

基于网络药理学、分子对接技术和实验验证探究狼毒大戟治疗甲状腺癌的分子机制

韩晓雯^{1,3}, 马晨辉^{1,3}, 张佳怡^{1,3}, 黄晓东^{1,3}, 李维东^{1,3}, 陈昊^{1,2,3*}

1. 兰州大学第二医院, 甘肃 兰州 730030

2. 兰州大学第二医院 肿瘤外科, 甘肃 兰州 730030

3. 甘肃省环境肿瘤学重点实验室, 甘肃 兰州 730030

摘要:目的 基于网络药理学、分子对接技术和实验验证探究狼毒大戟治疗甲状腺癌的作用机制。方法 通过 SwissADME、Swiss Target Prediction 数据库筛选狼毒大戟活性成分和相关作用靶点; 利用 GeneCards、OMIM、DisGeNET 数据库筛选甲状腺癌靶点基因; 基于 STRING 平台和 Cytoscape 软件构建蛋白互作网络 (PPI)、狼毒大戟 - 有效活性成分 - 交集靶点网络以及筛选核心靶点; 使用 DAVID 数据库进行基因本体 (GO) 功能注释分析与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析; 利用 AutoDockTools 软件对狼毒大戟核心成分和关键靶点进行分子对接验证; Western blotting 分析狼毒大戟对表皮生长因子受体 (EGFR) /Janus 激酶 (JAK2) /信号转导因子和转录激活因子 3 (STAT3) 信号通路的作用。结果 共获得狼毒大戟潜在活性成分 38 种、成分靶点 488 个, 甲状腺癌靶点 3 050 个, 交集靶点 175 个; 狼毒大戟治疗甲状腺癌的生物过程包括磷酸化、蛋白磷酸化、细胞增殖正调控等, 相关信号通路涉及 EGFR/JAK2/STAT3、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、EGFR、肿瘤坏死因子 (TNF)、高级糖基化终末产物 - 受体 (AGE-RAGE)、凋亡、Th17 细胞分化等信号通路; 分子对接结果表明狼毒大戟治疗甲状腺癌的核心成分与 JAK2、EGFR、STAT3 具有显著的亲和力, 结合性能稳定; Western blotting 实验提示狼毒大戟内酯 A 呈浓度相关性抑制 EGFR/JAK2/STAT3 信号通路。结论 狼毒大戟可能通过调控多个关键靶点、多种生物学过程和多条信号通路, 尤其是 EGFR/JAK2/STAT3 信号通路发挥抗甲状腺癌效应, 为今后深入研究狼毒大戟对甲状腺癌的调控机制提供理论依据。

关键词: 狼毒大戟; 甲状腺癌; 网络药理学; 分子对接; 狼毒大戟内酯 A; 表皮生长因子受体/Janus 激酶/信号转导因子和转录激活因子 3 信号通路

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)02-0300-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.02.006

Molecular mechanism of *Euphorbia fischeriana* for the treatment of thyroid cancer based on network pharmacology, molecular docking technology and experimental verification

HAN Xiaowen^{1,3}, MA Chenhui^{1,3}, ZHANG Jiayi^{1,3}, HUANG Xiaodong^{1,3}, LI Weidong^{1,3}, CHEN Hao^{1,2,3}

1. The Second Hospital & Clinical Medical School Lanzhou University, Lanzhou 730030, China

2. Department of Surgical Oncology, The Second Hospital & Clinical Medical School Lanzhou University, Lanzhou 730030, China

3. Key Laboratory of the Environmental Oncology of Gansu Province, Lanzhou 730030, China

Abstract: Objective To investigate the action mechanism of *Euphorbia fischeriana* in treatment of thyroid cancer based on network pharmacology, molecular docking technology, and experimental validation. **Methods** Screening the main active ingredient and corresponding targets of *E. fischeriana* through databases such as SwissADME and Swiss Target Prediction. GeneCards, OMIM and DisGeNET databases were used to collect the target genes of thyroid cancer. PPI network and “*E. fischeriana* - active ingredient - intersection targets” network diagrams were constructed using the STRING platform and Cytoscape software, from which core targets

收稿日期: 2024-12-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82473266; 82160129); 甘肃省科技重大专项 (22ZD6FA054); 甘肃省创新驱动助力工程项目 (GXH20230817-14)

作者简介: 韩晓雯, 女, 硕士, 研究方向为消化系统肿瘤、甲状腺肿瘤。E-mail: 220220906420@lzu.edu.cn

*通信作者: 陈昊, 男, 主任医师, 博士, 博士生导师, 研究方向为消化系统肿瘤的综合治疗。E-mail: cry_chenh@lzu.edu.cn

were screened. DAVID database was applied for GO functional annotation analysis and KEGG pathway enrichment analysis, and molecular docking analysis validated binding affinity values for the core components and key targets via AutoDockTools software. Western blotting was assessed for its effects of *E. fischeriana* on EGFR/JAK2/STAT3 signaling pathway. **Results** A total of 38 potential effective constituents, 488 drug related targets, 3 050 thyroid cancer targets, and 175 overlapping targets were obtained. Biological processes mainly included phosphorylation, protein phosphorylation, and positive regulation of cell population proliferation, etc. Relevant signaling pathways involved EGFR/JAK2/STAT3, PI3K/Akt, MAPK, EGFR, TNF, AGE-RAGE, apoptosis, and Th17 cell differentiation signaling pathways. Molecular docking revealed that the core active component jolkinolide A was stable in docking with JAK2, EGFR, and STAT3, implied with significant affinity. Western blotting assay showed that *E. fischeriana* inhibited EGFR/JAK2/STAT3 signaling pathway in a concentration-dependent manner. **Conclusion** *E. fischeriana* can exert an antithyroid cancer effect by regulating multiple key targets, multiple biological processes and multiple pathways, especially EGFR/JAK2/STAT3 signaling pathway, which will provide theoretical reference for further in-depth investigating the regulatory mechanism of *E. fischeriana* on thyroid cancer.

