

# 加味桂枝茯苓丸治疗前列腺增生症的网络药理学及实验研究

刘丹<sup>1</sup>, 陈亚飞<sup>2</sup>, 刘柘君<sup>2</sup>, 唐田<sup>1</sup>, 于淑俊<sup>1</sup>, 刘桂敏<sup>1</sup>, 汤轶波<sup>2\*</sup>, 刘振权<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>北京中医药大学中药学院; <sup>2</sup>北京中医药大学中医学院, 北京 100029

**摘要:**本研究通过网络药理学和分子对接技术探究加味桂枝茯苓丸治疗前列腺增生症(BPH)的潜在作用机制,并建立大鼠BPH模型对分子对接的关键靶点进行验证。通过TCMSP、TCMID数据库确定加味桂枝茯苓丸中植物药的候选成分及靶点信息,通过相关文献确定动物药水蛭的化学成分及靶点信息,再利用Cytoscape 3.7.1构建药物-候选成分-靶点网络图;通过GeneCards、OMIM、TTD、DisGeNET、DRUGBANK数据库确定BPH疾病的潜在靶点;取成分和疾病的交集靶点,利用STRING 11.0平台及Bisogenet 3.0.0插件构建PPI网络图。再导入Metascape平台、KOBAS 3.0数据库进行GO功能注释和KEGG通路富集分析及网络图绘制。然后,筛选出网络图中degree值较高的核心成分和关键靶点,采用AutoDock 4.2.6及PyMOL 2.2.0软件进行分子对接。最后采用去势手术联合丙酸睾酮皮下注射建立BPH大鼠模型,灌胃治疗后,结合免疫组化结果,观察各组大鼠前列腺组织中BAX的表达情况。网络药理学结果显示共筛选出加味桂枝茯苓丸的候选成分133种,其中作用于BPH的核心成分有槲皮素、 $\beta$ -谷甾醇、山奈酚、黄酮素、鞣花酸等;主要靶点有AKT1、BAX、BCL2、JUN、TGFB1、TNF、IL6、VEGFA、EGFR等;主要集中于PI3K-AKT、VEGF信号通路等来参与细胞凋亡、血管生长以及炎症等进程。分子对接结果显示,核心成分与关键靶点均能自发结合,其中BAX与 $\beta$ -谷甾醇结合能力最强。动物实验结果显示,与模型组相比,6.57、13.14、26.28 g/kg加味桂枝茯苓丸均可显著增加BAX的表达( $P < 0.01$ ),表明加味桂枝茯苓丸可能主要通过作用于BAX靶点来治疗BPH。

**关键词:**加味桂枝茯苓丸;前列腺增生症;网络药理学;分子对接;作用机制;实验验证

中图分类号:R285.5;R319

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)7-1234-16

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.7.017

## Study on the treatment of benign prostatic hyperplasia with modified Guizhi Fuling Pill based on network pharmacology and experiment verification

LIU Dan<sup>1</sup>, CHEN Ya-fei<sup>2</sup>, LIU Zhe-jun<sup>2</sup>,  
TANG Tian<sup>1</sup>, YU Shu-jun<sup>1</sup>, LIU Gui-min<sup>1</sup>, TANG Yi-bo<sup>2\*</sup>, LIU Zhen-quan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine;

<sup>2</sup>School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

**Abstract:** To explore the potential mechanism of modified Guizhi Fuling Pill (MGFP) in the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH) by network pharmacology and molecular docking. Then, the BPH model rats were established to verify the key targets from molecular docking. First, the candidate components and target information of plant herbs in MGFP were determined through TCMSP and TCMID databases, while the animal drug Hirudo was determined through relevant literature. Then, the drug-candidate component-target network diagram was constructed using Cytoscape 3.7.1. The potential targets of BPH were determined through GeneCards, OMIM, TTD, DisGeNET and DRUGBANK databases. The intersection targets of components and disease were selected and imported into STRING 11.0 platform, and PPI network diagram was constructed with Bisogenet 3.0.0 plug-in. Subsequently, Metascape platform and KOBAS 3.0 database were used to perform GO functional annotation, KEGG pathway enrichment analysis and network diagram drawing. Then, the core components and key targets with higher degree values in the network diagram were screened, which will be used for molecular docking in AutoDock 4.2.6 and PyMOL 2.2.0 software. Finally, BPH rat model was established by castration combined with subcutaneous injection of testos-

terone propionate and intragastrical treatment. Then, according to the immunohistochemical results, the expression of BAX in the prostate tissue of rats in each group was observed. The results of network pharmacology analysis showed that a total of 133 candidate components of MGFP were screened out, of which quercetin,  $\beta$ -sitosterol, kaempferol, baicalein, and ellagic acid could act on BPH. The main targets were AKT1, BAX, BCL2, JUN, TGFBI, TNF, IL6, VEGFA and EGFR, which are mainly concentrated in PI3K-AKT signaling pathway and VEGF signaling pathway to participate in the processes of apoptosis, angiogenesis, and inflammation. Molecular docking results showed that all core components and key targets could spontaneously bind, and BAX and  $\beta$ -sitosterol had the strongest binding capacity. Animal experiments showed that compared with the model group, the expression of BAX was significantly increased when the MGFP doses were 6.57, 13.14 and 26.28 g/kg ( $P < 0.01$ ). All these indicated that MGFP might mainly act on the target of BAX to treat BPH.

**Key words:** modified Guizhi Fuling Pill; benign prostatic hyperplasia; network pharmacology; molecular docking; mechanism; experimental verification

良性前列腺增生症 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 简称前列腺增生症, 临床发病群体多为中老年男性, 据统计, BPH 发病率随年龄增长而增加, 80 岁时达 80%, 且数据仍在逐年递增<sup>[1]</sup>。BPH 的治疗手段有西药和手术治疗, 但西药疗法会对神经认知和性功能造成损伤, 外科手术则伴随术后并发症, 所以探索 BPH 新的治疗途径刻不容缓。

中医讲究整体观和辨证论治, 在疾病治疗上有丰富经验和独特优势。桂枝茯苓丸出自汉代医圣张仲景, 本研究中的加味桂枝茯苓丸 (modified Guizhi Fuling Pill, MGFP) 由桂枝、茯苓、桃仁、牡丹皮、赤芍、王不留行、乌药、水蛭 8 味中药组成, 是课题组前期基于数据挖掘提取出的国医大师王琦院士治疗 BPH 的核心组方<sup>[2]</sup>。根据中医理论, BPH 的发病病机是“肾气亏虚、瘀血阻滞”, MGFP 善散瘀血、消癥积、通水道, 临床使用有显著疗效, 但中药复方成分复杂, 对其作用机制研究造成极大阻碍。

近年来, 网络药理学广泛用于中药药理学研究, 其理念围绕有效药物治疗疾病以相互连接网络中的多个分子为靶点, 这恰好与中药的多成分、多靶点、多途径理论相契合。基于此, 本研究利用网络药理学和分子对接技术探讨 MGFP 对 BPH 的潜在作用机制, 并建立 BPH 模型大鼠对其中结合能最优的靶点进行验证, 以为临床治疗提供数据支撑。

## 1 MGFP 治疗 BPH 的网络药理学研究

### 1.1 MGFP 相关靶点筛选

#### 1.1.1 植物药相关靶点筛选

通过 TCMSp 数据库 (<https://tcmsp.com/tcm-sp.php>)、TCMID 数据库 (<http://119.3.41.228:8000/tcmid/>) 寻找桂枝、茯苓、桃仁、牡丹皮、赤芍、王不留行、乌药 7 味植物类中药的化学成分。利用口服利用度 (oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$  及类药

性 (drug-likeness, DL)  $\geq 0.18$  两个 ADME 属性值对候选成分进行初步筛选。在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载候选化合物二维构象的 sdf 格式文件, 再导入 PharmMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 进行潜在靶点的预测, 并将“normalized fit score”排名前 10 的靶点确定为最终结果。筛选结束后, 将所有靶点剔除重复值, 利用 UniProt 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org>) 对上述靶点信息进行标准化处理。

#### 1.1.2 动物药相关靶点筛选

由于水蛭是动物药, 无法在 TCMSp 数据库中检索到, 故通过国内外相关文献<sup>[3,4]</sup> 搜索其候选成分。参照“1.1.1”项, 在 PubChem、PharmMapper 中筛选潜在靶点, 并对靶点信息进行规范化命名。

## 1.2 BPH 相关靶点筛选

选择“prostatic hyperplasia”“benign prostatic hyperplasia”等与 BPH 相关的疾病作为关键词, 挖掘 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库 (<http://www.omim.org>)、TTD 数据库 (<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd>)、DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>) 以及 DRUG-BANK 数据库 (<https://www.drugbank.ca>) 中 BPH 的潜在靶点。由于 GeneCards 数据库靶点过多, 而该数据库中 score 值越高代表此靶点与疾病联系越密切, 根据经验, 设定 score 值  $\geq$  中位数的目标靶点为 BPH 的潜在靶点, 合并 5 个疾病数据库靶点后, 删除重复值得到 BPH 最终靶点。

