

## 基于网络药理学及实验验证小白菊内酯对口腔癌的作用机制

刘新伟, 张 靓, 徐 健, 翟莹莹, 徐锦程\*

蚌埠医科大学第一附属医院, 安徽 蚌埠 233000

**摘要:** **目的** 通过网络药理学分析结合实验验证探讨小白菊内酯在口腔癌中的作用机制。**方法** 利用 SwissTargetPrediction、PharmMapper、GeneCards、OMIM、TTD 等数据库筛选小白菊内酯与口腔癌的交集靶点, 构建蛋白互作 (PPI) 网络并进行基因本体 (GO) 功能、京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 开展分子对接以评估小白菊内酯与核心靶点的结合能力, 并通过 Western blotting 检测 Cal-27 细胞关键蛋白水平。**结果** 共获得 57 个药物-疾病共同靶点, 其中表皮生长因子受体 (EGFR)、Src 酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、半胱天冬酶 3 (CASP3) 在网络中处于关键节点位置, 富集分析显示这些靶点显著参与细胞凋亡、蛋白质磷酸化、EGFR/ErbB 家族信号、MAPK 信号、焦点黏附及耐药相关通路。分子对接提示小白菊内酯能够与 EGFR、SRC、CASP3 等核心靶点稳定结合。体外实验进一步证实小白菊内酯下调 EGFR、SRC 蛋白相对表达水平, 上调 Caspase-3 蛋白表达水平, 抑制细胞增殖与迁移并促进凋亡 ( $P < 0.05, 0.01$ )。**结论** 小白菊内酯通过多靶点协同作用, 同时干预 EGFR、SRC、CASP3 等关键信号分子, 阻断促增殖和促迁移通路并激活凋亡机制, 从而发挥显著的抗口腔癌效应。

**关键词:** 小白菊内酯; 口腔癌; 网络药理学; 分子对接; 凋亡; 表皮生长因子受体; Src 酪氨酸蛋白激酶; 半胱天冬酶 3; 有丝分裂原激活蛋白

中图分类号: R287.7

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2025)12-3001-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.12.005

## Mechanism of parthenolide anti-oral cancer through network pharmacology and experimental validation

LIU Xinwei, ZHANG Liang, XU Jian, ZHAI Yingying, XU Jincheng

The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233000, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of action of parthenolide in oral cancer through network pharmacological analysis combined with experimental verification. **Methods** The intersection targets of parthenolide and oral cancer were screened by using databases such as SwissTargetPrediction, PharmMapper, GeneCards, OMIM, and TTD. PPI network was constructed and GO function, KEGG enrichment analysis was conducted. Molecular docking was carried out to evaluate the binding ability of parthenolide to the core target, and the levels of key proteins in Cal-27 cells were detected by Western blotting. **Results** A total of 57 drug-disease common targets were obtained, among which EGFR, SRC, and CASP3 were at key node positions in the network. Enrichment analysis revealed that these targets were significantly involved in apoptosis, protein phosphorylation, EGFR/ErbB family signaling, MAPK signaling, focal adhesion and drug resistance-related pathways. Molecular docking suggests that parthenolide can stably bind to core targets such as EGFR, SRC, and CASP3. *In vitro* experiments further confirmed that parthenolide down-regulated the relative expression levels of EGFR and SRC proteins, up-regulated the expression level of Caspase-3 protein, inhibited cell proliferation and migration and promoted apoptosis ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** Parthenolide exerts a significant anti-oral cancer effect by simultaneously intervening in key signaling molecules such as EGFR, SRC, and CASP3 through multi-target synergistic action, blocking proliferation-promoting and migration-promoting pathways and activating apoptotic mechanisms.

**Key words:** parthenolide; oral squamous cell carcinoma; network pharmacology; molecular docking; apoptosis; EGFR; SRC; Caspase-3; MAPK

收稿日期: 2025-10-25

项目基金: 安徽省高等学校自然科学研究项目 (KJ2021ZD0088)

作者简介: 刘新伟, 男, 研究方向为口腔医学。E-mail: 766423362@qq.com

\*通信作者: 徐锦程 E-mail: xjch9999@163.com

口腔癌是头颈部最常见的恶性肿瘤类型之一,其中超过 90% 的病例为口腔鳞状细胞癌,其全球疾病发病率呈持续上升趋势,并伴随发病年龄提前<sup>[1]</sup>。2022 年全球口腔癌的新发病例数高达 389 485 例,占全球恶性肿瘤新发病例总数的约 2.0%<sup>[2]</sup>。尽管当前临床治疗原则以根治性手术为核心,并辅以放疗、化疗及靶向治疗等多学科综合手段<sup>[3]</sup>,但由于早期诊断率偏低(约 60% 的患者确诊时已处于晚期)及口腔鳞状细胞癌较强的局部侵袭性,患者总体预后仍不理想<sup>[4]</sup>。并且化疗和放疗虽可延缓病情进展,但常伴有明显不良反应,严重影响患者生活质量。此外,靶向药物疗效受制于基因突变谱及耐药问题,导致临床受益人群比例有限。流行病学数据显示,口腔癌患者的 5 年总生存率仅为 50%~55%<sup>[5]</sup>。因此,亟需探索并开发兼具高效抗肿瘤活性和低不良反应的新型治疗策略,以期提高口腔鳞状细胞癌的早期干预成功率及改善整体预后。小白菊内酯是从菊科植物小白菊 *Tanacetum parthenium* 中分离得到的倍半萜内酯类化合物,具有独特的  $\alpha$ -亚甲基- $\gamma$ -内酯和环氧基团结构<sup>[6]</sup>。大量研究表明,小白菊内酯在多种癌症模型(包括白血病、乳腺癌等)中具有显著的抗肿瘤活性,主要通过诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖及阻断肿瘤相关信号通路发挥作用<sup>[7]</sup>。

