

基于 ERK/p38 MAPK 信号通路探究解毒活血汤治疗 III 型前列腺炎的作用机制

严张仁¹, 殷宏伟², 潘俊卿¹, 邓思巧², 刘 灿², 张乃忻^{1*}

(1. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330006; 2. 江西中医药大学研究生院, 江西 南昌 330004)

摘要: **目的** 探究解毒活血汤调控 ERK/p38 MAPK 信号通路治疗 III 型前列腺炎的作用机制。**方法** 采用去势手术+苯甲酸雌二醇(EB)诱导慢性前列腺炎大鼠模型。36 只 SD 大鼠随机分为空白组(生理盐水, 4 mL·kg⁻¹)、模型组(生理盐水, 4 mL·kg⁻¹)、阳性药物对照组(前列康片混悬液, 4 mL·kg⁻¹)、解毒活血汤低(4 mL·kg⁻¹)、中(8 mL·kg⁻¹)、高剂量组(12 mL·kg⁻¹), 每组 6 只, 所有实验动物连续给药 30 d。苏木精-伊红(HE)染色观察各组大鼠组织病理学变化; 免疫组化法、RT-PCR、Western Blot 技术检测相关炎症因子及蛋白表达水平。**结果** 与正常对照组相比, 慢性前列腺炎大鼠前列腺组织增生及水肿明显, 炎症浸润增加, 而阳性药物对照组及解毒活血汤各剂量组大鼠前列腺组织病变减轻或消失, 炎症浸润减少, 且与解毒活血汤剂量成正比; 免疫组化表示模型组 p38、P-p38、STAT3、P-STAT3 表达较高, 阳性药物对照组、不同剂量解毒活血汤组的 p38、P-p38、STAT3、P-STAT3 表达呈下降趋势, 且均低于模型组。RT-PCR 结果显示阳性药物对照组及解毒活血汤低、中、高剂量组均能降低大鼠前列腺组织中 TNF-α、IL-2、IL-6 的表达水平; Western Blot 检测提示大鼠疾病发生进展过程中 p38、P-p38、P-ERK1/2、STAT3、P-STAT3 呈高表达状态, 解毒活血汤能够降低其表达, 从而降低相关炎症因子的过度激活。**结论** 解毒活血汤能够抑制 ERK/p38 MAPK 信号通路的过度激活, 从而降低 IL-2、IL-6、TNF-α 等炎症因子的表达, 以改善前列腺组织炎症反应。

关键词: 解毒活血汤; III 型前列腺炎; ERK/p38 MAPK 通路; 毒瘀理论

中图分类号: R277.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2024)01-0067-12

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2024.01.013

The Mechanism of Jiedu Huoxue Decoction in Treating Type III Prostatitis Is Associated with the ERK/p38 MAPK Signaling Pathway

YAN Zhangren¹, YIN Hongwei², PAN Junqing¹, DENG Siqiao², LIU Can², ZHANG Naixin¹

(1. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;

2. Graduate School, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT: Objective To study the mechanism of Jiedu Huoxue Decoction (JDHDX) in treating type III prostatitis through ERK/p38 MAPK signaling pathway. **Methods** The rat model of chronic prostatitis was established by testectomy and using estradiol benzoate (EB). Thirty-six SD rats were randomly divided into sham (normal saline, 4 mL·kg⁻¹), model (normal saline, 4 mL·kg⁻¹), positive drug control (Qianlietang tablet suspension, 4 mL·kg⁻¹), and JDHDX low(4mL·kg⁻¹), medium(8mL·kg⁻¹) and high dose(12mL·kg⁻¹) groups, with 6 rats in each group. All animals were administered continuously for 30 days. The histopathological changes of rats in each group were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression levels of related inflammatory factors and proteins were detected by immunohistochemistry, RT-PCR and Western Blot. **Results** Compared to the sham group, rats in model group had chronic prostatitis with an increase in hyperplasia,

基金项目: 国家自然科学基金项目(81960873); 江西省自然科学基金(20202ACBL206027); 江西中医药大学 1050 青年人才工程项目(5142001001); 江西中医药大学科技创新团队(CXTD22009)

作者简介: 严张仁(1982-)男, 博士, 副教授, 主任中医师, E-mail: 20086128@jxutcm.edu.cn

* **通信作者:** 张乃忻(1978-)男, 主治医师, 研究方向: 中医男科学, E-mail: 3521404813@qq.com

edema, and inflammatory infiltration. However, JDHDX at different doses resulted in a reduction or disappearance of hyperplasia, edema, and inflammatory infiltration. The results of immunohistochemistry showed that the expression of p38, P-p38, STAT3 and P-STAT3 was elevated in the model group, but decreased in the positive drug control group and JDHDX groups. RT-PCR results showed that Qianliekang Tablets and JDHDX down-regulated the expression levels of TNF- α , IL-2, IL-6 and other cytokines in prostate tissue of rats at mRNA level. The results of Western Blot showed that p38, P-p38, P-ERK1/2, STAT3 and P-STAT3 were highly expressed in the process of disease progression in rats, while JDHDX down-regulated their expression, thereby inhibiting the excessive activation of related inflammatory factors. **Conclusion** JDHDX inhibits the excessive activation of ERK/p38 MAPK signaling pathway, thereby down-regulating the expression of IL-2, IL-6, TNF- α and other inflammatory factors, to improve the prostate tissue inflammatory infiltration and improve the inflammatory reaction.

KEY WORDS: Jiedu Huoxue Decoction; type III prostatitis; ERK/p38 MAPK pathway; theory of poison and stasis

根据美国国立卫生研究院(NIH)^[1]的定义,慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征(CP/CPPS)又称之为 III 型前列腺炎,是泌尿生殖系统的炎症反应综合征,占临床前列腺炎病例的 90%以上^[2]。III 型前列腺炎在全球男性中发病率约为 3%~16%,而在我国男性中约为 8.4%^[3-6]。其主要表现为下尿路不适、盆腔及会阴疼痛,或伴有性功能障碍和心理神经学异常等,上述临床症状单独或合并发作,严重影响患者生活质量及身心健康。此外,III 型前列腺炎的病因病机有待商榷,目前研究表明,III 型前列腺炎的发病机制可能与病原体微生物感染、氧化应激反应、细胞因子免疫应答、集体自身免疫机制、遗传等^[7-8]因素有关。因此,为了缓解患者的症状和疼痛,临床上采用了多种药物联合治疗,然而这些治疗缺乏特异性,很难达到令人满意的综合疗效,且 III 型前列腺炎易于复发和延长病程。所以,寻找治疗 III 型前列腺炎的药物并揭示其作用机制是当下研究之重。

中药在治疗 III 型前列腺炎方面具有明显优势,因其独特的辨证体系及良好的疗效而在 III 型前列腺炎的治疗中受到越来越多的关注。著名中医学教授喻文球根据长期临床实践经验,结合 III 型前列腺炎的病因病机,首创“毒瘀理论”,并基于此研制出解毒活血汤(Jiedu Huoxue Decoction,JDHDX)。前期研究表明,经 JDHDX 治疗后,患者的盆腔疼痛、下尿路不适等症状得到有效缓解^[9]。药理实验表明,JDHDX 可通过降低苯甲酸雌二醇(EB)诱导的 III 型前列腺炎大鼠模型中促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-8 的水平,同时增加抗炎细胞因子 IL-10 的表达来消除炎症反应^[10-11]。此外,我们在早期通过相关 miRNA 实验获得了 EB 诱导的 III 型前列腺炎大鼠的 miRNA 表达谱,

