

整合网络药理学和代谢组学探讨知母、黄柏盐炙前后滋肾丸抗慢性前列腺炎作用差异及机制

赵尚玲¹, 孟霄¹, 李思睿¹, 谭睿², 胡昌江¹, 余凌英^{1*}, 陈志敏^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 现代中药产业学院, 中药种质资源创新与高效利用四川省重点实验室, 成都 611137; 2. 西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610075)

[摘要] 目的: 基于超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱(UPLC-Q-Orbitrap-MS/MS)、网络药理学及血清代谢组学整合分析策略, 系统揭示知母、黄柏盐炙前后组方滋肾丸治疗慢性前列腺炎(CP)的作用差异及机制。方法: 通过醇水双提法提取知母、黄柏盐炙前后组方滋肾丸样品, 采用UPLC-Q-Orbitrap-MS/MS技术检测各样品化学成分, 并结合多元统计分析筛选差异成分, 随后基于滋肾丸化学成分进行网络药理学分析, 构建“成分-靶点-通路”网络与蛋白质相互作用(PPI)网络, 筛选滋肾丸抗CP的核心成分、靶点及通路。将42只雄性SD大鼠随机分为空白组, 模型组, 前列康组(1.54 g·kg⁻¹), 生品滋肾丸低、高剂量组(1.8、5.4 g·kg⁻¹), 盐炙滋肾丸低、高剂量组(1.8、5.4 g·kg⁻¹), 采用前列腺注射角叉菜胶诱导建立CP大鼠模型, 造模恢复1周后给予相应药物治疗21 d, 空白组与模型组给予同体积生理盐水。实验结束后, 采集血清及组织样本, 评价脏器指数、组织病理及血清炎症因子等药效指标。随后通过血清非靶向代谢组学技术, 分析代谢物变化, 进行通路富集分析, 并联合网络药理学, 构建“差异代谢物-反应-酶-基因”网络。结果: 生品、盐炙品滋肾丸共鉴定出76个成分, 多元统计分析筛选出差异成分34个, 其中, 小檗碱、小檗红碱、黄柏碱等14个成分盐炙后含量上升, 新芒果苷等20个成分盐炙后含量下降。网络药理学筛选出28个活性成分、185个潜在靶点, 核心成分包括小檗碱、黄柏碱、木兰花碱、药根碱等, 核心靶点包括信号转导与转录激活因子3(STAT3)、蛋白激酶B1(Akt1)、转录因子AP-1(JUN)等, 显著富集于磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等促炎信号通路。动物实验结果显示, 与模型组比较, 滋肾丸各给药组前列腺指数、血清白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)水平均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), 组织病理损伤有不同程度减轻; 在相同剂量下, 与生品组比较, 盐炙组前列腺指数、病理评分、血清IL-1 β 、IL-18、Bcl-2水平降低, 但差异无统计学意义。代谢组学显示, 盐炙滋肾丸给药后回调38个差异代谢物, 生品、盐炙品滋肾丸均调节 β -丙氨酸代谢、色氨酸代谢等通路; 除共同调节通路, 盐炙组特异性调节泛酸和辅酶A生物合成、嘧啶代谢、精氨酸和脯氨酸代谢通路。网络药理学与代谢组学交集通路有色氨酸代谢、精氨酸与脯氨酸代谢, 交集靶点有单胺氧化酶A(MAOA)、精氨酸酶1(ARG1)等。结论: 盐炙后滋肾丸中小檗碱、黄柏碱等成分含量增加, 可能通过抑制PI3K/Akt、MAPK等信号通路, 以及多靶点调控色氨酸、精氨酸及泛酸等代谢通路, 综合调节炎症、免疫反应, 从而增强对CP的治疗作用。

[关键词] 滋肾丸; 盐炙; 慢性前列腺炎; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱法(UPLC-Q-Orbitrap-MS/MS); 网络药理学; 代谢组学

[中图分类号] R242; R943.1; R691.9 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)13-0177-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260268

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260320.0954.001>

[网络出版日期] 2026-03-20 14:09:35 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Effect Difference and Mechanisms of Zishenwan Against Chronic Prostatitis Before and After Salt-processing of Anemarrhenae Rhizoma and Phellodendri Chinensis Cortex by Integrating Network Pharmacology and Metabolomics

ZHAO Shangling¹, MENG Xiao¹, LI Sirui¹, TAN Rui², HU Changjiang¹, YU Lingying^{1*}, CHEN Zhimin^{1*}

[收稿日期] 2025-12-27

[基金项目] 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-SC-41); 四川省重点研发项目(2023YFS0458)

[第一作者] 赵尚玲, 在读硕士, 从事中药炮制研究, E-mail: 1244253192@qq.com

[通信作者] * 余凌英, 博士, 副教授, 从事中药炮制研究, E-mail: lingyingyu@cdutcm.edu.cn;

* 陈志敏, 博士、博士后, 副教授, 从事中药炮制及其非物质文化遗产传承创新研究, E-mail: chenzhimin@cdutcm.edu.cn

(1. Key Laboratory of Chinese Medicine Germplasm Resources Innovation and Effective Uses in Sichuan Province, School of Pharmacy, School of Modern Chinese Medicine Industry, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
2. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610075, China)

[Abstract] Objective: This paper aims to systematically reveal the effect difference and mechanisms of Zishenwan against chronic prostatitis (CP) before and after salt-processing of *Anemarrhenae rhizoma* and *Phellodendri chinensis cortex* based on an integrated strategy of ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap-MS/MS), network pharmacology, and serum metabolomics. **Methods:** Zishenwan samples before and after salt-processing of *Anemarrhenae rhizoma* and *Phellodendri chinensis cortex* were extracted by alcohol-water dual extraction. The chemical components of each sample were detected by UPLC-Q-Orbitrap-MS/MS, and differential components were screened by multivariate statistical analysis. Network pharmacology analysis was performed based on the identified chemical components of Zishenwan to construct a protein-protein interaction (PPI) network of "component, target, and pathway", and the core components, targets, and pathways of Zishenwan against CP were screened. Forty-two male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a blank group, a model group, a Qianliekang group ($1.54 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), low- and high-dose raw Zishenwan groups ($1.8, 5.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low- and high-dose salt-processed Zishenwan groups ($1.8, 5.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The CP rat model was established by intraprostatic injection of carrageenan. After one week of recovery, the rats were administered the corresponding drugs for 21 days, while those in the blank group and model group received the same volume of normal saline. After the experiment, serum and tissue samples were collected to evaluate pharmacodynamic indicators including organ indices, histopathology, and inflammatory factors in serum. Subsequently, untargeted serum metabolomics technology was used to analyze metabolite changes and perform pathway enrichment analysis. The network pharmacology was used to construct a network of "differential metabolite, reaction, enzyme, and gene". **Results:** A total of 76 components were identified in raw and salt-processed Zishenwan, and 34 differential components were screened by multivariate statistical analysis. Among them, the contents of 14 components, including berberine, berberrubine, and phellodendrine, increased after salt-processing, while the contents of 20 components, such as neomangiferin, decreased. The 28 active components and 185 potential targets were screened out by network pharmacology. The core components included berberine, phellodendrine, magnoflorine, and jatrorrhizine, and the core targets included signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), protein kinase B1 (Akt1), and transcription factor AP-1 (JUN). These targets were significantly enriched in pro-inflammatory signaling pathways such as phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) and mitogen-activated protein kinase (MAPK). Compared with the model group, all Zishenwan administration groups showed decreased prostate index, reduced levels of interleukin (IL)- 1β , IL-18, and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) in serum ($P<0.05, P<0.01$), as well as varying degrees of alleviation in histopathological damage. At the same dose, compared with the raw Zishenwan groups, the salt-processed Zishenwan groups showed lower prostate index, pathological scores, and IL- 1β , IL-18, and Bcl-2 levels in serum, but the differences were not statistically significant. Metabolomics reveals that 38 differential metabolites were reversed after salt-processed Zishenwan administration. Both raw and salt-processed Zishenwan regulated pathways such as β -alanine metabolism and tryptophan metabolism. In addition to the common regulated pathways, the salt-processed group specifically regulated pantothenate and coenzyme A biosynthesis, pyrimidine metabolism, and arginine and proline metabolism. The intersecting pathways between network pharmacology and metabolomics were tryptophan metabolism and arginine and proline metabolism, with overlapping targets including monoamine oxidase A (MAOA) and arginase 1 (ARG1). **Conclusion:** The increased contents of components such as berberine and phellodendrine in salt-processed Zishenwan may enhance its therapeutic effect on CP by inhibiting the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways, along with multi-target regulation of tryptophan, arginine, and pantothenate metabolism pathways to comprehensively regulate inflammatory and immune responses.

