基于网络毒理学探讨邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯对非小细胞肺癌潜在作用机制

刘灏萱[1]，牟 彪[1]，徐 洋[1]，徐洋洋[1]，王 东[2,3*]

1. 内蒙古民族大学 临床医学院，内蒙古 通辽 028000
2. 内蒙古民族大学附属医院，内蒙古 通辽 028000
3. 内蒙古自治区蒙医（恶性肿瘤）临床医学研究中心，内蒙古 通辽 028000

摘 要：目的 基于网络毒理学、分子对接和分子动力学模拟探讨邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯（DEHP）与非小细胞肺癌相关的分子靶点及作用机制。**方法** 整合 GEO 数据库中非小细胞肺癌相关转录组数据，通过差异表达分析和加权基因共表达网络分析（WGCNA）筛选疾病相关基因。结合 ChEMBL、SwissTargetPrediction、SEA 数据库获取 DEHP 候选靶点，开展蛋白相互作用网络（PPI）分析、基因本体论（GO）功能及京都基因和基因组百科全书（KEGG）通路富集分析，并采用分子对接、100 ns 分子动力学模拟及分子力学-泊松-玻尔兹曼表面积（MM-PBSA）结合自由能计算评估候选蛋白与 DEHP 的相互作用。**结果** 共筛选获得 5 136 个差异表达基因及 138 个 DEHP 候选靶点，经交集分析获得 54 个 DEHP 与非小细胞肺癌的潜在关联靶点。PPI 网络显示基质金属蛋白酶（MMP）9、MMP2、信号传导及转录激活蛋白 1（STAT1）等蛋白处于网络核心位置。GO 功能及 KEGG 通路富集分析提示，相关靶点主要涉及细胞外基质重塑、蛋白水解及相关信号转导等生物学过程。分子对接结果显示，DEHP 与多个候选蛋白具有一定结合潜力，其中 MMP9、MMP7 与 DEHP 的预测结合能分别为−8.0、−6.0 kcal/mol（1 cal＝4.2 J）。分子动力学模拟显示，MMP7–DEHP 和 MMP9–DEHP 复合物在 100 ns 模拟过程中均表现出相对稳定的构象特征。MM-PBSA 分析结果显示，2 种复合物的结合自由能分别为−136.38、−109.01 kJ/mol，范德华作用和疏水相互作用可能是维持复合物稳定的主要因素。**结论** DEHP 可能通过多靶点、多通路网络参与非小细胞肺癌相关生物学过程，其中 MMP 家族介导的细胞外基质降解和组织重塑可能是重要方向。MMP7 和 MMP9 可作为进一步探索相关分子机制的候选靶点。

关键词：网络毒理学；邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯；非小细胞肺癌；基质金属蛋白酶 7；基质金属蛋白酶 9

中图分类号：R965 **文献标志码：**A **文章编号：**1674 - 5515(2026)10 - 2784 - 14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.10.005

Mechanisms of di-(2-ethylhexyl) phthalate in non-small cell lung cancer based on network toxicology

LIU Haoxuan[1], MU Biao[1], XU Yang[1], XU Yangyang[1], WANG Dong[2,3]

1. School of Clinical Medicine, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, China
2. Affiliated Hospital of Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, China
3. Inner Mongolia Clinical Medical Research Center of Mongolian Medicine (Malignant Tumors), Tongliao 028000, China

Abstract: Objective To investigate the molecular targets and mechanisms linking di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) to non-small cell lung cancer based on network toxicology, molecular docking, and molecular dynamics simulation. **Methods** non-small cell lung cancer-related transcriptomic data from the GEO database were integrated, and disease-related genes were screened using differential expression analysis and weighted gene co-expression network analysis (WGCNA). DEHP-related candidate targets were obtained from the ChEMBL, SwissTargetPrediction, and SEA databases. PPI network analysis, GO functional enrichment, and KEGG pathway enrichment analyses were performed. Molecular docking, 100-ns molecular dynamics simulation, and MM-PBSA binding free-energy calculation were further used to evaluate the potential interactions between candidate proteins and DEHP. **Results** A total of 5 136

收稿日期： 2026-07-09

基金项目：内蒙古自治区自然基金项目（2024MS08067）；内蒙古自治区本级事业单位引进人才科研启动支持项目（RCQD19003）；内蒙古自治区研究生科研创新项目（KC2025074S）

作者简介：刘灏萱，男，硕士，研究方向为内科学。E-mail: m15148762345@163.com

***通信作者：**王 东，主任医师，博士，研究方向为肿瘤学。E-mail: wangdong123567@163.com

differentially expressed genes and 138 DEHP candidate targets were identified, and 54 potential DEHP- non-small cell lung cancer-associated targets were obtained by intersection analysis. The PPI network showed that MMP9, MMP2, STAT1, and other proteins occupied central positions in the network. GO functional and KEGG pathway enrichment analyses suggested that these targets were mainly involved in biological processes such as extracellular matrix remodeling, proteolysis, and related signal transduction. Molecular docking showed that DEHP had potential binding affinity with several candidate proteins, among which the predicted binding energies of MMP9 and MMP7 with DEHP were −8.0 and −6.0 kcal/mol (1 cal = 4.2 J), respectively. Molecular dynamics simulation showed that both MMP7-DEHP and MMP9-DEHP complexes exhibited relatively stable conformational characteristics during the 100-ns simulation. MM-PBSA analysis showed that the binding free energies of the two complexes were −136.38 and −109.01 kJ/mol, respectively, suggesting that van der Waals and hydrophobic interactions may be the main factors maintaining complex stability. **Conclusion**　DEHP may participate in non-small cell lung cancer-related biological processes through a multi-target and multi-pathway network, in which MMP-mediated extracellular matrix degradation and tissue remodeling may represent important mechanisms. MMP7 and MMP9 may serve as candidate targets for further exploration of related molecular mechanisms.

Key words: network toxicology; di-(2-ethylhexyl) phthalate; non-small cell lung cancer; MMP7; MMP9

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯[di-(2-ethylhexyl) phthalate，DEHP]是常见的邻苯二甲酸酯类增塑剂，可通过食品包装、室内环境及日用品等途径进入人体。既往研究主要关注其生殖、发育、免疫及代谢毒性[1]，近年来也开始关注其与肿瘤发生发展之间的联系。DEHP 与直肠癌[2]、多发性骨髓瘤[3]、前列腺癌[4]、甲状腺癌[5]、乳腺癌[6]、膀胱癌[7]、胰腺癌[8]、食管鳞癌[9]等进展有关。非小细胞肺癌约占所有肺癌的 80%，约 75%的患者发现时已处于中晚期，5 年生存率很低。已有研究证明，DEHP 可以通过核因子-κB（NF-κB）介导的白细胞介素（IL）-6 上调，刺激非小细胞肺癌的迁移和侵袭[10]。张雅婷[11]研究发现双酚 A 和 DEHP 可促进二乙基亚硝胺、*N*-甲基-*N*-亚硝基脲和 *N*,*N*-双(2-羟丙基)亚硝胺联合诱导模型中肺部肿瘤的发生，发挥促癌作用，且二者联合作用更明显，从而增加雌性大鼠肺部肿瘤发生风险。

网络毒理学是一门融合了生物信息学、大数据挖掘、基因组学及其他相关技术手段的新兴交叉学科，它为研究与疾病发生相关的毒理学通路及分子机制提供了有效方法[12]。该研究策略有别于传统的单靶点、单药物研究模式，转向以多靶点为核心的研究思路，有助于揭示疾病网络和毒物相关网络中基因、蛋白质与代谢物之间复杂的相互作用。将计算机科学和统计学融合到医学问题，更加精确的解决医学难题[13]。分子对接和分子动力学模拟可以通过预测结合模式、亲和力以及生成复合物的结构稳定性，对配体－蛋白相互作用进行详细评估[14]。既往研究已从细胞实验层面提示 DEHP 与非小细胞肺癌相关生物学过程存在联系，但其潜在关联靶点及多通路作用网络仍有待进一步探索。因此，本研究整合非小细胞肺癌转录组数据与 DEHP 候选靶点，结合网络毒理学、分子对接及分子动力学模拟，筛选潜在关联靶点并分析其相关生物学过程，为后续作用机制验证提供研究线索。

1　方法

1.1　疾病数据获取

查询 GEO 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo），将“non-small cell lung cancer”设为搜索词。数据类型选取“series”，研究类型选为“expression profiling by array”。物种选取“homo sapiens”同时注意数据中的细胞类型为非小细胞肺癌且存在完整对照组与实验组，样本数量大于 30。最终选取 GSE19804、GSE75037 数据集作为训练组数据进行整合，下载相关数据集及平台文件。

1.2　疾病数据预处理

使用 R 语言（4.5.1）limma 包（3.66.0）对数据集的基因表达数据进行预处理：合并重复探针，对未对数转换的数据执行 $\log_2$ 转换，通过分位数标准化校正样本间偏差，最终按分组整合数据并输出标准化矩阵文件。通过 R 语言 sva 包（3.56.0）对 2 个标准化表达数据集进行整合，筛选共有交集基因后合并矩阵，使用 ComBat 算法进行批次效应校正，获得无批次偏差的整合表达数据。使用 ggplot2 包（4.0.2）绘制批次校正前后的基因表达箱线图。并对批次校正前后的表达矩阵进行主成分分析（PCA），通过样本聚类分布评估批次效应的去除效果。

