

六味地黄丸 /RXRa/PI3K-AKT 轴向调控前列腺癌的作用机制

何炜铖, 彭石云, 徐霖, 汪涛, 高丽云*

九江市环境致癌研究重点实验室九江学院基础医学院, 江西 九江 332005

DOI:10.61369/MRP.2026090032

摘要 : 六味地黄丸 (LWDHP) 在临床实践中展现出对抗前列腺癌的潜在疗效, 然而其背后的作用机制仍未阐明。本研究整合网络药理预测、生物信息分析及实验验证, 旨在揭示该方剂发挥抗癌功效的分子基础。通过筛选 LWDHP 所含活性组分, 获取药物靶点与疾病相关靶标的交集; 实施网络拓扑结构解析与功能富集评估; 并借助蛋白质印迹法检测关键蛋白的表达水平。最终鉴定出 69 种具有生物活性的化学实体, 以及 186 个核心作用基因; 其中槲皮素被确认为主要活性成分, 重要靶点涵盖 RXRa、PTGS2 与 HSP90AA1; 核心基因富集于 PI3K-Akt 和 TNF 通路。实验证实, LWDHP 下调前列腺癌细胞 RXRa 表达并改变 AKT 磷酸化水平。LWDHP 通过“多成分-多靶点-多通路”协同模式, 尤其调节 RXRa 介导的 PI3K-Akt 信号轴, 发挥抗前列腺癌效应。

关键词 : 六味地黄丸; 前列腺癌; RXRa; PI3K-Akt 信号通路

The Mechanism Of Liu Wei Di Huang Wan/Rxra/Pi3k-Akt Axial Regulation In Prostate Cancer

He Weicheng, Peng Shiyun, Xu Lin, Wang Tao, Gao Liyun*

Jiujiang Key Laboratory of Environmental Carcinogenesis Research, School of Basic Medical Sciences, Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332005

Abstract : Liuwei Dihuang Pill (LWDHP) has shown potential efficacy in combating prostate cancer in clinical practice, but its underlying mechanism of action remains unclear. This study integrates network pharmacology prediction, bioinformatics analysis, and experimental verification to reveal the molecular basis of the anti-cancer effect of this formula. By screening the active components contained in LWDHP, the intersection between drug targets and disease-related targets can be obtained; Implement network topology analysis and functional enrichment evaluation; And use Western blotting to detect the expression levels of key proteins. 69 bioactive chemical entities and 186 core functional genes were ultimately identified; Quercetin has been confirmed as the main active ingredient, with important targets including RXRa, PTGS2, and HSP90AA1; The core genes are enriched in the PI3K Akt and TNF pathways. Experimental evidence shows that LWDHP downregulates RXRa expression and alters AKT phosphorylation levels in prostate cancer cells. LWDHP exerts anti prostate cancer effects through a synergistic mode of "multi-component multi-target multi pathway", particularly by regulating the PI3K Akt signaling axis mediated by RXRa.

Keywords : Liuwei Dihuang Pill; Prostate cancer; RXRa; PI3K Akt signaling pathway

前列腺癌为全球男性高发恶性肿瘤, 发病率与致死率长期居高不下, 晚期去势抵抗性前列腺癌易出现治疗耐药与复发, 是临床治疗的重点与难点^[1]。六味地黄丸是经典补肾滋阴中药复方, 具有抗炎、抗氧化、调节免疫的药理活性, 在前列腺相关疾病中应用广泛, 但目前其抗前列腺癌的核心活性成分、靶点及分子通路尚未明确, 缺乏系统机制阐释^[2]。网络药理学可从“多成分-多靶点-多通路”整体层面解析中药复方作用机制, 是中药现代化研究的成熟手段^[3]。因此, 本研究结合网络药理学预测与细胞实验验证, 筛选六味地黄丸抗前列腺癌的核心活性成分与靶点, 聚焦 PI3K-Akt 等肿瘤核心通路开展验证^[4, 5], 旨在阐明其抗前列腺癌的物质基础与调控机制, 为该方剂临床转化及前列腺癌辅助治疗提供科学依据。

基金项目:

