

基于网络药理学和动物实验探讨化铁丸通过 PI3K/Akt 信号通路防治前列腺增生的作用

侯 强¹, 郑董璇¹, 耿若愚¹, 曹 琳¹, 冉 峰¹, 张海波², 胡君萍¹, 杨建华^{2*}

(1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830017; 2. 新疆医科大学第一附属医院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 探究化铁丸防治前列腺增生 (BPH) 的作用及其机制。方法 通过皮下注射丙酸睾酮构建 BPH 大鼠模型, 造模 4 周同时给药干预, 检测前列腺、精囊、提肛肌、睾丸、附睾指数, 并通过 HE 染色观察前列腺组织病理变化, ELISA 试剂盒检测睾酮 (T)、双氢睾酮 (DHT)、雌二醇 (E₂)、前列腺特异性抗原 (PSA) 水平。借助 TCMSP、PubChem、Swiss Target Prediction 数据库筛选化铁丸有效成分及靶点, GeneCards、OMIM、TTD 等数据库筛选 BPH 疾病靶点, 交集靶点借助 STRING 数据库及 Cytoscape 3.9.0 软件筛选靶点, 并进行 GO、KEGG 富集分析, 结合文献确认核心靶点, CB-Dock2 对质谱-网络药理学交集成分与核心靶点进行对接验证, Western blot 和 RT-qPCR 法检测前列腺 PCNA、α-SMA、AR、VEGF、PI3K、Akt、Bax、Bcl-2 表达。结果 与模型组比较, 化铁丸高剂量组 (2.7 g/kg) 前列腺指数降低 ($P<0.01$), 而精囊、提肛肌、睾丸、附睾指数无明显变化 ($P>0.05$), 前列腺组织病理状态得到改善; T、DHT、E₂、E₂/T、PSA 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。TCMSP 等数据库筛选出化铁丸活性成分 20 个、靶点 377 个, GeneCards 等数据库筛选出 BPH 靶点 497 个、交集靶点 65 个。GO 分析显示, 生物途径包括内类固醇激素受体信号通路、细胞凋亡等, 作用蛋白定位在细胞核、核浆、胞浆等上, 分子功能包括雌激素反应元件结合、类固醇结合等。KEGG 富集显示, 相关信号通路有 PI3K-Akt、VEGF、雌激素等, 结合文献, 确认核心靶点 VEGF、BFGF、Akt、PI3K、Bax、Bcl-2。分子对接显示, 质谱-网络药理学交集成分与核心靶点结合紧密。Western blot 和 RT-qPCR 显示, 化铁丸高剂量组可下调 PCNA、α-SMA、AR、VEGF、p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 表达, 上调 ERβ、Bax 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 化铁丸通过调节 BPH 大鼠性激素水平紊乱及性激素受体表达, 并激活 PI3K-Akt 通路促进细胞凋亡, 从而抑制 BPH。

关键词: 化铁丸; 前列腺增生 (BPH); 性激素; VEGF; PI3K/Akt 信号通路; 网络药理学; 动物实验

中图分类号: R285.5; R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)07-2355-10

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.07.040

良性前列腺增生 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 是一种以排尿障碍为主的中老年男性常见的慢性疾病, 又称前列腺肥大^[1], 其最典型的临床症状为严重的下尿路症 (LUTS), 如尿急、尿痛、排尿困难等, 严重影响着患者的生活质量^[2]。BPH 的发生率会随着年龄的不断增长而增加, 60 岁时为 50%, 80 岁时达 83%^[3]。《柳叶刀-老龄健康》最新研究表明, 2000 年至 2019 年全球 204 个国家和地区的 BPH 患病例数增加了 70.5%, 且预计相关医疗与经济负担将在未来几年持续上升^[4]。目前, BPH 一线治疗药物 (如非那雄胺、坦索罗辛) 存在头晕头痛、抑郁风险增加、射精障碍等不良反应^[5-7], 因此, 进一步探寻更为安全有效的方法成为必然趋势。

化铁丸最早收录于《普济方》, 后收载于《本草纲目》^[8], 该方由威灵仙与楮实子 2 味药组成, 具有软坚、

散结、补虚等功效, 可用于治疗腹内痞块和难化的坚硬肿物, 包括各种组织增生症、结石、肌瘤等^[9], 临幊上也用于治疗 BPH^[10], 但其物质基础及作用机制尚不明确。本研究通过丙酸睾酮诱导 BPH 大鼠模型探讨化铁丸的作用, 并通过网络药理学探寻作用机制, 并对预测靶点进行初步验证, 以期为化铁丸的临床转化提供实验基础和理论依据, 也进一步丰富了中药治疗 BPH 的理论和实践价值。

1 材料

1.1 动物 SD 雄性大鼠 40 只, 体质量 (330±30) g, 10~12 周龄, 购自新疆医科大学动物实验中心 [实验动物生产许可证号 SCXK (新) 2018-0002, 实验动物使用许可证号 SYXK (新) 2016-0001], 饲养在无特定病原体 (SPF) 环境中, 室温 22~25 °C, 相对湿度 40%~60%, 12 h/12 h 光/暗循环, 自由摄食和饮水。动物实验流程均符合动物伦

收稿日期: 2024-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82160772); 新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目 (2021D01D11, 2022D01D14)

作者简介: 侯 强 (1999—), 男, 硕士生, 从事天然产物研究与开发工作。E-mail: 1957184229@qq.com

* 通信作者: 杨建华 (1971—), 男 (壮族), 博士, 教授, 从事天然产物研究与开发工作。E-mail: yjh_yfy@163.com

理原则，并通过伦理委员会审批（伦理号 IACUC-20210115-09）。

1.2 药材 威灵仙（批号 210801）、楮实子（批号 210601）均购自华润三九医药股份有限公司，经新疆医科大学药学院胡君萍教授分别鉴定为毛茛科植物威灵仙 *Clematis chinensis Osbeck* 的干燥根、桑科植物构树 *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. 的干燥果实。

1.3 试剂 丙酸睾酮（批号 C14881047）、非那雄胺（批号 C14856973）均购自上海麦克林生化科技股份有限公司。酸性磷酸酶（acid phosphatase, ACP）试剂盒（批号 CV08LP488948）购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；睾酮（testosterone, T，批号 040619004114730418）、雌二醇（estradiol, E₂，批号 040619004115250418）、双氢睾酮（dihydrotestosterone, DHT，批号 041824004121370418）、前列腺特异性抗原（prostate specific antigen, PSA，批号 041824004532390418）酶联免疫吸附试验试剂盒均购自上海江莱生物科技有限公司；BCA 蛋白定量试剂盒（批号 SH251403）、cDNA 反转录试剂盒（批号 91258333）均购自美国 Thermo 公司；qPCR 试剂盒（批号 027E2260IA）购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；PCNA（批号 3522040705）、 α -SMA（批号 4000000298）、SRD5A2（批号 4000002287）、AR（批号 3522052604）、Bax（批号 3522120737）、Bcl-2（批号 4000003108）抗体均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司；ER α （批号 00125447）、ER β （批号 00125179）、 β -actin（批号 00102209）抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司；PI3K（批号 CN89330）、p-PI3K（批号 CN16231）、Akt（批号 CJ36131）、p-Akt（批号 XCJ36131）均购自南京巴傲得生物科技有限公司；VEGF（批号 BA11164062）、BFGF（批号 BA01137166）均购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.4 仪器 BP211D 电子天平（德国 Sartorius 公司）；Varioskan Flash 酶标仪（美国 Thermo 公司）；RM2016 病理切片机（德国 Leica 公司）；高速多功能冷冻离心机（法国 Jouan 公司）；SC-3610 低速离心机（安徽中科中佳科学仪器有限公司）；ChemiDoc MP 全自动凝胶成像分析仪、可调式恒压恒流电源、凝胶电泳及转膜设备、凝胶成像仪（美国 Bio-Rad 公司）；JX-2G 球磨仪（北京六一生物科技有限公司）；Eclipse Ni-U 显微镜（日本 Nikon 公司）；FJY 1002-UVF 超纯水机（青岛富勒姆科技有限公司）；DK-8D 电热恒温水槽（上海一恒科学仪器有限公司）。