Key words: *E. fischeriana*; thyroid cancer; network pharmacology; molecular docking; jolkinolide A; EGFR/JAK2/STAT3 signaling pathway

甲状腺癌是内分泌系统常见的恶性肿瘤之一,近 30 年来发病率呈持续升高且年轻化趋势。2020 年全球有 58.6 万新发甲状腺癌患者,甲状腺癌发病率在所有癌症中列第 9 位,女性发病率是男性的 3 倍^[1]。在我国,2022 年甲状腺癌新发病例数为 46.61 万例,发病率为 24.6/10 万,且女性发病年龄自 20~30 岁显著上升^[2]。目前,手术治疗、射频消融、¹³¹I 治疗、促甲状腺激素(TSH)抑制治疗是临床常见的治疗方式,但术后复发、甲状旁腺和喉返神经损伤、终身甲状腺素替代治疗等严重影响患者的生活质量,加重患者焦虑情绪。甲状腺癌归属于中医学“瘰疬”“石瘰”范畴,病因多为肝气郁结、气滞血淤、痰凝内生、为瘰为瘤^[3]。狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud. 大戟科大戟属多年生草本植物,始载于《神农本草经》,味辛,性平,全株有毒,根毒性强,具有破散癥瘕积聚功效。主要包括二萜、三萜、香豆素、甾醇类等多种活性成分^[4-6],对肝癌^[7]、肺癌^[8-9]、乳腺癌^[10]、胃癌^[11-12]、膀胱癌^[13]等多种癌症具有显著抑制效应。然而,国内外仅有 1 篇文献报道狼毒大戟活性成分 17-羟-岩大戟内酯 B 可能通过抑制有氧糖酵解、诱导凋亡发挥抗间变性甲状腺癌作用^[14]。网络药理学是一种基于生物分子网络分析“药物有效活性成分-疾病作用靶点”内在关联的新兴前沿学科,与中医学的整体论思想相符,近年来广泛应用于中医药研究领域^[15]。分子对接是用于研究配体-受体分子相互作用,并预测其结合方式和亲和力的一种理论模拟方法,在分析评估药物靶点筛选方面发挥关键作用。

基于此,本研究利用网络药理学方法、分子对接技术和实验进行验证,探讨狼毒大戟有效活性成

分、核心靶点及其治疗甲状腺癌的作用机制,旨在为今后临床深入研究提供科学依据,为甲状腺癌的治疗提供新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 狼毒大戟药物活性成分及相关靶点筛选

首先利用 Chemdraw 画出狼毒大戟的 2D 结构,将其导入 SwissADME 数据库(<http://www.swissadme.ch/>)进行吸收、分布、代谢、排泄(ADME)筛选。筛选条件如下:胃肠道吸收度(GI absorption): High 和 2 个 Yes 以上的类药性(DL)条件(Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge)。最后使用 Swiss Target Prediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库筛选可能性大于 0 的靶点作为上述狼毒大戟活性成分相关作用靶点。

1.2 甲状腺癌靶点基因的获取

通过在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、DisGeNET (<http://www.disgenet.org/>) 数据库中分别输入关键词“thyroid cancer”进行检索,合并去重后得到甲状腺癌的主要疾病靶点。

1.3 狼毒大戟-甲状腺癌共同靶点筛选

利用 Venny 2.1 在线作图平台(<https://bioinfo.p.cn/cnb.csic.es/tools/venny/>),将获得的狼毒大戟潜在活性成分靶点与甲状腺癌疾病靶点相互映射,绘制韦恩(Venn)图,从而获得交集基因,这些交集基因即为狼毒大戟治疗甲状腺癌的潜在靶点。

1.4 构建狼毒大戟-有效活性成分-交集靶点网络

将狼毒大戟及其有效成分、狼毒大戟-甲状腺癌的交集靶点导入到 Cytoscape 3.8.2 软件,构建“狼毒大戟-有效活性成分-交集靶点”网络,并对该

网络进行拓扑学分析。节点体积越大,表示自由度值越大。按自由度大小进行排序,排名前 5 位的成分即为狼毒大戟治疗甲状腺癌的核心活性成分。

1.5 狼毒大戟 - 甲状腺癌相互作用网络构建及核心靶点筛选

将狼毒大戟 - 甲状腺癌的交集靶点基因上传至 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 数据库构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络。物种设置为 “homo sapiens”, 最低相互作用评分设置为 0.4, 确保本研究的可信度, 其余参数保持默认设置, 结果储存为 TSV 格式, 将 TSV 文件导入 Cytoscape 3.8.2 中对 PPI 网络图进行可视化分析。运用 “Analyze Network” 分析网络拓扑参数, 以节点度值 (degree)、介数 (betweenness)、最短路径 (closeness) 均超过平均值为标准, 筛选出关键靶点, 并根据自由度值大小进行排序, 排名前 10 位的靶点基因即为狼毒大戟治疗甲状腺癌的核心靶点。

1.6 基因本体 (GO) 功能注释分析与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

将狼毒大戟 - 甲状腺癌共同靶点导入 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) 数据库进行 GO 功能注释分析和 KEGG 通路富集分析。标识符选择 “OFFICIAL_GENE_SYMBOL”, 物种设置为 “homo Sapiens”。分别选取 GO 功能注释中生物过程 (BP)、细胞成分 (CC)、分子功能 (MF) 的前 10 条和 KEGG 通路富集中前 30 条通路进行可视化分析。

1.7 分子对接

通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库获取主要活性成分的 2D 结构 (配体), 将其导入 ChemDrew 软件转化为 3D 结构; 通过 Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) 数据库获得关键靶点 3D 结构 (受体), 再将受体和配体上传到 AutoDockTools 1.5.6 (<http://autodock.scripps.edu/resources/tools>) 软件, 去除水分子和相应残基小分子配体, 进行分子对接, 并采用 Pymol 软件对接结果进行可视化分析。

1.8 实验验证

1.8.1 细胞株 人甲状腺癌 TPC-1 细胞株 (货号 FH1039) 购自上海富衡生物科技有限公司, 现保存在甘肃省环境肿瘤学重点实验室 -80 °C 冰箱中。TPC-1 细胞株培养在含 10% 胎牛血清 (FBS) + 89% 基础培养基 + 1% 青 - 链霉素双抗的 DMEM 高糖完全培养基中, 培养条件为无菌恒温、5% CO₂、温度

