

数据非依赖型质谱采集 (DIA) 磷酸化蛋白组学联合生物信息技术预测非诺贝特抗肺腺癌的潜在靶点与机制

王桂平¹, 叶云², 张彦焘¹

1. 广州卫生职业技术学院 药学院, 广东 广州 510180

2. 广西科技大学 生物与化学工程学院, 广西 柳州 545005

摘要: **目的** 基于数据非依赖型质谱采集 (DIA) 磷酸化蛋白质组学、网络药理学及分子对接等方法探讨非诺贝特抗肺腺癌的分子机制。**方法** 非诺贝特处理 A549 细胞后, 进行蛋白质提取、酶解及磷酸化肽段富集, 通过液相色谱-质谱进行磷酸化蛋白分析; 用 R 语言 limma 包筛选激酶类差异表达蛋白, 并进行基因本体论 (GO) 功能注释和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析; 通过 STRING 数据库构建蛋白相互作用 (PPI) 网络, 并运用 Cytoscape 可视化软件筛选核心靶点。运用分子对接技术评估非诺贝特与关键靶蛋白之间的结合稳定性。**结果** 共获得 104 个差异激酶蛋白, 包括上调蛋白 48 个, 下调蛋白 56 个; GO 富集显示差异蛋白主要涉及蛋白质磷酸化、蛋白质修饰过程、肽基-丝氨酸磷酸化等 87 个生物学过程 ($P < 0.01$); KEGG 通路富集则显示差异蛋白与丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和人表皮生长因子受体 (ErbB) 等 10 条信号通路相关。网络药理学分析预测到 SRC、MAP3K2、PAK2、LATS1、BRD4、PRKD1、MAP2K2、MAP3K1 为非诺贝特抗肺腺癌的 8 个关键靶蛋白, 并且分子对接也证实了非诺贝特与上述靶点结合较为稳定。**结论** 非诺贝特主要通过抑制 MAPK/ErbB 通路磷酸化激活而发挥抗肺腺癌作用, 而 PAK2、LATS1、PRKD1 等激酶可能是其抗肿瘤关键靶点, 本研究为后续临床研究提供了理论基础。

关键词: 非诺贝特; 肺腺癌; 磷酸化蛋白质组学; 生物信息学; 丝裂原活化蛋白激酶; 表皮生长因子受体

中图分类号: R974; 979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2025)11-2725-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.11.005

Mechanism of fenofibrate against lung adenocarcinoma based on DIA phosphoproteomics combined with bioinformatics

WANG Guiping¹, YE Yun², ZHANG Yantao¹

1. School of Pharmacy, Guangzhou Health Technology College, Guangzhou 510180, China

2. College of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545005, China

Abstract: **Objective** To investigate the molecular mechanism of fenofibrate against lung adenocarcinoma based on DIA phosphoproteomics, network pharmacology, and molecular docking. **Methods** After treating A549 cells with fenofibrate, proteins were extracted, enzymatically digested, and phosphorylated peptides were enriched. Phosphorylated proteins were analyzed via liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The limma package in R was used to screen differentially expressed kinase proteins, followed by GO functional annotation and KEGG pathway enrichment analysis. PPI network was constructed using the STRING database, and core targets were identified using Cytoscape visualization software. Molecular docking was employed to evaluate the binding stability between fenofibrate and key target proteins. **Results** A total of 104 differentially expressed kinase proteins were identified, including 48 upregulated and 56 downregulated proteins. GO enrichment revealed that these proteins were primarily involved in 87 biological processes ($P < 0.01$), such as protein phosphorylation, protein modification processes, and peptidyl-serine phosphorylation. KEGG pathway enrichment indicated associations with 10 signaling pathways, including MAPK and ErbB. Network pharmacology predicted eight key target proteins of fenofibrate against lung adenocarcinoma: SRC, MAP3K2, PAK2, LATS1, BRD4, PRKD1, MAP2K2, and MAP3K1. Molecular docking confirmed stable binding between fenofibrate and these targets. **Conclusion** Fenofibrate exerts its anti-lung adenocarcinoma effects mainly by inhibiting the phosphorylation activation of the MAPK/ErbB

收稿日期: 2025-08-19

基金项目: 广东省普通高校特色创新类项目 (2022KTSCX305, 2024KTSCX292)

作者简介: 王桂平, 男, 教授, 博士, 研究方向为抗肿瘤药物筛选及机制研究。E-mail: docgpwang@163.com

pathway. Kinases such as PAK2, LATS1, and PRKD1 may serve as critical anti-tumor targets, providing a theoretical foundation for subsequent clinical research.