网络药理学是融合系统生物学、网络科学与计算化学的新兴交叉学科,可通过“多成分、多靶点、多通路”的系统分析方法,揭示复杂疾病和药物作用间的分子网络联系<sup>[8-9]</sup>。与传统的“单一成分、单一靶点”研究模式相比,网络药理学更适合解析天然产物的多靶点协同作用机制。针对小白菊内酯在口腔癌治疗领域研究不足的问题,网络药理学能够系统性地预测并筛选潜在作用靶点和信号通路,为后续的实验验证提供理论依据,从而推动小白菊内酯的药理机制研究和新药开发。因此,本研究拟基于网络药理学方法,结合实验验证,探究小白菊内酯在口腔癌治疗中的多靶点作用机制及其潜在应用价值,为开发基于该天然先导化合物的新型口腔癌治疗策略提供科学依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

小白菊内酯(质量分数 99.38%)购自 APEXBIO 公司,人舌鳞癌 CAL27 细胞株(货号 CL-0265)购自武汉普诺赛生命科技有限公司,CCK-8 试剂盒

(货号 HX2301A)购自安徽华晓基因科技有限公司,BCA 定量试剂(货号 P0012)购自 Thermo Fisher Scientific 公司,表皮生长因子受体(EGFR)抗体(货号 66455)、非受体型酪氨酸激酶(SRC)抗体(货号 60316)、半胱天冬酶-3(Caspase-3)抗体(货号 19677)、cleaved-Caspase-3(货号 25128)抗体均购自美国 Proteintech 公司。

### 1.2 主要仪器

细胞恒温培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、超级净化工作台(日本 AIRTECH 公司)、全波长酶标仪(美国 Bio-RAD 公司)、低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司)、垂直电泳槽(美国 Bio-rad 公司)、自动曝光机(中国 Tanon 公司)、超高分辨率共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)、超低温冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

## 2 方法

### 2.1 获取小白菊内酯的相关基因靶点

登录 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库获取 PTL 的 SMILES 号,用其在 Swiss TargetPrediction (<https://swisstargetprediction.ch>)、PharmMapper ([www.lilab-ecust.cn/pharmmapper](http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper)) 数据库中检索小白菊内酯相关靶点,分别以 Probability $\geq 0.05$ 、Norm Fit $\geq 0.6$  为条件筛选后,合并、去重,得到小白菊内酯的潜在作用靶点。

### 2.2 获取口腔癌相关基因靶点

分别登录 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org>)、TTD 数据库([db.idrblab.net](http://db.idrblab.net)),以“oral cancer”为关键词,检索口腔癌相关基因靶点,以 Relevance score $\geq 11$  为条件,筛选后,合并去重获取口腔癌相关基因靶点。

### 2.3 获取交集靶点

登录 Venny 2.1.0 平台 ([bioinfogpcnb.csic.es/tools/venny](http://bioinfogpcnb.csic.es/tools/venny)) 将小白菊内酯及口腔癌相关靶点分别导入,获取药物-疾病交集靶点,并制作 Venn 图。

### 2.4 构建蛋白互作网络(PPI)

登录 STRING 数据库 (<https://string-db.org>),导入交集靶点,物种为“Homo sapiens”,构建 PPI 网络。利用 Cytoscape 3.10.3 软件分析网络,并构建 PPI 网络图。

### 2.5 进行 GO、KEGG 富集分析

利用 DAVID 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>) 进行交集靶点的基因本体(GO)功能和京都基因和

基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义的标准进行筛选。将数据导入微生信平台进行可视化分析, 分别选取 GO 前 10 位和 KEGG 前 20 位的结果进行绘图, 并利用 Cytoscape 3.10.3 构建“成分-靶点-通路”图。

## 2.6 分子对接

从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 和 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org>) 获取药物和 degree 值前 5 位关键靶点蛋白的结构。利用 Autodock Vina、Pymol 和 LigPlot+ 进行分子对接及可视化。

## 2.7 细胞实验

**2.7.1 CCK-8 实验检测细胞活力** 将对数生长期的 Cal-27 细胞制成细胞悬液, 以每孔  $8 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板中, 设对照组 (小白菊内酯  $0 \mu\text{mol/L}$ ) 及小白菊内酯 ( $10$ 、 $20$ 、 $30$ 、 $40$ 、 $50 \mu\text{mol/L}$ ) 组。细胞贴壁后, 分别加入不同浓度小白菊内酯的培养基进行处理。在处理  $24$ 、 $48$ 、 $72 \text{ h}$  后, 每孔加入  $10 \mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 并于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$  条件下孵育  $1 \text{ h}$ 。随后在酶标仪上于  $450 \text{ nm}$  波长检测各孔的吸光度 ( $A$ ) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

**2.7.2 克隆实验** 将对数生长期的 Cal-27 细胞以  $1\,000$  个/孔加入六孔板, 待细胞贴壁后, 加入小白菊内酯  $0$  (对照)、 $0.2$ 、 $0.4 \mu\text{mol/L}$  的培养基, 培养至肉眼可见明显克隆 (通常直径  $>0.5 \text{ mm}$ , 细胞数  $>50$  个), 期间每  $3 \sim 4$  天更换培养基, 然后对其固定、洗涤、染色、拍照。

