

基于网络药理学探究二至丸抑制良性前列腺增生的分子机制

陶蕊¹, 樊官伟^{1,2}, 毛浩萍¹, 王小莹¹, 苗琳^{1*}, 高秀梅¹

(1. 天津中医药大学 中医药研究院, 天津市现代中药重点实验室, 天津市中药药理学
重点实验室, 天津 300193; 2. 天津中医药大学 第一附属医院, 天津 300193)

[摘要] **目的:**基于网络药理学预测二至丸治疗良性前列腺增生的作用靶点,探讨其多成分-多靶点-多通路的作用机制,对其治疗良性前列腺增生的分子机制进行科学阐释。**方法:**采用网络药理学软件生物反应路径分析(IPA)构建“化合物-靶点-疾病”的网络;对二至丸作用靶点构建蛋白互作网络(PPI),进行基因富集分析(GO)功能注释和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,预测二至丸治疗前列腺增生的作用机制。**结果:**二至丸总共有 19 个化合物在 IPA 中,并且芹菜素(Apigenin),木犀草素(Luteolin),熊果酸(Oleanolic acid)和槲皮苷(Quercitrin)4 个化合物是女贞子和墨旱莲共有化合物,是二至丸的主要物质基础;毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M3(CHRM3),毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M2(CHRM2),尿激酶型纤溶酶原激活物受体(PLAUR),激肽释放酶 3(KLK3),钙黏蛋白 1(CDH1),趋化因子 3(CCL3)和金属蛋白酶 1(MMP1)等二至丸治疗前列腺增生的关键靶点;PPI 网络靶点蛋白有 20 条 GO 功能富集和 5 条主要的 KEGG 通路富集,并对相关靶点进行 Docking 验证。**结论:**二至丸通过激活 MMP1 和抑制 KLK3 以及 CCL3 蛋白表达,诱导细胞凋亡和抑制细胞增殖,干预丝裂原活化蛋白激酶/胞外信号调节激酶(MAPK/ERK),核转录因子- κ B(NF- κ B)等信号通路发挥抑制前列腺增生的作用。

[关键词] 网络药理学; 二至丸; 女贞子; 墨旱莲; 良性前列腺增生

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)05-0208-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190508

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181119.0946.007.html>

[网络出版时间] 2018-11-21 10:04

Molecular Mechanism of Erzhiwan in Inhibiting Benign Prostatic Hyperplasia Base on Network Pharmacology

TAO Rui¹, FAN Guan-wei^{1,2}, MAO Hao-ping¹, WANG Xiao-ying¹, MIAO Lin^{1*}, GAO Xiu-mei¹

(1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin Key Laboratory of TCM Pharmacology, Tianjin 300193, China;*

2. *The First Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)*

[Abstract] **Objective:** To explain the “multi-components, multi-targets, multi-pathways” mechanism of Erzhiwan in treating benign prostatic hyperplasia (BPH) based the network pharmacology. **Method:** Ingenuity pathway analysis (IPA) was used to construct components-targets-diseases network and PPI network, then the classified enrichment analysis of gene ontology (GO) and pathway enrichment analysis (KEGG) were carried out on the main function of its gene sets, so as to discuss the mechanism of Erzhiwan in the treatment of BPH. **Result:** Erzhiwan has 19 components in IPA; and apigenin, luteolin, oleanolic acid and quercitrin were common components of Ligustri Lucidi Fructus and Echiptae Herba and the main component of Erzhiwan. Muscarinic acetylcholine receptor M3 (CHRM3), muscarinic acetylcholine receptor M2 (CHRM2), urokinase plasminogen activator receptor (PLAUR), kinin releasing enzyme 3 (KLK3), cadherin 1 (CDH1), chemokines 3 (CCL3)

[收稿日期] 20180831(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81630106)

[第一作者] 陶蕊,在读博士,从事中药药理研究,E-mail:taorui2013tjutcm@126.com

[通信作者] *苗琳,博士,副研究员,从事中药药理研究,Tel: 022-59596171,E-mail: mmmlin7180@hotmail.com

and metalloproteinase-1 (MMP-1) were important targets for Erzhiwan to treat BPH. The target proteins in PPI network were enriched with 20 GO functions and 5 main KEGG pathways, and Docking was verified for relevant targets. **Conclusion:** Erzhiwan may play a role in treating BPH by activating MMP-1 and inhibiting KLK3 and CCL3 protein expressions, inducing apoptosis, inhibiting cell proliferation and intervening relevant pathways of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) and nuclear factor (NF) - κ B (NF- κ B).

