

基于网络药理学和分子对接的天麻钩藤汤治疗胶质母细胞瘤的机制分析

章超龙^{1,2}, 曾 传^{1,2}, 何春明^{2*}

¹赣南医科大学第一临床医学院, 江西 赣州

²赣南医科大学第一附属医院神经外科, 江西 赣州

收稿日期: 2025年10月6日; 录用日期: 2025年10月31日; 发布日期: 2025年11月10日

摘 要

目的: 胶质母细胞瘤(GBM)是一种侵袭性高、病死率高的原发脑肿瘤。天麻钩藤汤(TMGT)是一种具有降压、神经保护和潜在抗肿瘤作用的中药制剂, 但对其抗肿瘤作用机制的研究较少。因此, 我们对TMGT和GBM之间的相互作用进行了检验和测试。方法: TMGT的有效成分和靶点是从TCMSP和HERB数据库下载的, GBM靶点由来自GEO数据库的差异表达基因和来自DisGeNET和GeneCards数据库的靶点组成。在此基础上, 构建了成分-目标网络 and PPI网络, 找出了GBM TMGT的核心网络。最后, 通过分子对接验证了成分与疾病靶点之间的关系。结果: 我们从中草药数据库中获得了937个成分指标, 438个疾病指标和115个交叉指标。生物信息学分析结果表明, 这些交叉基因与细胞的存活、增殖和凋亡相关。拓扑分析确定了在核心网络中重要的12个核心基因(TP53, STAT3, CDK1, HDAC1, CCNB1, CCND1, ESR1, BIRC5, ABL1, AURK1, CDK2, PLK1), 尤其是CDK1。单细胞测序分析发现, 与其他核心PPI基因相比, STAT3在GBM组织中高表达, 而TP53则具有最高的平均表达水平。在分子对接结果中, CDK1与Corynox-eine的结合能最低。结论: 本研究揭示了天麻钩藤汤抗胶质母细胞瘤的有效成分及其多靶点和信号通路, 为天麻钩藤汤治疗胶质母细胞瘤提供了理论支持。

关键词

胶质母细胞瘤, 中医药, 天麻钩藤汤, 网络药理学, 单细胞RNA测序分析, 分子对接

Mechanistic Analysis of the Treatment of Glioblastoma with Tianma Gouteng Decoction Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

Chaolong Zhang^{1,2}, Chuan Zeng^{1,2}, Chunming He^{2*}

*通讯作者。

文章引用: 章超龙, 曾传, 何春明. 基于网络药理学和分子对接的天麻钩藤汤治疗胶质母细胞瘤的机制分析[J]. 临床医学进展, 2025, 15(11): 799-818. DOI: 10.12677/acm.2025.15113163

¹The First Clinical Medical College, Gannan Medical University, Ganzhou Jiangxi²Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou Jiangxi

Received: October 6, 2025; accepted: October 31, 2025; published: November 10, 2025

Abstract

Objective: Glioblastoma (GBM), an aggressive primary brain tumor with a high fatality rate. Tianma Gouteng Decoction (TMGTD), a traditional Chinese medicine formulation, which has antihypertensive, neuroprotective and potentially antitumor effects, but research on the mechanism of anti-tumor is lacking. Therefore, we have examined and tested the interaction between the TMGTD and GBM. **Methods:** Active ingredients and targets of TMGTD were downloaded from the TCMSP and HERB databases, and GBM targets consist of the intersection of differentially expressed genes from the GEO database and targets from the DisGeNET and GeneCards databases. Next, the ingredient-target network and PPI network were constructed to find the core network of TMGTD for GBM. Finally, Molecular docking was used to verify the relationship between the ingredients and disease targets. **Results:** We got 937 ingredient targets from TCMSP and the HERB database, 438 disease targets and 115 intersecting targets. The results of bioinformatics analysis show that these intersecting genes were associated with cellular survival, proliferation, and apoptosis. The topological analysis identified 12 core genes (TP53, STAT3, CDK1, HDAC1, CCNB1, CCND1, ESR1, BIRC5, ABL1, AURK1, CDK2, PLK1) that are important in the core network, especially CDK1. Single-cell sequencing analysis identified STAT3, which was highly expressed in GBM tissues compared to other core PPI genes, and TP53, which had the highest average expression level. In the results of molecular docking, CDK1 exhibited the lowest binding energy with Corynoxine. **Conclusion:** This study showed the effective ingredients of TMGTD against GBM, as well as multiple targets and signaling pathways, providing theoretical support for the treatment of TMGTD with GBM.

Keywords

Glioblastoma, Traditional Chinese Medicine, Tianma Gouteng Decoction, Network Pharmacology, Single Cell RNA Sequencing Analysis, Molecular Docking

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Open Access

1. 介绍

胶质母细胞瘤是恶性程度最高、病死率最高的原发脑肿瘤之一。这种肿瘤的快速生长和异质性导致其侵袭性进展，导致神经功能障碍和认知能力下降等症状。目前对新诊断病例的标准治疗包括术后放疗联合替莫唑胺和随后的辅助剂替莫唑胺[1]。然而，肿瘤的侵袭性及其在脑组织中的深层位置使完全切除具有挑战性。此外，即使在手术成功后，残留肿瘤细胞的存在也可能导致复发[2]。此外，胶质母细胞瘤通常表现出对标准放疗和化疗的抵抗，血脑屏障限制了治疗剂向肿瘤组织的输送，构成了治疗的挑战[3]。此外，由于遗传的异质性，不同部位的肿瘤细胞可以表现出不同的表型和基因表达模式，这给治疗带来了挑战。目前，胶质母细胞瘤的治疗仍然是一个紧迫的问题。因此，研究人员正在研究新的治疗策略，如免疫治疗、基因治疗和靶向治疗。免疫疗法需要刺激患者的免疫系统特异性地靶向和攻击肿瘤细胞[4]

[5]; 基因疗法通过引入特定基因或纠正遗传异常来调节肿瘤的发展和进展[6]-[8]。靶向治疗通过选择性地靶向分子靶点来抑制肿瘤细胞的增殖和存活[9] [10]。天麻钩藤汤(TMGTDT)是一种中药制剂, 已显示出治疗胶质母细胞瘤的潜力。TMGTDT 是一种由多种草药组成的草本化合物, 以其抗高血压、抗氧化和神经保护特性而被公认[11] [12]。周等人的一项研究总结了侯伟教授使用中医药传输支持平台(V2.5)治疗胶质瘤所采用的剂量模式。这项研究表明, 作为侯伟教授治疗方法中的基本草药配方, TMGTDT 通过个性化修改进一步增强了其抗癌作用[13]。为阐明天麻钩藤汤治疗胶质母细胞瘤的作用机制, 本研究采用网络药理学和分子对接方法。网络药理学是集系统生物学、网络分析和药物化学于一体, 研究药物与生物体相互作用的交叉学科。分子对接是网络药理学研究分子相互作用的重要计算化学方法。通过使用分子对接, 研究人员可以筛选具有潜在活性的化合物, 优化它们的设计, 并确定更有效的候选药物。这种方法集成了来自药物化学、靶标数据库和疾病基因组学数据的信息, 以揭示药物与靶标的相互作用和调控网络。网络药理学分析有助于预测和验证天麻钩藤汤影响胶质母细胞瘤的相关靶点, 并探索其在疾病发展中的调控机制。

2. 材料和方法

TMGTDT 靶标的筛选 从传统中药综合数据库(TCMID) (<http://www.megabionet.org/tcmid/>) [14]中检索 TMGTDT 制剂的成分。同时, 从《中药系统药理学数据库与分析平台》(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) [15]中获取这 11 种中草药的有效成分, 并利用中草药数据库(<http://herb.ac.cn>)进行比较和补充, 获得这 11 种中草药的有效成分[16]。以口服生物利用度(OB)≥ 为 30%, 类药性(DL)≥ 为 0.18, 血脑屏障通透性(BBB)≥ 为 0.3 [17]为标准建立筛选条件。

89 种有效成分的 SIMILES IDs 从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) [18]数据库中获得随后使用(SwissTargetPrediction.ch) (www.SwissTargetPrediction.ch) [19]数据库预测这些有效成分的靶点。对于没有 SIMILES IDs 的活性成分, 通过使用相应成分的 2D 结构在 SwissTargetForecast 数据库中构建 2D 结构来进行预测。

2.1. 胶质母细胞瘤相关基因的筛选

相关数据(GSE147352)通过使用 R 软件(调整 p 值 < 0.05 , $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$)中的 Geo Query 和 DESeq2 包访问 GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)获得[20] [21]。还从 DisGeNet 数据库[22]和 GeneCards 数据库(<http://www.genecards.org/>) [23]中获得了与大流行病有关的目标。以“Glioblastoma”为关键词进行检索, 获得相关靶点。在 DisGeNet 数据库中, 选择符合条件评分 $GDA > 0.01$ 的基因。同样, 在 GeneCards 数据库中, 识别出相关性分数 > 1 的基因。最后, 为了确定交叉基因, 从 DisGeNet 和 GeneCards 数据库检索到的疾病靶标、活性成分活性靶标、GEO 差异基因(DEG)之间进行了比较和评估。从这一分析中得到的重叠基因显示了需要进一步研究的感兴趣的基因。

2.2. 网络分析

使用 Cytoscape v3.10.0 构建网络, 可视化 11 种药物、89 种成分、937 个靶点和 115 个交叉靶点之间的关系。为了观察这些网络的核心关系, 我们使用了拓扑分析和设置筛选标准, 度、贴近度中心度、中间度中心度均大于平均水平。这一进程有助于确定网络中最相关和最重要的要素。

度、贴近度中心度和中间度中心度是评估网络中节点重要性的常用度量。以下是每个指标的简要说明: 1) 度: 度衡量一个节点与网络中其他节点的直接连接数量。程度越高表示联系越多, 通常与网络中的重要性或影响力越大相关。程度越高表示节点拥有更多连接, 这通常与网络中更高的重要性或影响力

