

基于网络药理学和细胞实验探究姜黄素治疗非小细胞肺癌的机制

刘玉玲^{1,2*}, 高俊萍³, 李宏斌⁴

1. 山西医科大学汾阳学院 医学检验系, 山西 汾阳 032200

2. 山西省汾阳医院 肿瘤科, 山西 汾阳 032200

3. 四川大学 生物治疗国家重点实验室, 四川 成都 610041

4. 兰州理工大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050

摘要: **目的** 利用网络药理学、分子对接技术探究姜黄素在非小细胞肺癌治疗中的潜在作用机制, 并进行体外实验验证。**方法** 利用 PubChem 和 Swiss Target Prediction 数据库筛选姜黄素的药物靶点; 在 GeneCards 数据库中获得非小细胞肺癌的疾病靶点。利用韦恩在线分析软件获得药物和疾病的交集基因, 通过 STRING 网站和 Cytoscape 软件将交集基因进行蛋白质-蛋白质相互作用网络 (PPI) 分析, 根据节点的度值筛选核心靶点。运用 DAVID 数据库对潜在作用靶点进行了基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析。通过 AutoDock 等软件将姜黄素和核心靶点进行分子对接, 并通过 Pymol 软件对结果进行可视化分析。体外培养非小细胞肺癌 A549 细胞, 将不同浓度 (0、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的姜黄素作用于 A549 细胞, 通过 MTT 实验、克隆形成实验、划痕、Transwell 实验和 DAPI 染色实验检测姜黄素对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖、迁移和凋亡的影响, 通过 Western blotting 法检测姜黄素对核心靶点丝氨酸和苏氨酸激酶 1 (AKT1)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、热休克蛋白 (HSP90AA1)、非受体酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、信号传导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 以及酪氨酸蛋白激酶/STAT3 (JAK/STAT3) 信号通路相关蛋白表达水平的影响。**结果** 基于网络药理学, 筛选获得姜黄素治疗非小细胞肺癌的潜在作用靶点 159 个。按照节点的度值筛选出前 5 位的核心靶点为: AKT1、MAPK1、Hsp90AA1、SRC 和 STAT3。GO 富集结果显示, 姜黄素治疗非小细胞肺癌涉及多个生物过程, 如信号转导、启动子转录、蛋白质磷酸化、JAK-STAT 级联反应信号转导途径和细胞凋亡。并通过 KEGG 富集筛选出多个信号通路, 如癌症信号通路、趋化因子信号通路、催乳素信号通路、AGE-RAGE 信号通路和 JAK-STAT 信号通路等。分子对接显示: 姜黄素与核心靶点 AKT1、Hsp90AA1、SRC 和 STAT3 的结合能均小于 $-20.9\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 说明姜黄素可能通过以上靶点治疗非小细胞肺癌。细胞实验结果显示, 姜黄素抑制 A549 细胞的增殖能力、迁移能力并促进细胞凋亡, 同时发现姜黄素处理 A549 细胞后, 细胞中 AKT1、MAPK1、SRC、STAT3 和 JAK2 蛋白的表达下调, 但 HSP90AA1 蛋白的表达没有变化。**结论** 姜黄素可能通过多靶点、多信号通路在治疗非小细胞肺癌过程中发挥重要作用, 姜黄素可能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路的表达影响非小细胞肺癌的增殖、迁移和凋亡。

关键词: 网络药理学; 姜黄素; 非小细胞肺癌; 分子对接; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)02-0416-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.02.015

Mechanism of curcumin in treatment of non-small cell lung cancer explored by network pharmacology and cell experiments

LIU Yuling^{1,2}, GAO Junping³, LI Hongbin⁴

1. Medical Laboratory Department, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China.

2. Department of Oncology, Fenyang Hospital, Fenyang 032200, China

3. State Key Laboratory of Biological Therapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China

4. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of curcumin in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) using network pharmacology and molecular docking techniques, and to validate *in vitro* experiments. **Methods** Curcumin drug targets were

收稿日期: 2024-06-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82003216); 山西省科技厅青年科技研究基金(20210302124580); 吕梁市科技计划项目(2023SHFZ50); 山西省大学生创新创业训练计划项目(20231798)

*通信作者: 刘玉玲, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤发病机制的研究。E-mail: linger8911@126.com

screened using PubChem and Swiss Target Prediction databases; And disease targets of NSCLC were obtained in GeneCards database. The intersection genes of drugs and diseases were obtained by using the Venny2.1.0. The intersection genes were analyzed by protein-protein interaction (PPI) network through the STRING database and the Cytoscape software, and the core targets were screened according to the degree value of the nodes. Then, GO function and KEGG pathway analysis were performed using the DAVID database. Curcumin and core targets were molecular docked by AutoDock software, and the results were visualized by Pymol software. NSCLC A549 cells were cultured and treated with curcumin at different concentrations (0, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) *in vitro*. The effect of curcumin on cell proliferation, migration and apoptosis of NSCLC were determined by MTT assay, clones formation assay, nicking, Transwell assay and DAPI staining assay, The effect of curcumin on the expression levels of the core targets AKT1, MAPK1, Hsp90AA1, SRC, STAT3, and JAK/STAT3 signaling-related proteins were tested by Western blotting assay. **Results** Based on network pharmacology, 159 potential targets for the treatment of NSCLC. The top five core targets were selected according to the degree values of the nodes: AKT1, MAPK1, Hsp90AA1, SRC, and STAT3. GO enrichment results showed that curcumin treatment in NSCLC involved several biological processes, such as signal transduction, promoter transcription, protein phosphorylation, signal transduction pathway of JAK-STAT cascade, and apoptosis. Several signaling pathways, such as cancer signaling pathway, chemokine signaling pathway, prolactin signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway and JAK-STAT signaling pathway, were screened out by KEGG enrichment. Molecular docking showed that the binding energy of curcumin and the core targets AKT1, Hsp90AA1, SRC and STAT3 was less than $-20.9\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, indicating that curcumin may be treating NSCLC. The results of cell experiments showed that curcumin inhibited the proliferation, migration and promoted apoptosis of A549 cells. Meanwhile, it was found that the expression of AKT1, MAPK1, SRC, STAT3 and JAK2 was downregulated in A549, but the expression of HSP90AA1 protein was unchanged. **Conclusion** Curcumin may play an important role in the treatment of NSCLC through a multi-targets, multiple pathway, and curcumin may affect the proliferation, migration and apoptosis of NSCLC by inhibiting the expression of JAK2/STAT3 signaling pathway.