- 江西省中医药管理局 (项目号 2021B697): 六味地黄丸靶向 RXRa 并经 PI3K-AKT 信号通路的作用机制研究;
- 国家自然科学基金青年项目 (NO:81502843) 名称: 长链非编码 RNAH19 在 2,3,7,8 - 四氯代二苯并对二恶英诱导小鼠脾裂中的作用机制;
- 江西省自然科学基金项目 (20232BAB206141) 名称: tsRNA-Val-5-0006 在苯并 (a) 芘诱导肺癌中的作用及机制研究;
- 九江市重点研发计划项目 (2025-000767) 名称: 精准治疗吸烟肺癌患者中编码蛋白基因生物标志物筛查;
- 九江学院医学类教育教学改革研究课题 (项目号: YXJG-2026-04): AI 辅助案例驱动与项目式学习在医学统计学教学中的应用研究 (2026.1-2028.12)。

通讯作者: 高丽云 (1977—), 女, 湖北黄冈人, 博士后, 副教授, 硕士生导师, 主要从事环境与健康等研究。邮箱: 563911288@qq.com

一、材料与方法

(一) 实验材料

前列腺癌 PC3 细胞株购自大连美伦生物科技有限公司。六味地黄丸所有中药材采购自九江市中医医院，并由该院完成品种鉴定与质量把控。各药材用清水浸泡 30min 后煎煮 45min，然后过滤收集药汁，重复两次。经浓缩、冷冻干燥制备六味地黄丸冻干粉，低温保存备用。实验试剂：RXR α 抗体（博士德，A01299-1）、p55 抗体（博士德，BM4344）、p-p55 激动剂（Med Chem Express，HY-P80846）、AKR 抗体（Santa Cruz，sc-33219）、p-AKR 抗体（普利莱，C1833-100）、ACTIN 内参抗体（博士德，BM0001）。实验仪器：Milli-Q Advantage A10 超纯水系统（Millipore）、Chemi Doc MP 凝胶成像系统（Bio-Rad）、CO-150 型 CO₂ 培养箱（NBS）。

(二) 网络药理学分析

通过 TC MSP 数据库检索六味地黄丸活性成分，设置筛选阈值为口服生物利用度 OB $\geq$ 30%、类药性 DL $\geq$ 0.18，获得有效活性组分。依托 UniProt 数据库匹配对应靶点，靶点信息不足时结合 Swiss Target Prediction 数据库补充预测，汇总后剔除冗余条目，标准化基因名称，构建药物靶点数据集。在 OMIM、Gene Cards、TTD 及 Pharm GKB 数据库，以“Prostatic Neoplasms”为关键词检索人类前列腺癌相关疾病靶点，去重后建立疾病靶点库。利用 Venny 2.1.0 平台获取药物靶点与疾病靶点的交集基因，即为六味地黄丸干预前列腺癌的潜在核心靶点，并绘制韦恩图。

采用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“成分-靶点”可视化网络，通过拓扑分析计算 Degree 值，筛选核心活性成分。将交集靶点导入 STRING 数据库，限定物种为人类，设置互作可信度 0.40，剔

除孤立节点，构建 PPI 蛋白互作网络，依据 Degree 值筛选核心 Hub 基因。将交集靶点导入 DAVID 数据库，开展 GO 功能富集与 KEGG 通路富集分析，涵盖生物学过程、细胞组分、分子功能及信号通路，通过微生信平台可视化展示结果，结合 R 软件辅助验证。通过 Protein Atlas、Genevestigator 数据库验证 RXR α 基因在正常前列腺组织与前列腺癌组织中的表达差异。

(三) 细胞实验与 Western blot 检测

选取对数生长期前列腺癌 LNCaP 细胞，以 1×10^4 个/mL 密度接种于六孔板。实验组采用终浓度 0.24 g/mL 六味地黄丸水提液干预^[9]，对照组加入等体积 RPMI-1640 培养基，常规培养 48 h。弃培养液，PBS 洗涤 3 次，提取细胞总蛋白，经 SDS-PAGE 电泳、转膜至 PVDF 膜。封闭后加入 RXR α 、p55、p-p55、AKR、p-AKR 及 ACTIN 内参一抗，4℃ 孵育过夜；TBST 洗涤后室温孵育二抗 2 h，TBST 充分洗涤。滴加化学发光底物，采用凝胶成像系统采集蛋白印迹图像，检测各靶点蛋白表达水平变化。

(四) 统计学方法

所有实验数据以 Mean $\pm$ SD 表示，采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。两组数据符合正态分布且方差齐时采用独立样本 t 检验，不符合正态分布则采用非参数秩和检验，以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