**2.7.3 划痕实验** 将对数生长期的细胞以  $2 \times 10^5$  个/孔加入 6 孔板, 细胞长满后划痕, 加入小白菊内酯  $0$  (对照)、 $10$ 、 $15$ 、 $20 \mu\text{mol/L}$  培养基, 培养  $12$ 、 $24 \text{ h}$  后, 倒置显微镜下拍照分析。

**2.7.4 Western blotting 实验** 收集的经小白菊内酯  $0$  (对照)  $10$ 、 $15$ 、 $20 \mu\text{mol/L}$  处理的 Cal-27 细胞经含蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂的裂解液裂解, BCA 法测定蛋白浓度。等量蛋白样品与上样缓冲液按  $1:5$  比例混合,  $100^\circ\text{C}$  变性  $10 \text{ min}$ 。变性样品及预染蛋白 Marker 经 SDS-PAGE 凝胶 (依据目标蛋白分子量选择合适浓度) 电泳分离。通过湿法转印系统, 在恒定电流下将蛋白转移至 PVDF 膜。转印后的膜以  $5\%$  脱脂奶粉室温封闭  $1 \text{ h}$ 。接着, 膜与特异性一抗 ( $4^\circ\text{C}$  孵育过夜) 及对应种属的 HRP 标记二抗 (室温孵育  $1 \text{ h}$ ) 依次孵育, 每次抗体孵育后

均以 TBST 充分洗涤。最后, 使用 ECL 化学发光底物进行显影, 拍照, 进行蛋白表达量标准化分析。

**2.7.5 统计学分析** 所有数据均经过 3 次独立实验获得, 并采用 Graph Pad Prism V.10 软件对数据进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用 ANOVA 法, 两组间比较采用  $t$  检验。

## 3 结果

### 3.1 小白菊内酯对口腔癌的潜在作用靶点

从 SwissTargetPrediction 和 PharmMapper 数据库所获数据经筛选、合并、去重后共获得 86 个小白菊内酯的潜在作用靶点; GeneCards、OMIM、TTD 数据库所得数据筛选、合并、去重后, 得到 2473 个口腔癌基因靶点。根据所得药物、疾病靶点制作韦恩图, 得到 57 个药物-疾病交集靶点, 见图 1。

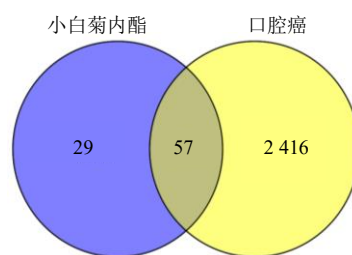


图 1 小白菊内酯-口腔癌共同靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn map of common target for oral cancer - parthenolide

### 3.2 PPI 网络

利用 STRING 数据库进行 PPI 网络构建, 如图 2 所示, 将结果导入 Cytoscape 3.10.3 软件, 利用 CytoHubba 插件拓扑分析, 根据 degree 值筛选出排名前 5 位的靶蛋白, 分别为 EGFR、SRC、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、雄激素受体 (AR)、AP-1 转录因子亚单位 (JUN)。

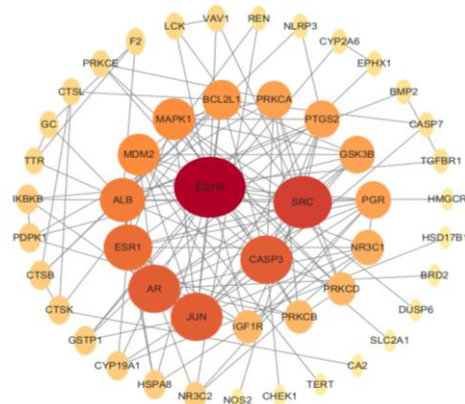


图 2 小白菊内酯-口腔癌靶点的 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram of parthenolide - oral cancer target

### 3.3 GO 与 KEGG 分析

通过 DAVID 数据库对所筛选出的交集基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析结果表明,如图 3 所示,小白菊内酯作用靶点在生物过程(BP)中显著富集于细胞凋亡过程、蛋白质磷酸化、肽基苏氨酸磷酸化以及表皮生长因子受体信号通路等关键过程,这些过程涉及细胞死亡调控、蛋白修饰和信号传导,提示小白菊内酯可能通过影响凋亡和

激酶通路发挥抗肿瘤作用。在细胞组分(CC)中,靶点富集于细胞质、核质和胞膜等部位,表明靶点蛋白广泛分布于细胞内关键区域,参与细胞结构和通讯。分子功能(MF)分析显示,靶点富集于酶结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、雌激素反应元件结合和类固醇结合等功能,反映了其在蛋白相互作用、激酶活性和激素响应中的多重角色。