2 方法

2.1 化铁丸提取物制备 威灵仙和楮实子按 1:1 比例混合，用研钵适度研磨，纯水浸泡 12 h，以药液比 1:15 进行回流提取，提取液经旋转蒸发仪浓缩后冷冻干燥，即得，提取率为 18.59%。

2.2 UPLC-MS 检测 取提取物粉末 100 μ L，置于 EP 管中，加入 400 μ L 80% 甲醇，涡旋振荡，冰浴静置 5 min，4 °C、12 000 r/min 离心 20 min，取一定量的上清，超纯水

稀释至甲醇体积分数为 53%，4 °C、12 000 r/min 离心 20 min，收集上清。分析采用 Xselect HSS T3 色谱柱（2.1 mm×150 mm, 2.5 μ m）；流动相水（含 0.1% 甲酸）(A)-乙腈（含 0.1% 甲酸）(B)，梯度洗脱（0~15 min, 98% A；15~17.1 min, 98%~0 A；17.1~20 min, 0~98% A）；体积流量 0.4 mL/min；柱温 50 °C；进样量 10 μ L。

2.3 分组及给药 大鼠适应性喂养 1 周后，随机分为对照组、模型组、阳性组（非那雄胺 5 mg/kg）和化铁丸低、高剂量组（1.35、2.7 g/kg）。除正常组外，其余各组大鼠每隔 1 d 皮下注射 50 mg/kg 丙酸睾酮橄榄油，建立 BPH 模型，正常组以相同剂量皮下注射橄榄油（由于非那雄胺不溶于水，故用 0.5% CMC-Na 配制成为一混悬液）。每天根据大鼠体质量，阳性组和化铁丸低、高剂量组灌胃给予相应剂量药物（剂量以临床中人用剂量根据表面积折算），对照组与模型组灌胃给予 0.5% CMC-Na，持续 4 周。末次给药后，所有大鼠禁食不禁水 12 h，乙醚麻醉后腹主动脉取血，室温放置 1 h，3 000 r/min 离心收集血清；另采集前列腺等组织，固定，冷冻保存。

2.4 性激素依赖器官指数检测 根据脏器指数公式计算前列腺指数（prostatic index, PI）、精囊、提肛肌、睾丸、附睾指数，公式为脏器指数=脏器湿重/大鼠体质量×100%。

2.5 前列腺病理变化观察 取大鼠前列腺组织适量，浸泡于 4% 多聚甲醛组织固定液中 48 h，石蜡包埋、切片后摊片，烘片，脱蜡至水，HE 染色，于光学显微镜下观察组织病理变化。

2.6 性激素、ACP 水平检测 采用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清 T、E₂、DHT 水平及前列腺组织 PSA 水平，计算 E₂/T；试剂盒检测血清 ACP 水平，上述操作均按照试剂盒说明书进行。

2.7 网络药理学靶点预测 采用 TCMSP 数据库 (<https://tcmsp-e.com/>)，以“威灵仙”“楮实子”为检索词，口服利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 为条件，筛选主要活性成分。在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载活性成分对应的 SMILES 序列，输入 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)，预测成分所对应的靶点。

以“BPH”“benign prostatic hyperplasia”为检索词，挖掘 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://omim.org/>)、TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、CTD 数据库 (<http://ctdbase.org/>)、DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>) 以及 NCBI Gene 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) 中 BPH 潜在靶点。为了保证靶点识别的准确性和可信度，选择 GeneCards、CTD 数据库中 Score 值 ≥ 50 的靶点，DisGeNET 数据库中 Score 值 ≥ 0.1 的靶点，对上述靶点进行合并，删除重复值后得到最终靶点。

将所收集的成分靶点与疾病靶点通过 Venny 2.1.0 取

得交集，并将其导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>)，构建 PPI 网络，Cytoscape 3.9.0 软件进行拓扑分析，根据 Degree 值筛选出核心靶点，最后利用 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 工具对交集靶点进行 GO、KEGG 富集分析。

2.8 分子对接验证 使用分子对接对质谱-网络药理学交集成分与核心靶点进行验证。首先在 PubChem 数据库中下载活性成分 SDF 格式的 3D 结构图，其次在 PDB 数据库中下载交集靶点 PDB 格式的 3D 结构图，最后上传至 CB-Dock2^[11] 进行分子对接，并筛选优势对接构象，用 PyMol 进行可视化。

2.9 Western blot 法检测大鼠前列腺组织各目的蛋白表达 取大鼠前列腺组织匀浆适量，加入 RIPA 裂解液提取蛋白，BCA 法测定蛋白浓度并进行归一化，蛋白样品经十

二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至 PVDF 膜，5% 脱脂牛奶或 3% BSA 封闭，分别孵育相应的抗体，4℃ 孵育过夜，加入 HRP 标记的 IgG 二抗 (1:5000) 孵育 1 h，使用 ECL 化学发光底物试剂盒显影，Image Lab 检测系统检测蛋白条带灰度值，Image Lab 程序进行分析。

2.10 RT-qPCR 法检测大鼠前列腺组织目的基因 mRNA 表达 取大鼠前列腺组织适量，加 TRIzol 试剂匀浆后加 0.2 mL 氯仿剧烈振荡，静置 5 min，4℃、10000 r/min 离心 15 min，取上层水相，加入等体积异丙醇，静置 10 min，4℃、10000 r/min 离心 10 min，弃上清，预冷的 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀，4℃、5000 r/min 离心 5 min，弃上清，离心管干燥 5 min，加 0.2 mL 去酶水，55℃ 水浴加热 10 min，获得 RNA 样品，反转录及实时荧光定量操作均按照试剂盒说明书进行。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	正向序列	反向序列
PCNA	5'-GAGCAACTTCCAATCCCAGAACAGG-3'	5'-CCAAGCTCCCCACTCGCAGAAA-3'
α-SMA	5'-ACCCACAATGTCCCCATCTA-3'	5'-TCTCCAGGGAAAGAAGACGAA-3'
SRD5A2	5'-ACGGAAACACACAGAGCT-3'	5'-ATGTGCAGAGAAGAGAGGCCA-3'
AR	5'-GCCGGACATGACAACAACCAGCC-3'	5'-AGTAAGGACCGCCAACCCATGG-3'
PSA	5'-TAGGGAGACGGCATTGCTTAT-3'	5'-CAAAGCCTTCGTTCAACCAGA-3'
ER α	5'-CGAGGTGTACGTGGACAACA-3'	5'-GTGATGCTCGACTGGCCATA-3'
ER β	5'-GAGGCAGAAAGTAGCCGGAA-3'	5'-CGTGAGAAAGAAGCATCAGGA-3'
VEGF	5'-CGTCTACCAGGGCAGCTATTG-3'	5'-CTCCAGGGCTTCATCATTCG-3'
BFGF	5'-CAGCGACAAGGCAGACTATT-3'	5'-CGTTTCAGTGCCACATACCA-3'
Bax	5'-ATGGAGCTGCAGAGGATGA-3'	5'-CCAGTTGCTAGCAAAGTAG-3'
Bcl-2	5'-GAGGATTGTGCCCTTCTTG-3'	5'-AGTACTCAGTCATCCACA-3'
GAPDH	5'-ATGATTCTACCCACGGCAAG-3'	5'-CTGGAACATGGTATGGTT-3'

