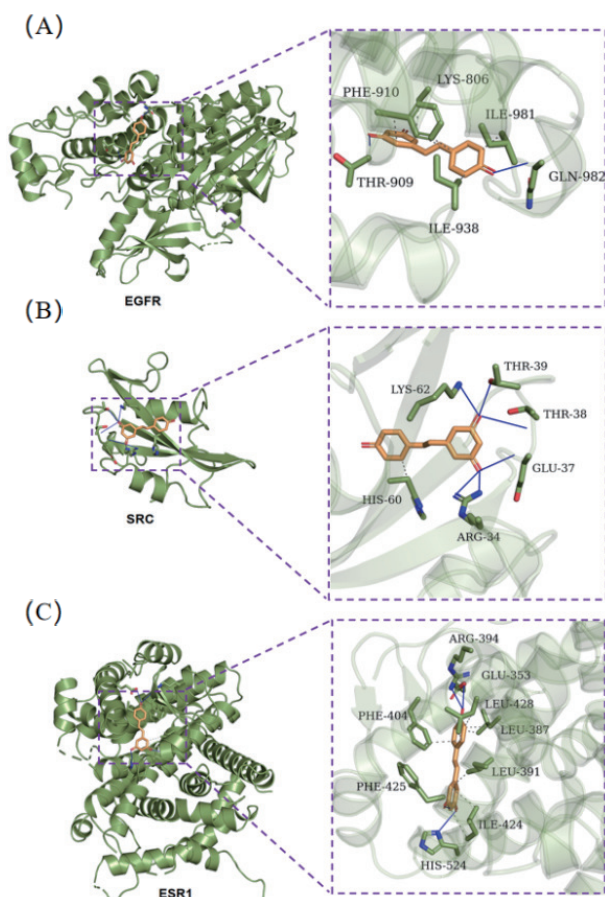


图 5 前三位核心靶点和白藜芦醇分子对接可视化结果

Fig.5 Molecular docking visualization of the top three core targets and resveratrol

注: (A)EGFR; (B)SRC; (C)ESR1。

的表达相比于健康人群,在 NSCLS 病人中显著下调,差异具有统计学意义($P<0.05$),如图 6 所示。这些发现表明通过网络药理学筛选预测的靶基因与 NSCLC 的发生发展密切相关。

2.6 白藜芦醇对 A549 细胞蛋白表达的影响

根据网络药理学和临床样本分析的数据,进一步探究白藜芦醇对相关靶基因及信号通路的影响。根据上述结果,在八个核心靶基因中选择排名前两位的 EGFR 和 SRC 进行初步验证,TCGA 临床样本结果提示 EGFR 和 SRC 在 NSCLC 中具有高表达或高活性的特点,如图 6 所示。且有研究表明 SRC 可通过与激活的 EGFR 起协同作用,参与激活其下游信号通路,从而影响肿瘤细胞的增殖^[13-14]。根据 KEGG 富集分析,PI3K-AKT 通路具有较强的生物学意义,为进一步分子生物学实验验证提供了方向。因此,使用不同浓度(30、50 $\mu\text{mol/L}$)的白藜芦醇处理人肺腺癌 A549 细胞,利用 Western Blot 实验进行初步探究白藜芦醇对靶蛋白 EGFR 和 SRC 及其下游 PI3K/AKT 信号通路蛋白的影响,如图 7 所示。Western Blot 结果显示,与空白对照组相比,白藜芦醇药