相关联。2) 接近中心性：接近中心性量化了一个节点能够到达网络中其他节点的难易程度。它被计算为从一个节点到所有其他节点的平均最短路径距离的倒数。3) 中间性中心性：中间性中心性标识充当网络中信息流的基本中介的节点。它量化了一个节点位于其他节点对之间的最短路径上的次数。

2.3. 蛋白质相互作用(PPI)分析

将 115 个交叉目标引入 String database 数据库(<https://string-db.org/>), 用于分析蛋白质 - 蛋白质相互作用[24]。在分析中, 智人被选为感兴趣的物种, 最低交互得分阈值被设置为“最高置信度 > 0.9”。这一标准确保在分析中只考虑具有高置信度的交互作用。随后, 将获得的结果导入到 Cytoscape v3.10.0 中, 以进行额外的分析和 PPI 网络的可视化。利用 Cytoscape 软件的 CytoHubba (v0.1)插件筛选出 MNC 值、MCC 值和 Dege 值排在前 20 位的 PPI 指标, 并将结果相交得到核心指标。同时, 利用 Cytoscape 软件中的 MCODE 插件对 PPI 蛋白进行聚类分析, 生成了一个高度连通的子网络。

最大团中心性(MCC)和最大邻域分量(MNC)是专门用来评估网络中特定子结构内节点重要性的中心性度量。

2.4. 功能富集分析

为了进行富集分析, 我们使用 R 软件对本研究获得的 937 个基因和 115 个交叉基因进行了处理。我们使用 ClusterProfiler、org.Hs.eg.db 和 ggplot2 包来可视化和分析 GO terms 和 KEGG pathways。在分析过程中, 我们使用过滤标准来确定具有统计学意义的结果。将 p 值过滤标准设置为 p 值过滤 < 0.05, 确保只考虑 p 值低于该阈值的浓缩结果。此外, 调整后的 p 值过滤标准被设置为 p.adjust < 0.05, 允许识别具有显著调整水平的丰富项或路径可以用于多次测试。

2.5. 分子对接

分子对接是一种预测和分析小分子(配体)与目标蛋白质相互作用的计算方法。为了进行分子对接, 进行了以下步骤:

1) 获取核心成分三维结构的 pdbqt 表格文件: 核心成分的 pdbqt 表格文件从 TCMSP 数据库中获取。此外, PubChem 数据库用于补充配体的结构信息。

2) 检索和下载目标蛋白 pdbqt 表格文件: 使用蛋白质数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/>)搜索和下载这些目标蛋白的 pdbqt 表格文件[25]。

3) 目标蛋白的前处理: 使用 PYMOL 软件对靶蛋白进行了前处理, 包括必要的修饰和准备, 以优化其结构以进行对接模拟。

4) 小分子的前处理: 使用 Autodock 1.5.7 对小分子进行前处理, 包括氢原子的添加和适当的电荷分配, 以确保配体的准确表示。

5) 分子对接模拟: 最后, 进行分子对接模拟, 将配体与靶蛋白的结合部位进行比对, 并计算相应的结合能。这些模拟能够评估配体和目标蛋白之间的潜在相互作用和亲和力。

3. 结果

3.1. 本研究综述

研究过程首先, 检索和筛选 TMGTD 的有效成分和作用靶点, 与 GBM 差异表达基因和治疗靶点交叉, 构建成成分 - 靶点 - 疾病网络。拓扑分析确定了 GBM 的 TMGTD 核心网络。其次, 对相交的基因靶点进行 GO 和 KEGG 分析, 以阐明 TMGTD 抗 GBM 的作用机制。最后, 通过分子对接进一步验证了

TMGTD 对 GBM 的治疗潜力。为了从不同水平全面了解 TMGTD 的发病机制和作用，我们利用生物信息学的方法，分别对 TMGTD 的 937 个组分靶点和 115 个交叉基因进行了分析。通过对这两个网络的比较，能够确定在 TMGTD 对 GBM 的疗效方面发挥重要作用的关键因素和途径。这些信息对 TMGTD 的进一步研究和优化具有重要的指导意义。通过了解 TMGTD 对细胞以及大脑中的分子水平的影响，并将其与 GBM 的整体治疗效果联系起来，可以更全面地了解 TMGTD 的治疗潜力和机制。并将其与 GBM 的整体治疗效果联系起来，可以更全面地了解 TMGTD 的治疗潜力和机制。

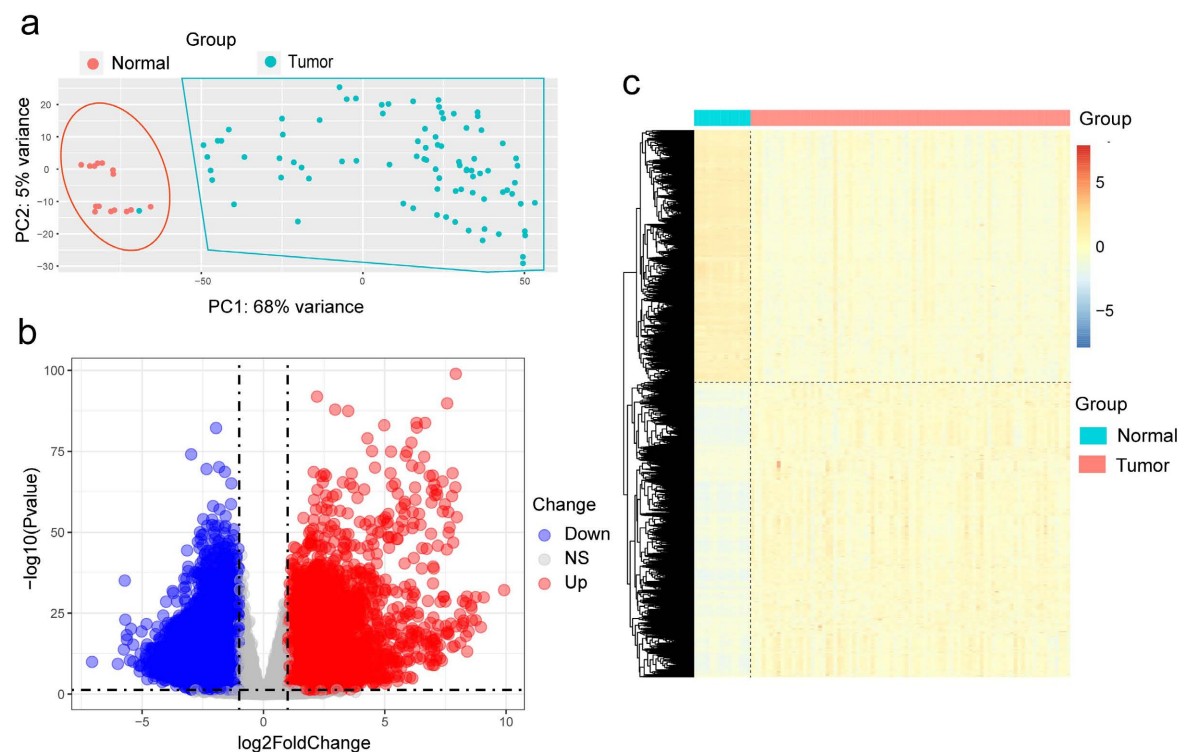
3.2. 目标集合

TMGTD 由 11 种中草药组成，分别为：1) 黄芩；2) 钩藤；3) 杜仲；4) 天麻；5) 益母草；6) 夏天无；7) 苏木；8) 鲍鱼；9) 紫杉；10) 栀子；11) 何首乌。通过中草药筛选，共鉴定出活性成分，均具有穿越血脑屏障的能力。在这些成分中，钩藤(Gouteng, GT) a 和黄芩(Huangqin, HQ)的有效成分含量最高，共有 27 种。另一方面，桑寄生(Sangjisheng, SJS)只有一种活性成分，未发现茉莉花(Shanzhi, SZ)和益母草(Yejiaoteng, YJT)的有效成分。表 1 显示了 11 种草药的信息。接下来，使用 SwissTargetForecast 数据库，根据活性成分预测作用靶点，共产生 937 个独特的成分靶点。

Table 1. 11 Information on medicinal plants
表 1. 11 种药用植物的信息

草药中文名	草药拉丁名	有效成分/所有靶点/ 疾病靶点的数量	药效
黄芩	<i>Radix scutellariae</i>	27/1404/55	清热燥湿、导火解毒、止血、安胎。
钩藤	<i>Ramulus uncaria cum uncis</i>	27/744/85	止风止痛、清热安肝
天麻	<i>Gastrodia elata</i>	19/306/64	止风止痛、平肝降阳、祛风通络。
杜仲	<i>Cortex eucommiae</i>	14/386/53	降血压，补肝补肾，壮筋骨，安胎。
益母草	<i>Leonurus cardiaca</i>	5/304/40	活血调经，解禁尿，消肿
朱茯神	<i>Poria cum ligno hospite</i>	2/179/27	清热解毒、镇静、活血化痰、抗菌消炎
川牛膝	<i>Radix cyathulae</i>	2/124/22	活血化痰法、祛风散湿
石决明	<i>Haliotidis</i>	2/179/27	治疗头痛、头晕导致的视力模糊、视神经萎缩和夜盲。
桑寄生	<i>Herba taxill</i>	1/44/4	祛风湿、壮筋骨、活血解毒
山栀	<i>Fructus gardeniae</i>	0/0/0	治疗热病躁动、尿色暗黄、血尿难痛、血尿、血热所致咯血、鼻出血、眼部炎症、脓疮、外用扭伤、瘀伤。栀子(烧焦)：咯血、鼻出血、血尿、血热性子宫出血。
夜交藤	<i>Polygonum multiflorum</i>	0/0/0	养心安神，祛风通络。