1.3　差异基因

对训练组数据使用 limma 包（3.66.0）筛选差异表达基因（$P_{adj}<0.05$，$|\log_2FC|>0.585$），并采用加权基因共表达网络分析（WGCNA）分析基因共表达模块及其与表型的相关性。将差异表达基因与关

键模块基因取交集，作为后续 DEHP－疾病交集分析的候选疾病基因。

1.4 DEHP 数据获取

通过 PubChem 网站确定 DEHP 结构及相关信息。在 ChEMBL 网站（https://www.ebi.ac.uk/chembl/）、SwissTargetPrediction 平台（https://www.swisstargetprediction.ch/）、SEA 平台（https://sea.bkslab.org/）查询化合物相关靶点，并绘制韦恩图，将靶点取并集用于后续研究。

1.5 DEHP 与疾病交集靶点分析

通过 R 语言 ggvenn 包（0.1.19）汇总潜在靶点并绘制韦恩图；将靶点上传至 STRING 数据库（https://cn.string-db.org/cgi/input?sessionId=bgJepzqaWVV2&input_page_show_search=on）进行蛋白相互作用（PPI）分析，物种设定为“homo sapiens”并隐藏未连接靶点。将生成的 PPI 网络 TSV 文件导入 Cytoscape 3.10.3 软件实施可视化分析。使用 CytoNCA 插件进行聚类分析（设置分析为介数中心性、接近中心性、度中心性、特征向量中心性），依据综合评分筛选出核心靶点。随后将交集靶点导入 DAVID 数据库进行基因本体论（GO）功能富集分析和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析，并以 $P<0.05$ 作为显著富集筛选阈值。

1.6 分子对接

根据候选靶点进行分子对接。通过 PubChem 下载 DEHP 的 SDF 结构，使用 Chem3D（23.0.1）进行能量最小化并导出 PDBQT 文件；基于 GeneCards 数据库及 UniProt 数据库下载目标蛋白结构，使用 CB-Dock2（2022）进行分子对接和可视化。

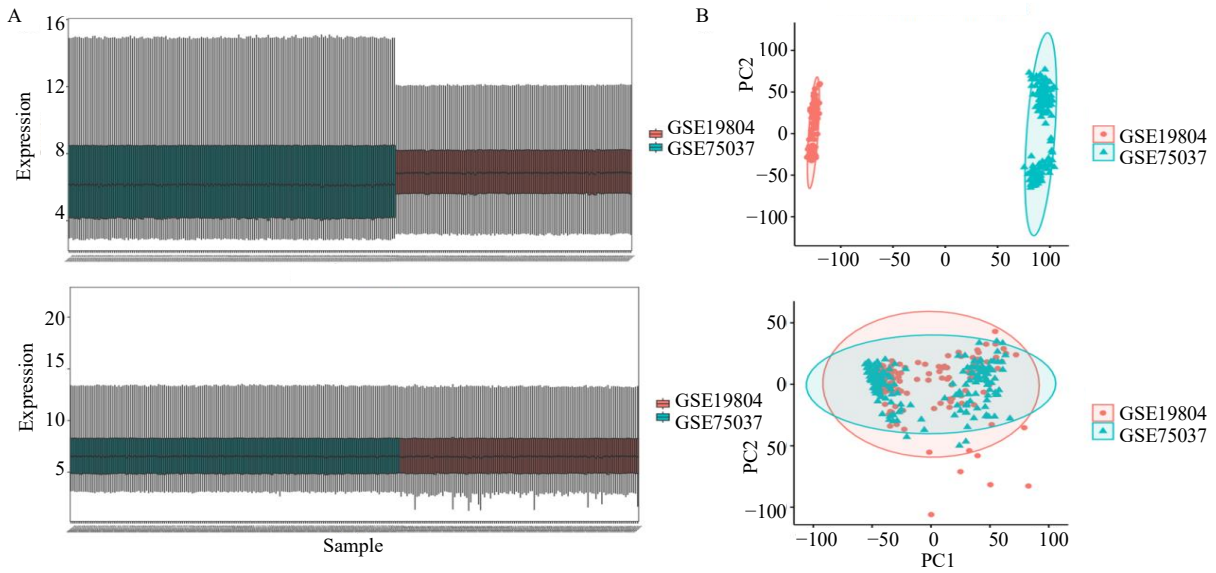
1.7 分子动力学

综合 PPI 网络拓扑参数、分子对接结合能及蛋白功能。选择合适蛋白进行后续分子动力学模拟对象。使用 GROMACS（2023.2）分子动力学模拟软件，对蛋白质－配体复合物体系进行 100 ns 全原子分子动力学模拟。蛋白质受体使用 CHARMM36 力场建模，配体小分子通过 sobtop 1.0 程序进行 GAFF（Generalized Amber Force Field）力场参数化。采用 SPC/E 水模型构建溶剂化体系，经能量最小化、退火预平衡、NVT/NPT 系综预平衡后，进行最终的生产动力学模拟，并绘制相关图片。

2 结果

2.1 疾病数据收集与处理

对 GSE19804、GSE75037 数据集作为训练组数据进行整合。GSE19804 纳入 120 例（对照组 60 例、疾病组 60 例），GSE75037 纳入 166 例（对照组 83 例、疾病组 83 例），合计 286 例。经 ComBat 算法进行批次效应校正后，获得无批次偏差的整合表达数据，见图 1A。经 PCA 分析再次证实，校正后表达分布更接近，主成分分布重叠增加，不同样本间的聚类模式明显改善，见图 1B。



A-ComBat 校正前（上）与校正后（下）的样本表达分布箱线图；B-校正前（上）与校正后（下）的主成分分析图。
A-Boxplots of sample expression distributions before (upper) and after (lower) ComBat correction; B-Principal component analysis plots before (upper) and after (lower) correction.

图 1 GSE19804 与 GSE75037 数据集的批次效应校正图
Fig. 1 Batch-effect correction of the GSE19804 and GSE75037 datasets

采用 limma 包对经 ComBat 批次效应校正后的合并表达矩阵进行差异表达分析，共筛选获得 2 923 个差异表达基因（$|\log_2FC|>0.585$，$P_{adj}<0.05$），并绘制按 $\log_2FC$ 排序的前 20 个上调基因和前 20 个下调基因，差异表达基因的热图见图 2。WGCNA 模块－性状相关性分析显示，MEturquoise 模块（4 309 个基因）与对照组呈极强正相关（$r=0.92$，$P=3\times10^{-116}$），与疾病组呈极强负相关（$r=-0.92$，$P=3\times10^{-116}$），见图 3。因此，选取 turquoise 模块作为疾病相关关键模块用于后续分析。

