·论著·一次研究·

基于网络药理学和分子对接技术探究毛花苷C对胶质母细胞瘤的治疗作用及分子机制

王紫薇，郭婉莹，丁利琼

湖北科技学院药学院（湖北咸宁 437100）

【摘要】目的 基于网络药理学和分子对接技术探究毛花苷 C 治疗胶质母细胞瘤（glioblastoma，GBM）的潜在靶点及作用机制。**方法** 通过 PharmMapper、SwissTargetPrediction 和 TargetNet 数据库筛选毛花苷 C 的潜在靶点，利用 GeneCards、DisGeNET 和 TTD 数据库获取 GBM 相关疾病靶点。借助 Venny 2.1.0 平台交叉分析药物靶点与疾病靶点，确定两者的交集靶点。使用 Cytoscape 3.9.1 软件构建交集靶点的蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络图，并通过插件筛选出核心靶点。基于 Metascape 平台对交集靶点进行基因本体论（Gene Ontology，GO）分析和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路分析，预测毛花苷 C 治疗 GBM 的潜在作用通路。通过分子对接技术验证毛花苷 C 与核心靶点的结合能力。为进一步全面分析毛花苷 C 在 GBM 中的潜在作用机制，借助 GeneMANIA 平台构建基因关联网络。利用 U-87 MG 和 U251 MG 细胞进行噻唑蓝比色法[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay，MTT] 检测实验，探究毛花苷 C 对 GBM 细胞增殖的影响。**结果** 最终筛选出 377 个毛花苷 C 潜在靶点和 4 012 个 GBM 相关疾病靶点。通过去除重复项，共获得 189 个交集靶点。PPI 网络拓扑分析并按度值（degree）排序获得 10 个核心靶点。KEGG 通路富集分析显示，毛花苷 C 主要涉及癌症信号通路。分子对接结果显示，*ESR1* 与毛花苷 C 的对接亲和度最高。基因关联网络构建后，每个核心基因拓展了 10 个共表达基因，合并去重后形成了包含 107 个靶点的毛花苷 C 治疗 GBM 的一个扩展潜在靶点数据库。MTT 实验进一步证实，毛花苷 C 对 U-87 MG 和 U251 MG 细胞增殖具有浓度依赖性的抑制作用。**结论** 通过网络药理学分析，发现毛花苷 C 通过多靶点、多途径作用于 GBM，且体外实验验证了其浓度依赖性地抑制 GBM 细胞增殖，为毛花苷 C 的进一步研究和临床应用提供了新的思路和理论依据。

【关键词】毛花苷 C；胶质母细胞瘤；网络药理学；分子对接

【中图分类号】R 739.41 **【文献标识码】**A

Exploration of the therapeutic effect and molecular mechanism of lanatoside C on glioblastoma based on network pharmacology and molecular docking technology

WANG Ziwei, GUO Wanying, DING Liqiong

School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, Hubei Province, China

Corresponding author: DING Liqiong, Email: dinglq2021@163.com

DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202412092

基金项目：2020 年湖北科技学院博士启动基金项目（BK202120）

通信作者：丁利琼，博士，副教授，硕士研究生导师，Email：dinglq2021@163.com

【Abstract】Objective To explore the potential targets and mechanisms of action of Lanatoside C in the treatment of glioblastoma (GBM) based on network pharmacology and molecular docking technology. Methods The potential targets of Lanatoside C were identified using PharmMapper, SwissTargetPrediction, and TargetNet databases. GeneCards, DisGeNET, and TTD databases were used to obtain disease-related targets associated with GBM. The Venny 2.1.0 platform was used to cross-analyze drug targets and disease targets to identify their intersection targets. Cytoscape 3.9.1 software was employed to construct a protein-protein interaction (PPI) network diagram of the intersection targets, and core targets were identified using plugins. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were conducted on the intersection targets based on the Metascape platform to predict the potential pathways through which Lanatoside C may act in the treatment of GBM. Molecular docking technology was applied to verify the binding ability of Lanatoside C to the core targets. To comprehensively analyze the potential mechanism of Lanatoside C in GBM, a gene association network was constructed using the GeneMANIA platform. The thiazolium blue assay [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay, MTT] was performed on U-87 MG and U251 MG cells to explore the effect of Lanatoside C on GBM cell proliferation. Results Finally, 377 potential targets of Lanatoside C and 4 012 disease-related targets for GBM were screened. After removing duplicates, a total of 189 intersection targets were identified. PPI network topology analysis revealed 10 core targets, ranked by degree. KEGG pathway enrichment analysis showed that Lanatoside C was primarily involved in cancer signaling pathways. Molecular docking results indicated that *ESR1* had the highest binding affinity for Lanatoside C. After the gene association network was constructed, each core gene was expanded to 10 co-expressed genes, and after merging and removing duplications, an expanded potential target database containing 107 targets was formed for the treatment of GBM by Lanatoside C. The MTT assay further confirmed that Lanatoside C had a concentration-dependent inhibitory effect on the proliferation of U-87 MG and U251 MG cells. Conclusion Through network pharmacology analysis, it was found that Lanotoside C acts on GBM through multiple targets and pathways. In vitro experiments have verified that it inhibits GBM cell proliferation in a concentration-dependent manner, provideing new ideas and a theoretical basis for further research and clinical application of Lanatoside C.

【Keywords】Lanatoside C; Glioblastoma; Network pharmacology; Molecular docking

神经胶质瘤是原发性中枢神经系统（primary central nervous system，CNS）肿瘤的一种，为了能够有效指导临床诊断、预后评估和治疗选择，世界卫生组织将胶质瘤分为四个等级（I~IV 级），级别越高，恶性程度越高，预后也越差[1]。胶质母细胞瘤（glioblastoma，GBM）是胶质瘤中等级最高的类型，在所有原发性脑肿瘤和其他 CNS 肿瘤中占 14.7%，同时，它也是原发性恶性脑肿瘤中最常见的一种，发生率高达 47.7%[2]。GBM 具有高度侵袭性，肿瘤细胞能够广泛浸润周围正常脑组织[3]。由于血脑屏障的存在，限制了许多药物在脑部疾病治疗中的应用。尤其在 GBM 的治疗中，血脑屏障的阻碍作用使得许多药物难以达到有效浓度。GBM 的标准治疗手段为手术切除、放疗和化疗[4]，但患者的中位生存期仍不理想，仅约 14 个月。因此，迫切需要开发能够有效突破血脑屏障、同时具备低副作用和高疗效的药物，以应对 GBM 的治疗挑战。

毛花苷 C（Lanatoside C）是一种来源于洋地黄属植物的强心苷，具有广泛的药理作用。近年来，毛花苷 C 作为一种天然来源的苷类化合物，逐渐受到研究者的关注，其不仅具有心血管活性，还显示出潜在的抗肿瘤作用。有研究表明，毛花苷 C 通过激活 PKCδ 并抑制 AKT/mTOR 信号通路，在肝癌细胞中诱导依赖和非依赖 caspase 的双通路凋亡[5]；此外，还有研究发现，它通过抑制 Na^+/K^+–ATPase 依赖的内质网应激诱导的 GRP78 表达，促进胰腺癌细胞凋亡[6]；同时，毛花苷 C 还可以通过抑制 Wnt/β–catenin 信号通路并促进 c–Myc 的泛素化降解，诱导胃癌细胞凋亡[7]。上

述研究展现了毛花苷 C 在多种癌症细胞中的强大抗癌活性，显示其能够通过多种机制有效抑制肿瘤的生长与扩散。

近年来，网络药理学被广泛应用于中药领域，它通过构建药物与疾病之间蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络，揭示药物、靶标和疾病之间的复杂网络联系，分析和预测药物治疗疾病的作用机制[8]，为新药的开发做出了巨大的贡献。毛花苷 C 对多种肿瘤细胞具有显著抑制作用，但其对 GBM 作用的报道较少。本研究通过网络药理学及分子对接技术挖掘毛花苷 C 治疗 GBM 的机制，同时通过细胞实验初步分析其对 GBM 细胞增殖的影响，以期为 GBM 的治疗提供新的靶向策略。

1 资料与方法

1.1 材料与试剂

人恶性胶质母细胞瘤细胞（U-87 MG）、人星形胶质瘤（U251 MG）购自上海碧云天生物技术有限公司；毛花苷 C 购自 TargetMol；噻唑蓝（MTT）购自武汉塞维尔生物科技有限公司；二甲亚砜（dimethylsulfoxide，DMSO）购自国药集团化学试剂有限公司；Dulbecco's 改良培养基-DMEM/High Glucose（DMEM）、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购自北京中生奥邦生物科技有限公司；0.25 % 胰蛋白酶、青霉素/链霉素溶液购自上海碧云天生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 毛花苷C靶点筛选

在PubChem数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov）中检索“Lanotoside C”，根据毛花苷 C 的 CAS 号（17575-22-3）下载符合条件的 2D 结构式，并复制 Canonical SMILES 编码。通过SwissTargetPrediction 数据库（http://swisstargetprediction.ch）输入该 Canonical SMILES 编码进行靶点预测，所有预测结果均被保留。在TargetNet数据库（http://targetnet.scbdd.com）中输入毛花苷 C 的 Canonical SMILES 编码，并筛选概率（Prob）大于 0 的靶点。利用 PharmMapper 数据库（https://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html）导入毛花苷 C 的 2D 结构图，并进行靶点预测，通过 UniProt 数据库（https://www.uniprot.org）将靶点转换为对应的基因名称。最后，将SwissTargetPrediction、TargetNet和PharmMapper 数据库所获得的靶点合并，并去除重复项。