## 1.3 构建药物候选成分目标网络

将 8 味药筛选出的候选成分与靶点基因导入 Cytoscape 3.7.1, 利用插件 Network Analyzer 计算 degree 值, 并构建 MGFP 药物-候选成分-靶点的网络

图。

#### 1.4 MGFP 成分-BPH 靶点 PPI 网络构建

提取 MGFP 成分与 BPH 疾病的交集靶点,并通  
过在线作图工具 Draw Venn Diagram 网站([http://  
bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/](http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/))绘制韦  
恩图。再将交集靶点导入 STRING 11.0 平台([ht-  
tps://string-db.org/](https://string-db.org/))分析靶点基因间的相互作用关  
系,最后将数据导入 Cytoscape 3.7.1 软件建立蛋白  
质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络图。

#### 1.5 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析

将“1.4”MGFP 与 BPH 的交集靶点导入 Meta-  
scape ([https://metascape.org/gp/index.html#/main/  
step1](https://metascape.org/gp/index.html#/main/<br/>step1))数据库及 KOBAS 3.0([http://kobas.cbi.pku.  
edu.cn/kobas3](http://kobas.cbi.pku.<br/>edu.cn/kobas3))数据库<sup>[5]</sup>,分别进行 GO 细胞组成  
(cellular component, CC)富集分析、生物过程(bio-  
logical process, BP)富集分析、分子功能(molecular  
function, MF)富集分析及 KEGG 富集分析,并在 Cy-  
toscape 3.7.1 软件中构建“成分-靶点-通路”网络  
图。

#### 1.6 分子对接验证

选取“成分-靶点-通路”网络中 degree 值排名前  
5 的 MGFP 核心成分与 BPH 关键靶点进行分子对  
接。具体操作如下:(1)制备小分子配体:首先从  
TCMSP 数据库下载 MGFP 核心成分的 .mol2 格式文  
件,再利用 AutodockTools 加氢、设为配体、确定扭矩  
中心、选择扭转键,导出为 .pdbqt 格式。(2)制备受  
体分子:蛋白质的晶体结构来自 RCSB PDB 网站  
(<http://www.rcsb.org/>),选择具有一种或多种共结  
晶配体及低“分辨率”值晶体结构的人类蛋白,保存  
为 .pdb 格式,利用 AutoDockTools 去水加氢,设为受  
体并导出为 .pdbqt 格式。(3)分子对接:AutoDock  
是一款基于模拟退火和遗传算法实现受体分子和配  
体盲对接的工具,盲对接是高通量筛选和反向对接  
的关键部分,可以发现受体和配体的最佳结合位置  
与构象,用半经验的自由能计算方法来评价两者的  
匹配情况<sup>[6]</sup>。通过 AutoDock 4.2.6 软件调整 Grid  
Box 参数直至盒子将受体分子全部包裹住,采用盲  
对接的方法寻找活性位点,导出格点参数文件  
(GPF),运行 Autogrid4,设置对接参数及算法进行  
半柔性对接,运行 Autodock4,查看结果。(4)利用  
PyMOL 2.2.0 软件将对接结果可视化处理。

## 2 MGFP 治疗 BPH 的动物实验验证

### 2.1 药物与试剂

MGFP 剂量参照王琦院士临床用药经验,由桂  
枝 10 g、茯苓 10 g、桃仁 9 g、牡丹皮 10 g、赤芍 10 g、  
王不留行 20 g、乌药 20 g、水蛭 3 g 组成,购自北京  
同仁堂股份有限公司新悦都店。玉米油购自中粮福  
临门食品营销有限公司(批号:Q/02A3097S);丙酸  
睾酮注射液购自宁波第二激素厂(批号:200801);  
非那雄胺片购自浙江仙琚制药股份有限公司(批  
号:201207);癸闭舒胶囊购自石家庄科迪药业有  
限公司(批号:J2011201);兔抗 BAX 购自美国 Cell  
Signaling Technology 公司(批号:14796S);免疫组化  
试剂盒购自北京中杉金桥公司(批号:SP-9001)。

### 2.2 动物

选用 SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠 48 只,体  
质量 200 ~ 220 g,购自维通利华实验动物技术有限公  
司,大鼠饲养于温度 23 ~ 25 ℃、湿度 50% ± 10% 的  
环境中,照明时间为 12 h/d,自由饮水和进食,在新  
环境适应性饲养 7 d 后开始实验。

### 2.3 仪器

旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI, R-220PRO);荧光倒  
置生物显微镜(日本 NIKON, TS-2);电热鼓风干燥  
箱(上海申光仪器仪表有限公司, 101AB-1);石蜡切  
片机(德国莱卡, LEICA-RM2165)。

### 2.4 分组及给药

SD 大鼠适应性饲养 7 天后,随机选取 6 只为空  
白组,6 只为假手术组,空白组大鼠不做手术处理,  
假手术组大鼠打开阴囊后挤出睾丸再放回缝合,其  
余 36 只大鼠随机分为模型组、MGFP 低、中、高剂  
量组、非那雄胺组以及癸闭舒胶囊组,每组 6 只,均  
采用去势手术联合丙酸睾酮注射建立 BPH 模型。操  
作方法:先用 10% 水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻  
醉大鼠,常规消毒后打开阴囊,挤出睾丸,小心剥离  
脂肪组织后摘除双侧睾丸,在伤口处撒入适量青霉  
素固体粉末防止感染,然后结扎止血缝合。术后让  
大鼠恢复 7 天,选取去势后状态良好的大鼠,皮下注  
射丙酸睾酮 5 mg/kg(丙酸睾酮溶解于玉米油中),1  
次/天,空白组和假手术组皮下注射等体积玉米油,  
连续 28 天。BPH 大鼠模型建立成功后开始给药治  
疗,MGFP 低、中、高剂量组分别灌胃 6.57、13.14、  
26.28 g/kg(相当于临床给药剂量的 5、10、20 倍),  
非那雄胺组灌胃 0.71 mg/kg,癸闭舒胶囊组灌胃 0.  
257 g/kg,空白组、假手术组及模型组灌胃等量蒸馏

水,1次/天,连续28天。实验期间,每3天称重一次,根据大鼠体重变化调节给药剂量。

## 2.5 取材

末次给药后24 h,水合氯醛麻醉,剖开大鼠腹部充分暴露腹腔内脏器,找到大鼠膀胱,前列腺与膀胱相连,位于膀胱背侧,将前列腺与膀胱一同剪取,然后小心分离摘取前列腺,用滤纸吸去多余水分,然后置于4%多聚甲醛固定,用于后续检测。

## 2.6 免疫组化检测大鼠前列腺组织中 BAX 蛋白的表达

固定24 h后,将上述前列腺组织从4%多聚甲醛溶液中取出,依次进行修块、常规乙醇脱水、石蜡包埋、切片(5  $\mu\text{m}$ )、烤片、脱蜡至水操作。蒸馏水中清洗2次,每次5 min;滴加内源性过氧化物酶阻断剂15 min,洗涤;浸入柠檬酸钠抗原修复液并置于微波炉95  $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min,进行抗原修复,自然冷却,洗涤;滴加5%山羊血清,室温封闭30 min,甩除免洗;滴加一抗工作液(1:400),4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗涤;滴加二抗辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG,室温孵育15 min,洗涤;再依次进行DAB显色、苏木精复

染、脱水、透明、封片、晾干并置于显微镜下观察并采集图像。用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统测定BAX, BAX的平均光密度值(average optical density, AOD) = 累积光密度值(integrated optical density, IOD)/阳性表达面积, AOD值越大表示BAX蛋白表达水平越高。

## 2.7 统计分析

采用SPSS 22.0软件进行数据分析,多组间比较用单因素方差分析,结果采用均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,  $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 MGFP 候选成分及其靶点信息

检索出MGFP化学成分共计713种,包括桂枝224种、茯苓34种、桃仁66种、牡丹皮55种、赤芍119种、王不留行26种、乌药128种、水蛭61种。经“1.1.1”筛选后,最终得到MGFP的候选成分共计133种,包括桂枝7种、茯苓11种、桃仁19种、牡丹皮6种、赤芍18种、王不留行4种、乌药9种、水蛭59种,删除重复值后得MGFP成分靶点317个。MGFP候选成分的基本信息见表1。