结果表明 JDHDX 可能通过调控 NF- κ B 信号通路、p38 MAPK 信号通路、TGF- β /Smad 信号通路及 mTOR 信号通路等来调节细胞增殖、自噬、免疫应答等重要生物学功能对差异 miRNA 进行干预^[12]。进一步研究发现,NF- κ B 超家族参与 EB 诱导的大鼠 III 型前列腺炎模型,且 JDHDX 可以通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活来减轻部分前列腺损伤^[13];另外一项研究证明 JDHDX 可能通过靶向 TGF β /Smad 信号通路抑制炎症反应、活性氧基因(ROS)和细胞凋亡来改善 III 型前列腺炎损伤^[14]。

因此,本研究在前期实验的基础上,通过 EB 诱导的 III 型前列腺炎大鼠模型,探讨 JDHDX 干预 ERK/p38 MAPK 信号通路治疗 III 型前列腺炎的作用机制,并在细胞分子水平解析“毒瘀理论”与 III 型前列腺炎病因病机的互通性,进一步为 JDHDX 的临床应用及中西医结合治疗 III 型前列腺炎的诊疗思路提供理论指导及现实依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 Sprague Dawley(SD)健康雄性大鼠 36 只(4~6 月龄,体质量 200 $\pm$ 20g),购自浙江省医学科学院(动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0002),饲养于江西中医药大学动物实验中心,实验室一定环境(光照 12 h/d、湿度 60% $\pm$ 5%、温度 23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C)下自由摄取食物和水,待大鼠适应环境后开始实验(动物伦理编号:江西中医药大学附属医院动物伦理号 2021-018)。

1.2 试验药物 JDHDX:土茯苓 30 g(江西江中中药饮片有限公司,批号 200528),萆薢 15 g(江西江中中药饮片有限公司,批号 200602),虎杖 15 g(江西江中中药饮片有限公司,批号 200202),王不留行 10 g(江

西江中中药饮片有限公司,批号 191125),莪术 12 g (江西江中中药饮片有限公司,批号 210723),小茴香 6 g(江西江中中药饮片有限公司,批号 211218),车前子 10 g (江西江中中药饮片有限公司,批号 200323),川牛膝 10 g(江西江中中药饮片有限公司,批号 200415),生甘草 6 g(江西江中中药饮片有限公司,批号 210522),临床成人用量。前列康片 0.57 克/片 (浙江康恩贝制药股份有限公司,国药准字 Z33020303,批号 20200786)。

1.3 主要试剂与仪器 主要试剂与仪器见表 1。

表 1 主要试剂与仪器设备

试剂与耗材名称	生产厂家
RIPA 强裂解液	Meilunbio, MA0151
蛋白酶抑制剂 Cocktail(不含 EDTA, 100x DMSO 储液)	大连美仑, MB2678
PMSF	凯基, KGP610
蛋白磷酸酶抑制剂复合物 I (100x)	大连美仑, MB12707
BCA 蛋白定量试剂盒	Thermo, 23209
PAGE 凝胶超快速制备试剂盒 10%	Meilunbio, MA0382
预染彩虹蛋白 marker	Meilunbio, MA0342
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5X)	碧云天, P0015L
脱脂奶粉	BBI, A600669-0250
NC 膜	Merck HATF0010
超敏化学发光检测试剂盒	百赛生物, S6009M
RNAiso Plus	TaKaRa, 9109
NovoScript Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix(gDNA Purge)	Novoprotein, E047-01A
NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus	Novoprotein, E096-01B
DEPC 处理水	美仑生物 P.N., MA0018
蛋白垂直电泳仪(DYY-6C)	北京市六一仪器厂
实时荧光定量 PCR 仪 IQ	ABI PRISM 7700, 美国
Thermal cycler PCR instrument	Bio-RAD, 美国
超高灵敏度化学发光成像系统(Chemi Doc™ XRS)	伯乐生命医学产品(上海)有限公司
大型水平电泳槽	北京东林昌盛生物科技有限责任公司
凝胶成像仪 WD-9413	北京市六一仪器厂
Spectrophotometer ND-1000/ND-2000	NanoDrop, 美国
7500 HT Fast RealTime PCR system	Applied Biosystems, 美国
核酸定量仪	Nanodrop 2000
显微镜	CX41 OLYMPUS
酶标仪	美国 BIO-BAD 公司
化学发光成像系统	美国 BIO-RAD 公司

1.4 III 型前列腺炎大鼠模型的建立与给药

1.4.1 模型建立 根据文献[15-18]建立苯甲酸雌二醇(EB)诱导的 III 型前列腺炎模型,具体步骤如下: 36 只 SD 大鼠饲养一周后随机取 6 只作为空白组,另外 30 只只用 2.5%戊巴比妥(0.3 mL/100g, i.p.)麻醉大鼠,将其固定于加热垫上,并在手术前对下腹部和阴

囊的皮肤进行剃毛和消毒。无菌条件下沿大鼠腹中线纵切约 0.5 cm,分离睾丸周边脂肪,充分暴露睾丸及附睾,结扎后切断精索。随后依次缝合肌肉、皮肤,包扎伤口,放回实验室鼠笼,自由饮食。每天用碘伏擦拭伤口,肌肉注射青霉素 20 万 U/kg,持续 1 周。去势后观察 6 d,于第 7 天背部皮下注射 EB(0.25 mg/kg/d, s.c.)

连续 30 d。

1.4.2 受试药物配置 采用传统中药煎煮法制备 JDHXD,具体方法:将所有药材放入砂质锅中,蒸馏水浸泡 40 min,首煎药水比例 1:8,先武火煮 15 min,随即改文火煮 40 min,倒出;二煎药水比例 1:6,煎沸后继续文火煮 40 min,两次所煎药水混合,并浓缩至 0.75 mg/mL,封装于 4℃冰箱保存备用。此外,前列康片给药时捣碎,以蒸馏水配成浓度为 0.5 mg/mL 的前列康片混悬液,放入 4℃冰箱中保存备用。

1.4.3 分组与给药 将造模成功的 30 只大鼠随机分为模型组、阳性药物对照组、JDHXD 低中高剂量组,每组 6 只。空白组与予生理盐水(4 mL·kg⁻¹)灌胃,模型组同空白组,阳性药物对照组予前列康片混悬液(4 mL·kg⁻¹)灌胃,JDHXD 低、中、高剂量组分别予以 JDHXD 药液(4、8、12 mL·kg⁻¹)灌胃,所有实验动物均给药 30 d。在建模结束时,从正常组和模型组中随机选取 1 只小鼠,用组织学方法证实建立前列腺炎模型的成功。在实验结束时,处死所有大鼠,并收集前列腺组织及血清样本进行随后的分析。上述给药剂量参照徐叔云《药理实验方法学》^[19]制定,中剂量用成人(60 kg)剂量计算,高剂量按中剂量 2 倍剂量计算,低剂量按 1/2 中剂量计算。

1.5 指标检测

1.5.1 HE 染色 取部分大鼠前列腺组织于 10% 福尔马林溶液中固定;按步骤依次脱水、包埋,制成 5 μm 大小切片,待切片烤干后 4℃条件下保存备用。取上述切片予二甲苯、无水乙醇及 PBS 溶液脱蜡和水化后行 HE 染色;封固后在光学显微镜下观察前列腺组织中炎症细胞浸润水平、坏死组织滞留和脱落、前列腺组织间质水肿等组织及细胞学变化。

