

· 临床研究 ·

# 基于网络药理学和分子对接探讨自拟排石汤治疗泌尿系结石的作用机制研究

赵子龙, 杨 夏, 高柏青\*

(内蒙古包头医院 药学部, 内蒙古 包头 014010)

**摘要:**目的:采用“药材-成分-靶点-通路”关联网络分析方法探索我院自拟排石汤治疗泌尿系统结石的作用机制。方法:基于中药分子机制的生物信息学分析工具平台(BATMAN)数据库检索排石汤的9味药材(金钱草、海金沙、王不留行、益母草、郁金、车前子、丹参、怀膝、生甘草)化学成分和作用靶点;查询 Gennecards、DisGenet 数据库泌尿系结石的相关靶点;筛选排石汤和泌尿系结石的交集靶点并寻找蛋白互作网络;在 cytoscape 中筛选蛋白互作网络的核心靶点,对核心靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析以探寻排石汤治疗泌尿系统的潜在机制。结果:以 Score cutoff >39 且 P < 0.05 作为筛选条件,筛选排石汤 124 个活性成分和 571 个靶点,与泌尿系统结石相关的靶点 140 个,包括 27 个核心靶点,例如 PTGS2, PDE5A, GSTP1, NQO1, PTGS2, F2, TNF 等,此外,丹参酮 VI,  $\gamma$ -谷固醇,甘草次酸,亚油酸,亚麻酸等为核心化合物。GO 富集得出 869 条结果,其中生物过程 790 条,包括多细胞生物过程的调控,对含氧化合物的反应,细胞外空间等;细胞组成 18 条,包括内膜系统,细胞外泌体,高尔基内腔等;分子功能 61 条,例如抗氧化活性,分子功能调节因子,核受体活性等。KEGG 通路富集得相关通路 103 条,结果显示排石汤可显著调节 TNF 信号通路(TNF signaling pathway),破骨细胞分化(osteoclast differentiation),肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system),Toll 样受体信号通路(toll-like receptor signaling pathway)等多条通路发挥治疗作用。分子对接验证结果显示排石汤的脂肪酸类化合物与核心靶点的残基可以自由结合。结论:通过网络药理学初步探讨了排石汤多成分、多靶点、整体调节的作用特点,预测了排石汤可能通过抗炎和抗氧化应激等方面治疗泌尿系结石,本研究为排石汤的活性成分生物学机制研究提供理论依据。

**关键词:**排石汤;泌尿系统结石;网络药理学;靶点通路;作用机制

**中图分类号:** R966

**文献标识码:** B

**文章编号:** 2095-512X(2021)02-0160-05

泌尿系结石是泌尿外科最外常见的疾病之一,其发病原因与生活环境和饮食习惯密切相关,发病机制并未明确且研究数量不多,患者出现症状可见绞痛和放射性疼痛,如何做好泌尿系结石的防治工作已成为医疗界和全社会关注的问题<sup>[1]</sup>。泌尿系统结石在中医领域属“淋证”范畴<sup>[2]</sup>。外感湿热或秽浊之邪,或者嗜食肥甘厚腻,或者嗜酒,均能够导致湿热内生,蕴积于内湿热流注下焦,则尿液倍受热灼煎熬,久而久之则诱发石淋之病。或者热灼伤血络,迫血妄行导致血液外溢,继而发生血淋。根据此病的发病机理,治疗结石的药物应该具有以下三个要素:一为利尿通淋,促进尿液排出量的增加,促使体内产生自排压力。二为清热泻火,尽早治疗泌尿系炎症,减轻炎症导致的水肿及感染。三为行气

活血,解除输尿管平滑肌和括约肌痉挛。三要素结合,能够促使结石顺利排出体内。

将传统中医辨证施治理论作为基础,针对泌尿系结石的病因病机,本院自制协定处方一排石汤,其组方按君,臣,佐,使的配伍原则,依据治疗结石三要素精选药物进行配制而成。我院自拟的排石汤用于治疗泌尿系结石具有较好的疗效,方中由金钱草、海金沙、王不留行、益母草、郁金、车前子、丹参、怀膝、生甘草 9 味药材组成。君药金钱草味苦,酸,微寒。归肝,胆,肾,膀胱经,功能清热解毒,利尿排石,活血散淤。臣药海金沙性下降,善清小肠、膀胱湿热,功专利尿通淋止痛,尤善止尿道疼痛,为治诸淋涩痛之要药。臣药王不留行具有利尿通淋功效,益母草具有利尿消肿,清热解毒之功效<sup>[3]</sup>。此