2.11 统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，先经方差齐性检验，若方差齐，组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 化铁丸成分分析 如图 1 所示，UPLC-MS 检测到化铁丸中成分包括黄酮类 313 种、脂质类 155 种、萜类 145 种、糖类 123 种、苯丙素类 100 种、酚类 76 种、生物碱类 75 种、胺类 34 种、醇类 25 种。

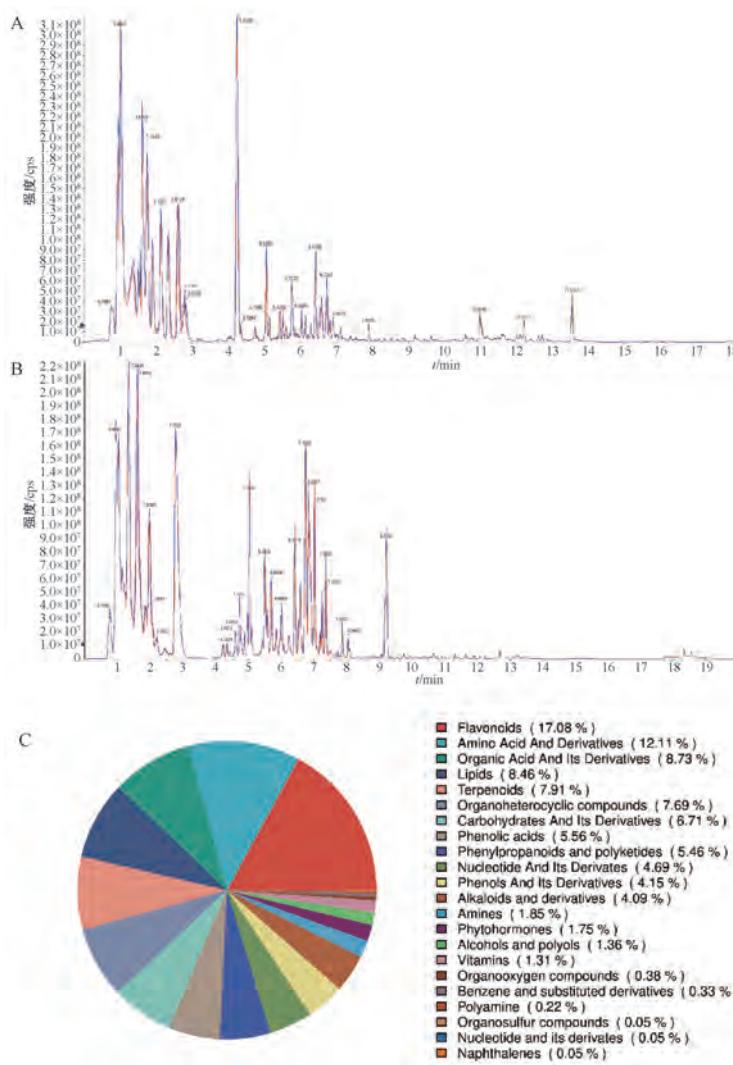
3.2 化铁丸对 BPH 大鼠激素依赖性器官的影响 如图 2 所示，与对照组比较，模型组大鼠前列腺形态有明显变化，前列腺指数、前列腺上皮细胞厚度增加 ($P < 0.01$)，HE 染色显示腺上皮细胞及基质细胞显著增生，腺腔内容物增多，上皮细胞呈肉瘤样突起增生，与 BPH 模型制备指南所描述的病征一致^[12]，说明造模成功；与模型组比较，化铁丸各剂量组和阳性组前列腺指数、前列腺上皮细胞厚度有不同程度的降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。以上结果表明，化铁丸有改善 BPH 的作用，且相较于非那雄胺有一定的安全性。

3.3 化铁丸对 BPH 大鼠血清 ACP 水平及前列腺组织 PCNA、α-SMA 蛋白和 mRNA 表达的影响 如图 3 所示，与

对照组比较，模型组大鼠血清 ACP 水平及前列腺组织 PCNA、α-SMA 蛋白和 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，化铁丸各剂量组和阳性组大鼠血清 ACP 水平及前列腺组织 PCNA、α-SMA 蛋白和 mRNA 表达有不同程度的降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。以上结果表明，化铁丸能改善 BPH 异常增殖，并具有舒缓 BPH 造成的尿道压迫作用。

3.4 化铁丸对 BPH 大鼠血清 T、E₂、DHT 水平的影响 如图 4 所示，与对照组比较，模型组大鼠血清 T、E₂、DHT 水平及 E₂/T 比值升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与模型组比较，化铁丸高剂量组和阳性组大鼠血清 T、E₂、DHT 水平及 E₂/T 比值降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。以上结果表明，化铁丸能够调节 BPH 大鼠的激素水平紊乱。

3.5 化铁丸对 BPH 大鼠前列腺组织 SRD5A2、AR、PSA 蛋白和 mRNA 表达的影响 如图 5 所示，与对照组比较，模型组大鼠前列腺组织 SRD5A2、AR、PSA 蛋白和 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，化铁丸各剂量组和阳性组大鼠前列腺组织 SRD5A2、AR、PSA 蛋白和 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。以上结果表明，化铁丸可通过调节雄激素受体的表达并下调 PSA 来抑制 BPH，且具有类似非那雄胺的作用。