Key words: network pharmacology; curcumin; non-small cell lung cancer; molecular docking; cell proliferation; cell apoptosis

肺癌是一种起源于肺支气管黏膜或腺体的恶性肿瘤,是常见的癌症之一,其被认为是全球癌症死亡的主要原因^[1-2]。据 2020 年数据统计,中国肺癌的发病率和死亡率分别占全球总发病率和死亡率的 37.0%和 39.8%,且逐年上升,严重危害着人类的生命和健康^[3-4]。肺癌的发病机制很复杂,常见的诱导因素有长期吸烟、空气污染、慢性肺病等^[5]。肺癌根据其病理学类别分为两种类型:非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌(SCLC),其中 NSCLC 的病例占肺癌的 85%^[6-7]。临床上,很少有患者早期诊断出来,绝大部分患者在发现时已经是晚期,并发生了转移,手术难且易复发^[8]。这使得预防和治疗肺癌具有重大的挑战性。目前,针对于 NSCLC 的治疗方法为:手术切除、放疗、化疗、靶向治疗和免疫治疗^[9],但耐药性仍然是当前肺癌治疗中的一个挑战。因此,针对治疗 NSCLC 有效药物的开发显得尤为重要。

姜黄素是从姜黄根茎中提取出来的多酚类化合物,已被广泛研究并证实在抗炎、抗氧化、抗微生物以及抗肿瘤等方面具有显著的药理活性^[10-11]。尤其在抗肿瘤方面,姜黄素对多种癌症如胃癌^[12]、结直肠癌^[13]、肝癌^[14]、宫颈癌^[15]和肺癌^[16]等均有一定的抑制作用。前期研究发现,姜黄素通过影响多

种分子靶标和细胞信号通路,包括核因子- κB (NF- κB)、丝氨酸/苏氨酸激酶 (Akt)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、B 淋巴细胞瘤-2 (BCL-2)、活性氧 (ROS) 和 microRNA (miRNA),延缓 NSCLC 的发生和进展^[16]。可见,姜黄素可能是治疗 NSCLC 的潜在药物。然而,具体的抗癌机制及其在多靶点治疗中的作用尚未完全阐明。

网络药理学是一种综合性的研究方法,它整合了系统生物学、药理学和计算机技术,以探索药物的机制和多靶点效应。通过网络药理学使得药物与生物体内复杂分子网络间的相互作用得以更加深入地揭示^[17]。因此,本研究旨在通过网络药理学和生物信息学方法,结合体外实验,深入探究姜黄素在 NSCLC 治疗中的潜在靶点、途径和机制,这一研究不仅有助于揭示姜黄素的抗癌机制,为其进一步的临床应用提供参考,同时也为中药的现代化研究提供了新的思路和方法。

1 材料

1.1 细胞株

人非小细胞肺癌细胞 A549 为山西医科大学汾阳学院徐义荣教授馈赠。

1.2 药品及其主要试剂

姜黄素 (MedChemExpress, 质量分数 98%, 批

号: 465-21-4); 胎牛血清 (货号: PYG0001)、DMEM/F12 培养基 (货号: PYG0074)、胰蛋白酶 (货号: PYG0014)、青-链霉素 (货号: PYG0016)、BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (货号 AR0146)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (货号: BM3894)、SDS-PAGE 凝胶配套试剂盒 (货号: AR0138)、磷酸盐缓冲液 (PBS, 货号: AR0030)、 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (货号: BA2305) 购自武汉博士德有限公司; MTT 试剂 (货号: M8180)、结晶紫 (货号: C8470)、DAPI (货号: AR1176) 购自北京索莱宝生物公司; 增强型 ECL 化学发光液 (货号: M8650) 购自大连美仑生物技术有限公司; Bcl-2 抗体 (货号: ET1702-53)、Bcl-2 相关 X (Bax) 抗体 (货号: ET1603-34)、AKT1 抗体 (货号: ET1609-47)、类固醇受体辅激活因子 (SRC) 抗体 (货号: ET1702-03)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1 (HSP90AA1) 抗体 (货号: ET1605-57)、细胞外调节蛋白激酶 (Erk2) 抗体 (货号: ER131218)、信号转导与转录激活蛋白-3 (STAT3) 抗体 (货号: ET1607-38) 购自浙江杭州华安生物科技公司; Janus 激酶 2 (JAK2) 抗体 (货号: 3230) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 主要仪器

Synergy H4 多功能酶标仪 (美国 BIOTEK 公司); ECLIPSE Ti2 荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); GelDoc Go 12009077 化学发光凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 姜黄素的分子结构及靶点基因的筛选 在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Swiss Target Prediction (<http://swisstargetprediction.ch/>) 数据库中获得姜黄素的预测靶点; 以 “Homo sapiens” 作为筛查物种, 在 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 中获得相应预测靶点的基因名, 最后合并去重得到姜黄素的潜在靶点。

2.1.2 NSCLC 的疾病基因获取 以 “non-small-cell lung cancer” 为关键词, 种属限定为 “Homo sapiens”, 在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库, 以 GeneCards 得分 10 分为筛选条件, 删除重复的基因获得 NSCLC 的疾病相关基因。

2.1.3 获得药物-疾病作用靶点及构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络 将筛选的姜黄素药物靶点与 NSCLC 的疾病相关基因通过韦恩在线软件交

集, 获得姜黄素和 NSCLC 的共同靶基因。将筛选得到的共同靶基因经 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 在线软件, 设置物种为 “Homo sapiens”, 相互作用阈值设为 0.7, 其余为系统默认值, 得到药物-疾病可能作用靶标 PPI 网络。下载 “tsv” 格式文件, 导入到 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化分析, 并根据节点度值筛选出潜在的核心作用基因。

2.1.4 姜黄素对 NSCLC 作用靶点的基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 利用 DAVID 数据库将姜黄素对 NSCLC 作用靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。

2.1.5 姜黄素与主要靶点的分子对接 将姜黄素和 PPI 网络中度值排名最高的 5 个靶点开展分子对接, 先从 PubChem 数据库获得姜黄素的结构, 作为配体文件; 从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载主要靶蛋白的 PDB 结构, 作为受体文件, 经 Pymol 软件进行转化的 “pdbqt” 格式, 随后通过 Auto Dock 软件对受体进行进一步加氢, 去水等处理, 使用 AutoDock Vina 进行分子对接, 计算出配体和受体之间的结合能力, 并用 Pymol 软件进行可视化分子对接结果, 一般认为结合能越低, 结合能力越高, 当结合能 $\leq -20.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 时, 表明姜黄素与核心靶点直接的结合能力较好。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养与药物制备 人非小细胞肺癌细胞 A549 使用含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM/F12 培养基中, 并将其放置在 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养, 待其生长至 80%~90% 时, 加入胰蛋白酶消化传代培养。

姜黄素溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 中制备成 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液, 根据实验设置将姜黄素稀释为对应的作用浓度 (5、10、20、 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.2.2 MTT 检测细胞活力 取对数生长期的 A549 细胞, 以每孔 $100 \mu\text{L}$ 的体积接种细胞 3×10^3 个于 96 孔板中, 待细胞培养过夜贴壁后, 向 96 孔板中加入不同浓度 0 (对照)、5、10、20、 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的姜黄素, 并培养 48 h 后, 向其中加入 $10 \mu\text{L} 5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液, 37°C 继续培养 4 h 后, 弃去上清液, 每孔加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO 溶液溶解, 用酶标仪 (Biotek) 测定在 490 nm 波长下各孔的吸光 (A) 值。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.2.3 细胞克隆形成实验 将对数生长期的 A549 细胞接种于 6 孔板中, 每孔 1×10^3 个, 待细胞贴壁

后,加入不同浓度(0、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)姜黄素培养细胞,每3天换液重新加药,培养12 d后,弃去上清,用PBS清洗3次,再用4%多聚甲醛室温固定20 min,用0.1%结晶紫染色30 min,PBS洗干净,晾干,拍照记录。