1.5.2 免疫组化 具体步骤如下:①大鼠前列腺组织切片、烤片:采用多聚甲醛溶液固定组织样本,制成石蜡切片,高温烤片 2 h;②脱蜡:二甲苯溶液浸泡 15 min,循环 2 次;梯度乙醇、纯化水各 5 min;③修复:抗原修复液浸泡切片,高温加热,常温冷却;④PBS 洗涤后浸入 3% H₂O₂(现配)湿盒中,常温孵育 10 min,PBS 持续冲洗;⑤封闭:5% BSA,37℃,0.5 h;⑥滴加一抗,将实验标本于置于 4℃下过夜;⑦PBS 冲洗后,继续滴加二抗,37℃,0.5 h;⑧PBS 冲洗后采用 DAB 显色法显色,镜下检测反应时间;⑨HE 复染 3

min;⑩盐酸乙醇分化,返蓝;PBS 冲洗,脱水,封片。

1.5.3 RT-PCR 检测 TNF-α、IL-2、IL-6、ERK1/2、p38、STAT3 使用 Trizol 试剂提取储存在-80℃的 100 mg 大鼠前列腺组织的总 RNA。取 1 μg 总 RNA 采用逆转录法合成 cDNA,以内部对照(GAPDH)为内参,检测 IL-2、IL-6、TNF-α、p38、ERK、STAT3 的表达水平。采用 2^{-ΔΔCt}(Livak)方法进行相关基因表达分析^[20]。引物序列信息见表 2。

表 2 引物序列(F:Forward;R:Reverse)

基因	序列(5'-3')
GAPDH	F:ATCAACGGGAAACCCATC
	R:GAAGACGCCAGTAGACTCCA
TNF-α	F:CTCAAGCCCTGGTATGAGCC
	R:CTCCAAAGTAGACCTGCCCCG
IL-2	F:TCTGCAGCGTGTGTTGGATT
	R:GGCTCATCATCGAATTGGCAC
IL-6	F:GACTTCCAGCCAGTTGCCTT
	R:CTGGTCTGTGTGGGTGGTAT
ERK1/2	F:TCATAGGCATCCGAGACAT
	R:GCTCAGGGTCAGCAATCC
p38	F:TTGGACTCGGATAAGAGGATCAC
	R:TAGGTCAGGCTCTTCCATTCC
STAT3	F:GCAATACCATTGACCTGCCG
	R:CACACTCCGAGGTCAGATCC

1.5.4 Western Blot 检测 p38、P-p38、STAT3、P-STAT3 及 P-ERK1/2 按 BCA 蛋白检测试剂盒说明书测定组织匀浆中的总蛋白浓度。首先通过研磨和细胞裂解试剂(SDS)来破坏样品的细胞结构。离心后,-80℃下储存,用于蛋白质浓度测定。根据蛋白质分析技术手册,本研究制定了一套蛋白质标准,用于测定总蛋白质浓度,以计算 570 nm 处的读数值。检测所需的蛋白体积,将蛋白质在 100℃下煮沸 5 min,使其变性。电泳分离蛋白质后转移到膜(PVDF)上,4℃下过夜。室温下在 PBST(PBS,0.05% Tween 20,pH 7.4)中摇晃和洗涤 3 次,兔抗大鼠 p38、P-p38、STAT3、P-STAT3、P-ERK1/2 和 GAPDH(1:1000,TBS),室温孵育 2 h,二抗(1:2000)室温孵育 2 h,加入发光剂。暗室中 X 胶片感光,采用 Quantity One 软件分析条带灰度值。

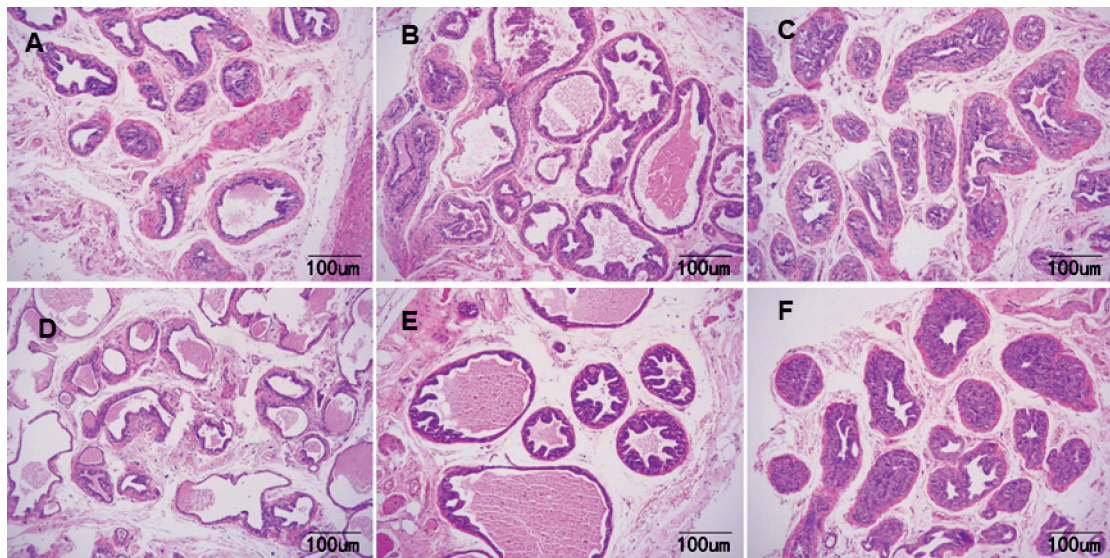
1.6 统计学处理 数据统计分析采用 GraphPad

Prism 9.0, 计量资料以均数和标准差描述, 采用单因素方差(one-way analysis of variance)分析实验数据, 等级资料比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠组织病理学变化 空白组大鼠前列腺组织各层边界清晰, 分层明显, 未见细胞坏死萎缩及脱落, 未见炎症细胞浸润结构完整, 腺泡腔饱满, 腺腔渗出

物较少; 模型组相对于空白组可见间充质组织稀疏水肿, 浆细胞和淋巴细胞浸润腺腔, 毛细血管扩张, 部分肥大细胞、成纤维细胞、腺泡上皮细胞乳头状增生。这些炎症的病理特征证实了模型的成功建立。而阳性药物对照组及 JDHXD 治疗组在给药后, 均减轻了 EB 诱导的大鼠前列腺炎。JDHXD 治疗组的浸润浆细胞和淋巴细胞明显低于阳性治疗组, JDHXD 高剂量组尤为明显。结果如图 1 所示。

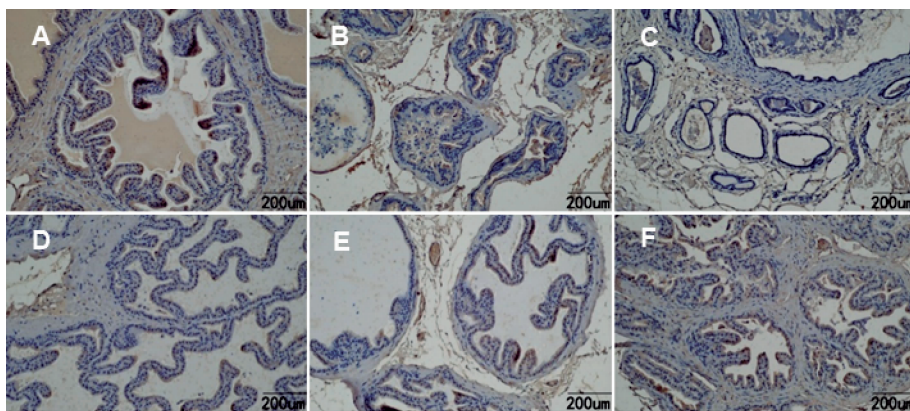


(A:空白组;B:模型组;C:阳性药物对照组;D:解毒活血汤低剂量组;E:解毒活血汤中剂量组;F:解毒活血汤高剂量组)

