

# 基于网络药理学探讨黄柏-王不留行药对治疗慢性非细菌性前列腺炎大鼠的作用机制

党静静<sup>1</sup>, 于文涛<sup>1</sup>, 莫小萱<sup>1</sup>, 刘兴超<sup>1,2,3</sup>, 邓国兴<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>河北中医药大学, 石家庄 050200; <sup>2</sup>河北省中药组方制剂技术创新中心; <sup>3</sup>河北省高校中药开发与产业化应用技术研发中心, 石家庄 050091

**摘要:** 探讨黄柏-王不留行 (Phellodendri Chinensis Cortex-Vaccariae Semen, PCC-VS) 对慢性非细菌性前列腺炎 (chronic non-bacterial prostatitis, CNP) 炎性损伤的保护作用。本研究使用 TCMSP 及文献检索的方式筛选黄柏-王不留行中药有效成分 41 个、对应靶点蛋白 156 个; 利用 OMIM、GeneCards 数据库筛选出 9 848 个与 CNP 疾病靶点; 使用 Cytoscape、String 软件构建蛋白靶点网络互作图 (protein-protein interaction network, PPI) 及药物-有效成分-疾病靶点-通路, PPI 结果主要涉及白细胞介素-6 (interleukin -6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumour necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 beta, IL1 $\beta$ )、肿瘤蛋白 p53 (tumor protein-53, TP53)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT1) 等关键蛋白; 使用 Metascape 对核心靶点蛋白基因进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析; KEGG 富集通路主要涉及磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B, PI3K-AKT)、脂质与动脉粥样硬化、前列腺癌、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等信号通路; 并将药物有效成分与核心靶点进行分子对接; 为了验证以上数据, 动物实验检测大鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18)、TNF- $\alpha$  含量变化、对前列腺组织进行 HE 染色观察组织病理结构改变、蛋白免疫印迹 (Western blot) 检测药物与疾病相关的核心靶点蛋白 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及筛选出通路上相关蛋白表达。动物实验发现各给药组对炎症因子的调控及炎症相关蛋白的表达有抑制作用。研究结果表明黄柏-王不留行通过多成分多靶点途径, 改善慢性非细菌性前列腺炎症状可能与调控 PI3K-AKT 信号通路有关。

**关键词:** 网络药理学; 药对; 慢性非细菌性前列腺炎; 黄柏; 王不留行; PI3K-AKT 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标识码: A

## Mechanism of Phellodendri Chinensis Cortex-Vaccariae Semen in the treatment of chronic non-bacterial prostatitis in rats based on network pharmacology

DANG Jing-jing<sup>1</sup>, YU Wen-tao<sup>1</sup>,

MO Xiao-xuan<sup>1</sup>, LIU Xing-chao<sup>1,2,3</sup>, DENG Guo-xing<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; <sup>2</sup>Hebei Technology Innovation Center of TCM Formula

Preparations; <sup>3</sup> Hebei University Traditional Chinese Medicine Development and Industrial Application Technology

Research and Development Center, Shijiazhuang 050091, China

**Abstract:** To investigate the protective effect of *Phellodendri Chinensis Cortex-Vaccariae Semen* (PCC-VS) on inflammatory injury of chronic non-bacterial prostatitis (CNP). In this study, 41 active ingredients and 156 corresponding target proteins were screened by TCMS and literature search. OMIM and GeneCards databases were used to screen out 9 848 disease targets related to CNP. Cytoscape and String software were used to construct protein target network interaction map and active ingredient-disease target-pathway. PPI results mainly involved key proteins such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), tumor protein-53 (TP53) and RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (AKT1). GO and KEGG pathway enrichment analysis were conducted using the Metascape database, enrichment of KEGG pathway involves PI3K-AKT, lipid and atherosclerosis, prostate cancer, MAPK signaling pathways; Molecular docking of active drug components and core targets was performed; In order to verify the above data, the serum levels of IL-1 $\beta$ , interleukin-18 (IL-18), TNF- $\alpha$  in rats were detected in animal experiments, The pathological changes of prostate tissue were observed by HE staining. The core target proteins IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and the related proteins in the screened pathway were detected by Western blot. Animal experiments showed that the regulation of inflammatory factors and the expression of inflammation-related proteins were inhibited in each treatment group. These results suggest that the PI3K-AKT signaling pathway may be involved in the improvement of CNP through multi-component and multi-target pathways.

**Key words:** network pharmacology; drug pair; chronic non-bacterial prostatitis; *Phellodendri Chinensis Cortex*; *Vaccariae Semen*; PI3K-AKT signaling pathway.

慢性非细菌性前列腺炎 (chronic non-bacterial prostatitis, CNP) 属于泌尿生殖系统疾病, 多见于中年男性患者。是一种以排尿异常、尿频、尿急、尿痛、排尿淋漓不尽为主要临床表现特征, 严重时会影响人的精神状况伴失眠、多梦、焦虑、抑郁等。在祖国医学中属于“精淋”“白浊”“癃闭”“淋浊”等范畴<sup>[1]</sup>。其病因主要为湿热瘀滞, 中医治法常以清热化湿活血调气为主。西医治疗常使用的药物包括 $\alpha$ 受体阻滞剂、抗生素、非甾体抗炎药等。目前, 由于对该病的病因尚不明确, 故缺乏对CNP的有效治疗。黄柏-王不留行两药配伍具有清热化湿、活血调气作用。黄柏 (*Phellodendri Chinensis Cortex*, PCC) 肾、膀胱经, 入下焦清湿热<sup>[2]</sup>, 《本草发挥》中对黄柏的记载为: “泻膀胱龙火一也, 利小便热结二也, 除下焦湿肿三也……”。现代药理学研究表明, 黄柏具有抗炎、抗菌、镇痛等药理

作用；黄柏中生物碱活性成分具有治疗前列腺增生作用<sup>[3]</sup>。王不留行（*Vaccariae Semen*, VS）入肝、肾经，具有活血通经，利尿消肿通淋功效<sup>[4]</sup>。现代药理表明王不留行醇提物<sup>[5]</sup>具有抗炎作用；王不留行多糖<sup>[6]</sup>具有缓解尿路感染导致的膀胱损伤。近年来中药药对被广泛应用于中药方剂配伍疗效和作用机制的研究<sup>[7-10]</sup>。因此本文利用网络药理学方法并通过动物实验对PCC-VS治疗CNP的分子机制进行全面的解析及加以验证，旨为药对PCC-VS的临床应用及实验研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