收稿日期: 2020-09-29; 修回日期: 2021-01-03

基金项目: 包头市科技计划项目(2018C2007-3-12)

作者简介: 赵子龙(1985-),男,内蒙古包头医院药学部主管药师。

通讯作者: 杨夏,主任药师,E-mail:304348407@qq.com 内蒙古包头医院药学部,014010

外,佐药郁金、车前子、丹参、怀膝、生甘草等几味药材也都具有不同程度的利尿作用<sup>[4,5]</sup>。网络药理学研究策略广泛应用于中医药的相关研究,其整合生物电子信息数据库数据对中药复杂成分的作用靶点和代谢途径进行分析和预测,利用网络药理学方法在一定程度上可以节约时间、降低新药研发成本并提高成功率。本研究采用网络药理学和分子对接方法探索排石汤治疗泌尿系结石的作用机制,为后续的新药开发及其机制验证提供理论支撑。

## 1 方法

### 1.1 排石汤的化学成分和作用靶点的检索

使用中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN)(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)检索排石汤的9味组成药材(金钱草、海金沙、王不留行、益母草、郁金、车前子、丹参、怀膝、生甘草)的成分和作用靶点,筛选 Score cutoff >39 且  $P < 0.05$  的活性成分并进行调控靶点的整理。

### 1.2 泌尿系结石疾病靶点的检索

以“Urolithiasis”为关键词在 Genecards(<https://www.genecards.org/>)及 DisGeNET(<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu/home>)数据库搜索泌尿系结石的相关靶点。

### 1.3 筛选交集靶点和核心靶点

将排石汤的活性成分作用靶点与泌尿系结石疾病相关靶点进行交集靶点的可视化分析,并将靶点数据上传至 String 数据库(<https://string-db.org/>)中构建 PPI (protein-protein interaction) 网络。利用 Cytoscape 软件(<http://www.cytoscape.org/>)计算 PPI 相关网络参数,以网络中节点间隔度和自由度等参数大于均值为条件筛选核心靶点<sup>[6]</sup>。

### 1.4 GO 和 KEGG 功能富集分析

将核心靶点上传至 String 数据库进行 GO (Gene Ontology) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 的富集分析,物种设定为人,基因名称为官方名称(official gene symbol),显著性  $P < 0.05$ ,最后对分析结果进行可视化。

### 1.5 分子对接

为进一步验证活性成分与蛋白靶点之间的结合活性,应用 Autodock 对“成分-靶点”作用网络中自由度显著的成分进行相关靶点的分子动力学模拟,PyMol 可视化化合物与对应靶点蛋白的结合模式。在 PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

中检索蛋白靶点并获得 .pdb 文件,应用 ChemDraw 构建小分子 .mol 结构文件。对小分子和蛋白进行删除配体分子和水分子、不完整残基、多余蛋白质构象,并加氢和分配相关电荷等操作后进行半柔性对接分析。结合能小于 0kcal/mol 表示可以自由结合<sup>[6]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 排石汤活性化合物和靶点的整理

共检索符合条件的活性成分 124 个,包括来自车前子的黄芩苷,来自丹参的丹参酮,来自甘草的甘草次酸等活性成分。对所有活性成分和作用靶点构建“药材-成分-靶点”作用网络(见图 1),黄色节点代表药材,粉色节点代表活性成分,青色节点代表活性成分作用的靶点。

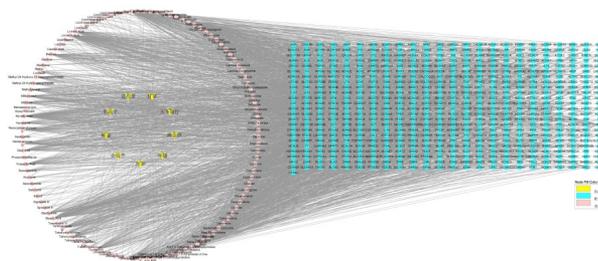


图1 药材-成分-靶点作用网络

### 2.2 筛选交集靶点和核心靶点

整合 Genecards、DisGeNET 数据库搜集的泌尿系结石相关靶点,筛选泌尿系结石与复方的共有靶点 140 个。将共有靶点上传至 String 进行 PPI 分析,组织 (Organism) 设置为“Homo sapiens”。共有 140 个节点,998 条边,平均节点度值为 14.3,预期的边数:313,PPI 富集  $p\text{-value} < 1.0e-16$ ,网络节点代表着各个靶点,线条代表着靶点之间的联系(见图 2)。