表1 MGFP 候选成分  
Table 1 Candidate components of MGFP

药物 Herb	标记 Mark	候选成分 Candidate component	
桂枝 Cinnamomi Ramulus	CR1	(-)-二氢榭皮素 (-)-Taxifolin	
	A1	$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol	
	B1	谷甾醇 Sitosterol	
	C1	(+)-儿茶素 (+)-Catechin	
	CR2	表儿茶素 <i>ent</i> -Epicatechin	
	CR3	花旗松素 Taxifolin	
	CR4	过氧麦角甾醇 Peroxyergosterol	
	茯苓 Poria	P1	(2 <i>R</i> )-2-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,16 <i>R</i> ,17 <i>R</i> )-3,16-Dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[ <i>a</i> ]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid
		P2	氢化松苓酸 Trametenolic acid
		P3	啤酒甾醇 Cerevisterol
P4		星鱼甾醇 Ergosta-7,22 <i>E</i> -dien-3beta-ol	
P5		麦角甾醇过氧化物 Ergosterol peroxide	
P6		脱氢齿孔酸 Dehydroeburicoic acid	
E1		常春藤皂苷元 Hederagenin	
P7		茯苓酸 Pachymic acid	
P8		茯苓酸 A Poricoic acid A	
P9		茯苓酸 B Poricoic acid B	
P10	茯苓酸 C Poricoic acid C		

续表 1 (Continued Tab. 1)

药物 Herb	标记 Mark	候选成分 Candidate component
桃仁 <i>Persicae Semen</i>	PS1	$\alpha$ 1-谷甾醇 Sitosterol $\alpha$ 1
	PS2	2,3-二脱氢 GA70 2,3-Didehydro GA70
	PS3	2,3-二脱氢 GA77 2,3-Didehydro GA77
	PS4	GA120
	PS5	GA121-异内酯 GA121-isolactone
	PS6	GA122-异内酯 GA122-isolactone
	PS7	4a-Formyl-7 $\alpha$ -hydroxy-1-methyl-8-methylidene-4 $\alpha$ ,4 $\beta$ -gibbane-1 $\alpha$ ,10 $\beta$ -dicarboxylic acid
	PS8	赤霉素 A44 Gibberellin A44
	PS9	GA54
	PS10	GA60
	PS11	GA63
	PS12	赤霉素 7 Gibberellin 7
	PS13	GA77
	PS14	GA87
	PS15	3- <i>O</i> -对香豆酰基奎宁酸 3- <i>O</i> - <i>p</i> -Coumaroylquinic acid
牡丹皮 <i>Moutan Cortex</i>	E1	常春藤皂苷元 Hederagenin
	A1	$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol
	PS16	菜油甾醇 Campesterol
	PS17	赤霉素 17 Gibberellin 17
	MC1	丁香香萆 Mairin
	B1	谷甾醇 Sitosterol
	MC2	山奈酚 Kaempferol
赤芍 <i>Paeoniae Radix Rubra</i>	C1	(+)-儿茶素 (+)-Catechin
	MC3	5-[ [5-(4-Methoxyphenyl)-2-furyl] methylene ] barbituric acid
	F1	槲皮素 Quercetin
	PRR1	鞣花酸 Ellagic acid
	PRR2	芍药苷元 Paeoniflorgenone
	PRR3	芍药苷 Paeoniflorin
	PRR4	黄芩素 Baicalein
	A1	$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol
	B1	谷甾醇 Sitosterol
	PRR5	菠菜甾醇 Spinasterol
赤芍 <i>Paeoniae Radix Rubra</i>	D1	豆甾醇 Stigmasterol
	C1	(+)-儿茶素 (+)-Catechin
	PRR6	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )-4-甲氧基-二苯乙烯 (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )-4-Methoxyl-distylin
	PRR7	豆甾-7-烯-3-醇 Stigmast-7-en-3-ol
	PRR8	油酸乙酯 Ethyl oleate (NF)
	PRR9	苡烯-5-烯-3 $\beta$ -醇 Campest-5-en-3 $\beta$ -ol
	PRR10	(-)-儿茶素 (-)-Catechin

续表 1 (Continued Tab. 1)

药物 Herb	标记 Mark	候选成分 Candidate component	
赤芍 <i>Paeoniae Radix Rubra</i>	PRR11	芍药新苷 Lactiflorin	
	PRR12	芍药内酯苷 Albiflorin	
	PRR13	芍药苷元酮 Paeoniflorigenone	
	PRR14	楝叶吴萸素 B Evofolin B	
王不留行 <i>Vaccariae Semen</i>	D1	豆甾醇 Stigmasterol	
	VS1	异牡荆素 Isovitexin	
	VS2	(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,12 <i>S</i> )-6-(1 <i>H</i> -indol-3-ylmethyl)-12-isopropyl-3,9-dimethyl-1,4,7,10,13-pentazacyclopentadecane-2,5,8,11,14-pentone	
	F1	槲皮素 Quercetin	
乌药 <i>Linderae Radix</i>	LR1	6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮 6,7-Dimethoxy-2-(2-phenylethyl) chromon	
	LR2	DMPEC	
	LR3	去甲波尔定 Norboldine	
	LR4	乌药醚内酯 Linderane	
	LR5	5,7,4-三羟基-3 $\alpha$ -羟基二氢查尔酮 Nubigenol	
	LR6	波尔定 Boldine	
	A1	$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol	
	B1	谷甾醇 Sitosterol	
	F1	槲皮素 Quercetin	
	水蛭 <i>Hirudo</i>	H1	胱氨酸 Cystine
		H2	$\beta$ -熊果酸 $\beta$ -Ursolic acid
		H3	藏红花酸 Crocetin
H4		藏红花素 Crocin	
H5		异萆金刚大定 Croomionidine	
H6		<i>D</i> -甘露醇 <i>D</i> -Mannitol	
H7		<i>D</i> -甘露庚酮糖 <i>D</i> -Mannoheptulose	
H8		卫矛醇 Dulcitol	
H9		依诺肝素 Enoxaparin	
H10		肝素 Heparin	
H11		肝素钠 Liquemin	
H12		那屈肝素 Nadroparin	
H13		槲子苷 Gardenoside	
H14		Gardnerilin A	
H15		京尼平龙胆双糖苷 Genipingentiobioside	
H16		京尼平尼酸 Genipinic acid	
H17		京尼平苷 Geniposide	
H18		<i>L</i> -半乳庚酮糖 <i>L</i> -Galactoheptulose	
H19		脂肪酶 Lipase	
H20		熊果酸 Ursolic acid	
H21		13-二十二碳烯酸甲酯 13-Docosenoic acid methyl ester	
H22		13-十八碳烯酸甲酯 13-Octadecenoic acid methyl ester	

续表 1 (Continued Tab. 1)

药物 Herb	标记 Mark	候选成分 Candidate component
水蛭 Hirudo	H23	腺苷 Adenosine
	H24	琥珀酸 Butanedioic acid
	H25	芸苔甾醇 Campesterol
	H26	胆固醇 Cholesterol
	H27	都桵子苷酸 Geniposidic acid
	H28	丙三醇 Glycerol
	H29	甘氨酸 Glycine
	H30	己酰胺 Hexanamide
	H31	次黄嘌呤 Hypoxanthine
	H32	次黄嘌呤核苷 Inosine
	H33	<i>L</i> -丙氨酸 <i>L</i> -Alanin
	H34	<i>L</i> -精氨酸 <i>L</i> -Arginine
	H35	<i>L</i> -天冬氨酸 <i>L</i> -Aspartic acid
	H36	<i>L</i> -谷氨酸 <i>L</i> -Glutamic acid
	H37	<i>L</i> -组氨酸 <i>L</i> -Histidine
	H38	<i>L</i> -异亮氨酸 <i>L</i> -Isoleucine
	H39	<i>L</i> -亮氨酸 <i>L</i> -Leucine
	H40	<i>L</i> -赖氨酸 <i>L</i> -Lysine
	H41	<i>L</i> -甲硫氨酸 <i>L</i> -Methionine
	H42	<i>L</i> -丝氨酸 <i>L</i> -Serine
	H43	<i>L</i> -苏氨酸 <i>L</i> -Threonine
	H44	<i>L</i> -色氨酸 <i>L</i> -Tryptophan
	H45	<i>L</i> -酪氨酸 <i>L</i> -Tyrosine
	H46	4-甲基十四烷酸甲酯 Methyl 4-methyltetradecanoate
	H47	12-甲基十四烷酸甲酯 Methyl 12-methyltetradecanoate
	H48	14-甲基十六烷酸甲酯 Methyl 14-methylhexadecanoate
	H49	14-甲基十五烷酸甲酯 Methyl 14-methylpentadecanoate
	H50	十七烷酸甲酯 Methyl heptadecanoate
	H51	烟酸 Nicotinic acid
	H52	棕榈酸 Palmitic acid
	H53	苯丙氨酸 Phenylalanine
	H54	脯氨酸 Proline
	H55	牛磺酸 Taurine
	H56	尿嘧啶 Uracil
	H57	尿核苷 Uridine
	H58	缬氨酸 Valine
H59	黄嘌呤 Xanthine	

### 3.2 BPH 相关靶点

通过检索 GeneCards、OMIM、TTD、DisGeNET 以及 DRUGBANK 五大疾病数据库中 BPH 的相关靶点,合并、删除重复值后,共获取到 BPH 的疾病靶点 3 026 个。