二、结果

(一) 六味地黄丸与前列腺癌高度相关的活性成分

以口服生物利用度 OB $\geq$ 0.30、类药性 DL $\geq$ 0.18 为筛选临界值，最终筛选获得 69 个与前列腺癌密切相关的有效活性成分（表 1）。

表 1 六味地黄丸与前列腺癌高度相关的活性成分

MolID	分子名称	OB/%	DL
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
MOL001494	Mandenol	42.00	0.19
MOL001495	Ethyllinolenate	46.10	0.20
MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75
续表 1			
MolID	分子名称	OB/%	DL
MOL002879	Diop	43.59	0.39
MOL002883	Ethylolate(NF)	32.40	0.19
MOL003137	Leucanthoside	32.12	0.78
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
MOL005360	malkangunin	57.71	0.63
MOL005481	2,6,10,14,18-pentamethylcosa-2,6,10,14,18-pentaene	33.40	0.24
MOL005486	3,4-Dehydrolycopen-16-al	46.64	0.49
MOL005489	3,6-Digalloylglucose	31.42	0.66
MOL005503	Cornudentanone	39.66	0.33
MOL005530	Hydroxygenkwanin	36.47	0.27

MOL005531	Telocinobufagin	69.99	0.79
MOL008457	Tetrahydroalstonine	32.42	0.81
MOL000554	gallicacid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside	30.25	0.67
MOL005552	geminD	68.83	0.56
MOL005557	lanosta-8,24-dien-3-ol,3-acetate	44.30	0.82
MOL001925	paeoniflorin_qt	68.18	0.40
MOL000211	Mairin	55.38	0.78
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24
MOL007003	benzoylpaeoniflorin	31.14	0.54
MOL007369	4-O-methylpaeoniflorin_qt	67.24	0.43
MOL007382	mudanpioside-h_qt2	42.36	0.37
MOL007384	paeonidanin_qt	65.31	0.35
MOL000098	quercetin	46.43	0.28
MOL001559	piperlonguminine	30.71	0.18
MOL001736	(-)-taxifolin	60.51	0.27
MOL000310	DenudatinB	61.47	0.38
MOL000322	Kadsurenone	54.72	0.38
MOL005429	hancinol	64.01	0.37
MOL005430	hancinoneC	59.05	0.39
MOL005435	24-Methylcholest-5-enyl-3beta-O-glucopyranoside_qt	37.58	0.72
续表 1			
MolID	分子名称	OB/%	DL
MOL005438	campesterol	37.58	0.71
MOL005440	Isofucosterol	43.78	0.76
MOL005458	DioscoresideC_qt	36.38	0.87
MOL000546	diosgenin	80.88	0.81
MOL005461	Doradexanthin	38.16	0.54
MOL005463	Methylcimicifugoside_qt	31.69	0.24
MOL005465	AIDS180907	45.33	0.77
MOL000953	CLR	37.87	0.68
MOL000273	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoicacid	30.93	0.81
MOL000275	trametenolicacid	38.71	0.80
MOL000276	7,9(11)-dehydropachymicacid	35.11	0.81
MOL000279	Cerevisterol	37.96	0.77
MOL000280	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclo-p-enta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoicacid	31.07	0.82
MOL000285	(2R)-2-[(5R,10S,13R,14R,16R,17R)-16-hydroxy-3-keto-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoicacid	38.26	0.82
MOL000283	Ergosterolperoxide	40.36	0.81
MOL000282	ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	43.51	0.72
MOL000287	3beta-Hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oicacid	38.70	0.81
MOL000289	pachymicacid	33.63	0.81
MOL000290	PoricoicacidA	30.61	0.76
MOL000291	PoricoicacidB	30.52	0.75
MOL000292	poricoicacidC	38.15	0.75
MOL000296	hederagenin	36.91	0.75
MOL000300	dehydroeburicoicacid	44.17	0.83

MOL000830	AlisolB	34.47	0.82
MOL000831	AlisolBmonoacetate	35.58	0.81
MOL000832	alisol,b,23-acetate	32.52	0.82
MOL000849	16β-methoxyalisolBmonoacetate	32.43	0.77
MOL000854	alisolC	32.70	0.82
续表1			
MolID	分子名称	OB/%	DL
MOL001559	piperlongumine	30.71	0.18
MOL000856	alisolCmonoacetate	33.06	0.83
MOL002464	1-Monolinolein	37.18	0.30
MOL000862	[(1S,3R)-1-[(2R)-3,3-dimethyloxiran-2-yl]-3-[(5R,8S,9S,10S,11S,14R)-11-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-3-oxo-1,2,5,6,7,9,11,12,15,16-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]butyl]acetate	35.58	0.81