1.2.2 胶质母细胞瘤相关靶点筛选及交集靶点获取

以“Glioblastoma”为关键词在GeneCards（https://www.genecards.org）、TTD（https://db.idrblab.net/ttd）和DisGeNET数据库（http://www.disgenet.org）中进行检索，收集 GBM 相关靶点。其中 GeneCards 与 DisGeNET 数据库获得的靶点根据其中位数进行筛选，TTD 数据库预测所得的靶点则全部保留。将三个数据库获得的靶点汇总后，删除重复基因，得到 GBM 相关靶点。使用 Venny 2.1.0 在线工具（http://www.liuxiaoyuyuan.cn）获取药物与疾病的交集靶点，并绘制韦恩图。

1.2.3 蛋白质相互作用网络构建及核心靶点筛选

将获得的药物-疾病交集靶点输入 STRING 数据库（https://string-db.org），靶点种类设置为“Homo sapiens”，最低相互作用阈值为 0.4，剔除周围游离的靶点，获得靶点相互作用的网络交互图和 tsv 格式文件。将 tsv 格式文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件，建立 PPI 网络图，利用 cytoHubba 插件和 MCODE 插件进行网络拓扑分析，分别得到最重要的核心靶点网络图和对网络关系图进行的聚类。

1.2.4 基因本体论功能富集分析及京都基因与基因组百科全书通路富集分析

将药物-疾病交集靶点导入 Metascape 在线平台（https://metascape.org/），通过超几何检验计算富集分析结果的显著性，并采用 Benjamini-Hochberg 方法对 P 值进行错误发现率（false discovery rate，FDR）校正。进行基因本体论（Gene Ontology，GO）功能富集分析和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路富集分析，并从中分别选取 P 值前 20 的基因，使用微生信平台（http://www.bioinformatics.com.cn/）绘制 GO 富集条形图和 KEGG 富集气泡图。

1.2.5 核心靶点的基因表达

使用 UALCAN 数据库（http://ualcan.path.uab.edu），打开页面后点击 TCGA，输入筛选出的前 10 个基因，选择 GBM，对比每个基因在正常组

织样本与 GBM 中的表达，及其与患者种族、年龄的相关表达情况。

1.2.6 分子对接验证

采用 Aotudock-vina 软件，将筛选出的毛花苷 C-GBM PPI 网络中排名前 10 的核心靶点分别与毛花苷 C 进行分子对接，检测毛花苷 C 与各核心靶点之间的结合活性。使用 PyMOL 软件对大分子（受体）- 小分子（配体）的三维结构复合体进行分析和可视化。

1.2.7 创建毛花苷C针对胶质母细胞瘤扩展的潜在治疗靶标数据库

利用 GeneMANIA 在线网络分析工具（https://genemania.org）对各核心靶点进行基因关联分析，筛选条件包括共表达、遗传相互作用和物理相互作用，最终为每个核心基因扩展了 10 个关联基因。将最初的 10 个核心靶点与所有扩展的关联基因合并，并去除重复项，构建基于 GMFA（GMFA 为基于 GeneMANIA 的功能关联分析）的扩展数据库（GMFA-ED），从而更全面地展示毛花苷 C 在治疗 GBM 中的基因功能关系。

1.2.8 扩展基因的基因本体论功能富集分析及京都基因与基因组百科全书通路富集分析

基于所得到的 GMFA-ED 中的 107 个基因，使用 Metascape 平台对其进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析，筛选出前 20 个生物过程（biological process，BP）、分子功能（molecular function，MF）、细胞组分（cellular component，CC）和潜在作用通路，并通过 Cytoscape 软件构建毛花苷 C- 靶点 - 途径网络关系图。

1.2.9 细胞培养

U-87 MG 细胞系来源于人类 GBM，呈上皮样贴壁生长，具有高度增殖能力。在遗传特性方面，该细胞系携带野生型 *p53* 基因，缺失 *PTEN* 基因，并高表达 *EGFR*。U251 MG 细胞系是一种来源于人类星形胶质瘤的细胞系，贴壁生长，细胞形态不规则，具有中等增殖能力，增殖速度较 U-87 MG 稍慢。在遗传特性方面，U251 MG 携带突变的 *p53* 基因，高表达 *EGFR*，但其 *PTEN* 通路功能部分受限。将 U-87 MG 和 U251 MG 细胞在含有 10 % FBS 和 1% 青霉素 / 链霉素的 DMEM 高糖培养基中培养，置于 5% CO_2 的 37 ℃ 加湿细胞培养箱中。

1.2.10 噻唑蓝比色法实验

在细胞对数期传代后，取适量的 U-87 MG 和 U251 MG 细胞悬液分别铺于 96 孔板内，每个浓度设置 6 个复孔，96 孔板周围一圈加入适量的磷酸盐缓冲液（phosphate buffer solution，PBS），置于培养箱中培养 24 h。次日，使用 DMSO 溶解毛花苷 C，制成 0.5 mM 母液，采用倍比稀释法，用不同浓度（0、20、40、80、160、320、640 nM）的毛花苷 C 处理细胞 24 h 后，从细胞培养箱内取出细胞，在避光条件下每孔内加入 20 μL MTT（5 mg/mL），接着在培养箱内孵育 4 h。随后，弃掉上清液体，每孔加入 150 μL DMSO，用锡箔纸包裹板子后置于摇床上低速摇晃 10 min，使结晶物充分溶解。最后，使用酶标仪在 490 nm 波长下测定各孔的吸光值。

1.2.11 统计分析

采用 Graphpad prism 8.2 软件进行数据分析，采用单因素方差分析比较对照组和各给药组之间的差异，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 毛花苷C、胶质母细胞瘤靶点的筛选及交集靶点的获取

通过SwissTargetPrediction、Targetnet、PharmMapper 数据库的检索，整合后去除重复项，获得 377 个毛花苷 C 的潜在作用靶点；通过 GeneCards、TTD 和 DisGeNET 数据库搜集与 GBM 有关的潜在靶点，整合后去除重复项，共获得 4 201 个疾病靶点。将预测的 377 个药物靶点与 4 201 个疾病基因输入 Venn 在线平台，获得 189 个交集靶点，见图 1。

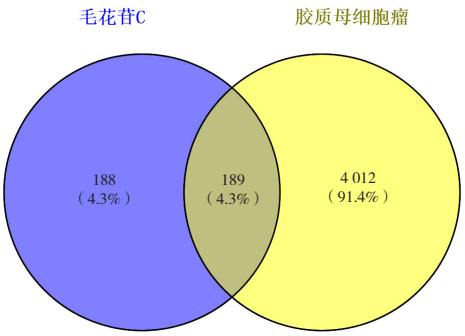


图1 毛花苷C与胶质母细胞瘤交集靶点的韦恩图

Figure 1. Venn diagram of intersection targets of Lanatoside C and glioblastoma

2.2 构建蛋白质相互作用网络图及筛选核心靶点

将获得的 189 个共有基因输入 STRING 数据库，通过 Cytoscape 3.9.1 软件建立 PPI 网络，见图 2–A。利用软件中的 cytoHubba 插件通过拓扑网络算法给每个基因赋值，根据 degree 值进行排序（图 3），排名前 10 的核心靶点分别为 *AKT1*、*EGFR*、*ALB*、*STAT3*、*CASP3*、*HSP9OAA1*、*JUN*、*SRC*、*MMP9*、*ESR1*，见图2–B。进一步通过 MCODE 插件进行聚类分析，选择了前 4 个相关非常密切的聚类，即聚类 1（得分 =31.824，节点 =35，边 =541）（图 4–A）、聚类 2（得分 =5.6，节点 =6，边 =14）（图 4–B）、聚类 3（得分 =5.538，节点 =27，边 =72）（图 4–C）、聚类 4（得分 =4，节点 =5，边 =8）（图 4–D）。其中，聚类 1 包含度值排名前 10 的核心靶点。