Key words: fenofibrate; lung adenocarcinoma; phosphoproteomics; bioinformatics; MAPK; ErbB

肺腺癌作为非小细胞肺癌的主要亚型,在全球范围内发病率持续攀升,死亡率常年位居恶性肿瘤前列,已成为危害人类生命健康的重大威胁^[1-2]。目前临床采用的手术切除、放化疗、靶向药物治疗及免疫检查点抑制剂等疗法,虽在一定程度上延长了患者生存期,但仍面临耐药性频发、治疗不良反应显著及部分患者因靶点缺失无法获益等局限,晚期患者 5 年生存率仍低于 20%^[3]。因此,探索新型有效治疗药物有迫切的临床需要。“老药新用”凭借其开发周期短、成本低及安全性明确等优势,成为突破治疗瓶颈的重要方向。

非诺贝特作为过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α) 激动剂,临床上主要应用于调节脂质代谢,有效降低血清胆固醇和三酰甘油水平,并提升高密度脂蛋白浓度。近年来,越来越多的研究揭示了非诺贝特潜在的抗肿瘤活性,它可抑制乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、肝癌等肿瘤生长,并可增强胶质母细胞瘤等肿瘤放化疗敏感性^[4-10]。上述证据表明非诺贝特是一种有潜力的抗肿瘤药物,然而,其抗肿瘤的具体分子机制仍待系统性解析,以加速其临床应用进程。

DIA 蛋白质组学联合生物信息技术可突破传统组学技术的检测深度和重现性限制,实现大规模、无偏性的磷酸化蛋白定量分析,其高通量和高特异性显著提升肿瘤信号通路关键靶点的筛选效率,为药物机制研究提供多维度分子图谱^[11-12]。为系统解析非诺贝特的抗肺腺癌机制,本研究基于非诺贝特处理的肺腺癌细胞磷酸化 DIA 定量蛋白组数据,结合网络药理学、分子对接等生物信息学分析方法,系统性解析非诺贝特抗肺腺癌的分子网络机制,为克服靶向治疗耐药提供潜在靶点和治疗策略,同时也为非诺贝特等药物的老药新用、实现精准抗肿瘤治疗开辟了新途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

非诺贝特 (F6020, 质量分数 >98%) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 尿素 (161-0731)、二硫苏糖醇 (161-0404)、碘乙酰胺 (161-2109) 购自美国 BioRad 公司; 青链霉素 (SV30010) 购自美国 Hyclone 公

司; 胰蛋白酶 (317107) 购自美国 Promega 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P0012)、南美胎牛血清 (C0226)、RPMI-1640 培养基 (C2721) 等常规试剂购自碧云天生物技术公司; High-SelectTM Fe-NTA 磷酸化多肽富集试剂盒 (A32992) 购自美国赛默飞世尔科技有限公司; Ki-3002-2 iRT 试剂盒购自美国 Biognosys 公司; 30UM EmporeTM SPE MCX C₁₈ 脱盐柱 (186001830BA) 购自美国 Waters 公司; SW-CJ-1FD 洁净工作台购自苏州安泰空气技术有限公司; 3111 型 CO₂ 培养箱、VanquishTM Neo UHPLC 系统和 OrbitrapTM AstralTM 质谱仪购自美国赛默飞世尔科技有限公司; BDS400 型倒置生物显微镜购自重庆奥特光学仪器有限公司。

1.2 磷酸化 DIA 定量蛋白质组学分析^[11, 13]

1.2.1 蛋白质提取及酶解 A549 细胞培养至对数生长期, 实验设对照组 (DMSO) 和非诺贝特 (200 μ mol/L) 组, 处理时间为 24 h^[7]。以预冷的 PBS 处理 A549 细胞 (密度为 5×10^6 个/mL), 以 2 500 r/min 离心 15 min, 液氮速冻; 经 RIPA 裂解、离心后采用 BCA 法进行蛋白质定量。取 200 μ L 蛋白质采用 FASP 法进行胰蛋白酶酶解, 酶解时胰蛋白酶与蛋白质比例为 3 : 200, 37 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, 酶解后的样品加入 50 μ L 0.1% 三氟乙酸酸化, 再加入 10% 三氟乙酸, 调 pH 值至 3 左右, 终止酶切反应。酶解后采用 EmporeTM SPE cartridge MCX C₁₈ 柱对肽段进行脱盐并冻干。

1.2.2 修饰肽段富集与 DIA 质谱数据采集 根据 High-SelectTM Fe-NTA 磷酸化肽富集试剂盒的操作方法富集磷酸化肽段, 富集后的磷酸化肽段, 真空浓缩, 用 0.1% 脂肪酸复溶。每个样本分别取出 2 μ g 肽段, 掺入适量标准肽段进行 DIA 质谱检测。DIA 分析采用纳升流速高效液相色谱 Vanquish Neo 系统进行色谱分离, 色谱分离后进入 Astral 高分辨质谱仪进行 DIA 质谱分析。检测模式: 正离子, 母离子扫描范围 m/z 380~980, 一级质谱分辨率为 240 000 (m/z 200), 标准化自动增益控制目标 500%, 最大 IT 为 5 ms。MS² 采用 DIA 数据采集模式, 设置 300 个扫描窗口, 隔离窗口为 m/z 2, HCD 碰撞能量为 25 eV, 标准化自动增益控制目标为 300%, 最大 IT