37 °C。

1.8.2 药物与试剂 岩大戟内酯 A (质量分数 ≥ 97%, 货号 B50559-5 mg) 购自上海源叶生物科技有限公司; DMEM 高糖培养基 (货号 11965092) 购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清 (货号 FSP500) 购自苏州依科赛生物科技股份有限公司; 胰酶消化液 (货号 G4001-100 ML)、青 - 链霉素溶液 (货号 G4003-100 ML)、PMSF (货号 G2008-1ML)、RIPA 裂解液 (货号 G2002-30 ML)、β-肌动蛋白 (β-actin) 抗体 (货号 GB15001) 均购自赛维尔生物科技有限公司; 表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体 (货号 18986-1-AP)、山羊抗兔/抗鼠 IgG 抗体 (货号 SA00001-2/SA00001-1) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司, p-Janus 激酶 (JAK2) 抗体 (货号 3776T)、JAK2 抗体 (货号 3230T)、p-信号转导因子和转录激活因子 3 (STAT3) 抗体 (货号 9145T)、STAT3 抗体 (货号 9139T) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.8.3 主要仪器 细胞恒温 CO₂ 培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司, 光学显微镜购自德国蔡司 (Zeiss) 公司, 电泳分析系统及设备购自美国 BIO-RAD 公司。

1.8.4 蛋白免疫印迹实验 以 0 (对照)、2、4、8 μg/mL 加入岩大戟内酯 A 到细胞量达 80% 以上、处于对数生长期且生长状态良好的 TPC-1 细胞中, 干预 24 h 后进行总蛋白提取, BCA 法对蛋白进行定量检测。蛋白上样, SDS-PAGE 胶电泳, 恒压 (220 V)、30~40 min。“夹心法” PVDF 膜电转; 恒流 (250 mA)、70 min (根据目的蛋白相对分子质量适时调整)。室温条件下用快速封闭液封闭 PVDF 膜 1 h 后加入相应一抗于 4 °C 摇床孵育过夜。第 2 天使用 TBST 洗膜 3 次后加入相应二抗于室温摇床孵育 1 h, 再次 TBST 洗膜 3 次后使用 ECL 系统曝光显影以检测内参和目的蛋白表达, 并使用 Image J 软件分析各条带灰度值。

2 结果

2.1 筛选狼毒大戟药物活性成分及收集基因靶点

利用 SwissADME 数据库筛选后获得 38 个狼毒大戟潜在活性成分, 见表 1。利用 Swiss Target Prediction 数据库进行靶点预测, 校正去重后共获得 38 种活性成分相对应的 488 个药物作用靶点。

2.2 甲状腺癌靶点筛选

利用 GeneCard、OMIM、DisGeNET 数据库检索甲状腺癌的疾病靶点, 去重后得到 3 050 个靶点。

表 1 狼毒大戟潜在活性成分

Table 1 Potential active ingredients of *E. fischeriana*

编号	活性成分
LD1	(4βS,8αS)-2-phenanthrenecarboxylicacid,4β, 5,6,7,8α, 9,10-octahydro-3-hydroxy-4β,8,8-trimethyl-methylester
LD2	2,4-二羟基-6-甲氧基苯乙酮
LD3	3-oxoatisane-16α,17-diol
LD4	3α-hydroxy-ent-16-kauran
LD5	15-羟基去氢松香酸
LD6	17-acetoxyjolkynolide B
LD7	2-phenanthrenyletha-one
LD8	ent-3β-(13S)-dihydroxyatis-16-en-14-one
LD9	antiquorin
LD10	araucarol
LD11	南洋杉酮
LD12	17-羟基岩大戟内酯 A
LD13	ebractenoid F
LD14	ent-(13S)-hydroxy-16-atisene-3,14-dione
LD15	ent-atisane-3β,16α,17-triol
LD16	ent-kaurane-3-oxo-16β,17-diol
LD17	ent-(13R,14R)-13,14-dihydroxyatis-16-en-3-one
LD18	ent-(13S)-13-hydroxyatis-16-ene-3,14-dione
LD19	ent-16β-H-3-oxokauran-17-ol
LD20	ent-atis-16-ene-3,14-dione
LD21	ent-kaurane-3β,16β,17-triol
LD22	euphonoid B
LD23	euphonoid C
LD24	euphonoid D
LD25	euphonoid E
LD26	euphonoid F
LD27	euphonoid G
LD28	fischeriabietane A
LD29	泽漆内酯 A
LD30	isopimara-7,15-dien-3-one
LD31	岩大戟内酯 A
LD32	岩大戟内酯 B
LD33	岩大戟内酯 E
LD34	langduin D
LD35	12-去氧佛波醇 13-棕榈酸酯
LD36	巨大戟二萜-3-肉豆蔻酸酯
LD37	巨大戟二萜-3-棕榈酸酯
LD38	丁香酸

2.3 狼毒大戟 - 甲状腺癌的交集靶点

利用 Venny 2.1 在线网站,生成狼毒大戟潜在作用靶点和甲状腺癌致病基因的 Venn 图,共获得 175 个交集靶点,见图 1。

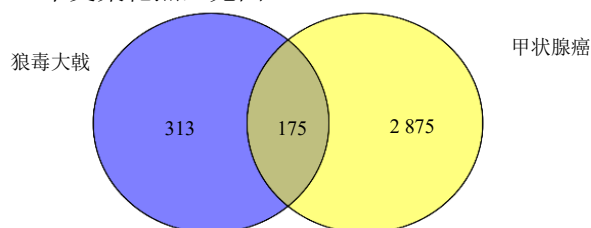


图 1 狼毒大戟 - 甲状腺癌共同作用靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of *E. fischeriana* and thyroid cancer

2.4 狼毒大戟 - 有效活性成分 - 交集靶点网络的构建

利用 Cytoscape 3.8.2 软件,以 175 个抗癌靶基因和 38 个狼毒大戟潜在活性成分构建“狼毒大戟 - 有效活性成分 - 交集靶点”网络图,如图 2 所示,由网络图可知,狼毒大戟治疗甲状腺癌的核心活性成分为 ent-(13S)-hydroxy-16-atisene-3,14-dione、ent-(13S)-13-hydroxyatis-16-ene-3,14-dione、ent-atis-16-ene-3,14-dione、isopimara-7,15-dien-3-one、岩大戟内酯 A。同一活性成分可对应多个交集靶点,多个活性成分也可对应同一交集靶点,这体现了狼毒大戟可以多成分、多靶点治疗甲状腺癌。