[Keywords] Zishenwan; salt-processing; chronic prostatitis; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap-MS/MS); network pharmacology; metabolomics

滋肾丸为滋阴泻火的经典方剂,该方常用于治疗以下焦湿热虚火为特征的疾病^[1]。现代药理研究证实,方中知母皂苷、黄柏生物碱及肉桂挥发油等成分具有明确的抗炎、免疫调节等作用^[2-5]。慢性前列腺炎(CP)属中医“精浊”“劳淋”范畴,其病机根本在于肾功能失调,与肾阴亏虚、湿热瘀阻下焦相关^[6],临床常以滋肾丸加减治疗。“盐制入肾”是经典

炮制理论之一,遵循该理论,滋肾丸方中知母、黄柏常盐炙后入药,以增强其清泻下焦虚火的作用^[1]。课题组前期研究发现,盐炙可引起知母-黄柏药对化学成分发生变化,其中芒果苷、小檗红碱等成分含量上升,新芒果苷等含量下降,此外,盐炙后组方的滋肾丸对CP大鼠的疗效优于生品,且二者对CP大鼠肠道菌群的调控作用存在差异,盐炙品能特异性

增加乳杆菌和瘤胃球菌等有益菌丰度^[7-8]。药物动力学研究显示,知母盐炙后新芒果苷、芒果苷及多种皂苷类成分在肾、睾丸等靶器官分布增加^[9],黄柏盐炙后生物碱类成分在肾组织中分布增加^[10],这些成分的定向分布可能与盐炙后药物下焦作用增强有关,与“盐制入肾”的传统理论相契合。

尽管现有研究已从成分变化、组织分布、肠道菌群调控等方面初步揭示盐炙机制,但对于盐炙后滋肾丸全方化学成分的系统变化及其与整体药效增强的关联,尚缺乏深入探讨。因此,本研究拟采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱(UPLC-Q-Orbitrap-MS/MS)技术系统分析滋肾丸盐炙前后的成分差异,并整合网络药理学、血清非靶向代谢组学,探讨其物质基础与作用机制,以期为“盐制入肾”炮制理论提供现代科学依据。

1 材料

1.1 仪器 Vanquish型超高效液相色谱系统、Q Exactive型四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪、Orbitrap Exploris120型质谱仪、Varioskan型多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),SI型正置光学显微镜、DS-U3型成像系统(日本 Nikon 公司),MiniStar型低温离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司),JXFSTPRP型多样品组织研磨机(上海净信科技有限公司),HB120-S型金属浴(中国西格玛奥德里奇贸易有限公司),5型多功能炒货机(常州迈斯仪器有限公司),JJ-12J型全自动组织脱水机(武汉俊杰电子有限公司),WB-3000型石蜡包埋机(常州微凯实验仪器有限公司),HM315型病理切片机[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],BT-I型组织摊片机(山东博科生物产业有限公司)。

1.2 药物与试剂 知母(批号231001)、黄柏(批号2401028)、肉桂(批号231201)均购于四川国强饮片有限公司,经成都中医药大学炮制与制剂教研室余凌英副教授鉴定均为正品且符合2025年版《中华人民共和国药典》的质量规定。角叉菜胶(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号C1013),前列康普乐安片(浙江康恩贝制药股份有限公司,批号241201),舒泰50(法国维克公司,批号9KWKA),盐酸塞拉嗪(敦化市圣达动物药品有限公司,批号20240607),美洛昔康注射液(齐鲁动物保健品有限公司,批号E134L002),大鼠白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18、大鼠B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号分为WS06J04JN4229、WA098HV449887、WA07H4R4N3

634),苏木素-伊红(HE)染液套装(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号G1005),小檗碱、小檗红碱对照品(成都瑞芬思德丹生物科技有限公司,批号分别为RFS-X04502406011、RFS-X06111811029,纯度 \geq 98%),绿原酸、芒果苷、新芒果苷、木兰花碱对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号分别为wkq20042702、wkq23030901、wkq20061603、wkq22080505,纯度 \geq 98%),知母皂苷BⅢ对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号wkq18101507,纯度 \geq 96%),黄柏碱对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号MUST-23072912,纯度 \geq 99.01%),盐酸药根碱对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号MUST-21121107,纯度 \geq 98.60%),甲醇、乙腈、乙酸铵、乙酸为质谱级,水为超纯水,其余试剂均为分析级。

1.3 动物 SPF级雄性SD大鼠42只,8~9周龄,体质量270~290 g,购自成都达硕实验动物有限公司,合格证号SCXK(川)2025-0030;饲养于成都中医药大学实验动物中心,温度(22 \pm 2)℃,相对湿度40%~70%,适应性喂养7 d后用于实验。

1.4 伦理 本文所涉及的动物实验经成都中医药大学实验伦理委员会批准,批准编号2025001。

2 方法

2.1 药液制备

2.1.1 盐知母、盐黄柏的制备 采用课题组前期已优化的炮制工艺^[11],取净知母,加盐水拌匀,闷润1 h,置预热的炒制容器内,160℃翻炒20 min,每100 g知母加盐2 g,盐水比例1:30,得盐知母;取净黄柏,加盐水拌匀,闷润1 h,置预热的炒制容器内,150℃翻炒15 min,每100 g黄柏加盐2 g,盐水比例1:15,得盐黄柏。

2.1.2 滋肾丸各药液的制备 参照课题组前期提取方法^[8],分别取适量盐知母、盐黄柏、肉桂进行配比组方(盐知母-盐黄柏-肉桂10:10:1),加入8倍量75%乙醇加热回流提取2次,分别保持微沸1.5、1 h,过滤,回收溶剂;滤渣再加入10倍量水加热回流提取2次,分别保持微沸1、0.5 h,过滤,回收溶剂;合并全部滤液,减压浓缩至生药量0.18 g·mL⁻¹和0.54 g·mL⁻¹,制成盐炙滋肾丸低、高剂量药液。同法取生知母、生黄柏、肉桂制成生品滋肾丸低、高剂量药液。于4℃下保存。

2.1.3 前列康液的制备 参照课题组前期实验方法^[8],取前列康片适量研成细粉,加入生理盐水配置成质量浓度0.154 g·mL⁻¹的混悬液。

2.2 滋肾丸化学成分UPLC-Q-Orbitrap-MS/MS分析

2.2.1 供试品溶液制备 取2.1项下制备的生品与盐炙品滋肾丸提取液,冷冻干燥。取冻干粉适量,精密称定,加入甲醇溶液超声(功率250 W,频率50 kHz,下同)提取30 min,称质量并用甲醇补足失重,用0.22 μm微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称定盐酸小檗碱、小檗红碱、绿原酸、芒果苷、黄柏碱、新芒果苷、知母皂苷BⅢ、木兰花碱、药根碱对照品适量,用甲醇溶解定容后制成质量浓度为0.590、3.760、0.640、0.602、0.995、1.085、0.672、0.310、0.206 g·L⁻¹的对照品母液,分别吸取各对照品储备液0.5 mL置10 mL量瓶中,用甲醇定容得到混合对照品溶液。