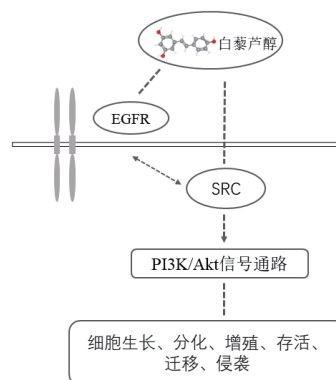
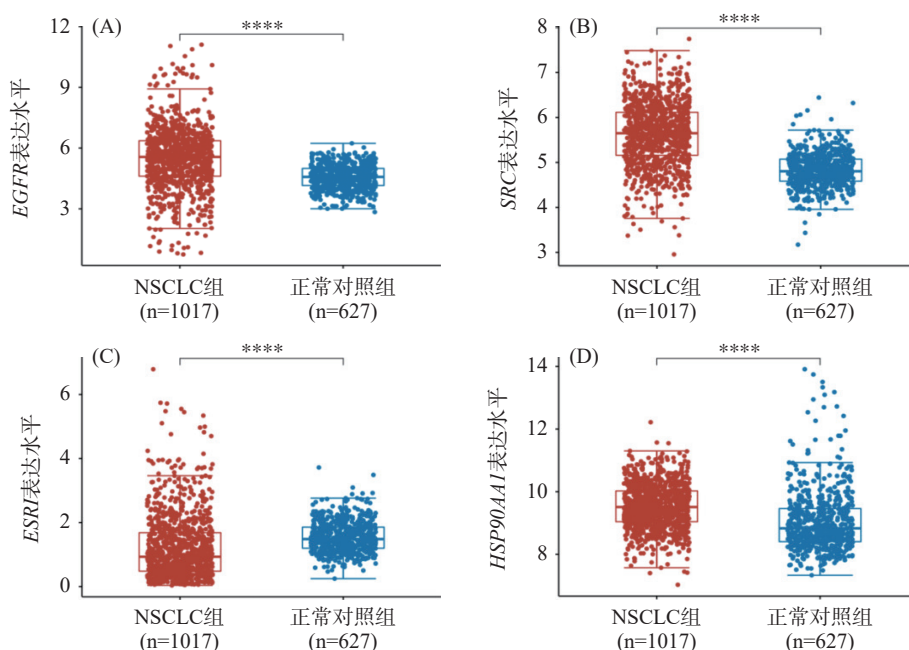


图 7 白藜芦醇对人肺腺癌 A549 细胞的作用假设模型

Fig.7 Hypothesis of the effect of resveratrol on human lung adenocarcinoma A549 cells

注:虚线表示直接或间接效应。



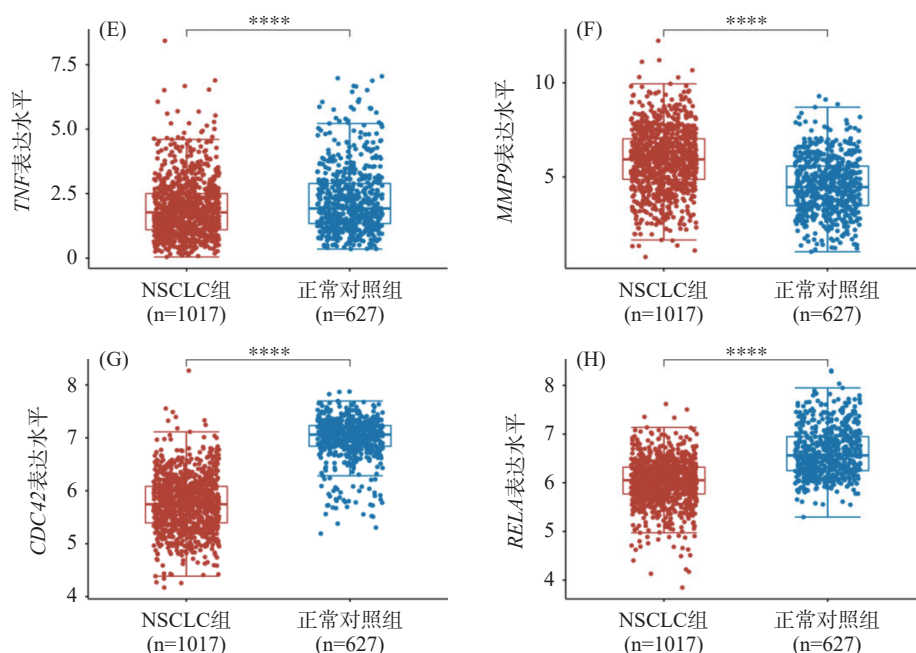


图6 NSCLC患者和健康人群中各靶基因的表达水平

Fig.6 Expression levels of each target gene in NSCLC patients and healthy population