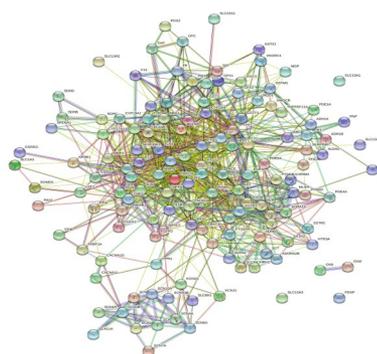


图2 交集靶点的蛋白互作网络

利用 cytoscape 计算 String 中 PPI 的网络参数,以“间隔度”“自由度”值大于均值(175.18, 14.57)为条

件筛选出 27 个核心靶点,包括肿瘤坏死因子(TNF),前列腺素内过氧化物合成酶 2(PTGS2),血管紧张素转化酶(ACE),立早基因(JUN),白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (PPARG)等靶点。

### 2.3 GO和KEGG富集分析

将 27 个核心靶点上传至 String 进行 GO 和 KEGG 富集分析,筛选  $P < 0.05$  的分析结果,GO 富集得出 869 条结果,其中生物过程(BP)790 条,包括脂质代谢过程的正调控、对内源性刺激的反应、对激素的反应、多细胞生物过程的调控等;细胞组成(CC)18 条,包括细胞外空间、细胞外区域、细胞质、内质网腔等;分子功能(MF)61 条,包括信号受体结合、蛋白质结合、受体配体活性、抗氧化活性等。其中 GO 各条目显著性前 10 的分析结果(见图 3)。

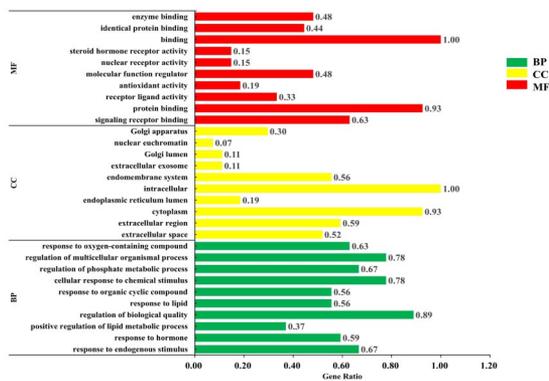


图 3 GO 富集分析结果

KEGG 通路富集相关通路 103 条,此部分列举了显著性前 20 的条目(见图 4)。由图 4 可以看出复方可能作用于 TNF 信号通路(TNF signaling pathway),破骨细胞分化(osteoclast differentiation),肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system),Toll 样受体信号通路(toll-like receptor signaling pathway)等多条通路治疗泌尿系结石。

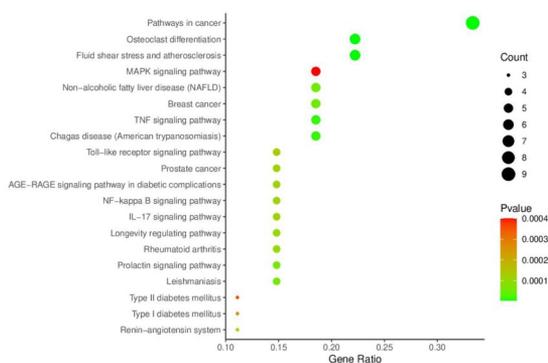


图 4 KEGG 富集分析结果

### 2.4 核心成分-靶点的结合模式

整理“成分-靶点”作用网络中自由度 TOP5 的活性成分,借助分子对接技术对活性成分最相关的靶点 AR(2PIU)和 TNF(10QE)进行半柔性对接以探索它们互作的模式,最后进行分析结果可视化(见图 5)。核心成分中不饱和和脂肪酸类化合物的网络参数自由度较高,它们多数作用于核心靶点 AR 和 TNF。分子动力学模拟结果显示 Hexadecylic Acid、Lauric Acid、Myristic Acid 和 Stearic Acid 与 AR 残基 ARG 结合较好, Linolenic Acid 与 TNF 的 HIS16 可以形成氢键,所有成分与对应的靶点结合能小于 0,都可以自由结合,它们可能在排石汤治疗泌尿系结石的生物学机制中发挥重要的作用。