[Key words] network pharmacology; Erzhiwan; Ligustri Lucidi Fructus; Echiptae Herba; benign prostatic hyperplasia

良性前列腺增生症 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 是老年男性常见的泌尿系统疾病, 症状包括尿频、尿急、排尿困难等。随着社会人口老龄化, BPH 已严重影响老年男性的生活质量^[1-3], 研究表明, 85 岁以上 BPH 患者中前列腺总体积增大高达 95%, 加强对良性前列腺增生的研究可改善老年男性的生活质量^[1,4], 中医将 BPH 归属于“癃闭”范畴, 其中肾阳虚衰作为 BPH 主要证型之一。

二至丸由女贞子和墨旱莲 2 味中药组成, 具有补益肝肾、滋阴止血、壮筋骨等功效, 对于肝肾阴虚所致的头晕目眩、耳鸣、咽干鼻燥、腰膝酸软、月经量多等症有较好的效果, 其药理作用主要包括提高免疫力、抗肿瘤、保肝等^[5-9], 二至丸能够补益肝肾, 但其治疗 BPH 很少有人研究, 且作用机制尚不清楚, 本文采用网络药理学方法对二至丸抑制 BPH 的分子机制进行预测, 探讨二至丸治疗 BPH 的物质基础与作用机制, 为临床应用提供参考价值。

1 方法

1.1 主要化学成分收集 主要化学成分的收集利用中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>), 并结合中药整合药理学平台 (TCMIP, <http://www.megabionet.org/tcmid/>) 及中药潜在靶点数据库 (TCM-PTD, <http://tcm.zju.edu.cn/ptd/>) 等数据库收集二至丸中女贞子和墨旱莲的主要化学成分, 以及本实验室应用超高效液相色谱-二极管阵列检测器/四极-飞行时间串联质谱对女贞子和墨旱莲化学成分进行了分析, 发现其主要包括黄酮类、酚酸类、丹参酮类、三萜类等多种结构类型, 如木犀草素、芹菜素、齐墩果酸等, 利用有机小分子生物活性数据库 (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库对其分子结构进行确证。

1.2 化合物靶点网络构建 将收集到的化合物输入到生物反应路径分析 (IPA, [ingenuity pathway analysis, http://www.ingenuity.com/](http://www.ingenuity.com/)) 中, 发现有 19

个化合物可以在 IPA 软件中找到, 利用“grow”功能构建二至丸化合物靶点网络。

1.3 疾病靶点网络构建 通过 IPA 中的 Diseases and Functions 模块输入疾病 Benign Prostatic Hyperplasia (BPH), 利用“grow”功能构建疾病靶标网络。

1.4 化合物-疾病靶点网络构建 利用 IPA 中的 Pathway Explorer 功能建立化合物-疾病网络。

1.5 靶点通路注释分析 通过 IPA 里的 core analysis 对化合物-疾病靶点进行基因富集分析 (gene ontology, GO) 富集分析和京都基因和基因组百科全书 (KEGG pathway analysis) 通路注释分析, 采用 Omicshare 软件绘制 GO 富集气泡图。

1.6 活性成分-靶蛋白分子对接 根据上述二至丸所含化学成分的靶点预测结果, 通过蛋白综合数据库 (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>) 找到相应蛋白的蛋白综合数据库编号 (PDB-ID)。将 PDB-ID 导入 Systems Dock Web Site (<http://systemsdock.unit.oist.jp/>) 软件对活性成分和靶蛋白进行分子对接。