注：OB 意指口服生物利用度，DL 则表征药物相似属性。

（二）六味地黄丸靶点与前列腺癌相关基因靶点交集

采用 Venny2.1.0 网络平台，对先前所得活性物质指向的靶标群组与前列腺癌相关基因群组实施交集分析，获取二者共有的靶标，即为该方剂作用于前列腺癌的潜在作用位点，同时生成反映重叠情况的韦恩图（图1）。

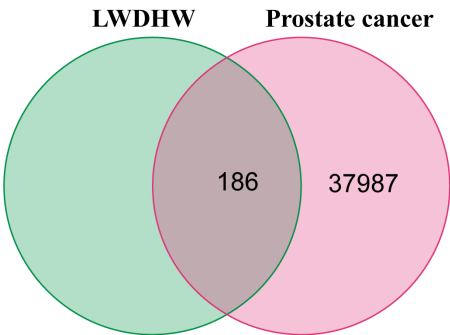


图1 药物靶点与疾病相关基因取交集情况

（三）药物有效成分与疾病靶点网络构建

运用 Cytoscape3.8.0 软件构建六味地黄丸“活性成分－靶点”调控网络，通过 Degree 值量化各节点核心程度并完成拓扑分析。网络图分层展示复方、药材、活性成分及疾病靶点的对应关

系，依据 Degree 评分对靶点进行环形层级排布，以节点大小表征关联强度，筛选出网络中与前列腺癌关联度最高的核心活性成分与关键靶点（图2A、图2B）。

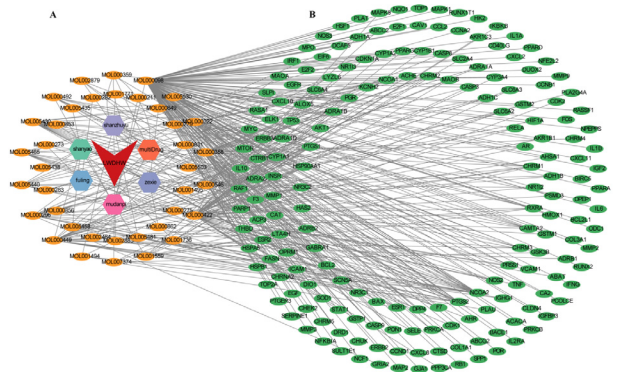


图2 药物靶点与疾病相关基因取交集情况

（四）核心基因通路分析

将六味地黄丸抗前列腺癌交集靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 蛋白互作网络，结合 Cytoscape3.8.0 软件开展 GO 功能注释与 KEGG 通路富集分析。结果显示，六味地黄丸6种活性成分可共同作用于 RXRa、PTGS2、HSP90AA1 核心靶点，并主要通过调控 PI3KAKT 通路发挥抗前列腺癌作用（表2）。

表2 核心基因通路分析

Chinesemedicine	Cancer	TargetGene	Pathway
FL	Prostatecancer	HSP90AA1	PI3K-Aktsignalingpathway
FL	Prostatecancer	PTGS2	TNFsignalingpathway
FL	Prostatecancer	RXRa	PI3K-Aktsignalingpathway
MDP	Prostatecancer	HSP90AA1	PI3K-Aktsignalingpathway
MDP	Prostatecancer	PTGS2	TNFsignalingpathway
MDP	Prostatecancer	RXRa	PI3K-Aktsignalingpathway
续表2			
Chinesemedicine	Cancer	TargetGene	Pathway
SY	Prostatecancer	HSP90AA1	PI3K-Aktsignalingpathway
SY	Prostatecancer	PTGS2	TNFsignalingpathway
SY	Prostatecancer	RXRa	PI3K-Aktsignalingpathway

SZY	Prostatecancer	HSP90AA1	PI3K-Akt signaling pathway
SZY	Prostatecancer	PTGS2	TNF signaling pathway
SZY	Prostatecancer	RXRa	PI3K-Akt signaling pathway
SDH	Prostatecancer	HSP90AA1	PI3K-Akt signaling pathway
SDH	Prostatecancer	PTGS2	TNF signaling pathway
SDH	Prostatecancer	RXRa	PI3K-Akt signaling pathway
ZX	Prostatecancer	HSP90AA1	PI3K-Akt signaling pathway
ZX	Prostatecancer	PTGS2	TNF signaling pathway
ZX	Prostatecancer	RXRa	PI3K-Akt signaling pathway