为 3 ms。

1.2.3 质谱数据的分析 各样品经蛋白质酶解、磷酸化修饰肽段富集后,数据采用 Spectronaut 软件进行分析,并进行修饰位点数、修饰肽段数、修饰蛋白数鉴定。软件参数设置如下:酶为胰蛋白酶,最大允许的未检测到的裂隙部位为 2。固定修饰为脲甲基化(C),动态修饰设定为氧化(M)和乙酰基(蛋白质 N 端)。此外,数据库检索鉴定到的蛋白需满足假发现率(FDR)小于 1%的过滤标准。

1.3 差异蛋白筛选

使用 R 软件(版本 4.4.2)中的 limma 包来筛选两组间的差异表达蛋白质,筛选标准设定为:差异倍数(FC) ≥ 1.2 或 ≤ 0.833 ,以及 $P < 0.05$ 。此外,利用 ggplot 包绘制火山图以可视化这些差异表达的蛋白质^[11-12]。

1.4 基因本体(GO)功能及京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

使用 clusterProfilerR 软件包对前述获得的非诺贝特抗肺腺癌的差异表达蛋白进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析。富集分析采用 Fisher 精确检验法进行,以 $P < 0.05$ 的功能类别和通路被认定为具有统计学意义^[12]。

1.5 蛋白相互作用网络(PPI)构建及核心蛋白筛选

将上述差异蛋白质导入 STRING 数据库(<http://string-db.org/>),物种设置为人类,置信度阈值设置为 0.70,构建靶蛋白互作网络,并使用 Cytoscape 3.9.1 软件将结果可视化,以 cytoNCA 插

件筛选网络关键蛋白^[12, 14]。

1.6 非诺贝特与关键靶点分子对接

选择蛋白作用网络中 8 个关键蛋白分子与非诺贝特进行分子对接。首先从 PDB 数据库(www.rcsb.org)获取核心靶点蛋白 3D 结构,并通过 PyMOL 软件删除蛋白中结晶水、配体和杂质分子;从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.gov/>)获取非诺贝特 SDF 二维结构分子,并通过 Chem3D 优化结构。然后,使用 AutoDockVina 软件定位配体与受体结合的活性口袋,计算药物与关键蛋白最低结合能,通过 PyMOL 进行结合模式的可视化展示^[14]。

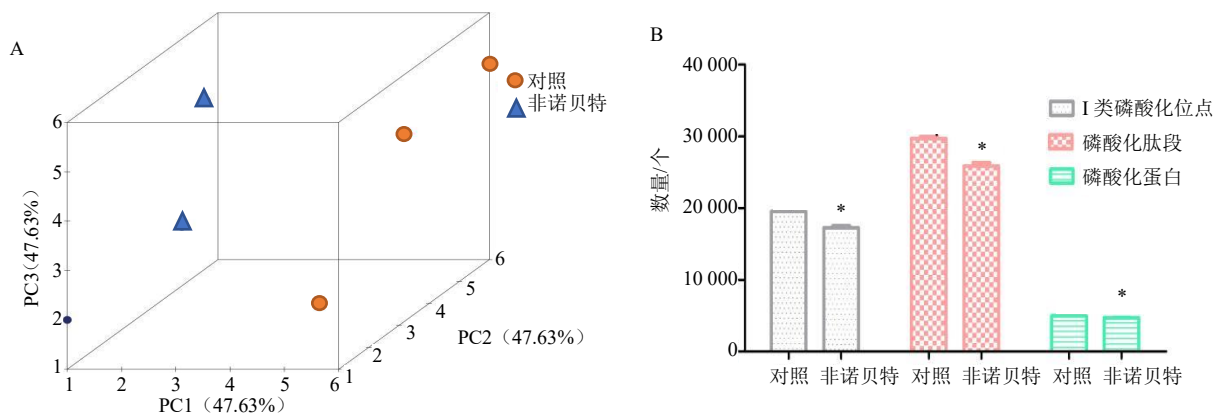
2 结果

2.1 两组蛋白质鉴定结果

样品主成分分析如图 1A 所示,在 95%置信区间内,非诺贝特组与对照组区分度较好,且组内重复样本聚集性良好。磷酸化 DIA 蛋白质数量鉴定情况如图 1B 所示,非诺贝特组 I 类磷酸化位点、磷酸化肽段、磷酸化蛋白质鉴定数分别为 $(17\ 271.66 \pm 430.68)$ 、 $(25\ 881.33 \pm 753.63)$ 、 $(4\ 712.00 \pm 64.21)$ 个,与相应对照组 $(19\ 515.66 \pm 198.05)$ 、 $(29\ 716.33 \pm 436.92)$ 、 $(5\ 003.33 \pm 24.21)$ 个相比有明显统计学差异($P < 0.05$),可用于差异蛋白的筛选。

2.2 非诺贝特处理肺腺癌 A549 细胞的激酶类差异蛋白筛选

蛋白激酶发生突变、缺失导致其活性或表达水平异常,常是导致癌症等人类疾病最主要原因,也是重要的药物靶点之一,因此本研究主要分析非诺贝特对肺腺癌蛋白激酶影响。两组样本共鉴定合格



A-两组样本蛋白定量结果主成分分析三维图; B-各组 I 类磷酸化位点、磷酸化肽段及磷酸化蛋白鉴定比较。

A- Three-dimensional principal component analysis of protein quantification results from two groups of samples; B-identification and comparison of Class I phosphorylation sites, phosphorylated peptides and phosphorylated proteins in each group.