注: (A)EGFR; (B)SRC; (C)ESR1; (D)HSP90AA1; (E)TNF; (F)MMP9; (G)CDC42; (H)RELA; **** $P < 0.0001$ 。

物干预抑制了 A549 细胞中 SRC、EGFR、p-PI3K 和 p-AKT 的活性并以剂量依赖的方式降低了蛋

白的表达, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 如图 8 所示。

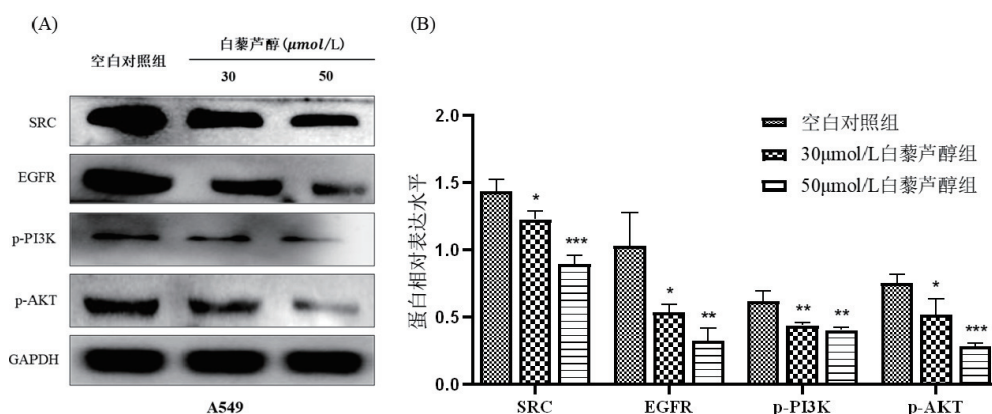


图8 不同浓度白藜芦醇对人肺腺癌 A549 细胞蛋白表达的影响

Fig.8 Effect of different concentrations of resveratrol on protein expression in human lung adenocarcinoma A549 cells

注: 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n = 6$)。

3 讨论与结论

本研究共筛选出 40 个白藜芦醇治疗 NSCLC 的作用靶点, 并以可视化和交互的模式呈现。通过构建交集靶点的 PPI 蛋白互作网络和拓扑学分析, 最终获得八个关键靶基因, 分别为 EGFR、SRC、ESR1、HSP90AA1、TNF、MMP9、CDC42、RELA。EGFR 属于酪氨酸激酶受体家族, 在上皮源性恶性肿瘤中经常过度活跃^[15]。靶向 EGFR 的受体酪氨酸激酶抑制剂已用于 NSCLC 的临床治疗^[16]。但仍有 TKIs 治疗耐药的出现^[17]。因此白藜芦醇有可能为其联合 NSCLC 的靶向治疗协同抗肿瘤活性带来新契机。SRC 参与许多细胞信号转导的调控, 对肿瘤的生长、转移以及血管生成有着至关重要的作用^[18]。在

NSCLC 中具有高表达或高活性的特点^[19]。研究表明, SRC 可通过与激活的 EGFR 起协同作用, 参与激活下游信号通路影响肿瘤细胞增殖^[13], 也可通过调节 G1/S 转化影响细胞周期^[20]。ESR1 是雌激素受体的一种亚型^[21], 研究表明 ESR1 通过与靶基因启动子中的雌激素应答元件和 AP-1 增强子元件结合, 促进基因转录^[22]。此外, ESR1 信号传导也可能与影响 T 细胞浸润的肿瘤微环境因素相关^[23]。HSP90 α 是热休克蛋白家族成员^[24], 被认为在肺癌的侵袭和迁移调节中起关键作用^[25]。TNF 及其受体在 NSCLC 中广泛表达^[26], 研究表明 TNF 可以促进细胞死亡或肿瘤生长^[27]。MMP9 是一种基质金属蛋白酶^[28], 研究发现 MMP9 的表达水平在 NSCLC 中显著上调, 通

过 PI3K 信号转导级联抑制 EGFR 信号可显著调节 NSCLC 的 MMP9 的表达^[29]。CDC42 已被确定在许多人类癌症中表达异常, 包括 NSCLC^[30]。此外, 也有研究报道肿瘤区域 RELA 表达与炎症浸润强度相关^[31]。

GO 功能富集分析白藜芦醇治疗 NSCLC 的相关靶基因, 提示白藜芦醇抗癌作用与细胞凋亡有密切关系。已有研究证实了白藜芦醇通过促进细胞凋亡在 NSCLC 中的抗肿瘤作用^[9], 这与本研究预测结果一致。KEGG 通路富集分析表明白藜芦醇在治疗 NSCLC 的过程中主要涉及肿瘤蛋白多糖、雌激素、PI3K-AKT 等多条信号通路。研究发现雌激素途径在 NSCLC 发展中的作用是多方面的, 一方面, 雌激素可易位到细胞核调节基因的转录^[32]; 另一方面雌激素可以激活 SRC 导致下游信号传导的激活, 包括 RAS/RAF/MEK/ERK 和 PI3K/AKT 途径^[33-34]。PI3K/AKT 通路调节细胞生长和增殖, 在癌症中经常由于突变、扩增、缺失、甲基化和翻译后修饰而失调^[35]。在 NSCLC 中, PI3K/AKT 信号通路肿瘤发生进展密切相关^[36]。以上富集分析显示了白藜芦醇的潜在靶点分布于多个生物过程及信号通路, 这些有效成分协同起到防治 NSCLC 的作用, 为后续研究提供了思路。