黄柏颗粒（神威药业集团有限公司，批号：21082272）；王不留行颗粒（神威药业集团有限公司，批号：230515P2）；角叉菜胶（美国 Sigma 公司，批号：C1013-100G）；白细胞介素-1 $\beta$ （interleukin-1 beta, IL-1 $\beta$ ）、白细胞介素-18（interleukin-18, IL-18）、肿瘤坏死因子- $\alpha$ （tumour Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ）试剂盒（生工生物工程股份有限公司，批号：D731007、D731079、D731168）；抗体 $\beta$ -actin（武汉赛维尔生物科技有限公司，批号：ZB15001-HRP-100）；白细胞介素-6（interleukin -6, IL-6）、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、磷脂酰肌 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K）、磷酸化磷酸肌醇 3-激酶（phosphorylated phosphoinositide 3-kinase, p-PI3K）、蛋白激酶 B（protein kinase B, PKB/AKT）、磷酸化 AKT 蛋白（phosphorylation protein kinase B, p-AKT）（江苏亲科生物研究中心有限公司，批号：DF6087、AF7014、AF4006、AF6241、AF3241、AF0836、AF8355）。

### 1.2 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只，约 180~200 g，由辽宁长生生物科技有限公司提供。动物生产许可证号：SCXK(辽)2020-0001，实验动物使用许可证：SYXK(冀)2017-0007。大鼠饲养在标准实验室条件下，温度为 25 $\pm$ 2  $^{\circ}$ C，相对湿度为(50 $\pm$ 15)%，12 h 的暗光循环，自由食水。动物设施和方案已通过河北中医药大学实验动物福利委员会审查批准实施，伦理审查批准号：DWLL202401001。

### 1.3 黄柏-王不留行化学成分靶点收集

以药物名称为关键词，通过 TCMSP 数据库和文献检索的方式进行检索，通过设置口服生物利用度（oral bioavailability, OB） $\geq$ 30、类药性（drug-likeness, DL） $\geq$ 0.18 筛选药物的有效成分及靶点蛋白名称，并将靶点蛋白名称导入 UniProt 数据库将物种限制为“Homo sapiens”，与 UniProt 数据库中标准名称对应获得相应的药物基因信息。

### 1.4 慢性前列腺炎疾病相关靶点收集

在 GeneCards 数据库、OMIM 数据库中以“Chronic Non-bacterial Prostatitis”为关键词进行检索，

对基因名称进行规范化处理，合并结果，删除没有 UniProt 标识符或重复的靶点，以获得全部的目标。通过 VENN2.1.0 获得药对黄柏-王不留行与疾病慢性非细菌性前列腺炎的共同靶点，即为药对黄柏-王不留行防治 CNP 疾病的潜在作用靶点。

### 1.5 蛋白质互作网络构建

将潜在靶点导入 STRING 数据库，选择“multiple proteins”模式，限定物种为“Homo sapiens”，选择置信度得分  $\text{score} \geq 0.7$ ，进行 PPI 分析，储存 PPI 相互作用结果信息。将文件导入 Cytoscape 3.10.1，进行拓扑分析。数值越大说明该节点越重要。选取度中心性（Degree）、接近中心性（Closeness）和中介中心性（Betweenness）高于平均值的目标被选为使用网络药理学研究的关键靶标。

### 1.6 GO 富集分析及 KEGG 通路富集

通过对靶点进行 GO，KEGG 富集分析，以研究药对黄柏-王不留行治疗 CNP 疾病所涉及的关键生物功能和信号通路。将目标靶点导入数据库 Metascape 平台，进行可视化处理。

### 1.7 网络构建与分析

数据利用 Cytoscape 3.9.1 软件可视化处理，构建网络如下：（1）构建黄柏-王不留行防治 CNP 潜在靶点的 PPI 网络，并分析网络的拓扑特性，筛选黄柏-王不留行防治 CNP 的核心成分与关键靶点；（2）“药物有效成分-疾病靶点-信号通路”网络。

### 1.8 分子对接

从 PDB 数据库下载目标蛋白的 3D 晶体结构。选择物种为“Homo sapiens”，分辨率设置区域 2A~3A，并从 PubChem 数据库下载关键化合物保存为 SDF 格式。利用 Auto DockTools 软件和 PyMol 2.5 进行分子对接可视化处理。

### 1.9 动物实验

#### 1.9.1 实验动物分组及模型制备

40 只大鼠随机分为 5 组，每组 8 只，分别为假手术组(Sham surgery,Sham)、模型组(Model,Mod)、黄柏-王不留行药对组(PCC-VS)、黄柏组(PCC)、王不留行组(VS)，依据课题组前期研究<sup>[11]</sup>，用药剂量选取高剂量作为研究，该剂量由体表面积等效剂量计算，故药对组给药剂量为 1.08 g/kg、黄柏组 0.54 g/kg、王不留行 0.54 g/kg。实验所需动物适应性饲养一周后，手术造模方式依据文献<sup>[12]</sup>，手术组用 3%浓度的戊巴比妥钠进行麻醉大鼠，将大鼠下腹部用剃毛器剔除备皮。在无菌条件下，对大鼠腹部进行消毒处理，下腹部正中开约 2 cm 的纵切口，找到膀胱，用 1 mL 无菌注射器将配好的 1%角叉菜胶溶液抽取注入前列腺左右腹叶中各 100  $\mu\text{L}$ 。假手术组则在前列腺左右腹叶中注射等

量生理盐水，术后对大鼠状态进行密切观察。造模成功标准依据文献<sup>[13]</sup>主要从解剖学观察、前列腺指数测定、组织病理学检测几个方面进行评估。

### 1.9.2 样本采集

大鼠灌胃四周结束后，使用3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后，股动脉取各组大鼠血清在4℃、2500 r/min条件下离心20 min后取上清，-80℃条件下储存备用。取前列腺组织用生理盐水清洗干净后使用滤纸吸干称重，在前列腺组织中央线部位使用刀片切割，左侧腹叶使用多聚甲醛固定，右侧腹叶放入冻存管中立即放入液氮中冻存。

### 1.9.3 大鼠前列腺指数测定

各组大鼠称重记录其体重并进行麻醉，取前列腺组织进行称重计算前列腺指数：前列腺指数=前列腺重量/大鼠体重×100%。

### 1.9.4 大鼠血清中炎症因子含量变化

按照相应试剂盒中提供的制造商说明测定IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$ 的含量。

### 1.9.5 前列腺组织病理变化

取前列腺组织通过不同梯度浓度的酒精进行脱水→石蜡包埋→切片→用苏木精-伊红染色，最后使用光学显微镜进行病理观察。

### 1.9.6 Western Blot法检测前列腺组织蛋白的表达

取冻存的前列腺组织，进行称量剪碎裂解离心后提取蛋白，然后制备SDS-PAGE凝胶→电泳→转膜→1XTBST洗膜6次/5 min→快速封闭10 min→洗膜→敷一抗；在4℃过夜后，用ECL发光液进行显影，使用Image J对数据进行统一处理。