图 1 非诺贝特及对照组磷酸化 DIA 蛋白质鉴定结果

Fig. 1 Identification results of fenofibrate and phosphorylated DIA proteins in the control group

的蛋白激酶 I 类磷酸化位点和磷酸化肽段分别为 364、556 个。采用 limma 包对两组鉴定出的激酶类蛋白质进行差异表达蛋白筛选,结果如图 2 所示,共筛选得到 104 个差异蛋白,包括上调蛋白 48 个,下调蛋白 56 个,其中上调倍数最高的前 5 种蛋白为 GTF2F1、CDK11B、TTBK2、PRKDC、PKN2,而下调倍数最高的前 5 种蛋白则为 PRKD1、EEF2K、SRC、MARK2、MINK1。

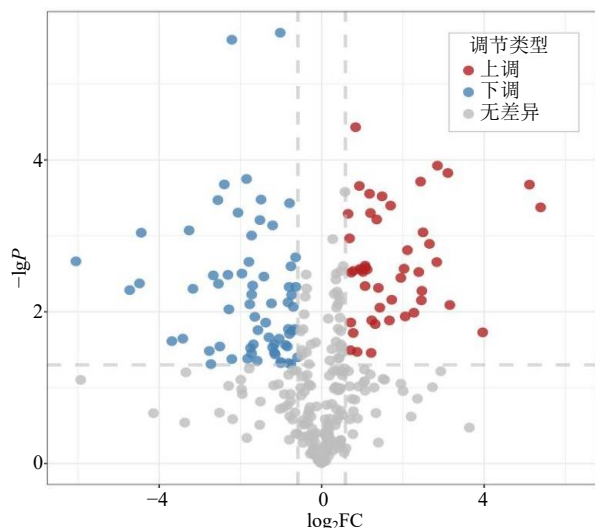


图 2 非诺贝特处理 A549 细胞激酶类磷酸化差异蛋白火山图
Fig. 2 Fenofibrate-treated A549 cell kinase phosphorylation differential protein volcano diagram

2.3 磷酸化激酶类差异蛋白 GO 和 KEGG 通路富集分析

GO 富集分析结果如表 1 所示,磷酸化激酶差异蛋白主要富集在蛋白质磷酸化、蛋白质修饰过程、肽基-丝氨酸磷酸化、有机氮化合物代谢过程、大分子代谢过程、肽基-氨基酸修饰、氮化合物代谢过程、细胞内信号转导等 87 个生物学过程 ($P < 0.01$)。KEGG 通路富集分析结果如表 2 所示。差异磷酸化激酶主要富集在丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、表皮生长因子受体 (ErbB)、促性腺激素释放激素 (GnRH)、Ras 相关蛋白 1 (Rap1)、膀胱癌、自噬、催产素、缝隙连接、肌动蛋白细胞骨架调控及 Ras 10 条信号通路。如图 3 所示,富集的 10 条信号通路中相关磷酸化蛋白基本均为表达下调,提示非诺贝特主要对上述信号通路产生抑制作用而发挥抗肺癌效应,其中对 MAPK、ErbB、GnRH、Rap1 通路抑制最显著。

2.4 磷酸化激酶差异蛋白作用网络分析

将上述蛋白 Uniprot 号转换为蛋白名称,删除重复蛋白,最后将 40 个显著磷酸化激酶蛋白输入 String 数据库,构建 PPI 网络(图 4A)。应用 Cytoscape 3.9.1 软件对获得的 PPI 网络进行可视化处理,去除网络中游离的节点和小型集群网,最终构建了 SRC 等 31 个靶点蛋白质的 PPI 网络。使用 CytoNCA 插

表 1 差异磷酸化激酶 GO 生物过程富集结果(前 10 位)

Table 1 Enrichment results of differentially phosphorylated kinase GO biological processes (top 10)

生物过程	基因	富集分数	错误发现率
protein phosphorylation	36	4.42	1.17×10^{-42}
protein modification process	37	1.46	2.05×10^{-25}
protein autophosphorylation	18	4.86	2.30×10^{-22}
peptidyl-serine phosphorylation	16	4.11	1.22×10^{-18}
organonitrogen compound metabolic process	38	0.83	1.43×10^{-17}
macromolecule metabolic process	38	0.71	3.32×10^{-15}
peptidyl-amino acid modification	21	1.89	6.09×10^{-15}
nitrogen compound metabolic process	39	0.64	1.26×10^{-14}
intracellular signal transduction	24	1.42	4.35×10^{-14}
primary metabolic process	39	0.60	1.91×10^{-13}

件计算网络 degree 值、介度、紧密度,筛选出 SRC ($\log_2FC = -3.688$, $P = 0.024$)、MAP3K2 ($\log_2FC = -1.824$, $P < 0.001$)、PAK2 ($\log_2FC = -2.059$, $P < 0.001$)、LATS1 ($\log_2FC = -2.212$, $P = 2.603E-06$)、BRD4 ($\log_2FC = -2.397$, $P = 0.000$)、PRKD1 ($\log_2FC = -4.484$, $P = 0.004$)、MAP2K2 ($\log_2FC =$