2 结果

2.1 二至丸化合物靶点网络 将女贞子和墨旱莲的 68 个化合物上传至 IPA 分析软件, 只有 19 个能在 IPA 中找到, 利用“grow”分析模块构建化合物靶标网络。网络图中每一个节点代表 1 个分子靶标, 其中黄色分子为女贞子和墨旱莲共有化合物, 红色分子为分子靶点, 直线代表 2 个分子间的直接作用关系, 虚线代表 2 个分子间的间接作用关系。从图中可以看出, 19 个化合物中有 11 个是女贞子单独含有的化合物, 4 个是墨旱莲单独含有的化合物。见图 1。

2.2 BPH 相关靶点网络 将 BPH 疾病输入到 IPA 分析软件中, 利用“grow”分析模块构建疾病靶标网络。如图 2 所示, 并利用 IPA 中的分子预测功能在 5 α -还原酶 1 型 (steroid 5- α -reductase Type 1, SRD5A1) 和 5 α -还原酶 2 型 (steroid 5- α -

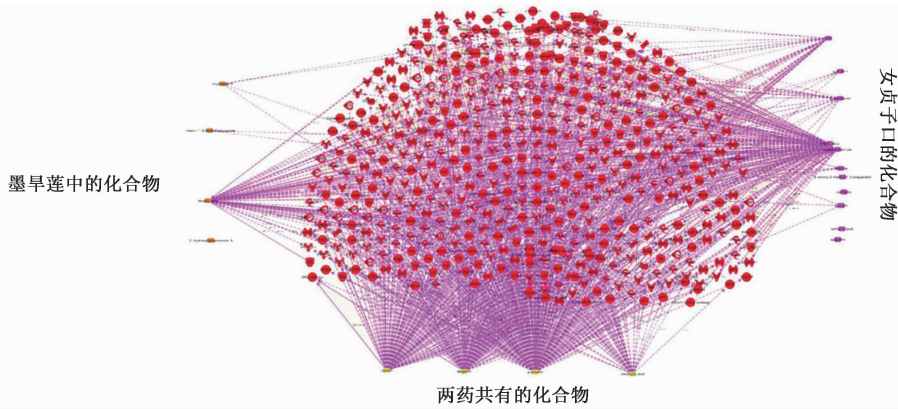


图 1 女贞子,墨旱莲化合物靶点网络图

Fig.1 Network on compounds of Ligustru Lucidi Fructus and Ecliptae Herba

reductasetype 2, SRD5A2) 被抑制状态下进行预测,网络图中每一个节点代表 1 个分子靶标,其中直线代表 2 个分子间的直接作用关系,虚线代表 2 个分子间的间接作用关系。从图中可以看出,当 SRD5A1 和 SRD5A2 被抑制,激肽释放酶 3 (kallikrein 3, KLK3), 金属蛋白酶-1 (metalloproteinase-1, MMP-1), 尿激酶型纤溶酶原激活物 (urinary plasminogen activator, PLAU) 等靶点也被抑制,而磷酸二酯酶 5A (phosphodiesterase 5A, PDE5A) 和瞬时受体电位通道 M_8 (transient receptor potential channel, TRPM₈) 等靶点被激活。

腺增生,红色代表化合物,粉色代表疾病,虚线条代表相互作用关系。见图 3。

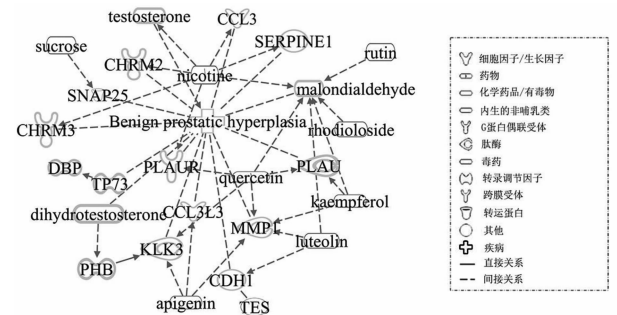


图 3 二至丸化合物与前列腺增生靶点网络关系

Fig.3 Network on relationship between Erzhiwan compounds and targets of benign prostatic hyperplasia