用 R 软件进行差异基因分析，共鉴定出 6816 个差异基因，其中上调基因 3673 个，下调基因 3143 个。这些结果如图 1 所示。从 DisGeNet 数据库和 GeneCards 数据库下载的基因数量分别为 1467 和 2945。将三者相交，得到 438 个交叉基因。通过对 937 个成分靶点和 438 个交叉基因的比较，最终得到 115 个交叉基因。



(a) DEGS 主成分分析图，DEGS 在正常组和肿瘤组中的分布；(b) DEGS 火山图，红色代表上调基因，蓝色代表上调基因，灰色代表正常基因；(c) GBM 中 6816 个 DEGS 的热图。

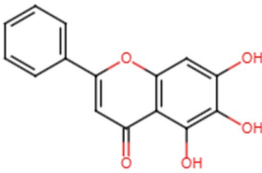
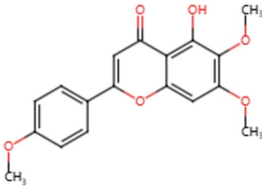
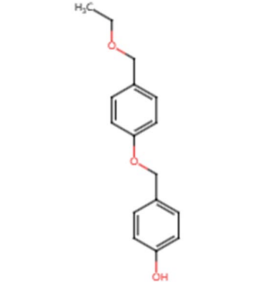
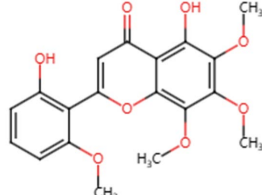
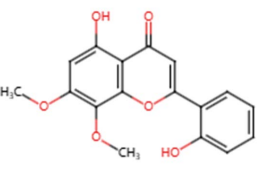
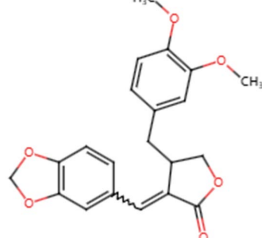
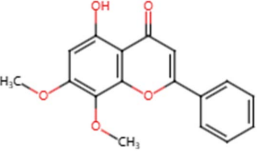
Figure 1. DEGS in GBM
图 1. GBM 中 DEGS

3.3. 网络构建

Table 2. The top10 effective ingredient information of Tianma Gouteng Decoction (TMGTD)
表 2. 天麻钩藤汤排名前 10 位的有效成分的信息

Ingredients ID	Ingredients Name	Molecule Structure	Degree	Source
HBIN009937	4,4'-dihydroxy dibenzyl ether	<chem>CC(C)(C)c1ccc(O)cc1COc2ccc(O)cc2CO</chem>	31	Tianma
MOL008477	Corynoxine	<chem>COC(=O)C1=C(C=C(C=C1)C2=CC=CC=C2)C3=CC=CC=C3N4C(=O)CCN4C=C</chem>	30	Gouteng
MOL000525	Norwogonin	<chem>Oc1cc(O)c2c(c1)oc(=O)c3cc(O)c(O)cc32</chem>	29	Huangqin

续表

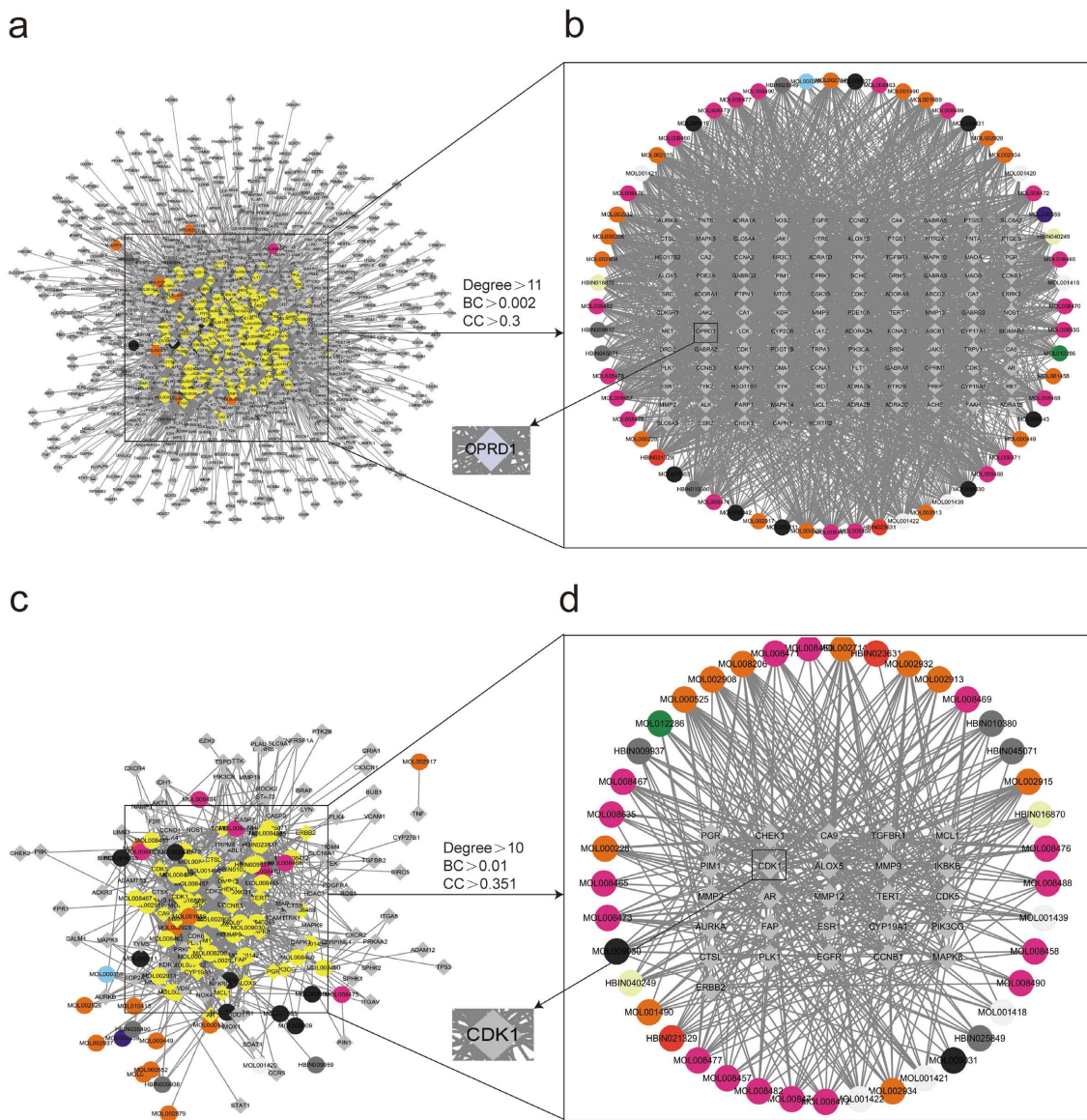
MOL002714	Baicalein		28	Huangqin
MOL002915	Salvigenin		27	Huangqin
HBIN010380	4-ethoxymethylphenyl-4'-hydroxybenzylether		26	Tianma
MOL002934	Neobaicalein		25	Huangqin
MOL002932	Panicolin		25	Huangqin
HBIN045071	suchilactone		25	Tianma
MOL008206	Moslosooflavone		24	Huangqin

以 11 种中药材、89 种有效成分、937 个靶点和 115 个交叉基因为基础，利用 Cytoscape 3.10.0 构建了成分 - 靶点网络和成分 - 靶点 - 疾病网络。排名前 10 位的有效成分的详细信息见(表 2)。在这些网络

中,靶基因被描绘成棱柱图案,而组件则被描绘成圆圈。每种成分都被分配了特定的颜色如下: CNX 是绿色的, DZ 是黑色的, GT 是粉色的, HQ 是橙色的, SJM 是红色的, TM 是灰色的, YMC 是白色的, ZFS 是米色的, SJS、HQ、GT 的共同成分是紫色, CNX、DZ、HQ 和 YMC 的共同成分是蓝色。将度值最大的基因单独标记出来。

然后建立了成分-目标网络(图 2(a)), 该网络由 1014 个节点和 5440 条边组成。在 Cytoscape V3.10 中进行拓扑分析, 筛选出 TMGTD 用于颅内作用的核心网络(图 2(b)), 包括 175 个节点和 2031 条边。

成分-靶标-疾病网络(图 2(c))由 188 个节点和 958 条边组成。根据成分-目标核心网络的过滤条件进行过滤后得到核心网络(图 2(d)), 该核心网络由 67 个节点和 386 条边组成。