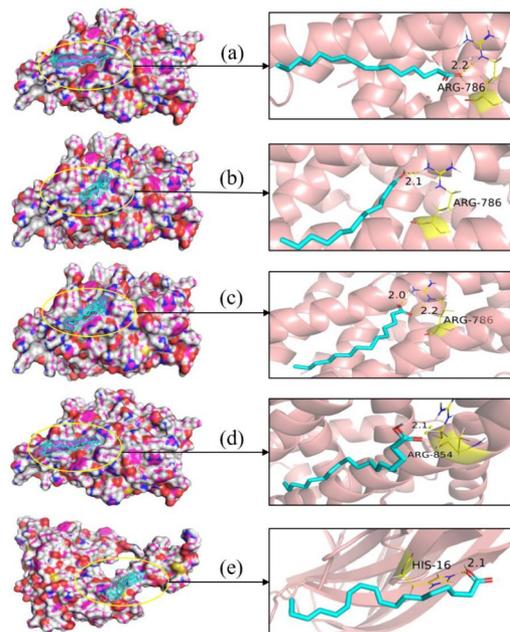


图 5 T05 核心成分与相关靶点的结合模式

(a): 十六酸;(b): 月桂酸;(c): 肉豆蔻酸;  
(d): 硬脂酸;(e): 亚麻酸

## 3 讨论

泌尿系结石为泌尿系统常见疾病,可发生于肾、输尿管、膀胱及尿道等任意部位,结石长到 5mm 以上,可能会导致输尿管阻塞,导致下背部或腹部严重疼痛,结石还可能导致尿血,呕吐或排尿疼痛,大约有一半患有肾结石的人将在十年内再患结石。许多危险因素影响泌尿系结石的发生发展,饮食是重要因素之一,饮食中动物蛋白,钠,糖的高摄入量,以及过多摄入果汁可能会由于尿酸排泄量增加而增加泌尿系结石形成的风险。目前,关于泌尿

系结石的生物学机制研究较少,洞悉其生物学机制有利于尽早实现精准治疗。中医药秉持整体观念和辨证论治的诊治原则在疾病的预防、治疗和保健方面发挥着重要的作用。此外,中药及其天然产物是新药发现的重要途径和有力工具,较为经典的抗疟药青蒿素,抗白血病药物三氧化二砷,抗癌药物紫杉醇都挖掘自中药和天然产物。我院自制的排石汤由9种具备清热解暑,利尿排石功效的药材组成,在治疗泌尿系结石方面具有很好的疗效。

本研究借助网络药理学的方法预测了排石汤的潜在靶点和相关通路,为后续排石汤的生物学机制和治疗泌尿系结石的先导化合物的开发提供支撑。通过网络药理学的相关参数计算,发现了排石汤排石汤中的薄荷酮,油酸,亚油酸,亚麻酸,硬脂酸,没食子酸,姜黄素,异三叶素,丹参酮和丹参酚等核心化合物(见图1)通过调控肿瘤坏死因子(TNF),前列腺素内过氧化物合成酶2(PTGS2),血管紧张素转化酶(ACE),立早基因(JUN),白细胞介素 $1\beta$ (IL-1B),过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPARG)等27个核心靶点发挥治疗泌尿系结石的作用,它们共同调节了TNF信号通路(TNF signaling pathway),破骨细胞分化(osteoclast differentiation),肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system),Toll样受体信号通路(toll-like receptor signaling pathway)等多条通路(见图4),它们是排石汤治疗泌尿系结石的潜在作用机制。

据报道,晶胞相互作用是尿结石形成中最关键的步骤之一,高草酸尿症诱导的肾小管上皮细胞凋亡变化是这种相互作用的终点,重要的是TNF转导途径可以促进肾小管细胞凋亡这一进程。草酸钙是大多数尿结石的主要成分,高草酸尿症是特发性肾结石的主要危险因素之一,肾小管细胞在高水平的草酸盐或草酸钙晶体状态下受到明显损伤,这与氧化应激的发展和活性氧(ROS)的过量生产有关,细胞内ROS主要由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶和线粒体产生,并参与多种信号传导途径。在暴露于高水平的草酸盐或草酸钙晶体期间,NADPH氧化酶已成为受体介导的ROS产生的主要来源。NADPH氧化酶的激活增加了ROS的生成,而ROS可以调节几种与石头有关的大分子的表达,从而促进肾结石的形成<sup>[7-9]</sup>。肾素-血管紧张素系统可能在高草酸尿大鼠的肾脏结晶和ROS产生中起重要作用<sup>[10-12]</sup>。本研究的KEGG富集分析结果显示排石汤可以作用上述关键通路,它们可能是