注：A 为正离子流图，B 为负离子流图，C 为化铁丸成分分类占比图。

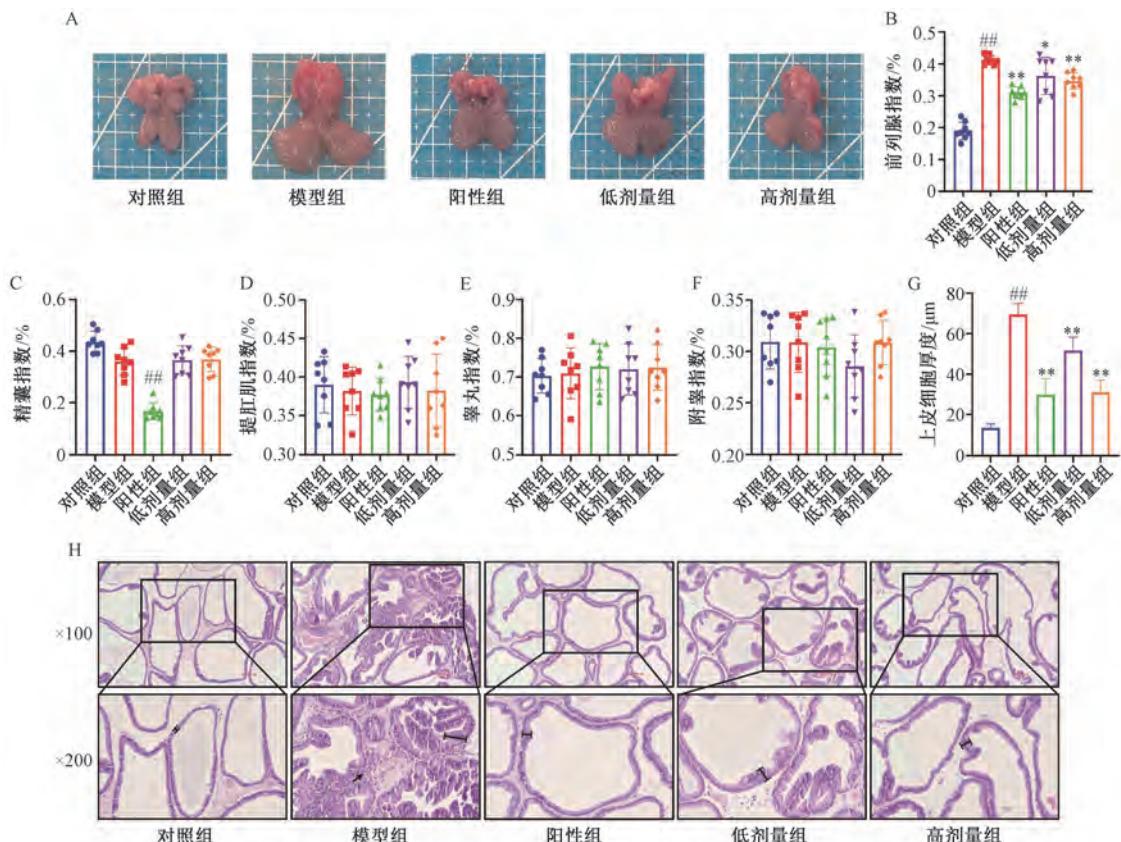
图1 化铁丸总离子流图及成分分类

3.6 化铁丸对 BPH 大鼠前列腺组织 ER α 、ER β 蛋白和 mRNA 表达的影响 如图 6 所示，与对照组比较，模型组大鼠前列腺组织 ER α 蛋白和 mRNA 表达升高 ($P<0.01$)，ER β 蛋白和 mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组比较，化铁丸高剂量组和阳性组大鼠前列腺组织 ER α 蛋白和 mRNA 表达降低 ($P<0.01$)，ER β 蛋白和 mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，化铁丸低剂量组 ER α 蛋白和 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。以上结果表明，化铁丸可通过调节雌激素受体的表达来抑制 BPH。

3.7 化铁丸作用 BPH 的网络药理学靶点预测 如图 7 所示，共收集到共有靶点 65 个，通过 PPI 蛋白互作网络构建，并用 Cytoscape 进行核心靶点筛选，颜色越深的节点代表其网络自由度越大，即该靶点在网络中越重要，排名前 10 位的靶点分别为 IL6、Akt1、TP53、EGFR、ESR1、MAPK3、PTGS2、PPARG、MMP9、CCND1，即在 PPI 网络中起着关键作用，可能是化铁丸治疗 BPH 的关键靶点。利用 DAVID 数据库对 65 个交集靶点进行 GO、KEGG 富集分

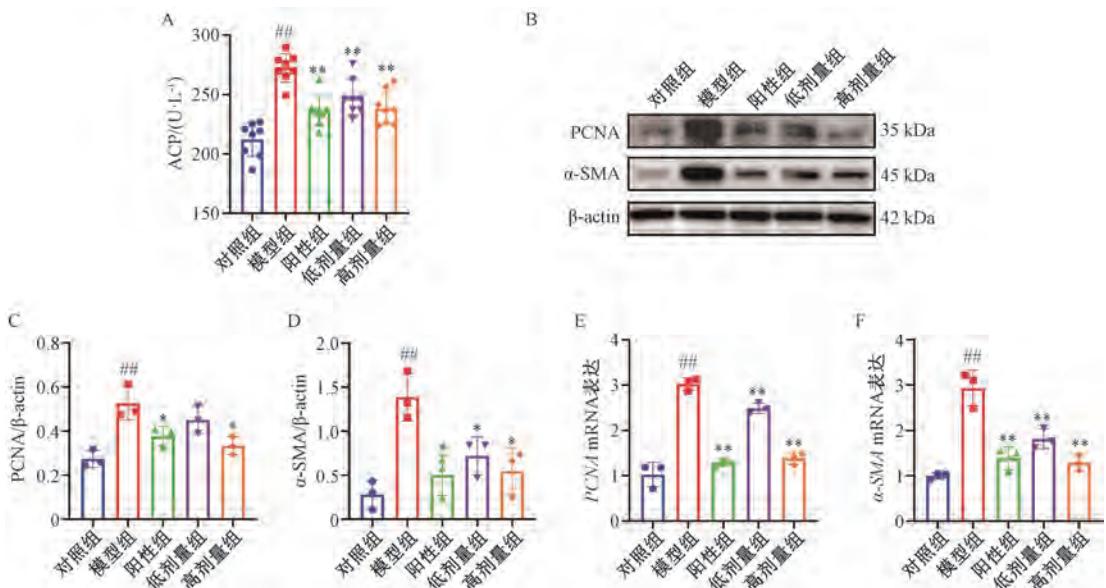
析，GO 富集结果显示，在生物过程 (BP) 方面，化铁丸主要影响了对外源刺激的反应、基因表达的正向调节、基因表达的负向调控、细胞内类固醇激素受体信号通路、细胞凋亡过程等；在细胞组分 (CC) 方面，化铁丸作用主要涉及细胞核、核浆、细胞质、胞浆上；在分子功能 (MF) 方面，化铁丸主要影响了蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性和酶结合、雌激素反应元件结合、类固醇结合等过程。KEGG 富集结果显示，化铁丸影响的通路包括 PI3K-Akt、催乳素、VEGF、松弛素、雌激素等。

3.8 分子对接核心靶点验证 通过 TCMSP 数据库收集 $DL \geq 0.18$ 的成分，与 UPLC-MS 检测成分取交集，获得 29 种共有成分。综合网络药理学结果及文献，共筛选出 6 个核心靶点 (VEGFA、BFGF、PIK3CA、Akt1、Bax、Bcl-2)。将 29 个交集成分与 6 个核心靶点通过 CB-Dock2 进行对接，结果显示结合能量均小于 0 kJ/mol，具体见表 2，说明成分和靶点可自发结合。再将结合能最小对接结果用 Pymol 进行可视化，见图 8。



注：A为肝组织肉眼观察图，B~F分别为前列腺、精囊、提肛肌、睾丸、附睾指数，G为前列腺上皮细胞厚度，H为前列腺组织HE染色图。与对照组比较， $^{##}P<0.01$ ；与模型组比较， $^*P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

图2 化铁丸对BPH大鼠激素依赖性器官的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=8)