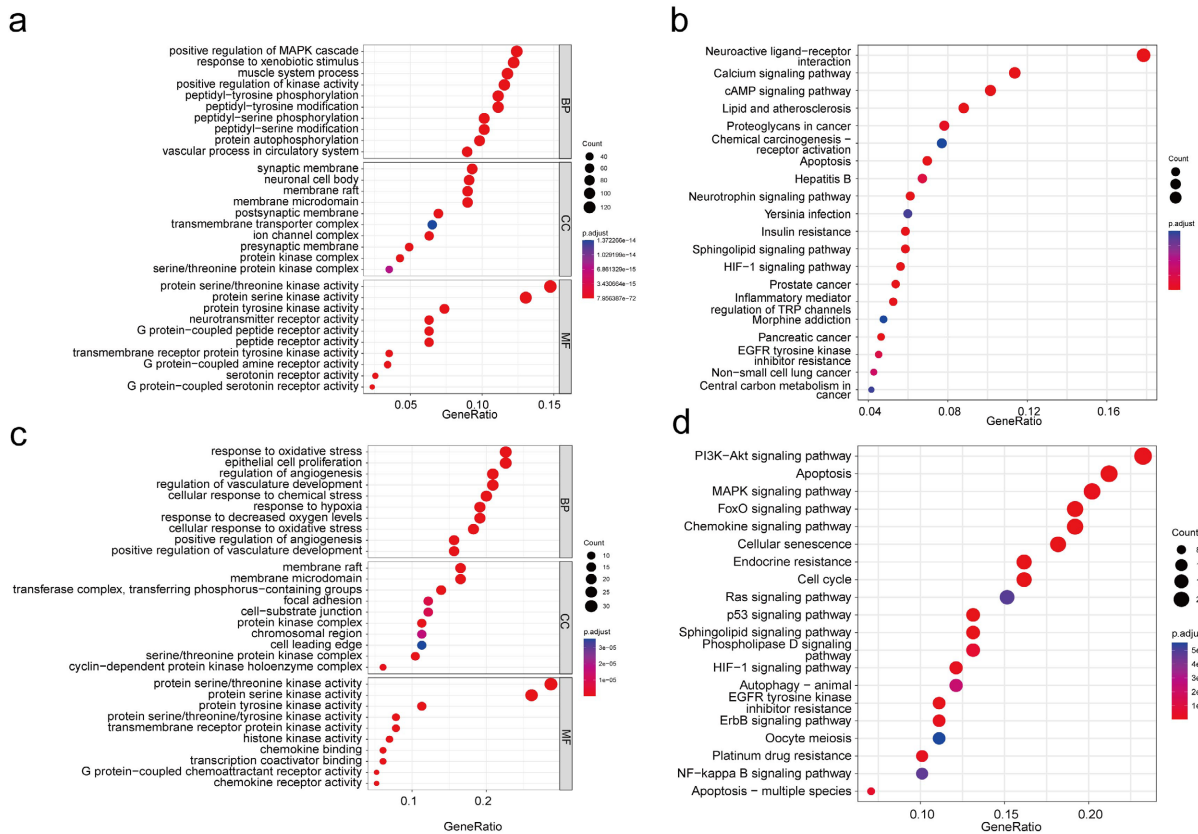


(a) 成分-靶点网络。(b) 核心成分-靶点网络(以 Degree > 11, BC > 0.002, CC > 0.3 筛选所得)。(c) 成分-靶点-疾病网络。(d) 核心成分-靶点-疾病网络(以 Degree > 10、BC > 0.01、CC > 0.351 筛选所得。)

Figure 2. Network diagram
图 2. 网络图

3.4. 功能富集分析

我们使用 R 软件(图 3(a)、图 3(b))可视化了 937 个目标的 GO 和 KEGG 分析结果。分析表明, 937 靶点分布多样, 主要定位于突触膜、神经元胞体、膜筏、膜微域、突触后膜、跨膜转运体、离子通道复合体、突触前膜、蛋白激酶复合体和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合体。此外, 937 靶标还显示了广泛的分子功能, 包括蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白丝氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、神经递质受体活性、G 蛋白偶联多肽受体活性、多肽受体活性、跨膜蛋白酪氨酸激酶活性、G 蛋白偶联胺受体活性、5-羟色胺受体活性、G 蛋白偶联的 5-羟色胺受体活性。



纵轴表示富集项, 横轴表示基因比率, 表示该项的基因数与所有基因的比率。气泡的大小和颜色代表了丰富基因的数量和 p 值。GO 分析包括细胞成分(CC)、分子功能(MF)和生物过程(BP)。(a) 成分目标 GO 富集分析。(b) 成分目标是 KEGG 富集分析。(c) 交叉基因 GO 富集分析。(d) 交叉基因 KEGG 富集分析。

Figure 3. Function enrichment analysis chart

图 3. 功能丰富分析图

在 937 组分靶基因中, 已确定的关键生物学过程包括: 正向调节 MAPK 级联反应、对异物刺激的响应、肌肉系统过程、正向调节激酶活性、肽 - 酪氨酸磷酸化、肽 - 酪氨酸修饰、肽 - 丝氨酸磷酸化、肽 - 丝氨酸修饰、蛋白质自磷酸化以及循环系统中的血管过程。另一方面, KEGG 富集分析揭示了 TMGTD 在颅骨内作用的主要机制, 主要涉及神经活性配体 - 受体相互作用、钙信号通路、cAMP 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、癌症中的蛋白多糖、化学致癌 - 受体激活、细胞凋亡、乙肝、神经营养因子信号通路和耶尔森菌感染。

115 个交叉基因的 GO 和 KEGG 分析结果如图 3(c)和图 3(d)所示。根据 GO 分析的结果(图 3(c)), 发

现交叉基因主要定位于细胞部分,如膜筏、膜微区、参与含磷基团转移的转移酶复合体、焦点粘连、细胞-底物连接、蛋白激酶复合体、染色体区域、细胞前沿、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合体和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合体。在分子功能方面,这些交叉基因表现出不同的活性,包括蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白丝氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白激酶活性、组蛋白激酶活性、趋化因子结合、转录共激活因子结合、G 蛋白偶联趋化因子受体活性和趋化因子受体活性。此外,这些交叉基因还参与了氧化应激应答、上皮细胞增殖、血管生成调控、血管发育调控、细胞对化学胁迫的应答、低氧应答、低氧应答、细胞对氧化应激的应答、血管生成的正向调控和血管发育的正向调控等多种生物学过程。

根据 KEGG 富集分析的结果(图 3(d)),TMGTD 对 GBM 的作用机制涉及几个信号通路。这些通路包括 PI3K-Akt 信号通路、细胞凋亡、MAPK 信号通路、FoxO 信号通路、趋化因子信号通路、细胞衰老、内分泌抵抗、细胞周期、Ras 信号通路和 P53 信号通路。这些通路在各种细胞过程中发挥着重要作用,如细胞存活、增殖、细胞凋亡,以及对环境刺激的反应。

3.5. 蛋白互作分析

在对 115 个相交基因进行 PPI 分析后,使用 Cytoscape v3.10.0 生成 PPI 网络,得到一个具有 98 个节点和 333 条边的网络(图 4(a))。随后,基于度、贴近度中心度和介数中心度的筛选条件对网络进行过滤以识别核心网络,得到图 4(b)。利用 Cell Hubba 插件对网络进行分析,筛选出具有前 20 度值、前 20 个最大集团中心度(MCC)值和前 20 个最大邻域分量(MNC)值的目标(图 4(d))。获得了核心 PPI 蛋白(TP53, STAT3, CDK1, HDAC1, CCNB1, CCND1, ESR1, BIRC5, ABL1, AURK1, CDK2, PLK1)的这三组靶点的交叉(图 4(c))。有关 PPI 网络涉及的 12 个核心蛋白的详细信息,请参见表 3。

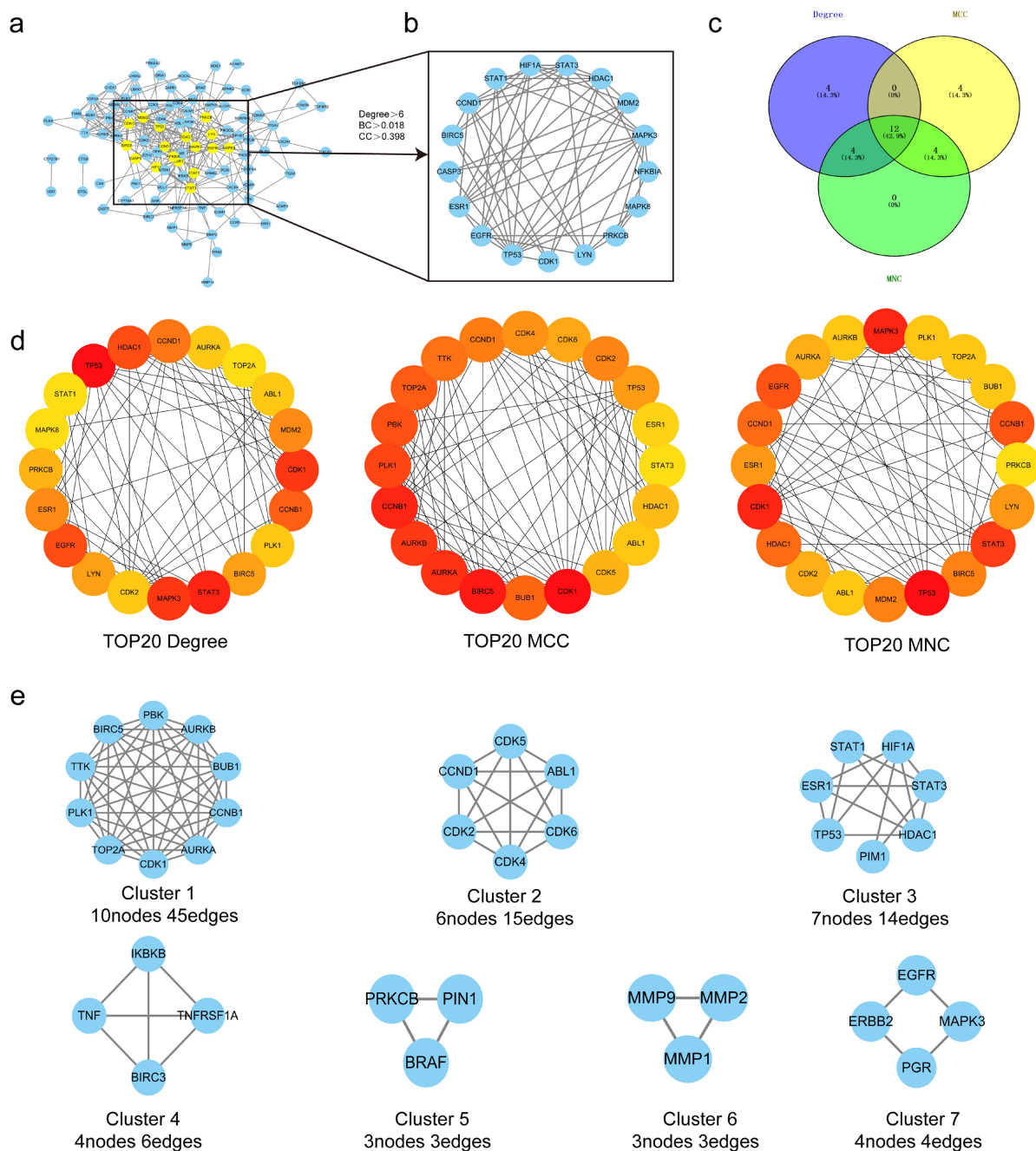
此外,为了进一步探索 TMGTD 对 GBM 核心靶点的影响,使用分子络合物检测(MCODE)插件分析 PPI 网络,生成一个高度连接的子网络,并将识别的靶点分为 7 组,代表 GBM 治疗的潜在关键靶点,如图 4(e)所示。