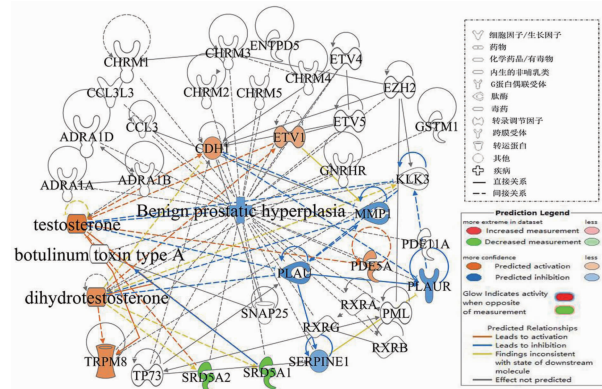


图 2 前列腺增生靶点网络

Fig.2 Network on targets of prostatic hyperplasia

2.3 二至丸与 BPH 分子靶点网络 显示了二至丸与 BPH 分子靶点网络关系,从图中可以看出,二至丸所含芦丁 (Rutin), 红景天苷 (Rhodiolioside), 山奈酚 (Keampferol), 芹菜素 (Apigenin) 等化合物通过 PLAU, MMP-1, KLK3, 毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M_2 (muscarine type acetylcholine receptor M_2 , CHRM₂), 毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M_3 (muscarine type acetylcholine receptor M_3 , CHRM₃) 等靶标干涉前列

2.4 二至丸与 BPH 共同作用的相关信号通路 通过 IPA 软件的“Canonical pathway”“Comparison analysis”及“core analysis”对二至丸与 BPH 分子靶点进行分析,发现关联度较强的 5 条经典通路。见图 4,5。

2.5 KEGG 信号通路分析 对关联度排名前 2 的两条信号通路进行解析发现 MMP1, PLAU, PLAU, KLK3 等蛋白参与第一条信号通路,并与丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK), 胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK), 胶原蛋白 I 型 (collagen type I), 胶原蛋白 II 型 (collagen type II), 胶原蛋白 III 型 (collagen type III) 和胶原蛋白 IV 型 (collagen type IV) 等信号网络相关联,而 CHRM2, CHRM3, G 蛋白偶联受体 26 (G-protein coupled receptor 26, GPR26) 等蛋白参与第二条信号通路,并与蛋白络氨酸激酶 (Akt), 磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K), ERK, MAPK, 核转录因子- κ B (nuclear