2.2.4 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 将A549细胞接种于6孔板中,每孔 5×10^5 个,待细胞贴壁后,经200 μL 枪头垂直于6孔板划线,用PBS清洗3次后,加入不同浓度(0、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)姜黄素培养基,分别在0 h和48 h用倒置显微镜拍照,通过Image J软件分析图片。

相对划痕愈合率=迁移面积/原始划痕面积

2.2.5 Transwell 实验检测细胞迁移能力 收集“2.2.4”项姜黄素处理24 h后的细胞,用无血清培养基重悬,调整细胞相同浓度,取200 μL 细胞悬液接种于Transwell上室中,下室中加入600 μL 含10%血清的完全培养基,放入培养箱中培养24 h。用4%多聚甲醛进行固定,0.1%结晶紫溶液进行染色、PBS润洗、室温风干,棉签擦去小室底部上层细胞,显微镜对小室底部细胞进行拍照,采用Image J软件对细胞计数。

2.2.6 DAPI 染色实验检测细胞凋亡 将处于对数生长期的A549细胞以每孔 3×10^3 个的密度接种到96孔板中。待细胞贴壁后,向各孔中加入含有不同浓度姜黄素(0、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的培养基,继续培养48 h。吸去上清液,加入100 μL 4%多聚甲醛室温固定20 min,加入DAPI染色30 min后,PBS洗3次,荧光显微镜下观察并拍照。

2.2.7 Western blotting 检测相关蛋白的表达 不同浓度0、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的姜黄素处理A549细胞48 h后,收集细胞,用PBS洗涤3次,加入适量含有苯甲磺酰氟的RIPA裂解液冰上裂解细胞,并在13 300 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的高速低温离心机中离心15 min,收集上清液,采用BCA法进行蛋白定量,经SDS-PAGE电泳,转膜、脱脂牛奶封闭室温封闭,一抗Bcl-2(1:1 000)、Bax(1:1 000)、AKT1(1:1 000)、SRC(1:1 000)、HSP90AA1(1:1 000)、Erk2(1:1 000)、STAT3(1:1 000)、 β -actin(1:5 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;室温二抗孵育1 h后,TBST室温洗涤后,使用ECL发光液检测蛋白条带,用Image J软件分析条带的灰度值。

2.3 数据统计

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。用GraphPad Prism 5.0

软件进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析,两组数据之间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 姜黄素抗 NSCLC 的靶点预测

以“curcumin”为关键词,在PubChem数据库和Swiss Target Prediction数据库分别获得姜黄素的潜在作用靶点为235个和112个,合并去除重复的靶点,得出323个姜黄素的可能靶点;在GeneCards数据库中,以“non-small-cell lung cancer”为关键词,筛出2 051个NSCLC的相关基因。将药物靶点与疾病靶点交集后,得到159个共同靶点,即为姜黄素抗NSCLC的潜在靶点,见图1。

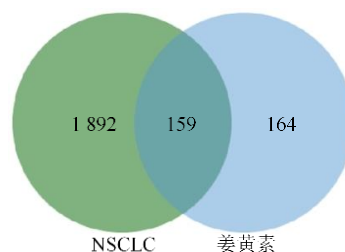


图1 “药物-疾病”共同靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn plot of common target of "drug-disease"

3.2 PPI 网络的构建

将姜黄素治疗NSCLC的159个潜在靶点导入STRING数据库进行可视化分析,并建立PPI网络,见图2。为了进一步筛选出姜黄素抗NSCLC的关键靶点,将PPI网络的节点运用Cytoscape3.7.2软件按照度值、介数中心性和接近中心性的中位数为节点进行筛选,最后筛选出25个关键蛋白,见表1。

3.3 GO 和 KEGG 富集分析

将关键靶点输入DAVID数据库进行GO功能富集和KEGG通路富集分析,根据 $P<0.05$ 选出GO条目265个,其中生物过程(BP)179个,细胞组成(CC)33个,分子功能(MF)53个,见图3。其中BP包括:信号转导、胞内信号转导、正向调控从RNA聚合酶II启动子的转录、蛋白质磷酸化、白细胞介素-9介导的信号转导途径、参与生长激素信号转导途径中的JAK-STAT级联反应和细胞凋亡等。CC主要与胞质内浆膜外成分、细胞溶质、细胞核和大分子复合物等有关。MF与蛋白磷酸酶结合、酶结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、转录因子活性、特异性DNA结合等。

KEGG通路富集分析筛出密切相关通路有135

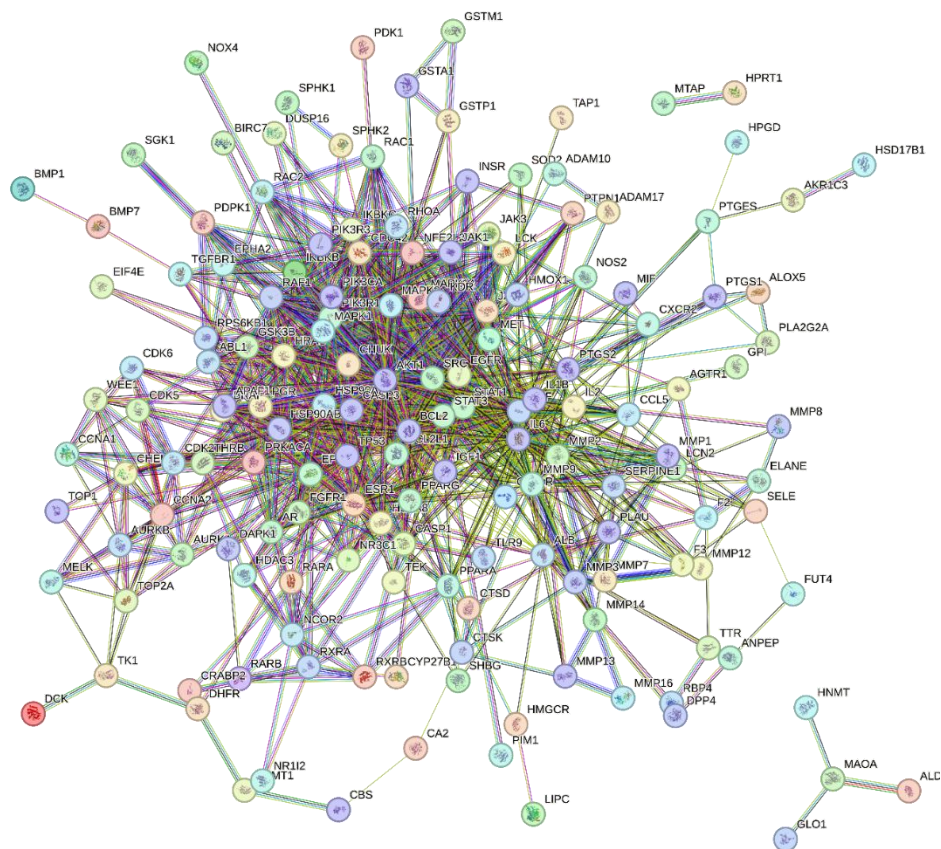


图 2 姜黄素治疗 NSCLC 潜在靶点的 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of potential targets of curcumin treatment in NSCLC