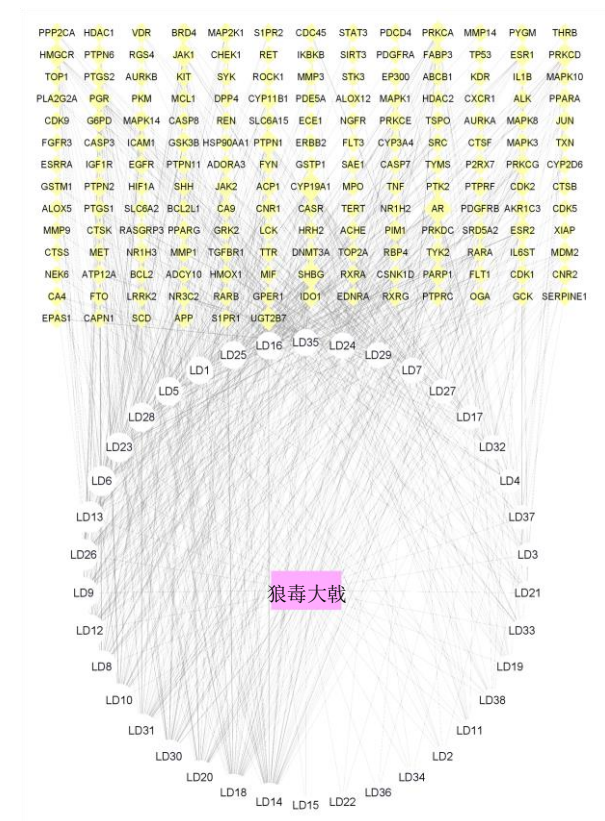


图 2 “狼毒大戟 - 有效活性成分 - 交集靶点”网络图

Fig. 2 “*E. fischeriana* - active ingredient - overlapping targets” network diagram

2.5 PPI 网络构建与核心靶点筛选

通过 STRING 数据库分析构建 PPI 网络,见图 3,共有 173 个节点和 2924 条相互作用的边,平均节点 degree 值 33.8。利用 Cytoscape 3.8.2 软件对 degree 值进行计算,并由高到低进行排序,见图 4,发现狼毒大戟治疗甲状腺癌的核心靶点(排名前 10)分别为 TP53、表皮生长因子受体 (EGFR)、肿

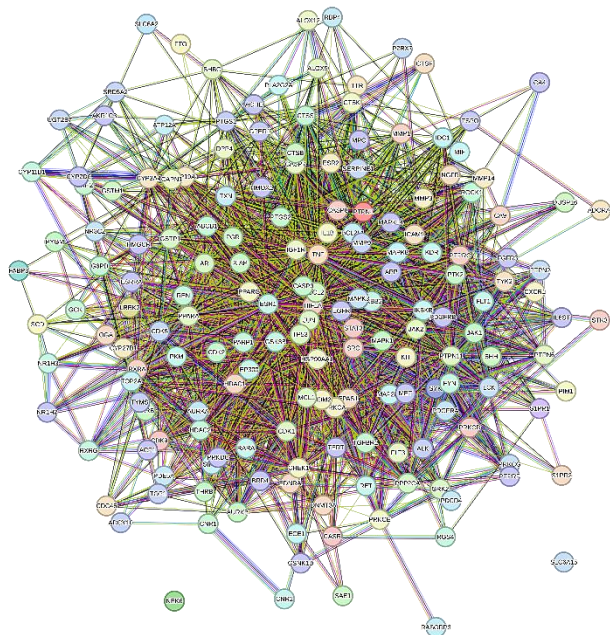


图 3 狼毒大戟 - 甲状腺癌靶蛋白 PPI 网络图
Fig. 3 PPI network diagram of *E. fischeriana*-thyroid cancer target protein

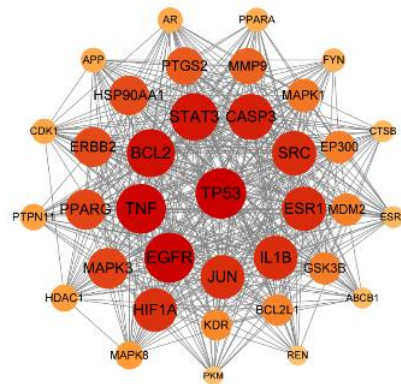


图 4 根据 degree 值由高到低排列的 PPI 网络图
Fig. 4 PPI network diagram ranked in a descending sequence by degree value

瘤坏死因子 (TNF)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、STAT3、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、雌激素受体 1 (ESR1)、白细胞介素 (IL)-1B、V-Jun 肉瘤病毒癌基因同源物 (JUN), 见表 2。其中 PPI 网络图节点越大、颜色越深意味该靶点越重要。

表 2 狼毒大戟治疗甲状腺癌的核心潜在靶点

Table 2 Core potential targets of *E. fischeriana* in the treatment of thyroid cancer

序号	靶点名称	degree 值	介数	最短路径
1	TP53	114	1 280.986 192 973 375 4	0.004 329 004 329 004 329
2	EGFR	113	1 499.096 774 193 765 7	0.004 329 004 329 004 329
3	TNF	112	1 562.377 362 522 040 0	0.004 291 845 493 562 232
4	Bcl-2	108	985.596 749 139 403 5	0.004 219 409 282 700 422
5	STAT3	106	906.299 021 992 857 7	0.004 201 680 672 268 907
6	CASP3	102	911.405 198 420 161 9	0.004 115 226 337 448 560
7	SRC	98	1 883.323 213 534 601 6	0.004 048 582 995 951 417
8	ESR1	98	1 107.870 875 368 057 6	0.004 048 582 995 951 417
9	IL-1B	97	860.772 751 821 323 7	0.004 032 258 064 516 129
10	JUN	97	722.916 164 619 184 9	0.004 032 258 064 516 129

2.6 GO 功能注释分析和 KEGG 通路富集分析

GO 功能注释分析显示 BP 共有 749 条, CC 共有 86 条, MF 共有 150 条。靶点主要 BP 包括磷酸化、蛋白磷酸化、细胞群增殖正调控等; CC 主要涉及细胞质、胞浆、细胞核等; MF 富集结果显示主要靶点功能涉及 ATP 结合、酶结合、蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白结合等, 见图 5, 由此可推测, 狼毒大戟可以通过调控多种生物学过程发挥抗甲状腺癌效应。KEGG 通路富集分析共得到 159 条通路, 主要富集于癌症通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) / 蛋白激酶 B (Akt)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、