### 3.3 MGFP 药物-候选成分-靶点网络图

将 MGFP 所含 8 味中药、133 种候选成分以及靶点信息导入 Cytoscape 3.7.1 进行可视化分析,药物-候选成分-靶点网络图由 448 个节点和 1 825 条边组成(见图 1)。结果显示,degree 值较高的成分是 F1(槲皮素)、A1( $\beta$ -谷甾醇)、D1(豆甾醇)、MDP2(山奈酚)和 E1(常春藤皂苷元),表明其可能是 MGFP 治疗 BPH 的主要成分,而 degree 值较高的靶点是 PTGS2、CA2、NCOA2、PTGS1、PGR、BMP2、MAOB、GABRA1、PIM1、CDK2,表明 MGFP 治疗 BPH 将通过调控多个靶点来发挥作用。

### 3.4 MGFP 成分-BPH 靶点 PPI 网络构建

将筛选后的 317 个 MGFP 成分靶点与 3 026 个 BPH 疾病靶点取交集,并通过 Draw Venn Diagram

网站绘制韦恩图,最终得到交集靶点 212 个(见图 2)。将交集靶点导入 STRING 11.0 平台,设置置信度为 medium confidence 0.400,获取 PPI 网络图的 TSV 文件,输入 Cytoscape 3.7.1,并利用 Bisogenet 3.0.0 插件在线检索蛋白质相互作用数据库,构建成成分疾病的交集靶点 PPI 网络(见图 3)。网络 A 由 211 个节点、4 272 条边组成,说明交集靶点基因之间存在复杂的相互作用关系,网络 B、C 分别通过度中心性(degree centrality, DC)  $\geq 32$ 、 $DC \geq 59$  筛选核心网络,最终的核心网络 C 由 54 个节点、1 233 条边组成。根据 degree 值降序排列,54 个核心靶点分别为 AKT1、ALB、TP53、IL6、VEGFA、TNF、EGFR、EGF、JUN、MMP9、MYC、CASP3、MAPK1、SRC、MAPK8、ESR1、PTGS2、CXCL8、CCND1、PTEN、FOS、IL1B、HSP90AA1、MMP2、CCL2、IL10、ERBB2、MAPK14、CAT、ANXA5、NOS3、AR、SERPINE1、BCL2L1、ICAM1、PPARG、CYCS、SPP1、RELA、IL2、CASP8、STAT1、HMOX1、VCAM1、TGFB1、KDR、CDKN1A、PLG、HIF1A、CAV1、IFNG、MMP1、MPO、CASP9。

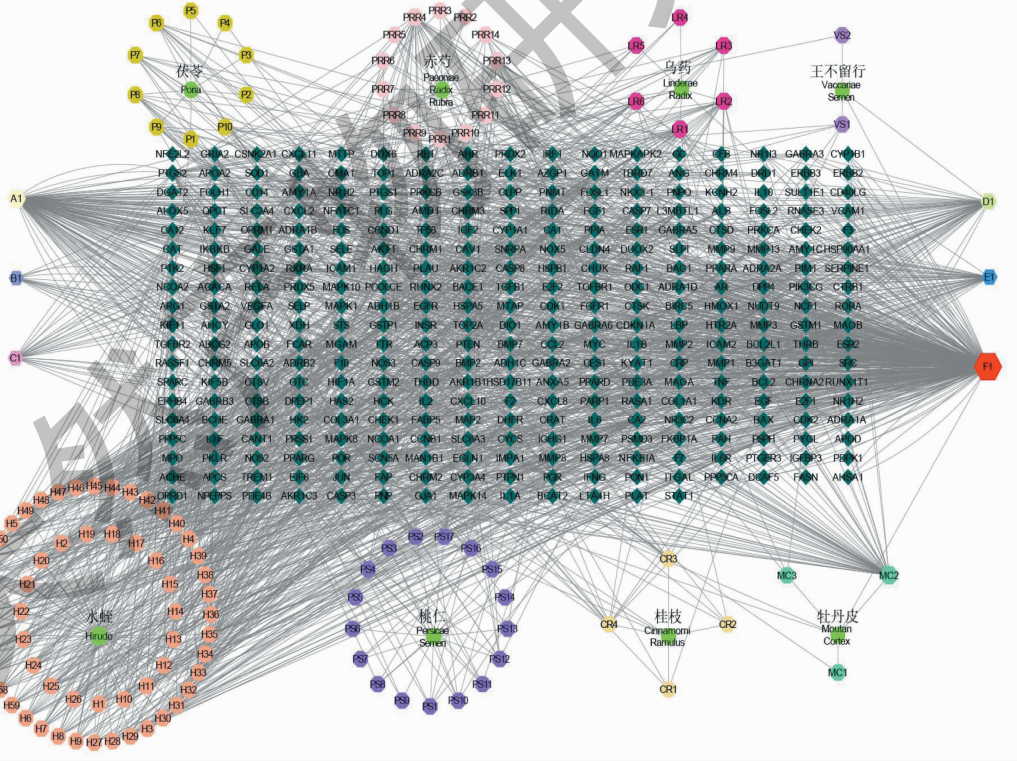


图 1 MGFP 药物-候选成分-靶点网络图

Fig. 1 Network diagram of MGFP herbs-candidate components-targets

注:圆形节点代表中药;六边形节点代表候选成分;菱形节点代表靶点。Note: Circular node represents the herb; Hexagonal node represents candidate component; Rhombic node represents target.





图2 MGFP成分靶点与BPH疾病靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of the intersection targets of MGFP component and BPH disease

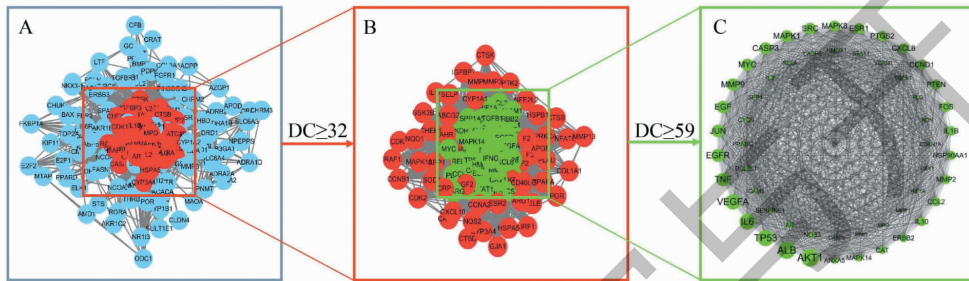


图3 MGFP-BPH核心靶点的筛选图

Fig. 3 Screening diagram of MGFP-BPH core targets

注:A有211个节点和4 272条边;B有106个节点和2 825条边;C有54个节点和1 233条边。Note:A contains 211 nodes and 4 272 edges; B contains 106 nodes and 2 825 edges; C contains 54 nodes and 1 233 edges.

### 3.5 GO功能注释和KEGG通路富集分析

将212个交集靶点导入Metascape数据库,依次选择GO-CC、GO-BP、GO-MF进行GO功能富集分析,设置 $P < 0.01$ ,  $\text{count} \geq 3$ ,最终分别得到100、2 489、186条信息。筛选 $P$ 排名最小的前20条GO生物功能信息,将相关数据导入微生信网站(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制GO生物功能气泡图(见图4)。图中气泡颜色越红越亮表示靶点的 $P$ 越小,即富集越显著,气泡面积越大表示靶点数越多。结果显示,MGFP主要参与的生物学进程显著性富集于血管生长相关过程、氧化应激相关过程、凋亡相关过程、凝血相关过程及免疫相关过程,见图4B。其中血管生长相关过程包括脉管系统发育进程(vasculature development)、心血管系统发育进程(cardiovascular system development)、血管发育进程(blood vessel development)、血管形态发生(blood vessel morphogenesis);氧化应激相关过程包括对无机物的应答(response to inorganic substance)、活性氧代谢进程(reactive oxygen species metabolic process)、对活性氧的应答(response to reactive oxygen species)、细胞氧化应激应答(cellular response to oxidative stress)。另外,在GO-BP的富集过程中,利

用MCODE算法挖掘出三个核心子模块,具体富集分析结果见表2。

相关靶点调控BPH的功能则主要富集于转录因子结合(transcription factor binding)、核受体活性(nuclear receptor activity)、蛋白激酶活性(protein kinase activity)、细胞因子受体结合(cytokine receptor binding)、肾上腺素能受体活性(adrenergic receptor activity)、RNA聚合酶II转录因子结合(RNA polymerase II transcription factor binding)等(见图4C),由此可见,多个靶点的功能与BPH的发生机制密不可分<sup>[7]</sup>。

将212个交集靶点导入KOBAS 3.0数据库,选择KEGG进行富集分析,得到254条通路,其中 $P > 0.001$ 的通路有172条。运用KOBAS 3.0数据库进行可视化分析,绘制出KEGG信号通路水平柱状图(见图5)。图5A每个节点表示一个富集项,每条边表示两个富集项之间的连接,图中显示出两个富集项的基因重叠比率大于特定界限值(默认值 $> 0.35$ )的8个cluster,不同颜色的cluster代表结构网络中特定拓扑社区的节点。图5B纵轴表示MGFP治疗BPH的相关KEGG通路,横轴表示富集率,计算方式为“输入靶点数/背景靶点数”,图5B条状图