KEGG 通路富集分析结果如图 4 所示,交集靶

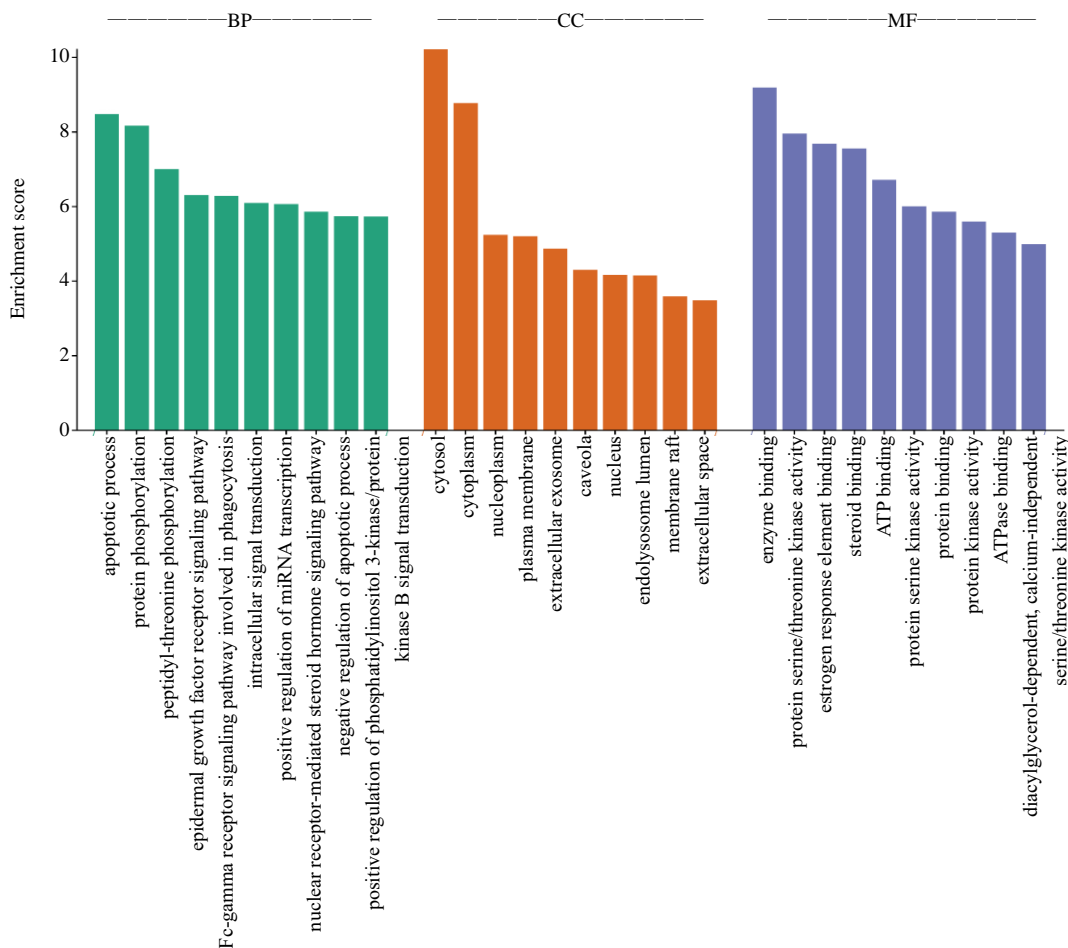


图 3 GO 富集分析图

Fig. 3 GO enrichment analysis chart

点主要富集于癌症相关通路、脂质与动脉粥样硬化通路、癌症中的蛋白多糖通路、细胞凋亡通路、前列腺癌通路、糖尿病并发症中的晚期糖基化终产物(AGEs)/晚期糖基化终产物受体(RAGE)信号通路等。利用 Cytoscape 3.10.3 制作“成分-靶点-通路”。如图 5 所示,KEGG 富集结果提示小白菊内酯相关靶点主要集中于肿瘤相关信号通路、细胞凋亡与激酶介导的信号传导、激素应答、细胞黏附/转移及炎症反应等通路。这些通路与基因的共同富集

提示小白菊内酯可能通过调控关键激酶和凋亡相关分子、影响肿瘤微环境与药物敏感性来发挥抗肿瘤作用。

### 3.4 分子对接

利用 AutoDock Vina 1.5.7 对筛选出的前 5 位核心靶点蛋白(EGFR、SRC、CASP3、AR、JUN)与活性化合物小白菊内酯进行分子对接分析,结合能越小说明配体和蛋白结合能力越强。如图 6 所示,小白菊内酯与各靶点均表现出较强的结合能力,其