条, 根据 $P < 0.05$ 筛选出前 25 条进行绘图, 见图 4。其中颜色越深则表明富集程度越高, 主要的富集通路包括: 癌症信号通路、程序性死亡配体 1 (PD-L1) 表达和程序性死亡受体 1 (PD-1) 检测点通路在癌症中的作用、趋化因子信号通路、催乳素信号通路、AGE-RAGE 信号通路和 JAK-STAT 信号通路等。

3.4 姜黄素与关键靶点的分子对接结果

将姜黄素与排名前 5 位关键靶点进行分子对接, 对接值越小表示结合活性越高, 表明药物与靶蛋白的结合稳定性越好, 分子对接结果见图 5, 且所对应的结合能见表 2。结果显示, 姜黄素与 AKT1 的结合稳定性最好, 结合能为 $-35.03 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; 姜黄素与 HSP90AA1、SRC 和 STAT3 的结合比较稳定, 其结合能均小于 $-20.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; 但是姜黄素与 MAPK1 的结合稳定性较弱, 其结合能为 $-18.81 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

3.5 姜黄素抑制 A549 细胞增殖

如图 6 结果显示, 与对照组相比, 不同浓度姜黄素作用 A549 细胞 48 h 后, A549 细胞的存活率显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结果表明: 姜黄素显著抑制 A549 细胞的增殖, 且呈浓度相关性。

表 1 姜黄素治疗 NSCLC 的关键基因

Table 1 Key targets of curcumin in treatment of NSCLC

靶基因蛋白	介数中心性	接近中心性	度值
AKT1	1 819.446	0.524	39
MAPK1	1 618.173	0.526	38
SRC	1 691.355	0.522	36
HSP90AA1	1 611.591	0.500	36
STAT3	2 967.176	0.508	32
PI3KR1	675.928	0.482	32
HRAS	796.948	0.460	27
MAPK14	989.623	0.475	24
MAPK8	489.288	0.438	23
RHOA	365.344	0.443	22
EGFR	321.465	0.462	22
EP300	684.421	0.451	21
LCK	95.813	0.464	20
RXRA	399.844	0.416	19
RAC1	222.524	0.460	19
ESR1	252.972	0.458	18
AR	779.409	0.476	18
NCOR2	260.704	0.419	17
JAK2	472.419	0.453	17
NR3C1	212.603	0.455	16
JAK1	53.480	0.445	16
RPS6KB1	180.039	0.429	16
STAT1	39.050	0.451	15
JAK3	30.543	0.439	14
CDC42	52.491	0.416	14

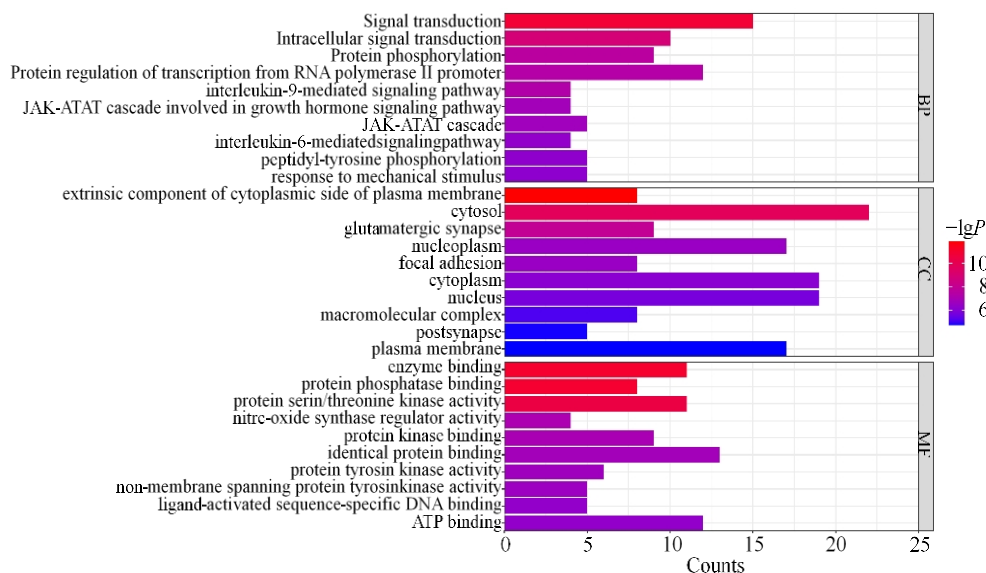


图 3 姜黄素治疗 NSCLC GO 富集分析

Fig. 3 GO Enrichment analysis for curcumin treatment in NSCLC

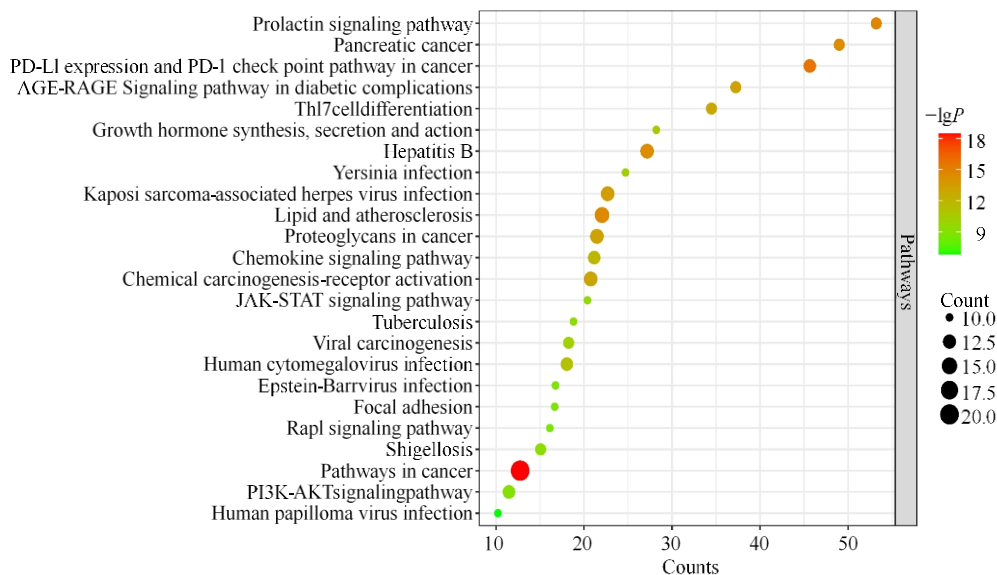


图 4 姜黄素治疗 NSCLC KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis for curcumin treatment in NSCLC