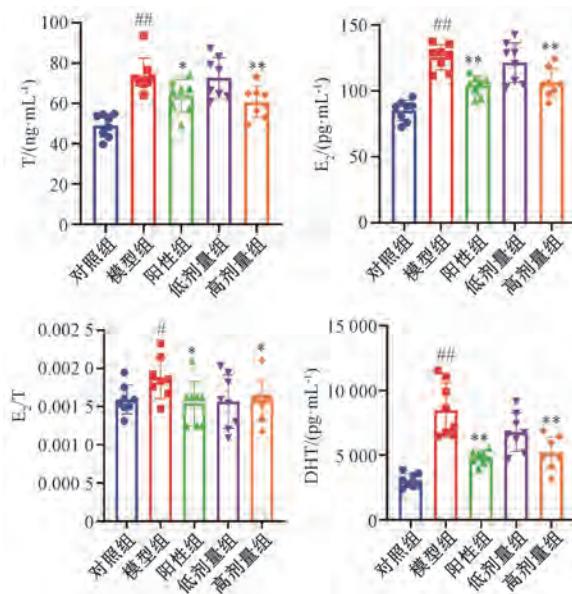


注：A为血清ACP水平，B分别为前列腺组织PCNA、 α -SMA蛋白条带，C~D分别为前列腺组织PCNA、 α -SMA蛋白表达，E~F分别为前列腺组织PCNA、 α -SMA mRNA表达。与对照组比较， $^{##}P<0.01$ ；与模型组比较， $^*P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

图3 化铁丸对BPH大鼠血清ACP水平及前列腺组织PCNA、 α -SMA蛋白和mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

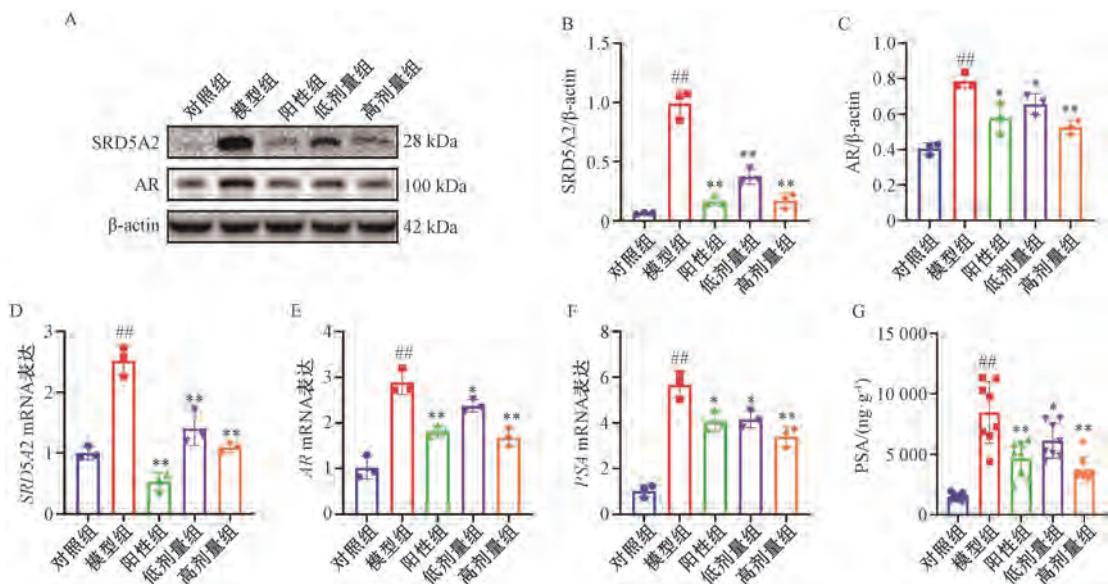
3.9 化铁丸对BPH大鼠前列腺组织VEGF、PI3K/Akt通路及凋亡的影响 如图9所示，与对照组比较，模型组大鼠前列腺组织VEGF、BFGF、p-PI3K、p-Akt、Bcl-2蛋白和

VEGF、BFGF、Bcl-2 mRNA表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，Bax蛋白和mRNA表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组比较，化铁丸高剂量组和阳性组大鼠前列腺组织VEGF、



注：与对照组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

图4 化铁丸对BPH大鼠血清T、E₂、DHT水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=8)



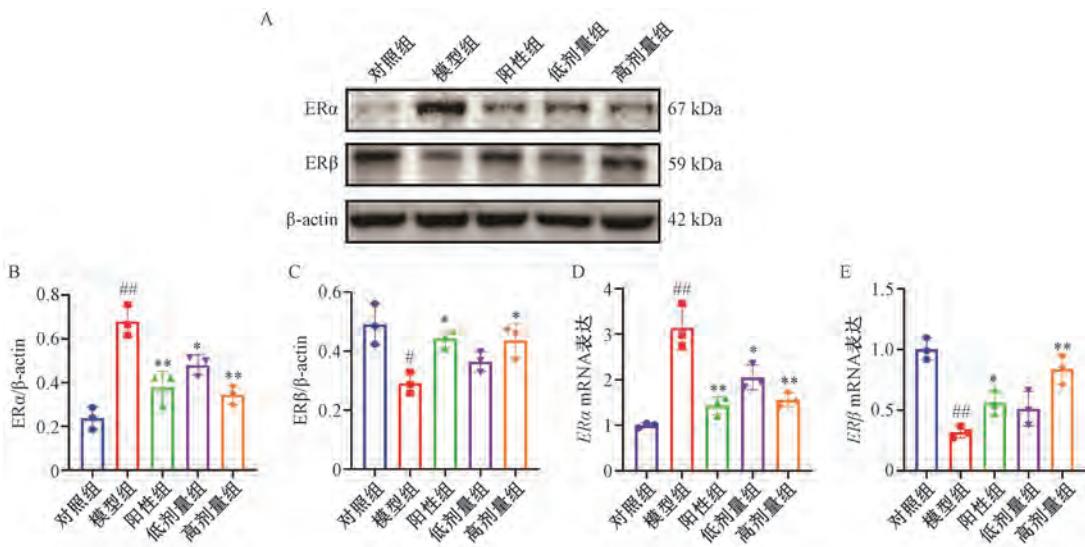
注：A为前列腺组织SRD5A2、AR蛋白条带，B~C分别为前列腺组织SRD5A2、AR蛋白表达，D~F分别为前列腺组织SRD5A2、AR、PSA mRNA表达，G为前列腺组织PSA水平。与对照组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

图5 化铁丸对BPH大鼠前列腺组织SRD5A2、AR、PSA蛋白和mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

BFGF、p-PI3K、p-Akt、Bcl-2蛋白和VEGF、BFGF、*Bcl-2* mRNA表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，Bax蛋白和mRNA表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，化铁丸低剂量组大鼠前列腺组织VEGF、BFGF、p-Akt蛋白和VEGF、*Bcl-2* mRNA表达降低 ($P<0.05$)，*Bax* mRNA表达升高 ($P<0.01$)。以上结果提示，化铁丸可抑制VEGF和BFGF表达，并通过激活PI3K/Akt通路促使PI3K与Akt发生磷酸化来促进BPH细胞凋亡。