Table 3. Details of 12 core proteins
表 3. 12 个核心蛋白的详细信息

基因符号(PDB ID)	目标名称	蛋白质结构	度值(D 值)	最大团中心性最大 邻域分量(MCC 值)	最大邻域分量 (MNC 值)
TP53 (2K8F)	细胞肿瘤抗原 TP53		32	1479	31
STAT3 (4ZIA)	信号转导和转录激活因子 3		25	165	21
CDK1 (6GU7)	细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 1		22	364,806	22

续表

HDAC1 (5ICN)	组蛋白脱乙酰酶 1		18	716	16
CCNB1 (5LQF)	G2/有丝分裂特异性 细胞周期蛋白-B1		17	363,636	17
CCND (2W96)	G1/S 特异性细胞周 期蛋白-D1		16	1688	16
ESR1 (1HCQ)	受体雌激素		15	184	13
BIRC5 (2RAX)	杆状病毒 IAP 重复 序列蛋白 5		14	363,642	14
ABL1 (4WA9)	酪氨酸蛋白激酶 ABL1		12	557	11
AURKA (5ORY)	极光激酶 A		12	363,626	12
CDK2 (2CCH)	细胞周期蛋白依赖 性激酶 2		12	1638	12
PLK1 (2V5Q)	丝氨酸/苏氨酸蛋白 激酶 PLK1		12	363,605	11



(a) PPI 网络。(b) 核心 PPI 网络。(c) 核心 PPI 蛋白的维恩图。(d) cell Hubba 插件分析结果。(e) MCODE 插件分析结果。

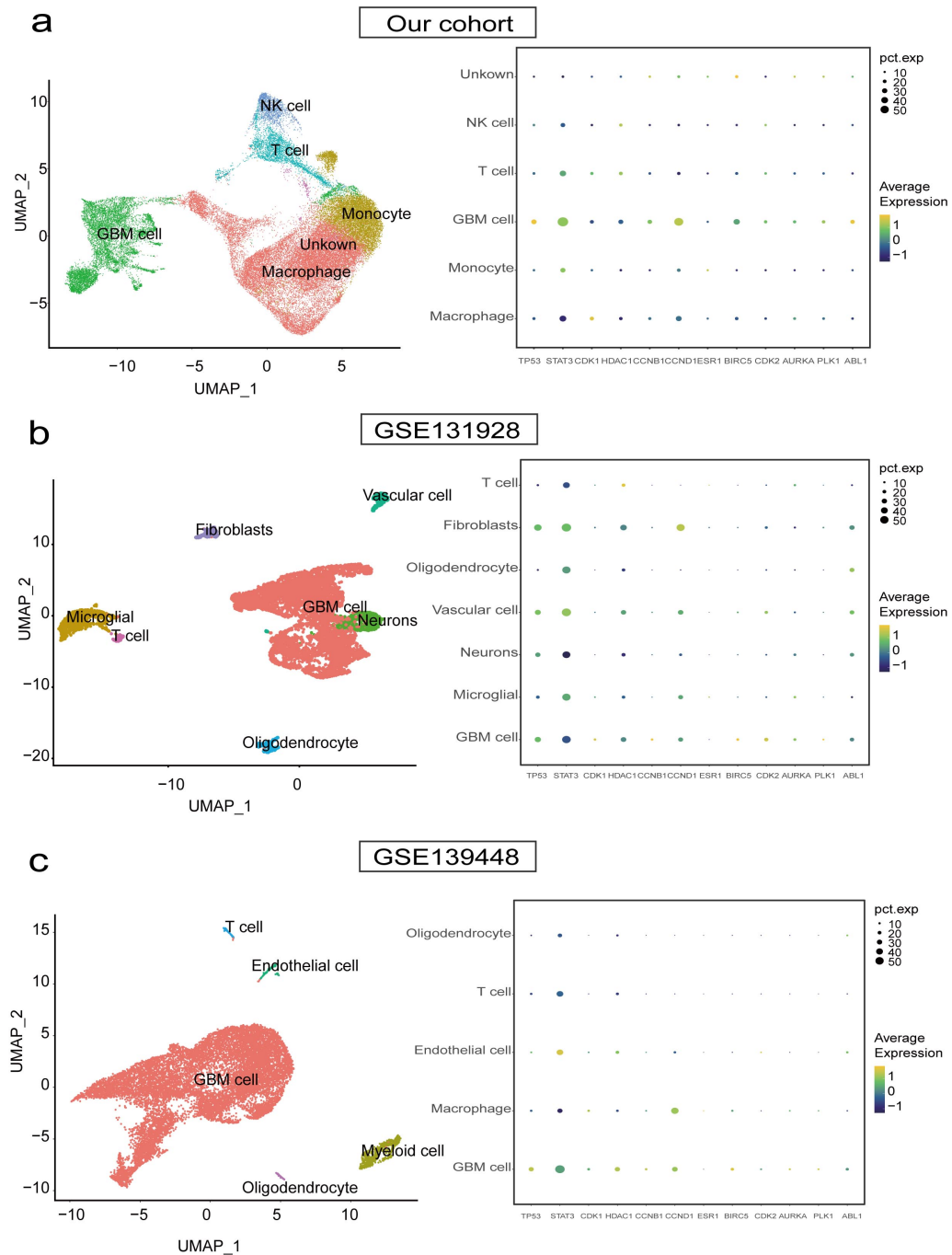
Figure 4. PPI analysis results

图 4. PPI 分析结果

3.6. 单细胞 RNA 测序分析

利用上述方法，我们分析了核心 PPI 基因在单个细胞中的表达模式。我们将 GBM 组织分为相邻的正常脑组织样本和 GBM 样本，并生成 UMAP 图进行可视化。随后，我们通过绘制核心 PPI 基因在样本中不同细胞群中的表达水平来构建点图(图 5)。在点图中，横轴代表核心 PPI 基因，纵轴代表细胞群体，点的大小对应于高表达基因在细胞群体中的比例，颜色表示基因在细胞群体中的平均表达水平。

根据图中描述的结果,我们观察到在 GBM 组织中,这些核心 PPI 基因主要在 GBM 细胞中表达,其次是未知细胞(我们的队列)、血管细胞(GSE131928)和内皮细胞(GSE139448),其中 TP53 的平均表达水平最高,而 STAT3 在 GBM 组织的各种细胞中的表达水平高于其他基因。

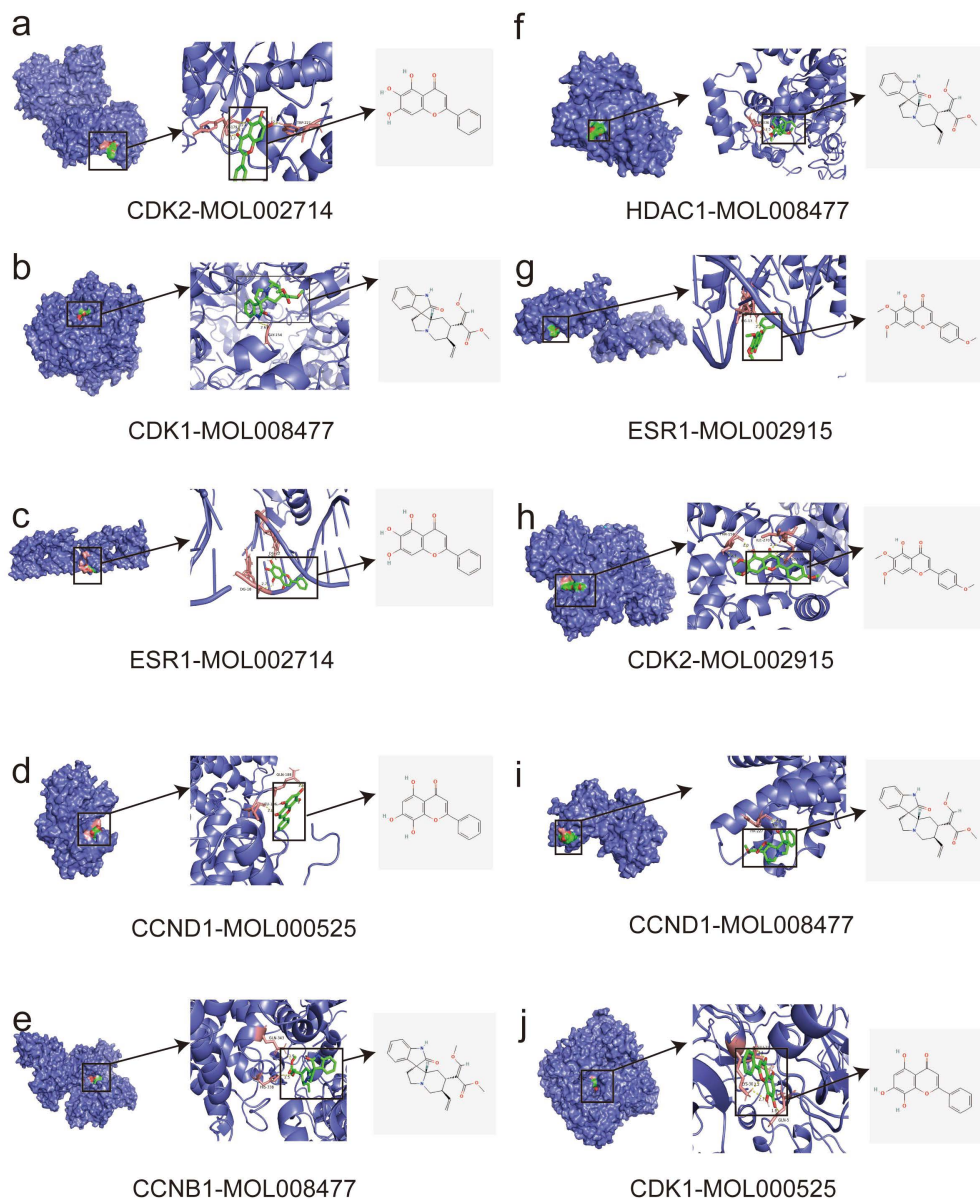


基于单细胞 RNA 数据的细胞分组和每种细胞类型的 12 个核心 PPI 基因的表达,产生了 UMAP(左)和点图(右)。点的大小代表特定基因在细胞类型中高表达的细胞的比例,颜色强度代表表达的细胞在细胞群体中的平均表达水平。