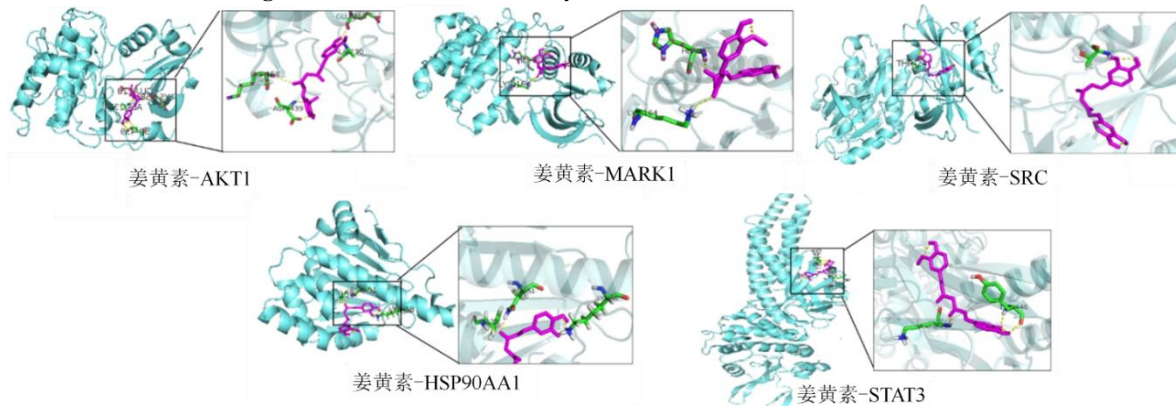


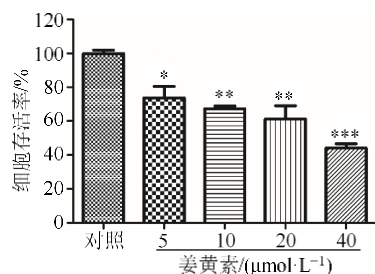
图 5 姜黄素与关键靶蛋白的分子对接模型

Fig. 5 Molecular docking model of curcumin and key target proteins

表 2 姜黄素与关键靶蛋白之间的结合能

Table 2 Binding energy between curcumin and key target

proteins			
配体	受体	PDB ID	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
姜黄素	AKT1	3VMH1	-35.03
	MAPK1	4ZXT	-18.81
	SRC	1FMK1	-23.62
	HSP90AA1	4BQG1	-22.61
	STAT3	6NJS	-21.90

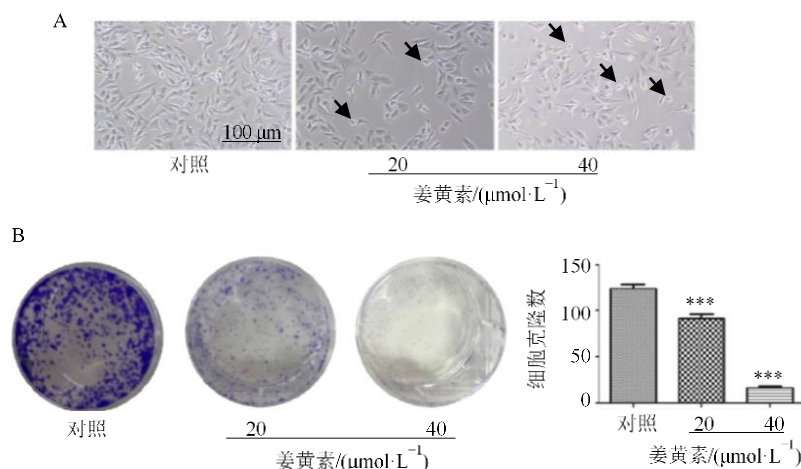


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.01$ vs control group.

图 6 姜黄素对 A549 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effect of curcumin on viability of A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



A-白光下展示 A549 细胞形态的变化; B-克隆形成实验检测细胞集落形成能力; 与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

A-Changes of A549 cells under white light; B-Clone formation assay tested for cell colony forming ability; *** $P < 0.001$ vs control group.

图 7 姜黄素对 A549 细胞克隆形成能力和细胞形态的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effects of curcumin on clonogenic ability and cell morphology of A549 cells ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

数目显著低于对照组, 见图 8。因此, 结果表明姜黄素抑制 A549 细胞的迁移能力。

3.8 姜黄素促进 A549 细胞凋亡

为了进一步明确姜黄素对肺癌细胞 A549 细胞凋亡的影响。用荧光显微镜采集 DAPI 染色后 A549 细胞核的变化, 见图 9, 随着姜黄素浓度的增加, A549 细胞核膨大, 且细胞核内染色质凝集。可见姜

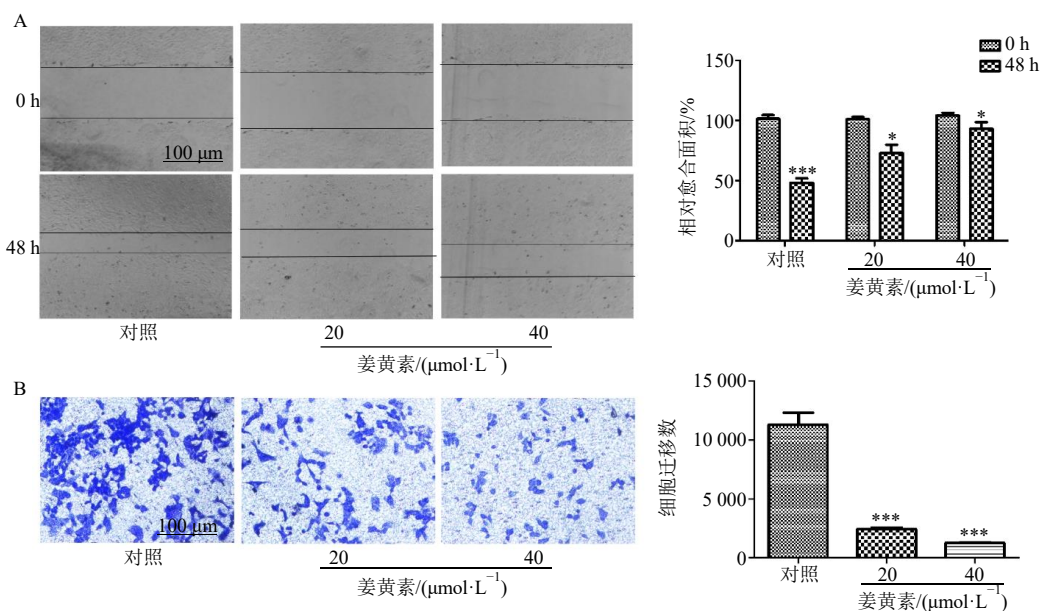
3.6 姜黄素抑制 A549 细胞集落形成

不同浓度 (20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 姜黄素作用 A549 细胞 48 h 后, 光学显微镜观察 A549 细胞, 发现, 与对照组细胞相比, 姜黄素干预的细胞形态由长梭形变成了圆形, 图 7 中的箭头所指示的细胞。如图 7 细胞集落形成实验结果显示, 不同浓度 (20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 姜黄素作用 A549 细胞 48 h 后, 与对照组相比, A549 细胞集落数显著减少 ($P < 0.001$), 且随着姜黄素作用浓度的增加, A549 细胞集落数减少更多。因此, 细胞集落形成实验结果进一步表明: 姜黄素抑制 A549 细胞的增殖。

3.7 姜黄素抑制 A549 细胞的迁移能力

为了进一步明确姜黄素对 A549 细胞迁移能力的影响, 通过 Transwell 实验和划痕实验检测姜黄素作用 A549 细胞对其迁移能力的影响。划痕实验结果显示, 与对照组相比, 姜黄素处理 A549 细胞 48 h 后, 细胞划痕愈合率显著下降 ($P < 0.05$), 且呈现浓度相关性, 见图 8。Transwell 实验结果显示, 不同浓度的姜黄素处理细胞 A549 后, 细胞迁移的