2.2.3 检测条件 色谱条件为Accucore™ C₁₈色谱柱(3 mm×100 mm, 2.6 μm),柱温30 °C,流动相A相为0.1%甲酸水溶液,B相为乙腈,梯度洗脱(0~10 min, 90% A; 10~15 min, 90%~88% A; 15~18 min, 88% A; 18~25 min, 88%~80% A; 25~30 min, 80%~76% A; 30~32 min, 76%~74% A; 32~43 min, 74%~53% A; 43~45 min, 53%~52% A; 45~47 min, 52%~48% A; 47~60 min, 48%~5% A; 60~65 min, 5% A),流速0.3 mL·min⁻¹,进样量5 μL。质谱条件为电喷雾离子源(ESI),正、负离子全扫描模式,离子源温度300 °C,鞘气流速15 L·min⁻¹,喷雾电压3.5 kV和-2.5 kV。一级质谱全扫描分辨率设为35 000,质量扫描范围m/z 100~1 500;二级质谱分辨率设为17 500,并采用阶梯碰撞能(20、40、60 eV)。

2.2.4 数据处理 原始数据通过Xcalibur 4.0软件进行采集,经Compound Discoverer 3.3软件进行峰提取、对齐及积分。化学成分的鉴定基于一级质谱精确分子量(质量误差<|5.0|×10⁻⁶)及二级质谱碎片信息,通过比对对照品、自建数据库及相关文献完成。对原始峰面积进行含量归一化处理,计算公式为:归一化后峰面积=原始峰面积/(冻干粉称样量/冻干得率),结果表示为单位生药量的相对峰面积。将归一化后的数据导入MetaboAnalyst 6.0(<https://www.metaboanalyst.ca>)平台进行预处理,包括最小值的1/5填充缺失值、lg₁₀转换,随后导入SIMCA 14.1软件进行主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA),以变量重要性投影(VIP)值>1.0且t检验P<0.05为标准,筛选差异成分。

2.3 网络药理学分析

2.3.1 滋肾丸活性成分靶点预测 将2.2项下滋肾

丸成分,利用Swiss ADME(<http://www.swissadme.ch/>)平台进行类药性筛选,设定GI absorption为“high”;Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge至少有2个为“yes”。将筛选的活性成分导入Swiss Target Prediction(<https://swisstargetprediction.ch/>)数据库,以“Homo sapiens”为物种,预测其潜在靶点,保留Probability>0的靶点并去重。

2.3.2 慢性前列腺炎相关基因的获取 从Gene Cards(<https://www.genecards.org/>)、OMIM(<https://www.omim.org/>)数据库中以“Chronic Prostatitis”为关键词检索疾病相关靶点,合并后去重。

2.3.3 网络构建与通路富集 利用微生信平台(<https://bioinformatics.com.cn/>)绘制韦恩图,成分靶点与疾病靶点的交集即为滋肾丸抗CP的潜在作用靶点。将该交集靶点导入STRING(<https://cn.string-db.org/>)数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,设定物种为“Homo sapiens”,最低互作置信度>0.700。将结果导入Cytoscape 3.10.4软件的CytoNCA插件,基于度值(Degree)、介数中心性(Betweenness Centrality)等拓扑参数筛选核心靶点。使用Metascape(<https://metascape.org/gp/>)数据库对交集靶点进行基因本体论(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,设定P<0.05为显著性标准。利用微生信平台对富集结果前10条GO条目与前20条KEGG通路进行可视化。

2.3.4 “成分-靶点-通路”网络构建 将筛选得到的前20条KEGG通路及成分、靶点导入Cytoscape 3.10.4软件,构建“成分-靶点-通路”调控网络,以可视化滋肾丸的多成分、多靶点、多通路作用。

2.4 造模、分组及给药 42只雄性SD大鼠适应性饲养7 d后,随机选择6只作为空白组,其余大鼠参照课题组前期方法造模^[8]。造模前禁食不禁水12 h,于无菌条件下腹腔注射舒泰50(20 mg·kg⁻¹)、盐酸塞拉嗪(5 mg·kg⁻¹)混合溶液麻醉,在下腹正中切口,暴露膀胱腹侧前列腺,每侧叶注射3%角叉菜胶生理盐水溶液100 μL,缝合肌肉、皮肤并消毒,放回鼠笼并观察状态。待大鼠苏醒后皮下注射美洛昔康注射液2 mg·kg⁻¹止痛,每天1次,连续3 d。术后恢复7 d,将大鼠随机分为模型组,前列康组(1.54 g·kg⁻¹),生品滋肾丸低、高剂量组(1.8、5.4 g·kg⁻¹),盐炙滋肾丸低、高剂量组(1.8、5.4 g·kg⁻¹),给药剂量按体表面积折算,前列康组给药剂量相当于临床成人等效剂量的2.5倍,滋肾丸低、高剂量分别相当于临床成人等效剂量的1倍和

3倍^[8],每组6只,各组大鼠按体质量10 mL·kg⁻¹灌胃对应药液,空白组、模型组灌胃同体积生理盐水,每日1次,连续给药21 d,模型成功与否通过模型组实验终点的组织病理学及炎症指标予以验证。

2.5 样本采集与处理 末次给药结束后,大鼠禁食不禁水12 h,记录体质量后,麻醉,腹主动脉取血,室温静置30 min后于4 °C,3 500 r·min⁻¹离心15 min,离心半径9.5 cm,小心吸取上清液,分装于无菌离心管中,立即置于-80 °C冰箱中保存。取血后立即解剖大鼠,摘取双侧肾上腺、脾脏及前列腺,置于生理盐水中轻轻漂洗,用滤纸吸干表面水分后精确称量各器官湿质量并记录,随后取一侧前列腺组织腹侧叶于4%多聚甲醛中固定,用于石蜡包埋和HE染色。

2.6 滋肾丸治疗CP药效学评价

2.6.1 各组大鼠脏器指数 计算各组大鼠前列腺、肾上腺、脾脏器指数。计算公式为脏器指数(mg·g⁻¹)=脏器湿质量(mg)/大鼠终末体质量(g)。

2.6.2 HE染色观察前列腺组织病理变化 取4%多聚甲醛固定的前列腺组织,进行石蜡包埋、切片、HE染色,置光学显微镜下观察前列腺组织的病理形态学变化,并对HE染色切片进行半定量评分,评估前列腺组织的病理变化程度,评分标准主要针对炎性细胞浸润程度、腺体结构破坏程度及间质纤维化程度3项指标进行^[12],具体评分标准见表1。

表1 慢性前列腺炎病理评分标准

Table 1 Pathological scoring criteria for chronic prostatitis

评分/分	炎性细胞浸润程度	腺体结构改变	间质纤维化程度
0分	无或极少散在	腺体结构正常,无萎缩;上皮细胞排列整齐	无间质增宽
1分	轻度、散在浸润	腺体出现轻度萎缩;无或少腺体破坏;腺泡上皮细胞轻度增生、排列紊乱	间质轻度纤维化,轻度增宽
2分	中度、弥漫性浸润	腺体出现中度萎缩;少量腺体破坏;腺泡上皮细胞明显增生、排列紊乱	间质中度纤维化,中度增宽,腺体分隔
3分	重度、弥漫性密集浸润	腺体形态严重畸形、重度萎缩或破坏;腺泡上皮细胞广泛增生/破坏	间质广泛纤维化,重度增宽,腺体被广泛分隔、挤压、变形

2.6.3 ELISA检测血清IL-1 β 、IL-18及Bcl-2水平 取2.5项下采集的大鼠血清,按ELISA试剂盒说明书,酶标仪450 nm测定各孔吸光度A,代入标准曲线计算IL-1 β 、IL-18及Bcl-2水平。

2.7 血清非靶向代谢组学分析

2.7.1 血清样本处理 取冻存的空白组、模型组、

生品滋肾丸高剂量组(以下简称生品滋肾丸组)及盐炙滋肾丸高剂量组(以下简称盐炙滋肾丸组)大鼠血清样本缓慢解冻,各精确移取50 μ L加入200 μ L预冷的提取液(甲醇-乙腈1:1),置于涡旋振荡器上以750 r·min⁻¹振荡5 min,取出静置5 min后过滤,收集滤液备用。为监控分析过程的稳定性与数据质量,从所有样本中分别取等量提取液混合制成质量控制(QC)样本。