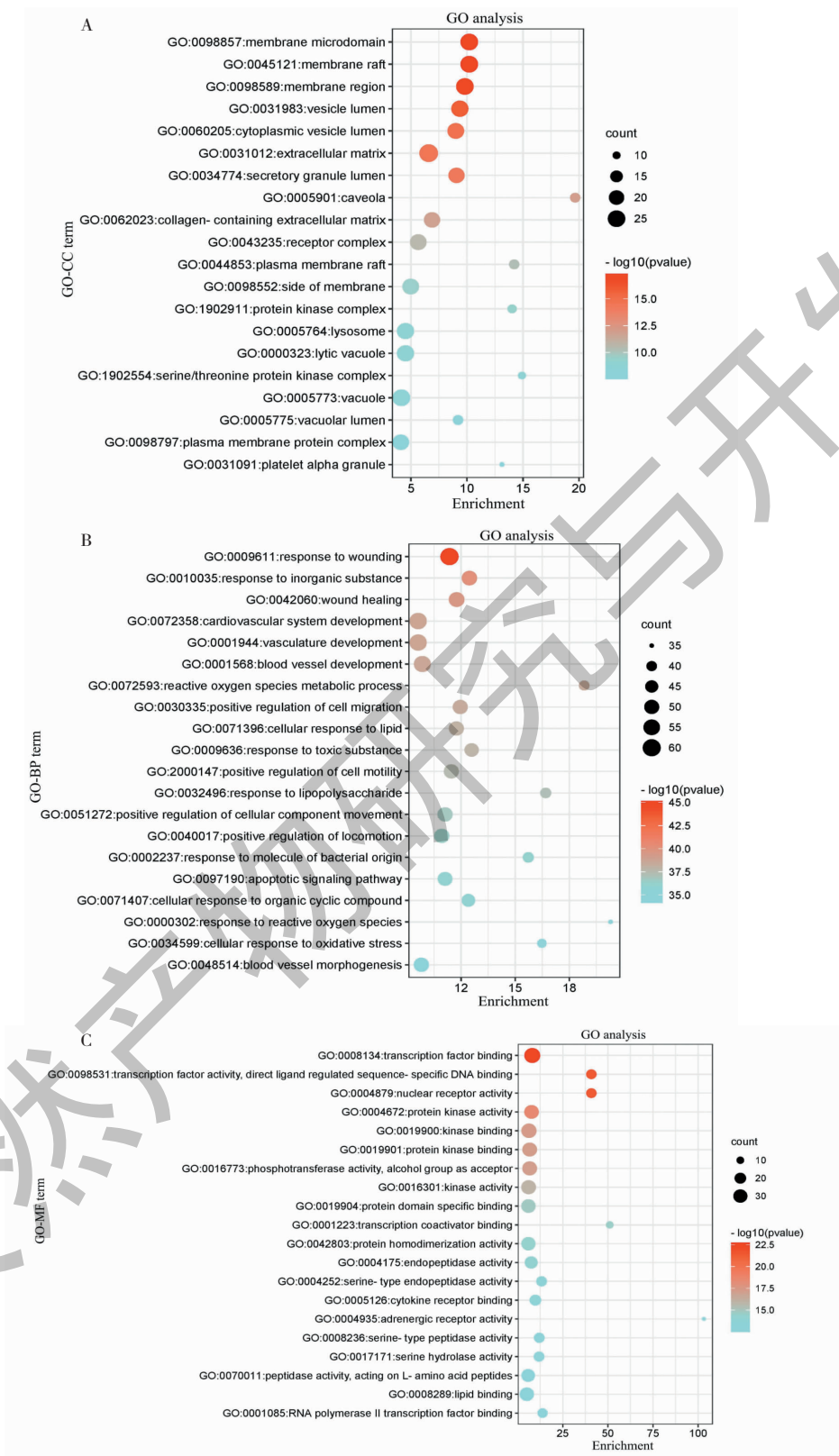


图4 GO功能注释富集分析

Fig. 4 GO function annotation enrichment analysis

注:A:细胞组成分析;B:生物过程分析;C:分子功能分析。Note:A:Cellular component analysis;B:Biological process analysis;C:Molecular function analysis.

表 2 子模块 GO-BP 富集分析基本信息 (Top3)

Table 2 Basic information of GO-BP enrichment analysis of sub-module (Top3)

功能模块 MCODE	GO 条目 GO item	功能描述 Functional description	Log10(P)
MCODE_1	GO:0010035	对无机物的反应 Response to inorganic substance	-16.6
	GO:0018105	肽基-丝氨酸磷酸化 Peptidyl-serine phosphorylation	-16.2
	GO:0097190	凋亡信号通路 Apoptotic signaling pathway	-16.1
MCODE_2	GO:0048514	血管形态发生 Blood vessel morphogenesis	-16.2
	GO:0001568	血管发育 Blood vessel development	-15.5
	GO:0001944	脉管系统发育 Vasculature development	-15.3
MCODE_3	GO:0007050	细胞周期阻滞 Cell cycle arrest	-11.7
	GO:2000134	负调控有丝分裂细胞周期的 G1/S 期转换 Negative regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle	-11.3
	GO:1902807	细胞周期 G1/S 相变的负调控 Negative regulation of cell cycle G1/S phase transition	-11.2

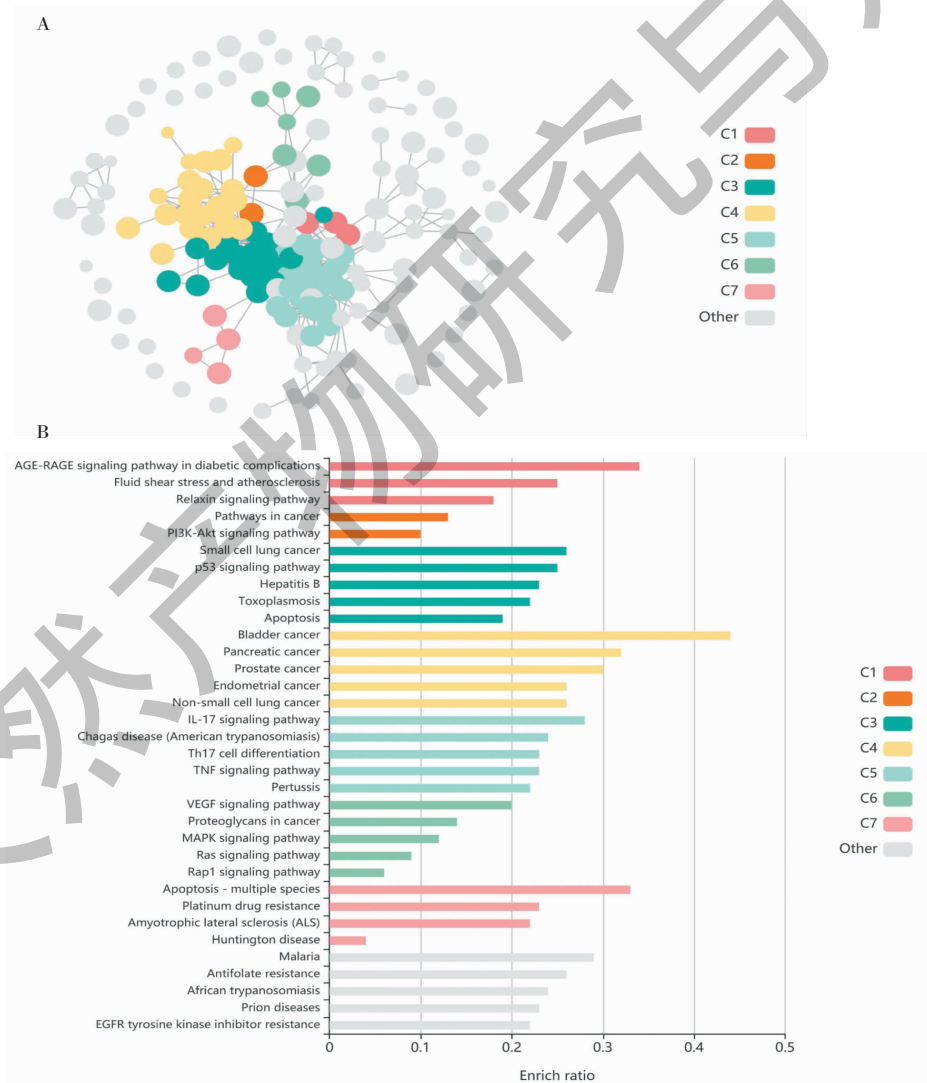


图 5 KEGG 信号通路富集分析

Fig. 5 KEGG signaling pathway enrichment analysis

注:A:KEGG 信号通路模块富集网络图;B:KEGG 通路分析水平柱状图。Note:A:Module enrichment network diagram of KEGG signaling pathway;B:Histogram of KEGG pathway enrichment analysis.