EGFR、TNF、高级糖基化终末产物 - 受体 (AGE-RAGE)、凋亡、Th17 细胞分化等信号通路, 见图 6。其中, 共同靶点显著富集的通路为 EGFR/JAK2/STAT3 癌症相关通路, 故本研究选择 EGFR/JAK2/STAT3 通路进行后续研究。

2.7 分子对接验证

选择狼毒大戟治疗甲状腺癌的 degree 值排名前 5 位核心活性成分 ent-(13S)-hydroxy-16-atrisene-3, 14-dione、ent-(13S)-13-hydroxyatis-16-ene-3, 14-dione、ent-atris-16-ene-3, 14-dione、isopimar-7, 15-dien-3-one、岩大戟内酯 A 与 degree 值排名前 5 位的核心靶点

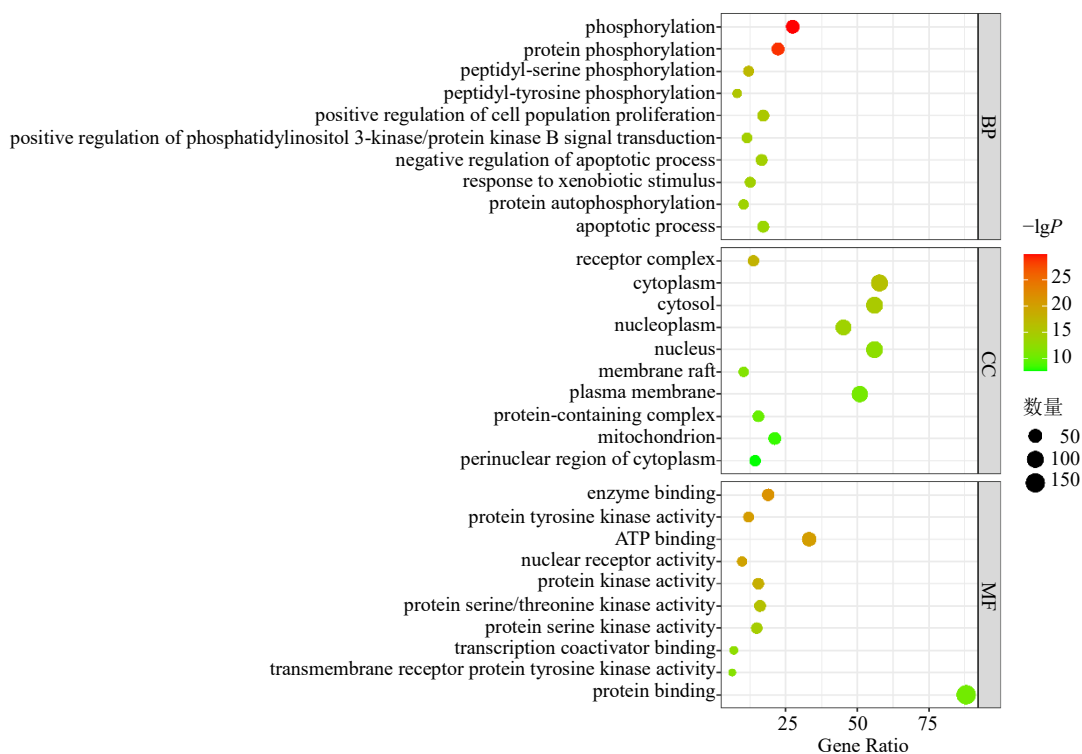


图 5 GO 功能注释分析气泡图

Fig. 5 Bubble chart of GO functional annotation analysis

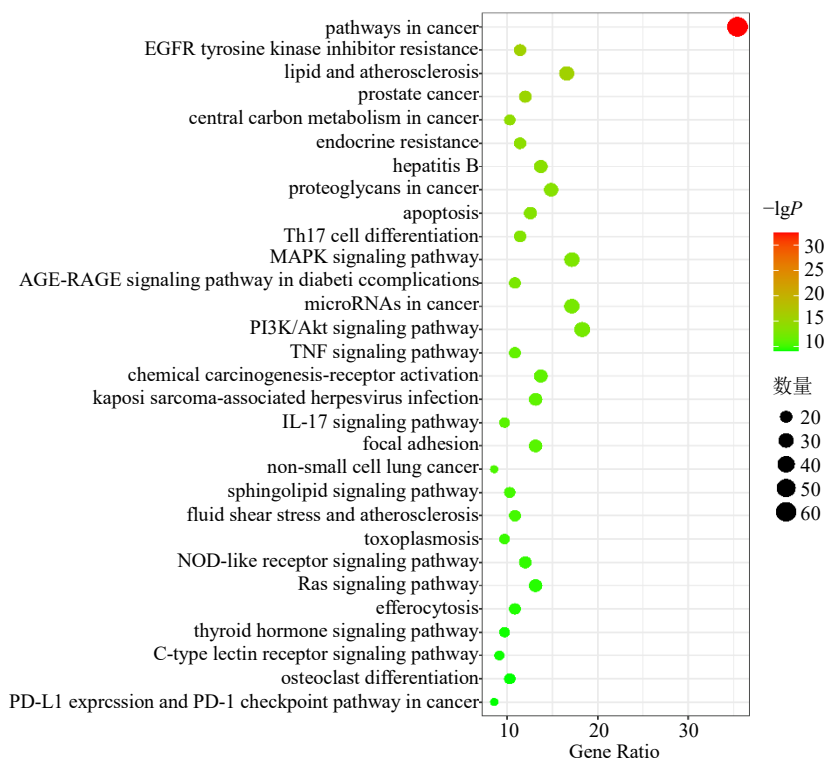


图 6 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 6 Bubble chart of KEGG pathway enrichment analysis

TP53、EGFR、TNF、Bcl-2、STAT3 和 KEGG 通路显著富集的 EGFR/JAK2/STAT3 癌症相关通路涉及的分子靶点 JAK2 进行分子对接。图 7 为核心活性成分与靶点分子对接的结合能热图（颜色越深，表示结合能值越低，即结合效力越强，配体-受体结合构象越稳定）。既往文献报道，结合能 < -5.0 kcal/mol ($1\text{ cal}=4.2\text{ J}$)，亲和力较好；当结合能 < -7.0 kcal/mol 时，具有显著的亲和力^[16]。结果发现，根据分子对接所选取的核心活性成分与关键靶点的结合能均小于 -5.0 kcal/mol。说明这些成分与靶点具有良好的结合活性，分子构象结合稳定。其中，岩大戟内酯 A 与 JAK2、EGFR、STAT3 具有显著的亲和力（结合能均小于 -7.0 kcal/mol，且排名前 3 位）。进一步证实了狼毒大戟可能通过调控 EGFR/JAK2/STAT3 癌症相关通路发挥抗甲状腺癌作用。岩大戟内酯 A 与 JAK2、EGFR、STAT3 的分子对接可视化图见图 8。