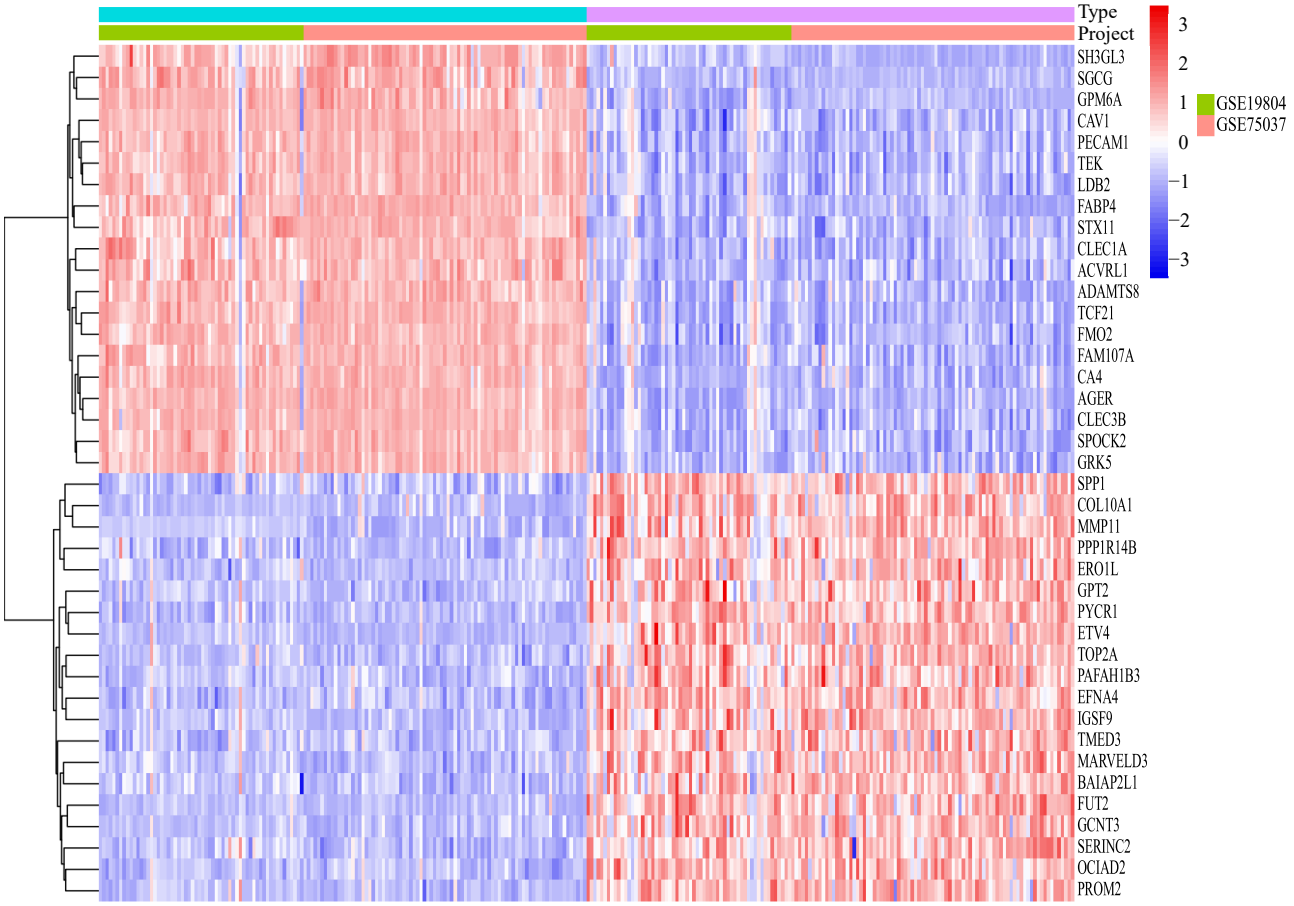


图 2　GSE19804 与 GSE75037 合并数据的差异表达基因热图

Fig. 2　Heatmap of differentially expressed genes in the merged GSE19804 and GSE75037 datasets

2.2　DEHP 数据获取

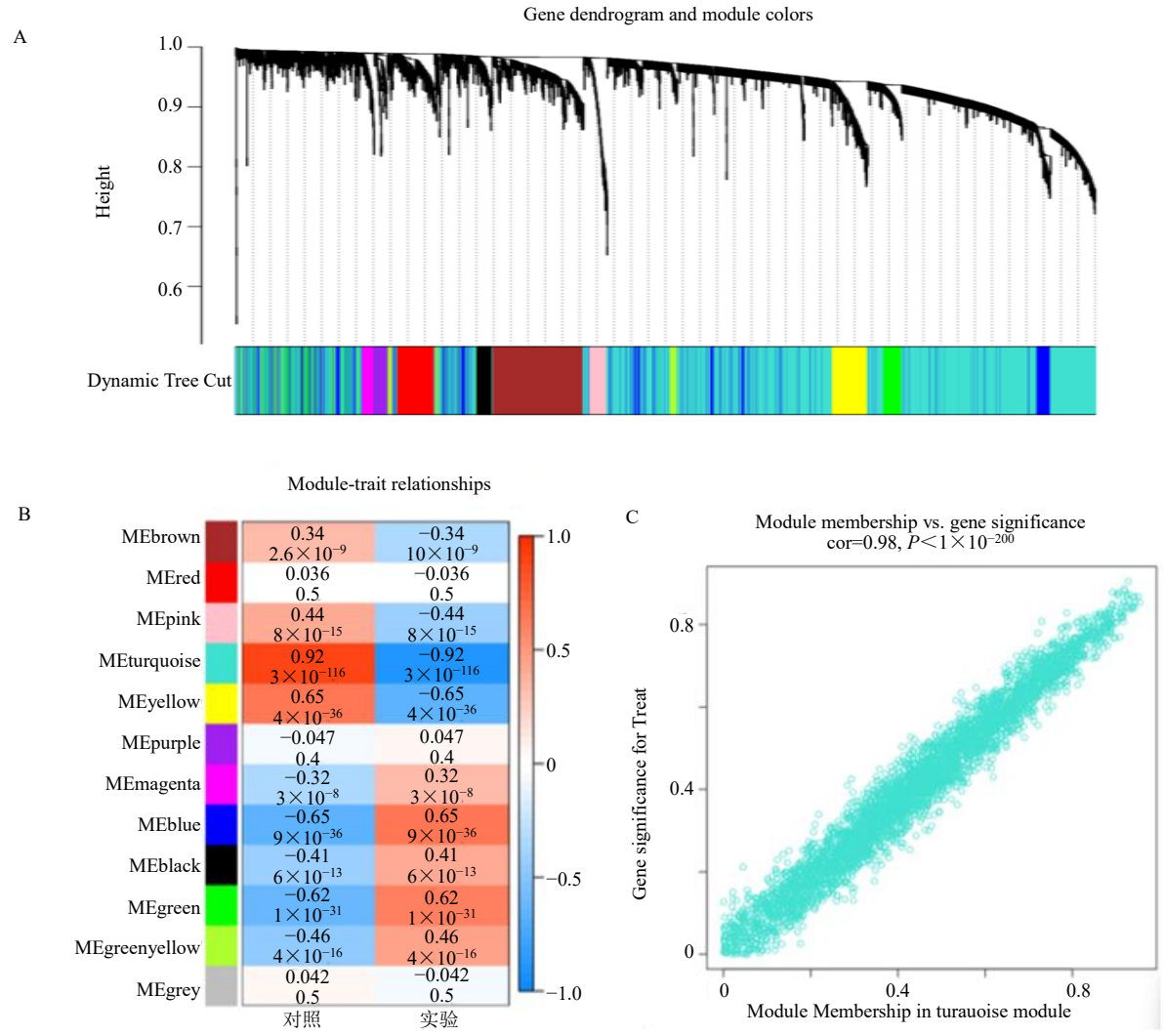
通过 PubChem 网站查询 DEHP，PubChem CID 为 8 343，CAS 为 117-81-7，SMILES 为 CCCCC(CC)COC(=O)C1=CC=CC=C1C(=O)OCC(CC)CCCC（图 4A）。通过ChEMBL网站、SwissTargetPrediction 平台、SEA 平台数据汇总，共获得靶点 138 个（图 4B）。

2.3　DEHP 与疾病交集靶点分析

采用 ggvenn 包将将上述差异表达基因（2 923 个）与 WGCNA 关键模块基因（4 309 个基因）两类基因的并集（5 136 个）与 DEHP 候选靶点（138 个）进行交集分析，共获得 54 个交集基因（图 5A）。STRING 网站进行 PPI 分析，使用 Cytoscape 3.10.3 软件实施可视化分析并对 PPI 网络图中前 20 个核心靶点及其拓扑参数进行排序分析，见图 5B、表 1。

2.4　GO 功能与 KEGG 通路富集分析

将上述靶点上传至 DAVID 平台进行 GO 功能富集和 KEGG 通路分析。GO 和 KEGG 富集结果显示，候选靶点主要涉及细胞外基质重塑、蛋白水解、外源性化合物应答、膜受体信号转导、钙信号、细胞周期及细胞凋亡等功能模块。具体而言，GO 结果显示，候选靶点富集于胶原分解代谢过程、细胞外基质解体、蛋白水解、肽酶活性、金属肽酶活性、胶原结合及细胞外基质等条目，提示候选靶点可能参与细胞外基质降解和组织重塑过程。候选靶点还富集于对外源性物质刺激的应答，提示 DEHP 相关



A-基因层次聚类树及模块颜色；B-模块特征基因与样本分组的 Pearson 相关系数及 *P* 值；C-turquoise 模块内基因的模块成员度与疾病组基因显著性。

A-Gene dendrogram and module colors, B-Pearson correlations and *P* values between merged module eigengenes and sample groups, C-Module membership was positively correlated with gene significance for the disease group within the turquoise module.

图 3　GSE19804 与 GSE75037 合并数据 WGCNA 分析

Fig. 3　WGCNA analysis of the merged GSE19804 and GSE75037 datasets

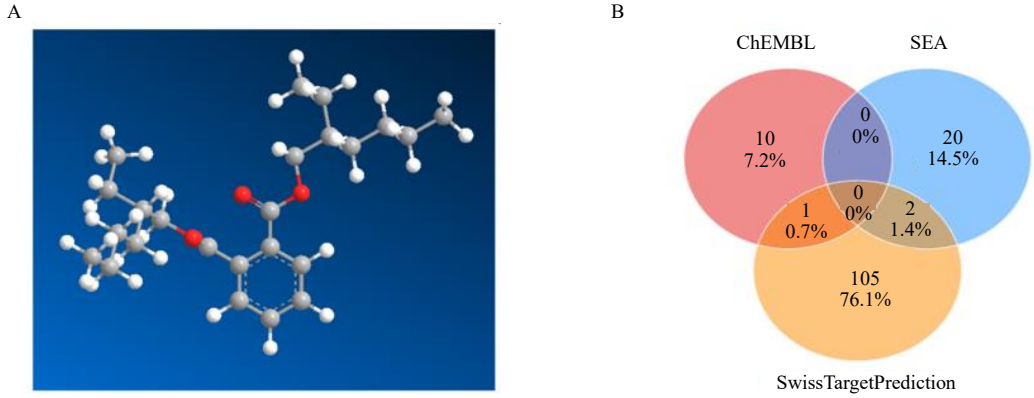


图 4　DEHP 的三维分子结构（A）和数据库预测靶点韦恩图（B）

Fig. 4　Three-dimensional molecular structure of DEHP (A) and database prediction of target Venn diagram (B)