黄素诱导 A549 发生 DNA 损伤。此外, 采用 Western blotting 检测姜黄素对 A549 细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达水平的影响, 结果显示, 与对照组相比, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素作用 A549 细胞后, 凋亡相关蛋白 Bcl-2 蛋白的表达显著降低 ($P < 0.001$), Bax 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001), 见图 9。

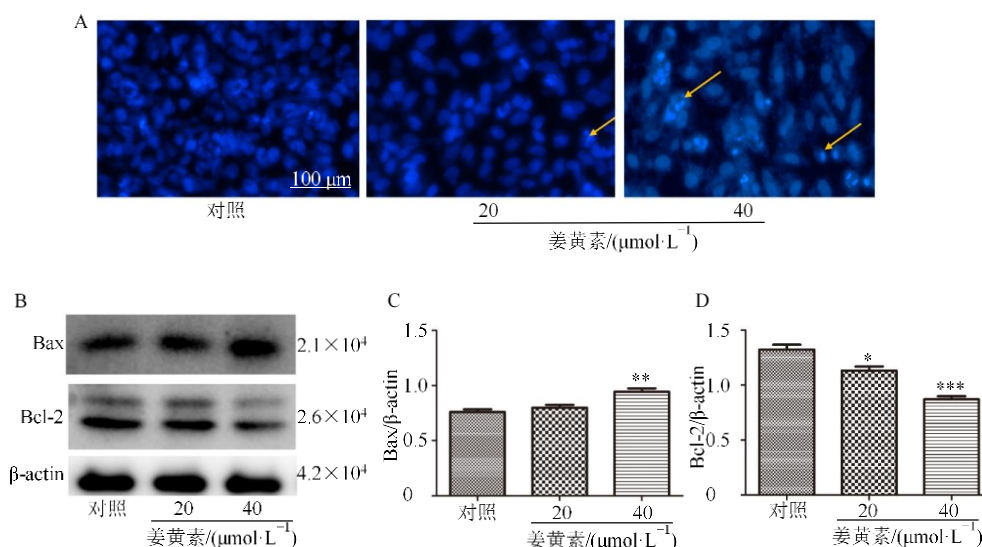


A-划痕实验展示 A549 细胞迁移能力; B-Transwell 实验检测细胞迁移能力; 与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

A-Scratch experiment demonstrate migration ability of A549 cells; B-Cell migration capacity was determined by the Transwell assay; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 8 姜黄素对 A549 细胞迁移能力的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Effect of curcumin on migratory capacity of A549 cells ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)



A-DAPI 染色展示 A549 细胞核的变化 (图中箭头所示); B-通过蛋白免疫印记技术展示凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2 的表达; C~D-柱形图展示了相关蛋白的半定量分析; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-DAPI staining showed the changes in the nucleus of A549 cells (The arrow in the figure indicates); B-Demonstrate the expression of the apoptosis-related proteins Bax, Bcl-2 by protein immunoblotting technology; B-G-bar diagram showing the semi-quantitative analysis of related proteins; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

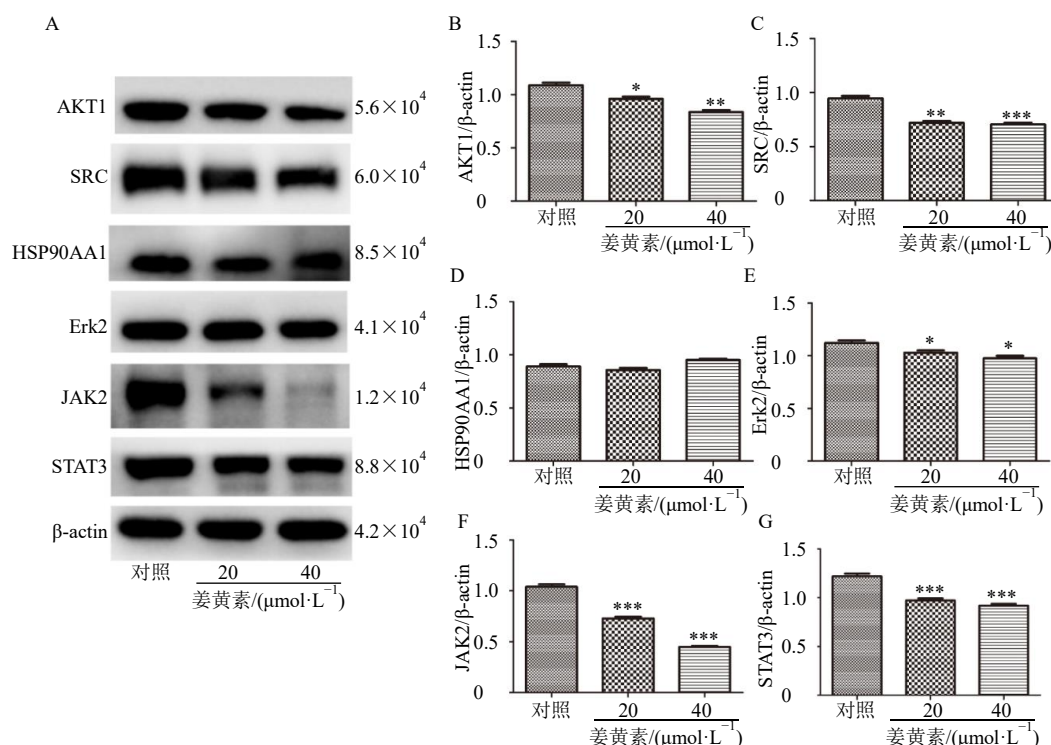
图 9 姜黄素对 A549 细胞凋亡的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Effect of curcumin on apoptosis in A549 cells ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.9 姜黄素对肺癌 A549 细胞中 AKT1、Erk2、Hsp90AA1、SRC、STAT3 以及 JAK/STAT3 通路主要蛋白表达的影响

结合核心靶点、分子对接的结果和 KEGG 信号通路,预测姜黄素可能通过 JAK/STAT3 信号通路参

与 NSCLC 的治疗。因此,为了进一步研究姜黄素对肺癌 A549 细胞中核心蛋白质以及 JAK/STAT3 信号通路蛋白表达的影响。通过 Western blotting 检测不同浓度姜黄素对 A549 细胞相关蛋白表达量的影响,结果如图 10 所示,与对照组相比,姜黄素作用



A-通过蛋白免疫印记技术展示核心蛋白 AKT1、SRC、HSP90AA1、Erk2、JAK2、STAT3 蛋白的表达；B~G-柱形图展示了相关蛋白的半定量分析；与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-Demonstrate the expression of core protein AKT1, SRC, HSP90AA1, Erk2, JAK2, STAT3 proteins by protein immunoblotting technology; B-G-bar diagram showing the semi-quantitative analysis of related proteins; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 10 姜黄素对 A549 细胞核心蛋白以及 JAK2/STAT3 信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 10 Effect of curcumin on the expression of core protein and JAK2/STAT3 signaling pathway proteins in A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A549 细胞后，细胞内 AKT1、Erk2、SRC、STAT3 和 JAK2 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)，但是细胞中 HSP90AA1 蛋白整体水平无显著变化，说明姜黄素通过作用多靶点和抑制 JAK2/STAT3 信号通路来抑制 NSCLC 的增殖、迁移和促进细胞凋亡。