图1 HE组织病理学染色

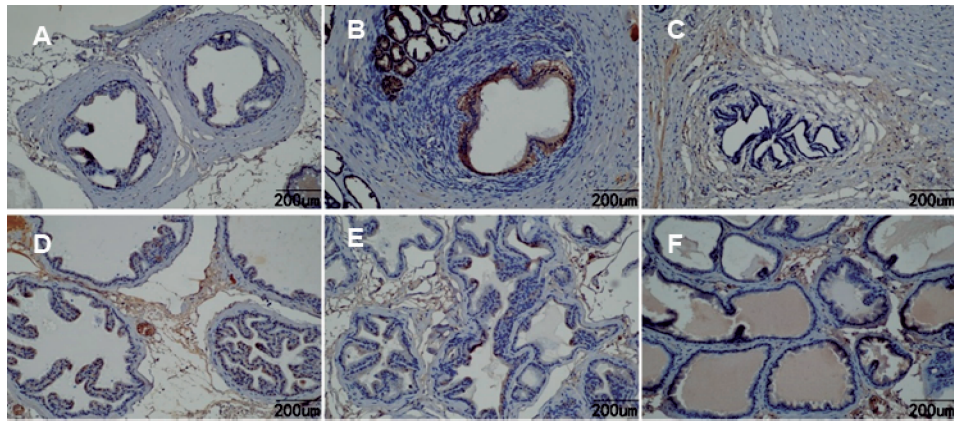
2.2 大鼠前列腺组织 p38、P-p38、STAT3、P-STAT3 的免疫组化检测结果 各组前列腺组织中 p38、P-p38、STAT3、P-STAT3 表达含量免疫组化图见图 2-图 5。与空白组比较, 模型组 p38、P-p38、STAT3、P-STAT3 表达较高, 表明在 III 型前列腺炎大鼠模型前列腺组织中 p38、P-p38、STAT3、P-STAT3 处于高表

达状态。经干预治疗 30 d, 阳性药物对照组、不同剂量 JDHXD 组的 p38、P-p38、STAT3、P-STAT3 表达呈下降趋势, 且均低于模型组。与模型组比较, p38、P-p38、STAT3、P-STAT3 随着 JDHXD 剂量的增加表达相对减少。



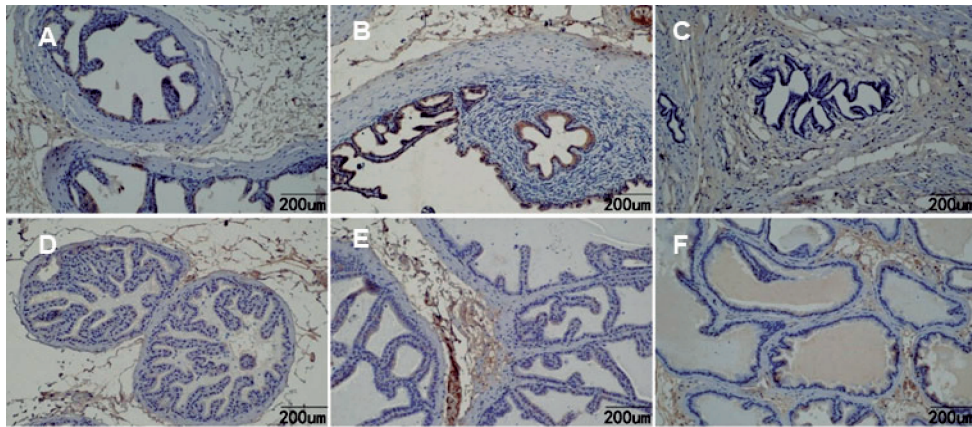
(A:空白组;B:模型组;C:阳性药物对照组;D:解毒活血汤低剂量组;E:解毒活血汤中剂量组;F:解毒活血汤高剂量组)

图2 各组前列腺组织中 p38 表达水平免疫组化图



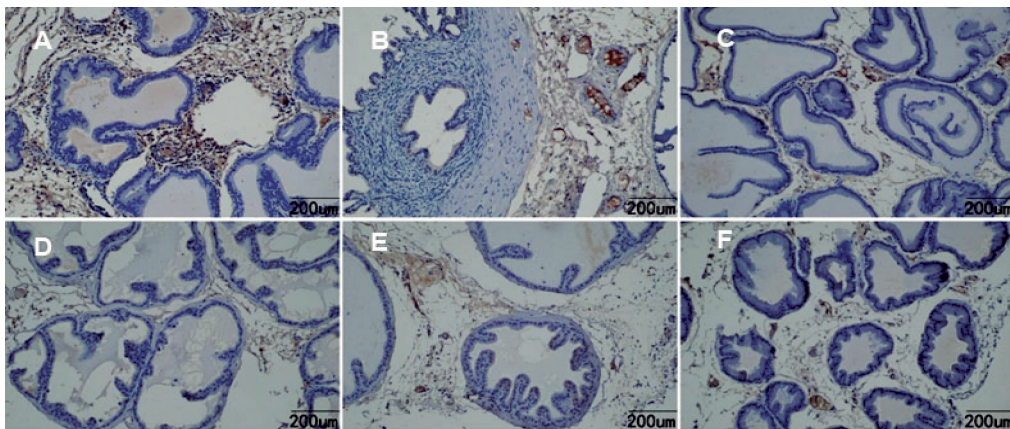
(A:空白组;B:模型组;C:阳性药物对照组;D:解毒活血汤低剂量组;E:解毒活血汤中剂量组;F:解毒活血汤高剂量组)

图 3 各组前列腺组织中 P-p38 表达水平免疫组化图



(A:空白组;B:模型组;C:阳性药物对照组;D:解毒活血汤低剂量组;E:解毒活血汤中剂量组;F:解毒活血汤高剂量组)

图 4 各组前列腺组织中 STAT3 表达水平免疫组化图



(A:空白组;B:模型组;C:阳性药物对照组;D:解毒活血汤低剂量组;E:解毒活血汤中剂量组;F:解毒活血汤高剂量组)

图 5 各组前列腺组织中 P-STAT3 表达水平免疫组化图

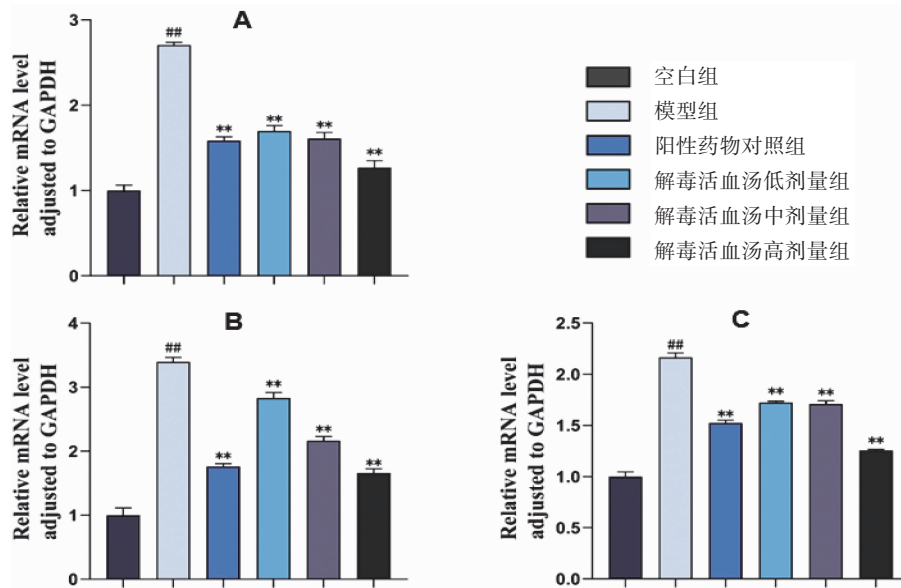
2.3 各组大鼠前列腺组织 p38、ERK、STAT3 mRNA 表达的检测结果 图 6 可见,模型组前列腺组织中 p38、ERK、STAT3 表达较空白组显著升高 ($P<0.05$)。干预治疗 30 d,阳性药物对照组(前列康片)、JDHDX