### 1.9.7 统计方法

使用GraphPad Prism 9.0进行数据分析，数据均使用均数加减标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组间数据采用独立样本 $t$ 检验，多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 黄柏-王不留行化学成分筛选

利用TCMSP数据库结合文献检索黄柏-王不留行共获得41个活性成分，各化学成分的具体信息见表1。

表1 黄柏-王不留行化学成分基本信息

Table1 Basic information of chemical composition of Huangbai-Wangbuliuxi

| 药物 Drug | 分子标识符<br>Molecular Identifier | 化合物 Compound                   | 分子式<br>Chemical formula                                       | OB (%) | DL   |
|---------|-------------------------------|--------------------------------|---|--------|------|
| PCC     | MOL001454                     | 盐酸小檗碱 Berberin                 | C <sub>39</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 36.86  | 0.78 |
| PCC     | MOL001458                     | 黄连碱 Coptisine                  | C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>4</sub>               | 30.67  | 0.86 |
| PCC     | MOL002636                     | Kihadalactone A                | C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> O <sub>7</sub>                | 34.21  | 0.82 |
| PCC     | MOL013352                     | 黄柏酮 Obacunone                  | C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub>                | 43.29  | 0.77 |
| PCC     | MOL002641                     | Phellavin_qt                   | C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>12</sub>               | 35.86  | 0.44 |
| PCC     | MOL002643                     | Delta 7-stigmastanol           | C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O                             | 37.42  | 0.75 |
| PCC     | MOL002644                     | 珊瑚菜素 Phellopterin              | C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>                | 40.19  | 0.28 |
| PCC     | MOL002651                     | 丹参酮 IIA Dehydrotanshinone II A | C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>                | 43.76  | 0.4  |
| PCC     | MOL002652                     | Delta 7-dehydrosophoramine     | C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O              | 54.45  | 0.25 |
| PCC     | MOL002656                     | 二氢尼洛替星 Dihydroniloticin        | C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub>                | 36.43  | 0.81 |
| PCC     | MOL002659                     | Kihadanin A                    | C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>                | 31.6   | 0.7  |
| PCC     | MOL002660                     | 尼罗替尼 Niloticin                 | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>                | 41.41  | 0.82 |
| PCC     | MOL002662                     | 吴茱萸次碱 Rutaecarpine             | C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O              | 40.3   | 0.6  |
| PCC     | MOL002663                     | 茵芋碱 Skimmianin                 | C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub>               | 40.14  | 0.2  |
| PCC     | MOL002666                     | 白屈菜红碱 Chelerythrine            | C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> ClNO<br>4                     | 34.18  | 0.78 |
| PCC     | MOL000449                     | 豆甾醇 Stigmasterol               | C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O                             | 43.83  | 0.76 |
| PCC     | MOL002668                     | 甲基黄连碱 Worenine                 | C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub>               | 45.83  | 0.87 |
| PCC     | MOL002670                     | Cavidine                       | C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>               | 35.64  | 0.81 |
| PCC     | MOL002671                     | Candletoxin A                  | C <sub>33</sub> H <sub>42</sub> O <sub>8</sub>                | 31.81  | 0.69 |
| PCC     | MOL002672                     | Hericenone H                   | C <sub>35</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub>                | 39     | 0.63 |
| PCC     | MOL002673                     | 鬃毛酮 Hispidone                  | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>                | 36.18  | 0.83 |
| PCC     | MOL000358                     | $\beta$ -谷甾醇 Beta-sitosterol   | C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O                             | 36.91  | 0.75 |
| PCC     | MOL000622                     | Magnograndiolide               | C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>                | 63.71  | 0.19 |
| PCC     | MOL000762                     | Palmidin A                     | C <sub>30</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>                | 35.36  | 0.65 |

|     |           |   |   |       |      |
|-----|-----------|---|---|-------|------|
| PCC | MOL000785 | 黄藤素 Palmatine   | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>  | 64.6  | 0.65 |
| PCC | MOL000787 | 原藜芦碱 Fumarine   | C <sub>41</sub> H <sub>63</sub> NO <sub>14</sub>              | 59.26 | 0.83 |
| PCC | MOL000790 | Isocorypalmine  | C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>               | 35.77 | 0.59 |
| PCC | MOL000098 | 槲皮素 Quercetin   | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>                | 46.43 | 0.28 |
| PCC | MOL001131 | Phellamurin_qt  | C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub>               | 56.6  | 0.39 |
| PCC | MOL001455 | 四氢小檗碱 ( <i>S</i> )-Canadine   | C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>               | 53.83 | 0.77 |
| PCC | MOL001771 | Poriferast-5-en-3beta-ol  | C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O                             | 36.91 | 0.75 |
| PCC | MOL002894 | 小檗红碱 Berberrubine   | C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> ClNO<br>4                     | 35.74 | 0.73 |
| PCC | MOL005438 | 菜油甾醇 Campesterol  | C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O                             | 37.58 | 0.71 |
| PCC | MOL006392 | 二氢尼洛替星 Dihydroniloticin   | C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub>                | 36.43 | 0.82 |
| PCC | MOL006401 | Melianone   | C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>                | 40.53 | 0.78 |
| PCC | MOL006413 | 黄柏呈 Phellochin  | C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> O <sub>4</sub>                | 35.41 | 0.82 |
| PCC | MOL006422 | 唐松草定碱 Thalifendine  | C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>               | 44.41 | 0.73 |
| VS  | MOL000449 | 豆甾醇 Stigmastero   | C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O                             | 43.83 | 0.76 |
| VS  | MOL002322 | 异牡荆素 Isovitexin   | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>               | 31.29 | 0.72 |
| VS  | MOL008908 | (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,12 <i>S</i> )-6-(1 <i>H</i> -indol-3-ylmet<br>hyl)-12-isopropyl-3,9-dimethyl-1,4,<br>7,10,13-pentazacyclopentadecane-2<br>,5,8,11,14-pentone | C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> | 33.27 | 0.78 |
| VS  | MOL000098 | 槲皮素 Quercetin   | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>                | 46.43 | 0.28 |

## 2.2 黄柏-王不留行对 CNP 疾病作用靶点筛选

在 UniProt 数据库中检索到 175 个药物对应基因靶点，在 GeneCards、OMIM 数据库中以“chronic non-bacterial prostatitis”为关键词进行检索，得到 9 848 个靶点与 CNP 疾病相关。将药物靶点与疾病相关靶点取交集后获得 156 个潜在靶点（见图 1）。