4 讨论

NSCLC 的发生发展是多基因、多信号通路相互作用的结果。因此，寻找药物主要治疗靶点对于治疗 NSCLC 具有重要意义。网络药理学在研究多靶点药物方面具有重要的应用。通过分析药物与多个蛋白质、基因、受体等之间的相互作用网络，可以识别多靶点药物的作用机制、预测其治疗效果，并对药物的多靶点效应进行评估。

本研究通过网络药理学筛选出姜黄素抗 NSCLC 的核心靶点，通过 GO 和 KEGG 富集姜黄素治疗 NSCLC 的潜在信号通路，通过分子对接技术分析姜黄素与核心靶点之间的关系，在体外实验验证中，本研究将姜黄素作用于 NSCLC 细胞 A549，采用 MTT 法和

细胞克隆法验证姜黄素抑制 NSCLC 的增殖，且呈现药物浓度依赖性和作用时间依赖性。通过划痕实验和 Transwell 实验检测表明姜黄素抑制肺癌细胞 A549 的迁移能力；进一步通过 DAPI 染色和 Western blotting 法验证姜黄素促进 A549 细胞凋亡，且呈浓度依赖性，因此，姜黄素在治疗 NSCLC 过程中发挥重要作用，推测这个过程可能与调节 JAK/STAT3 信号通路密切相关。

本研究首先通过网络药理学筛选出姜黄素治疗 NSCLC 的靶基因共有 159 个，提示，姜黄素具有较好的抗 NSCLC 的潜力。通过 PPI 网络分析发现 AKT1、MAPK1、Hsp90AA1、SRC 和 STAT3 可能为姜黄素治疗 NSCLC 的关键靶基因，且通过分子对接显示姜黄素与 AKT1、Hsp90AA1、SRC 和 STAT3 结合能均小于 $-20.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，提示以上靶蛋白可能在姜黄素治疗 NSCLC 过程中发挥重要作用。AKT1 是 AKT 家族中重要的成员之一，在肿瘤的发生发展具有重要的意义^[18]。研究表明，改变细胞内 AKT1 的表达对于 NSCLC 的增殖和迁移具有重要的意义。有研究发现，细胞内 AKT1 下调可

以抑制肺癌细胞的增殖、侵袭和细胞周期^[19]。在肺癌细胞中, miR-377-5p 靶向 AKT1, 且抑制 AKT1 的表达抑制肺癌细胞的增殖和迁移^[20]。研究表明姜黄素通过抑制 PI3K/AKT1 通路诱导肺癌细胞凋亡^[21]。MAPK1 即 ERK2, 属于丝裂原活化蛋白激酶家族, 在肿瘤的发生发展中具有重要的作用^[22]。研究发现沉默 MAPK1 基因的表达可以抑制肺癌细胞 A540 增殖、迁移和细胞周期, 且促进 A549 细胞凋亡^[23]。过表达 MAPK1 可以逆转由于 has-circRNA-101237 敲低引起的 NSCLC 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用^[24]。Hsp90AA1 属于热休克蛋白家族, 是一种分子伴侣, 其通过协助其他蛋白质正确折叠而维持细胞内蛋白质稳定状态。研究发现, 下调肺癌细胞中 HSP90AA1 的表达, 可以抑制肺癌细胞增殖, 并通过 AKT1/ERK 途径诱导肺癌细胞凋亡^[25]。Src 是有一种非受体酪氨酸激酶蛋白, Src 异常表达与多种肿瘤细胞的生长、迁移、侵袭和耐药性密切相关, 包括肺癌、乳腺癌和结肠癌等^[26-28]。研究报道在 NSCLC 中 Src 激酶的活性水平较高, 且其激酶活性程度与肿瘤大小相关^[29]。研究发现 miR-654-3p 通过靶向 SRC 的表达抑制 NSCLC 细胞增殖和迁移, 促进细胞凋亡^[30]。STAT3 属于 STAT 家族, 是一种转录因子蛋白, 与肺癌的发病机制密切相关^[31]。STAT3 蛋白的活化需要磷酸化的 JAK 激酶来实现。激活的 STAT3 从细胞质转移进入细胞核内, 调控多种基因的转录, 进而影响细胞的增殖、分化和凋亡等生物学过程^[32]。葫芦素 B 通过抑制 STAT3 的激活诱导 NSCLC 铁死亡^[33]。

通过 KEGG 通路富集分析, 预测姜黄素防治 NSCLC 的可能作用通路, 结合姜黄素与核心靶蛋白的结合能, 推测 JAK/STAT3 信号通路可能在姜黄素防治 NSCLC 作用中发挥重要作用。研究证明, JAK/STAT3 信号通路在抗癌药物治疗肺癌过程中扮演着重要的角色^[34]。红豆杉水提取物通过 JAK/STAT3 信号通路抑制肺癌的增殖和转移^[35]。类黄酮通过靶向 JAK/STAT 信号通路抑制肺癌细胞的迁移、侵袭和增殖^[36]。姜黄素通过 JAK-STAT3 信号通路阻断 SCLC 细胞迁移、侵袭、血管生成、细胞周期和肿瘤形成^[37]。此外, 在耐药方面, 没食子酸通过 JAK/STAT3 信号通路增强顺铂在 NSCLCA549 细胞中的抗癌作用^[38]。本实验发现姜黄素抑制 NSCLCA549 细胞中 JAK2 和 STAT3 的蛋白表达水平, 说明姜黄素可能通过调节

JAK2/STAT3 信号通路抑制 NSCLCA549 细胞的增殖和迁移能力。

本研究应用网络药理学和分子对接证明姜黄素通过多靶点和多通路发挥治疗 NSCLC 的作用, 并预测可能通过调控 JAK2/STAT3 信号通路来实现姜黄素防治 NSCLC 作用, 最后通过细胞实验证明姜黄素通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路显著抑制 NSCLC 细胞增殖、迁移能力, 促进细胞凋亡。因此, 本实验为姜黄素的进一步开发和临床应用提供了重要的实验依据。而本研究不足之处是仅探讨了姜黄素对 NSCLCA945 的生物学活性的影响, 没有通过动物实验进行验证, 下一步将进行体内实验, 进一步证明姜黄素防治 NSCLC 的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Schabath M B, Cote M L. Cancer progress and priorities: Lung cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2019, 28(10): 1563-1579.
- [2] Wang M X, Li R C, Bai M, et al. Exploration of *Ginkgo biloba* leaves on non-small cell lung cancer based on network pharmacology and molecular docking [J]. Medicine, 2024, 103(9): e37218.
- [3] 赫捷, 李霓, 陈万青, 等. 中国肺癌筛查与早诊早治指南(2021, 北京) [J]. 中国肿瘤, 2021, 30(2): 81-111.
He J, Li N, Chen W Q, et al. China guideline for the screening and early detection of lung cancer (2021, Beijing) [J]. China Cancer, 2021, 30(2): 81-111.
- [4] Zhou G Y, Pu Y, Zhao K J, et al. Heat shock proteins in non-small-cell lung cancer-functional mechanism [J]. Front Biosci, 2023, 28(3): 56.
- [5] Schwartz A G, Cote M L. Epidemiology of lung cancer [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 893: 21-41.
- [6] Osmani L, Askin F, Gabrielson E, et al. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy [J]. Semin Cancer Biol, 2018, 52(Pt 1): 103-109.
- [7] Kong F M, Wang C R, Zhao L L, et al. Traditional Chinese medicines for non-small cell lung cancer: Therapies and mechanisms [J]. Chin Herb Med, 2023, 15(4), 509-515.
- [8] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [9] Chaff J E, Rimner A, Weder W, et al. Evolution of systemic