2.7.2 检测条件 色谱条件为Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μ m),柱温30 °C,流动相A相为含25 mmol·L⁻¹乙酸铵与25 mmol·L⁻¹氨水的水溶液(pH=9.75),B相为乙腈,梯度洗脱(0~0.25 min, 95% B; 0.25~3.5 min, 95%~65% B; 3.5~4 min, 65%~40% B; 4~4.5 min, 40% B; 4.5~4.55 min, 40%~95% B; 4.55~6 min, 95% B),流速0.5 mL·min⁻¹,进样量2 μ L。质谱条件为电喷雾离子源(ESI),正、负离子全扫描模式,离子源温度300 °C,鞘气流速50 Arb,辅助气流速15 Arb,喷雾电压3.8 kV和-3.4 kV。一级质谱全扫描分辨率设为60 000,二级质谱分辨率设为15 000,并采用阶梯碰撞能(20、30、40 eV)。

2.7.3 数据处理及分析 原始数据进行色谱峰识别、提取、对齐、积分及鉴定,并进行相对标准偏差去噪、总离子流强度归一化。将归一化后的数据导入MetaboAnalyst 6.0平台进行最小值的1/5填充缺失值、lg₁₀转换,随后导入SIMCA 14.1软件进行PCA及OPLS-DA分析,根据OPLS-DA模型获取VIP值,将VIP值>1.0且t检验P<0.05的代谢物定义为差异代谢物。最后,利用MetaboAnalyst 6.0平台对差异代谢物进行KEGG通路富集分析。

2.8 代谢组学与网络药理学联合分析 利用微生物平台绘制网络药理学KEGG富集通路与代谢组学富集通路的韦恩图,筛选二者交集通路。并将差异代谢物与网络药理学的交集靶点导入Cytoscape 3.10.4的插件Metscape,构建“差异代谢物-反应-酶-基因”网络,筛选二者重叠靶点。

2.9 统计学分析 所有计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用SPSS 25.0软件进行统计分析。对数据进行正态性检验和方差齐性检验;若符合正态分布,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较若方差齐用最小显著性差异法(LSD),方差不齐用Dunnett's T3法。不符合正态分布,则采用Kruskal-Wallis H秩和检验进行多组间比较。P<0.05为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 滋肾丸盐炙前后化学成分鉴定与差异分析

对生品、盐炙品滋肾丸的醇水双提液样品的总离子流图进行定性和半定量分析。共鉴定出76个化学成分,主要包括黄柏碱、小檗碱等生物碱类,芒果苷、新芒果苷等酮类,知母皂苷BⅢ等皂苷类及桂皮醛等挥发性成分,炮制前后未出现成分种类增减,但成分含量有变化。PCA结果显示,生品组与盐炙组样本点明显分离,表明盐炙后滋肾丸化学成分发生明显改变。OPLS-DA模型得分中两组进一步分离,其 R^2Y (模型对Y变量的解释率)和 Q^2 (模型的预测率)均 >0.9 ,200次置换检验 Q^2 回归线的截距 <0 ,表明模型拟合度和预测能力良好,模型稳定可靠。以VIP值 >1.0 结合t检验 $P<0.05$ 为标准,筛选出34个差异成分,其中知母皂苷BⅢ、小檗碱、小檗红碱、黄柏碱等14个成分盐炙后含量上升,知母皂苷Ⅱ、新芒果苷等20个成分盐炙后含量下降。见增强出版附加材料。

3.2 基于网络药理学的滋肾丸抗CP机制预测

3.2.1 滋肾丸抗CP潜在活性成分、靶点及CP疾病靶点筛选

将3.1项下鉴定的滋肾丸化学成分通过Swiss ADME平台进行类药性筛选,共获得潜在活性成分28个。利用Swiss Target Prediction数据库对活性成分进行靶点预测,经去重后共得到潜在作用靶点590个。通过Gene Cards、OMIM数据库检索,共获得与“Chronic Prostatitis”相关的疾病靶点1425个。见表2。

3.2.2 滋肾丸抗CP潜在核心靶点筛选与PPI网络分析

将成分靶点与疾病靶点取交集,获得滋肾丸抗CP的潜在作用靶点185个。将交集靶点导入STRING数据库构建PPI网络,并利用CytoNCA插件进行拓扑分析,以度值、中介中心性、接近中心性、特征向量中心性及局部平均连通性度数的中位值为阈值,筛选出关键靶点57个,其中度值排名前10的为信号转导与转录激活因子3(STAT3)、非受体酪氨酸激酶(SRC)、蛋白激酶B1(Akt1)、热休克蛋白90 α A1(HSP90AA1)、表皮生长因子受体(EGFR)、连环蛋白 β_1 (CTNNB1)、肿瘤坏死因子(TNF)、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶催化亚基 α (PIK3CA)、雌激素受体1(ESR1)、AP-1转录因子(JUN)。见增强出版附加材料。

3.2.3 滋肾丸抗CP潜在靶点的GO功能与KEGG通路富集分析

通过Metascape数据库对185个交集靶点进行GO功能与KEGG通路富集分析。GO

表2 滋肾丸潜在活性成分

Table 2 Potential active components of Zishenwan

No.	化合物	化学式	变化趋势	No.	化合物	化学式	变化趋势
1	松柏醛	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	↑	15	木兰花碱*	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	↑
2	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	↑	16	黄柏碱*	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	↑ ¹⁾
3	鸢尾根酮	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	↓ ²⁾	17	黄柏酮酸	C ₂₆ H ₃₂ O ₈	↑
4	草质素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	↑	18	缬氨酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂	↑
5	儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	↑	19	脯氨酸	C ₅ H ₉ NO ₂	↓
6	脱落酸	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	↓	20	5-羟甲基糠醛	C ₆ H ₆ O ₃	↑ ¹⁾
7	2'-O-甲基异甘草素	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	↑ ¹⁾	21	4-羟基苯甲醛	C ₇ H ₆ O ₂	↑ ²⁾
8	异樱花素	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	↑	22	4-羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₃	↑ ²⁾
9	构树素B	C ₁₆ H ₁₈ O ₃	↑	23	苯乙酮	C ₈ H ₈ O	↓ ²⁾
10	阿魏酰酪胺	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	↓	24	3-异丁基戊二酸	C ₉ H ₁₆ O ₄	↑
11	三羟基十八碳烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	↓	25	壬二酸	C ₉ H ₁₆ O ₄	↑
12	小檗红碱*	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	↑ ²⁾	26	秦皮乙素	C ₉ H ₆ O ₄	↑
13	小檗碱*	C ₂₀ H ₁₇ NO ₄	↑ ¹⁾	27	反式肉桂醛	C ₉ H ₈ O	↓
14	药根碱*	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	↑ ¹⁾	28	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	↓ ²⁾

注:↑,上升;↓,下降;与生品组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;*,该成分经对照品比对确认

功能分析共获得2540条显著富集条目,其中生物过程(BP)2212条,主要涉及细胞表面受体信号转导、细胞迁移调控、激素刺激应答及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联反应调控等;细胞组分(CC)110条,主要富集于受体复合物、膜筏、膜微结构域及黏着斑等结构;分子功能(MF)218条,主要与蛋白激酶活性及激酶结合相关。KEGG富集分析共得到196条通路,主要涉及磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路、MAPK信号通路、脂质与动脉粥样硬化、前列腺癌及内分泌抵抗等与炎症、肿瘤密切相关的通路。见增强出版附加材料。

3.2.4 滋肾丸抗CP的“成分-靶点-通路”网络构建

构建前20条KEGG通路及与滋肾丸活性成分、靶点的“成分-靶点-通路”网络。小檗碱、黄柏碱、木兰花碱、药根碱等成分及癌症通路、PI3K/Akt信号通路、MAPK信号通路等通路在网络图中有较高的度值。见增强出版附加材料。