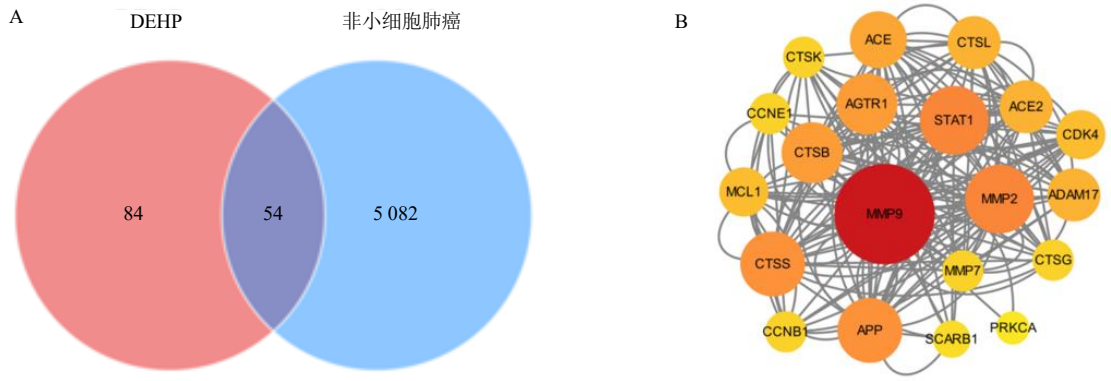


图 5　DEHP 候选靶点与非小细胞肺癌交集靶点韦恩图（A）、PPI 网络图（B）

Fig. 5　Intersection target Venn diagram of DEHP candidate targets and non-small cell lung cancer (A), PPI network diagram (B)

表 1　PPI 网络前 20 个核心靶点及其拓扑参数

Table 1　Topological parameters of the top 20 hub targets in the PPI network

编号	靶点	度中心性	特征向量中心性	介数中心性	接近中心性
1	MMP9	44	0.374	695.431	0.179
2	STAT1	28	0.245	257.435	0.167
3	MMP2	28	0.286	157.380	0.171
4	CTSS	26	0.299	41.200	0.166
5	APP	26	0.264	200.496	0.170
6	AGTR1	24	0.173	605.045	0.169
7	CTSB	24	0.286	13.550	0.163
8	ACE	22	0.259	38.911	0.166
9	ACE2	20	0.245	31.640	0.166
10	ADAM17	20	0.249	19.075	0.165
11	CTSL	20	0.238	8.435	0.161
12	MCL1	18	0.154	279.812	0.164
13	CDK4	18	0.154	74.298	0.164
14	CTSK	14	0.176	1.050	0.157
15	CCNE1	14	0.089	33.453	0.161
16	CCNB1	14	0.110	30.389	0.161
17	MMP7	14	0.182	0.583	0.157
18	CTSG	14	0.179	0.733	0.157
19	SCARB1	12	0.117	91.417	0.160
20	PRKCA	10	0.039	225.010	0.159

候选靶点可能与外源性化合物应答及毒性反应有关，见图 6。KEGG 通路分析显示，候选靶点富集于 G 蛋白偶联受体信号通路、细胞外信号调节激酶（ERK）1 和 ERK2 级联反应的正调控、胞质钙离子浓度正调控、钙信号通路等条目，提示候选靶点可能与膜受体信号转导、ERK 级联反应及钙信号调控有关。此外，候选靶点还富集于有丝分裂细胞周期 G1/S 期转换、细胞凋亡、细胞衰老及癌症相关通路等条目，提示 DEHP 暴露可能通过影响细胞周期、凋亡和衰老等过程参与非小细胞肺癌相关生物学过程。

2.5　分子对接

基于 PPI 网络筛选获得的 20 个候选靶点与 DEHP 进行分子对接分析，见表 2。结果显示，DEHP 与候选靶点整体具有较好的结合潜力。其中基质金属蛋白酶 9（MMP9）与 DEHP 预测结合能最低，为−8.0 kcal/mol；MMP7 与 DEHP 的预测结合能为−6.0 kcal/mol。选取结合能≤−6 kcal/mol（1 cal＝4.2 J）的靶点进行可视化分析，展示 DEHP 与靶点蛋白活性口袋及关键氨基酸残基之间的相互作用情况，见图 7。

3　分子动力学

综合 PPI 网络拓扑参数、分子对接结合能及 MMP 家族在细胞外基质重塑中的作用，选择 MMP7 和 MMP9 作为后续分子动力学模拟对象。MMP9 在 PPI 网络中具有最高的度中心性，且与 DEHP 的分子对接结合能最低（−8.0 kcal/mol）。尽管 MMP7 的网络拓扑参数及分子对接结果并不优于 MMP2，但既往研究表明，MMP7 表达与非小细胞肺癌肿瘤细胞增殖及患者预后相关[15]，且其除参与细胞外基质降解外，还可在特定实验条件下促进 pro-MMP2 和 pro-MMP9 的活化，提示其具有潜在的蛋白水解级联调节作用[16]。故本研究分别选取具有较高网络中心性的 MMP9 及具有潜在级联调节功能的 MMP7 作为代表性候选蛋白，进一步评估其与 DEHP 形成的预测复合物在模拟条件下的构象稳定性。

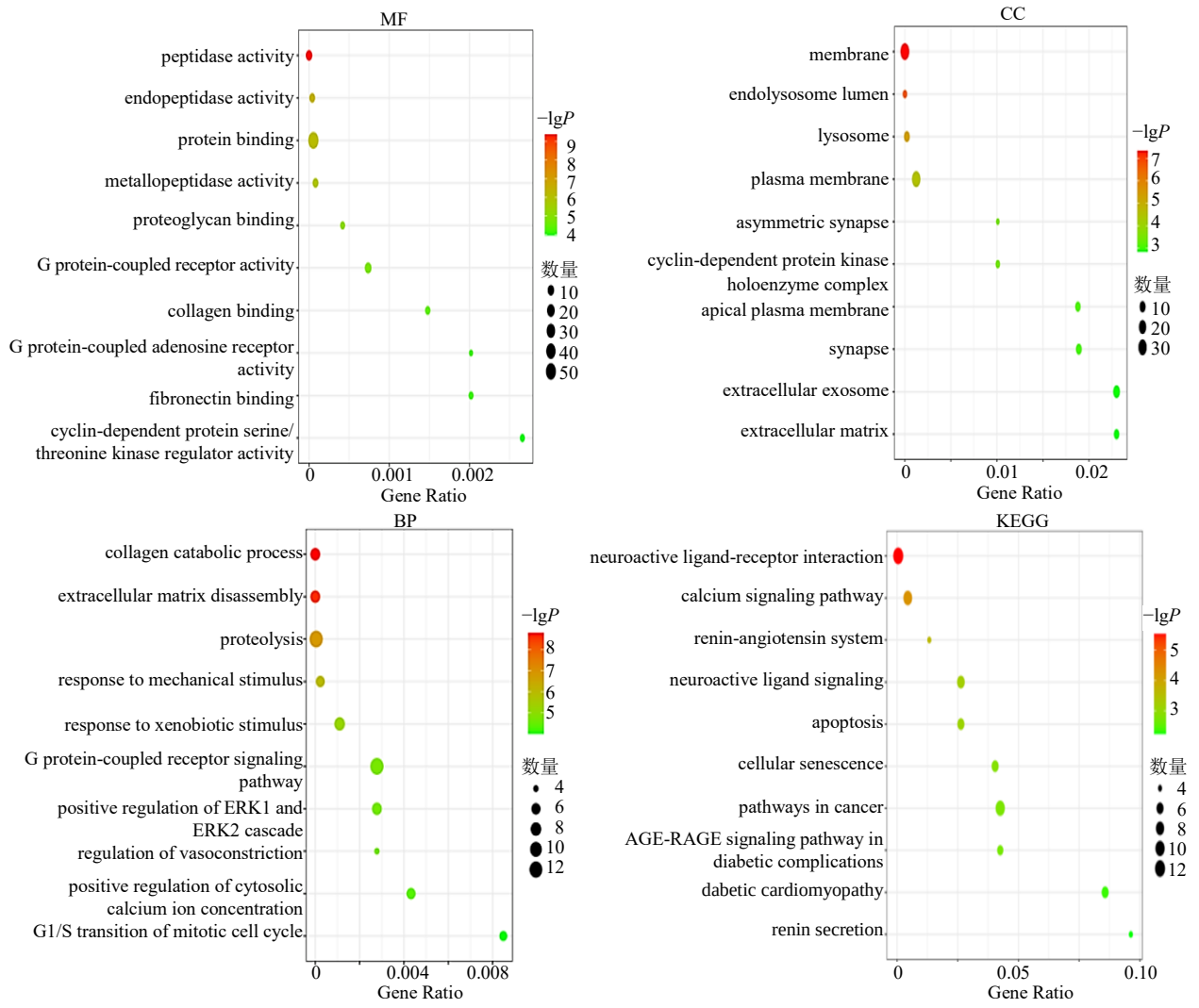


图 6 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 GO functional and KEGG pathway enrichment analysis