- therapy for stages I-III non-metastatic non-small-cell lung cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(9): 547-557.
- [10] 陈榕, 颜焯, 何梓炫, 等. 提升姜黄素疗效的策略及技术研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55(15): 5315-5330.
Chen R, Yan Y, He Z X, et al. Research progress on strategies and techniques for improving therapeutic effect of curcumin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(15): 5315-5330.
- [11] Ahmad I, Ahmad S, Ahmad A, et al. Curcumin, its derivatives, and their nanoformulations: Revolutionizing cancer treatment [J]. *Cell Biochem Funct*, 2024, 42(1): e3911.
- [12] Ham I H, Wang L, Lee D, et al. Curcumin inhibits the cancer-associated fibroblast-derived chemoresistance of gastric cancer through the suppression of the JAK/STAT3 signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2022, 61(1): 85.
- [13] Xu W, Shen Y. Curcumin affects apoptosis of colorectal cancer cells through ATF6-mediated endoplasmic reticulum stress [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2024, 103(1): e14433.
- [14] Miyazaki K, Morine Y, Xu C M, et al. Curcumin-mediated resistance to lenvatinib via EGFR signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Cells*, 2023, 12(4): 612.
- [15] Zhang X Y, Zhu L, Wang X Z, et al. Basic research on curcumin in cervical cancer: Progress and perspectives [J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2023, 162: 114590.
- [16] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的应用与挑战 [J]. *中草药*, 2024, 55(12): 4204-4213.
Liao Y N, Zhao K L, Guo H W. Application and challenges of network pharmacology research in traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [17] Hopkins A L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [18] Sarker R S, Steiger K. A critical role for Akt1 signaling in acute pancreatitis progression [J]. *J Pathol*, 2020, 251(1): 1-3.
- [19] Tian X L, Wang R, Gu T X, et al. Costunolide is a dual inhibitor of MEK1 and AKT1/2 that overcomes osimertinib resistance in lung cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 193.
- [20] Wu H, Liu H Y, Liu W J, et al. MiR-377-5p inhibits lung cancer cell proliferation, invasion, and cell cycle progression by targeting AKT1 signaling [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(5): 8120-8128.
- [21] 刘嘉欣, 黎同明, 黄慧贤, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨姜黄素诱导 A549 细胞凋亡的机制 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(17): 2487-2491.
Liu J X, Li T M, Huang H X, et al. Mechanism of curcumin induced apoptosis of A549 cells based on PI3K/Akt signal pathway [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2023, 39(17): 2487-2491.
- [22] 张倩楠, 贾琴琴, 杨婷婷, 等. MAPK1 基因沉默对肺癌 A549 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力的影响 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2022, 44(4): 373-379.
Zhang Q N, Jia Q Q, Yang T T, et al. Effect of MAPK1 gene silencing on proliferation, apoptosis, migration and invasion of lung cancer A549 cells [J]. *J Ningxia Med Univ*, 2022, 44(4): 373-379.
- [23] Zhang Z Y, Gao X H, Ma M Y, et al. CircRNA_101237 promotes NSCLC progression via the miRNA-490-3p/MAPK1 axis [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 9024.
- [24] 李祥鹏, 付荣, 李宪威, 等. PRC1 通过 MAPK 途径促进肺癌对顺铂耐药的机制研究 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(12): 1063-1067.
Li X P, Fu R, Li X W, et al. Mechanism of PRC1 promoting cisplatin resistance of lung cancer through MAPK pathway [J]. *Chin Clin Oncol*, 2019, 24(12): 1063-1067.
- [25] Niu M Y, Zhang B, Li L, et al. Targeting HSP90 inhibits proliferation and induces apoptosis through AKT1/ERK pathway in lung cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 724192.
- [26] Caner A, Asik E, Ozpolat B. SRC signaling in cancer and tumor microenvironment [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1270: 57-71.
- [27] Roskoski R Jr. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 94: 9-25.
- [28] Liu W S, Kovacevic Z, Peng Z H, et al. The molecular effect of metastasis suppressors on Src signaling and tumorigenesis: New therapeutic targets [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(34): 35522-35541.
- [29] Giaccone G, Zucali P A. Src as a potential therapeutic target in non-small-cell lung cancer [J]. *Ann Oncol*, 2008, 19(7): 1219-1223.
- [30] Pang M, Jiang Y J, Huang Y Y, et al. MiR-654-3p targets SRC to suppress tumor growth in non-small cell lung cancer [J]. *Cell Mol Biol*, 2023, 69(4): 157-163.
- [31] Dong Y S, Chen J Y, Chen Y H, et al. Targeting the STAT3 oncogenic pathway: Cancer immunotherapy and drug repurposing [J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2023, 167: 115513.
- [32] Liu Z, Ma L, Sun Y M, et al. Targeting STAT3 signaling overcomes gefitinib resistance in non-small cell lung cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6): 561.
- [33] Zeng Z Y, Hu Y Y, Xiang J, et al. Cucurbitacin B targets

- STAT3 to induce ferroptosis in non-small cell lung cancer [J]. Eur J Pharmacol, 2024, 978: 176805.
- [34] Han Y G, Zhang Y, Tian Y, et al. The interaction of the IFN γ /JAK/STAT1 and JAK/STAT3 signalling pathways in EGFR-mutated lung adenocarcinoma cells [J]. J Oncol, 2022, 2022: 9016296.
- [35] Sun L T, Ding S N, Luo Q, et al. *Taxus wallichiana* var. *chinensis* (pilg.) florin aqueous extract suppresses the proliferation and metastasis in lung carcinoma via JAK/STAT3 signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 736442.
- [36] Khan A Q, Ahmed E I, Elareer N, et al. Curcumin-mediated apoptotic cell death in papillary thyroid cancer and cancer stem-like cells through targeting of the JAK/STAT3 signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(2): 438.
- [37] Yang C L, Liu Y Y, Ma Y G, et al. Curcumin blocks small cell lung cancer cells migration, invasion, angiogenesis, cell cycle and neoplasia through Janus kinase-STAT3 signalling pathway [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37960.
- [38] Zhang T X, Ma L J, Wu P F, et al. Gallic acid has anticancer activity and enhances the anticancer effects of cisplatin in non-small cell lung cancer A549 cells via the JAK/STAT3 signaling pathway [J]. Oncol Rep, 2019, 41(3): 1779-1788.

[责任编辑 齐静雯]