低、中、高剂量组 p38、ERK、STAT3 表达水平显著低于模型组 ($P<0.01$),p38、ERK、STAT3 表达水平在高剂量组中表达水平更低。

2.4 各组大鼠前列腺组织 IL-2、IL-6、TNF- α mRNA

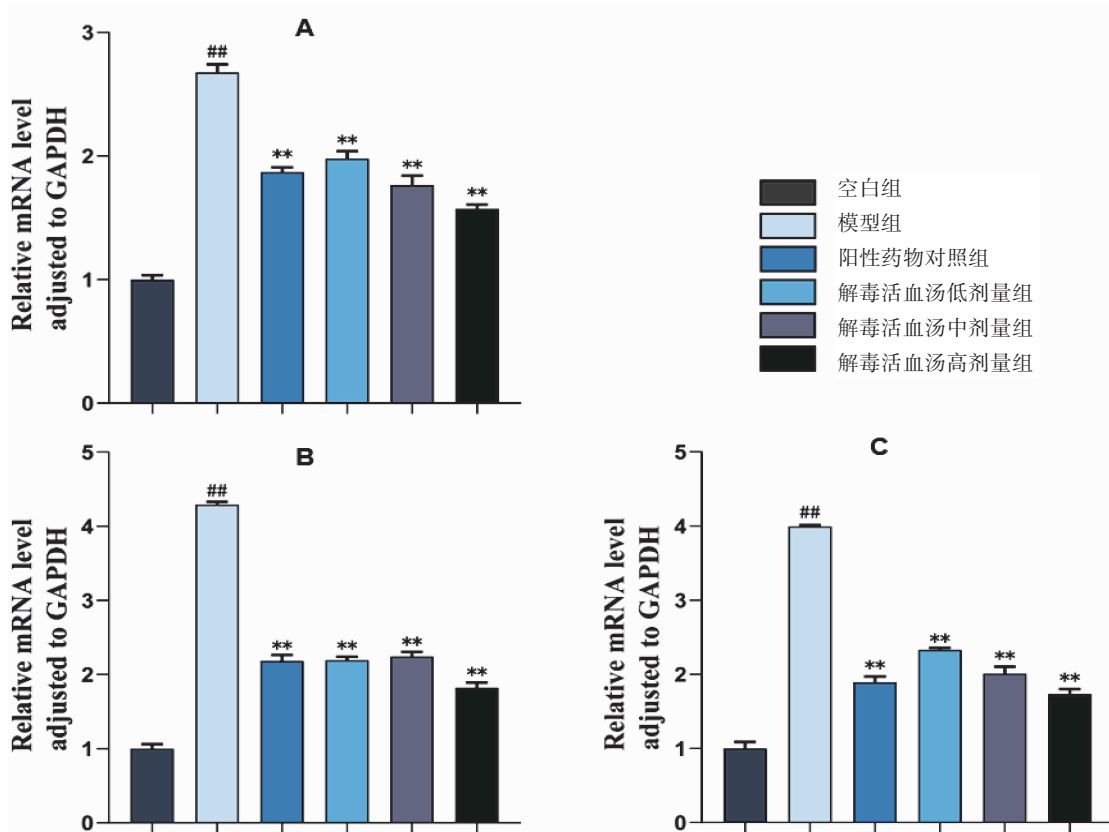
表达的检测结果 如图 7 所示, 各组前列腺组织中 IL-2、IL-6、TNF- α mRNA 表达水平出现不同程度的改变。与空白组相比, 模型组中 IL-2、IL-6、TNF- α mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$), 表明在 III 型前

列腺炎大鼠前列腺组织中 IL-2、IL-6、TNF- α 呈现表达状态。治疗 30 d 后, 与模型组比较, 阳性药物对照组 (前列康片) 及 JDHXD 低剂量组中 IL-2、IL-6、TNF- α mRNA 表达水平降低($P<0.01$), 在中、高剂量



注: 对比空白组 (## $P<0.01$); 对比模型组 (** $P<0.01$)。

图 6 各组前列腺组织中的 p38(A)、ERK(B)、STAT3(C)mRNA 表达水平



注: 对比空白组 (## $P<0.01$); 对比模型组 (** $P<0.01$)。

图 7 各组前列腺组织中的 IL-2(A)、IL-6(B)、TNF- α (C)mRNA 表达水平

更明显($P<0.01$)。

2.5 大鼠前列腺组织 p38、P-p38、P-ERK1/2、STAT3、P-STAT3 等蛋白表达结果 各组前列腺组织中 p38、P-p38、P-ERK1/2、STAT3、P-STAT3 的蛋白表达水平见图 8-图 9。与空白组相比,模型组中 p38、P-p38、P-ERK1/2、STAT3、P-STAT3 的蛋白表达量较高 ($P<0.01$),表明大鼠在Ⅲ型前列腺炎病程中 p38、P-p38、P-ERK1/2、STAT3、P-STAT3 呈现过表达状态。治疗 30 d 后,与模型组相比,p38、P-p38、P-ERK1/2、STAT3、P-STAT3 表达水平在阳性药物对照组、JD-HXD 低剂量组的有所降低($P<0.05$),在中、高剂量降低更明显($P<0.01$)。