表 2 候选蛋白与 DEHP 的分子对接结合能

Table 2 Binding energies of candidate proteins docked with DEHP

蛋白名称	结合能/(kcal·mol^{-1})	蛋白名称	结合能/(kcal·mol^{-1})
MMP9	−8.0	ACE2	−6.1
CTSS	−7.7	MMP7	−6.0
SCARB1	−7.7	CTSL	−5.9
CCNB1	−7.6	CCNE1	−5.9
MMP2	−7.2	AGTR1	−5.7
MCL1	−7.2	CTSB	−5.7
ACE	−6.9	STAT1	−5.6
PRKCA	−6.3	CDK4	−5.0
ADAM17	−6.2	CTSG	−4.9
CTSK	−6.2	APP	−4.4

3.1 MMP7、MMP9 与 DEHP 复合物的分子动力学分析

通过均方根偏差（RMSD）分析，可见 MMP7 在模拟初期（0～10 ns）快速上升后稳定于 0.35 nm，并在后续模拟中保持相对平稳。与 DEHP 结合后，MMP7–DEHP 复合物的 RMSD 在模拟前期同样经

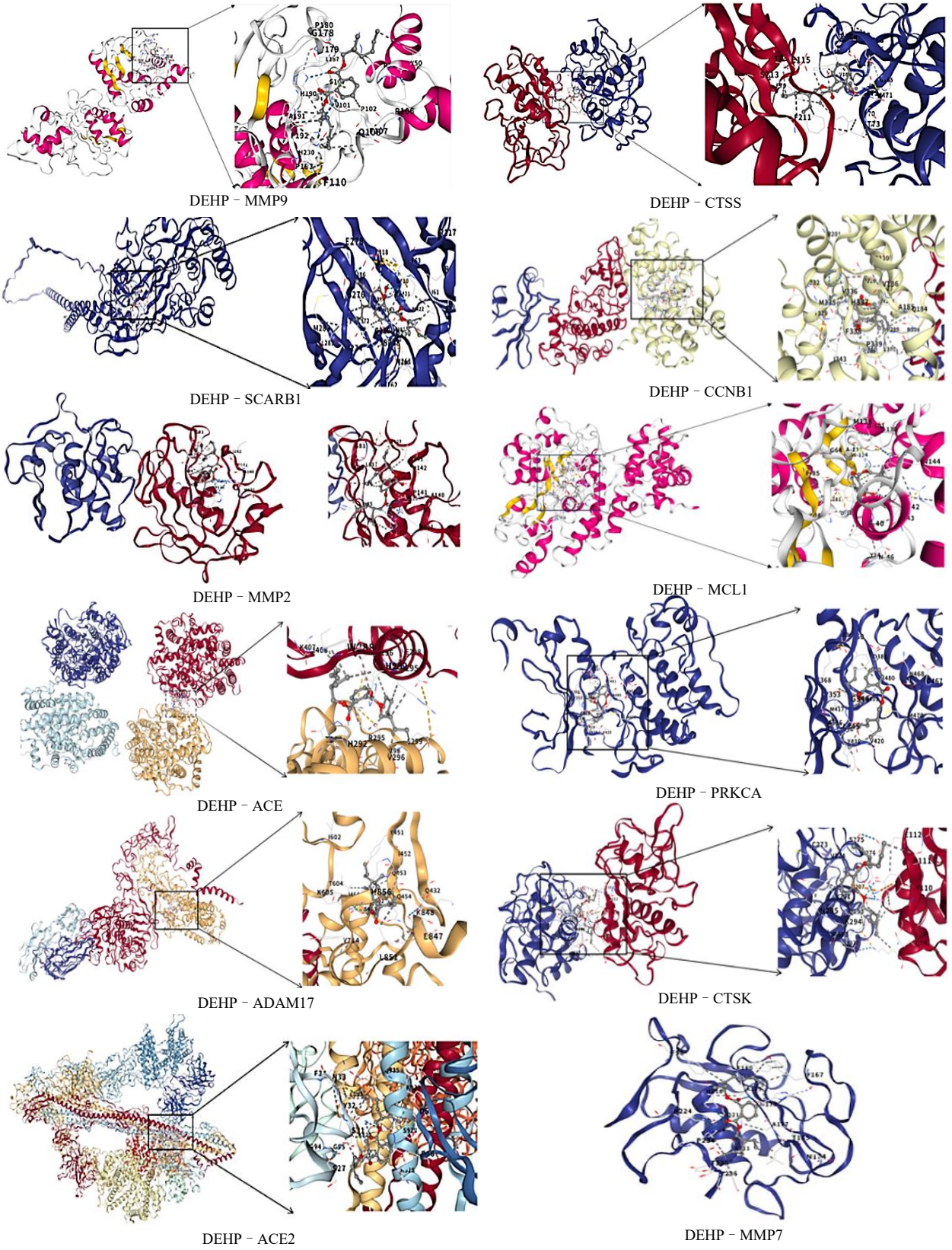
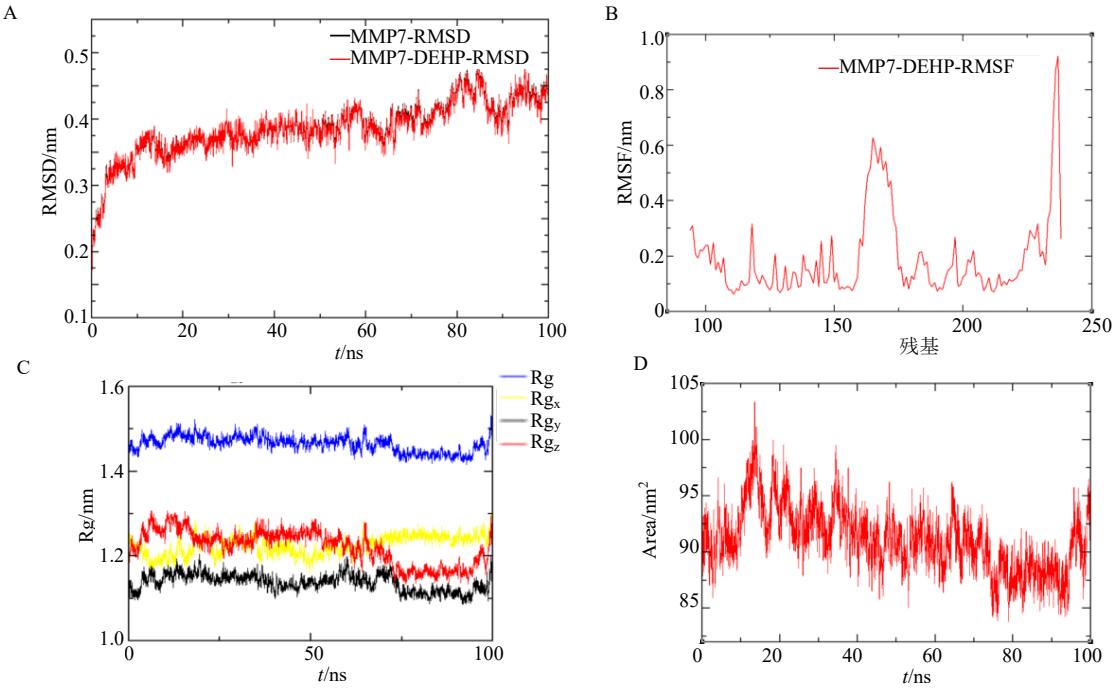


图 7　候选靶点与 DEHP 的分子对接模式图

Fig. 7　Molecular docking model of candidate target and DEHP

历快速调整阶段，随后在 0.35～0.46 nm 波动。游离态 MMP7 与结合 DEHP 后的复合物 RMSD 曲线走势基本重合，表明 DEHP 的结合未显著改变 MMP7 的整体骨架结构，复合物在模拟过程中维持了良好

的构象稳定性（图 8A）。均方根波动（RMSF）分析提示，整体 RMSF 值 0.05～0.3 nm，表明大部分残基在模拟过程中波动较小，维持蛋白酶核心区域结构刚性。体系存在两处高柔性区域，分别为催化裂隙周边 160～170 号残基环区及 235～240 号 C 端尾部残基，与基质金属蛋白酶家族天然柔性区域特征一致。参与 DEHP 模拟结合的关键氨基酸（Met222、Leu97、Trp104 等）RMSF 值均低于 0.2 nm，结合口袋区域构象高度稳定，可保障配体与蛋白形成稳固结合模式（图 8B）。回转半径（Rg）用于评判蛋白质空间紧凑程度，模拟全程复合物 Rg 稳定介于 1.45～1.50 nm，三轴方向回转半径无明显波动，仅在 60～80 ns 出现短暂小幅收缩后恢复常态，说明 DEHP 结合仅诱导 MMP7 发生轻微构象微调，未造成蛋白整体空间膨胀或塌陷，空间折叠状态保持稳定（图 8C）。溶剂可及表面积（SASA）结果表明，模拟前期复合物表面接触溶剂面积短暂升高，15 ns 达到峰值后逐步下降，70 ns 后稳定处于 85～90 nm^2。该变化规律提示体系初期发生短暂空间舒展，随 DEHP 逐步嵌入结合口袋、疏水相互作用不断形成，蛋白结构趋于紧凑，印证了 MMP7－DEHP 复合物具备良好结构稳定性（图 8D）。



A-均方根偏差分析，B-均方根波动分析，C-回转半径，D-溶剂可及表面积。

A-root mean square deviation analysis, B-root mean square fluctuation analysis, C-rotation radius, D-solvent accessible surface area.