利用 TCGA 数据库初步分析临床样本中靶基因的表达与 NSCLC 发生发展的关系。结果提示核心靶基因 *EGFR*、*SRC*、*ESR1*、*HSP90AA1* 以及 *MMP9* 的表达在 NSCLC 中显著上调, *TNF*、*CDC42* 以及 *RELA* 的表达在 NSCLC 中显著下调 ($P < 0.05$)。进一步在细胞水平上探讨白藜芦醇抗 NSCLC 的潜在作用机制, 由于 SRC 的激活参与了癌症的进展且与 EGFR 之间存在相互作用, 影响着许多下游蛋白, 抑制 SRC 可能会中断 EGFR 的下游信号通路。通过 Western Blot 实验, 结果提示白藜芦醇抑制了 A549 细胞中 SRC、EGFR、p-PI3K、p-AKT 的活性和蛋白表达, 这可能导致癌细胞侵袭和迁移能力的下降。揭示了白藜芦醇发挥其抗癌效应可能是通过抑制 NSCLC 中 SRC 相关信号通路, 包括 PI3K/AKT 信号通路。

综上所述, 本研究基于网络药理学与实验验证就白藜芦醇治疗 NSCLC 的抗癌效应进行了初步探讨, 为后续白藜芦醇的基础研究和临床应用提供理论依据和参考价值。

参考文献

[1] NIE P, HU W, ZHANG T, et al. Synergistic induction of erlotinib-mediated apoptosis by resveratrol in human non-small-cell lung cancer cells by down-regulating survivin and up-regulating PUMA [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2015, 35(6): 2255-2271.

[2] ZHAO Q S, HU L L, WANG Z D, et al. Resveratrol-loaded folic acid-grafted dextran stearate submicron particles exhibits enhanced antitumor efficacy in non-small cell lung cancers [J]. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*,

2017, 72: 185-191.

[3] CHIOU W C, HUANG C, LIN Z J, et al. α -Viniferin and ϵ -viniferin inhibited TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion in lung cancer cells through downregulation of vimentin expression [J]. *Nutrients*, 2022, 14(11): 2294.

[4] MA L, LI W, WANG R, et al. Resveratrol enhanced anti-cancer effects of cisplatin on non-small cell lung cancer cell lines by inducing mitochondrial dysfunction and cell apoptosis [J]. *International Journal of Oncology*, 2015, 47(4): 1460-1468.

[5] HU S, LI X, XU R, et al. The synergistic effect of resveratrol in combination with cisplatin on apoptosis via modulating autophagy in A549 cells [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*, 2016, 48(6): 528-535.

[6] ZHONG Z, GUO X, ZHENG Y. Network pharmacology-based and molecular docking analysis of resveratrol's pharmacological effects on type I endometrial cancer [J]. *Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry*, 2022, 22(10): 1933-1944.

[7] GAO P, REN G. Identification of potential target genes of non-small cell lung cancer in response to resveratrol treatment by bioinformatics analysis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(19): 23245-23261.

[8] YUAN L, ZHOU M, HUANG D, et al. Resveratrol inhibits the invasion and metastasis of colon cancer through reversal of epithelial-mesenchymal transition via the AKT/GSK-3 β /Snail signaling pathway [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 20(3): 2783-2795.

[9] WANG H, JIA R, LÜ T, et al. Resveratrol suppresses tumor progression via inhibiting STAT3/HIF-1 α /VEGF pathway in an orthotopic rat model of non-small-cell lung cancer (NSCLC) [J]. *OncoTargets and Therapy*, 2020, 13: 7057-7063.

[10] WANG X, WANG D, ZHAO Y. Effect and mechanism of resveratrol on the apoptosis of lung adenocarcinoma cell line A549 [J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2015, 73(2): 527-531.

[11] LI X, WEI S, NIU S, et al. Network pharmacology prediction and molecular docking-based strategy to explore the potential mechanism of Huanglian Jiedu decoction against sepsis [J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2022, 144: 105389.

[12] PINZI L, RASTELLI G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4331.

[13] PAN Z, WANG K, WANG X, et al. Cholesterol promotes EGFR-TKIs resistance in NSCLC by inducing EGFR/Src/Erk/SP1 signaling-mediated ERR α re-expression [J]. *Molecular Cancer*, 2022, 21(1): 77.

[14] MIN W, HE C, ZHANG S, et al. c-Src increases the sensitivity to TKIs in the EGFR-mutant lung adenocarcinoma [J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 11: 602900.

[15] CHEN Y, HOU L. HCRP-1 alleviates the malignant phenotype and angiogenesis of oral squamous cell carcinoma cells via the downregulation of the EGFR/STAT3 signaling pathway [J]. *Oncology Letters*, 2022, 24(5): 387.