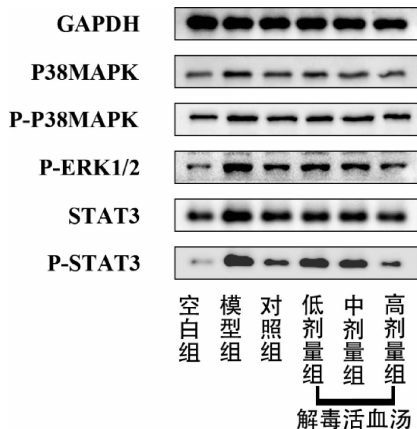
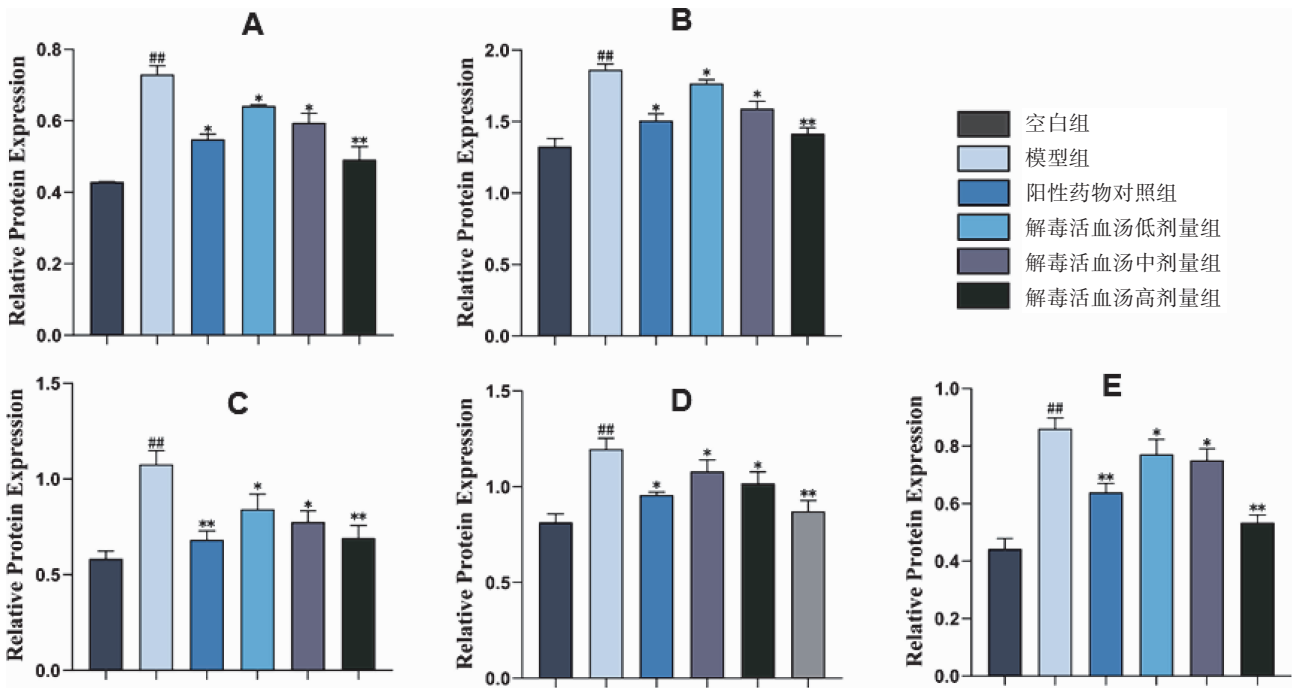


图 8 各组 P 38 MAPK、P-p38、P-ERK1/2、STAT3、P-STAT3 的蛋白表达条带图(以 GAPDH 为内参)



注:对比空白组(## $P<0.01$);对比模型组(** $P<0.01$)。

图 9 各前列腺组织中的 p38(A)、P-p38(B)、P-ERK1/2(C)、STAT3(D)、P-STAT3(E)的蛋白表达水平

3 讨论

Ⅲ型前列腺炎的病因病机复杂多变,其主要临床症状表现为排尿异常、下腹及会阴处坠胀疼痛、性功能障碍或心理精神状态异常等,易反复发作^[21-22]。而中医将Ⅲ型前列腺炎及相关病症共同归于“淋证”“精浊”“赤白浊”“尻痛”等范畴,并指出Ⅲ型前列腺炎的发生主要责之于湿热、瘀血、体虚^[23]。对Ⅲ型前列腺炎的中医证型进行归纳总结不难发现,表现为湿热下注证、气滞血瘀证证候的患者占比达 70%以上,两

种证候常相兼发病,体现在病程进展的各个阶段^[24-26]。针对Ⅲ型前列腺炎中医证候分布的特点,喻文球教授认为Ⅲ型前列腺炎发病主要以湿热毒邪为诱因,气滞血瘀为其病理产物,毒甚致瘀、瘀甚成毒,二者共同致病,毒为因、瘀致变、虚为本,贯穿始终。并根据几十年临证经验,遣方用药时不忘守正创新,总结出治疗Ⅲ型前列腺炎的经验方——JDHDX,形成基于“毒瘀理论”论治Ⅲ型前列腺炎的学术思想。

本研究显示 EB 诱导的Ⅲ型前列腺炎大鼠前列

腺间充质组织水肿,浆细胞和淋巴细胞浸润腺腔,血管扩张充血,腺泡上皮细胞乳头状增生明显等,提示造模成功。从中医宏观角度来讲,此与喻文球教授“毒瘀理论”之“瘀”相对应,造成这种状态的一切致病因素皆称之为“毒”。“毒瘀理论”之“毒”多为病因之毒,此处不仅指六淫邪气久郁之毒,还包括“浊瘀败精”之毒、“尿毒”“疫毒”等。浊瘀败精之血蕴积下焦,久郁成毒;败精之血瘀阻精道,血溢脉外而成瘀血,久瘀生热,此乃“瘀毒”“热毒”;结合微观生物学来看,部分 III 型前列腺炎患者在细菌检测时虽呈阴性,但各类病原微生物如支原体、真菌、滴虫等^[27]常通过性传播构成其感染因素,不可忽略,此为“疫毒”。王琦教授则指出病原微生物为中医有形之“虫毒”范畴,湿热毒邪为无形之“虫毒”范畴,并指出中医湿热虫邪为 III 型前列腺炎致病的内在因素,微生物感染为外在表现,瘀阻为病理产物^[28]。现代医家根据排尿障碍、尿液反流等现象提出“化学性”前列腺炎这一概念^[29],这种情况我们可称之为“尿毒”。无论是“尿毒”“疫毒”“虫毒”亦或是湿热之毒等,都会影响气血津液的运行而至瘀,毒瘀互结,浊瘀败精之血内生而致病,因此治疗上解毒活血之法贯穿疾病始终,以期祛邪务尽。结合“毒瘀理论”之“毒”的概念,此处所阐述的治疗之法不局限于解毒活血,还涵盖清热、利尿、祛湿、行气、解郁、化瘀、止痛等范畴。

MAPK 信号通路是一种多级调控,级联放大,基于磷酸化和部分蛋白泛素化并广泛表达的信号通路。STAT3 是一种具有转录及激活功能的蛋白,与细胞凋亡有关,能够介导自身 DNA 结合域与 NF- κ B 相互作用从而调节肿瘤的发生发展^[30-32]。ERK、p38 作为 MAPK 信息通路中重要的细胞信号传递者,广泛参与免疫炎症等各项生物学过程^[33-34]。其中 p38 能被多种促炎和环境应激因子激活,调节从细胞存活到细胞凋亡的多个细胞过程,如炎症和铁死亡^[35]。ERK 能够被特异性磷酸化激活形成 P-ERK 二聚体,并转移进入细胞核内,通过调控相关转录因子引起免疫炎症等反应。最新研究表明,IL-2、IL-6、TNF- α 等因子能够诱导 ERK-1/2、p38、JNK 的磷酸化从而激活 MAPKs 信号通路。另一项研究发现 STAT3 蛋白的过度表达与前列腺癌的发生发展有关,其表达水平可作为判断临