-2.211 , $P = 0.042$)、MAP3K1 ($\log_2FC = -2.307$, $P = 0.003$) 8 个核心靶点(图 4B),结果表明非诺贝特通过抑制上述核心磷酸化激酶发挥抗肺腺癌作用。

2.5 分子对接结果

分子对接能够预测分子间的结合模式和亲和力,通常以结合能 $-5.0 \sim -7.0$ kcal/mol ($1 \text{ cal} = 4.2 \text{ J}$,

表 2 差异磷酸化激酶 KEGG 通路富集结果

Table 2 Enrichment results of the differential

phosphorylated kinase KEGG pathway

通路名称	蛋白数量	富集分数	错误发现率
MAPK	8	1.14	3.76×10^{-5}
ErbB	4	0.78	0.004 4
GnRH	4	0.78	0.004 4
Rap1	5	0.69	0.004 8
bladder cancer	3	0.77	0.006 0
autophagy	4	0.65	0.008 8
oxytocin	4	0.6	0.011 7
Gap junction	3	0.5	0.033 7
actin cytoskeleton	4	0.45	0.033 7
Ras	4	0.43	0.039 0

有一定稳定性)、 $-7.0 \sim -10.0$ kcal/mol (稳定性较好)、 < -10.0 kcal/mol (非常稳定) 作为判定稳定结合的标准。非诺贝特与核心靶点的分子对接结果及对接模式可视化结果如表 3、图 5 所示。非诺贝特与所有的核心蛋白之间的整体结合趋势均较好, 其中非诺贝特与 SRC、LATS1、MAPK6 分子结合能分别为 -7.2 、 -7.9 、 8.2 kcal/mol, 结合稳定性较好。

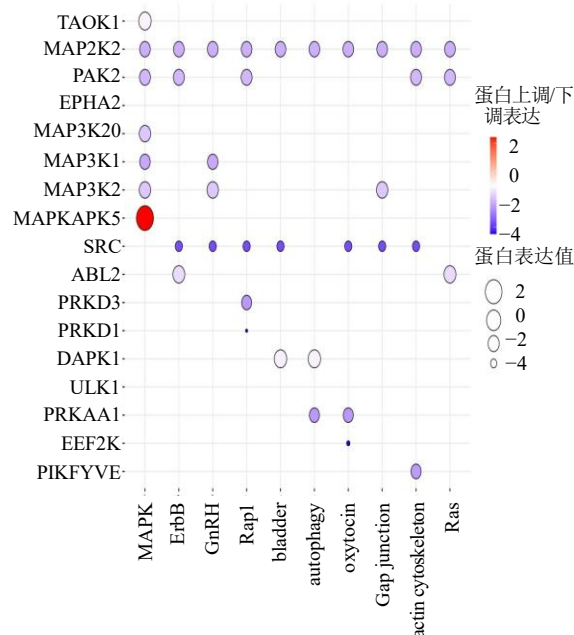
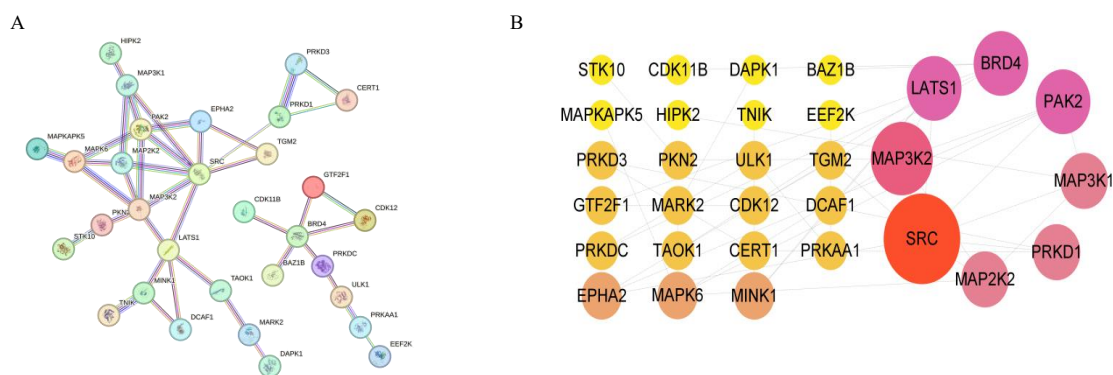


图 3 KEGG 富集通路中相关磷酸化蛋白表达情况

Fig. 3 Expression of phosphorylated proteins related to the KEGG pathway enrichment pathway



A-String 蛋白 PPI 图, B-核心靶点 Cytoscape 可视化结果。

A-String PPI network diagram, B-core target Cytoscape visualization result.