[16] SORIA J C, OHE Y, VANSTEENKISTE J, et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer [J]. *New England Journal of Medicine*, 2018, 378(2): 113-125.

[17] YE L, CHEN X, ZHOU F. EGFR-mutant NSCLC: Emerging novel drugs [J]. *Current Opinion In Oncology*, 2021, 33(1): 87-94.

[18] OKUZAKI D, YAMAUCHI T, MITANI F, et al. c-Src promotes tumor progression through downregulation of microRNA-129-1-3p [J]. *Cancer Science*, 2020, 111(2): 418-428.

[19] HUANG W C, KUO K T, WANG C H, et al. Cisplatin resis-

- tant lung cancer cells promoted M2 polarization of tumor-associated macrophages via the Src/CD155/MIF functional pathway[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2019, 38(1): 180–197.
- [20] WANG D, GAO J, ZHAO C, et al. Cyclin G2 inhibits oral squamous cell carcinoma growth and metastasis by binding to IGF-BP3 and regulating the FAK-SRC-STAT signaling pathway[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 560572.
- [21] ATMACA A, AL-BATRAN S E, WIRTZ R M, et al. The validation of estrogen receptor 1 mRNA expression as a predictor of outcome in patients with metastatic non-small cell lung cancer[J]. *International Journal of Cancer*, 2014, 134(10): 2314–2321.
- [22] CHENG T D, DARKE A K, REDMAN M W, et al. Smoking, sex, and non-small cell lung cancer: Steroid hormone receptors in tumor tissue (S0424)[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2018, 110(7): 734–742.
- [23] OH M S, ANKER J F, CHAE Y K. High gene expression of estrogen and progesterone receptors is associated with decreased T cell infiltration in patients with NSCLC[J]. *Cancer Treatment and Research Communications*, 2021, 27: 100317.
- [24] ZHONG B, SHEN J, ZHANG C, et al. Plasma heat shock protein 90 alpha: A valuable predictor of early chemotherapy effectiveness in advanced non-small-cell lung cancer[J]. *Medical Science Monitor*, 2021, 27: e924778.
- [25] DONG Z, YANG P, QIU X, et al. KCNQ1OT1 facilitates progression of non-small-cell lung carcinoma via modulating miRNA-27b-3p/HSP90AA1 axis[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(7): 11304–11314.
- [26] LIU Y, GAO Y, LIN T. Expression of interleukin-1 (IL-1), IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in non-small cell lung cancer and its relationship with the occurrence and prognosis of cancer pain[J]. *Annals of Palliative Medicine*, 2021, 10(12): 12759–12766.
- [27] GONG K, GUO G, BECKLEY N, et al. Tumor necrosis factor in lung cancer: Complex roles in biology and resistance to treatment[J]. *Neoplasia*, 2021, 23(2): 189–196.
- [28] MONDAL S, ADHIKARI N, BANERJEE S, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 194: 112260.
- [29] LI J, WANG H, KE H, et al. MiR-129 regulates MMP9 to control metastasis of non-small cell lung cancer[J]. *Tumor Biology*, 2015, 36(8): 5785–5790.
- [30] LI Y, WANG Z, LI Y, et al. MicroRNA-29a functions as a potential tumor suppressor through directly targeting CDC42 in non-small cell lung cancer[J]. *Oncology Letters*, 2017, 13(5): 3896–3904.
- [31] GIOPANO I, LILIS I, PAPALEONIDOPOULOS V, et al. Comprehensive evaluation of nuclear factor- κ B expression patterns in non-small cell lung cancer[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132527.
- [32] TANG H, LIAO Y, CHEN G, et al. Estrogen upregulates the IGF-1 signaling pathway in lung cancer through estrogen receptor- β [J]. *Molecular Oncology*, 2012, 29(4): 2640–2648.
- [33] TIAN L, LI Y, LIU H L, et al. Exposure to PM2.5 enhances the PI3K/AKT signaling and malignancy of ER α expression-dependent non-small cell lung carcinoma[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2021, 34(4): 319–323.
- [34] CHAPPELL W H, STEELMAN L S, LONG J M, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: Rationale and importance to inhibiting these pathways in human health [J]. *Oncotarget*, 2011, 2(3): 135–164.
- [35] TAN A C. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Thoracic Cancer*, 2020, 11(3): 511–518.
- [36] ZHANG H B, QIU X M, ZHANG Y C, et al. Circ_0017639 facilitates proliferative, migratory, and invasive potential of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells via PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 1590–1601.