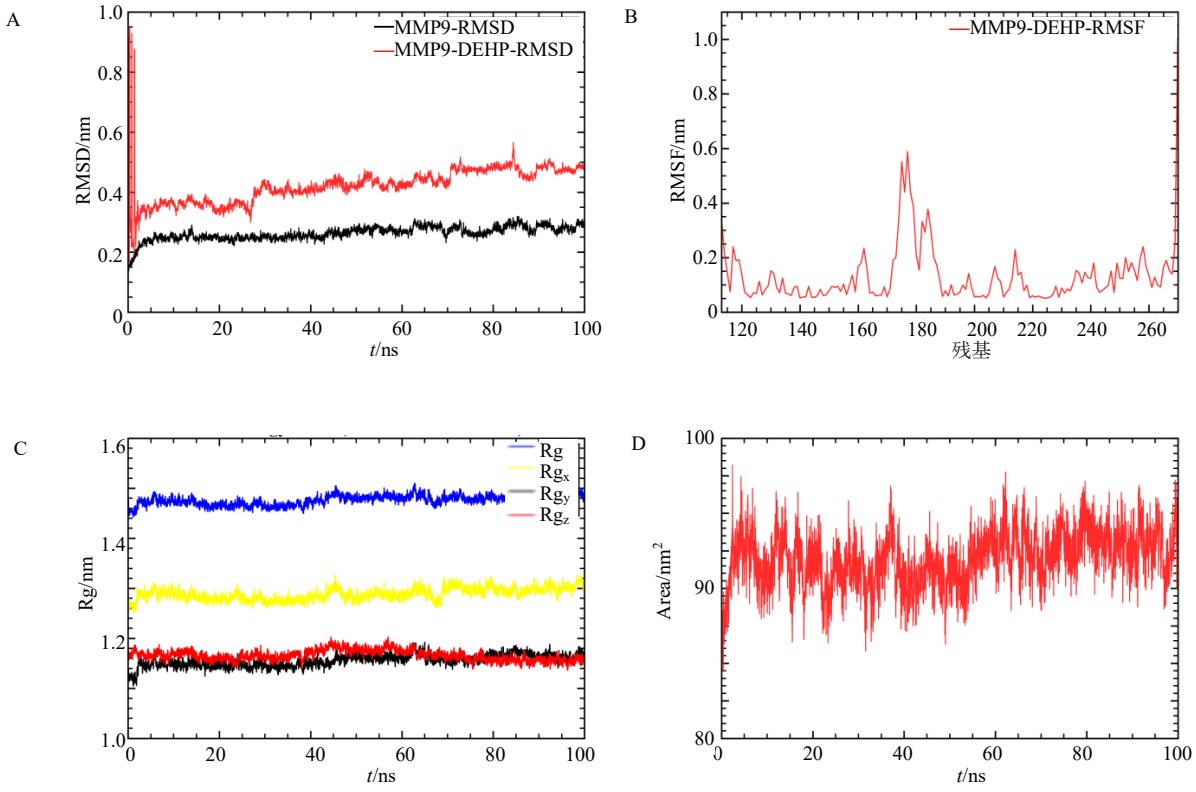
图 8 MMP7－DEHP 复合物的分子动力学模拟轨迹分析

Fig. 8 Molecular dynamics trajectory analysis of the MMP7–DEHP complex

通过 RMSD 分析可见，MMP9 蛋白在模拟初期快速调整，随后整体维持在较低波动范围内。游离蛋白 RMSD 全程平均值约为 0.263 nm，在模拟后期主要稳定于 0.25～0.32 nm，说明 MMP9 蛋白骨架在 100 ns 模拟过程中未发生明显结构失稳。与 DEHP 结合后，MMP9－DEHP 复合物 RMSD 整体高于蛋白单独 RMSD，后期主要波动于 0.44～0.57 nm，提示 DEHP 结合后复合物经历了一定程度的构象调整。尽管复合物 RMSD 较高，但其后期未出现持续升高趋势，表明 MMP9－DEHP 复合物在模拟过程中逐渐达到相对稳定状态（图 9A）。

RMSF 分析显示，大部分残基 RMSF 值低于 0.2 nm，说明 MMP9 主体结构在模拟过程中保持较好的稳定性。体系中存在若干高柔性区域，主要集中于 174～179 号残基附近以及 C 端末端区域，其中残基 270 的 RMSF 值最高，可能与末端残基天然柔性较高有关。174～179 号残基区域的较高波动提示该区域可能为 MMP9 蛋白中的柔性环区，在配体结合和局部构象调节过程中具有一定活动性。整体来看，除局部柔性片段外，MMP9 蛋白核心区域波动较小，能够维持较稳定的空间构象（图 9B）。

Rg 用于评价蛋白质整体空间紧凑程度。模拟结果显示，MMP9－DEHP 复合物 Rg 全程平均值约为 1.476 nm，后 20 ns 平均约为 1.481 nm，整体主要稳



A-均方根偏差分析，B-均方根波动分析，C-回转半径，D-溶剂可及表面积。

A-root mean square deviation analysis, B-root mean square fluctuation analysis, C-rotation radius, D-solvent accessible surface area.

图 9　MMP9－DEHP 复合物的分子动力学模拟轨迹分析

Fig. 9　Molecular dynamics trajectory analysis of the MMP9–DEHP complex

定于 1.45～1.50 nm。该结果表明 DEHP 结合未引起 MMP9 蛋白明显展开或塌陷，复合物整体空间折叠状态较稳定，仅存在轻微构象微调（图 9C）。

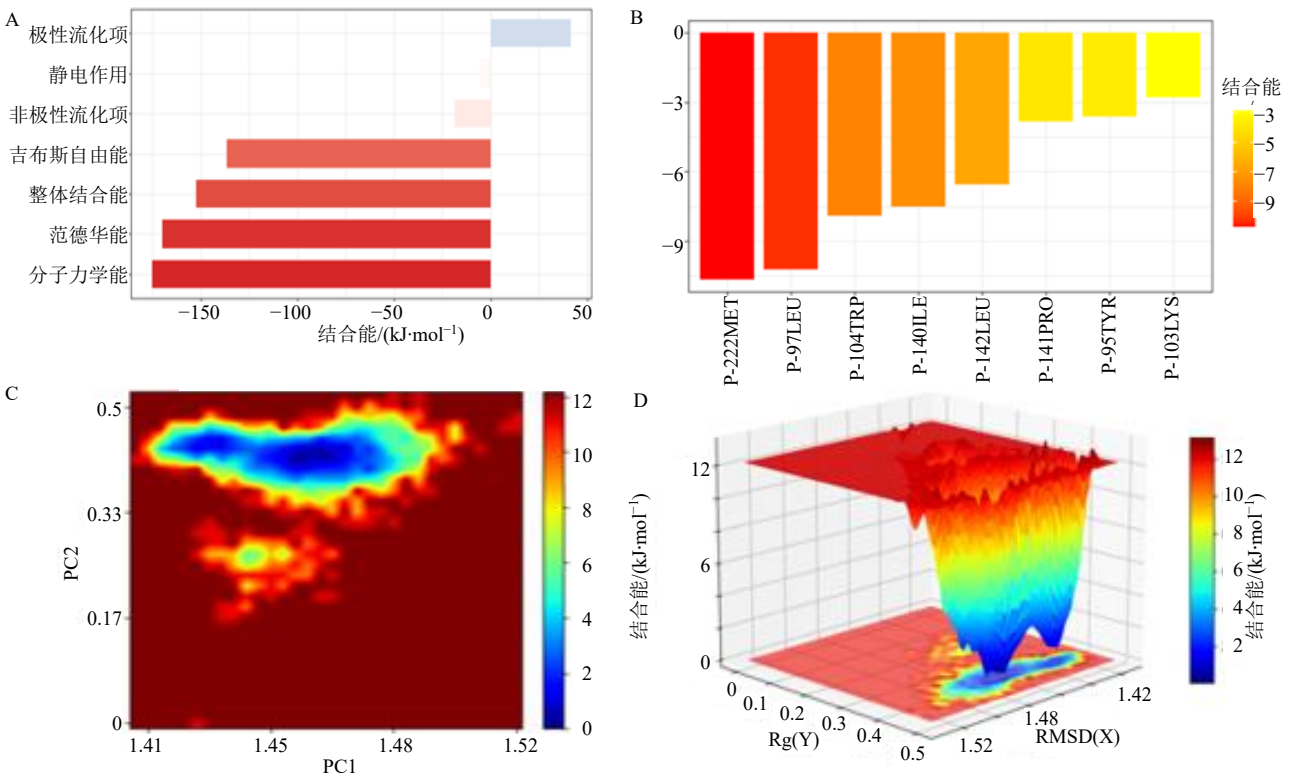
SASA 结果显示，MMP9－DEHP 复合物 SASA 全程平均值约为 91.95 nm^2，后期平均值约为 92.99 nm^2，较模拟初期略升高。该变化提示复合物在模拟过程中可能存在局部表面暴露增加，但整体波动幅度有限，未出现大幅度结构展开现象。结合 RMSD 与 Rg 结果可知，DEHP 结合后 MMP9 复合物整体结构保持相对稳定，仅发生局部构象调整（图 9D）。