图 4 非诺贝特抗肺腺癌 PPI 网络图及核心靶点

Fig. 4 PPI network diagram and core targets of fenofibrate against lung adenocarcinoma

表 3 非诺贝特与核心靶点的分子对接结果

Table 3 Molecular docking results of fenofibrate with the core target

靶点	PDB ID	氢键数量	最低结合能/(kcal·mol ⁻¹)	参与形成氢键的残基
SRC	1A07	4	-7.2	ARG-208(2)、LYS-206(2)
MAP3K2	2CU1	3	-5.7	LYS-38、THR-93、THR-90
PAK2	9M41	4	-6.0	LYS-134、SER-133、ARG-438(2)
LATS1	5B5W	1	-7.9	ARG-656
BRD4	2I8N	2	-6.4	LYS-53、SER-7
MAPK6	6YLL	1	-8.2	MET-111
MAP2K2	1JKY	0	-6.5	
MAP3K1	6WHB	0	-5.6	

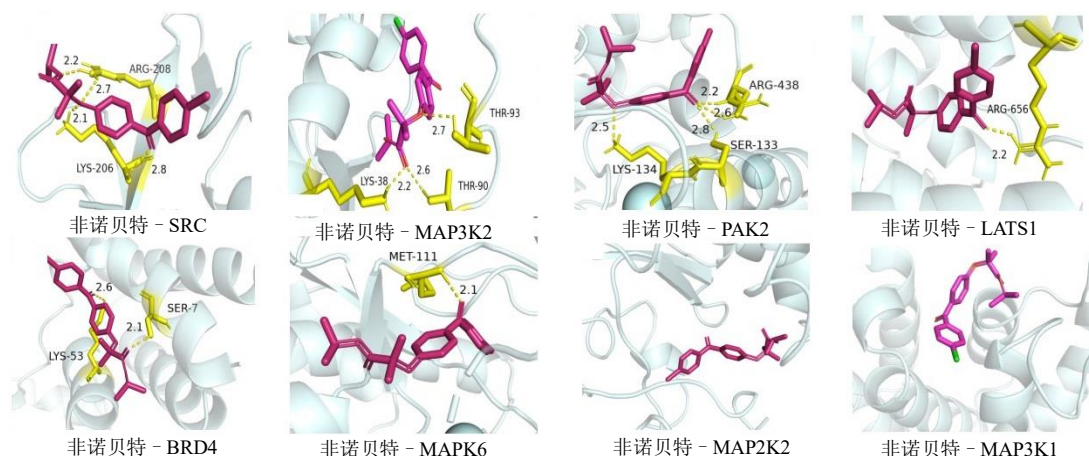


图 5 非诺贝特与核心靶点的分子对接模式图

Fig. 5 Molecular docking model diagram of fenofibrate with the core target

3 讨论

肺腺癌作为最常见的肺癌亚型之一，全球发病率和死亡率居高不下，对人类健康构成严重威胁。尽管近年来靶向治疗和免疫治疗的进展令人瞩目，但针对肺腺癌的有效治疗手段仍然有限。因此，急需探索新的治疗策略和靶点，以改善肺腺癌患者的预后^[1, 15]。非诺贝特作为一种临床常用的降脂药物，近年来被发现具有抗肿瘤潜力，已被报道可抑制肺癌、结肠癌、乳腺癌、白血病等多种人类肿瘤的生长，其机制涉及激活 PPAR 通路调控脂质代谢和抑制炎症反应等^[4-7]。蛋白激酶是一类催化蛋白质磷酸化修饰的酶类，通过调控信号转导和代谢过程维持细胞稳态；其在肺腺癌中异常活化（如 SRC 激酶家族高表达）常驱动增殖、迁移等恶性表型，进而促进肿瘤发生发展。因此，本研究主要关注激酶类蛋白的磷酸化改变，探索其在非诺贝特抗肺腺癌治疗中的核心作用。实验筛选到 104 个差异磷酸化激酶蛋白，其中上调 48 个，下调 56 个；差异蛋白主要富集于 MAPK、ErbB、Ras 等 10 条癌症相关信号通路，尤其对 MAPK 和 ErbB 信号通路的抑制作用最显著；通过 PPI 网络鉴定出 SRC、MAP3K2 等 8 个核心靶点，并且分子对接证实非诺贝特与关键靶点可形成稳定结合，提示非诺贝特可能通过抑制这些激酶的磷酸化级联反应发挥抗肿瘤作用。

KEGG 富集分析显示，非诺贝特发挥抗肺腺癌作用的核心机制在于对 MAPK 信号通路和 ErbB 信号通路的显著抑制。MAPK 信号通路作为调控肺腺癌细胞增殖、存活及转移的核心途径，其异常活化是驱动肿瘤进展和耐药性的关键因素^[16]。本研究发现，非诺贝特处理后 MAPK 通路中关键激酶