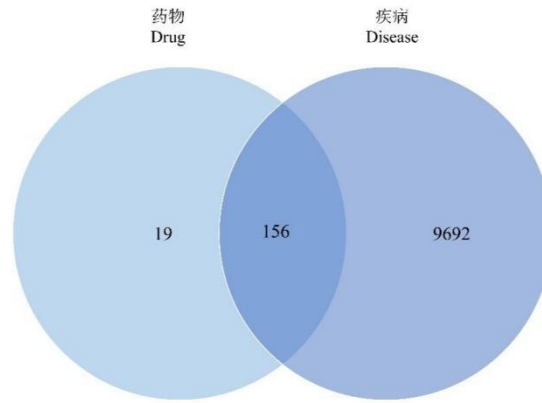


图 1 药物-疾病韦恩图

Fig.1 Venn diagram of component target and disease target

## 2.3 黄柏-王不留行治疗 CNP 疾病关键靶点筛选

如图 2 所示，PPI 网络中共有 156 个节点和 1 048 条边，节点表示蛋白，连线表示蛋白之间的关系。以 Degree、Closeness 和 Betweenness 均高于平均值为准进行筛选，取综合排名前 15 名如表 2 所示，靶点信息见图 2。

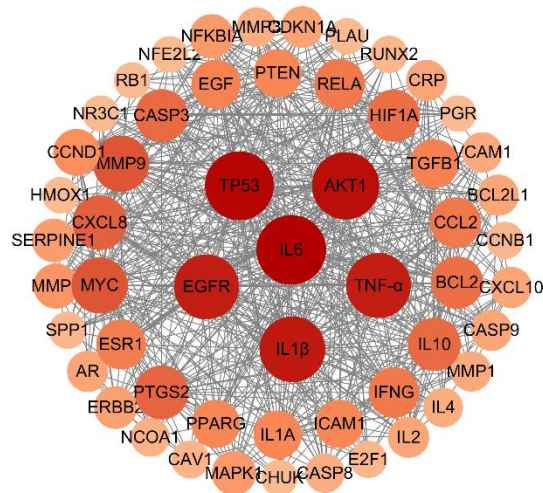


图 2 黄柏-王不留行治疗 CNP 疾病靶点的 PPI 网络分析



Fig.2 PPI network analysis of disease targets of PCC-VS in the treatment of CNP

表 2 核心靶点的参数分析

Table 2 Parametric analysis of core targets

| 蛋白质编码<br>Uniport ID | 蛋白靶点 Protein target  | 基因名字<br>Genes name | 接近中心性<br>Closeness | 中介中心性<br>Betweenness | 度中心性<br>Degree |
|---------------------|--|--------------------|--------------------|----------------------|----------------|
| P05231              | 白细胞介素-6 Interleukin-6  | IL6                | 0.556              | 0.055                | 57             |
| P04637              | 细胞肿瘤抗原 P53 Cellular tumor antigen<br>p53                             | TP53               | 0.559              | 0.089                | 56             |
| P31749              | 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B RAC-alpha<br>serine/threonine-protein kinase           | AKT1               | 0.554              | 0.084                | 54             |
| P01584              | 白细胞介素-1 $\beta$ interleukin-1 beta                                   | IL1 $\beta$        | 0.533              | 0.037                | 52             |
| P01375              | 肿瘤坏死因子- $\alpha$ tumour necrosis factor- $\alpha$ ,<br>TNF- $\alpha$ | TNF- $\alpha$      | 0.539              | 0.048                | 51             |
| P00533              | 表皮生长因子受体 Epidermal growth factor<br>receptor                         | EGFR               | 0.570              | 0.092                | 51             |
| P14780              | 基质金属蛋白酶-9 Matrix<br>metalloproteinase-9                              | MMP9               | 0.513              | 0.031                | 40             |
| P01106              | Myc 原癌基因蛋白 Myc proto-oncogene<br>protein                             | MYC                | 0.503              | 0.032                | 40             |
| P10145              | 白细胞介素-8 Interleukin-8  | CXCL8              | 0.509              | 0.032                | 38             |
| P35354              | 前列腺素 G/H 合酶 2 Prostaglandin G/H<br>synthase 2                        | PTGS2              | 0.522              | 0.047                | 37             |
| P42574              | 胱天蛋白酶 3 Caspase-3  | CASP3              | 0.501              | 0.026                | 36             |
| P22301              | 白细胞介素-10 Interleukin-10  | IL10               | 0.496              | 0.010                | 36             |
| P10415              | 凋亡调节因子 Bcl-2 Apoptosis regulator<br>Bcl-2                            | BCL2               | 0.492              | 0.011                | 35             |
| D0VY79              | 低氧诱导因子-1 Hypoxia-inducible factor<br>1-alpha                         | HIF1A              | 0.511              | 0.013                | 35             |

## 2.4 GO 生物功能与 KEGG 通路富集分析

将药物与疾病交集靶点基因导入数据库 Metascope 平台，进行 GO 功能富集分析，得到 2 604 个 GO 项目，其中和生物过程相关的有 2 316 个，主要包括细胞凋亡过程、慢性炎症反应、凋亡 DNA 片段化的正调控、生物合成的正调控等；和分子功能相关的有 196 个，主要包括肾上腺素能受体活性、组蛋白激酶活性、前列腺素内过氧化合酶活性等；和细胞成分相关的有 92 个，主要包括激酶复合物、半胱天冬酶复合物、丝氨酸蛋白酶抑制剂复合物等见图 3。KEGG 通路富集 ( $P \leq 0.01$ ) 共映射到 165 条通路。 $P$  值从小到大取前 20 条进行可视化处理，结果见图 4，图中气泡颜色代表  $P$  值，大小代表基因的数量。涉及到的通路主要有 PI3K-AKT 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、MAPK 信号、乙型肝炎、丙型肝炎等。