3.3 知母、黄柏盐炙前后组方滋肾丸对CP大鼠药效学指标的影响

3.3.1 对CP大鼠脏器指数的影响

与空白组比较,模型组大鼠的前列腺、肾上腺、脾脏指数明显升

高($P<0.05, P<0.01$),提示CP模型复制成功,并伴随脾脏与肾上腺的增大。与模型组比较,前列康组和各滋肾丸给药组前列腺指数明显降低($P<0.05, P<0.01$)。在相同剂量下,与生品组比较,盐炙组前列腺指数有所降低,但差异无统计学意义。与模型组比较,前列康组与盐炙滋肾丸高剂量组肾上腺指数明显降低($P<0.05, P<0.01$),盐炙滋肾丸高剂量组脾指数明显降低($P<0.05$)。见表3。

3.3.2 对CP大鼠前列腺组织病理学形态的影响 空白组大鼠前列腺组织结构正常,腺泡形态规则,上皮细胞排列整齐,间质无明显炎性细胞浸润。模型组大鼠前列腺组织腺体严重萎缩,腺上皮细胞增生或坏死脱落,间质严重增宽,并见大量弥漫性炎症细胞浸润,与空白组比较,其病理评分显著升高($P<0.01$),提示造模成功。与模型组比较,前列康组大鼠前列腺组织炎症细胞浸润范围显著缩小,腺体结构得到较好改善,病理评分显著降低($P<0.01$);2种滋肾丸高剂量组可见炎症浸润减少,腺体结构趋于规则,间质纤维化程度显著

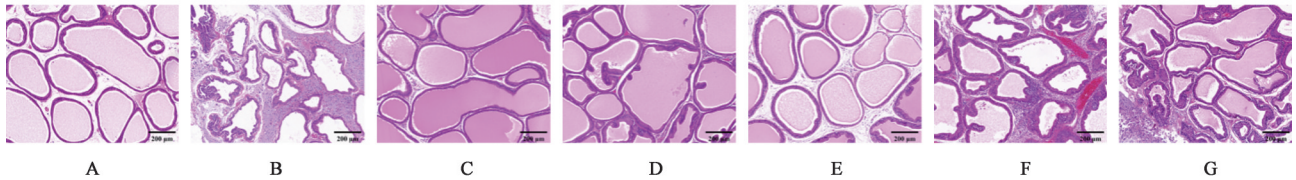
表3 知母、黄柏盐炙前后滋肾丸对CP大鼠脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Zishenwan on organ index of CP rats before and after salt processing of Anemarrhenae Rhizoma (AR) and Phellodendri Chinensis Cortex (PCC) ($\bar{x} \pm s, n=6$) mg·g⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	前列腺指数	肾上腺指数	脾指数
空白组		1.96±0.09	0.14±0.04	1.67±0.13
模型组		2.66±0.11 ²⁾	0.28±0.02 ²⁾	1.95±0.17 ¹⁾
前列康组	1.54	2.08±0.06 ⁴⁾	0.19±0.02 ⁴⁾	2.00±0.09
生品滋肾丸高剂量组	5.4	2.14±0.13 ⁴⁾	0.21±0.05	1.77±0.09
盐炙滋肾丸高剂量组	5.4	2.11±0.08 ⁴⁾	0.18±0.05 ³⁾	1.67±0.12 ³⁾
生品滋肾丸低剂量组	1.8	2.42±0.16 ³⁾	0.22±0.06	1.81±0.20
盐炙滋肾丸低剂量组	1.8	2.39±0.19 ³⁾	0.22±0.04	1.82±0.18

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05, ^2)$ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05, ^4)$ $P<0.01$ (表4和表5同)

减轻,生品高剂量组病理评分明显降低($P<0.05$),盐炙高剂量组病理评分显著降低($P<0.01$)。在相同剂量下,与生品组比较,盐炙组病理评分有所降低,但差异无统计学意义。见图1、表4。



注:A.空白组;B.模型组;C.前列康组;D.生品滋肾丸高剂量组;E.盐炙品滋肾丸高剂量组;F.生品滋肾丸低剂量组;G.盐炙品滋肾丸低剂量组
图1 知母、黄柏盐炙前后滋肾丸对CP大鼠前列腺组织病理学形态的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of Zishenwan on prostate histopathological morphology of CP rats before and after salt processing of AR and PCC (HE, ×100)

表4 知母、黄柏盐炙前后滋肾丸对CP大鼠前列腺组织病理评分的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Zishenwan on prostate histopathological score of CP rats before and after salt processing of AR and PCC ($\bar{x} \pm s, n=6$) 分

组别	剂量/g·kg ⁻¹	炎性细胞浸润	腺体结构	间质纤维化	总分
空白组		0.50±0.55	0.67±0.52	0.33±0.52	1.50±0.55
模型组		2.83±0.41 ²⁾	2.83±0.41 ²⁾	2.67±0.52 ²⁾	8.33±0.52 ²⁾
前列康组	1.54	1.50±0.84	0.67±0.82 ⁴⁾	0.33±0.52 ⁴⁾	2.50±0.84 ⁴⁾
生品滋肾丸高剂量组	5.4	1.17±0.41	1.00±0.63 ³⁾	0.50±0.55 ³⁾	2.67±0.52 ³⁾
盐炙滋肾丸高剂量组	5.4	1.00±0.63 ³⁾	0.83±0.41 ⁴⁾	0.33±0.52 ⁴⁾	2.17±0.41 ⁴⁾
生品滋肾丸低剂量组	1.8	2.67±0.52	2.00±0.00	1.33±0.52	6.00±0.63
盐炙滋肾丸低剂量组	1.8	2.50±0.84	1.67±0.52	1.33±0.52	5.50±0.84

3.3.3 对CP大鼠血清IL-1 β 、IL-18及Bcl-2水平的调控 与空白组比较,模型组大鼠IL-1 β 、IL-18、Bcl-2水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,前列康组、盐炙滋肾丸高剂量组的IL-1 β 、IL-18、Bcl-2水平均显著降低($P<0.01$),生品滋肾丸高剂量组的IL-1 β 、IL-18、Bcl-2水平明显降低($P<0.05, P<0.01$)。在相同剂量下,与生品组比较,盐炙组大鼠血清IL-1 β 、IL-18、Bcl-2降低,但差异无统计学意义。见表5。

3.4 基于血清代谢组学的滋肾丸盐炙增效机制分析

3.4.1 多元统计分析 PCA结果显示,无明显离群样本,且QC样本聚集良好,说明检测系统稳定可靠。空白组与模型组的样本点基本分离,说明造模引起大鼠血清代谢物紊乱。盐炙组与生品组部分重叠,但均与模型组分离。OPLS-DA结果显示,各组样本点明显区分,各组 R^2Y 和 Q^2 值均 >0.6 ,200次置换检验 Q^2 回归线的纵截距 <0 ,提示模型拟合度和

表5 知母、黄柏盐炙前后滋肾丸对CP大鼠血清IL-1 β 、IL-18及Bcl-2水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Zishenwan on serum levels of IL-1 β , IL-18, and Bcl-2 in CP rats before and after salt processing of AR and PCC ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹	IL-18/ng·L ⁻¹	Bcl-2/ μ g·L ⁻¹
空白组		66.96 \pm 16.51	33.28 \pm 10.98	0.20 \pm 0.05
模型组		120.60 \pm 11.06 ²⁾	56.65 \pm 6.62 ²⁾	0.43 \pm 0.07 ²⁾
前列康组	1.54	89.20 \pm 7.28 ⁴⁾	39.12 \pm 4.31 ⁴⁾	0.26 \pm 0.06 ⁴⁾
生品滋肾丸高剂量组	5.4	93.60 \pm 15.29 ³⁾	43.28 \pm 6.91 ³⁾	0.28 \pm 0.06 ⁴⁾
盐炙滋肾丸高剂量组	5.4	88.48 \pm 11.81 ⁴⁾	37.22 \pm 5.21 ⁴⁾	0.27 \pm 0.05 ⁴⁾
生品滋肾丸低剂量组	1.8	103.50 \pm 15.79	47.17 \pm 9.62	0.33 \pm 0.09
盐炙滋肾丸低剂量组	1.8	98.03 \pm 14.06	46.66 \pm 6.32	0.32 \pm 0.06