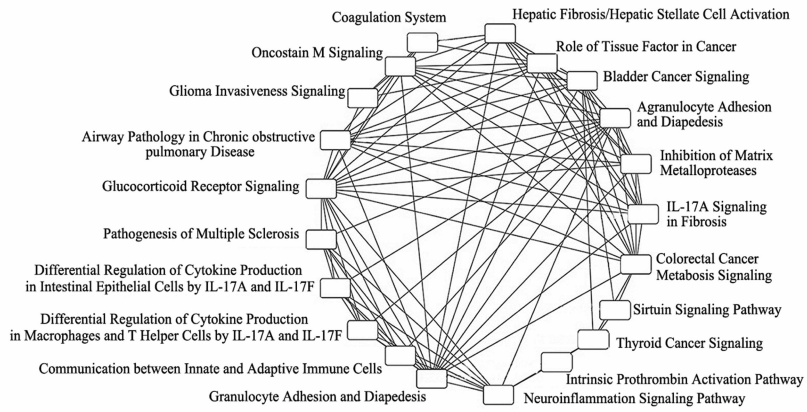


图 4 二至丸治疗前列腺增生的相关信号通路

Fig. 4 Signaling pathway of Erzhiwan treating benign prostatic hyperplasia

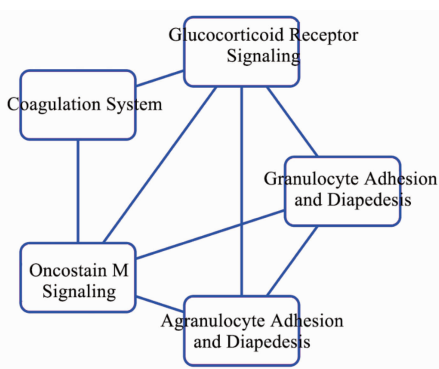


图 5 相关度较强的 5 条信号通路

Fig. 5 Five high correlation signaling pathways

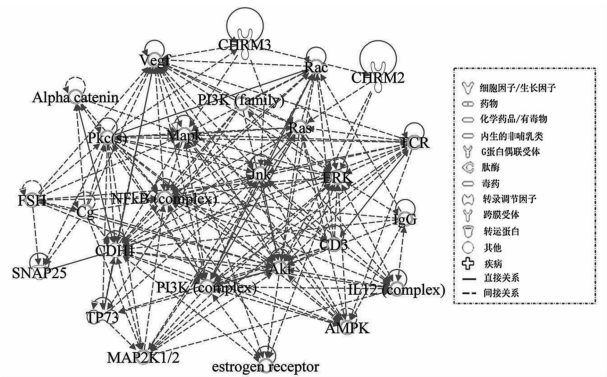


图 7 第二条信号通路网络

Fig. 7 Network of second signaling pathway

factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) 等信号网络相关联。综上所述,可以发现前列腺增生与二至丸相关靶点大部分与 MAPK, ERK 信号通路相关,由此可见,二至丸治疗前列腺增生可能与 MAPK/ERK 信号通路相关。见图 6,7。

增殖,免疫反应,炎症反应等。见图 8。

2.7 Docking 验证结果 将二至丸化合物和疾病靶点进行简单的 Docking 验证,可以发现,Apigenin 和 Luteolin 可以激活 MMP-1, KLK3 和趋化因子 3 (CCL3) 蛋白;而 Oleanic Acid, 硬脂酸 (Stearic Acid) 和 Ursolic Acid 激活 MMP-1, 抑制 KLK3 和 CCL3 蛋白的表达,由此可见,在二至丸可能通过激活 MMP-1, 双向调节 KLK3 和 CCL3 蛋白,进而抑制前列腺增生。见图 9。

3 讨论

BPH 主要以膀胱梗阻及梗阻相关并发症为主,具体表现为尿频、进行性排尿困难和急迫性尿失禁等,其发病机制尚未完全搞清。目前关于 BPH 发病机制学说主要包括激素-内分泌学说、生长因子学说、上皮-间质细胞相互作用学说、细胞凋亡与基因调控学说、炎症等^[10]。中医认为 BPH 属本虚标实的疾病,其病因病机可归咎于中老年人年老体衰、肾阳不足,命门火衰,中气虚弱,三焦气化失司等方面,中医治疗 BPH 多采用以通为用,温肾益气、活血利