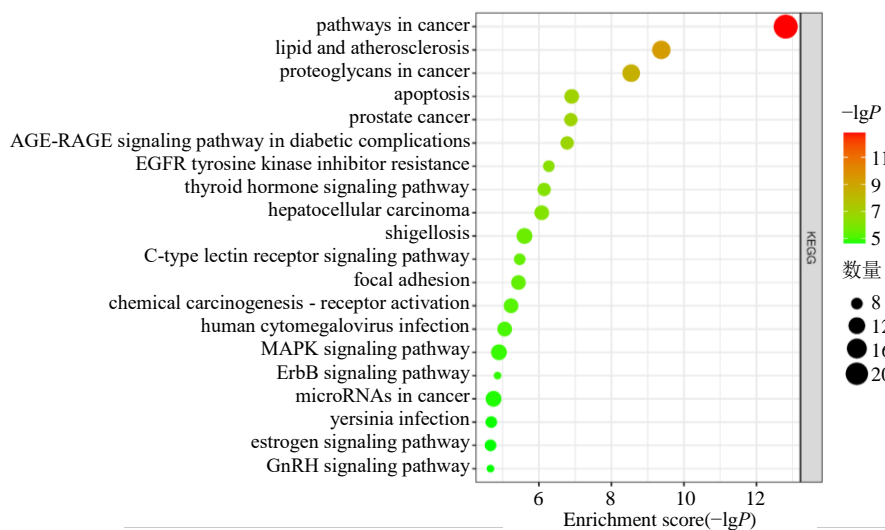


图 4 KEGG 富集分析气泡图  
Fig. 4 KEGG enrichment analysis bubble chart

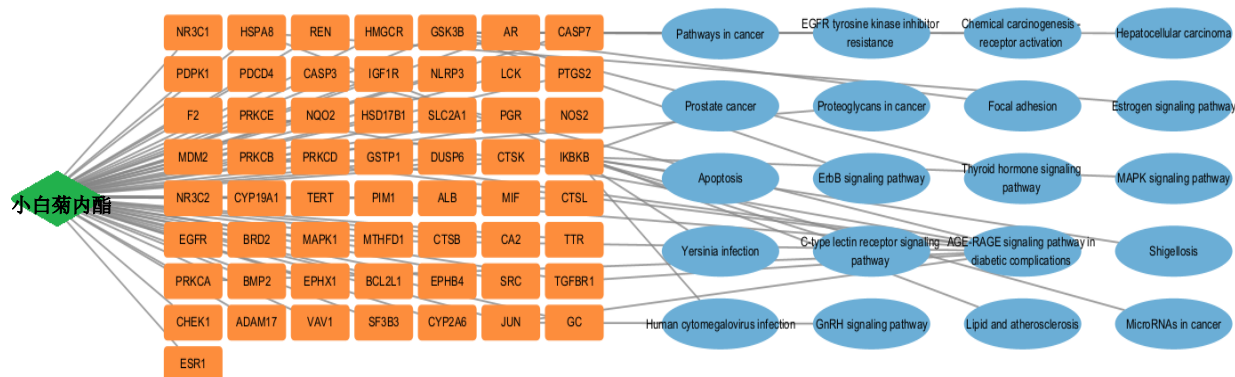


图 5 “成分 - 靶点 - 通路”网络图  
Fig. 5 “Component - target - pathway” network diagram

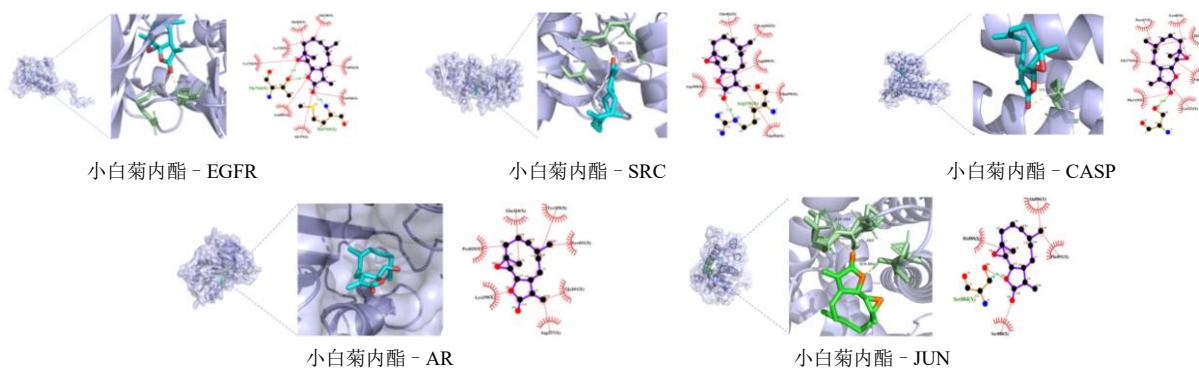


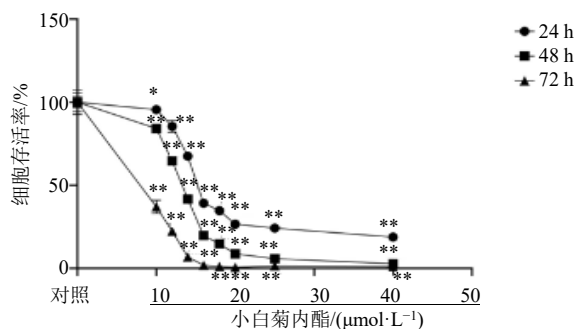
图 6 分子对接图  
Fig. 6 Molecular docking diagram

结合能分别为 EGFR:  $-7.8 \text{ kcal/mol}$  ( $1 \text{ cal} = 4.2 \text{ J}$ )、SRC:  $-7.6 \text{ kcal/mol}$ 、CASP3:  $-7.5 \text{ kcal/mol}$ 、AR:  $-7.0 \text{ kcal/mol}$ 、JUN:  $-6.5 \text{ kcal/mol}$ 。结合能均  $< -5.0 \text{ kcal/mol}$ ，表明存在显著结合活性。

### 3.5 小白菊内酯对 Cal-27 细胞活力的影响

如图 7 所示，与对照组比较，小白菊内酯各浓度可显著降低 Cal-27 细胞存活率 ( $P < 0.05, 0.01$ )。经 CCK-8 法测定，小白菊内酯作用 24、48、72 h





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

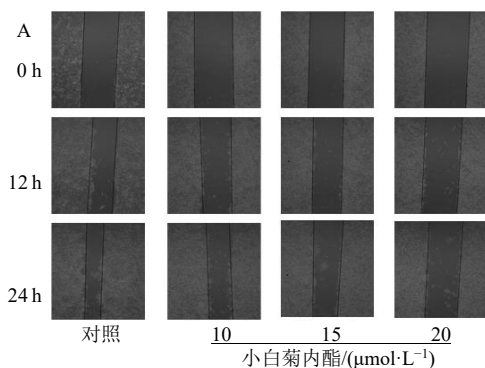
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group.