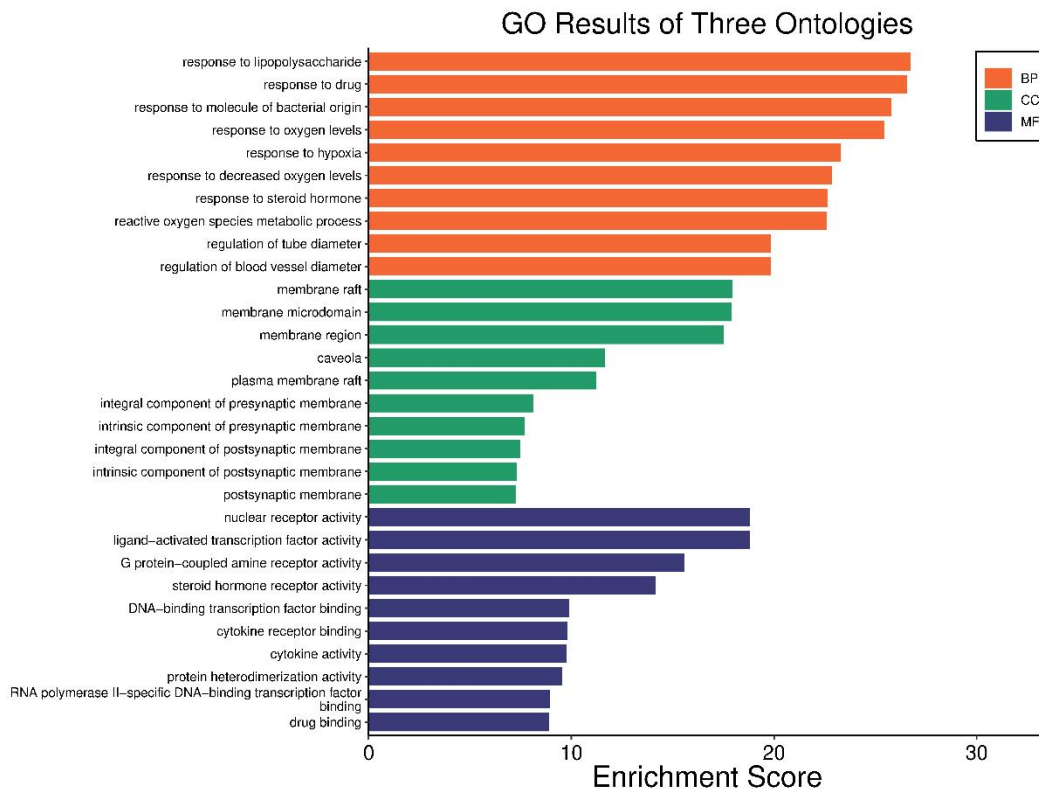


图 3 GO 富集分析

Fig.3 GO enrichment analysis

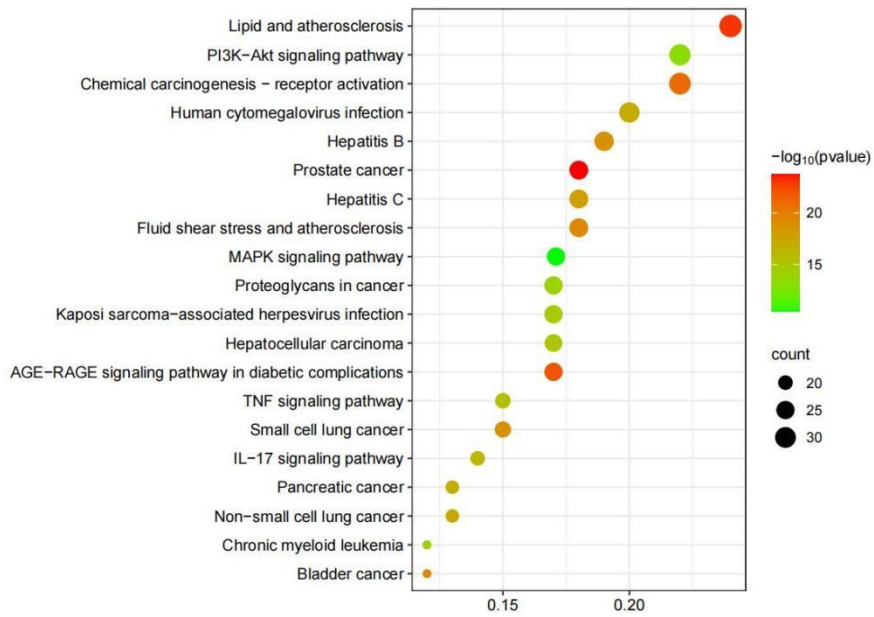


图 4 KEGG 通路富集分析

Fig.4 KEGG pathway enrichment analysis

## 2.5 构建“药物有效成分-疾病靶点-信号通路”图

黄柏-王不留行治疗 CNP 的核心靶点和富集信号通路的网络见图 5。右边红色代表中药黄柏相对应的化学成分；右上紫色代表王不留行相应的化学成分，中间蓝色代表药物与疾病的核心靶点；左边绿色代表通路，边代表关键靶点和通路之间的关系



图 5 “药物有效成分-疾病靶点-信号通路”网络

Fig.5 “Drug active ingredient-disease target-signaling pathway” network

## 2.6 分子对接结果

为进一步验证活性成分与核心靶点的相互作用关系，将 Degree 值排名前六的核心靶点与关键化合物进行分子对接。从 PDB 数据库获取主要靶点蛋白 3D 结构：IL-6（PDB ID: 42S7）；TNF（PDB ID: 5MU8）；IL1B（PDB ID: 1S0L）；AKT1（PDB ID: 3O96）；TP53（PDB ID: 6MXZ）；EGFR（PDB ID: 7U99），其结合能越小表示结合活性越高，化合物越容易与靶标蛋白结合，结果见表 3，用 Pymol 软件进行可视化处理（见图 6）。结果显示，PCC-VS 治疗 CNP 作用机制主要与炎症反应和细胞凋亡相关。

表 3 关键化合物与核心靶点蛋白分子结合能

Table 3 Binding energy between key compounds and core target protein molecules

| 化合物<br>Compound       | 分子式<br>Molecular<br>formula                      | 结合能 Binding energy (kJ/mol) |               |             |      |      |      |
|-----------------------|--|-----------------------------|---------------|-------------|------|------|------|
|                       |  | IL-6                        | TNF- $\alpha$ | IL1 $\beta$ | AKT1 | TP53 | EGFR |
| 槲皮素 Quercetin         | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>  | -8.3                        | -7.3          | -6.3        | -6.8 | -6.7 | -7.2 |
| 吴茱萸次碱<br>Rutaecarpine | C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O | -7.1                        | -8.7          | -6.2        | -5.8 | -5.3 | -5.1 |

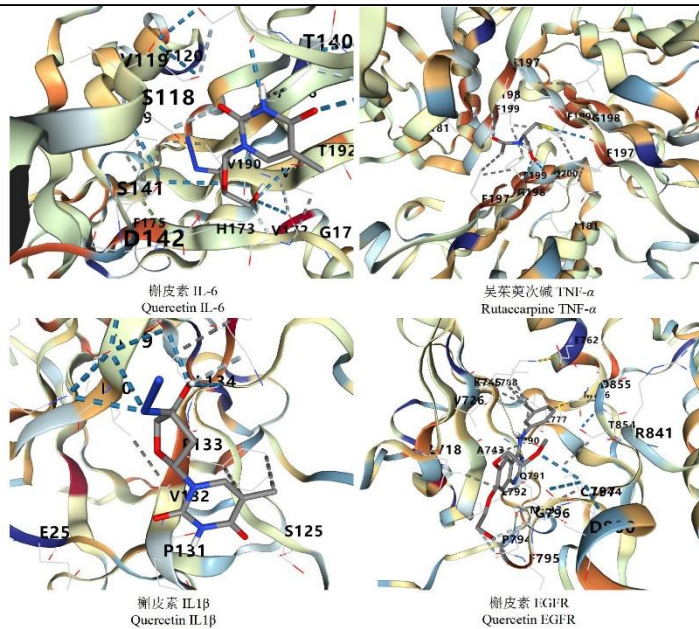


图 6 分子对接结果

Fig.6 Results of molecular docking

## 2.7 大鼠前列腺脏器系数比

前列腺脏器系数比是反映前列腺炎症的一个基本指标，脏器系数越大表明脏器水肿、肥

大增生或者充血。如表 4 所示，与Sham组相比，Mod组大鼠的前列腺脏系数比显著增高（ $P<0.01$ ）。与Mod组相比，除PCC-VS组大鼠前列腺脏系数比降低（ $P<0.05$ ），PCC组、VS组前列腺脏系数均降低，但无统计学意义。