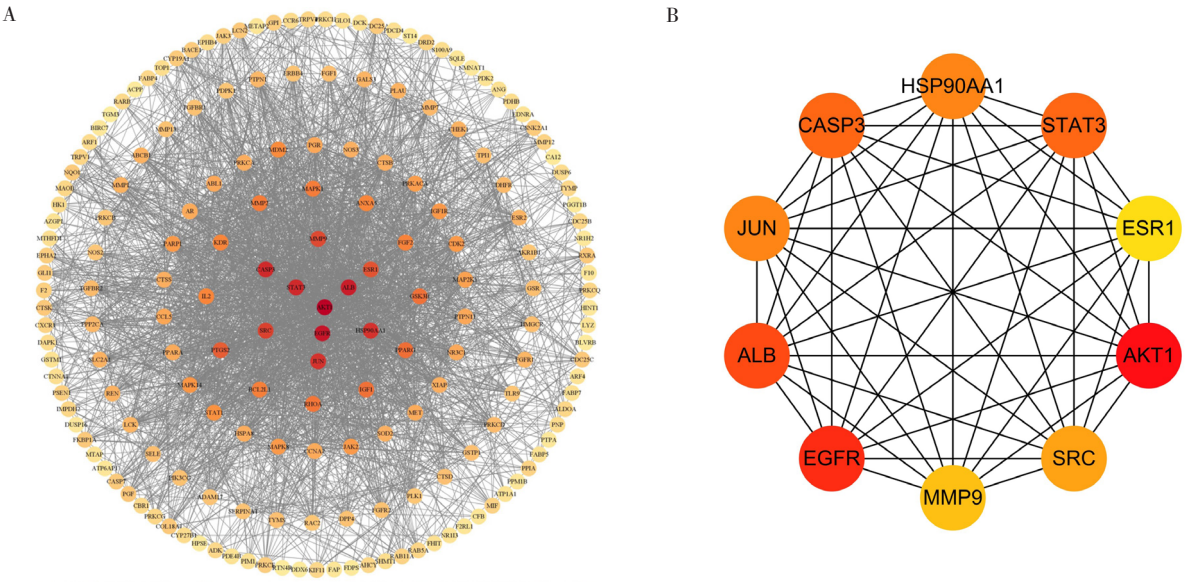


图2 核心靶点基因蛋白质相互作用网络图

Figure 2. The protein–protein interaction network of core targets

注：A. 189个交集靶点的蛋白质相互作用网络图；B. 度值排名前10的核心靶点的蛋白质相互作用网络图。

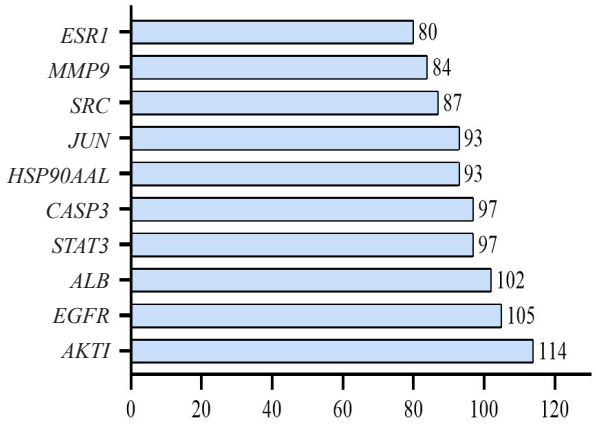


图3 度值排名前10的靶点

Figure 3. Top 10 targets by degree values

2.3 基因本体论功能富集分析、京都基因与基因组百科全书富集分析及药物–靶点–通路网络图的构建

将 189 个交集靶点导入 Metascape 在线平台，种类选择“Homo sapiens”，分别进行 GO 的 BP、CC 和 MF 三个层面的功能分析与 KEGG 富集分析。根据 *P* 值，分别筛选出 BP、CC 和 MF 排名前 20 的富集条目，如图 5–A 所示，GO 功能富集分析中主要涉及信号转导（signal transduction）、磷酸化（phosphorylation）、凋亡过程（apoptotic process）等 BP；胞质（cytosol）、核（nucleus）、细胞质（cytoplasm）等 CC；蛋白结合（protein binding）、蛋白质同源二聚化活性（protein homodimerization activity）等 MF。如图5–B 所示，KEGG 富集路径排名前 20 的条目主要涉及一些癌症信号通路，如 MAPK 信号通路、PI3K–Akt 信号通路等。随后，构建“药物 – 靶点 – 通路”网络图（图 5–C），可视化毛花苷 C 与预测的作用靶点和相关通路之间的关联。在网络图中，度值排名前 3 的通路分别为癌症通路（62）、MAPK 信号通路（33）、PI3K–Akt 信号通路（31）。进一步分析显示，GBM 与 *MAPK1*、*AKT1*、*EGFR*、*MAP2K1*、*FGF2*、*PRKCA*、*VEGFA*、

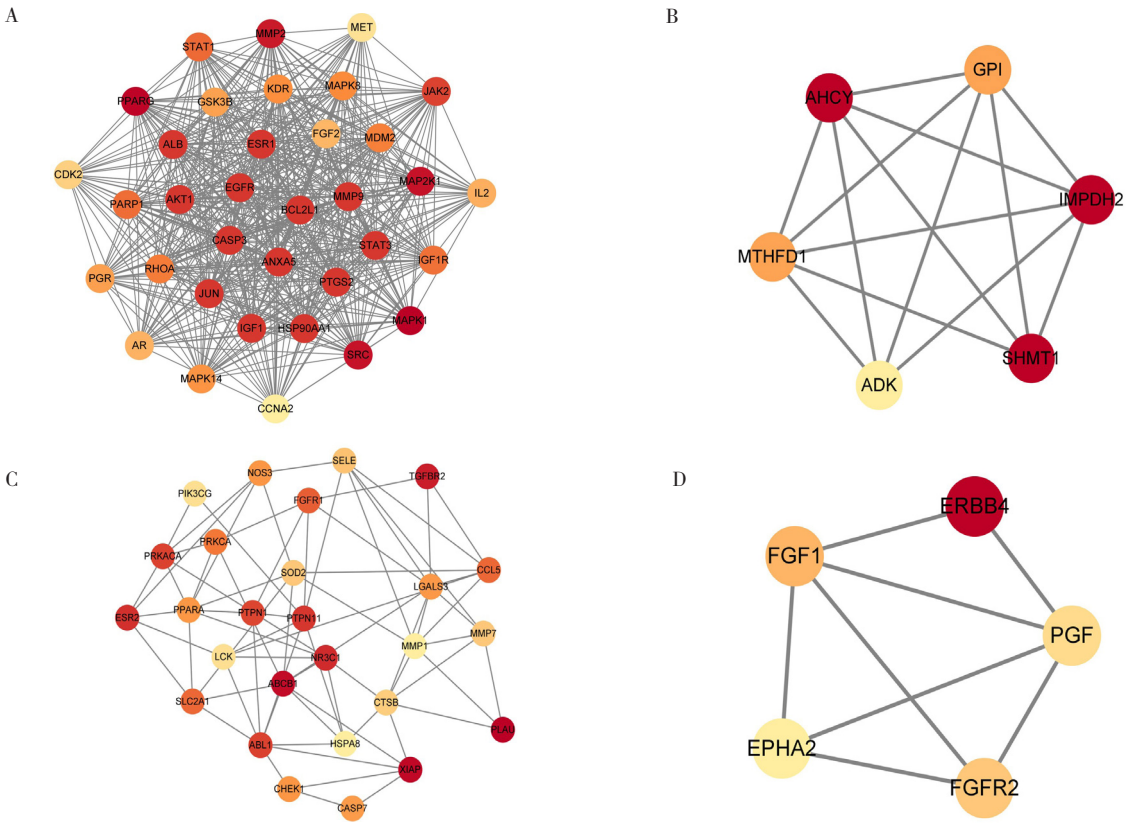


图4 关键的子网络

Figure 4. Key subnetworks

注：4个高度相关的聚类分析。A. 聚类1；B. 聚类2；C. 聚类3；D. 聚类4。

FGFR1、*IGF1R*、*IGF1* 这 10 个基因密切相关，表明在毛花苷 C 治疗 GBM 的过程中，应综合考虑其通过多靶点和多通路协同作用的机制，以优化治疗策略。

2.4 核心靶点在正常组织与肿瘤组织、不同种族和年龄段中基因表达的差异

使用 UALCAN 公开数据库比较前 10 个核心靶点的基因表达差异，结果发现在正常组织与原发肿瘤组织中除 *HSP90AA1* 外，其他 9 个基因在原发肿瘤中的表达均明显高于正常组织；核心基因在不同种族中的表达情况也有所不同，将前 10 个核心靶点在高加索人、非裔美国人和亚洲人三个种族中进行比较，仅 *EGFR* 基因的表达在亚洲人群中明显升高；核心基因在不同年龄段患者中的表达也存在不同，*CASP3* 基因仅在 81~100 岁 GBM 患者中表达最为明显（图 6）。

2.5 分子对接结果

为了进一步验证核心靶点与毛花苷 C 的结合活性，使用 Autodock-vina 将每个核心靶点与毛花苷 C 进行对接，结果显示，毛花苷 C 与各核心靶点之间的结合能均较低，表明亲和力较强，其中与 *ESR1* 结合能最低，亲和力最强，表明毛花苷 C 可能对 *ESR1* 具有潜在的抑制作用，见表 1。最后，利用 PyMoL 将 10 个对接复合物进行可视化，结果见图 7。

2.6 基于GeneMANIA的毛花苷C抗胶质母细胞瘤前10个核心靶点的功能关联网络分析

利用 GeneMANIA 在线网络分析工具，拓展了每个核心靶点的 10 个共表达基因，见图 8。将这些基因与最初的 10 个基因合并去重后，得到包含 107 个基因的 GMFA 扩展数据库（GMFA-ED），可用于更全面的基因 - 基因相互作用分析。

2.7 毛花苷C抗胶质母细胞瘤的GMFA-ED的基因本体论功能富集分析、京都基因与基因组百科全书富集分析及药物-靶点-通路网络图的构建

为了进一步验证毛花苷 C 的潜在作用机制，使用 Metascape 平台对毛花苷 C 抗 GBM 获得的 107 个新潜在靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。