图 7 小白菊内酯对 Cal-27 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 7 Effect of parthenolide on the survival rate of Cal-27 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为 14.37、13.01、9.196  $\mu\text{mol/L}$ 。

基于上述药效学特征,本研究在短期功能实验中选取 10、15、20  $\mu\text{mol/L}$  3 个梯度浓度作为处理条件,以系统探讨小白菊内酯对 Cal-27 细胞的生物学效应;而在反映长期增殖能力的克隆形成实验中,则根据预实验结果选用低浓度(0.2、0.4  $\mu\text{mol/L}$ )小白菊内酯,以避免高浓度药物造成过度细胞死亡,保证能观察到药物对克隆形成率的真实影响。



A-Cal-27 细胞划痕愈合情况; B-Cal-27 细胞划痕愈合率。与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ 。

A-scratch healing condition of Cal-27 cells; B-scratch healing rate of Cal-27 cells. \*\* $P < 0.01$  vs control group.

图 9 小白菊内酯对 Cal-27 细胞划痕愈合的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 9 Effect of parthenolide on scratch healing in Cal-27 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

### 3.8 Western blotting 实验

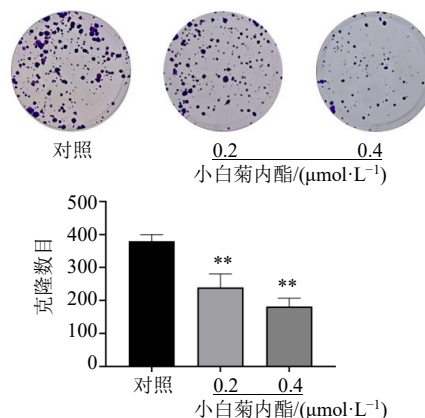
虽然 PPI 网络分析及分子对接结果共筛选出 5 个核心靶点蛋白,本研究选取排名前 3 位且具备明确药物-疾病作用机制支持的靶点 (EGFR、SRC、Caspase-3) 进行 Western blotting 验证。结果如图 10 所示,相比对照组,小白菊内酯 10、15、20  $\mu\text{mol/L}$

### 3.6 细胞克隆实验

克隆形成能力分析结果如图 8 所示,与对照组相比,小白菊内酯 0.2、0.4  $\mu\text{mol/L}$  组克隆团数量显著降低 ( $P < 0.01$ )。

### 3.7 划痕实验

划痕实验结果如图 9 显示,与对照组相比,小白菊内酯 10、15、20  $\mu\text{mol/L}$  细胞在划痕后 12、24 h 的划痕愈合率显著下降 ( $P < 0.01$ )。

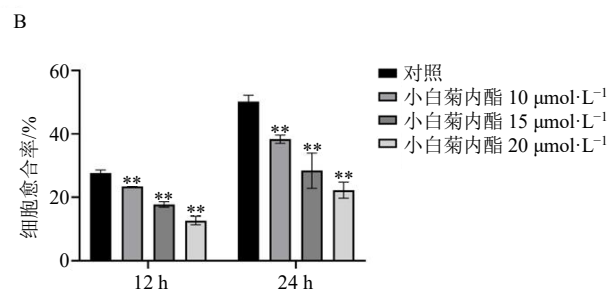


与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ 。

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

图 8 小白菊内酯对 Cal-27 细胞克隆形成能力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

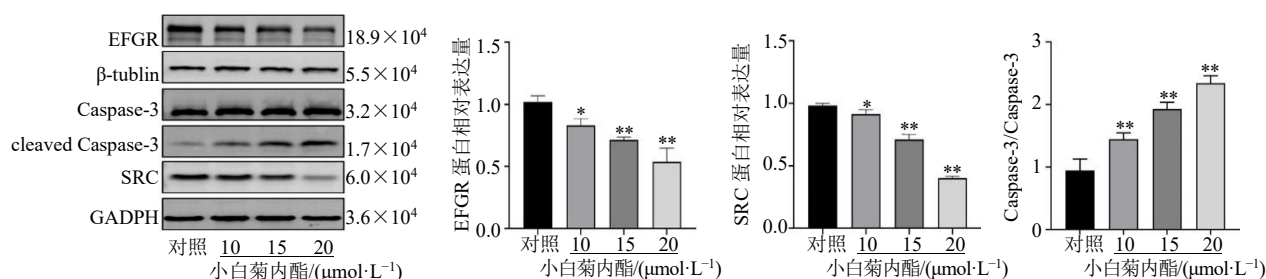
Fig. 8 Effect of parthenolide on the clone formation ability of Cal-27 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



组 EGFR、SRC 蛋白相对表达量显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01); Caspase-3、cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量显著升高 ( $P < 0.01$ )。