的颜色与图 5A 的 8 个 cluster 对应,条形长度越长代表富集率越高,每个 cluster 显示富集率最高的 5 条 KEGG 通路。KEGG 分析结果表明,MGFP 可能通过糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、PI3K-AKT 信号通路 (PI3K-AKT signaling pathway)、细胞凋亡 (apoptosis/apoptosis-multiple species)、IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、Th17 细胞分

化 (Th17 cell differentiation)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、VEGF 信号通路 (VEGF signaling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、Ras 信号通路 (Ras signaling pathway)、Rap1 信号通路 (Rap1 signaling pathway) 等信号通路在治疗 BPH 中发挥作用,交集靶点在 PI3K-AKT 信号通路中的情况见图 6<sup>[8]</sup>。

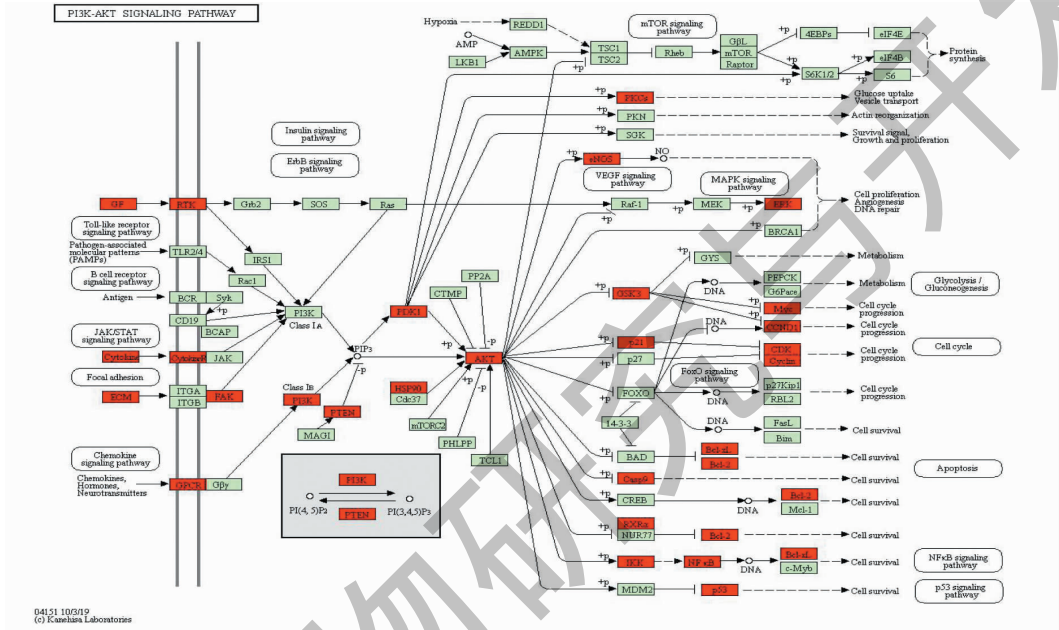


图 6 MGFP-BPH 的交集靶点在 PI3K-AKT 信号通路中的情况

Fig. 6 The intersection targets of MGFP-BPH in PI3K-AKT signaling pathway

注:红色矩形代表 MGFP-BPH 的交集靶点;绿色矩形代表通路中的基础靶点。Note: Red rectangle represents the intersection targets of MGFP-BPH; Green rectangle represents the basic targets in the pathway.

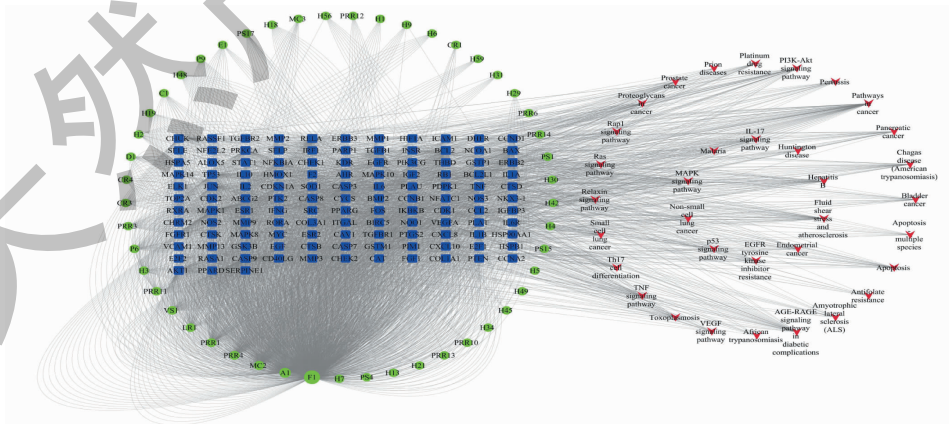


图 7 MGFP 治疗 BPH 的“成分-靶点-通路”网络图

Fig. 7 Network diagram of “component-target-pathway” of MGFP in the treatment of BPH

注:蓝色方形代表靶点;绿色圆形代表主要候选成分;红色 V 形代表通路。Note: Blue square represents the target; Green circle represents the main candidate component; Red V-shape represents the pathway.

此外,利用 KOBAS 3.0 分析结果中的核心通路反向匹配出相应靶点和成分,并将相关信息导入 Cytoscape 3.7.1 构建“成分-靶点-通路”网络图(见图 7)。结果显示,槲皮素、 $\beta$ -谷甾醇、山奈酚、黄芩素、鞣花酸五种化合物及 MAPK1、CASP3、RELA、CASP9、AKT1、BAX、BCL2、PRKCA、TP53、JUN、TGFB1、CASP8、TNF、IL6、VEGFA、EGFR、MAPK8、CHUK、MAPK14、CDKN1A 20 个靶点的 degree 值处于较高水平,参照文献发现 AKT1、BAX、BCL2、JUN、TGFB1、TNF、IL6、VEGFA、EGFR 是与 BPH 发病机制密切相关的靶点,该结果也与“3.4”中 PPI 网络中筛选出的核心靶点相符,故选取上述 5 种核心成分、9 个关键靶点用于后续分子对接。

### 3.6 MGFP 核心成分与关键靶点分子对接

下载 MGFP 核心成分槲皮素(MOL000098)、 $\beta$ -谷甾醇(MOL000358)、山奈酚(MOL000422)、黄芩素(MOL002714)、鞣花酸(MOL001002)与关键靶点

蛋白 AKT1(PDBID:4EJN)、BAX(PDBID:3WZE)、BCL2(PDBID:51F4)、JUN(PDBID:3OY1)、TGFB1(PDBID:5VQP)、TNF(PDBID:2AZ5)、IL6(PDBID:1ALU)、VEGFA(PDBID:5HHC)、EGFR(PDBID:5CAS)的相关文件,使用 AutoDock 4.2.6 软件进行分子对接,结果见表 3。以结合能为参考指标,活性分子与靶点蛋白的最低结合能  $< 0$ ,说明配体与受体均可自发结合,而结合能越小,二者间的结合能力越强。本研究选取结合能  $\leq -20\ 929\ \text{J/mol}$  作为筛选依据,其中 AKT1、BAX、JUN、TNF、VEGFA 靶点与 5 种核心成分对接结果良好,表明相互间结合能力较优,潜在生物活性高。

以对接结果最好的 BAX 与  $\beta$ -谷甾醇为例,两者间结合能为  $-37\ 966\ \text{J/mol}$ ,受体蛋白 BAX 与  $\beta$ -谷甾醇配体小分子之间的结合模式见图 8。其中氨基酸残基 GLU-815 与  $\beta$ -谷甾醇配体小分子形成氢键相互作用,氢键长度为  $0.19\ \text{nm}$ 。

表 3 MGFP 核心成分与关键靶点的分子对接结合能

Table 3 Molecular docking binding energy of the core components of MGFP to key targets (J/mol)

成分 Component	靶点 Target								
	AKT1	BAX	BCL2	JUN	TGFB1	TNF	IL6	VEGFA	EGFR
槲皮素 Quercetin	-28 548	-23 859	-21 557	-22 311	-22 813	-24 069	-23 566	-23 985	-19 841
$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol	-33 194	-37 966	-27 794	-29 427	-27 459	-37 715	-29 510	-28 924	-32 817
山奈酚 Kaempferol	-22 855	-25 031	-19 715	-24 236	-19 590	-29 259	-23 734	-27 710	-22 143
黄芩素 Baicalein	-27 752	-30 054	-23 566	-26 413	-22 771	-27 878	-29 175	-25 827	-26 706
鞣花酸 Ellagic acid	-35 915	-26 203	-20 887	-24 613	-20 594	-25 952	-17 999	-24 864	-24 152