3.2　MMP7、MMP9 与 DEHP 复合物分子力学－泊松－玻尔兹曼表面积（MM-PBSA）结合自由能分析

采用 MM-PBSA 方法定量计算 MMP7 与 DEHP 之间的结合自由能。结合能分解分析结果显示，配体－受体结合过程中，分子力学能（−175.22 kJ/mol）和范德华能（−169.97 kJ/mol）是最主要的有利贡献项，极性溶剂化项（41.46 kJ/mol）为主要不利因素，反映了去溶剂化过程的能量消耗。静电作用（−5.25 kJ/mol）和非极性溶剂化项（−18.73 kJ/mol）对整体结合自由能（−136.38 kJ/mol）的贡献相对较小（图 10A）。

为进一步明确 MMP7 中参与 DEHP 结合的关键氨基酸残基，提取了各残基对结合自由能的贡献。其中贡献最大的 3 个残基分别为 P222MET（−10.673 kJ/mol）、P-97LEU（−10.208kJ/mol）、P-104TRP（−7.889 kJ/mol）为贡献度最高的关键氨基酸，表明疏水相互作用是维持 MMP7－DEHP 复合物稳定性的核心因素（图 10B）。

通过自由能形貌图可见，在二维自由能分布图中，大面积连续低能区域占据主导，仅边缘存在少量高能瞬时构象，证明 DEHP 结合可诱导 MMP7 形成单一稳定优势构象，构象转换自由度低，结合状态高度固化（图 10C）。三维自由能曲面结果显示，体系仅形成单一深度能量低谷，对应复合物热力学最稳定构象，该低能区域分布范围广泛，表明模拟过程中体系主要聚集于此稳定构象状态，极少发生大幅度构象转变（图 10D）。



A-结合自由能及能量分项，B-残基能量分解，C-二维自由能地形图，D-三维自由能曲面。

A-binding free energy and energy components, B-per-residue energy decomposition, C-two-dimensional free-energy landscape, D-three-dimensional free-energy surface.

图 10 MMP7－DEHP 复合物的 MM-PBSA 结合自由能分析

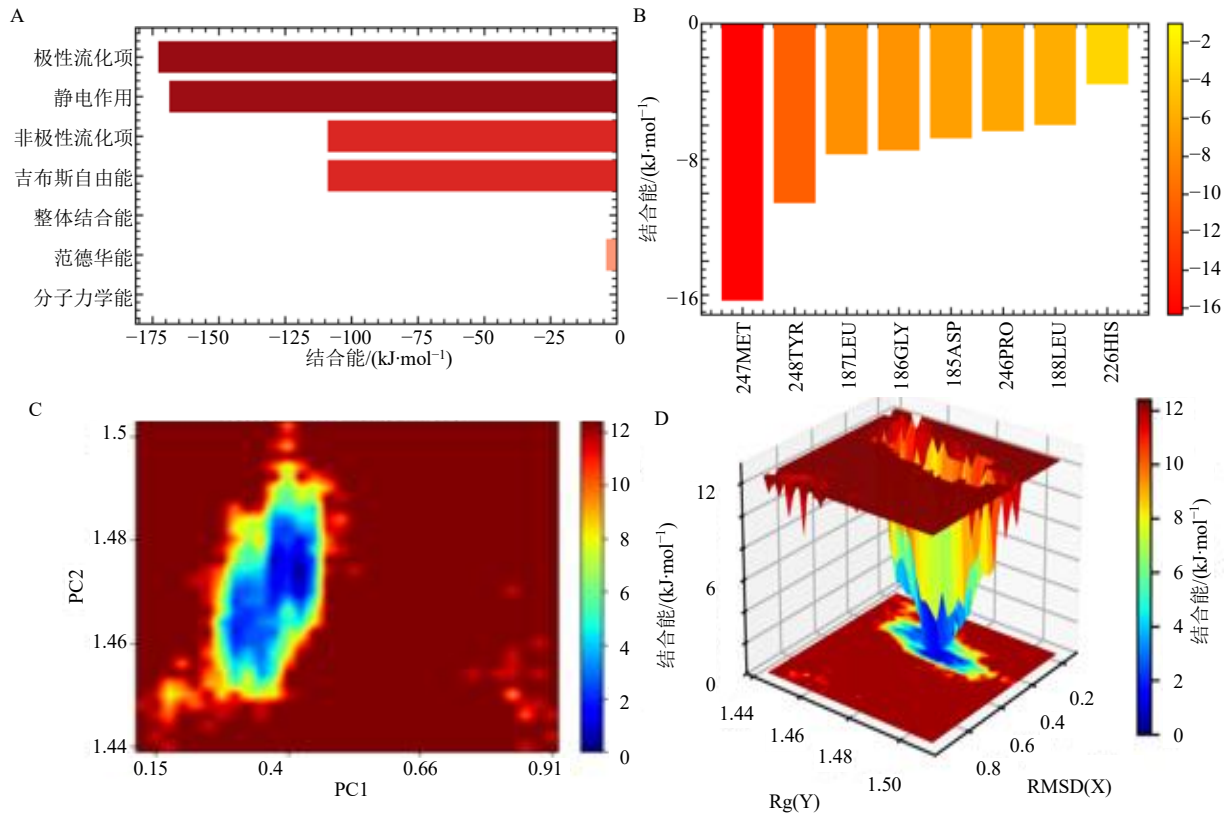
Fig. 10 MM-PBSA binding free-energy analysis of the MMP7-DEHP complex

采用 MM-PBSA 方法定量计算 MMP9 与 DEHP 之间的结合自由能。结合能分解结果显示，配体–受体结合过程中，分子力学能（−172.77 kJ/mol）和范德华能（−168.72 kJ/mol）是最主要的有利贡献项，提示疏水相互作用和范德华作用在 MMP9－DEHP 复合物稳定中发挥主导作用。静电作用（−4.05 kJ/mol）对结合自由能也有一定有利贡献，但贡献较小。在本次计算参数和模型设定下，极性溶剂化项和非极性溶剂化项均未显示出明显贡献。因此整体结合自由能主要由分子力学能能量项决定。最终 MMP9－DEHP 复合物的整体结合自由能为−109.01 kJ/mol，表明二者在模拟条件下具有较强的结合倾向（图 11A）。

为进一步明确 MMP9 中参与 DEHP 结合的关键氨基酸残基，提取了各残基对结合自由能的贡献。结果显示，贡献最大的 3 个残基分别为 P247MET（−16.36 kJ/mol）、P248TYR（−10.68 kJ/mol）和 P187LEU（−7.77 kJ/mol），为 MMP9－DEHP 结合过程中的主要关键氨基酸。此外，P186GLY、P185ASP、P246PRO、P188LEU、P226HIS 也表现出一定的有利能量贡献。上述结果提示，MMP9－DEHP 复合物的稳定性主要受 Met、Tyr、Leu 等残基参与的疏水作用和范德华相互作用驱动（图 11B）。

自由能形貌图进一步反映了 MMP9－DEHP 复合物的构象分布特征。在二维 Gibbs 自由能分布图中，低能区域主要集中于 PC1（0.30～0.45）、PC2（1.46～1.49），说明模拟过程中体系主要聚集于相对稳定的低能构象区域，仅在边缘区域出现少量高能瞬时构象（图 11C）。三维自由能曲面图显示，体系形成较明显的能量低谷，且低能区域集中分布于 RMSD 与 Rg 的特定范围内，表明 MMP9－DEHP 复合物在模拟过程中存在优势稳定构象，未发生大范围构象转换（图 11D）。

综上，100 ns 分子动力学模拟结果表明，MMP9－DEHP 复合物在模拟条件下能够维持相对稳定的构象状态。DEHP 结合后并未造成 MMP9 蛋白整体结构崩解或明显空间展开，但可诱导局部柔性区域发生一定构象调整。需要指出的是，上述结果仅提示 MMP9－DEHP 复合物在计算模拟条件下



A-结合自由能及能量分项，B-残基能量分解，C-二维自由能地形图，D-三维自由能曲面。

A-binding free energy and energy components, B-per-residue energy decomposition, C-two-dimensional free-energy landscape, D-three-dimensional free-energy surface.