预测能力良好,模型稳定可靠。见增强出版附加材料。

3.4.2 差异代谢物分析 基于OPLS-DA模型获得的VIP值>1.0,结合t检验P<0.05,筛选出组间差异代谢物。与模型组比较,空白组、盐炙组、生品组分别筛选出215、212、158个差异代谢物;与生品组比较,盐炙组筛选出117个差异代谢物。对差异代谢物进行分析,盐炙滋肾丸组回调差异代谢物共38个,其中,生品组与盐炙组共同回调代谢物23个,盐炙组特异性回调代谢物15个。见增强出版附加材料。

3.4.3 代谢通路分析 对各组差异代谢物进行KEGG通路富集分析,富集到 β -丙氨酸、吡啶乙酸等14个给药后回调代谢物。空白组与模型组间的差异代谢物富集于嘧啶代谢、 β -丙氨酸代谢、泛酸和辅酶A生物合成等通路。模型组与生品滋肾丸组间的差异代谢物富集于组氨酸代谢、 β -丙氨酸代谢、色氨酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢及花生四烯酸代谢。模型组与盐炙滋肾丸组间的差异代谢物富集于嘧啶代谢、泛酸和辅酶A生物合成、 β -丙氨酸代谢、组氨酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、色氨酸代谢等8条通路。生品滋肾丸组与盐炙滋肾丸组间的差异代谢物富集于色氨酸代谢、 β -丙氨酸代谢、组氨酸代谢及牛磺酸和亚牛磺酸代谢通路。见表6及增强出版附加材料。

将各组Impact值>0.1的通路整合绘制矩阵点图,结果显示, β -丙氨酸代谢是所有组间均富集到的核心通路;泛酸和辅酶A生物合成、嘧啶代谢为盐炙滋肾丸组特异性回调通路;精氨酸与脯氨酸代

谢、精氨酸生物合成为盐炙组特异性调节通路;色氨酸代谢、组氨酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢通路在模型组对生品滋肾丸组、模型组对盐炙滋肾丸组、生品滋肾丸组对盐炙滋肾丸组中均被富集。见增强出版附加材料。

表6 不同滋肾丸干预后CP大鼠通路富集分析中关键差异代谢物信息

Table 6 Key serum differential metabolites in CP rats after intervention with different Zishenwan

No.	代谢物	化学式	HMDB ID	B/A	C/B	D/B	D/C
1	β -丙氨酸	C ₃ H ₇ NO ₂	HMDB0000056	↓	↑ ¹⁾	↑ ²⁾	↑ ¹⁾
2	吡啶乙酸	C ₁₀ H ₉ NO ₂	HMDB0000197	↓	↑	↑ ²⁾	↑
3	色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	HMDB0030396	↓	↑ ¹⁾	↑ ²⁾	↑ ¹⁾
4	胍基乙酸	C ₃ H ₇ N ₃ O ₂	HMDB0000128	↓	↑	↑ ¹⁾	↑
5	尿嘧啶	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	HMDB0000300	↓ ²⁾	↑ ²⁾	↑ ²⁾	↑
6	5,6-二氢尿嘧啶	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	HMDB0000076	↓ ¹⁾	↑	↑ ²⁾	↑
7	天冬氨酸	C ₄ H ₇ NO ₄	HMDB0000191	↓	↑ ¹⁾	↑ ¹⁾	↑ ¹⁾
8	精氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	HMDB0000517	↓	↑	↑ ²⁾	↑
9	泛酸	C ₉ H ₁₇ NO ₅	HMDB0000210	↓	↑	↑ ¹⁾	↑ ²⁾
10	犬尿氨酸	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	HMDB0000684	↑	↓ ¹⁾	↓ ¹⁾	↓
11	犬尿嘧啶	C ₁₀ H ₇ NO ₃	HMDB0000715	↑ ¹⁾	↓ ¹⁾	↓ ¹⁾	↓
12	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	HMDB0000220	↑ ¹⁾	↓	↓ ²⁾	↓
13	尿酸	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	HMDB0000289	↑ ²⁾	↓	↓	↓ ²⁾
14	脯氨酸	C ₅ H ₉ NO ₂	HMDB0000162	↑	↓	↓ ²⁾	↓

注: ↑. 上升; ↓. 下降; A. 空白组; B. 模型组; C. 生品滋肾丸组; D. 盐炙滋肾丸组; 组间比较¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

3.5 代谢组学与网络药理学联合分析 196条网络药理学KEGG富集通路与8条盐炙组的代谢组学富集通路共有2条交集通路,分别为色氨酸代谢、精氨酸与脯氨酸代谢。将模型组对盐炙滋肾丸组、生品滋肾丸组对盐炙滋肾丸组的差异代谢物导入Metscape构建“差异代谢物-反应-酶-基因”网络,并识别与网络药理学交集靶点重叠的基因。基于模型组对盐炙滋肾丸组差异代谢物构建的网络中,代谢组学与网络药理学重叠靶点及相关通路为色氨酸代谢,靶点单胺氧化酶A(MAOA)、儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT);精氨酸与脯氨酸代谢,靶点精氨酸酶1(ARG1);酪氨酸代谢,靶点COMT;脂肪酸从头合成,靶点脂肪酸合成酶(FASN)。基于生品滋肾丸组对盐炙滋肾丸组差异代谢物构建的网络中,色氨酸代谢、酪氨酸代谢及脂肪酸从头合成再次被富集,此外,还涉及嘌呤代谢,靶点髓过氧化物酶(MPO)、黄嘌呤脱氢酶(XDH);三羧酸循环,靶点异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)。色氨酸代谢为构建的2个关联网络中共同富集通路,且在MetaboAnalyst通路

分析中 Impact 值 > 0.1, 表明其在两组学数据中均具有重要的生物学影响。进一步将网络药理学交集靶点导入上述网络中构建色氨酸代谢的“代谢物-反应-酶-基因”双向调控子网络, 结果显示, 色氨酸代谢通路除直接关联 MAOA、COMT 外, 还包括多个细胞色素 P450 (CYP) 酶家族的亚型, CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2D6、CYP3A4、CYP19A1。见增强出版附加材料。

4 讨论

化学分析表明, 滋肾丸盐炙后多种成分发生显著变化, 其中, 小檗碱、小檗红碱、黄柏碱含量显著增加。研究表明, 小檗红碱可通过上调转运蛋白 OCT2 的表达, 增强黄柏整体活性成分的肾脏靶向性, 其含量增加可能是黄柏实现“盐炙入肾”的关键^[13]。小檗碱、黄柏碱已被证实可调节 PI3K/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、核转录因子- κ B (NF- κ B)、MAPK 等与 CP 炎症、纤维化及疼痛相关的通路^[14-17], 且盐炙后其在肾组织中的分布也增加^[10]。上述成分变化为盐炙后药效增强提供了物质基础。

IL-1 β 与 IL-18 作为 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体下游关键因子, 在 CP 中发挥核心作用^[14]; Bcl-2 是关键抗凋亡蛋白, 其在 CP 状态下高表达会抑制炎症细胞的正常凋亡, 导致炎症迁延^[18-19]。本研究药效学结果显示, 生品、盐炙品滋肾丸均可显著降低 CP 大鼠前列腺指数, 改善组织病理损伤, 下调血清 IL-1 β 、IL-18 及 Bcl-2 水平, 且盐炙品优于生品, 提示盐炙后滋肾丸抗炎作用增强。