Figure 5. Single cell sequencing analysis results
图 5. 单细胞测序分析结果

3.7. 分子对接结果

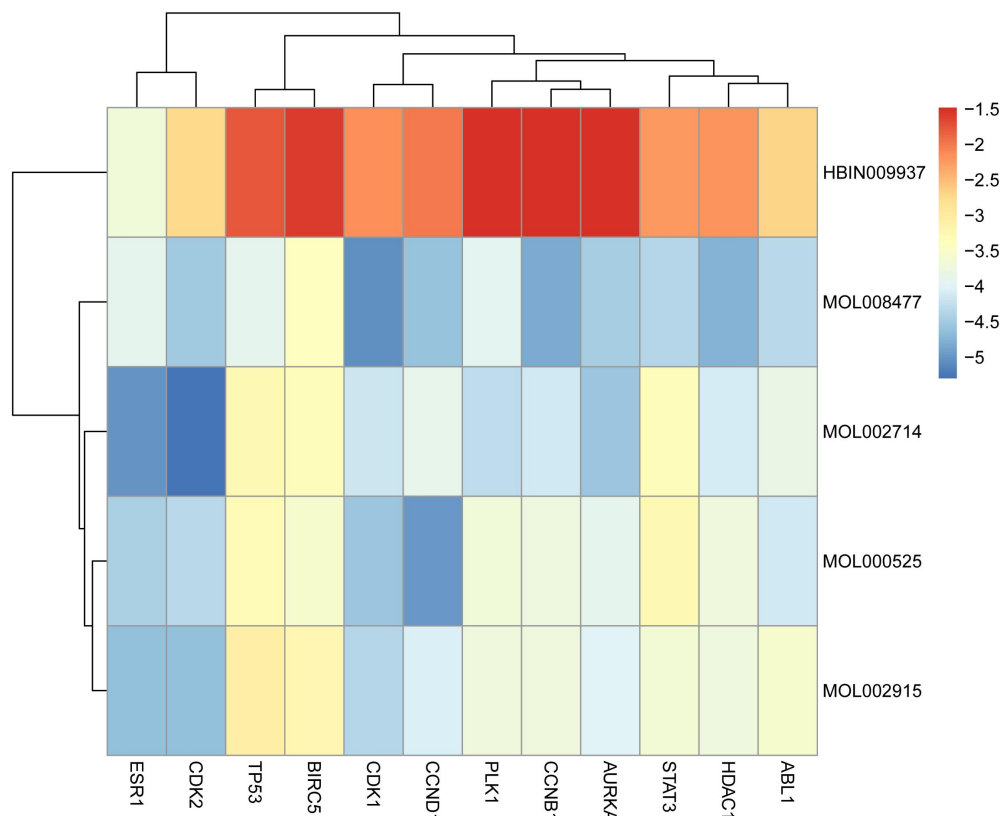
通过分子对接模拟将核心 PPI 蛋白(TP53, STAT3, CDK1, HDAC1, CCNB1, CCND1, ESR1, BIRC5, ABL1, AURK1, CDK2, PLK1)与前 5 个活性分子(HBIN009937、MOL008477、MOL000525、MOL002714 和 MOL002915)进行比较。这些模拟提供了对活性分子和核心 PPI 蛋白之间的结合能和结合模式的洞察,表明了它们潜在的相互作用和亲和力。CDK1 和 MOL008477 的结合能在全组中最低。结合能值越低,亲和力越强,相互作用越有利,负值则表明能量释放。对接结果在图 6 中可视化,这允许观察活性分子和核心 PPI 蛋白之间的空间排列和潜在的相互作用。图 7 显示了每个组的结合能,其值大小在(表 4)中所示。



受体蛋白显示为紫色,活性成分显示为绿色(成分的分子结构显示在第三张图中),与活性成分对接的氨基酸显示为红色。

Figure 6. Docking of core protein with small molecule

图 6. 核心蛋白与小分子对接



将图 7 中 ABL1、HDAC1、STAT3、AURKA、CCNB1、PLK1、CCND1、CDK1、BIRC5、TP53、CDK2、ESR1 蛋白质与网络中的小分子成分进行分子对接，并将对接能量绘制成热图。红色代表所需的高对接能量，蓝色代表所需的低对接能量。

Figure 7. Heat map of molecular docking binding energy
图 7. 分子对接结合能热图

Table 4. Molecular docking energy
表 4. 分子对接能量

Gene name	PDB ID	Ingredients ID				
		HBIN009937	MOL000525	MOL002714	MOL002915	MOL008477
TP53	(2K8F)	-1.76	-3.28	-3.26	-3.07	-3.91
STAT3	(4ZIA)	-2.23	-3.27	-3.35	-3.63	-4.37
CDK1	(6GU7)	-2.14	-4.55	-4.18	-4.37	-5.06
HDAC1	(5ICN)	-2.18	-3.71	-4.11	-3.75	-4.73
CCNB1	(5LQF)	-1.5	-3.76	-4.14	-3.73	-4.82
CCND1	(2W96)	-1.99	-4.96	-3.87	-4.04	-4.58
ESR1	(1HCQ)	-3.69	-4.43	-5	-4.64	-3.9
BIRC5	(2RAX)	-1.59	-3.57	-3.32	-3.2	-3.41
CDK2	(2CCH)	-2.71	-4.34	-5.3	-4.64	-4.53
PLK1	(2V5Q)	-1.48	-3.67	-4.3	-3.72	-3.93
AURKA	(5ORY)	-1.49	-3.92	-4.57	-3.99	-4.48
ABL1	(4WA9)	-2.67	-4.13	-3.83	-3.58	-4.33

4. 讨论

为了阐明中药制剂 TMGTD 的潜在治疗机制,我们使用了 TCMSP 和草药数据库来收集关于其成分的信息。总而言之,我们获得了 94 种能够穿越血脑屏障的活性成分。在这些成分中,有两个化合物(MOL000358 和 MOL000359)在一种以上的中草药中被发现,这表明这些共同的成分可能是 TMGTD 的生物学功能所必需的。此外,我们还观察到,在所研究的 11 种中草药中,有效成分主要存在于钩藤(GT)和黄芩(HQ)中。网络分析结果进一步表明,成分-靶点核心网络和成分-靶点-疾病核心网络中的主要成分都来自 GT 和 HQ。这些发现有力地表明 GT 和 HQ 是 GBM 的 TMGTD 的关键草药成分。

钩藤,俗称钩藤,是一种广泛用于治疗中枢神经系统和心血管疾病的中药。它通常用于治疗与肿瘤相关的疾病、各种脑血管疾病、神经疾病,以及与高血压、癫痫、中风和先兆子痫相关的疾病[26]。番红花含有几种能够穿越血脑屏障的活性成分,其中一种活性化合物——玉米素在成分-靶标-疾病网络中显示出重要作用。已有研究表明,ERK1/ERK2 的抑制剂 Corynoxine 通过抑制 PDGFBB 诱导的血管平滑肌细胞增殖而发挥抗血管生成作用[27]-[29]。这种作用机制可能有助于抑制肿瘤的生长和转移,减少肿瘤的血供,从而表现出抗 GBM 的特性。

黄芩,俗称黄连,在传统中药中应用广泛。其药理活性已得到很好地证实,包括抗炎、免疫调节、抗纤维化和抗肿瘤等多种特性[30]。这些特点使黄芩成为治疗胶质母细胞瘤(GBM)的潜在药物。黄芩含有多种有效成分,包括黄芩苷、黄芩素和汉黄藤素。先前的研究表明,这些成分通过多种机制发挥抗肿瘤作用,如抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡、抑制血管生成和调节免疫系统功能[31]。值得注意的是,虽然黄芩素是黄芩的重要活性成分之一,但去甲乌甲素在 TMGTD 的核心网络中具有最重要的意义。研究表明,去甲黄芩素具有潜在的抗肿瘤特性,可通过多种途径抑制人结肠癌细胞的生长[2] [3]。具体地说,去甲黄芩素可能通过触发线粒体介导的细胞凋亡、诱导自噬和导致 G2/M 细胞周期停滞来发挥其抗 GBM 的作用。因此,黄芩作为补肾益气活血方的潜在成分之一,含有抗炎、免疫调节、抗纤维化、抗肿瘤等多种有效成分,具有抗炎、免疫调节、抗纤维化、抗肿瘤等作用。今后的研究应进一步探讨黄芩苷及其成分之一对 GBM 的作用机制,为其临床应用提供更有力的科学依据。