2.8 岩大戟内酯 A 对 EGFR/JAK2/STAT3 信号通路的影响

Western blotting 结果显示，相较于对照组，岩

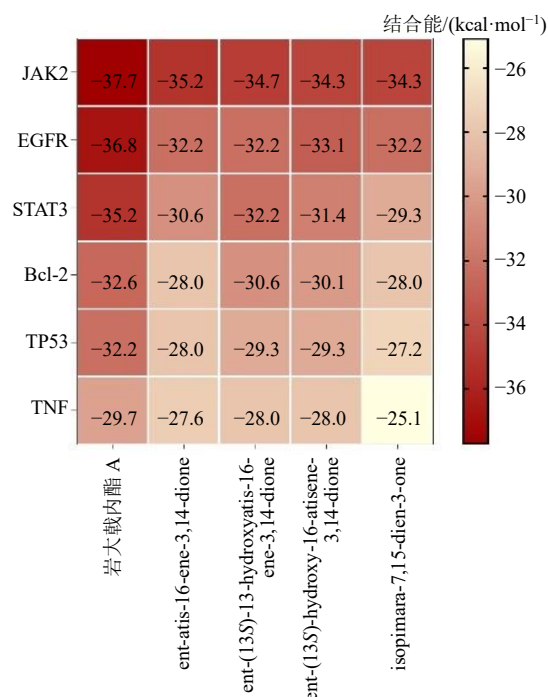


图 7 核心活性成分与靶点分子对接的结合能热图

Fig. 7 Heatmap of binding energy for molecular docking between core active ingredients and target molecules

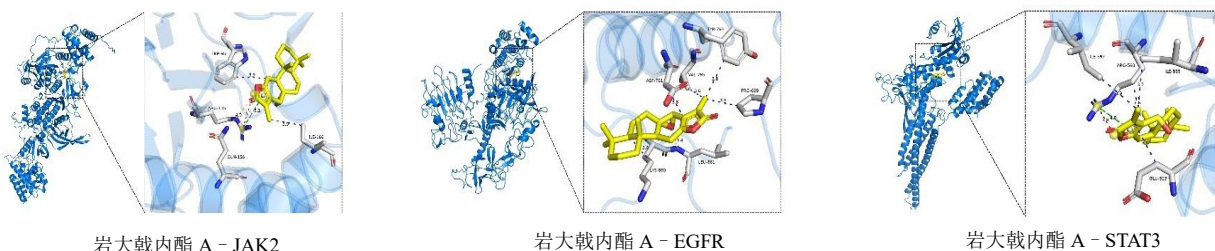


图 8 分子对接可视化图

Fig. 8 Visualization diagram of molecular docking

大戟内酯 A 可以显著下调 EGFR、p-JAK2、p-STAT3 的表达水平 ($P<0.001$)，且抑制效应呈浓度相关性，见图 9，提示狼毒大戟可能通过调控 EGFR/JAK2/STAT3 信号通路发挥抗甲状腺癌作用。

3 讨论

中医药作为中国传统文化的瑰宝，在甲状腺癌的预防和治疗领域彰显出独特优势。从病因来看，中医认为甲状腺癌的发生与饮食不当、情志失调等多种因素有关，导致人体气血瘀滞，痰湿壅结于颈前，中医学将其称为“瘰疬”。在治疗方面，中医药可以通过软坚散结、扶正补虚、疏肝理气、活血化瘀等作用，调节肿瘤内环境，抑制甲状腺癌细胞增殖、侵袭和迁移，诱导凋亡，促进自噬，逆转耐药

等多方面发挥抗癌效应^[17]。狼毒大戟作为一味传统中药，被广泛用于治疗多种癌症，尤其是二萜类化合物具有良好的抗肿瘤疗效^[18-19]。Zhang 等^[12]发现岩大戟内酯 B（狼毒大戟二萜类化合物之一）可诱导 MKN45 胃癌细胞凋亡，也可以激活 ATR/CHK1/CDC25A/Cdk2 信号通路诱导 MKN45 细胞 DNA 损伤导致 S 期停滞，最终有效抑制胃癌细胞生长。此外，Ma 等^[20]研究发现，12-去氧佛波醇-13-棕榈酸酯可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路抑制白血病细胞株 HL60 细胞增殖并诱导其凋亡。本研究通过网络药理学、分子对接技术和实验验证探讨狼毒大戟的有效活性成分、关键靶点及治疗甲状腺癌的分子机制。

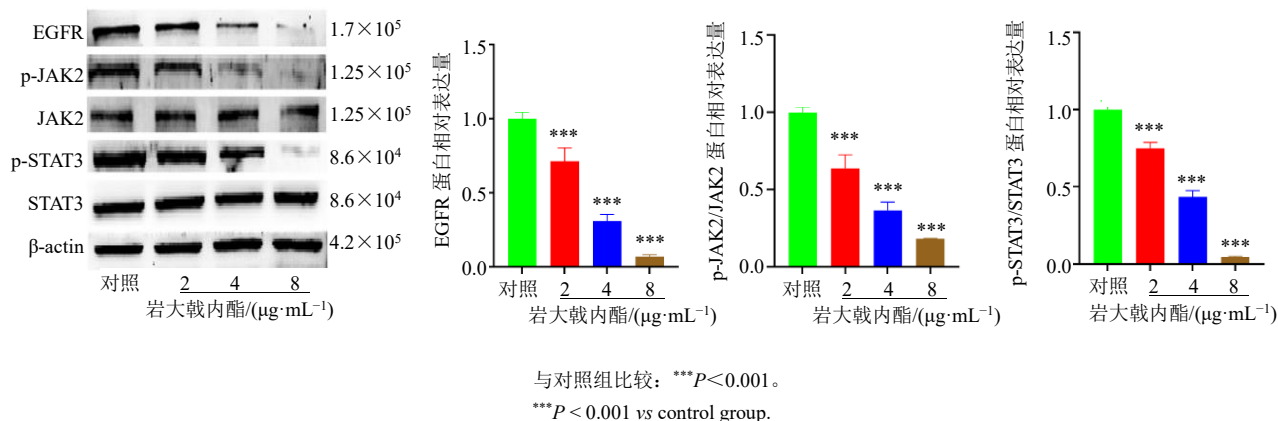


图 9 岩大戟内酯 A 对 EGFR、p-JAK2、p-STAT3 蛋白相对表达水平的影响

Fig. 9 Effect of jolkinolide A on the protein expression of EGFR, p-JAK2, and p-STAT3