重要的治疗途径。此外,一项以大鼠为研究对象的Toll样受体在肾结石引起的继发性炎症反应的结果显示受体的亚型发生变化,可能是泌尿系结石的标识受体<sup>[13]</sup>。而本研究的结果显示排石汤可作用这一受体发挥药理活性。另外,本研究的代谢通路富集分析结果显示泌尿系结石的发生发展可能与典型的NF- $\kappa$ B信号通路和MAPK信号通路相关,其中IL1B,PTGS2,TNFSF11,TNF参与了NF- $\kappa$ B信号通路,IL1B,FGF2,JUN,INS,TNF参与了MAPK信号通路,Yusuf Ozlem Ilbey<sup>[14]</sup>等人通过大鼠实验发现上述两种经典的信号通路可以诱导大鼠肾脏氧化应激和结石形成,因为p38-MAPK和NF- $\kappa$ B途径在多种肾脏炎性疾病实验模型中被激活,包括抗肾小球基底膜肾炎,输尿管阻塞,内毒素血症和免疫性复杂性肾炎。此外,作为MAPK的同工酶,p38-MAPK直接影响胶原蛋白的表达参与了动脉粥样硬化的发作,草酸钙结石形成过程中,p38 MAPK信号通路介导了上皮细胞紧密连接的破坏,p38 MAPK信号通路相关蛋白的表达水平上调<sup>[15]</sup>。重要的是,自拟排石汤的网络药理学预测显示可以调节NF- $\kappa$ B信号通路和MAPK信号通路,可能通过调节氧化应激反应治疗泌尿系结石。应用分子对接的策略对排石汤的关键成分和作用靶点的进行了验证(见图5),结果发现脂肪酸类化学成分与AR和TNF的残基可以自由结合,排石汤可能与它们作用产生治疗作用。本研究应用网络药理学和分子对接技术预测我院自拟排石汤治疗泌尿系结石的分子机制,自拟排石汤通过调节TNF,PTGS2,JUN,IL-1B,AR等核心靶点,肾素血管紧张素系统,Toll样受体信号通路,TNF信号通路,NF- $\kappa$ B和MAPK等核心通路治疗泌尿系结石。由于数据库的选择以及更新的差异,研究结果可能存在不足,更多的机制需要后续的生物学实验的设计和验证。

#### 4 展望

综上所述,应用网络药理学和分子对接分析方法发现了排石汤治疗泌尿系结石的潜在分子机制,多靶点-多途径的治疗特点与中医药治疗疾病的整体观念不谋而合,排石汤通过调控与炎症反应和氧化应激密切相关的靶点和通路发挥治疗作用。中医药对于医药健康领域一个伟大的宝库,需要更好的开发和利用,相信借助现代分析技术使得更多人们科学认知中医药,受益于中医药。