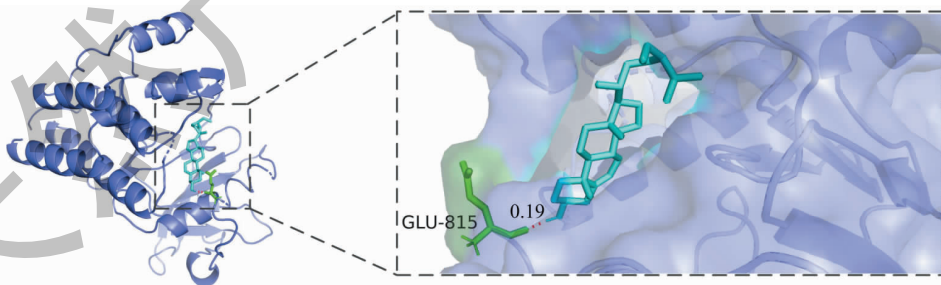


图 8 BAX 和  $\beta$ -谷甾醇的分子对接示意图

Fig. 8 Molecular docking diagram of BAX and  $\beta$ -sitosterol

### 3.7 MGFP 对 BPH 模型大鼠前列腺组织中 BAX 蛋白表达的影响

图 9 所示为各组大鼠前列腺组织中 BAX 免疫组化结果,观察切片,空白组和假手术组大鼠的前列腺腺体排列规整,上皮细胞排列紧密,腺腔规则平

整,腔内基本无炎性细胞浸润。模型组大鼠前列腺腺体向腔内呈乳头状凸起,腺腔显著缩小,腺上皮细胞排列紊乱,呈复层或假复层柱状增生,腔内可见少量炎性细胞,腔外部分平滑肌组织被破坏,排列不紧密,提示造模成功。其余各给药组与模型组相比,前

列腺壁厚均有不同程度的减轻。

免疫组化半定量结果见表4。连续给药28天后,空白组大鼠前列腺组织中BAX的表达与假手术组相比无显著差异( $P > 0.05$ )。与假手术组相比,模型组大鼠前列腺组织中BAX的表达显著降低( $P$

$< 0.01$ )。与模型组相比,MGFP低、中、高剂量组、非那雄胺组以及癃闭舒胶囊组均可显著升高BAX的表达( $P < 0.01$ ),其中MGFP高剂量组及非那雄胺组效果更好。

表4 MGFP对BPH模型大鼠前列腺组织中BAX蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of MGFP on the expression of BAX protein in the prostate tissue of rats with BPH( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	BAX
空白组 Control	-	0.342 ± 0.049
假手术组 Sham operation	-	0.322 ± 0.033
模型组 Model	-	0.131 ± 0.015 $\Delta\Delta$
MGFP低剂量组 MGFP-L	6.57	0.183 ± 0.019 **
MGFP中剂量组 MGFP-M	13.14	0.226 ± 0.010 **
MGFP高剂量组 MGFP-H	26.28	0.252 ± 0.020 **
非那雄胺组 Finasteride	0.71	0.275 ± 0.032 **
癃闭舒胶囊组 Longbishi	0.257	0.269 ± 0.018 **

注:与假手术组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与模型组相比,\*\* $P < 0.01$ 。

Note:Compared with sham operation,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ;Compared with model, \*\* $P < 0.01$ .

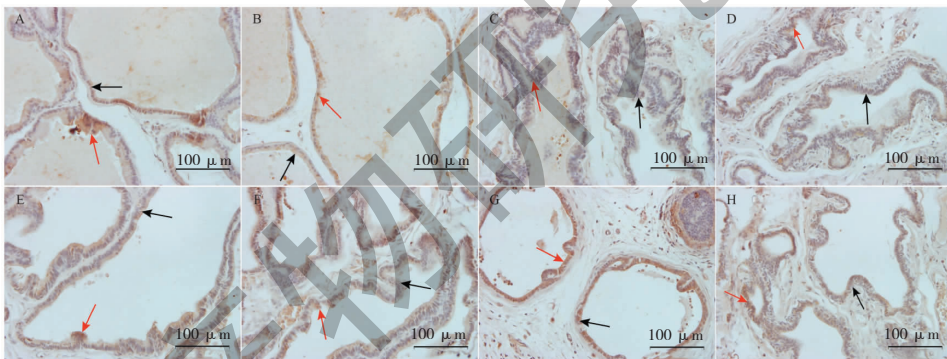


图9 各组大鼠前列腺组织中BAX蛋白表达情况( $\times 200$ )

Fig. 9 Expression of BAX protein in prostate tissue of rats in each group ( $\times 200$ )

注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:MGFP低剂量组;E:MGFP中剂量组;F:MGFP高剂量组;G:非那雄胺组;H:癃闭舒胶囊组。红色箭头表示免疫组化阳性表达区域;黑色箭头表示前列腺组织壁厚。Note:A:Control group;B:Sham operation group;C:Model group;D:MGFP-L group;E:MGFP-M group;F:MGFP-H group;G:Finasteride group;H:Longbishi group. Red arrow indicates immunohistochemical positive expression area;Black arrow indicates the wall thickness of prostate tissue.

#### 4 讨论与结论

据报道,BPH的发病机制主要与性激素、生长因子、炎症反应、细胞凋亡异常等有关<sup>[9]</sup>,其主要病理特征表现为前列腺上皮细胞和基质细胞的增殖。MGFP此方寒温并用,有活血消癥、软坚利水之效,能够明显改善“肾气亏虚、瘀血阻滞”所致的BPH。现代药理研究表明,桂枝茯苓丸的成分主要包括丹皮酚、芍药苷、桂皮醛、茯苓素及苦杏仁苷等,其通过改善血液流变学参数可以降低血液黏稠度,一般用于治疗瘀血(浊)蕴结所致的BPH<sup>[10]</sup>等疾病。另外

还发现,王不留行既能延长血瘀证模型大鼠的凝血时间,又能降低大鼠全血黏度<sup>[11]</sup>;水蛭所含水蛭素具有抗血凝、抗血栓的作用<sup>[12]</sup>;而乌药的主要成分挥发油又能上宣肺气,下输膀胱以缓解泌尿系统结石潴留,从而通利小便<sup>[13]</sup>。由此可见,MGFP中的化学成分可以通过一定途径达到治疗BPH的目的,体现了中药复方多成分、多靶点、多通路的作用机制。

本研究通过韦恩图得到交集靶点212个,再根据KOBAS分析结果中的核心通路反向匹配出MG-

FP 治疗 BPH 的核心靶点,结合 degree 值排名、文献,得到与 BPH 发病机制联系密切的核心靶点,包括 AKT1、BAX、BCL2、JUN、TGFB1、TNF、IL6、VEGFA、EGFR。上述靶点主要与细胞凋亡、血管生长以及炎症有关。据报道,AKT 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在 AKT 亚型中,AKT1 可抑制凋亡和促进细胞生长、存活,参与 BPH 的发展<sup>[14]</sup>。VEGFA 是具有高度特异性的血管内皮细胞有丝分裂素,与前列腺新生血管的形成和维持密切相关,活化的 AKT 磷酸化 eNOS 以产生 NO,促进 VEGFA 诱导的内皮细胞迁移、血管舒张、血流量增加和血管生成<sup>[15]</sup>。IL-6 是一种功能广泛的多效性细胞因子,在前列腺组织中,IL-6 经自分泌途径促进前列腺基底上皮细胞的增殖,造成机体内前列腺细胞增殖和凋亡失衡,从而诱导 BPH 的发生<sup>[16]</sup>。

本研究通过 GO 功能注释分析发现,MGFP 参与的生物学进程主要富集在血管生长相关过程、氧化应激相关过程、凋亡相关过程、凝血相关过程及免疫相关过程等,其调控 BPH 的分子功能主要富集在转录因子结合、核受体活性、蛋白激酶活性、细胞因子受体结合、肾上腺素能受体活性、RNA 聚合酶 II 转录因子结合等。

本研究通过 KEGG 通路富集分析发现,MGFP 对 AGE-RAGE 信号通路、PI3K-AKT 信号通路、细胞凋亡、IL-17 信号通路、Th17 细胞分化、TNF 信号通路、VEGF 信号通路、MAPK 信号通路、Ras 信号通路、Rap1 信号通路等有调控作用。研究表明,AGE-RAGE 可以刺激促炎因子的产生,从而使细胞过度增殖,导致 BPH 进一步发展<sup>[17]</sup>。PI3K-AKT 信号通路的激活会导致促凋亡蛋白磷酸化,进而阻断其与抗凋亡分子 BCL-2、BCL-XL 的结合,使 BPH 中细胞凋亡减少<sup>[18]</sup>。IL-17 信号通路、Th17 细胞分化和 TNF 信号通路均可介导免疫炎症反应,报道称,感染刺激引起 BPH 基质细胞产生促炎因子 IL-6、IL-8 和 TNF,从而激活浸润性 CD4<sup>+</sup> T 细胞,并通过分泌 IL-12、IL-23 促进其在 Th1、Th17 效应细胞中的分化;而活化的 Th1、Th17 淋巴细胞则会产生促炎细胞因子,如 IL-17,促进免疫炎症反应,导致前列腺细胞增生<sup>[19]</sup>。VEGF 是一种由 PI3K-AKT 信号通路介导的血管生成因子,可促进间质组织中的血管生成和细胞增殖,在 BPH 发展中也起关键作用<sup>[20]</sup>,再结合核心靶点的结果和图 6 所示,我们推测 PI3K-AKT 信号通路和 VEGF 信号通路间有密切关联。MAPK、Ras 信号通路参与调控细胞的基本生物学活动,包括增殖、凋亡、分化和衰老,MAPK 级联反应具有