表 4 各给药组对大鼠前列腺脏器系数比的影响（ $\bar{x} \pm s, n=6$ ）

Table 4 Effects of each administration group on the ratio of prostatic organ coefficients in rats. ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 分组 Group | 前列腺脏器系数比 Prostate organ coefficient ratio |
|----------|---|
| Sham     | 0.001 6±0.000 2                           |
| Mod      | 0.002 2±0.000 2**                         |
| PCC-VS   | 0.001 7±0.000 1#                          |
| PCC      | 0.002 0±0.000 1                           |
| VS       | 0.002 0±0.000 1                           |

注：与Sham相比，\*\* $P<0.01$ ；与Mod相比，# $P<0.05$ 。

Note:Compared withSham group, \*\* $P<0.01$ ;Compared with Mod group, # $P<0.05$ .

## 2.8 黄柏-王不留行对大鼠血清中炎症因子含量的影响

与Sham组相比，Model组中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18的水平显著升高（ $P<0.001$ ）；与Mod组相比，各给药组TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18的表达水平均下降（见本表 5），其中PCC-VS组表达水平下降具有统计学意义（ $P<0.01$ ）。

表 5 黄柏-王不留行对大鼠促炎因子水平的影响

Table 5 The effect of PCC-VS on the level of proinflammatory factors in rats

| 分组 Group | TNF- $\alpha$ (pg/mL) | IL-1 $\beta$ (pg/mL) | IL-18 (pg/mL)  |
|----------|-----------------------|----------------------|----------------|
| Sham     | 6.00±0.61             | 8.63±0.32            | 114.51±3.85    |
| Mod      | 9.99±0.18***          | 11.71±0.46***        | 135.16±3.00*** |
| PCC-VS   | 8.78±0.21##           | 10.61±0.28##         | 125.37±1.86##  |
| PCC      | 9.13±0.44#            | 11.14±0.45           | 128.15±3.81    |
| VS       | 9.81±0.82             | 11.09±0.37           | 127.96±6.21    |

注：与Sham组相比，\*\*\* $P<0.001$ ；与Mod组相比，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

Note:Compared with Sham group,\*\*\* $P<0.001$ ;Compared with Mod group, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ .

## 2.9 黄柏-王不留行对前列腺组织的病理形态影响

Sham组大鼠前列腺组织结构完整，腺体管腔未见缩小，间质无水肿，炎细胞浸润少见

(图 7A)；Mod组大鼠前列腺腺腔狭窄甚至闭塞，出现大量炎细胞浸润（图 7B）；与Mod组相比，各给药组前列腺结构相对完整，间质内出现不同程度的炎性浸润，PCC-VS组炎症浸润改善较明显（图 7C~7E）。

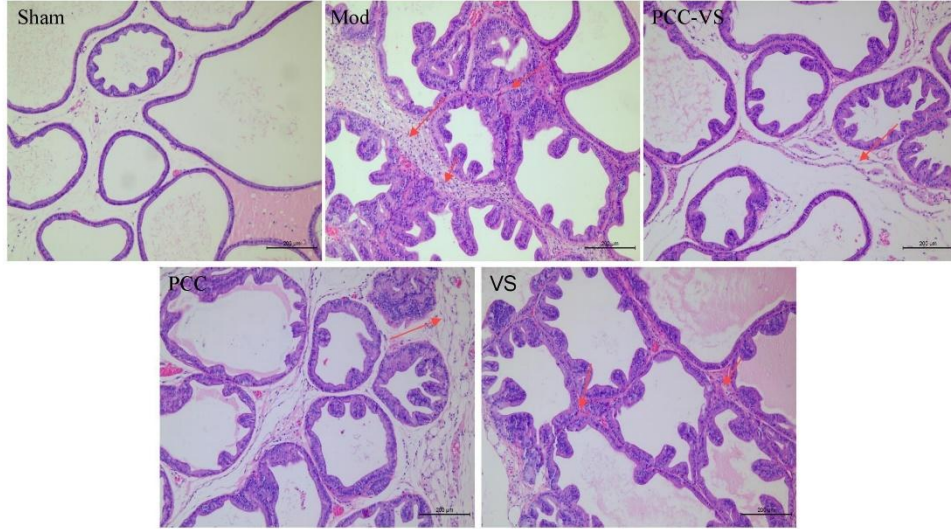


图 7 黄柏-王不留行对大鼠前列腺组织的病理形态影响（HE，×200）

Fig.7 The effect of PCC-VS on pathological morphology of prostate tissue in rats(HE, ×200)

#### 2.10 Western Blot检测前列腺组织蛋白的表达

与Sham组相比，Mod组中PI3K和AKT磷酸化蛋白表达增加（ $P<0.001$ ），同时药物与疾病靶点相关的核心靶点蛋白TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 的蛋白表达也增加（ $P<0.01$ ），然而与Mod组相比，各给药组中这些蛋白表达均有所下调，其中PCC-VS组中这些蛋白水平表达与Mod组相比显著降低（ $P<0.05$ ）（见图 8）。