代谢组学结果显示, 生品、盐炙品滋肾丸均可回调 β -丙氨酸代谢, 表现为该通路中 β -丙氨酸、天冬氨酸等代谢物回升, 且盐炙品回调幅度大于生品, 表明滋肾丸可能通过增强抗氧化防御和蛋白质合成能力促进前列腺组织损伤修复, 且盐炙后作用进一步增强^[20-21]。此外, 盐炙组还表现出对泛酸和辅酶 A 生物合成、嘧啶代谢的回调作用; β -丙氨酸和泛酸是合成辅酶 A 的前体和必需组分, 其水平上调可促进辅酶 A 的生物合成^[22]; 辅酶 A 合成亦受 PI3K/Akt 通路调控, 该通路可影响泛酸摄取及辅酶 A 合成酶的表达^[23]。辅酶 A 是能量代谢与乙酰化反应的核心辅因子, 其合成增加有助于改善前列腺细胞的能量稳态并支持抗炎过程^[24]。本研究盐炙组大鼠血清泛酸、5,6-二氢尿嘧啶及 β -丙氨酸均上调, 表明盐炙滋肾丸可能通过激活 PI3K/Akt 通路促进辅酶 A 合成, 从而改善 CP 大鼠的细胞能量代谢并增强抗炎能力。

色氨酸代谢在维持免疫稳态和调控炎症反应

中具有重要作用, 其代谢产物吲哚乙酸可作为芳烃受体 (AhR) 配体, 发挥抗炎作用^[25]; 联合分析筛选出的靶点 CYP1A1、CYP1B1 等 CYP450 酶可能介导色氨酸转化为包括吲哚乙酸在内的 AhR 配体, 进而参与调控 Th17/Treg 平衡与炎症反应^[26-27]。该代谢通路另一代谢产物犬尿氨酸可激活 AhR 信号通路间接增强 STAT3 活性, 促进 IL-6 合成^[28]; 同时, 犬尿氨酸途径代谢物可激活 PI3K/Akt 信号通路, 加剧细胞异常增殖, 并促进 NLRP3 炎症小体的活化与 IL-1 β 释放^[29-30]。本研究中, 盐炙组大鼠血清色氨酸、吲哚乙酸上调, 犬尿氨酸下调, 表明盐炙滋肾丸可能通过调控 CYP450 酶及 STAT3 等靶点, 干预 AhR/STAT3 与 PI3K/Akt 等促炎信号通路, 从而在 CP 中发挥免疫调节与抗炎作用。

精氨酸和脯氨酸代谢参与炎症、组织修复等过程, 精氨酸是该通路中合成一氧化氮、肌酸及多胺的关键前体^[31], 胍基乙酸为肌酸合成的必需的中间体^[32], 而肌酸在炎症反应中具有组织保护作用^[33]。联合分析靶点 ARG1 是该通路中催化多胺合成的关键酶, 其表达上调可促进组织修复^[34]。盐炙组大鼠血清精氨酸、胍基乙酸上调, 表明其可能通过上调 ARG1, 促进肌酸与多胺合成, 发挥组织保护作用; 同时, 本研究盐炙组大鼠血清脯氨酸下调, 提示胶原过度沉积抑制, 可延缓纤维化进程^[35]。

盐炙组对生品组的差异代谢物与网络药理学的关联分析还涉及脂肪酸从头合成、嘌呤代谢等通路。脂肪酸从头合成通路的终产物棕榈酸不仅是合成致痛介质的前体, 还可通过激活巨噬细胞 MAPK 信号通路, 促进 NLRP3 炎症小体活化及 IL-1 β 等促炎因子的释放^[36]。网络药理学预测的核心靶点 JUN 作为 MAPK 通路下游关键转录因子, 其被抑制可减少 IL-1 β 的释放^[37]; JUN 还可调控该通路限速酶乙酰辅酶 A 羧化酶 1 的表达, 联合分析靶点 FASN 为该通路另一限速酶, 二者均可调节棕榈酸的合成^[38]。本研究盐炙组大鼠血清棕榈酸水平下调, 表明其可能通过协同抑制 JUN、FASN 等靶点, 减少棕榈酸合成及其对 MAPK/NLRP3 通路的激活, 进而减轻炎症与疼痛反应。嘌呤代谢中, 盐炙组大鼠血清尿酸水平下调, 联合分析靶点 XDH、MPO 参与该通路调控。CP 状态下组织炎症和氧化损伤会激活嘌呤代谢, 导致尿酸升高^[39]; 盐炙滋肾丸可能通过调控 XDH 减少尿酸及其伴生活性氧的源头生成^[40], 并通过调节 MPO 减轻中性粒细胞介导的氧化损伤^[41]。

考虑到生物个体差异、样本量等因素,本研究
中盐炙品与生品在药效指标上虽未达到统计学差
异,但盐炙品呈现优于生品的趋势,其数值更接近
空白组,该趋势与盐炙后活性成分升高、盐炙组回
调更多代谢通路的结果相一致。综上所述,与生品
比较,盐炙滋肾丸能更有效地改善CP炎症与组织
损伤,其机制可能在于盐炙后多成分协同抑制PI3K/
Akt,MAPK等促炎信号通路,并多靶点调控色氨酸、
精氨酸、脂肪酸及泛酸代谢等多条途径,从而协同增
强抗炎、调节免疫及组织修复作用。本研究初步阐明
滋肾丸中知母、黄柏盐炙机制,但关键靶点与通路尚
未经实验直接验证,亦未探究炮制前后体内成分变
化,后续拟开展蛋白免疫印迹法等技术验证核心靶点
与通路,并结合药物代谢动力学方法,为盐炙增效机
制提供更深入的科学内涵。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 张春玲,范林宏,范顺明,等. 滋肾丸研究进展[J]. 中药与临床, 2019,10(Z2):59-64.
ZHANG C L, FAN L H, FAN S M, et al. Research progress on Zishen pill[J]. Pharm Clin Chin Mater Med, 2019, 10(Z2): 59-64.
- [2] 王文君,杨泽敏,刘安,等. 知母化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物预测分析[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(4): 934-945.
WANG W J, YANG Z M, LIU A, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects of Anemarrhenae Rhizoma and predictive analysis of its quality markers[J]. China J Chin Mater Med, 2025, 50(4): 934-945.
- [3] 李靖琪,张琪,陈雨桐,等. 去亚甲基小檗碱的药理作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2025, 41(1): 7-12.
LI J Q, ZHANG Q, CHEN Y T, et al. Advances in pharmacological effects of demethyleberberine[J]. Chin Pharmacol Bull, 2025, 41(1): 7-12.
- [4] 周嘉浩,丁子涵,宋培荣,等. 桂皮醛的抗炎作用及其作用机制研究进展[J]. 中药药理与临床, 2026, doi: 10. 13412/j. cnki. zyy. 20250929. 009.
ZHOU J H, DING Z H, SONG P R, et al. Anti-inflammatory effect and mechanisms of cinnamaldehyde: A review[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2026, doi: 10. 13412/j. cnki. zyy. 20250929. 009.
- [5] 苏萌,谭福雄,吕洁,等. 基于网络药理学、分子对接及实验验证研究知母-黄柏药对抗炎的物质基础[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(4): 687-698.
SU M, TAN F X, LYU J, et al. Study on the material basis of Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex against inflammation based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification[J]. Nat Prod Res Dev, 2022, 34(4): 687-698.
- [6] 李生龙,卢刚刚,赵渊博,等. 慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合

征中医药治疗研究进展[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(10): 2648-2653.

LI S L, LU G G, ZHAO Y B, et al. Research progress in treatment of chronic prostatitis/ chronic pelvic pain syndrome with traditional Chinese medicine[J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(10): 2648-2653.

[7] 范顺明,杨勇勋,张春玲,等. 知母-黄柏药对盐炙前后HPLC指纹图谱及多指标成分含量变化[J]. 中成药, 2023, 45(3): 820-828.

FAN S M, YANG Y X, ZHANG C L, et al. Changes of HPLC fingerprint and multi-index components of Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri chinensis herb pair before and after salt-processed[J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(3): 820-828.

[8] 张春玲,范顺明,李星,等. 知母黄柏盐制前后组成滋肾丸对慢性前列腺炎及肠道菌群的对比研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(1): 34-40.