### 4 讨论

本研究基于网络药理学方法分析了小白菊内酯在口腔癌中的潜在作用机制。通过 Swiss Target



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

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

图 10 Westren blotting 法检测小白菊内酯对 Cal-27 细胞相关分子蛋白表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 10 Effect of parthenolide on the expression levels of related molecular proteins in Cal-27 cells was detected by Westren blotting ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Prediction 与 PharmMapper 等数据库预测靶点, 并与 GeneCards、OMIM、TTD 的疾病靶点交集分析, 获得了 57 个药物与疾病共同靶点。PPI 网络分析显示, EGFR、SRC、CASP3 (Caspase-3) 等蛋白在网络中处于关键节点, 提示其可能在小白菊内酯抗口腔癌作用中发挥核心调控作用。通过 DAVID 数据库进行 GO 与 KEGG 富集分析发现, 小白菊内酯相关靶点在 BP 中显著富集于细胞凋亡、蛋白质磷酸化、肽基苏氨酸磷酸化及表皮生长因子受体信号通路等环节, 这与 EGFR、SRC、CASP3 在调控增殖、迁移和凋亡中的作用高度一致; 在 CC 方面, 靶点分布广泛, 涵盖胞质、核质、胞膜等区域, 说明其可跨膜受体信号、胞内转导及核内调控多个层面发挥作用; MF 富集结果显示靶点涉及酶结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性及激素反应元件结合等多重功能, 提示小白菊内酯可同时调控激酶活性与蛋白相互作用网络。KEGG 分析显示, 靶点富集于癌症相关通路、EGFR/ErbB 家族信号通路、MAPK 信号通路、细胞凋亡通路、焦点黏附通路以及 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药通路, 同时涉及雌激素信号、GnRH 信号及炎症相关通路 (如 C 型凝集素受体信号通路)。这些结果共同提示小白菊内酯在抗肿瘤作用中可能通过抑制关键激酶活化、促进凋亡及调节肿瘤微环境发挥多靶点、综合性调控效应。分子对接结果显示, 小白菊内酯与 EGFR、SRC、Caspase-3 均能形成稳定结合, 提示其可能直接影响上述靶点活性。Western blotting 检测证实, 小白菊内酯可下调 Cal-27 细胞中 EGFR、SRC、CASP3 的蛋白水平, 上调了 cleaved-Caspase-3, 伴随细胞增殖率下降、克隆形成及迁移能力减弱。

EGFR (ErbB1/HER1) 是酪氨酸激酶受体家族的重要成员, 在口腔鳞状细胞癌中呈过表达, 并与患者肿瘤分期、淋巴结转移率、总体生存率呈显著相关性<sup>[10-11]</sup>。其激活可介导 MAPK/ERK、PI3K/Akt、JAK/STAT 等多条下游信号, 促进细胞持续增殖、抑制凋亡、增强侵袭, 同时影响微环境支持血管生成和免疫逃逸<sup>[12-14]</sup>。此外, EGFR 的过度活化在临床上与多种化疗及靶向药物耐药密切相关<sup>[15]</sup>。KEGG 富集结果中, EGFR 相关通路 (包括 EGFR/ErbB 家族通路及 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药通路) 显著富集, 进一步支持小白菊内酯在该信号节点上的潜在干预作用。小白菊内酯还可通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号, 减少炎症因子 (如 IL-6、TNF- $\alpha$ ) 释放, 间接影响 EGFR 通路的异常激活<sup>[16-17]</sup>。这说明小白菊内酯有望作为一种多靶点、低毒性的天然候选分子参与口腔癌治疗, 不仅能直接抑制 EGFR 信号, 还可能改善 EGFR 靶向药物的耐药问题。

SRC 蛋白是非受体型酪氨酸激酶家族的重要成员。大量研究表明, 在口腔鳞状细胞癌中, SRC 常呈高表达或高活化状态<sup>[18]</sup>。GO 功能分析显示, SRC 参与多种与细胞迁移、黏附及信号转导相关的生物过程, 包括细胞黏附斑组装、细胞骨架重塑、上皮-间质转化 (EMT)、凋亡信号调节等。KEGG 通路富集结果提示, SRC 显著富集于焦点黏附 (Focal adhesion) 通路、EGFR 信号通路、PI3K/Akt 信号通路及 MAPK 信号通路, 与肿瘤的增殖、侵袭和耐药性密切相关。在机制上通过磷酸化黏着斑激酶 FAK、paxillin 等多种下游结构蛋白及 STAT3、PI3K 等信号分子, 促进肿瘤细胞的上 EMT、细胞骨架重排以及侵袭能力增强<sup>[19]</sup>。在 EGFR 靶向治疗

或化疗过程中, SRC 的异常激活可绕过受体信号阻断, 维持下游促增殖通路的活性, 从而导致耐药<sup>[20]</sup>。在本研究中, Western blotting 结果显示, 小白菊内酯处理可显著下调细胞 SRC 蛋白水平。这与 GO、KEGG 分析结果相呼应, 提示小白菊内酯可能通过抑制 SRC 的表达, 调控下游多种蛋白及信号分子, 最终在多条信号通路上实现对口腔癌的综合抑制效应。Western blotting 实验不仅验证了小白菊内酯对 SRC 的直接抑制作用, 也为其多靶点调控机制提供了蛋白水平依据, 进一步佐证了网络药理学预测的可靠性。

Caspase-3 在细胞凋亡的执行阶段发挥核心作用, 属于半胱天冬酶家族的关键成员<sup>[21]</sup>。其原酶 (pro-Caspase-3) 在受到凋亡信号刺激后, 经上游的活化酶 (如 Caspase-8 或 Caspase-9) 切割为活化的 cleaved-Caspase-3。活化后的 Caspase-3 通过裂解多种结构蛋白, 实现 DNA 断裂、细胞骨架重排和细胞形态改变, 从而完成不可逆的细胞死亡过程<sup>[22-23]</sup>。其在口腔鳞状细胞癌中常呈低活性或表达下调<sup>[24]</sup>。KEGG 富集分析表明凋亡通路在本研究靶点中显著富集。实验结果显示, 小白菊内酯上调 Caspase-3 水平说明其促进了凋亡信号通路的最终执行步骤。结合 KEGG 富集结果, 小白菊内酯对 Caspase-3 的调控不仅可能通过线粒体依赖途径 (内源性凋亡) 增强细胞色素 c 释放, 还可能与抑制 NF- $\kappa$ B 信号降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达有关, 从而为 Caspase-3 激活创造条件。另外, EGFR 与 SRC 的同时下调可减少上游促生长信号输入, 降低 PI3K/Akt、MAPK/ERK 等通路对凋亡的抑制作用, 使肿瘤细胞更易进入凋亡流程<sup>[25]</sup>。这种“抑制促存活信号+促进执行酶激活”的双向效应, 是小白菊内酯在口腔癌中呈现较强抗肿瘤活性的关键机制之一。

综上, 本研究结合网络药理学及体外实验, 揭示了小白菊内酯对口腔癌的多靶点、多通路作用机制。小白菊内酯可通过干预 EGFR、SRC、Caspase-3 等核心节点, 抑制增殖与迁移、促进凋亡, 并可能通过调节微环境与耐药相关通路增强治疗效果。这为其作为低毒性天然候选药物、参与联合精准治疗提供了理论基础与实验支持。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] Zandoni D K, Montero P H, Migliacci J C, *et al.* Survival

outcomes after treatment of cancer of the oral cavity (1985-2015) [J]. *Oral Oncol*, 2019, 90: 115-121.