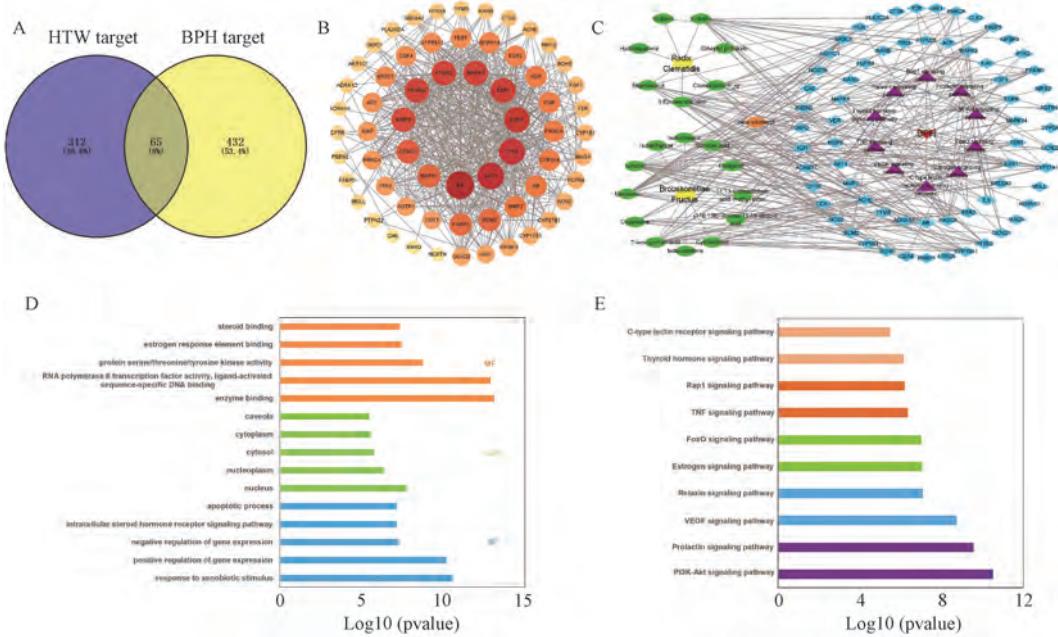
4 讨论

中医认为，BPH属于“精癃”“癃闭”范畴，男子年老致正气衰落，肝肾等脏器功能失调，造成实症肝郁气滞，虚症肾阳亏虚，从而引起BPH^[1]。威灵仙为毛茛科植物威灵仙的干燥根和根茎^[13]，《本草正义》言其“以走窜消克为能事，积湿停痰，血瘀气滞，诸实宜之”^[10]，具有祛风湿、通经络等功效^[14]。楮实子为桑科植物构树的干燥成熟果实^[13]，《本草纲目》记载其具“壮筋骨，助阳气，补虚劳，健腰膝，益颜色”之功效^[15]，能健脾补肾、清肝明目。



注：A为前列腺组织ER α 、ER β 蛋白条带，B~C分别为前列腺组织ER α 、ER β 蛋白表达，D~E分别为前列腺组织ER α 、ER β mRNA表达。与对照组比较，#P<0.05，##P<0.01；与模型组比较，*P<0.05，**P<0.01。

图6 化铁丸对BPH大鼠前列腺组织ER α 、ER β 蛋白和mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=3)



注：A为化铁丸与BPH靶点韦恩图，B为核心靶点网络图，C为药物-成分-靶点-通路-疾病的可视化网络图，D为GO分析，E为KEGG通路富集分析。

图7 化铁丸治疗BPH的网络药理学分析

目^[16]。因此，威灵仙、楮实子两药相合能产生标本兼治之效，具有防治BPH的潜力。

本研究采用丙酸睾酮诱导非去势BPH大鼠模型，此法在发病机制和病理特征上更趋近于临床，保留了雄激素来源器官睾丸，在体内原有的雄激素水平基础上外源皮下注射丙酸睾酮，使得大鼠体内性激素水平紊乱，诱导BPH发生。精囊、提肛肌、睾丸、附睾均为雄激素依赖性靶器官，非那雄胺降低了精囊指数，而化铁丸仅对PI有抑制作用，即具有一定的组织特异性，可能通过类似选择性雄激素受

体调节剂(SARMs)即雄激素受体组织特异性配体相关机制在BPH中发挥作用^[17]。BPH会使血清中ACP升高，临幊上将其作为BPH的血清标志物^[18]；PCNA和α-SMA可反映前列腺细胞增殖状态^[19]以及大鼠前列腺平滑肌细胞层厚度^[20]，两者表达增高能够反映BPH病程的严重程度。本研究结果表明，化铁丸降低了BPH大鼠血清中ACP水平，抑制了前列腺中PCNA和α-SMA的表达，与郭欣欣^[21]、Tao等^[17]报道一致，提示化铁丸能缓解BPH过程中细胞过度增殖及前列腺平滑肌对尿道产生的压迫。

表2 CB-Dock2分子对接结果

编号	化合物	VEGFA (1MKK)	BFGF (1BFG)	PIK3CA (6PYR)	Akt1 (1UNQ)	Bax (5W60)	Bcl-2 (600K)
1	stigmasterol	-8.4	-6.6	-9.1	-7.1	-6.6	-8.0
2	vanillic acid	-5.4	-4.5	-6.2	-4.9	-5.7	-5.4
3	isovanillic acid	-5.3	-4.3	-6.2	-4.9	-5.1	-5.1
4	2,4-di-tert-butylphenol	-5.7	-5.1	-7.6	-5.3	-5.1	-6.1
5	benzoic acid	-4.9	-4.1	-6.2	-4.8	-4.8	-5.0
6	oleanic acid	-8.5	-8.0	-11.0	-6.9	-7.1	-7.8
7	guaiacol	-4.6	-4.2	-5.0	-4.3	-4.7	-4.9
8	hederagenin	-8.3	-7.7	-10.3	-6.7	-6.8	-7.6
9	vanillin	-5.0	-4.1	-5.8	-4.6	-5.2	-5.0
10	dibutyl phthalate	-5.8	-4.8	-6.4	-4.9	-5.6	-6.2
11	5-hydroxymethylfurfural	-4.5	-4.0	-5.1	-4.3	-4.7	-4.3
12	eicosenoic acid	-4.8	-3.9	-5.5	-4.4	-4.6	-6.1
13	diosgenin	-9.0	-7.2	-9.5	-7.9	-7.6	-9.5
14	luteolin	-7.5	-6.3	-8.7	-6.1	-7.0	-7.2
15	linoleic acid	-5.3	-4.5	-5.7	-4.3	-4.4	-5.9
16	azelaic acid	-4.8	-4.6	-5.1	-4.5	-4.8	-5.1
17	methyl myristate	-4.9	-4.2	-5.2	-3.9	-4.4	-5.3
18	heptadecanoic acid	-5.1	-3.8	-5.8	-4.4	-4.8	-5.3
19	palmitoleic acid	-5.1	-4.1	-5.6	-4.2	-4.9	-5.2
20	lauric acid	-4.6	-4.1	-5.3	-4.2	-4.6	-5.0
21	docosanoic acid	-4.7	-4.1	-5.9	-3.8	-4.9	-5.8
22	scopoletin	-6.1	-5.2	-7.0	-5.1	-5.2	-5.9
23	linolenic acid	-5.4	-4.6	-6.0	-4.7	-5.1	-5.3
24	oleic acid	-5.0	-4.3	-6.2	-4.1	-4.9	-5.3
25	apigenin	-7.5	-6.1	-8.5	-6.3	-7.2	-7.1
26	trillin	-8.6	-7.9	-8.7	-7.9	-8.0	-8.2
27	myristic acid	-4.9	-4.3	-5.4	-4.2	-4.3	-4.9
28	methyl linoleate	-5.0	-4.4	-5.6	-4.3	-5.3	-5.5
29	2-methoxyhexadecanoate	-5.0	-4.4	-5.5	-3.9	-4.5	-4.9