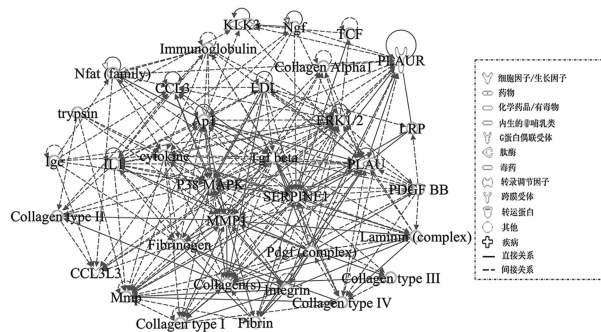


图 6 第一条信号通路网络

Fig. 6 Network of first signaling pathway

2.6 GO 功能富集分析 对二至丸治疗前列腺增生的靶点进行 GO 生物学过程分析,发现涉及到的生物学过程及功能主要包括细胞凋亡,调控细胞

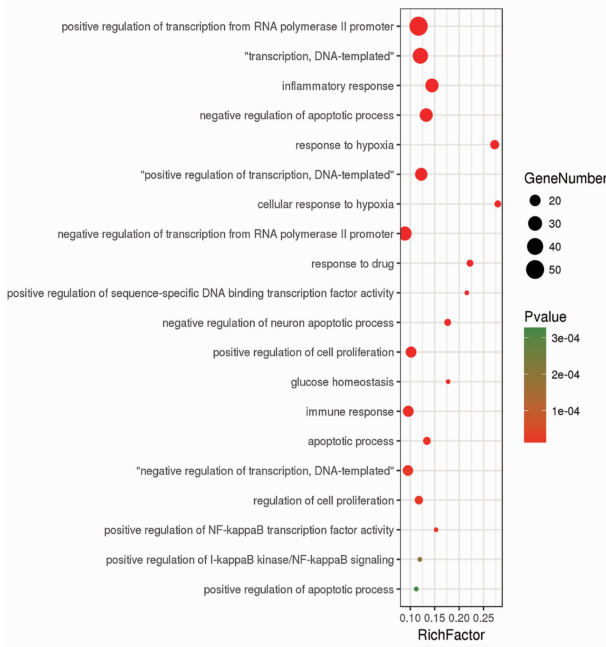


图 8 二至丸治疗前列腺增生相关靶点 GO 富集气泡
Fig. 8 GO bubble chart of relative targets on Erzhiwan treating benign prostatic hyperplasia

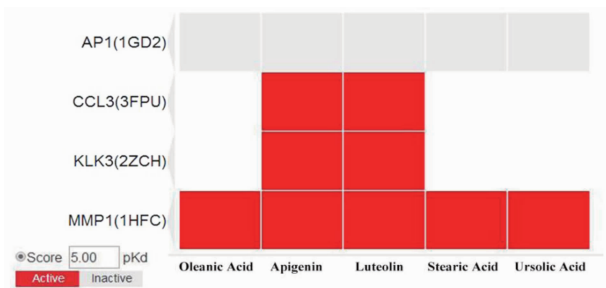


图 9 分子对接验证二至丸化合物和疾病靶点
Fig. 9 Docking validation of Erzhiwan compound and disease target

尿等作为其治疗的基本法则。二至丸出自吴旻辑的《扶寿精方》，为传统补肾之方药，临床上多用于肝肾阴虚所致疾病的治疗，这与中医治疗 BPH 的病因病机相合，但二至丸用 BPH 的治疗很少有研究，IPA 是新兴的生物信息学分析软件，其优势在于收录和及时更新影响因子 (impact factor, IF) 在 3 以上的文章和 Pubchem, 核酸序列数据库 (Genbank) 等权威数据库资料，预测信息较为可靠真实。中药中成分复杂，其药效机制研究困难，通过 IPA 预测结合实验验证或分子对接 Docking 验证可降低研究难度、增加准确性^[11]。

本研究通过查找文献及本实验室分析所得化合物利用 IPA 对二至方治疗良性前列腺增生的靶点机制进行预测，结果发现，二至丸主要通过调节 MMP1, PLAU, 尿激酶型纤溶酶原激活物受体

表 1 分子对接评分

Table 1 Docking score

蛋白名	PDB 编号	待测化合物	分子对接评分 (pKd/pKi)
AP1	1GD2	OleanicAcid	0
AP1	1GD2	Apigenin	0
AP1	1GD2	Luteolin	0
AP1	1GD2	Stearic Acid	0
AP1	1GD2	UrsolicAcid	0
CCL3	3FPU	OleanicAcid	4. 808
CCL3	3FPU	Apigenin	7. 431
CCL3	3FPU	Luteolin	7. 288
CCL3	3FPU	Stearic Acid	4. 805
CCL3	3FPU	UrsolicAcid	4. 871
KLK3	2ZCH	OleanicAcid	4. 891
KLK3	2ZCH	Apigenin	7. 65
KLK3	2ZCH	Luteolin	6. 729
KLK3	2ZCH	Stearic Acid	4. 797
KLK3	2ZCH	UrsolicAcid	4. 912
MMP1	1HFC	OleanicAcid	7. 104
MMP1	1HFC	Apigenin	6. 745
MMP1	1HFC	Luteolin	6. 642
MMP1	1HFC	Stearic Acid	5. 497
MMP1	1HFC	UrsolicAcid	6. 951

(urinary plasminogen activator receptor, PLAUR), KLK3, CCL3, MAPK, ERK, collagen type I, collagen type II, collagen type III, collagen type IV, CHRM2, CHRM3, GPR26 等相关靶点蛋白, 干预细胞凋亡, 调控细胞增殖, 免疫反应, 炎症反应等生物途径及 MAPK/ERK 和 NF- κ B 信号通路进而抑制 BPH。