(五) 六味地黄丸核心成分多通路调控机制分析

六味地黄丸6个成分都对应靶基因可能通过所有的信号通路前十名的信号通路的情况, GraphPad 软件分析见图3。

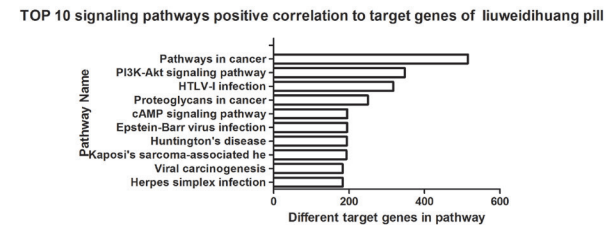


图3六味地黄丸靶向基因所对应的排名前十的信号通路

(六) PI3K-AKT 通路情况

PI3K-AKT 信号级联是驱动肿瘤细胞异常扩增的核心途径之一。KEEG 数据库分析六味地黄丸 RXRa 通过 PI3K-AKT 信号通路在肿瘤中的作用机制(图4)。

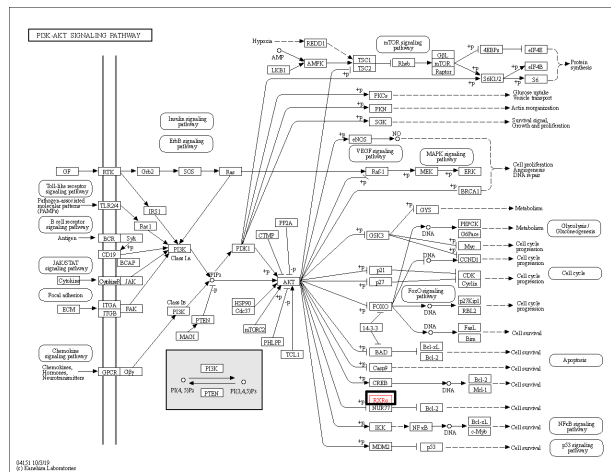


图4KEGG 数据库中六味地黄丸靶向 RXRa 基因所对应 PI3K-AKT 信号通路

(七) RXRa 在正常及前列腺癌组织中的表达差异

分别通过 ProteinAtlas 数据库检索 RXRa 蛋白病理表达水平, Genevestigator 数据库验证其转录表达特征。结果显示, 靶基因 RXRa 在前列腺癌组织中呈高表达状态(图5)。

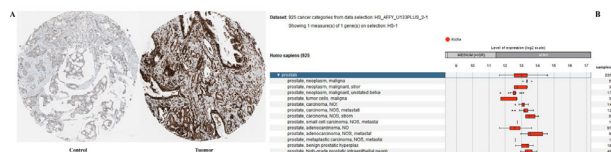


图5六味地黄丸基因表达在前列腺癌患者组织中的表达情况

(八) 六味地黄丸对前列腺癌细胞 PI3K-AKT 信号通路的调控作用

选取对数生长期 LNCaP 前列腺癌细胞, 以 1×10^4 cells/mL 接种于六孔板。实验组采用终浓度 0.24g/mL 六味地黄丸水提液干预, 对照组加入等量 RPMI-1640 培养基, 常规培养 48h。弃培养液后经 PBS 清洗, 按试剂盒说明书提取细胞总蛋白, 检测 PI3K-AKT 通路相关蛋白表达水平(图6)。结果表明, 六味地黄丸可通过调控经典 PI3K-AKT 信号级联反应, 发挥对前列腺癌细胞的生物学调控作用。

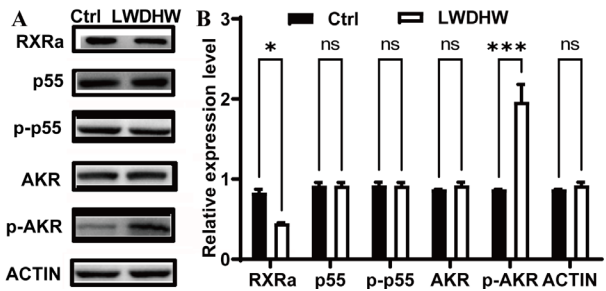


图6六味地黄丸经由典型 PI3K-AKT 信号轴呈现的调控状态

三、讨论

前列腺癌是全球男性高发恶性肿瘤, 晚期患者普遍存在治疗耐药、病情复发等临床难题, 发病机制涉及多基因、多信号通路紊乱。其中 PI3KAkt 信号通路异常激活是前列腺癌细胞增殖、存活及侵袭转移的核心驱动因素, 也是肿瘤靶向治疗的关键研究靶点^[7]。当前临床治疗手段仍存在局限性, 挖掘中药复方多靶点协同干预优势, 对丰富前列腺癌辅助治疗体系、改善患者预后具有重要研究价值。