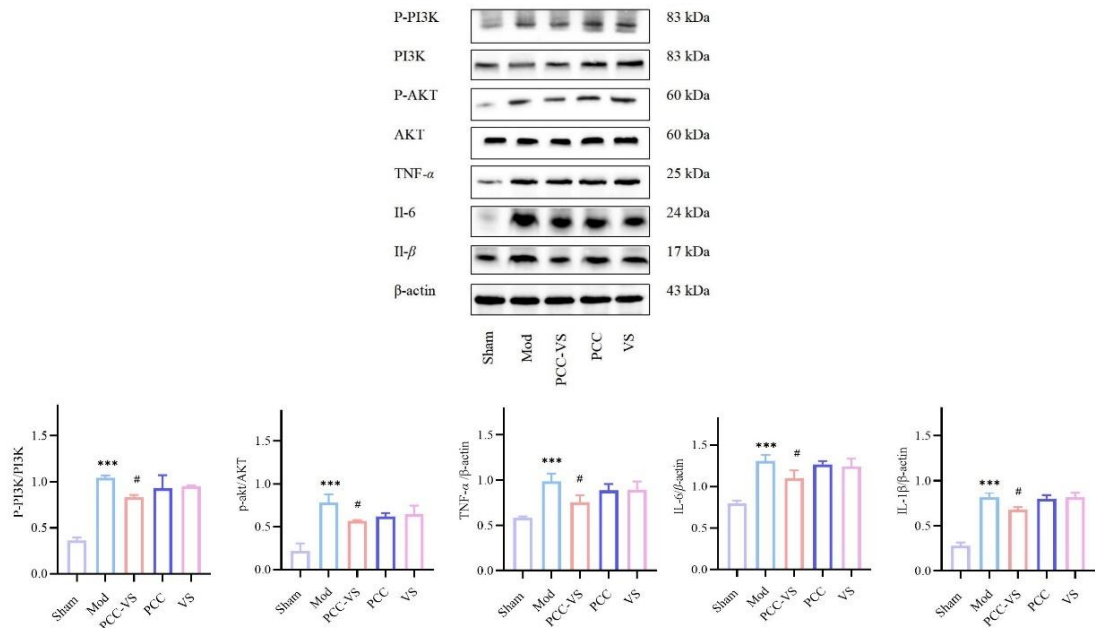


图 8 黄柏-王不留行对前列腺组织蛋白的表达影响

Fig.8 The effect of PCC-VS protein expression in prostate tissue

### 3 讨论与结论

中医药治疗慢性非细菌性前列腺炎有较好的疗效，黄柏和王不留行单独给药显示出对CNP具有抗炎作用，有研究<sup>[14]</sup>表明关黄柏生物碱可减少前列腺蛋白的渗出，有效抑制CNP的发展；亦有研究表明黄柏生物碱提取物<sup>[2]</sup>可以通过下调前列腺增生模型大鼠中LOX-5/COX-2的表达水平并通过环氧合酶和脂氧合酶信号通路破坏花生四烯酸代谢来改善前列腺增生；王不留行多糖<sup>[15]</sup>可抑制前列腺增生。但黄柏和王不留行联合用药的疗效是否优于单一药物的问题至今尚未确定。因此本研究从清化饮中选取其君药药对黄柏-王不留行进行药物协同作用研究。以评价黄柏-王不留行成分伍伍的协同作用，明确中医方剂中协同配伍的用药规律。

通过网络药理学与动物实验研究，我们发现黄柏-王不留行对治疗CNP起到一定的保护作用。主要通过PI3K/AKT信号通路抑制炎症和细胞凋亡，探讨了黄柏-王不留行药对对治疗CNP的作用机制。黄柏和王不留行含有小檗碱、槲皮素、异牡荆苷、豆甾醇、白屈菜红碱、黄连碱等化学物质，具有抗炎、抗菌、镇痛等药理作用。通过网络药理学筛选出41个化学成分与CNP相关，其中小檗碱<sup>[16]</sup>可改善自身免疫性前列腺炎大鼠前列腺组织病理改变，抑制炎症反应。槲皮素<sup>[17]</sup>是天然黄酮类化合物具有抗炎作用，研究表明槲皮素可通过抗炎作用对慢性前列腺炎大鼠起到显著的治疗效果。异牡荆苷<sup>[18]</sup>具有较强的抗炎作用。豆甾醇<sup>[19]</sup>具有抗炎、抗氧化等药理作用，有研究表明豆甾醇有抑制前列腺肥大及调控前列腺平滑肌收缩

的作用。白屈菜红碱与黄连碱<sup>[20]</sup>具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等药理作用，黄连碱调节平滑肌收缩，抑制前列腺肥大和逼尿肌收缩，为抗膀胱功能障碍的药物候选物。我们推测这些成分 是黄柏-王不留行药对治疗CNP的主要活性化合物。

PPI结果显示，IL-6、TP53、AKT1、TNF- $\alpha$ 、IL1 $\beta$ 、CASP-1、EGFR和BAX是黄柏-王不留行药对与CNP相互作用的关键靶点。炎症介质是介导和参与炎症反应的因子，白介素是非常重要的细胞因子家族，参与机体多种生理和病理反应，主要涉及免疫细胞的成熟、活化、增殖、调节等诸多过程。TNF- $\alpha$ 由巨噬细胞和单核细胞分泌，参与炎症反应和免疫反应。IL-6主要由单核巨噬细胞T细胞合成，在机体感染后炎症反应早期出现。IL-1 $\beta$ 是由单核细胞、内皮细胞、巨噬细胞产生，参与机体的炎症反应及免疫调节，在炎症的发生发展中起着关键作用。IL-18作用不同细胞，能促进炎症反应和调节宿主免疫功能等，与多种炎症反应疾病、免疫性疾病的发生发展密切相关。研究表明<sup>[21]</sup>CNP可分泌大量促炎因子如TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 和IL-18，他们在CNP中起着重要作用。因此我们通过ELISA验证了黄柏-王不留行对CNP大鼠模型中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-18炎症因子水平的调控作用及Western Blot检测了大鼠前列腺组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6蛋白表达变化。结果表明黄柏-王不留行抑制了炎症反应，降低了大鼠前列腺组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6蛋白表达。HE病理结果也与以上结果相一致，假手术组中前列腺组织结构完整，腺体管腔未见缩小，间质无水肿，炎细胞浸润少见；模型组腺体由柱状上皮细胞变为矮柱状，前列腺腺腔狭窄甚至闭塞，出现大量炎细胞浸润。PI3K/AKT是抗炎、抗凋亡的重要通路，GO和KEGG的富集分析结果表明，PI3K/AKT信号通路在CNP疾病的发生发展中起着重要作用。PI3K/AKT信号通路具有调控多种转录因子如NF- $\kappa$ B、CREB和调节细胞、增殖、分化和迁移等多种生物学功能<sup>[22]</sup>。研究证明<sup>[23]</sup>该通路可调节下游蛋白改善CNP大鼠炎症、氧化应激等影响疾病发生发展；一些中药成分<sup>[24]</sup>可能通过该通路发挥保护的过程。因此本研究中黄柏-王不留行可能是通过PI3K/Akt信号通路影响下游NF- $\kappa$ B的激活，增加IL-1 $\beta$ 及TNF- $\alpha$ 含量促进炎症反应。我们通过Western Blot检测PI3K/AKT信号通路上的蛋白表达，结果表明黄柏-王不留行组抑制了PI3K和AKT磷酸化蛋白表达，从而改善CNP的炎症损伤。分子对接结果显示IL-6、TNF- $\alpha$ 、TP53、AKT1、EGFR与黄柏-王不留行中具有抗炎、抗凋亡减轻CNP损伤作用的重要活性成分槲皮素、异牡荆苷、豆甾醇、白屈菜红碱具有良好的结合能力。从这些分子对接结果中，我们阐明了黄柏-王不留行在CNP治疗中的作用。分子对接和网络药理学结果相互一致，证明了网络药理学在靶点预测中的可靠性。