MMP-1 可以降解间质胶原, 抑制间质细胞增生, 在前列腺增生组织表达减少^[12], KLK3 又称前列腺特异性抗原 (prostate specific antigen, PSA), 是前列腺增生的 9 个相关基因之一, 研究显示, 前列腺增生患者血清中 KLK3 表达异常升高, 但机制目前还不明确^[13], 通过 BPH 合并前列腺炎的研究, 明确了前列腺炎是前列腺增生的促进因素, 而未敲出雄激素受体 (androgen receptor, AR) 基因的 BPH 基质细胞能够表达大量的炎症因子 CCL3, 同时炎症因子有会刺激前列腺组织表达更多的 AR, 导致增生加重^[14]。本研究 Docking 结果发现二至丸可以激活 MMP-1 的表达, 抑制 KLK3 和 CCL3 的表达, 这与

以往研究相符,也证实了IPA网络药理学预测结果的准确性,为笔者后期进一步研究二至丸治疗前列腺增生提供了理论基础。

[参考文献]

[1] FU Y, HAN S, WANG L, et al. Comparison of characteristics of benign prostatic hyperplasia (bph) patients treated with finasteride and alpha blocker combination therapy versus alpha blocker monotherapy in china: an analysis of electronic medical record data[J]. *Adv Ther*, 2018, 35(8): 1191-1198.

[2] Salem R, Hairston J, Hohlastos E, et al. Prostate artery embolization for lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia: results from a prospective fda-approved investigational device exemption study[J]. *Urology*, 2018, 120:205-210.

[3] ZHANG J, LI X, YANG B, et al. Alpha-blockers with or without phosphodiesterase type 5 inhibitor for treatment of lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia: a systematic review and meta-analysis[J]. *World J Urol*, 2018, doi: 10. 1007/s00345-018-2370-2.

[4] Mallikarjuna C, Nayak P, Ghose S M, et al. Transurethral enucleation with bipolar energy for surgical management of benign prostatic hyperplasia: our initial experience[J]. *Indian J Urol*, 2018, 34(3): 219-222.

[5] 张永宁,袁丽超,佟书娟,等.二至丸、地黄煎影响小鼠免疫功能的比较研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(8): 159-162.

[6] 尚广彬,曾莉萍,赵益,等.二至丸对诱发性乳腺癌组织中 VEGF 和 MMP9 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(13): 270-273.

[7] 闫冰,蔡秀江,姚卫峰,等.二至丸保肝活性成分群对 CCl4 致小鼠急性肝损伤保护作用研究[J]. *中国中药*

杂志, 2012, 37(9): 1303-1306.

[8] 闫冰,丁安伟,张丽.二至丸提取物对小鼠四氯化碳急性肝损伤的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(22): 3080-3083.

[9] 赵海梅,周步高,王馨,等.二至丸预防和治疗性给药对大鼠损伤后肝细胞再生障碍的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(16): 128-132.

[10] Calogero A E, Burgio G, Condorelli R A, et al. Epidemiology and risk factors of lower urinary tract symptoms/benign prostatic hyperplasia and erectile dysfunction[J]. *Aging Male*, 2018, 2018(3): 1-8.

[11] YU F, SHEN X Y, FAN L, et al. Genome-wide analysis of genetic variations assisted by ingenuity pathway analysis to comprehensively investigate potential genetic targets associated with the progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(15): 2102-2108.

[12] Lein M, Nowak L, Jung K, et al. Metalloproteinases (MMP-1, MMP-3) and their inhibitors (TIMP) in blood plasma of patients with prostate carcinoma[J]. *Urologe A*, 1998, 37(4): 377-381.

[13] Soni A, Bansal A, Mishra A K, et al. Association of androgen receptor, prostate-specific antigen, and CYP19 gene polymorphisms with prostate carcinoma and benign prostatic hyperplasia in a north Indian population [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2012, 16(8): 835-840.

[14] WANG X, LIN W J, Izumi K, et al. Increased infiltrated macrophages in benign prostatic hyperplasia (BPH): role of stromal androgen receptor in macrophage-induced prostate stromal cell proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(22): 18376-18385.

[责任编辑 周冰冰]