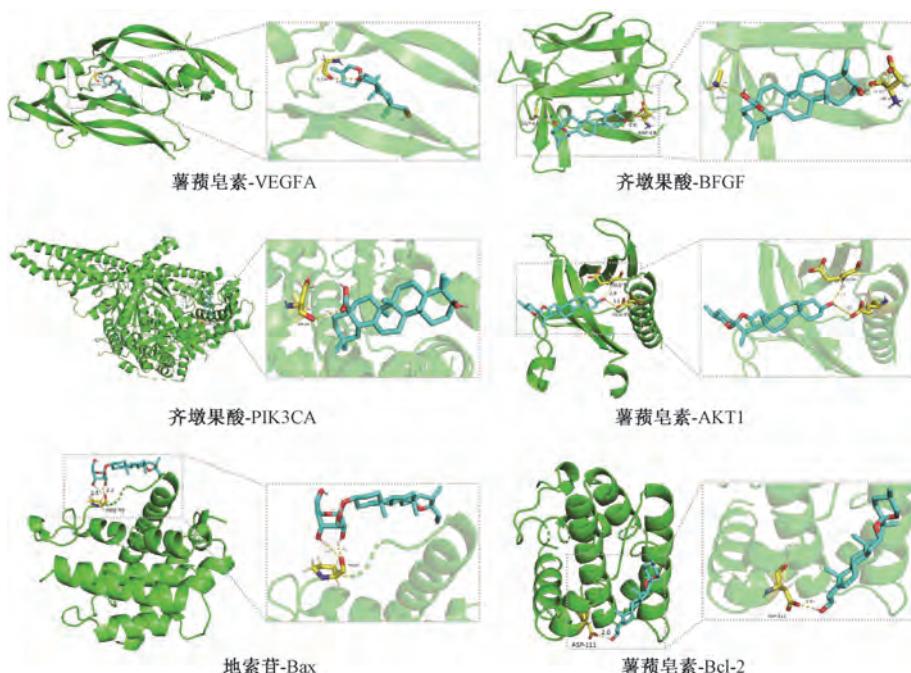
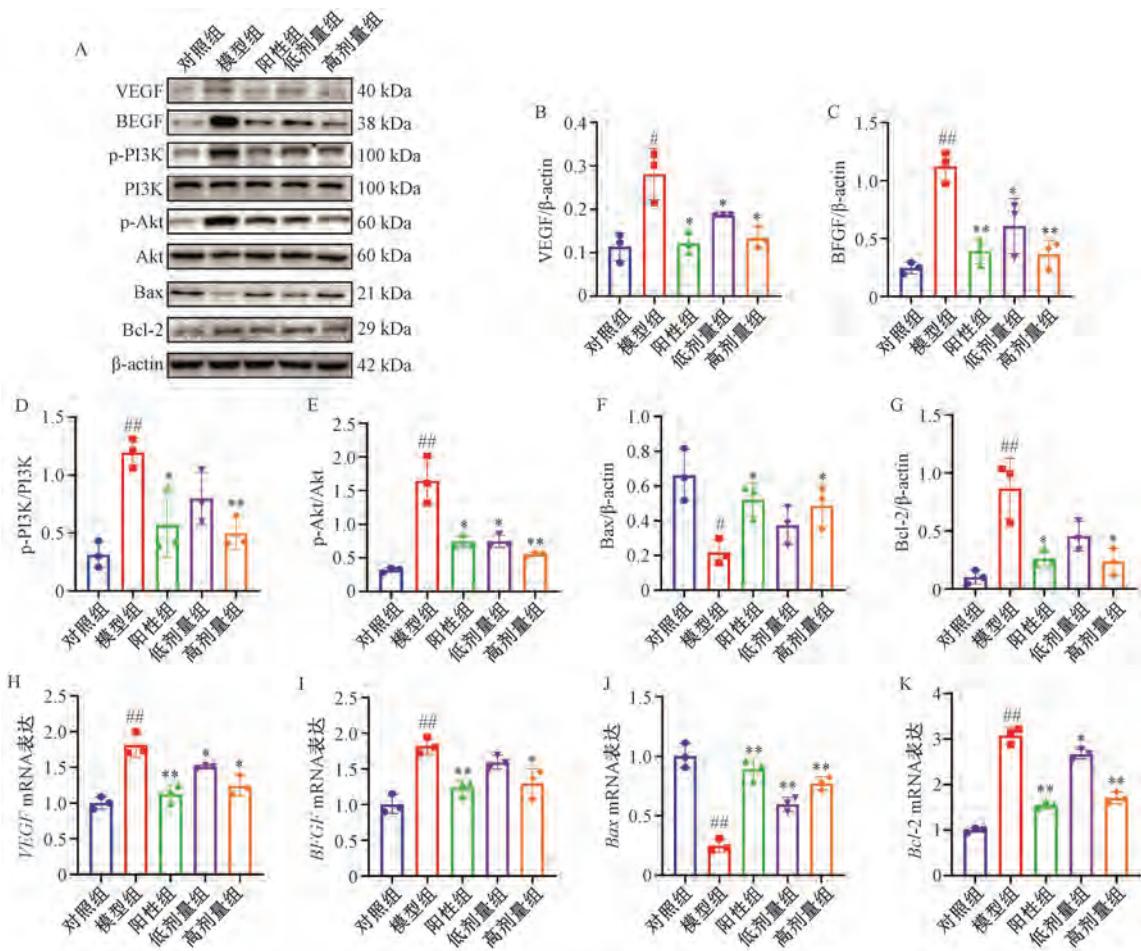


图8 核心靶点分子对接验证



注：A 为前列腺组织 VEGF、BFGF、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、Bax、Bcl-2 蛋白条带，B~G 分别为前列腺组织 VEGF、BFGF、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Bax、Bcl-2 蛋白表达，H~K 分别为前列腺组织 VEGF、BFGF、Bax、Bcl-2 mRNA 表达。与对照组比较，[#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

图9 化铁丸对BPH大鼠前列腺组织VEGF、PI3K/Akt通路及凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

激素水平紊乱是BPH的关键诱因之一^[22]，T是男性最主要的雄激素，其在5α-还原酶(SRD5A)的作用下会转化为DHT，进而促进前列腺腺体的生长发育^[23-24]。 E_2 是男性最常见的雌激素，当T水平升高时机体会调节其产生以维持内分泌平衡，参与多种生物过程，故抑制其水平升高有利于减轻BPH的发展^[17]。此外，随着年龄的增长男性体内雄激素水平下降，而雌激素水平保持不变或低程度下降， E_2/T 比值升高，导致BPH^[25]。本研究发现，化铁丸干预可逆转BPH大鼠血清T、 E_2 、 E_2/T 、DHT水平升高，提示它可影响内分泌系统，从而调节激素水平紊乱治疗BPH。同时，性激素若想要发挥作用必须与其相应受体结合，例如DHT需与AR结合形成复合物后进入细胞核并作用于下游靶点PSA^[17,26]，进而刺激BPH发生发展。有研究表明， E_2 与ER α 结合可促进前列腺基质细胞的增殖，而与ER β 结合则相反^[17,20]；本研究显示，化铁丸可下调BPH大鼠前列腺中SRD5A2、AR、PSA、ER α 表达并上调ER β 表达，提示它能减少BPH过程中T向DHT的转化，并通过调控雌雄激素受体来抑制BPH。