MAP3K2 ($\log_2FC = -1.824$) 和 MAP2K2 ($\log_2FC = -2.211$) 的磷酸化水平显著下调，提示其激酶活性被有效抑制，进而阻滞下游 ERK 磷酸化级联反应从而发挥抗肿瘤效应。rbB 信号通路常因 EGFR 家族突变或过表达激活，从而促进肺腺癌生长、侵袭及血管生成^[17]。本研究观察到非诺贝特显著下调 SRC ($\log_2FC = -3.688$) 的磷酸化水平，而 SRC 作为 ErbB 通路的关键分子，其去磷酸化可直接削弱 EGFR 信号转导能力。目前国内外关于非诺贝特对 MAPK/ErbB 通路的抑制作用报道极少，主要报道该药是通过调控 PPAR α 、PI3K/Akt 等通路发挥抗肿瘤作用^[18-19]。尽管既往研究强调非诺贝特通过激活 PPAR 通路发挥抗肿瘤作用，但本研究基于磷酸化蛋白质组学的结果并未直接检测到 PPAR 通路的显著富集。这一差异可能与本研究主要聚焦于激酶磷酸化修饰、以及不同细胞模型等条件有关，提示在肺腺癌中非诺贝特可能主要通过非 PPAR 依赖的激酶信号重编程发挥作用，但并不排除 PPAR 通路在其他环节的协同贡献。值得注意的是，本研究发现非诺贝特对 MAPK 信号通路主要成员均是抑制的，但可显著上调 MAPKAPK5 的表达，报道显示 MAPKAPK5 蛋白质是一种肿瘤抑制因子，在癌症、神经退行性疾病和炎症性疾病中都有重要作用^[20]。因此了解非诺贝特如何调控这些信号通路，将为开发新的肺腺癌靶向治疗策略提供重要依据。

网络药理学整合多组学数据，系统性预测药物-靶点-通路互作网络，为机制研究提供整体视角；分子对接则精准验证结合亲和力，二者联合显著提升药物靶点发现的可靠性。本研究通过网络药理学筛选出非诺贝特抗肺腺癌的 8 个核心靶点，即 SRC、

MAP3K2、PAK2、LATS1、BRD4、PRKD1、MAP2K2、MAP3K1，并且所有蛋白的 IgFC 均小于 0，表明非诺贝特是通过抑制上述核心磷酸化激酶发挥抗肺腺癌作用。分子对接结果表明，非诺贝特与所有的核心蛋白之间的整体结合稳定性较好。8 个核心靶蛋白中，SRC 在肺癌等肿瘤研究较多，也是肿瘤治疗的重要靶点^[21]。MAP3K2、MAP3K1、MAP2K2 均属于 MAP 激酶激酶家族，主要调节细胞生长、增殖、分化、迁移、代谢和细胞凋亡，在肿瘤的发生、发展和转移发挥重要作用^[22]。PAK2 是细胞信号通路中的关键调控因子，在血管生成、转移、细胞存活及耐药性等过程发挥重要作用，靶向 PAK2 的小分子抑制剂在肿瘤治疗领域具有潜在应用价值^[23]。BRD4 在调控染色质修饰、DNA 损伤修复、维持端粒功能等方面发挥着重要作用，它被认为是肺癌等恶性肿瘤预防和治疗的一个有前景的候选靶点^[24]。PRKD1 属于钙调蛋白激酶家族，它既可发挥原癌基因作用，也可作为肿瘤抑制因子，近年来 PRKD 抑制剂的研发也成为重要热点^[25]。LATS1 是 Hippo 通路激酶，它通过调控 YAP 和 TAZ 在促进组织增殖、正常及癌症干细胞自我更新、迁移和致癌过程发挥重要作用^[26]。进一步分析发现，这 8 个核心靶点并非孤立存在，而是构成了一个协同调控的信号网络。其中，SRC 作为上游枢纽，可调控 MAP3K1/MAP3K2-MAP2K2 级联反应，同时 SRC 也能与 PAK2、LATS1 等相互作用，影响细胞骨架重组和 Hippo 通路；而 BRD4 作为表观遗传调控因子，可能通过调控上述激酶转录参与网络维持；PRKD1 则与 MAPK 通路交叉对话，共同协调细胞应激与存活应答。推测这种多靶点、多层次的网络式抑制，可能是非诺贝特高效阻断肺腺癌恶性表型的重要基础，此不仅为非诺贝特的抗肿瘤机制增添了新的证据，也为未来的临床应用提供了潜在的靶点。