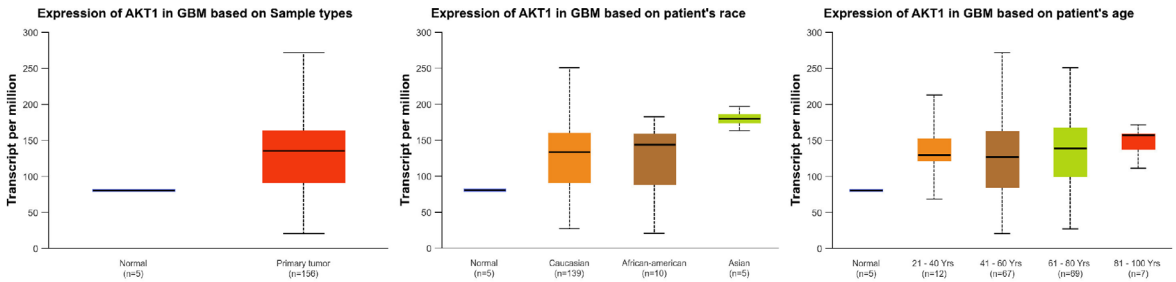


图5 基因本体论功能分析和京都基因与基因组百科全书富集分析

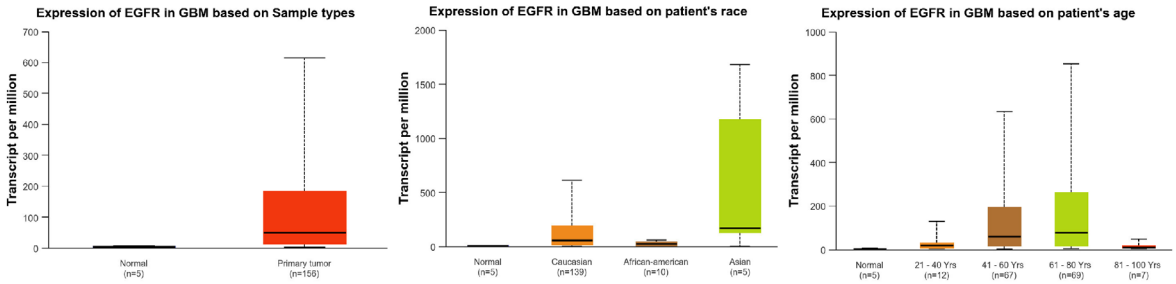
Figure 5. Gene Ontology functional analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analysis enrichment analysis

注：A. 毛花苷C和胶质母细胞瘤共同靶点的基因本体论功能分析图；B. 毛花苷C和胶质母细胞瘤共同靶点的京都基因与基因组百科全书富集分析图；C. 药物−靶点−通路图（毛花苷C−189个交集靶点−京都基因与基因组百科全书富集分析中前20条通路）。

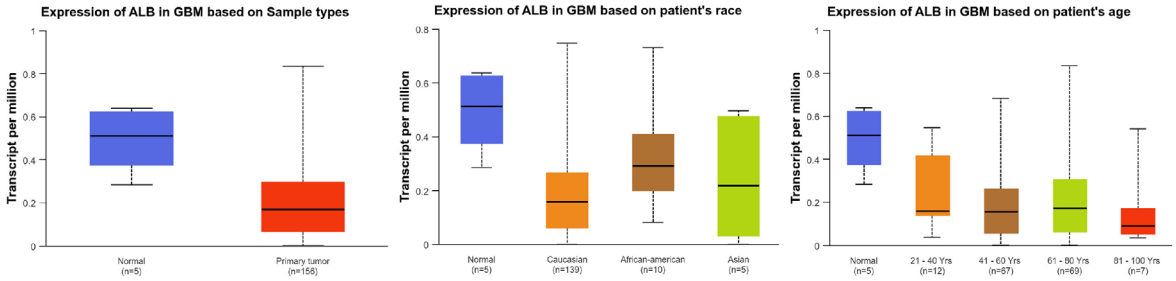
A


Expression of AKT1 in GBM based on Sample types
Expression of AKT1 in GBM based on patient's race
Expression of AKT1 in GBM based on patient's age
Transcript per million
Normal (n=5)
Primary tumor (n=156)
Caucasian (n=139)
African-american (n=10)
Asian (n=5)
21 - 40 Yrs (n=12)
41 - 60 Yrs (n=67)
61 - 80 Yrs (n=69)
81 - 100 Yrs (n=7)

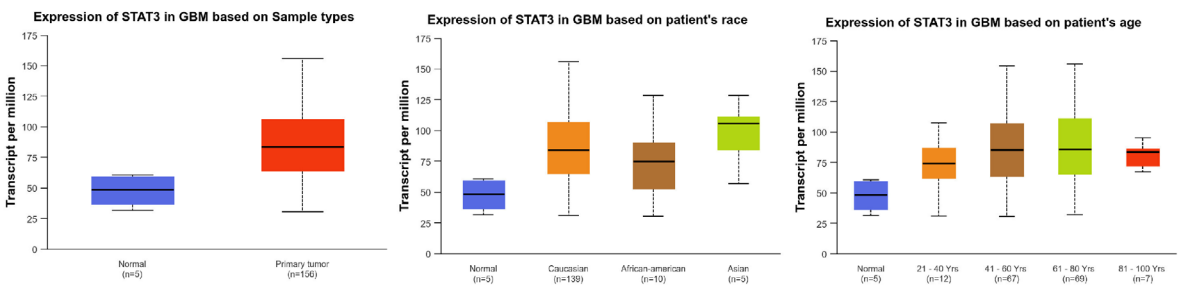
B


Expression of EGFR in GBM based on Sample types
Expression of EGFR in GBM based on patient's race
Expression of EGFR in GBM based on patient's age
Transcript per million
Normal (n=5)
Primary tumor (n=156)
Caucasian (n=139)
African-american (n=10)
Asian (n=5)
21 - 40 Yrs (n=12)
41 - 60 Yrs (n=67)
61 - 80 Yrs (n=69)
81 - 100 Yrs (n=7)

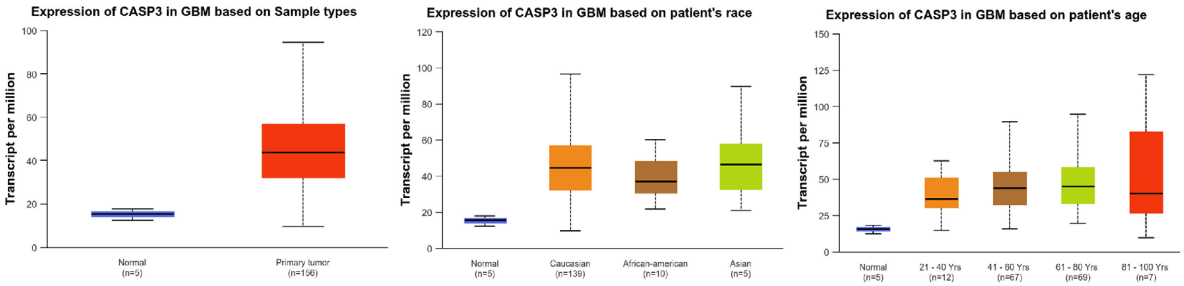
C


Expression of ALB in GBM based on Sample types
Expression of ALB in GBM based on patient's race
Expression of ALB in GBM based on patient's age
Transcript per million
Normal (n=5)
Primary tumor (n=158)
Caucasian (n=139)
African-american (n=10)
Asian (n=5)
21 - 40 Yrs (n=12)
41 - 60 Yrs (n=67)
61 - 80 Yrs (n=69)
81 - 100 Yrs (n=7)

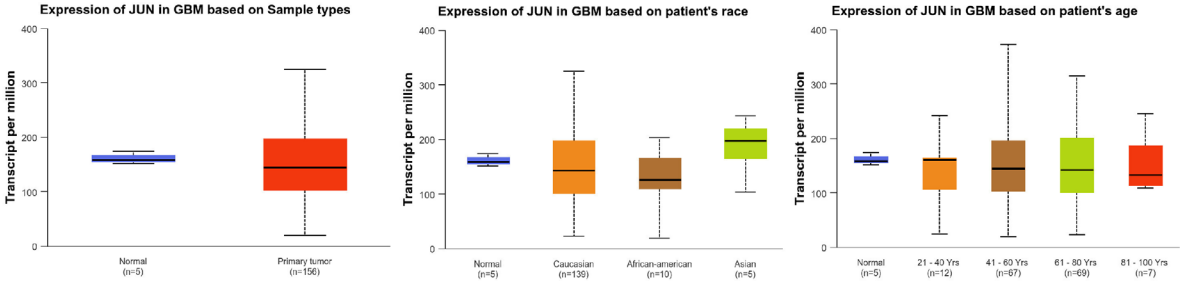
D


Expression of STAT3 in GBM based on Sample types
Expression of STAT3 in GBM based on patient's race
Expression of STAT3 in GBM based on patient's age
Transcript per million
Normal (n=5)
Primary tumor (n=156)
Caucasian (n=139)
African-american (n=10)
Asian (n=5)
21 - 40 Yrs (n=12)
41 - 60 Yrs (n=67)
61 - 80 Yrs (n=69)
81 - 100 Yrs (n=7)

E


Expression of CASP3 in GBM based on Sample types
Expression of CASP3 in GBM based on patient's race
Expression of CASP3 in GBM based on patient's age
Transcript per million
Normal (n=5)
Primary tumor (n=156)
Caucasian (n=139)
African-american (n=10)
Asian (n=5)
21 - 40 Yrs (n=12)
41 - 60 Yrs (n=67)
61 - 80 Yrs (n=69)
81 - 100 Yrs (n=7)

F


Expression of JUN in GBM based on Sample types
Expression of JUN in GBM based on patient's race
Expression of JUN in GBM based on patient's age
Transcript per million
Normal (n=5)
Primary tumor (n=156)
Caucasian (n=139)
African-american (n=10)
Asian (n=5)
21 - 40 Yrs (n=12)
41 - 60 Yrs (n=67)
61 - 80 Yrs (n=69)
81 - 100 Yrs (n=7)