本研究根据公认的 ADME 筛选条件筛选鉴定出 38 种狼毒大戟活性化合物, 其中岩大戟内酯 A、12-deoxyphorbol-13-palmitate 等多种化合物的抗癌活性已有大量文献报道^[21-22]。基于 Swiss Target Prediction 数据库, 预测了 38 种活性化合物相对应的 488 个药物作用靶点。结合甲状腺癌的疾病相关靶点进一步构建狼毒大戟-有效活性成分-交集靶点网络, 筛选出狼毒大戟治疗甲状腺癌的核心活性成分包括 ent-(13S)-hydroxy-16-atrisene-3,14-dione、ent-(13S)-13-hydroxyatis-16-ene-3,14-dione、ent-atris-16-ene-3,14-dione、isopimar-7,15-dien-3-one、岩大戟内酯 A。通过 STRING 数据库构建 PPI 网络图发现, 狼毒大戟抗甲状腺癌的核心靶点包括 TP53、EGFR、TNF、Bcl-2、STAT3、CASP3、SRC、ESR1、IL-1B、JUN。研究表明, 这些核心靶点与肿瘤细胞增殖、侵袭、迁移、凋亡、上皮间质转化、细胞周期调控等生物学过程密切相关。如 TP53, 一种抑癌基因, 位于染色体 17p13.1, 目前已证实参与肿瘤细胞增殖、DNA 修复、调控细胞周期停滞、促进细胞凋亡等恶性生物学过程, 可作为评估肿瘤治疗和预后的潜在靶标^[23]。TNF 可与肿瘤细胞表面的 TNF 受体 (TNFR) 结合, 招募一系列接头蛋白如 TRADD, 从而激活 Caspase 级联反应, 诱导肿瘤细胞凋亡。TNF 也可以诱导多种炎症因子和趋化因子的产生, 在免疫细胞激活、肿瘤进展方面发挥重要作用。此外, 有学者研究发现, TNF 通过诱导上皮间质转化 (EMT) 以促进甲状腺癌细胞株 TPC-1 的侵袭转移^[24]。Bcl-2 作为细胞凋亡的代表基因, 可通过抑制线粒体细胞色素 C 释放、激活 Caspase 诱导程序性细胞死亡^[25]。EGFR 是一种跨膜糖蛋白受体

酪氨酸激酶, 定位于细胞膜上, 显著高表达能够促进甲状腺癌细胞异常增殖、迁移、多发转移和血管生成^[26]。研究发现, EGFR 发生突变后, 可与 TNF- α 、EGF 等活性因子相互结合, 从而激活下游信号通路, 促进肿瘤的发生发展。STAT3 参与多种生物学功能的信号转录活化因子, 在细胞增殖、分化、代谢和凋亡中发挥核心作用, 异常的 STAT3 激活会诱导 c-Myc 和 CyclinD1 的持续表达, 调节癌细胞的生长、转移等环节^[27-28]。JAK2 是酪氨酸激酶 JAK 家族中重要成员, 作为 STAT3 的上游因子, 其持续激活有助于上皮间质转化, 从而驱动肿瘤的侵袭、转移, 进一步影响患者的预后^[29]。本研究选择狼毒大戟治疗甲状腺癌的核心活性成分 (degree 值排名前 5 位) 作为分子对接的配体, 筛选 PPI 网络中自由度值排名前 5 位的核心靶点 (TP53、EGFR、TNF、Bcl-2、STAT3) 和 KEGG 通路显著富集的 EGFR/JAK2/STAT3 癌症相关通路涉及的分子靶点 JAK2 作为分子对接的受体, 发现上述核心活性成分与关键靶点的结合能均小于 -5.0 kcal/mol, 说明这些成分与靶点具有良好的结合力, 分子构象结合稳定, 进一步佐证了狼毒大戟能够通过多成分、多靶点发挥抗癌效应, 符合中医系统性、整体性的特点。此外, 本研究还发现岩大戟内酯 A 与 JAK2、EGFR 和 STAT3 具有显著的亲和力, 说明狼毒大戟可能通过调控 EGFR/JAK2/STAT3 癌症相关通路发挥抗甲状腺癌作用。

许多研究已证实, EGFR/JAK2/STAT3 信号通路参与调节肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭, 诱导血管生成, 维持干细胞分化等恶性生物学过程^[30-32], 提示该信号通路可以作为药物发挥抗肿瘤作用的靶

标。本研究中, KEGG 通路富集分析得到共同靶点显著富集的通路为癌症相关通路, 结合分子对接结果, 推测狼毒大戟可能通过 EGFR/JAK2/STAT3 癌症相关通路实现抗甲状腺癌作用。为了验证推测, 本研究通过 Western blotting 实验发现岩大戟内酯 A 呈浓度相关性下调甲状腺癌 TPC-1 细胞中 EGFR 的表达, 抑制 JAK2 和 STAT3 蛋白的磷酸化, 表明抑制 EGFR/JAK2/STAT3 癌症相关通路的确是狼毒大戟发挥抗癌效应的关键机制之一。