床疗效和预后的重要指标^[36]。在 III 型前列腺炎患者的临床样本中能够观察到炎症因子和趋化因子如 TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-8、MCP-1 等过度表达^[37-40]。这些指标在炎症损伤后释放,可能会增加外周传入神经对刺激的敏感性,并导致慢性疼痛的发生^[41-42]。有研究表明 III 型前列腺炎患者的 IL-10 和 TNF- α 与 NIH 慢性前列腺炎症状评分(NIH-CPSI)具有显著的正相关性^[43]。在 EPA(实验性自身免疫性前列腺炎)诱导的大鼠模型中,IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 呈过度表达,在 EAP 大鼠免疫系统激活和炎症浸润中起重要作用^[44-46]。此外,研究显示 III 型前列腺炎患者更可能具有低 IL-10 产生基因型,这表明低 TNF- α 和高 IL-10 表型可能表示治疗效果欠佳^[47]。且作为参与细胞生长凋亡的因子 VEGF 在前列腺炎大鼠模型中异常高表达^[48]。本研究发现 EB 诱导的 III 型前列腺炎大鼠前列腺呈现出组织增生萎缩,腺泡腔数量减少、体积缩小,炎症细胞浸润,血管充血扩张等炎症反应及组织损伤的表现。JDHDX 能够减轻 III 型前列腺炎大鼠前列腺间质增生,腺泡萎缩、炎症细胞浸润等症状。免疫组化结果显示在 III 型前列腺炎大鼠模型前列腺组织中 p38、P-p38、STAT3、P-STAT3 处于高表达状态。经干预治疗后,阳性药物对照组、不同剂量 JDHDX 的 p38、P-p38、STAT3、P-STAT3 表达均低于模型组。结合其在细胞内的分布情况,提示 JDHDX 治疗 III 型前列腺炎可能是通过改善细胞间质充血缓解其临床症状达到治疗效果。且 III 型前列腺炎大鼠疾病发生进展过程中 p38、P-p38、P-ERK1/2、STAT3、P-STAT3 呈高表达状态,ERK/p38 MAPK 信号通路被激活,相关炎症因子 IL-2、IL-6、TNF- α 呈现过量表达状态。JDHDX 可以显著抑制 ERK、p38、STAT3 及其磷酸化表达(P-p38、P-ERK1/2、P-STAT3),从而抑制 ERK/p38 MAPK 信号通路的激活,同时降低 IL-2、IL-6、TNF- α 等炎症因子的表达,降低 III 型前列腺炎大鼠的炎症反应。其中 STAT3、P-STAT3 的过量表达可能与前列腺“炎癌转化”有关,“炎癌转化”这一概念由 Rudolf Virchow 首次提出^[49]。现已有大量研究表明 III 型前列腺炎与前列腺癌(prostate carcinoma, PCa)存在一定关系,本实验提示 JDHDX 可能通过抑制 STAT3 及其磷酸化表达从而抑制前列腺炎癌之间

的转化,但单一分子或单一途径的实验室研究不能全面揭示其作用机制^[50-54]。虽“炎癌转化”机制尚不明确,但结合“毒瘀理论”能够给当代医者全新的认识途径及实验设计方案。

本研究通过 EB 诱导的 III 型前列腺炎大鼠模型,采取 RT-PCR、Western Blot、免疫组化等技术,结合中医“毒瘀理论”,分析 JDHDX 治疗 III 型前列腺炎的作用机制,发现 JDHDX 治疗 III 型前列腺炎的机制可能是抑制 ERK/p38 MAPK 信号通路的过度激活,从而降低 IL-2、IL-6、TNF- α 等炎症因子的表达,以改善前列腺组织炎症反应。

参考文献:

- [1] KRIEGER J N, NYBERG L, NICKEL J C. NIH consensus definition and classification of prostatitis[J]. *JAMA*, 1999, 282(3):236-237.
- [2] WANG W, NAVEED M, BAIG M M F A, et al. Experimental rodent models of chronic prostatitis and evaluation criteria [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 108: 1894-1901.
- [3] COLLINS M M, STAFFORD R S, O'LEARY M P, et al. How common is prostatitis? A national survey of physician visits[J]. *The Journal of Urology*, 1998, 159(4): 1224-1228.
- [4] NICKEL J C, SHOSKES D A, WAGENLEHNER F M E. Management of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS): the studies, the evidence, and the impact[J]. *World Journal of Urology*, 2013, 31 (4):747-753.
- [5] PONTARI M, GIUSTO L. New developments in the diagnosis and treatment of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. *Current Opinion in Urology*, 2013, 23 (6):565-569.
- [6] LIANG C Z, LI H J, WANG Z P, et al. The prevalence of prostatitis-like symptoms in China[J]. *The Journal of Urology*, 2009, 182(2):558-563.
- [7] TYAGI P, KASHYAP M, PORE S, et al. MP25-07 prostatic inflammation evokes upregulation of neurotrophins in sensory ganglia: possible contribution to dysfunctional voiding[J]. *The Journal of Urology*, 2015, 193(Suppl 4): e287.
- [8] PONTARI M A, RUGGIERI M R. Mechanisms in prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. *The Journal of Urology*, 2008, 179(5 Suppl):S61-67.
- [9] 王万春, 封俊光, 严张仁, 等. 解毒活血汤治疗Ⅲa型前列腺炎的临床疗效及其对患者前列腺液中 IL-6 和 IL-8 水平的影响[J]. *中国医药指南*, 2010, 8(6):107-109.
- [10] 王万春, 郑进福, 熊河辉, 等. 解毒活血汤对慢性非细菌性前列腺炎大鼠前列腺组织匀浆中 TNF- α 、IL-8 和 IL-10 的影响[J]. *新中医*, 2012, 44(12):133-134.
- [11] 王万春, 陈俊, 陈琦, 等. 前列解毒活血汤对Ⅲ型前列腺炎患者前列腺液中细胞因子水平的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(5):508-510.
- [12] YAN Z, HUANG C, HUANG G, et al. The effect of Jiedu Huoxue decoction on rat model of experimental nonbacterial prostatitis via regulation of miRNAs[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2020, 58(1):745-759.
- [13] YAN Z, HUANG C, HUANG G, et al. Jiedu Huoxue decoction improves inflammation in rat type III prostatitis: the importance of the NF- κ B signalling pathway[J]. *Andrologia*, 2019, 51(5):e13245.
- [14] YI J, PAN J, ZHANG S, et al. Improvement of chronic non-bacterial prostatitis by Jiedu Huoxue decoction through inhibiting TGF- β /SMAD signaling pathway [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 152:113193.
- [15] 张新玥, 张静文, 卫昊. 慢性非细菌性前列腺炎大鼠模型的研究现状与评价[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37 (10):1282-1286.
- [16] ROBINETTE C L. Sex-hormone-induced inflammation and fibromuscular proliferation in the rat lateral prostate [J]. *The Prostate*, 1988, 12(3):271-286.
- [17] HARRIS M T, FELDBERG R S, LAU K M, et al. Expression of proinflammatory genes during estrogen-induced inflammation of the rat prostate[J]. *The Prostate*, 2000, 44 (1):19-25.
- [18] OKA M, UEDA M, OYAMA T, et al. Effect of the phytotherapeutic agent Eviprost on 17 β -estradiol-induced nonbacterial inflammation in the rat prostate [J]. *The Prostate*, 2009, 69(13):1404-1410.
- [19] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:1557
- [20] BUSTIN S A, BENES V, GARSON J A, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quan-