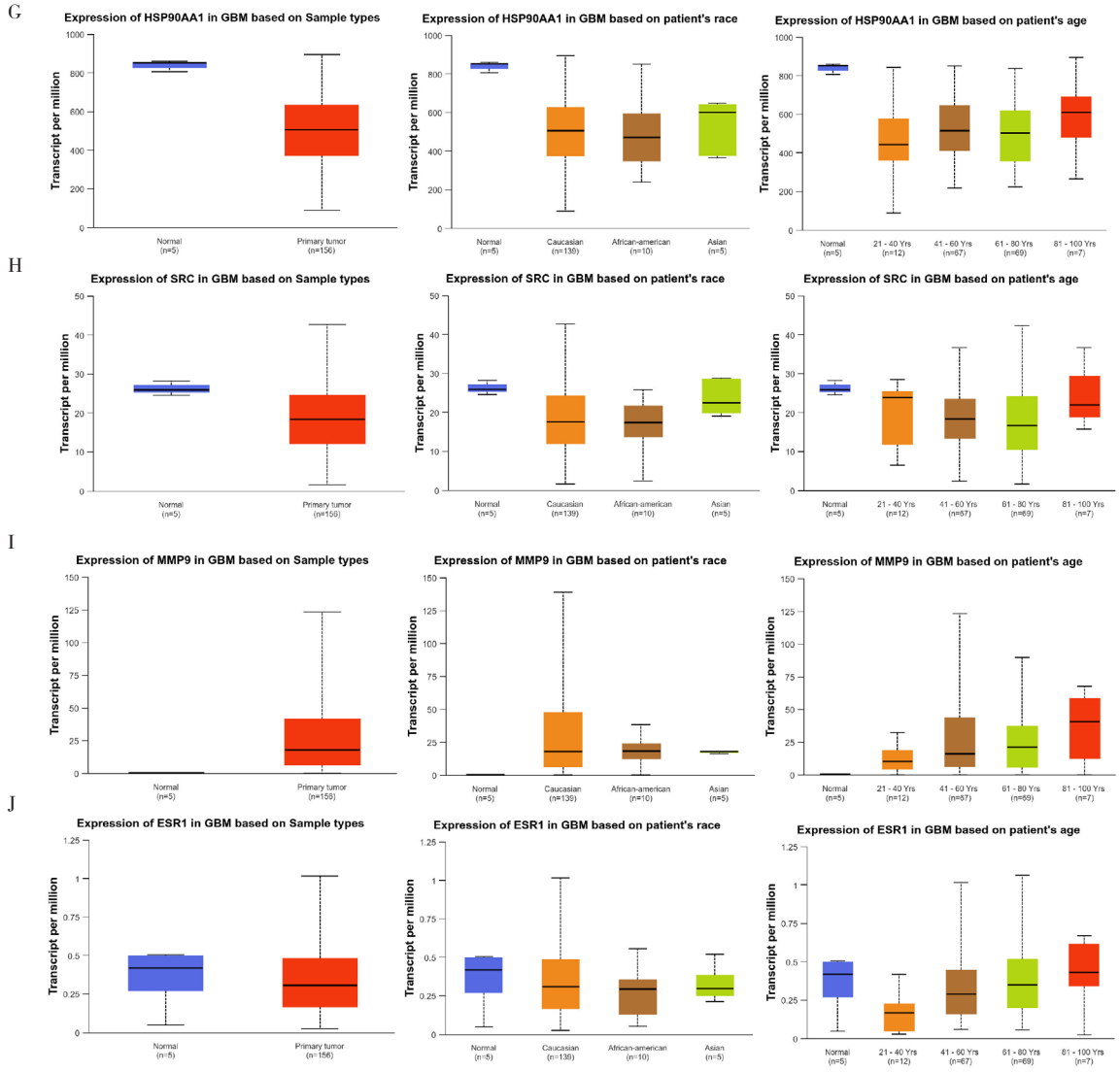


图6 基于样本类型、患者不同种族和不同年龄段在正常组织和肿瘤组织中对比前10个核心靶点的基因表达差异

Figure 6. The gene expression differences of the top 10 core targets in normal and tumor tissues were compared based on sample type, patient race and age

注：A. *AKT1*；B. *EGFR*；C. *ALB*；D. *STAT3*；E. *CASP3*；F. *JUN*；G. *HSP9OAA1*；H. *SRC*；I. *MMP9*；J. *ESR1*。

表1 毛花苷C与10个核心靶点的分子对接结合能

Table 1. Molecular docking binding energy of Lanatoside C with 10 core targets

靶点	PDB ID	结合能（Kcal/mol）
AKT1	6HHJ	−8.179
EGFR	3W2P	−8.475
ALB	7X7X	−10.162
STAT3	6NJS	−7.889
CASP3	6BJR	−8.747
JUN	6Y3V	−8.173
HSP90AA1	8W8K	−8.100
SRC	8JN9	−10.633
MMP9	8K5W	−8.669
ESR1	8DUI	−10.843

注：PDB ID，Protein Data Bank identifier，是蛋白质数据库中的唯一标识符，用于区分不同的蛋白质结构数据。

图 9–A 筛选出 GO 分析中各类别的前 20 个条目，其中 BP 包括蛋白质修饰过程的正调控、酶联受体信号通路、激素反应等；CC 涉及基底膜、细胞基底等；MF 涵盖激酶结合、蛋白同源二聚化等功能。图 9–B 展示了 KEGG 富集分析的前 20 个信号通路，值得注意的是，PI3K–Akt 信号通路在与第一次 KEGG 富集分析结果中排名均靠前，进一步突显其关键作用。最后，合并前 20 条信号通路的靶点，利用 Cytoscape 绘制药物 – 靶点 – 通路图（图 9–C）展示毛花苷 C 的分子机制和治疗路径。

2.8 毛花苷C抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖

为了观察毛花苷 C 对 GBM 细胞增殖和密度

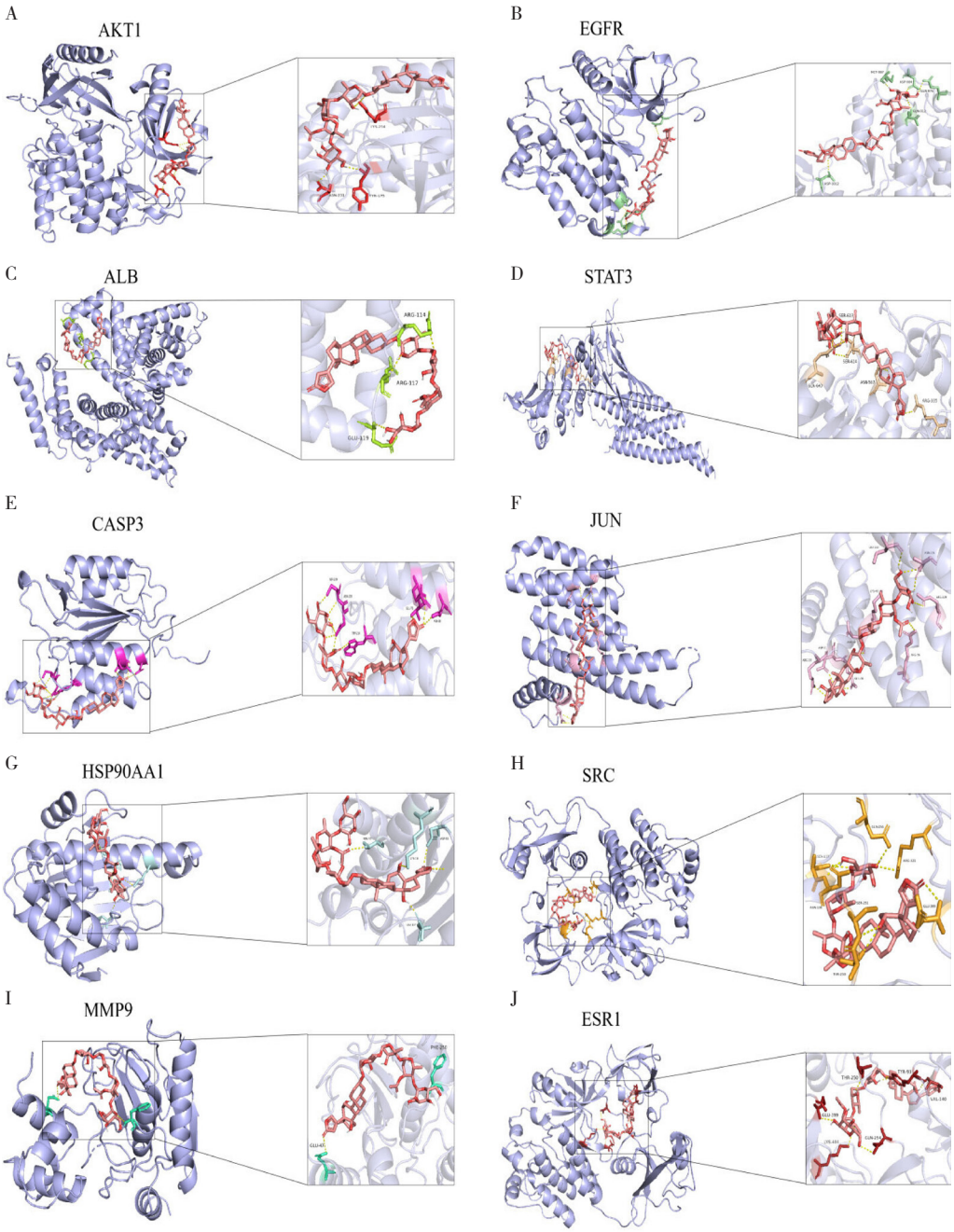
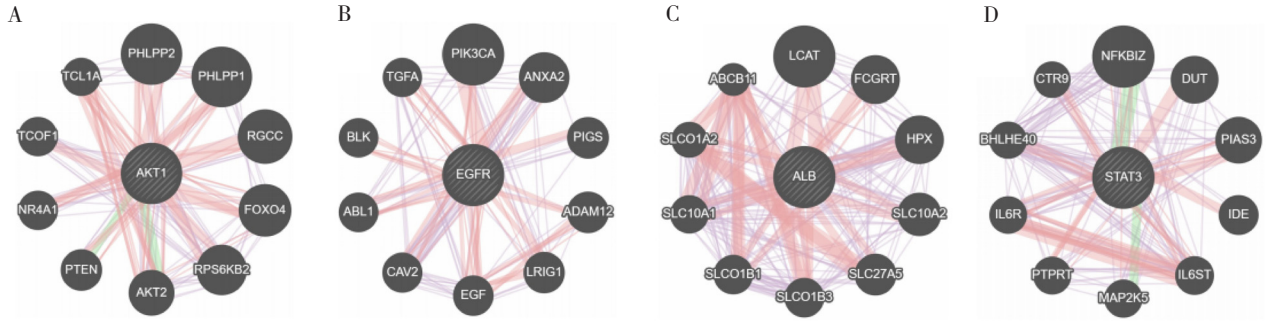