有趣的是,活性成分在成分-靶点-疾病核心网络中的分布是值得注意的,在网络的有效成分中,钩藤和黄芩是主要贡献者,分别占 41 种有效成分中的 16 种和 10 种。然而,当根据活性成分的度值对其进行排序时,可以观察到组成上的细微变化。在前 10 种有效成分中,HQ (6 分)是最常见的,其次是 GT (3 分)和天麻(TM) (1 分)。值得注意的是,具有最高度值的活性成分 HBIN009937 (4,4'-二羟基二苈基醚)来自 TM,表现出许多重要的性质,这得到了以前的研究的支持[32]-[34]。它被广泛应用于中医,被认为具有镇静和镇静的作用。它有安抚神经系统和缓解焦虑和失眠等问题的能力。此外, TM 被认为有助于改善认知表现,改善学习和记忆。因此,它已成为研究和治疗认知障碍和神经退行性疾病的潜在治疗剂。此外, TM 还具有抗炎和抗氧化活性,这归因于其多种活性成分。这些成分在抑制炎症反应和清除自由基方面发挥了关键作用[35]。已经有研究证明 TM 在小鼠结肠癌模型中具有抗肿瘤作用,这使我们推测它可能在 GBM 中表现出类似的抗肿瘤作用[36]。

为了了解 TMGTD 的调控机制,我们进行了 GO 和 KEGG 分析,并比较了组分靶点和交叉基因的功能浓缩结果。目的是探讨 TMGTD 的颅内效应与其对 GBM 的潜在治疗作用的异同。结果表明, TMGTD 在颅内效应和 GBM 治疗中具有相同的分子功能,如蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白丝氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性,但在关键靶点和信号通路上存在差异。同样的分子功能与细胞增殖、凋亡和细胞周期调节密切相关,与抗癌治疗密切相关[1] [5] [37]。

对 115 个交叉基因的 KEGG 富集度分析,其结果表明 GBM 潜在的信号通路具有广泛的抗癌功能,

包括调节细胞的存活、增殖。PI3K-Akt 信号通路是 115 个交叉基因丰度最高的信号通路，在调节细胞的存活、增殖和凋亡中起着关键作用，被认为是各种类型肿瘤的重要靶点，包括卵巢癌、胃癌[38]-[41]。在正常细胞中，这一途径通过调节细胞分化、代谢调节和细胞周期控制等各种细胞过程中的关键因素来维持细胞的存活和增殖。然而，在癌症中，PI3K-Akt 信号通路的过度激活有助于细胞的异常增殖和存活，从而促进肿瘤的生长和增殖。

PI3K-Akt 信号通路与细胞凋亡通路之间存在复杂的相互作用。PI3K-Akt 通路的过度激活可以抑制细胞凋亡，使肿瘤细胞逃避正常的细胞死亡机制。相反，抑制 PI3K-Akt 通路或针对该通路的干预可以促进细胞凋亡，从而抑制肿瘤生长。因此，针对 PI3K-Akt 信号通路的抑制剂已成为癌症治疗的一个有前途的研究领域。通过靶向 PI3K-Akt 信号通路，有可能抑制肿瘤细胞的存活和增殖，同时促进细胞凋亡。这为 TMGTD 调节这一途径提供了机会，并有可能发挥其对 GBM 的治疗作用。

通过对 TMGTD 和 GBM 之间的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的分析，我们确定了参与 GBM 发生发展的关键靶蛋白。这些蛋白包括 TP53、STAT3、CDK1、HDAC1、CCNB1、CCND1、ESR1、BIRC5、ABL1、AURK1、CDK2 和 PLK1，它们在 GBM 中起着重要的调节作用。此外，本研究侧重于根据活性分子的度值来筛选活性分子，这些值代表了它们在复合靶标疾病网络中的连接性和重要性。确定的前五个活性分子是 HBIN009937、MOL008477、MOL000525、MOL002714 和 MOL002915，这表明它们对 GBM 具有潜在的治疗活性。为了研究这些活性分子与核心 PPI 蛋白之间的相互作用，进行了分子对接模拟。结果揭示了这些活性分子与核心 PPI 蛋白之间的潜在结合作用。其中，MOL008477 (Corynoxene)与 CDK1 结合能最高。

CDK1 是一种属于细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)家族的蛋白激酶。CDK1 的异常表达和功能障碍与包括癌症在内的多种疾病的发生发展密切相关。在肿瘤细胞中，CDK1 的过度激活可导致细胞周期异常，促进细胞增殖和肿瘤进展。因此，CDK1 已成为一种潜在的癌症治疗靶点，CDK1 抑制剂的开发已成为抗癌药物研究和开发的重要焦点[42] [43]。源于 GT 的 Corynoxene 是根据源自 GT 的度值排名前 10 位的唯一活性化合物。其既定的作用机制是通过抑制 ERK1/ERK2，发挥抗血管生成作用。然而，Corynoxene 和 CDK1 之间的具体作用机制仍有待研究。根据已知的 CDK1 在体内的作用，我们推测 Corynoxene 作为 CDK1 抑制剂发挥作用，通过抑制 CDK1 发挥抗 GBM 的作用。

在我们的研究中，我们对核心蛋白-蛋白相互作用(PPI)基因进行了单细胞 RNA 测序数据分析，以进一步了解它们在胶质母细胞瘤(GBM)细胞中的表达模式。我们观察到核心 PPI 基因在 GBM 组织所描述的细胞群体中主要在 GBM 细胞中表达，其中 TP53 的平均表达水平最高，STAT3 在 GBM 组织的各种细胞中的表达水平高于所有其他基因。这些发现表明，STAT3 和 TP53 可能是靶向分子引导治疗和诊断(TMGTD)治疗 GBM 的关键靶基因。

在基底膜组织中观察到高比例的 STAT3 基因过度表达，这表明在疾病的发生和发展中起着重要的调节作用。STAT3 是一种重要的信号分子，参与调控细胞增殖、存活和转化等过程[44] [45]。它的高活性已被证实存在于多种类型的肿瘤中，并与肿瘤的增殖、侵袭和转移有关。因此，靶向 STAT3 可能是 TMGTD 治疗 GBM 的一个重要策略，另一方面，TP53 的最高平均表达水平突显了其在 GBM 中的关键作用。TP53 是一种关键的肿瘤抑制基因，参与细胞凋亡、DNA 修复和细胞周期调节等过程[46] [47]。TP53 基因的异常表达或功能缺陷与多种肿瘤的发生发展密切相关。因此，针对 TP53 活性的干预对 TMGTD 在 GBM 治疗中的使用具有重要意义。我们的研究结果表明，STAT3 和 TP53 可能是治疗 GBM 的关键靶基因。

5. 结论

总之，本研究通过网络药理学和分子对接分析了 TMGTD 治疗 GBM 的机制，提示 TMGTD 有望成

为治疗 GBM 的一种潜在方法。TMGTD 通过靶向 CDK1、STAT3、TP53 和 PI3K-Akt 等关键蛋白和信号通路,可能干扰 GBM 细胞的生长、周期调节和转移潜能,从而抑制肿瘤的发展,这些发现为进一步研究 TMGTD 的治疗机制和开发新型抗 GBM 疗法提供了有价值的基础。

6. 陈述与声明

竞争利益

作者没有相关的财务或非财务利益可供披露。

作者贡献

何春明为研究构思和设计做出了贡献。章超龙、曾传和何春明进行资料准备、数据收集和分析,手稿的初稿是由章超龙撰写的,所有作者都对以前的手稿版本进行了评论。所有作者都阅读并批准了最后的手稿。

基金项目

赣南医科大学附属第一医院科研启动项目(QD202316)。

参考文献

- [1] McKinnon, C., Nandhabalan, M., Murray, S.A. and Plaha, P. (2021) Glioblastoma: Clinical Presentation, Diagnosis, and Management. *British Medical Journal*, **374**, n1560. <https://doi.org/10.1136/bmj.n1560>
- [2] Wang, R., Sharma, R., Shen, X., Laughney, A.M., Funato, K., Clark, P.J., et al. (2020) Adult Human Glioblastomas Harbor Radial Glia-Like Cells. *Stem Cell Reports*, **14**, 338-350. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.01.007>
- [3] Wang, Z., Zhang, Q., Zhou, L., et al. (2020) Norwogonin Flavone Suppresses the Growth of Human Colon Cancer Cells via Mitochondrial Mediated Apoptosis, Autophagy Induction and Triggering G2/M Phase Cell Cycle Arrest. *Journal of BUON*, **25**, 1449-1454.
- [4] Reardon, D.A., Brandes, A.A., Omuro, A., Mulholland, P., Lim, M., Wick, A., et al. (2020) Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients with Recurrent Glioblastoma: The Check Mate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, **6**, 1003-1010. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.1024>
- [5] Zhang, W., Stetler, R.A., Chen, J. (2017) Akt-GSK3 β Pro-Survival Signaling Pathway in Cerebral Ischemic Injury. In: *Primer on Cerebrovascular Diseases*, Academic Press, 269-272.
- [6] Friedman, H.S., Prados, M.D., Wen, P.Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L.E., et al. (2009) Bevacizumab Alone and in Combination with Irinotecan in Recurrent Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, **27**, 4733-4740. <https://doi.org/10.1200/jco.2008.19.8721>
- [7] Stupp, R., Hegi, M.E., Gorlia, T., Erridge, S.C., Perry, J., Hong, Y., et al. (2014) Cilengitide Combined with Standard Treatment for Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma with Methylated MGMT Promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 Study): A Multicentre, Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *The Lancet Oncology*, **15**, 1100-1108. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(14\)70379-1](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(14)70379-1)
- [8] Yang, Q., Zhou, Y., Chen, J., Huang, N., Wang, Z. and Cheng, Y. (2021) Gene Therapy for Drug-Resistant Glioblastoma via Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles Combined with Focused Ultrasound. *International Journal of Nanomedicine*, **16**, 185-199. <https://doi.org/10.2147/ijn.s286221>
- [9] An, Z., Aksoy, O., Zheng, T., Fan, Q. and Weiss, W.A. (2018) Epidermal Growth Factor Receptor and EGFRvIII in Glioblastoma: Signaling Pathways and Targeted Therapies. *Oncogene*, **37**, 1561-1575. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0045-7>
- [10] Le Rhun, E., Preusser, M., Roth, P., Reardon, D.A., van den Bent, M., Wen, P., et al. (2019) Molecular Targeted Therapy of Glioblastoma. *Cancer Treatment Reviews*, **80**, Article 101896. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101896>
- [11] Shen, Y.C., Lu, C.K., Liou, K.T., et al. (2015) Common and Unique Mechanisms of Chinese Herbal Remedies on Ischemic Stroke Mice Revealed by Transcriptome Analyses. *Journal of Ethnopharmacology*, **173**, 370-382. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.018>
- [12] Deng, L., Liu, W., Xu, Q., Guo, R., Zhang, D., Ni, J., et al. (2022) Tianma Gouteng Decoction Regulates Oxidative