- titative real-time PCR experiments[J]. *Clinical Chemistry*, 2009, 55(4): 611-622.
- [21] LAI H H, THU J H L, MOH F V, et al. Clustering of patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. *The Journal of Urology*, 2019, 202(3): 546-551.
- [22] HIRAMATSU I, TSUJIMURA A, SOEJIMA M, et al. Tadalafil is sufficiently effective for severe chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome in patients with benign prostatic hyperplasia[J]. *International Journal of Urology*, 2020, 27(1): 53-57.
- [23] 李海松, 王彬, 赵冰. 慢性前列腺炎中医诊治专家共识[J]. *北京中医药*, 2015, 34(5): 412-415.
- [24] 周青, 贺菊乔, 王大进, 等. 1083 例慢性前列腺炎中医证型分布调查研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2008, 28(6): 71-73, 79.
- [25] 李焱风, 丁世霖, 杨毅坚, 等. 昆明地区 1186 例慢性前列腺炎支原体感染情况与中医证型的相关性研究[J]. *云南中医中药杂志*, 2015, 36(11): 19-22.
- [26] 孙松, 李玉锋, 鲍双君, 等. 慢性前列腺炎合并勃起功能障碍中医证型分布规律初探[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(7): 2626-2628.
- [27] 李豫, 商学军. 某些特殊病原体在慢性前列腺炎/慢性骨盆疼痛综合征中的可能作用[J]. *中华男科学杂志*, 2022, 28(2): 162-166.
- [28] 符方智, 易港, 任杰, 等. 基于“湿热生虫”理论探讨慢性前列腺炎病机及当归贝母苦参丸加滑石组方思路[J]. *陕西中医*, 2022, 43(7): 918-920, 935.
- [29] 于洪波, 孙则禹, 卫中庆. 尿动力学异常与慢性前列腺炎诊治关系的探讨[J]. *中华男科学*, 2001(4): 240-242.
- [30] KARIN M, CAO Y, GRETEN F R, et al. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2(4): 301-310.
- [31] 田太平, 许军, 刘燕华, 等. STAT3 及其肿瘤关系的研究进展[J]. *云南化工*, 2017, 44(7): 3-6.
- [32] 王雨辰, 陈越, 季鸣, 等. STAT3 靶点抑制剂 Bt354 抗前列腺癌作用及其分子机制研究[J]. *药学报*, 2019, 54(10): 1851-1857.
- [33] SUN H, MO J, CHENG R, et al. ENO1 expression and Erk phosphorylation in PDAC and their effects on tumor cell apoptosis in a hypoxic microenvironment[J]. *Cancer Biol Med*, 2022, 19(11): 1598-1616.
- [34] MENG L Q, YANG F Y, WANG M S, et al. Quercetin protects against chronic prostatitis in rat model through NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *The Prostate*, 2018, 78(11): 790-800.
- [35] GUO B, ZUO Z, DI X, et al. Salidroside attenuates HALI via IL-17A-mediated ferroptosis of alveolar epithelial cells by regulating Act1-TRAF6-p38 MAPK pathway[J]. *Cell communication and signaling*, 2022, 20(1): 183.
- [36] 梁作文, 贾慧婕, 李馨, 等. STAT3 蛋白在前列腺癌患者前列腺组织中的表达和意义[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(9): 1171-1172.
- [37] DESIREDDI N V, CAMPBELL P L, STERN J A, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 α as possible biomarkers for the chronic pelvic pain syndrome[J]. *The Journal of Urology*, 2008, 179(5): 1857-1862.
- [38] HE L, WANG Y, LONG Z, et al. Clinical significance of IL-2, IL-10, and TNF- α in prostatic secretion of patients with chronic prostatitis[J]. *Urology*, 2010, 75(3): 654-657.
- [39] NADLER R B, KOCH A E, CALHOUN E A, et al. IL-1 β and TNF- α in prostatic secretions are indicators in the evaluation of men with chronic prostatitis[J]. *The Journal of Urology*, 2000, 164(1): 214-218.
- [40] ORHAN I, ONUR R, ILHAN N, et al. Seminal plasma cytokine levels in the diagnosis of chronic pelvic pain syndrome[J]. *Int J Uro* 2001, 8(9): 495-499.
- [41] AMAYA F, IZUMI Y, MATSUDA M, et al. Tissue injury and related mediators of pain exacerbation[J]. *Current Neuropharmacology*, 2013, 11(6): 592-597.
- [42] LUNDH D, HEDELIN H, JONSSON K, et al. Assessing chronic pelvic pain syndrome patients: blood plasma factors and cortisol saliva[J]. *Scandinavian Journal of Urology*, 2013, 47(6): 521-528.
- [43] HU C, YANG H, ZHAO Y, et al. The role of inflammatory cytokines and ERK1/2 signaling in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome with related mental health disorders[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28608.
- [44] WAZIR J, ULLAH R, KHONGORZUL P, et al. The effectiveness of Hedyotis diffusa Willd extract in a mouse model of experimental autoimmune prostatitis[J]. *Andrologia*, 2021, 53(1): 13913.

- [45] WANG K, MAO W, NI J, et al. Infiltration of inflammatory factors induced penile damage in chronic prostatitis[J]. *Andrologia*, 2021, 53(8): 14113.
- [46] ZHANG Y, LI X, ZHOU K, et al. Influence of experimental autoimmune prostatitis on sexual function and the anti-inflammatory efficacy of celecoxib in a rat model[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 574212.
- [47] SHOSKES D A, ALBAKRI Q, THOMAS K, et al. Cytokine polymorphisms in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: association with diagnosis and treatment response[J]. *The Journal of Urology*, 2002, 168(1): 331–335.
- [48] KANG S W, PARK J H, SEOK H, et al. The effects of korea red ginseng on inflammatory cytokines and apoptosis in rat model with chronic nonbacterial prostatitis[J]. *BioMed Research International*, 2019, 2019: 2462561.
- [49] WANG K, KARIN M. Tumor-Elicited Inflammation and colorectal cancer[J]. *Advances in Cancer Research*, 2015, 128: 173–196.
- [50] SFANOS K S, YEGNASUBRAMANIAN S, NELSON W G, et al. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development[J]. *Nature Reviews Urology*, 2018, 15(1): 11–24.
- [51] 廖开森, 周玮, 任黎刚. 病原微生物、慢性炎症与前列腺癌[J]. *中华男科学杂志*, 2021, 27(1): 70–74.
- [52] 张钰菲, 任正举, 曹德宏, 等. 前列腺“炎-癌转化”的研究进展[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2020, 25(5): 453–456.
- [53] 张燕宇, 王婧, 黄艺顺. NF- κ B 信号通路与前列腺炎、前列腺癌形成的关系[J]. *中国药理学杂志*, 2020, 55(20): 1653–1658.
- [54] 王建, 丁聪聪, 陆岩, 等. NLK 通过维持 NF- κ B/P53 平衡抑制前列腺炎-癌转化[J]. *中国癌症杂志*, 2022, 32(7): 614–623.

(收稿日期: 2023–11–15)

- (上接第 61 页) IV in sepsis-induced acute kidney injury[J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14(14): 5855–5877.
- [12] RENDON J L, CHOUDHRY M A. Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis[J]. *J Leukoc Biol*, 2012, 92(3): 529–538.
- [13] KESSEL A, BAMBERGER E, MASALHA M, et al. The role of T regulatory cells in human sepsis[J]. *J Autoimmun*, 2009, 32(3–4): 211–215.
- [14] MCGEACHY M J, CUA D J. T cells doing it for themselves: TGF- β regulation of Th1 and Th17 cells[J]. *Immunity*, 2007, 26(5): 547–549.
- [15] HOTCHKISS R S, KARL I E. The pathophysiology and treatment of sepsis[J]. *New Engl J Med*, 2003, 348(2): 138–150.
- [16] DE METZ J, ROMIJN J A, ENDERT E, et al. Interferon-gamma increases monocyte HLA-DR expression without effects on glucose and fat metabolism in postoperative patients[J]. *J Appl Physiol*, 2004, 96(2): 597–603.
- [17] NALOS M, SANTNER-NANAN B, PARNELL G, et al. Immune effects of interferon gamma in persistent staphylococcal sepsis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(1): 110–112.
- [18] HOTCHKISS R S, MONNERET G, PAYEN D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(12): 862–874.

(收稿日期: 2023–07–19)