图7 毛花苷C与10个核心靶点的分子对接可视化

Figure 7. Visualization of molecular docking of Lanatoside C with 10 core targets

注：A. *AKT1*与毛花苷C；B. *EGFR*与毛花苷C；C. *ALB*与毛花苷C；D. *STAT3*与毛花苷C；E. *CASP3*与毛花苷C；F. *JUN*与毛花苷C；G. *HSP90AA1*与毛花苷C；H. *SRC*与毛花苷C；I. *MMP9*与毛花苷C；J. *ESR1*与毛花苷C。



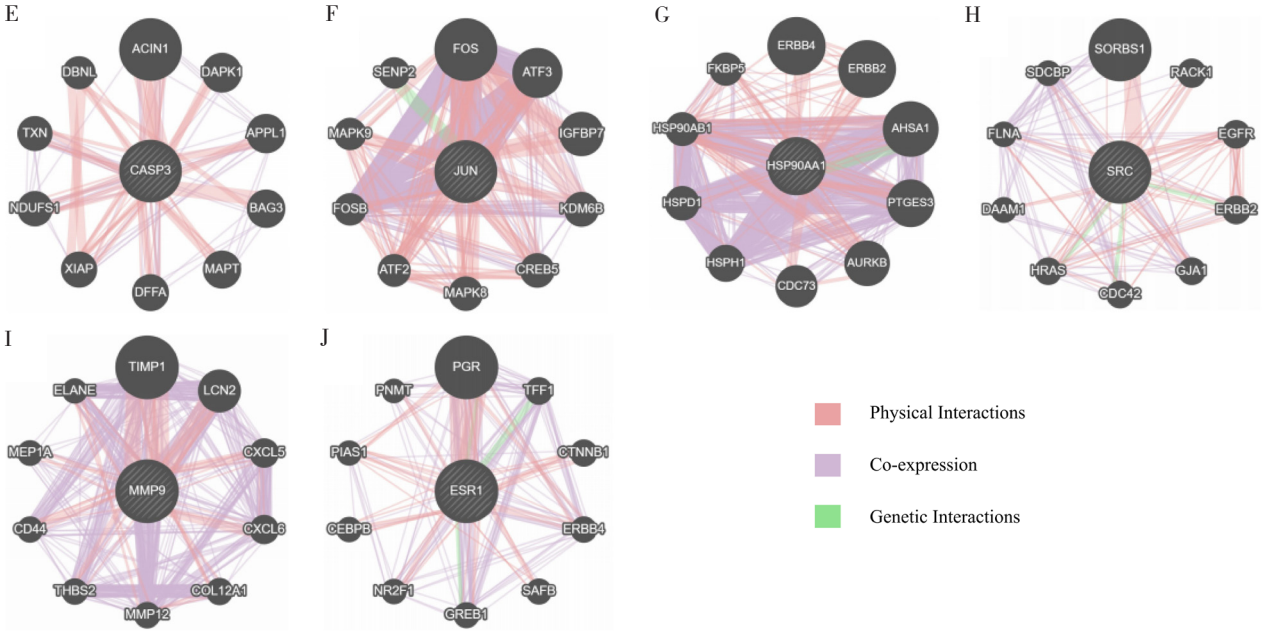
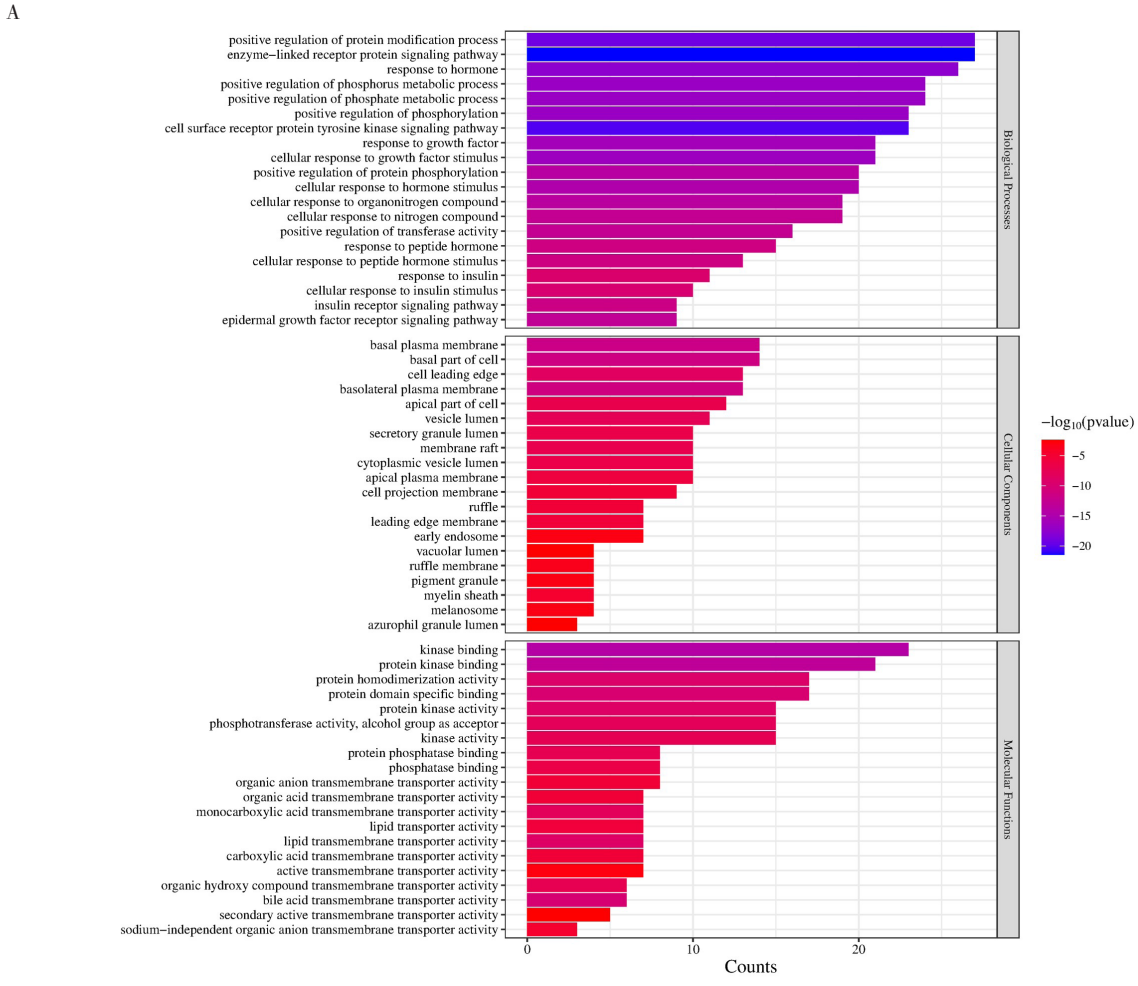


图8 核心基因的GeneMANIA功能关联网络分析

Figure 8. GeneMANIA functional association network analysis of core genes

注：A. *AKT1*的10个共表达基因；B. *EGFR*的10个共表达基因；C. *ALB*的10个共表达基因；D. *STAT3*的10个共表达基因；E. *CASP3*的10个共表达基因；F. *JUN*的10个共表达基因；G. *HSP90AA1*的10个共表达基因；H. *SRC*的10个共表达基因；I. *MMP9*的10个共表达基因；J. *ESR1*的10个共表达基因。