ZHANG C L, FAN S M, LI X, et al. Comparative study on effects of different Zishen pill composed of raw or salted Anemarrhenae Rhizoma and Phellodendri Chinensis Cortex on chronic prostatitis and intestinal flora[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(1): 34-40.

[9] 苏晓楠. 知母盐炙效应物质基础及药代动力学研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.

SU X N. Material basis and pharmacokinetic study of salt-processed Anemarrhenae Rhizoma [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2020.

[10] 张凡,孟莉,刘蓬蓬,等. 黄柏生品与盐炙品中生物碱类成分在大鼠肾组织脏器中的吸收差异[J]. 中成药, 2020, 42(11): 2954-2959.

ZHANG F, MENG L, LIU P P, et al. Absorption differences between the raw and salt-water processed *Phellodendron chinense* in rats kidney[J]. Chin Tradit Pat Med, 2020, 42(11): 2954-2959.

[11] 范顺明,张春玲,王佳琪,等. 知母-黄柏药对盐炙前后配伍对2型糖尿病大鼠糖脂代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(3): 22-29.

FAN S M, ZHANG C L, WANG J Q, et al. Effect of compatibility of Anemarrhenae Rhizoma-Phellodendri Chinensis Cortex couplet medicines on glucolipid metabolism in type 2 diabetic rats before and after salt-processed[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2021, 27(3): 22-29.

[12] 熊悦,程世源,张丹丹,等. 基于肠道菌群和代谢组学探讨金刚藤胶囊治疗慢性非细菌性前列腺炎作用机制[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(19): 5521-5533.

XIONG Y, CHENG S Y, ZHANG D D, et al. Mechanism of Jinggangteng capsules in ameliorating chronic nonbacterial prostatitis based on gut microbiota and metabolomics[J]. China J Chin Mater Med, 2025, 50(19): 5521-5533.

[13] 葛修通. 基于“细胞摄取-配体垂钓”技术探讨黄柏“盐炙入肾”的炮制作用机制[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2025.

GE X T. Study on the processing mechanism of "salt-processed Phellodendri Chinensis Cortex entering kidney" based on "cellular uptake-ligand fishing" technology [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2025.

- [14] 尚博毅, 杨子朝, 王小龙, 等. 中医药干预慢性前列腺炎相关信号通路研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20251826.
SHANG B Y, YANG Z C, WANG X L, et al. Research progress on intervention of TCM in signaling pathways related to chronic prostatitis[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20251826.
- [15] TIAN E, SHARMA G, DAI C. Neuroprotective properties of berberine: Molecular mechanisms and clinical implications[J]. Antioxid(Basel Switz), 2023, 12(10):1883.
- [16] HU L, WANG J, WU N, et al. Utilizing network pharmacology and experimental validation to investigate the underlying mechanism of phellodendrine on inflammation[J]. Peer J, 2022, 10:e13852.
- [17] 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.
- [18] KAYAGAKI N, WEBSTER J D, NEWTON K. Control of cell death in health and disease[J]. Annu Rev Pathol, 2024, 19:157-180.
- [19] 宋武, 李冬阳, 袁海川, 等. 前列腺液中IL-8浓度与前列腺增生组织中bFGF、Bcl-2表达的相关性[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(2):104-107.
SONG W, LI D Y, YUAN H C, et al. Relationship between interleukin-8 levels in expressed prostatic secretion and expressions of bFGF and Bcl-2 in benign prostatic hyperplasia[J]. Natl Med J China, 2016, 96(2):104-107.
- [20] SOLANA-MANRIQUE C, SANZ F J, MARTÍNEZ-CARRIÓN G, et al. Antioxidant and neuroprotective effects of carnosine: Therapeutic implications in neurodegenerative diseases[J]. Antioxid(Basel Switz), 2022, 11(5):848.
- [21] HOLEČEK M. Aspartic acid in health and disease[J]. Nutrients, 2023, 15(18):4023.
- [22] PARTHASARATHY A, SAVKA M A, HUDSON A O. The synthesis and role of β -alanine in plants[J]. Front Plant Sci, 2019, 10:921.
- [23] BARRITT S A, DUBOIS-COYNE S E, DIBBLE C C. Coenzyme A biosynthesis: Mechanisms of regulation, function and disease[J]. Nat Metab, 2024, 6(6):1008-1023.
- [24] DOBRZYN P. CoA in health and disease[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(8):4371.
- [25] CHAJADINE M, LAURANS L, RADECKE T, et al. Harnessing intestinal tryptophan catabolism to relieve atherosclerosis in mice[J]. Nat Commun, 2024, 15(1):6390.
- [26] WANG P C, CHEN S T, HONG Z K, et al. Tryptophan and kynurenine stimulate human decidualization via activating Aryl hydrocarbon receptor: Short title: Kynurenine action on human decidualization[J]. Reprod Toxicol, 2020, 96:282-292.
- [27] SCHIERING C, WINCENT E, METIDJI A, et al. Feedback control of AHR signalling regulates intestinal immunity[J]. Nature, 2017, 542(7640):242-245.
- [28] HUANG T, SONG J, GAO J, et al. Adipocyte-derived kynurenine promotes obesity and insulin resistance by activating the AhR/STAT3/IL-6 signaling[J]. Nat Commun, 2022, 13(1):3489.
- [29] BISHNUPURI K S, ALVARADO D M, KHOURI A N, et al. IDO1 and kynurenine pathway metabolites activate PI3K-Akt signaling in the neoplastic colon epithelium to promote cancer cell proliferation and inhibit apoptosis[J]. Cancer Res, 2019, 79(6):1138-1150.
- [30] LIU Z, LI J, LIN S, et al. PI3K regulates the activation of NLRP3 inflammasome in atherosclerosis through part-dependent Akt signaling pathway[J]. Exp Anim, 2021, 70(4):488-497.
- [31] WU G, MEININGER C J, MCNEAL C J, et al. Role of L-arginine in nitric oxide synthesis and health in humans[J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1332:167-187.
- [32] OSTOJIC S M, JORGA J. Guanidinoacetic acid in human nutrition: Beyond creatine synthesis[J]. Food Sci Nutr, 2023, 11(4):1606-1611.
- [33] LI J Y, GUO Y C, ZHOU H F, et al. Arginine metabolism regulates the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. Nutr Rev, 2023, 81(5):578-586.
- [34] KIELER M, HOFMANN M, SCHABBAUER G. More than just protein building blocks: How amino acids and related metabolic pathways fuel macrophage polarization[J]. FEBS J, 2021, 288(12):3694-3714.
- [35] WONG L, HUTSON P R, BUSHMAN W. Prostatic inflammation induces fibrosis in a mouse model of chronic bacterial infection[J]. PLoS One, 2014, 9(6):e100770.
- [36] KORBECKI J, BAJDAK-RUSINEK K. The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: An overview of molecular mechanisms[J]. Inflamm Res, 2019, 68(11):915-932.
- [37] REDMER T, RAIGEL M, STERNBERG C, et al. JUN mediates the senescence associated secretory phenotype and immune cell recruitment to prevent prostate cancer progression[J]. Mol Cancer, 2024, 23(1):114.
- [38] LI Q, WANG Y, WU S, et al. CircACC1 regulates assembly and activation of AMPK complex under metabolic stress[J]. Cell Metab, 2019, 30(1):157-173. e7.
- [39] LI Z, SU Y, SU H, et al. Serum uric acid and its metabolism-a vital factor in the inflammatory transformation of cancer[J]. J Adv Res, 2026, 83:869-896.
- [40] FURUHASHI M. New insights into purine metabolism in metabolic diseases: Role of xanthine oxidoreductase activity[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2020, 319(5):E827-E834.
- [41] LIN W, CHEN H, CHEN X, et al. The roles of neutrophil-derived myeloperoxidase (MPO) in diseases: The new progress[J]. Antioxid(Basel Switz), 2024, 13(1):132-156.

[责任编辑 吕冬梅]