综上所述, 本研究基于网络药理学方法阐述了狼毒大戟通过“多成分、多靶点、多通路”模式治疗甲状腺癌的潜在机制。结果表明, 潜在作用机制可能是狼毒大戟有效活性成分岩大戟内酯 A 与 JAK2、EGFR、STAT3、Bcl-2、TP53、TNF 等关键靶点共同作用(主要涉及 EGFR/JAK2/STAT3 癌症相关通路)来实现的。本研究为狼毒大戟治疗甲状腺癌提供了新的理论依据和治疗思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
- [2] 何林烨, 王艺超, 李志辉. 2022 年中国甲状腺癌流行情况分析: 基于《中国肿瘤登记年报》2005 - 2018 年数据 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2024, 31(7): 790-795.
- [3] 邵嘉锴, 闵晓俊, 赵勇, 等. 甲状腺癌中医药治疗研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2020, 16(7): 192-195.
- [4] 王晓阳, 康廷国, 孟宪生. 狼毒大戟萜类化学成分及抗肿瘤活性研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(8): 30-35.
- [5] Li Y N, He J, Zhang J, *et al.* Existing knowledge on *Euphorbia fischeriana* Steud. (Euphorbiaceae): Traditional uses, clinical applications, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114095.
- [6] 史影雪, 赫军, 张佳, 等. 狼毒大戟化学成分研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(8): 2107-2111.
- [7] Zhao J, Tian X C, Zhang J Q, *et al.* Mechanism exploration of *Euphorbia fischeriana* Steud. for liver cancer based on aspartic acid identification in metabolomics [J]. *Chin J Integr Med*, 2024, 30(6): 507-514.
- [8] 孙悦, 封佳欣, 何旭, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨狼毒大戟治疗肺癌的作用机制 [J]. *延边大学学报: 自然科学版*, 2023, 49(2): 175-182.
- [9] Shen L, Zhang S Q, Liu L, *et al.* Jolkinolide A and jolkinolide B inhibit proliferation of A549 cells and activity of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 223-237.
- [10] Wang Y, Shen S Y, Liu L, *et al.* Jolkinolide B inhibits proliferation or migration and promotes apoptosis of MCF-7 or BT-474 breast cancer cells by downregulating the PI3K-Akt pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 282: 114581.
- [11] Ma C H, Gao L, Song K W, *et al.* Jolkinolide B inhibits gastric cancer growth by targeting the PANoptosis molecular switch Caspase-8 [J]. *J Cancer*, 2024, 15(18): 6038-6051.
- [12] Zhang H, Qian J Y, Jin M, *et al.* Jolkinolide B induces cell cycle arrest and apoptosis in MKN45 gastric cancer cells and inhibits xenograft tumor growth *in vivo* [J]. *Biosci Rep*, 2022, 42(6): BSR20220341.
- [13] Wang K, Yang J C, Jang Y J, *et al.* 19-(Benzoyloxy)-19-oxojolkinolide B (19-BJB), an ent-abietane diterpene diepoxide, inhibits the growth of bladder cancer T24 cells through DNA damage [J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0248468.
- [14] Yang L, Shi W Y, Li D H, *et al.* Study on the mechanism of 17-hydroxy-jolkinolide B on anaplastic thyroid cancer cell [J]. *Am J Med Sci*, 2024, 24: S0002-9629(24)01470-8.
- [15] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的研究应用与挑战 [J]. *中草药*, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [16] 叶宇, 王玉, 竹炳, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨杜仲治疗先兆流产的作用机制 [J]. *现代药物与临床*, 2025, 40(1): 63-70.
- [17] 向中山, 王立祚, 张格松, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨中医药治疗甲状腺癌研究进展 [J/OL]. *中医学报* [2025-02-06]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1411.R.20240905.1038.002.html>.
- [18] 张洲, 朱朋艳, 马金蓉, 等. 狼毒大戟化学成分及抗肿瘤活性研究 [J]. *中南药学*, 2023, 21(3): 574-581.
- [19] Jian B Y, Zhang H, Han C C, *et al.* Anti-cancer activities of diterpenoids derived from *Euphorbia fischeriana* Steud [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 387.
- [20] Ma L W, Chen Z, Li J, *et al.* DP from *Euphorbia fischeriana* S. mediated apoptosis in leukemia cells via the PI3k/Akt signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 113889.
- [21] Bailly C. Yuexiandajisu diterpenoids from *Euphorbia ebracteolata* Hayata (Langdu roots): An overview [J]. *Phytochemistry*, 2023, 213: 113784.
- [22] Yan X L, Zhang J S, Huang J L, *et al.* Euphonoids A-G, cytotoxic diterpenoids from *Euphorbia fischeriana* [J]. *Phytochemistry*, 2019, 166: 112064.

- [23] Fu H Y, Zhou H R, Qiu Y Y, *et al.* SEPT6_TRIM33 gene fusion and mutated TP53 pathway associate with unfavorable prognosis in patients with B-cell lymphomas [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 765544.
- [24] 吕男男, 高芸, 单忠艳. 肿瘤坏死因子- α 通过诱导上皮间质转化促进乳头状甲状腺癌细胞的侵袭转移 [J]. *中国医科大学学报*, 2019, 48(8): 747-751.
- [25] Zhang B W, Fan Y M, Cao P X, *et al.* Multifaceted roles of HSF1 in cell death: A state-of-the-art review [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(2): 188591.
- [26] Ferrari S M, Patrizio A, Stoppini G, *et al.* Recent advances in the use of tyrosine kinase inhibitors against thyroid cancer [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2024, 25(12): 1667-1676.
- [27] El-Tanani M, Al Khatib A O, Aladwan S M, *et al.* Importance of STAT3 signalling in cancer, metastasis and therapeutic interventions [J]. *Cell Signal*, 2022, 92: 110275.
- [28] Tang J C, Ren Y G, Zhao J, *et al.* Shikonin enhances sensitization of gefitinib against wild-type EGFR non-small cell lung cancer via inhibition PKM2/stat3/cyclinD1 signal pathway [J]. *Life Sci*, 2018, 204: 71-77.
- [29] Fan X H, Fu H T, Xie N, *et al.* Inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway by panaxadiol limits the progression of pancreatic cancer [J]. *Aging*, 2021, 13(19): 22830-22842.
- [30] Kang D Y, Sp N, Kim D H, *et al.* Salidroside inhibits migration, invasion and angiogenesis of MDA-MB 231 TNBC cells by regulating EGFR/Jak2/STAT3 signaling via MMP2 [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(2): 877-885.
- [31] Sp N, Kang D Y, Lee J M, *et al.* Mechanistic insights of anti-immune evasion by nobiletin through regulating miR-197/STAT3/PD-L1 signaling in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9843.
- [32] Zhang Y P, Wang D, Zhao Z, *et al.* Nephronectin promotes cardiac repair post myocardial infarction via activating EGFR/JAK2/STAT3 pathway [J]. *Int J Med Sci*, 2022, 19(5): 878-892.

[责任编辑 高源]