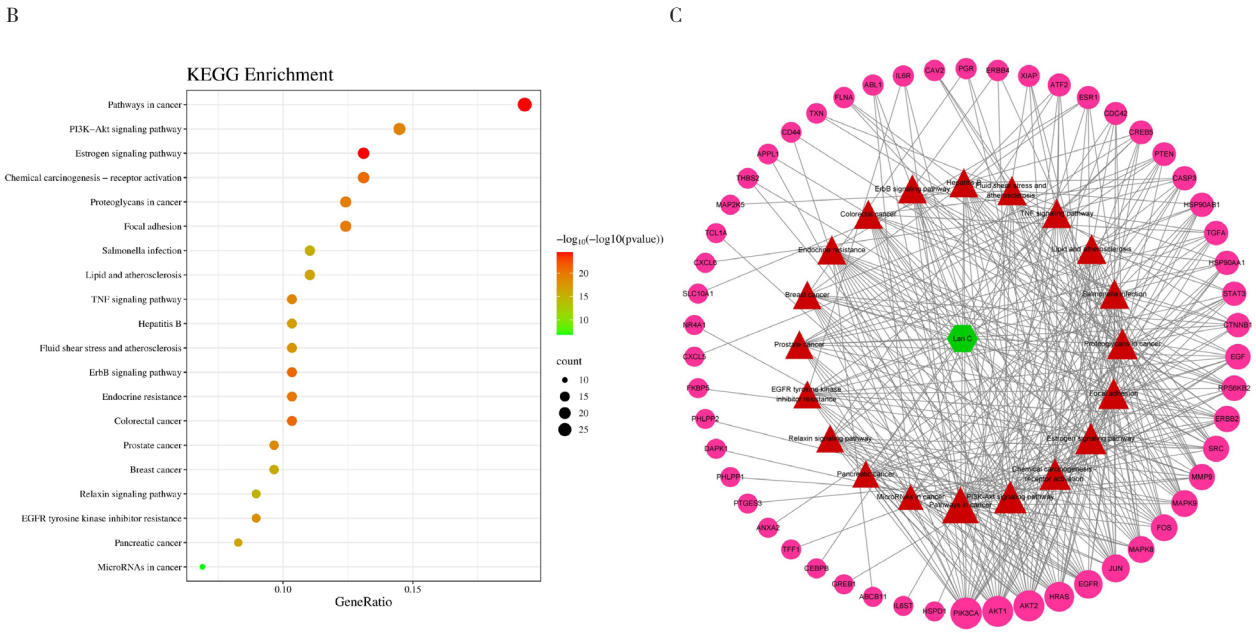
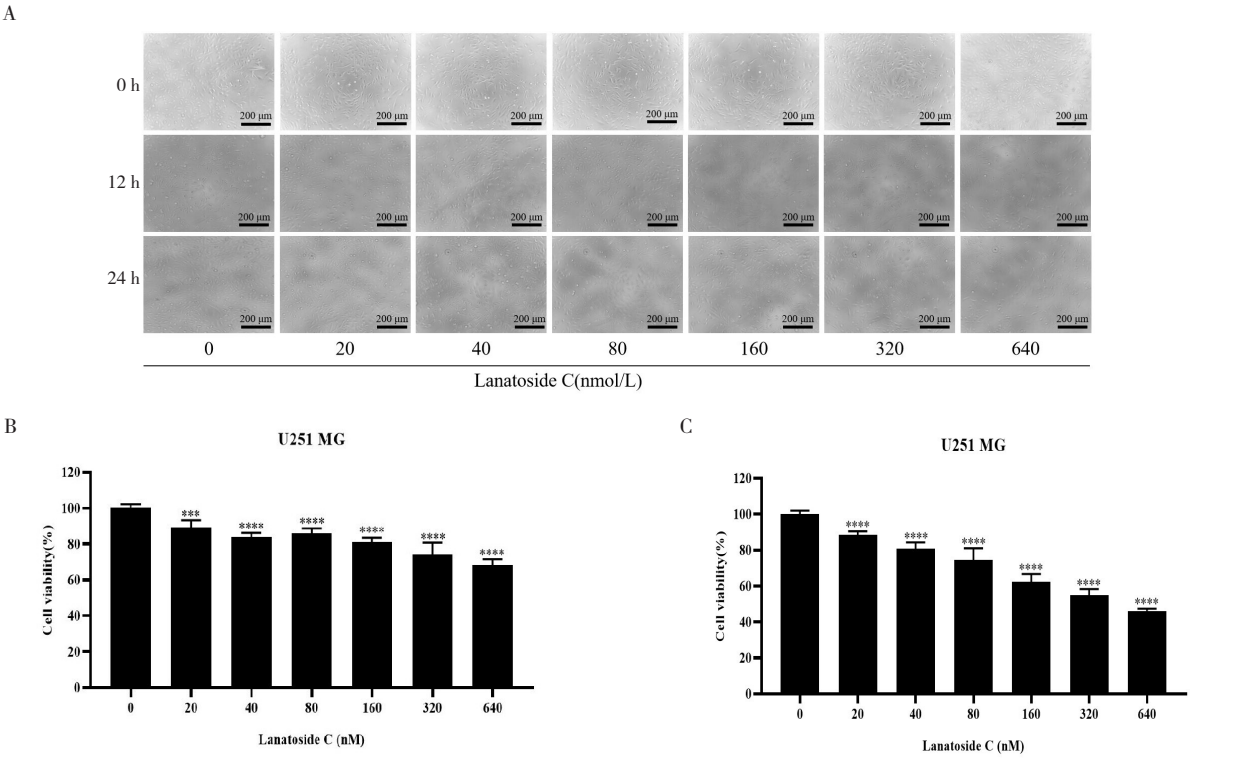


图9 GMFA–ED数据中鉴定的毛花苷C新的潜在作用靶点的基因本体论功能分析、京都基因与基因组百科全书富集分析

Figure 9. Gene Ontology functional analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analysis of new potential targets of Lanatoside C identified in GMFA–ED data

注：A. 107个新的潜在靶点的基因本体论功能分析图；B. 107个新的潜在靶点的京都基因与基因组百科全书富集分析图；C. 药物−靶点−通路图（毛花苷C−107个新的潜在靶点−京都基因与基因组百科全书富集分析中前20条通路）。

的影响，使用不同浓度的毛花苷 C 处理 U251 MG 和 U–87 MG 细胞 24 h，分别在给药前（0 h）、给药后 12 h 和 24 h 观察细胞密度的变化。结果显示，毛花苷 C 对 GBM 细胞的抑制作用呈浓度依赖性，随着给药浓度增加，GBM 细胞增殖能力下降、密度减少，尤其在高浓度组，细胞增殖明显受到抑制、密度显著减少（图 10），进一步验证了毛花苷 C 可以抗 GBM 的结论。



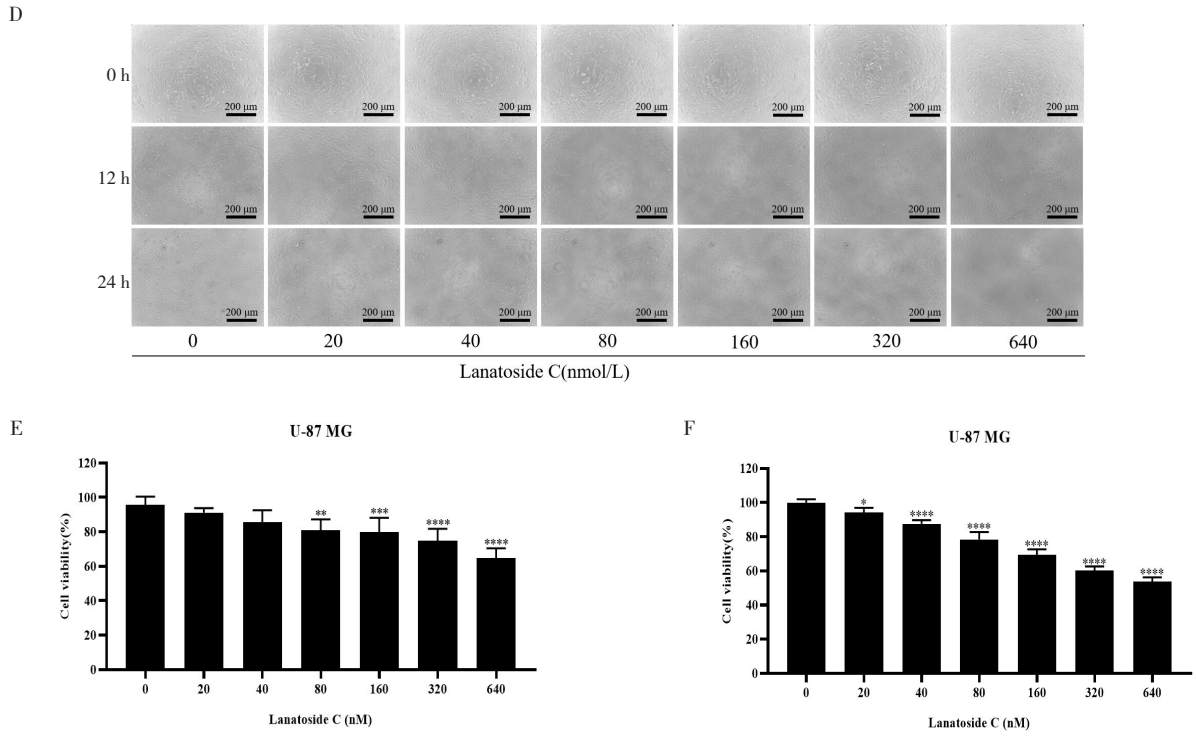


图10 不同浓度毛花苷C对胶质母细胞瘤细胞系生长的影响

Figure 10. Effect of Lanatoside C at different concentrations on the growth of glioblastoma cell lines

注：A. 不同浓度毛花苷C处理U251 MG细胞12 h、24 h的细胞状态图；B. 不同浓度毛花苷C处理U251 MG细胞12 h对细胞增殖的影响；C. 不同浓度毛花苷C处理U251 MG细胞24 h对细胞增殖的影响；D. 不同浓度毛花苷C处理U−87 MG细胞12 h、24 h的细胞状态图；E. 不同浓度毛花苷C处理U−87 MG细胞12 h对细胞增殖的影响；F. 不同浓度毛花苷C处理U−87 MG细胞24 h对细胞增殖的影响；$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01，$^{***}P$<0.001，$^{****}P$<0.0001。