Ras 依赖性,其异常激活会造成机体细胞增殖/凋亡失衡<sup>[21]</sup>。另外,还发现 Rap1 信号通路的激活会促进细胞增殖和迁移,进而使前列腺体积增大<sup>[22]</sup>。由此推测,MGFP 可能通过调节多条信号通路来影响炎症反应、细胞凋亡和增殖,起到治疗 BPH 的目的。

本研究通过分子对接发现,MGFP 的核心成分槲皮素、 $\beta$ -谷甾醇、山奈酚、黄芩素、鞣花酸与 AKT1、BAX、BCL2、JUN、TGFB1、TNF、IL6、VEGFA、EGFR 的结合能均小于 0,说明相互间可以自发结合,而槲皮素、 $\beta$ -谷甾醇、山奈酚、黄芩素、鞣花酸与 AKT1、BAX、JUN、TNF、VEGFA 的结合能均小于 -20.929 J/mol,具有较强的结合能力,以 BAX 与  $\beta$ -谷甾醇的对接结果最优。研究表明, $\beta$ -谷甾醇是一种植物甾醇,会干扰多种细胞信号通路,对细胞周期、细胞凋亡、增殖、血管生成等过程造成影响,临床常用于心脏病、肺结核、宫颈癌等疾病<sup>[23]</sup>。在细胞凋亡过程中,促凋亡的 BAX 易位到线粒体并与线粒体外膜整合,诱导线粒体外膜通透化释放出细胞色素 c,使细胞正常死亡<sup>[24]</sup>。Sharmila 等<sup>[25]</sup>建立二乙基亚硝胺诱导的大鼠肾癌模型,结果发现, $\beta$ -谷甾醇治疗组大鼠 BAX 蛋白表达显著增加。另外,一项多中心、安慰剂对照、双盲的研究显示  $\beta$ -谷甾醇对 BPH 也有明显改善作用,但其作用机制尚不明确<sup>[26]</sup>。

本研究通过建立 BPH 大鼠模型探讨前列腺组织中 BAX 的表达情况,结果表明,与假手术组相比,模型组大鼠腺上皮细胞增生,腺腔显著缩小,而其余各治疗组与模型组相比,前列腺壁厚均有不同程度的减轻,提示 MGFP 对 BPH 模型大鼠有一定治疗效果。免疫组化半定量结果显示,空白组与假手术组大鼠前列腺组织中 BAX 的表达无显著差异;与假手术组相比,模型组大鼠前列腺组织中 BAX 的表达显著降低( $P < 0.01$ ),表明 BPH 可能通过抑制前列腺组织中 BAX 表达,造成细胞凋亡异常。与模型组相比,MGFP 低、中、高剂量组、非那雄胺组以及癸闭舒胶囊组均可显著升高 BAX 的表达( $P < 0.01$ ),可能是 MGFP 调节线粒体依赖性凋亡通路,使与促进细胞凋亡相关的基因 BAX 表达升高,抑制细胞增殖,且作用效果呈剂量依赖性。

综上所述,MGFP 可能通过槲皮素、 $\beta$ -谷甾醇、山奈酚、黄芩素、鞣花酸等核心成分调节 AKT1、BAX、JUN、TNF、VEGFA 等靶点以及 PI3K-AKT 信号通路、VEGF 信号通路等进而调控机体前列腺血管生长、凋亡、氧化应激等相关生物学过程,发挥治疗 BPH 的作用。分子对接初步预测到核心成分与关键靶点的最优结合模式为  $\beta$ -谷甾醇-BAX,并通过动

物实验探究了 MGFP 对 BAX 的作用,为 MGFP 的广泛应用提供药效学基础。鉴于数据库对化学成分收录不足的局限性且中药炮制后成分发生的变化,后续可通过指纹图谱技术对 MGFP 的化学成分进行深入研究,有助于提高网络药理学预测结果的可靠性。

### 参考文献

- Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380: 2163-2196.
- Liu D, Tang YB, Bai X, et al. Master of traditional Chinese medicine academician WANG Qi's prescription excavation for clinical treatment of prostatic hyperplasia and exploration of medicine ideas [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med (天津中医药)*, 2021, 38: 1108-1115.
- Dong H, Ren JX, Wang JJ, et al. Chinese medicinal leech: ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological activities [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2016, 2016: 7895935.
- Jing WG, Fu J, Liu YM, et al. Chemical constituents of hiru-do [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2014, 20(19): 120-123.
- Bu D, Luo H, Huo P, et al. KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1): W317-W325.
- Rauf MA, Zubair S, Azhar A. Ligand docking and binding site analysis with pymol and autodock/vina [J]. *Int J Appl Basic Med*, 2015, 4(2): 168-177.
- Liu D, Bai X, Liu GM, et al. Research progress on pathogenesis benign prostatic hyperplasia [J]. *J Pract Clin Med (实用临床医药杂志)*, 2021, 25(5): 112-117.
- Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D457-D462.
- Wang K, Wu Q, Geng R, et al. Study on anti-prostatic hyperplasia activity and mechanism of *Carpesium cernuum* [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2019, 31: 517-522.
- Dai XH. Treatment of benign prostatic hyperplasia with Guizhi Fuling pill [J]. *Chin J Clin (中国临床医生杂志)*, 2014, 42(3): 80-82.
- Yu P, Bai J, Liu J, et al. Study on the effect of salvia miltiorrhiza-vaccaria seed on promoting blood circulation and removing blood stasis [J]. *Changchun Univ Tradit Chin Med (长春中医药大学学报)*, 2012, 28: 965-966.
- Liu X, Gao MF, Kong Y. Research progress on the chemical constituents and pharmacological action of leeches [J]. *Pharm Biotech (药物生物技术)*, 2017, 24(1): 76-80.
- Xiong XM. Treatment of urinary calculi with radix linderae [J]. *J Tradit Chin Med (中医杂志)*, 1997(3): 135.
- Torrealba N, Vera R, Fraile B, et al. TGF- $\beta$ /PI3K/AKT/mTOR/NF- $\kappa$ B pathway. Clinicopathological features in prostate cancer [J]. *Aging Male*, 2020, 23: 801-811.
- Rudko AS, Efendieva MK, Budzinskaya MV, et al. Influence of vascular endothelial growth factor on angiogenesis and neurogenesis [J]. *Vestn Oftalmol*, 2017, 133(3): 75-81.
- Luo G, Wang YB. Research progress on the role of inflammatory cytokines in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia [J]. *J Cont Urol Rep Oncol (现代泌尿生殖肿瘤杂志)*, 2012, 4(3): 182-184.
- Krušlin B, Tomas D, Džombeta T, et al. Inflammation in prostatic hyperplasia and carcinoma-basic scientific approach [J]. *Front Oncol*, 2017, 7: 77.
- Sreenivasulu K, Nandeesh H, Dorairajan LN, et al. Over expression of PI3K-Akt reduces apoptosis and increases prostate size in benign prostatic hyperplasia [J]. *Aging Male*, 2018, 23: 440-446.
- Yang M, Xu Z, Zhuang Z. Macrophages affect immune inflammation and proliferation in benign prostatic hyperplasia via androgen receptor and CD40/CD40L signaling pathway [J]. *Tissue Cell*, 2020, 64: 101343.
- Grivas N, Goussia A, Stefanou D, et al. Microvascular density and immunohistochemical expression of VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 in benign prostatic hyperplasia, high-grade prostate intraepithelial neoplasia and prostate cancer [J]. *Cent European J Urol*, 2016, 69(1): 63-71.
- Morales CR, Badran H. Prosaposin ablation inactivates the MAPK and Akt signaling pathways and interferes with the development of the prostate gland [J]. *Asian J Androl*, 2003, 5(1): 57-64.
- Weng YF, Yang ZB. The research progress of biological functions and regulation of Rap1 [J]. *Biol Chem Eng (生物化工)*, 2018, 4(5): 147-149.
- Bin Sayeed MS, Ameen SS. Beta-sitosterol: a promising but orphan nutraceutical to fight against cancer [J]. *Nutr Cancer*, 2015, 67(8): 1216-1222.
- Zheng H, Xu W, Lin J, et al. Qianliening capsule treats benign prostatic hyperplasia via induction of prostatic cell apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7: 848-854.
- Sharmila R, Sindhu G. Modulation of angiogenesis, proliferative response and apoptosis by  $\beta$ -sitosterol in rat model of renal carcinogenesis [J]. *Indian J Clin Biochem*, 2017, 32(2): 142-152.
- Pagano E, Laudato M, Griffo M, et al. Phytotherapy of benign prostatic hyperplasia. a minireview [J]. *Phytother Res*, 2014, 28: 949-955.