综上所述，与单独药物作用相比，药对组对炎症因子的调控及炎症相关蛋白的表达有协



同抑制作用。在一定程度上表明黄柏-王不留行配伍发挥协同改善 CNP 作用。该研究通过网络药理学与体内实验初步揭示黄柏-王不留行药对可能通过改善炎症反应以发挥清热化湿调气活血功效。进而为其后续治疗湿热瘀滞型 CNP 的临床研究提供了支持,也为中药“相须”七情配伍的现代生物学内涵解析提供新思路。

#### 参考文献

- 1 Sun DL,Jin BF.Mechanism of traditional Chinese medicine in the treatment of chronic nonbacterial prostatitis[J].Natl J Androl(中华男科学杂志),2024,30:564-568.
- 2 Wu SQ,Li YW,Sang Y,et al.The bioactive alkaloids identified from Cortex Phellodendri ameliorate benign prostatic hyperplasia via LOX-5/COX-2 pathways[J].Phytomedicine,2021,93:153813.
- 3 Zhao XN,Li YR,Huai JX,et al.Compatibility effects of herb pair Phellodendri Chinensis Cortex and Anemarrhenae Rhizoma on benign prostatic hyperplasia using targeted metabolomics[J].Biomed Chromatogr,2018,32:e4296.
- 4 Jin J,Xiao X.Research progress on chemical composition,pharmacological action and clinical application of Wang Buliuxing[J].China J Pharm Econ(中国药物经济学),2022,17:124-128.
- 5 Yang CL,Wang SB,He WP,et al.Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Polygala sibirica* L. var *megalopha* Fr. on lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells[J].Chin J Integr Med,2023,29:905-913.
- 6 Mao X,Yao RM,Bao YY,et al.Wangbuliuxing polysaccharide can improve bladder injury caused by urinary tract infection by inhibiting NLRP3 inflammasome pathway[J].China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2021,46:3388-3393.
- 7 Kang J,Yang LL,Liu JX,et al.Present situation and prospect of the research on deconsolidation of traditional Chinese medicine[J].China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志),2024,39:3580-3585.
- 8 Cheng C ,Xu C ,Zhou W ,et al.Integrated network pharmacology and serum metabonomics analysis to explore the potential mechanism of *Anemarrhena asphodeloides* Bunge-*Phellodendron chinense* Schneid herb pair in the treatment of benign prostatic hyperplasia.[J].J Pharm Biomed Anal,2024,248:116264.
- 9 Meng XQ,Zhang CL,Jia YX,et al.Analysis of pharmacodynamic material basis and action mechanism of Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis herb pair in the treatment of type 2 diabetes before and after salt processing based on serum pharmacochimistry and network pharmacology[J/OL].J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报),2024,40:479-493.
- 10 Wang M,Qiao AP,Jia XG,et al.Study on the mechanism of Gastrodiae Rhizoma-Chuanxiong Rhizoma herb

- pair in the treatment of hypertension based on network pharmacology and molecular docking technology[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2022,34:473-483.
- 11 Han YP,Yu WT,Zhang Y,et al.Qinghua decoction improves chronic nonbacterial prostatitis possibly via regulating the chromogranin A/nerve growth factor/tyrosine kinase A signaling pathway mediated by inflammatory factors[J].J Tradit Chin Med(中医杂志:英文版),2023,43:695-703
- 12 Zhu PX,Fan QY,Zhang JX,et al.Carrageen glue to the influence factors of chronic prostatitis model in rats[J].World J Tradit Chin Med(世界中医药),2021,16:2094-2100.
- 13 Dai YH,Long XQ,Liu CQ,et al.Preparation and evaluation of an animal model of carrageenan induced chronic abacterial prostatitis[J].Acta Lab Anim Sci Sin(中国实验动物学报),2017,25:544-550.
- 14 Sun H,Li XN,Zhang Y,et al.A metabolomic study on the intervention effect of *Phellodenron amurense* Rupr. alkaloid protects against chronic nonbacterial prostatitis in rats[J].Mod Tradit Chin Med Mate Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化),2016,18:1709-1719.
- 15 Zhang H,Jing Y,Wu G .Inhibitory effects of crude polysaccharides from Semen Vaccariae on benign prostatic hyperplasia in mice[J].J Ethnopharmacol,2013,145:667-669.
- 16 Miu RY,Wang B,Long ZM. Effect of berberine on Th17/Treg balance in rats with autoimmune prostatitis by regulating AMPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J].Tianjin Med J(天津医药),2023,51:1104-1109.
- 17 Zhao QX,Yang FY,Chen D,et al. To investigate the therapeutic effect and mechanism of lycopene combined with quercetin and curcumin on chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome in rats[J].Nat J Androl(中华男科学杂志),2021,27(02):99-105.
- 18 Liu MX,Li T,Wang WG,et al.Regulatory effect of isovitexin on MAPK/NF- $\kappa$ B signal in mice with acute ulcerative colitis[J].J Asian Nat Prod Res,2022,25:11-18.
- 19 Ma YX,Wu YX,Sao R,et al. Stigmasterol inhibits the contraction of rat prostate stromal cells by inhibiting calcium influx[J].Tianjin Tradit Chin Med(天津中医药),2022,39:1445-1451.
- 20 Lin M,Yun XT,Yang XH,et al.An inhibitory effect of berberine from herbal *Coptis chinensis* Franch on rat detrusor contraction in benign prostatic hyperplasia associated with lower urinary tract symptoms[J].J Ethnopharmacol,2021,268:113666.
- 21 Liu SJ,Zhao F,Deng YJ,et al.Investigating the multi-target therapeutic mechanism of Guihuang formula on chronic prostatitis[J].J Ethnopharmacol,2022,294:115386.
- 22 Feng JL,Hou D,Zhao C,et al.A rat study model of depression-driven chronic prostatitis by modulating the PI3K/Akt/mTOR network[J].Andrologia,2022,54:e14488.

- 23 Feng B,Dong ZL,Wang YR,et al.Li-ESWT treatment reduces inflammation,oxidative stress,and pain via the PI3K/AKT/FOXO1 pathway in autoimmune prostatitis rat models[J].Andrology,2021,91593-1602.
- 24 Wang HL,Li XM,Xia BW,et al.Amelioration of chronic prostatitis by fractions of Mongolian medicine *Hosta plantaginea* flowers via inhibition of NF- $\kappa$ B,MAPKs,JAK-STAT,and PI3K-Akt signaling pathways in rats[J].J Ethnopharmacol,2023,307:116245.

收稿日期: 2024-05-27                      接受日期:

基金项目: 河北省自然科学基金 (H2023423087); 河北省中医药管理局资助项目 (2019087)

\*通信作者 E-mil:deng6191@163.com