本研究整合网络药理学、生物信息学与体外细胞实验, 系统探究六味地黄丸抗前列腺癌的物质基础与分子机制。研究筛选出六味地黄丸69个抗前列腺癌活性成分及186个药物-疾病交集靶点, 鉴定出 RXRa、PTGS2、HSP90AA1 等核心靶点。通路富集结果证实, 靶点基因显著富集于 PI3K-Akt 肿瘤核心信号通路, 该通路的持续激活是前列腺癌恶性进展的重要特征^[8]。Westernblot 实验验证发现, 六味地黄丸可下调前列腺癌细胞 RXRa 蛋白表达、上调磷酸化 AKR 水平, 明确其可靶向调控 PI3K-Akt 通路, 干扰肿瘤细胞增殖存活的恶性生物学进程。

RXR α 作为关键核受体,可通过转录调控与信号转导参与肿瘤发生发展,其功能具有显著环境依赖性^[9],提示六味地黄丸可通过调控 RXR α 介导的信号网络发挥抗肿瘤作用。

本研究 KEGG 富集分析同时富集 TNF 炎症信号通路,该通路在肿瘤微环境调控中具有双重作用,可通过调控 NF- κ B、PTGS2 等分子影响肿瘤炎症与免疫状态^[10]。既往研究证实六味地黄丸具备良好的免疫调控能力,可重塑机体免疫稳态,提示其或

可通过改善前列腺肿瘤免疫微环境,间接抑制肿瘤进展,为中药联合免疫治疗提供了新的研究思路。

综上,本研究证实六味地黄丸依托“多组分-多靶点-多通路”模式,通过调控 PI3K-Akt 核心通路发挥抗前列腺癌作用,阐释了经典名方的现代药理机制。后续将开展体内实验与单体药效研究,进一步完善机制体系,推动中医药在前列腺癌辅助治疗中的临床转化与应用。

参考文献

- [1] LIF, YUY, JIANGM, et al. Targets for improving prostate tumor response to radiotherapy[J]. European Journal of Pharmacology, 2025, 986: 177149.
- [2] TSAIJ-J, YENC-Y, HSUC-H, et al. Immunomodulatory effects of modified Liu-Wei-Di-Huang-Wan traditional Chinese medicine on allergic asthmatic mice[J]. Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 2023, 19(1): 35.
- [3] LIS, CHENJ, HUYY, et al. network pharmacology and AI[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 307: 116260.
- [4] WUZ, YUX, ZHANGS, et al. The role of PI3K/AKT signaling pathway in gallbladder carcinoma[J]. American Journal of Translational Research, 2022, 14(7): 4426.
- [5] YEY, LIUM, WUF, et al. TRMT6 promotes hepatocellular carcinoma progression through the PI3K/AKT signaling pathway[J]. European Journal of Medical Research, 2023, 28(1): 48.
- [6] ZHANX, LIH, JINJ, et al. Network pharmacology and experimental validation to explore the role and potential mechanism of Liuwei Dihuang Decoction in prostate cancer[J]. BMC complementary medicine and therapies, 2024, 24(1): 284.
- [7] WANGR, QUZ, LVY, et al. Important roles of PI3K/AKT signaling pathway and relevant inhibitors in prostate cancer progression[J]. Cancer medicine, 2024, 13(21): e70354.
- [8] TORTORELLAE, GIANTULLIS, SCIARRAA, et al. A PI3K/AKT in prostate cancer: a tale of two interconnected pathways[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(3): 2046.
- [9] PANDZICD, SUPICG, MISICD, et al. The impact of genetic variations in retinoid X receptor alpha on the risk and prognosis of HPV-negative oral carcinoma[J]. European Journal of Oral Sciences, 2025, 133(3): e70015.
- [10] CAOY, YIY, HANC, et al. NF- κ B signaling pathway in tumor microenvironment[J]. Frontiers in immunology, 2024, 15: 1476030.