性激素在BPH发生中起重要作用，但都是间接对前列腺细胞起作用，直接刺激前列腺细胞增生的是肽类生长因子，如BFGF高表达会刺激前列腺基质细胞生长^[27]，VEGF是刺激前列腺内皮细胞和上皮细胞最有效的有丝分裂因子之一^[28]，且生长因子下游可通过PI3K/Akt通路促进细胞增殖^[29]。细胞凋亡与BPH之间存在密切的关系，其中抗凋亡蛋白Bcl-2和促凋亡蛋白Bax是决定细胞凋亡的关键靶点^[30]，也是PI3K/Akt通路的下游靶标。网络药理学与分子对接结果显示，化铁丸可能影响VEGF、BFGF表达并通过激活PI3K/Akt通路促进细胞凋亡来抑制BPH，验证试验进一步证实了该结论。

综上所述，化铁丸可调节性激素水平，影响性激素受体，同时可下调VEGF、BFGF表达来介导PI3K/Akt通路促进BPH细胞凋亡，抑制BPH，并且是通过多成分、多靶点和多通路来治疗本病，为其药理机制研究提供了一定参考。

参考文献：

- [1] 中华医学会男科学分会，良性前列腺增生诊疗及健康管理指南编写组. 良性前列腺增生诊疗及健康管理指南[J].

- 中华男科学杂志, 2022, 28(4): 356-365.
- [2] 赵琦, 李海松, 王继升, 等. 中医药治疗良性前列腺增生临床研究评述 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(2): 236-241.
- [3] 孙自学, 宋春生, 邢俊平, 等. 良性前列腺增生中西医结合诊疗指南 (试行版) [J]. 中华男科学杂志, 2017, 23(3): 280-285.
- [4] GBD 2019 Benign Prostatic Hyperplasia Collaborators. The global, regional, and national burden of benign prostatic hyperplasia in 204 countries and territories from 2000 to 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet Healthy Longev*, 2022, 3(11): e754-e776.
- [5] Garcia-Argibay M, Hirosaki A, Fall K, et al. Association of 5 α -reductase inhibitors with dementia, depression, and suicide [J]. *JAMA Netw Open*, 2022, 5(12): e2248135.
- [6] Nguyen D D, Marchese M, Cone E B, et al. Investigation of suicidality and psychological adverse events in patients treated with finasteride [J]. *JAMA Dermatol*, 2021, 157(1): 35-42.
- [7] Wilt T J, Macdonald R, Rutks I. WITHDRAWN: Tamsulosin for benign prostatic hyperplasia [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011(9): CD002081.
- [8] 曹琳, 冉峥, 侯强, 等. 化铁丸化学成分分析及其防治乳腺增生的潜在机制预测 [J]. 中国药物警戒, 2023, 20(10): 1113-1120.
- [9] 吕选民, 常钰曼. 柴草瓜果篇第五十七讲 楮实子 [J]. 中国乡村医药, 2020, 27(7): 57-58.
- [10] 邹海宽, 王新新, 谢轶哲. 化铁丹治疗良性前列腺增生经验 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2016, 14(4): 125-126.
- [11] Liu Y, Yang X, Gan J, et al. CB-Dock2: improved protein-ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W159-W164.
- [12] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 前列腺增生动物模型制备规范 (草案) [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(19): 15-19.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [14] 徐坤元, 苟筱雯, 刘文科. 威灵仙的临床应用及其用量探究 [J]. 长春中医药大学学报, 2020, 36(5): 875-877.
- [15] 彭坚. 加减化铁丸临床运用举隅 [J]. 湖南中医杂志, 2000, 16(2): 51-52.
- [16] 陆小鸿. “滋阴补肾” 楮实子 [J]. 广西林业, 2016(1): 25-26.
- [17] Tao R, Liu E, Zhao X, et al. Combination of *Ligustrum Lucidum Fructus* with *Ecliptae Herba* and their phytoestrogen or phytoandrogen like active pharmaceutical ingredients alleviate oestrogen/testosterone-induced benign prostatic hyperplasia through regulating steroid 5 α -reductase [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154169.
- [18] 王金行, 王月, 刘柏新, 等. 血清 PSA、FPSA/TPSA 与 ACP 联合检测对前列腺癌诊断的意义 [J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(5): 999-1001.
- [19] Cheon S Y, Jin B R, Kim H J, et al. Oleanolic acid ameliorates benign prostatic hyperplasia by regulating PCNA-dependent cell cycle progression *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(4): 1183-1189.
- [20] Tao R, Miao L, Yu X, et al. *Cynomorium songaricum* Rupr demonstrates phytoestrogenic or phytoandrogenic like activities that attenuates benign prostatic hyperplasia via regulating steroid 5 α -reductase [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 235: 65-74.
- [21] 郭欣欣. 油菜蜂花粉抗前列腺增生的机制及其临床研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2019.
- [22] Gong G Y, Xi S Y, Li C C, et al. Bushen Tongluo formula ameliorated testosterone propionate-induced benign prostatic hyperplasia in rats [J]. *Phytomedicine*, 2023, 120: 155048.
- [23] Chang W H, Tsai Y S, Wang J Y, et al. Sex hormones and oxidative stress mediated phthalate-induced effects in prostatic enlargement [J]. *Environ Int*, 2019, 126: 184-192.
- [24] Jin B R, Lim C Y, Kim H J, et al. Antioxidant mitoquinone suppresses benign prostatic hyperplasia by regulating the AR-NLRP3 pathway [J]. *Redox Biol*, 2023, 65: 102816.
- [25] 左艇, 田硕, 郭琳, 等. 金花葵花总黄酮对小鼠前列腺增生模型的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(9): 4154-4158.
- [26] 叶兴龙, 赵丽晶, 王丽娜, 等. 葛根异黄酮对大鼠前列腺增生的抑制作用 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53(24): 2074-2078.
- [27] Boget S, Cereser C, Parvaz P, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) is over-expressed in benign prostatic hyperplasia whereas FGFR2-IIIc and FGFR3 are not [J]. *Eur J Endocrinol*, 2001, 145(3): 303-310.
- [28] 李卓, 莫介荣, 叶木石, 等. 氨氯地平对去势大鼠前列腺增生的影响及其机制 [J]. 实用医学杂志, 2021, 37(11): 1409-1413.
- [29] Sun S, Gong F, Liu P, et al. Metformin combined with quercetin synergistically repressed prostate cancer cells via inhibition of VEGF/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Gene*, 2018, 664: 50-57.
- [30] Lee J Y, Kim S, Kim S, et al. Effects of red ginseng oil (KGC110) on testosterone-propionate-induced benign prostatic hyperplasia [J]. *J Ginseng Res*, 2022, 46(3): 473-480.