图 11　MMP9－DEHP 复合物的 MM-PBSA 结合自由能分析

Fig. 11　MM-PBSA binding free-energy analysis of the MMP9-DEHP complex

具有相对稳定的结合构象。

4　讨论

本研究通过整合非小细胞肺癌相关转录组数据与 DEHP 候选靶点，获得 54 个潜在关联靶点，并通过 PPI 网络分析筛选出 20 个核心候选靶点。其中，MMP2、MMP7、MMP9 同属于基质金属蛋白酶家族，与细胞外基质降解和组织重塑密切相关。GO 功能及 KEGG 通路富集分析提示，候选靶点可能涉及细胞外基质重塑、蛋白水解及相关信号转导等生物学过程，为进一步探索 DEHP 与 NSCLC 相关的潜在分子机制提供了研究线索。

细胞外基质降解和基底膜破坏是非小细胞肺癌细胞发生迁移、侵袭及远处转移的重要环节。MMPs 是一类依赖锌离子的蛋白水解酶，通常以无活性的酶原形式合成，并在特定条件下经蛋白水解激活。MMPs 可降解胶原、明胶、层黏连蛋白、纤维连接蛋白及蛋白聚糖等多种细胞外基质成分，同时还可通过调节细胞黏附、释放基质结合型生长因子、影响炎症因子活性及促进血管生成等方式参与肿瘤微环境重塑和恶性进展[17-18]。

MMP2、MMP7、MMP9 均属于 MMP 家族，但三者在底物特异性、活化方式及肿瘤相关功能方面存在一定差异。MMP2 和 MMP9 分别为明胶酶 A 和明胶酶 B，能够降解IV型胶原，而IV型胶原是基底膜的重要结构成分。因此，MMP2 和 MMP9 活性增强可能促进肿瘤细胞突破基底膜并进入周围组织。在非小细胞肺癌中，MMP2 和 MMP9 表达升高与肿瘤分期、淋巴结转移、血管侵犯及患者预后密切相关，提示二者可能是非小细胞肺癌细胞外基质降解和侵袭转移过程中的重要效应分子[19]。此外，已有研究显示，肿瘤组织中 MMP2 和 MMP9 的高表达与肺癌患者较差的生存结局相关，且 MMP2 与 MMP9 表达之间存在一定相关性，提示二者可能共同参与肺癌细胞的基底膜破坏和转移过程[20]。

MMP7 又称基质溶素，是 MMP 家族中相对分子质量较小但底物谱较广的成员。MMP7 不仅能够

降解多种细胞外基质成分，还可切割细胞表面蛋白及部分基质结合型生长因子，从而影响细胞黏附、增殖、迁移和局部微环境。临床研究表明，MMP7 在非小细胞肺癌组织中的表达升高与肿瘤细胞增殖及患者预后不良相关，提示 MMP7 可能参与非小细胞肺癌的发生发展和恶性表型维持[15]。除自身的基质降解作用外，MMP7 还可能通过调节其他 MMP 成员的活化形成蛋白水解级联。已有研究表明，重组人 MMP7 能够促进无活性的 pro-MMP2 和 pro-MMP9 活化，并增强明胶酶活性。Wang 等[16]在卵巢癌细胞及永生化卵巢上皮细胞的条件培养基中发现，MMP7 可促进 pro-MMP2 和 pro-MMP9 的转化，并通过作用于 MMP2/组织基质金属蛋白酶抑制剂-2（TIMP-2）复合物促进 MMP2 的释放与活化。因此，MMP7 可能通过直接促进 pro-MMP2 和 pro-MMP9 活化，以及间接调节 MMP2/TIMP-2 复合物 2 种方式，增强 MMP 介导的细胞外基质降解。从这一角度看，MMP7 除发挥自身的蛋白水解作用外，还可能通过调节其他 MMP 家族成员的活性参与细胞外基质重塑。然而，这种蛋白水解级联调节作用在非小细胞肺癌中的具体意义仍需进一步明确。除 MMP 家族蛋白本身的肿瘤相关功能外，已有研究也为 DEHP 与非小细胞肺癌相关生物学过程之间的联系提供了实验依据。Kim 等[21]研究发现，DEHP 处理 A549 细胞后，MMP9 和 NF-κB 的 mRNA 及蛋白水平均升高，同时伴随 p38 和 JNK 磷酸化水平增强以及 Wnt/β-catenin 相关信号分子的变化；此外，DEHP 还可促进 A549 细胞增殖，诱导炎症反应和上皮－间质转化（EMT）相关变化。Gong 等[22]的系统评价及 Meta 分析显示，非小细胞肺癌肿瘤组织中 MMP9 高表达与较晚的肿瘤分期及较差的总体生存结局相关，其临床研究还发现血清 MMP9 活性与肿瘤进展及转移存在一定关联。上述研究从细胞实验及临床关联层面支持 MMP9 在非小细胞肺癌相关生物学过程中的研究价值，与本研究筛选出 MMP9 作为核心候选靶点的结果具有一定一致性。然而，既往研究主要涉及 DEHP 对相关信号通路及 MMP9 表达的调控，本研究的分子对接与分子动力学模拟则从计算层面探索了 DEHP 与 MMP9 直接相互作用的可能性，两者提供了不同层面的研究线索，其功能联系仍有待进一步验证。

本研究仍存在一定局限性。研究结果主要基于数据库分析及计算模拟，DEHP 与候选靶点之间的潜在关联及其生物学作用尚需实验验证。后续可通过检测不同浓度 DEHP 暴露后 MMP7、MMP9 的蛋白表达及酶活性变化，结合细胞迁移、侵袭实验及靶点干预研究，进一步明确相关候选靶点的生物学功能及其在 DEHP 相关非小细胞肺癌生物学过程中的潜在作用机制。

5 结论

本研究基于网络毒理学、分子对接及分子动力学模拟，发现 DEHP 与非小细胞肺癌相关的候选靶点主要涉及细胞外基质重塑、蛋白水解及相关信号转导过程。分子对接及动力学模拟提示，DEHP 与 MMP7、MMP9 存在潜在相互作用，两种预测复合物在模拟条件下均表现出相对稳定的构象特征。MMP7 和 MMP9 可能是 DEHP 相关非小细胞肺癌机制研究的重要候选靶点，本研究为后续作用机制及生物学功能验证提供了研究线索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Hao J Q, Ran B, Hu S Y, *et al*. Exploring the link between Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) exposure and muscle mass: A systematic investigation utilizing NHANES data analysis, network toxicology and molecular docking approaches [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2025, 295: 118132.

[2] Zhu Z, Qin J, He C G, *et al*. Computational analysis of DEHP's oncogenic role in colorectal cancer [J]. *Discov Oncol*, 2025, 16(1): 848.

[3] Li W X, Fu H J, Zhu L J, *et al*. *Di*-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and its metabolite promote multiple myeloma progression and bortezomib resistance [J]. *J Hazard Mater*, 2025, 495: 139147.

[4] Yin Z F, Jin X, Mao C L, *et al*. Analysis of toxicity and mechanisms of DEHP in prostate cancer with network toxicology and molecular docking strategy [J]. *Int J Surg*, 2025, 111(1): 1454-1457.

[5] Zhang Y H, Wang Q. Network toxicological insights into DEHP exposure and thyroid cancer development and progression [J]. *Front Oncol*, 2025, 15: 1617202.

[6] Wang Z C, Wang Y W. Mechanism exploration of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced breast cancer via network toxicology and molecular docking analysis [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 27257.

[7] Lin F, Zheng W C, Ke Z B, *et al*. A comprehensive analysis-based study of *Di*-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-Environmental explanation of bladder cancer progression [J]. *Environ Pollut*, 2025, 367: 125625.

[8] Chen J H, Pang H X, Wang J D, *et al*. Multi-scale systems toxicology defines a KLF5-centered adverse outcome pathway linking DEHP exposure to pancreatic cancer progression and signaling programs relevant to therapy tolerance [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2026, 14: 1769023.

[9] Zhu J, Zhang X S, Wen B, *et al*. Diethylhexyl phthalate (DEHP) regulates the proliferation and chemosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma cells via regulation of PTEN [J]. *Hum Cell*, 2021, 34(4): 1153-1162.

[10] Wang Y Y, Zhao M, Liu J Y, *et al*. Up regulation of IL-6 is involved in di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) induced migration and invasion of non small cell lung cancer (NSCLC) cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 1037-1044.

[11] 张雅婷. BPA 与 DEHP 经雌激素受体 ESR2 影响雌性大鼠肺部肿瘤的发生及其机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022.

[12] 杨雪, 刘传鑫, 袁付丽, 等. 基于网络毒理学商陆致大鼠肾损伤作用机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 4974-4984.

[13] Handelman G S, Kok H K, Chandra R V, *et al*. eDoctor: Machine learning and the future of medicine [J]. *J Intern Med*, 2018, 284(6): 603-619.

[14] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, *et al*. The STRING database in 2023: Protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D638-D646.

[15] Liu D, Nakano J, Ishikawa S, *et al*. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 correlates with tumor proliferation and a poor prognosis in non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2007, 58(3): 384-391.

[16] Wang F Q, So J, Reierstad S, *et al*. Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase [J]. *Int J Cancer*, 2005, 114(1): 19-31.

[17] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(3): 161-174.

[18] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment [J]. *Cell*, 2010, 141(1): 52-67.

[19] Hoikkala S, Pääkkö P, Soini Y, *et al*. Tissue MMP-2 and MMP-9 are better prognostic factors than serum MMP-2/TIMP-2 complex or TIMP-1 in stage I-III lung carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2006, 236(1): 125-132.

[20] Shao W L, Wang W, Xiong X G, *et al*. Prognostic impact of MMP-2 and MMP-9 expression in pathologic stage IA non-small cell lung cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2011, 104(7): 841-846.

[21] Kim J H. Di(2-ethylhexyl) phthalate promotes lung cancer cell line A549 progression via Wnt/β-catenin signaling [J]. *J Toxicol Sci*, 2019, 44(4): 237-244.

[22] Gong L, Wu D, Zou J D, *et al*. Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 18458-18468.

[责任编辑　高源]