3 讨论

本研究采用网络药理学技术筛选出毛花苷C与GBM的交集靶点，并通过韦恩图分析确认共有189个靶点。将这些交集靶点进行PPI分析以及网络拓扑异构分析，根据度值得到排名前10的关键靶点，分别为*AKT1*、*EGFR*、*ALB*、*STAT3*、*CASP3*、*HSP9OAA1*、*JUN*、*SRC*、*MMP9*、*ESR1*，这些靶点可能在毛花苷C治疗GBM中发挥重要作用。为了进一步探讨毛花苷C治疗GBM的分子机制和核心通路，对交集靶点进行GO功能富集分析和KEGG通路分析，富集后分别选取排名前20的通路，得到了这些靶点在不同BP、MF、CC中的潜在角色和毛花苷C的潜在主要作用通路，其中癌症信号通路（pathways in cancer）富集最为显著。结合能作为配体和受体形成复合物时的能量变化指标，结合能越低，表明两者之间亲和力越强。分子对接结果显示，毛花苷C与所有核心靶点均表现出较强的结合能力，其中分子对接后结合能力最强的靶点为*ESR1*。此外，GeneMANIA平台拓展的共表达基因网络为毛花苷C提供了107个新的潜在靶点，进一步丰富了对其抗肿瘤机制的理解。未来需通过更深入的分子和体内实验，以验证这些靶点的功能并确定其在临床应用中的可行性，为GBM的治疗提供新的靶向策略。

在两次KEGG富集分析中，PI3K−Akt信号通路均表现出显著的重要性，提示其在毛花苷C对GBM治疗中的潜在作用。Reddy等的研究表明，毛花苷C通过诱导DNA损伤和抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路，从而诱导乳腺癌、肝癌和肺癌细胞凋亡[9]。在GBM发生时，经常会出现*EGFR*、*p53*、*PTEN*等基因的突变[10−12]，同时伴随PI3K/AKT等信号通路的异常激活[13−15]，这些信号通路的异常与肿瘤细胞的增殖、侵袭以及抗凋亡能力密切相关。有研究表明，生物钟与GBM的进展存在复杂的分子机制联系，可能成为潜在的治疗靶点[16]。

通过网络药理学技术，本研究初步筛选并确定了毛花苷C治疗GBM的潜在作用靶点和相关

信号通路。通过不同浓度的毛花苷 C 处理 GBM 细胞系 U251 MG 和 U-87 MG，实验结果显示，毛花苷 C 在较低浓度下即可显著抑制 GBM 细胞的增殖，初步验证了网络药理学预测的抗肿瘤作用。本研究揭示了毛花苷 C 对 GBM 的潜在治疗效果，提示其具有抗癌药物开发的潜力，为 GBM 的治疗提供了新的研究思路。

Jansson 等的研究表明，毛花苷 C 可以作用于脑屏障细胞，包括周细胞、内皮细胞等 [17]。虽然强心苷类药物在脑屏障组织中的抗胶质瘤功效尚未被研究，但鉴于强心苷具有广泛的化学多样性和吸收、分布、代谢、排泄特性 [18]，毛花苷 C 在胶质瘤的治疗方面具有很大的潜力。作为一种被美国食品和药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）批准用于治疗心血管疾病的药物 [19]，毛花苷 C 的安全性具有一定的保证，但是对于非心血管疾病的治疗，其是否会带来其他毒副作用，仍需进一步研究。

本研究存在一定局限性：首先，网络药理学预测结果的实验验证尚停留在细胞水平，对毛花苷 C 在体内的治疗效果及其安全性尚未进行深入研究；其次，对毛花苷 C 的作用机制探讨不够全面，特别是其在诱导细胞凋亡、调控细胞周期以及应对氧化应激中的具体分子机制仍需进一步阐明。在本研究中，仅通过 MTT 实验对毛花苷 C 的治疗浓度进行了初步筛选，未来将通过体外细胞实验和体内动物实验进一步验证毛花苷 C 的抗肿瘤效果及其安全性；应用多组学技术（如转录组学）全面解析毛花苷 C 的作用靶点和信号通路；重点探讨毛花苷 C 在 GBM 细胞凋亡、周期调控和氧化应激中的具体作用及分子机制。同时，可结合药物递送技术优化毛花苷 C 的生物利用度和靶向性，为 GBM 的治疗提供更为有效的治疗策略。

综上所述，本研究基于网络药理学和分子对接技术，发现毛花苷 C 通过多靶点、多途径作用于 GBM，并通过体外实验验证了其浓度依赖性地抑制 GBM 细胞增殖，为毛花苷 C 的进一步研究和临床应用提供了新思路和理论依据。

参考文献

1 Park YW, Vollmuth P, Foltyn-Dumitru M, et al. The 2021 WHO classification for gliomas and implications on imaging diagnosis: part 1-key points of the fifth edition and summary of imaging findings on adult-type diffuse gliomas[J]. J Magn Reson Imaging, 2023, 58(3): 677-689. DOI: 10.1002/jmri.28743.

2 Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011-2015[J]. Neuro Oncol, 2018, 20(suppl_4): iv1-iv86. DOI: 10.1093/neuonc/noy131.

3 Cudalbu C, Bady P, Lai M, et al. OTME-13. Integration of metabolic and transcriptional signatures of glioblastoma invasion reveals extracellular matrix reorganization and vasculature remodeling[J]. Neuro-Oncology Advances, 2021, 3(Suppl 2): ii16. DOI: 10.1093/noajnl/vdab070.064.

4 Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma[J]. Handb Clin Neurol, 2016, 134: 381-397. DOI: 10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2.

5 Chao MW, Chen TH, Huang HL, et al. Lanatoside C, a cardiac glycoside, acts through protein kinase Cδ to cause apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells[J]. Sci Rep, 2017, 7: 46134. DOI: 10.1038/srep46134.

6 Ha DP, Tsai YL, Lee AS. Suppression of ER-stress induction of GRP78 as an anti-neoplastic mechanism of the cardiac glycoside Lanatoside C in pancreatic cancer: Lanatoside C suppresses GRP78 stress induction[J]. Neoplasia, 2021, 23(12): 1213-1226. DOI: 10.1016/j.neo.2021.10.004.

7 Hu Y, Yu K, Wang G, et al. Lanatoside C inhibits cell proliferation and induces apoptosis through attenuating Wnt/β-catenin/c-Myc signaling pathway in human gastric cancer cell[J]. Biochem Pharmacol, 2018, 150: 280-292. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.02.023.

8 Yuan Z, Pan Y, Leng T, et al. Progress and prospects of research ideas and methods in the network pharmacology of traditional Chinese medicine[J]. J Pharm Pharm Sci, 2022, 25: 218-226. DOI: 10.18433/jpps32911.

9 Reddy D, Kumavath R, Ghosh P, et al. Lanatoside C induces G2/M cell cycle arrest and suppresses cancer cell growth by attenuating MAPK, Wnt, JAK-STAT, and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways[J]. Biomolecules, 2019, 9(12): 792. DOI: 10.3390/biom9120792.

10 Liu F, Hon GC, Villa GR, et al. EGFR mutation promotes glioblastoma through epigenome and transcription factor network remodeling[J]. Mol Cell, 2015, 60(2): 307-318. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.09.002.

11 Cataldi S, Arcuri C, Lazzarini A, et al. Effect of 1α, 25(OH)$_2$ vitamin D$_3$ in mutant p53 glioblastoma cells: involvement of neutral sphingomyelinase1[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(11): 3265. DOI: 10.3390/cancers12113163.

12 Du L, Zhang Q, Li Y, et al. Research progress on the role of PTEN deletion or mutation in the immune microenvironment of glioblastoma[J]. Front Oncol, 2024, 14: 1409519. DOI: 10.3389/fonc.2024.1409519.

13 Fan HW, Ni Q, Fan YN, et al. C-type lectin domain family 5, member A (CLEC5A, MDL-1) promotes brain glioblastoma tumorigenesis by regulating PI3K/Akt signalling[J]. Cell Prolif,

2019, 52(3): e12584. DOI: 10.1111/cpr.12584.

14 Gong Y, Ma Y, Sinyuk M, et al. Insulin-mediated signaling promotes proliferation and survival of glioblastoma through Akt activation[J]. Neuro Oncol, 2016, 18(1): 48-57. DOI: 10.1093/neuonc/nov096.

15 Pan J, Sheng S, Ye L, et al. Extracellular vesicles derived from glioblastoma promote proliferation and migration of neural progenitor cells via PI3K-Akt pathway[J]. Cell Commun Signal, 2022, 20(1): 7. DOI: 10.1186/s12964-021-00760-9.

16 Nelson N, Relógio A. Molecular mechanisms of tumour development in glioblastoma: an emerging role for the circadian clock[J]. NPJ Precis Oncol, 2024, 8(1): 40. DOI: 10.1038/s41698-024-00530-z.

17 Jansson D, Dieriks VB, Rustenhoven J, et al. Cardiac glycosides target barrier inflammation of the vasculature, meninges and choroid plexus[J]. Commun Biol, 2021, 4(1): 260. DOI: 10.1038/s42003-021-01787-x.

18 Botelho AFM, Pierezan F, Soto-Blanco B, et al. A review of cardiac glycosides: structure, toxicokinetics, clinical signs, diagnosis and antineoplastic potential[J]. Toxicon, 2019, 158: 63-68. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.11.429.

19 Gurel E, Karvar S, Yucesan B, et al. An overview of cardenolides in Digitalis-more than a cardiotonic compound[J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(34): 5104-5114. DOI: 10.2174/1381612823666170825125426.

收稿日期：2024 年 12 月 16 日 修回日期：2025 年 03 月 22 日
本文编辑：张 苗 黄 笛

引用本文：王紫薇，郭婉莹，丁利琼. 基于网络药理学和分子对接技术探究毛花苷C对胶质母细胞瘤的治疗作用及分子机制[J]. 数理医药学杂志, 2025, 38(6): 403-417. DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202412092.
Wang ZW, Guo WY, Ding LQ. Exploration of the therapeutic effect and molecular mechanism of lanatoside C on glioblastoma based on network pharmacology and molecular docking technology[J]. Journal of Mathematical Medicine, 2025, 38(6): 403-417. DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202412092.