- [2] Bray F, Laversanne M, Sung H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [3] Koyfman S A, Ismaila N, Crook D, *et al.* Management of the neck in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: ASCO clinical practice guideline [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(20): 1753-1774.
- [4] Neville B W, Day T A. Oral cancer and precancerous lesions [J]. *CA Cancer J Clin*, 2002, 52(4): 195-215.
- [5] Tarle M, Lukšić I. Pathogenesis and therapy of oral carcinogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(12): 6343.
- [6] Freund R R A, Gobrecht P, Fischer D, *et al.* Advances in chemistry and bioactivity of parthenolide [J]. *Nat Prod Rep*, 2020, 37(4): 541-565.
- [7] Mathema V B, Koh Y S, Thakuri B C, *et al.* Parthenolide, a sesquiterpene lactone, expresses multiple anti-cancer and anti-inflammatory activities [J]. *Inflammation*, 2012, 35(2): 560-565.
- [8] Zhang P, Zhang D F, Zhou W, *et al.* Network pharmacology: Towards the artificial intelligence-based precision traditional Chinese medicine [J]. *Brief Bioinform*, 2023, 25(1): bbad518.
- [9] 梁爽, 唐源, 兰天, 等. 基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨雷公藤红素调控铁死亡抑制胃癌的作用机制 [J]. *中草药*, 2025, 56(7): 2385-2395.
- [10] Huang Z X, Rui X, Yi C, *et al.* Silencing LCN2 suppresses oral squamous cell carcinoma progression by reducing EGFR signal activation and recycling [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 60.
- [11] Du Y F, Karatekin F, Wang W K, *et al.* Cracking the EGFR code: Cancer biology, resistance mechanisms, and future therapeutic frontiers [J]. *Pharmacol Rev*, 2025, 77(5): 100076.
- [12] Rubio K, Romero-Olmedo A J, Sarvari P, *et al.* Non-canonical integrin signaling activates EGFR and RAS-MAPK-ERK signaling in small cell lung cancer [J]. *Theranostics*, 2023, 13(8): 2384-2407.
- [13] Nweke E, Ntwasa M, Brand M, *et al.* Increased expression of plakoglobin is associated with upregulated MAPK and PI3K/AKT signalling pathways in early resectable pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(6): 4133-4141.
- [14] Li J Y, Zheng J L, Lin B H, *et al.* Knockdown of NCAPG promotes the apoptosis and inhibits the invasion and migration of triple negative breast cancer MDA MB 231



- cells via regulation of EGFR/JAK/STAT3 signaling [J]. *Exp Ther Med*, 2023, 25(3): 119.
- [15] Chong C R, Jänne P A. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer [J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1389-1400.
- [16] Zhu S P, Sun P, Bennett S, *et al.* The therapeutic effect and mechanism of parthenolide in skeletal disease, cancers, and cytokine storm [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1111218.
- [17] Shostak K, Chariot A. EGFR and NF- $\kappa$ B: Partners in cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2015, 21(6): 385-393.
- [18] Zhou Q, Liu S S, Kou Y Y, *et al.* ATP promotes oral squamous cell carcinoma cell invasion and migration by activating the PI3K/AKT pathway via the P2Y2-Src-EGFR axis [J]. *ACS Omega*, 2022, 7(44): 39760-39771.
- [19] Raji L, Tetteh A, Amin A R M R. Role of c-Src in carcinogenesis and drug resistance [J]. *Cancers*, 2023, 16(1): 32.
- [20] Pan Z Z, Wang K, Wang X N, *et al.* Cholesterol promotes EGFR-TKIs resistance in NSCLC by inducing EGFR/Src/Erk/SP1 signaling-mediated ERRA re-expression [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 77.
- [21] Nano M, Mondo J A, Harwood J, *et al.* Cell survival following direct executioner-caspase activation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(4): e2216531120.
- [22] Wang B Y, Moon S P, Cutolo G, *et al.* HSP27 inhibitory activity against Caspase-3 cleavage and activation by Caspase-9 is enhanced by chaperone O-GlcNAc modification *in vitro* [J]. *ACS Chem Biol*, 2023, 18(8): 1698-1704.
- [23] Yang Q, Li S Y, Fu Z Z, *et al.* Shikonin promotes adriamycin induced apoptosis by upregulating caspase 3 and caspase 8 in osteosarcoma [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 1347-1352.
- [24] Veeravarmal V, Austin R D, Siddavaram N, *et al.* Caspase-3 expression in normal oral epithelium, oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma [J]. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2016, 20(3): 445-452.
- [25] Lin X M, Wang G F, Liu P, *et al.* Gallic acid suppresses colon cancer proliferation by inhibiting SRC and EGFR phosphorylation [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(6): 638.

[责任编辑 高源]