## 参考文献

- [1]于敏,白玛嘎金,洛松曲措,等.西藏自治区八宿县常驻居民泌尿系结石的流行病学调查及影响因素分析[J].临床肾脏病杂志, 2020;20(10):797-802
- [2]翁湘涛,王树声,古焱明,等.基于数据挖掘方法总结王树声教授治疗上尿路结石的用药经验[J].中国中西医结合外科杂志, 2020;26(05):991-996
- [3]毛鑫,徐玉辉,姚荣妹,等.王不留行治疗尿路感染有效部位筛选及其对膀胱IL-1 $\beta$ 的影响[J].世界中医药, 2020;15(20):3031-3034+3039
- [4]李博雯,王莹,祖禄,等.郁金及其3种功效成分对朱砂致大鼠肝毒性的保护作用[J].毒理学杂志, 2020;34(04):311-314
- [5]蒋鹏,高宏君,梁泰生,等.基于网络药理学探究车前子治疗慢性前列腺炎的作用机制研究[J].大众科技, 2020;22(08):50-55
- [6]商志浩,潘成镇,马月辉,等.基于网络药理学联合分子对接对逍遥散干预原发性肝癌的作用机制研究[J].天然产物研究与开发, 2020;32(08):1302-1315
- [7]Zhang J, Wang Q, Xu C, et al. MitoTEMPO Prevents Oxalate Induced Injury in NRK-52E Cells via Inhibiting Mitochondrial Dysfunction and Modulating Oxidative Stress[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017;2017:7528090
- [8]Sedeek M, Nasrallah R, Touyz R M, et al. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe[J]. J Am Soc Nephrol, 2013;24(10):1512-1518
- [9]Chen M F, Liou S S, Kao S T, et al. Erianin protects against high glucose-induced oxidative injury in renal tubular epithelial cells[J]. Food Chem Toxicol, 2019;126:97-105
- [10]Tsuji H, Wang W, Sunil J, et al. Involvement of renin-angiotensin-aldosterone system in calcium oxalate crystal induced activation of NADPH oxidase and renal cell injury[J]. World J Urol, 2016;34(1):89-95
- [11]Qin B, Wang Q, Lu Y, et al. Losartan Ameliorates Calcium Oxalate-Induced Elevation of Stone-Related Proteins in Renal Tubular Cells by Inhibiting NADPH Oxidase and Oxidative Stress[J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2018;2018:1271864-1271864
- [12]Kang J, Sun Y, Deng Y, et al. Autophagy-endoplasmic reticulum stress inhibition mechanism of superoxide dismutase in the formation of calcium oxalate kidney stones[J]. Biomed Pharmacother, 2020;121:109649
- [13]Olcucu M T, Teke K, Yalcin S, et al. Characterizing the Association Between Toll-like Receptor Subtypes and Nephrolithiasis With Renal Inflammation in an Animal Model[J]. Urology, 2018;111:238
- [14]Ilbey Y O, Ozbek E, Simsek A, et al. Effects of pomegranate juice on hyperoxaluria-induced oxidative stress in the rat kidneys[J]. Ren Fail, 2009;31(6):522-531
- [15]Qi S, Wang Q, Xie B, et al. P38 MAPK signaling pathway mediates COM crystal-induced crystal adhesion change in rat renal tubular epithelial cells[J]. Urolithiasis, 2020;48(5):1-10

(上接第131页)

因为功能关系中的潜在异常不仅存在于DMN内部,也存在于DMN与其他相关神经系统紊乱(如任务控制)之间。为了更全面地解决这个问题,未来的研究需要更全面的多脑区或网络之间的关系研究探讨。

## 参考文献

- [1]Raichle ME, MacLeod AM, Snyder AZ, et al. A default mode of brain function. Proc Natl Acad Sci USA, 2001;98:676-682
- [2]Anticevic A, Hu S, Zhang S, et al. Global resting-state functional magnetic resonance imaging analysis identifies frontal cortex, striatal, and cerebellar dysconnectivity in obsessive-compulsive disorder. Biol Psychiatry, 2014;75:595-605
- [3]谢生辉,牛广明,高阳,等.首发抑郁症脑局部一致性静息态MRI对比研究[J].磁共振成像, 2015;000(001):10-14
- [4]Chi, K. F., Korgaonkar, M., Grieve, S.M. Imaging predictors of remission to anti-depressant medications in major depressive disorder. Journal of Affective Disorders, 2015;186:134-144
- [5]Dutta, A., McKie, S., Deakin, J. F. Resting state networks in major depressive disorder. Psychiatry Research:Neuroimaging, 2014;224(3):139-151
- [6]Mulders, P. C., van Eijndhoven, P. F., Schene, et al. Resting-state functional connectivity in major depressive disorder: a review. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2015;56:330-344
- [7]姚志剑,王丽,卢青,等.抑郁症静息态默认状态网络内功能连接的初步探讨[J].中国神经精神疾病杂志, 2008;34(5):278-281
- [8]Peng, D., Liddle, E. B., Iwabuchi, S. J., et al. Dissociated large-scale functional connectivity networks of the precuneus in medication-naive first-episode depression. Psychiatry Research: Neuroimaging, 2015;232(3):250-256
- [9]Zou K, Gao Q, Long Z, et al. Abnormal functional connectivity density in first-episode, drug-naive adult patients with major depressive disorder. Journal of Affective Disorders, 2016;194:153-158
- [10]Wang L, Dai Z, Peng H, et al. Overlapping and segregated resting-state functional connectivity in patients with major depressive disorder with and without childhood neglect. Hum Brain Mapp, 2014;35:1154-1166
- [11]Kaiser RH, Andrews-Hanna JR, Wager TD, et al. Large-scale network dysfunction in major depressive disorder: A meta-analysis of resting-state functional connectivity. JAMA Psychiatry, 2015;72:603-611