- Stress and Inflammation in AngII-Induced Hypertensive Mice via Transcription Factor EB to Exert Anti-Hypertension Effect. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **145**, Article 112383. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112383>
- [13] Zhou, T., Yao, Z., Hu, S., *et al.* (2021) Research on Professor Hou Wei's Medication Pattern for the Treatment of Glioma Based on the Traditional Chinese Medicine Inheritance Support System. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica—World Science and Technology*, **23**, 2830-2837.
- [14] Huang, L., Xie, D., Yu, Y., Liu, H., Shi, Y., Shi, T., *et al.* (2018) TCMID 2.0: A Comprehensive Resource for TCM. *Nucleic Acids Research*, **46**, D1117-D1120. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1028>
- [15] Ru, J., Li, P., Wang, J., Zhou, W., Li, B., Huang, C., *et al.* (2014) TCMSP: A Database of Systems Pharmacology for Drug Discovery from Herbal Medicines. *Journal of Cheminformatics*, **6**, Article No. 13. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-6-13>
- [16] Fang, S., Dong, L., Liu, L., Guo, J., Zhao, L., Zhang, J., *et al.* (2021) HERB: A High-Throughput Experiment- and Reference-Guided Database of Traditional Chinese Medicine. *Nucleic Acids Research*, **49**, D1197-D1206. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1063>
- [17] Wu, J., Li, X., Liang, J., Fang, D., Yang, Z., Wei, J., *et al.* (2022) Network Pharmacological Analysis of Active Components of Xiaoliu Decoction in the Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Frontiers in Genetics*, **13**, Article 940462. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.940462>
- [18] Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., *et al.* (2021) Pubchem in 2021: New Data Content and Improved Web Interfaces. *Nucleic Acids Research*, **49**, D1388-D1395. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>
- [19] Daina, A., Michielin, O. and Zoete, V. (2019) Swisstargetprediction: Updated Data and New Features for Efficient Prediction of Protein Targets of Small Molecules. *Nucleic Acids Research*, **47**, W357-W364. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>
- [20] Barrett, T., Wilhite, S.E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I.F., Tomashevsky, M., *et al.* (2013) NCBI GEO: Archive for Functional Genomics Data Sets—Update. *Nucleic Acids Research*, **41**, D991-D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1193>
- [21] Huang, T., Yang, Y., Song, X., Wan, X., Wu, B., Sastry, N., *et al.* (2021) PRMT6 Methylation of RCC1 Regulates Mitosis, Tumorigenicity, and Radiation Response of Glioblastoma Stem Cells. *Molecular Cell*, **81**, 1276-1291.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.01.015>
- [22] Piñero, J., Bravo, À., Queralt-Rosinach, N., Gutiérrez-Sacristán, A., Deu-Pons, J., Centeno, E., *et al.* (2017) DisGeNET: A Comprehensive Platform Integrating Information on Human Disease-Associated Genes and Variants. *Nucleic Acids Research*, **45**, D833-D839. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw943>
- [23] Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., *et al.* (2016) The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*, **54**. <https://doi.org/10.1002/cpbi.5>
- [24] Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., *et al.* (2023) The STRING Database in 2023: Protein-Protein Association Networks and Functional Enrichment Analyses for Any Sequenced Genome of Interest. *Nucleic Acids Research*, **51**, D638-D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- [25] Berman, H.M. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, **28**, 235-242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- [26] Zhang, Q., Zhao, J.J., Xu, J., Feng, F. and Qu, W. (2015) Medicinal Uses, Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Uncaria*. *Journal of Ethnopharmacology*, **173**, 48-80. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.011>
- [27] Huang, B., Zeng, Y., Li, Y., Huang, X., Hu, N., Yao, N., *et al.* (2017) *Uncaria* Alkaloids Reverse ABCB1-Mediated Cancer Multidrug Resistance. *International Journal of Oncology*, **51**, 257-268. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4005>
- [28] Kim, T., Lee, J., Lee, J., Yu, J., Hwang, B., Ye, S., *et al.* (2008) Corynoxine Isolated from the Hook of *Uncaria rhynchophylla* Inhibits Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation through the Blocking of Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2 Phosphorylation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **31**, 2073-2078. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.2073>
- [29] Yuan, D., Ma, B., Wu, C., Yang, J., Zhang, L., Liu, S., *et al.* (2008) Alkaloids from the Leaves of *Uncaria rhynchophylla* and Their Inhibitory Activity on NO Production in Lipopolysaccharide-Activated Microglia. *Journal of Natural Products*, **71**, 1271-1274. <https://doi.org/10.1021/np8000305>
- [30] Wu, L., Yang, F.R., Xing, M.L., *et al.* (2022) Multi-Material Basis and Multi-Mechanisms of the Dahuang Zhechong Pill for Regulating Treg/Th1 Balance in Hepatocellular Carcinoma. *Phytomedicine*, **100**, Article 154055. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154055>
- [31] Li-Weber, M. (2009) New Therapeutic Aspects of Flavones: The Anticancer Properties of Scutellaria and Its Main Active Constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treatment Reviews*, **35**, 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.09.005>
- [32] Heese, K. (2020) *Gastrodia elata* Blume (Tianma): Hope for Brain Aging and Dementia. *Evidence-Based*

- Complementary and Alternative Medicine*, **2020**, Article 8870148. <https://doi.org/10.1155/2020/8870148>
- [33] Lu, C., Qu, S., Zhong, Z., Luo, H., Lei, S.S., Zhong, H., *et al.* (2022) The Effects of Bioactive Components from the Rhizome of *Gastrodia elata* Blume (Tianma) on the Characteristics of Parkinson's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, **13**, Article 963317. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.963327>
- [34] Matias, M., Silvestre, S., Falcão, A. and Alves, G. (2016) *Gastrodia elata* and Epilepsy: Rationale and Therapeutic Potential. *Phytomedicine*, **23**, 1511-1526. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.09.001>
- [35] Kim, N., Xin, M.J., Cha, J., Ji, S., Kwon, S., Jee, H., *et al.* (2017) Antitumor and Immunomodulatory Effect of *Gastrodia elata* on Colon Cancer *in Vitro* and *in Vivo*. *The American Journal of Chinese Medicine*, **45**, 319-335. <https://doi.org/10.1142/s0192415x17500203>
- [36] Zhang, Z., Zhou, J., Song, D., Sun, Y., Liao, C. and Jiang, X. (2017) Gastrodin Protects against LPS-Induced Acute Lung Injury by Activating Nrf2 Signaling Pathway. *Oncotarget*, **8**, 32147-32156. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16740>
- [37] Hawes, B.E. and van Biesen, T. (2001) Protein Tyrosine Kinase Activity Assays. *Current Protocols in Pharmacology*, **5**. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0305s05>
- [38] Akbarzadeh, M., Mihanfar, A., Akbarzadeh, S., Yousefi, B. and Majidinia, M. (2021) Crosstalk between miRNA and PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Cancer. *Life Sciences*, **285**, Article 119984. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119984>
- [39] Alzahrani, A.S. (2019) PI3K/AKT/mTOR Inhibitors in Cancer: At the Bench and Bedside. *Seminars in Cancer Biology*, **59**, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.009>
- [40] Ediriweera, M.K., Tennekoon, K.H. and Samarakoon, S.R. (2019) Role of the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Ovarian Cancer: Biological and Therapeutic Significance. *Seminars in Cancer Biology*, **59**, 147-160. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.05.012>
- [41] Huang, Y., Zhang, J., Hou, L., Wang, G., Liu, H., Zhang, R., *et al.* (2017) LncRNA AK023391 Promotes Tumorigenesis and Invasion of Gastric Cancer through Activation of the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **36**, Article No. 194. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0666-2>
- [42] Malumbres, M. and Barbacid, M. (2009) Cell Cycle, CDKs and Cancer: A Changing Paradigm. *Nature Reviews Cancer*, **9**, 153-166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>
- [43] Xie, B., Wang, S., Jiang, N. and Li, J.J. (2019) Cyclin B1/CDK1-Regulated Mitochondrial Bioenergetics in Cell Cycle Progression and Tumor Resistance. *Cancer Letters*, **443**, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.11.019>
- [44] Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., *et al.* (2004) Regulation of the Innate and Adaptive Immune Responses by STAT-3 Signaling in Tumor Cells. *Nature Medicine*, **10**, 48-54. <https://doi.org/10.1038/nm976>
- [45] Yu, H., Pardoll, D. and Jove, R. (2009) STATs in Cancer Inflammation and Immunity: A Leading Role for STAT3. *Nature Reviews Cancer*, **9**, 798-809. <https://doi.org/10.1038/nrc2734>
- [46] Levine, A.J. and Oren, M. (2009) The First 30 Years of P53: Growing Ever More Complex. *Nature Reviews Cancer*, **9**, 749-758. <https://doi.org/10.1038/nrc2723>
- [47] Muller, P.A.J. and Vousden, K.H. (2013) P53 Mutations in Cancer. *Nature Cell Biology*, **15**, 2-8. <https://doi.org/10.1038/ncb2641>