综上，本研究通过整合 DIA 磷酸化蛋白质组学、网络药理学与分子对接等方法，揭示了非诺贝特主要通过抑制 MAPK/ErbB 信号通路磷酸化而发挥抗肺腺癌作用，这为传统药物精准再定位奠定了理论基础，为后续临床研究提供了重要方向。同时也发现 PAK2、LATS1、PRKD1 等关键激酶蛋白可能是非诺贝特抗肺腺癌的重要靶点，拓展了该药非依赖 PPAR α 途径抗肿瘤的新机制。未来将聚焦于 PAK2 等核心靶点的实验验证，进一步探索非诺贝特的作用机制，推进其在肺腺癌治疗中的应用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 田泽, 宋英达, 李剑慧, 等. 1990—2021 年中国与全球青少年和年轻成人肺癌流行病学特征比较 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2025, 32(7): 991-999.
- [2] Chen P X, Liu Y H, Wen Y K, *et al.* Non-small cell lung cancer in China [J]. *Cancer Commun*, 2022, 42(10): 937-970.
- [3] Li Y T, Yan B S, He S M. Advances and challenges in the treatment of lung cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 169: 115891.
- [4] Warzecha K W, Pudelek M, Catapano J, *et al.* Long-term fenofibrate treatment stimulates the phenotypic microevolution of prostate cancer cells *in vitro* [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 15(11): 1320.
- [5] Kong R, Wang N, Han W, *et al.* Fenofibrate exerts antitumor effects in colon cancer via regulation of DNMT1 and CDKN2A [J]. *PPAR Res*, 2021, 2021: 6663782.
- [6] Kogami M, Abe S, Nakamura H, Aoshiba K. Fenofibrate attenuates the cytotoxic effect of cisplatin on lung cancer cells by enhancing the antioxidant defense system *in vitro* [J]. *Oncol Lett*, 2023, 26(1): 313.
- [7] 王桂平, 李智斌, 周伟平, 等. 非诺贝特通过下调细胞周期蛋白 D1 表达诱导肺腺癌细胞周期阻滞 [J]. 中华生物医学工程杂志, 2023, 29: 34-40.
- [8] Alkotub B, Bauer L, Bashiri D A, *et al.* Radiosensitizing capacity of fenofibrate in glioblastoma cells depends on lipid metabolism [J]. *Redox Biol*, 2025, 79: 103452.
- [9] Wang M S, Han Q S, Jia Z R, *et al.* PPAR α agonist fenofibrate relieves acquired resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer by promoting apoptosis via PPAR α /AMPK/AKT/FoxO1 pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(1): 167-176.
- [10] 刘桥发, 朱能, 张婵娟, 等. 非诺贝特抑制 STAT3 抗人肾透明细胞癌 786-O 细胞增殖及诱导凋亡的作用 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(12): 2789-2799.
- [11] Jian C S, Fu J J, Cheng X, *et al.* Low-dose sorafenib acts as a mitochondrial uncoupler and ameliorates nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Cell Metab*, 2020, 31(5): 892-908.
- [12] Nogales C, Mamdouh Z M, List M, *et al.* Network pharmacology: Curing causal mechanisms instead of treating symptoms [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(2): 136-150.
- [13] Cang S, Liu R, Jin W, *et al.* Integrated DIA proteomics and lipidomics analysis on non-small cell lung cancer patients with TCM syndromes [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 126.
- [14] Zhang W T, Tian W Q, Wang Y F, *et al.* Explore the mechanism and substance basis of Mahuang FuziXixin

- Decoction for the treatment of lung cancer based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Comput Biol Med*, 2022, 151(Pt A): 106293.
- [15] 黄洁雅, 郇文辉, 杨仁义, 等. “诸气贲郁, 皆属于肺”视域下探讨肺腺癌相关性抑郁因果关系及干预中药预测 [J]. *中草药*, 2025, 56(8): 2885-2897.
- [16] Bahar M E, Kim H J, Kim D R. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: From mechanism to clinical studies [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 455.
- [17] Passaro A, Jänne P A, Mok T, *et al*. Overcoming therapy resistance in EGFR-mutant lung cancer [J]. *Nat Cancer*, 2021, 2(4): 377-391.
- [18] Chen W Q, Chen F H, Gong M C, *et al*. Fenofibrate suppresses the progression of hepatoma by downregulating osteopontin through inhibiting the PI3K/AKT/Twist pathway [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2024, 397(2): 1025-1035.
- [19] Wang M S, Han Q S, Jia Z R, *et al*. PPAR α agonist fenofibrate relieves acquired resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer by promoting apoptosis via PPAR α /AMPK/AKT/FoxO1 pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(1): 167-176.
- [20] Horn D, Fernández-Núñez E, Gomez-Carmona R, *et al*. Biallelic truncating variants in MAPKAPK5 cause a new developmental disorder involving neurological, cardiac, and facial anomalies combined with synpolydactyly [J]. *Genet Med*, 2021, 23(4): 679-688.
- [21] Hsu P C, Yang C T, Jablons D M, *et al*. The crosstalk between Src and Hippo/YAP signaling pathways in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Cancers*, 2020, 12(6): 1361.
- [22] Tan J, Li X S, Wang Y G, *et al*. EIF3B stabilizes MAP2K2 to activate the ERK pathway and promote the progression of laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 333.
- [23] Chen X P, Yang Z T, Yang S X, *et al*. PAK2 as a therapeutic target in cancer: Mechanisms, challenges, and future perspectives [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2025, 1880(1): 189246.
- [24] Zhang M M, Li Y B, Zhang Z L, *et al*. BRD4 Protein as a target for lung cancer and hematological cancer therapy: A review [J]. *Curr Drug Targets*, 2023, 24(14): 1079-1092.
- [25] Liu Y, Song H, Zhou Y H, *et al*. The oncogenic role of protein kinase D3 in cancer [J]. *J Cancer*, 2021, 12(3): 735-739.
- [26] Zhao Y, Sheldon M, Sun Y T, *et al*. New insights into YAP/TAZ-TEAD-mediated gene regulation and biological processes in cancer [J]. *Cancers*, 2023, 15(23): 5497.

[责任编辑 高源]